

原 著

皮膚糸状菌の角質内侵入と予防に関する研究

森 下 宣 明 二 宮 淳 也 清 佳 浩
滝 内 石 夫

昭和大学藤が丘病院皮膚科

〔受付6月21日, 2004年. 受理8月23日, 2004年〕

要 旨

健康人の踵部の角質片に、数種の皮膚糸状菌を塗布し、角質内への菌の侵入速度や侵入後の洗浄による菌の除去について検討した。

足白癬を想定した実験系では、角質表面に菌を塗布した後、以下の2系列の実験系をたてた。①屋内で靴下を履いている環境として、湿度90%を8時間、湿度100%を16時間、②屋内で裸足でいる環境として、湿度80%を8時間、湿度100%を16時間培養し、経日的に取り出し、石鹸水を浸した綿棒による洗浄前後について、それぞれPAS染色、走査電顕で観察した。①では1日後に洗浄しても菌を除去することはできなかったが、②では2日後でも菌が除去されていた。靴を脱いでいるときには足の湿度を低く保つこと、連日足底・趾間の洗浄をおこなうことにより、角質内に菌が侵入し始めても容易に除去できると思われた。

また、体部白癬を想定した実験系では、角質切断面に菌を塗布し、湿度80%で培養後、経日的に取り出し、PAS染色後観察した。*Trichophyton tonsurans* は、0.5日で角質への侵入が始まり、他の菌種の皮膚糸状菌よりも角質内への侵入速度が速く、最近の感染拡大の要因の1つであると思われた。

Key words: 足白癬 (tinea pedis), 体部白癬 (tinea corporis), 皮膚糸状菌 (dermatophyte), 侵入 (penetration), 湿度 (humidity), 角質の外傷 (minor injury of stratum corneum), 洗浄 (washing), *Trichophyton tonsurans*

序 文

著者らは健康人踵部の角質に皮膚糸状菌を塗布し、湿度を一定にした条件で培養後、角質内への菌の侵入速度や侵入速度に及ぼす温度・湿度の影響などについて検討し、足白癬については湿度が最大の発症要因であると報告した¹⁾。また、高湿度がさほど重要な要因とは思われない体部白癬などについては、角質の軽微な外傷が主たる要因であり、起因菌種の違いも比較的大きな要因であろうと報告した²⁾。

足白癬を想定した前回までの実験系は、湿度を一定にした条件での結果である。しかしながら、1日24時間を通じ、高湿度を保つという状況は日常生活では考えがたく、今回は日常生活に合わせた湿度として、16時間高湿度を保ち、残りの8時間は湿度を下げた条件に置き、菌の角質内への侵入を観察し、合わせて培養直後の角質片について、日常的な洗浄行為により、一度角質細胞へ侵入した菌が除去できるかも検討した。また、体部白癬を想定した実験系については、軽微な外傷が主たる発症要因と考えられるため、鋏で切断した角質片の切断面に *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum*

gypseum, *M. canis* の他、近年格闘競技者間での発症が激増している *T. tonsurans* を塗布し、角質内への菌の侵入速度を検索したので報告する。

材料と方法

実験に供した菌株は、いずれも当科外来臨床分離株で、足白癬を想定した実験系には、3株の *T. mentagrophytes* を使用し、体部白癬を想定した実験系には *T. tonsurans* 6株, *T. mentagrophytes* 4株, *T. rubrum* 4株, *M. gypseum* 4株, *M. canis* 2株を使用した。

各々の菌株について1白金耳をサブローブドウ糖液体培地に接種し、27°Cにて2週間培養し、遠沈により菌要素を取り出し、10mlの滅菌生理食塩水と共にホモジネートした菌溶液を試料とした。発育速度の遅い菌株は使用せず、2週間後に液体培地の液面全体(直径24mm)に菌要素が増殖したものを選択して実験に用いた。尚 *T. mentagrophytes* については何れの菌株も小分子数で約 10^7 個/mlであった。

角質片は健康人の踵部角質を鋏で切除し、ガス滅菌後、足白癬を想定した実験系では体表面が上になるように両面テープでスライドガラス上に固定し、その角質表面に滅菌した綿棒で菌液を塗布した。体部白癬を想定した実験系では鋏による切断面が上になるように両面テープでスライドガラス上に固定し、同様に菌液を塗布し

別刷請求先: 森下 宣明

〒227-0043 神奈川県横浜市青葉区藤が丘1-30

昭和大学藤が丘病院 皮膚科

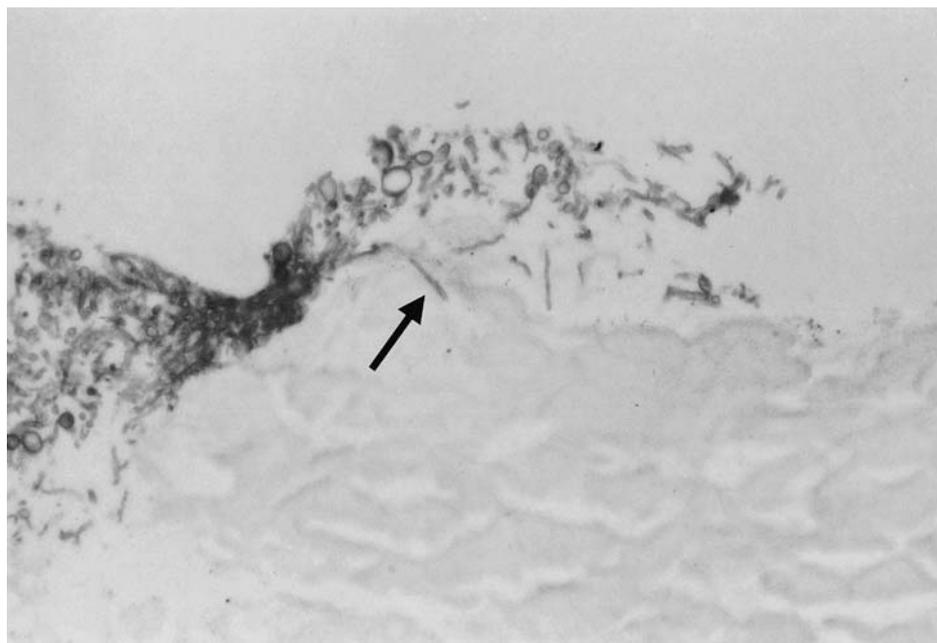


Fig. 1. Fungal elements were detected in the superficial cornified layer (arrow). PAS stain, $\times 400$.

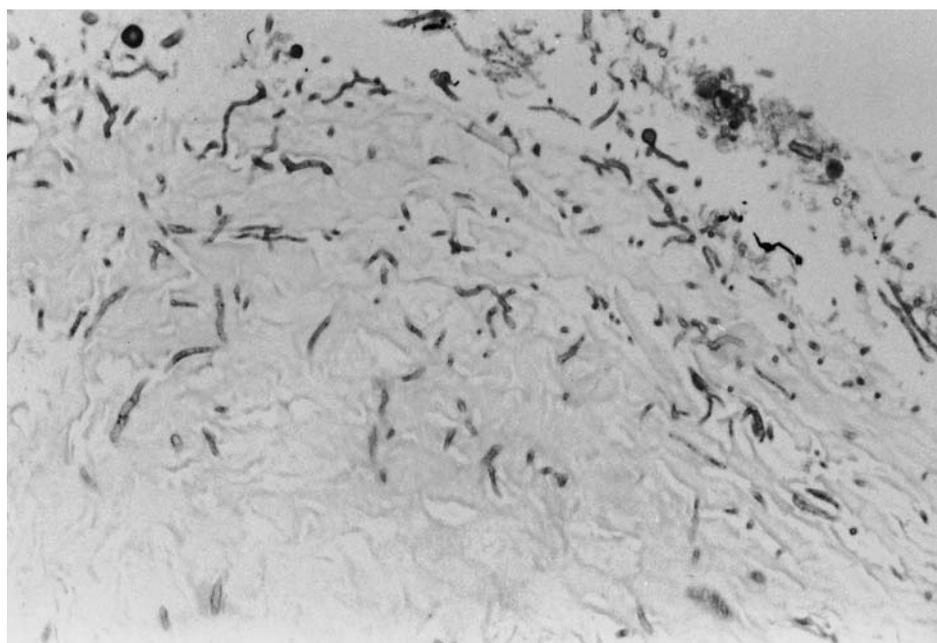


Fig. 2. Fungi penetrated into the middle of the cornified layer. PAS stain, $\times 400$.

た. その後, 恒温恒湿槽内で 35°C にて培養した. 尚角質片は各々に2つずつ用意し, 後にPAS染色用, 走査電子顕微鏡用に使用した.

足白癬を想定した実験系での設定湿度は, 靴および靴下を履いている時の趾間の湿度を100%, 靴を脱ぎ靴下のみ履いている時の趾間の湿度を90%, 靴・靴下の何れも脱ぎ裸足の時の趾間の湿度を80%とした. 比較的長時間靴を履いている人を想定し, 1日の中で靴・靴下を履いている時間を16時間, 屋内で靴を脱いでいる時間を8時間とし, この8時間について, 屋内でも靴下を履いている人と裸足になっている人を各々想定した. 即ち, ①

菌液塗布後湿度90%にて8時間培養する系と②80%で8時間培養する系を各々作成し, その後, 両系とも湿度100%にて16時間培養した. このサイクルの培養を2日間施行し, 経日的に角質片を取り出して半切し, 一方は流水で表面を流すのみとし, 他方は角質表面を石鹼水に浸した綿棒で5往復軽く擦った後, 流水で流して洗浄とした. その後, 両者ともホルマリン固定しPAS染色にて菌の角質内への侵入の有無や程度を観察した. また同時に, オスミウムによる蒸気固定, 自然乾燥後, 白金パラジウムで蒸着し, 走査電顕にて角質片表面での菌要素の残存の有無を観察した.

Table 1-① The effect of washing in the phylaxis against *T. mentagrophytes* under conditions simulating the daily life of those who wear socks in a house: 90% humidity 8 hours and 100% humidity 16 hours

Strain	Washing	Day 1	Day 2
a	before	2	2
	after	1	2
b	before	1	2
	after	1	2
c	before	1	2
	after	1	2

0: no fungal elements in the cornified layer
 1: fungal elements were detected in the superficial cornified layer
 2: fungi penetrated into the middle of cornified layer

Table 1-② The effect of washing in the phylaxis against *T. mentagrophytes* under conditions simulating the daily life of those who have bare feet in a house: 80% humidity 8 hours and 100% humidity 16 hours

Strain	Washing	Day 1	Day 2
a	before	1	1
	after	1*	0
b	before	1	1
	after	0	0
c	before	1	1
	after	0	1

*: Only one fungal element was detected on the surface of the cornified layer by the scanning electron microscope.

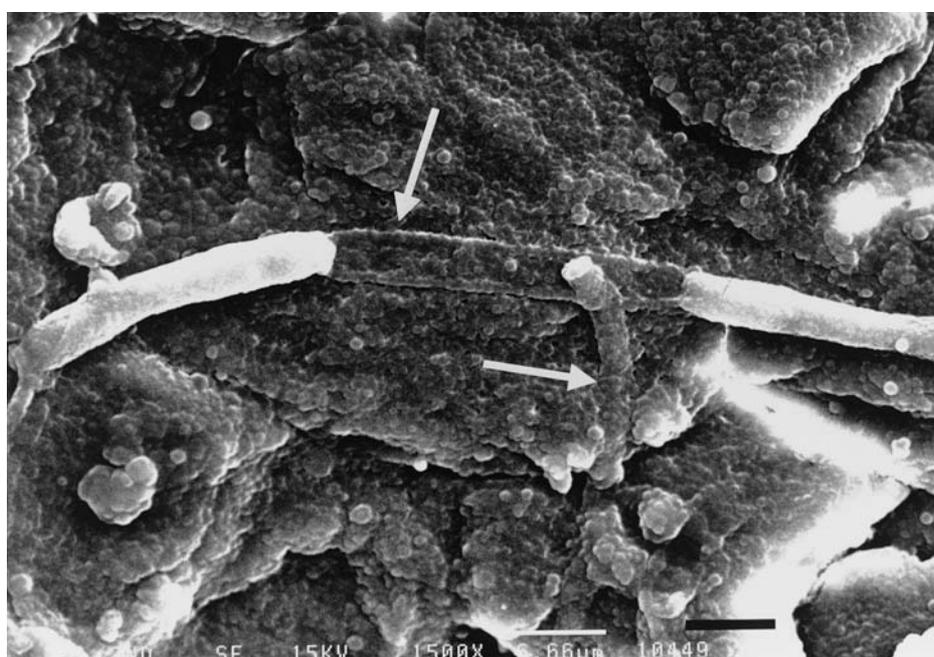


Fig. 3. Surface of the cornified layer 1 day before washing, fungal elements were detected on this surface and had begun to penetrate into the superficial corneum layer (arrows). Bar=6.66 μm

体部白癬を想定した実験系についての設定湿度は、顔面付近を考え、裸足の時の湿度と同様に80%とし、12時間、24時間、48時間培養した。その後、水洗し、ホルマリン固定、PAS染色にて菌の侵入の有無や程度を観察した。

何れの実験系もPAS染色にて角質細胞内への菌要素の侵入が認められないものを0、角質表層の1から2層までの角質細胞内への菌要素の侵入が認められるものを1 (Fig. 1)、それ以上の深層まで菌要素の侵入像が認められるものを2 (Fig. 2) と判定した。

結 果

Table 1-①に示した如く、靴を脱いでいる時に靴下を履いていると想定した系は、3株とも1日で角質内に侵入し、2日後には更に深く侵入していた。Fig. 3に角質細胞内へ侵入した菌糸の走査電顕像を示した。また、1

日、2日後とも洗浄しても菌要素は除去されなかった。

一方、靴を脱いでいる時は裸足していると想定した系でも、1日で角質内への侵入が認められたが、侵入速度は遅く2日後でも角層の表層までの侵入に留まっていた (Table 1-②)。これを洗浄すると、1日後ではPAS染色上、菌は除去されて認められなかった a 株で走査電顕上全ての観察部位中に1菌糸認められたのみで、b・c 両株では菌は除去されていた。c 株以外では2日後でも洗浄により菌が除去されていた (Table 1-②)。一度角質細胞内へ侵入した菌が、洗浄により除去されたと思われる走査電顕像を Fig. 4 に示した。

体部白癬を想定した実験系の結果は、*T. tonsurans* では6菌株中2菌株で0.5日、3菌株では1日で角質切断面への菌の侵入が認められた (Table 2)。*T. tonsurans* 以外の4菌種については、*T. rubrum* の2菌株で2日での菌の侵入像が見られたものの、*T. mentagrophytes*, *M.*



Fig. 4. Scanning electron microscopic photograph of the surface of the cornified layer 1 day after washing, fungal elements were not detected, but have left trails on its surface (arrows). Bar=6.66 μ m

Table 2. Comparison of the penetration of dermatophytes into the cornified layer of the cutting side

Strain	Day 0.5	Day 1	Day 2
A : <i>T. tonsurans</i>	2	2	2
B : <i>T. tonsurans</i>	0	0	0
C : <i>T. tonsurans</i>	0	1	1
D : <i>T. tonsurans</i>	0	1	1
E : <i>T. tonsurans</i>	1	1	1
F : <i>T. tonsurans</i>	0	1	1
G : <i>T. mentagrophytes</i>	0	0	0
H : <i>T. mentagrophytes</i>	0	0	0
I : <i>T. mentagrophytes</i>	0	0	0
J : <i>T. mentagrophytes</i>	0	0	0
K : <i>T. rubrum</i>	0	0	2
L : <i>T. rubrum</i>	0	0	0
M : <i>T. rubrum</i>	0	0	1
N : <i>T. rubrum</i>	0	0	0
O : <i>M. gypseum</i>	0	0	0
P : <i>M. gypseum</i>	0	0	0
Q : <i>M. gypseum</i>	0	0	0
R : <i>M. gypseum</i>	0	0	0
S : <i>M. canis</i>	0	0	0
T : <i>M. canis</i>	0	0	0

0: no fungal elements in the comified layer

1: fungal elements were detected in the superficial cornified layer

2: fungi penetrated into the middle of cornified layer

gypseum, *M. canis* では、2日間を通じて菌の侵入像は全く観察されなかった。

考 案

Japan Foot Week 研究会の報告³⁾によると皮膚科受

診患者の27.3%が足白癬を主訴に来院し、その大部分(94.5%)が実際に真菌感染症と診断されている。また、足白癬以外の皮膚疾患を主訴に来院した患者の20%に足の真菌症が認められたという。この結果から我が国には人口の20%、2,500万人程の白癬患者がいるであろうと推定している。

足白癬発症の前段階は、以下の過程を経るものと考えられる。まず、白癬患者の病巣部から環境中へ皮膚糸状菌が散布され、散布された皮膚糸状菌が足白癬ではない人の足底や趾に付着し、角質内に侵入するものと思う。

足白癬患者の病巣部から環境中への皮膚糸状菌の散布に関しては、藤広ら⁴⁾は、足白癬患者に表面が塩化ビニール製のスリッパを10分間着用させた後、そのスリッパより菌の分離を試み、183例中118例(64.5%)から皮膚糸状菌が分離されたと報告している。Maruyamaら⁵⁾も足底を数秒間培地に圧抵する foot-press 培養法で足白癬患者42例中30例(71.4%)から皮膚糸状菌を分離している。この方法では、反復しても同様に皮膚糸状菌が培養されるため、足白癬患者の足底からは皮膚糸状菌が数秒間で散布され、しかもその散布は持続的であることを証明している。足白癬患者の病巣から皮膚糸状菌が散布される頻度は高いと言える。尚、Maruyamaら⁵⁾の報告では、圧抵された培地を顕微鏡で観察すると約80%の菌要素が角質細胞とは別に存在していることより、皮膚糸状菌は角質細胞とともに落ちるのではなく、単独で散布されると結論している。

皮膚糸状菌の生存期間に関して新村⁶⁾は、家庭塵埃中の *T. mentagrophytes* は9ヶ月放置された後にも培養されると報告しており、足白癬患者から散布された皮膚糸状菌は、想像以上に長期間環境中に生存していると思われる。

る。実際に皮膚糸状菌は患者の住居⁶⁾や職場⁷⁾、公衆浴場⁸⁾、プールサイド⁹⁾、病院¹⁰⁾など様々な場所から分離されている。

環境中の皮膚糸状菌が非感染者の足底や趾間に付着する可能性については、加藤ら¹¹⁾により足底に関しては foot-press 培養法、趾間に関しては finger-press 法を用い詳細に検討されている。この報告によると、foot-press 培養法陰性の被験者が様々な対象環境において裸足で過ごした後、foot-press 培養法を行うと、皮膚糸状菌が分離されること、しかも finger-press 法により趾間にも皮膚糸状菌が付着することが証明されている。

また、Japan Foot Week 研究会の報告³⁾では、真菌症リスクへの背景因子として「同居家族に真菌症あり」のオッズ比が著しく高く、家庭内での感染の機会が多いことを推測している。

足白癬の発症には皮膚糸状菌の付着が必須であるが、その後、皮膚糸状菌が角質内に侵入することも必須である。この菌の侵入に関しては、藤田ら¹²⁾は、*T. mentagrophytes* をモルモットの足底に固定 (wet disc inoculation method) し、経時的に走査電顕により観察し、12時間後で菌糸が角質細胞に侵入し、24時間後では多数の菌糸が認められるものの、PAS 染色標本では24時間後では菌の侵入が認められず、3日後に角層の上 1/3 に菌の侵入が認められた事より、足白癬での感染が確実に成立するためには、菌の付着後3日間は湿度が保たれた状態にあることが必要であろうと報告している。

著者らは健康人の踵部の角質を用いて皮膚糸状菌の侵入に関する要因として温度、湿度、外傷の影響をこれまで検討してきた^{1, 2)}。*T. mentagrophytes* においては皮膚糸状菌の至適発育温度と言われる 27°C よりも、体表温度に近い 35°C の方が早期に角質内に侵入し、湿度に比例して角質への侵入は速くなることを報告した。速い菌株は、35°C 湿度 100% では *T. mentagrophytes* は 1 日で、*T. rubrum* は 1.5 日で角質表面への侵入像が認められた。しかし、実験に用いたいずれの菌株も湿度 85% 以下 (70%, 80%, 85%) では、観察した 7 日間では侵入像は認められなかった。以上より、皮膚糸状菌が角質表面に侵入するには至適発育温度の 27°C よりも体表温度に近い 35°C の方が適しており、湿度は 90% 以上が必要と推定した。尚、Japan Foot Week 研究会の報告では、「靴を 8 時間以上はく」は「都道府県平均気温」よりも真菌症リスクのオッズ比が高いことから、皮膚糸状菌が角質に侵入するためには温度よりも湿度の影響が高いと思われる。また、角質の外傷を想定して角質の切断面が上になるようにスライドガラスに接着し、この角質切断面に *T. mentagrophytes* と *T. rubrum* の菌液を塗布した場合では、角質表面に菌液を塗布した結果よりも早期に侵入し、いずれの菌も湿度 95~100% では、0.5 日で侵入が始まっている。また、湿度 80% でさえも *T. mentagrophytes* で 1 日、*T. rubrum* では 4 日で侵入像が観察された。したがって、角質の外傷は湿度とともに皮膚糸状菌の角質内への侵入に極めて重要な因子であり、靴の中の足ほどの

高湿度な環境に成り難い体部白癬の発症要因としては最も重要な因子と思われる。

足底に皮膚糸状菌が付着しても、そのすべてが足白癬を発症するわけではなく、加藤ら¹¹⁾は、被験者は特に予防的なことをおこなわなかったにもかかわらず、足白癬を発症しなかったという。Watanabe ら¹³⁾は、健康人の足底に付着した皮膚糸状菌は、日常的な動作であるタオルで拭く、石鹸で洗う、裸足で 1 時間過ごすなどの処置により、消失ないしは減少したと報告している。

今回の実験系の湿度の設定については、靴を履いている時の趾間の湿度 100% と靴を脱いでいるが靴下を履いている時の趾間の湿度 90% は、数人の第 1 趾間を測定し、実測値に基づいて決定した。また、裸足の時の趾間の湿度 80% と顔面、頸部付近を考えた体部白癬の湿度 80% は、東京の 7 月の平均湿度が 75% (平成 15 年版理科年表) であることより、発汗を加味して決定した。しかし、近年はエアコン等の空調設備の整った環境が多く、実際には更に湿度は低いと思われる。

今回の結果では、足白癬を想定した何れの実験系でも、洗浄前では菌は 1 日で角質表層に侵入していた。洗浄後の結果は、湿度 90% で 8 時間の培養を加えた系では、1 日後においても洗浄により菌を除去することができなかった。一方、湿度 80%、8 時間の培養系では、1 日後の結果で、a 株でのみ走査電顕による観察で 1 本の菌糸の侵入が見られたものの、残りの 2 株では菌は洗浄により除去されており、2 日後の結果でも 2 株で洗浄による菌の除去が認められた。洗浄の効果に関しては、走査電顕での洗浄後の所見では、菌が侵入していたと思われる跡が角質表面に認められること、角質表面の性状が変化していることより、石鹸ではなく物理的な綿棒の作用による菌の除去と角質の剥離が主であると思われた。以上の結果より、足白癬の発症を予防するためには、靴を脱いでいる時には、裸足などで足の湿度を低く保つこと、連日の足底・趾間・趾腹の物理的な洗浄が必要と考えられ、この何れか或いは両者を怠ることで、足白癬の発症の可能性が高まるものと思われた。

また、体部白癬を想定した実験系については、足白癬と同様に皮膚の免疫の作用する以前の角質表層での菌の侵入を想定したこと、体部白癬では足白癬ほどの高湿度に至らないために角質の外傷が主な菌の侵入のトリガーと考えられることより、踵の角質の切断面を使用した。鋏で切断した角質片の切断面に *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. gypseum*, *M. canis* の他、*T. tonsurans* を塗布し、角質内への侵入速度を検索したところ、*T. tonsurans* は他の 4 菌種と比べ侵入速度が速く、0.5 日で菌の侵入が開始していた。格闘技では、顔面、頸部付近の角質の外傷が生じ易いと考えられ、格闘技者間での感染が拡大¹⁴⁾したものと思われた。また、その感染予防には、競技後すぐに洗浄することが必要といえる。

以上、足白癬、体部白癬を想定した実験系にて皮膚糸状菌の角質内侵入と予防に関して記載した。

参考文献

- 1) Ninomiya J, Ide M, Ito Y, Takiuchi I: Experimental penetration of *Trichophyton mentagrophytes* into human stratum corneum. *Mycopathologia* **141**: 153-157, 1998.
- 2) 井出真弓, 二宮淳也, 伊藤弥生, 寺本輝代, 滝内石夫: 皮膚糸状菌の人角質内侵入条件に関する研究. *真菌誌* **40**: 93-97, 1999.
- 3) Japan Foot Week 研究会: 本邦における足・爪白癬の疫学調査成績. *日皮会誌* **111**: 2101-2112, 2001.
- 4) 藤広満智子: 足白癬患者からの白癬菌散布状態の検討. *真菌誌* **34**: 43-55, 1993.
- 5) Maruyama R, Katoh T, Nishioka K: Demonstration of dermatophyte dissemination from the infected soles using the foot-press method. *Mycoses* **41**: 145-151, 1998.
- 6) 新村陽子: 白癬患者および家塵からの皮膚糸状菌の分離. *真菌誌* **26**: 74-80, 1985.
- 7) 境 繁雄, 石川知之, 佐藤静生, 加畑雅行, 帷子康男: 汗疱状白癬の感染源に関する2, 3の検索. *臨皮* **30**: 385-389, 1976.
- 8) Gentles JC: The isolation of dermatophytes from the floors of communal bathing places. *J Clin Path* **9**: 374-377, 1956.
- 9) English MP, Gibson MD: Studies in the epidemiology of tinea pedis. II. Dermatophytes on the floors of swimming-baths. *Brit Med J* **1**: 1446-1448, 1959.
- 10) 藤広満智子: 病院環境から分離された白癬菌と病院内で感染した足白癬症例の検討. *真菌誌* **35**: 25-32, 1994.
- 11) 加藤卓朗: 白癬の感染経路. *皮膚病診療* **22**: 608-613, 2000.
- 12) 藤田 繁, 松山東平, 佐藤良夫: 皮膚糸状菌症—実験的モルモット足白癬—. *真菌誌* **29**: 163-168, 1988.
- 13) Watanabe K, Taniguchi H, Katoh T: Adhesion of dermatophytes to healthy feet and its simple treatments. *Mycoses* **43**: 45-50, 2000.
- 14) 笠井達也, 牧野好夫, 望月 隆: 複数高校の柔道部員間に蔓延した *Trichophyton tonsurans* による白癬. *真菌誌* **43** (Suppl.2): 78, 2002.

Experimental Studies on the Penetration of Dermatophytes into the Human Stratum Corneum and the Effects of Washing

Nobuaki Morishita, Junya Ninomiya, Yoshihiro Sei, Iwao Takiuchi
Department of Dermatology, Showa University Fujigaoka Hospital,
1-30 Fujigaoka, Aoba-ku, Yokohama, Kanagawa 227-0043, Japan

After several types of dermatophytes were applied to the stratum corneum obtained from a healthy human heel, we evaluated the penetration speed of fungal elements into the stratum corneum and the effect of washing its surface.

We designed the following two environments, assuming tinea pedis after applying fungal elements to the surface of the stratum corneum. The samples were incubated under conditions simulating the daily life of those who wear socks in a house: ① 90% humidity for 8 hours, and 100% humidity for 16 hours, and those who have bare feet in a house: ② 80% humidity for 8 hours and 100% humidity for 16 hours. We took the samples out every 24 hours and made observations by PAS stain and scanning electron microscope before and after washing them. Although fungal elements were not removable in ①, even if washed one day later, they could be removable one and two days later in ②. We suggest that fungal elements were easily removable even if dermatophytes had begun to penetrate the surface of the stratum corneum, because the soles retained a low humidity when the shoes were removed, and the soles and interdigital regions were washed every day.

Moreover, in an experiment assuming tinea corporis, fungal elements were applied to the cutting side of the stratum corneum, incubated at 80% humidity, and observed after PAS stain. The penetration of *Trichophyton tonsurans* to the cutting side of the stratum corneum began in 0.5 days, which was sooner than other dermatophytes. We believe this is one factor of the latest expansion of *T. tonsurans* infection in Japan.