

した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大量発現させ、精製を行った。

本年度は現在保有するヒストプラズマ症患者血清を用いて、ELISA 法への応用を検討した。

B. 研究方法

H. capsulatum の主要な抗原として既に知られている H 抗原および M 抗原を含めた各抗原タンパク質は昨年度に構築したタンパク質大量発現ベクターを用いて、His-tag 融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。発現させたタンパク質はいずれも封入体として回収され、8M 尿素で可溶化した。封入体からの抗原タンパク質の精製はニッケルカラムを用いて行った。得られたタンパク質を精製抗原タンパク質として以下の実験に用いた。

ELISA に用いる 96-well plate には MaxiSorp (Nunc) を用いた。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°C にてコーティングを行った。TBS にて洗浄後、ブロッキングを行った。Protein Free Blocking Buffer solution (Pierce) によるブロッキングが BSA によるブロッキングよりもバックグラウンドを低減させることができたことから、Protein Free Blocking Buffer solution を用いることとした。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°C 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°C 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 (1N 硫酸) 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

研究方法に示したように実験条件を設定し、健常人血清 22 サンプルとヒストプラズマ症患者血清 10 サンプルを用いて、ELISA を行った。

まず既知の抗原である H 抗原、M 抗原を用いて実験を行った。本研究で設定した条件下において ELISA を行った結果、健常人群と患者群の間で抗体価に有意な差が認められた (図 2)。

次にこれまでに我々が同定した抗原タンパク質についても同様の条件下で ELISA を行った。その結果、Glutamate carboxypeptidase II (C 末 273 アミノ酸部分) と Catalase P に対する抗体価は健常人群に比べて患者群が有意に高かった。他の抗原タンパク質については現在用いている条件では健常人群と患者群の間では有意な差が認められなかった。

D. 考察

これまでに我々はヒストプラズマ症の血清診断への応用に向けた新規 *H. capsulatum* 抗原タンパク質の同定を行ってきた。血清診断法への応用の第一歩として、これまでに得られている組み換え精製抗原タンパク質を利用し

た ELISA 法への応用を試みた。

まずは既知の *H. capsulatum* 抗原タンパク質である M 抗原および H 抗原を組み換えタンパク質として大腸菌内で産生させ、精製後、ELISA に用いた。この結果、M 抗原および H 抗原に対する抗体価が患者群において健常人群に比べ優位に高いことが示された。用いた患者血清は免疫拡散法において陽性を示した血清（要確認！）であり、M 抗原や H 抗原に対する抗体価が有意に高かったことから本研究で用いた組換え H 抗原および M 抗原が *H. capsulatum* 培養上清中の H 抗原および M 抗原と同様に利用できる可能性が示唆された。このことは病原体 *H. capsulatum* を直接用いず、安定的な抗原タンパク質の供給が可能となることを示している。

我々が同定してきた抗原タンパク質についても同様の検討を行った。これまでに同定してきた抗原タンパク質の中で Catalase P と Glutamate carboxypeptidase II（C 末 273 アミノ酸

部分タンパク質）に対する患者群の抗体価が健常人群に比べて優位に高いことが示された。この結果からこれら二つの抗原タンパク質については上記の M 抗原、H 抗原とともに ELISA 法への応用が強く期待される。現在、他の輸入真菌症患者血清を用いて、交差反応についての検討を進めている。

さらに上記以外の 6 種の抗原タンパク質については本実験で用いた条件下では現在のところ患者群と健常人群で抗体価に有意な差は認められていない。今後、一層の条件検討が必要と考えられる。

また、本実験で用いている抗原タンパク質はいずれも大腸菌内で封入体を形成し、不溶化している。補体結合法などの迅速診断法への応用を考えた場合、タンパク質の可溶化は非常に重要である。今後は抗原タンパク質の可溶化について検討を行い、ELISA 以外の迅速診断法への応用の可能性を探る予定である。

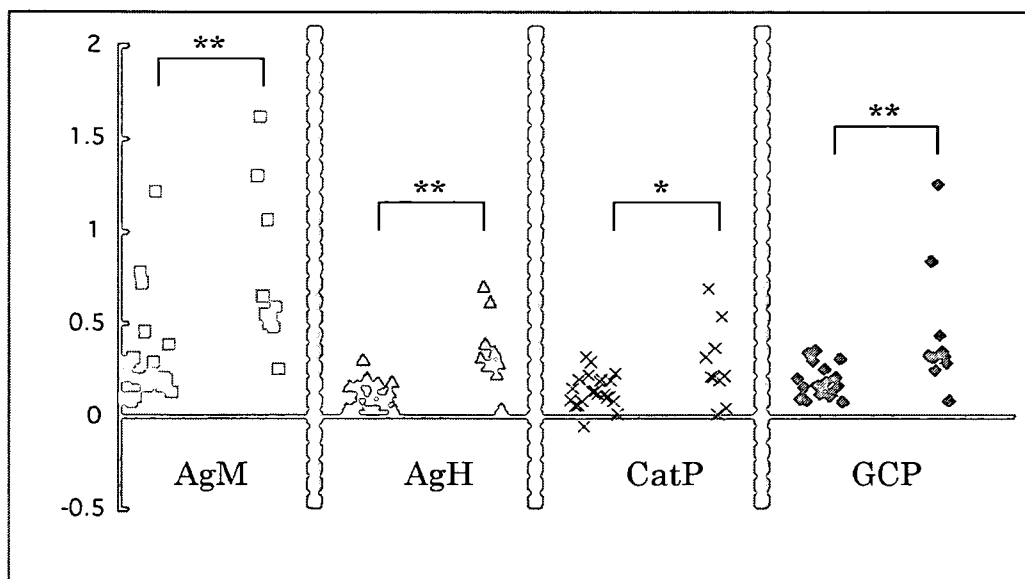


図2：抗原タンパク質を用いた ELISA

各抗原タンパク質を用いたデータにおいて左側は健常人血清 (N=22)、右側は患者血清 (N=10) の結果を示している。AgH：H 抗原；AgM：M 抗原；CatP：catalase P；GCP：glutamate carboxypeptidase II C 末側 273a.a. Mann-Whitney の U 検定により、*： $p \leq 0.05$ 、**： $p \leq 0.01$ で有意差ありと判定された。

学会発表

- 1) 高橋華子, 佐野文子, 亀井克彦, 相楽裕子：HIV 感染者に合併した播種性ヒストプラズマ症の一例. 第 81 回日本感染症学会総会, 感染症誌 81(臨増):285, 京都, 4 月 10-11 日, 2007.
- 2) 伊藤淳二, 佐野文子, 亀井克彦, 神戸俊夫, 三上襄：高度病原真菌 *Coccidioides* 属のトポイソメラーゼ 2 遺伝子及び関連遺伝子による同定法. 第 80 回日本細菌学会総会, 細菌学雑誌 62(1): 191, 大阪, 3 月 26-27 日, 2007.
- 3) 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, 2 月 10 日, 2007.

- 4) 豊留孝仁, 亀井克彦：新規 *Histoplasma* 抗原を用いたヒストプラズマ症迅速診断法の開発. 千葉大学オープン・リサーチ 2007, 千葉, 10 月 6 日, 2007.

論文

- 1) Murata Y, Sano A, Ueda Y, Inomata T,

- Takayama A, Poonwan N, Nanthawan M, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, Kamei K: Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Med Mycol* 45(3): 233-247, 2007.
- 2) Sakaeyama S, Sano A, Murata Y, Kamei K, Nishimura K, Hatai K: *Lecythophora hoffmannii* isolated from a case of canine osteomyelitis in Japan. *Med Mycol* 45(3): 267-272, 2007.
- 3) Hoshino S, Tachibana I, Kijima T, Yoshida M, Kumagai T, Osaki T, Kamei K, Kawase I: A 60-year-old woman with cough, fever, and upper-lobe cavitory consolidation. *Chest* 132(2): 708-710, 2007.
- 5) 佐野文子, 亀井克彦: 感染症学各論 感染症法分類 発症・病態・診断・治療 四類感染症 コクシジオイデス症. *日本臨床* 65(増刊号 3 新感染症学 (下) —新時代の基礎・臨床研究—): 223-228, 2007.
- 451-453, 2007.
- 著書
- 1) 亀井克彦, 渡辺哲: I 深在性真菌症の疫学・環境 Q4 海外渡航者で気をつけるべき真菌症とその対策は? 「改訂版 深在性真菌症 Q&A—2007 ガイドラインを踏まえて—」, 医薬ジャーナル社 河野茂編, pp.18-21, 2007.
- 2) 亀井克彦, 渡辺哲: 輸入真菌症—コクシジオイデス症, ブラストミセス症, ヒストプラズマ症, パラコクシジオイデス症, マルネツフェイ型ペニシリウム症. 「病原性真菌ハンドブック」. 宮治誠編, 医薬ジャーナル社, pp.132-139, 2007.
- 3) 亀井克彦: 真菌症—カンジダ症, クリプトコッカス症, アスペルギルス症, ムーコル症, ムコール症, 輸入真菌症. 「内科学第9版」, 朝倉書店, pp.341-346, 2007.
- 総説
- 1) 亀井克彦, 渡辺哲: 真菌感染症におけるトピックス 輸入真菌症. *臨床と微生物*, 34(6): 729-734, 2007.
- 2) 亀井克彦, 渡辺哲: 輸入肺真菌症. *呼吸器科* 11(1): 35-42, 2007.
- 3) 亀井克彦: 深在性真菌症とその対策. *感染防止* 17(40): 1-9, 2007.
- 4) 亀井克彦, 渡辺哲: 感染症学各論 微生物の病原因子 真菌の病原因子. *日本臨床* 65(増刊号 3 新感染症学 (下) —新時代の基礎・臨床研究—):

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

分担研究報告書

我が国における臨床分離真菌菌株のカルチャーコレクション構築と生化学的手法で同定された *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* の遺伝的多様性解析について

順天堂大学医学部 感染制御科学

菊池 賢・佐々木 崇

研究要旨：我が国で発生する深在性真菌症研究の基礎となる臨床背景の明らかな臨床分離株カルチャーコレクションを構築し、*Candida* 4 菌種についての遺伝的多様性の解析を行った。1997年より2008年までに国内30以上の施設から集められた臨床分離真菌1200株を対象として全て-80°Cで凍結保存し、検体情報、分離患者の臨床背景、生化学的同定検査、抗菌薬感受性試験成績、遺伝子背景 (ITS1-5.8S rDNA-ITS2, 26S rDNA D1/D2 領域) をデータベース化した。*Malassezia*, 糸状菌を除く酵母は923株あり、そのうちの主要4菌種である *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* について ITS1-5.8S rDNA-ITS2, 26S rDNA D1/D2 領域の遺伝的多様性を調べた。*C. glabrata* の ITS1-5.8S rDNA-ITS2 を除くほとんどの臨床分離株は一つの clade を形成していたが、従来の生化学的手法で同定された *C. albicans* には *C. dubliniensis* が、*C. parapsilosis* には *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *Lodderomyces elongisporous* がそれぞれ数株ずつ含まれていた。また、少なくとも26S rDNA D1/D2 領域の相同性から血液培養由来の *C. albicans* 1株、*C. parapsilosis* 1株、*C. tropicalis* 1株、*C. glabrata* 2株の5株の26S rRNA 配列は従来のどの菌種とも一致しないため、新菌種である可能性が示唆された。今回集積した真菌菌株のほとんどが分離された感染症の診断、治療経過などの臨床背景が明らかな株であることから、本データベースは我が国発生 of 深在性真菌症の基礎的・臨床的研究基盤として、疫学的解析、新たな診断法や抗真菌薬の開発に不可欠な財産であると考えられる。今後、個人情報につながらない情報の研究者への公開、菌株譲渡も含め、菌株保存施設への移管も検討したい。

A. 研究目的

近年、深在性真菌症に関して様々な大規模な多国間疫学調査が行われるようになってきたが、我が国における

大規模調査はまだまだ少なく、解析された菌株の保存・公開はほとんどなされていない。臨床背景の明らかな菌株のカルチャーコレクション構築は深

在性真菌症の疫学解析、予防、新しい診断法や抗真菌薬の開発などには不可欠である。しかし、我が国における臨床分離株の大規模な真菌カルチャーコレクションの整備は産業用菌株と違い、千葉大学真菌医学研究センター、帝京大学医真菌研究センターなどのごく一部の組織を除いて、ほとんど実施されてこなかった。我々は1997年より国内での深在性真菌症の発生动向調査や他の医療施設からの真菌菌種同定・感受性試験依頼、カルチャーコレクション移管、などにより約1200株の臨床分離真菌菌株を集積し、保存・管理してきた。これらの菌株の多くは分離された患者の診断・治療経過・臨床背景などが明らかであり、そのデータベース整備は本研究班の目的である新しい深在性真菌症診断法や抗真菌薬の開発に重要な役割を果たす。このため、我々は研究者への個人情報以外の情報公開・菌株譲渡も視野に入れた真菌臨床分離株データベース作成を行い、集められた菌株のうち、最も多かった *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* について、

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。

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。

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：

森澤雄司、菊池 賢、上 昌広、細川直登. 深在性真菌症の現状と今後の展望. 内科. 99:937-951, 2004.

学会発表：

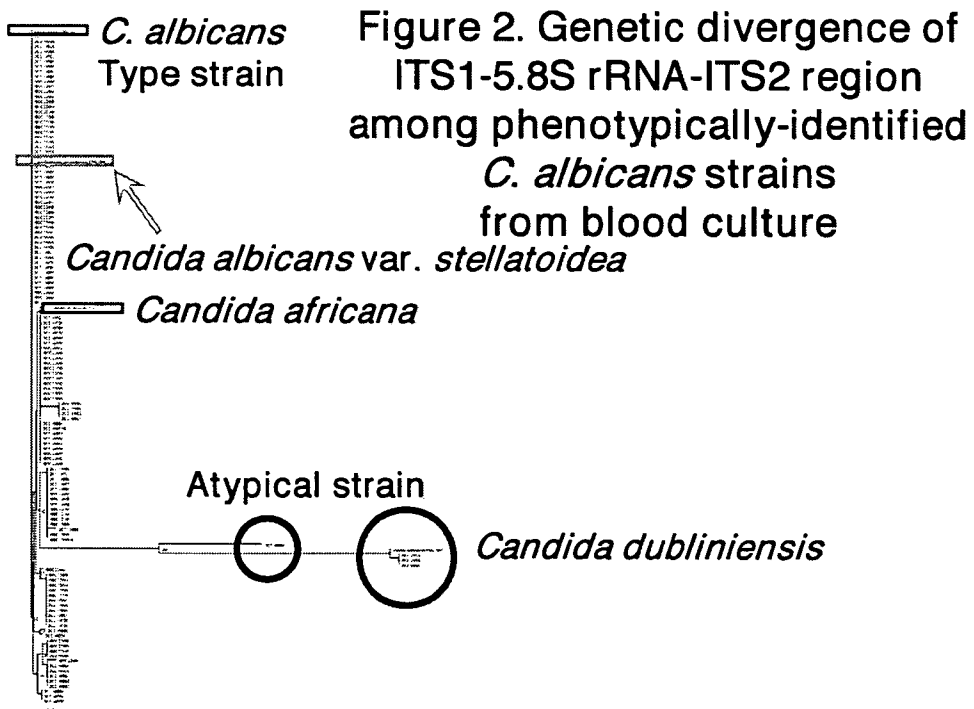
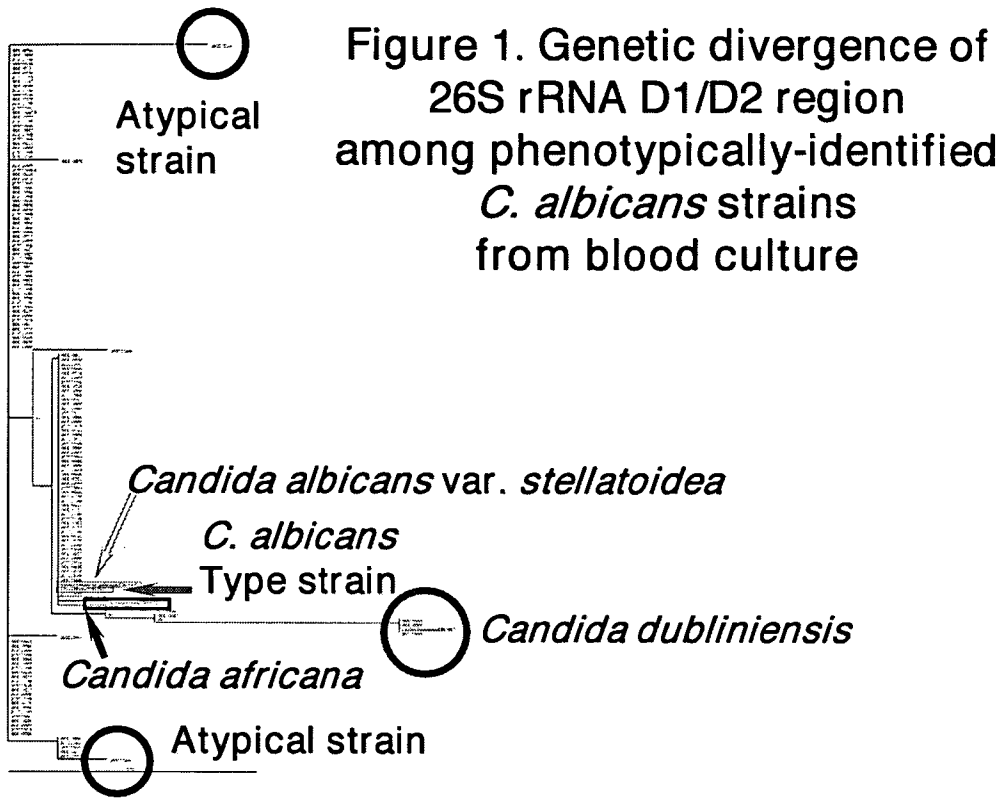
菊池 賢、杉田 隆、槇村浩一、亀井克彦、新見昌一、上原至雅. 我

が国の洞窟環境のヒストプラズマ分布状況と洞窟探検家のヒストプラズ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（横浜）. 日本医真菌学会雑誌 45 (Suppl 1): 99, 2004.

Kikuchi K, Piao T, Yasunami T, To J, Yamaura H, Totsuka K. Antifungal activity of aureobasidin A: a novel class of antifungal agent against pathogenic yeasts isolated from blood. 44th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington DC, USA. , Abstract of the 44th ICCAC, American Society for Microbiology, 207 (F-841), 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



Type strain

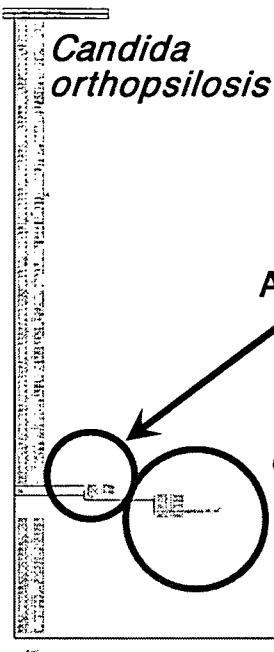


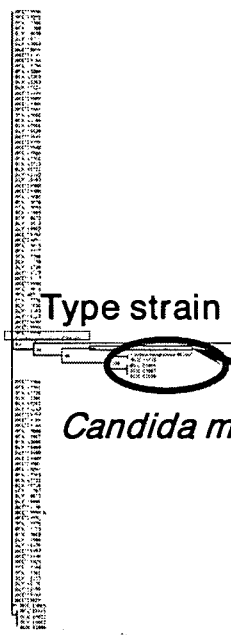
Figure 3. Genetic divergence of 26S rRNA D1/D2 region among phenotypically-identified *C. parapsilosis* strains from blood culture

Atypical strain

Candida metapsilosis

Lodderomyces elongisporous

Figure 4. Genetic divergence of ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region among phenotypically-identified *C. parapsilosis* strains from blood culture



Type strain

Lodderomyces elongisporous

Candida orthopsilosis

Candida metapsilosis

Figure 7. Genetic divergence of 26S rRNA D1/D2 region among phenotypically-identified *C. glabrata* strains from blood culture

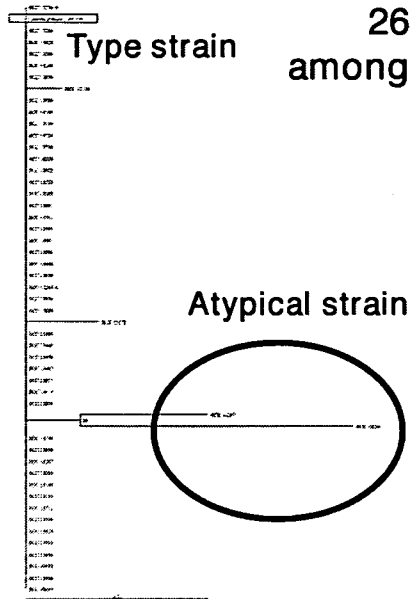
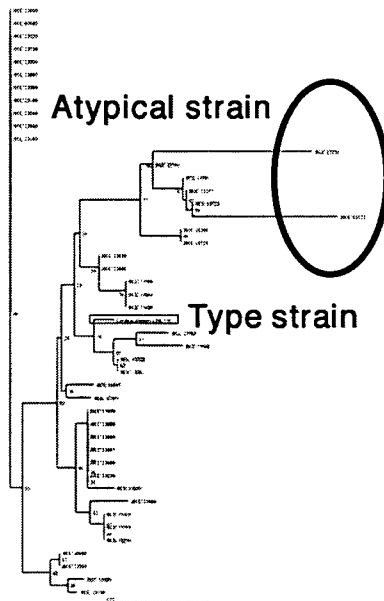


Figure 8. Genetic divergence of ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region among phenotypically-identified *C. glabrata* strains from blood culture



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

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

分担研究者 榎村 浩一 帝京大学医真菌研究センター 准教授

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「ニューモシスチス症診断用 LAMP 法の研究開発」および「主要マラセチアの典型的表現形質発現頻度と培養同定法の研究」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 ニューモシスチス症診断用 LAMP 法の研究開発

A. 研究目的

かつてカリニ肺炎と呼ばれたニューモシスチス症 (*Pneumocystis jirovecii* 感染症) は、未だに培養が困難な真菌 (古生子囊菌) による感染症である。本症の診断は、現在も直接検鏡が主流であり、その診断精度は偏に検査担当者の個人的能力に依存するものであった。そのため、熟練した臨床検査技師が不足している現状において、その臨床的重要性にも拘らず本症の診断には困難な部分が少なくない。この点を補うために、PCR法を用いた *P. jirovecii* の DNA 検出が商業的に

行われているが、操作および依頼の煩雑さと結果取得までに掛かる日数の問題等から充分活用されているとは言えない。そこで、迅速性と特異性に優れ、陽性結果を目視判定することも可能な遺伝子増幅法である LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法を用いたニューモシスチス症診断法の研究開発を行った。

B. 研究方法・結果

LAMP法とは、標的となる遺伝子の 6 領域から 4 種類のプライマーを設計し、1 種類の鎖置換型酵素を使用し一定温下で反応が進行し、感度および特異度の高い DNA 増幅法である。更にループプライマーを追加すると 30 分

内の迅速な増幅が可能となる。リアルタイム検出も可能であるが、目視検出も可能である。これらの特長から増幅反応から検出まで特別な機器を用いずに行える検査法であり、臨床の場での応用が可能である。

方法

近縁の菌種 (表 1) 4 本のプライマー (図 1)、鎖置換型 DNA ポリメラーゼ、基質 (dNTPs) と反応バッファの混合液を作り、鋳型 DNA を入れ、一定温度 (60~65°C) でインキュベーションした。検出はリアルタイム検出 (図 2) の他、濁度あるいは蛍光試薬添加による目視判定 (図 3) で行った。電気泳動での検出も可能であるが、LAMP 反応による増幅産物が大変多く、それらが実験室内で飛散する事による他の実験系へのコンタミネーションのリスクがあることから施行しなかった。

原理

2 本鎖 DNA は 60~65°C 付近では動的平衡状態にある。この状態では、1 本鎖部分の相補的な箇所プライマーがアニールし、そこから鎖置換型 DNA ポリメラーゼが作用し 2 本鎖 DNA をはがしながらプライマーが 3' 側より伸長する。Inner primer である FIP プライマーで伸長した DNA 配列は Outer primer の F3 プライマーがアニールして伸長するときにはがされていく。そのはがされた 1 本鎖 DNA が鋳型となり BIP プライマー (inner primer) および B3 プライマー (outer

primer) が前述と同様に働き、両端に相補鎖を持つためループ形成しダンベル構造をもった配列を生成する。このダンベル構造が起点構造となり、自らを鋳型として 3' 側が連続的に伸長し、次にダンベルのループ部分で示される 1 本鎖の部位には Inner primer (FIP/BIP) がアニールし先に伸長した配列を剥がしながら伸びる。剥がされた DNA 配列は相補鎖を含みループ形成し、はじめの起点構造と裏返しのダンベル構造が作られる。自己アニールによる伸長と、ループ部分の 1 本鎖へ Inner primer がアニールし、それらの反応が繰り返されていく。この過程の結果、同一鎖上に互いに相補的な配列が繰り返す構造がいろいろなサイズで生成される。これらのメカニズムは複雑であり、詳細については栄研化学株式会社の Eiken Genome Site にある LAMP 法の原理 (<http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/index.html>) を参照されたい。

従来 PCR 法との違い

LAMP 法の増幅効率としては、標的遺伝子を 15~60 分で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍程度に増幅することが可能であり、従来の PCR 法の 10^3 倍におよぶ。6 箇所の特異的領域を認識する 4 本のプライマーにより極めて高い特異性が得られている。LAMP 法は PCR 法と違い、増幅を目視で確認できる。増幅反応の過程で生成される副産物としてピロリン酸マグネシウムがあるが、増幅産物と比例して産生されることか

ら、それを白濁として見るができる。またカルセインを含む蛍光試薬を用いることにより、はじめはマンガニオンと結合していたカルセインが、反応液中に増量するピロリン酸イオンにマンガンを奪われ発光し、さらに反応液中のマグネシウムイオンと結合することで蛍光が増強する。現在、PCR法は定量性もある real-time PCR系も開発されている。感度も高いが、特殊な装置を必要とし、一般の検査室ではなく外注検査に頼らざるを得ない。LAMP法も特別な装置を用いれば real-time 検出が可能であるが、一般の検査室でも保有しているようなインキュベーターがあれば増幅反応が進行し目視によるエンドポイント判定が可能である。

LAMP法によるニューモシスチス症遺伝子診断

(i)感度・特異度

本研究によって開発された LAMP 系の特異度は、表 1 に示した各種病原真菌と交差せず、*P. jirovecii* に特異的であることが示された。また、感度は図 2 に示される通りリアルタイム測定では plasmid 当たり 10 コピー、肉眼的には 100 コピー (図 3) が検出下限と考えられた。

(ii)臨床検体への適用

臨床的にニューモシスチス症が疑われた 18 症例の気道検体に於いて、熟練した検者による鏡検、LAMP、および PCR 法 (ゲル電気泳動法) を比較したところ、本 LAMP 法は PCR 法

より優れ、鏡検とほぼ同等の検出陽性結果が得られた。

C. 考察

本研究によって、ニューモシスチス症に対する LAMP 法の有効性が示唆された。本法は反応に特殊な機械を必ずしも必要とせず、肉眼による検出も可能なことから、臨床的な有用性が期待される。今後も検討を進め、本法を用いた本症遺伝子診断の臨床応用を検討したい。

D. 結論

LAMP 法を用いたニューモシスチス症遺伝子診断法が開発され、その臨床的有用性が示唆された。

E. 文献

1. Natsu Uemura, Koichi Makimura, Masanobu Onozaki, Yoshihito Otsuka, Yasuhiro Shibuya, Hirohisa Yazaki, Yoshimi Kikuchi, Shigeru Abe, and Shoji Kudoh. Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. Journal of Medical Mycology 2008;57(Pt 1):50-7.

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

1. Natsu Uemura, Koichi Makimura,

Masanobu Onozaki, Yoshihito Otsuka, Yasuhiro Shibuya, Hirohisa Yazaki, Yoshimi Kikuchi, Shigeru Abe, and Shoji Kudoh. Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. Journal of Medical Mycology 2008 Jan;57(Pt 1):50-7.

2. 上村 なつ、榎村 浩一. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)法の原理と真菌症への応用.P80-85. 呼吸器科 11 巻 1 号.2007.1.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当しない。

II 主要マラセチアの典型的表現形質 発現頻度と培養同定法の研究

A. 研究目的

Malassezia 属は癬風や脂漏性湿疹の原因として知られ、発育に脂質を要求する酵母であるが、脂質輸液製剤の使用等に伴って近年カテーテル感染症の起因菌としても報告されている。このような酵母は従来見落とされていたものと考えられるが、発育因子の添加によって *Candida* と同時に *Malassezia* を分離培養可能な培地を既に報告した(図4:既に市販されている)。しかしながら、本属菌種の同定は今日まで分離菌株のゲノム塩基配列を解析しなければ不可能であった。

そこで、一般臨床微生物検査室において本菌の同定が可能となる、培養形質に基づいた同定法を開発した。

B. 研究方法・結果

まず、本属各菌種の同定指標となる形質をリストアップし、その確からしさを臨床分離株により検討した(表3)。その結果、従来同定の指標として原記載などにおいて記されていた表現形室が必ずしも安定でないことが明らかとなった。その一方で、新たに同定の指標を選び直してフローチャートとすることによって、主要マラセチア症起因菌の同定が可能となることが明らかとなった。

C. 考察

本属菌種は例外的に脂質要求性を持たない菌種をのぞき、その表現形室による同定は不能と考えられてきたが、その可能性が示された。また、併せて表現形室の種内における多様性も示されたことから、今後の分類学あるいは病原性との関連について十分な評価が求められる。

D. 結論

主要マラセチア症起因菌の表現形室による同定法が開発された。

E. 文献

1. Takamasa Kaneko, Koichi Makimura, Michiko Abe, Ryoko Shiota, Yuka Nakamura, Rui Kano, Atsuhiko Hasegawa, Takashi Sugita, Shuichi

Shibuya, Shinichi Watanabe, Hideyo Yamaguchi, Shigeru Abe, and Noboru Okamura. A revised culture based identification system for *Malassezia* Journal of Clinical Microbiology 2007 Nov;45(11):3737-42.

F. 健康危険情報

ない。

G. 研究発表

1. Takamasa Kaneko, Koichi Makimura, Michiko Abe, Ryoko Shiota, Yuka Nakamura, Rui Kano, Atsuhiko Hasegawa, Takashi Sugita, Shuichi Shibuya, Shinichi Watanabe, Hideyo Yamaguchi, Shigeru Abe, and Noboru Okamura. A revised culture based identification system for *Malassezia* Journal of Clinical Microbiology 2007 Nov;45(11):3737-42.
2. 金子孝昌、榎村浩一、阿部美智子、塩田量子、杉田隆、長谷川篤彦、渡辺晋一、山口英世、安部茂：*Malassezia* 同定法の評価並びに主要三菌種の簡易同定法。セレクティブ・シンポジウム。2007年11月9-10日、第51回日本医真菌学会総会、高山、岐阜

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当しない。

III 平成19年業績リスト

A. 原著論文

1. 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 50(1):25-30.
2. Tani K, Adachi M, Nakamura Y, Kano R, Makimura K, Hasegawa A, Kanda N, Watanabe S. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 2007 Aug 21; [Epub ahead of print]
3. Liu C, Matsushita Y, Shimizu K, Makimura K, Hasumi K. Activation of prothrombin by two subtilisin-like serine proteases from *Acremonium* sp. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jun 22;358(1):356-62. Epub 2007 Apr
4. Hossein Mirhendi, Kambiz Diba, Parivash Kordbacheh, Nilufar Jalalizand and Koichi Makimura Identification of pathogenic *Aspergillus* species by a PCR-restriction enzyme method. *Journal of Medical Mycology* . 2007 Nov;56(Pt 11):1568-70.
5. Takamasa Kaneko, Koichi Makimura, Michiko Abe, Ryoko Shiota, Yuka Nakamura, Rui Kano,

- Atsuhiko Hasegawa, Takashi Sugita, Shuichi Shibuya, Shinichi Watanabe, Hideyo Yamaguchi, Shigeru Abe, and Noboru Okamura. A revised culture based identification system for *Malassezia* Journal of Clinical Microbiology 2007 Nov;45(11):3737-42.
6. Natsu Uemura, Koichi Makimura, Masanobu Onozaki, Yoshihito Otsuka, Yasuhiro Shibuya, Hirohisa Yazaki, Yoshimi Kikuchi, Shigeru Abe, and Shoji Kudoh. Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. Journal of Medical Mycology 2008 Jan;57(Pt 1):50-7.
 7. Tsuyoshi Yamada, Koichi Makimura, Tatsuya Hisajima, Maki Ito, Yoshiko Umeda, Shigeru Abe. Genetic transformation of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*, based on the use of G418 resistance as a dominant selectable marker. Journal of Dermatological Science 2008 Jan;49(1):53-61.
 8. 柴田 明佳, 金子 孝昌, 榎村 浩一, 小野崎 正修, 荻原 利彦, 柴田 裕子, 菊池 賢, 安部 茂: 合成酵素基質を用いた酵母様真菌分離鑑別培地ポアメディア Viカンジダ寒天培地ならびに CHROMagar Candida の発育支持および菌種鑑別能に関する比較検討. 真菌誌 49:33-38, 2008.
- B. 総説・著書**
1. 榎村浩一. 【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.P43-46. Medical Technology 35 巻1号.2007.1
 2. 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、海江田哲、上昌広、亀井克彦、木内哲也、久米光、渋谷和俊、相馬一玄、高田徹、竹末芳生、田中秀治、田村和夫、二木芳人、福田隆浩、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、吉田耕一郎、吉田稔). 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2007. 協和企画、東京、2007.
 3. 上村 なつ、榎村 浩一. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)法の原理と真菌症への応用.P80-85. 呼吸器科 11 巻1号.2007.1.
 4. 榎村浩一. 【新感染症学 新時代の基礎・臨床研究】 感染症学総論 感染症の診断 原因微生物の検索 真菌の各種検査法.P169-173. 日本臨床 65 巻増刊 2.2007.2.
 5. 榎村浩一. 【新感染症学 新時代の基礎・臨床研究】 感染症学総

- 論 抗菌薬 薬剤耐性化と対策
 薬剤耐性化 真菌の耐性化機
 序.P466-470. 日本臨床 65 巻増刊
 2.2007.2
6. 槇村浩一. 病原真菌と真菌が関与
 する疾患 現状と展望.P472-482.
 Progress in Medicine 27 巻 2
 号.2007.2.
 7. 槇村浩一. (1) 抗真菌剤はなぜ
 効く?たくさんあるけどどこが
 違うの?、1塗り薬、2ノーベル
 賞級の水虫治療薬はもう完成し
 ている?、第4章 達人伝授の治
 療法、PP.178-181. 渡辺晋一、宮
 地良樹 編、水虫最前線 皮膚科
 診療最前線シリーズ、メディカル
 レビュー、東京、2007.
 8. 槇村浩一. クリプトコックスと
 クリプトコックス症:その診断・
 治療. 日本医事新報 4339: 85,
 2007.
 9. 槇村浩一. 真菌による日和見感
 染症. 特集 日和見感染症.
 P.710-715, Medical Technology 35
 巻7号 (2007年7月号)
 10. 槇村浩一. 我が国における病原
 真菌と健康障害ならびに対策の
 現状. 日本細菌学会雑誌 62(2):
 295-312, 2007.
 11. 槇村浩一. 深在性真菌症の遺伝
 子診断は有用か? pp.79-81, *IN* 河
 野茂 編 改訂版 深在性真菌
 症Q&A-2007ガイドラインを踏ま
 えて-, 医薬ジャーナル社、大阪、
 2007.
 12. 槇村浩一. 真菌症の遺伝子診断
 法. Pp.100-104, *IN* 宮地誠 編
 病原性真菌ハンドブック 医薬
 ジャーナル社、大阪、2007.
 13. 槇村浩一. 真菌の多様性と病原
 性-特集2 微生物の生残戦略と
 病原性の関連-, *JVM* 獣医畜産
 新報 60(7):587-588, 2007.
 14. 小野崎正修、槇村浩一:カンジダ、
 ニューモシスチス. 世界的にみ
 た感染症の検査法. 臨床と微生
 物 34 (4) : 335-339, 2007.
 15. 大森雅之、石岡憲明、泉龍太郎、
 江崎孝行、大石浩隆、太田寛行、
 加藤憲二、喜多正和、東端晃、福
 井啓二、藤本信義、槇村浩一、山
 崎丘:宇宙微生物学研究班 WG 活
 動報告. Space Utiliz Res 23 :
 353-354, 2007.
 16. 槇村浩一. 深在性真菌症の検査法
 -主流となる最新技術-特集 深在
 性真菌症. アニムス 51 : 24-28,
 2008.
- C. 口頭発表
1. 大森雅之、石岡憲明、泉龍太郎、
 江崎孝行、大石浩隆、太田寛行、
 加藤憲二、喜多正和、東端晃、福
 井啓二、藤本信義、槇村浩一、山
 崎丘:宇宙微生物学研究班 WG 活
 動報告.2007. 1. 15-17.宇宙利用
 シンポジウム (第23回) 日本
 学術会議、宇宙航空研究開発機
 構・宇宙科学研究本部、日本学術
 会議、東京
 2. 佐藤公美子、海老原睦仁、坪井
 良治、槇村浩一. 爪甲病変からの