

価値ある髄液検査にせまる

宿谷 賢一, 下澤 達雄

東京大学医学部附属病院 検査部：東京都文京区本郷 7-3-1 (〒113-8655)

Key Words 脳脊髄液, CSF

はじめに

2002年に日本臨床衛生検査技師会髄液検査法編集ワーキンググループ(委員長:大田喜孝)より「髄液検査法2002」¹⁾が出版され、実質上の髄液一般検査のガイドラインになっている。

本書が発刊され、すでに6年が経過し、髄液一般検査は着実に標準化に向かっている。また、日々の研鑽により、白血球の分類だけでなく白血病細胞や癌細胞などの鑑別が可能となり、髄液一般検査のレベルは向上した。しかし、未だにメランジュールの使用や細胞数の単位に 13mm^3 を用いるなど、ガイドラインの方法に準じて検査されてない施設があり、細胞鑑別などの技術的な施設間差が生じているのが現状である。

髄液一般検査は、髄膜炎・脳炎の診断のため、日常検査として24時間対応可能でなければならず、また、脳腫瘍、髄膜白血病などの検査方針や治療効果の把握のため重要な検査の一つとして位置づけられている。しかしながら、髄液一般検査の実施件数は、血液・尿検査とは比較にならないほど少数のため、各医療機関の検査室では、検査技術の精度を維持することが難しく、かつ、スタッフへの教育が問題になっている。今後は、より一層の標準化を進めるうえで、検査方法のみでなく、各個人の力量を踏まえた教育方法の確立が必要になる。

本稿では、「髄液検査法2002」¹⁾に準じて髄液検体の取り扱い、細胞の算定と分類、および化学的検査について解説するとともに、当検査部で実施している教育を目的とした事例と工夫を加えて紹介する。

髄液採取法と取り扱い

髄液の採取は、腰椎穿刺法、後頭下穿刺(大槽穿刺)、脳室穿刺(脳室ドレナージ)などがある²⁾。プラスチック(ポリプロピレン)製の滅菌スピッツ2~3本に分けて採取し、多くの細胞が含まれている最初の1本目を一般検査に用いる。検体量は再検量を踏まえて1mLあれば十分である。禁忌事項として、抗凝固剤は使用してはならない。血液が混入した場合などに、ヘパリン添加により血液凝固阻止が実施されることがあるが、ヘパリンは細胞数算定時に使用するサムソン液と反応し、多量の微細粒子が発生するので注意を要する。これはヘパリンのアミノ酸(セリン、グリシン)がサムソン液中の酢酸に反応し、凝集結晶化するためと考えられる。

髄液細胞は髄液中の蛋白量が低いため、室温保存では2時間後に細胞の約30%が変性・崩壊する。好中球が変性する速度はリンパ球に比べて速い。したがって、保存する場合は4℃が望まれ、採取から1時間以内に検査を実施する。

検査実施にあたり、検査結果の保証の一つとして、採取時間および検査開始時間を明確に記録する。肉眼的観察は重要な検査事項であり、正常の髄液は無色透明であることから、混濁や着色を確認した場合は病的変化の可能性がある。肉眼観察を加えることで、出血の有無や細胞の増多の程度を推定でき、細胞算定時に有用な所見になる。

日光微塵の観察は、髄液の入ったスピッツを光にかざしながら軽く振って細胞の微細粒子の有無を見る。血性髄液の場合は、遠心上清のキサントクロミーの有無を確認する。

サムソン液希釈後の安定性

採取した髄液細胞は極めて不安定であるため、迅速に検査を実施する以外に方法はないが、日常検査で使用するサムソン液で希釈した後は、細胞の安定性が極めて高い。

サムソン液希釈直後と24時間後(図1)、120時間後(図2)の細胞数の経時変化を以下に示す。サムソン液希釈直後と24時間後、120時間後の細胞数に大きな変化は認められない。同様に多核球・単核球などの細胞分画にも影響が認められなかった³⁾。サムソン液中の酢酸により、細胞は変性・崩壊することなく、また、細胞変性の早い好中球でさえも安定して保存されていることが示唆される。染色性は染色直後に比べると細胞は濃染傾向にあったが、鏡検に影響はなかった。

サムソン液希釈検体を保存することで、検査実施後の再検査や髄液細胞分類の技術教育などにも活用できる。

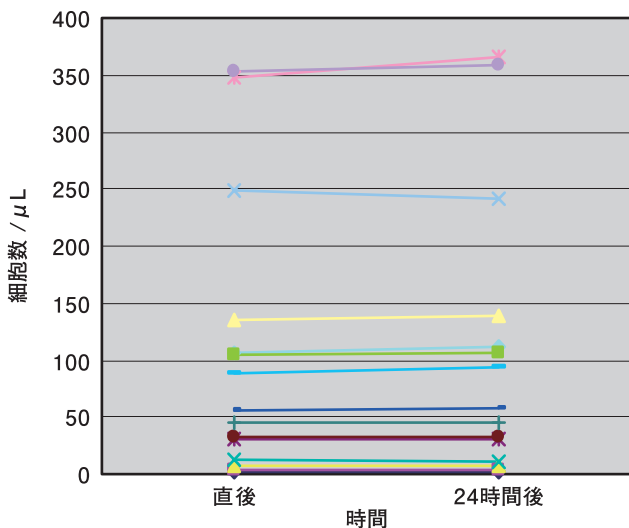


図1. サムソン液で希釈直後と24時間後の経時変化

細胞数算定

メランジュール法は、実際の希釈量以上の髄液が必要なうえ、吸い口を介して起こる感染の危険性から使用すべきではない。「髄液検査法 2002」¹⁾ではマイクロピペット法を推奨しているが、マイクロピペットの高い精度が要求され、器具の定期的な検定、統一した手技など細心の注意が必要となる。検査方法は表1, 2に示す。

細胞分類

細胞は単核球と多核球の2種類に分類する。リンパ球, 単球, 組織球を単核球としてまとめ, 好中球, 好酸球, 好塩基球を多核球としてまとめる⁴⁾。

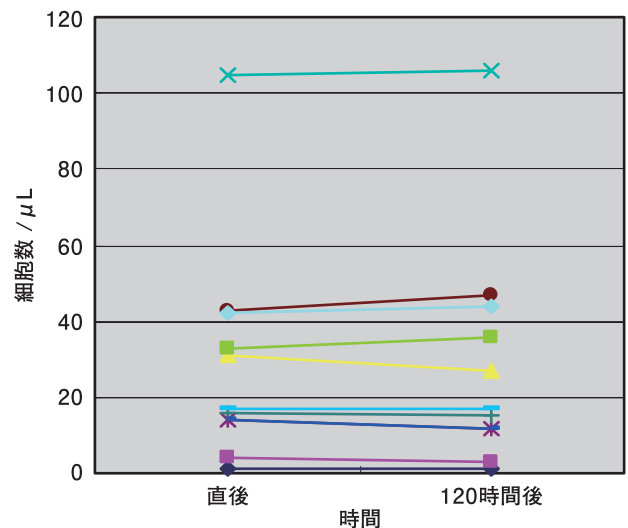


図2. サムソン液で希釈直後と120時間後の経時変化

表1. サムソン希釈方法

| | |
|---|--|
| 1 | 希釈はプラスチック(ポリプロピレン)製の試験管で行う。(補足1) |
| 2 | 希釈液にはサムソン(Samson)液を用いる。(補足2) |
| 3 | 希釈にはマイクロピペットを使用し、髄液:サムソン液=180:20 μL あるいは200:20 μL とする。 |
| 4 | 細胞数が著しく増加した髄液では、あらかじめ髄液を生理食塩水で適度に希釈する。(補足3) |
| 5 | 多数の赤血球がある場合は白血球の核の染色性の低下があり、細胞算定の障害となる。この場合、髄液とサムソン液を混合後、試験管のまましばらく放置することで赤血球の崩壊が促進されるとともに、核の染まりが良くなる。 |

補足1 プラスチック試験管は管壁への細胞付着が少ない。

補足2 市販のサムソン液でも染色性は劣化するので定期的(約2年)に更新する。

補足3 細胞数が10,000/ μL 以上になる検体では計算盤上に細胞同士が重なり算定が困難である。この場合、肉眼的に髄液の白濁が薄らぐまで生理食塩水で希釈する。例えば、 $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$ の倍々希釈法が簡便である。

表2. 細胞数算定法

| | |
|---|---|
| 1 | フックス・ローゼンタール計算盤を推奨する。 |
| 2 | 計算室の両側にニュートンリングが見えるようにカバーガラスをかけ、サムソン液で希釈した髄液を注入後、細胞が計算室の底に沈降するまで3～5分間放置する。(補足1) |
| 3 | 鏡検倍率は200倍(対物レンズ20倍×接眼レンズ10倍)を使用するのが良い。(補足2) |
| 4 | 白血球のみを算定の対象とする。 |
| 5 | 結果値は整数とし、単位は細胞数表示の国際標準単位である/μLを用いる。(補足3) |
| 6 | 最小値は1とし、算定した数値が1に満たない場合は1/μL以下と表現する。 |
| 7 | 細胞分類は単核球と多核球の2種類に分類する。 |

補足1 現在ではカバーガラスが装着済みのディスプレイタイプが販売されている。

補足2 200倍では1視野にフックス・ローゼンタール計算盤の最小区画が4区画入り、効率良く細胞算定と分類を同時に行うことができる。

補足3 単位には/3mm³を用いない。

1. 単核球

1) リンパ球(図3)

大きさは白血球の中で一番小さく、核はほぼ円形で、細胞質は狭く核周囲にリング状に見られる。リンパ球の増加はウイルス感染症ならびに慢性炎症を示す。

2) 単球(図4)

リンパ球の1.5～2倍の大きさで、偏在する核は類円形で切れ込みを持つものが多い。サムソン液によく染まる細胞質を有する。単球は髄膜の炎症や頭蓋内出血など、髄膜へのある種の刺激に対し反応性に出現する。

3) 組織球(図5)

髄液に出現する白血球の中で最も大型で、核は一般に小さく、N/C比は低い。単球と同一起源の細胞であり、その出現機序や細胞形態も単球に似る。細胞質は泡沫状で淡い桃色を呈し、変性空胞を認めることもある。小型の核は偏在し、時に多核のタイプも認める。くも膜下出血や脳室内出血などでは、組織球の細胞質内に赤血球片、ヘマトイジン結晶やヘモジデリン顆粒の貪食を認めることも多い。これは髄液腔内出血を反映する有用な所見である⁵⁾。

2. 多核球

1) 好中球(図6)

細胞質はサムソン液に染まらず、偽足を持ったような不整形を示すものが多い。分葉した核は、時には重なり合い単核状に見える場合があるが、細胞質の形状と染色性に留意すればリンパ球や単球との鑑別は容易に行える。好中球の増加は細菌感染症ならびに急性炎症を示す。

2) 好酸球(図7)

好中球と比較して、細胞質はより円形のものが

多く、注意深く観察すると細胞質内が輝くような淡いオレンジ色を呈し、典型的なものはメガネ状の二核を確認できることがある。しかし、計算盤上では積極的な分類は避け、ギムザ系染色を施し確認する。好酸球は寄生虫性髄膜炎やアレルギー反応で著明に増加することがある。

3) 好塩基球

サムソン染色の認識はできないので計算盤上では好中球、好酸球とともに多核球として分類する。

3. その他の成分(図8～10)

髄液検査で確認できる腫瘍細胞には原発性腫瘍と転移性腫瘍がある。形態の特徴としては、上皮系の腫瘍細胞(図8)は、一般的に大きく細胞質に厚みがあり明瞭な辺縁構造で、核のN/C比が大きい。血球系の腫瘍細胞(図9)は、正常リンパ球より大きく、核形の不整、核小体の肥大が見られる。

髄液採取時に医原的に混入する細胞には、腰椎穿刺髄液では皮膚扁平上皮細胞、椎体軟骨細胞、骨髄細胞などがあり、脳室ドレナージ髄液では大脳組織細胞、脳室脈絡叢細胞、組織球、ヘマトイジン結晶(図10)などが挙げられる。

なお、計算盤上に白血球以外の細胞を認めた場合、それが病的意義を有するものであれば診断や治療に重要な指針となる。したがって、細胞数の算定、分類とは別に付加価値としての積極的な臨床側への情報提供が望まれるが、計算盤のみによる詳細な判断は避け、病的異型細胞に関しては「異型細胞疑い」としてのみ報告し、後にギムザ系染色による細胞塗抹標本で確認する必要がある。



図3. リンパ球 (×400倍, サムソン液)

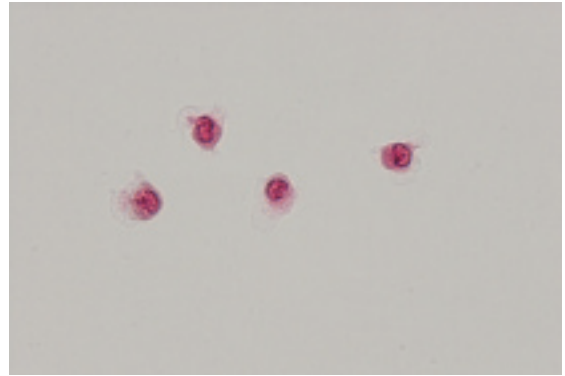


図4. 単球 (×400倍, サムソン液)

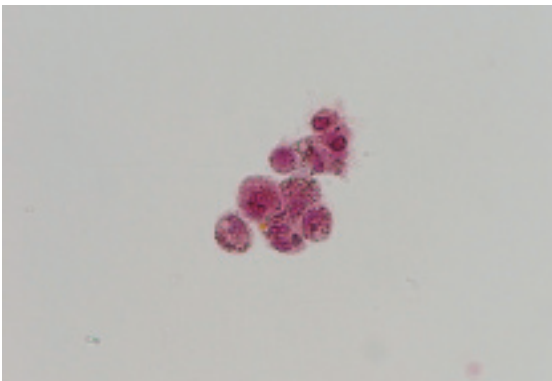


図5. 組織球 (×400倍, サムソン液)

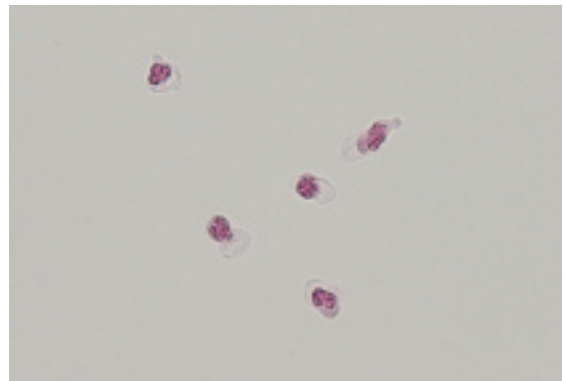


図6. 好中球 (×400倍, サムソン液)

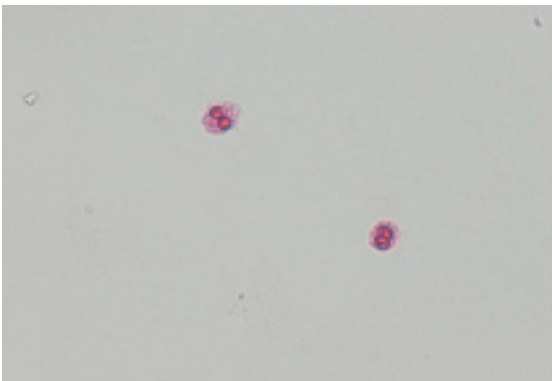


図7. 好酸球 (×400倍, サムソン液)

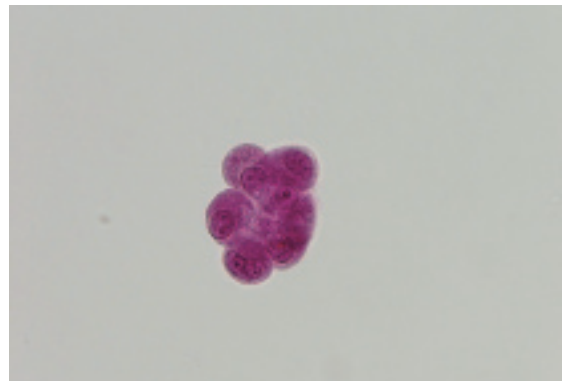


図8. 腺癌細胞 (×400倍, サムソン液)

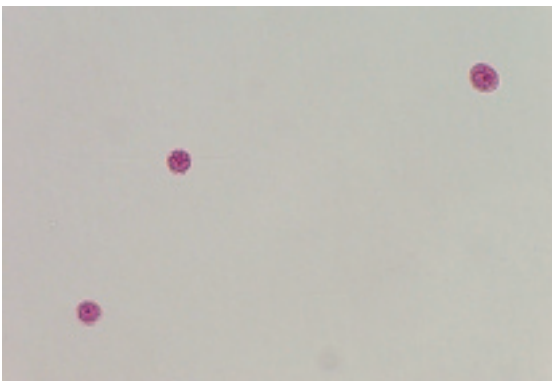


図9. 白血病細胞 (×400倍, サムソン液)

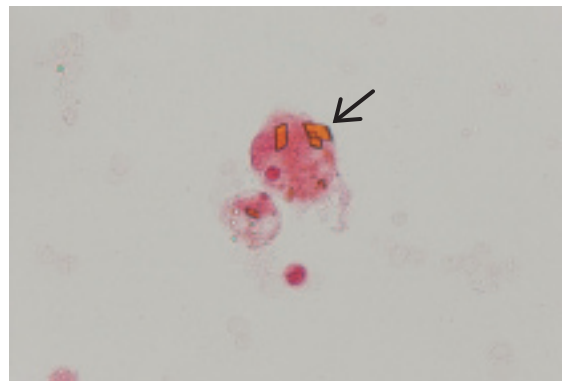


図10. ヘマトイジン結晶 (×400倍, サムソン液)

細胞分類の工夫と教育方法

計算盤での腫瘍細胞分類では、鑑別困難な場合もあり、ギムザ系染色による細胞塗抹標本では、細胞崩壊などの諸問題がある。当検査部では、細胞数算定後のサムソン希釈検体を使用し、計算盤上では鑑別困難な成分の鑑別に、表3に示す方法も導入している³⁾。髄液検査で用いる計算盤上で分画を行う場合と比較すると、細胞像が明瞭となり観察が容易となった(図11, 12)。また、細胞数が少ない症例では、遠心操作により細胞の回収率が上がり分画の精度が向上した。

計算盤上の細胞鑑別には熟練を要するため、未経験者への教育に時間を要するなどの諸問題がある。当検査部では、本法による鏡検方法により教育訓練期間が短縮した。

化学的検査法

髄液一般検査で実施される化学検査項目の中で、蛋白、糖、LD、CKの測定については臨床的意義を有している⁶⁾。一方、古典的な化学検査であるグロブリン反応のノンネ・アペルト(Nonne-Apelt)反応、パンディー(Pandy)反応は、今日の臨床検査の現場で正確に測定できる項目としては疑問が持たれているので、各施設において実施にあたり再検討が望まれる。

1. 蛋白

髄液蛋白は、血漿蛋白に由来し、その濃度は血漿蛋白の0.2～0.6%であり、蛋白量(腰椎穿刺髄液の)は健常成人で15～45mg/dLである。50mg/dL以上であれば中枢神経疾患により血液脳関門が破壊され、多くの蛋白が血中より髄液に移行したものと考えられる。特に細菌性髄膜炎、結核性髄膜炎、真菌性髄膜炎の憎悪期、ギラン・バレー(Guillain-Barre)症候群などで高値を示す。

2. 糖

髄液糖は、大部分がグルコースであるため、血糖値と合わせて評価する。一般的に血糖値の60～80%に維持されており、血糖値が正常であれば髄液糖は50～80mg/dLを示す。髄液糖が低下を示す場合は、髄液腔で増加した病原微生物や好中球による嫌気性解糖作用、血液脳関門の破壊による糖移送能障害が原因とされ、代表的な疾患として細菌性髄膜炎、結核性髄膜炎、真菌性髄膜炎、悪性腫瘍の髄膜浸潤などが挙げられる。

3. LD

髄液中のLDは、白血球数の増加により白血球由来LDが上昇することから細菌性髄膜炎で優位に上昇し、臨床的に意義のある髄液マーカーとされている。測定値の詳細な評価にはLDアイソザイム検査

表3. サムソン希釈検体による遠心鏡検法

| | |
|---|--|
| 1 | 細胞数算定後のサムソン希釈検体を使用する。 |
| 2 | 800回転で5分間遠心し、その後上清を除去する。 |
| 3 | 尿沈渣用スライドガラス・カバーガラスを用いて残渣をスライドに滴下し鏡検する。 |



図11. 計算盤の方法(×400倍, サムソン液)

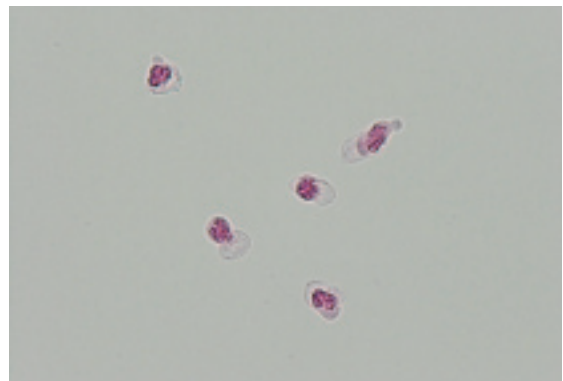


図12. 尿沈渣の方法(×400倍, サムソン液)

が必要であり、分画パターンにより細菌性髄膜炎 (LD4, LD5 上昇), ウイルス性髄膜炎 (LD2, LD3 上昇) の鑑別が可能になる。

4. CK

髄液中の CK は脳由来の CK-BB タイプであり、上昇する疾患には脳挫傷、髄膜脳炎、脳腫瘍、脳血管障害、多発性硬化症などが挙げられ、その上昇は脳組織の荒廃に由来すると考えられる。

内部精度管理における標準作業手順書

検査データの質を高めるには日々の精度管理が重要になり、各施設内で標準作業手順書 (Standard Operation Procedure ; SOP) の整備や、SOP に基づく実地教育訓練が必要になる⁷⁾。また、ISO15189 臨床検査室認定では、形態検査の技術レベルの管理も重要視されており、個人の力量の評価、内部精度管理など形態検査の技術教育の確立は重要である⁸⁾。

まとめ

近年、髄液一般検査の細胞数算定、細胞鑑別の自動分析機が販売され高い評価を受けているが、多くの医療機関では、髄液一般検査は用手法で行われている現状である。髄液一般検査は中枢神経系の病態を迅速に把握できる重要な検査法であり、臨床からは質の高い

検査データの提供が求められている。従って、検査技術の精度を維持することが必須であり、各施設において検査技術の精度管理に努めなければならない。

参考文献

- 1) (社) 日本臨床衛生検査技師会髄液検査法編集ワーキンググループ 編. 髄液検査法2002. 東京: (社) 日本臨床衛生検査技師会; 2002. 107p.
- 2) 石山雅大. 髄液検査の採取と検査の進め方. *Medical Technology*. 2003 ; 31 (5) : 472-475.
- 3) 田中雅美, 宿谷賢一, 下澤達雄. 矢富 裕 他 編. 髄液細胞の保存. *臨床病理レビュー特集号: 臨床検査 Yearbook2008*. 2008 ; 140 : 187-189.
- 4) 大田喜孝. 矢富 裕 他 編. 標準化のための髄液一般検査. *臨床病理レビュー特集号: 臨床検査 Yearbook2008*. 2008 ; 140 : 65-71.
- 5) 田中雅美, 宿谷賢一, 下澤達雄. 頭蓋内出血を示唆するヘマトイジン結晶. *医学検査*. 2008 ; 57 (7) : 979-981.
- 6) 奈良 豊. 髄液の生化学検査. *Medical Technology*. 2003 ; 31 (5) : 476-483.
- 7) 大田喜孝, 長山大輔, 伊藤園江. 髄液細胞検査の精度管理. *検査と技術*. 2008 ; 36 (8) : 742-747.
- 8) 北川 隆. 矢富 裕 他 編. 形態検査における ISO15189 の必要性. *臨床病理レビュー特集号: 臨床検査 Yearbook2008*. 2008 ; 140 : 226-229.

Realities of Valuable Cerebrospinal Fluid Examination

Kenichi SHUKUYA and Tatsuo SHIMOSAWA

Clinical Laboratory, The University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655

Key Words Cerebrospinal Fluid, CSF