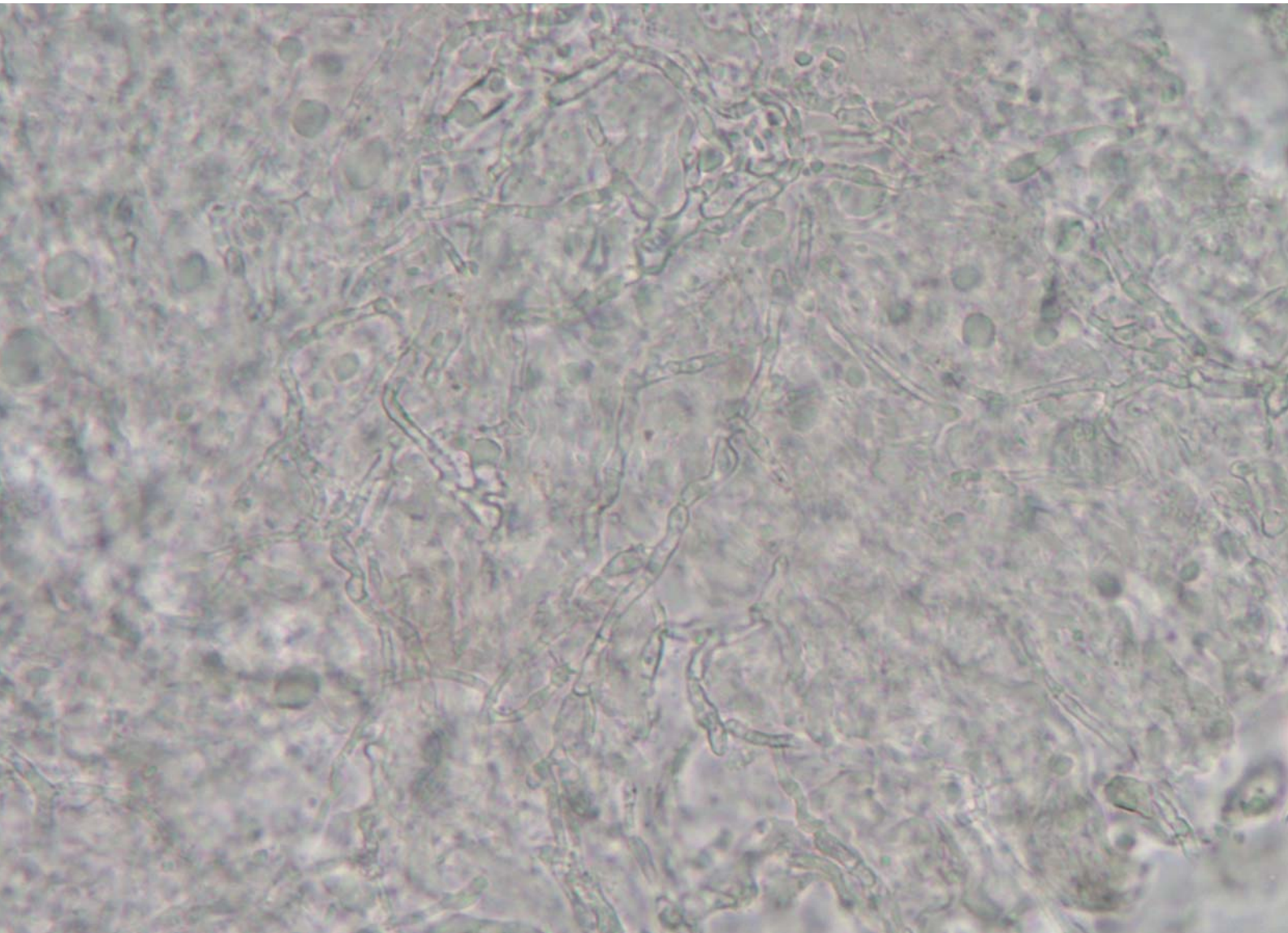


皮膚科医のための
真菌講習会テキスト



金沢医科大学皮膚科学講座

編集にあたって

金沢医科大学 皮膚科学
望月 隆

皮膚真菌症は最も common な皮膚疾患のひとつであり、皮膚科診療の中でも大きな割合を占める。本症の診断法や診療のコツは、比較的最近までは大学の医局において先輩医師から後輩へと伝授されていた。しかし、近年の免疫学や皮膚生物学の急速な進歩にともなって皮膚科学者の興味が放散し、真菌症自体が研究テーマとして取り上げられることは少なくなった。そのためか、研究とは異なる次元であるべき真菌症診療の教育までもが軽んじられてきた感がある。

さて金沢医科大学皮膚科では当時の石崎 宏教授の立案によって1988年より毎年1回若手皮膚科医を対象とした真菌講習会を開催し、昨年まで30回を重ねてきた。この間に *Trichophyton tonsurans* 感染症の out break が起こり、その対策を求められるなど皮膚科医が社会から求められるものも様変わりしている。そのため、平成27年にも講習内容を再検討しテキスト第3版を編纂したが、近年の知見の加筆、付図の整備、一部では記述の簡略化を行い、一方でマニュアルとしての機能を高めるなどの改訂版をAMEDの補助金を受けて発行することとした。また、研修医や皮膚科専攻医に限らず、すべての皮膚科医の皆さんに目を通していただきたいとの考えから、テキストのタイトルから「若手」の文言を外した。

このテキスト、講習会によって皮膚科医の皆さんの皮膚真菌症への理解が深まり、適切な診療につながることを期待したい。さらに講習会に参加できなくとも、これを自学自習の参考書にしていただければ幸いである。

平成31年2月吉日

このテキストの刊行は国立研究開発法人日本医療研究開発機構AMED（課題番号JP18fk0108008）の支援を受けた。

皮膚科医のための皮膚真菌症カリキュラム

概要

皮膚科専門医として皮膚疾患を適切に診療するために、皮膚真菌症の基礎的知識、診断技術、標準的治療法を理解し、身につける。

到達目標

- 1 白癬、カンジダ症、マラセチア症の患者から適切な検体を採取することができる。
- 2 KOH 直接検鏡法により真菌要素を検出ことができ、その際、菌様モザイクなど菌要素以外の構造物を明瞭に区別できている。
- 3 真菌培養の適応疾患と標準的な培養法を述べることができる。
- 4 深在性皮膚真菌症を疑った際に真菌培養を行うことができる。
- 5 培養された *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*(*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*)、*T. tonsurans*、*Microsporum canis*、*Sporothrix globosa*、*Fonsecaea monophora*、*Candida* 属真菌、*Aspergillus* 属真菌（汚染菌としても重要）を鑑別、同定できる。
- 6 典型的な表在性真菌症、深在性皮膚真菌症を列挙し、その症状と治療法を述べることができる。
- 7 皮膚真菌症の診断に必要な検査用物品を列挙でき、調達できる。
- 8 インターネット上で医真菌学の情報を検索できる。
- 9 皮膚真菌症の診断、治療について相談できる。

目 次

編集にあたって	望月 隆
皮膚真菌症 概説	望月 隆 …………… 1
皮膚科医のための真菌検査法	望月 隆 …………… 15
よくみる皮膚真菌症原因菌の同定	安澤 数史 …………… 29

皮膚真菌症 概説

金沢医科大学 皮膚科学

望月 隆

はじめに

皮膚真菌症は皮膚科の日常診療で最も多くみられる疾患群の1つである。皮膚科医は皮膚の症状を詳細に観察し、診断を行なうというスキーム（思考方法の枠組み）を持つが、皮膚真菌症の診療ではしばしばこのスキームの破綻を経験する。皮膚真菌症の皮疹は1) 真菌の直接的な組織破壊、2) 真菌に対する宿主の炎症反応、免疫応答、3) 搔破や外用薬による二次的な変化、が種々の割合で複合して生じる。真菌の菌要素は微細であり、その大きさはヒトの目の検出限界を2桁下回る。したがって裸眼では菌を観察できない。また皮膚の炎症反応は原因が真菌でなくても生じてくる反応である。例えばIL-17が皮膚カンジダ症とともに、乾癬でも作動していることから両者が類似の皮疹を作り、鑑別には真菌検査が必要なことが理解されよう。そもそも *Trichophyton tonsurans* 感染症で菌が毛包に侵入すると炎症のない毛包一致性の微細な丘疹のみを示すことがあり、手慣れた皮膚科医でも皮疹の存在を確認することさえできないことがある。「皮疹が（見え）ない」皮膚疾患を皮膚科医はどのように診断すればいいのだろうか。

皮膚科専門医は、このように日常用いているスキームに限界があることを認識し、皮膚真菌症への対応が可能なスキームを意識的に構築することが求められている。

真菌の生物学的特徴

生物は三つのドメイン（Domain）、すなわち真正細菌（Bacteria）、古細菌（Archaea）、真核生物（Eukaryota）に分けられる。真菌（fungus, pl. fungi, 菌界: Kingdom Fungi）はこのうち真核生物ドメインに含まれる。真菌は自然界に広く分布するカビ、キノコ、酵母など100万種程度の種を含む大きな生物のグループである。このうちヒトの真菌症の原因菌として知られているものはせいぜい数百種、皮膚真菌症の原因菌は数十種類程度と考えられる。真菌は多糖

類からなる厚い細胞壁を持つが、鞭毛一本を細胞の後ろに持つ生物群（後方鞭毛生物、opisthokonta）に属するため、系統学的に動物に近縁と考えられ、これは近年の分子生物学的研究によっても支持されている。自然界では土壌や水中で生物の死骸などの分解者として大きな役割を果たす、いわば地球の「掃除屋」である。自然界に真菌がいることで不潔になるわけではなく、たとえば皮膚糸状菌症（白癬）の原因菌である皮膚糸状菌が含まれる一群の真菌は動物の角質を分解し、結果的に地表が動物の皮、毛や爪で覆われることを防いでいる。真菌は分布が広く、適応力も大きい地球最後の生物の一種になると予想される。さらにヒトは真菌の旺盛な成長力や強い分解力を利用し、それ自体を食品、薬品として摂取したり、発酵食品や薬品の製造に盛んに利用している。したがって、医真菌学は真菌を一方向からアプローチして捉えたにすぎず、その知見は真菌学全体から見ると部分的である。

真菌の構造は、核、ミトコンドリア、小胞体など細胞内小器官をもち、他の真核生物と同様の構造を示す（図1）。真菌の細胞膜に含まれる脂質の組成は動物細胞とは異なり、コレステロールに代えてエルゴステロールが用いられる。最外層の細胞壁はキチン、 β -グルカン、そして糖タンパク質よりなる¹⁾。

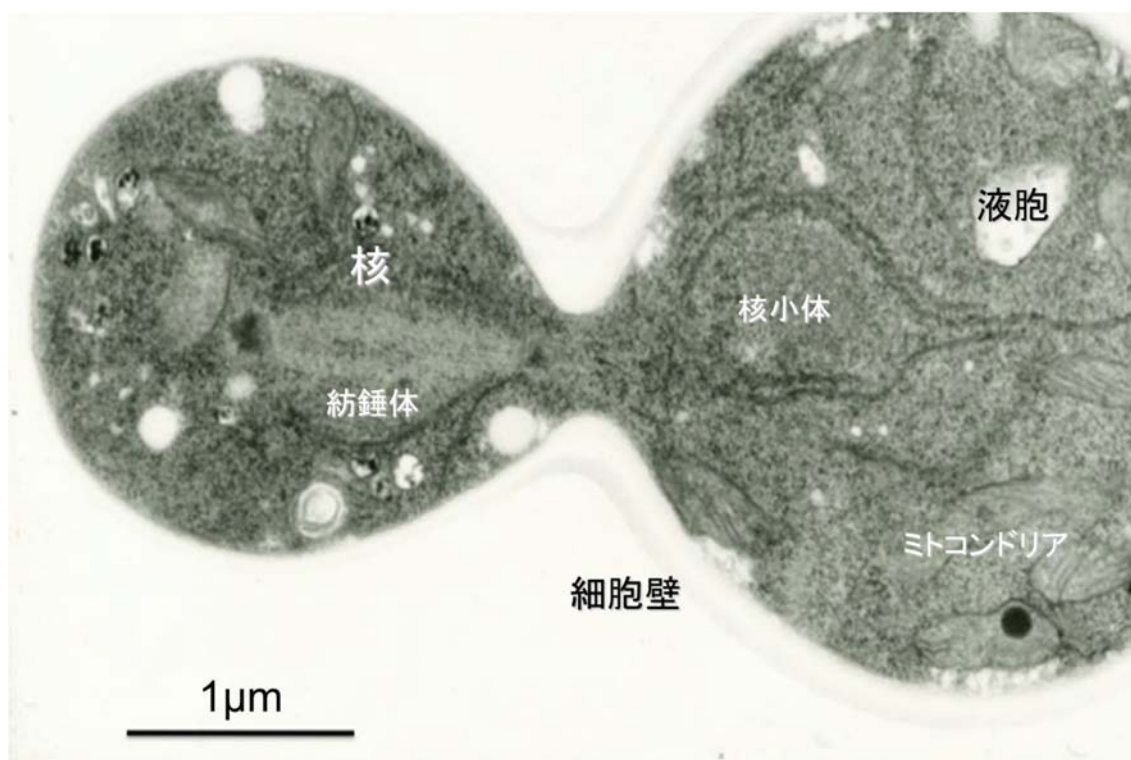


図1：真菌細胞の構造 (*Cryptococcus neoformans*)

真菌をどの様に分類し、命名するかについては、使用する分類のキーにより複数の分類体系が提示されてきた。したがって捉え方により相互に矛盾が生じ、場合によっては混乱が生じていた。近年分子生物学的方法の導入により系

統学的関係に基づいた分類が勢力を増しているが、ここでは今も使われている従来の分類法、そして分子生物学的方法について略述する。

真菌をコロニーの形態と細胞の性状から、湿性のコロニーを作り、出芽により増殖し、単細胞である酵母(yeast like fungi)と、乾いたコロニーを作り、多細胞の菌糸よりなる糸状菌(filamentous fungi, カビ mold, mould)に分ける方法がある。この方法は菌を略述するのに便利である。ただし培養条件によってはこの両方の形態を示す真菌があり(二形性真菌 dimorphic fungi)、*Candida* 属や *Sporothrix* 属など多くの病原菌がこの二形性を示す。

分類学上の階層のうち、とくに属(Genus)と種(Species)は肉眼的、顕微鏡的形態、とくに分生子の形状や形成過程、菌糸の形状で記載、命名されてきた。次いで有性世代のありかた、すなわち生殖の様式に対応して分類が行われ、門(Division)や綱(Class)の分類が行われた。その結果、病原真菌は接合菌門(Zygomycota)、子囊菌門(Ascomycota)、担子菌門(Basidiomycota)、そして有性世代が見つからない種の総称である不完全菌門(Deuteromycota)に分類されていた。もっとも不完全菌門でも交配試験によって妊孕性のある子孫の存在が確認されると新たに種として記載され、同時にしかるべき門に移されるので、皮膚糸状菌では多くの種が不完全菌門から子囊菌門に移されてきた。それと並行して寄生形態、培養形態に基づいた、あるいは栄養要求性や糖の利用能などの生理学的性状に基づいた分類も行われてきた。さらに皮膚糸状菌は生態学的に好土壌性菌(geophilic dermatophytes)、好獣性菌(zoophilic dermatophytes)、好ヒト性菌(anthropophilic dermatophytes)に分けると進化や臨床像との関連²⁾を理解しやすくなるので、この分類が現在も用いられている。

最近では分子生物学的方法を用いて系統関係に基づく分類が提案され、多くの新種が記載されるとともに、属、科(Family)、目(Order)などの上位の分類の変更が行われている。また遺伝子解析により不完全菌門の菌の再分類も行われた。ここには種や属の線引きをどのくらいの差で行うべきか定説がないことや、分析に適する遺伝子が属ごとに異なり、分類の基準の統一がなされていないという問題がある。そのため、分類が恣意的に見えることすらある。また形態学的に区別されていた種がある遺伝子では区別できない事例、形態学的に定義された種が遺伝子では新種を含む多くの種に細分類される事例が見られ、臨床上使いにくく感じられることも多い。このため、分子生物学的方法が必ずしも万能とはいえない。さらに分類や同定の元になる菌の命名規約の変更^{3,4)}に伴い、今後一菌種一菌名の動きが進むため、有性世代と無性世代との関係で理解されていた多くの皮膚糸状菌は名称が変わり、あるいは同じ菌名でも内容が変わってくるのが予想される。新旧の文献を調査する際にはとくに留意する必要がある。

皮膚真菌症とその特性

皮膚真菌症は表在性皮膚真菌症と深在性皮膚真菌症に分けられる。

表在性皮膚真菌症では菌の寄生が口腔や外陰部の粘膜、角層、毛、爪など皮膚の表面に限られる。本邦の代表的な表在性皮膚真菌症は皮膚糸状菌症（ほぼ全例が白癬、ごくわずかの黄癬、渦状癬を含む）、皮膚・粘膜カンジダ症、癬風であり、まれなものに黒癬がある。皮膚糸状菌症の病型では足白癬がもっとも多い。足白癬は医療者の間でも「水虫」と呼び慣わされているが、広辞苑（第7版、2018年）には「水虫」は「白癬菌による皮膚病の一つ。足の裏や足指のあいだなどに水ぶくれができたり皮膚が白くふやけたりただれたりし、かゆみが多いことが多い。汗疱。水瘡（みずくさ）」とある。したがって「水虫」は足白癬でも角質増殖のみを示す例や鱗屑が付着するだけの例（図2）は含まれず、また真菌が関わらない疾患も含まれる曖昧な用語である。まして巷間「水虫」と言われる状態は足白癬と同義ではない。*Malassezia* 属真菌や *Candida* 属真菌などは常在菌であり、一部の好ヒト性皮膚糸状菌も常在化していると見なしうるが、高温多湿の環境や皮膚の湿潤、ステロイド薬の使用、あるいは免疫能の低下により菌が増殖すると疾患として認知される。

深在性皮膚真菌症は、外傷を契機に菌が真皮以下に迷入し発症する原発性のものと、他臓器の真菌症から血行性に転移して真皮、皮下組織に病変を形成する続発性のものに分けられる。しかし感染した菌が体内から完全に除かれず潜伏感染の形で残存し、宿主の免疫の低下に乗じて内因性に発症してくる例がある。この判別は多くの場合可能であるが、クリプトコックス症ではしばしば原発性（外因性）か続発性（内因性）か判別が困難である。深在性皮膚真菌症ではスポロトリコーシスがもっとも多い。次いでクロモ（ブラスト）ミコーシス（黒色分芽菌症）やフェオヒフォミコーシス（黒色菌糸症）などの黒色真菌感染症、クリプトコックス症、深在性カンジダ症、まれなものに深在性皮膚糸状菌症（深在性白癬）などがある。これらの深在性皮膚真菌症のうちスポロトリコーシス以外の多くは弱毒菌による日和見感染として発症するため、宿主の抵抗性減弱のシグナルとみなしうる。

放線菌症、ノカルジア症や非結核性抗酸菌症、あるいは藻類によるプロトテコーシスは病変部の形状が深在性皮膚真菌症に類似し、経過も緩徐で、診断に培養が必要になるなど共通点があるため、慣習的に「皮膚真菌症類似疾患」として扱われている。

少し視点を変えて、皮膚真菌症を真菌の立場から見ると全く異なった面が見える。前述のように、病原真菌は外界より偶発的にヒトに感染する。真菌にとって自然界とヒトのいずれがより生存に適しているかを考えることも興味深い。培地に菌株を接種し、適切な温度で培養すると急速に発育するが、同じ菌種でも病巣では菌の増殖は遅く、あるいはスポロトリコーシスのよう



図2：足白癬：上：踵から土踏まずに強い角質増殖と亀裂がある。右足も同様であった。下：趾腹、足底に薄い鱗屑をつける。角質増殖や炎症はない。ともに痒みは訴えないが、白癬菌が陽性であった。

に菌要素が極めて少ないこともある。真菌症は自然治癒もあるし、もとよりヒトの皮膚に到っても、感染成立はおろか、付着さえ許されない場合がほとんどであろう。培地上での発育と異なり、生体は高温、低栄養（消化しにくい角層で覆われ、糖分が少ない）、角質の持続的更新、体内では低酸素状態であり、さらに活性酸素、抗体、その他の抗真菌作用のある物質を産生して常に菌を排除、不活化、破壊しようとするので、真菌にとって皮膚をはじめヒトの体は極めて生きづらい環境といえよう。このように真菌も「苦勞」して生きており、ようやくヒトとの折り合いを付けた結果が皮疹となって現れている。

皮膚真菌症の疫学

日本医真菌学会の疫学調査⁵⁾を見ると、皮膚科新患患者のうち13.8%が真菌症で、その99.9%が表在性皮膚真菌症であった。表在性皮膚真菌症全体からみた疾患の内訳は、白癬が87.1%、皮膚・粘膜カンジダ症が9.7%、マラセチア症が3.2%であった。さらに白癬全症例数に対する各病型の頻度は、足白癬63.0%、爪白癬34.0%、体部白癬7.4%、股部白癬4.1%であった。同時期に足・爪白癬の有病率を求めるために、足の疾患以外を主訴に受診した患者の足の大規模調査 (Foot Check 2007) がおこなわれ、その結果、足白癬の有病率は21.6%(日本全体での患者数は2500万人程度)、爪白癬は10.0%(1200万人程度)と推計されている⁶⁾。この疾患構造や原因菌には変遷⁷⁾があることが知られている。たとえば、高齢者に *T. interdigitale* による表在性白色爪真菌症が高頻度で見られること^{8,9)}、体部白癬、頭部白癬の主要原因菌は、1991年の調査¹⁰⁾では体部白癬、頭部白癬とケルスス禿瘡をあわせた症例のうち76.9%が *Microsporum (M.) canis* によると報告されたが、2006年の調査¹¹⁾では30.8%に低下していた、などである。また1991年の調査¹⁰⁾では全く見られなかった *T. tonsurans* が、2006年の調査¹¹⁾では38.5%を占めていた。この理由として少子・高齢化、スポーツやペットとの関わりの変化があげられる。とくに *T. tonsurans* による白癬は2000年頃から当初レスリング、続いて柔道、少し遅れて相撲競技者で集団発生が見られており、競技者の家族や友人への二次感染が確認されている。なお *M. canis* の蔓延は一時より下火になってはいるが、現在でもイヌ、ネコの一部で感染が維持されており、まれならずヒトへの感染が生じている¹²⁾。さらに環境の温暖化の影響では白癬の増加、癬風・*Malassezia* 毛包炎の増加、黒癬の北上が予想される。スポロトリコーシスは都市のヒートランド化、少子化で減少が予測されるが、東北や北海道の農村地帯では温暖化にともない発症が増加し、分布地図¹³⁾が変わる可能性がある。黒色真菌症では黒色分芽菌症が減り、日和見感染としての黒色菌糸症が増加する傾向にある。このような疫学的変化や新興・再興感染症の発症はいずれも地道な真菌培

養により検出されてきたもので、培養件数が少なくなった現状では疫学調査は十分とは言えない。

真菌検査法について

皮膚真菌症の皮疹は多彩で、しばしば非定型的な臨床像を示す。診断は真菌症を疑って真菌検査をおこない、菌要素が確認されて初めて確定する。ステロイド薬の外用で完治しない皮疹は真菌検査の良い適応になる。どのような患者、皮疹からどのような検体を取るかは診断力そのものである。また念のために調べた検体から菌要素が検出され、「まさかの Pilz (真菌)」に驚かされることもある(図3)が、これも含めての診断力であろう。真菌検査は自らの診断力を評価するツールとしても有用であると言える。



図3：体部白癬：左腋—前胸部に境界が不明瞭な淡い紅斑がある。軽度の痒みがある。念のための真菌検査で「まさかの Pilz」を検出した。

1. KOH 直接検鏡法

KOH 直接検鏡法 (KOH 法) は皮膚科入局者 (専攻医) がまずはじめに習得すべき手技であり、その後皮膚科医が生涯にわたり行い続けるものである。光学顕微鏡と簡単な用具で短時間に確定診断が得られるため、極めて有用な方法

である。ある程度の習熟が必要であるが、指導者のもとで確認を受けながら修練すると短期間で習得できる。

検査の判定は菌要素が (+) か (-) のみで済まらず、菌要素の形態や数にも注目したい。たとえば白癬で菌要素が分節分生子の状態で見られるのは菌を取り巻く条件が悪い、すなわち菌が「守り」の態勢にあることを示している。菌糸の内容が顆粒状に変性している、あるいは中空になって菌糸の内容がぬけている例はすでに死菌である。KOH 標本を繰り返し観察すると、外用中の抗真菌薬の効果なども判定できる。2 週間も治療すると KOH 法で角質が溶けるに従って菌糸の断裂が明らかになり、抗真菌薬の効果が見て取れる。

2. 培養検査法

サブロー・ブドウ糖寒天 (Sabouraud dextrose agar, SDA) 培地を用いて検査材料より分離培養された菌について巨大培養とスライド培養を行い、必要によっては生理的検査 (糖醗酵、糖利用検査など) を行って菌種を同定する。巨大培養は肉眼的所見 (発育速度、表面の外観、裏面の色調、培地の着色)、スライド培養は顕微鏡的所見 (胞子のサイズ、外形、着生様式、配列、特殊器官の形態) を観察するために行われる。白癬の病変から分離培養される主なものは *Trichophyton rubrum* と *T. interdigitale* (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*) で、その他に *T. mentagrophytes* (var. *mentagrophytes*), *T. verrucosum*, *T. violaceum*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* などがある。爪白癬では直接検鏡で菌要素が証明されても、菌の培養成績は悪い。カンジダ症では起因菌のほとんどが *Candida albicans* である。*C. albicans* は常在菌であり、培養結果のみでカンジダ症と診断できない。直接検鏡で菌糸状菌要素を確認する必要がある。癬風では *Malassezia* 属真菌が皮膚の常在菌であるため、培養が診断に用いられることはない。深在性皮膚真菌症を疑った際は、病巣表面の痂皮、細切した生検組織や生検時の病巣拭い液 (組織液) を、抗菌剤を含まない培地数本に植えて 27°C と 37°C で培養する。真菌の菌名が診断名に直結するため、深在性皮膚真菌症における培養は必須である。

3. 外来で行なわれるその他の検査法

1) 皮内反応 (図 4)

日常診療で用いられるのは以下の 2 つで、いずれも遅延型過敏反応である。スポロトリキン (sporotrichin) 反応はすでに 100 年以上前より行われているが、临床上は感度、特異性ともにすぐれ、スポロトリコーシスの補助的診断法として利用価値が高い。疑わしい症例では先ずこれを行うとよい。スポロトリキン液 0.1ml を皮内注射する。判定は 48 時間後の浸潤の径を測定し、10mm 以上を陽性とする。スポロトリキンは *S. schenckii* sensu lato (広義) の糖タンパクであり、菌体あるいはその培養濾液より抽出される。タンパクの部分

が遅延型反応に関与する¹⁴⁾。厳密には *Sporothrix* 属と環境真菌 *Ceratocystis* 属には交叉反応がある。

トリコフィチン(trichophytin)は *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* の糖タンパクであり、菌体あるいはその培養濾液より抽出される。トリコフィチン反応は「いわゆる深在性白癬」であるケルズス禿瘡、白癬菌性毛瘡、生毛部急性深在性白癬では強陽性を、真の深在性白癬である白癬菌性肉芽腫では陰性を示すことに意味がある。トリコフィチン液 0.1 ml を皮内注射する。判定は 48 時間後に浸潤の径を測定して行う。トリコフィチンに対して細胞性免疫が成立していると前者の、不正立の際は後者の臨床像をとる。診断用の検査ではなく、病巣形成の理解のために行われる。



図4：真菌に対する皮内反応：左：スポロトリキン反応，右：トリコフィチン反応

2) 病理組織学的検査法

深在性皮膚真菌症の診断には真皮、皮下組織での菌要素の発育を組織学的に確認する必要がある。またスポロトリコース、黒色真菌症、クリプトコックス症では、いずれも特徴的な組織所見が観察される。菌要素の証明のためにはPAS染色、グロコット染色(メテナミン銀染色)などの特殊染色を施す。海外では爪真菌症の診断にPAS染色標本が用いられることがあるが、本邦では使われていない。

3) 血清学的検査

真菌の細胞壁を構成する(1→3)- β -D-グルカンの定量が真菌症全般のスクリーニングに用いられる。鋭敏で特異性に優れるが、クリプトコックス症、ムーコル症では増加しない。属レベルの起因菌の検索にはカンジダ抗原(細胞壁マンナン)、アスペルギルス抗原(細胞壁ガラクトマンナン)、クリプトコッ

クス抗原（莢膜グルクロノキシロマンナン）を検出する方法が実用化されている。いずれも感度・特異性の問題から、これのみで真菌症の確定診断を行えるわけではない。深在性カンジダ症、クリプトコックス症などでは患者の血液、髄液中の真菌由来の抗原量、代謝産物を測定する。キットが市販され、診断および病勢の経過観察に有用である。また肺アスペルギルス症では真菌の菌体成分に対する抗体量が測定されている。

4. 分子生物学的検査法

組織や血中の真菌の DNA の検出による真菌症の診断法や、塩基配列データを基にした菌種の同定法が各種考案され、実用化されつつある。また従来の形態学的方法では未解決の分類、同定、系統関係、疫学などの課題解決にきわめて有用であり、もはや不可欠な手法となっている。以下に最近のトピックスのいくつかを当教室の業績を含めて紹介する。

1) 検体からの真菌 DNA 検出

生検組織（パラフィン包埋切片¹⁵⁾を含む）、血液、膿汁、鱗屑、爪、毛髪など様々な臨床検体から、PCR 法や LAMP 法などを用いて真菌 DNA を増幅し検出することができる。また増幅した DNA から菌種同定が行える場合がある。この検査法は非常に迅速で簡便、そして高感度である。しかし皮膚科の検体の性質（検体は外界に接している）や、高すぎる検出感度ゆえに、疾患と無関係な真菌 DNA を検出する可能性がある。またパラフィン包埋検体では含まれる DNA の劣化も検出の妨げになる。したがって、症状その他の情報により、ある程度起原菌が推定される場合に最大の効果を発揮する。

2) 分類と菌種同定

DNA 塩基配列情報から系統関係の推定（いわゆる系統樹を作成する）が行われ、従来の形態学的、生理学的性状などに基づく分類とは異なった分類が提案されてきた。その成果は DNA Data Bank of Japan（DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>）などの塩基配列情報のデータベースに蓄積されているので、臨床分離株を同定する際に塩基配列を決定し、データベースに照会することで菌の候補名を容易に入手できる。しかし、この方法による結果が常に正しいとは限らず、結果の解釈については慎重さが必要である。その理由として、まず菌の分類の枠組みが確定していないことがあげられる。たとえば形態学的に *T. mentagrophytes* とされた菌の一部は有性世代の存在から *Arthroderma benhamiae*、*A. vanbreuseghemii* あるいは *A. simii* と記載されたが、塩基配列解析の結果 *T. interdigitale* という種名の提案¹⁶⁾もなされ、データベース内の菌種名も種の枠組みの「揺らぎ」の影響を受けると考えられる。現状では各々の菌種について、いくつかの遺伝子の塩基配列情報に基づく解析をもとに分類の見直し作業が続けられており、なお新しい種名が提案されている。ついで培養や DNA の汚染の問題がある。データに再現性があり、外

からの汚染が否定できるか考慮する。さらにデータベースが常に正しいわけではなく¹⁷⁾、誤同定に基づく塩基配列の情報が少なからず含まれることに留意する。とはいえ、蓄積された塩基配列情報が菌種同定の際に非常に強力なツールとなることは確かである。リボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) の internal transcribed spacer (ITS) 領域や D1/D2 領域¹⁷⁾、 β -tubulin¹⁸⁾、 α -actin¹⁸⁾、chitin synthase I¹⁹⁾、topoisomerase II²⁰⁾などの遺伝子の塩基配列を決定することで今まで一度も目にしたことがない菌でも、おおよそどのような菌種か知ることができる。それを手がかりにして、形態などを合わせて菌種の同定を行うことになる。また、FUSARIUM-ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) に代表されるような塩基配列データベースもこれからさらに充実していくと考えられる。

3) 種内変異を用いた分子疫学

スポロトリコーシスの原因菌である *S. schenckii* sensu lato はミトコンドリア DNA の制限酵素切断片長多型分析によって 31 の genotype に分けられ、これらは A 群 (タイプ 1-3, 11, …) と B 群 (4-10, 12, 13…) という 2 群に大別されることが知られていた²¹⁾。世界を見ると南アフリカと米大陸では A 群が多く、オーストラリアと日本では B 群が多かった。本邦では genotype の分布に地理的な偏りがみられ、タイプ 4、6 の多い九州、関西地方、タイプ 5 の多い東海、関東、東北地方、タイプ 1、2 のみられる北陸地方の 3 地域に大別された²¹⁾。最近出された *Sporothrix* 属の再分類²²⁾との関係を見ると、本邦で分離された *S. schenckii* の A 群、B 群はそれぞれ *S. schenckii* sensu stricto と *S. globosa* に対応していたと考えられる。

皮膚糸状菌の分子疫学²³⁾では、ペットなどの動物を介して感染する *A. (T.) benhamiae* については rDNA の non transcribed spacer (NTS) 領域の多型に基づく解析が行われ、11 の genotype に分けられることが示された。そのうちペットに関連する家族内感染例からは同一の genotype が得られ、感染経路の特定に利用できることが示された²⁴⁾。同様に NTS 領域の多型は *T. rubrum*、*T. interdigitale*、あるいは *T. tonsurans* の種内変異の検討²⁵⁻²⁷⁾に用いられている。さらに *M. canis* ではゲノム内に散在する短いくり返し配列の長さの差を用いた多型検出法 (microsatellite 解析) により多くの多型が検出されるが、家族内感染例では同一の genotype が得られ、感染経路の特定に用いられている^{28,29)}。鋭敏な分子生物学的マーカーは菌株の識別にも威力を発揮し、菌株の由来や感染源の特定など、疫学調査の強力な手段となる。

治療について

皮膚真菌症の治療は病型、原因菌にあわせて抗真菌薬の内服、外用や切除、温熱療法などが単独あるいは組み合わせて行われるが、真菌症の治療に先立

って正確な診断が必須である。診断が確定しないうちに、試しに抗真菌薬による治療を開始することは避けねばならない。これはひとたび治療が開始されると真菌の検出が困難になるためである。治療法の選択は、患者の合併症など全身状態や併用薬剤、副作用、見込まれるアドヒアランスなどを考慮して総合的に行われるべきである。スペクトルムの広い内服抗真菌薬は目標の真菌以外の真菌や細菌とヒトの共生関係に影響を及ぼす可能性もあり、すべての皮膚真菌症が必ずしも治療されるべきものではない。場合によっては放置されてもやむをえない例もあり、たとえば高齢者の爪白癬などに強力な内服薬の使用を強要しない、などである。治療に先立って患者に各種の治療法と予測される治療効果を示し、治療のゴールを共有しておく。

引用文献

- 1) 杉田 隆ほか：真菌細胞の構造 目で見る真菌と真菌症（亀井克彦編）医薬ジャーナル社 16-22, 2014.
- 2) 田中壯一：水虫菌の進化 医学のあゆみ 184:996-998, 1998.
- 3) 岡田 元：第 18 回国際植物学会議(IBC2011, Melbourne)で採択されたアナモルフ菌類および多型的生活環をもつ菌類の統一命名法. 日菌報 52:82-97, 2011.
- 4) 望月 隆：病原真菌の命名にかかわる諸問題 皮膚病診療 35:1004-1009, 2013.
- 5) 清 佳浩：2011 年次皮膚真菌症疫学調査報告. Med Mycol J 56J: J129-135, 2015.
- 6) 仲 弥ほか：足白癬・爪白癬の実態と潜在罹患率の大規模疫学調査(Foot Check 2007). 日臨皮誌 27:27-36, 2009.
- 7) 望月 隆：皮膚真菌症の最近の動向 日医師会誌 146:503-507, 2017.
- 8) 中嶋 弘：いわゆる寝たきり老人（高齢者）の爪白癬および手足白癬の実態とその特徴. 皮膚病診療 33:320-324, 2011.
- 9) Watanabe S, et al: High prevalence of superficial white onychomycosis by *Trichophyton interdigitale* in a Japanese nursing home with a geriatric hospital. Mycoses 60:634-637, 2017.
- 10) 日本医真菌学会疫学調査委員会：1991 年次皮膚真菌症疫学調査成績 真菌誌 34:493-502, 1993.
- 11) 清 佳浩：2006 年次皮膚真菌症疫学調査報告. Med Mycol J 53: 185-192, 2012.
- 12) Yamada S, et al: An epidemiological study of feline and canine dermatophytosis in Japan. Med Mycol J (in press)
- 13) 楠原正洋：スポロトリコーシスの疫学. 皮膚科臨床アセット 4 皮膚真菌

- 症を究める (古江増隆、望月 隆編集) 184-186, 2011, 中山書店、東京.
- 14) 石崎 宏ほか: Sporotrichosis. 化学療法の領域 20:1135-1139, 2004.
 - 15) Futatsuya T, et al: Molecular identification of fungi in formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) skin tissue samples. J Dermatol 46:171-172, 2019.
 - 16) de Hoog GS, et al: Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. Mycopathologia 182:5-31, 2017.
 - 17) 河崎昌子ほか: 真菌の新たな遺伝子診断 MB Derma. 151:18-25, 2009.
 - 18) Hsieh HM, et al: Molecular phylogeny of *Hypoxylon* and closely related genera. Mycologia 97:844-865, 2005.
 - 19) Kano R, et al: Species-specific primers of chitin synthase 1 gene for the differentiation of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. Mycoses 42:71-74, 1999.
 - 20) Kanbe T, et al: Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. J Dermatol Sci 33:41-54, 2003.
 - 21) Ishizaki H, et al: Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in India, Thailand, Brazil, Colombia, Guatemala and Mexico. Jpn J Med Mycol 50:19-26, 2009.
 - 22) Marimon R, et al: Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol 44: 3251-3256, 2006.
 - 23) Mochizuki T, et al: Molecular markers useful for intraspecies subtyping and strain differentiation of dermatophytes. Mycopathologia 182:57-65, 2017.
 - 24) Takeda K, et al: Molecular epidemiology of a major subgroup of *Arthroderma benhamiae* isolated in Japan by restriction fragment length polymorphism analysis of the non-transcribed spacer region of ribosomal RNA gene. Jpn J Infect Dis 65: 233-239, 2012.
 - 25) Takeda K, et al: Polyclonality of *Trichophyton rubrum* isolates in a dermatophytosis patient with multiple lesions. Med Mycol J 57E:E17-20, 2016.
 - 26) Wakasa A, et al: Molecular typing of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* isolated in a university hospital in Japan based on the non-transcribed spacer region of the ribosomal RNA gene. J Dermatol 37:431-440, 2010.
 - 27) Sakata Y, et al: Molecular epidemiology of *Trichophyton tonsurans*, the causative dermatophyte of the epidemic of tinea gladiatorum in

- Japan between 2011 and 2015. *Jpn J Infect Dis* 71:140–144, 2018.
- 28) Watanabe J, et al: Molecular epidemiology of Japanese isolates of *Mircosporum canis* based on multilocus microsatellite typing fragment analysis. *Jpn J Infect Dis* 70:544–548, 2017.
- 29) Takeda K, et al: Infant case of tinea faciei caused by *Microsporium canis*. *J Dermatol* 45:e187–e188, 2018.

皮膚科医のための真菌検査法

金沢医科大学 皮膚科学

望月 隆

はじめに

皮膚真菌症は皮膚科外来患者の約8%、あるいは新患患者の12%にのぼり、白癬はその約9割を占める。また国民の5人に1人が足白癬に、10人に1人が爪白癬に罹患していると推計される。現状では多くの患者が皮膚科以外の診療科で治療され、また薬局で医家向けとほぼ同じ外用抗真菌薬を購入できる中で、皮膚科医が皮膚真菌症の診療を主導するためには正確な診断に裏打ちされた質の高い医療を提供する必要がある。真菌検査法の中心はKOH直接検鏡法(KOH法)と培養であるが、本稿では皮膚科医が専攻医のうちに是非とも習得してほしい真菌検査について解説する。

診断の心構えと検査法

皮膚真菌症と同様の皮疹は真菌が存在しなくても生じうる。またひとたび治療を開始すると菌要素を検出しにくくなる。したがって、その皮疹に真菌がいるか否かは抗真菌薬による治療に先立って決定的に重要である。また診断に際しては、単に真菌の存在を確かめるだけでなく、菌種、宿主の反応、病変が生じた皮膚の特性、あるいは前治療に応じて多彩な臨床所見が現れることを考慮する。そして、どのような病態にあるか、どう菌を除去するのが最適か考察し、皮疹はどう改善していくかを予想することも真菌症の診断に含まれる。

真菌検査¹⁾ではどのような検体をどこから、どのように採取するか、が診断力そのものである。検体は活きのいい菌要素が多量に存在しそうな部位から採取する。病巣周辺部の鱗屑、小水疱があれば水疱蓋、爪ではなるべく健常部に近い病変部、毛は容易に抜去できたもの、あるいは毛包内に黒点があればそれを摘出して検査に用いる。菌は角質に寄生しているので、出血するような検体採取法は不適切である。顔面、小児や乳児の白癬では安全のためにセロファンテープや両面テープを用いて検体を採取することも考慮する。テープに付着し

た検体はそのまま直接検鏡や真菌培養に用いることができる。

表 1 : 検体採取のコツ

浅在性皮膚真菌症	
鱗屑：	病巣から遊離したものより、病巣に付着したものを剥して用いる 趾間では浸軟した部分を避け、周囲の乾いた部位から採取したもの 小児、顔面、股部ではセロファンテープを粘着させて剥したもの
水疱、膿疱：	小尖刀で削ぐ様に採取した上蓋
頭皮、毛髪：	容易に抜去可能であった毛髪 膿疱を貫通する毛髪 毛包内の黒点 ヘアブラシや湿綿棒で頭皮をまんべんなく擦過したものは培養に 用いられる
爪：	メスで削ぐ様に採取した爪表面の白斑 楔状の混濁部では、鋭またはドリルで開窓して採取した変性した爪 爪は砕いて小片にしたもの 健全部と病変部の境界部（最深部）から採取する
深在性皮膚真菌症	
生検組織：	固着した痂皮、生検時に圧出した組織液を綿棒でぬぐったものも 検鏡、培養に用いられる
膿瘍内容：	圧排された膿、穿刺吸引した膿汁

1. KOH 直接検鏡法…「皮膚科医の identity」

KOH 直接検鏡法（KOH 法）で、最も重要なポイントは良い検体を採取すること（表 1）であり、検体採取が診断力に直結する。ある程度のトレーニングを積まないと良い検体は採取できず、その結果、自信をもって真菌の有無を評価できない。したがって、「皮膚科医の identity は研鑽を積んだ KOH 法にある」と言うことができる。

1) 用意するもの（図 1）

操作性がよく、視野が広くて明るい顕微鏡、KOH 液、アルコールランプなど穏やかな加熱装置、検体採取に用いるピンセット、刃のなましてあるメスの刃、ニッパ型の爪切鉗子など、各自使いやすいものを用意する。電気ドリルがあれば爪からの検体採取に便利である。スライドガラス、カバーガラスは最も安価な物でよい。検体採取に用いる器具はあらかじめガスや火炎で滅菌しておくか、アルコール綿などで除菌して用いる。セロファンテープや両面テープ（共に除

菌はできない) を使うと安全に検体を採取できる。検体の付いたテープをスライドガラスに貼付し、少量の KOH 液をなじませると簡単に平坦な KOH 標本を作成できる。両面テープを用いて検体を採取し、検体が上になるようにスライドガラスに貼付け、KOH 法を行ってもよい。KOH 水溶液は水酸化カリウム（水酸化ナトリウムでも可）を 20-30% になるように水に溶解して調整する。これに 20-40% の Dimethylsulfoxide (DMSO) を加えると角質の溶けが速やかに進む。市販のズーム液は若干高価であるが、透徹に優れ、持ち運びにも便利である。



図 1：真菌検査に用いる器具

2) 観察の実際

KOH 液は少なめに使用し、加熱は穏やかに行う。余分な KOH 液は圧排し、薄い標本にする。菌を探す際には 100 倍で、コンデンサーの絞りをしぼってコントラストをつける。見えた構造が菌か否か見分けるには 200-400 倍で、絞りを開いて視野を明るくして観察する（図 2）。検体は良く溶かしてから観察する（図 3）。KOH 法のコツを表 2 に示した。

3) 所見の評価

皮膚糸状菌は隔壁を持った、少し屈曲し、時に分枝する糸状の構造に見える。菌糸のかわりに分節分生子（孢子）の連鎖や、爪では菌塊のみが見えることがある。見誤りやすいものでは混入した真皮の弾性線維や、細胞膜の脂質による菌様モザイクがある。モザイクは 400 倍で絞りを開いて観察すると幅が一定ではなく、壁の滑らかな菌要素と異なることがわかる（図 4）。あるいはさらに数分でも時間を置いて観察すると消失していることがある。

Candida 属真菌は、多くの場合白癬菌と見分けることが可能である。前者で

は菌糸のくびれた部分から球状の酵母状細胞が出芽している像が確認できる(図5a)。

Malassezia 属真菌はパーカーインク苛性カリ法(KOH溶液にパーカーインク社製のQuink SOLV-X Permanent blue/black inkを10~50%の割合に加えたもの)、あるいはズームブルー®液(久光製薬)で青く、クロラゾールブラックで青黒く染まる。他の菌と異なり、400倍で、コンデンサーを開いて焦点深度を浅く設定して観察する。癬風では非分岐性の短い菌糸と円形、卵円形の胞子の集団がみられるが、原因菌 *M. globosa* は常在菌であり、胞子のみで癬風と診断しない(図5b)。

直接検鏡法で痂皮、鱗屑の中に multiform cell (sclerotic body、大型、暗褐色、球形、細胞壁が厚く、分割線を有する大型の胞子) が証明されれば黒色分芽菌症(chromoblastomycosis クロモブラストミコーシス)と診断される。また multiform cell が見られず、膿瘍の内容で暗色~褐色の菌糸あるいは胞子連鎖が観察されれば、黒色菌糸症(phaeohyphomycosis)と診断される。

表2 : KOH直接検鏡法のコツ

顕微鏡 :	視野が広く、明るい顕微鏡を用いる 対物レンズは高級品でなくてよいが、10倍、20倍、40倍を用意する 菌を捜す際(100倍)はコントラストをつけるため絞りを絞るかコンデンサーを下げる 菌を確認する際(400倍)は絞りを開けるかコンデンサーを上げる
KOH液 :	自作のKOH液は沈殿ができると溶けが悪くなるので、作り直す 自作のKOH液にDMSOを加えた際にはよく混和しておく
検体処理 :	溶かす前に検体を細かくしておく 加熱時に沸騰させない 標本は薄い方が見やすいので、余分なKOH液は圧排しておく 毛は溶けきってしまう前に毛外性か毛内性かを確認する
診断 :	角質は良く溶かして観察する 100倍で確実に菌と言えるのは菌、疑念があり400倍で確認してみると多くは菌ではない 外用の効果があれば1~2週で菌糸の断裂が観察できる

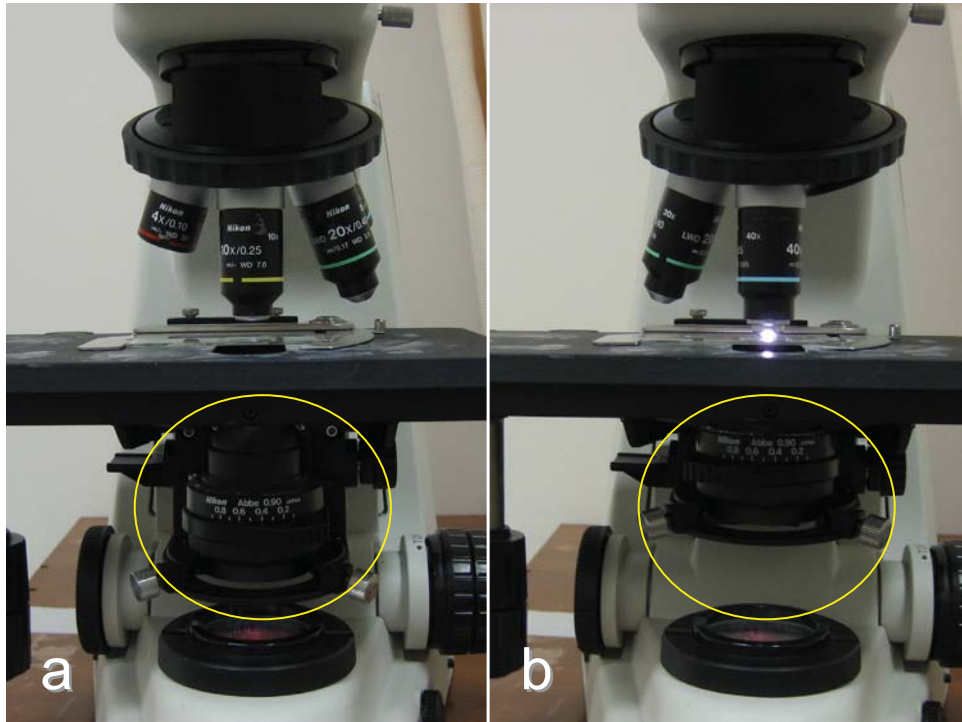


図2：検鏡中のコンデンサーの調節 a：低倍率でコントラストをつける際のポジション b：高倍率で光量を増やして観察する際のポジション

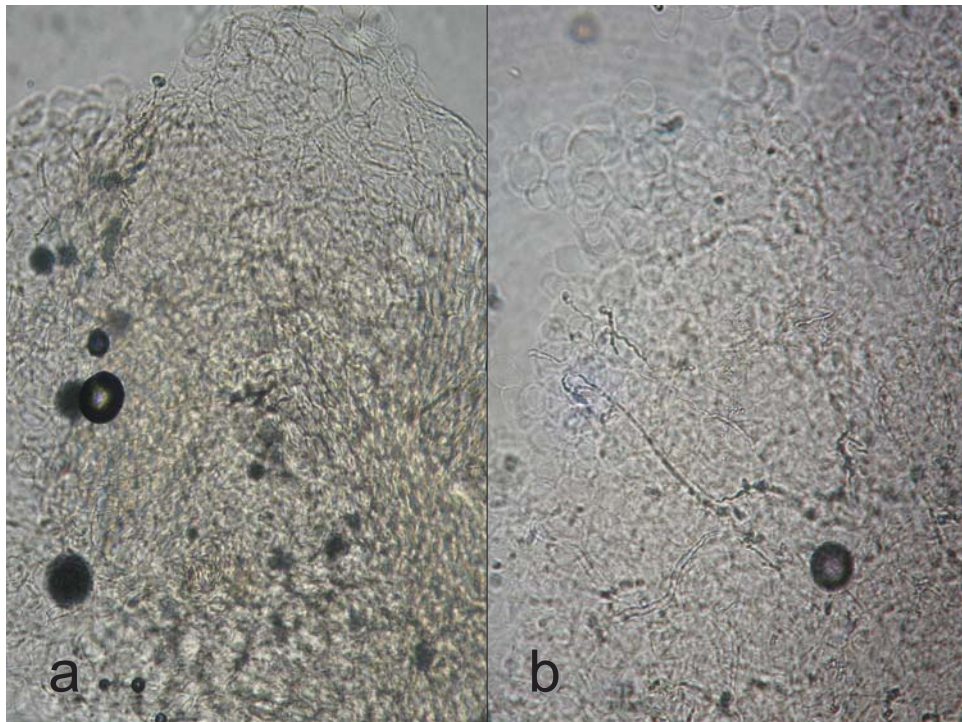


図3：溶解の影響 a：KOH液添加直後、菌は陰性的のように見える。b：約10分後の同じ視野。角質が溶けて菌が明瞭に観察できる。

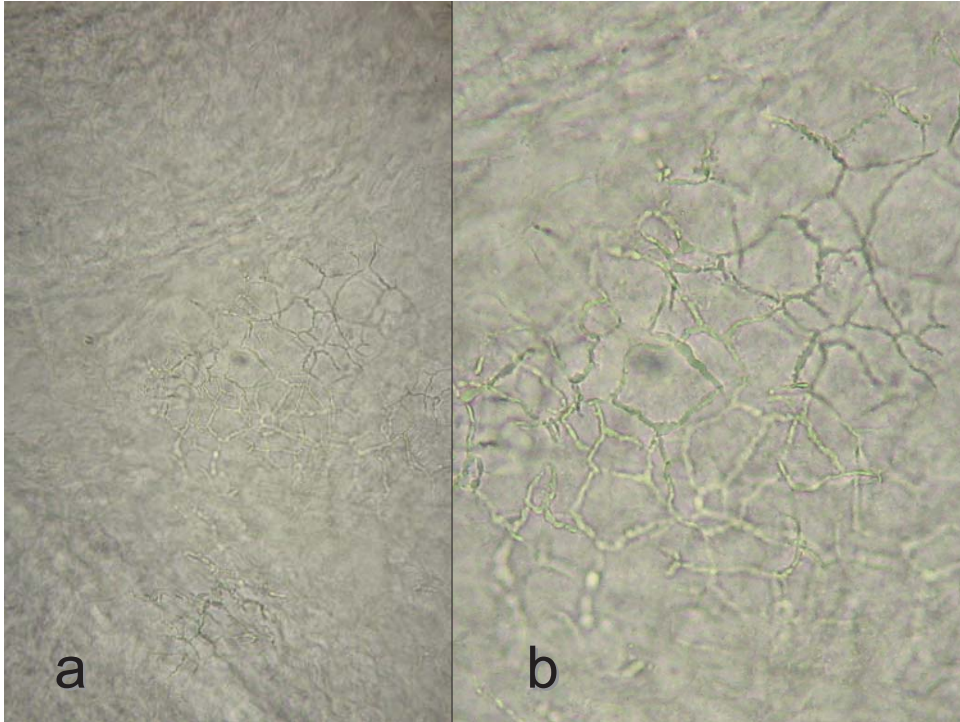


図4：菌様モザイク a：弱拡大では菌要素が多数存在するように見える。
b：強拡大では、幅は一定でなく、滑らかな細胞壁、細胞内小器官も観察できず、菌でないことが簡単にわかる。

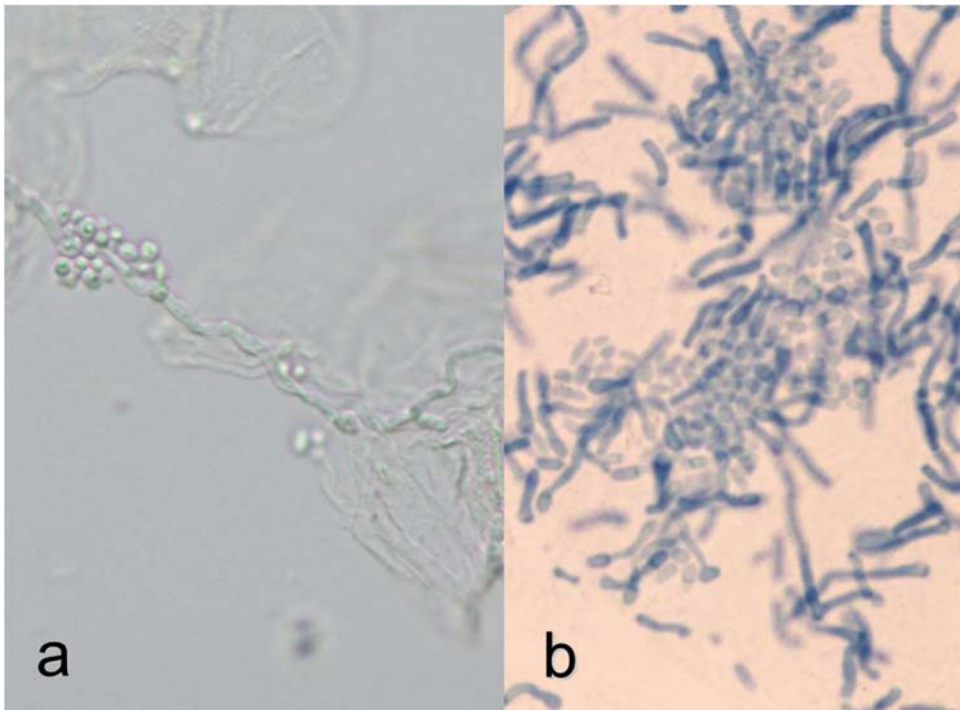


図5：カンジダ症と癬風で見られた菌要素 a：*Candida* 属真菌。菌糸の細胞間の隔壁がくびれている。球状の胞子がブドウの房状に集塊をなす。
b：癬風で見られた「スパゲティとミートボール」状の短い「く」の字に屈曲した菌糸と胞子状菌要素(パーカーインク法)。

2. 真菌培養法…「意外に簡単にすくすく育つ」

国際化、高齢化、そして趣味やペットの多様化などによる新興、再興真菌症の出現に即やかに対応するためには、真菌培養は欠かせない。実施される件数の減少が懸念されるが、重要性は増していると考えられる。

1) 用意するもの

培地、エーゼ（もしなければ滅菌綿棒の棒の部分で代用可能）。検体採取はKOH法と同時にやってよい（表1）。活きの良い菌要素がいそうな検体を十分量用いる。深在性皮膚真菌症を疑った場合は生検を行い、病理検査と同時に真菌培養を行う。培地はクロマイセチン添加サブロー（クロマイサブロー）培地またはマイコセル培地の斜面または平板を用いる（市販品あり）。サブロー培地は雑真菌や雑細菌の混入が頻繁に生じるので、初心者が皮膚表面からの検体（鱗屑、爪や毛髪など）の培養を行う際には適さない。培養が必要な疾患と対応する培地を表3に示した。

表3：培養が必要な疾患/病型と培地

疑われる疾患	必要な理由	培地
頭部白癬	感染源対策の参考、治癒判定時にも	マイコセル培地
手白癬	外界からの感染の可能性	マイコセル培地
手の爪真菌症	菌種により抗真菌剤の選択を工夫	マイコセル培地/ クロマイ添加サブロー培地
体部白癬	感染源対策の参考 菌種により足/爪白癬も併せて治療	マイコセル培地
深在性皮膚真菌症	真菌症の診断に必須 菌種により治療法に差 治療判定に必要	サブロー培地 +血液寒天培地, 小川培地

脚注1： *Trichophyton verrucosum* の分離にはマイコセル培地に10%になるようにスキムミルクを加え、37℃で4週間培養する。

脚注2：真菌の分離培養には2系列の温度設定（25-27℃, 37℃）が奨められる。特に *Sporothrix globosa* は37℃では発育しない。

脚注3：深在性皮膚真菌症や爪真菌症の原因菌である *Fusarium* 属、*Aspergillus* 属、*Cryptococcus* 属真菌はマイコセル培地（抗菌剤シクロヘキシミド含有）上では発育しない。

2) 培養法の実際

表在性皮膚真菌症：白癬を疑った場合、湿潤した病変からの検体採取は雑菌が多いため避ける。斜面培地では、エーゼあるいは滅菌綿棒（棒の部分）で検体を培地に貼付けるように乗せていく。スクリュウ栓は密閉せず、振って音がする程度にごく緩く閉める。平板では数カ所に検体を乗せる。平板培地は乾燥しやすいのでテープ類でシャーレの周囲に目張りを施す。培養は27°C程度の保温器内、あるいは暖かい診察室内で2-4週間行う。ただし *Trichophyton (T.) verrucosum* は37°Cでなければ生えず、しかも発育はきわめて緩徐である。頭部白癬の診断にブラシ培養法や綿棒法が有効である。これは清潔なヘアブラシ（歯ブラシでも可）や湿綿棒で頭を擦り、その先を平板培地に押し付けて培養する方法である。集団検診で保菌者を検出する唯一の方法である（図6）。

深在性皮膚真菌症：病巣の表面に付着する痂皮、膿汁、生検時の創から滲み出る組織液、生検組織片が培養用の検体になる。組織片は清潔状態のまま、メスでミンチ状に細切し、綿棒の棒の部分などで培地表面に付着させていく。グラインダーなどでホモジネートしすぎると、*Mucor* 属やその近縁種は生えなくなる。培地はマイコセルに含まれるシクロヘキシミドによる生育の抑制が懸念されるため、サブロー培地、あるいはクロロマイセチン添加サブロー培地を用いる。培養温度は27°Cと37°Cが好ましい。菌種によって、例えば *Sporothrix globosa* などは37°Cで発育が抑制される。

3) 同定の実際

現在本邦では *T. rubrum* と *T. interdigitale* (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*) で分離菌の99%以上を占める。格闘技競技者からは *T. tonsurans* が、小児や女性の頭部白癬や露出部の体部白癬では *Microsporum (M.) canis* や動物由来の *T. mentagrophytes* が稀ならず分離される。高齢者の頭部白癬からは *T. rubrum*、*T. violaceum*、*M. canis*、まれに *T. tonsurans* が分離される。

生えた菌はコロニーの性状を観察する。試験管や平板培地、あるいは巨大培養の肉眼的所見では発育速度、表面の外観、裏面の色調、培地の着色を観察する。さらに試験管や平板培地の壁を通して（図7）、あるいは初代の培養からごく少量の菌を掻き取り、ラクトフェノールコットン青（市販品あり）をなじませて微細構造を観察する。掻き取った際のコロニーの硬さも同値の参考になる。*T. rubrum* はコロニーが硬く、コロニーに付着して培地が取れてくる。*T. interdigitale* では培地を残してコロニーだけが取れてくる（図8）。*T. tonsurans* のコロニーは、*T. rubrum* に似た硬さがある。より正確に形態を観察する際にはスライド培養（図9）¹⁻³⁾ を行い、顕微鏡的に孢子のサイズ、外形、着生様式、配列、特殊器官の形態を観察する。培養結果は成書や図説^{2, 3)}、ネット上の情報（<http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb/>帝京大学医真菌研

究センター、<http://www.pf.chiba-u.ac.jp/>（千葉大学真菌医学研究センター）などに照らし合わせて同定する。同定や情報提供の依頼は金沢医科大学皮膚科学講座（920-0293 石川県河北郡内灘町大学1-1、E-mail:dermat@kanazawa-med.ac.jp あるいは講座ホームページ<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~dermat/>内の皮膚真菌症質問コーナー）で応じている（実費必要）。なお、*T. tonsurans* は平板培地の裏面から観察すると培養5日目から培地内の菌糸の一部が球状に膨張し、厚膜孢子様構造を示すことが知られている⁴⁾（図7）。皮膚科医は *T. tonsurans* 感染症の診断を求められることがあるが、この特徴を知っておくと菌の同定が容易に行える。巨大培養は肉眼的所見（発育速度、表面の外観、裏面の色調、培地の着色）、スライド培養は顕微鏡的所見（孢子のサイズ、外形、着生様式、配列、特殊器官の形態）を観察するために行われる。



図6：ブラシ検査法 頭皮全体を20回まんべんなく擦り、マイコセル培地にスタンプする。*Trichophyton tonsurans* ならば数日のうちに裏面から厚膜孢子様構造が観察される（図7d）。

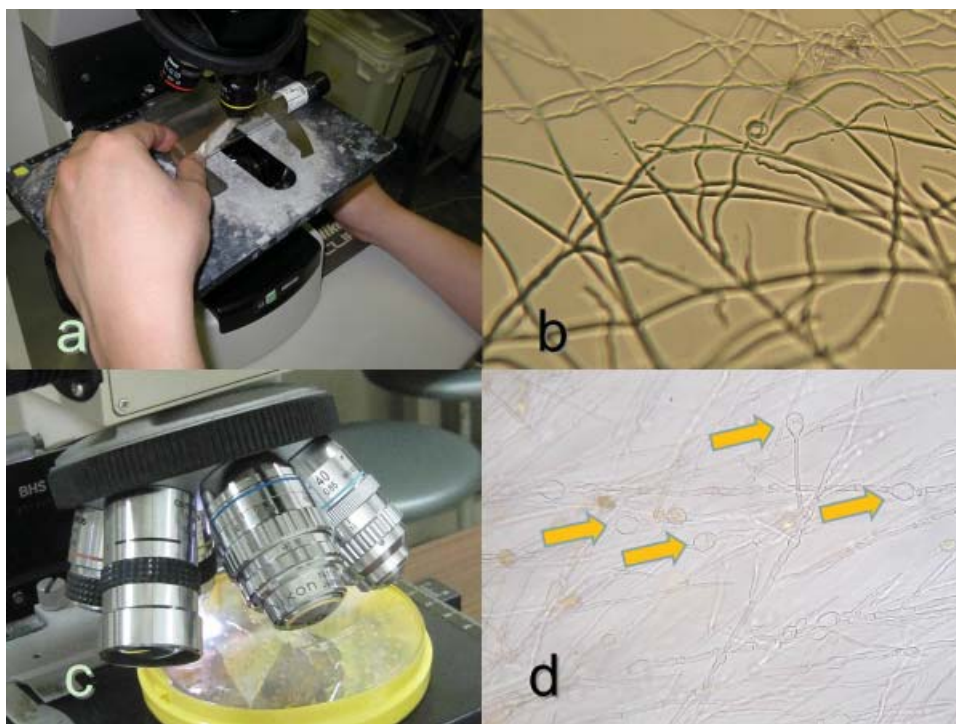


図7：顕微鏡による直接観察法 生じたコロニーの試験管壁(a)からの観察。b: *Trichophyton interdigitale* では螺旋器官が観察される。平板培地(c)の裏面からの観察。d: *Trichophyton tonsurans* では厚膜孢子様構造が観察される(矢印)。

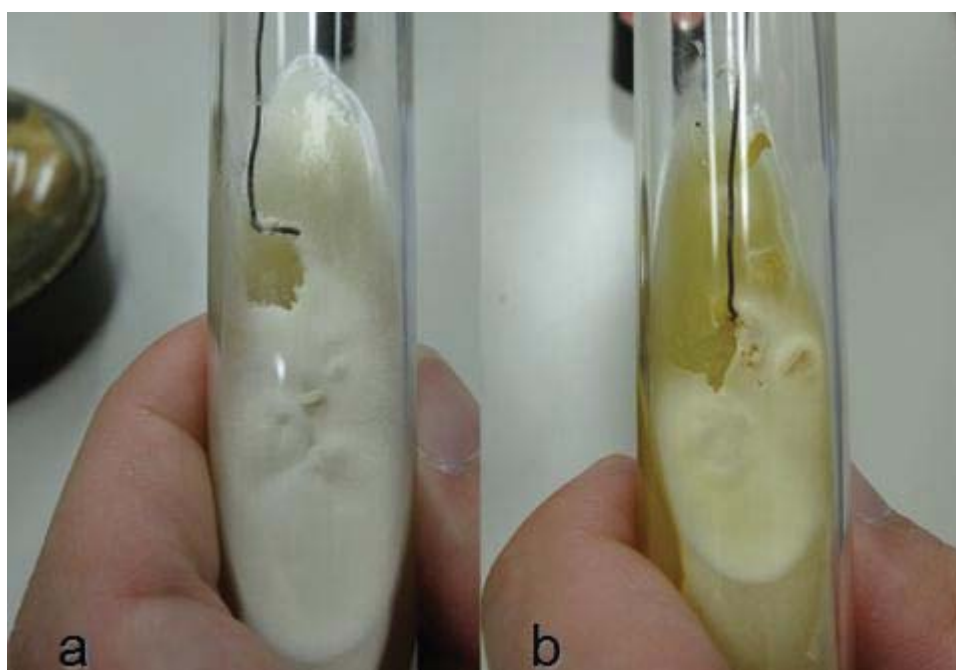


図8：コロニーを掻き取った際の所見 a: *Trichophyton interdigitale* では菌が軟らかくコロニーだけが取れてくる。b: *Trichophyton rubrum* では菌糸が培地に食い込んでおり、培地ごとコロニーが取れてくる。

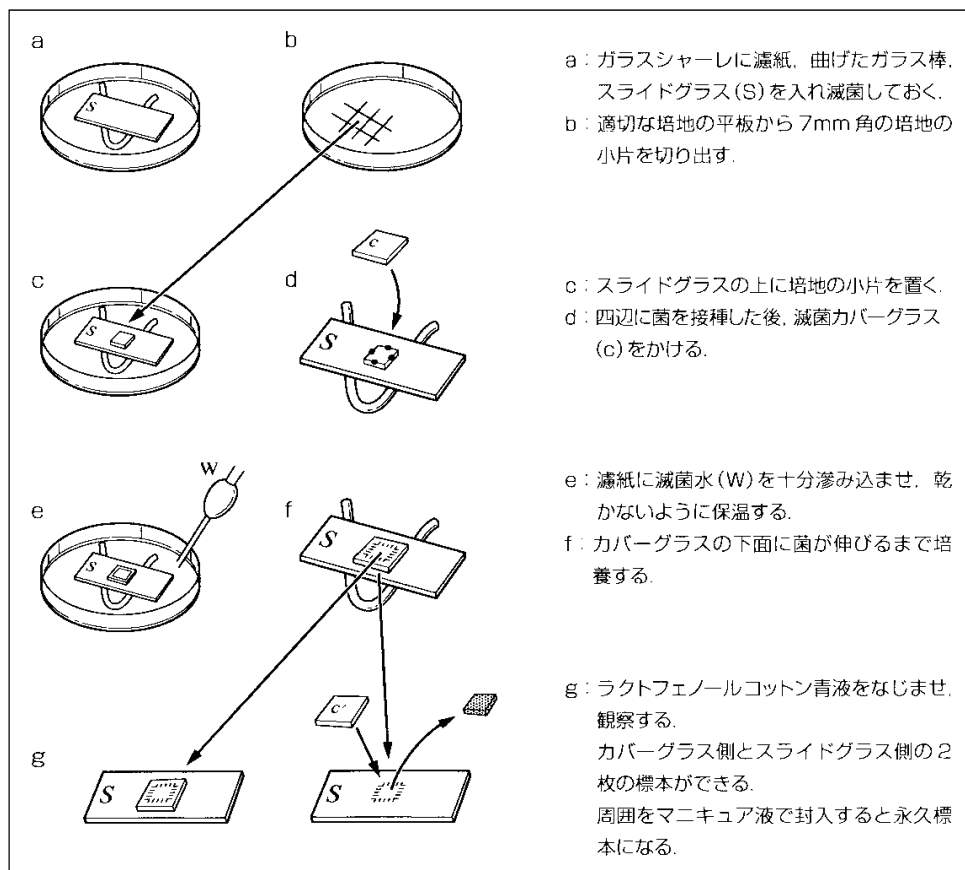


図9：スライド培養法

3. その他の検査法

1) 皮内反応

トリコフィチン (trichophylin) 反応は白癬菌の抗原に感作されているかを診断する皮内反応である。ケルスス禿瘡や白癬菌性毛瘡、白癬菌アレルギーである白癬疹⁵⁾で陽性になる。市販品はなく、2-3の施設で調整されたものが用いられている。スポロトリキン (sporotrichin) 反応⁶⁾は *Sporothrix* 属真菌への感作の有無を判定するものでスポロトリコーシスの鋭敏で特異性に優れた補助診断法である。これは菌の培養液を精製したもので0.05ないし0.1mlを前腕皮内に接種し、48時間後の硬結が10mm以上あれば陽性とする。高齢者や免疫不全をとまなう患者では反応が弱くなり、播種性スポロトリコーシスでは陰性になる。抗原分譲の希望があれば金沢医科大学皮膚科学講座へ連絡する。

2) Wood 灯検査

Wood 灯は365nmの紫外線の線源である。暗所で病巣に照射し、病巣の蛍光を観察する。頭部白癬のうち *M. canis* によるものでは侵された毛孔が点々と緑青色に輝くため、病変の範囲の確定や治癒判定に役立つ (図10)。足白癬、股部白癬の鑑別疾患として重要な紅色陰癬では病巣が鮮やかなピンク色の蛍光

を発する。暗室を必要としない機器が発売されている⁷⁾。

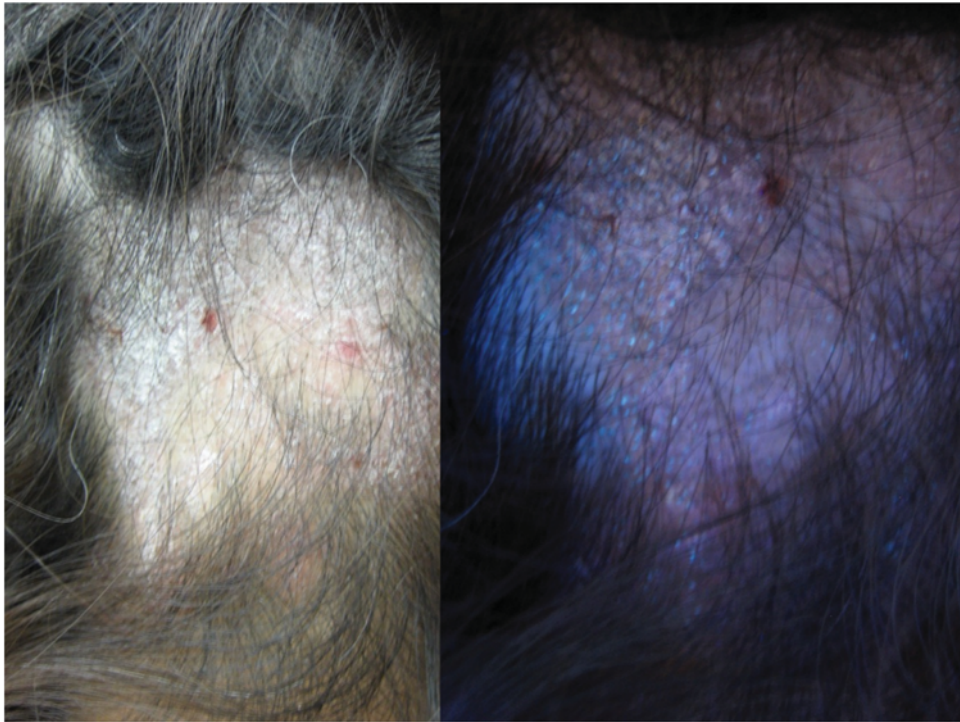


図 10 : Wood 灯検査 *Microsporum canis* による頭部白癬。侵された毛孔が点々と緑青色に蛍光を発している。

3) 血清学的診断法⁸⁾

血清中に含まれる菌体成分あるいは修飾産物を生化学的、免疫学的に検出するもので、各種の検査キットが用いられている。真菌症全般のスクリーニングには真菌の細胞壁を構成する(1→3)-β-D-グルカンを比濁法で検出する方法が用いられる。鋭敏で特異性に優れるが、クリプトコックス症、ムーコル症では検出できない。属レベルの起病因菌の検索にはカンジダ抗原(細胞壁マンナン)、アスペルギルス抗原(細胞壁ガラクトマンナン)、クリプトコックス抗原(莢膜グルクロノキシロマンナン)を検出する方法が実用化されている。いずれも感度・特異性の問題から、これのみで真菌症の確定診断を行えるわけではない。

4) 病理組織学的検査⁹⁾ (表 4)

皮膚真菌症のうち、真皮以下で菌が発育して生じる深在性皮膚真菌症の診断には真皮、皮下組織での菌要素の発育が組織学的に確認される事が必要である。また比較的頻度の高いスポトリコース、黒色真菌症、クリプトコックス症では、いずれも特徴的な組織所見と菌の寄生形態が観察されるため、病理検査は診断に重要である。このうち、黒色真菌症では組織内菌要素が褐色調を示し、HE 染色で観察が可能であるが、多くはPAS 染色、グロコット染色、グラム染色などの特殊染色が必要である。*Sporothrix* 属や *Cryptococcus* 属真菌の菌要素

は思いのほか小さいので、特殊染色標本の微小膿瘍内や肉芽腫（特に巨細胞内）を 400 倍で丁寧に探す。

表 4：真菌症の病理検査に用いられる染色法

染色方法	用途	真菌などの染色態度
HE染色	組織反応の検討	多くは菌の検出は困難、 <i>Aspergillus</i> 属は菌要素が淡青、 <i>A. niger</i> では蔞酸カルシウムの結晶が確認可能
	黒色真菌の観察	黒色真菌は褐色
	星芒状体の観察	星芒状体は紅色
PAS染色	菌要素の観察	細胞壁は紅色に 特に孢子状菌要素は濃染
Grocott染色	菌要素の観察	細胞壁は黒染 他の組織成分も黒染しうる
Fontana-Masson染色	メラニンの観察	黒色真菌、 <i>Cryptococcus</i> が明瞭に黒染
Mucicarmine染色	莢膜多糖類の観察	<i>Cryptococcus</i> は紅色に
Gram染色	真菌、放線菌の検出	いずれも濃紺色に染色

5) 分子生物学的診断法¹⁰⁾

分子生物学的方法が真菌の検出や同定に用いられる。皮膚糸状菌では分離された菌についてのリボゾーム RNA 遺伝子の internal transcribed spacer (ITS) 領域を用いた同定は実用のレベルに達し、また直接検体から DNA を抽出して PCR を行い、培養を経ずに原因菌を判定する手法 (direct PCR 法) も応用されている。さらに loop-mediated isothermal amplification (LAMP) を用いて *T. tonsurans* の感染が疑われる病巣から 1 時間以内に *T. tonsurans* の有無を判定できる方法も開発された¹¹⁾。黒色真菌や *Sporothrix* 属真菌ではリボゾーム RNA 遺伝子のほかカルモジュリンやチュブリンなど菌種に応じて蛋白や酵素の遺伝子の塩基配列を用いて同定が行われている (本テキスト「皮膚真菌症 概説」参照)。使用にあたっては、感度、特異性や目的から、個々の事例についてどのような方法が適切か考え、その結果も臨床所見や他の真菌検査と矛盾しないかよく吟味する。

まとめ

皮膚真菌症の診断といえば検査の手技、あるいは近年では分子生物学的方法を用いた同定法の開発のみが注目され、鋭敏な方法が開発されれば真菌症の診断をめぐる問題は解決するかのよう風潮がある。しかし、KOH 法や培養法が省略できるわけではなく、医療の進歩や国際交流、日常生活の多様化に伴って思わぬ真菌症に遭遇する可能性がある。したがって“伝統的“な真菌検査は以前より重要度を増していると考えられる。

参考文献

- 1) 望月 隆：皮膚科外来の真菌検査法. *Visual Dermatology* 1:786-793, 2002.
- 2) 西本勝太郎：真菌の分類・検査法. 最新皮膚科学大系 14 細菌・真菌性疾患、(玉置邦彦他編) 中山書店 162-174, 2003.
- 3) 比留間政太郎：病原真菌の分離・同定の手引き. *Visual Dermatology* 1:794-803, 2002.
- 4) 藤広満智子：病院皮膚科医の地域における役割 -*Trichophyton tonsurans* 蔓延防止の取り組み-. *真菌誌* 49:191-195, 2008.
- 5) 古賀哲也：白癬疹. *MB Derma.* 37:49-53, 2000.
- 6) 石崎 宏ほか：Sporotrichosis. 病原性真菌ハンドブック(宮治 誠編) 医薬ジャーナル社 123-126 2007.
- 7) 田邊 洋：光学機器による診察. 一冊でわかる皮膚真菌症(望月 隆、他編) 文光堂 98-99, 2008.
- 8) 槇村浩一：血清学的検査. 一冊でわかる皮膚真菌症(望月 隆、他編) 文光堂 218-221, 2008.
- 9) 望月 隆：病理組織学的検査法. 一冊でわかる皮膚真菌症(望月 隆、他編) 文光堂 215-217, 2008.
- 10) 望月 隆：皮膚科セミナーウム 皮膚真菌症の検査法(第2報). *日皮会誌* 121:1-5, 2011
- 11) Yo A, et al: Detection and identification of *Trichophyton tonsurans* from clinical isolates and hairbrush samples by loop-mediated isothermal amplification system. *J Dermatol* 43:1037-1043, 2016.

よくみる皮膚真菌症原因菌の同定

金沢医科大学 皮膚科学

安澤 数史

原因菌の同定とは、培養されてきた真菌（分離菌）が原因菌かどうかを見極め、原因菌と考えられる分離菌を属や種など既知のくりに当てはめることであると考えられる。通常皮膚科の検体は外界と接しているために複数の真菌が培養され、その中から原因菌を見極める必要があることが多い。加えて、分離菌を既知のくりに当てはめる（菌種同定）ためには、比較対象となる真菌の特徴を知っていなければならない、両者をあわせた原因菌の同定はどうしても難しく感じられてしまう。しかし原因菌の同定に慣れた人にとっては多くの場合に、分離菌をほとんど見ただけでこの作業が終了してしまうこともまた事実である。これは、知っている、あるいは予測される原因菌が高頻度で現れてくるからであり、必ずしも作業者が真菌の専門家だからではない。すなわち皮膚真菌症の原因菌の種類は限られていること、さらにそれらが見ための違いによってある程度識別できることを示している。従って主要な皮膚真菌症原因菌の典型的な特徴を知ることとは原因菌の同定への大きな一歩となる。本実習では主要な皮膚真菌症原因菌を見比べ、その違いを感じていただければよいと思います。それを踏まえて今後、自分で採取した検体を用いて原因菌の同定を実際に行ってみてください。

よくみる皮膚真菌症原因菌

○浅在性皮膚真菌症原因菌(人や動物と関連するものが多い)

白癬	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> complex	(人、動物)
	<i>Trichophyton rubrum</i>	(人)
	<i>Trichophyton tonsurans</i>	(人・格闘競技者)
	<i>Microsporum canis</i>	(動物)
	<i>Microsporum gypseum</i> complex	(土、動物)
	<i>Epidermophyton floccosum</i>	(人)

○深在性皮膚真菌症原因菌(環境中に存在し外傷と関連するものが多い)

黒色真菌症	<i>Exophiala</i> spp.	
	<i>Fonsecaea monophora</i>	
スポロトリコーシス	<i>Sporothrix schenckii</i> complex	
スケドスポリウム症	<i>Scedosporium apiospermum</i> complex	

○その他

Candida albicans

A. *Trichophyton mentagrophytes* complex

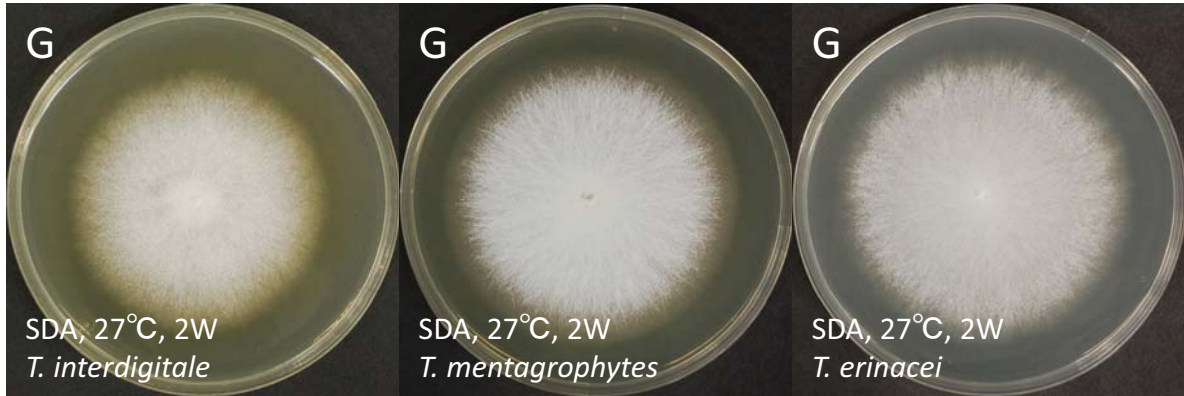


图 1

图 2

图 3

B. *Trichophyton interdigitale*

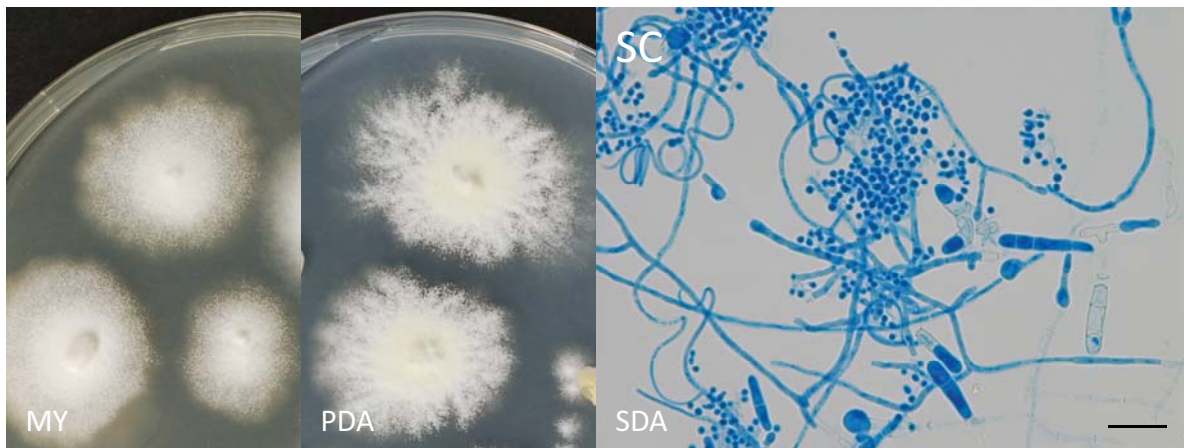


图 4

图 5

图 6

C. *Trichophyton mentagrophytes*

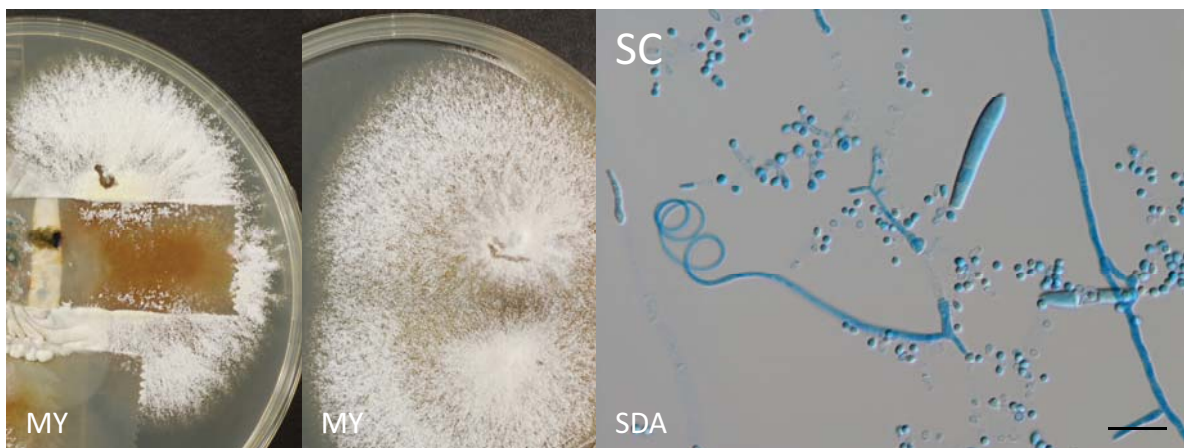


图 7

图 8

图 9

D. *Trichophyton erinacei*



图10

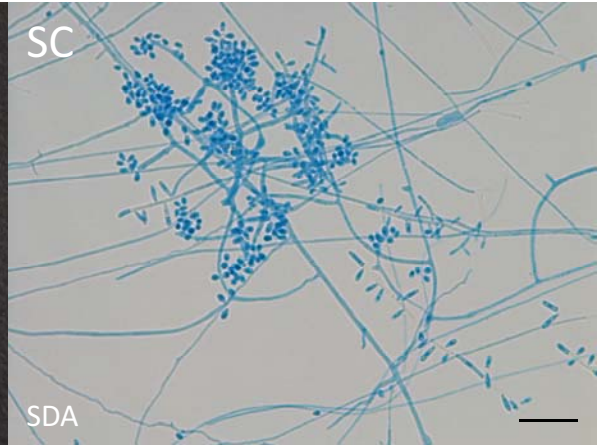


图11

E. *Trichophyton rubrum*



图12



图13



图14

F. *Trichophyton tonsurans*

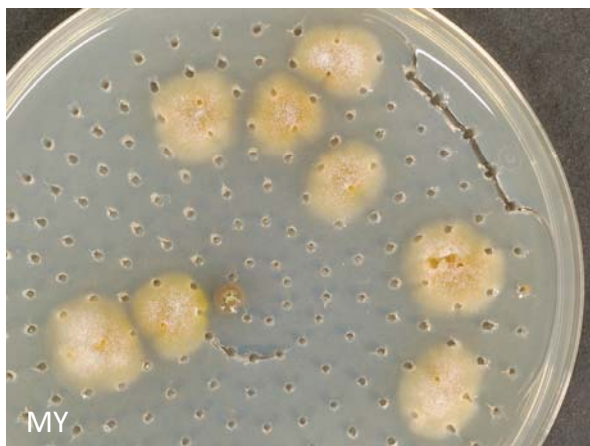


图15

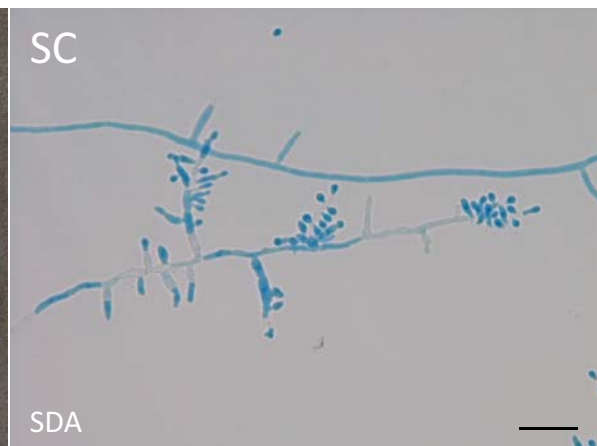


图16

G. *Microsporium canis*



図17

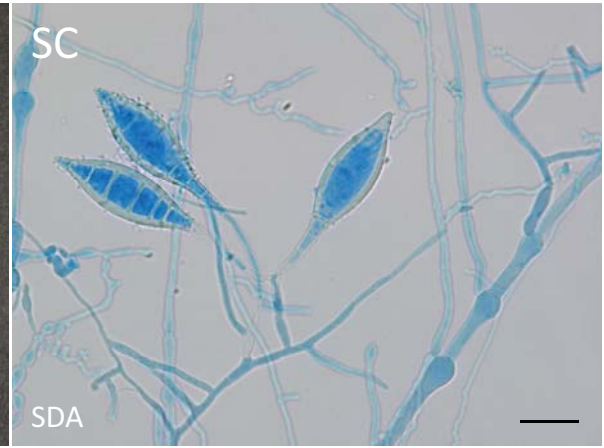


図18

H. *Microsporium gypseum* complex (*Nannizzia gypsea* など)



図19



図20



図21

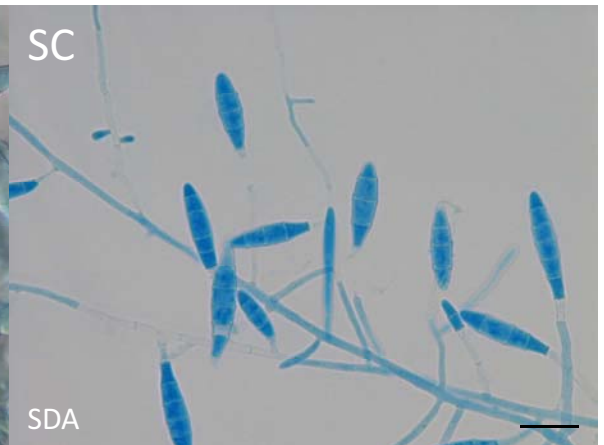


図22

I. *Epidermophyton floccosum*



図23



図24

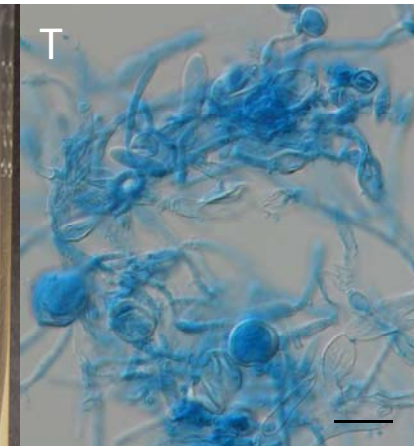


図25

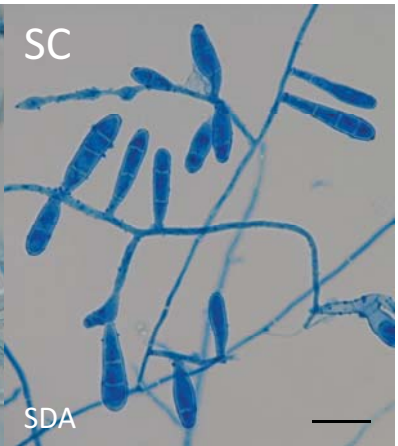


図26

J. *Exophiala* spp. (*E. xenobiotica*, *E. jeanselmei*, *E. oligosperma* など)

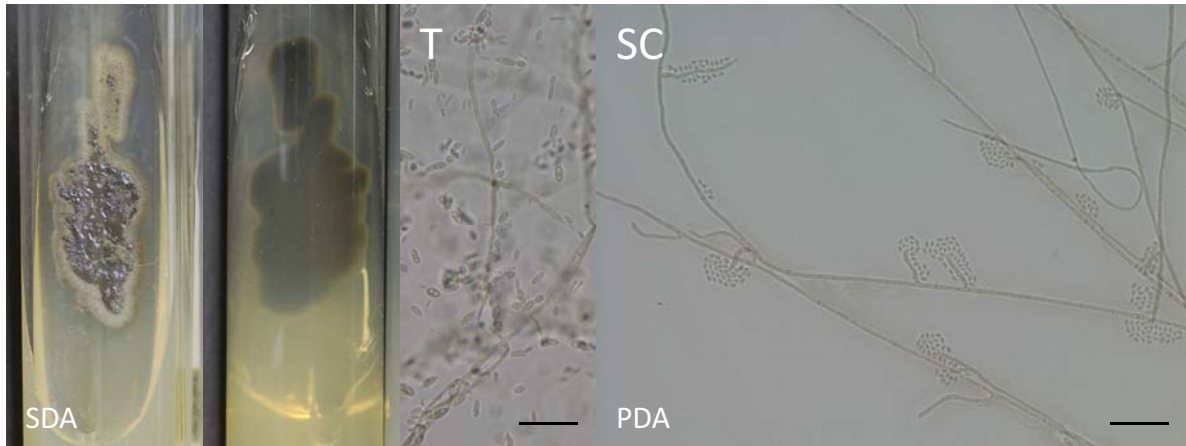


図27

図28

図29

図30

K. *Fonsecaea monophora*

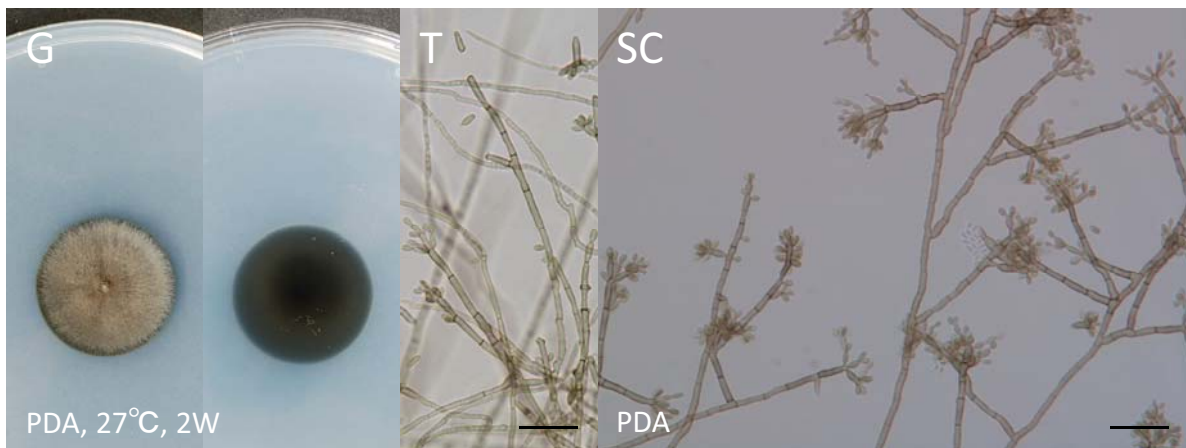


図31

図32

図33

図34

L. *Sporothrix schenckii* complex (*S. schenckii*, *S. globosa* など)

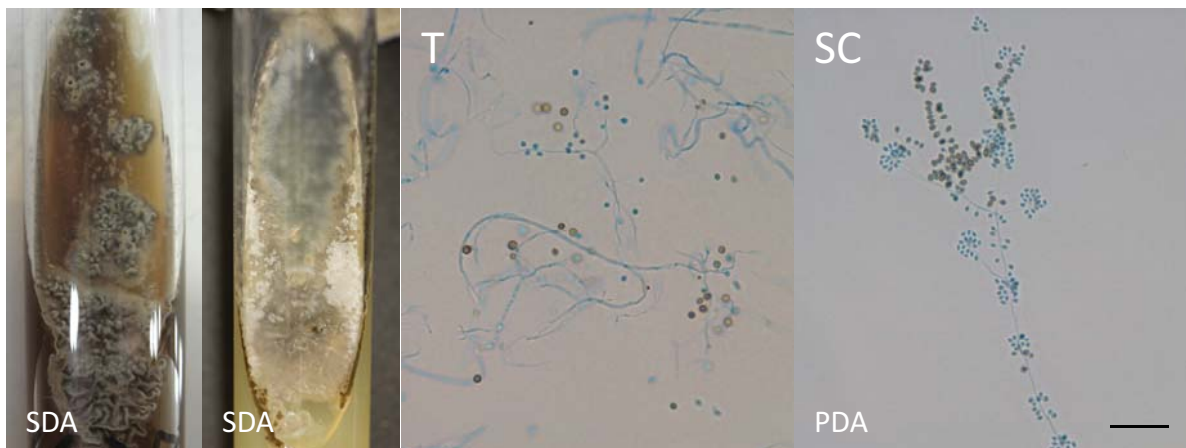


図35

図36

図37

図38

M. *Scedosporium apiospermum* complex

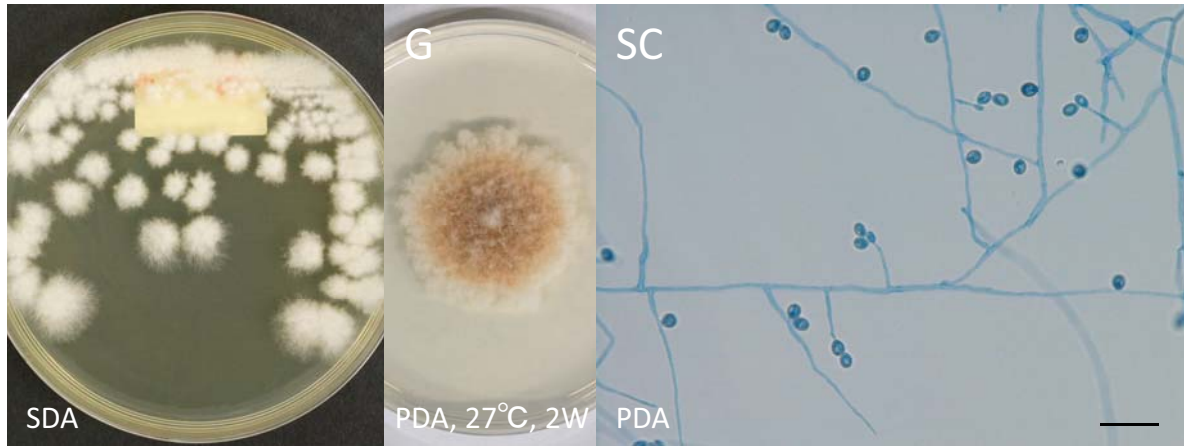


図39

図40

図41

N. *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. parapsilosis* など)

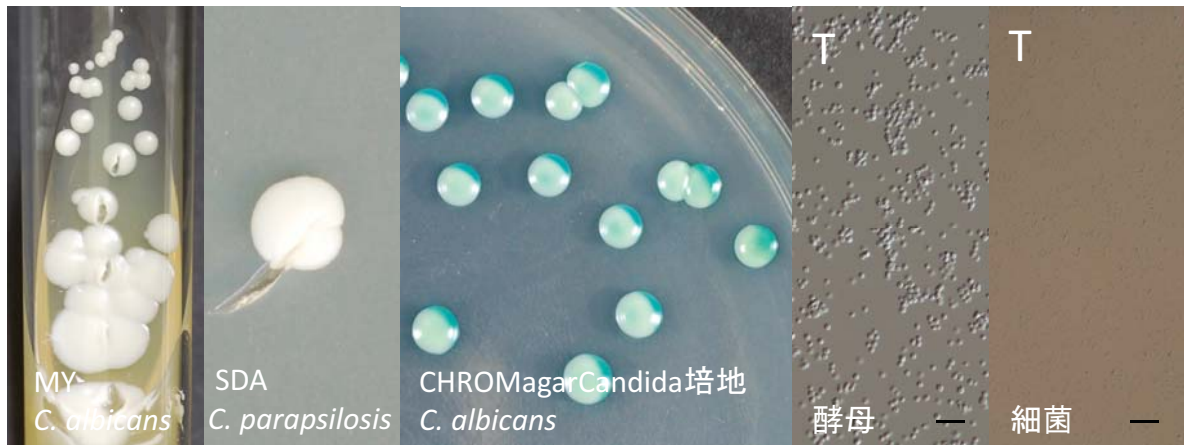


図42

図43

図44

図45

図46

G: 巨大培養
T: かきとり標本
SC: スライド培養

SDA: サブローデキストロース寒天培地
PDA: ポテトデキストロース寒天培地
MY: マイコセル寒天培地
図中のサイズバーは全て 20μm

皮膚科医のための真菌講習会テキスト

発行日 平成 31 年 2 月 28 日
発行 金沢医科大学皮膚科学講座
発行責任者 望月 隆
印刷 田中昭文堂印刷株式会社
