

平成 13 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

研 究 報 告 書

平成 14 年 4 月

主任研究者 上原 至雅

(国立感染症研究所生物活性物質部長)

目 次

総括研究報告書：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	
上原 至雅（国立感染症研究所）	1
深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査	10
分担研究報告書：抗真菌剤耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索	
上原 至雅、新見 昌一（国立感染症研究所）	45
分担研究報告書：輸入真菌症の診断法の研究	
亀井 克彦（千葉大学真菌医学研究センター）	53
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	
菊池 賢（東京女子医科大学）	62
分担研究報告書：輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発	
楨村 浩一（帝京大学医真菌研究センター）	67
分担研究報告書：好中球機能不全と真菌症および真菌成分誘発の慢性疾患発症に関する研究	
鈴木 和男（国立感染症研究所）	78
《研究協力者による研究報告書》	
輸入真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究	
岡部 信彦（国立感染症研究所感染症情報センター）	85
微生物資源としての菌類	
奥田 徹、沖 俊一（玉川大学学術研究所）	88
深在性アスペルギルス症の非侵襲的診断方法：real-time PCR 法の応用	
上 昌広（国立がんセンター薬物療法部幹細胞移植療法室）	91
ラット腸管膜上でのアスペルギルスの血管侵襲に関する微速撮影による動態的観察	
渋谷 和俊、直江 史郎（東邦大学医学部大橋病院）	101
動物から見た真菌性ズーノーシス	
高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所）	109
In situ hybridization 法による粘液栓子内真菌の検出・同定に関する検討	
馬場 基男、蛇沢 晶（国立療養所東京病院）	119
村山そう明（帝京大学医学部微生物学教室）	
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	
堀田 国元（国立感染症研究所）	122
石川 淳、土崎 尚史、梅山 隆（共同研究者）	
本邦における <i>Nocardia</i> 症の原因菌の分類同定に関する研究	
三上 襄（千葉大学真菌医学研究センター）	128
Coccidioides immitis の球状体の簡易形成法	
宮治 誠、西村和子、亀井克彦、佐野文子（千葉大学真菌医学研究センタ）	135
新規抗真菌薬の開発状況に関する調査	
八木澤 守正（財団法人日本抗生物質学術協議会）	137
新規抗真菌薬開発の動向に関する資料文献収集と論評	
山口 英世（帝京大学医真菌研究センター）	154

平成13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」名簿

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	上原 至雅	国立感染症研究所・生物活性物質部	部長
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
分担研究者	菊池 賢	東京女子医科大学医学部・中央検査部・感染対策室	講師
分担研究者	楨村 浩一	帝京大学医真菌研究センター	講師
分担研究者	鈴木 和男	国立感染症研究所・生物活性物質部・生体防御物質室	室長
分担研究者	新見 昌一	国立感染症研究所・生物活性物質部・抗生物質室	室長
研究協力者	大川原 明子	国立感染症研究所・生物活性物質部・生体防御物質室	研究員
研究協力者	岡部 信彦	国立感染症研究所・感染症情報センター	センター長
研究協力者	沖 俊一	玉川大学学術研究所・応用生命科学研究施設	教授
研究協力者	奥田 徹	玉川大学学術研究所・応用生命科学研究施設	教授
研究協力者	上 昌広	国立がんセンター・中央病院・薬物療法部	医員
研究協力者	渋谷 和俊	東邦大学医学部附属大橋病院・病理学講座	助教授
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
研究協力者	直江 史郎	東邦大学医学部附属大橋病院・病理学講座	教授
研究協力者	馬場 基男	国立療養所・東京病院・呼吸器内科	医師
研究協力者	深澤 秀輔	国立感染症研究所・生物活性物質部・増殖制御物質室	室長
研究協力者	堀田 国元	国立感染症研究所・生物活性物質部・遺伝生化学室	室長
研究協力者	三上 襄	千葉大学真菌医学研究センター	教授
研究協力者	宮治 誠	千葉大学真菌医学研究センター	教授
研究協力者	八木澤 守正	日本抗生物質学術協議会	常務理事
研究協力者	山口 英世	帝京大学医真菌研究センター	所長
オブザーバー	奥平 雅彦	北里大学	名誉教授

平成13年度厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

総括研究報告書

・ 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	1
・ 深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査	10
アスペルギルス症に対する意識調査（アンケートA）の結果	12
アスペルギルス症の発生状況と分離菌種の動向調査 （アンケートB）の結果	33
アンケート協力施設一覧	43

主任研究者

上原至雅 国立感染症研究所生物活性物質部長

「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」

主任研究者 上原至雅 国立感染症研究所 部長

研究要旨： 輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と深在性真菌症の発生動向を把握するために、1) アスペルギルス症に対する意識調査およびアスペルギルス症の発生状況と分離真菌の動向を知るためのアンケート調査、2) 輸入真菌症の診断法の研究、3) 世界模型飛行機選手権大会の参加者における *Coccidioides immitis* 暴露に関する追跡調査、4) 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、5) 輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発、6) 好中球機能不全と真菌症および真菌成分誘発の慢性疾患発症に関する研究、7) 抗真菌剤耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索に関する研究を行った。

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

菊池 賢 東京女子医科大学 医学部中央検査部感染対策科講師

榎村浩一 帝京大学 医真菌研究センター講師

鈴木和男 国立感染症研究所 室長

新見昌一 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

近年、医療の先進・高度化に伴い、免疫不全に陥った患者を中心に深在性真菌症の発生率が上昇しており、日和見感染症として極めて憂慮すべき状況にある。また国際交流が益々盛んになるにつれて、国内には生息していない病原真菌による感染症の発生・増加は避けがたく、致命率の高いコクシジオイデス症を始め、ヒストプラズマ症やパラコクシジオイデス症の国内発生事例が少なからず報告されている。事実、平成 13 年 10 月に米国カリフォルニア州で行なわれた模型飛行機国際競技会の参加者の中からヨーロッパ人数名がコクシジオイデス症に感染した。この報告を 12 月中旬に米国 CDC から受け、当研究班は直ちに日本人参加者 20 名の追跡調査を開始し、現在血清学的検査による感染の有無を調査中である。

これらの真菌感染症においては、一般に培養検査による診断が困難なものが多く、血清学的診断法や遺伝子診断法などの迅速かつ高感度の診断法の開発が待たれている。特に PCR 法による遺伝子診断と DNA プローブを用いた分離菌の同定は今後の迅速診断法開発の中心的課題となることが予想されるが、これらの診断システムが実用化に至るまでにはまだ多くの問題が残されている。一方、深在性真菌症の治療に関しては、適用可能な抗真菌薬が少数に限られている上に、現在頻用されているアンホテリシン B あるいはフルコナゾールなどのアゾール系抗真菌剤は安全性や有効性の点で限界があり、さらに耐性菌の出現によって真菌感染症の治療は今後一層困難になることが危惧されている。

以上のように、真菌症に対する適切な対応策の確立は緊急かつ重要な課題となっている。こ

の理由から、本研究事業では深在性真菌症ならびに輸入真菌症の診断の確立ならびに予防・治療に関する諸問題を解決するための基礎および応用の両面にわたる研究を企画した。研究全体としては、わが国の深在性真菌症および輸入真菌症患者の発生動向のサーベランスおよびレファレンスシステムを確立して感染予防に有用な情報提供を可能にするとともに、新しい遺伝子診断法、薬剤耐性機構の解明および、より有効な治療法と新しい抗真菌剤の開発につながる基礎研究を計画した。

前年度は、輸入真菌症については海外における流行状況と国内発生状況、およびわが国と海外流行地域との人的物的交流に関する調査を行い、また全国の主要な医療施設を調査対象にして深在性真菌症に対する意識調査と真菌血症の発生動向に関するアンケート調査を行った。引き続き平成 13 年度は、近年特に易感染宿主に対して発生が危惧されているアスペルギルス症について、臨床医の意識調査と我が国における発生状況を調査した。一方、各分担研究者により、輸入真菌症の診断法の研究、模型飛行機国際競技会の参加者における *Coccidioides immitis* 暴露に関する追跡調査、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、輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発、好中球機能不全と真菌症および真菌成分誘発の慢性疾患発症に関する研究、および抗真菌剤耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索に関する研究を行った。

B. 研究方法

1. 本研究は 13 名の研究協力者と 1 名のオブザーバーに加えて、新たに 2 名の研究協力者（上、馬場両先生）が加わり、強力な支援のもとに行なわれた。

大川原明子 国立感染症研究所研究員

岡部信彦 国立感染症研究所感染症情報センター部長

沖 俊一 玉川大学学術研究所客員教授

奥田 徹 玉川大学学術研究所教授

上 昌広 国立がんセンター中央病院薬物療法部幹細胞移植療法室医員

渋谷和俊 東邦大学医学部助教授

高鳥浩介 国立医薬品食品衛生研究所室長

直江史郎 東邦大学医学部教授

馬場基男 国立療養所東京病院呼吸器内科医師

深澤秀輔 国立感染症研究所室長

堀田国元 国立感染症研究所室長

三上 襄 千葉大学真核微生物研究センター教授

宮治 誠 千葉大学真核微生物研究センター教授

八木澤守正 日本抗生物質学術協議会常務理事

山口英世 帝京大学医真菌研究センター教授

奥平雅彦 北里大学名誉教授（オブザーバー）

第 1 回班会議は平成 13 年 9 月 11 日（11 名参加）に行い、今後の研究事業の進め方について討議し、特にアスペルギルス症の発生動向調査のためのアンケート調査の方法について議論した。第 2 回班会議は平成 13 年 10 月 11 日に行い（6 名出席）、発生動向調査の具体化に向けてアンケート作りを行った。アンケート A ではアスペルギルス症に関する一般的な事項を尋ねるための調査表を作成し、アンケート B ではアスペルギルス症の発生状況と気道分泌物から分離されるアスペルギルス属およびその他の糸状菌の種類や数の年次推移について尋ねるための調査表を作成した。アンケート調査表は平成 13 年 10 月中旬に全国 509 病院に郵送した。第 3 回班会議は平成 13 年 12 月 25 日に行い（10 名出席）、発生動向調査のアンケート解析を行った。第 4 回班会議は平成 14 年 1 月 23 日に行い（23 名出席）、発生動向調査のアンケート A および B の解析結果を発表するとともに、主任、分担研究者ならびに研究協力者の活動報告を行った。

2. 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各分担研究を行った。各分担研究課題は次のとおりである。

- 1) 輸入真菌症の診断法の研究および世界模型飛行機選手権大会の参加者における *Coccidioides immitis* 暴露に関する追跡調査 (担当: 亀井克彦 千葉大学 真菌医学研究センター)
- 2) 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 (担当: 菊池 賢 東京女子医科大学 医学部中央検査部感染対策科)
- 3) 輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発 (担当: 榎村浩一 帝京大学 医真菌研究センター)
- 4) 好中球機能不全と真菌症および真菌成分誘発の慢性疾患発症に関する研究 (担当: 鈴木和男 国立感染症研究所)
- 5) 抗真菌剤耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索 (担当: 新見昌一、上原至雅 国立感染症研究所)

C. 研究結果

1. アスペルギルス症に対する意識調査およびアスペルギルス症の発生状況と分離真菌の動向を知るためのアンケート調査 (担当: 上原至雅、亀井克彦、菊池 賢、榎村浩一、鈴木和男、新見昌一)

アンケート A および B の調査結果を本総括研究報告書の末尾に添付した。

2. 輸入真菌症の診断法の研究および世界模型飛行機選手権大会の参加者における *Coccidioides immitis* 暴露に関する追跡調査 (担当: 亀井克彦)

I. パラコクシジオイデス症診断法の開発

パラコクシジオイデス症は、ブラジルを中心に南アメリカ各国に広く蔓延する真菌性風土病である。近年、わが国ではいわゆる輸入真菌症の症例が著しく増加していることが明らかとなっているが、パラコクシジオイデス症も例外ではない。原因菌である *Paracoccidioides brasiliensis* は、主に肺から経気道的に侵入し、

肺、皮膚、リンパ節、粘膜などを広汎に侵す。パラコクシジオイデス症の診断法は、病巣からの菌の分離、あるいは病巣の病理組織学的検討といった侵襲的検査法に依存している。血液などを用いた非侵襲的な検査法は確立していないため、診断は必ずしも容易でなく、流行地域外ではなおさら困難となっている。一方、真菌細胞壁の構成成分である (1→3)- β -D-グルカンの測定法は、わが国で開発されたすぐれた深在性真菌症の診断手法であるが、パラコクシジオイデス症において果たして有効であるかは検討されていない。そこで、遺伝子増幅法であるPCR法により血液中から *P. brasiliensis* の遺伝子を検出する方法を開発し、(1→3)- β -D-グルカンの測定法と併せて、それらの有用性を検討した。その結果、PCR法は(1→3)- β -D-glucan測定よりも高感度であり、また、血漿よりも血餅の方が感度が高かった。しかし、血漿であっても3段階のPCR法を施行することにより、感度は向上し、臨床への応用が期待される。

II. 世界模型飛行機選手権大会の参加者における *Coccidioides immitis* 暴露に関する追跡調査

コクシジオイデス症は、米国カリフォルニア～アリゾナ～ニューメキシコを中心とした地域に発生する真菌症で、その病原体である *Coccidioides immitis* は、半乾燥地帯の地中に生息し、条件が整うと地上に孢子(分生子)を放出する。孢子は風に乗って広範囲に拡散し、経気道的にヒトに感染する。ヒトからヒトへの感染はほとんど無いが、菌の浮遊している地域に滞在していると、多数の人間が同時に感染し、発病する可能性が高い。

2001年10月8日～13日に米国カリフォルニア州ベーカーズフィールド郊外のローストヒルズにおいて2001年度世界模型飛行機選手権大会(フリーフライト種目)が行なわれた。世界30国から300名以上が参加したが、大会後、帰国した各国の参加者の間にコクシジオイデス症の多発が認められたとの情報がWHO、CDCを通じてもたらされた。このため、わが国から

の参加者においても同様にコクシジオイデス症の発症が懸念されたため、追跡調査を行なった。現時点では日本人参加者の間に明らかな発病者は認められていない。欧米人の中には現地にテントを張って寝泊まりしていた参加者も多く、暴露をさらに深刻にした可能性が指摘されている。これに対し、日本人が暴露の危険性の高いフィールドに立ち入ったのは、競技の行なわれている日中のみであり、夜間は競技場から遠く、空調設備の整ったホテルに宿泊していた。このため砂塵に紛れて飛んで来る *C. immitis* の分生子の吸入が少なかったものと推測される。

わが国では、コクシジオイデス症を初めとする輸入真菌症の増加が繰り返し報告されているものの、医療体制は十分整っているとはいえない。とくに今回のように、多数の対象者が全国に居住している場合、各地に、輸入真菌症に対するある程度以上の知識を持ち、対応しえる医療機関、検査機関を組織的に配置しておくことが必要となるが、現状ではコクシジオイデス症に十分な知識を持つ臨床医、検査技師は極めて少なく、また菌学的、血清学的検査を行なえる施設も限定されている。今回の事例により、これらの問題点が浮き彫りとなった。

今回は、本プロジェクトがすでに開始されていたため、血清検査を行なう体制が整えられていたなどの点で、本研究班は有効に機能したと考えられるが、今後より一層の増加が予想される輸入真菌症に対応するためには、一般医療施設の医療従事者（医師、検査技師）の基礎教育とともに、各地に拠点となる機関を設け、中心となるリファレンスセンターと協力して対応する体制が必要と考えられる。

3. 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（担当：菊池 賢）

深在性真菌症の実態調査のため、全国 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。真菌血症が疑われた患者の血液、中心静脈カテーテル、組織など

から約 400 株が収集され、このうち、血液培養由来 189 株について、菌種同定を行なった。菌種の内訳は *C.albicans* が 84 株 (44.4%) と最も多く、続いて *C.parapsilosis* 47 株 (24.9%)、*C.glabrata* 21 株 (11.1%)、*C.tropicalis* 21 株 (11.1%) の順であり、4 菌種で 173 株 (91.5%) を占めていた。*albicans* 以外の *Candida* は 95 株 (50.3%) と過半数を越えていた。

真菌血症患者背景は解析可能な 172 名について、調査を行なった。患者の男女比は 2 : 1、年齢は 63.4 ± 19.5 歳で 60 歳以上の高齢者が 76.5% を占めていた。基礎疾患では固形腫瘍が 36 例 (20.9%) と最も多く、血液疾患は 11 例とそれほど多くなかった。真菌の血清検査では β -glucan が 65 例 (37.8%) で施行され、陽性は 48 例 (73.8%) であった。血液疾患に伴う症例が少ないものの多様な診療科で真菌血症が発生していること、血清検査がそれほど定着していないことから、深在性真菌症はまだ十分、臨床側に認識されていない可能性があり、臨床への深在性真菌症の意識浸透が急務であると考えられた。

4. 輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発（担当：榎村浩一）

I 輸入真菌症起因菌の迅速同定システムの研究

国際交流の盛んな今日、本邦におけ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（感染症新法）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した。

本研究で選択し、また設計した特異プライマ

一対を各種病原真菌 DNA に対する特異性試験に供したところ、各々標的とする菌種 DNA のみから特異産物を増幅した。以上より、輸入真菌症起因菌4種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。

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。

II 輸入真菌症遺伝子診断の研究

一般的に診断が困難である深在性真菌症のなかでも、本邦では充分教育がなされているとは言いがたい輸入真菌症に関する診断は特に困難と言わざるを得ない。そのような疾患に対して強力な診断能力を発揮するのが遺伝子診断法である。本研究においては、本邦において既に実用化されている広範囲病原真菌遺伝子診断法によって、輸入真菌症の診断可能性を評価する事を目的とした。

本邦においてヒストプラスマ症が疑われたものの確定診断に至らなかった症例の血液から、上記診断法によって特異産物増幅した。この産物の塩基配列を解析することによって、当該感染症の起因菌を *H. capsulatum* と同定し得た（この症例の詳細は原著報告後に再度報告する予定である）。本邦における現行（ただし保険未

収載）の深在性真菌症遺伝子診断法によって輸入真菌症の診断が可能である事が示された。本法の本症診断上のアプリケーションについての知識普及とともに、一日も早い保険適用が待たれる。

5. 好中球機能不全と真菌症および真菌成分誘発の慢性疾患発症に関する研究（担当：鈴木和男）

真菌症は生体側の「免疫不全」が主たる要因になっているが、「免疫不全」と真菌感染との関係が十分理解されていない。その一方で、好中球の機能不全に起因して真菌症が発症することが、欠損症（慢性肉芽腫症および Myeloperoxidase(MPO)欠損症）やこれにかかわる遺伝子欠損マウスの結果から明らかにされた。好中球殺菌酵素 NADPH oxidase 欠損は、慢性肉芽腫症(CGD)となり、*Aspergillus* を主とした真菌感染を誘発し死に至る。また、その酵素の下流に位置する myeloperoxidase (MPO) の欠損はカンジダ症を誘発する。これは、遺伝子のノックアウト(KO)マウスの *in vivo* での感染実験からも実証された。昨年度は、われわれのグループが作製した MPO-KO マウスの *Candida albicans* 殺菌能の低下を報告した。本年度は、MPO-KO マウスを用いて種々の真菌や細菌に対する感染防御能について検討した。MPO-KO マウスは、トリコスポロンと緑膿菌の殺菌能も著しく低下し、さらに、アスペルギルスとクレブシエラの殺菌能も野生型マウスに比し有意に低下した。しかし、黄色ブドウ球菌と肺炎球菌の殺菌能低下は認められなかった。一方、真菌成分がアレルギーや慢性炎症を誘発することが知られ、これまで、*Candida* 成分 (*Candida albicans* - derived substances (CADS)による冠状動脈炎の誘導の要因が、MPOであることを報告してきた。本年度は、*Candida* 成分から冠状動脈炎誘導分子を特定するとともに、好中球機能解析および免疫機構を解析した。その結果、CADS の腹腔内投与により、血中 MPO-ANCA の上昇と冠状動脈炎が誘導と同様

に CAWS の腹腔内投与も同様の成績が得られた。*in vitro* での脾細胞培養系において、CAWS 低濃度ではサイトカイン産生促進作用を、高濃度では細胞障害作用とサイトカイン産生抑制作用を示したが極端に低下していた。真菌成分 (CADS や CAWS) 投与によって誘発される血管炎とその血清中に上昇する MPO-ANCA は、MPO-KO マウスの解析から MPO が主要要因であることが判明している。冠状動脈炎への CADS と CAWS 投与により CAWS の方が CADS よりも高い頻度で血管炎を誘発していたことより、CAWS に CADS より多量に含まれている β 1,3-, 1,6-グルカンが関与していることが強く示唆された。

6. 抗真菌剤耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索 (担当: 新見昌一、上原至雅)

I. 病原真菌 *Candida albicans* の薬剤排出ポンプ *CDR1* の機能解析

Candida albicans のフルコナゾール耐性には様々な機構が関与しているが、耐性化した臨床分離株ではほとんどの場合 ABC タイプの排出ポンプ Cdr1p が過剰発現している。また *CDR1* は、これと相同性の高い *Saccharomyces cerevisiae* の *PDR5* を破壊した株に発現させると薬剤耐性を相補する。しかし臨床分離耐性株では排出ポンプのみならず他の耐性因子も関わっている可能性がある。今回我々は Cdr1p の機能を直接 *C. albicans* 細胞で検討するために *CDR1* 破壊株に *CDR1* を再挿入して発現制御系を作製し、種々の薬剤に対する基質特異性をしらべた。

CDR1 破壊株、その親株 CAI4 およびプラスミドのみを挿入した株はアゾール3剤 (フルコナゾール、ケトコナゾール、イトラコナゾール) に対してほぼ同程度に高感受性であった。一方、*CDR1* 発現株のアゾール剤に対する感受性は親株、破壊株、プラスミド挿入株に比べて著しく低下した。*CDR1* が *HEX1* promoter の制御のもとに発現調節されるかどうかを見るために、炭素源飢餓の *CDR1* 発現株細胞にグルコースま

たは *N*-アセチルグルコサミンを添加して増殖を再開させ、*CDR1* mRNA の発現量の経時的変化をしらべ、細胞膜画分の Cdr1p 産生量を SDS-PAGE クマシー染色および抗 Cdr1p 抗体によるウエスタン法で追跡した。*N*-アセチルグルコサミンを加えると、*CDR1* mRNA 量はすみやかに上昇し、細胞膜内の Cdr1p の産生量も顕著に増加した。グルコースの場合にはそのような変化は見られなかった。しかし、グルコース培地で発育した *CDR1* 発現株も高度耐性を示したので、構成的に発現する *CDR1* が耐性を与えるのに十分と思われた。*CDR1* 発現株はアゾール剤に加えて、構造的、機能的に関連性のない薬剤に対しても耐性になった。また *CDR1* 発現株は、排出ポンプに阻害作用を持つと思われるいくつかの免疫抑制剤の存在下でフルコナゾールに対して感受性となった。

以上のことから、*CDR1* 発現株の薬剤排出ポンプ *CDR1* は *HEX1* promoter によって転写制御を受け、Cdr1p の発現によって多剤耐性を獲得することが示された。さらに免疫抑制作用を持つ薬剤とフルコナゾールの併用によって耐性株を感受性化させる可能性も確認した。

II. *C. albicans* のための新規発現ベクターの構築および評価

カンジダ症の主要原因菌である *C. albicans* は、その成育過程において酵母形および菌糸形の二つの形態 (二形性) を持っており、通常の培養条件では酵母形で生育し、血清等の刺激によって菌糸形へと形態を変換する能力を有している。深在性カンジダ症の病巣部には菌糸状に生育した菌要素が頻繁に観察されることから、菌糸形の方が酵母形よりも病原性が強いことが予想されている。このように、*C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変換機構は基礎生物学的だけでなく、医学的にも興味深い研究対象である。

C. albicans は遺伝学的に最も進んでいる酵母 *S. cerevisiae* と比べて分子生物学を行う道具が少なく、また一倍体の世代を持たないため、こ

れまで遺伝学的な解析を行うのが困難であった。また、昨年度まで行っていた *S. cerevisiae* における強制発現系だけでは、宿主背景が異なるという点からも薬剤排出ポンプの正確な機能を調べるには不十分であり、本菌の薬剤耐性機構を解析するためにも有用なツールが必要と考え、*C. albicans* のための新規の発現ベクターを構築した。

新しく作製した発現ベクターの有用性を確認するために、レポーターとして、ウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子をベクターに挿入し、*C. albicans* に形質転換して、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、発現を誘導した場合にのみ活性が確認でき、プロモーターの強さは、*ACT1* プロモーターと比べて、*MAL2* プロモーターは約 0.7 倍、*MET3* プロモーターは約 2 倍であった。*MAL2* プロモーターおよび *MET3* プロモーターを抑制した場合には検出限界以下であった。この結果から、これら 3 種類のベクターは、十分に機能することが明らかとなった。また、薬剤排出ポンプを機能を持つ分子として発現できるかどうかを確認するために、3 種類のベクターに薬剤排出ポンプ *CDR1* の遺伝子を挿入して、*CDR1* 遺伝子破壊株を宿主として形質転換を行った。発現した Cdr1p 蛋白の C 末端側には FLAGtag が融合されているので、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタン解析によって発現の有無を確認できるはずである。それぞれのプラスミドを導入した株を培養後、膜画分を抽出し、ウェスタン解析を行ったところ、発現を誘導した株においてのみ、予想される大きさの位置にバンドが検出された。この結果から、予想通り Cdr1p 蛋白は発現されており、膜へと移行されていることが明らかになった。また、発現を誘導することによって、フルコナゾールに対する感受性に影響を与えるかどうかを調べた。*CDR1* 遺伝子破壊株は、その親株に比べてフルコナゾールへの感受性が強くなることが既に明らかにされており、遺伝子破壊株において、*CDR1* 遺伝子を発現するとフルコナゾール感受性が弱まることが予想される。実際、*CDR1* の

遺伝子発現を誘導した株においては、フルコナゾール感受性が減少することが明らかとなった。この結果から、新規のベクターで発現させた Cdr1p 蛋白は、発現、膜への局在だけでなく、薬剤の排出ポンプとしての機能も維持していることが明らかになった。

以上 2 つのレポーター遺伝子を用いた解析によって、新規に作製した発現ベクターは本菌の遺伝子工学的解析を行うに当たって十分有用であり、薬剤耐性機構を解明するためのツールとしても使えることが明らかになった。

III. 真菌の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索

真菌はヒト細胞と同様に真核細胞であるために細菌に比べて薬剤の選択毒性が発現し難い。このような本質的な困難さのゆえに真菌症の化学療法は容易ではなく、新しい抗真菌剤の開発をはばむ大きな障害になっている。しかしその中でもアゾール系抗真菌剤は最も期待され、これまで開発の焦点となってきた薬剤である。従って、真菌の排出ポンプの働きを止めて菌を感受性化すれば、アゾール剤の抗菌力の回復が期待される。このように既存の抗真菌剤の活性を復活させる試みは、新しい抗真菌物質を探索することと並行して、耐性菌対策には有益であると考え、昨年度から薬剤排出ポンプを標的分子とする阻害剤の探索を開始した。

自己の主要な排出ポンプが破壊され高度耐性となった *S. cerevisiae* AD 株に *C. glabrata* の *CgCDR2* を導入したところ前回の 3 種のポンプの場合と同様に高度耐性を示した。SDS-PAGE によって AD/*CgCDR2* 株の細胞膜画分には 170 kDa の蛋白が過剰に発現していた。AD および AD/pSK-PDR5 株はアゾール剤のいずれに対しても高い感受性を示したのに対して、*C. albicans* の *CDR1* または *CDR2*、あるいは *C. glabrata* の *CgCDR1* または *CgCDR2* を導入した株ではフルコナゾールに対してすべて耐性を示し、特に *CgCDR1* 導入株はスクリーニングに用いる *S. cerevisiae* OE (*PDR5* 過剰発現) 株と同程度の高度耐性を示した。

薬剤排出ポンプ阻害剤の探索については昨年度は *Streptomyces* 属菌の培養ろ液780F がフルコナゾール存在下でディスク周辺に大きな阻止円を形成し *S. cerevisiae* OE 株に対して強い増殖阻害効果を示した。他の排出ポンプ発現株に対しても同様の効果を示すことが分かったが、今回は 780F の構造決定を行ない、この活性物質は *Questiomycin A* と判明した。*Questiomycin A* をフルコナゾールと併用して両者の *Chemosensitisation* をしらべたところ、*S. cerevisiae* OE 株を著しく感受性化した。

以上の結果からフルコナゾールと *Questiomycin A* との組み合わせはフルコナゾール高度耐性の *S. cerevisiae* OE 株の増殖を効果的に阻害した。

D. 考察

平成13年度の新興・再興感染症研究事業により得られた上記の成果に加えて、アスペルギルス症のアンケート調査結果及び世界模型飛行機選手権大会の参加者における *Coccidioides immitis* 暴露に関する追跡調査は特筆すべきで、次のように要約することができる。

1) アスペルギルス症に対する意識調査およびアスペルギルス症の発生状況と分離真菌の動向を知るためのアンケート調査

アスペルギルス症は臨床現場ではすでに重要な感染症として顕在化しているが、この疾患に関して医師に対する意識調査および発生状況等の疫学調査はこれまであまり行われてこなかった。昨年の真菌血症の発生動向調査（回答率は49.8%）に比べて、同じ形式の調査であったにもかかわらず、今回の回答率は28%に留まり、アスペルギルス症の難しさおよび関心の低さがうかがわれた。

今のところアスペルギルス症に対する簡便で正確な診断法はなく、この疾患を経験した医師

の多くが診断・治療の困難さを訴えた。臨床所見や画像所見に加えて、菌学的診断や組織学的診断がなされるが、菌要素を直接証明できることは少なく、血清診断や遺伝子診断の試みがなされているが、まだ一般的なレベルにまで普及しているとは言い難い。従って将来これらの診断法を取り入れ、標準化された方法の普及がこの疾患の診断の難しさを軽減するための方法であろう。

治療については、経験的な治療としてフルコナゾールが使用され、必ずしもアスペルギルス症を想定して抗真菌剤が使われているわけではない。アスペルギルス症の適切な診断が難しい現状ではこのような抗真菌剤使用の傾向は避けられないのかもしれない。本疾患に最適の抗真菌剤が存在しない以上、現実にはアンホテリシン B あるいはイトラコナゾールに頼らざるを得ない。骨髄移植患者の死亡原因の30~50%が侵襲性肺アスペルギルス症であるといわれる現状では、これらの抗真菌剤について適切な指針が必要であり、現時点で奨励される適切な治療のガイドラインの作成が望まれる所以である。

アスペルギルス症の発生動向については、*A. fumigatus* が分離される割合が最も高く、漸増傾向を示していた。多くの検査室ではアスペルギルス属菌の菌種を特定するところまでには至っておらず、全体的にはアスペルギルス属菌の検出率は2~3/1000件程度と極めて低い。元来アスペルギルス属菌の陽性率はそれほど高くないとは考えられるが、より正確な発生動向を知るためには、血液内科など深在性真菌症に遭遇する機会の多い医療施設において、アスペルギルス属菌の検出率の経年推移がどのような傾向を示すかを精査するべきであろう。治療法について現状では、アスペルギルス症に有効な副作用のない殺菌性の抗真菌剤はないが、現在開発が進んでいるカンジン系やアゾール系の新しい抗真菌剤の登場が切望されるところである。以上のことから、今後も基礎及び臨床の両面からより活発な研究が行われなければならない。

2) 世界模型飛行機選手権大会の参加者における *Coccidioides immitis* 暴露に関する追跡調査

平成 13 年 10 月に米国カリフォルニアで行なわれた模型飛行機国際競技会においてヨーロッパからの参加者にコクシジオイデス症が発生したため、日本人参加者 20 名全員の追跡調査を開始した。現時点では感染発症者はいないが、慎重な追跡調査を継続している。輸入真菌症は渡航先で感染して帰国後発症する危険性が高いことが今回の事例で如実に示された。幸いに米国 CDC との綿密な情報交換により逸早く対策を講じることができ、日本人参加者の徹底的な追跡調査を直ちに行った。今後このような事例に遭遇する可能性は高く、本研究事業の果たす役割が極めて重要であることが再確認された。これに直接関連して輸入真菌症の診断法の研究は極めて重要である。輸入真菌症起因菌および病原真菌の分子生物学的同定法を開発し、国内において発症した輸入真菌症（千葉県と福岡県におけるヒストプラズマ症、計 2 例）の遺伝子診断と分離菌株の遺伝子同定に成功した。また血液を用いた遺伝子解析法によるパラコクシジオイデス症の診断法を実験モデルで開発した。国外に依存していたコクシジオイデス症、ヒスト

プラズマ症に対する菌学的、血清学的診断・検査体制を整備し、ファレンスセンターの基礎を築いた。「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」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起因菌を国内で同定できるシステムが初めて提供された。また、これまで海外に依存していたコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症に対する診断検査体制の整備が進んできたことは大きな成果といえよう。

E. 結 論

本研究により、アスペルギルス症の全国的な発生动向が初めて明らかにされると共に、本疾患に関わる困難さがより鮮明になった。従って、アスペルギルス症の診断・治療に対する標準的な指針を作り、新しい診断・治療の確立とアスペルギルス症に関する情報の提供が重要である。一方、基礎研究としては本研究全体を通して分子遺伝学的診断法の開発および抗真菌性化学療法剤に対する耐性機構の解明および真菌感染と宿主との相互作用に基づく新しい抗真菌剤の開発が期待された。これらの研究によって期待される成果は真菌感染症から国民を守るために多大の貢献をするものと考えられた。

深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査 アスペルギルス症について

平成12年度から開始された厚生科学研究新興・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」（主任研究者：上原至雅 国立感染症研究所生物活性物質部部長）は、わが国における輸入真菌症ならびに深在性真菌症の発生動向を調査してその疫学的データを集積するとともに、これらの真菌感染症に対する診断・治療法の研究を行うことを目的としている。深在性真菌症について全国レベルの発生動向情報を収集し、現状を正確に把握することが重要と考え、初年度は全国の主要な医療施設を調査対象にして深在性真菌症に対する意識調査と真菌血症の発生動向に関するアンケート調査を行い、その解析結果をJpn. J. Antibioticsに掲載した¹⁾。

平成13年度も前年度と同一医療施設（概ね500床以上の主要な一般病院508施設）に協力を仰ぎ、情報の収集を行った。今回は、アンケートAでは「アスペルギルス症に対する一般的事項」について医師の個人的な見解を調査し、臨床医がアスペルギルス症をどのように意識しているのか、日常の医療活動において実際にアスペルギルス症に遭遇した際にどう対応し、どのような問題が生じるのかを調査した。アンケートBの「アスペルギルス症の発生状況と分離真菌の動向」調査においてはアスペルギルス症の発生状況概略を把握するために総気道分泌物培養件数アスペルギルス症の発生状況と分離真菌の動向」調査においては、アスペルギルス症の発生状況概略を把握するために総気道分泌物培養件数、気道分泌物の菌種別培養陽性件数、真菌培養陽性件数、真菌菌種別培養陽性件数、病型別アスペルギルス症例数、使用した培地ならびに同定システム、抗真菌剤使用量について1996年から2000年にかけての年次推移をアンケート調査し、我が国におけるアスペルギルス症の発生状況の一端を把握すること

にした。以下に、今回のアンケート調査の結果を記す。

アンケート回収結果

アンケートAは感染症担当医師、アンケートBは検査部担当者に回答をお願いしたところ、143施設（28%）から回答が得られた。昨年行なった深在性真菌症に対する意識調査と真菌血症の発生動向に関するアンケート調査では253施設（49.8%）から回答が得られたが、それに比較すると今回の回収率は極めて低かった。このことはアスペルギルス症に関するアンケート調査が回答者にとってかなり答えにくい難しい作業であったことを物語っていると同時にアスペルギルス症に対する関心の低さもうかがわれた。しかしご多忙の中、困難な作業にご協力頂いた方々に深く感謝致します。今回も回答施設は全国に偏りなく分布しているので、この調査はわが国全体の医療機関におけるアスペルギルス症の発生動向の実態を反映しているものと思われる。

アンケートAの結果

回答者の科別の内訳

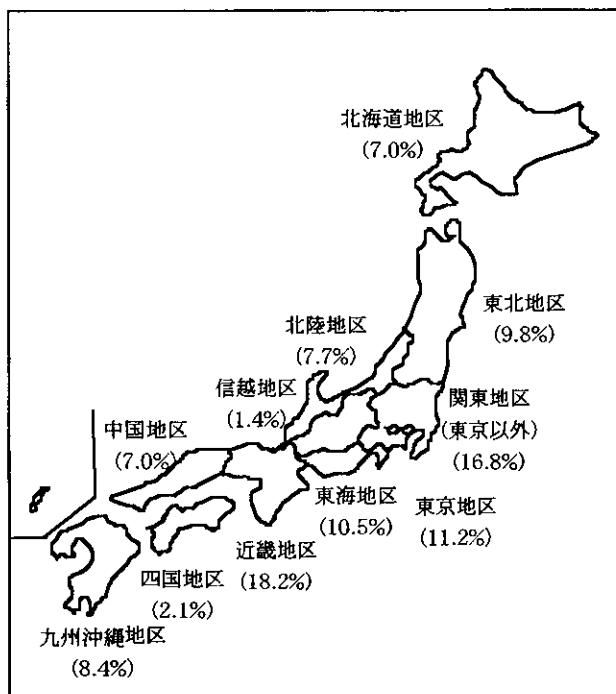
アンケートAの回答者の科別の内訳を図に示した。163名の回答者のうち124名（76%）が内科医師であった。そのうち呼吸器内科医師の割合が82名（全体の50%）、感染症内科およびその他の内科がそれぞれ22名（全体の13%）、さらに血液内科が19名（全体の12%）であった。アスペルギルス症は肺を中心とした感染症であるので呼吸器内科医師からの回答が多くなるのは当然の結果である。

発送数：508（対象；概ね500床以上の一般病院）

回答施設数：143（回収率28%）

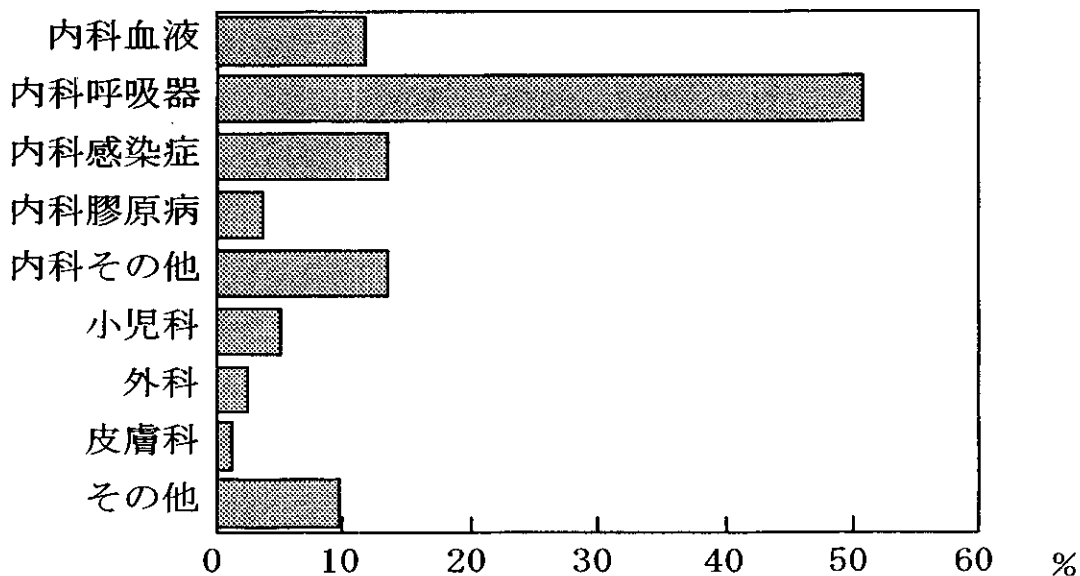
地域別の内訳

地区名	施設数	(%)
北海道地区	10	(7.0)
東北地区	14	(9.8)
北陸地区	11	(7.7)
関東地区 (東京以外)	24	(16.8)
東京地区	16	(11.2)
信越地区	2	(1.4)
東海地区	15	(10.5)
近畿地区	26	(18.2)
中国地区	10	(7.0)
四国地区	3	(2.1)
九州沖縄地区	12	(8.4)
合計	143	(100)



アンケートA（アスペルギルス症について）の解析結果

アンケートA 回答者の科別の内訳



深在性真菌症の発生動向調査に関するアンケート A
アスペルギルス症について

年 月 日 病院名 部署

アンケート回答者氏名

アンケート回答者の専門分野 該当する分野を ○で囲んでください。

内科（血液、呼吸器、感染症、膠原病、その他）、小児科
外科、皮膚科、その他（ ）

アスペルギルス症の診断・治療経験についてお尋ねします。

- 1 これまでにアスペルギルス症の診断で困ったことがありましたか。 ある（ ） ない（ ）
どんなことで困りましたか（ ）
- 2 これまでにアスペルギルス症の治療で困ったことがありましたか。 ある（ ） ない（ ）
どんなことで困りましたか（ ）
- 3 これまでに経験した主な病型と病態について該当する項目すべてに○印をご記入ください。
肺アスペルギローマ（侵襲性肺アスペルギルス症に進展したものも含む）（ ）
侵襲性肺アスペルギルス症（ ）
慢性壊死性肺アスペルギルス症（ ）
アレルギー性気管支肺アスペルギルス症（ ）
播種性アスペルギルス症（ ）
その他（ ）
- 4 播種性アスペルギルス症の場合、肺以外の感染臓器はどこでしたか。該当する臓器すべてに○印をご記入ください。
脳（ ） 肝（ ） 腎（ ） 心臓（ ） 骨（ ）
その他（ ）

次の 5～7 の質問には、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症を除いたアスペルギルス症についてお答えください。

- 5 アスペルギルス症を発症した患者には何か基礎疾患がありましたか。
ある（ ） ない（ ）
- 6 基礎疾患があった場合、それは何ですか。該当する項目すべてに○印をご記入ください。
白血病（ ） 悪性腫瘍（ ） 好中球減少症（ ） ステロイド療法（ ）
骨髄移植（ ） 臓器移植（ ） HIV 感染（ ） 自己免疫疾患（ ）
結核（ ） サルコイドーシス（ ） 慢性閉塞性肺疾患および気管支拡張症（ ）
糖尿病（ ） その他（ ）

- 7 アスペルギルス症の診断はどのようになっていますか。該当する項目すべてに○印をご記入ください。
- | | | | |
|-----------------|-----|-----------|-----|
| 1) 臨床症状 | () | 6) 血清検査 | () |
| 2) 抗細菌剤不応熱 | () | 7) 病理組織検査 | () |
| 3) 胸部X線などの画像 | () | 8) 遺伝子検査 | () |
| 4) 鏡検(喀痰、塗沫、組織) | () | 9) 皮内反応 | () |
| 5) 培養 | () | 10) 除外診断 | () |
- 11) その他(具体的に)
- 8 アスペルギルス症の治療にはどのような薬剤を用いましたか。該当する項目すべてに○印をご記入ください。
- | | |
|---------------------|-----|
| 1) ファンギゾン(アンホテリシンB) | () |
| 2) フロリド(ミコナゾール) | () |
| 3) ジフルカン(フルコナゾール) | () |
| 4) イトリゾール(イトラコナゾール) | () |
| 5) アンコチル(フルシトシン) | () |
| 6) その他 | () |
- 9 アスペルギルス症の診断・治療に関してどこから情報を入手していますか。該当する項目すべてに○印をご記入ください。
- | | | | |
|---------------|-----|--------------------|-----|
| 1) 感染症教科書、解説書 | () | 5) 製薬メーカーの医薬情報(MR) | () |
| 2) 専門誌 | () | 6) 新聞、一般誌等 | () |
| 3) 他の医師 | () | 7) インターネット(具体的に |) |
| 4) 検査室 | () | 8) その他(|) |
- 10 アスペルギルス症に関してどのような情報を最も必要としていますか。該当する項目を1つだけ選んで○印をご記入ください。
- | | | | |
|--------|-----|------------|-----|
| 1) 予防法 | () | 4) 発生情報/動向 | () |
| 2) 診断法 | () | 5) 感染管理 | () |
| 3) 治療法 | () | 6) その他(|) |
- 11 アスペルギルス症に関して相談する人や施設などがありますか。
ある () ない ()
あれば具体的に ()
- 12 最近5年間でアスペルギルス症は増えていると思いますか。
思う () 思わない () 分からない ()
- 13 このアンケートやアスペルギルス症に関してのご意見などをお知らせください。

ご協力を誠にありがとうございました。

返送期限：11月15日

Fax：03-5285-1175

Tel：03-5285-1111, 内線 2301

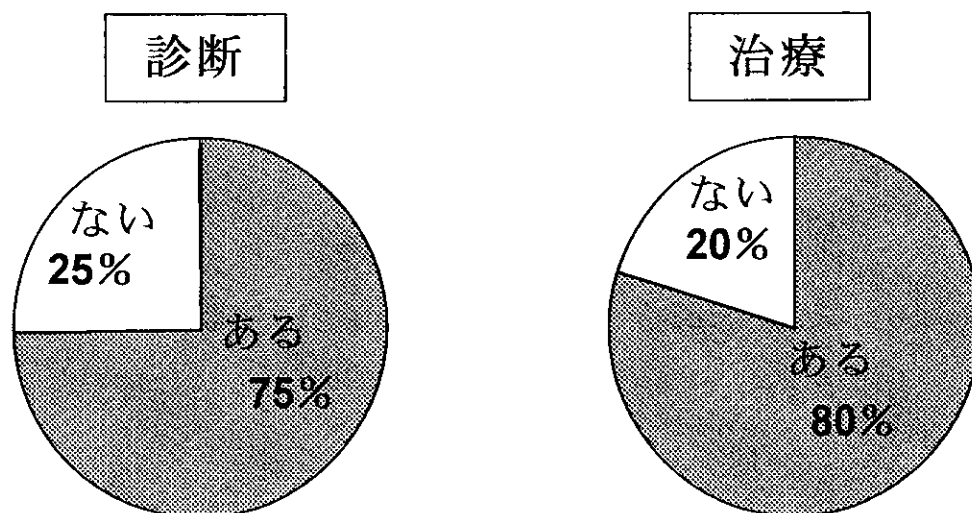
平成13年度厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業
「輸入真菌症等の診断治療法の開発と発生動向調査に関する研究」
主任研究者：上原至雅(国立感染症研究所生物活性物質部部長)

- 1 これまでにアスペルギルス症の診断で困ったことがありましたか。 ある () ない ()
どんなことで困りましたか ()
- 2 これまでにアスペルギルス症の治療で困ったことがありましたか。 ある () ない ()
どんなことで困りましたか ()

アスペルギルス症の診断・治療で困ったこと

アスペルギルス症の診断・治療で困ったことがあるかどうかを尋ねたところ、3/4 以上の医師が診断・治療のいずれに対しても困った経験を有していた。その内容は多岐にわたっていたが、診断に関して困ったことは、画像所見からアスペルギルス症が疑われても、菌の分離ができず、血清学的診断法が求められているにもかかわらず容易ではないため、確定診断が困難であるということに集約される。また、播種性アスペルギルス症が腎不全や心不全の原因であったことに気づけなかったという例や、結局は剖検によって確定診断が得られたという例などが挙げられた。治療に関して困ったことを要約すると、適切な治療薬が少なく抗菌薬の効果が不十分であり、アンホテリシン B は副作用が強いということに尽きよう。特に肺アスペルギローマに対する治療に難儀し、アンホテリシン B またはイトラコナゾールの投与によっても改善が認められなかったという記載が数多くあった。アスペルギルス症の診断・治療で困ったことに関する多くのご意見が寄せられたので、アンケート A の最後にまとめて列挙した。

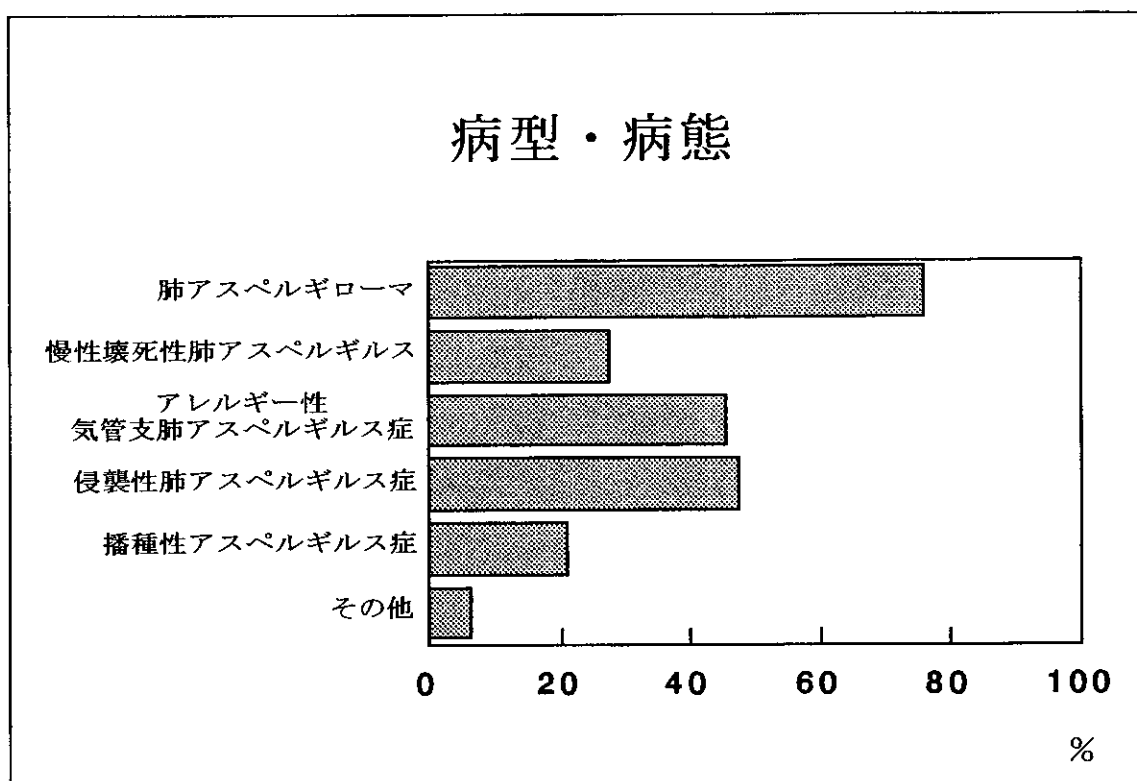
困った経験



- 3 これまでに経験した主な病型と病態について該当する項目すべてに○印をご記入ください。
- | | |
|-----------------------------------|-----|
| 肺アスペルギローマ（侵襲性肺アスペルギルス症に進展したものも含む） | () |
| 侵襲性肺アスペルギルス症 | () |
| 慢性壊死性肺アスペルギルス症 | () |
| アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 | () |
| 播種性アスペルギルス症 | () |
| その他（ | ） |

アスペルギルス症の主な病型と病態

これまでに経験したアスペルギルス症の主な病型と病態についての質問に対しては、次の調査結果が得られた。最も回答が多かったのは肺アスペルギローマ 124 例 (76%) であり、続いて侵襲性肺アスペルギルス症 77 例 (47%)、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 74 例 (45%)、慢性壊死性肺アスペルギルス症 45 例 (28%)、播種性アスペルギルス症 34 例 (21%)であった（複数回答）。



4 播種性アスペルギルス症の場合、肺以外の感染臓器はどこでしたか。該当する臓器すべてに○印をご記入ください。

脳 () 肝 () 腎 () 心臓 () 骨 ()
その他 ()

肺以外の感染臓器

播種性アスペルギルス症に関して肺以外の感染臓器に進行した症例について尋ねたところ、図のように肝(26%)、脳(21%)、腎(21%)、心(18%)などが挙げた。このアンケート調査では肝臓が播種性アスペルギルス症の好発部位であったが、肝エコーによる診断が日常用いられているために肝臓が好発部位としてやや過大に見積られたのではないかとということが想像される。剖検診断では脳が好発部位として報告されている。しかし、両臓器ともに播種性アスペルギルス症が高頻度に感染する臓器であることは間違いない。(複数回答)

