

ファンギフローラ Y を用いた白癬菌の蛍光染色

(株) 菅原バイオテック教育研究所
医学博士 菅原 和行



■白癬について

白癬は、ヒトや動物の体表面を覆っている角質に真菌が寄生・腐生した状態であり、真菌は分化を終えた角質のケラチンなどを分解する酵素を自ら産生し、栄養源として分解利用しながら増殖

する。この菌体や代謝産物と宿主との免疫反応などによる臨床の諸症像があらわれる。また、患者の基礎疾患や免疫状態、患部の物理的状态などにより感染症状や経過は異なる。

通常は、角質層をこえ真皮まで真菌が侵入することはないため、多くの患者さんは、不快症状が長期化しても我慢するなど比較的軽視しがちな傾向にある。しかし、体表部に発生した白癬は、共有接触物を介しての感染、もしくは、自身の爪や他の体表部へ感染する難治例も多く見られ、まれには、眼科領域など治療が困難な部位へ感染する例もあり注意が必要である。

白癬の原因菌としては、表 1 に示した数種の真菌が主な感染菌種で、なかでも *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* の 3 菌種が約 90% を占めている。これらの真菌が、感染した体表部位により、頭部白癬、白癬菌性毛瘡、体部白癬、手白癬、足白癬、爪白癬など、異なった名称で分類される。同じ白癬の中で馴染み深い、足白癬（水虫）の臨床病型は、小水泡型（強い痒み）、趾間型（マタグサレ：二次的細菌感染）、角質増殖型（ヒビワレ：ガサガサ足底）、無症状型（無自覚キャリアー）と多様である。

白癬には、外用薬と内服薬とによる治療法がありいずれも、治療には 3 カ月から半年～1 年の長期間を要する事が多い。このため、患者が自己判断で市販外用薬のみに頼り正しく治療されない例や通院治療をしても痒みなどの不快症状の改善を治癒と勘違いして患者自身が治療を止める例などが多く、完治することなく軽快・再燃とが反復し、数年以上に渡り長期化する例もある。

■蛍光染色による画像報告の意義と効果

完治の途中で治療放棄される原因としては、これまでの患者への診断結果報告法にも要因があると思われる。通常、①採取した被検体を担当医が検査もしくは、検査センターに提出し患者は白癬陽性という結果のみを知らされる。または、②専門家でも判断が難しい例がある真菌画像を白癬菌ですと正確な理解無く説明を受けていた。③また、近々市販されるイムノクロマト法も特異性や感度は高い検査法であるが同様に試験結果の陽性ラインの提示もしくは検査結果だけを聞かされる。このため、患者さんは自分の真菌感染の実態への緊迫感は低かった様思う。

白癬の治療は、専門医による完治の診断を受けるまで長期間の治療を必要とするため、患者さんに正確な治療計画の伝達と患者さんの協力が必要です。これには、患者自身の角質層に寄生・腐生した真菌の実態を直接解り易い画像を見て頂くのがもっとも効果的です。これには、ファンギフローラ Y を用いた白癬菌の蛍光染色が最適と思われる。本法は、検出感度も高く、患部の材料を採取した後、10 分前後の操作で簡単に染色でき、真菌は黄緑色の蛍光に染まり、分岐した菌体と隔壁も明瞭なため、菌体を初めて見る患者さんでも容易に鑑別できます。患者さんから採取した試料に、白癬菌の菌糸体が角質を浸食し広がった菌体画像をモニターで見た患者さんは驚嘆し、完治への願望を強く抱かれます。この時に、完治までの長期間に渡る治療計画を説明すると治療への協力が得られやすいと思います。

白癬の内服治療薬としては、グリセオフルピンは、500-1000mg/ 日を治癒するまで連続投与、イトラコナゾールは、400mg/ 日を 1 週間内服し、3 週間休薬するパルス療法を 3 回繰り返す。テルбинаフィン、125mg/ 日を 24 週間連続投与が行われる。副作用の発現率は順に、28.3%、7.94%、10.76% と言われているためそのモニターとして定期的な血液検査を受ける必要がある。

比較的外見上からの観察で推察される事が多い足白癬でも、前述の治療協力を得る手段としてだけでなく、類似症状が多いため確定的な鑑別検査が必要となります。足白癬と区別が必要な症状としては、加齢による角化型の生理的変化、湿った足指間の細菌感染、カンジダなどの白癬菌以外の真菌感染、植物・金属・化粧品などの接触皮膚炎、汗疱、掌蹼膿疱症、多形滲出性紅斑などがある。

■ファンギフローラ Y による蛍光染色の原理と留意点

ファンギフローラ Y は、真菌の細胞壁に存在する多糖類（セルロース、キチン）に染着します。しかし、多糖類の中でも β 構造をもつ多糖類には染着するがデンプン、グリコーゲン、アガロースなどの α 構造をもつ多糖類には染着しない。また、ファンギフローラ Y は、真菌だけでなくセルロースやキチンを有する赤血球、ケラチン、組織内コラーゲンおよび植物性の繊維や花粉なども染着される。これらは、形態上の相違から真菌との鑑別は容易である。また、試料中に真菌以外の染着物質の存在が予測される試料では、A 液（変性ヘマトキシリン）を用いて予め対向染色すると観察が比較的容易です。また、ファンギフローラ Y は、その染着特性上、接合菌の細胞壁への染着は極めて低い。

■ファンギフローラ Y の染色の実際

白癬では、鱗屑（りんせつ）、爪、皮膚などが材料となるが、これらは、丈夫なケラチン質に覆われているため、角質層を縦横無尽に貼り廻った菌糸はそのままでは見え難いため染色前に KOH でケラチン層を溶解する必要がある。通常は、10%～15%の KOH、これに 10% グリセロールを加えたものもしくは 40% の DMSO（Dimethyl sulfoxide）を加えたもの（ズーム法：久光製薬株式会社より市販化）などを用いる。処理時間は、2分から 10 分間、爪の場合は 30 分～数時間が必要です。試料を KOH 処理する場合の容器は、試料の大小にもよるが、通常は、1.5ml の遠心チューブを用いると操作が容易です。また、トラストメディカル（株）で開発された Well 付ポリマー樹脂スライドの Well 内で一連の処理・染色操作を行えば、試料のロスが無く効率的な作業操作が可能です。

具体的な、染色操作は図 1 に示したが、試料をメタノールで 2～5 分間殺菌・固定し、メタノールを除去後、KOH 処理を行う。KOH 液を除去・洗浄後、染色 A 液、B 液の順に染色する。A 液での染色は、試料によっては省いてもよい。染色 B 液は自己蛍光が強いため検出感度を上げるには組織内に浸透した染色 B 液の十分な洗浄、もしくは染色標本をカバーガラス上から圧縮するのが効果的である。染色後の試料をスライドガラス上に移し、カバーガラスをかけ蛍光を観察する。

■蛍光染色標本の観察

フィルターモジュール V（紫）：395-425nm、または UV：330-380nm の励起波長で励起された黄緑色の蛍光を観察します。また、LuminTM など LED を用いた 490nm の励起波長でも観察できます。標本に、分岐し張り巡らされたライン状の菌体と隔壁が濃く染着した真菌体の画像が検出されると白癬菌陽性です。ただ、注意すべき点は、ティッシュペーパーの破片やセルロース素材なども強く染着されるため、分岐した菌体と隔壁の存在、菌体幅の均一性、非先鋭な末端構造などの確認が必要です。また、厚い試料での深層部での感染例や微量の菌数感染例などでは、材料を圧縮し易いように、KOH によるケラチン溶解時間を、5 分間（皮膚など）、30 分間（爪など）以上置いた方が検出が容易である。観察時の顕微鏡の倍率は、基本的な確認事項を順守すれば 100 倍で充分であるが、200 倍や 400 倍での観察がより鑑別は容易である。



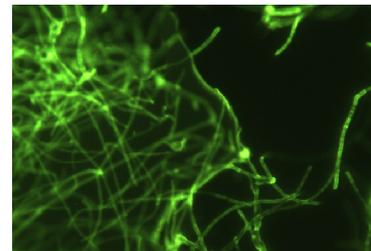
A 液（対向染色液）：変性ヘマトキシリン：8 mL

B 液（蛍光染色液）：蛍光染料（pH7.2）：8 mL

※本キットで 1 滴使用の場合、約 160 検体の染色ができます。

※標準価格 セット（A 液+B 液） ¥19,000（税別）

◆貯法 冷蔵保存（2～8℃）。



ファンギフローラ Y による白癬菌の蛍光観察画像

TRUST
Medical

〒679-0105

兵庫県加西市朝妻町 1044 番地

トラストメディカル株式会社 統合開発部

お問い合わせは TEL 0790(47)9008

プロフィール（菅原和行）

略歴

1970年 長崎大学医学部付属病院検査部勤務

（臨床化学検査、微生物検査、肺機能検査、遺伝子検査を担当）

2000年 長崎大学医学部付属病院検査部副技師長

2005年 長崎大学大学院医学研究科 博士課程修了

2008年 長崎大学医学部付属病院検査部 退職

2008年 菅原バイオテック教育研究所 開設

2010年 株式会社菅原バイオテック教育研究所 設立