

- (1980)
- [80]. Mostafa LE : *Ver Bull*, 36, 189-193 (1966)
- [81]. Nakamura Y, Sato H, Watanabe S, et al : *Mycoses*, 39, 125-128 (1997)
- [82]. Okoshi S, Hasegawa A : *Jpn J Med Mycol*, 5, 57-64 (1964)
- [83]. Okoshi S, Hasegawa A : *Jpn J Vet Sci*, 30, 39-42 (1968)
- [84]. 大越 伸, 長谷川篤彦 : *真菌誌*, 9, 233-240 (1970)
- [85]. Okoshi S, Takashio M : *Jpn J Vet Sci*, 25, 203-205 (1963)
- [86]. 清水邦一, 高鳥浩介, 一条 茂 : *日獣会誌*, 33, 80-82 (1980)
- [87]. 白井茂雄, 南 毅生, 高鳥浩介 : *日獣会誌*, 47, 856-859 (1994)
- [88]. Shirley AGH : *Vet Rec*, 77, 675-677 (1965)
- [89]. Singer JI, Muncie JE : *NY State J Med*, 52, 2147-2153 (1952)
- [90]. Spiltoir CF, Olive LS : *Mycologia*, 47, 242-246 (1955)
- [91]. 高橋伸也, 牧野好夫, 福士 堯 : *臨皮*, 25, 427-430 (1971)
- [92]. 高鳥浩介 : *畜産の研究*, 41, 29-34 (1987)
- [93]. Takatori K, Hasegawa A : *Mycopathologia*, 90, 59-63 (1985)
- [94]. 高鳥浩介, 一条 茂 : *畜産の研究*, 31, 1073-1083, 1184-1196 (1977)
- [95]. 高鳥浩介, 一条 茂 : *日獣会誌*, 41, 655-663 (1979)
- [96]. Takatori K, Ichijo S : *Mycopathologia*, 90, 15-19 (1985)
- [97]. Takatori K, Ichijo S, Hasegawa A, et al : *Jpn J Vet Sci*, 55, 343-344 (1993)
- [98]. Takatori K, Ichijo S, Kurata H : *Mycopathologia*, 73, 105-108 (1981)
- [99]. Takatori K, Ichijo S, Tanaka I, et al : *Jpn J Vet Sci*, 43, 307-313 (1981)
- [100]. 高鳥浩介, 一条 茂, 田中一郎, 他 : *日獣会誌*, 34, 580-584 (1981)
- [101]. Takatori K, Kamada M, Fukunaga Y, et al : *Bull Equine Res Inst*, 21, 81-87 (1984)
- [102]. Takatori K, Kawai S, Ichijo S, et al : *Jpn J Vet Sci*, 52, 823-825 (1990)
- [103]. 高鳥浩介, 近藤末男 : *日畜会報*, 49, 578-586 (1978)
- [104]. 高鳥浩介, 近藤末男 : *日畜会報*, 50, 453-459 (1979)
- [105]. 高鳥浩介, 小菅句子 : *獣畜新報*, 50, 281-283, 389-392 (1997)
- [106]. 高鳥浩介, 坂本京子, 一条 茂 : *日菌報*, 21, 113-120 (1980)
- [107]. 高鳥浩介, 清水邦一, 一条 茂 : *日獣会誌*, 337, 162-165 (1984)
- [108]. Takatori K, Tanaka I : *Jpn J Zootech Sci*, 53, 89-92 (1982)
- [109]. Taniyama H, Ono T : *Jpn J Vet Sci*, 47, 139-144 (1985)
- [110]. Thomas GM et al : *Am Bee J*, 112, 88-92 (1955)
- [111]. 宇田川俊一 : *真菌誌*, 38, 1-4 (1997)
- [112]. Vanbreuseghem R, de Vroey, Takashio M : *Practical Guide to Human and Veterinary mycology*, 2nd ed, Masson Publ (1978)
- [113]. 矢久保義哉 : *真菌誌*, 14, 96-98 (1973)
- [114]. 山本 泉 : *日皮会誌*, 95, 1447-1459, (1985)
- [115]. 山本脩太郎 : *真菌誌*, 1, 99-106 (1960)

表1 おもな真菌性ズーノーシス

ズーノーシス	原因真菌	主な罹患動物	罹患部位	分布
皮膚糸状菌症	<i>Microsporium canis</i>	犬、猫、チンパンジー、ウサギ、チン チラ、モルモット、	体表	世界各国
	<i>M. gallinae</i>	ハト、犬、猫、マウス	体表	世界各国
	<i>M. gypseum</i>	猫、犬、ウサギ、チンパンジー オウム、モルモット、チンチラ、マウ ス、ラット	体表	世界各国
	<i>Trichophyton equinum</i>	馬属	体表	ヨーロッパ、 北米、オセア ニア、日本等
	<i>T. mentagrophytes</i>	犬、猫、ウサギ、リス、猿、チンチラ、 ラット、モルモット、マウス	体表	世界各国
	<i>T. simii</i>	猿、犬、マウス、ラット、リス	体表	インド、イギ リス等
	<i>T. verrucosum</i>	犬、猫	体表	世界各国
	アスペルギルス症	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ハト、カナリア、オウム、犬、猫、	肺、骨、皮膚、気 管、消化器、肝、
<i>A. flavus</i>		ウサギ、猿、モルモット	脾、腎、目、卵巣、	
<i>A. niger</i>			神経系、気のう、 結合織、リンパ節	
<i>Emicella nidulans</i> (= <i>A. nidulans</i>)			胃、皮下、腸管、	
<i>A. terreus</i>				
ムーコル症	<i>Absidia corymbifera</i>	マウス、犬、猫、ウサギ、モルモット、	肺、気管、肝、腎、	世界各国
	<i>Mucor racemosus</i>	鳥、猿	腹部、リンパ節、	
	<i>Rhizomucor pusillus</i>		神経系、気のう	
	<i>Rhizopus microsporus</i>		肺、腎、皮膚、ツ メ、膈、胃、食道、	
	<i>R. oryzae</i>			
カンジダ症	<i>Candida albicans</i>	猿、猫、犬、マウス、モルモット	口腔	世界各国
	<i>C. tropicalis</i>		神経系、皮膚、肺、	
	<i>C. rugosa</i>		呼吸器系、鼻腔、	
クリプトコッカス症	<i>Cryptococcus neoformans</i>	犬、マウス、猿、ウサギ、モルモット、 フェレット、猫	乳房、消化器系、 リンパ節	世界各国
スポロトリコーシス	<i>Sporothrix schenckii</i>	犬、猫、ラット、チンパンジー	皮下織、肺、リン パ節、肝、皮膚	世界各国

表2 外国にみる真菌性ズーノーシス

ズーノーシス	原因真菌	主な罹患動物	感染部位	発生地域
コクシジオイデス症	<i>Coccidioides immitis</i>	犬、猿、猫、ウサギ	肺、気管支、皮膚、二次的に全身性	北アメリカ(西部、南部) 中央アメリカ 南アメリカ
ブラストミセス症 (北アメリカ分芽菌症)	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	犬、猫	肺、皮膚、骨、脳、泌尿器	北アメリカ 中央アメリカ
ヒストプラズマ症	<i>Histoplasma capsulatum</i>	犬、猫	肺、気管支、リンパ節	南アメリカ アフリカ ヨーロッパ 東アジア(インド) 南アメリカ(ブラジル、
パラコクシジオイデス症 (南アメリカ分芽菌症)	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	(アルマジロ、野生動物など)	肺、粘膜、二次的に全身性	コロンビア、ベネズエラなど)

In situ hybridisation 法による粘液栓子内真菌の検出・同定に関する検討

国立療養所東京病院 馬場基男・蛇沢 晶
帝京大学医学部微生物学教室 村山そう明

研究要旨

アレルギー性気管支肺真菌症の一義的病変は、気管支内を閉塞する好酸球性粘液栓子であるが、従来の真菌学的検査では原因真菌の同定は困難である。そこで、in situ hybridisation 法を用いて、2 例の ABPM 症例から喀出された好酸球性粘液栓子における真菌の同定を試みた。粘液栓子内に存在する真菌は *Aspergillus* と確認された。いずれも通常の paraffin 切片を使用しており retrospective な菌種の確認が可能であるとともに、連続切片で HE, Grocott 染色を行うことにより contamination を容易に関知する事ができた。

研究目的

近年、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (ABPA) と同様の病態が、アスペルギルス以外の真菌、すなわち *Schizophyllum commune* や *Mucor* などによっても引き起こされることが明らかになり、アレルギー性気管支肺真菌症 (以下 ABPM) の概念が提唱された。

しかし真菌学的検査又はアレルギー学的検査にて ABPM の原因真菌の同定は困難であり、病理形態学的にも、一般的な Grocott 染色により真菌の存在は確認されるが、菌種までは判断できない。一方で in situ hybridization (以下 ISH) は病原微生物の核酸の局在とともに、菌種に特異的なプローブを使用することにより病原微生物の検出と同定が同時に可能となる方法である。今回われわれは、ABPM の一義的病変である好酸球性粘液栓

子¹⁾内の真菌を ISH により同定しうるか否かについて検討を行った。

研究方法

対象は、好酸球性粘液栓子を確認できた 2 例の ABPM 症例である。各症例とも、年余の経過で再発を繰り返しており、少なくとも 2 回以上、好酸球性粘液栓子が確認されていた。

症例 1 は現在、71 歳の女性。1980 年 7 月および 1991 年 1 月にそれぞれ好酸球性粘液栓子を喀出しており、病理形態学的に糸状真菌が確認されている。

症例 2 は現在、65 歳男性。症例 1 と同様の好酸球性粘液栓子が 1988 年 11 月と 1991 年 4 月に確認されている。

以上 4 ケの好酸球性粘液栓子の paraffin ブロックから、それぞれ 10 枚ずつの連続切片を作製し、

HE・Grocott の各染色を行うとともに Hanazawa ら²⁾の方法に従って以下の3種の probe をジゴキシゲニン標識し ISH を施行した。probe は、i) 汎真菌を認識する 18S rRNA 遺伝子 (687 bp BrT probe), ii) *Aspergillus* 属全体を認識する *Aspergillus* alkaline proteinase 遺伝子 (538 bp alp probe), iii) *Aspergillus fumigatus* に特異的な レトロトランスポゾン Afut1 の LTR 領域 (245 bp Afut1 probe) の3種を使用した。

研究結果

症例1において1998年11月に喀出された標本を「case1-No.1」、1991年1月の標本を「case1-No.2」とし、症例2の標本についても同様に表記した(表)。

Case1-No.1はBrT・alpが陽性、Afut1が陰性であったのに対し、case1-No.2はBrT・alp・Afut1がすべて陽性であった。症例2は、No.1・No.2ともにすべて陽性であった。BrTとalpについて比較すると、どの標本もほぼ同様の数の真菌が陽性に染色されていたが、BrTの方が菌糸周囲に色素の滲みが強い傾向にあった。Afut1の陽性菌糸はBrT・alpに比して少なく、また、染まり具合も薄かった。なお、陽性所見は黒色に、背景は灰白色に染まるため、菌糸の同定は容易であった。また、染色による artifacts と思われる針状結晶が見られる標本が存在したが、真菌とは明らかに構造が異なるため、検討からの除外は容易であった。

HE染色では、変性好酸球塊1)や粘液と同様に菌糸が好酸性に染まるため、高倍率でわずかな菌糸が確認されるのみであった。Grocott染色では、多数の菌糸が確認されたが、粘液と同様に黒色に呈するため、中倍率から高倍率での詳細な観察が必要であった。

考案と結論

今回の検討でISHにより、好酸球性粘液栓子内の真菌が *Aspergillus* であることが確認され、今後、原因真菌の同定にISHが役立つ可能性の高いことが示された。今回使用したalp・Afut1 probeの標的が、RNAに比べると遙かに安定なDNAであったことが一つの要因であったと思われるが、14年前の標本でも陽性所見を得られたことは通常のparaffin切片からretrospectiveに菌種を確認しうることを示している。また、連続する薄切標本でISHと通常の染色を施行・比較することにより、病変内の存在部位や周囲の病変の種類を見ることができ、かつcontaminationによる陽性所見を容易に感知・除外することができる。なお、今回の検討では、case1-No.1がAfut1陰性、case1-No.2がAfut1陽性と結果が異なっていた。case1-No.1が *Aspergillus fumigatus* 以外の *Aspergillus* 属である可能性もあるが、Afut1の感度が低いこと、case1-No.1が最も古い検体であることを考慮すると、手技上の問題でAfut1陰性となった可能性も否定できない。ISHの場合も、他の染色と同様、陽性所見のみを有意と捉えるべきである。

従来からのABPM症例の原因真菌の同定法としては、まず痰やBAL液からの培養が挙げられるが、i) ABPMでは培養陽性例が非常に少ない、ii) 生の検体をすぐに処理する必要がある、iii) 培養までの時間が長く、iv) 陽性であったとしても検体採取の際もしくは検査室でのcontaminationの可能性がある、などの欠点がある。臨床的にはほかに、Latex凝集反応・沈降抗体検査などが行われてきたが、これらはfalse positive/false negativeが多いことが報告されている³⁾。

病理学的なパラフィン標本を使用した同定法として、PCR 法もしくは免疫組織学的検査が行われている。PCR 法は核酸の抽出に時間がかかるほか、特異性の問題が生ずる場合がある。また、病変部位における真菌の位置を確認することもできない。免疫組織学的検討でも病変部位の真菌の位置を確認できるが、抗体の作成が煩雑であるほか、異種真菌間の交叉反応が起きるため特異性に問題があるといわれている⁴⁾。

今後は、多菌種の probe を用いた ISH を行っていきたい。その理由は第 1 に、多菌種に対する ISH を同一好酸球性粘液栓子に行うことにより、一部で報告されている「多菌種による ABPM 症例」が当院に存在するか否か、あるとすればどの程度の頻度であるか、を判断しうるからである。

第 2 の理由として、ABPM の再発が外来性再感か否かを判断しうる可能性が挙がる。我々は、ABPM 発症時と再発時の好酸球性粘液栓子が保存された症例を数例有している。両時期の標本にお

ける ISH の結果を比較し、両者間で陽性菌種が異なれば外来性再感染と確認できることとなる。

参考文献

- 1) 蛇沢 晶, 田村厚久, 倉島篤行, ほか : アレルギー性気管支肺アスペルギルス症・真菌症の病理形態学的研究 日呼吸会誌 1998; 36: 330-337.
- 2) Hanazawa R, Murayama SY, Yamaguchi H: In-situ detection of *Aspergillus fumigatus*. J Med Microbiol. 2000; 49: 285-290.
- 3) Kappe R, Schulze-berge A: A new cause for false-positive results with the Rastrex *Aspergillus* antigen latex agglutination test. J Clin Microbiol 1993; 31: 2489-2490.
- 4) Kaufman L, Standard PG, Jalbert M, et al: Immunohistologic identification of *Aspergillus* spp. And other hyaline fungi by using polyclonal fluorescent antibodies. J Clin Microbiolo 1997; 35: 2206-2209.

検体 (日時) probe	症例 1		症例 2	
	case1-No.1 (1980.7)	case1-No.2 (1991.1)	case2-No.1 (1988.11)	case2-No.2 (1991.4)
BrT (汎真菌)	+++	+++	+++	+++
alp (<i>Aspergillus</i> 属)	+++	+++	+++	+++
Afut1 (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	-	++	+	++

Candida albicans 遺伝子の迅速検出法と放線菌等の薬剤耐性遺伝子ゲノム情報

研究協力者 堀田 国元 (国立感染症研究所 生物活性物質部)

共同研究者 石川 淳、土崎 尚史、梅山 隆 (国立感染症研究所 生物活性物質部)

昨年度の研究において放線菌を用いて確立したコロニーダイレクトPCRを*Candida albicans*の特定遺伝子(sap6)の検出に適用したところ、放線菌よりもラフな操作によっても標的遺伝子検出が容易にできることが認められた。また、DNAを鋳型とするよりもはるかに良い成績が得られた。

一方、公開されたゲノム情報を基に放線菌の薬剤耐性遺伝子について調査した。その結果、これまでに知られていない数種の耐性遺伝子(例えば、アミノグリコシドアデニル化酵素遺伝子)と想定される遺伝子の存在が認められた。分類学的に放線菌の仲間とされている結核菌では、多様な薬剤耐性遺伝子の存在が認められた。

A. 研究目的

医真菌の検出・診断あるいは遺伝子解析にとって標的遺伝子の迅速検出法の確立は重要な課題である。昨年度(平成12年度)は、放線菌において抗生物質耐性遺伝子kanを指標として*S. griseus*を簡便迅速に検出するコロニーダイレクトPCR法を確立し、その有用性を検討した¹⁾。今年度は、*Candida albicans*の特定遺伝子の迅速検出を目指してコロニーダイレクトPCR法の汎用性について検討した。

一方、公開された放線菌等のゲノム情報を基に、従来の表現型に基づく情報では明らかにされていない抗生物質耐性遺伝子の存在の可能性について調査した。

B. 研究方法

1. 使用菌株と標的遺伝子: *Candida albicans* CA14を用いてSAP6(*Candida albicans* secreted aspartic proteinase) 遺伝子²⁾(GenBank No. Z30192)を標的とした(図1)。

2. コロニーダイレクトPCR

寒天培地に生育した*C. albicans*のコロニーから滅菌爪楊枝の先を使って少量の細胞をPCR反応液に添加後、直ちにPCR反応を行った。

PCR反応液(20 μ l)は、1 \times PCRバッファ、dNTPs各0.2mM、MgSO₄·H₂O 1mM、KOD-plus-DNAポリメラーゼ(TOYOBO) 0.4U、プライマー(図1)0.3 μ M、鋳型(コロニー細胞またはDNA)を基本組成とした。

PCRは、95 $^{\circ}$ C・3分 \rightarrow (95 $^{\circ}$ C・30秒 \rightarrow 58 $^{\circ}$ C・30秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C・60秒) \times 30サイクル行なった後、さらに72 $^{\circ}$ C・3分インキュベートした。反応終了後、増幅DNAを1.8%アガロース電気泳動によりモニターした。

3. 放線菌等のゲノム情報

放線菌(*S. coelicolor* A3(2))はhttp://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)は、<http://www.genolist.pasteur.fr/Tuberculist/>、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は、<http://www.pseudomonas.com/>より情報を得た。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所で定められているバイオセーフティ規則と標準的微生物学手法に従って菌株を取り扱った。

C. 研究結果

1. コロニーダイレクトPCRによる*C. albicans* 遺伝子の増幅

*Candida albicans*の遺伝子の迅速検出法としてPCRがよく使われているが、一般的に菌体から抽出したDNAを鋳型として用いられている。そのため、数多くの菌株の遺伝子を解析するに当たってはDNAの抽出ステップが律速段階となる。この問題を解決することを狙っ

て、コロニーダイレクトPCRによる*C. albicans*に共通し、かつ特異的な遺伝子の検出を試みることにした。

標的遺伝子として図1に示す*C. albicans*-secreted aspartic proteinase 6 (SAP)を選んでコロニーダイレクトPCRを行った(図2)。放線菌でコロニーダイレクトPCRを確立した際に、PCR反応液に添加する菌体(細胞)量が重要なポイントであったので、目に見えるほどの菌体、それより少ない量の菌体(中間量)、および目に見えない量の菌体を添加したときの標的遺伝子断片(265bp)の増幅を比較した。同時に、比較対照として、添加量を変えたDNAを鋳型とするPCRも行った。

その結果、図2において明らかなように、DNAを鋳型とするよりもコロニーダイレクトPCRにおいてははるかにクリアな標的断片の増幅が認められた。標的断片増幅の程度は、見えない量の添加の場合に最も強かったが、はっきりと目に見える量を添加したときも十分強い増幅が認められ、細胞添加量の影響は放線菌の場合よりもはるかに少ないと判断された。

これに対して、DNAを鋳型として用いたときは、添加量が最も少ない(0.5 μ l)ときにのみクリアな標的バンドが見られたが、添加量を倍加すると標的バンドのクリアな増幅が認められなかった。

2. ゲノム情報に基づく薬剤耐性遺伝子の検索

公開されたゲノム情報を基に放線菌、結核菌および緑膿菌の薬剤耐性遺伝子について調査し、その結果を表1にまとめた。

放線菌では3種(アデニル化、アセチル化、リン酸化)のアミノグリコシド耐性(修飾酵素)遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、マクロライド耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、Tetracenomycin(アンスラサイクリン)耐性遺伝子と想定される遺伝子の存在が認められた。これらの中で、アミノグリコシドアデニル化酵素遺伝子は、これまでに放線菌では報告されていなかった。

分類学的に放線菌の仲間とされている結核菌では、多剤耐性遺伝子などに類似性のある遺伝子の存在が認められた。また、緑膿菌では、多剤耐性に関する排出ポンプ遺伝子の他、アミノグリコシドリソニウム耐性遺伝子 $aph(3')-Ib$ などが認められた。

D. 考察

1. コロニーダイレクトPCRによる*C. albicans* 遺伝子の検出

コロニーダイレクトPCRは、*C. albicans*においても全く問題なく使うことができることを証明した。しかも、これまでに確立してきたMRSA³⁾や放線菌^{1,4)}の場合においてはPCRに添加する量を目に見えない量に制限

することが重要な条件であったが、*C. albicans*の場合は添加菌体量の影響が最も少ないという利点も認められた。試験した菌株が1株であるため、*C. albicans*の菌株に普遍的に通用するかどうかは今後のデータを待たねばならないが、MRSAや放線菌における経験から判断すると、多少の条件検討は要するものの十分普遍的な方法として使えるものと期待できる。

PCRは、*C. albicans* 遺伝子の迅速検出法として使われてきたが、一般的に菌体から抽出したDNAを鋳型として用いているので、多数の菌株の遺伝子を迅速に調べるためにはDNA抽出が大きなネックであった。今回の研究によりコロニーダイレクトPCRによって標的遺伝子の検出ができることがわかったことは、今後、多数の菌株の遺伝子を迅速に検出する上で大きなバリアーがなくなったことを意味すると判断される。

2. ゲノム情報に基づく薬剤耐性遺伝子の検索

PCRはゲノム情報を基に成立する技術である。今後、医真菌の診断などにPCRを有効に活用していくためには、ゲノム情報を的確にチェックし、解析のための標的となるような遺伝子を把握していくことが重要である。今回、放線菌と放線菌に接点のある菌、即ち、結核菌と緑膿菌についてゲノム情報に基づき各種薬剤耐性遺伝子を検索した結果、多様な遺伝子が浮かび上がってきた。それらの中には、表現性状に基づく情報では存在が認められていなかった遺伝子も存在することがわかった。

それらの特異性や共通性を検討した上で、標的菌株の検出や診断に役立てていくことが今後の課題であろう。

E. 結論

1. DNAの代わりに菌体そのものを直接PCR反応液に添加し、そのままPCRを行って標的遺伝子を増幅させるコロニーダイレクトPCR法によって、DNAを鋳型としたときよりも明瞭に*Candida albicans*の標的遺伝子を増幅できることを証明した。
2. その結果、多数菌株の遺伝子検出に要する時間を大幅に短縮することが可能となった。
3. 放線菌、結核菌および緑膿菌のゲノム情報に基づく検索の結果、各種の薬剤耐性遺伝子と想定できる遺伝子が認められた。中には、表現型に基づく従来の研究では認められていないものやかなり共通性のあるものが認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsuchizaki, N., Hamada M. and Hotta K.: Rapid characterization by colony direct PCR of distribution specificity in *Streptomyces* of *kan* gene encoding a specific aminoglycoside-3-N-acetyltransferase. *Actinomycetologica* 15: 23-29 (2002).

2. 学会発表

1) 土崎尚史、石川淳、浜田雅、堀田国元：放線菌におけるアミノグリコシド耐性遺伝子の分布特性ーコロニーPCRによる検証ー。平成13年度日本放線菌学会大会。平成13年6月，吹田市。

2) Hotta K., Tsuchizaki, N. and Ishikawa J: Rapid checking by colony PCR of the distribution of specific antibiotic resistance genes in actinomycetes. 12th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Aug. 2001, Vancouver, Canada.

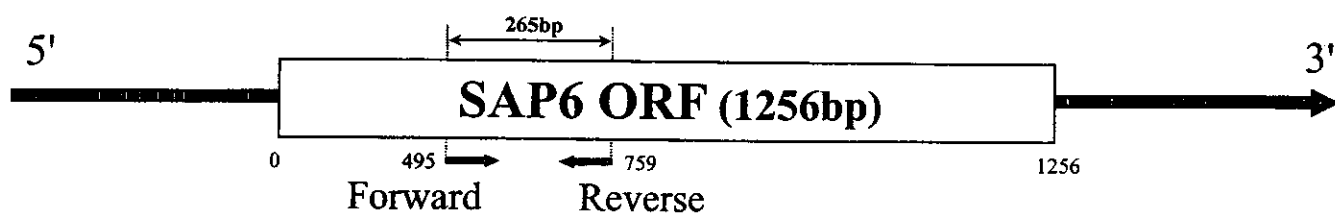
H. 参考文献

1) 堀田国元：放線菌の特定菌種に特異な遺伝子の迅速検出に関する研究。平成12年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）「輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究（主任研究者 上原至雅）」研究報告書，pp. 96-101.

2) Flahaut, M. et al: Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J. Clin. Microbiol.* 36: 395-401 (1998).

3) 土崎尚史、石川淳、堀田国元：コロニーPCR法によるMRSAおよび腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出。 *Japanese J. Antibiotics* 53: 422-429 (2000).

4) Ishikawa J, Tsuchizaki N, Yoshida M, Ishiyama D and Hotta K: Colony PCR for detection of specific DNA sequences in actinomycetes. *Actinomycetologica* 14: 1-7 (2000).



Primer sequences

Forward: 5'-CTGCTGATATTACTGTTGGTTA-3' (22mer)

Reverse: 5'-CCACCAATACCAACGGTATC-3' (20mer)

SAP6 (GenBank Accession No. Z30192)

図1. SAP6遺伝子のPCR増幅用プライマーの位置と塩基配列

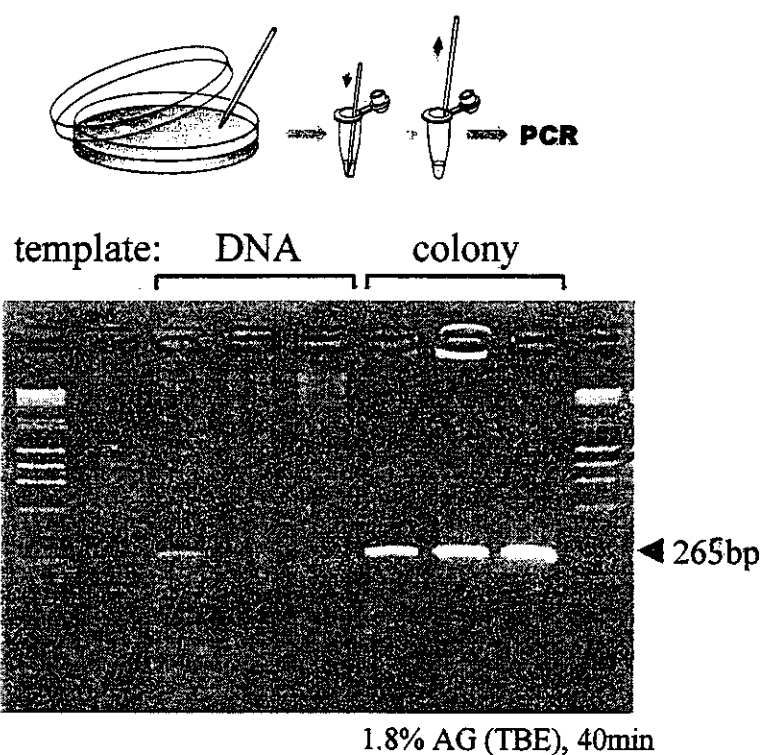


図2. コロニーダイレクトPCRによるsap6遺伝子の増幅

DNA: DNAを鋳型としたPCR; 左より0.5, 1.0, 2.0 μ lのDNA溶液を鋳型とした。

Colony: コロニーダイレクトPCR; 左より はっきり目に見える量、中間量、目に見えない量の細胞を鋳型とした。

表 1. ゲノムから見た薬剤耐性遺伝子

-
1. 放線菌 : *Streptomyces coelicolor* A3(2) : 8.7Mb (*Streptomyces avermitilis*:9.0Mb)
[\(http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/\)](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/)
- SCJ11.36c putative aminoglycoside nucleotidyltransferase (AAD)
 SCC22.09 putative aminoglycoside acetyltransferase (AAC)
 SCD49.05c putative aminoglycoside phosphotransferase (APH)
 cmlR chloramphenicol resistance protein
 SC10F4.35 chloramphenicol resistance protein
 SCBAC1A6.13 macrolide resistance rRNA adenine methyltransferase
 SCBAC1A6.14 macrolide glycosyltransferase
 3SCF60.15 tetracycline resistance protein
 SC4A7.01c tetracenomycin C resistance and export protein
 SC8E4A.11 putative resistance protein
 SCH35.26 putative heavy metal resistance membrane protein
 SCF56.25 tellurite resistance protein
 SC3D9.05 possible arsenic resistance membrane transport protein
 SC4B10.12c putative hydroperoxide resistance protein
2. 結核菌 : *Mycobacterium tuberculosis* <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>
- drxA 85.2% similar to daunorubicin resistance atp-binding protein
 drxB 64.0% similar to daunorubicin resistance transmembrane protein
 emrE 43.6% similar to resistance to ethidium bromide
 merT mercury resistance probable hg transport system
 pncA resistance to antituberculous drug pyrazinamide
 Rv0047c 29.4% similar to mithramycin resistance determinant
 Rv0274 similar to fosfomicin resistance protein
 Rv0324 32.2% similar to probable mercury resistance
 Rv0783c 30.4% similar to multidrug resistance protein
 Rv1250 32.9% similar to tetracenomycin C resistance protein
 Rv1404 35.1% similar to multiple antibiotic resistance protein
 Rv1634 similar to many antibiotic resistance (efflux) proteins
 Rv1819c 40.6% similar to multidrug resistance protein
 Rv2136c 35.6% similar to bacitracin resistance protein
 Rv2303c 33.2% similar to macrotetrolideantibiotic-resistance protein
3. 緑膿菌 : *Pseudomonas aeruginosa* <http://www.pseudomonas.com/>
- PA0156 probable RND efflux membrane fusion protein precursor
 PA0158 probable RND efflux transporter
 PA0334 probable MFS transporter
 PA0424 multidrug resistance operon repressor MexR
 PA0425 RND multidrug efflux membrane fusion protein MexA precursor
 PA0426 RND multidrug efflux transporter MexB
 PA0427 outer membrane protein OprM precursor
 PA0458 probable MFS transporter
 PA0706 chloramphenicol acetyltransferase
 PA0749 hypothetical protein (49% similar to VanW)
 PA0809 probable transporter
 PA0813 hypothetical protein (43% similar to capreomycin acetyltransferase)

PA0875 conserved hypothetical protein (71% similar to usaric acid resistance)
PA1032 probable penicillin amidase
PA1108 probable MFS transporter
PA1113 probable ATP-binding/permease fusion ABC transporter
PA1129 probable fosfomicin resistance protein
PA1129 probable fosfomicin resistance protein
PA1161 rRNA methyltransferase
PA1231 conserved hypothetical protein
(46% similar to multidrug resistance efflux pump homolog PmrA)
PA1282 probable MFS transporter
(55% similar to multidrug efflux protein QacB)
PA1313 probable MFS transporter
(46% similar to tetracenomycin C resistance and export protein)
PA1316 probable MFS transporter (53% similar to methylneomycin A resistance gene)
PA1425 probable ATP-binding component of ABC transporter
(1% similar to lincomycin resistance protein)
PA1858 streptomycin 3'-phosphotransferase
PA3389 probable ring-cleaving dioxygenase (52% similar to fosfomicin-resistance protein)
PA3573 probable MFS transporter (52% similar to bicyclomycin resistance protein)
PA4119 aminoglycoside 3'-phosphotransferase type IIb
PA5065 conserved hypothetical protein (74% similar to AAC)

厚生省科学研究費補助金

研究報告書

本邦における *Nocardia* 症の原因菌の分類同定に関する研究

研究協力者 三上 襄 千葉大学真菌医学研究センター教授

矢沢 勝清 千葉大学真菌医学研究センター

研究要旨

千葉大学真菌医学研究センターにおいて、2001年に新たに本邦の医療機関およびタイ国立衛生研究所より同定依頼を受けた *Nocardia* 症およびその他の放線菌(Actinomycetes)による疾患の原因菌の同定および分類学的な検討を行った。その結果、85株の依頼株のうち56株が *Nocardia* で残りは *Actinomadura*, *Mycobacterium*, *Gordonia* および *Rothia* 属の菌種であった。*Nocardia* 属の菌種の同定の結果、今回、新たに *N. pseudobrasiliensis* 株が分離された。

A. 研究目的

千葉大学真菌医学研究センターにおいては、これまで各医療機関からの要請に基づき病原性放線菌である嫌気性放線菌や好気性放線菌の同定を行ってきた。昨年度は過去10年間での結果をまとめて報告したが、今年度は2001年度の同定依頼85件について、*Nocardia* については菌種の同定を、また、*Nocardia* 以外の放線菌については、菌属の同定を行った。また当研究センターで行ってきたこれまでの同定結果に2001年度の結果を加えた本邦における放線菌による疾患の年次推移を明らかにすることを目的に検討した。

B. 研究方法

昨年度と同様に細胞壁成分のジアミノピメリン酸の有無と異性体、構成糖成分のアラノース、ガラクトース、マジュロース、キシロースの存在の有無、ミコール酸の Rf 値、メナキノンノ成分の解析等により、放線菌の菌属を決定した。また、*Nocardia* の種の最終

確認は 16s rRNA 遺伝子配列の解析によって行った。

C. 研究結果

1) 本邦の *Nocardia* 症の原因菌

2001年に本センターで日本各地の医療機関およびタイ国の国立衛生研究所から同定依頼された放線菌数は85株で、日本国内からは53株でタイ国からは32株であった。その中で、*Nocardia* 属の放線菌として同定された株は56株であった。その他は *Mycobacterium* が8株、*Gordonia* が8株、*Streptomyces* が6株で他に *Rothia* 等が含まれていた。

図1に1991年からの *Nocardia* 症の年次推移を示したが、本邦の *Nocardia* 症の患者は少なくとも50例以上であることが明らかになった。また、これまでほとんど報告のなかった *Gordonia* による感染症が8例もあり、放線菌による疾患の原因菌にも変化が見られた。

Nocardia 症の原因菌を調べた結果(図2)、

最も多い菌種は *N. asteroides* で続いて、*N. farcinica* と *N. nova* であったが *N. nova* による感染例は年により大きな変動が見られた。次に多いのが *N. brasiliensis* による感染で *N. otitidiscaviarum* による感染症は毎年1例か2例と少なかった。

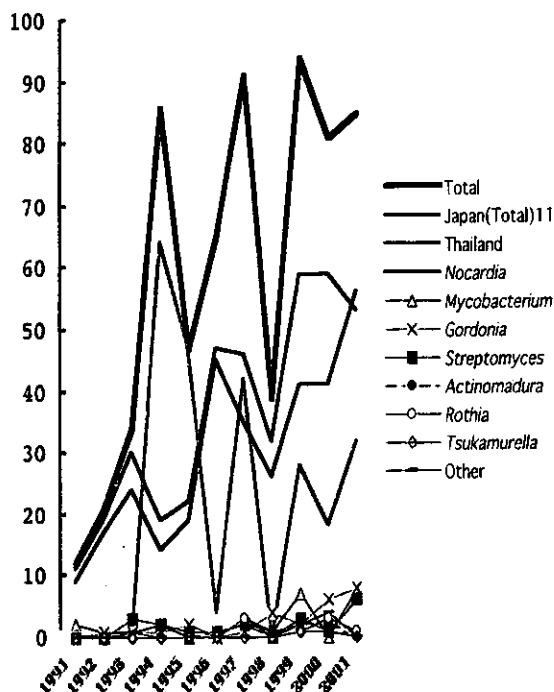


図1. *Nocardia* 症の年次的推移

2001年にタイ国で喀痰から分離された2株の *Nocardia* 株 (IFM1082 および IFM 1083 株) が、*N. brasiliensis* に類似していたが、予備的な HSP 遺伝子の制限酵素によるパターン解析の結果、*N. brasiliensis* とはパターンが異なっていることが明らかになったので、PCR での 16S rRNA 遺伝子領域を増幅し (図3)、これら増幅した遺伝子の塩基配列を決定し、ホモロジー検索を進めた結果、IFM 1081 および IFM 1082 株とも *N. pseudobrasiliensis* に対して 99%の相同性を示した。また、生理生化学的性状も *N.*

pseudobrasiliensis と一致したことから、これらの2株を *N. pseudobrasiliensis* と同定した。なお、図4に *N. pseudobrasiliensis* の標準株と IFM 1082 および IFM 1083 株との 16s rRNA 遺伝子領域の遺伝子配列の比較を示した。

D. 考察

2001年に本センターが外部の医療機関からの依頼で同定した菌株は85株に達した。その内訳は昨年度とほぼ同様で、*N. asteroides* と *N. farcinica* が最も多かった。特に *N. farcinica* による感染は増加傾向にあり、本菌は脳への親和性も強く、また薬剤への耐性傾向もあることから今後治療等の問題が出てくると思われる。本センターでは *Nocardia* の同定は生理生化学的手法を用いているが、我々の報告した薬剤感受性試験法も有効であることが多くの検査室で確かめられている。

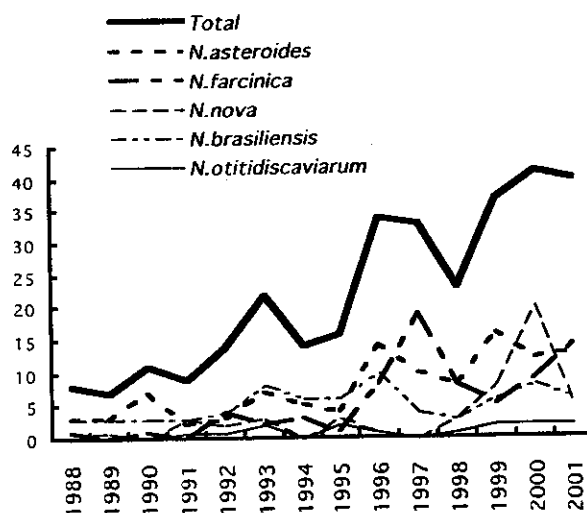


図2. *Nocardia* 症の原因菌の年次的推移

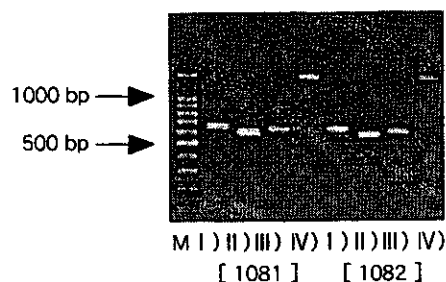


図3. 16S rRNA遺伝子領域のPCRによる増幅

今回タイの株から、*N. pseudobrasiliensis* が2株見つかったが、この報告はタイ国のみならず、アジア地域での初めての報告である。最近、我々は日本で *N. pseudobrasiliensis* による感染例を1例見出した。もともと *N. pseudobrasiliensis* の感染は米国が主であったことから、本菌の感染経路などに興味もたれ、詳細な遺伝子解析を進めている。

発表論文

- 1) Nemoto A, Hoshino Y, Yazawa K, Ando A, Mikami Y, Komaki H, Tanaka Y, Graefe U: Asterobactin, a new siderophore group antibiotic from *Nocardia asteroides*. J. Antibiotics, submitted.
- 2) Morisaki N, Hashimoto Y, Furihata K, Yazawa K, Tamura M, Mikami Y. Glycosylative inactivation of chalcomycin and tylosin by a clinically isolated *Nocardia asteroides* strains. J. Antibiotics 54: 157-165, 2001.
- 3) Furumoto H, Sasaki T, Tatebayashi K, Shimizu T, Mikami Y: Profound skin infection with bone involvement due to

Nocardia asteroides in a patient with myelodysplastic syndrome. J. Dermatol. 28: 582-583, 2001.

4) Maeda M, Sato M, Tozaki Y, Okumura Y, Mikami Y: *Nocardia brasiliensis* infection seen on grafted skin of the dorsum of a foot. Jpn. J. Med. Mycol. 42: 137-142, 2001.

5) Shimizu A, Ishikawa O, Nagai Y, Mikami Y, Nishimura K: Primary cutaneous nocardiosis due to *Nocardia nova* in a healthy woman. Brit. J. Dermatol. 145: 154-156, 2001.

6) Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordoman P. Chracterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located intergron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. J. Bacteriol. 183: 235-249, 2001.

```

1081      -----CCTGCGCGGCGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAAGCCCTTCGGGTACA
1082      -----AACGCTGGCGGCGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAAGCCCTTCGGGTACA
N. pseudobrasiliensis  ACGAACGCTGGCGGCGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAAGCCCTTCGGG-TACA
      *****

CGAGCGCGAAGCGGTGACTAACACGCTGGGTGATCTGCGCACTCTGGGTAAAGCTGGGAACTGGGTATATACCGGA
CGAGCGCGAAGCGGTGACTAACACGCTGGGTGATCTGCGCACTCTGGGTAAAGCTGGGAACTGGGTATATACCGGA
CGAGCGCGAAGCGGTGACTAACACGCTGGGTGATCTGCGCACTCTGGGTAAAGCTGGGAACTGGGTATATACCGGA
*****

TATGACCAAGAGCTGCATGGTTTTTGGTGAAGGTTTACTGCTGCGAGATGGGCGCGGCTATACGCTTGTGGTGGG
TATGACCAAGAGCTGCATGGTTTTTGGTGAAGGTTTACTGCTGCGAGATGGGCGCGGCTATACGCTTGTGGTGGG
TATGACCAAGAGCTGCATGGTTTTTGGTGAAGGTTTACTGCTGCGAGATGGGCGCGGCTATACGCTTGTGGTGGG
*****

TAACCGCTTACCAAGCGGACGCGGTAGCGGACCTGAGGGGTATCGCCCACTGGGACTGAGACCGGCCAGACTCC
TAACCGCTTACCAAGCGGACGCGGTAGCGGACCTGAGGGGTATCGCCCACTGGGACTGAGACCGGCCAGACTCC
TAACCGCTTACCAAGCGGACGCGGTAGCGGACCTGAGGGGTATCGCCCACTGGGACTGAGACCGGCCAGACTCC
*****

TACGGGAGCGACGCTGGGAAATTTGCAATGGCGGAGCCCTGATCGAGGAGCGCCGCTGAGGATGACGGCTTCGG
TACGGGAGCGACGCTGGGAAATTTGCAATGGCGGAGCCCTGATCGAGGAGCGCCGCTGAGGATGACGGCTTCGG
TACGGGAGCGACGCTGGGAAATTTGCAATGGCGGAGCCCTGATCGAGGAGCGCCGCTGAGGATGACGGCTTCGG
*****

GTGTAAACCTCTTTCGACAGCGACAGCGCGTAGGGTCCGAGCTGTCTCGGAAATTAATCGGCTAAAGAGTTTAGCC
GTGTAAACCTCTTTCGACAGCGACAGCGCGTAGGGTCCGAGCTGTCTCGGAAATTAATCGGCTAAAGAGTTTAGCC
GTGTAAACCTCTTTCGACAGCGACAGCGCGTAGGGTCCGAGCTGTCTCGGAAATTAATCGGCTAAAGAGTTTAGCC
*****

GCTCTGTGCTGAGTGTGAAATCTTGCAGTCAACTGCAAGCTCGAGTGTGATCGGCGAGACTAGAGTACTTCAGGGGA
GCTCTGTGCTGAGTGTGAAATCTTGCAGTCAACTGCAAGCTCGAGTGTGATCGGCGAGACTAGAGTACTTCAGGGGA
GCTCTGTGCTGAGTGTGAAATCTTGCAGTCAACTGCAAGCTCGAGTGTGATCGGCGAGACTAGAGTACTTCAGGGGA
*****

GACTGGAAATCTGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGAGGAAACCGGTGGGAGCGCGCTCTCGGAAATTAAC
GACTGGAAATCTGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGAGGAAACCGGTGGGAGCGCGCTCTCGGAAATTAAC
GACTGGAAATCTGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGAGGAAACCGGTGGGAGCGCGCTCTCGGAAATTAAC
*****

TGAGCTGAGAGCGGAAAGCTGGGTAGCGAGAGGATTAAGTACCTGGTACTCCGCGGTAAAGCGTGGTACTAGTGC
TGAGCTGAGAGCGGAAAGCTGGGTAGCGAGAGGATTAAGTACCTGGTACTCCGCGGTAAAGCGTGGTACTAGTGC
TGAGCTGAGAGCGGAAAGCTGGGTAGCGAGAGGATTAAGTACCTGGTACTCCGCGGTAAAGCGTGGTACTAGTGC
*****

TGGTTTTCTTCCAGCGGATCTGCGGTAGCTAACCGATTAACTACCGCGCTGGGAGTACGGCCAAAGCTAAAACTC
TGGTTTTCTTCCAGCGGATCTGCGGTAGCTAACCGATTAACTACCGCGCTGGGAGTACGGCCAAAGCTAAAACTC
TGGTTTTCTTCCAGCGGATCTGCGGTAGCTAACCGATTAACTACCGCGCTGGGAGTACGGCCAAAGCTAAAACTC
*****

AAGGAAATGACGGGGCCCGCACAGCGGGGAGCAATGGATTAATTTGATGCAAGCGGAGGAACTTACTGGGTTT
AAGGAAATGACGGGGCCCGCACAGCGGGGAGCAATGGATTAATTTGATGCAAGCGGAGGAACTTACTGGGTTT
AAGGAAATGACGGGGCCCGCACAGCGGGGAGCAATGGATTAATTTGATGCAAGCGGAGGAACTTACTGGGTTT
*****

GACATACATCGGAAACCTGAG-AGATGTAGCCCCCTTGTGTGGGTACAGGTGTGCTATGGCTGTGTCACTGTGT
GACATACAGCGGAAACCTGAGTAGATGTAGGCCCTTGTGTGGGTACAGGTGTGCTATGGCTGTGTCACTGTGT
GACATACAC- GGAATCTGAG-AGATGTAGCCCCCTTGTGTGGGTACAGGTGTGCTATGGCTGTGTCACTGTGT
*****

GTGTGATGTGTGGTTAAGTCCCGAAGCGGCAACCTTATCTTATGTTGCGAGCGGTAATGGCGGGACTGTGAG
GTGTGATGTGTGGTTAAGTCCCGAAGCGGCAACCTTATCTTATGTTGCGAGCGGTAATGGCGGGACTGTGAG
GTGTGATGTGTGGTTAAGTCCCGAAGCGGCAACCTTATCTTATGTTGCGAGCGGTAATGGCGGGACTGTGAG
*****

AGACTCGCGGGTCAACTGCGAGGAGGTGGGACGCTCAAGTCAATCGCCCTTATGTCCAGGCTTCACACATGCTA
AGACTCGCGGGTCAACTGCGAGGAGGTGGGACGCTCAAGTCAATCGCCCTTATGTCCAGGCTTCACACATGCTA
AGACTCGCGGGTCAACTGCGAGGAGGTGGGACGCTCAAGTCAATCGCCCTTATGTCCAGGCTTCACACATGCTA
*****

CAATGCCGCTACAGAGGCTCGGTACCTGAGGTGGAGGAAATCCCTTAAAGCGGCTCAAGTTCGGTGGGCTTCCA
CAATGCCGCTACAGAGGCTCGGTACCTGAGGTGGAGGAAATCCCTTAAAGCGGCTCAAGTTCGGTGGGCTTCCA
CAATGCCGCTACAGAGGCTCGGTACCTGAGGTGGAGGAAATCCCTTAAAGCGGCTCAAGTTCGGTGGGCTTCCA
*****

ACTGACCGCTGAAATGAGTCCCTACTAATCCAGATCAGCAACCTTGGGTGAATAGCTTCGGGGCTGTACACAC
ACTGACCGCTGAAATGAGTCCCTACTAATCCAGATCAGCAACCTTGGGTGAATAGCTTCGGGGCTGTACACAC
ACTGACCGCTGAAATGAGTCCCTACTAATCCAGATCAGCAACCTTGGGTGAATAGCTTCGGGGCTGTACACAC
*****

CGCCGCTACGCTATGAAAGTGGTAAACCGGAGCGCGTGGCTAACCCCTTGGGGAGGACCGCTGAAAGTGGGATT
CGCCGCTACGCTATGAAAGTGGTAAACCGGAGCGCGTGGCTAACCCCTTGGGGAGGACCGCTGAAAGTGGGATT
CGCCGCTACGCTATGAAAGTGGTAAACCGGAGCGCGTGGCTAACCCCTTGGGGAGGACCGCTGAAAGTGGGATT
*****

GGGATTTGGAGAACTCTAACAAAGGTAGCGTCCGCG-AGGTTGGGCTGGATCACTCTCT
GGGATTTGGAGAACTCTAACAAAGGTAGCGTCCGCGAGCGGAGGCTGGTCACTCTCT

```

図4. 3菌株における16S rRNA遺伝子領域のアライメント

千葉大学真菌医学研究センターで1995年から2001年までに *Nocardia* 症および関連放線菌による疾患の原因菌の同定依頼を受けた主な医療機関（機関によっては年間10例近くに及ぶ同定依頼がある）

1995年

J A 広島厚生連・尾道総合病院（広島）
佐世保中央病院（長崎）
千葉大学医学部付属病院（千葉）
東北労災病院（宮城）
千葉東病院（千葉）
獨協医科大学（栃木）
市立千葉病院（千葉）
J A 広島厚生連・広島総合病院（広島）
福岡大学医学部（福岡）
荒尾市立病院（熊本）
社会保険・栗林病院（香川）
宮崎医科大学付属病院（宮崎）
日本医科大学付属病院（東京）
千葉県がんセンター（千葉）
江東微生物研究所（東京）
慶応大学医学部（東京）

1996年

国立津病院（三重）
長崎市民病院（長崎）
中国労災病院（広島）
千葉大学医学部付属病院（千葉）
京都大学胸部疾患研究所（京都）
成田赤十字病院（千葉）
国立国際医療センター（東京）
倉敷中央病院（岡山）
新潟大学医学部（新潟）
東京都・老人医療センター（東京）
西神戸医療センター（兵庫）
愛媛大学医学部付属病院（愛媛）
燕労災病院（新潟）

名古屋大学医学部付属病院（愛知）
千葉市立海浜病院（千葉）
社会保険・紀南総合病院（和歌山）
杏林大学医学部付属病院（東京）
シオノギバイオメディカルラボラトリー（大阪）
長崎大学熱帯医学研究所（長崎）
都立駒込病院（東京）
社会保険・神戸中央病院（兵庫）
日赤医療センター（東京）
エス・アール・エル（東京）
福井医科大学（福井）
川崎医科大学（岡山）

1997年

広島大学医学部付属病院（広島）
山口大学医学部（山口）
千葉大学医学部付属病院（千葉）
広島赤十字・原爆病院（広島）
横浜市立大学医学部付属病院（神奈川）
国立津病院（三重）
長崎市民病院（長崎）
中国労災病院（広島）
京都大学胸部疾患研究所（京都）
成田赤十字病院（千葉）
倉敷中央病院（岡山）
新潟大学医学部（新潟）
東京都・老人医療センター（東京）
西神戸医療センター（兵庫）
愛媛大学医学部付属病院（愛媛）
燕労災病院（新潟）
名古屋大学医学部付属病院（愛知）

千葉市立海浜病院（千葉）
社会保険・紀南総合病院（和歌山）
東邦大学医学部・佐倉病院（千葉）
荒尾市民病院（熊本）
金沢医科大学（石川）
藤田保健衛生大学病院（愛知）
熊本労災病院（熊本）
大阪大学医学部附属病院（大阪）
都立・駒込病院（東京）
シオノギバイオメディカルラボラトリー（大阪）
エス・アール・エル（東京）
阪大微生物病研究会（大阪）
昭和大学藤が丘病院（東京）
杏林大学医学部附属病院（東京）
J A 秋田厚生連秋田組合総合病院（秋田）
長崎大学熱帯医学研究所（長崎）
和歌山労災病院（和歌山）
関東通信病院（東京）
社会保険・神戸中央病院（兵庫）
日赤医療センター（東京）
日大板橋病院（東京）
徳山中央病院（山口）
福井医科大学（福井）
川崎医科大学（岡山）
香川医科大学（香川）
香川労災病院（香川）
病体生理研究所（東京）
大阪医科大学（大阪）

1998 年

千葉大学医学部附属病院（千葉）
熊本県・公立玉名中央病院（熊本）
倉敷中央病院（岡山）
上野総合市民病院（三重）
市立千葉病院（千葉）

名古屋大学医学部附属病院（愛知）
帝京大学医学部附属市原病院（千葉）
県立広島病院（広島）
太田西ノ内病院（福島）
成田赤十字病院（千葉）
長崎大学医学部附属病院（長崎）
国立加古川病院（兵庫）
島根医科大学（島根）
国立療養所再春荘病院（熊本）
大垣市民病院（大分）
国立別府病院（大分）
尾道市民病院（広島）
長崎大学熱帯医学研究所（長崎）

1999 年

東京都老人医療センター（東京）
J A 連合会・尾西病院（愛知）
千葉大学医学部附属病院（千葉）
広島赤十字原爆病院（広島）
昭和大学病院（東京）
利根中央病院（群馬）
近畿大学医学部（大阪）
大垣市民病院（岐阜）
結核予防会・大阪病院（大阪）
県立岐阜病院（岐阜）
松下記念病院（大阪）
吉備高原医療リハビリテーションセンター（岡山）
国立三重中央病院（三重）
千葉県がんセンター（千葉）
昭和大学藤が丘病院（東京）
佐世保中央病院（長崎）
日本医科大学附属病院（東京）
名古屋大学附属病院（愛知）
徳島大学医学部（徳島）
杏林大学医学部附属病院（東京）

順天堂大学医学部（東京）
エス・アール・エル（東京）
倉敷中央病院（岡山）
日本赤十字社・和歌山医療センター（和歌山）
厚生連篠ノ井総合病院（長野）
長崎大学医学部付属病院（長崎）
新潟中央病院（新潟）
都立荏原病院（東京）

2000年

千葉大学医学部附属病院（千葉）
千葉県がんセンター（千葉）
九州大学医学部整形外科（福岡）
球磨郡公立多良木病院（熊本）
倉敷中央病院（岡山）
茅ヶ崎徳洲会総合病院（神奈川）
西神戸医療センター（兵庫）
エス・アール・エル（東京）
東京女子医科大学皮膚科（東京）
千葉市立病院（千葉）
結核予防会千葉支部（千葉）
国立小児病院呼吸器科（東京）
荒尾市民病院（熊本）
総合病院土浦協同病院（茨城）
天理よろず 병원（奈良）
国立療養所再春荘病院（熊本）
弘前市立病院（青森）
都立荏原病院（東京）
横浜市民病院（神奈川）
みさと健和病院（埼玉）
中国労災病院（広島）
長岡赤十字病院（新潟）
厚生連長岡病院（新潟）
東大医科研附属病院（東京）
神戸市医師会医療センター（兵庫）
近畿大学医学部附属病院（大阪）

神奈川県立こども医療センター（神奈川）
都立大久保病院（東京）
松下記念病院（大阪）
関東中央病院（東京）

2001年

都立大久保病院（東京）
自治医科大学病院（栃木）
徳島大学医学部第3内科（徳島）
厚生連長岡病院（新潟）
松江赤十字病院（島根）
千葉大学医学部附属病院（千葉）
杏林大学医学部附属病院（東京）
信越病院（長野）
徳島市民病院（徳島）
自治医科大学呼吸器内科（栃木）
西神戸医療センター（兵庫）
国立医療センター呼吸器科（東京）
聖マリアンナ医科大学皮膚科（神奈川）
東京保険会病体生理研究所（神奈川）
長崎市民病院（長崎）
NTT 東日本関東病院（東京）
県立岐阜病院（岐阜）
東京大学医学部附属病院（東京）
東京医科大学霞ヶ浦病院（茨城）
熊本労災病院（熊本）
千葉市立病院（千葉）
エス・アール・エル（神奈川）
旭川医科大学皮膚科（北海道）
名古屋市立大学医学部第2内科（愛知）
茨城県立中央病院皮膚科（茨城）
倉敷中央病院（岡山）
広島赤十字原爆病院（広島）
浜松赤十字病院（静岡）
三井大牟田病院（福岡）
尾道市民病院（広島）

Coccidioides immitis の球状体の簡易形成法

千葉大学真菌医学研究センター
宮治 誠, 西村和子, 亀井克彦, 佐野文子

Coccidioides immitis は coccidioidomycosis の原因菌であり, 自然界および通常の培地上では菌糸状で棲息し, 分節型分生子を産生, これが風や土木工事などの振動により空中に飛散する。人はこれら分生子を吸入することにより肺感染を起こすのである。肺内に吸引された分節型分生子は膨化し, 無数の内生孢子で満たされた球状体となる。それ故 *C. immitis* を同定するためにはこの球状体を証明しなければならない(現在では遺伝子同定法が開発されつつあるが, 菌学的研究には必要不可欠である)。

現在まで球状体を証明するために *in vivo* と *in vitro* の方法が報告されているが, いずれの方法を用いるとしてもかなりの危険を伴い, かつ熟練した手技が必要とされる。それ故簡便で危険性の少ない簡便な方法が求められており, 今回その開発に成功したので報告する。

1. 材料と方法

1) 使用菌株: 日本で患者から分離された3株 (IFM 4935, 4945, 45868) を使用した。

2) 使用培地: 1% Dextrose 加 Bact Yeast Nitrogen Base (以下 YNB と略す) Agar を使用した。なお YNB の組成は表 に示した。培地の作製法はまず A 液として YNB 6.7g を 100 ml の蒸留水に溶かし, フィルターろ過により滅菌する。次に B 液として dextrose 10 g と agar 15 g を 900 ml の蒸留水に溶かし, オートクレーブで滅菌し, 60 °C 前後で保温しておく。最後に 60 °C 位に温めた A 液中に B 液を加えシャーレに分注する。

3) 接種法: 培地の中央に菌を接種しビニールテープでしっかりとシャーレの蓋を密閉する。その後注射針で4ヵ所に穴を開け, 37 °C で培養する。

4) 観察法: 適時シャーレを逆さにして鏡台に置き観察した。

2. 結果と議論

1) 肉眼的観察: 培養約1ヶ月前後で3株とも直径1.5~2.5 cm の菌糸状集落上に1~4個の小さい白色酵母状集落が出現してきた(写真1)。この集落を同上の培地の斜面寒天培地に接種し, 37 °C で培養すると酵母状で継代培養が可能となった。

2) 顕微鏡的観察: 培養20日頃より集落の辺縁部の菌糸の先端部や介在部の一部が膨らみはじめ, 厚膜孢子に極似た初期の球状体が形成され

ていた。以後その数は増加し, 数珠状に連なる場面も観察された(写真2, 3)。球状体は膨らみ続け, それと同時に内部に壁ができ, 細胞を分割していった(写真4)。

現在まで球状体の形成方法に関し, 特殊な培地を用いる方法 (*in vitro*) と動物に感染させて観察する方法 (*in vivo*) が報告されている。我々の経験ではマウス腹腔内注射による感染と宮治, 西村が開発した寒天埋没法が優れていた。In vitro の方法は簡単なようであるが, 培地の調整, 培養装置等の他, 菌をそのまま白金耳で接種するのではなく, まず分節型分生子の浮遊液を調整し, 所定の菌数を接種しなければならない。また培養途中で菌を鏡検しなければならない。危険性が高い。Converse¹⁾が開発した「Converse の液体培地」と「Converse の固型培地」を用いる方法と Roberts 等²⁾の方法が知られている。

なお *in vivo* の方法の内「寒天埋没法³⁾」は一週間以内で球状体が観察できること, また腹腔内で菌が拡散しないため, 感染実験より危険性ははるかに少ない。しかし *in vitro* 及び *in vivo* のいずれの方法にしる, 危険性が大きく, かつ熟練を要するため, 通常の施設や, 技術では不可能である。今回我々の開発した方法は安全かつ簡便であり, 有用性が極めて高い方法と思われる。

3. *C. immitis* の球状体の簡便かつ安全な形成方法を開発した。