

な抗真菌療法が施されたため、生前に真菌感染に罹患した症例であっても剖検では検出されなかった可能性が否定できない。本研究は真菌感染の頻度を過小評価しているかもしれない。

深在性真菌症は造血器悪性腫瘍の重大な合併症である。近年、アスペルギルス感染症の頻度が増加し、対策の改善が求められる。

IV. 本邦で分離された真菌血症由来酵母 353 株の遺伝子学的同定、group I intron typing について

近年、医療技術の進歩により、感染症の病態に大きな変化が生じてきている。中でも深在性真菌症は免疫不全患者に発生することの多い日和見真菌症の代表であるが、わが国全体での発生状況等の疫学調査はほとんど行われていない。

そこで、国内での深在性真菌症の発生動向調査のため、1997年より2005年までに17施設で真菌血症患者の血液培養より分離された酵母 353 株について、従来の生化学的手法に加え、ITS1-5.8S rDNA-ITS2, 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列解析による遺伝子学的同定を行った。

関東近郊を中心とした 17 施設にて、2000年12月より1年間に発生した全ての真菌血症由来酵母 198 株、及びこの期間を除く1997年より2005年に東京女子医科大学病院、東京大

学医学部附属病院で発生した真菌血症由来酵母 155 株の計 353 株について検討を行った。菌株は 50% glycerol 中で-85°Cで凍結保存した。

従来法による同定として、クロモアガーカンジダ上での発育、厚膜胞子形成、仮性菌糸形成、rapid ID32C, Vitek2 による同定を行った。

DNAはSabouraud寒天培地に継代培養したコロニーより、Genとるくん(酵母用)(TaKaRa)を用いて精製した。これらの酵母DNAをtemplateとして、18S rDNAの3'末端に設定したプライマーITS-1F(5'-GTCGTAACAAGGTTAACCTGCGG-3')と26S rDNA D1/D2領域3'末端のプライマーNL-4R(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG)を用いてPCRを行い、塩基配列を解読した。得られたデータはBlast searchでヒットした菌種の標準株DNAとのhomology検索を行い、99%以上一致したものをその菌種と同定した。従来法で*Candida albicans*と同定された菌株についてはgroup I intron typingをMcCulloughらの方法(J Clin Microbiol 37: 417-421, 1999)に基づいて行った。各種抗真菌薬に対するMICは微量液体希釈法(NCCLS M27-A2)に従って行った。

今回解析した 353 株の遺伝子学的同定による菌種のうち、327 株(92.6%)が *Candida* 属であった。*Candida* の菌種では、*C. albicans* が 150 株と最も多かったが、Non-*albicans* 全体が 177 株と、過半数を占めた。Non-*albicans* では *C. parapsilosis* が 89 株と多く、次いで *C. glabrata* 41 株、*C. tropicalis* 28 株の順であり、*C. albicans* を加えた主要 4 菌種の占める割合は *Candida* 327 株中 308 株(94.2%) とほとんどを占めた。

C. albicans との鑑別が困難であり、本邦の真菌血症由来株としては報告のみられなかった。*C. dubliniensis* は 3 株認められた。従来、*C. parapsilosis* に含まれていた *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* もそれぞれ 3, 1 株ずつ検出された。

Candida 属以外の酵母では *C. curvatus* が 9 株と最も多く、次いで *C. neoformans* の 5 株と、*Cryptococcus* 属が多かった。また、従来、本邦の真菌血症を含む深在性真菌症の起原菌としてはほとんど報告のみられない *Rhodotorula mucilaginosa*, *Lodderomyces elongisporus* が 4, 3 株ずつ認められた。

遺伝子同定と従来法による同定を比較すると、両者の一致率は 95% であった。*C. dubliniensis* はすべて従来法では *C. albicans* と同定され、*C. metapsilosis* および *C. orthopsilosis* は *C. parapsilosis* と同定されていた。*Lodderomyces elongisporus* は従来法では *C. parapsilosis* または *C. sake* と同定されていた。

従来法で *C. albicans* と同定された 137 株の group I intron typing を行うと、*C. albicans* は A, B, C, E の 4 type に、*C. dubliniensis* は D type に分かれ、両者を区別することが可能である。今回、ITS1-26S rDNA sequence にて *C. dubliniensis* と同定された 3 株は全て D type と判定された。従来報告では分離頻度は A, B, C の順であるとされ、今回の結果もそれを裏付けていたが、PCR でバンドの検出できない non-typeable 株が 31 株と A type に次いで多かった。

C. dubliniensis の検出患者背景については、1 例は単心室で手術後の患者で、カンジダ性食道潰瘍が先行し、その後 fluconazole 投与にも

かかわらず、感染性心内膜炎で死亡した症例であった。

C. dubliniensis 3 株に対する各種抗真菌薬の MIC については、近年問題となっている azole 耐性は認められなかったが、TWCC 13452 に対する micafungin の MIC は 16 と高かった。

近年、真菌の遺伝子同定方法がほぼ確立し、*Candida* 属では *C. dubliniensis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* などが従来 *C. albicans*, *C. parapsilosis* から分離された。*C. dubliniensis* では HIV 患者の口腔カンジダ症からの検出が多いこと、azole 耐性が多いのではないかと報告が相次ぎ、注目を集めている。これまでに本邦での真菌血症例からの分離報告はなく、今回見出された 3 症例は初めての症例と考えられた。*C. dubliniensis* と *C. albicans* は今回用いた CHROMO agar 上での発育、Vitek2, rapid ID32C などの同定キットで区別可能とされているが、*C. dubliniensis* 3 株はいずれも *C. albicans* と同定されており、その同定は困難であった。実際の臨床現場で *C. dubliniensis* は見逃されている可能性が示唆される。

C. orthopsilosis, *C. metapsilosis* は従来、genotype II, III *C. parapsilosis* と呼ばれていたもので、最近独立種として扱うことが提案された (J Clin Microbiol 43: 284-292, 2005)。病原性の違い等について今後の臨床検討が必要と考えられる。今回の検討では、*C. curvatus*, *R. mucilaginosa*, *L. elongisporus* など、真菌血症からは本邦を含めてほとんど報告されていない菌種が含まれており、その臨床背景については、注意すべき新興深在性真菌症の一つとし

て、その位置付けについて更なる検討が必要と考えられた。これらの菌は今後、院内感染として更に増加、蔓延する危険性を孕んでおり、疫学、発生動向などの調査を続行すべきであると思われた。

近年、病院内の感染対策、感染症の危機管理が叫ばれている。その一方ではこうした日々の感染症、新興・再興感染症への迅速な対応に不可欠な感染症検査室の外部委託が次々と押し進められている。真菌検査は感染症検査の中でも専門家が少なく、対応に苦慮することが少なくない。今回、明らかになったような新興深在性真菌症は今後、更に増加することが考えられ、抗真菌薬選択肢が広がるとともに、耐性の問題も出てくることが考えられる。こうした中で深在性真菌症の疫学、正確かつ最新の情報を把握し、広く診療に還元していくことが重要であると考えられた。

V. コクシジオイデス症病原体検出用プライマーの設計とコクシジオイデス症遺伝子診断法の開発

コクシジオイデス症は感染症法第四類感染症全数把握疾患に規定された唯一の真菌症である。本症は米国西南部（カリフォルニア州、ネバダ州、ユタ州、テキサス州、ニューメキシコ州、アリゾナ州）、メキシコ北部、アルゼンチンのパンパ地域、ベネズエラのパルモン州の半乾燥地域の風土病で、土壤中に生息する *Coccidioides immitis* および

Coccidioides posadasii が原因真菌である。真菌としては最も感染力が強く危険である。日本国内ではこれまで 42 例あまりが発症し、約 85%がアメリカ合衆国での感染例である。近年は増加が著しく、毎年 3-4 名の発病が確認されている。コクシジオイデス属は感染力が強いため健常者でも感染する例が多く、検査中の感染事故が起こりやすい。

コクシジオイデス症は特異的抗体の検出によって診断がなされる場合が多い。しかし、深在性真菌感染症のリスクが特に高い免疫不全患者においては感染しても抗体が産生されない可能性があるため、診断できないという問題点がある。また、臨床検体から真菌を培養・同定することによって感染症の診断がなされる場合、培養はバイオセーフティーレベル 3 実験室に限られており、さらに、培養に数週間を要するため、真菌の培養を介さない診断検査法の開発が強く望まれている。近年、感染症の検査法として遺伝子診断が広く導入されるようになり、コクシジオイデス症においても ITS(internal transcribed spacer)領域や proline rich antigen を標的とした PCR 検出法が報告されているが、非特異的検出の問題により実用化には到っていない。そのため、コクシジオイデス属真菌を特異的に検出する PCR 法プライマーの設計とその評価が必要であった。

C. posadasii は、以前は非カリフォルニア型 *C. immitis* として認識されていた菌種である。臨床症状、表現型にほとんど差が無いにも関わらず、その一塩基多型の多さから *C. immitis* とは別菌種として認識される経緯と

なった。これらの2つの種はマイクロサテライトを含む領域の長さや真菌酵素をコードする遺伝子内の変異によって識別される。現在のところ、臨床上、2菌種を識別する重要性は低い、生息地域によって異なる遺伝子多型が存在している点で進化生物学的に興味深い対象として研究が行われている。

本研究は、PCR法によりコクシジオイデス属真菌遺伝子の特異的に検出し、*C. immitis*および*C. posadasii*を区別するためのプライマー配列を提供することを目的とした。

これまで開発されている遺伝子診断法では、近縁種との交差増幅が頻繁に認められるなど、特異性に問題があった。この問題を解消するために、*Coccidioides*属のDNAを検出可能、かつ、*Coccidioides*属以外の真菌由来のDNAでは陰性になるようなプライマーの開発が必要となる。そのために、米国Broad Instituteにおいて既に公開されている*C. immitis*のゲノム配列より、PCRで720 bpを増幅できる領域を数ヶ所選別した。その領域を増幅するための20 merのプライマーを設計し、*C. immitis*のゲノムDNAに対してDNA増幅を行った。

プライマーセットCoi9-1を用いたPCR検出系により、5株の*C. immitis*由来のDNAより720 bp、14株の*C. posadasii*由来のDNAより630 bpのDNA断片を増幅することが示された。塩基配列の解析により、その増幅産物の長さの違いは90 bpの欠失によることが判明した。従来、2菌種の識別には数塩基の違いを検出するフラグメント解析や1塩基変異を検出するための塩基配列解析が必要であったが、本研究によって開発したPCR検出法によりアガロ

ースゲル電気泳動による解析のみで識別が可能になった。

病原真菌に対するPCR検出系の特異性およびコクシジオイデス属真菌以外の病原真菌(60菌種、73株)に対する非特異性も検討した。本PCR検出系においてはコクシジオイデス属真菌以外の病原真菌を検出しないことが示された。

以上、特異プライマーセットをPCR検出系に用いた場合、コクシジオイデス属真菌を特異的に検出し、分類学上非常に近い2菌種*C. immitis*と*C. posadasii*を容易に識別できることを初めて明らかにした。本研究により、真菌培養を介さない簡便かつ迅速なコクシジオイデス症診断が、臨床現場で可能となる。それにより、検査室事故の危険性を軽減させることが出来る。また、産業上の利用可能性として本研究によるプライマーセットを用いたPCR検出系は、コクシジオイデス症の体外診断薬としての実用化が期待できる。

VI. 非培養系による *Histoplasma* の定量的検出と種内多様性の解析

*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。確定診断には菌の培養が不可欠であるが、本菌は培養に時間を要することから非培養系の検出が迅速性の点からは好ましい。一方、本症は中南米およびアフリカで認められるが、輸入感染症として国内症例がしばしば

報告されている。感染経路(原産国)を明らかにするには本菌の種内多様性の解析が適している。

そこで本年度は、1) 早期診断法の開発を指向し real time PCR を用いた非培養検出系の開発、および 2) 様々な分離源由来の菌株の種内多様性を解析した。

オランダの菌株保存機関である CBS に保存されている 25 株を用いた。本菌株からの DNA 抽出は本研究班分担研究者である帝京大学榎村浩一先生に実施して頂いた。Real time PCR を用いて *Histoplasma* を検出するためには rRNA 遺伝子の LSU 上に *Histoplasma* 特異的な primer および TaqMan probe を設計した。PCR 増幅された LSU 領域を pCR 2.1 プラスミドに挿入し、 10^1 から 10^8 copy までの希釈系列を用いて検量線を作製した。測定機器は AB 7500 システムを用いた。種内多様性を解析するために、18S rRNA 中に挿入されている Group I intron を挟むように PCR primer を作製し、PCR を行った。PCR 陽性産物はダイレクトシーケンスにより DNA 塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。

1. Real time PCR を用いた *Histoplasma* の検出

H. capsulatum には 3 変種 (variety *capsulatum*, variety *duboisii*, variety *faciminosum*) が存在するが、全変種を検出できるように primer/probe を設計した。 10^1 – 10^8 では $r^2=0.999$ の直線的な検量線がいずれの変種に対しても作成された。アフリカ・中南米に渡航歴のある日本人患者病理組織サンプル

から本定量系を用いて解析したところ、約 10^3 copy の rRNA 遺伝子が検出できた。

2. 種内多様性の解析

CBS 由来の 25 株を実験に供した。このうち 15 株 (=60%) から intron が検出された。PCR 産物は塩基配列解析から group I intron であることを確認した。今回塩基配列を決定した 15 株と既に GenBank に登録されている 3 株の intron 配列から系統樹を作製したところ、7 グループに大別された。Variety *capsulatum* は多系を示したが、variety *faciminosum* は互いに系統枝を形成した。なお、variety *duboisii* からは intron は検出されなかった。

本年度は *Histoplasma* の非培養定量系を構築し、また *H. capsulatum* の種内多様性を解析した。*Histoplasma* の培養には時間を要することから患者からの迅速な菌の検出が必要である。今回は多くの臨床検体を入手できなかったが、供試した剖検サンプルから比較的多量の DNA を定量的に検出することができた。今後の臨床応用を期待したい。

これまでに *Histoplasma* の多様性解析は主に機能遺伝子について行われている。rRNA 遺伝子中に intron の挿入が確認されている菌種はごく一部に限られる。Intron は水平伝播であることから疫学的解析には適していると考えられる。限られた菌株数の検討であるが variety *faciminosum* に顕著な変種内多様性は認められなかった。一方、variety *capsulatum* は顕著な多様性が認められた。アフリカ・中南米に渡航歴のある日本人患者病

理組織サンプルからもこの intron が検出でき、
系統的には suriname 株の配列と一致した。こ
のことからただちに当該患者が中米で感染し
たとは言えないが、今後更に多くの菌株を検

討することで分子疫学調査に応用したいと考
えている。

平成17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

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およびヒストプラズマ症の血清診断法に関する研究 亀井 克彦 (千葉大学真菌医学研究センター) - - - - -	23
本邦で分離された真菌血症由来酵母 353 株の遺伝子学的同定 group I intron typing について 菊池 賢 (東京女子医科大学) - - - - -	31
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) - - - - -	39
Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いた病理細胞診検体に認められる病原糸状菌の判別に関する基礎的検討 篠崎 稔 (東邦大学医療センター) 渋谷 和俊 (東邦大学) - - - - -	58
造血器悪性腫瘍患者における深在性真菌症の頻度 上 昌広 (東京大学医科学研究所) - - - - -	62
非培養系による <i>Histoplasma</i> の定量的検出と種内多様性の解析 杉田 隆 (明治薬科大学) - - - - -	66
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) - - - - -	72
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) - - - - -	82
コクシジオイデス症病原体検出用プライマーの設計とコクシジオイデス症遺伝子診断法の開発 上原 至雅 (国立感染症研究所) - - - - - 梅山 隆 (国立感染症研究所) 新見 昌一 (国立感染症研究所) 西村 和子 (千葉大学真菌医学研究センター) 亀井 克彦 (千葉大学真菌医学研究センター) 佐野 文子 (千葉大学真菌医学研究センター)	88

分担報告書

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
ヒストプラズマ症の血清診断法に関する研究

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

研究要旨 輸入真菌症の実態調査を行い、コクシジオイデス症およびヒストプラズマ症が増加を続けていること、とくにコクシジオイデス症の増加が著しく実態調査を開始してから最多の患者数を示したことなどを明らかにするとともに、滞日中の米国人患者の増加など新しい傾向が認められたことなどを指摘した。またヒストプラズマ症診断法の開発について、新規抗原抽出法を確立し、得られた抽出物から新規抗原候補タンパク質の検索を行った。

1. 輸入真菌症の実態調査

A. 研究目的

これまでの研究によりわが国の輸入真菌症症例数は全体として増加傾向にあること、コクシジオイデス症で全身播種による死亡例が発生するに至ったこと、その一方で、感染症法の対象となっているコクシジオイデス症以外の輸入真菌症では実態把握が困難であることなどを示してきた。この中でも輸入真菌症、特にコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症の増加が続いていること、重症化が見られていることについては懸念が大きく、引き続き実態調査が必要と考えられた。

B. 研究方法

症例は前回と同様の方法で収集した。すなわち真菌症のコンサルテーション、菌株の同定、抗体の測定などを目的として、当センターに主治医より接触のあった症例、感染症法4類報告、醫學中央雑誌、Medline などより報告症例を検索した。必要に応じて主治医に直接問い合わせを行ない詳細な経過を確認した。

C. 研究成果 (図1)

1) コクシジオイデス症

総症例数は49例であった。2005年は7例が確認され、prospectiveな統計をとり始めてから1年間あたりの症例数としては最高であった2004年をさらに上回った。全体の経過としてもこれまでの右肩上がりの増加傾向が持続していることが明らかとなった。2004年のような

死亡例は見られなかったが、昨年1名確認された米国人の感染例が、2005年は2例に増加しており、来日して日本に居住している外国人での感染が日常的に見られるようになったことが確認された。また、2005年の症例において

は、感染地は7例中4例がカリフォルニア、残りのうち2例がアリゾナであり、近年最大の感染地がアリゾナからカリフォルニアに変化していることが確認された。

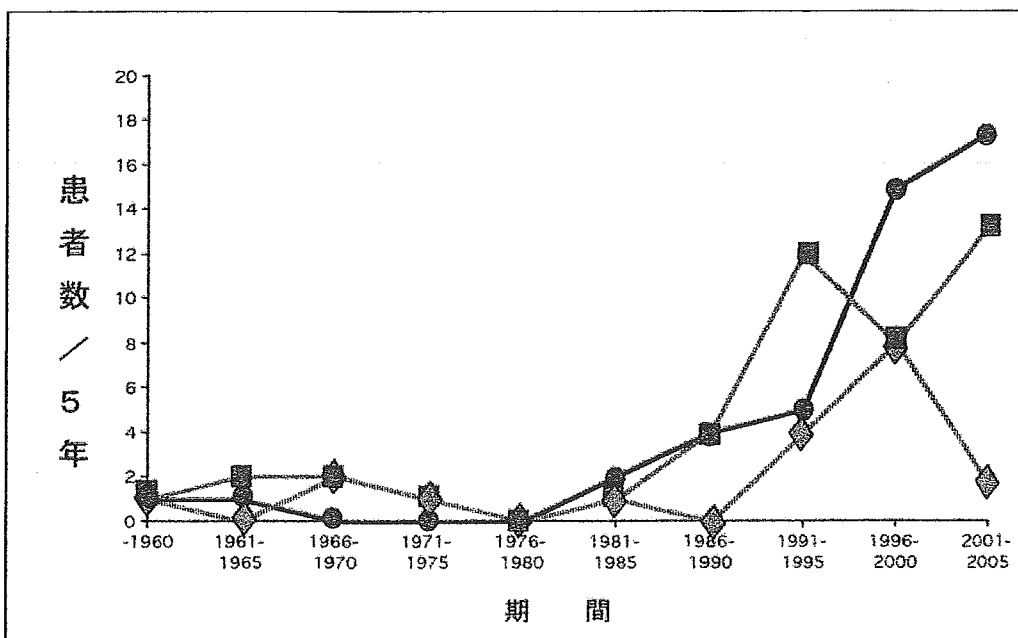


図1：我国の輸入真菌症症例数の変遷

コクシジオイデス症、ヒストプラズマ症の増加が明らかである。(● コクシジオイデス症、■ ヒストプラズマ症、◆ パラコクシジオイデス症) パラコクシジオイデス症は、症例の減少が続いていたが、2005年も症例の報告が見られなかった。これは流行地からの人口流入の現象によるものと考えられ、今後注意深く観察する必要があると思われる。

2) ヒストプラズマ症

2005年のヒストプラズマ症は2004年と同様に3例認められた。総計は46例となった。5年ごとの症例数は、緩やかな増加傾向にあると考えられた。感染地は1例は米国と考えられた。これまで我が国での米国感染症例はこれまで非常

に少なかったが、米国は本症の最大流行地と考えられるため、妥当なものと考えられた。また、1例は海外渡航歴がなく、これまでもしばしば指摘されてきている我が国における国内感染の可能性が示唆された。

3) パラコキシジオイデス症およびその他の輸入真菌症

2005年にはパラコキシジオイデス症を始め、その他の輸入真菌症の報告は見られなかった。

D. 考察

前回の調査で指摘されたコキシジオイデス症およびヒストプラズマ症の増加が持続していることが確認された。その中でもヒストプラズマ症の増加は緩やかであるものの、コキシジオイデス症の増加は著しく特に注意を要すると考えられた。これまでは、コキシジオイデス症の増加の主要な原因として、アリゾナでの患者数が増加が影響を及ぼしているものと推測されてきたが、2005年は患者数が比較的安定しているカリフォルニアでの感染例が中心を占めていた。この理由は不明であるが、いずれにしてもわが国でのコキシジオイデス症の増加は持続する可能性が考えられ、医療機関に対する情報の徹底が必要と思われた。

ヒストプラズマ症は3例認められ、計47例となった。うち1例は感染地では国内感染の可能性も考えられた。現在われわれのグループで研究を進めているヒストプラズマ症原因菌 *Histoplasma capsulatum* の国内生息の検索をさらに継続する必要が示されたものと考えられる。

II ヒストプラズマ症血清診断に関する基礎的研究

A. 研究目的

ヒストプラズマ症は本邦における主要な輸入真菌症の一つである。近年、症例数が増大しており、また海外渡航者増加等の要因により今後更に増大してゆくことが懸念されている。本症の診断には、病理組織観察や培養による菌の検出等が行われるが、いずれも特殊な設備、時間を要する上に感度の良い検出法とは言いがたい。迅速・簡便な診断法としてヒストプラズマ菌体由来する抗原もしくはそれに対する抗体を検出する血清試験がある。既に抗体検出を目的とした血清診断試薬が市販されている。しかしながら、これを用いて研究班において本邦の症例に対して検討を行った結果では、十分な感度を得られないことが明らかとなった。本市販試薬では抗体検出のための抗原として菌糸形ヒストプラズマ培養ろ過物を用いているが、この抗原が適当でないのではないかと考えた。そこで本研究では抗体検出のための良好な抗原候補を探索し、血清診断法確立に向けての基礎的研究を行った。

B. 研究方法

1) *Histoplasma capsulatum* 抗原の調製

H. capsulatum からの抗原抽出は以下のように行った。菌株は千葉大学真菌医学研究センター菌株保存施設に保存されている CDC 105 株を用いた。BHI-YE-Glucose スラント上にて 37°C で 3 週間培養された菌体を滅菌純水中に懸濁し、ボルテックスミキサーにて 1 分間激しく攪拌した。遠心分離後、上清を回収した。その

ままもしくは2回の純水による洗浄操作の後に0.1% Triton X-100 溶液に懸濁した。同様にボルテックスミキサーで攪拌し、遠心分離により上清を回収した。更に1% Triton X-100 溶液で同様の操作を繰り返し、上清を回収した。上清画分はいずれもろ過滅菌を行い、トリクロロ酢酸沈殿法で濃縮を行った。

2) 電気泳動法によるタンパク質分離と抗原候補の検出

1次元 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(1D SDS-PAGE)、2次元電気泳動(2DE)及びウェスタンブロッティングは定法に従って行った。1次抗体として千葉大学真菌医学研究センターにて保存されているヒストプラズマ症患者血清を用いた。陰性コントロールとして健常人血清も同時に用いた。抗原と反応したヒト抗体を検出するために Protein L-HRP を用いた。

3) 質量分析による抗原候補タンパク質の同定

質量分析は東京大学医科学研究所蛋白質解析室(大海忍助教授)において行った。2次元電気泳動を行った後、クマシーブリリアントブルー(CBB)染色によりタンパク質を可視化した。イムノブロッティングの結果より抗原候補と考えられるタンパク質スポットを切り出した。脱色、トリプシン消化の後、ペプチドをゲルより抽出し、LC-TOF-MS/MS によって解析を行った。

C. 研究結果

今回、新規に確立した抽出法により抗原候補混合物を得ることが出来た。免疫拡散法により検討を行った結果、0.1%もしくは1% Triton X-100 溶液抽出物と市販陽性血清の間では precipitin を形成しないが、いくつかの患者ヒト血清との間では弱いながらも precipitin を形成することが分かった。

次に 1D SDS-PAGE で展開後、イムノブロッティングを行った。本研究で用いた3つの患者血清では、いずれも抽出抗原と強く反応することが明らかとなった(図2)。特に50kDaから100kDaに複数の抗原候補が存在することが示唆された。一方、健常人血清ではほとんど抗原との反応は見られなかった。

1D SDS-PAGE では分離が十分でないと考え、2DEによる展開を行い、同様にイムノブロッティングを行った。現在、2DEは0.1% Triton X-100 抽出物についてのみ解析を進めている。図3に示すように本研究で用いた3つの患者血清でいずれも複数の抗原候補が認められた。1D SDS-PAGE の結果と合致するようにこれらは50kDaから100kDaに分布していた。2DE分離後、ゲルから抗原候補を取り出し、質量分析を行った。得られたデータを解析ソフト Mascot において解析した結果、表1に示すようなタンパク質が含まれていると考えられた。

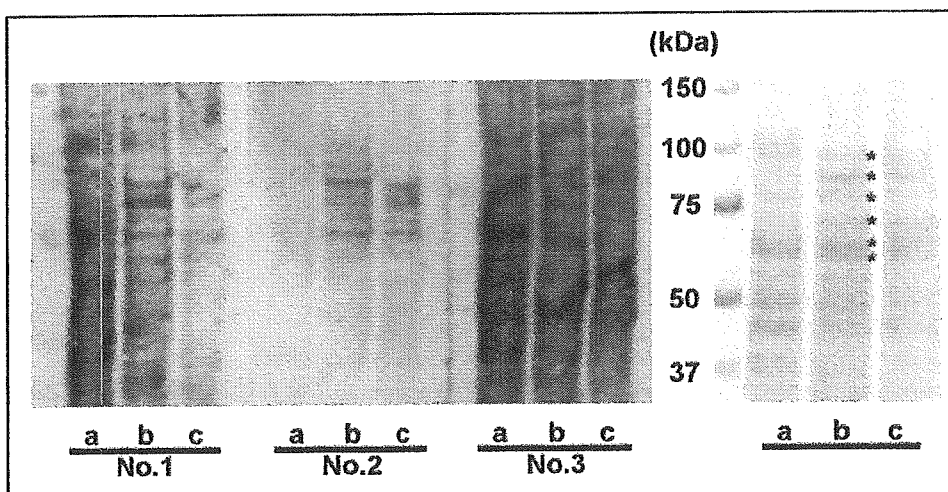


図 2 : 抽出した粗抗原の SDS-PAGE 電気泳動パターン及び粗抗原への患者血清の反応性
 抽出した粗抗原を SDS-PAGE により展開し、左パネルは CBB により染色を行った。右パネルは PAG のタンパク質を PVDF 膜に転写後、一次抗体として患者血清を用い、二次抗体の代わりに Protein L-HRP を用いて検出を行った。レーン a, b, c はそれぞれ 0%、0.1%、1% Triton X100 溶液で抽出した粗抗原をアプライしたレーンである。パネル B は No.1、2、3 と便宜的に呼ぶ 3 種の患者血清を用いている。アスタリスクは抗原候補を示している。

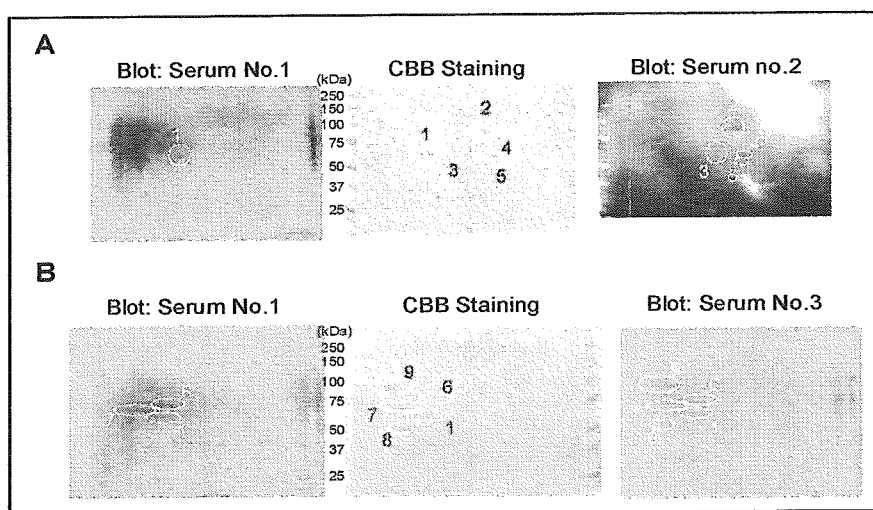


図 3 : 抽出した粗抗原の 2 次元電気泳動パターン及び粗抗原への患者血清の反応性
 0.1% Triton X-100 水溶液で抽出した粗抗原 (B は純水抽出後に更に純水で 2 回の洗浄を行って後に、0.1% Triton X-100 溶液で抽出を行ったサンプルである) を 2 次元電気泳動により展開した。ゲル左方が酸性端 (pH3)、右方が塩基性端 (pH10) である。中央パネルは CBB により染色を行った像である。左右パネルは患者血清でイムノプロットを行った結果である (方法は図 2 と同様)。用いた血清は図 2 と同様である。患者血清中抗体により認識されているタンパク質を CBB 染色像から切り出し、質量分析を行った。染色像内につけている番号は表 1 左欄の番号と対応している。

表 1 : 現在までに解析された抗原候補タンパク質とその解析結果

No.	Putative candidate	Highest hit on Mascot (Matrix Science Ltd.) database search
1	Hsp60	Heat shock protein 60 (<i>Ajellomyces capsulatus</i>)
2	Aconitase	Aconitate dehydratase, mitochondrial (<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293)
3	Aconitase	Aconitate dehydratase, mitochondrial (<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293)
4	Catalase P	Catalase isozyme P (<i>Ajellomyces capsulatus</i>)
5	Dihydrolipoamide dehydrogenase	zcn12d09.x2 F_HC7CDNA <i>Ajellomyces capsulatus</i> cDNA 3', mRNA sequence
6	Hsp70	Heat shock 70 kDa protein from <i>Ajellomyces capsulatus</i>
6'	Hsp70	70 kDa heat shock protein (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)
7	Protein disulfide isomerase	zcn01d02.x2 F_HC7CDNA <i>Ajellomyces capsulatus</i> cDNA 3', mRNA sequence
8	ATP synthase b subunit	ATP synthase F1, beta subunit, putative (<i>A. fumigatus</i> Af293)
9	?	No hits found

抗原候補タンパク質を中央欄に記載した。番号は図3に記載した番号に対応している。データベースサーチの結果、最も有望とされた候補を右に示した。*Histoplasma capsulatum* (*Ajellomyces capsulatus*)に由来するタンパク質がデータベースサーチの結果から得られなかった場合には、その情報に基づき、ゲノム上から相同タンパク質がコードされていると推定される領域の存在を確認した。

D. 考察

これまでの研究班による本邦症例についての検討において、市販の抗体検出法では陽性率が低率にとどまることが示唆されており、臨床的に問題となっている。市販試薬では菌糸形培養ろ過物を抗原として用いている。ヒト体内での寄生形態が酵母形であり、また Compliment Fixation 法による検討で酵母形の方が抗原性が高いとの報告があることから本研究では酵母形ヒストプラズマを用いた。また、表面タンパク質の抽出を目的として弱い界面活性剤を用いた。このように確立された新規抗原抽出法から得られた抽出物には新規抗原候補タンパク質が含まれるものと期待している。実際に図2のデータから、菌糸形培養ろ過物中の主要抗原である M タンパク質、H タンパク質以外の新規抗原タンパク質の存在が示唆されている。質量分析によって挙げられた抗原候補タンパク質は他の真菌にも広く分布しているものから現在までにいずれの真菌からも分離されていない、*Histoplasma* に特異的かもしれないタンパク質まで多岐にわたっていた。*Histoplasma capsulatum* はまだ全ゲノムの決定がなされていないことやタンパク質の読み枠も決定されていないものが多いことから、質量分析の結果だけでは遺伝子の構造を決定できない。今後、タンパク質全長のクローニングのためにも更に解析を進める必要がある。今回得られた基礎的なデータを元に抗原候補の抗原性の確認、検出法の選択・確立等の検討が必要と思われる。

E. まとめ

輸入真菌症はコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症を中心に増加を続けており、特にコクシジオイデス症の増加が注目される。

事故につながる輸入真菌症取り扱い時の院内連携体制の整備を含め、わが国における診療体制、教育体制の見直しが必要である。

ヒストプラズマ症血清診断法については、新たな抗原を用いた検出法の開発を進めている。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1) 原著論文

Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K and Uehara Y. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 2006 (In press).

Sugita T, Kikuchi K, Makimura K, Urata K, Someya T, Kamei K, Niimi M, Uehara Y: *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. *Appl Environm Microbiol* 71: 7626-7629, 2005

2) 学会発表 準備中

3) 総説その他

亀井克彦: わが国の輸入真菌症とその問題点. *真菌誌* 46(1): 17-20, 2005.

亀井克彦: 深在性真菌症—なぜ今また注目されているのか—糸状菌感染症 アスペルギルス症, シュードアレシエリア症, 接合菌症. *日本医事新報* 4216: 33-36, 2005.

亀井克彦: 深在性真菌症—なぜ今また注目されているのか—輸入真菌症. *日本医事新報* 4218: 33-36, 2005.

亀井克彦: 国内にある感染症 輸入真菌症(コクシジオイデス症). *モダンフィジシャン 特集* これだけは知っておきたい国際感染症 255(5): 563-566, 2005.

亀井克彦: 免疫学的検査 非ウイルス性感染症関連検査(抗原および抗体を含む) コクシジオイデス症ならびにパラコクシジオイデス症. *日本臨床* 63(増刊号7): 259-262, 2005.

亀井克彦: 特集 主な抗真菌薬の特長と使い方の抗真菌薬. *メディカメント ニュース* 1851号: 8-9, 2005.

Kamei K, Watanabe A: *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Med Mycol* 43(S1): 595-599, 2005.

村田佳輝, 佐野文子, 鐘田響子, 荒島康友, 西村和子, 亀井克彦: 一般家庭で飼育されている犬, 猫の口腔内真菌叢. *千葉県獣医師会会報* 105: 43-45, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中 上原至雅、梅山 隆、新見昌一、
西村和子、亀井克彦、佐野文子 コクシジオイ
デス症病原体検出のためのプライマー

分担研究報告書

本邦で分離された真菌血症由来酵母 353 株の
遺伝子学的同定、group I intron typing について

分担研究者 菊池 賢 東京女子医科大学感染症科 講師

研究要旨：1997年より2005年までに国内17施設で発生した真菌血症由来酵母353株について、従来の生化学的手法に加え、ITS1-5.8S rDNA-ITS2, 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列解析による遺伝子学的同定を行った。菌株の内訳は *Candida* 属が327株（92.6%）とほとんどを占めた。*Candida* では *C. albicans* が150株（42.5%）と最も多く、次いで *C. parapsilosis* 89株（25.2%）、*C. glabrata* 41株（11.6%）、*C. tropicalis* 28株（7.9%）の順であり、4菌種で308株とほとんどを占めた。*C. albicans* のうち134株について group I intron typing を行ったところ、A型が58株（43.2%）と最も多く、B型28株（20.9%）、C型17株（12.7%）の順であったが、non-typeable が31株（23.1%）含まれていた。*C. albicans* と従来法で同定された株のうち3株は遺伝子同定では *C. dubliniensis* となった。*C. dubliniensis* に対する薬剤感受性で1株は micafungin 耐性を示した。*C. parapsilosis* と従来法で同定された株のうち遺伝子的に1株は *C. orthopsilosis*、2株は *C. metapsilosis*、1株は *Lodderomyces elongisporus* と同定された。*Candida* 以外の酵母は26株（7.4%）であり、*C. curvatus* が9株と最も多かった。従来法と遺伝子学的方法の一致率は95%であった。*C. curvatus* 以外にも、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Lodderomyces elongisporus* が複数株認められており、遺伝子同定の導入により真菌血症の起病因菌として本邦ではほとんど報告されていない菌種が少なからずみられることが明らかになった。

A. 研究目的

近年、医療技術の進歩により、感染症の病態に大きな変化が生じてきている。中でも深在性真菌症は免疫不全患者に発生することの多い日和見真菌症の代表であるが、わが国全体での発生状況等の疫学調査はほとんど行われていない。

そこで、国内での深在性真菌症の発生動向調査のため、1997年より2005年までに17施設で真菌血症患者の血液培養より分離された酵母353株について、従来の生化学的手法に加え、ITS1-5.8S rDNA-ITS2, 26S rDNA D1/D2 領域の塩基配列解析による遺伝子学的同定を行った。

B. 研究方法

関東近郊を中心とした17施設（東京女子医科大学病院、東京大学医学部附属病院、社会保険中央病院、順天堂大学医学部附属病院、日本大学医学部附属病院、東京慈恵会医科大学附属病院、東海大学医学部附属病院、北里大学医学部附属病院、聖マリアンナ医科大学附属病院、横浜市立大学医学部附属病院、東京厚生年金病院、慶応大学医学部附属病院、NTT 東日本関東病院、千葉大学医学部附属病院、帝京大学医学部附属病院、埼玉医科大学附属病院、国立神戸病院）にて、2000年12月より1年間に発生した全ての真菌血症由来酵母198株、及びこの期間を除く1997年より2005年に東京女子医科大学病院、東京大学医

学部付属病院で発生した真菌血症由来酵母155株の計353株について検討を行った。菌株は50% glycerol 中で-85℃で凍結保存した。

従来法による同定として、クロモアガーカンジダ上での発育、厚膜胞子形成、仮性菌糸形成、rapid ID32C, Vitek2による同定を行った。

DNAはSabouraud寒天培地に継代培養したコロニーより、Genとるくん（酵母用）(TaKaRa)を用いて精製した。これらの酵母DNAをtemplateとして、18S rDNAの3'末端に設定したプライマー ITS-1F (5'-GTCGTAACAAGGTTAACCTGCGG-3')と26S rDNA D1/D2領域3'末端のプライマー NL-4R (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG)を用いてPCRを行い、塩基配列を解読した。得られたデータはBlast searchでヒットした菌種の標準株DNAとのhomology検索を行い、99%以上一致したものをその菌種と同定した。従来法で*Candida albicans*と同定された菌株についてはgroup I intron typingをMcCulloughらの方法(J Clin Microbiol 37: 417-421, 1999)に基づいて行った。各種抗真菌薬に対するMICは微量液体希釈法(NCCLS M27-A2)に従って行った。

C. 研究結果

表1に今回解析した353株の遺伝子学的同定による菌種内訳を示す。

353株中、327株(92.6%)とほとんどが*Candida*属であった。*Candida*の菌種では、*C. albicans*が150株と最も多かったが、Non-*albicans*全体が177株と、過半数を占めた。Non-*albicans*では*C. parapsilosis*が89株と多く、次いで*C. glabrata* 41株、*C. tropicalis* 28株の順であり、*C. albicans*を加えた主要4菌種の占める割合は*Candida* 327株中308株

(94.2%)とほとんどを占めた。

*C. albicans*との鑑別が困難であり、本邦の真菌血症由来株としては報告のみられなかった*C. dubliniensis*は3株認められた。従来、*C. parapsilosis*に含まれていた*C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*もそれぞれ3, 1株ずつ検出された。

*Candida*属以外の酵母では*C. curvatus*が9株と最も多く、次いで*C. neoformans*の5株と、*Cryptococcus*属が多かった。また、従来、本邦の真菌血症を含む深在性真菌症の起原菌としてはほとんど報告のみられない*Rhodotorula mucilaginosa*, *Lodderomyces elongisporus*が4, 3株ずつ認められた。

表2に従来法による同定と遺伝子同定と従来法による同定の比較成績を示す。両者の一致率は95%であった。*C. dubliniensis*はすべて従来法では*C. albicans*と、*C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*は*C. parapsilosis*と同定されていた。*Lodderomyces elongisporus*は従来法では*C. parapsilosis*, *C. sake*と同定されていた。

表3に従来法で*C. albicans*と同定された137株のgroup I intron typing結果を示す。group I intron typeでは*C. albicans*はA, B, C, Eの4 typeに、*C. dubliniensis*はD typeに分かれ、両者を区別することが可能である。今回、ITS1-26S rDNA sequenceにて*C. dubliniensis*と同定された3株は全てD typeと判定された。従来報告では分離頻度はA, B, Cの順であるとされ、今回の結果もそれを裏付けていたが、PCRでバンドの検出できないnon-typeable株が31株とA typeに次いで多かった。

表4には*C. dubliniensis*の検出患者背景を示す。1例は単心室で手術後の患者で、カンジダ性食道潰瘍が先行し、その後fluconazole投与にもかかわらず、感染性心内膜炎で死亡した症例であった。

表5には *C. dubliniensis* 3株に対する各種抗真菌薬のMICを示す。近年問題となっている、azole 耐性は認められなかったが、TWCC 13452に対する micafungin のMICは16と高かった。

D. 考察

近年、真菌の遺伝子同定方法がほぼ確立し、*Candida* 属では *C. dubliniensis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* などが従来の *C. albicans*, *C. parapsilosis* から分離された。*C. dubliniensis* では HIV 患者の口腔カンジダ症からの検出が多いこと、azole 耐性が多いのではないかの報告が相次ぎ、注目を集めている。これまでに本邦での真菌血症例からの分離報告はなく、今回見出された3症例は初めての症例と考えられた。*C. dubliniensis* と *C. albicans* は今回用いた CHROMO agar 上での発育、Vitek2, rapid ID32C などの同定キットで区別可能とされているが、*C. dubliniensis* 3株はいずれも *C. albicans* と同定されており、その同定は困難であった。実際の臨床現場で *C. dubliniensis* は見逃されている可能性が示唆される。

C. orthopsilosis, *C. metapsilosis* は従来、genotype II, III *C. parapsilosis* と呼ばれていたもので、最近独立種として扱うことが提案された (J Clin Microbiol 43: 284-292, 2005)。病原性の違い等について今後の臨床検討が必要と考えられる。今回の検討では、*C. curvatus*, *R. mucilaginosa*, *L. elongisporus* など、真菌血症からは本邦を含めてほとんど報告されていない菌種が含まれており、その臨床背景については、注意すべき新興深在性真菌症の一つとして、その位置付けについて更なる検討が必要と考えられた。これらの菌は今後、院内感染として更に増加、蔓延する危険性を孕んでお

り、疫学、発生動向などの調査を続行すべきであると思われた。

近年、病院内の感染対策、感染症の危機管理が叫ばれている。その一方ではこうした日々の感染症、新興・再興感染症への迅速な対応に不可欠な感染症検査室の外部委託が次々と押し進められている。真菌検査は感染症検査の中でも専門家が少なく、対応に苦慮することが少なくない。今回、明らかになったような新興深在性真菌症は今後、更に増加することが考えられ、抗真菌薬選択肢が広がるとともに、耐性の問題も出てくることが考えられる。こうした中で深在性真菌症の疫学、正確かつ最新の情報を把握し、広く診療に還元していくことが重要であると考えられた。

E. 結論

本邦真菌血症由来酵母 353 株について、遺伝子学的同定を行った。菌株の内訳は *Candida* 属が 327 株 (92.6%) とほとんどを占めた。*Candida* では *C. albicans* が 150 株 (42.5%) と最も多く、次いで *C. parapsilosis* 89 株, *C. glabrata* 41 株, *C. tropicalis* 28 株の順で、4 菌種で 308 株とほとんどを占めた。*C. albicans* のうち 134 株について group I intron typing を行ったところ、A 型が 58 株 (43.2%) と最も多かったが、non-typeable が 31 株 (23.1%) 含まれていた。*C. albicans* と従来法で同定された株のうち 3 株が遺伝子同定では *C. dubliniensis* と同定された。*C. dubliniensis* に対する薬剤感受性で 1 株は micafungin 耐性を示した。従来法と遺伝子学的方法の一致率は 95%であった。今回の検討で、従来、菌血症からの報告の稀な *C. curvatus*, *R. mucilaginosa*, *L. elongisporus* が複数株認められており、遺伝子同定の導入により真菌血症の起因菌として本邦ではほと

んど報告されていない菌種が少なからずみられることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表：

Sugita T, Kikuchi K, Makimura K, Urata K, Someya T, Kamei K, Niimi M, Uehara Y: *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. *Appl Environ Microbiol* 71: 7626-7629, 2005

Shimokawa O, Niimi M, Kikuchi K, Saito M, Kajiwara H, Yoshida S: Relationship between MIC and minimum sterol 14 α -demethylation-inhibitory concentration as a factor in evaluating activities of azoles against various fungal species. *J Clin Microbiol* 43: 5547-5549, 2005

学会発表：

菊池 賢、戸塚恭一、内山竹彦. 血液培養由来酵母 287 株に対する遺伝子学的同定. 第 49 回日本医真菌学会総会（千葉）. 日本医真菌学会雑誌 46 (Suppl 1): 84, 2005.

Kikuchi K, Niimi M, Totsuka K, Uchiyama T. Reduced activity of micafungin against *Candida dubliniensis* strains isolated from blood. 45th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington DC, USA. , Abstract of the 45th ICCAC, American Society for Microbiology, 434 (M-1015), 2005.

菊池 賢. 本邦 17 病院において検出された血液培養由来真菌の遺伝子同定と感受性試験成績、及び新しい真菌感染症について. 第 17 回日本臨床微生物学会総会（横浜）. 第 17 回日本臨床微生物学会総会ワークショップ WS4 p14-19, 2006.

表 1. 遺伝子学的同定による真菌血症由来酵母 353 株の菌種内訳

菌種名	菌株数	(%)
<i>Candida albicans</i>	150	42.5
<i>Candida parapsilosis</i>	89	25.2
<i>Candida glabrata</i>	41	11.6
<i>Candida tropicalis</i>	28	7.9
<i>Candida krusei</i>	5	1.4
<i>Candida lusitanae</i>	4	1.1
<i>Candida dubliniensis</i>	3	0.8
<i>Candida guilliermondii</i>	3	0.8
<i>Candida metapsilosis</i>	3	0.8
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	0.3
<i>Candida</i> , total	327	92.6
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	3	0.8
<i>Pichia anomala</i>	1	0.3
<i>Cryptococcus curvatus</i>	9	2.5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	5	1.4
<i>Trichosporon asahii</i>	4	1.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4	1.1
Total	353	100.0