

漿中濃度が高くなり、それに伴い血中濃度時間曲線下面積（AUC）が3～6倍増加することが報告されている<sup>4)7)</sup>。Infectious Diseases Society of America (IDSA)のアスペルギルス感染症治療ガイドラインにおいては、毒性の評価や十分量のVRCZが投与されているか評価するためにVRCZの血漿中濃度の測定がエビデンスレベルB-Ⅲとして示されており<sup>8)</sup>、これらのことをふまえて、日本においても血中薬物モニタリング（TDM）対象薬剤となっている。一方、これまで愛知医科大学病院では、VRCZ投与症例で実施された血中濃度モニタリング結果によると、ばらつきが極めて多く散見されている。そこで今回、VRCZが投与されCYP2C19の遺伝子解析が実施可能であった症例について検討を行った。

## (2) 血液培養からカンジダ属が検出された成人30症例の解析

剖検統計によるとフルコナゾールの上市以降、侵襲性カンジダ症はアスペルギルス症よりも頻度が低くなっているが、最近では侵襲性カンジダ症は横ばいで、深在性真菌症においてカンジダ症が占める割合は依然として大きい。愛知医科大学病院における最近10年間の真菌の検出状況も、*Candida*属は横ばいであるが、*Aspergillus*属の検出数は増加傾向である。*Candida*属の内訳は、全体で見ると*C. albicans*と比べてnon-*albicans Candida*が微増傾向にあり、2008年は*C. albicans* 67.9%（741株）、non-*albicans Candida* 22.1%（350株）であった。一方、最近10年間に血液培養から検出された真菌は*Cryptococcus* 2株以外はすべて*Candida*属であった。*Candida*属の検出株数は検体数の増加とともに増加しており、内訳は年によってばらつきがあるものの、2008年は*C. albicans* 54.2%（32株）、non-*albicans Candida* 45.8%（27株）であった。今回、*Candida*血症の症例について、臨床的・微生物学的

に後方視的に検討した

## B. 研究方法

### (1) CYP2C19遺伝子解析結果からみたポリコナゾール血中濃度モニタリングの臨床的意義

愛知医科大学病院で、2008年8月～VRCZのTDM解析を実施した15例のうち、同意取得が可能であった3例を対象とした。CYP2C19の遺伝子多型の解析は、患者から同意を得て血液を2 mL採取し、株式会社ビー・エム・エルにて、CYP2C19\*2（G681A）とCYP2C19\*3（G636A）の2箇所をInvader法にて解析を行った。なお、本研究は、愛知医科大学病院の倫理委員会（承認番号588）の承認を得て行った。

### (2) 血液培養からカンジダ属が検出された成人30症例の解析

対象期間は、愛知医科大学病院において、抗真菌薬の感受性試を施行するようになった2008年1月～2009年6月までを対象とした。対象症例は、当院の全診療科で採取された血液培養検体から真菌が検出された30例を対象とした。同一菌種が同一症例より2週間以内に繰り返し検出された場合は、1症例として扱った。血液培養検体とカテーテル先端培養検体から同時に同一菌種が分離培養されたものを、カテーテル関連血流感染症とした。調査は、診療録、検査データベースから後方視的に抽出し、各症例における年齢、性別、診療科、基礎疾患、リスク因子、抗真菌薬投与、死亡などの転帰、検出真菌の薬剤感受性などについて調査した。カンジダ血症のリスク因子は、深在性真菌症 診断治療ガイドライン2007、および、Pfaller (Pfaller MA: Clin Microbiol Rev 2007, 20, 133-163) の提唱した非好中球減少患者におけるカンジダ血症のリスク因子を参考に調査した。

血液培養は、BACTEC®9240systemを使用し、カテーテル先端培養は、Brain Heart Inf

usion液体培地で、37°Cで培養後、血液寒天培地またはマッコンキー培地で培養したものを使用した。真菌の同定は、API 20C オキサノグラム(SYSMEX bioMérieux Co.,Ltd.)を用いて実施した。

検出された *Candida* 属30株に対し、amphotericin B (AMPH-B: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)、fluconazole (FLCZ: Pfizer, Groton, CT, USA)、itraconazole (ITCZ: ヤンセンファーマ, 東京) miconazole (MCZ: 持田製薬、東京)、voriconazole (VRCZ: Pfizer, Groton, CT, USA)、micafungin (MCFG: アステラス製薬、東京) および5-fluorocytosine (5-FC: 5-FC; flucytosine, 和光純薬工業株式会社、東京) の7薬剤の薬剤感受性試験を行った。MICの測定は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が推奨する酵母の感受性測定標準法 M27-A3<sup>2)</sup> に準拠し、市販の酵母様真菌DP“栄研” (栄研化学) を用い微量液体希釈法で実施した。FLCZ、ITCZは感性和耐性の中間域の濃度の感受性を示すものを用量依存的感性 (S-DD) とし、5-FCではそれを中間 (intermediate; I) とした。

### C. 研究結果

(1) CYP2C19遺伝子解析結果からみたポリコナゾール血中濃度モニタリングの臨床的意義

症例1では投与開始4日目の血漿中トラフ濃度は8.43  $\mu$ /mLと高値を示し、幻視・幻覚の有害事象が発現したが、CYP2C19欠損者 (PM) ではなかった。症例2では投与開始4日目、7日目の血漿中トラフ濃度はそれぞれ5.53  $\mu$ g/mL、8.61  $\mu$ g/mLと高値を示し、AST・ALTなどの肝機能指標が軽度上昇し、PMであった。症例3では投与開始5日目の血漿中トラフ濃度は3.2  $\mu$ g/mL、12日目の血漿中トラフ濃度は3.25  $\mu$ g/mLと変化は認められず、治療域内を維持し、PMではなかった。

(2) 血液培養からカンジダ属が検出された成人30症例の解析

2008年1月～2009年6月の間に、愛知医科大学病院で血液培養から真菌が検出されたのは30例で、検出真菌は、全例が *Candida* 属であった。男女比は、男性19例、女性11例で、最終予後に有意差は認めなかった ( $p=0.4497$ )。

年齢は63.9 $\pm$ 19.9歳 (16～87歳) で、最終予後に有意差は認めなかった ( $p=0.1418$ ) が、20歳以下は全例生存例であった。

診療科は救命救急科26.7% (8/30)、腎臓膠原病内科 20.0% (6/30)、脳外科 13.3% (4/30) の順に多かった。

基礎疾患は、固形腫瘍11例、良性呼吸器疾患10例、糖尿病10例、循環器疾患8例などであった。

深在性真菌症のリスク因子は、血管内カテーテル留置27例 (90.0%)、その他の医療器具留置26例 (86.7%)、先行する3日以上抗真菌薬投与例26例 (86.7%)、低アルブミン血症 (血清アルブミン値 $\leq$ 3.0mg/dL) 23例 (76.6%)、高カロリー輸液20例 (66.7%) などであった。PCPS使用例、上部消化管穿孔例、ステロイド使用例、免疫抑制剤使用例、好中球減少例、同種造血幹細胞移植例、先天性免疫不全症例は認めなかった。

最終予後は、生存15例、死亡15例であった。死亡例15例では、28日死亡は14例、14日死亡は、死亡8例であった。真菌性眼内炎の合併は認めなかった。

カテーテル関連血流感染は18例 (60.0%) 認めた。

カンジダ血症の症例の白血球数は10900.0 $\pm$ 6704.6 / $\mu$ L、CRP値は8.0 $\pm$ 5.5 mg/dLであった。28日生存例と死亡例では、白血球、CRP値ともに有意差は認めなかったが (WBC ; 11380 $\pm$ 2004 v.s 10600 $\pm$ 1474、 $p=0.7561$ 、CRP ; 6.2 $\pm$ 1.4 v.s 9.8 $\pm$ 1.4、 $p=0.0689$ )、CRP値は死亡例で高い傾向を認めた。血液培養採取前後3日以

内に $\beta$ -グルカン値(カットオフ値20)が測定されたのは22例あり、86.4%(19/22)が陽性であった。特に45.5%(10/22)が300ng/mL以上と高値であった。

検出された*Candida*属は、単数真菌検出は28例(93.3%)で*C. albicans*が14例(50%)、*non-albicans Candida*が14例(50%)であった。内訳は、*C. albicans*(14)、*C. parapsilosis*(7)、*C. glabrata*(3)、*C. tropicalis*(2)、*C. guilliermondii*(2)の順であった。複数真菌血症は2例で、*C. albicans* + *C. glabrata*、*C. parapsilosis* + *C. lucitaniae*をそれぞれ1例ずつ認めた。

抗真菌薬の薬剤感受性は、*C. albicans*(15)、*C. parapsilosis*(2)、*C. tropicalis*(2)について施行された。*C. albicans*は、MCFG感性が93.3%(14/15)であった。アゾール系抗真菌薬に対して感性株は、FLCZが86.7%(13/15)、VRCZが100%であったが、ITCZはCLSI感性株が46.7%(7/15)、SDDが40%(6/15)、Rが13.3%(2/15)であった。AMPH-Bに対するMICは0.25~1であった。*C. guilliermondii* 2株のうちの1株は、FLCZ >64  $\mu$ g/mL、MCZ >64  $\mu$ g/mL、MCFG 8  $\mu$ g/mL、ITCZ >8  $\mu$ g/mL、VRCZ 8  $\mu$ g/mLと耐性を示した。*C. parapsilosis* 8株の1株はFLCZ >64  $\mu$ g/mL、MCZ >64  $\mu$ g/mL、MCFG 8  $\mu$ g/mL、ITCZ >8  $\mu$ g/mL、VRCZ 8  $\mu$ g/mLと多剤耐性を示したが、AMPH-Bに対するMICは0.5  $\mu$ g/mLと良好な感受性結果であった。*C. tropicalis* 2株は、いずれの抗真菌薬も感受性は良好であった。

カテーテル関連血流感染18例の14日死亡は22.2%(4/18)、28日死亡は38.9%(7/18)であった。非カテーテル関連血流感染12例の14日死亡は33.3%(4/12)、28日死亡は58.3%(7/12)であった。カテーテル関連血流感染例と非カテーテル関連血流感染例での14日死亡、28日死亡には、統計学的有意差は認めなかった( $p=0.6779$ ,  $p=0.4572$ 、Fisherの正確確率検定)が、非カテーテル関連血流感染例において高い傾

向を認めた。

カテーテル関連血流感染18例の原因真菌内訳は、*C. albicans* 50.0%(9/18)、*C. parapsilosis* 16.7%(3/18)、*C. tropicalis* 11.1%(2/18)、*C. guilliermondii* 11.1%(2/18)、*C. glabrata* 5.6%(1/18)の順に多かった。一方、非カテーテル関連血流感染12例の原因真菌内訳は、単数真菌感染は*C. albicans* 41.7%(5/12)、*C. parapsilosis* 33.3%(4/12)、*C. glabrata* 16.7%(2/12)の順に多く、複数真菌感染2例を認めた。

血液培養採取前3日以内に、抗真菌薬投与されていたのは、6例で、生存3例、死亡3例であった。その内訳は、生存例では、ITCZ 2例、F-FLCZ 1例、死亡例3例の内訳は、MCFG、F-FLCZ、VRCZがそれぞれ1例ずつであった。検出真菌別にみると、*C. albicans*の1例はFLCZ(1)、*C. parapsilosis* 3例は、MCFG(1)、ITCZ(1)、VRCZ(1)であった。*C. guilliermondii* 1例はITCZ(1)であった。*C. parapsilosis* + *C. lucitaniae* 1例はFLCZであった。*C. tropicalis* および*C. glabrata*は血液培養採取前3日以内に、抗真菌薬投与された症例は認めなかった。血液培養採取前3日以内に、抗真菌薬投与されていたうちの66.7%(4/6)が*C. parapsilosis* 単独もしくは複数菌による真菌血症であった。また、これら4例は、検体採取後(真菌血症疑い時)に抗真菌薬を追加(3)(MCFG→FLCZ追加、FLCZ→L-AMB追加、VRCZ→MCFG追加)、または変更(1)(ITCZ→F-FLCZに変更)されていた。*C. albicans*ではF-FLCZ→L-AMBに変更されていた。*C. guilliermondii*ではITCZ→VRCZに変更されていた。

血液培養採取時に抗真菌薬が投与されていなかった23例における、血液培養採取から抗真菌薬投与開始までの日数は、生存例、死亡例とも平均48時間であった。血液培養採取から抗真菌薬投与までの日数と28日目の死亡率の関係は、12時間以内、24時間、72時間以上で、死亡

率が増加傾向にあり、24時間以降、72時間以降と、遅滞するほど死亡率が増加していた。これら23例の初期治療薬として選択された抗真菌薬は、MCFG が11例 (47.8%)、F-FLCZ が8例 (34.8%)、L-AMBが3例 (13.0%)、ITCZが3例 (13.0%) であった。これら23例における初期治療薬を検出真菌別にみると、MCFG11例は、*C. albicans* 5例、*C. parapsilosis* 2例、*C. tropicalis* 1例、*C. glabrata* 2例、*C. guilliermondii* 1例であった。F-FLCZは、6例全て *C. albicans* であった。L-AMBは、*C. albicans* 2例、*C. glabrata* 1例であった。ITCZは *C. parapsilosis* 2例、*C. tropicalis* 1例であった。

non-*albicans Candida*との複数真菌感染をnon-*albicans Candida*とした場合の、*C. albicans*とnon-*albicans Candida*の比較では、性別、年齢、事前投与抗真菌薬投与の有無、カテーテル関連血流感染の有無、WBC数、CRP値、 $\beta$ -D-グルカン値、14日予後、28日予後でいずれも有意差は認めなかった。

#### D. 考察

(1) CYP2C19遺伝子解析結果からみたポリコナゾール血中濃度モニタリングの臨床的意義

近年、深在性真菌症は診断技術の向上や様々な新しい治療薬の開発などにより、治療成績が向上してきている。深在性真菌症のなかでもアスペルギルス症においては、宿主状態が不良なことが多く、治療に難渋するケースが多いのが現状である。アスペルギルス症の第一選択薬であるVRCZは、侵襲性アスペルギルス症におけるアムホテリシンB (AMPH-B) との比較試験において、有効率、死亡率、安全性、治療継続率など全てにおいてAMPH-Bに有意に優ることが報告されている<sup>9), 10)</sup>。VRCZを投与する際には、有効性と安全性を考慮する必要があるが、VRCZの薬物動態と遺伝子多型、有害事象の関係などに関する報告はあまりない。そこで今回、患者の同意を得てCYP2C19の遺伝子解析を行

ったVRCZ投与症例に関して、血中濃度と遺伝子多型、有害事象の関連について検討を行った。

症例1は添付文書で承認された投与範囲内であったにもかかわらずVRCZの血中濃度は有害事象発現域まで上昇し、幻視・幻覚の症状が発現したが、肝機能指標の変動は認められなかった。遺伝子解析の結果PMではなかった。症例2では、VRCZの血中濃度は有害事象発現域まで上昇し、肝機能指標が軽度上昇した。さらに、遺伝子解析の結果はPMであった。VRCZは主に肝臓のCYP3A4、CYP2C19、CYP2C9の分子種で代謝にされることが知られている<sup>11)</sup>。また、肝臓や小腸において薬物を代謝するために必要な酵素であるCYPには遺伝子多型が存在する。なかでもCYP2C19ではextensive metabolizer (EM)、heterozygous extensive metabolizer (HEM)、poor metabolizer (PM)が存在し、日本人にはCYP2C19活性の低いPMの頻度が約15-20%と高いことが報告されている<sup>4), 12), 13)</sup>。さらに、PMではVRCZの代謝が遅延し、EMと比較して血漿中濃度が高くなり、それに伴い血中濃度時間曲線下面積が3~6倍増加することが知られている<sup>5), 7)</sup>。

症例1に関してはPMではなかったが血中濃度が異常上昇し、症例2に関してはPMであり濃度が上昇したことから、遺伝子多型の有無に関わらず思わぬ血中濃度の上昇が認められることが考えられ、遺伝子多型のみでは説明しきれないと考えられた。

VRCZの治療血中トラフ濃度域に関する報告は様々である。日本人の健康成人において肝機能障害が発生した症例のうち、血中濃度が測定されていた症例において血漿中トラフ濃度はいずれも4.5  $\mu$ g/mL以上であったことから、添付文書には4.5  $\mu$ g/mLを超えないこととの記載がある。海外においてはトラフ値が1  $\mu$ g/mL以下<sup>2)</sup>、あるいは2.05  $\mu$ g/mL未満で無効例が増加したとの報告がある<sup>14)</sup>。また他の報告において有効治療トラフ濃度は1~6  $\mu$ g/mL

としていることから<sup>15), 16)</sup>、これらのことを総合的に考慮して、当院のVRCZのトラフ濃度の設定は、3~5  $\mu\text{g/mL}$ としている。また、血中濃度は投与量の増量とともに非線形に上昇することも報告されている<sup>17)</sup>ことから、急激な投与量の増量には注意が必要となる。今回の結果から、VRCZを投与する場合、常用量の投与においても血中濃度測定的重要性が示唆され、治療濃度を推移させるためには、より厳密に投与設計を行うことが必要であると考えられた。

今回、有害事象に関しては症例1、2とも血中濃度の上昇とともにそれぞれ別の有害事象が発現した。有害事象においては肝障害、視覚異常、悪心、嘔吐、霧視、頭痛などが知られている。国内第Ⅲ相臨床試験では霧視や羞明などの視覚に関する有害事象の発現頻度は52%であり、これらの有害事象は投与初期に多く、持続期間は1週間以内であると報告されている。肝・胆道系の有害事象の発生頻度は36%であり、定期的な肝機能検査を行うことが望ましいとの報告がある<sup>18)</sup>。また、海外では、肝障害や視覚異常と血中濃度には相関があるとの報告があり<sup>19), 20)</sup>、VRCZの血漿中濃度が1  $\mu\text{g/mL}$ 上昇するごとに視覚障害発症のオッズ比は4.7%ずつ、ALT異常発現のオッズ比は7.4%ずつ増加することも報告されている<sup>19)</sup>。しかしながら、日本での臨床試験の段階においては血漿中濃度と有害事象の関係性は認められてはいない<sup>20)</sup>。症例3に関しては、PMではなく、血漿中VRCZは良好な濃度を維持し、有害事象も認められなかった。VRCZを投与する際は、血中濃度のみならず肝機能値の推移や視覚異常の発現の有無には十分注意が必要であることが示唆された。

今回の症例から、症例数は少ないもののVRCZはCYP2C19の発現有無に関係なく体内動態に大きな変動があること、また有害事象に関しても濃度の上昇とともに発現する可能性があることが示唆された。国内第Ⅲ相臨床試験に

おいては、PMの血漿中VRCZ濃度は高い傾向であったが、EM、HEMと比較すると有意な差は認められていない。これらのことからCYP2C19の遺伝子多型からだけでは血中濃度の上昇は予測できないことが考えられ、TDMを行い、より厳密な投与設計が必要になると考えられる。また、臨床症例においては体重や併用薬、その他の合併症などの影響も強いと考えられるため、VRCZの投与にあたっては、頻回のTDMの実施が治療上有効性を高め、毒性を軽減させる上で重要である。

特に、小児患者におけるポリコナゾールの薬物動態および薬動力学のデータは不足しているが、Neely Mら<sup>21)</sup>は、0.8~20.5歳の患者46例計207件のポリコナゾール測定データから、血清ポリコナゾールのトラフ値1,000ng/mL未満が死亡のオッズ比の2.6倍増加と関連していたことを報告している。さらに、Neely Mら<sup>22)</sup>は、シミュレーション結果から、7mg/kg静脈内投与または200mg 1日2回経口投与により、ほとんどの患者でトラフ値1,000ng/mL超を達成すると予測可能であったが、濃度のばらつきが大きくなる可能性も指摘していることも、VRCZの投与にあたってはTDMの実施が不可欠であることを示している。

#### 【文献】

- 1) Goodwin ML, Drew RH.: Antifungal serum concentration monitoring : an update. *J Antimicrob Chemother* 61: 17-25, 2008
- 2) Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O : Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* 46: 201-211, 2008
- 3) Kimura M, Ieiri I, Mamiya K, Urae A, Higuchi S.: Genetic

- polymorphism of cytochrome P 450s, CYP2C19, and CYP2C9 in a Japanese population. *Ther Drug Monit* 20: 243-247, 1998
- 4) Shimizu T, Ochiai H, Asell F, et al. : Bioinformatics research on inter-racial difference in drug metabolism I. Analysis on frequencies of mutant alleles and poor metabolizers on CYP2D6 and CYP2C19. *Drug Metabo Pharmacokinet* 18 (1): 48-70, 2003
- 5) Wood N.: Voriconazoleの薬物動態. *日化療会誌* 53 (S-2): 16-23, 2005
- 6) Ikeda Y, Umemura K, Kondo K, et al.: Pharmacokinetics of voriconazole and cytochrome P450 2C19 genetic status. *Clin Pharmacol Ther* 75: 587-588, 2004
- 7) Weiss J, Hoevel MM, Burhenne J, et al.: CYP2C19 genotype is a major factor contributing to the highly variable pharmacokinetics of voriconazole. *J Clin Pharmacol* 49: 196-204, 2009
- 8) Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, et al.: Infectious Diseases Society of America. : Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 46: 327-360, 2008
- 9) Karthaus M: Voriconazole versus amphotericinB for invasive aspergillosis. *N Eng J. Med* ; 347(25), 2080-2081, 2002
- 10) Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al.: Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global Aspergillus Study Group: Voriconazole versus amphotericinB for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Eng J. Med* ; 347(6), 408-415, 2002.
- 11) Murayama N, Imai N, Nakane T, et al.: Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 73: 2020-2026, 2007
- 12) Kubota T, Chiba K, Ishizaki T: Genotyping of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in an extended Japanese population. *Clin Pharmacol Ther* 60: 661-666, 1996
- 13) Furuta T, Ohashi K, Kosuge K, et al.: CYP2C19 genotype status and effect of omeprazole on intragastric pH in humans. *Clin Pharmacol Ther* 65(5): 552-561-561, 1999
- 14) Smith J, Safdar N, Knasinski V, et al.: Voriconazole therapeutic drug monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1570-1572, 2006
- 15) Lewis RJ.: What is the "therapeutic range" for voriconazole. *Clin Infect Dis* 46: 212-214, 2008
- 16) Bruggemann RJM, Donnelly JP, Aarnoutse RE, et al.: Therapeutic drug monitoring of voriconazole. *Ther Drug Monit* 30: 403-411, 2008
- 17) Purkins L, Wood N, Ghahramani P, et al.: Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2546-2553, 2002
- 18) 医薬品インタビューフォーム, ブイフェンド錠50 mg, 200 mg, ブイフェンド200 mg静注用, ファイザー株式会社, 2005年6月作成.
- 19) Tan K, Brayshaw N, Tomaszewski K, et al.: Investigation of the potential

relationship between plasma voriconazole concentration and visual adverse events or liver function test abnormalities. *J Clin Pharmacol* 46: 235-243, 2006

20) 二木芳人, 吉田稔, 島田馨, 他.: 深在性真菌症に対するvoriconazoleの臨床試験. *日化療会誌* 53 (S-2): 32-50, 2005

21) Neely M, Rushing T, Kovacs A, et al. Voriconazole pharmacokinetics and pharmacodynamics in children. *Clin Infect Dis* 50: 27-36, 2010.

## (2) 血液培養からカンジダ属が検出された成人30症例の解析

真菌血症の予後は、不良で、1時間治療開始が遅滞するごとに死亡率は増加するというデータがある。今回われわれの検討でも、投与開始が遅れるごとに死亡率が増加しており、早期治療開始が患者アウトカムにつながることを裏付ける結果となった。

今回の検討では、カンジダ血症30で、90.0%

(27例)がカテーテル留置例であった。30例中17例(56.7%)がカテーテル関連血流感染症であり、深在性真菌症の発生において、カテーテル留置はリスク因子の一つとして重要と考えられる。しかし、予後という点からみると、真菌血症判明後14日後の死亡率、28日後死亡率も、統計学的有意差は認めないものの、カテーテル関連血流感染を認めない群において高い傾向を認めており、カテーテル関連血流感染では、カテーテルを抜去することが治療においてまず優先されることを示唆しているかもしれない。

カテーテル関連血流感染を、原因菌種別にみると、*C. tropicalis*や*C. guilliermondii*はすべてカテーテル関連感染例であり、これはバイオフィーム形成と関連している可能性もあると考えられる。Tumbarello (2007) の報告によ

ると、バイオフィーム形成*Candida*感染は、*C. albicans* 22.6%、non-*albicans Candida* 33.3%で統計学的有意差を認めており(p=0.004)、また、バイオフィーム形成カンジダ感染の予後は、不適切治療(オッズ比2.35)に次いで高い(オッズ比 2.33)死亡リスク因子と報告されている。

カンジダ血症の基礎疾患として、一般的には単癌患者が多いという特徴があるが、今回31例の患者背景をみると、熱傷や脳血管障害、リウマチ患者が多い特徴がみられた。これはいわゆる経過が長く、肺炎などに合併して、抗菌薬長期必要例などに多い特徴であり、背景として、愛知医科大学病院が担癌患者症例が少ないという特殊が考えられる。

血液由来株ではnon-*albicans Candida*が多い理由としては、内科領域での予防投与の影響や、FLCZ投与によるブレイクスルー感染症として起こっている可能性が推察される。

検出菌による死亡率の違いの意味としては、*C. tropicalis*は一般的に予後不良といわれるが、バイオフィーム形成しやすい真菌であることが由来している可能性がある。*C. parapsilosis*は、今回検出された菌種5つの中では、病原性は低い菌種とされているが、外因性感染も指摘されているように、hostの状態が悪いところで感染しているといえる。薬剤感受性もさることながら、宿主の状態が大きく影響するといえる。患者のアウトカムをよくするという観点からも宿主の状態と、外因性感染に注意が必要である。一般的に予後不良の報告が多い

*C. guilliermondii*は、今回2例中2例とも生存例であったが、2例とも治療抗真菌薬をL-AMBに変更していることから、L-AMBが有効であった可能性が示唆される。

## E. 結論

(1)ポリコナゾールの血中濃度モニタリングの評価により、臨床現場におけるポリコナゾール

の使用法を明らかにした。

(2)血液培養からカンジダ属が検出された成人30症例の解析から以下のことが明らかになった。カンジダ血症は死亡率が高いため、真菌血症を疑った時点で早期に抗真菌薬の全身投与が必須である。カンジダの菌種によって抗真菌薬の薬剤感受性が明らかに異なり、真菌血症など無菌的な検体から検出された真菌については、菌種レベルまで同定することが患者のアウトカムにつながると考えられる。無菌的な検体から検出された真菌については、可能な限り抗真菌薬の薬剤感受性試験を行うことで、オーダーメイド治療が可能となると考えられる。

## F. 健康危険情報

アムホテリシンB脂質製剤使用中は低カリウム血症の発現頻度が%あるため、投与中の血清カリウム値には十分留意する必要がある。

## G. 研究発表

論文発表

1. 木村匡男、山岸由佳、川澄紀代、萩原真生、長谷川高明、三嶋廣繁：CYP2C19遺伝子解析結果からみたポリコナゾール血中濃度モニタリングの臨床的意義Jpn J Antibiotics 63：255-264, 2010.
2. 山岸由佳、三嶋廣繁：アムホテリシンB脂質製剤が使用された症例の後方視的検討、Jpn J Antibiotics 63：347-364, 2010.
3. 三嶋廣繁、宮崎修一、山岸由佳：日常診療に役立つ抗感染症薬のPK-PD、戸塚恭一監修、ユニオンエース、東京、pp. 1-151、2010.
4. 三嶋廣繁、山岸由佳：(分担執筆) II. カンジダ各論、2. カンジダ症で使用される抗真菌薬の特殊な状態での使用法、2) 妊婦における抗真菌薬の使用法. 米国感染症学会IDSAガイドライン 真菌症治療のUP-TO DATE～2008年-2010年のアスペルギルス、カンジダ、クリプトコックスIDSA GL改訂版を踏まえて～、河野茂

編、医薬ジャーナル社、大阪、pp. 76-78、2010.

5. 山岸由佳、三嶋廣繁：(分担執筆) II. カンジダ各論、5. カンジダによる各臓器感染症の推奨治療と予防、2) 外陰腔カンジダ症の治療. 米国感染症学会IDSAガイドライン 真菌症治療のUP-TO DATE～2008年-2010年のアスペルギルス、カンジダ、クリプトコックスIDSA GL改訂版を踏まえて～、河野茂編、医薬ジャーナル社、大阪、pp. 139-144、2010.
6. 三嶋廣繁、山岸由佳：(分担執筆) IV. クリプトコックス各論、3. 特殊状態におけるクリプトコックス感染症の治療戦略と*C. gattii*感染症、2) 妊婦におけるクリプトコックス感染症の治療戦略と*C. gattii*感染症. 米国感染症学会IDSAガイドライン 真菌症治療のUP-TO DATE～2008年-2010年のアスペルギルス、カンジダ、クリプトコックスIDSA GL改訂版を踏まえて～、河野茂編、医薬ジャーナル社、大阪、p p. 302-305、2010.

学会発表

1. 宮島節雄、大野智子、山田敦子、内藤和香子、澤村治樹、山岸由佳、三嶋廣繁：愛知医科大学病院において分離された酵母様真菌の薬剤感受性、第21回日本臨床微生物学会総会、東京、2010. 1. 30-31.
2. 内藤和香子、三嶋廣繁、山岸由佳、澤村治樹、谷浩也、山田敦子、大野智子：愛知医科大学病院における最近10年間*Candida*属の分離状況、第21回日本臨床微生物学会総会、東京、2010. 1. 30-31.
3. 木村匡男、山岸由佳、川澄紀代、三嶋廣繁：CYP2C19の遺伝子解析を行ったポリコナゾール投与症例に関する検討、第25回日本環境感染学会総会、東京、2010. 02. 05.
4. 山岸由佳、三嶋廣繁：カンジダ血症と診断された症例の疫学解析、真菌症フォーラム第1回学術集会、東京、2010. 3. 13.



5. 竹末芳生、織田成人、福島亮治、古川清憲、草地信也、三嶋廣繁、藤島清太郎、小谷穰治、相馬一玄、篠澤洋太郎、相川直樹：外科救急領域における深在性真菌症治療におけるイトラコナゾールの有用性に関する多施設臨床試験、第58回日本化学療法学会総会一般演題80、長崎、2010. 6. 3.
6. 山岸由佳、三嶋廣繁：愛知医科大学病院におけるL-AMBの使用経験、第58回日本化学療法学会総会一般演題172、長崎、2010. 6. 3.
7. 木村匡男、山岸由佳、川澄紀代、萩原真生、長谷川高明、三嶋廣繁：ポリコナゾール血漿中濃度と有害事象、遺伝子多型に関する検討、第58回日本化学療法学会総会一般演題179、長崎、2010. 6. 3.
8. 三嶋廣繁：開講！平成真菌塾－基礎から学ぶ真菌感染症－ 侵襲性カンジダ症に対する抗真菌薬使用のコツとピットフォール、第58回日本化学療法学会総会レクチャー1、長崎、2010. 6. 3.
9. 川澄紀代、山岸由佳、藤巻恵理子、杉田隆、

三嶋廣繁：トリコスポロン属の分離背景と抗真菌薬の使用状況との関係、第58回日本化学療法学会西日本支部総会 受賞演題：第4回日本化学療法学会西日本支部 支部長賞－臨床部門一、2011. 11. 25.

10. 山岸由佳、三嶋廣繁：血液培養からカンジダ属が検出された成人症例の解析、第58回日本化学療法学会西日本支部総会 一般演題50、2011. 11. 25.

11. 山岸由佳、三嶋廣繁：カンジダ血症の病態と診断・治療、第54回日本医真菌学会シンポジウム2深在性真菌症の病態と診断、2010. 10. 16.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得  
 該当なし  
 実用新案登録  
 該当なし  
 その他  
 特記すべきことなし

#### 4. 病状と病原性に関する研究

研究分担者 谷口 修一 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 血液内科 部長

研究協力者 荒岡 秀樹 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 臨床感染症部 医員

**研究要旨** 造血幹細胞移植領域における、アスペルギルス属およびその他の糸状菌による侵襲性真菌感染症（IMI）の日本における現状を把握すべく2年間の疫学調査を行っている。1年8カ月経過した現段階において、全国30施設から計577件の症例登録があった。これまでにProven fungal disease 2例、Probable fungal disease 17例、Possible fungal disease 22例のIMIが発症した。今後残り4カ月の症例登録と、その後の追跡調査を行い、解析を進める予定である。

##### A. 研究目的

造血幹細胞移植領域における、アスペルギルス属およびその他の糸状菌による侵襲性真菌感染症の日本における現状を把握する（2年間の疫学調査）。

侵襲性糸状菌感染症（Invasive Mould Infection; IMI）の発症率、死亡率および現在の治療法を明らかにする。

##### B. 研究方法

造血幹細胞移植症例を前向きコホート登録し、追跡調査を行った。

##### C. 研究結果

###### 1. 症例の登録

これまでに全国30施設から計577件（2010年11月30日現在）の造血幹細胞移植症例の登録があった。

###### 2. IMIの発症

これまでにProven fungal disease 2例、Probable fungal disease 17例、Possible fungal disease 22例（EORTC/MSGの基準）

のIMIが発症した。うち、菌種が特定されたものが3例あった。

##### D. 考察

海外の疫学データ（CID 2010; 50: 1091-1100.）と比較して、現段階では発症率に大きな差はないと思われる。さらなる解析が必要である。

##### E. 結論

現在のところ、解析するために十分な症例登録数が集まっている。今後、残り4カ月の症例登録と、その後の追跡調査を行い、データの精度をさらに高めていく必要がある。

##### F. 健康危険情報

疫学調査であり、特になし。

##### G. 研究発表

論文発表

1. Yamamoto H, Kato D, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Takagi S,

- Nakano N, Tsuji M, Asano-Mori Y, Matsuno N, Masuoka K, Izutsu K, Wake A, Yoneyama A, Makino S, Taniguchi S. Successful sustained engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with severe aplastic anemia. *Blood*. 2011.
2. Takagi S, Ota Y, Uchida N, Takahashi K, Ishiwata K, Tsuji M, Yamamoto H, Asano-Mori Y, Matsuno N, Masuoka K, Wake A, Miyakoshi S, Ohashi K, Taniguchi S. Successful engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for myelofibrosis. *Blood*. 2010; 116: 649-652.
3. Araoka H, Baba M, Takagi S, Matsuno N, Ishiwata K, Nakano N, Tsuji M, Yamamoto H, Seo S, Asano-Mori Y, Uchida N, Masuoka K, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A. Monobactam and aminoglycoside combination therapy against metallo-beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* screened using a 'break-point checkerboard plate'. *Scand J Infect Dis*. 2010; 42: 231-233.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
- 特許取得  
1. 該当なし
- 実用新案登録  
1. 該当なし
- その他  
1. 該当なし

## 5. 真菌症剖検症例を用いた後方視的疫学観察研究

研究分担者 渋谷 和俊 東邦大学医学部病院病理学講座教授

研究協力者 篠崎 稔 東邦大学医療センター大森病院病理部

**研究要旨** 他の感染症と比較して確定診断が困難な深在性真菌症の発生動向を明確に調査するためには、剖検例に関する詳細な病理組織学的検索が必要である。従って、深在性真菌症剖検症例を用いた後方視的疫学観察研究は、真菌感染対策上の有益な情報基盤を提供する。この場合、薬剤感受性の異なる原因真菌を組織学的に判別するために、ホルマリン固定パラフィン切片試料を用いた高精度の遺伝子病理組織学的診断法の確立が求められている。

本報告では、Polymerase Chain Reaction (PCR)法と *in situ* hybridization (ISH)法を基幹とした遺伝子解析法による 49 症例 59 試料の真菌症剖検症例の解析結果を報告する。

核酸の保存性の評価を目的とした PCR 法と ISH 法において関連性がみられ ( $p<0.05$ )、共に 6 割の試料で陽性所見が得られた。さらに、*Aspergillus* 属の検出を目的とした nested PCR 法と ISH 法においても関連性が認められた ( $p<0.01$ )。また、仮性菌糸を形成する *Candida* 属と *Trichosporon* 属、*Aspergillus* 属と接合菌、そして、*Aspergillus* 属の間で遺伝子解析による解析結果と初期診断における形態学的な菌種の判断で乖離がみられた。

同一試料に対する複数の PCR 法と ISH 法との複合的判断により、精度が高い真菌症診断の可能性とこれまでに蓄積された病理診断試料を用いた後方視的発生動向調査による有益な情報基盤の構築の可能性が示唆された。

### A. 研究目的

ホルマリン固定パラフィン切片に対する遺伝子解析法を応用した病原真菌の検出に関連する知見の集積は少なく、その手技の妥当性も付与されていないことから、これまで我々は再現性が高い遺伝子病理組織学的診断法の確立を目的とした基礎的検討を行ってきた。一方、確定診断に苦慮する深在性真菌症では、真菌症剖検症例に基づく後方視的疫学観察研究が真菌感染対策上の有益な情報基盤を提供してきたことから、我々は遺伝子病理組織学的診断法

を応用した真菌症剖検症例に対する後方視的疫学観察研究の可能性について検討したので報告する。

### B. 研究方法

症例は病理解剖（1985 年～2007 年）にて病理組織形態学的に真菌症と診断された 49 症例 59 試料で、死後時間の平均は 2 時間 47 分（47 分～10 時間 30 分）、平均年齢は 53 歳（1.6 歳～87 歳）、性別は女性 24 例、男性 25 例。主な検索臓器は肺の 46 試料であった。以下、心臓

7、小腸2、胸膜2、腎臓1、動脈瘤1であった(図1)。主として造血器悪性腫瘍、重度の熱傷、固形癌およびステロイド投与など易感染患者における侵襲性病変を検討した(図2)。

複数の病理医による菌種の推定を目的とした病理組織標本の再評価により、以下の如く形態的な分類を行った。Monomorphic yeast (MY), Dimorphic yeast (DY), Non zygomycete mold (NZM), Zygomycete (ZM), Mold not otherwise specified (MNOS) (図1)。

ヒトβ-グロビン遺伝子および多くの病原真菌のリボゾーム関連遺伝子群を標的としたPCR法を施行する事で、試料中における核酸の保存性を評価した。さらに *Aspergillus* 属、*Fusarium* 属、接合菌、*Scedosporium* 属のリボゾーム関連遺伝子群を標的としたPCR法およびnested PCR法を施行し(図3)、ITS-1および18S rRNA 遺伝子領域の増幅産物をPCRダイレクトシーケンス法にてシーケンス解析をした。

多くの病原真菌の28S rRNAを標的としたPeptide Nucleic Acid (PNA) をプローブとしたISH法を施行し、菌体内における核酸の保存性を評価した。さらに *Fusarium* 属、*Candida albicans* の28S rRNAを標的としたPNAプローブによるISH法と二本鎖DNAプローブによる *Aspergillus fumigatus* Alkaline Proteinase (ALP)遺伝子を標的としたISH法を施行した(図4)。

### C. 研究結果

1. 菌種の推定を目的とした病理組織学的再評価によって、59試料は以下の如く分類された。MY: 2, DY: 9, NZM: 40, ZM: 2, NZMとZMの重複感染: 1, MNOS: 5 (図1)。

2. 本検討におけるPCR法、ISH法ならびにPCRダイレクトシーケンス解析の結果を示す(図

5)。PCR法における陽性率および陽性試料数はヒトβ-グロビン遺伝子(110 bp) 61% (36/59)、ヒトβ-グロビン遺伝子(250 bp) 17% (10/59)、汎真菌(300 bp) 22% (13/59)、汎真菌(230 bp) 12% (7/59)、*Aspergillus*属(236 bp) 19% (11/59)、(146 bp) 47% (28/59)、*Fusarium*属(170 bp) 0% (0/59)、接合菌(170 bp) 8% (5/59)、*Scedosporium*属(172 bp) 0% (0/59)であった。ISH法における陽性試料数および陽性率は汎真菌 59% (35/59)、*Aspergillus*属(ALP遺伝子) 64% (38/59)、*Fusarium*属 0% (0/59)、*C. albicans* 8% (5/59)であった。

3. 核酸の保存性に関する検討においてはヒトβ-グロビン遺伝子PCR法(110 bp)と汎真菌ISH法において共に6割の試料で陽性所見が得られ、両者の間で関連性が認められた( $p < 0.05$ ) (図6)。また、これらは剖検時の死後時間およびパラフィンブロックの保存期間との間で関連性は認められなかった(図7)。

4. *Aspergillus*属を標的とした2種類のnested PCR法とALP遺伝子を標的としたISH法との間で関連性が認められた。特に146 bpと増幅産物のサイズが短いnested PCR法において陽性率が高く、ALP ISH法との間で関連性も強かった( $p < 0.01$ , kappa coefficient 0.53) (図8)。

5. PCRダイレクトシーケンス法においては汎真菌PCR法(300bp)にてITS-1領域が増幅された試料のうち、菌種の特定につながる結果が得られたのは9試料で、*A. flavus*などnon *fumigatus* による*Aspergillus*属 1試料、*A. fumigatus* 5試料、*Trichosporon ovoides*などによる*Trichosporon*属 3試料であった。*Aspergillus*属の18S rRNA遺伝子領域を標的としたnested PCR法(146 bp)にて増幅された試料では、*A. flavus*などnon *fumigatus* による*Aspergillus*属 1試料、他27試料においては*Aspergillus*属に矛盾しない相同性を示した。接合菌の18S rRNA遺伝子領域を標的とした

nested PCR法 (170 bp)で増幅された試料では*Rhizopus* 属、*Rhizomucor*属 とともに1試料であった。

6. 今回検索した代表的な症例を呈示する。試料1 (図9) は形態学的に *Aspergillus* 属に特徴的な二方向性の分岐の頻度が少なく、菌体の太さも太く、直ちに *Aspergillus* 属と判断できなかった症例である。*Aspergillus* 属 nested PCR 法および ALP ISH 法は陽性で、ITS-1 領域におけるシーケンス解析にて *non fumigatus* アスペルギルス症が示唆される症例であった。試料14 (図10) は酵母形態を示すと同時に、仮性菌糸の形成が認められ、*C. albicans* が考えられた症例である。PCR 法にて菌種の特定につながる所見は得られなかったが、*C. albicans* ISH 法にて陽性所見が得られ、形態学的判断との間で整合性が得られた。試料20 (図11) は酵母形態を示し、初期診断において *Candida* 属と判断され、再評価において DY と判断された症例である。*C. albicans* ISH 法は陰性で、ITS-1 領域のシーケンス解析にて *Trichosporon* 属を示唆する所見が得られた。試料46 (図12、13) は *Aspergillus* 属と接合菌が重複感染した症例で、*Aspergillus* 属 nested PCR 法および接合菌 nested PCR 法陽性、シーケンス解析にて *A. fumigatus* と100%の相同性を示した。ALP ISH 法は形態学的に *Aspergillus* 属と判断可能な糸状菌に陽性所見を示す一方で (図12)、接合菌と判断される菌体には陰性であり (図13)、形態学的判断と整合性が得られた。

#### D. 考察

ISH法とPCR法による核酸の保存性の評価において、6割の試料で評価可能な試料と判断された。さらに、死後時間およびパラフィンブロックの保存期間との関連性はなかったことから、保管年数に影響を受けず、これまでに蓄積された膨大な試料の検索が可能である事が

わかった。

49試料においてISH法あるいはPCR法において菌の特定につながる陽性結果が得られ、再評価の結果、MNOSと分類された菌種の推定が困難な5試料のうち、2試料で陽性所見が得られ、1試料においてはBグロビンPCR法および汎真菌ISH法にて陽性所見が得られている事から、さらなる検索により、菌種の特定の可能性があると考えられた。これらの点を考慮すると、真菌症剖検症例に対する本法の適用の有効性が示唆された。

初期診断、組織学的再評価そして遺伝子解析との関連性において、仮性菌糸を形成する *Candida* 属と *Trichosporon* 属、*Aspergillus* 属と接合菌、そして、*Aspergillus* 属の間で遺伝子解析による解析結果と初期診断における形態学的な菌種の判断で乖離がみられたことから、これらの点を形態学的判断の問題点として指摘したい。

#### E. 結論

同一試料に対する複数のPCR法とISH法との複合的判断により、精度が高い真菌症診断の可能性とこれまでに蓄積された病理診断試料を用いた後方視的発生動向調査による有益な情報基盤の構築の可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

原著および総説

1. Takahashi H, Wada A, Yokoyama Y, Ishii M, Shibuya K, Suguro T: Idiopathic hypertrophic spinal pachymeningitis: a case report. J Orthop Surg, 18:113-7, 2010
2. Okubo Y, Yokose T, Tuchiya M, Mituda A, Wakayama M, Hasegawa C, Sasai D,

- Nemoto T, Shibuya K: Duodenal gangliocytic paraganglioma showing lymph node metastasis: A rare case report. *Diagn Pathol* 5:27, 2010 (DOI:10.1186/1746-1596-5-27)
3. 大塚 創, 秦 美暢, 笹本修一, 密田亜希, 渋谷和俊, 高木啓吾: 出血により急速に増大した肺葉内肺分画症の1切除例. *日本呼吸器外科学会雑誌*, 24(4) 64-70, 2010
  4. Ishikawa M, Kimura K, Tachibana T, Hashimoto H, Shimojo M, Ueshiba H, Tsuboi K, Shibuya K, Yoshino G: Establishment and characterization of a novel cell line derived from a human small cell lung carcinoma that secretes parathyroid hormone, parathyroid hormone-related protein, and pro-opiomelanocortin. *Hum Cell*, 2010, (DOI:10.1111/j.1740-0774.2010.00082.x)
  5. Hata Y, Isobe K, Sasamoto S, Tamaki K, Takahashi S, Sato F, Mitsuda A, Okubo Y, Shibuya K, Homma S and Takagi K: Pulmonary Hamartoma Diagnosed by Convex Probe Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration (EBUS-TBNA). *Inter Med*, 49:1171-3, 2010
  6. 玉置優子, 片桐由起子, 内出一郎, 中熊正仁, 土屋雄彦, 谷口智子, 豊泉孝夫, 前村俊満, 渋谷和俊, 森田峰人: 骨盤内に漿液性嚢胞を伴ったアンドロゲン不応症の一例. *日本産科婦人科内視鏡学会雑誌*, 25(2):366-9, 2010
  7. Nakajima S, Shibuya K, Kamiyama N, Sumino Y: Comparison of ultrasound colored image views produced by application of statistical analysis of radio-frequency signals and histological findings in patients with chronic hepatitis C. *J Med Ultrasonics*, 2010,(DOI:10.1007/s10396-009-0248-9)
  8. Watanabe M, Shiozawa K, Takahashi M, Wakui N, Otsuka Y, Kaneko H, Tanikawa K, Shibuya K, Kamiyama N, Sumino Y: Parametric imaging using contrast-enhanced ultrasound with Sonazoid for hepatocellular carcinoma. *J Med Ultrasonics*, 37:81-6, 2010 (DOI 10.1007/s.10396-009-0254-Y)
  9. Saijyo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, Fujikado N, Kusaka T, Chung S, Komatsu R, Miura N, Adachi Y, Ohno N, Shibuya K, Yamamoto N, Kawakami K, Yamasaki S, Saito T, Akira S and Iwakura Y: Dectin-2 Recognition of  $\alpha$ -Mannans and Induction of Th17 Cell Differentiation Is Essential for Host Defense against *Candida albicans*. *Immunity* 32:681-91, 2010 (DOI:10.1016/j.immuni.2010.05.001)
  10. 磯部和順, 秦 美暢, 阪口真之, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 高木啓吾, 本間 栄: FEG-PET で消化管に異常集積を認めた肺癌症例の検討. *日本呼吸器学会雑誌*, 48(7):482-7, 2010
  11. 石川真由美, 久保木幸司, 大久保洋一郎, 重光理華, 伊賀 涼, 正井なつ美, 宮城匡彦, 安藤恭代, 磯 薫, 廣井直樹, 上芝 元, 周郷延雄, 渋谷和俊, 芳野原: 成長ホルモン分泌不全を合併したグリメピリドによる低血糖の1例. *東邦医学会雑誌*, 57(4):274-9, 2010
  12. 杉本元信, 中山あすか, 瓜田純久, 谷川佳世子, 渋谷和俊: 急性発症しウルソデ

- オキシコール酸にて長期緩解した原発性胆汁性肝硬変の 1 症例. 胆汁酸, 9(1):18-9, 2010
13. 西山彌生, 阿部美知子, 池田玲子, 宇野潤, 小栗豊子, 渋谷和俊, 前崎繁文, 毛利 忍, 山田 剛, 石橋弘子, 蓮見弥生, 安部 茂: 日本医真菌学会法による「酵母の抗真菌薬感受性試験法」に関する検討. 日本医真菌学会雑誌, 51(3):153-62, 2010
  14. 佐地 勉, 藤原麻耶, 渋谷和俊. 肺動脈性肺高血圧症の成因と病態. 循環器内科, 67(5):464-8, 2010
  15. Okubo Y, Shinozaki M, Yoshizawa S, Nakayama H, Wakayama M, Hatori T, Mituda A, Hirano T, Shimodaira K, Zhi Yuzhu, Shibuya K: Diagnosis of systemic toxoplasmosis with HIV infection using DNA extracted from paraffin-embedded tissue for polymerase chain reaction: a case report. J Med Case Reports, 4:265.2010 (DOI:10.1186/1752-1947-4-265)
  16. Tanaka N, Kusunoki Y, Kaneko K, Yamamoto T, Kaburaki M, Muraoka S, Abe H, Endo H, Sato D, Homma S, Shibuya K, Kawai S: Systemic lupus erythematous complicated by recurrent pneumothorax: Case report and literature review. Jpn J Clin Immunol Case Report, 33(3):162-8, 2010
  17. 平田晶子, 大西 清, 丸山 優, 渋谷和俊: 爪の解剖と成長. PEPARS, 44:1-8, 2010
  18. 杉野圭史, 磯部和順, 岩田基秀, 伊藤貴文, 和田知博, 鏑木教平, 後町杏子, 石田文昭, 山越志保, 佐藤大輔, 阪口真之, 佐藤敬太, 佐野 剛, 坂本 晋, 高井雄二郎, 赤坂喜清, 渋谷和俊, 植草利公, 武村民子, 江石義信, 本間 栄: 難治性肺線維症合併サルコイドーシスの 1 剖検例. 日サ会誌, 30(1):33-42, 2010
  19. 石井 淳, 山崎有浩, 田村 晃, 谷島聡, 前田徹也, 大嶋陽幸, 野崎達夫, 渋谷和俊, 島田英昭, 金子弘真: 特発性血小板減少性紫斑病の脾摘術後に発症した早期胃癌に対し腹腔鏡補助下幽門側胃切除術を施行した 1 例. 日外科系連会誌, 35(4):576-81, 2010
  20. Uramatsu M, Matsumoto T, Tateda K, Shibuya K, Miyazaki S, Horino T, Tanabe M, Sumiyama Y, Kusachi S, Yamaguchi K: Involvement of endotoxin in the mortality of mice with gut-derived sepsis due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Microbiol Immunol, 54(6):330-7, 2010
  21. 三宅洋子, 佐々木久美子, 篠崎 稔, 若山 恵, 井手 忠, 根本哲生, 渋谷和俊: 真菌の形態ーグロコット染色細胞診標本をよむー. 深在性真菌症~SFI Forum~, 6:26-9, 2010
  22. 廣井直樹, 伊東俊秀, 薬師寺史厚, 須江麻里子, 吉原 彩, 緒方秀昭, 島田長人, 坪井久美子, 渋谷和俊, 芳野 原: バセドウ病治療中に発見された甲状腺微小乳頭癌の 1 例. 内分泌外科, 27:197-202, 2010
  23. Takagi K, Hata Y, Sasamoto S, Tamaki K, Fukumori K, Hasegawa C, Shibuya K: Late onset postoperative pulmonary fistula following a pulmonary segmentectomy using electrocautery or a harmonic scalpel. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 16(1):21-5, 2010



24. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Aoki T, Ohashi Y, Miyagi M, Sakai K, Shibuya K, Hase H, Aikawa A: Increased ACE and Decreased ACE2 Expression in Kidneys from Patients with IgA Nephropathy. *Nephron Clin Pract*, 4:117(1):c57-c66, 2010
25. Sue M, Yoshihara A, Okubo Y, Ishikawa M, Ando Y, Hiroi N, Shibuya K, Yoshino G: A Case of juvenile acromegaly that was initially diagnosed as severe congestive heart failure from acromegaly-induced dilated cardiomyopathy. *Intern Med*, 2010;49(19):2117-21, 2010
26. Shinozaki M, Okubo Y, Sasai D, Nakayama H, Murayama SY, Ide T, Wakayama M, Hiruta N, Shibuya K: Identification of *Fusarium* Species in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Sections by *in Situ* Hybridization Using Peptide Nucleic Acid Probes. *J Clin Microbiol*, Nov 24, 2010, doi:10.1128/JCM.01149-10
27. Ito T, Sugino K, Satoh D, Muramatsu Y, Sano G, Sato K, Sakaguchi S, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Hata Y, Shibuya K, Uekusa T, Kurosaki A, Homma S: Bird Fancier's Lung Which Developed in a Pigeon Breeder Presenting Organizing Pneumonia. *Intern Med*, 2010; 49(23): 2605-8, 2010

#### 著書

1. 密田亜希, 澁谷和俊: 肺真菌症: 家庭医学大全科第2版, pp2443-4 (株)法研, 東京, 2010

#### 学会発表

1. 永吉 優, 多田裕司, 亀井克彦, 落合恵理, 渡辺 哲, 田邊信宏, 滝口裕一, 横田文子, 安田直史, 澁谷和俊, 巽浩一郎: 真菌胞子の反復気管内投与により惹起されるマウス肺動脈リモデリングの検討. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 4/23-25, 2010
2. 杉野圭史, 山越志保, 佐藤敬太, 坂本晋, 高木啓吾, 澁谷和俊, 植草利公, 黒崎敦子, 本間 栄: UIP 類似の分類不能型特発性間質性肺炎の臨床病理学的検討. 第50回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 4/23-25, 2010
3. 大久保陽一郎, 横瀬智之, 土屋 勝, 密田亜希, 若山 恵, 羽鳥 務, 平野孝幸, 笹井大督, 下平佳代子, 職 玉珠, 中山晴雄, 澁谷和俊: リンパ節転移を来した神経細胞性傍神経節腫 (gangliocytic paraganglioma) の1例. 第99回日本病理学会総会, 東京, 4/27-29, 2010
4. 若山 恵, 大久保陽一郎, 篠崎 稔, 笹井大督, 中山晴雄, 下平佳代子, 平野孝幸, 密田亜希, 羽鳥 努, 村山琮明, 澁谷和俊: *in situ* hybridization を用いたヒトヒストプラスマ症の組織診断法の検討. 第99回日本病理学会総会, 東京, 4/27-29, 2010
5. 羽鳥 努, 佐野弘子, 齋藤紀彦, 平野孝幸, 密田亜希, 長谷川千花子, 澁谷和俊, 大久保陽一郎, 若山 恵, 吉本賢隆, 北山康彦, 板橋正幸, 並木恒夫: 術前化学療法後の乳腺 carcinoma with cartilaginous and/or osseous metaplasia の1例. 第99回日本病理学会総会, 東京, 4/27-29, 2010
6. 中山晴雄, 澁谷和俊: 市中病院での深在性真菌症の現状と ICT 介入による深在性真菌症対策への取り組み・有用性. 第84

- 回日本感染症学会総会，京都，4/5, 6, 2010
7. 千葉暢子，佐々木久美子，井手 忠，若山 恵，大久保陽一郎，密田亜希，羽鳥努，渋谷和俊，伊東俊秀，坪井久美子：甲状腺髄様癌8症例の細胞像．第51回日本臨床細胞学会総会(春期大会)，横浜，5/29-31，2010/04/13
  8. 笹本修一，後藤英典，佐藤史朋，高橋祥司，田巻一義，秦 美暢，高木啓吾，大久保陽一郎，密田亜希，渋谷和俊：Two stage で気管軟骨 5ring 切除を伴う左 sleeve 肺全摘した腺様嚢胞癌の1例．第27回日本呼吸器外科学会総会，仙台，5/13-14，2010
  9. 渋谷和俊，村山琮明：「真菌感染症」－からだにつくカビを退治する－．第49回東邦大学薬学部公開講座，千葉，5/15，2010
  10. 渋谷和俊：「病理からみた感染症～病原体対する生体の規則性～」．第2回血液腫瘍カレントセミナー，東京，5/18，2010
  11. 渋谷和俊：幡種性カンジダ症マウスモデルにおける糖脂質投与の影響．第21回日本生体防御学会，仙台，7/22，2010
  12. 渋谷和俊：「症例Ⅱ 東邦大学医療センター大森病院からの提供」．第26回肺真菌症研究会学術集会，東京，7/3，2010
  13. 渋谷和俊：『感染病態研究における基礎と臨床のクロストーク(Ⅱ)』『アスペルギルス感染症』基礎．第3回感染病態研究フロンティア，横浜，7/10，2010
  14. 渋谷和俊：Phantom of models: Topics of pathological diagnosis on invasive mold infections. Program for the First Forum on Advances of *Aspergillus* and *Aspergillosis*, 7/16-18, 2010 Chengdu, China
  15. Suetsugu T, Yamamoto M, Yasuda M, Kobayashi M, Seto Y, Shimura F, Matsushima K, Matsuno H, Edamatsu H, **Shibuya K**: Is PPI treatment more effective than surgery for laryngeal granuloma with GERD?. 13th Korea Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, 9/9-11, 2010 Seoul, Korea
  16. 金澤真作，緒方秀昭，三塚幸夫，馬越俊輔，齋藤芙美，久保田伊哉，伊東俊秀，密田亜希，羽鳥 努，白神伸之，渋谷和俊，金子弘真：乳癌術前化学療法 of 判定における造影 CT/MRI と造影超音波の有用性の比較検討．第69回日本癌学会学術総会，大阪，9/22-24，2010
  17. 大久保陽一郎，根本哲生，若山 恵，横瀬智之，北原加奈子，羽鳥 努，密田亜希，平野孝幸，笹井大督，下平佳代子，職 玉珠，渋谷和俊：胃癌由来 Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy の6症例．第48回日本病理学会関東支部学術集会，東京，9/4，2010
  18. 鈴木 隆，船橋公彦，塩川洋之，小池淳一，赤坂喜清，渋谷和俊：横行結腸癌との鑑別が困難で免疫組織学的に診断された壁外浸潤性胃癌の1例．第30回城南地区大腸疾患懇話会，東京，9/10，2010
  19. 若山 恵，大久保陽一郎，篠崎 稔，中山晴雄，密田亜希，大野秀明，宮崎義継，中谷行雄，亀井克彦，渋谷和俊：in situ hybridization 法を用いたヒトヒストプラズマ症の組織診断の検討．第54回日本医真菌学会総会，東京，10/16-17，2010
  20. 菊池 賢，西村昌晃，村松昌武，平山紀夫，渋谷和俊，篠崎 稔，大久保陽一郎，榎村浩一，田村弘志，平松啓一：ニワト

リを用いた食道カンジダ症ならびに全身性カンジダ症モデルの作成. 第 54 回日本医真菌学会総会, 東京, 10/16-17, 2010

21. 篠崎 稔, 大久保陽一郎, 笹井大督, 職珠玉, 中山晴雄, 若山 恵, 井手 忠, 村山琮明, 渋谷和俊: パラフィン包埋組織を用いた ISH 法および PCR 法の診断応用に関する基礎的研究. 第 54 回日本医真菌学会総会, 東京, 10/16-17, 2010
22. 渋谷和俊: 顆粒球減少時の侵襲性糸状菌症. 第六回北海道小児血液真菌症研究会, 北海道, 11/5, 2010
23. 秦 美暢, 根本哲生, 佐藤敬太, 佐藤史朋, 杉野圭司, 本間 栄, 渋谷和俊, 廣島健三, 高木啓吾: [症例 11]. 第 11

回中皮種パネル, 広島, 10/2, 2010

24. 高橋祥司, 秦 美暢, 後藤英典, 佐藤史朋, 田巻一義, 笹本修一, 密田亜希, 渋谷和俊: 肺腺扁平上皮癌 6 切除例の検討. 第 51 回日本肺癌学会, 広島, 11/3-4, 2010

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許取得  
なし  
実用新案登録  
なし  
その他  
なし

Pathological characteristics of the 59 samples

Characteristic	
* Tissue site (Number of blocks: formalin-fixed and paraffin-embedded sections)	
• Lung	46
• Intestine	2
• Kidney	1
• Heart	7
• Pleura	2
• Aneurysm of aorta	1
☞ Total number of blocks	59
* Histopathological review	
• Yeast	8
• Monomorphic yeast	2
• Dimorphic yeast	6
• Mold	51
• Non zygomycetes mold	40
• Zygomycete, probable	2
• Combined zygomycete and non zygomycete mold	1
• Mold not otherwise specified	8
☞ Total number of blocks	59

図 1

Clinical summary of the 49 cases

• Median age (yr) (range)	53 (1.6-87)
• Gender (female/male)	24/25
• Period	1985-2007
• Postmortem interval (hr) (range)	2:47 (0:47-10:30)
• Underlying disease	
• AML	8
• ALL	6
• ATL	1
• CML	1
• Aplastic anemia	2
• Malignant lymphoma	7
• Interstitial pneumonia (including fibrosis)	3 (1)
• Carcinoma	5
• Extended burn injury	2 (1)
• Hydrocephalus	1
• Nephrotic syndrome	1
• Pneumonia	1
• SCA	1
• Tuberculosis	1
• Aspergillosis	2 (2)
• SLE	1
• Systemic sclerosis	1
• MDS	1
• Myasthenia gravis	1
• Multiple myeloma	1
• ANCA associated disease	1
• Hemophagocytic syndrome	1
☞ Total number of case and samples (blocks)	49 cases, 59 blocks
Number shown with ( ) indicates those of non-invasive mold infection (fungus ball type)	

AML: Acute Myeloid Leukemia, ALL: Acute Lymphoid Leukemia, Adult T Cell Leukemia, SCA: Spino Cerebellar Ataxia  
SLE: Systemic lupus erythematosus, MDS: Myelodysplastic syndrome, ANCA: Anti-neutrophil cytoplasmic antibody

図 2

Primer sequences used for PCR

Specificity	Name of primer	Product size	Sequence
Human $\beta$ -globin gene Saiki RK, et al. Science. 1985.	PC03	110 bp	ACACAACCTGTGTCACATGC
	PC04		CAACTTCATCCACGTTACC
Human $\beta$ -globin gen Saiki RK, et al. Science. 1985.	PC03	250 bp	ACACAACCTGTGTCACATGC
	GH21		TGACAAAGCCCATACGCT
Panfungus 28S rRNA gene Saitoh G, et al. J. Clin. Microbiol. 1997.	U1	260 bp	GTGAAATGTTGAAAGGGAA
	U2		GACTCTGTTCCGCTGTT
Panfungal 18S and ITS1 rRNA gene Makimura K, et al. J. Clin. Microbiol. 1999.	18SF1	300 bp	AGGTTCCCTAGTGAACCT
	58SR1		TTGCTGCGTCTTCATCGA
<i>Aspergillus</i> species 18S rRNA gene Hofman V, et al. Diagnostic Pathology. 2010.	ASP nest1	250 bp	TCCTGGTCCGGCATCGAT
	ASP nest2		TGACAAAGCCCATACGCT
	ASP nest3	146 bp	GAAGAAGCCGCAAAATGC
	ASP nest4		AMCACAAGGCTGTGTA
<i>Aspergillus</i> species 18S rRNA gene Bialek R, et al. J. Clin. Pathol. 2005.	AFU7S	405 bp	CGG CCC TTA AT AGC CGG
	AFU7AS		GAC CGG GTT TGA CCA ACT TT
	AFU5S	236 bp	AGG CGC AGC GAG TAC ACC TTG
	AFU5AS		GGG GGT CGT TGC CAA CUC CUC TGA
<i>Fusarium</i> species 28S rRNA gene Shimozaki M, Nakayama H, Shibuya K: unpublished data.	FS S	170 bp	TGGGAGGTATATGTTCTCTAA
	FS AS		GATGATCAACCAAGCCCA
<i>Zygomycetes</i> 18S rRNA gene Bialek R, et al. J. Clin. Pathol. 2005.	ZM1	385 bp	ATT ACC ATG AGC AAA TGA GA
	ZM2		TCC GTC AAT TCC TTT AAG TTT C
	ZM1	178 to 177 bp	ATT ACC ATG AGC AAA TGA GA
	ZM3		CAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT
<i>Scedosporium</i> species 5.8S, ITS2 rRNA gene Hagari V, et al. Arch Dermatol. 2002.	Pho1	197 bp	TTA CTA CGC AGA AGG CAA
	SP1		AAT CTT TGA AGC CAC ATT
	Pho1	149 bp	TTA CTA CGC AGA AGG CAA
	SP2		TGT CCG AGC GTC ATT TC

図 3

Nucleotide sequences of the primers and probes used in the study

Probe target	Nucleotide sequence	Probe length	Probe labeling
<i>A. fumigatus</i> Alkaline phosphatase gene (ALP)	GCCTATCGGTACTTGTAG AAGGTTACAGCAGATCAAC	583 bp ds DNA	PCR: FITC
Hanazawa R, et al. J Med Microbiol 49: 285-290, 2000.			
Panfungal 28S rRNA	TGGCTATCGCGTGTTCAT	18 mer PNA	N terminus: FITC
Shinozaki M, Shibuya K, et al. J. Clin. Microbiol doi:10.1128/JCM.01149-10			
<i>Fusarium</i> sp. 28S rRNA	GATGATCAACCAAGCCCA	18 mer PNA	N terminus: FITC
Shinozaki M, Shibuya K, et al. J. Clin. Microbiol doi:10.1128/JCM.01149-10			
<i>C. albicans</i> 26S rRNA	ACAGCAGAAGCCGTG	15 mer PNA	N terminus: FITC
Oliveira J, et al. J. Clin Microbiol 39: 4138-4141, 2001.			

4

Results of PCR, ISH, and histopathological review of postmortem examination specimens

Case No.	Sex	Age	Specimen	Alkaline phosphatase (ALP)	Panfungal	<i>Fusarium</i>	<i>C. albicans</i>	Histopathology	Final diagnosis
1	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
2	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
3	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
4	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
5	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
6	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
7	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
8	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
9	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
10	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
11	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
12	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
13	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
14	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
15	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
16	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
17	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
18	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
19	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
20	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
21	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
22	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
23	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
24	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
25	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
26	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
27	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
28	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
29	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
30	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
31	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
32	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
33	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
34	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
35	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
36	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
37	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
38	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
39	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
40	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
41	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
42	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
43	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
44	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
45	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
46	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
47	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
48	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
49	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
50	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
51	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
52	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
53	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
54	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
55	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
56	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
57	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
58	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
59	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
60	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
61	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
62	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
63	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
64	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
65	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
66	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
67	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
68	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
69	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
70	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
71	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
72	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
73	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
74	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
75	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
76	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
77	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
78	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
79	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
80	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
81	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
82	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
83	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
84	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
85	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
86	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
87	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
88	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
89	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
90	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
91	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
92	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
93	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
94	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
95	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
96	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
97	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
98	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
99	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus
100	M	70	Brain	+	+	+	+	Aspergillus	Aspergillus

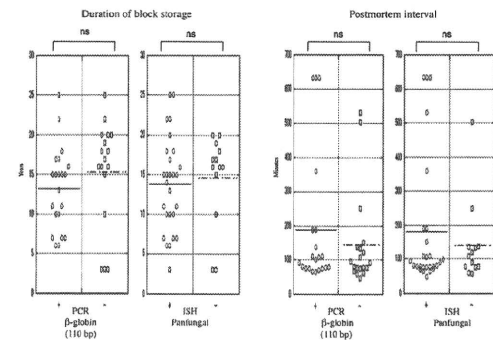
5

Comparison of PCR and ISH for assessments of nucleic acid preservation in tissue sections

		Human $\beta$ globin PCR (110 bp)		Human $\beta$ globin PCR (250 bp)		Panfungal PCR (250 bp)		Panfungal PCR (300 bp)	
		+	-	+	-	+	-	+	-
Panfungal	+	26	9	3	32	6	29	12	23
ISH	-	11	13	3	21	2	22	2	22
chi-squared P-value		p<0.05		ns		ns		p<0.05	

6

Relationships among postmortem interval, duration of block storage, and assessments of nucleic acid preservation in tissue sections



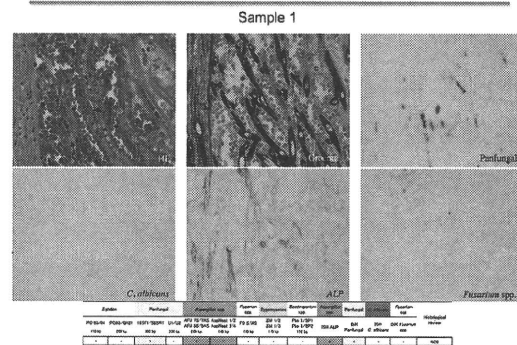
7

Relationships among 3 detection methods for detection of *Aspergillus* spp.

	ISH: ALP	Nested PCR AFU78/7AS AFU55/5AS (236 bp)	Nested PCR Asp Nest1/2 Asp Nest3/4 (142 bp)
ISH: ALP		chi-squared P-value: ns Kappa coefficient: 0.17	chi-squared P-value: p<0.01 Kappa coefficient: 0.53
Nested PCR AFU78/7AS AFU55/5AS (236 bp)			chi-squared P-value: p<0.01 Kappa coefficient: 0.34
Nested PCR Asp Nest1/2 Asp Nest3/4 (142 bp)			

8

Presentation of representative cases in this study



\* *Aspergillus flavus* strain PM-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1: 100%  
 \* *Aspergillus oryzae* isolate RP-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1: 100%

9