

## 研究

## 当院におけるニューモシスチス肺炎迅速診断の試み

渡 智久、三浦佐知子、安田篤志、尾柏 隆、森 早苗、畑中宗博

地域支援病院北見赤十字病院 検査部

**Rapid defection of *Pneumocystis jirovecii*****要旨**

ニューモシスチス肺炎は、HIV 感染者が初期症状として発症する日和見感染症として広く知られているが、非 HIV 感染者においても膠原病などでステロイド薬や免疫抑制剤投与を受けている易感染患者にも発症し、HIV 感染者よりも進行が急激であるとされる。カリニDNAを検出する PCR 法では診断までに約 5 日間を要するため、臨床側ではより迅速で的確な検査法が求められる。当院における各種染色法での *P. jirovecii* 検出の検査成績をまとめ、その問題点について考察する。

**Watari Tomohisa et al:** ISSN 1343-2311 Nisseki Kensa40 : 48-52, 2006 (2006.12.13 受理)

**KEYWORDS**

**迅速、ニューモシスチス肺炎、BALF**

**【はじめに】**

ニューモシスチス肺炎は、*Pneumocystis jirovecii* (*carinii*)による肺炎で、主に HIV 感染者、免疫不全患者、癌の化学療法、ステロイド投与患者に発症することが知られている。本症の臨床像は急性から亜急性に乾性咳嗽、発熱、労作時の息切れなどの症状を呈し、胸部 X 線写真では両側のびまん性スリガラス状陰影が特徴的所見となる。また本感染症診断には Grocott's 染色をはじめ、ギムザ染色、Diff Quik 染色 (Wright-Gimsa 染色の簡易法)、トルイジンブルー O 染色 (以下 TBO) などの各種染色法や PCR 法が用いられており有用な方法として一般に知られている。また HIV 感染者と非 HIV 感染者では、臨床的に差異があるとされる。非 HIV 感染者は HIV 感染者に比べ、発症が急激で、気管支肺胞洗浄液 (BALF) における *P. jirovecii* 量は少なく、好中球が優位で炎症反応が強く、死亡率が高いとされている。*P. jirovecii* 量

が少ないのに対して免疫機構が保たれているため、急激に発症するものと考えられている<sup>1)</sup>。このような臨床症状から非 HIV 感染者に発症したニューモシスチス肺炎は迅速な診断と早期の適切な治療が求められる。そこで今回我々は、当院におけるニューモシスチス肺炎診断のための鏡検による迅速検査成績について報告するとともに、検査精度の向上につなげるべく考察をする。

**【対象】**

2004 年 7 月～2006 年 3 月までの 1 年 9 ヶ月の間に、当院内科において HIV 感染症や膠原病などの基礎疾患を有しステロイド、免疫抑制薬投与中に肺炎を発症し、ニューモシスチス肺炎の鑑別が必要とされた患者 7 例を対象とした。

**【検査法】**

血液・生化学検査より炎症反応を確認し、血

漿β-D-グルカン（和光純薬）の上昇、血液ガス所見、胸部X線の肺炎像などからニューモシスチス肺炎を疑い、その後、BALFを採取し各種染色を行った。BALFは前処理として3000rpm、10分間遠心し、その沈殿物に滅菌生理食塩水を適量加え検体とした。まず検体を1枚のスライドガラスに適量を塗抹し、もう1枚のスライドガラスをすり合わせる方法で塗抹標本を作成し、そのまま自然乾燥した。標本は厚くならないように配慮した。グロコット染色用には剥離防止のためシランコート処理されたスライドガラスを使用した。

TBOはあらかじめ冷蔵庫(4℃)で冷やしておいた硫酸エーテル（固定液）を使用し、標本固定の間も冷蔵庫に入れたまま行った。5分後流水で固定液を水洗し、0.15%トルイジンブルーO液で3分間染色を行った。最後にイソプロピルアルコールで脱色と脱水を行い透徹後封入した。1回目のイソプロピルアルコールはスポイトを用いて余分な染色液を洗い流すようにスライド表面にかけた。その後ドーゼに2回ほど浸した。ギムザ染色は血液検査室において実施し、ギムザ染色液を60分と通常よりも長めに染色を行った。グロコット染色は病理検査室で施行した。ギムザ染色は栄養体や嚢子の観察、TBO、Grocott's染色は嚢子の観察を目的として*P. jirovecii*の検索を行った。顕微鏡は200倍でほぼ全視野

を観察し、疑わしい所見が認められた場合は400倍、または1000倍で判定を行った。確定診断は、カリニPCRを外部検査センターへ委託し、臨床側での臨床症状や治療経過と矛盾しないものをニューモシスチス肺炎とした。

【結果】

主な検査結果を表1に示した。7例のうち症例1～5の5症例でPCR法が陽性となったが、いずれかの染色で*P. jirovecii*が観察されたのは症例1～4の4症例であった。鏡検で*P. jirovecii*は主に嚢子として確認され(図1, 2)、栄養体は症例2のHIV感染者のみであった(図3)。また、血漿β-D-Glucan値は、36.1～159.5 ng/mlの範囲で全例が高値を示した。CRP値も1.89～6.71mg/dlと全例に上昇を認めた。症例1～5はニューモシスチス肺炎に対する治療により軽快し、臨床的にも矛盾がなかったため最終的にニューモシスチス肺炎と診断された。PCR法が陰性であった2症例のうち、症例6はその後の精査、臨床経過によりニューモシスチス肺炎は否定された。症例7については、気管支肺胞洗浄の7日前よりβ-D-Glucan値が高値を示し真菌性肺炎、ニューモシスチス肺炎を考慮しempiric therapyとしてmicafungin、ペンタミジンが投与されていた。

表1 カリニ肺炎疑い7例の主な検査結果

Case No.	Underling Disease	Specimen	PCR	β-D- Glucan (ng/ml)	TBO	Grocott's	Gimsa	CRP (mg/dl)	LDH (IU/L)	CMV Ag
1	DMS	BALF	+	98.5	+	+	-	5.43	701	-
2	HIV	BALF	+	159.5	+	+	+	1.89	376	+
3	DMS	BALF	+	36.1	+	+	-	6.71	490	+
4	CRF	BALF	+	124.2	-	±	-	3.94	304	-
5	DMS	BALF	+	62.3	-	-	-	2.28	288	ND
6	RA	BALF	-	8.8	-	-	-	7.53	245	-
7	RA	BALF	-	20.2	-	-	-	15.1	446	-

DMS : dermatomyositis, CRF : chronic renal failure, HIV : human immunodeficiency virus, RA : rheumatoid arthritis, BALF : bronchoalveolar lavage fluid, CMV Ag : cytomegalovirus antigen

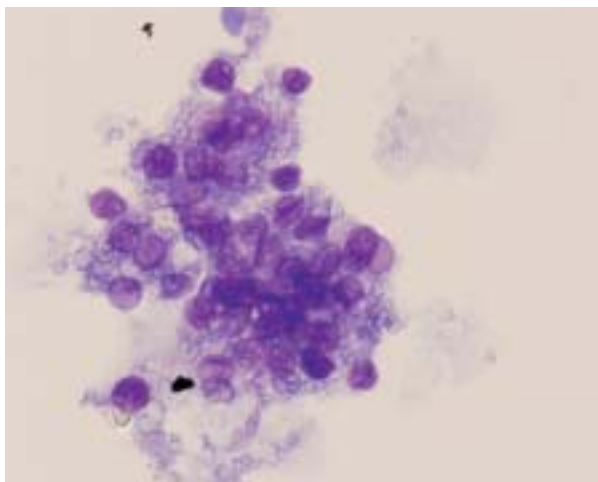


図1 トルイジンブルーO染色像 嚢子  
(×1000)

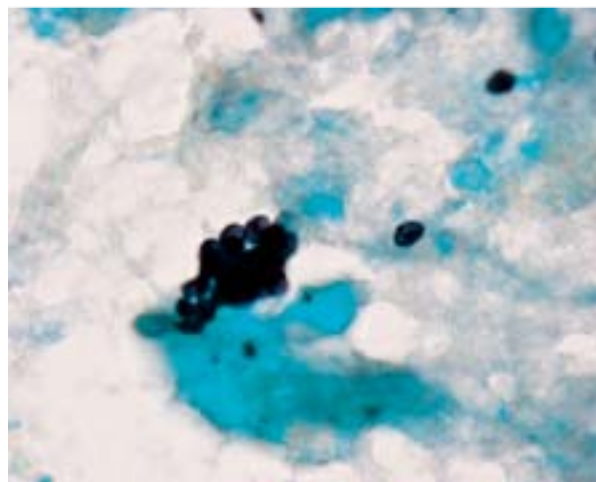


図2 Grocott's染色像 嚢子 (×1000)

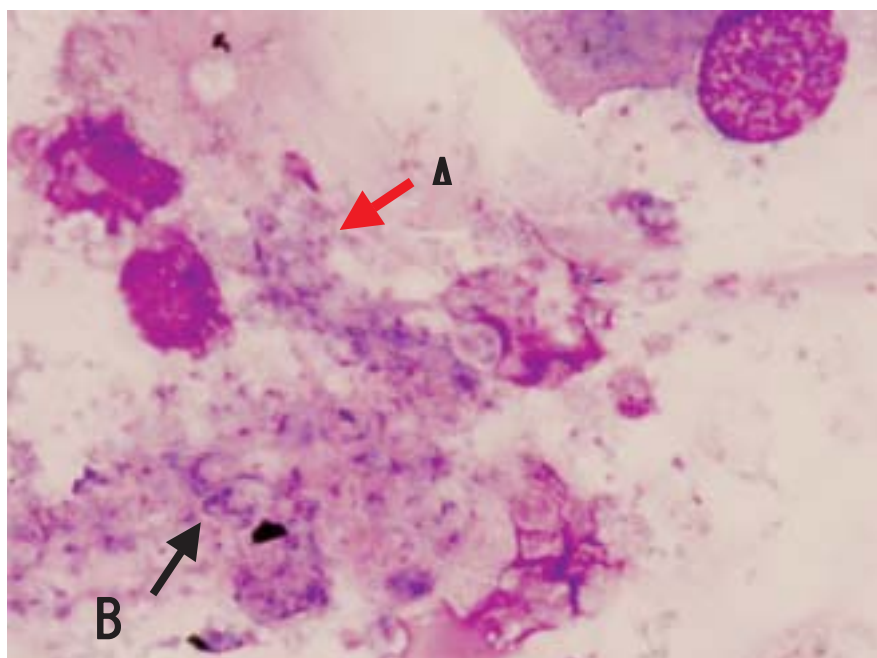


図3 Gimesa染色における栄養体(A)と  
嚢子(B) (×1000)

#### 【考察】

当院は AIDS 拠点病院である一方、膠原病外来を有しており、膠原病に対する治療を施行している入院患者も多数有する。症例2を除いて我々が経験したニューモシスチス肺炎は、発症前にステロイド薬の投与を受けていた非 HIV 感染者であった。HIV 感染者と比べ症状が急速に進行することが知られており、より確実な迅速検査が必要となる。平岡ら<sup>2)</sup>は、ニューモシスチス肺炎の確定診断には BALF の PCR 法によるカリニ DNA の検

出が有用で、従来の Grocott's 染色を用いた直接鏡検は HIV 感染者の 5 症例中 3 例で陽性であったが、非 HIV 陽性患者では 8 例中 2 例のみ陽性であり、感度の面で問題があると述べている。非 HIV 感染者のニューモシスチス肺炎においては、嚢子の集合体の検出率は 22~55%と考えられている<sup>3,4)</sup>。

今回我々の検討においても TBO、Grocott's 染色の成績はほぼ同等であり、確定診断に至った 5 症例中 3 例については嚢子を確認することができ迅速診断が可能であった。1 例につ

いては嚢子と思われる所見が Grocott's 染色で1個のみ確認されたが、この時点で臨床例に *P. jirovecii* 陽性と報告することができなかったため、結果的に PCR 法の結果を待って確定診断となった。我々も嚢子をターゲットにした染色法では感度の面で限界を感じる結果であった。栄養体の観察が可能な染色法として Gimsa 染色、メイ・グリーンワルド・ギムザ染色、Wright-Gimsa 染色、Diff Quik 染色などが知られている。当院では Gimsa 染色によってその検出を試みた。検査成績は HIV 感染者の1例のみ栄養体を確認することができたが非 HIV 感染者4例ではいずれも確認することができなかった。これは大塚ら<sup>5)</sup>の報告と大きく乖離するものであった。ニューモシスチス肺炎の確定診断が可能であった全症例(10例)において *P. jirovecii* の確認ができた Diff Quik 染色が有用であるとし、Grocott's 染色の3例で嚢子の確認ができなかったとしている。その理由について、検体中の *P. jirovecii* のほとんどが栄養体として存在するためと述べている。誘発喀痰法の診断率は60%とされるが<sup>6)</sup>、気管支鏡による検査は95%以上で菌体を証明できる<sup>7)</sup>といわれている。以上より、当院のBALF検査成績をより良好なものにするためには、栄養体の検出について再考する必要があると考えた。後

藤<sup>8)</sup>は *P. jirovecii* の栄養体は細胞と同様に形状的に壊れやすいため、また検出感度を上げるために弱回転遠心濃縮後、濁度を調整し、速やかに検体の水分を吸収しつつスライドガラスに細胞や有形成分を塗抹させる細胞収集装置で標本作製する方法(図4)を提案している。栄養体の検出において3000rpm、10分の遠心は回転数、遠心時間がともに不適切な設定であり、必要以上の負荷が *P. jirovecii* の栄養体の形状を破壊してしまっていたことが考えられた。HIV 感染患者と比較して BALF 中の *P. jirovecii* の数量が少ないとされる非 HIV 感染者例の検査成績に大きな影響を与えたと思われる。

治療が先行して行われた場合でも、2日以内に内視鏡検査を行えば診断率が下がることはないとされているが、症例7ではBALFの7日前に empiric therapy が行われていたためニューモシスチス肺炎であったとしても *P. jirovecii* の検出が困難であったと思われる。重症例のニューモシスチス肺炎では、治療が奏功して菌体が消失しても呼吸不全状態が遷延したり、逆に進行が認められたりすることがまれではなく、本感染症の治療は原則的に empiric に行うべきではなく、気管支内視鏡検査によるニューモシスチス肺炎の確定診断と、他疾患の否定が必須であるとの

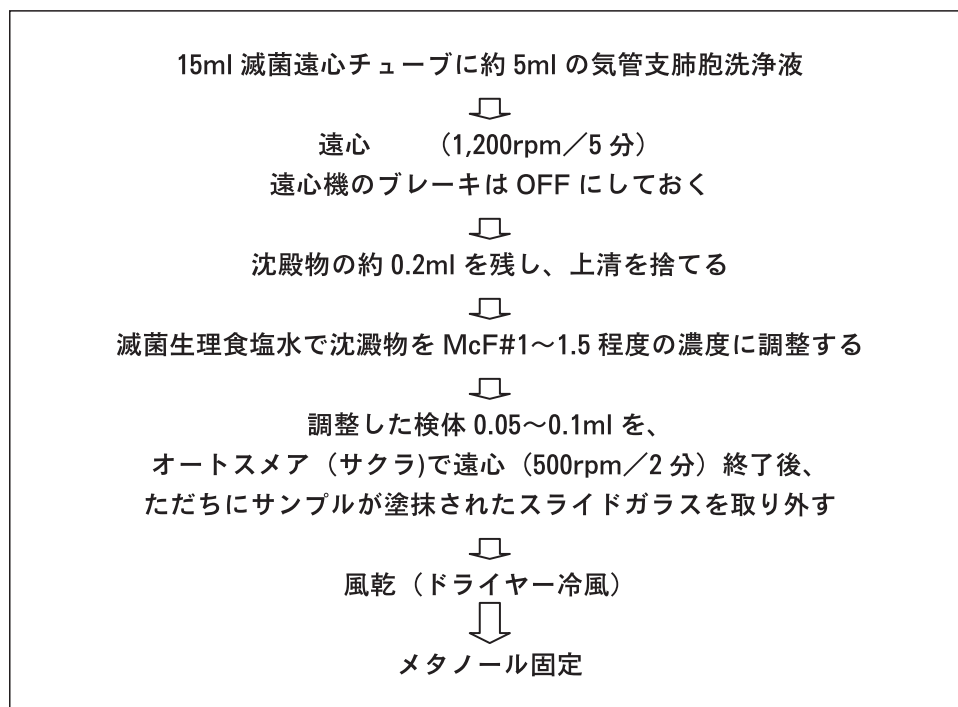


図4 BALF からの塗抹標本作製<sup>8)</sup> 一部改変

考えもある<sup>9)</sup>。一般的に、ニューモシスチス肺炎の確定診断には、カリニ DNA を検出する PCR 法が用いられているが結果報告までに数日を要する。そのため、症状が急速に進行する非 HIV 感染者においては、確定診断前に治療を開始しなければならない場合もあり顕微鏡検査の有用性が問われる。早期の適切な治療に貢献するためには、BALF での迅速鏡検による検査成績向上を目指すことはもちろん、臨床側とのコミュニケーションが必要であると考えられる。

また、ステロイド療法の副作用としての易感染状態は、ニューモシスチス肺炎のみならずサイトメガロウイルス、結核、真菌（カンジダ、アスペルギルス）などによる肺炎も考慮する必要がある。今回経験した症例の中でも、BALF でのサイトメガロウイルス抗原陽性 2 例、抗酸菌染色陽性 1 例と 5 症例中 3 例に重複感染と思われる検査所見を認めた。ニューモシスチス肺炎が疑わしい場合であっても、他の日和見病原体による重複感染を念頭においた検査法も実施することが重要であると思われた。

#### 【まとめ】

ニューモシスチス肺炎迅速検査の実施は、臨床側の要望に応えるかたちで開始したものであり、一定の評価を得ている。1年9ヶ月を経過し 2005 年度までの検査成績をまとめてみた。嚢子の検出については、5 症例中 3 例の迅速診断が可能であった。これは他の報告と比較しても同程度の成績と思われたが、栄養体の検出成績が悪く、検査手順見直しの必要性にせまられた。今後は図 4 に示した方法で標本作製をおこない、ニューモシスチス肺炎の迅速診断成績の向上を目指していきたいと考える。また、その結果についても再評価を行いたい。

#### 文献

- 1) 高橋賢, 古西満, 善本英一郎ほか: カリニ肺炎の臨床的検討 - HIV 感染症例と非 HIV 感染症例での相違. 感染症学雑誌. 75: 709-710. 2001
- 2) 平岡範也, 池田栄人, 山田亮詞ほか: カリニ肺炎の臨床的検討. 京都医学会雑誌. 51(1): 17-18. 2004
- 3) Tollerud DJ, Kim CK, Weseler TA, et al.: Use of rapid differential stain for identifying *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage fluid. Chest. 95: 493-497, 1989
- 4) Andrew HL, Kennth PO, Thomas FS, et al.: *Pneumocystis carinii* pneumonia Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. Am Rev Respir Dis. 140(5): 1204-1209. 1989
- 5) 大塚喜人, 室谷真紀子, 吉部貴子ほか: カリニ肺炎迅速診断法の確立. 社会保険医学雑誌. 43: 109-113. 2004
- 6) Zaman MK, Wooten OJ, Suprahmanya B, et al.: Rapid noninvasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* from induced liquefied sputum. Ann Intern Med. 109(1): 7-10. 1988
- 7) 掛屋弘, 宮崎義継, 河野茂: 日和見真菌症. 総合臨床. 52(6): 1961-1967. 2003
- 8) 後藤恵美子: *Pneumocystis* sp. の直接塗抹標本を用いた迅速染色法検査, 臨床と微生物, 31(増刊号): 554-558, 2004
- 9) 照屋勝治: 8. カリニ肺炎の適切な診断と治療 - 疑うヒント -. PROGRESS IN MEDICINE. 23(9): 2295-2299. 2003