

- nested PCR 法による爪白癬の菌種同定法の開発.P56. 東京医科大学雑誌 65 巻 1 号.2007.1.
3. 榎村浩一、杉田隆、辨野義己、西山彌生、安部茂. 宇宙ステーション内生活環境及び乗員の体内外における微生物生態系解析システムの研究開発.P178. 日本細菌学雑誌 62 巻 1 号.2007.2.
  4. 山田剛、榎村浩一、安部茂. 白癬菌形質転換体の選抜に用いる新たな薬剤の検討.P191. 日本細菌学雑誌 62 巻 1 号.2007.2.
  5. Takashi Sugita and Koichi Makimura : Analysis of cutaneous microflora using a molecular-based cultureindependent method. The 5th ISLSWG International Workshop on Space Microbiology, Sep. 19th-21st, 2007, Tokyo
  6. Koichi MAKIMURA , Kazuo SATOH, Tsuyoshi YAMADA, Yayoi NISHIYAMA, Shigeru ABE, Yuuji TSUKII, Takashi SUGITA, Kosuke TAKATORI, Yoshimi BENNO, Takashi YAMAZAKI: Development of Analyzing System for Microbial Flora on board Space Station and Astronauts. The 5th ISLSWG International Workshop on Space Microbiology, Sep. 19th-21st, 2007, Tokyo
  7. 榎村浩一 : What's new? 医真菌学の方向性、将来の課題について、2007年10月6日 第15回医真菌学セミナー、品川、新宿
  8. 榎村浩一 : 真菌症起因菌の臨床的問題とその対策、新感染症レクチャー、“日常診療に役立つ細菌学アップデート”、2007年10月13日 第90回日本細菌学会関東支部総会、新宿、東京
  9. 榎村浩一 : 真菌症起因菌の臨床的問題点とその対策. 2007年11月2日 埼玉血液疾患懇話会、さいたま市、埼玉
  10. 木村雅友、宇田川俊一、榎村浩一 : 健常者に認められた胸膜 *Rhizomucor pusillus* 感染症、2007年11月9-10日、第51回日本医真菌学会総会、高山、岐阜
  11. 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. セレクトイッド・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
  12. 金子健彦、近藤亨子、榎村浩一 : ペットのネコから感染した *M. canis* による体部白癬の二例. 2007年11月9-10日、第51回日本医真菌学会総会、高山、岐阜
  13. 南條育子、古賀裕康、榎村浩一、坪井良治 : 外用抗真菌薬ルリコナゾールの *Malassezia restricta* 臨床分離株に対する抗真菌活性. 2007年11月9-10日、第51回日本医真菌学会総会、高山、岐阜
  14. 古賀裕康、南條育子、榎村浩一、坪井良治 : *Malassezia restricta* を

- 用いたモルモット脂漏性皮膚炎モデルの作製と外用抗真菌薬の高価の検討. 2007年11月9-10日、第51回日本医真菌学会総会、高山、岐阜
15. 佐藤久美子、海老原睦仁、榎村浩二、安部茂、坪井良治. Nested PCR法を用いた爪白癬の菌種同定と治癒判定の試み. 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
  16. 小野崎正修、鈴木基文、榎村浩二: *Prototheca zopfii* 同定のためのPCR系の開発. 2007年11月9-10日、第51回日本医真菌学会総会、高山、岐阜
  17. 伊藤慎、榎村浩一、安部茂: 微少重力環境下における *Candida albicans* の発育と薬剤感受性の評価. 2007年11月9-10日、第51回日本医真菌学会総会、高山、岐阜
  18. 佐藤一朗、榎村浩一、山田剛、西山彌生、安部茂: 宇宙ステーション内生活環境および乗員の体内外における真菌検出システムの研究開発. 2007年11月9-10日、第51回日本医真菌学会総会、高山、岐阜
  19. 榎村浩一、佐藤一朗、安部茂: *Candida albicans* 菌体および培養液から検出される(1→3)-β-D-グルカンの挙動. 2007年11月9-10日、第51回日本医真菌学会総会、高山、岐阜
  20. 石原克人、榎村浩一、佐藤一朗、杉田隆、安部茂: PCR-熱解離曲線解析による *Cryptococcus neoformans* タイピング法の開発. 2007年11月9-10日、第51回日本医真菌学会総会、高山、岐阜
  21. 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、那須正夫、東端晃、福井啓二、藤本信義、榎村浩一、森崎久雄、山崎丘: 宇宙微生物学研究班 WG 活動報告. 2008. 1. 17-18. 宇宙利用シンポジウム(第24回) 日本学術会議・総合工学委員会、宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究本部、日本科学未来館、東京
  22. 榎村浩一、佐藤一朗、山田剛、西山彌生、安部茂、月井雄二、杉田隆、高鳥浩介、辨野義己、山崎丘: 宇宙ステーション内生活環境及び乗員の体内外における微生物生態系解析システムの開発. 2008. 1. 17-18. 宇宙利用シンポジウム(第24回) 日本学術会議・総合工学委員会、宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究本部、日本科学未来館、東京

# Pneumocystis jirovecii LAMP

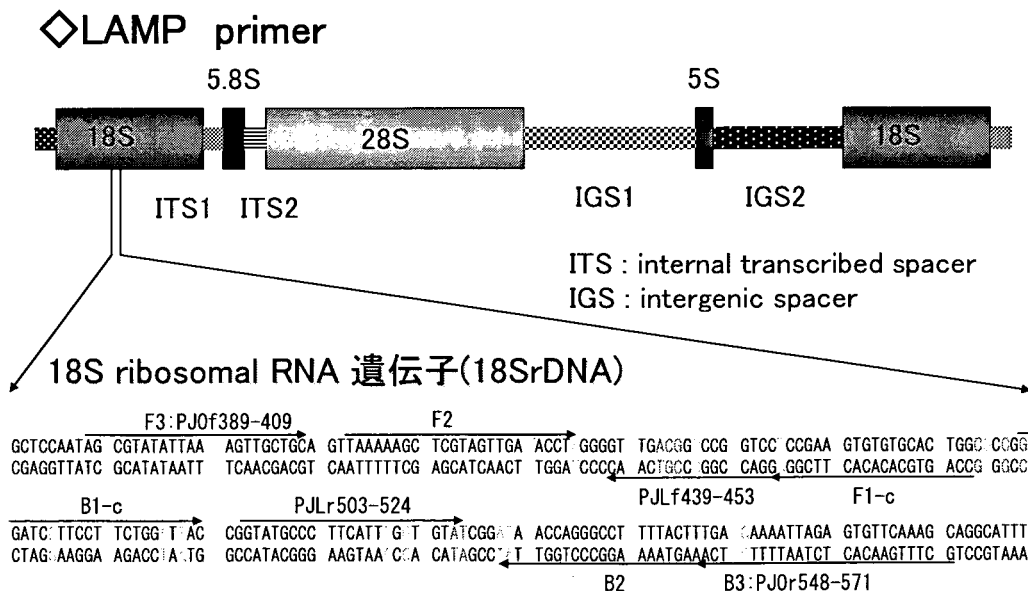
## 1. Primer設計

◇ 18S ribosomal RNA 遺伝子(18SrDNA)特異的

◇ Alignment (GENETYX®, GENETYX Co.Ltd., Tokyo)

Species	Accession number	Species	Accession number
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	*	<i>Taphrina nana</i>	AB000955
<i>Pneumocystis mustalae</i>	S83267	<i>Taphrina wiesneri</i>	D12531
<i>Pneumocystis wakefieldiae</i>	L27658	<i>Taphrina communis</i>	AB000949
<i>Pneumocystis murina</i>	AY532651	<i>Taphrina ulmi</i>	AB000959
<i>Pneumocystis carinii</i>	X12708	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	X58056
<i>Taphrina carnea</i>	AB000948	<i>Candida albicans</i>	E15168
<i>Taphrina virginica</i>	AB000960	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Z75578
<i>Taphrina robonsoniana</i>	AB000958		

\*Shah, J.S. et al. Clin Diagn Lab Immunol. 3: 119-27, 1996 記載4塩基配列および独自に決定した塩基配列を用いた。



Orange : *Pneumocystis jirovecii* 特異的、Yellow : *Pneumocystis* 特異的、Green : 種内変異

図1

## ◇特異性の検討

以下の菌種(51菌種69株)において交叉反応は認めなかった。

<i>Candida albicans</i> 3株	<i>Aspergillus niger</i> 3株	<i>Aspergillus penicillioides</i>
<i>Candida glabrata</i> 2株	<i>Aspergillus flavus</i> 3株	<i>Aspergillus terreus</i> var.terreus
<i>Candida krusei</i> 2株	<i>Aspergillus conicus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
<i>Candida dubliniensis</i> 2株	<i>Aspergillus restrictus</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>
<i>Candida tropicalis</i> 2株	<i>Aspergillus ustus</i>	<i>Eurotium chevalieri</i>
<i>Candida parapsilosis</i> 2株	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	<i>Eurotium herbariorum</i>
<i>Candida guilliermondii</i> 2株	<i>Aspergillus unguis</i>	<i>Neosartorya fischeri</i> var.fischeri
<i>Clavispora lusitanae</i> 2株	<i>Aspergillus tamarii</i>	<i>Neosartorya quadricincta</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Aspergillus avenaceus</i>	<i>Petromyces alliaceus</i>
<i>Shizosacchamycetes pombe</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Emericella rugosa</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Aspergillus nidulans</i> var.nidulans	<i>Fennellia nivea</i>
<i>Cryptococcus gattii</i> 2株	<i>Aspergillus varians</i>	<i>Penicillium marneffeii</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> 2株	<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Pichia anomala</i> 2株	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Pseudallescheria boydii</i>
<i>Trichosporon asahii</i> 2株	<i>Aspergillus clavatonanicus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> 2株	<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Mucor circinelloides</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> var.fumigatus	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>

表1

## ◇感度の検討

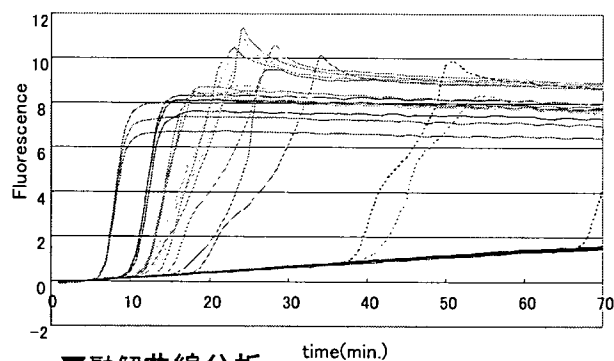
*Pneumocystis jirovecii*  
plasmid  
(各鋳型量は3検体ずつ  
検討した)

- :  $2 \times 10^6$ コピー
- :  $10^4$ コピー
- :  $10^3$ コピー
- :  $10^2$ コピー
- : 50コピー
- : 10コピー
- : 1コピー
- : DW

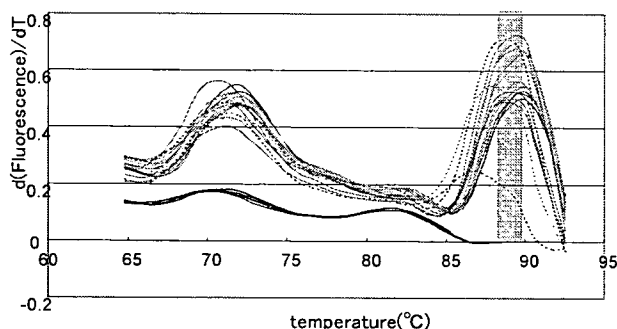
点線は非特異的の反応を示す

図2

### ▼定量解析



### ▼融解曲線分析



◇目視(蛍光検出および濁度)

▼蛍光



▼濁度



鑄型量(コピー数) 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10, 0 (DW)      2 × 10<sup>6</sup>, 0(DW)  
(*P. jirovecii* plasmid)

判定                    +   +   +   -   -                    +   -

図3

Clinical information of specimens collected from PCP patients.

sample number	case number	clinical specimen	underlying disease <sup>e</sup>	results		
				microscopic examination	LAMP	PCR
1	C1	BALF <sup>b</sup>	HIV carrier	(+)	(+)	(+)
2	C2	BALF	RA	(+)	(+)	(+)
3	C3	sputum	RA	(+)	(-)	(-)
4	C3(after Tx <sup>a</sup> )	sputum	RA	(-)	(+)	(-)
5	C4	BALF	WG	(+)	(+)	(+)
6	C5	sputum	HIV carrier	(+)	(+)	(+)
7	C6	BALF	HIV carrier	(+)	(+)	(+)
8	C6	sputum	HIV carrier	(+)	(+)	(+)
9	C7	BALF	RA	(+)	(+)	(-)
10	C8	sputum	RA	(+)	(+)	(-)
11	C9	sputum	RA	(+)	(-)	(-)
12	C9	BALF	RA	(-)	(-)	(-)
13	C9(after Tx)	sputum	RA	(-)	(-)	(-)
14	C10	sputum	LC(chemo. <sup>d</sup> )	(+)	(+)	(+)
15	C10(after Tx)	sputum	LC(chemo.)	(-)	(-)	(-)
16	C11	BALF	IPF	(-)	(+)	(-)
17	C12	BALF	HIV carrier	(+)	(+)	(+)
18	C13	sputum	HIV carrier	(+)	(+)	(+)

表2

<sup>a</sup>after Tx, after PCP therapy. <sup>b</sup>BALF, bronchoalveolar lavage fluid. <sup>c</sup>RA, rheumatic arthritis; HIV, human immunodeficiency virus; WG, Wegener granulomatosis; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; LC, lung cancer. <sup>d</sup>chemo., undergoing chemotherapy

# カテーテル感染症の起因菌となる *Malassezia* spp.

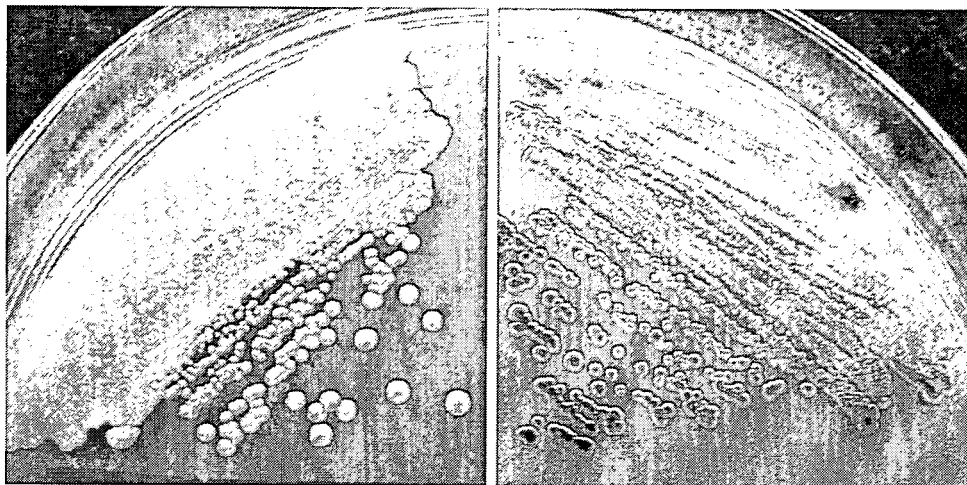


図4

TABLE 3. Biological features and incidence of a typical phenotype of nine species of *Malassezia*

Species identified by circular biological analysis	No. of strains	Colony characteristics on CLETHOM (% of incidence) <sup>a</sup>			Growth characteristics (% of incidence) <sup>b</sup>				Catalase reaction
		Size	Color/morphology	Prevalence	SDA	TY slant	1% slant	40°C	
<i>M. pachydermatis</i>	43	Large (100)	Pale pink, smooth (100)	- (100)	Growth (95.3) <sup>c</sup>	Growth and produced a black zone (95.3) <sup>c</sup>	Growth (95.3) <sup>c</sup>	NT	+ (100)
<i>M. sympodialis</i>	34	Large (100)	Pale pink, smooth (100)	+ (100)	No growth (100)	Growth and produced a black zone (100)	No growth (100)	NT	+ (100)
<i>M. glabris</i>	14	Small (100)	Purplish, smooth (100)	+ (100)	No growth (100)	No growth and no change (100)	No growth (100)	NT	+ (100)
<i>M. albicans</i>	5	Large (100)	Pale pink to purplish, smooth (100)	- (100)	No growth (100)	Growth and no change (100)	No growth (100)	NT	+ (100)
<i>M. fortii</i>	41	Large (100)	Pale pink, wrinkled (100)	- (97.6) <sup>d</sup>	No growth (100)	Growth and produced a black zone (100)	Growth (95.4)	NT	+ (100)
<i>M. chrysi</i>	108	Small (100)	Pale pink, smooth (100)	- (100)	No growth (100)	Growth and no change (65.7) <sup>e</sup>	No growth (98.1)	Growth (84.3) <sup>f</sup>	+ (100)
<i>M. octospora</i>	4	Medium (100)	Pink, rough (100)	- (100)	No growth (100)	No growth but produced a black zone (100)	No growth (100)	NT	+ (100)
<i>M. cinnamomi</i>	71	Small (100)	Pink, smooth (100)	- (100)	No growth (100)	No growth and no change (100)	No growth (100)	NT	- (100)
<i>M. japonica</i>	2	Large (100)	Pink, smooth (100)	- (100)	No growth (100)	Growth and produced a black zone (100)	No growth (100)	No growth (100)	+ (100)

<sup>a</sup> Incubated at 37°C for 4 to 7 days.

<sup>b</sup> Incubated at 37°C for 4 days. NT, not tested; +, positive; -, negative.

<sup>c</sup> Only one strain of fresh clinical isolates produced a precipitate.

<sup>d</sup> Only two strains of fresh clinical isolates did not grow on SDA and TY, and did not produce a black zone on TY.

<sup>e</sup> Thirty-seven strains of fresh clinical isolates produced a black zone on TY, and 17 strains did not grow on Sabouraud's dextrose and Norman agar at 40°C for 4 days.

表3

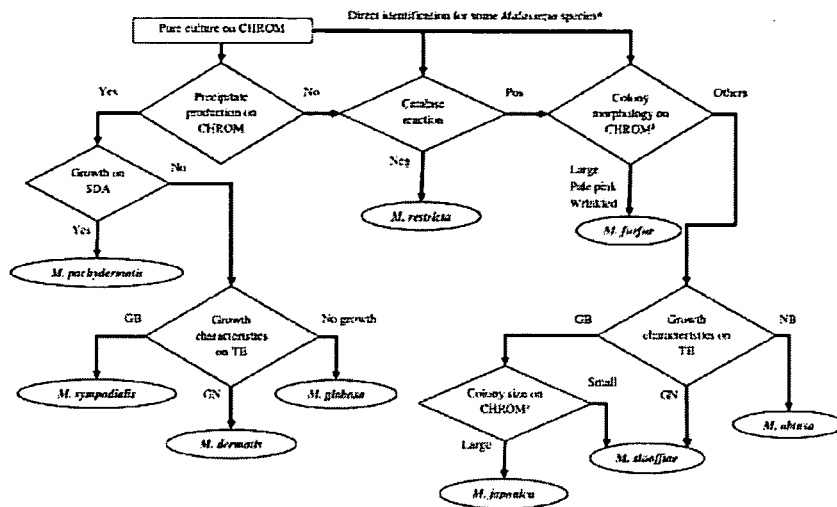


FIG. 2. Proposed identification workflow for nine species of *Malassezia*. Pos, positive; Neg, negative; GB, growth and black zone; GN, growth and no change; NB, no growth and black zone. *a*, Direct identification by catalase reaction and features of colonies on CHROM for *M. restricta* and *M. furfur*. *b*, Colony morphology on CHROM as shown in Fig. 1. *c*, Colony size of *M. japonica* and *M. slooffiae* on CHROM as shown in Fig. 1.

5

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

病理診断で常用されるホルマリン固定パラフィン切片を用いた病原糸状菌の遺伝子学的判別に関する基礎的検討

研究協力者 篠崎 稔<sup>[1]</sup> 中山晴雄<sup>[2]</sup>

分担研究者 渋谷和俊<sup>[2]</sup> 東邦大学医学部病院病理学講座 教授

[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 本年度は近年その有用性が期待される Peptide Nucleic Acid (PNA) プローブを導入した。また、多数例を解析することを想定した精度管理のためのコントロールアレイブロックを作製し、一般・実用化を前提とした検討を行った。その一方、ホルマリン固定パラフィン切片に認められる病原糸状菌の核酸を PCR 法に供するための DNA 抽出法を検討し、最適な抽出条件を設定した。

PNA プローブは、60 分～120 分のハイブリダイゼーション時間で十分なシグナル強度と選択性を示し、迅速且つ特異性に優れた ISH 法確立の可能が示唆された。コントロールアレイブロックを資料となる組織切片と同一スライドに貼付することで、多数例を解析する際の適切なコントロールとして用いることができると考えられた。設定した最適な真菌 DNA 抽出条件の下、剖検症例を中心としたホルマリン固定パラフィン切片における種々のプライマーを用いた PCR 法による解析を試み、ISH 法と組み合わせた病原糸状菌の判別法を構築した。



## A. 研究目的

われわれは昨年度までの報告において、日常病理診断に常用されるホルマリン固定パラフィン切片上に観察される病原糸状菌の判別に関して、In situ hybridization (ISH) 法を応用するための基礎的検討を行い、適切な前処理法の条件設定と新たな検出系の構築を行った。また、従来真菌の検出に 응용がほとんど行われていない PNA (Peptide nucleic Acid) プローブの有用性についても検討した。さらに、多数例を解析する際、精度管理上不可欠であるコントロールアレイブロックを培養死菌を用いて作製し、ISH および FISH の一般・実用化を前提とした検討を行った。

この一方、現在、PCR 法の試料としてのホルマリン固定パラフィン包埋材料の特性はほとんど解析されていない状況であり、中でも真菌 DNA 抽出法に関しては、一般化された手技は、一切確立されていない。そこでホルマリン固定パラフィン包埋材料を対象とした真菌に関連する DNA 抽出法の基礎的検討を行い、実際の診断への利用を前提とした精度および妥当性を検討した。

## B. 研究方法

1) ISH 法における PNA プローブの評価

*Candida albicans* の 26S r-RNA を標的とした PNA プローブの N 末端に Fluorescein Isothiocyanate (FITC) を標識し、ISH 法のプローブに供した (FITC-ACAGCAGAAGCCGTG)。

EDTA による加熱処理と Proteinase K による二重処理を施し、ハイブリダイゼーション後、抗 FITC 抗体を用いた酵素抗体法によりシグナルを検出した。ハイブリダイゼーションの時間と特異性に関して、*Aspergillus fumigatus* と *C. albicans* を同一標本上にて観察できる剖検症例のホルマリン固定パラフィン切片を用いて評価した。

2) コントロールアレイブロックの検討

培地上から採取された *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus*, *Fusarium solani*, *Rhizopus oryzae* 計 6 菌種のホルマリン浮遊液からパラフィンブロックを作製した。その際、同一ブロックに包埋し、コントロールアレイブロックとし、ALP プローブによる ISH 法を施行した。

3) ホルマリン固定パラフィン切片に

## おける真菌 DNA 抽出法の検討

培地上から採取された *A. fumigatus* のホルマリン浮遊液からパラフィンブロックを作製し、5  $\mu$ m 切片4枚を1つのチューブに採取した。これをDNA抽出法の検討に供し、加熱処理の有無、溶菌酵素の濃度、界面活性剤の種類、脱パラフィンの各手技について検討した。

## 4) 感染動物モデルおよび臨床材料における応用

B-3) において得られた最適条件の下、剖検症例および感染動物モデルのホルマリン固定パラフィン切片を用いて、種々のプライマー(表1)を用いたPCR法およびALPプローブと *Afut-1* プローブによるISH法を施行した。

Primer sequences used for PCR			
Name of primer	Product size	Sequence	Specificity
Al-Pan Al-Ter	282bp	GCCLATCCGFGACTGTGATG AAGGTTCAACCAGGATCAAC	<i>A. fumigatus</i> alkaline phosphatase gene
LFP1a LFP1b	145bp	CTTTCACADA1GCTTAGAAC GCTCC1AACCAGGCGATG	<i>A. fumigatus</i> 1990nt consensus <i>Afut-1</i> long terminal repeat
APU7a APU7b	402bp	GGG CCG TTA AAT AGC CCG GAC CCG GTT TGA CCAACT TT	<i>Aspergillus species</i> 18S rRNA gene
APU5a APU5b	130bp	AGG GTC AGC GAG TAC ATC AGC TTT GGG GGT CCG TGC CAA CCC CCC TGA	<i>Aspergillus species</i> 18S rRNA gene
PM31 PM32	109bp	AAT ATT CTG GGC GGC ATG CCT GT ACA AAT TAC AAC TTG GTC CCG AGA	<i>Fusarium species</i> 5.8S/18S 28S rRNA gene
ZM1 ZM2	185bp	ATT AAT ATG AGC AAA TCA GA TCC GTC AAT TCC TTA AAT TTT C	<i>Zygomycetes</i> 18S rRNA gene
ZM1 ZM2	175 to 177	ATT AAT ATG AGC AAA TCA GA CAG TCC AAG AAT TTC ACC TCT	<i>Zygomycetes</i> 18S rRNA gene
PM4 SP1	197bp	TTA CIA CDE AGA AGG CAA AAT CTT TGA ACC CAC ATT	<i>Sordariomycetes</i> 5.8S/18S rRNA gene
PM4 SP1	163bp	TTA CIA CDE AGA AGG CAA TGT CCG ACC CTC ATT TC	<i>Sordariomycetes</i> 5.8S/18S rRNA gene

表 1

## C. 研究結果

### 1) PNA プローブのハイブリダイゼー

ション時間の検討では、60分~120分の反応で一晩反応させた標本と同等のシグナル強度を得ることができた(図1)。また、*C. albicans* に特異的なシグナルが観察され、近傍に認められる *A. fumigatus* ではシグナルはみられなかった。その連続切片で ALP 遺伝子に対する ISH 法を施行したところ、*A. fumigatus* に選択的なシグナルを認めた(図2)。

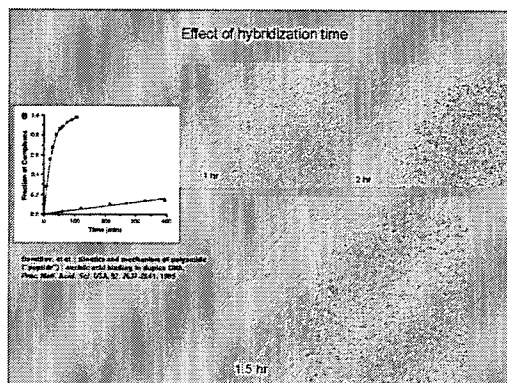


図 1

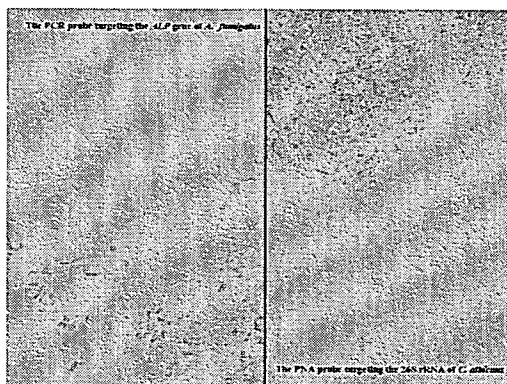


図 2

### 2) コントロールアレイブロックを用いた ALP プローブによる ISH 法にお

いては、

*A. fumigatus*, において強いシグナルが得られた。*A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus* においては軽度から中等度のシグナルが観察され、*Fusarium solani*, *Rhizopus oryzae* では反応がみられなかった。

3) 加熱処理を施すことにより、高分子領域 DNA の分解が観察されたが、より高い収量を得られた (図 3)。溶菌酵素の濃度は  $50\text{U}/100\ \mu\text{l} \sim 100\text{U}/\mu\text{l}$  が効果的であった (図 4)。検討した界面活性剤のうち、SDS が最も効果的であった (図 5)。

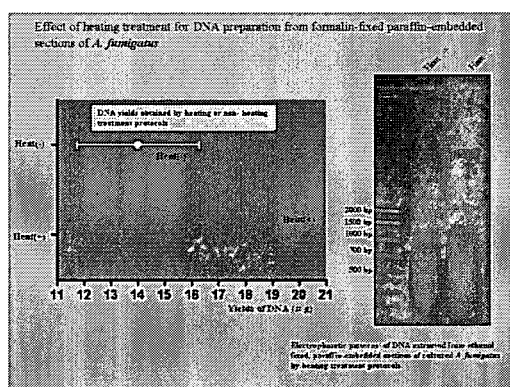


図 3

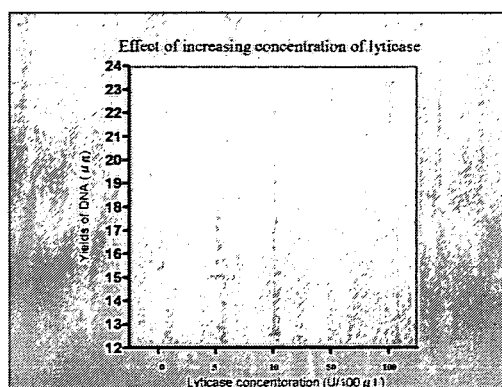


図 4

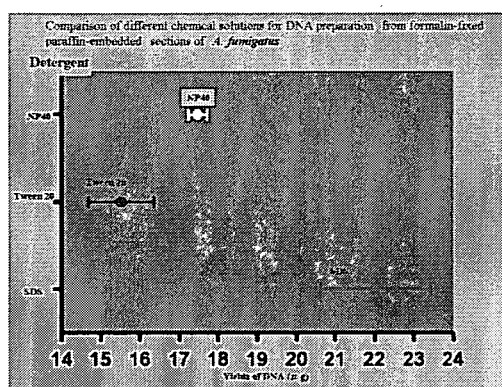


図 5

4) 感染動物モデルの組織と臨床材料を用いた検討では、PCR 法および ISH 法は概ね両者の間で整合性が得られたが (表 2)、検体のホルマリン固定による過固定や酸による脱灰操作の影響と思われる偽陰性がみられた。

ISH and PCR results from formalin-fixed, paraffin-embedded sections																				
Case	Age/sex	Organ	Underlying disease	Diagnosis	ISH				PCR											
					Afu-1	ALP	ALP/ALP	LTRs	AFLG	P458	ZM1	Pout								
1				Experimental invasive aspergillosis																
2*	57F	Lung	HbE	PA	+	+														
3*	83M	Brain	HbE	Mucormycosis																
4*	64M	Lung	MM	PA	+	+														
5*	57F	Lung	CML	PA	+	+														
6	80F	Bladder stroma		Paraneoplastic hyperglycemia	+	+														

\* Autopsy cases; PA: Invasive pulmonary Aspergillus; HbE: non Hodgkin's lymphoma; MM: multiple myeloma; CML: chronic myelogenous leukemia.

表 2

## D. 考察

- 1) PNA プローブを用いた ISH 法は 60 分から 120 分で良好なシグナルが得られ、簡便、迅速かつ精度が高い診断法としての有用性が示唆された。
- 2) 今回作製したコントロールアレイブロックは被検サンプルと同一スライドに貼付することで、良好なコントロールブロックとして使用可能であり、多数例を解析する際の制度管理に貢献すると思われた。
- 3) ホルマリン固定パラフィン切片から、真菌 DNA を抽出する際の最適な処理法を設定した。本条件を用いることで、比較的核酸の保持が良好でない剖検症例からも効率的に真菌 DNA が得られ、PCR 法に供することが可能であった。
- 4) 今回の検討で選定したプライマーを使用した PCR 法と ALP および

Afut-1 プロブを用いた ISH 法を併用することで、ホルマリン固定パラフィン切片における真菌を対象とした精度が高い遺伝子診断が可能であることが示唆された。

## E. 結論

ホルマリン固定パラフィン切片においては DNA の断片化が進み、PCR 法による真菌 DNA の増幅が困難な場合も少なくない。病理診断現場における形態診断の補助診断法として、PCR 法に加え ISH 法を併用することで、さらに精度が高い真菌症の診断が可能になることが本研究から示唆された。今後、更なる研究の継続が必要と思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 杉野圭史, 長谷川千花子, 木村一博, 佐野 剛, 磯部和順, 渋谷和俊, 本間 栄. 白血病に合併した侵襲性肺アスペルギルス症の臨床病理学的検討. 感染症学雑誌 81: 261-7, 2007
- 2) 磯部和順, 村岡 成, 杉野圭史, 山崎陽子, 菊池 直, 濱中伸介, 高井雄二郎, 清水邦彦, 木村一博, 廣井直樹, 渋谷和俊, 本間 栄. ポリ

- コゾナルによる抗利尿ホルモン分泌異常症候群を認めた肺アスペルギルス症の一例. 日本呼吸器学会雑誌 45: 489-93, 2007
- 3) Omuta J, Uchida K, Yamaguchi H, Shibuya K. Histopathological Study On Experimental Endophthalmitis Induced by Bloodstream Infection with *Candida albicans*. Jpn J Infect Dis 60: 33-9, 2007
  - 4) Taguchi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Kawabata T, Wakayama M, Ogoshi T, Iwabuchi S, Shibuya K, Nishimura K, Takahashi K. Allergic fungal sinusitis caused by *Bipolaris spicifera* and *Schizophyllum commune*. Med Mycol 45: 559-64, 2007
  - 5) Ochiai E, Kamei K, Watanabe A, Nagayoshi M, Nagaoka T, Tada Y, Sato A and Shibuya K. Inhalation of *Stachybotrys chartarum* causes pulmonary arterial hypertension in mice. Int J Exp Pathol, accepted
2. 学会発表
- 1) 落合恵理、亀井克彦、永吉 優、渡辺 哲、豊留孝仁、渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* 単回投与によるマウス肺高血圧症の形成に関する検討. 第 81 回日本感染症学会 (京都) 2007 年 4 月
  - 2) 永吉 優、渡辺 哲、多田裕司、長岡鉄太郎、佐藤弘一、笠原靖紀、田辺信宏、栗山喬之、渋谷和俊、亀井克彦: *Stachybotrys chartarum* の反復気管内投与によって誘導されるマウス肺高血圧症に関する検討. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会 (東京) 2007 年 5 月
  - 3) 永吉 優、落合恵理、佐藤綾香、渡辺 哲、多田裕司、長岡鉄太郎、佐藤弘一、笠原靖紀、田邊信宏、栗山喬之、渋谷和俊、亀井克彦: *Stachybotrys chartarum* の反復気管内投与により惹起されるマウス肺高血圧に関する検討. 第 1 回 iPUC-II (Integrated pulmonary circulation research) (東京) 2007 年 6 月
  - 4) 落合恵理、亀井克彦、渡辺 哲、永吉 優、豊留孝仁、渋谷和俊: *Cladosporium* 属、*Penicillium* 属菌の気管内反復投与がマウスの肺動脈に与える影響について. 第 56 回日本感染症学会東日本地方会総会 (東京) 2007 年 10 月
  - 5) 落合恵理、亀井克彦、佐藤綾香、渡辺 哲、永吉 優、豊留孝仁、渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* 胞子のメタノール処理とマウス肺動脈病変の形成について. 第 51 回日本医真菌学会総会 (岐阜) 2007 年 11 月
  - 6) 渋谷和俊. 肺真菌症 UPDATE: 病態から治療まで. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会(シンポジウム). 東京, 2007 年 5 月
  - 7) 中山晴雄, 渋谷和俊, 倉石安庸. Breakthrough zygomycosis - 2 case reports. 第 12 回神経感染症学会総会. 福岡, 2007 年 10 月
  - 8) 中山晴雄, 大久保陽一郎, 上田守三, 渋谷和俊. 中枢神経カンジダ症に関する病理学的検討. 第 12 回神経感染症学会総会. 福岡, 2007 年 10 月
  - 9) 久住英二, 上昌広, 渋谷和俊. 白血病、悪性リンパ腫および固形癌における真菌症の頻度: 日本病理学会剖検輯法データベースを用いた解析. 第 69 回日本血液学会第 49 回日本臨床血液学会合同総会. 横浜, 2007 年 10 月
  - 10) 中山晴雄, 上田守三, 篠崎稔, 大久保陽一郎, 渋谷和俊. 中枢神経カンジダ症に関する病理学的検

- 討. 真菌症フォーラム第9回学術集会. 東京, 2008年2月
- 11) 菅又美穂, 渋谷和俊, 榎村浩一, 内田勝久, 山口英世, 安部茂. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* の実験的気道感染マウスにおける病態の病理組織学的検索. 第28回関東医真菌懇話会. 東京, 2007年6月
  - 12) 渋谷和俊. 深在性真菌症:動物モデルによる病態解析と遺伝子組織学的診断の試み. 第51回日本医真菌学会総会モーニングセミナー. 高山, 2007年11月
3. 総説 他
- 1) 渋谷和俊. 深在性真菌症の病理. 上尾市医師会報 108: 6-10, 2007
  - 2) 篠崎 稔, 井手 忠, 中山晴雄, 渋谷和俊. 病理細胞診断材料を用いた真菌 DNA 抽出法について. ビオメリユー・ニュースレター 7: 8-9, 2007
- H. 知的財産権の出願・登録情報なし。

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

真菌に関する認知度調査

分担研究者 上 昌広 東京大学医科学研究所

研究協力者 田中祐次 同上

#### 研究要旨

深在性真菌症や輸入真菌症は臨床的に重要な感染症である。近年、抗真菌薬の開発が進み、治療選択も増えてきた。治療のコンプライアンスをあげ迅速な治療を行うために、患者側の真菌に対する知識と理解が増えることが期待される。そこで、現状の真菌に対する認知度を調査し現状の把握を行った。また、情報入手経路を調査することで今後の真菌に関する情報発信に関して考察した。

無料の医療雑誌ロハス・メディカルを利用しアンケート調査を実施。468人よりアンケートを回収した。カンジダを除いて深在性真菌症や輸入真菌症の認知度は低い。また、情報入手経路は医師と医学雑誌が多かった。

今回の調査の結果から、患者側の真菌の認知度を上げる必要があると判断した。その方法としては医学雑誌などのメディアを携える事が有効である可能性がある。

#### A. 研究目的

近年、抗真菌薬の開発が進み、治療選択も増えてきている。真菌症の治療において、治療のコンプライアンスをあげ迅速な治療を行うためには患者や家族に対して十分な説明と理解を得る必要がある。そのためには患者側

の真菌に対する知識と理解が増えることが期待される。

そこで、今回我々は現状の真菌に対する認知度を調査し現状の把握を行った。また、情報入手経路を調査することで今後の真菌に関する情報発信に関して考察した。

## B. 研究方法

院内フリーマガジン「ロハス・メディカル」の紙面を利用してはがきによるアンケート調査を行った。調査内容は図1を参照。

### ロハス・メディカル

ロハス・メディカルは22万部発行している無料の雑誌で、毎月20日に発行している。都内120病院に12万部、新聞の販売促進物で10万部配られている。

今回のアンケート調査は2008年1月20日。アンケート回収期間は2008年1月20日から2月20日。

## C. 研究結果

### 対象者背景

回答総研数468名（男性187名、女性281名）、年齢中央値53歳（18-87）、疾患内訳：がん67人、皮膚疾患99人、その他322人であった。

### 真菌の認知度（図2）

表在性真菌症に関しては表在性真菌症としてではなく、一般名のミズムシ（452人）、インキン（391人）、シラクモ（301人）として認知度は高い。

重症感染症を引き起こす深在性真菌症では、カンジダ（366人）の認知度は極めて高いが、他のアスペルギルス（74人）とクリプトコッカス（73人）の認知度は低い。

輸入真菌症は9人と低い、輸入真

菌症の原因菌であるヒストプラズマ（54人）のみ認知度が比較的高かった。**情報入手経路との関係（図3）**

全体の30.1%（141人）が医師から情報を得ており、ついで医学雑誌27.8%（130人）、テレビ22.0%（103人）である。深在性真菌症を知っている人（70人）、輸入真菌症を知っている人（9人）そしてヒストプラズマを知っている人（54人）の情報入手経路も図3に示した。こちらも同様に医師（22人）、医学雑誌（16人）が多かった。また、インターネットからの入手は全体の中の51人（10.9%）とあまり多くない。

## D. 考察

本研究では、真菌感染に対する認知度と情報入手経路に関して調査を行った。

深在性真菌症の原因として最近ではアスペルギルス感染が増えてきている。しかし、調査で、深在性真菌症やその原因菌であるカンジダ、アスペルギルスやクリプトコッカスの認知度はカンジダ以外は低いことが明らかとなった。カンジダはミズムシに並ぶ程の認知度であった。カンジダは深在性真菌症の原因菌としてではなく性病の原因菌として広く認知されている可能性がある。

輸入真菌症の発症は増加傾向にあ



る。しかしながら、今回の調査では輸入真菌症を知っている人は9名と極めて少なかった。今後、若い健常人にも感染する可能性があるために広く国民に認知してもらう必要がある。一方、輸入感染症の原因菌のひとつであるヒストプラズマに関しては54人と比較的多く認知されている。ヒストプラズマを知る群は母集団と比べ真菌感染の既往、疾患に差は見られないが、年齢中央値46歳と母集団より若く、また表在性真菌症や深在性真菌症などの言葉を良く知っていた。ヒストプラズマの認知度が高いことの正確な理由は不明であり、今後の検証が必要である。

情報伝達に関して、全体としては医師からの伝達をもっとも多かった。次いで、医学雑誌から情報を得ている人が多かった。癌患者で真菌感染症の合併が2パーセント程度と少ないことから、真菌感染発症前に事前に医師より患者に説明する事は現実的に難しい。しかし、医学雑誌から情報を得ている患者や家族が多いことを考慮すると活字を用いた冊子を情報伝達媒体として有効であると考えられる。インターネットからの情報を得ている人が少なかったがこの理由としては対象

者の年齢中央値が53歳とややインターネット世代に較べると高齢であったことが考えられる。今後、インターネットを活用できる世代が広がることを考えると雑誌だけではなく将来的にはインターネットも情報伝達手段として有効である可能性はある。

## E. 結論

真菌感染症において臨床上問題となる深在性真菌症や原因菌のアスペルギルス、クリプトコッカス、そして輸入感染症の認知度が低い。情報入手経路では医師からと医学雑誌からが多かった。

## F. 健康危機情報

特記すべき事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特記すべき事項はなし。

図1. アンケート調査用紙

Q1 あなたの現在住む所の国は何ですか  
 日本 立国名 名称( )

---

Q2 深在性真菌症に知られたりはありますか  
 ある ない わからない

---

Q3 深在性真菌症をどこかで聞きましたか(知れず可)  
 知らない 国( ) 雑誌( ) その他( ) 医師( )  
 友人 家族( ) テレビ インターネット その他( )

---

Q4 以下の名前も知っていますか？(知れず可)  
 深在性真菌症 深在性真菌症 輸入真菌症  
 カンジダ アスペルギルス クリプトコッカス  
 コクジジオイデス ヒストプラズマ パラコクジジオイデス  
 ムコール スムシ エナムシ インカン シラクモ

---

お住いの地域の郵便番号を  
 ご記入下さい    -

年齢 歳 性別 男・女

以下、項目を希望する方は下記にもご記入ください。

住所 \_\_\_\_\_

氏名 \_\_\_\_\_

図2. 認知度

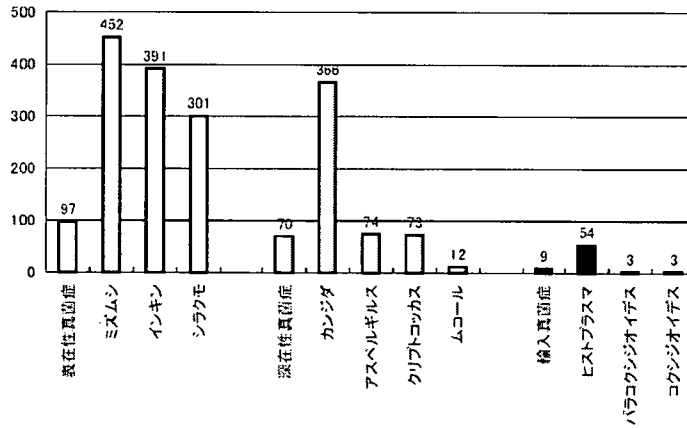


図3. 情報入手経路

	医師	看護師	その他の医療者	患者同士	友人	医学雑誌	テレビ	インターネット
全体 468人	141 (30.1)	22 (4.7)	28 (6.0)	9 (2.0)	36 (7.7)	130 (27.8)	103 (22.0)	51 (10.9)
深在性真菌症 70人	39 (55.7)	8 (11.4)	10 (14.3)	0 (0.0)	7 (10.0)	37 (52.9)	20 (28.6)	12 (17.1)
輸入真菌症 9人	4 (44.4)	0 (0.0)	4 (44.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (33.3)	1 (11.1)	0 (0.0)
ヒストプラズマ 54人	22 (40.7)	3 (5.6)	7 (13.0)	1 (1.9)	6 (11.1)	16 (29.6)	22 (40.7)	10 (18.5)

( )内はパーセンテージ

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

抗真菌薬シーズの開拓と *Penicillium marneffeii* 定量的検出と種内多様性の解析

分担研究者 杉田 隆 明治薬科大学微生物学教室

研究要旨

新規な抗真菌薬の開発を目指して、きのこおよび海生菌の代謝産物からシードなる化合物の探索を試みた。440 サンプル中 4 サンプルから、*Candida albicans* および *Cryptococcus neoformans* の両菌種に抗真菌活性を見出した。また、単独では抗真菌作用を示さないが、フルコナゾールとの併用で、アゾール耐性株に相乗的な増殖抑制効果を示すエキスも見出した。

輸入真菌感染症の一つであるマルネッフィ型ペニシリウム症の起因菌である *Penicillium marneffeii* の定量的検出と種内多様性を検討した。TaqMan probe を用いた real time PCR 検出系を開発した。定量限界は  $10^1$  copy であったことから、実際の臨床材料を用いての定量的な検出が期待できる。世界規模での分子疫学調査を行うツールとして rRNA 遺伝子中の IGS(intergenic spacer)領域の塩基配列を決定した。複数の反復配列を有しており、分子疫学調査に応用できる可能性が考えられた。

A. 研究目的

現在、上市されている抗真菌薬は抗細菌薬や抗ウイルス薬に比べればその数は格段に少ない。また、ヒトと同じ真核細胞であるため選択毒性となる作用機序も限られる。そこで新たな抗真菌薬シードをきのこおよび海生菌の代謝産物に求めた。

また、昨年度は起因菌はヒストプラズマ症の起因菌 *Histoplasma capsulatum* の定量的検出系を構築した

が、本年度は輸入真菌症の一つであるマルネッフィ型ペニシリウム症を選びその起因菌である *Penicillium marneffeii* の定量的検出と種内多様性の解析も合わせて行った。

B. 研究方法

1) エキスの作製と抗真菌活性

きのこは粉状に、海生菌は培養ろ液を調整した。クロロホルム、酢酸エチルおよびメタノールの3溶媒を用い

て分画した。調整されたエキスの抗真菌活性を *Candida albicans* および *Cryptococcus neoformans* 株を用いて評価した。また、アゾール耐性株を用いて、アゾール薬とエキス成分との相乗効果も併せて評価した。

## 2) *Penicillium marneffei*

a. 定量的検出系の構築：rRNA 遺伝子の IGS (intergenic spacer region) 上に *Penicillium marneffei* 特異的な primer および TaqMan probe を設計した。PCR 増幅された IGS 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。

b. 種内多様性の解析：オランダの菌株保存機関である CBS より *Penicillium marneffei* を入手した。また、タイ人患者の血液より分離された *Penicillium marneffei* を含めた合計 50 株の rRNA 遺伝子中の IGS 領域を解析した。なお、DNA は本研究班の分担研究者である 榎村浩一先生に調製して頂いた。

## C. 研究結果

### 1. 抗真菌活性物質の探索

a. エキスの評価：440 サンプル中、4 サンプルに *C. albicans* および *C. neoformans* の両菌種に抗真菌活性が認められた。コントロール(溶媒群)に対する増殖阻害率を図 1 に示した。いずれのエキスも濃度異存的に両菌種の増殖を阻害し、かつその作用は致死的であった(図 2)。

b. アゾール薬との相乗効果：フルコナ

ゾールを 8、4、2、1 mcg/mL となるようにエキスに加え、アゾール薬耐性 *C. albicans* に対する増殖抑制効果を図 2 に示す。2 mcg/mL のフルコナゾールの添加で相乗効果が示された。なお供試株の薬剤感受性は、フルコナゾール、イトラコナゾールおよびボリコナゾールに対してそれぞれ、 $>32$ 、 $>8$ 、8 mcg/mL である。

### 2. *Penicillium marneffei* 定量検出系の構築

IGS 領域から primer/probe を設計した(図 3)。 $10^1$ – $10^8$  では  $r^2=0.999$  の直線的な検量線が作成された(図 4)。

b. 種内多様性の解析：6 プライマーで IGS の全長の塩基配列が決定された。約 2200bp であり、複数の反復配列が見出された(図 5)。詳細な疫学的見地からの多様性解析は次年度に行う予定である。

## D. 考察

創薬にはまず有用なシードを見出すことが基本である。放線菌はこれまでに多くの抗生物質のシーズを提供してくれた。新規化合物部の探索のために、あまり検討されていないきのこや海生菌に着目した。この代謝産物から約 1%の確率で子囊菌と担子菌の両方に抗真菌活性を有するエキス分画を見出した。広域の抗真菌スペクトルが期待できるが、構造決定は次年度の課題である。一方でアゾール薬はその広域性と安全性の点から最も汎用されている抗真菌薬である。しかしながら近年では耐性株の出現もまた問題と