

201123023A

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

真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と国内  
診断・治療ネットワークの構築に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年3月

研究代表者

河野 茂

(長崎大学医歯薬学総合研究科)

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

真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と国内  
診断・治療ネットワークの構築に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年 3 月

研究代表者

河野 茂

(長崎大学医歯薬学総合研究科)

平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

「真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と国内診断・治療ネットワーク  
の構築に関する研究」班員名簿

氏 名	所 属	職 名
河野 茂	長崎大学医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座	教授
宮崎 義継	国立感染症研究所 生物活性物質部	部長
三嶋 廣繁	愛知医科大学 大学院医学研究科 感染制御学	教授
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
渋谷 和俊	東邦大学医学部 病院病理学講座	教授
槇村 浩一	帝京大学医真菌研究センター	教授
比留間政太郎	順天堂大学医学部附属練馬病院 皮膚・アレルギー科	教授
望月 隆	金沢医科大学 環境皮膚科学	教授
亀井 克彦	千葉大学 真菌医学研究センター	教授
川上 和義	東北大学 大学院医学系研究科	教授
掛屋 弘	長崎大学医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座	講師
山越 智	国立感染症研究所 生物活性物質部	主任研究官



# 目 次

I. 真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と国内診断・治療ネットワークの構築に関する研究	
総括研究報告書（平成 23 年度）	1
研究代表者：河野 茂（長崎大学大学院医歯薬学研究科 感染免疫学講座）	
II. 分担研究報告書	
1. 真菌・地衛研ネットワークの構築	5
分担研究者：宮崎 義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）	
2. 外科真菌症の診断や疫学	14
分担研究者：三嶋 廣繁（愛知医科大学大学院医学研究科 感染制御学）	
3. 病状と病原性に関する研究	21
分担研究者：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）	
4. 病理組織・細胞診断における遺伝子補助診断法の開発と診断支援活動への応用	23
分担研究者：渋谷 和俊（東邦大学医学部病院病理学講座）	
5. 新興再興真菌症・診断構築（遺伝子）	
様々な検体からの遺伝子診断法のシステム化	31
分担研究者：槇村 浩一（帝京大学医真菌研究センター）	
6. 日本における <i>Trichophyton tonsurans</i> 感染症の疫学とその感染対策に関する研究	42
分担研究者：比留間 政太郎（順天堂大学医学部付属練馬病院皮膚アレルギー科）	
7. トリコフィトントズランス感染症の診断治療法の構築と、病原性解明に関する応用研究 ー トズランス感染症の診断法構築 ー	51
分担研究者：望月 隆（金沢医科大学 医学部 皮膚科学部門）	
8. 輸入真菌症の国内発生状況調査と ヒストプラズマ症の迅速診断法改良・開発へ向けた基礎的研究	56
分担研究者：亀井 克彦（千葉大学真菌医学研究センター臨床感染症分野）	
9. 真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と 国内診断・治療ネットワークの構築に関する研究	66
分担研究者：川上 和義（東北大学大学院医学系研究科）	
10. 接合菌の診断系構築に関する研究	75
分担研究者：掛屋 弘（長崎大学医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座）	
11. アスペルギルス症の診断系構築	78
分担研究者：山越 智（国立感染症研究所 生物活性物質部）	

# I. 総括研究報告書

真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と  
国内診断・治療ネットワークの構築に関する研究

研究代表者 河野 茂 長崎大学大学院医歯薬学研究科 感染免疫学講座

研究要旨

診療ならびに検査ラボネットワークの構築を最終目標として、内科、皮膚科、外科、検査、基盤研究の観点から、ネットワークで共有すべき疫学情報を明らかにし、専門的観点から課題解決に向けた研究を実施した。深在性真菌症では地域流行型真菌症と造血幹細胞移植患者における真菌症、皮膚真菌症ではトリコフィトン・トンスランス感染症、外科真菌症に関してはカンジダ症とトリコスポロン症、検査法構築については病理標本からの遺伝子診断法と糸状真菌に関する新規診断法、基盤研究ではクリプトコックスの認識機構、それぞれについて成果をあげた。また、ネットワークにおいて共有すべき標準的真菌同定法について検討し、全国の3拠点で検査法を検証した。

A. 研究目的

我が国には、真菌症診断治療のガイドラインが存在するが、我が国の医療事情や新しいエビデンスに基づく診療の普及には、診療機関のネットワーク構築や逐次更新された疫学情報の発信が必要である。現在のところ真菌症の確定診断ができるラボは限定されており、真菌症の診療支援や疫学情報共有のためのネットワークの構築を並行して行うことを最終目的とする。

さらにネットワーク構築過程において、内科領域と皮膚科領域、外科領域、検査領域のそれぞれにおいて現状における真菌症の課題の解決を図る。

B. 研究方法

各分担研究者は、深在性真菌症と皮膚真菌

症、外科真菌症、診断検査、病態解析のそれぞれの専門領域で問題となる課題を設定し、これを解決する過程において相互に連携する。さらに、専門領域に関して研究協力者とも連携することで、真菌症に対する診療とラボネットワーク構築を図る。

1. 深在性真菌症.

1) 疫学研究. ①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。②旅行者真菌症のコンサルテーションおよび菌株の同定、抗体の測定依頼などの依頼があった症例に基づいて基礎データを作製した。これに醫學中央雑誌、Medlineなどに掲載された報告症例も検索したデータを使用した。

2) 新規診断法構築. シグナルシークエンストラップ法（SST-REX 法）」（Kojima T, Kitamura T. A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor. Nat

Biotechnol,17:487-490, 1999) をアスペルギルス属と接合菌に応用し、細胞からの分泌蛋白質および膜蛋白質に関して得られた情報から、新規の効率的診断に応用可能と推測される蛋白質について生化学的性質や診断応用性につき検討した。

## 2. 皮膚科領域.

1) *Trichophyton tonsurans* 感染症の疫学研究. 対象は、2008年～2011年度に東京学生柔道連盟に競技登録した全ての大学柔道選手(約50大学チーム・1200～1300人/年度)である。方法は、大学入学の毎年度4月中旬に各大学において、練習前に丸形ブラシで頭部を15～20回程度強く擦り、Hairbrushをポリ袋に入れて検査機関へ送付する。培養はマイコセル寒天培地(平板)25℃で14日間培養後判定した。各選手は、調査用紙に従って年齢、性別、身長、体重、居住様式、同居者数、運動時間、過去および現在における白癬皮膚の有無、治療内容などを調査した。

2) *Trichophyton tonsurans* 感染症の診断治療法の構築. ①Cytobrush法. 子宮頸部細胞採取用の八田式頸管ブラシ(Cytobrush)を用いて、頭部白癬患者を培養し、Hairbrush培養法と比較した。②遺伝子診断. *T. tonsurans*臨床分離株263株を用いて、種内変異の鑑別に用いた分子マーカー、リボソームDNAのnon-transcribed spacer (NTS) 領域の制限酵素分析、以下NTS-RFLP (Mochizuki et al, Jpn J Infect Dis, 60:188-192,2007, Jpn J Infect Dis, 61:219-222, 2008) を実施し分類し、NTSI, II, IIIの3つの遺伝子型に関して真菌学的性質や薬剤感受性について比較検証した。

## 3. 外科領域.

ミカファンギン(MCFG)使用量とトリコスポロン属の検出数との関連について調査を行った。2003年から2009年までの間に、1施設で

トリコスポロン属が検出された62名81検体を対象に、患者背景、検出状況を検討した。同期間における抗真菌薬の使用本数および使用比率を調査し、トリコスポロン属の検出状況との関連性について検討した。

## 4. 検査法・診断法.

1) 病理組織標本からの確定診断法. *in situ* hybridization (ISH)法におけるPeptide Nucleic Acid (PNA)プローブを新たに設計し、実験的マウス感染症、並びに、組織学的に播種性トリコスポロン症およびカンジダ症が確認され、血液培養あるいは感染病巣におけるITS-1領域のシーケンス解析にて組織学的診断と矛盾しない剖検症例の標本を用いて検討した。

2) *T. tonsurans* 特異的LAMP系を用いた本菌感染症診断同定系の開発. DDBJなどに登録されている*Trichophyton tonsurans* DNA塩基配列を検索・検討し、beta tubulin 遺伝子塩基配列から以下の本菌検出用特異的LAMPプライマーセットA・Iを設計した(BIP 5' CCTGGTTCGTTCTCAGGTACCCAGCACCAATTTGGTTACCCT 3', B3 5' TGCATGAATGCTCACCAGAA 3', FIP 5' ATGGCCGGTTTGGAGATGGACGCGAGCTTCGAGCATCAG 3', F3 5' ACAGGCTTCGAGTTTCACAA 3')。このプライマーセットを用いて各種真菌ゲノムに対する検出特性を検討した。

## 5. 真菌症の病態解明.

難治性ならびに慢性のクリプトコックス症における宿主免疫応答機序を解明するために、特に感染後の宿主免疫による菌体の認識機構と各種Thサブセットの分化誘導との関連性、特に多糖の認識に重要なC-type lectin receptors (CLRs) とそのシグナル伝達分子のCARD9について検討した。

## C. 研究結果

### 1. 深在性真菌症

1) 疫学研究. ①免疫不全患者の真菌症については、全国 39 施設から計 758 件の造血幹細胞移植症例の登録があり、真菌症の発症は Proven fungal disease 5 例、Probable fungal disease 20 例、Possible fungal disease 26 例 (EORTC/MSG の基準) であった。うち、菌種が特定されたものが 6 例あった。②旅行者真菌症については、2011 年は計 4 例が確認され、総症例数は 66 例となった。感染地はいずれも米国であり、カリフォルニア 2 名、アリゾナ 1 名、ニューメキシコ 1 名であった。病型が明らかであった症例 3 例はいずれも肺コクシジオイデス症と考えられた。2007 年の 3 例以降、3 例→2 例→1 例と一応の減少傾向が見られたが、本年のデータからは本疾患の再増加の可能性が考えられた。マルネツフェイ型ペニシリウム症は 2009 年の 2 例、昨年の 1 例に続き、1 例が発見され計 7 例となった。パラコクシジオイデス症は 2009 年の 2 例以降、わが国での発生は認められていない(計 21 例)。2011 年のヒストラズマ症は 2 例が認められ総計は 73 例となった。

2) 新規診断法構築. ①アスペルギルス. 抗原 B11 に対するウサギポリクローナル抗体とモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製し、抗体を精製してサンドイッチ ELISA 系の構築を行った。②接合菌. 昨年度の検討で最も発現量が多かった 23kDa 蛋白質と 2 番目に多かった 46kDa 蛋白質を対象として、大腸菌で発現させ蛋白質の精製を行った。

### 2. 皮膚真菌症

1) *Trichophyton tonsurans* 感染症の疫学研究. 検診調査における過去 4 年間の *T. tonsurans* 感染症の罹患状況を示した。本症の

罹患状況については、2008 年度には Hairbrush 陽性者が 102 名 (11.3%) であったの対し、2009 年度には 76 名 (6%) と約 1/2 程度に低下した。その後、陽性者は 2010 年度には 76 名 (5.9%)、2011 年度は 71 名 (5.4%) とゆるやかな減少傾向を示した。Hairbrush 陽性者における無症候キャリアについては、検査時に「無症候である」と回答したものは、2008 年度 102 名中 88 名 (86.3%)、2009 年度 76 名中 70 名 (92.1%)、2010 年度 76 名中 69 名 (90.8%) と陽性者の大部分を占めていた。2011 年度においては未回答の 1 名を除く 70 名全員が「無症候である」と回答した。

2) *Trichophyton tonsurans* 感染症の診断治療法の構築. ①Cytobrush法. 本法と Hairbrush法での培養菌数は、相関係数は 0.8 であり、相関がみられた。②遺伝子診断. コロニー直径は NTS I 9-44mm (平均 27mm)、NTS II 15-49mm (平均 32mm)、NTS III 23-45mm (平均 37mm) で NTS II は直径が大きい傾向 (有意差なし) があり、コロニーの色調も白色調が強いように見受けられた。NTS I と NTS III の差は大きさ、色調とも明らかではなかった。薬剤感受性については molecular type 分類による違いは認めなかった。

### 3. 外科領域.

トリコスポロン属の検出数と MCFG の使用本数には、統計学的に有意な関連性 ( $p < 0.05$ ) が認められ、相対的使用量より絶対的使用量において関連性が高いことが示唆された。MCFG は、深在性真菌症の予防および治療として広く使用されており、抗真菌薬の偏重な使用は、真菌のブレイクスルー感染症を引き起こすことが知られていることから、病院全体で抗真菌薬の絶対的使用量への配慮も必要であると考えられる。

### 4. 検査法・診断法

1) 病理組織標本からの確定診断法. *T.*



*asahii* および *C. albicans* 感染マウス腎組織のホルマリン固定パラフィン切片に対する汎真菌 PNA プローブによる核酸の保存性に関する評価を行ったところ、両者の菌体内に良好なシグナルが検出されたことから、標本上における核酸の保存性が確認された。未染色標本またはパラフィンブロックが提供された 24 件については、形態学的に真菌が否定された 2 件を除き、可能な限り、遺伝子補助診断を試みた。その内訳は、ISH 法と PCR を併せて行った症例が 11 件、PCR 法のみが 8 件、ISH 法のみが 3 件であった。

2) プライマーセット A I の各種真菌に対する検出特異性を確認し、検討した限り、本プライマーセットは *T. tonsurans* および *T. equinum* ゲノムのみの特異的増幅を示した。パイロット・スタディーとして、*T. tonsurans* 感染症診断に活用できる LAMP 法開発への道が開けた。

#### 5. 真菌症の病態解明.

クリプトコックス症の病態に関して以下の点を明らかにした。

1) *Cryptococcus neoformans* DNA には、既知の CpG-DNA とは異なる機序で TLR9 依存性に樹状細胞を刺激する新規モチーフを有しており、新たな免疫アジュバントになりうる可能性がある。2) *Card9* 遺伝子欠損状態では、Th17 細胞への分化が障害されることによって *C. neoformans* 感染が悪化することが明らかになった。3) *Card9* の上流で機能する *C. neoformans* の認識受容体の候補としていくつかの候補分子を明らかにした。4) *C. neoformans* 感染 7 日後には、肺内でエフェクターメモリー T 細胞が検出され、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17A 産生能を有していた。

#### D. 考察と結論

真菌症の疫学に関してはコクシジオイデス

症、ヒストプラズマ症、トリコフィトン・トズランスの発生動向をアップデートした。また、造血幹細胞移植患者におけるわが国の深在性真菌症疫学がはじめて明らかになった。真菌症の検査法に関しては、トリコフィトン・トズランスに関しては、簡便な LAMP 法の構築への応用が可能な配列を明らかにし、アスペルギルスと接合菌について分泌抗原とし検査応用可能な蛋白質を明らかにした。真菌症の確定診断法に関しても、培養陰性である場合でも現在の病理組織学的診断に替わる方法として、病理組織からの菌成分を検出する方法が構築されつつある。標準的な遺伝子診断法の普及についても全国に拠点ラボを試験的に運用開始した。病原性に関して、健常者に発症するクリプトコックス症を対象として、自然免疫機構の一端を明らかにしたので、今後は診断・治療への応用に関するスキームを提案する。

真菌症の対策には、各領域の専門家が連携しネットワークを構築維持し、情報共有しながら問題を解決していく必要がある。

#### F. 健康危険情報

各分担報告書参照

#### G. 研究発表

各分担報告書参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 特許取得

各分担報告書参照

#### 実用新案登録

各分担報告書参照

#### その他

特になし

## Ⅱ. 分担研究報告書

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）  
分担研究報告書

真菌・地衛研ネットワークの構築

研究分担者	宮崎義継	国立感染症研究所	生物活性物質部
研究協力者	大野秀明		同
	梅山 隆		同
	田辺公一		同
	山越 智		同

研究要旨 真菌感染症の診療支援や情報共有のためのネットワーク構築のために、診療とラボ機能の両面において、全国にわたる5つの地域の地方衛生研究所と研究協力体制を構築した。これまで個々の施設で行ってきた深在性真菌症の原因菌の同定法を一元化し、診断支援、情報共有のための基盤を作った。

A. 研究目的

わが国における真菌感染症の基盤応用研究や医療現場での真菌症対策のさらなる充実を図るため、診療とラボ機能に着目した国内の真菌症レファレンスネットワークの構築診療支援や情報共有のためのネットワーク構築を目的とする。そのために、その中核をなす地方衛生研究所と国立感染症研究所との間で、真菌症診療とラボ機能の両面において、研究協力体制を構築することは必須である。今年度はその基盤作りを主なものとする。そのために、その中核をなす地方衛生研究所と国立感染症研究所との間で、真菌症診療とラボ機能の両面において、研究協力体制を構築することは必須である。今年度はその基盤作りを主なものとする。そのために、その中核をなす地方衛生研究所と国立感染症研究所との間で、真菌症診療とラボ機能の両面において、研究協力体制を構築することは必須である。今年度はその基盤作りを主なものとする。

B. 研究方法

1) 真菌の培養

寒天培地に塗布し、適切（25°C、30°C、35°C、37°C など）な温度下で培養した。寒天培地より、1～数コロニー拾い、YPD

pH5.6 6ml に接種、30°C、250rpm（平行震盪）で一晩培養した。一部をグリセロールストックで保存した。

2) 真菌同定

同定に際して、糸状菌においてはコロニーの色調、菌糸、孢子など形態の観察、酵母においては生化学的同定（RapID 法）、クリプトコックス属においては CGB 培地での発育能などを必要に応じて行った。

遺伝学的同定法は、標準株の遺伝子を対照として、rRNA 遺伝子間に存在する internal transcribed spacer (ITS)領域、または rRNA 遺伝子中の D1/D2 LSU (large subunit)を増幅するプライマーにて PCR を行い、増幅産物が得られた場合には、この産物についてシーケンスを行ったのち、国際的に公表されているデータベースを参照して菌種を同定した。

3) DNA の抽出

培養した菌を集菌し、DNA 抽出キット (QIAGEN 社 DNeasy Plant Mini kit) のマニュアルに従い DNA を抽出した。

#### 4) PCR による DNA 断片の増幅

1)で抽出した DNA を template にして、D1/D2 LSU および ITS 領域を増幅した。Takara 社の ExTag 酵素とその反応液を用いた。

##### D1/D2 primer

NL1	5'- gca tat caa taa gcg gag gaa aag-3
NL2	5'- ggt ccg tgt ttc aag acg g-3

##### ITS primer

ITS1	5'- tcc gta ggt gaa cct gcg g -3
ITS4	5'- tcc tcc get tat tga tat gc -3

##### サイクル

温度	時間	サイクル数
98°C	5 min	-
95°C	1 min	40 cycles
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	-

#### 3) PCR 産物の確認・コンタミの予防

1% agarose gel で泳動し、増幅産物の有無、大きさを確認した。検査室内汚染を判別可能とするマーカー入り陽性対照を作製し、使用した。また、試薬の調整、検体処理、泳動などは物理的に隔離された場所で実施した。

#### 4) シークエンス

PCR product を精製後、それぞれ、NL1、NL4、ITS1、ITS4 のプライマーで、シークエンスを行った。BigDye(R) Terminator

v3.1Cycle を使い、マニュアルに従い試薬を混和し、シークエンス反応を行った。

##### シークエンス反応

温度	時間	サイクル数
96 °C	2 min	-
96 °C	10 s	25 cycles
55 °C	5 s	
60 °C	4 min	
4 °C	forever	-

#### 5) ホモロジー検索

国際的に公表されているデータベースである BLAST

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を参照して、99%以上の相同性を基準として、菌種を同定した。またアスペルギルス属に関しては上記以外に  $\beta$ -tubulin 遺伝子、クリプトコックス属に関しては IGS 領域の塩基配列まで決定し、同定した。

#### C. 研究結果

全国における 5 つの地域の地方衛生研究所と研究協力体制を構築した。

地方衛生研究所との研究支援体制を整えるために、今年度は、各病院施設等から依頼される分離真菌の同定を想定し、ネットワークづくりのための真菌同定法の一元化と各施設への技術の共有を試みた。

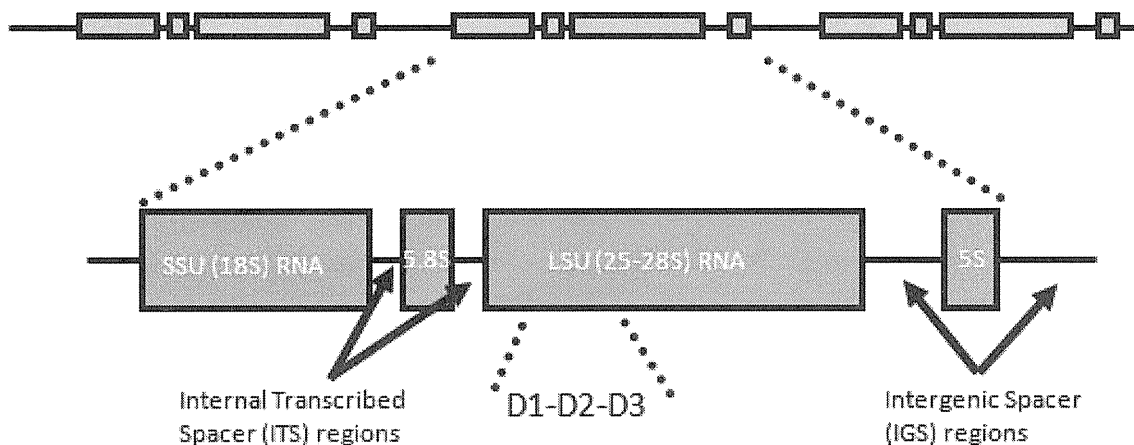
各施設から地方衛生研究所に送られる臨床検体から分離された真菌はバイオセーフティレベル 2 以下である。まず、共通技術の確立を行った。代表的真菌、*Candida albicans*, *Aspergillus fumigates*, *Cryptococcus neoformans* から DNA を抽



出して、D1/D2 LSU および ITS 領域を増幅した (図 1)。標準 DNA として常に *Candida albicans* SC5314 から調整した DNA 13 ng/μl (終濃度 1.3 ng/μl) を用い、特異性の指標とした。

現在、菌の同定に必要な DNA フライマー、標準菌株、試薬およびプロトコールを各地方衛生研究所に送る手配をしており、今年度中に実施されるようお願いしている。

A. ITS1、ITS2、ITS1+2、D1/D2 領域



B. PCR により増幅された ITS1、ITS2、ITS1+2、D1/D2 領域

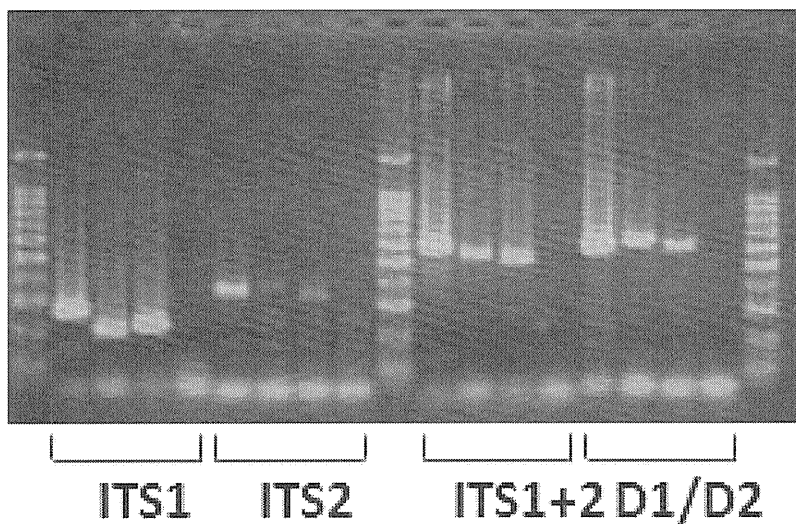


図 1. 各主要真菌における ITS1、ITS2、ITS1+2、D1/D2 領域 の増幅  
各々左から *A. fumigatus* Afu293, *C. neoformans* ATCC90112, *C. albicans* TUA4, Negative contol の順

#### D. 考察

今年度は菌株の同定に関する技術共有を行った。次年度は臨床検体の扱いを目的とした技術共有のための条件検討をする必要がある。検体の種類により DNA 抽出処理方法が変わると考えられ、今後、処理法に応じて標準 DNA をどの段階でどの様に導入するか等。再検討が必要になると考えられる。その場合、感度をいかに保証するか、の条件も検討する必要があると考えられる。

#### E. 結論

国立感染症研究所と全国にわたる地方衛生研究所の5か所とのネットワークを構築した。病原性深在性真菌の同定法の一元化のためのプロトコール作成し、各施設で代表的な真菌とDNAスタンダードを使いPCR法にてD1/D2 LSUおよびITS領域を増幅する条件を決め、技術共有の基盤を作った。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

英文

1. Kohno S, Izumikawa K, Kakeya H, Miyazaki Y, Ogawa K, Amitani R, Niki Y, Kurashima A. Clinical efficacy and safety of micafungin in Japanese patients with chronic pulmonary aspergillosis: a prospective observational study. *Med Mycol.* 49:688-693, 2011.
2. Miyazaki T, Izumikawa K, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Yasuoka A, Kohno S. The glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl protease Yps1 is transcriptionally regulated by the calcineurin-Crz1 and Slt2 MAPK pathways in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 11:449-456, 2011.
3. Tomita H, Muroi E, Takenaka M, Nishimoto K, Kakeya H, Ohno H, Miyazaki Y, Utani A. Rhizomucor variabilis infection in human cutaneous mucormycosis. *Clin Exp Dermatol.* 36:312-314, 2011.
4. Kinjo Y, Illarionov PA, Vela JL, Pei B, Girardi E, Li X, Li Y, Imamura M, Kaneko Y, Okawara A, Miyazaki Y, Gomez-Velasco A, Rogers P, Dahesh S, Uchiyama S, Khurana A, Kawahara K, Yashilkaya H, Andrew PA, Wong CH, Kawakami K, Nizet V, Besra GS, Tsuji M, Zajonc DM, Kronenberg M. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol.* 12:966-974, 2011.
5. Kaneko Y, Obata Y, Nishino T, Kakeya H, Miyazaki Y, Hayasaka T, Setou M, Furusu A, Kohno S. Imaging mass spectrometry analysis reveals an altered lipid distribution pattern in the tubular areas of hyper-IgA murine kidneys. *Exp Mol Pathol.* 91:614-621, 2011.

6. Tanabe K, Lamping E, Nagi M, Okawada A, Holmes AR, Miyazaki Y, Cannon RD, Monk BC, Niimi M. Chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal features of pleiotropic drug resistance transporter structure and function. *Mol Microbiol.* 82:416-433, 2011.

#### 和文

1. 堀内一宏, 山田萌美, 白井慎一, 高橋育子, 加納崇裕, 金子幸弘, 秋沢宏次, 梅山 隆, 宮崎義継, 矢部一郎, 佐々木秀直. 脳室内抗真菌薬投与が奏効した *Cryptococcus gattii*による脳および肺クリプトコックス症の1例. *臨床神経学* in press.
2. 金子幸弘, 宮崎義継. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて VI. 主な感染症に対する実地医科の抗菌薬使用の実際/A. 主要感染症から見た抗菌薬の選択と使用の実際 43. カンジダ症, アスペルギルス症, クリプトコックス症. *M. P. Medical Practice*臨時増刊号. 28:483-490, 2011.
3. 宮崎義継, 金子幸弘. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて II. 抗菌薬の特徴とそれに基づいた使い方のコツとポイント 11. 抗真菌薬. *M. P. Medical Practice*臨時増刊号. 28:137-141, 2011.
4. 金子幸弘, 宮崎義継. 特集・病原真菌と真菌症の新たな理解に向けて 臨床 4. 深在性真菌症診断の現状と今後の展望. *化学療法の領域.* 28:89-97, 2012.
5. 宮崎義継. 各論 II. 各病原体別にみた

病態, 診断, 治療 H. 真菌感染症1. カンジダ症. 社団法人日本化学療法学会編. 感染症専門医テキスト 第I部 解説編. p1073-1076, 2011年, 南江堂, 東京.

6. 宮崎義継. 各論 II. 各病原体別にみた病態, 診断, 治療 H. 真菌感染症2. クリプトコックス症. 社団法人日本化学療法学会編. 感染症専門医テキスト 第I部 解説編. p1077-1079, 2011年, 南江堂, 東京.
7. 宮崎義継. 第II章 中級編 20.腎炎治療中に肺異常陰影を呈した症例. 社団法人日本化学療法学会編. 感染症専門医テキスト 第II部 ケーススタディ編. p239-244, 2011年, 南江堂, 東京.
8. 金子幸弘, 宮崎義継. 4章 真菌感染症 4-3 コクシジオイデス症. 感染症事典編集委員会編. 感染症事典. p251-254, 2012年, オーム社, 東京.

#### 学会発表

1. Kinjo Y, Illarionov PA, Vela JL, Pei B, Li XJ, Kaneko Y, Miyazaki Y, Nizet V, Kawakami K, Tsuji M, Kronenberg M. NKT cells recognize glycolipids from *Streptococcus pneumoniae* and GBS. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011).* September 6-10, 2011, Sapporo.
2. Kaneko Y, Ohno H, Miyazaki Y. Farnesol attenuates the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Union of Microbiological Societies 2011*

Congress (IUMS2011). September 6-10, 2011, Sapporo.

3. Kinjo Y, Tarumoto N, Ueno K, Okawara A, Shinozaki M, Shibuya K, Miyazaki Y. *Candida* sepsis induced by iNKT cell activation. The 6th International Symposium on CD1 and NKT. September 23-27, 2011, Chicago, USA.

#### 国内学会

1. 宮崎義継, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 渋谷和俊, 大野秀明. 診断ワークショップ5 深在性真菌症の病理 深在性真菌症における臨床的課題. 第100回日本病理学会総会. 4月28-30日, 2011年.
2. 梅山 隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越 智, 渡邊 浩, 宮崎義継. 福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコッカス症多発発生例からの分離株のMLSTによる疫学的検討. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
3. 筋野恵介, 樽本憲人, 山口敏行, 前崎繁文, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. *Rothia*属菌により出血性脳梗塞を合併した感染性心内膜炎の1例. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年.
4. 徳山承明, 眞木二葉, 竹村 弘, 高木妙子, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継, 亀井克彦, 長谷川泰弘. 日本人AIDS患者に発症したマルネツフェイ型ペニシリウム症の一例. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
5. 金城雄樹, 樽本憲人, 上野圭吾, 大川原明子, 篠崎 稔, 渋谷和俊, 宮崎義継. カンジダ敗血症マウスモデルにおける炎症反応の解析. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
6. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans*の代償機構の解明とその制御による治療の可能性. 第108回日本内科学会. 4月17-18日, 2011年, 東京.
7. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. カンジダバイオフィルムにおけるストレス応答とその阻害効果. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
8. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus*のMps1キナーゼの新たな抗真菌薬ターゲットとしての可能性の検討. 第59回日本化学療法学会総会. 6月23-25日, 2011年, 札幌.
9. 金城雄樹, 金子幸弘, 樽本憲人, 大川原明子, 川上和義, 宮崎義継. 自然リンパ球による肺炎球菌認識機構の解析. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
10. 樽本憲人, 金城雄樹, 大川原明子, 上野圭吾, 篠崎 稔, 渋谷和俊, 宮崎義継. 糖脂質投与マウスの播種性カンジダ症増悪における免疫学的解析. 第22回日本生体防御学会. 6月29-7月1日, 2011年, 那覇.
11. 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 宮崎義継. 遺伝子診断法を用いた土壤中に生息するヒストプラスマ属検出の試み. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年.



12. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida* バイオフィームにおける抗真菌薬耐性関連遺伝子の発現調節. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
13. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 橋本ゆき, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus* 属分泌蛋白質を標的にしたサンドイッチELISA法によるアスペルギルス症診断系構築の試み. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
14. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 畠山修司, 亀井克彦, 宮崎義継. 国立感染症研究所における地域流行型真菌症への対応と現状. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
15. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans* のbiofilmにおける抗真菌薬に対する代償性の遺伝子発現. 第59回日本化学療法学会総会. 6月23-25日, 2011年, 東京.
16. 大野秀明, 田辺公一, 杉田 隆, 畠山修司, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 亀井克彦, 宮崎義継. 国内で初めて分離されたVGIIa型 *Cryptococcus gattii* 株の薬剤感受性と病原性についての検討. 第59回日本化学療法学会総会. 6月23-25日, 2011年.
17. 大野秀明, 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越 智, 宮崎義継. クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*). 衛生微生物技術協議会第32回研究会. 6月29-30日, 2011年.
18. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans* に対する既存薬と抗真菌薬との併用効果についての検討. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
19. 宮崎義継. 教育講演「抗真菌薬耐性の基礎と臨床」. 第81回日本感染症学会西日本地方会学術集会. 10月6-8日, 2011年, 小倉.
20. 金城雄樹, 樽本憲人, 大川原明子, 上野圭吾, 篠崎 稔, 渋谷和俊, 宮崎義継. 自然免疫の活性化による播種性カンジダ症マウスモデルの解析. 基礎・臨床シンポジウム4「真菌と感染防御」. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
21. 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継. アスペルギルス属の病原性制御にむけたアプローチ. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
22. 三原 智, 泉川公一, 井手昇太郎, 平野勝治, 峰松明日香, 細萱直希, 永吉洋介, 田代将人, 中村茂樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 掛屋 弘, 山本善裕, 柳原克紀, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継, 田代隆良, 河野 茂. 長崎大学における *Cryptococcus* の Multilocus Sequence Typing (MLST) を用いた分子疫学調査. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
23. 梅山 隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越 智, 宮崎義継. 標準化MLST解析法を用いたわが国のクリプトコックス属臨床分離株の分子疫学解析. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
24. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明,

- 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* MPS1キナーゼの化学的・遺伝学的アプローチによる解析. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
25. 大川原明子, 金城雄樹, 上野圭吾, 山越智, 梅山 隆, 樽本憲人, 大野秀明, 新見昌一, 宮崎義継. β結合型マンノースを欠失したカンジダマンナンは樹状細胞の炎症性サイトカイン産生を増強する. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
26. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. フルコナゾール感受性調整物質の探索. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
27. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 橋本ゆき, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus*の分泌蛋白質B-11およびそのホモログの検出系と病原性について. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
28. 大野秀明, 大川原明子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 泉川公一, 藤井 毅, 竹村 弘, 岸 一馬, 河野 茂, 宮崎義継. 日本国内で分離された *Cryptococcus*属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. ワークショップ3 深在性真菌症の新たな展開—重症例、難治症例の病態と治療—. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
29. 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継. 日本とタイにおける遺伝子検出法を用いた環境生息ヒストプラスマ属の検出. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
30. 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 杉田 隆, 畠山修司, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii*臨床分離株の実験的病原性解析. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
31. 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 宮崎義継. *Candida glabrata*臨床分離株におけるキャンディン感受性とFKS遺伝子の解析. 真菌分子細胞研究会. 11月12-13日, 2011年, 香川.
32. 名木 稔, 田辺公一, 中山浩伸, 知花博治, 梶原 将, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata*の細胞外ステロール獲得機構の解明. 真菌分子細胞研究会. 11月12-13日, 2011年, 香川.
33. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 畠山修司, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii*国内分離株の病原因子解析. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
34. 名木 稔, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata*の鉄欠乏ストレス応答. 2011年インターラボセミナー(日本細菌学会関東支部). 12月10日, 2011年, 東京.

35. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 抗真菌併用薬探索を目的とした既知化合物ライブラリースクリーニング. 2011年インターラボセミナー (日本細菌学会関東支部). 12月10日, 2011年, 東京.
36. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 緑膿菌におけるquorum sensing欠損株とホモセリンラクトナーゼ*aiiM*誘導株の病原性比較. 第53回緑膿菌感染症研究会. 2月17-18日, 2012年, 東京.
37. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. アゾール薬との併用薬の探索. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
38. 宮崎義継. わが国における地域流行型真菌症の現況. 第三回長崎メディカルシンポジウム. 7月9日, 2011年, 長崎.
39. 宮崎義継. 最近話題の真菌症—*Cryptococcus*症など—. 臨床微生物研究会. 9月16日, 2011年, 岡山.
40. 大野秀明, 宮崎義継. 真菌症診断の現状と課題. 第128回ICD講習会. 10月22日, 2011年, 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特許取得
1. アスペルギルス・フミガーツス感染症の検査、予防及び治療のための方法並びに組成物  
PCT 国際出願 PCT/JP2011/068454  
2011.8.12 出願  
発明者: 宮崎 義継 山越 智 梶川 益紀、杉浦 雅仁、伊藤 玲子
- 実用新案登録  
特になし。
- その他  
特になし

外科真菌症の診断や疫学

研究分担者 三嶋 廣繁 愛知医科大学大学院医学研究科 感染制御学

研究協力者 山岸 由佳 愛知医科大学病院 感染制御部

研究要旨 トリコスポロン属は、土壌中に分布する環境真菌で、日和見感染症の原因菌として重要であるが、偏重な抗真菌薬の使用によるブレイクスルー感染症としても重要である。今回、ミカファンギン（MCFG）使用量とトリコスポロン属の検出数との関連について調査を行った。2003年から2009年までの間に、愛知医科大学病院でトリコスポロン属が検出された62名81検体を対象に、患者背景、検出状況を検討した。また、同期間における抗真菌薬の使用本数および使用比率を調査し、トリコスポロン属の検出状況との関連性について検討した。関連性の統計学的解析は、Spearmanの順位相関係数を用い、Spearmanの順位相関係数 $r_s > 0.786$ を有意差あり（ $p < 0.05$ ）とした。検出検体は尿が最も多く、次いで痰、糞便であった。8種のプライマーを用いたRandom Amplified Polymorphic DNA解析では、医療関連感染も示唆される症例を認めた。各年におけるトリコスポロン属の検出患者数とMCFGの使用本数および使用比率との順位相関係数は、0.811（ $p=0.03$ ）および0.613（ $p=0.14$ ）であった。トリコスポロン属の検出数とMCFGの使用本数には、統計学的に有意な関連性（ $p < 0.05$ ）が認められ、相対的使用量より絶対的使用量において関連性が高いことが示唆された。MCFGは、深在性真菌症の予防および治療として広く使用されており、抗真菌薬の偏重な使用は、真菌のブレイクスルー感染症を引き起こすことが知られていることから、病院全体で抗真菌薬の絶対的使用量への配慮も必要であると考えられる。

A. 研究目的

1. 外科領域において分離された酵母様真菌の疫学を明らかにする。
2. 外科領域における深在性真菌症治療における各種抗真菌薬の臨床的位置づけを明らかにする。
3. 外科領域における深在性真菌症（侵襲性カンジダ症）の診断および治療に役立つレファレンスネットワークを構築する。

【臨床におけるトリコスポロン属の分離状況

に関する検討】

トリコスポロン属は酵母様真菌の一種で、自然界では広く土壌や腐敗樹木などに存在し、ヒトの皮膚や気道に一時的に保菌したり、消化管の細菌叢に恒久的に定着することもある。日本では家屋に発生したトリコスポロンを吸入することで起こる夏型過敏性肺炎の原因抗原としても知られている<sup>1)</sup>。近年では、易感染性宿主における深在性トリコスポロン症の発症の報告が増加しており、致死率が80～90%と予後不良であることが知られている<sup>2)</sup>。そ