



# 外来診療における 皮膚糸状菌の検査・同定法 —培養・分離同定編—

監修

日本医真菌学会評議員

楠 俊雄 (くすのき皮膚科院長)

日本医真菌学会評議員

比留間政太郎 (順天堂大学医学部皮膚科講師)

日本医真菌学会評議員

山口 英世 (帝京大学医真菌研究センタ 名誉教授)  
(五十音順)

今日、皮膚真菌症の臨床領域においては、ステロイド外用剤の普及、血液疾患患者、腎移植患者、AIDS患者などの免疫不全患者の増加に伴ない、非定型的な臨床像をとる症例が増加してきたこと、その病原となる真菌の種類が多様化してきたことなどが指摘されています。皮膚真菌症の診断は、

- (1) 皮膚症状をよく観察し、まず真菌症を疑うこと、
  - (2) その病巣部からKOH標本などにより直接鏡検で真菌を証明すること、
  - (3) 原因菌を分離同定すること
- によりなされます。

これは真菌が細菌類などと異なり、病巣内の菌を光学顕微鏡で容易に観察することができること、原因菌をブドウ糖寒天培地などの簡単な培地で培養することができることなどの特徴を考慮したものです。この際大切なことは、顕微鏡で観察された菌の寄生形態と培養された菌の所見が一致することです。

この小冊子では、「直接鏡検編」に引き続き、皮膚糸状菌を中心に「分離培養法」、「菌種同定法」および「皮膚糸状菌主要菌種の特徴」について見ていきます。

## INDEX

### 外来診療における 皮膚糸状菌の検査・同定法 —培養・分離同定編—

#### **1 分離培養法**

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 1) 培地           | 3 |
| 2) 薬包紙、ゼラチンカプセル | 3 |
| 3) 培養の手順        | 4 |

#### **2 菌種同定法**

- |                |   |
|----------------|---|
| 1) 肉眼による観察     | 5 |
| 2) 顕微鏡による観察    | 7 |
| 3) 巨大培養・スライド培養 | 8 |

#### **3 皮膚糸状菌主要菌種の特徴**

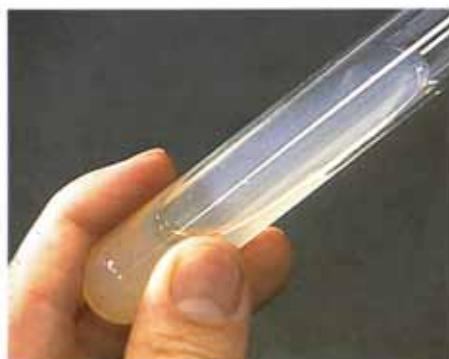
- |                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 1) <i>Trichophyton rubrum</i>         | 10 |
| 2) <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 11 |
| 3) <i>Microsporum canis</i>           | 12 |
| 4) <i>Microsporum gypseum</i>         | 13 |
| 5) <i>Epidermophyton floccosum</i>    | 14 |

真菌培養の目的は、その疾患の原因菌を決定し、最善の治療法を選択することです。分離成功率は直接鏡検で得られた菌所見、検体の採取量などが影響します。従って、日頃、直接鏡検と培養検査を繰り返し行ない、両者の結果の関係を体得することが大切です。また、菌種の同定に当たっては、真菌の細かな特徴を知識として覚えておく事も必要ですが、実際に自分で培養した菌を観察してみることが特に大切です。

## 1・培地

### ●サブロー・グルコース寒天斜面培地

使用する培地の種類によって、真菌の発育コロニーの形は様々な形態を示しますが、参考書に多く見られるコロニー形態の記載や、写真は、サブロー・グルコース寒天培地の場合のものがほとんどなので、この培地を用いるのが便利です。培地組成は、右下の表のように極めて簡単なものです。



### ●選択培地

採取部位に細菌感染があると考えられる場合には、クロラムフェニコールとシクロヘキシミドを加えた選択培地を使用します。しかし、この培地では、クリプトッコックス、アスペルギルス、ムーコル、ノカルジアなどの発育も抑えられますので、これらの菌が原因菌として疑われる場合は適当ではありません。

### 4%サブロー・グルコース寒天培地

ブドウ糖	40g
ペプトン	10g
寒天	15g
精製水	1000ml

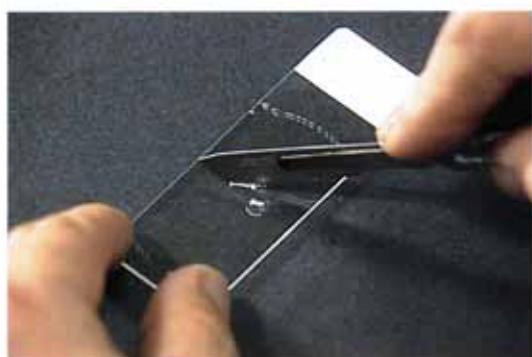
(選択培地の場合は、これに、クロラムフェニコール50mgと、シクロヘキシミド500mgを加える)

## 2・薬包紙、ゼラチンカプセル

真菌は厚い細胞壁をもち乾燥に強いので、薬包紙やゼラチンカプセル内で長期間生きたまま保存することができます。また、培養を他施設に依頼する場合には、この状態で検体を輸送することもできます。



### 3・培養の手順



①スライドグラスに消毒用アルコールを少量かけ、病巣から採取した検査材料をのせ、細かく刻みます。

真菌は短時間の消毒用アルコール処理では死にませんが、熱には弱いので注意が必要です。



②細断した検査材料の小片を、カギ型白金線を使って、培地表面の3、4ヶ所に埋め込むように接種します。



③真菌培養台帳と照らし合わせ、日付、患者名、検体採取部位などを試験管壁にマジックペンで記入します。



膿汁、分泌液、口腔内の白苔などは、培地表面に波状に塗り付けます。



④培養は、室温または25度で行い、菌の発育を観察します。

培養陰性と判定するには少なくとも、1、2ヶ月の培養が必要です。

真菌は、おおよそ、単細胞性の酵母と糸状の細長い菌糸をつくる糸状菌とに分けられます。白癬の原因菌は、皮膚糸状菌と呼ばれ、その菌種の同定は、巨大培養によるコロニー（集落）の肉眼的所見、スライド培養による胞子形成様式などの顕微鏡的所見、さらに色素産生能、尿素分解能、栄養要求性などの生物学的性状を総合して行います。

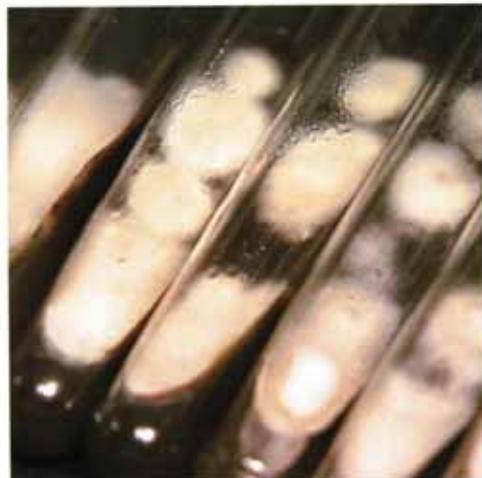
## 1・肉眼による観察

まず、発育した菌のコロニーを肉眼で観察します。菌種が違えば外観も異なるので、菌種の鑑別に役立ちます。肉眼による観察は、コロニーの発育速度、表面の外観（色調、きめ）、裏面の色調、培地の着色などに注目して行います。

日常最も多く分離される菌は、*Trichophyton rubrum*、次が*Trichophyton mentagrophytes*で、この2つの菌種で少なくとも分離菌の90%以上を占めます。慣れてくると、両者が典型的なコロニーを作る場合には、外観だけでも鑑別することができるようになります。

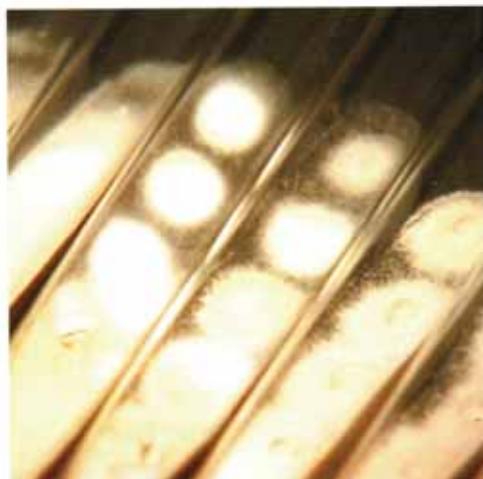
### ●*Trichophyton rubrum*

*Trichophyton rubrum* のコロニーの外観は、菌株によって様々ですが、表面は粉状、ビロード状、または綿毛状で、白色、ないし黄白色を呈し、紅色の色素を産生するのが特徴的です。



### ●*Trichophyton mentagrophytes*

*Trichophyton mentagrophytes* は、発育が速く、コロニー表面は黄白色粉状、または白色絨毛状を呈します。



## 以下のような例は、注意が必要です。



### ●培養陰性

白癬病巣からの原因菌(皮膚糸状菌)の分離率はおおよそ60%です。直接鏡検で菌が陽性であっても、培養で菌が生えてこないことも少なくありません。



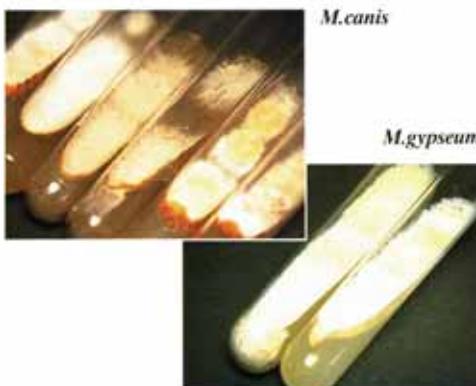
### ●汚染菌

この試験管には、白色クリーム状のコロニーが発育しており、カンジダ属と考えられます。しかし、臨床所見による診断は足白癬で、直接鏡検所見でも分節胞子が観察され、原因菌は皮膚糸状菌であったと考えられます。したがって培養で生えてきたこのカンジダ属の菌は汚染菌であって、原因菌ではないと考えられますので、同定検査をこれ以上進めても無駄です。



### ●黒色真菌

この黒色真菌も白癬菌ではありませんので、汚染菌と推察されます。



### ●*T.rubrum*, *T. mentagrophytes*

#### 以外の皮膚糸状菌

これらの菌株は*Trichophyton rubrum* や、*Trichophyton mentagrophytes*とは異なる皮膚糸状菌です。左上は*Microsporum canis*、右下は*Microsporum gypseum*という菌です。



### ●白色綿毛状の集落

白色綿毛状のコロニーをつくる場合は、特徴が少な過ぎて、コロニーを観察しただけでは菌種を同定できません。更に詳しい検査が必要です。

## 2・顕微鏡による観察

おおよそのコロニーの観察が終わったら、次に顕微鏡による分生子（胞子）などの観察を行います。顕微鏡による観察で、同定上特に重要なポイントは、胞子のサイズ、外形、着生様式、配列、菌糸の装飾によってつくられる特殊器官の形態などです。顕微鏡による観察には、以下に示すようないくつかの方法があります。

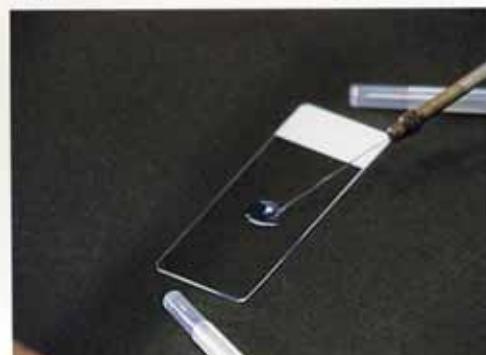
### ●試験管壁を通した観察

斜面培地のへりから試験管壁に沿って、試験管壁のガラス越しに、分生子などの観察を行います。

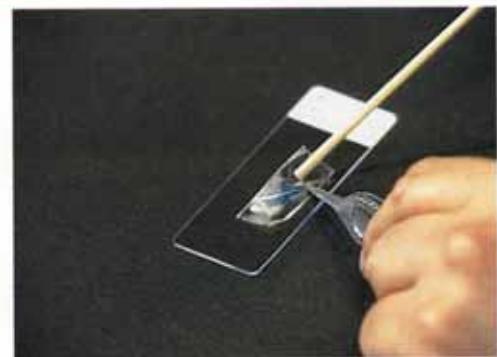


### ●ラクトフェノールコットンブルー染色による観察

コロニーの一部を白金耳で掻き取ってラクトフェノールコットンブルー液を滴下しておいたスライドグラスに載せ、注射針で菌糸をほぐした後、カバーガラスをかぶせて鏡検します。



セロテープと竹串を使用して、試料を取り標本を作製する方法も便利です。



### 3・巨大培養・スライド培養

正確な菌種の同定には、巨大培養やスライド培養などを行います。

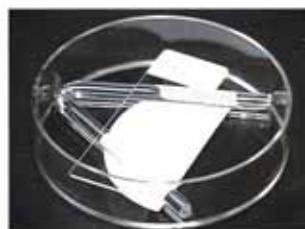


#### ●巨大培養の作り方

発育コロニーを詳細に観察するには巨大培養を行います。巨大培養を作るには、サブロー・グルコース寒天平板培地の中央に菌を接種します。これを長期間（4～8週）培養すると、1個の大きなコロニーができ、その特徴を容易に観察することができます。

#### ●スライド培養の作り方

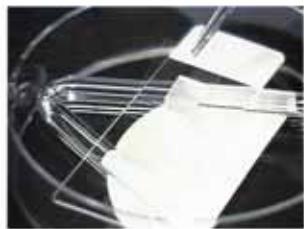
スライド培養法は、操作がやや煩雑な上に時間もかかりますが、最も詳細な観察が可能です。



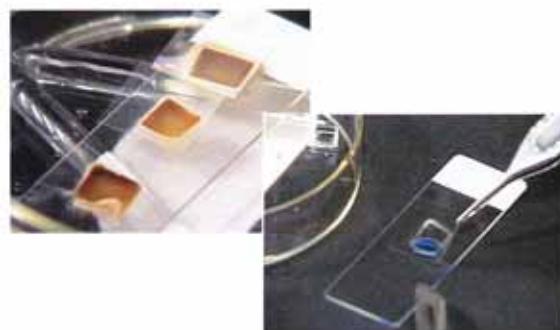
シャーレにろ紙を敷き、その上にU字形のガラス棒を置いて、スライドグラスを重ねます。



寒天培地を平板から1cm角に切り出し、スライドグラスの上に載せ、培地片の四つの縁に菌を接種します。



カバーグラスをかぶせ、下に敷いたろ紙に滅菌水を滴下して湿らせ、室温で培養します。ろ紙が乾燥しないように時々滅菌水を追加します。



何日かたって、菌がカバーグラスとスライドグラスの培地面に沿って発育しているのが肉眼で確認できたら、カバーグラスをはずし、あらかじめラクトフェノールコットンブルー液1滴を滴下した、新しいスライドグラスの上に静かに被せます。培養したスライドグラス側に残った菌も同様に標本にすることができます。



カバーグラスの周囲をネイルエナメルで封じると、永久標本として長期間保存・観察することができます。

皮膚糸状菌は*Trichophyton* 属、*Microsporum* 属、*Epidermophyton* 属の三属からなります。

### 皮膚糸状菌（広義の白癬菌）の主要菌種

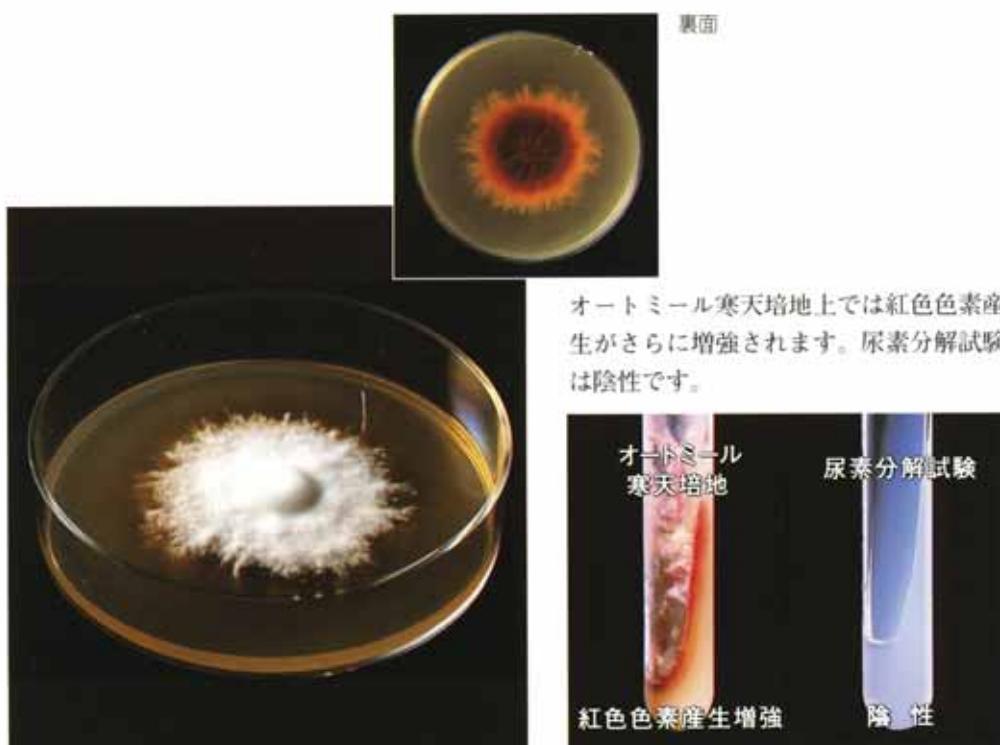
<i>Trichophyton</i> (白癬菌属)	<i>T.rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>T.tonsurans</i> <i>T.verrucosum</i> <i>T.violaceum</i> その他
<i>Microsporum</i> (小胞子菌属)	<i>M.canis</i> <i>M.gypseum</i> <i>M.audouinii</i> その他
<i>Epidermophyton</i> (表皮菌属)	<i>E.floccosum</i>

わが国で白癬病巣から分離されるのは比較的まれなものを含めて 8 菌種ほどです。ここではそのうちの主な 5 菌種の特徴を示します。

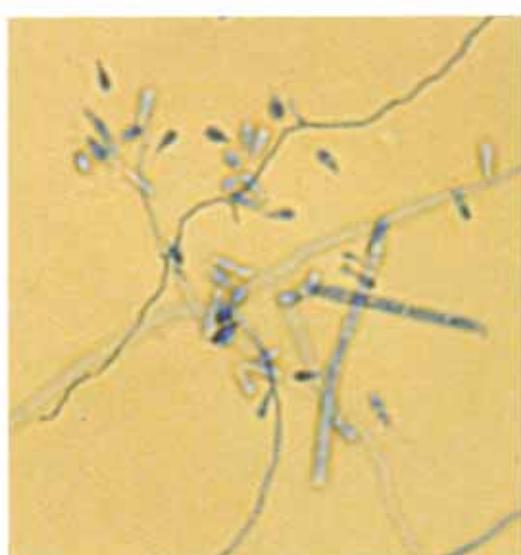
## ● *Trichophyton rubrum*

この菌は白癬の原因菌として最も多く分離される菌種です。

発育速度は中程度で、表面の性状は菌株により様々です。初めは棘状の小突起を有する湿性のコロニーですが、徐々に、粉末状、ビロード状、綿毛状となり、偏平で中心部には小さな隆起、陥凹、放射状溝などできます。表面は白色、黄白色、紅色などの色調を呈します。コロニー裏面の紅色の色素産生が特徴的です。



*T.rubrum* の巨大培養



*T.rubrum* の顕微鏡像

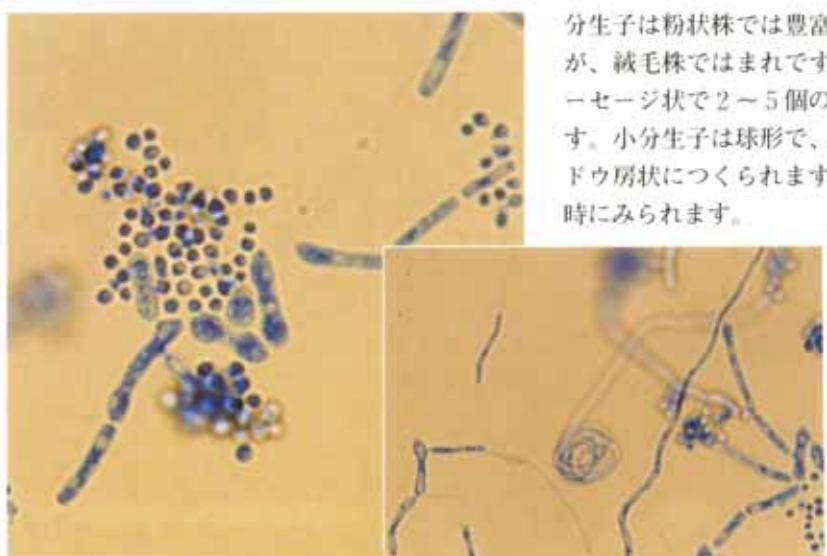
分生子形成は一般に不良で、特に絨毛株ではまれです。大分生子の形はソーセージ状ないし、こん棒状で、3～8個の細胞からなります。大分生子の細胞壁が平滑である点が *Trichophyton* 属の特徴です。小分生子はゴマ状、洋梨状で、単純性、つまり一個ずつ離れて形成されます。らせん器官はみられません。

## ● *Trichophyton mentagrophytes*

この菌は*Trichophyton rubrum*について多い白癬の原因菌種です。発育は速く、黄白色、粉末状のコロニーで、中央部に小突起が見られます。縁は鋸歯状で、白色の粉末状ないし短い絨毛性を呈します。裏面は白色から淡黄色です。



*T. mentagrophytes* の巨大培養



*T. mentagrophytes* の顕微鏡像

らせん器官

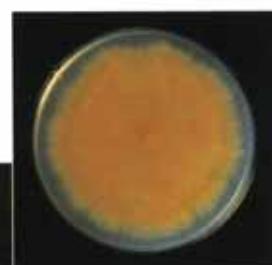
分生子は粉状株では豊富につくられますが、絨毛株ではまれです。大分生子はソーセージ状で2～5個の細胞から成ります。小分生子は球形で、単純性およびブドウ房状につくられます。らせん器官が時にみられます。

## ● *Microsporum canis*

発育は速く、黄白色から淡黄色の平坦なビロード状のコロニーを作り、その周囲は長い絨毛に覆われます。コロニーの裏面はクロム黄色を呈します。この菌は、動物好性菌で、しばしばイヌやネコが感染源となります。



*M. canis* の巨大培養



裏面

症例は、4歳男児に発症した本菌によるケルスス禿瘡で、感染源はネコでした。



*M. canis* によるケルスス禿瘡

大分生子は豊富に形成され、先端がとがった紡錘形で、細胞壁の棘が目立ちます。6～15個の細胞からなる大型のものです。*Microsporum* 属の大分生子は、細胞壁が厚くて棘があり、粗慥であることが最も特徴的な所見です。小分生子は数が少なく、棍棒状で、菌糸の側壁に単純性に形成されます。



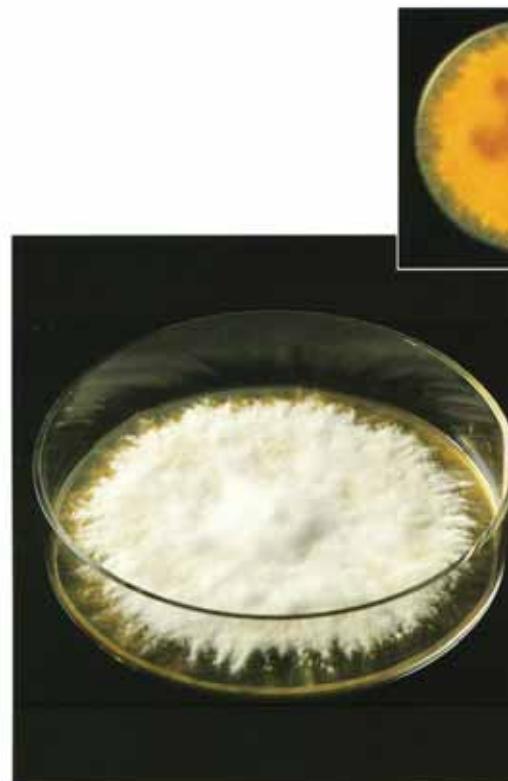
*M. canis* の顕微鏡像



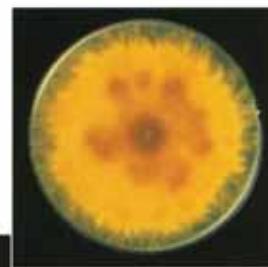
培養・分離同定編

## ● *Microsporum gypseum*

コロニーの発育は速く、表面は平坦、肌色、粉末状で、周辺部は白色の短い絨毛状を呈します。裏面は黄褐色です。



*M. gypseum* の巨大培養



裏面

症例は、3歳、女児の本菌による体部白癬です。この菌は土壤中に生息し（土壤好性菌）、動物やヒトに感染して白癬を引き起こします。



*M. gypseum* による体部白癬

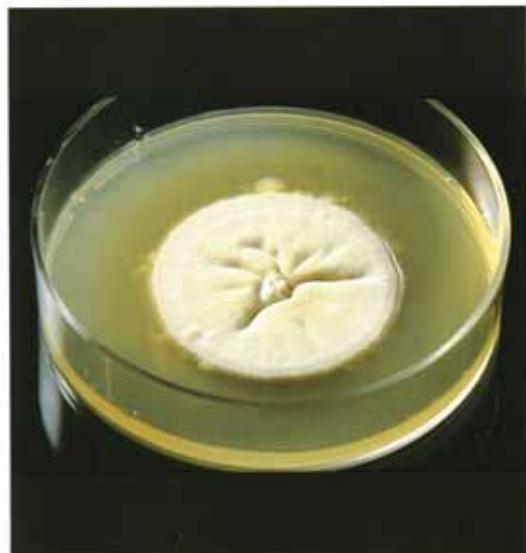


*M. gypseum* の顕微鏡像

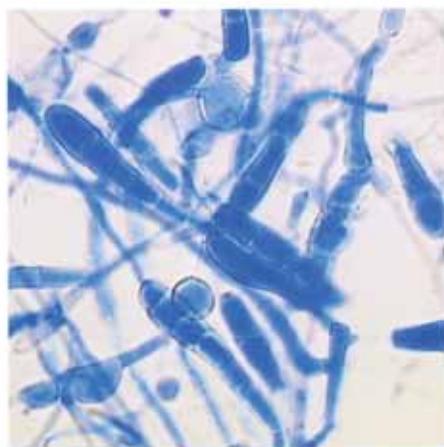
大分生子は豊富に形成され、先端が鈍い楕円形を呈し、4～6個の細胞からなります。小分生子は数が少なく、棍棒状で、菌糸の側壁に単純性に生じます。

## ● *Epidermophyton floccosum*

発育速度は比較的遅く、表面は短い絨毛状で、わずかに緑色を帯びた黄白色の色調を呈します。中心部はやや隆起し、放射状の溝を形成します。



*E. floccosum* の巨大培養



*E. floccosum* の顕微鏡像

小分生子がまったく形成されない点が他の皮膚糸状菌と異なります。一方、大分生子は菌糸側壁、および先端に多数つくられます。その先端は丸みを帯びたこん棒状、ないしは梢円形を呈し、細胞壁は薄く平滑で2～4個の細胞からなります。

皮膚糸状菌の直接鏡検、培養、同定は、白癬の診断、治療を行う上で大変重要な検査です。  
ぜひ、この小冊子を日常の診療にお役立てください。