

原著論文

自治医科大学附属大宮医療センター皮膚科における
5年間の白癬菌相と PCR-RFLP 法による非定型分離
白癬菌株の同定について

梅本 尚可	加倉井真樹	横倉 英人
戸田 淳	大沢 真澄	阿部 浩之
平塚裕一郎	岡田 栄子	東 隆一
和田 由香*	林 和*	望月 隆**
		出光 俊郎

当科において、5年間に来院した白癬患者293例から分離された白癬菌308株の菌種の同定を行った。また、形態学的に分類不能な14株については、分子生物学的手法により同定を行い、形態学的同定結果と比較した。

同定した白癬菌株は *Trichophyton rubrum* (TR) 172株, *Trichophyton mentagrophytes* (TM) 132株, *Microsporum canis* が1株であった。同定が困難であった14株では、PCR-RFLP 法により、TRと思われたがTMであった3株を含め、計4株が形態による同定法の結果と異っていた。

当科では全国平均よりもTMの割合が高く、全白癬のTR/TM比は1.30, 足白癬のTR/TM比は0.85であった。TMの多い背景には気候, 地域性, 病院の特殊性などが推測された。形態学的に同定困難な非定型的な白癬菌株の同定には、PCR-RFLP 法が有用であった。

(キーワード: 白癬, 皮膚糸状菌, 白癬菌相, PCR-RFLP 法, さいたま市)

I. はじめに

皮膚真菌症は皮膚科外来患者の10%を占めており、その大半は我が国に1000万人以上の患者がいるといわれる足白癬である(1)。国民病といわれる足白癬の起原菌は *Trichophyton* (T.) *rubrum* がその大半を占めると言うのが定説である(2)。白癬から分離される菌種は、地域によって差が認められる。菌の種類によって、感染源や白癬の症状、あるいは治療に対する反応性に相違のみられることもある。白癬菌相は世相を繁栄するといわれているが、白癬菌相を研究する施設も大幅に少なくなったため、実態をつかみにくい現状である。現在まで埼玉県において、白癬菌の培養成績について統計学的検討はなされていない。そのような現状から、さいたま市の大学医学部附属医療機関皮膚科において5年間の統計的観察を行った。

一般に、分離菌株の菌種同定においては、主として肉眼的な形態に、顕微鏡的、生化学的な所見を参考になされている。しかしながら、しばしば、分類困難な白癬菌も分離される。特に *T. rubrum* と *T. mentagrophytes* は非定型的な肉眼的所見を呈することも少なくない。近年、分子生物学的な同定法が開発された(3)。今回分離された株で、一般的な方法では分類され難かった *Trichophyton* 株14検体については、Ribosomal DNAを抽出してPCR-RFLP (PCR産物の制限酵素分析法)により、同定を試みた。

II. 対象および方法

1 白癬菌株

当科に2001年4月から2006年1月まで約5年間に来院した白癬患者293例(男181例・女112例)

から分離された白癬菌308株の菌種の同定を行った。

2 真菌同定

真菌培養では、サブローブドウ糖寒天培地上の集落の肉眼的観察、ポテトデキストロース培地での *T. rubrum* の色素産生、ウレアーゼテストにおける発色の有無を観察した。一部はスライド培養を行い、同定を試みた。

3 Ribosomal DNA region の *Mva I* による PCR-RFLP (PCR 産物の制限酵素分析法)

肉眼的、顕微鏡的、生化学的に分類不能な14株については、近年開発された分子生物学的手法 (PCR-RFLP 法) により同定を行って、確認した(3)。具体的には真菌のリボソーム RNA 遺伝子を ITS 領域の制限酵素分析 (PCR-RFLP 法) を行った。用いた制限酵素は *Mva I* である。これら14株の内訳を表1に示した。足白癬由来が11株、体部白癬が3株(1株は顔面白癬由来)であった。

III. 結果

1 分離菌株の種類

分離した総白癬菌株308株の内訳は *T. rubrum* 172株 (55.8%), *T. mentagrophytes* 132株 (42.9%) であった。また、*Microsporium canis* (MC) が1例あった (図1)。3株は *Trichophyton* 属であるものの分類できなかった。全白癬菌の *T. rubrum*/*T. mentagrophytes* (TR/TM) 比は1.30である。

年次別にみると2002年、2003年が *T. mentagrophytes* 優位で、2004年と2005年は *T. ru-*

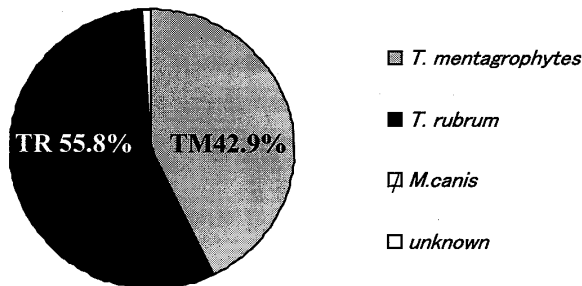


図1 分離菌種
分離された白癬菌の割合を円グラフで示した。*Trichophyton rubrum* 172株 (55.8%), *Trichophyton mentagrophytes* 132株 (42.9%), *Microsporium canis* 1株が分離、同定された。3株は *Trichophyton* であるものの同定ではできなかった。

brum が多くなっていた (図2)。

1) 部位別 TR/TM の割合

308株について、分離菌株の割合を部位別にみると足白癬が163 (52.9%), 爪白癬82 (26.6%) 臀部・陰股部白癬32 (10.4%), 体部白癬17 (5.5%), 顔面白癬10 (3.2%), 手白癬4 (1.3%) であった。TR/TM の割合について、分類不能白癬菌株や *M. canis* 1株を除くと以下ようになる。足白癬161株では TR/TM=74:87, TR/TM 比0.85で、*T. mentagrophytes* 優位であった。爪白癬80株は TR/TM=44:36, 臀部、股部白癬は TR/TM=26:6であった。顔面の白癬は TR/TM=10:0であった。顔面以外の体部白癬は TR/TM=14:2であった。手白癬 TR/TM=4:0であった (図3)。

2) 混合感染

一つの解剖学的部位の鱗屑から2種類の菌種が得られた例は2症例あり、部位は臀部白癬と足白癬各1例で、いずれも *T. rubrum* と *T. mentagrophytes* の両者が分離された

3) 重複感染

二つ以上の解剖学的部位から別の菌種が分離

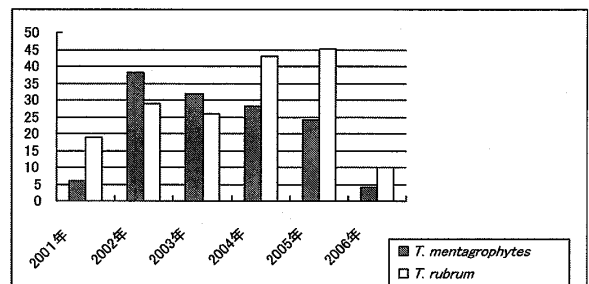


図2 年次別 *Trichophyton mentagrophytes* と *Trichophyton rubrum* の比較。
2001年4月皮膚科新設時から2006年1月までの各分離株数を実数で示した。2002年、2003年は *Trichophyton mentagrophytes* 優位になっている。

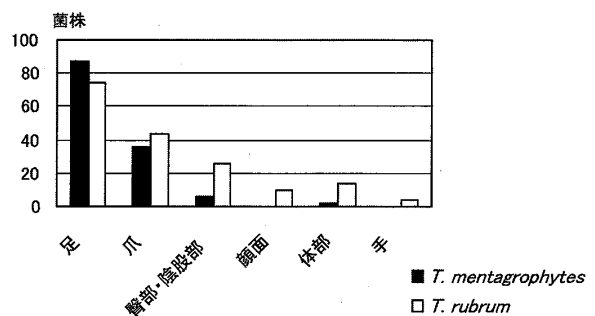


図3 *Trichophyton mentagrophytes* と *Trichophyton rubrum* の部位別にみた分離株数

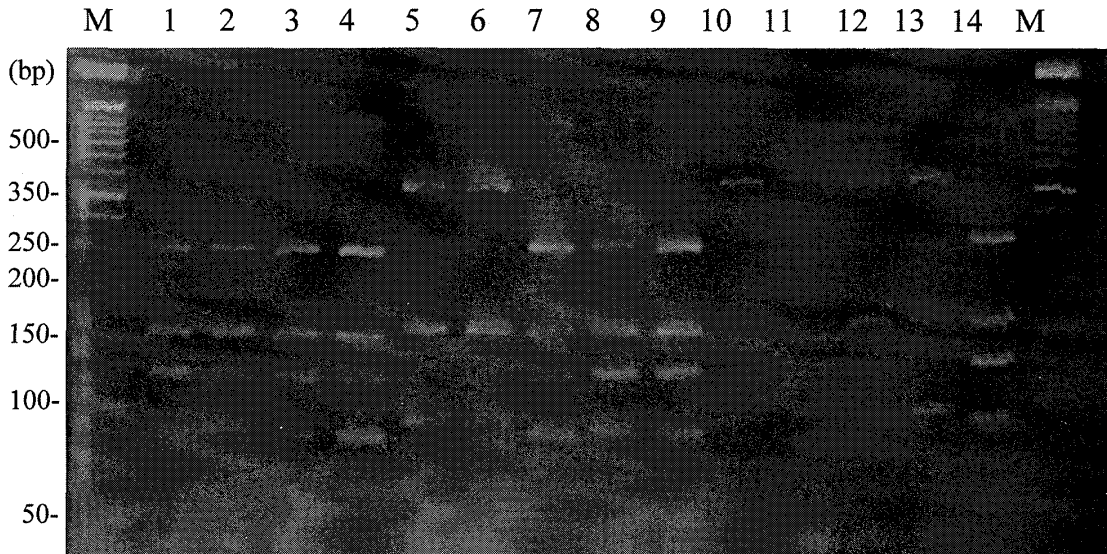


図4 非定型分離菌株のPCR-RFLP法による電気泳動パターン
 数字は患者から分離された菌株の番号で、Mはマーカーを表す。
 患者菌株1～4, 7～9, 14は同一パターンを示し、*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* である。

された例は3例であった。顔面 *T. rubrum* と足 *T. mentagrophytes*, 足 *T. rubrum* と爪 *T. mentagrophytes*, および陰股部 *T. rubrum* で足 *T. mentagrophytes* の症例がそれぞれ1例ずつであった。

2 PCR-RFLP法 (PCR産物の制限酵素分析法)

菌株それぞれにバンドが検出された (図4)。これらはすべて、*T. mentagrophytes* var. *interdigitale* 型および *T. rubrum* 特有の分子型であった。8株が *T. mentagrophytes* var. *inter-*

digitale 型で、6株が *T. rubrum* 型であった。PCR-RFLP法により肉眼的、顕微鏡的、生化学的に同定が困難であった14例では4例が肉眼的および生化学的な同定結果と異なる結果を示した (表1)。足白癬から分離され *T. rubrum* 類似の3株は *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* と同定された。また、体部白癬からの *T. tonsurans* と思われた株は *T. rubrum* と確認された。肉眼的に *T. rubrum* と思われる同定困難例では、実際には *T. mentagrophytes* の可能性があると見える。

表1 一般的同定法とPCR-RFLP法による菌種同定の比較

	臨床病型.	一般的同定(肉眼的/顕微鏡的/生化学的)	PCR-RFLP analysis
1	足白癬	<i>T. rubrum</i> suspected	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
2	足白癬	<i>T. rubrum</i> suspected	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
3	足白癬	<i>T. mentagrophytes</i> suspected	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
4	足白癬	<i>T. mentagrophytes</i> suspected	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
5	体部白癬	<i>T. rubrum</i> suspected	<i>T. rubrum</i>
6	足白癬	<i>Trichophyton</i> species	<i>T. rubrum</i>
7	足白癬	<i>T. mentagrophytes</i> suspected	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
8	足白癬	<i>T. mentagrophytes</i> suspected	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
9	足白癬	<i>T. mentagrophytes</i> suspected	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>
10	足白癬	<i>T. rubrum</i> suspected	<i>T. rubrum</i>
11	足白癬	<i>T. rubrum</i> suspected	<i>T. rubrum</i>
12	顔面白癬	<i>T. rubrum</i> suspected	<i>T. rubrum</i>
13	体部白癬	<i>T. tonsurans</i> suspected	<i>T. rubrum</i>
14	足白癬	<i>T. rubrum</i> suspected	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>

IV. 考察

今回得られた分離菌株は *T. rubrum* と *T. mentagrophytes* がほとんどで、そのほかの白癬菌は *M. canis* 1株のみであった。分離された菌種が少ないのは、当施設では小児の診療を行っていないので、小児の白癬がないこと、さいたま市近郊は都市化が進み土壌由来の菌の感染する機会が減少していることなどが考えられる。

1 分離菌株の割合と年次推移

都会では白癬菌相が変わりつつある。成書(2)によれば TR/TM 比は2.63とされる。当科では、TR/TM 比が1.3と両菌種が拮抗していた。また、足白癬の TR/TM 比は、全国的には1.62であるのに対して、今回の検討では0.85と逆転している。そこで、日本各地のデータと当施設のデータを比較してみることにする(表2)。山城による沖縄の診療所の白癬菌相の報告(4)では、全分離白癬分離菌株では TR/TM 比は1.5で、足白癬では0.8としており、さいたま市の今回の報告と近似している。山城(4)は、足白癬の TR:TM 比が0.8と逆転現象を生じたことについては、「気候との関係では平均気温が20℃、平均湿度が70%をこえた4月から10月の間に足白癬患者が激増し TR/TM 比の逆転を呈した」としている。一方、北海道札幌市の診療所の報告(5)では全白癬の TR/TM 比は、4.08で、足白癬は2.98とかなりの *T. rubrum* 優位である。さいたま市の大学附属医療機関と沖縄の診療所の白癬菌相が類似していたことについては様々な推測をすることができるが、君津中央病院(6)のデータでも TR/TM 比は白癬全体では1.43で、足白癬では0.81とこれもわれわれのデータに似ている。昭和大学藤が丘病院の2002年-2004年の3年間の統計では、足白癬では *T. rubrum*:*T. mentagrophytes* = 260:257、爪白癬では *T. rubrum*:*T. mentagrophytes* = 92:17と足白癬の TR/TM 比が拮抗している(7)。彼らは施設による違いとしているが、TR/TM 比の減少は、

全国的な傾向かも知れない。

2 *T. rubrum* の足白癬と *T. mentagrophytes* の足白癬の違い

当科の成績は他の多くの報告と異なり、前述のように TR:TM 比が低かったが、特に足白癬では TM が優位であった。皮膚糸状菌の菌種によって、好獣性、好土壌性皮膚糸状菌などでは、ヒトに感染した場合には炎症症状が顕著であるなどの臨床的特徴がみられる。しかし、どちらも好人性皮膚糸状菌である *T. rubrum* による白癬と *T. mentagrophytes* による白癬の違いとしては(1) *T. mentagrophytes* は *T. mentagrophytes* var. *intergitale* といわれるように趾間に発生するものが多い。(2)夏場に汗疱状白癬を呈するものは *T. mentagrophytes* が多い。(3) *T. mentagrophytes* は湿度依存性である、などといわれるものの正確には不明である。無症候性の足白癬では TR/TM 比は0.72と低いことが報告されている(8)。したがって、当施設の *T. mentagrophytes* 優位には、(1)糖尿病など生活習慣病患者の院内紹介が多い(2)昨今のマスクミで足白癬、爪白癬を取り上げることが多く、無症状や軽症の *T. mentagrophytes* による足白癬患者が多数来院するようになったことも関与しているのではないかと思われる。元来、環境中から分離される白癬菌は *T. mentagrophytes* が多いとされる(9)。 *T. mentagrophytes* のほうが発症は多いが、医療機関を受診する患者の白癬菌は TR 優位とも考えられる。また、 *T. mentagrophytes* は *T. rubrum* に比較して培地での成育がよいことが知られている。テクニカルに未熟な研修医も患者からの検体を培地に植え込むため、 *T. mentagrophytes* のほうが生えやすく、 *T. rubrum* は生えにくいということもあるかもしれない。今後、基礎疾患などの患者のバックグラウンドや地域の変化などの面からも考えていく必要がある。

3 混合感染と重複感染

表2 *T. rubrum*/*T. mentagrophytes* (TR/TM) 比の地域比較

	最新皮膚科学大系	札幌市 1992-2001	宜野湾市 1993-1995	君津中央 1994-1999	自治医大大宮 2001-2006
全白癬 TR/TM 比	2.63	4.08	1.5	1.43	1.3
足白癬 TR/TM 比	1.62	2.98	0.8	0.81	0.85

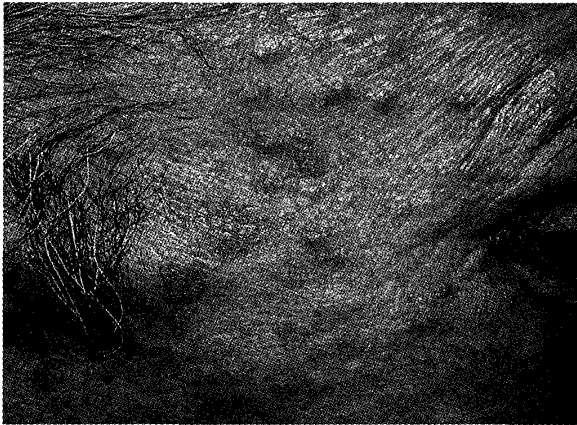


図5 *Trichophyton rubrum* を分離した顔面の異型白癬 (臨床像)
右こめかみ部に毛嚢一致性の丘疹 (毛嚢炎) を合併している。

まずは *T. mentagrophytes* と *T. rubrum* の混合感染であるが、おそらく、時期を異にして、同一部位に感染したと考えられるが、局所の環境が複数菌種の感染をきたしやすいのではないかと思われる。一方、2カ所から別々の菌種が分離された症例は3例であった。

4 顔面白癬からの分離菌種

10例からすべて *T. rubrum* が分離された。顔面の白癬は異型白癬が多いが(10)、今回の例でも定型像をとらないものが多かった(図5)。小児で多種の菌種が分離されることが多いが、当センターでは小児診療を行っていないことも菌種が多彩でない要因のひとつであろう(11)。

5 *Mircrosporum canis* について

人畜共通感染症である *M. canis* による白癬が1例にみられた(図6)。一時期、本菌種は日本各地で蔓延していたが、最近では、本菌罹患数は著明に減少している(12)。野良猫や拾いネコからの感染が有名であるが、自験例では、動物専門学校のカンパニー実習で感染したため、発疹の数は少なく、腕のみで顔面にはない特徴があった。実習でペアを組んだ学生にも同様症状があり、真菌症として他医で治療をうけた。

6 非定型的白癬菌株の分子生物学的同定

とりわけ、*T. mentagrophytes* を *T. rubrum* と見間違ふ傾向がみられた。おそらく判定の困難な例で *T. rubrum* と同定している株の中には *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* が混在していると思われる。本方法の簡便化が進み、一般の検査室レベルで検査が可能になることが

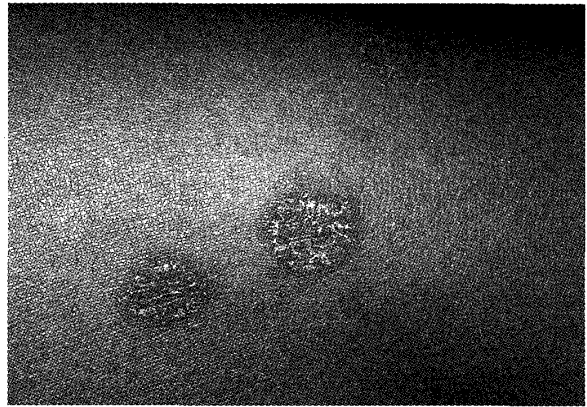


図6 *Microsporium canis* による体部白癬 (臨床像・スライド培養)
動物看護専門学校の犬のカンパニー実習で感染した症例。前腕部の小円形病巣が認められる (a)。スライド培養では本菌に特徴的な紡錘形の大分生子が認められる (b)。

期待される。

V. まとめ

さいたま市の大学附属医療機関である当施設の白癬菌相では、ほとんどが、*T. rubrum* と *T. mentagrophytes* であり、そのうち *T. mentagrophytes* の割合が高くなっている。これは従来の教科書的記載と逆であり、気候の温暖化や軽症受診患者の増加などとも関係している可能性があり、より大きな集団での検討が必要と考えられる。肉眼的に同定の困難な非定型分離菌株の正確な同定には、分子生物学的手法は有用であり、より簡便に施行でき普及されることが期待される。

文 献

- 1 渡辺晋一：皮膚真菌症治療のニューコンセプト 日本医事新報 No.3953 (2000年1月29日)

- 2 望月隆：皮膚糸状菌症 最新皮膚科学大系 14巻 (玉置邦彦編) 中山書店2003年 pp. 204-223.
- 3 望月隆, 田邊洋, 河崎昌子, 他：リボゾーム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 山城一純：沖縄の一診療所における最近3年間の白癬の菌相調査成績と統計的観察 西日皮膚62:662-667, 2000
- 5 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
- 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 日本医真菌学会雑誌 (真菌誌) 43:21-27, 2002
- 7 清佳浩：足白癬, 爪白癬の病態と治療 日皮会誌115:1889-1893, 2005.
- 8 小笠原弓恵：白癬の頻度と患者意識 日本医真菌学会雑誌44:253-260, 2003.
- 9 加藤卓朗：白癬の感染経路 皮膚病診療22:608-613, 2000.
- 10 出光俊郎, 藤井祥子, 加倉井真樹, 他：タクロリムス外用剤使用中の食道癌患者にみられた顔面白癬の1例. 皮膚臨床48:131-132, 189-191, 2006.
- 11 出光俊郎, 花田順子, 平本力, 他：顔面白癬50例の臨床的検討. 臨床皮膚科.42:279-285, 1988年.
- 12 笠井達也：皮膚真菌症30年の推移 国立仙台病院皮膚科に於ける1968~1997年の皮膚真菌症の統計的観察 日本医真菌学会雑誌45:149-163, 2004.

Analysis of Dermatophyte Flora for 5 years at Jichi Medical University Omiya Medical Center in Saitama and Identification of Atypical Dermatophytes using Molecular Biological Technique (PCR-RFLP analysis)

Naoka Umemoto, Maki Kakurai, Hideto Yokokura,
Sunao Toda, Masumi Osawa, Hiroyuki Abe,
Yuichiro Hiratsuka, Eiko Okada, Ryuichi Azuma,
Yuka Wada*, Mutsumu Hayashi*, Takashi Mochizuki**,
Toshio Demitsu

Abstract

Background It is well known that tinea, especially tinea pedis, is a common dermatosis. However, dermatophyte flora causing tinea in Saitama City has not been previously investigated.

Materials & Methods (1) Dermatophyte flora in the central city of Saitama was evaluated. Three-hundred-eight strains of dermatophytes were isolated from the patients from 2001 to 2006 January. (2) Fourteen cases of undetermined strains were analyzed by the PCR-RFLP method.

Results (1) *Trichophyton rubrum* (TR)/*Trichophyton mentagrophytes* (TM) proportion was 172 : 132. TR/TM in tinea pedis was TM predominant; 74 : 87. Four cases of 14 strains revealed different results from those by routine analyzes by the PCR-RFLP method.

Conclusion In the central city of Saitama, TM is an important fungus as a causative fungus in tinea pedis. This is a characteristic result because TR is the predominant causative fungus of tinea pedis in Japan. Interestingly, our results are similar to those in Okinawa and Chiba. The PCR-RFLP method is a useful and reliable tool for the precise identification of the dermatophytes which cannot be identified by routine examination such as macroscopic, microscopic, and biochemical methods.

(Key words: tinea, dermatophyte, fungal culture, PCR-RFLP analysis, Saitama City)