

総 説

日和見感染症および夏型過敏性肺炎の原因菌種としての

Trichosporon asahii の多様性解明

杉 田 隆

明治薬科大学微生物学教室

要 旨

深在性トリコスポロン症は担子菌系不完全酵母 *Trichosporon asahii* を主要起因菌として発症する予後不良な日和見真菌感染症の一つである。また、*T. asahii* は土壌等の環境中にも広く存在し、環境中から飛散した菌株が家屋で定着・増殖し、それを反復吸入することによって発症する夏型過敏性肺炎 (SHP) の主要原因抗原でもある。本研究では、両疾患に関与する *T. asahii* の微生物学的な多様性を検討した。様々な分離源由来の *T. asahii* について RAPD 解析を行ない UPGMA フェノグラムを作成した。臨床分離株間の類似度 (matching coefficient) は、90%以上を示し、互いにクラスターを形成したが、SHP 株および環境分離株は単独のクラスターを形成せず両者が混在していた。生化学的性状からも同様にフェノグラムを作成したところ、環境分離株のみが単独のクラスターを形成した。さらに RAPD バンドの DNA 塩基配列を詳細に解析したところ、臨床分離株および SHP 株には共通するが環境分離株には存在しない DNA 断片を見出した。以上のことから、*T. asahii* を起因菌とする深在性トリコスポロン症および夏型過敏性肺炎の両疾患は、それぞれ異なる遺伝子型株に支配されていること、また、環境中に存在するすべての菌株が夏型過敏性肺炎に関与するのではなく、一定の選択を受けた菌株のみがその発症に関与している可能性が明らかにされた。また、分子疫学的な見地から深在性トリコスポロン症患者由来株の rRNA 遺伝子中の 26S と 5S の間に位置する IGS (intergenic spacer) 領域の DNA 塩基配列を解析した。本領域は著しい種内変異を有し、地域特異性を示したことから新しい分子疫学ツールとして有用である。

Key words: トリコスポロン アサヒ (*Trichosporon asahii*), トリコスポロン症 (trichosporonosis), 夏型過敏性肺炎 (summer-type hypersensitivity pneumonitis), 多様性 (diversity)

はじめに

Trichosporon は、分節型分生子の産生を特徴とする担子菌系不完全酵母である。現在のところ Fig. 1 に示す 27 菌種が記載されているが、未発表を含めると少なくとも 30 菌種以上が存在する。*Trichosporon* を起因菌とする深在性トリコスポロン症は、アムホテリシン B に対しても低感受性を示す極めて予後不良な日和見真菌感染症の一つである¹⁻³⁾。従来、トリコスポロン症の起因菌は、*T. cutaneum* (≡*T. beigeli*) と考えられていたが、一方で本菌は分類学的に極めて不均一な菌種であることも長い間議論されていた。1992 年にパスツール研の Guého ら⁴⁾ により、また 1994 年に著者ら⁵⁾ により本菌の高度な不均一性が明らかにされ、新しい *Trichosporon* 属の分類が提唱された。この新分類に基づいてトリコスポロン症の起因菌は急速に明らかにされてきた。深在性トリコスポロン症の起因菌は、*T. asahii* および *T. mucoides*、表在性では、*T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin* および *T. ovoides* であり、特に後 2 菌種は白色砂毛症の起因菌として知られてい

る^{6,7)}。これに著者ら⁸⁾ が最近、臨床材料由来の新種として記載した *T. dermatis* および *T. debeurmannianum* を加えると *Trichosporon* 属のうち、少なくとも 8 菌種が感染に関与していると考えられる。トリコスポロン症の中でも临床上最も重要な疾患は予後不良な深在性トリコスポロン症である。深在性トリコスポロン症と診断された本邦の患者から分離される *Trichosporon* のほぼ 100% が *T. asahii* である。一方、*Trichosporon* は感染症のみならずアレルギー疾患である夏型過敏性肺炎 (SHP, summer-type hypersensitivity pneumonitis) も引き起こす。*Trichosporon* が本疾患の原因抗原であることは Ando らのグループによる一連の研究で明らかにされた⁹⁻¹²⁾。SHP 患者家屋から分離される *Trichosporon* は、少なくとも Fig. 1 に示す 8 菌種が知られているが、主要原因抗原は、*T. asahii*, *T. mucoides* および *T. montevidense* と考えられている¹³⁾。この様に *T. asahii* は感染症と SHP の両疾患に関与する医真菌学上重要な菌種である。

本研究においては、各々の疾患に関与した菌株についてその多様性を調べ、またその意義について検討した。さらに rRNA 遺伝子中の IGS (intergenic spacer) 領域中に地域特異性を示す興味深い DNA 塩基配列を見出したので分子疫学的観点からも検討を加えた。

別刷請求先: 杉田 隆

〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1
明治薬科大学微生物学教室

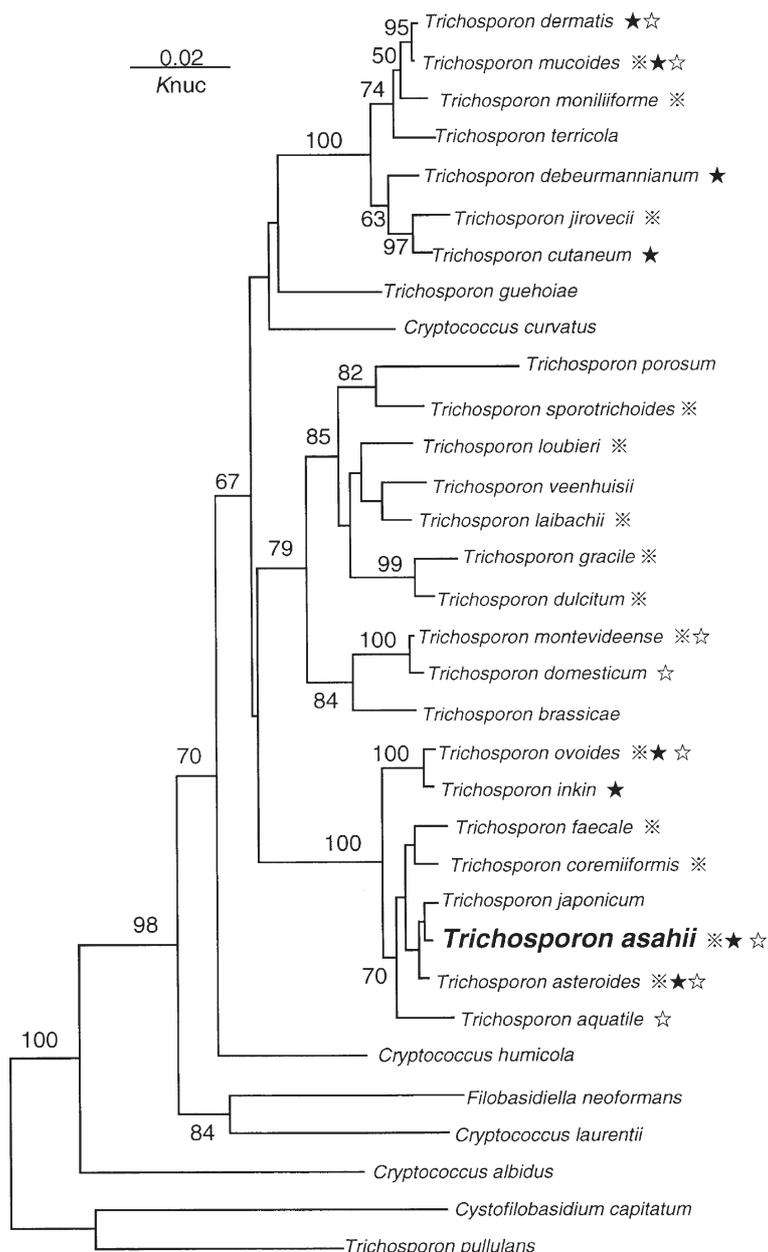


Fig. 1. Molecular phylogenetic tree of *Trichosporon* species.

The tree was constructed from D1/D2 26S rDNA sequences (approximately 600 bp) using the Neighbor-Joining method. The numerals are the confidence level from 100 replicate bootstrap samplings (frequencies of less than 50% are not indicated). ★, clinical isolates; ☆, strains isolated from SHP patients' houses, ※, species formerly treated as *T. cutaneum* or *T. begelii*. *T. asahii*⁵⁾, *T. debeurmannianum*⁸⁾, *T. dermatitis*⁸⁾, *T. domesticum*²¹⁾, *T. japonicum*²²⁾, and *T. terricola*²³⁾ were described by the author.

Trichosporon asahii の種名について

T. asahii は本邦で分離された菌種であるため若干の説明を加えたい。本菌は、1929年 Akagi¹⁴⁾ により“*Trichosporia cutis psoriaticiformis progressiva Asahi et Akagi*”の患者から分離された。分節型分生子を産生することから、*Trichosporon* と考えたが、既知の *Trichosporon* とは異なることから、新種 *Trichosporon asahii* と命名した。“*asahii*”は、九州大学皮膚科旭憲吉教授の姓に由来している。本菌は *T. cutaneum* の異名 (synonym) として長い間取り扱われてきたが、現在の分類基準においても

新種に相当すること、当時の菌株が現存していること、また種名“*asahii*”を存続させるため、著者ら⁵⁾ は新たな記載 (taxonomic description) を行なうことにより命名規約上、これを合法化し、*Trichosporon asahii* Akagi ex Sugita, Nishikawa et Shinoda とした。現在では、*T. asahii* は深在性トリコスポロン症あるいは夏型過敏性肺炎の原因菌種として認知されているが、ここに示す様に基準株 (type strain) は皮膚由来株である。

Trichosporon asahii の多様性解析¹⁵⁾

T. asahii は感染症および SHP に関与するが、土壌等

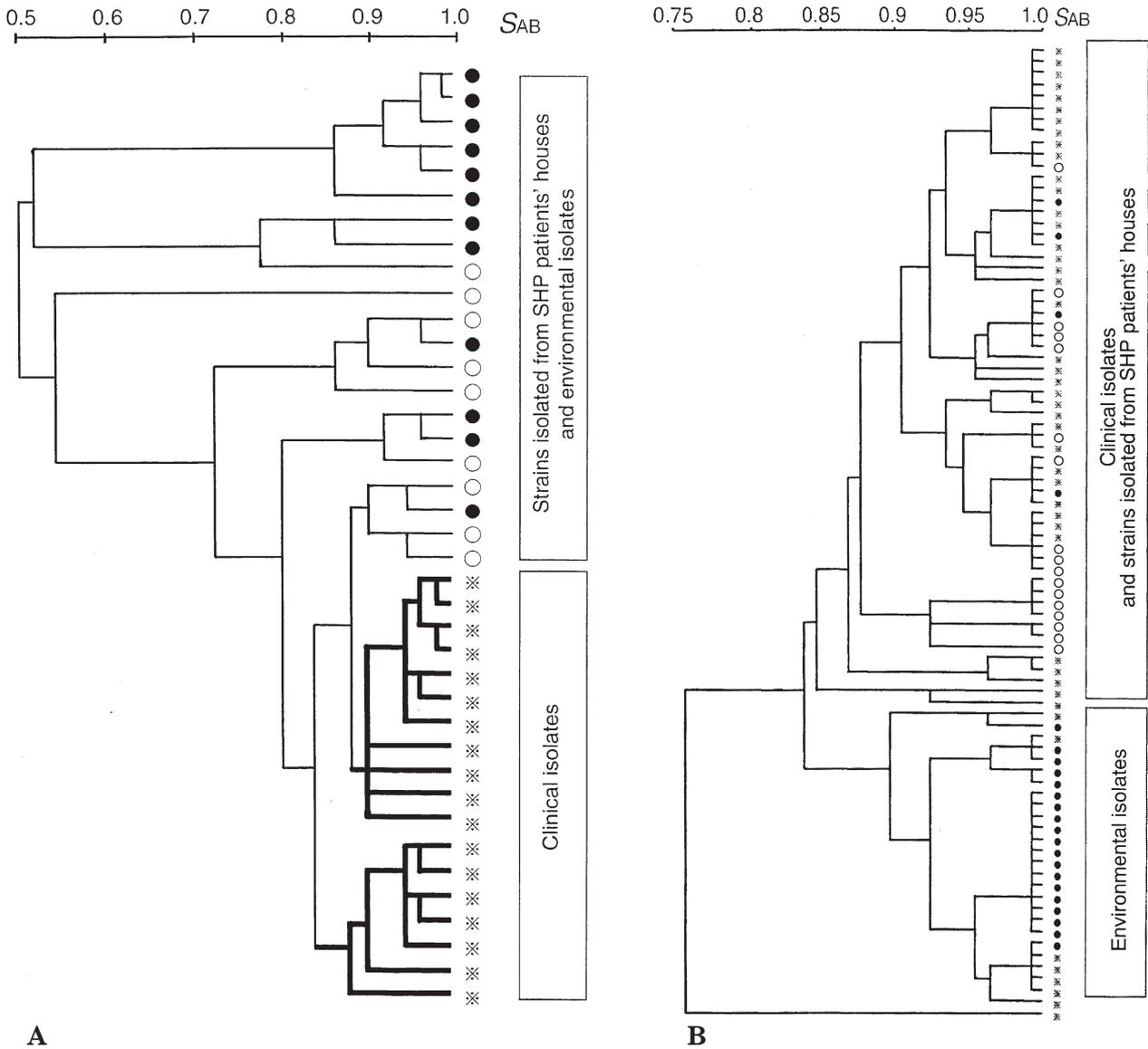


Fig. 2. Phenograms of *Trichosporon asahii* isolates calculated from DNA fingerprinting patterns obtained with primers M13, OPE1, and RC8 (A), and calculated from the ability to utilize 31 compounds (B).

The phenogram showing the similarities of the isolates was generated by the unweighted pair group method with the arithmetic mean (UPGMA phenogram), based on the pairwise similarity coefficient matrix. The program PAUP (ver. 4.0b2) was used to calculate similarity values and to generate the UPGMA phenogram. A similarity value (S_{AB}) was calculated for each pair of patterns, based on matching fragment positions.

※, clinical isolates; ○, strains isolated from SHP patients' houses; ●, environmental isolates.

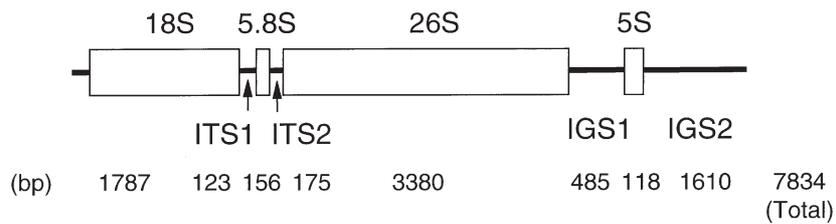


Fig. 3. Schematic representation of the rDNA locus in *Trichosporon asahii* CBS 2479 (type strain).

ITS, internal transcribed spacer; IGS, intergenic spacer.

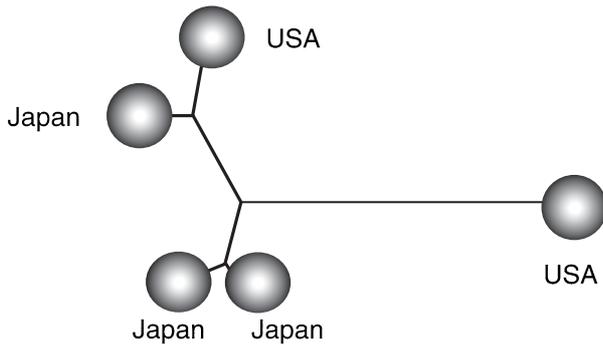


Fig. 4. A phylogenetic tree of the five IGS 1 genotypes of *Trichosporon asahii*.

Forty-three *T. asahii* clinical isolates were analyzed. The sequences were aligned using Clustal W (ver. 1.8) software, and the tree was constructed using TreeView (ver. 1.6.2).

の環境中にも広く分布することから¹⁶⁾, まず, 様々な分離源由来の菌株について, DNA レベルでの多様性を検討した. 臨床材料(血液等), SHP 患者家屋および環境材料(土壌)由来の菌株について RAPD (Random amplification of polymorphic DNA) を行い, 得られた多型バンド (polymorphic band) の類似度から UPGMA フェノグラムを作成した (Fig. 2A). 臨床分離株間, SHP 株間および環境分離株間の類似度は, それぞれ 91.3%, 74.5%, 72.0% であった. UPGMA フェノグラムでは, SHP 株と環境株は同一のクラスターを形成し, これらの株間の多型バンド類似度に有意な差は認められなかった ($p > 0.1$). 臨床分離株は独立したクラスターを形成し, SHP 株および環境分離株とは多型バンド類似度は有意に異なっていた ($p < 0.01$). このことは, 感染症と SHP の各々の疾患は異なる菌株によって引き起こされることを示している. 言い換えると両疾患は互いに異なる遺伝型 (genotype) に支配されていることを意味する. さらに, RAPD から得られた各々の DNA 断片をクローニング後, その DNA 塩基配列を詳細に解析した. 臨床株および SHP 株には共通の 330bp の DNA 塩基配列が存在したのに対して, 環境株の多くにはその配列は存在しなかった. SHP は環境中に存在する菌株が患者家屋に飛散し, そこで定着・増殖後, その分生子・菌糸を反復吸入することで発症すると考えられるため, RAPD 解析で SHP 株と環境株が同一のクラスターを形成したことは妥当である. しかしながら, この特異断片の発見は, 環境株の中でも, 一定の選択をうけた菌株のみが SHP 発症に関与していることを示唆している. さらにこの点を表現性状から検討した. ID32 を用いた資化性試験の結果からフェノグラムを作成したところ, 環境株と SHP 株が位置するクラスターは互いに異なっていた (Fig. 2B). 環境株の全てあるいは大部分は, sorbitol, rhamnose および mannitol を資化できるのに対して, SHP 株の大部分はこれらの化合物を利用できなかった. これらの性状の差が, 菌株の育成環境として SHP 患者家屋と環境 (土壌等) を識別するか否かは不明であるが, 表現性状は明らかに SHP 株と環境株では異なっていることが示された.

Trichosporon asahii の IGS 配列に基づく分子疫学¹⁷⁾

病原真菌の同定あるいは分子系統解析を行う場合, これまで D1/D2 26S rDNA および ITS (internal transcribed spacer) 領域等が多用されてきた^{18,19)}. 種内多様性, すなわち株レベルでの多様性を検討するには, これらの領域では限界があり, さらに別の遺伝子 (あるいは領域) の発見が求められていた. 今回, 著しい種内変異を検出できる DNA 塩基配列を IGS (Intergenic spacer) 領域に見出した. Fig. 3 に *T. asahii* の基準株 (CBS 2479) の rDNA の構造を模式化した. IGS は全長 2,095 bp で, IGS1 領域が 485 bp, IGS2 領域が 1610 bp であった. 特に IGS1 領域は地域特異性を示す配列であることが明らかになった. すなわち, IGS は 5 つの遺伝子型から構成され, そのうちの 3 つは日本人患者由来株であるのに対し, 残りの 2 つの遺伝子型は米国人患者由来株であった (Fig. 4). *Cryptococcus neoformans* 臨床分離株についても, IGS の遺伝子型と地域特異性に相関が認められる結果を得ている²⁰⁾. この様に, 今回見出した IGS 領域は, 新しい分子疫学ツールとして有用であると考えられる.

おわりに

Trichosporon asahii は, 深在性トリコスポロン症および夏型過敏性肺炎を引き起こすが, 両疾患はそれぞれ異なる遺伝子型株に支配されていることが明らかにされた. 今後, これら両疾患の発症機序等の解明にあたっては, この遺伝子型について考慮する必要がある. さらに, 今回新たに見出した IGS 領域は, 著しい種内変異を有し, 分子疫学ツールとして有用であった. これらの研究手法は *Trichosporon* のみならず, 他の感染症起因菌にも十分に適応できると考えられる.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 御指導を頂きました明治薬科大学微生物学教室篠田孝子教授 (現, 名誉教授) に心より感謝致します. また, 終始, 御助言, 御協力頂きました同大学免疫生物学教室西川朱實教授に厚く御礼申し上げます. 発表論文に共著者として加わって頂きました多くの共同研究者の皆様と教室の池田玲子助教授, 市川智恵博士をはじめ大学院生・卒論生諸氏に深謝致します.

文 献

- 1) Perparim K, Nagai H, Hashimoto A, Goto Y, Tashiro T, Nasu M: *In vitro* susceptibility of *Trichosporon beigeli* to antifungal agents. *J Chemother* **8**: 445-448, 1996.
- 2) Toriumi Y, Sugita T, Nakajima M, Matsushima T, Shinoda T: Antifungal pharmacodynamic characteristics of amphotericin B against *Trichosporon asahii*, using time-kill methodology. *Microbiol Immunol* **46**: 89-93, 2002.
- 3) Walsh TJ, Melcher GP, Lee JW, Pizzo PA: *Infections*

- due to *Trichosporon* species: new concepts in mycology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Curr Top Med Mycol* **5**: 79-113, 1993.
- 4) Guého E, Smith MT, de Hoog GS, Billon-Grand G, Christen R, Batenburg-van der Vegte: Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **61**: 289-316, 1992.
 - 5) Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T: Reclassification of *Trichosporon cutaneum* by DNA relatedness by using the spectrophotometric method and the chemiluminometric method. *J Gen Appl Microbiol* **40**: 397-408, 1994.
 - 6) Guého E, Improvisi L, de Hoog GS, Dupont B: *Trichosporon* on humans a practical account. *Mycoses* **37**: 3-10, 1994.
 - 7) Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T, Kume H: Taxonomic position of deep-seated, mucosa associated, and superficial isolates of *Trichosporon cutaneum* from trichosporonosis patients. *J Clin Microbiol* **33**: 1368-1370, 1995.
 - 8) Sugita T, Takashima M, Nakase T, Ichikawa T, Ikeda R, Shinoda T: Two new yeasts, *Trichosporon debeurmannianum* sp. nov. and *Trichosporon dermatis* sp. nov., transferred from the *Cryptococcus humicola* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1221-1228, 2001.
 - 9) Shimazu K, Ando M, Sakata T, Yoshida K, Araki S: Hypersensitivity pneumonitis induced by *Trichosporon cutaneum*. *Am Rev Respir Dis* **130**: 407-411, 1984.
 - 10) Yoshida K, Ando M, Sakata T, Araki S: Environmental mycological studies on the causative agent of summer-type hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* **81**: 475-83, 1988.
 - 11) Ando M, Sakata T, Yoshida K, Yamasaki H, Araki S, Onoue K, Shinoda T: Serotype-related antigen of *Trichosporon cutaneum* in the induction of summer-type hypersensitivity pneumonitis: correlation between serotype of inhalation challenge-positive antigen and that of the isolates from patients' homes. *J Allergy Clin Immunol* **85**: 36-44, 1990.
 - 12) Ando M, Arima K, Yoneda R, Tamura M: Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis. Geographic distribution, home environment, and clinical characteristics of 621 cases. *Am Rev Respir Dis* **144**: 765-769, 1991.
 - 13) Nishiura Y, Nakagawa-Yoshida K, Suga M, Shinoda T, Guého E, Ando M: Assignment and serotyping of *Trichosporon* species: the causative agents of summer-type hypersensitivity pneumonitis. *J Med Vet Mycol* **35**: 45-52, 1997.
 - 14) Akagi S: Über eine neue mykotische Hautkrankheit "Trichosporia cutis psoriatiformis progressiva Asahii et Akagi". *Jpn J Dermatol Urol* **29**, 53-55, 1929.
 - 15) Sugita T, Ichikawa T, Matsukura M, Sueda M, Takashima M, Ikeda R, Nishikawa A, Shinoda T: Genetic diversity and biochemical characteristics of *Trichosporon asahii* isolated from clinical specimens, houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis, and environmental materials. *J Clin Microbiol* **39**: 2405-2411, 2001.
 - 16) Sugita T, Nishikawa A, Ichikawa T, Ikeda R, Shinoda T: Isolation of *Trichosporon asahii* from environmental materials. *Med Mycol* **38**: 27-30, 2000.
 - 17) Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T: Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol* **40**: 1826-1830, 2002.
 - 18) Kurtzman CP, Robnett CJ: Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* **35**: 1216-1223, 1997.
 - 19) Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, Shinoda T: Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J Clin Microbiol* **37**: 1985-1993, 1999.
 - 20) Sugita T, Ikeda R, Shinoda T: Diversity among strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* as revealed by a sequence analysis of multiple genes and a chemotype analysis of capsular polysaccharide. *Microbiol Immunol* **45**: 757-768, 2001.
 - 21) Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T, Yoshida K, Ando M: A new species, *Trichosporon domesticum*, isolated from the house of a summer-type hypersensitivity pneumonitis patient in Japan. *J Gen Appl Microbiol* **41**: 429-436, 1995.
 - 22) Sugita T, Nakase T: *Trichosporon japonicum* sp. nov. isolated from the air. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 1425-1429, 1998.
 - 23) Sugita T, Takashima M, Nakase T, Ichikawa T, Shinoda T, Nishikawa A: A basidiomycetous anamorphic yeast, *Trichosporon terricola* sp. nov., isolated from soil. *J Gen Appl Microbiol* (accepted)

Intraspecies Diversity of *Trichosporon asahii* as the Causative Agent of Opportunistic Fungal Infection and Summer-type Hypersensitivity Pneumonitis

Takashi Sugita

Department of Microbiology, Meiji Pharmaceutical University, Kiyose,
Tokyo 204-8588 Japan

Trichosporon asahii is the major causative agent of the opportunistic infection trichosporonosis, and also causes summer-type hypersensitivity pneumonitis (SHP). Random amplification of polymorphic DNA analysis was used to determine the intraspecies diversity of *T. asahii* isolates from clinical specimens, the houses of SHP patients, and environmental material. Clinical isolates formed a cluster, characterized by a 90% matching coefficient, but they did not cluster with strains isolated from SHP patients' houses or environmental sources. The biochemical characteristics of *T. asahii* isolates from the three sources were compared, and a phenogram was constructed. One of the two clusters included most of the clinical isolates and strains isolated from the houses, and the other cluster included most of the environmental isolates. There was a remarkable difference in the abilities of the strains belonging to these clusters to utilize several compounds. These results suggest that the genetic diversity and biochemical characteristics of *T. asahii* are related to the source of the isolates.

In addition, based on the IGS1 sequence, which is located between the 26S and 5S rRNA genes, we identified five genotypes of *T. asahii*, which is a major causative agent of deep-seated trichosporonosis. Of the five genotypes, three were isolates that originated in Japan, whereas two were American isolates. IGS sequence analysis shows great potential as a new epidemiological tool.

(平成14年度日本医真菌学会奨励賞受賞論文)