

平成16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

平成17年4月

主任研究者 上原 至雅

(国立感染症研究所生物活性物質部長)

# 目 次

総括研究報告書：輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究 上原 至雅（国立感染症研究所）	1
分担研究報告書：コクシジオイデス症およびヒストプラズマ症など輸入真菌症国内発生状況 の把握 亀井 克彦（千葉大学真菌医学研究センター）	41
分担研究報告書：我が国のヒストプラズマ症ならびに「洞窟熱」類似疾患に関する調査 菊池 賢（東京女子医科大学感染症科）	45
分担研究報告書：輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発 楨村 浩一（帝京大学医真菌研究センター）	59
分担研究報告書：呼吸器系細胞診検体に関する真菌検出感度と形態による菌種推定 に関する研究 渋谷 和俊（東邦大学医学部病院）	72
分担研究報告書：造血器悪性腫瘍患者における真菌感染の診断・治療法の開発 上 昌広（国立がんセンター中央病院）	80
分担研究報告書：国内コウモリ・グアノの菌相と入洞者血清抗体の解析 杉田 隆（明治薬科大学）	85
分担研究報告書：真菌感染抵抗性の解析と治療の評価系の開発 鈴木 和男（国立感染症研究所）	93
分担研究報告書：真菌の病原性および薬剤耐性機構の解明 新見 昌一、上原 至雅（国立感染症研究所）	98
研究協力者による研究報告書： <i>Coccidioides immitis</i> 遺伝子同定法 佐野 文子（千葉大学真菌医学研究センター）	105

平成16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」名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	上原 至雅	国立感染症研究所・生物活性物質部	部長
分担研究者	亀井 克彦	千葉大学真菌医学研究センター	教授
分担研究者	菊池 賢	東京女子医科大学・感染症科	講師
分担研究者	楨村 浩一	帝京大学医真菌研究センター	助教授
分担研究者	渋谷 和俊	東邦大学医学部・病院病理学講座	助教授
分担研究者	上 昌広	国立がんセンター・中央病院・薬物療法部	医員
分担研究者	杉田 隆	明治薬科大学・微生物学教室	講師
分担研究者	鈴木 和男	国立感染症研究所・生物活性物質部・第三室	室長
分担研究者	新見 昌一	国立感染症研究所・生物活性物質部・第一室	室長
研究協力者	山口 英世	帝京大学医学部	名誉教授
研究協力者	染谷 孝	佐賀大学農学部・応用生物科学科・土壌環境学研究室	助教授
研究協力者	佐野 文子	千葉大学真菌医学研究センター	助教授
研究協力者	石川 淳	国立感染症研究所・生物活性物質部・第四室	室長

平成16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

総括研究報告書

輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究 - - - - - 1

- |       |                     |
|-------|---------------------|
| 上原 至雅 | (国立感染症研究所生物活性物質部)   |
| 亀井 克彦 | (千葉大学真菌医学研究センター)    |
| 菊池 賢  | (東京女子医科大学感染症科)      |
| 槇村 浩一 | (帝京大学医真菌研究センター)     |
| 渋谷 和俊 | (東邦大学医学部病院病理学研究室)   |
| 上 昌広  | (国立がんセンター中央病院薬物療法部) |
| 杉田 隆  | (明治薬科大学微生物学教室)      |
| 鈴木 和男 | (国立感染症研究所生物活性物質部)   |
| 新見 昌一 | (国立感染症研究所生物活性物質部)   |

主任研究者

上原至雅 国立感染症研究所生物活性物質部長

平成16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

総括研究報告書

「輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究」

主任研究者 上原至雅 国立感染症研究所 部長

研究要旨：国内発生が疑われるヒストプラズマ症について、定着の想定される国内環境のヒストプラズマ分布状況調査、定着の想定される環境に接する機会の多い洞窟探検家に対する血清中の抗ヒストプラズマ抗体価の測定を行った。また、日本各地の鍾乳洞、風穴などのコウモリの生息する洞窟 41 箇所から採取したグアノサンプルにつき、分離培養ならびに非培養法を用いて *Histoplasma* sp. の検出を試みたが、これらのサンプルからヒストプラズマは検出されなかった。洞窟探検家 100 名（日本人 79 名、韓国人 21 名）、A 地方またはその近郊に在住する健常者 34 名、ならびに B 地方在住の非洞窟探検家対照 48 名の採血を行い、抗ヒストプラズマ抗体を試みたが、抗体は検出されなかった。この結果から、我が国の洞窟環境がヒストプラズマに汚染されている可能性は低いものと考えられた。

国内の洞窟・風穴から採取されたコウモリ・グアノサンプルの菌相解析を行ったところ、約 80% の洞窟から *Trichosporon* が分離された。しかもその中に 7 種の新種が含まれていた。*Trichosporon* は夏型過敏性肺臓炎の原因抗原である。そこで入洞に伴う呼吸器症状との関連性を明らかにするため、入洞経験者と未経験者（A 地方および B 地方在住）の血清中抗 *Trichosporon* 特異抗体を測定・比較した。入洞経験者は未経験者（B 地方）に比べて有意に高い抗体価を示した。理由は不明であるが A 地方の入洞未経験者は経験者と差がなかった。また、グアノから分離された *Trichosporon* 株の血清型と入洞者血清の特異抗原への反応性には相関性が認められたことから、入洞者は *Trichosporon* 抗原に感作されていると推定された。

一方、輸入真菌症の実態調査を行い、コクシジオイデス症を中心に増加を続けていること、prospective な調査を開始して以来初めて播種型コクシジオイデス症による死亡例が発生したことなどを明らかにするとともに、我国における輸入真菌症のパターンが変化しつつあること、医療体制における問題点が依然として多いことなどを指摘した。

分担研究者：	上 昌広	国立がんセンター・中央病院・薬物療法部・医員	
亀井克彦	千葉大学真菌医学研究センター・教授	杉田 隆	明治薬科大学・微生物学教室・講師
菊池 賢	東京女子医科大学・感染症科・講師	鈴木和男	国立感染症研究所・生物活性物質部・第三室・室長
楨村浩一	帝京大学医真菌研究センター・助教授	新見昌一	国立感染症研究所・生物活性物質部・第一室・室長
渋谷和俊	東邦大学医学部病院病理学講座・助教授		

## 1. 我が国のヒストプラズマ症に関する調査

### A. 研究目的

国内での発生が疑われるヒストプラズマ症について、定着の想定される環境からの分離、定着の想定される環境に接する機会の多い洞窟探検家、ならびに洞窟環境付近で生活、居住する住民の臨床症状、血液検査（炎症所見等）、血清抗ヒストプラズマ抗体等を調査すると同時に、国内各所の洞窟内コウモリグアノからの *Histoplasma capsulatum* 分離を試みた。

### B. 研究方法

日本洞窟学会など洞窟研究、洞窟探検家団体などの協力を得て、日本各地の洞窟 41 箇所よりコウモリグアノサンプル 92 検体（図 1）を採取した。得られたサンプルは 5 倍量の滅菌生理食塩水を加え vortex 後、1 時間静置し、上清を直接及び 100 倍希釈したものそれぞれ 100  $\mu$ l について、10 mg/L gentamicin, 10 mg/L polymyxin B, 20 mg/L aztreonam 添加 Mycosel 寒天培地 (BD) に塗布し、8 週間 25°C で培養を行った。1 週間以降に生えてきた糸状菌について Sabouraud 寒天培地に継代培養（巨大コロニー作成）、スライドカルチャーを行い、菌種同定を行った。

血清抗ヒストプラズマ抗体の調査については、洞窟探検家 100 名（国内 79 名、韓国 21 名）ならびに A 地方またはその近郊に在住する健常者 34 名を対象に同意を得た上で採血を行った（資料 1-4）。また、洞窟探検家

19 名については洞窟入洞前ならびに入洞 24 時間後の採血を併せて行った。得られた血液はラテックス凝集法ならびに免疫拡散法による抗ヒストプラズマ抗体（分担研究者：千葉大学亀井先生実施）、白血球数、好中球数、高感度 CRP、過敏性肺臓炎のマーカーである KL-6、SP-D を測定した。また、I, II, III, I-III 型 *Trichosporon* 抗体価の測定（分担研究者：明治薬科大学杉田先生実施）を行った。B 地方在住の健常人ボランティア 48 名の採血を併せて行い、同じ項目について検査した。

（倫理面への配慮）国立感染症研究所ならびに東京女子医科大学の倫理規定に沿い、各倫理委員会倫理審査を受け、実施許可を得た。

### C. 研究結果

#### 1) 国内洞窟内からのヒストプラズマ分離

図 1 にサンプル採取洞窟の地域、採取サンプル数の内訳を示す。解析した 92 サンプルからヒストプラズマは培養では検出されなかった。

#### 2) 洞窟探検家ならびに地域住民の血液検査

表 1 に採血調査対象者の内訳を示す。表 2 には抗ヒストプラズマ抗体価の測定結果を示す。ラテックス凝集法、免疫拡散法いずれも陽性者はみられなかった。図 2-3 に各抗 *Trichosporon* 抗体価の測定結果を示す。A 地方居住者で抗 I 型 *Trichosporon* 抗体が洞窟探検家と比較して有意に高い値を示したが、健常対照との間に差は認められなかった。木造家屋の住民に発症する夏型過敏性肺臓炎との関連性を指摘されている抗 II 型

*Trichosporon*抗体は洞窟探検家1名を除いてすべて陰性であった。一方、抗 III 型 *Trichosporon* 抗体については日本の洞窟探検家が B 地方在住対照と比較して有意に高値を呈したが、A 地方在住者は更に高値を示していた。B 地方在住対照者の測定は行っていないが、抗 I-III 型 *Trichosporon* 抗体についても同様の傾向が認められた。炎症反応のマーカーでは韓国の洞窟探検家の白血球数、好中球数が有意に高く、日本の洞窟探検家も B 地方在住対照に比べると高値を呈していた (図 4)。一方、CRP に差は認められなかった (図 5)。間質性肺炎、過敏性肺臓炎などのマーカーとされる KL-6, SP-D についてはいずれの群でも差は認められなかった (図 5)。

図 6 には過去 2 週間以内に別の洞窟に入洞していない洞窟探検家 19 名の洞窟入洞前、入洞 24 時間後に行った各炎症マーカー、KL-6, SP-D の変化を示す。入洞後には有意に CRP の上昇が認められた。入洞負荷により 19 名中 2 名に呼吸器症状が出現した (データ未提示)。

そこで呼吸器症状と洞窟探検家や地域住民に陽性者の多かった抗 III 型、抗 I-III 型 *Trichosporon* 抗体価と炎症所見、KL-6, SP-D との関連を調べた (図 7、8)。抗 III 型 *Trichosporon* 抗体陽性 ( $\geq 3$ ) と KL-6 に有意の関係を認めた。また、入洞後の呼吸器症状の既往のある洞窟探検家に対する検査成績 (図 9、10) では抗 *Trichosporon* 抗体価に有意差は認められなかったものの、症状を呈した洞窟探検家には SP-D が有意に高値を示していた。

#### D. 考察

輸入真菌症として知られているヒストプラズマ症は国内で報告されている 40 数例のうち約 20%は国内での感染が疑われている。ヒストプラズマの感染源としては洞窟環境に棲息するコウモリ由来グアノ (堆積した糞) が以前から重要視されている。疾患としては洞窟入洞後に呼吸器症状を呈する急性ヒストプラズマ症として発症し、「洞窟熱」としてよく知られている。今回、調査した国内 41 箇所の洞窟の 92 サンプルからはヒストプラズマは検出されなかった。ヒストプラズマは我が国では稀な疾患であり、実際に環境に定着しているとしても、それはごく限られた地域である可能性がある。この結果から直ちに国内でのヒストプラズマ定着を否定することは難しいが、少なくとも国内洞窟環境にヒストプラズマが普遍的に蔓延している可能性は低いと考えられた。洞窟探検家に血清抗体価測定でも陽性者がみられなかったこともこのことを支持する所見である。但し、抗ヒストプラズマ抗体の陽性持続期間はそれほど長くなく、今回調査した地域には国内発症ヒストプラズマ症で唯一、菌の培養された C 地区の検体、洞窟探検家、地域住民が含まれていない。このことから、今後、国内での発症が推察された地域での同様の調査が必要になるものと思われた。

一方、洞窟探検家が洞窟入洞後に呼吸器症状を呈する頻度は高く、「日本洞窟熱」とでもいふべき新たな疾患の関与も推察される。今回の調査でも健常者に比較して、抗 III 型 *Trichosporon* 抗体が高値を示すこと、症状を

有したことがある洞窟探検家には SP-D のような過敏性肺臓炎で上昇するマーカーが高値を示していること、洞窟入洞によって CRP の有意な上昇がみられること、などアレルギー機序を介した洞窟由来 *Trichosporon* の何らかの関与が疑われた。これらの抗 *Trichosporon* 抗体価は一部の地域住民も高値を示したが、今回調査した地域と住民の数が限られること、調査した住民の中に呼吸器症状を呈しているヒトは認められなかったことより、この抗体価高値にどのような臨床的意義があるかどうかは現時点では不明である。*Trichosporon* 抗体価に関する全国調査は本研究班の本来の目的からはそれるが、今

回の結果を踏まえ、調査の範囲を広げて正確な実態を把握する必要があると思われる。

#### E. 結論

日本国内洞窟 41 箇所から得られたコウモリグアノからはヒストプラスマは分離されず、洞窟探検家などの血清抗体価も陰性であった。但し、調査地区がまだ限定されており、国内での発症地域を中心に引き続き調査が必要と考えられた。洞窟入洞後の急性呼吸器症状についてはアレルギー機序を介した洞窟由来 *Trichosporon* の何らかの関与が疑われた。



調査洞窟:41洞窟/92サンプル  
(洞窟数/サンプル数)

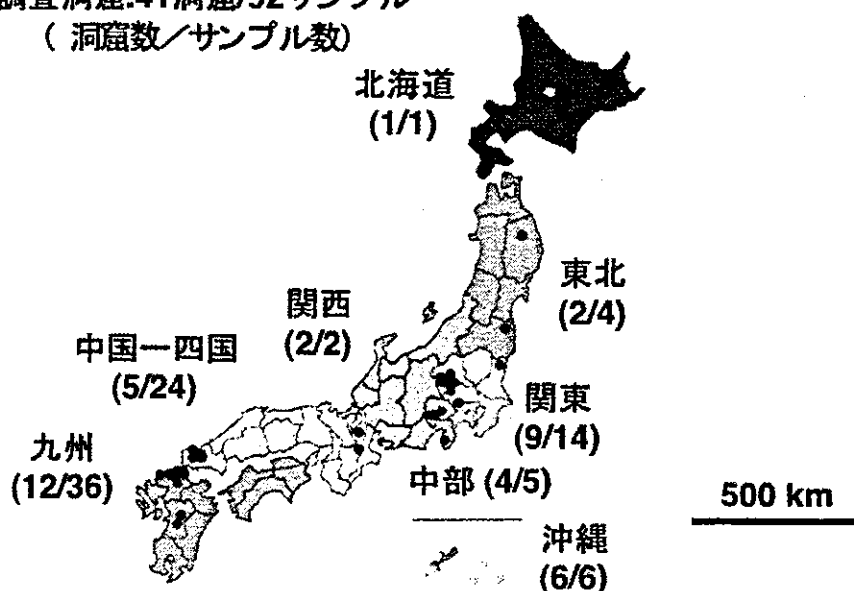


図1. 調査洞窟国内分布と採取サンプル数

表1. 対象者背景

項目	対象者				
	洞窟探検家 (日本) (N = 79)	洞窟探検家 (韓国) (N = 21)	A地域居住者 (N = 7)	A地域勤務者 (N = 27)	B地域居住者 (N = 48)
年齢 (平均 ±SD)	33 ± 14	29 ± 8	47 ± 20	45 ± 15	39 ± 10
年齢 (中央値)	32	26	49	46	37
年齢分布	16-73	18-48	24-69	19-67	24-69
男性数 (%)	61 (77)	20 (95)	0 (0)	13 (48)	44 (92)

表2. 抗ヒスト プラスマ抗体測定結果

抗体測定法	陽性数 (%)				
	洞窟探検家 (日本) (N = 79)	洞窟探検家 (韓国) (N = 21)	A地域居住者 (N = 7)	A地域勤務者 (N = 27)	B地域居住者 (N = 48)
ラテックス凝集法	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
免疫拡散法	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
M-band	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
H-band	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

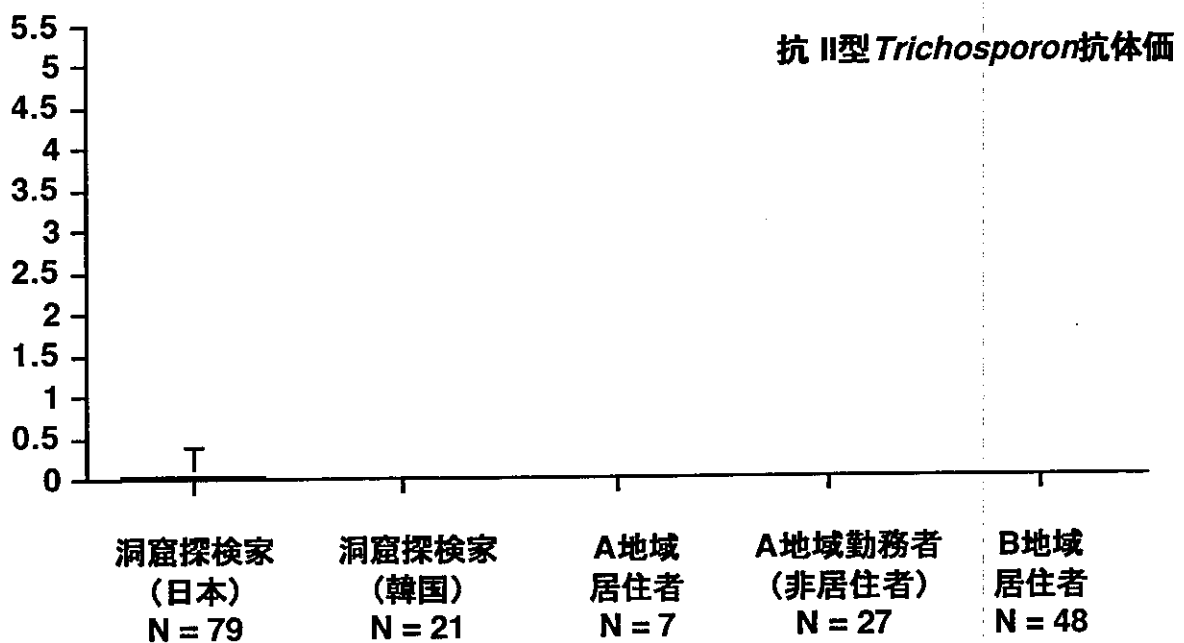
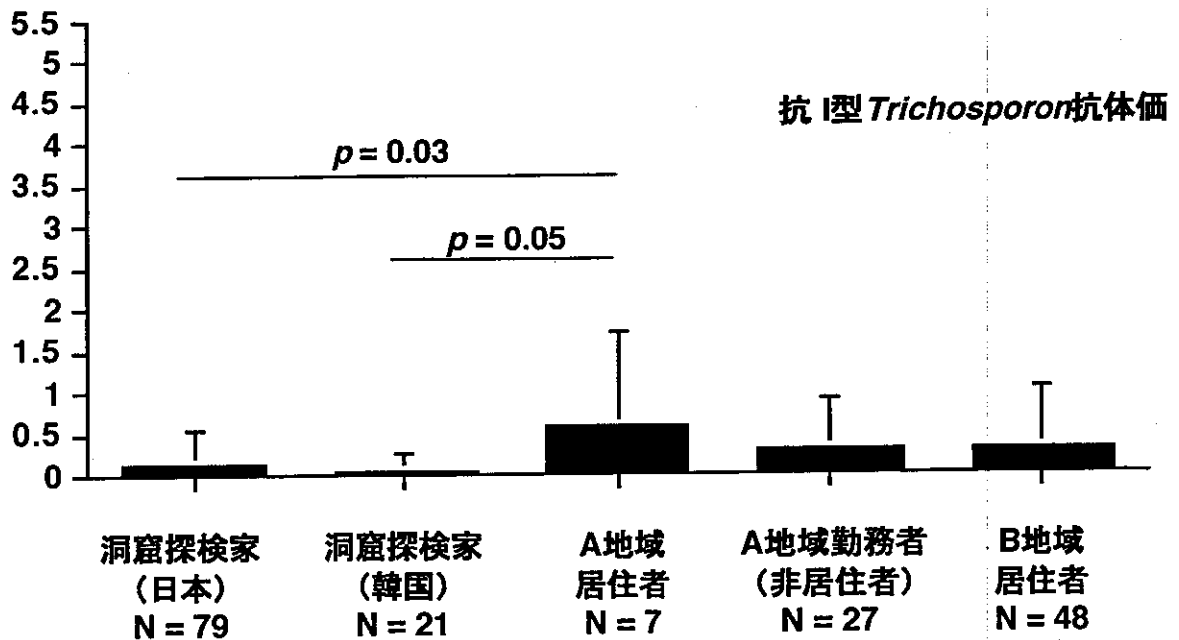


図2. 洞窟探検家、A地域居住者、A地域勤務者、B地域居住者血清中の抗 *Trichosporon* I, II 抗体価の比較

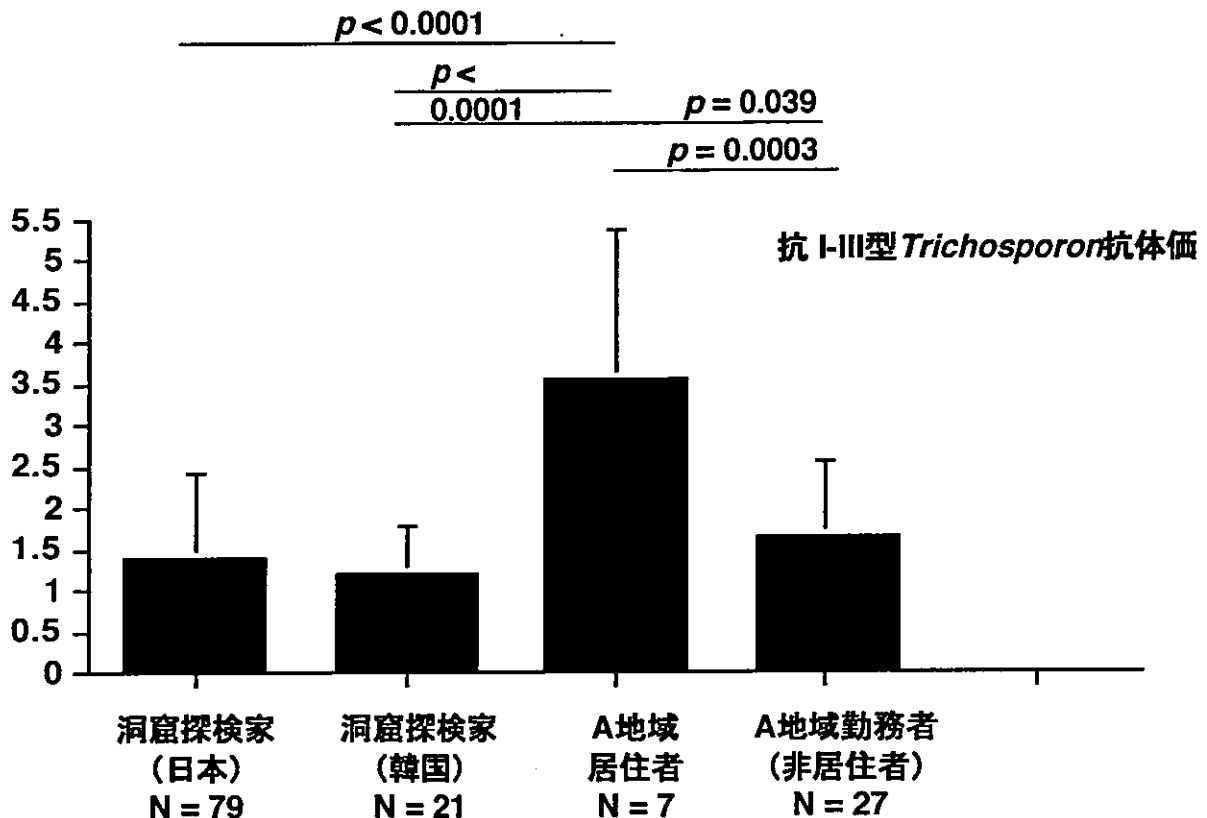
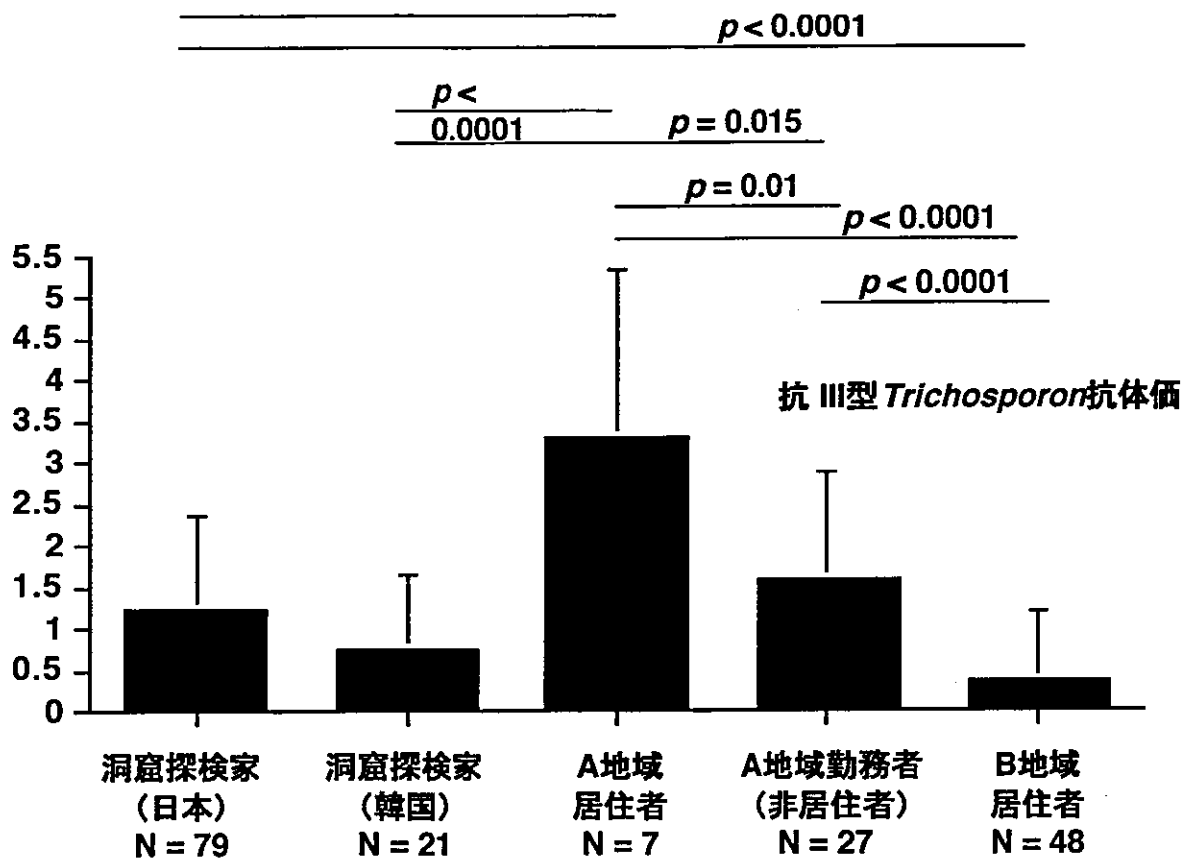


図3. 洞窟探検家、A地域居住者、A地域勤務者、B地域居住者  
血清中の抗*Trichosporon* III, I-III抗体価の比較

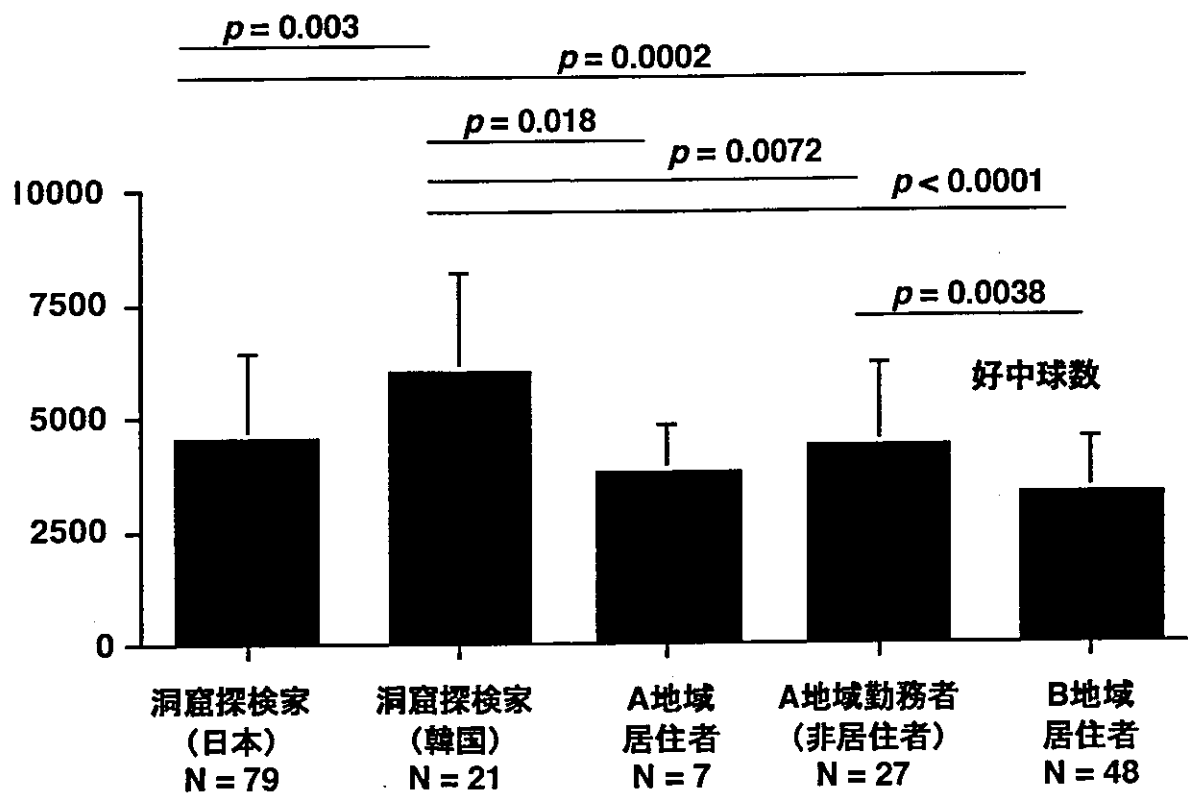
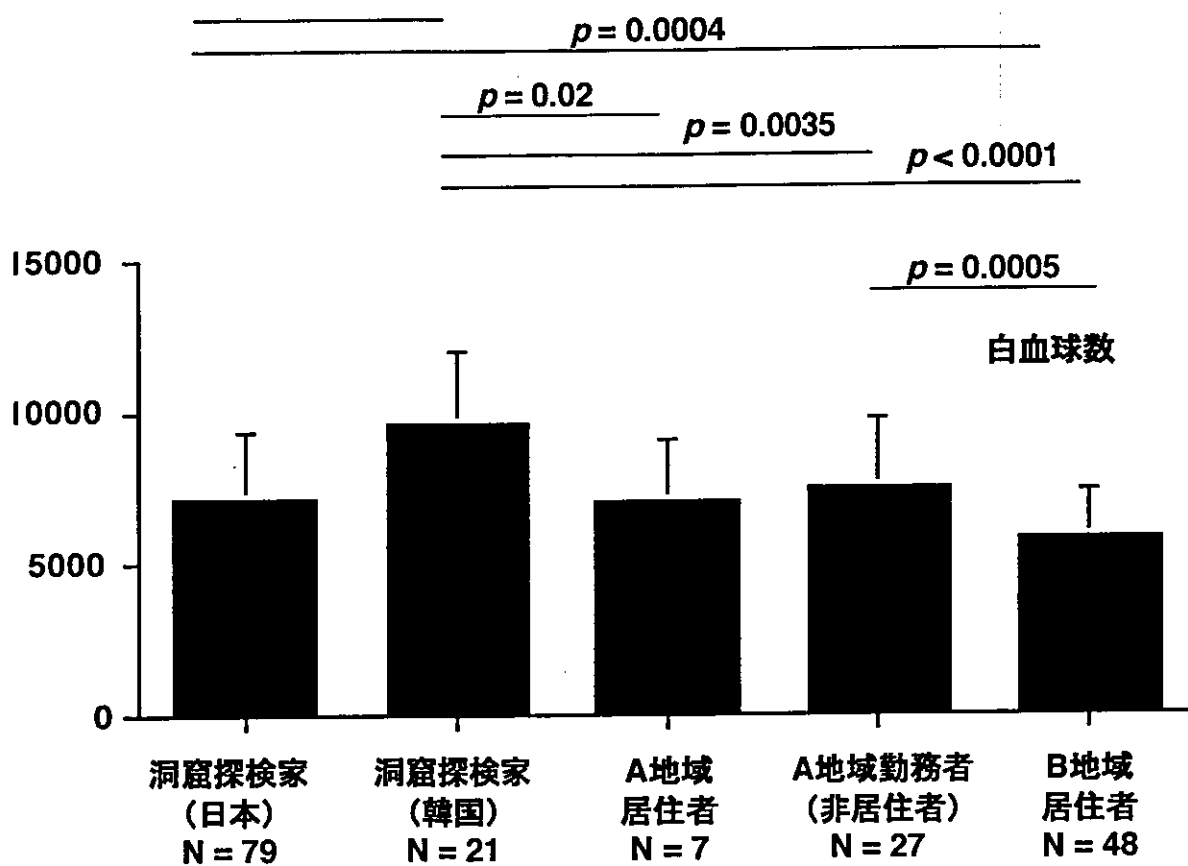


図4. 洞窟探検家、A地域居住者、A地域勤務者、B地域居住者の白血球数、好中球数の比較

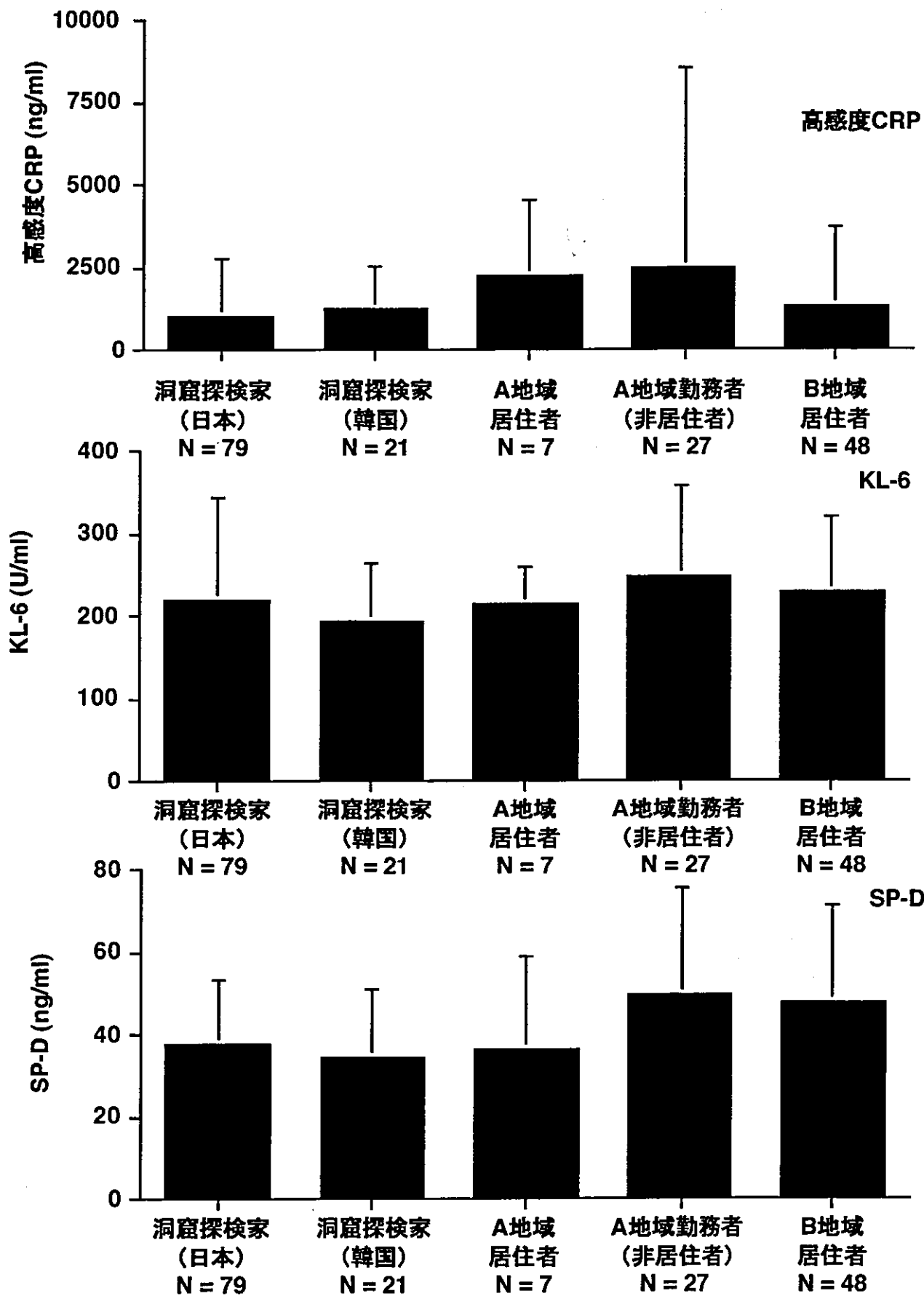


図5. 洞窟探検家、A地域居住者、A地域勤務者、B地域居住者の血清中高感度CRP, KL-6, SP-D値の比較

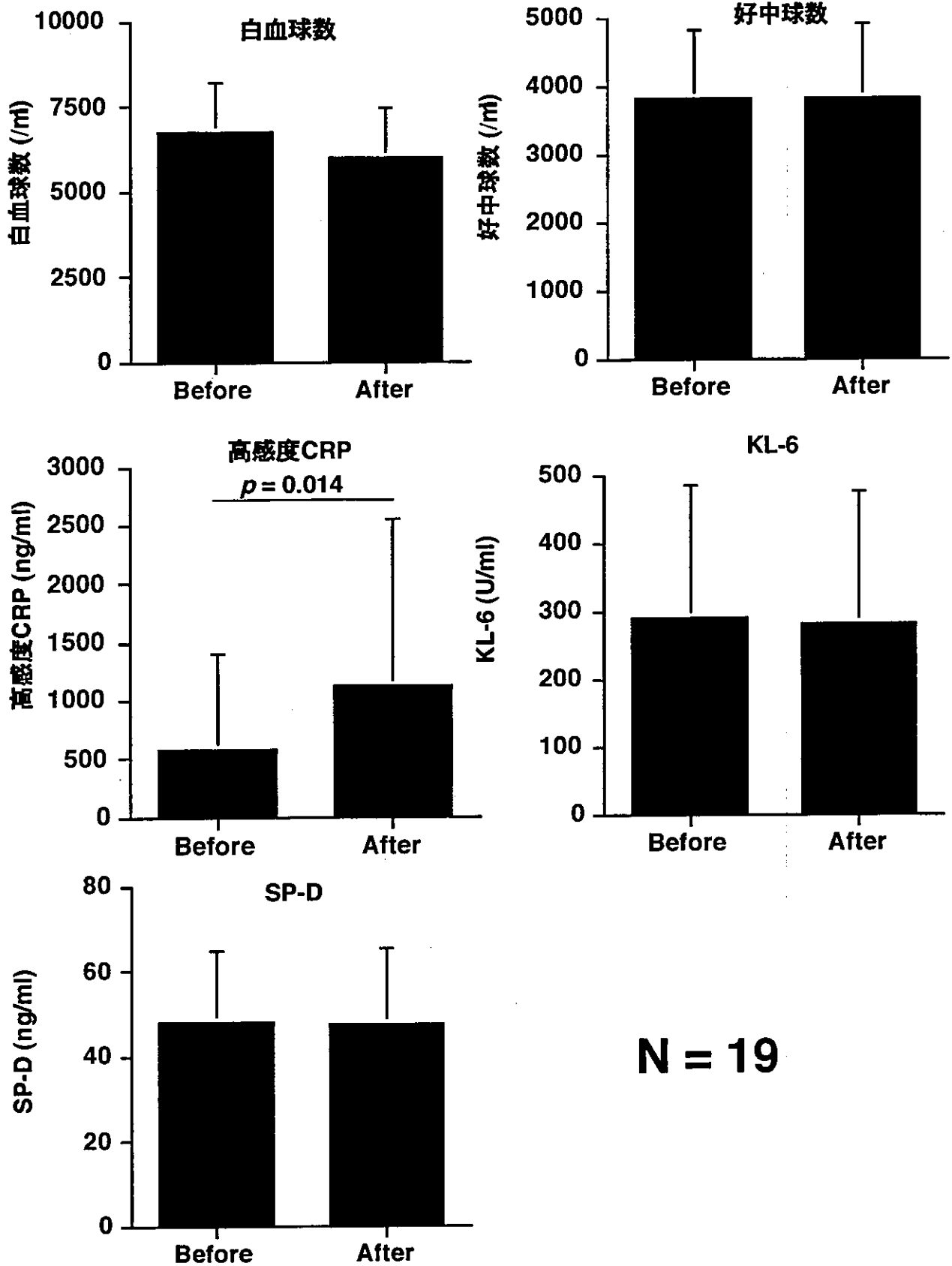


図6. 洞窟探検家の入洞負荷前後の検査成績の比較

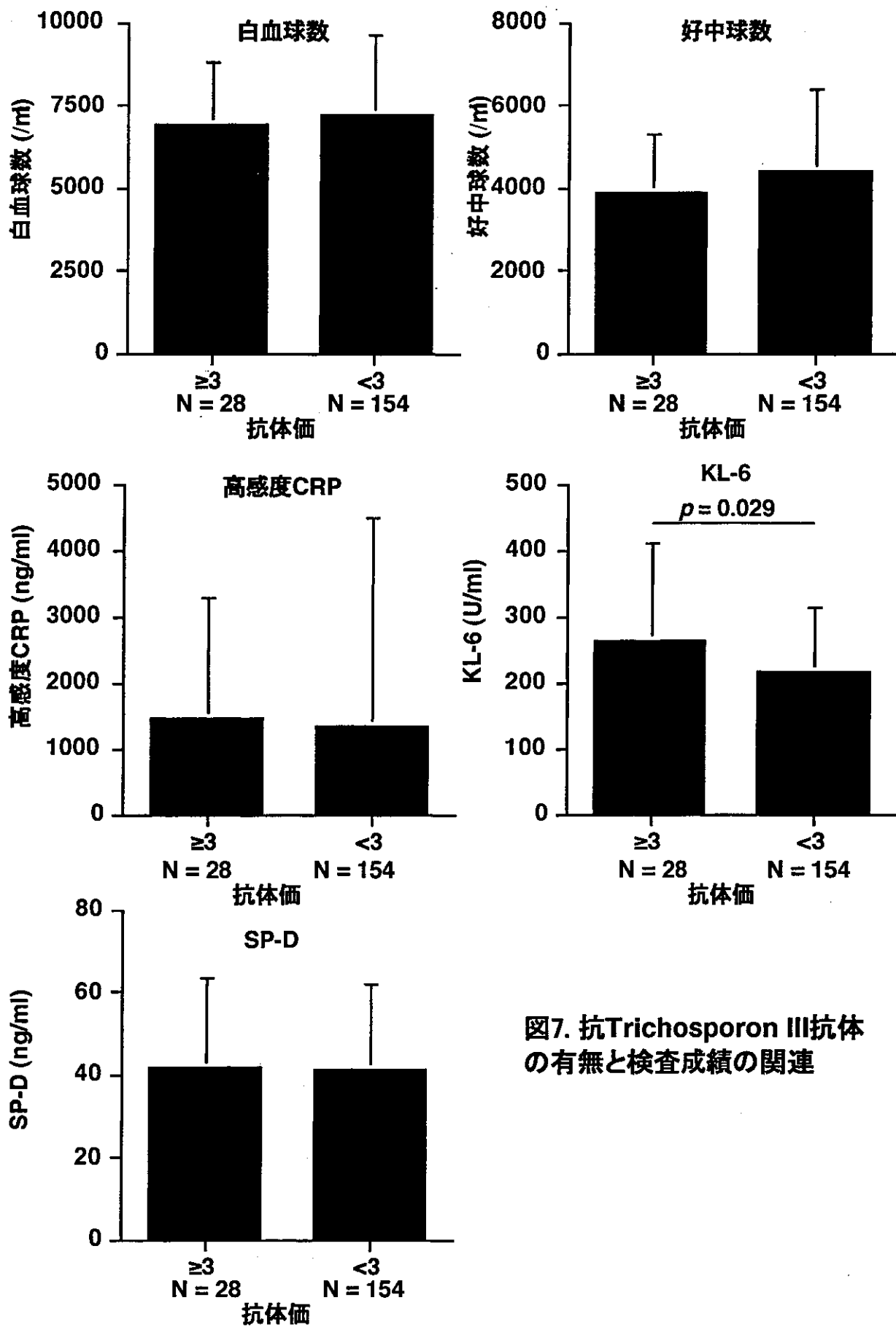


図7. 抗Trichosporon III抗体の有無と検査成績の関連

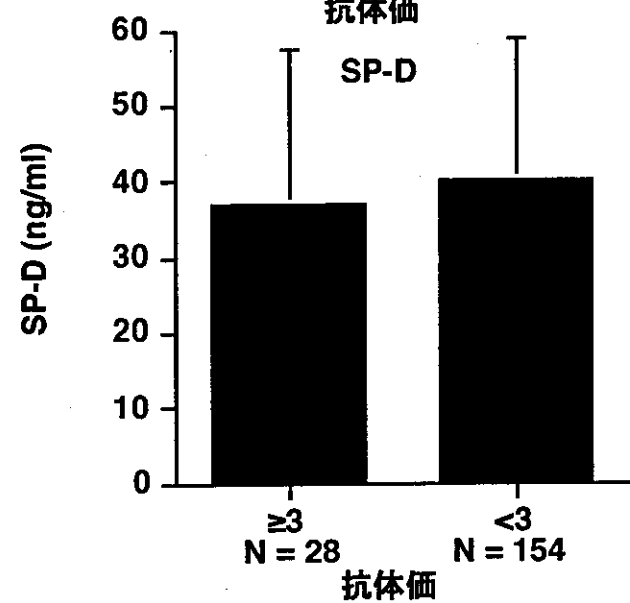
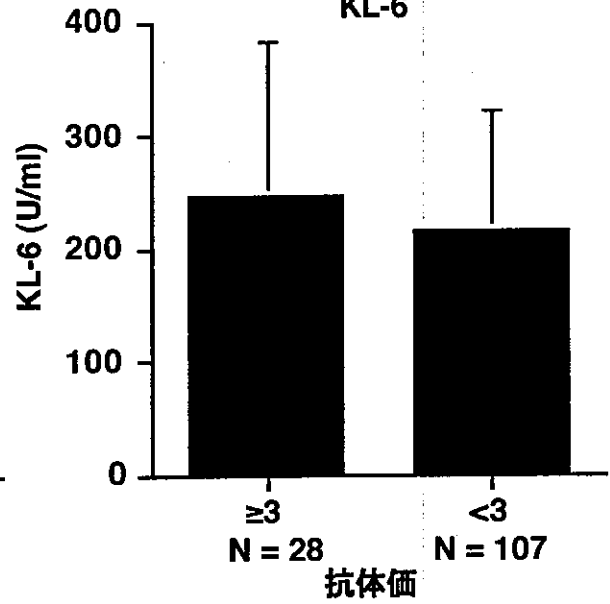
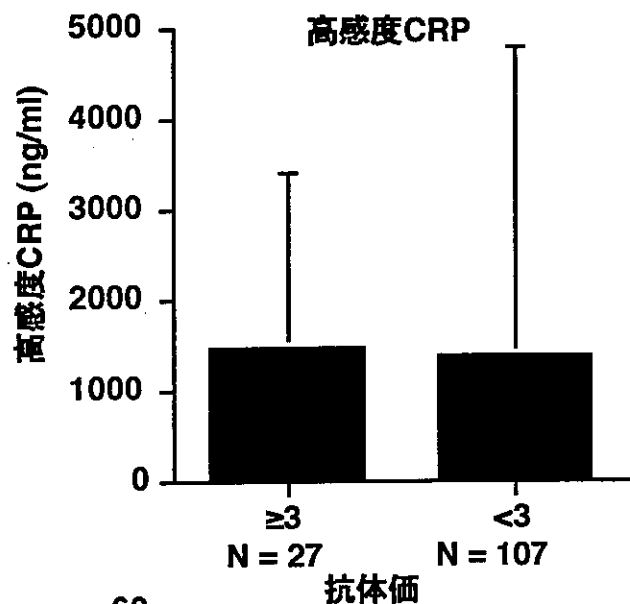
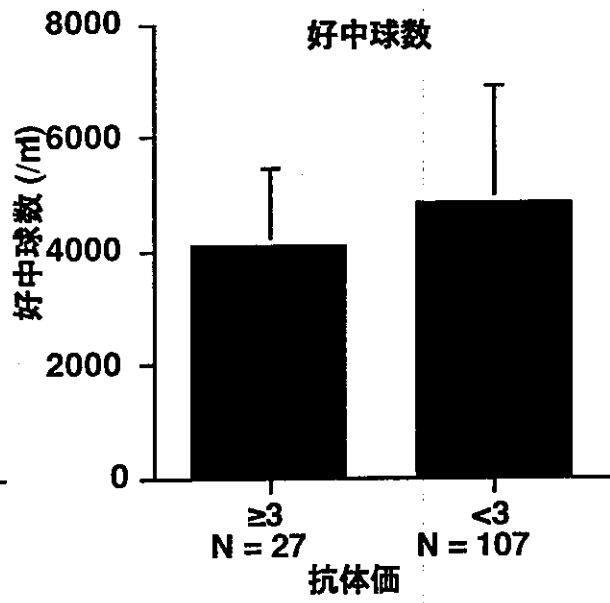
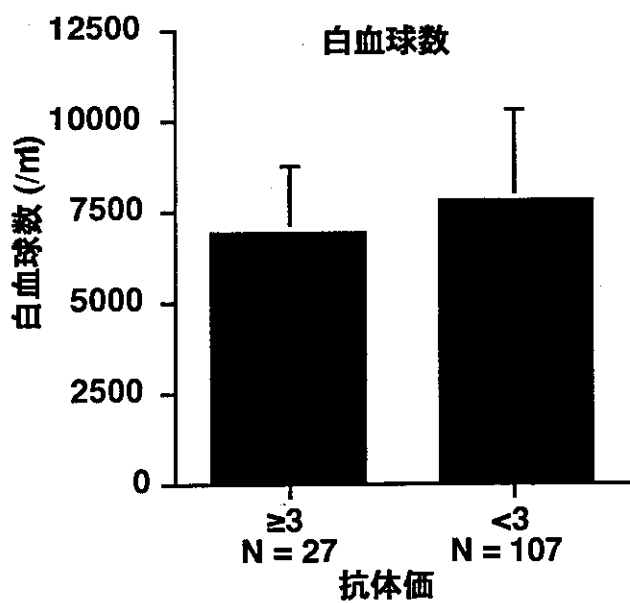


図8. 抗Trichosporon I-III抗体の有無と検査成績の関連



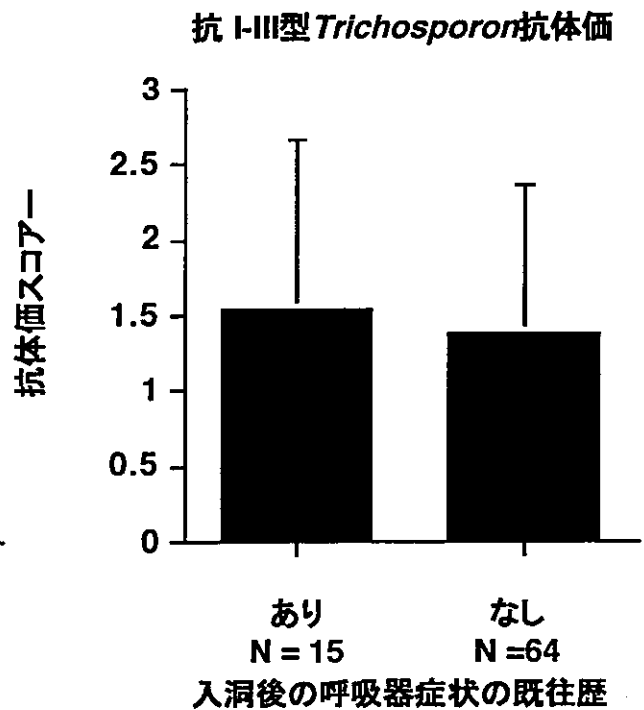
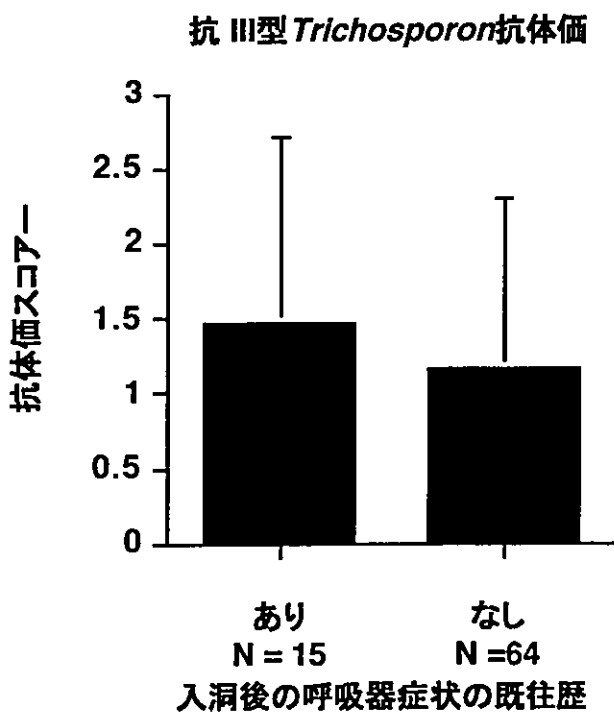
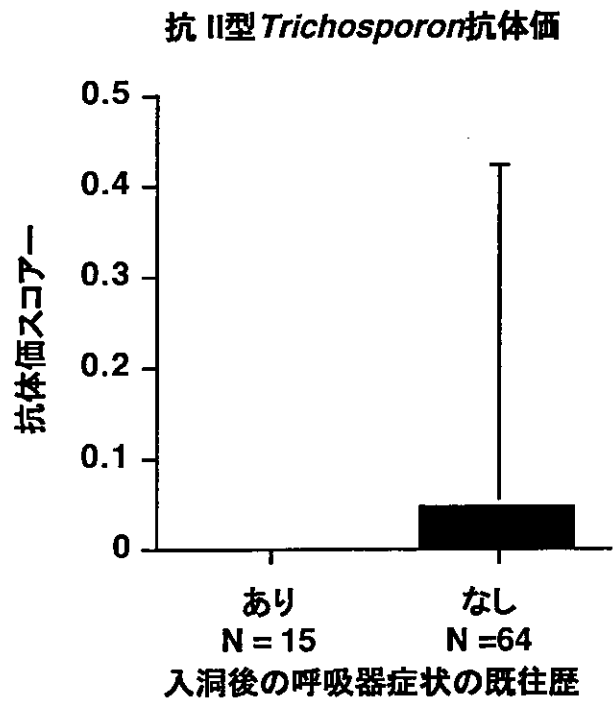
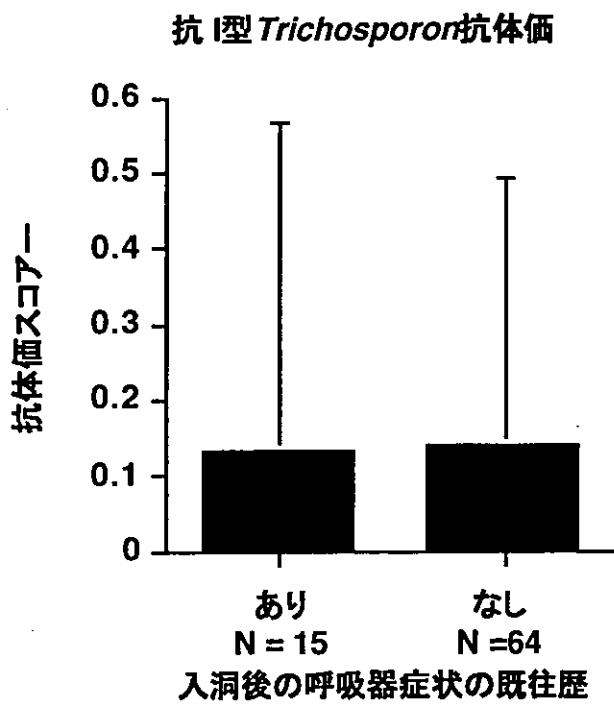


図9. 洞窟入洞後の呼吸器症状既往歴の有無と抗 *Trichosporon* 抗体の関連

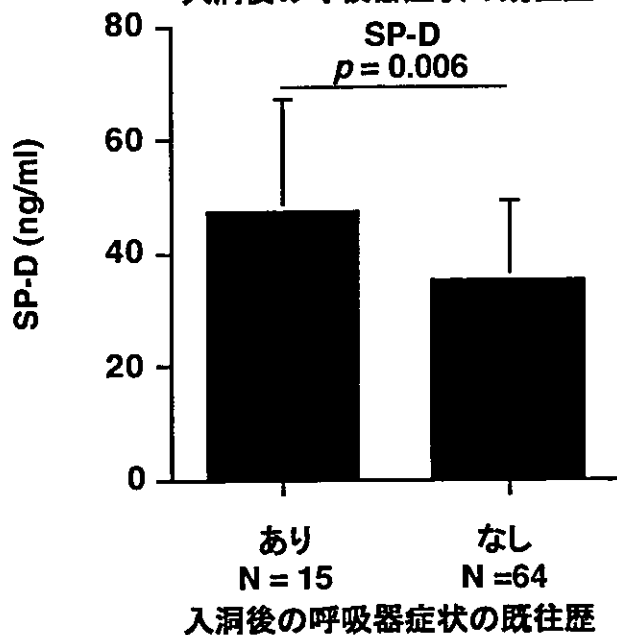
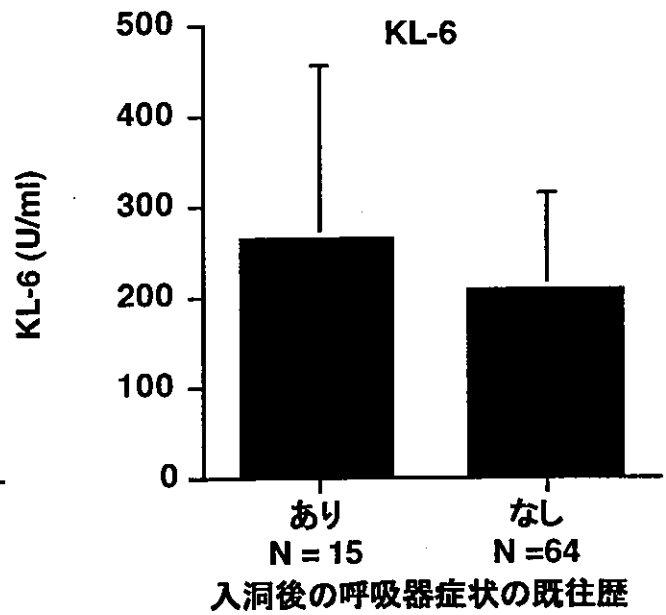
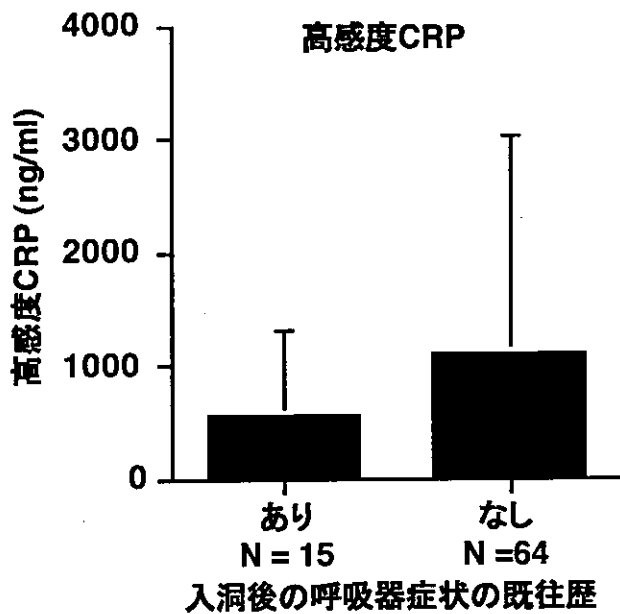
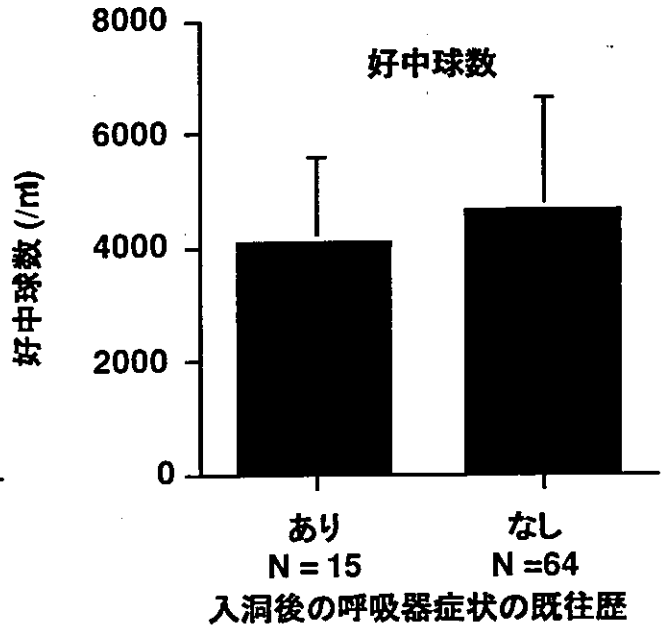
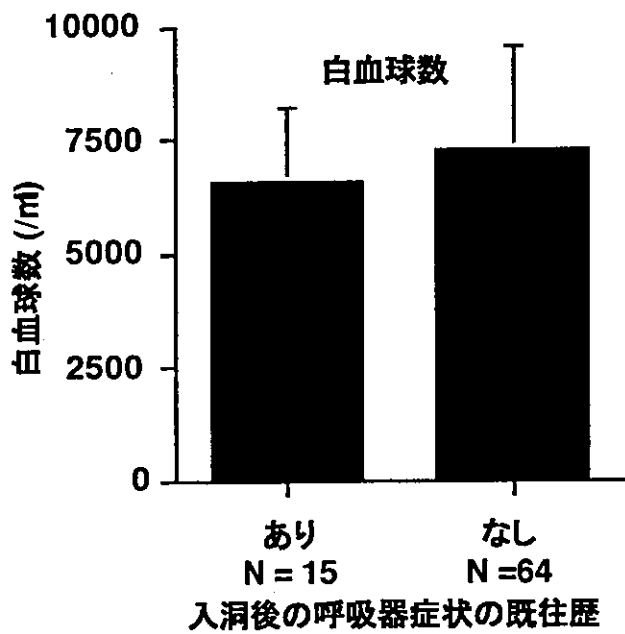


図10. 洞窟入洞後の呼吸器症状既往歴の有無と検査成績の関連

## 2. 国内コウモリ・グアノの菌相と入洞者血清抗体の解析

### A. 研究目的

*Histoplasma capsulatum*を起因菌とするヒストプラズマ症は主要な輸入真菌症の一つであるが、国内感染と推定される症例が少なくない。また、動物における国内感染例も報告されている。このことから *Histoplasma* は我が国に存在している可能性が考えられる。南米を中心とした環境調査から本菌はコウモリあるいはその堆積糞(グアノ)からしばしば分離されている。本研究では我が国に *Histoplasma* が存在するか否かを調べるために様々な地域の洞窟・風穴から採取されたグアノから *Histoplasma* の検出を非培養法を用いて行なった。また、前年度のグアノの菌相解析から *Trichosporon* が高頻度に検出されることを明らかにした。*Trichosporon* は夏型過敏性肺臓炎の原因抗原である。そこで入洞に伴う呼吸器症状との関連性を明らかにするため、入洞経験者と未経験者の血清中抗 *Trichosporon* 特異抗体を測定・比較した。

### B. 研究方法

#### 1) コウモリ・グアノサンプル

本研究班分担研究者である東京女子医科大学感染症対策科菊池賢先生より分与頂いた80サンプルを実験に供した。

#### 2) *Histoplasma* の検出

約1gのグアノにブレインハートインフュージョンブロースを加え27°Cで3日間培養、および滅菌生理食塩に懸濁し、真菌DNAを抽出した。ITS領域上に、*H. capsulatum*、*H. duboisii*および*H. farciminosus*の3変種に共通なDNA塩基配列を見出し特異プライマ

ーを作製した。Nested PCR後、陽性PCR産物はTAクローニングを行い、DNA塩基配列を決定した。なお、PCRの特異性は、*Histoplasma* 保存株のDNA(分担研究者 榎村浩一先生より分与)を用いて確認した。

#### 3) グアノサンプル中の真菌相解析

約0.5gのグアノにYMブロース(含、ペニシリン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール)を加え27°Cで1日培養し、培養液を同寒天培地に塗抹した。得られた酵母様コロニーのITS1-5.8S-ITS2-D1/D2 26S rDNA塩基配列解析を行ない、当該菌株の同定を行なった。

#### 4) 血清中抗 *Trichosporon* 特異抗体の検出

*Trichosporon* 抗原(血清型 I, II, III, I-III)に対する反応性をスライド凝集反応により測定した。なお、血清は入洞経験者100例、入洞未経験者(A地方34例、B地方48例)から所定の手続きを経て得た(分担者: 菊池賢先生より)。

### C. 研究結果

#### 1) *Histoplasma* の検出

80サンプルについて *Histoplasma* の検出を非培養法で試みたが、本検出条件下では *Histoplasma* DNAは検出できなかった。

#### 2) グアノサンプル中の真菌相解析

20の洞窟から採取したグアノから約700の酵母を分離し、rDNAシーケンスから菌株を同定した。担子菌系酵母として、*Trichosporon prosum*, *T. laibachii* および unknown *Trichosporon* spp. *Cryptococcus podzolicus* 子囊菌系酵母は *Candida palmioleophila*, *C. lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenispora* sp. *Saccharomyces cerevisiae* *Williopsis californica* および *Zygo-*

*saccharomyces florentinus* が分離・同定された。*Trichosporon* の分離頻度を Fig. 1 に、それ以外の酵母の分離頻度を Fig. 2 に示す。特に *Trichosporon* spp. は 20 洞窟中 17 と高頻度に分離された。また、50% の洞窟から新種に相当する菌種も分離された。分離された *Trichosporon* spp. は、Ovoides clade 以外のすべての clade に広く分布していた (Fig. 3)。

### 3) 抗 *Trichosporon* 特異抗体の検出

抗体価は便宜的に反応性に応じて 0-7 までにスコア化した (Fig. 4)。また、抗体陽性率を Fig. 5 に示す。入洞経験者は未経験者 (B 地方) より有意に抗体が検出された。特に、III 型および I-III 型抗原に対する反応性が高く、I 型にはわずかに、また II 型には反応しなかった。A 地方の未経験者は入洞経験者と同程度かそれ以上の検出率を示した。

## D. 考察

本試験では、前年度に引き続き関東から九州に至る洞窟・風穴から採取されたコウモリ・グアノ中の *Histoplasma* の検出を試みたが、全てのサンプルから検出されなかった。南米を中心とした環境調査からコウモリあるいはそのグアノ中からの分離例は多く報告されていることから、今後も継続して分離を試みる必要があると思われる。

*Histoplasma* は分離できなかったものの大部分の洞窟から担子菌系酵母 *Trichosporon* spp. が分離された。*Trichosporon* spp. は我が国固有のアレルギー疾患とされている夏型過敏性肺臓炎 (SHP) の原因抗原でもある。本菌は、血清学的には 4 型 (I, II, III, I-III

型) に大別され、その血清型は分子系統樹上の clade と相関する。SHP 患者家屋から分離される菌株の大部分は I 型あるいは II 型であり、III 型および I-III 型はほとんど分離されない (Fig. 6)。一方、グアノからは II 型を除いてすべての血清型株が分離された (Fig. 3)。Fig. 7 に SHP 患者家屋およびグアノから分離された菌株の血清型を比較して示した。

*Trichosporon* spp. は SHP の原因抗原であるため、入洞に伴う呼吸器症状との関連性が示唆された。入洞経験者の約 30% から *Trichosporon* 抗体が検出された。特に III 型抗体の検出率が高く II 型は検出されなかった。これは、グアノ中の菌相結果とよく相関することから、入洞経験者は洞窟内で *Trichosporon* 抗原に感作されている可能性が考えられた。A 地方の入洞未経験者についても入洞経験者と同様の抗体検出パターンであった。今後はさらに検査対象を広げて調査する必要がある。

## E. 結論

今回解析したサンプルからは *Histoplasma* は検出出来なかった。渡航歴のないヒストプラズマ症患者が報告されていることから、更に継続した広範囲な調査が必要である。また、大部分の洞窟に SHP 原因抗原である *Trichosporon* が存在することが明らかになった。入洞者から抗 *Trichosporon* 抗体が検出されたことから、本菌と入洞に伴う呼吸器症状との関連性が示唆された。