図４に総培養件数に対する *A. fumigatus* の占める割合を表した。*A. fumigatus* の分離率は経年的に漸増傾向を示した。

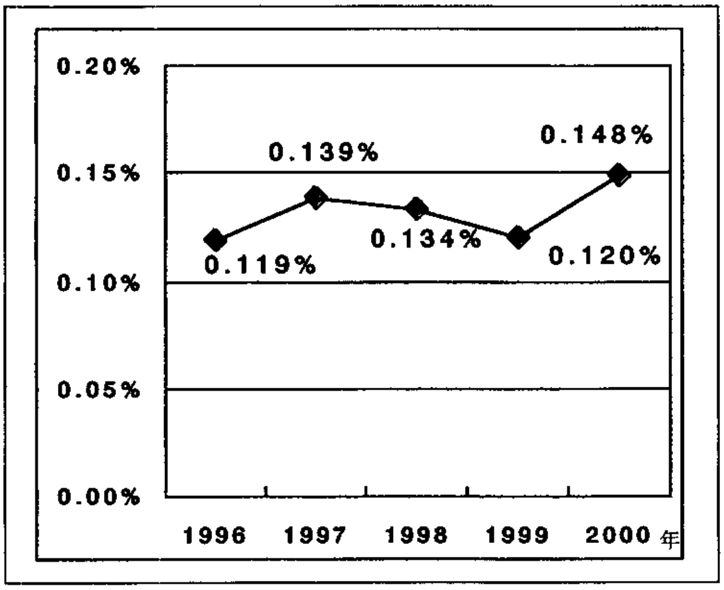


図４．総培養件数に対する *A. fumigatus* の分離率

分離培養に使用した培地

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を対象とした分離培養に用いる培地に対する質問に対して、回答が得られたのは143件中９６件（67.1%）であった。この回答率は、検査室においてアスペルギルス属菌種の検出を想定した体制がとられている程度を如実に表しているものと言えよう。

回答内容を詳細に見ると、アスペルギルス症起因菌(*Aspergillus* 属菌種)の検出に適した培地を利用している施設は９６件中７７件（80.2%）であり、回答施設中では比較的適切な培地が使用されていることが示された。これに対して、１２件（12.5%）の施設では、いわゆる真菌用培地の中で、特にアスペルギルス症起因菌の培養に適さない培地の使用が認められた。現在、臨床検体に対する真菌用選択培地として市販されているものは、真菌の発育を支持する培地に加えて、１）クロラムフェニコール、ゲンタマイシン等抗細菌剤を含有したもの、２）カンジダ属および、皮膚糸状菌以外の真菌の発育を抑制するシクロヘキシミド、グアノフラシン等を含有するもの、３）特定の菌種を同定するために特別の発色基質を含有するもの、の３つに大別できる。ここで１）に相当するのが上記アスペルギルス症起因菌の培養に適した培地として知られる、（抗生物質添加）サブロー（デキストロース）寒天培地、ポテト（デキストロース）寒天培地等であるが、それ以外の２）および３）に相当する培地は、必ずしも培養が容易ではないアスペルギルス属菌種の分離培地として明らかに不適である。２）に属するものには、商品名として、カンジダ GS 培地、マイコセル寒天培地、皮膚糸状菌選択寒天培地などがあるが、これらの培地に含まれる抗菌剤は、アスペルギルス属菌種の発育を少なくとも部分的に阻害する。このカテゴリーに属する培地は、時に「糸状菌培養用培地」として販売されている事があるが、これは同じ糸状菌の中でも、皮膚糸状菌を指すものであり、深在性真菌症起因菌としての糸状菌培養には適さない事を充分留意しなければならない。また、３）に属するものとして、クロモアガー・カンジダ（商品名）があるが、これはカンジダ属病原酵母の同定を目的としたものであり、アスペルギルス属菌種の発育支持は不十分である。

抗真菌剤の使用量

過去5年間の抗真菌剤使用総量については 23 医療施設のデータに基づき、各抗真菌剤の総和を図 5 に表した。ファンギゾン（アンホテリシン B）の使用量が最も多いが、過去5年間に 60,201g から 41,357g に減少していた。次にアンコチル（ミコナゾール）が多く 21,393~26,044g の間を推移した。ジフルカン（フルコナゾール）は 16,806~17,900g の使用量があり、5年間一定していた。イトリゾール（イトラコナゾール）は14,953~19,032g で過去3年間の間に若干減少傾向がみられた。フロリード（フルシトシン）は3,589~5,059g であった。

この使用量のデータは、アンケート A のアスペルギルス症の治療に用いる薬剤を尋ねた質問8の回答とは若干異なっている。アンケート A ではアスペルギルス症の治療に適応したファンギゾンとイトリゾールが最も多く選択されたが、図5に示した実際の使用量はファンギゾンに続いてアンコチルが多い。従って、ここに表された抗真菌剤の使用量はアスペルギルス症の治療に実際に用いた量ではなく、恐らく各医療施設における抗真菌剤の使用総量を反映していると思われる。アスペルギルス症の診断が困難な現状では、アスペルギルス症の治療に限って使用した薬剤のみを抽出しその使用量を算定するのは非常に難しいと思われるので、このような結果になるのは妥当であろう。

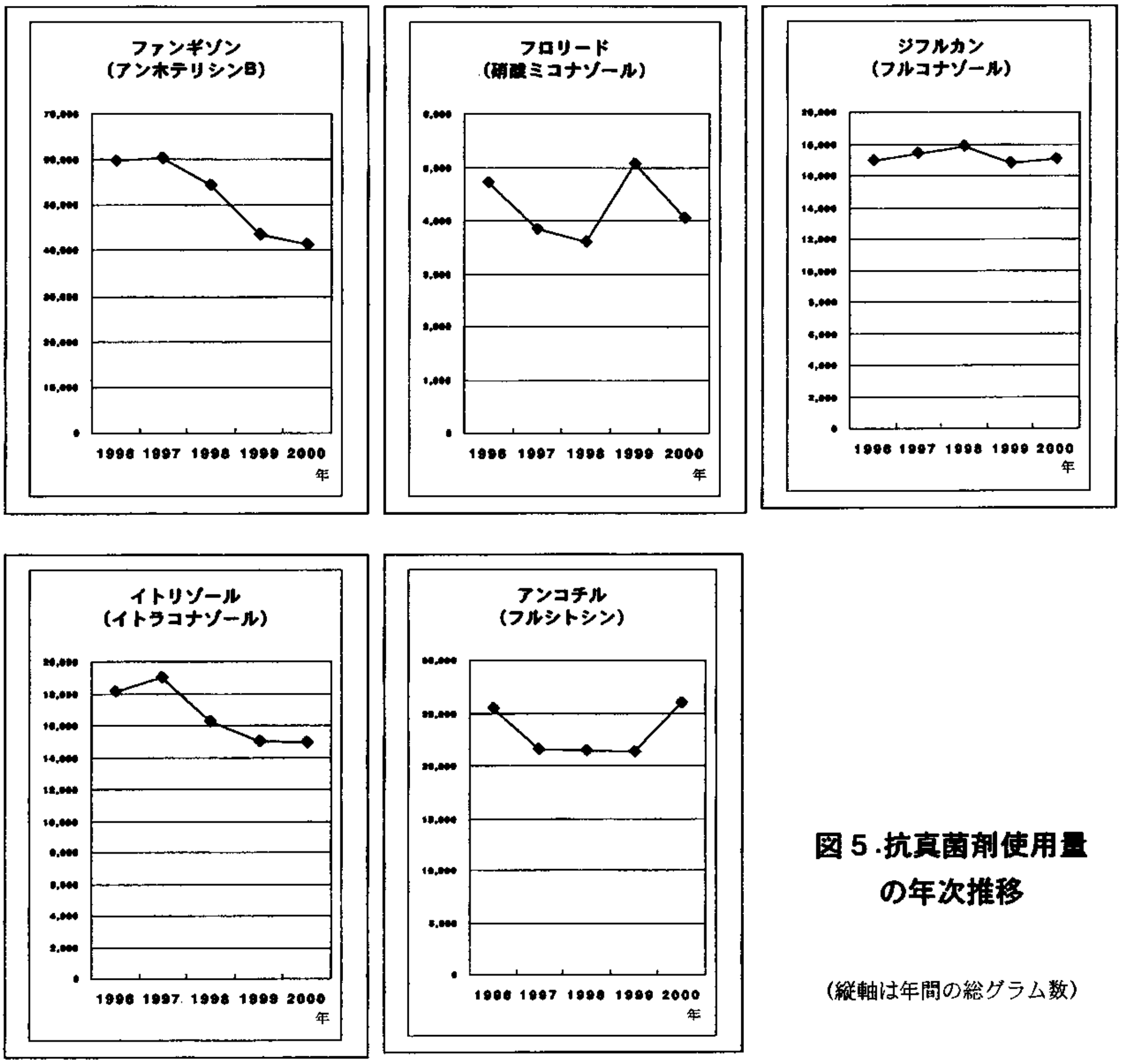


図5.抗真菌剤使用量の年次推移

（縦軸は年間の総グラム数）

同定法

同定法の設問に対する回答は、１４３件中９３件（65.0%）であり、その意味付けは前項同様に考えて良いものと思われる。回答を得た９３件中８４件(90.3%)では、培養菌体をスライドカルチャー等にて標本作成し、顕微鏡観察によって菌種を同定している。これに対して、７件(7.5%)では巨大培養の観察のみ、同定しない施設と病理的所見によって同定する施設が各１件（1.1%）であった。

アンケートＢのまとめ

今回のアスペルギルス症の発生動向に関するアンケート調査においても、*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。しかし、アスペルギルス症の診断・治療ともに満足な結果が得られていないことも明らかである。アスペルギルス属菌の同定については、時間的、経済的その他様々な制約があるためか多くの検査室では菌種を特定するところまでには至っていない。一方では、原因菌がアスペルギルス属菌と判明すれば、菌種の同定は必要ないのではないかという意見もある。臨床的には重要であるにも関わらず、全体的には大学病院でも中枢的な病院においても同様にアスペルギルス属菌の検出率は極めて低く、2~3/1000 件程度である。アスペルギルス属菌の陽性率は実際にはそれほど高くないとは考えられるが、発生動向をより明確にするためには、血液内科など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調査するべきであろう。アスペルギルス属菌検出のために使用する培地・培養時間についての問題点が指摘されたが、前述の通りである。真菌培養検査の指針などを作成する必要があろう。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。アンケート B に関しても多数の貴重なご意見が寄せられたので、以下にまとめて列挙した。

謝辞

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に比較すると今回の回収率は低かったが、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、我々の設問の仕方に配慮が足りなかったのではないかとの反省もある。ご多忙の中、困難な作業にご協力頂いた方々に深く感謝申し上げたい。

真菌アンケートB　意見・備考

1	呼吸器センター内科	6) すべての喀痰培養に真菌用の培地は使用していません
7	内科	本病院は精神科専門病院である。その内容（患者）は精神病者、高齢による痴呆患者が大部分を占める。従って真菌症発生の可能性はありうる。末期的疾患として呼吸器疾患が大勢を占め、中には診断困難をきたし、真菌症を疑われるものも時にあり得る。しかし精査の結果、今迄確定された患者は存在しない。しかし可能性を含んでいる為、今後共注意して観察したい。
8	精神科	精神科単科の病院のため、時にカンジダは検出されることがありますが、アスペルギルス症は経験ありません。お役に立てずに申しわけありません。
10	総務課	1) 199*年の病床数は*月*日より***。9) 使用量は病名に関わりなく病院内の処方や私用の総量。（院外処方は含まず）なお 1) ,2) ,8) 医事課 3) ～7) 検査部 9) 薬剤部からの回答を取りまとめました。アンケート A に関しては、別に呼吸器内科****先生が回答済みです。おそくなってすみませんでした。
11	呼吸器科	業務多忙につき、かかる詳細な調査を返送期限内に完了する事は不可能です。
12	検査部・内科	4) 気道分泌物の菌種別培養陽性件数（件）(A. fumigatus、A. flavus、A. niger) は検査の対象としていない。
14	呼吸器	特になし
15	呼吸器	当院にては、私に特に相談された症例はなく、アスペルギルスに関しては 0 と考えます。
21	臨床検査部	院長の命により臨床検査部で作成致しましたのでご報告致します。当院ではアスペルギルス症の事例がございません。したがって、真菌検索依頼があった時の培地等のみの報告とさせていただきます。
22	臨床検査部	当院では症例が少ないので、年次別推移を検討できません。
27	内科	このような検査部、薬剤部など複数部署にまたがる膨大な調査にはお答えしかねます。（当院では感染症科的なものはなく集計がしにくいということもありますので）
28	ICD	臨床よりの要求なし、検査室汚染のおそれ等より菌糸様真菌検出のみで同定・感受性は行っていない。正確なデータなし
29	検査科	十分な資料ではありませんがよろしくお願いします。
41		たいへん申し訳ございませんがお答えは不可能です。これでよければデータを御使用下さい。12 年度分をお送りいたします。
42	内科	1998 年はデータが喪失しています。1999 年は 4 月 1 日より 12 月 31 日まで。それ以外はデータが喪失しています。
44	薬剤科、検査科	4) A. fumigatus、A. niger 以外は sp で報告
46	内科	1996 年、1997 年はシステムの変更に伴い培養件数不明
48	血液科	4) 気道分泌物の菌種別培養陽性件数（件）は Aspergillus sp として一括集計 (1996~1999 年は不明)

49	検査部	参加辞退します
50	検査部	1996~1998年　3）以降のデータなし
52	検査部	3）の培養件数は喀痰と BAL のみの件数です。4）の培養陽性件数はアスペルギルス属と糸状菌真菌を合わせた件数です。真菌の同定は実施していません
56	内科	1996,7 年データなし。病型診断は難しいです。特に慢性壊死性肺アスペルギルス症、侵襲性肺アスペルギルス症には、どちらともつかないような例が存在しているように思います。
59	内科	当院では入院カルテ管理をコンピューター化していないため、全科の症例を過去に遡って調べることは到底不可能です。内科だけでも困難ですが、この 5 年でアスペルギルス症とはっきり診断のついた症例はありませんでした。
64	呼吸器科	当院における統計はなく、(一部わかる範囲でのみ記入）残念ながら回答できません。
66	検査部	統計処理を行っていないので記入できません。年間、数例の検出があります。
69	臨床検査科	9）抗真菌剤使用量は 2001.1～11 のみデータあり（過去分については調査不可）
73	呼吸器科、感染症科	5）“有為菌”の意味がわかりません。また統計もありません（外来も含むため）。8）肺アスペルギローマと侵襲性肺アスペルギルス症：統計上区別不可能なため合わせた数。9）抗真菌剤使用量：1996,1997 年データなし
77	感染症科	9）抗真菌剤使用量は 1996 年,1997 年のデータ不明
80	検査科、薬剤部、医事課	8）病型別アスペルギルス症例数は確定診断名として人数の記載不能です
81	検査部	9）抗菌剤の使用量ですが薬局からは裏面の通り返答がありましたのでそのまま記入致しました。・当院ではアスペルギルス属の同定は sp での報告としていますのでよろしくお願い致します。
85	感染免疫診療部	このような後ろ向きの調査を過去5年にさかのぼってデータを収集するのはかなりの無理がある。特に大学病院のような大病院で全科のデータを集めて抜けがないようにするのは不可能に近く、今回の発生状況は当院でおそらく発生状況が飛び抜けて多いと思われる呼吸器内科と血液内科に協力を頂いてデータを収集した。このようなアンケート方式で集めたデータが信頼性のあるものになるとは思えず、地道に前向き調査を行って欲しい。
86	中央検査科	アンケート B について参加します。1998 年～2000 年の 3 年間を調査しました。ファンギゾン・ジフルカン：量は不明
88	内科	本院では 2000 年 4 月より病原微生物（検出菌）についての統計処理法を変更した為 2000 年 4 月以前の data はお伝えできません。
89	呼吸器科	1）,2）ファックスのデータ不明
90	呼吸器科	9）抗真菌剤使用量の 1997 年データは 4 月～12 月分、1996 年及び 1997～1998 年のジフルカン Cap.はデータなし
91	呼吸器科	申しわけありません。検査室に依頼しましたが、昨年度しか調べられず、昨年は 0 件でした。尚、アンケートAの症例は 1996 年以前と 2001 年の症例です
103	中央検査部	細菌検査システムを構築中のため今回の調査期間において詳細な内容の報告はできませんことをお詫び申し上げます。

104	呼吸器科	3）総気道分泌物（喀痰、BAL 等）培養件数（件）は呼吸器の検査材料すべての件数です
106	管理課庶務係	コンピューター化されたばかりのため、算出不能
108	医局	特になし
110	細菌検査室	一般細菌、TB はデータをコンピューター管理してありますが、真菌は管理してませんので大変です。また真菌培養は、細菌培養・TB とセット検査で出てきますので真菌症を疑った検査は総培養の中では本当に少ないと思います。喀痰からはカンジダが主に分離されます。剖検診断書では 1996～2000 年で、アスペルギルスに関する診断は 6 例ありましたが、内 3 例が脳より検出された侵襲性アスペルギルス症でした。抗真菌剤の年間使用量ですが、医事課にお願いしていましたが、あまりにも時間がかかるとの事で調べることができませんでした。
119	内科	細菌検査室で同定できた例を調べましたが、実際に深在性真菌症といえるものは少ないと思われました。
121	呼吸器科	調査遅れ、充分に記入出来なく申し訳ありませんでした。必要あれば又御指示ください。
131	検査部	8）病型について　1999 年以降はコンピューター上で患者の診断名が調べられるようにシステムが変わったので、アスペルギルス陽性者が有意菌か確認できましたが、診断名が細かく分類されていなかったりしたため結局病型別の人数は不明になってしまいました。 9）抗菌剤使用量　使用量が不明のため購入量です。アンケートの返送が大変遅くなってしまい申し訳ありませんでした。
132		4）陽性件数　すべて「真菌」で結果報告のため「アスペルギルス属」まで報告しておりません。全て 0 件。（気道分泌物培養の材料名等の年次別の表　添付）
133	感染対策科	今回の調査で、臨床現場で Aspergillosis がほとんど把握されていないこと、検査部と臨床間の連携が必要な事（この解決に）があらためて認識されました。昨年の Yeast 以上に臨床へのアピールが必要な感染症だと痛感しました。
134	細菌検査室	不充分な解答ですがご了承下さい。副院長（院内感染対策委員会担当）
135	血液内科	アンケートに手間取りまして遅れました。申し訳ございません。
139		6)培地以降は記入ミスにより入力不可能
141	呼吸器内科	回答がおくれ、申し訳ございませんでした。裏面の data に関して 1） 1999 年 9 月から当院の中央検査部内システム変更に伴い、検出菌数は、1999 年 9 月以降のものです。それ以前の菌株数については、現在システムの変更に伴い、まだ整理し切れておりませんので回答できかねます。 2） 症例数については、当科（呼吸器内科）で私（竹田）の実際に診療した患者のみ（入院例のみ記載）しましたが院内の他の内科系もしくは外科系の診療科の症例の調査は今回できませんでしたので、症例数に入れておりません。当科での実際の自験例は、昭和 63 年から私の経験した把握している症例は、平成 13 年 11 月までで、72 例＋および院内他科の consultation 受けた症例、ですので年平均 5～6 例と思われますが、平成 12 年は 6 例、平成 13 年は 4 月－11 月までで 7 例と若干増加の傾向も伺われると感じました。 3） 当院は 30 床の結核病床を有しますので、症例数の評価に際し、考慮に入れる必要があると考えます。
143	呼吸器内科	アスペルギルス症に関する診断基準を作成するなど、具体的な基準のコンセンサスが得られると良い。特に、保険診療の枠内で可能な基準と、特別な検査を必要とする基準を分けて示していただければ好都合。

アンケート協力施設一覧

北海道地区

王子総合病院
市立札幌病院
北海道大学医学部附属病院
国立療養所札幌南病院
渓仁会西円弥間山病院
旭川赤十字病院
市立旭川病院
滝川市立病院
釧路労災病院
市立釧路総合病院

東北地区

中通総合病院
平鹿総合病院
由利組合総合病院
岩手県立中央病院
智徳会岩手晴和病院
岩手医科大学附属病院
国立療養所松丘保養園
八戸赤十字病院
福島県立医科大学医学部附属病院
財団法人竹田綜合病院
（財）白檮会総合津中央病院
東北大学医学部附属病院
山形県立中央病院
山形市立病院済生館

北陸地区

福井医科大学医学部附属病院
福井赤十字病院
金沢医科大学病院
石川県立中央病院
国立金沢病院
高岡市民病院
富山県厚生農業協同組合連合高岡病院
田宮病院
新潟県立中央病院
新潟大学医学部附属病院
県立新発田病院

関東地区（東京以外）

聖マリアンナ医科大学
北里大学病院
相模原協同病院
横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター
横浜市立大学医学部附属病院
横浜南共済病院
国立横浜病院
国立療養所千葉東病院
国立精神・神経センター国府台病院
順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院
日立製作所日立総合病院
国立栃木病院
済生会宇都宮病院
国立療養所東埼玉病院
埼玉医科大学附属病院
埼玉医科大学総合医療センター
防衛医科大学校病院
慈光会慈光会病院
前橋赤十字病院
伊勢崎市民病院
富士重工業健康保険組合総合太田病院
桐生厚生総合病院
山梨県立中央病院
山梨医科大学医学部附属病院

東京地区

三井記念病院
東京慈恵会医科大学附属病院
順天堂大学医学部附属順天堂医院
東京医科歯科大学医学部附属病院
東京大学医学部附属病院
厚生協会東京足立病院
昭和大学病院
自衛隊中央病院
東京医科大学病院
東京厚生年金病院
東京女子医科大学病院
杏林大学医学部付属病院
国立精神・神経センター武蔵病院
公立昭和病院
医療法人社団永生会永生病院
東京慈恵会医科大学附属第三病院

信越地区

信州大学医学部附属病院
県立岐阜病院

東海地区

静岡県立総合病院
市立島田市民病院

浜松医科大学医学部附属病院
岡崎市民病院
社会保険中京病院
国立名古屋病院
香流会紘耕仁病院
名古屋第二赤十字病院
名古屋市立大学病院
加茂病院
トヨタ記念病院
愛知医科大学附属病院
小牧市民病院
春日井市民病院
一宮市立市民病院

近畿地区

国立三重中央病院
大津赤十字病院
長浜赤十字病院
財団法人田附興風会北野病院
大阪府立成人病センター
景岳会総合病院南大阪病院
市立豊中病院
大阪府済生会吹田病院
大阪大学医学部附属病院
大阪医科大学附属病院
星ヶ丘厚生年金病院
若弘会若草第二竜間リハビリテーション病院
東大阪市立総合病院
国立大阪南病院
大阪労災病院
医仁会武田総合病院
京都市立病院
京都社会事業財団京都桂病院
奈良県立奈良病院
天理よろづ相談所病院
和歌山県立医科大学附属病院
神戸大学医学部附属病院
西神戸医療センター
兵庫県立尼崎病院
兵庫医科大学病院
国立療養所兵庫中央病院

中国地区

山陰労災病院
川崎医科大学附属川崎病院
総合病院岡山赤十字病院
国立病院岡山医療センター
広島県厚生農業協同組合連合 JA 尾道総合病院
社会保険広島市民病院
広島県厚生農業協同組合連合呉共済病院
国立岩国病院
光輝会光輝病院
山口大学医学部附属病院

四国地区

高松赤十字病院
高松市民病院
香川医科大学医学部附属病院

九州沖縄地区

北九州市立医療センター
社会保険小倉記念病院
浜の町病院
九州大学医学部附属病院
福岡大学病院
久留米大学病院
長崎大学医学部附属病院
熊本大学医学部附属病院
国立療養所菊池恵楓園
国立別府病院
鹿児島大学医学部附属病院
琉球大学医学部附属病院

（各地区郵便番号順）

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

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

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

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（東京女子医科大学医学部）－－－－－－－－－－－－－－－－－　６２

輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発

槇村　浩一（帝京大学医真菌研究センター）－－－－－－－－－－－－－－　６７

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

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」
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

主任研究者・上原至雅　国立感染症研究所　部長
分担研究者・新見昌一　国立感染症研究所　室長

I. 病原真菌 *Candida albicans* の薬剤排出ポンプ *CDR1* の機能解析、II. *Candida albicans* のための新規発現ベクターの構築および評価、III. 真菌の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索）に関して，平成１３年度の成果を以下に報告する．

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

A. 研究目的

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。その結果アゾール剤のみならず構造的に多様な薬剤に対しても耐性化することを見い出した。

B. 研究方法

HEX1 promoter/*CDR1* ORF を挿入したベクター・プラスミドを作り、これで *C. albicans* のフルコナゾール感受性 *CDR1* 破壊株（日本ロシュから分与）を形質転換して、*HEX1* promoter/*CDR1* ORF が染色体に組み込まれた株 FL3 を得た。対象としてはベクターのみの形質転換株 DL1 を用いた。*HEX1* promoter は *C. albicans* の *N*-acetylhexosaminidase をコードする遺伝子 *HEX1* のプロモーターで、培地の炭素源を変えることにより下流の遺伝子発現を制御できる。即ち、グルコースによる抑制と *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc) による発現誘導である。

C. 研究結果

CDR1 破壊株、その親株 CAI4 および DL1 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、FL3 のアゾール剤に対する感受性は親株、破壊株、DL1 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 FL3 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、図１のように *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 FL3 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。図２に示したように FL3 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 FL3 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。

D. 考察

以上のことから、FL3 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。

E. 結論

C. albicans の *CDR1* を破壊すると菌はアゾール剤に対して著しく感受性となり、*CDR1* 遺伝子を戻すとアゾール剤のみならず、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。

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

学会発表

新見昌一, FJ Fischer, 新見京子、高野幸枝、上原至雅、RD Cannon： *Candida albicans* 耐性遺伝子 *CDR1*-ポンプの発現制御と多様な基質特異性— 真菌症フォーラム 平成１３年２月　東京

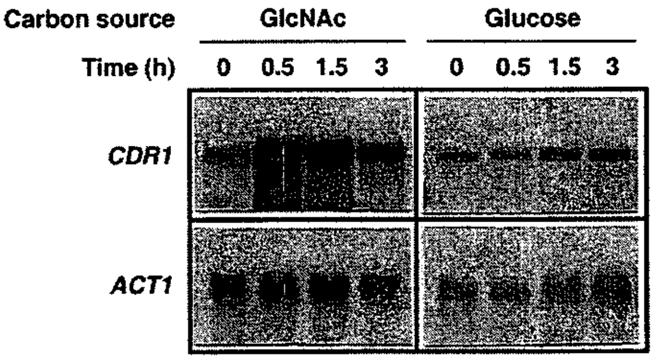


図1. *C. albicans* FL3 細胞の *HEX1* promoter による *CDR1* mRNA の発現調節。*ACT1* mRNA は発現コントロール。

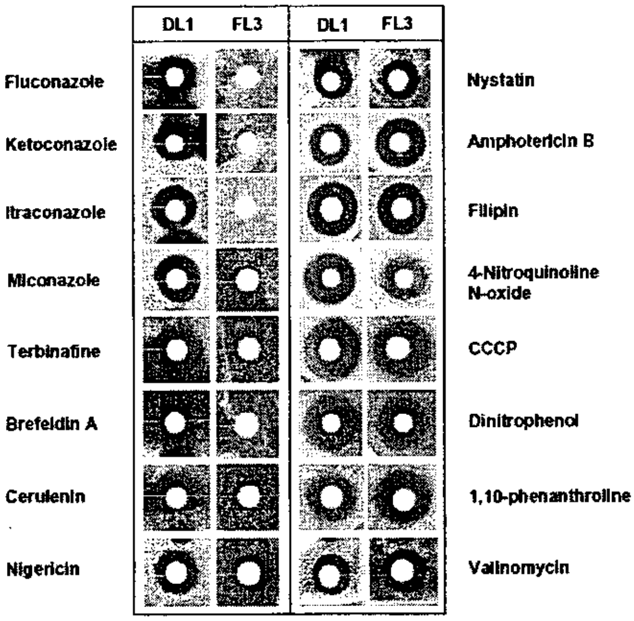


図2. Cdr1p を発現した *C. albicans* FL3 細胞および DL1（コントロール）細胞の種々の薬剤に対する感受性。

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

A. 研究目的

近年、カンジダ症などの深在性真菌症が、エイズ、悪性腫瘍患者や臓器・骨髄移植患者を中心に高頻度に発症しており、医療の先進・高度化に伴う日和見感染症としてきわめて憂慮すべき状況にある。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。

B. 研究方法

まず、大腸菌の *ori*、アンピシリン耐性遺伝子、*C. albicans* の *Ura3* マーカー、染色体への相同組換えに必要な *RP10* 遺伝子を含む環状プラスミドを構築した。さらに、*ACT1* 遺伝子のターミネーターおよび 3 種類のプロモーター（恒常的発現のための *ACT1* プロモーター、マルトースの添加で誘導可能な *MAL2* プロモーター、メチオニンの添加で抑制可能な *MET3* プロモーター）をそれぞれ挿入し、3 種類のベクターを構築した。クローニング部位として、8 塩基認識制限酵素である *Sse*8387I および *Fse*I を含む 5 種類の制限酵素部位を導入し、さらに、発現を確認するのに有用な FLAGtag が発現された蛋白の C 末端に融合されるような配列を挿入した（図）。このベクターを評価するためにルシフェラー
ゼおよび薬剤排出ポンプ Cdr1p を発現させ、それぞれの活性を測定した。

C. 研究結果

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。

D. 考察・結論

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。今後はこのベクターを用いて様々な遺伝子を発現することによって、薬剤耐性への影響を調べ、薬剤耐性機構を解明していく予定であて、*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
る。

E. 健康危険情報

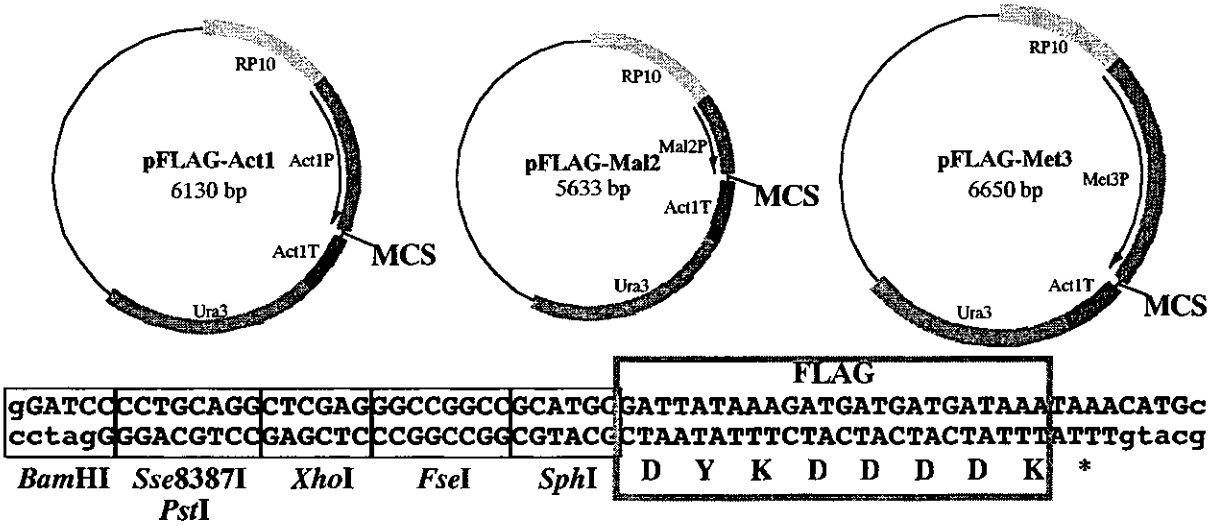
ない。

F. 研究発表

Umeyama T, Nagai Y, Niimi M, Uehara Y (2002) Construction of FLAG tagging vectors for *Candida albicans*. YEAST:(in press)

H. 参考文献

なし。



III. 真菌の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索

A. 研究目的

生物の細胞膜には様々な transporter が存在している。これらの transporter の生理的な役割は多岐にわたるが、そのうちのあるものはエネルギー依存的に働き、細胞にとって有害な物質を細胞外に汲み出すポンプの役割を果たしている。真菌においても例外ではなく、細胞膜に局在する transporter の機能が亢進するとフルコナゾールなどのアゾール系抗真菌剤を細胞外に排出し、その結果アゾール剤耐性を獲得する。フルコナゾール耐性 *C. albicans* 臨床分離株が頻繁に分離されるようになり、それらの耐性株のほとんどは ABC transporter が亢進していることが分ってきた。

真菌はヒトの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。

B. 研究方法

ポンプ機能の解析のために昨年と同様の手法により *C. glabrata* の ABC transporter である *CgCDR2* を *S. cerevisiae* AD 株に導入し、AD/*CgCDR2* 株を作製した。

スクリーニングの評価系としては、Prof. Andre Goffeau (Unitede Biochimie Physiologiquw, Universite de Louvain, Belgium) および Dr Brian C Monk (Molecular Microbiology Laboratory, University of Otago, New Zealand) が作製した *S. cerevisiae* OE 株を用いた。この株は *S. cerevisiae* の薬剤排出ポンプ Pdr5p が過剰発現してフルコナゾールに高度耐性 (MIC = 600 μg/ml) となった変異株である。昨年度は *Streptomyces* 属菌 1357 株の培養ろ液のうち 1 株の培養ろ液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ので、７８０F の解析を行なった。

C. 研究結果

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１７０kDa の蛋白が過剰に発現していた。AD 株、ベクターのみを挿入した AD/pSK-PDR5 株、AD/*CDR1* 株、AD/*CDR2* 株、AD/*CgCDR 1* 株及び AD/*CgCDR2* のフルコナゾールに対する感受性を Fig.1 に示した。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、図 3 のように *S. cerevisiae* OE 株を著しく感受性化した。

D. 考察

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。今後は *C. albicans* や *C. glabrata* のポンプを発現しフルコナゾール耐性を獲得した *S. cerevisiae*AD 株に対する効果ならびにフルコナゾール耐性臨床分離株に対する効果、さらに今後はポンプ ATPase の阻害効果、ローダミン排出の阻害効果の有無を検証する。

E. 結論

Streptomyces 属菌の培養ろ液の中にフルコナゾール存在下でフルコナゾール耐性菌の増殖を阻止する培養ろ液 780F が見い出された。780F は構造決定により Questiomycin A と判明した。Questiomycin A をフルコナゾールと併用することにによって、*S. cerevisiae* OE 株を著しく感受性化した。

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

ない。

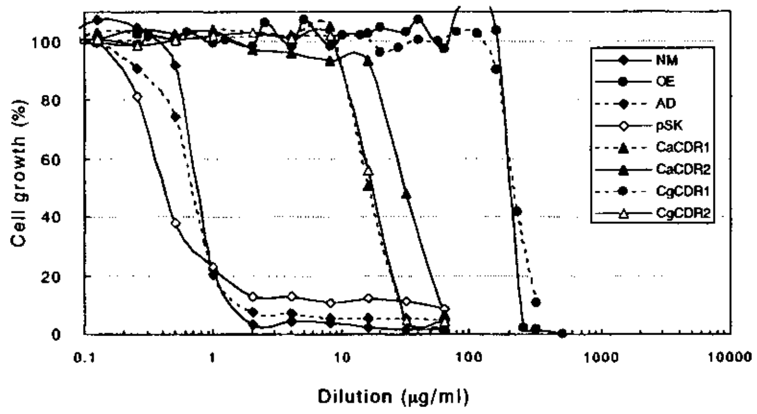
H. 参考文献

Albertson, G. D, Niimi, M., Cannon, R. D. and Jenkinson, H. F. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40, 2835-2841 1996.

Maebashi, K., Niimi, M., Kudoh, M., Fischer F. J., Makimura, K., Niimi, K., Piper, R. J., Uchida, K., Arisawa, M., Cannon, R. D., Yamaguchi, H. Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 47, 527-536, 2001.

Nakamura, K., Niimi, M., Niimi, K., Yates, J. E.. Decottignies, A., Monk, B. C., Goffeau, A. and Cannon, R. D. Functional expression of the *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45, 3366-3374, 2001.

Fig. 1. Fluconazole sensitibity of *S. cerevisiae* expressing an efflux pump



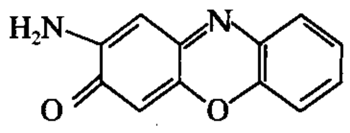
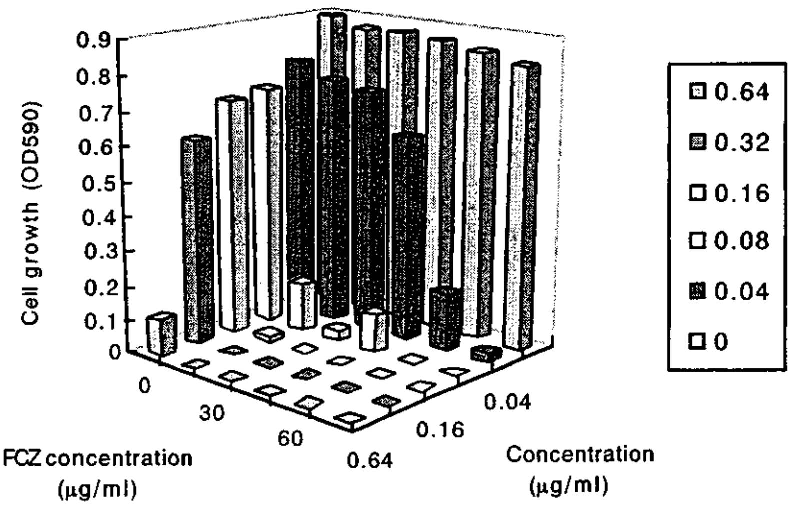


Fig. 2. Questiomycin A

Fig. 3. Chemosensitisation of *S. cerevisiae* OE strain with questiomycin A



厚生省科学研究費補助金（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

輸入真菌症の診断法の研究
（模型航空世界選手権の参加者における*Coccidioides immitis*暴露に関する追跡調査）

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

代表的な輸入真菌症であるパラコクシジオイデス症の診断法の開発を目的として、血液のPCR法による診断法を開発するとともに、本症に初めて（1→3）-β-D-グルカン測定法を応用し、これらを比較検討した。また、米国における模型飛行機競技会参加者にコクシジオイデス症が多発した事件に関連し、わが国からの参加者に対する追跡調査を行なった。

I．パラコクシジオイデス症診断法の開発

A. 研究目的

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。

1．パラコクシジオイデス症患者血清を用いてPCR法で*gp43*遺伝子の検出を試みる。

2．実験的に*P. brasiliensis*を感染させたマウスの血漿を用いて，PCR法による*gp43*遺伝子検出と(1→3)-β-D-glucan 検出キットを比較する。

B. 研究方法

1．菌株：PDAにて室温で継代していたPb-18株(IFM41612)を1％グルコースBHI寒天培地に接種し、35℃にて5日間培養して酵母形に変形させた後、生理食塩水で5 x 10^6 cells/mlに調整し、感染に用いた。

2．マウス：ddYマウス，♂，5週齢

3．感染：*P. brasiliensis* の菌液を0.2 ml ずつマウスの静脈内に接種した（10^6 yeasts/mouse）。0，6、12、24、48、72 時間後および5、7、10、14、17、21、24、28，56 日後、屠殺して脳、心、肺、肝、脾、腎および血液を採取した。各臓器は10％ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋して標本を作製した。標本はHE、PASにて染色し、検鏡した。

血液培養：ヘパリン化した注射器にてマウスの心臓から採血を行ない、100 mcl はBHI寒天プレートにて35℃ で 2週間 培養し、残りは直ちに血漿を分離し保存した。

4．患者：パナラ州ロンドリーナ大学病院で診断されたパラコクシジオイデス症の患者20名を対象とし、採血の後、血清を分離して、保存した。

5．*gp43* 遺伝子の検出

DNA の抽出は、血漿および血餅から DNA extraction kit (Gen Toru Kun、宝酒造、大津市) を用いた。2.5 mlのDNA を の 4.5 mM MgSO4を含む10 x buffer、d-NTPs（2 ml）、10 pM primer set（2 ml）、Taq polymerase (0.125 ml、TaqTM、宝酒造)と混合した。１回目のPCRに用いたprimerは MAE (5'-TGC TGC GGC GGG GTT AAA CCA TGT C-3') および ATO (5'-GTT GTG GTA TGT GTC GAT GTA GAC G-3')、２回目のPCR は、F2 (5'-GTC TGG GCC AAA AAC TCA AAT C -3') と R2 (5'-TGG TAT GTG TCG ATG TAG ACG T-3')、３回目は F3 (5'-GCC AAA AAC TCA AAT CTG AGG G-3') と R3 (5'-GTC GAT GTA GAC GTT CTT GTA T-3')を用いた。94℃ 4 分のdenaturationののち、PCR Thermal Cycler MP (宝酒造)を用いて、40 回の増幅（94℃、2 分、55℃、2 分、72℃、2 分）を行い，さらに72℃ 10分のextension を行った。２回目および３回目の増幅は、2 ml の PCR 産物を templateとた。最終的に得られたPCR 産物は1.0% agarose gelsを用いて TBE buffer内で 泳動し，ethidium bromideで染色した。３回目のPCR産物は direct DNA sequencing を行い、*gp43* 遺伝子の 746番 から 1208番の 塩基に相当する部分の塩基配列を調べた。

また、RPMI 1640にて調整した10^6-10^4個の *P. brasiliensis* を 10^6個のマウス腹腔マクロファージと混合し、5%のマウス血清を添加し、37℃ CO_2インキュベーターにて 24 時間培養した。その後、同様のキットを用いて DNAを抽出した。コントロールは RPMI 1640 で調整した 10^6、10^5 および 10^4 個の *P. brasiliensis* を用い、PCR法による遺伝子の検出感度を比較検討した。*P. brasiliensis* 単独で行なった場合の検出感度は、10^6 個および10^5 個であった。マクロファージと混合した場合は、10^4個であった。ヒトにおける検討は、慢性肺パラコクシジオイデス症の患者 20 名および健常人3名の血清を用いて行なった。

なお、今回用いた PCR 系は、*Histoplasma capsulatum*、*Blastomyces dermatitidis*、*Sporothrix schenckii*、*Penicillium marneffei* などの病原真菌と反応しないことが確認されている。

6．(1→3)-β-D-glucan の測定

(1→3)-β-D-glucan の測定は G-test TE（生化学工業）を用いプレートリーダーにて測定した。

7．統計解析

血中(1→3)-β-D-glucan濃度はコントロール群、患者群との間で、non-parametric Mann-Whitney testにより検定した。２回目、３回目のPCRとβグルカン法における陽性率の相違は、chi-square 法により検定した。いずれも $p<0.05$を有意と判定した。

C. 研究結果

各臓器の病理疎組織学所見を示す(表２)。感染早期（12 時間以内）では、PAS 陽性の酵母が既に認められ、ghost 様の真菌が肺内に散在していた。多形核白血球は12時間後には肺に出現していた(図. 1a)。肺では肉芽腫形成は５日目から出現し、17 日目には明かとなった。脳や心においても酵母の存在が確認された。肝、腎、脾といったほかの臓器では、感染早期においては感染の徴候はほとんど認められなかったが、７日後には明らかになった。脳や、心、肝における肉芽腫形成は７日後から認められるようになり、17 日目には明かとなった。脾における真菌細胞を伴わない巨細胞の出現は、感染後５から 14 日を要し、真菌細胞を伴った肉芽腫形成は 17 日目から明かとなった。脳 (図.1b)、心 (図. 1c)、肺 (図. 1d) における病変は感染後 56 日まで持続した。

血液培養、PCR法、(1→3)-β-D-glucan を比較すると、以下のようなことが明かとなった。即ち、血液培養陽性所見は７日間以内に５匹中 ２匹のマウスで認められた。PCR法 では、1回目は血餅、血漿の何れもの検体からもバンドを検出しえなかった。しかし２回目では、血漿からは検出できなかっ

たが、 *gp43* 遺伝子 が血餅 78 検体中 49 検体から検出された。3回目のPCR法では *gp43* 遺伝子が全ての血餅から、また 血漿では、 78検体中28検体から検出された (表 3、 図. 2)。 慢性パラコクシジオイデス症の患者血清 20 検体中 5 検体で、 3 回目のPCRにて陽性が確認された。3回目の PCRにて確認されたsequenceは GenBank accession numbers ABO 47691 （動物実験）ABO47692 （臨床検体）と同一のものであることが確認された。

血漿(1→3)-β-D-glucan は、感染直後は全例陽性であったが、その後は個体差が大きかった。 感染直後から7日目までの値はコントロール群の値に比べ、有意に高かった（$p < 0.05$、 non-parametric Mann-Whitney test）。(1→3)-β-D-glucan 法の感度は、血餅を用いた nested PCR 法（2回目および3回目）よりも劣っていた。（$p < 0.001$)。ただし、血漿では（1→3）-β-D-グルカンと3回目のPCRとの間に有意差は認められなかった。

D. 考察

パラコクシジオイデス症の血清診断としては、抗体検出法が用いられることが多い。しかし、感度に問題があることが知られている。これを克服するため、 *P. brasiliensis* の可溶性抗原あるいはDNA の検出が試みられてきた。今回の研究では、まず 感染したマウスの血餅から nested PCRにより *P. brasiliensis* に特異的な *gp43* 遺伝子 の検出を試み、血液培養陰性のマウスでありながら、グルカン検出法に比し高い感度で検出できることが明かとなった。さらに、病理組織学的検査にて肺、心、脳では、単核球浸潤を伴わない肉芽腫の内部に変性した無数の菌の存在が明かとなった。また、巨細胞のない肉芽腫と単核球浸潤が、感染マウスに認められた。 生体防御機構により真菌が変性したしたためPCR法の陽性率が向上した可能性が考えられたが、実際、マクロファージと *P. brasiliensis* を混合培養すると、明らかに感度が上昇した。すなわち *P. brasiliensis* がマクロファージにより傷害されたため、DNA が培養液中に流出したものと考えられた。このように生体防御機構がDNAの検出に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、血餅中の感度が高かったことより、血餅中の白血球内に、真菌のDNAが破壊された状態で取り込まれている可能性も考えられよう。Goldiani、 Sugerらも、DNA 抽出法の相違による DNA 検出能力の違いについて検討しているが、我々の検出系では、3 回の PCR を施すことにより、検出感度は2回目の60.3% (49/78) から 100% (78/78) へと上昇し、実際に20名の患者のうち5名から gp43 geneの検出に成功した。

パラコクシジオイデス症におけるグルカン測定を試みた報告はない。そこで感染マウスを用いて、(1→3)-β-D-glucan値を測定してみたところ、感染直後から7日までは、有意な上昇が認められた。(1→3)-β-D-glucan 値測定は PC R法に比べて感度が低かったが、測定自体が迅速に済むというメリットがある。培養は少なくとも3週間が必要であり、PCR 法は DNA 抽出を含めて24 時間が、必要であるが、これに対して、(1→3)-β-D-glucan 測定は1時間以内に終了できることを考慮すると、(1→3)-b-D-glucan 測定もパラコクシジオイデス症と腫瘍性病変との鑑別診断において重要な役割を果たしえるものと考える。

E. 結論

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い。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Detection of the *gp43* gene and (1→3)-β-D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice Jpn J Med Mycol 43：29-35、2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし