

分子生物學在皮膚病理診斷上的應用

蕭百芬^{1,2,3,4}

¹馬偕紀念醫院皮膚科，台北，台灣

²馬偕醫護管理專科學校，台北，台灣

³台灣皮膚科醫學會，台北，台灣

⁴美國皮膚科醫學會，美國

摘要

隨著分子生物學的進步，其技術愈來愈常被應用於皮膚病理（dermatopathology）檢體的研究，對皮膚疾病的診斷及相關分類帶來不少幫助。本文以蕈樣肉芽腫（mycosis fungoides; MF）及皮膚結核（cutaneous tuberculosis）為例，介紹分子生物技術如何被應用於惡性腫瘤及感染性皮膚疾病（infectious skin diseases）的診斷。在蕈樣肉芽腫方面，藉由分子生物技術偵測T細胞受體（T cell receptor; TCR）基因重組（genetic recombination），可幫助診斷蕈樣肉芽腫，並進一步以之為腫瘤標記（tumor marker）追蹤疾病病程。在皮膚結核方面，利用聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction; PCR）偵測結核桿菌（*Mycobacterium tuberculosis*）DNA，可幫助診斷皮膚結核、判別病原體（pathogen），並篩檢病人對結核病（tuberculosis）治療用藥的抗藥性（drug resistance）。本文所列舉的例子只是分子生物學應用於皮膚疾病研究上的一小部分，相信這樣的應用在未來會更普及，有更多的皮膚疾病可藉由分子生物學瞭解其成因，協助疾病分類及預測預後。（生醫 2008;1(2):175-188）

關鍵字：分子生物學、皮膚病理（dermatopathology）、蕈樣肉芽腫（mycosis fungoides; MF）、聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction; PCR）、皮膚結核（cutaneous tuberculosis）

前言

近年來，隨著研究方法的不斷進步，分子生物學已成為生物醫學重要的發展利器。從分子生物學的角度研究臨床疾病有助於改變傳統診斷方法、疾病分類及預測預後，更有助於瞭解疾病的致病機轉。在皮膚科，以皮膚切片作病理診斷向來是診斷皮膚疾病的重要依據。而結合皮膚病理

（dermatopathology）和分子生物技術則能從皮膚檢體中獲得更多關於疾病的訊息。因此近年來在皮膚醫學領域，結合二者的相關研究論文也不斷推陳出新。分子生物學在皮膚病理研究上的應用包含以下兩方面：

（1）惡性腫瘤之診斷

通訊作者：蕭百芬醫師

電話：886-2-25433535 ext 2214

傳真：886-2-25433642

地址：104台北市中山北路二段92號馬偕紀念醫院皮膚科

電子郵件：hpf01@ms1.mmh.org.tw

對於不容易早期診斷的惡性腫瘤，如淋巴瘤（lymphoma）、基底細胞癌（basal cell carcinoma; BCC）、鱗狀細胞癌（squamous cell carcinoma）、惡性黑色素瘤（malignant melanoma）等，以分子生物技術偵測其致癌基因（oncogene）、抑瘤基因（tumor suppressor gene）、細胞凋亡（apoptosis）相關標記（marker），以及訊息傳遞路徑（signaling pathway）的表現等，有助於在早期惡性細胞數目仍很少、細胞型態變化不明顯的階段，即有效偵測出癌細胞的存在，達到早期治療、密切追蹤的目的。此方式亦可應用於瞭解腫瘤的致病機轉。本文以蕈樣肉芽腫（mycosis fungoides; MF）為例，對此方法作進一步介紹。

（2）感染性皮膚疾病（infectious skin diseases）之診斷

由於分子生物技術能直接偵測微量的感染病原體（pathogen）之DNA或RNA，因此可大幅提高診斷的敏感度。雖然微生物培養仍是目前診斷感染性皮膚疾病的黃金標準（gold standard），但受限於檢體或環境等的限制，往往診斷敏感度低，使得早期診斷不太容易。目前分子生物技術已能應用於皮膚結核（cutaneous tuberculosis）、非典型分枝桿菌（atypical mycobacteria）、癩病（leprosy）、單純疱疹病毒（herpes simplex virus）、水痘疱疹病毒（varicella zoster virus）、梅毒（treponema pallidum）、萊姆病（Lyme disease，病原體為*Borrelia burgdorferi*）、貓抓病（cat-scratch disease）、皮膚萊什曼原蟲病（leishmaniasis）、恙蟲病（scrub typhus或tsutsugamushi disease）等疾病的診斷。在台灣，結核病的盛行率有逐漸上升的趨勢，然而皮膚結核往往因檢體中存在的致病菌極少，而非常不容易診斷，藉由分子生物技術即能有效提升皮膚結核的診斷率。另一種感染性疾病—癩病由於病程長、疾病表現多樣化，加上引進外勞和觀光旅遊頻繁等因素，時有境外移入的病例，造成診斷上

的困難，分子生物技術亦能有效輔助醫師進行臨床診斷。本文以皮膚結核的相關研究為例，進一步介紹如何應用分子生物技術診斷此類疾病。

首先以蕈樣肉芽腫為例，介紹分子生物學技術在惡性腫瘤診斷之應用。

早期診斷蕈樣肉芽腫的困難

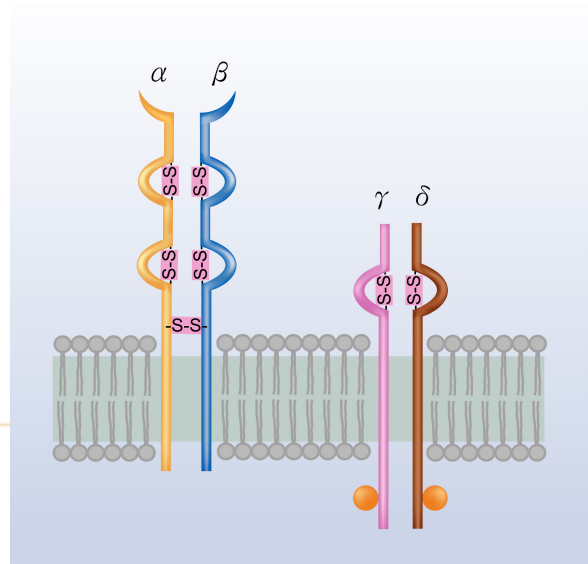
早期診斷蕈樣肉芽腫一直是讓皮膚科醫師及病理科人員頭痛的難題。蕈樣肉芽腫是皮膚T細胞淋巴瘤（cutaneous T cell lymphoma; CTCL）最常見的一型，約佔所有皮膚T細胞淋巴瘤病例的50%。我國各醫學中心的報告顯示約佔25-62%¹⁻³，和西方國家報告的比例相當。

蕈樣肉芽腫的皮膚表現可分為斑期（patch）、板塊期（plaque）和腫瘤期（tumor）。其中前兩者所佔的比例較高，卻不易診斷。早期斑期、板塊期的臨床表現和許多良性發炎性皮膚疾病（benign inflammatory skin diseases）極相似，因此容易被誤診為全身性濕疹（generalized eczema）、乾燥性皮膚炎（asteatotic eczema）、類乾癬（parapsoriasis）等。其病理切片下，由於惡性T淋巴球（malignant clonal T lymphocytes）數目少，型態變化不明顯，再加上有許多發炎性淋巴球浸潤（lymphocytic infiltration），使得病理診斷的困難度大大提高。不少學者嘗試提出幫助病理診斷的條件⁴⁻⁶，例如Pautrier氏微小膿瘍（Pautrier's microabscess）、淋巴球親表皮性（epidermotropism）無伴隨的細胞間水腫（spongiosis）、淋巴球異形現象（atypia），但這些變化都不具特異性，也有可能出現在其他良性發炎性皮膚疾病。近年來，陸續有Guitart等人⁷提出9分評量系統（包含3項主要診斷標準，各佔0-3分）、Pimpinelli等人⁸提出評分系統同時考量臨床及病理表現的方法，以評分的高低做為診斷證據的強弱，可見其病理診斷確有困難度。

免疫染色法 (immunohistochemical staining) 可藉由確認淋巴球 (lymphocyte) 是否主要為 CD4+ T細胞 (CD4+ T cell)，以及是否失去部分成熟T細胞抗原 (pan T cell antigen)，如 CD7，來幫助進行診斷。然而，這些表現一樣不具特異性，亦即它們也有可能出現在其他良性發炎反應 (inflammation)。Smoller等人⁹的一項大型研究指出，在151位蕈樣肉芽腫病人中，僅有116位病人 (76.8%) 的免疫染色結果支持其患有蕈樣肉芽腫的診斷，其偽陰性 (false-negative) 率為 23.2%。且在92位並未被診斷為蕈樣肉芽腫的病人中，也有20位病人 (22.2%) 的免疫染色結果出現類似蕈樣肉芽腫的變化。因此，Smoller等人認為，免疫染色法只能用來支持形態上的病理診斷。

T細胞受體 (T cell receptor; TCR) 基因重組 (genetic recombination) 之偵測臨床應用

T細胞受體包括 α 、 β 、 γ 、 δ 鏈等，在細胞表面上是以 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 的組合存在 (圖一)。 α 、 β 、 γ 、 δ 鏈分別由不同數目的V、(D)、J、C片段組成 (表一)。不同的V、(D)、J組合構成可變區 (variable region)，亦即抗原結合區 (antigen binding domain)，T細胞受體最大的差異性即在此¹⁰。超過98%的皮膚T細胞淋巴瘤中之惡性T細胞是 $\alpha\beta$ 組合，但不論是 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 型的T細胞，其基因體中都至少有一重組的 γ 鏈存在。由於T細胞受體的 γ 基因只有12個V片段、5個D片段及2個J片段，結構上比 α 、 β 鏈單純，且彼此間的同質性高，所以只需要少數的引子 (primer) 即能偵測出大部分可能的T細胞受體 γ 基因重組。此外，T細胞受體 γ 基因的V、J片段位置相當接近 (相距400-700 bp)，因此可直接以基因體DNA進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)。目前的研究多針對T細胞受體 γ 基因重組，以不同



圖一、T細胞受體 (T cell receptor; TCR) 示意圖。

T細胞受體包括 α 、 β 、 γ 、 δ 鏈等，在細胞表面上是以 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 的組合存在。(彩圖詳見本刊網頁)

的方法加以偵測為主。此外，每一個T細胞群落 (clone) 都有其特有具專一性的變異部位，若能定序此V、J片段相連處的序列，則可以拿它做病人的T細胞群落特異性標記 (clone specific marker)，以追蹤疾病治療的情況。

偵測方法

1980年代晚期，偵測T細胞受體 γ 基因重組的方法以南方點墨法 (southern blot) 為主，但其偵測敏感度低，在多株T細胞群落的背景下，單株T細胞群落的數量需大於5%才能被偵測出來。此外，南方點墨法需要以剛取下的冰凍切片檢體才能進行偵測，並不方便。因此，此法目前幾乎已完全被更便利的PCR取代。

表一、T細胞受體之 α 、 β 、 γ 、 δ 鏈的V、D、J片段數目。

| | V片段 | D片段 | J片段 |
|----------|-------|-----|-----|
| α | 70-80 | 0 | 61 |
| β | 52 | 2 | 13 |
| γ | 12 | 0 | 5 |
| δ | 3 | 3 | 4 |

近年來，有不同的研究應用不同的引子設計及不同的實驗方法，偵測是否有單株T細胞群落的存在。目前的文獻報告顯示，偵測PCR產物的方法除了傳統的聚丙烯醯胺電泳（polyacrylamide gel electrophoresis）之外，尚有單鏈構象多態性（single strand conformational polymorphism; SSCP）、溫度梯度凝膠電泳（temperature gradient gel electrophoresis; TGGE）、變性梯度膠凝電泳（denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE）、異源雙鏈核酸分子（heteroduplex; HD）及高效液相色譜（high performance liquid chromatography; HPLC）等方式。除了實驗方法的差異外，各研究所收集的病人之情形也不盡相同。有的研究收集已被診斷為蕈樣肉芽腫的病人，或較晚期表現的病人。有的研究則收集初期病理變化尚不明顯、診斷未確定的病人，而病人之後是否發展為蕈樣肉芽腫並不清楚。上述差異造成實驗結果上的差距，使這些結果之間難以互相比較。目前的文獻報告顯示，在蕈樣肉芽腫病人偵測到單株T細胞群落的比例約為40-90%¹¹⁻¹⁸。

新進的分析方法是以螢光標記（fluorescently labeled）的DNA引子，以自動化毛細管電泳（automated capillary electrophoresis）分離，再以GeneScan 軟體分析。經過四年的研究，在歐洲七國嘗試以BIOMED-2六個引子將分析方法標準化後，此方法已應用於超過700例新鮮冰凍淋巴結（lymph node）檢體之分析¹⁹。然而目前卻只有一篇研究報告將之應用於蠟塊檢體的皮膚T細胞淋巴瘤分析²⁰。該報告指出，在10例確定為蕈樣肉芽腫的病人中，有8例（80%）能偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組。此研究所使用的標準化偵測方法將有助於未來的研究，提高其分析量及彼此間的可比較性。一篇最新的報告比較HD及GeneScan自動化毛細管電泳分離兩種分析方法，發現後者在早期蕈樣肉芽腫病灶偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組的敏感度更高²¹。

除上述因素外，在PCR時使用設計於 γ 鏈基因

上不同片段的引子亦會影響實驗結果。Signoretti等人以在V γ 1-8、J γ 1/2片段上設計之引子，利用PCR-SSCP的方法，偵測出83.3%的T細胞淋巴瘤病人有單株T細胞受體 γ 基因重組²²。若再加入於V γ 9、V γ 10、V γ 11片段上設計之引子，則分別能再多偵測到4.2%、8.3%及0%的病人具單株T細胞受體 γ 基因重組。Li等人¹⁵以PCR-DGGE在皮膚T細胞淋巴瘤病人中偵測出單株T細胞受體 γ 基因重組，其中，79.6%（39/49）發生在V γ 1-8片段，18.4%（9/49）發生在V γ 片段，2%（1/49）發生在V γ 10/V γ 11片段。以BIOMED-2引子在同一病人的兩處以上不同病灶偵測其是否有相同的T細胞受體 γ 基因重組（dual-PCR），結果顯示其敏感性高達82.6%（19/23），這可能與該引子涵蓋幾乎所有可能的V γ -J γ 重組有關²⁰。

在皮膚疾病診斷上的限制與可行的解決方案

偵測到T細胞受體 γ 基因重組未必代表一定有惡性T細胞的存在，因為在良性發炎性皮膚疾病，如扁平苔蘚（lichen planus; LP）、急性苔蘚樣瘡狀糠疹（pityriasis lichenoides et varioliformis acuta; PLEVA）、慢性苔蘚樣糠疹（pityriasis lichenoides chronica; PLC）、硬化性苔蘚（lichen sclerosis; LS）等，亦有25-65%可以偵測到T細胞受體 γ 基因重組，其臨床意義尚不清楚²³⁻²⁷。Thurber等人²⁰在同一病人的兩處不同病灶偵測是否有相同T細胞受體 γ 基因重組（dual TCR-PCR）發現，在23例發炎性皮膚疾病患者中，僅3例有單株T細胞受體 γ 基因重組，其中2例只有在一處病灶有單株T細胞受體 γ 基因重組，1例在兩處病灶皆有單株T細胞受體 γ 基因重組，而此病例的最後診斷未明。此研究的專一性（specificity）高達95.7%（22/23），顯示dual TCR-PCR應可提升偵測T細胞受體 γ 基因重組在皮膚疾病診斷的專一性，但其與臨床和病理變化的配合仍是目前最重要的診斷基礎。

與病理變化之間的關聯性

最初Tok等人²⁴的研究發現，在12位蕈樣肉芽腫病人的39個切片檢體中，不論其病理變化是否可診斷為蕈樣肉芽腫，其偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組的比例在三個組別，包括：無法診斷、建議診斷及確定診斷，均得到類似的結果。因此Tok等人認為，病理變化和分子生物表現二者之間並無相關性。然而，後來Ponti等人²⁸的研究卻有不同的結果。Ponti等人²⁸以Guitart等人⁷提出的9分評量系統得分對病人進行分類，發現在得分超過5分的病人中，有92%能偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組，但是在得分小於5分的病人中，只有50%能偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組。作者進行多元迴歸分析（multiple regression analysis）的結果發現，下列三項因素與早期蕈樣肉芽腫檢體是否能偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組的機率有關：（1）細胞浸潤的密度和程度；（2）親表皮性（epidermotropism）的程度；（3）淋巴球異形（atypia）程度。Ponti等人因此認為，蕈樣肉芽腫病人的惡性T淋巴球數目愈多時，偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組的機率愈高，其勝算比（odds ratio）為 3.6（ $p = 0.0199$ ）。

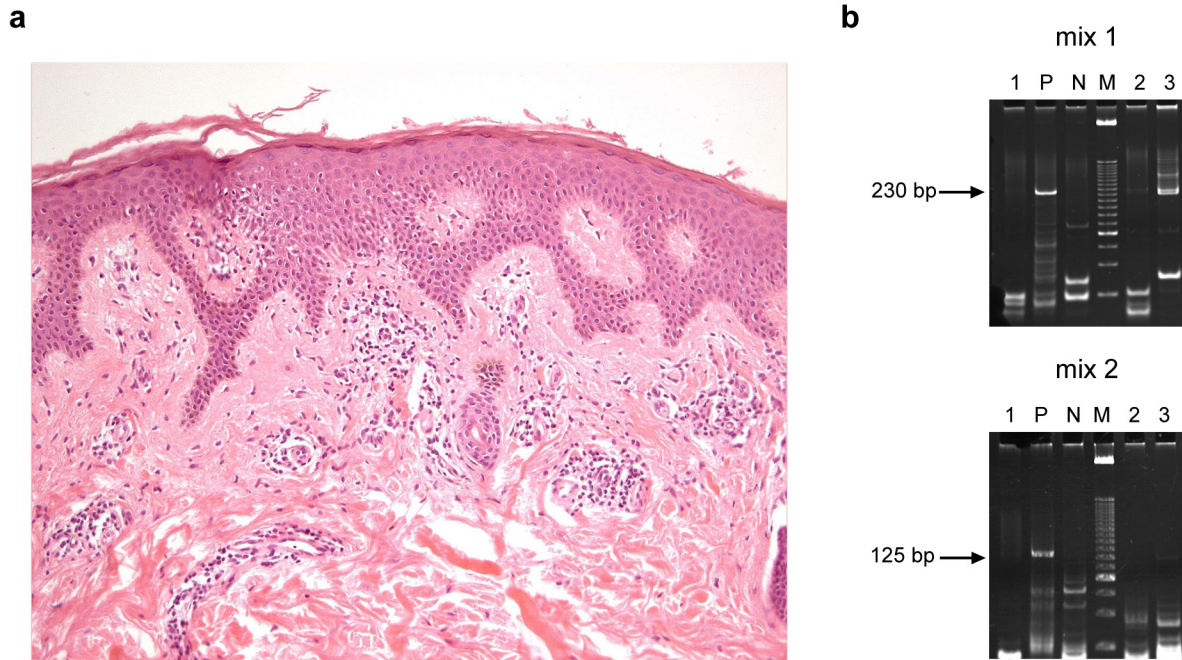
Thurber等人²⁰的研究則進一步顯示，病人的9分評量系統得分愈高時，有較高比例能在兩處不同病灶皆偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組。在得分超過5分的10位病人中，有9位的dual TCR-PCR結果為陽性（positive），而唯一一位結果為陰性（negative）的病患後來被證實為藥物疹（cutaneous drug eruptions）。在得分小於4分的8位病人中，有3位的dual TCR-PCR為陽性，其中2位結果為陽性的病患後來被證實為蕈樣肉芽腫。Thurber等人因此得到以下結論：當病理變化愈符合蕈樣肉芽腫時（得分愈高），偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組的機會愈高。

台灣的相關研究主要針對非常早期斑期蕈樣肉芽腫的病人。這些病人被進一步區分為下列四

組進行分析²⁹，包括：確定診斷、可以診斷、建議診斷和無法診斷。結果發現，在前兩組的檢體中無法偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組者，其發炎程度較厲害，且真皮乳突層（papillary dermis）明顯地纖維化（fibrosis）。該研究的作者因此認為，發炎程度呈中度至嚴重程度，尤其是伴隨明顯的真皮乳突層之纖維化時，有可能偵測不到單株T細胞受體 γ 基因重組，這是在判斷分子生物檢查結果時必須考慮的因素。該研究也建議，當蕈樣肉芽腫在初期發炎細胞不明顯時，分子生物的檢查反而幫助較大。以一實際病例為例，一名病患的身上及四肢有多處紅斑，情況反覆超過十年以上，期間曾被診斷為濕疹（eczema）及類乾癬，卻對治療這些疾病的藥物反應不佳。該病患亦曾做過多次皮膚切片檢查，病理變化為非特異性發炎反應（圖二 a）。其中一次的皮膚檢體經抽取DNA後，以PCR偵測其是否有單株T細胞受體 γ 基因重組，發現有一反應為陽性（圖二 b、c），因而將之診斷為蕈樣肉芽腫，並開始接受光化學療法（psoralen photochemotherapy; PUVA），結果病患的皮膚病灶有明顯改善。

提高偵測率的方法

目前已有研究陸續嘗試以更精確的取樣方法來提高單株T細胞受體 γ 基因重組的偵測率。Gellrich等人³⁰以雷射（laser）輔助的方式，分別自表皮（epidermis）及真皮（dermis）部位取單一淋巴球進行PCR。結果發現，在早期斑期蕈樣肉芽腫，有較多的表皮淋巴球能被偵測到有單株T細胞受體 γ 基因重組，而發炎性不具單株T細胞受體 γ 基因重組的淋巴球則主要存於真皮。然而，此方法十分耗時，因此不易普及。Cerroni等人³¹以紫外線雷射光（P.A.L.M. UV laser microbeam）分離表皮及真皮發現，只取表皮的蕈樣肉芽腫檢體有較高比例能偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組。Dereure等人³²根據此觀念以更簡單的徒手操作，用30號針頭在顯微鏡下徒手分開表皮及真皮，結果發現，若以整個檢體進行PCR-HD，29位病人中



圖二、以偵測T細胞受體 (T cell receptor; TCR) γ 基因重組 (genetic recombination) 輔助診斷蕁樣肉芽腫 (mycosis fungoides; MF)。

(a) 病患多次進行皮膚切片檢查，病理變化均為非特异性發炎 (inflammation)。其在表皮 (epidermis) 局部有淋巴球 (lymphocyte) 浸潤，出現細胞間水腫。在真皮 (dermis) 上層有輕度至中度淋巴球浸潤 (lymphocytic infiltration) 在血管周圍。(hematoxyline-eosin stain, x100)；(b) 取不同部位的檢體 (1、2、3) 以引子mix 1及mix 2進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)，偵測單株T細胞受體 γ 基因重組，結果檢體3在mix 1 PCR出現陽性 (positive) 反應。(彩圖詳見本刊網頁)

槽1、2、3為病人皮膚檢體；P為陽性對照組 (positive control)；N為陰性對照組 (negative control)；M為PCR產物大小標記 (marker)。

只有16位被偵測到有單株T細胞受體 γ 基因重組，但只取表皮的檢體，29位病人中有24位被偵測到有單株T細胞受體 γ 基因重組。Dereure等人因此認為，這種簡易的操作方式可應用於一般實驗室以提高偵測率。此外，他們還發現，此方法對早期斑期蕁樣肉芽腫檢體比對板塊期的檢體更有幫助。

近年來較常被提到的取樣方式是以雷射顯微擷取 (laser capture microdissection; LCM) 更精確地採取標的細胞，再萃取其DNA，如此一來，可有效避免其他細胞DNA的干擾稀釋，提高PCR的偵測率³³。此外，其DNA萃取步驟更為簡便快速，可

以在一天之內獲得結果。Yazdi等人³⁴以 LCM取得11例蕁樣肉芽腫病人真皮處血管周圍的淋巴球進行PCR，發現能提高27%的偵測率 (11/11相對於8/11)。雖然以此方式取樣可更專一性地選取淋巴球，卻無法有效區分其為單株T淋巴球或多株反應性T淋巴球。筆者本身的研究是選取病理診斷確定為蕁樣肉芽腫，但PCR結果呈陰性的檢體，再以LCM取樣，希望能提高偵測率²⁹。我們分別選取表皮淋巴球、真皮血管周圍淋巴球進行PCR。結果發現，在表皮淋巴球的部分能偵測出少量單株T細胞受體 γ 基因重組。我們認為，應該是表皮內的淋巴球較少被發炎性淋巴球干擾，因此能偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組，但因在LCM取樣時受

限於取樣的細胞數目較少，使得PCR的產物量也少。而選取真皮淋巴球時主要還是多株T細胞，因此對提升PCR偵測率的幫助有限。

在病程追蹤上之應用

蕈樣肉芽腫的病程長、復發率高，這可能和接受治療後腫瘤細胞仍然存在有關。少量殘餘疾病 (minimal residual disease; MRD) 是指在已經完全痊癒的病人中，仍可偵測到少量腫瘤細胞的存在³⁵。在白血病 (leukemia) 或淋巴瘤 (lymphoma) 病人的血液或骨髓可偵測到少量殘餘疾病，並與其臨床病程有關^{36,37}。

Poszepczynska-Guigne等人³⁸首先發現，在13位臨床上被認為已經完全痊癒的蕈樣肉芽腫病人當中，有4位病人仍然可偵測到有單株T細胞受體 γ 基因重組，但是其意義不明，不清楚是否和病人未來的病程有關。但Poszepczynska-Guigne等人仍認為單株T細胞受體 γ 基因重組對蕈樣肉芽腫而言，是可靠的腫瘤標記 (tumor marker)。筆者曾針對一位以BCNU (carmustine) 治療脫色素蕈樣肉芽腫病 (hypopigmented mycosis fungoides)，且臨床上已獲得改善的病人進行偵測，發現仍可偵測到其有少量殘餘疾病³⁹。筆者嘗試將PCR產物經由選殖 (cloning)、定序，進一步定量分析治療前後，病人的單株T細胞在數量上的變化。筆者分別採取病人的表皮及真皮檢體進行偵測，發現於治療後臨床上症狀已改善的病灶，在病人的表皮已無法偵測到單株T細胞受體 γ 基因重組，但在真皮仍有單株T細胞受體 γ 基因重組，亦即在真皮仍有治療前的單株T細胞存在，只是數量上已有減少。此病人在三年半的追蹤期間沒有疾病復發，因此筆者認為，少量殘餘疾病似乎和蕈樣肉芽腫的病程無關，但仍需要更多病例研究來確定。

藉由上述研究發現，進一步定序或定量單株T細胞受體 γ 基因重組，可作為追蹤蕈樣肉芽腫病程的一項專一性標記，不但對臨床醫師很有幫助，

更是未來研究腫瘤免疫療法 (immunotherapy) 的一個嶄新方向。接下來以皮膚結核為例，進一步介紹分子生物學在皮膚感染性疾病上的應用。

皮膚結核的流行病學相關研究

當結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染人體，即有可能在人體細胞內持續增生，進一步造成慢性傳染性疾病。目前結核病 (tuberculosis) 在許多國家，特別是位於熱帶地區的國家，仍然是公共衛生上重要的傳染疾病。早期診斷出結核病，不僅有助於及早給予有效治療，避免產生嚴重後遺症，更有助於預防疾病的傳染擴散。

皮膚結核雖然發生的比例低，但是由於結核病的盛行率在一些地區有上升的趨勢，皮膚結核仍是皮膚科醫師在鑑別診斷時必須考慮的重要疾病。儘管菲律賓的報告指出，425位住院接受治療的肺結核病例中，沒有一位出現皮膚結核⁴⁰。但是近十年來在香港地區收集到的176位皮膚結核病人中，150例為類結核反應 (tuberculid)，26例為皮膚結核⁴¹。土耳其報告的360位肺結核病例中，皮膚感染的比例為3.5%⁴²。其中，出現結核淋巴腺炎 (tuberculous lymphadenitis) 合併皮膚感染的比例為44%，出現肺結核合併皮膚感染的比例為3%。突尼西亞的報告指出，皮膚結核的新增病例在1981至1990年為每年1.4人，在1991至2000年為每年1.2人⁴³。

雖然結核桿菌的致病性不高，僅5-10%的感染會造成疾病，造成疾病的部分原因和宿主本身的免疫力有關，但近年來由於免疫力不全的病人數目有上升之趨勢，也使得結核病出現的機會升高，表現更多樣化。然而，病人可能只有皮膚結核的表現而無其他相關症狀，而結核桿菌的生長速度緩慢，細菌培養非常耗時，加上皮膚檢體的細菌數量少，不易培養確認病原體，臨床的表現又多樣化，因此如何及早確定診斷，向來令臨床

醫師頭痛不已。

皮膚結核的分類

較新的皮膚結核分類方式是根據傳染途徑及宿主的免疫力高低分成以下三型，並同時區分為少菌型（paucibacillary）及多菌型（multibacillary）⁴⁴：

1. 由外來物質感染皮膚而得。共有兩種：疣狀皮膚結核（tuberculosis verrucosa cutis）為少菌型，其宿主有高免疫力；結核下疳（tuberculous chancre）為多菌型，其宿主幾乎無免疫力。
2. 由病患本身病灶感染相鄰皮膚部位。腺病瘡（scrofuloderma）為少菌型，常由頸部的淋巴結擴散到附近皮膚，宿主有高免疫力；腔口皮膚結核（orificial tuberculosis）為多菌型，常在肛門附近形成潰瘍，宿主的免疫力很低。
3. 經由血液全身性自我感染。尋常性狼瘡（lupus vulgaris）為少菌型，病灶侷限，宿主有高免疫力；粟粒狀結核（miliary tuberculosis）為多菌型，病灶多發，宿主幾乎無免疫力。

此外，結核疹（tuberculid reaction）也是和結核有關的皮膚表現，但非由感染造成。其確實致病原因仍不清楚。共分以下三種：（1）硬結性紅斑（erythema induratum）；（2）結核性苔癬（lichen scrofulosorum）；（3）壞死性丘疹樣結核疹（papulonecrotic tuberculid）。這些皮膚表現有可能是因為被結核桿菌以外的其他抗原刺激而誘發表現。雖然有些硬結性紅斑病人在接受結核病治療後，病況有所改善，但仍有不少病人對結核病治療沒有反應，PCR也無法證明其有結核桿菌的DNA存在。

分子生物學應用於皮膚結核的診斷

對少菌型皮膚結核而言，要由細菌培養來確定診斷並不容易，且往往需要耗時數週之久⁴⁵。欲在皮膚切片染色下找到結核桿菌更是困難，受限於其敏感度，需要每毫升（micro liter）組織或組織液至少含有 10^4 細菌數⁴⁶。因此近年來研究人員陸續嘗試以PCR，在皮膚切片組織偵測結核桿菌DNA。

目前已有針對結核桿菌DNA的不同部分所設計之引子，如針對IS6100、65kD耐熱蛋白（hsp65）、MPB 64蛋白、mtp 40（MT sensu stricto gene fragment）蛋白、38kD蛋白及核糖體（ribosome）蛋白等設計之引子。其中，IS6100是一重複且具移動性的基因片段，在菌體內有多個副本存在（約1-20個），是對結核病菌群（*mycobacterium tuberculosis complex*），包含*mycobacterium tuberculosis*、*mycobacterium bovis*、*mycobacterium bovis BCG*、*mycobacterium africanum*、*mycobacterium microti*，有專一性的標的基因。此方法已應用於診斷皮膚結核，尤其是對傳統方法無法診斷的少菌型皮膚結核幫助最大⁴⁷⁻⁵¹。在一些原因不明，病理變化為肉芽腫發炎反應（granulomatous inflammation）的蠟塊檢體中，約有50-72%可以偵測出結核病菌DNA的存在，有助於進一步確認病因^{50,52-54}。然而，對臨床上懷疑是皮膚結核，而結核桿菌培養結果為陰性的病例而言，當PCR偵測出結核桿菌DNA的存在時，是否就能診斷其為皮膚結核，這一點仍有爭議⁴⁴。但陸續也有報告指出，對這些病人給予結核病治療後，症狀有所改善，此結果支持這項檢查在診斷上的實用性^{51,55}。

雖然以新鮮的冰凍切片來進行DNA萃取是比較有效的方式，但是在實際臨床診斷時，除非切片時即考慮後續會進行分子生物方面的檢查，否

則在進行這類檢查時，較常使用的檢體是福馬林（formalin）固定過的蠟塊檢體。欲由過去的蠟塊檢體萃取DNA，可能會有一些問題⁵⁶，包括：DNA已分解、不易從結核桿菌富含脂肪的細胞壁（cell wall）萃取DNA、蠟塊中可能含有抑制物質等。已有報告指出，當蠟塊保存時間超過五年時，會因DNA分解，而大幅減少PCR的偵測成功率⁵⁷。然而，目前大部分的實驗室主要還是以蠟塊檢體來進行PCR，因此在判讀結果時必須考慮上述因素。

結核桿菌抗藥性（drug resistance）的基因診斷

在許多國家，包括台灣⁵⁸⁻⁶⁰，結核桿菌的抗藥性是日趨嚴重的問題，此問題同樣也反映在皮膚結核的治療上。目前分子生物學研究發現，造成結核桿菌抗藥性的原因多是特定基因發生突變（mutation），已知約有9個基因和第一線抗結核用藥的抗藥性有關⁶¹。其中，*katG*、*inhA*、*aphC*、*kasA*和isoniazid的抗藥性有關；*rpoB*和rifampicin的抗藥性有關；*rpsL*、*rrs*和streptomycin的抗藥性有關；*embB*和ethambutol的抗藥性有關；*pcnA*和pyrazinamide的抗藥性有關。進一步的研究發現，只要篩選以下6個基因：*rpoB531*、*rpoB526*、*rrs-513*、*rpsL43*、*embB306*、*katG315*，即能有效診斷出90%對rifampin、streptomycin、ethambutol有抗藥性的結核病例，70%對isoniazid有抗藥性的結核病例⁶²。尤其以*rpoB531*、*rpoB526*、*katG315*為最，可偵測出90%具多重抗藥性的結核病例。

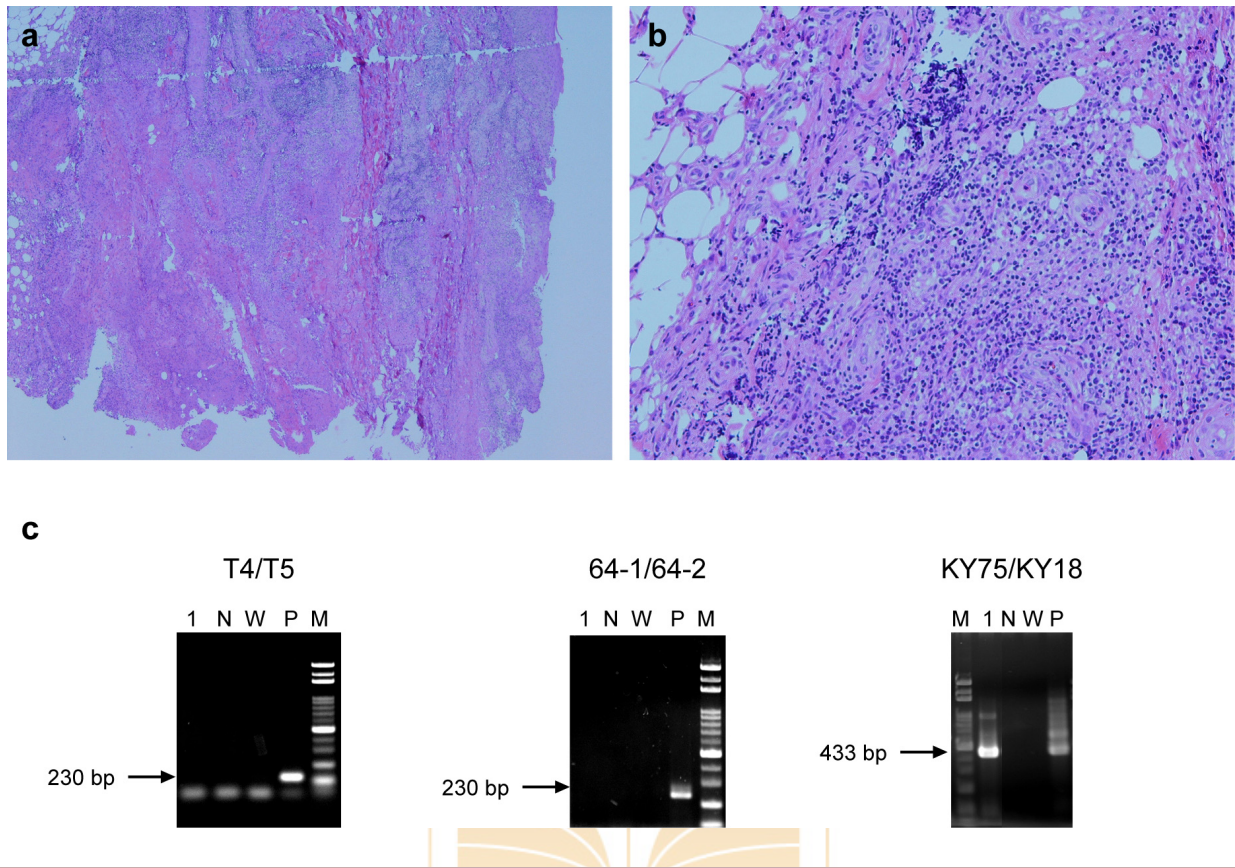
傳統抗藥性鑑定必須透過細菌培養才能完成，往往需要耗時2-9週之久。相較之下，以分子生物學技術偵測抗藥性相關的基因突變，有助於這些病例的迅速診斷和確認。但此方式也有一些限制，例如它只能針對現有已知的基因變異進行檢查，因此對基因突變未知的藥物抗藥性，尤其是isoniazid的抗藥性，及其他二線藥物的抗

藥性，無甚用武之地。此外，有些基因突變在臨床上也未必會表現出抗藥性。因此未來需要進一步建立特定基因突變和藥物抗藥性之間的因果關係。

分子生物學在其他非典型分枝桿菌（atypical mycobacteria）皮膚感染診斷上的應用

結核病菌群以外的分枝桿菌（mycobacterium other than tuberculosis; MOTT）也會感染皮膚，造成疾病如魚缸肉芽腫（fish tank granuloma）（致病菌為*Mycobacterium marinum*）、Buruli潰瘍（Buruli ulcer）（致病菌為*Mycobacterium ulcerans*）以及注射潰瘍（injection abscesses）（致病菌為*Mycobacterium chelonae*、*Mycobacterium kansasii*）等。這些由非典型分枝桿菌造成的皮膚感染有時比皮膚結核還常見，但是對檢體進行細菌培養的結果往往是陰性，不易確定診斷。在此舉一實際病例說明，一名病患在小腿處有一不斷擴大難以癒合的潰瘍，其病理切片下可見慢性發炎細胞從真皮層延伸到皮下脂肪，在真皮處並可發現局部壞死及血管炎變化（圖三 a、b）。其特殊染色找不到致病菌，細菌培養（包括結核桿菌及非典型分枝桿菌）也沒有結果。以蠟塊檢體抽取DNA，分別以結核桿菌專一性引子及分枝桿菌引子進行PCR，發現前者的反應為陰性，後者的反應為陽性（圖三 c、d、e）。此結果顯示，該病患的潰瘍之感染病原體為結核桿菌以外的分枝桿菌，但其菌種有待進一步鑑定。經抗生素給藥治療後，此潰瘍有明顯改善。

由於傳統菌種鑑定（phenotyping）是根據體外（*in vitro*）培養表現的特性來分類，但此性狀表現會受到培養環境改變、基因突變導致酵素（enzyme）改變等因素影響而變化，因此有時結果會難以辨識。目前常用的基因鑑



圖三、以分子生物技術鑑定病患潰瘍致病原。

(a) 由真皮 (dermis) 到皮下脂肪交界處有混合發炎細胞浸潤。(hematoxyline-eosin stain, x40)；(b) 在真皮下層有許多淋巴球 (lymphocyte) 及單核球 (monocyte) 浸潤及血管發炎 (inflammation)。(hematoxyline-eosin stain, x100)；(c) 取皮膚檢體DNA分別以結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 專一性引子 (specific primer) —T4/T5及64-1/64-2, 及分枝桿菌 (mycobacterium) 引子—KY75/KY18進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR)。其中只有KY75/KY18的PCR呈陽性 (positive) 反應。(彩圖詳見本刊網頁) 槽1為病人皮膚檢體; N為陰性對照組 (negative control)；W為水; P為陽性對照組 (positive control)；M為PCR產物大小標記 (marker)。

BIOMEDICINE JOURNAL

定 (genotyping) 方法有以下幾種：IS6100的限制酶片段多型性 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) 可針對不同菌株進行鑑定⁶³⁻⁶⁵；間隔寡核酸分型法 (spacer oligonucleotide typing, spoligotyping) 和mycobacterial interspersed repetitive units variable number tandem repeats (MIRU-VNTR) 可用來辨識不同菌種^{61,66,67}；直接定序基因序列能進行分類^{68,69}。基因鑑定方法的優點是可以直接採用福馬林固定過的蠟塊檢體，進行菌種鑑定。

但陸續也有報告發現傳統菌種鑑定和基因鑑定結果不一致，如Tortoli等人⁷⁰曾報告一例傳統菌種鑑定為*Mycobacterium flavescens*，而基因鑑定為*Mycobacterium szulgai*的病例。台灣亦報告過一例傳統菌種鑑定為mycobacterium flavescens，而基因鑑定為mycobacterium kansasii的病例⁷¹。但總體而言，基因鑑定確實有助於彌補以往傳統菌種鑑定之不足，提供臨床醫師更多診斷的訊息。

總結和展望

本文以二種疾病為例，說明分子生物技術如何應用於研究皮膚疾病，但是這只是眾多應用的一小部份。其他皮膚科學上的相關應用，尚包括一些以傳統方法診斷有困難的遺傳性皮膚疾病，目前已可藉由分子生物技術確認其致病分子是否有異常或突變來幫助診斷。一些免疫性水泡疾病亦可藉由分析病人血清抗體所針對抗原分子的不同，做到更精確的診斷及分類。相信未來分子生物技術會更普及，成為重要的輔助診斷工具，更能成為研究皮膚疾病的重要工具。這也是值得基礎研究人員、皮膚科醫師及病理科醫師共同努力的方向。

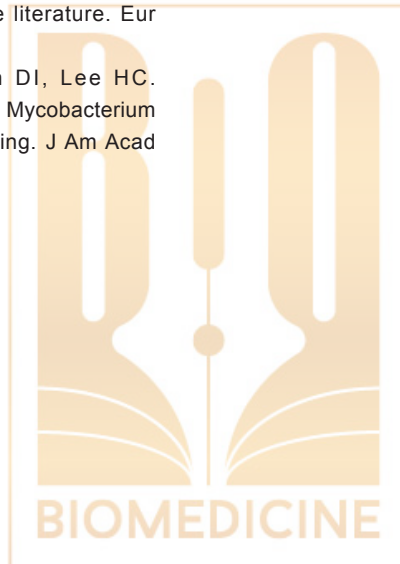
引用文獻

1. Su IJ, Wu WY, Chen YC, Hsieh HC, Cheng AL, Wang CH, Kadin ME. Cutaneous manifestations of postthymic T cell malignancies: description of five clinicopathologic subtypes. *J Am Acad Dermatol* 1990;23:653-662.
2. Chang YT, Liu HN, Chen CL, Chow KC. Detection of Epstein-Barr Virus and HTLV-I in T-cell lymphoma of skin in Taiwan. *Am J Dermatopathol* 1998;20:250-254.
3. Hsiao CJ, Lee YY. Mycosis fungoides: a clinicopathologic study and early diagnosis of patch lesions. *Dermatologica Sinica* 2001;19:98-111.
4. Shapiro PE, Pinto FJ. The histologic spectrum of mycosis fungoides/sezary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma). *Am J Surg Pathol* 1994;18:645-667.
5. Smoller BR, Bishop K, Glusac E, Kim YH, Hendrickson M. Reassessment of histopathologic parameters in the diagnosis of mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1423-1430.
6. Santucci M, Biggeru A, Feller AC, Massi D, Burg G. Efficacy of histologic criteria for diagnosing early mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol* 2000;24:40-50.
7. Guitart J, Kennedy J, Ronan S, Chmiel JS, Hsieh YC, Variakojis D. Histologic criteria for the diagnosis of mycosis fungoides: proposal for a grading system to standardize pathology. *J Cutan Pathol* 2001;28:174-183.
8. Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haefner AC, Stevens S, Burg G, Cerroni L, Dreno B, Glusac E, Guitart J, Heald PW, Kempf W, Knobler R, Lessin S, Sander C, Smoller BS, Telang G, Whittaker S, Iwatsuki K, Obitz E, Takigawa M, Turner ML, Wood GS; International Society for Cutaneous Lymphoma. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:1053-1063.
9. Smoller BR, Bishop K, Glusac EJ, Kim YH, Bhargava V, Warnke RA. Reassessment of lymphocyte immunophenotyping in the diagnosis of patch and plaque stage lesions of mycosis fungoides. *Appl Immunohistochem* 1995;3:32-36.
10. Janeway CA, Jr Travers P, Walport M, Schlomchik M, editors. *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 5th edition. New York: Garland Science, 2001:131-141.
11. Wood GS, Tung RM, Haefner AC, Crooks CF, Liao S, Orozco R, Veelken H, Kadin ME, Koh H, Heald P, Barnhill RL, Sklar J. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sezary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol* 1994;103:34-41.
12. Curco N, Servitje O, Lluçia M, Bertran J, Limon A, Carmona M, Romagosa V, Peyri J. Genotypic analysis of cutaneous T-cell lymphoma: a comparative study of Southern blot analysis with polymerase chain reaction amplification of the T-cell receptor-gamma gene. *Br J Dermatol* 1997;137:673-679.
13. Delfau-Larue MH, Laroche L, Wechsler J, Lepage E, Lahet C, Asso-Bonnet M, Farcet JP. Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood* 2000;96:2987-2992.
14. Murphy M, Signoretti S, Kadin ME, Loda M. Detection of TCR-gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides by non-radioactive PCR-SSCP. *J Cutan Pathol* 2000;27:228-234.
15. Li N, Bhawan J. New insights into the applicability of T-cell receptor gamma gene rearrangement analysis in cutaneous T-cell lymphoma. *J Cutan Pathol* 2001;28:412-418.
16. Dippel E, Klemke D, Hummel M, Sten H, Goerdts S. T-cell clonality of undetermined significance. *Blood* 2001;98:247-248.
17. Alessi E, Coggi A, Venegoni L, Merlo V, Gianotti R. The usefulness of clonality for the detection of cases clinically and/or histopathologically not recognized as cutaneous T cell lymphoma. *Br J Dermatol* 2005;153:368-371.
18. Kohler S, Jones CD, Warnke RA, Zehnder JL. PCR-heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangement in paraffin-embedded skin biopsies. *Am J Dermatopathol* 2000;22:321-327.
19. van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Sanz RG, Morgan GJ, Parreira A, Molina TJ, Cabeçadas J, Gaulard P, Jasani B, Garcia JF, Ott M, Hansmann ML, Berger F, Hummel M, Davi F,

- Brüggemann M, Lavender FL, Schuurung E, Evans PA, White H, Salles G, Groenen PJ, Gameiro P, Pott Ch, Dongen JJ. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007;21:201-206.
20. Thurber SE, Zhang B, Kim YH, Schrijver I, Zehnder J, Kohler S. T-cell clonality analysis in biopsy specimens from two different skin sites shows high specificity in the diagnosis of patients with suggested mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2007;57:782-790.
21. Ponti R, Fierro MT, Quaglino P, Lisa B, Paola FC, Michela O, Paolo F, Comessatti A, Novelli M, Bernengo MG. TCR gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan: diagnostic accuracy improvement and clonal heterogeneity analysis in multiple cutaneous T-cell lymphoma samples. *J Invest Dermatol* 2008;128:1030-1038.
22. Signoretti S, Murphy M, Cangi MG, Puddu P, Kadin ME, Loda M. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction and nonradioactive single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol* 1999;154:67-75.
23. Schiller PI, Flaig MJ, Puchta U, Kind P, Sander CA. Detection of clonal T cells in lichen planus. *Arch Dermatol Res* 2000;292:568-569.
24. Tok J, Szabolcs MJ, Silvers DN, Zhong J, Matsushima AY. Detection of clonal T-cell receptor gamma chain gene rearrangements by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE) in archival specimens from patients with early cutaneous T-cell lymphoma: correlation of histologic findings with PCR/DGGE. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:453-460.
25. Dereure O, Levi E, Kadin ME. T-Cell clonality in pityriasis lichenoides et varioliformis acuta: a heteroduplex analysis of 20 cases. *Arch Dermatol* 2000;136:1483-1486.
26. Shieh S, Mikkola DL, Wood GS. Differentiation and clonality of lesional lymphocytes in pityriasis lichenoides chronica. *Arch Dermatol* 2001;137:305-308.
27. Lukowsky A, Mucche JM, Sterry W, Audring H. Detection of expanded T cell clones in skin biopsy samples of patients with lichen sclerosus et atrophicus by T cell receptor-gamma polymerase chain reaction assays. *J Invest Dermatol* 2000;115:254-259.
28. Ponti R, Quaglino P, Novelli M, Fierro MT, Comessatti A, Peroni A, Bonello L, Bernengo MG. T-cell receptor gamma gene rearrangement by multiplex polymerase chain reaction/heteroduplex analysis in patients with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Sézary syndrome) and benign inflammatory disease: correlation with clinical, histological and immunophenotypical findings. *Br J Dermatol* 2005;153:565-573.
29. Hsiao PF, Hsiao CH, Lin YC, Tseng MP, Tsai TF, Jee SH. Histopathologic-molecular correlation in early mycosis fungoides using T-cell receptor gamma gene rearrangement by polymerase chain reaction with laser capture microdissection. *J Formos Med Assoc* 2007;106:265-272.
30. Gellrich S, Lukowsky A, Schilling T, Rutz S, Mucche M, Jahn S, Audring H, Sterry W. Microanatomical compartments of clonal and reactive T cells in mycosis fungoides: molecular demonstration by single cell polymerase chain reaction of T cell receptor gene rearrangement. *J Invest Dermatol* 2000;115:620-624.
31. Cerroni L, Arzberger E, Ardigo M, Putz B, Kerl H. Monoclonality of intraepidermal T lymphocytes in early mycosis fungoides detected by molecular analysis after laser-beam-based microdissection. *J Invest Dermatol* 2000;114:1154-1157.
32. Dereure O, Levi E, Vonderheld EC, Kadin ME. Improved sensitivity of T-cell clonality detection in mycosis fungoides by hand microdissection and heteroduplex analysis. *Arch Dermatol* 2003;139:1571-1575.
33. Yazdi AS, Puchta U, Flaig MJ, Sander CA. Laser-capture microdissection: applications in routine molecular dermatopathology. *J Cutan Pathol* 2004;31:465-470.
34. Yazdi AS, Medeiros LJ, Puchta U, Thaller E, Flaig MJ, Sander CA. Improved detection of clonality in cutaneous T-cell lymphomas using laser capture microdissection. *J Cutan Pathol* 2003;30:486-491.
35. Radich J. Minimal residual disease. *Curr Opin Hematol* 1995;2:300-304.
36. Faderl S, Kurzrock R, Estov Z. Minimal residual disease in hematologic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:1030-1034.
37. Lion T, Henn T, Gaiger A, Kalhs P, Gadner H. Early detection of relapse after bone marrow transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Lancet* 1993;341:275-276.
38. Poszepczynska-Guigne E, Bagot M, Wechsler J, Revuz J, Farcet JP, Delfau-Larue MH. Minimal residual disease in mycosis fungoides follow-up can be assessed by polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* 2003;148:265-271.
39. Hsiao PF, Hsiao CH, Tsai TF, Jee SH. Minimal residual disease in hypopigmented mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:S198-201.
40. Jacinto SS, de Leon PL, Mendoza C. Cutaneous tuberculosis and other skin diseases in hospitalized treated pulmonary tuberculosis patients in the Philippines. *Cutis* 2003;72:373-376.
41. Chong LY, Lo KK. Cutaneous tuberculosis in Hong Kong: a 10-year retrospective study. *Int J Dermatol* 1995;34:26-29.
42. Kivanc-Altunay I, Baysal Z, Ekmekci TR, Koslu A.

- Incidence of cutaneous tuberculosis in patients with organic tuberculosis. *Int J Dermatol* 2003;42:197-200.
43. Fenniche S, Ben Jennet S, Marrak H, Khayat O, Zghal M, Ben Ayed M, Mokhtar I. [Cutaneous tuberculosis: anatomoclinical features and clinical course (26 cases)]. *Ann Dermatol Venereol* 2003;130:1021-1024.
 44. Hay RJ. Cutaneous infection with *Mycobacterium tuberculosis*: how has this altered with the changing epidemiology of tuberculosis? *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:93-95.
 45. Daniel TM. The rapid diagnosis of tuberculosis: a selective review. *J Lab Clin Med* 1990;116:277-282.
 46. Yeager H, Lacy J, Smith LR, LeMaistre CA. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Am Rev Respir Dis* 1967;95:998-1004.
 47. Penneys NS, Leonardi CL, Cook S, Blauvelt A, Rosenberg S, Eells LD, Konwiser M, Aaronson CM. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in five different types of cutaneous lesions by the polymerase chain reaction. *Arch Dermatol* 1993;129:1594-1598.
 48. Seçkin D, Akpolat T, Ceyhan M, Tuncer S, Turanlı AY. Polymerase chain reaction in cutaneous tuberculosis. *Int J Dermatol* 1997;36:51-54.
 49. Tan SH, Tan BH, Goh CL, Tan KC, Tan MF, Ng WC, Tan WC. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA using polymerase chain reaction in cutaneous tuberculosis and tuberculids. *Int J Dermatol* 1999;38:122-127.
 50. Hsiao PF, Tzen CY, Chen HC, Su HY. Polymerase chain reaction based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Int J Dermatol* 2003;42:281-286.
 51. Welsh O, Vera-Cabrera L, Fernandez-Reyes M, Gomez M, Ocampo J. Cutaneous tuberculosis confirmed by PCR in three patients with biopsy and culture negative for *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Dermatol* 2007;46:734-735.
 52. Salian NV, Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, Bates JH. Polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in histologic specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1150-1155.
 53. Afghani B, Stutman HR. Diagnosis of tuberculosis: can the polymerase chain reaction replace acid-fast bacilli smear and culture? *J Infect Dis* 1995;172:903-905.
 54. Li JY, Lo ST, Ng CS. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Diagn Mol Pathol* 2000;9:67-74.
 55. Wang TC, Tzen CY, Su HY. Erythema induratum associated with tuberculous lymphadenitis: analysis of a case using polymerase chain reactions with different primer pairs to differentiate bacille Calmette-Guérin (BCG) from virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Dermatol* 2000;27:717-723.
 56. Senturk N, Sahin S, Kocagoz T. Polymerase chain reaction in cutaneous tuberculosis: is it a reliable diagnostic method in paraffin-embedded tissues? *Int J Dermatol* 2002;41:863-866.
 57. Inghirami G, Zaboies MJ, Yee HT, Corradini P, Cesarman E, Knowles DM. Detection of immunoglobulin gene rearrangement of B-cell non Hodgkin's lymphomas and leukemias in fresh unfixed and formalin-fixed, paraffin embedded tissue by polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1993;68:746-757.
 58. Jou R, Chuang PC, Wu YS, Yan JJ, Luh KT. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2006;12:871-872.
 59. Liu CE, Chen CH, Hsiao JH, Young TG, Tsay RW, Fung CP. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2004;37:295-300.
 60. Tsao TC, Chiou W, Lin H, Wu T, Lin M, Yang P, Tsai Y. Change in demographic picture and increase of drug resistance in pulmonary tuberculosis in a 10-year interval in Taiwan. *Infection* 2002;30:75-80.
 61. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998;79:3-29.
 62. Van Rie A, Warren R, Mshanga I, Jordaan AM, van der Spuy GD, Richardson M, Simpson J, Gie RP, Enarson DA, Beyers N, van Helden PD, Victor TC. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. *J Clin Microbiol* 2001;39:636-641.
 63. Bascunana CR, Belak K. Detection and identification of mycobacteria in formalin-fixed paraffin-embedded tissue by nested PCR and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1996;34:2351-2355.
 64. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1997;35:2969-2973.
 65. Lopez-Calleja AI, Lezcano MA, Vitoria MA, Iglesias MJ, Cebollada A, Lafoz C, Gavin P, Aristimuno L, Revillo MJ, Martin C, Samper S. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* over two periods: a changing scenario for tuberculosis transmission. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:1080-1086.
 66. Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Allix C, Fauville-Dufaux M, Rastogi N. Population-based molecular epidemiological study of tuberculosis in Malatya, Turkey. *J Clin Microbiol* 2007;45:4027-4035.
 67. Yang CY, Jou R, Chuang PC, Chang JT, Lee JJ, Huang RM. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in

- a family proved by genotyping. *J Formos Med Assoc* 2007;106:808-814.
68. Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger EC. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:323-330.
69. Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* 1998;36:139-147.
70. Tortoli E, Besozzi G, Lacchini C, Penati V, Simonetti MT, Emler S. Pulmonary infection due to *Mycobacterium szulgai* case report and review of the literature. *Eur Respir J* 1998;11:975-977.
71. Tzen CY, Chen TL, Wu TY, Yonh DI, Lee HC. Disseminated cutaneous infection with *Mycobacterium kansasii*: genotyping versus phenotyping. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:620-624.



生物醫學

BIOMEDICINE JOURNAL

分子生物學在皮膚病理診斷上的應用

何宜承醫師（財團法人長庚紀念醫院高雄院區皮膚科主治醫師）

在認識分子生物學於皮膚病理診斷上的應用之前，可以先回顧西方醫學中皮膚科學的發展過程。早在1808年，英國的Robert Willam醫師（1757-1812）即著有「皮膚疾病」（Cutaneous Disease）一書，並以皮膚形態學，又稱為皮疹學，奠定近代皮膚科學發展的基礎。然而當時卻鮮有醫師想研究皮膚疾患。接著，奧地利維也納大學（Universität Wien, Vienna）的Ferdinand von Hebra醫師（1816-1880）開始結合皮疹形態外觀與顯微鏡下結構表現和病理特徵，帶領現代皮膚科學逐漸向前發展，擺脫皮膚科醫師在人們眼中「一眼即下診斷」的刻板印象。筆者經常思考：如果這些皮膚科先進今日依然健在，當代皮膚科醫師的診斷功力與他們相比，會是誰勝誰負呢？現代醫學界治療皮膚疾病的能力當然遠遠超越一百多年前的水準。但是現今正確診斷皮膚疾病的能力是否也一樣遠超過一百多年以前？答案可能不是那麼肯定。

皮膚組織病理學在歷經一個多世紀的發展後，到現在大部份皮膚科醫師明顯地依賴皮膚切片病理，作為皮膚疾病最後診斷的重要依據。但事實上，皮膚組織病理學在鑑別診斷上有其極限，例如本篇作者在文中提到的蕈樣肉芽腫病（mycosis fungoides）、皮膚結核（cutaneous tuberculosis）或非結核分枝桿菌（non-tuberculosis mycobacterium; NTM）的感染。需要一提的是，NTM這個名稱目前已普遍取代文中使用之「結核病菌群以外的分枝桿菌」（mycobacterium other than tuberculosis; MOTT）的舊用法。以蕈樣肉芽腫病為例，有些病患必須歷經數年多次切片檢查後，才能獲得確定的診斷。免疫組織染色（immunohistochemical stain）在這方面的診斷價值也不高，正如作者在文中引

用Smoller等人的結論。因此，目前皮膚淋巴瘤專家的診斷共識是：蕈樣肉芽腫病的診斷必須通盤考量臨床表現、病理發現、免疫組織染色形態，以及T細胞受體（T cell receptor; TCR）基因重組（genetic recombination）檢驗，才能有較高的診斷正確率。類似的情形也發生在免疫性水泡疾病（immunobullous disease）上（請參閱「生物醫學」第1卷第1期，吳育弘醫師所著之「皮膚免疫螢光檢查在診斷皮膚疾病的角色」。）

臨床皮膚病理切片顯示，肉芽腫發炎反應（granulomatous inflammation）相當常見，雖然它不一定是病菌感染所致。當臨床上強烈懷疑一肉芽腫發炎反應是由病菌感染所引起，但病理切片特殊染色卻找不到致病菌，或找到分枝桿菌，卻無法分辨為結核桿菌（mycobacterium tuberculosis）或NTM時，若欲以細菌培養進行鑑定，則NTM的培養不但耗費時日，且其培養陽性率通常不超過三成。此外，不同的致病性NTM常需要以不同的抗生素來治療。這些情形都讓皮膚科醫師殷切期盼新的菌種鑑定法問世。

自從1983年，Kary Mullis發明聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction; PCR）技術以後，它即廣泛地被運用於基因研究、傳染疾病診斷、犯罪科學與親子鑑定等方面。Mullis亦因此獲得1993年的諾貝爾化學獎（The Nobel Prize in Chemistry 1993）。所有輔助診斷的檢查技術在成為常規檢查之前，必須滿足臨床醫師對高敏感度（sensitivity）與高專一性（specificity）的要求。作者已於文中詳述，許多改良的分子生物技術可以做到更精確的診斷及分類。筆者深切期待這些技術能夠迅速普及，以輔助皮膚科醫師在一些困難疾病上的診斷與治療，以造福更多的病患。