

- Takayanagi N, Nakamura S, Inoue Y, Higashiyama Y, Fukushima K, Ishida T, Sawai T, Yoshimura K, Nakahama C, Omichi M, Kakukawa T, Nishioka Y, Aoki N, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K: Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* antigens in sputum from patients with lower respiratory tract infection
2. 13th ICID (クアラルンプール) Kohno S, Inoue M, Ono Y, Jones R, Turnidge J: Multicenter retrospective evaluation of tigecycline clinical pathogens from Japan (2003-2004)
 3. 13th ICID (クアラルンプール) Kohno S, Yanagihara K, Jones R, Castamheira M: Multicenter evaluation of tigecycline: an in vitro upon clinical pathogens from Japan (2006-2007)
 4. 13th ICID (クアラルンプール) Niki Y, Kohno S, Aoki N, Watanabe A, Sato J, Yagisawa M, Hanaki H: Verification of resistance prevalence in bacterial nationwide surveillance conducted by the Japanese Society of Chemotherapy
 5. 17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria (濟州島) Kohno S: Deep-seated mycosis and current topics, Symposium 66b(Mycosis): Opportunistic mycosis
 6. 48th ICAAC Washington DC (ワシントン) Kohno S, Aoki N, Niki Y, Watanabe A, Nagashima M: Dichotomy between in vitro and in vivo: Does azithromycin extended release (AZM-ER) show clinical efficacy in macrolide resistant pneumococcal pneumonia?
 7. 48th ICAAC Washington DC (ワシントン) Yanagihara K, Morinaga Y, Araki N, Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S: In vivo efficacy of sivelestat in combination with pazufloxacin against legionella pneumophila in a murine pneumonia model
 8. 48th ICAAC Washington DC (ワシントン) Yanagihara K, Araki N, Morinaga Y, Nakamura S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S: In vivo efficacy of doripenem (s-4661), a novel carbapenem, against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine chronic respiratory tract infection model
 9. 48th ICAAC Washington DC (ワシントン) Kohno S, Kida H, Mizuguchi M, Shimada J: A double-blind, placebo-controlled study of intravenous peramivir in acute influenza patients
 10. 48th ICAAC Washington DC (ワシントン) Jones R.N, Yanagihara K, Moet G.J, Rhomberg P.R, Kohno S: Tigecycline in vitro susceptibility test accuracy using three methods and USA-FDA interpretive criteria When testing Japanese clinical isolates
 11. 11th WPCCID 2008 (タイペイ) Kohno S: Epidemiology in Asia of invasive fungal infections Symposium 14: Invasive Fungal Infections
 12. 11th WPCCID 2008 (タイペイ) Nakamura S., Yanagihara K., Morinaga Y., Izumikawa K., Seki M., Kakeya H., Yamamoto Y., and Kohno S: In vitro activity of sitafloxacin against *Haemophilus influenzae* including clinical isolates of fluoroquinolone-resistant strains, and comparison of its mutant prevention concentration to levofloxacin, garenoxacin and ciprofloxacin
 13. 第56回 日本化学療法学会西日本支部総会(神戸)河野 茂: Respiratory Year in Review

14. 第57回 日本感染症学会東日本学術集会 第55回 日本化学療法学会東日本支部総会(埼玉) 河野 茂 : 呼吸器感染症の常識と非常識
15. 第38回 生涯教育講演会 日本内科学会九州支部(熊本) 河野 茂 : 外来診療における深在性真菌症のチェックポイント
16. 第56回 日本化学療法学会西日本支部総会(広島) 河野 茂 : 新薬シンポジウム「タゾバクタム/ピペラシリン

ン(YP-18)」 タゾバクタム/ピペラシリンの臨床的位置づけ

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

3. 患者背景因子に関する研究 (2)

研究分担者 河野 茂 長崎大学大学院医歯薬総合研究科 感染免疫学

研究協力者 泉川公一 長崎大学大学院医歯薬総合研究科 感染免疫学

研究要旨 COPDや結核後遺症などの慢性呼吸器疾患を有する患者における難治性感染症の一つである慢性肺アスペルギルス症について、その患者背景因子のひとつとしてinnate immunityの機能に関わる遺伝子群のSNPs解析を行った。長崎大学医学部・歯学部附属病院で診断された5例の慢性肺アスペルギルス症患者のgDNAについて、特にmannose-binding lectinについて検討したところ、コーサカス人では有意なSNPsとして報告されているC868Tは本邦では少ない可能性があり、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症のSNPsであるG1011Aの陽性率が高かった。また、欧米では報告されていないC649TのSNPsを多く認め、コーサカス人と日本人では、遺伝子背景が異なる可能性が示された。

A. 研究目的

COPD等を基礎疾患に有する場合の難治性感染症の一つである肺アスペルギルス症について、宿主の疾患感受性に関する研究は少なく、コーサカス人においては、mannose-binding lectin (MBL)などのinnate immunityに関わる宿主因子の機能不全がその発症と関係するという報告がある。本邦における慢性肺アスペルギルス症の危険因子は、結核後遺症などであり、COPDが中心となるコーサカス人とは異なる。本邦における遺伝子学的な患者背景の解析を行うことが目的である。

B. 研究方法

対象：すでに慢性肺アスペルギルス症と診断されている患者。今後、慢性肺アスペルギルス症と診断された患者に、説明、同意を得る。同意を得られた患者より約3mlの全血採血を行い、gDNAを定法により抽出(一部は-80℃にて保存)。PCRにて、MBL、SP-A、TLR2、TLR4、TLR9、Dectin-1

遺伝子を増幅し、増幅産物のシーケンスを行い、遺伝子多型を欧米の報告と比較検討する。

C. 研究結果

5人の慢性肺アスペルギルス症患者のMBL遺伝子の解析を行った。

SNPs of Mannose-binding lectin (MBL)
Tested samples: gDNA of CPA patients (#1-#5)
Negative control: gDNA of healthy volunteers (5)

	C649T	C868T	G1011A
		CCPA	ABPA
CPA #1	positive	none	positive
CPA #2	positive	none	positive
CPA #3	none	none	none
CPA #4	positive	none	positive
CPA #5	positive	none	positive
HV #1-5	none	none	none

D. 結論と今後の予定

CPA患者のMBL遺伝子解析において、コーサカス人では有意なSNPsとして報告されているC868Tは本邦では少ない可能性がある。一方、ABPAのSNPsである

G1011A の陽性率は高い。また、欧米では報告されていないC649TのSNPsを多く認めた。他の同意取得できているCPA患者における解析を進め、negative control (healthy volunteer)のデータ取りを行う。他の遺伝子についても解析を進める。

E. 健康危険情報
特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kohno S: High mortality in invasive aspergillosis: what we need to know for determination of poor prognosis and next countermeasures. Clin Infect Dis 47: 1185-7, 2008
2. Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S: Pulmonary Cryptococcosis in Late Pregnancy and Review of Published Literature. Mycopathologia, 2008
3. Morinaga Y, Yanagihara K, Nakamura S, Yamamoto K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S: In vivo efficacy and pharmacokinetics of tomopenem (CS-023), a novel carbapenem, against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine chronic respiratory tract infection model. J Antimicrob Chemother 62: 1326-31, 2008
4. Nakamura S, Higashiyama Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Mizuta Y, Kohno S. The

roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. Jpn J Infect Dis 61: 375-8, 2008

5. Tashiro M, Izumikawa K, Yoshioka D, Nakamura S, Kurihara S, Sakamoto N, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mukae H, Hayashi T, Fukushima K, Tashiro T, Kohno S: Lung fibrosis 10 years after cessation of bleomycin therapy. Tohoku J Exp Med 216: 77-80, 2008
6. Yamamoto Y, Shiohita K, Takazono T, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Tashiro T, Otsuka Y, Ohkusu K, Kohno S: An autopsy case of *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis. Intern Med 47: 1437-40, 2008
7. Seki M, Watanabe A, Mikasa K, Kadota J, Kohno S: Revision of the severity rating and classification of hospital-acquired pneumonia in the Japanese Respiratory Society guidelines. Respirology 13: 880-5, 2008
8. Nakamura S, Yanagihara K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Miyazaki Y, Suyama N, Kohno S: Severe pulmonary tuberculosis complicating ileocecal intussusception due to intestinal tuberculosis: a case report. Ann Clin Microbiol Antimicrob 13: 7-16, 2008

9. Izumikawa K, Zhao Y, Motoshima K, Takazono T, Saijo T, Kurihara S, Nakamura S, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Hayashi T, Kohno S: A case of pulmonary cryptococcosis followed by pleuritis in an apparently immunocompetent patient during fluconazole treatment. *Med Mycol*: 9:1-5, 2008
10. Ehara N, Fukushima K, Kakeya H, Mukae H, Akamatsu S, Kageyama A, Saito A, Kohno S: A novel method for rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum and its application in adult respiratory tract infections. *J Med Microbiol* 57: 820-6, 2008
11. Fukushima KY, Yanagihara K, Hirakata Y, Sugahara K, Morinaga Y, Kohno S, Kamihira S: Rapid identification of penicillin and macrolide resistance genes and simultaneous quantification of *Streptococcus pneumoniae* in purulent sputum samples by use of a novel real-time multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 46: 2384-8, 2008
12. Kakeya H, Ehara N, Fukushima K, Seki M, Izumikawa K, Yamamoto Y, Yanagihara K, Saito A, Kohno S: Severe Legionnaires' disease successfully treated using a combination of fluoroquinolone, erythromycin, corticosteroid, and sivelestat. *Intern Med* 47: 773-7, 2008
13. Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Fujimoto K, Mishima K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mizuta Y, Kitaoka T, Kohno S: Reversible visual disturbance due to cryptococcal uveitis in a non-HIV individual. *Med Mycol* 46:367-70, 2008
14. Kihara R, Yanagihara K, Morinaga Y, Araki N, Nakamura S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tsukamoto K, Kamihira S, Kohno S: Potency of SMP-601, a novel carbapenem, in hematogenous murine bronchopneumonia caused by methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2163-8, 2008
15. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S: Gabexate mesilate suppresses influenza pneumonia in mice through inhibition of cytokines. *J Int Med Res* 36: 322-8, 2008
16. Motoshima M, Yanagihara K, Yamamoto K, Morinaga Y, Matsuda J, Sugahara K, Hirakata Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S: Quantitative detection of metallo-beta-lactamase of blaIMP-cluster-producing *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis for rapid diagnosis and treatment of nosocomial infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61: 222-6, 2008

17. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S: Two-dimensional gel electrophoresis analysis in simultaneous influenza pneumonia and bacterial infection in mice. *Clin Exp Immunol* 152:364-71, 2008
18. Hirakata Y, Yanagihara K, Kurihara S, Izumikawa K, Seki M, Miyazaki Y, Kohno S: Comparison of usefulness of plasma procalcitonin and C-reactive protein measurements for estimation of severity in adults with community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61: 170-4, 2008
19. Sawai T, Soda H, Kohno S: *Mycobacterium intracellulare* pulmonary infection which co-existed and mimicked lung cancer. *Intern Med* 47: 459-62, 2008
20. Kakeya H, Miyazaki Y, Senda H, Kobayashi T, Seki M, Izumikawa K, Yanagihara K, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S: Efficacy of SPK-843, a novel polyene antifungal, in comparison with amphotericin B, liposomal amphotericin B, and micafungin against murine pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1868-70, 2008
21. Kakeya H, Miyazaki Y, Senda H, Kobayashi T, Seki M, Izumikawa K, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S: Efficacy of SPK-843, a novel polyene antifungal, in a murine model of systemic cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1871-2, 2008
22. Watanabe A, Yanagihara K, Kohno S, Matsushima T; HAP study group: Multicenter survey on hospital-acquired pneumonia and the clinical efficacy of first-line antibiotics in Japan. *Intern Med* 47: 245-54, 2008
23. Yanagihara K, Morinaga Y, Nakamura S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S: Subinhibitory concentrations of telithromycin, clarithromycin and azithromycin reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 61: 647-50, 2008
24. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S: Elevated levels of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in sera from patients with severe bacterial pneumonia coinfecting with influenza virus. *Scand J Infect Dis* 40: 38-42, 2008
2. 学会発表
1. ATS 2008 (トロント) Kohno S, Izumikawa K, Akamatsu S, Kageyama A, Takayanagi N, Nakamura S, Inoue Y, Higashiyama Y, Fukushima K, Ishida T,

- Sawai T, Yoshimura K, Nakahama C, Omichi M, Kakukawa T, Nishioka Y, Aoki N, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K: Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* antigens in sputum from patients with lower respiratory tract infection
2. 13th ICID (クアラルンプール) Kohno S, Inoue M, Ono Y, Jones R, Turnidge J: Multicenter retrospective evaluation of tigecycline clinical pathogens from Japan (2003-2004)
 3. 13th ICID (クアラルンプール) Kohno S, Yanagihara K, Jones R, Castamheira M: Multicenter evaluation of tigecycline: an in vitro upon clinical pathogens from Japan (2006-2007)
 4. 13th ICID (クアラルンプール) Niki Y, Kohno S, Aoki N, Watanabe A, Sato J, Yagisawa M, Hanaki H: Verification of resistance prevalence in bacterial nationwide surveillance conducted by the Japanese Society of Chemotherapy
 5. 17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria (濟州島) Kohno S: Deep-seated mycosis and current topics, Symposium 66b(Mycosis): Opportunistic mycosis
 6. 48th ICAAC Washington DC (ワシントン) Kohno S, Aoki N, Niki Y, Watanabe A, Nagashima M: Dichotomy between in vitro and in vivo: Does azithromycin extended release (AZM-ER) show clinical efficacy in macrolide resistant pneumococcal pneumonia?
 7. 48th ICAAC Washington DC (ワシントン) Yanagihara K, Morinaga Y, Araki N, Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S: In vivo efficacy of sivelestat in combination with pazufloxacin against legionella pneumophila in a murine pneumonia model
 8. 48th ICAAC Washington DC (ワシントン) Yanagihara K, Araki N, Morinaga Y, Nakamura S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S: In vivo efficacy of doripenem (s-4661), a novel carbapenem, against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine chronic respiratory tract infection model
 9. 48th ICAAC Washington DC (ワシントン) Kohno S, Kida H, Mizuguchi M, Shimada J: A double-blind, placebo-controlled study of intravenous peramivir in acute influenza patients
 10. 48th ICAAC Washington DC (ワシントン) Jones R.N, Yanagihara K, Moet G.J, Rhomberg P.R, Kohno S: Tigecycline in vitro susceptibility test accuracy using three methods and USA-FDA interpretive criteria When testing Japanese clinical isolates
 11. 11th WPCCID 2008 (タイペイ) Kohno S: Epidemiology in Asia of invasive fungal infections Symposium 14: Invasive Fungal Infections
 12. 11th WPCCID 2008 (タイペイ) Nakamura S., Yanagihara K., Morinaga Y., Izumikawa K., Seki M., Kakeya H., Yamamoto Y., and Kohno S: In vitro activity of sitafloxacin against *Haemophilus influenzae* including clinical isolates of fluoroquinolone-resistant strains, and comparison of its mutant prevention concentration to levofloxacin, garenoxacin and ciprofloxacin
 13. 第56回 日本化学療法学会西日本支部総会(神戸)河野 茂: Respiratory Year

in Review

14. 第57回 日本感染症学会東日本学術集会 第55回 日本化学療法学会東日本支部総会(埼玉) 河野 茂 : 呼吸器感染症の常識と非常識
15. 第38回 生涯教育講演会 日本内科学会九州支部(熊本) 河野 茂 : 外来診療における深在性真菌症のチェックポイント
16. 第56回 日本化学療法学会西日本支部総会(広島) 河野 茂 : 新薬シンポジウム「タゾバクタム/ピペラシ

ン(YP-18)」 タゾバクタム/ピペラシリンの臨床的位置づけ

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

4. 改良(1→3)- β -D-グルカン測定法の臨床的評価

分担研究者 二木芳人 昭和大学医学部 臨床感染症学

研究協力者 吉田耕一郎 昭和大学医学部 臨床感染症学

研究要旨 ファンギテック G テスト MK(MK 法)のアルカリ前処理液の改良によって非特異反応出現率が著しく低下する。我々は前処理液改良後の MK 法の検査性能を臨床的に評価した。我々の前任施設である川崎医科大学附属病院で 2003 年 4 月 23 日から 6 月 4 日の期間に β -グルカンが測定された全 121 例から採取された保存血漿 121 検体を材料とした。血漿中の β -グルカン値を改良前後の MK 法で測定し、感度、特異度、positive predictive value(PPV)、negative predictive value (NPV)を求めた。また、各々の receiver operating characteristic (ROC)解析も行った。改良前の MK 法の感度と特異度、および陽性的中率と陰性的中率は 91.7%、85.3%、44.0%、98.8%、改良後は 75.0%、91.6%、52.9%、96.7%であった。改良前の AUC は 0.9175、改良後の AUC は 0.9123 であり、改良後の AUC が改良前に比して僅かに縮小していたが統計学的有意差は認めなかった。従来、MK 法は本邦の他の β -グルカン測定キットよりも高い感度を有していると評価されてきた。今回の前処理液改良により、問題であった特異度も大きく改善され、従来法に比して新 MK 法の臨床的有用性はさらに高くなった。

A. 研究目的

近年、免疫不全宿主の増加に伴い侵襲性真菌感染症の臨床的重要性は高まりつつある。早期に確定診断を得ることが困難な症例が多いため、わが国では血清診断法を補助的に用いて、早期診断に結びつける努力が行われてきた。(1→3)- β -D-グルカン(β -グルカン)測定法は 1995 年に生化学工業㈱が開発した侵襲性真菌感染症の体外診断薬であり、本邦の日常臨床で広く用いられてきた。本邦では 5 種類のキットが商品化されたが、現在臨床に应用可能なキットはファンギテック®G テスト MK(MK 法)、 β -グルカンテストワコー、 β -グルカンテストマルハの 3 種である。

我々はこれまでに MK 法の検体アルカリ前処理で生じる非特異反応による偽陽性に

着目し検討を重ねてきた。その結果、従来のアルカリ前処理液の成分構成や分量を一部変更した改良アルカリ前処理液で検体を処理した後、 β -グルカンを測定することにより非特異反応出現を著しく減少させることに成功し、2005 年 7 月以降、この改良アルカリ前処理液が MK 法に採用されている。

今回、この新 MK 法の臨床的有用性を明らかにする目的で、アルカリ処理液改良前後のキットで臨床検体中の β -グルカン値を測定し臨床背景などを比較検討した。

B. 研究方法

1. 対象患者と検体

川崎医科大学附属病院で 2003 年 4 月 23 日から 6 月 4 日の期間に、深在性真菌症疑い、または治療経過観察目的で β -グルカン

が測定された 121 例から採取された保存血漿 121 検体を材料とした。

2. 深在性真菌症の診断分類

深在性真菌症の診断・治療ガイドラインに準じて、 β -グルカン測定用採血が行われていた時点で、症例毎に深在性真菌症の有無を後ろ向きに評価し、確定診断例、臨床診断例、疑診例、否定例、不明例の 5 つの診断カテゴリーに分類した。複数回採血が行われていた症例では改良前 MK 法の測定値が最高値をとった日を評価ポイントとし、1 症例 1 ポイントの評価とした。各カテゴリーに分類した日に採取された血漿中の β -グルカン値を改良前後の MK 法で測定し、感度、特異度、positive predictive value (PPV)、negative predictive value (NPV) を求めた。また、各々の receiver operating characteristic (ROC) 解析も施行した。各診断カテゴリーの分類基準は、以下の通りに定義した。

- ① 確定診断例: 臨床経過が深在性真菌症として合致し、無菌検体で真菌学的もしくは病理組織学的に原因真菌が証明されたもの。
- ② 臨床診断例: 臨床経過が深在性真菌症として合致し、典型的画像所見に加え、 β -グルカン以外の血清ないし遺伝子診断法が陽性であったもの。
- ③ 疑診例: 臨床経過は深在性真菌症として矛盾しないが、これを支持する検査所見が得られないもの。
- ④ 否定例: 臨床経過が深在性真菌症として合致せず、活動性炎症性疾患の合併がないか、真菌感染症以外の感染症の存在が確認されたもの。
- ⑤ 不明例: 上記のいずれにも当てはまらないもの。

確定診断例では深在性真菌症の診断名と原因真菌を、臨床診断例では深在性真菌症の診断名を調査した。

3. 血漿中 β -グルカン値測定

2005 年 7 月にアルカリ前処理液が改良された新 MK 法と、それ以前の改良前 MK 法を用いて血漿中の β -グルカン値を測定した。測定はいずれも添付文書に記載された測定手順に従って行った。測定にはウェルリーダー-SK603(生化学工業株、東京)を使用し、37℃で 30 分間、405nm・492nm の吸光度変化率からカインティック法で β -グルカン濃度を測定した。両法とも基準値 20pg/mL、定量下限値 3.9pg/mL である。

4. 検討方法

- (1) 測定値の比較: 121 検体を改良前後の MK 法で測定し、これらの測定値を比較した。また判定結果の一致率を求めた。
- (2) 改良 MK 法の臨床的性能評価
各法の感度、特異度、PPV、NPV を算出した。さらに統計学的解析として、各法の ROC 曲線を作成し、area under the curve (AUC) を比較した。またこの ROC 曲線から(感度+特異度)/2 で求められる数値が最小となるカットオフ最適値を示し、現行の基準値の妥当性に関しても検討した。

C. 研究成果

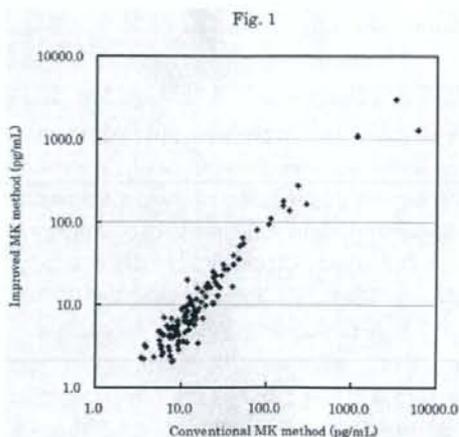
1. 症例

検討した 121 例の内訳は、男性 79 例、女性 42 例であった。年齢は 15-91 歳(62.8 ± 15.7 歳)、中央値は 66 歳であった。深在性真菌症診断分類は、確定診断例 13 例(10.7%)、臨床診断例 3 例(2.5%)、疑診例 8 例(6.6%)、否定例 95 例(78.5%)、不明例 2 例(1.7%)であった。確定診断例と臨床診断例、計 16 例の深在性真菌症の内訳は、慢性壊死性肺アスペルギルス症 5 例、肺アスペルギローマ 4 例、カンジダ血症 3 例、尿路カンジダ症 1 例、肺カンジダ症 1 例、腹腔カンジダ症 1 例、侵襲性肺アスペルギルス症治療後 1 例であった。感度、特異度、PPV、NPV などの検討では肺アスペルギローマ症例は除外した。また確定診断例の原因真菌の内訳は *Aspergillus fumigatus* 5 例、*A.niger* 2 例、*Aspergillus* spp. 1 例、

Candida albicans 2 例、*C.parapsilosis* 2 例 *C.glabrata* 1 例であった。

2. 測定値の比較

改良前後の MK 法で測定した β -グルカン値の比較を Fig.1 に示した。



各々の測定値は一定の相関を認めたが、改良前 MK 法の測定値が高い数値になる傾向が認められた。定性判定結果が両法とも陽性の検体は 25 検体、両法とも陰性であったものは 86 検体、改良前 MK 法が陽性で改良後 MK 法が陰性であったものは 9 検体、改良前 MK 法が陰性、改良後 MK 法が陽性であったものは 1 検体であった。両者の一致率は 91.7%であった。

3. 改良 MK 法の臨床的評価

改良前後の MK 法の感度と特異度、および陽性的中率と陰性的中率は Table 1 に示す。

Table 1

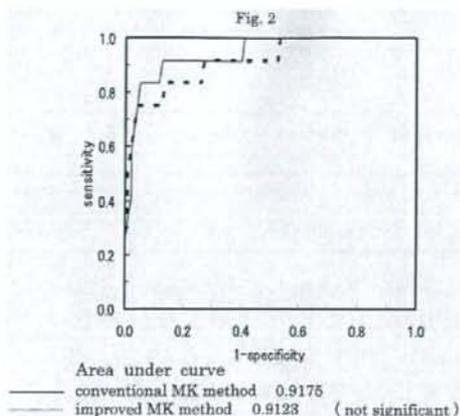
	sensitivity	specificity	PPV	NPV
Conventional MK method	91.7 % (11/12)	85.3 % (81/95)	44.0 % (11/25)	98.8 % (81/2)
Improved MK method	75.0 % (9/12)	91.6 % (87/95)	52.9 % (9/17)	96.7 % (87/90)

PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive values

感度は 91.7%から 75.0%に低下したが、特異度は 85.3%から 91.6%へ改善した。また

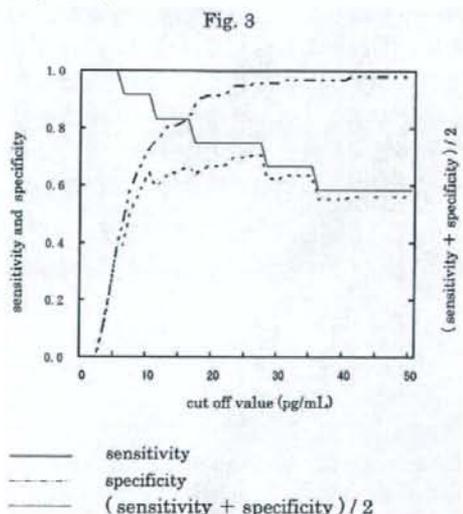
PPV も 44.0%から 52.9%へ改善を認めた。

また、改良前後の ROC 解析の結果を Fig.2 に示した。



改良前の AUC は 0.9175、改良後の AUC は 0.9123 であり、改良後の AUC が改良前に比して僅かに縮小していたが統計学的有意差は認めなかった。

改良後 MK 法の感度・特異度曲線を Fig.3 に示した。



今回の検討症例の測定値から算出した最適基準値は 26pg/mL であった。この数値を適

用して改良後 MK 法の性能を検討した結果は Table 2 に示した。

	sensitivity	specificity	PPV	NPV
20.0 pg/mL	75.0 % (9/12)	91.6 % (87/95)	52.9 % (9/17)	96.7 % (87/90)
26.0 pg/mL	75.0 % (9/12)	95.8 % (91/95)	69.2 % (9/13)	96.8 % (91/94)

PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive values

基準値を 20pg/mL から 26pg/mL に高く設定することにより、特異度が 91.6% から 95.8%、PPV が 52.9% から 69.2% とさらに改善した。感度の低下は認めなかった。

D. 結果および今後の予定

今回の検討で得られた特異度は改良前 MK 法 85.3%、新 MK 法 91.6% と 6.3% の改善が得られており、アルカリ前処理液の改良が本法の臨床的問題点の根本的解決に有用であったと評価できた。また、我々の症例から算出した至適基準値は 26pg/mL であり、20pg/mL に設定されている現行基準値が新 MK 法においてやや低いと判断できる結果であった。基準値の設定は検査法の臨床的性能を決定する上で極めて重要であり、今回の少数例での検討で、現行基準値

の是非について言及することは出来ない。しかしながら 26pg/mL の基準値を適用することで感度を損なうことなく特異度のさらなる上昇が得られた。今後は基準値の設定に関する臨床的検討も重要な課題である。2004 年 5 月に米国の Food and Drug Administration が新しい β -グルカン測定キット Fungitell[®] を承認し、海外でもその臨床応用が進められてきている。また、2008 年に改訂された European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infectious Cooperative Group and National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycosis Study Group の侵襲性真菌感染症診断ガイドラインにも β -グルカン測定の項目が組み込まれている。わが国で開発され、国内の日常診療に多用されてきた β -グルカン値測定法が国際的な評価を受けつつある。今後はさらに国際的な統一規格の確立も見据えた大規模な臨床試験が必要である。

E. 健康危機情報：特になし。

F. 研究発表：今年度はなし。

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

5. 慢性壊死性肺アスペルギルス症の症状と病原性に関する研究

研究分担者 小川賢二 国立病院機構東名古屋病院 臨床研究部

研究協力者 奥村欣由 名城大学薬学部 微生物学
二改俊章 名城大学薬学部 微生物学

研究要旨 慢性壊死性肺アスペルギルス症で見られる特徴的な症状を59症例で検討したところ、通常の細菌性肺炎ではほとんど見られない症状である咯血と血痰が40症例(68%)に認められた。これらの症状を引き起こす原因としてアスペルギルス属の産生する菌体外蛋白分解酵素エラスターゼに注目した。その性状を調べたところエラスターゼ活性以外にコラゲナーゼ活性やフィブリノゲナーゼ活性も示した。そこで菌から分離精製したエラスターゼをモルモット肺に注入し病理学的変化を検討したところ出血性肺炎の所見を得た。結論として、アスペルギルスの産生するエラスターゼは病原因子として重要であり臨床的に咯血や血痰症状を引き起こす原因である可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性壊死性肺アスペルギルス症で見られる特徴的臨床症状を抽出しその原因と考えられる菌の病原因子を探ることを目的とした。

B. 研究方法

現在わが国で用いられている慢性壊死性肺アスペルギルス症の診断基準に合致する59症例をレトロスペクティブに検討した。また臨床分離した*Aspergillus fumigatus*を用い培養上清をクロマトグラフィーにて精製しエラスターゼを抽出した。この精製エラスターゼの生化学的性状を調べた。またモルモット肺に注入しその病理学的変化を検討した。

C. 研究結果

- ① 59症例の臨床的検討から慢性壊死性肺アスペルギルス症の特徴的臨床症状は咯血と血痰であることが分かった。本症状を呈した症例は40症例(68%)であった。
- ② 臨床分離*Aspergillus fumigatus*の培養

上清から分離精製したエラスターゼは分子量32000、等電点9.1、熱安定性60℃、pH安定性5.0-12.0、至適温度37℃、至適pH8.0のセリンプロテアーゼであった。またエラスチン、カゼイン、フィブリノーゲン、コラーゲン(type I~IV)を分解し、さらに毛細血管透過性亢進作用、肺胞マクロファージ貪食能抑制作用等も示した。

- ③ この精製エラスターゼをモルモット肺に注入し病理学的変化を検討したところ出血性肺炎の所見を得た。

D. 考察

慢性壊死性肺アスペルギルス症に限らずアスペルギルス感染症において咯血・血痰症状は他の感染症に比べ頻度が高いと考えられる。これはアスペルギルス属がもつ何らかの病原因子と関連があるのではないかと考え、菌の産生する菌体外蛋白分解酵素に着目した。この中でエラスターゼは感染組織を高度に破壊する性状を持つことが判明した。特に強いコラゲナーゼ活性の存在は肺組織の基底膜を破壊する点で注目された。

モルモットの病理実験においてこのことが証明され、病原因子としての重要性が確認された。

E. 結論

アスペルギルスの産生するエラスターゼは病原因子として重要であり臨床的に咯血や血痰症状を引き起こす原因である可能性が示唆された。

F. 健康危害情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

小川賢二、奥村欣由、二改俊章、垂水 修、中川 拓、齋藤裕子：慢性型肺アスペルギルス症の臨床的検討およびエラスターゼ阻害物質の検討。真菌誌。2006； Vol.47: 171-178

2. 学会発表

当院における慢性型肺アスペルギルス症の診断と治療。第49回日本医真菌学会総会（シンポジウム） 2005 千葉

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

特になし

6. 慢性壊死性糸状菌感染症、とくにアスペルギルス感染症における病理組織学的研究、 文献上の病態の解析の変遷とともに

分担研究者 安藤常浩 (日本赤十字社医療センター 感染症科)

研究協力者 渋谷 和俊 (東邦大学医学部病院病理学講座 教授)

佐多徹太郎 (国立感染症研究所 感染病理部)

研究要旨 慢性壊死性肺アスペルギルス症 (CNPA) について、病理組織所見が得られた症例を対象として、病理組織学的に解析を行い CNPA の進展様式を含めた病態の解明を目的として研究を行った。症例は剖検例が3例で、1例は切除例であった。経過中の画像所見では4例とも空洞と空洞壁の肥厚、周囲のコンフリクション、GGA(ground-glass appearance)、粒状影、さらにその周囲や対側肺に陰影の拡大を認めた。病理組織学的にはいずれの症例も、菌塊(Fungus ball)を内部に有する空洞があり、空洞壁には壊死と線維化および慢性炎症細胞浸潤を認めた。その周囲や空洞からはなれた病変部では異物型の多核巨細胞を含んだ肉芽腫性反応や器質化肺炎像が多く認められた。その部位では菌糸は認められないことから、肉芽腫性反応や器質化肺炎は脂肪酸カルシウムなど菌糸に由来する物質に対する組織反応の可能性であることが推測された。

A. 研究目的

慢性壊死性肺アスペルギルス症 (CNPA) は、わが国に多く認められる慢性壊死性糸状菌感染症の代表的な疾患である。CNPA については肺アスペルギルス症のなかの一つの病型として1982年 Binderらにより報告されているが、前年に Geffer らが Semi-invasive pulmonary aspergillosis を提唱し、その後 2003 Denning らは Chronic cavitary pulmonary aspergillosis(CCPA), Chronic fibrosing pulmonary aspergillosis (CFPA)といった新たな分類を提起している。従来の CNPA について本邦においても疾患としての解釈がさまざまであった。さらに新たな分類が提唱されたことで、臨床的に混乱を招くことが懸念されている。Aspergilloma や CNPA などの慢性アスペルギルス症においては、これまで病理組織学的な解析を含めた十分な病態の解明がほと

んどなされていない。そこで病理組織所見が得られた CNPA 症例を対象として病理組織学的に解析を行い CNPA の進展様式を含めた病態の解明を目的として検討を行った。

B. 研究方法

当院で CNPA と診断した、4例について検討を行った。3例は剖検例であり、1例は肺切除が行われた症例であった。診断については、臨床症状と胸部 X 線にて陰影を認め、1か月から数年の経過で進行性であり、菌学的に培養検体にてアスペルギルス属が確認された症例とした。

それぞれの肺組織検体をホルマリン固定後、肉眼的観察を行った後、パラフィン切片を作製した。これらを hematoxylin-cosin (HE)染色、elastica van Giesson(EVG)染色、グロコット染色、Masson 染色など各種染色をほどこし、病理組織学的に詳細な検討を

行なった。また、経過中の臨床所見、画像所見についても検討を加え、画像所見と病理組織所見との対比を行なった。

さらに、これまで報告されている慢性肺アスペルギルス症について、それぞれの解釈と病態の理解とその変遷についての総括を試みた。

C. 研究結果

症例提示

症例1：72才男性、7年前 invasive thymoma にて外科治療、その後経口抗がん剤であるエトポシド (VP-16) を内服治療継続していた。発熱、咳、血痰が出現、胸部X線上、左上肺の陰影を認めた。喀痰培養にて *A. fumigatus* を検出し CNPA と診断。イトラコナゾール (ITCZ) 投与、その後アムホテリシン B (AMPH-B)、フルシトシン (5-FC) 併用治療を行ったが、6ヶ月の経過で呼吸不全にて死亡に到った。

画像所見：

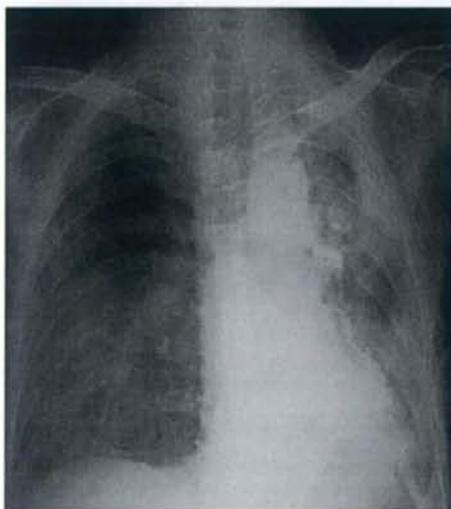


図1 胸部単純写真 (症例1)

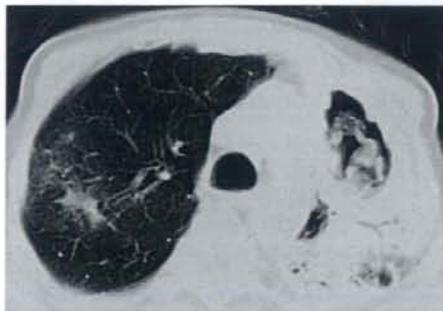


図2 胸部CT(症例1)

左上肺に空洞を伴う浸潤影を認め、徐々に拡大、左下肺にも浸潤影、さらに右肺にも新たな陰影を確認した (図1)。胸部CTでは空洞内の菌球様陰影を認め、空洞周囲はコンソリデーションを呈し、対側肺に淡い陰影も確認された (図2)。

病理像：



図3 病理組織所見 (症例1 EVG染色)

空洞内に黄色 fungus ball を認め、空洞壁は線維性に肥厚し周囲は器質化巣を呈した。空洞周囲のみならず、とくに左下葉において広範に肺胞腔内への器質化滲出物を認め器質化肺炎像を呈していた (図3)。

症例2：80才男性、結核の既往あり、1ヶ月前から発熱と体重減少が出現。画像上、左上肺に空洞を認め結核再燃疑われたが、喀痰より、*A. niger* を検出し CNPA と診断。

ミカファンギン (MCFG) 投与したが改善乏しく、さらに AMPH-B 併用治療も行なわれたが、呼吸不全にて死亡。剖検を行なった。

画像所見：



図4 胸部単純写真 (症例2)

右上肺に空洞を伴う浸潤影を認め、経過中徐々に陰影は拡大、右下肺、左中肺野にも新たな斑状影を認めていた。(図4)

病理像：

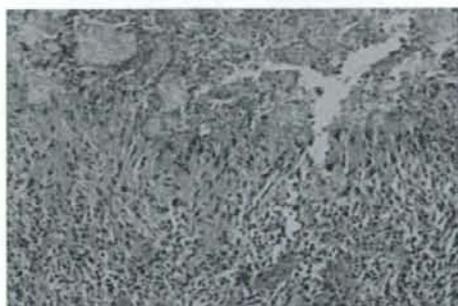


図5 病理組織所見 (症例2 HE染色)

空洞の周囲や両側肺において、好中球、単核球および組織球浸潤を認め、しばしば複屈折を示す草酸カルシウム結晶と思われる結晶物を貪食した異物型巨細胞を認める。一部に組織球が palisading する肉芽腫性反応も認められる (図5)。それらを含んだ器質化肺炎、閉塞性細気管支炎の像も認められる。

7. 壊死性肺糸状菌感染症における新たな抗原検索に関する研究

分担研究者 山越 智 (国立感染症研究所 生物活性物質部)

研究協力者 岡部智也 (株式会社 ACTGen 事業開発部)
大野秀明、大川原明子、新見昌一、宮崎義継
(国立感染症研究所 生物活性物質部)

研究要旨

慢性壊死性肺アスペルギルス症は、COPD 等においてときに致死性的となる。その診断ではアスペルギルスガラクトマンナン抗原検出法が比較的信頼性の高い検査として使用されているが、未だに特異度など課題の多い検査である。今回われわれは哺乳類の細胞表面および分泌蛋白質を網羅的に同定できるシグナルシーケンストラップ法を用い、*Aspergillus fumigatus* 膜蛋白質、分泌蛋白質の網羅的同定を行った。得られた 465 個の cDNA クローンを解析し 75 種類の遺伝子を得ることができた。その中から、発現する量と推定される機能をもとに 16 種類の遺伝子について分泌されるか否かを *Saccharomyces cerevisiae* 発現系を用いて検討した。その結果 8 種類の蛋白質を、診断等への応用が可能な新規抗原となりうる候補蛋白質として選択した。現在、それらに対するモノクローナル抗体を作製しており、今後アスペルギルス症の診断、治療などへの応用を試みる。

A. 研究目的

医療技術の進歩によりもたらされる免疫不全者の増加などに伴い深在性真菌症も近年増加傾向を示している。慢性壊死性肺アスペルギルス症は、COPD 等においてときに致死性である。現在、アスペルギルス感染症の早期診断を目的として使用されているガラクトマンナン抗原検出系は、血液悪性疾患の患者では約 80%の感度を有しているが、他の基礎疾患では特異度が低く、より感染実態を反映するアスペルギルス感染症の早期診断系の確立が求められている。このような背景のもと、われわれの研究室では慢性壊死性肺アスペルギルス症の原因真菌で最も多い *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) を対象に、早期診断系の作製を念頭に新たな標的抗原の検索を行った。

B. 研究方法

1. *A. fumigatus* RNA 抽出: *A. fumigatus* 臨床分離株 MF-13 の分生子を YPD 培地に接種し 37°C で 3 日間培養した。培養において分生子が菌糸形成し、直径約 5 から 10mm の球状に増殖させ、集菌後 total RNA を調整した。

2. シグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法)

抽出した *A. fumigatus* total RNA から活性型 MPL を含むレトロウイルス発現ベクター pMX-SST を用いて cDNA レトロウイルスライブラリーを作成した。マウス BA/F3 細胞に感染させ、IL-3 非依存的増殖可能な細胞をスクリーニングした。得られた細胞から、導入したベクター配列を用い *A. fumigatus* 由来遺伝子と推定される遺

伝子断片を増幅させシーケンスを行った。

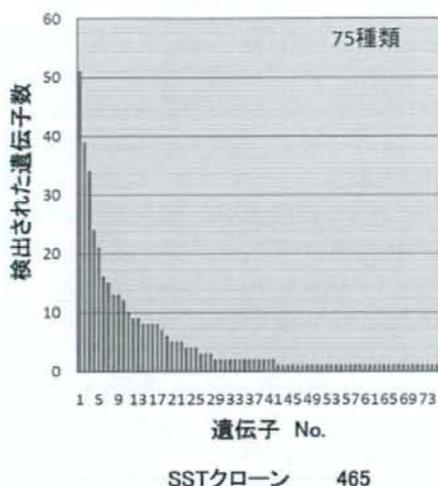


図 1. YPD 培地による培養で同定された遺伝子

3. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) 発現による分泌蛋白質の検出

SST-REX 法で得られた分泌蛋白質、膜蛋白質をコードすると考えられる *A. fumigatus* 遺伝子の中から、*A. fumigatus* のゲノムデータベースに記載されている annotation 情報と、得られたクローン数を考慮し、16 数種類の遺伝子を選択した。これらを HA tag を蛋白質の C 末端に付加することのできる pADH-HA 発現ベクターに挿入し、*S. cerevisiae* に導入した。培養後細胞上清を回収、抗 HA 抗体で免疫沈降した。さらにウエスタンブロットに供し、抗 HA-抗体で分泌蛋白質を検出した。

C. 研究結果

1. *A. fumigatus* における SST-REX 法の有効性。

真菌である *A. fumigatus* 遺伝子をマウス由来細胞に導入した場合でも、糸状菌由

来蛋白質のシグナルペプチドによりマウス細胞表面に移送されることが明らかになった。

2. 同定された *A. fumigatus* 遺伝子。

得られた SST クローンの総数は 465 個で、シーケンスにより 75 個の *A. fumigatus* 遺伝子が同定された (図 1)。その中で 9 個の遺伝子は既に報告されていた。残りの得られた遺伝子の約 8 割は、既存の蛋白質に何らかのホモロジーを持つもの、あるいは蛋白質モチーフを持つものであったが、約 2 割は機能不明蛋白質であることが判った。

3. *S. cerevisiae* を用いた発現による分泌蛋白質の検出

S. cerevisiae に導入した候補遺伝子 16 種類のうち、8 種類の蛋白質の分泌が確認され、分子量も期待されるものであった (図 2)。そのなかで Y-58 に見られるように、3 種類の遺伝子が、電気泳動のパターンから糖鎖修飾を受けていると考えられた。

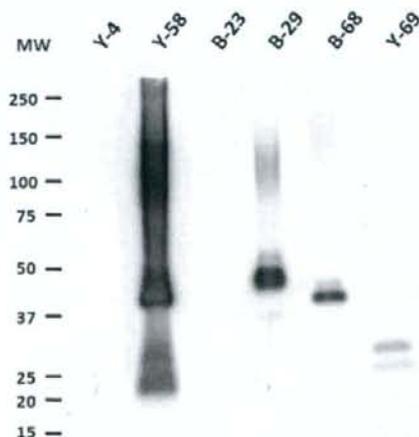


図 2. 酵母発現系で分泌発現をする遺伝子

4. モノクローナル抗体の作製

S. cerevisiae の系で分泌発現した遺伝子

のモノクローナル抗体の作製を試みた。SST-REX 法により最も多く得られ、*S. cerevisiae* 発現系で分泌発現された Y-1 遺伝子を保持する BA/F3 細胞である Y-1 SST クローンを直接マウスに免疫することで Y-1 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ 4 種を樹立した。大腸菌で発現させた GST-Y-1 融合蛋白質を用いウエスタンブロットにより 4 種のモノクローナル抗体の特性を確認した (図 3)。

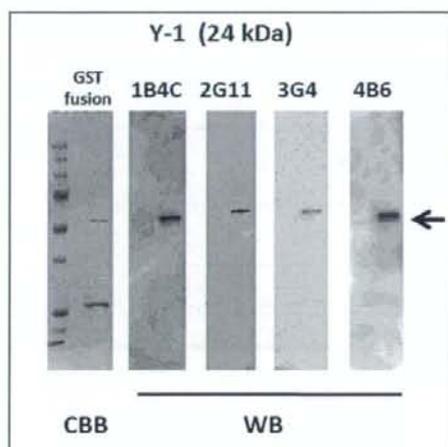


図 3. Y-1 モノクローナル抗体によるウエスタンブロット

D. 考察

シグナルシーケンストラップ (SST-REX) 法は、細胞膜あるいは細胞外へ分泌される蛋白質を同定する手法として Tashiro らにより報告された (Tashiro et al. *Science*. 1993)。今回われわれはこの手法を糸状菌、とくに *A. fumigatus* に応用することで、新たな診断系の標的となりうる可能性のある分泌蛋白質の網羅的検出を試みた。

本研究では計 465 個のクローンから 75

個の遺伝子が同定された。約 8 割の遺伝子は機能予測がされるものであったが、残りの遺伝子は、機能不明蛋白質であった。

S. cerevisiae を用いて蛋白質の発現を確認したが、一部の候補遺伝子では発現が確認されなかった。これは分泌蛋白質というよりはむしろ膜蛋白質である可能性が高いと考えられた。

また、それら分泌発現を確認できた中で、SST-REX 法で同定された数が多いことから遺伝子発現量も多いと予想される機能不明蛋白質 Y-1 に対するモノクローナル抗体を作製した。それら抗体を用いて現在サンドイッチ ELISA 法の構築を試みている。

今後これら抗体を利用した *A. fumigatus* 感染の検出の可能性、さらにはアスペルギルス感染症の予防、治療効果について検討する予定である。一方、他の多くのスクリーニングされた蛋白質については、今後モノクローナル抗体の作製、ELISA 系の構築をする予定である。

E. 結論

SST-REX 法を用いて *A. fumigatus* の細胞外分泌蛋白質や膜蛋白質の網羅的検出を行なった結果、新規アスペルギルス検出系の候補となる分泌蛋白質が得られた。現在それらに対するモノクローナル抗体を作製中であり、今後それらの診断、治療への応用を考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 山越 智、橋本ゆき、大川原明子、田辺公一、新見昌一、大野秀明、宮崎義継

シグナルシーケンストラップ法を用