

Figure 7. Pathology of crop infected with *C. albicans* CBS 6589 (10^9 CFU / chick), PAS staining

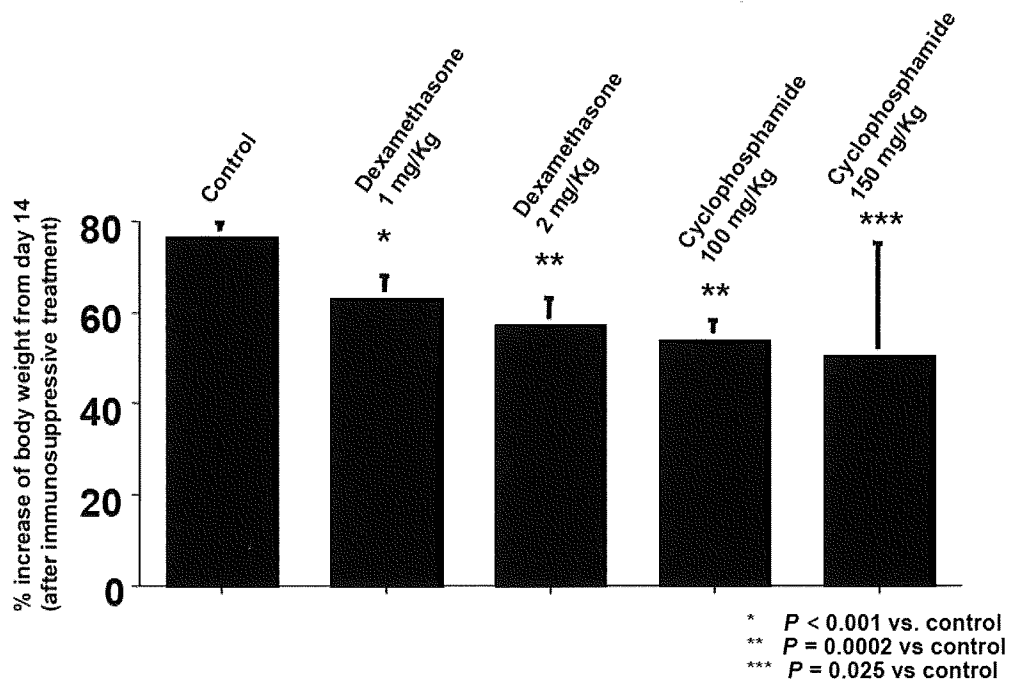


Figure 8. Effect of immunosuppressive treatments body weight of chicks infected with *C. albicans* JICC 60040 (% Δ body weight increase 2 weeks after immunosuppressive treatment)

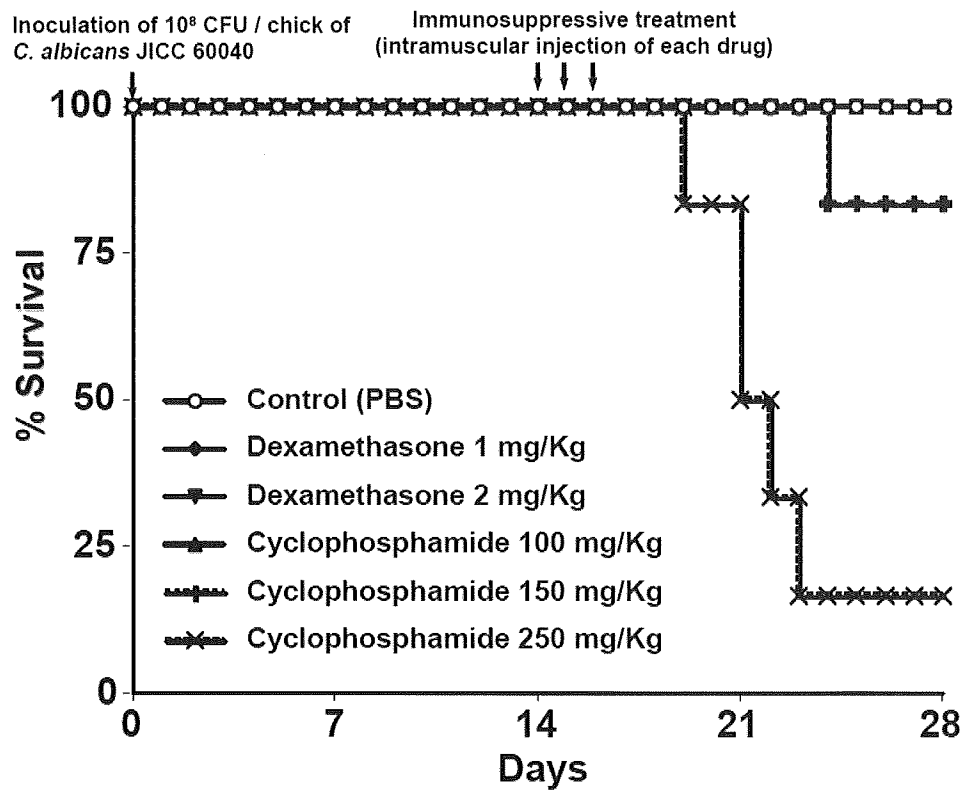


Figure 9. Survival of chicks infected with *C. albicans* JICC 60040 after immunosuppressive treatment

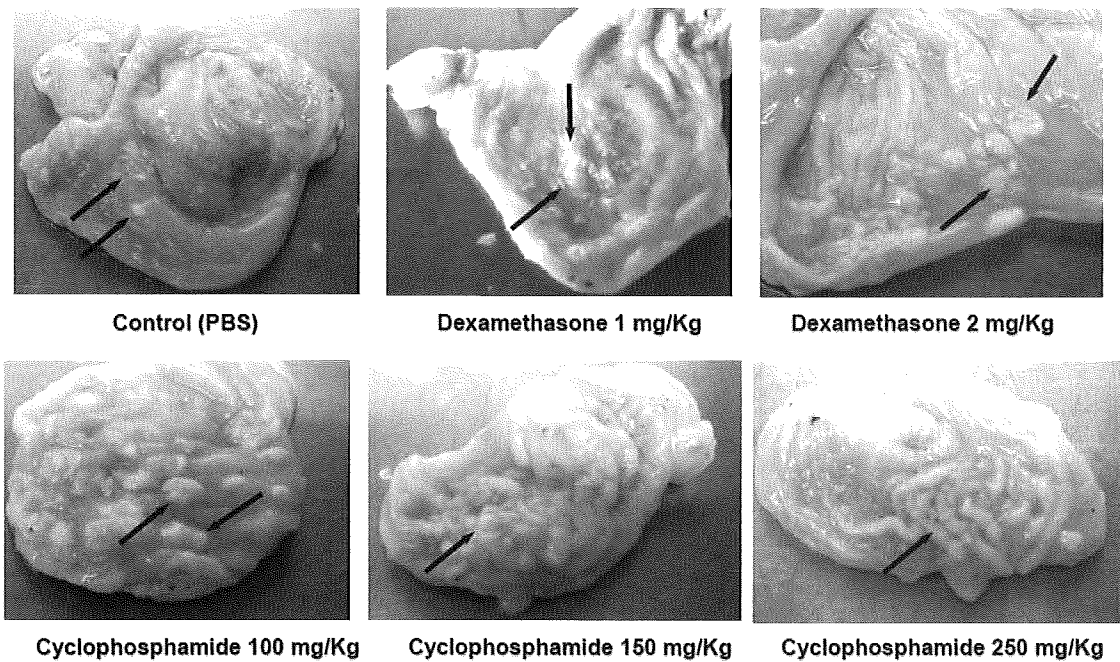


Figure 10. Macrofinding of crop infected with *C. albicans* JICC 60040 2 weeks after each immunosuppressive treatment. Each arrow indicates white plaque (thrush-like) lesion.

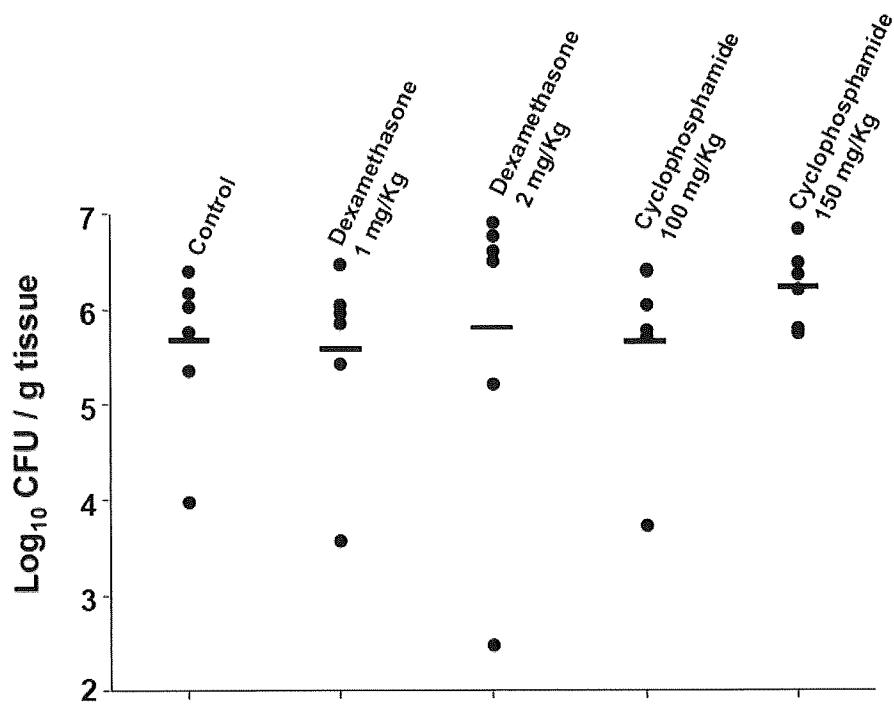


Figure 11. Effect of immunosuppressive treatment for recovery of *Candida* (CFU / g tissue) from crops 4 weeks after infection (2 weeks after immunosuppressive treatment). Each bar indicates mean.

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・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

輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発

研究分担者 榎村浩一 帝京大学医真菌研究センター 准教授

研究要旨

輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法を開発を適切に施行するためには、確定診断に繋がる起因菌の系統解析と新種記載の蓄積に基づいた分離同定を欠かすことはできない。また、その病原性解析に基づいた診断法開発をはじめとした真菌症管理のための基盤的研究としては、起因菌の病原性に関する研究が必須である。そこで、「輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発」のための系統解析と新種記載として、分担研究者が行った「真菌症として扱われる新種プロトテカ藻の記載、およびプロトテカ藻の病原性と診断に関する研究」、ならびに起因菌の病原性に関する研究として、「環境真菌と気道感作・感染の惹起に関する研究」、「接合菌の病原的意義と診断に関する研究」に関する本年度の成果を記載し、本年度の発表業績を以下に報告する。

A. 研究目的

易感染患者の増加等を背景として、真菌症の起因菌（微生物）種は増加の一途にある。従って、これら病原体による感染の迅速診断法を開発し、管理するためには、その分類学的基盤を常に整備し、かつ病原性への関与のあり方を常に評価し続けなくてはならない。そこで本研究では、「輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発」のための系統解析と新種記載として、「真菌症として扱われる新種プロトテカ藻の記載、およびプロトテカ藻の病原性と診断に関する研究」を行った。また起因菌の病原性に関する研究としては、「環境真菌と気道感作・感染の惹起に関する研究」、「接合菌の病原的意義と診断に関する研究」を

施行することによって、真菌の真菌症発症に関わる病原的意義を考察することを目的とした。

B. 研究方法

1. 「真菌症として扱われる新種プロトテカ藻の記載、およびプロトテカ藻の病原性と診断に関する研究」

1) 新種プロトテカ藻の記載：市中病院の検査室において、臨床分離され、表現形質に基づいて *Prototheca wickerhamii* と同定されていた株を再検討し、表現形質および遺伝形質の解析結果から新種と断定し、その記載を行った。

2) *Prototheca wickerhamii* の血液分離株の系統解析：プロトテカ藻の中でも、我が国の研究者によって記載され、

かつ全世界的にも 最も症例数が多い *P. wickerhamii* について、その血液感染例分離株を入手（岐阜大学大学院医学系研究科 大楠 清文 先生ならびに若草第一病院臨床検査課 森友 久美子 先生との共同研究）し、分子系統解析から病原株の遺伝的性状を解析した。

2. 「環境真菌と気道感作・感染の惹起に関する研究」

近年、担子菌ヤケイロタケ *Bjerkandera adusta* の上気道定着と慢性咳嗽との関連が報告され、その診断および治療上の対策が議論されている（済生会金沢病院 小川 晴彦 先生他との共同研究：Journal of Asthma 46:407-12, 2009. ; Journal of Asthma 46:849-55, 2009. ; および Respiratory Medicine 103:1492-7, 2009.）。本菌は、環境中にありふれたキノコ（子実体）であるが、本菌感作による慢性咳嗽の発症には季節性が見られず、冬期の石川県（本菌の子実体は認められない）における初発症例咽頭からも本菌が分離されることから、症例が本菌に曝露する機序が不明であった。そこで、症例分離株を用いて、本菌の浮遊菌体形成能を検討した。

3. 「接合菌の病原的意義と診断に関する研究」

接合菌感染症は、深在性真菌症起因菌として、最もその診断ならびに治療が困難な真菌症である。その起因菌は多様な接合菌であるが、本症の生前診断が困難であることから、臨床分離株の分離も容易ではなく、起因菌レベルにおける病原性の研究並びに感受性試験等は十分なされていない。そこで、帝京大学医真菌研究センターカルチャーコレクション (TIMM) に保存されている臨床分離株を用いることによ

って、吸入（呼吸器）感染原となる分生子（孢子嚢胞子）の感染指標として知られている粒子径を測定し、併せて既存の深在性真菌症を適用にもつ抗真菌薬に対する感受性を検討した。

尚、本研究全般にわたって、ヒューマンサイエンス財団 リサーチ・レジデント 佐藤一朗博士が共同研究者となっている。

C. 研究結果

1. 「真菌症として扱われる新種プロトテカ藻の記載、およびプロトテカ藻の病原性と診断に関する研究」

1) 新種プロトテカ藻の記載：市中病院検査室において *P. wickerhamii* と同定された株は、図1に示す症例から分離されたものである。本症の病理組織像（図2）および培養像（図3, 4）は、*P. wickerhamii* と明らかには矛盾するものではなかったが、やや典型的ではなかったことから、核リボソーム RNA 遺伝子 18S 領域の塩基配列を解析した。その結果、本分離株は *Prototheca* 属の新種であることが樹形図上示された（図5）。そこで、必要な解析を追加し、本株をプロトテカ属の新種 *Prototheca cutis* sp. nov. として記載した (Int J Syst Evol Microbiol. 2009 Aug 7. [Epub ahead of print])。

2) *Prototheca wickerhamii* の血液分離株の系統解析：上述の研究から、国内分離の *P. wickerhamii* には、新種に相当する遺伝的多様性が内在しているものと考え、本藻の血液感染例を含む臨床分離株並びに保存株の分子系統解析を施行した。その結果、すでに DDBJ/EMBL/GenBank 遺伝子データベースに登録されている塩基配列を含めて、*P. wickerhamii* 自体が単系統ではない上に、同一株からも多数の塩基配列が得られる（図6）ことが明らか

となった。

2. 「環境真菌と気道感作・感染の惹起に関する研究」

慢性咳嗽との関連が深いヤケイロタケを、適切な培地に接種後、冬期の屋内あるいは床下等に相当する4°Cから体内に相当する37°Cにわたる温度域の各孵卵器に設置し、子実体形成によらない浮遊菌体（分生子）形成能を観察した。その結界、発育と着生の多寡はあるものの、全ての温度域において本菌は2x5 μm程度の分節型分生子を形成することが示された（図7）。

3. 「接合菌の病原的意義と診断に関する研究」

気道感染時のその本体となる本亜綱に属する各種病原菌分生子（孢子囊胞子を含む）の粒子径を測定した。結果を表1に示す。また、各種本菌の現行抗真菌薬に対する感受性を測定した。結果は、表2、および3に示した。

D. 考察

1. 「真菌症として扱われる新種プロトテカ藻の記載、およびプロトテカ藻の病原性と診断に関する研究」では、従来の同定法では本病原藻の遺伝的多様性を明らかにできないことが示された。本藻の病原的意義とその管理について論じる上でも、一層の病原研究の必要性が明らかである。また、本藻の分類学自体も再検討の余地が大きいことが分子系統解析の結果から示された。併せて同一株内における遺伝的多様性も、その進化および病原性獲得機序を論ずる上において興味深い。

2. 「環境真菌と気道感作・感染の惹起に関する研究」からは、ヤケイロタケによる周年性感作の機序として、本

菌菌系における分節型分生子形成が関与している可能性が示唆された。この分生子粒子径は、咽頭等の上気道に付着し、定着するのに適当な大きさであり、定着部において生育可能な37°C発育可能性が示されている。このことから、本菌をはじめとした担子菌系系状菌が気道に定着し、過敏反応を惹起しうることが明らかとなった。また、実際に微生物検査室において、気道検体から同定不能な菌系の発育はしばしば経験されるが、そのような例の中にも本菌のような担子菌が含まれている可能性があることから、留意が求められる。

3. 「接合菌の病原的意義と診断に関する研究」では、一般に下気道感染を生じると考えられている接合菌の分生子（孢子囊胞子）の粒子径が、菌株によっては5 μmを超え、10 μmにも及ぶことが示された。これは、*Aspergillus fumigatus* の分生子径が2.5 μmに過ぎないことと比べると十分大きいことから、本菌の感染経路が本当に下気道か否かを再検討する必要をも示唆するものである。粒子の下気道到達性については、粒子径のみならず、粒子表面の荷電、疎水性等多種の因子が関与しているものと考えられることから、これら勘案しつつ検討を続ける必要があるものと考えられる。また、抗真菌薬感受性についても、菌株によっては、意外にも現行抗真菌薬に感受性を示すものもあり、治療上の選択肢として考える余地が期待できる。本菌同定の必要性和併せて検討したい。

E. 結論

真菌症対策上、起因菌の分離同定は基本であり、これを整備することによって、まれな「真菌症」であるプロト

テカ症、真菌による気道過敏症である慢性咳嗽、および深在性真菌症としてその対策上最も難渋する接合菌症の何れをとっても、適切な診断および治療に直結する情報提供が可能となることが示された。そのために必要となる、人的・経済的基盤の一層の整備を期待したい。

F. 健康危険情報
ない。

G. 平成21年業績リスト
原著論文 (27報)

- 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*, 54(1):56-59, 2009.
- 2) Koga H, Nanjoh Y, Makimura K, Tsuboi R: In vitro antifungal activities of luliconazole, a new topical imidazole. *Medical Mycology* 47(6):640-647, 2009.
- 3) 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* 47(5):485-494, 2009.
- 4) 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* 62(1): 20-25, 2009.
- 5) 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* 62(2):164-167, 2009.
- 6) 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* 36(4): 202-208, 2009.
- 7) Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K: Is *Bjerkandera adusta* important to fungus-associated chronic cough as an allergen? Eight cases report. *Journal of Asthma* 46(8):849-55, 2009.
- 8) Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K: Efficacy of itraconazole in the treatment of patients with chronic cough whose sputa yield basidiomycetous fungi; fungus-associated chronic cough (FACC) *Journal of Asthma* 46(4):407-12, 2009.
- 9) AlShahni MM, Makimura K, Satoh K, Ishihara Y, Takatori K, Kimura T, Sawada T: A Suggested Pathogenic Role of *Trichosporon montevidense* in a Case of

- Onychomycosis in a Japanese Monkey. *Journal of Veterinary Medical Science* 71(7):983-6, 2009.
- 10) Saito T, Shime N, Itoh K, Fujita N, Saito Y, Shinozaki M, Shibuya K, Makimura K, Hashimoto S: Serum Galactomannan Negative Disseminated Aspergillosis In An Intensive Care Unit; A Case Report. *Infection* 2009, in press.
 - 11) Ebihara M, Makimura K, Sato K, Abe S, , Tsuboi R: Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested PCR based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *British Journal of Dermatology* 161(5):1038-1044, 2009.
 - 12) Sugita T, Suzuki M, Goto S, Nishikawa A, Hiruma M, Yamazaki T, Makimura K: Quantitative analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota in 770 healthy Japanese by age and gender using a real-time PCR assay. *Medical Mycology*. May 21:1-5, 2009.
 - 13) Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K: The importance of basidiomycetous fungi cultured from sputum of chronic idiopathic cough. *Respiratory Medicine* 103(10):1492-7, 2009.
 - 14) Yamamura M, Makimura K, Fujisaki R, Satoh K, Kawakami S, Nishiya H, Ota Y: Polymerase chain reaction assay for specific identification of *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*). *J Infect Chemother*. 15(4):214-8, 2009.
 - 15) Satoh K, Ooe K, Nagayama H, Makimura K: *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009, in press.
 - 16) Yamada T, Makimura K, Hisajima T, Ishihara Y, Umeda Y, Abe S: Enhanced gene replacements in Ku80 disruption mutants of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*. *FEMS Microbiol Lett*. 298(2):208-17, 2009.
 - 17) Kimura M, Udagawa SI, Makimura K, Satoh K, Toyazaki N, Ito H: Isolation and identification of *Rhizomucor pusillus* from pleural zygomycosis in an immunocompetent patient. *Medical Mycology* 47(8): 869-873, 2009.
 - 18) Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K, Ito T, Matsubara K, Hasegawa A, Kamata H: 26S rDNA-based phylogenetic investigation of Japanese cattle-associated *Prototheca zopfii* isolates. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2009, in press.
 - 19) Alshahni M, Makimura K, Yamada T, Takatori K, Sawada T: Nourseothricin acetyltransferase: a new dominant selectable marker for the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. *Medical Mycology* 2009, in press.
 - 20) Miyajima Y, Satoh K, Umeda Y,

- Makimura K: Quantitation of fungal DNA contamination in commercial zymolyase and lyticase used in preparatin of fungi. Japanese Journal of Medical Mycology 50(4): 259-262, 2009.
- 21) 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 an inpatient in a Japanese hospital. Microbiology and Immunology 53(1):41-4, 2009.
- 22) Kaneko T, Shiota R, Shibuya S, Watanabe S, Umeda Y, Takeshita K, Yamamoto M, Nishioka K, Makimura K: Human External Ear Canal as the Specific Reservoir of *Malassezia slooffiae*. Medical Mycology 2009, in press.
- 23) Mirhendi H, Moazeni M, Nikaeen M, Makimura K: Typing of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* Strains by Random Amplification of Polymorphic DNA Analysis Using a Six Primer Set. Shiraz E-Medical Journal 10(4):190-200, 2009.
- 24) 塩田量子、金子孝昌、矢野裕明、武下公子、西岡慶子、榎村浩一: *Malassezia*属真菌の関与が疑われた外耳道炎の検討. 医真菌学会誌 50(2):109-16, 2009.
- 25) 佐藤公美子、海老原睦仁、山崎正視、榎村浩一、安部茂、坪井良治: nested PCR法を用いた爪白癬の菌種同定と治癒判断の試み。東京医科大学雑誌 67(3) : 299-305, 2009.
- 26) 石原晋、中山晴雄、和泉春香、長瀬大輔、藤本吉紀、名取一彦、安藤常治、渋谷和俊、榎村浩一、酒井文和、倉石安庸: 打ち抜き感染 (Breakthrough infection) として発症した侵襲性ムコール症の1剖検例. The Japanese Journal of Antibiotics 62(1):55-62, 2009.
- 27) 山田陽三、岡村明治、西岡五郎、榎村浩一: 長期ステロイド剤外用後に生じた皮膚フサリウム症の一例。日本皮膚科学会雑誌 119(4):797, 2009.
- 総説・著書 (13報)
- 1) 榎村浩一: 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ー. MB Derma 148: 1-5, 2009.
- 2) 榎村浩一: 宇宙: 近未来のヒト生活環境と微生物 (1) - 真菌から見た宇宙におけるヒト生活環境ーウオストークからミールまで. The Chemical Times 211: 22-25, 2009.
- 3) 榎村浩一: 接合菌と接合菌症. Japanese Journal of Antibiotics 62(1): 61-62, 2009.
- 4) 榎村浩一: 治療の進歩 新規抗真菌薬 Annual Review呼吸器 2009 巻: 237-241, 2009.
- 5) 山村麻倫子、榎村浩一: 「呼吸器における薬剤の現状と開発」感染症 抗真菌薬の現状。THE LUNG-perspectives 17(3) : 252-256, 2009.
- 6) 小野崎正修、榎村浩一: 薬剤感受性測定法と耐性菌 2 特殊微生物の抗微生物薬感受性測定法 真菌 : 臨床と微生物 3 6 巻 (増刊号) 596-574, 2009.
- 7) 榎村浩一: 深在性真菌症 起因菌からのアプローチ Medical Q 平

成21年7月20日号

- 8) 川上小夜子、石垣しのぶ、厚川喜子、斧康雄、榎村浩一、宮澤幸久、山口英世：真菌検査法カラーアトラス *Malassezia furfur* に関連した中心静脈カテーテル感染症と微生物学的検査。深在性真菌症：SF1 Forum 5(1)：20-23, 2009.
 - 9) 榎村浩一 第13回クリプトコッカス症 医師から見たズーノーシス 飼い主・動物医療従事者の感染予防のために Journal of Small Animal Medicine 11(6)：84-87, 2009
 - 10) 榎村浩一：新規抗真菌薬Annual Review呼吸器 2009 中外医学社、東京、工藤翔二、土屋了介、金沢実、大田健 編 237-241, 2009.
 - 11) 榎村浩一。真菌症の診断と治療ハリソン内科学 第3版 Part7 感染症 Section 16 真菌および微細藻類感染症 p1304-1306, 2009
 - 12) 榎村浩一。その他の真菌症と微細藻類感染症 ハリソン内科学 第3版 Part7 感染症 Section 16 真菌および微細藻類感染症 p1325-1330, 2009
 - 13) 榎村浩一。 *Pneumocystis* 感染症ハリソン内科学 第3版 Part7 感染症 Section 16 真菌および微細藻類感染症 p1330-1332, 2009
- 口頭発表 (37件)
- 1) 佐藤一朗、山田 剛、榎村浩一、石原由美子、西山彌生、安部 茂：宇宙ステーション内生活環境および乗員の体内外における真菌検出システムの研究開発。真菌症フォーラム 第10回学術集会、ヒルトン名古屋、2009.
 - 2) 佐藤一朗、榎村浩一、西山彌生、山口英世：ヒト外耳道から分離した新規酵母 *Candida auris* sp. nov. . . 第82回日本細菌学会総会、名古屋国際会議場、2009.
 - 3) 山村麻倫子、榎村浩一、藤崎竜一、古賀一郎、西谷 肇、太田康男：PCR法を用いた *Candida guilliemondii* (*Pichia guilliemondii*) 特異的遺伝子同定系の研究。第82回日本細菌学会総会、名古屋国際会議場 2009.
 - 4) 山田 剛、榎村浩一、安部 茂：アグロバクテリウム法を用いた白癬菌遺伝子破壊株の作出。第82回日本細菌学会総会、名古屋国際会議場 2009.
 - 5) 宮嶋良治、佐藤一朗、榎村浩一：粉塵計並びに定量PCRを用いた非培養系による環境真菌計測法の評価。第82回日本細菌学会総会、名古屋国際会議場 2009.
 - 6) 小野崎正修、榎村浩一：Nested PCR を用いた *Prototheca zopfii* 同定法の検討。第82回日本細菌学会総会、名古屋国際会議場 2009.
 - 7) 榎村浩一、佐藤一朗、藤崎竜一、山村麻倫子、宮嶋良治、山田剛、西山彌生、安部茂、石原百合子、梅田宜子 菌体成分の定量による環境および臨床検体における微生物検出系の検討。第82回日本細菌学会総会、名古屋国際会議場 2009.
 - 8) 榎村浩一、佐藤一朗、藤崎竜一、山村麻倫子、宮嶋良治、山田 剛、西山彌生、安部 茂：菌体成分の定量による環境および臨床検体における微生物検出系の検討。第82回日本細菌学会総会、名古屋国際会議場、2009.
 - 9) 山田陽三、岡村明治、西岡五郎、榎村浩一 長期ステロイド剤外用後に生じた皮膚フサリウム症の一例。日本皮膚科学会雑誌 119巻4号 p797 2009. 3
 - 10) Koichi Makimura：Phylogenetic

- analysis and molecular detection and identification of *Prototheca*. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
- 11) Koichi Makimura : Specific detection and identification of fungal DNA using quantitative PCR and loop-mediated isothermal amplification; their advantages and limitations. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, , 2009.
 - 12) Alshahni M, Makimura K, Satoh K, Ishihara Y, Takatori K, Sawada T: Rapid direct colony PCR from fungi by ampdirect plus. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
 - 13) Miyajima Y, Satoh K, Umeda Y, Yamada T, Makimura K: Real-time PCR quantitation of DNA contaminant in recent β -glucanase products used for fungal preparations. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
 - 14) Onozaki M, Makimura K, Satoh K, Hasegawa A: Development of *Prototheca zopfii* detecting system with TaqMan MGB probe and resolight dye. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
 - 15) Moe Asano, Rui Kano, Koichi Makimura, Atsuhiko Hasegawa : Clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and *A. niger* from transplant recipients in Japan. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
 - 16) Yukimi Munechika, Tetsuo Toga, Takahiro Matsumoto, Hiroyasu Koga, Koichi Makimura, Ryoji Tsuboi : Antifungal activity of luliconazole in a guinea pig seborrheic dermatitis model with *Malassezia restricta*. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
 - 17) Hossein Mirhendi, Amir Ghiasian, Nilufar Jalalizand, Mohamadreza Asgary, Mohamad Chadegani Poor, Maiken Cavling Arendrup, Makimura K : Preliminary identification and typing of pathogenic and toxigenic fusarium species based on restriction digestion of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
 - 18) Hossein Mirhendi, Koichi Makimura, Hassan Adin, Maiken Cavling Arendrup, Nilufar Jalalizand, Mohamad Reza Shidfar : Identification of pathogenic yeasts species based on PCR-fragment size polymorphism (PCR-FSP) by using normal agarose gel electrophoresis. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
 - 19) Hossein Mirhendi, Ali Zia, Koichi Makimura, : A new species of the genus *Malassezia* based on the sequence analysis of 26S (D1/D2) and internal transcribed spacer 1 in Ribosomal DNA. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
 - 20) Satoh K, Ooe K, Nagayama H, Makimura K : A newly pathogen of

- protothecosis as a novel achlorophyllic alga isolated from the inflamed skin caused by protothecosis. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
- 21) Makimura K, Satoh K, Yamada T, Nishiyama Y, Abe S, Tsukii Y, Sugita T, Takatori K, Benno Y, Yamazaki T: Development of analyzing system for microbial flora on board International Space Station and astronauts. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
- 22) Tsuyoshi Yamada, Koichi Makimura, Shigeru Abe : Enhanced gene replacements in Ku80 disruption mutants of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
- 23) Mayuko Muro, Sato K, Ebihara M, Koichi Makimura, Shigeru Abe, Tsuboi R : Detection of dermatophytes and nondermatophytes from onychomycosis patients after systemic antifungal treatment: Evaluation of cure by nested PCR. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
- 24) Petr Hamal, Koichi Makimura, Ken Kikuchi, Michaela Tycova, Vladislav Raclavsky, Lenka Ruskova, Lenka Postlerova, Pavel Sauer, Dagmar Koukalova, Hideyo Yamaguchi: Karyotype difference of the Czech and Japanese *Candida glabrata* bloodstream isolates. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
- 25) Alshahni M, Makimura K, Satoh K, Ishihara Y, Takatori K, Kimura T, Sawada T: A case of onychomycosis in a Japanese monkey. The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
- 26) Hideto Sobukawa, Yuji Kishimoto, Rui Kano, Takaaki Ito, Masanobu Onozaki, Koichi Makimura, Kiyoshi Matsubara, Atsuhiki Hasegawa: The International Society for Human and Animal Mycology Tokyo, 2009.
- 27) Koichi Makimura, Kazuo Satoh, Yayoi Nishiyama, Yuuji Tsukii, Takadhi Sugita, Kosuke Takatori, Yoshimi Benno, Takashi Yamazaki: Microbiological research on board International Space Station/ "KIBO" . The 23rd Annual Meeting of the Japanese Society for Biological Sciences in Space. JAXA Tsukuba Space Center October 2, 2009.
- 28) 榎村浩一 Microbes in space. グルカン研究会 東京 2009.
- 29) 榎村浩一 真菌症遺伝子診断のアップデート。第三十回関東医真菌懇話会 2 東京, 2009.
- 30) 榎村浩一 *Cryptococcus* とはどんな真菌か? 第二回関東呼吸器真菌症研究会 経団連会館 東京, 2009.
- 31) 榎村浩一 深在性真菌症と起因菌のアップデート。重症感染症セミナー 熊本大学医学部附属病院, 2009.
- 32) 榎村浩一 病原真菌と健康障害の up to date。第 3 2 6 回八戸地区病院薬剤師会薬学例会 八

- 戸, 2009.
- 33) 榎村浩一 病原真菌と検査法のアップデート。真菌の検査法と病原性に関する研究会 札幌市, 2009.
- 34) Makimura, Koichi Microbe in space. Glucan Workshop 2009 Otemachi Sankei Plaza Sankei Bldg, Tokyo, 2009.
- 35) 榎村浩一 真菌症遺伝子診断のアップデート 第30回関東医真菌懇話会 シンポジウム 東京, 2009.
- 36) 榎村浩一 深在性真菌症と起因菌 第119回山梨臨床検査医学研究会 山梨, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 該当しない。

Case: a 57-year-old (y.o.) male civil service employee.

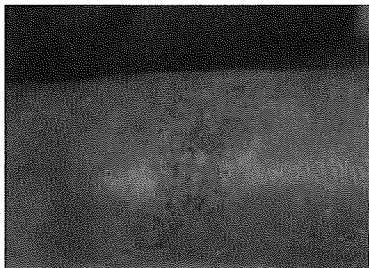
Chief compliance: Left antebrachial ulcer.

History: Psoriasis?(51 – 57 y.o.; treated by prednisolone p.o. 8 – 15 mg/day).

Present history: In April 2008, the patient noticed ulcer formation in his forearm without any injury. The case was suspected to be protothecosis because a yeast-like strain was isolated and identified as *P. wickerhamii* by API20C kit. Typical *Prototheca* cells were observed on histopathological examination but no characteristics of psoriasis were observed. The case was treated by itraconazole (p.o. 200 mg/day) from June.

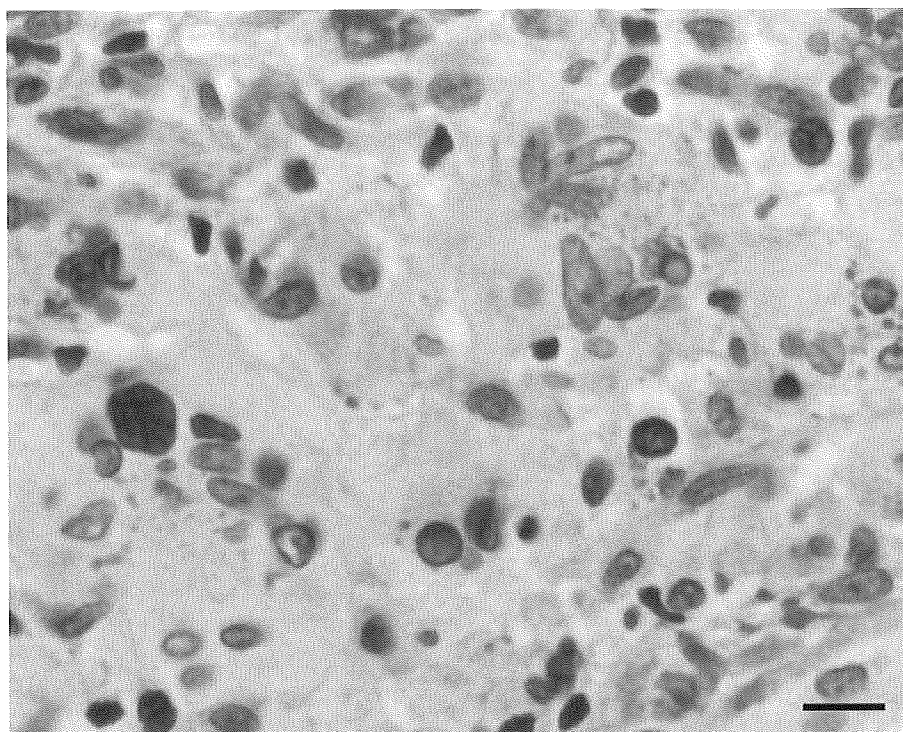
In July, a second biopsy was performed because the dermatitis had improved but rubor and some small abscesses remained. A yeast-like strain (JCM15793) was isolated (and identified as *P. wickerhamii*) again and *Prototheca* cells were still observed.

Continuous treatment with itraconazole induced remission by October 2008.



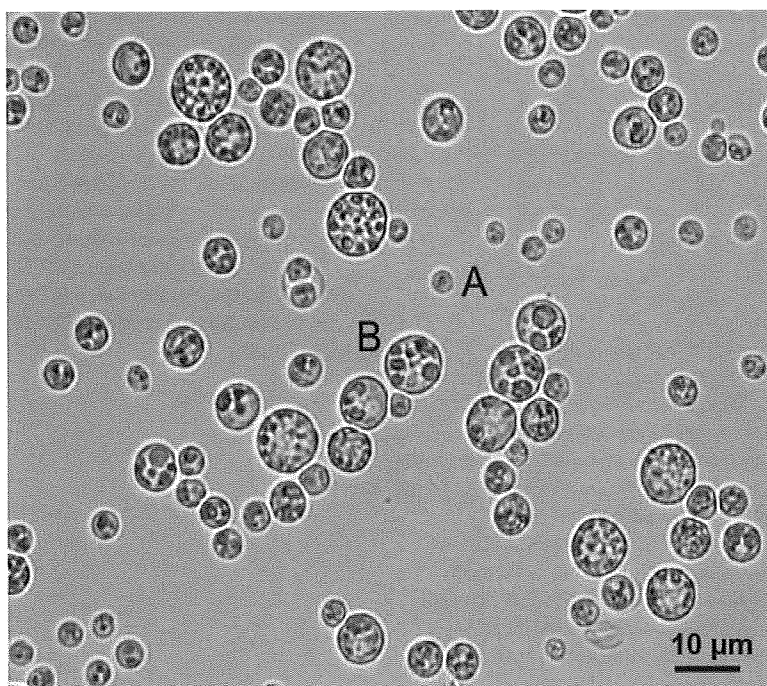
Cellulitis-like dermatitis with ulcer (70 × 25 mm) was observed on the left forearm

図1 臨床分離プロトテカ新種藻の記載1(症例)



Histopathological image of biopsy specimen. The scale bar indicates 10 μ m.

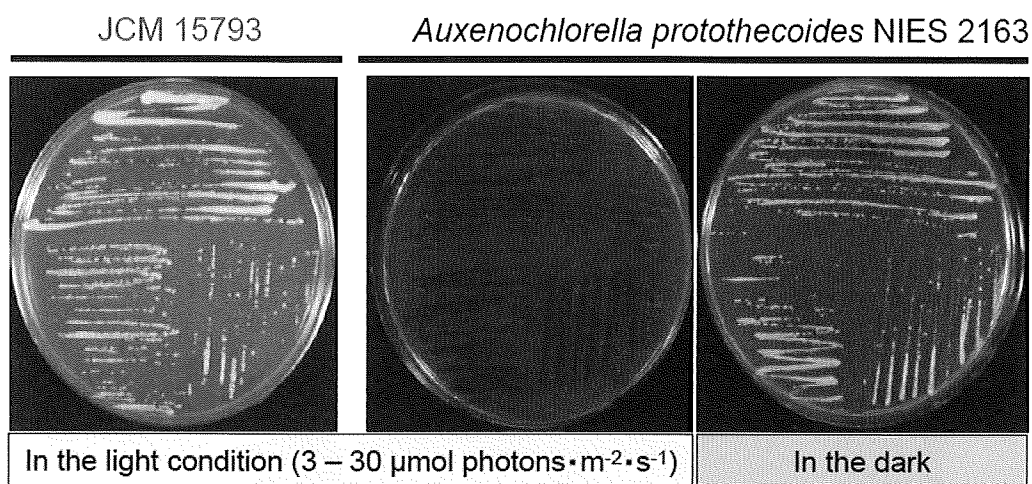
図2 臨床分離プロトテカ新種藻の記載2(病理組織像)



Prototheca cutis JCM 15793. 3 days at 30°C on Sabouraud dextrose agar plates. (A) Sporangia, (B) released sporangiospores.

図3 臨床分離プロトテカ新種藻の記載3(培養顕微鏡像)

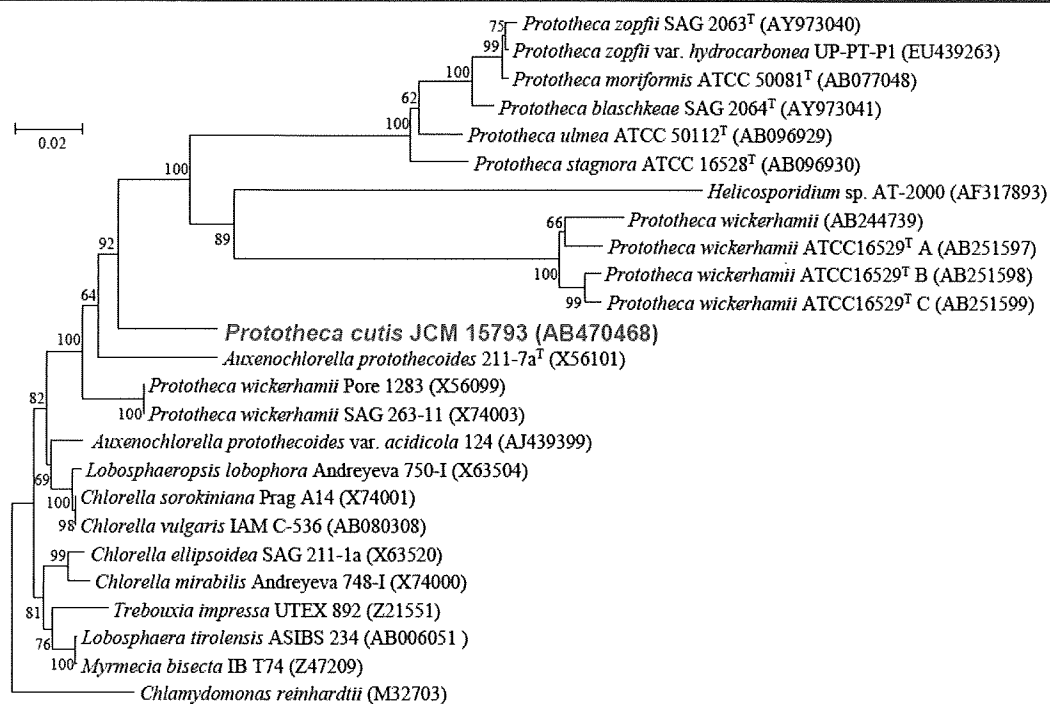
Macroscopic image of the isolates.



Prototheca cutis JCM 15793: The colonies could grow in the light or dark and were white to ivory with no relation to the light or dark growth conditions.
As *Auxenochlorella protothecoides* has chlorophyll, the cultures become green in the light.

図4 臨床分離プロトテカ新種藻の記載4(培養条件)

NJ tree of 18S ribosomal RNA gene



Bootstrap percentages over 60% from 1000 bootstrap replicates are shown. Outgroup: *Chlamydomonas reinhardtii*.

図5 臨床分離プロトテカ新種藻の記載5(分子系統樹)

NJ tree of 18S ribosomal RNA gene and Hot points

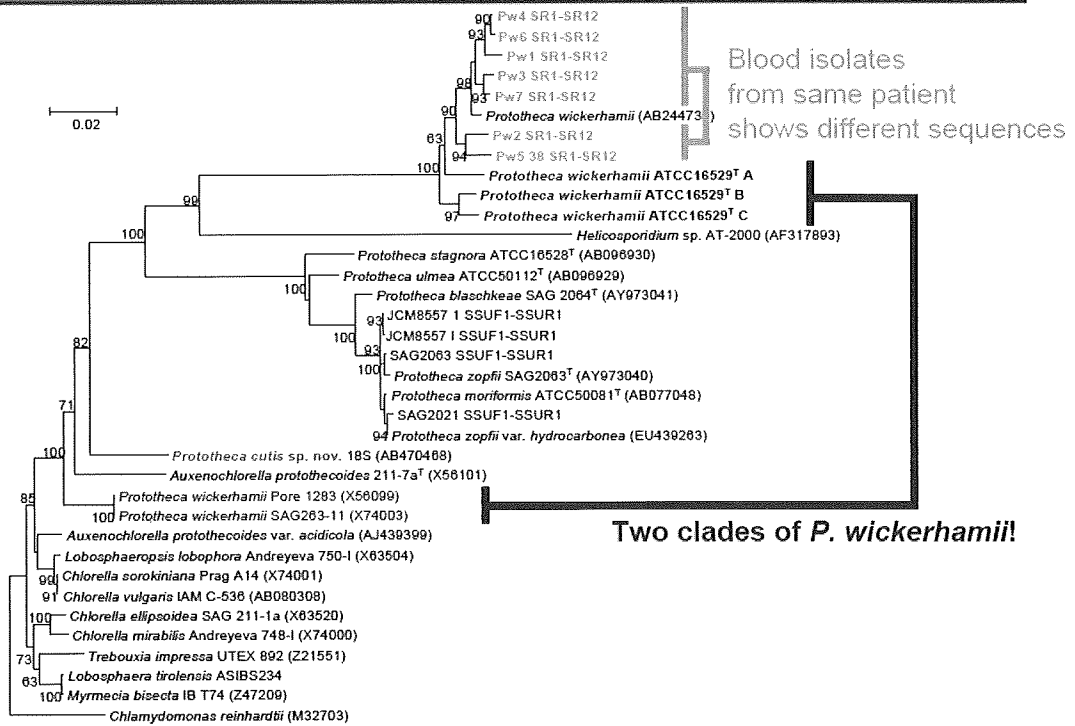


図6 *Prototheca wickerhamii* 標準株および血液分離株の分子系統

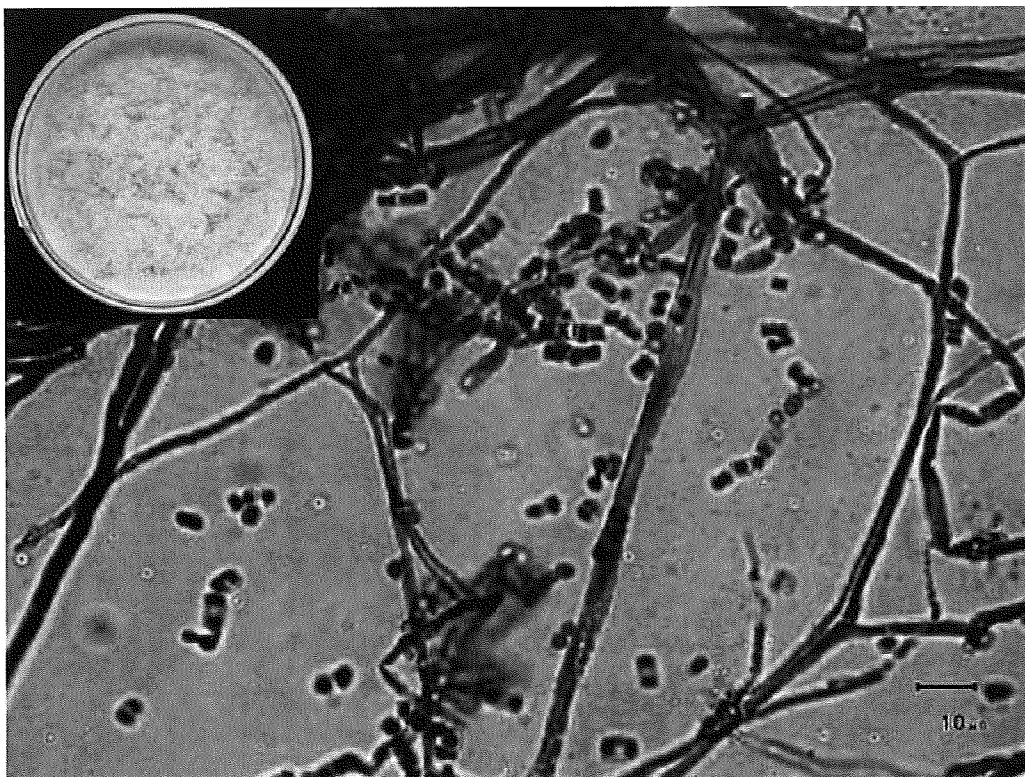


図7 慢性咳嗽の原因となるヤケイロタケ *Bjerkandera adusta* 巨大培養(左上)と分節分生子

表1 各種病原接合菌保存株にみる分生子(孢子嚢胞子)の大きさ

保存記号	TIMM No.	遺伝子同定名	分生子の大きさ(μm)
Ab-2	0002	<i>Actinomucor elegans</i> var. <i>meitauzae</i>	直径:4.5
Ab-1346	3796	<i>Abcidia corymbifera</i>	長径:7.5 短径:5.0
JCM5602	3971	<i>Abcidia corymbifera</i>	直径:3.5
M-c-1	1324	<i>Mucor circinelloides</i>	直径:5.0
M-c-3176	3176	<i>Rhizomucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i>	直径:5.0
M-s-1	1322	<i>Mucor racemosus</i>	長径:10.0 短径:5.0
M-s-2	1323	<i>Mucor racemosus</i>	直径:10.0
M-r-1	1320	<i>Mucor circinelloides</i>	長径:6.25 短径:5.0
R-o-2	1327	<i>Rhizopus oryzae</i>	長径:5.0 短径:2.5
R-o-3181	3181	<i>Rhizopus oryzae</i>	長径:7.5 短径:5.0
R-s-1	1328	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	直径:2.5
R-s-2	1329	<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	直径:2.5
R1	6207	<i>Rhizomucor pusillus</i>	直径:2.5
NBRC6334		<i>Cunninghamella echinulate</i> var. <i>elegans</i>	長径:7.5 短径:5.0
Ishizuka		<i>Rhizopus oryzae</i>	長径:7.5 短径:5.0

表2 各種病原接合菌保存株にみる抗真菌薬感受性1

遺伝子同定名	保存記号	TIMM No.	薬剤感受性希釈濃度								
				ポリコナゾール	アムホテリシンB	フルシトシン	フルコナゾール	イトラコナゾール	ミコナゾール	ミカファンギン	
<i>Rhizopus oryzae</i>	R-o-2	1327	1st	>8	0.5	>64	>64	8	8	>16	
			2nd	>8	0.5	>64	>64	8	4	>16	
	R-o-3181	3181	1st	>8	0.25	>64	>64	4	4	>16	
			2nd	>8	0.5	>64	>64	4	4	>16	
	Ishizuka	—	—	1st	>8	0.5	>64	>64	>8	8	>16
				2nd	>8	0.5	>64	>64	>8	8	>16
<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	R-s-1	1328	1st	0.25	2	>64	>64	0.12	2	>16	
			2nd	0.5	2	>64	>64	0.12	2	>16	
	R-s-2	1329	1st	0.12	2	>64	>64	0.12	1	>16	
			2nd	0.5	2	>64	>64	0.12	1	>16	
<i>Rhizomucor pusillus</i>	R1	6207	1st	—	0.5	>64	>64	1	2	>16	
			2nd	>8	0.25	>64	>64	1	2	>16	
<i>Rhizomucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i>	M-c-3176	3176	1st	>8	0.5	>64	>64	>8	4	>16	
			2nd	>8	0.25	>64	>64	>8	8	>16	

表3 各種病原接合菌保存株にみる抗真菌薬感受性2

遺伝子同定名	保存記号	TIMM No.	MIC							
				ポリコナゾール	アムホテリシンB	フルシトシン	フルコナゾール	イトラコナゾール	ミコナゾール	ミカファンギン
<i>Mucor circinelloides</i>	M-c-1	1324	1st	>8	0.25	>64	>64	8	4	>16
			2nd	>8	0.5	>64	>64	4	4	>16
	M-r-1	1320	1st	>8	0.5	>64	>64	8	4	>16
			2nd	>8	1	>64	>64	>8	4	>16
<i>Mucor racemosus</i>	M-s-1	1322	1st	>8	0.5	>64	>64	2	4	>16
			2nd	>8	0.25	>64	>64	2	8	>16
	M-s-2	1323	1st	>8	0.5	>64	>64	8	8	>16
			2nd	>8	0.25	>64	>64	>8	4	>16
<i>Actinomucor elegans</i> var. <i>meitauzae</i>	Ab-2	0002	1st	>8	0.25	>64	>64	2	8	>16
			2nd	>8	0.5	>64	>64	1	4	>16
<i>Abcidia corymbifera</i>	Ab-1346	3796	1st	8	0.5	>64	>64	1	4	>16
			2nd	>8	0.5	>64	>64	0.5	4	>16
<i>Cunninghamella echinulate</i> var. <i>elegans</i> (登録名)	NBR C6334		1st	>8	2	>64	>64	4	8	>16
			2nd	>8	2	>64	>64	2	4	>16

厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・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」

分担報告書

In situ hybridization 法における制度管理を目的としたアレイブロックの作製と

プローブの特異性に関する検討

研究協力者 篠崎 稔^[1], 中山晴雄^[2], 若山 恵^[1]
研究分担者 渋谷和俊^[2] 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

病理診断材料中に認められる病原真菌の鑑別を目的とした *in situ hybridization* (ISH)法を実際の臨床症例に応用する際には、その手技が適切に行われたかどうかを評価するコントロール実験の実施が必須である。そこで、30 菌種のホルマリン浮遊液から、それらを同一ブロック上に集約して配置させたアレイブロックの作製法を確立し、プローブの特異性を検証した。さらに、ホルマリン固定が PCR 法による核酸の増幅に及ぼす影響を検討した。

アガロースを支持体としたセルブロック作製法は、分散しやすい *Candida* 属をはじめとする浮遊液中の酵母菌を包埋する際、特に有効であった。アレイブロックを用いたプローブの特異性に関する検討においては、これまでの検討と概ね同様の結果が得られた。一部の菌で交差反応を認めたが、その反応は弱く、部分的でプローブの特異性に影響を与えるほどではなかった。さらに、ホルマリンによる固定時間は PCR 法による DNA の増幅に影響する重要な因子であることが分かった。特に増幅産物のサイズが大きいほど顕著にこの傾向が認められた。

アレイブロックを用いたコントロール実験は、今後予定している多数例の解析を前提とした後ろ向き発生動向調査における制度管理に有用であると考えられた。

A. 研究目的

病理組織・細胞診断標本中にみられる病原真菌の鑑別を目的とした ISH 法においては、適切にその手技が施行され、十分な特異性が得られている事を検証するコントロール実験が必須である。

制度管理に関して、昨年度まで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。本年度は、形態学的に鑑別を要すると考えられる 30 菌種を集約して、同一ブロックに整列させて再包埋したコントロールアレイブロックの作製法を検討し、プローブの特異性を確認した。さらに、今後予定している多数例の解析による発生动向調査を実施するに当たり、ホルマリンが解析試料に及ぼす影響を把握する事は重要である。そこで、ホルマリンによる固定時間と PCR 法における遺伝子増幅結果の関連性について検討した。

B. 研究方法

1) コントロールアレイブロックの作製

i) 菌株

病理組織標本上で形態学的に鑑別が問題となる 30 菌種の分離培養菌を実際の病理診断材料を想定して、10%ホルマリンで2日間固定した浮遊液を作製した。この検討に使用した 30 菌種を表 1 に示す (表 1)。

ii) セルブロック作製法

加温溶解した 3%アガロース 50 μ l を病理封入用カバーガラス (18 mm \times 24 mm) 上に盛り上がる様に置き、直ちにホルマリン固定した培養浮遊液 30 μ l をアガロースに注入し、チップの先端で攪拌して菌を懸濁させた。アガロースがゲル化したのち、バイオプシーシートに包み、病理用包埋カセットに入れて、型通りにパラフィン包埋した。一部の糸状菌などピンセットで把持可能な場合はナイロン膜に挟み包埋カセットに入れ、同様にパラフィン包埋した。

iii) アレイブロックの作製

30 菌種が包埋されたパラフィンブロックをドナーブロックとして、一つのブロックに 30 菌種を配置させたアレイブロックを作製した。組織アレイ作製装置 (東屋医科器械, 東京) を使用して内径 2.0mm 径の中空針でドナ