Detection of *M. leprae* in the skin lesions of the so-called negative cases. Scrutinization of concentration methods

AKIRA NAGAI, YUTAKA MIURA, SOICHI SUZUKI

(Research Institute for Tuberculosis and Leprosy, Tohoku University, Sendai)

AND SHIRO MAJIMA

(Tohoku Shinseien, Miyagi Pref.)

Detection of *M. leprae* in 168 skin samples removed by trepanation from 58 patients negative for bacilli in repeated examinations of 3 to 8 times in the periods ranging from 1/2 to 2 years was performed. In addition, 6 cases showing occasionally positive, and 17 cases showing 2+ to 3+ positive for bacilli were examined similarly. These skin pieces were smeared directly or after trituration and grinding (40 samples of 27 cases) on slides and examined. For the purpose of concentration of bacilli in the tissue, two techniques were employed, NaOH-(with and without acetic acid treatment) and chloroform-methods. The results obtained were summarized as follows:

1) The trepan-snip method seemed to be slightly superior to the routine slit method so far as the 168 samples concerned. However, 3 out of the skin samples showing positive for bacilli, very few in number, by slit method, gave negative results.

2) Smearing preparation after grinding the skin piece in a mortar did not work only unfavorably for search of *M. leprae*, but also made it difficult presumably because of increase in masking effect of tissue debris on bacillary bodies which would be gradually losing their acid-fastness.

3) Concentration procedure with NaOH chloroform was unlikely serviceable to the purpose of detecting *M. leprae* in the skin samples of very small amount with scanty bacilli.

4) From these results, it can be safely stated that the routine snip or scraping method is a fairly good means for detection of *M. leprae*. The method is quite simple, practical and suitable for repeated examinations. In addition, the yield is not necessarily inferior in efficiency to snip method, if care is taken for selection of the site to be examined, and for preparation of films after rendering the site bloodless by pressure.

5) Varied changes in morphological and tinctorial properties of *M. leprae* were observed; viz., granular form (5 cases), shortening of bacillary body (1), purplish red (3) or pale bluish staining (1), etc. The meaning of these changes remains to be solved by further research.

6) The instruments to be used should be kept quite sanitary. Cleaning of the knife, and other instruments, mortar and pestle, etc. in a boiling NaHCO_3 -solution is very simple and satisfiable for washing out adhering acid-fast germs to them.

いわゆる菌陰性者における癩菌の検出とその手技の検討

永 井 彰・三 浦 裕・鈴 木 壮 一

(東北大学抗酸菌病研究所)

馬 嶋 四 郎

(東北新生園)

(受付1966年10月17日)

緒 論

化学療法の進歩により癩患者の症状が著しく軽快し、リハビリテーションの問題が大きくとり上げられるようになった。言うまでもなく、治癒の判定に最も重要なのは、患者、殊に、その皮疹から癩菌を検出するにある。癩菌は培養できないので、結局、皮膚組織の塗抹標本を作って鏡検するほかはない。これには従来から患者皮膚に小切を加えて塗抹標本を作る方法が慣用されているが、検査すべき部位の撰択の他、標本の染色法や鏡検の精粗が問題となる。それらはしばらくおき、先づ、重要な被検材料の採取法と集菌法について検討を加えたので、以下これについて述べよう。

材 料 と 方 法

被検患者：主として東北新生園収容の患者と抗酸菌病研究所外来の患者である。通常の塗抹法による検査で、こゝ半年以上2年余に亘る数回、10数回の検査にかゝわらず、菌が検出できなくなったもの58例についてトレパン採取法による検査を行った。1人で1〜5ヶ所の皮面より皮片を採取したので、その総数は168個に達する。そのうち47例は病歴及び現在の症状から極めてよく吸収された陳旧癩腫癩、若しくはその経過者(burnt out cases)と診断され、いわゆる、二次的神経癩に相当する例で、鼻汁中に癩菌を証したものはなかった。但し3例で鼻汁中に大小の太い抗酸性桿菌の3〜5個を散在性に認めた場合があったが、その形から癩菌とは言い難かった。結核様癩経過者は6例で、内2例はかなり吸収されたがなお淡紅褐色斑をとどめ、2例ではやゝ明らかな、残りの2例では微かな各癩痕を残していた。いわゆる純粋な神経型にいれるべきものは2例で、その他境界群、反応性結核様癩、急性浸潤(組織像は結核様)の鎮静期の各1例となる。臨床所見やレプロミン反応の成績は、菌の検出との関連で重要且つ興味ある処であるが、こゝ

ではこれ以上この問題には触れない。以上の他、菌陽性者、即ち、僅数の菌を時折証明できるもの6例、1〜2+内外の菌が常に容易に証明できるもの11例、計17例のL型患者も参考に供せられた。

標本の採取：2mm径のトレパンを用いて、予じめ、沃丁、酒精、湯で消毒清拭した検査部皮膚(2mg内外)を皮下に達するまでくり抜くようにして切取った。その際、ピンセットで切除部周囲の皮膚をやゝ広くつまみ、トレパン、次いで鉗で手早く切りとり、血液の附着をできるだけさける様にした。材料が多いほど菌の検出率も一般に増すと思われるからである。殆ど麻酔を必要としないし、傷の縫合も不要で、小ガーゼをあて、絆創膏でしっかりとめておけば事足り、一時に数ヶ所の検査は勿論、時を隔てて幾回か検査を反覆するのも容易である。材料の採取は、原則として以前に結節や浸潤が著明であった部分で行い、その他耳朶、眉の上側方、前膊、下腿の末端部等も好んで扱われた。

標本の作製：大別すると次の4通りになる。新しい、而も、滅菌した清浄なスライド硝子の一面を用時火焰にかざし、冷した後、

1) その部位に採取皮片の断端を充分になすりつけるか、軽く押しつけて、所謂、スタンプ標本を作る(スタンプ・塗抹——仮称)。

2) 採取皮片を清浄な乳鉢中で細切し、すりつぶしたものを塗抹する(すりつぶし塗抹)。

3) 細切した採取組織片に1〜2.5 N NaOH液の0.5〜1 mlを加えて懸濁液を作り、37°Cに30分放置後、塩酸水を加えて全体を冷却しながら中和し、数倍量の水を加えて攪拌し、3,000 rpmで30分遠心し、上清の大部分を棄て、沈渣の最上面を塗抹し、更に食塩水を加えて懸濁液を作り、スライドに塗抹した。(2)及び(3)の材料は小川培地に塗抹して培養試験(37°C, 28°C)に供した(苛性ソーダ法)。

4) 細切した皮片を Dharmendra 抗原作製法³⁾にならいクロロホルムで抽出するか、又は、Kar et al.⁷⁾の方法に準じて、皮片を直ちに2% 醋酸水に投じ1~3時間後、軟化膨潤した材料から上皮だけ除くか、又は、そのまゝ乳鉢でよくすりつぶし、少量の生理的食塩水に懸濁し、クロロホルムを1滴加えて3,000 rpm, 30分遠心し、クロロホルム層(下)と生理的食塩水層(上)の境界にある粒子層をピペットで吸ひ取り、スライドに塗抹、染色する(クロロホルム法)。

標本に見出される菌の形態について：これについては化学療法との関連もあり、形、染色共に良好なもの(solid)、形はよいが染色が極めて不良のもの、又は、形が崩れて顆粒状になったもの(non-solid)、など色々の変状が知られている。これらを常に明確に癩菌と同定することは時によって簡単でないこともある。それらが数が少く、而も、同じ標本内に形のよい癩菌が見出せない場合は一層難かしい。我々の場合も、時にかゝる崩壊に瀕した菌に接したが、多くは桿菌状のものと共存していた。抗酸性顆粒のみが見られた場合が5例、極めて短い桿菌のみの場合が1例、染色が不良で紫紅色を呈する菌のみの場合が3例、青染した菌のみの場合が1例づつあった。その他、癩菌と考えて間違いない桿菌と共にこれらの不良菌が共存した例はかなり見られたが、そのうち青染した桿菌をかなり混えていた例は4例あり、いわゆる、segmented の桿菌を混じたものもあり、1例ではかなり多かった。菌の染色及び形態の変化と臨床所見、経過との関連は仔細に見ると複雑なものがあり、注意して観察すると病勢がなお衰えぬ結節中の菌にもかゝる変化に陥った菌が見られる。いづれにしても、興味ある問題で稿を改めて論ぜねばなるまい。なお、鼻汁内菌陰性の10例(内7例は snip 法又は集菌法で少数の菌を皮疹内に証明)で、鼻粘膜を鋭匙でかきとり塗抹標本を作ったが癩菌を証明したものはなかった。

検査用器具の清浄化について：最後に、最も注意すべきことに、検査に用いる器具の清浄化がある。トレパンや鉋、ピンセットは充分磨粉で清拭し、先端は酒精に浸し、少時火焰にかざすのがよい。乳鉢と乳棒とは最も警戒すべきもので、磨粉と石鹼による清拭では抗酸菌の附着は除き得ない。遠心沈澱管、ピペット、スライド硝子等は重クローム硫酸中に1夜以上浸漬する。1度菌検査に用いた器具は、石鹼、磨粉、アルコール、クロロホルム、エーテル等での洗滌では次の用に供し得ないと心得るべきで、金属器具では焼灼するか、160°C 3~6時間乾熱滅菌する要がある。特に、癩菌以外の抗酸菌を扱っ

ている研究室では、清拭には慎重の上にも慎重を期さねばならない、凡て、器具は5%重曹水で煮沸し、石鹼水で充分洗滌する方法が簡単で確実であることを後で知った。

成 績

先づ、単純塗抹法で(slit 又は scraping)で、簡単に菌が発見できる癩腫癩皮疹(+2~+3)約20個をトレパンで採取し、以上の方法で鏡検するなら全例で多くの菌を見るのは当然で、殊に、集菌法ではしばしば菌が集塊を作って見られる。即ち、slit 法よりも小皮膚片を採取するトレパン法、即ち、snip 法の方がより多くの菌が検出でき、集菌法を施せば一層多くの菌が発見されると思われた。併し、菌のきわめて少い材料についてはこうはいかなかった。

1) トレパン採取皮片から塗抹乃至スタンプ標本を作った場合(トレパン・スニップ法)

イ) 半年以上数年も連続して皮表より菌が証明できなかった前述58例で、その168個の皮疹で調べたら更に10例、13ヶ(7.8%)がこの方法で菌陽性となった。即ち、通常の slit 法よりやや優るように見えた。ところが

ロ) 通常塗抹法(slit 法)では菌の証明がかなり困難だが、時に、2、3ヶ程度の少数の菌が見出されるような症例6人の15ヶの材料でトレパン・スニップを行った所、わづかにその2例3個の皮疹で菌陽性だったにすぎず、菌の少い材料では必ずしもトレパン・スニップ法がslit 法にまさるとは言えなかった。もとより検査部位が同じではなく検査の時期にもズレがあったから、その比較は無理で、検査部位の選択と検査の精粗が最も問題になるとは言え案外の実績であった。

2) 集菌法による成績

イ) トレパン採取皮片を乳鉢で充分すりつぶした場合(すりつぶし法)

27例で40個の材料で検したところ、そのうち4例4ヶ(10%)に陽性と言う悪い成績で、スタンプ塗抹の成績よりずっと不良であった。

ロ) NaOH 集菌法(苛性ソーダ法)

前述、皮片をすりつぶしてから苛性ソーダで処理した分を含めて、56例78個(殆どL型で9例9ヶの1+~2+菌陽性例を含む)の皮疹でこの方法を実施した。それによると、6例6個(7.7%)の陰性皮片が更に菌陽性となった。すなわちすりつぶしてからNaOHの処理をした分は21例33個であるが、2例2ヶだけが菌陽性となった。而るに、スタンプ塗抹、若しくは、「つぶし」法で

Table 1. Results of bacillary findings observed in 78 skin samples of 56 cases by concentration technique with NaOH

Changing of bacillary findings before and after concentration procedure	Number of	
Before (slit and snip) → After (concentration)	patients examined	skin lesions examined (per cent)
(-) → (-)	28	50
(-) → (+)	6	6(7.7%)
(+) → (-)	13	13(16.6%)
* (+) → (+)	9	9
	56	78

* Cases showing occasionally positive for *M. leprae*, though a few in number, in skin lesions.

Table 2. Results of bacillary findings observed in 45 skin samples of 40 cases by concentration technique with chloroform

Changing of bacillary findings before and after concentration procedure	Number of	
Before (slit and snip) → After (concentration)	patients examined	skin lesions examined (per cent)
(-) → (-)	25	30
(-) → (+)	4	4(8.9%)
(+) → (-)	2	2(4.4%)
* (+) → (+)	9	9
	40	45

* Cases showing occasionally positive for *M. Leprae*, though a few in number, in skin lesions.

菌陽性だった13例13ケの皮疹では本集菌法によってかえって全例が陰性となったのが注目された。併し2+程度の菌陽性皮片9例では全例菌陽性に変わらなかった。(第1表)。

ハ) クロロホルム集菌法

40例45個(内9例は1+~2+の菌陽性者)で行ったが、菌陽性者4例を増し、反対に slit 陽性の2例が却って陰性化した。2+菌陽性者は全例菌陽性に変わらなかった(第2表)。

結局、NaOH、クロロホルム両集菌法を延べ96例123ケの皮疹で行ったが、これら集菌法によって新たに菌が検出された場合は、8%内外で以外に成績が悪く、殊に、NaOH法ではスタンプ塗抹(snip)法で陽性だった皮片の16%が菌陰性と化したのは以外であった。即ち、含有菌数が微量な場合、小さい皮膚片について集菌法を行うことには無理があり、薬剤処理による抗酸性の低下、操作中の菌の流失、組織片による隠蔽が大きく影響すると思われる。

考 按

皮膚の癰腫(結節)から癰菌を証明することは、一般に甚だ簡単で何の工夫も要しない。併し、不定群皮疹、結核様皮疹や吸収に類した癰腫性疹では、このことは必ずしも容易でなく、時に殆ど不可能でさえある。病勢が停止消失し、“burnt out”の状態となり、年余に亘って反覆検査しても菌が検出できなくなったような症例、即ち、いわゆる、arrested casesでは、更に、この状態が1年以上続けば、軽快若しくは臨床的治癒と考えて實際上まづ差支えなからうと言うのが1966年4月、高松の第39回癰学会での癰研究協議会の「治癒判定基準」シンポジウムの¹⁷⁾の決議的見解でもあった。癰菌の培養ができない以上、止むを得ぬ措置である。即ち、癰の治癒判定に最も大切な基準は、癰菌の検出にあることは言うまでもない。このため従来より色々な措置が取られた。1933年のマニラの国際癰会議¹⁶⁾では、標準法として、scraping(皮膚に小切を加え割面内面を塗抹する)とsnip(2mm

位の深さに皮部を剪みとって塗抹を作る)の2方法をあげたが、先に Lowe¹⁰⁾ の言った slit 法と clip 法がそれに当る。Wade¹⁴⁾ は皮疹よりの菌検査の方法を詳細に論じ、incision (小切開) と snip (小皮片の採取) の両法をあげ、前者が実際に最も簡単でその効率も後者に劣らないと述べ、少くとも 2 mm 以上の深さまで割を加えること、被検部はよく拭き、癩菌以外の抗酸菌の混入を避けるため表皮面は塗抹せぬこと、何にも増して器具の清拭が大切だから刃物は酒精に浸して火焰にかざすべきこと(灼くのではない)などの注意を述べた。同氏によると、記録に残っている snip 法は Alvarez¹⁾ (ハワイ)のものが最初であると言う。Arnold²⁾ によると、Souza Araujo¹³⁾ は pean などで皮面をつまみ、局処の乏血を起させておいて、太い注射針で 2~3 ケ所から淋巴を集めて塗抹検鏡する方法がよく、Wade¹⁵⁾ の scraping incision にはるかに優ると述べたと言う。Figueredo et al.⁶⁾ は snip 法変法を推奨した。Muir¹²⁾ もその著で slit, snip, puncture 及び cutting puncture の 4 法をあげた。Maddock¹¹⁾ は安全カミソリの刃で回転しながら割を入れる法で arrested cases の 84 例中 19 例で菌を証したと言う。その後、略時を同じうして、印度からこれに関し 3 つの集菌法が発表された。煩を顧みず紹介すると、

1) Figueredo et al.⁶⁾ の法: 切除皮片 (3 mm) を試験管に入れ、2.5% アセトンにクロロホルム 2.5 cc を加えて 4~5 時間置いてから硝子棒でつぶして抽出し、クロロホルムを温浴中で数滴になるまで蒸散し、冷却後、5 cc のエーテルを加えて 3,000 回転 15 分遠心し、管底に数滴を残してエーテルを蒸散せしめ、スライド上に塗抹し、更に、遠沈管を数滴のエーテルで洗って追加塗抹し、carnoy 液でこれを固定して染色鏡検する集菌法である。染色はチール氏液 10 分、弁色は 10% 塩酸で行う。同氏等はこの方法で 48 例の癩患者接触者 (contact) 中その 31 例の皮膚に菌を証したと言う。

2) Dharmendra et al.⁴⁾ の法: クロロホルムで皮片を抽出し、同じくその塗抹標本を carnoy で固定する集菌法である。同氏等の言う neuromacular 症例の 53 例中 51 例までに菌を証明したと言う。

3) Khanolkar et al. 法^{8,9)}: 皮片 (5×3×5 mm) を 1% 醋酸水中に 4-8 時間浸漬し、表皮を除去した残りを硝子製の Potter 型ホモジナイザーで 2,000 回転 5~10 分かけ、管壁の組織層を 1% 醋酸水で洗い落とし、全量を 5 cc とし、石油エーテルと硫酸エーテルの 1:10 混合液 20 滴をこれに加え、強く振盪しつつ混和し、そのまゝ 15~20 分間管を立てたまゝ放置し、次に 10 cc の蒸留水

を管壁を洗い落しながら加えると、2~5 分後に液面に白色又は琥珀色の輪状の層がでるからこれをスライドに塗抹して染色鏡検する。弁色には 33% 塩酸を使い、復染色には薄めた azur II を用いた。同氏等はこの方法で、通常の方法では証明できなかった神経型から採った 100 例を越える皮膚片で、菌を証明することができたと言う。最近、Kar et al.⁷⁾ の発表した研究室外集菌法は、皮片 (2-4 mm) を 0.4 cc の醋酸 (2%) に入れ表皮を去り、つぶして、上清を捨て、微量のクロロホルム (0.04 cc) を加えて 3 分間振り、1,000 g で 10 分間遠心し、上清は去って沈渣を塗抹する。この方法で、通常法では 5 例しか陽性でなかった 31 例の、所謂 “burnt out” cases の 21 例までが陽性になったと言う。以上が菌検査法に就ての先人研究の跡で、我々の研究も凡そこれにならったもので、トレパンにより比較的大量の材料を容易に採取し、組織中の菌をできるだけ多く遊離せしめて集め、検出率の向上をはかったものである。例数が少く、検査の時期や最も大切な検査部位が同一でないから、直ちに比較するのは無理であるが Lowe¹⁰⁾ の報告にもあるように snip 法は通常の塗抹法、即ち、slit 法に多少優る成績を獲たがこれと通常の塗抹処理を充分丁寧にするなら、両者の成績に大差がなかったのではないかと思われる、現に slit 法で極めて僅かの菌を見た 6 例が snip 法で 3 例陰性化したのをみた。又、トレパンで採取した皮片を乳鉢で充分すりつぶして塗抹する方法も意外に悪く、却って、陰性率の著しい低下を来したが、これは、弱った菌を器械的に崩壊せしめ抗酸性が失われる、余分の組織片で masken される、操作中に流出する、とかの理由によるのかもしれない。集菌法に至っては、菌の比較的多い材料では一層有効と思われるが、今問題としているような菌が弱って居り、且つ、極めて少い材料では案外芳しくなく、多少陽性率の向上を来しても (7.7%)、その反面、スタンプ塗抹陽性 (少数菌) 例が陰性化する傾向があり、殊に、それは NaOH 法で極めて著しく 20% にも達した。最後に、検査器具を清浄にすることが最も重要であることを強調し、これには、5% 重曹水の煮沸処理が最も簡単で有効なことを強調したい。

結 論

1) 6 ヶ月乃至 2 年余に亘る数回の検査にも、菌が陰性であった症例について、168 個の皮疹を 2 mm のトレパンで採取し、塗抹法と集菌法 (NaOH 及びクロロホルム法) とにより癩菌の検出を試みた。

2) 皮片採取塗抹法 (snip) は小切開 (slit) 法より多

少優るようであるが、後者を丁寧に行えば實際上、成績に殆ど差はないと思われる。集菌法は、材料が余りに小さいため、苛性ソーダ法にせよ、クロロホルム法にせよ、一方で多少陽性率を増すとしても（10% 以下）、他方では却ってこれを低下させる。殊に、それは苛性ソーダ法で著しい。即ち、手技の繁雑な割に効果は少い。結局、真皮より皮下にかけての組織を十分に塗抹するなら、slit (scraping) 法、即ち、慣用の塗抹作製法が簡単で実用に適し、効果もトレパン (snip) 法や集菌法に劣るものではない。

4) 器具の清浄化には5% 重曹水煮沸洗滌が最も簡単で有効である。

文 献

- 1) Alvarez: cited by Wade in (14)
- 2) Arnold, H. L., Jr.: Modern concepts of leprosy. Springfield, U.S.A. 1953, p. 34
- 3) Dharmendra: Studies of the lepromin test. (9) A bacillary antigen standardized by weight. Lep. India, **14**, 121 (1942)
- 4) Dharmendra and N. Mukerjee: A simple method of concentration of leprosy bacilli from "closed" cases of leprosy. Lep. India, **24**, 169-177 (1952)
- 5) Figueredo, N. and S.D. Desai: Positive bacillary findings in the skin of contacts of leprosy patients. (Reprint.) Intern. J. Lep., **18**, 59-66 (1950)
- 6) Figueredo, N. and S.D. Desai: A new method for the detection of leprosy in neural cases and contacts. Indian J. Med. Sci., **6**, 296-301 (1952); (abst.) Intern. J. Lep., **21**, 128 (1953)
- 7) Kar, S., E.P. Elliston and C.E. Taylor: Field method for concentrating *Mycobacterium laeprae* in skin leprosy specimens. Intern. J. Lep., **32**, 18-23 (1964)
- 8) Khanolkar, V.R.: A concentration method for acid-fast bacilli in skin biopsies from leprosy patients. Lep. Rev., **23**, 133-138 (1952)
- 9) Khanolkar, V.R. and K. Rajalakshmi: A method for concentration of acid-fast bacilli in skin biopsies from leprosy patients. Lep. India, **24**, 47-61 (1952)
- 10) Lowe, J. and E.B. Christian: Bacteriological examination in leprosy. Indian J. Med. Res., **19**, 867 (1932)
- 11) Maddock, R.K.: Skin scrapings in leprosy; positive results by the Wayson technique in 84 supposedly arrested cases. J. Amer. Med. Assoc., **148**, 44-45 (1952)
- 12) Muir, E.: Manual of leprosy. E.S. Livingston, Ltd. 1948, p. 84
- 13) Souza Araujo: cited from Arnold in (2)
- 14) Wade, H.W.: The bacteriological examination in leprosy. Lep. Rev., **6**(2), 2-8 (1935)
- 15) Wade, H.W.: Skin scrapings in leprosy. (Corres.) J. Amer. Med. Assoc., **149**, 1595 (1952)
- 16) [Manila Congress]: Intern. J. Lep., **1**, (1933)
- 17) [第39回 日本癩学会総会特別報告] 癩病勢並治癒判定基準, レブラ, **35**, 100-103 (1966)