

を記録した前年度より若干の減少を示した。しかし、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。2005年のような死亡例は見られなかった。感染地の観点から見ると、これま

で増加してきていたアリゾナが減少し、4例中3例がカリフォルニア、残り1例がメキシコであり、2大流行地域としてのカリフォルニアの重要性が再認識された。

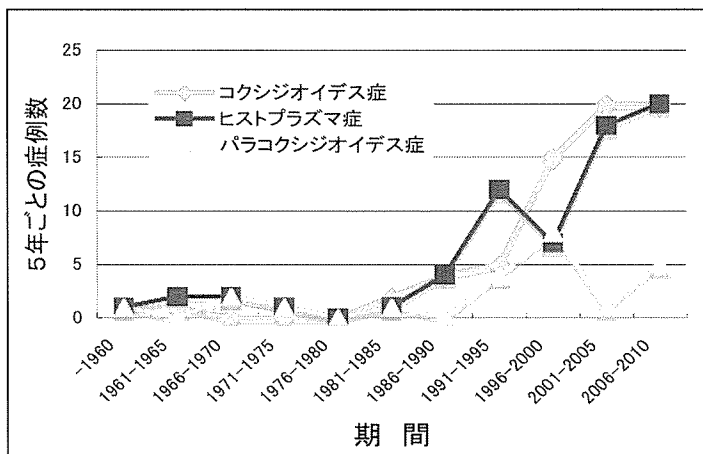


図1：我が国の輸入真菌症症例数の変遷
コクシジオイデス症、ヒストプラズマ症の増加傾向が明らかである。パラコクシジオイデス症は、症例の減少が続いていたが、3年ぶりに症例が見られた。また、3例目となるマルネツフェイ型ペニシリウム症の発症が確認された。

2) ヒストプラズマ症

2006年のヒストプラズマ症症例数は2005年よりわずかに増加し、4例認められた。総計は52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2例は東南アジアで、残りはメキシコおよびガーナが1名ずつと考えられた。4例中3例がAIDSを基礎疾患としており、内1名は死亡した。AIDSは我が国で増加を続けていることから今後注意が必要と考えられた。

3) パラコクシジオイデス症およびその他の輸入真菌症

2006年には2003年以来3年間見られな

かったパラコクシジオイデス症の発症が見られ、計19例となった。患者はブラジルからの労働者であり、1991年から1997年にかけて出現した流行時と同じ特徴が認められた。その他の輸入真菌症では、マルネツフェイ型ペニシリウム症が1例認められた。本例は我が国3例目となるが、菌の分離に成功した初めての例である。

D. 考察

前回の調査で指摘されたコクシジオイデス症およびヒストプラズマ症がその後もコンスタントに国内で発症していることが確認された。特に注目されるのはAIDSを基礎疾患と

する輸入真菌症であり、ヒストプラズマ症では4例中3例が、またマルネツフェイ型ペニシリウム症の1例も AIDS を基礎疾患として発症したと考えられた。ヒストプラズマ症のうち1例は死亡しており、我が国における AIDS 患者の増加とあわせ、重要な傾向と考えられた。

コクシジオイデス症のうち1例は膿気胸を呈し、本症を疑わないまま開胸手術をされたため、術後に診断がついて後、院内感染対策と感染拡大の防止に奔走する結果となった。幸い感染拡大は今のところ認められていないが、このようなことが繰り返されれば医療施設の機能が麻痺することが予想される。医療従事者への啓蒙の重要性が示された。

ヒストプラズマ症、コクシジオイデス症を中心に、今後もわが国での輸入真菌症の増加は継続することが予想され、医療機関に対する情報の徹底が必要と思われた。

2. 肺結核疑診例に潜在するヒストプラズマ症のスクリーニングに関する研究

A. 研究目的

これまでの研究より、本邦におけるヒストプラズマ症の約18%に該当する海外渡航歴が見られていないことが明らかとなっている。これは輸入真菌症としてはきわめて例外的であり、コクシジオイデス症、パラコクシジオイデス症などほかの疾患で見ることが出来ない特徴といえる。一方、ヒストプラズマ症は、1) 軽症例では自然治癒例がある、2) 臨床、特徴的所見に乏しい、などの特徴があるため、正診を得られなくても治癒したりあるいは死亡に至ることにより、結果的に看過さ

れてしまった症例が多数存在する可能性が考えられる。

そこで、臨床像が近似し誤診されやすい疾患を対象に、ヒストプラズマ症が混入している可能性を検討した。

B. 研究方法

具体的疾患として、ヒストプラズマ症と臨床像や胸部 X 線写真像が類似している肺結核症疑診症例を対象とした。具体的には明らかな肺結核症を除外するため、「臨床上、肺結核症を疑われながらも、結核菌の存在が確定できなかった症例」を対象とした。協力病院に依頼し、同条件に合致する患者 113 名の血清を収集した。血清の収集にあたっては、必要に応じて倫理委員会の了承を得た。

ヒストプラズマ症のスクリーニングには、本研究でも用いてきた抗体測定法（免疫拡散法および IgM ラテックス凝集法）を用い、血清を対象として測定した。

C. 研究成果

被検者 113 名からそれぞれ1検体ずつ採取、検討した。その結果、陽性は ID 法で 9 名（8.0%）、LA 法で 0 名であった。また、疑陽性（弱陽性）は ID 法で 5 名（4.4%）、LA 法では 0 名であった。

ID 法にて陽性を示した 9 名のうち 1 名（全体の 0.9%）は、ヒストプラズマ症であったことが病理学的に確認された。そのほかの陽性患者については、主治医に結果を報告したところ、2 名で臨床的にヒストプラズマ症の可能性が考えられるとの見解であった。これらはいずれも「原因の明確でない肺炎」の臨床像を呈していた。

D. 考察

今回の検討で、少数とはいえ真性のヒストプラズマ症が結核疑診例の中から発見されたことは、多くのヒストプラズマ症症例が肺結核症と誤診されたまま看過されている、という我々の仮説を支持するものであり、きわめて重要な問題を提起している。

今後、今回明確な結論に至らなかった陽性例や偽陽性例について、特に疑わしい症例を中心に画像その他の専門家を交えて詳細な検討に関して検討を行うとともに、早急に、検討対象の症例数を拡大し、広範な検討を行う必要がある。さらに現在用いられている抗体検出法にはその検出能力に限界があることから、次項にて検討を進めている改良抗体検出法を用いて再検査を行うことも含め、早急な検討が必要と考えられる。

3. 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に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が、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り、ヒストプラズマ症血清診断法の開発・改良が求められている。これまでの研究において、まずは *Histoplasma capsulatum* より抗原を抽出する方法を確立し、患者血清中抗体により認識される *H. capsulatum* 抗原タンパク質の同定を行ってきた。

これに引き続き、各抗原タンパク質を *H. capsulatum* total RNA よりクローニングし、大腸菌内での組換えタンパク質としての大量発現・精製を行った。更に抗原タンパク質を用いて ELISA による患者血清中抗体検出法の基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1) *H. capsulatum* 抗原タンパク質の再同定
Broad Institute, MIT より公開されている *H. capsulatum* ゲノム情報から推定されたタンパク質情報を用いて、再度 Mascot にて解析を行った。

2) *H. capsulatum* 抗原タンパク質のクローニング

H. capsulatum ゲノム情報より、各抗原タンパク質の N 末及び C 末部位を推定し、推定された抗原タンパク質コード領域を total RNA から RT-PCR により増幅を行った。得られた DNA 断片を pBlueScript II KS+ ベクター上にクローニングし、塩基配列の決定を行った。

3) 抗原タンパク質の *E. coli* 内大量発現系及び精製法の確立

抗原タンパク質をコードする遺伝子はいずれも pQE-80L ベクター上に組み込み、His タグを融合したタンパク質として発現させた。い

ずれのタンパク質も不溶化したため、8M 尿素にて可溶化した。His タグタンパク質の精製は定法に従って行った。発現及び精製後タンパク質の確認は一次元 SDS-PAGE にて行った。

4) 精製抗原タンパク質を用いた ELISA 法の検討

ELISA に用いる 96-well plate は主に MaxiSorp (Nunc)を用いたが、一部は PolySorp (Nunc)による検討も行った。抗原タンパク質のコーティングには 1 well あたり 200ng の精製タンパク質を用い、コーティングバッファ中で 16 時間、4℃にてコーティングを行った。TBS にて洗浄後、Protein Free Blocking Buffer solution (Pierce)を用いてブロッキングを行った。1% Tween20 含有 TBS (TBS-T) で洗浄後、100 倍希釈した患者血清を 2 時間、25℃にて反応させた。再度 TBS-T で洗浄し、Protein L-HRP を添加し、1 時間、37℃にて反応を行った。TBS-T による最後の洗浄を行い、TMB を用いた発色反応を室温で 30 分間行った。停止液にて反応を止めて速やかに 450nm における吸光度を測定した。

C. 研究結果

H. capsulatum のゲノム解析を行っている Broad Institute, MIT にて公開されている最新のタンパク質情報を用いて、再度抗原タンパク質の同定を行った。その結果、前回同定出来なかった抗原タンパク質が Glutamate carboxypeptidase II のホモログであることが明らかとなった (図 2)。

全ての抗原タンパク質について既知のホモログタンパク質等をゲノム情報と照らし合わせるによりタンパク質の N 末部位及び C 末

部位を推定した。それらの部位に相当するプライマーを設計し、*H. capsulatum* total RNA に対して RT-PCR を行った。その結果、単一のバンドとして増幅された DNA 断片が得られた。それら DNA 断片の塩基配列を決定し、各抗原タンパク質の一次構造を決定した。更に得られた配列情報とゲノム情報を照らし合わせた結果、遺伝子をコードする領域内に 2 つから 7 つのイントロンを持つことが明らかとなった。

抗原遺伝子は更に His タグ融合タンパク質発現ベクターへと組み込んだ。*E. coli* 内での大量発現を試みた結果、glutamate carboxypeptidase II 以外は大量発現をさせることに成功した。glutamate carboxypeptidase II は全 653 アミノ酸のうち、N 末側 380 アミノ酸を欠失したタンパク質として大量発現させることが出来た。菌体破碎後、いずれのタンパク質も不溶性画分にその存在が確認できたことからインクルージョンボディを形成していると考えられた。そのため、8M 尿素含有バッファを用いてタンパク質を溶解し、得られたタンパク質溶液からニッケルカラムを用いて His タグ融合抗原タンパク質を精製した (図 3)。

得られた精製タンパク質を用いて ELISA を行った。一部の抗原タンパク質では多くの患者血清において健常人血清よりも高い抗体価を示した。現在、PolySorp にて条件を検討中である。

D. 考察

これまでの研究に引き続き、*H. capsulatum* の抗原タンパク質同定を進めてきた。最新の

情報から未同定であった抗原タンパク質が glutamate carboxypeptidase II のホモログであることが分かった。これにより全ての抗原タンパク質を同定することが出来た。更にゲノム情報を参照し、抗原タンパク質をコードする遺伝子の全長を推定し、RT-PCRにより mRNA から標的遺伝子をクローニングできた。また、全ての抗原タンパク質について *E. coli* 内での大量発現に成功した。Glutamate carboxypeptidase II のみ全長タンパク質の発現が得られなかったがペプチダーゼであることから菌体に対する毒性が高いことが推測された。また、いずれのタンパク質もインクルージョンボディとなったが可溶化することにより精製が可能となった。本実験では *E. coli* を用いたが、bacterial component (LPS 等) の混入や不溶化の問題は残る。今後は

Pichia 属の酵母を用いる等について検討する予定である。

精製したタンパク質溶液には高濃度の尿素やイミダゾールが含まれているが、これらの存在下でも

プレートへ抗原のコーティングに成功した。熱ショックタンパク質については MaxiSorp でコーティングに問題が生じたため、現在 PolySorp を用いて検討を行っている。二次抗体に抗ヒト IgG 抗体を用いるなど、今後も ELISA を行う条件を最適化する必要があると考えられる。また、結果判定基準を決定するために、より多くの健常人血清及び患者血清を用いた検討が必要と考えられる。更に他真菌症患者血清との交差反応についても検討する必要がある。

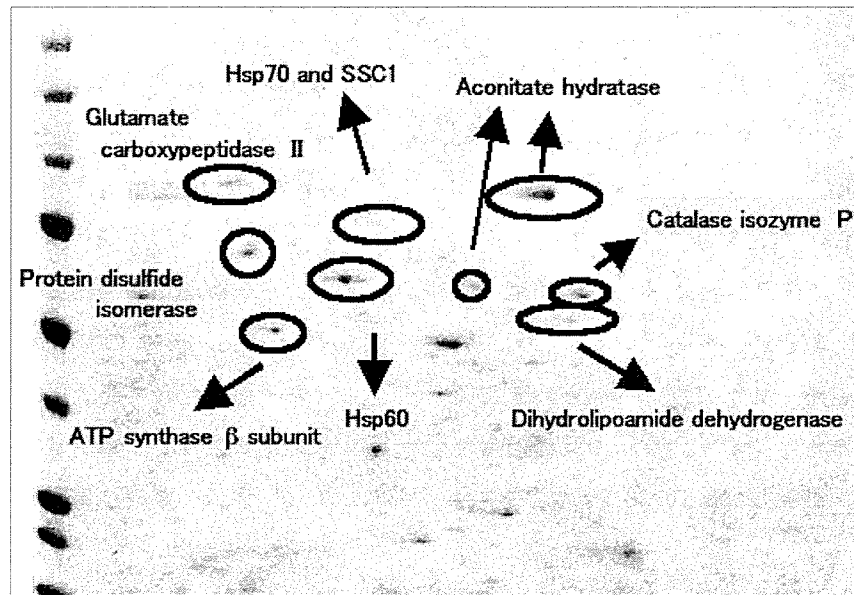


図 2 : 同定した抗原タンパク質

抗原タンパク質の質量分析結果を *H. capsulatum* ゲノムデータから推定されたタンパク質情報と照らし合わせた結果、全ての抗原タンパク質が同定できた。抽出した粗抗原の二次元電気泳動パターン上における抗原タンパク質の位置と同定したタンパク質名を示した。

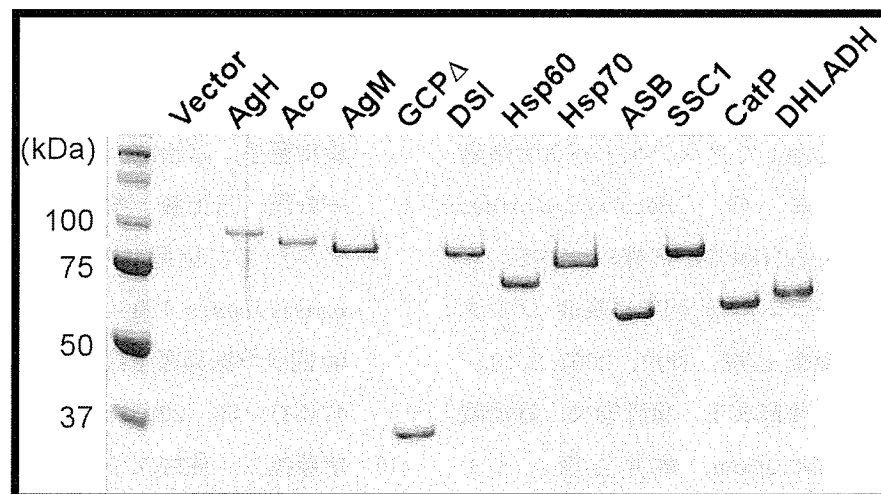


図 3 : 精製後の抗原タンパク質

各レーンには 400ng に相当するタンパク質 (BCA 法による定量) をアプライし、泳動した。AgH : H 抗原 ; Aco : aconitate hydratase ; AgM : M 抗原 ; GCPΔ : glutamate carboxypeptidase II C 末側 273a.a ; DSI : disulfide isomerase ; ASB : ATP synthase b subunit ; CatP : catalase P ; DHLADH : dihydrolipoamide dehydrogenase

学会発表

1. 豊留孝仁, 落合恵理, 渡辺哲, 田口英昭, 亀井克彦: 新規ヒストプラズマ抗原の探索. 第 50 回日本医真菌学会総会, 東京, 2006. 10. 21-22 (国内学会発表)
2. 豊留孝仁, 渡辺哲, 田口英昭, 亀井克彦: 新たに確立したヒストプラズマ抗原抽出法による抗原タンパク質の探索. 第 55 回日本感染症学会東日本地方会総会第 53 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 東京, 2006. 10. 26-27 (国内学会発表)
3. 豊留孝仁, 落合恵理, 渡辺哲, 田口英昭, 亀井克彦: 質量分析による *Histoplasma* 抗原タンパク質の同定. 第 3 回真菌分子細胞研究会, 千葉, 2006. 11. 28-29 (国内学会発表)
4. 佐野文子, 高山明子, Itano EN, Ono MA, 鎗田響子, 宮治誠, 亀井克彦, 宇野潤, 三上襄, 西村和子: 各種遺伝子配列で低い相同性を示したブラジル・パラナ州患者由来の *Paracoccidioides brasiliensis* IFM 54648 株について. 真菌症フォーラム第 8 回学術集会 プログラム/抄録集 p. 68, 神戸, 2007. 2. 10.
5. 村田佳輝, 佐野文子, 猪股智夫, 宮治誠, Poonwan Natteewan, 亀井克彦, 三上襄: 我が国におけるイヌのヒストプラズマ症の分子疫学. 平成 17 年度日本獣医師会三学会年次大会 (つくば), 講演要旨集 p210, つくば, 2006. 3. 18-20.
6. 豊留孝仁, 落合恵理, 渡辺哲, 田口英昭, 亀井克彦: 質量分析による *Histoplasma* 抗原タンパク質の同定. 第 3 回真菌分子細胞研究会・四大学連携感染症ワークショップ in 千葉ジョイント開催, プログラム要旨集 p13, 千葉, 2006. 11. 28-29.
7. 高山明子, Itano EN, 佐野文子, Ono MA, 鎗田響子, 宮治誠, 亀井克彦, 西村和子, 宇野潤, 三上襄: 病原性真菌 *Paracoccidioides brasiliensis* の主要抗原遺伝子 *gp43* の有用性. 第 3 回真菌分子細胞研究会・四大学連携感染症ワークショップ in 千葉ジョイント開催, プログラム要旨集 p11, 千葉, 2006. 11. 28-29.
8. 豊留孝仁, 渡辺哲, 田口英昭, 亀井克彦: 新たに確立したヒストプラズマ抗原抽出法による抗原タンパク質の探索. 第 55 回日本感染症学会東日本地方会総会第 53 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 プログラム・抄録集 p154, 東京, 2006. 10. 26-27.
9. 高山明子, Itano EN, 佐野文子, Ono MA, 鎗田響子, 宮治誠, 亀井克彦, 西村和子, 宇野潤, 三上襄: 多遺伝子解析でアウトグループに位置した *Paracoccidioides brasiliensis* IFM54648 株について. 第 50 回日本医真菌学会総会, 東京, 真菌誌 47(S1): 55, 2006. 10. 21-22.
10. 伊藤淳二, 佐野文子, 亀井克彦, 西村和子, 宮治誠, 三上襄: *Coccidioides* 属のトポイソメラーゼ II 遺伝子 (TOP2) 及び関連遺伝子 (TRF4) による同定法について. 第 50 回日本医真菌学会総会, 東京, 真菌誌 47(S1): 58, 2006. 10. 21-22.
11. 上原雅江, 井出京子, 永井啓子, 羽毛田牧夫, 佐野文子, 亀井克彦, 西村和子:

- タイ人 AIDS 患者の菌血症から分離された *Penicillium marneffeii*. 第 50 回日本医真菌学会総会, 東京, 真菌誌 47(S1): 77, 2006. 10. 21-22.
12. 豊留孝仁, 落合恵理, 渡辺哲, 田口英昭, 亀井克彦: 新規ヒストプラズマ抗原の探索. 第 50 回日本医真菌学会総会, 東京, 真菌誌 47(S1): 82, 2006. 10. 21-22.
13. 梅山隆, 佐野文子, 亀井克彦, 新見昌一, 西村和子, 上原至雅: コクシジオイデス症原因菌 *Coccidioides immitis* および *Coccidioides posadasii* の同定および分類: 新しいアプローチによる遺伝子診断用プライマーの開発. 第 50 回日本医真菌学会総会, 東京, 真菌誌 47(S1): 82, 2006. 10. 21-22.
14. 佐野文子, Itano EN, 高山明子, Ono MA, 鎗田響子, 宮治誠, 亀井克彦, 宇野潤, 三上襄, 西村和子: 多遺伝子解析でアウトグループに位置した *Paracoccidioides brasiliensis* IFM54648 株. 第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会 プログラム抄録集 p173, 長崎, 2006. 10. 11-13.
- 論文
1. Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y: Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. J Clin Microbiol 44(5): 1859-1862, 2006.
2. Sano A, Miyaji M, Kamei K, Mikami Y, Nishimura K: Reexamination of *Coccidioides* spp. reserved in the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, based on a multiple gene analysis. Jpn J Med Mycol 47(2): 113-117, 2006.
- 総説
1. 亀井克彦: 高病原性真菌感染症. カレントセラピー 24(7): 658-660, 2006.
2. 亀井克彦, 渡辺哲: 輸入真菌症. 総合臨床 55(11): 2707-2709, 2006.

分担研究報告書

「輸入真菌症等真菌症に対する対策に向けた総合的基盤研究」班
我が国の洞窟環境における *Histoplasma capsulatum* の分布調査

菊池 賢、佐々木 崇（順天堂大学医学部感染制御科学）、染谷 孝（佐賀大学農学部生物環境学科）、
浦田健作（大阪経済法科大学科学技術研究所）
分担研究者：菊池 賢、研究協力者：染谷 孝

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-特に国内発症ヒストプラズマ症の第一症例が報告された岡山県に関して、同県中央部-北部カルスト地形に分布する鍾乳洞23カ所及び沖縄県石垣島の鍾乳洞3カ所から採取したグアノサンプル93検体につき、*Histoplasma capsulatum* の分離培養ならびに nested PCR による *Histoplasma* 特異遺伝子の検出を試みた。これらのサンプルから *Histoplasma capsulatum* は培養されなかったが、石垣島カラ B 洞より得られたグアノより *Histoplasma* 特異 100kDa タンパク抗原遺伝子が検出された。direct sequence により塩基配列は type strain のものと 99%一致していた。他の *Histoplasma* 特異 18SrRNA, M 抗原, H 抗原遺伝子増幅 PCR では特異断片は検出されなかった。同洞窟は現在着工されている石垣島新空港の建設地にあり、建設工事により、破壊される予定になっている。培養や他の遺伝子が検出されていないことから今回の結果の解釈は難しいが、万が一 *Histoplasma capsulatum* が実際に存在している場合には、土木工事により感染性分生子が飛散する可能性が高く、工事関係者などにヒストプラズマ症を発症する危険性がある。少なくとも、工事責任者への注意勧告が必要と判断した。

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、特に国内発症の第一例が報告され、ヒストプラスミン反応陽性者の比率が高いとされる岡山県ならびに沖縄県石垣島で *Histoplasma capsulatum* 定着の想定される洞窟内コウモリグアノの採取を行い、サンプルからの *H. capsulatum* の培養ならびに PCR による検出を試みた。

B. 研究方法

日本洞窟学会、岡山大学ケイビングクラブの協力を得て、2007年9月10-13日、23-24日に岡山県中部-北部に広がるカルスト台地に分布する鍾乳洞計23カ所の調査を行った。また、報告者の一人である浦田は2007年9月27-28日に沖縄県石垣島の3カ所の洞窟（鍾乳洞）の調査を行った。各洞窟全てにコウモリグアノの存在を認め、それぞれ数カ所からサンプルを採取した。調査、サンプル採取に

あたっては、予め教育委員会、各行政機関及び地権者に許可を取得した。調査洞窟名、所在地、調査日時、採取サンプル数の一覧を表1に示す。

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 ml 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。

グアノサンプルからの DNA 抽出は土壤 DNA 抽出キット: ISOIL for Beads Beating (Nippon Gene) を用いた。Histoplasma 特異 100 kDa タンパク遺伝子、H 抗原遺伝子、M 抗原遺伝子、Histoplasma 特異 18SrRNA 遺伝子を PCR ならびに nested PCR により検出し、特異バンドの得られたものは全て direct sequence により塩基配列の確認を行った。使用した PCR を表2に示す。

C. 研究結果

今回、採取したコウモリグアノ 93 サンプルからヒストプラズマは培養されなかった。

Hc18SrRNA nested PCR により 56 の陽性と思われるバンドが検出された (図1) が、sequence が *H. capsulatum* と一致したものは認められなかった。Hc100 nested PCR では5件が陽性となり (図2)、このうち石垣島カラ B 洞から採取されたサンプル (矢印) の PCR 産物が sequence により、200 bp 中 198 bp が陽性コントロール配列と一致していた (図3)。H-antigen hemi-nested PCR、M-antigen PCR

ではいずれも陽性検体は得られなかった。

D. 考察

ヒストプラズマ症は *H. capsulatum* の分節型分生子を吸入することにより、発症する。感染源として洞窟に生息するコウモリの腸管ならびにその糞便の堆積物であるグアノがよく知られている。海外で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は「洞窟熱」としてよく知られている。我が国ではこれまでに約 50 例のヒストプラズマ症の報告があり、その多くは輸入真菌症と考えられているが、20%程度は渡航歴や土壌などを扱う職歴が認められず、国内での感染と考えられている。我々はこれまでも本研究班により、日本全国各地の洞窟コウモリグアノ調査を行ってきたが、*H. capsulatum* の存在を示す確証は得られなかった。しかし、我々はまだ国内で最初にヒストプラズマ症の報告された岡山県の洞窟について調査を行って来なかった。岡山県中部～北部には大規模な石灰岩カルスト地形が分布し、大小多数の鍾乳洞が見つかっている。岡山県の最初の症例の感染想定地域もこの周辺であることから、我々は岡山の洞窟調査の重要性を認識し、今回の調査に入った。残念ながら岡山のいずれの調査洞窟からも *H. capsulatum* は検出されなかったが、沖縄県石垣島カラ B 洞で採取されたグアノサンプルより Hc100 タンパク遺伝子が検出された。その塩基配列は陽性コントロールとほぼ一致しており、*H. capsulatum* 由来である可能性が高い。しかし、同じサンプルから他の *Histoplasma* 特異 18SrRNA, H 抗原、M 抗原遺伝子は検出されておらず、確実にこの洞窟に *H. capsulatum* が存在しているといえる結果は得られなかった。しかし、このカラ B 洞は

石垣島新空港の建設現場にあり、建設工事によって破壊されることが決まっている。本当に *H. capsulatum* が存在していた場合には、工事により分節型分生子が飛散し、工事関係者や周辺住民にヒストプラズマ症を発症する危険性がある。工事関係者や地域住民には洞窟に近づく場合にマスク着用を行う等の注意勧告をすべきであると考えられた。

E. 結論

岡山県 23 洞窟、沖縄県石垣島 3 洞窟から得られたコウモリグアノ 93 サンプルから、培養では *H. capsulatum* は証明されなかったが、石垣島カラ B 洞で採取されたグアノサンプル 1 件より *H. capsulatum* 特異 100kDa タンパク抗原遺伝子が検出された。同洞窟は石垣島新空港建設工事によって破壊されることが決まっており、工事関係者や周辺住民にヒストプラズマ症を発症する危険性があるため、注意勧告をすべきであると考えられた。

F. 健康危険情報

石垣島カラ B 洞周辺住民、新空港工事関係者にヒストプラズマ症を発症する危険性があるため、注意勧告をすべきであると考えられた。

G. 研究発表

論文発表：

菊池 賢. 抗真菌薬の効きにくい新興真菌とその対応について. 深在性真菌症ーSFI Forumー 3:37-38, 2007.

菊池 賢. 感染症医の立場からみた我が国の深在性真菌症の現状と問題点. LAL 2:印刷中, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

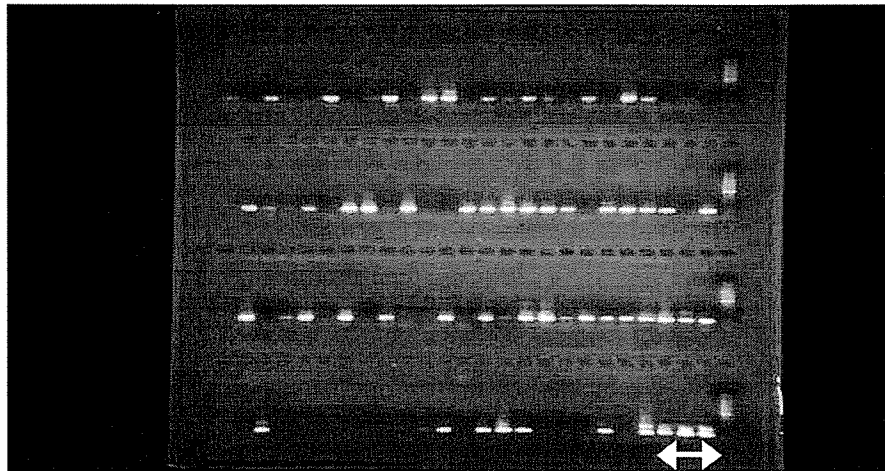
なし

表 1. 調査洞窟リスト

番号	洞窟名	所在地	調査日時	グアノ サンプル数
1	日め坂鍾乳穴	岡山県新見市豊永赤馬	2007.9.10	5
2	岩屋の穴	岡山県真庭市阿口杉	2007.9.10	4
3	井倉洞	岡山県新見市草間谷合	2007.9.11	3
4	ゴンボウゾネの穴	岡山県新見市草間岩中東	2007.9.11	2
5	ニツ木の穴	岡山県新見市土橋新屋	2007.9.11	7
6	鬼女洞	岡山県新見市法曾柏	2007.9.11	4
7	唐松コウモリ穴	岡山県新見市唐松位田	2007.9.11	5
8	ショウゴの穴	岡山県新見市足見東組	2007.9.11	1
9	土橋の穴	岡山県新見市土橋新屋	2007.9.11	8
10	満奇洞	岡山県新見市豊永赤馬楨	2007.9.12	2
11	神庭の鬼の穴	岡山県真庭市神庭	2007.9.12	4
12	神代の鬼の穴	岡山県真庭市神代神代北	2007.9.12	3
13	神代の鬼の穴第 2 洞	岡山県真庭市神代神代北	2007.9.12	1
14	風戸の穴	岡山県新見市豊永赤馬楨	2007.9.12	4
15	イマの穴	岡山県新見市草間宮原	2007.9.12	3
16	三ツ木の穴	岡山県高梁市中井町津々横内	2007.9.12	5
17	備中鍾乳穴	岡山県真庭市上水田井殿	2007.9.12	3
18	井弥の穴	岡山県真庭市下砦部	2007.9.12	2
19	宇山洞	岡山県新見市豊永山矢中	2007.9.12	4
20	磐窟洞(ダイヤモンドケイブ)	岡山県高梁市川上町七地磐窟谷	2007.9.13	4
21	蛇の穴	岡山県井原市芳井町上嶋高原	2007.9.13	3
22	本小屋の穴	岡山県新見市草間岩中東	2007.9.23	6
23	牛追い小屋の穴	岡山県新見市草間岩中東	2007.9.24	5
24	カラ A 洞	沖縄県石垣市カラ岳	2007.9.27	2
25	カラ B 洞	沖縄県石垣市カラ岳	2007.9.27	2
26	カラ E 洞	沖縄県石垣市カラ岳	2007.9.28	1
				計:93

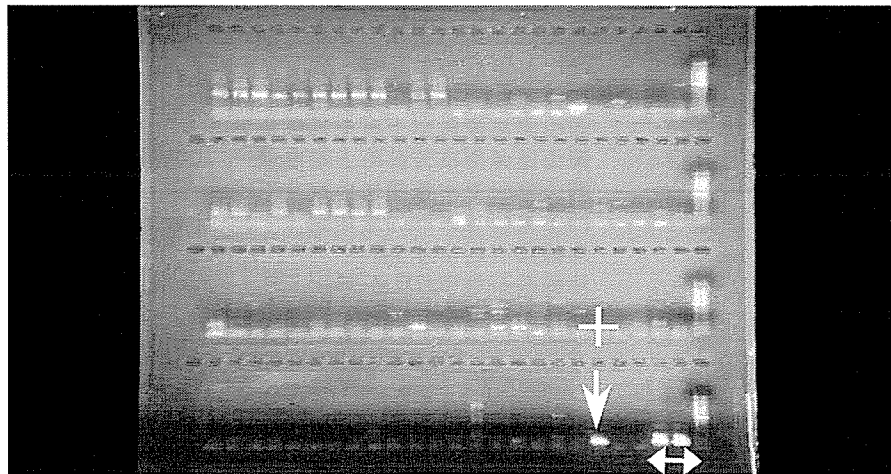
表 2. Histoplasma capsulatum-specific PCR リスト

番号	PCR 名	検出 遺伝子	種類	primer 名	配列	product size (bp)	文献
1	Hc18SrRNA (nested PCR)	18SrRNA	1st PCR	fungus-I fungus-II	5'-GTTAAAAAGCTCGTAGTT-3' 5'-TCCCTAGTCGGCATAGTTTA-3'	429	J Clin Microbiol 40:1644, 2002
			nested PCR	Histo-I Histo-II	5'-GGCCGGACCTTTCTCCTGGGGAGC-3' 5'-CAAGAATTTACCTCTGACAGCCGA-3'	231	
2	Hc100 (nested PCR)	100kDa protein gene	1st PCR	Hc-I Hc-II	5'-GCGTTCCGAGCCTTCCACCTCAAC-3' 5'-ATGTCCCATCGGGCGCCGTGTAGT-3'	391	J Clin Microbiol 40:1644, 2002
			nested PCR	Hc-III Hc-IV	5'-GAGATCTTAGTCGCGGCCAGGTTCA-3' 5'-AGGAGAGAAGTGTATCGGTGGCTTG-3'	210	
3	H-antigen (hemi-nested PCR)	H-antigen gene	1st PCR	Hc2 Hc3	5'-GCGGGGTTGGCTCTGCTCT-3' 5'-TTGAAACCCCGGGCTTG-3'	439	J Clin Microbiol 41:1753, 2003
			hemi-nested PCR	Hc2 Hc1	5'-GCGGGGTTGGCTCTGCTCT-3' 5'-TCATAGTAGGCTGTTACCCCGC-3'	330	
4	M-antigen (2 different PCR)	M-antigen gene	PCR1	Msp1F Msp1R	5'-ACAAGAGACGACGGTAGCTTCAAG-3' 5'-GCGTTGGGGATCAAGCGATGAGCC-3'	111	J Clin Microbiol 41:535, 2003
			PCR2	Msp2F Msp2R	5'-CGGGCCGCGTTTAAACAGCGCC-3' 5'-ACCAGCGCCATAAGGACGTC-3'	279	



positive control

図1. *Histoplasma*-specific 18SrRNA-nested PCR結果



positive control

図2. *Histoplasma* -specific 100kDa protein nested PCR結果

[GENETYX-MAC: Multiple-Alignment]
Date : 2007.01.25

2-92 FINAL.nuc	1	GATCTAGTCGGCGCCAGGTTCAACGGAGGACAACGAGTGGTACC	60
AJ005963.1.nuc	1	GATCTAGTCGGCGCCAGGTTCAACGGAGGACAACGAGTGGTACC	60
2-92 FINAL.nuc	61	AACGACCGTGAAGCGAAAAAAGCCGACGTCGTTTACATCGACTAC	120
AJ005963.1.nuc	61	AACGACCGTGAAGCGAAAAAAGCCGACGTCGTTTACATCGACTAC	120
2-92 FINAL.nuc	121	GTTCGGTGGACCCGCTCCGGCCCTCACGGCAGCCGAGTTTTCCGTGCAGAAAATTCGA	180
AJ005963.1.nuc	121	GTTCGGTGGACCCGCTCCGGCCCTCACGGCAGCCGAGTTTTCCGTGCAGAAAATTCGA	180
2-92 FINAL.nuc	181	CCCAAGCCACEGATACAGT	200
AJ005963.1.nuc	181	CCCAAGCCACEGATACAGT	200

198 / 200 base 一致 (99.0%), gap なし

図3. nested PCR陽性 産物(100kDa protein) の塩基配列比較

上段: 陽性サンプル、下段: コントロール

平成 18 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」
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 榎村 浩一 帝京大学医真菌研究センター 助教授

研究要旨 輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発を適切に施行するためには、確定診断に繋がる起因菌の分離同定を欠かすことはできない。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分生子による気中汚染を防止し輸入真菌症ならびに深在性真菌症の起因菌となる糸状菌を安全に操作するための培養管の開発に関する本年度の成果、ならびに本年度の発表業績を以下に報告する。

I 分生子による気中汚染を防止し輸入真菌症ならびに深在性真菌症の起因菌となる糸状菌を安全に操作するための培養管の開発

A. 研究目的

輸入真菌症ならびに深在性真菌感染症の診断、起因菌の同定、および感受性等の性状検査を施行する上で、当該菌株の培養と分生子の回収等の操作は必須である。真菌感染症の診断、起因菌の同定、および感受性等の性状検査を施行する上で、当該菌株の培養と分生子の回収等の操作は必須である。

しかしながら、糸状菌の分生子は気中に飛散しやすく、実験室内を汚染し、実験者を感染・感作の危険に曝しがちであった。そのため、これら真菌の取り扱いには、セーフティキャビネットが要求されることとなり、結

果的に本感染症とその起因菌に関する研究と管理における後進性を許していた。

しかしながら、糸状菌の分生子は気中に飛散しやすく、実験室内を汚染し、実験者を感染・感作の危険に曝しがちであった。そのため、これら真菌の取り扱いには、セーフティキャビネットが要求されることとなり、結果的に本感染症とその起因菌に関する研究と管理における後進性を許していた。そこで、気道感染症またはアレルギー起因菌となる糸状菌等病原真菌から、

(1) 分生子を環境への飛散を伴うことなく回収することにより、植え継ぎ、あるいは抗真菌薬感受性試験に利用でき、

(2) また必要に応じてアルコール等を用いた固定を行う事によって、感染の危険なく遺伝子解析等を可能にする「安全培養管」を開発した。

B. 研究方法・結果

本培養管(図1)は、スクリーキャップ中央に注射針による貫通可能なラバープラグ(ブチルゴム)を有したクロラムフェニコール添加YM寒天斜面培地である。

このラバープラグ部を介して分生子回収液(0.05% Tween 80 添加生理的食塩水)または、菌体固定液(エタノール)を開封することなく注入することが可能となり、実験室内の汚染を防止できる。

本培養管の安全性(培養管内封じ込め)を確認するため、*Aspergillus flavus* TIMM2935を本培養管内にて27℃ 7日間培養(豊富な分生子着生を確認)後、

安全キャビネットの試料保護試験法(Japan Industrial Standard (JIS), 2000. Class II biological safety cabinets, JIS K3800: 2000.)に準じて継代培養操作、ならびに試料固定操作(図2, 3)を行い、分生子が環境中に飛散しないことを確認した。

安全培養管を用いた操作により、分生子が環境中に飛散しないことを確認した。本培養管を用いることによって、従来糸状菌の取り扱いが困難であった一般微生物検査室においても、感染、感作、または実験室環境汚染を恐れることなく取り扱うことが可能となり、真菌症・アレルギー等管理上の貢献が期待できる。

C. 考察

本培養管を用いることによって、従来糸状菌の取り扱いが困難であった一般微生物検査室においても、感染、感作、または実験室環

境汚染を恐れることなく取り扱うことが可能となり、真菌症・アレルギー等管理上の貢献が期待できる。

上記研究によって研究開発した安全培養管を本研究班分担者が各々の施設(国立感染症研究所各室、千葉大学真菌医学研究所、順天堂大学病院検査部、帝京大学医真菌研究センター)において確認することで、その信頼性を評価する必要がある。

D. 結論

本研究によって分生子による気中汚染を防止し輸入真菌症ならびに深在性真菌症の起菌となる糸状菌を安全に操作するための培養管が提供された。

E. 文献

1. Makimura K, Kaneko T, Onozaki M, Sugamata M, Yamaguchi H, Abe S. Development of safety culture tube for molds and proposed procedure for collecting conidia or fixing strains for control fungal infection and allergy. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi [Japanese Journal of Medical Mycology]* 47 (3) : 235-237, 2006.
2. Japan Industrial Standard (JIS), 2000. Class II biological safety cabinets, JIS K3800: 2000.
3. Division of Emerging and Other Communicable Diseases Surveillance

and Control. World Health Organization (WHO), 1997. Guidelines for the Safe Transport of Infectious Substances and Diagnostic Specimens. WHO/ECM/97.3

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

1. 榎村浩一, 金子孝昌, 小野崎正修, 横山耕治, 亀井克彦, 杉田隆, 山口英世, 安部茂. 輸入真菌症起因菌に対する分子生物学的検出同定系並びに検査検体の安全な培養・移送・検査系の開発. 日本細菌学会総会 2006 年(日本細菌学雑誌 61 巻 1 号 Page125(2006.02))
2. 榎村浩一, 金子孝昌, 菅又美穂, 山口英世, 安部茂. 分生子による気中汚染を防止し糸状菌を安全に操作するための培養管の開発. 日本医真菌学会総会 2006 年(日本医真菌学会雑誌 47 巻 Suppl.1 Page81(2006.08))
3. Makimura K, Kaneko T, Onozaki M, Sugamata M, Yamaguchi H, Abe S. Development of safety culture tube for molds and proposed procedure for collecting conidia or fixing strains for control fungal infection and allergy. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi [Japanese Journal of Medical Mycology]* 47 (3) : 235-237, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当しない。

II 平成18年業績リスト

A. 原著論文

1. Yamada T, Makimura K, Abe S: Isolation, characterization, and disruption of *dnr1*, the *areA/nit-2*-like nitrogen regulatory gene of the zoophilic dermatophyte, *Microsporum canis*. *Medical Mycology* 44(3): 243-252, 2006.
2. Kaneko T, Makimura K, Sugita T, Yamaguchi H: Tween 40-Based Precipitate Production Observed on Modified Chromogenic Agar and Development of Biological Identification Kit for *Malassezia* species. *Medical Mycology* 44(3): 227-232, 2006.
3. Yoshida E, Makimura K, Mirhendi H, Kaneko T, Hiruma M, Kasai T, Uchida K, Yamaguchi H, and Tsuboi R: Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by specific PCR based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 1 region. *Journal of Dermatological Science* 42: 225-230, 2006.
4. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh MR, Yamaguchi H: A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important *Candida* Species. *Nippon Ishinkin Gakkai*

- Zasshi [Japanese Journal of Medical Mycology]* 47 (3): 225-229, 2006.
5. Makimura K, Kaneko T, Onozaki M, Sugamata M, Yamaguchi H, Abe S. Development of safety culture tube for molds and proposed procedure for collecting conidia or fixing strains for control fungal infection and allergy. *Japanese Journal of Medical Mycology* 47 (3) : 235-237, 2006.
 6. Koga H, Nanjoh Y, Inoue K, Makimura K, Tsuboi R. [In vitro Activities of Antifungal Drugs against Clinical Isolates of *Trichophyton tonsurans*.] *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2006;47(4):299-304. Japanese.
 7. Shiraki Y, Hiruma M, Matsuba Y, Kano R, Makimura K, Ikeda S, Ogawa H. A case of tinea corporis caused by *Arthroderma benhamiae* (teleomorph of *Tinea mentagrophytes*) in a pet shop employee. *J Am Acad Dermatol*. 2006 Jul;55(1):153-4.
 8. Bii CC, Makimura K, Abe S, Taguchi H, Mugasia OM, Revathi G, Wamae NC, Kamiya S. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses*. 2007 Jan;50(1):25-30.
 9. 古賀裕康, 南條育子, 井上和美, 槇村浩一, 坪井良治. *Trichophyton tonsurans* 臨床分離株に対する各種抗真菌薬の *in vitro* 抗真菌活性. 日本医真菌学会雑誌 47 : 299-304, 2006.
 10. 菅又美穂, 槇村浩一, 内田勝久, 渋谷和俊. 垣内史堂異なる病原性を有する *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* 分離株感染による病態解析の比較. 東邦医学会雑誌 53 : 105-117, 2006.
 11. Pongpermddee S, Shiraki Y, Hiruma M, Makimura K, Ichinohe M, Ogawa H, Ikeda S: Molecular detection of *Aspergillus sydowii* from the infected nail of a patient with onychomycosis. *Journal of Dermatology*, 2006, in press.

B. 総説・著書

1. 槇村浩一. 深在性真菌症の検査 感染制御 2 (1): 58-62, 2006.
2. 槇村浩一. 耐性菌の基礎と臨床 主として院内感染で問題となる耐性菌 真菌(基礎編). 臨床検査 50:813-817, 2006.
3. 槇村浩一. 【検査業務にかかわる感染をどう防ぐか】 各種検査業務からみた職業感染予防策 微生物検査に伴う感染とその予防策 呼吸器検体からの真菌感染. *Medical Technology* 35:43-46, 2007.
4. 槇村浩一. 【Compromised host と深在性真菌症】 真菌症の診断. 血液・腫瘍科 53 : 244-250, 2006.

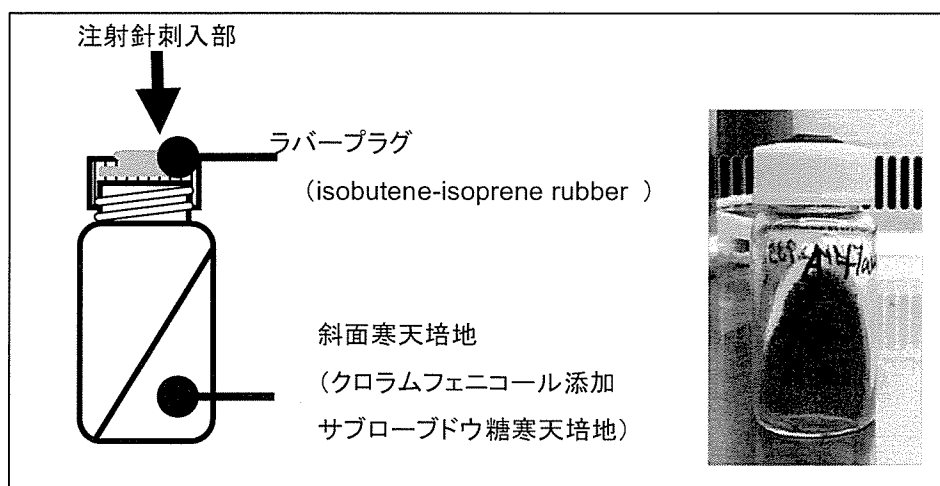


図 1. 分生子の飛散により環境汚染が懸念される真菌培養のための安全培養ビン

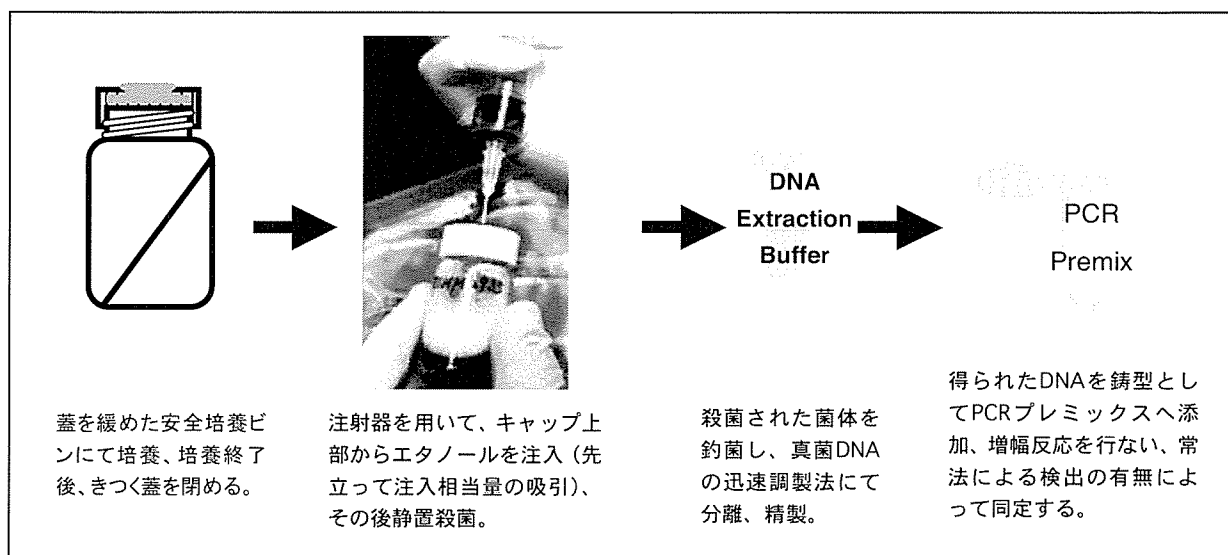


図 2. 発育菌株に対する PCR 同定検出系の手順



図 3. 安全培養ビンからの分生子回収（または不活化）安全性試験操作

分担研究報告書

病原糸状菌検出を目的とした Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法の検討

研究協力者 篠崎 稔[1] 中山晴雄[2]

分担研究者 渋谷和俊[2]

[1]東邦大学医療センター大森病院病理部,

[2]東邦大学医学部病院病理学講座

研究要旨 病理細胞診検体に FISH 法を応用して病原真菌を判別するために、標本の前処理法および使用するプローブの特異性に関する検討を行った。この結果、ホルマリン固定パラフィン切片に蛍光標識 DNA プローブを使用する場合には、高 pH 領域の緩衝液中での加熱処理と Proteinase K による二重処理が最も有効性であった。さらに、本法を病理細胞診検体に応用することにより、アスペルギルス属における菌種レベルでの正確な判別が可能となることが推測された。

A. 研究目的

病理細胞診検体に出現する病原糸状菌を判別するため、これらの検体に FISH 法を応用し、形態診断と遺伝子診断を組み合わせた精度の高い輸入真菌症を含む深在性真菌症の診断法の確立を目的とし、日常的に用いられる検体処理法であるホルマリン固定パラフィン切片およびエタノール固定細胞診検体を用いて FISH 法の妥当性について評価した。

B. 研究方法

プローブとして *A. fumigatus* の alkaline proteinase 遺伝子領域 (ALP : 583bp) をならびに *A. fumigatus* の retrotransposon *Afut-1* の LTR (long terminal repeat) 遺伝子領域 (245bp) をそれぞれ Ulysis nucleic acid labeling kits

(Molecular Probes: U-21652) および PCR fluorescein labeling mix (Rosche : 1636154) を使用して蛍光色素 Alexa546 および FITC 蛍光標識を施したものを使用した。また、上記プローブの比較として、*Aspergillus* 属の 5S リボゾーマル RNA に対する 21mer と 22mer のオリゴヌクレオチドの 3'末端に Tailing 反応で、FITC を取り込み、蛍光標識プローブを作製した。蛍光観察後、抗 FITC モノクローナル抗体を用いて Ni/Co/DAB 発色法を使用することにより、シグナルの増感と標本の永久保存化を行った。

下記に記した 3 項目につき検討した。
1 : ホルマリン固定パラフィン切片および Papanicolaou 染色細胞診標本に FISH 法を適用するための前処理法の検討として、加熱処理と Proteinase K を用いた蛋白分解酵

素処理の効果と使用する緩衝液の pH の影響について 5 種類の緩衝液を用いてその染色強度を比較検討した。

2: 感染動物モデル、手術摘出材料、剖検材料に認められる 6 菌種につき、*Afut-1* および ALP プローブの特異性に関する検討を行った。

3: ALP および *Afut-1* プローブを異なる励起波長の蛍光色素で標識し、同時に FISH 法を行う Two Color FISH 法について検討した。

C. 研究結果

1: ホルマリン固定パラフィン切片を用いた

場合、ALP および *Afut-1* プローブを使用する条件としては、加熱処理と Proteinase K の二重処理がそれぞれの単独処理に比較して優れていた。また、加熱処理に使用する緩衝液を検討した結果、高い pH 領域の緩衝液が有効であった。(表 1、図 1) Papanicolaou 染色細胞診標本においては加熱処理あるいは Proteinase K 処理の単独処理を施すことで、十分なシグナルが得られた。一方、リボゾーマル RNA を標的としてオリゴヌクレオチドプローブを用いた際には、処理法の違いにより発色強度に優位な差は認められなかった。

Preliminary trials of various pretreatment protocols

	Citrate(pH6.0) or		Heat-treatment [※]				
	—	Proteinase K	Citrate(pH6.0)	Citrate(pH7.0)	EDTA(pH8.0)	TE(pH9.5)	Tris-HCl(pH9.0)
Ethanol-fixed cytological specimens (Cultured fungi)	+++	+++					
Papanicolaou stained cytological specimens (Cultured fungi)	++	+++					
Ethanol-fixed paraffin-embedded sections (Cultured fungi)	++	+++	+++				
Formalin-fixed paraffin-embedded sections (Tissue section)	-	+	+	+~++	++	++	++

※ The tissues following heat-treatment were subjected to proteinase K (10 μg/ml) treatments for 10min.

Degree of fluorescent intensity is indicated as follows:
-: negative, +: weak, ++: definite, +++: intense.

表 1: ALP および *Afut-1* プローブを用いた FISH 法を種々の病理診断材料に適用する際の前処理法の検討結果