중합효소연쇄반응과 제한효소분석을 이용한 조갑진균증 원인 진균의 진단

가톨릭대학교 의과대학 피부과학교실

채희재 · 백승철 · 조백기

=Abstract=

Diagnosis of Causative Fungi of Onychomycosis Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis

Hee Jae Chae, Seung Cheol Baek and Baik Kee Cho

Department of Dermatology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background: Onychomycosis has become one of the common fungal infection. However, highly reliable and sensitive methods of detecting and identifying causative fungi of onychomycosis are not established yet. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of clinical specimens including blood, sputum, urine, and cerebrospinal fluid collected from patient systemically infected fungus is known as a sensitive diagnostic method. But it has been questionable whether PCR analysis is also applicable to onychomycosis.

Objective: The purpose of this study was to develop a DNA-based diagnostic method to improve the sensitivity and specificity of detection and identification of pathogenic fungi of onychomycosis.

Methods: To detect the fungi in the nail, PCR was performed by using 4 sets of primer (TR1 & TR2, NS5 & NS6, B2F & B4R and CA1 & CA2) designed in conserved sequences of the small ribosomal subunit (18S-rRNA) genes and restriction enzyme analysis of amplified product by *Hae* III was done to identify species. Nail specimens were obtained from 19 cases of onychomycosis confirm by fungus culture.

Results:

1. Preparation of nail powder, which is necessary for removal of keratin, and composition of lysis buffer with guanidinium thiocyanate, Tris-HCl, and β-mercaptoethanol are the most proper modalities for isolation of fungal DNA from fungus-infesting nails.

2. Specific fragments of the 18S-rRNA gene of fungi, 581 bp, 308 bp, 688 bp and 1106 bp were amplified respectively. From sequences of 18S-rRNA gene of fungi by universal primers, dermatophytes (*Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes*) and yeast (*Candida albicans*) yielded identical products.

3. Using *Hae* III endonuclease, digested patterns of fragment of *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans* resulted in different pattern.

Conclusion: This method released enough DNA from fungus-infected nails to result in proper

†별책 요청 저자: 채희재, 150-713 서울특별시 영등포구 여의도동 62번지 가톨릭대학교 성모병원 피부과

amplification and it can be possible to differentiate dermatophytes, yeasts, and molds using *Hae* III endonuclease. The present study is the first one to demonstrate the feasibility of this molecular biologic approach to identify fungi in the infected nail. Therefore, precise detection and identification of the causative fungi would be of help in investigating distribution of the causative fungi of onychomycosis as well as appropriate treatment of the disease.

[Kor J Med Mycol 4(1): 6-14]

Key Words: Onychomycosis, Polymerase chain reaction, Restriction enzyme analysis

서 론

조갑진균증은 손톱이나 발톱에 진균이 감염되어 발생하는 질환으로 최근 노령 인구의 증가, 약물 남용, 목욕 시설 및 스포츠 레저 활동의 증대로 감염 환자가 크게 증가하고 있다[1]. 조갑진균증은 조갑 질환의 약 50% 이상을 차지하는 질환으로 치료를 위해서는 항진균제를 3~6개월간 장기 투여하여야 한다[2,3]. 그러나 임상적으로 건선이나 편평태선 등과 같이 조갑진균증과 감별이 어려운 조갑 질환이 있을 수 있고 장기간의 항진균제 복용시 간독성 등의 부작용이 있을 수 있어 치료 전에 정확한 진균학적 진단이 필요하다. 또한 조갑진균증은 일반적인 피부사상균 (dermatophytes) 외에 효모균 (yeasts) 및 다양한 mold (non-dermatophytic filamentous fungi)가 원인균으로 작용하고 있으며 원인균에 따른 항진균제의 감수성이 다르다. 이 중 일부는 기존의 항진균제에 저항성을 보여[4,5] 치료 전에 진균학적 동정을 정확하게 하여 항진균제를 선택해야 한다.

조갑진균증의 진단 및 동정에는 이제까지 potassium hydroxide (KOH) 도말 검사와 진균 배양검사가 주로 이용되고 있다. KOH 도말 검사는 양성률이 40~50% 정도로 진단적 예민도가 낮다. 진균 배양검사의 경우에도 배양 성공률이 20~50% 정도로 낮고 잡균 오염 등으로 인해 원인균주를 동정하는데 많은 어려움이 있다[6~8].

최근 감염균에 대한 유전자를 이용한 분자생물학적 진단은 가장 정확하고 예민한 진단법으로 정립되고 있어 임상 증상이나 질병 양상에 따라 소변, 객담, 혈액 등의 가검물을 분자생물학적 진단에 이용하고 있다[9~11]. 그러나 조갑진균증의 경우 실험적으로 병변 조갑에서 진균 유전자를 순수 분리하는데 어려움이 많아 분자생물학적 접근이 쉽지 않다.

본 연구는 조갑진균증의 진단율을 높이고 원인 균주를 정확히 동정하기 위하여 조갑내의 진균 유전자를 순수하게 분리하는 방법을 개발하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)의 결과로 진균 감염 유무를 판정하고 증폭된 유전자를 제한효소 (restriction enzyme)로 처리하여 나타난 절단양상의 다형성 (restriction fragment length polymorphism; RFLP)으로 원인균이 피부사상균, 효모균, mold 중 어느 균류에 속하는지 동정하는 방법을 개발하는 것을 목적으로 시도되었다.

재료 및 방법

1. 실험 재료: 조갑분말 채집

KOH 도말 검사와 진균 배양검사를 통해 조갑진균증으로 진단된 19예를 대상으로 하였다. 조갑의 표면을 알코올로 닦은 후 진균 침범이 예상되는 조갑과각화 부위 (subungal hyperkeratotic portion)와 조갑판 (nail plate)을 치과용 전기 분쇄기 (Marathon-1 power grinder, SaeYang Company, Korea)로 갈아 조갑분말을 채집한 후 -20℃에 냉동 보관하였다. 실험에 사용된 조갑은 진균배양검사로 확인된 *Trichophyton rubrum*에 의한 조갑진균증 15예, *Trichophyton mentagrophytes*에 의한 조갑진균증 3예, *Candida albicans*에 의한 조갑진균증 1예였다.

2. 실험 방법

1) DNA 추출

채집된 조갑분말로부터 DNA를 추출해 내기 위하여 이전에 발표된 논문[12,13]에서 Sabouraud 배지에 배양된 진균으로부터 DNA를 추출해 내는 방법과 저자들이 고안한 DNA 추출법을 병행하였다. 저자들의 DNA 추출법을 간략하면 다음과 같다. 5~10 mg의 조갑분말을 400 μl의 1% sodium dodecyl sulfate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 10분간 실온에서 처리 후 12,000 rpm

(Centrifuge 5415C, TUV, Berlin, Germany)에서 5분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 4 M guanidinium thiocyanate (Fluka Biochemika, Japan), 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 1% β-mercaptoethanol로 구성된 용해 완충액 (lysis buffer) 400 μl를 넣고 상온에서 15분간 반응시켰다. 400 μl의 phenol (Sigma Chemical Co.)과 400 μl의 chloroform (Tedia Company, Fairfield, Ohio, USA)/isoamylalcohol (Sigma Chemical Co.) (24:1)을 순서대로 넣고 5분간 잘 혼합한 다음 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 회수하는 과정을 2회 반복 시행하였다. 480 μl의 88% isopropanol (Sigma Chemical Co.)-0.2M potassium acetate (Junsei Chemical Co., Japan)를 넣고 -20℃에서 10분간 반응시킨 다음 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 DNA를 회수하였다. 500 μl의 70% ethanol (Sigma Chemical Co.)로 세척한 후 10 μl의 TE 완충액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Ethylenediamine- tetraacetic acid, Sigma Chemical Company), pH 8.0으로 DNA를 녹여 이 중 2 μl를 중합효소연쇄반응의 주형 (template)으로 사용하였다.

Bock 등[12]은 3% sodium dodecyl sulfate, 50 mmol Tris-HCl, 50 mmol EDTA로 용해 완충액을 구성하였고 Maiwald 등[13]은 Sabouraud 배지 위의 배양균주를 걷어 증류수에 직접 부유 (suspension)시키는 방법을 사용하였다.

피부사상균 (*T. rubrum*), 효모균 (*C. albicans*) 배양균주가 배양되고 있는 Sabouraud 배지로부터도 저자들의 DNA 추출법으로 진균 DNA를 추출하였다.

2) 시발체

진균 18S-rRNA 유전자의 진균 특이 보존 염기서열 (fungus-specific conserved sequence)을 참고로[12~15] 서로 다른 시발체 4 쌍 (Table 1)을 합성하였다 (Bioneer, 청원, 한국). 합성된 시발체는 모든 진균의 18S-rRNA 유전자에 공통적인 보존 염기서열을 참고로 고안된 공유 시발체 (universal primer)이다.

3) 중합효소연쇄반응

5 μl의 10배 반응 완충액 (10X reaction buffer, Takara Biomedicals, Japan)과 4 μl의 2.5 mM dNTP (Takara Biomedicals), 1.25 units의 *Taq* polymerase (Boehringer Mannheim GmbH, Germany), 20 pmol의 시발체, 2 μl의 주형액이 들어 있는 중합효소연쇄반응액에 증류수를 첨가하여 총 용량이 50 μl이 되도록 하였다. 반응액은 중합효소연쇄반응기 (Takara PCR Thermal Cycler MP, Takara Biomedicals)로 95℃에서 3분간 초기 변성반응 (initial denaturation) 후 95℃에서 1분간 denaturing, 55℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension 과정을 35회 시행하였다. 중합효소연쇄반응 후 반응액을 1% 한천 겔 (NuSieve GTG agarose, SeaKem GTG agarose, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)에서 전기영동 후 ethidium bromide (Sigma Chemical Co.)로 염색하여 자외선 투사기 (ultraviolet transilluminator)로 판독하였다.

4) 겔 유출 (gel elution)

중합효소연쇄반응으로 증폭된 증폭산물이 포함된 한천겔을 절제한 다음 비특이적 반응을 배제하고 특이성을 높이기 위해 겔 유출을 시행하였다.

전기영동 후 증폭산물을 포함하고 있는 band 부위를 자외선 투사기 상에서 잘라낸 다음 Jetsorb Gel Extraction kit (Genomed, NC, USA)를 사

Table 1. Primer sets designed on the basis of the conserved sequences of the small ribosomal subunit 18S-rRNA genes

Primers	Sequences	Position	Size
TR1 & TR2	TR1 : 5'-GTTTCTAGGACCGCCGTA-3' TR2 : 5'-CTCAAACTTCCATCGACTTG-3'	798-815 1359-1378	581 bp
NS5 & NS6	NS5 : 5'-AACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3' NS6 : 5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3'	1093-1114 1377-1400	308 bp
B2F & B4R	B2F : 5'-ACTTTCGATGGTAGGATAG-3' B4R : 5'-TGATCGTCTTCGATCCCCTA-3'	276-294 944-963	688 bp
CA1 & CA2	CA1 : 5'-ACTGCGAATGGCTCATTAAATCAG-3' CA2 : 5'-AGTCAAATTAAGCCGCAG-3'	48-71 1136-1153	1106 bp

Size : size of amplified products

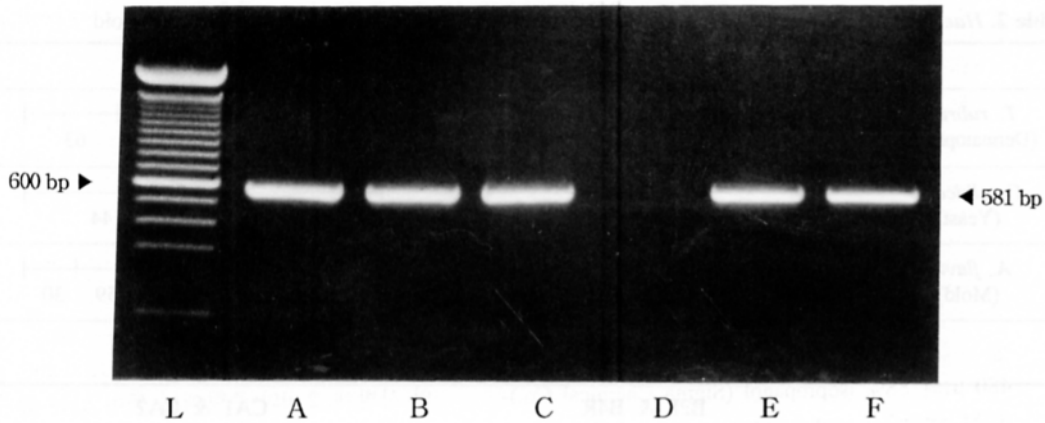

Fig. 1. PCR results of clinical specimens of onychomycosis and cultured fungal strains by using a universal primer set (TR1 & TR2). Lanes: L, 100-bp DNA ladder (GIBCO BRL, Gathersburg, MO, USA); A, *Trichophyton rubrum* from toenail; B, *Trichophyton mentagrophytes* from toenail; C, *Candida albicans* from fingernail; D, normal nails; E, cultured strain of *Trichophyton rubrum*; F, cultured strain of *Candida albicans*.

용하여 DNA를 유출하였다. $NaClO_4$, Tris-acetate-EDTA 완충액, sodium acetate로 조성된 A1 용액 300 μl에 잘라낸 겔과 10 μl의 glass milk를 넣고 50℃에서 15분간 반응시킨 후 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 침전물에 ethanol, NaCl-EDTA, Tris-HCl으로 조성 된 A2 용액 300 μl를 가하여 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 침전물을 20 μl의 증류수로 녹인 후 50℃ 수조에서 5분간 반응시킨 다음 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 튜브로 옮겨 이 중 12 μl를 제한효소분석에 이용하였다.

5) 제한효소분석 (Restriction enzyme analysis)

겔 유출 후 반응액 12 μl, 2 μl의 반응 완충액 (M buffer, Takara Biomedicals), 5 μl의 증류수, 1 μl의 *Hae* III 제한효소 (Takara Biomedicals)로 총 용량 20 μl의 반응액을 만들어 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응액을 3% 한천 겔 (NuSieve GTG agarose, SeaKem GTG agarose, FMC Bioproducts)에서 전기영동 시킨 다음 ethidium bromide에 염색하여 자외선 투사기 상에서 판독하였다.

결 과

1. 중합효소연쇄반응을 이용한 조갑진균증의 진단

진균 배양검사를 통해 원인 진균이 밝혀진 조갑분말에서 Bock 등[12]이나 Maiwald 등[13]이 고안한 Sabouraud 배지로부터 진균 DNA를 추출해 내는 방법으로는 진균 DNA를 추출해 낼 수 없었다. 반면에 저자들이 고안한 DNA 추출법으로 DNA를 추출한 후 TR1, TR2 시발체로 증폭한 바 581 bp 크기의 증폭산물이 관찰되었다 (Fig. 1). 정상 조갑분말로 시행한 중합효소연쇄반응에서는 증폭산물이 관찰되지 않았다. 실험에 사용된 피부사상균 (*T. rubrum* 15예, *T. mentagrophytes* 3예), 효모균 (*C. albicans*) 1예 모두 공유 시발체

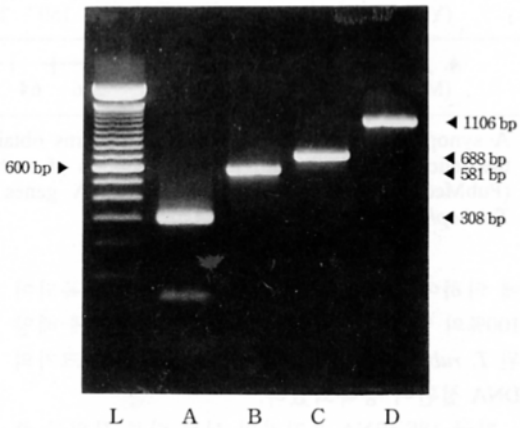

Fig. 2. Amplifiction products of *Trichophyton rubrum* using various universal primers for fungus-specific 18S-rRNA gene. Lanes: L, 100bp ladder (GIBCO BRL); A, primers NS5 & NS6; B, primers TR1 & TR2; C, primers B2F & B4R; D, primers CA1 & CA2.

Table 2. *Hae* III restriction enzyme maps of a representative fungus of dermatophyte, yeast and mold

	TR1 & TR2	NS5 & NS6
T. rubrum (Dermatophyte)	442 90 49	147 90 63
C. albicans (Yeast)	437 142	163 144
A. flavus (Mold)	441 59 50 30	146 71 59 30

Continued

	B2F & B4R	CA1 & CA2
T. rubrum (Dermatophyte)	306 225 54 36 25 22 10 9 6	415 306 193 63 54 36 25 10 9
C. albicans (Yeast)	220 157 150 128 19	408 175 157 150 120 63
A. flavus (Mold)	315 226 64 61 21	416 315 249 64 61

A synopsis of the predicted fragment patterns obtained by digestion with *Hae* III restriction enzyme should theoretically facilitate individual recognition of each fungi. Predicted cuts are based on published sequences (PubMed Nucleotide Query) of 18S-rRNA genes and amplified products of different primer pairs. (T.: *Trichophyton,* C.: *Candida*, A: *Aspergillus*)

에 의하여 동일한 크기의 DNA 절편이 증폭되어 100%의 양성율을 보였다. Sabouraud 배지에 배양된 *T. rubrum, C. albicans*로부터도 동일한 크기의 DNA 절편이 증폭되었다.

진균 18S-rRNA 유전자의 서로 다른 부위를 증폭하도록 고안 된 다른 세 쌍의 시발체를 사용한 중합효소연쇄반응에서도 308 bp, 688 bp, 1106 bp가 각각 증폭되었으며 (Fig. 2) 증폭의 양상은 다른 균종에서도 같은 결과를 보였다.

2. 제한효소분석을 이용한 조갑진균증 원인 진균의 동정

중합효소연쇄반응으로 증폭된 진균 유전자를 하나의 제한효소 만으로도 원인 진균이 피부사상균, 효모균, mold 중 어느 균류에 속하는지 개략적으로 동정할 수 있는 제한효소를 검색해 본 결과 *Hae* III 제한효소가 가장 적당할 것으로 결론지었다 (Table 2).

본 실험에서 *Hae* III 제한효소분석을 통해 실험에 사용된 모든 예에서 *T. rubrum, C. albicans*에서 예상되는 절단 양상 (Table 2)과 일치하는 결과를 보였다 (Fig. 3, 4). 그러나 *T. mentagrophytes*에서는 18S-rRNA의 염기서열이 알려져 있지 않아 *Hae* III 제한효소분석을 알 수는 없었다.

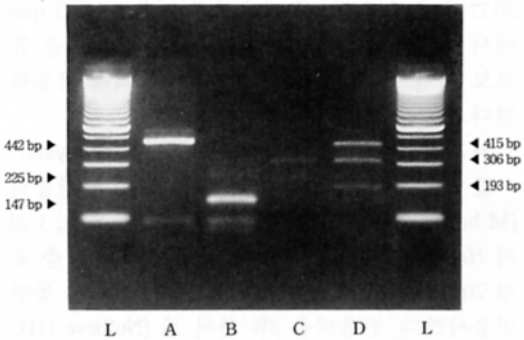

Fig. 3. *Hae* III digestion pattern of PCR products from *Trichophyton rubrum* by using primers, TR1 & TR2 (A), NS5 & NS6 (B), B2F & B4R (C), and CA1 & CA2 (D). L; 100bp ladder (GIBCO BRL).

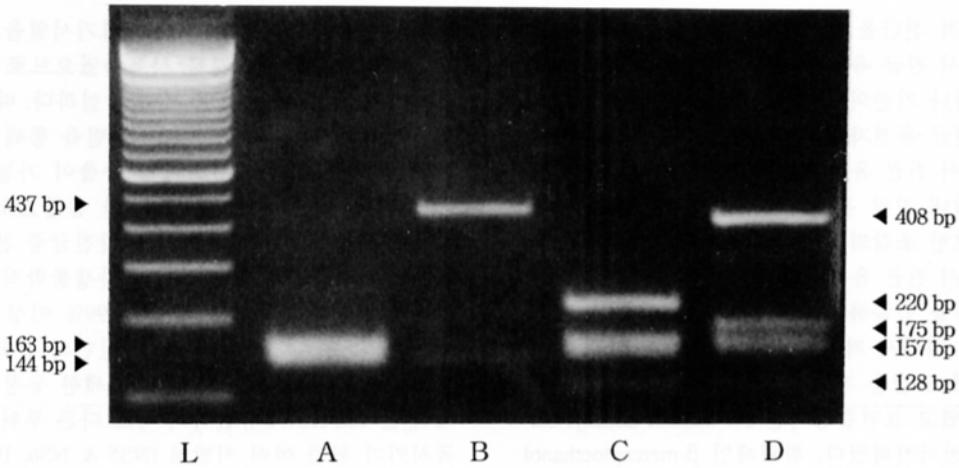

Fig. 4. *Hae* III digestion pattern of PCR products from *Candida albicans* by using primers, NS5 & NS6 (A), TR1 & TR2 (B), B2F & B4R (C), and CA1 & CA2 (D). L; 100bp ladder (GIBCO BRL).

고 찰

현재 약 50,000여종의 진균이 밝혀져 있으나 병원성을 지닌 종은 약 300여종이다. 이 중 피부진균증을 일으킬 수 있는 균종은 크게 피부사상균, 효모균, mold로 나눌 수 있다[16]. 손톱이나 발톱의 진균 감염으로 인해 발생하는 조갑진균증에서도 피부사상균, 효모균, mold는 모두 원인 진균으로 작용할 수 있으나 그 발생 빈도나 발생 비율에 대해서는 보고자에 따라 큰 차이를 보인다[6,17,18]. 이는 조갑진균증의 발생에 대한 지역적 차이나 실험적으로 서로 다른 배양 배지를 사용하는 등의 차이 때문일 수도 있으나 근본적으로는 조갑진균증을 정확하게 확진할 수 있는 진단법이 현재까지 없기 때문이다. 최근 그 동안 주된 원인균이었던 피부사상균 외에 효모균이나 mold에 의한 조갑진균증이나 2종류 이상의 진균이 복합감염 (mixed infection)된 조갑진균증의 발생율이 증가하고 있어[19] 정확한 진균학적 동정 없이 무분별하게 치료하는 경우 기존 항진균제의 치료 실패율이 높아질 것으로 예상된다. 따라서 조갑진균증의 진단율을 높이고 임상적으로 적절한 치료제 선택을 위해서는 보다 민감하고 정확한 진단 및 동정법이 절실하다.

조갑진균증의 진단법으로 최근까지 가장 흔히 이용되고 있는 KOH 도말 검사는 적은 비용으로 신속하고 용이하게 진균의 균사나 포자를 확인할 수 있는 검사법이나 양성률이 40~50% 정도로 다른 부위의 피부진균증에서보다 진단적 예민도가 크게 떨어져 임상적 응용에 어려움이 많다. 또한 진균 질환에서 원인 균주의 분리를 위해서는 진균 배양검사를 통한 동정이 필수적이지만 조갑진균증에서 배양 성공률은 20~50% 정도로 낮을 뿐만 아니라 일반균의 오염 등으로 인해 원인 균주를 규명하는데 많은 어려움이 있다[6,8]. 또한 진균 배양검사를 위해서는 진균에 따라 배양 배지를 포함한 배양 조건을 맞추어야 하는 번거로움이 있을 수 있고 결과 판정까지 약 2주 이상의 배양 기간이 필요한 것도 단점이다. KOH 도말 검사나 진균 배양검사 외에 최근 조갑진균증의 새로운 진단법으로서 면역조직화학법 (immunohistochemisty)과 유량 세포계산법 (flow cytometry)이 소개되고 있다[20]. 그러나 이 경우에는 진단을 위해 조갑을 발췌하여야 하고 면역조직화학법을 위해서는 각각의 진균에 특이한 단클론성 항체 (monoclonal antibody)를 필요로 하며 유량 세포계산법을 위해서는 표준치 및 참고치의 설정 등에 대한 제한점 등이 있다. 따라서 기존의 여러 진단 및 동정법의 단점을 보완하면서 보다 정확하고 신속한 진단 및 동정을 위해 저자들은 조갑진균증의 분자생물학적 진단 및 동정법을 생각하게 되었다.

진균감염증에서 혈액, 소변, 객담 등의 가검물에서 중합효소연쇄반응을 이용한 분자생물학적 진단법은 가장 민감하고 특이성이 뛰어나[9~11] 1 pg 이상의 진균 유전자만으로도 진단이 가능한 것으로 알려져 있다[15]. 그러나 조갑진균증의 분자

생물학적 진단을 위해서는 우선적으로 병변 조갑내에서 진균 유전자를 변성 없이 순수 분리하여야 하나 기존의 혈액, 소변, 객담 등의 가검물에서 진균 유전자를 추출하는 방법[14,21]이나 진균 배지에서 진균 유전자를 추출하는 방법[12,13,15]으로는 조갑내 진균 유전자를 추출할 수 없었다. 이는 견고한 조갑의 각질 성분을 효과적으로 용해시키면서 진균 유전자의 변성은 피할 수 있는 청정 조건을 만족하기가 어렵기 때문일 것으로 생각된다. 따라서 저자들은 각질 용해를 원활히 하기 위해 조갑을 전기 드릴로 갈아 분말 형태로 채집하였고 표면활성제인 1% sodium dodecyl sulfate로 전처치하였다. 환원제인 β-mercaptoethanol과 세포를 용해시키고 균질화 시키기 위한 guanidinium thiocyanate 그리고 Tris-HCl로 pH를 조절한 용해 완충액을 조성하여 진균 유전자 분리의 최적 조건을 결정하였다.

진핵세포의 ribosomal RNA는 모든 세포내에 존재하면서 계통발생학적으로 개체에 따라 공통적으로 나타나는 보존 염기서열 (conserved sequence)과 진화되면서 각기 달라지는 변이 염기서열 (variable sequence)로 구성되어 있어 최근 분자생물학적 발생학 연구에 가장 널리 이용되고 있다[22,23]. 진핵세포의 ribosomal RNA는 크기에 따라 large-subunit ribosomal RNA (28S-rRNA, 25S-rRNA), small-subunit ribosomal RNA (18S-rRNA), 5.8S-rRNA, 5S-rRNA로 나뉘어지며 이 중 18S-rRNA는 전체 크기가 1,800 bp 정도로 비교적 개체간 비교가 용이한 크기이며 변이 염기서열 비율이 높지 않아 진균의 계통발생학적 분류에 주로 이용되고 있다[23,24]. 저자들은 본 실험에서 진균 18S-rRNA 유전자의 보존 염기서열을 참고로 조갑진균증의 분자생물학적 진단에 이용하고 변이 염기서열을 참고로 원인 진균의 동정에 이용하였다.

본 실험에서는 진균에 공통적으로 나타나는 보존 염기서열을 참고로 제작된 시발체를 사용하여 진균 유전자를 증폭시켰으므로 피부사상균, 효모균, mold에서 모두 같은 크기의 증폭 양상을 보일 것이 예상되었고 환자의 조갑분말 및 진균 배지에서 배양된 피부사상균, 효모균에서는 이를 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 실험 기간 중 mold에 감염 된 조갑진균증 예가 없었기 때문에 mold에서는 이를 확인하지 못하였으나 mold에 감염된 조갑진균증의 경우에도 모든 진균의 18S-rRNA 유전자에 공통적인 보존 염기서열을 참고로 고안된 공유 시발체를 사용하였으므로 같은 크기의 증폭 양상을 보일 것이 확실하다. 따라서 저자들이 고안한 유전자 추출 방법을 통해 조갑진균증 조갑내 진균 유전자의 추출이 가능하며 이를 진균 특이 시발체를 사용한 중합효소연쇄반응을 통해 증폭시킴으로써 조갑진균증 진단이 가능함을 증명하였고 이러한 분자생물학적 진단법으로 조갑진균증의 진단율을 99% 이상 높일 수 있을 것으로 기대된다. 또한 진단의 정확도를 높이고 제한효소분석 시 더욱 자세한 동정을 위해 진균 18S-rRNA 유전자의 서로 다른 부위를 증폭시키기 위한 여러 시발체 (NS5 & NS6, B2F & B4R, CA1 & CA2)를 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 예상되는 크기의 유전자 증폭을 보여 (Fig. 2) 본 연구에서 고안된 진균 유전자 추출 방법으로 원하는 진균 18S-rRNA 유전자 부위를 증폭할 수 있음을 확인할 수 있었다.

일정 유전자의 제한효소분석을 통해 나타나는 다형현상은 개개의 균주 (strains), 균종을 구별하는데 널리 이용되고 있다[25~27]. 조갑진균증에서 질병 양상 추정이나 항진균제 선택 등의 임상적 도움을 얻기 위해서는 우선적으로 원인 진균이 피부사상균, 효모균, mold 중 어느 균류에 속하는지 동정하는 것이 필요하다. 따라서 저자들은 일차적으로 중합효소연쇄반응의 결과로써 조갑진균증이 진단된 경우 신속하고 정확한 동정을 위해 하나의 제한효소 만으로도 원인 진균이 피부사상균, 효모균, mold 중 어느 균류에 속하는지 알 수 있는 제한효소를 찾아보았다. 그 결과 *Hae* III 제한효소 하나만으로 제한효소분석을 시행하여도 쉽게 이를 구별할 수 있을 것으로 생각되었고 (Table 2) 실제 제한효소분석 결과도 이와 일치하였다 (Fig. 3, 4). 그러나 경우에 따라서 피부사상균, 효모균, mold 내에서 보다 정확한 종을 동정하기 위해서는 진균 18S-rRNA 유전자 염기서열을 참고로 수 개의 제한효소분석을 동시에 시행할 수도 있을 것으로 생각된다.

현재까지 18S-rRNA 유전자 염기서열이 알려진 진균은 39종에 이른다. 그러나 진균 배양검사를 통해 이제까지 18S-rRNA 유전자 염기서열이 알려지지 않은 진균이 배양된 경우 저자들의 방법을 통해 진균 18S-rRNA 유전자를 추출하고 증폭함으로써 역으로 그 염기서열의 일부 혹은 전체를 알아낼 수도 있어 기초 진균학이나 진균 계

통발생학 연구에도 이바지할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통하여 조갑진균증의 진균 감염 여부를 정확히 진단할 수 있고 원인 진균의 분리 동정도 일부 가능해짐으로써 조갑진균증의 정확한 발생률이나 발병 추세 변화, 원인 균주의 분포 양상 등을 알 수 있을 것이다. 또한 원인 진균에 따라 적절한 항진균제 선택이 가능하며 향후 새로 개발되는 항진균제의 효과 판정이나 치료 기간 및 적응증 설정에도 크게 기여하리라 기대된다.

결 론

조갑진균증은 진균에 감염되어 발생하는 가장 흔한 조갑 질환이나 현재까지 원인균에 대한 정확한 진단법이나 동정법이 없어 조갑진균증의 치료 및 관리에 많은 문제점이 있어 왔다. 이에 본 연구는 조갑진균증의 진단율을 높이고 원인 균주를 정확히 동정하기 위한 분자생물학적 진단 및 동정법 개발을 목적으로 시도되었다.

조갑진균증의 분자생물학적 진단을 위해서는 조갑의 각질 성분을 효과적으로 용해시키면서 진균 유전자의 변성을 피할 수 있는 청정조건을 갖추어야 하나 기존의 혈액, 소변, 객담 등의 가검물에서 진균 유전자를 추출하는 방법으로는 조갑내 진균 유전자를 순수 분리할 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 KOH 도말 검사와 진균 배양검사를 통해 조갑진균증으로 진단된 19예에서 얻은 조갑표본을 재료로 하여 중합효소연쇄반응 및 *Hae* III 제한효소 처리를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 조갑내 진균 유전자 분리의 최적 조건을 위해서는 각질 용해가 용이하도록 조갑을 분말 형태로 채집하여야 하고 guanidinium thiocyanate, Tris-HCl, β-mercaptoethanol로 용해 완충액을 구성하였을 때 최적의 청정 조건을 만족할 수 있었다.

2. 진균의 18S-rRNA 유전자에 공통적인 보존 염기서열을 참고로 고안된 공유 시발체 (TR1 & TR2, NS5 & NS6, B2F & B4R and CA1 & CA2)를 이용한 중합효소연쇄반응 결과 피부사상균 (*T. rubrum, T. mentagrophytes*), 효모균 (*C. albicans*)에서 각각 581 bp, 308 bp, 688 bp, 1106 bp의 동일한 크기의 DNA 절편이 증폭되었다.

3. 중합효소연쇄반응으로 증폭 된 *T. rubrum* 진균 유전자를 *Hae* III 제한효소로 처리한 결과 예상되는 절단양상과 일치하는 다형 현상을 보였다.

위의 결과로 본 연구의 유전자 추출 방법을 통해 조갑진균증 조갑내 진균 유전자의 추출이 가능하며 이를 진균 특이 시발체를 사용한 중합효소연쇄반응을 통해 증폭시킴으로서 조갑진균증의 진단이 가능하였다. 또한 증폭산물에 대한 *Hae* III 제한효소분석을 통해 원인 진균이 피부사상균, 효모균, mold 중 어느 균류에 속하는지 동정이 가능함이 증명되었다.

이와 같이 조갑진균증의 진균 감염 여부를 정확히 진단할 수 있고 원인 진균의 진단율을 높임으로서 조갑진균증의 정확한 발생률이나 발병 추세 변화, 원인 균주의 분포 양상 등 조갑진균증에 관한 연구 및 임상에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Scher RK. Onychomycosis: A significant medical disorder. J Am Acad Dermatol 1996; 35 Suppl: 2-5
2. Andre J, Achten G. Onychomycosis. Int J Dermatol 1987; 26: 481-490
3. Daniel CR. The diagnosis of nail fungal infection. Arch Dermatol 1991; 127: 1566-1567
4. Roseeuw D, De Doncker P. New approaches to the treatment of onychomycosis. J Am Acad Dermatol 1993; 29 Suppl: 45-50
5. Barranco V. Proceedings and transactions of onychomycosis. Int J Dermatol 1994; 33: 292-299
6. Clayton Y. Clinical and mycological diagnostic aspects of onychomycosis and dermatomycoses. Clin Exp Dermatol 1992; 17 Suppl 1: 37-40
7. Elewski BE. Diagnostic techniques for confirming onychomycosis. J Am Acad Dermatol 1996; 35 Suppl 1: 6-9
8. Pierard GE, Arrese JE, Doncker PE. Present and potential diagnostic techniques in onychomycosis. J Am Acad Dermatol 1996; 34: 273-277
9. Miyakawa Y, Mabuchi T, Kagaya K. Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by

polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 894-900

10. Spreadbury C, Holden D, Aufaurre-Brown A. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31: 615-621
11. Lipschik GY, Gill VJ, Lundgren JD. Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. Lancet 1992; 340: 203-206
12. Bock M, Maiwald M, Kappe R. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. Mycoses 1994; 37: 79-84
13. Maiwald M, Kappe R, Sonntag HG. Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Med Vet Mycol 1994; 32: 115-122
14. Hopfer RL, Walden P, Setterquist S. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. J Med Vet Mycol 1993; 31: 65-75
15. Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol 1994; 40: 358-364
16. Odom R. Pathophysiology of dermatophyte infections. J Am Acad Dermatol 1993; 28 Suppl: 2-7
17. Willemsen M. Changing patterns in superficial fungal infections: focus on onychomycosis. J Eur Acad Dermatol Venereol 1993; 2 Suppl: 6-11
18. Greer DL. Clinical consequences of new pharmacological concepts in cutaneous fungal infections. J Eur Acad Dermatol Venereol 1992; 2 Suppl: 26-33
19. Pierard GE, Arrese-Estrada J, Pierard-Franchimont C. Treatment of onychomycosis: traditional approaches. J Am Acad Dermatol 1993; 29 Suppl: 41-45
20. Arrese JE, Pierard-Franchimont C, Greimers. Fungi in onychomycosis: a study by immunohistochemistry and dual flow cytometry. J Eur Acad Dermatol Venereol 1995; 4: 123-130
21. Niersters HGM, Goessens WHF, Meis JFM, Quint WGV. Rapid polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. J Med Clin Microbiol 1993; 31: 904-910
22. Baharaeen S, Vishniac HS. 25S ribosomal RNA homologies of basidiomycetous yeasts: taxonomic and phylogenetic implications. Can J Microbiol 1984; 30: 613-621
23. Kurtzman CP. rRNA sequence comparisions for assessing phylogenetic relationships among yeasts. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 1-6
24. Bowman BH, Taylor JW, White TJ. Molecular evaluation of the fungi: human pathogens. Mol Biol Evol 1992; 9: 893-904
25. Magee BB, D'Souza TM, Magee PT. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. J Bacteriol 1987; 169: 1639-1643
26. Laaser G, Moller E, Jahnke KD. Ribosomal DNA restriction fragment analysis as a taxonomic tool in separating physiologically similar basidiomycetous yeasts. Syst Appl Microbiol 1989; 11: 170-175
27. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J Bacteriol 1990; 172: 4238-4246