

図5

深在性真菌症遺伝子診断法 プライマーによるPCRの特異性

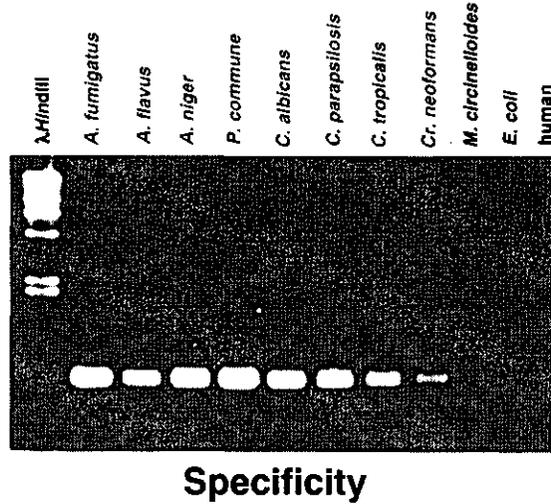


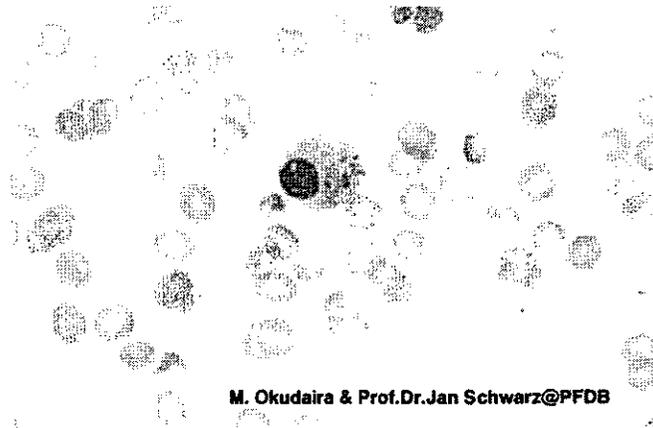
図6

病原真菌データベース・ホームページ



図7

ヒストプラスマ症末梢血塗沫像



M. Okudaira & Prof.Dr.Jan Schwarz@PFDB

図8

病原真菌データベースに関する新聞報道

11 2版 2001年(平成13年)6月18日 金曜日 朝日新聞 東京 15頁 (多分)

真菌のデータ ネットで公開
 国立感染症研究所が、国内の病原真菌に関するデータベース「FUNGUS」をインターネット上で公開した。同データベースは、国内の病原真菌に関する最新の情報を提供し、研究者や医療関係者のために役立つ。また、一般市民の健康意識の高まりに応じ、病原体の名称や特徴に関する情報を提供することにも役立つ。

「FUNGUS」は、国内の病原真菌に関する最新の情報を提供し、研究者や医療関係者のために役立つ。また、一般市民の健康意識の高まりに応じ、病原体の名称や特徴に関する情報を提供することにも役立つ。

国立感染症研究所 感染症情報センター
 〒162-8601 東京都小平市池袋1-1-1
 TEL: 042-525-3111 FAX: 042-525-3112
 E-mail: info@nids.go.jp
 URL: http://www.nids.go.jp/

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

分担者： 鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨： 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発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 が主な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。本研究は、大川原明子、橋本ゆき、赤川久義、高野幸枝、倉文明、渡辺治雄（以上、国立感染症研）、直江史郎、高橋啓、大原関利章（以上、東邦大・医・大橋病院）、岡崎富男（広島市民病院）、荒谷康昭、小山秀機（以上、横浜市大・木原研）、大野尚仁、三浦典子（以上、東京薬大）、Nobuyo Maeda（ノースカロライナ大 USA）の各博士の協力のもとに行なわれた。

A. 研究目的

免疫不全は、真菌症をひきおこす。特に、好中球殺菌酵素の欠損では、重篤な真菌症になるなど、好中球を主体とした生体側の

免疫不全が主たる要因であり、生体側の排除機構の不全が真菌症の病態形成にかかわることがわかってきている。しかし、「免疫不全」の実態の理解が不十分であり、か

なりの部分は推測の域を脱していないと思われる。しかし、真菌症が好中球の機能不全に起因していることは、慢性肉芽腫症や Myeloperoxidase(MPO)欠損症で示されており、また、これにかかわる遺伝子欠損マウスの結果からも確認されてきている。活性酸素産生酵素 NADPH oxidase の欠損は、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 MPO の欠損は、*Candida* 症を誘発する。このように、好中球機能の低下は、真菌易感染の日和見感染の主たる要因になっている。とりわけ、2つの酵素 NADPH-oxidase と MPO は真菌感染防御に重要な役割を担っている。

NADPH-oxidase は、gp91^{phox}-gp22^{phox}, p47, p67 の各分子が好中球活性化によって細胞膜上に集積し活性酸素を産生する。Dinauer ら(インディアナ大)が作製した gp91^{phox}-KO マウスは *Aspergillus* を排除できないことが証明された。

もう一方の酵素である、MPO は、H₂O₂ と CL から次亜塩素酸を生成する反応を触媒する好中球のライソゾーム酵素である。われわれのグループで作製した MPO-KO マウスを用いて個体レベルでカンジダ菌および細菌に対する感染防御能を解析してきた。昨年度は、MPO-KO マウスの *Candida albicans* 殺菌能の低下を報告したが、本年度は、さらに、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。

一方、アスペルギルスにより喘息アレルギーが誘発されたり、カンジダ菌成分

Candida albicans - derived substances (CADS)により冠動脈炎が誘導されるなど、真菌が慢性炎症誘発への関与も注目されている。その要因が MPO であることをわれわれは報告してきた。これら疾患を誘発する分子の特定も重要課題になっており、本年度は、直江ら(東邦大)、大野ら(東京薬大)との共同研究によりカンジダ成分から冠動脈炎誘発分子を特定するとともに、その免疫機構の解析も合わせて行った。

また、MPO の役割を解明するため、マウスリコンビナント MPO(rmMPO)およびマウス MPO(mMPO)特異的抗体を作製した。rmMPO は、ヒトと同様 mMPO を *E. coli* に発現・精製し、native mMPO もマウス腹腔より調整した。

B. 研究方法

1) 真菌および細菌接種

カンジダ菌を鼻腔内投与し、肺炎を誘発させた。また、トリコスポロン、アスペルギルスとクレブシエラ、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌も投与した。

2) 血管炎モデルマウス

CADS および CAWS 誘導の冠動脈血管炎マウス：4週齢オス C3H/HeN および DBA/2 マウスに5週齢と9週齢に CADS を5日連投した。

3) 好中球の分離

ヘパリン採血し、比重法によって抹消好中球画分を単離した。

4) 好中球機能解析

4-1) MPO 放出活性：終濃度 10⁻⁶ M の FMLP および 5 μg/ml の サイトカラシン B で好中

球を刺激して脱顆粒し、 H_2O_2 を基質として細胞外へのMPO放出率を求めた。

4-2) 活性酸素産生：活性酸素産生は、チトクロームcの還元能により求めた。

5) マウスのリコンビナントMPOの調整

マウスのリコンビナントMPOは、ヒトのリコンビナントMPOと同様に作製した。

6) マウス血清中のMPO-ANCA値

ヒトおよびマウスMPOのELISAにより測定した。ヒトMPOはヒトMPO-IIIを抗原とした。マウスMPOは、*rmMPO*を使用した。

7) 血管炎発症の検討

屠殺後、病理標本作製し血管炎の評価をした。

C. 研究結果

1) MPOの抗真菌作用

われわれのグループが作製したMPO-KOマウスの*Candida albicans*殺菌能の低下について昨年度報告した。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。まず、カンジダ菌を鼻腔内投与すると、MPO-KOマウスは肺炎を誘発し、5日目までに約60%のマウスが死亡した。また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との比較において有意に低下した。しかし、黄色ブドウ球菌と肺炎球菌に対する殺菌能の低下はほとんど認められなかった。すなわち、MPOはカンジダ菌のみならず、アスペルギルスをはじめ他の真菌や細菌感染に対する生体防御に重要な酵素であ

ることが個体レベルで明らかとなった。

2) CADS誘導の冠状動脈血管炎

CADS誘導の冠状動脈血管炎に伴いMPO-ANCA値は、MPO-KOマウスでは、野生型マウスに比べ抑制された。CADS誘導の血管炎発症率と血清中のMPO-ANCA値について野生型のそれと比較した結果、血管炎の発症率は、MPO-KO群では40%と対照群100%より激減した。一方、血清MPO-ANCA値はMPO-KO群では、ワイルド対照群と比較して有意に抑制されていた(表1)。

表1. MPO-KO群とワイルド対照群における冠状動脈炎発症、MPO-ANCAおよび抗DNA抗体値

Mouse	N	MPO-ANCA (hEU/ml)	anti-dsDNA (IU/ml)	CA (%)
CADS injection				
C57BL/6	4	11.1 ± 6.0	37.1 ± 33.5	100
MPO-KO	5	4.8 ± 2.2	22.3 ± 3.8	40
PBS (-) injection				
C57BL/6	10	3.5 ± 4.5	23.4 ± 8.4	0

3) CAWSの腹腔内投与による冠状動脈炎の誘導

予備的ではあるが、CAWSの腹腔内においてもCADSの場合と同様の成績が得られた。

4) CAWSによる脾細胞培養におけるサイトカイン産生への影響

*in vitro*での脾細胞培養系において、CAWSによるIFN γ 産生がDBA/2マウスでは、促進作用を示し、C3H/HeNでは産生抑制作用を示した(図1)。

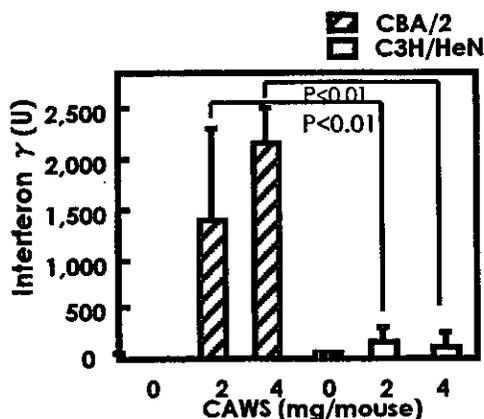


図1. 脾細胞培養系へのCAWSの添加によるIFN γ 産生。
DBA/2マウス(左:斜線)、C3H/HeN(右)。

5) リコンビナントMPO分子は作製

リコンビナントMPO分子は作製できたので、これを用いてポリクローナル抗体を作製する。今後は、Deletion mutantsからフラグメントを調整し、エピトープ解析を行う。

D. 考察

1) MPOの抗真菌作用

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*殺菌能の低下について報告した。本年度は、その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。個体レベルでの種々の真菌および細菌に対する感染防御能を解析した。カンジダ菌の鼻腔内投与では、MPO-KOマウスは肺炎を誘発し、5日目までにおよそ2/3のマウスが死亡した。また、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との比較において有意に低下していた。しかし、黄色ブドウ球菌と肺炎球菌に対する殺菌能の低下はほとんど認められなかった。これらの結果は、MPOはカンジダ菌のみならず、多くの真菌や細菌感染に対する生体防御に重要な酵素であることが個体レベルで明らかとなった。

2) CADS誘発の冠状動脈血管炎発症へのMPOの関与

野生型マウスにおいて、冠状動脈血管炎発症率とMPO-ANCA値に、正の相関が認められたことから、CADS抽出物誘導の冠状動脈血管炎の発症にMPO-ANCA産生の関与が示唆された。また、MPO-KOマウスにおいて、CADS抽出物誘導の冠状動脈血管炎の発症が低下し、血清中のMPO-ANCAが低値を示した個体が多かったことから、MPOが抗原になっていることが確認された。しかし、MPO-KOマウスにおいて、CADS抽出物誘導の血管炎を発症し、MPO-ANCA値の高い個体が認められたことにより、MPO-ANCA産生には、MPO以外の抗原の存在も示唆された。

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が主な要因であることが判明した。しかし、血管炎やMPO-ANCAは、完全に抑制されていないことから、CADS、CAWS中の分子との交差やeosinophil peroxidaseの発現も深く関与していることも推定される。直江・村田らによって開発されたCADSする冠状動脈

炎のモデルをもちいた CADs と CAWS の作用の評価から、CAWS の方が CADs よりも高い頻度で血管炎を誘発していた。これは、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。

4) リコンビナント MPO 分子は作製

リコンビナント MPO 分子は作製できたので、これを用いてポリクローナル抗体を作製する。今後は、Deletion mutants からフラグメントを調整し、エピトープ解析を行う。

E. 結論

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。カンジダ菌の鼻腔内投与では、MPO-KO マウスは肺炎を誘発により、2/3 のマウスが死亡した。MPO はカンジダ菌のみならず、多くの真菌や細菌感染に対する生体防御に重要な酵素であることが個体レベルで明らかとなった。また、MPO-KO マウスを使用することにより、真菌由来物質 CADs によって誘発する冠動脈炎が MPO および MPO-ANCA と関連することが明らかになった。さらに、MPO の役割を解明するため、マウスリコンビナント MPO およびマウス MPO 特異的抗体を作成した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, Y. Hashimoto, Y. Aratani, H. Koyama, N. Maeda, S. Naoe, K. Suzuki Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation* 25: 381-387, 2001.
- 2) W.K. Dawson, K. Suzuki, and K. Yamamoto. A physical origin for functional domain structure in nucleic acids as evidenced by cross linking entropy. part II. *J. Theor. Biol.*, 213:387-412, 2001.
- 3) W.K. Dawson, K. Suzuki, and K. Yamamoto. A physical origin for functional domain structure in nucleic acids as evidenced by cross linking entropy. part I. *J. Theor. Biol.*, 213:359-386, 2001.
- 4) K. Suzuki. Neutrophil functions of patients with vasculitis related to MPO-ANCA. *International Journal of Hematology* 74, 134-143, 2001.
- 5) K. Suzuki. Neutrophil functions of patients with vasculitis related to MPO-ANCA (Review) *Intl. J. Hematol.* 74: 134-143, 2001.
- 6) K. Suzuki. Bioimaging of chemotaxis/migration and adhesion for transmigration of neutrophils with special reference to neutrophil functions (Review). *Bioimages* 9:1-14,

- 2001
- 7) Y. Segawa, Y. Itokazu, N. Inoue, T. Saito and K. Suzuki. Possible changes in expression of a chemotaxin LECT2 mRNA in mouse livers after concanavalin A-induced hepatic injury. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 425-428, 2001.
- 8) Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda and M. Koyama. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J. Infectious Diseases* 182, 1276-1279, 2000.
- 9) 鈴木和男 特集「血管炎の基礎と臨床」血管炎と自己抗体—抗好中球細胞質抗体を中心に— *最新医学* 55; 2636-2646, 2000
- Hashimoto, 3) Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associate with MPO-ANCA production induced by *Candida albicans*-derived substances Gordon Research Conference-Phagocytes, 2001.
- 3) K. Suzuki. Arteritis related with Myeloperoxidase. Geneva Biology of Ageing Workshop 2001-Cardiac ageing, heart failure and cell therapy Geneva, Switzerland Coronary. Sept. 27-29, 2001, Geneva, Switzerland.
- 4) 鈴木和男 *Aspergillus* 感染成立に関与する好中球の役割医真菌学会9月26-28, 2001, 東京
2. 学会発表
- 1) Toshiyuki Matsuoka, Yuki Hashimoto, Akiko Ishida-Okawara, Keiko Matsuo, Takuro Iwasaki, Hideki Kajiwara, Takao Arai, Keiko Ozato, and Kazuo Suzuki. Genetic inactivation of interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP/IRF-8) is associated with a marked suppression of neutrophil and eosinophil function Gordon Research Conference-Phagocytes, 2001.
- 2) Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Yuki

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請：なし

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
研究協力者報告書

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	
高島 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
<i>Coccidioides immitis</i> 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ー）	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

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

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

研究要旨 本研究協力者は、主任研究者および亀井克彦分担研究者（輸入真菌症の疫学および制御）に協力し、感染症情報センターにおいて感染症サーベイランスから4類感染症として報告される真菌症(コクシジオイデス症)の状況をまとめ、研究班として入手されるデータとの比較等を行い、輸入真菌症の疫学調査を行うこととした。平成11年4月感染症法施行後、平成13年12月末までのコクシジオイデス症の報告は3例であった。

A. 研究目的

コクシジオイデス症は米国西南部（カリフォルニア、アリゾナ、テキサス、ネバダ、ユタの諸州）、メキシコ西部、アルゼンチンのパンパ地域、ベネズエラのファルコン州の半乾燥地域の風土病で、我が国での報告は稀である。しかし、今後「輸入感染症」としての警戒は必要であり、平成11年より施行されている「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（感染症法）」では「4類感染症-全数報告疾患-」に指定され、その発生動向は国のサーベイランス対象疾患として調査されるように整備された。

本研究は、主任研究者および亀井克彦分担研究者（輸入真菌症の疫学および制御）に協力し、感染症情報センターにおいて感染症サーベイランスから4類感染症として報告される真菌症(コクシジオイデス症)の状況をまとめ、研究班として入手されるデータとの比較等を行い、輸入真菌症の疫学調査を行うことである。またそのほかの輸入真菌症に関する情報の交換を積極的に行い、国内での発生動向

に注意を払うことも目的の一つである。

B. 研究方法

感染症法では、法律の対象となる感染症を1-4類、指定感染症および新感染症に分類してある。本症は、4類感染症—全数把握疾患—に分類されている。4類感染症は、サーベイランスを行い、その情報を提供・公開することによって、疾患の発生拡大を防止しようとするもので、全医師に診断から7日以内の届け出を求めるもの（全数把握疾患）と、定点医療機関の協力を求めてその発生動向の傾向を求めるもの（定点把握疾患）に分かれている。本症はこの前者に分類される。

得られた1-4類感染症情報は報告のあった各地域でも解析・還元されるが、国立感染症研究所感染症情報センターにおいて国全体のデータとして解析し、還元が行われている。

4類全数感染症の発生届け出は規定の書式にしたがって行われるが、個人を特定できる様な項目に関しては人権保護の立場から含まれていない。得られた情報は、感染症情報セン

ターにおいて従来の印刷物による月報（病原微生物検出情報：IASR）、年報等に加えて、ホームページ（<http://idsc.nih.gov/index-j.html>）の利用などによって、対象となっている1-4類感染症すべてについて、そのサーベイランス結果を感染症週報(Infected Disease Weekly Report: IDWR)として最新情報の還元提供を行っている。なおこれらの情報の公表にあたっては、すべての疾患について人権保護の立場から、氏名等の患者個人を識別できる情報は除かれている。

本研究は、このサーベイランス情報に基づいたコクシジオイデス症に関する疫学情報をまとめようとするものである。

なお本症の届け出にあたっての症例定義、報告のための基準等は、以下のようになっている。

定義：カリフォルニア州、アリゾナ州、ニューメキシコ州をはじめとする米国西南部各州、メキシコの太平洋側の半乾燥地帯、ベネズエラのコロ地方、アルゼンチンのパンパ地域に発生する風土病で、原因菌は真菌で *Coccidioides immitis* である。

臨床的特徴：南北アメリカ、特にカリフォルニア州のサンホアキン溪谷で患者が多発している。強風や土木工事などにより土壌中の *C. immitis* の分節型分生子が土埃と共に空中に舞い上がり、これを吸入することにより肺感染が起こり、そのうち約0.5%の患者が全身感染へと進み、約半数が死亡する最も危険な真菌症である。特に皮膚病巣は特徴があり、結節、潰瘍を繰り返し、花キャベツ状の腫瘤を形成する。

報告のための基準：

当該疾患を疑う症状や所見があり、かつ、以下のいずれかの方法によって病原体診断が

なされたもの。

・病原体の検出

例、喀痰などからの分離・培養と菌の分離（鏡検）など

C. 研究結果

平成11年4月感染症法施行後、平成13年12月末までのコクシジオイデス症の報告3例のみであった。

その内訳は、平成11年の報告はゼロ、平成12年は東京都から報告された28歳男性例1例で、推定感染地はアメリカ合衆国アリゾナ州であった。平成13年は石川県から報告された41歳男性例で、推定感染地は同じくアリゾナ州であった。

なお平成14年はこれまでに31歳男性例が大坂府より届け出られている。推定感染地はアメリカ合衆国（州名不明）である。

研究班が把握した症例は、感染症法による届け出を若干上回るものであり、情報交換の結果、見届け例については研究班より届け出をすすめるようにした。また研究班が把握していない症例については、サーベイランスデータを提供し、研究班における症例の把握を行った。

2001年10月に米国カリフォルニア州バーカーズフィールド郊外のローストヒルズにおいて世界模型飛行機選手権大会が行なわれた。世界30国から300名以上が参加したが、大会後、帰国した参加者の間にコクシジオイデス症の多発が認められた。日本人参加者があったためこの情報はWHO、CDCを介して速やかに国立感染症研究所感染症情報センターおよび細菌部（渡邊治雄部長）のもとに届き、本研究班と連携をとり、分担研究者である千葉大学真菌医学研究センターを中心として参加者20名に関する追跡調査が行われた。幸い現時点では、これ

らの帰国者およびその周辺において明らかな感染例は認められていないが、連携により実態の把握が可能になった点は特筆すべきことと考える。

海外での患者数は現時点で、確診例 2 名（英国人、フィンランド人各 1 名、疑診例 2 名（オーストラリア人、ニュージーランド人各 1 名）であるが、各国で調査が進んでいる。

IASR ではこの状況について Vol.23, No.2 2002、Vol.23 No.3 2002 など情報提供を行った。

また IASR 2002 年 3 月号では、輸入真菌症の特集を行い本症に関する情報提供と啓発を行った。この特集編集にあたっては本研究班班員各位の多大な協力を頂いた。

D. 考察と結論

感染症発生動向調査システムに基づいて届け出がなされた症例は 3 例であった。さらに平成 14 年になって 1 例が加わり、現在 4 例である。分担研究者の亀井の報告によれば、この間数例の連絡が千葉大学真菌症センターにあり、報告漏れ例があふことが指摘されている。主任研究者上原のアンケート調査によれば、本症の届け出義務を知っていた医師は約 48%と半数に至っておらず、今後の周知徹底が必要である。

感染症情報センターでは、本症に関する解説記事の感染症週報(IDWR)の掲載（平成 12 年 51/52 週号）、あるいは病原微生物検出情報 (IASR:月報)への特集記事の掲載などにより、本症に関する理解を広く求めているところである。

感染症情報センターには、これらの IDWR、IASRなどを介した読者からの問い合わせの他、インターネット、電子メール、電話等による一般からの問い合わせに対しても積極的に応

じている。具体的な本症の問い合わせがあったのは複数の医療機関からの患者についての診断並びに検査の問い合わせ、患者自身からの診断方法についての問い合わせなどである。前者については本研究班の分担研究者である亀井が所属する千葉大学医学部真菌センターを紹介することによって診断が確定、真菌センターへは患者登録がなされているものもある。

今後本症に関するサーベイランスが強化され、各分野の理解を広く得ることによって、本症の実態が明らかとなり、その結果は、第一線にある医療機関、公衆衛生機関にフィードバックされ、患者の早期発見と治療、そして疾患の拡大防止に結びつくことが期待される。

F. 健康危険情報

我が国にコクシジオイデス症は輸入感染症として存在しているが、その届け出状況は十分なものではない。今後のサーベイランスの強化、サーベイランス情報の注目が必要である。

G. 研究発表

病原微生物検出情報 特集「輸入真菌症」
およびその関連情報 Vol.23 No.3 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

現時点でなし

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

微生物資源としての菌類

研究協力者 奥田 徹 玉川大学学術研究所教授

沖 俊一 玉川大学学術研究所特任教授

研究要旨 真菌症治療薬を天然物から発見することを目的とし、未知の部分の多い菌類を分離・培養しスクリーニング・サンプルのライブラリー構築を継続した。これまでに3,400株以上の多様性に富んだ菌類を分離し、10,000 サンプル以上のライブラリーを完成した。ライブラリーの中から7,840 サンプル（1,960 株）を Efflux pump スクリーニング・アッセイに供給し、25 サンプル（8 株）が活性ありと判断され、そのうち18 サンプル（7 株）に再現性が認められた。現在5株について活性物質を単離精製中である。

A. 研究目的

Penicillium citrinum から発見された三共のメバロチンと *Tolyposcladium inflatum* の生産物であるサイクロスポリンが、それぞれ天然物由来の医薬品として脚光を浴びて以来、微生物を用いた生理活性物質スクリーニングが行われてきた。中でも菌類は、地球上に生息していると推定される150万種の約5%、わずか77,000種しか明らかにされておらず、95%は未開拓資源である。しかも、そのうち培養可能な菌類は5%であり、新規菌類の分離同定ならびに培養技術の開発が行なわれれば、さらに資源としての価値も高まる可能性がある。菌類は植物内生菌としての共生、動植物に対する寄生、様々な基質上での腐生的な栄養分と領域の奪い合いによる菌類の遷移など、相互作用の中で情報伝達、生理活性物質の産生など重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、それらの相互関係の研究から、有用な抗真菌物質が開発できる期待

は大きい。

一方で、とくにアメリカを中心とした先進国ではコンビナトリアル・ケミストリーとハイスループット・スクリーニングが盛んに行われ、人手と時間がかかる天然物スクリーニングから撤退する企業が相次いでいる。しかし菌類の新規代謝産物発見はまだ増加傾向にあること、対象と方法を選び、ライブラリーを構築すれば、効率よいスクリーニングが可能となり、新規物質を発見できる可能性は高い。

B. 研究方法

玉川学園内、津軽地方、八丈島などで採集した土壌、泥炭、落葉、朽ち木、キノコなどを用い、洗浄濾過法、表面殺菌法、直接分離法などで菌類を分離し、純粋培養株を確立した。この課程ではとくに内生菌、植物病原菌、落葉分解菌、菌類寄生菌、核菌類をターゲットにした。

分離株は、仮同定をして、取捨選択し、

10%グリセリン水に懸濁して-80℃で超低温保存した。

保存株を適宜スラントに復元し、固体培地(2種:押し麦、ソバの実を用いた培地)と液体培地(2種:グリセリンとペプトン、でんぷんと大豆粉)を20gまたは20ml用い、容器は250ml容三角フラスコを用いて静置培養した。培養温度は25℃、培養日数は12から15日である。

培養物は等量のブタノールで抽出し、ブタノール層を96穴マイクロプレートに150~200µlずつ分注し、40℃で減圧濃縮乾燥した。これを無酸素下、-80℃でサンプル・ライブラリーとして保存した。

ライブラリーから960サンプルをスクリーニングに供試した。

すべてのデータはマイクロソフト・アクセスを用いて作ったデータベースSTRAUSSに入力した。

活性が認められた場合、最初の培養物の抽出物を再アッセイに供試し、再現性を確認した。次いで活性物質単離法の検討と高次のアッセイに供試するために再培養を行い、培養の再現性を確認後、予備分画操作を行った。

予備分画は抽出物を濃縮し、その一部をシリカゲルTLCに供試して適当な溶媒系で展開後、すべてのバンドをかき取り、抽出した。抽出物をアッセイに供試し、その活性部位を確認した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来材料などは扱っていないので問題ない。

C. 研究結果

玉川学園内、津軽地方、八丈島などで採

集した土壌、泥炭、落葉、朽ち木、キノコなどから、洗浄濾過法、表面殺菌法、直接分離法などを用い、土壌菌、内生菌、植物病原菌、落葉分解菌、菌類寄生菌、核菌類など合計3,400株以上を純粋分離した。

このうち、担子菌きのこの子実体から分離した *Hypomyces* spp. 2種および *Cladobotryum* sp. 1種は新種、*Hypomyces sympodiophorus* と *H. corticiicola* は日本新産種である。

固体培地2種、液体培地2種を用いて培養した培養物をブタノール抽出し、合計10,000サンプル以上のスクリーニングサンプル・ライブラリーを構築した。

このライブラリーから7,840サンプル(1,960株)を、*Candida* を用いたazole efflux pump 阻害剤スクリーニング・アッセイに供試した。その結果、25サンプル(8株)に活性が認められた。18サンプルに再現性が確認された。それらは以下の7株である。*Fusarium* sp. F 490は青森県の畑土壌から洗浄濾過法で分離された。未同定糸状菌F 605およびF 688は青森県土壌から希釈平板法で分離された。未同定糸状菌F 1801とF 2036はそれぞれ福島県の雪まじりの土壌と神奈川県土壌から洗浄濾過法で分離された。*Sepedonium chrysospermum* F 2481は神奈川県で採集したBoletaceaeの子実体から分離された。*Fusarium* sp. F 2536は玉川大学内のアカマツ落葉から表面殺菌法で分離された。現在このうちの5株について、活性物質の単離精製を行っている。

D. 考察

対象を明確にして、効率よい分離法を開

発し、新種、日本新産種と思われる菌類を分離できたことは新規物質発見に寄与する大きな一歩と考えられる。また 7,840 サンプルから期待できるヒットが再現性のあるヒットを 7 株得られたことは意義がある。このうち菌類寄生菌の *Sepedonium* に活性が認められたことは興味深い。

E. 結論

今回のスクリーニングで再現性の得られた 18 サンプル (7 株) のヒットについて、再培養を行い、再現性を確認し、活性物質のプロファイリングを行った。このうち 5 株について現在単離精製中である。

F. 健康危険情報

対象としている菌類はいずれも腐生菌か植物病原菌であり、ヒトの健康管理上問題ない。ただし、無菌操作はクリーンベンチ内で行い、また有機溶媒はドラフト内で操作することにより安全、健康管理を行った。実験操作終了後は手洗いなどを履行した。

G. 研究発表

1. 論文発表

常盤俊之・奥田徹 2000 日本産菌寄生核菌類 *Hypomyces* 属菌 3 種 日菌報 42 : 199-209

2. 学会発表

常盤俊之・奥田徹 2001 日本産菌寄生核菌類 *Hypomyces* 属菌 3 種 日本菌学会第 45 回大会講演要旨集 C-05 55p.
(5 月 20 日 日本獣医大学)

奥田徹・植木清子・渡辺京子・栗原正幸 2001 電解機能水を用いた菌類の分離 日本菌学会第 45 回大会講演要旨集 B-

29 51p (5 月 20 日 日本獣医大学)

奥田徹・山本耕三・岸登 2001 八丈島の菌類 (1) *Idriella* sp., *Exserticlava vasiformis*, *Brachiosphaera tropicalis* 日本菌学会第 45 回大会講演要旨集 A-20 30p (5 月 20 日 日本獣医大学)

T. Okuda, K. Yajima, K. Yamamoto, K. Watanabe, and K. Ueki 2001 Current status of natural product screening activities in Japan – including some of our experience. Proceedings of 4th Asia-Pacific Biotechnology Congress, Waterfront Cebu City Hotel, Philippines, May 16-18 19-29pp.

常盤俊之・奥田徹 2002 日本産菌寄生核菌類 *Hypomyces* 属菌について (2) 日本菌学会第 46 回大会口頭発表予定 (5 月 信州大学)

H. 知的財産権の出願・登録状況

予定なし

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

研究協力者 上 昌広 国立がんセンター薬物療法部幹細胞移植療法室

序言

深在性真菌感染症は、造血器悪性腫瘍患者における重大な合併症である。Figure 1 に 1980 年より 1999 年に、虎の門病院・東京大学医学部付属病院・都立駒込病院にて造血器悪性腫瘍と診断された 720 症例の剖検結果を示す(1)。この 20 年間で深在性真菌症の頻度は 30%前後で大きな変化を認めていないが、起炎菌は大きく変化している。侵襲性アスペルギルス症の深在性真菌症全体に占める割合は、1980 年代には 26.6%であったが、1990 年代には 50.0%に増加しており、侵襲性アスペルギルス症は急速に増加しつつあることがわかる(2)。

侵襲性アスペルギルス症は、生前診断が困難なことが問題である。前述のうち、生前診断されていた症例は 40%である(3)。特に中枢神経系・心臓・甲状腺に播種した場合、正確な診断を行うことは困難であった。多くの症例で造血器悪性腫瘍の直接浸潤として治療が行われていた。アスペルギルス菌糸による脳梗塞・脳出血・急性心筋梗塞などで急死している症例もあり、侵襲性アスペルギルス

症の予後改善には正確な診断を早期に行うことが必須である。

侵襲性アスペルギルス症は組織診にて糸状菌の浸潤を証明し、病変部位よりの培養でアスペルギルス属を証明した場合に確定診断される(4)。しかし、造血器悪性腫瘍患者では、骨髄抑制のため侵襲的病理診断を安全に行うことは困難であることが多い。気管支肺胞洗浄液を用いた培養、抗原検査、遺伝子検査は有用であるが(5) (6)、頻回に施行することは困難で、検査自体が侵襲的である。このため、造血器悪性腫瘍症例では、侵襲性アスペルギルス症の診断は臨床所見、画像検査、血液検査を用いて総合的に行われることが多い。

侵襲性アスペルギルス感染症についてのアメリカからの報告は、確定診断に基づくものが多いが(7) (8)、出血傾向、白血球低下などを考慮した場合、臨床現場では確定診断をつけることは困難である。臨床的な疑い、あるいは血清診断・画像診断を用いて治療を行うことが多く、本年欧州の共同研究グループより、このような診断基準が提唱された(9)。

深在性真菌症の研究を行う、あるいは評価する場合、その診断基準に留意すべきであり、この基準が異なれば、実際の臨床現場を反映しない結果が報告される可能性が否定できない。

血液培養

血液を含む無菌部位よりアスペルギルス菌糸を培養した場合、侵襲性アスペルギルス症の診断は確定する。血液培養は感染症の診断の基本であるが、アスペルギルスが血液から培養されることはきわめて少ない(10)。我々の施設でも侵襲性アスペルギルス症の血液培養陽性率は1%以下である(2)。近年、itraconazole や fluconazole などの吸収性の抗真菌剤の予防投与をうけていることも、真菌感染症の血液培養の低下と関係があるかもしれない(11) (12)。また、糸状菌の培養には1週間程度を要し、治療を急ぐ侵襲性アスペルギルス症の場合、その臨床的有用性は高くない。アスペルギルス特異的抗体検査は、免疫抑制患者では感度・特異度ともに低い(13)。このため、血液検体を用いたアスペルギルス抗原検査、遺伝子検査が開発され、臨床応用されている。

抗原検査

1979年、Schaffer等は侵襲性アスペルギルス症例の末梢血中にアスペルギルス抗原が存在することを報告し、ガラクトマンナンであると同定した(14)。この抗原に対するモノクローナル抗体が作成され、臨床応用され

ている。*Paecilomyces spp.*や *Penicillium spp.* などの一部の真菌(15) (16)、cyclophosphamide 代謝産物(17)との交差反応が報告されているが、この抗体の特異性は高いと考えられている。

現在、ラテックス凝集反応を用いる方法(LA)(Pastorex aspergillus, Sanofi Diagnostic Pastur, France)と、enzyme-linked immunosorbent assay (EIA)(Platelia Aspergillus, Diagnostic Pasteur, France)を用いる方法が開発され、臨床応用されている。侵襲性アスペルギルス症を臨床的に疑った場合、繰り返して抗原検査を行うことが推奨されている。多くの研究では1週間で最低2回は検査されており(18) (19) (20)、LAの感度・特異度は44-70%、80-93% (21) (22) (23) (24)、EIAの感度・特異度は、59-90%、84-100%と報告されている(21) (25) (26)。*In vitro*の検討ではLAのガラクトマンナンの検出限界は25 ng/mL、EIAは1 ng/mLであり、EIAの方が感度良好である(27)。現在ではEIAが用いられることが多いが、この方法を用いてもガラクトマンナン抗原の検出率は高くない。ヒトの体内ではガラクトマンナンは細網内皮系で迅速に代謝されると考えられており(28)、抗原検査の感度を向上させる必要である。

EIA法を用いた場合の問題は擬陽性が増加することである。造血幹細胞移植早期(24)、未熟児(29)での擬陽性が報告されている。更に我々は、EIAと比較して感度の低いラテックス凝集法を用いても、化学療法施行後の好中球低下期間には擬陽性検体の出現頻度が増

加することが報告した(30)。抗癌剤投与後や未熟児の場合、障害された粘膜よりアスペルギルス菌体成分が吸収され、抗原検査が擬陽性となるのかもしれない。一過性抗原血症の臨床的意義は明らかでなく検討が必要である。また、好中球低下症例、造血幹細胞移植症例などの侵襲性アスペルギルス症ハイリスク症例に擬陽性が生じやすいことは、抗原検査の臨床的意義を考える上で重要である。アスペルギルス抗原検査の結果を解釈するさいには、患者の全身状態を考慮する必要があると思われる。

中枢神経アスペルギルス症への抗原検査の応用

中枢神経アスペルギルス感染症は、侵襲性アスペルギルス症の進行した状態で、迅速な診断・治療が必須である(3)。病理学的には脳膿瘍・脳梗塞を生じ、髄膜炎を伴うことは少ないと報告されている(31)。髄液の培養は有用でなく、中枢神経の病理学的評価が必要と考えられてきた。中枢神経アスペルギルス感染症は、迅速に診断されなければならない疾患であるが、有効な診断法は報告されていない。

我々は病理学的に中枢神経アスペルギルス症と確定診断された5症例より採取した髄液を用いて、アスペルギルス抗原の有無をEIA、LA、PCR法にて検討した(32)。髄液よりアスペルギルスが培養された症例は存在しなかったが、4症例でEIA、LAが陽性となり、PCRは全例で陽性であった。

アスペルギルス抗原検査には非血液検体

を用いることも可能であり、extra-pulmonary aspergillosisの早期診断に有用である可能性がある。

画像検査

胸部CT検査は、アスペルギルス抗原検査と並ぶ侵襲性アスペルギルス症の代表的検査法である。アスペルギルスの多くは孢子を吸入することにより経気道的に感染するが、血管侵襲性が強いとため、血管壁を破壊し血流に侵入する。この結果、肺内の他部位、中枢神経、消化管、肝臓、脾臓、甲状腺などの多臓器に浸潤する。肺ではアスペルギルス菌糸により血管が塞栓され、出血性梗塞を呈することが多い(33)。

この出血性梗塞病変が胸部CTではhalo signとして描出される。Halo signは好中球が低下した白血病患者に限れば、侵襲性肺アスペルギルス症(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)に対する特異性が高いと考えられている(34)。Haloは侵襲性アスペルギルス症発症早期に認められるため、早期診断に有用であると考えられている。これはair-crescent signが好中球回復後に観察されることとは対照的である(35)。Cailottらは47例のIPA患者を対象とした研究で、早期に胸部CTを撮影することで治療成績が改善することを示した(36)。

CT検査により肺内の微小病変を検出することは、IPAの早期診断に有用である可能性は高い。しかし、halo signの出現頻度はIPAでも30%程度と高くなく(37)、また、肺結核・悪性リンパ腫肺浸潤・ムコール感染症

などで同様の所見を呈することも報告されており、必ずしもアスペルギルス感染症特異的ではない(38, 39)。

このため、我々は侵襲性アスペルギルス症の早期診断における胸部 CT 検査と血液抗原検査の有用性を比較する prospective study を行った(22)。我々は 215 症例を対象として、発熱が生じた場合、毎週最低 1 回、LA, BDG 定量を行い、抗生剤に反応しない場合、胸部 CT 写真を撮影した。この研究では 16 症例が IA と確定診断され、この 16 例を対象に解析を行った。LA の感度、特異度はそれぞれ 44%, 93%で、BDG は 63%, 74%であった。胸部 CT で halo sign が認められたのは 7 例であったが、何らかの異常陰影は全症例で認められた。もっとも多く認められた CT 所見は 'multiple nodular consolidations'で、アスペルギルス感染に特異的ではなかった。CT で何らかの異常所見を認めたのは、LA, BDG がはじめて陽性となった日より、平均して 7.1 日、11.5 日早かったことは興味深い。単純 X 線写真と胸部 CT を比較した場合、単純 X 線では放射線科専門医が読影しても、約半数の症例で異常陰影を検出することが出来なかった。胸部 CT は非特異的所見を呈することが多いが、血液抗原検査より早期に異常陰影を示し早期診断に有用であることがうかがえる。

胸部 CT と血液抗原検査は、お互いに補完する関係にあると考えられる。前者は肺実質の早期病変の検出には有効であるが、多くの症例で multiple nodular consolidations という非特異的所見を呈する。このため、特

異性が問題となる。また、稀なタイプの侵襲性アスペルギルス症である気管支肺アスペルギルス症では、アスペルギルス菌糸が気管を閉塞するように増殖し肺実質浸潤が遅れるため、胸部 CT は早期診断に有効でないかもしれない(40)。一方、血液抗原検査は胸部 CT と比較した場合、早期診断に対する有用性はあまり高くないと考えられる。アスペルギルス属は経気道感染し、肺実質に対する親和性が高いことを考慮すれば、血液を用いた検査より肺の画像検査の方が早期診断に有用であることはきわめて合理的であろう。血液抗原検査の長所はアスペルギルス特異的所見を示すことである。我々は、アスペルギルス抗原検査・胸部 CT 検査の利点・欠点を十分に認識して、IA の早期診断につとめるべきであろう。

定量的遺伝子診断法の確立

IA を末梢血を用いて早期診断する場合、臨床応用されている抗原検査の感度を更に向上させると同時に、好中球低下患者や造血幹細胞移植後早期に生じる一過性のアスペルギルス抗原血症と鑑別する必要がある。

アスペルギルス感染の感度の向上を目的とした場合、PCR を用いた遺伝子検査は有望である。これまでに真菌感染症の診断を目的とした PCR 法が幾つかのグループより報告されている(41) (42) (43)。アスペルギルス感染に関しては、気管支肺胞洗浄液(44)や血清を用いた方法(42)が報告されている。通常の PCR 法を用いた場合、その感度は高く、*in vitro* では 10 fg のアスペルギルス特異的

DNA を検出することが可能であるが(42)、従来の PCR 法ではアスペルギルス感染症の管理に重要な定量的情報を得ることができない。アスペルギルス菌体負荷についての正確な情報を得ることは、深在性アスペルギルス感染症の治療に必須である。我々は定量的 PCR 法として real-time automated PCR に着目し、侵襲性アスペルギルス感染症の診断に応用できないか検討した(45)。Real-time PCR 法はウイルス感染症に対しては広く応用されていたが(46)、真菌感染を対象とした報告は存在しなかった。

この研究では、200-1000 μ L の全血を用いて真菌 DNA を抽出した。DNA の抽出は、増幅反応・泳動を行う部屋とは別の bioclean room で行い、環境よりの contamination を予防した。DNA の抽出時には、Zymorylase や beads による真菌細胞壁の破壊は行なわなかった。Primer はアスペルギルス 18S rRNA 遺伝子配列より選択し、TaqMan probes の選択、標的遺伝子配列の増幅、PCR 産物の検出方法については既報の通りである(46)。

In vitro の検討では、この方法は *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*, and *A. oryzae* 由来の DNA を増幅し、*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* and *C. guilliermondii* とは反応しなかった。20 から 10^{10} コピーのアスペルギルス菌体を用いた検討では、intra-, inter-assay coefficient of variance は共に 2%であり、安定した結果を示した。この方法を用いた場

合、20 コピーまでは定量性を維持しながらアスペルギルス特異的 DNA を検出することができた。アスペルギルスのような常在真菌を対象とした PCR では常に contamination が問題となりうる。今回の検討で特に問題となったのは PCR reagent の汚染(47)であった。現在、我々は PCR 反応を行う前にすべての reagent について contamination の有無を評価している。このような過程を通じ、real-time PCR は *in vitro* では感度・特異度ともに高く安定した成績を示すようになった。

その後、我々は 33 例の侵襲性アスペルギルス症確定診断例と、それ以外の造血器悪性腫瘍症例 89 症例より採取した血液検体を用いて real-time PCR の臨床的有用性を検討した。合計 323 サンプルを用い、real-time PCR 法、EIA 法、BDG 定量にてアスペルギルス感染症の有無を検討した。各方法の感度は 79, 58, 67%で、特異度は 92, 97, 84%であった。今回の検討では real-time PCR のほうが、他の二つの抗原検査よりも感度が高かった。EIA の OD ratio, BDG レベルの間には統計的に有意な相関を認めしたが、一部の症例ではいずれかの検査のみ陽性を示した。症例によりアスペルギルスの菌体成分の末梢血を循環する状態に違いがあるのかもしれない。このことは将来的な研究課題であるが、現時点では異なる菌体成分を認識する検査を組み合わせることによりアスペルギルス感染症の診断効率があがると考えるべきであろう。

最後に、アスペルギルス気管支肺炎の一例の経過を示す(45)。Real-time PCR は BDG, EIA より早期に陽性化し、真菌負荷量を鋭敏