

原 著

爪白癬からの起因菌同定における培養法と PCR-RFLP 法の比較検討

吉 村 理枝子 伊 藤 弥 生 森 下 宣 明

二 宮 淳 也 滝 内 石 夫

昭和大学藤が丘病院皮膚科

〔受付 7 月 14 日, 2005 年. 受理 10 月 20 日, 2005 年〕

要 旨

当科外来を受診した爪白癬患者 100 例から得られた罹患爪の一部をサブローブドウ糖寒天培地に培養し, 27°C にて, 最長 2 ヶ月間観察した。残りの爪サンプルを凍結, 超音波破碎し DNA を抽出, リボゾーム DNA 上の ITS 領域を用いた PCR をおこない, 得られた PCR 産物を *Mva* I, *Hinf* I の各制限酵素で消化し, 切断パターンを分析した。また, 爪サンプルの重量を測定し, PCR-RFLP 法の結果と比較した。結果は培養法の同定率が 20% にとどまったのに対し, PCR-RFLP 法では 73% であった。爪サンプルの重量と PCR-RFLP 法での同定結果との間には有意差は認められなかった。サブローブドウ糖培地を用いた培養による爪白癬の起因菌同定に際し, 菌の viability の問題から培養成功率の低さが指摘されていたが, 爪サンプルから直接行う PCR-RFLP 法は迅速かつ成功率の高い同定法であると思われる。

Key words: 爪白癬 (tinea unguium), 皮膚糸状菌 (dermatophyte), polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), internal transcribed spacer (ITS)

序 文

爪白癬の起因菌同定には, 通常, サブローブドウ糖培地による培養 (以下培養法と略す) がおこなわれているが, その成功率は低い。近年, 皮膚糸状菌のリボソーム DNA 遺伝子の internal transcribed spacer (以下 ITS と略す) 領域を polymerase chain reaction (以下 PCR と略す) で増幅し制限酵素分析 (restriction fragment length polymorphism) (以下 RFLP と略す) によって同定する PCR-RFLP 法が菌種の同定に簡便かつ有用な方法と報告されている¹⁻³⁾。

今回, 直接罹患爪から起因菌の DNA を抽出し, PCR-RFLP 法を用いて同定した結果と, 培養法での結果との比較を基に PCR-RFLP 法の有用性等について検討した。

材料および方法

2004 年 7 月から 2005 年 4 月に昭和大学藤が丘病院外来を受診した爪白癬患者 100 例 (男性 59 例, 女性 41 例, 年齢 42~86 歳)。全例共 KOH 直接検鏡により診断を確定した。爪サンプルは初診時, ニッパーを使用して, 病変部から可能な限りの量を採取した。

1. 培養法

サブロー・シクロヘキシミド・クロラムフェニコール寒天培地 (ペプトン 10 g, ブドウ糖 20 g, 寒天 20 g/蒸留水 1,000 ml+クロラムフェニコール 50 mg+シクロヘキシミド 500 mg) に爪サンプルを接種し, 27°C にて培養, 最長 2 ヶ月間観察した。培養された菌は, コロニーの形態およびスライドカルチャー所見から菌種を同定した。尚, 酵母等コロニーが皮膚糸状菌と思われないものを汚染菌とした。なお, 同定された菌については後述する PCR-RFLP 法にて菌種の確認もおこなった。

2. PCR-RFLP 法

① DNA の抽出

爪サンプルを液体窒素で凍結した物を乳鉢中で粉碎し, パウダー状にした後, 望月ら²⁾の方法に従い, 糸状菌溶解バッファー (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA) 450 μ l を加え, 超音波発振器 (UH-50, SMT 社) にてさらに破碎した。なお, 器具は洗浄後逆性石鹼, エタノール消毒し, 乾燥させたものを用いた。これに 3M sodium acetate 150 μ l を加え, 12,000 rpm で 5 分間遠沈し上清を採取した。上清に等量の phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) を加え 2,000 rpm で 10 分間遠沈し上清を採取した。これに等量の chloroform を加え, 2,000 rpm で 10 分間遠沈した。上清に等量の 2-propanol

と ethanmate (Wako 社) 1 μ l を加え攪拌し, 12,000 rpm で10分間遠沈し DNA の沈殿を得た. 沈殿物を乾燥後, 20 μ l の蒸留水に溶解し, 4 $^{\circ}$ C にて一晩静置した.

② PCR

プライマー ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG, Operon 社) と ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC, Operon 社)⁴⁾ を用いて増幅した. PCR は 94 $^{\circ}$ C, 4 分の変性後, 94 $^{\circ}$ C, 1 分, 58 $^{\circ}$ C, 2 分, 72 $^{\circ}$ C, 1.5 分を 35 サイクル繰り返し, 2% アガロースゲルで電気泳動した.

③制限酵素による切断

制限酵素 *Mva* I (Takara 社), *Hinf* I (Takara 社) で消化し, 3% アガロースゲルで電気泳動し, それぞれ UV 照射下で観察した.

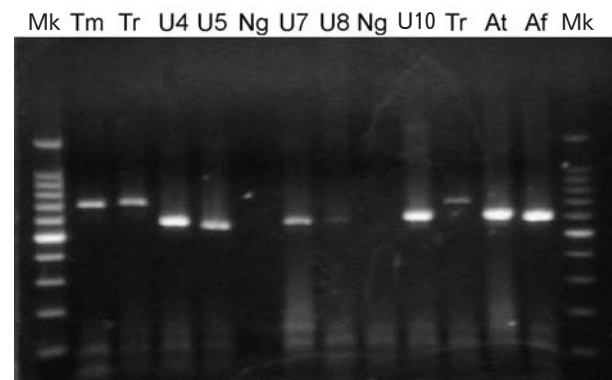
PCR-RFLP 法の結果, 既知のパターンを示さなかった例を汚染菌と判断した. また, 爪サンプル重量に対する PCR-RFLP 法での同定成功例と不成功例との間の有意差について F 検定および t 検定をおこなった.

結 果

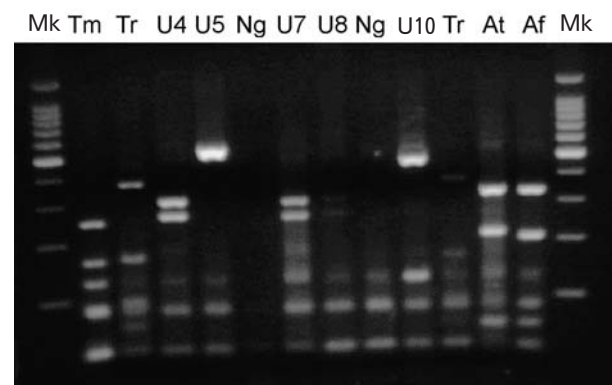
培養法および PCR-RFLP 法による同定結果を Fig. 1 に示した. 培養法での皮膚糸状菌同定率は 20% (20 例) で, 汚染菌が 6% (6 例) 培養され, 残りの 74% (74 例) は何らの菌も培養されなかった. 同定された菌の内訳は 75% (15 例) が *Trichophyton rubrum*, 25% (5 例) が *T. mentagrophytes* であった. 一方, PCR-RFLP 法での同定率は 73% (73 例), 汚染菌は 5% (5 例) であった. 残りの 22 例 (22%) は電気泳動にてバンドが認められなかった. PCR-RFLP 法により同定された菌の内訳は, 90.4% (66 例) が *T. rubrum*, 9.6% (7 例) が *T. mentagrophytes* であった. 同定不能で汚染菌と判定された 5 例を Fig. 2 に示した. この中で U5 は培養が陽性で, カンジダチェック[®]にて *Candida albicans* serotype A と同定された. 培養株を PCR-RFLP 法にて同定したところ U5 と同

様のバンドが認められた. U4, U7, U8, U10 については Fig. 2 に At, Af で示した *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* をマーカーとして加えた泳動像と一致する像もみられず, 同定不能と判断した. なお, 培養法と PCR-RFLP 法との同定結果に相違がみられた例はなかった.

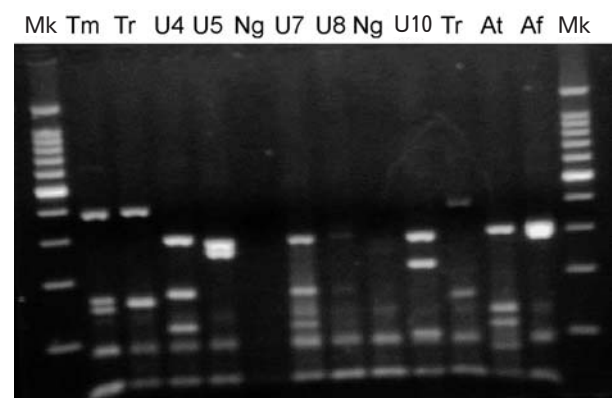
爪サンプル重量に対する上記の同定不能例 (未知の RFLP-pattern) を除いた同定成功例と, PCR で増幅できなかった不成功例の比較は有意差がなく, PCR-RFLP 法の成否はサンプル重量に依存しないというものであった



PCR



Mva I



Hinf I

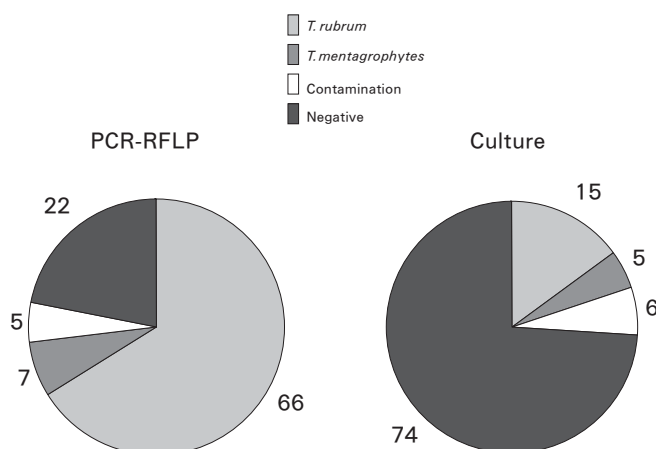


Fig. 1. Result of identification using culture medium and PCR-RFLP (n=100). There was no positive case that showed different species between PCR-RFLP analysis and culture.

Fig. 2. PCR and RFLP profiles of the samples unidentified. Mk: marker; Tm: *T. mentagrophytes*; Tr: *T. rubrum*; U4-10: unidentified; Ng: negative; At: *Aspergillus terreus*; Af: *Aspergillus flavus*.

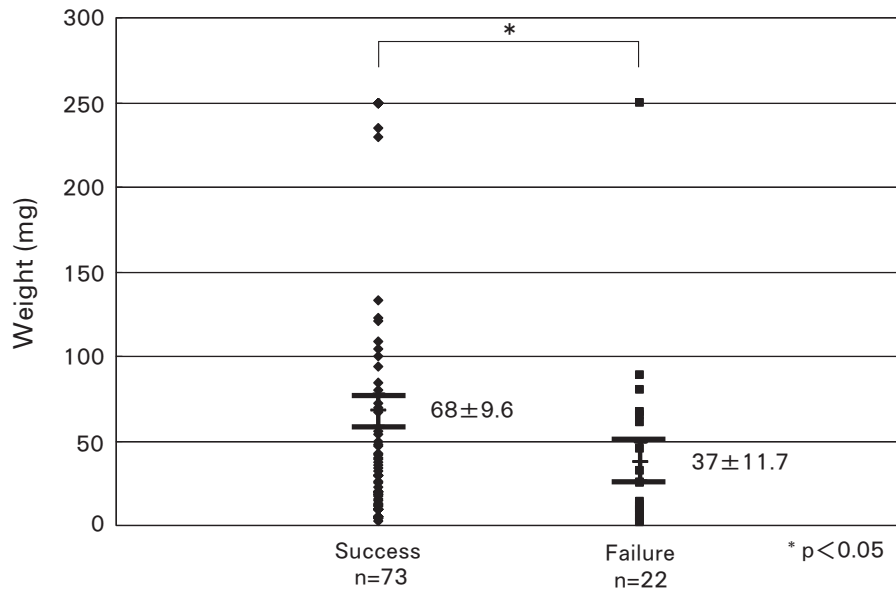


Fig. 3. Weight of nail samples and the result of PCR-RFLP analysis.

(Fig. 3).

考 察

爪白癬の培養成功率は低く、前田ら⁵⁾は20%、高橋ら⁶⁾は22.3%、柴木ら⁷⁾は39.3%であったと報告している。福田ら⁸⁾は、ニュートラルレッド法を用いて、爪白癬病巣における皮膚糸状菌のviabilityについて検討し、KOH直接検鏡陽性にもかかわらず培養が不成功である例は、KOH直接検鏡にてみられる菌の多くが死菌なのであろうと推定している。ドリルを用いた開窓法により爪の中核側から爪サンプルを採取すると、培養率が飛躍的に向上するとの報告がある^{9, 10)}。このような培養の手技により同定率を上げることは不可能ではないというものの、日常の外来診療では負担であると思われる。殊に、真菌学を専攻する医師以外の皮膚科医が診療に当たる施設においては、培養法によって高い同定率を得ることは困難であろう。さらに通常、KOH直接検鏡にて診断を確定する際、培養がおこなわれるが、分離、同定に至るまでに早いものでも2～3週間、遅いものでは2ヶ月間と、長期間を要することも培養法の欠点の1つである。

近年、病原真菌の同定にPCR法が用いられている。望月ら^{2, 3)}はリボソームDNA遺伝子のITS領域をPCRで増幅し、制限酵素 *Mva* I, *Hinf* I を組み合わせた制限酵素分析の有用性を報告している。爪からのDNA抽出に関して、現在のところ確立された方法はない。一般に組織片からのDNA抽出にはproteinase K処理がおこなわれているが、爪のような強靱な組織からの抽出には応用しがたい。液体窒素を用いた凍結と超音波破碎を加えた今回の方法は、簡便かつ十分な結果が得られる方法と思われた。また、PCR-RFLP法自体も、DNA抽出から切断パターンの分析まで2日と迅速な起因菌の同定が可能であり、同定率も73%と優れた結果であった。

同定結果を菌種別に検討すると、*T. mentagrophytes* の

検出された症例数は、培養法とPCR-RFLP法の間に差は認められなかったものの、*T. rubrum*の検出された症例は、培養法15例に対しPCR-RFLP法66例と、4倍以上の差が認められた。この結果は、爪病巣における*T. mentagrophytes*と*T. rubrum*のviabilityに差がある可能性が高く、今後検討していく予定である。爪白癬の起因菌は圧倒的に*T. rubrum*が多く、この*T. rubrum*の同定率が高いという今回の結果は、爪白癬の起因菌の同定におけるPCR-RFLP法がより優れていることを示すものと思われた。

今回、全例KOH直接検鏡にて菌陽性と判定された症例について検討したが、カンジダチェック[®]で*C. albicans*と同定された菌を除き、培養法やPCR-RFLP法でも同定できず、汚染菌と判断した症例が数例ずつ認められた。これらが皮膚糸状菌以外の菌による爪真菌症である可能性は否定できないが、仮に皮膚糸状菌以外の真菌を検出できたとしても、これが病原性を有するものなのか、腐生しているだけなのかを証明する手段はなく、今後の課題である。現在のところ皮膚糸状菌以外の菌による爪真菌症の診断には、KOH直接検鏡像の仔細な観察と、繰り返しの培養が不可欠である¹¹⁾。

PCR-RFLP法の同定に必要な爪サンプル量については、同定の成功例と不成功例の間に統計学的な差はなかった。この結果から、得られた爪の中に必ずしも十分な菌が存在していない、菌のDNAが変性、損傷していた可能性が考えられた。同定率を高めるためにはKOH直接検鏡で多数の菌が証明された部位を中心に爪を採取し、より多くの菌のDNAを得る必要があると思われた。

本要旨は66回 Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology (St. Louis, USA, 2005年5月)にて発表した。

参考文献

- 1) Jackson CJ, Barton RC, Evans EGV: Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin Microbiol* **37**: 931-936, 1999.
- 2) Mochizuki T, Tanabe H, Kawasaki M, Ishizaki H, Jackson CJ: Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by PCR-RFLP analysis of ribosomal DNA regions. *J Dermatol Sci* **32**: 25-32, 2003.
- 3) 望月 隆, 田邊 洋, 河崎昌子, 安澤数史, 石崎 宏: リボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域の分子型に基づく皮膚糸状菌の菌種同定の実績. *日皮会誌* **114**: 1763-1767, 2004.
- 4) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA ed), pp.315-322, Academic Press, London, 1990.
- 5) 前田 学, 野田徳朗, 森 俊二, 北島康雄, 沢村治樹, 鹿野由紀子: 岐阜大学皮膚科における最近2年間(1991~1992年)の白癬患者—10年前の調査との比較検討. *真菌誌* **36**: 265-270, 1995.
- 6) 高橋容子, 西村和子: 君津中央病院皮膚科における最近6年間(1994~1999年)の白癬菌相. *真菌誌* **43**: 21-27, 2002.
- 7) 芝木秀臣, 芝木晃彦: 札幌市の一診療所における10年間(1992~2001年)の白癬菌相. *真菌誌* **44**: 209-216, 2003.
- 8) 福田知雄, 塩原哲夫, 仲 弥: Neutral red 染色法を用いた抗真菌剤の薬効効果—爪白癬への応用—. *日皮会誌* **106**: 1313-1316, 1996.
- 9) Mochizuki T, Kawasaki M, Tanabe H, Ishizaki H: A nail drilling method suitable for the diagnosis of onychomycosis. *J Dermatol* **32**: 108-113, 2005.
- 10) 齋藤卓也, 山田一雄, 岸本三郎: ラジオ工作用ドリルを用いた開窓法による楔状爪真菌症の診断. *臨皮* **58**: 586-587, 2004.
- 11) 西本勝太郎: Non-dermatophytic onychomycosis. *真菌誌* **34**: 127-134, 1993.

Comparative Study between Culture and PCR-RFLP Analysis on Identification of the Causative Agent of Tinea Unguium

Rieko Yoshimura, Yayoi Ito, Nobuaki Morishita,

Junya Ninomiya and Iwao Takiuchi

Department of Dermatology, Showa University Fujigaoka Hospital

1-30 Fujigaoka, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa 227-8501, JAPAN

Background: To identify the pathogenic fungi of dermatophytosis, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of PCR amplified ribosomal DNA including internal transcribed spacers (ITS) has been established in Japan. Our purpose was to evaluate the usability of PCR-RFLP analysis to identify the causative agent of tinea unguium directly from a nail sample.

Method: Samples of tinea unguium from 100 nails were collected and cultured on Sabouraud's glucose agar and observed for 2 months. DNA was extracted from these samples, and the PCR product was digested with restriction enzymes *Mva* I and *Hinf* I. Weight of the samples was determined.

Result: Sensitivity of PCR-RFLP analysis (73%) was higher than that of culture (20%) showing that PCR is more advantageous for identification of the causative agent of tinea unguium. Sensitivity of PCR-RFLP did not depend on weight of the nail sample.