

総 説

Sporothrix schenckii のミトコンドリア DNA 分析

石 崎 宏

金沢医科大学皮膚科学教室

要 旨

Sporothrix schenckii はミトコンドリア DNA の restriction fragment length polymorphism (RFLP) 分析によりこれまで 24 の mtDNA タイプ (Type1~Type24) に分けられ, mtDNA タイプの系統樹により A, B の 2 群に大別された。A 群に属する菌株は南アフリカ, 北米, 中米, 南米に多く, B 群に属する菌株はオーストラリア, 日本, 中国に多い。*S. schenckii* 臨床分離株は全て RFLP 分析により *S. schenckii* と確認されたが, 従来の形態学的方法により同定された自然界分離株では *S. schenckii* は少なく, 多くは *S. schenckii* と似た他種であることが判明した。自然界分離株の同定には分子生物学的検討を要すが, 臨床分離株ではその必要がないことが示された。

Key words: *Sporothrix schenckii*, ミトコンドリア DNA (mitochondrial DNA), 分子疫学 (molecular epidemiology)

はじめに

スポロトリコーシスは本邦の代表的な深在性皮膚真菌症の 1 つである。*Sporothrix schenckii* はスポロトリコーシスの原因菌である。本症は世界的にみられ, 本邦においても症例数は既に 3,000 例を越えると推測される。しかし近年は減少傾向にあり, 年間発症件数は 50 例を下回ると考えられる。

S. schenckii はこれまで主に形態学的特徴により同定されて来たが, これには限界があり, *Ceratocystis* 属の類縁菌などとの鑑別が問題であった。すなわちこれら類縁菌は形態学的性状のみならず, 免疫学的, 化学的性状も *S. schenckii* とよく似ている為, 両者の鑑別の決め手がなかった¹⁻³⁾。

ミトコンドリア DNA 分析

この限界を乗り越えるために, 金沢医科大学皮膚科学教室では 1988 年をはじめミトコンドリア DNA の制限酵素切断パターンにより臨床分離された *S. schenckii* の同定, タイプ分け, 類縁菌との鑑別などを行った⁴⁾。その結果, *S. schenckii* は mtDNA の *HaeIII* による切断パターン (RFLP パターン) の違いにより 12 の mtDNA タイプ (Type 1~Type 12) に分けられ, そのうち本邦の分離株には 11 の mtDNA タイプがあり, また類縁菌である *Ceratocystis stenoceras*, *Sporothrix schenckii* var. *luriei*, *S. curviconia*, *S. inflata* と同 RFLP パターンが異なることが判明し, これまで懸案であった *S. schenckii* と *C. stenoceras* との異同の問題が解決された。すなわち *S. schenckii* は *C. stenoceras* の anamorph ではないことが明らかとなった。

さらに 1991 年, 各 mtDNA タイプの菌株について *HaeIII* 以外の制限酵素 *MspI*, *HindIII*, *BglII*, *XbaI* による RFLP パターンも加えて, Nei & Li の計算法⁵⁾ に基づいて各 mtDNA タイプの塩基置換率を推計し, Fitch & Margoliash の方法⁶⁾ により mtDNA タイプの系統樹を作製した⁷⁾。この系統樹から, *S. schenckii* の mtDNA タイプは A, B の 2 群に大別され, 本邦の大部分の株が B 群に属することが明らかになった。さらに mtDNA タイプと地域との関係を見ると, 本邦は, 1) Type 4, Type 6 の比率が高い関西, 九州地方, 2) Type 5 が多い東海, 関東, 東北地方, 3) Type 1, Type 2 の比率が高い北陸地方に分けられた。この地域的な特徴を解明する為には, さらに本邦, 近隣諸国のみならず広く外国の菌株について検討する必要がある。これまで北米, 中米, 南米, 南アフリカ, オーストラリア, 中国の臨床分離株について検討した成績を発表して来た⁸⁻¹¹⁾。この分子疫学的研究には *S. schenckii* の世界的に分布していることが好都合であった。

これまでの成績のまとめと考按

当教室での現在までの研究成績をまとめると以下の如くなる。

1) *S. schenckii* は 24 の mtDNA タイプ (Types 1~24) に分けられ, さらに A 群 (Types 1-3, 11, 14-19, 22, 23) と B 群 (Types 4-10, 12, 13, 20, 21, 24) の 2 群に大別される。最近, 新たに 6 mtDNA タイプ (Type 25~Type 30) がメキシコ, グアテマラ, コロンビアの菌株で発見されたとする他施設からの報告¹²⁾がある。しかしこの mtDNA タイプの一部はわれわれの既に報告した mtDNA タイプと重なり, 現在検討中である。より対照地域の範囲を広げまた新たな菌株を検討すれば, mtDNA タイプ数は今後も増加すると考えられる。

別刷請求先: 石崎 宏

〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学 1-1
金沢医科大学皮膚科学教室

2) 北米, 中米, 南米, 南アフリカの菌株の多くは A 群に, オーストラリア, 日本, 中国の株の多くは B 群に属する. これまでのところ, A, B 群の菌株が同数程度に入り混じるような地域はない. 南アフリカ以外のアフリカ, 東欧, ロシアを含めたヨーロッパ, 東南アジア諸国の菌株の検討が今後の課題である. そして全世界的な mtDNA タイプ, A, B 群の分布が明らかになるであろう.

3) mtDNA タイプには地域的特徴がある. 前述の本邦の菌株では Type 5 の mtDNA タイプが東海, 関東, 東北地方に圧倒的に多いのが特徴的である. 外国では南アフリカの Type 17, ベネズエラの Type 3 (subtype 3B), コスタリカの Type 14 (subtype 14A), アメリカ合衆国の Type 2 などが挙げられる. この様な特徴は逆に感染地の推測に役立つであろう.

4) Type 3 (A 群), Type 4 (B 群) は世界的に広く分布する. Type 3 は B 群が優勢なオーストラリア, 日本, A 群が優勢な南アメリカ, 中央アメリカで見られ, Type 4 は中国, 日本, オーストラリア, 南アメリカで見られる. 系統樹からこの 2 つの mtDNA タイプは A, B 群の祖先型かあるいはそれに近いのではなからうか.

5) A 群に属する mtDNA タイプ間の遺伝的距離は長い, B 群に属するそれは短い. A 群の mtDNA タイプの菌株は分岐後長い時間を経ているが, B 群のそれは A 群に比べて時間が短い, すなわち A 群の菌株は B 群の菌株に比べて古いと推測される. 以上より推測が許されるならば, パングアと呼ばれた超大陸で A 群の Type 3 から B 群の Type 4 が分岐し, Type 4 は大陸移動とともに東方に, すなわちアジア方面に分布するとともに更に分岐し現在の分布に至ったと考える. そしてこの推測が正しければ, インド, 東南アジアの菌株も B 群に属するであろう.

mtDNA 分析の妥当性

mtDNA 分析による *S. schenckii* の同定, タイプ分け, 系統樹に基づくグループ分けの妥当性を証明する為には, 同じ菌株について更に他の分子生物学的方法で検討する必要がある.

Tateishi¹³⁾ は, *S. schenckii* を Pulsed-Field Gel Electrophoresis による karyotype 分析で 2 群に分けた. すなわち本邦分離株の大部分は第 1 のグループ, 米国, その他の外国の分離株は第 2 のグループに属した. そして 2 種の異なった計算方法により作成された系統樹で, いずれも同様の結果が得られている. このグループ分けは当教室の mtDNA 分析によるそれとよく合致している.

Sugita¹⁴⁾ は各 mtDNA タイプの *S. schenckii* 株について membrane transporter gene 分析を行い, *S. schenckii* を a, b, c の 3 群に分けた. そのうち b, c の 2 群の菌株は mtDNA 分析の A 群に, a 群の菌株は同じく B 群に属することが判明し, この結果は mtDNA 分析の結果とよく合致している.

渡辺ら¹⁵⁾ は各ミトコンドリア DNA タイプの菌株につ

いて ITS 領域のリボゾーム DNA の RFLP パターンを検討した. その結果 *HaeII*, *ApaI*, *NlaIII* でいずれも 2 つのパターンを示し, 2 群に分けられた. この 2 群は mtDNA 分析による A, B の 2 群と合致した.

以上の異なった手法による 3 種の分析結果はいずれも mtDNA 分析に基づく結果と矛盾しないことより, mtDNA 分析によるタイプ分け, グループ分けの妥当性が証明されたと考える.

自然界分離の *S. schenckii*

S. schenckii は自然界に生存している. この菌が外傷を通して皮膚に入り, スポロトリコーシスを発症することより, スポロトリコーシスの疫学的研究には, 自然界の *S. schenckii* を調査・検討する必要がある.

S. schenckii の同定は臨床分離株, 自然界分離株を問わず, その形態学的特徴に基づいてなされて来た. 中国での自然界分離 25 株の mtDNA 分析の結果では, 真の *S. schenckii* は 25 株中 6 株のみで, 他の 19 株は *S. schenckii* とは異なることが判明している¹⁶⁾. すなわちこの 19 株 (non-*S. schenckii*) は形態学的には *S. schenckii* とは区別出来ないが, 分子生物学的方法では区別が可能であった. また non-*S. schenckii* 株は血清反応, 皮内反応ともに *S. schenckii* と交互反応を示し, 化学的性状においても *S. schenckii* と似ている¹⁶⁾. さらに自然界分類のオーストラリアの 2 株, 南アフリカの 3 株も *S. schenckii* ではなかった¹⁷⁾. 以上より, 自然界分離の *S. schenckii* 株については, 分子生物学的な再確認が必要である.

一方, 臨床分離株で形態学的に *S. schenckii* と同定されたものは, これ迄のところ, 全て *S. schenckii* であることが分子生物学的にも確認されている. このことは臨床分離株については, 形態学的方法による同定のみでよいことを示唆している. 菌株が人体を通過すること, すなわち感染を通して非病原性の non-*S. schenckii* が除かれ, 病原性のある *S. schenckii* 菌株のみが病巣から分離されるであろう.

本邦では中原¹⁸⁾ は 1312 土壌サンプルより *S. schenckii* に *S. schenckii* と思われる 98 株を分離し, そのうち形態学的, 生物学性状がきわめて *S. schenckii* に類似する菌を 5 株得ている. そしてこの 5 株中の 2 株を人体接種し, 1 株で潰瘍形成をみている. この 1 株は当教室の分析により Type 6 と判明した. 中原の報告は土壌中には *S. schenckii* に類似した菌種の菌数は多いが, 真の *S. schenckii* の菌数は少ないことを示唆している.

文 献

- 1) Taylor JJ: A comparison of some *Ceratocystis* species with *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* 42: 233-240, 1970.
- 2) Ishizaki H, Nakamura Y, Kariya H, Iwatsu T, Wheat R: Delayed hypersensitivity cross-reactions between *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis* species in sporotrichotic patients. *J Clin Microbiol* 3: 545-547, 1976.
- 3) Ishizaki H, Wheat RW, Kiel DP, Conant NF: Serological

- cross-reactivity among *Sporothrix schenckii*, *Ceratocystis*, *Europhium*, and *Graphium* species. *Infect Immun* **21**: 585-593, 1978.
- 4) Suzuki K, Kawasaki M, Ishizaki H: Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. *Mycopathologia* **103**: 147-151, 1988.
 - 5) Nei M, Li WH: Mathematical model for studying genetic variation in items of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 5259-5273, 1979.
 - 6) Fitch WM, Margoliash E: Construction of phylogenetic trees. *Science* **155**: 279-284, 1967.
 - 7) Takeda Y, Kawasaki M, Ishizaki H: Phylogeny and molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in Japan. *Mycopathologia* **116**: 9-14, 1991.
 - 8) Ishizaki H, Kawasaki M, Aoki M, Miyaji M, Nishimura K, Fernandez JAG: Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in Costa Rica. *J Med Mycol* **34**: 71-73, 1996.
 - 9) Ishizaki H, Kawasaki M, Aoki M, Matsumoto T, Padhye AA, Mendoza M, Negróni R: Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. *Mycopathologia* **142**: 115-118, 1998.
 - 10) Lin J, Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, You G, Li R: Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* clinical isolates from China. *Mycopathologia* **148**: 69-72, 1999.
 - 11) Ishizaki H, Kawasaki M, Aoki M, Vismer H, Muir D: Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in South Africa and Australia. *Med Mycol* **38**: 433-436, 2000.
 - 12) Mora-Cabrera M, Alonso RA, Ullor-Arvizu R, Torres-Guerrero H: Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii*. *Med Mycol* **39**: 439-444, 2001.
 - 13) Tateishi T, Murayama Y, Otsuka F, Yamaguchi H: Karyotype analysis in *Sporothrix schenckii*. In *Genes and Genomes in Medically Important Fungi*. (Tanaka K, Yamaguchi H, Magee PT-ed) 69-74, Tokyo, 1995. The Proceedings of the First International Symposium on Deep Mycosis.
 - 14) Sugita Y: Molecular analysis of DNA polymorphism of *Sporothrix schenckii*. *真菌誌* **41**: 11-15, 2000.
 - 15) 渡邊晴二, 河崎昌子, 望月 隆, 石崎 宏: *Sporothrix schenckii* の ITS 領域の制限酵素分析. *日皮会誌* **112**: 723, 2002.
 - 16) Ishizaki H, Kawasaki M, Mochizuki T, Jin XZ, Kagawa S: Environmental isolates of *Sporothrix schenckii* in China. *真菌誌* **43**: 257-260, 2002.
 - 17) 石崎 宏, 河崎昌子: *Sporothrix schenckii* の分子疫学. *真菌誌* **41**: 545-549, 2000.
 - 18) 中原哲士: 土壌より分離した *Sporothrix schenckii* についての研究. *真菌誌* **12**: 30-46, 1971.

Mitochondrial DNA Analysis of *Sporothrix schenckii*

Hiroshi Ishizaki

Department of Dermatology, Kanazawa Medical University
Uchinada, Ishikawa, 920-0293, Japan

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in mitochondrial DNA (mtDNA) of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii* was investigated.

Isolates of *S. schenckii* were classified into 24 mtDNA types (Types 1-24) based on mtDNA RFLP patterns with *HaeIII* and clustered into two major groups by phylogeny, Group A and Group B. Group A isolates are predominant in South Africa, North America, Central America and South America, while Group B isolates are predominant in Australia, Japan and China.

Based on the mtDNA-RFLP patterns with *HaeIII*, most environmental isolates morphologically identified as *S. schenckii* were confirmed to be species distinct from *S. schenckii* and *S. schenckii* isolates were few, while all of more than 500 clinical isolates were confirmed as *S. schenckii*. Therefore, RFLP analysis of mtDNA is essential for the identification of environmental, but not clinical isolates of *S. schenckii*.