

# 塗抹検鏡

江口 洋<sup>1)</sup> Hiroshi Eguchi

1) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 眼科分野

〒 770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15

E-mail : hiroegu0113@gmail.com

## 意 義


角結膜感染症で塗抹検鏡をすることの最大の意義は、塗抹像は起炎微生物が同定される前に開始しなければならない初期治療（empiric therapy：エンピリック治療）の判断材料となることにある。細菌の種同定には、研究室でも48時間は必要であり、臨床では3ないし4日を要することが多い。真菌の場合は1週間程度かかることが多く、長ければ1カ月を要することもある。一般眼科診療所でのウイルスやアメーバの分離は難しい。したがって、臨床サンプルの培養結果が判明していない状態で、できるだけ確なエンピリック治療を開始するためには、患者の疫学情報・臨床所見に加え、角結膜擦過物や眼脂の塗抹像を考慮した薬剤選択が必要である。

次なる意義は、角膜擦過物を塗抹検鏡する際に、角膜上皮を搔爬し実質を露出することで、角膜実質への薬剤透過性を高めることである。抗真菌薬の多くは角膜透過性が低いため、診断目的の塗抹検鏡を実施してから薬剤を投与することで、治療効果も期待できる。アカントアメーバ角膜炎では、角膜搔爬そのものが重要な治療方法の一つである<sup>1)</sup>。

## 方 法

### 1) 準備するもの

#### ①スライドガラス数枚

断端はフロスト加工（1）を、ガラス表面は剝離防止用コーティング加工をされているものがよいが、いずれも必須ではない

#### ②滅菌済みの綿棒

綿球径が4mm未満のものがよい

#### ③円じん刀、角膜異物針、注射針（23G～27G）など

角膜実質を搔爬・擦過できる滅菌済みの物品

### 2) 塗抹方法

#### ①眼脂の場合

比較的多く採取できるため、複数枚のスライドガラスを準備する。

綿棒で眼脂を絡めとり、スライドガラスの中央にできるだけ薄く塗布する。漿液性眼脂の場合は、綿球の先端をスライドガラスに軽くスタンプするように塗抹してもよい。

#### ②角膜の場合

円じん刀や異物針で擦過した角膜を、スライドガラス中央に塗布

深層を塗抹したい場合は、注射針をチストーム状に加工し（必須ではないが、加工したほうが操作しやすい）、擦過した際に生じる実質片を塗

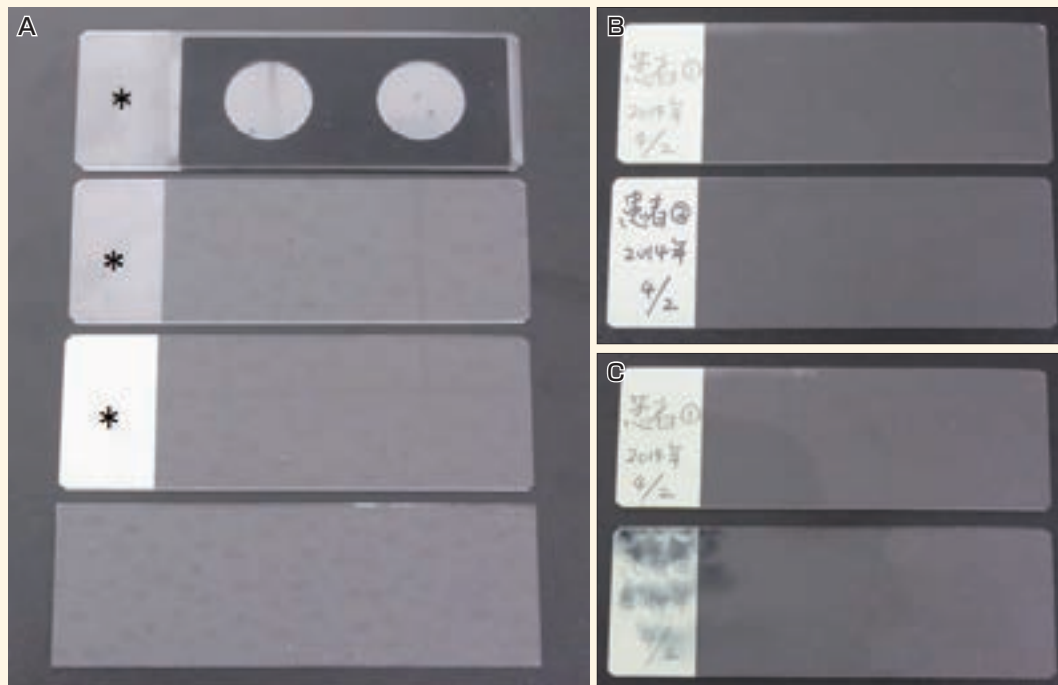


図1 塗抹に使うスライドガラス

A：各種スライドガラス。フロスト加工（\*）部にサンプルIDを記載できる。

B：鉛筆書き（上）と油性マジック書き（下）。最初はどちらも判別できる。

C：脱色後。油性マジックで記載しても脱色で文字がにじむことがあるため、鉛筆書きが望ましい。

抹する。

擦過物を採取するのが難しい場合は、滅菌済みのスライドガラスを擦過後の角膜に直接押し当てても塗抹できる。

### ③塗抹時のコツ

分厚く塗抹されると染色ムラを生じ、検鏡時の判断ミスにつながる。塗抹後に厚みがある場合は、もう1枚のスライドガラスを斜めに押し当てながら、一拭きしてスメアする。スメアでは、血液サンプルのようにカバーガラス（厚さ0.12～0.17mm）を用いると割れてしまうことがある。

塗抹組織をしっかりと固定させることが重要である。急ぐ場合は、2～3分風乾した後に、スライドガラスを水平に置きエタノールを霧吹きで噴霧するとよい。エタノール入りのびんにスライドガ

ラスを浸す場合や、エタノールを流しかける場合は、十分に風乾させていなければならない。アルコールランプやガスバーナーがある場合は火災固定でもよいが、極端な加熱は禁物である。

## 染色の種類

### 1) ディフ・クイック染色（Diff-Quik stain™）

ギムザ染色迅速簡易法である。厳密なギムザ染色は時間を要するため、臨床ではディフ・クイック染色（Diff-Quik stain™）の使用が推奨される。最大の利点は、簡便かつ短時間でできることである。染色行程は約1分で終了し、乾燥・固定を含め、塗抹から約7～8分後には観察可能となる。青紫色主体の像だが、得られる染色像は鮮明であ

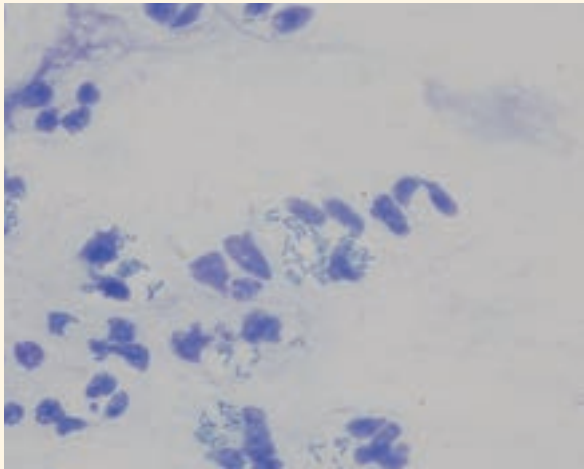


図2 眼脂のディフ・クイック染色像 (×1000)  
白血球と桿菌の存在が鮮明に染色されている。

り (図2), 細菌, 真菌, アメーバ (嚢子: シストのみ染色される) などが判別できる。好酸球性顆粒が鮮明な赤橙色に染まる (図3) ため, アレルギー性疾患との鑑別にも有用である。

## 2) グラム染色

ハッカー変法, フェイバー法, パーミー法などがある。染色液 A (クリスタルバイオレット, ゲンチアナバイオレット) で陽性部を染め, ルゴール液かアルコールで脱色後, 染色液 B (サフラニン, フクシン) で陰性部を染める。いずれも市販の製品の取り扱い説明書通りに実施すれば, 容易に染色できる。最大の利点は, エンピリック治療の判断材料になることである。起炎菌が細菌の場合, その形態とグラム染色性で, グラム陽性・陰性・球菌・桿菌の4分類ができる (図4)。サンプルの由来とグラム染色像だけで, 臨床的にはほぼ確定診断に至る症例もある。短時間で実施できる (染色行程は5分以内に終了し, 乾燥・固定を含めても塗抹後約15分で観察できる) こと, およ

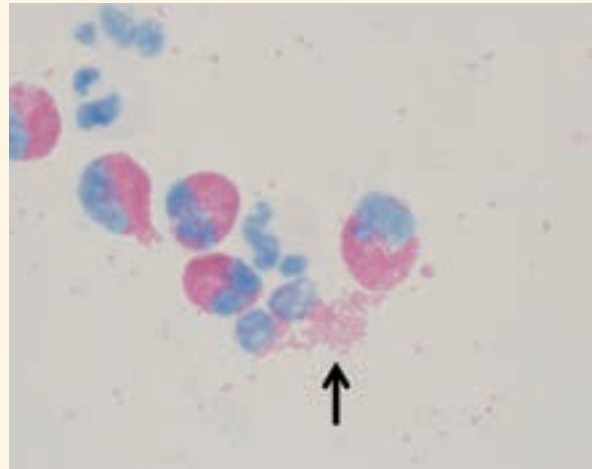


図3 好酸球 (×1000)  
好酸球性顆粒が赤橙色に染色されている。脱顆粒像 (矢印) も確認できる。

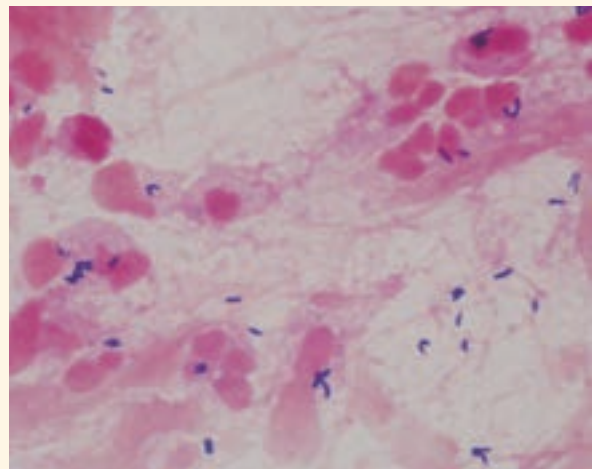


図4 眼脂のグラム染色像 (×1000)  
陰性所見 (赤) 背景にグラム陽性桿菌が青紫色に染色されている。

び安価であることも利点である。

## 3) 特殊染色 (蛍光顕微鏡が必要なもの)

### ① ファンギフロラ Y<sup>®</sup> 染色

キチンやセルロースなどのβ構造をもつ多糖類が特異的に染色されるため, 真菌やアメーバシストが染色され (図5), 診断に有用である。染色行程が約20分で施行できること, プレパラート

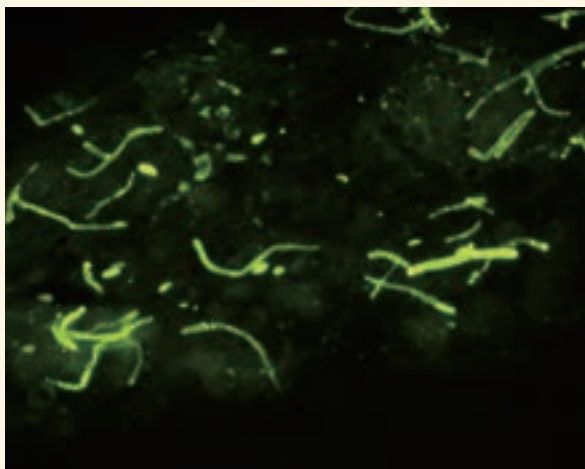


図5 角膜擦過物のファンギフローラ Y<sup>®</sup> 染色像 (× 200)  
真菌が染色されている。

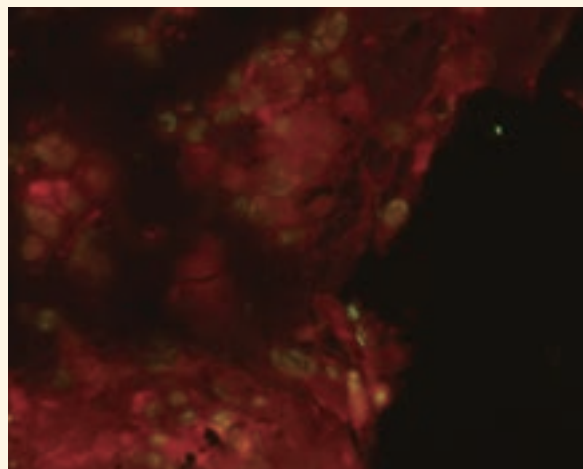


図6 角膜擦過物の HSV-1 蛍光抗体法 (× 200)  
陰性所見 (赤) の中にウイルスに感染した上皮細胞がアップルグリーンに染色されている。

の長期保存ができることも利点である。

## ② 蛍光抗体法 (HSV-1, -2)

蛍光色素標識抗 HSV-1, -2 抗体と、サンプル内のヘルペスウイルスとの反応を観察できる (図6)。全染色行程は約 20 分だが、厳密にはマイクロピペットやプレパラートの湿潤を保つ環境が必要であり、研究施設のみで施行されている。

## 染色のコツと落とし穴

### 1) グラム染色

きれいな染色像を得るための最大のポイントは、脱色を十分に行うことである。脱色不良 (図7) では、陽性か陰性かの判別を困難にし、グラム染色の利点を半減させる。人体由来の組織はすべてグラム陰性 (赤色) に染まること、グラム陰性の所見は脱色後に染色液 B で初めて染色されることから、脱色後に塗抹部位が肉眼で明らかに判別できるほど紫に染色されていたら、おおむね脱色不良である。脱色操作の鍛錬には、グラム陰

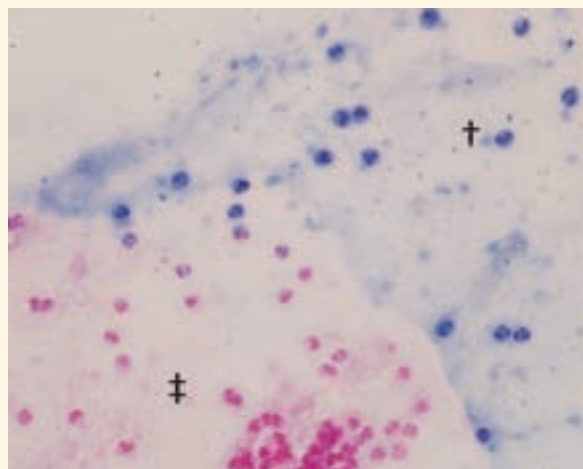


図7 グラム染色での脱色不良 (× 100)

右上の領域 (+) は脱色不良ゆえに、白血球の核や細胞質が青紫に染色されたままである。本来は左下の領域 (×) のように染まらなければならない。

性菌のコロニー染色をするとよい (図8)。十分な脱色操作後には、塗抹部がすべて白く抜けてしまうが、それでも、グラム陰性の所見はしっかり染色される。ただし、仮にグラム陽性の所見であっても長時間脱色するといずれは色が抜けるので、過剰な脱色 (5 分以上脱色液に浸漬するなど) には注意する。

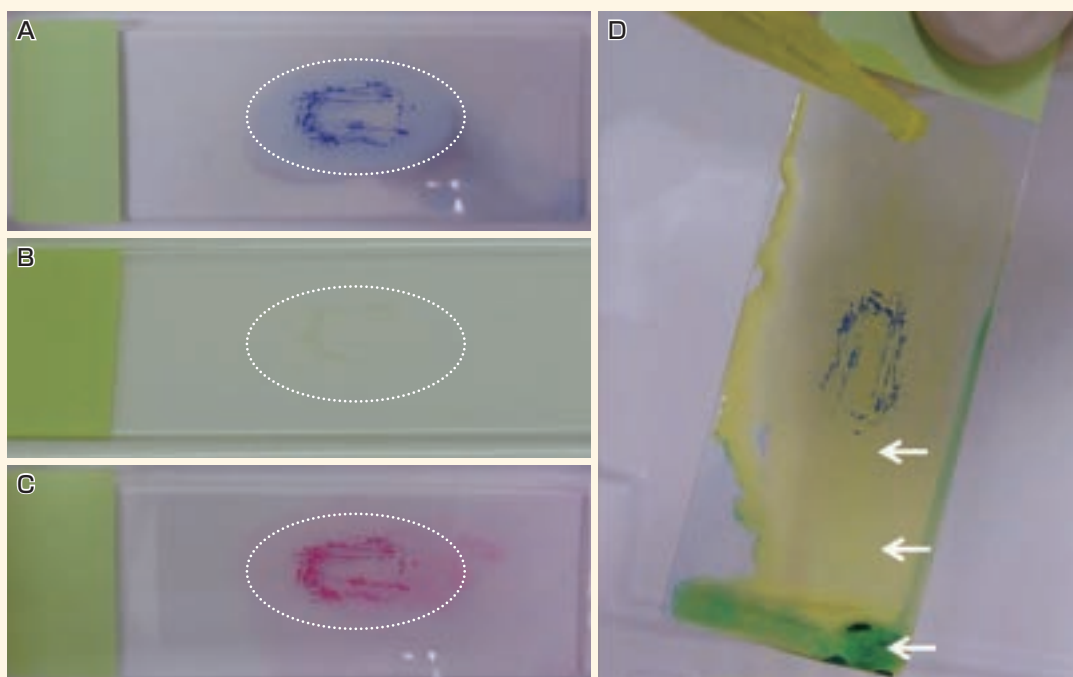


図8 緑膿菌（グラム陰性桿菌）のコロニー染色

- A：陽性所見。染色液Aで染めると塗抹部（点線）はいったんすべてが紫色に染まる。  
 B：脱色後。十分な脱色でグラム陰性部は白く抜け、肉眼では判別しにくくなる。  
 C：陰性所見。十分な脱色後でも染色液Bでグラム陰性部は赤色に染まる。  
 D：脱色操作。染色液Aがにじみ出している（矢印）うちは脱色不足である。

## 2) 蛍光抗体法での染色

非特異蛍光の判別には注意を要する。スライドガラスにもともと付着していた、あるいは塗抹時に付着した小さな埃などは、一見すると真菌のようにも見えてしまう。紫外線で異常に励起され、ほかの塗抹部よりも明らかに鮮明なものも多くは、非特異蛍光と考えてよい（図9）。

### トピック

近年、グラム・ファンギフローラ Y<sup>®</sup> 二重染色の有用性が報告されている<sup>2)</sup>。先にグラム染色を完結させ、プレパラートの余分な水分を除去した後、ファンギフローラ Y<sup>®</sup> 染色の B 液（蛍光染色



図9 埃. 非特異蛍光 (×200)

一見すると真菌のようである。

液) を 2～3 分滴下するのみで実施できる。簡便かつ短時間で、一つのプレパラートにおいてグラ

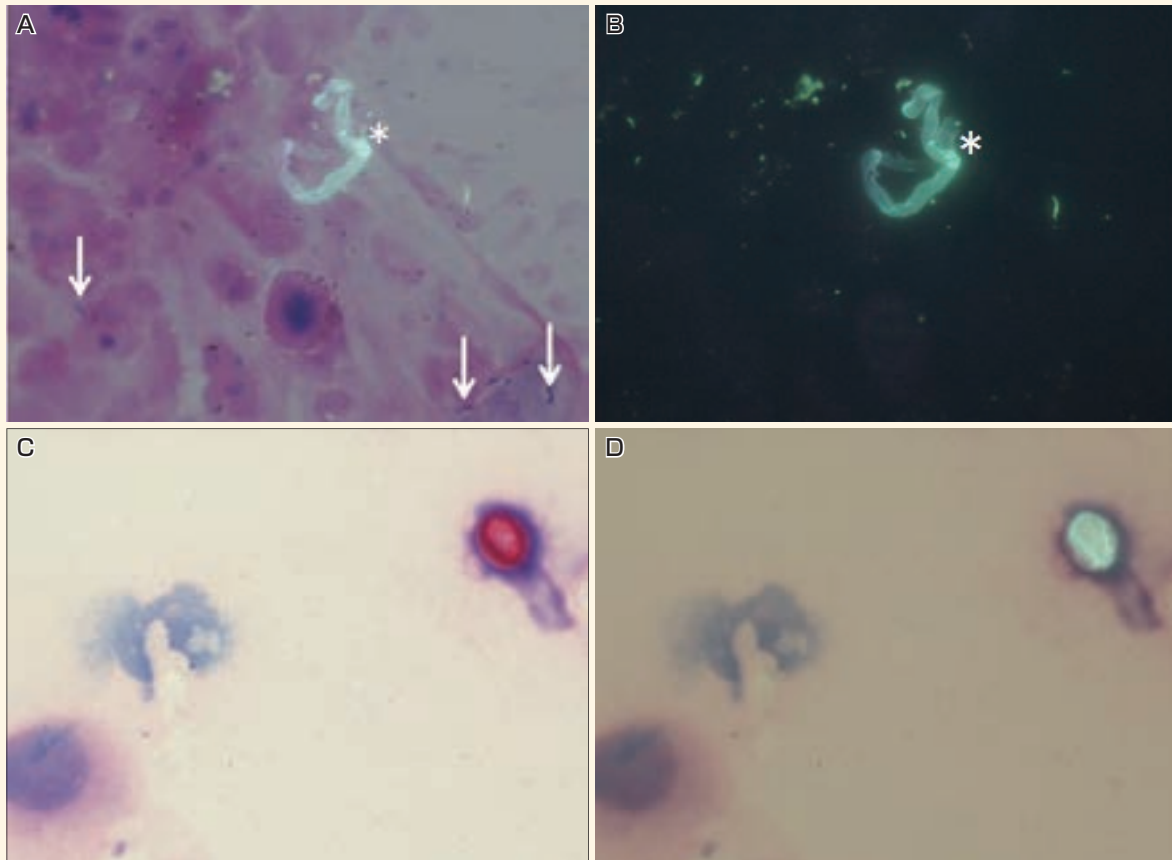


図 10 グラム・ファンギフローラ Y<sup>®</sup> 二重染色 (すべて× 1000)

- A: 光源と紫外線を ON. グラム陽性桿菌 (矢印) と真菌 (\*) が確認できる.  
 B: 光源を OFF. 通常のファンギフローラ Y<sup>®</sup> 染色像になる.  
 C: 光源と紫外線を ON. 角膜上皮細胞, 白血球, シスト様の物体が見える.  
 D: 光源を絞り紫外線を ON. 二重壁構造のシストが明瞭になる.

ム染色像とファンギフローラ Y<sup>®</sup> 染色像を同時に観察できる (図 10) ことが利点である.

### 文 献

- 1) Ishibashi Y, et al. Oral itraconazole and topical miconazole with debridement for Acanthamoeba keratitis. Am J Ophthalmol. 109, 1990, 121-6.
- 2) 宮崎 大ほか. 感染性角膜炎におけるグラム・ファンギフローラ Y<sup>®</sup> 二重染色の有用性. 日本眼科学会雑誌. 117, 2013, 351-6.