

# 白 癬 の 診 断

河 井 正 晶

順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院皮膚科

## 要 旨

日常診療上、足白癬、爪白癬をはじめとする白癬は極めて頻度の高い皮膚疾患である。白癬の診断の基本となるのは KOH による直接鏡検とサブロー・ブドウ糖寒天培地による真菌培養である。しかし菌株によっては必ずしも典型的な培養形態をとらずに、正確な同定が難しいこともある。そこで近年従来の同定法を補完する新たな分子生物学的手法を用いた分類・同定法が考案されてきた。具体的には核 DNA、ミトコンドリア DNA、リボゾーム RNA (18S, 28S)、ITS1 (internal transcribed spacer 1) 領域などの塩基配列を利用して、その電気泳動パターンを見ることで、あるいは direct sequencing することで同定する方法である。我々は白癬菌由来のアクチン (ACT) の mRNA と DNA を標的遺伝子として、菌の viability の評価と菌の同定する方法を考案し、良好な結果を得た。現在のところ白癬の診断、同定には、あくまで従来の方法を十分にふまえたうえで、その目的に応じて分子生物学的手法を活用することが大切である。

**Key words:** 白癬の診断 (diagnosis of dermatophytoses), 直接鏡検 (direct microscopy), 培養 (culture), 爪白癬 (tinea unguium), 分子生物学的手法 (molecular biological methods), アクチン遺伝子 (actin mRNA)

## I はじめに

日常診療上、足白癬、爪白癬は極めて頻度の高い皮膚疾患である。白癬の診断の基本は KOH による直接鏡検とサブロー・ブドウ糖寒天培地による真菌培養である。また最近では菌種の同定に分子生物学的手法が盛んに用いられるようになってきた。ここでは従来の真菌検査法と新しい分子生物学的手法について述べ、さらに今後の白癬の診断の展望についてまとめてみた。

## II 従来の真菌検査とその進歩

直接鏡検では病巣内の真菌の有無、菌量、またおおまかな真菌の種類 (皮膚糸状菌か、酵母か) などを判定することができる。菌種まで同定するには培養が必要で、一般的にはサブロー・ブドウ糖寒天培地が使用される。巨大培養からはコロニーの性状や発育形態あるいは色素産生を詳しく観察することができる。さらにスライドカルチャーによる分生子の形態を確認することで菌種を同定できる。また特殊な培養方法としてフットプレス法では菌の分布や重複感染の有無をチェックでき、ヘアーブラン法は主にケルスス禿そうや感染源と考えられる動物に用いられる。その他、皮膚生検、トリコフィチン反応、ウッド灯検査などが白癬の診断の際に行われる。また、菌の生理学的な特徴を検査する方法として、ウレアーゼテストや毛髪穿孔試験が、菌の生死を判定する方法とし

て、ニュートラルレッド法が用いられることもある。

日常診療で爪白癬を診断する際には、次のような問題点がある。爪病変のどこをどれだけ試料としてとれば良いのか。良くて 50% といわれる培養陽性率の低さ、これは直接鏡検は陽性だが、培養は陰性になる例をしばしば経験する。さらに非白癬菌による爪真菌症の存在などである。

爪白癬をより正確に診断するための方法に関しては、爪切り (nail clipping) と鋭匙 (1 mm curette) を使って、爪病変のできる限り近位側から爪甲下の腐生した組織 (subungal debris) をとることで培養陽性率は 77% まで高まると報告されている<sup>1)</sup>。またトリコフィトンに対する抗体で免疫染色する方法やフローサイトメトリーを利用する方法が考案されていた<sup>2)</sup>。さらに nail clipping や生検で得られた試料から病理標本を作製し、PAS 染色するのが最も確実な爪白癬の診断法であるとする報告があり<sup>3, 4)</sup>、中でも Lawry らは、PAS 染色法単独で 85% の陽性率、さらに培養と組み合わせることで 94% の陽性率が得られたと報告している<sup>5)</sup>。実際アメリカの一部の個人クリニックでは、採取した爪の検体を真菌を扱う研究所に送付して診断をつけてもらうという方法が行われている。その場で診断がつかないという問題点はあるが、より確実な診断を求めるといって将来的には我が国でも、開業医と真菌を扱う研究所との連携が必要になる可能性がある。非白癬菌は爪真菌症の 1.5~6% を占めるとされている<sup>6)</sup>。カンジダ以外ではクラドスポリウム属、アスペルギルス属、ペニシリウム属が多く、実際には汚染菌として正確な同定がされていないことが多いと

別刷請求先: 河井 正晶

〒279-0021 千葉県浦安市富岡 2-1-1

順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院皮膚科

考えられる<sup>7)</sup>.

### III 白癬の分子生物学的同定法の進歩

#### 1. 分子生物学的同定法の分類

従来分離菌の同定は、巨大培養でコロニーの形態性状や発育速度、あるいは色素産生能を観察し、スライド培養で分生子を確認する方法で行われてきた。しかし、従来の方法では典型的な培養形態を示さず同定に苦慮する症例も珍しくない。それに対して近年分子生物学的手法を用いた分類、同定法が考案されてきた<sup>8)</sup>。実際には属 (genus) の分類、種 (species) の同定、種内変異 (strain) の解析を目的とし、それぞれの目的に応じて、特定の DNA 配列あるいはタンパクをコードする遺伝子を標的遺伝子として①電気泳動パターンをみる、②PCRのあと塩基配列を決定する (direct sequencing)、③増幅パターンをみる (real time PCR) など多種多様な方法がある。

その中でも代表的な手法はミトコンドリア DNA の制限酵素断片長の多型性を利用した方法 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)<sup>9)</sup>、核 DNA を標的にし、非特異的プライマーで増幅したもの (random

amplification of polymorphic DNA, RAPD) の電気泳動パターンをみる方法<sup>10)</sup>、核 ribosomal DNA の ITS1 (internal transcribed spacer 1) 領域の direct sequencing<sup>11, 12)</sup>、キチン合成酵素 (chitin synthase 1) 遺伝子の direct sequencing<sup>13)</sup> などである。

#### 2. アクチン遺伝子を用いた分子生物学的手法

我々は白癬菌の細胞骨格のタンパクであるアクチン (ACT) をコードする遺伝子に着目して、菌の viability を検出する目的で mRNA を逆転写した cDNA を intron を挟む形の primer で増幅する方法<sup>14)</sup> と、種を同定する目的でアクチン遺伝子の intron 内に primer を設定する方法を考案し、real time PCR (Light Cycler System) を行った (Fig. 1)。

その結果、viability を検出する属特異的な primer では dermatophytes を検出し、また種特異的な primer (この場合 *T. mentagrophytes* に特異的な primer) を使った場合にはその種のみを検出することができた (Fig. 2)。さらに爪白癬の病変部 10 例を用いたところ、従来の方法では直接鏡検が 10 例陽性、その培養が 4 例のみ陽性であったところ、アクチン mRNA は 10 例陽性で鏡検と

#### Partial structure of dermatophyte actin DNA

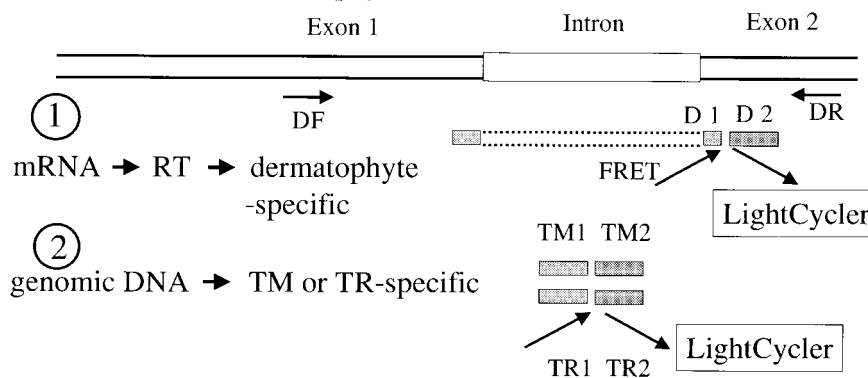


Fig. 1. Designs of ACT primers

- ① ACT primer pairs crossing the intron were dermatophyte genus-specific for viability assessment.
- ② ACT intron based primers were dermatophyte species-specific for determination.

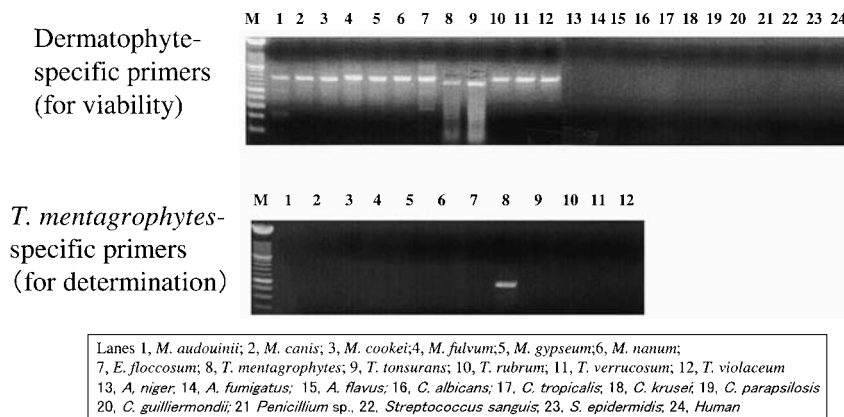


Fig. 2. Specificity of ACT primers

Upper lanes: the result of PCR using dermatophyte-specific primers for viability. Lane 1 ~ 12 (dermatophyte genus) were positive. Lower lanes: the result of PCR using *T. mentagrophytes*-specific primers for determination. Only lane 8 (*T. mentagrophytes*) was positive.

結果が一致した。以上より我々の実験では、アクチン遺伝子の mRNA と DNA を検出する方法は感度が高く、特異性にもすぐれていることが明らかとなった<sup>15)</sup>。今後の課題としては爪病変からできるだけ効率のよい total RNA の抽出方法を確立することがあげられる。

#### IV おわりに

白癬の診断の基本は分子生物学的手法が盛んになってきた現在でも、直接鏡検と培養である。分離菌の同定には従来の方法を十分にふまえたうえで、その目的にあわせて分子生物学的手法を活用することが大切である。一部の種については従来の手法と分子生物学的手法の結果が完全には一致しない場合があるので、今後分類の見直しを含めてさらに検討が必要である。将来的には分子生物学的手法は、客観的診断法であり検出度も高いので、新たな治験法の開発や治癒判定などに応用されていくであろう。

#### 文 献

- 1) Hull PR, Gupta AK, Summerbell RC: Onychomycosis-an evaluation of three sampling methods. *J Am Acad Dermatol* **39**: 1015-1017, 1998.
- 2) Gerald E, Jorge E, Claudine PF: Present and potential diagnostic techniques in onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* **34**: 273-277, 1996.
- 3) Gianni C, Morelli V, Cerri A: Usefulness of Histological examination for the diagnosis of onychomycosis. *Dermatology* **202**: 283-288, 2001.
- 4) Borkowski P, Williams M, Holeywinski J: Onychomycosis-An analysis of 50 cases and a comparison of diagnostic techniques. *J Am Podiatr med Assoc* **91**: 351-355, 2001.
- 5) Lawry MA, Eckart H, Katherine S: Methods for diagnosing onychomycosis. *Arch Dermatol* **136**: 1112-1116, 2000.
- 6) Ellis DH, Marley JE, Watson AB: Significance of non-dermatophytic moulds and yeasts in onychomycosis. *Dermatology* **194**: 40-42, 1997.
- 7) Gupta AK, Cooper EA, Macdonald P: Utility of inoculum counting (Walshe and English Criteria) in clinical diagnosis of onychomycosis caused by non dermatophytic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* **39**: 2115-2121, 2001.
- 8) 望月 隆, 杉田泰之, 楨村浩一, Jeong Aee Kim, 加納 壘, 高橋一郎, Okeke CN, 河崎昌子: 皮膚糸状菌への分子生物学の応用. *真菌誌* **42**: 81-86, 2001.
- 9) Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H: Phylogenetic relationships of some *Microsporum* and *Arthroderma* species inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia* **130**: 11-21, 1995.
- 10) 望月 隆, 上原正巳: Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) 法による *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* と *Trichophyton rubrum* の鑑別. *真菌誌* **37**: 97-100, 1996.
- 11) Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H: Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol* **37**: 920-924, 1999.
- 12) Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME: Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology* **40**: 87-109, 2002.
- 13) Kano R, Nakamura Y, Watari T, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H, Hasegawa A: Phylogenetic analysis of 8 dermatophyte species using chitin synthase 1 gene sequences. *Mycoses* **40**: 411-414, 1997.
- 14) Okeke CN, Tsuboi R, Kawai M, Hiruma M, Ogawa H: Isolation of an intron-containing partial sequence of the gene encoding dermatophyte actin (*ACT*) and detection of a fragment of the transcript by reverse transcription-nested PCR as a means of assessing the viability of dermatophytes in skin scales. *J Clin Microbiol* **39**: 101-106, 2001.
- 15) Tsuboi R, Okeke CN, Inoue A, Yamazaki M, Hiruma M, Ogawa H: Identification and viability assessment of dermatophytes infecting nail based on quantitative PCR of dermatophyte actin (*ACT*) mRNA. *Jpn J Med* **43**: 91-93, 2002.

## Diagnosis of Dermatophytoses: Conventional Methods and Recent Molecular Biological Methods

Masaaki Kawai

Department of Dermatology, Juntendo University Urayasu Hospital,  
2-1-1 Tomioka, Urayasu, Chiba 279-0021, Japan

Dermatophytoses such as tinea pedis and tinea unguium are very common diseases in the field of dermatology. The diagnosis of dermatophytoses is usually performed by direct microscopy and culture. The identification of species is based on morphological features of giant culture and slide culture. However, in some cases, it is difficult to identify the species clearly because the culture shows an atypical appearance or is false negative. Therefore, several molecular biological methods have been developed for precise identification of a species. The analysis of patterns of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphisms (RFLP) of mitochondrial DNA is useful for identifying isolates which are not clearly identifiable by conventional biological techniques. The phylogenetic analysis of dermatophytes was made by using DNA direct sequencing of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1). Sequence analysis of chitin synthase 1 (*CHS 1*) is a rapid tool for species level identification.

We attempted the identification and viability assessment of dermatophytes based on the quantitative measurement of dermatophyte actin (*ACT*) mRNA. An internal fragment of the *ACT*, 725 to 762 bp, was isolated by PCR from the genomic DNA of dermatophytes and sequenced. *ACT* intron based primers were dermatophyte species-specific and primer pairs crossing the intron were dermatophyte genus-specific. The results indicated that quantification of dermatophyte *ACT* mRNA correlated with the results of culture and KOH examination.

It is important that the identification of dermatophyte be done by combining conventional methods with molecular biological methods. In some cases results of the two methods do not correspond, and is those the fungal species needs to be re-examined.

---

この論文は、第46回日本医真菌学会総会の“シンポジウムV: 白癬の現状と将来I”において発表されたものです。