

教育シンポジウム 5

分子生物学的真菌検査法

望 月 隆

金沢医科大学環境皮膚科学部門

要 約

近年、分子生物学的手法が酵母状真菌だけでなく、比較的明瞭な形態学的特徴を示す糸状菌に対しても検査法として用いられるようになってきた。本稿では分子生物学の検査法の原理ならびに、実用例として皮膚糸状菌（白癬菌）の迅速同定に有用な ribosomal RNA 遺伝子を用いた制限酵素分析法（restriction fragment length polymorphisms, RFLP），ならびに応用例として現在感染が拡大している *Trichophyton tonsurans* 感染症の分離株についての分子疫学的検討について解説した。

はじめに

皮膚科の受診患者の約 2 割を占める皮膚真菌症は、病巣から病原真菌を検出してはじめて診断が確定する。しかし、診療の現場では真菌症が疑われても菌が見つからない、菌要素が KOH 直接法で見つかっても培養ができない、培養ができて菌種の同定ができない、あるいは分離菌が病原菌か否か判然としない、という問題がしばしば生じている。分子生物学的方法は、元来は従来の真菌検査の後方支援の手技に他ならず、診断をいかに正確に、簡素に付けるか、が応用のスタートになっていたが、最近では使用する分子の種類、方法によっては疫学研究などに新しい展開、発展が見られる。本稿では分子生物学の検査の原理、ならびに実用例、応用例として、皮膚糸状菌（白癬菌）の迅速同定に有用な ribosomal RNA 遺伝子を用いた制限酵素分析法（restriction fragment length polymorphisms, RFLP），ならびに、現在広く感染が拡大している *T. tonsurans* 感染症からの分離株について分子マーカーによる疫学的解析を行った結果を紹介する。

分子生物学的検査法の原理

糸状菌の種の記載は培養に基づく形質をもとに行われている。これは分子生物学の発展した現在でも白癬菌においては基本的には変わらない。しかし近年分子生物学の進歩にともないミトコンドリア DNA¹⁾、リボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) の internal transcribed spacer (ITS) 領域²⁾、chitin synthase I 遺伝子³⁾ や topoisomerase II 遺伝子⁴⁾ などの分子を用いたクラスター解析、系統進化の解明が進んだ。その中で培養形態や交配試験など培養法を基礎にした白癬菌の種の枠組みと分子解析の所見が、複

数の分子マーカーを用いても多くの場合一致する事が確かめられ、これが確かめられた分子マーカーは種の同定の参考にできることが明らかにされた。最近ではさらに進んで分子生物学的所見で菌種を記述しようとする立場がある。今後形態学的、交配試験による生物学的種との間に整合性が図られると、分子生物学的所見を基準に同定が行われる事になるが、未だ合意には至っていない。

どのような場合に分子生物学的検査が行われるか

皮膚真菌症の診断は浅在性、深在性に関わらず臨床検体から菌を検出し、そして分離された菌を同定する事で確定する。このうち、検体からの菌が顕微鏡で検出しにくい場合、菌種を迅速に知りたいとき、また分離された菌の形態から菌種の同定ができないとき、さらには交配試験の特徴をもって記載された菌の同定に際して交配能力が確認できない場合など、各種の分子生物学的検査が用いられる。また菌の培養が不成功であっても検体から直接 DNA を抽出し、分子マーカーを用いる事で種の同定が可能である例が知られてきた。

実用例 (図 1, 2)

皮膚糸状菌の菌種の同定に有用な rDNA の ITS 領域の RFLP について解説する。ITS 領域は比較的多くの変異が蓄積された領域であるので、近縁の菌種間の鑑別に有用である²⁾。本来はこの領域の塩基配列を決定するのがよいが、経済性、利便性からこれの簡便法である RFLP が用いられる。白癬菌では制限酵素 *Mva* I, *Hinf* I の組み合わせで臨床検体から高頻度に分離される 10 余の taxa を明瞭に鑑別できる⁵⁾。まず少量の菌体から mini-prep 法で抽出した全細胞 DNA を PCR の鋳型とし、rDNA の ITS 領域を含む DNA 断片を PCR で増幅する。これを制限酵素で消化し、電気泳動法で切断パターンを観察する。この PCR-RFLP 法は手技が単純で、培地上に発育したコロニーから数時間で泳動パターンが得られるので、迅速同定や多数の菌株の処理に有用である^{5, 6)}。

この方法はさらに爪、鱗屑などの病的組織⁷⁾、あるいはパラフィン切片⁸⁾ から直接 DNA を抽出し、培養を経ずに原因菌を判定する手法に道を開いた。特に爪では平均の培養陽性率は 20-30% 程度にすぎず、また検体が溶けにくいと、KOH 直接鏡検法さえ陰性に終わる事が稀ではない。このような例でも高率に菌由来の DNA が検出される事が報告されている。しかし、病巣からの非

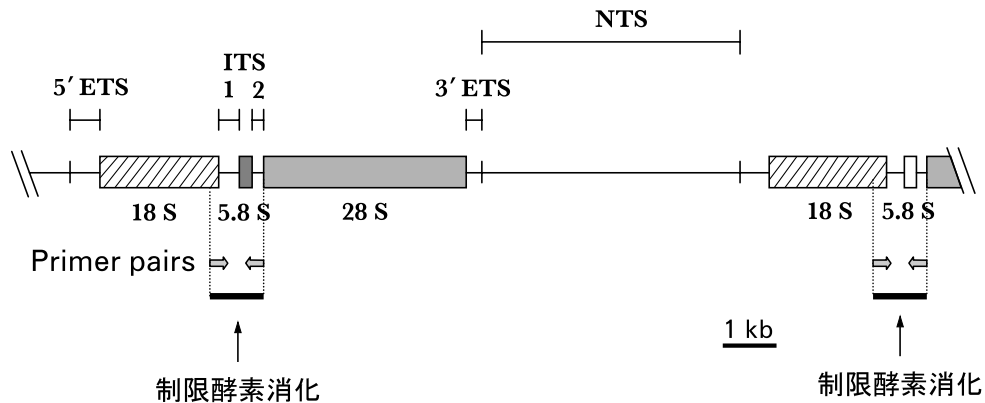


図1. 白癬菌のリボソーム RNA 遺伝子と分子マーカーとしての応用

菌種間でリボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域の塩基配列に差がある事が知られているので、分離菌がどのような塩基配列を持つかを解析し、データベースに参照することで菌種を絞り込める。簡便法では制限酵素パターンを観察する。

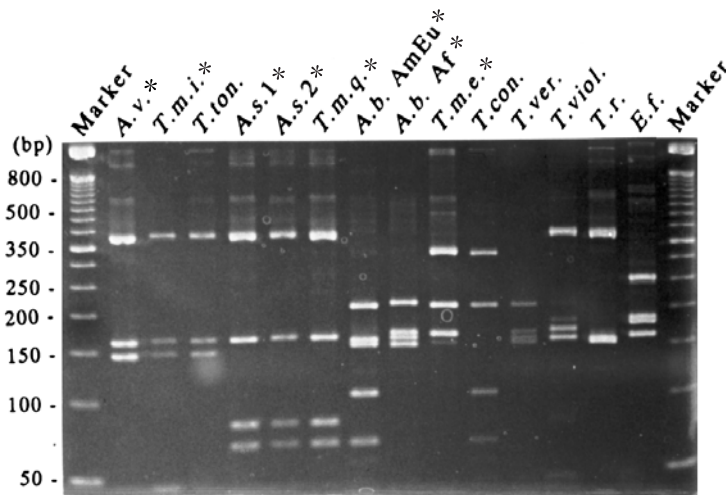


図2. 白癬菌のリボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域の制限酵素パターン

制限酵素 *Hinf* I で消化した主要白癬菌の泳動パターン。*で示す *Trichophyton mentagrophytes* 関連の 8 taxa は形態上類似するが5つの分子型に分けられる。文献5)より引用。A. v.: *Arthroderma vanbreuseghemii*, T. m. i.: *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, T. ton.: *T. tonsurans*, A. s.: *A. simii*, T. m. q.: *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*, A. b. AmEu: *A. benhamiae*, Americano-European race, A. b. Af: *A. benhamiae*, African race, T. m. e.: *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, T. con.: *T. concentricum*, T. ver.: *T. verrucosum*, T. viol.: *T. violaceum*, T. r.: *T. rubrum*, E. f.: *Epidermophyton floccosum*.

培養系の DNA の検出は感度が敏感であるため、真の病原菌以外の菌に由来する DNA を検出する危険に留意する必要がある。なお同様の方法が *Fonsecaea pedrosoi*⁹⁾, *Sporothrix schenckii*¹⁰⁾ について開発されている。

応用例

さらに多くの変異を蓄積した分子を用いると種内の株間の鑑別が可能になり、疫学的検討に応用できると予想される。このような分子として rDNA の non-transcribed spacer (NTS) 領域が有望である¹¹⁾。われわれは NTS 領域の RFLP により、*T. tonsurans* の国内分離株について分子疫学的検討を試みた¹²⁾。その結果、本邦分離株には NTS I-VI の 6 つの分子型が認められること、格闘技競技者からの分離株は NTS I, II, III の 3 型が検出されるこ

と、本邦の高齢者の散発例からは NTSIV 型が分離されることが明らかになった。この結果は、格闘技の集団発生には本邦に古くから分布していたと考えられる NTSIV 型は関与せず、数次にわたって国外から持ち込まれた菌が感染、拡散した輸入感染症であることを強く示唆するものである。

最後に

分子生物学的方法は、形態学的に典型でない菌株までも迅速、正確に同定できるためにきわめて有用である。しかし、真菌症診断の基本になるのはあくまでも KOH 直接鏡検法や培養法であり、分子生物学的方法はそれを補完する意味合いが強い。今後は非培養系による菌種レベルの同定や種内変異の検討が広く応用されるなど、分

子生物学ならではの病原真菌学の展開が大いに期待される。しかし、適応と限界を認識して、目的にかなった分子マーカーを選択する必要がある。

文 献

- 1) Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H: Phylogenetic relationships of some *Microsporum* and *Arthroderma* species inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia* **130**: 11-21, 1995.
- 2) Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H: Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol* **36**: 2629-2633, 1998.
- 3) Kano R, Nakamura Y, Watari T, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H, Hasegawa H: Phylogenetic analysis of 8 dermatophyte species using chitin synthase 1 gene sequences. *Mycoses* **40**: 411-414, 1997.
- 4) Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Fujihiro M, Kikuchi A: PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. *J Derm Sci* **32**: 151-161, 2003.
- 5) Mochizuki T, Tanabe H, Kawasaki M, Ishizaki H, Jackson CJ: Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by PCR-RFLP analysis of ribosomal DNA regions. *J Dermatol Sci* **32**: 25-32, 2003.
- 6) 望月 隆, 田邊 洋, 河崎昌子, 安澤数史, 石崎 宏: リボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域の分子型に基づく皮膚糸状菌の菌種同定の実績. *日皮会誌* **114**: 1763-1767, 2004.
- 7) 吉村理枝子, 伊藤弥生, 森下宣明, 二宮淳也, 滝内石夫: 爪白癬からの起因菌同定における培養法と PCR-RFLP 法の比較検討. *真菌誌* **47**: 11-14, 2006.
- 8) Nagao K, Sugita T, Ouchi T, Nishikawa T: Identification of *Trichophyton rubrum* by nested PCR analysis from paraffin embedded specimen in trichophytia profunda acuta of the glabrous skin. *Jpn J Med Mycol* **46**: 129-132, 2005.
- 9) Tanabe H, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H: Species identification and strain typing of *Fonsecaea pedrosoi* using ribosomal RNA gene internal transcribed spacer regions. *Jpn J Med Mycol* **45**: 105-112, 2004.
- 10) Watanabe S, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H: RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. *Jpn J Med Mycol* **45**: 165-175, 2004.
- 11) Jackson CJ, Mochizuki T, Barton RC: PCR fingerprinting of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* using polymorphic subrepeat loci in the rDNA nontranscribed spacer. *J Med Microbiol* **55**: 1349-1355, 2006.
- 12) Mochizuki T, Kawasaki M, Tanabe H, Anzawa K, Ishizaki H, Choi JS: Molecular epidemiology of *Trichophyton tonsurans* isolated in Japan using RFLP analysis of non-transcribed spacer regions of ribosomal RNA genes. *Jpn J Infect Dis* (in press).