

II. 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

A. 研究目的

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年度模型航空世界選手権（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（表1）。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。

B. 研究方法 方法

日本人は全国各地から20名が参加していた。うち19名について、全国6カ所の病院にて診察、検査（胸部X線写真、一般血液検査、抗体測定など）を行なった（注1）。血清中の抗 *Coccidioides immitis* 抗体は、千葉大学真菌医学研究センターでID法にて測定した。

注1：日本人参加者は計20名であったが、うち1名は帰国後間もなくして他病死した。このためこの症例については、詳細な検討がなしえなかったが、明らかなコクシジオイデス症の発症は認められていない。

C. 研究結果

1. 参加者の背景

・男性：女性 12：7

・年齢 25歳～68歳

・参加形式 マネージャー、選手、サポーター、観客

2. 検査結果

感染を疑わせる症状の見られたことのある例数：0/19名

胸部X線写真異常例数：1/19名（注2）

抗体陽性者：0/19名→現時点で明らかな感染者は認められていない

注2：この異常陰影は、コクシジオイデス症に由来する可能性は低く、非活動性の病変が疑われている。

3. 現在の追跡状況：

このように現時点では明らかな感染例は認められていないが、日本人19名について、ひきつづき定期的な追跡調査を実施中である。今後も、慎重な調査・追跡が必要と思われる。

4. 各国参加者における感染状況患者（表1）

参加者 322名(+α)（注3）

参加国 30カ国（欧州24カ国+オーストラリア、ニュージーランド、カナダ、日本、イスラエル、アルゼンチン）

患者発生状況 英国人1名（1/33）、フィンランド人1名、オーストラリア人1名（疑診）、ニュージーランド人1名（疑診）

このように、現時点で、確診例2名、疑診例2名であるが、現在、各国で調査が進んでおり、今後増加する可能性がある。

注3：正式な参加者以外にも、参加者の家族などが競技会に臨んでいるため、当日何人が会場にいたかなど正確な数は不明。

D. 考察

競技会が行われたベーカーズフィールド周辺は、カリフォルニアの中でもコクシジオイデス症の多発地帯として知られている。参加者は強風の中、屋外の砂地で連日競技を行っており、これがoutbreakに結びついたものと思われる。

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。この原因としてはさまざまな要素が考えられるが、原因の一つとして、日本人参加者の暴露が少なかった可能性が考えられる。すなわち、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、医療体制はが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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

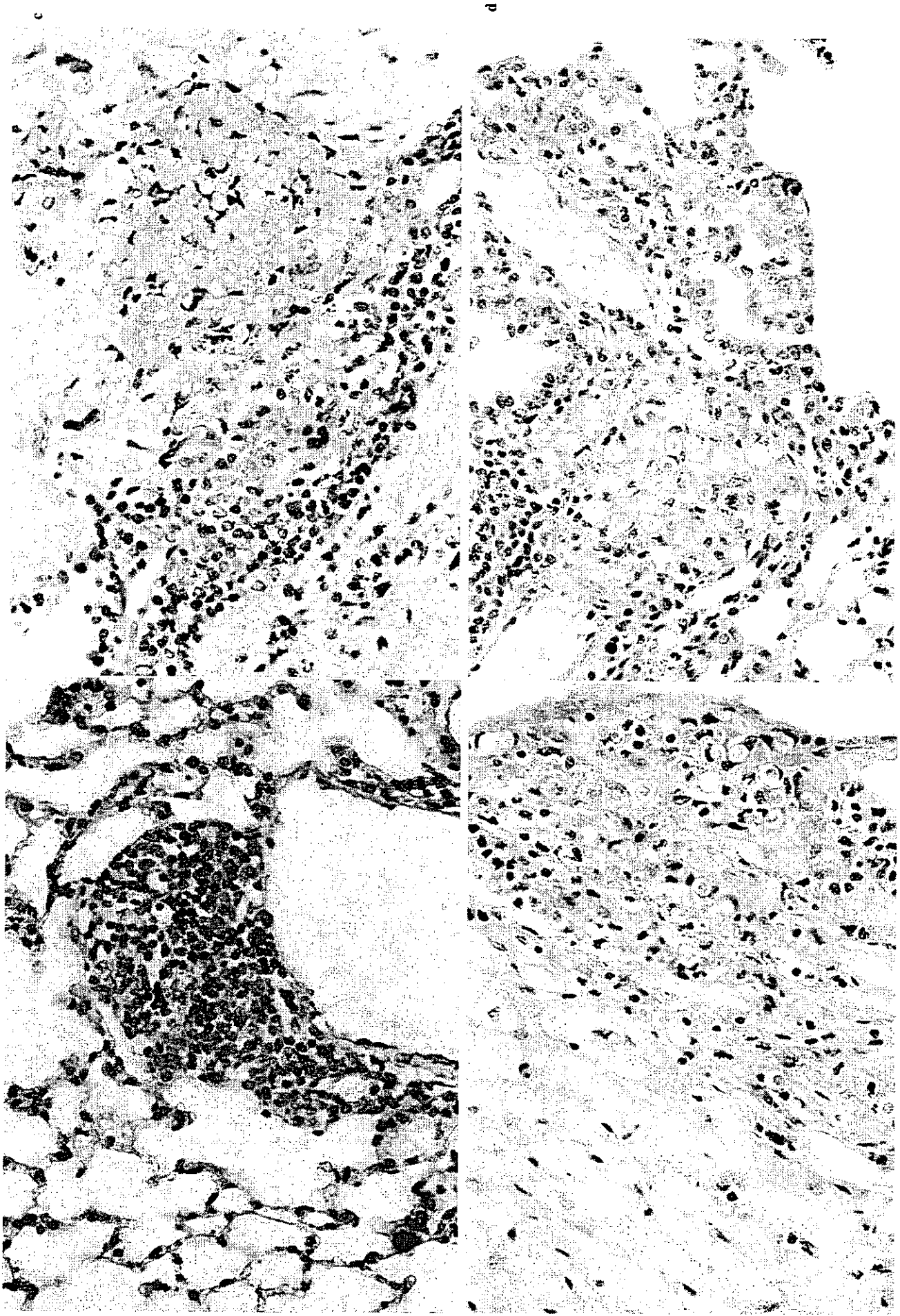


図1：感染12時間後の肺 (a, PAS x200)。著しい細胞浸潤を認める；感染56日後の諸臓器では、肉芽腫形成が認められ、心、脳の一部では、無数の真菌が厚膜性病変を形成している (b；脳、c；心、d；肺)

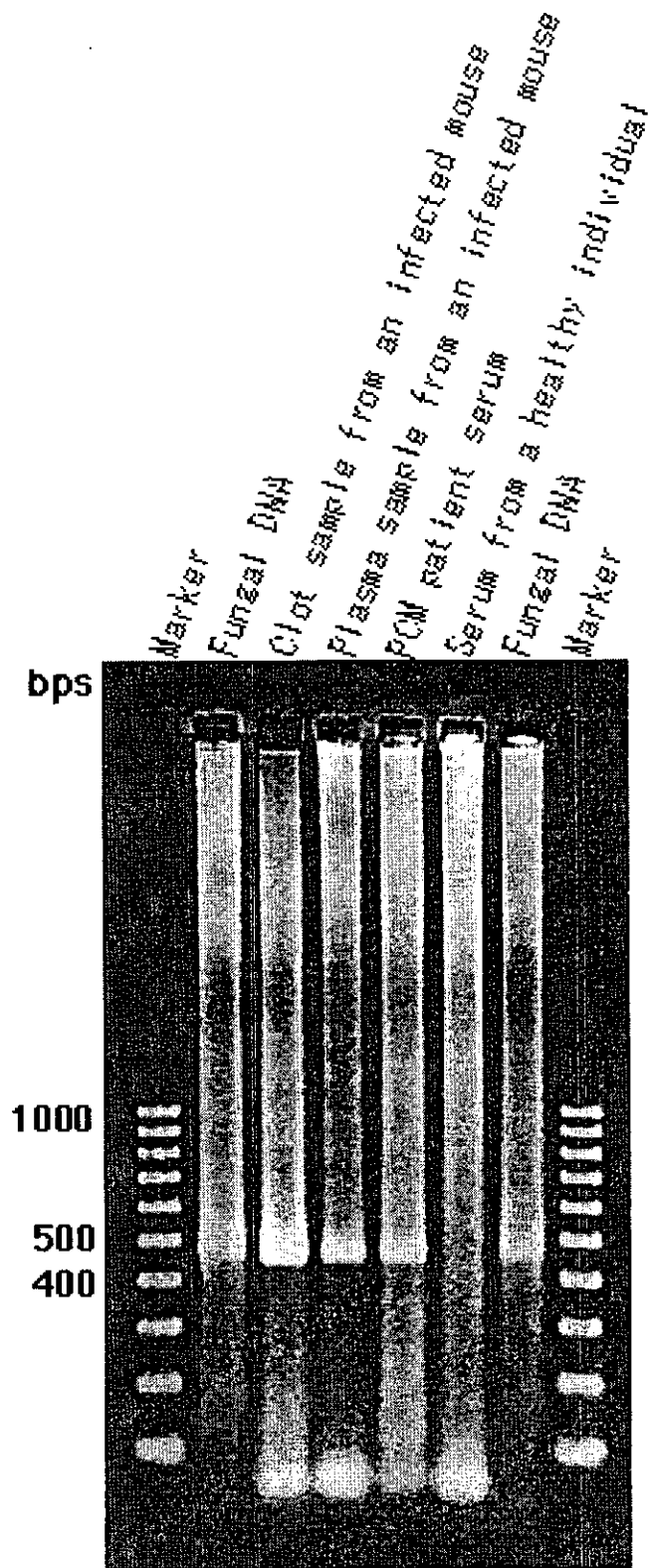


図 2 : 3 回目の PCR 後の電気泳動像

*

表 1. パラコキシジオイデス症患者におけるPCR法の成績

No.	年齢	性別	最終日	生検	DI*	ELISA	病型	PCR
1	62	男性	1995.5.21	+	-	+	慢性	+
2	64	男性	1997.10.15	施行せず**	+	+	慢性	-
3	11	女性	1997.7.21	+	+	+	慢性	-
4	53	男性	1999.3.24	施行せず	+	+	慢性	-
5	45	男性	1999.1.12	施行せず	+	+	慢性	-
6	24	男性	1999.5.27	施行せず	+	+	慢性	-
7	54	男性	1999.5.27	施行せず	+	+	慢性	-
8	38	男性	1999.8.5	+	+	+	慢性	+
9	47	男性	1999.10.13	+	+	+	慢性	+
10	49	男性	1999.10.13	+	+	+	慢性	-
11	73	男性	2000.8.24	施行せず	+	+	慢性	-
12	65	男性	2000.10.4	施行せず	+	+	慢性	-
13	63	男性	1998.8.1	施行せず	+	+	慢性	-
14	67	男性	1998.7.1	施行せず	+	+	慢性	-
15	23	男性	1998.8.6	施行せず	+	+	慢性	-
16	49	女性	1999.3.31	+	+	+	慢性	-
17	64	男性	1997.7.24	施行せず	+	+	慢性	-
18	54	男性	1999.5.17	施行せず	+	+	慢性	+
19	42	男性	1999.6.30	施行せず	+	+	慢性	+
20	34	男性	1999.5.4	施行せず	+	+	慢性	-

*: double immunodiffusion test

** : 喀痰中に真菌陽性

表 2. *Paracoccidioides brasiliensis* 感染マウスの病理所見

感染後 経過時間	マウス匹数	脳		心		肺		肝		脾		腎	
		FC	IR	FC	IR	FC	IR	FC	IR	FC	IR	FC	IR
Control	4	0/4	なし	0/4	なし	0/4	なし	0/4	なし	0/4	なし	0/4	なし
0 hour	5	0/5	なし	0/5	なし	0/5	なし	0/5	なし	0/5	なし	0/5	なし
6 時間	5	1/5	なし	0/5	なし	3/5	CI	0/5	なし	0/5	なし	0/5	なし
12 時間	5	0/5	なし	0/5	なし	4/5	CI	0/5	なし	0/5	なし	0/5	なし
24 時間	5	1/5	なし	0/5	なし	4/5	CI	0/5	なし	0/5	なし	0/5	なし
48 時間	5	2/5	CI	4/5	CI	5/5	CI	0/5	CI	0/5	なし	0/5	なし
72 時間	5	2/5	CI	4/5	CI	5/5	CI	0/5	CI	0/5	なし	0/5	なし
5 日	5	4/5	CI	5/5	CI	5/5	CI	0/5	CI	0/5	G-cell	0/5	なし
7 日	5	5/5	CI	5/5	G	5/5	G	1/5	G	0/5	G-cell	0/5	なし
10 日	5	5/5	G	4/5	G	5/5	G	0/5	G	0/5	G-cell	0/5	なし
14 日	5	5/5	G	5/5	G	5/5	G	0/5	G	0/5	G-cell	0/5	なし
17 日	5	5/5	G	2/5	G	5/5	G	4/5	G	1/5	G	0/5	G
21 日	5	5/5	G	4/5	G	5/5	G	0/5	G	0/5	G	0/5	G
24 日	5	5/5	G	5/5	G	5/5	G	3/5	G	4/5	G	4/5	G
28 日	5	5/5	G	5/5	G	5/5	G	0/5	G	4/5	G	0/5	G
56 日	8	8/8	G	8/8	G	8/8	G	4/8	G	4/8	G	1/8	G

FC: PAS陽性の真菌細胞の出現

IR: 炎症反応

CI: マクロファージおよび多形核白血球による細胞浸潤.

G: 肉芽腫形成

G-cell: 巨細胞

表3. *Paracoccidioides brasiliensis* 感染マウスにおける血液培養、PCR法、(1→3)-beta-D-glucan検出法の比較

感染後 経過時間	マウス匹数	Ratio	血液培養 Mean+SD	gp43 gene陽性				(1→3)-b-D-glucan陽性	
				1 st	2 nd	3 rd	3 rd pl	Ratio	Mean+SD (mg/ml)
Control	4	0/4	0	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	3.8+2.2
0 hour	5	5/5	>100	0/5	1/5	5/5	3/5	5/5	126.0+40.3*
6 hours	5	5/5	28.2+20.4	0/5	2/5	5/5	5/5	1/5	37.1+50.4*
12 hours	5	4/5	4.2+2.9	0/5	4/5	5/5	3/5	2/5	17.9+11.6*
24 hours	5	5/5	6.0+1.0	0/5	1/5	5/5	1/5	3/5	47.1+48.5*
48 hours	5	4/5	3.6+2.1	0/5	2/5	5/5	2/5	2/5	91.8+148.8*
72 hours	5	5/5	2.4+1.1	0/5	5/5	5/5	1/5	2/5	31.8+30.2*
5 days	5	2/5	1.0+1.4	0/5	4/5	5/5	3/5	3/5	30.1+21.3*
7 days	5	2/5	0.4+0.5	0/5	2/5	5/5	1/5	1/5	36.6+52.4*
10 days	5	0/5	0	0/5	4/5	5/5	0/5	1/5	21.0+39.4
14 days	5	0/5	0	0/5	4/5	5/5	2/5	1/5	11.6+20.3
17 days	5	0/5	0	0/5	2/5	5/5	2/5	2/5	161.5+321.5
21 days	5	0/5	0	0/5	4/5	5/5	1/5	0/5	4.9+4.1
24 days	5	0/5	0	0/5	3/5	5/5	1/5	0/5	3.7+4.0
28 days	5	0/5	0	0/5	5/5	5/5	2/5	2/5	24.2+41.2
56 days	8	0/8	0	0/8	6/8	8/8	1/8	1/8	15.1+30.3

SD: 標準偏差

*: コントロール群に対し有意差あり, P<0.05

Pl: 血漿からDNA 抽出

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

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。

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い。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、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

関東近郊を中心とした 17 施設（東京女子医科大学病院、東京大学医学部附属病院、社会保険中央病院、順天堂大学医学部附属病院、日本大学医学部附属病院、東京慈恵会医科大学附属病院、東海大学医学部附属病院、北里大学医学部附属病院、聖マリアンナ医科大学附属病院、横浜市立大学医学部附属病院、東京厚生年金病院、慶応大学医学部附属病院、NTT 東日本関東病院、千葉大学医学部附属病院、帝京大学医学部附属病院、埼玉医科大学附属病院、国立神戸病院）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。得られた菌株は東京女子医科大学にて生化学的ならびに分子遺伝学的手法による再同定を行なった。

(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

真菌血症の発生頻度

2002年2月28日現在までに回収された真菌症菌株は約400株で、このうち同一患者検体を除いた血液培養由来株が189株あった。調査票は172名の患者分について回収され、この分について、解析を行なった。

患者背景

172名の真菌血症の患者背景を表1に示す。男女比は2:1で男性に多く、年齢分布は平均63.4歳と高齢者での発症が多かった。診療科では外科系、内科系がほぼ同数であった。外科では消化器外科が29例と最も多かった。

Table 1. Patient background with fungemia

Patient background	Data
Male:Female	2:1
Age, range	0-89
Age, mean ± SD	63.4 ± 19.5
Age over 60 (%)	76.5
Clinic	
Surgery related (%)	45.8
Medicine related (%)	54.2

基礎疾患について表2に示す。固形腫瘍が36例と最も多く、血液悪性疾患は11例にとどまっていた。

Table 2. Underlying diseases and conditions with fungemia

Characteristics	Number	%
Solid tumors	36	20.9
Neutropenia (<3000)	14	8.1
Neurological diseases	13	7.6
Hematological malignancies	11	6.4
Bacterial infections	10	5.8
Cardiovascular diseases	9	5.2
Diabetes	9	5.2
Gastrointestinal diseases	7	4.1
Others	6	3.5
Respiratory diseases	5	2.9
Renal failure	4	2.3
Autoimmune diseases	3	1.7
Burns	3	1.7
Endocrine diseases	3	1.7
Trauma	3	1.7

検査成績について、表3に示す。白血球数が3000未満の neutropenia は14名にとどまり、むしろ10000以上を呈した症例が72名と多かった。

Table 3. Laboratory data of patients with fungemia

Tests	Range	Mean ± SD
WBC (/mm ³)	100-30200	9879 ± 5751
RBC (X10 ⁶ /mm ³)	146-487	314 ± 65.3
Hemoglobin (g/dl)	5.0-15.5	9.7 ± 2.1
Hematocrit (%)	14.3-47.0	29.5 ± 6.1
Platelet (X10 ⁴ /mm ³)	0.6-184.0	23.3 ± 20.9
CRP (mg/dl)	0.1-34.4	9.6 ± 7.1

深在性真菌症の補助診断として、β-D-glucan, D-arabinitol, Candi-tec, galactomannanなどが用いられているが、今回の調査で10例以上に使用され

ていたのは β -D-glucan, Candi-tec であった。その実施状況、陽性率を表 4 に示す。 β -D-glucan, の実施数は 65 例で、陽性率も 73.8%と高いが、実施率は 38%にとどまっており、主治医が当初から真菌血症をあまり想定していなかったことがうかがえる。

Table 4. Serodiagnostic tests of patients with fungemia

Tests	No.of patients tested	%patients tested	No.of positive	% positive
β -glucan	65	37.8	48	73.8
Candi-tec	22	12.8	13	59.1

検出真菌の分布

回収された 189 株中、179 株 (94.7%) とほとんどが *Candida* 属であった。*Candida* の菌種では、*C.albicans* が 84 株 (44.4%) と最も多かったが、*Non-albicans* 全体では 95 株と、過半数を占めた。*Non-albicans* では *C.parapsilosis* が 47 株と多く、次いで *C.tropicalis*, *C.glabrata* で 3 菌種合わせる

Table 5. Species of fungi isolated in episodes of fungemia

	Number	%
<i>Candida</i> , total	179	94.7
<i>C.albicans</i>	84	44.4
<i>C.parapsilosis</i>	47	24.9
<i>C.tropicalis</i>	21	11.1
<i>C.glabrata</i>	21	11.1
<i>C.krusei</i>	2	1.1
<i>C.guilliermondii</i>	2	1.1
<i>C.lusitanae</i>	1	0.5
Unidentified <i>Candida</i> sp.	1	0.5
<i>Trichosporon asahii</i>	2	1.1
<i>Cryptococcus</i> , total	5	2.6
<i>C.curvatus</i>	3	1.6
<i>C.neoformans</i>	2	1.1
<i>Rhodotorula</i> sp.	2	1.1
<i>Fusarium solani</i>	1	0.5
Total	189	100.0

と 89 株とほぼ全体の半数に達していた。他の *Candida* sp.は最近注目されている *C.krusei* を含め、数株にとどまっていた。

Candida 以外の稀な真菌ではほとんど臨床報告の見られない *Cryptococcus curvatus* が 2 施設 3 名の患者から 3 株認められた。また、*Rhodotorula* が 2 名の患者から 2 株、糸状菌では *Fusarium solani* が 1 例から 1 株検出されていた。表 5 に結果を示す。

D. 考案

昨年度の深在性真菌症に関する全国アンケート調査で、真菌血症の頻度が減少していることを報告した。その理由として、最近導入が進んでいる血液培養自動検出システムの影響、血液内科などでスタンダードとなりつつある抗真菌剤の予防投与、医療法改正による病院検査室の撤廃、外注化など、真菌検査自体の衰退があげられた。今回の検討では、従来の報告に比べると血液疾患患者からの検出例が少なかった。予防投与などで真菌症が早期にコントロールされているか、薬剤の影響で真菌が検出されにくいだけなのか、その判断はできないが、いずれにしてもどの施設でも血液内科からの真菌症検出は減少しているものと思われた。基礎疾患で最も多かったのは固形腫瘍であり、それ以外にも様々な疾患が関与しており、病院内で発生した敗血症ではどのような基礎疾患を持っていても、常に深在性真菌症を念頭に置かねばならないと考えられる。

診療科としては外科系と内科系がほぼ半分ずつを占めていたが、特に外科系では消化器外科が多く、真菌症が検出される診療科が多様化している実態が浮かび上がってきた。血液培養と同時に測定された真菌症の血清診断は β -D-glucan が最も多く提出され、陽性率も 74%に達してい

たが、症例全体の実施率は 38%にとどまっております。血液培養を採取する時点、その後についてもあまり深在性真菌症を疑っていないか、深在性真菌症の検査についての認識が低い可能性が示唆された。

血液培養から検出される *Candida* 属のうち、近年アメリカなどで増加が指摘されているのが、*C.glabrata*, *C.krusei* などの fluconazole 耐性、低感受性菌であるが、本検討では *C.glabrata* は 21 株みられたものの、*C.krusei* は 2 株のみで、まだそれほど頻度は高くなかった。*C.albicans* に次いで分離が多かったのは *C.parapsilosis* で、これは他の *Candida* 菌種と比べると、内因感染よりも外因性のものが多く、中心静脈カテーテル感染との関係が深いとされる。今回の症例につき中心静脈カテーテルの使用状況を現在、調査中である。fluconazole の感受性は *C.albicans* に比べて悪いとされ、fluconazole 使用に伴い、増加傾向にあるとする報告がある。今回の分離率はアメリカよりもむしろ SENTRY program によるヨーロッパの多国、カナダの解析結果に近い。今後、抗真菌剤の使用状況や深在性真菌症の検出方法、臨床科の意識などと各国の真菌分離状況を比較する必要があるものと思われる。

近年、*C.albicans* や *C.tropicalis* での azole 系薬剤耐性が問題となってきている。今回の調査で収集された株の各種抗真菌剤に対する MIC は現在調査中であるが、preliminary には fluconazole の MIC が $>64\text{mg/L}$ を示すものが少なくとも *C.albicans* や *C.tropicalis* で数株存在することが示されている。引き続き解析を続けたい。

プロスペクティブな真菌血症発生動向調査はこれまでわが国ではほとんど行なわれて来なかった。今回検討された症例数、株数はそれほど多くはないものの、欧米等でのプロスペクティブスタディでもほぼ同等の報告が見られる。今

回明らかになった実態は、ある程度わが国の深在性真菌症の実態を反映するものと思われる、今後本研究調査を続行する意義が大きいものと考えられた。

深在性真菌症に対する認識は診療科によって大きく異なる。今回、予想以上に血液内科以外の診療科からの症例が多かったことから、潜在的な深在性真菌症、臨床現場で把握できていない深在性真菌症は相当数に上るものと見られる。臨床現場への深在性真菌症の適切な診断・治療の啓蒙・指導はわが国の医療現場の多様化に伴い、大きな意義を持つものと思われる。

近年、様々な耐性菌による院内感染が問題となっており、適切な対応が叫ばれている。その一方では院内感染監視の不備が指摘されながらも法改正により検査室が廃止、検査が外注化され、院内感染監視が行えなくなる等、ちぐはぐな対応も目に付く。真菌検査の質を保つことが困難な時代になりつつある。抗真菌剤の不適切な使用によっては、今後 MRSA や緑膿菌などと同じように院内感染の新たな起因菌として拡がる恐れもあるだけに、深在性真菌症の疫学、正確な情報を把握し、広く一般診療家に伝えることが非常に重要であり、本研究の使命の一つであると考えられた。

E. 結論

関東近郊を中心とした 17 施設にて 1 年間の真菌血症のプロスペクティブスタディを行なった。血液内科以外の診療科からの真菌血症の頻度が高くなっており、血液培養時に真菌症を想定していないと考えられる対応も目についた。菌株では *C.albicans* 以外の *Candida* 属が過半数を占めており、中でも *C.parapsilosis* が多い傾向が見られた。臨床現場への深在性真菌症の適切な診断・治療の啓蒙・指導のために、本研究は大

きな意義を持つものと思われ、研究の継続が必要である。

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. 参考文献

1. 論文発表

Malassezia sympodialis による中心静脈カテーテル感染症の1例.

医真菌学雑誌 42: 220-222, 2001. 菊池 賢、戸塚 恭一、藤代佳子、瀬下明 良、亀岡信吾、槇村浩一、山口英世.

わが国における深在性真菌症の現状と対策—発生動向に関するアンケート調査の解析から—.
Jpn.J. Antibiot. 54 448-472, 2001. 上原至雅、槇村 浩一、亀井克彦、鈴木和男、菊池 賢、新見昌 一.

存亡の危機に瀕する微生物検査室. Le Depart. 20: 2002. 6-9. 菊池 賢.

わが国における深在性真菌症の発生動向と問題点. BMSA. 13: 2002.2-5. 菊池 賢.

2. 学会での発表

国内 253 施設の過去 5 年間の真菌血症の推移.
第 45 回日本医真菌学会総会 (東京)、日本医 真菌学会雑誌 42 Suppl 1, 77, 2001. 菊池 賢、 新見昌一、上原至雅、鈴木和男、亀井克彦、 槇村浩一.

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 輸入真菌症起因菌の迅速同定システムの研究—本研究班、千葉大学亀井克彦博士他との共同研究—、Ⅱ 輸入真菌症遺伝子診断の研究、およびⅢ 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 13 年度の成果ならびにⅣ 業績を以下に報告する。

Ⅰ 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

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。

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、本邦において発症の報告があるコクシジオイデス症をはじめとした輸入真菌症起因菌 4 種（コクシジオイデス症起因菌：*Coccidioides immitis*、ヒストプラスマ症起因菌：*Histoplasma capsulatum*、パラコクシジオイデス症起因菌：*Paracoccidioides brasiliensis*、マルネッフェイ型ペニシリウム症起因菌：*Penicillium marneffeii*）に対する各々特異的 PCR 検出系を開発した。使用する PCR プライマーは、*P. marneffeii*、*P. brasiliensis* に関しては既報^{1, 2)}の配列が利用可能であったので、その信頼性を確認した。しかし、本研究班における主要研究課題であるコクシジオイデス症起因菌：*C. immitis*、

およびヒストプラスマ症起因菌：*H. capsulatum* に関しては使用可能な特異プライマーの報告が知られていないので、*C. immitis* に関しては千葉大学真菌医学研究センター保存株の塩基配列を決定し、新規プライマー対を設計した。また、*H. capsulatum* については DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている塩基配列を利用して新規特異プライマー対を設計した（図1）。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）病原診断を可能にした（図2）。

C. 研究結果

本研究で選択し、また設計した特異プライマー対を各種病原真菌 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（図3）。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。

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（図4）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

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、最も信頼性が高く、簡便性および迅速性に優れた分子生物学的手法による起因菌の検出同定系を検討した。

使用するPCRプライマーは既報のものを利用してその信頼性を確認すると共に、新規配列からの特異プライマー対の設計と検討を行

った。

以上の検討から、起因菌検出用の PCR プレミックスと DNA 抽出試薬のキットによる輸入真菌症起因菌 4 種の PCR 同定検出系が開発できた。

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

1. 植村浩一、村上有沙、亀井克彦、横山耕治、内田勝久、山口英世. 輸入真菌症起因菌遺伝子同定システムの研究. 2001 年 9 月 26 日 第 45 回日本医真菌学会総会, 千代田区、東京

II 輸入真菌症遺伝子診断の研究

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

本邦において広く利用されている、広範囲深在性真菌症診断用 PCR 法（図 5：東洋紡ジーンアナリシス）による増幅産物の塩基配列解析によって、輸入真菌症の診断を行う。

C. 研究結果

本邦においてヒストプラズ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）。

D. 考察・結論

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。

E. 健康危険情報

ない。

F. 研究発表

準備中である。

III 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

分散限局している医真菌研究・教育資料の効率的利用と、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、アドレス：<http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb/>）を作成してきた（図6）。インターネット上の情報提供による真菌症情報の普及が本研究の目的である。

B. 研究方法

多くの情報提供者の協力によって、輸入真菌症をはじめとした深在性真菌症の臨床写真、および病理像の提供が可能となった。これらのインターネット上の公開に対する、ユーザーの反応を期待する。

C. 研究結果

現在も多くの協賛を得て、順次データを更新中である。データ公開に対するユーザーの反応としては、本法において充分情報が提供されているとはいいがたい輸入真菌症の臨床像・病理像として、ヒストプラズマ症の画像

情報（図7）を提供しているが、これを参考にして臨床診断に至った例の報告を受けている。また外部評価としては、朝日新聞科学欄（図8）上で紹介された。

D. 考察

本データベースは現在世界各国から、1日に3000件程のアクセスを記録しており、好評を博している。今後より一層の情報拡張と改善に勤めたい。ただし、このようなボランティアデータベースは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続けたい。

E. 結論

オンライン環境を利用した医真菌研究者の共有的知的基盤の作成に成功し、実効を挙げている。

F. 健康危険情報

ない

G. 研究発表

1) 「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/>

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

3) 植村浩一：オンライン病原真菌データベース作成の試み，2001年4月3日 第74回日本細菌学会総会，岡山市，岡山

4) 植村浩一、渋谷和俊、加納壘、杉田隆、岩口伸一、前崎繁文、望月隆。オンライン病原真菌データベース：PFDB 2001。2001年9月26日 第45回日本医真菌学会総会，千代田区、東京

IV 平成13年業績リスト

学会発表

1. Makimura K. Medical Mycology in Space Generation. "Medical Mycology -Moving forward in the new millennium, 2001.1.15. National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Tokyo.
2. 植村浩一、渋谷和俊。オンライン病原真菌データベース作成の試み，2001年1月27日 真菌症フォーラム第2回学術集会，新宿，東京。
3. 植村浩一。深在性真菌症の実験室的診断法。2001年2月21日 平成12年度希少感染症診断技術研修会，厚生労働省結核感染症課・国立感染症研究所，新宿，東京。
4. 植村浩一。呼吸器真菌症に対する遺伝子診断・検査法の現状と可能性。招請シンポジウム-真菌検査法の最近の進歩-，2001年3月10日 第6回東京呼吸器真菌症研究会，千代田区，東京
5. 植村浩一：オンライン病原真菌データベース作成の試み，2001年4月3日 第74回日本細菌学会総会，岡山市，岡山
6. 村山そう明、山崎堅一郎、植村浩一、西山彌生、斧康雄、山口英世：Arxiozyma telluris 菌株間の多様性に関する解析。2001年4月3日 第74回日本細菌学会総会，岡山市，岡山
7. 安部茂、丹生茂、石橋弘子、植村浩一、西山彌生、斧康雄、山口英世：感染性微生物を含む飛沫の微小重力環境における動態の解析。2001年4月3日 第74回日本細菌学会総会，岡山市，岡山
8. 植村浩一。Malassezia 属菌種同定の現状と本菌研究の展望。皮膚真菌症 新世紀に向けて，2001年9月26日 第45回日本医真菌学会総会，千代田区、東京
9. 植村浩一、西山彌生、安部茂、内田勝久、山口英世。微小重力環境モデルとしての重力方向不定培養装置を用いた糸状菌の分生子形成および分生子発育能に与える影響の検討。2001年9月26日 第45回日本医真菌学会総会，千代田区、東京
10. 植村浩一、渋谷和俊、加納壘、杉田隆、岩口伸一、前崎繁文、望月隆。オンライン病原真菌データベース：PFDB 2001。2001年9月26日 第45回日本医真菌学会総会，千代田区、東京
11. 上原至雅、亀井克彦、菊池賢、植村浩一、鈴木和男、新見昌一。深在性真菌症に対する意識調査 アンケート調査の結果。2001年9月26日 第45回日本医真菌

学会総会，千代田区、東京

12. 菊池賢、新見昌一、上原至雅、鈴木和男、
亀井克彦、楳村浩一。国内253施設の
過去5年間の真菌血症の推移。2001年
9月26日 第45回日本医真菌学会総会、
千代田区、東京
13. 楳村浩一、村上有沙、亀井克彦、横山耕
治、内田勝久、山口英世。輸入真菌症起
因菌遺伝子同定システムの研究。2001
年9月26日 第45回日本医真菌学会総
会、千代田区、東京
14. 杉田知妹、楳村浩一、村上有沙、内田勝
久、山口英世、永井厚志。肺アスペルギ
ルス症起因菌の分子生物学的同定法の検
討。2001年9月26日 第45回日本医
真菌学会総会、千代田区、東京
15. 金子健彦、瀬川聡子、岡部省吾、楳村浩
一。表皮角層内に *Malassezia* 菌要素を認
めた悪性黒色表皮腫。2001年9月27
日 第45回日本医真菌学会総会、千代
田区、東京
16. 楳村浩一。深部真菌症あるいは全身性真
菌症の診断について。ケースフォーラム
1 深在性真菌症。2001年11月1日
第50回日本感染症学会東日本地方会総会
／第48回日本化学療法学会東日本支部総
会医真菌学会総会、文京区、東京

原著論文

1. 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.
2. Maebashi K, Niimi M, Kudoh M, Fischer FJ,
Makimura K, Niimi K, Piper RJ, Uchida K,
Arisawa M, Cannon RD, Yamaguchi H:
Mechanisms of Fluconazole Resistance in
Candida albicans Isolates from Japanese AIDS
Patients. *J Antimicrob Chemoth* 47(5): 527-536,
2001.
3. 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): 357-363, 2001.
4. Iwaguchi S, Sato M, Magee BB, Magee PT,
Makimura K, Suzuki T: Extensive
chromosome translocation in a clinical isolate
showing the distinctive carbohydrate
assimilation profile from a candidiasis patient.
Yeast 18(11):1035-1046, 2001.
5. Tsunemi T, Kamata T, Fumimura Y, Watanabe
M, Yamawaki M, Saito Y, Kanda T, Ohashi K,
Suegara N, Murayama S, Makimura K,
Yamaguchi H, Mizusawa H:
Immunohistochemical diagnosis of
Cryptococcus neoformans var. *gattii* infection
in chronic meningoencephalitis: the first case

in Japan. Intern Med 40(12):1241-1244, 2001.

総説・著書

1. 榎村浩一. 真菌症に対する分子生物学的アプローチ. 臨床と微生物 28(1):124-125, 2001.
2. 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(2):61-67, 2001.
3. 望月隆、杉田泰之、榎村浩一、Jeong Aee Kim, 加納壘、高橋一郎、Charles N. Okeke, 河崎昌子. 皮膚糸状菌への分子生物学の応用. 日本医真菌学会雑誌 42(2): 81-86, 2001.
4. 上原至雅、榎村浩一、亀井克彦、鈴木和男、菊池賢、新見昌一. わが国における深在性真菌症の現状と対策-発生動向に関するアンケート調査の解析から-. The Japanese Journal of Antibiotics 54(8): 448-472, 2001.
5. 榎村浩一、杉田知妹、村上有沙、山口英世、永井厚志. 生前喀痰分離株と剖検肺分離株の同一性が分子生物学的に示唆されたアスペルギローマの1例. 分子呼吸器病 5(5):467-471, 2001.
6. 村上有沙、榎村浩一、林谷陽子、田尻義人、内田勝久、山口英世. 特異的 PCR プライマーを用いた *Malassezia* 属菌種の迅速同定システム. 日本医真菌学会雑誌 42(4):211-213, 2001.
7. 菊池賢、藤代佳子、戸塚恭一、瀬下明良、亀岡信吾、榎村浩一、山口英世. *Malassezia sympodialis* による中心静脈カテーテル感染症の1例. 日本医真菌学会雑誌 42(4):220-222, 2001.
8. 榎村浩一. 病原真菌研究に与える分子生物学的分類・同定法のインパクト. BMSA 会誌 13(3):2-6, 2001.

図 1

rDNA における輸入真菌症起因菌 同定用特異プライマーの標的領域

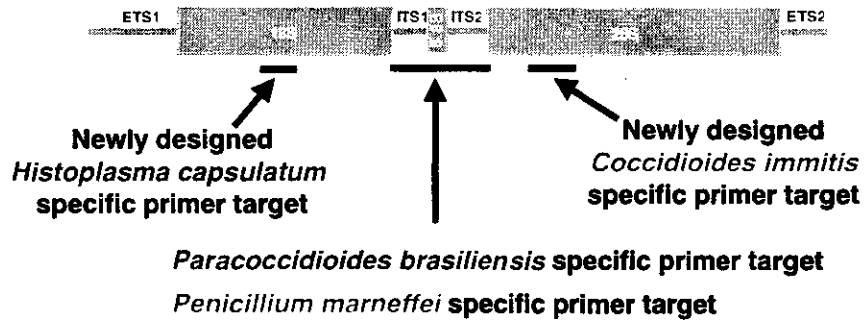
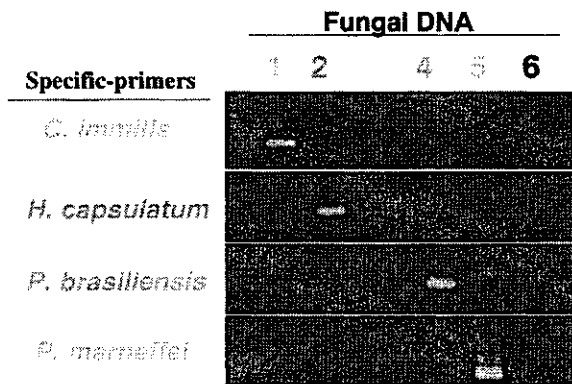


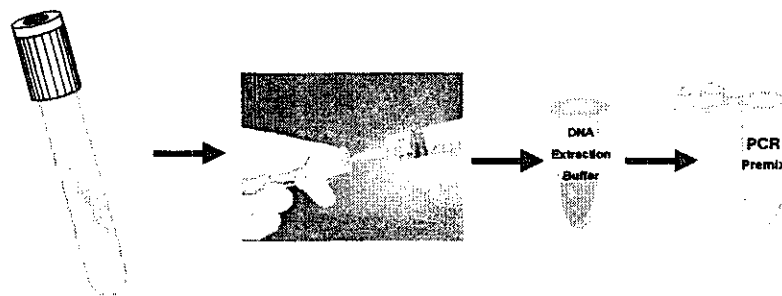
図 3

輸入真菌症起因菌同定用特異プライマー を用いたPCRの特異性



Fungal DNA 1: *Coccidioides immitis*, 2: *Histoplasma capsulatum*,
4: *Paracoccidioides brasiliensis*, 5: *Penicillium marneffeii*, 6: *Aspergillus fumigatus*

図2 輸入真菌症起因菌PCR同定検出系の手順



蓋を緩めたスクリーキャップ付き試験管斜面培地にて培養、培養終了後きつく蓋を閉める。

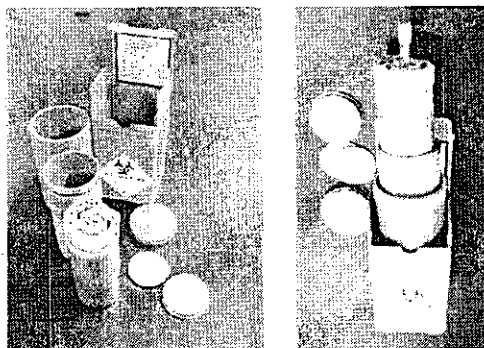
注射器を用いて、キャップ上部からエタノールを注入（先立って注入相当量の吸引）、その後静置殺菌。

殺菌された菌体を釣菌し、真菌DNAの迅速調製法⁴⁾にて分離、精製。

得られたDNAを鋳型としてPCRプレミックスへ添加、増幅反応を行ない、常法による検出の有無によって同定する。

図4

UN規格による微生物輸送容器



© K.Makimura@PFDB