

図1 剖検総数に対する内臓真菌症の経年的発現頻度  
(日本病理剖検輯報1969年-2001年の解析、死産児を除く)

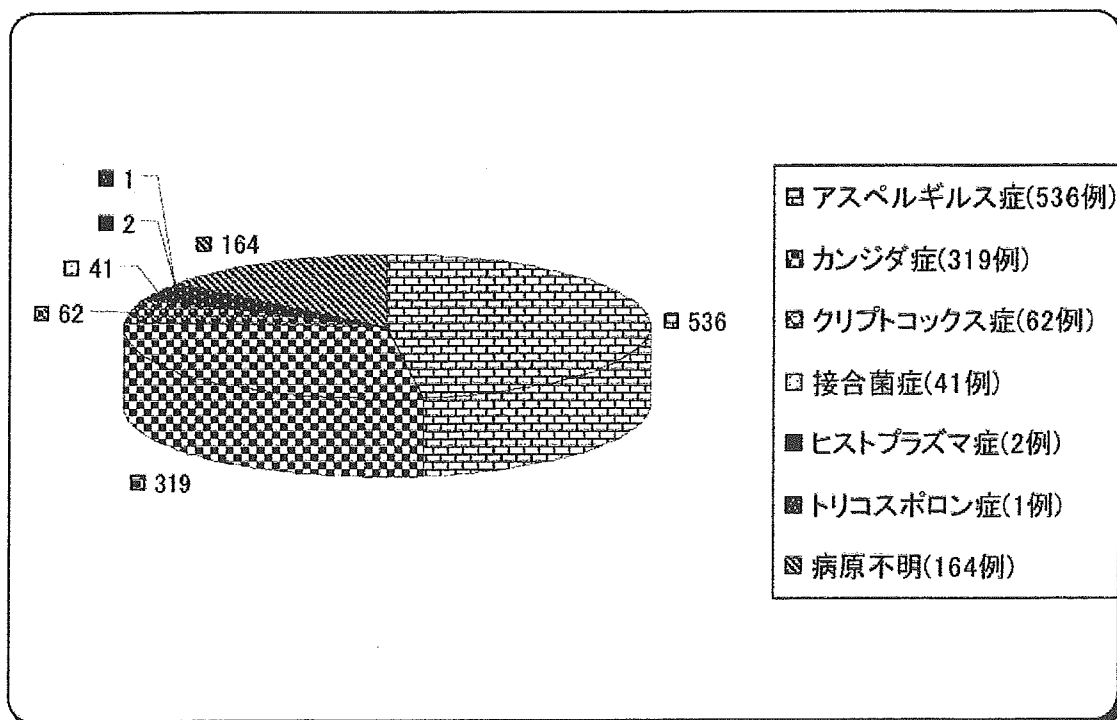


図2 深在性真菌症例における起因为因真菌別症例数  
(日本病理剖検輯報、2001年度 単独感染例 1,125例、死産児を除く)

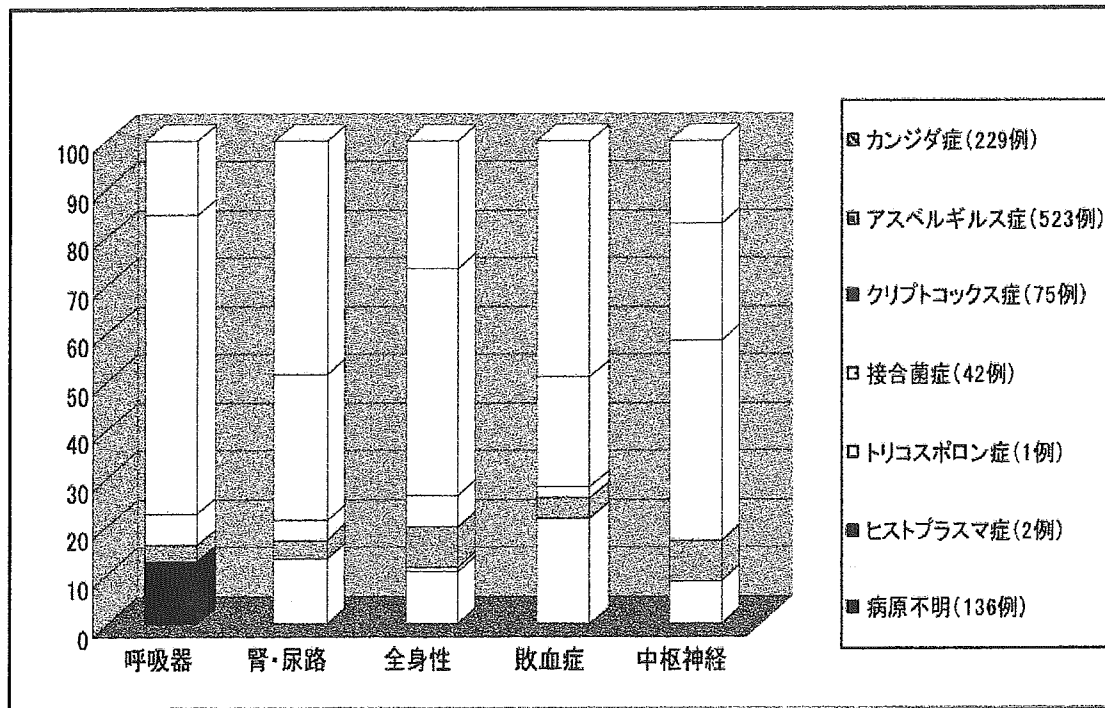


図3 主な病型・罹患臓器別にみた起因真菌別頻度(%)  
(日本病理剖検輯報 2001年度、死産児を除く)

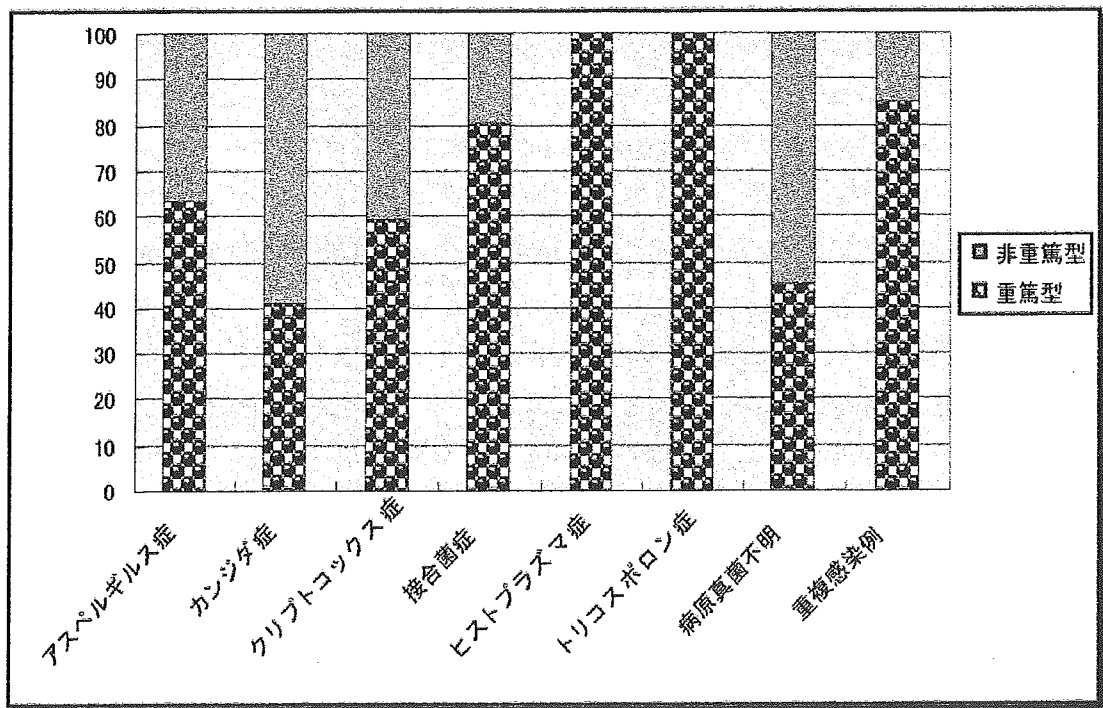


図4 起因真菌別にみた重篤型と非重篤型の割合  
(日本病理剖検輯報 2001年度、死産児を除く)

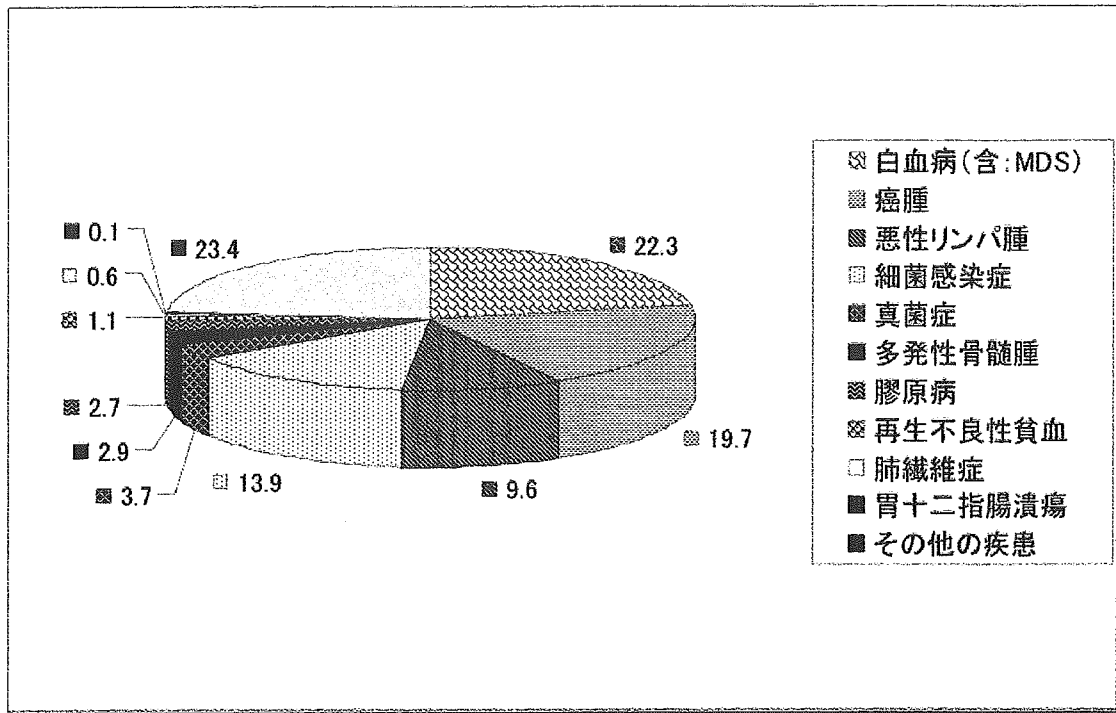


図5 深在性真菌症例における基礎疾患別内訳(真菌症例総数を母集団とした頻度%)  
 (日本剖検輯報 2001年度、死産児を除く)

協力研究報告書

*Coccidioides* spp. の多種遺伝子配列に基づいた再同定

研究協力者 佐野文子 千葉大学真菌医学研究センター 助教授

研究要旨 *Coccidioides* spp. は Fisher らの 2002 年にマイクロサテライトの多種遺伝子解析に基づいた分類により、アメリカ合衆国カリフォルニア地域に分布する遺伝子型を *C. immitis*, その他の地域に分布する遺伝子型を *C. posadasii* と分類するようになり、この分類法が広く受け入れられるようになった。そこで、我が国で保存されている *Coccidioides* spp. を新しい分類基準に沿って再分類することを目的とし、今回、19 株について多種遺伝子解析に基づいた再同定を行ったところ、5 株が *C. immitis*, 14 株が *C. posadasii* と同定され、その根拠となった配列を公開した。

A. 研究目的

コクシジオイデス症は南北両アメリカ大陸の半砂漠地帯に限局して生息する *Coccidioides* spp. の感染によって起る風土病で、我が国では輸入真菌症として取り扱われている。米国アリゾナ州に限っても毎年 2000 例以上が報告され、無症候性感染は 10 万以上と推定されている。原因菌はこれら地域の土壌に生息し春先に菌糸から胞子になり、晩春にこの胞子が強風、土木建設、発掘調査、地震などによって空中に舞い上がり肺炎、稀に全身感染を起こす。日本人はこれら地方に旅行あるいは滞在して感染することがあり、感染症法第四類感染症全数把握疾患に指定されている唯一の真菌症である。これまでに 45 例が報告され、多くは合衆国で感染しているが、渡航

歴のない原綿など輸入原材料を取り扱う職業人にも発生している。本原因菌種は真菌では最も病原性が強く、取り扱いにはバイオセーフティレベル 3 実験室に限られ、しかも分生子が非常に飛散しやすく、実験室内感染事故が起こりやすいため特別訓練を受けた研究者や臨床技師が培養検査する必要がある、分離、同定には約 2 週間かかる。

原因菌は Fisher らが 2002 年に報告したマイクロサテライトの多種遺伝子解析に基づいた分類により、アメリカ合衆国カリフォルニア地域に分布する遺伝子型を *C. immitis*, その他の地域（アリゾナ州、テキサス州等米国西南部、メキシコ北部、アルゼンチンのパンパ地帯、ベネズエラのファルコン州など）に分布する遺伝子型を *C. posadasii* としてい

る (1). しかし, 両菌種の遺伝子配列情報は特許事業等の影響によりほとんどが公開されていない。

また, Fisher らは, dioxygenase (DO), serine proteinase (SP), chitinase (CT) の配列を連結させて解析することにより, *C. immitis* と *C. posadasii* を分けることが出来たと報告している (2).

我々は我が国で保存されている *Coccidioides* spp. を新しい分類基準に沿って再分類し, 情報公開することが使命であると考へた. そこでこの分類法を応用して千葉大学真菌医学研究センターに *C. immitis* として保存されている 19 株について, これら 3 種遺伝子の連結配列に基づいた解析結果による再同定を行い, 配列を公開した (Table 1, 2).

合わせて, おのおのの遺伝子単独での解析結果を照合すると共に, 病原真菌の分類に広く使用されている rRNA 遺伝子の internal transcribed spacer (ITS) 1-5.8S-ITS 2 および large subunit rRNA 遺伝子の D1/D2 領域, ならびに病原性を司る遺伝子の一種の urease (Ure) 遺伝子の部分配列を解析し, 多種遺伝子配列の連結に基づいた解析によらず, 単独で *Coccidioides* spp. の遺伝子種 (genospecies) を決定できる遺伝子を探った.

## B. 研究方法

### 1. 使用菌株

表1に示した.

### 2. DNA の抽出

27°C で 2 週間, ポテト・デキストロース寒

天斜面培地で培養した菌体より, 市販キットを用いて DNA を抽出した.

### 3. 検出遺伝子

dioxygenase (DO), serine proteinase (SP), chitinase (CT), rRNA 遺伝子の internal transcribed spacer (ITS) 1-5.8S-ITS 2 および large subunit rRNA 遺伝子の D1/D2 領域, ならびに病原性を司る遺伝子の一種の urease (Ure) 遺伝子の部分配列を解析し, 明らかに由来のわかっている *C. immitis* と *C. posadasii* 株を基準に, それぞれをクラスター解析した.

## C. 研究結果

3 種の遺伝子(DO, SP, CT)を組み合わせた解析に基づいて 5 株が *C. immitis*, 14 株が *C. posadasii* と同定された (Fig. 1). DO, SP, Ure 遺伝子の配列は単独でも上記の結果と整合性を得たものの, CT, ITS, D1/D2 遺伝子は一致しなかった. さらに, 真菌の分類に用いられている rRNA 遺伝子は ITS, D1/D2 領域ともに種内相同性は 99% 以上であった. 各配列のアクセッション番号は Table 1 に示した.

## D. 考察

我が国では *C. immitis* と *C. posadasii* を保有し, それらの遺伝子情報を公開することが出来た.

DO, SP, Ure 遺伝子の配列は単独でも 3 遺伝子を組み合わせて解析した結果と整合性を得たので, 配列決定すれば, 同定は可能である. 一方, CT, ITS, D1/D2 遺伝子による同定

は属レベルである。

真菌の分類に広く用いられている rRNA 遺伝子は、ITS, D1/D2 領域ともに種内相同性は 99%以上であったことから、従来の遺伝子同定による分類基準により *Coccidioides* spp. を 2 菌種に分類することは不可能であった。

#### E. まとめ

遺伝子情報に基づき *C. immitis* と *C. posadasii* に分類することは世界的にも受け入れられるようになってきている。本研究を通じて多くの遺伝子情報を公開し、遺伝子同定のレファレンスを構築することが出来た。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 原著論文

1. Nishifuji K, Ueda Y, Sano A, Kadoya M, Kamei K, Sekiguchi M, Nishimura K, Iwasaki T: Interdigital involvement in a case of primary cutaneous canine histoplasmosis in Japan. *J Vet Med Assoc* 52: 478-80, 2005.

2. Komori T, Sano A, Yarita K, Kitagawa T, Kamei K, Nishimura K: Phylogenetic analysis of *Histoplasma capsulatum* based on partial sequence of the D1/D2 region of the 28S rRNA gene. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 46: 291-5, 2005.

3. Ramos SP, Sano A, Ono MA, Camargo ZP,

Estavao D, Miyaji M, Nishimura K, Itano EN: Antigenuria and antigenemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*, 43:631-6, 2005.

4. Sano A, Miyaji M, Kamei K, Mikami Y, Nishimura K: Reexamination of *Coccidioides* spp. reserved in the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, based on a multiple gene analysis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 47 in press.

5. Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Yehara Y: Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *JCM*, in press.

##### 2) 学会発表

1. 佐野文子, 村田佳輝, 亀井克彦, 西村和子: イヌの口腔内より分離された本邦初の *Arthrographis kalrae* について. 日本微生物資源学会 第12回大会, 講演要旨集. P31, かずさアーク (木更津), 2005.6.21-22.

2. Murata Y, Sano A, Nishimura K, Kamei K: The first isolation of *Arthrographis kalrae* from the oral cavity of a canine in Japan. The Mycological Society of America & The Mycological Society of Japan Joint Meeting 2005. Program and Abstract P168, The University of Hawaii, Hilo, Hawaii, 2005.7.30-8.5.

3. Tatibana BT, Sano A, Uno J, Kamei K, Igarashi T, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, Itano EN: Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 in sputa by loop-mediated isothermal amplification method. IX International Meeting of Paracoccidioidomycosis, Abstract (Rev Inst Trop Med S. Paulo, Supple 14) p35, 2005.10.2-5, Água de Lindóia, São Paulo, Brazil.

4. 村田佳輝, 佐野文子, 猪股智夫, Poonwan Natteewan, 亀井克彦, 三上 襄: 我が国におけるイヌのヒストプラズマ症の分子疫学. 第49回日本医真菌学会総会, 真菌誌 46 (増1): 102 千葉, 2005.10.6-7.

5. 佐野文子, 宮治 誠, 亀井克彦, 三上 襄,

西村和子: 千葉大学真菌医学研究センターに保存されている *Coccidioides* spp. の多種遺伝子配列に基づいた再同定. 第49回日本医真菌学会総会, 真菌誌 46 (増1): 104 千葉, 2005.10.6-7.

6. 小豆畑康児, 川名秀忠, 東 守洋, 東和彦, 若新英史, 大矢佳寛, 佐野文子, 亀井克彦, 張ヶ谷健一: 播種性コクシジオイデス症の1例. 第49回日本医真菌学会総会, 真菌誌 46 (増1): 104 千葉, 2005.10.6-7.

#### H. 知的財産権

1 件 (申請中) 申請課題名: コクシジオイデス症病原体検出用プライマー, 申請者: 上原至雅 (申請代表者: 国立感染症研究所生物活性物質部・部長)

Table 1. *Coccidioides* spp. isolates and their accession numbers.

IFM No.	Isolate				Gene (length)				
	Strain	Identification	Origin	Country	Deoxygenase (636 )	Serine proteinase (646)	Chitinase ( 487 )	Urease (536)	rRNA( 1251)
4935	Nagoya	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan	AB232864	AB232726	AB232745	AB232707	AB232883
4945	Ohashi	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan	AB232865	AB232727	AB232746	AB232708	AB232884
45809	Silveira (SAP2)	<i>C. posadasii</i>	Animal passage 11	USA	AB232866	AB232728	AB232747	AB232709	AB232885
45810	Silveira (SAP3)	<i>C. posadasii</i>	Animal passage 111	USA	AB232867	AB232729	AB232748	AB232710	AB232886
45811	Arizona	<i>C. posadasii</i>	Human case	USA	AB232868	AB232730	AB232749	AB232711	AB232887
45812	San Antonio	<i>C. posadasii</i>	Human case	USA	AB232869	AB232731	AB232750	AB232712	AB232888
45813	New York	<i>C. posadasii</i>	Human case	USA	AB232870	AB232732	AB232751	AB232713	AB232889
45815	91-48	<i>C. immitis</i>	Human case	USA	AB232871	AB232733	AB232752	AB232714	AB232890
45816	91-153	<i>C. immitis</i>	Human case	USA	AB232872	AB232734	AB232753	AB232715	AB232891
45817	Nicols	<i>C. posadasii</i>	Human case	USA	AB232873	AB232735	AB232754	AB232716	AB232892
46868	Yokohama	<i>C. immitis</i>	Human case	Japan	AB232874	AB232736	AB232755	AB232717	AB232893
50992	90-242	<i>C. immitis</i>	Human case	USA	AB232875	AB232737	AB232756	AB232718	AB232894
50993	Kanazawa	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan	AB232876	AB232738	AB232757	AB232719	AB232895
50994	Toranomon	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan	AB232877	AB232739	AB232758	AB232720	AB232896
50995	Handai	<i>C. immitis</i>	Human case	Japan	AB232878	AB232740	AB232759	AB232721	AB232897
51112	Himeji	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan	AB232879	AB232741	AB232760	AB232722	AB232898
54194	Nagano	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan	AB232880	AB232742	AB232761	AB232723	AB232899
54195	Fukunaga	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan	AB232881	AB232743	AB232762	AB232724	AB232900
54196	Chiba	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan	AB232882	AB232744	AB232763	AB232725	AB232901



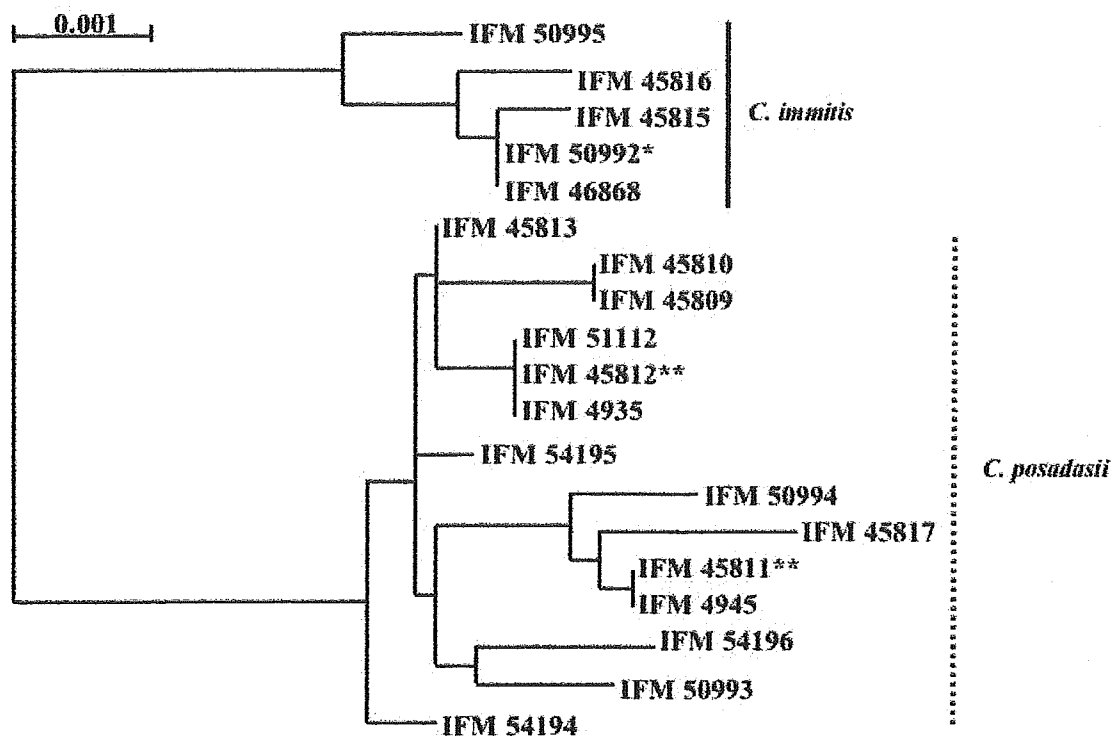


Fig. 1. Unrooted tree based on a combination of three gene sequences--dioxygenase (DO), serine proteinase (SP), and chitinase (CT) consisting of 1769 base pairs constructed by the neighbor-joining method. The scale bar represents a difference corresponding to 0.001 (0.1%). Isolates identified as *C. immitis* are in the upper clade and those as *C. posadasii* are in the lower one. \*: isolate used as *C. immitis* standard; \*\*: isolate used as *C. posadasii* standard.