

た *Sepedonium chrysospermum* F 2481 は現在培養条件検討中である。

#### 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 サンプルから再現性のあるヒットが 7 株得られた。3 株から活性本体として環状の depsihexapeptide が単離されたことは意義深い、残念ながら既知物質 enniatin 類であった。

#### E. 結論

今回のスクリーニングで再現性の得られたうち 4 株について活性物質の単離精製を行い、3 株から既知物質 enniatins を得た。F 2481 については引き続き培養ならびに単離精製の検討中である。今後は 1) より多様性に富んだ菌類をライブラリーに加えるため、とくに昆虫生息菌もターゲットとする。2) 早期に活性物質を既知・未知判定を行うために、分画法、HLPC などの分析法を検討する予定である。

#### 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

- Shindo, K., Suzuki, H. and Okuda, T.,  
Paecilopeptin, a new cathepsin S inhibitor produced by *Paecilomyces carneus* Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 2444-2448, 2002
- Igarashi, Y., Sekine, A., Fukazawa, H., Uehara, Y., Yamaguchi, K., Endo, Y., Okuda, T., Furumai, T. and Oki, T. Anicequol, a novel inhibitor for anchorage-independent growth of tumor cells from *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx TP-F0213 J. Antibiot. 55: 371-376, 2002
- Yajima, K., Ohgaru, T., Hashimoto, Y., Suto, N. and Okuda, T. An effective tool for homogeneous assays using a simple robot arm with stackers - TRISTAN J. Biomol. Screening 7: 89-94, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況  
予定なし

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金(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

幹細胞移植の際の抗真菌剤使用実態調査  
全国アンケート調査の結果

研究協力者 上 昌広  
国立がんセンター中央病院幹細胞療法室

背景：

①幹細胞移植の際の真菌感染症予防策

米国 CDC は同種幹細胞移植の際の真菌感染予防としてフルコナゾールの投与を提唱している(1)。好中球低下期間のカンジダ感染症に対しては、フルコナゾールの予防投与をレベル AI で、すなわち、十分なランダム化比較試験(2) (3)の結果に基づき、十分な臨床的有効性があると推奨している。しかし、フルコナゾール予防投与継続の至適期間は不明であり、今後の検討が必要である。近年、Marr らはフルコナゾールの長期予防投与の有効性を検討するため、生着後にフルコナゾールの予防投与を継続する群とプラセボを投与する群に無作為に振り分ける第 III 相臨床試験の結果を発表した。この研究では、フルコナゾールの長期予防投与が移植後のカンジダ感染症頻度、および、それによる死亡を有意に減少させるという結果となった(4)。この研究はフルコナゾールの予防投与の有用性を示唆する貴重なものであるが、晩発性の真菌感染症の主体はアスペルギルス感染であり、アスペルギルスに対し感受性を有さないフルコナゾールを長期間投与することの合理性に関しては疑問を抱く研究者も多い。

②経口アンホテリシン B

アンホテリシン B は消化管から吸収されず、消化管に存在する真菌のみを抑制するため、造血幹細胞移植の真菌感染対策として広く用いられてきた。

しかし、経口アンホテリシン B については、常在する消化管真菌には有効であるものの全身性感染症を減少させる効果はなく、またコンプライアンスも不良であることなどから、その有用性はフルコナゾールよりも劣っている。CDC のガイドラインでも造血幹細胞移植患者への真菌感染予防目的の使用には疑問が示されている(1)。

③フルコナゾールによる予防の問題点

フルコナゾールは、安定した吸収性を有するものの、アスペルギルス属には抗菌作用を示さないことと、一部のカンジダ属(*C. krusei* や *C. glabrata*)には無効である事が指摘されている(5)。

フルコナゾールの予防投与が普及し、かつて致死率が高かった *C. albicans* による深在性真菌感染が減少し、アスペルギルスや他のカンジダ属による感染症の頻度が増加している(6)。特にアスペルギルス感染症は致死率が高い。このため、フルコナゾールの漫然とした予防投与の有用性に関しては疑問がもたれている。

④新規抗真菌剤の開発状況

感染症の分野においては、AIDS 関連真菌感染症の対策が社会的急務となっていることを背景に、より有効で毒性の少ない新規の抗真菌剤の開発が相次いでいるためである(7)。このことは、幹細胞移植領域においては朗報である。現在、海外において、吸収性を改善したイトラコナゾール・オーラルソル

ーションおよび、静注薬が市販されており、国内においては同薬剤の治験が進行中である。また、脂肪化アンホテリシン B や、ポリコナゾール(8)、ミカファンギンなど、新規抗真菌剤の開発が相次いでおり、これら薬剤の幹細胞移植領域における有用性と汎用性が検証される必要がある。

#### ⑤ reduced-intensity stem cell transplantation (RIST)の普及と真菌感染症

RIST は、近年急速に増加しつつある新しい造血幹細胞移植の方法である。この治療法が開発されたため、これまで造血幹細胞移植の適応外と考えられてきた高齢者、あるいは臓器障害患者にも移植が行えるようになった。また、治療関連死亡の頻度が減少したため、悪性腫瘍や固形腫瘍など、これまで移植が試みられてこなかった疾患に対しても臨床試験が始まっている。

RIST における真菌感染症の頻度は報告により大きな差を認める(9) (10)。一般論として、RIST では好中球減少期間が短く、前処置による粘膜毒性が軽いため、真菌感染、特にカンジダ感染の頻度は減少すると予想される。しかし、GVHD の頻度は従来の移植と変わらず、免疫抑制は高度である。このため、アスペルギルスを始めとする晩発性真菌感染症は、RIST でも大きな問題になるかもしれない。RIST の対象患者には高齢者が含まれる事を考慮すれば、RIST では真菌感染症は重大な問題であることがわかる。今後、RIST における真菌感染予防を確立する必要がある。

対象と方法：

##### ①目的

国内における幹細胞移植の際の真菌感染予防に関する実態調査。

##### ②方法

全国の 122 の移植施設にアンケート調査用紙を送付し、年間の総移植件数、移植の内訳、無菌室クリーンベット使用状況、抗真菌剤使用状況、深在性真菌症発症例の詳細を調査した。対象とした症例は、

2001 年 1 月から 12 月までの間に移植を受けた症例とした。

##### ③調査経過

骨髓移植実施施設として登録されている全国 418 施設を対象に、2002 年 8 月 16 日に、本研究への参加の意思を往復はがきで確認した。合計 134 施設から返信があり、122 施設が参加の意思を表明した。これらの参加意思表明施設を対象に、2002 年 9 月 20 日付けでアンケート用紙を郵送した。回答の期限は 10 月 10 日とした。10 月 31 日までに 53 施設からの回答が得られた。2003 年 1 月に、回答の再依頼を行い、2003 年 1 月 31 日現在、総計 63 施設からの回答が得られた。これを本報告における解析対象とした。

##### ④解析方法

深在性真菌症発症率の比較に、 $\chi^2$  乗検定を用いた。深在性真菌症発症に影響を与える因子の検証のために、単変量解析として Logistic 回帰分析を用いた。いずれの有意差検定も、5%有意水準で判断した。

結果：

##### ① 参加施設

総回答施設は 63 施設、総移植件数は 652 件であった。自家幹細胞移植(auto-SCT)が 274 件(42.0%)、同種幹細胞移植(allo-SCT)が 317 件(48.6%)、reduced-intensity SCT(RIST)が 61 件(9.4%)であった(Tab. 1)。

##### ② 原疾患

急性骨髄性白血病 15%、急性リンパ性白血病 14%、慢性骨髄性白血病 8%、中高悪性度リンパ腫 21%、低悪性度リンパ腫 5%、骨髓異形成症候群 6%、多発性骨髄腫 12%、再生不良性貧血 2%、固形腫瘍 10%、その他 7%であった(Fig 1)。

##### ③ 無菌室の使用状況

auto-SCT、allo-SCT、RIST における無菌室の

併用率は、それぞれ、64.9%、88.7%、46.8%であり、allo-SCT で最も高く、RIST で最も低かった。(Fig. 2)

#### ④ 抗真菌剤予防薬の選択状況

抗真菌剤予防投与薬は、auto-SCT、allo-SCT、RIST いずれにおいてもフルコナゾールが最も多用されており、その使用率はそれぞれ、72.3%、80.5%、87.5%であった。(Fig. 3)

#### ⑤ 深在性真菌症発症例の原疾患

急性骨髄性白血病 15%、急性リンパ性白血病 14%、慢性骨髄性白血病 8%、中高悪性度リンパ腫 21%、低悪性度リンパ腫 5%、骨髄異形成症候群 6%、多発性骨髄腫 12%、再生不良性貧血 2%、固形腫瘍 10%、その他 7%であった(Fig 4)。

#### ⑥ 深在性真菌症発症率および発症形式

総移植件数は 652 件中、深在性真菌症を発症した症例は、35 例であった。proven 11 例、probable 24 例であり、発症率は 5.4% (35/652)であった。これら 35 例のうち、auto-SCT、allo-SCT、RIST

考察：

##### 1) 本邦における真菌感染予防の実態

造血幹細胞移植領域で有効性が確立している真菌感染対策は、1) HEPA フィルターの使用 2) 骨髄抑制期間のフルコナゾールの予防投与である(1)。この二つの方法は、CDC のガイドライン(1)、および日本造血幹細胞学会の感染対策ガイドラインでも推奨されている。多くの移植医は、この二つのガイドラインの存在を知り、その内容を熟知していると予想される。しかるに、真菌感染対策では、これらの基準が十分に遂行されているとは言えない。この原因を考察する事は、移植医療の向上を考える上で重要であると考えられる。

##### 2) HEPA フィルター

HEPA フィルターは微細なフィルターを通して移植病棟の空気を循環させることにより、空中の粉塵を濾過することが出来る。この装置はアスペルギルス胞子を除去することが可能であり(11)、好中球

の症例はそれぞれ 2 例、24 例、9 例づつであった(Fig 5)。また、これらのうち、原因菌が同定された症例は 15 例であり(Tab. 2)、その内訳は Fig. 6 の通りであった。

100 日以内の発症が 60.0%を占めていた。発症日の中央値は 77 日であった。(Fig. 6)

発症例のうち発症時に、GVHD の合併があった症例は 18/35 (51.4%)、免疫抑制剤投与中の症例は 29/35 (82.9%)、ステロイド投与中の症例は 20/35 (57.1%)であった(Tab. 3)。

#### ⑦ 深在性真菌症の治療

発症例 35 例中 26 例(74.3%)でフルコナゾールの予防投与を併用していた。一方、深在性真菌症発症後の治療薬には、35 例中 24 例(68.6%)でアンホテリシン B を第一選択薬として用いていた(Fig. 8)。

#### ⑧ Outcomes

35 例中、12 例は感染症から改善したが、23 例は改善しなかった。

低下期間の侵襲性アスペルギルス感染症の頻度を低下させる。HEPA フィルターは、わが国のほぼ全ての移植病棟に装備されていると考えられる。このように HEPA フィルターの重要性に関しては、多くの臨床医が十分に納得していると考えられる。

しかるに、従来型の同種移植の 11%、およびミニ移植の 53%が所謂「無菌室」で移植を受けていない事は興味深い。この原因として最も考えられる事は、アスペルギルス感染症の好発時期の変化であろう。従来、アスペルギルス感染の好発は骨髄抑制期間と慢性 GVHD 発症時期の二峰性を呈していた(12)。しかし、近年はアスペルギルスの発症は専ら慢性 GVHD 発症時期のみに限定されるようになり、今や晩発性合併症と認識されるようになった(13)。この理由としては、HEPA フィルターの普及が関与している可能性も否定できないが、移植の補助技術が全体として向上したことに負う部分が大きいであろう。このように移植手技の向上により背景が変化したため、過去において確立された医療行為が、

たとえガイドラインで推奨されていても遵守する医師が減少したことは興味深い。HEPA フィルターの有用性に関しては、現在の医療水準で再評価することが必要であろう。

### 3) 抗真菌剤予防投与

抗真菌剤の予防投与を取り囲む状況は前者とは異なる。全ての施設が、自家、同種、ミニ移植の何れの場合にも何らかの抗真菌剤を投与している (Figure 3)。この事実は、全ての移植医が移植時には何らかの抗真菌剤の予防投与が必要であると考えていることを意味する。移植患者に投与する抗真菌剤の種類に関しては、過去に複数の Phase III 試験が行われており、経口アゾール系薬剤が amphotericin B の経静脈投与と比較して、真菌感染予防効果は同等であり、副作用が少ない点で優れていることが証明されている(14, 15)。尚、今回の調査でも同種移植患者の 13%の症例に投与されている AMPH-B 経口製剤はコンプライアンスが不良で、その投与は推奨されていない(1)。

このように、わが国の移植現場では、ガイドラインにて推奨されていない抗真菌剤の予防投与が行われているが、この慣行は一部の患者に不利益を与えている可能性がある。今回の研究では 35 件の真菌感染症が確認され、15 件で起炎菌が同定された。その内訳を Figure 7 に示す。アスペルギルス属が培養にて検出しにくいいため、カンジダ属の頻度が高くなったと推察される。しかしながら、6 例では *C. albicans* が検出され、好中球低下期間に真菌感染が多発している事は重大である。*C. albicans* は移植後に発症する深在性真菌症の中で最も重症度が高く、アゾール系を用いた真菌感染予防の主たる目的は、この真菌の感染を予防することであったといっても過言ではない。*C. albicans* はフルコナゾールに対する感受性が高く、少量でも予防投与が行われていれば深在性真菌症を起こす事はない。以上の事実より、わが国では同種移植の際のアゾール系抗真菌剤の予防投与を徹底するように啓蒙する必要がある。わが国でアゾール系の抗真菌剤の予防投与が徹底されていない理由としては、アゾール系抗真菌剤の予防投与が適応がないことが大きく影響してい

る事は想像に難くない。今後、医師主導臨床試験などにより適応拡大を念頭におく必要があろう。

### 4) 結語

本邦における真菌感染症予防は、概ね世界標準とされるガイドラインを遵守している。しかし、アゾール系抗真菌剤の予防投与に関しては施設間格差を認め、患者の予後に悪影響を及ぼしている可能性がある。アゾール系抗真菌剤の予防投与が行えない背景には、わが国の保険事情、ガイドラインの啓蒙の不徹底など幾つかの要因が挙げられる。

### 引用文献

1. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000;6(6a):659-713; 715; 717-27; quiz 729-33.
2. Goodman JL, Winston DJ, Greenfield RA, et al. A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1992;326(13):845-51.
3. Slavin MA, Osborne B, Adams R, et al. Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infections after marrow transplantation—a prospective, randomized, double-blind study. *J Infect Dis* 1995;171(6):1545-52.
4. Marr KA, Seidel K, Slavin MA, et al. Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. *Blood* 2000;96(6):2055-61.
5. Wildfeuer A, Laufen H, Schmalreck AF, et al. Fluconazole: comparison of pharmacokinetics, therapy and in vitro

- susceptibility. *Mycoses* 1997;40(7-8):259-65.
6. Kami M, Machida U, Okuzumi K, et al. Effect of fluconazole prophylaxis on fungal blood cultures: an autopsy-based study involving 720 patients with haematological malignancy. *Br J Haematol* 2002;117(1):40-6.
  7. Asensio A, Oliver A, Gonzalez-Diego P, et al. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* 2000;30(1):55-60.
  8. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Voriconazole versus amphotericin B for
  9. Junghanss C, Boeckh M, Carter RA, et al. Incidence and outcome of cytomegalovirus primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002;347(6):408-15. infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood* 2002;99(6):1978-85.
  10. Hagen EA, Stern H, Porter D, et al. High rate of invasive fungal infections following nonmyeloablative allogeneic transplantation. *Clin Infect Dis* 2003;36(1):9-15.
  11. Uzun O, Anaissie E. Antifungal prophylaxis in patients with hematologic malignancies: a reappraisal. *Blood* 1995;86(6):2063-72.
  12. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis* 1997;175(6):1459-66.
  13. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* 2002;100(13):4358-66.
  14. Koh LP, Kurup A, Goh YT, et al. Randomized trial of fluconazole versus low-dose amphotericin B in prophylaxis against fungal infections in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2002;71(4):260-7.
  15. Wolff SN, Fay J, Stevens D, et al. Fluconazole vs low-dose amphotericin B for the prevention of fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation: a study of the North American Marrow Transplant Group. *Bone Marrow Transplant* 2000;25(8):853-9.

Tab. 1 Total cases of stem cell transplantation

Institute N =53, Total cases of transplantation N = 652

Modality of transplantation

	Proportion	
	cases	(%)
auto-SCT	274	42.0
allo-SCT	317	48.6
RIST	61	9.4
合計	652	100.0

Fig. 1 Underlying disease of transplantation

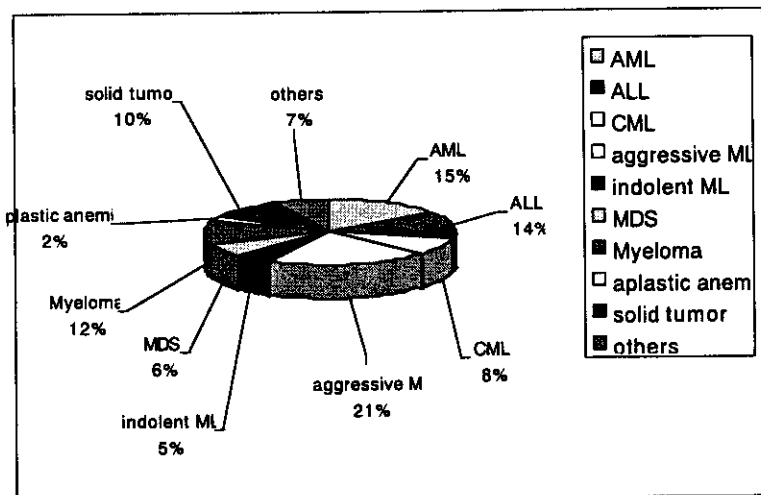


Fig. 2 Use of aseptic room or clean bed

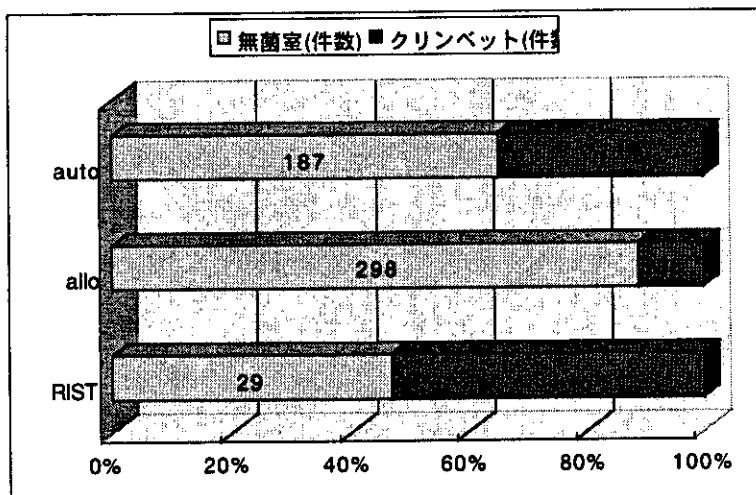


Fig. 3 Prophylactic use of antifungal drugs

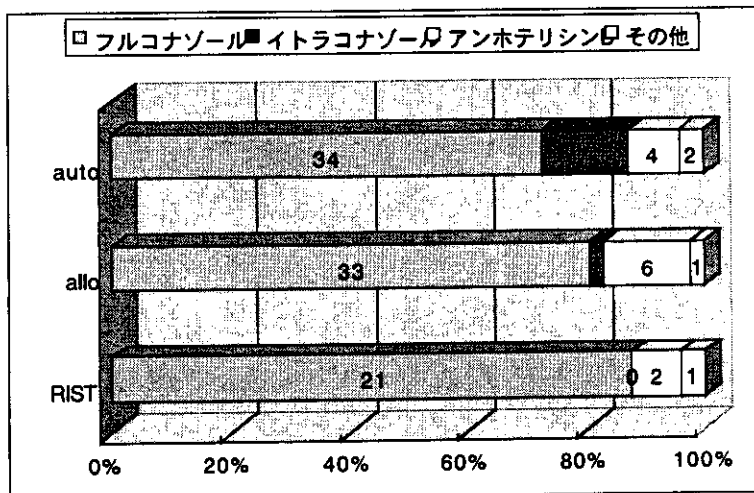


Fig. 4 Underlying disease of cases of invasive fungal infection

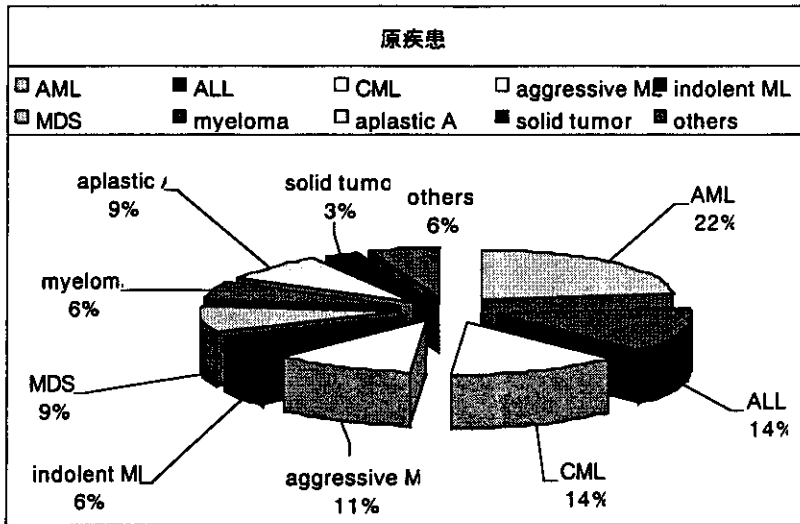
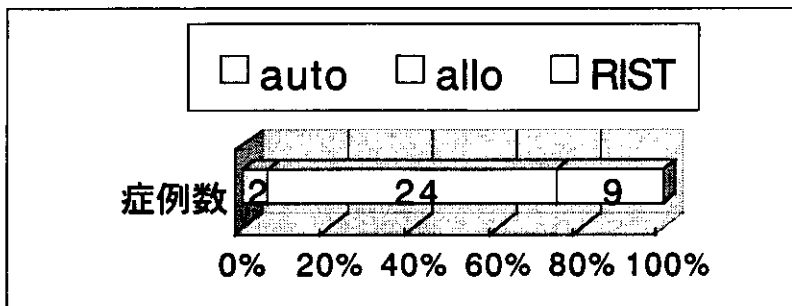


Fig. 5 Type of invasive fungal infection



Tab. 2 Etiology of infection

原因真菌同定の有無	Number of Cases
有	15
無	20

Fig. 6 Etiology of infection

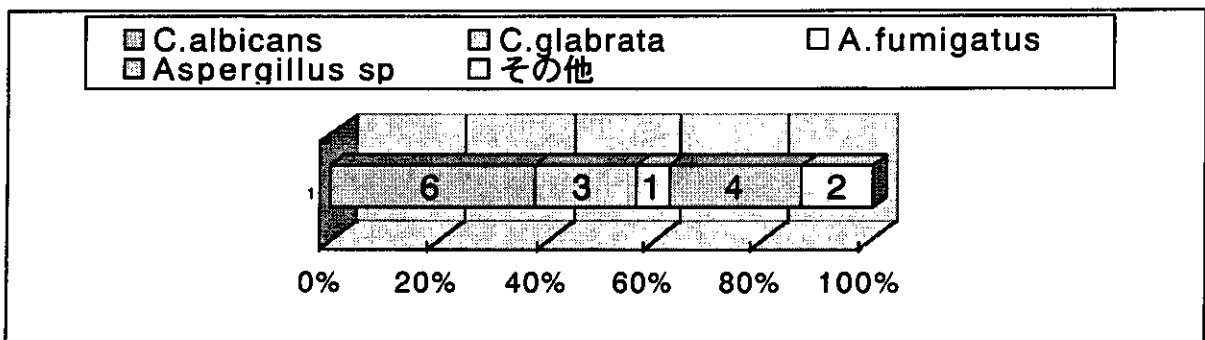
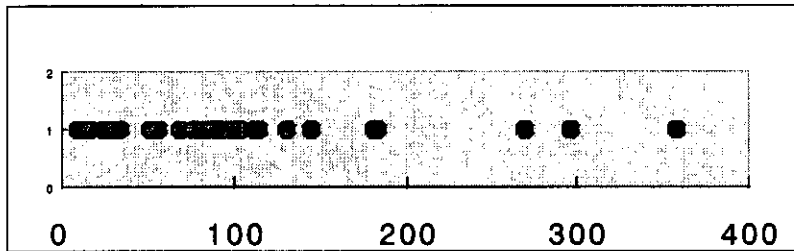




Fig. 7 Onset of invasive fungal infection

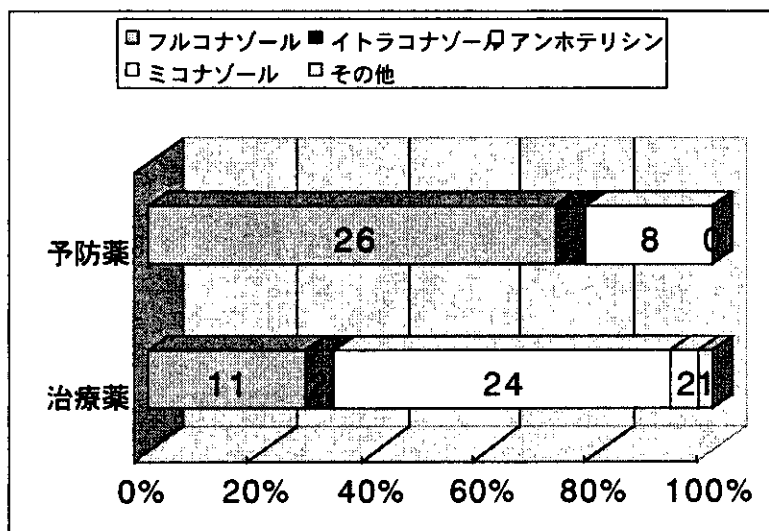


Tab. 3 Background of cases

発症時の状況

	GVHD	免疫抑制剤投与	ステロイド投与
有	18 (51.4%)	29 (82.9%)	20 (57.1%)
無	17 (48.6%)	6 (17.1%)	15 (42.9%)
合計	35 (100.0%)	35 (100.0%)	35 (100.0%)

Fig. 8 Prophylactic and therapeutic antifungal drugs



平成14年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

実験用カニクイザル体表の真菌に関する研究

分担研究者 高鳥浩介 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長

研究要旨

輸入動物の検疫学的見地から実験用カニクイザル体表の真菌学的調査を行った。調査動物は、インドネシア産カニクイザル雌 39 例，雄 35 例で，これら 74 例中 73 例から真菌が分離された。分離された真菌のうち *Cladosporium* がもっとも多く，以下 *Acremonium*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Arthrimum*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Emericella* であった。一方，皮膚糸状菌やケラチン好性真菌および病原性真菌は分離されなかった。

A. 研究目的

輸入動物には感染性疾患を有す危険性の観点から疫学調査を重視する必要がある。真菌症もその一つである。そこで，輸入動物のなかで研究者に重要なサル類の真菌学的検討を実施した。毒性試験に用いられているサルのなかでカニクイザルのほとんどは野生由来である。これらは，輸入時に所定の消毒処置が施されているが，体表に付着または寄生する真菌が全て死滅しているとは考え難く，そのまま実験現場に持ち込まれてくる可能性が高いといわれている。搬入された実験用カニクイザル体表について真菌学的調査を行い，さらに脱毛の認められる個体については発生頻度と程度を調査し，皮膚糸状菌に起因する脱毛の可能性について検討した。

B. 研究方法

調査した動物は搬入されたインドネシア産カニクイザル，雌 39 例(約 5 歳齢)，雄 35 例(5 歳齢以上)である。これらは輸入時に，消毒液の噴霧を受けた後，国内検疫施設で 9 週間以上の検疫期間を経ている。

採材は顔面，胸部，腹部，後背部の四カ所，および脱毛の認められる例では脱毛部の各部位に，メンディングテープを数回貼り付け，テープを二分し，それぞれの供試試験片を 10cm<sup>2</sup> とした。一つは一般真菌用ポテト・デ

キストロース寒天平板(以下 PDA)，もう一方を皮膚糸状菌分離用シクロヘキシミド加 PDA 平板に貼付後，30℃で 2 週間培養した。培養後，発育した真菌集落は PDA 斜面培地で分離，常法に従って同定した。なお平板上に貼付したテープは培養開始 3~4 日目に取り除き，培養を続行した。

C, D. 研究結果および考察

脱毛例の発生頻度および程度：

各例における脱毛の判定基準は，外傷瘢痕部を除外し，脱毛に伴ってフケや軽度の発赤が認められるものを陽性とした。脱毛は調査した 74 例中 16 例，約 22%に認められ，その 16 例中 6 例，約 38%が 2 カ所以上の脱毛が確認された。

これら脱毛例の体表を 5 カ所の領域に大別した場合，脱毛部位の分布頻度は，側頭部 5 例，肩部~前肢端 8 例，後背部 2 例，腰部~後肢端 8 例，尾根部~尾端 1 例で，その脱毛程度は広い範囲にわたって発生しているものから，母指頭大のものまでさまざまな大きさで観察された。

体表の真菌学的調査：

体表の真菌学的調査では，調査した 74 例中 73 例から何らかの形で糸状菌または酵母

Table 1. Fungal isolates from skin surface of cynomolgus monkeys

Fungus	No. of monkey
<i>Cladosporium</i>	37
<i>Acremonium</i>	11
<i>Alternaria</i>	10
<i>Curvularia</i>	10
<i>Arthrimum</i>	9
<i>Trichoderma</i>	7
<i>Stachybotrys</i>	5
<i>Emericella</i>	5
<i>Epicoccum</i>	2
<i>Pestalotia</i>	1
<i>Aureobasidium</i>	1
Yeasts	43

が分離された。分離菌のうち *Cladosporium* が 37 例ともっとも多く、以下 *Acremonium* 11 例、*Alternaria* および *Curvularia* 10 例、*Arthrimum* 9 例、*Trichoderma* 7 例、*Stachybotrys* および *Emericella* 5 例、そして *Epicoccum* 2 例、*Pestalotiopsis* および *Aureobasidium* 1 例、酵母 43 例で、脱毛の原因となるような皮膚糸状菌は分離されなかった (Table 1)。これらの真菌は、サル体表から重複して分離された。また分離に際し、採材部位の違いによる検出率の差や、菌種の特異性はなかった。分離された菌のうち *Cladosporium* は空中、*Acremonium*、*Aureobasidium* は湿性環境、*Alternaria*、*Curvularia* は植物や空中、*Arthrimum* は動物体表や植物、*Trichoderma*、*Stachybotrys* は植物や植物線維、*Emericella* は動物体表や乾燥土壌、*Epicoccum*、*Pestalotiopsis* は植物や土壌中から主に分離されることが知られており、特に *Emericella* は南方地域に分布する菌種とされている[1]。

このように今回分離された真菌は、*Cladosporium* のような空中に浮遊する腐生性真菌以外、自然環境下に生息域をもつ菌種の多いことが特徴であった。

また脱毛例を含めたすべての部位からも、皮膚糸状菌は分離されなかった。脱毛が感染性を有す真菌でないとする、動物間の行動によるか、ストレスなどの影響を受けたことによるか今回は確認できなかった。

ケラチン好性真菌の検討：

今回分離された真菌のうち *Alternaria*、*Curvularia* および *Acremonium* の一部には、*Trichophyton*、*Microsporum*、*Chrysosporium* などのようにケラチン好性を示す菌種があり、このような真菌は日和見的に角膜炎や角質層の感染症を起こすことが報告されている[2]。そこで今回分離された菌株のケラチン好性真菌としての可能性を検討する目的で、以下の実験を試みた。すなわち、ケラチン好性真菌は通常高いプロテアーゼ活性をもつことから、滝内らの方法[3]により得られた培養液を Lowry 法によりタンパク濃度を測定し、対照ケラチン好性真菌として用いた *Microsporum gypseum* (C74-A 株)との比較を行った。その結果、対照真菌とした *M. gypseum* では  $95.7 \mu\text{g/ml}$  であったのに対し、今回分離された *Alternaria* M\*90001 株は  $64.4 \mu\text{g/ml}$ 、*Curvularia* M\*90002 株は  $64.6 \mu\text{g/ml}$ 、*Acremonium* M\*90003 株は  $60.5 \mu\text{g/ml}$  といずれも低値を示し、これらの菌株がケラチン好性真菌となりうる可能性は低いものと推察された (Table 2)。

今回の調査に限れば、検出された真菌を見る限り、ある意味では特徴ある狭い分布を取ることがわかった。輸入された実験用カニクイザルには空中浮遊菌ばかりでなく、自然界に分布する菌種が付着した状態で実験現場に搬入されていることが示唆されたが、動物実験に影響を与えるような菌種の混入は認められなかった。しかしながら、実験用霊長類において皮膚糸状菌に起因する *Microsporiosis*[4]や *Trichophytosis*[5]などの感染症も報告されていること、および症例

は多くないがアスペルギルス症、接合菌症、フザリウム症、カンジダ症や放線菌症のような典型的な日和見感染症が報告されて[6]いることから、今後とも実験用霊長類の管理上、疫学的検討が必要であると思われる[7]。

Table2. Results of protein measurement (µg/ml) in fluid medium

Neg. control	medium*		33.0
Pos. control	<i>Microsporium gypseum</i> (C74-A)		95.7
Strains from monkey	<i>Alternaria</i> (M#90001)		64.4
	<i>Curvularia</i> (M#90002)		64.6
	<i>Acremonium</i> (M#90003)		60.5

\*: Reference [3] ( ): Strain No.

#### E. 結論

輸入動物の検疫学的見地から、実験用カニクイザル体表の真菌学的調査を行った。

調査動物は、インドネシア産カニクイザル雌 39 例、雄 35 例で、これら 74 例中 73 例から真菌が分離された。

分離された真菌のうち *Cladosporium* がも

っとも多く、以下 *Acremonium*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Arthrimum*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Emericella* であった。

皮膚糸状菌やケラチン好性真菌は分離されなかったが、今後も輸入動物が検疫の対象として多くなる可能性の高いことから検疫体勢を十分に維持する必要がある。

#### F. 文献

- [1] 宇田川俊一・椿啓介編(1987). 菌類図鑑・上, 33-85, 講談社, 東京.
- [2] 高鳥浩介(1987). 畜産の研究, 41, 1165-1168.
- [3] 滝内石夫(1973). *Japan J. Med. Mycol.*, 14, 191-193.
- [4] Henry J. Baler, Linwood G. Bradford, and Leopoldo F. Montes (1971). *J. Ame. Vet. Med. Ass.*, 159, 1607-1611.
- [5] Saez H. and Chauvier G (1977). *Animales de Parasitologie.*, 52, 659-671.
- [6] 高鳥浩介 (1997) 日獣会誌 50, 691-699.
- [7] 前島一淑 監 (2000) 実験動物感染症の対応マニュアル, アドスリー

厚生労働科学研究費補助金（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」

糸状細菌による呼吸器感染症に関する臨床病理学的研究

研究協力者 馬場基男 国立療養所東京病院呼吸器内科

研究要旨 国立療養所東京病院において経験した *Nocardia* 及び *Actinomyces* を含む糸状細菌による呼吸器感染症の症例について臨床病理学的に検討した。いずれも手術材料にて診断されることが多く、手術材料にても *Nocardia* と *Actinomyces* の鑑別が困難であった。

A. 研究目的

嫌気性病原性 *Actinomycetes* である *Actinomyces* および好気性病原性 *Actinomycetes* である *Nocardia* はいずれも真菌と細菌の両方の特徴をそなえているが、現在は糸状細菌として分類上細菌に属している。いずれも肺化膿症の起炎菌として臨床的に重要であるが時に診断が困難である上、両者ともに菌糸を形成する糸状細菌であるため、形態的に鑑別が困難である。本研究は糸状細菌による呼吸器感染症の症例に関して臨床病理学的に検討し、これらの特徴及び診断、治療上の問題点を明らかにすることを目的とした。

B. 対象及び方法

1988年から2002年の間、国立療養所東京病院において経験した糸状細菌による呼吸器感染症の症例12例(男性11例、女性1例)。年齢は46~73

歳で平均年齢は60.0±7.7歳。これら症例について臨床及び病理学的に検討した。

症例内訳はノカルジア症が2例、放線菌症が1例で、ノカルジア症と放線菌症の同定ができなかった同定困難例が9例である。診断根拠はノカルジア症の1例が気管支洗浄と肺葉切除、他の1例が気管支洗浄より *N.asteroides* が同定され、放線菌症の1例は気管支洗浄より *A.odondolyticus* が同定された症例である。同定困難例については気管支擦過2例、経気管支肺生検1例、肺部分切除2例、肺葉切除4例であり、これらの検体にて糸状細菌が確認されたが、ノカルジアか放線菌かの同定が困難なものとした。

C. 研究結果

基礎疾患に関してノカルジア症は陳旧性肺結核、気管支拡張症がそれ

ぞれ 1 例、放線菌症の 1 例に糖尿病が、同定困難例は糖尿病が 6 例、陳旧性肺結核、肺気腫がそれぞれ 1 例あり、明らかな基礎疾患の無いものは 1 例のみであった。

症状については発熱が 7 例 (58.3%)、咳嗽が 11 例 (91.7%)、血痰 8 例 (66.7%)、喀血 4 例 (33.3%)、胸痛が 5 例 (41.7%) に見られ全例が有症状であった。症状発現から診断までの時期は 1~60 ヶ月で平均 8.3±16.1 ヶ月で亜急性から慢性に経過している傾向にあった。

画像所見は孤立結節影、塊状影、嚢胞影に分類した。孤立結節影は 2 例でいずれも同定困難例、塊状影を呈した 9 例はいずれも単発で、ノカルジア症が 1 例、放線菌症が 1 例、同定困難例が 7 例であった。嚢胞陰影はノカルジア症の 1 例に見られた。陰影内の低吸収域と空洞はいずれも嚢胞陰影を除く 11 例で検討し、それぞれ 10 例 (91%)、5 例 (45%) に認められた。胸膜肥厚は 9 例 (75%) に、胸水は放線菌症の 1 例 (8%) に見られた。病変部位は 5 例 (同定困難例 4 例、放線菌症 1 例) が S1+2 で、2 例 (同定困難例 1 例、ノカルジア症 1 例) が右 S3 でありその他は右 S6 (同定困難例)、左 S6 (同定困難例)、右 S4 (同定困難例)、右 S5 (ノカルジア症)、右 S10 (同定困難例) がそれぞれ 1 例ずつ

であった。

転帰に関しては術前診断例 5 例の中、ノカルジア症の 1 例が ST 合剤による治療に抵抗性であり中葉切除を行っており、その他はノカルジア症の 1 例は ST 合剤、放線菌症の 1 例はペニシリン、同定困難例 2 例は MINO を中心とする抗生剤にて治癒した。術後診断例 7 例全例が術後合併症なく再発も見られなかった。

手術例 8 例の病理所見は、新旧の違いはあるが、いずれも肺化膿症の所見であった。膿瘍内容物の培養は全例で施行しており、1 例に *Nocardia asteroides* が分離されたが、他は明らかな糸状細菌は分離できなかった。糸状細菌の菌塊である、いわゆる sulfur granule は 7 例 (87.5%) に認められ、この中にはノカルジア症の 1 例も含まれていた。sulfur granule 周囲の Splendore-Hoeppli 現象は同定困難例の 3 例に見られた。病理学的に既存の肺病変は、ノカルジア症に気管支拡張が、同定困難例にバリウム誤嚥、陳旧性結核病変がそれぞれ 1 例に確認された。

#### D. 考案と結論

放線菌症とノカルジア症は臨床的にも形態学的にも多数の類似点を有している。今回の症例において臨床症状はいずれも非特異的なものであり、画像上は嚢胞陰影を呈したノカ

ルジア症の 1 例を除き、孤立結節影または塊状影であり膿瘍化している事が多く両者を鑑別するような特徴的な所見は見られなかった。発症要因に関しては、一般にノカルジア症は免疫不全患者における日和見感染症とみなされているが、今回の症例には免疫不全患者は含まれておらず、ノカルジア症の 2 例、同定困難例の 2 例はいずれも既存の肺病変に続発し、その他は高率に糖尿病が合併しており、発症要因は既存の肺病変に続発するものと、糖尿病を基礎疾患に有するものとに大別された。

肺放線菌症は膿瘍内に糸状細菌の菌塊である sulfur granule を形成する事が大きな特徴とされ、一方でノカルジア症は通常、肺においては菌塊を形成しないとされている<sup>1)</sup>。一般に肺放線菌症の診断は、培養同定あるいは sulfur granule の証明のいずれかによるとされているが、培養陽性率は 10~15%程度と低く、専らの診断は膿瘍内の sulfur granule の証明のみでなされているのが現状である<sup>2)3)</sup>。今回の手術例は内科的治療に抵抗したノカルジア症の 1 例を含めた 8 例であり、この 8 例中 7 例に sulfur granule が確認された。しかしノカルジア症

の手術材料にても sulfur granule を認めており、この所見のみをもって放線菌症と診断する事はできないと考えられた。ただ臨床的に、放線菌とノカルジアの鑑別が問題となるのは外科切除例よりも生検等により糸状細菌が確認された症例である。今回このような症例が 2 例あり、いずれも MINO を中心とする抗生剤で治癒してはいるものの、一般にノカルジア症と放線菌症では治療方針が異なる。いずれも適切な抗生剤の使用により根治しうる疾患であり、両者の形態的な鑑別法の確立が期待される。

#### 参考文献

- 1) Robby SJ, Vickery AL: Tinctorial and morphologic properties distinguishing actinomycosis and nocardiosis. *New Engl J Med* 1970; 282: 593~596.
- 2) 中西祐之, 橋爪一光, 他: 肺癌と鑑別困難であった肺放線菌症の 1 例. *日胸疾会誌* 1993; 31: 103~108.
- 3) 佐藤哲也, 高田信和, 他: 前縦隔腫瘍との鑑別を要した肺放線菌症の 1 例. *日胸疾会誌* 1997; 35: 888~893.

## コロニーダイレクトPCRによる放線菌遺伝子の迅速検出

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

前年度までの研究で*Streptomyces* や *Candida* において確立したコロニーダイレクトPCR (CD-PCR) を *Nocardia* に適用して汎用性を検討するとともに、放線菌において菌種特異的な遺伝子を対象に設計したプライマーの特異性の高さを検討した。その結果、*Nocardia* でもCD-PCRを容易に適用できること、また、菌種特異的な遺伝子の検出にとって高選択性のPCR条件を確立した。放線菌のゲノム解析が進んでいる現在、各種の放線菌に特異性の高い遺伝子を選択し、それらを標的とするプライマーを設計してCD-PCRを行うことにより菌の同定や薬剤耐性遺伝子などの迅速検出が可能になると期待できる。

### A. 研究目的

医真菌の検出・診断あるいは遺伝子解析にとって標的遺伝子の迅速検出法の確立は重要な課題である。平成12年度は、放線菌において抗生物質耐性遺伝子 *kan* を指標として *S. griseus* を簡便迅速に検出するコロニーダイレクトPCR (CD-PCR) 法を確立し、その有用性を検討した<sup>1)</sup>。平成13年度は、*Candida albicans* 遺伝子の迅速検出にも容易に適用できることを、SAP6 (*Candida albicans* secreted aspartic proteinase) 遺伝子<sup>2)</sup> (GenBank No. Z30192) を標的遺伝子として明らかにした。平成14年度は、16S rDNA を標的として *Nocardia* におけるCD-PCRの汎用性を検討するとともに、菌種特異的な遺伝子として *S. griseus* のAAC(3) をコードする遺伝子 (*kan*)、*S. kasugaensis* のAAC(2') をコードする遺伝子 (*ist*) を対象に選択性の高いプライマーの設計し、CD-PCRによる選択的迅速検出法の確立を目指した。

### B. 研究方法

1. 使用菌株と標的遺伝子：ゲノム解析が進んでいる菌種 (*Nocardia farcinica*) を含めて *Nocardia* の4菌株を用いた (図1)。また、*S. griseus* ISP5236、*S. kasugaensis* 3株および稀少放線菌 #8株のAAC(3)、AAC(2') およびAAC(6') の遺伝子を対象としてプライマーを設計した (表1)。

#### 2. Colony Direct PCR

寒天培地に生育した *Nocardia* のコロニーから滅菌爪楊枝の先を使って少量の細胞をPCR反応液に添加後、

直ちにPCR反応を行った。

PCR反応液 (20  $\mu$ l) は、1 $\times$ PCR バッファ、dNTPs 各0.2mM、MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1mM、KOD-plus-DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) 0.4U、16S rDNA プライマー 0.3  $\mu$ M を基本組成とした。

PCRは、95 $^{\circ}$ C・3分 $\rightarrow$ (95 $^{\circ}$ C・30秒 $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C・30秒 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C・60秒)  $\times$ 30サイクル行った後、さらに72 $^{\circ}$ C・3分インキュベートした。反応終了後、増幅DNAを1.8%アガロース電気泳動によりモニターした。

#### (倫理面への配慮)

国立感染症研究所で定められているバイオセーフティ規則と標準的微生物学手法に従って菌株を取り扱った。

### C. 研究結果

#### 1. Colony Direct PCRによる*Nocardia*遺伝子の検出

16S rDNAを標的遺伝子としてColony Direct PCRを行った。その結果、図1において明らかのように、標的断片のクリアな選択的増幅が認められた。

#### 2. 菌種特異的な遺伝子のCD-PCRによる選択的検出

図2は、放線菌の菌種特異的な遺伝子のCD-PCRによる増幅のためのプライマーの標的領域を示している。また、表1にはそれらの塩基配列を示した。

それらを用いたCD-PCRの結果を図3にまとめて示した。*S. griseus* に特異的に存在する *kan* 遺伝子は、従来用いていたプライマーである *kan1* と *kan2* の組合せ



では他菌種の*S. kasugaensis* において特異的な断片の増幅が観察された。

このプライマーセットはこの遺伝子の制御領域からORFの前半領域を標的領域にしていたので、それに代わるものとしてORFの全体領域をカバーするkan3とkan4を設計してCD-PCRを行ったところ、極めて選択性高く*S. griseus* において標的断片が増幅することが認められた。

*S. kasugaensis* のAAC(2')をコードする*ist*遺伝子を標的とした場合、最初に用いた*ist1* と*ist2* というプライマーセットでは*S. lividans* においていくつかの増幅断片が認められたが、新たに設計した*ist3*と*ist4*というプライマーセットでは標的断片が選択性高く増幅することが認められた。さらに、このプライマーセットを用いて、Kaugamycin生産菌株の*S. kasugaensis* 3株と*S. kasugaspinus* 1株を対象にCD-PCRを行ったところ、*S. kasugaensis* の3株において選択的に標的断片の増幅が観察された。

#### D. 考察

今回の研究で、Colony Direct PCRは、*Streptomyces*のみならず*Nocardia* やその他の稀少放線菌でも有効に標的断片の増幅検出に使えることが明らかとなった。*C. albicans* においても全く問題なく使うことができることを昨年証明しており、この方法の汎用性と利便性が裏付けられたと考えることができる。留意点としては、目に見えない極少量の菌体をPCR溶液に添加することと性能の高いDNA Polymeraseを使用することがキーポイントである。

一方、*S. griseus* や*S. kasugaensis* に特異的な遺伝子を選択性よくPCR増幅するプライマーを設計することができた。現在、*Nocardia* のゲノム解析が進んでおり、すでに報告されている*Streptomyces* のゲノム情報や個別に解析されている遺伝子の中から、特定の菌種や菌株に特異性の高い遺伝子を選択することが可能になると考えられる。これらを考慮するならば、CD-PCRによって多数の菌株の標的遺伝子の存否を迅速簡便に検出することが可能になると判断される。

#### E. 結論

1. DNAの代わりに菌体そのものを直接PCR溶液に添加し、そのままPCRを行って標的遺伝子を増幅させるColony Direct PCR法は、一般細菌と同様に放線菌や*Candida* においても汎用性高く使用できることがわかった。
2. 標的遺伝子を増幅させるためのプライマーの設計

次第によって標的遺伝子増幅の選択性を高めることができた。

3. 今後、ゲノム情報の蓄積によって多様な菌株における特異性の高い遺伝子の存在が明らかになるにつれ、それらを標的とするColony Direct PCRは、多様な菌株の迅速簡便な識別・同定法として有効性を発揮すると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tsuchizaki, N., Hamada M. and Hotta K.: Rapid characterization by colony direct PCR of distribution specificity in *Streptomyces* of *kan* gene encoding a specific aminoglycoside-3-N-acetyltransferase. *Actinomycetologica* 15: 23-29 (2002).
- 2) 土崎尚史、堀田国元: Colony direct PCRによる各種微生物遺伝子の簡便・迅速検出. TOYOBO UPLD AD No. 70, pp. 15-16 (2002).

##### 2. 学会発表

- 1) 植木雅志、石川淳、長田裕之、堀田国元: PCRを用いたランダム増幅による未知未利用遺伝子の取得. 第17回日本放線菌学会大会、2002年6月、つくば。

#### H. 参考文献

- 1) 堀田国元: 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. 平成12年度厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業) 「輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究(主任研究者 上原至雅)」研究報告書, pp. 96-101.
- 2) 堀田国元: *Candida albicans* 遺伝子の迅速検出と放線菌等の薬剤耐性遺伝子ゲノム情報. 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(主任研究者 上原至雅)」研究報告書, pp. 122-124.
- 3) Ishikawa J, Tsuchizaki N, Yoshida M, Ishiyama D and Hotta K: Colony PCR for detection of specific DNA sequences in actinomycetes. *Actinomycetologica* 14: 1-7 (2000).

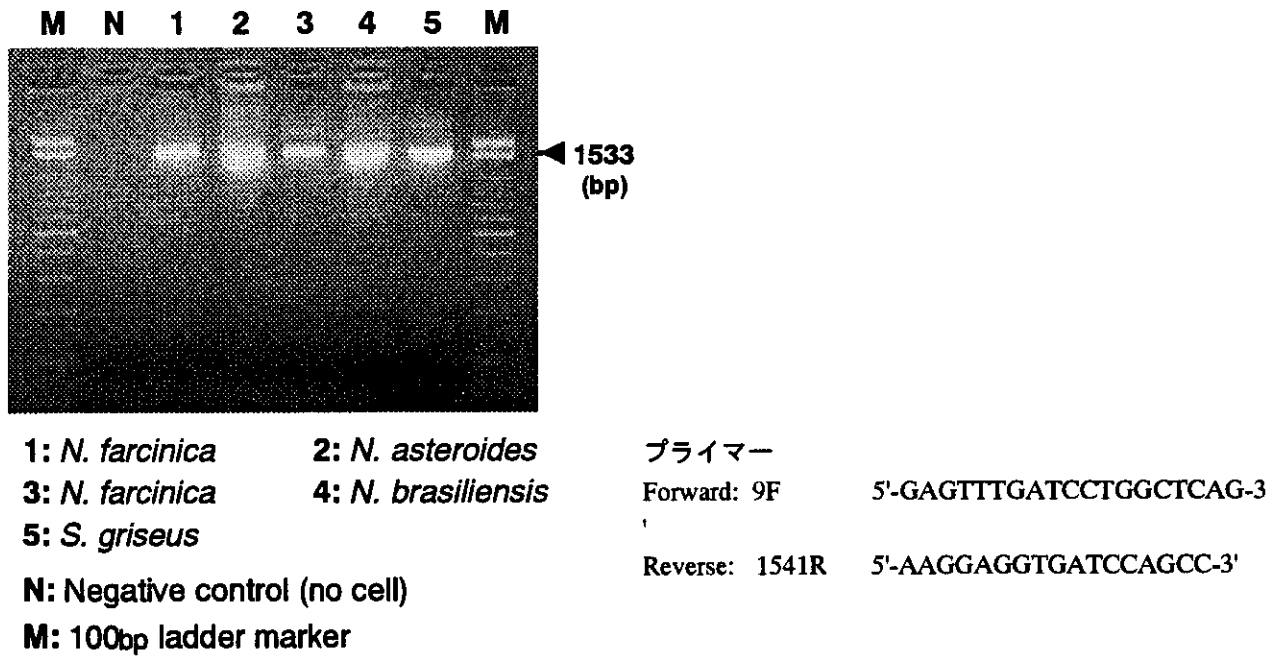


図 1. CD-PCRによる*Nocardia* の16S rDNAの増幅検

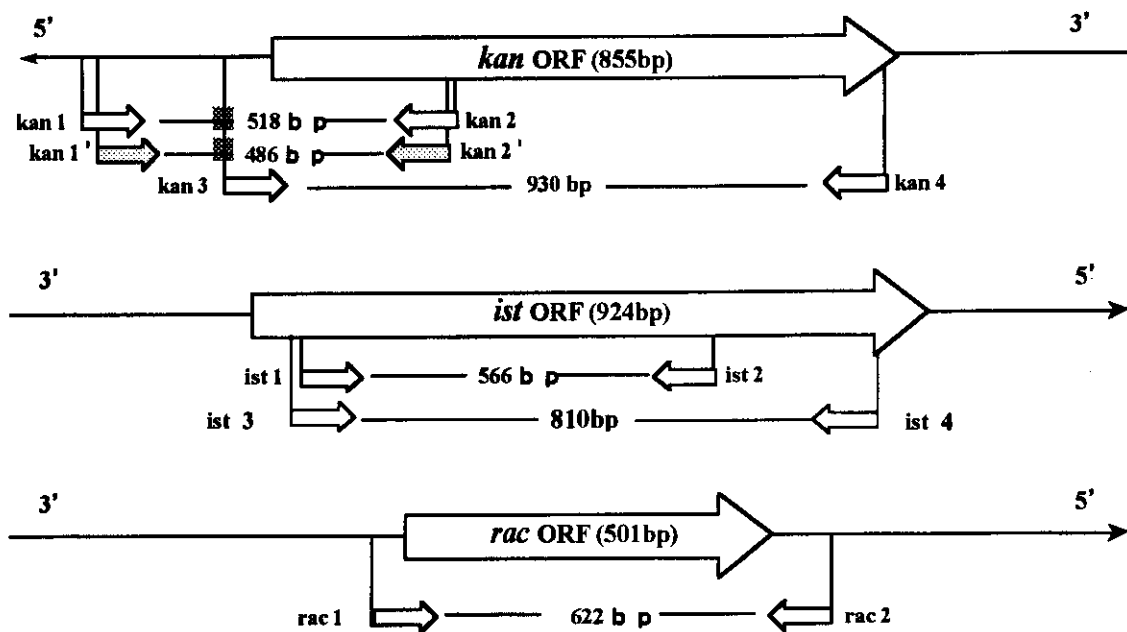


図 2. 菌種特異的遺伝子検出のためのプライマーの位置

表 1. プライマー

Gene	Enzyme	Product (bp)	Primers
<i>kan</i>	AAC(3)	518	kan1: 5' - CAGAGCCAGCAGCGACAAGG -3' kan2: 5' - GGCCAGTCGGTGAAGTCGTA -3'
		486	kan1': 5' - ACAAGGTGGACGGCGGCATC -3' kan2': 5' - TAGGGCGGAGCGTCGTTCCA -3'
		930	kan3: 5' - ATGGTCCCCAGTCCGTGTTC -3' kan4: 5' - TCAGGTGCTCCTCGATCCAG -3'
<i>ist</i>	AAC(2')	566	ist1: 5' - CACCAGGACAAAAGCCGCAG -3' ist2: 5' - CTCCCACGCCTTCCACGTAG -3'
		810	ist3: 5' - TTCGACCCTACCGACCGAAC -3' ist4: 5' - TCGGCAGGACGTAGAGGAAG -3'
<i>rac</i>	AAC(6')	620	rac1: 5' - ACGTCCCAAAGCCGTCATTC -3' rac2: 5' - GACCAAGGTTTGCCGGTCTC -3'

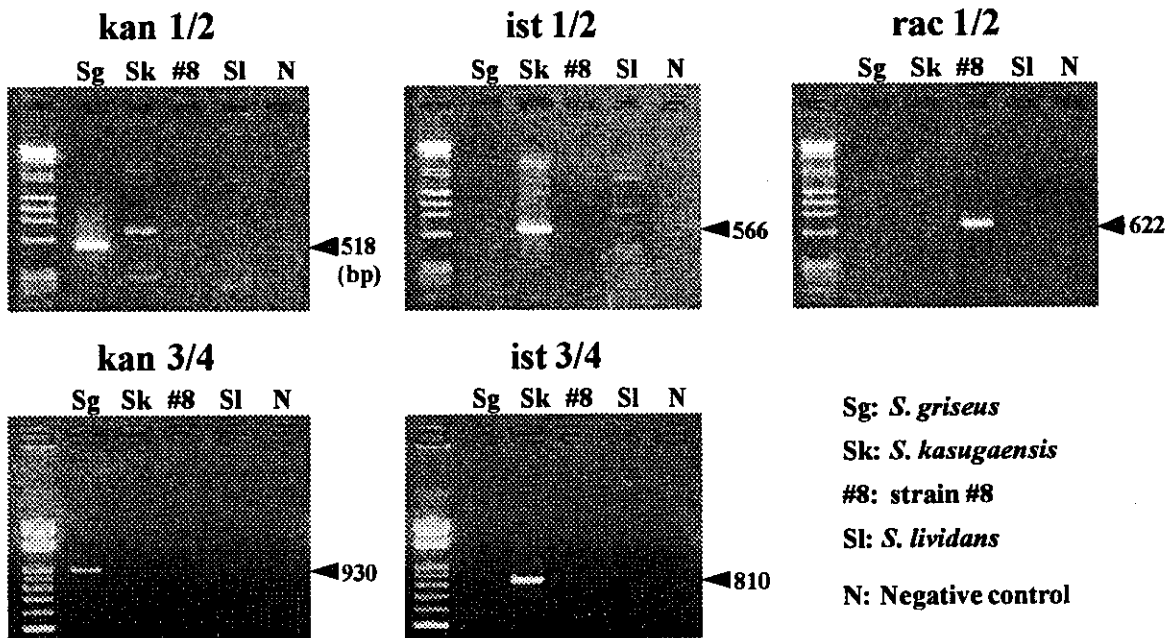


図 3. CD-PCRによる菌種特異的遺伝子の選択検出に対するプライマーの影響

平成14年度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」

平成14年度における本邦の *Nocardia* 症の原因菌の分類同定に関する研究

研究協力者 三上 襄 千葉大学真菌医学研究センター・教授

共同研究者 影山 亜紀子、矢沢 勝清 (千葉大学真菌医学研究センター)

#### 研究要旨

平成14年において、本邦の42の医療機関から依頼のあった110株の放線菌について同定を行った。その結果、110株の放線菌のうち、72株が *Nocardia* に属し、それらの菌株の中には *N. cyriacigeorgica*, *N. veterana*, *N. beijingensis* および *N. transvalensis* 等のように、本邦ではこれまで感染例の報告のない菌株が存在していた。特に、*N. beijingensis* はもともと土壌よりの分離株であり、世界的にも感染例の報告のない菌株であった。*Nocardia* 以外には *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*,

#### A. 研究目的

日本における放線菌による疾患の実体を把握することを目的に、平成14年度に千葉大学真菌医学研究センターで本邦の42の医療機関 (Table 1) から同定依頼を受けた病原性放線菌110株の分類学的な研究を行った。特に *Nocardia* 属の菌株については、これまでの伝統的な分類方法以外に新たに16S rRNA 遺伝子の解析を行い、それらの情報に基づく、系統関係を明らかにすることも目的に研究を行った。また、*Nocardia* 属以外の放線菌については、属レベルでの同定を目的に研究を行った。

*Gordonia*, *Actinomadura*, *Tsukamurella*, *Rothia* および *Nocardiopsis* であった。また、嫌気性の放線菌である *Actinomyces* および *Propionibacterium* も含まれていた。これらの中で、*Mycobacterium* がもっとも多く約10%含まれおり、続いて *Actinomadura* 属菌が多かった。

平成13年度に分離され、一時的に *N. brasiliensis* として同定されていた菌株がその後の16SrRNA 遺伝子解析の結果、*N. pseudobrasiliensis* に属することが明らかになり、本菌種による本邦初の症例報告となった。

#### B. 研究方法

110株の放線菌については、菌体のミコール酸の有無により、ミコール酸含有放線菌と、非含有菌に分け、さらにシリカの薄層クロマトグラフィー (TLC) 上での Rf 値を調べ、それらのパターンから、*Mycobacterium* type (他に *Tsukamurella*, *Gordonia* を含む)、*Nocardia* type (他に *Rhodococcus* を含む) および *Corynebacterium* type に細分した。それぞれの菌株については、さらにメナキノン組成と細胞壁成分であるジアミノピペリンの異性体の存在、また構成糖であるアラビノー