

輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究 研究報告書

輸入真菌症の発生動向調査
（輸入真菌症起因菌の迅速同定システムの研究）

分担研究者 亀井克彦・千葉大学真菌医学研究センター助教授

研究要旨

我が国における輸入真菌症の実態調査を行った。その結果、コクシジオイデス症、ヒストプラズマ症、パラコクシジオイデス症の急激な増加と、マルネツフェイ型ペニシリウム症の本邦上陸が確認された。今後もこれらの疾患の増加が予想され、医療体制の整備が必要と考えられた。また、輸入真菌症の迅速診断を目的として、遺伝子を用いた *Coccidioides immitis* の同定システムの開発を行った（槇村浩一博士との共同研究）。

I. 輸入真菌症の発生動向調査

A. 研究目的

輸入真菌症とは、本来我が国に存在せず、患者が海外の流行地で感染し日本に持ち込まれる真菌症の総称である。我が国固有の真菌症に比しはるかに感染力が強く健常人に発生しやすい上、重篤化しやすいため、診療に当たっては対応した知識と技術が必要であるが、これまでその詳細な実態は明らかになっていない。また、我が国の医療従事者、医療機関におけるこれらの疾患に対する認識および診断、治療予防などに関する知識も極めて乏しいと考えられる。そこで本邦の主要な輸入真菌症であるコクシジオイデス症、パラコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症、マルネツフェイ型ペニシリウム症およびプラストミセス症を対象として、日本国内における発生状況を調査した。また、海外の流行地における流行状況も現地医療機関と協力し検討した。

B. 研究方法

医学中央雑誌、Medline等を用いた各種の文献および学会報告の調査に加え、全国の主要な医療機関に対してアンケート調査による全国調査を実施し、その解答を分析した後、さらに個別に聞き取り調査

を行なって集計を行い検討した（アンケート調査の方法に関しては、共同研究者の菊池の報告を参照のこと）。また、コクシジオイデス症に関しては、平成11年4月から施行された感染症新法に基づき各医療機関から都道府県保健所に提出された報告もこれに加えた。

C. 研究結果

総数で、コクシジオイデス症27例、ヒストプラズマ症30例、パラコクシジオイデス症13例が日本国内で診断、あるいは治療されていることが判明した。これによりこれまでの文献報告のみの集計に比べ、実数が大幅に多いことが明らかになった。また、マルネツフェイ型ペニシリウム症は1995年に初めて国内の発生例が確認された（図1）。

経時的に発生件数の変遷を確認すると、コクシジオイデス症では1970年代までに2例、80年代が6例であったのに対し、90年以降は19例に達した。ヒストプラズマ症でも、70年代までに6例、80年代が5例であったが、90年以降は19例に及んでいた。同様にパラコクシジオイデス症も70年代までに4例、80年代1例、以後8例と増加し、これらの輸入真菌症がいずれも近年急増していることが明

らかとなった。また、マルネツフェイ型ペニシリウム症は1995年に我が国への上陸が確認されており、AIDSの蔓延とともに今後とも増加することが予想された(図2-4)。

感染地の検討では、コクシジオイデス症では約85%が米国(主にアリゾナ、カリフォルニア)で感染していた。海外渡航歴のない症例が2例あったが、いずれも輸入綿花の取扱者であり、作業中に、輸入した綿花に付着していた*C. immitis*の胞子を吸入することによって感染したものと推測された。事実、2例中1例の綿花はコクシジオイデス症の流行地域から輸入されたものであることが確認された(図5)。また、ヒストプラズマ症では、海外で集団で感染して帰国する例が大部分を占めたが(30%)、海外渡航歴がなく、種々検討しても日本国内での感染と考えざるを得ない症例が20%を占めていた。うち1例は、輸入腎の移植後に発症した例であり、米国から持ち込まれた死体腎から感染したものと推測されたが、残りの症例は感染経路が不明であった。このような傾向はほかの輸入真菌症には認められず、ヒストプラズマ症に特徴的と考えられた。67%の症例が中南米を感染地としており、本来最大の流行地であるアメリカ合衆国ミシシッピー川流域で感染したと考えられた症例は見当たらなかった(図6)。一方、パラコクシジオイデス症は流行のメッカともいえるブラジル国での感染例が大部分を占めた(図7)。

患者の人種/民族的背景の観点から見ると、コクシジオイデス症は感染地の明確なすべての症例において、日本人が流行地に一時的に滞在した際に感染したと考えられるのに対し、パラコクシジオイデス症に関しては、92%がブラジル人あるいは日系ブラジル人に発生したものであり、日本人が海外滞在中に感染した例は1例に見られたのみであった(図8)。

また海外の流行状況では、コクシジオイデス症が米国カリフォルニア州およびアリゾナ州でも増加し

ており、特に後者では過去10年間に約11倍の患者が報告されていることが明らかとなった(図9)。

患者の病型をおおまかに検討すると、肺に局限した症例が多かったが、パラコクシジオイデス症はすべての症例で肺外への進展が認められた(図10-12)。しかしながら、予後の観点から見ると、最も死亡率が高かったのはヒストプラズマ症であり(23.3%)、コクシジオイデス症は7.4%、パラコクシジオイデス症では死亡例は認められなかった。

D. 考察

今回検討した輸入真菌症はプラストミセス症を除くといずれも急速に患者数の増加を認めている。その中でもコクシジオイデス症はあらゆる真菌症の中で最も危険とされる疾患であるが、その流行地は日本との往来が特に多いカリフォルニアおよびアリゾナである上、これらの地域における流行も増悪しており、この点からも今後我が国での症例のさらなる増加が予想される。

ヒストプラズマ症も同様に急増しているが、特に海外渡航歴のない患者での発生が多数見られている点が重要である。我が国内ではこれまでヒストプラズマ症の起原菌である*Histoplasma capsulatum*が自然環境内から分離されたことはない。このためヒストプラズマ症は我が国に存在しない輸入真菌症として取り扱われてきた。しかし、世界的に見るとヒストプラズマ症の分布は世界各国に及んでおり、その中には我が国と同様の気候風土を持っている地域も多い。その点から見ると、*H. capsulatum*が我が国の自然環境内に生息していても特に不思議ではない。今後、ヒストプラズマ症患者の発生動向に十分注意するとともに、血清学的なサーベイランスを施行する必要性も検討すべきと考える。

人種/民族的背景の観点から検討すると、コクシジオイデスが全例、流行地域に滞在した日本人が感染して帰国したものであった。これはコクシジオイデス症がごく短時間の暴露により感染するという経

験的事実を裏付けるものといえ、感受性の高い個人（AIDS、妊婦など）を中心に流行地域への立ち入りを含めた予防対策が必要であることを示すものである。一方、パラコクシジオイデス症では、ほとんど症例がブラジル人あるいは現地で生まれ育った日系ブラジル人であった。これが本菌感染が成立するためには、長期間の感染地内滞在あるいは反復暴露が必要であることを示すものか、あるいは同じ感染地内での生活地域によるものなのか、明確ではない。しかしいずれにしても本症を診断する上で、便宜的に有用と思われる。

予後の分析では、ヒストプラズマ症が最も高い死亡率を示した。これはヒストプラズマ症ではAIDSなど重篤な基礎疾患を有していた症例が多かったこと、その一方で、パラコクシジオイデス症は進行が緩徐のため、適切な対応が可能であったためと思われる。コクシジオイデス症で死亡率が比較的低率にとどまったことは、ヒストプラズマ症に比べ重篤な基礎疾患を持った症例が無かった点が大きく寄与していると考えられるが、今後AIDSその他の基礎疾患の上にコクシジオイデス症が発症するケースが予想されるため警戒を怠るべきではない。

我が国国内医療機関における輸入真菌症に対する認識は乏しく、疾患に関する基本的な知識、予防、診断、治療など、技術面でも対応が遅れている。早急な対策が必要である。

E. 結論

輸入真菌症症例は過去10年間に急速に増加した。海外との往来の増加にともない、この傾向は今後も持続すると考えられる。その一方で、一般医療機関の知識、認識とも乏しく、また、対応も不十分である。医療機関に対する啓蒙活動を行うとともに、診断、治療に関するサポート体制を完備したりファレンスセンターの確立が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 輸入真菌症起因菌の迅速同定システムの研究

A. 研究目的

輸入真菌症の診断の重要な手法として、起因菌の同定があげられる。この種の真菌の同定は主に形態学的手法により行われるが、経験を必要とするうえ、作業中に本菌を吸入することにより感染する危険が極めて高いため、特殊な施設、スタッフを有さない医療機関では、同定は困難である。そこで本菌（生菌）に可能な限り接触する機会を少なくし、同定を行う方法として、榎村浩一博士との共同研究により遺伝子解析による同定法の開発を試みた。我々は輸入真菌の中でも特にもっとも危険性が高く、取り扱いが困難とされる*Coccidioides immitis* に関して共同研究を行った。

B. 研究方法

C. immitis は極めて感染性、病原性とも高いため、以下の実験は当センターのP3実験施設を使用して行った。

ヒトのコクシジオイデス症例から分離、保存に成功した*C. immitis* 菌株をポテトデキストロース液体培地に接種し、37℃にて厳重な管理下に培養を行い、発育をチェックした。最終的に2株を選択した。これら菌株が十分な菌糸の発育と分節型分生子の形成を行ったのを確認したのち、細心の注意を払ってエタノールによる滅菌を行い、菌体を固定した。これよりDNAを抽出し、遺伝子同定法の開発に用いた（以下は共同研究者の榎村浩一博士の報告を参照されたい）。

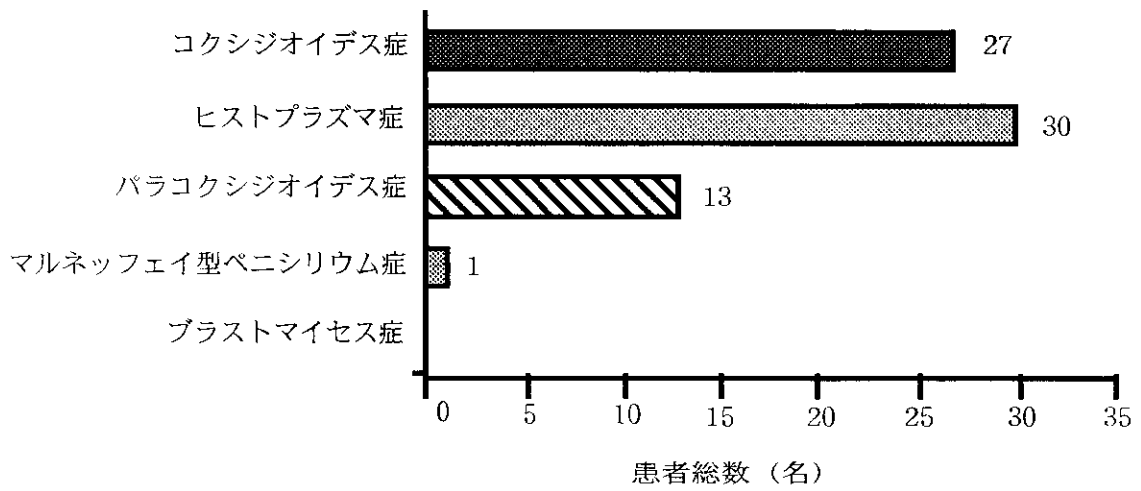


図1 我が国における輸入真菌症の総数

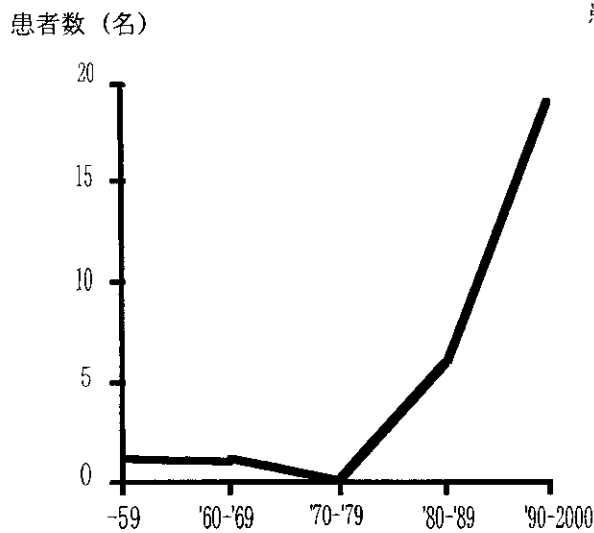


図2 コクシジオイデス症患者数の推移
過去10年間に急速に増加しており、今後も増加することが予想される。

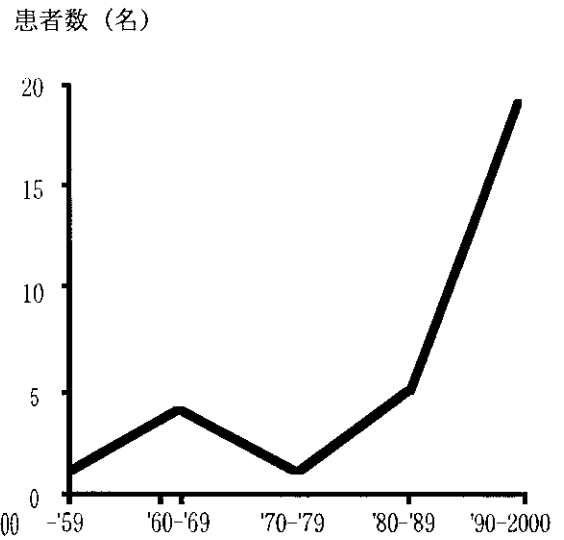


図3 ヒストプラズマ症患者数の推移

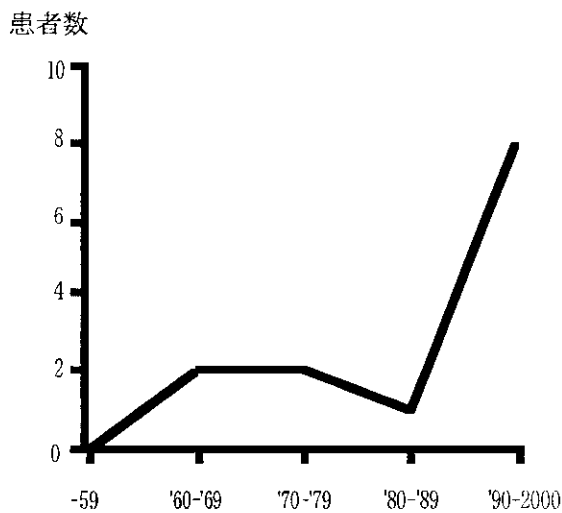
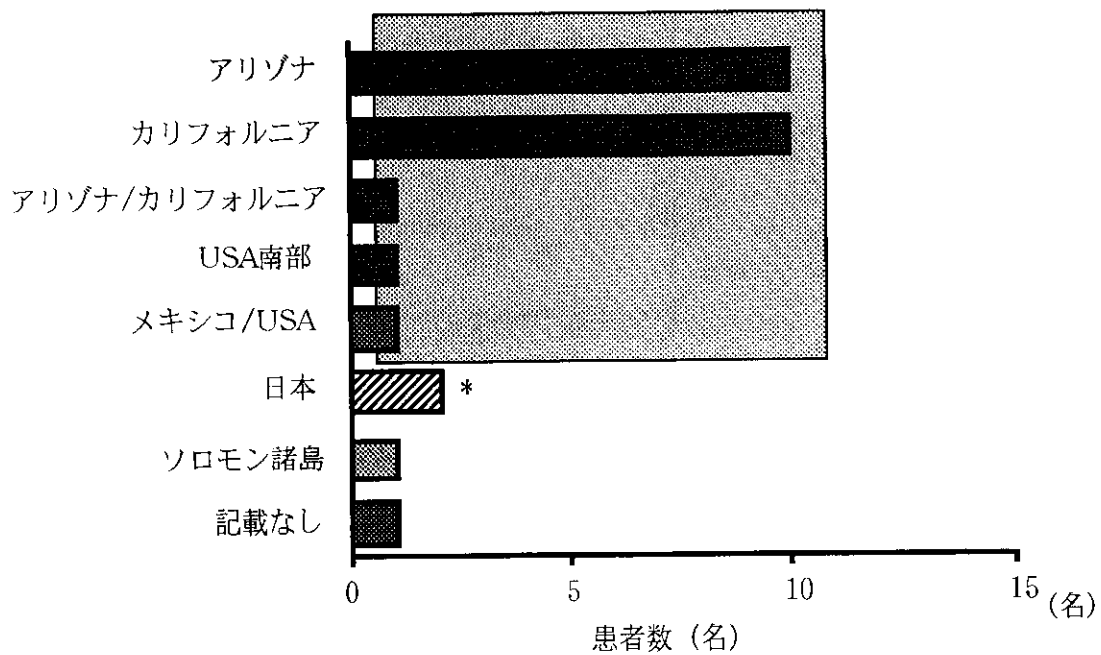


図4 パラコクシジオイデス症患者数の推移

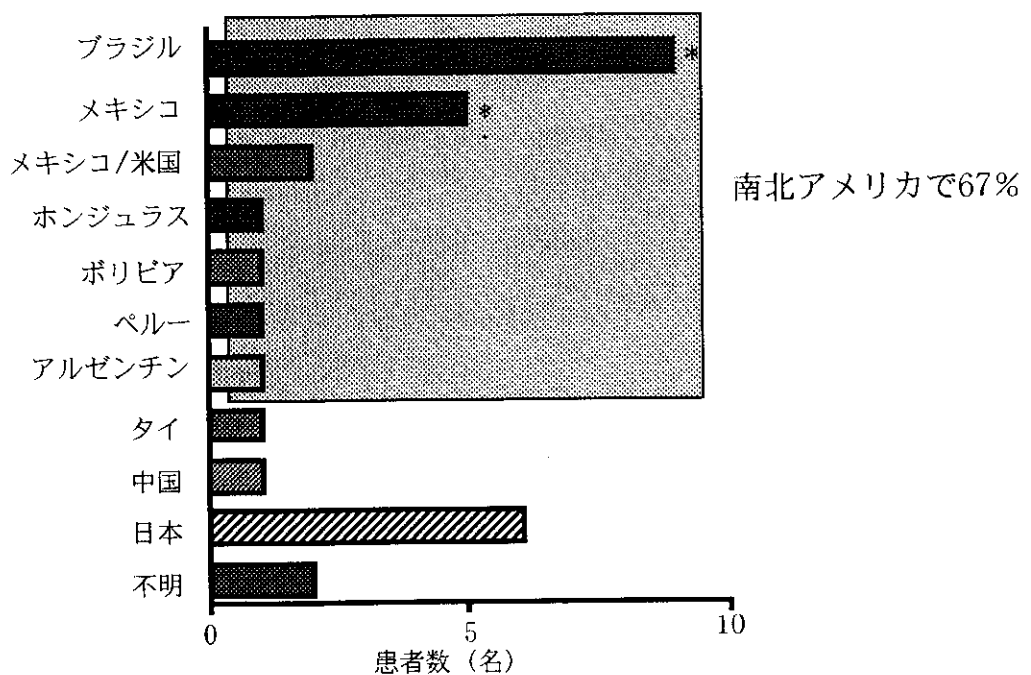
ヒストプラズマ症、パラコクシジオイデス症ともに、1980年代以降の患者数の増加が著しい。



* いずれも輸入綿花取扱者

図5 我国で発症したコクシジオイデス症患者の感染地

米国での感染が全体のほぼ85%を占めている



* 内8例が集団発症

** 内2例が集団発症

図6 我国で発症したヒストプラズマ症患者の感染地

約20%が日本国内で感染したと考えられ、今後の検討が必要である。

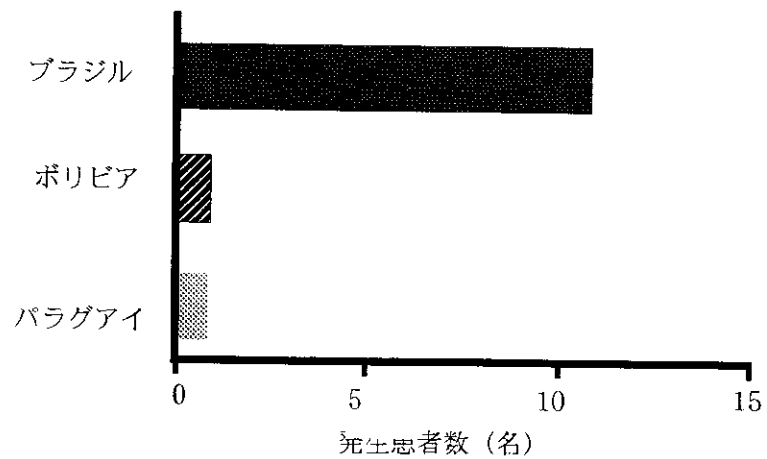


図7 我国で発症したパラコキシジオイデス症患者の感染地
85%は最大の流行地域であるブラジルで感染している。

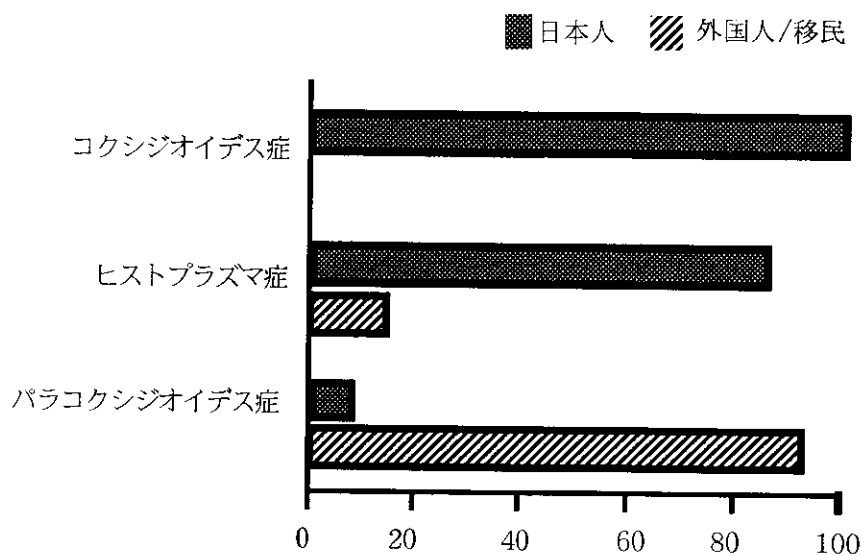


図8 輸入真菌症患者の人種/民族的背景

コキシジオイデス症がすべて日本人であったのに対し、パラコキシジオイデス症は多くが流行地で生まれ育ったブラジル人あるいは日系ブラジル人であった。感染源に対する暴露の状態、あるいは居住地などの要因が考えられる。

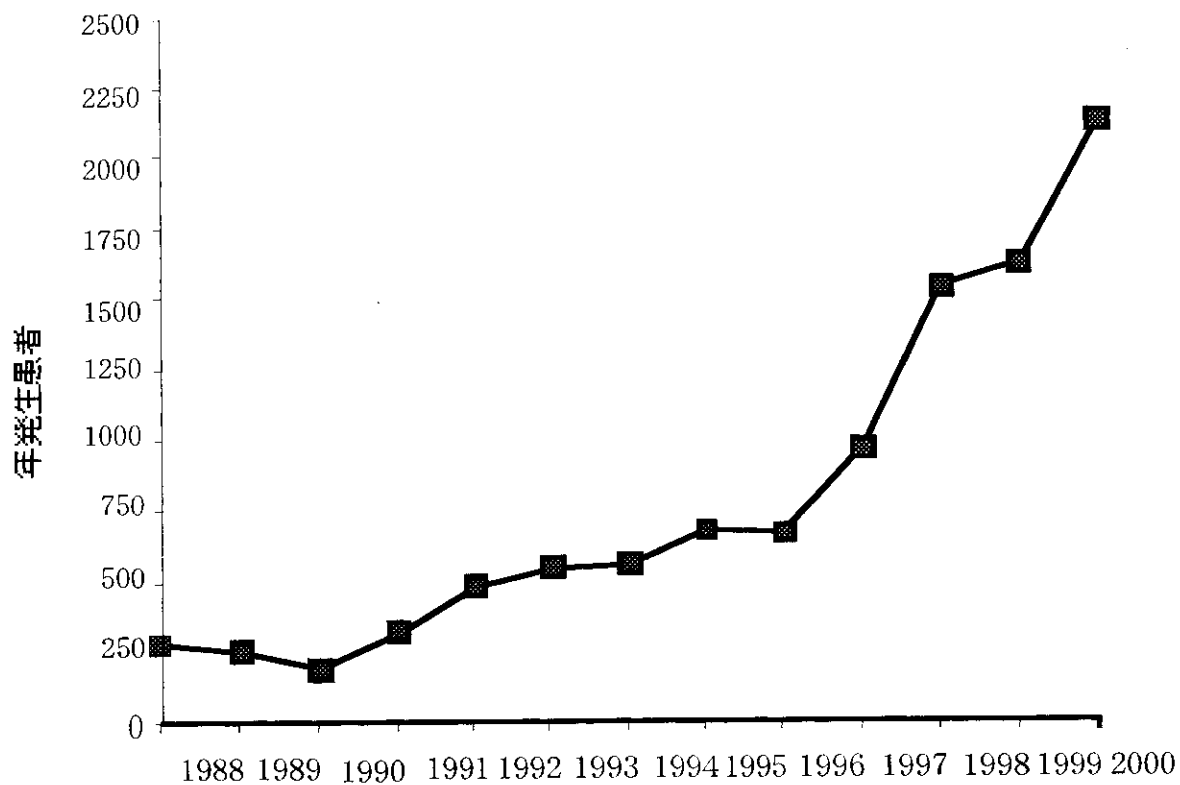


図9 米国アリゾナ州におけるコキシジオイデス症患者数(1988 - 2000)

アリゾナはカリフォルニアと並び、コキシジオイデス症の最大の流行地である。我が国における患者の大部分はこのアリゾナ、あるいはカリフォルニアで感染したと考えられる。アリゾナにおけるコキシジオイデス症は過去10年間で急増しているが、このような流行地域での発生頻度の増加は、我が国にも少なからぬ影響を与えるものと考えられる。

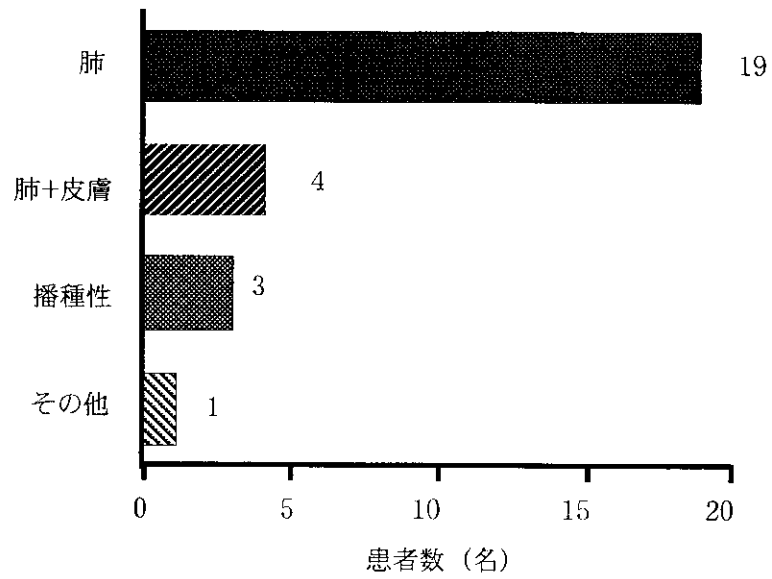


図 1 0 我国で発症したコクシジオイデス症患者の病型

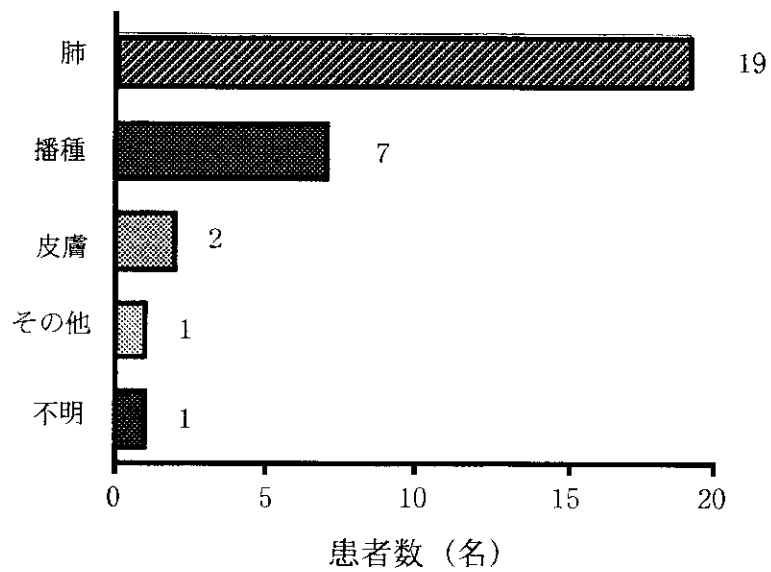


図 1 1 我国のヒストプラズマ症患者の病型

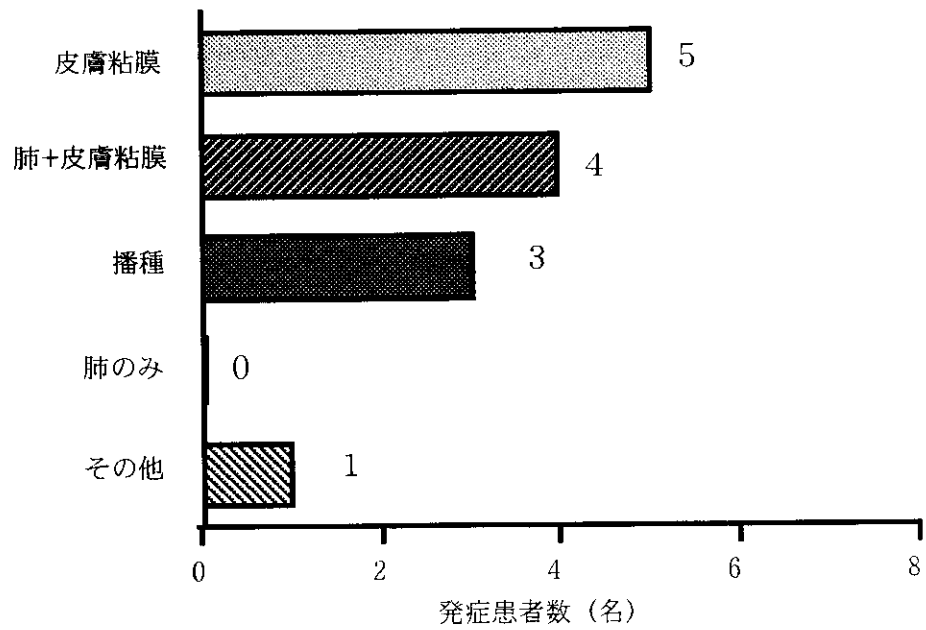


図 1 2 我国におけるパラコクシジオイデス症患者の病型

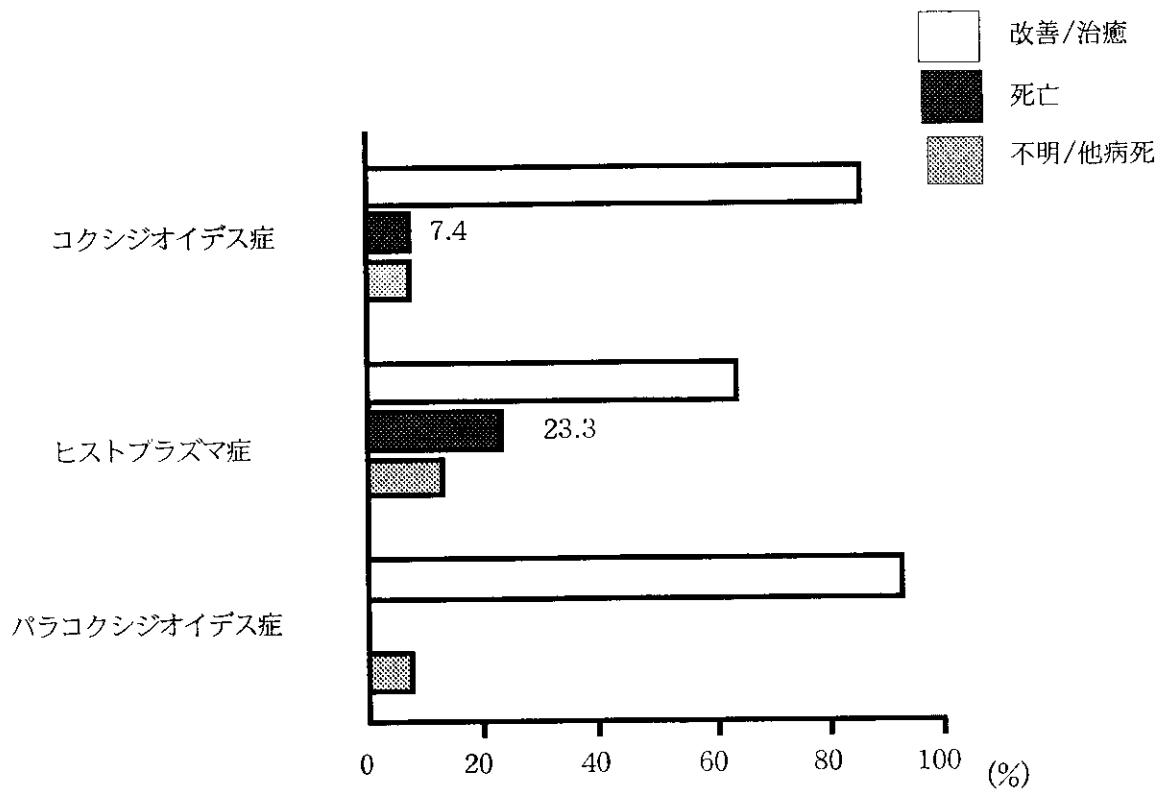


図 1 3 輸入真菌症例の予後

全身播種型の少なかったコクシジオイデス症よりも、ヒストプラズマ症の致命率が一段と高く、細胞性免疫の低下群を中心に今後十分な注意を要する。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

日和見真菌および新興真菌による真菌症の分子疫学的調査と
予防・治療法の開発に関する研究

分担研究者：菊池 賢 東京女子医科大学医学部中央検査部感染対策科

研究要旨

全国の深在性真菌症の動向を把握するため、500床以上の病院を中心に508施設にアンケート調査を行った。また、より詳細な真菌症の実態調査のため、17施設について1年間のプロスペクティブな真菌血症の発生動向調査を行った。真菌血症の検出率は年々低下傾向にあり、それと反比例して血液培養自動検出システムの導入が進んでいた。深在性真菌症の正しい診断、検出を行うため、検査システムの改良も念頭に置く必要がある。プロスペクティブな真菌血症調査では*C.albicans*以外の菌種の増加傾向がうかがえる。今後、菌種の正確な同定方法を踏まえた真菌血症の動向調査が引き続き必要である。

A. 研究目的

近年、医療技術の進歩により、感染症の病態に大きな変化が生じてきている。中でも深在性真菌症は免疫不全患者に発生することの多い日和見真菌症の代表であるが、わが国全体での発生状況等の疫学調査はほとんど行われていなかった。そこで、深在性真菌症の中でも比較的診断の容易な真菌血症につき、大まかな国内での深在性真菌症の発生状況をアンケート調査によって把握した上で、比較的規模の大きな17施設で向こう1年間発生した真菌血症全例の詳細な調査を行い、遺伝子学的な菌の正確な同定による発生状況、薬剤耐性、分子疫学的特徴などを明らかにする。

B. 研究方法

アンケート調査 主任研究者、上原至雅を中心とし、深在性真菌症に関する2種類のアンケ

ート（A; 深在性真菌症に対する認識調査、B; 真菌血症の発生状況調査）を全国の概ね500床以上の病院（精神科単科病院を除く）に対して郵送、回収した。このうち、アンケートBの真菌血症発生状況とそれに与える検査方法の影響等について分担研究者；菊池が解析した。

プロスペクティブな真菌血症の発生動向調査 関東近郊を中心とした17施設（表1）にて、2000年12月より1年間発生した全ての真菌血症（静脈留置カテーテル感染を含む）につき、その患者背景を調査すると同時に、検出された菌株を全て、分担研究者；菊池の元に収集する。得られた菌株は28S rRNA, ITS1領域の遺伝子配列決定することにより、正確な菌種同定を行う。この際、現在用いられている従来の生化学的反応、形態観察、キットによる同定を同時に行い、動向調査に望ましい同定方法を選定する。

表1. 真菌血症調査研究 研究協力機関

番号	研究協力機関
1	東京大学医学部附属病院
2	順天堂大学医学部附属病院
3	慶応大学医学部附属病院
4	東京慈恵会医科大学附属病院
5	帝京大学医学部附属病院
6	日本大学医学部附属病院
7	千葉大学医学部附属病院
8	聖マリアンナ医科大学附属病院
9	北里大学医学部附属病院
10	東海大学医学部附属病院
11	横浜市立大学医学部附属病院
12	埼玉医科大学附属病院
13	社会保険中央病院
14	NTI関東病院
15	国立神戸病院
16	東京厚生年金病院
17 (分担研究者)	東京女子医科大学附属病院

近年、抗真菌薬耐性 *Candida* の分離頻度が増加傾向にあり、今後我が国でも大きな問題となることが予想されるため、現在用いられている amphotericin B, flucytosine, miconazole, fluconazole, itraconazole に加え、開発中の voriconazole, echinocandin (FK463) について感受性を微量液体希釈法にて測定する。また、国内でしかも直接の連携のない多施設で分離される *Candida* 属の分子疫学的解析を whole DNA 及び *Sfi* I, *Bss*H II など で消化した DNA のパルスフィールド電気泳動にて比較する。

(倫理面への配慮)

調査票には個人情報が含まれるため、その情報は厳密に管理する。特に最近ではコンピューターハッカー被害が相次いでいるため、集計のための入力作業には暗号変換を導入し、万が一情報が漏れても個人情報がわからないようにする。

C. 研究結果

アンケート調査の解析

送付したアンケート 508 のうち、253 通の回答が得られた。ここで、過去5年間の血液培養数、そのうちの培養陽性件数、真菌陽性件数を比較したものを図1に示す。血液培養数、培養陽性

件数は年々増え続けており、その率はほとんど同じである。一方、真菌陽性件数は増加しているものの、全2者に比べて、カーブが緩やかである。ということは血液培養陽性の中の真菌血症の比率はむしろ、減少していることになる。

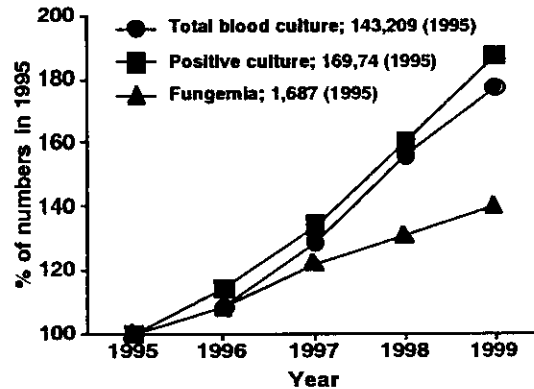


図1. 5年間の血液培養の推移

そこで、各施設でどのような血液培養システムを用いているのか、集計した。結果を図2に示す。血液培養自動検出システムの導入が過去5年間で急速に進んでおり、それと反比例して従来のマニュアル検出法が用いられなくなっている。このマニュアル検出法の推移と全血液培養陽性件数に占める真菌陽性数の比率の2つのカーブがぴったりと重なっているのがよくわかる。

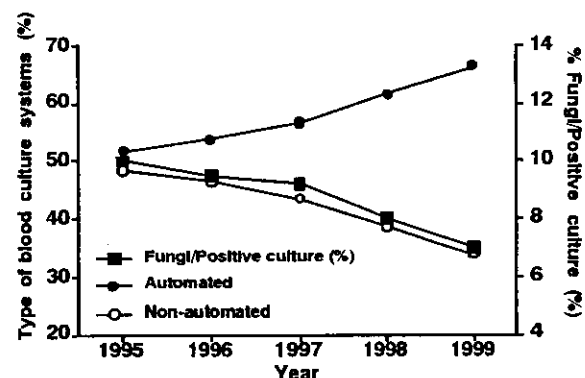


図2. 5年間の血液培養システムと真菌陽性率の推移

プロスペクティブな真菌血症発生動向調査

2000年12月1日より調査を開始した。順調に調査票、菌株が回収されており、現在までにおよそ20株ほどの真菌血症由来株を収集された。順次、同定検査、遺伝子解析を行っている。これまでに分離された株では予想に反して

C.glabrata, *C.parapsilosis* が多く、*C.albicans* が少ない。これが 1 年間を通してのことなのか、目下観察中である。

D. 考察

近年、深在性真菌症の増加傾向を指摘される報告が多い中で、真菌血症が年々減少傾向にあるのは一見、矛盾しているように考えられる。それが真の減少なのか、それとも検出システムの問題なのか、検証が必要である。そこで、最近導入が進んでいる血液培養自動検出システムが浮かび上がってきた。これらのシステムは孵卵器中で自動的に震盪培養を行っている。このため、一般細菌の培養効率が上がり、検出時間が短縮される。真菌が検出される検体には混合感染が少なくなく、このことはより培養に時間のかかる真菌が増殖する前に、一般細菌が増殖し過ぎて、真菌の検出に支障をきたしている可能性が考えられる。また、こうした血液培養自動検出システムでは観察期間を 48 時間などで区切っているが、この培養時間は真菌検出には不十分であり、設定条件を見直す必要があると考えられた。実際に深在性真菌症を検出するシステム上の問題点が浮かび上がってきたことで、こうしたシステムの検証、培地の改良等が今後当研究班で解決を図らねばならない課題の一つであると考えている。

プロスペクティブな真菌血症発生動向調査はまだ、十分な解析ができる程データが集まっていないが、*C.albicans* 以外の菌種の増加傾向が認められている。今回のアンケート調査によると、過去 5 年間に得られた真菌血症由来の菌種では *C.albicans* が最も多い。しかし、依然、菌種同定を行っていなかったり、同定不能な株も相当な数に及んでいるため、真の深在性真菌症の実態を把握するためには、本研究調査を行う意義が

大きいものと考えられた。*C.glabrata* や *C.krusei* などでは薬剤耐性が大きな問題となっており、抗真菌剤の不適切な使用によって、今後 MRSA や緑膿菌などと同じように院内感染の起因菌として拡がる恐れもある。このような深在性真菌症の正確な実態を把握するためのシステム作成は非常に重要であり、本研究の使命の一つであると考えられた。

E. 結論

真菌血症の検出率は年々低下傾向にあり、それと反比例して血液培養自動検出システムの導入が進んでいた。深在性真菌症の正しい診断、検出を行うため、検査システムの改良も念頭に置く必要がある。preliminary には真菌血症の中で *C.albicans* 以外の菌種の増加傾向がうかがえる。今後、菌種の正確な同定方法を踏まえた真菌血症の動向調査が引き続き必要である。

F. 健康危険情報

国内で発生した真菌血症としては特に感染性、病原性の強い菌種の増加傾向は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会・その他での発表

深在性真菌症の発生動向とその問題 菊池賢 平成 12 年度 希少感染症診断技術研修会
国立感染症研究所 平成 12 年度希少感染症診断技術研修会資料 p24, 2001 厚生労働省健康局・結核感染症課

平成 12 年度厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
「輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究」
分担報告書

輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発

分担研究者 榎村 浩一 帝京大学医真菌研究センター講師

「輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発」として分担研究者が行った以下の研究課題（Ⅰ深在性真菌症補助診断法の評価に関する研究（健常人例）、Ⅱ病原真菌の分子生物学的同定システムの研究、Ⅲ輸入真菌症起因菌の迅速同定システムの研究、およびⅣインターネットを用いた病原真菌及び真菌症に関する情報公開に関する研究）に関して、平成 12 年度の成果を以下に報告する。

Ⅰ 深在性真菌症補助診断法の評価に関する研究（健常人例）

A. 研究目的

深在性真菌症は悪性腫瘍の治療、移植医療等高度医療技術の普及にともなって、今日益々増加の傾向にあるが、未だに決定的な早期診断法が確立されていないために、治療の機会を逸していることが少なくない。その中で、近年開発された真菌細胞壁β-グルカン測定法と、真菌遺伝子 PCR 増幅法は、感度・特異度共に高い真菌症補助診断法として、最も信頼性が高い検査法であると考えられている。しかしながら、これらの検査法について、健常人における十分な検討はなされていないために、陽性結果に対する評価に疑問があった。そこで本邦で現行の深在性真菌症補助診断法として受託施行されている上記診断法の評価第 1 段として、健常成人の同一採血検体に対

する各法の陽性例出現頻度とその原因を明らかにし、検査結果における評価基準の検討を目的とする研究を企画した。

B. 研究方法

対象：都内企業において事務、営業職に就き、少なくとも日常業務に支障ない程度に健康な①35±5歳、②45±5歳、および③55±5歳の3群各25人についてボランティアを募集し、アンケート、聞き取り調査、採血、および健康記録調査を含む、のべ300件の協力を得た。

供血：必要な説明と問診調査票の記入後、分担研究者監督の下に看護婦または臨床検査技師によって一人当たり約19mlの採血が行われた。

検査項目（当該受託・販売各社の協力による）と採血量：

C. β-グルカン測定法

(1)ファンギテック G テスト (β -グルカンの比色測定による深在性真菌症起因菌全般の定量検出法), 生化学工業株式会社; 2 ml

(2) β -グルカンテスト ワコー (β -グルカンの比濁測定による深在性真菌症起因菌全般の定量検出法), 和光純薬工業株式会社; 3 ml

b. PCR 増幅法

(3)病原性真菌検出 PCR (単純 PCR とサザンハイブリダイゼーション法による深在性真菌症起因菌全般の定性検出法), 株式会社東洋紡ジーンアナリシス; 2 ml

(4)geniQ-アスペルギルス (TaqMan PCR によるアスペルギルス症起因菌の定量検出法), geniQ-カンジダ (TaqMan PCR によるカンジダ症起因菌の定量検出法), 大塚アッセイ研究所/大塚製薬株式会社; 7 ml

c. 一般生化学

(5)TP, GOT, GPT, γ -GTP, BUN, Cr, BS, CRP, 大塚アッセイ研究所/大塚製薬株式会社; 5 ml

(倫理面の配慮)

この研究の目的と意義, および被験者の権利について説明した。また採血で調査する項目は, β グルカン量, 真菌遺伝子の有無と定量, 並びに一般的生化学検査項目のみであり, 無断で他の検査には用いないこと, また, 検査の結果, 問診の内容共に, 本研究のみに用い他に流用することはないことを説明して同意を得た。その他, 被験者所属企業の社内倫理

規定による必要決裁を得た。

C. 研究結果

a. 一般状況

(1)被験者構成: 被験者は年齢階級別に①35 \pm 5歳: 24人, ②45 \pm 5歳: 26人, および③55 \pm 5歳: 25人であり, 階級②に含まれた5人の女性を除いた総べてが男性であった。

(2)被験者の既往, 現病歴: 若干の高血圧症, 高脂血症等の軽度慢性疾患を認めたが, 特記すべきものはない。

(3)被験者血液生化学検査結果: 軽度から中等度の高血糖, 軽度の肝逸脱酵素高値を若干名にみたが, 特記すべきものはない。

b. 深在性真菌症補助診断法の結果

(i) β -グルカン測定法

(1)ファンギテック G テスト: 通常感度測定(20pg/ml 以上陽性)で 1 検体に陽性が得られた。但し, cut off 以下の比較的(判定保留域)高値として 10pg/ml 以上 20pg/ml 未満の陽性例は 24 例であった。

(2) β -グルカンテスト・ワコー: 通常感度測定(11pg/ml 以上陽性)で 1 検体に陽性が得られた。但し, cut off 以下の比較的高値として 1pg/ml 以上 11pg/ml 未満の陽性例は 32 例であった。

(ii) PCR 増幅法

(3)病原性真菌検出 PCR: エチジウムブロマイド染色(EtBr)による検出で 2 検体に陽性が得られた。但し, サザンハイブリダイゼーション(SH)を施行した場合

の陽性例は39例であった。SH 陽性例の検体は再増幅した上で、塩基配列による菌種同定を試みた(18S rDNA のB2F/B4R 領域塩基配列解析による。詳細は、「II 病原真菌の分子生物学的同定システムの研究」参照)。増幅された真菌 DNA の塩基配列は各々、子囊菌共通配列: 3例, 真正子囊菌配列: 2例, *Penicillium* 属配列: 8件, *Aspergillus fumigatus* グループ配列: 15件, *Debaryomyces hansenii* グループ配列: 3, *Saccharomyces cerevisiae* グループ配列: 2例, *Candida parapsilosis* グループ配列: 1例, その他半子囊菌配列: 2例, 担子菌配列4例(一部複数検出あり)であった。

(4)-1 geniQ-アスペルギルス: 通常感度測定(40copies 以上陽性)で陽性例は得られなかった。但し, 40copies 未満の検出例は14例であった。

(4)-2 geniQ-カンジダ: 通常感度測定(40copies 以上陽性)で1例に *C.glabrata/C.krusei* 特異的配列を検出した。また, 40copies 未満の検出例は17例であった。

(iii) 各診断法間の陽性一致検体

各診断法の通常感度または低感度測定において, 陽性結果が一致した検体について見ると, (1)ファンギテック G テストとβ-グルカンテスト・ワコーは, 唯一同一検体で陽性となっている。この検体は病原性真菌検出 PCR においては SH 施行によってはじめて陽性となり, geniQ では geniQ-アスペルギルスにおいてのみ 40copies 未満陽性

である。塩基配列解析結果から, 本例検体に含まれた真菌 DNA は真正子囊菌配列と担子菌配列であったが, いずれも主要病原真菌の配列には一致しなかった。真正子囊菌配列陽性の結果は, geniQ-アスペルギルスの低値陽性結果と矛盾しないものである。(2)病原性真菌検出 PCR の EtBr 陽性例2例のうち1例は, 他の何れの検査法においても陽性が得られなかった。他の1例は, ファンギテック G テストとβ-グルカンテスト・ワコーにおいて cut off 以下の比較的高値陽性例に一致したが, geniQ との一致は見られなかった。(3)geniQ-カンジダの陽性例は, 他の何れの検査法においても陽性が得られなかった。

(iv) 陰性コントロール

この試験で用いた試験管, 水, 試薬, その他の器材に関しては総べて陰性コントロールとして, 完全な陰性結果を確認した。

D. 考察

今回の試験において検討したβ-グルカン検出法, および遺伝子検出法は従来の検査法に比較して極めて高感度かつ特異的であることから, その有効性は臨床的に大きく期待されている。本法は高感度であるために, 検体中に含まれる微量の真菌菌体成分(β-グルカン及びDNA)をも検出することになる。これら微量真菌菌体の検出は従来であれば, 「汚染」の一言で済まされて来たものである。しかし, よくコントロールされた今回の検討において, 健常人血液検体から複数の検査法によって陽性例が見られたことから, 健常人

においても血液等の無菌的体液・組織に従来検出できなかった、微量の真菌菌体成分が存在することが強く示唆される結果となった。

微生物がいわゆる感染によらずに、体内の無菌的体液・組織中に侵入する現象は、今日 **Microbial translocation (MT)** または **Bacterial translocation** として知られている。腸管内の微生物または、ピーズ等がリンパ管または門脈血を經由して血行に移行する現象である。環境中または食品中の真菌菌体成分が **MT** の機序によって体内に取り込まれることは十分考えられることであり、本検討の陽性例はこの現象を検出したものと思われる。

ここで注意しなくてはならないのは、健常人において今回用いた検査法が少ない割合で陽性例を得たことをもって、これら検査法の有効性・有用性が損なわれるものではないという点である。もとより、本検討に用いたものは総べて深在性真菌症の診断キットであり、また本邦において深在性真菌症は日和見感染症として免疫不全状態の患者に発症するものである。そのような患者にとっては、健常人において問題とならない **MT** が、まさに致命的な感染に繋がるのは言うまでもない。今回検討した各々のキットは、そのような患者の感染症診断に有力な検査法である。また、今回 **MT** に基づくと考えられる各種試験法陽性例は、可能性として **MT** を惹起しやすい素因を持っている可能性もあり、そのような人は一度免疫抑制状態に置かれると感染惹起の可能性が高いことも示唆される。今後追跡調査を考慮する必要がある。

また、今回の「健常人例」結果を踏まえて、

「免疫抑制患者例」、および「真菌症確診例」についても検討を続けることによって、これら診断検査法の有効な利用法に関する指針の作成が必要である。

E. 結論

深在性真菌症診断法各キットを用いた検討により、少ない割合ながら健常人から **MT** に由来するものと思われる陽性例が認められた。今回の「健常人例」結果を踏まえて、臨床症例についての検討を続けることによって、これら補助診断法に関する指針の作成が必要である。

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

現在準備中である。

II 病原真菌の分子生物学的同定システムの研究

A. 研究目的

起因菌の同定は、感染管理上・治療上極めて重要である。現在、真菌の菌種同定は、菌株の表現形を観察することによって行われている。しかし、臨床分離菌株の中には典型的な形態または生化学的性状を示さない場合もあり、そのような菌の同定は事実上不可能であった。この問題を解決するために研究されたのが **DNA 塩基配列の解析による同定法（分子生物学的同定法）** である。本法は菌の発育

環境に左右されにくい、固有の遺伝型に基づいた同定法であることから、信頼性の高い同定結果が期待できる。

B. 研究方法¹⁻⁵⁾

分子生物学的同定法を行うためには、塩基配列の解析装置と共に、すでに完成された真菌菌種・菌株別の DNA 塩基配列と分子系統解析情報の集積（菌種同定用 DNA データベース）が必須である。データベースとしては、DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている塩基配列と、必要に応じて分担研究者が新たに決定した配列を利用した。

真菌 DNA は、培養菌体を界面活性剤中ですり潰し、蛋白変性後エタノール沈澱法によって精製した（所要時間約 80 分）。

PCR は、下図に示すいずれかのプライマー対を用いた。使用するプライマー対によって、次頁に示すように同定可能な分類階級がとな

るため、目的によって適切な選択が必要となる。

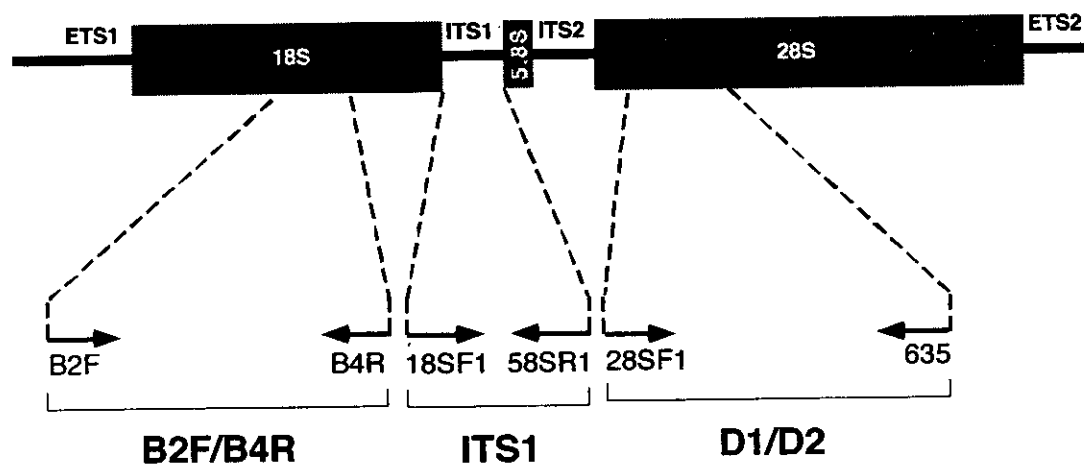
C. 研究結果

菌種特異性が高い ITS の配列を解析することによって、主要病原真菌の属から菌種レベルの詳細な同定が可能となった。

D. 考察

このような菌種特異的な DNA 塩基配列の解析により、従来明らかにすることができなかった菌種間の系統関係、ならびに 1 菌種の「範囲」(Genospecies)^{6-1, H-2)}に関する新たな知見がもたらされた。また、上記解析によって得られた配列を利用して、特異的プライマー対を用いた PCR 法を開発することも可能である。この場合は、分離菌株から 1 日以内で菌種同定が可能となり、迅速性および簡便性の点で臨床的有用性をもつことが示唆される。

リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) と真菌の検出・同定に用いる配列領域



rDNA: ribosomal DNA, 18S: 18S rDNA, 5.8S: 5.8S rDNA, 28S: 28S rDNA,
 NTS: non-transcribed spacer, ETS: external transcribed spacer, ITS: internal transcribed spacer

解析する塩基配列と同定・識別が可能な分類階級

解析する塩基配列 (領域)	識別可能な分類階級	(真菌) 界	属	種	菌株の型
18S rDNA (B2F/B4R増幅領域)		●			
28S rDNA (D1/D2領域)			●		
ITS1 (ITS1全域)				●	

また、PCR による増幅産物多型や直接塩基配列決定法による菌株識別法も報告されており、疫学的解析への応用が期待できる。

E. 結論

塩基配列に基づいた病原真菌同定法の基礎的方法論が確立された。

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

1) Makimura K: Species identification system for dermatophytes based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1. *Japanese Journal of Medical Mycology* 42, 2001, in press. (資料参照)

H. 参考文献

1) Makimura K, Hanazawa R, Takatori K, Tamura Y,

Fujisaki R, Nishiyama Y, Abe S, Uchida K, Kawamura Y, Ezaki T, Yamaguchi H: Fungal flora on board Mir-space station, identification by morphological features and ribosomal DNA sequences. *Microbiology and Immunology* 45(5), 2001, in press.

2) Makimura K, Tamura Y, Murakami A, Kano R, Nakamura Y, Hasegawa A, Uchida K, Yamaguchi H: Cluster Analysis of Human and Animal Pathogenic Microsporium Species and Their Teleomorphic States, *Arthroderma* species, Based on the DNA Sequences of Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1. *Microbiology and Immunology* 45(3), 209-216, 2001.

3) Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H: Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Journal of Clinical*

Microbiology 37(4): 920-924, 1999.

- 4) Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H: Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Journal of Clinical Microbiology* 36(9):2629-2633, 1998.
- 5) Makimura K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H: Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Journal of Medical Microbiology*, 49(1): 29-35, 2000.

III 輸入真菌症起因菌の迅速同定システムの研究

A. 研究目的

本研究班における主要研究課題である輸入真菌症管理のためには、確実にして簡便迅速な病原診断検査法および、当該検査が可能なレファレンスシステムの確立が必須である。しかしながら、現状において全例報告第4類感染症に規程されたコクシジオイデス症をはじめとした輸入真菌症に関して、国内で診断し、あるいは起因菌を同定するシステムは存在しない。そこで、本研究では、輸入真菌症対策上焦眉の急ともいえるこれら病原診断検査法に限定して、実用可能な具体的方法および手順の開発を目的とする。

B. 研究方法

病原診断法として、最も信頼性が高く、簡便性および迅速性に優れた方法は、分子生物学的手法による起因菌の検出同定系である。そこで、コクシジオイデス症をはじめとした輸入真菌症起因菌3種 (*Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffeii*) に対する各々特異的PCR検出系を開発する。使用するPCRプライマーは既報(LoBuglio KF, Taylor JW: Phylogeny and PCR identification of the human pathogenic fungus *Penicillium marneffeii*. *J Clin Microbiol* 1995 Jan;33(1):85-9) のものを利用してその信頼性を確認すると共に、必要に応じて新規プライマーを作成する。その際利用する塩基配列は既に報告されており、利用可能である。また、臨床検体および分離菌株からの真菌DNA抽出法も既に確立されているため、これを利用できる。さらに起因菌検出用のPCRプレミックスとDNA抽出試薬をキット化することによって、地方衛生試験所レベルで本症の(予備的)病原診断を可能にする。

C. 研究結果

輸入真菌症起因菌3種 (*Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffeii*) に対する各々特異的PCR同定検出系が開発できた。本法により、千葉大学真菌医学研究センターおよび帝京大学医真菌研究センター保存の各々の菌種を特異的、迅速、簡便に同定することが可能となった。

D. 考察

上記感染症の診断および起因菌の同定は、地方衛生試験所をはじめとした然るべき機関に検体を移送してはじめて可能となるが、現状において検体および菌株を安全に移送するためのガイドラインは存在しない。上述の検査システムを実際的に稼動するためにも、ソフト、ハード両面における検体移送システムの可及的速やかな開発は不可欠である。

また、上記研究によって研究開発した輸入真菌症診断、同定キットと検体移送法を本研究班分担者が各々の施設（国立感染症研究所各室、千葉大学真菌医学研究所、東京女子医科大学検査部、帝京大学医真菌研究センター）および技術を用いて確認することで、その実施可能性を併せて評価することが必要である。

E. 結論

地方衛生試験所レベルで輸入真菌症の（予備的）病原診断を可能にする迅速同定キットが作成できた。

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

準備中である。

IV インターネットを用いた病原真菌及び真菌症に関する情報公開に関する研究

A. 研究目的

真菌症研究の重要性は今日益々高まっているが、これに反して医真菌研究のために利用で

きる情報は限られていると言わざるを得ない。そこで、分散限局している医真菌研究・教育資材の効率的利用と、研究者相互の情報交換を計る目的で、病原真菌情報をデータベース化し、それらをインターネットサーバ上で公開することによって、研究者が容易に（誰もが、自由に、無料で）利用できる知的基盤の整備が必要である。そのために「オンライン病原真菌データベース」（英名：Pathogenic Fungi Database、略称：PFDB）<http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb/>の作成を試みた。

B. 研究方法

PFDBの目的は、研究者相互の協力により病原真菌の研究と教育のために利用できる、画像とデータを供給することにある。そこで、医真菌にかかわる情報の無償共有に賛同する研究者からの情報提供を（特に研究上のプライオリティーにかかわらない範疇で）依頼した。データベース化は分担研究者が行った。

C. 研究結果

PFDBの公開に成功した(字頁図参照)。多くの協賛を得て、順次データを更新中である。

D. 考察

本データベースには、現在世界各国から、1日に1000件程のアクセスを記録している。このようなボランティアデータベースは、有益であることに異論はないものと思われるが、公的な援助がなければ継続した知的基盤となり得ない。各方面からの援助獲得を検討した