

図8. 抗Trichosporon I-III抗体の有無と検査成績の関連

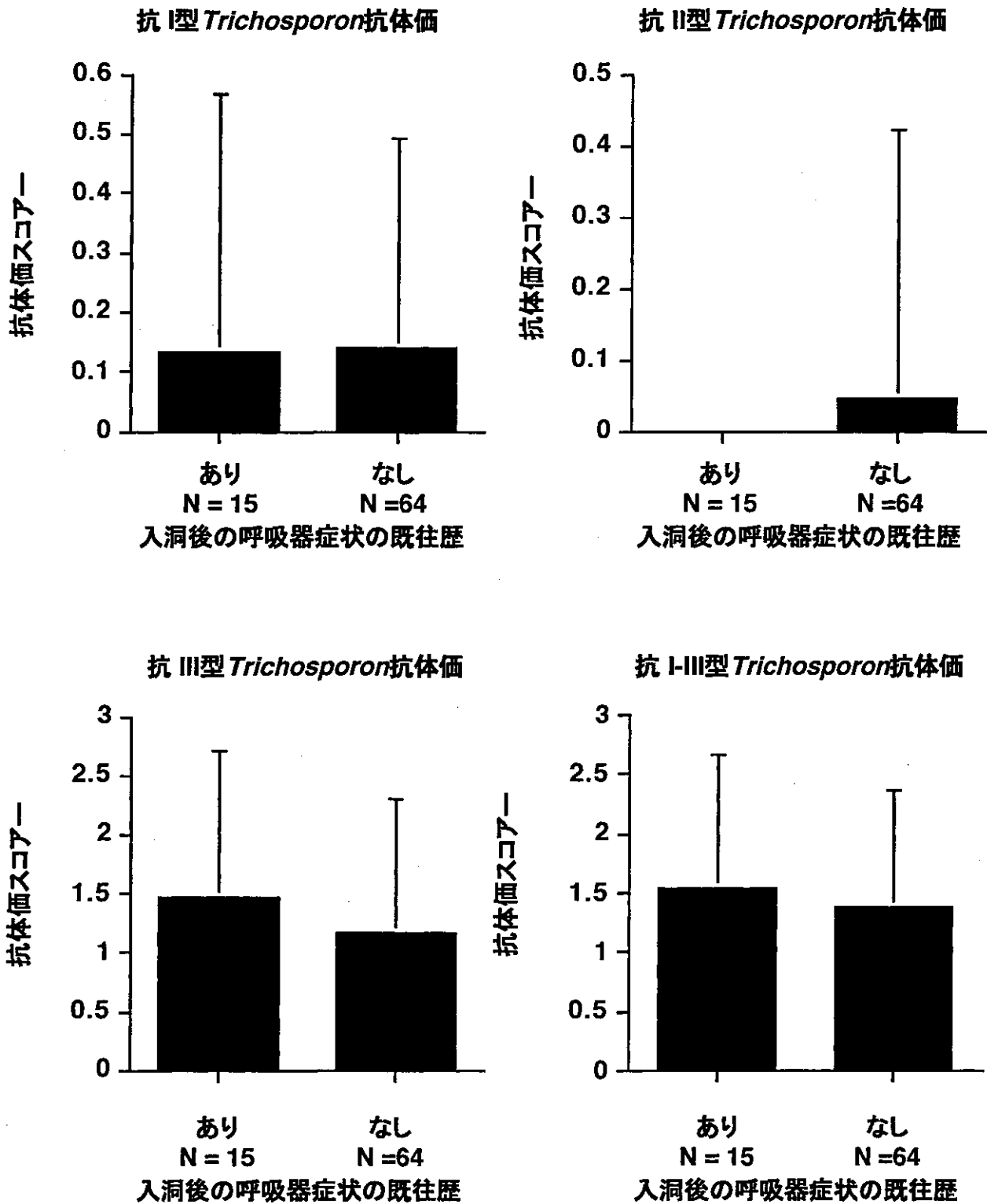


図9. 洞窟入洞後の呼吸器症状既往歴の有無と抗Trichosporon 抗体の関連

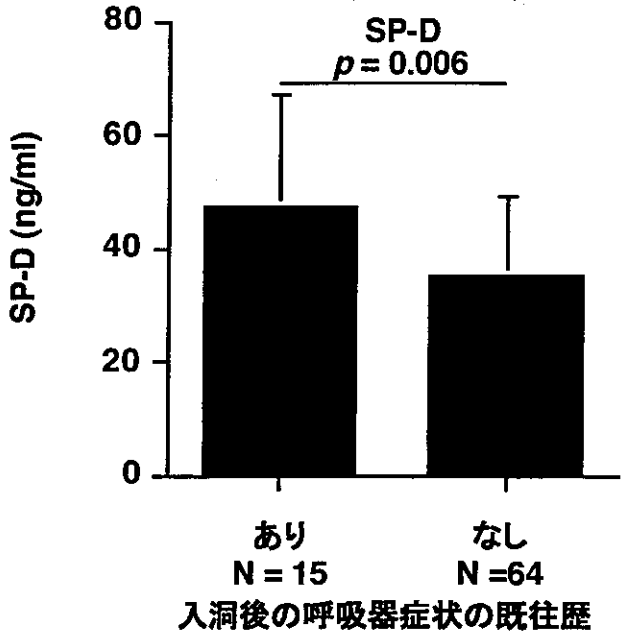
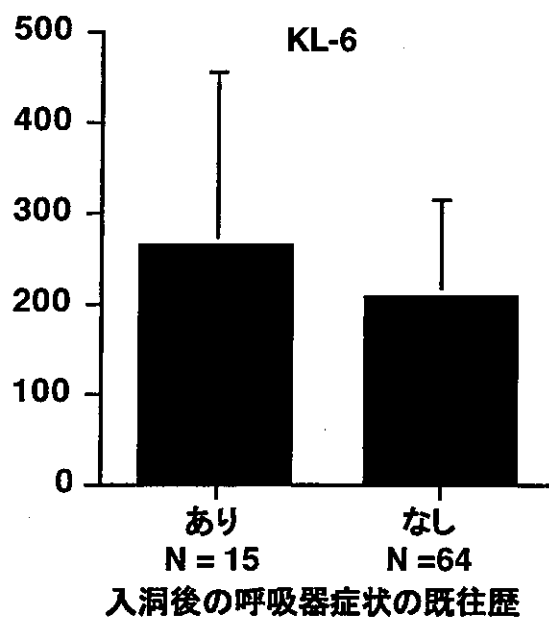
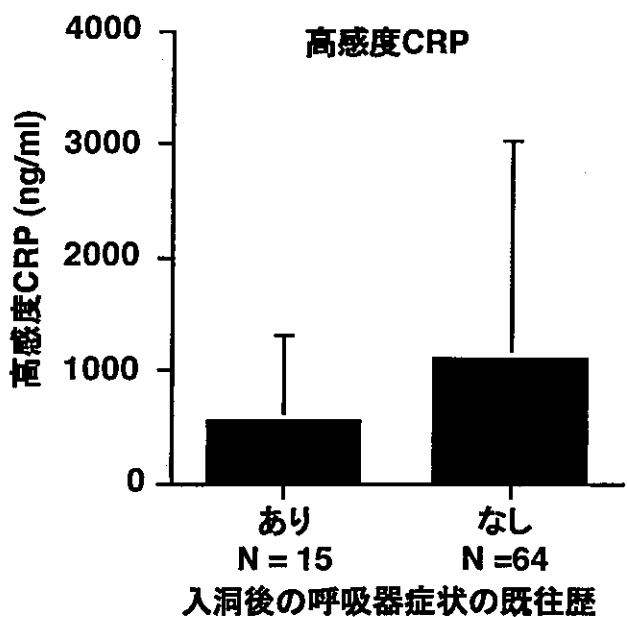
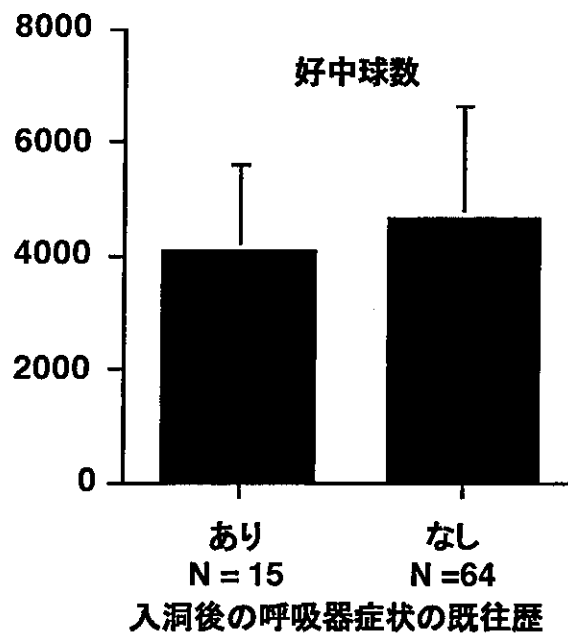
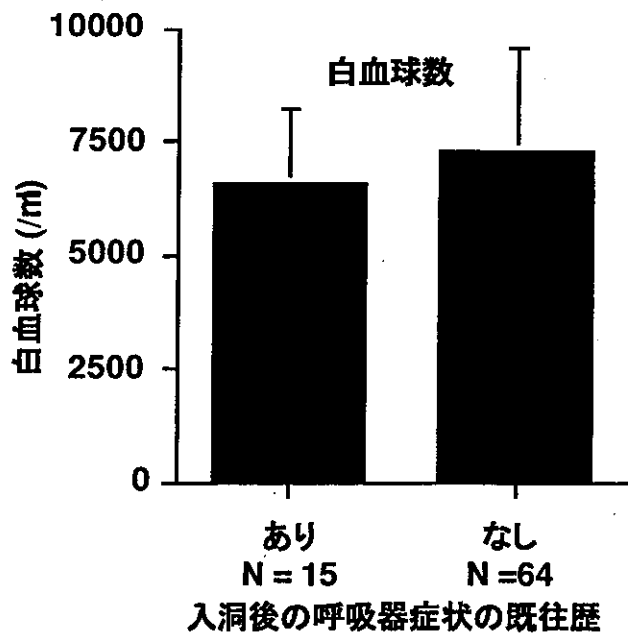


図10. 洞窟入洞後の呼吸器症状既往歴の有無と検査成績の関連

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 横村 浩一 帝京大学医真菌研究センター 助教授

研究要旨 起因菌の抗真菌剤感受性測定は、真菌症対策上益々必須となろう。近年、米国 NCCLS、および日本医真菌学会標準化委員会により、各々酵母様真菌に対する感受性測定の標準法が報告され、また様々な酵母様真菌に対する薬剤感受性試験用簡易キットが国内外で開発・上市された。これらの市販キットは簡便であり、比較的良好に品質が管理されているため、臨床分離株の感受性を測定する上で有益である。しかしその一方で、測定条件、再現性等については、十分な検討がなされていないものも少なくない。そこで、「輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発」のための抗真菌薬感受性診断・検査法研究として、分担研究者が行った以下の研究課題 (I『抗真菌薬感受性試験法の標準化に関する基礎的検討1:臨床分離病原酵母200株を用いた日本医真菌学会標準法と市販凍結プレートの各々によって得られた感受性結果の相関性/互換性に関する検討』およびII『抗真菌薬感受性試験法の標準化に関する基礎的検討2:抗真菌薬感受性測定法市販凍結プレートによって得られた感受性結果の安定性と、同法の国際標準規格としてのNCCLS M27-A2 提案感受性域との相関性の多施設検討』)に関する本年度の成果、ならびにIII 本年度の発表業績を以下に報告する。

I 抗真菌薬感受性試験法の標準化に関する基礎的検討1:臨床分離病原酵母200株を用いた日本医真菌学会標準法と市販凍結プレートの各々によって得られた感受性結果の相関性/互換性に関する検討

A. 研究目的

抗真菌剤感受性試験日本医真菌学会標準化委員会提案法^{1,2)}(以下、標準法)による抗真菌薬感受性測定法の普及を目的として、入手と使用が容易な市販凍結プレートによ

って得られる感受性値と標準法感受性値の相関検討し、互換可能性を考察する。

B. 研究方法

提案法は、日本医真菌学会標準化委員会報告^{1,2)}によって試行した。栄研化学の市販凍結プレート⁴⁾は、添付文書に基づいて以下の通り操作を行った。使用菌株は、(i) NCCLS法に規定された対照6菌株に併せて、臨床分離病原酵母200株を供試した。また、ここで得られた各菌株/薬剤毎のMIC域に関して、

両検査法における MIC 値の互換性を検討した。
プロトコール：原則的に標準法に準じた「酵母様真菌 FP '栄研」添付文書によった。ただし、①一連の試験は同一人物が、②1 菌株あたり、少なくとも 10 プレートの試験を行った。

(i) 試験菌株の調製

a. 試験菌株は、YM 寒天培地 (%w/v; yeast extract, malt extract, and peptone 0.5 each, glucose 1, agar 1.5)、35°C にて少なくとも 2 回継代培養を行い、菌の生存と純培養を確認した。

b. 35°C にて、24 時間または 48 時間培養後、直径 1 mm 以上のコロニー 5 個 を採取して 5 ml の滅菌生理的食塩水 (0.85%) に懸濁した。

c. 懸濁液を Vortex ミキサーにて 15 秒間攪拌し、滅菌生理的食塩水で

McFarland (530 nm) 透過度 0.5 に調製した後 10 倍に希釈し、約 0.5 ml (1×10^3 細胞/ml 相当) を感受性測定プレートに接種した。

(ii) 培養

予め解凍された感受性測定プレートに菌液を接種し、必要に応じて初発濁度を測定後、乾燥を防ぐため湿度を保った容器にいれ、72 時間を限度として 35°C にて培養した。プレートを 24 時間毎に観察し、初発濁度若しくは陰性コントロールの濁度を差し引いた発育コントロールの濁度が 0.15 に達した時点で最小発育阻止濃度 (MIC) を判定した。

(iii) 判定

a. 最小発育阻止濃度 (MIC) は、発育コント

ロールに対する 80% 発育阻止濃度 (IC_{80}) を用い、マイクロプレートリーダーによって測定した。

b. IC_{80} は次のいずれかの方法にて判定した。

① マイクロプレートを 1 分間振盪攪拌した後、発育コントロール液 40 μ l に対して培地 160 μ l を加えたウェルの濁度 (IC_{80} スタンダードウェル値) に対して、同等以下の濁度を示すウェルを終末点として、その薬剤濃度を MIC とした。

② 薬剤の希釈系列に対して、終末濁度から初発濁度を引いた値の中で、初発濁度を引いた発育コントロールの濁度の 20% 値 (IC_{80} スタンダード計算値) に対して同等以下の濁度を示すウェルを終末点として、その薬剤濃度を MIC とした。

C. 研究結果

臨床分離 200 株に対する感受性値は、両法において極めて良好 (amphotericin B 100%, flucytosine 100%, fluconazole 97.5%, itraconazole 97.0%, miconazole 97.0%: 図 1) であった。また、国内分離病原酵母 200 株について、抗真菌薬毎の感受性を明らかにした (表 1)。

D. 考察

標準法と市販凍結プレートによる感受性値は高い相関が認められたことから、従来実験室において新鮮調製が求められていた標準法に代えて、市販凍結プレートを利用する事に

よって簡便に抗真菌薬感受性の測定が可能となり、より効果的な抗真菌化学療法への利用が期待できる。

E. 結論

市販凍結感受性プレートによって得られた抗真菌薬感受性結果は、標準法による結果と互換可能である。

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

1. Koichi MAKIMURA, Takako SUZUKI, Takashi TAMURA, Masanari IKEDO, Ryo HANAZAWA, Yuko TAKAHASHI, Yohko YAMADA, Katsuhisa UCHIDA, and Hideyo YAMAGUCHI: Comparative evaluation of standardized method of the Japanese society for medical mycology and commercial frozen plate for microdilution broth antifungal susceptibility testing of yeasts with 200 clinical isolates. *Microbiology and Immunology* 48: 747-753, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当しない。

II 抗真菌薬感受性試験法の標準化に関する基礎的検討 2：抗真菌薬感受性測定法市販凍結プレートによって得られた感受性結果の安定性と、同法の国際標準規格としての NCCLS M27-A2 提案感受性域との相関性の多施設検討

A. 研究目的

前章の研究によって抗真菌剤感受性試験日本医真菌学会標準化委員会提案法^{1,2)}

(以下、標準法)との互換性が明らかにされた市販凍結プレートを用いて、その施設間再現性を確認すると共に、NCCLS M27-A2³⁾(以下、NCCLS法)による感受性測定値との互換性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

日本医真菌学会標準化委員会提案法と同等であることが報告された栄研化学の市販凍結プレート⁴⁾を用いて、(i) NCCLS法に規定された対照6菌株(①*Candida parapsilosis* ATCC22019(QC)、②*C. krusei* ATCC6258(QC)、③*C. albicans* ATCC90028(Reference)、④*C. albicans* ATCC24433(Reference)、⑤*C. parapsilosis* ATCC90018(Reference)、⑥*C. tropicalis* ATCC750(Reference))に対する国内4施設による再現性試験(各10回)を行い、施設間再現性を評価した。(ii)また、

ここで得られた各菌株／薬剤毎の MIC 域と、NCCLS 法によって推奨された MIC 域との比較を行い、両検査法における MIC 値の互換性を検討した。

プロトコールは、前章に準じた。

C. 研究結果

標準法により、参加 4 施設のすべてにおいて 24 時間の培養後 MIC が判定された。また、2 施設においては、48 時間培養後の感受性測定を併せて行なった。

菌株別 MIC 値と施設間一致性、および NCCLS 法において定められた MIC 標準値(以下、MIC 域)との一致性は、薬剤別にまとめて表 2 から 6 に示した。ここで、施設間一致率(% Agreement inter-institute)とは、本試験において得られた測定時間毎の総べての MIC 値を、濃度階級毎に集計し、その最頻値となる階級を含む連続した 3 濃度に相当する MIC 値の出現頻度を表したものである。また、NCCLS 一致率(% Agreement with NCCLS)は、本試験において得られた測定時間毎の総べての MIC 値のうち、NCCLS に規定された MIC 域と一致するものの割合を示したものである。但し、NCCLS 法では、Itraconazole に対する Reference 株の MIC 値、および Miconazole に対する総べての株の MIC 域を提示していないので、これらの薬剤と菌株との組み合わせについては値を示さない。

施設間一致率は、Amphotericin B, Flucytosine, および Fluconazole で良好であるものの、Itraconazole, および Miconazole

ではやや不良となり、薬剤による差異が認められるが、概して 24 時間測定の結果に比して明らかに 48 時間測定の一致率が高い。

また NCCLS 一致率は、Amphotericin B, Flucytosine, および Fluconazole に対する感受性については、一部の例外を除いて 24 時間測定の結果に比して明らかに 48 時間測定の一致率が高い。しかし Itraconazole については、NCCLS 法で MIC 域の規定がある何れの株においても 48 時間測定値の一致率が 24 時間測定値における一致率を下回った。

D. 考察

標準法による抗真菌剤感受性試験では、通常 2 4 時間培養後に MIC 値の判定を行なうことになる。しかし今回の他施設試験の結果から、施設間一致率、NCCLS 一致率の何れも、概ね 48 時間培養後の一致率が優れていた。

この理由は、1) 標準法の研究開発時に用いた菌株が、今回使用している菌株および MIC 域と異なること、2) 標準法開発時は、測定法の感度 (MIC 識別能) に焦点を併せていたため、発育が飽和する 48 時間の時点よりも早い測定時期を設定したこと、3) NCCLS 法では一律 48 時間培養後の測定を規定していること、が考えられる。

何れにしても、検査データの国際的互換性が重視される今日においては、標準法の変法として NCCLS 法に一致するデータが得られる、(*Candida* 属については)一律 48 時間測定を提案する必要があるだろう。但し、Itraconazole

およびMiconazoleに対するMIC値については、
両薬剤の難水溶性に由来すると考えられる不
安定要素が認められるので、運用上注意が必
要であるが明らかになった。

E. 結論

抗真菌薬感受性試験法としての市販凍結感
受性プレートの信頼性の評価と、使用上の基
本的注意事項が提供された。また、本プレー
トによって得られた抗真菌薬感受性結果は、
事実上国際的標準法となっている
NCCLSM27-A2 とほぼ互換が可能である事が明
らかになった。

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

2. Koichi MAKIMURA, Toyoko OGURI, Yuzuru
MIKAMI, Hikaru KUME, Ryo HANAZAWA,
Michiko ABE, Reiko IKEDA and Takako
SHINODA: Multicenter evaluation of
commercial frozen plates for
microdilution broth antifungal
susceptibility testing of yeasts and
comparison of MIC limits recommended
in NCCLS M27-A2, *Microbiology and
Immunology* 49(2): 97-106, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当しない。

文献

- 1) Yamaguchi H, Uchida K, Kume H, Shinoda
T, Watanabe K, Kusunoki T, Hiruma M,
Ishizaki H. 1995. Report of the
Committee of Clinical Laboratory
Standards-1994. *Nippon Isinkin Gakkai
Zasshi.* 36:61-86.
- 2) Makimura K, Sudo T, Kudo M, Uchida K,
Yamaguchi H. 1998. Development of
reference procedures for broth
microdilution antifungal
susceptibility testing of yeasts with
standardized endpoint determination.
Microbiology and Immunology 42:
55-59.
- 3) National Committee for Clinical
Laboratory Standards. 2002. Reference
method for broth dilution antifungal
susceptibility testing of yeasts;
approved standard. Second edition,
document M27-A2. National Committee
for Clinical Laboratory Standards,
Wayne, Pa.
- 4) 田村俊、須藤貴子、槇村浩一、内田勝久、
山口英世. 抗真菌剤薬剤感受性プレート
の評価. 1997年10月 第41回日本医真
菌学会総会、岐阜市、岐阜

III 平成15年業績リスト

学会発表

- 1) 榎村浩一. 真菌症遺伝子診断と疫学へ応用. シンポジウム II 真菌症の基礎および臨床的諸問題 第15回日本臨床微生物学会総会 2004年1月24日 つくば市、茨城
- 2) 榎村浩一. 深在性真菌症のLAMP法による遺伝子診断法. ランチョンセミナーV 新しい遺伝子検査法(LAMP法)による微生物迅速検査Part II 第15回日本臨床微生物学会総会 2004年1月25日 つくば市、茨城
- 3) 西山彌生、蓮見弥生、Petr Hamal、藤崎竜一、榎村浩一、内田勝久、田中孝志、川上小夜子、宮澤幸久、斧康雄、山口英世. 帝京大学附属病院において分離されたmicafungin耐性*Candida glabrata*の生物学的特性の検討. 真菌症フォーラム第5回学術集会、2004年1月31日 港区、東京
- 4) 藤崎竜一、榎村浩一、清水利朗、富岡治明、山口英世. Light Cyclerを用いたLAMP法による結核菌遺伝子診断法の開発. 第77回日本細菌学会総会、2004年4月1日、大阪市、大阪
- 5) 榎村浩一. 三ツ矢正安、山口英世. 「タモギタケ」栽培キノコ農家に発症したアレルギー性気管支肺真菌症起因菌の分子生物学的解析. 第77回日本細菌学会総会、2004年4月2日、大阪市、大阪
- 6) 榎村浩一. 皮膚真菌症に対する分子生物学的アプローチ. 分子皮膚科学セミナー、2004年4月9日、名古屋市、愛知
- 7) 海老原睦仁、吉田江理、榎村浩一、坪井良治、山口英世、安部茂. 検診材料を用いた*Trichophyton tonsurans*感染症遺伝子診断法の開発. 第25回関東医真菌懇話会、2004年6月12日、新宿、東京
- 8) 白木祐美、松葉よう子、比留間政太郎、榎村浩一、小川秀興. *Arthroderma benhamiae*による体部白癬の1例. 第25回関東医真菌懇話会、2004年6月12日、新宿、東京
- 9) 榎村浩一. 世界と日本のヒストプラズマ症、洞窟学シンポジウム“日本に洞窟ヒストプラズマ症はあるか? ”、第30回日本洞窟学会総会 2004年8月20日、北九州市、福岡県
- 10) 西山彌生、蓮見弥生、藤崎竜一、Petr Hamal、榎村浩一、斧康雄、内田勝久、山口英世. 帝京大学附属病院において分離されたmicafungin耐性*Candida glabrata*の生物学的特性の検討. 第48回日本医真菌学会総会、2004年9月25-26日、横浜、神奈川
- 11) 榎村浩一、内田勝久、山口英世、安部茂. 「タモギタケ」栽培キノコ農家に発症したMushroom-worker's lung (過敏性肺炎)起因菌の分子生物学的解析. 第48回日本医真菌学会総会、2004年9月25-26日、横浜、神奈川
- 12) 白木祐美、松葉よう子、比留間政太郎、小川秀興、榎村浩一. *Arthroderma benhamiae*(*T. mentagrophytes* anymal type4)による体部白癬の1例. 第48回日本医真菌学会総会、2004年9月25-26日、横浜、神奈川
- 13) 海老原睦仁、吉田江理、榎村浩一、坪井良治、渡辺晋一、安部茂. 都内大学柔道部

- 員における *Trichophyton tonsurans* 感染症の追跡検診. 第 48 回日本医真菌学会総会、2004 年 9 月 25-26 日、横浜、神奈川県
- 14) 加納壘、山田剛、榎村浩一、山口英世、渡辺晋一、長谷川篤彦. *Arthroderma gypseum* のケラチナーゼ遺伝子について. 第 48 回日本医真菌学会総会、2004 年 9 月 25-26 日、横浜、神奈川県
- 15) 山田剛、榎村浩一、内田勝久、山口英世、安部茂. 白癬菌形質転換系の開発. 第 48 回日本医真菌学会総会、2004 年 9 月 25-26 日、横浜、神奈川県
- 16) 菊池賢、杉田隆、榎村浩一、亀井克彦. 我が国の洞窟環境のヒストプラスマ分布状況と洞窟探検家のヒストプラスマ症に関するアンケート調査. 第 48 回日本医真菌学会総会、2004 年 9 月 25-26 日、横浜、神奈川県
- 17) 藤崎竜一、榎村浩一、鈴木渉、山口英世、安部茂. 熱解離曲線を利用した病原真菌 LAMP 増幅産物同定法の開発. 第 48 回日本医真菌学会総会、2004 年 9 月 25-26 日、横浜、神奈川県
- 18) Hamal P, Makimura K, Ohshima T, Maeda N, Yamaguchi H, Abe S. Pulsed-field gel electrophoresis as a convenient tool for typing of *Candida dubliniensis* strains. 第 48 回日本医真菌学会総会、2004 年 9 月 25-26 日、横浜、神奈川県
- 19) 胡偉民、石橋弘子、渋谷和俊、榎村浩一、山口英世、安部茂. 吸入ステロイド剤によるマウス咽頭カンジダ症. 第 48 回日本医真菌学会総会、2004 年 9 月 25-26 日、横浜、神奈川県
- 20) 菅又美穂、渋谷和俊、榎村浩一、西山彌生、安部茂、内田勝久、山口英世. 本邦動物園飼育下のコアラから分離されたクリプトコックス症起因菌の真菌学的諸性状. 第 48 回日本医真菌学会総会、2004 年 9 月 25-26 日、横浜、神奈川県
- 21) 菅又美穂、渋谷和俊、榎村浩一、安部茂、内田勝久、山口英世. 動物園飼育下のコアラから分離されたクリプトコックス症起因菌のマウスに対する病原性の比較. 第 48 回日本医真菌学会総会、2004 年 9 月 25-26 日、横浜、神奈川県
- 22) 竹内保雄、安枝浩、齋藤明美、秋山一男、榎村浩一、山口英世. 分子生物学的真菌定量化の開発. 第 48 回日本医真菌学会総会、2004 年 9 月 25-26 日、横浜、神奈川県

原著論文

- 1) Yamada Y, Makimura K, Y, Uchida K, Yamaguchi H, Osumi M: Phylogenetic relationships among medically important yeasts based on sequences of mitochondrial large subunit ribosomal RNA gene. *Mycoses* 47(1-2):24-28, 2004.
- 2) Asuka Hirai, Rui Kano, Koichi Makimura, Eduardo Robson Duarte, Junia Soares Hamdan, Marc-Andre Lachance, Hideo Yamaguchi and Atsuhiko Hasegawa: *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependant yeast species isolated from animals. *International Journal*

- of *Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 2): 623-627, 2004.
- 3) Tsuyoshi Yamada, Koichi Makimura, Asuka Hirai, Rui Kano, Atsuhiko Hasegawa, and Hideyo Yamaguchi: Isolation of a Secreted Metalloprotease Gene from *Microsporium canis* and Its Promoter Region. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57(1): 25-28, 2004.
- 4) Chise Sugita, Koichi Makimura, Katsuhisa Uchida, Hideyo Yamaguchi, and Atsushi Nagai. PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *A. fumigatus*, *A. flavus*, and *A. niger*, *Medical Mycology* 42(10): 433-437, 2004.
- 5) Kaneko T, Makimura K, Onozaki M, Ueda K, Yamada Y, Nishiyama Y, Yamaguchi H: Essential ingredients in *Malassezia* species and examination of the simultaneous separation of *Malassezia* and *Candida* species in modified CHROMagar Candida. *Medical Mycology*, 2004, in press.
- 6) Koichi MAKIMURA, Takako SUZUKI, Takashi TAMURA, Masanari IKEDO, Ryo HANAZAWA, Yuko TAKAHASHI, Yohko YAMADA, Katsuhisa UCHIDA, and Hideyo YAMAGUCHI: Comparative evaluation of standardized method of the Japanese society for medical mycology and commercial frozen plate for microdilution broth antifungal susceptibility testing of yeasts with 200 clinical isolates. *Microbiology and Immunology* 48: 747-753, 2004.
- 7) Yasuki Kamai, Kazunori Maebashi, Michinari Kudoh, Koichi Makimura, Wataru Naka, Katsuhisa Uchida and Hideyo Yamaguchi: Characterization of Mechanisms for Fluconazole Resistance in a *Candida albicans* Isolate from a Japanese Patient with Chronic Mucocutaneous Candidiasis. *Microbiology and Immunology* 48(12): 937-943, 2004.
- 8) Hossein Mirhendi, Koichi Makimura, Kamiar Zomorodian, Tsuyoshi Yamada, Takashi Sugita, Hideyo Yamaguchi: A simple PCR-RFLP method to identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *Journal of Microbiological Methods* 61: 281-284, 2005.
- 9) Tsuyoshi Yamada, Koichi Makimura, Katsuhisa Uchida, and Hideyo Yamaguchi: A reproducible genetic transformation system for two dermatophytes, *Microsporium canis* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Medical Mycology*, 2005, in press.
- 10) Koichi MAKIMURA, Toyoko OGURI, Yuzuru MIKAMI, Hikaru KUME, Ryo HANAZAWA, Michiko ABE, Reiko IKEDA and Takako SHINODA: Multicenter evaluation of

commercial frozen plates for microdilution broth antifungal susceptibility testing of yeasts and comparison of MIC limits recommended in NCCLS M27-A2, *Microbiology and Immunology* 49(2): 97-106, 2005.

総説・著書

1. 榎村浩一. 真菌症の分子生物学的診断法 化学療法の領域 20(2): 165-169, 2004.
2. 榎村浩一. 深在性真菌症. pp. 291-294, V維持血液透析療法 合併症とその対策 感染症 日本臨牀 血液浄化療法(下), 2004.
3. 榎村浩一. 真菌症遺伝子診断とその展望、日本医真菌学会雑誌 45(2): 59-62, 2004.
4. 榎村浩一. カンジダ症. pp. 996-997, 水島裕、黒川清 総監修 疾患別・症状別 今日の治療と看護 改訂版、南江堂、東京、2004.
5. 榎村浩一. クリプトコックス症. P. 997, 水島裕、黒川清 総監修 疾患別・症状別 今日の治療と看護 改訂版、南江堂、東京、2004.
6. 榎村浩一. アスペルギルス症. pp. 997-998, 水島裕、黒川清 総監修 疾患別・症状別 今日の治療と看護 改訂版、南江堂、東京、2004.
7. 榎村浩一. ムコール症. P. 998, 水島裕、黒川清 総監修 疾患別・症状別 今日の治療と看護 改訂版、南江堂、東京、2004.
8. 榎村浩一. スポロトリコーシス. P. 999, 水島裕、黒川清 総監修 疾患別・症状別 今日の治療と看護 改訂版、南江堂、東京、2004.
9. 深在性真菌症のガイドライン作成委員会(委員長:河野茂. 顧問:山口英世. 委員:荒木恒敏、岡慎一、亀井克彦、木内哲也、久米光、竹末芳生、田中秀治、角田卓也、二木芳人、前崎繁文、榎村浩一、三鴨廣繁、光武耕太郎、宮崎義継、森健、森雅亮、矢野啓子、吉田稔). 各領域における深在性真菌症の診断・治療-ガイドライン理解のために-. 医歯薬出版、東京、2004.
10. 榎村浩一. 真菌症のDNA診断、深在性真菌症の診断、特集内科領域の深在性真菌症. 内科 94(5): 827-830, 2004.

図1 日本医真菌学会標準法と市販凍結感受性測定プレートによる感受性値の相関

fluconazole

JSMM standard (μg/ml)	≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64
>64											7
64										1	2
32								2	3	1	
16							1	5			
8						3	7	1			
4					5	19	4				
2				5	12	7					
1		1	1	5	3						
0.5	3	5	9	3	1						
0.25	4	27	1								
≤0.125	40	12									
	≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64

Agreement: 97.5% Frozen plate (mg/ml)

itraconazole

JSMM standard (μg/ml)	≤0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	>8
>8											7
8											
4									1		
2								1			
1							4	8	1		
0.5				2	9	23	4				
0.25				5	13	3					
0.125		1	3	10	3						
0.06	2	2	12	5							
0.03	6	43	6								
≤0.015	22	3	1								
	≤0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	>8

Agreement: 97.0% Frozen plate (mg/ml)

miconazole

JSMM standard (μg/ml)	≤0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32
>32											
32											
16											
8							1	1	1		
4					1		7	1			
2				1	7	2	2				
1				9	10	3					
0.5			2	8	5	1					
0.25	2	3	19	4	1						
0.125	8	2	5								
≤0.06	92	2									
	≤0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32

Agreement: 97.0% Frozen plate (mg/ml)

表1 市販凍結感受性測定プレートによって求められた臨床分離病原酵母200株の抗真菌薬感受性結果

Species	No. of isolates	Antifungal agent	No. of occurrences at MIC ($\mu\text{g/ml}$) of:													
			≤ 0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	64<
<i>Candida albicans</i>	100	Amphotericin B					11	66	23							
		Flucytosine				88	4	3	2						1	2
		Fluconazole				45	37	4	2		2		1		1	8
		Itraconazole	28	44	13	4	1	1	3							
<i>Candida tropicalis</i>	8	Miconazole				2	4	2	1	1	6	1	1			
		Amphotericin B					1	6	1							
		Flucytosine				7			1							
		Fluconazole				2	3		1	1					1	
<i>Candida parapsilosis</i>	12	Itraconazole	1	2	2	2						1				
		Miconazole			3	2			2		1					
		Amphotericin B					3	5	4							
		Flucytosine				9	2								1	
<i>Candida glabrata</i>	8	Fluconazole					3	3	4	2						
		Itraconazole		2	3	6	1	4	4	1						
		Miconazole				3	3	2								
		Amphotericin B						4	4							
<i>Candida guilliermondii</i>	4	Flucytosine				1	1		2							
		Fluconazole								2	1	1				
		Itraconazole					1	1	2							
		Miconazole							1		2	1				
<i>Candida krusei</i>	9	Amphotericin B					1	5	3							
		Flucytosine									1	2	6			
		Fluconazole									1	5	2	1		
		Itraconazole			1	1	4	3								
<i>Candida lusitanae</i>	3	Miconazole					1	1	6	1						
		Amphotericin B						3								
		Flucytosine				3										
		Fluconazole					1	1	1							
<i>Candida kefyr</i>	2	Itraconazole	1		1	1		1	1							
		Miconazole			2		1									
		Amphotericin B						1	1							
		Flucytosine				1					1					
<i>Candida famata</i>	3	Fluconazole				2	1	1				1	1			
		Itraconazole		1				1	2							
		Miconazole			1				1		1					
		Amphotericin B						1	2							
<i>Pichia anomala</i>	12	Flucytosine				10	6	5	1					1	1	
		Fluconazole						5	5	2		10	2			
		Itraconazole							5	5						
		Miconazole							5	5	2					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21	Amphotericin B						7	14							
		Flucytosine				17	3	1								
		Fluconazole						1	2	7	5	5		1		
		Itraconazole			1	1	4	9	3	2	1					
<i>Cryptococcus neoformans</i>	5	Miconazole			6	2	9	2	2							
		Amphotericin B						3	2							
		Flucytosine							1	1	1	1				
		Fluconazole							1		2	1	1			
<i>Trichosporon asahii</i>	13	Itraconazole			1	2	2									
		Miconazole					2	2	1							
		Amphotericin B						2	10	1						
		Flucytosine								1						
<i>Trichosporon asahii</i>	13	Fluconazole							2	5	6	4		3	3	
		Itraconazole				2	4	6	1							
		Miconazole			1	5	6	1								
		Amphotericin B							2	10	1					

Blank cells indicate 0 occurrences.

表2 amphotericin Bに対する施設間および NCCLS M27-A2提案域MIC値一致率

		Strains					
		<i>C. albicans</i> ATCC24433	<i>C. albicans</i> ATCC90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	<i>C. parapsilosis</i> ATCC90018	<i>C. tropicalis</i> ATCC750	<i>C. krusei</i> ATCC6258
Percent agreement inter-institute	24 h	75.0 (83.3)	82.6 (100)	95.7 (100)	93.5 (69.2)	100 (100)	89.4 (100)
	48 h	91.7	100	100	100	100	100
Percent agreement with NCCLS	24 h	61.4 (83.3)	52.2 (69.2)	95.7 (100)	63.0 (69.2)	69.6 (96.2)	68.1 (100)
	48 h	75.0	100	77.8	100	100	100
MIC range in NCCLS ($\mu\text{g/ml}$)		0.25-1.0	0.5-2.0	0.25-1.0	0.5-2.0	0.5-2.0	0.5-2.0
Percent MICs within range in NCCLS		99.5	91.9	99.1	96.4	93.7	99.5

Values in parentheses are the number of percent agreement calculated from the MIC distributions of institute A and D only.

表3 flucytosineに対する施設間および NCCLS M27-A2提案域MIC値一致率

		Strains					
		<i>C. albicans</i> ATCC24433	<i>C. albicans</i> ATCC90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	<i>C. parapsilosis</i> ATCC90018	<i>C. tropicalis</i> ATCC750	<i>C. krusei</i> ATCC6258
Percent agreement inter-institute	24 h	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
	48 h	100	100	100	100	100	100
Percent agreement with NCCLS	24 h	0 (0)	26.1 (30.8)	100 (100)	100 (100)	100 (100)	100 (100)
	48 h	83.3	100	100	100	100	100
MIC range in NCCLS ($\mu\text{g/ml}$)		1.0-4.0	0.5-2.0	0.12-0.5	$\leq 0.12-0.25$	$\leq 0.12-0.25$	4.0-16
Percent MICs within range in NCCLS		91.9	95	98.6	99.5	99.5	96.8

Values in parentheses are the number of percent agreement calculated from the MIC distributions of institute A and D only.

表4 fluconazoleに対する施設間および NCCLS M27-A2提案域MIC値一致率

		Strains					
		<i>C. albicans</i> ATCC24433	<i>C. albicans</i> ATCC90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	<i>C. parapsilosis</i> ATCC90018	<i>C. tropicalis</i> ATCC750	<i>C. krusei</i> ATCC6258
Percent agreement inter-institute	24 h	100 (100)	95.7 (100)	100 (100)	100 (100)	91.3 (100)	100 (100)
	48 h	95.8	73.1	100	100	100	100
Percent agreement with NCCLS	24 h	75.0 (54.2)	58.7 (38.5)	91.5 (100)	100 (100)	89.1 (100)	100 (100)
	48 h	95.8	73.1	100	100	96.2	100
MIC range in NCCLS ($\mu\text{g/ml}$)		0.25-1.0	0.25-1.0	2.0-8.0	0.25-1.0	1.0-4.0	16-64
Percent MICs within range in NCCLS		95.9	97.3	99.1	98.2	95.5	99.1

Values in parentheses are the number of percent agreement calculated from the MIC distributions of institute A and D only.

表5 itraconazoleに対する施設間および NCCLS M27-A2提案域MIC値一致率

		Strains					
		<i>C. albicans</i> ATCC24433	<i>C. albicans</i> ATCC90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	<i>C. parapsilosis</i> ATCC90018	<i>C. tropicalis</i> ATCC750	<i>C. krusei</i> ATCC6258
Percent agreement inter-institute	24 h	86.4 (75.0)	71.7 (76.9)	66.0 (77.8)	95.7 (92.3)	54.3 (61.5)	61.2 (63.0)
	48 h	100	100	100	92.3	100	63.0
Percent agreement with NCCLS	24 h	NA	NA	55.3 (44.4)	NA	NA	61.2 (40.7)
	48 h	NA	NA	22.2	NA	NA	51.9
MIC range in NCCLS ($\mu\text{g/ml}$)		NA	NA	0.06-0.25	NA	NA	0.12-0.5
Percent MICs within range in NCCLS		NA	NA	99	NA	NA	94

NA: not available because of no description of MIC range for the 4 strains in NCCLS M27-A2.

Values in parentheses are the number of percent agreement calculated from the MIC distributions of institute A and D only.

表6 miconazoleに対する施設間MIC値一致率

		Strains					
		<i>C. albicans</i> ATCC24433	<i>C. albicans</i> ATCC90028	<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	<i>C. parapsilosis</i> ATCC90018	<i>C. tropicalis</i> ATCC750	<i>C. krusei</i> ATCC6258
Percent agreement inter-institute	24 h	100 (100)	97.8 (100)	85.1 (100)	97.8 (100)	47.8 (69.2)	78.7 (66.8)
	48 h	100	100	100	100	100	96.3

Values in parentheses are the number of percent agreement calculated from the MIC distributions of institute A and D only.

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

Study on sensitivity and diagnostic accuracy of fungal elements demonstrated in several kinds of cytological specimen from respiratory tract

渋谷和俊，三宅洋子，前田陽子，平田晶子，長谷川千花子，浜谷茂治，羽鳥 努，野中博子

（東邦大学医学部病院病理学講座）

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

研究要旨： 1998年から2003年までの6年間に東邦大学大森病院病理部で施行された各種呼吸器系細胞診7377件を再検討し，真菌の検出率ならびに形態による菌種の推定を試みた。また，2001年から2003年までの3年間は，粘液への過剰染色を抑制する変法グロコット染色を施行し，検出率や菌種の推定について検討した。一定の基準を設定して菌種について再検討を行った場合，推定不能例を約20%にまで減少させることが可能であった。また，気管支洗浄液や擦過細胞診のように病巣部位の選択性が高い採取法でも口腔に由来するカンジダの混入が明らかとなり，診断上留意が必要と考えられた。

A. 研究目的

近年，国内外の深在性真菌症に関するガイドラインでは，組織診あるいは細胞診での菌の証明と菌種の推定が，培養と並び確定診断の要件と記されている。細胞診は，患者への負担が比較的軽度で迅速な診断が可能であることから，今後，本疾患領域の診断における重要性が増すと思われる。本研究では，細胞診検体を検索する場合に重要なグロコット染色の改良とこの染色法と標本上の真菌の形態に基準を設定して，菌種推定の精度について検討した。

東邦大学大森病院病理部で施行された各種呼吸器系細胞診7377件。方法1：グロコット染色の改良

細胞診標本上の粘液成分の染色を回避し，真菌の菌体成分に対する選択性の向上を目的に以下の操作手順により染色法の改良を行った。

改良グロコット染色法

- ① 塗抹標本作成後エタノール固定
- ② 菌液（充分に乾燥）
- ③ 菌液 0.5%過ヨード液へ 10分
- ④ 蒸留水 3回
- ⑤ アンモニア液（50℃）10～20分 蒸気で脱臭
- ⑥ 蒸留水 3回
- ⑦ 0.2%過化水 10秒～1分
- ⑧ 蒸留水 3回
- ⑨ 2%オオ酸銀ナトリウム 1分
- ⑩ 蒸留水洗
- ⑪ 1%ライトグリーン 10秒
- ⑫ 水洗
- ⑬ 蒸留水，蓋液，封入

● アンモニア液
20%過ヨード液 3ml に蒸アンモニアを添加し濃度が成人用になった後，蒸留水を加えて濃度を 50% とする
（注：50% 日本標準純度標準試薬工業用級品 0229-01V 参照）

B. 研究方法

材料：1998年から2003年までの6年間に東

方法2：菌種推定の形態的基準

標本上に認められる真菌についてカンジダと

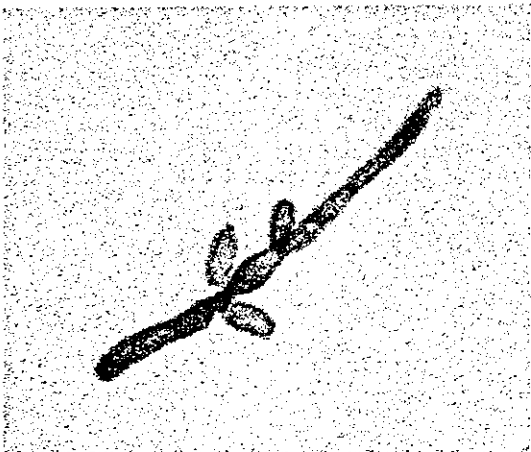
アスペルギルスを形態的に識別するために以下のような基準を設定し、その妥当性について検討した。

指標 I	
1 酵母-菌性菌糸	カンジダ
2 酵母-菌性菌糸	カンジダ >> カンジダ + アスペルギルス
3 菌糸-菌性菌糸+菌性菌糸	カンジダ >> カンジダ + アスペルギルス
4 菌性菌糸のみ	カンジダ
5 菌性菌糸のみ	アスペルギルス > カンジダ
6 菌性菌糸-菌性菌糸	アスペルギルス、カンジダ

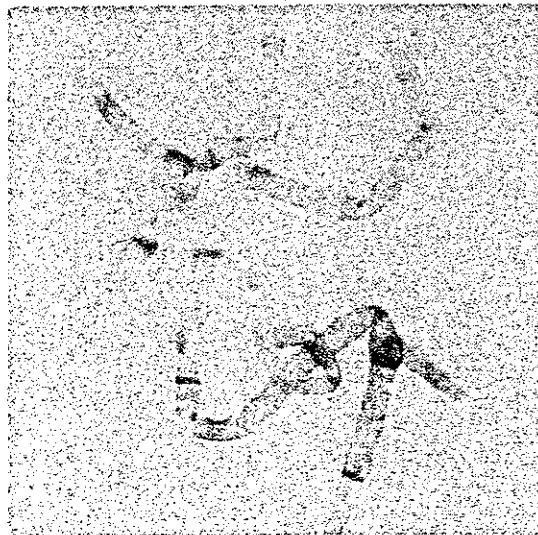
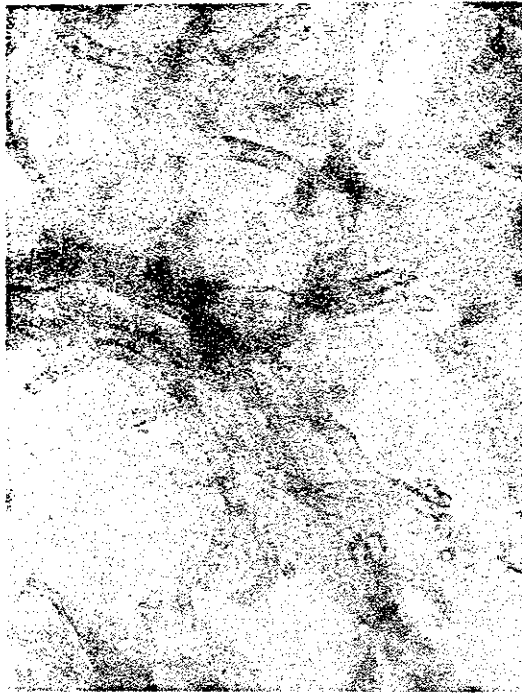
指標 II	
1 高等二方向性分岐	アスペルギルス
2 分岐に一致した出芽	カンジダ
3 発芽管形成	カンジダ

代表的な形態的特徴を以下に提示する。

カンジダ：



アスペルギルス：



C. 研究結果

検索を行った呼吸器系細胞診検体中、真菌成分を認めた症例は92検体であり、検体別の内訳は、喀痰：42件、YM式喀痰：4件、経気管支擦過細胞診：11件、気管支洗浄液：34件、および経気管支穿刺細胞診：1件であった。年次別推移を以下に示す。

年次	検出例	再検再検再検				
		培養	YM	培養	BAL	細菌科-その他
1998	8	4	0	1	3	0
1999	11	7	2	0	2	0
2000	13	9	1	1	2	0
2001	18	4	0	3	11	0
2002	22	10	0	4	8	0
2003	20	8	1	2	8	1
合計	102	52	4	11	32	1

一方、改良グロコット染色を導入した 2001 年以後の 3 年間で以前の 3 年間の真菌の検出率を比較すると 17.1%から 23.1%と有意に上昇した。

標本上に真菌を認めた 92 例の内 57 例は、通常の報告では菌種の推定が回避されていた。

表2 依頼時の第一推定菌種の内訳

年次	検出例	再検再検	再検再検再検					
			培養	YM	培養	BAL	細菌科-その他	
1998	53	14	28	10	22	8	0	1
1999	28	5	24	20	10	4	0	0
2000	77	46	31	11	14	5	0	1
2001	86	53	38	19	12	3	2	0
2002	102	54	48	20	21	7	0	0
2003	70	41	29	13	12	1	0	3
合計	430	213	217	93	81	28	2	5
			(42.5%)	(47.9%)	(12.0%)	(0.9%)	(2.5%)	

※()内は依頼時菌種推定中のその菌種の占める割合

そこで改良グロコット染色を導入した 2001 年以降の症例について、前記の形態的基準に従い再検討を行ったところ、菌種の推定不能症例が 65%から 20%にまで減少し、その多くがカンジダと推定された。

年次	検出例	再検再検	再検再検再検					
			培養	YM	培養	BAL	細菌科-その他	
2001	18	8	8	0	0	0	2	0
2002	22	14	3	0	0	0	8	0
2003	20	17	3	3	0	0	10	1
合計	60	39	14	3	0	0	18	1

※1 真菌菌種を推定した症例数
 ※2 菌種推定不能を伴った症例数
 ※3 再検再検も推定不能を推定し再検再検した症例

D. 考察

日常の診断に用いられる細胞診検体の多くは、培養に提出されるものと共通であるが、培養

による真菌の検出率は施設により大きな開きがあると同時に総じて低い。従って、細胞診標本上での菌種の推定が必要となる場合は頻りに生じている。更に近年では、数種類の新規抗真菌剤が上梓され、それらの菌種に対する感受性が異なることから、精度の高い菌種の推定は、より重要なものとなっている。

そこで本研究では、過去に蓄積された細胞診検体を用いて、改めて基本的な組織内菌形態により菌種の推定を試みた。更に、粘液の過剰染色を回避するための改良をグロコット染色に施し、検出率の変化についても検討した。

この結果、基本的な形態の確認のみでも、初回診断時に明確な推定を避けた症例の多くで、菌種の推定を行うことが可能であった。また、気管支洗浄液や擦過細胞診のように採取部位の選択性の高い検体であっても口腔内に由来するカンジダの混入が多く、実際の診断では特に注意を要する事象と考える。更に、改良グロコット染色は細胞診標本から真菌を検出するためには、極めて有用であり、一般の施設への普及が望まれる。

E. 結語

1998 年から 2003 年までの 6 年間に東邦大学大森病院病理部で施行された各種呼吸器系細胞診 7377 件を再検討し、真菌の検出率ならびに形態による菌種の推定を試みた。また、2001 年から 2003 年までの 3 年間は、粘液への過剰染色を抑制する変法グロコット染色を施行し、検出率や菌種の推定について検討した。一定の基準を設定して菌種について再検討を行った場合、推定不能例を約 20%にまで減少させ

ることが可能であった。また、気管支洗浄液や擦過細胞診のように病巣部位の選択性が高い採取法でも口腔に由来するカンジダの混入が明らかとなり、診断上留意が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Miyagi K, Kinjo T, Yara S, Koguchi Y, Miyazato A, K Shibuya, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Saito A: Interferon-gamma production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes Infect* 6: 339-349, 2004
2. 齋藤宗樹, 高橋 寛, 和田明人, 岡島行一, 勝呂 徹, 渋谷和俊: 特発性脊髄肥厚性硬膜炎の一例. *日脊髄障害医会誌* 17: 62-63, 2004
3. 安藤常浩, 太田啓介, 森本泰介, 生島壮一郎, 折津 愈, 渋谷和俊: 侵襲性肺アスペルギルス症・アスペルギローマの治療. *内科* 94: 875-879, 2004
4. 田口勝二, 川畑智子, 若山 恵, 大原関利章, 横内 幸, 高橋 啓, 直江史郎, 大越俊夫, 岩淵 聡, 渋谷和俊, 西村和子: 本邦初の *Bipolaris spicifer* によるアレルギー性真菌性副鼻腔炎. *日医真菌会誌* 45: 239-245, 2004
5. Shibuya K, Ando T, Hasegawa C, Wakayama M, Hamaatani S, Hatori T, Nagayama T, Nonaka H: Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. *J infect Chemother* 10:138-145, 2004
6. 渋谷和俊, 安藤常浩, 長谷川千花子, 浜谷茂治, 羽鳥 努, 野中博子: 深在性真菌症の病態と病理診断. *内科* 94: 831-838, 2004
7. 渋谷和俊 (分担): 呼吸器の病気. 肺真菌症, 家庭医学大全科最新版 (高久文麿, 北村惣一郎, 猿田亨男, 福井次矢監修): p1090-1092, 法研, 東京, 2004
8. 上原至雅, 亀井克彦, 菊池 賢, 槇村浩一, 渋谷和俊, 上昌広, 杉田 隆, 鈴木和男, 新見昌一: 深在性真菌症及び輸入真菌症対策に向けた総合的基盤研究. 厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)「深在性真菌症及び輸入真菌症対策に向けた総合的基盤研究」平成15年度総括研究報告書, p1-22, 2004
9. 渋谷和俊, 亀田典章, 杉田隆, 上芝元, 長谷川千花子, 浜谷茂治, 野中博子: ヒストプラズマ症の1国内剖検例. 厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)「深在性真菌症及び輸入真菌症対策に向けた総合的基盤研究」平成15年度総括研究報告書, p49-54, 2004
10. Tanabe M, Matsumoto T, Shibuya K, Tateda K, Miyazaki S, Nakane A, Iwakura Y, Yamaguchi K.: Compensatory response of IL-1 gene knockout mice after pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol.* 54: 7-13, 2005