

Pneumocystis carinii および *Pneumocystis carinii* 肺炎の研究

V. 喀痰集シスト法による診断

吉田幸雄 猪飼剛 荻野賢二
竹内滋 山田稔 嶋田義治
塩田恒三

京都府立医科大学医動物学教室

(昭和53年7月14日 受領)

Pneumocystis carinii 肺炎 (以下 Pc 肺炎と略) は、生体の免疫機能低下時に発症しやすい肺炎であり、放置すればほぼ100%の致死率をもつ重症な疾患である。従来 pentamidine isethionate や pyrimethamine と sulfa 剤との合剤がその治療薬として使用されてきたが、最近 Hughes *et al.* (1975) が trimethoprim と sulfamethoxazole の有効性について報告した。我々も既報 (吉田ら, 1977) したように動物実験でその有効性を確認するとともに、臨床面においても4例の有効例を経験した。この薬剤は1976年から我が国でも販売されるようになり、今後 Pc 肺炎の治療および予防薬として大いに期待されている。一方、Pc 肺炎の診断には尚困難な場合が多く、確定診断のつかないまま投薬される例も少なくない。これは、現在 Pc を検出するためには肺生検や肺吸引のような高いリスクを伴う方法に頼らざるを得ないためである。そこで、我々は、この欠点を補うために、大量の喀痰または、気道分泌物を採取し、これを mucolytic enzyme を用いて処理し、効率よくシストを集める方法を検討し、良好な成績を得たのでここに報告する。

材料ならびに方法

今回の実験に用いた材料は、まず Pc 肺炎で死亡した患者の肺と Pc 肺炎の患者の喀痰ないしは気道分泌物とである。すなわち剖検肺から取り出した Pc が、今回考案された集シスト法によって損傷を受けないかどうかの

検討に用いられ、ついで、当大学附属病院に入院中の本症患者の喀痰について実際に検討した。一方、宿主の気管と気管支の腔内に実際に Pc が存在するかどうかをたしかめるための動物実験を行った。すなわちラットに酢酸コーチゾンを週2回、各回25mg 宛連続注射して実験的に Pc を肺内で増殖させ、気管および気管支を摘出し、Pc の有無、濃度を調べ、他の肺組織内のそれと比較した。

成績

A 喀痰または気道分泌物の集シスト法

先ず初めに我々が得た最良と思われる術式を述べ、ついで種々の操作条件の比較検討結果を述べることにする。

Pc 肺炎は喀痰の排出の少ないのが特徴の1つであり、喀痰の採取自体に問題があるが、我々は患者の枕元に容器を置き、努めて喀痰を喀出するよう指示し、喀痰が少ない場合は24時間、あるいは、48時間間の全喀痰を材料とした。

I. 術式

1) 喀痰容器には予め amphotericin B の1.2 μ g/ml 溶液を入れておき、真菌などの増殖を防ぐ。

2) acetyl-l-cysteine を2w/v%の割合に0.2N NaOH に溶解した溶液を喀痰の約10倍量これに加え、ガラス棒でよく混和する。数分の混和で喀痰や分泌物の粘性がとれる。操作は室温で行う。

3) ガーゼ1枚で濾過し、3,000rpm で5分間遠沈する。

4) 上清を捨て、沈渣に生理食塩水を加え、ガラス棒

本研究は文部省科学研究一般研究 (課題番号244032号) の補助を受けて行われた。記して謝意を表す。

京都府立医科大学医動物学教室業績第420号。

で混和しながら洗浄する。

5) 3,000rpm で5分間遠沈する。

6) 4), 5)をもう一度繰り返す。この2回の洗浄で液はほぼ中性となる。

7) 上清を捨て、沈渣をピペットでよく混和した後、図1のようにスライドガラスに塗布する。

8) 風乾後、toluidine blue-O 染色(以下 TBO 染色と略)を行い鏡検する。

II. acetyl-l-cysteine 加 NaOH 溶液のシストにおよぼす影響についての検討

1) 材料および方法

Pc 肺炎で死亡した症例の肺を用いた。肺 1g ずつを9本の遠沈管に取り、ハサミで細断し、各々に生理食塩水 10ml を加え、ガラス棒でよく混和する。ついでガーゼ1枚で濾過し、濾液の0.01ml をスライドガラスに3ヶ所とり、それぞれのシスト数を定量した。定量法は、既報(猪飼ら, 1977)の集シスト法に準じた。定量後、3,000rpm で5分間遠沈し、上清を捨て、3本を1群として3群に分け、それぞれの群の沈渣に 2 w/v % acetyl-l-cysteine 加 0.2N NaOH 溶液, 2 w/v % acetyl-l-cysteine 加 0.5N NaOH 溶液, 2 w/v % acetyl-l-cysteine 加 1N NaOH 溶液を10ml ずつ加え、ガラス棒でよく混和した。溶液を加えた後、各群の1本ずつを、15分後、30分後、60分後に3,000rpm で5分間遠沈し、上清を捨て、沈渣を生理食塩水で2回洗浄した後、再び生理食塩水を10ml 加えガラス棒で混和し、シスト数を定量した。

Table 1 Influence of mucolytic treatment with 2 w/v % acetyl-l-cysteine and 0.2 N NaOH to *P. carinii* cysts

Number of cysts* before treatment	Minutes for treatment	Number of cysts after treatment
2,157,700	15	2,070,300
2,010,900	30	2,531,600
1,969,800	60	1,751,100

* Cysts in 1g of patient's lung died by *P. carinii* pneumonia.

2) 成績

Table 1 に示す如く、2 w/v % acetyl-l-cysteine 加 0.2N NaOH 溶液では、60分処理後でもシスト数に大きな変化はなく、かつ Fig. 2 に示すように TBO 染色での染色性や形態的な変化は認められなかった。しかし 1N NaOH 溶液では、15分後ですでに Fig. 3 に示す如く、TBO 染色で著明なシストの変形を認めた。0.5N

NaOH 溶液では、若干のシストの変形とシスト数の減少を認めた。acetyl-l-cysteine 加 NaOH 溶液で喀痰を消化する方法は、すでに Kubica *et al.* (1963) が喀痰より結核菌を抽出する方法として報告した。彼らは、その中で最も効率のよい消化を得るための acetyl-l-cysteine と NaOH 溶液の濃度について検討し、2 w/v % acetyl-l-cysteine 加 0.5N NaOH 溶液を用いた。今回我々は彼らの報告を参考とし、さらに種々の検討の結果より、mucolytic 作用が強く、シストの変形や染色性の変化がない濃度として、0.2N NaOH 溶液が適当であると結論した。

III. *In vitro* における抗真菌剤のシストへおよぼす影響についての検討

1) 材料および方法

酢酸コーチゾン 25mg を週2回皮下注射し、実験的に Pc を肺内で増殖させた Wistar 系ラットの肺を用いた。方法はラット肺各 1g ずつを4本の遠沈管に取り、ハサミで細断した後、生理食塩水を 5ml ずつ加えガラス棒で混和した。ガーゼ1枚で濾過し、濾液中のシスト数を定量した。そして、それぞれの遠沈管に amphotericin B 1.2 μ g/ml, 12 μ g/ml, nystatin 25units/ml および 250units/ml の濃度になるように加えた。抗真菌剤を加えた後、1時間、4時間、6時間、24時間でのシスト数を定量した。

2) 成績

Table 2 に示す如く、amphotericin B 1.2 μ g/ml の濃度では、24時間後でもシスト数の変化はほとんど認められなかった。しかし、amphotericin B 12 μ g/ml および nystatin 25units/ml では、24時間後に、若干のシスト数の減少を認めた。さらに nystatin 250units/ml では、1時間後に既に相当のシスト数の減少を認めた。amphotericin B 1.2 μ g/ml の濃度は、ほぼ常在の真菌の発育を抑制することから、喀痰をはじめとする気道分泌物の採取時に、あらかじめ採取瓶へこの濃度の amphotericin B を加えておくことが、真菌の混入ならびに発育を少くして Pc を検出しやすくするために良いと結論した。

B ラットの気管および気管支におけるシストの検出

1) 材料および方法

酢酸コーチゾン 25mg を週2回皮下注射し、4週から10週の間に死亡した Wistar 系ラット 46匹について検討した。死亡したラットを開胸し、肺および気管・気管支を摘出した。肺は集シスト法(猪飼ら, 1977)で処理

Table 2 Influence of antifungal drugs, amphotericin B and nystatin, to *P. carinii* cysts

Hours for treatment	Number of cysts* after treatment with			
	Amphotericin B		Nystatin	
	1.2 $\mu\text{g/ml}$	12 $\mu\text{g/ml}$	25 units/ml	250 units/ml
before treatment	1,972,800	2,093,600	1,882,600	1,455,400
1	1,812,200	2,065,900	1,593,900	677,200
4	2,107,700	2,113,200	1,845,100	653,500
6	2,008,300	1,833,200	1,757,200	519,400
24	1,909,300	1,627,900	1,693,900	701,500

* Cysts in 1g of the lungs of rats treated with cortisone acetate.

Table 3 Relation of number of cysts in the lungs and presence of cysts in trachea and bronchus among 46 rats

Number of cysts in 1g of the lungs	Number of cases without cysts in trachea and bronchus	Number of cases with cysts in trachea and bronchus
10^5-10^6	2	0
$10^6-5 \times 10^6$	5	3
$5 \times 10^6-10 \times 10^6$	0	8
more than 10×10^6	0	28

し、1g 当りのシスト数を定量した。気管および気管支は、homogenizer 用遠沈管に取り、ハサミで細断した後、homogenizer (日本精機 HB II型) 18,000rpm で2分間磨砕した。ついでガーゼ1枚で濾過し、濾液を3,000rpm で5分間遠沈し、上清を捨て、沈渣をピペットでよく混和した後、スライドグラスに塗布し、風乾後TBO染色を行い鏡検した。

2) 成績

Table 3に示す如く、46匹中39匹(84.8%)に気道よりシストを検出した。この気道内シスト数と肺組織の中のシスト数との関係を見ると、肺1g中のシストが100万個以下の場合、2匹とも気道内は陰性、100万個から500万個では8匹中3匹(37.5%)が陽性であり、500万個以上になると、36匹中すべてが陽性であった。すなわち、肺胞内にシスト数が増大してくると、気管や気管支腔内にも高率にシストが見出され、従つてこれが喀痰や気道分泌物中に出現するのは充分考えられることである。

C 臨床的応用2症例について

症例1、久○理○、63歳、男子

昭和51年12月9日ホジキン氏病で京都府立医大第2内科に入院し、Vincristine, Endoxan, 6-Mercaptopurine,

Prednine (VEMP療法)等の化学療法を受けたが余り効果を認めなかつた。昭和52年3月12日呼吸困難が出現し、胸部レントゲン写真でFig. 4に示すような網状陰影を認めた。Pc肺炎の疑いで喀痰の集シスト法を行い、3月14日の喀痰からFig. 5に示すような多数のシストを検出し診断を確定した。その後直ちにtrimethoprime 800mg/日とsulfamethoxazole 4g/日の投与を行つたが症状は改善せず、基礎疾患が悪化して4月2日死亡した。この症例は剖検が行えず、肺でのPcの検索は行えなかつた。

症例2、角○光○、60歳、男子

昭和52年1月27日、左上葉の肺未分化癌で京都府立医大第2内科に入院し、コバルト照射およびPrednine投与をうけ、腫瘍陰影は縮小したが、4月12日左上葉に膿瘍が出現した。これはセファゾリン、アンピシリン、スルベニシリン等の抗生剤で改善したが、4月30日より咳嗽を訴え、胸部レントゲン写真でFig. 6に示すような網状陰影が出現した。Pc肺炎の疑いで喀痰の集シストを行つたところ、5月2日の喀痰中にFig. 7に示すようなシストを検出した。しかし診断時の患者の一般状態は既に極めて悪く、治療を施さずともまもなく、同日呼吸不全のため死亡した。死後、直ちに肺吸引を行い、TBO

染色と Giemsa 染色を行って検索したところ共に多数の Pc を確認した (Fig. 8, 9).

考 察

生前に患者の肺から Pc を検出して診断する方法はいくつかあるが、まず White *et al.* (1961), Marshall *et al.* (1964), Dominy and Lucas (1965), Robbins *et al.* (1965), Lillehei *et al.* (1968), Desai *et al.* (1971), Kirby *et al.* (1971), Gentry *et al.* (1972), Rosen *et al.* (1975) 等の開胸的肺生検, Lillehei *et al.* (1968), Einzig *et al.* (1969), Jacobs *et al.* (1969), DeVita *et al.* (1969), Cohen and Weiss (1971), Kirby *et al.* (1971), Gentry *et al.* (1972), 等の閉鎖的肺生検, Repsher *et al.* (1972), Hodgkin *et al.* (1973) 等の経気管支的肺生検, Becroft and Costello (1965), Johnson and Johnson (1970), Hughes *et al.* (1973), 石黒ら (1975), Giebink *et al.* (1976), Chaudhary *et al.* (1977) 等の経皮的肺吸引等が報告されている。我々も今迄に開胸的肺生検 1 例, 経皮的肺吸引 5 例を経験している。これらは, Pc の検出率では優れているが, 出血や気胸といった合併症が多く, 患者の状態によつて施行出来ない場合も多い。一方, 気道分泌物からの Pc の検出の報告は, Vinh (1960, 1963), Erchul *et al.* (1962), Robillard *et al.* (1965), Rifkind *et al.* (1966), Catar (1968), Gentry *et al.* (1972), 田村ら (1975) 等があり, 主として気道吸引物を直接塗抹染色して見出している。一方 Fortuny *et al.* (1970), Minielly *et al.* (1970), Mojon (1971), 古山ら (1976) 等は喀痰から検出し, さらに Chan *et al.* (1977) は胃液から検出したと報告した。しかし, これらの方法は単に喀痰や気道分泌物をスライドガラスに塗抹したもので, 大量の材料からシストを集めたものでなく, 従つて検出率が低く, Pc 肺炎の診断法として推奨されなかつた。今回我々が行った acetyl-l-cysteine と NaOH 溶液による集シスト法は, もともと Kubica *et al.* (1963) が結核菌を喀痰から抽出する方法として最初に報告したものである。Kim *et al.* (1972) は本法をラット肺から Pc シストを抽出するために用いているが, その際 NaOH を加えていない。今回我々が報告した方法は, 大量の材料を簡便に, かつ迅速に処理でき, TBO 染色でその染色性や形態的变化もなく, かつ鏡検も容易である。TBO 染色で Pc のシストと鑑別上問題となる真菌類も, 採取する材料に amphotericin B を 1.2

$\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えたり, あらかじめ amphotericin B を加えた水で口腔内を洗浄させたりすることにより, かなり減少させることができる。また, 従来, シストは気道にあまり出現しないとされていたが, 今回ラットを用いた実験で, 肺におけるシスト数の増加に平行して, かなりのシストが気道に出現することが判明した。このことは, 喀痰や気道分泌物の検索が, Pc 肺炎の診断に有力な手段であることを示すだけでなく, Pc の空気感染説をも裏付けるものと考えられる。

結 語

Pc 肺炎の診断を確定するために, 従来, 肺生検や, 肺吸引によつて Pc を検出していたが, これらの方法は常に危険が伴い, 重症の患者には用いることができない。そこで患者の喀痰あるいは気道分泌物を出来るだけ大量に採取して, この中から Pc のシストを集めることができれば, 患者への侵襲はなく極めて有益である。我々は種々の検討の結果, 2 w/v % acetyl-l-cysteine 加 0.2N NaOH 溶液で喀痰などを処理することにより, 能率よくシストを集め得ることを示し, この方法で診断した 2 症例を呈示した。また動物実験で気管および気管支内かなりのシストが存在することを示し, 喀痰や気道分泌物中にシストが存在することの裏付けを行った。

文 献

- 1) Becroft, D. M. O. and Costello, J. M. (1965) : *Pneumocystis carinii* pneumonia in siblings : Diagnosis by lung aspiration. N. Z. Med. J., 64, 273-280.
- 2) Catar, G. (1968) : Some observations on *Pneumocystis carinii* and pneumocystic pneumonia. 8th Intn. Cong. Trop. Med. Mal., Teheran, 925 (abtr.).
- 3) Chan, H., Pifer, L., Hughes, W. T., Feldman, S., Pearson, T. A. and Woods, D. (1977) : Comparison of gastric contents to pulmonary aspirates for the cytologic diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. J. Pediat., 90, 243-244.
- 4) Chaudhary, S., Hughes, W. T., Feldman, S., Sanyal S. K., Coburn, T., Ossi, M. and Cox, F. (1977) : Percutaneous transthoracic needle aspiration of the lung. Amer. J. Dis. Child., 131, 902-907.
- 5) Cohen, M. L. and Weiss, E. B. (1971) : *Pneumocystis carinii* pneumonia : Percutaneous lung biopsy and review of literature. Chest, 60, 195-199.

- 6) Desai, A. B., Shah, R. C. and Sehgal, K. N. (1971) : *Pneumocystis carinii* pneumonia. Ind. Pediat., 8, 129-131.
- 7) DeVita, V. T., Emmer, M., Levine, A., Jacobs, B. and Berard, C. (1969) : *Pneumocystis carinii* pneumonia. Successful diagnosis and treatment of two patients with associated malignancy processes. New Eng. J. Med., 280, 287-291.
- 8) Dominy, D. E. and Lucas, R. N. (1965) : *Pneumocystis carinii* infection diagnosed by antemortem lung biopsy. Ann. Thorac. Surg., 1, 305-310.
- 9) Einzig, S., Hong, R. and Sharp, H. L. (1969) : Successful treatment of *Pneumocystis carinii* in an immunologically deficient acute lymphatic leukemia patient. Cancer, 23, 658-662.
- 10) Erchul, J. W., Williams, L. P. and Meighan, P. P. (1962) : *Pneumocystis carinii* in hypopharyngeal material. New Eng. J. Med., 267, 926-927.
- 11) Fortuny, I. E., Tempero, K. F. and Amsden, T. W. (1970) : *Pneumocystis carinii* pneumonia diagnosed from sputum and successfully treated with pentamidine isethionate. Cancer, 26, 911-913.
- 12) 古山正之・岡田昌彦・中津川孝道(1976) : 急性骨髄性白血病治療中に発症した *Pneumocystis carinii* 肺炎の一治験例. 日血会誌, 39, 106-107.
- 13) Gentry, L. O., Ruskin, J. and Remington, J. S. (1972) : *Pneumocystis carinii* pneumonia. Problems in diagnosis and therapy in 24 cases. Calif. Med., 116, 6-14.
- 14) Giebink, G. S., Sholler, L., Keenan, T. P., Franciosi, R. A. and Ouie, P. G. (1976) : *Pneumocystis carinii* pneumonia in two Vietnamese refugee infants. Pediat., 58, 115-118.
- 15) Hodgkin, J. E., Andersen, H. A. and Rosenow, E. C. III. (1973) : Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by transbronchoscopic lung biopsy. Chest, 64, 551-554.
- 16) Hughes, W. T., Price, R. A., Kim, H. K., Coburn, T. P., Grigsby, D. and Feldman, S. (1973) : *Pneumocystis carinii* pneumonitis in children with malignancies. J. Pediat., 82, 404-415.
- 17) Hughes, W. T., Feldman, S. and Sanyal, S. K. (1975) : Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis with trimethoprim-sulfamethoxazole. C.M.A.J., 112, 47s-50s.
- 18) 猪飼 剛・吉田幸雄・荻野賢二・竹内 滋・山田 稔(1977) : *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis carinii* 肺炎の研究, II. 集シスト法. 寄生虫誌, 26, 314-322.
- 19) 石黒和正・小泉晶一・山本 昭・加藤貞人・平谷美智夫・川島ひろ子・竹谷徳雄・森尻悠一郎・佐藤 保・谷口 昂・北川正信・中沼安二・太田五六(1975) : 小児悪性腫瘍に合併した *Pneumocystis carinii* 肺炎の4症例——肺生検による早期診断と治療——. 小児科臨床, 28, 451-457.
- 20) Jacobs, J. B., Vogel, C., Powell, R. D. and DeVita, V. T. (1969) : Needle biopsy in *Pneumocystis carinii* pneumonia. Radiol., 93, 525-530.
- 21) Johnson, H. D. and Johnson, W. W. (1970) : *Pneumocystis carinii* pneumonia in children with cancer. Diagnosis and treatment. J.A.M.A., 214, 1067-1073.
- 22) Kim, H. K., Hughes, W. T. and Feldman S. (1972) : Studies of morphology and immunofluorescence of *Pneumocystis carinii*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 141, 304-309.
- 23) Kirby, H. B., Kenamore, B. and Guckian, J. C. (1971) : *Pneumocystis carinii* pneumonia treated with pyrimethamine and sulfadiazine. Ann. Intern. Med., 75, 505-509.
- 24) Kubica, G. P., Dye, W. E., Cohn, M. L. and Middlebrook, G. (1963) : Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. Amer. Resp. Dis., 87, 775-779.
- 25) Lillehei, J. P., Funke, J. L., Drage, C. W., Sharp, H. L. and Burke, B. A. (1968) : *Pneumocystis carinii* pneumonia. Needle-biopsy diagnosis and successful treatment. J.A.M.A., 206, 596-600.
- 26) Marshall, W. C., Weston, H. J. and Bodian, M. (1964) : *Pneumocystis carinii* pneumonia and congenital hypogammaglobulinaemia. Arch. Dis. Childh., 39, 18-25.
- 27) Minielly, J. A., McDuffie, F. C. and Holley, K. E. (1970) : Immunofluorescent identification of *Pneumocystis carinii*. Arch. Path., 90, 561-566.
- 28) Mojon, M. (1971) : Introduction a l'étude de la pneumonie a *Pneumocystis carinii*. Thèse Lyon, 1-157.
- 29) Repsher, L. H., Schröter, G. and Hammond, W. S. (1972) : Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonitis by means of endobronchial brush biopsy. New Eng. J. Med., 287, 340-341.
- 30) Rifkind, D., Faris, T. D. and Hill, R. B. Jr. (1966) : *Pneumocystis carinii* pneumonia. Studies on the diagnosis and treatment. Ann. Intern. Med., 65, 943-956.

- 31) Robbins, J. B., Miller, R. H., Areal, V. M. and Pearson, H. A. (1965) : Successful treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *New Eng. J. Med.*, 272, 708-713.
- 32) Robillard, G., Bertrand, R., Gregoire, H., Berdnikoff, G. and Favreau-Ethier M. (1965) : Plasma cell pneumonia in infants. Review of 51 cases. *J. Canadian Assoc. Radiol.*, 16, 161-168.
- 33) Rosen, P. P., Martini, N. and Armstrong, D. (1975) : *Pneumocystis carinii* pneumonia. Diagnosis by lung biopsy. *Amer. J. Med.*, 58, 794-802.
- 34) 田村正・川村芳弘・阿部正紀・千葉峻三(1975) : *Pneumocystis carinii* 肺炎の生前診断——気管分泌液の検索——. *医学のあゆみ*, 93, 583-585.
- 35) Vinh, L. T., Vialatte, J., Pellerin, J. and Sinna, H. T. (1960) : La pneumonie a *Pneumocystis*. *Arch. Franç. Péd.*, 17, 1149-1160.
- 36) Vinh, L. T., Cochard, A. M., Dong, V. T. and Solonar, W. (1963) : Diagnostic "In vivo" de la pneumonie a "*Pneumocystis*". *Arch. Franç. Péd.*, 20, 773-792.
- 37) White, W. F., Saxton, H. M. and Dawson, I. M. P. (1961) : *Pneumocystis* pneumonia. Report of three cases in adults and one in a child with a discussion of the radiological appearances and predisposing factors. *Brit. Med. J.*, 2, 1327-1332.
- 38) 吉田幸雄・竹内 滋・荻野賢二・猪飼 剛・山田 稔(1977) : *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis carinii* 肺炎に関する研究. III. Pyrimethamine+Sulfamonomethoxine および Trimethoprim+Sulfamethoxazole の治療効果に関する動物実験. *寄生虫誌*, 26, 367-375.

Abstract

STUDIES ON *PNEUMOCYSTIS CARINII* AND
PNEUMOCYSTIS CARINII PNEUMONIA
 V. DIAGNOSIS BY CYST CONCENTRATION FROM SPUTUM

YUKIO YOSHIDA, TSUYOSHI IKAI, KENJI OGINO, SHIGERU TAKEUCHI,
 MINORU YAMADA, YOSHIHARU SHIMADA AND TSUNEZO SHIOTA

(*Department of Medical Zoology, Kyoto Prefectural University
 of Medicine, Kyoto, Japan*)

Antemortem diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by detecting the organism has mainly been done by lung biopsy or lung aspiration. However, the procedures as mentioned above sometimes cause severe complications such as pneumothorax and hemorrhage. The present study was attempted to give diagnosis by detecting the cyst in the patient's sputum in spite of this idea has been discarded for its low detecting rate in the past. However, our method is different as mentioned below from the former usual method which is direct smear of the sputum.

Procedure: (1) The sputum or tracheal aspirates are collected for 24 hours or more in a bottle which contains 1.2 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B solution (Table 2).

(2) Mucolytic solution is freshly prepared at use by dissolving acetyl-L-cysteine at the rate of 2 w/v% in 0.2 N NaOH solution. This prescription showed good mucolytic action without any damage to the cyst in preliminary experiment (Fig. 2, Table 1). Ten times volume of this solution is added to the sputum, and agitated for several minutes under the room temperature.

(3) Deviscid solution is filtrated through one sheet of gauze then centrifuged 3,000 rpm for 5 minutes.

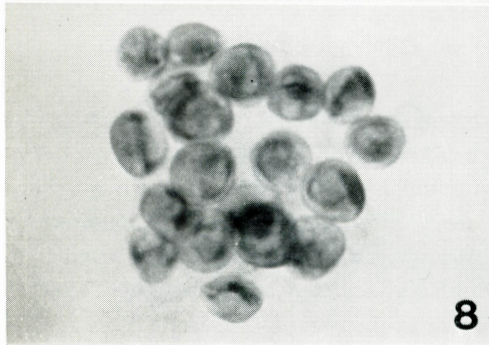
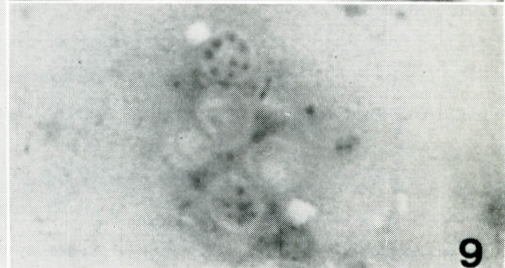
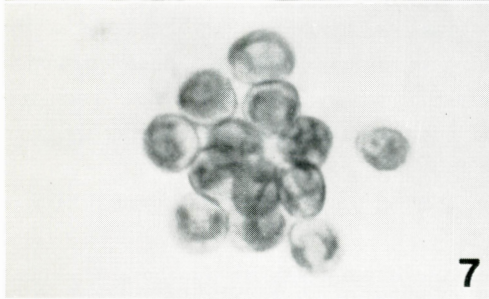
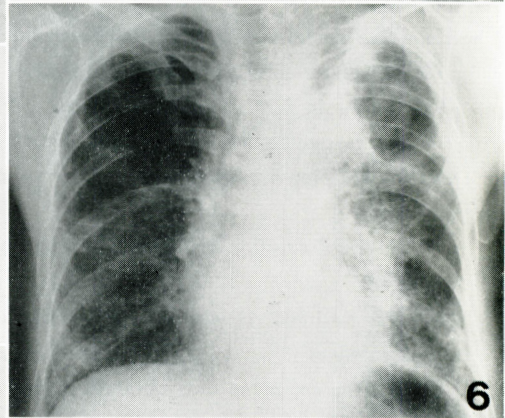
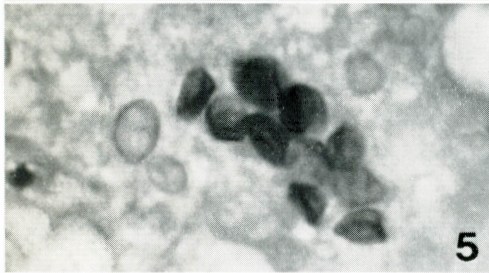
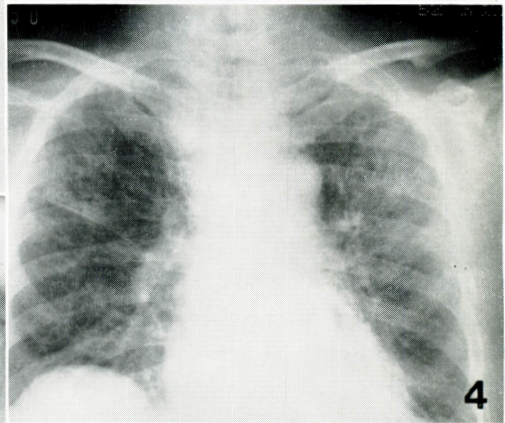
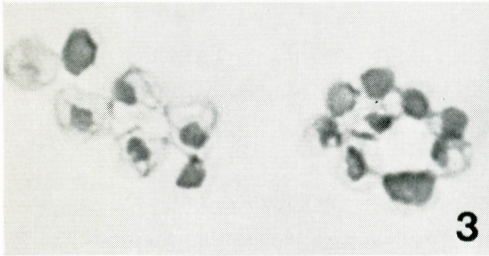
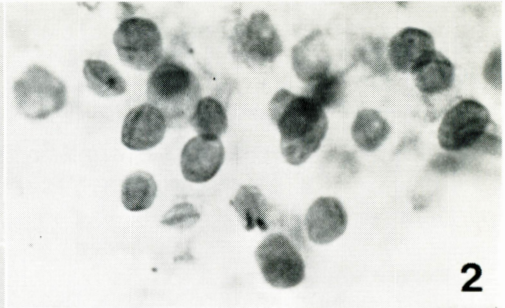
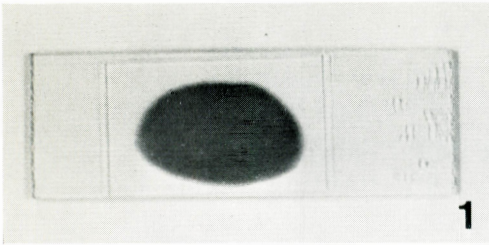
(4) The sediment is washed with saline, and centrifuged again like the above.

(5) Procedures (3) and (4) are repeated once more.

(6) All the sediment thus obtained is spread on a slide glass, dried and stained with toluidine blue 0 (Fig. 1).

In order to realize the presence or absence of *P. carinii* cysts actually in the trachea and/or bronchus, a series of animal experiment is carried out. Forty-six rats were treated with cortisone acetate 25 mg, twice weekly, then examined for *P. carinii* cysts in the lungs and in the airway at the time 4 to 10 weeks of the treatment. As the result, 39 or 84.8% of total rats were positive for cysts in the airway, especially the positive rates were 100% among heavily infected rats such as more than 5×10^6 cyst counts in 1 g of the lungs (Table 3). Those facts indicate the possibility of cysts appearing in the sputum in man.

Two clinical cases of *Pneumocystis carinii* pneumonia who were diagnosed by detection of the cysts in their sputa by the present method are shown (Fig. 4-9).



Explanation of Figures

- Fig. 1 Sediment smear of *P. carinii* cyst concentration method of sputum.
- Fig. 2 *P. carinii* cysts without damage after treatment by 2 w/v % acetyl-l-cysteine and 0.2 N NaOH solution ($\times 1000$).
- Fig. 3 *P. carinii* cysts with damage after treatment by 2 w/v % acetyl-l-cysteine and 1N NaOH solution ($\times 1000$).
- Fig. 4 Chest roentgenogram of *P. carinii* pneumonia (Case No. 1) at the time of cyst positive in sputum.
- Fig. 5 *P. carinii* cysts revealed by the present method from sputum of Case No. 1 ($\times 1000$).
- Fig. 6 Chest roentgenogram of *P. carinii* pneumonia (Case No. 2) at the time of cyst positive in sputum.
- Fig. 7 *P. carinii* cysts revealed by the present method from sputum of Case No. 2 ($\times 1000$).
- Figs. 8-9 *P. carinii* cysts stained by toluidine blue-O (Fig. 8) and giemsa (Fig. 9) found in lung aspiration materials of Case No. 2 after death.
- Figs. 1-3, 5, 7, 8 Toluidine blue-O stain. Fig. 9 Giemsa stain.