

で生育陽性であり、*Candida* 属としては特徴的な培養性質を示した。その他の培養性質から本菌株はグループ VI (イノシトール・硝酸カリウム・エリスリトール陰性、40℃陽性) に分類された。本グループは *C. albicans* をはじめとして病原性が報告されている種が複数属しているが、本菌株の病原性は不明である。ポリコナゾール・イトラコナゾール・フルコナゾール・5-FC に対する感受性は既知の種と差が認められなかった。(表 1, 図 1-2 参照)

#### D. 考 察

これらの結果から、本菌株を新種と判断し *Candida auris* と命名した (type strain JCM15448<sup>T</sup> = CBS10913<sup>T</sup> = DSM21092<sup>T</sup>, Microbiology and Immunology, in press)。

#### E. 結 論

国内ヒト臨床検体より新規 *Candida* 属酵母を分離し、新種記載した。本菌は、現状において病原性が確認できないが、今後日和見感染症起因菌となる可能性があることから、慎重にその分離動向を追跡したい。

#### F. 健康危険情報

ない。

#### G. 研究発表

1. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y,

Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H: *Candida auris* Sp. Nov., a Novel Ascomycetous Yeast Isolated from the External Ear Canal of the Inpatient in a Japanese Hospital. Microbiology and Immunology 2008, in press.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当しない。

## II 動物園飼育下における輸入真菌症起因菌保菌動物から分離された新種酵母の記載

#### A. 研究目的

動物の鼻腔には様々な微生物が常在していることが知られているが、動物種ごとの微生物叢はまだ十分に調べられていない。動物園は生物多様性の保存を目的の 1 つとした施設であることから、動物園飼育下における各動物に固有の常在菌も同じく保存されている可能性が高い。我々は希少動物として重要なコアラ (健康) の鼻腔から新規担子菌酵母を得たので報告する。

#### B. 研究方法

神戸市立王子動物園飼育のクイーンズランドコアラ 5 頭の鼻腔スミアより菌株

を分離した。

分離菌株の 26S rDNA D1/D2 領域 (26S) および ITS1+5.8S rDNA+ITS2 領域 (ITS) を用いた分子系統分類を行った。そのほかの試験項目は The Yeasts 4th ed に準じた。

### C. 研究結果

異なる 3 頭から CHRMagar Candida に特徴的なルビー色を呈する 3 株の酵母を得た。3 株の性状は一致し、ITS の相同性が *Sporobolomyces* 属菌と 88~92%, 26S が *Sporobolomyces* 属菌と 95~99% であった。偽菌糸の形成条件は近縁の *S. carnicolor* および *S. japonicus* とは異なっていた。したがってこれら 3 株は *Sporobolomyces* 属の新種であると判断した。本菌株は至適温度が 28~30°C, 32°C では生育しなかった。(表 2-3, 図 3-7 参照)

### D. 考察

これらの結果から、本菌株を新種と判断し *Sporobolomyces koalae* と命名した (type strain JCM15063<sup>T</sup>=DSMZ19992<sup>T</sup>, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 2983-2986, 2008.)。

*Sporobolomyces* 属の主な分布は落ち葉や枯れ枝であるが、土壌・空中のみならず 2000m 以深の深海からも分離が報告されるなど、あまねく環境に生育する多系統真菌である。

また、臨床的にはエイズ患者などに対する日和見感染として、リンパ節炎・皮

膚炎・脳感染症・真菌血症などの症例報告がある。しかし、本分離菌の病原性は不明であり、宿主が健康であるため非病原性の常在真菌であると考えられる。

### E. 結論

輸入真菌症起因菌保菌動物より新規 *Sporobolomyces* 属酵母を分離し、新種記載した。本菌は、現状において病原性が確認できないが、今後日和見感染症起因菌となる可能性があることから、慎重にその分離動向を追跡したい。

### F. 健康危険情報

ない。

### G. 文献

1. Satoh K, Makimura K: *Sporobolomyces koalae* sp. nov., a novel basidiomycetous yeast isolated from the nasal smear of Queensland koalas kept in a Japanese zoological park. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 2983-2986, 2008.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当しない。

### III 市販簡易遺伝子抽出キットの病原糸状菌を用いた評価とその応用

## A. 研究目的

真菌症の遺伝子診断、および起因菌の遺伝子解析・同定のためには、迅速かつ簡便な起因菌遺伝子の抽出法が必須である。*Candida*

属等の酵母については、細胞の性質上煮沸程度の単純な操作によって比較的容易にゲノム遺伝子が放出されることから、遺伝子増幅が必要な場合であっても抽出を経ることなく、菌体を直接反応試験管に投入することによって、多検体の PCR 増幅・解析が可能である（コロニー PCR と呼ばれる）。しかし、より細胞壁が強固であり、菌体量に比較してゲノム比率が少ない糸状菌においては、単純に菌体を反応試験管に投入したとしても、解析に耐える遺伝子を増幅出来ない場合が少なくない。そのため、糸状菌にも適用可能なコロニー PCR 系が求められてきた。島津製作所の Ampdirect® Plus は、各種生物組織を直接検体として PCR 反応に適用できるキットであるが、真菌に対する応用は限られており、至適条件は得られていなかった。そこで、本キットを糸状菌遺伝子増幅に応用・至適化することに着想した。

## B. 研究方法・結果

添付文書に基づいて、1 時間を要する溶解過程を経た場合、*Candida* 属等の酵母ならびに *Aspergillus* 糸状菌を含む 63 株のすべてから Ampdirect® Plus kit 同梱の PCR バッファーを使用することによって PCR 法によるゲノム遺伝子の増幅が得ら

れた。また、溶解過程を省略して一般的な PCR バッファーを用いた場合と、Ampdirect® Plus kit 同梱の PCR バッファーを用いた場合を比較してコロニー直接 PCR を施行したところ、前者では 31.43% の増幅に止まったが、後者では 97.14% の菌株から遺伝子が増幅された。

(表 4-6 参照)

## C. 考察

糸状菌の遺伝子を PCR によって増幅する場合、Ampdirect® Plus kit 同梱の PCR バッファーを用いることによって、検査工程の迅速化、多検体化が可能となろう。

## D. 結論

糸状菌遺伝子解析のために有益な、遺伝子抽出・増幅系が提供された。

## E. 健康危険情報

ない。

## F. 研究発表

1. AlShahni MM, Makimura K, Yamada T, Satoh K, Ishihara Y, Takatori K, Sawada T: Direct Colony PCR of Several Medically Important Fungi using Ampdirect® Plus. Japanese Journal of Infectious Diseases 2008 in press.

IV 葉緑体を持たない病原藻類：プロトテカに対する遺伝子同定法の開発



## A. 研究目的

葉緑素を持たない藻類である *Proptotheca zopfii* は、ヒトや犬・牛において全身に感染し Prptotecosis (プロトテカ症) を引き起こす起因藻の一つとして知られる。言うまでもなく本病原体は真菌ではなく、むしろ8界説によれば植物界に帰属するが、病原体の表現形質が真菌と鑑別困難であり、病態が真菌症に類似していることから歴史的に医真菌学におい取り扱われている。本藻は、ヒトの深在性の皮膚感染症や尿路感染症等の疾患、牛の乳房炎、犬の皮膚炎等を引き起こし症状はいずれも重篤である。治療については、早期の診断と有効な抗真菌薬を選択することが重要である為、菌種の同定が必要であると考えられる。本研究では、*Proptotheca zopfii* に特異的な Primer の設計を試みた。

## B. 研究方法

プライマーの作成は、GenBank に登録のある *Chlorella* 属及び *Proptotheca* 属の SSU 領域での塩基配列を参考に、*Proptotheca zopfii* に特異的な領域 18PZF1 と 18PZR1 を設計した。また、その領域の外側に nested PCR をおこなう目的で 018SF1 と 018SR1 を設計した。これらのプライマーセットを使用した PCR 反応を行なう為、*Proptotheca* 属については、JCM (理化学研究所) で保管されている *P. zopfii* 10 株、

*P. wicherhamjii* 4 株、*P. stagnora* 2 株を用い、また、*Chlorella* (V-12) 1 株、及び *Candida* 属 4 株 (TIMM) も合わせ計 9 菌種 21 株をコロニー PCR により確認した。

## C. 研究結果

領域 018S のプライマーセットを用いた結果では、すべてが 586bp の目的増幅産物を得て、さらに 18PZ のプライマーセットにて nested PCR をおこなった結果、*P. zopfii* 10 株のみ 246bp の目的増幅産物を確認した。我々の作成した 018S 及び 18PZ のプライマーセットは *Proptotheca zopfii* の同定において迅速で特異性が高く有用であると考えられた。(表 7-8, 図 8 参照)

## D. 考察

分類同定が容易ではなかった本藻に対する高感度・高特異度が期待できる遺伝子同定系が提供された。本研究結果は、本症の診断・治療のみならず、その起因藻の生物学的研究にもインパクトを与えるものと期待したい。

## E. 結論

主要プロトテカ症起因藻：*Proptotheca zopfii* の遺伝子同定法が開発された。

## F. 健康危険情報

ない。

### G. 研究発表

1. Onozaki M, Makimura K, Hasagawa A: Rapid identification of *Prototheca zopfii* by nested polymerase chain reaction based on the nuclear small subunit ribosomal DNA. *Journal of Dermatological Science*, 2008, in press.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当しない。

## III 平成 20 年業績リスト

### A. 原著論文

1. Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H, Kikuchi Y, Abe S, Kudoh S: Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. *Journal of Medical Microbiology* 57(1):50-7 2008.
2. Yamada T, Makimura K, Hisajima T, Ito M, Umeda Y, Abe S: Genetic transformation of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*, based on the use of G418 resistance as a dominant selectable marker. *Journal of Dermatological Science* 49(1):53-61 2008.
3. Fijisaki R, Makimura K, Hayashi T, Yamamura M, Yamaoka T, Shiraishi K, Ishihashi S, Kawakami S, Kurihara T, Nishihya H: Exotic myiasis caused by 19 larvae of *Cordylobia anthropophaga* in Namibia and identified using molecular methods in Japan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102(6):599-601,2008.
4. Osumi T, Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K, Ito T, Matsubara K, Hasegawa A: *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Veterinary Microbiology* 131(3-4):419-23,2008.
5. Kano R, Sano A, Makimura K, Watanabe S, Nishimura K, Yamaguchi H, Hasegawa A: A new genotype of *Arthroderma benhamiae*. *Medical Mycology* 8:1-6, 2008.
6. Hisajima T, Maruyama N, Tanabe Y, Ishibashi H, Yamada T, Makimura K, Nishiyama Y, Funakoshi K, Oshima H, Abe S: Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. *Microbiology and Immunology* 52(7):327-33,2008.
7. Kalkanci A, Mekha N, Poonwan N, Makimura K, Sugita T: Comparative evaluation of *Trichosporon asahii* susceptibility using ASTY colorimetric microdilution and CLSI M27-A2 broth microdilution reference methods.

- Microbiol Immunol 52: 435-439, 2008.
8. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H: *Candida auris* Sp. Nov., a Novel Ascomycetous Yeast Isolated from the External Ear Canal of the Inpatient in a Japanese Hospital. *Microbiology and Immunology* 2008, in press.
  9. Satoh K, Makimura K: *Sporobolomyces koalae* sp. nov., a novel basidiomycetous yeast isolated from the nasal smear of Queensland koalas kept in a Japanese zoological park. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2983-2986, 2008.
  10. Kikuchi K, Sugita T, Makimura K, Urata K, Someya T, Sasaki T, Kamei K, Niimi M, Hiramatsu K, Uehara Y: *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? *Microbiology and Immunology* 2008, in press.
  11. Onozaki M, Makimura K, Hasagawa A: Rapid identification of *Prototheca zopfii* by nested polymerase chain reaction based on the nuclear small subunit ribosomal DNA. *Journal of Dermatological Science*, 2008, in press.
  12. Koga H, Nanjoh Y, Makimura K, Tsuboi R: In vitro antifungal activities of luliconazole, a new topical imidazole. *Medical Mycology* 2008 in press.
  13. Yamada T, Makimura K, Satoh K, Umeda Y, Ishihara Y, Abe S: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*: an efficient tool for gene transfer. *Medical Mycology* 2008 in press.
  14. Yamamura M, Makimura K, Ota Y: Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and melting curve analysis. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2008, in press.
  15. AlShahni MM, Makimura K, Yamada T, Satoh K, Ishihara Y, Takatori K, Sawada T: Direct Colony PCR of Several Medically Important Fungi using Ampdirect? Plus. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2008 in press.
  16. Uchida T, Makimura K, Ishihara K, Goto H, Tajiri Y, Okuma M, Fujisaki R, Uchida K, Abe S, Iijima M: Comparative study of direct PCR, microscopic examination, and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples. *Journal of Dermatology* 2008 in press.
  17. 柴田 明佳, 金子 孝昌, 横村 浩二, 小野崎 正修, 荻原 利彦, 柴田 裕子, 菊池 賢, 安部 茂: 合成酵素基質を用いた酵母様真菌分離鑑別培地ポアメディア Vi カンジダ寒天培地ならびに CHROMagar *Candida* の発育支持および菌種鑑別能に関する比較検討. *真菌誌* 49: 33-38, 2008.



## B. 総説・著書

1. 横村浩一. 深在性真菌症の検査法-主流となる最新技術-特集 深在性真菌症. アニムス 51: 24-28, 2008.
2. 横村浩一、佐藤一朗、山田剛、西山彌生、安部茂、月井雄二、杉田隆、高鳥浩介、辨野義己、山崎丘: 宇宙ステーション内生活環境及び乗員の体内外における微生物生態系解析システムの開発. Space Utiliz Res 24: 344-346, 2008.
3. 大森雅之、石岡憲明、泉龍太郎、江崎孝行、大石浩隆、太田寛行、加藤憲二、喜多正和、那須正夫、東端晃、福井啓二、藤本信義、横村浩一、森崎久雄、山崎丘: 宇宙微生物学研究班 WG 活動報告. Space Utiliz Res 24: 344-346, 2008.
4. 横村浩一. 病原真菌の同定法 P 248-252. 医学のあゆみ 第225巻第3号 2008.4.
5. 横村浩一. 主要病原 Candida 属分離鑑別のための呈色培地における各種酵母の集落性状 P35-37. 深在性真菌症, Apr. 2008 Vol. 4, no. 1
6. 横村浩一. 生物における真菌の位置と皮膚糸状菌 P500-505. Visual Dermatology 第7巻第5号 2008
7. 横村浩一. 主要病原 Candida 属分離鑑別のための呈色培地: クロモアガーTM カンジダにおける各種糸状菌の集落性状 P33-35. 深在性真菌症, Oct. 2008 Vol. 4, no. 2
8. 佐藤一朗, 横村浩一: 【変貌した深在性真菌症治療と必須検査】 真菌の検査法 遺伝子診断、Medical Technology 36(7):719-723. (2008)
9. 矢口貴志, 高島昌子, 川崎浩子, 横村浩一: 病原真菌研究におけるカルチャーコレクションの役割と利用法、日本医真菌学会雑誌 49(3): 221-228, 2008.
10. 二木芳人, 福田隆浩, 横村浩一, 吉田耕一郎: 深在性真菌症の診断と治療、呼吸 27(6): 555-565, 2008.
11. 工藤由起子、納富継宣、平田行正、横村浩一、中山哲夫: LAMP 法を用いた遺伝子検査の現状と将来展望、モダンメディア 54(10): 283-301, 2008.
12. 横村浩一: 病原真菌の基礎知識. 特集皮膚真菌症診療ガイドーこれだけは知っておきたい皮膚真菌症の知識一. MB Derma 148: 1-5, 2009.
13. 横村浩一. 培養同定検査(真菌) P 636-637. 桜林郁之介、熊坂一成編集、最新臨床検査項目辞典、医歯薬出版、2008
14. 横村浩一. 真菌顕微鏡検査 P 637. 桜林郁之介、熊坂一成編集、最新臨床検査項目辞典、医歯薬出版、2008
15. 横村浩一. 真菌遺伝子検査 P 637-638. 桜林郁之介、熊坂一成編集、最新臨床検査項目辞典、医歯薬出版、2008
16. 横村浩一. 抗ヒストプラスマ抗体 P 681-682. 桜林郁之介、熊坂一成編集、最新臨床検査項目辞典、医歯薬出版、2008





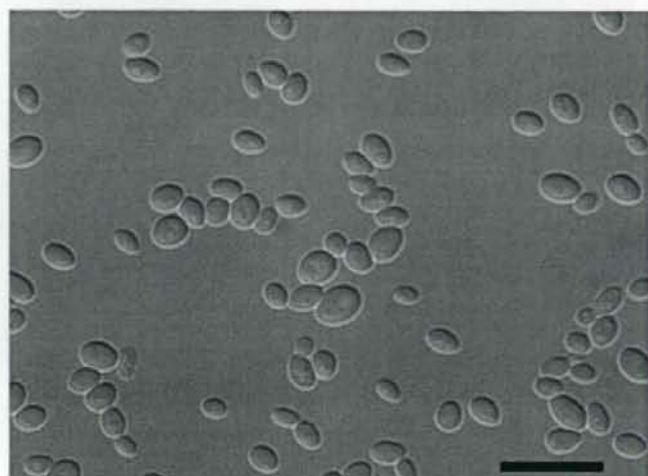


Fig. 2. *Candida auris* JCM15448<sup>T</sup>. Vegetative cells grown in glucose-yeast extract-peptone broth after 3 days at 25°C. Scale Bar indicates 10  $\mu$ m.

图2

Table 1. Minimal inhibitory concentrations of *in vitro* susceptibility testing against antifungal agents for strain JCM15448<sup>T</sup>

	24 h (IC <sub>50</sub> )	48 h (IC <sub>100</sub> )
Voriconazole	7.8 ng/ml	31 ng/ml
Itraconazole	7.8 ng/ml	63 ng/ml
Fluconazole	1 $\mu$ g/ml	2 $\mu$ g/ml
5-Fluocytosine	$\leq$ 31 ng/ml	0.5 $\mu$ g/ml

表1



純粋分離菌JCM15063株のCHRMagar Candidaでのコロニー。



Christensen尿素培地においてウレアーゼ活性を示した。



デンプン生成培地Ⅰ デンプン生成培地Ⅱ

デンプン生成活性は認められなかった。



反応前 反応後

DBBは陽性を示した。

図3

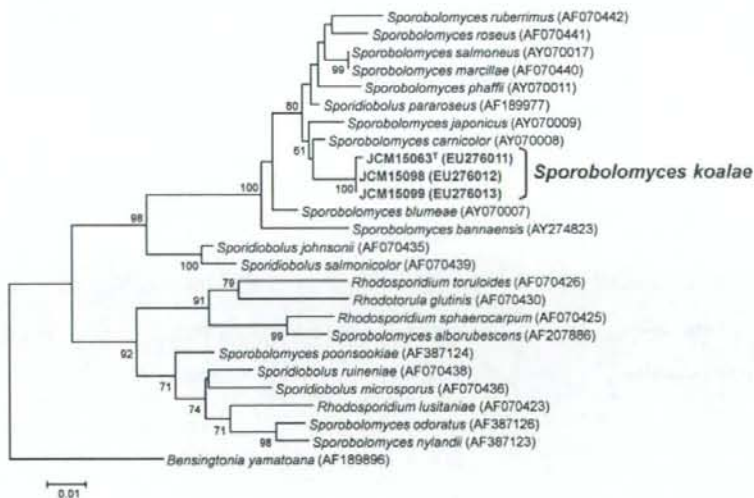


図4 26S rDNA D1/D2領域によるNJ-tree. ブートストラップ1000回で60%以上の数値を表示。

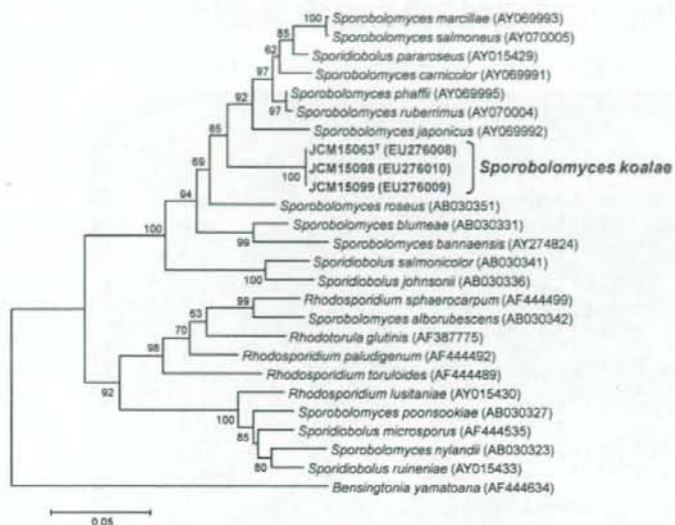
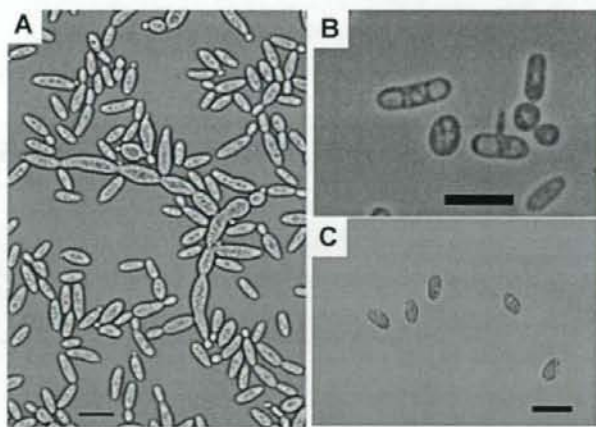


図5 ITS1+5.8S rDNA+ITS2領域によるNJ-tree. ブートストラップ1000回で60%以上の数値を表示。

図6 *Sporobolomyces koalae* JCM15063株の顕微鏡写真



A: Vegetative cellsおよびpseudohyphae. B: Ballistoconidia-producing cellおよび vegetative cells. C: Ballistoconidia. Bars, 10  $\mu$ m.



図7 *S. koalae* JCM15063株の温度感受性

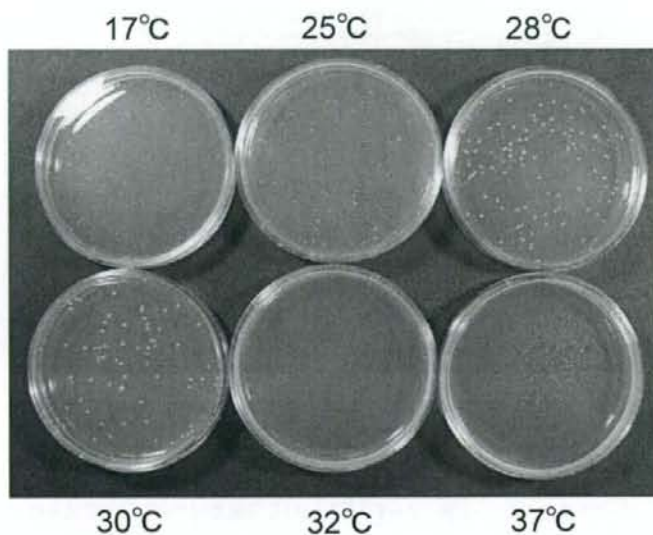


表2 *S. koalae*と近縁種の炭水化物資化性

	Glucose	Galactose	L-Sorbose	Sucrose	Maltose	Cellobiose	Trehalose	Lactose	Melibiose	Raffinose	D-Gluconate
<i>S. koalae</i>	+	-	-	+	+	+	w	-	-	+	w
<i>S. carnicolor</i> *	+	s	s	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>S. japonicus</i> †	+	w	n	+	+	n	n	-	n	w	+
	Inulin	Xylose	L-Arabinose	D-Arabinose	Ribose	L-Ramnose	Methanol	Ethanol	Glycerol	Erytritol	Soluble starch
<i>S. koalae</i>	w	-	w	-	-	-	-	-	w	-	+
<i>S. carnicolor</i> *	s	s	-	s	+	-	n	+	+	-	s
<i>S. japonicus</i> †	+	-	n	n	-	-	n	n	n	n	+
	Ribitol	Mannitol	Sorbitol	Glactitol	Salicin	Melezitose	DL-Lactate	Succinate	Citrate	Inositol	α-Methyl-D-glucoside
<i>S. koalae</i>	-	+	w	-	w	w	-	+	-	-	-
<i>S. carnicolor</i> *	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	s
<i>S. japonicus</i> †	n	+	+	n	+	n	n	-	+	n	n

+ : positive, - : negative, w : weak, s : slow, n : no data

\*Bai, F.-Y., Zhao, J.-H., Takashima, M., Jia, J.-H., Boekhout, T. & Nakase, T. (2002). Reclassification of the *Sporobolomyces roseus* and the *Sporidibolus pararoseus* complexes, with the description of *Sporobolomyces phaffii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2309-2314.

†Iizuka, H. & Goto, S. (1965) Microbiological studies on petroleum and natural gas VIII. Determination of red yeasts isolated from oil-brines and related materials. *J Gen Appl Microbiol* **11**, 331-337.

表3 *S. koalae*と近縁種の窒素源資化性

	Ammonium sulfate	Sodium nitrite	Potassium nitrate	Ethylamine	Cadaverine	L-Lysine
<i>S. koalae</i>	+	-	+	-	-	-
<i>S. carnicolor</i> *	+	-	-	-	+	+
<i>S. japonicus</i> †	+	n	-	n	n	n

+: positive, -: negative, n: no data.

\*Bai, F.-Y., Zhao, J.-H., Takashima, M., Jia, J.-H., Boekhout, T. & Nakase, T. (2002). Reclassification of the *Sporobolomyces roseus* and the *Sporidiobolus pararoseus* complexes, with the description of *Sporobolomyces phaffii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2309–2314.

†Iizuka, H. & Goto, S. (1965) Microbiological studies on petroleum and natural gas VIII. Determination of red yeasts isolated from oil-brines and related materials. *J Gen Appl Microbiol* **11**, 331-337.

表4

Table 1. Mold strains examined by Ampdirect PCR protocol

Strains	Strains
<i>Aspergillus terreus</i> var. <i>terreus</i> JCM 10257	<i>Fusarium moniliforme</i> TIMM 1294
<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>nidulans</i> JCM 2728	<i>Aspergillus candidus</i> JCM 10250
<i>Aspergillus versicolor</i> JCM 10258	<i>Aspergillus clavatus</i> JCM 10080
<i>Aspergillus flavus</i> JCM 2061	<i>Aspergillus conicus</i> JCM 1725
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> JCM 1962	<i>Aspergillus unguis</i> JCM 2256
<i>Aspergillus tamarii</i> JCM 2259	<i>Aspergillus sydowii</i> JCM 2722
<i>Aspergillus ochraceus</i> JCM 10255	<i>Aspergillus penicillitoides</i> JCM 10256
<i>Eurotium amstelodami</i> JCM 1565	<i>Eurotium chevalieri</i> JCM 1568
<i>Eurotium herbariorum</i> JCM 1575	<i>Penicillium expansum</i> JCM 1293
<i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>1)</sup>	<i>Aspergillus niger</i> <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Thirteen strains of *A. fumigatus* were examined, *A. fumigatus* TIMM 2922, TIMM 0108, TIMM 2916, TIMM 2904,

TIMM 2905, TIMM 2906, TIMM 2907, TIMM 2908, TIMM 2909, TIMM 2914, TIMM 2913, TIMM 1776, and *A.*

*fumigatus* var. *fumigatus* JCM 10253.

<sup>2)</sup> Five strains of *A. niger* were examined, *A. niger* JCM 10254, TIMM 0114, TIMM 0115, TIMM 2911, and TIMM

2915.

表5

Table 2. Yeast strains examined by Ampdirect PCR protocol

Strains
<i>Candida albicans</i> ATCC10231, ATCC 90028 030315, and CBS 2747
<i>Candida fukushimaensis</i> Lucy colony M 9/1
<i>Candida guilliermondii</i> TIMM 0257 and TIMM 3400
<i>Clavispora lusitanae</i> TIMM 1667 and TIMM 2941
<i>Pichia anomala</i> TIMM 3420 and TIMM 3826
<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neoformans</i> ATCC 90113 and CN03010902 INOKICHI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763
<i>Saccharomyces pastorianus</i> ATCC 2366
<i>Candida dubliniensis</i> CBS 7987T 2120 and CBS 7988
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 and CBS 138
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018 and ATCC 22019
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 and Lucy colony S 9/1
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258 and TIMM 3404
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> L972h

表6

Table 3. Results of Direct colony PCR (DCPCR) with Ampdirect and Standard PCRs and without lysis steps as compared with the Ampdirect PCR protocol

Fungal species	DCPCR		Ampdirect PCR
	Ampdirect <sup>1)</sup>	Standard <sup>2)</sup>	protocol <sup>3)</sup>
<i>Aspergillus candidus</i> JCM10290	-	-	+
<i>Aspergillus terreus</i> var. <i>terreus</i> JCM10297	+	-	+
<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>nidulans</i> JCM2728	+	-	+
<i>Aspergillus clavatus</i> JCM10980	+	-	+
<i>Aspergillus flavus</i> JCM2061	+	-	+
<i>Aspergillus tamarii</i> JCM2254	+	-	+
<i>Aspergillus niger</i> <sup>4)</sup>	+	-	+
<i>Aspergillus ochraceus</i> JCM10285	+	-	+
<i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>5)</sup>	+	+	+
<i>Aspergillus conica</i> JCM10255	+	-	+
<i>Aspergillus nidulans</i> JCM2722	+	+	+
<i>Aspergillus versicolor</i> JCM10298	+	-	+
<i>Aspergillus penicillioides</i> JCM10256	+	-	+
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> JCM1967	+	-	+
<i>Aspergillus niger</i> JCM2256	+	-	+
<i>Fusarium moniliforme</i> TIMM1294	+	-	+
<i>Eurotium chevalieri</i> JCM1588	+	+	+
<i>Eurotium herbariarum</i> JCM 375	+	-	+
<i>Eurotium amstelredami</i> JCM1544	+	-	+
<i>Penicillium expansum</i> TIMM1293	+	-	+

<sup>1)</sup> Ampdirect DCPCR. <sup>2)</sup> Standard DCPCR. <sup>3)</sup> Ampdirect Levin (AJL) prior to Ampdirect PCR. <sup>4)</sup> Four strains of *A. niger* were examined, *A. niger* TIMM 0114, TIMM 0118, TIMM 2911, and TIMM 2915. <sup>5)</sup> Thirteen strains of *A. fumigatus* were examined, *A. fumigatus* TIMM 2922, TIMM 0108, TIMM 2910, TIMM 2904, TIMM 2905, TIMM 2906, TIMM 2907, TIMM 2908, TIMM 2909, TIMM 2914, TIMM 2913, TIMM 1776, and *A. fumigatus* var. *fumigatus* JCM 10253.

\* None of the *A. fumigatus* strains showed any bands on standard PCR except *A. fumigatus* TIMM1776. (+) Generation of PCR products. (-) Absence of PCR products. The results were confirmed twice.



表7

TABLE 1. (a) Origin and distribution of *Promethes* and yeast-like organism strains

Species	No. of isolates			Origin
	Yeast strains	Reference strains	Clinical isolates	
<i>Promethes zoffii</i>	10	10*		KC80156, KC80177, KC80146, KC80145, KC80150, KC80151, KC80154, KC80155, KC80154
<i>Promethes wickerhamii</i>	4	4*		KC80148, KC80149, KC80144, KC80141
<i>Promethes rugosa</i>	1	1*		KC80141
<i>Candida albicans</i>	1	1 <sup>b</sup>		TD-010234
<i>Candida rugosa</i>	1	1 <sup>b</sup>		TD-01730
<i>Candida guillierii</i>	1	1 <sup>b</sup>		TD-010030
<i>Candida brucei</i>	1	1 <sup>b</sup>		TD-010119
<i>Clavispora spizizenii</i>	1	1 <sup>c</sup>		CE-22
Yeast-like organisms	50		50*	Y01, Y03, Y04, Y05, Y06, Y07, Y08, Y09, Y10, Y11, Y12, Y13, Y14, Y15, Y16, Y17, Y18, Y19, Y20, Y21, Y22, Y23, Y24, Y25, Y26, Y27, Y28, Y29, Y30, Y31, Y32, Y33, Y34, Y35, Y36, Y37, Y38, Y39, Y40, Y41, Y42, Y43, Y44, Y45, Y46, Y47, Y48, Y49, Y50, Y51, Y52
Total	70	20	50	

\* Japan Collection of Microorganisms (JCM, RIKEN Bioresource Centre, Wako, Saitama, Japan)

<sup>b</sup> Tokyo University Institute of Medical Mycology (TUMM, Tokyo, Japan)<sup>c</sup> Eusei Chemicals V12™ (Chionoda Industry Co., Ltd, Tokyo, Japan)<sup>d</sup> Livestock Medical Centre, Aichi Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Association (SA, Aichi, Japan)

表8

(a) Assimilation patterns of reference strains of *Promethes* and 50 clinical isolates

Species	No. of isolates		Carbohydrates							
	Reference strains	Clinical isolates	Glucose	Galactose	DK-(β)Fructose	1-Propanol	Trehalose	Sucrose	Ethanol	Glycerol
<i>Promethes zoffii</i>	10	0	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Promethes wickerhamii</i>	4	0	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Promethes rugosa</i>	1	0	+	-	-	-	-	-	-	-
Yeast-like organisms	0	50	+	-	-	-	-	-	-	-

+, positive assimilation; -, negative assimilation; w, weakly positive assimilation.

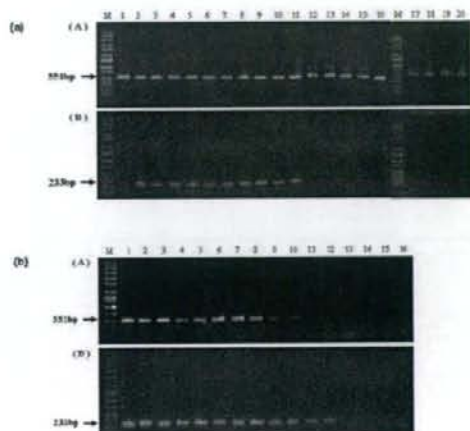
(b) Primers and their nucleotide sequences used in this study

Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Primer pair (5-3)	Expected size (bp)
universal primer			
O18P1	TACGACATCCAGAAAGGCA	O18P1/O18R1	511bp
O18R1	CTTGGCAATGCTTTCCCA		
<i>P. zoffii</i> -specific primer			
18PZ1	ACAATACGTAGCGATCCGAACT	18PZ1/18PZ2	331bp
18PZ2	GCCAGCCAGAGGACCCGAA		

(c) Results of PCR analysis with O18P1/R1 and 18PZ1/R2 primers for reference strains and 50 clinical isolates

Species	Origin	PCR with primer pair			
		O18P1/O18R1 (Yeast PCR)		18PZ1/18PZ2 (yeast PCR)	
		Positive	Negative	Positive	Negative
<i>Promethes zoffii</i>	Reference strains	10	0	10	0
<i>Promethes wickerhamii</i>		1	0	0	1
<i>Promethes rugosa</i>		1	0	0	1
<i>Candida albicans</i>		1	0	0	1
<i>Candida rugosa</i>		1	0	0	1
<i>Candida guillierii</i>		1	0	0	1
<i>Candida brucei</i>		1	0	0	1
<i>Clavispora spizizenii</i>		1	0	0	1
Yeast-like organisms	Clinical isolates	50	0	50	0
Total		67	0	60	7

图 8



厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

分担研究報告書

ホルマリン固定パラフィン切片における *Fusarium* 属および *Histoplasma capsulatum* の検出を目的とした PNA プローブを用いた *In situ* hybridization 法の開発

研究協力者 篠崎 稔<sup>[1]</sup> 中山晴雄<sup>[2]</sup> 大久保陽一郎<sup>[2]</sup>

研究分担者 渋谷和俊<sup>[2]</sup> 東邦大学医学部病院病理学講座 教授

[1]東邦大学医療センター大森病院病理部,

[2]東邦大学医学部病院病理学講座

研究要旨 昨年度まで我々は、病理診断材料、特にホルマリン固定パラフィン切片に観察される病原糸状菌の判別を目的とした *in situ* hybridization (ISH) 法の妥当性を検討してきた。その中で、Peptide Nucleic Acid (PNA) をプローブとした ISH 法の優れた特異性と迅速性に関して報告した。

そこで、本年度はこの PNA をプローブとした ISH 法を組織標本上で *Aspergillus* 属と鑑別を要する糸状菌である *Fusarium* 属、ならびに主要な輸入真菌症のひとつであるヒストプラズマ症の起原菌である *Histoplasma capsulatum* の検出に応用すべく、新たにプローブを設計し、その特異性を中心に検討を行った。

さらに、ISH 法において標的としている rRNA の保存度を評価するため、多くの病原真菌の rRNA を標的とした Panfungal PNA プローブを作製し、材料と手技の評価を目的とした ISH 法を確立した。

#### A. 研究目的

病理組織・細胞診断標本中の菌形態のみで菌種を特定することは困難な場合が少なくない。特に新興病原真菌と呼ばれる *Fusarium* 属の真菌は、組織内における形態学的類似性から *Aspergillus* 属との鑑別は事実上不可能である。また、主要な輸入真菌症のひとつであるヒストプラズマ症の起原菌である *Histoplasma capsulatum* は

組織内における寄生形態などから他の酵母形態を示す真菌との鑑別が困難な場合も少なくない。これらの点を勘案し、われわれは昨年度までの報告において、その有用性が確認された PNA プローブを用いた ISH 法をこれらの菌の検出に応用するため、新規にプローブを設計し、感染動物モデルを中心としたホルマリン固定パラフィン材料において、その特異性の検証を行った。



さらに多くの病原真菌の rRNA を標的とした Panfungal PNA プローブを新たに設計し、rRNA の保存度の評価を目的とした ISH 法を確立した。

## B. 研究方法

### 1) プローブ

Panfungal PNA プローブは 28S rRNA 遺伝子領域から多くの病原真菌に保存性が高い領域を選定し、N 末端に Fluorescein Isothiocyanate (FITC) 標識を施したアンチセンス PNA プローブを作製した。

*Fusarium* 属および *H. capsulatum* PNA プローブは 28S rRNA 遺伝子領域からそれぞれに保存性が高い特異的な領域を選定し、同様に N 末端に FITC 標識を施したアンチセンス PNA プローブを作製した。それぞれの塩基配列を以下に記す。

Panfungal: TACTTGTGCGCTATCGGT

*Fusarium* 属: GATGATCAACCAAGCCCA

*H. capsulatum*: CACACGGGCGAGAC

### 2) ISH 法

ISH 法は昨年度までに我々が構築した DNA プローブを使用した ISH 法のプロトコールに準拠したが、ハイブリダイゼーション前の denature を行わず、ハイブリダイゼーションと洗浄の温度を 56°C に設定した。以後、抗 FITC モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法によりシグナルを検出した。

### 3) 感染動物モデルおよび臨床材料における特異性の検証

Panfungal および *Fusarium* 属 PNA プローブは仮性菌糸を形成した *C. albicans* と 5 種類の糸状菌 (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *F. solani*, *R. oryzae*) 感染マウスを用いて特異性を検証した。*H. capsulatum* PNA プローブでは自施設における自験例 2 例および 2 種類の糸状菌 (*A. fumigatus*, *P. boydii*) と酵母形態を主体とした *C. albicans* の感染マウスを対象とした。

## C. 研究結果

Panfungal PNA プローブの特異性を 6 菌種の感染マウスの肺組織を用いて検討したところ、すべての菌においてその菌体に強い顆粒状のグナルが検出された (図 1)。

図 2 は *P. boydii*, *A. terreus*, *F. solani* の感染マウスの肺組織のホルマリン固定パラフィン切片に対して、上段が Panfungal プローブによる ISH 法、下段が *Fusarium* 属プロローブによる ISH 法を施行した例を示している。Panfungal プローブにおいて強いシグナルが得られていることから、評価可能な rRNA が保存されている事が証明されると同時に、形態学的に鑑別を要する糸状菌における *Fusarium* 属 PNA プローブの有用性が示唆された。

*Fusarium* 属 PNA プローブの特異性を 6 菌種の感染マウスの肺組織を用いて検討したところ、*F. solani* に特異的なシグナルを認めた (図 3)。

*H. capsulatum* PNA プローブの特異性を *A. fumigatus* および *P. boydii* の感染マ

ウスの肺組織と培養にて確認されているヒストプラズマ症患者の骨髄生検のホルマリン固定パラフィン切片において検討した

(図4)。PanfungalプローブによるISH法(図上段)で3種の菌にシグナルが検出された。一方、*H. capsulatum*プローブによるISH法(図下段)においては、*H. capsulatum*の菌体のみシグナルを認められた。

さらに本症例の*H. capsulatum*を、*C. albicans*感染マウスの腎組織で観察される菌体との比較を行った例を示す(図5)。*C. albicans*の26S rRNAを標的としたPNAプローブによるISH法(図上段)において、*C. albicans*にシグナルを認め、*H. capsulatum*プローブによるISH法(図下段)においては*H. capsulatum*にシグナルを認めた。形態学的に類似している菌において、菌種特異的プローブを併用する事で、それぞれの鑑別が可能であった。

今回提示したヒストプラズマ症はHIV陽性のタイ人の男性患者で、培養で確認され、ホルマリン固定パラフィン切片からのITS1領域のシークエンス反応により、*H. capsulatum*に100%の相同性がある事が確認されている。上記のようにホルマリン固定パラフィン切片において*H. capsulatum* PNAプローブによるISH法でシグナルが検出された事から、本プローブの臨床材料における応用が可能であると考えられた(図6)。

#### D. 考察

Panfungal PNAプローブによる材料と手技の評価を目的としたISH法を確立した。我々がISH法において標的としているrRNAは真菌の細胞質に多量に存在する事が想定される。しかし、病理診断で常用されるホルマリン固定パラフィン切片においては、固定、標本作製過程等で、化学的に不安定なRNAは消失する可能性も否定できず、RNAの保存度の検討を行う事は必須の操作と考えている。今回我々が作製したPanfungal PNAプローブは、検討したすべての菌において十分なシグナルが得られ、rRNAの保存度の評価に有用であると考えられた。

*Fusarium*属PNAプローブによるISH法を構築した。感染モデルにおいてその特異性が検証されたことから、臨床検体における応用が期待される。

*H. capsulatum* PNAプローブはヒストプラズマ症患者におけるホルマリン固定パラフィン切片において良好な反応性を示し、臨床応用が可能である事が示唆された。今後さらに、形態学的に鑑別が難しい酵母形態を有する菌における特異性の検証が望まれる。

#### E. 結論

Panfungal、*Fusarium*属、および*H. capsulatum*の28S rRNAを標的としたPNAプローブを新たに設計し、その有用性を検証した。今後、形態学的に鑑別を要する種々の病原真菌に対するPNAをプローブとしたISH法の開発と応用が期待される。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizuiri S, Henmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, Sakai K, Ishikawa Y, **Shibuya K**, Hase H, Aikawa A. Expression of ACE and ACE2 in individuals With Diabetic Kidney Disease and Healthy Controls. *Am J Kidney Dis*, 51(4) (April): 613-23, 2008
2. 谷島 聡、土屋 勝、大塚 由一郎、山崎 有浩、田村 晃、久保田 喜久、鷺沢 尚宏、渡辺 正志、佐藤 真司、**渋谷 和俊**、金子 弘真. 腹腔鏡補助下に切除した小腸 GIST の一例. *臨床と研究*, 85 巻 5 号、87-90、2008
3. 中山晴雄、篠崎 稔、三宅洋子、井手 忠、大久保陽一郎、**渋谷和俊**. 病理組織検査. *Medical Technology*, 36(7): 707-12、2008
4. 谷川佳世子、大久保陽一郎、中山晴雄、長谷川千花子、密田亜希、羽鳥 努、和久井紀貴、土屋 勝、相川 厚、**渋谷和俊**. 胆管炎と間質性腎炎で発症した IgG4 関連硬化性疾患の 1 例. *診断病理*, 25(3)、222-5、2008
5. Hanaoka N, Takano Y, **Shibuya K**, Fugo H, Uehara Y, Niimi M. Identification of the Putative Protein Phosphatase Gene PTCI as a Virulence-Related Gene Using a Silkworm Model of *Canadialbicans* Infection. *Eukaryot Cell*. 7(10): 1640-8, 2008
6. Sugino K, Hasegawa C, Sano G, **Shibuya K**, Homma S. Pathophysiological Study of Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 61(6), 450-3, 2008
7. 篠崎 稔、中山晴雄、**渋谷和俊**. 肺真菌症の新しい病理診断手法. *日胸*, 67 巻 11 号増刊、250-54、2008
8. 磯部和順、岩田基秀、石田文昭、楠木敦平、後町杏子、村松洋子、阪口真之、佐藤大輔、佐野 剛、草野英美子、坂本 晋、高井雄二郎、**渋谷和俊**、本間 栄. マレイン酸メチルエルゴメトリンによる肺胞出血の 1 例. *日呼吸会誌*, 46 (12)、1007-12、2008
9. 大久保陽一郎、中山晴雄、長谷川千花子、密田亜希、羽鳥 努、谷川佳世子、篠崎 稔、**渋谷和俊**. 深在性真菌症の病態と病理組織学的特徴. *日本臨床*, 66(12)、2327-33、2008 (Okubo Y, Nakayama H, Hasegawa C, Mitsuda A, Hatori T, Tanikawa K, Shinozuka M, **Shibuya K**. Pathophysiology of invasive fungal infection in diabetic patients. *Nippon Rinsho*, 66(12), 2327-33, 2008)