

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）研究報告書
「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」

後天性免疫不全症候群(AIDS)における真菌症に関する病理学的研究

研究協力者 渋谷 和俊 東邦大学医学部助教授

研究要旨

後天性免疫不全症候群(AIDS)における重篤な日和見感染症である深在性真菌症について病理組織学的に検討した。AIDS における深在性真菌症の特徴は、クリプトコックス症の頻度が特異的に高いことである。組織学的には、脾・リンパ節で、構造破壊をみる高度の菌増殖と軽微な組織球反応が特徴的であった。肺では、広範な胞隔毛細血管内への菌の侵入をみるが、肺胞内の菌の増殖と組織球の反応の程度は症例により異なった。しかし、肉芽腫性病変いずれにもみられなかった。一方、HAART 施行例では、組織球や線維芽細胞による菌の増殖巣の被包化が観察され、本症におけるCD4+細胞の賦活化による特徴的な所見と推定された。

A. 研究目的

AIDS における日和見感染症の発症は重篤なものが多く、中でも真菌感染症は非定型好酸菌症やカリニ肺炎などとともに AIDS における代表的な日和見感染症として注目されている。本研究の目的は、ロサンゼルス市内の2施設で行われた AIDS 剖検例を用いて深在性真菌症の発生頻度やその病理組織学的を明確にするである。また Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART)が施行された1例についてより詳細な検討を行い、いわゆる炎症再燃による病変の修飾像についても検討した。

B. 材料および方法

1. 系統的病理解剖が行われた HIV 抗体陽

性例 162 例。その内訳は、1983 年から 1993 年 2 月までの UCLA Medical Center での剖検例 123 例と 1985 年 6 月から 1991 年 4 月までの VA Medical Center での剖検例 39 例であった。

2. 1998 年に UCLA にて剖検された HAART 施行全身性クリプトコックス症例 1 例。

検索対象とした剖検例は、ほぼすべての臓器の標本が作成されており、これらを顕微鏡で観察した。さらに代表的な病変部の切片については、酵素抗体間接法を施し免疫組織学的検索も行った。また、1993 年までの剖検例における深在性真菌症を、原因菌種別に単独の臓器に感染巣がみられた限局性真菌症と血行性播種による全身性真菌症とに分けて、それらの頻度なら

びに組織像について検討した。ここでは、全身性真菌症が真菌血症の結果であることをより明確にするために、肺・腎・肝などの実質臓器2臓器以上に菌の増殖を認めた症例を全身性真菌症例とした。またこのとき、同一患者に合併した食道や口腔などの粘膜に認められた真菌感染巣は、全身性真菌症の侵襲臓器からは除外した。

C. 結果

1. 限局性真菌症

限局性真菌症の原因菌ならびに侵襲臓器別の頻度は、高いものから順に口腔内カンジダ症 12 例 (7.4%)、食道カンジダ症 10 例 (6.17%)、肺アスペルギルス症 7 例 (4.32%)、カンジダ性肺膿瘍 5 例 (3.01%)、脳クリプトコックス症 4 例 (2.47%)、腎カンジダ症 1 例 (0.62%) であった。

組織学的に食道カンジダ症では、粘膜表面でのカンジダの菌糸性発育と上皮剥離ならびにわずかな壊死を伴う粘膜表層への好中球浸潤を認めたが、カンジダが粘膜に侵入する像は観察されなかった。カンジダおよびアスペルギルスによる肺病変では、核破砕物やわずかな好中球の浸潤を伴った壊死巣の形成が特徴的であった。また、アスペルギルス症では、気管支粘膜のみに菌の増殖を認めた症例が 1 例含まれているが、この症例も同様の粘膜の真菌症である食道カンジダ症とは異なり、菌の粘膜内への侵入を認めた。

2. 全身性真菌症

全身性真菌症の中では、クリプトコックス症が 18 例 (11.1%) と最も頻度が高く、ついで

ヒストプラズマ症 3 例 (1.85%)、コクシジオイデス症 2 例 (1.23%)、カンジダ症 2 例 (1.23%) の順であった。

全身性真菌症の中で最も頻度の高かったクリプトコックス症剖検例では、肺、脾、リンパ節、中枢神経、肝、腎の順で感染病巣が観察された。組織学的には、網内系臓器である脾・リンパ節や脳などでは、臓器の基本構造を破壊する高度の菌増殖と極めて軽微な組織球反応を認めた。また、肺でも菌の増殖は顕著であるが、症例ごとに組織球反応の程度は異なっていた。肺での菌増殖巣は、主に巣状の分布を示す。しかし、この増殖巣が少数の場合、これを取り囲む組織球の集簇巣が形成される。一方、多数の菌の増殖巣が癒合性に形成された場合には、大半の肺胞が菌と組織球によって満たされており、組織球の集簇は明らかではなかった。また、いずれの症例でもリンパ球浸潤は極くわずかで、少数の B 細胞の集簇を認めるものの、CD4+細胞はほとんどみられず、末梢血中の CD4/CD8 比ならびに CD4+細胞数の極端な低値を組織学的にも証明する結果であった。

HAART 施行例でのクリプトコックスによる侵襲臓器は肺と中枢神経であった。肺では、結節状の菌の増殖巣が散見され、この辺縁は組織球ならびに線維芽細胞により被包され、この周囲に CD4+細胞が観察された。この結節部以外の胞隔内毛細血管に菌は認められず、HAART 未施行例との大きな相違点であった。

一方、クリプトコックス症と同様に健常人に発症し、肺に肉芽腫を形成する代表的な深在性真菌症であるコクシジオイデス症では、比較的

良好な異物型巨細胞や組織球の反応をみ、多くの菌は巨細胞の細胞質内に取り込まれていた。原発性コクシジオイデス症と比較して、AIDS患者に日和見感染として発症した病変では、病変の境界が不鮮明なことと好中球浸潤が目立つことの2点が、組織学的な相違であった。

D. 考案

AIDSにおける深在性真菌症の特徴として、限局性真菌症としては食道および口腔内のカンジダ症の、また全身性真菌症としてはクリプトコックス症の頻度がそれぞれ著しく高いことが上げられよう。また、粘膜のカンジダ症が高頻度に合併するにもかかわらず、全身性カンジダ症が162例中わずか2例と際だって少ないことも一つの特徴といえよう。この結果は、AIDS患者でもカンジダに対する粘膜から血中への移行を阻止する機能が良好に保たれていることを示している。腎や肺に形成されたカンジダの感染病巣は、比較的良好な好中球浸潤をともなった非特異性化膿性炎の像であり、カンジダに対する感染防御の主たる働きを有している好中球の機能がHIV感染患者でも良好に残されており、菌が全身に散布され難い状態であることが推定される。しかし、常在菌であるカンジダがAIDS患者において消化管、特に口腔や食道で著明な増殖を示すことは、粘膜局所の免疫能の低下との因果関係を示唆するものであるが、この事実に関する明確な理由は、現在のところ不明といわざるを得ない。

一方、深在性全身性真菌症としては、クリプトコックス症の頻度が極めて高いことが特徴的

であり、これは白血病とはじめとする代表的な深在性真菌症の基礎疾患群における発症頻度と著しい相違を示している。この点は、本症の感染防御が、真菌症の中でも特に主要組織適合複合体クラスII分子(MHC class-II molecule)に拘束された細胞間相互作用に依存していることの密接な関係を示唆するものと理解できよう。さらに、組織学的に菌の高度の増殖とこれに伴う組織球反応をみることは、従来の続発性クリプトコックス症でみられる組織球反応の欠如した囊胞病変とは異なった組織像であり、AIDS症例に特徴的な所見と考えたい。また、北米でのAIDS患者におけるクリプトコックス症の発症頻度は、臨床的な報告よりも今回の検索結果の方が若干高く、その理由の一つとして、臨床診断が困難な症例の存在が推定された。さらにHAART施行例では、増殖巣の組織球を主とした被包化による明確な組織内菌増殖の抑制が観察された。これは本症におけるCD4+細胞の賦活化による特徴的な所見の一つと推定された。

E. 結論

米国ロサンゼルス市内の代表的な2医療施設におけるAIDS剖検例に関する病理組織学的検討を行い、深在性真菌症の合併頻度やその種類ならびに組織学的特徴について検討を行った。この結果、粘膜のカンジダ症ならびに全身性クリプトコックス症の頻度が著しく高いことを病理解剖学的に確認した。また、それぞれの真菌感染巣の組織学的所見から、大食細胞や好中球などの感染防御にかかわる細胞の機能はある程度保たれていると推定され、真菌症に対する適

切な抗真菌剤の選択が AIDS 症例の救命に極めて有効であり、また重要であると考えられた。更には、CD4+細胞の賦活化によるクリプトコックスの組織内増殖の抑制が病理組織学的に明確にし得た。

F. 健康危険情報

AIDS 症例における HAART 導入に際し、クリプトコックスが広範な臓器侵襲を来していた場合、CD4+細胞の賦活化による高度の組織球反応が将来され、症例によっては癒着による臓器の機能障害を来す可能性が予想される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 渋谷和俊, 若山恵, 直江史郎. 真菌症の病理. 臨床と微生物. 27(2): 141-53, 2000

2) 若山恵, 渋谷和俊, 安藤常浩, 高橋啓, 大原関利章, 直江史郎, Walter F. Coulson. 固形臓器移植例に合併した深在性真菌症に関する検討. 感染症誌 74(4): 378-86, 2000

3) Koich Makimura, Kyoko Yamamoto, Chise Sugita, Kazutoshi Shibuya, Hideyo Yamaguchi. Blood lysate staining, a new microscopic method for diagnosis of fungemia using peripheral blood. Microbiol Immunol. 44(8): 637-41, 2000

4) 渋谷和俊. 侵襲性肺アスペルギルス症. MEDICAL CORNER. 108(1): 23-5, 2001

2. 学会発表

1) 若山恵, 渋谷和俊, 安藤常浩, 大原関利章, 高橋啓, 直江史郎. 心筋層内アスペルギル

ス病変の形態発生に関する三次元的解析. 第 89 回日本病理学会総会, 2000, 4, 11-13, 大阪

2) 渋谷和俊, マオ ジョアン, ネルソン スコット, 若山恵, 渋谷和俊, 大原関利章, 高橋啓, 直江史郎, クールソン ウォルター. 4カ月の Highly Active Antiretroviral Therapy の後に全身性クリプトコックス症で死亡した後天性免疫不全症候群の 1 剖検例. 第 89 回日本病理学会総会, 2000, 4, 11-13, 大阪

3) 安藤常浩, 大原関利章, 若山恵, 高橋啓, 渋谷和俊, 折津愈, 武村民子, 直江史郎. 侵襲性肺アスペルギルス症の結節性病変の成立機序に関する病理学的研究. 第 89 回日本病理学会総会, 2000, 4, 11-13, 大阪

4) 渋谷和俊. 侵襲性肺アスペルギルス症の病理-菌と生体防御因子の可変性による病変形成とその形態的分析-, シンポジウム 2 「深在性真菌症の発症機序とその対策-アスペルギルス症を中心として-」. 第 74 回日本感染症学会総会, 2000, 4, 20-21, 福岡

5) Highly Active Antiretroviral Therapy で加療された後天性免疫不全症候群に発症した全身性クリプトコックス症の 1 剖検例. 渋谷和俊, Joan Mao, Scott Nelson, 安藤常浩, 若山恵, 大原関利章, 高橋啓, 直江史郎, Walter Coulson. 第 74 回日本感染症学会総会, 2000, 4, 20-21, 福岡

6) Kazutoshi Shibuya, Joan Mao, Scott Nelson, Megumi Wakayama, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, Walter Coulson. Histopathology of cryptococcal infection in a patient with

acquired immunodeficiency syndrome treated with antiretroviral therapy. 14th International Society for Medical and Animal Mycology, 2000,5,8-12, Buenos Aires, Argentina

7) Kazutoshi Shibuya, Sophie Paris, Masayoshi Takaoka, Katsuhisa Uchida, Megumi Wakayama, Hideyo Yamaguchi, Toahiki Oharaseki, Kei Takahashi, Jean-Paul Latge, Shiro Naoe. Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis produced by mutants of *Aspergillus fumigatus*. 14th International Society for Medical and Animal Mycology, 2000,5,8-12, Buenos Aires, Argentina

8) Megumi Wakayama, Kazutoshi Shibuya, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe. Histological study of cardiac aspergillosis in myocardium. 14th International Society for Medical and Animal Mycology, 2000,5,8-12, Buenos Aires, Argentina

9) Shiro Naoe, Kei Takahashi, Toshiaki Oharaseki, Kazutoshi Shibuya, Megumi Wakayama. Analysis of candida albicans extract causing angitis in mice as an animal model of Kawasaki disease. 14th International Society for Medical and Animal Mycology, 2000,5,8-12, Buenos Aires, Argentina

10) 若山恵, 渋谷和俊, 安藤常浩, 大原関利章, 高橋啓, 直江史郎. 全身性カンジダ症,

特に腎病変の組織像の変遷についての一考察.

第44回日本医真菌学会総会, 2000,11,25-26, 長崎

11) 花澤良, 村山宗明, 渋谷和俊, 内田勝久, 直江史郎, 斧康雄, 山口英世. レトロトランスポゾン *Afut1* をプローブにした *in situ* hybridization 法による組織切片上での *A. fumigatus* の特異的検出. 第44回日本医真菌学会総会, 2000,11,25-26, 長崎

12) 安藤常浩, 渋谷和俊, 大原関利章, 若山恵, 高橋啓, 折津愈, 武村民子, 直江史郎. 侵襲性肺アスペルギルス症の画像の経時的解析-病理所見との対比をもとに-. 第44回日本医真菌学会総会, 2000,11,25-26 長崎

13) 渋谷和俊, 高岡成好, 内田勝久, 安藤常浩, 若山恵, 大原関利章, 高橋啓, 山口英世, 直江史郎. 侵襲性肺アスペルギルス症に関する実験病理学的研究-数種の変異株を用いた組織侵襲に関する検討-. 第44回日本医真菌学会総会, 2000,11,25-26 長崎

14) 榎村浩一, 渋谷和俊, 望月隆, 岩口伸一. オンライン病原真菌データベース作成の試み. 第44回日本医真菌学会総会, 2000,11,25-26, 長崎

15) Shibuya Kazutoshi. Histopathology of pulmonary cryptococcosis. 学友会シンポジウム-2. 医真菌学-新しい世紀を迎えて, 2001,1,15 東京

16) 榎村浩一, 渋谷和俊. オンライン病原真菌データベース作成の試み. 真菌症フォーラム, 第2回学術集会. 2001,1,27, 東京

17) 若山恵, 渋谷和俊, 安藤常浩, 大原関

利章, 高橋啓, 直江史郎. 全身性カンジダ症例における腎病変の変遷についての一考察. 真菌症フォーラム, 第2回学術集会. 2001,1,27, 東京

18) 安藤常浩, 渋谷和俊, 大原関利章, 若山恵, 高橋啓, 折津愈, 武村民子, 直江史郎. 侵襲性肺アスペルギルス症における画像所見の解析. 真菌症フォーラム, 第2回学術集会. 2001,1,27, 東京

19) K. Shibuya, M.D., T. Ando, M.D., M. Wakayama, M.D., T. Oharaseki, M.D., K. Takahashi, M.D., M. Oritsu, M.D., T.

Takemura, M.D., S. Naoe, M.D.. SEQUENTIAL CHANGE OF CHEST ROENTGENOGRAM IN INVASIVE PULMONARY ASPERGILLOSIS WITH A REFERENCE TO THE HISTOPATHOLOGY. Focus on Fungal Infection 11, 2001,3,14-16, Washington DC, USA

著書

1) 渋谷和俊, 直江史郎 (分担) 病理組織学的診断, pp46-53, 診療医学新書, 深在性真菌症 (河野茂編), 診療新社 2000,10 大阪

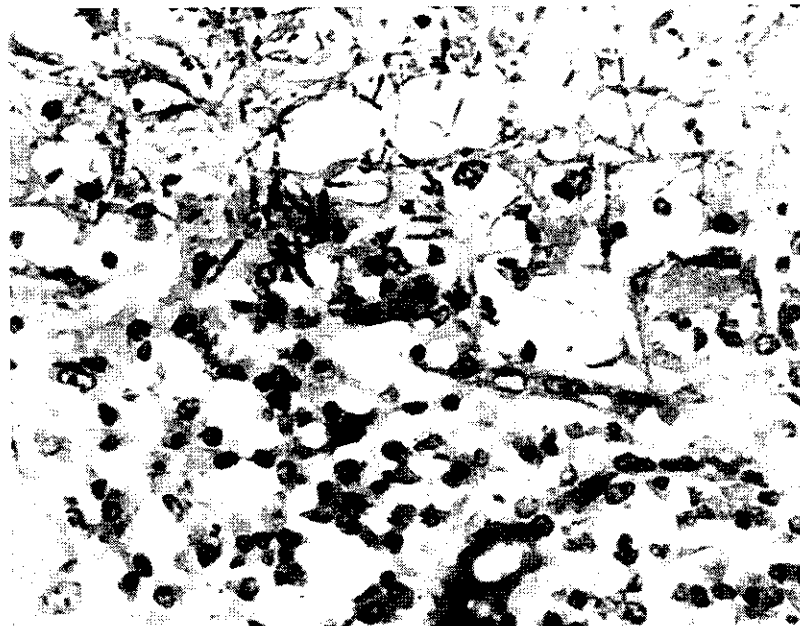


図 1. 食道カンジダ症. 上皮剥離部に付着した壊死物質内で菌糸性発育を示す Candida sp. 慢性炎症細胞浸潤をみる粘膜内に菌糸の侵入は認められない(HE 染色, 400 倍).

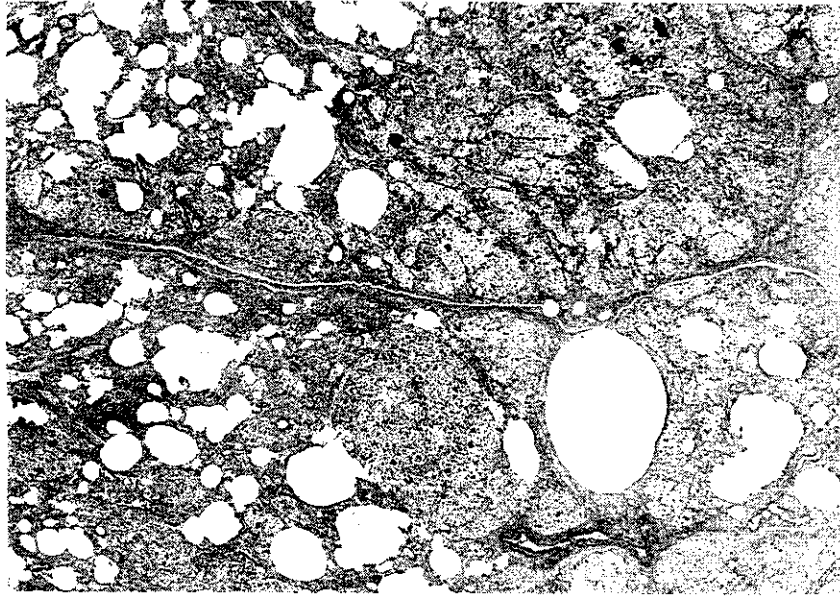


図 2. 全身性クリプトコックス症の肺病変. 拡張した肺胞は増殖した菌と多数の組織球で満たされ、含気の減少をみる(PAS 染色, 100 倍).

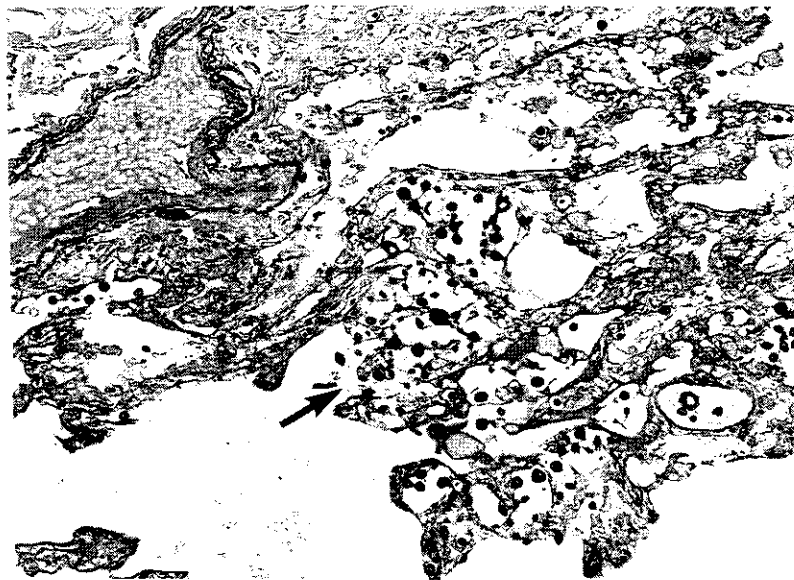


図 3. 全身性クリプトコックス症の肺病変. 胞隔内毛細血管ならびに肺胞内で増殖する菌とこれに対する微弱な組織球反応を認める(PAS 反応, 200 倍).

住環境にみる真菌とその生態

研究協力者 高鳥 浩介 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長

研究要旨

真菌は住環境に広く分布しており、主要真菌として *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Wallemia*, *Rhodotorula*などを挙げるができる。これら真菌には生体に何らかの健康障害をおよぼす種は少なくない。生活環境のうち住環境中にみる真菌分布を総括した。また季節特異性をもつ空中浮遊真菌、生死真菌の多いハウスダストおよび接触頻度の高い布団にみる真菌に限ってその生態分布をまとめた。

本年度は、今後研究が進展するであろう真菌感染症の診断治療および予防研究の基礎資料となる生活環境にみる真菌を紹介した。

真菌は、室内空気、ハウスダストなど住環境に広く分布し、真菌に都合のよい適環境を求めながら生息する。住環境にみる主要な真菌は、そうした形で活性を維持しながら分布する。住環境にみ

る真菌の生態をさまざまな角度から検証し、真菌の生態分布、住環境での汚染形態および細胞活性・不活性を生物学的観点からまとめた。

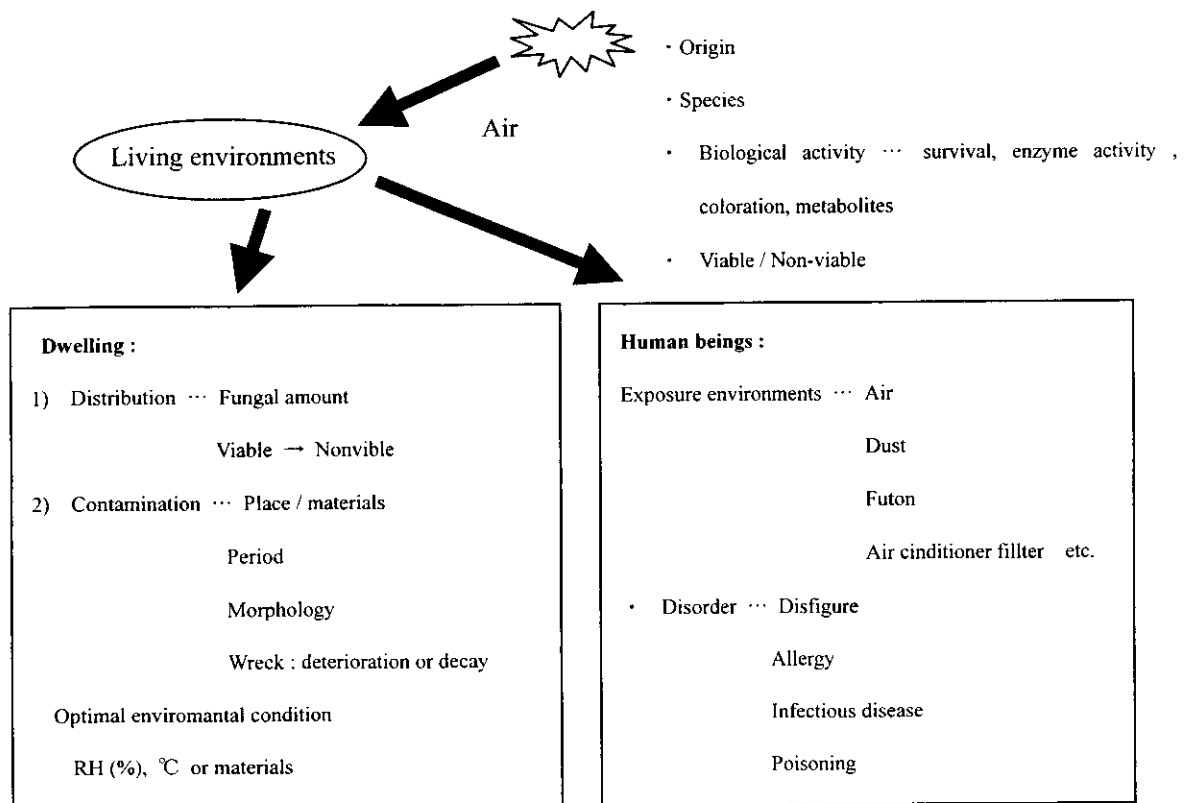


Fig.1 Fungal movement in dwelling environments

1. 住環境にみる真菌の生態分布

生活環境で最も身近な場所は住環境である。真菌の多くは自然生態系で土壤に分布し、大気を介して住環境へ侵入してくる(Fig.1)。真菌は細胞の生残性、酵素活性、二次代謝物産生性など特有の性質を有しており、そうした生理活性を持ちながら住環境に分布するようになる。住環境では、真菌は浮遊しながら建築素材に付着し、適環境条件となったときに汚染へと進むようになる。浮遊量が多くなったり、また汚染することにより建物以外でもさまざまな弊害を生ずる。特に大気、ダスト、布団、エアコンなどに曝露されることによる感染症、アレルギーなどの健康被害が住環境にみる真菌に起因することも十分考えられる。

住環境にみる真菌と発生しやすい環境、特に相対湿度(RH)との関係をまとめた(Table1)。ここでは真菌の適RHを3通りに分け、それぞれに主要な真菌を例に挙げ住環境での分布をまとめた。発育のための適RHが高い *Cladosporium* は、浴室、台所、結露部位に多く、大気中に最も多く分布する。*Penicillium* および *Aspergillus* はリビング、

衣類、タタミなどに多く、さらにハウスダスト、書籍等の乾燥性素材は、*Aspergillus*, *Penicillium* に限らず、好稠・好乾性とする *Eurotium*, *Wallemia*, *Aspergillus restrictus* が多くなる。こうした分布は、一戸建て住宅や高気密高断熱の集合住宅などでも共通してみられる。

1) 空中浮遊真菌

屋内空中真菌についての調査研究の多くはアレルギーの観点から本報に限らず多くの研究者によって報告されている。筆者らもその調査を行っているが、その研究から示された真菌数(CFU)、検出頻度および分布の結果は他の研究者らとほぼ同様な傾向にある。過去5年間における室内でのCFUの月変化をみると、総CFUは年間を通してほぼ2峰性を示し、春季(4~6月)、秋季(9~10月)にピークとなる傾向にある(Fig.2)。つまり夏季にはやや下降し、やがて秋季に増加しはじめる。また冬季(12~2月)は最もCFUが減少する。その要因としていくつか考えられるが、土壤と植物と気温湿度の関係から、真菌を含めた微粒子の空中飛散量が少なくなるものと推測される。

Table1. Fungal distribution in dwelling environments

Optimal RH(%)	Fungus	RH/Aw					
		High	Moderate			Low	
		Bath Rm	Closet	Air	Clothes	House dust	Book
		Kitchen	Lavatory		Tatami		Lens
		Condesation					
95~98	<i>Cladosporium</i>	●	●	●	○	○	
	<i>Alternaria</i>	●	○	○			
	<i>Fusarium</i>	●	○	○			
85~95	<i>Penicillium</i>	○	○	○	●	●	○
	<i>Asperillus</i>		○		●	○	○
75~90	<i>Eurotium</i>		○		●	●	●
	<i>Wallemia</i>					●	○
	<i>A. restrictus</i>					●	●

● High contaminant ○ Moderate contaminant

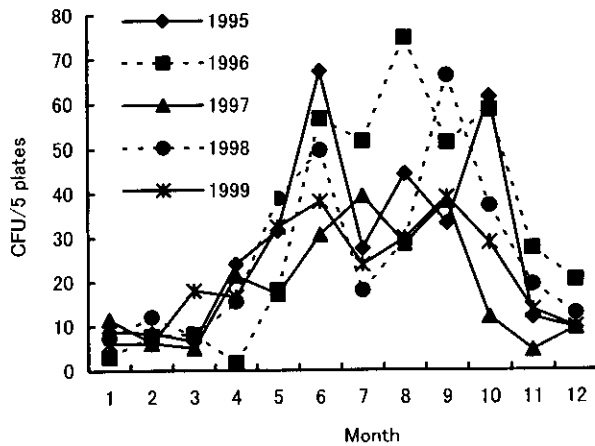


Fig.2 Airborne fungi in indoor (1995-1999)

住環境に浮遊する真菌分布をまとめると、主要真菌の多くは *Cladosporium* である。*Cladosporium* は、屋内に限らず、屋外環境でも多い真菌の一つであり、次いで *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* などである。これら検出される真菌の病原性に関しては原発性は知られておらず、続発性感染症の観点から症例報告されている。

2) ハウスダストと真菌

住環境でのハウスダストも重要な病原因子となりうる。ハウスダスト 1g 中の CFU をみると、季節に関わりなくほぼ $10^{4-6} \cdot g^{-1}$ である。ダストは乾燥しており、そうした中で真菌をみても乾燥に抵抗性の強い *Eurotium*, *Aspergillus restrictus*, *Wallemia* といった好稠・好乾性真菌や *Penicillium*, *Aspergillus* が多い。一方、*Trichoderma*, *Alternaria*, *Fusarium* などの好湿性真菌は一般に少ない。また酵母や放線菌も重要なアレルゲンとして話題にのぼるが、ハウスダストでみる限り、特定の湿性環境でない限り認めることは少ない。

病原性真菌の存在として重視される皮膚糸状菌はここでの結果からはっきりしないが、白癬罹患環境のハウスダストから定性的分離で検出される頻度の高いことが知られている。

3) 布団と真菌

布団にみる真菌は側地と中綿に分布すると思われるが、測定してみると CFU は少なく、菌種も大きな特徴はつかめない。布団と真菌の関係はアレルギーから追求されており、病原性真菌としてのそれはない。特に、*Malassezia*, *Candida*, *Actinomyces* などによる感染症は無視できないことから、今後研究されていかねばならない生活環境といえる。

2. 住環境にみる主要真菌の生態、生物学的特徴

住環境にみる主要真菌を取り上げ、それら真菌について住環境での生態および生物学的特徴を簡単にまとめる。

1) *Cladosporium*: 自然界での普遍的な真菌であり、空中に最も多い。元来土壌に多く、そこから植物や空中に分布する。好高湿性、適温が 30°C 以下の中温性真菌で、熱や薬剤に対する感受性が強い。汚染し始めると侵入性が強く、強力な薬剤でも容易に死滅しない。湿ったタタミ、結露した壁、浴槽、台所水回りなどを汚染する。病原性 *Cladosporium* として、*C. carrionii* が知られるが環境から分離される頻度はきわめて少ない。

2) *Alternaria*: 空中や植物に多い。 $100 \mu\text{m}$ ほどの大型多細胞であり、薬剤、UV に抵抗性が強い。汚染は浴室、台所、結露部分など湿ったところに見られ、好高湿性で乾燥には弱い。発芽能は強い特徴がある。日和見病原性真菌である。

3) *Penicillium*: 耐乾性、中温性真菌であり、自然界では普遍的な分布をとる。ハウスダスト、大気、タタミ、ジュートン、ベニヤ、皮革などに多く、発生すると白～緑色となる。乾燥に強く、乾いたところでも胞子の状態で数年以上生存できる。ペニシリウ

ム症原因真菌として注目される *P. marneffei* は住環境には分布しない。

4) *Aspergillus*: 中温～高温性である。特に高温性 *Aspergillus* として *A. fumigatus* があり、多くの真菌が不活性となる 55℃でも発育できる。*Aspergillus* には温帯に多い種類と熱帯、亜熱帯に多い種類がある。

病原性 *Aspergillus* として、*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. nidulans* (= *Emericella nidulans*) が重要であるが、これらは生活環境中に普遍的に生息することから、今後 *Aspergillus* の生態に注目する必要がある。

住環境にみる真菌の生態分布をまとめてきたが、すでに述べたように対象とする真菌のほとんどが非病原性真菌であり、むしろアレルギー学的観点にたつてまとめられているのが現状である。しかし今日の住環境および生活様式とヒトの健康を考える場合、今後さまざまな生物による健康被害は無視できなくなる兆しが見えつつある。その代表的な生物として真菌が挙げられる。真菌による健康被害はアレルギーに限らず、感染症としても重要であり、特に快適環境での真菌の動態は今昔で明らかな変化をみている。すなわち今日の住環境は真菌にとり都合のよい環境であり、内装材などの住建材に著しい被害をもたらしている。こうした環境被害は同時にヒトに対して健康被害をおよぼすことになる。このような背景をもとに住環境にみる真菌の生態をまとめてみた。

参考文献

- [1] Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton, B. C., et al. : Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th ed., CAB, Wallingford (1995)
- [2] Howard D. H. : Fungi Pathogenic for Human and Animals, Part A&B, Marcel Dekker, New York (1983)
- [3] 加藤卓朗: 真菌誌, 35:403-408 (1994)
- [4] 高鳥浩介: 日猷会誌, 50:691-699 (1997)
- [5] 宇田川俊一: 真菌誌, 38, 1-4 (1997)
- [6] 山本泉: 日皮会誌, 95, 1447-1459, (1985)
- [7] 宮治誠, 西村和子: 医真菌学辞典, 協和企画通信 (1991)

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」

剖検からみた深在性真菌症の発生状況に関する観察

研究協力者 直江史郎 東邦大学医学部大橋病院病理学講座

研究要旨

病理学的観点から深在性真菌症の発症状況を1968年と1998年の30年の相違点を検討した。同時に、日本病理剖検輯報を用いて統計的観察を行う際に幾つかの問題や注意点を指摘した。

A: 研究目的

病理剖検の観点から深在性真菌症の発症状況について1968年と1998年の30年間という時間差における原因菌種の相違や、真菌感染病変の重症度を比較検討した。

また、日本病理剖検輯報は第1輯から第41輯に至る現在まで64文字以内に主病変と副病変を記載するという基本的な記載方法は変化を見ない。しかし、年が経てコンピューターを導入する時代を迎えてからデータの読み方に異なる点があり、統計的に観察する場合に幾つか点に十分な注意を要することに気付いた。日本病理剖検輯報は世界的に見ても類を見ない記録集であり、今後とも利用されることが多いと思われるので幾つかの注意点もあげる。

B: 研究方法

日本病理剖検輯報の第11輯(1968)と第41輯(1998)の剖検例を用いた。かなり経験の有る病理医が自ら剖検輯報に記載してある深在性真菌症例を抽出した。第11輯

(1968)では記載された68文字以外の情報は得られない。しかしながら、第41輯(1998)では、68文字以外にもコンピューターにデータが収録される様になっているために、巻末に統計処理されている真菌症輯報の基本的68文字の記載がある真菌症例数よりも多いので、統計の取り方に十分な注意が要求されるので注意点も加えて報告しておきたい。

C: 研究結果

1. 真菌症発症頻度: 1968年には剖検総数25,234例中に真菌症と記載のあった症例数は308例で、発症頻度は1.22%であった。一方、30年後の1998年では26,754例の剖検数のうち真菌症は847例で、発症頻度は3.17%で、剖検例からみた真菌症の発症頻度は2.6倍にもなっており、真菌症が増えていることの証左を得た。(表1)

2. 剖検輯報を検索する際の注意点: ここで十分に留意せねばならぬことは、剖検輯報の巻末の統計表に記載されていた真菌

症例数が 1,150 例 (4.30%) であったことである。これは実際に記載されてあった例数とは 303 例もの差があったことになる。この差は我々の検索が誤っていたわけではなく、コンピューターによる剖検輯報の統計は記載用紙に記載されているよりも多くの症例が収録されているという矛盾からでた結果である。すなわち、剖検輯報の記載は昔は単に 68 文字を記載するのみで、現在でも記載用紙に 68 文字の記載をすることに変化がない。しかし、それ以外の情報もコンピューターで検索出来るように 68 文字以外のデータも得ることが出来るようにマークシートでより詳細に書き込む様になったためであることを念頭に置かねばならない。巻末の統計表を検索した結果のみでは、真菌症の症例数や菌種別症例数などを知る他に、あまり詳細なデータを得ることが出来ない。また、剖検輯報のデータベースを用いるには、日本病理学会の許可を得なければならない。

3. “真菌症”とのみ記載していることに関して： さて、1968 年の真菌症の記載には、単に「真菌症」とのみ記載された症例数は 95 例もあり、全真菌症例 308 例の 30.8%を占めていた。それに対して、1998 年度では約 6%であった。この 30 年間の差は、病理医の真菌に対する形態診断力の向上が最も考えられる。

4. カリニ肺炎の取り扱いについて： 分子生物学的観点から *Pneumocystis carinii* は近年真菌として分類されている。そこで、1998 年度輯報検索の際にカリニ肺炎も調べた。カリニ肺炎は 40 例あったが、このうち 11 例は真菌症との重複感染症例であった。ここでは 30 年前との比較を行うた

めに、カリニ肺炎単独感染症は統計処理の対象としていない。

5. 菌種別にみた真菌症： 1968 年では全真菌症例 308 例の中にカンジダ症は 96 例で 31.8%であった。1998 年では 32.8%で、真菌症中に占めるカンジダ症の割合は 30 年前と変化が無い。その一方で、アスペルギルス症は 30 年前の 2 倍以上にもなっており、真菌症を考える上でアスペルギルス症がかなり大きな問題を含んでいると云えよう。クリプトコックス症は、発症頻度がかかなり減少していた。これらの所見は、真菌症の発症動態を考える上で極めて興味のある事実であった。(表 2)

6. 菌種別真菌症における重症度の変遷： 剖検輯報では、主要病変と副病変とに分けて記載するように定められている。勿論、主要病変が複数あっても構わない。(表 2) から見られる様に、全真菌症中にカンジダ症やアスペルギルス症が主要病変に占める割合、すなわち重症な症例は、30 年前に比べてかなりな増加が見られることがわかった。ただ、クリプトコックス症のみが重症度がかかなり減少していた。

D. 考察

これまで細菌やウイルスなどは人為的にコントロール出来るが多かったが、真菌症の発症の抑制や治療が困難であった。このような状態が長期間続いてきたが、約 10 年位前から少しずつ真菌症制圧への動きが出て数種の治療薬も上梓される様になった。その為に、一時期真菌症はなくなるという楽観視した臨床医さえいた。しかし、生物の中で最後に残る生物が真菌であると推測されているわけでもないであろうが、

この数年前から真菌症の症例数が増加していることを感じさせられることがしばしばある。発症頻度とは視点は異なるが、剖検例の組織像を見ていると、多少真菌症の病態が変化してきたことも感じることもある。

ここでは、まず日本病理剖検輯報を用いて剖検例から観察することを試みた。今回は、真菌症の発生状況を明確する目的から、1968年と最新のデータが記載されている1998年度の輯報を用いて30年の違いを出してみようと試みた。

その結果、剖検総数が30年前とあまり変わらないのに真菌症例は2倍以上にもなっており、真菌症は決して減少していないことが分かった。それと共に、真菌症総数に対するカンジダ症の発生頻度はあまり変化が見られないのに比して、アスペルギルス症の割合が約2倍もあったことは予想し得なかった。このことは、*Candida albicans* を主とするカンジダ属の感染症やクリプト

コックス症にはかなり感受性を持つ抗真菌剤があるのに比して、アスペルギルス症の治療薬がまだ不十分な感を拭えない。以前は殆ど見られなかった *Aspergillus niger* の症例が増える傾向にあったり、アスペルギルス症の病理像も多少変化しつつあるように思われることから、今後はアスペルギルス症に焦点を合わせてより詳細な検討を加えて行く必要があると考える。

E. 結果

まだ十分な解析は出来ていないが、1968(第11輯)年と1998年(第41輯)の日本病理剖検輯報を用いて、30年という年代による病理学的な観点から真菌症の動きを把握することを試み、そこには幾つかの興味有る変化が確認できたので報告した。

F. 研究発表

研究協力者 渋谷和俊と同様。

(表 1)

1968年度

剖検総数	25,224 例	真菌症例数	308 例
		<u>真菌症発症頻度</u>	<u>1.22%</u>

1998年度

剖検総数	26,754 例	真菌症例数 (自己検索)	847 例
		<u>真菌症発症頻度</u>	<u>3.17%</u>

[真菌症例数 (輯報記載) 1150 例
真菌症発症頻度 4.30%]

(表 2)

1968 年度

	主病変	副病変	各真菌症数/真菌症剖検例数
カンジダ症	6	92	96/308(31.8%)
アスペルギルス症	12	66	78/308(25.3%)
クリプトコックス症	13	17	30/308(9.74%)
ムコール症	2	5	5/308(2.27%)
真菌症のみの記載	5	90	95/308(30.84%)
計	38	270	38/308(12.3%)

1998 年度

	主病変	副病変	各真菌症数/真菌症剖検数
カンジダ症	57	197	254/785(32.3%)
アスペルギルス症	114	302	416/785(53.0%)
クリプトコックス症	14	34	48/785(6.1%)
ムコール症	4	16	20/785(2.5%)
真菌症とのみ記載	13	34	47/785(6.0%)
計	202	583	202/785(25.7%)

放線菌の特定菌種に特異な遺伝子の迅速検出に関する研究

研究協力者 堀田 国元、石川 淳、土崎 尚史（国立感染症研究所 生物活性物質部）

医真菌に包含されている放線菌の一つである *Streptomyces griseus* に特異的かつ共通して存在する遺伝子 (*kan*) を標的として迅速簡便な検出法を検討し、コロニーPCR法を確立した。この方法を用いて、*kan* 遺伝子が *S. griseus* 菌株中に共通して存在すること、および多様な微生物が共存する溶液中においても *kan* 遺伝子を検出できることを確認した。また、放線菌に共通する rRNA (rDNA) の特異配列も多種の放線菌においてコロニーPCRによって検出できることを確認した。以上のことから、*Kan* 遺伝子を標的としたコロニーPCRは *S. griseus* の迅速、簡便、選択的な検出法として有用と考えられた。

A. 研究目的

放線菌は細菌の1種であるが、糸状の生育をすることから医学の分野においては放線菌症起因菌などは古くから医真菌に包含されて取り扱われてきた。その例として *Actinomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura* および *Streptomyces* に属する菌種が知られている¹⁾。

本研究は、遺伝子操作技術を用いてこれら放線菌症の起因菌の迅速検出法の確立を目的としている。平成12年度は、*S. griseus* を研究対象に選び、この菌種に特異的かつ共通して存在することを明らかにしている抗生物質耐性遺伝子 *kan*²⁻⁵⁾ を指標として *S. griseus* を簡便迅速に検出するコロニーPCR法を確立し、その有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 使用菌株: *Streptomyces griseus* 菌株およびその他の *Streptomyces* 属放線菌。
2. 指標遺伝子: *S. griseus* SS-1198PR から Kanamycin 耐性遺伝子としてクローン化し、*kan* と命名したアセチル化酵素をコードする遺伝子^{2, 3)}。サザンハイブリダイゼーション試験により、*S. griseus* とその類縁菌に特異的に共通して存在することがわかっている⁴⁾。
3. コロニーPCR

栄養寒天培地などの寒天培地に生育した放線菌のコロニーまたは画線培養に滅菌爪楊枝の先をまっすぐ軽く突き刺し、それをPCR反応液にまっすぐ浸漬し、かき混ぜずにすぐ抜き出した後、直ちにPCR反応を行った。微生物懸濁液に *S. griseus* を混合した場合は、その2 μ l をPCR反応液に添加してPCRを行った。PCR反応は以下の条件で行った。

PCR反応液 (20 μ l) は、1 \times PCR バッファ、dNTPs 各0.2mM、MgSO₄·H₂O 1mM、KOD-plus-DNA polymerase (TOYOBO) 0.4U、プライマー (*kan* 遺伝子の塩基配列⁵⁾ に基づいて設計; 図1) 各0.5 μ M、鋳型 (コロニー細胞または5 μ l の) を基本組成とした。

PCRは、サーマルサイクラー (Perkin-Elmer社 Gene Amp PCR System 9600) を用いて、95°C・3分→(95°C・30秒→60°C・30秒→72°C・60秒) \times 30サイクルの条件で行ない、反応終了後、増幅DNAを1.4%アガロース電気泳動によりモニターした。

(倫理面への配慮)

使用菌株は患者由来の菌株ではなく、また病原性が示されていない菌株なので、国立感染症研究所で定められているバイオセーフティ規則と標準的微生物学手法に従って菌株を取り扱った。

C. 研究結果

1. コロニーPCRによる *kan* 遺伝子の増幅

大腸菌など溶菌しやすいグラム陰性菌では、菌体を直接反応液に添加してPCRを行うコロニーPCRによる遺伝子増幅が知られているが、溶菌が困難なMRSAなどのグラム陽性菌では難しいと考えられてきた。しかし我々は、「目に見えない程度の量の菌体」を添加することによってMRSAや腸球菌でも再現性よくコロニーPCRが成立することを見出した⁶⁾。

それを基に、放線菌でもコロニーPCR法の確立を目指して、*S. griseus* の *kan* 遺伝子を標的として基本条件を検討した結果、以下のことが明らかになった。

1) プライマーの組み合わせ

*kan*遺伝子を標的とした4種のプライマーを(表1)用いて4通りの組み合わせでPCRを行った(図2右)。その結果、Forwardプライマーとして *kan1*を用いたときに選択性高く、Reverseプライマーとして *kan2*または *kan2'*を用いても標的断片のみが増幅した。*kan1'*をForwardプライマーに用いたときは選択性が低く、標的以外に多数の増幅バンドが出現した。同じような結果は、図1(左側)にみられるように、DNAを鋳型として行ったPCRでも得られた。

*kan1*と *kan1'*の配列を比べると、両者のGC含量は同じであるが、*kan1'*では中間領域にGCが集中しており、これが特異性の低下の原因となるものと考えられた。但し、アニーリング温度を60°Cから65°Cに上げると、*kan1'*をプライマーにした場合も標的バンドしか検出されなくなり、選択性が高くなることが認められた(データ省略)。

2) コロニーPCR成功のための諸条件

爪楊枝をコロニーの表面に触れる、軽く突き刺す、培地まで突き刺す、という方法を比較した結果、標的の増幅はコロニー表面に触れるだけより突き刺す方が安定していた。但し、コロニーに突き刺すときも反応液に浸漬するときも爪楊枝はまっすぐ上下に操作し、できる限り少量の菌量を反応液に添加することが良い結果を得るために重要であった。目に見える程の小さな塊の菌体を入れては失敗する

また、気菌糸がコロニーをおおっている場合は、気菌糸だけに爪楊枝を触れたのではうまくいかない菌株があるので、基底菌糸に触れるようにすることがコロニーPCRの成功にとって必要である。

なお、DNAポリメラーゼとしてKOD-PLUS (TOYOBO)を用いているが、古典的なAmpliTacを用いると標的配列のPCR増幅は不安定で、増幅の認められないケースがままあった(データ省略)。

2. *S. griseus* 関連菌株における *kan*遺伝子の検出

各種の放線菌株(34株)から抽出したDNAを鋳型として *kan*プライマーを用いてPCRを行ったところ、分類学的に *S. griseus*の近縁とされている菌株のうちの数株において標的と思われるDNA断片(0.5kb)の増幅を認めた(表2)。しかし、多くの菌株では増幅断片は検出できなかった。

これに対して、*S. griseus*関連菌株を対象にコロニーPCRを行ったところ、多くの菌株で標的断片の明瞭な増幅が認められた。必ずしも増幅が明瞭でなかったものについては *kan1/kan2*のプライマー組み合わせでコロニーPCRを行った後に、*kan1'/kan2'*を用いてNested PCRを行ったところ、標的断片の明瞭な増幅が認められた(図3)。

3. 標的遺伝子増幅に対するプライマーの選択性

1) 標的菌種と非標的菌種における標的遺伝子の増幅

コロニーPCRによる *kan*遺伝子検出の特異性をみるために、標的菌種と非標的菌種を用いて遺伝子増幅の比較試験を行った。すなわち、*S. griseus* SS-1198, *S. kasugaensis* MB273、稀少放線菌株#8 および *S. lividans* TK21を用い、プライマーとして *kan1/kan2*を用いてコロニーPCRを行った。その結果、*S. kasugaensis*(レーン Sk)や *S. lividans*(レーン S1)から複数の増幅バンドが出現したが、いずれも *kan*遺伝子の標的バンドとは明瞭に区別できた(図4左)。

2) 多菌種共存下における標的遺伝子の選択増幅

図4(右)は *S. griseus* SS-1198, *S. kasugaensis* MB273 および稀少放線菌#8株の3菌株のコロニー細胞を混ぜて3つのPCR反応液に添加し、そこへそれぞれの菌特有の遺伝子(*kan*, *ist*および *rac*の)のプライマーを個別に添加してPCRを行った結果を示している。

結果は、3種の菌株が共存していても反応液に添加したプライマーに対応する標的遺伝子断片がそれぞれ選択的に増幅することを示している。

図5は、土壌微生物懸濁液(200 μ l)に *S. griseus*を1白金耳添加し、その2 μ lをPCR反応液に加えてPCR(プライマー *Kan1'/kan2'*)を行った結果を示している。いずれの場合(レーン 4, 6, 10, 12)もPCRによって多数のバンドが生じたが、標的バンドは他のバンドと明確に区別できるバンドとして検出された。

4. 放線菌に特有な遺伝子のコロニーPCRによる検出

図6は、表1に示したプライマー(9Fと1541R)を用いて各種の放線菌の16SrRNAの遺伝子の増幅を行った結果を示している。図から明らかなように、約1.5kbの標的断片がいずれの菌においても明瞭に増幅した。用いた菌株のうち、#8株は少なくとも *Streptomyces*以外の属に属する菌株である証拠が得られている(データ省略)。

D. 考察

設計した *kan*プライマー (*kan1/kan2*)を用いるコロニーPCRによつて、放線菌の異なる菌種の混在下であっても *kan*遺伝子の増幅を指標として *S. griseus*の検出が可能になったことがわかった。このことから、*kan*遺伝子の塩基配列は他の放線菌種には見られない特異性の高いものであることを意味すると考えられた。また、放線菌はGC含量が70%前後と高いことから、*kan*遺伝子はバクテリアやかびの遺伝子との相同性も低いと考えられる。このことを支持する状況証拠として、多様な微生物が混在する土壌懸濁液中においても *kan*遺伝子断片の増幅が識別できることをあげることができる。

また、*kan*遺伝子は *S. griseus*とその類縁菌種に共

通して存在することをコロニーPCRはDNAを鋳型とするPCRよりも信頼性高く検出できることが示された。これは、放線菌の菌体からDNAを抽出する際、DNaseによるDNA分解がまま起きるためと思われる。

一方、放線菌の16SrRNAに特有な遺伝子配列もコロニーPCRによって明瞭に検出できることがわかった。

これらのことから、本研究で確立したコロニーPCRは、*S. griseus* をモニターする方法として有効性が高いと考えられた。そして、他の医真菌-放線菌の迅速検出をコロニーPCRによって行うための足掛かりができたことを意味すると思われる。

E. 結論

DNAの代わりに菌体そのものを直接PCR反応液に添加し、そのままPCRを行って標的遺伝子を増幅させるコロニーPCR法によって、DNAを鋳型としたときと遜色なく*S. griseus* に特異な遺伝子 (*kan*遺伝子) を増幅できる条件を確立できた。他の放線菌や細菌など多菌種が混在する条件でも問題なく標的遺伝子を検出できることがわかった。これらのことにより、コロニーPCRによって標的放線菌の迅速簡便な検出やモニタリングを確立する基盤ができたと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 石川淳、土崎尚史、吉田美枝、砂田亜津子、石山大輔、中嶋睦安、堀田国元：コロニーPCRによる抗生物質耐性遺伝子の検出。平成12年度日本放線菌学会大会（福岡），

H. 参考文献

- 1) 桑原章吾、清水喜八郎、高橋久 監訳 「臨床医のための病原細菌・真菌便覧」 pp. (18)-(21), 最新医学社(1990).
- 2) Hotta K, Ishikawa J, Ichihara M, Naganawa H and Mizuno S: Mechanism of increased kanamycin-resistance generated by protoplast regeneration of *Streptomyces griseus* I. Cloning of a gene segment directing a high level of an aminoglycoside 3-N-acetyltransferase activity. *J. Antibiotics* 41: 94-103 (1988).
- 3) Ishikawa J, Koyama Y, Mizuno S and Hotta K: Mechanism of increased kanamycin resistance generated by protoplast regeneration of *Streptomyces griseus* II. Mutational gene alteration and gene amplification as genetic mechanisms. *J. Antibiotics* 41: 104-112 (1988).
- 4) Hotta K and Ishikawa J: Strain- and species-specific distribution of the streptomycin gene cluster and *kan*-related sequences in *Streptomyces griseus*. *J. Antibiotics* 41: 1116-1123 (1988).
- 5) Ishikawa J and Hotta K: Nucleotide sequence and transcriptional start point of the *kan* gene encoding an aminoglycoside 3-N-acetyltransferase from *Streptomyces griseus* SS-1198 PR. *Gene* 108: 127-132 (1991).
- 6) 土崎尚史、石川淳、堀田国元：コロニーPCR法によるMRSAおよび腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出。 *Japanese J. Antibiotics* 53: 422-429 (2000).
- 7) Ishikawa J, Tsuchizaki N, Yoshida M, Ishiyama D and Hotta K: Colony PCR for detection of specific DNA sequences in actinomycetes. *Actinomycetologica* 14: 1-7 (2000).

表 1. PCRプライマー

標的	プライマー	塩基配列
<i>kan</i>	Forward: kan1	5'-CAGAGCCAGCAGCGACAAGG-3'
	kan1'	5'-ACAAGGTGGACGGCGGCATC-3'
	Reverse: kan2	5'-GGCCAGTCGGTGAAGTCGTA-3'
	kan2'	5'-TAGGGGGAGCGTCGTTCCA-3'
16S rDNA	Forward: 9F	5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
	Reverse: 1541R	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

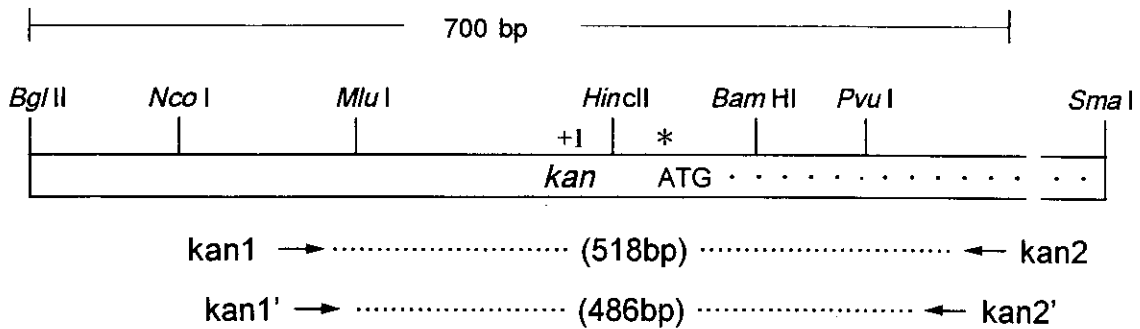


図 1. *kan* 遺伝子におけるkanプライマーの位置
+1: 転写開始点、*: 翻訳開始コドン、矢印: プライマー

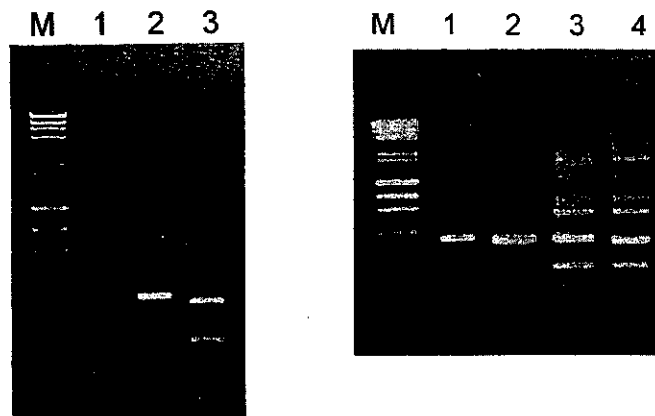


図 2. *kan* 遺伝子のコロニーPCR増幅に及ぼすプライマーの影響
左図: DNAを鋳型としたPCR; レーン1: kan1/kan2, 2: kan1/kan2'
右図: レーン 1: kan1/kan2, 2: kan1/kan2', 3: kan1'/kan1, 4: kan1'/kan2'

表1. kanプライマーを用いるPCRによる各種放線菌におけるDNA増幅

菌 株	DNA鑄型PCR (増幅 サイズ)		コロニーPCR (増幅 サイズ)			
	プライマー1' / 2'	プライマー1/2	プライマー1/2			
1. <i>S. griseus</i> 9株 <i>S. griseus</i> ISP 5236 など9株	+	0.5 kb	+	0.5 kb	+	0.5 kb
2. <i>S. griseus</i> 類縁株 15株						
1) <i>S. anulatus</i> ISP 5361 など4株	+	0.5	+	0.5	+	0.5
2) <i>S. albidus</i> ISP 5320 など3株	+	0.2-0.35	-		+	0.5
3) <i>S. lipmannii</i> ISP 5070 など8株	-		-		+	0.5
3. <i>S. griseus</i> 非類縁株 10株						
1) <i>S. tenjimariensis</i> SS-939 など3株	-		-			試験せず
2) <i>S. tenebrarius</i> ISP 5477 など3株	-		+	1.4~2.4		試験せず
3) <i>S. fradiae</i> ISP 5063 など2株	+	0.3~0.35	-			試験せず
4) <i>S. kasugaensis</i> MB273 1株	+	0.5	+	2.0		試験せず

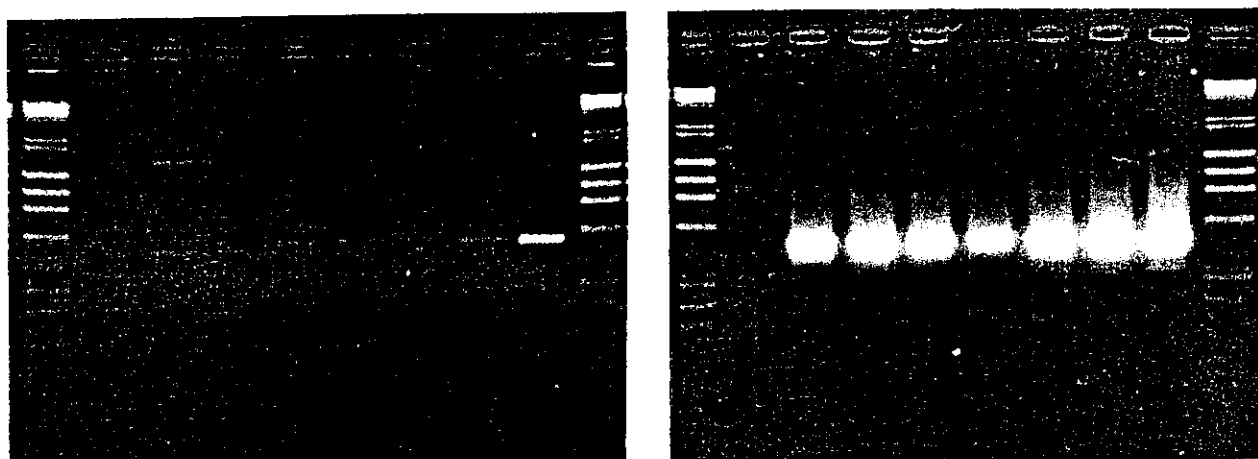


図3. コロニーPCR後のNested PCRによるkanプライマー標的配列の増幅