

教育シンポジウム 6

簡便な真菌検査法

藤 広 満智子

掛斐厚生病院皮膚科

I. はじめに

皮膚科医にとって真菌検査は、内科医の聴打診に匹敵する基本的な検査である。しかし、顕微鏡や検体採取用の器具、20% KOH 溶液の準備など越えなければならないハードルがあり、手間と時間を必要とするため、慣れていないと敬遠しがちである。そこで、ここではひとりでも診察中に片手間にできる、必要最低限の検査法を紹介する。これは、短時間にできて、器具は手の届く範囲にあり、患者にやさしく、消毒・滅菌操作が省略され、必要なら学会報告もできるというたいへん便利な“手抜



図 1. 真菌検査器具一式

き真菌検査法”である。

そのポイントは、①鱗屑採取には、先端に溝のない口腔用摂子または眼科用曲クーパーを、患者ごとに酒精綿で拭いて繰り返し使う。②生毛部白癬にはセロファン粘着テープ（以下“テープ”）を使う。③培養はその摂子を使ってマイコセル斜面培地に、またはテープに付けたまま Actidione, chloramphenicol 添加サブロー平板培地（以下“ACS平板”）に植える。④KOH 標本の加温は顕微鏡の光源の熱などを使う。⑤スライドカルチャーはスライドグラスなしで行う。⑥培養はすべて室温で行う。などである（図 1～4）。特にテープはさまざまな使い方があるので、まずそれを紹介したい。

II. セロファン粘着テープを用いた真菌検査法

皮膚に寄生し、病巣を形成する皮膚糸状菌は、汚染菌として検出される危険性は非常に低い¹⁾。そのため滅菌してないテープを鱗屑の採取、鏡検、培養に利用できる。テープで検体を採取するメリットは、多量の鱗屑が、患者に痛みを与えることなく得られることである。

その手順は

- 1) 皮膚貼付試験の前処置のように、幅 18mm のテープで白癬病巣の辺縁付近から剥離を数回くりかえし、病巣の皮脂やよごれを取り除く。そのテープは捨てる。
- 2) 同一部位を長さ 9 cm のテープの中央で 2, 3 回剥離し、中央に集中して鱗屑を附着させる。その際病巣の中心から辺縁、健常部の方向に接着剥離を繰り返すと



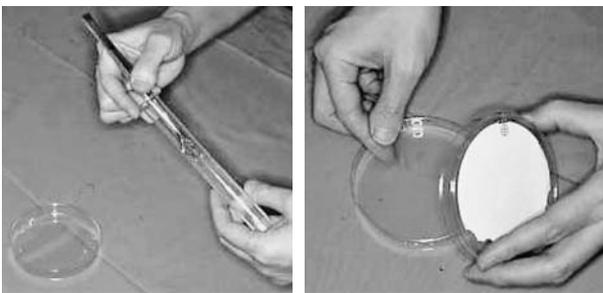
図 2. マイデスク



診察機の引き出し

冷蔵庫の上

図3. 培養は室温で十分. 高いところが暖かいので最適



斜面培地への接種

平板培地へのセロテープ接種

図4. マイコセル培地への接種法



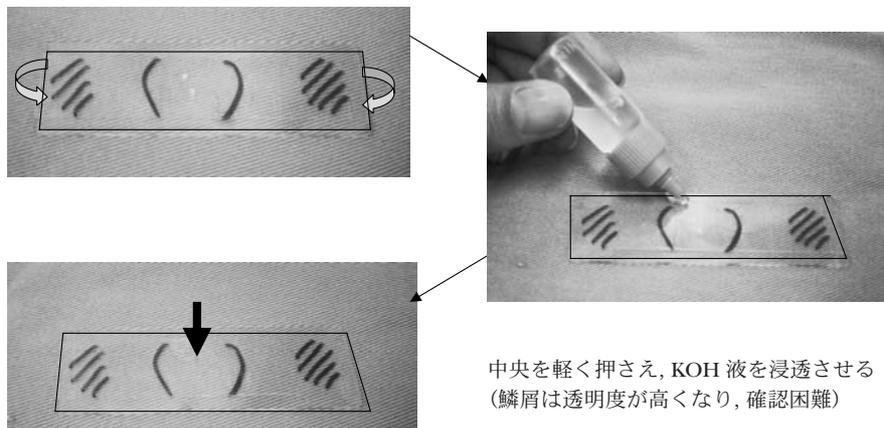
図5. セロテープを病巣の辺縁に貼り付けて数回ストリッピングする

うまく鱗屑が採取できる. 必ず肉眼的に確認できる大きさの鱗屑を採取する (図5).

- 3) スリガラス部分のないスライドグラスに, 鱗屑の付着した中央をわずかに浮かせて貼り付け, それ以外の部位を指でしっかりスライドグラスに接着させる. 両端をスライドグラスの裏まで貼り付けるとよい. 鱗屑の付着している部分をマーカーでマークし, すきまに少量のKOH液を入れ, 鱗屑が液に浸るようにかかるく上からおさえる (図6). なお, KOH液はDMSOを含まない方が粘度が低く入れやすいので, できれば自家調整したものがよい.
- 4) 室温で数分待ってコンデンサーを下げた顕微鏡で鏡検する (図7). テープが波打つので温めてはいけない. 両端を密着できていないと, KOH液を入れる際にスライドグラスからテープがはがれて失敗する. 慣れないうちは, 中央の検体付着部をカバーグラスと同じくらいの大きさに切って鏡検したほうが, 広くKOH液に浸って見やすいが, 対物レンズが接触しないように気をつける (図8).
- 5) 培養が必要な場合はもう1枚の2, 3cmのテープで鱗屑を剥離して, ACS平板に接着面を下にしてそのまま植える.
- 6) ビニールテープでシャーレを密封し, 室温で培養する (図9).

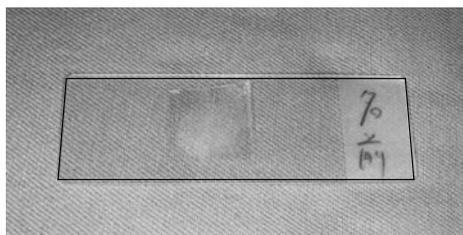
この方法は主として股部白癬, 体部白癬などの鱗屑が薄い生毛部白癬に応用している. 肉眼的に鱗屑がはっきりしない場合でも確実に採取でき, 慣れると鱗屑のはがれ方で白癬やカンジダ症がわかるようになる. 足白癬は鱗屑が厚く, テープでは採取しにくいこと, 足には雑菌が多く付着していることから適応ではないが, 摂子を怖がる小児の足白癬には有用である.

この他にもテープは癬風の自己診断 (色素斑に一致して剥離できる細かい鱗屑) (図10), 鱗屑・毛などの検体の保存 (スライドグラスに貼り付けて), それらの輸送手段として利用できる. たとえば訪問看護師が患者宅から持ち帰ったテープ検体を外来で鏡検し, 真菌症の診断をすることも可能である. 最近では, *Trichophyton tonsurans*

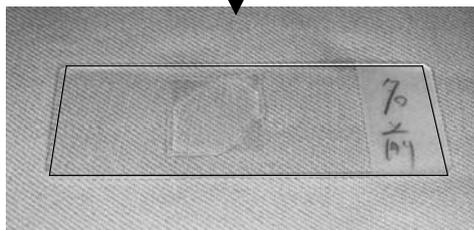


中央を軽く押さえ, KOH液を浸透させる (鱗屑は透明度が高くなり, 確認困難)

図6. セロテープKOH標本の作り方: 中央をわずかに浮かしてスライドグラスに貼り付けて斜線部分を密着させる. 裏まで貼り付けるとよい.



カバーガラス大のセロテープで鱗屑を剥離し、スライドガラスに置く



毛細管現象を利用し, KOH 液を隙間に入れる数分後に鏡検

図7. セロテープ小片を使った KOH 鏡検

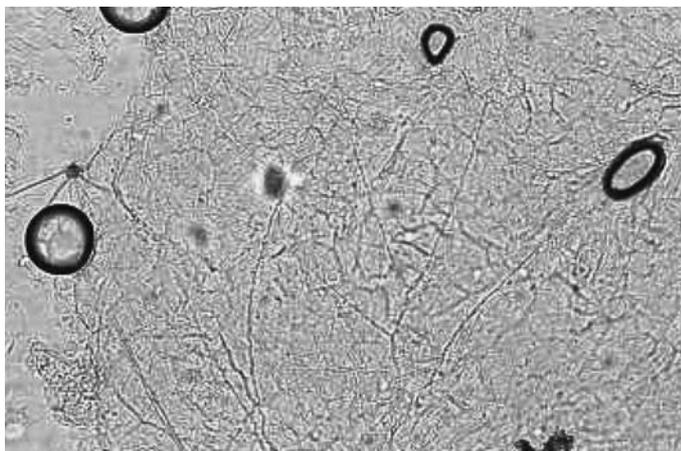


図8. セロテープ KOH 標本中の皮膚糸状菌

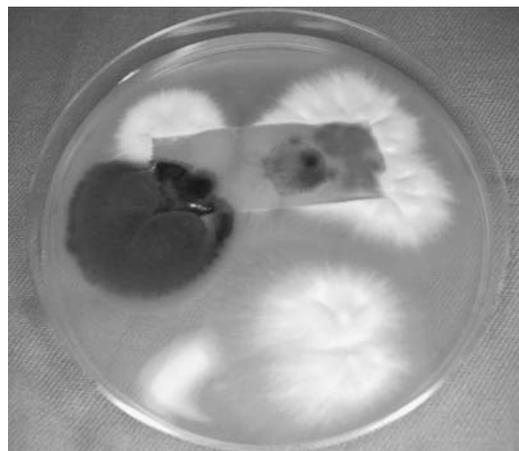
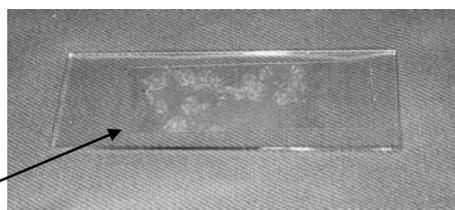
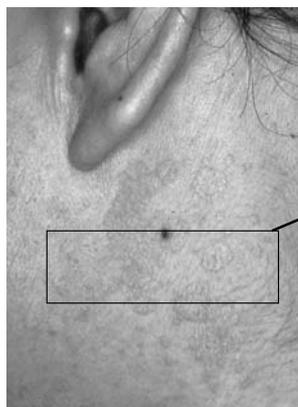
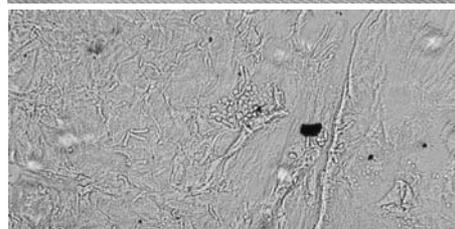


図9. セロテープ培養したマイコセル平板上の *T. rubrum*



セロテープに付着した色素斑に一致した細かい鱗屑



セロテープ KOH 法 (短い菌糸と孢子塊)

図10. 癬病巣のストリッピングによる自己診断

感染症が疑われる場合に、検体を付着させたテープをクリアファイルに貼り付け、封筒に入れて郵送してもらうよう東海地方の開業医の先生方をお願いしている。

この方法の欠点は、セロファンは親水性なので KOH 処理後 30 分以内に鏡検しないと波打って観察しにくい点、培養では雑菌のコンタミが多い点である。しかし、

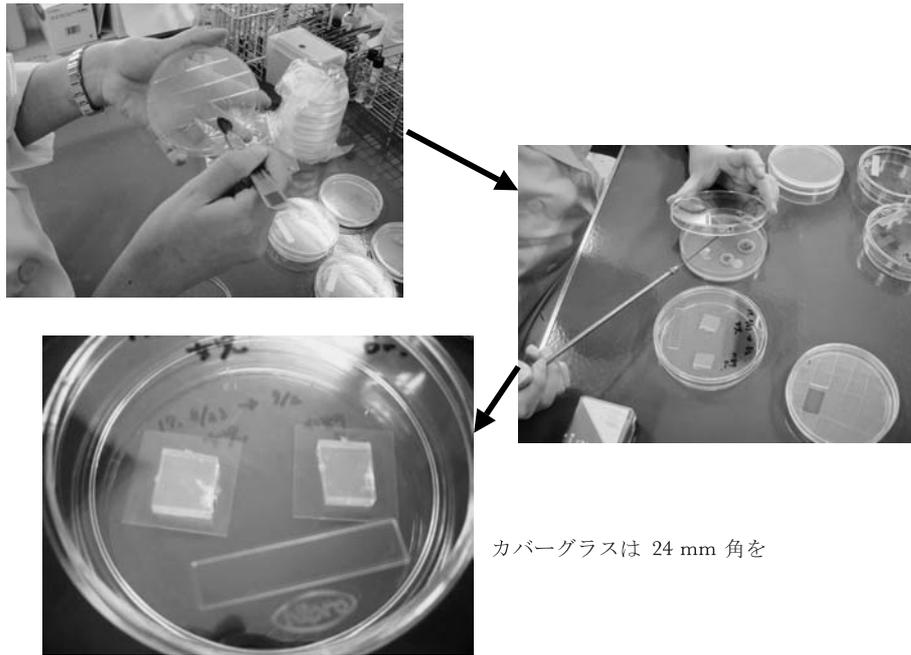


図11. スライドガラスを使わないスライドカルチャーの方法

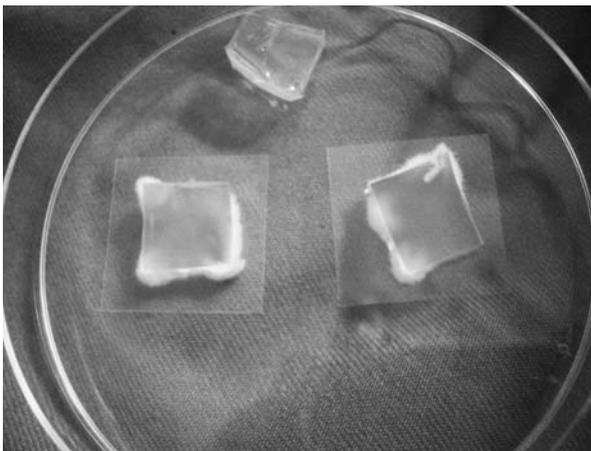


図12. スライドカルチャー2週間後



図13. *T. tonsurans* のスライドカルチャー1週間後
(シャーレの裏面から観察, 無染色(×100))

生毛部白癬の培養陽性率は90%と、従来法と比較して遜色はない²⁾。これは採取できる鱗屑量が多いためと考えられている。

III. スライドガラスを使わないスライドカルチャー

皮膚真菌症の学会報告のためには、菌のマクロの所見を示す平板培養とともに、ミクロのそのスライドカルチャーが必要である。2～4週間培養してカバーガラスをはずし、ラクトフェノールコットンブルーで染めて鏡検するのが通常のやり方だ。しかしプレパラートが完成してから、同定に必要な孢子が確認できず、再度行うこともある。そこで発育の様子が裏から経時的に観察ができる、つまり懸滴培養を兼ねたスライドカルチャーをシャーレ内で行っているので紹介する(図11, 12)。

- 1) 薄めに作成したACS平板培地をスライドカルチャー用に1 cm 四方に切る。
- 2) 滅菌シャーレに2個培地片を離して置く。

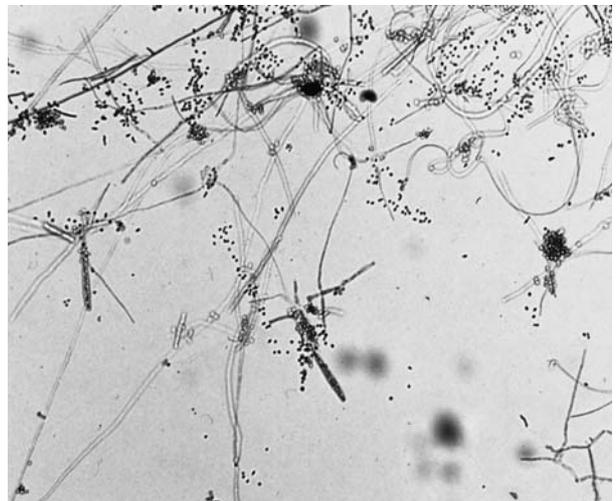


図14. *T. mentagrophytes* のスライドカルチャー所見
(ラクトフェノールコットンブルー染色×100)

- 3) 培地片にそれぞれ2, 3か所菌を接種する.
- 4) 火炎滅菌したカバーガラスを被せ, 軽く押さえる.
- 5) 湿度を保持する目的でもうひとつ培地片をシャーレの隅に入れる.
- 6) ピニールテープでシャーレを密封し, 室温で培養する.
- 7) 培養1週間目ころから, シャーレを逆さにして裏面から菌の発育状況を顕微鏡で観察し (図13), 目的の胞子が観察されたらカバーガラスを取り, コットンブルー染色標本作製する (図14).
- 8) 長期に保存したいコットンブルー染色標本は, カバーガラスの周囲を好みの色のマニキュアで封入する. 透明なものは封入されているかどうかわかりにくいので色のあるマニキュアがよい.

以上が当院で日常的に行っている真菌検査法である. 環境菌などアクチジオンの添加されたACS培地では発育できない菌の培養用に, サブロー培地は常に冷蔵庫に準備してある. しかし皮膚真菌症の原因菌の99%以上を

占める皮膚糸状菌やカンジダはACS培地で十分発育し, スポロトリコーシスを引きおこす, *Sporotrix schenckii* や, クロモミコーシスの原因菌として多い, *Fonsecaea pedrosoi* も十分発育する.

ここに紹介した手抜き法は, まず医真菌学会標準化委員会の提案した真菌検査法³⁾に従ってある程度の件数の鏡検, 培養を実施した後に試すことが望ましい. 手間を惜しまない真菌検査は診断技術の向上に欠かせないので, 是非テープ法を真菌検査に慣れる手段として試していただきたい. またすでに真菌検査に習熟している方は工夫のヒントとしていただければ幸いである.

文 献

- 1) 藤広満智子: 足白癬患者からの白癬菌散布状態の検討. 真菌誌 34: 43-55, 1993.
- 2) 藤広満智子: セロファン粘着テープを用いた生毛部白癬診断法. 皮膚臨床 38: 893-895, 1996.
- 3) 山口英世, 他: 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1992~1994年). 真菌誌 36: 61-86, 1995.