

ーブロックを打ち抜き、6×5 列に再包埋してアレイブロックを作製した (図 1)。

2) 検索対象

東邦大学医療センター大森病院に保管されているパラフィン包埋されている剖検組織および生検組織で真菌の感染が形態的に明確な症例数例。東邦大学医学部倫理委員会承認番号：#20047 (糸状菌多施設)。

3) プローブ

これまで我々が検討してきた *Aspergillus fumigatus* の alkaline proteinase (ALP) 遺伝子を標的とした DNA プローブおよび昨年度あらたに設計した *Fusarium* 属と *Histoplasma capsulatum* の 28S rRNA を標的とした PNA プローブの特異性を検証した。

4) ISH 法

ISH 法は昨年度までに我々が構築した ISH 法のプロトコールに準拠して行った。ハイブリダイゼーションの条件として、DNA プローブは 50°C、一晚、PNA プローブにおいては 56°C、90 分に設定した。以後、ALP 遺伝子 DNA プローブにおいてはプローブに標識された FITC による蛍光シグナルを蛍光顕微鏡にて直接観察し、

Fusarium 属と *H. capsulatum* PNA プローブにおいては抗 FITC モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法によりシグナルを検出した。

5) ホルマリン固定が PCR 法に及ぼす影響

病理診断に常用されるホルマリン固定が PCR 法に及ぼす影響を検討するため、培養された *Candida albicans* のホルマリン浮遊液から作製したパラフィン切片に対して、rRNA 遺伝子領域を標的とした増幅産物のサイズが異なる二つの PCR 法を施行した。ホルマリンによる浸漬時間は 0 時間、2 時間、1 日、3 日、7 日、最長 15 日までと固定条件を変化させた。

6) ヒトヒストプラズマ症病理検体を用いた診断系の評価

再生不良性貧血や HIV 感染症を基礎疾患とする 2 例ならびに基礎疾患のない症例 3 例のパラフィン切片を対象とし、ISH 法を用いて、プローブの実用性の検証を行った。

C. 研究結果

アガロースゲルを支持体としたセ

ルブロック作製法は、分散しやすい *Candida* 属をはじめとする酵母菌をパラフィン包埋する際、特に有効であった。本法を用いた PAS 染色や Alcian-Blue 染色などの粘液染色において良好な染色結果が得られた。また、*C. albicans* 26S rRNA を標的とした ISH 法においては、*C. albicans* の菌体に一致した良好なシグナルが得られ、病理診断材料中で鑑別を要する *Trichosporon asahii* の菌体にはシグナルは認めなかった (図 2)。

アレイブロックを用いた ALP 遺伝子 DNA プローブの特異性に関する検討において、*Aspergillus* 属で中等度から強い蛍光シグナルが検察された。*Pseudallescheria boydii* においてもシグナルが得られたが、その蛍光強度は弱く、部分的であった。(図 3)

Fusarium 属 PNA プローブにおいては *Fusarium solani* および *F. oxysporum* において、びまん性且つ、菌体内に強い顆粒状のシグナルが得られた。*P. boydii* においても、弱い部分的なシグナルが得られた (図 4)。

H. capsulatum PNA プローブにおいては分離培養菌が用意できなかったため、培養にて確認されているヒスト

プラスマ症患者の骨髓生検のホルマリン固定パラフィン切片を使用して検討した結果、その菌体内に強い陽性シグナルが検出された。アレイブロックにおける 30 菌種ではシグナルは全く得られなかった (図 5)。

なお、*H. capsulatum* に関しては、上記の骨髓生検例を含む基礎疾患のある 2 例では、ISH 法において、菌要素に一致した陽性シグナルが認められた。しかし、他施設から提供された基礎疾患のない症例 3 例では、組織学的には *H. capsulatum* 感染が明確であるものの、ISH 法、PCR 法ともに良好な陽性結果が得られなかった。

ホルマリンによる固定時間と PCR 法における遺伝子増幅の関連性を検討した結果、固定時間が長いほど PCR 法による増幅が困難になる傾向が明確となった。特に増幅産物のサイズが 700bp 程のプライマー B2F/B4R による PCR 法において顕著にこの傾向がみられ、3 日以上固定されたものでは増幅が困難であった。増幅サイズが小さいプライマー 18SF1/58SR1 による PCR 法においては、バンドは薄いながらも 10 日間固定された試料においても増幅が確認された。

D. 考察

ISH 法においては対象試料と手技の評価を目的としたコントロール実験が必須である。そこで、我々はホルマリン固定した 30 菌種のホルマリン浮遊液からセルブロックを作製し、集約して同一の包埋ブロックに配置させたコントロールアレイブロックの作製について検討した。その際、分離培養菌のホルマリン浮遊液からパラフィン包埋する際にアガロースを支持体とする事で、効率的に包埋することが可能であった。特に *C. albicans* など浮遊液中で分散しやすい酵母菌において特に有効であった。この様に作製されたパラフィン切片では ISH 法をはじめとする種々の特殊染色が可能である事が証明された。

アレイブロックにおけるプローブの特異性に関する検討では、ALP 遺伝子 DNA プローブはこれまでの検討と同様に、概ね *Aspergillus* 属の検出が可能であった。*Fusarium* 属 PNA プローブにおいては *F. solani* および *F. oxysporum* で陽性シグナルが得られた事から *Fusarium* 属の菌を検出できる可能性が示唆された。さらに、*H.*

capsulatum PNA プローブにおいもその特異性が確認された。標的とした以外の一部の菌で認められたシグナルは弱く、部分的でプローブの特異性に影響する事はないと判断された。

しかし、*H. capsulatum* に関しては、宿主の免疫状態が保たれている条件下で形成される病変では、防御担当細胞による *Histoplasma* の核酸の変性が大きく、本研究で用いた 28S 領域 ribosomal RNA を標的とした PNA probe による検出が困難である可能性が示唆され、今後 ISH の普及・均霑化を企図する上で重要な課題と考えられた。

これまで、ホルマリン固定は核酸の断片化等を誘導し、分子生物学的解析法に影響を与える事は知られているが、具体的な固定条件における検討は十分に成されていない。我々の検討ではホルマリンの固定時間は PCR 法による DNA の増幅に影響をあたえる重要な因子であることが分かった。特に増幅産物のサイズが大きいほど顕著にこの傾向が認められた。実際の病理診断材料を想定した場合は、増幅産物のサイズをより短く設定する必要がある。

E. 結論

30 菌種を同一ブロックに配置して包埋するコントロールアレイブロックの作製とこれらをもちいたプローブの特異性を検証した。今後、多数例の解析を前提とした発生動向調査において、制度管理に応用可能であると考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

原著および総説

- 1) 磯部和順, 秦 美暢, 杉野圭史, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 本間 栄. 間質性肺炎合併癌診断における FDG-PET の有用性の検討. 日呼吸会誌. 47(4): 278-85, 2009
- 2) 大久保陽一郎, 羽鳥 努, 密田亜希, 長谷川千花子, 谷川佳世子, 中山晴雄, 篠崎 稔, 渋谷和俊. 真菌症が発生したらどう対応すればよいでしょうか? 腎と透析, 66(4): 693-95, 2009
- 3) Sugino K, Kobayashi M, Iwata M, Gocho K, Kaburaki K, Muramatsu Y, Ishida F, Miyazaki T, Sato D, Sakaguchi S, Sano G, Kusano E, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Takagi K, Homma S. Successful Treatment with Pneumonectomy for Pulmonary *Mycobacterium Abscessus* Infection. Inter Med, 48: 459-63, 2009
- 4) Shinozaki M, Okubo Y, Nakayama H, Mitsuda A, Ide T, Murayama S, Shibuya K. Application of *In Site* Hybridization to Tissue Sections for Identification of Molds Causing Invasive Fungal Infection. Jpn J Med Mycol, 50:75-83, 2009
- 5) 渋谷和俊, 下平佳代子. 深在性真菌症の病態と診断. 今日の移植, 22:368-75, 2009
- 6) 磯部和順, 秦 美暢, 岩田基秀, 石田文昭, 鏑木教平, 後町杏子, 小林美奈穂, 阪口真之, 佐藤大輔, 佐野 剛, 杉野圭史, 草野英美子, 坂本 晋, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 高木啓吾, 本間 栄. 多発薄壁空洞を形成した細気管支肺胞上皮癌の 1 剖検例. 日呼吸会誌, 47:512-17, 2009
- 7) Sugino K, Gocho K, Ota H, Kobayashi M, Sano G, Isobe K, Takai Y, Izumi H, Kuraishi Y, Shibuya K, Homma S. Miliary Tuberculosis Associated with Chronic Neutrophilic Leukemia. Inter Med, 48:1283-7, 2009
- 8) Takahashi H, Wada A, Yokoyama Y, Fukushi S, Sakurai T, Shibuya K, Suguro T. Ligamentum flavum haematoma: a report of two cases. J Orthop Surg, 17:212-5, 2009
- 9) 石原 晋, 中山晴雄, 和泉春香, 長瀬大輔, 藤本吉紀, 名取一彦, 安藤常浩, 渋谷和俊, 榎村浩一, 酒井文和, 倉石安庸. 抜き打ち感染 (Breakthrough infection) として発症した侵襲性ムーコル症の 1 剖検例. THE JAPANESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, 62:53-68, 2009

- 10) 鈴木 琢, 渋谷和俊. -これだけは知っておきたい皮膚真菌症の知識-真菌症と病理. Monthly Book Derma, 148:7-11, 2009
- 11) Saito T, Shime N, Itoh K, Fujita N, Saito Y, Shinozaki M, **Shibuya K**, Makimura K, Hashimoto S. Disseminated Aspergillosis Following Resolution of *Pneumocystis* Pneumonia With Sustained Elevation of Beta-Glucan in an Intensive Care Unit: a Case Report. Infection 2009, e-Publish 2009 (Infection 2009 DOI 10.1007/s15010-009-8108-5)
- 12) 塩澤一恵, 渡邊 学, 高山竜司, 池原 孝, 住野泰清, 谷川佳世子, 渋谷和俊, 山崎康朗.
- 13) Ig G 4 関連病変が疑われた肝炎炎症性偽腫瘍の1例. Liver Cancer, 15(2):175-84, 2009
- 14) Isobe K, Hata Y, Sakamoto S, Takai Y, **Shibuya K**, Homma S. Clinical characteristics of acute respiratory deterioration in pulmonary fibrosis associated with lung cancer following anti-cancer therapy. Respirology, e-Publish 2009 (DOI 10.1111/j.1440-1843.2009.01666.x)
- 16) Isobe K, Hata Y, Takai Y, **Shibuya K**, Takagi K, Homma S. Usefulness of fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography for investigating unexplained rising carcinoembryonic antigen levels that occur during the postoperative surveillance of lung cancer patients. Int J Clin Oncol 14:497-501, 2009 (DOI 10.1007/s10147-009-0905-4)
- 著書
- 1) 大久保陽一郎, 渋谷和俊. 合併症・免疫抑制薬の副作用とその対応、感染症：真菌. 腎移植のすべて (高橋公太編)、pp323-324 メジカルビュー社, 東京, 2009
- 学会発表
- 2) **Shibuya K**. PATHOPHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS OF DIAGNOSIS IN INVASIVE ASPERGILLOSIS. ISHAM 2009 Satellite Symposia Beijing, May29-31, 2009 China
- 3) Shinozaki M, **Shibuya K**. Application of *in site* hybridization procedure on tissue sections to identification of molds causing invasive fungal infections. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May25-29, 2009 Japan
- 4) Nagayoshi M, Ochiai E, Watanabe A, Sato A, Tada Y, Tatsumi K, **Shibuya K**, Kamei K. Rho-Kinase inhibitor suppresses pulmonary artery remodeling induced in mice by repeated inhalation of *Stachybotrys chartarum*. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May25-29, 2009 Japan
- 5) Ochiai E, Nagayoshi M, Sato A, Watanabe A, Toyotome T, **Shibuya**

- K, Kamei K. The effect of fungal species and murine strains on the development of pulmonary arterial hypertension. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May25-29, 2009 Japan
- 6) Shimamura T, Kubota N, Nagasaka S, Suzuki T, Mukai H, Shibuya K. Establishment of novel model of onychomycosis in rabbits for evaluation of antifungal agents. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May25-29, 2009 Japan
- 7) Suzuku T, Kubota N, Shimamura T, Nagasaka S, Mukai H, Shibuya K. Histopathological study on the experimental onychomycosis in rabbit. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May25-29, 2009 Japan
- 8) Shinozaki M, Nakayama H, Okubo Y, Ide T, Miyake Y, Sasaki K, Maruyama S, Shibuya K. Development and application of *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes in tissue sections for histological diagnosis of invasive fungal infections. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May25-29, 2009 Japan
- 9) Sugino K, Hasegawa C, Sano G, Sato D, Kusano E, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Takagi K, Homma S. Pathophysiological study of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis associated with sequelae of tuberculosis. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May25-29, 2009 Japan
- 10) Nakayama H, Shinozaki M, Iwabuchi S, Shibuya K. Histopathological study of central nervous system candidiasis. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May25-29, 2009 Japan
- 11) Miyake Y, Shimizu M, Shinozaki M, Makayama H, Abe F, Iwamoto K, Nagase D, Shibuya K. A case of cryptococcal meningitis of which morphological examination on yeasts in cytological specimen was useful for accurate assessment for antifungal chemotherapy. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May25-29, 2009 Japan
- 12) 北島 悟, 福島大輔, 原田直幸, 根本匡章, 周郷延雄, 黒木貴夫, 長尾建樹, 大久保陽一郎, 羽鳥努, 渋谷和俊. 硬膜転移によって慢性硬膜下血腫をきたした2例. 第134回東邦医学会例会, 6/11, 2009 東京
- 13) 酒井 謙, 高須二郎, 二瓶 大, 米倉尚志, 青木裕次郎, 大谷隆俊, 大橋 靖, 川村 毅, 水入苑生, 相川 厚, 宍戸清一郎, 渋谷和俊. 血漿交換+Rituximabにて完全寛

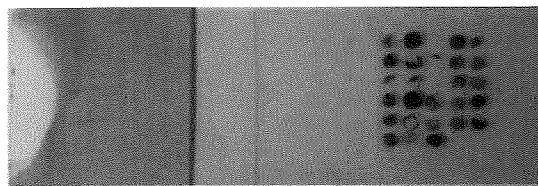
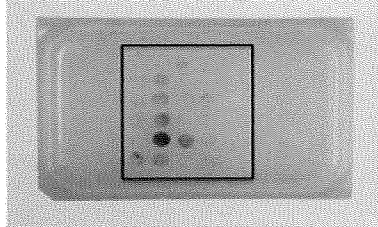
- 解した腎移植後巣状糸状体硬化症の定期的腎生検の一例. 移植腎病理研究会・第 134 回学術集会, 7/18, 2009 東京
- 14) 渋谷和俊. Threat of Aspergillosis: Early diagnosis and treatment. 第 5 回ファンガス・クラブ, 8/4, 2009 東京
- 15) 下平佳代子, 中山晴雄, 篠崎 稔, 大久保陽一郎, 職 珠玉, 若山 恵, 井手 忠, 渋谷和俊. 病理からみた東邦大学における侵襲性糸状菌症の変遷. 共同利用研究第 3 回アスペルギルス研究会, 9/26, 2009 東京
- 16) 清水雅子, 緒方美和子, 田邊なおみ, 井手 忠, 大久保陽一郎, 密田亜希, 羽鳥 務, 若山 恵, 渋谷和俊. セルブロックにおける悪性中皮種と反応性中皮細胞の免疫染色の検討. 第 48 回日本臨床細胞学会秋期大会, 10/30, 31, 2009 福岡市
- H. 知的財産権の出願・登録情報なし。

Fungal strains used in this study

<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>flavus</i>	NBRC 33021
<i>Aspergillus niger</i>	NBRC 33023
<i>Aspergillus terreus</i>	NBRC 33028
<i>Aspergillus fumigatus</i> var. <i>fumigatus</i>	NBRC 6344
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NBRC 33022
<i>Fusarium solani</i>	NBRC 5232
<i>Fusarium oxysporum</i>	NBRC 7152
<i>Pseudallescheria boydii</i>	NBRC 8078
<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC 5780
<i>Rhizomucor pusillus</i>	NBRC 4446
<i>Cunninghamella elegans</i> var. <i>elegans</i>	NBRC 9744
<i>Penicillium commune</i>	NBRC 4554
<i>Mucor circinelloides</i> f.sp. <i>circinelloides</i>	NBRC 5763
<i>Pseudocochliobolus spicifer</i>	NBRC 100222
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Trichosporon asahii</i>	CBS2479T
<i>Candida albicans</i> var. <i>stellatoidea</i>	TIMM0310
<i>Candida glabrata</i>	TIMM1054
<i>Candida guilliermondii</i>	TIMM0260
<i>Candida kefyr</i>	TIMM0302
<i>Candida krusei</i>	TIMM0269
<i>Candida lusitanae</i>	TIMM1668
<i>Candida parapsilosis</i>	TIMM0292
<i>Candida tropicalis</i>	TIMM0313
<i>Cryptococcus neoformans</i>	TIMM0354
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	TIMM2937
<i>Hansenula anomala</i>	JCM3585
<i>Pichia subpelliculosa</i>	IFO0808
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TIMM0026

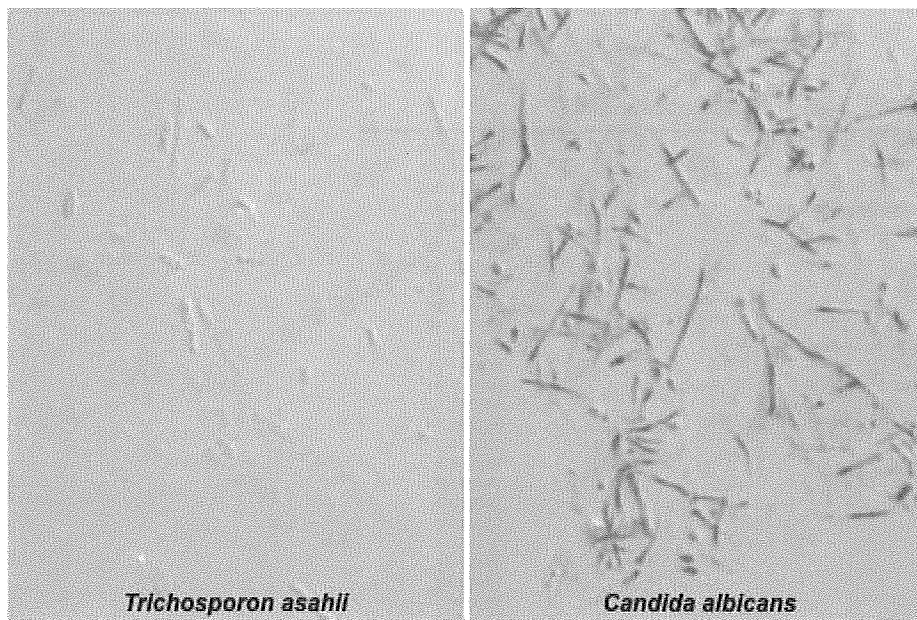
表 1

The array block of formalin- fixed and paraffin- embedded fungi



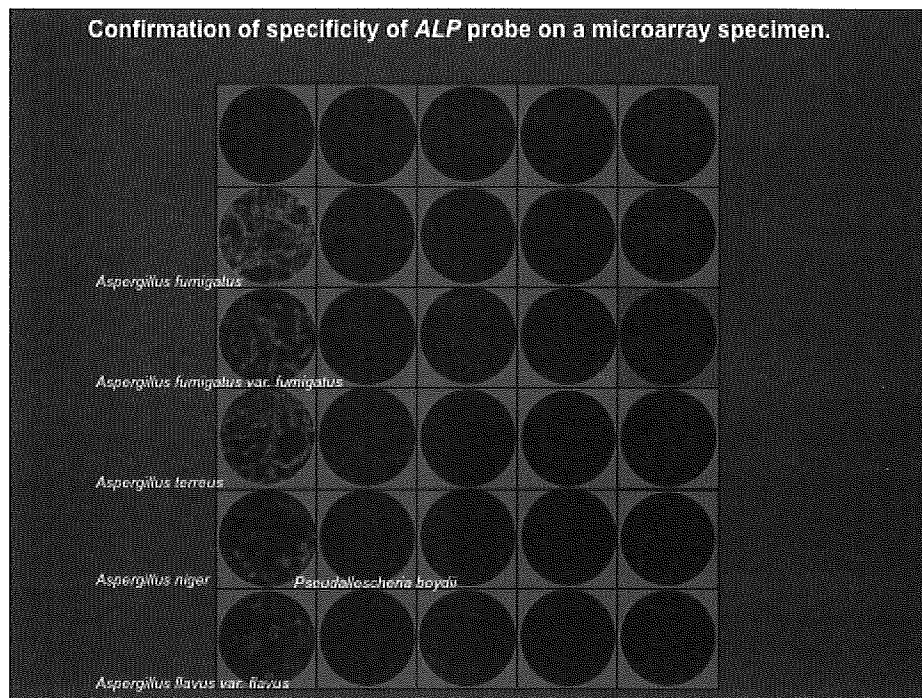
Low-magnification photograph of group of 30 cultured fungi in the array (Grocott stain)

图 1



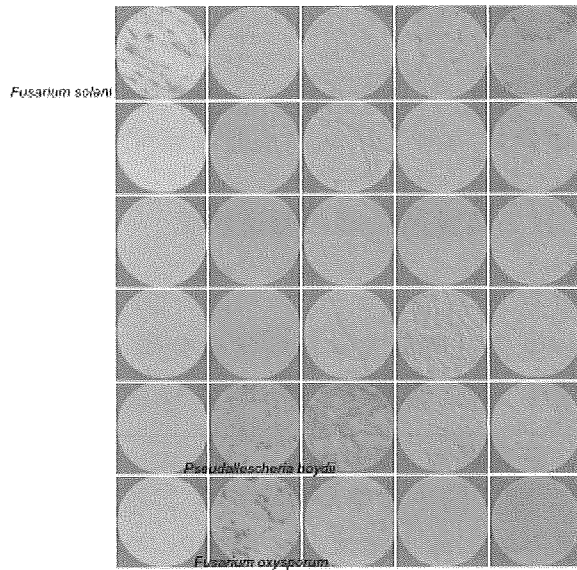
The PNA probes targeting the 26S rRNA of *Candida albicans*

☒ 2



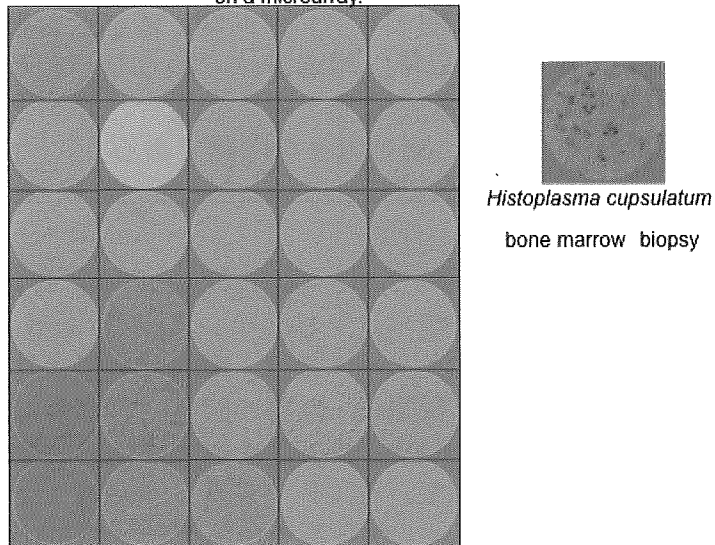
☒ 3

Confirmation of specificity of *Fusarium* species PNA probe on a microarray.



☒ 4

Confirmation of specificity of *Histoplasma capsulatum* PNA probe on a microarray.



☒ 5

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

「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

メディアにおける真菌感染症の報道状況

分担研究者 上 昌広 東京大学医科学研究所
研究協力者 岸 友紀子 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、治療の選択肢が増えた。治療のコンプライアンスをあげ、適切な治療を行うために、患者の真菌に対する知識と理解が増えることが必要である。

昨年度までは日経テレコンという新聞データベースを用い、真菌感染に関する情報が国民にどの程度提供されているかを調査した。本年度は、週刊誌を調査対象に追加した。

本研究では、「かび」や「真菌」に関する情報が新聞、雑誌上で扱われることは少なく、1990年代以降、報道量は変わらないことが明らかとなった。真菌感染症に関する啓発を考えた場合、新聞という媒体を有効に活用できていないことは大きな問題であろう。

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

日経テレコン 21
(<http://telecom21.nikkei.co.jp/>)
のデータベースを利用し、1992年から

2007年の真菌感染に関する報道数を調べた。日経テレコン 21の基本データベースには、国内で発行されている新聞紙・雑誌の記事内容が登録されている。検索語を入力すると、登録されている「タイトル」「内容」「キーワード」から該当するデータが抽出される。

対象となる新聞

収載されている新聞紙の中から、「朝日新聞」「毎日新聞」「読売新聞」「産経新聞」「日本経済新聞」のいわゆる五大紙を対象として検索した。すべての新聞紙のデータベースが完備しているのが1992年以降であるため、1992年以降を対象とした。

また、収載されている107の雑誌を対象に同様の検索を行った。

C. 研究結果

「かび」に関する新聞記事数

対象となった五紙の真菌に関する記事数の年次推移を図1に示す。データベースの登録数は、90年代前半から増加し、2000年以降はほぼ横ばいで、2009年には減少していた。

総記事に対する「かび」に関連する記事の割合

総記事数に対する「かび」関係の記事の割合はほぼ一定であった(図2)。5紙を比較すると、産経新聞の割合が高く、日経新聞が低かった。

総記事に対する「真菌」に関連する記事の割合

総記事に占める「真菌」関連の記事数を示す。何れの新聞においても真菌の記事数は少なく、研究期間中に大きな変化を示さなかった(図3)。

「かび」に関する雑誌記事数

対象となった雑誌記事の年次推移を図4に示す。記事数は2000年以降、徐々に増加しているが、総数は新聞の約半分である(図4)。

「真菌」に関する雑誌記事数

「真菌」という単語を用いている雑誌は極めて少ない。その変動に一定の傾向を認めない(図5)。

新型インフルエンザの流行が報道に与えた影響

新聞、雑誌の何れにおいても、新型インフルエンザ関連のカビ・真菌記事が増加している(図6、7)。

D. 考察

新聞・雑誌は国民への情報提供の強力な手段である。近年、医療や医学

に関する新聞記事は増加傾向にあり、がん対策や産科・小児科問題を啓発する上で大きな役割を果たしていると考えられている。

本研究では、真菌感染症に関する新聞・雑誌記事報道は極めて少なく、新聞を通じて真菌感染情報が国民には伝わっていないことを明らかにした。

昨年度までの研究で、大手新聞では平均して、毎日1回程度、「カビ」という単語が用いられていることが明らかとなった。2009年度は、記事数が減少しているのは、新型インフルエンザの流行により、紙面が制約されたためと考える。

ただ、新聞で報道されている「カビ」の記事の多くは医療とは無関係のものである。事実、「真菌」という記載がある記事は、「カビ」という記載がある記事の20分の1程度である。以上の事実は、新聞が真菌感染の啓蒙に果たす役割は少なく、戦略の見直しを考える必要があることを示唆する。

雑誌の状況は、もっと悲惨である。登録されている雑誌すべて合わせて「カビ」の記載がある記事は200程度に留まる。それも、醸造など食品関係の雑誌に偏る。雑誌は、新聞では書くことができない専門性が高い情報を提供することが可能である。真菌感染も、その範疇に入りうる。雑誌を用いた啓蒙活動についても、検討が必要である。

近年、さまざまなメディアが発達し、国民に多様な医療情報を提供している。しかしながら、その詳細については不明な点が多い。真菌感染症対策の徹底を考慮した場合、このようなメディアの特性を理解し、効率的に利用することが重要であろう。

E. 結論

主要新聞・雑誌上における真菌感染症の報道は少ない。

F. 健康危機情報
特記すべき事項なし。

なし
2. 学会発表
なし

G. 研究発表
1. 論文発表

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。

五大紙検索語『カビ』

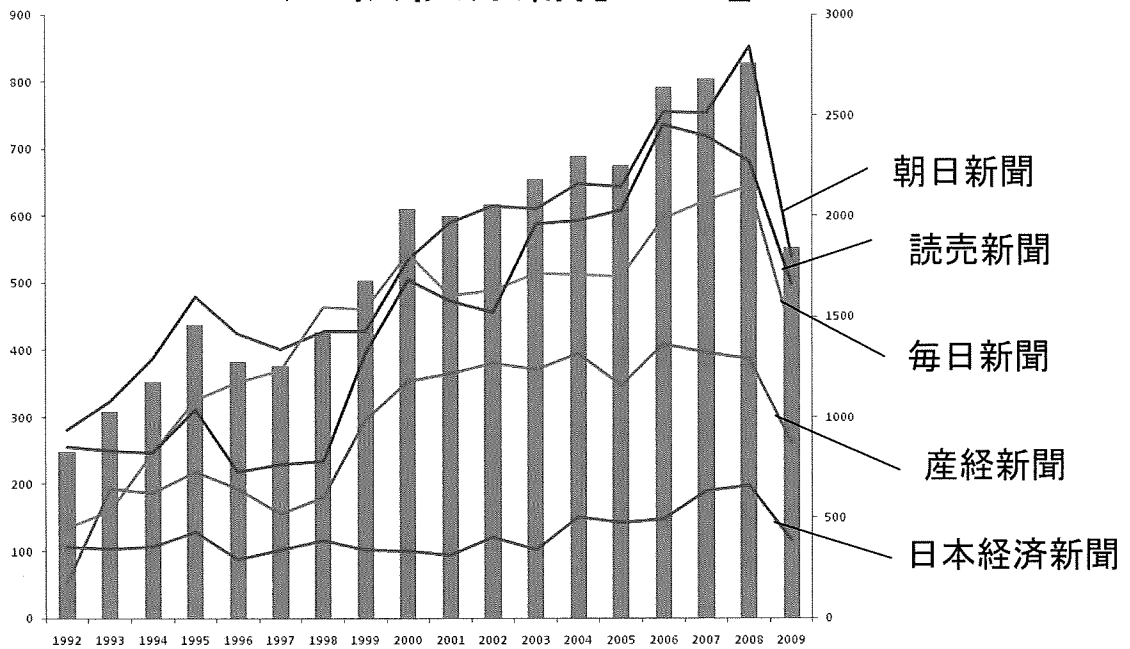


図 1

検索語『カビ』全新聞に占める割合

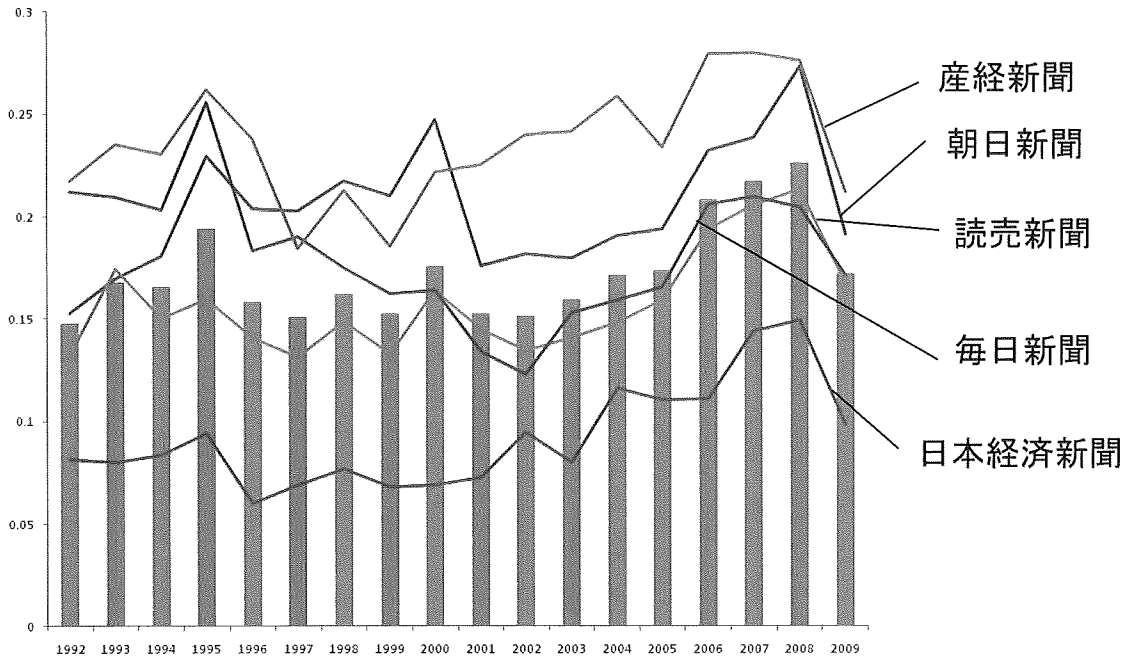


図 2

検索語『真菌』全新聞に占める割合

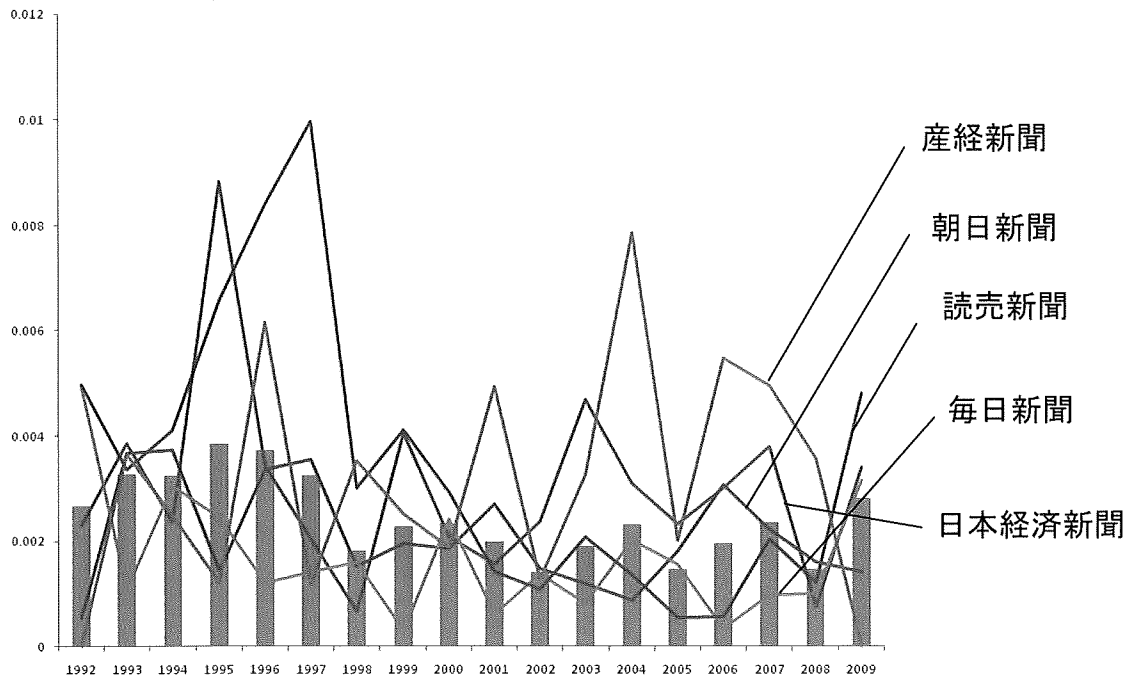


図 3

雑誌 検索語『カビ』

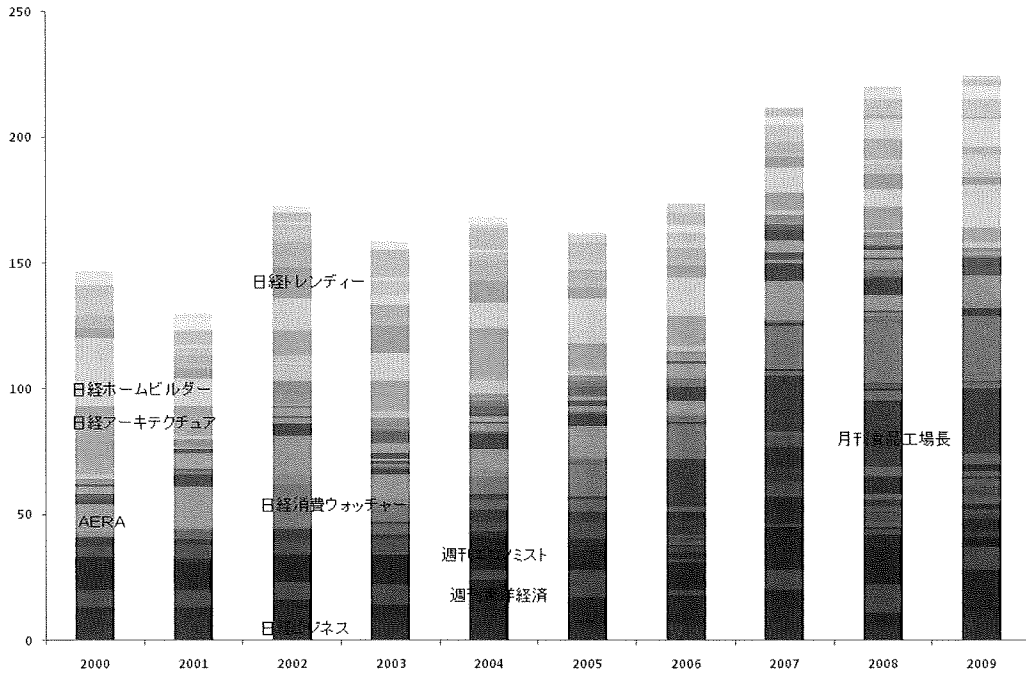


図 4

雑誌 検索語『真菌』

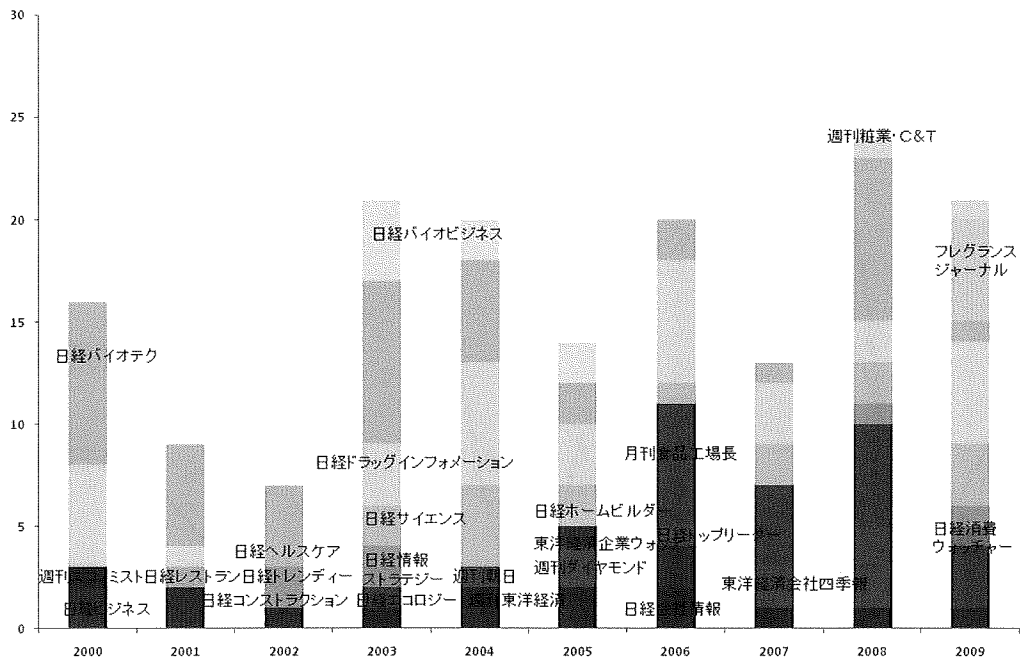


図 5

検索語『新型インフルエンザ and (カビ or 真菌)』 全新聞に占める割合

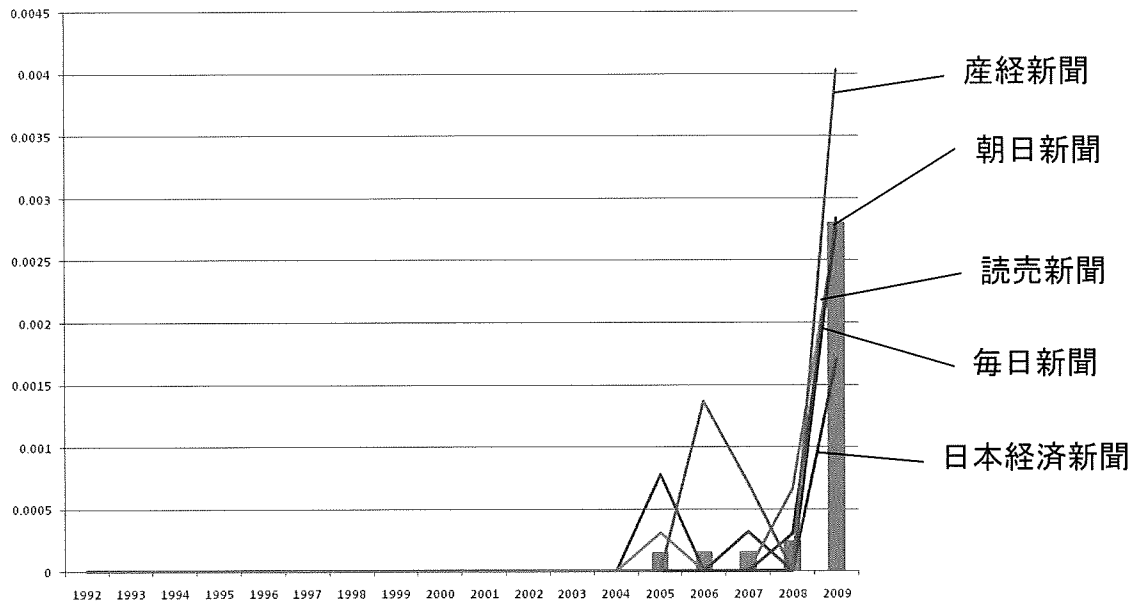


図 6

検索語『新型インフルエンザ and (カビ or 真菌)』 全雑誌に占める割合

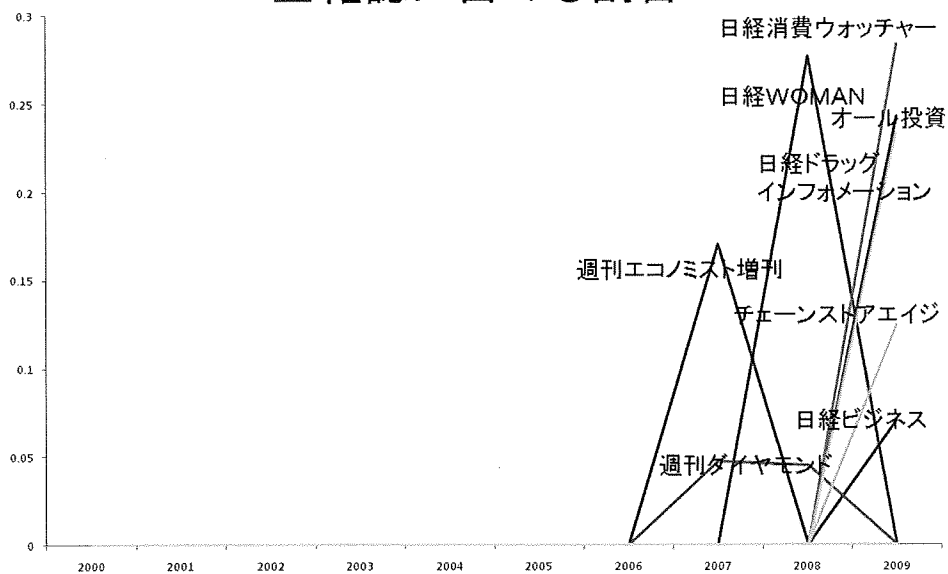


図 7

平成 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」
研究報告書

抗真菌薬シーズの開拓と新興真菌感染症の分子疫学

分担研究者 杉田 隆 明治薬科大学微生物学教室

研究要旨

1. 新規抗真菌薬の開発を目指して、海生菌の二次代謝産物からシーズとなる化合物の探索を試みた。新規化合物 DB-2 は糸状菌から酵母にわたり幅広い活性を示し、またその作用は殺菌的であった。新規抗菌薬シーズとなりうる可能性を見出した。
2. 新興真菌感染症の一つであるトリコスポロン症は予後不良な真菌感染症に位置づけられ、我が国でもその患者数は上昇の傾向にある。本年度も世界レベルでの疫学調査を継続した。起因菌である *Trichosporon asahii* の遺伝子型は各国に特徴的であった。
3. さらに、タイ患者から新規な *Pseudozyma* spp. を分離した。アムホテリシン B 以外の抗真菌薬にはすべて耐性であった。

A. 研究目的

1. 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。昨年、抗真菌活性を有する画分の化学構造 DB-2 を決定した。本年度は DB2 に対する詳細な抗真菌スペクトルについて検討した。
2. 新興真菌感染症の一つであるトリコスポロン症は予後不良の感染症である。近年ではキャンディン系抗真菌薬投与後のブレークスルー感染症として、患者数は増加傾向である。特に、致死率は 70%以上とカンジダ症のそれよりも高い。昨年より継続して本症の起因菌である *Trichosporon asahii* の種内多様性を調べ、諸外国患者由来株と比較を行うことにより本邦の真菌学的な特徴を比較検討した。
3. 易感染性宿主の増加に伴い、これに

発症する日和見感染症患者も増加している。これには起因菌の多様化も連動する。タイ患者血液から分離した新規な真菌についても検討を加えた。

B. 研究方法

- 1) 新規抗真菌化合物 DB-2 の抗菌スペクトル：海洋から分離した真菌 *Didymella bryoniae* の培養ろ液中の CHCl₃ エキス画分から得られた新規抗真菌化合物 DB-2 の化学構造を図 1 に示す。表 1 に示す糸状菌、酵母および細菌について抗菌活性を CLSI 法に準拠して調べた。
- 2) トリコスポロン症起因菌 *T. asahii* の分子疫学調査：トルコのトリコスポロン症患者 107 例について検討した。*T. asahii* の rRNA 遺伝子中の最も variable な領域である IGS1 (intergenic spacer region) (図 2) の DNA シーケンスを行い、これまでに行われた本邦、米国、タイ患者由来株と比較した。
- 3) 新興真菌感染症起因菌 *Pseudozyma*：タイ人真菌症患者から分

離した真菌株について、新種としての検討を行った。

C. 研究結果

1. 新規抗真菌化合物 DB-2 の抗菌スペクトル：糸状菌 6 菌種 17 株、酵母 7 菌種 45 株はすべて $1 \mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で増殖が阻止された(表 1)。またそれは殺菌的であった。細菌についてはグラム陽性・陰性菌ともに作用は全く示さなかった。DB-2 は病原真菌に対して幅広い抗真菌活性を示すことが判明した。

2) トリコスポロン症起因菌 *T. asahii* の分子疫学調査：IGS 解析から 107 株中 87 株が *T. asahii* であった。この内、78%が 1 型を示し、次いで 5 型が 8%と続いた(図 3, 4)。図 4 には本邦、米国、タイについての情報も加えた。米国とは著しくその分布は異なるが、トルコは本邦と類似したパターンを示していた。既存の抗真菌薬に対する感受性は、ポリコナゾールが最も効果が高かった(表 2)。なお、107 株中 20 株が *T. faecale* 等の *non-asahii Trichosporon* であった。1 株は新種に相当した。

3) 新興真菌感染症起因菌 *Pseudozyma*: タイ患者の血液より分離された菌株について系統解析を行ったところ、*Pseudozyma* に属する新種と判明した(図 5)。また、アムホテリシン B 以外の薬剤にはすべて耐性あるいは低感受性であった(表 3)。

D. 考察

天然物にはいまだ未知の新規化合物が多く存在している。本研究で見出された新規抗真菌活性物質 DB-2 の詳細な抗菌スペクトルを調べた。その結果、子嚢菌と担子菌の両方に抗真菌活性を示すことから広域スペクトル化が期待できる。今後は本化合物をリードとして抗真菌活性の至適化が期待される。

トリコスポロン症の深在性真菌症に占める本症の割合は、本邦ではおよそ 5%程度と推定されている。本研究で、世界規模での分子疫学調査を実施したところ、その遺伝子型には地域特異性が見出された。トルコ人患者における遺伝子型分布は本邦の患者と類似している。しかしながら、*non-asahii Trichosporon* については本邦にない著しい多様性が見出された。本邦ではまだ報告はないがタイではすでに *Pseudozyma* 症患者が何例か報告されている。本邦でも日和見感染症患者の増加にともない起因菌も多様化していることが予想されるため、この様な未知な菌種についての同定・検出系を構築しておくことが大事である。

E. 結論

新規化合物 DB-2 は子嚢菌および担子菌の両方に幅広く抗真菌活性を有していた。また、新興感染症の一つであるトリコスポロン症の世界規模での分子疫学調査を行い、起因菌の遺伝子型は地域特性性を有することが判明した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (原著)

1. Takashima M, Sugita T, Toriumi Y, Nakase T: *Cryptococcus tepidarius* sp. nov., a thermotolerant yeast species isolated from a stream from a hot spring are in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 181-185, 2009
2. Dizbay M, Adisen E, Kustimur S, Sari N, Cengiz B, Yalcin B, Kalkanci A, Gonul II, Sugita T: Fangemia and Cutaneous Zygomycosis Due to *Mucor circinelloides* in an Intensive Care Unit Patient: Case Report and Review of Literature. *Jpn J Infect Dis.* 62, 146-148, 2009
3. Yang X, Sugita T, Takashima M,

- Hiruma M, Li R, Sudo H, Ogawa H, Ikeda S: Differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates from Japanese and Chinese patients by randomly amplified polymorphic DNA and DNA sequence analysis of the non-transcribed spacer region of the rRNA gene. *J Dermatol Sci.* 54, 38-42, 2009
4. Takahata Y, Hiruma M, Shiraki Y, Tokuhisa Y, Sugita T, Muto M: Treatment of dermatophyte onychomycosis with 3 pulses of terbinafine (500 mg day for a week). *Mycoses* 52, 72-76, 2009
 5. Ishibashi Y, Kato H, Asahi Y, Sugita T, Nishikawa A: Identification of the major allergen of *Malassezia globosa* relevant for atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 55, 185-192, 2009
 6. Yang X, Li Y, Zhou X, Wang Y, Geng S, Liu H, Yang Q, Lu X, Hiruma M, Sugita T, Ikeda S, Ogawa H: Rhinofacial conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a Chinese rice farmer. *Mycoses.* 2009 Apr 29. [Epub ahead of print]
 7. Kalkanci A, Sugita T, Arikan S, Yucesoy M, Ener B, Otag F, Kiraz N, Kustimur S, Sancak B, Evcil C, Emektas G: Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen *Trichosporon* isolated from Turkish patients. *Med Mycol.* 2009 May 22:1-6. [Epub ahead of print]
 8. Sugita T, Suzuki M, Goto S, Nishikawa A, Hiruma M, Yamazaki T, Makimura K: Quantitative analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota in 770 healthy Japanese by age and gender using a real-time PCR assay. *Med Mycol.* 2009 May 21:1-5. [Epub ahead of print]
 9. Mekha N, Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A, Auttateinchai R, Poonwan N, Sawanpanyalert P: Genotyping and antifungal drug susceptibility of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii* isolated from Thai patient. *Mycopathologia* 169, 67-70, 2010
 10. Sugita T, Miyamoto M, Tsuboi R, Takatori K, Ikeda R, Nishikawa A: *In vitro* activities of azole antifungal agents against *Propionibacterium acnes* isolated from patients with acne vulgaris. *Biol Pharm Bull.* 33, 125-127, 2010
 11. Abdel—Rahman SM, Sugita T, Gonzalez GM, Ellis D, Arabatzis M, Vella-Zhra L, Vigui-Vallanet C, Hiruma M, Leeder JS, Preuett B: Divergence among an international population of *Trichophyton tonsurans* isolates. *Mycopathologia.* 169, 1-13, 2010
- 学会発表 (国際)
1. Fukuda T, Sugita T, Takakura S, Takata T, Kushima H, Takaue Y, Tamura K, Tokimatsu I. Clinical Characteristics and Treatment Outcome of Disseminated Trichosporonosis: Survey of 67 Patients with Hematological Disease. 2009 BMT Tandem Meetings, 2009/2, Florida, USA
 2. Ishibashi Y, Kato H, Asahi Y, Sugita T and Nishikawa A. *Malassezia* colonization and the IgE antibody response in atopic dermatitis. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo
 3. Sugita T. Recent progress in the taxonomy, identification, and epidemiology of the basidiomycetous pathogen *Trichosporon*. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo.
 4. Tajima M, Sugita T, Nishikawa A and Tsuboi R. Molecular analysis of *Malassezia* microflora in seborrheic dermatitis patients: Comparison with other diseases and healthy subjects. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo

5. Sugawara K, Ishibashi Y, Sugita T and Nishikawa A. Thymic stromal lymphopoietin secretion from human keratinocytes during exposure to *Malassezia* species. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo
6. Miyamoto M, Sugita T, Tajima M, Ito T, Kato Y, Tsuboi R, Kato H and Nishikawa A. *Malassezia* microbiota and specific IgE antibody production in patients with atopic dermatitis. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo
7. Ishibashi Y, Asahi Y, Kato H, Sugita T and Nishikawa A. Identification of the major allergen of *Malassezia*. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo
8. Kato H, Sugita T, Ishibashi Y, Nishikawa A, Takahata Y, Muto M and Hiruma M. Evaluation of specific IgE and IgA levels against *Malassezia* species in sera of patients with atopic dermatitis. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo
9. Kushima H, Tokimatsu I, Sugita T, Takakura S, Fukuda T, Takata T, Kadota J and Tamura K. Disseminated trichosporonosis caused by *Trichosporon* species in patients with hematological malignancies: A retrospective multicenter study from Japan. The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo.
10. Sugita T. Molecular Epidemiology of the cutaneous *Malassezia* microbiota in *Malassezia*-related skin disease. Satellite Symposia, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo.
11. Ishibashi Y, Asahi Y, Kato H, Sugita T and Nishikawa A. Major allergen components of *Malassezia restricta* in patients with atopic dermatitis. Satellite Symposia, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo
12. Yang XM, Sugita T, Takashima M, Hiruma M, R.Y.Li, Sudoa H, Ogawa H, Ikeda S. Differentiation of *Trichophyton Rubrum* clinical isolates from Japanese and Chinese patients by randomly amplified polymorphic DNA and DNA sequence analysis of the non-transcribed spacer region of the rRNA gene. Satellite Symposia, The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009/5, Tokyo
13. Onder M, Kalkanci A, Tevlek C, Gürer MA, Sugita T. Molecular analysis of cutaneous *Malassezia* load in Turkish patients with atopic dermatitis in different anatomical sites with different severities. 4th Trends in Medical Mycology, Athens, Grece, 2009/10
14. Sugita T. The *Malassezia* microbiota in patients with *Malassezia*-related skin diseases. 4th Trends in Medical Mycology, Athens, Grece, 2009/10

学会発表 (国内)

1. 園田尚子、時松一成、門田淳一、杉田隆、高倉俊二、福田隆浩、高田徹、田村和夫、血液疾患群と非血液疾患群における深在性トリコスポロン症の臨床像、真菌症フォーラム第10回学術集会、2009/2、名古屋
2. 清水美貴子、杉田隆、竹内修、望月真弓、田村悦臣、プロバイオティクスの科学的エビデンスの構築 -基礎と臨床研究の統合-、日本薬学会第129年会、2009/3、京都
3. 塚田真梨子、深井みゆき、鈴木俊宏、杉田隆、三木和彦、石野雅弘、木下薫、高橋邦夫、小山清隆、海洋由来真菌代謝産物からの血管新生阻害活性物質の探索、日本生薬学会第