

200931008B

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・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

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 大野秀明

平成22（2010）年4月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・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

平成 19 年度～21 年度 総合研究報告書

研究代表者 大野秀明

平成22（2010）年4月

目 次

I. 総合研究報告書	
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 大野秀明	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
III. 研究成果の刊行物・別冊	79

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総合研究報告書

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

研究代表者 大野秀明 国立感染症研究所生物活性物質部 室長

研究要旨

(1) 輸入真菌症の国内発生状況調査：現在までコクシジオイデス症 61 例、ヒストプラスマ症 68 例などが把握された。またパラコクシジオイデス症の再増加やマルネツフェイ型ペニシリウム症の増加が示され、輸入真菌症の多彩化が明らかとなった。(2) 抗 *Histoplasma capsulatum* 抗体検出法の開発：エピトープ部位絞り込みのための部分タンパク質の発現・精製に成功した。今後エピトープ部位の同定を行う事により、*Histoplasma* 抗原を用いた ELISA 法を用いた高感度な検出法が作成可能となった。(3) 輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発：(a) 真菌症原因菌となる新種微生物の記載：ヒト臨床検体より分離された病原体として 2 種の新種記載・報告 (*Candida auris*、*Prototheca cutis*) と、動物から分離された 1 種の新種酵母 (*Sporobolomyces koalae*) の記載・報告を行った。(b) *Malassezia* 属酵母に対する有効な培養法と表現形質の解析法を開発・報告すると共に、本菌のヒト常在菌としての生態学的研究を行った。(c) *Pneumocystis* 肺炎に対して我が国で発明された loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を用いた新規遺伝子診断法を研究開発した。(d) 輸入真菌感染症マルネツフェイ型ペニシリウム症の菌学的診断法を開発した。(e) 新興真菌感染症トリコスポロン症の分子疫学調査：病原真菌 *Trichosporon asahii* の種内多様性を調べ、遺伝子型は感染国において特徴的であることが判明した。(f) 臨床検体から分離されるカンジダ属の主要病原菌 4 菌種の簡便な同定方法を確立した。(g) *Aspergillus fumigatus* 新規抗原検索と診断への応用：シグナルシーケンストラップ (SST) 法を用いて *Aspergillus fumigatus* の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。(4) ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた真菌症の遺伝子学的診断法検討：PCR 法および *in situ* hybridization (ISH)法を基幹とした分子生物学的解析法を病理診断在材料に応用し、疫学観察研究に向けた予備データを収集した。(5) 抗真菌剤耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索研究：海洋微生物由来の化合物および培養ろ液をスクリーニングし、真菌の ABC トランスポーターを阻害する新規物質を見出した。(6) *Candida albicans* のプロテインキナーゼを標的とする抗真菌物質の探索および基礎的解析に関する研究：*Candida albicans* の生存に必須なプロテインキナーゼ CaMPS1(mono-polar spindle-1)を新規抗真菌剤の標的候補分子とし、そのキナーゼ活性阻害物質の探索を行った。(7) 抗真菌薬シーズの開拓：きのこおよび海生菌の二次代謝産物からシードとなる化合物の探索を試み、抗真菌活性を持つ化合物を単離した。(8) メディアにおける真菌感染症の報道状況：真菌感染症対策の徹底を考慮した場合、メディアの特性を理解し、効率的に利用し情報発信を行うことが重要であると考えられた。(9) 真菌病原因子の解明：(a) 真菌感染症における宿主免疫機構の解明とその臨床的評価法の開発：i) *C.neoformans* の菌体中に NKT 細胞によって認識される糖脂質抗原として MGDG、CMH がその候補になるものと考えられた。ii) *C.neoformans* 由来の DNA は CpG モチーフとは異なる機序で TLR9 に認識され樹状細胞を活性化することが明らかになった。iii) 細胞性免疫能の定量的評価法として、T-bet/GATA3 比を指標とすることが有用と考えられた。(b) *C. albicans* α型 マンノース転移酵素欠失株の網羅的作製とその解析：*C. albicans* のα-1,2、α-1,3、α-1,6 マンノース転移酵素に着目して 25 種類の遺伝子破壊株を網羅的に作製し、菌学的性質や精製マンナン蛋白刺激による炎症性サイトカイン産生誘導について解析を行った。

研究代表者

新見昌一 国立感染症研究所・室長（平成
19、20 年度代表）

研究分担者

亀井克彦 千葉大学真菌医学研究センター・教授

榎村浩一 帝京大学医真菌研究センター・
准教授

渋谷和俊 東邦大学医学部病院病理学
講座・教授

上原至雅 岩手医科大学薬学部・教授

杉田 隆 明治薬科大学微生物学教室・
准教授

上 昌広 東京大学医科学研究所先端医療
社会コミュニケーションシステム社会連携研究部門・准教授

菊池 賢 順天堂大学医学部大学院感染制
御学 COE・准教授

三嶋廣繁 愛知医科大学病院感染制御部・
教授（平成 20、21 年度分担）

川上和義 東北大学大学院医学系研究科・
教授（平成 21 年度分担）

宮崎義継 国立感染症研究所生物活性物質
部・部長（平成 19 年度分担）

大川原明子 国立感染症研究所生物活性物
質部・主任研究官（平成 19、20
年度分担）

1. 輸入真菌症の国内発生状況調査

A. 研究目的

これまでの当研究班の研究から、わが国の輸入真菌症の症例数はコクシジオイデス症およびヒストプラズマ症を中心として増加しつつあること、その他の輸入真菌症も

散発的ながら確実に増加しつつあることが示されてきた。特にヒストプラズマ症は感染症法の対象となっていないため実態把握が困難であるが、これまでの結果では最も危険とされるコクシジオイデス症よりもさらに高い致死率が示されており、厳重な実態の監視が必要と思われる。そこで本年度も引き続き輸入真菌症の実態調査を行った。

B. 研究方法

症例の収集は、これまでと同様に、千葉大学真菌医学研究センターに対する真菌症のコンサルテーション、菌株の同定、抗体の測定などの依頼があった症例を基礎データとし、これに醫學中央雑誌、Medline などに掲載された報告症例を加えて作成した。また、同様に国立感染症研究所に対する依頼症例も重要な情報源として利用した。なお、感染症法 4 類に指定されているコクシジオイデス症に関しては、同法に基づく報告を確認しダブルチェックを行うとともに、同報による報告の認知度も確認した。症例の詳細に関しては必要に応じて主治医に直接問い合わせ、情報を補完した。

C. 研究成果（図 1）

1) コクシジオイデス症

2009 年は計 2 例が確認され、総症例数は 61 例となった。2007 年以降、3 例、3 例、2 例と比較的症例数は落ち着いてきており、これまでの増加傾向が落ち着きつつあるものと思われた。感染地は 2 例とも米国（アリゾナ州およびカリフォルニア州：1 例）であり、病型では 2 例とも肺の孤立結節影を主訴とする慢性肺コクシジオイデス症であった。いずれも大きな基礎疾患はなく、

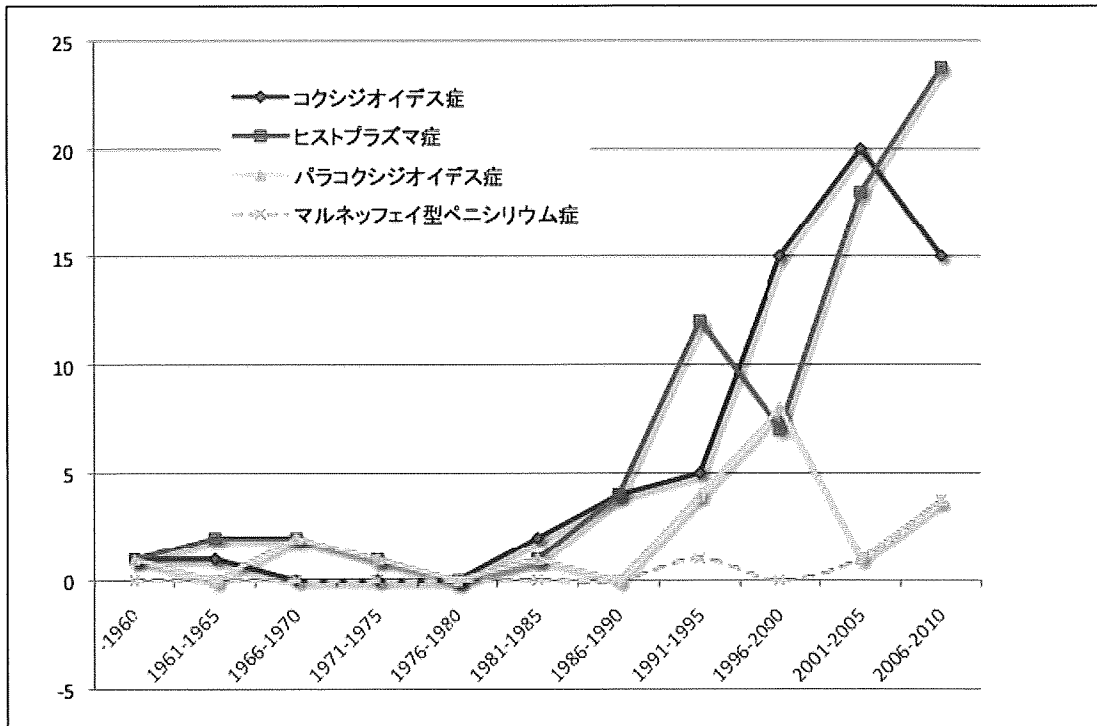


図1：我国の輸入真菌症症例数の変遷

落ち着きつつあるコクシジオイデス症症例数に対し、パラコクシジオイデス症、マルネツフェイ型ペニシリウム症の増加が目立ち、多様化が進んでいる様子が窺える。一方、ヒストプラズマ症は増加傾向が定着し、わが国でもっとも重要な輸入真菌症となりつつある。(● コクシジオイデス症、■ ヒストプラズマ症、◆ パラコクシジオイデス症、× マルネツフェイ型ペニシリウム症)。

健康人に感染する典型例と考えられた。

2) ヒストプラズマ症

2009年のヒストプラズマ症症例数は3例認められ総計は68例となった。感染地は東南アジア(タイ2例)、南米(グアテマラ1例)であり、うち2例はHIV感染を基礎としていた。病型は2例が肺感染、1例が全身播種型ヒストプラズマ症であった。昨年のような集団感染は見られなかった。

3) パラコクシジオイデス症

2006年を最後に2年間ほど発症の見られなかったパラコクシジオイデス症であるが、2009年は2例認められた。いずれも滞日中の南米人であり、ブラジルおよびボリビアに居住していた際に感染したものと思われた。病型は2例とも肺線維症+口腔粘膜などの潰瘍を呈するものであった。

4) マルネツフェイ型ペニシリウム症

これまでわずかに3例の症例が認められたのみであったが、2009年には新たな2例が相次いで発見され、計5例となった。

いずれも東南アジア（タイ及びベトナム）での感染であり、HIV 感染を基礎疾患とする全身感染であった。

5) その他の輸入真菌症

その他の輸入真菌症に関しては、ブラストミセス症を含め発生は認められなかった。

D. 考察

今回の検討では、コクシジオイデス症はやや減少傾向、ヒストプラズマ症も急速な増加からやや落ち着きを取り戻しつつあるように見える。しかし、一方では、これまで長い間症例の認められなかったパラコクシジオイデス症およびメルペニシリウム症の患者が相次いで発見され、輸入真菌症の多様化が進行していることが示された。これに対して、ブラストミセス症はまだわが国で1例も信頼に足る報告がなされていないが、同疾患の広い感染地域（米国五大湖周辺を中心とするや、米国での患者数の多さを考えると、今後わが国でも確実に発生するものと予想され、診断体制、治療体制を完備しておく必要があると考えられる。今回の調査では、一時コンスタントに症例が見られたパラコクシジオイデス症が復活したこと、そして、わが国で報告の見られる輸入真菌症の中でもっとも稀なものとされていたマルネツフェイ型ペニシリウム症で2例がまとまって認められたことが特徴といえる。マルネツフェイ型ペニシリウム症は昨年までは総計でも3例の報告しか認められず、輸入真菌症の中でもきわめて稀なものと考えられていた。しかし、その内容を見てみると、1998年に第1例が報告された後、2002年、2006年にそれぞれ1例ず

つ報告され、今回2例まとめて報告されたことになる。着実な増加が認められ、主要な輸入真菌症の1つとなる可能性が懸念される。本症は特にその多くがHIVを基礎としており、わが国でも今回の例を含め全例がHIV陽性者である。わが国で潜在的なHIV陽性者が増加していくと、更に深刻な問題となる可能性も考えられる

今回の調査では、症例総数の増加よりもその多様化が目立った。これには、HIV感染の広がりや社会構造の変化等が起因していると思われる。さらにこれらの高度病原性真菌はいずれも比較的高温を好む性質を持っているため、地球温暖化により流行地での感染機会の増加はもちろん、起因菌がわが国に定着できるようになる可能性もあり、今後の展開を注視しておく必要がある。

E. 結論

今年度の発生状況調査にてパラコクシジオイデス症の再増加やマルネツフェイ型ペニシリウム症の増加が示され、輸入真菌症の多彩化が明らかとなった。今後とも多面的な情報提供、研究が必要と考えられる。

2. 抗 *Histoplasma capsulatum* 抗体検出法の開発

A. 研究目的

ヒストプラズマ症は本邦における主要な輸入真菌症の一つである。これまでの本研究班の調査においても本邦における輸入真菌症症例数はヒストプラズマ症を中心に増大を続けており、その後も海外渡航者増加等の要因により更に増大していることが懸念される。このため引き続きヒストプラズマ症、コクシジオイデス症を中心とする輸

入真菌症の実態調査を行った。また、本症の診断には、病理組織観察や培養による菌の検出等が行われ、非常に重要な意義を持っている。しかしながら、いずれも感度が低く、また特殊な設備、時間を要するという大きな欠点を持っており、これらの手法と同時に迅速・簡便な診断法が求められている。ヒストプラズマ菌体に由来する抗原もしくはそれに対する抗体を検出する血清試験が迅速診断法として用いられているが、現行の血清診断試薬を用いた本邦の症例に対する検討では十分な感度が得られないことが明らかとなった（以前の本邦厚労科研究事業での成果）。このような背景からヒストプラズマ症血清診断法の開発・改良が求められている。これまでの研究において、患者血清中抗体により認識される *H. capsulatum* 抗原タンパク質を同定してきた。さらにこれまでに同定した各抗原タンパク質を *H. capsulatum* total RNA よりクローニングし、大腸菌内での組換えタンパク質として大量発現させ、精製を進めた。精製した抗原タンパク質の ELISA 法への応用を現在保有するヒストプラズマ症患者血清を用い検討を行った結果、これまでに既知の抗原である M 抗原(AgM)および H 抗原(AgH)では、我々が精製した組換えタンパク質においても患者群において健常人群に比べその抗体価は優位に高い値を示すことがわかり、これら組換えタンパク質が今後、血清診断に利用可能であることが示唆された。また、その他複数の新規抗原においても健常人群に比べヒストプラズマ症患者群の血清中抗体と有意に強く反応することがわかり、今後の応用が期待できる。また、複数の抗原タンパク質を可溶化状態で精製する

ことに成功しており、これらは今後の *H. capsulatum* 抗原の幅広い応用の道を拓くものと期待される。

一方で、各抗原タンパク質のエピトープ部分に関する情報はこれまでに全く知られていない。患者血清中抗体が認識する主要なエピトープ部分が同定できれば、エピトープではないタンパク質部分の除去、複数のエピトープ複合タンパク質の作製により、これまでより感度高く検出ができると期待される。そこでエピトープを同定するための部分タンパク質発現ベクターの構築およびそれらタンパク質の発現・精製を行った。

迅速診断の一つとして PCR ベースの迅速診断法が行われている。これまでに同定した新規抗原タンパク質のうち、一つが PCR による迅速診断法に应用可能である可能性が明らかとなってきたため、その検討も同時に行った。

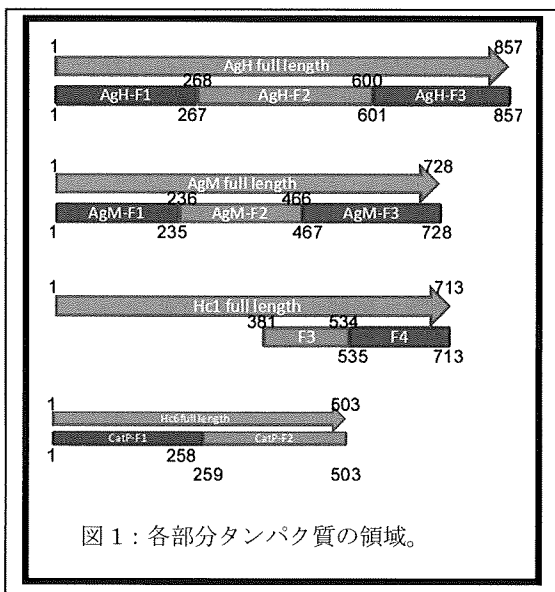
B. 研究方法

1. *H. capsulatum* 部分タンパク質のクローニング、精製・発現および部分タンパク質を用いた ELISA

H. capsulatum の主要な抗原として既に知られている AgH および AgM を含めて、合計 4 種の抗原タンパク質について図 1 に示した部分タンパク質遺伝子をクローニングし、発現ベクターへ組み込んだ。これらのタンパク質大量発現ベクターを用いて、His-tag 融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。発現させたタンパク質はいずれも可溶化せず、封入体として回収されたため、8M 尿素で可溶化した。封入体からの抗原タンパク質の精製はニッケルカラムを用いて行い、250mM イミダゾールを含むバッ

ファで溶出した。得られたタンパク質を精製抗原タンパク質とした。

ELISA は以下の通り行った。抗原タンパク質をコーティングバッファ中で MaxiSorp (Nunc) に 16 時間、4℃にてコーティングした。TBS にて洗浄後、Protein Free Blocking Buffer solution (Pierce) によるブロッキングを行った。0.1% Tween20 含有 TBS (TBS-T) で洗浄後、100 倍希釈した患者血清を 2 時間、25℃にて反応させた。再度 TBS-T で洗浄し、Protein L-HRP を添加し、1 時間、37℃にて反応を行った。TBS-T による最後の洗浄を行い、TMB を用いた発色反応を室温で 30 分間行った。停止液 (1N 硫酸) にて反応を止めて速やかに 450nm における吸光度を測定した。



2. *H. capsulatum* 抗原 Hc1 遺伝子の相同性検索と各真菌種相同遺伝子との系統樹の作成

公共データベース上からえられた Hc1 遺伝子と相同性がある真菌遺伝子 66 配列を比較した。配列は GENETYX Ver.9 上の

ClustalW でアライメントを行い、近隣結合法により系統樹を作図した。

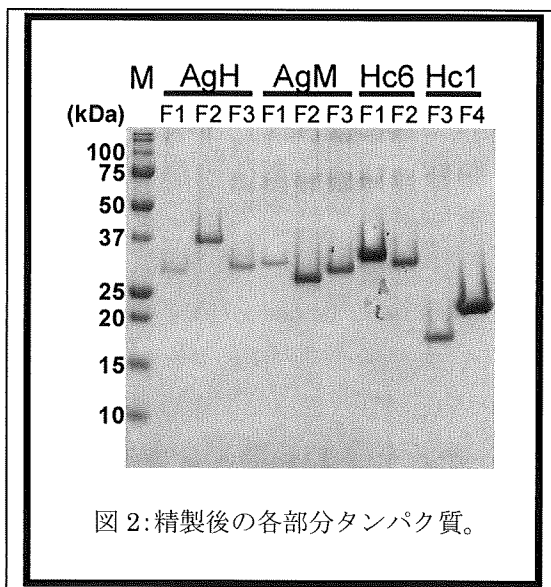
(倫理面への配慮)

千葉大学真菌医学研究センター倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1. 部分タンパク質の精製・発現

研究方法に示した精製により、AgM、AgH、Hc1 と Hc6 の部分タンパク質について封入体を形成したがいずれについても発現・精製をすることができた(図 2)。



現在、これらの部分タンパク質と昨年度までに精製した全長抗原タンパク質を 96 ウェルプレートにコーティングをして、患者血清中抗体がどの部分と反応しているかを検討している。患者血清 3 検体を用いた予備実験の結果から Hc1 では 2 検体は F3 部分タンパク質、1 検体は F4 部分タンパク質と反応しており、それぞれの部分タンパク質上に主要なエピトープ部位が存在すると示唆された。また、Hc6 では 1 検体で F1

部分タンパク質と強く反応が認められ、F1部分タンパク質上にエピトープ部位が存在していることが示唆された。

2. *H. capsulatum* 抗原 Hc1 遺伝子の応用利用

Hc1 遺伝子と相同性が見られる遺伝子を各真菌種より検索した。*H. capsulatum* も検索対象とし、また主要な輸入真菌症原因菌である *C. immitis*、*C. posadasii*、*P. brasiliensis*、*B. dermatitidis*、*P. marneffei* の遺伝子を含め、66 の配列を比較した。

H. capsulatum において Hc1 遺伝子のパラログと推測される遺伝子が 2 つ見つかった。これらは Hc1 遺伝子とおよそ 45% の相同性を有していた。

相同性検索と NJ 法による解析から *C. immitis*、*C. posadasii*、*P. brasiliensis*、*B. dermatitidis* においても *H. capsulatum* と同様に Hc1 と相同性が最も高いホモログの他に 2 つのパラログを持っていること、またそれぞれがグループを形成し、相同性を基に大きく 3 つのグループに分けられることが明らかとなった。*P. marneffei* のみこれら 3 グループのうち、Hc1 遺伝子が含まれるグループと相同性が高い遺伝子を有していないことも明らかとなった。Hc1 遺伝子が含まれるクレードを図 3 に示した。

Candida 属については 6 菌種 のホモログ遺伝子配列を解析に用いたが、これらの遺伝子は *Candida* 独自のグループを形成しており、Hc1 を含む 3 つの遺伝子との相同性はいずれも 50% 程度であった。*Aspergillus* 属菌の相同遺伝子も Hc1 遺伝子のパラログと同じグループに入るものはあったが、Hc1 遺伝子との相同性はおよそ 50% と高いもの

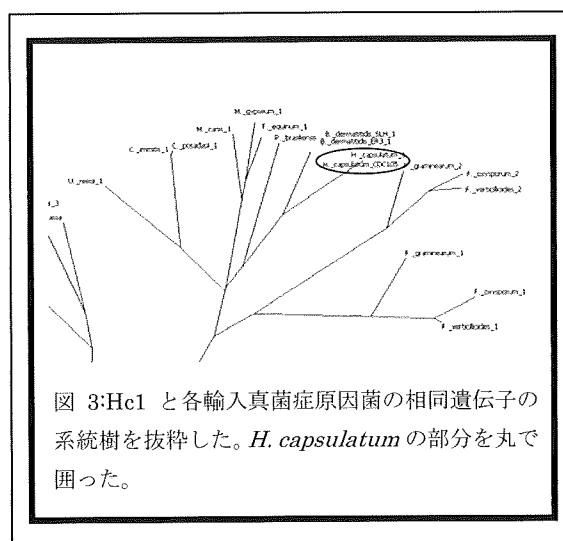


図 3:Hc1 と各輸入真菌症原因菌の相同遺伝子の系統樹を抜粋した。*H. capsulatum* の部分を丸で囲った。

ではなかった。*Rhizopus* 属や *Cryptococcus* 属のホモログも Hc1 遺伝子やそのパラログとは系統樹上、同一のグループに入らないことが明らかとなった。

D. 考察

本研究課題においてこれまでに *H. capsulatum* の新規抗原を同定し、それらの組換えタンパク質の精製、ELISA への応用を進めてきた。これまでに既知の抗原に加えて 2 種の抗原タンパク質で患者群と健常人群の間で抗体価に有意な差が見られることを明らかとしてきた。

さらに感度の上昇とバックグラウンドの低減を目指して、エピトープ部位の同定を進める。今年度はそのための部分タンパク質の発現・精製をすすめた。4 種の抗原タンパク質の部分タンパク質合計 10 種について発現および精製に成功した。これらのタンパク質のうち、Hc1 および Hc6 の部分タンパク質を用いて予備的解析を行った結果、Hc1 では患者により F3 もしくは F4 の部分タンパク質に主要なエピトープが存在し、Hc6 では主要なエピトープが F1 部分タ

ンパク質に存在することが示唆された。更に患者血清の数を増やし、またさらに詳細にエピトープ部位の解析を進める予定である。これらの解析が感度の上昇とバックグラウンドの低減などに資するものと期待している。

また、これまでに同定してきた Hc1 抗原遺伝子が *H. capsulatum* 同定に有用であることが遺伝子解析の結果から明らかとなってきた。Hc1 を含む遺伝子グループは我が国における主要な真菌症原因菌 *A. fumigatus*、*C. neoformans*、*Candida* 属菌では存在しない。*B. dermatitidis* は有性世代は *H. capsulatum* と同じ *Ajellomyces* 属であり、Hc1 遺伝子とそのホモログの間での相同性は 78% と非常に高い。その他の輸入真菌症原因菌では *P. brasiliensis* が最も相同性が高いが、その相同性は 66% にとどまる。このことから *H. capsulatum* を特異的に検出するための標的遺伝子として Hc1 遺伝子が有望と推測される。現在、本遺伝子の 2 領域を標的として検討を進めている。これらの解析を進めることにより、PCR をベースとした迅速診断法の開発につなげられると期待する。

E. 結論

エピトープ部位絞り込みのための部分タンパク質の発現・精製に成功した。また、予備的解析を開始しており、今後エピトープ部位の同定を行う事により、*Histoplasma* 抗原を用いた ELISA における感度上昇、バックグラウンド低減を達成できると期待する。

また、これまでに同定してきた抗原をコードする遺伝子が PCR をベースとした迅速診断法へ利用できる可能性を示した。

3. 輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発

A. 研究目的

本研究課題の一部としてその目的となっている「深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法開発」を遂行するため、本分担研究では「輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発」を分担研究課題として、その基盤的・応用的研究ならびに開発をおこなう。

B. 研究方法

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、これら感染症起因菌の分離同定と、起因菌となる菌種のリストアップ、および適切な新種記載を欠かすことはできない。したがって、本研究では診断法の開発と共に、その基盤となる病原真菌の菌学的・分類学的研究を行うことを目的とする。

本分担研究によって、我が国における真菌症対策上必須となる病原真菌のインベントリ一作成が推進され、本症管理の基盤形成が期待される。また、この成果に基づいて、柔軟かつ信頼性の高い分子生物学的診断法の開発が可能となる。

C. 研究結果

1) 病原真菌の菌学的・分類学的研究

(1) 真菌症起因菌となる新種微生物の記載：ヒト臨床検体より分離された病原体として 2 種の新種記載・報告 (*Candida auris*、*Prototheca cutis*) を行った。また、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 1 種の新種酵母 (*Sporobolomyces koalae*) を記載・報告した。

(2) 真菌症起因菌の分離培養と生態の解明：培養が困難であったために、表在性および深在性真菌症の起因菌としての頻度が高いにもかかわらず、その解析が遅れていた *Malassezia* 属酵母に対する有効な培養法と表現形質の解析法を開発・報告すると共に、本法を用いた本菌のヒト常在菌としての生態学的研究を行う等、国内における病原真菌の分布および生態に関する報告を行った。

「環境真菌と気道感作・感染の惹起に関する研究」からは、ヤケイロタケによる周年性感作の機序として、本菌菌糸における分節型分生子形成が関与している可能性が示唆された。この分生子粒子径は、咽頭等の上気道に付着し、定着するのに適当な大きさであり、定着部において生育可能な 37℃ 発育可能性が示されている。このことから、本菌をはじめとした担子菌系糸状菌が気道に定着し、過敏反応を惹起しうることが明らかとなった。

「接合菌の病原的意義と診断に関する研究」では、一般に下気道感染を生じると考えられている接合菌の分生子 (孢子囊胞子) の粒子径が、菌株によっては 5 μm を超え、10 μm にも及ぶことが示された。これは、*Aspergillus fumigates* の分生子径が 2.5 μm に過ぎないことと比べると十分大きいことから、本菌の感染経路が本当に下気道か否かを再検討する必要をも示唆するものである。粒子の下気道到達性については、粒子径のみならず、粒子表面の荷電、疎水性等多種の因子が関与しているものと考えられることから、これら勘案しつつ検討を続

ける必要があるものと考えられる。また、抗真菌薬感受性についても、菌株によっては、意外にも現行抗真菌薬に感受性を示すものもあり、治療上の選択肢として考える余地が期待できることが示された。

2) 輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発

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研究を報告すると共に、新規プライマー系を用いた新興真菌血症起因菌: *Candida guilliermondii* に対する遺伝子同定法の開発・報告した。また、AIDS/HIV をはじめとした免疫抑制患者にとって最も重要な感染症でありながら、その病原診断が困難な *Pneumocystis* 肺炎に対して我が国にて発明された loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いた新規遺伝子診断法を研究開発し、報告することに成功した。

D. 考察

本研究課題に必要な臨床分離菌種の分離頻度等に関する情報を収集管理するための国内体制を整備し、併せて分離株の保存と分析研究が可能となる体制の整備がもたらされる。本体制は、単に我が国における真菌症起因菌の疫学を明らかにして、その感染管理に利するのみならず、我が国固有の遺伝子・微生物資源である本邦臨床分離株を保全し、国民の健康に関わる本症研究に供し、かつ新規診断治療法の研究開発に有効かつ必須である。また、研究成果の医療機関・専門的学術機関への公表とレファレンスシステムの構築を継続的に検討して行く必要がある。

4. ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた真菌症の遺伝子学的診断法検討

A. 研究目的

これまで病理診断材料に常用されるホルマリン固定パラフィン切片に対して、真菌の検出を目的とした分子生物学的解析法を応用した研究は十分になされていないため、関連する知見の集積はなく、手技も一般化していない。そのため、ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた遺伝子学的検討についての妥当性が付与されていない。我々はPCR法およびISH法による分子生物学的解析法を病理診断材料に応用するための検討を行った。

B. 研究方法

1) プローブ

Panfungal PNA プローブは 28S rRNA 遺伝子領域から多くの病原真菌に保存性が高い領域を選定し、N 末端に Fluorescein Isothiocyanate (FITC) 標識を施したアンチセンス PNA プローブを作製した。*Fusarium* 属および *H. capsulatum* PNA プローブは 28S rRNA 遺伝子領域からそれぞれに保存性が高い特異的な領域を選定し、同様に PNA プローブを作製した。さらに、既に実績のある PNA プローブとして *C. albicans* に対する PNA プローブを作製した。それぞれの塩基配列を以下に記す。

Panfungal: TACTTGTGCGCTATCGGT

C. albicans: ACAGCAGAAGCCGTG

Fusarium 属: GATGATCAACCAAGCCCA

H. capsulatum: CACACGGGCGAGAC

また、*Aspergillus fumigatus* の alkaline proteinase (ALP) 遺伝子および

retrotransposon *Afut-1* の long terminal repeat を標的とした FITC 標識 DNA プローブを PCR 法により作製した。

2) ISH

ISH 法はこれ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 遺伝子および *Afut-1* 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、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。

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 μm 切片を 4 枚作製し、エッペンチューブに採取した。これらを DNA 抽出法の検討に供し、加熱処理の有無、溶菌酵素の濃度、界面活性剤の種類などについて検討した。

4) コントロールアレイブロックの作製

i) 菌株

病理組織標本上で形態学的に鑑別が問題となる 30 菌種の分離培養菌を実際の病理診断材料を想定して、10%ホルマリンで 2 日間固定した浮遊液を作製した。この検討に使用した 30 菌種を表 1 に示す (表 1)。

ii) セルブロック作製法

加温溶解した 3%アガロース 50 μl を病理封入用カバーガラス (18 mm×24 mm) 上に盛り上がる様に置き、直ちにホルマリン固定した培養浮遊液 30 μl をアガロースに注

入し、チップの先端で攪拌して菌を懸濁させた。アガロースがゲル化したのち、バイオプシーシートに包み、病理用包埋カセットに入れて、型通りにパラフィン包埋した。一部の糸状菌などピンセットで把持可能な場合はナイロン膜に挟み包埋カセットに入れ、同様にパラフィン包埋した。

iii) アレイブロックの作製

30 菌種が包埋されたパラフィンブロックをドナーブロックとして、一つのブロックに 30 菌種を配置させたアレイブロックを作製した。組織アレイ作製装置（東屋医科器械，東京）を使用して内径 2.0mm 径の中空針でドナ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）。

5) 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）。

6) プローブの特異性の検証

作製したプローブの特異性は 7 種類のマウス感染モデルおよび 30 菌種からなるアレイブロックを用いて検証した。

7) 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。

8) 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て ISH 法を施行し、プローブの実用性の検証を行った。

9) 感染動物モデルおよび臨床材料における応用

これまでに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。

C. 研究結果

ホルマリン固定パラフィン切片における真菌 DNA 抽出法に関する検討では、加熱処理を施すことにより高分子領域の DNA の分解が観察されたが、より高い収量が得られた。溶菌酵素の濃度は 50U~100U/ μ l が効果的であった。検討した界面活性剤の中では、SDS が最も効果的であった。

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。

Panfungal PNA プローブの特異性を 7 菌種の感染マウスの肺組織を用いて検討したところ、すべての菌においてその菌体に強い顆粒状のグナルが検出された（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出された。*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 プローブの特異性を7菌種の感染マウスの肺組織を用いて検討したところ、*F. solani* に特異的なシグナルを認めた(図4)。アレイブロックにおいては *F. 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5)。

H. capsulatum PNA プローブの特異性をヒストプラズマ症患者の骨髄生検のホルマリン固定パラフィン切片において検討したところ、*H. capsulatum* の菌体に一致した顆粒状のシグナルを認めた(図6)。アレイブロックを用いた検討では検討した30菌種においてシグナルは全く得られなかった(図7)。なお、上記の骨髄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、バンドは薄いが10日間固定され

た試料においても増幅が確認された。

感染動物モデルと剖検症例を用いた検討では、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。

D. 考察

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。

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。

感染動物モデルおよび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. solni* 感染モデルの菌体に特異的なシグナルが得られ、アレイブロックにお

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。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。*H. capsulatum* PNA プローブにおいてもアレイブロックおよびヒトヒストプラズマ症病理検体においてその特異性が確認された。

我々が ISH 法において標的としている rRNA は真菌の細胞質に多量に存在する事が想定される。しかし、病理診断で常用されるホルマリン固定パラフィン切片においては、固定、標本作成過程等で、化学的に不安定な RNA は消失する可能性も否定できず、RNA の保存度の検討を行う事は必須の操作と考えている。今回我々が作製した Panfungal PNA プローブは、検討したすべての菌において十分なシグナルが得られ、rRNA の保存度の評価に有用であると考えられた。

ヒストプラズマ症は細胞性免疫が低下した患者では、重篤な播種性感染を生じるが、このような播種性病変では菌に一致した良好なシグナルを検出することができた。一方で、宿主の免疫状態が保たれている条件

下で形成される中心壊死を伴う限局性肉芽腫性病変では、防御担当細胞による *Histoplasma* の核酸の変性が大きく、ISH 法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る。

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。

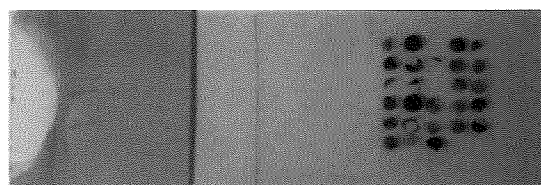
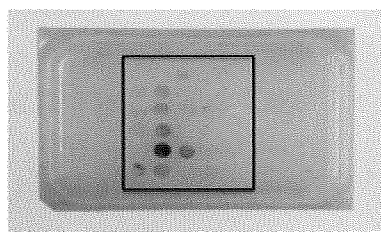
剖検症例のホルマリン固定パラフィン切片においては PCR 法による真菌 DNA の増幅が困難な症例も認められた。これらの点は後方視的発生動向調査（疫学観察研究）に向けた課題であるが、PCR 法に加え ISH 法を併用することで、さらに精度が高い真菌症の診断が可能になることが本研究から示唆された。

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 33026
<i>Aspergillus fumigatus</i> var. <i>fumigatus</i>	NBRC 6344
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NBRC 33022
<i>Fusarium solani</i>	NBRC 6232
<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>	ATCC10231
<i>Trichosporon asahii</i>	CBS2479T
<i>Candida albicans</i> var. <i>stellatoidea</i>	TIMM0310
<i>Candida glabrata</i>	TIMM1064
<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>	JCM3595
<i>Pichia subpelliculosa</i>	IFC0808
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TIMM0925

表 1

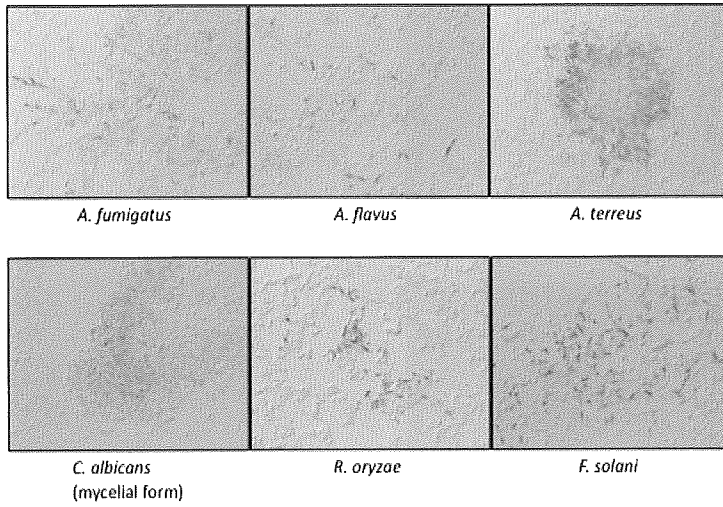
The array block of formalin- fixed and paraffin- embedded fungi



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

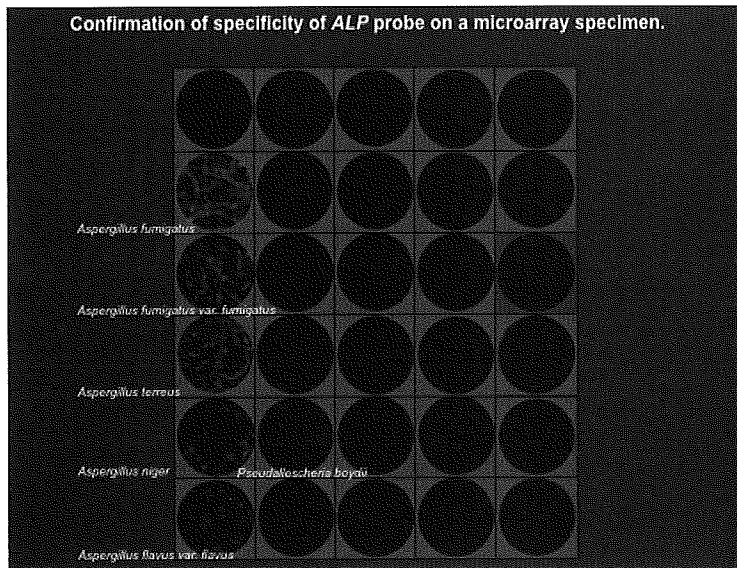
图 1

Confirmation of panfungal PNA probe specificity using formalin-fixed, paraffin-embedded sections



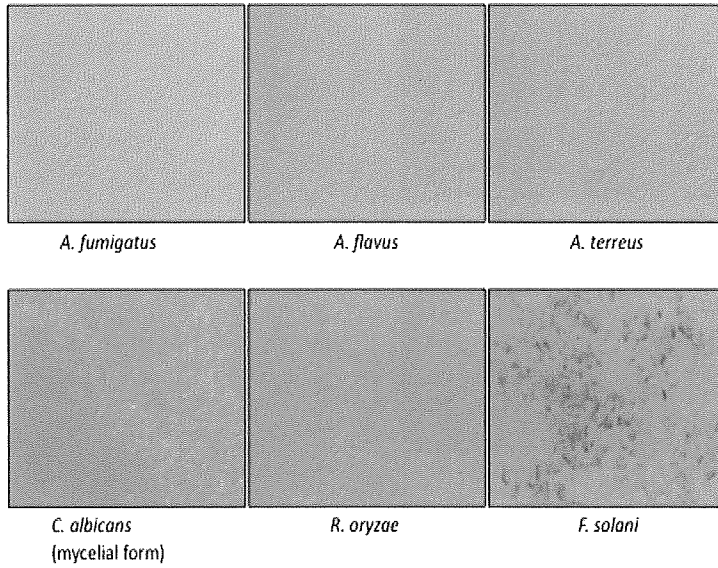
☒ 2

Confirmation of specificity of ALP probe on a microarray specimen.



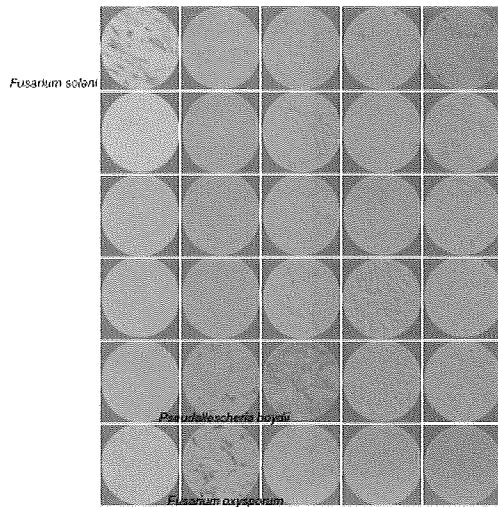
☒ 3

Confirmation of *Fusarium* spp. PNA probe specificity using formalin-fixed, paraffin-embedded sections

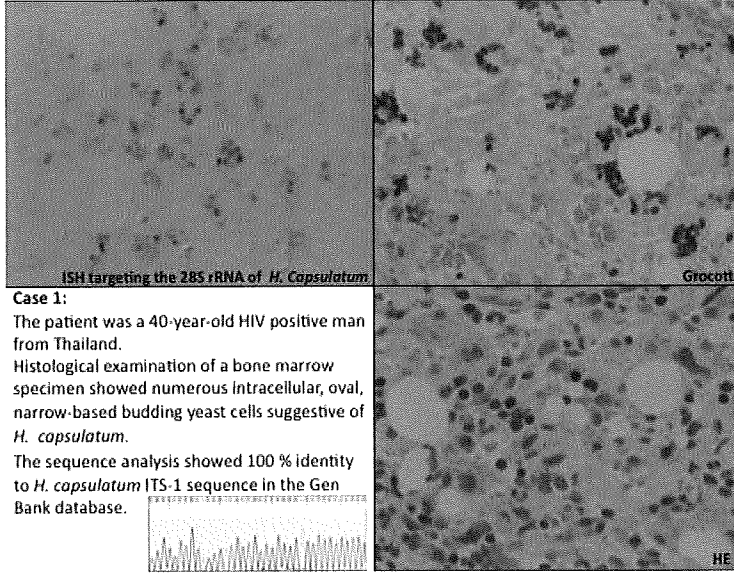


☒ 4

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

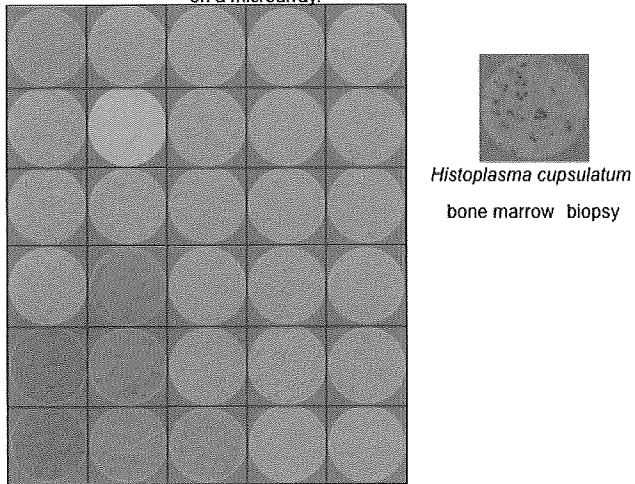


☒ 5



☒ 6

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



☒ 7