

皮膚スミア検査（らい菌検査）

Slit skin smear test (SSST)

らい菌 (*Mycobacterium leprae*) は、抗酸性、グラム陽性、孢子形成はなく、幅 0.2~0.4 μm 長さ 2~7 μm の桿菌である。一般に多菌型 (MB: LL 型, BL 型, BB 型, BT 型) の一部では菌が多数観察されるが、少菌型 (PB: I 群, TT 型, BT 型) の大部分では発見が困難である。化学療法などによって桿菌のほかに顆粒状、断裂状、短桿状を示す菌が混在する。

1. 皮膚塗抹標本の作り方。

1) 用意するもの：消毒綿、メス、スライドガラス（図 1）

2) 採取部位：皮疹部位、あるいは定位置として耳介・前額・顎・前腕伸側・指背・背・臀部等の 7~8 カ所から行う場合もある。

3) 手技・手順：通常、局麻をする必要はない

① 消毒綿で採取部位を消毒する。

② 採取部皮膚を 2 本の指でつまみ上げ、除血（皮膚が白くなる位強く）する。（血液の混入を防ぎ、切開時の痛みの軽減になる。）

③ メスで皮膚面に直角に切開する。深さ 3mm 程度・長さ 5mm 程度（メスは通常 15 号円刃刀を使用する 図 2）

④ メスを刺して 90° 回し刃に組織液が付着するようにしてからハネ上げるようにメスを抜く。血液を混入させないことが望ましい。

⑤ 刃面に付着した組織液をスライドガラスに均等に塗抹し、乾燥させる。メス刃は各箇所ごとに取り替えるか、消毒綿で除菌して使用する。

⑥ 皮膚断面を絆創膏等で止血する。

*日本では皮膚スミア検査は医師が実施する。

2. 鼻粘膜の塗抹標本の作り方

- 1) 用意するもの：滅菌綿棒、スライドガラス（図1）
- 2) 採取部位：鼻腔粘膜浸潤部
- 3) 手技・手順：綿棒で鼻内粘膜の浸潤部を擦過して採取し、スライドガラスに塗抹乾燥させる。

図 1



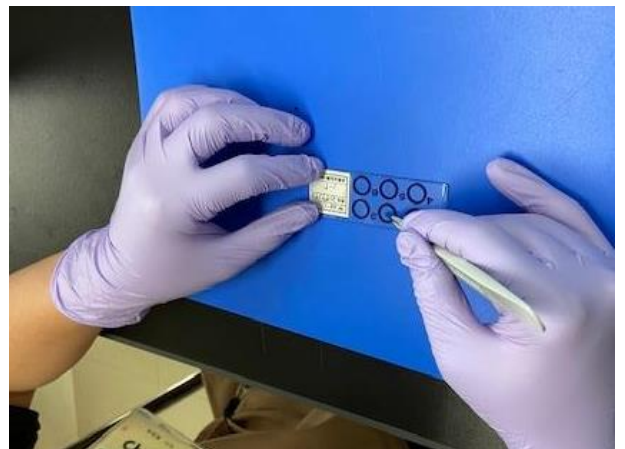
図 2



皮膚スミア検査検体採取



皮膚スミア検査: 90度回し、メス刃に組織液付着するように擦りながら跳ね上げる。



皮膚スミア検査、メス付着の組織液をスライドグラスに塗布

Ziehl-Neelsen 染色 (Z-N 染色) (皮膚スミア標本)

らい菌は結核菌等の他の抗酸菌と比べ抗酸性が弱く、通常の方法で行った Z-N 染色では染色され難い。らい菌検出を目的にする塗抹標本の Z-N 染色は、結核菌等の染色で行われる一般的な方法と少し異なる。脱色液は通常用いられる 3 %塩酸 70 %エタノールではなく、1 %塩酸 70 %エタノールを使用し、脱色時間も短時間で済ませる。後染色のメチレンブルー液では、過染に注意する。採取された検体は速やかに火炎固定する。

1. 平行なガラス棒の上に標本を置き、使用時濾紙で濾過した石炭酸フクシン液を標本に充分量を載せる。

2. アルコールランプで標本の下面を熱し染色液から湯気の出る程度まで加温する。

*この時染色液を沸騰させると標本に色素がこびりつき、菌の判定が困難となる。

*アルコールランプの燃料が少ないとランプの芯が燃え、ススが標本の裏にこびりつき、後でふき取るのに難儀する。

3. 加温後約 15 分間放置する。

*放置時間を過度に長くし、標本上に載せた染色液を乾燥させてはならない。色素が標本にこびりつき、菌の判定が困難となる。

4. 流水水洗 2~3 分

5. 脱色 染色ドーゼに入れた 1 %塩酸 70 %エタノール液中で 5 回出し入れを繰り返す。

*この時肉眼で観察し、塗抹面が赤色に染まっいて脱色が不完全と思われても、過度に脱色を繰り返さない。多くは検体採取時に混入した赤血球が染まっている。

6. 流水水洗 約 5 分

7. 染色ドーゼに入れたレフレルのメチレンブルーに5回出し入れする。

*肉眼で標本の染色状態を判断し、加減する。

8. 流水水洗 2~3分

9. 乾燥・鏡検(1000倍 油浸)

注意！

- ・ **石炭酸フクシン液での染色は、染色ドーゼを用いて、染色するのは禁忌**である。染色液中に陽性検体から剥がれ落ちた菌が他の標本に付着し、偽陽性になる危険がある。平行なガラス棒に載せる方法での染色を推奨する。
- ・ 染色時に、流し台に標本を落とさない様に注意する。水廻り等の自然界に存在する非結核性抗酸菌（NTM）が標本に付着し偽陽性となる可能性がある。

Ziehl-Neelsen 染色 (Fite 法) (病理組織標本)

オリーブ油を用いて脱パラを行うため、抗酸菌の菌体表面のロウ様物質が保護される。このため Ziehl-Neelsen 染色と比較して、抗酸性の弱いらい菌などの検出に優れている。

1. オイルキシレン(オリーブ油:キシレンを 1 : 1) 2 槽各 15 分で脱パラフィンを行う。
2. ろ紙で軽くおさえ、余分のオイルキシレンを吸い取る。

*できるだけきれいにオリーブキシレンを吸い取る。吸い取りが悪いと標本が汚くなる

3. 使用時濾紙で濾過した石炭酸フクシン液を標本に充分量を載せる。

*標本の乾燥を防ぐため湿潤箱を使用し 30 分間染色する。

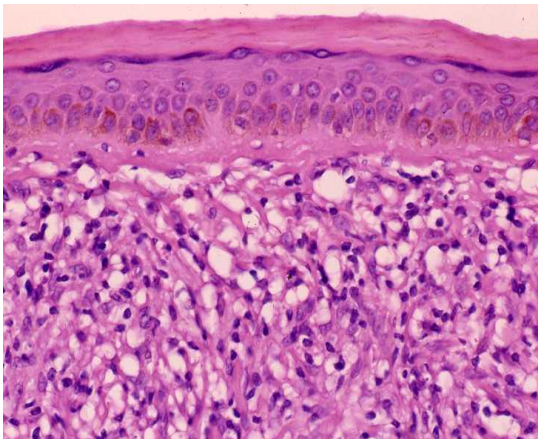


4. 流水中で水洗を 3 分間行う。
5. 1%塩酸 70 %エタノール水溶液に浸し色を確認し、赤色から薄いピンクになるまで分別を行う。
6. 流水中で 3 分水洗
7. 染色ドーゼに入れたレフレルのメチレンブルー液に 1 回浸す。
8. 水洗 1 分間
9. 乾燥

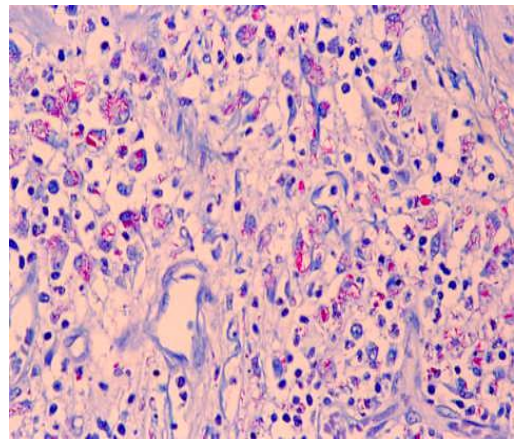
10. 透徹 封入

11. 検鏡 (通常 400 倍 1000 倍油浸でも確認する。)

らい菌は赤からピンク色の桿菌として染色され、背景の組織は薄い青色に染色される。



HE 染色 200 倍
真皮に多数の明るい泡沫細胞が見られる。
(多菌型ハンセン病)



Z-N 染色 (Fite 法) 400 倍
赤染するらい菌が真皮のマクローファージ内に多数存在する。
(多菌型ハンセン病)

試薬調整

Ziehl-Neelsen 染色

1. 石炭酸フクシン

1) 5 %石炭酸水溶液

蒸留水	9 5 0 mℓ
石炭酸液	5 0 mℓ

2) ニューフクシンフクシン溶液

ニューフクシン	9 g
無水エタノール	1 0 0 mℓ

* 無水エタノールを 3 回に分けて加え、湯煎加温しながら良く混和し、完全に溶解させる。

3) 5 %石炭酸水溶液に完全に溶解したニューフクシン溶液を加え、良く攪拌して褐色瓶に入れ保存する。

フクシンの選択

*市販されている塩基性フクシンは、パラローズアニリン、フクシン、ニューフクシンの混合物である。抗酸菌の染色にはメチル基の多い、最大吸収波長 552 μm 以上のものを使用する。当検査科ではクローマ製のニューフクシン(最大吸収波長 555-556 μm)を使用している。(原田澄先生研究)

2. 脱色液(1 %塩酸 7 0 %エタノール)

無水エタノール	7 0 0 mℓ
蒸留水	2 9 0 mℓ
塩酸	1 0 mℓ

3. レフレルのメチレンブルー液

1) メチレンブルー原液

メチレンブルー	1.4 g
95%エタノール	100 ml

2) レフレルのメチレンブルー液

メチレンブルー液	30 ml
1%水酸化カリウム水溶液	1 ml
蒸留水	100 ml

- 3) レフレルのメチレンブルー液そのままでは濃染するので、蒸留水で5～10倍程度に薄めて使用する。

Ziehl-Neelsen 染色 Fite 法

1. オリーブキシレン

オリーブオイル	50 ml
キシレン	50 ml

2. 他の試薬は Ziehl-Neelsen 染色と共通

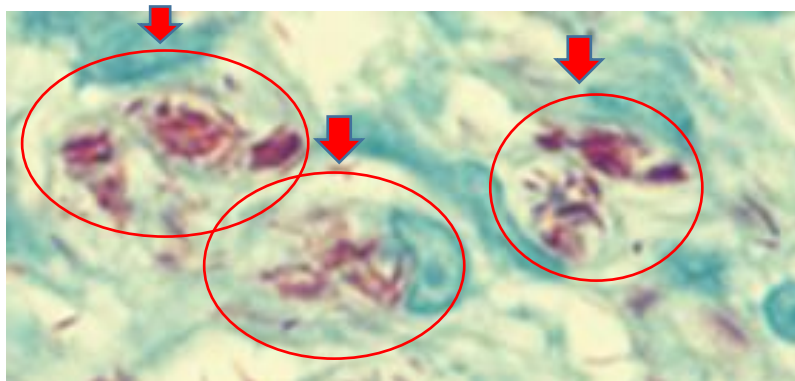
塗抹検査における菌指数 (Bacterial Index)

塗抹標本による菌検査は、ハンセン病の診断、病型・病勢の判断、治療効果判定等に 他の臨床症状と同様、重要な情報を提供する。

毎視野中に菌が平均	1000 個以上のもの	6+
毎視野中に菌が平均	100~1000 個のもの	5+
毎視野中に菌が平均	10~100 個のもの	4+
毎視野中に菌が平均	1~10 個のもの	3+
10 視野中の菌の合計が	1~10 個のもの	2+
100 視野中の菌の合計が	1~10 個のもの	1+
菌が発見できないもの		—

Ziehl-Neelsen 法で染色した塗抹標本を、対物レンズ 100 倍 (油浸)、接眼レンズ 10 倍で顕微鏡検査する。

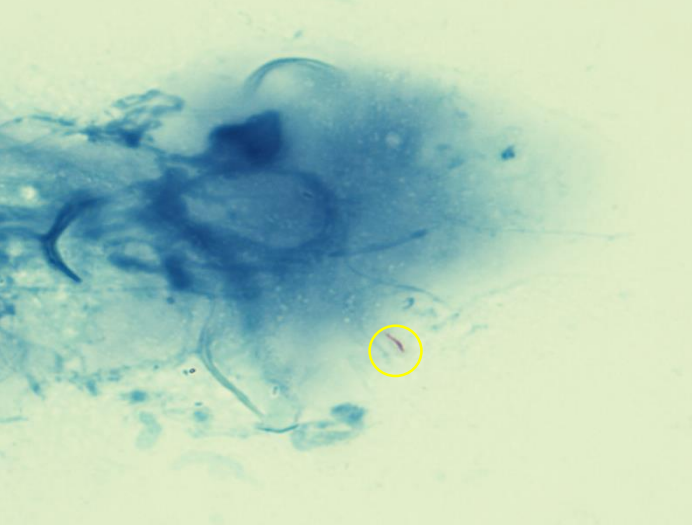
LL 型ではらい菌に対する細胞性免疫応答が成立せずマクロファージの殺菌作用が進まないため、マクロファージ内で増殖したらい菌が球状の緻密な集団 (Globi) ↓ を形成する。



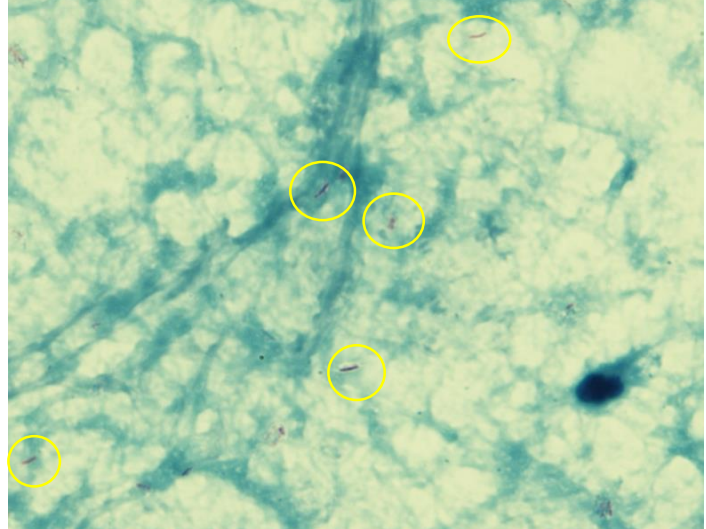
Z-N 染色 (1000 倍 油浸)

★Globi の報告

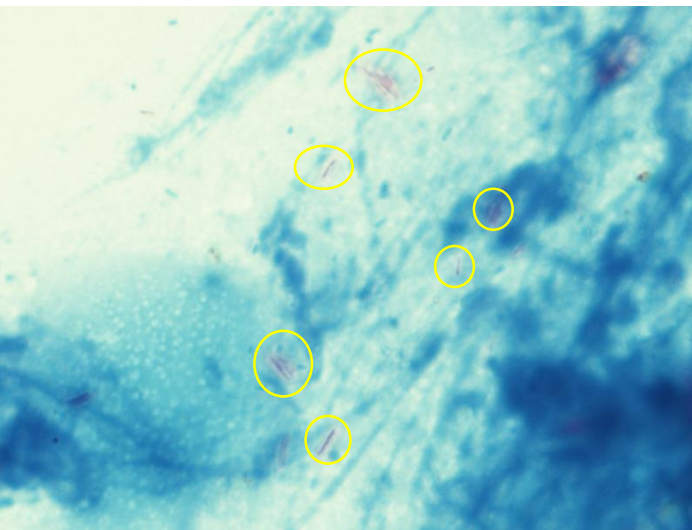
標本中で Globi が観察された場合、1+~3+の範囲で報告する。



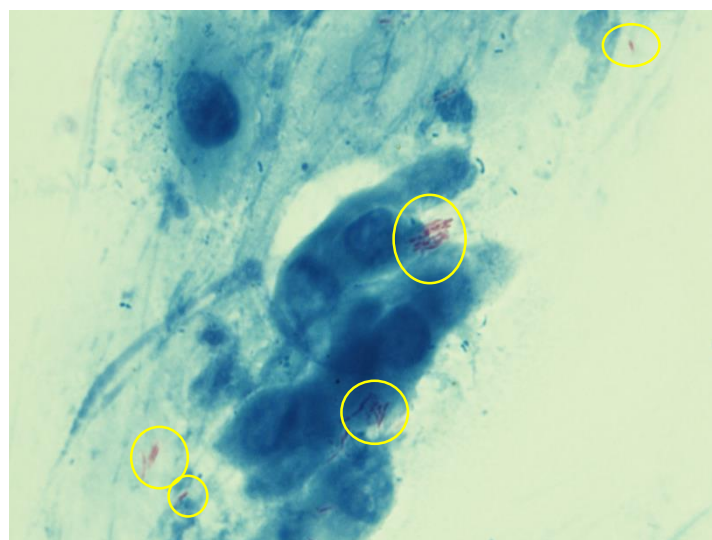
BI 1+
100視野中菌の合計1-10個



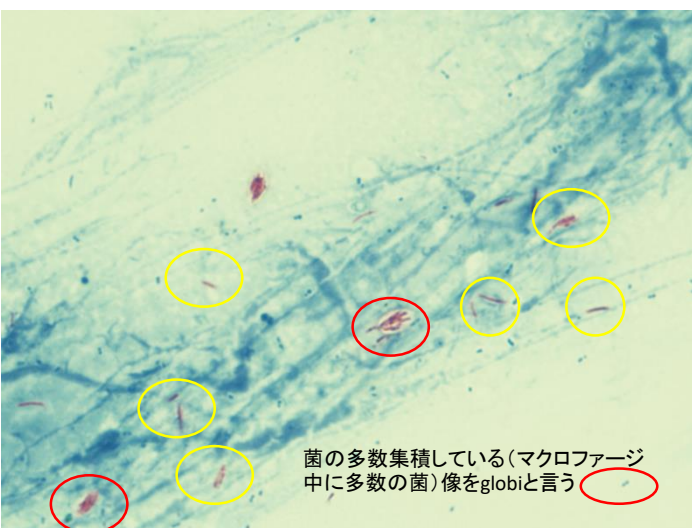
BI 2+
10視野中菌の合計1-10個



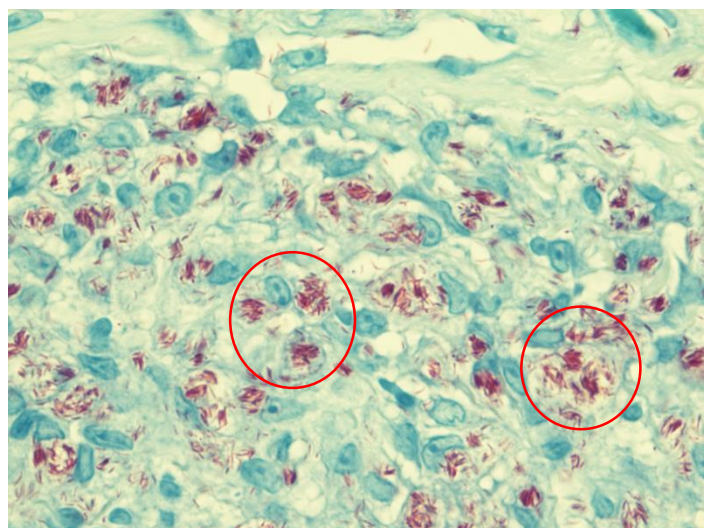
BI 3+
毎視野中菌の平均1-10個



BI 4+
毎視野中菌の平均10-100個



BI 5+
毎視野中菌の平均100-1000個



BI 6+
毎視野中菌の平均1000個以上

塗抹検査における菌の形態指数 (Morphological Index)

化学療法による菌の形態学的変化は、治療効果判定の一指標となる。顕微鏡でカウントされた全菌数に対する solid 菌の百分比を表示する。

solid の菌 =完全な桿状に染色された菌
 (生菌と考えられている)

non-solid の菌 =菌形に断裂や顆粒化などが見られる菌
 (死菌と考えられている)

$\text{solid 菌数} / \text{solid 菌数} + \text{non-solid 菌数} = \text{M. I.}$ (%で表示する)

* Handbook of Leprosy(W.H.Jopling), Leprosy(S.J.Yawalkar)や Leprosy(Hastings)等の教科書では、M. I.判定には 200 個、少なくとも 100 個の重なり合っていない菌を数えて算出すると記載されている。

参考書籍：	ハンセン病診断・治療指針	厚生省、籐楓協会
	総説現代ハンセン病医学	東海大学出版会
	ハンセン病医学夏期大学講座教本	
	Handbook of Leprosy	W. H. Jopling
	Leprosy	S. J. Yawalkar
	Leprosy	R. C. Hastings
	皮膚抗酸菌症テキストブック	石井則久

菌の形態学的変化

Solid型



* 長さが幅の4倍以上

端尖状

一部淡染

Non-Solid型



* 長さが幅の3倍以上

湾曲状

湾曲状

端尖状

短冊状



断裂状



断裂状



連珠状



連珠状



連珠状



淡染色状



異染顆粒をもつもの



顆粒状

らい菌は死滅すると菌表面の染色性に差異ができません(Non-Solid)になる。死菌になっても『菌』として検鏡できる (Non-Solidとして)