

らい菌検査

皮膚塗抹検査 (B. I. ・ M. I.) の手引

国立療養所多磨全生園

研究検査科

2004年2月3日作製

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 (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 (I群, TT型, BT型) の大部分では発見が困難。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。

通常、塗抹標本は検査伝票と共に標本箱に入れた状態で検査科に提出される。提出された検体は、速やかにアルコールランプで火炎固定をおこなう。

1. 皮膚塗抹標本の作り方。

- 1) 用意するもの ; 70%アルコール綿、メス、スライドグラス。
- 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 70%アルコール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) する。
 - 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>
 - ④ 刃で割面を擦過し組織汁をとる。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汁をスライドグ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、各患者ごとに取り替える。
 - ⑥ 皮膚割面を絆創膏等で止血する。
* 皮膚塗抹標本採取は医師のみに許される。

2. 鼻粘膜の塗抹検査

綿棒で鼻内粘膜の浸潤部を擦過して採取する。

3. らい菌検出を目的とした Ziehl-Neelsen 染色 (皮膚・鼻粘膜塗抹標本)

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 Ziehl-Neelsen 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チールネルゼン染色は、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。

1) 火炎固定

塗抹面を上にして、アルコールランプの炎の中を 2~3 回ゆっくりと通過させる。

2) 染色

- ① 平行なガラス棒の上に標本を置き、濾紙で濾過しながら標本に十分な量の石炭酸フクシン液を載せる。
- ② アルコールランプで標本上の染色液から湯気の出る程度まで加温する。
 - * この時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、後でふき取るのが大変である。
- ③ 加温後約 15 分間位放置する。
 - * 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 約 5 秒
 - * 標本をピンセットでつまみ、染色ビンに入れた 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ていた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 分位
- ⑥ 後染色 30 秒~1 分
 - * 染色時間は肉眼で標本の染色状態を判断し、時間を加減する。
- ⑦ 流水水洗 2~3 分
- ⑧ 乾燥・鏡検

注意：石炭酸フクシン液での染色では、染色壺を用いて、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、誤陽性になる危険がある。1 枚ずつ平行なガラス棒に載せる方法で染色しなければならない。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定型抗酸菌が標本に付着する可能性がある。

4. 試薬作製

1) 石炭酸フクシン

- ① 蒸留水 950 ml に加温溶解した石炭酸液 50 ml を加え、混和・溶解させる。
- ② フラスコ等の容器中でニューフクシン 9 g を、全量 100 ml の無水エタノールを 3 回に分けて加え、加温しながら良く混和し、完全に溶解させる。洗浄室の温水水道を利用できる。
- ③ 5% 石炭酸水溶液に完全に溶解したニューフクシンを加え、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ール基の多い、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)

* この処方ニューフクシン粉末は高濃度である。各施設によって作製方法が異なる。

2) 脱色液 (1% 塩酸 70% エタノール)

無水エタノール	700 ml
蒸留水	290 ml
塩酸	10 ml

3) レフレルのメチレンブルー液

① メチレン青原液

メチレン青	1.4 g
95% エタノール	100 ml

② レフレルのメチレン青液

メチレン青液	30 ml
1% 水酸化カリウム水溶液	1 ml
蒸留水	100 ml

* レフレルのメチレン青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。

5. 塗抹検査における菌指数 (Bacterial Index) [Ridley による分類]

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。その表し方としてリドレーの菌指数 (B.I.) が国際的に広く用いられている。

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。

標本中で Globi が観察された場合、(1+) ~ (3+) の範囲で報告する。

標本中に顆粒状の菌が目立って観察される場合、(1+) ~ (3+) の範囲で報告する。

6. 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

non-solid の菌 = 菌形に断裂や顆粒化などが見られる菌

solid 菌数 / (solid 菌数 + non-solid 菌数) = 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

ハンセン病医学

らい医学夏期大学講座教本

Handbook of Leprosy

Leprosy

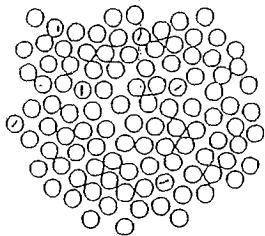
厚生省、藤楓教会

東海大学出版会

W.H.Jopling

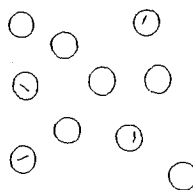
S.J.Yawalkar

BI 1+
1-10 bacilli, on average, in 100 oil immersion fields



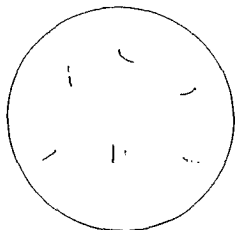
Examine 100 oil immersion fields

BI 2+
1-10 bacilli, on average, in 10 oil immersion fields



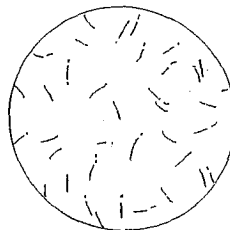
Examine 100 oil immersion fields

BI 3+
1-10 bacilli in an average oil immersion field



Examine 25 oil immersion fields

BI 4+
10-100 bacilli in an average oil immersion field



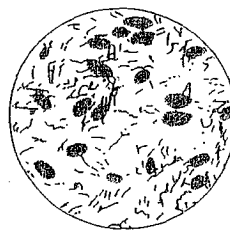
Examine 25 oil immersion fields

BI 5+
100-1000 bacilli in an average oil immersion field



Examine 25 oil immersion fields

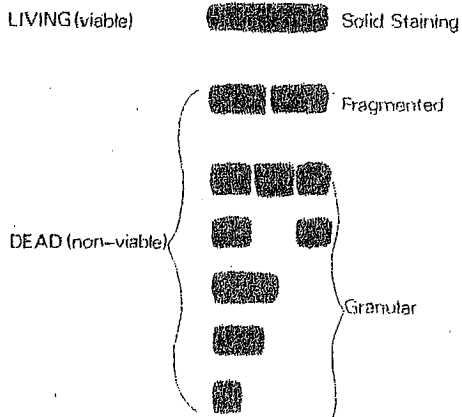
BI 6+
Over 1000 bacilli (many globi) in an average oil immersion field



Examine 25 oil immersion fields

Fig. 16 Diagrammatic representation of the Bacteriological Index (BI) of slit-skin smears or nose-blow smears according to Ridley's logarithmic scale

Diagrammatic representation of various forms of MYCOBACTERIUM LEPRAE stained by modified Ziehl-Neelsen method.



Living (viable) leprosy bacilli

Solid-Staining (S)

Dead leprosy bacilli

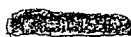
Fragmented (F)

Granular (G)

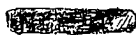
Fig. 5 Living and dead leprosy bacilli

菌の形態学的変化

Solid形



※長さが幅の4倍以上



(端尖状)

(一部淡染)

Non-Solid

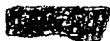
(弯曲状)



(端尖状)



(短形状)

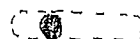


※長さが幅の3倍以上

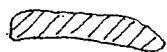
(断裂状)



(連珠状)



(淡染色状)



(異染顆粒をもつもの)



顆粒形

