

SAC Academy

シリーズ連載………4



皮膚検査



百田 豊

[ももた ゆたか]

日本獣医生命科学大学
獣医保健看護学科 准教授

1995年に大阪大学経済学部を卒業し、同年に東京農工大学獣医学科に入学。その後、岐阜大学大学院連合獣医学研究科を修了したが、博士課程在籍中は千葉大学医学部皮膚科医局にて(国内留学)過ごす。2005年に岩手大学に着任したのち、2008年に現職。美容皮膚科学という新分野を開拓中。

はじめに

本稿では、皮膚検査の基本である皮膚搔爬検査、毛検査、テープストリッピング法、培養検査を主に取り上げる。これらの検査は、獣医師や動物看護師にとって在学中の講義・実習で出会い、働き始めた動物病院すぐに実践が求められる、基本的な検査である。しかし、実際に検査を現場で実践する段階で疑問が多く出てくる検査でもある。ルーティンな検査にもかかわらず、検査項目に関する評価方法が明示されていないからと思われる。理由として考えられるのは、感染症に関わる検査が多いため、定性的な評価はしっかりと確立されているものの、定量的な評価(検出された対象の数・量)を科学的観点から意義づけることが困難な点である。しかし、定量的視点は検査者にとって、気になるポイントのため、もやもやした感情が残るところである。その点は筆者が考案した評価法を一部紹介するので参考にしていただきたい。

皮膚搔爬検査(皮膚スクラッチ検査)

おもに、疥癬、ニキビダニ、真菌の検出を目的とする。病変部からメス刃や鋭匙、スパートルをもちいて搔きとり顕微鏡で観察する検査である。たとえば、鱗屑(フケ)が多い部分、脱毛部分、紅斑や丘疹を呈している皮膚病変が対象となる。

【準備】

メス刃(または、鋭匙、スパートル)、鉛油(ミネラルオイル、流動パラフィン)、スライドガラス、カバーガラス(図1)



図1

準備：メス刃、スライドガラス、鉛油

注意点) 一般にスクラッチ検査をする際は、メス刃の峰部分の柄部分(ツバ口)を把持するが、採材中に動物が動いて、“切っ先”での切皮を多く経験した。そのため本学医療センターでは、図のように“切っ先”側の刃先部分を把持する方法をとるように指導している。

【方法】

メス刃(または、鋭匙、スパートル)をもちいて病変部を搔きとり、検体を採取する。ニキビダニや疥癬を疑っている場合は病変部に鉛油を滴下した後に病変部をつまんで絞り出すイメージで搔きとりをおこなう(図1-1)。準備したスライドガラスに鉛油やKOH溶液を滴下しておく。その上に病変部分から搔きとった検体(被毛、落屑、痂皮、丘疹部から搔きとったもの)を移す(図1-2)。その後、適度にサンプルを広げた後にカバーガラスをかける。DMSO-KOH溶液の場合、数分～数十分静置して検査材料が軟化・透明化するのを待ってから観察する。(図1-3)

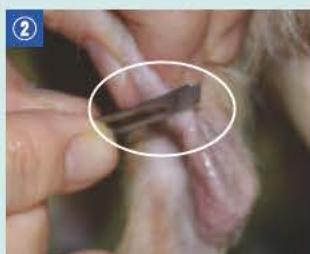


図 1-1

- ① 搔把をおこなう部位にあらかじめ鉛油を少量滴下しておく。
⇒ 理由：搔把した際に擦り取れた材料が鉛油中に混在した結果、検査材料が確保される。
- ② 毛包内の虫を押し出すようにやさしく絞るようにつまむ
- ③ 血が滲む程度まで皮膚を搔爬する
⇒ 搔把する工夫として、皮表の鉛油を集めるように擦る。
⇒ 往復するように擦ると材料を多く確保できる。
- ④ 材料が混じた鉛油を掬い取る。

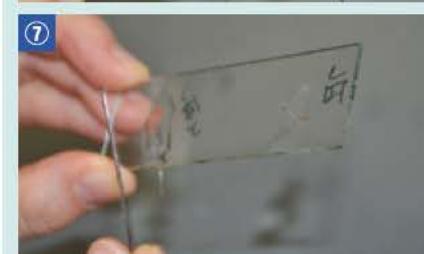
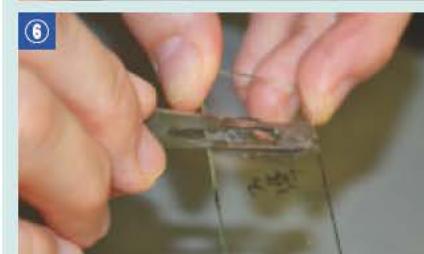


図 1-2

- ⑤ あらかじめ、スライドガラスにも鉛油を滴下しておく。
- ⑥ 刃上の材料をスライドガラス辺縁でこそぎ落とすように移す。
- ⑦ スライドガラス状の鉛油と材料を混ぜ合わせる。カバーガラスをかけて検鏡へ(図表にはない)。

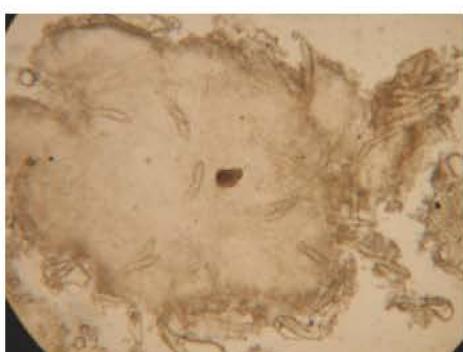


図 1-3

採取したサンプルが多い場合は、10～20 % 水酸化カリウム溶液 (KOH) で角質を溶解させて観察すると、デブリス中の検査対象を観察することができる。

【メモ】

スクリービングに使用する器具にはスパーーテルが使いやすいが、検査に使用できる手頃なものが購入できること、鋭匙は直線上の広い搔爬部分がないことから、メス刃を利用している。皮膚搔爬検査のコツは、皮疹部を摘み、血が滲む程度に搔

爬する深部搔爬が一般的で、毛包内の毛包虫の検出を目的としている。検査部位を広く搔爬し、複数箇所を検査する方が高い検出率に寄与すると考えている。角層表面のみを搔爬する浅部搔爬は主に疥癬を検出する目的でおこなうが、筆者は、疥癬目的でも深部搔爬で済ませている。また、採材したサンプルが大きな角質の残渣のため内部が観察しづらい場合は、DMSO 添加・水酸化カリウム溶液(DMSO-KOH 溶液)を加えて数分～数十分静置することで検査材料が軟化・透明化し、観察に役立つことがある。

【筆者の考え方】

毛包虫症に関して、皮膚搔爬検査と毛検査法(被験部位から100本抜毛する方法)と比較した論文(Saridomichelakis 2007)では、皮膚搔爬検査で100 % 検出された場合に毛検査法は85.1 % の検出率で前者が優れるという結論であった。筆者は抜毛数を増やした毛検査によるスクリーニングをしているため、皮膚搔爬検査は脱毛部の検査と位置付けている。しかし、非常に強力な殺虫効果と高い安全性を併せ持つ薬剤が上市されているため、治療的診断が実質的に可能な状況である。それに対して、疥癬は皮膚搔爬検査が重要な検査である。ちなみに、治療的診断は古典的な疥癬の診断法の一つである。

毛検査(トリコグラム)

被毛の状態の観察と皮膚糸状菌の検出、毛包虫を簡易的に検出することを目的とする。

【準備】

鉗子(モスキート鉗子など)、DMSO-KOH 溶液、スライドガラス、カバーガラス、爪楊枝(必要であれば)(図2)
注)DMSO : Dimethylsulfoxide、KOH : 水酸化カリウム

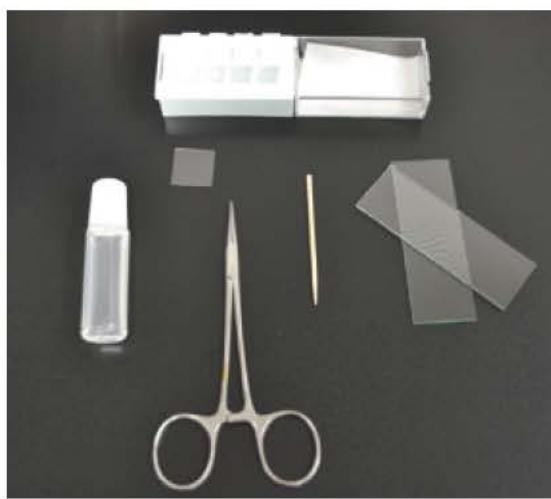


図2

【方法】

病変部から鉗子をもちいて抜毛をおこなう。皮膚糸状菌の検出を目的とする場合は、準備したスライドガラスに鉛油(皮膚糸状菌検出の場合はDMSO-KOH溶液)を滴下しておき、検体である被毛を載せてカバーガラスをかけておく。そして、数分～数十分静置して検査材料が軟化・透明化するのを待ってから観察する。

- ・被毛の毛周期を評価するためにもおこなわれる。搔爬による機械的な脱毛か(図2-3)、毛周期が休止期になっているため脱毛しているか(休止期脱毛、図2-4)を検査する。
- ・皮膚糸状菌による感染毛(図2-5)を検出した場合、確定診断となる。



図2-1

- ① 幹部から、被毛をしっかりと保持してから引き抜く。
注)被毛の保持が緩いと、抜け易い休止期の被毛のみ採取されるため、毛根部の評価に影響する。

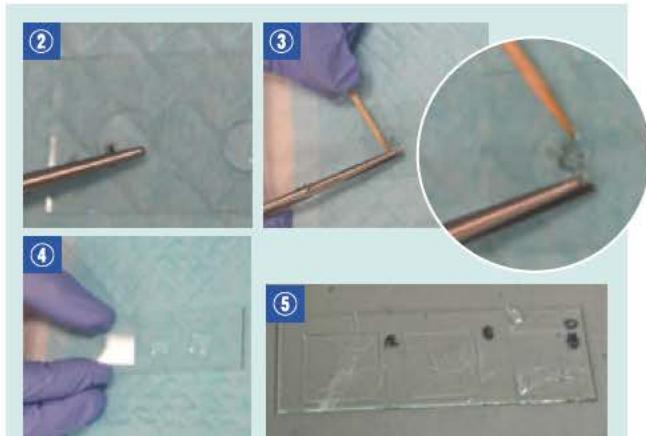


図2-2

- ② あらかじめ、スライドガラスに鉛油を滴下しておく。真菌検査では、鉛油の代わりに DMSO-KOH 溶液を使用する。
- ③ 保持した被毛をスライドガラス上に移す際に、爪楊枝などを使用すると、ストレスなく作業ができる。
- ④ 鉛油中に静置した被毛にカバーガラスをかけて、顕微鏡で観察する。
- ⑤ 複数個所の場合、採材部位の名称を振る

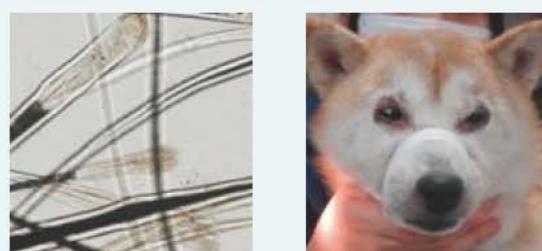


図2-3

機械的搔破による被毛遠位部(毛先)の毛先の破断・裂毛状態が観察される。モスキート鉗子で破壊された被毛も類似した所見が見られるので、注意する。

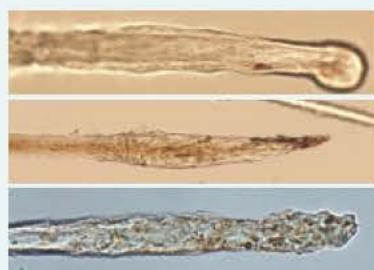


図2-4

成長期毛(上段)と休止期毛(中段)。下段の被毛は判断不能であるが、成長期毛の先端が破断したと思われる。



図2-5

皮膚糸状菌の感染毛(右奥側)と正常毛(手前)。感染毛は明らかに膨潤し毛径が肥大している。また、毛幹の構造が不明瞭になっている。

毛包虫用トリコグラム

【準備】

鉗子(モスキート鉗子など)、流動パラフィン、スライドガラス、カバーガラス

【方法】

病変部から鉗子をもちいて抜毛をおこなう。準備したスライドガラスに流動パラフィンを滴下しておき、被毛の毛根の方向を揃えて静置する。さらに、顕微鏡で観察するために、カバーガラスをかける。

【毛包虫検出のための変法】

カバーガラス(18×18 mm)に全体的に密に覆う程度の毛数を抜毛する。短毛種以外では毛根部から1 cm以下にカットしておく。毛包虫検出には、毛根周囲以外に診断価値がないからである。既報(Saridomichelakis 2007)では100本程度抜毛とあるが、筆者は診断ステップにはやや不安な本数を感じている。筆者的方法では、治療前の検査でスライドガラス全体あたり50~200匹程度検出された。治療が奏功すると全く確認されなくなる。評価法として、卵、幼虫、成虫でスライドガラス全体をカウントする。多忙な一次診療では過剰な評価かもしれないが、治療成果を評価するには有用と思われる。

【筆者の考え方】

休止期脱毛を診断するための毛検査には問題点がある。多くの品種では休止期毛が優位であり、90 %程度休止期が正常でも観察される品種の場合は、診断価値を求めることが難しい。むしろ、そう痒性疾患による機械的脱毛の確認のため毛先を検査する方が確実な利益が得られる。休止期脱毛の診断には、臨床所見を重視し必要であれば皮膚生検を組合わせる必要がある。

皮膚糸状菌の検出では毛検査での診断が確定診断とされる。個人的な経験では検出力が低いため、真菌培養検査または外部検査機関による遺伝子検査が一般的に必要となる。また、診断経験がないと検出ポイントが掴みにくいため、感染毛の観察をする機会を積極的に得るべきであろう。

皮膚押捺検査(皮膚スタンプ検査)

細菌とマラセチア菌、その他の病原体や細胞成分の検出を目的におこなう。

【準備】

スライドガラス、染色キット(簡易染色セット、ライ

トギムザ染色、グラム染色)、封入剤(マリノール、キシレンなど)、カバーガラス

【方法】

病変部にスライドガラスを圧着させて、サンプルを取る。耳道内や顔面などの皺、指間(趾間)などは清潔な綿棒で病変部から検体を採取して、スライドガラスに塗布するか、採材したサンプルが多い場合は転がしながら検体を塗布する。検体が載っているスライドガラスを、必要であれば乾燥させてから、染色をおこなう。後に再度観察したり外部の検査機関に提出する際は、定法に従って封入剤をもちいてカバーガラスを被せて標本を保存する。

テープトリッピング法

皮膚押捺検査の変法

【準備】

セロテープ(有機溶媒により変色しない高品質のもののが望ましい)、染色液(簡易染色キットの第三液、ニューメチレンブルーなど)(図3)

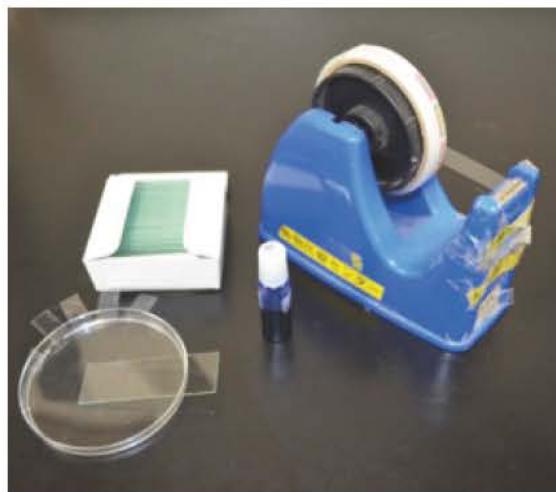


図3

日本獣医生命大学にて、検査の際に用意するセット。スライドガラスの幅程度のセロテープをあらかじめ切って準備している。指紋が着かないようにセロテープの端を切る。

【方法】

病変部にセロテープを貼り付ける。スライドガラス上に数滴分の染色液を載せておき、その上にセロテープを貼り付ける。テープから溢れる過剰な染色液はペーパータオルなどで拭き取る。そのまま、顕微鏡で観察する(図3-1)。



図 3-1

- 1 スライドガラスに検査部位の名称を書いておく。3枚のテープを貼ることが多い。
- 2 予め、数滴分の染色液を落としておく。
- 3 皮疹部にセロテープを添付して、皮表のサンプルを採取する。
- 4 そのまま、染色液の上に貼り付ける。
- 5 溢れる染色液をペーパータオルなどで吸い取る。
▷ テープ全面を染色するために、染色液を多めに使用する。

【日本獣医生命科学大学で実施している評価法】

テープストリッピング検査の評価法は明らかな“癖”がある。それを明快に説明しているテキストは欧米を含めて一切存在しないため、筆者が必要に迫られて開発した方法である。是非、参考にされたい。

《角質》 角質層を形成する最小単位は、表皮細胞が角化した“角質細胞”と呼ばれる。聞き慣れない細胞生物学用語と思われるかもしれないが、テープストリッピング法に詳しくなるには必要な専門用語であろう。角質細胞は5~6角形をしており、核が無いか名残(nuclear ghost: 角膜遺残物)が見られる。頻繁に、葉巻状に折疊まれて濃く染色された短冊状の角質細胞がみられる(図4-1)。皮膚が荒れると、ターンオーバーが亢進し有核細胞がみられ、角質細胞の集塊がみられるようになる。この集塊を筆者は“島”と呼んでいる。

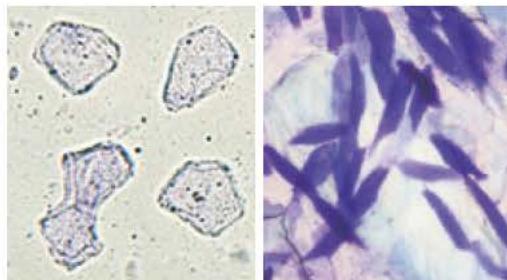


図 4-1

左図は、正常な形態を残した剥離した角質。
右図は、葉巻状に折疊まれた角質であり、色素が毛細管現象で入り込んで非常に濃く染まっている。

《好中球》 非常に観察が容易であると同時に、血液塗沫や細胞診での所見にとらわれている場合に、見落としがちな所見でもある。本学で指導している研修医の多くが当初、見識が浅い所見であるので、本稿の読者にも非常に役立つであろう。

テープストリッピング標本にみられる好中球は“島状”に集簇する場合が多く、典型的な所見である(図4-2)。筆者は、集簇した好中球の中に細菌がみられる場合が非常に多いこと、塊状の剥離した角質と絡み合うなどバリエーションが豊富なことから、細菌感染にみられる集簇傾向を示す好中球の一般的な所見と仮定した。ただし、細菌を認める、認めないにかかわらず、“島状”所見が膿皮症=治療対象といった判断はしていないことに注意を促したい。皮膚病の診断では臨床所見の判断を併せて総合診断するべきである。

“島状”に好塩基性に染色される所見は、錯角化を起こした皮疹部から数層の角層が剥離された“角質細胞集塊”が非常に多くテープストリッピング標本で観察される。しかも低倍率で好中球の集簇と非常によく似た所見を示すが、強拡大では、好中球の所見と容易に区別できる(図4-3)。

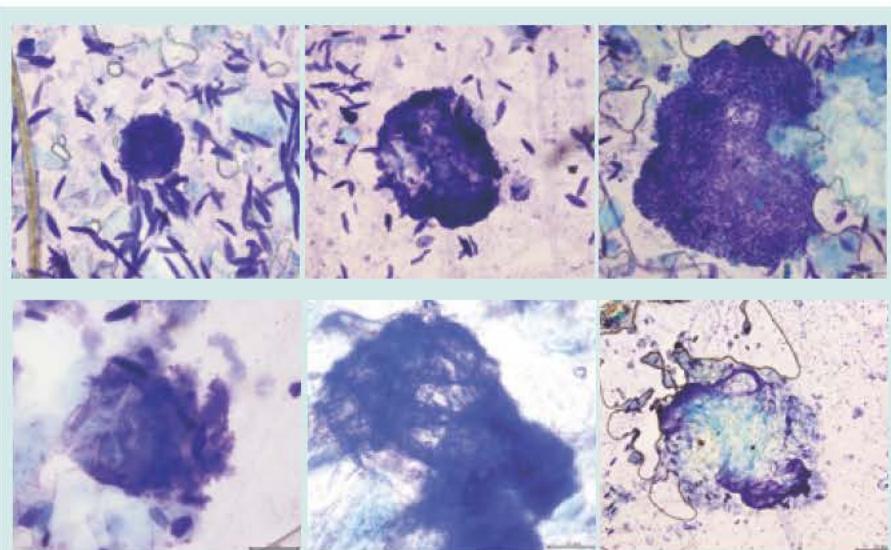


図 4-2

集簇した形態が多い。好中球は変性して、核内のDNA鎖が複雑に絡み合う。

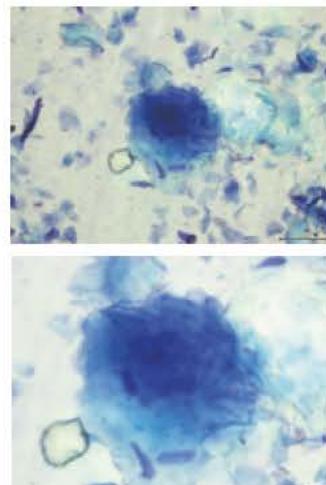


図 4-3

角質細胞の集塊は層状になっているため無染色か、上図のように強く染まり、好中球の集塊と間違이やすい。強拡大で観察すると容易に判別できる。

本検査では、好中球の変性が非常に進んでいることが一般的である。それに較べてマクロファージは細胞質を含めて表皮上でも形態を維持できる。図4-2で示したように、好中球の細胞質は消失しているものの本来の顆粒状の核を残した所見から、納豆の糸状に本来の血球形態とかけ離れたスメア状の所見まで幅広い形態を示すため、やや豊富な経験と他の観察部位から類推する技術が必要である。“島状”に剥離した角質細胞群と好中球は相性が良いようで、ドッキングした形態でたびたび標本上に現れる(図4-3)。

好中球にも細胞質が残っている変性が非常に少ない所見は、非常に湿潤した皮疹の場合、とくに落葉状天疱瘡や無菌性結節性脂肪織炎などの自己免疫性疾患の塗沫標本によくみられる(図4-4)が、表在性膿皮症ではみられない所見である。ただし、破裂していない新鮮な膿胞を注射針の先端で破って塗沫を作成する場合は血液塗沫にみられるような変性の少ない好中球の所見がみられる。(注)

(注) 明らかに膿皮症を疑う所見で膿胞がみられる場合は、細菌培養の検査の材料として推奨されている。

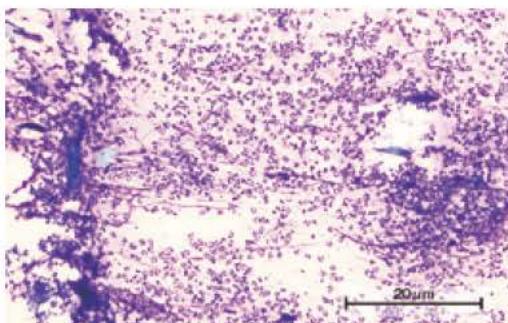


図4-4

変性度が低く、単核細胞が豊富な免疫介在性皮膚疾患でよくみられる所見。

【細菌、マラセチアの評価の考え方】

菌数の評価は臨床所見に比較して診断価値が低いことに注意したい。鏡顕検査の検出限界は 10^5 CFU/ml(g)程度である。標本の全視野をくまなく探し、数個の菌体がようやくみられる程度の菌数しかいなくても、培養検査の結果は1+～2+なので、明らかに菌体を見つけることができれば、感染症でみられる菌数に達している(佐々木崇博士の私信)。一方、臨床的に問題がなければ細菌が多い夾雜物が皮膚表面に付着しただけかもしれない。皮膚病の診断は臨床所見の診断技術から始まる総合判断という点を強調したい。

【細菌の評価】

細菌の大きさと形態に慣れるには、耳垢塗沫を利用して1000倍の油浸レンズを必ず油浸オイルを使用して観察することを薦める。指導者がいない場合の自己学習には非常に役立つ方法である。そして、細菌の形態をはっきり記憶しておく。なぜなら、夾雜物の多いテープストリッピングでは、

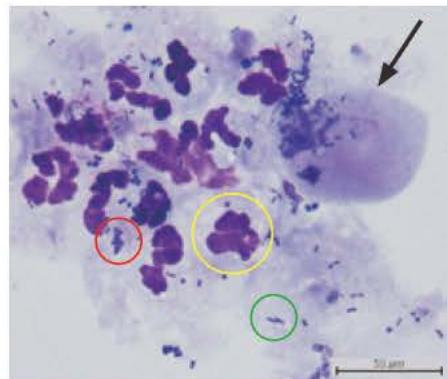


図4-5

耳垢塗抹標本。角質細胞(黒矢印)、好中球(黄円)、球菌(赤円)、桿菌(緑円)のサイズや形態の学習に向いている。

テープとスライドガラスの間の染色液も影響してクリアな像の観察が非常に難しいからである(図4-5)。好中球が集簇している部位から観察を始めると菌体の発見が早いと思われる。また、テープに貼りついた角質表面を観察することも夾雜物のない所見を観察することに非常に有用である。

細菌を見つけるために一番推奨したい優れた方法は、前述した集簇する好中球集塊に注目することである。島状の好中球集塊を画面に中央において油浸レンズ(1000倍)へ交換すると容易に細菌を見つけることができる(図4-6)。現在、日本獣医生命科学大学の研修医は、この方法で菌数の評価をおこなっている(表1を参照)。一方、新鮮膿胞を注射針の先で破って塗沫した標本内で球菌を貪食した好中球を探した図が正書では掲げられている。

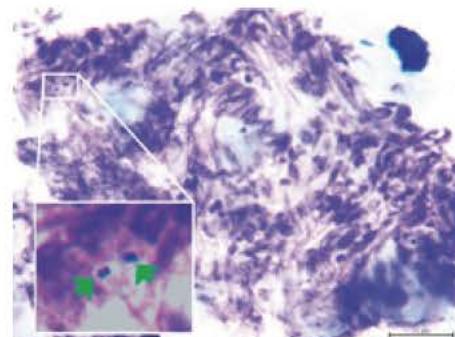


図4-6

好中球の集簇したところに、細菌がよく認められる。膿皮症の所見として、細菌の探索に適している。緑矢印が分裂した球菌を認める。染色性、連鎖、大きさから球菌と判断される。皮膚に認められるため、ブドウ球菌や連鎖球菌の疑いが確率的に高いと診断される。

表1 テープストリッピング標本における各指標の尺度

任意尺度	好中球	細菌： 一つの集簇好中球内の 1000倍における菌数
+	40倍で複数視野に 1個の集簇像	1～10
++	40倍で1～数個の集簇像	10～100
+++	40倍で5個以上の集簇像	100以上

細菌数の評価は、島状の好中球集塊で、1視野のみの計測とした。この判断でテープ全体の菌数を説明できないが、簡便性を優先した。

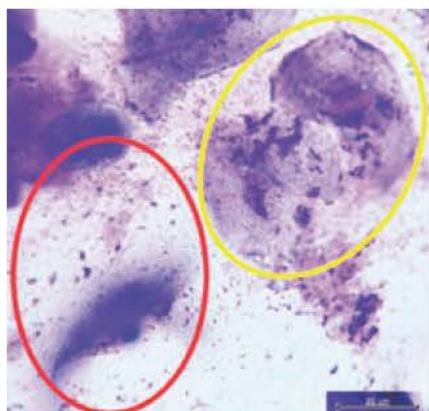


図 4-7

角質のないテープ上(赤枠内)は夾雜物と鑑別が難しいが、球菌は角質表面に良く分布して(黄色枠内)、夾雜物も少ない。

次に推奨する方法は、標本内の剥離された角質表面に存在する細菌を探索することである。なぜならテープ接着面と角質細胞で挟まれた空間内には夾雜物が入り込みづらいため、観察に適した環境といえる。図4-7に示すように、角質のないテープ上(赤枠内)には球菌のサイズに近い多数の陰影がみられるが、角質表面のような細菌の特色を反映した所見がないため観察に向かないことが一見して判断できる。細菌は角質のないテープ上にも角質のあるテープ上にも当然存在する。とくに球菌は角質表面に良く分布している(黄色枠内)。これは角質表面に特異的に接着する機能をブドウ球菌が有しているためと思われる(Lu et al. Vet Dermatol. 2007)。つまり、角質表面もブドウ球菌を探しやすい部位と筆者は考えている。

前述した方法は、簡易染色に依存した検査方法であり、グラム染色のように特異性があるわけではないため、推論を元にした検査方法に近いことを忘れてはいけない。臨床所見が一番重要であると再度述べたい。

【誤謬を起こしたり、疑問が生じる所見】

テープストリッピング標本は夾雜物が非常に多いことが特徴である。とくにパットの間の標本では、環境中の夾雜物が標本に接着することが非常に多い。シャンプーを定期的におこなっていない症例でも経験する。

『染色液中の析出物(沈殿物?)』 簡易染色キットを利用される読者の先生方も血液塗沫で経験されると思われるが、分注した染色瓶の染色液内に細菌と見誤る析出物(沈殿物)が生じる。塗沫表面に接着して細菌や真菌の増殖所見と、初学者は間違いやすい。本稿でお薦めしている点眼瓶に分注した染色液内にも同様な析出物(沈殿物)が生じる(図4-8)。見慣れると鑑別できるが、1週間程度で新しい染色液に交換するように筆者はお願いしている。

『メラニン顆粒』 よく間違いやすいものの代表は、メラニン顆粒である(図4-9)。メラニン顆粒は球菌と同じ大きさといって良いであろう。著者を含めて初学者が必ず

経験するピット・フォールといえる。炎症部位には当然メラニン顆粒を認める機会が多い。淡褐色~茶褐色をしており、困ったことに染色されてしまうことも度々経験する。しかし、すべてのメラニン顆粒が染色されているわけではないので、じっくり観察すると鑑別ができる。その他に、細菌と鑑別するための筆者が重視する所見は、メラニン顆粒は細菌と違い顆粒同士が隣接することが少なく、分布に規則性が低い点、アーモンド形の形態をしている点である。一方、細菌は分裂を繰り返すため、連鎖したりブドウの房状に配置されるものである。頻繁に遭遇するブドウ球菌は割と大型の菌のためメラニン顆粒より大きいようだ。これらの観察所見は非常に重要な観察技術である。『シモンシェラ』 口腔内細菌で、テキストにも記載がある。頬部や前肢の肢端部などを舐めることで口腔内のシモンシェラが一時的に皮膚上に移行し、検査時に検出される(図4-10)。皮膚に対する病原性はないとされる。

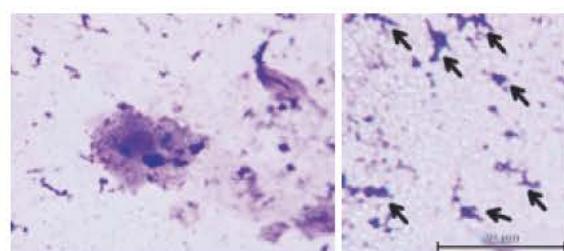


図 4-8 染色液中の析出物

本学では点眼瓶に分注して使用。染色液が時間の経過が進むと、デブリス状の染色残渣が増える。カビや細菌と勘違いしないように注意する。

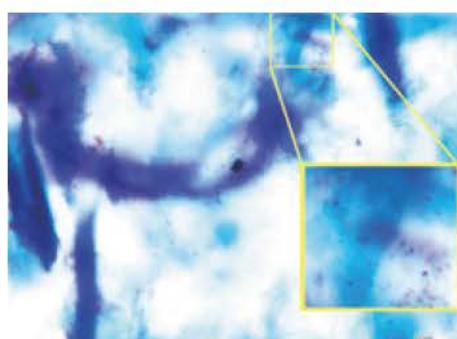


図 4-9 メラニン顆粒

メラニン顆粒は淡褐色~茶褐色をしているが、染色されることが度々生じる(黄枠)。球菌と誤解しないように、特徴を掴んでおく。



図 4-10 シモンシェラ

研修医の先生方から少なくとも数年に1度は質問される所見である。

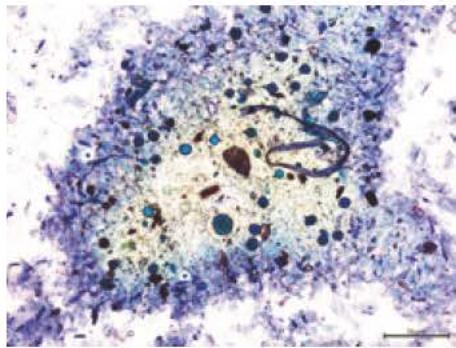


図4-11 花粉

『花粉』 関東圏であれば3~4月の花粉の多い時期にテープストリッピングの所見にも花粉が観察される(図4-11)。様々な大きさと形態がみられるので注意が必要である。経験のない初学者には大型の細菌や真菌の胞子、寄生虫卵などを想起しがちである。

『真菌類』 細菌培養検査をおこなっていると、時折真菌が同時に培養されてくることがある。図4-12は前述の花粉の様な所見であるが、真菌培養をおこなうと真菌のコロニーが発育され、18SrRNAのITS領域の遺伝子塩基配列をもじいて菌種の同定をおこなうと *Trichoderma reesei* というツチアオカビの1種で枯れ木などに繁茂する真菌であった。このように環境にある非病原性の真菌が皮膚表面に付着しており、テープストリッピング検査で誤謬をおこす所見となりえる。

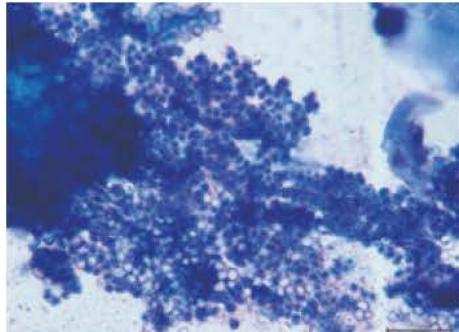


図4-12 環境中の真菌

【マラセチアの評価】

マラセチアは脂質依存性酵母であり、動物でみられるのは *Malassezia pachydermatis* である。この菌は脂質依存性の増殖に限らないため、一般の培地で増殖する経験が多い。サイズは2~7 μmの幅があるので、大型の球菌と鑑別できることもあるが、楕円形の形態や雪だるま状の増殖形態を探すことが鑑別に有用である。しかし、基本的に400倍の強拡大で観察できるサイズのため球菌(1000倍で観察)とは鑑別に苦労しない。楕円形

に限らず円形に見える場合もある(図4-13)。

マラセチアの場合、細菌のように好中球の集簇塊の中にいるとは限らず、飛び石的に増殖することが一般的であるため、評価方法が作り難いので、2通りの評価基準を考えた。観察区分として、“菌体が増殖したエリア(増殖集塊)における菌体数”と“テープ全体での分布”的2通りで計測し、どちらかを採用することとした(表2)。前者の評価は、菌体が増殖した観察部位(最低1箇所)での1視野における計測である。テープ全面での菌体数ではない。テープ全面に散在的に増えている場合も時にみられる。その場合は1視野での評価では不十分である。そのため、増殖集塊の個数を数える評価方法(後者)を併記した。

2通りの評価をおこなうとテープ全面の菌体数を反映すると思われるが、簡便性のために評価者の必要に応じ一方を選択することとした。

マラセチアは慣れると400倍の強拡大で発見できるが、慣れない方は必ず1000倍の油浸レンズで確認することを推奨する。

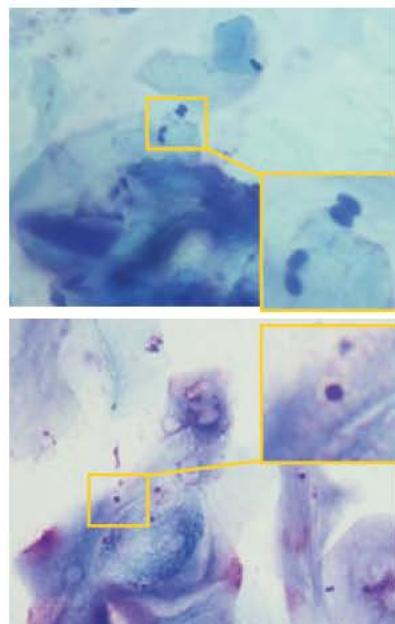


図4-13

マラセチアは一般的に楕円形で観察される場合が多いが、円形でみられることが稀にある。培養すると両方の形態が増殖する。楕円形・雪だるま状の形態のみを覚えていると戸惑うが、マラセチアは細菌と比べて遥かにサイズが大きいので、診断に大いに有用である。

表2 テープストリッピング標本における各指標の尺度

任意尺度	マラセチア：菌数	
観察区分	増殖部における菌体数	テープ全体での分布
+	400倍で、1~10	増殖集塊が、1~10箇所
++	400倍で、10~100	10箇所以上
+++	400倍で、100以上	テープ全面に菌体を認める

菌数の評価は、熟練者では感覚的におこなわれる。検査法・評価法が共有されている場合、困らない。しかし、初学者や動物看護師に対しては、明確な評価方法を示しておく方が検査方法の教育の際に便利であろう。

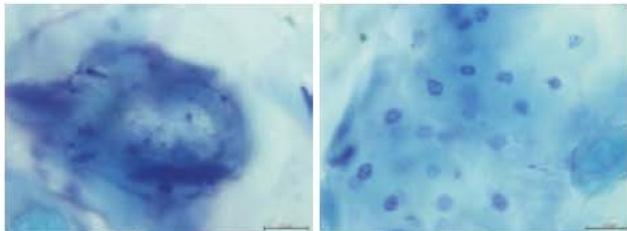


図 4-14

マラセチア(左図)は、角質細胞に遺残した核と大きさが類似している。核独特のクロマチンパターンなどを参考にする簡単に見分けられる(右図)。1000倍の油浸レンズで観察するのが良い。

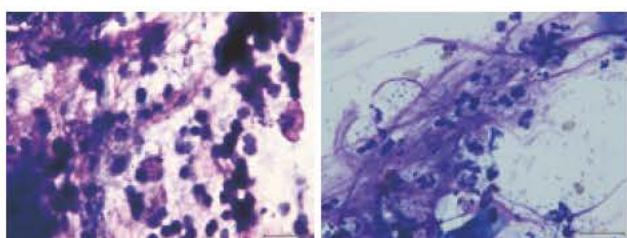


図 4-15

好中球の露出した核が多数みられる所見。マラセチアや真菌の胞子と見間違う。1000倍の油浸レンズで観察するのが良い。

【誤謬を起こしたり、疑問が生じる所見】

マラセチアのサイズは、有核の角質細胞にある核の大きさに類似し形態も紛らわしい(図4-14)が、核にみられるクロマチン所見などを観察することで区別は容易である。初学者に鑑別が難しいのが、変性の少ない好中球の核が露出している場合で、マラセチアや真菌の胞子と非常に紛らわしい(図4-15)。マラセチアは必ず他の部位にも見つかるのでそちらを参考にするのが非常に簡単な区別である。1000倍の油浸レンズが一番よい観察方法で自主学習にもつながるので、面倒くさがらずに利用すること。

ウッド灯検査

波長365 nmの紫外線(ウッド灯)を皮膚の病変部に照射する。犬と猫の真菌感染の場合、犬小胞子菌(*Microsporum canis*)という皮膚糸状菌の一種のみがウッド灯検査で検出する対象となる。また、罹患動物の約50%以上がウッド灯検査陰性といわれているため、陰性結果が出た場合は追加検査として真菌培養検査をおこなうべきか検討する。

【準備】

ウッド灯

【方法】

ウッド灯は点灯後3~5分程度待ち輝度が安定してか

ら使用することが推奨される。暗室内または検査室を暗くして、罹患動物の病変部にライトを当てて蛍光を発する皮膚や被毛を探す。紫外線の照射により、犬小胞子菌が感染した被毛や鱗屑は“青りんご色”に蛍光する。ただし、感染していない鱗屑なども黄色く発光する場合があるため、未経験者は気を付ける必要がある。そのため、確定診断に、発光している検体を採取して培養検査に供するとよい。

培養検査

細菌培養と真菌培養検査があり、細菌培養の際は、理想的には新鮮で破れていない膿疱を注射針で穴をあけて流れる膿を採取する。理想的な病変部がない場合は、病変部を滅菌綿棒で15~20秒ほど拭って検査材料を採取するスワブ法(ふき取り法)をおこなう。その際、乾燥した病変部では綿棒を滅菌生理食塩水で湿らせてから採取する。後者の採取法は病原菌以外に病気に関係のない皮膚常在菌も採取する欠点がある。真菌培養検査は、一般的に皮膚糸状菌の感染の有無を調べる検査と治療効果を調べる検査がおこなわれ、主に後者ではマッケンジーブラシ法により広範囲から検査材料を採取して陰転の確認に利用する。

細菌培養の場合

【準備】

輸送培地、注射針(25 Gなど)、ディスポーザブル手袋(または滅菌手袋)

【方法】

細菌培養の場合は、おもに外部検査機関に依頼するのが一般的である。その場合、検査機間に送るための輸送培地を使用する。輸送培地のキットに付属している滅菌綿棒で、膿汁や患部表面からサンプルを採取する。そのまま、輸送培地に差し込んで送る(図5-1、5-2)。新鮮な膿疱を注射針で破って排出させた内容物を検査材料に使用することがテキストに書かれているが、そのような幸運に恵まれないことが多い。この作業の際に滅菌ゴム手袋を使用して操作すると、検査者の手指に付着した細菌が混入するリスクを防げる。ただし、ヒトの常在菌とされるコアグラーゼ陰性ブドウ球菌が培養されることが度々あるが、飼い主様か、診察した獣医師由来なのか不明である。皮膚バリア機能障害がある皮膚ではこのような細菌が腸内細菌群などと同様に増えているとも考えられる。不思議ながら、既報(笠井2010)にあるように黄色ブドウ球菌を検出した経験は筆者もなかった。



図 5-1

深在性膿皮症で膿管から膿を採取する場合、まず、同じ患部の表面を清拭する（消毒薬を使用すると培地中に混入した場合に培養陰性になる可能性がある）。圧迫して膿管から表面に出てきた膿をスワブ先端で採取する。なるべく患者の皮膚表面に触れないように気をつける。輸送培地に差し込んで外部検査機関へ提出する。



図 5-2

表在性膿皮症の場合、表皮小環などの患部中心に湿潤させたスワブを置き、スワブごと表皮小環を含む皮膚全体を掴み、10秒以上ローリングさせて採取するようにしている。スワブを湿潤させる方法は図 5-3 を参考のこと。



図 5-3

左図は滅菌生理食塩水でスワブ先端を湿潤させている。より安価で簡単なのは、輸送培地にスワブ先端を浸して湿潤させる方法である（右図）。

真菌培養の場合

【準備】

皮膚糸状菌鑑別用培地(DTM 培地)、鉗子(モスキート鉗子など)、新品の歯ブラシや小型の櫛(個包装されているものが良い)

【方法】

皮膚糸状菌症を疑う場合の真菌培養では、病変部、特に脱毛した病変部の辺縁の被毛を鉗子で採取する。使用する鉗子は滅菌または消毒をおこなったものを使用する。または、治療効果を確認する場合は、感染のあった部位を中心に清潔な歯ブラシや櫛で広範囲に検体(落屑や被毛)を採取して培地に移す。最初の7~10日は毎日観察をして培地の呈色(赤色)を確認する(図6-1)。コロニーが形成される早期から培地の呈色反応をみるとことが判定となる。



図 6-1

皮膚糸状菌の DTM 培地による培養例。左の培地が最初に培養されたコロニーであり、複数の菌が混在している可能性があつたため、犬小胞菌が疑われるコロニーを再度培養し直したのが、右の培地である。初代コロニーからの再培養は、推奨されるテクニックである。(注：抗真菌剤含のため時間がかかる)



図 6-2

図のコロニーは皮膚糸状菌に似ているが、よく見るとコロニーが緑色である。DTM 培地で早期から呈色反応を起こすのは、コウジカビの 1 種と思われる。コウジカビは様々な酵素によりデンプンやタンパク質を分解し、生成するグルコースやアミノ酸を栄養源として増殖する。そのため、皮膚糸状菌と類似する呈色反応を示す。シクロヘキシミドにより増殖が抑制されているので、1 週間前後から生えてくる。

筆者が頻用する DTM 培地(ダーマキット、共立製薬)での経験であるが、皮膚糸状菌以外にも真菌が増殖し、呈色反応もコロニー直下で生ずる場合も経験する(図 6-2)。緑色に着色するコロニーで経験するため、幸い簡単に鑑別できる。しかし、この DTM 培地は抗真菌剤(シクロヘキシミド)とフェノールによる呈色反応もあるためか、犬小胞子菌の典型的なコロニーの形成が確認できないことが一般的である。大分生子が確認できない場合もたびたび経験する(図 6-3)。そのため、抗真菌剤などの増殖ストレスがない一般的な培地(サブロー・デキストロース寒天培地など)で培養してコロニー形態と大分生子を確認すると良い(図 6-4)。経験が浅く、心配な場合は、遺伝子検査による診断を外部検査機関に依頼することも可能となっている。経験を積むと DTM 培地でみられる非典型的な増殖コロニーおよび必ず確認できる菌糸の形態より犬小胞子菌を類推できるようになる。

治療中における判定の際にもコストパフォーマンスの高い DTM 培地を使用できる。イトラコナゾールを筆者は治療に使用するが、毛髪内に薬剤が沈着するこ

とが証明されている(Vlaminck, et al. 2004)。そのためか、罹患動物の被毛を培養すると、コロニーを認めないか、1 週間前後から環境中真菌のコロニーが増殖してくる。そのため、前述のような観察技術を確立していると非常に有用である。一般的に、2 回の培養で陰性を示すことが治療の終了とされている。

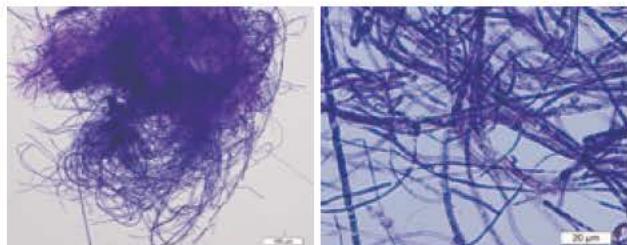


図 6-3

DTM 培地では、大分生子は少ないか全くみられない。慣れない鏡検による鑑別が簡単にできない。筆者は、形成された菌糸の観察で混入した真菌と類別することが多い。しかし、菌種の同定とは違うことに注意。

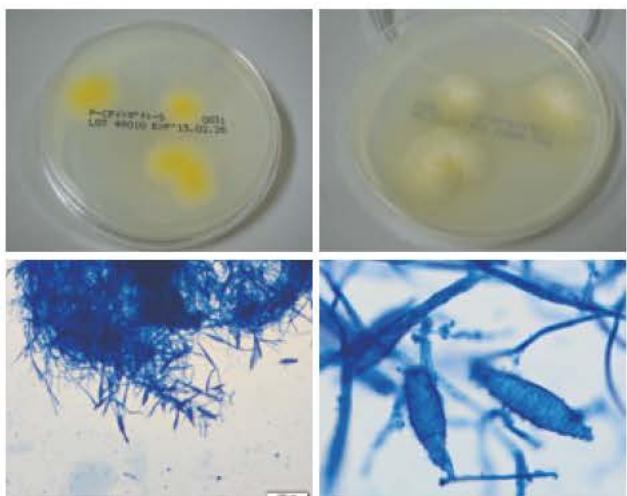


図 6-4

一般的な培地で増殖させると犬小胞子菌の典型的なコロニー形態(周囲は綿毛状で白色、中心部が黄色のパターン)と、鏡検で大分生子がたくさんみられる。大分生子の形態から菌種同定ができる。

【謝辞】

専門的な手技についてご指導、ご助言を頂戴した、荒井延明先生ならびに佐々木崇先生に深謝します。

参考論文

皮膚搔爬検査(皮膚スクラッチ検査)、毛検査(トリコグラム)

Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Farmaki R et al. Relative sensitivity of hair pluckings and exudate microscopy for the diagnosis of canine demodicosis. Vet Dermatol 2007;18:138-141.

テープストリッピング法

Lu YF, McEwan NA. Staphylococcal and micrococcal adherence to canine and feline corneocytes : quantification using a simple adhesion assay. Vet Dermatol . 18 (1); 29-35, 2007.

培養検査

笠井智子、三枝早苗、佐々木崇 臨床検査機関でメチシリソ耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)と同定された犬由来ブドウ球菌株の分類学的再検討 獣医臨床皮膚科 2010. 16 (3) 119-24

Vlaminck K. M. J. A. and Engelen M. A. C. M. Itraconazole : a treatment with pharmacokinetic foundations. The 5th World Cong. Vet. Dermatol. 2005 ; 1-19.