

イヌ由来*Chaetomium globosum*の臨床学的及び
分子生物学的特徴に関する研究

麻布大学大学院 獣医学研究科
獣医学専攻 博士課程
基礎獣医学健康系 分子生物学

DV0561 杉 山 和 寿

イヌ由来 *Chaetomium globosum* の臨床学的及び
分子生物学的特徴に関する研究

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 分子生物学

DV0561 杉山和寿

目次

緒言	3
第1章 皮膚炎症状を呈するイヌからの <i>Chaetomium globosum</i> の分離と同定	5
第2章 イヌ由来 <i>Chaetomium globosum</i> の分子生物学的特徴	14
第3章 <i>Chaetomium globosum</i> と <i>Microsporum canis</i> との迅速鑑別診断法の開発	20
総括	29
引用文献	31
謝辞	37
図表	

緒言

真菌症は日和見真菌症、皮膚糸状菌症、高度病原性真菌症の 3 種に大別できる(山口, 2003)。中でも皮膚糸状菌症は接触により感染し、第三者への伝播があるため強い感染力が知られている。また、高度病原性真菌症は健常な個体でも感染し、死に至らしめる強い病原性を持つが、第三者への直接伝播はない(山口, 2003)。

一方、日和見真菌症は宿主の免疫状態が低下したときに環境中に存在する病原真菌により発症し、カンジタ症、アスペルギルス症、クリプトコックス症、接合菌症などがよく知られている(山口, 2003)。これらの他にも黒色真菌、植物病原菌、キノコなどによる日和見真菌症も知られている(山口, 2003)。高度医療化が進んだ今日、医学、獣医学領域ともに日和見真菌症が問題となっている。

Chaetomium globosum は、子囊菌門 *Ascomycota*、ソルダリア目 *Sordariales* *Chaetomium* 属の 1 菌種である。本菌種の分布は全世界的で、環境中に常在し、通常土壌、紙類、動物糞などから分離されている (de Hoog *et al.* 2000)。*Chaetomium* 属菌種はマイコトキシン産生 (Umeda *et al.* 1975; Ohtsubo *et al.* 1978; Udagawa *et al.* 1979)、セルラーゼ分解能 (Mishara *et al.* 1979)、有用物質の産生等 (Wang *et al.* 2006; Kanokmedhakul *et al.* 2007) で知られている。また、新興真菌症原因菌としても知られ、日和見感染が知られている (Walsh *et al.* 2006)。時にヒトに感染し、爪、皮膚などの表在性真菌症のみならず (Stiller *et al.* 1992; Naidu *et al.* 1993; Costa *et al.* 1998; Hattori *et al.* 2000; Yu *et al.* 2006)、肺炎 (Yeghen *et al.* 1996)、脳感染 (Abott *et al.* 1989; Anandi *et al.* 1989)、カテーテルによる全身感染 (Teixeira *et al.* 2003) や骨髄移植後の日和見感染により致死的な感染症に発展した例 (Lesire *et al.* 1999) 等

が報告されている。

一方、現在までに動物の症例からの本菌種を分離した報告は知られていない。ヒトと接触する機会の多いイヌにおいても被毛の常在菌叢を構成する菌種としての報告はあるものの (Cabanès *et al.* 1996)、病巣から本菌種が分離された報告はない。今回、脱毛、紅斑、肥厚、軽度掻痒、鱗屑などの皮膚症状を呈するイヌから本菌種の分離に初めて成功した。本症例においては病変部の落屑から繰り返し *C. globosum* が分離できたことにより、本菌種の感染したことによる皮膚疾患と診断し治療した (第1章)。

現時点において、ヒトとイヌにおける本菌種の関連や環境株との相違は明らかでない。しかし、*C. globosum* はヒトに感染すると深部真菌症の原因となり得ることから、その感染性や病原性の有無を明らかにすることは人獣共通感染症の観点からも重要であると考えられる。そこで、本研究においては、症例から得られた *C. globosum* の病原性に関する分子生物学的特徴を明らかにするため、これまで環境や他の症例から分離され千葉大学真菌医学研究センターに寄託された *C. globosum* 17 株との DNA レベルでの比較を行った (第2章)。

また、本菌種は人獣共通真菌症の原因菌として最も良く知られている *Microsporum canis* との鑑別が難しいことが第1章の結果より明らかとなった。併せて同属の *M. gypseum* との鑑別が必要であること、さらに形態学的特徴は一般の培養検査で観察することが難しいことが問題点としてあげられた。特に本菌種は、ヒトでの血行性播種例 (Teixeira *et al.* 2003) が報告されていることから、分子生物学的手法による迅速診断法の開発は急務と考え、*M. canis* との鑑別も同時に行うことが可能な PCR による迅速診断法を開発し、臨床検体での検出を試みた (第3章)。

第1章 皮膚炎症状を呈するイヌからの *Chaetomium*

globosum の分離と同定

1 序論

Chaetomium 属菌種は、子囊菌門 *Ascomycota*、ソルダリア目 *Sordariales* に属し、環境中に常在し、世界的に広く分布している真菌である。土壌、紙類、動物糞などから分離されたと報告されている (de Hoog *et al.* 2000)。本菌種はマイコトキシン産生 (Umeda *et al.* 1975; Ohtsubo *et al.* 1978; Udagawa *et al.* 1979)、セルラーゼ分解能 (Mishara *et al.* 1979)、有用物質の産生等 (Wang *et al.* 2006; Kanokmedhakul *et al.* 2007) で知られているほか、新興真菌症原因菌としても知られている (Walsh *et al.* 2006)。

病原性を有する *Chaetomium* 属菌種としては、現在までにヒトにおいて *C. globosum*、*C. atrobirumeum*、*C. strumarium*、*C. perlucidum*、*C. funicoham*、*C. murorum* の各菌種の感染により 20 症例以上が報告されている (Yu *et al.* 2006)。これらの症例には皮膚感染による表在性および深在性皮膚糸状菌症 (Stiller *et al.* 1992; Naidul *et al.* 1993; Costa *et al.* 1998; Hattori *et al.* 2000; Yu *et al.* 2006) ばかりでなく、AIDS 患者や骨髄移植患者などの免疫不全患者における肺炎 (Yeghen *et al.* 1996)、脳炎 (Abott *et al.* 1989; Anandi *et al.* 1989)、カテーテルによる全身感染 (Teixeira *et al.* 2003) などにより死に至った症例も含まれている。

しかし、動物の症例から *Chaetomium* 属菌種が分離された報告は認められず、イヌにおいても *C. globosum* について被毛の常在菌叢を構成する菌種としての報告はあるが (Cabanes *et al.* 1996)、病巣から本菌種が分離された報告はな

い。第1章においては、脱毛、紅斑、肥厚、軽度掻痒、鱗屑などの皮膚症状を呈するイヌの病変部の落屑から初診時、初診2週間後及び3週間後の3回にわたって繰り返し *C. globosum* が分離・同定できたことにより、本菌種の感染したことによる皮膚疾患であることが強く示唆された症例について報告する。

2 症例および臨床経過

2-1 症例

症例は、静岡市清水区内で飼育されているラブラドル系雑種犬、4 ヶ月齢、雄、体重 7.25Kg、体温 38.5℃、心拍数 108 回/分であった。患犬には、2 カ月齢および 3 カ月齢時に 9 種混合ワクチン（イヌジステンパーウイルス、伝染性肝炎ウイルス、アデノウイルスⅡ型、イヌポルボウイルス、イヌパラインフルエンザ、イヌコロナウイルス、レプトスピラコペンハーゲニー、カニコーラ、ヘブドマデイス）及び狂犬病不活化ワクチンの接種、フィラリア予防薬などの投与は通常通り行われていた。患犬は、ドライフードのみを 1 日に 2 回適正量給餌され、散歩による外出以外は室内飼育されていた。また、飼育者と一緒の布団で寝るなどヒトとの接触の頻度は非常に高い状況であった。10 日前より左眼下皮膚に軽度の掻痒をともなう脱毛および発赤が認められ、徐々に拡大傾向にあるとの主訴で来院した。患犬の食欲、排泄状況、活力、歩様、意識レベル、発育状況などは正常で皮膚病変以外に臨床的異常を認めなかった。

2-2 臨床経過

初診時において左眼下の皮膚病変部は、円形に脱毛（直径 7 ～ 8cm）しており、発赤、象皮様の肥厚、鱗屑が認められた（図 1 a）。また、左右耳朶外側、左側口唇、尾、左右踵にも脱毛および痂皮を伴う病変が認められた。

病変部落屑をブラシで掻き採り、20% KOH を滴下したスライドグラス上で直接鏡顕すると、菌糸と思われる構造物が認められた（図 2）。一方、ウッド燈検査ではわずかにピンク色系発色を認められたが不鮮明で判定不能であった。患部落屑を糸状菌選択培地およびサブロー寒天平板培地（SDA、日研生物医学研究

所)を用い、25℃で培養したところ、3日目にサブロー寒天培地のみに中心部が灰白色で全体的に黄色味を帯びた白色綿毛状のコロニーの形成が認められた(図3)。本病変は、皮膚糸状菌によるものと仮診断し、飼育者に対しては1日に3回のクロルヘキシジンによる患部の清浄清拭とケトコナゾールクリーム of 塗布による治療を指示した。

初診3週間後には左眼下の病変は初診時よりも発赤および肥厚が軽快傾向にあった。しかし、掻痒、落屑は継続しているばかりでなく、病変部範囲の拡大および右眼下、外耳内側、尾根部などへ病変部位が増加する傾向にあった。落屑を20% KOH 滴下スライドグラス上で直接鏡検すると初診時と同様の菌糸が観察された。ウッド燈検査は依然として判定不明であった。また、落屑の培養検査では SDA において同様のコロニー形成が認められた。このことから、ケトコナゾールクリームのみ of 治療は無効ではないが、増加した患部すべてに塗布することが困難であると考えられた。また、初診時落屑をポテトデキストロール寒天培地(PDA, Difco, USA) スラントで25℃において4週間培養すると緑色の集落が得られた。これを実体顕微鏡で観察すると黒色縮毛状 of ターミナルヘアを伴う子囊殻が認められた。子囊殻 of 形態学的特徴から *Chaetomium* 属菌 of 感染が疑われた(図4 a, b)。そこで、にケトコナゾールクリームによる局所治療を続行するとともに既報(Teixeira *et al.* 2003)における本菌種に対する抗真菌剤 of 最小有効阻止濃度(MIC)を参考 to ケトコナゾール 50mg SID の経口投与を併用した。また、本菌 of 同定後、ブーノーシス of 観点から飼い主に対して患犬との接触 of 制限、接触後 of 手洗いの励行など飼育方法 of 改善を指示した。

初診9週間後には病変部は軽快し、発毛も顕著に認められた(図1 b)。また、病変部皮膚 of 直接鏡検で菌糸が観察されなくなり、ウッド燈検査においても発色が認められず陰性と判定した。また、SDA における培養検査でコロニー of

形成は認められなかった。治療はさらに 3 週間継続し、12 週間後に外用および内服薬を中止したが、その後の再発および再感染は認められていない。本症例における検査及び治療経過を表 1 に示した。

3 病原学的検索

3-1 形態学的同定

初診時患部落屑を PDA スラントにおいて室温で 4 週間培養すると深緑色の集落を形成した (図 4 a)。これを実体顕微鏡で観察すると、特徴的な縮毛を伴った黒色の子囊殻が観察された (図 4 b)。これらの子囊殻の形態から子囊菌である *Chaetomium* 属菌を疑った。さらに、初診 3 週間後に繰り返し採材した落屑培養検査の追試でも同様の集落を形成し、同様の顕微鏡所見が得られた。

上記分離株を SDA および PDA 平板培地中央に接種し、25℃、37℃および 42℃で 4 週間培養した (図 5)。SDA の 25℃における集落は、房毛状で中心部が灰白色、周辺部が黄色味を帯びた白色で集落の直径は 9.0cm であった (図 5 a)。SDA の 37℃および 42℃における集落は、白色ビロード状で直径はそれぞれ 6.7cm および 3.7cm であった。一方、PDA の 25℃における集落 (図 5 b) は、深緑色顆粒状で周辺部の表面は房毛状で裏面は濃茶色で集落の直径は 9.0cm であった。37℃においては、中心部は明るい茶色の房毛状を呈し、周囲へ白色綿毛状に拡大しており、直径は 7.3cm であった。42℃においては、灰緑色の皺状をしており直径は 2.3cm であった。SDA および PDA 培地でのいずれの温度の培養においても、十分な真菌増殖がみられた。また、顕微鏡下では SDA における集落は白色菌糸を認めるのみであったが、PDA における集落では、スラント培養同様に子囊殻を認めた (図 6 a, b, c)。そこで、PDA 平板培地培養物を掻き取り、光学顕微鏡下で観察すると、子囊殻内部は 8 個の子囊胞子を包含する子囊で満たされていた (図 6 d, e)。成熟した子囊胞子は褐色で、直径は 10-12 μm で両端が平板化したレモン型、その一端には出芽孔を持つ構造であった (図 6 f)。これらの形態学的特徴により本菌を *Chaetomium globosum* と同定した。

3-2 分子生物学的同定について

一般に真菌の種を同定するためにリボゾーム RNA のラージサブユニット (26S rDNA) D1/D2 部分 (図 7) の塩基配列を解析する方法が用いられている (Kurtzman *et al.* 1997)。そこで、本症例の初回分離株の PDA スラントを用い、25℃で 2 週間培養したものから常法により DNA を抽出し、同部分の塩基配列約 640 塩基を解析した。決定した塩基配列を図 8 に示し、アクセッション番号 AB292591 として DDBJ/GenBank/EMBL DNA データベースへ登録した。この配列を既知の真菌の D1/D2 領域における塩基配列との相同性に基づいた分子系統樹を作成したところ (図 9)、本症例株は既知の *C. globosum* と同じクラスターに分類され、本分離株は分子生物学的にも *C. globosum* と同定された。

3-3 抗真菌剤に対する感受性

本症例菌に対する抗真菌剤の最小発育阻止濃度 (MIC) は NCCLS-38A (National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002) に従い判定した。原法ではアムホテリシン B、5-フルオロシトシン及びイトラコナゾールを対象に記載されているが、ミコナゾール、フルコナゾール、ミカファンギン、ケトコナゾールについても同様に検討した。PDA スラントを用い、25℃で 4 週間培養した子嚢胞子を用いた。スラント表面を 0.01% の Tween80 を添加した滅菌生理食塩水で洗い、子嚢胞子を集めグラスフィルターを通過後、MOPS により緩衝させた RPMI 1640 培養液に 10^4 個/ml 濃度に調製し 96 穴プレートにて各濃度の段階希釈した抗真菌剤とあわせて 30℃にて好氣的条件で 48 時間培養した。判定は薬剤の入っていない培養物をコントロールとして目視で比較した。アムホテリシン B、イトラコナゾールおよびケトコナゾールは完全発育を阻止した濃度、

その他の薬剤は 80% 阻止した濃度を読み取った。結果はアムホテリシン B ; 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 、ケトコナゾール ; 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 、イトラコナゾール ; 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、ミコナゾール ; 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、ミカファンギン ; 16.0 $\mu\text{g/ml}$ 以上、フルコナゾール ; 16.0 $\mu\text{g/ml}$ 、5-フルオロシトシン ; 64.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。なお、これらの値は 72 時間後も同値であった (表 2)。

4 考察

本菌種は、環境中に広く分布し土壌、木材、湿った壁などから分離されている (de Hoog *et al.* 2000)。また、感染経路は接触および空気中浮遊菌の吸入とされているが (Yeghen *et al.* 1996)、本症例の感染経路については明らかでない。本菌種は、主として日和見感染するとされており免疫の状態が発症に大きく関与している。ヒトにおける発症要因としては、HIV 感染、臓器移植後の免疫抑制などが報告されている (Anandi *et al.* 1989 ; Teixeira *et al.* 2003)。本症例における発症要因については明らかでないが、本症例は、4 ヶ月齢とイヌの発育過程において幼若期であったことから免疫の関与が示唆される。

本菌は、SDA において非常に急速にコロニー形成を行うが、発育初期の形態は *Microsporium canis* に酷似している。形態学的に本菌を同定するためには、子嚢果および子嚢胞子を観察しなければならないが、SDA による 3 週間の培養では子嚢果を観察することが不可能であった。通常、孢子形成促進培地として、コーンミール寒天培地や PDA が用いられているが、PDA を用いた場合でも子嚢果形成までに約 4 週間を要した。このため、迅速性が求められる院内検査において形態学的な同定により本菌を診断し、治療することは困難である。これらのことから過去に SDA においてコロニー形成は認められるが、分生子形成が遅い *M. canis* による皮膚糸状菌症として診断されている症例の中に本菌種による感

染例が存在していた可能性が示唆される。従って、確定診断に長期間を要する形態学的な同定法ではなく、遺伝子検査などにより簡便で迅速に同定できる診断法が求められる。

また、本症例菌の MIC の結果から、本症例菌に対してアムホテリシン B、ケトコナゾール、イトラコナゾール、ミコナゾールが有効であることが判明した。この結果は、既報 (Teixera *et al.* 2003) のヒト患者から得られた菌株に対する MIC の結果、アムホテリシン B ($0.25 \sim 2.0 \mu\text{g/ml}$)、ケトコナゾール ($0.5 \sim 1.0 \mu\text{g/ml}$)、イトラコナゾール ($0.25 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$)、ミコナゾール ($0.125 \sim 0.25 \mu\text{g/ml}$) とほぼ一致していた。

動物との接触による真菌感染症は、ネコの引っ掻き傷からスポロトリコーシスに感染することはよく知られている (Lopes-Bezerra *et al.* 2006)。本菌種も含めヒトと動物に共通に感染し、全身感染に至る危険性のある菌種に飼育動物が感染した場合、獣医師による飼育方法の改善（濃厚接触の防止や手洗い励行など）の指示は重要である。

以上のことから、病理検査ができず確定はできなかったものの、臨床学的、形態学的及び分子生物学的検索から *C. globosum* 感染が原因であったと判断し、またその治療にはケトコナゾール、イトラコナゾール、ミコナゾールなどの抗真菌剤が有効であることを明らかにした。イヌにおける *C. globosum* 感染による皮膚炎の初めての症例であると報告した (Sugiyama *et al.* 2008)。

第2章 イヌ由来 *Chaetomium globosum* の分子生物学的特徴

1 序論

C. globosum は、環境中に広く存在しており (de Hoog *et al.* 2000)、イヌの常在菌叢の一種であると報告されている (Cabanès *et al.* 1996)。また、イヌの皮膚からの *C. globosum* 分離には季節性があり、特に春のシーズンによく分離されると報告されている (Cabanès *et al.* 1996)。しかし、イヌの皮膚病変から本菌種を分離したのは今回が最初であり (第1章)、どのようなメカニズムで病原性を現したのかを検討することは、今後の症例における診断および治療ならびに感染予防対策を講じる上で大きな示唆を与えられと考えられる。また、本菌種は、ヒトに感染すると重篤な深部真菌症を引き起こす新興真菌症原因菌としても知られていることから、感染経路や発症要因などの感染性を明らかにすることは、人獣共通感染症の観点からも重要である。

今回、イヌの皮膚病巣由来本菌株と環境や他の症例から分離された *C. globosum* 菌株との遺伝的・分子系統分類学的な位置づけや特徴を明らかにするために本症例株と千葉大学真菌医学研究センターに寄託された様々な由来の *C. globosum* 17 株とを β -チューブリン遺伝子、ウレアーゼ遺伝子、ハイドロホビンなどいくつかの遺伝子領域と RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) の DNA 多型に注目して DNA レベルで比較検討した。

2 材料と方法

2-1 材料

千葉大学真菌医学研究センターより生物遺伝資源提供同意書に基づいて入手した *Chaetomium globosum* (18 株) (第 1 章で単離した *C. globosum* 株を含む) の DNA を用いた (表 3)。

2-2 方法

2-2-1 β -チューブリン遺伝子領域の塩基配列解析による分類

β -チューブリン遺伝子領域は真菌の遺伝子の解析や分子系統樹の作成に用いられており (Jieh-Juen Yu *et al.* 1997)、今回 *Neurospora crassa* や *Sclerotinia sclerotiorum* などの子囊菌において PCR 増幅が確認されている Bt2a と Bt2b (Bt2a: 5' -AATAGGTGCCGCTTTCTGG-3'、Bt2b: 5' -AGTTGTCGGGACGGAAGAG-3') のプライマーセットを用いて (Glass NL and Donaldson GC 1995; Yaguchi *et al.* 2007) PCR を行った。PCR 反応組成は、10×PCR 緩衝液 5 μ l、dNTPs 4 μ l、10 μ M プライマーセット 1 μ l、HS-Ex Taq ポリメラーゼ 0.25 μ l、滅菌蒸留水 38.75 μ l の混合液に DNA を 1 μ l 添加して全量を 50 μ l とした。サーマルサイクラー (iCycler; Bio-Rad) を用いて初期熱変性 95°C 3 分、続いて熱変性 95°C 30 秒、アニーリングを 58°C 30 秒、伸長反応を 72°C 30 秒のセットで 32 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C 5 分を行った。PCR 反応産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム溶液で染色して目的サイズの PCR 産物を確認した。これらの PCR 産物を精製後、サイクルシーケンス反応を行い、両鎖より塩基配列を 3100 Genetic Analyzer を用いて解析した。

2-2-2 真菌分類用ランダムプライマー (FM1) による分類

DNA 多型からの真菌分類用として利用されている 1 種類のプライマー FM1: 5' -AGCCGCCTCCATGGCCCCAGG-3' (Kano *et al.* 1997) を用いて PCR を行った。PCR

反応組成は、10×PCR 緩衝液 5 μ l、dNTPs 4 μ l、40 μ Mプライマー0.5 μ l、HS-Ex Taq ポリメラーゼ 0.25 μ l、滅菌蒸留水 38.75 μ l の混合液に DNA を 1 μ l 添加して全量を 50 μ l とした。サーマルサイクラー (iCycler; Bio-Rad) を用いて初期熱変性 95°C 3 分、続いて熱変性 95°C 30 秒、アニーリングを 50°C 1 分、伸長反応を 72°C 1 分のセットで 40 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C 5 分を行った。PCR 反応産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム溶液で染色して PCR 産物のバンドパターンを比較した。

3 結果

3-1 β -チューブリン遺伝子領域の塩基配列解析による分類

β -チューブリン遺伝子領域の一部の PCR 増幅により *C. globosum* の 18 菌株すべてにおいて PCR 産物が得られた (図 10)。これらの塩基配列を解析したところ (図 11)、18 菌株は 2 種類の DNA 型 (A と B タイプ) に分けられ、本研究でのイヌ症例株 (第 1 章) は、B タイプであった。A と B タイプでは 360 塩基長のうち、2 塩基に相違が見られた。調べた *C. globosum* 18 菌株のうち、5 株が A タイプ、13 株が B タイプであった (表 4)。

3-2 FM1 ランダムプライマーによる分類

C. globosum の 18 株を対象にした FM1 ランダムプライマーによる PCR では、ほとんど共通した DNA バンドパターンが得られたが、約 1.1k bp と約 1.3k bp の大きさのバンドは株間により濃度差が認められた。これらの 2 本のバンドに注目し、1.3k bp のバンドが濃いものを Z タイプとし、1.1k bp のバンドが濃いものを Y タイプとした (図 12)。その結果、18 菌株のうち 14 サンプルが Z タイプ、4 サンプルが Y タイプであり、本研究でのイヌの皮膚炎由来 *C. globosum* は Z タイプであった。

4 考察

C. globosum 18 株は、 β -チューブリン遺伝子領域の塩基配列の相違により 2 つの DNA 型に分類できた。また、FM1-PCR の DNA バンドパターンによっても、2 つのグループ分けが可能であった。これらの DNA 型分類からイヌ由来本症例株（第 1 章）は B-Z 型と分類された。これは、本症例株発見約 2 年後に千葉県においてイヌの皮膚から分離された株と同一の DNA 型であったが、ブラジル由来株や国内の環境（土壌）由来株の DNA 型とも一致していた。このように菌の由来や分離した地域に規則性は認められず、今回の DNA 型分類ではイヌ皮膚炎由来本症例株の特異性は認められなかった（表 3）。

C. globosum を DNA レベルで特徴付けるにあたり、真菌で解析されているハイドロホビン遺伝子領域の塩基配列多型にも注目した。プライマーセット rodA1 と rodA2 (Glass NL and Donaldson GC 1995) での増幅を試みたが、いずれの *C. globosum* 株 DNA から PCR 産物が得られなかった。また、ウレアーゼ遺伝子領域にも注目して、プライマーセット UREa と UREb (Jieh-Juen Yu *et al.* 1997) を用いて *C. globosum* 株 DNA からの増幅を試みた。その結果、目的のサイズの約 550 bp のバンドと 850 bp のバンドが得られたが、クローニング後、配列解析をしたところ、どちらもウレアーゼ遺伝子配列に該当しないと考えられた。さらに、*C. globosum* と分類学的に最も近い子囊菌門オニゲネラ目アルスロデルマ科アルスロデルマ属の *Arthroderma benhaminae* のウレアーゼ遺伝子の一部の配列を参考にプライマーを設計し、PCR 増幅を試みたが、目的のサイズ (300 bp) のバンドは得られなかった。

用いた *C. globosum* 18 株についてリボゾーム RNA 遺伝子における ITS1 領域および D1/D2 領域（図 7）の塩基配列多型を解析したが、イヌ皮膚炎由来本症例株のみを特徴付ける配列多型は認められなかった（データは示していない）。

一般にマイコトキシンを産生する真菌は *Aspergillus* spp. や *Penicillium* spp.、*Fusarium* spp. など多種類存在するが、マイコトキシン自体の遺伝的多様性は少な

い。多くのマイコトキシンが孢子形成に伴って生成される一方で、*C. globosum* の産生するマイコトキシンである Ch-A と Ch-C は共に孢子形成と関係なく生成され、乾いたコロニーであっても大量のマイコトキシンを含む可能性がある (Nielsen KF 2003)。マイコトキシンは食物の汚染では問題になるが、皮膚疾患との関連があるかどうかは報告がない。しかし、マイコトキシンについては様々な真菌で DNA の解析が行われており、今後 *C. globosum* の分類に応用できるかもしれない。

一般に感染の危険性は、多因子要因に基づいており、皮膚糸状菌症はこの疾患に感受性のあるあらゆる年齢、性別、動物種に感染する (Carlotti *et al.* 1999)。しかし、ほとんどの場合、ストレス、若齢、低栄養、医原性副腎皮質機能亢進症、消耗性疾患、免疫機能障害（甲状腺機能低下症、下垂体由来副腎皮質機能亢進症、糖尿病など）との合併が動物の病歴に認められる (Carlotti *et al.* 1999)。また、皮膚糸状菌症の発生率は、地理的地域性および気候に大きく影響され、温度および湿度が上昇した地域では皮膚糸状菌症との発生率に正の相関が認められる (Sparkes *et al.* 1993 ; Molliello *et al.* 1994)。また、ヨークシャーテリアのような特定の品種において、抗真菌特性のある皮脂の組成に変化が見られるため感染率が高くなることが報告されている (Cafarchia *et al.* 2004)。その他の感染の好発因子としては、過剰な入浴による皮脂の除去および角質層の菲薄化があり、皮膚糸状菌感染の成立を促進する可能性がある。また、*C. globosum* の感染機序について、ヒトでは空気中で形成された孢子の吸引であると考えられているが、イヌにおいては土壤などとの直接的な接触による感染も考えられる。

また、*C. globosum* の感染により 14 歳の少年の顔面皮膚に広範囲にわたる壊死病変を起こした症例においては、菌株の由来は分子生物学的に他の患者からの株や環境由来株と相違がなかった (Yu *et al.* 2006)。また、その患者の CD3 リンパ球の割合は 41.85% と正常に比較して低下していた (Yu *et al.* 2006)。したがって、本症例においても患犬側の免疫機能が発症の引き金になったと推測している。した

がって、イヌにおける *C. globosum* の感染防御は、免疫力の低下している個体や老齢犬、免疫が未熟な子犬の衛生管理に特に注意を払う必要がある。

本症例においては、ステロイドの投与歴もなく他の臨床症状は認められず、免疫機能障害などの疾患の兆候も認められなかったことから、考えられる唯一の感染発症要因として4ヵ月齢と若齢あったことが考えられる。

第3章 *Chaetomium globosum* と *Microsporium canis* との迅速鑑別診断法の開発

1 序論

動物の皮膚糸状菌症は、一般臨床において非常によく遭遇する感染性の皮膚疾患であるが、届け出義務のある感染症ではないため、その浸潤状況については不明である。イヌとネコの皮膚糸状菌症はすべての皮膚疾患の約 2% を占めるとの報告がある (Foil 1998 ; Scott *et al.* 2001)。また、皮膚糸状菌症の動物から最も一般的に分離される菌は、*M. canis* であるといわれ (Foil 1998 ; Scott *et al.* 2001)、さらにイヌにおける皮膚糸状菌症の原因菌としての分離頻度の割合は、*Microsporium* 属菌が 90% であるとの報告 (長谷川ら 1982) がある。今回、症例から分離した *C. globosum* は、SDA における培養の初期段階において *M. canis* と非常によく類似したコロニーを形成した。従来の方法で *C. globosum* と *M. canis* および *M. gypseum* を鑑別診断するためには、孢子形成がなされるまで培養を続けて、孢子の形態を観察しなければならないために長期間を要する。本症例の場合にも孢子形成培地である PDA において 4 週間を必要とした。これらの真菌は、すべてヒトに感染して人獣共通感染症を引き起こす。特に *C. globosum* は、表在性皮膚糸状菌症ばかりでなく深部真菌症を引き起こすことから、疑症例を診察したら感染予防のためになるべく早い段階での確定診断が望まれる。そこで、本研究では、PCR を利用した分子生物学的手法を用いることによりこれらの真菌感染症の迅速的な鑑別診断方法を開発検討するとともに実際の臨床検体を用いて検査を行うことにより臨床現場での応用の可能性について検討した。

2 材料と方法

2-1 材料

千葉大学真菌医学研究センターより生物遺伝資源提供同意書に基づいて入手した *Chaetomium globosum* (18 株) (表 3)、*Microsporum canis* (58 株)、*Microsporum gypseum* (4 株) の DNA を用いた。

臨床材料として、真菌症皮膚炎の疑われるイヌ、ネコおよびウサギの落屑から DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した DNA を用いた。また、落屑を培養して得られた真菌から同キットを用いて抽出した DNA も用いた。

2-2 方法

2-2-1 RAPD-PCR による真菌種特異的 DNA マーカーの探索

以下の 8 種類のランダムプライマーを RAPD 用プライマーとして使用した。

Yuki	5' -GACGG CCAGT TTA-3'
Kumo	5' -GACGG CCAGT ATT-3'
Kaminari	5' -GACGG CCAGT TAT-3'
Kasumi	5' -CAGCT ATGAC CGT-3'
Kiri	5' -CAGCT ATGAC CAG-3'
OPG-18	5' -GGCTC ATGTG-3'
OPG-19	5' -GTCAG GGCAA-3'
primer6	5' -GCGAT CCCCCA-3'

PCR 反応組成は、10×PCR 緩衝液 5 μ l、dNTPs 4 μ l、各 20 μ M プライマー 1 μ l、滅菌蒸留水 38.75 μ l、HS-ExTaq ポリメラーゼ 0.25 μ l の混合液に、鋳型 DNA 1 μ l を加え、全量を 50 μ l とした。PCR 反応の温度サイクル条件は、95°C で 3 分間初期熱変性後、95°C 30 秒、36°C 30 秒、72°C 30 秒の温度サイクルを 40 回行い、最後に

72°C5 分間で伸長反応を完了させた。PCR 増幅産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム溶液で染色してバンドパターンを確認した。

2-2-2 *C. globosum* 及び *M. canis* 特異的 DNA 断片のクローニングと塩基配列の決定

RAPD-PCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動で得られた4つの特徴的な各DNA断片をゲルから切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いてDNAを精製した。精製したDNA断片をpGEM T-easy ベクター (Promega)を用いてTAクローニングを行い、複数のコロニーからインサート部分の塩基配列をダイレクトシーケンシングにより決定した。必要に応じて、シーケンス用プライマーを設定し、インサート全長配列を解析した。シーケンシング装置は3100 Genetic Analyzer を、配列解析ソフトは GENETIX-MAC version 14.0.5 を用いた。5~10 個のコロニーから得られたインサート配列のコンセンサス配列を各DNA断片の配列とした。

2-2-3 *C. globosum* 及び *M. canis* の DNA 断片特異的検出のための PCR の構築

2-2-2 で得られた4つの特徴的な各DNA断片の塩基配列情報に基づき、それらの断片のうち、*C. globosum* 用の2つと *M. canis* 用の1つをそれぞれ検出するための以下のプライマーを設定した。

<i>C. globosum</i> 検出用特異的プライマー	塩基配列
Yuki L-321F	5' -TAGCG TGC GG TCGTG TTTA-3'
Yuki L-614R	5' -ATGAA CCGAA TCACC TTACC GAT-3'
Yuki U-306F	5' -GTTGG CAAGT ACATC GGCAT CTA-3'
Yuki U-944R	5' -TGACC GTAGG TAGTA CCGCT GAA-3'

M. canis 検出用特異的プライマー

塩基配列

Kasumi L-321F 5' -TAAGC CAAAC CGAAT TTAAC TCAAC-3'

Kasumi L-467R 5' -GCGTA AACTC ATCCA CCAAC GAA-3'

PCR 条件は、10×PCR 緩衝液 5 μ l、dNTPs 4 μ l、10 μ M の各配列特異的プライマーセット 1 μ l、HS-Ex *Taq* ポリメラーゼ 0.25 μ l、滅菌蒸留水 38.75 μ l の混合液に DNA を 1 μ l 添加して全量を 50 μ l とした。サーマルサイクラー (iCycler; Bio-Rad) を用いて初期熱変性 95°C 3 分、続いて熱変性 95°C 30 秒、アニーリングを 55°C 30 秒、伸長反応を 72°C 30 秒のセットで 35 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C 5 分行った。

マルチプレックス PCR では、Yuki L-321F、Yuki L-614R、Kasumi L-321F、Kasumi L-467R の混合プライマーセットを用いた。反応条件は上述と同様とした。増幅産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム溶液で染色してバンドパターンを確認した。

3 結果

3-1 RAPD-PCR による特異的 DNA 断片の探索

8 種類のランダムプライマーを用いて、第 1 章でイヌ皮膚病巣から分離した *C. globosum* を含む *C. globosum* の 18 株、*M. canis* の 58 株、*M. gypseum* の 4 株のそれぞれの DNA を鋳型として、RAPD-PCR を行った。その結果、プライマー Yuki では、*C. globosum* に共通した特徴的なバンドパターンが見られたのに対し、*M. canis* と *M. gypseum* では増幅産物はみられなかった (図 13)。一方、プライマー Kasumi では、*M. canis* に共通して 2 つの増幅断片がみられたのに対して、*C. globosum* や *M. gypseum* では増幅が見られないか、不安定で非特異的なバンドであった (図 14)。残りの 6 種類のプライマーを用いた PCR では、*C. globosum*、*M. canis*、

M. gypseum のそれぞれの真菌に共通した特徴的な増幅断片は見られなかった (図 15)。

プライマーYuki を使った RAPD-PCR により得られた *C. globosum* DNA の特徴的なバンドパターンのうち、顕著な増幅の見られた約 900 bp と約 1300 bp の 2 つの断片に注目し、TA クローニングを行い、それらの塩基配列を決定した (図 16)。Yuki プライマー結合部位を除く塩基配列の長さは、817 bp と 1298 bp であった。BLAST による DDBJ/GenBank/EMBL 国際 DNA データベースとの相同検索の結果、これらの配列はいずれも *C. globosum* 配列であると判断されたが、詳細なアノテーションについては不明であった。同様に、プライマーKasumi による RAPD-PCR で得られた *M. canis* に特徴的な約 700 bp と 800 bp の断片をクローニングし、塩基配列を決定した (図 17)。Kasumi プライマー結合部位を除く塩基配列の長さは、665 bp と 769 bp であった。相同性検索により、いずれも有意な相同性を示す登録配列はなく、新規な配列と考えられた。

3-2 *C. globosum* 及び *M. canis* を特異的に検出する PCR 技術の構築

上述の 3-1 のこれらの配列情報に基づき、それぞれの断片を特異的に検出するプライマーセットを設計し、PCR を行なった。すなわち、*C. globosum* 由来の 817 bp と 1298 bp 長の断片からそれぞれを増幅するように設定した Yuki L-321F と Yuki L-614R のプライマーセット及び Yuki U-306F と Yuki U-944R のプライマーセットで PCR を行なったところ、いずれも *C. globosum* にのみ目的のサイズの増幅産物が得られた (図 18: 817 bp 由来断片から設計した PCR 増幅結果のみを示した。316 bp 長)。

また、*M. canis* 由来の 665 bp 長の断片から設定したプライマーセットによる PCR では、*M. canis* 由来にのみ目的のサイズ (169 bp 長) の増幅産物が得られた (図 19)。なお、*M. canis* 由来の 769 bp 長の断片から設定したプライマーセットによる PCR では、*M. canis* に目的の増幅産物が得られたものの、*C. globosum* に

目的のサイズとは異なる複数の非特異的な増幅バンドが認められた（データは示していない）。このように、*C. globosum* と *M. canis* をそれぞれ特異的に検出する PCR を設定することができた。

次に、臨床での効率的な診断応用も考慮して、マルチプレックス PCR による *C. globosum* と *M. canis* の同時検出の可能性の検討を行った。上述の *C. globosum* を特異的に検出するプライマーセット（Yuki L-321F と Yuki L-614R）と *M. canis* を特異的に検出するプライマーセット（Kasumi L-321F と Kasumi L-467R）を組み合わせたマルチプレックスによる PCR を、*C. globosum* または *M. canis* の精製した DNA を鋳型として行ったところ、それぞれ目的の増幅産物が得られ、非特異的な産物は見られなかった（図 20 A）。

また、*C. globosum* DNA と *M. canis* DNA を分子数比で 1:1、10:1、1:10 に混合した鋳型を用いた場合、いずれも同時に検出することが可能であり、しかもそれぞれの DNA 由来の増幅産物量は鋳型 DNA の量差を反映していた（図 20 B）。なお、*M. gypseum* はこのマルチプレックス PCR では検出されないことを確認した（データは示していない）。このように、本マルチプレックス PCR は *C. globosum* と *M. canis* の検出に有効であった。*C. globosum* を特異的に検出するプライマーセットとして Yuki U-306 F と U-944R の使用も可能であったが、Yuki L-321F と Yuki L-614R のセットの方が感度が高いことを確認した（データは示していない）。

3-3 臨床検体へのマルチプレックス PCR の応用

続いて、皮膚炎症状を示したネコの落屑を培養して、胞子の形態学的観察から、*M. canis* と同定できた真菌から抽出した DNA を用いて 3-2 でのマルチプレックス PCR を行ったところ、期待通り、*M. canis* のバンドが得られた（図 21 a レーン 1）。さらに、イヌの落屑の培養途中で孢子形成が不十分であり、種の特定ができない状態での真菌からの DNA によるマルチプレックス PCR でも、*M. canis* と判断できた（図 21 a レーン 4）。このサンプルは、3 週間の培養後、孢子形態から *M.*

canis と確認できた。このマルチプレックス PCR 法を用いて、皮膚炎症状の認められた計 23 頭（イヌ 20 頭、ネコ 2 頭、ウサギ 1 頭）の臨床材料（落屑等）を分析したところ、*C. globosum* はいずれにも検出されなかったが、上述のネコとイヌに加え、1 頭のウサギの落屑からも *M. canis* が検出された（表 5）。これらのうち、イヌとネコ個体由来の真菌は、上述の通り培養による形態学的観察からも *M. canis* と確認されたが、ウサギの落屑サンプルからの培養は陰性で、胞子の形態により *M. canis* であることは確認できなかった。しかし、*M. canis* に有効な抗真菌剤（イトラコナゾール）により治癒した。一方、8 頭の健常犬の皮膚（表 5 Nos. 27～34）から採取した角質を培養して得られた常在真菌の DNA を抽出して、このマルチプレックス PCR 法をおこなったところ、いずれからもバンドは検出されなかった（図 22 a）。なお、D1/D2 及び ITS 領域の PCR では産物が得られ（図 22 b, c）、配列解析の結果これらの真菌は *Alternaria* sp.、*Trichosporon debeurmannianum*、*Valsaria ceratoniae* であると考えられた（表 5）。

4 考察

第 1 章及び第 2 章の結果から *C. globosum* はイヌの皮膚病変部から初めて検出されたものの、イヌに感染する *C. globosum* として DNA レベルで特別な特徴は認められなかった (第 2 章)。この結果から、環境株も含め *C. globosum* であれば、イヌへの感染症を引き起す危険性があることが示唆された。

また、真菌感染の皮膚症状をもつイヌのこれまでの診断において、*C. globosum* 感染を、比較的多く見られる *M. canis* や他の真菌の感染と見誤っていた可能性もある。現在、真菌症であるかどうかは、落屑の真菌専用 SDA 培地による約 1 週間の培養により判断しており、また真菌種の特定には、さらに約 3 週間の培養による孢子形成とその形態観察を必要としている。従って、真菌種に応じて適切な効果のある抗真菌剤を選別する以前に、治療を開始しなければならないのが臨床現場の現状である。

そこで、*C. globosum* と *M. canis* 及び *M. gypseum* の感染症を迅速に診断するため、PCR を用いた鑑別法の開発を試みた。8 種類の RAPD プライマーを用いて *C. globosum*、*M. canis* 及び *M. gypseum* DNA の PCR による多型解析を行ったところ、*C. globosum* 及び *M. canis* それぞれに特異的な DNA 断片を得ることができた。これらの断片を特異的に検出するプライマーを設定し、PCR を行ったところ、*C. globosum* と *M. canis* を特異的に検出することができ、鑑別用 PCR 技術を構築できた。

また、臨床材料を用いた本マルチプレックス PCR 法では、孢子形成前の状態の真菌から *M. canis* と同定することができた。また、ウサギの落屑からも *M. canis* を同定することができた。臨床検体では、培養検査で必ずしもコロニーが得られるとは限らない。本症例のように臨床症状から皮膚糸状菌症が強く疑われている症例の迅速診断に有用性が示唆された。

診断治療方針への一助としての応用だけでなく、疫学的研究を進める上で、

今後さらに多くの真菌症の疑われる臨床材料について調査することが必要である。本研究で構築したマルチプレックス PCR 診断法はこれらに有効であると考えられる。また、このように真菌の感染による皮膚炎の形態学的診断の短所を解決した新技術であるマルチプレックス PCR 診断は、大幅な時間短縮となり早期診断とイヌの皮膚炎の類症鑑別が可能となり、迅速かつ適切な治療に貢献できると考えられる。

総括

Chaetomium globosum は、環境中に広く分布する常在真菌（糸状菌）の一種であり、最近、新興真菌感染症の原因真菌の一つであると考えられている。ヒトにおいては、一般に爪、皮膚などの表在部位へ感染して重篤な皮膚炎症状を引き起こすことが知られており、水晶体への感染も報告されている。また、免疫不全のヒトでは肺および脳などの深部組織への感染も確認されており、死に至る場合もあるといわれている。一方、ヒトと接触することの多いイヌにおいて本菌種は、被毛の常在菌叢に存在するとの報告があるものの、皮膚病変から本真菌が分離されたという報告はこれまで知られていない。今回、著者は脱毛と紅斑の皮膚炎症状を呈し来院したイヌから本真菌の分離に初めて成功した。本症例では、病変部位より本真菌が繰り返し分離できたことから、*C. globosum* が感染したことによる皮膚疾患と診断し治療した。ケトコナゾールの外用および内服で12週間治療した結果、各種検査が陰転し、その後の再発および再感染は認められなかった。また、初回の分離菌の各抗真菌剤に対する感受性は、アムホテリシン B; 4.0 μ g/ml, 5-フルオロシトシン; 64.0 μ g/ml, イトラコナゾール; 0.5 μ g/ml, ケトコナゾール; 0.25 μ g/ml, フルコナゾール; 16.0 μ g/ml, ミコナゾール; 1.0 μ g/ml, ミカファンギン; 16.0 μ g/ml 以上であり、アムホテリシン B、ケトコナゾール、イトラコナゾールとミコナゾールが有効であると考えられた (Sugiyama *et al.* 2008)。

イヌにおける本真菌のヒト由来株や環境株との遺伝的関連は明らかではない。しかし、*C. globosum* はヒトに感染すると深部真菌症の原因菌と成り得ることから、本真菌の遺伝的相違による感染性や病原性の有無を明らかにすることは人獣共通感染症の観点からも重要と考えられる。そこで、本症例から得られた *C. globosum* の分子系統学的特徴をまず明らかにするため、これまでに主に環境から分離され千葉大学真菌医学研究センターに寄託された *C. globosum* 17 株との DNA レベルで

の比較を行った。その結果、 β チューブリン遺伝子領域の一部の PCR 増幅産物の塩基配列の差異により 2 つのグループに分類できた。さらに、ランダムプライマー FM1 を用いた PCR により得られたバンドパターンの違いからも 2 つのグループに分類できた。しかし、これ以外にいくつかの遺伝子領域について多型解析を試みたものの、本症例株を他の由来の異なる *C. globosum* 株と遺伝的に区別することはできなかった。

一般に糸状菌を形態学的に同定するためには孢子の確認が必要であり、本真菌ではポテトデキストロース寒天培地での培養により 4 週間も要した。治療方針の決定などを考慮すると、より迅速な確定診断が望まれる。そこで、イヌやネコなどの愛玩動物に対して表在性皮膚感染症を引き起こす頻度が高い糸状菌である *M. canis* 及び *M. gypseum* との鑑別も含め、*C. globosum* の PCR による迅速な診断法の開発を検討した。これら 3 種の真菌の DNA を鋳型として、いくつかのランダムプライマーを用いて RAPD-PCR を行い、種特異的な DNA 断片の検出を試みた。その結果、*C. globosum* と *M. canis* のそれぞれに特徴的な増幅断片が検出できた。これらの増幅断片をクローニングし、塩基配列を決定し、それぞれの断片を特異的に増幅するプライマーを設定した。真菌医学研究センターより入手した *M. canis* (58 株) と *C. globosum* の DNA を用いて PCR を行い、設定したプライマーの種特異性を確認した。また、マルチプレックス PCR でも *C. globosum* と *M. canis* を検出できることを確認した。さらに、本研究で構築したマルチプレックス PCR 診断法は、臨床材料（落屑等）を用いた場合においても鑑別診断に有効であることから、本研究で開発した PCR 技術は、*C. globosum* と *M. canis* との迅速な鑑別及びイヌの皮膚病変における真菌感染の簡易スクリーニング系として臨床応用が期待される。

引用文献

Abbott SP, Sigler L, McAleer R, McGough DA, Rinaldi MG, Mizell G: Fatal cerebral mycoses caused by the ascomycete *Chaetomium strumarium*. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2692-2698.

Anandi V, John TJ, Walter A, Shastry JC, Lalitha MK, Padhye AA, Ajello L, Chandler FW: Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Chaetomium globosum* in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2226-2229.

Cabanes FJ, Abarca ML, Bragulat MR, Castella G: Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. *Mycopathologia* 1996; 133: 1-7.

Cafarchia C, Romito D, Sasanelli M, Lia R, Capelli G, Otranto D: The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. *Mycoses.* 2004; 47: 508-513.

Costa AR, Porto E, Lacaz C da S, de Melo NT, Calux Mde J, Valente NY: Cutaneous and ungual phaeohyphomycosis caused by species of *Chaetomium* Kunze (1817) ex Fresenius, 1829. *J Med Vet Mycol.* 1988; 26: 261-268.

DeBoer DJ, Moriello KA: Development of an experimental model of *M. canis* infection in cats. *J Vet Microbiol.* 1994; 42: 289.

de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (eds): Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed. Utrecht, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili Reus, Spain: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

Foil CS: Dermatophytosis. Infectious Disease of the Dog and Cat, 2nd Ed. (C.E. Greene, ed.). W.B. Saunders, Philadelphia, Pa., 1998; 362-370.

Glass NL, Donaldson GC: Development of sets desined for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycets. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 1323-1330.

Gnann JW Jr, Bressler GS, Bodet CA 3rd, Avent CK: Human blastomycosis after a dog bite. *Ann Intern Med.* 1983; 98: 48-49.

長谷川篤彦: 動物の白癬. 現代皮膚科学大系 7B 感染性皮膚症Ⅲ, 中山書店, 東京, 1982 ;122-130.

Hattori N, Adachi M, Kaneko T, Shimoizuma M, Ichinohe M, Iozumi K: Case report. Onychomycosis due to *Chaetomium globosum* successfully treated with itraconazole. *Mycoses.* 2000; 43: 89-92.

Hay RJ, Brostoff J: Immune responses in patients with chronic *Trychophyton rubrum* infections. *Clin Exp Dermatol.* 1993; 2: 373-380.

Hay RJ: Genetic susceptibility to dermatophytosis. *Eur J Epidemiol.* 1992; 8: 346-349.

Jieh-Juen Yu, Smithon SL, Thomas PW, Kirkland TN, Garry T: Cole Isolation and characterization of the urease genes (URE) from the pathogenic fungus *coccidioides immitis*. *Gene.* 1997; 198: 387-391.

Kano R, Nakamura Y, Watari T, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H, Hasegawa A: Identification of clinical isolates of *Microsporum canis* and *M. gypseum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization analyses. *Mycoses.* 1997; 41: 139-143.

Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Phonkerd N, Soyong K, Kongsaree P, Suksamrarn A: Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. *Planta Med.* 2002; 68: 834-836.

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.* 1997; 35:

1216-1223.

Lesire V, Hazouard E, Dequin PF, Delain M, Therizol-Ferly M, Legras A: Possible role of *Chaetomium globosum* in infection after autologous bone marrow transplantation. *Intensive Care Med.* 1999; 25: 124-125.

Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO: *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc.* 2006; 78: 293-308.

Mishra MM, Singh CP, Kapoor KK, Jain MK: Degradation of lignocellulosic material and humus formation by fungi. *Ann Microbiol. (Paris)* 1979; 130 : 481-486.

Moriello KA, DeBoer, DJ: Fungal Flora of the coat of pet cats. *Am J Vet Res.* 1991; 52: 602-606.

Moriello KA, DeBoer DJ: Fungal Flora of the haircoat of cats with and without dermatophytosis. *J Med Vet Mycol.* 1991; 29: 285-292.

Moriello KA, Kunkle G, DeBoer DJ: Isolation of dermatophytes from the hair coats of stray cats from selected animal shelters in two different geographic regions in the United States. *Vet Dermatol.* 1994; 5: 57-62.

Naidu J: Growing incidence of cutaneous and ungual infections by non-dermatophyte fungi at Jabalpur (M.P.). *Indian J Pathol Microbiol.* 1993; 36: 113-118.

Naidu J, Singh SM, Pouranik M: Onychomycosis caused by *Chaetomium globosum* Kunze. *Mycopathologia.* 1991; 113: 31-34.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. M38-A. Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

Nucci M, Marr KA: Emerging fungal diseases. *Clin Infect Disese.* 2005;

41: 521-526.

Ohtsubo K, Saito M, Sekita S, Yoshihira K, Natori S: Acute toxic effects of chaetoglobosin A, a new cytochalasan compound produced by *Chaetomium globosum*, on mice and rats. *Jpn J Exp Med.* 1978; 48: 105-110.

Pfaller MA, Diekema DJ: Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4419-4431.

Scott DW: Fungal skin diseases. Muller & Kirk' s Small Animal Dermatology, 6th Ed. W.B. Saunders, Philadelphia, Pa., 2001; 336-361.

Scott DW, Miller WH, Griffen CE: Fungal Skin Diseases: Dermatophytosis. In: Muller & Kirk' s Small Animal Dermatology, 6th Ed. WB Saunders, Philadelphia, Pa., 2001; 339-361.

Serena C, Ortoneda M, Capilla J, Pastor FJ, Sutton DA, Rinaldi MG, Guarro J: In vitro activities of new antifungal agents against *Chaetomium* spp. and inoculum standardization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3161-3164.

Sparks AH: A study of inapparent carriage of *Microsporum canis* by cats and the viability of arthrospores on isolated hairs. *J Small Anim Pract.* 1994; 35: 397-401.

Stiller MJ, Rosenthal S, Summerbell RC, Pollack J, Chan A.: Onychomycosis of the toenails caused by *Chaetomium globosum*. *J Am Acad Dermatol.* 1992; 26: 775-776.

杉田隆, 西川朱實: DNA 塩基配列解析による病原真菌の分類・同定. *日本医真菌学会誌.* 2004; 45: 55-58.

Sugiyama K, Sano A, Murakami M, Ogawa T, Mishima H, Otake H, Kamei K, Sugiyama S: Three isolation of *Chaetomium globosum* from erythematous

epilation of canine skin. *Med Mycol.* 2008; 46: 505-510.

Teixeira AB, Trabasso P, Moretti-Branchini ML, Aoki FH, Vigorito AC, Miyaji M, Mikami Y, Takada M, Schreiber AZ: Phaeohyphomycosis caused by *Chaetomium globosum* in an allogeneic bone marrow transplant recipient. *Mycopathologia.* 2003; 156: 309-312.

Udagawa S, Muroi T, Kurata H, Sekita S, Yoshihira K, Natori S, Umeda M: The production of chaetoglobosins, sterigmatocystin, O-methylsterigmatocystin, and chaetocin by *Chaetomium* spp. and related fungi. *Can J Microbiol.* 1979; 25: 170-177.

Umeda M, Ohtsubo K, Saito M, Sekita S, Yoshihira K: Cytotoxicity of new cytochalasans from *Chaetomium globosum*. *Experientia.* 1975; 31: 435-438.

Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E: Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10: 48-66.

Wang S, Li XM, Teuscher F, Li DL, Diesel A, Ebel R, Proksch P, Wang BG: Chaetopyranin, a Benzaldehyde Derivative, and Other Related Metabolites from *Chaetomium globosum*, an Endophytic Fungus Derived from the Marine Red Alga *Polysiphonia urceolata*. *J Nat Prod.* 2006; 69: 1622-1625.

Yaguchi T, Hioe Y, Tanaka R, Matsuzaka T, Ito J, Nishimura K: Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigai* isolated from clinical specimens in Japan. *Jpn J Med Mycol.* 2007; 48: 37-46.

山口英世: 病原真菌と真菌症. 南山堂, 東京, 2003; 2-39.

Yeghen T, Fenelon L, Campbell CK, Warnock DW, Hoffbrand AV, Prentice HG, Kibbler CC: *Chaetomium* pneumonia in patient with acute myeloid leukaemia. *J Clin Pathol.* 1996; 49: 184-186.

Yu J, Yang S, Zhao Y, Li R: A case of subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Chaetomium globosum* and the sequences analysis of *C. globosum*. *Med Mycol.* 2006; 44: 541-545.

謝辞

本研究を行うにあたり、及び本論文をまとめるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました千葉大学真菌医学研究センター 佐野文子准教授ならびに麻布大学分子生物學研究室 村上賢教授に深く感謝の意を表します。

本論文をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導とご助言を賜りました麻布大学衛生学第二研究室 福安嗣昭教授、麻布大学内科学第二研究室 土屋亮教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたり、多大なご協力をいただいた麻布大学分子生物學研究室的皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、社会人学生としての活動を支えてくれた両親、家族、杉山獣医科のスタッフの皆様に深く感謝いたします。



図 1 初診時の皮膚病変、左側眼下の皮膚における直径 7~8cm の皮膚病変
a. 脱毛、発赤、肥厚、痂皮が認められる
b. 治療 9 週間後の病変部

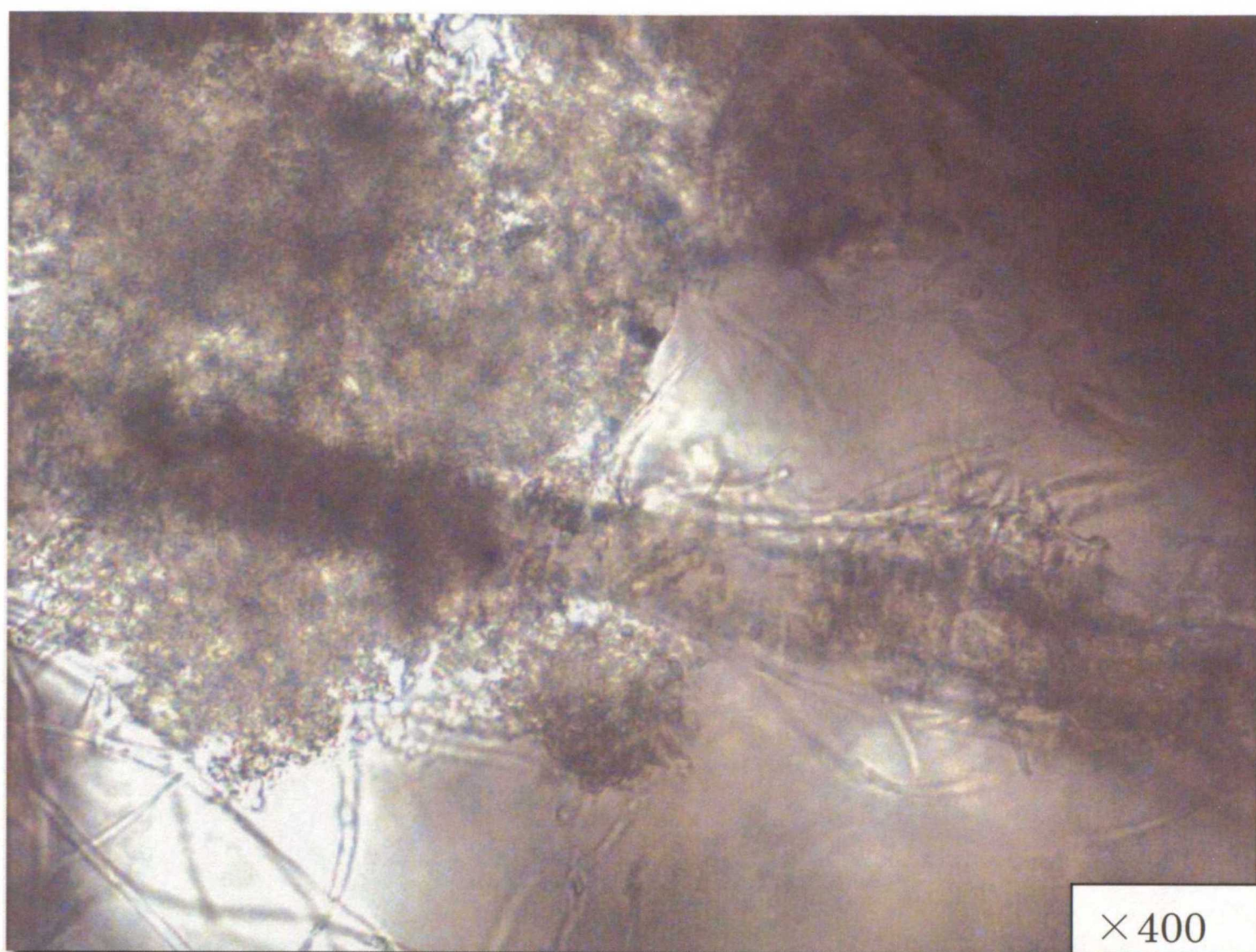


図2 患部痂皮の直接鏡検 (×400)

20%KOH に浸漬後に鏡検した。菌糸状構造物が観察される。



図 3 サブロー寒天培地で、25℃3 日間培養によるコロニー形成
中心部が灰白色で白色綿毛状コロニーが見られた。



図 4 PDA スラントで 25℃、4 週間培養によるコロニー形成

a. 緑色コロニーが認められた。

b. 縮毛状ターミナルヘアを伴う子嚢果が認められた。

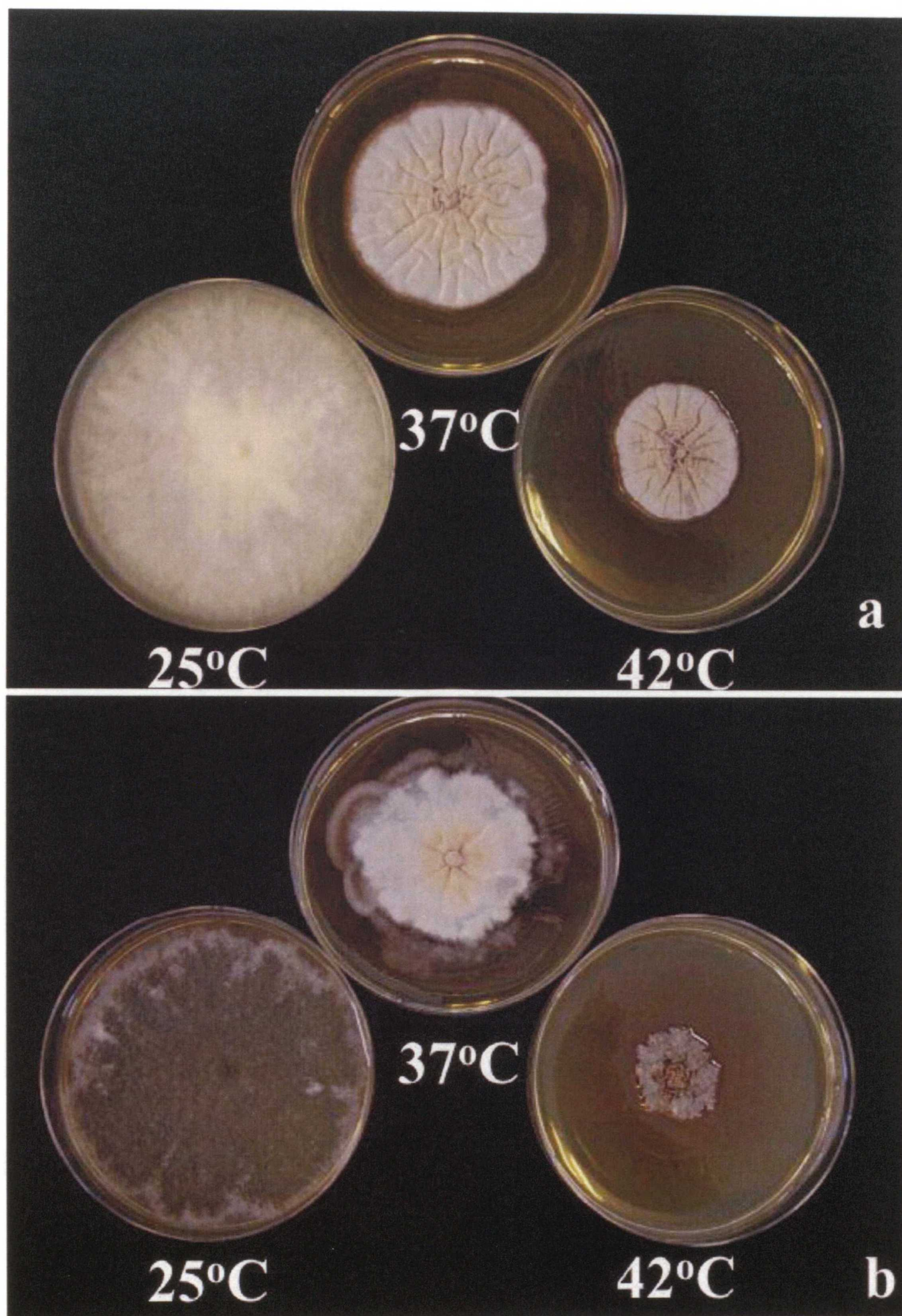


図 5 SDA および PDA の 25°C、37°C、42°C によるコロニー形成

a. SDA

b. PDA

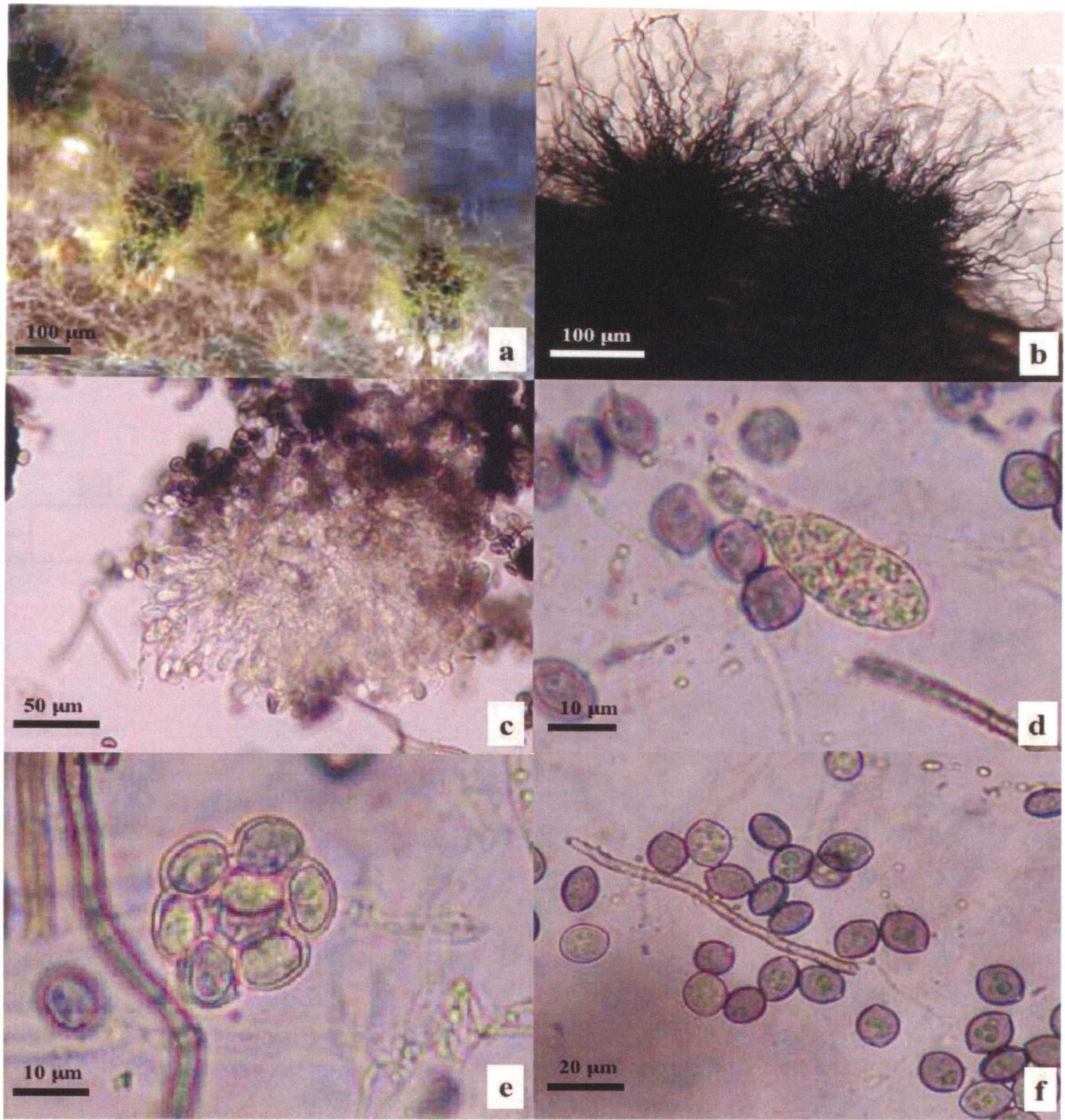


図 6 PDA において 25°C、4 週間培養後の鏡検像

- a. 縮毛状のターミナルヘアを伴う子嚢果 (平板培地)
- b. 縮毛状のターミナルヘアを伴う子嚢果 (スラント培地)
- c. 子嚢殻
- d. 未成熟の子嚢胞子
- e. 成熟直前の子嚢胞子
- f. 成熟した子嚢胞子

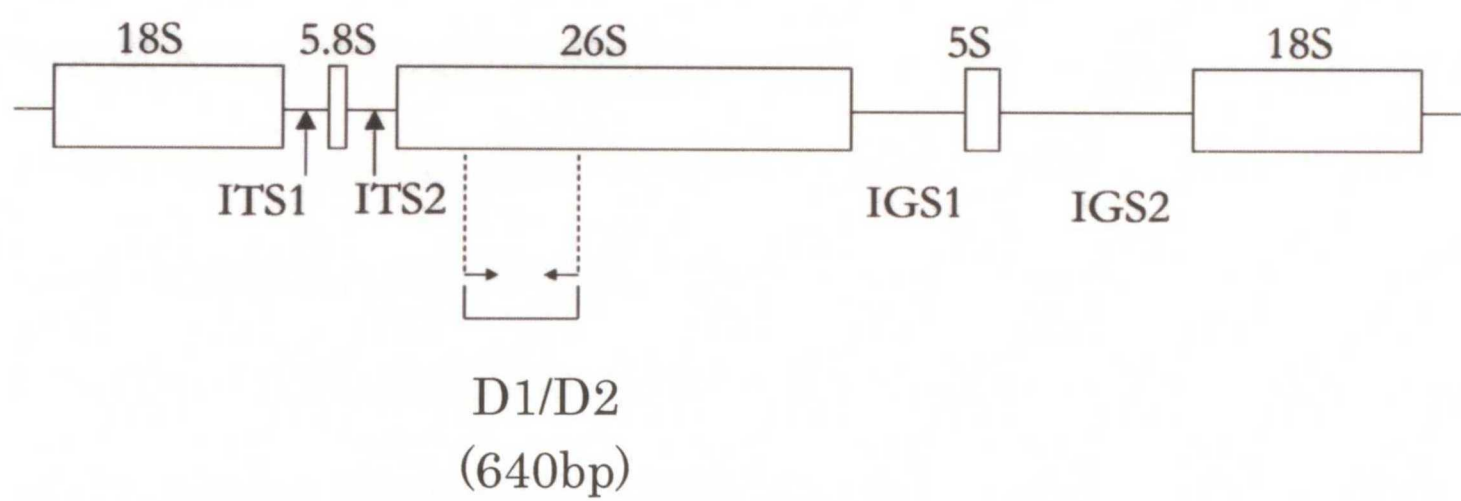


図 7 リボゾーム RNA 遺伝子の構造

TGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAAC
GGCGAAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCT
TCGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGAAGCTTTAGGCGCGGCACCTTCTGA
GTCCCCTGGAACGGGGGCGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTATAGTTGGATG
CCTAGCCTGTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCT
CATAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGAT
AGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGT
TAAATAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGCG
CCGGGCGGATCATCCGGTGTTCTCACCGGTGCACTCCGCCCCGGCTCAGGCCA
GCATCGGTTCTCGCGGGGGGATAAAGGTCCTGGGAACGTAGCTCCTCCGGG
AGTGTTATAGCCCGGGGGCGTAATGCCCTCGCGGGGACCGAGGTTCGCGCAT
CTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCATCAGCGACCCGTCTTGAAACACGGA
CCA

図8 本研究での *C. globosum* の D1/D2 領域の塩基配列 (Accession No. AB292591)

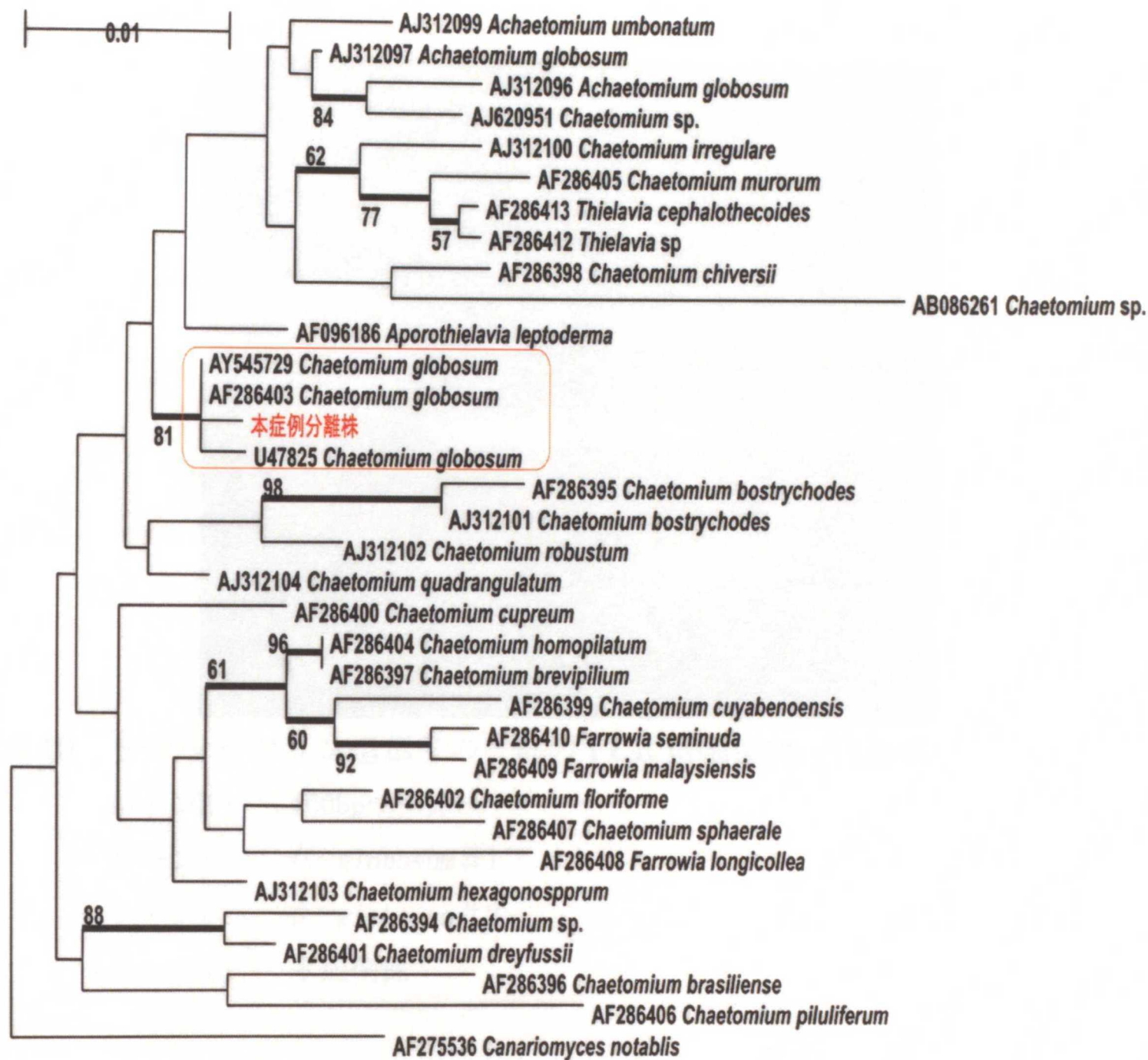


図 9 26S リボソーム RNA 遺伝子の D1/D2 領域の配列に基づいた *Chaetomium* 属及びその関連菌種の分子系統樹

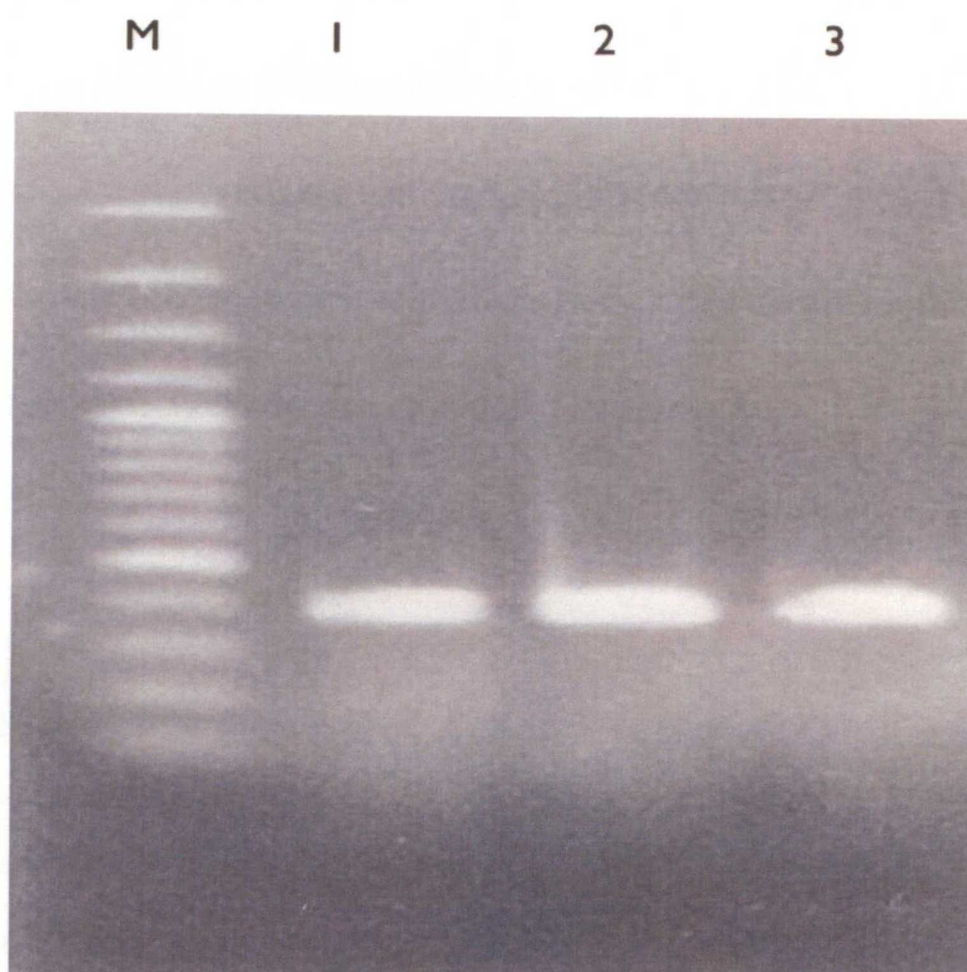


図 10 β -チューブリン遺伝子の一部の PCR 増幅産物 (代表例)

レーンM : 100bpマーカー

レーン1 : *C. globosum* #1

レーン2 : *C. globosum* #2

レーン3 : 本症例株

A type	1	TACGTCCAAGCAAAGCAAACACTCTTGGCTGATGACAATCGAGACTGACTTCTTTTCAGGCAGACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCAATGGCG	100
B type	1C.....	100
A type	101	TGTATGTGGGCATGACAGTTCCCAACCGATAAATCCCCGCTCACCGCTTCGATAGGTACAACGGCACCTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTGTA	200
B type	101	200
A type	201	CTTCAACGAGGTCAGTCGGGTCAAATAATTTACACGACCGAGTGATGGCGTGCTCATAGTATTATACAGGCTTCGGGCAACAAGTATGTTCCCTCGCGCT	300
B type	201C.....	300
A type	301	GTCCTCGTCGACTTGGAGCCCGGCACCATGGATGCCGTCCGTGCCGGCCCTTCGGCCAG	360
B type	301	360

図 11 β -チューブリン遺伝子領域 A タイプと B タイプの塩基配列の比較
 A タイプの塩基配列 (A、G、C、T) のみを記載し、B タイプの配列は、これらと同一の場合はドット (.) で表し、異なる場合は対応する塩基文字を記載した。A タイプと B タイプで 360 塩基中 2 塩基に相違が見られた。

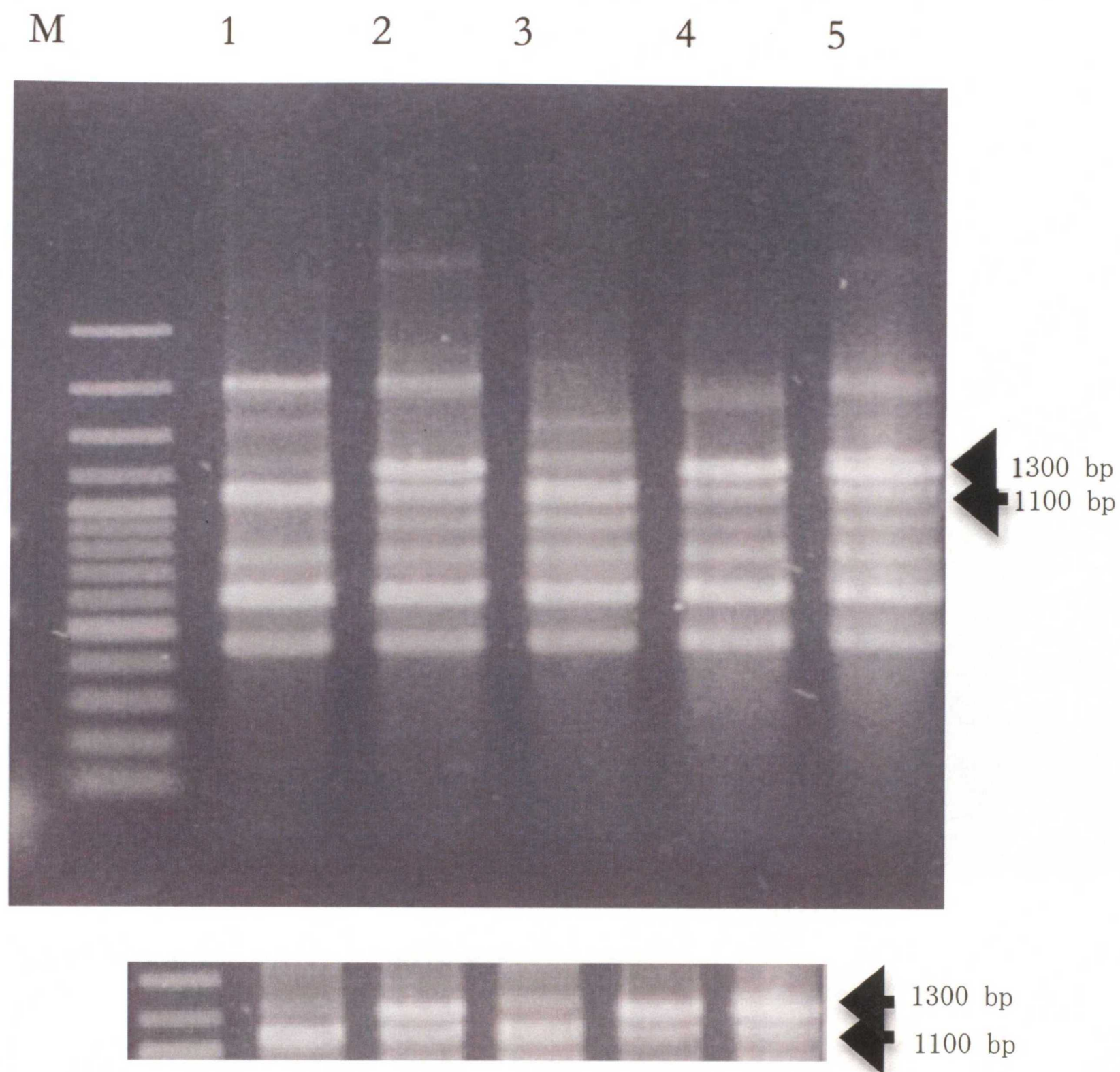


図 12 ランダムプライマーFM1-PCR のバンドパターン (代表例)

- レーンM : 100 bpマーカー
- レーン1 : *C. globosum* #1 (Yタイプ)
- レーン2 : *C. globosum* #5 (Zタイプ)
- レーン3 : *C. globosum* #10 (Yタイプ)
- レーン4 : 本症例株 (Zタイプ)
- レーン5 : *C. globosum* #16 (Zタイプ)

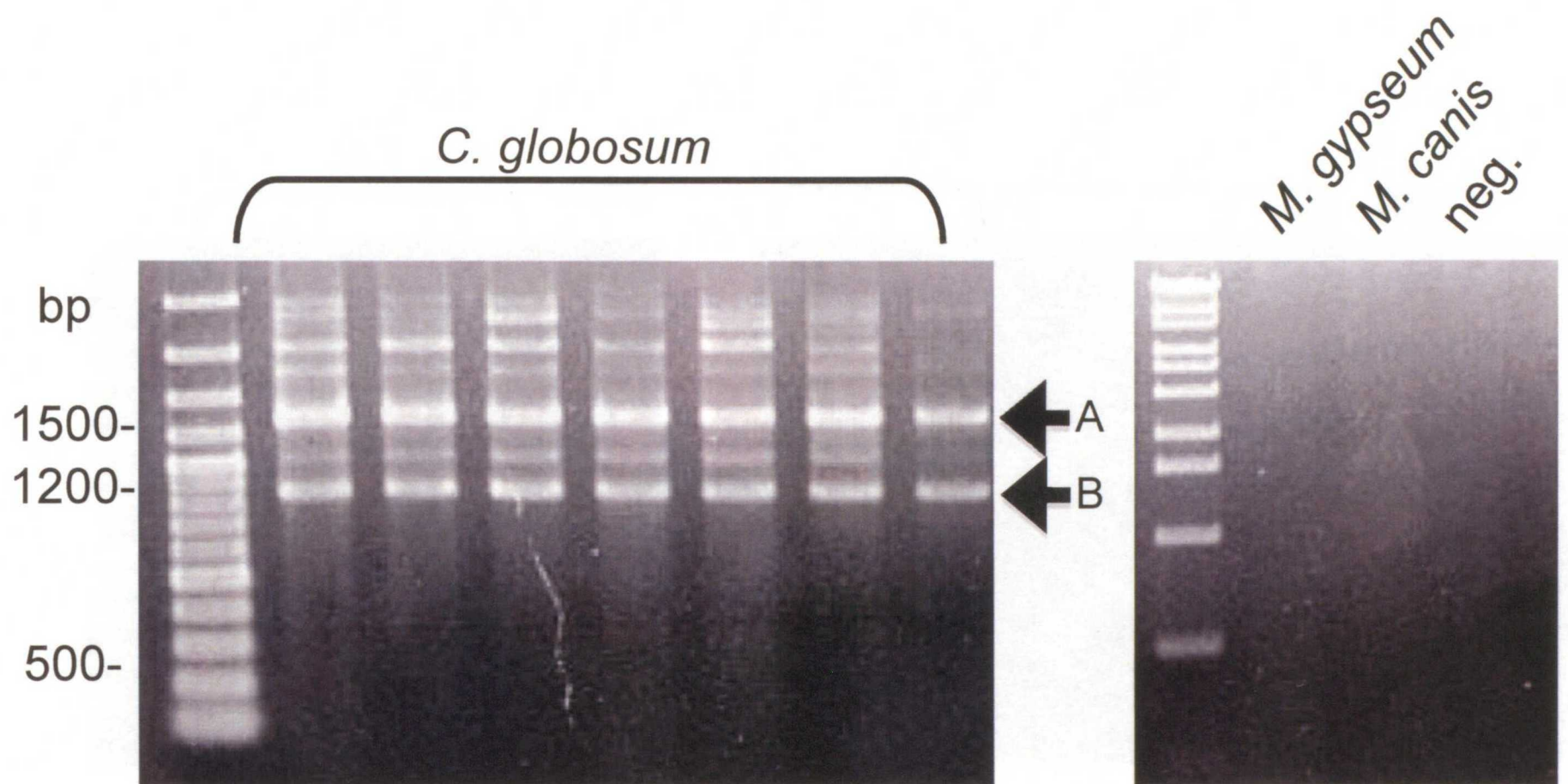


図13 プライマーYukiによるRAPD-PCR（代表例）
*C. globosum*では約1300 bp（矢印A）と約900 bp（矢印B）に顕著な特徴的増幅断片が見られる。

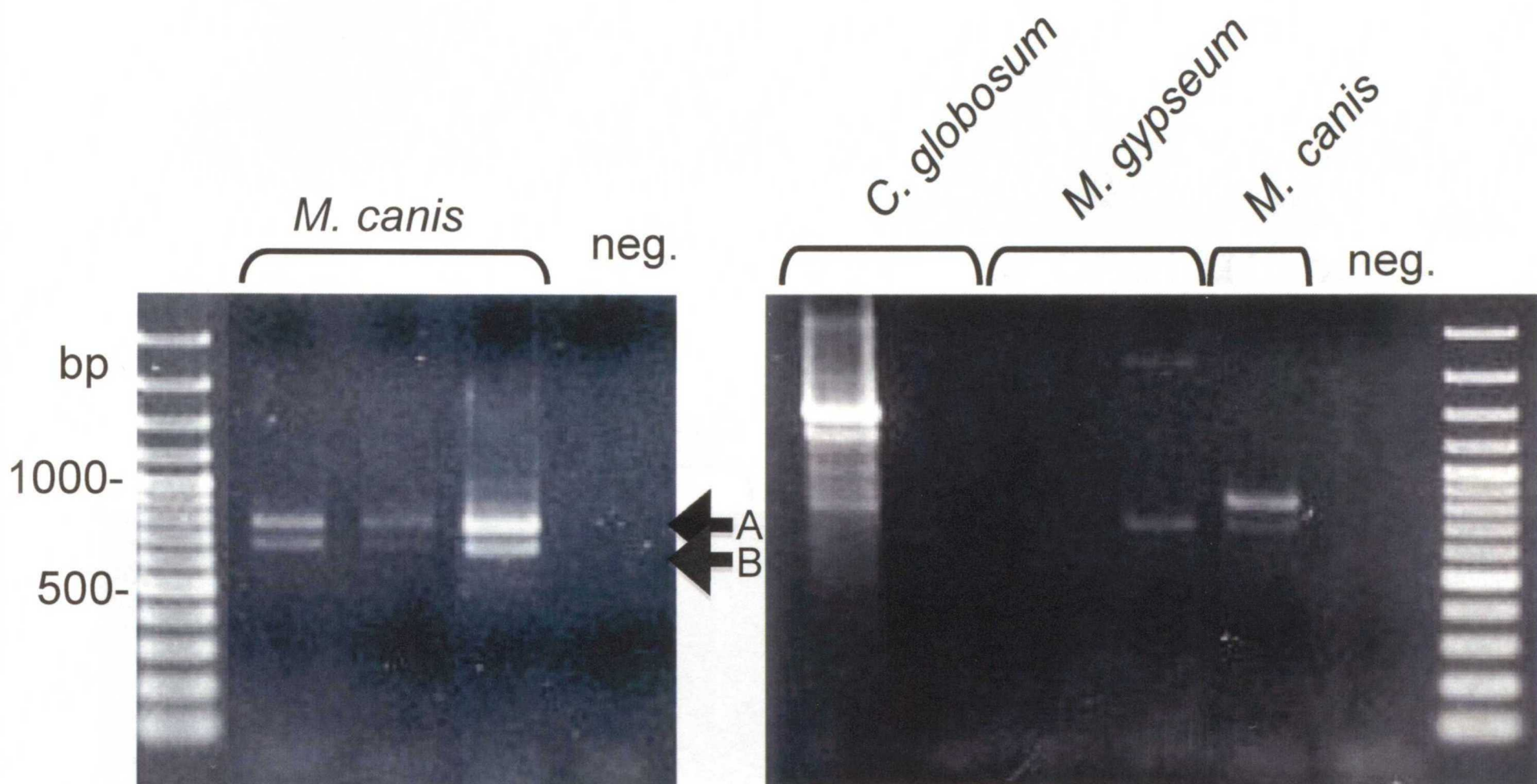


図14 プライマーKasumiによるRAPD-PCR (代表例)
*M. canis*では約800 bp (矢印A) と約700 bp (矢印B) に2つの特徴的
 増幅断片が見られる。

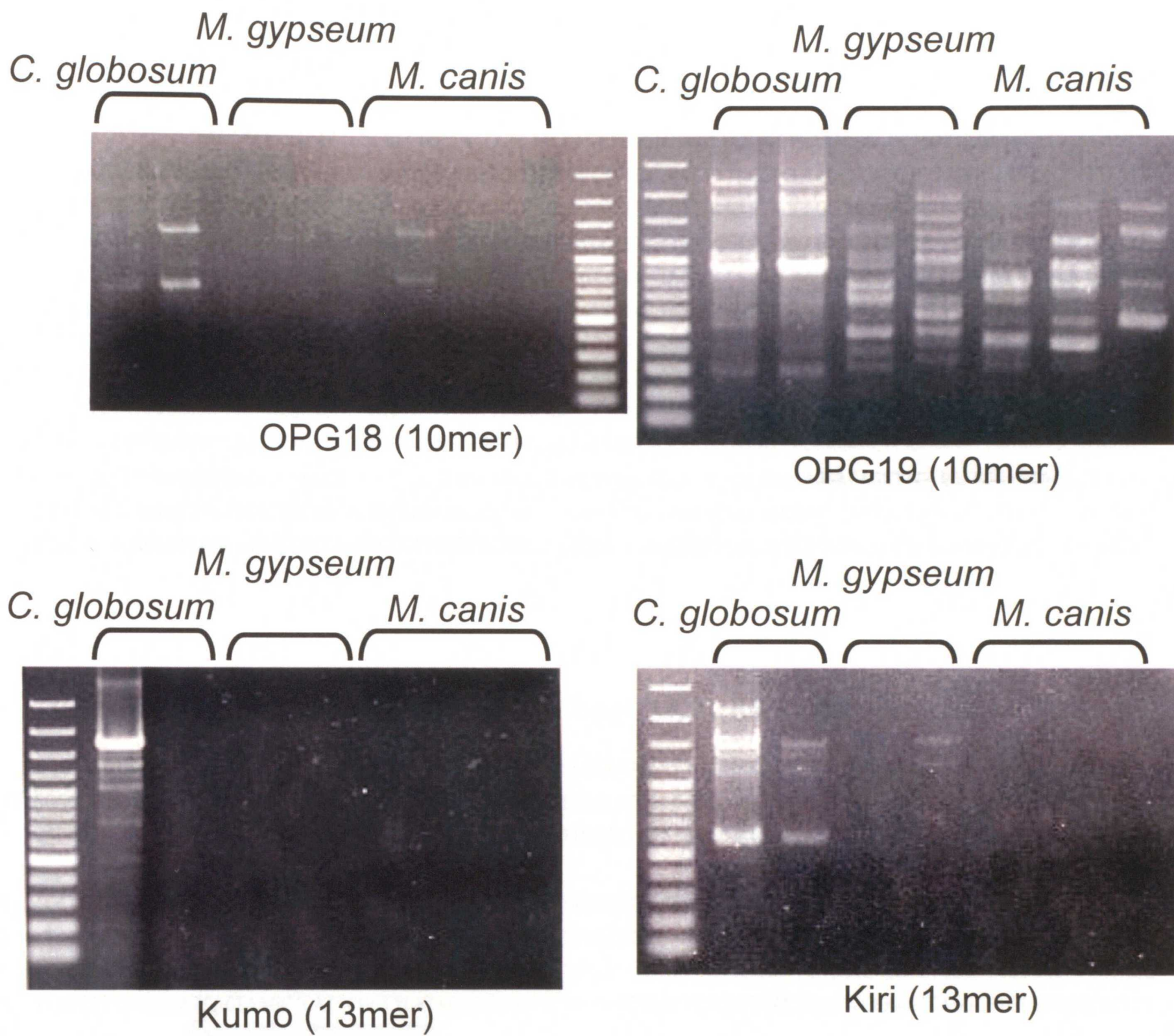


図15 各種プライマーによるRAPD-PCR
4種類のRAPDプライマーによる代表例を示した。

C. globosum 断片A (全長1298 bp) (Accession No. AB500269)

1	ACGGTGCAATACGCCAAGGCAAACAATCTCGCGGCTGTTGCCGTCTACCTATTGCTCTCGTTGCTGCTCAAACGGCGCAGATCGGAAAGTCTCCCACTC	100
101	CTTCGCCACGGTCATAGACCTCACCAGCATGCGTCCGTGGGACGCATCACCTTGCCTCCCTTTGCCTCCTTGTTACCGCCTCTTCAATCACCATTATCG	200
201	GTCTTGCTTGCTTTGTGACACGGATCGCTAACTCGGCACATAGCCGGGAGCGTTTGGCTCAAGAACTGGGCCGACAGAAACACCGAGGCCGGCAGTAACC	300
301	CCGAGGTTGGCAAGTACATCGGCATCTACTTCGTGTTTCGGCGTCGGCGCTGCCGTCTTGACGGTTGTACAGACCCTCATTCTTTGGATTTTCTGCTCCAT	400
401	CGAAGTATGTCTGGCCAAACAAGCGGACCGGATCTTGAGCTCACATGTGGTTTGCATAGGCATCCCGCAAGTTACACGAGAAAATGGCCACGGCCATCTT	500
501	CAGGTCGCCCATGTCCTTCTTTGACGTTACACCGGCTGGCCGCATTCTAAACCGGTTCTCGAGGTGCGTAATTGTGGCCCTACTCCAATAATTTTTCTG	600
601	CTTTTTTTTTTCCACGGGGTAGGACGAGCCAGCTGCTGTGAAAGGGGGCTTGAGCCAAGTGGCTCCAACGGTGCGGGAACCACCGGCGCCAGCGATGTC	700
701	ATACATCCGTGTCACGTAACGCCCATCGAACTCCCAATCCTGCACAGTGCAGACAGCCTCAAACCTCCGAGTTTACTGACTGTTTCACAGTGACATTTA	800
801	TCGTGTCGATGAGGTAATTGCCCCGACCTTCAACATGCTGTTCAACAACCTTGCCAGGTCGCTATTCACCCTTGTCGTCATCTCGGTACAGTGCCTCCT	900
901	TTTACCGCTTTCATCGTTCCGTTAGGTCTCATGTACATGTGGATTGAGCGGTAACCTACGGTCATCCCGAGAGCTCAAGAGATTGGACAGCGTGAGCC	1000
1001	GCAGCCCAATCTATGCTCACTTCCAGGAGTCCTTGGGCGGCATCTCCACCATCCGTGCATACCGCCAGCAGGACAGGTTGAGCTCGAGAACGAGTGGCG	1100
1101	GGTGGATGCCAACCTTCGTGCTTACTACCCTTCCATCAGCGCTAATCGATGGCTGGCGATACGGCTCGAGTTCATTGGTGCGATTGTTATCCTGGCTGCC	1200
1201	GCTGGGCTCGCCGTACTGCGGTGGCCAACGGCGTTGATCTCAGCCCCGGGATGGTCGGCTTGCCCTCTCGTACGGCTTGCAAATCACCACGTCTCT	1298

C. globosum 断片B (全長817 bp) (Accession No. AB500270)

1	CGGCGACGTACGTCATCAGCGCGCGCTGCTGATGAGGAGCAACCTGCCCCGCGACGTGAGCCGGACCGTCGGCGACGCGCTCGAGAGCGCGCTGGAGCC	100
101	GGGGTTCGTCGACCGTTGGTTTGAAGGCTGGTTCCTGCTCGCCAGCATAGGGACGGCCGCGGGGATATGGGTGGGCAGGAAGGTTAATAGTGGGTTTGGG	200
201	GAGGAGTGGGATGAGTTCGCGGGCGAGGAGATGGGGCAGAAGCGATCTTGATTTGATTGTACGAGTGGTCATTTGTTGTGTGTTTGTGTTGGAGCGTGT	300
<div><div>Yuki L-321F</div><div></div></div>		
301	ACATATTATTTGTAATCATTTAGCGTGCGGTCGTGTTTATTATGTGTCATGTGTAGAATAAAGGAGTAGGAATCTTATGTACCTTATGTTACAGCCCTTG	400
401	ATACTGAGGCTGGAAACCAGACACCGCCGACCATTTCTTCGCCGTGAGTTCCTCGGCATGTCGTGTACAGTTTTCACTTTTAAAATTACAGCTGAGGTTT	500
501	GGGGAAAAGTCCATCATTGGCCCTCTTTGTTGATTTGCAGAAGCAAATACGTCGACACCTTAGCTACATCAGAAGACATCTCCCATGGGGAGCTCCTAGG	600
601	TTATCTTTCGAGAATCGGTAAGGTGATTGCGTTTCATAGACCACGTTCTTCCCCCTGACTCTCATTTACTGCAAGCGAAGCCAGGGTTGTGTTGGCTCTCT	700
<div><div></div><div>Yuki L-614R</div></div>		
701	CCTAGAACAGCTCTCAGGAAGGCCAATTCCTTCCTCATAAACTCGCTTTGGAGACCCAACTATCACATACGACCATACTGCCAGAAAACACGGGATCCC	800
801	GTCTGCTCTCCCCTAGT	817

図16 プライマーYukiによるPCRで得られた*C. globosum*の特徴的DNA断片の塩基配列
矢印は断片B(図13) 検出用に設定したプライマーYuki L-321F
とYuki L-614Rの結合部位を示す。これらのプライマーでは
PCRで316 bp長の増幅断片が得られる。

M. canis 断片A (全長769 bp) (Accession No. AB500271)

1	ACTTTTATCATGCTGTTTCACCTGCACCCTCTAAGGGTGGAGGTATGGAGTGACTATCAAGCAAAATGATATCATGCAACACATCAGGCGCCTTTGGCAC	100
101	TTTTTCATTTTCCCGTTATATACACTCCAGAATATCCGAAATAAACTATTGAGCGTGGTGGCTTCTGTGAGGGGTTTCGGTAAATGGATGAAGCCTCCGA	200
201	TTTGGCTCATTGGACGCACGGTTGTATAGCAAGCTAGCTACACAATCAAGCTTGTGATCGCCATTCAACCAGCTTATCTATAGCGACTGGGTTCTACCCT	300
301	GCATTGATTTTCATACGAATGACCGGCGACACCGATTGACTTGTGAGTACGCTACGAGAGAGCCATTTCAACAAAACGCCTTATCAAGAGTTATTCAACT	400
401	AGAAAACGATCAAGGTTTTTCGAACCATTTAATCTTGCTTCTTCAGGTACACAACCTAGCCTTCCCATAGACACGGCATAGACAATGGAATGGCTAGACC	500
501	TAGAGGAGCGATCTGAATGTCTTTACTAGAGCCACCGAAGGTTTCGTCGTTCTAGAATCCACGGATTTCGTCATTGATGGTCCCTCGTTAAATATAAACTGG	600
601	TTGGCAACATTTTCAGTGGTGAGAACTTTAACGTCCATAGTCGTTAGACTAAAATCGCAGACACCACCCGAGAGTTAGAGTGGCGTAATATTGCTTTTTCC	700
701	GTCGATAAGCCCTCCACAACTCCAGCCATGGCTCGCCATGAAGTCAGTCATTAACCTTATAGTCAGTTA	769

M. canis 断片B (全長665 bp) (Accession No. AB500272)

1	GAGGCAGTATTTTGTAGCGCAATCAACTAAGAACGGCCTTTTTCACGGGAAGCTGGTTGTCACATTTGCAACAGACCCTTGTGAAAGGCCATTGTTATTAT	100
101	GTTACAGGTGCTACCGTCTGCCAATGATGCAGCCTGCCGGAAGCCTAGAAGCATCAAAGTGTGACCAGCCAGAGATAAAAAGCTGAGTATGCAGACAC	200
201	TGAAACGTTAGCCAACTTACGATCCAGCAGCCGAGTGATAGATCGAATGATAATATGAGCAGTCGGAAGACTGGCAAGCTCCCCAACTATCCACGTACTC	300
301	TGTACATAGAGAGTGCCAAATAAGCCAAACCGAATTTAACTCAACGCCTATCCAATTCAAAGTCTTTATCCGGTAGCGAGCCTGGCCATCACTTAGTGTA	400
401	TCACATATAGAACGACGAGGGCTTGATGAATGTTTCCATGGAACTATGCTTTCTATGAAAAAGTATTGTTGGTGGATGAGTTTACGCCCTACTTTTG	500
501	TTTCATTTTCATGGATCGACGTATATATCACGTGATACATAATTAATGTATGGATGGTCGACCTTCCTAATTGGGACAAGAGATAGATCTACTTAATAAAA	600
601	ACCACTGTGAAGGAAGATTTTGGGGGCGTAAATGGGTATCATCACCATGAACCACCTGTCTGTGG	665

図17 プライマーKasumiによるPCRで得られた*M. canis*の特徴的DNA断片の塩基配列
矢印は断片B (図14) 検出用に設定したプライマーKasumi L-321F
とKasumi L-467Rの結合部位を示す。これらのプライマーによる
PCRで169 bp長の増幅断片が得られる。

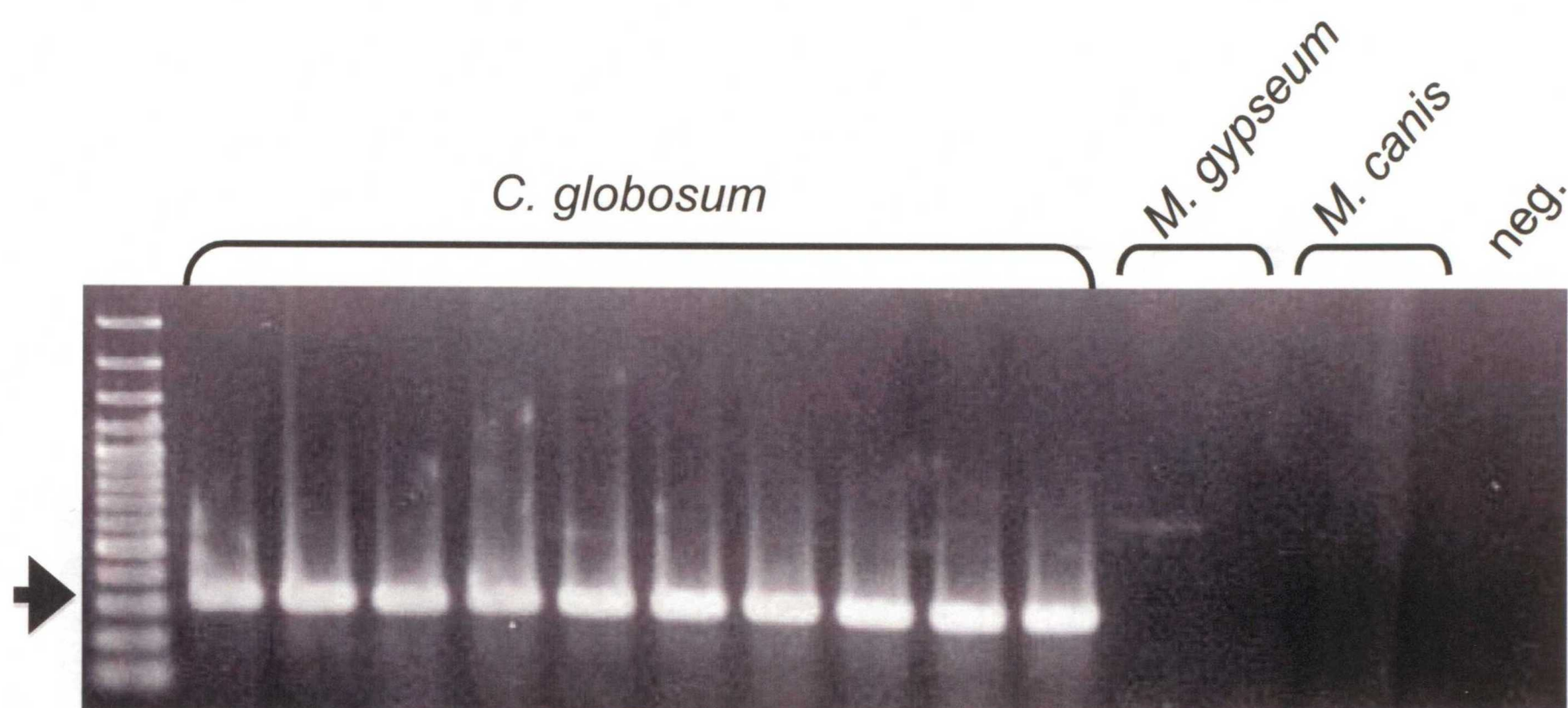


図18 *C. globosum* DNA (断片B: 図13, 16) 特異的検出のための PCR増幅
*C. globosum*にのみ目的の316 bp長の増幅産物 (矢印) が見られる。

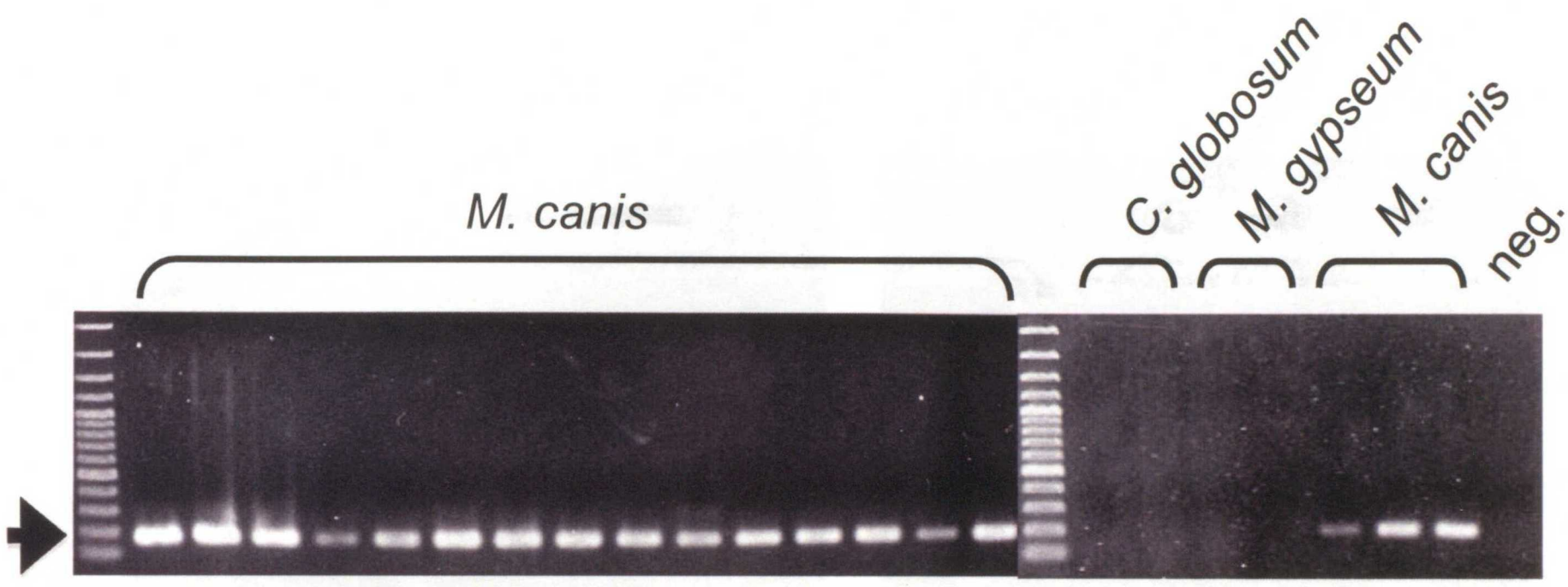


図19 *M. canis* DNA (断片B:図14, 17) 特異的検出のための PCR増幅
*M. canis*にのみ目的の169 bp長の増幅産物 (矢印) が
見られる。

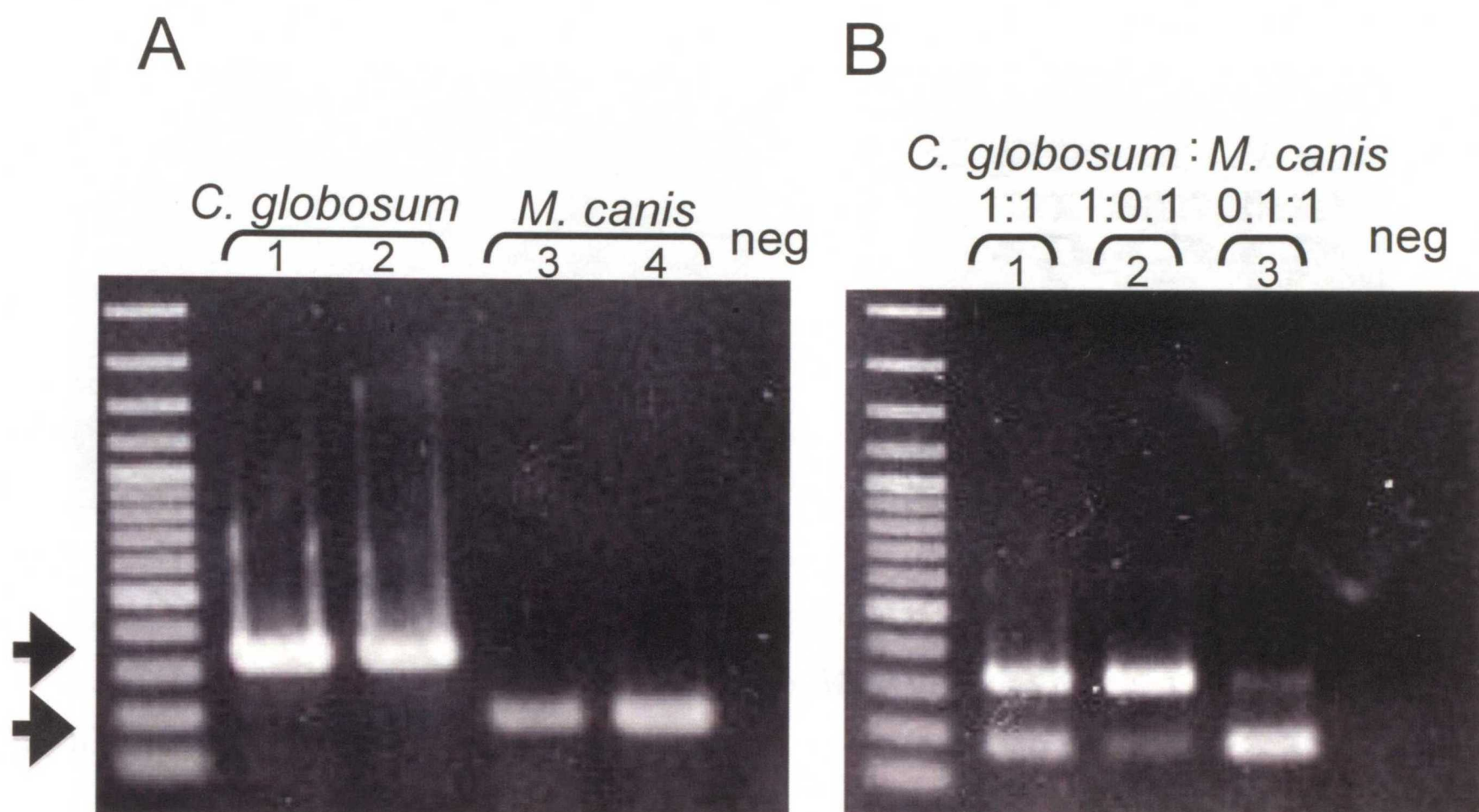


図20 マルチプレックスPCRによる*C. globosum*と*M. canis*の検出

A: レーン1, 2は*C. globosum* DNAを、レーン3, 4は*M. canis* DNAを鋳型として用いた。

B: レーン1, 2, 3は*C. globosum* と*M. canis* DNAをそれぞれ1:1, 1:0.1, 0.1: 1の割合で混合したものを鋳型として用いた。

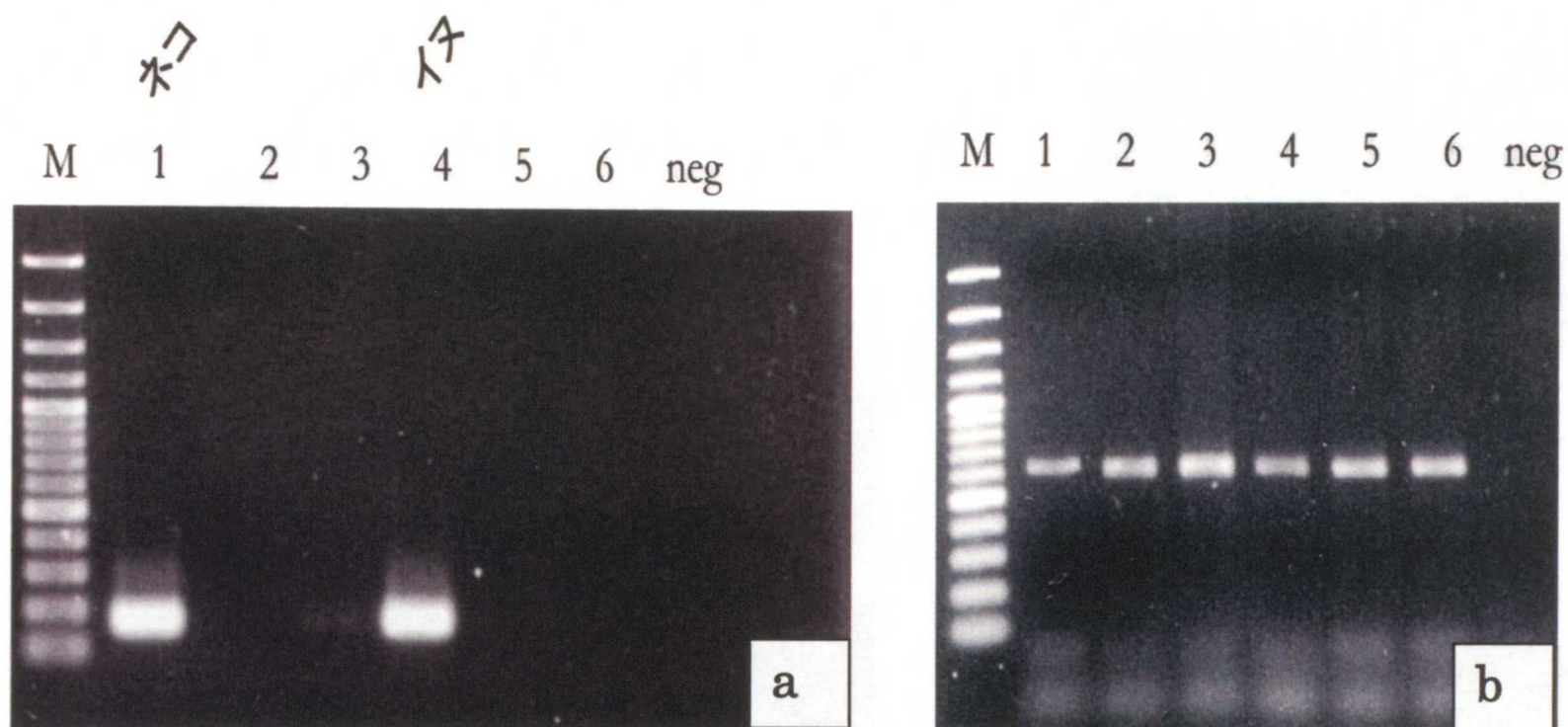


図 21 皮膚炎症状の認められた臨床材料からの DNA による PCR (代表例)

a. 本研究でのマルチプレックス PCR による *M. canis* の検出

b. D1/D2-PCR

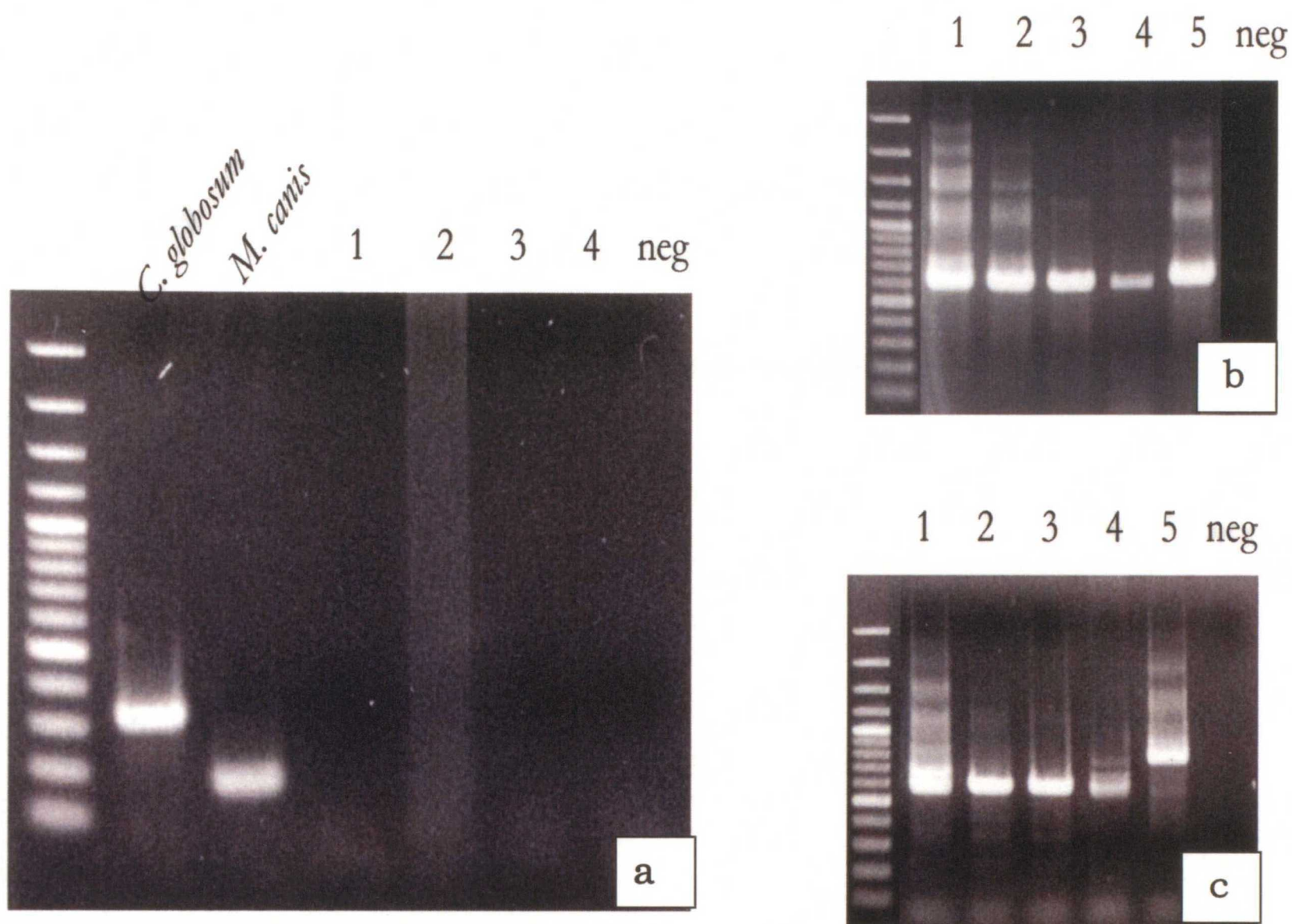


図 22 健常イヌ皮膚由来培養真菌（常在真菌）由来 DNA による PCR
 レーン 1～5 は、それぞれ異なる健常イヌ個体の皮膚から採取した真菌 DNA に
 よる増幅を示す。

- a. 本研究でのマルチプレックス PCR
- b. D1/D2-PCR
- c. ITS-PCR

表 1 治療経過及び検査経過



	初診	3 週間後	9 週間後	12 週間後
ケトコナゾール 内服				
ケトコナゾール 外用				
病変部落屑培養 によるコロニー 形成	+	+	—	—
ウッド燈	±	±	—	—
直接鏡検による 菌糸の検出	+	+	—	—

表 2 各抗真菌剤の最小発育阻止濃度（MIC）

抗真菌剤	MIC (μ g /ml)
Amphotericin B	4.0
Ketoconzole	0.25
Itraconazole	0.5
Myconazole	1.0
Micafungin	>16.0
Fluconazole	16.0
5-Fluorocytosine	64.0

表 3 *C. globosum* 18 株の詳細

サンプル番号#	IFM No.	採取地	分離源	備考
1	40868	日本	不明	長崎県五島列島環境分離株
2	40869	日本	不明	長崎県五島列島環境分離株
3	40870	日本	不明	長野県佐久環境分離株
4	40872	日本	不明	由来:unknown,=NHL
5	40873	日本	不明	長野県佐久環境分離株
6	40874	日本	不明	長崎県五島列島環境分離株
7	40875	日本	不明	由来:unknown,=NHL
8	40876	日本	不明	由来:unknown,=NHL
9	40877	日本	不明	由来:unknown,=NHL
10	40878	日本	不明	長崎県五島列島環境分離株
11	70880	カナダ	不明	由来:unknown,=DAOM
12	50667	ブラジル	ヒト患者	
13	50668	ブラジル	ヒト患者	
14	52186	ブラジル	患者病室	
15	54755	日本	落下菌	ファーストラボ
16	55623	日本	イヌ:頸部痂皮	千葉県
			背即部体毛	報告日=同定日 2005.11.30
17	40881	カナダ	アラスカエンドウの さや	
本症例株	53574	日本	イヌ、黒ラブ: 皮膚炎	申告日:2004.3.12 (Accession No. AB292591)

表 4 *C.globosum*18 株の分子生物学的分類

サンプル番号#	IFM No.	β チューブリンDNA型	FM1 DNA型
1	40868	A	Y
2	40869	B	Z
3	40870	A	Y
4	40872	A	Y
5	40873	A	Z
6	40874	A	Z
7	40875	B	Z
8	40876	B	Z
9	40877	B	Z
10	40878	B	Y
11	70880	B	Z
12	50667	B	Z
13	50668	B	Z
14	52186	B	Z
15	54755	B	Z
16	55623	B	Z
17	40881	B	Z
本症例株	53574	B	Z

表 5 臨床材料からの PCR 結果

No	動物種	症状	サンプル腫	PCR 結果	形態同定	備考	シーケンス結果
1	ネコ	+	培養菌糸	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>		
2	イヌ	+	培養菌糸	×	×		<i>Alternaria</i> sp.
3	イヌ	+	培養菌糸	×	×		
4	イヌ	+	培養菌糸	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>		
5	イヌ	+	培養菌糸	×	×		<i>Alternaria</i> sp.
6	イヌ	+	培養菌糸	×	×		<i>Penicillium</i> sp.
7	イヌ	+	培養菌糸	×	×		<i>Malassezia pachydermatis</i>
8	ウサギ	+	皮膚	<i>M. canis</i>	×	コロニー (-)	
9	イヌ	+	皮膚	×	×		
10	イヌ	+	培養菌糸	×	×		
11	ネコ	+	皮膚	×	×	治癒検体	
12	イヌ	+	皮膚	×	×		
13	イヌ	+	皮膚	×	×		
14	イヌ	+	皮膚	×	×	治療中	
15	イヌ	+	皮膚	×	×		
16	イヌ	+	皮膚	×	×		
17	イヌ	+	皮膚	×	×		
18	イヌ	+	皮膚	×	×		
19	イヌ	+	皮膚	×	×		
20	ネコ	+	皮膚	×	×		
21	イヌ	+	培養菌糸	×	×		<i>Cladosporim</i> sp.
22	イヌ	+	培養菌糸	×	×		<i>Alternaria</i> sp.
27	イヌ	-	培養菌糸	×	×	健常	<i>Trichosporon debeurmannianum</i>
28	イヌ	-	培養菌糸	×	×	健常	
29	イヌ	-	培養菌糸	×	×	健常	
30	イヌ	-	培養菌糸	×	×	健常	<i>Alternaria</i> sp.
31	イヌ	-	培養菌糸	×	×	健常	<i>Valsaria ceratoniae</i>
32	イヌ	-	培養菌糸	×	×	健常	
33	イヌ	-	培養菌糸	×	×	健常	
34	イヌ	-	培養菌糸	×	×	健常	<i>Alternaria</i> sp.

＋：皮膚症状あり、－：皮膚症状なし、×：*C. globosum* 及び *M. canis* とともに未検出