

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」班
分担研究報告書

臨床検体から分離される *Candida* 主要 4 菌種 (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*,
Candida glabrata, *Candida tropicalis*) の簡便な同定方法の確立

順天堂大学医学部 感染制御科学・細菌学 准教授
研究分担者 菊池 賢

研究要旨: 深在性真菌症として頻度の高いカンジダ症の起因菌のほとんどを占める *Candida* 主要 4 菌種 (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*) の CHROMagar *Candida* と血液寒天を組み合わせた簡便な同定方法を確立した。CHROMagar *Candida* で区別がしにくい *C. parapsilosis*, *C. glabrata* は血液寒天上での増殖がほとんど認められない *C. glabrata* と増殖が良好な *C. parapsilosis* で明瞭に区別できた。近年、微生物検査の採算性の問題から、病院で微生物検査室を廃止、外部委託するケースが進んでおり、真菌の同定検査自体が実施されなくなっている。このことは臨床現場での深在性真菌症の診断・治療に支障をきたすばかりでなく、本研究班の大きな目的でもある国内の深在性真菌症の発生動向調査や抗真菌薬感受性調査などの疫学解析にも大きな影響を及ぼす。今回開発した新しい方法は、特殊な機器・試薬などを必要とせず、検査室が常用する培地のみを用い、非常に簡便で判定が容易であり、しかも費用が極めて廉価であることから、今後の真菌の簡易同定に広く応用可能であり、臨床現場への迅速な結果フィードバックはもとより、大規模疫学調査などにも寄与できるものとして、期待できる。

A. 研究目的

近年、様々な医療技術の進歩により、免疫不全患者の日和見感染症は増加の一步を辿っている。その代表の深在性真菌症は細菌感染症に比べ、治療薬が少なく、また、相手が我々と同じ真核生物であることから、診断・治療が中々困難である。深在性真菌症の中でも日常遭遇する機会の最も多いのがカンジダ症であり、その起因菌としては *Candida* 主要 4 菌種 (*Candida albicans*, *Candida*

parapsilosis, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*) で 90%以上を占める。我々が 2000 年から 2001 年に行った国内 17 施設の 1 年間の前向き調査でも、188 例のカンジダ血症の分離菌のうち、上記の 4 菌種が 95%を占めていた (図 1)。また、*C. glabrata* は fluconazole への有効性が良くなく、*C. parapsilosis* に対する micafungin の抗菌活性が劣るなど、4 菌種の同定は抗真菌薬選択に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。一

方で、医療費削減の大方針の下、微生物検査は採算性の問題から、病院で微生物検査室を廃止したり、外部委託するケースが進んでいる。手間がかかる上に採算性も良くない真菌の同定検査は最早、多くの病院で実施されなくなっている。例えば一部の施設では、従来、菌種名で報告が出ていた同定結果が Yeast-like fungi や *Candida* sp. などと報告されるようになってきている。また、検査の外部委託により、検査結果報告がこれまで以上に時間がかかるようになり、早期治療が必要な深在性真菌症の診療上にも支障をきたすおそれが出ている。このため、余分な費用をかけず、迅速に簡便に深在性真菌症として頻度の高い菌種の同定方法が強く求められている。

CHROMagar *Candida* は酵素反応基質を含む真菌選択培地であり、*C. albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* の3菌種が発育コロニーの性状と色により、明瞭に区別できるため、臨床検体からの真菌の選択分離と同時に *Candida* 属の簡易同定に微生物検査室に広く普及している。しかし、この培地では *Candida* 主要4菌種のうち、2番目、3番目に分離頻度の高い *C. parapsilosis*, *C. glabrata* がどちらも薄ピンク-紫系統の極めて類似したコロニー性状を呈することから、両者の区別は不可能である。この2菌種は前述のように抗真菌薬に対する感受性が異なり、同定結果次第で使用する抗真菌薬が変わる可能性がある。このため、両者を迅速・簡便かつ明確に区別できる同定方法が求められていた。このため、trehalose の利用能を指標にするいくつ

かの *C. glabrata* 簡易同定キットが発売され、臨床現場でも用いられている。しかし、これらのキットは価格が高く、また、それ程使用頻度がない在庫を抱える問題もあり、現実的にこの検査室でも使用できるものとは言い難かった。無論、PCRなどの技術を用いて、迅速診断を行うことは可能であるが、機器、手間、費用の問題がある。

私はたまたま、本研究班で昨年度から続けている我が国における深在性真菌症由来菌株のカルチャーコレクション構築において、全国から寄せられた菌株の保存・同定を行っている際に、偶然、*C. glabrata* がヒツジ血液寒天平板上でほとんど発育しないことを見いだした。このような性質を持つ真菌はヒトに病原性を示す酵母様真菌の中では、同菌に限られていた。このため、検査室にほお普及している CHROMagar *Candida* と微生物検査室ならどこでも常用している血液寒天平板、真菌培養によく用いられるサブローデキストロース寒天平板の3種を組み合わせれば、*Candida* 主要4菌種と *C. krusei* の5菌種が簡便に同定できるものと考え、検討を行った。

B. 研究方法

基準株及び26S rRNA gene D1/D2 region のDNA sequenceにより菌種同定を行った CHROMagar 上で淡ピンク-紫を示すヒト感染症の起因菌として知られる *Candida* 8菌種 (*C. parapsilosis* group - *C. parapsilosis* 34株, *C. metapsilosis* 5株, *C. orhtopsilosis* 2株, 及び *C. lusitaneae* (*Clavispora lusitaniae*) 4

株, *C. guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*) 3株, *C. utilis* (*Pichia jadinii*) 1株, *C. pelliculosa* (*Pichia anomala*) 1株, *C. glabrata* 46株)と *C. parapsilosis* 近縁の *Lodderomyces elongisporus* 5株の計 101株を用いた。培地には微生物検査室で通常の臨床検体の分離培養に汎用されている血液寒天平板生培地 7種類 (トリブチケースソイ 5% ヒツジ血液寒天-BD, ヒツジ血液寒天 (M)-BD, 5血液寒天培地 (ウマ) -極東製薬、血液寒天培地 (ヒツジ) -極東製薬、ポアメディア羊血液寒天培地-栄研化学、ニッスイプレート羊血液寒天培地-日水製薬、緬羊血液寒天培地-コージンバイオ)、CHROMagar Candida (関東科学)、サブローデキストロース寒天 (コージンバイオ) を用いた。

各菌株は滅菌生理食塩水中で MacFarland 1.0 の菌液を作成し、滅菌綿棒で各培地に分画接種した。37°C、好気培養を行い、24 時間後に増殖の有無を判定した。血液寒天での増殖性はサブローデキストロース寒天上の発育と比較し、血液寒天上での増殖が認められないか明らかに不良な場合 (コロニーサイズが 0.1 mm 以下) に陰性、ほぼ同等ないし血液寒天上でより良好な発育を認めるものを陽性とした。

また、臨床検体から直接 CHROMagar Candida 上で分離培養 (37°C、24時間) されたピンク-紫色のコロニーについて、血液寒天上での増殖性で *C. glabrata*, *C. parapsilosis* の簡易同定を行い、遺伝子同定結果との比較を行った (図2)。

C. 研究結果

表 1 に今回使用した血液寒天の組成を示す。A 社 2 製品、B 社 2 製品、C 社、E 社の 6 製品はカゼインペプトンとソイペプトンを主な栄養源とするトリブチックソイベース、D 社はウシ心臓抽出液を栄養源とするハートインフュージョンベースである。トリブチックソイベース血液寒天の間には B 社製品に用いられている内容不明の「発育因子」以外には大きな構成成分の差は認められない。

図 3 に血液寒天、サブローデキストロース寒天、CHROMagar Candida 上での代表的な各菌株の増殖を示す。*C. glabrata* 以外の菌種はいずれの培地上で良好な発育が認められるが、*C. glabrata* だけは血液寒天上での発育が認められない。

表 2 に試験した 7 種類の血液寒天上での試験 101 株の発育性を示す。どの血液寒天でも *C. glabrata* すべての株で血液寒天上での発育性は陰性と判定されたが、A 社のウマ血液寒天、C 社のヒツジ血液寒天では *C. glabrata* の若干の発育を認めた。しかし、サブローデキストロース、CHROMagar Candida での発育に比して、血液寒天上での発育性はかなり劣っており、他の菌種の発育性とは明瞭に区別可能であった。このように、明確に *C. glabrata* と CHROMagar Candida 上で同じ系統の色のコロニー性状を示す他菌種との判別が可能であることから、図 2 に示したように、CHROMagar Candida を臨床検体の真菌初代分離培養に用い、得られたピンク-紫系統のコロニー 39 株について、血液寒天での発育性と 26S rRNA D1/D2 region sequence による菌種同定との比較を行っ

た。血液寒天での発育性から *C. glabrata* と同定された 27 株は全て、遺伝子同定で同菌であることが確認され、結果は 100% 一致していた。血液寒天に良好な発育を示した株はすべて *C. parapsilosis* であった。

D. 考察

CHROMagar Candida は臨床検体から直接、各種真菌を分離培養でき、かつ酵素反応による発色に基づき、*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* の 3 菌種の簡易同定が同時にできることから、微生物検査室に急速に広く普及した。しかし、ヒト感染症から分離される頻度が高く、抗真菌薬に対する感受性の異なる *C. glabrata*, *C. parapsilosis* の鑑別が困難であった。今回検討した血液寒天を CHROMagar Candida に組み合わせる培養方法は、この欠点を補い、臨床現場で遭遇する頻度の高い主要な *Candida* 5 菌種はすべて同定可能となった。この方法には微生物検査室ならどこでも汎用している安価な血液寒天とサブローデキストロース寒天があれば良く、非常に簡便で設備投資も不要である。使用する血液寒天はトリブチックソイベースでもハートインヒュージョンベースでも可能であるが、種類によっては若干の発育を認めるものがあることから、予め、精度管理に使用可能な陽性コントロール、陰性コントロール株で発育性を確認することが望ましいと思われた。また、添加血液としてはウマ血液よりもヒツジ血液の方が良いことがわかった。CHROMagar Candida 上でピンク-紫系統の色を示す菌種は多く、今

回の結果でも *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* などの *C. glabrata* 以外の菌種は今回の方法では区別できない。但し、臨床検体から *C. parapsilosis* 以外の上記菌種が検出されることは比較的稀であり、検査室の日常業務では「*C. parapsilosis* 疑い」として報告を行い、血液、無菌部位などの分離株については同定キットや遺伝子同定などを考慮すれば良いと思われる。実際、臨床検体からランダムに得られた 39 株では *C. glabrata*, *C. parapsilosis* 以外の菌種は分離されなかった。これらの結果を踏まえ、現在、7 箇所が多施設検討を開始しており(資料 1)、臨床現場での有用性について、次なる課題としておきたい。

近年、医療技術の進歩により、深在性真菌症のリスクを抱える患者はどんどん増加している。その一方で、感染症の迅速な対応に不可欠な微生物検査の外部委託が押し進められ、採算性の良くない微生物検査室を廃止してしまう病院も少なくない。真菌検査は専門家が少なく、対応に苦慮することが少なくない。簡便で費用をかけず、確実に迅速に臨床で問題となる頻度の高い真菌の同定方法が望まれる所以である。また、世界的に見ても抗生物質のみならず抗真菌薬の開発は頭打ちであり、耐性菌を含めた深在性真菌症の疫学を正確に把握することは、本研究班の役割としても非常に重要である。今回、開発した真菌同定方法は、本研究班の活動を通じて、大きく深在性真菌症の診断・治療に貢献できるものと考えられた。

E. 結論

深在性真菌症として頻度の高いカンジダ症の起因菌のほとんどを占める *Candida* 主要 4 菌種 (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*) の CHROMagar *Candida* と血液寒天を組み合わせる簡便な同定方法を確立した。*C. parapsilosis*, *C. glabrata* は血液寒天上での発育性の差により、明瞭に区別可能であった。今回開発した新しい方法は、特殊な機器・試薬などを必要とせず、検査室が常用する培地のみを用い、非常に簡便で判定が容易であり、しかも費用が極めて廉価であることから、今後の真菌の簡易同定に広く応用可能であり、臨床現場への応用はもとより、大規模疫学調査などにも寄与できる本研究班の大いなる成果として、期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1) 論文発表:

1. Kikuchi K, Sugita T, Makimura K, Urata K, Someya T, Sasaki T, Kamei K, Niimi M, Hiramatsu K, Uehara Y. Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? *Microbiol Immunol* 52: 455-459, 2008
2. 柴田 明佳、金子 孝昌、横村 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 日本医真菌学雑誌 49: 33-38, 2008

3. 菊池 賢: 外因性感染を起こす *Candida*. LAL 2008 <http://www.seikagakubb.co.jp/lalweb/topics/topics13.html> (web 版)
4. 菊池 賢: 洞窟関連ヒストプラズマ症について. *Caving Journal* 33: 37-39, 2008
- 2) 学会発表:
 1. 菊池 賢 臨床上に重要な細菌の知識- 真菌 第 6 回長野県病院薬剤師会薬剤師専門講座講演 松本市 2008.
 2. 菊池 賢、佐々木 崇、上原由紀、大串大輔、廣瀧慎太郎、清水健一郎、大塚正之、小野由可、野竹重幸、平松啓一. 我が国の血流感染分離 *Candida* 主要 4 菌種の遺伝的多様性 第 82 回日本細菌学会総会 名古屋市 2009.
 3. 柴崎澄枝、彦坂恵子、安中めぐみ、樋口浩、安達桂子、石川貴敏、増田義重、上原由紀、菊池 賢、稲松孝思 上顎洞膿瘍から *Pseudallescheria boydii* が検出された 1 症例 第 20 回日本臨床微生物学会総会 仙台市 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. 2000-2001年に我が国17病院で分離された真菌血症由来 *Candida* 188株の内訳

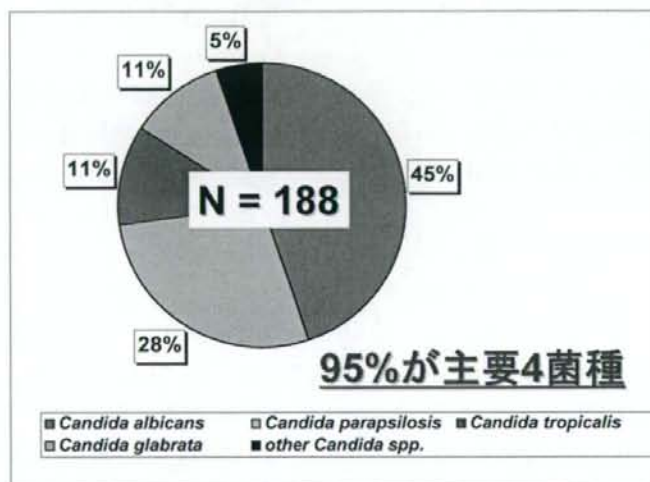


図2. CHROMagar Candidaと血液寒天を用いた *Candida* 簡易同定方法

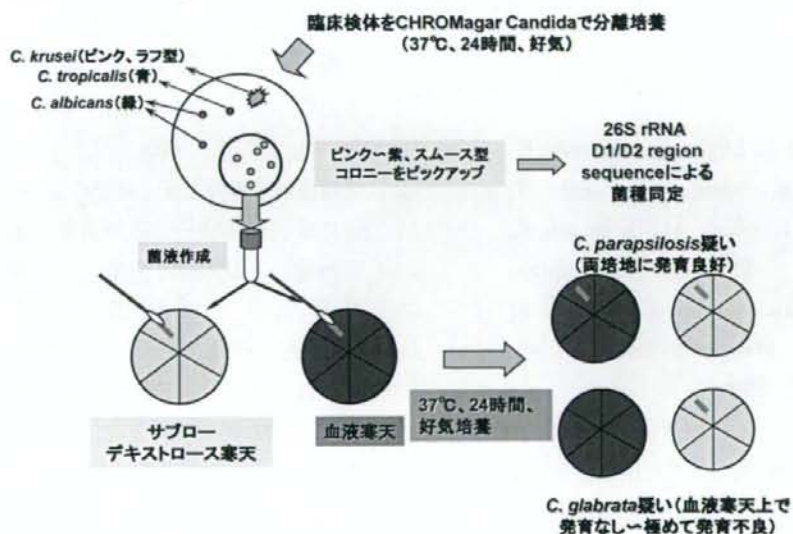


図3. CHROMagar Candida上で淡ピンク〜紫コロニー
を示す *Candida* の血液寒天上での発育

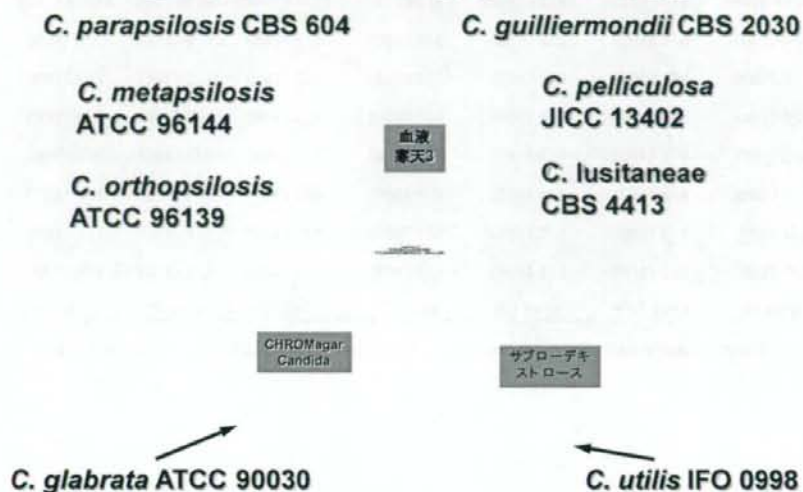


表1. 使用血液寒天平板培地の組成表

成分	血液寒天の種類						
	1 (A社)	2 (A社)	3 (B社)	4 (B社)	5 (C社)	6 (D社)	7 (E社)
ベース	トリブチックソイ	トリブチックソイ	トリブチックソイ	トリブチックソイ	トリブチックソイ	ハート	トリブチックソイ
血液	5%ヒツジ	5%ウマ	5%ヒツジ	5%ヒツジ	5%ヒツジ	5%ヒツジ	5%ヒツジ
ウシ心臓抽出液						500 g	
カゼインペプトン	15.0 g	15.0 g	14.5 g	14.5 g	13.0 g	10.0 g	10.0 g
ソイペプトン	5.0 g	5.0 g	5.0 g	5.0 g	5.0 g		
NaCl	5.0 g	5.0 g	5.0 g	5.0 g	5.0 g	5.0 g	5.0 g
発育因子			1.5 g	1.5 g			
寒天	15.0 g	15.0 g	14.0 g	14.0 g	15.0 g	15.0 g	15.0 g

表2. 各種血液寒天平板培地上での各種 *Candida* の発育性

試験菌種	陽性株数/真菌菌株数 (%)						
	1 (A社)	2 (A社)	3 (B社)	4 (B社)	5 (C社)	6 (D社)	7 (E社)
<i>C. parapsilosis</i>	34/34 (100)	34/34 (100)	34/34 (100)	34/34 (100)	34/34 (100)	34/34 (100)	34/34 (100)
<i>C. metapsilosis</i>	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
<i>C. orthopsilosis</i>	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)
<i>L. elongispori</i>	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
<i>C. guilliermii</i>	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)
<i>C. lusitanae</i>	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)
<i>C. utilis</i>	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)
<i>C. pelliculosa</i>	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)
<i>C. glabrata</i>	0/46 (0)	0/46 (0)*	0/46 (0)	0/46 (0)	0/46 (0)*	0/46 (0)	0/46 (0)

*: A社製ウマ血液寒天、C社製ヒツジ血液寒天には他の血液寒天に比して、明らかに良好な増殖を認めるが、サブローデキストロース

表3. 臨床検体から検出されたピンク～紫色のコロニーの菌種同定結果

検体名 (n)	菌種同定結果			
	血液寒天法		26S rRNA sequence	
	<i>C. glabrata</i> ?	<i>parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i> ?	<i>parapsilosis</i>
血液 (9)	1	8	1	8
痰 (11)	9	2	9	2
腔分泌物 (1)	16	2	16	2
尿 (1)	1	0	1	0
総数 (39)	27	12	27	12

資料1

「臨床材料で分離される *Candida* 属の簡
便な同定方法の検討」
実地計画書

順天堂大学医学部 感染制御科学

菊池 賢、大塚正之(江東微生物研究所 兼務)、
小野由可(三井記念病院 検査部 兼務)、野竹重幸
(ミロクメディカル・ラボラトリー 兼務)、平松啓一
順天堂大学医学部附属順天堂医院 臨床検査部

三澤成毅

順天堂大学医学部 臨床検査医学

近藤成美

駿河台日本大学病院 臨床検査部

西山宏幸

亀田総合病院 臨床検査部

戸口明宏、大塚喜人

最終版作成 平成 21 年 1 月 30 日

目次

1. 研究の名称
2. 研究の目的
3. 研究の背景
4. 研究組織構成
5. 本研究に対する研究助成
6. 研究計画、調査・検査項目
7. 成績の評価、発表
8. 参考文献

研究参加施設用研究参加同意書(別紙1)

1. 研究の名称

本研究の名称は「臨床材料で分離される *Candida* 属の簡便な同定方法の検討」とする。

2. 研究の目的

臨床材料から分離される頻度の高い *Candida* 属主要4菌種 (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*) の簡便な同定方法を確立する。

3. 研究の背景

近年、医療技術の進歩とともに、いわゆる弱毒微生物による感染症が大きな問題となっている。中でも深在性真菌症は診断が困難で治療が限られ、臨床現場で苦慮することが少なくない。深在性真菌症の起原因菌として頻度の最も高い *Candida* 症の起原因菌はほとんどが主要4菌種 (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*) で占められる。これらは菌種によって抗真菌薬の感受性が異なり、治療選択に影響を及ぼすことから、微生物検査室での正確な同定が求められるようになってきた。

このため、*Candida* 属の簡易同定を兼ねながら臨床検体から真菌を選択培養する CHROMagar *Candida* が広く検査室では用いられている。CHROMagar *Candida* は発色酵素基質(成分未公表)を数種類組み合わせることで、それぞれの菌種の生化学的性状の違いをコロニーの色で判別できるユニークな培地で、*C. albicans*(緑)、*C. tropicalis*(青)、*Candida krusei*(ピンク、ラフ型コロニー)を明確に区別できる。しかし、主要4菌種のうち、*C. parapsilosis*, *C. glabrata* については淡いピンク〜紫系統の類似したコロニーを示し、両者の判別は困難である。*C. glabrata* は fluconazole などの azole 系抗真菌薬に、また、*C. parapsilosis* は micafungin などの candidin 系抗真菌薬に、それぞれ低感受性を示すことがあり、臨床現場では抗真菌薬の選択に影響することから、この2菌種の同定は重要である。生化学的性状を用いた *Candida* 属同定キットは各種発売されているが、価格、労力の点から現実的に日常業務に使用される状況にはない。*Candida glabrata* は微生物検査室の日常業務に一番使用されている血液寒天培地に他の *Candida* と違ってほとんど生えない。このため、CHROMagar *Candida* と血液寒天の組み合わせで一般の微生物検査室どこでも *Candida* 主要4菌種を鑑別できる可能性が高い。本研究では CHROMagar *Candida* で分離された *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* 以外の *Candida* について、その有用性について検証する。

4. 研究組織構成

「臨床材料で分離される *Candida* 属の簡便な同定フローチャートの検討」は、順天堂大学感染制御科学 准教授 菊池 賢を研究班長とし、実務を同大 感染制御科学 大塚正之、小野由可、野竹重幸、同大 医学部附属順天堂医院臨床検査部 三澤成毅、同大医学部臨床検査医学 近藤成美、駿河台日本大学病院 臨床検査部 西山宏幸、亀田総合病院 臨床検査部 戸口明宏、大塚喜人らが担当する。各参加施設は所属する医療機関の了承を得た上で、研究代表者と実務担当者(兼務可能)を任命し、研究班参加同意書(別紙1)を研究班長まで提出する。

5. 本研究に対する研究助成

本研究は平成 20-21 年度 厚生労働省 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」(主任研究者 国立感染症研究所 新見昌一、分担研究者 順天堂大学 菊池 賢)の研究助成を受けて行う。

6. 研究計画、調査・検査項目、倫理への配慮

本研究は、臨床分離真菌株を用いた前向き検討(prospective study)である。

- 1) 血液培養以外の検体由来株の検討(尿、口腔、各種カテーテル、腔分泌物など)―各施設の臨床検査の過程(検体の種類は問わない。血液培養については、迅速報告を考慮して別プロトコールとする。)で CHROMagar *Candida* 上で分離された緑(*C. albicans*)、青コロニー(*C. tropicalis*)ないしピンクのラフ型コロニー(*C. krusei*)以外の淡いピンク～紫色を呈するコロニー(*C. parapsilosis* と *C. glabrata* が大半を占めると想定される)について、生理食塩水で MacFarland No. 1.0 の菌液を作製する。これを 1 エーゼ、5%ヒツジ血液加 TSA II 寒天培地、サブロー・デキストロース寒天培地に画線し、24 時間、37°C、好気条件で培養する。それぞれの菌株は順天堂大学医学部感染制御科学で ITS1-26S rRNA sequence による菌種名の確定を行う。サブロー・デキストロース寒天培地上では良好な発育を示すが、血液寒天培地上にほとんど発育の認められないものを *C. glabrata* と判断し、遺伝子同定方法との一致率、感度、特異度を検証する。また、両方の寒天培地に良好な発育を認めた菌のうち、*C. parapsilosis* である比率がどの程度であるか、確認する。解析株は全体で 400 株とする。
- 2) 血液培養由来株の検討―血液培養陽性検体で、培養ボトルのグラム染色にて酵母が確認されたものは、CHROMagar *Candida*、5%ヒツジ血液加 TSA II

寒天培地、サブロー・デキストロース寒天培地に、24 時間、37°C、好気条件で分離培養する。CHROMagar Candida 上で緑 (*C. albicans*)、青コロニー (*C. tropicalis*) ないしピンクのラフ型コロニー (*C. krusei*) 以外の淡いピンク〜紫色を呈するコロニー (*C. parapsilosis* と *C. glabrata* が大半を占めると想定される) を呈し、サブロー・デキストロース寒天培地上では良好な発育を示すが、血液寒天培地上にほとんど発育の認められないものを *C. glabrata* と判断し、遺伝子同定方法との一致率、感度、特異度を検証する。

3) 血液寒天上での発育性は

良好発育: *C. parapsilosis* CBS 604 (=ATCC 22019)

不良発育: *C. glabrata* ATCC 90030 を内部コントロールとする。

コントロール株を保有していない施設には順天堂大学感染制御科学から送付する。

尚、培地については、下記のことを研究班から供給する。各施設はそれぞれの必要培地枚数、コントロール株送付必要の有無を別紙 3 の供給品発注書に記入の上、ファックスないしメールで研究代表者まで連絡する。

菌株は、ある程度、まとまった本数が出た所で、研究代表者宛に着払い宅急便(常温)にて送付する。

CHROMagar Candida 生培地(関東化学)

血液寒天: 5%ヒツジ血液加トリプチケース・ソイ II 寒天培地(日本 BD)

サブロー・デキストロース寒天生培地(関東化学)

サブロー・デキストロース寒天斜面培地(関東化学)

その他、実験に必要な物品は研究班長より各施設に現物で供給する。

順天堂大学医学部感染制御科学での遺伝子同定結果については、各施設に速やかに報告される。研究実施期間は 2009 年 2 月 1 日より約 1 年間を予定する。

本研究は検査室で分離された菌株を対象としており、検体の由来する患者情報は一切、使用しない。このため、発表された研究内容から個人が特定されることはありえない。

7. 成績の評価、発表

成績はしかるべき学会で発表し、英文医学雑誌へ投稿する。

8. 参考文献

- 1) Marks ML, O'Toole E. Laboratory identification of *Torulopsis glabrata*: typical appearance on routine bacteriological media. *Appl. Microbiol.* 1970. 19: 184-185.
- 2) Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 1997. 35: 1216-1223.
- 3) Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 1994. 32: 1923-1929.

「臨床材料で分離される *Candida* 属の簡便な同定方法の検討」
研究参加同意書

平成 年 月 日

「臨床材料で分離される *Candida* 属の簡便な同定方法の検討」参加に同意します。

(研究班長: 順天堂大学感染制御科学 准教授 菊池 賢)

施設名:

責任者所属・職名:

責任者名: 印

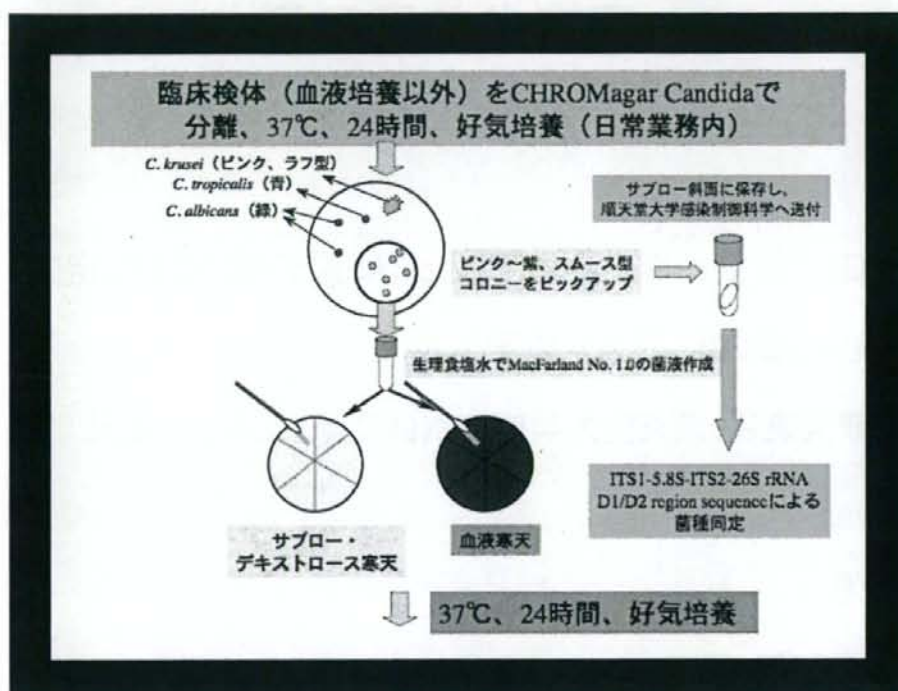
研究代表者名:

研究実務担当者名:

検査結果報告方法: 郵送 ファックス E-mail

検査報告宛先:

プロトコール図示

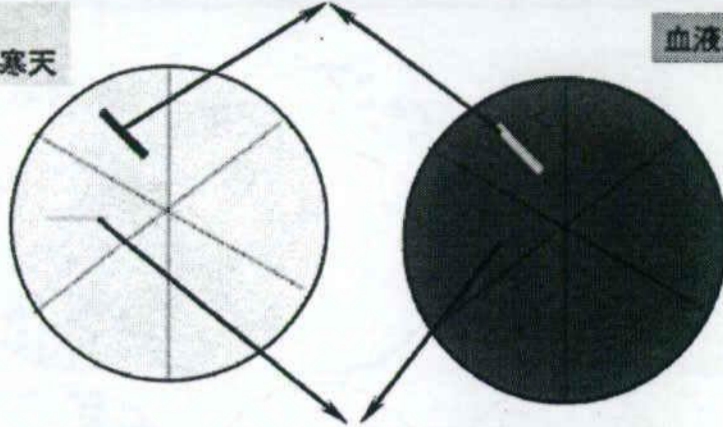


判定方法

C. parapsilosis 疑い (両培地に発育良好)

サブロー・
デキストロース寒天

血液寒天

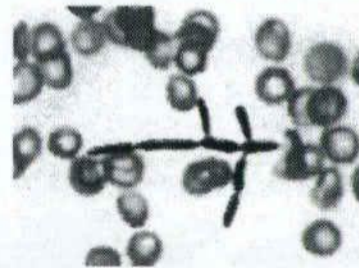


C. glabrata 疑い (血液寒天上で
発育なし~極めて発育不良)

遺伝子同定された菌種名と比較し、感度、特異度などを検証

血液培養陽性検体のグラム染色で酵母陽性検出 (日常業務内)

CHROMagar Candida,
サブロー・デキストロース寒天,
血液寒天で分離培養



CHROMagar
Candida

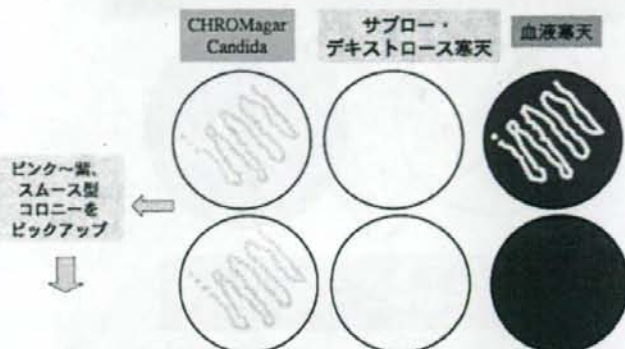
サブロー・
デキストロース寒天

血液寒天

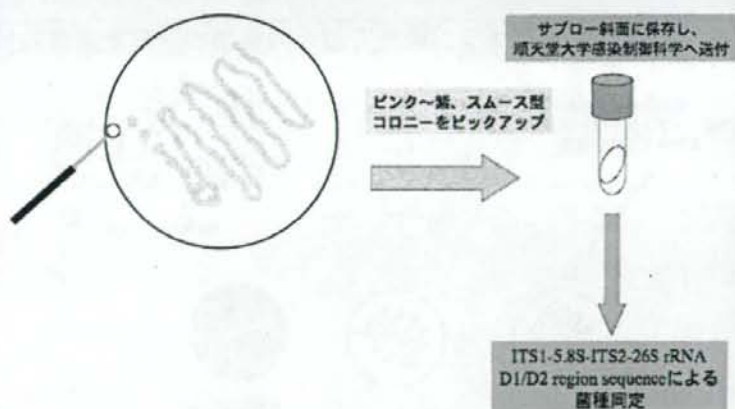
37°C、24時間、好気培養

判定方法

C. parapsilosis 疑い (いずれの培地にも発育良好でCHROMagar上でピンク～紫のコロニー形成)



C. glabrata 疑い (CHROMagar上でピンク～紫のコロニーを呈するが、血液寒天上で発育なし～極めて発育不良)



遺伝子同定された菌種名と比較し、感度、特異度などを検証

供給品発注用紙

順天堂大学医学部感染制御科学 菊池

FAX: 03-5684-7830

or E-mail: kikuti@jutendo.ac.jp

発注日時： 希望配達日：

発注者：

送付先機関名：

- 1) CHROMagar *Candida* 生培地 枚
- 2) TSA II/5%ヒツジ血液寒天培地 枚
- 3) サブロー・デキトロース寒天培地 枚
- 4) サブロー・デキトロース寒天斜面培地 本
- 5) *Candida parapsilosis* CBS 604 送付 要・不要
- 6) *Candida glabrata* ATCC 90030 送付 要・不要
- 7) その他

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

研究分担者 横村 浩一 帝京大学医真菌研究センター 准教授

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系統解析と新種記載の蓄積に基づいた分離同定を欠かすことはできない。また、その迅速診断のためには至適化された簡易遺伝子抽出系と、遺伝子同定系の持続的な開発が必須である。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」のための系統解析と新種記載として、分担研究者が行った「ヒト臨床検体より分離された新規カンジダ属酵母の記載」、「動物園飼育下における輸入真菌症起因菌保菌動物から分離された新種酵母の記載」および、遺伝子診断関連技術の解析として、「市販簡易遺伝子抽出キットの病原糸状菌を用いた評価とその応用」、「葉緑体を持たない病原藻類:プロトテカに対する遺伝子同定法の開発」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 ヒト臨床検体より分離された新規カンジダ属酵母の記載

A. 研究目的

真菌症は免疫力の低下した患者にとって重篤な症状を起こす病害である。そのため、免疫力の低下した患者における微生物叢とその薬剤耐性を定期的に把握する必要がある。我々は外来患者の外耳道から新規 *Candida* 属酵母を得たので報告する。

B. 研究方法

国内病院での外来患者の外耳道から綿棒

で掻き採ったスマアを分離源とした。純粋分離菌株の 26S rDNA D1/D2 領域 (26S) および ITS1+5.8S rDNA+ITS2 領域 (ITS) を用いた分子系統分類を行った。そのほかの試験項目は The Yeasts 4th ed に準じた。

C. 結果

純粋分離菌 JCM15448 株は 26S の相同性が *Candida haemulonii* CBS5149^T とは 85.7%、*C. pseudohaemulonii* CBS10099^T とは 83.0%であった。ITS はそれぞれ 84.9、81.4%であり、系統樹では *Candida* 属に分類されたが同一な種は認められなかった。本菌株は 42℃およびビタミンフリー培地