

「ニューモシスチスとはどんな微生物か？ —その生物学と分類学を中心に—」

“What microorganism is *Pneumocystis*?
Focusing on its biological and taxonomical features”

やま ぐち ひで よ
山口 英 世
Hideyo YAMAGUCHI

I. はじめに

私が所属する帝京大学医真菌研究センターは、世界有数の病原真菌株コレクション (TIMM コレクション) を擁しています。このコレクションは、ほとんどすべての病原菌種を網羅していますが、例外が2つあります。1つはコクシジオイデス *Coccidioides immitis*、そしてもう1つがニューモシスチス *Pneumocystis* です。前者についてはこれほど高い病原性をもつ真菌を安全に取り扱うだけの設備が整っていないからであり、後者については *in vitro* 培養ができないからです。このように理由は別々ですが、どちらの真菌も発見当初は原生動物 (原虫) とみなされていたという点では好一対といえるかも知れません。しかし *C. immitis* の場合は発見されてから10年も経たないうちに真菌と判明したのに対して、*Pneumocystis* が真菌と認められるまで20世紀の大半、ほぼ80年を費やしました。なぜそんなに長い年月が必要だったのか、それを説明するのがこのレビューを執筆した目的であるともいえます。

正直に告白しますと、執筆に取り組むまで私は *Pneumocystis* について人並み以上の関心はあったものの、通り一片の知識しか持っていませんでした。ところが文献を調べていくうちに、*Pneumocystis* の科学がいかに波乱に富んだ歴史的背景とともに今日に至ったかを知り、すっかり認識を新たにしました。しかし *Pneumocystis* の研究に直接たずさわった経験のない私にとっては、その膨大過ぎる内容を1編のレビューにうまくまとめる作業は決して容易ではなく、机に向かって呻吟 (しんぎん) する日々は数カ月も続きました。そのあげく、迷いながらも私なり

の考え方で何とかまとめてみたのですが、偏見に過ぎる部分が多々含まれている可能性は否めません。また原稿の枚数が予定を遥かに超え、編集関係者や読者の方々に多大な忍耐を強いる結果になってしまったことも誠に申し訳なく思う次第です。

カリニ肺炎などともよばれてきた *Pneumocystis* 感染症が、主要な深在性真菌症の1つとして今後ますます大きな脅威になることは必至ですが、その病原体である *Pneumocystis* はまだ多くの謎を秘めています。このレビューには、この不思議な微生物の本体についての理解と関心を深めるのに少しでもお役に立てたらという願いが込められています。

引用した文献は多数にのぼりますが、本稿にかかわる研究内容のオーバービューとしては Cushion¹⁾ および Stringer & Walzer²⁾ のそれが好適です。また日本語で書かれたものとしては、横村浩一博士 (帝京大学医真菌研究センター) の総説³⁾ がコンパクトながら要点を抑えていて大変参考になります。

II. *Pneumocystis* と *Pneumocystis* 感染症の研究の歴史

1909年に *Pneumocystis* が発見されてからすでに100年を過ぎました。人工培養ができないこの得体の知れない微生物を相手に悪戦苦闘しながらその科学的解明に挑戦した研究の歴史、ならびに予想もしなかった *Pneumocystis* 感染症の発生とそれに翻弄された歴史は、まさに一篇のドラマを見ているようで興味尽きないものがあります。こうした歴史に刻まれた主な出来事を表1にまとめてみました。

Pneumocystis の第1発見者は、シャガス病 Chagas' disease (アメリカトリパノソーマ症) とよばれる原

表1 *Pneumocystis* とその感染症の主な出来事と研究の歴史

1900年代	<i>Pneumocystis</i> がラットの肺から初めて発見 (Chagas, 1909)。
10年代	<i>Pneumocystis</i> を新種の原虫と考え、 <i>Pneumocystis carinii</i> と命名 (Delanoë & Delanoë, 1912)。
40～50年代	間質性形質細胞性肺炎の小児患者から <i>P. carinii</i> が検出 (Van der Meer & Berg, 1942)。 <i>P. carinii</i> が間質性形質細胞性肺炎の病原体と判明 (Vaněk, 1951)、以後この疾患は <i>P. carinii</i> 肺炎 (PCP) とよばれる。 ペンタミジンによる PCP の最初の治療成功例が報告 (Ivady & Paldy, 1958)。
60～70年代	トリメトプリム-スルファメトキサゾール合剤が PCP 治療薬として臨床導入、第1選択薬となる。 <i>P. carinii</i> の超微形態学を中心とする生物学的研究が進展。 <i>P. carinii</i> のヒト由来株をラット由来株とは別の種と考え、 <i>P. jiroveci</i> の新種名を提案 (Frenkel, 1976)。
80～90年代	AIDS の世界的な大流行とともに PCP が第1位の AIDS 関連日和見感染症となる。 遺伝形質の解析により <i>P. carinii</i> が原虫から真菌に移される。
2000年代	医療の高度先進化に伴って、PCP は AIDS のみならずさまざまなタイプの免疫不全患者の主要な続発感染症となる。

虫疾患の名でも有名なブラジルの寄生虫学者 Carlos Chagas (1879～1934) です。彼はこの微生物をラットの肺から発見した時、それをシャガス病の病原体クルーズ・トリパノソーマ *Trypanosoma cruzi* の生活環のなかの1つの発育形と誤って解釈したまま、1909年に論文として発表しました⁴⁾。この記載に刺激されたイタリアの原虫学者 Antonio Carini は、リュウイス・トリパノソーマ *Trypanosoma lewisi* に感染したと診断されたラットの肺組織切片標本をパスツール研究所 (パリ) の研究仲間だった Delanoë 夫妻に送って観察を依頼しました。彼らは、その微生物がトリパノソーマとはまったく別の寄生性原虫であると結論し、論文に発表しました⁵⁾。そのうえで、この新しい原虫の同定に Carini が貢献したことを称え、種小名 specific epithet を “*carinii*” とする一方、属名にはこの原虫の肺親和性を考慮して肺を意味する “*pneumo-*”、それと特徴的な発育形態である “*cyst* (シスト)” (次頁参照) を組み合わせた造語 “*Pneumocystis*” をあてたのです。このようにして “*Pneumocystis carinii* Delanoë & Delanoë 1912” という種名が記載されました (この種名を尊重して、ここから先の記述には *P. carinii* を使用します)。

その後の数十年の間に、*P. carinii* がラットだけではなくさまざまな哺乳動物の肺にも寄生または感染していることが知られるようになったのですが、医学領域ではほとんど注目されませんでした。ヒトに病気 (感染症) をひき起こすとは誰も考えなかったからです。ところが、1942年、乳児を含む3例の肺炎患者の肺に *P. carinii* が存在することが Van der Meer と Brug によって報告されました⁶⁾。事実上、これはヒトの *P. carinii* 感染症 (肺炎) の最初の報告ということになりますが、この微生物が病原体として確認されたわけではありませんでした。この頃は、

第2次大戦の戦時中から戦後にかけての不衛生と食糧難に見舞われた時期であり、ヨーロッパでは間質性形質細胞性肺炎が低栄養の未熟児や幼小児の間で猛威をふるっていました。

1951年、Vaněk は間質性形質細胞性肺炎で死亡した複数の幼小児患者の肺胞浸出物から *P. carinii* を検出し⁷⁾、ここによく *P. carinii* が本症の病原体であると確認されました。さらにその翌年には、Vaněk の共同研究者である Otto Jirovec が小児を中心とする集団における *P. carinii* による間質性形質細胞性肺炎の流行について報告しました⁸⁾。これらの経緯は Gajdusek の総説⁹⁾ に詳しく述べられています。こうした研究成果によって、間質性形質細胞性肺炎は *P. carinii* 肺炎 (*Pneumocystis carinii* pneumonia ; 略語 PCP) の名で広く知られるようになり、わが国ではもっぱらカリニ肺炎とよばれてきました。

やがて戦後の経済復興によって生活環境が改善されると、幼小児などに多くみられた PCP 患者は減少の一途をたどりました。これに追打ちをかけたのが治療薬としてのペンタミジンの導入であり、1958年には治療成功例が報告されています¹⁰⁾。またラットの PCP モデルが利用できるようになったことなどから、1960年代から1970年代にかけて PCP 治療薬の研究・開発が急速に進みました。現在も主要な抗 PCP 薬として繁用されているトリメトプリム-スルファメトキサゾール (TMP-SMX) 合剤が臨床導入されたのもこの時期です。その結果、TMP-SMX 合剤がより毒性の強いペンタミジンに代わって第1選択薬となり、PCP の治療と予防は大きく前進しました^{11～13)}。しかし、まだ表立って問題化してはいませんでした。未熟児や低栄養児に代って悪性腫瘍や臓器移植後の免疫抑制薬使用などによる免疫不

全患者の間でPCPの発生がすでに起こっていたのです^{14,15)}。一方、1970年代には電子顕微鏡が普及したことなどから、超微形態学を中心に*P. carinii*の生物学的研究が、特に寄生虫学や原虫学の領域で着実な進展をみせていました。これにはわが国の研究者の貢献も大いにあずかっています¹⁶⁾。またPCP患者の肺から分離される*P. carinii*株とラットからの分離株との間で生物学的性状に差があることも次第に明らかになってきました。そうした成績に基づいて、1976年、Frenkelはヒト由来*P. carinii*がラット由来のそれとは別種であると考え、*Pneumocystis jiroveci*という新種名を提案しました¹⁷⁾。この種小名は、いうまでもなく前出のJirovecの名をとったものです。しかし*P. jiroveci*という種名はそれから四半世紀の間ほとんど使われることはありませんでした。

1980年代に入ると、PCPの疫学的状況を一変させる衝撃的な事態が起きました。予想もしなかったHIV感染症/AIDSの世界的大流行に伴って、PCPがAIDS関連日和見感染症の第1位を占める高い頻度でそれらの患者に発生したことです^{18,19)}。当時、AIDS患者の60～80%にPCPが続発したばかりでなく²⁰⁾、未発症のHIV感染者もAIDS発症に先行してPCPに罹患し²¹⁾、AIDS患者の死因の20～25%を占めるに至りました²²⁾。この深刻な医学的、公衆衛生的状況が契機となり、分子生物学的研究手法の導入や動物感染モデルの利用とも相まって、*P. carinii*の研究は、依然として*in vitro*培養ができないという大きなハンディキャップをかかえながらも、1980年代末から僅か数年の短い期間に驚くべき成果をあげました。その最たるものが18SリボソームRNA (rRNA) または18S rRNA 遺伝子、ならびにいくつかのタンパク質をコードする遺伝子についての塩基配列解析です。それに基づく分子系統関係の解析結果からは、これまでもっぱら原虫と考えられてきた*P. carinii*が実は真菌に属する微生物であることが明らかになりました。またそうしたデータの蓄積は*P. carinii*のラット由来株とヒト由来株との違いをますます明確にし、1999年に後者に対する種名*P. jiroveci* (後に*P. jirovecii*と修正) が再び提案されると²³⁾、ようやくこの新種名が次第に広く受け入れられるようになったのです。以上の経緯については、次に続くいくつかの項でもう少し詳しく述べることにいたします。

ここでAIDS患者のPCPに話しを戻します。1990年代に入ってペンタミジンやTMP-SMX合剤による予防投与が行われるようになると、1980年代に60%もあったPCP発生率は、1990年代前半には40%となり、やがて20%台まで低下しました^{24～27)}。またPCPによる死亡率もそれまでの20～40%から約10%へと改善したのです²⁸⁾。一方、AIDSに対するHAART療法が導入されたことによる影響はといえば、確かに初期はPCPの発生率を低下させたのですが、今世紀に入ってもPCPを発症するAIDS患者、PCP関連死亡者のどちらもまだかなり多いことがいくつものデータから示されています^{29,30)}。このように1990年代の後半を過ぎてもPCPはAIDS患者の最多感染症、最多肺疾患として患者の病態と予後に深くかかわっており³¹⁾、PCPの予防と治療は依然として大きな問題であり続けています^{32,33)}。

このようにPCPといえばAIDS患者の発症例にばかり注目が集まったのですが、それは氷山の一角に過ぎませんでした³³⁾。発生率こそAIDS患者の場合ほど高くはないにしても、それ以外のさまざまなタイプの免疫不全状態にある、より大きな患者集団でのPCP発症例が目立って増えるようになったのです。代表的な高リスク集団としては、未熟児³⁴⁾、固形臓器(肝、腎など)移植患者^{35～38)}、血液腫瘍・骨髄移植患者^{39～41)}、さらにはステロイド薬や生物学的製剤の投与を受けた患者^{42,43)}などもあげられます。なかでも血液腫瘍患者には重篤なPCP発症例が数多くみられ、それによる死亡率が36%にも達すると報告されています⁴¹⁾。2000年代に入って、医療の高度先進化と歩調を合わせるかのようにこうした高リスク患者がますます増えている現状を考えますと、PCP対策がこれまで以上に重要な医療的課題になることは必至といわなければなりません。

Ⅲ. 形態学的特徴と生活環

これから述べる*Pneumocystis*属微生物の発育形態と生活環に関する研究の成果は、主としてラット由来株つまり狭い意味の*P. carinii*について得られたものですが、基本的にはヒト由来株にもあてはまると考えられています。したがって、ここからは*Pneumocystis*という共通のよび方を使うことにします。またそうした研究の多くは、*Pneumocystis*が原

虫であるとの観点に立つて行われました。そのために、生活環のなかの各段階の発育形に対しては、原虫に対する用語が与えられましたので、取り敢えずそれを踏襲することにします。

1. 主な発育形態

Pneumocystis は、ヒト（特にPCPを発症した免疫不全患者）やラットその他のさまざまな哺乳動物（特に免疫抑制状態にした動物）の肺組織、とりわけ肺胞上皮細胞外に観察されます。ヒトを含めて宿主動物の種類が別々でも、検出される *Pneumocystis* には形態学的な違いがほとんどみられません。最も多く観察される発育形 developing form は、シスト（嚢子）cyst と栄養体（栄養型）trophozoite です。またそのほかにプレシスト（前嚢子）precyst もみられることがあります。このように *Pneumocystis* には少なくとも3つの発育形があり、生活環を構成する主なメンバーだと考えられます。*Pneumocystis* 発育形の形態学的研究は、もっぱら免疫抑制ラットに *Pneumocystis* のラット由来株を感染させてつくったPCPの動物モデルを使って行われてきましたが、ヒト（感染患者）の肺からの分離株も同様の形態学的特徴をもつことが示されています。

PCP患者の肺病巣組織（写真1）または喀痰検体から Grocott のメテナミン銀（GMS）染色、トルイジンブルーO（TBO）染色、ギムザ染色などによる染色標本を作成して光学顕微鏡下で観察すると、小型の楕円形（直径1～4 μ m）を呈する栄養体と、よ

り大型の球形～卵円形（直径5～8 μ m）のシストが肺胞上皮細胞の外、つまり間質中に認められます（写真2～5）。特に目立つのはシストであり、栄養体は比較的数が少ないようにみえますが、実際には栄養体のほうがシストの10倍も多く存在しています。栄養体が一見少ないのは、シストではその表面を覆うシスト壁 cyst wall つまり細胞壁 cell wall がGMS染色やTBO染色によって濃染される（ただしギムザ染色では染まらない）ので検出されやすいのに対して、栄養体の表層（外被 pellicle）は染色されないためと考えられます。この染色性の違いは、シストの厚く強固な細胞壁（80～120nm）にはかなりの量の β -グルカン^{44,45)}や糖タンパク質^{46～52)}が含まれているのとは対照的に、栄養体がきわめてうすく脆弱な細胞壁しかもっていないことに由来するようです⁵²⁾。またシストに比べて栄養体が不規則な形になりやすいのもそのせいらしく、特に電子顕微鏡観察用に固定・作製した標本などではアメーバ状にみえたりします⁵³⁾。しかしそうした異常な形は無固定標本では観察されませんので、これは固定処理によって生じたアーチファクトと判断されます^{54～56)}。

電子顕微鏡法による *Pneumocystis* の微細構造についての研究は、1960年代後半から盛んに行われるようになりました。主な研究材料は、1966年にFrenkelが開発した免疫抑制ラットのPCPモデル¹¹⁾でしたが、後にはPCP患者の肺組織検体も使われています。*Pneumocystis* が原虫かさもなければ真菌であることは、当初から分っていたのですが、微細

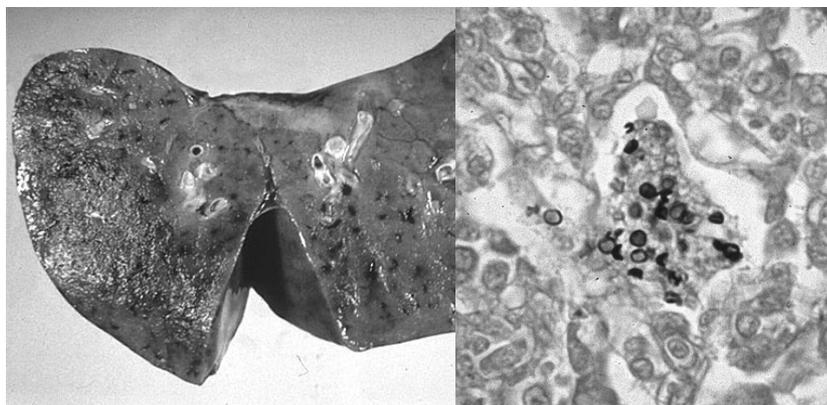


写真1 *Pneumocystis* 感染患者の肺病理組織像。
左：マクロ像；右：光顕像（TBO染色）

（北里大学名誉教授 奥平雅彦博士ご提供）

（写真1は巻末のカラーページに掲載しています。）

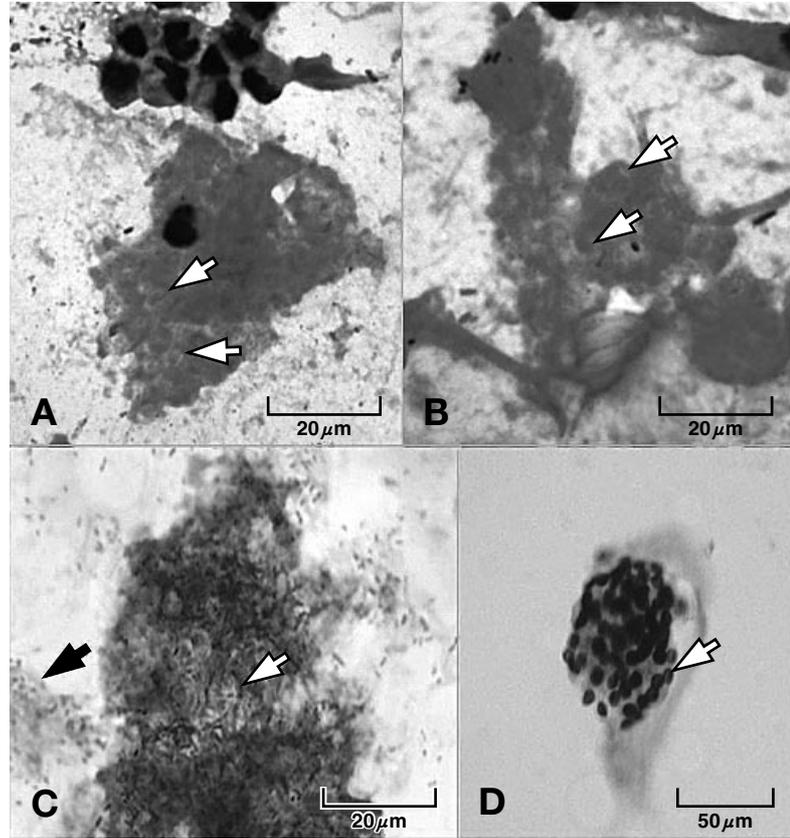


写真2 さまざまな染色法によって観察される PCP を続発した AIDS 患者の臨床検体中の *Pneumocystis* の光顕像。

A, B: グラム染色; C: ギムザ染色 (ディフ・クイック染色); D: GMS 染色。
 ⇨ の矢印はシストを、⇦ の矢印は栄養体を、各々示す。

(亀田総合病院臨床検査部 大塚喜人博士ご提供)

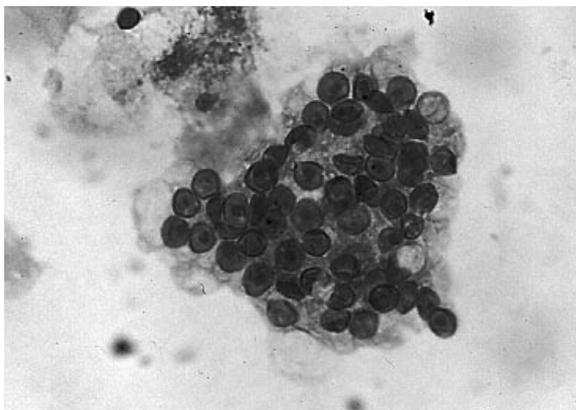


写真3 PCP 患者喀痰中の *Pneumocystis* の光顕像。多数の集簇した球形のシストに混じて三日月状を呈する脱シスト完了後のシストも観察される。(TBO 染色、×300)

(駿河台日本大学病院臨床検査部 西山宏幸先生ご提供)

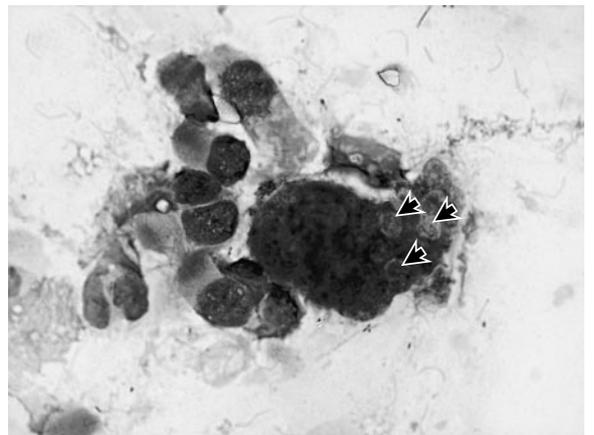


写真4 シストが目立つ PCP 患者喀痰中の *Pneumocystis* の光顕像。矢印はシストを示す。(ギムザ染色)

(亀田総合病院臨床検査部 大塚喜人博士ご提供)

(写真2, 3, 4 は巻末のカラーページに掲載しています。)

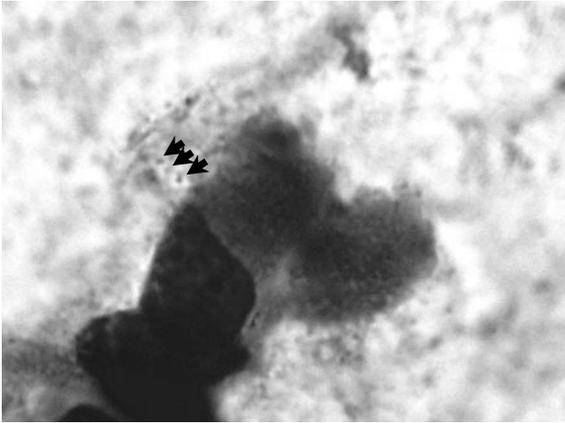


写真5 栄養体が目立つPCP患者喀痰中の *Pneumocystis* の光顕像。
矢印は栄養体を示す。(ギムザ染色)
(亀田総合病院臨床検査部 大塚喜人博士ご提供)

(写真5は巻末のカラーページに掲載しています。)

構造をいくら調べてもそのどちらかを決定づける証拠はなかなか見つかりませんでした。つまり原虫説と真菌説が対立しながら共存していたわけです。この議論については後の項で詳しく触れることにして、次に *Pneumocystis* の3つの主な発育形について各々の形態学的特徴のあらましを述べます。

栄養体. 電子顕微鏡を用いて細胞内の微細構造を観察すると、二重膜構造と核孔をもつ核膜、核小体、粗面小胞体、リボソーム、液胞、ミトコンドリア(1~2個)、グリコーゲン顆粒など、真核細胞に共通するオルガネラその他の構造体が認められます。ミトコンドリアは、内部にラメラ状のクリステ cristae をもち、この点では管状のクリステをもつ原虫のミトコンドリアよりもむしろ真菌のそれに似ています^{53, 57}。運動性を欠く栄養体には、べん毛などの運動器官もなければ微小管、微小フィラメントといった細胞骨格もみられません。

一部の研究者は、栄養体を外形の大小、表面の管状伸長体 tubular extension⁵⁸の有無、さらには核のサイズ、グリコーゲン顆粒の数、細胞封入体の数などの大小に基づいて、大型のタイプと小型のタイプにそれぞれ分けています。小型タイプは脱シスト excystation (孢子放出 spore release) が起こったばかりの栄養体、一方、大型タイプは増殖過程を代表する成熟した栄養体、と各々推測されています。大型栄養体の表面に局在する管状伸長体は、内部に高電子密度の顆粒が充満した長くてうすいコイル状の

構造体です。その機能は明確ではありませんが、おそらく宿主細胞であるI型肺上皮細胞への付着または栄養素の取り込みにあずかると考えられています^{53, 56, 58, 59}。

栄養体の増殖は、大多数の酵母にみられるような出芽(分芽) buddingではなく、細菌のように二分裂 binary fissionによって起こると考えられます。この点では、典型的な酵母である *Saccharomyces cerevisiae* などよりもむしろ分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* に似ているようです^{58~61}。

プレシスト. スポロサイト sporocyteともよばれ、栄養体から次に述べるシストの形成に至る中間段階の細胞をいいます。さまざまな形をしていますが、代表的なものは栄養体が接合してできたと思われる大きな単核(おそらく2倍体)をもつ球形細胞と、複数(ふつう8個)の小さな核(おそらく1倍体)をもつより大型の球形細胞です。細胞が大型化するにつれて、細胞壁も厚さを増し、最終的にはシスト壁と同じ3層構造の厚い壁(80~120nm)で覆われるようになります。

シスト. 上に述べたように、シストは厚くて硬い細胞壁(この段階ではシスト壁とよばれる)で覆われ、ふつう8個のスποロゾイト sporozoite またはシスト内小体 intracystic body とよばれる構造体を内蔵します。シスト壁は、かなりの量のグルカン(特にβ-グルカン)に加えて、キチンまたは少なくともその構成糖であるN-アセチルグルコサミンを含むことが、生化学的分析、免疫細胞化学的検出法、特異染色法などによって確かめられています^{44, 52, 62, 63}。

シスト内で成熟したスποロゾイトが放出されると(脱シスト)、そのあとには空になった三日月状のシスト(写真3)が観察されます。また潰れてしまったシスト内に放出されずに残ったスποロゾイトがみられることもあります。

2. 生活環

Pneumocystis の *in vitro* 培養が成功していないために、宿主肺での正確な生活環 life cycle は残念ながら分かっていません。したがって、光学顕微鏡法や電子顕微鏡法で得られる感染肺組織内のさまざまな発育形をつなぎ合せて、生活環の各段階を推定するほかありません。これまでに、二分裂による無性生殖だけの単純な生活環から、有性生殖と無性生殖

が組み込まれた複雑な生活環まで、いくつかの推定生活環が提唱されてきました。いずれも原虫、特に寄生性原虫、を念頭に置いてつくられたものです。

Pneumocystis の生殖環に関する電子顕微鏡的研究は、1980年代に吉田幸雄博士（当時京都府立医大医動物学教授）の研究グループによって詳細に行われました^{16, 58, 64}。図1に示したのは、*Pneumocystis* が有性世代と無性世代の双方をもつと想定してつくられた生活環の模式図です。このような生活環が提示された1980年代前半の頃には、*Pneumocystis* を原虫とみなす説が主流でしたので、各段階の発育形は原虫のそれに準じた用語で表現されています。まず封入体の数や核の大きさを増した大型の1倍体 (n) 栄養体細胞の間で交配が起こり、接合子 zygote がつくられます。栄養体が1倍体であることは、蛍光顕微鏡を用いて測定した核当りのDNA含量がゲル電気泳動法によって解析された染色体のゲノムサイズ（約7Mb）とほぼ一致することからも裏付けられます^{65, 66}。初めは1倍体の2核、次いで融合した2倍体 (2n) の単核をもった接合子は、やがて減数分裂によって4つの1倍体核をもつようになり、続く有糸分裂によって8核になります。それに伴って細胞は次第に大型球形化し、細胞壁も肥厚してきます。そうすると、各々の核は囲りに集まってきたミトコンドリアその他のオルガネラや細胞基質とともにコンパートメント化され、孢子形成が完了します。ここまですべてがプレシストとよばれる発育段階ですが、か

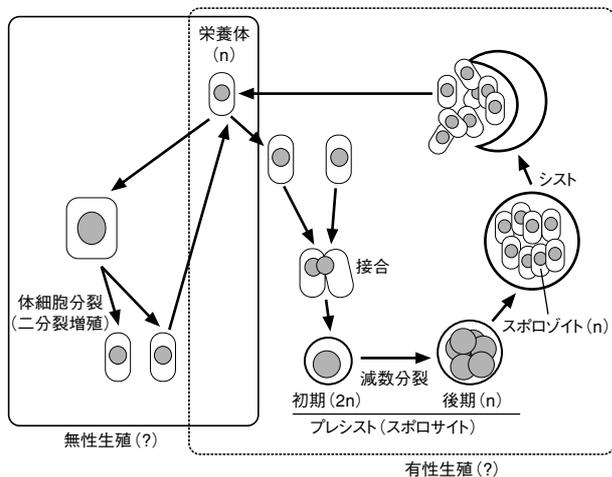


図1 感染肺の組織細胞像から推定される *Pneumocystis* の生活環。各発育形は主として原虫学の用語で表わされている。

(横村浩一博士 提供の図を一部改変)

なり複雑で多彩な過程が含まれることから、この段階を前期と後期（または前、中、後期）に分けることもしばしば行われます。

いうまでもありませんが、交配が起こるためには、オスとメス (α と a、または + と -、とも表わされます) と称される異性の配偶子 gamete がともにそろって存在しなければなりません。しかし今のところ、それを想わせるような形の違った栄養体は観察されていません。したがって、想定されるオス、メスの配偶子は同型配偶子 isogamete ということになります。この点は原虫の場合と似ているようにみえますが、実は酵母でも同様なのです。例えば、代表的な子囊菌酵母として知られる *S. cerevisiae* の2つの交配型 (α と a) や分裂酵母 *S. pombe* の交配型 (+ と -) は、いずれも形態学的にはまったく区別がつかず、交配型特異的遺伝子によってコードされるフェロモンまたはリセプターによって決められているのです⁶⁷。またこれらの酵母の交配の引き金になるのが栄養欠乏（特に窒素飢餓）といった環境ストレスであることを考えますと、*Pneumocystis* にみられる孢子形成も、宿主動物の肺が何らかの肺疾患や低栄養によって病的状態に陥るといった不適条件が引き金となって誘導されるのではないかと推測されます。

有性生殖のプロセスはともかくとして、完成したスポロゾイト（ふつう8個）を内蔵する大型の球形構造体が観察されるようになると、シストとよばれる段階に入ります。スポロゾイトが成熟するとともにシストは破れてスポロゾイトを外部に放出し（脱シスト）、三日月状の残骸となります。一方、シストから放出されたスポロゾイトはやがて栄養体に発育し、再び有性生殖環 sexual cycle に入ります。この生活環が1回転するのに、ラットの肺では4日かかるという報告があります⁶⁸。

有性生殖環とは別に、*Pneumocystis* には無性生殖環もあるらしいといわれています。この場合、無性的な細胞増殖（複製）は有糸分裂（体細胞分裂）によって行われることにはなりますが、その複製様式は *S. cerevisiae* をはじめ *Candida* spp. など大多数の酵母にみられる出芽ではなく、*S. pombe* のような分裂酵母に限ってみられる二分分裂であることが大きな特色です。これは後で述べるように *Pneumocystis* と最も近い系統関係にある真菌が *S. pombe* である事

実とも符号します。

1990年代に入って *Pneumocystis* が真菌に属するという考え方が確立すると、従来から各發育形にあてられてきた原虫学的用語を真菌学的用語に変える必要性が生じました。その結果、表2に示すような用語の変更案が提唱されてきました。しかし、こうした変更が必ずしも研究者の間で徹底していないために、現在に至ってもまだ表現法に混乱がみられるのが実状です（この問題については、「V. *Pneumocystis* の分類学」の項で少し詳しく述べます）。

3. 形態学からの原虫説と真菌説

意外な事実ですが、*Pneumocystis* がPCPの病原体であることが確認されて間もない頃に、早くもこれを真菌と考えた研究者もかなりいたようです。1950年代初頭、Giese^{69, 70}は肺胞浸出物中に見出される *Pneumocystis* の光学顕微鏡的形態が酵母の子嚢胞子にそっくりだとして、この微生物を真菌と見なし、“*Blastomycosis pulmonum*”と命名しました。同じ頃にSimon⁷¹は、PCP患者の肺組織中に観察されるシスト形をした微生物つまり *Pneumocystis* を、ヒトの肺という不慣れた環境によってもたらされた *Candida* の変則的な形態であると報告しました。また同年BauchとLadstätter⁷²は、PCPの病原体を *Candida* 属の1種と同定し、Simonの説を支持しました。続いてCsillagとBraudstei⁷³は、今でいうPCPの患者から分離し、しかも培養までしたという真菌様の微生物を生れたてのマウスに接種した結果、間質性形質細胞性肺炎と似た病理像が得られたことを根拠に、この微生物が本症の病原体に間違いないと主張したばかりか、*S. cerevisiae* と同様に、子嚢菌類のエンドミセス科 (*Endomycetaceae*)、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) に分類される真菌種だと報告したのです。さらに前出のLandstätter⁷⁴も間質性

形質細胞性肺炎に罹った患者や生れたばかりのネコから同様の酵母を分離培養したことを報告しました。培養に成功したというのは明らかに誤りですが、真菌だとする同定結果は「当らずといえども遠からず」、なかなか興味深いものがあります。*Pneumocystis* の酵母（真菌）説を支持する研究者はほかにもいました⁷⁵。しかし原虫の可能性が高いと考える研究者のほうがどうやら多かったようです^{76, 77}。

1960年代に入ると、電子顕微鏡を駆使した *Pneumocystis* の微細構造についての研究が盛んに行われるようになりました。詳細は略しますが、初めは真菌との類似性のほうが大きいと主張する研究者も少なからずいました^{59, 78, 79}。しかし原虫の細胞構造により近いとする以前からの意見のほうが次第に勢いを増してゆくこととなります^{52, 64, 80, 81, 82}。

このように形態学的解析の面からは、必ずしも原虫説が圧倒的に強かったわけではなさそうです。これは私の想像ですが、大勢が原虫説へ傾いた理由の1つには、多くの優れた形態学的研究が原虫学のエキスパートの手によってなされた反面、真菌学領域からの研究報告がほとんどなかったこともあるように思います。しかし *Pneumocystis* が原虫かそれとも真菌かという議論に決着がつかなかった最大の理由は、*Pneumocystis* の形態学には典型的な原虫とも真菌ともつかない両者が入り混じった特徴がみられること、そして何よりも *Pneumocystis* の純培養が不可能だったことにあったのです。

IV. 真菌説を決定づけた分子生物学的根拠とそれを支持するその他の根拠

原虫説が勢いを増すなか、この状況を一転させたのは1988年のEdmanらの報告⁸³に端を発した多くの分子生物学的研究の輝かしい成果でした。鍵と

表2 *Pneumocystis* の各發育段階における形態や事象を表現する原虫学的用語とそれに対応する真菌学的用語

原虫学的用語	真菌学的用語	真菌学的用語への補足
栄養体 (栄養型) trophozoite	栄養形 trophic form	「酵母細胞 yeast cell」とする意見もある。
プレシスト (前嚢子) precyst	スポロサイト sporocyte	シストに移行するまでの過程は真菌の「胞子形成 sporogenesis」に相当する。
シスト (嚢子) cyst	胞子ケース spore case	「子嚢 ascus」とする意見もある。
スポロゾイト sporozoite (シスト内小体 intracystic body)	胞子 spore	
脱シスト (脱嚢) excystment	胞子放出 spore release	

なったのはリボソーム RNA (rRNA) 塩基配列の解析です。Edman らの研究グループは、18S rRNA (16S 様 rRNA とよばれました) の塩基配列が、当時解析されていたどの原虫の配列よりも *S. cerevisiae* のそれと遥かによく似ていることを明らかにしたのです。翌 1989 年には Edman ら⁸⁴⁾ および Stringer ら^{85, 86)} によって、*Pneumocystis* からクローン化された 18S (16S 様) rRNA 遺伝子の塩基配列がいくつもの真菌 (*C. albicans*, *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans* など) との間で比較解析がなされ、その結果も同様に *Pneumocystis* と真菌 (特に子嚢菌) との明らかな類縁関係を示唆するものでした。一方、渡辺純一博士 (当時東大医科研寄生虫研究部) は、同年、*Pneumocystis* の 5S rRNA (18S rRNA とは別のリボソーム RNA 分子) の塩基配列を解析し、接合菌のそれと近い関係にあることを報告しています⁸⁷⁾。

これらの研究とほぼ同時かまたは少し遅れて、rRNA 遺伝子の新たな領域^{88, 89)} に加えて、次にあげるようなさまざまな酵素やタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列が解析されました。ペプチド鎖の伸長因子 (EF-3) 遺伝子⁹⁰⁾、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子⁹¹⁾、チミジン酸合成酵素 (TS) 遺伝子⁹²⁾、 β -チューブリン遺伝子^{93, 94)}、 α -チューブリン遺伝子⁹⁵⁾、TATA 結合タンパク遺伝子⁹⁶⁾、P-タイプ カチオン転位 ATP アーゼ (P-type cation-translocating ATPase) 遺伝子^{97, 98)}、ミトコンドリア DNA 中のいくつかのタンパク質 (アポシトクロム b、NADH デヒドロゲナーゼ、シトクロム オキシダーゼ サブユニット II) の各遺伝子⁹⁹⁾、アクチン遺伝子¹⁰⁰⁾、アロム arom (芳香族アミノ酸合成に関与する多機能酵素) 遺伝子¹⁰¹⁾。いずれの解析結果も、*Pneumocystis* の各遺伝子の塩基配列が真菌の対応する遺伝子の塩基配列と高い相同性 (> 60%) を示す一方、原虫のそれとの相同性は遥かに低い (< 20%) ことが判明したのです。さらに、このなかのいくつかの遺伝子および (または) その産物について、*Pneumocystis* と真菌との類似性を示す興味深い事実がいくつも明らかにされました。1つは、真菌特有 (原虫にはない) といわれる EF-3 タンパク質です。*Pneumocystis* の EF-3 タンパク質は、*S. cerevisiae* のそれと 57% 相同であり⁹⁰⁾、しかもタンパク質の構造の点でも *S. cerevisiae* や *C. albicans* との間で共通性がみられます。もう 1つの例としては、DHFR と TS の転写がリー

シユマニア *Leishmania* やプラスモジウム (マラリア原虫) *Plasmodium* といった寄生性原虫では単一遺伝子によって支配されているのに対して^{102, 103)}、*Pneumocystis* では真菌と同様に各々の酵素をコードする遺伝子が異なる染色体上に別々に存在することがあげられます^{91, 92)}。

こうした多種多様な遺伝子の塩基配列解析の報告が、1980 年代の末から 1990 年代前半までの僅か 4, 5 年の間に堰を切ったように輩出し、流れは一気に真菌説に傾きました¹⁰⁴⁾。加えて、生化学的研究の成績もそれを後押ししました。特に注目されるのは、*Pneumocystis* のシスト壁の生化学的分析であり、真菌細胞壁の特徴的多糖成分として知られる β -グルカンおよびキチンの存在が確認されたことです^{44, 52, 62, 63)}。さらに、シスト壁がザイモリアーゼ zymolyase (β -1,3-glucan laminaripentohydrolase) によって溶解されることから、シスト壁に存在する β -グルカンが真菌細胞壁共通の骨格多糖 β -1,3-グルカンであることも示唆されました。これは、 β -1,3-グルカン合成阻害作用をもつキャンディン系抗真菌薬が PCP マウスモデルで良好な治療効果を示すという成績^{68, 105)} とも一致します。シスト壁内に β -1,3-グルカンが大量に含まれていて、その合成酵素の遺伝子がシストの段階でのみ発現されることも後に明らかになりました¹⁰⁶⁾。こうして *Pneumocystis* の真菌説を強く支持する分子生物学的並びに生化学的データが数多く積み重ねられた結果、1990 年代中期には、原虫か真菌かという論争はほぼ完全に終止符を打ったといつてよいと思います¹⁰⁷⁾。

Pneumocystis が真菌と同じ遺伝子をもっていることは、その後に行われた交配やストレス応答に関するさまざまな遺伝子についての研究によっても確認されました^{108 ~ 113)}。また、そのなかのいくつかの遺伝子については、*S. cerevisiae* や *S. pombe* といった酵母細胞内で機能することも示されています。

V. *Pneumocystis* の分類学

1. 真菌の系統発生と分類

Pneumocystis が真菌に帰属するということになりますと、次に解決しなければならないのは、真菌の分類体系のなかのどこに位置するかという問題で

す。これを論じる前に、真菌の概念、真菌と関連微生物群との系統関係、そうした概念や系統関係に基づく真菌分類学の現状、などについて少し触れておきたいと思います。

真菌は、従属栄養性であり、分岐をもつ菌糸を伸ばして（まれに単細胞性で）発育し、有性的または無性的に胞子を産生する真核性微生物のすべてを包括する概念とされています。この概念にあてはまる微生物群としては、従来から真正真菌 true fungi (*Eumycota*) とよばれてきた典型的な真菌がまずあげられ、分類学上は真菌界 Kingdom *Fungi* としてまとめられています。界 Kingdom とは、最上位の分類階級のことです。それに加えて、真菌界とは別の2つの大きな分類群であるクロミスタ界 K. *Chromista* と原生動物（原虫）界 K. *Protozoa* に属する一部の微生物も真菌に含まれます。このように、真菌は地球上のすべての生命体を7つに分けた大分類群すなわち7つの界のうちの3つの界にまたがった多種多様でしかも10万種以上も含むといわれる巨大な微生物群なのです。

真菌界に属する真菌（真正真菌）は、光合成や貪食作用を営まずにもっぱら吸収によって栄養素を獲得すること、細胞壁にキチンと β -グルカンを含むこと、ミトコンドリア内部のクリステが管状でなく扁平であること、などを特徴とします。これに対して、クロミスタ界の微生物の特徴は、主として単細胞性で、大半が光合成を営み、細胞壁にはキチンも β -グルカンもなくふつうセルロースだけが含まれ、管状クリステのあるミトコンドリアをもつことにあります。植物界に属する紅藻を除く大多数の藻類は、このクロミスタ界に所属します。他方、原虫界の微生物の特徴としては、大多数が単細胞性で、変形体または群体をつくり、貪食作用によって栄養を獲得すること、栄養体には真の細胞壁が欠けていること、ミトコンドリアのクリステが管状であること、などがあげられます。

こうした真菌の複合的な分類体系が提案されたのは、1990年代に入ってからのことです^{114, 115}。界の次の位にある分類階級は、門 Phylum です。1995年に発表された Hawksworth らの分類体系¹¹⁵によれば、真菌界は次の4つの門に分類されます。(i) 子囊菌門 Phylum *Ascomycota*, (ii) 担子菌門 P. *Basidiomycota*, (iii) 接合菌門 P. *Zygomycota*, (iv) ツボカビ

門 P. *Chytridiomycota*。この分類体系がそれ以前のものとは大きく異なっている点は、(i) および (ii) と肩を並べていた不完全菌門 P. *Deuteromycota* とよばれていた分類群が門として扱うほどのまとまりに欠けるという理由から消されてしまったことです。もともと不完全菌（類）imperfect fungi (deuteromycetes ; mitosporic fungi) は、有性世代が判明していない真菌の総称であり、さまざまな系統の真菌を含んでいます。そのために系統（特に分子系統）を重視した新しい分類体系では、各不完全菌を系統関係に基づいて子囊菌門または担子菌門のなかに位置づけるようになったのです。ヒト病原性をもつ真菌のほとんどすべては、(iv) を除く3つの門のいずれかに属します。

クロミスタ界には全部で10の門があり、そのうち3ないし4つの門に真菌が含まれていて、それらは偽真菌 pseudofungi とよばれますが、無色の藻類として観察される場合が多いようです。次の3菌種がまれなヒト病原菌として知られています。(i) *Pythium insidiosum* (ピチウム症原因菌)、(ii) *Rhizosporidium seeberi* (リノスポリジウム症原因菌) (iii) *Prototheca wickerhamii* (プロトテコーシス原因菌)。原虫界は16の門から構成され、そのうち4つの門に真菌が含まれていますが、ヒト病原性をもつことが知られているものは1つもありません。医学的に重要なのはむしろ残りの12の門に所属する原虫であり、さまざまな原虫の病原体（寄生性原虫）が知られています。*Pneumocystis* もかつてはこの仲間と考えられていたわけです。

以上述べた真菌の大きな分類群、すなわち真菌界をはじめとする3つの界と真菌界の4つの門の系統関係を図2に示します。なお、2008年に Kirk ら¹¹⁶が発表した最新の分類体系では、真菌界にグロムス門 P. *Glomeromycota* と微孢子虫門 P. *Microsporidia* が新たに追加されました。しかし、いずれの門にもヒト病原性を示す真菌はみられません。

表3には、真菌界のなかでヒト病原菌を含む3つの門の形態学を中心とした生物学的特徴をまとめました。*Pneumocystis* の系統関係からいえば、子囊菌門の真菌、特に子囊菌酵母（例、*S. cerevisiae*, *S. pombe*）との対比が最も重要になります。

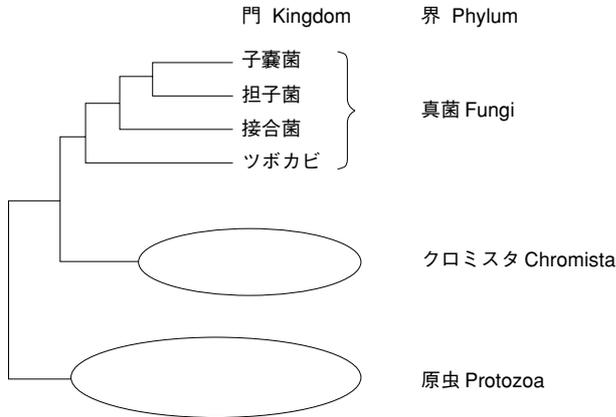


図2 18S rRNA 塩基配列に基づく真菌界と他の2つの微生物分類群(界)との系統関係を示す模式図。

2. *Pneumocystis* の分子系統： 真菌界のなかでの位置づけ

rRNA 遺伝子の塩基配列の比較は、細菌のような原核微生物だけではなく、真菌や原虫といった真核微生物の系統関係を解析するのにも、最も広く用いられる方法です¹¹⁷⁾。1980年代の末、Edmanら^{83, 84)}およびStringerら^{85, 86)}の研究グループは、ラット由来 *Pneumocystis* の18S rRNA またはその遺伝子(クローン化DNA)の塩基配列が真菌とりわけ子囊菌のそれと密接に関連することを明らかにしました。さらにBrunsら¹¹⁸⁾は、*Pneumocystis* と35種の真菌との間で18S rRNAの塩基配列の比較解析を行い、

Pneumocystis が系統的には子囊菌門に近縁であることを示しました。しかし、ここで問題となったのは、真核生物に共通する特性としてこれまで調べられたすべての真菌が何百という多数のrRNA 遺伝子をもっているのに対して、*Pneumocystis* がもつrRNA 遺伝子はたった1つだけという点です^{119, 120)}。単一遺伝子が100以上もの遺伝子のクラスターよりも速く進化してゆくのは当然のことですから、rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいてつくられた分子樹系図では *Pneumocystis* の分岐枝の長さが不正確になる可能性があります。しかし同様の樹系図がDHFR/TS 遺伝子^{121, 122)}、 β -チューブリン遺伝子^{123, 124)}、アクチン遺伝子¹⁰⁰⁾、カルモジュリン遺伝子¹²⁵⁾、といったさまざまな遺伝子についても得られたことから、*Pneumocystis* の系統関係はほぼ確定しました。その結果、*Pneumocystis* は子囊菌門のなかの、それも担子菌門に近いところに位置づけられ¹²⁶⁾、rRNA 遺伝子塩基配列がすでに知られている真菌のなかでは分裂酵母 *S. pombe* や植物寄生性真菌の1種 *Taphrina wiesneri* が最も近縁であることが分かったのです^{121, 122, 127, 128)}。これは、*Pneumocystis* が古生子囊菌 Archiascomycetes とよばれる原始グループ(綱 Class)¹²⁹⁾に所属することを意味します。さらに、Eriksson は、表3に示すように、子囊菌門の原始グループすなわち古生子囊菌綱のなかに新たに目 Order として *Pneumocystidales*、科 Family として *Pneumocystidaceae* を各々設

表3 ヒト病原菌種を含む真菌界の3つの門
—子囊菌門、担子菌門および接合菌門—の特徴

子囊菌(門) <i>Ascomycota</i>	<ul style="list-style-type: none"> ●子囊 ascus (内部に核融合と減数分裂に続いて子囊胞子 ascospore が生じるさまざまな程度に複雑化した囊状の構造体)が最も重要な特徴。 ●真菌全体の約半数の種を擁する最大の門。不完全菌の大半もここに含まれる。 ●細胞壁はうすい高電子密度の外層と比較的厚い低電子密度の内層からなる。 ●子囊の配列様式によって幾つかのグループに分類される(例：<i>Hemiascomycetes</i>, <i>Plectomycetes</i>, <i>Pyrenomycetes</i> など)。 ●<i>Saccharomycetales</i> とは異なる次のような幾つかの目 Order を含む原始グループ(綱)^{a)}がある： ① <i>Pneumocystidales</i> ; ② <i>Protomycetales</i> ; ③ <i>Schizosaccharomycetales</i> ; ④ <i>Taphrinales</i>。
担子菌(門)	<ul style="list-style-type: none"> ●胞子は内生的ではなく担子器 basidium 上に外生的に産生される(担子胞子 basidiospore)ことが最大の特徴。 ●細胞壁は厚い低電子密度の層を欠くラメラ状の高電子密度の物質からなる。 ●二核性菌糸 dikaryotic hyphae (融合や減数分裂を行う前のことなる由来の核を含む菌糸)が特徴的なすがい連結 clamp connection をつくり、隔壁にたる型小孔 dolipore をもつ。 ●子囊菌門の種の約半数と比較的少数の不完全菌が帰属する。 ●大多数はキノコ類であり、そのほか錆菌や黒穂菌といった植物病害菌も含まれる。医学的に問題になるのは限られた担子菌酵母(例、クリプトコックス)のみ。
接合菌(門) <i>Zygomycota</i>	<ul style="list-style-type: none"> ●糸状菌であり、子囊菌(門)および担子菌(門)のいずれとも異なり、菌糸に隔壁がないことを特徴とする。 ●多くの系統を含むまとまりのない分類群。 ●有性生殖によって肥厚壁をもつ接合胞子 zygospore を産生する。 ●約1,000種を擁し、その多くは腐生性(糞などに生える)であるが、一部は昆虫に寄生。約10の門に分布する少数の種だけがヒト病原性をもつ。

a)「古生子囊菌(綱) Archiascomycetes」という名称が提唱されている(文献¹²⁹⁾参照)。

け、そこにヒト由来の *Pneumocystis* を帰属させることを提案しました¹³⁰⁾。

図3は、ヒト由来 *Pneumocystis* (図中には *P. jirovecii* の種名で示されています) を含む主な真菌の18S rRNA 遺伝子塩基配列に基づいて作図された分子樹系図です。前に述べたように、*Pneumocystis* と同様に二分裂という真性真菌としては異例の分裂様式をもつ *S. pombe* が表現形質だけではなく遺伝形質の上でも類縁関係にあることは、大変興味深い点です。

Pneumocystis が原虫ではなく真菌であることが研究者の間で広く受け入れられるようになると、生活環の各段階の発育形をどう表現すべきかがあらためて問題になってきました。これまでの原虫学的用語では不適切であり、真菌にふさわしい用語に変更すべきだという声が大きくなり、いくつかの研究グループからさまざまな意見や提案が出されました^{131~133)}。各案の間には若干の相違があるものの、全体としては以前に Ruffolo⁵³⁾ が提案したものにはほぼ準じているようです。そうした真菌学的用語を表2

に示しましたが、どれも真菌学領域で確立された用語ではないために、今でも不統一な表現がしばしば目につきます。

3. *Pneumocystis* の多様性と種の命名をめぐる論争

Pneumocystis についての電気泳動法による核型解析や rRNA (またはその遺伝子) の特定領域の塩基配列解析などの研究は、当初ラット由来株を用いて行われました。ヒト由来株と比べて、宿主動物からの分離やそうした動物の維持がはるかに容易だったからです。間もなく同様の分子生物学的研究がヒト由来株についても行われるようになると、少なくともいくつかの遺伝子の塩基配列に関してはマウス由来株との間に別の種 species といってもよいほどの大きな違いがあることが判明しました¹³⁴⁾。さらに同様の比較解析がラットを含む30種以上の哺乳動物からの分離株について行われた結果、各々がヒト由来株との間では無論のこと、異なる動物種由来株同士の間でも核型、染色体構造、遺伝子塩基配列などに通常の真菌の種差を超えるほどの著しい違いが

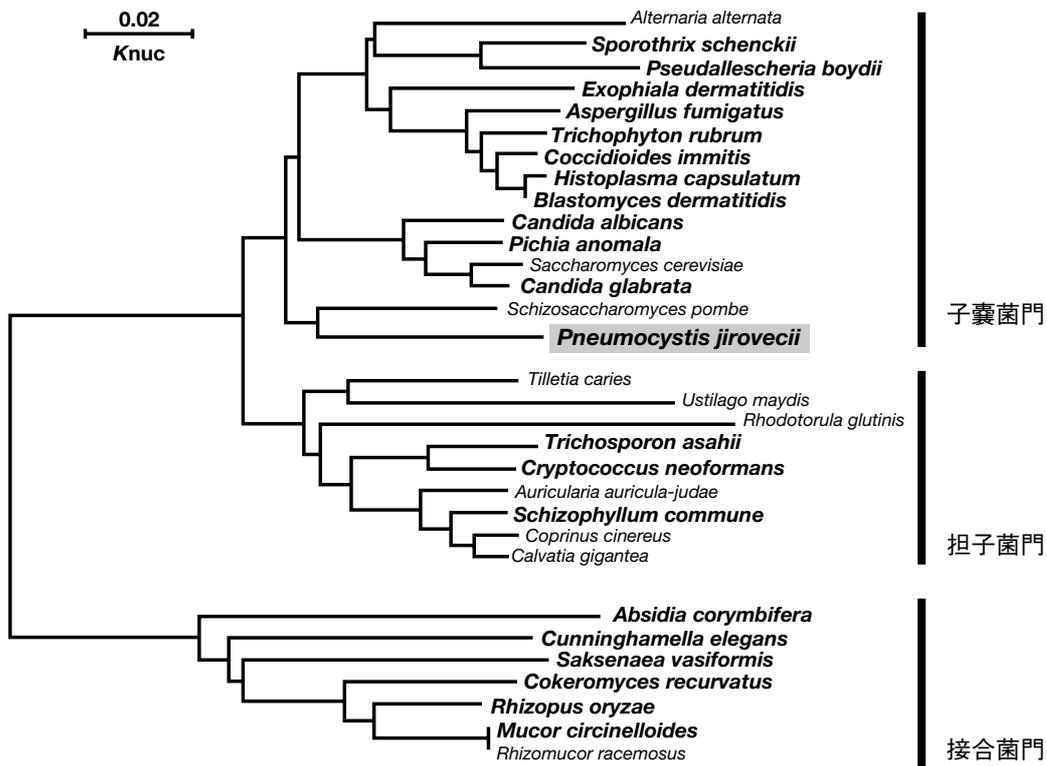


図3 18S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく *Pneumocystis* (*P. jirovecii*) を含む主要病原真菌の分子樹系図。太字で示すのはヒト病原性が確認されている種。

(横村浩一博士 提供の図を一部改変)

(図3は巻末のカラーページに掲載しています。)

認められたのです^{2, 135-137)}。また各分離株の宿主特異性は、こうした遺伝形質だけにとどまらず、表現形質のうえでも認められます。このことは、ある特定の動物種からの *Pneumocystis* 分離株がそれ以外のどんな動物種にも決して感染しないという事実¹³⁸⁾からも明らかです。PCP 患者についていえば、病原体はヒト由来株に限られているということです。また *Pneumocystis* の抗原性に関しても、ヒト由来株とラット由来株との間に明らかな違いがあることを示す証拠が、1972 年以来数多く報告されています¹³⁹⁻¹⁴²⁾。

話を rRNA 遺伝子の塩基配列に戻します。宿主動物が系統的に近縁であればあるほど、由来する *Pneumocystis* 株の系統も近い関係にあると考えられます。これを確かめる目的で、ヒトを含む 18 種の霊長類から分離した *Pneumocystis* 株同士で rRNA 遺伝子塩基配列を比較したところ、各宿主由来株の間に少ないものでも 2%、多いものでは何と 28% という大差が認められたのです¹⁴³⁾。これは、さまざまな哺乳動物に寄生または感染している *Pneumocystis* が宿主と連動した進化すなわち共進化 coevolution の道をたどってきたこと、またその進化の過程できわめて高い宿主特異性が成立したことを示唆しています¹⁴⁴⁾。かくして、ヒト由来の *Pneumocystis* が他のいかなる動物種に由来するとしても *Pneumocystis* と比べても歴然と異なることは、もはや疑う余地のない事実となりました。

そうになると、次に直面する問題は、各々の宿主特異的な *Pneumocystis* の分類学的取り扱いと命名法です。もっと具体的にいえば、異なる宿主に由来する株を別々の種とするのかそれとも同じ種のなかの別々のタイプとするのか、また各々の場合にどのように命名するのか、という問題です。その答えを出すには、何をもって種とするのかをまず決めておく必要があります。生物学の領域で一般に通用している種の定義は、Mayr による「同一グループの他のメンバーとのみ稔性の交配能をもつ生物の 1 群」というものです¹⁴⁵⁾。しかしこの定義は、不完全菌とよばれる有性世代の不明なメンバーが圧倒的多数を占める真菌の場合には、ごく一部の種にしか適用できません。そのために、大半の真菌については形態学的特性、生理学的特性、発育増殖様式といった表現形質に加え、特に近年は遺伝子塩基配列に基づく系統関係を考慮して種の認識・識別を行うという

方法¹⁴⁶⁾が広く受け入れられるようになりました。

さて本題に入りますと、1980 年代には異なる宿主動物種に由来する *Pneumocystis* 株を区別するのに、宿主動物の種名をつけ加えて命名するという単純なやり方が用いられました¹⁴⁷⁾。例えば、ヒト由来株は“*P. carinii, humanus*”、ラット由来株は“*P. carinii, rattii*”といったふうです。続く 1990 年代になると、由来の違う *Pneumocystis* 株の各々を、*P. carinii* の特別品種 forma specialis (f. sp. と略) として取り扱うという分類・命名法が Stringer らの研究グループその他の研究者から提案されました^{135, 148)}。特別品種とは、1 つの種のなかで特定の宿主に特異的に寄生または感染する株のグループを指し、分類学的には変種 varietas よりも下の階級の分類群 taxon になります。Stringer らの方式では、ヒト由来、ラット由来およびマウス由来の各 *Pneumocystis* 株は、それぞれ“*P. carinii* f.sp. *hominis*”、“*P. carinii* f.sp. *carinii*”、“*P. carinii* f.sp. *muris*”と命名されます。彼らは *Pneumocystis* 属に含まれる種を 1 種だけとして取り扱い、あえて新種をつくることをしなかったために、この提案に異論をさしはさむ研究者もなく、比較的容易に受け入れられたようです。ただし、その種名はともかくとしても、ヒト由来 *Pneumocystis* には遺伝型の異なるさまざまな株（またはタイプ）が含まれていること、また複数の株（タイプ）による混合感染も起こり得ることは、多くの研究成績が示しています¹⁴⁹⁻¹⁵⁶⁾。

問題が起きた発端は、2001 年に Stringer らが今度はヒト由来株に対して“*P. jiroveci*”の種名を与えるという再提案でした²³⁾。実は、“*P. jiroveci*”はそれより 25 年も前に Frenkel が提案した種名にほかなりません¹⁷⁾ (Ⅱ.「歴史」の項参照)。当時は *Pneumocystis* が原虫と見なされていたために、Frenkel は国際動物命名規約 International Code for Zoological Nomenclature のガイドラインに基づいて命名し、1976 年にこれを提案しました。いうまでもなく“*jiroveci*”という種小名は、初期の PCP 研究で業績をあげた Jirovec の名をとったものです。しかし、ヒト由来の *Pneumocystis* 株とラットなどの動物からの株との区別がまだできていなかった時代ですから、この新種名は普及せず、また正式に認められることもありませんでした。それからほぼ四半世紀経った 1999 年に Frenkel が再びこの種名を論文発表すると¹⁵⁷⁾、

Stringer らがこれに賛同して提案したというのが事の次第です²³⁾。

その後間もなく *Pneumocystis* が原虫から真菌に移されたために、Frenkel は "*P. jiroveci*" の種名を国際植物命名規約 International Code of Botanical Nomenclature (ICBN) にあらためて申請しました。その結果、"*P. jiroveci*" は文法的に正しい "*P. jirovecii*" に修正されたうえで、1976 年の時点に遡って有効名とすることが 2005 年にウィーンで開催された国際植物学会議 International Botanical Congress において承認されたのです。したがって有効名は、"*Pneumocystis jirovecii* Frenkel 1976" となります。またこれと併せて、従来の "*P. carinii*" という種名は、ラットに見出される 2 種の *Pneumocystis* のうちの 1 つに対する有効名 ("*Pneumocystis carinii* Delanoë & Delanoë 1912") として承認されました。現在 *Pneumocystis* 属のメンバーとしては、前記の 2 種のほかに、もう 1 つのラット感染種 *P. wakefieldiae*¹⁵⁸⁾ およびマウス感染種 *P. murina*¹⁵⁹⁾、合わせて 4 種が ICBN ガイドラインに基づいて記載されています。

予想されたことですが、欧米特に米国の研究者の間からはこの新種提案に少なからず反対意見が出されました。新種とする根拠が遺伝形質に偏重し過ぎていて、表現形質に関するデータが乏しいというのが主な理由のようです。確かにヒト由来の *Pneumocystis* (*P. jirovecii*) と動物由来の *Pneumocystis* spp. とでは、ほんの僅かな形態の違いしか認められないことが報告されています^{17, 160)}。また関係する学問領域 (原虫学、真菌学、微生物分類学など) の研究者間で種名変更についてのコンセンサスが十分に得られていないことも問題を複雑にしているようです。こうした反対意見や批判に対しては、当然ながら提案者側から反論がなされ、活発な論争がくり広げられてきました^{161~169)}。最近になってもこの議論に決着がつかない状況が続いていることもあって、微生物学や感染症領域の学術雑誌などでは、PCP の病原体に対して *P. carinii*, *P. jiroveci*, *P. jirovecii*, または単に *Pneumocystis* と標記するなど、種名の使い方が不統一であるために、大きな不便と混乱をひき起こしています。この問題の早急な解決をぜひとも望みたいものです。

いずれにしても、*Pneumocystis* の分類学はまだまだ流動的だといわざるを得ません。PCP の病原体

すなわち *Pneumocystis* のヒト由来株に限ってみても、遺伝型の異なる株が多数見つかっており、これらを各々別の種とするのかそれとも同一種の違うタイプとして扱うのかは今後の大きな課題です。

なお、わが国では米国などとやや状況が異なり、ヒト由来の *Pneumocystis* に対しては "*P. jirovecii*" の種名を使うというコンセンサスがほぼ定着しているようであり、私もそれに賛成です。また "*jirovecii*" の日本語 (カタカナ) 標記としては、英語圏でよくつかわれている発音 "yee-row-vet-zee" に準じて「イロベチー」とする例が多く見受けられます。

ヒト由来 *Pneumocystis* の種名が *P. carinii* から *P. jirovecii* に変更されたことに伴うもう 1 つの問題は、これまで "*Pneumocystis carinii pneumonia* (PCP)" (日本語ではカリニ肺炎) とよんできた病名をどうするかです。これについては、前の病名から種小名 "*carinii*" を除いて "*Pneumocystis pneumonia*" (「ニューモシスチス肺炎」) とすれば、PCP の略名は変えずに済むという妙案が米国の研究者 (A.G.Smulian など) から提案され、この問題は一応落ち着きました。

VI. 異端の真菌

Pneumocystis が真菌の仲間であることに異論を挟む人はほとんどいなくなりましたが、*Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* といったふつう知られている真菌と比べてかなり変わった性質をもっていることは確かです。この異端者ぶりこそが、長い間 *Pneumocystis* の正体を紛らわしくしてきた大きな原因でもあります。ここで典型的な真菌からおよそかけ離れた *Pneumocystis* の真菌らしからざる特徴をまとめてみます。

第 1 は、*in vitro* 培養ができず、したがって純培養が得られないことです。近年発見されて真菌の仲間に加えられた微孢子虫門¹¹⁶⁾のメンバーのように、細胞内寄生体としてしか発育・生存できない真菌もあることはあります。しかし、少なくとも病原真菌に関しては、*Cryptococcus neoformans* (クリプトコックス症原因菌) のように感染組織内で細胞内寄生性を示すものも含めて、人工培地に培養できないものはほとんどありません。例外中の例外は、ロボミコーシスの原因菌 *Loba lobi* ぐらいなものです。ミトコン

ドリアを欠く微胞子虫などと違って、*Pneumocystis* は通常の真菌と同様のミトコンドリアをもち、宿主組織内では細胞外で発育・増殖します。それなのになぜ人工培地に発育しないのかは大きな謎です。この問題については次の項でもう少し詳しく触れます。

第2は、*Pneumocystis* の細胞膜には、真菌特有のステロール成分であるエルゴステロールがなく、その代わりにコレステロールなどほかのステロールが含まれていることです^{170, 171)}。細胞膜のエルゴステロール分子およびエルゴステロール合成系の主要酵素をそれぞれ標的とするアムホテリシンBとアゾール系抗真菌薬がなぜPCPの治療に無効なのか¹⁷²⁾は、これで説明がつかず。

第3は、*Pneumocystis* の栄養体は、その細胞壁がきわめてうすく柔らかいために、容易に変形することです¹⁷³⁾。その結果、アメーバ状になることもあれば、付着した肺胞上皮細胞の表面をなぞるように形を変えることも知られています。一方、細胞壁がうすくて柔らかいことは、物理的な脆弱性を意味し、事実、この栄養体が溶解しやすいという観察結果が得られています⁶⁵⁾。

以上のような真菌とはとてもいえないような*Pneumocystis* のユニークな生物学的特徴をいくつも見せつけられると、*Pneumocystis* が重要な病原体だったからたまたま見つかっただけで、私達が見逃している変り種の真菌がほかにも多数いるに違いない¹⁷⁴⁾ という意見があるのは当然かも知れません。

VII. *In vitro* 培養への挑戦

最後になりましたが、このレビューのなかでどうしても触れておかなければならないのは、*Pneumocystis* 研究の進歩を阻む最大の要因となっている *in vitro* 培養の問題です。もし *Pneumocystis* の *in vitro* 培養系特に純培養（無菌培養）axenic culture のシステムが確立したならば、この微生物をめぐる謎の多くが解き明かされるに違いないからです。

宿主動物の肺からの初代分離株を用いた *Pneumocystis* の *in vitro* 培養の試みは、長い歴史をもち、すでに1940年代から行われてきました¹⁷⁵⁾。細胞（組織）培養や臓器培養など生きた細胞を用いた培養系のほか、人工培地だけの純培養系についても数多くの検討がなされました。しかし、これまでの研究報

告を見る限り、せいぜい5～10倍程度の増殖が得られるだけで、継代培養に成功したという報告は見当りません^{175～186)}。継代可能な純培養に成功したというある研究グループからの報告¹⁸⁷⁾が1つだけありますが、残念ながら他の研究グループがこれを追試・確認したという話しは聞いてきません。したがって、*Pneumocystis* の確実な *in vitro* 培養系はまだ確立されていないといわざるを得ません。しかし、この意欲をかきたてるような夢の難題への挑戦が途絶えずに続くことを、心から願うものです。

おわりに

今から30年ほど前のある日のことです。私はたまたま訪れた日本女子大学の大隅正子博士（現・同大学名誉教授）の研究室で数枚の電子顕微鏡写真（超薄切片像）を見せられ、「先生はこれをどうぞ覧になりますか？」と尋ねられました。聞いてみると、それは高名な原虫学者（実は前出の吉田幸雄博士）から判読を依頼されたある原虫の写真だということでした。大隅博士は人も知る酵母の超微形態研究の第1人者です。「細胞壁がほとんど見えないことを別にすれば、細胞の微細構造は酵母にそっくりですね。」というのがその時の一致した感想でした。おそらく吉田博士も、それが酵母である可能性を否定しきれず、それでわざわざ大隅博士のところを持ち込んだのでしょう。後でふり返ってみると、私にとってこれが *Pneumocystis* との最初の出会いです。しかしその時は、原虫とされていたこの微生物の正体がまさか真菌だとは夢にも思わず、いつしか私の記憶からほとんど消えてしまっていました。

それから10年近くも経ってNature誌に発表されたEdmanらの論文⁸³⁾を見た時、私は思わず目を見張りました。*Pneumocystis* が実は真菌だというのは、その衝撃とともにとっさに甦ったのが、かつての大隅研究室での記憶でした（このいきさつはエッセイとして拙著¹⁸⁸⁾に載せてあります）。

Edmanら^{83, 84)}や続くStringerら^{85, 86)}の研究グループの報告を契機に、*Pneumocystis* は医真菌学の領域でにわかに注目を集めるようになりました。この動きの後押しをしたのは、1991年にモントリオール（カナダ）で開催された第11回国際医真菌学会議（The 11th Congress of the International Society for

Medical Mycology) において *Pneumocystis* に関するシンポジウムがもたれたことです。“The fungal nature of *Pneumocystis carinii*” と題するこのシンポジウム¹⁸⁹⁾ は、前出の Edman 博士、Stringer 博士をはじめ、Cushion 博士など当代きってのエキスパートがシンポジストとして参加した実に意義深いもので、私自身も大いに感銘を受けました。それ以来 *Pneumocystis* について秘かに関心をもつようになりましたが、純培養が不可能なこの微生物を積極的に研究の対象にする気にはなれなかったのです。それから数年経って、当時大学院生だった榎村浩一博士(現・教授)らによって開発された rRNA 遺伝子の ITS 領域を標的とする広範囲真菌検出・同定用 PCR 法を用いて得られたデータ¹⁹⁰⁾ が、*Pneumocystis* 真菌説を支持する重要な根拠として注目されるようになるうとはまったく予想外のことでした。

今回この総説を執筆する機会に恵まれたのも、そんな因縁があったからかも知れません。それで力が入り過ぎたせいか、思わぬ長文となってしまいました。しかし幾多の紆余曲折を経た *Pneumocystis* の物語を一部でもお読み頂き、かくも不思議な微生物に少しでも興味をもって頂ければ大変嬉しく思いますし、ましてや研究してみようという気になって下さるならそれこそ筆者冥利に尽きるというものです。

謝 辞

貴重な図または写真のご提供を頂いた諸先生に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Cushion MT : Chapter 34 *Pneumocystis carinii*. In : Collier L, Balows A, Sussman M (eds) Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections 9th Ed, vol. 4 Medical Mycology, p.645-683, Arnold, London·Auckland, 1998.
- 2) Stringer JR, Walzer PD : 9 *Pneumocystis* –A genus long known, but with relationships only recently appreciated. In : Damer JE, Kobayashi GS (eds) The Mycota XII Human Fungal Pathogens, p.167-189, Springer-Verlag, Berlin·Heidelberg, 2004.
- 3) 榎村浩一 : 呼吸器系の生物学 : *Pneumocystis carinii* の生物学的位置づけ. Annual Review 呼吸器 2002. p.38-48, 中外医学社、東京、2002.
- 4) Chagas C : Nova tripanosomíaze humana. Memórias de Instituto Oswaldo Cruz Rio J, 1 : 159-218, 1909.
- 5) Delanoë P, Delanoë M : Sur les rapports des kystes de Carinii du poumon des rats avec le trypanosome Lewisii. C R Acad Sci (Paris), 155 : 658-660, 1912.
- 6) Van der Meer MG, Brug SL : Infection à *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. Ann Soc Belge Med Trop, 22 : 301-309, 1942.
- 7) Vaněk J : Atypical interstitial pneumonia of infants produced by *Pneumocystis carinii*. Casop lék česk, 90 : 1121, 1951.
- 8) Jirovec O : *Pneumocystis carinii* puvodce t.zv interstitialnich plasmocelularnich pneumonii kojencw. Csl Hyg Epidemiol Mikrobiol, 1 : 141, 1952.
- 9) Gajdusek DC : *Pneumocystis carinii* – etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. Pediatrics, 19 : 543-565, 1957.
- 10) Ivady V, Paldy G : Ein neues Behandlungsverfahren der interstitiellen plasmazelligen Pneumonie der Frühgeborener mit fünfwertigen Stibium und aromatischen Diamidinen. Monatsschr Kinderheilkd, 106 : 10-14, 1958.
- 11) Frenkel JK, Good JT, Schultz JA : Latent *Pneumocystis* infection of rats, relapse, and chemotherapy. Lab Invest, 15 : 1559-1577, 1966.
- 12) Dutz W : *Pneumocystis carinii* pneumonia. Pathol Ann, 5 : 309-340, 1970.
- 13) Hughes WT, McNabb PC, et al : Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Antimicrob Agents Chemother, 5 : 289-293, 1974.
- 14) Hughes WT, Price RA, Kim HK, et al : *Pneumocystis carinii* pneumonitis in children with malignancies. J Pediatr, 82 : 404-415, 1973.
- 15) Walzer PD, Perl DP, Krogstad DJ, et al : *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States : epidemiologic, diagnostic, and clinical features. Ann Intern Med, 80 : 83-93, 1974.
- 16) 吉田幸雄 : ニューモシスチスカリニ肺炎. 南山堂、東京、1981.
- 17) Frenkel JK : *Pneumocystis jiroveci* n.sp. from man : morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. Natl Cancer Inst Monogr, 43 : 13-30, 1976.
- 18) Mills J : *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* infection in patients with AIDS. Rev Infect Dis, 8 : 1001-1011, 1986.
- 19) Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, et al : Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. Protist, 153 : 303-310, 2002.
- 20) Center for Disease Control. Update : acquired immunodeficiency syndrome – United States. MMWR, 35 : 757-766, 1986.
- 21) Selik RM, Starcher ET, Curran JW : Opportunistic diseases reported in AIDS patients : frequencies, associations, and trends. AIDS, 1 : 175-182, 1987.
- 22) Dei-Cas E, Soulez B, Polluault F, et al : *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. Méd Sci, 6 : 517-525, 1990.

- 23) Stringer JR, Cushion MT, Wakefield AE : New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. J Eukaryot Microbiol, Suppl : 184S-189S, 2001.
- 24) Center for Disease Control : HIV/AIDS surveillance, Report : Year End Edition, 1994.
- 25) Hardy WD, Feinberg J, et al : A controlled trial of trimethoprim-sulfamethoxazole or aerosolized pentamidine for secondary prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome AIDS. Clinical Trials Group Protocol 021. N Engl J Med, **327** : 1842-1848, 1992.
- 26) Saah AJ, Hoover DR, et al : Predictors for failure of *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis. Multicenter AIDS Cohort Study. JAMA, **273** : 1197-1201, 1995.
- 27) Bozzette SA, Finkelstein DM, Spector SA, et al : A randomized trial of three antipneumocystis agents in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. NIAID AIDS Clinical Trials Group, N Engl J Med, **332** : 693-699, 1995.
- 28) Feinberg J : Critical look at new therapies. In : Ballière's Clinical Infectious Diseases, International Practice and Research, *Pneumocystis carinii* ; 2, p.487-503, Ballière Tindall, London, 1995.
- 29) Morris A, Wachter RM, Luce J, et al : Improved survival with high active antiretrovirus therapy in HIV-infected patients with severe *Pneumocystis carinii* pneumonia. AIDS, **17** : 73-80, 2003.
- 30) Jain MK, Skiest DJ, Cloud JW, et al : Changes in mortality related to human immunodeficiency virus infection : comparative analysis of inpatient deaths in 1995 and in 1999-2000. Clin Infect Dis, **36** : 1030-1038, 2003.
- 31) Thomas CF Jr, Limper AH : *Pneumocystis* pneumonia. N Engl J Med, **350** : 2487-2498, 2004.
- 32) Deresinski SC : Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in adults with AIDS. Semin Respir Infect, **12** : 79-97, 1997.
- 33) Patel N, Keziel H : *Pneumocystis carinii* pneumonia in adult patients with AIDS : treatment strategies and emerging challenges to antimicrobial therapy. Treat Respir Med, **3** : 381-397, 2004.
- 34) Goldman AS, Goldman LR, Goldman TA : What caused the epidemic of *Pneumocystis* pneumonia in European premature infants in the mid-20th century? Pediatrics, **115** : 725-736, 2005.
- 35) Yele SH, Limper AH : *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome : associated illness and prior corticosteroid therapy. Mayo Clin Proc, **71** : 5-13, 1996.
- 36) Meyers B, Borrego F, Papanicolaou G : *Pneumocystis* pneumonia prophylaxis with atvaquone in trimethoprim-sulfamethoxazole-intolerant orthotopic liver transplant patients : a preliminary study. Liver Transpl, **7** : 750-751, 2001.
- 37) Rodriguez M, Sifri CD, Fishman JA : Failure of low-dose atvaquone prophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* infection in transplant recipients. Clin Infect Dis, **38** : 76-78, 2004.
- 38) Yazaki H, Goto N, Uchida K, et al : Outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients : *P. jirovecii* is contagious to the susceptible host. Transplantation, **88** : 380-385, 2009.
- 39) Groll AH, Ritter J, Müller FM : Guidelines for prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonitis in children and adolescents with cancer. Klin Paediatr, **213** (Suppl. 1) : A38-A49, 2001.
- 40) Pagano L, Fianchi L, Mele L, et al : *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with malignant haematological diseases : 10 years' experience of infection in GIMEMA centres. Br J Haematol, **117** : 379-386, 2002.
- 41) Roblot F, Le Moal G, Godet C, et al : *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with hematologic malignancies : a descriptive study. J Infect, **47** : 19-27, 2003.
- 42) Farr RW : *Pneumocystis carinii* pneumonia due to corticosteroids. South Med J, **85** : 52-53, 1992.
- 43) Harigai M, Koike R, Miyasaka N : *Pneumocystis* pneumonia associated with infliximab in Japan. N Engl J Med, **357** : 1874-1876, 2007.
- 44) Williams DJ, Radding JA, Dell A, et al : Glucan synthesis in *Pneumocystis carinii*. J Protozool, **38** : 427-437, 1991.
- 45) Yoshidawa H, Tegoshi T, Yoshida Y : Detection of surface carbohydrates on *Pneumocystis carinii* by fluorescein-conjugated lectins. Parasitol Res, **74** : 43-49, 1987.
- 46) Yoshikawa H, Morioka H, Yoshida Y : Ultrastructural detection of carbohydrates in the pellicle of *Pneumocystis carinii*. Parasitol Res, **74** : 537-543, 1988.
- 47) Pesanti EL, Shanley JD : Glycoproteins of *Pneumocystis carinii* : characterization by electrophoresis and microscopy. J Infect Dis, **158** : 1353-1359, 1988.
- 48) Gigliotti F, Ballou LR, Hughes WT, et al : Purification and initial characterization of a ferret *Pneumocystis carinii* surface antigen. J Infect Dis, **158** : 848-854, 1988.
- 49) Cushion MT, De Stefano JA, Walzer PD : *Pneumocystis carinii* : surface reactive carbohydrates detected by lecithin probes. Exp Parasitol, **67** : 137-147, 1988.
- 50) Linke MJ, Cushion MT, Walzer PD : Properties of the major antigens of rat and human *Pneumocystis carinii*. Infect Immun, **57** : 1547-1555, 1989.
- 51) Lundgren B, Koch C, Mathiesen L, et al : Glycosylation of the major human *Pneumocystis carinii* surface antigen. APMIS, **101** : 194-200, 1993.
- 52) De Stefano JA, Cushion MT, et al : Analysis of *Pneumocystis carinii* cell wall. II. Sugar composition. J Protozool, **37** : 436-441, 1990.
- 53) Ruffolo JJ : *Pneumocystis carinii* cell structure. In : Walzer PD (ed) *Pneumocystis carinii* Pneumonia, p.25-43, Marcel Dekker, New York, 1994.
- 54) Shiota T : Morphology and development of *Pneumocystis carinii* observed by phase-contrast microscopy and semi-ultrathin section light-microscopy. Jpn J Parasitol, **33** : 443-455, 1984.
- 55) Cushion MT, Ruffolo JJ, Walzer PD : Analysis of the deve-

- lopmental stages of *Pneumocystis carinii* in vitro. Lab Invest, **58** : 324-331, 1988.
- 56) Cushion MT, Stringer JR, Walzer PD : Cellular and molecular biology of *Pneumocystis carinii*. Int Rev Cytol, **131** : 59-107, 1991.
- 57) Palluault F, Pietrzyk B, et al : Three dimensional reconstruction of rabbit-derived *Pneumocystis carinii* from serial-thin sections I. trophozoite. J Protozool, **38** : 402-407, 1991.
- 58) Yoshida Y : Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. J Protozool, **36** : 53-60, 1989.
- 59) Vavra J, Kucera K : *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. J Protozool, **17** : 463-468, 1970.
- 60) Campbell WG : Ultrastructure of *Pneumocystis* in human lung. Life cycle in human pneumocystosis. Arch Pathol, **93** : 312-324, 1972.
- 61) Richardson JD, Queener SF, et al : Binary fission of *Pneumocystis carinii* trophozoites grown in vitro. J Protozool, **36** : 27S-29S, 1989.
- 62) Walker AN, Garner RE, Horst MN : Immunocytochemical detection of chitin in *Pneumocystis carinii*. Infect Immun, **58** : 412-415, 1990.
- 63) Garner RE, Walker AN, Horst MN : Morphological and biochemical studies of chitin expression in *Pneumocystis carinii*. J Protozool, **38** : 12S-14S, 1991.
- 64) Matsumoto Y, Yoshida Y : Sporogony in *Pneumocystis carinii* : synaptonemal complexes and mitotic nuclear divisions observed in precysts. J Protozool, **31** : 420-428, 1984.
- 65) Hong ST, Steele PE, Cushion MT, et al : *Pneumocystis carinii* karyotypes. J Clin Microbiol, **28** : 1785-1795, 1990.
- 66) Lundgren B, Cotton R, Lundgren JD, et al : Identification of *Pneumocystis carinii* chromosomes and mapping of five genes. Infect Immun, **58** : 1705-1710, 1990.
- 67) Herskowitz I : Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev, **52** : 536-553, 1988.
- 68) Schmatz DM, Powles MT, Mcfadden DC, et al : Treatment and prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia and further elucidation of the *P. carinii* life cycle with 1,3-beta-glucan synthesis inhibitor L-671,329. J Protozool, **38** : 151S-153S, 1991.
- 69) Giese H : Pathogenese und Ätiologie der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie. Verh Dtsch Ges Pathol, **36** : 284, 1952.
- 70) Giese H : Pathogenese und Ätiologie der interstitiellen plasmazellulären Säuglingspneumonie. Zentralbl Allg Pathol, **90** : 54, 1953.
- 71) Simon H : Die sogenannte *Pneumocystis carinii*, eine besondere Vegetations Form des Soor. Naturwissenschaften, **40** : 625, 1953.
- 72) Bauch R, Ladstätter L : *Pneumocystis carinii* und interstitielle plasmazelluläre Pneumonie der Frühgeburten. Klin Wochenschr, **31** : 900, 1953.
- 73) Csillag A, Brandstein L : The role of a Blastomyces in the aetiology of interstitial plasmacellular pneumonia of the premature infant. Acta Microbiol Hung, **2** : 179-190, 1954.
- 74) Ladstätter L : Kulturversuche bei interstitieller plasmazellulärer Pneumonie. Klin Wochenschr, **32** : 1044, 1954.
- 75) Bruns G, Böttger D : Ein Beitrag zur Histochemie der *Pneumocystis carinii*. Virchows Arch Path Anat, **326** : 278, 1955.
- 76) VaněkJ, Jirovec O, Lukeš J : Interstitial plasma cell pneumonia in infants. Ann Paediatr, **180** : 1, 1953.
- 77) Baar HS : Interstitial plasmacellular pneumonia due to *Pneumocystis carinii*. J Cell Pathol, **8** : 19, 1955.
- 78) Seifert K, Pliess G : Beitrag zum Entwicklungscyclus von *Pneumocystis carinii* auf vergleichend elektronenoptischer und cytochemischer Basis. Beitr Pathol Anat, **123** : 412, 1960.
- 79) Mansour NJ, DeVita VT, Goodell BW : *Pneumocystis carinii* pneumonia. Ann Intern Med, **73** : 342-343, 1970.
- 80) Bömmner W : *Pneumocystis carinii* from human lungs under electron microscopy. Am J Dis Child, **104** : 657-661, 1962.
- 81) Barton EG, Campbell WG : Further observations on the ultrastructure of *Pneumocystis*. Arch Pathol, **83** : 527-534, 1967.
- 82) Ham EK, Greenberg SD, et al : Ultrastructure of *Pneumocystis carinii*. Exp Mol Pathol, **14** : 326, 1971.
- 83) Edman JC, Kovacs JA, Masur H, et al : Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be member of the fungi. Nature, **334** : 519-521, 1988.
- 84) Edman JC, Kovacs JA, Masur H, et al : Ribosomal RNA genes of *Pneumocystis carinii*. J Protozool, **36** : 18S-20S, 1989.
- 85) Stringer SL, Stringer JR, Blasé MA, et al : *Pneumocystis carinii* : sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. Exp Parasitol, **68** : 450-561, 1989.
- 86) Stringer SL, Hudson K, Blasé MA, et al : Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. J Protozool, **36** : 14S-16S, 1989.
- 87) Watanabe J, Hori H, Tanabe K, et al : Phylogenetic association of *Pneumocystis carinii* with the 'Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group' indicated by comparison of 5S ribosomal RNA sequences. Mol Biochem Parasitol, **32** : 163-167, 1989.
- 88) Lin H, Niu MT, Yoganathan T, et al : Characterization of the RNA-encoding genes and transcripts, and a group-I self-splicing intron in *Pneumocystis carinii*. Gene, **119** : 163-173, 1992.
- 89) Liu Y, Rocourt M, Pan S, et al : Sequence and variability of the 5.8S and 26S rRNA genes of *Pneumocystis carinii*. Nucleic Acids Res, **20** : 3763-3772, 1992.
- 90) Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS : Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. Infect Immun, **60** : 4140-4145, 1992.
- 91) Edman JC, Edman U, Cao M, et al : Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase

- gene. Proc Natl Acad Sci USA, **86** : 8625-8629, 1989.
- 92) Edman U, Edman JC, Lundgren B, et al : Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene. Proc Natl Acad Sci USA, **86** : 6503-6507, 1989.
 - 93) Dyer M, Volpe F, Delves J, et al : Cloning and sequence of a beta-tubulin cDNA from *Pneumocystis carinii* : possible implications for drug therapy. Mol Microbiol, **6** : 991-1001, 1992.
 - 94) Edlind TD, Bartlett MS, Weinberg GA, et al : The beta-tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. Mol Microbiol, **6** : 3365-3373, 1992.
 - 95) Zang J, Stringer JR : Cloning and characterization of an alpha-tubulin-encoding gene from rat-derived *Pneumocystis carinii*. Gene, **123** : 137-141, 1993.
 - 96) Sunkin SM, Stringer JR : Transcription factor gene from rat *Pneumocystis carinii*. J Eukaryot Microbiol, **42** : 12-19, 1995.
 - 97) Meade JC, Stringer JR : PCR amplification of DNA sequences from the transcription factor IID and cation transporting ATPase genes in *Pneumocystis carinii*. J Protozool, **38** : 66S-68S, 1991.
 - 98) Meade JC, Stringer JR : Cloning and characterization of an ATPase gene from *Pneumocystis carinii* which closely resembles fungal hydrogen ATPases. J Eukaryot Microbiol, **42** : 298-307, 1995.
 - 99) Pixley FJ, Wakefield AE, Banerji S, et al : Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. Mol Microbiol, **5** : 1347-1351, 1991.
 - 100) Fletcher LD, McDowell JM, Tidwell RR, et al : Structure, expression and phylogenetic analysis of the gene encoding actin I in *Pneumocystis carinii*. Genetics, **137** : 743-750, 1994.
 - 101) Banerji S, Wakefield AE, Allen AG, et al : The cloning and characterization of the *arom* gene of *Pneumocystis carinii*. J Gen Microbiol, **139** : 2901-2914, 1993.
 - 102) Beverly SM, Ellenberger TE, Cordingley JS : Primary structure of the gene encoding the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Leishmania major*. Proc Natl Acad Sci USA, **83** : 2584-2588, 1986.
 - 103) Bzik DJ, Li W-B, Hori T, et al : Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. Proc Natl Acad Sci USA, **84** : 8360-8364, 1987.
 - 104) Stringer JR : The identity of *Pneumocystis carinii* : not a single protozoan, but a diverse group of exotic fungi. Infect Agents Dis, **2** : 109-117, 1993.
 - 105) Schmatz DM, Romanchek MA, Pittarelli LA, et al : Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia with 1,3- β -glucan synthesis inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, **87** : 5950-5954, 1990.
 - 106) Kottom TJ, Limpert AH : Cell wall assembly by *Pneumocystis carinii*. Evidence for a unique *gsc-1* subunit mediating beta-1,3-glucan deposition. J Biol Chem, **275** : 40628-40634, 2000.
 - 107) Cushion MT : *Pneumocystis* : unraveling the clock of obscurity. Trends Microbiol, **12** : 243-249, 2004.
 - 108) Thomas CF Jr, Kottom TJ, Leof FB, et al : Characterization of a mitogen-activated protein kinase from *Pneumocystis carinii*. Am J Physiol, **275** : L193-L199, 1998.
 - 109) Fox D, Smulian AG : Mkp1 of *Pneumocystis carinii* associates with the yeast transcription factor Rlm1 via a mechanism independent of the activation state. Cell Signal, **12** : 381-390, 2000.
 - 110) Kottom TJ, Thomas CF Jr, Mubarak KK, et al : *Pneumocystis carinii* uses a functional *cdc13* B-type cyclin complex during its life cycle. Am J Respir Cell Mol Biol, **22** : 722-731, 2000.
 - 111) Kottom TJ, Thomas CF Jr, Limpert AH : Characterization of *Pneumocystis carinii* PHR1, a pH-regulated gene important for cell wall integrity. J Bacteriol, **183** : 6740-6745, 2001.
 - 112) Gustafson MP, Thomas CF Jr, Rusrak F, et al : Differential regulation of growth and checkpoint control mediated by a Cdc25 mitotic phosphatase from *Pneumocystis carinii*. J Biol Chem, **276** : 835-843, 2001.
 - 113) Smulian AG, Sesterhenn T, Tanaka R, et al : The *ste3* pheromone receptor gene of *Pneumocystis carinii* is surrounded by a cluster of signal transduction genes. Genetics, **157** : 991-1002, 2001.
 - 114) Barr DJS : Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. Mycologia, **84** : 1-11, 1992.
 - 115) Hawksworth DL, Kirk PM, et al : Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th edn, CAB International, Willingford, 1995.
 - 116) Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, et al : Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 10th edn, CAB International, Willingford, 2008.
 - 117) Vandamme P, Pot B, Gillis M : Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev, **60** : 407-438, 1996.
 - 118) Bruns TD, Vigalys R, Bams SM, et al : Evolutionary relationships with in the fungi : analyses of nuclear small subunit RNA sequences. Mol Phytoenet Evol, **1** : 231-241, 1992.
 - 119) Tang X, Bartlett MS, Smith JW, et al : Determination of copy number of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis*. J Clin Microbiol, **36** : 2491-2494, 1998.
 - 120) Nishimura A, Francioli P, Blanc DS, et al : Determination of the copy number of the nuclear rDNA and β -tubulin genes of *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* using PCR multicompetitors. J Eukaryot Microbiol, **47** : 368-372, 2000.
 - 121) Edman JC, Sogin ML : Molecular phylogeny of *Pneumocystis carinii* p.91-105. In : Walzer PD (ed) *Pneumocystis carinii* pneumonia, p.91-105, Marcel Dekker, Inc., New York, 1994.
 - 122) Keely S, Pai HJ, Baughman R, et al : *Pneumocystis* species inferred from analysis of multiple genes. J Eukaryot Microbiol, **41** : 94S, 1994.
 - 123) Baldauf SL, Palmer JD : Animals and fungi are each

- other's closest relatives : congruent evidence from multiple proteins. Proc Natl Acad Sci USA, **90** : 11558-11562, 1993.
- 124) Li J, Edlind T : Phylogeny of *Pneumocystis carinii* based on β -tubulin sequence. J Eukaryot Microbiol, **41** : 97S, 1994.
- 125) Fletcher LD, Berger LC, Tidwell RR, et al : Cloning and characterization of the calmodulin-encoding gene from *Pneumocystis carinii*. Gene, **129** : 307-308, 1993.
- 126) Van der Peer Y, Hendriks L, Goris A, et al : Evolution of basidiomycetous yeasts as deduced from small ribosomal subunit RNA sequences. Syst Appl Microbiol, **15** : 250-258, 1992.
- 127) Kuttzman CP, Sugiyama J : Ascomycetous yeasts and yeast-like taxa. In : McLaughlin D, McLaughlin EG, Lemke PA (eds) The mycota : systematics and evolution, vol.1, p.179-200, Springer, Berlin·Heidelberg·New York, 1994.
- 128) Gargas A, DePriest PT, et al : Multiple origins of lichen symbiosis in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. Science, **268** : 1492-1495, 1995.
- 129) Nishida H, Sugiyama J : *Archiascomycetes* : detection of a major new lineage within the *Ascomycota*. Mycoscience, **35** : 361-366, 1994.
- 130) Eriksson OE : *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals, referred as to a new family and order (*Pneumocystidaceae*, *Pneumocystidales*, *Ascomycota*). Systema Ascomycetum, **13** : 165-180, 1994.
- 131) Schuh JCL, Harrington KA, Fanslow WC : Terminology changes needed for descriptions of *Pneumocystis carinii* infection [letter ; comment]. Infect Immun, **65** : 1135-1136, 1997.
- 132) Cushion MT, Walzer PD, Smulian AG, et al : Terminology for the life cycle of *Pneumocystis carinii* [letter], **65** : 4365, 1997.
- 133) Haase G : *Pneumocystis carinii* Delanoë & Delanoë (1912) has been placed in the Archiascomycetales, a class of the Ascomycota [letter, comment]. Infect Immun, **65** : 4365-4366, 1997.
- 134) Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, et al : Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. Mol Biochem Parasitol, **43** : 69-76, 1990.
- 135) Stringer JR : *Pneumocystis carinii* : what is it, exactly. Clin Microbiol Rev, **9** : 489-498, 1996.
- 136) Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, et al : *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. Mol Biochem Parasitol, **45** : 183-184, 1991.
- 137) Stringer JR, Stringer SL, Zhang J, et al : Molecular genetic distinction of *Pneumocystis carinii* from rats and humans. J Eukaryot Microbiol, **40** : 733-741, 1993.
- 138) Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG, et al : *Pneumocystis carinii* is not universally transmittable between mammalian species. Infect Immun, **61** : 2886-2890, 1993.
- 139) Kim HK, Hughes WT, Feldman S : Studies of morphology and immunofluorescence of *Pneumocystis carinii*. Proc Soc Exp Biol Med, **141** : 304-309, 1972.
- 140) Gigliotti F, Stokes DC, Cheatham AB, et al : Development of murine monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis, **154** : 315-322, 1986.
- 141) Gigliotti F : Host species-specific antigenic variation of mannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis, **165** : 329-336, 1992.
- 142) Gigliotti F, Haidaris PJ, Haidaris CG, et al : Further evidence of host species-specific variation in antigens of *Pneumocystis carinii* using the polymerase chain reaction. J Infect Dis, **168** : 191-194, 1993.
- 143) Demanche C, Berthelmy M, Petit T, et al : Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. J Clin Microbiol, **39** : 2126-2133, 2001.
- 144) Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, et al : *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. Infect Genet Evol, **8** : 708-726, 2008.
- 145) Mayr E : Theory of biological classification. Nature, **220** : 545-548, 1968.
- 146) Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, et al : Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genet Biol, **31** : 22-32, 2000.
- 147) Hughes WT, Gigliotti F : Nomenclature for *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis, **157** : 432-433, 1998.
- 148) Anonymous : Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*. The pneumocystis Workshop. J Eukaryot Microbiol, **41** : 121S-122S, 1994.
- 149) Lee CH, Lu JJ, Bartlett MS, et al : Nucleotide sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. J Clin Microbiol, **31** : 754-757, 1993.
- 150) Wakefield AE, Fritscher CC, Malin AS, et al : Genetic diversity in human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from four geographical locations shown by analysis of mitochondrial rRNA gene sequence. J Clin Microbiol, **32** : 2959-2961, 1994.
- 151) Keely SP, Stringer JR, Boughman RP, et al : Genetic variation among *Pneumocystis carinii* hominis isolates in recurrent pneumocytosis. J Infect Dis, **172** : 595-598, 1995.
- 152) Beard CB, Navin TR : Molecular epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Emerg Infect Dis, **2** : 147-150, 1996.
- 153) Latouche S, Poirot JL, Bernard C, et al : Study of internal transcribed spacer and mitochondrial large-subunit genes of *Pneumocystis carinii* hominis isolated by repeated bronchoalveolar lavage from human immunodeficiency virus-infected patients during one or several episodes of pneumonia. J Clin Microbiol, **35** : 1687-1690, 1997.
- 154) Wakefield AE : Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. FEMS Immunol Med Microbiol, **22** : 59-65, 1998.
- 155) Beard CB, Fox MR, Lawrence GG, et al : Genetic differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immuno-

- competent infants and from adults with AIDS : epidemiological implications. *J Infect Dis*, **192** : 1815-1818, 2005.
- 156) Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G, et al : Restriction fragment length polymorphism typing demonstrates substantial diversity among *Pneumocystis jirovecii* isolates. *J Infect Dis*, **200** : 1616-1620, 2009.
- 157) Frenkel JK : *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD) : a critical historical overview. *J Eukaryot Microbiol*, **46** : 89S-92S, 1999.
- 158) Cushion MT, Stringer JR : Molecular and phenotypic descriptions of *Pneumocystis wakefieldiae* sp.nov., a new species in rats. *Mycologia*, **96** : 429-438, 2004.
- 159) Keely SP, Fischer JM, Cushion MT, et al : Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp.nov., a new species in laboratory mice. *Microbiology*, **150** : 1153-1165, 2004.
- 160) Creusy C, Bahun-le Capon J, Fleurisse L, et al : *Pneumocystis carinii* pneumonia in four animal species : histology and ultrastructure. *J Eukaryot Microbiol*, **43** : 47S-48S, 1996.
- 161) Stringer JR, Beard CB, Miller RF, et al : A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis*, **8** : 891-896, 2002.
- 162) Hughes WT : *Pneumocystis carinii* vs. *Pneumocystis jiroveci* : another misnomer (response to Stringer et al.). *Emerg Infect Dis*, **8** : 276-277, 2003.
- 163) Gigliotti F : *Pneumocystis carinii* : has the name really been changed? *Clin Infect Dis*, **41** : 1752-1755, 2005.
- 164) Cushion MT, Stringer JR : Has the name really been changed? It has for most researchers. *Clin Infect Dis*, **41** : 1756-1758, 2005.
- 165) Gigliotti F : *Pneumocystis carinii* nomenclature ; response to Cushion and Stringer [letter]. *Clin Infect Dis*, **42** : 1208-1209, 2006.
- 166) Weinberg GA : *Pneumocystis carinii* nomenclature ; 2 misnomers are not better than 1 [letter]. *Clin Infect Dis*, **42** : 1209-1210, 2006.
- 167) Limper AH : *Pneumocystis* nomenclature [letter]. *Clin Infect Dis*, **42** : 1210-1211, 2006.
- 168) Hughes WT : *Pneumocystis carinii* versus *Pneumocystis jirovecii* (*jiroveci*) Frenkel [letter]. *Clin Infect dis*, **42** : 1211-1212, 2006.
- 169) Stringer JR, Cushion MT, Redhead SA : Reply to Weinberg, to Hughes, and to Limper [letter]. *Clin Infect Dis*, **42** : 1212-1214, 2006.
- 170) Kaneshiro ES, Ellis JE, Jayasimhulu K, et al : Evidence for the presence of "metabolic sterols" in *Pneumocystis* : identification and initial characterization of *Pneumocystis carinii* sterols. *J Eukaryot Microbiol*, **41** : 78-85, 1994.
- 171) Furlong ST, Samia JA, Rose RM, et al : Phytosterols are present in *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob Agents Chemother*, **38** : 2534-2540, 1994.
- 172) Hughes WT : *Pneumocystis carinii* : taxing taxonomy. *Eur J Epidemiol*, **5** : 265-269, 1989.
- 173) Ruffolo JJ, Cushion MT, Walzer PD : Ultrastructural observation on life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool*, **36** : 53S-54S, 1990.
- 174) Cavalier-Smith T : What are fungi? *In* : McLaughlin D, McLaughlin EG, Lemke PA (eds) *The Mycota : Systematics and Evolution*, vol.1, p.3-37, Springer, Berlin·Heidelberg·New York, 1994.
- 175) Cushion MT : *In vitro* studies of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool*, **36** : 45-52, 1989.
- 176) Pifer LL, Hughes WT, Murphy MJ : Propagation of *Pneumocystis carinii* in vitro. *Pediatr Res*, **11** : 305-316, 1977.
- 177) Bartlett MS, Verbanac PA, Smith JW : Cultivation of *Pneumocystis carinii* with WI-38 cells. *J Microbiol*, **10** : 796-799, 1979.
- 178) Latorre CR, Sulzer AT, Norman LG : Serial propagation of *Pneumocystis carinii* in cell line cultures. *Appl Environ Microbiol*, **33** : 1204-1206, 1977.
- 179) Cushion MT, Walzer PD : Growth and serial passage of *Pneumocystis carinii* in the A549 cell line. *Infect Immun*, **44** : 245-251, 1984.
- 180) Armstrong MYK, Richards FF : Propagation and purification of rat *Pneumocystis carinii* in short term cell culture. *J Protozool*, **36** : 24S-27S, 1989.
- 181) Tegoshi T, Yoshida Y : New system of in vitro cultivation of *Pneumocystis carinii* without feeder cells. *J Protozool*, **17** : 463-483, 1989.
- 182) Cushion MT, Ebbets D : Growth and metabolism of *Pneumocystis carinii* in axenic culture. *J Clin Microbiol*, **28** : 1385-1394, 1990.
- 183) Sloand E, Laughon B, Armstrong MYK, et al : The challenge of *Pneumocystis carinii* culture. *J Eukaryot Microbiol*, **40** : 188-195, 1993.
- 184) Armstrong MYK, Cushion MT : In vitro cultivation. *In* : Walzer PD (ed) *Pneumocystis carinii* Pneumonia, 2nd Edu, p.3-24, Marcel Dekker, New York, 1994.
- 185) Lee CH, Bauer NL, Shaw MM, et al : Proliferation on microcarrier beads in spinner flask. *J Clin Microbiol*, **31** : 1659-1662, 1993.
- 186) Cushion MT, Collins M, Hazra B, et al : Effects of atvaquone and diospyrin-based drugs on the cellular ATP of *Pneumocystis carinii* f.sp. *carinii*. *Antimicrob Agents Chemother*, **44** : 713-719, 2000.
- 187) Melari S, Frevert U, Williams JH, et al : Continuous axenic cultivation of *Pneumocystis carinii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96** : 2402-2407, 1999.
- 188) 山口英世 : 昔 原虫、今 真菌 - 放浪の微生物 *Pneumocystis carinii* の帰属問題. 山口英世 (著) 真菌 (かび) 万華鏡, p.140-143, 南山堂、東京、2004.
- 189) Stringer JR, Edman J, Cushion MT, et al : The fungal nature of *Pneumocystis carinii*. *J Med Vet Mycol*, **30** (Suppl. 1) : 271-278, 1992.
- 190) Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H : Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol*, **40** : 358-364, 1994.