

微生物検査

江口 洋 Hiroshi Eguchi

近畿大学医学部堺病院 眼科

〒590-0132 大阪府堺市南区原山台2-7-1

感染症での細隙灯顕微鏡検査

前眼部炎症性疾患の診断において、最も基本的な情報は細隙灯顕微鏡検査で得られる。結膜炎では、結膜充血の程度や眼脂の性状、および結膜濾胞や結膜乳頭を観察することで、細菌性結膜炎かウイルス性結膜炎かアレルギー性結膜炎かの大雑把な分類ができる。角膜炎の場合、角膜の混濁が浸潤なのか膿瘍なのか、および、それらの範囲や形状を観察することで、感染症か免疫反応かを推察できる。その結果、治療の主座を抗微生物にするか、免疫抑制にするか、場合によっては真逆となる治療を的確に選択できる。

感染症の場合は、細菌感染か真菌感染か原虫感染かも、大雑把な判断できる。なかには、属レベルで起炎菌の推定が可能なこともある。例えば、コンタクトレンズ装用の既往がある症例での輪状角膜膿瘍の場合は緑膿菌感染を疑うことができ、同様にコンタクトレンズ装用者に、角膜全面に及ぶびまん性浸潤や局所的な多発性浸潤、上皮の不正、および強い毛様充血や輪部炎がある場合、アcantアメーバ角膜炎を疑うことができる(図1)。角膜ヘルペスの上皮型病変は、その特徴的なフルオレセイン染色像(図2)から臨床診断は容易であり、角膜ヘルペスの既往がある患者の円板状角膜炎を見つければ、実質型の角膜ヘルペスを疑う

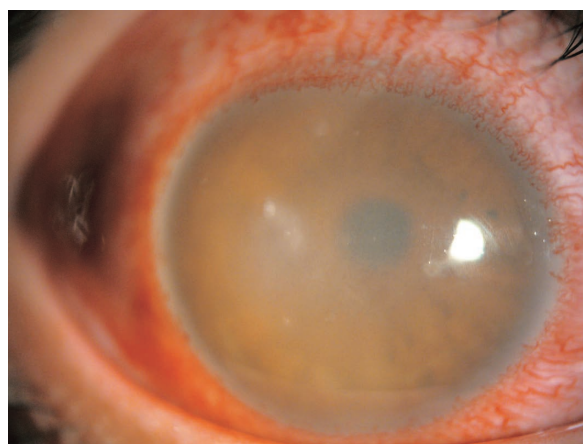


図1 アcantアメーバ角膜炎

強い毛様充血と角膜上皮の浸潤がある。

ことも難しくはない。これらは、いずれも細隙灯顕微鏡所見だけで臨床診断に至る。当然、そのような臨床診断を元に empiric therapy を開始するため、細隙灯顕微鏡検査は、感染症診療において最も重要な検査と言える。

細隙灯顕微鏡検査の限界

感染症診療において重要な細隙灯顕微鏡検査だが、限界もある。細菌・真菌感染症において、起炎菌の属や種の違いが予後に影響する場合、細隙灯顕微鏡所見だけでそれらの違いを予測することは、ほぼ不可能である。従来から、いくつかの細隙灯顕微鏡所見と起炎菌との関連が述べられてい

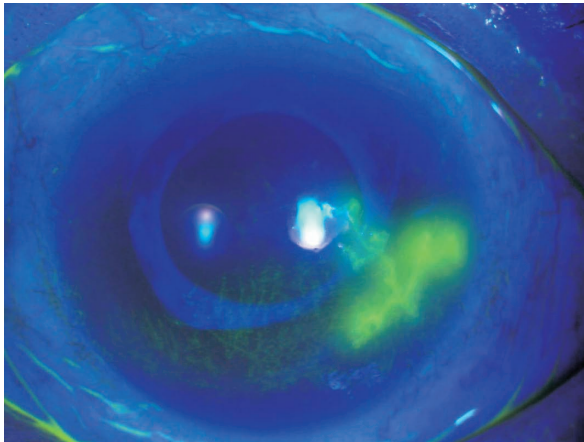


図2 角膜ヘルペス

上皮型角膜ヘルペスの典型的な所見である。樹枝状潰瘍がある。この所見だけで上皮型の角膜ヘルペスと診断してよい。

るが、必ずしもその通りではない症例もある。例えば、前述の緑膿菌性角膜炎は輪状膿瘍が特徴とされるが、実際には輪状膿瘍とは言えない角膜混濁を呈する症例が多く存在する。かつてアcantアメーバ角膜炎は、輪状浸潤や輪状膿瘍を呈する症例が多かったが、昨今は、病初期に発見される症例が増えており、多彩な細隙灯顕微鏡所見を呈すると考えておくべきである。角膜ヘルペスでは、他の疾患として長期的な治療をしたりステロイドを投与したりすると、細隙灯顕微鏡所見は典型的な像にはならない。感染性角膜潰瘍が進行すると、その形態で起炎菌の判別はできない(図3)。感染症の厳密な診断は、より早期の消炎、ひいては良好な視力予後につながるが、そのような観点でみると、細隙灯顕微鏡検査には限界があるという認識も必要である。

微生物検査

感染症診療における微生物検査は、細隙灯顕微鏡検査の限界を補うことで、早期に厳密な診断と

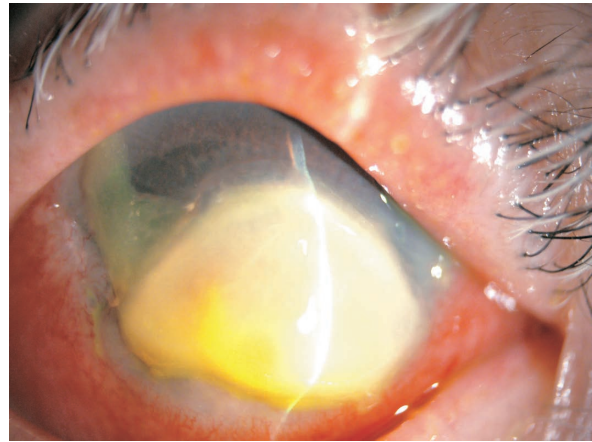


図3 細菌性角膜潰瘍の重症例

細菌感染か真菌感染か、それらの混合感染か、細隙灯顕微鏡所見だけで判別は不可能である。

治療を可能にし、良好な視力予後を得ることを目的として実施する以下の3つの検査がある。

1) 塗抹検鏡

①検体

眼脂、角結膜擦過物、涙嚢分泌物や涙点からの逆流物、前房水、硝子体液など

②方法

検体をスライドガラスに薄くスミアし、各種染色液で染色し光学顕微鏡で観察する。染色法は、標的にしている微生物や細胞に応じて適宜使い分けるのがよい。感染症を疑う場合でスライドガラス1枚分しか検体が採取できない場合は、グラム染色を実施する。感染症かアレルギーかを鑑別したい場合は、ギムザ染色(ディフ・クイック染色)を実施する。スライドガラス3枚分以上の検体が採取できた場合は、グラム染色、ディフ・クイック染色、ファンギフローラY染色、およびヘルペスウイルス蛍光抗体染色を実施するのがよい。染色液、洗面台、風乾用の送風機、エタノールがあればどこでも実施できるが、ファンギフローラY染色像とヘルペスウイルス蛍光抗体染色像を観察

表…眼科で分離される主な微生物のグラム染色性

染色性 形態	陽性 (紫色・青紫色)	陰性 (赤色・赤紫色・ピンク色)
球菌	黄色ブドウ球菌 表皮ブドウ球菌 レンサ球菌属 腸球菌	淋菌 モラクセラ属
桿菌	コリネバクテリウム アクネ菌* 放線菌	緑膿菌 セラチア属 その他多くの環境由来菌
その他	真菌, アカントアメーバ嚢子	幼若なアカントアメーバ嚢子

**Propionibacterium acnes*

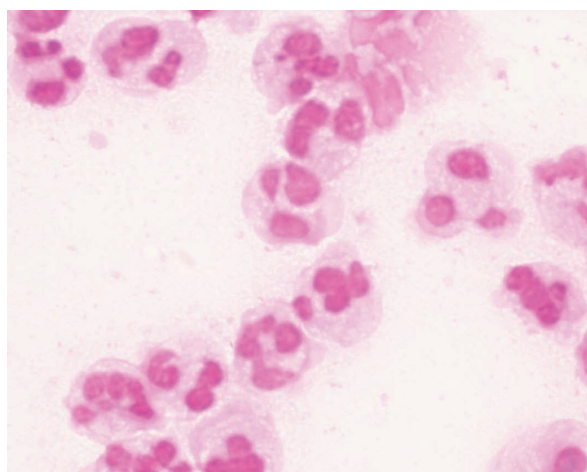


図4 眼脂のグラム染色像 (×1,000)

多核白血球の核までグラム陰性に染色されており, この塗抹像の染色性は良好である。

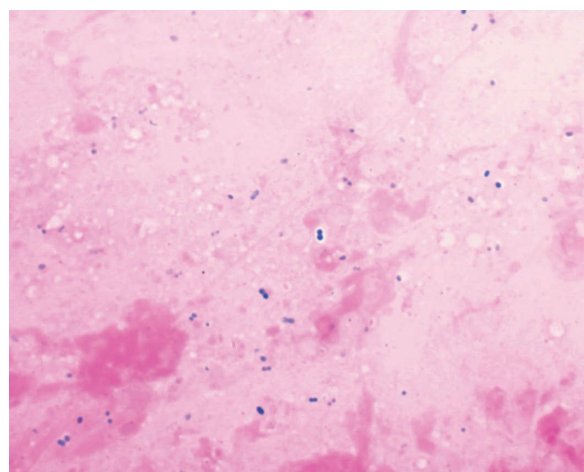


図5 角膜擦過物のグラム染色像 (×1,000)

グラム陽性双球菌が検出されたためセフェム系点眼薬を第1選択とする。
中央に, 莢膜で菌体周囲が抜けているものもある。

するには, 蛍光顕微鏡が必要となる。その他は, 光学顕微鏡で観察可能である。

③結果判定

細菌感染症におけるグラム染色では, 起炎菌をグラム陽性か陰性か, 球菌か桿菌かに4分類でき, 抗菌薬の選択に有益な情報となる (表)。動物由来の組織は, すべてグラム陰性 (赤色) に染まることで, 染色性の良し悪しを判断する (図4)。場合によっては属レベルの診断が可能である (図

5)。ファンギフローラY染色では, 真菌 (図6) やアメーバの嚢子 (図7) が明瞭に観察できるが, 非特異蛍光 (図8) と微生物との鑑別が重要である。

2) 培養

①検体

眼脂, 角結膜擦過物, 涙嚢分泌物や涙点からの逆流物, 前房水, 硝子体液など

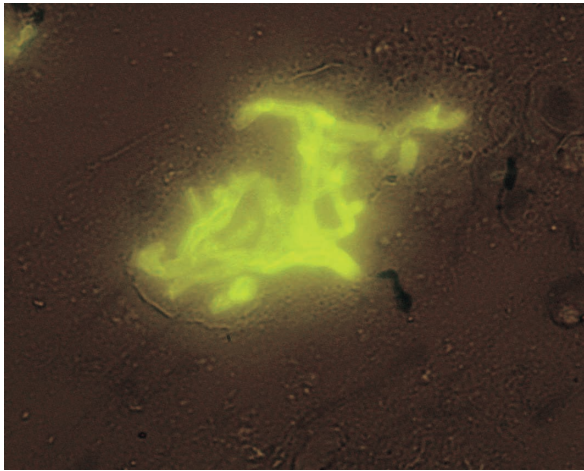


図6 角膜擦過物のファンギフローラY染色像 (×400)
励起光で真菌が明瞭に映し出される。

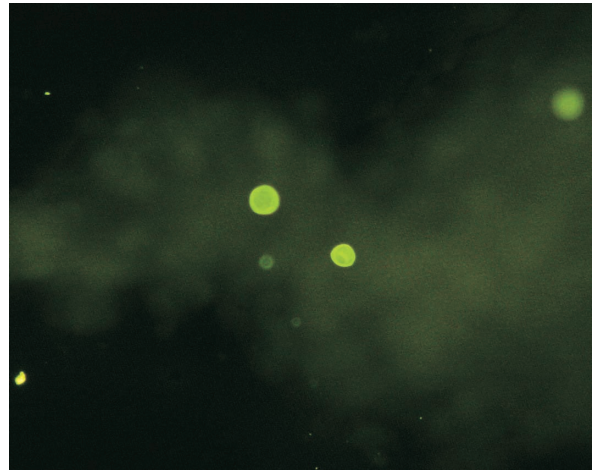


図7 ファンギフローラY染色でのアメーバ嚢子 (×400)
二重壁構造で円形のアメーバ嚢子が明瞭に映し出される。

②方法

何らかの滅菌された物品（綿棒，鑷子，ガラス棒，注射器など）で採取し，各種培地へ塗布する．輸送用培地の付属綿棒で採取し，そのまま輸送用培地に接種してもよいが，培地の成分や保管の条件が起炎菌にとって至適でなければ，培養陰性となる可能性があることを認識しておく．嫌気性菌を考慮するならば，嫌気ポーター（酸素吸収剤を入れた密閉容器）が必要である．眼科医側に細菌学的な専門知識がなくとも，事前に細菌検査部の技師に相談すれば，必要な培地や送付に必要な物品を準備してくれたり，より適切な検体採取・保存法を教えてくれたりする．その際，検体の種類，患者の疫学背景，疾患名に加え，標的としている微生物を伝えるとよい．真菌を考慮する場合，一般的にサブロー培地やポテトデクストロース培地を用いるが，可能であれば，同じ検体を同種の培地2枚に接種し，片方は37℃，もう片方は室温（約25℃）で培養するため培地は多めに準備する．自身で培養する場合，検査部に依頼する場合，受託機関に依頼する場合，いずれも真菌は72時間

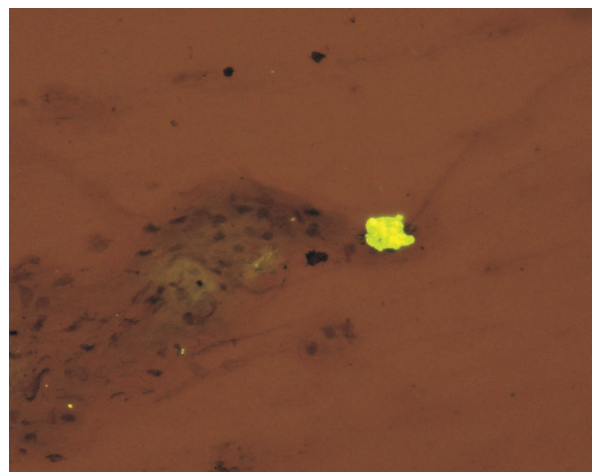


図8 非特異蛍光 (×200)

周りの組織よりも極端に励起光が強く，不均一な形態の物体として映る。

で培養陰性だからといって培地を破棄するのではなく，最低1週間，可能であれば1カ月培養を継続する．なかには7週間経過して培地にコロニーを形成する株もある¹⁾．

③結果判定

培養の結果が陽性，かつ事前に塗抹検鏡を実施していて，その結果と合致した場合は，間違いなく起炎菌と言える．同時に報告される薬剤感受性

試験の結果は、その後の薬剤選択の重要な根拠となり得る。塗抹検鏡との乖離がある場合、臨床経過を鑑み、どちらかと言えば塗抹検鏡の結果を重視する姿勢で起炎菌の判断をする。

培養陰性の場合、次の3つの可能性を考慮する。すなわち、1)すでに感受性のある薬剤が投与されていたため検体採取時、あるいは培養開始時に微生物が死滅していた可能性、2)培養は比較的容易な菌だが、検体の保管や培養条件が至適ではなかったため検査部で検出できなかった可能性、および3)培養不可能・難培養菌が起炎菌であった可能性である。1)についてはいかんともしがたいので、塗抹検鏡像と臨床経過でその後の治療方針を決定する。厳密には、起炎菌は不明と言わざるを得ない。2)は、臨床現場で頻発している現象である。これを回避するには、眼科医が細菌学的知識を身につけるか、細菌検査部の技師との連携を図ることが大事だが、最も簡単な解決策は、臨床現場の臨場感を技師に伝えることである。培養結果が患者の臨床経過にいかに関与するかを伝えるだけで、ほとんどの検査技師は、何とか病原微生物を分離しようと努力してくれる。検査技師との良好な人間関係が、培養陽性率を高くするとも言えるかもしれない。

3) 分子生物学的検査

①検体

眼脂、角結膜擦過物、涙嚢分泌物や涙点からの逆流物、前房水、硝子体液など

②方法

具体的な方法は、何を目的として、いかなる手法を用いるかで大いに異なる。細菌について言えば、保存法によっては簡単に溶菌してしまう種があるが、溶菌しても結果に影響しない手法と、大

いに影響する手法があるため、細菌を含んだ検体の保存法には熟慮が必要である。

③結果判定

いかなる手法を用いたかで、その結果の判定法、および判定結果の臨床的意義は異なる。一般的に、polymerase chain reaction (PCR)を用いた検査では、採取時の検体汚染の影響を大きく受けるため、その解釈は慎重でなければならない。例えば、前房水や硝子体液を採取する場合、角膜切開創、結膜、強膜を器具が通過する際、眼表面にいる細菌に1個体でも触れてしまうと、それが検出され起炎菌と誤診する可能性がある。逆に、ウイルスDNA検出目的で前房水を採取する場合、前房内炎症が強い場合は、血球成分がPCRを阻害するため、陰性となりやすい。分子生物学的検査の結果は有益なことが多いものの、そのみで診断し治療方針を決定することが危険な場合もある。

微生物検査の温故知新

かつて、感染症の起炎菌の定義としてコッホの3原則が提唱され、塗抹検鏡と培養が感染症の起炎菌同定に必須の微生物検査となった。すなわち、「一定の病気から一定の微生物が検出される」および「感染病巣からその微生物が分離される」ことを、塗抹検鏡と培養で確認をすることが必須であった。しかし実際には、病巣から必ずしも一つの微生物が検出されるとは限らず、複合感染の症例報告もまれではない²⁾。難培養菌が感染することもわかってきた。ゆえにコッホの3原則にも限界があり、それを補うべく、昨今の分子生物学的検査がある。

しかし、複合感染症例の病巣に感染している複

数の微生物において、その優位性が変化することを塗抹検鏡で捉えられ、その判断が良好な結果を得た報告もある³⁾。これは分子生物学的検査では決して得られないことであり、現代の感染症診療においても、古典的な微生物検査である塗抹検鏡が、いまだ重要な位置にあることを表している。すなわち、1) 塗抹検鏡・2) 培養・3) 分子生物学的検査が三位一体となることで、互いの検査の不足分を補い、より厳密な診断と的確な治療につながる。仮に、1) から3) のどれか一つだけで臨床診断を下さなければならない場合、最も重視すべきは塗抹検鏡であり、ついで培養である。検体が微量だからといって、分子生物学的検査のみで臨床診断を下すことは危険である。

文 献

- 1) Hayashi Y, et al. Polymicrobial sclerokeratitis caused by *Scenedosporium apiospermum* and *Aspergillus cibarius*. *Cornea*. 33 (8), 2014, 875-7.
- 2) Kalamurthy J, et al. Spectrum of bacterial keratitis at a tertiary eye care centre in India. *Biomed Res Int*. doi : 10. 1155/2013/181564.
- 3) Hotta F, et al. A super-infection in the cornea caused by *Stemphylium*, *Acremonium*, and *a*-*Streptococcus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 16 (1), 2017, 11. doi : 10. 1186/s12941-017-0187-z.