

の疫学は、深在性真菌血症の原因真菌では、酵母様真菌においてカンジダ属に次いで2番目に多い³⁾とされるが、日本における頻度は、1%未満⁴⁾から8%前後⁵⁾と幅があり、診断の難しさを反映していると推察される。また、検出率は患者背景や抗真菌薬の使用状況に影響されるとも考えられている⁶⁾。

トリコスポロン症は、キャンディン系抗真菌薬の使用中に発症するブレイクスルー感染症としても注目されている。キャンディン系抗真菌薬は、真菌細胞壁の構成成分である1,3-β-D-グルカンの合成酵素を分子標的としており、真菌細胞壁の生合成を特異的に阻害する薬剤であるが、深在性真菌症の主要な原因真菌であるカンジダ属、アスペルギルス属に優れた抗真菌活性を示す^{7), 8)}一方で、トリコスポロン属やクリプトコックス属に対しては、活性を持たず⁸⁾、国内外で、ブレイクスルー感染症の報告がみられている⁹⁾⁻¹⁵⁾。

トリコスポロン症は、消化管からの内因性感染によって発症すると考えられているが、また一方で、中心静脈カテーテルや末梢静脈カテーテルを長期留置された症例が多く¹⁶⁾、外因性感染の可能性も否めない。Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 解析により、院内伝播を示唆する報告^{17), 18)}もあり、院内感染の可能性も注目されている。

愛知医科大学病院（以下、当院）の各種培養検査において、2005年と2008年に例年より多いトリコスポロン属の検出がみられたことから分離背景について調査を行った。また、トリコスポロン属検出数と抗真菌薬の院内使用状況との関係性に着目し、特にミカファンギン（MCFG）使用量との関連について検討した。

B. 研究方法

（1）研究実施経過

2003年1月から2009年12月までに当院でトリコスポロン属が分離された63名のうち、

新生児1名を除いた62名81検体を対象とし、診療録および検査記録から後方視的に調査した。トリコスポロン属の検出状況に関しては、検体種別症例数および持続検出の有無を調査項目とした。検出が1回のみまたは検出後30日以内に同一部位から再検出が認められなかった症例を単回検出例、同一患者から30日以内に複数回の検出が認められた場合は、1症例とし、それが同一検体からの検出であった場合は持続例とした。また、30日以上経過してから再検出をみた場合は、再検出例とした。なお、各症例におけるトリコスポロンの定着、感染症（疑いを含む）の有無にかかわらず、純粹にトリコスポリンが検出された症例のみを検討した。患者背景として、性別、年齢、基礎疾患、検出30日以内における抗真菌薬前投与の有無、検出30日以内における抗菌薬投与の有無、入院期間中における転帰を調査した。

また、同期間におけるMCFGの使用本数および抗真菌薬に占めるMCFGの使用比率を調査し、トリコスポロン属検出症例数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、 $n=7$ において、Spearmanの順位相関係数 $r_s > 0.786$ を有意差あり（ $p < 0.05$ ）とした。トリコスポロン属の同定には、API20Cオキサノグラム（SYSMEX bioMérieux Co., Ltd.）を使用した。また、2008年5月から2009年7月の検出検体のうち18検体について、RAPD解析を行った。RAPD解析には、R28-1、R28-2、M13、A1、A2、6、OPE-1、RC8の8種のプライマーを用いた。

（2）倫理面への配慮

本研究では、トリコスポロン属が分離された患者を研究対象者としているが、匿名化された患者背景情報および分離された真菌のみを利用しており、本研究において研究対象とした患者を特定化することは不可能である。したがって、人権擁護上の配慮は十分であり、

研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性はない。

C. 研究結果

1. 検出部位と検出状況

調査対象となった63例(62名)の菌種の内訳は、*Trichosporon asahii* 61例(96.8%)、その他の*Trichosporon*属2例(3.2%)であった。検出部位は、尿が35例(55.6%)と最多で、次いで糞便13例(20.6%)、喀痰8(12.7%)例、膿2(3.2%)例、血液1例(1.6%)、腹水1例(1.6%)、皮膚1例(1.6%)、複数箇所からの検出が2例(3.2%)であった。複数箇所からの検出の検出部位はそれぞれ、膿(胸腔ドレナージ)と喀痰が1例、咽頭擦過と喀痰が1例であった。単回検出例は56例(88.9%)、持続検出例は6例(9.5%)、再検出例は1例(1.6%)であった。

2. 患者背景

性別は、男性42例(66.7%)、女性21例(33.3%)と、男性に多い傾向がみられた。63例の年齢は 68.1 ± 16.4 歳(4~89歳)であった。基礎疾患は、固形腫瘍11例(17.5%)、造血器腫瘍11例(17.5%)、腎疾患10例(15.9%)、脳血管障害8例(12.7%)、糖尿病7例(11.1%)、自己免疫疾患4例(6.3%)、良性呼吸器疾患2例(3.2%)、熱傷2例(3.2%)、その他8例(12.7%)であった。

患者転帰は、単回検出例に比べ、持続検出例において死亡率が高い傾向があった。

検出前30日以内の抗菌薬の使用歴は54例(85.7%)、30日以内の抗真菌薬の使用歴は、16例(25.4%)であった。注射用抗真菌薬は、深在性カンジダ症の標的治療、経験的治療、予防投与に対し投与されていた。経口抗真菌薬使用例は、血液内科・小児科領域での予防投与であった。

3. トリコスポロン属の検出症例数の推移と抗

真菌薬使用量推移

トリコスポロン属検出症例数は、2005年に18症例、2008年に14症例と例年より多く検出されていた。MCFGの年間使用本数は、2003年に2256本、その後2005年の2515本をピークに微減したが、2008年は3455本と増加した。また、MCFGの占める割合は、採用直後の2003年には48%を占め、その後、ホスフルコナゾール、ポリコナゾール、リポソーマルアムホテリシンB、イトラコナゾールと次々に新しい薬剤が採用されるにつれて、2005年の57%をピークに減少し、2008年は44%であった。

4. トリコスポロン属検出症例数とMCFG使用本数および使用比率との順位相関

各年におけるトリコスポロン属検出症例数と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($p=0.14$)であり、検出症例数とMCFG使用本数との間には、統計学的有意性($r_s > 0.786$, $p < 0.05$)が認められた。

5. RAPD解析

RAPD解析を行った18検体は、AからDの4つのグループに分類された。グループAに分類された検体番号1, 2, 5, 7, 12, 13の6検体は、同等性が高かった。検体番号2と7は同一患者(patient2)であるが、検体番号2での検出の後、検体番号7までの間に、5回の尿培養が行われており、すべて陰性であった。グループCに分類された検体番号14から18は、同一患者由来であり、遺伝子パターンも同一であった。

D. 考察

トリコスポロン属は、カンジダ属やアスペルギルス属に比べ病原性は低いとされている¹⁹⁾が、近年、深在性トリコスポロン症が注目される背景には、医療の進歩により、抗がん薬治療や移植治療中の免疫力低下した患者や医療器具を使用する患者の増加に伴い、易感

染性宿主の深在性トリコスポロン症の報告²⁰⁾⁻²²⁾が増加していること、一旦発症した場合の致死率が極めて高いこと²⁾などが挙げられる。新たなリスク因子として、トリコスポロン属に感受性を持たないキャンディン系抗真菌薬^{9), 10)}や、アゾール系薬^{11), 12)}の長期使用が報告されている。

トリコスポロン属は、幅広く様々な患者から検出されるが、その多くは単回検出の通過菌であると推測される。しかしながら、持続検出例においては、死亡症例で検出期間が長期になる傾向がみられた。Hauptらは、易感染性宿主の3.7%が、糞便、皮膚、尿などの何らかの検体において陽性であり、尿培養で繰り返しトリコスポロンが検出される場合には、トリコスポロン発症につながる可能性を示唆している²³⁾。日本においては、2002年よりMCFGの使用が可能となり、トリコスポロン症のブレイクスルー感染症の報告が増加している^{9)-11), 15)}。Suzukiらは、1992年から2007年までの16年間にみられた血液癌患者におけるトリコスポロン症33例のうちの18例がMCFGのブレイクスルーであったと報告しており¹⁵⁾、MCFGの登場以降、トリコスポロン症の発症が増加していることがうかがえる。また、病理剖検例からみた疫学調査においても、トリコスポロン症は増加傾向にあると考えられている²⁴⁾。しかしながら、MCFG投与患者に占めるブレイクスルー感染症の発症頻度は非常に低く、発症症例の報告においても使用量や投与期間は様々で、MCFG使用量とトリコスポロン症の発症率あるいは検出率との関連性については明確にされていない。今回、我々の研究では、MCFGの使用本数とトリコスポロン属の検出症例数との間に、正の相関性を認めた。MCFG使用量の増加は、自然耐性であるトリコスポロン属に対して、発症以前の保菌状況にも影響を与えている可能性が示唆されたが、今後、より広い疫学調査によって検証される

べきと考える。

また、院内伝播の観点からは、尿培養でトリコスポロンが陽性であった患者において尿路カテーテルを抜去した直後の無菌室および廊下の空気中からトリコスポロンが検出され、RAPD解析により、同一パターンを示したとの報告¹⁴⁾があり、医療器具の取扱いが環境に与える影響も否めない。本研究では、RAPD解析を行った検体のうち、patient2から2度の検出(検体番号2、7)が認められたが、尿路感染症ではなかった。同一症例から2度の検出が認められたことが、尿以外の部位での保菌によるものか、新たな検出かは明確ではないが、同一期間に同一病棟のpatient5(検体番号5)からも同等性の高い菌株が検出されたことから、院内伝播の可能性も考えられた。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いる。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可能性があり、病院ごとに、病院全体の抗真菌薬の絶対的使用量を把握することは意義があると考えられる。

【文献】

- 1) Shimazu K, Ando M, Sakata T, Yoshida K, Araki S : Hypersensitivity pneumonitis induced by *Trichosporoncutaneum*. Am Rev Resp Dis 1984; 130: 407-411
- 2) Tashiro T, Nagai H, Kamberi P, Goto Y, Kikuchi H, Nasu M, Akizuki S : Disseminated *Trichosporonbeigelii* infection in patients with malignant diseases. Eur J ClinMicrobiol Infect 1994; 13: 218-224
- 3) Chagas-Neto TC, Chaves GM, Colombo AL : Update on the genus *Trichosporon*. Mycopathologia2008;166:121-132
- 4) 久米光、山崎俊和、安部美知子、ほか : 白血病 (MDS を含む) 剖検例における内臓

- 真菌症の疫学. 日本医真菌学会雑誌 2006; 47: 15-24
- 5) 山上由理子: 真菌症の診断, トリコスポロン・ムーコル症: 日本臨床微生物学雑誌 1998; 8: 136-41
 - 6) 時松一成、門田淳一: 新興深在性真菌症—トリコスポロン症の臨床—. 感染症学雑誌 2006; 80: 196-202
 - 7) 小林寅哲、鈴木真言、雑賀威、池田文昭、堀康宏、松本哲、他: 臨床分離 *Candida* 属および *Aspergillus* 属真菌の micafungin 感受性(第2報). 日化療会誌 2008; 56: 344-352
 - 8) Espinel-Ingroff A: In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20(4): 121-136
 - 9) Matsue K, Uryu H, Koseki M, Asada N, Takeuchi M: Breakthrough Trichosporonosis in Patients with Hematologic Malignancies Receiving Micafungin. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 753-7
 - 10) Akagi T, Yamaguti K, Kawamura T, Nakamura T, Kubo K, Takemori H: Breakthrough trichosporonosis in patients with acute myeloid leukemia receiving micafungin. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1182-1183
 - 11) Asada N, Uryu H, Koseki M, Takeuchi M: Successful treatment of breakthrough *Trichosporonasahii* fungemia with voriconazole in a patient with acute myeloid leukemia. *Clin Infect Dis* 2006; 43: e39-41
 - 12) Bayramoglu G, Sonmez M, Tosun I, Aydin K, Aydin F: Breakthrough *Trichosporonasahii* Fungemia in Neutropenic Patient with Acute Leukemia while Receiving Caspofungin. *Infection*. 2008; 36: 68-70
 - 13) Rieger C, Geiger S, Herold T, Nickenig C, Ostermann H: Breakthrough infection of *Trichosporonasahii* during posaconazole treatment in a patient with acute myeloid leukaemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 843-845
 - 14) Hosoki K, Iwamoto S, Kumamoto T, Azuma E, Komada Y: Early detection of breakthrough trichosporonosis by serum PCR in a cord blood transplant recipient being prophylactically treated with voriconazole. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30: 917-919
 - 15) Suzuki K, Nakase K, Kyo T, Kohara T, Sugawara Y, Shibasaki T, et al.: Fatal *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic malignancies. *Eur J Haematol* 2010; 84: 441-447
 - 16) 田代隆良、永井寛之、山崎透、後藤陽一郎、秋月真一郎、那須勝: 播種性トリコスポロン感染症の菌学的、免疫組織学的研究. *感染症誌* 1993; 67: 704-711
 - 17) Pini G, Faggi E, Donato R, Fanci R: Isolation of *Trichosporon* in a hematology ward. *Mycoses* 2005; 48: 45-49
 - 18) Wolf DG, Falk R, Hacham M, Theelen B, Boekhout T, Scorzetti G, et al.: Multidrug-Resistant *Trichosporonasahii* Infection of Nongranulocytopenic Patients in Three Intensive Care Units. *J Clin Microbiol.*

2001; 39: 4420-4425

- 19) 中村智次、坂井俊彦、福沢正男、羽山正義、発地雅夫：まれな深在性真菌症の病理 トリコスポロン症を中心に。真菌誌 1993; 34: 155-163
- 20) Krcmery V Jr, Mateička F, Kunová A, Špánik S, Gyarfáš J, Syčová Z, et al. : Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. Support Care Cancer 1999; 7:39-43
- 21) Girmenia C, Pagano L, Martino B, D' Antonio D, Fanci R, Specchia G, et al. : Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies : A retrospective multicenter study from Italy and review of literature. J Clin Microbiol. 2005; 43:1818-1828
- 22) Tashiro T, Nagai H, Kamberi P, Goto Y, Kikuchi H, Nasu M, et al. : Disseminated *Trichosporon beigelli* infection in patients with malignant diseases. Eur J Microbiol Infect 1994; 13: 218-224
- 23) Haupt HM, Merz WG, Beschorner WE, Vaughan WP, Saral R : Colonization and infection with *Trichosporon* species in the immunosuppressed host. J Infect Dis 1983; 147: 199-203
- 24) 久米光：深在性真菌感染症の現況と対策. Jpn J Antibiot 2009; 62: 545-550

E. 結論

トリコスポロン属の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。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える。

F. 健康危険情報

MCFGの偏重使用はトリコスポロン属のブレイクスルー感染症を引き起こす可能性がある。トリコスポロン属は医療関連感染を引き起こす可能性を有している。

G. 研究発表

論文発表

1. 三嶋廣繁、山岸由佳：(分担執筆) II. 第4章 術後感染における抗菌薬治療 3. 抗真菌薬～侵襲性カンジダ症を中心に～、竹末芳生編、外科・救急集中治療における感染症対策 今すぐ実践したい周術期管理と抗菌薬適正使用、医薬ジャーナル社、大阪、pp.355-372、2011.3.10.
2. 三嶋廣繁、山岸由佳：抗真菌薬 安全性、臨床と微生物 38: 111-115, 2011.
3. 三嶋廣繁、山岸由佳：抗真菌薬のPK/PD、SFI Forum 7; 17-25, 2011.
4. Hagihara M, Kasai H, Umemura T, Kato T, Hasegawa T, Mikamo H : Pharmacokinetic-pharmacodynamic study of itraconazole in patients with fungal infections in intensive care units. J Infect Chemother 17: 224-230, 2011
5. Hagihara M, Suwa M, Ito Y, Muramatsu Y, Kato Y, Yamagishi Y, Mikamo H. Preventing surgical-site infections after

r colorectal surgery. J Infect Chemother 2011 Sep 9 [Epub ahead of print]

学会発表

1. Takesue Y, Aikawa N, Oda S, Fujishima S, Mikamo H: Efficacy of intravenous itraconazole for the treatment of invasive candidiasis in surgical department and acute care medicine; a multi-center clinical study. P2113, 21th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 27th International Congress of Chemotherapy (ICC), Milano, Italy, 2011. 5. 10.
2. Mikamo H, Yamagishi Y. Pharmacokinetics-Pharmacodynamics (PK-PD) of Liposomal Amphotericin B (L-AMB) Efficacy in Non-Neutropenic Patients with Candidemia, A2-581, 51stInterscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago, USA, 2011. 9. 18.
3. 山岸由佳、三嶋廣繁: ケースカンファレンス 抗真菌薬～あなたなら何を選ぶ?～ Case 1、第9回キャンディン研究会、東京、2011. 3. 5.
4. 三嶋廣繁: 「真菌症: 欧米のガイドラインと我が国のガイドラインに比較、今後我が国のガイドラインのあるべき姿は?」 1. 日本のガイドラインからみた侵襲性カンジダ症の診断・治療を考える～今後必要とされるエビデンスとは?～、第81回日本感染症学会西日本地方

会学術集会シンポジウム、北九州市、2011. 10. 8.

5. 山岸由佳、三嶋廣繁: カンジダ血症に関する最近の臨床研究のシンポ～自験例を中心に～、第55回日本医真菌学会学術集会 基礎・臨床シンポジウム6「カンジダとカンジダ症」、2011. 10. 22.
6. 山岸由佳、三嶋廣繁: 真菌性腹膜炎から検出されたCandida属のバイオフィルム形成能に関する検討、真菌症フォーラム第12回学術集会、東京、2011. 2. 5.
7. 山田敦子, 澤村治樹, 加藤由紀子, 山岸由佳, 三嶋廣繁: 精神科閉鎖病棟で長期間メンテナンスされなかった空気清浄機が環境に与える影響に関する検討、第26回日本環境感染学会 1-0-32-3、横浜、2011. 2. 18.
8. 加藤 由紀子, 山田敦子, 山岸 由佳, 三嶋 廣繁: 病院内改修工事施工時に実施した感染対策の評価、第26回日本環境感染学会 2-0-54-3、横浜、2011. 2. 19.
9. 山岸由佳、三嶋廣繁: *Candida* 持続真菌血症に対して VRCZ を長期投与した症例から学んだこと、第55回日本医真菌学会 P-062, 02-1-7、東京、2011. 10. 22.

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

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

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

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。症例登録期間は終了し、全国39施設から計758件の症例登録があった。これまでにProven fungal disease 5例、Probable fungal disease 20例、Possible fungal disease 26例のIMIが発症した。現在追跡調査期間であり、今後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

症例登録期間は終了し、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った。

2. IMIの発症

これまでに Proven fungal disease 5 例、Probable fungal disease 20 例、Possible fungal disease 26 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 6 例 (*Aspergillus fumigatus* 2 株、

Aspergillus terreus 1 株、*Fusarium solani* 2 株、*Fusarium dimerum* 1 株) 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

解析するために十分な症例登録数が集まった。今後、追跡調査期間終了を待って、データの精度をさらに高め、IMI発症症例を中心に解析を進めていく予定である。

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. H. Yamamoto, D. Kato, N. Uchida, K. Ishiwata, H. Araoka, S. Takagi, N. Nakano, M. Tsuji, Y. Asano-Mori, N.

- Matsuno, K. Masuoka, K. Izutsu, A. Wake, A. Yoneyama, S. Makino and S. Taniguchi. Successful sustained engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with severe aplastic anemia. Blood 117: 3240-2, 2011
2. N. Uchida, A. Wake, N. Nakano, K. Ishiwata, S. Takagi, M. Tsuji, H. Yamamoto, D. Kato, N. Matsuno, K. Masuoka, H. Araoka, Y. Asano-Mori, K. Izutsu, S. Makino, A. Yoneyama and S. Taniguchi. Mycophenolate and tacrolimus for graft-versus-host disease prophylaxis for elderly after cord blood transplantation: a matched pair comparison with tacrolimus alone. Transplantation 92: 366-71, 2011
3. M. Kimura, H. Araoka, N. Uchida, H. Ohno, Y. Miyazaki, T. Fujii, A. Nishida, K. Izutsu, A. Wake, S. Taniguchi and A. Yoneyama. Cunninghamella bertholletiae pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation. Med Mycol Epub Date: 2011/11/23

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

厚生労働科学研究費補助金（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

分担研究報告書

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

分担研究者 渋谷和俊^[2] 東邦大学医学部病院病理学講座

研究協力者 篠崎 稔^[1] 若山 恵^[2]

[1]東邦大学医療センター大森病院病理部,

[2]東邦大学医学部病院病理学講座

研究要旨 これまでの検討で、Polymerase Chain Reaction (PCR)法と *in situ* hybridization (ISH)法を基幹とした遺伝子病理組織学的診断法は、真菌症剖検症例に対する後方視的発生動向調査、および確定診断に苦慮する深在性真菌症の病理診断においては有用な補助診断法であることが示唆されている。

本報告では、酵母血流感染症における病理診断において、形態学的に鑑別が求められるカンジダ属とトリコスポロン属を明確に鑑別する事を目的として、新たにトリコスポロン属を標的としたISH法のPeptide Nucleic Acid (PNA)プローブを設計し、その特異性を検証した。さらに検出感度の向上を目的として、Polymer 抗体にリンカー抗体を介在させる Intercalated antibody-enhanced polymer (i-AEP)法を使用した際の検出感度に関する検討を行った。さらに、従来行ってきた病理検体を用いた真菌症診断支援活動をシステム化し、遺伝子補助診断法を組み込むことで得られた結果について検証を行った。

トリコスポロン属を標的としたPNAプローブによるISH法は、病理診断材料中において、形態学的に鑑別が求められるカンジダ属とトリコスポロン属を高い精度で鑑別し得る可能性が示唆された。また、i-AEP法はISH法の感度の向上に寄与する検出法であることが検証された。真菌症診断支援活動については、糸状菌の鑑別、特に臨床の現場で診断・治療に難渋することの多いムーコル感染症を除外する目的での依頼が多いことが明確になった。

これまでに開発してきた病理組織標本に対するISH法による真菌症の補助診断法は、後方視的発生動向調査および今後進められる病理診断領域における真菌症診断支援ネットワークの構築に寄与すると考えられる（東邦大学医学部倫理委員会承認番号：20047）。

A. 研究目的

真菌症剖検症例に対する後方視的発生動向調査や確定診断に苦慮する深在性真菌症の病理診断において、Polymerase Chain Reaction (PCR)法と *in situ* hybridization (ISH)法を基幹とした遺伝子病理組織学的診断法は、有益な補助診断法となり得る可能性が示唆されてい

る。

実際、病理診断の現場においては、酵母血流感染症の病理診断におけるカンジダ属とトリコスポロン属の形態学的類似性が問題となる。そこで、トリコスポロン属を標的としたISH法におけるPeptide Nucleic Acid (PNA)プローブを新たに設計し、マウス感染モデル

と剖検症例を用いて本プローブの特異性を検証した。また、病理診断に常用されるホルマリン固定パラフィン包埋試料における ISH 法では、核酸の断片化やマスキングにより、十分な検出感度を得られないことも想定されることから、polymer 試薬にリンカー抗体を介在させる Intercalated antibody-enhanced polymer (i-AEP)法を用いた ISH 法の検出法を検討した。

さらに、臨床材料や切除組織の培養検査によって、真菌症の原因菌が必ずしも分離できない状況を背景として、菌の形態学的観察を基盤とする病理組織診断は、真菌症の診断分野において長くにわたり重要な位置を占めてきた。しかし、近年、新たな抗真菌剤が上梓され、多様化しつつある抗真菌薬を選択して有効な治療法に結びつけるために、菌種をより正確に判定することが求められている。この現況下で、真菌の遺伝子補助診断法の重要性は明らかに増してきている。

我々は、従来より病理検体を用いた真菌症診断支援活動を行ってきた。今回、これをシステム化し、さらに遺伝子補助診断法を組み込むことで、より精度の高い菌種の判定が期待できるようになった。この真菌症診断支援活動の依頼内容やその結果について検討した。

B. 研究方法

1. *Trichosporon asahii* 15、*T. asahii* 336 および、*Candida albicans* J2-15 (明治薬科大学、杉田先生より供与) を ICR マウス (8 週齢、体重 30-39g) (Charles River Laboratories Japan, Inc.) に尾静脈接種し、マウス感染モデルを作成した。さらに疫学観察研究が既に施行された剖検症例から、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を抽出した。これらの試料を用いて PNA プローブの特異性を検証した。

病理組織標本において、ISH 法によるトリコスポロン属の検出を目的として、26S rRNA 遺伝子領域からトリコスポロン属に保存性が高い領域を選定し、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 アンチセンス PNA プローブを新たに設計した (N-CGGACAATCGAAGAC)。同時に *C. albicans* の検出を目的として、これまでの検討でその特異性が確認されている *C. albicans* 26S rRNA を標的とした PNA プローブ (N-ACAGCAGAAGCCGTG) による ISH 法も同時に施行した。標本中の核酸の保存性は汎真菌 PNA プローブ (N-TGGCTATCGCGTGTTTCAT) による ISH 法を施行することで評価した。

2. ISH 法における検出感度に関して、i-AEP 法の応用性を検証した。この検討ではトリコスポロン症剖検組織に対して、トリコスポロン属 PNA プローブによる ISH 法を施行することで検証した。この際、これまでに至適化された条件である 1µg/ml の PNA プローブを連続希釈したプローブを使用して、通常使用している polymer 法と i-AEP 法のシグナル強度を比較した。この検討において、EnVision™ FLEX (DAKO) キット付属の試薬およびマウスリンカー (DAKO) を使用した。

3. 過去 2 年間において、当講座に依頼された真菌症の病理診断コンサルテーション例について、その概要と得られた結果について検討した。

この診断支援活動については、図 1 に示すシステムに従って行った。依頼は受付を経て、最初に病理組織学的検討を行い、目標菌種を決定後、遺伝子補助診断法を選択した。

真菌症病理診断支援の流れ(2012.1現在)

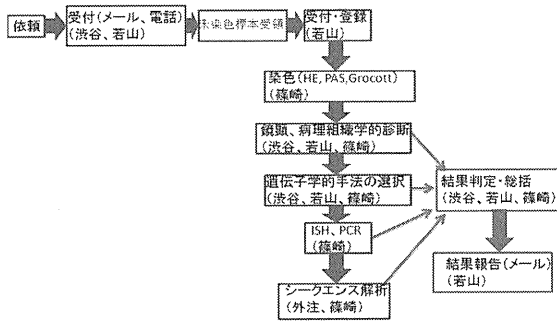


図1 真菌症病理診断コンサルテーションシステム

具体的な方法としては、病理組織学的検討には、HE染色、PAS反応、Grocott染色を行い、菌種の推定を行った。その後、遺伝子補助診断法として、ISH法、PCR法を適宜選択、施行した。ISH法、PCR法はいずれも当講座で構築した手法に準拠して行った。ISH法には、多数の真菌に共通の塩基配列を用いた primer である Panfungal、*C. albicans* に特異的な塩基配列を用いた primer、およびアスペルギルス属に特異的な塩基配列を用いた ALP、*Afut1* の各 primer を用いた。PCR法に関しては、Panfungal のほか、ムーコルをターゲットとした nested PCR、アスペルギルス属をターゲットとした nested PCR を随時行った。

本研究におけるヒト由来の既存試料に関する解析計画は、東邦大学医学部倫理委員会の承認を得て施行した(承認番号:20047(糸状菌発生動向多施設調査))。

C. 研究結果

1. *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(図2)。これらの試料に対して、新たに設計したトリコスポロン属を標的としたISH法を施行したところ、*T. asahii* 感染マウスにおける菌体内に強

いシグナルが検出される一方で、*C. albicans* の菌体内にはシグナルが確認されなかった(図2)。*C. albicans* を標的としたISH法においては、*C. albicans* の菌体内にのみシグナルが得られた。

Specificity of ISH for *trichosporon* spp. in infected animal models

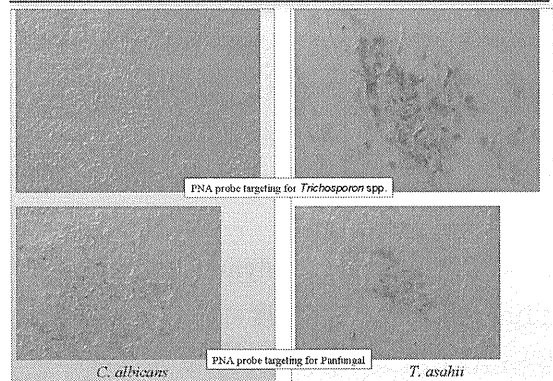


図2

播種性トリコスポロン症(図3)およびカンジダ症(図4)剖検症例に対して、トリコスポロン属および*C. albicans*を標的としたISH法を施行したところ、それぞれの菌体内に強いシグナルが観察された(図3、4)。

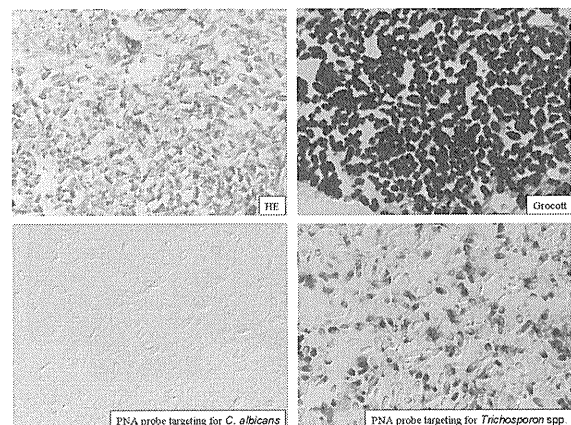


図3

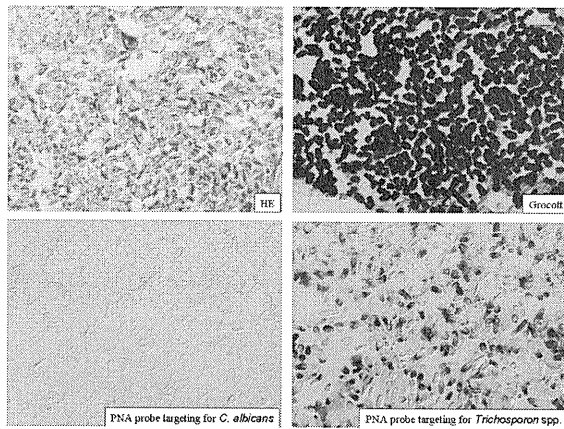


図 4

2. 通常使用しているpolymer法で至適化された1 μ g/mlのプロープ濃度において、polymer法とi-AEP法では有意なシグナル強度の差はみられなかった。polymer法では0.5 μ g/mlから0.25 μ g/mlにプロープ濃度が減少するにつれて、濃度依存性にシグナル強度の減弱が認められるのに対して、i-AEP法ではシグナルの減弱は認められなかった（図5）。

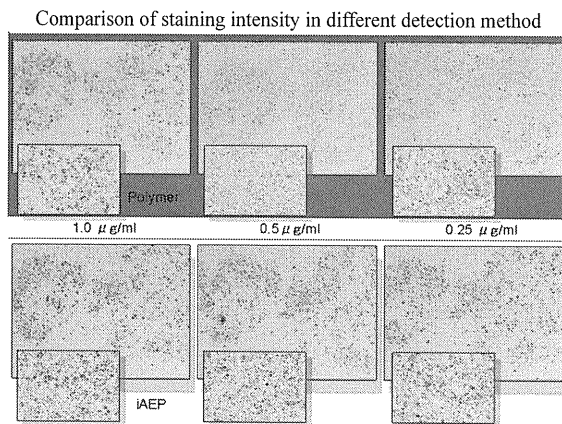


図 5

3. 2009年7月～2011年12月の、当講座における真菌症の病理診断コンサルテーション依頼件数は29件であった。

依頼経路としては、担当医から直接の依頼が21件、関連施設を経由した由来が8件であった。

提供された試料の種類は、遺伝子補助診断を行うに適切な未染色標本が提供されたものが23件、病理組織検査用のパラフィンブロッ

クの提供が1件であり、他、染色済み組織標本のみの提供が3件、1枚～数枚の病理組織写真のみが提供されたものが2件であった。

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。PCR法のみを行った8件中、3件ではシーケンス解析も施行した。

判定された菌種については、*Aspergillus*属7件、*Mucor*6件、*Candida*属4件、*Histoplasma*4件、*Cryptococcus*2件であり、うち1件は*Candida*と*Cryptococcus*の混合感染例であった。この他、病理組織標本の観察では糸状菌が推測されたが遺伝子補助診断法で確定できなかった症例が1件、病理組織写真1枚のみの提供であったため糸状菌が推測されたが菌種は判定困難であった症例が1件あった。

D. 考察

酵母血流感染症の病理診断におけるトリコスポロン属とカンジダ属の形態学的な判断の困難さは、昨年度までに施行した疫学観察研究において、明らかになった真菌症の病理診断における問題点のひとつである。この点を勘案し、トリコスポロン属を標的としたISH法におけるPNAプローブを新たに設計し、その特異性を検証した。本検討からこのプローブの特異性が検証され、これまで使用してきた*C. albicans*を標的としたPNAプローブと併用することで、この両者を高い精度で鑑別し得る可能性が示唆された。さらに、従来から使用しているpolymer試薬にリンカー抗体を介在させるi-AEP法は、従来法と比較して高い感度を示したことから、標的核酸の保存性が懸念されるホルマリン固定パラフィン包埋試料を用いたISH法において、有効な検出

法となり得る可能性が示唆された。

また、真菌症病理診断支援システムの解析結果から、侵襲性糸状菌症の原因菌の中でも臨床の現場で診断・治療に難渋することの多い *Mucor* を、*Aspergillus* 属等の糸状菌から除外できることを期待しての依頼が多いことが明確になった。また、より頻度は低いものの、*Candida*、*Cryptococcus*、*Histoplasma* をはじめとする酵母状真菌も、鑑別が問題となる例があることが判明した。

また、精度の高い菌種判定を行うためには、遺伝子補助診断法を施行するのに十分な未染色標本の提供が必須であり、また、未染色標本の提供があった場合にも、特に組織内の菌数が微量である場合、不十分な標本量では菌種の判定に至らない場合もあった。

これらのことから、今後もこの真菌症診断支援活動を継続・整備していくことが、深在性真菌症の原因真菌の決定において重要な位置を占めると考えられた。

E. 結論

新たに設計したトリコスポロン属を標的とした ISH 法における PNA プローブの特異性が検証された。これまでに構築してきた病理組織標本に対する ISH 法、PCR 法を用いた真菌症の補助診断法は、後方視的発生動向調査および今後進められる病理診断領域における真菌症診断支援ネットワークの構築に寄与すると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. Shimodaira K, Okubo Y, Nakayama H, Shinozaki M, Sasai D, Takahashi K,

Saji T, Shibuya K: Trends in incidence of invasive fungal infections emerged from analysis of annual records of autopsy cases of Toho University. *Mycoses*, in press

2. Nagayoshi M, Tada Y, West J, Ochiai E, Watanabe A, Toyotome T, Tanabe N, Takiguchi Y, Shigeta A, Yasuda T, Shibuya K, Kamei K, Tatsumi K. Inhalation of *Stachybotrys chartarum* Evokes Pulmonary Arterial Remodeling in Mice, Attenuated by Rho-Kinase Inhibitor. *Mycopathologia.* , 172(1), 5-15, 2011
3. Takahashi H, Yokoyama Y, Terajima F, Hasegawa K, Suguro T, Shibuya K, Wada A. Isolated neck extensor myopathy causing a dropped head: a case report. *Journal of Orthopaedic Surgery.* 19(1), 104-107, 2011
4. Okubo Y, Shibuya K, Namiki A, Takamura K, Kameda N, Nemoto T, Mitsuda A, Wakayama W, Shinozaki M, Hiruta N, Kitahara K, Ishiwatari T, and Yamazaki J. Leiomyosarcoma with partial rhabdomyoblastic differentiation: First case report of primary cardiac origin. *BMC Cancer*, 11: 76 (online journal), 2011
5. Wakui N, Iida K, Kanayama M, Nagai H, Watanabe M, Ishii K, Kudo T, Kaneko H, Shibuya K, Sumino Y. Splenic artery aneurysm that gradually increased in size over 4 years until threatening rupture. *J Med Ultrasonics* 38, 167-171, 2011
6. Shimamura T, Kubota N, Nagasaka S, Suzuki T, Mukai H, Shibuya K. Establishment of a Novel Model of

- Onychomycosis in Rabbits for Evaluation of Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(7), 3150-3155, 2011
7. Isobe K, Nagata R, Ota H, Sugino K, Shibuya K, Homma S. A case of small-cell lung cancer associated with paraneoplastic limbic encephalitis during Chemotherapy. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, 49(8), 602-606, 2011
 8. Shiozawa K, Watanabe M, Igarashi Y, Ichimori M, Hirano N, Nakano S, Maeda T, Yamazaki K, Okubo Y, Nemoto T, Shibuya K, Sumino Y. Gastrointestinal Stromal Tumor Mimicking Arteriovenous Malformation of the Jejunum. *Case Rep Gastroenterol*, 5, 558-64, 2011
 9. 笹井大督, 石渡誉朗, 大久保陽一郎, 井手忠, 根本哲生, 若山恵, 渋谷和俊: 環境由来カビによる感染症の診断. *かびと生活* 4: 113-9, 2011
 10. 根本哲生, 若山 恵, 酒井 謙, 渋谷和俊. 特集 透析医療に必要な薬の使い方真菌症. *腎と透析*, 70(4):593-596, 2011
 11. 高橋賢司, 松江陽一, 福田雄介, 長嶋 克, 森山 梓, 青木千津, 間崎和夫, 竹下直樹, 前村俊満, 片桐由起子, 田中政信, 森田峰人, 根本哲生, 渋谷和俊. 胎児機能不全を呈した臍帯血管断裂の1例. *日本産科婦人科学会東京地方部会誌*, 60(1):174-178, 2011
 12. 後町杏子, 坂本 晋, 笹本修一, 渋谷和俊, 高木啓吾, 本間 栄. 3D-CTにより診断し、異常血管のみの切除にて治癒した肺底動脈大動脈起始症の1例. *日本呼吸器学会雑誌*, 49(3), 221-225, 2011
 13. 石黒 卓, 高柳 昇, 齋藤明美, 秋山一男, 若山 恵, 渋谷和俊, 清水禎彦, 杉田裕, 亀井克彦. スエヒロタケとアスペルギルスによるアレルギー性気管支肺真菌症の1例. *日本呼吸器学会雑誌*, 49(8), 612-618, 2011
 14. 磯部和順, 永田莉那, 太田宏樹, 杉野圭史, 渋谷和俊, 本間 栄. 化学療法中に傍腫瘍性辺縁系脳炎を合併した肺小細胞癌の1例. *日本呼吸器学会雑誌*, 49(8), 602-606, 2011
- 図書発表
1. Okubo Y, Shinozaki M, Wakayama M, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Nemoto T, Shibuya K. *Applied Gene Histopathology: Identification of Fusarium species in tissue sections by In situ hybridization* Editors: Louise O'Connor and Barry Glynn. *Fungal Diagnostics: Methods and Protocols*. Humana Press New York (in press)
- 学会発表
- 国際学会
1. Wakayama M, Okubo Y, Shinozuka M, Tochigi N, Ono H, Miyazaki Y, Nakatani Y, Kamei K, Murayama S, Nemoto T, Shibuya K. HISTOPATHOLOGICAL DIAGNOSIS OF HUMAN HISTOPLASMOSIS USING *IN SITU* HYBRIDIZATION TECHNIQUE. International Union of Microbiological Societies Congress, 9/6-10, 2011 Sapporo, Japan
 2. Kaneko T, Shibuya K. A PATIENT CYSTIC GRANULOMA TRICHOPHYTICUM WHO REQUIRED SURGICAL RESECTION. International Union of Microbiological Societies Congress, 9/6-10, 2011 Sapporo, Japan

3. Kamei K, Watanabe A, Kakeya H, Miyazaki Y, Shibuya K. EPIDEMIOLOGIC STUDY ON ZYGOMYCOSIS IN JAPAN BASED ON QUESTIONNAIRE TO MEDICAL FACILITIES. International Union of Microbiological Societies Congress, 9/6-10, 2011 Sapporo, Japan
4. Shibuya K, Wakayama M, Shinozuka M. WHAT'S HAPPENED BEHIND CT? International Union of Microbiological Societies Congress, 9/6-10, 2011 Sapporo, Japan
5. Shibuya K: Dynamic Pathophysiology of Onychomycosis. 2011 Medical Mycology Workshop-Recent Advances on Dermatmycoses, 8/13-14, 2011 Guanzhou, China
4. 守屋敦子, 安藤常浩, 熊坂利夫, 武村民子, 渋谷和俊. 急速に進展し予後不良となった慢性肺アスペルギルス症 3 例の検討. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 10/21-22, 2011
5. 笹井大督, 杉田 隆, 大久保陽一郎, 石渡誉郎, 島村 剛, 篠崎 稔, 若山 恵, 渋谷和俊. アゾール耐性トリコスポロンに対する in vivo での L-AMB の有効性検討. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 10/21-22, 2011
6. 大久保陽一郎, 篠崎 稔, 中山晴雄, 若山恵, 笹井大督, 石渡誉郎, 渋谷和俊. *Cryptococcus gattii* 感染症における病態解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 10/21-22, 2011
7. 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 杉田 隆, 島山修司, 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, 東京, 10/21-22, 2011

国内学会

1. 中山晴雄, 篠崎 稔, 職 珠玉, 大久保陽一郎, 笹井大督, 若山 恵, 根本哲生, 村山そう明, 岩渕 聡, 渋谷和俊. パラフィン包埋組織を用いた ISH 法および PCR 法による分子生物学的診断法の現状. 第 24 回日本外科感染症学会総会, 三重, 2011
2. 下平佳代子, 若山 恵, 大久保陽一郎, 中山晴雄, 篠崎 稔, 笹井大督, 石渡誉郎, 高橋 啓, 石井寿晴, 渋谷和俊. 東邦大学病理剖検例における深在性真菌症の過去 52 年間の発生動向について. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 10/21-22, 2011
3. 安藤常浩, 守屋敦子, 熊坂利夫, 武村民子, 渋谷和俊. 慢性アスペルギルス症の病理組織学的解析とバイオフィルム形成についての一考察. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 10/21-22, 2011
8. 中山晴雄, 篠崎 稔, 大久保陽一郎, 笹井大督, 職 珠玉, 若山 恵, 井手 忠, 根本哲生, 村山琮明, 渋谷和俊. ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた病原酵母の遺伝子学的補助診断法の開発. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 10/21-22, 2011
9. 鈴木 琢, 久保田信雄, 島村 剛, 渋谷和俊. 爪白癬動物モデルを用いた肉眼的所見と病理組織所見との相関における検討. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 10/21-22, 2011
10. 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. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 10/21-22, 2011

11. 篠崎 稔, 中山晴雄, 大久保陽一郎, 笹井大督, 若山 恵, 村山琮明, 根本哲生, 渋谷和俊. FFPE 試料を用いた遺伝子補助診断法の開発と評価. 第 55 回日本医真菌学会学術集会, 東京, 10/21-22, 2011
 12. 白坂健太郎, 船橋公彦, 小池淳一, 栗原聰元, 塩川洋之, 松田 聡, 鈴木孝之, 島田英昭, 若山 恵, 渋谷和俊, 金子弘真. FAP にて腹腔鏡下全結腸切除術術後に腹膜炎を契機に発見されたデズモイド腫瘍の 1 例. 第 36 回日本外科系連合学会学術集会, 千葉, 6/16-17, 2011
 13. 大久保陽一郎, 北原加奈子, 笹井大督, 平野孝幸, 長谷川千花子, 密田亜希, 羽鳥努, 若山 恵, 横瀬智之, 根本哲生, 渋谷和俊. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 4/28-30, 2011
 14. 石川由紀雄, 赤坂喜清, 鈴木高祐, 藤原美恵子, 井 清, 新野 史, 田中道雄, 森永正二郎, 小沼純子, 下川伶子, 緒方謙太郎, 川原 穰, 杉浦 仁, 品川俊人, 滝本寿朗, 飯田(柳田)真岐, 渋谷和俊, 高橋 啓, 宇月美和, 深澤(秋嶋)由里, 石井壽晴. 心筋梗塞発生の基盤となる心筋架橋が左冠状動脈前下行枝の内膜病変進展に及ぼす意義. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 4/28-30, 2011
 15. 若山 恵, 篠崎 稔, 渋谷和俊. 病理検体を用いた遺伝子診断と後方視的発生病態. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 4/28-30, 2011
 16. 安藤常浩, 渋谷和俊. 画像から考える病態. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 4/28-30, 2011
 17. 宮崎義継, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 渋谷和俊, 大野秀明. 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, 横浜, 4/28-30, 2011
 18. 奥平雅彦, 渋谷和俊. 真菌と真菌症と病理. 第 100 回日本病理学会総会ランチョンセミナー19, 横浜, 4/30, 2011
 19. 高橋りえ, 篠崎 稔, 佐々木久美子, 大久保陽一郎, 密田亜季, 羽鳥 努, 若山 恵, 根本哲生, 渋谷和俊, 山辺史人. 膀胱原発小細胞癌の 1 例. 第 52 回日本臨床細胞学会, 福岡, 5/20-22, 2011
 20. 重田文子, 多田裕司, 笠原靖紀, 渋谷和俊, James West, 巽浩一郎. CD40 刺激は気腫肺形成に関与している. 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 4/22-23, 2011
 21. 杉野圭史, 秦 美暢, 石田文昭, 磯部和順, 渋谷和俊, 植草利公, 本間 栄. 肺癌を合併した気腫合併肺線維症の画像病理学的検討. 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 4/22-23, 2011
 22. 磯部和順, 秦 美暢, 坂口真之, 佐野 剛, 杉野圭史, 坂本 晋, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 高木啓吾, 本間 栄. IPF 合併肺癌における IP 領域の SUV 値上昇機序の検討. 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 4/22-23, 2011
 23. 渋谷和俊. 深在性真菌症における病理診断の現状と課題. 第 28 回日本医学会総会, 横浜, 4/8, 2011
 24. 奥平雅彦, 渋谷和俊. 真菌と真菌症と病理. 第 100 回日本病理学会総会. 横浜, 2011 年
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 特許取得
特記事項なし
- 実用新案登録
特記事項なし
- その他
特記事項なし

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

研究分担者 榎村 浩一 帝京大学医真菌研究センター

研究協力者 佐藤 一郎 帝京大学医真菌研究センター

研究要旨 様々な検体からの遺伝子診断法のシステム化を目的とした研究として、今日コンタクティング・スポーツ選手を中心として国民的流行をきたしている「*T. tonsurans*特異的LAMP系を用いた本菌感染症診断同定系の開発」を行った。また、遺伝子診断並びに治療法の開発上必要となる「白癬菌における染色体遺伝子破壊系の開発」を行った。レファレンス的研究としては、「輸入真菌症起因真菌のキャリアとなりうる国内飼育希少保護動物における菌叢の解析」により、保護動物における*Cryptococcus neoformans*および*Cryptococcus gattii*保有の状況を明らかにすると共に、当該動物より担子菌の新種真菌を見出し、これを記載した。また、「カテーテル関連真菌血症起因株となった脂質好性担子菌酵母*Malassezia furfur*の分子生物学的・表現形質的解析」を行い、真菌血症起因株と皮膚常在株との相違を明らかにした。

A. 研究目的

1. *T. tonsurans*特異的LAMP系を用いた本菌感染症診断同定系の開発：

柔道・レスリングをはじめとしたコンタクティング・スポーツ選手を中心として、*Trichophyton tonsurans* 感染症は国民的流行の様相を呈している。本菌は一般に臨床症状が少ないために受診の機会を逃しやすい上、一度高齢者、小児等に感染した場合は、重篤なケルスス禿瘡へと進展することが知られている。しかし、本菌の同定および、本症の診断が可能な皮膚科医は限られており、結果的に適切な診断・治療さえも危ぶまれる現状にある。

そこで様々な検体からの遺伝子診断法のシステム化を目的とした研究として、

*T. tonsurans*特異的LAMP系を用いた迅速遺伝子検査法の研究・開発を試みた。

2. 白癬菌における染色体遺伝子破壊系の開発：遺伝子診断並びに治療法の開発上、起因菌のゲノム解析は必須であり、そのための分子生物学的手法として遺伝子組換え、遺伝子破壊系の確立は不可欠である。しかしながら、同じ真菌の中でもゲノム遺伝子形質転換が比較的容易な酵母やアスペルギルス属と異なり、白癬菌の形質転換効率は低いことが知られていた。そこで、より容易かつ効率的に形質転換・遺伝子破壊が可能となる実験系の開発を行った。

3. 輸入真菌症起因真菌のキャリアとなりうる国内飼育希少保護動物における菌叢の解析：分担者らは輸入真菌症起因菌の国内リザーバとなりうる輸入国内希少保護動物について、継続的な

検査を行ってきた。その長期的トレンドを明らかにすると共に、潜在的病原菌の探索を行う目的で1施設に注目して、長期的な観察データを纏め、またその過程で新規真菌種（新種）の探索も行った。

4. カテーテル関連真菌血症起因株となった脂質好性担子菌酵母 *Malassezia furfur* の分子生物学的・表現形質的解析：脂質好性担子菌酵母 *Malassezia* 属は、ヒト皮膚常在菌であると共に本菌に関連する様々な皮膚疾患の起因菌として広く知られている。概ね1990年頃から中心静脈栄養時の脂質添加輸液使用に伴って、本菌による真菌血症が報告され始めた。しかし、本菌は通常検査室で使用される培地では発育しないことから、一般には認識されず、適切な診断治療も、また必要な基礎的研究も遅れていた。そこで、本研究では、深在性真菌血症起因菌となりうる本菌の性状を明らかにする目的で、皮膚検体由来の菌株と、カテーテル関連真菌血症の由来の菌株について、各々分子生物学および表現形質的解析を行った。

B. 研究方法

1. *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' CCTGGTTCGTTCTCAGGTACCCAGCACCAATTTGGTTACCT 3'、B3 5' TGCATGAATGCTCACCAGAA 3'、FIP 5' ATTGGCCGGTTTGGAGATGGACGCGAGCTTCGAGCATCAG 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。

2. 白癬菌における染色体遺伝子破壊系の開発：白癬菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) の特定の遺伝子破壊株を効率よく得るために

は、菌の持つ非相同末端結合機構

(non-homologous end-joining pathway, NHEJ pathway) による修復機能を抑えることが望ましい。菌糸形真菌では NHEJ pathway の最終段階にある DNA ligase IV を不活化するとことによって形質転換に必要な homologous recombination (HR) の頻度を上げることができるものと考えられていることから、白癬菌における ligase IV ホモログを見出し、その破壊を試みた。

3. 輸入真菌血症起因真菌のキャリアとなりうる国内飼育希少保護動物における菌叢の解析：国内において希少保護動物を飼育している1園館との共同研究として、コアラ鼻腔内および環境中の *C. neoformans* と *C. gattii* を始めとした担子菌酵母を検索した。

4. カテーテル関連真菌血症起因株となった脂質好性担子菌酵母 *Malassezia furfur* の分子生物学的・表現形質的解析：国内医療施設においてカテーテル関連真菌血症として分離培養された本属菌株、並びに皮膚分離株を収集し、ITS1 rDNA 塩基配列 (Makimura 他, J Med Microbiol 49: 29-35, 2000.) および、各種表現形質を解析した。

C. 研究結果

1. *T. tonsurans* 特異的 LAMP 系を用いた本菌感染症診断同定系の開発：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図1に示す。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。

2. 白癬菌における染色体遺伝子破壊系の開発：白癬菌における ligase IV の homolog である *TmLIG4* 破壊株を作成した (図2)。*TmLIG4* を破壊した白癬菌のミュータント株の表現型は野生株と変わらない。成長率、孢子形成および DNA 阻害物質に対する感受性についても親株と変わらなかった。4点の異なる

箇所を破壊した *TmLIG4*破壊株では野生株が0~40%の割合で相同組み替えを起こすのに対し93%の頻度への向上が期待できることがわかった(表1)。

3. 輸入真菌症起因真菌のキャリアとなりうる国内飼育希少保護動物における菌叢の解析: 表2に示す通り、動物鼻腔内には個体によって、*C. neoformans* または *C. gattii* が維持されていた。また、この過程で解析した担子菌酵母に新種が含まれていることが明らかになった。本菌は *Cryptococcus yokohamensis* と命名された(図3)。

4. カテーテル関連真菌血症起因株となった脂質好性担子菌酵母 *Malassezia furfur* の分子生物学的・表現形質的解析: 遺伝子型の解析によって、カテーテルチップ由来または血液培養由来菌株は ITS1 type I-3 に帰属するのに対して、皮膚由来菌株は I-1, 4 に帰属することが明らかとなった(表3)。また、表現形質からは、特に血液培養分離菌は特徴的に自己凝集を示さないことが示された(表4)。

D. 考察

1. *T. tonsurans* 特異的 LAMP 系を用いた本菌感染症診断同定系の開発: プライマーセット A I は、*T. tonsurans* および *T. equinum* ゲノムの何れも同等に増幅したが、これは両者が極めて近縁であり、塩基配列レベルで識別することが困難であることに起因するものである。また、後者はヒト感染の起因菌ではないことから考えても、両菌の増幅が交叉することは、本システムの実用性には影響しないものと考えられる。今後より菌株を増すこと、より感度特異度の高いプライマーセットを検討することが必要となろう。

2. 白癬菌における染色体遺伝子破壊系の開発: 本研究によって、初めて白癬菌の形質転換・遺伝子破壊系が実用化のレベルに到達したのと考えられ、今後の研究推進に拍車がか

かかるとを期待したい。

3. 輸入真菌症起因真菌のキャリアとなりうる国内飼育希少保護動物における菌叢の解析: 人獣共通感染症起因菌となる *C. neoformans* または *C. gattii* が動物鼻腔において長期的に維持されていること、ならびに潜在的に病原菌となりうる新規酵母が今後も見出される可能性が示された。

4. カテーテル関連真菌血症起因株となった脂質好性担子菌酵母 *Malassezia furfur* の分子生物学的・表現形質的解析: 真菌血症起因菌となる株と皮膚常在菌を構成する株とでは、分子生物学的に異なる集団であることが示唆された。また、特にカテーテルチップ由来株と異なっており、血液培養由来菌株は自己凝集を示さないことから、流血中において生育しやすい特殊な菌株となっている可能性が示唆された。今後解析を進めたい。

E. 結論

1. *T. tonsurans* 特異的 LAMP 系を用いた本菌感染症診断同定系の開発: 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。

2. 白癬菌における染色体遺伝子破壊系の開発: *TmLIG4*破壊株を用いることで、標的とする遺伝子破壊を非常に効率よく行うことが可能となった。本研究成果は、論文発表15として報告される。

3. 輸入真菌症起因真菌のキャリアとなりうる国内飼育希少保護動物における菌叢の解析: 動物においてもヒト同様にクリプトコックス症起因菌が維持されていることが明らかになった。また、新規微生物探索の必要性も示された。本研究成果は、論文発表6および12として報告される。

4. カテーテル関連真菌血症起因株となった脂質好性担子菌酵母 *Malassezia furfur* の分子生物学的・表現形質的解析: 従来皮膚疾患の起因

菌としてのみ認識された本菌の中でも、真菌血症を生じやすい菌株が存在することが、遺伝子的にも表現形質的にも明らかとなった。本研究成果は論文発表13として報告される。

これらを踏まえて来年度は以下の課題を予定している。

(1)本年度に開発した *T. tonsurans* 特異的 LAMP 法を診断法として開発し、臨床的有用性を評価する。

(2)臨床的重要性が高い真菌症について、遺伝子診断法/起原菌同定法の開発を続ける。

(3)同定・型別が困難な真菌症起原菌についての遺伝子解析を共同研究として受け入れ、我が国の病原真菌叢データを蓄積する。

(4)真菌関連呼吸器疾患等、顧みられなかった真菌関連健康障害 (Neglected Fungal Health Disorders; NFHD) についての知見を集積する。

これらの成果、行政政策上以下の効果が期待できる。

(1)地方衛生研究所等においても実施可能な、*T. tonsurans* 感染症診断キットが提供される。

(2)真菌症対策上必要な、我が国における病原真菌叢についてデータが蓄積される。

(3)生命の危機こそ無いが、生活の質を低下させる NFHD 関連疾患・真菌を明らかにし、対策を可能とすることによって国民福祉に貢献できる。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K: The Influence of *Schizophyllum commune* on Asthma Severity. Lung, Dec; 189(6):485-92, 2011.

2) Chie Okazaki, Chihiro Wakusawa, Rika Chikama, Kazuhiro Murakami, Hideaki Hitomi, Kazuo Satoh, Koichi Makimura, Masataro Hiruma: A case of cutaneous protothecosis in a polyarteritis nodosa patient and review of cases reported in Japan. Dermatology Online Journal, Sep 15;17(9):2, 2011.

3) Satoh K, Nishiyama Y, Yamazaki T, Sugita T, Tsukii Y, Takatori K, Benno Y, Makimura K: Microbe-I: fungal biota analyses of the Japanese experimental module KIBO of the International Space Station before launch and after being in orbit for about 460 days. Microbiol Immunol, Dec; 55(12):823-829, 2011.

4) Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K, Satoh K: Sensitization to *Bjerkandera adusta* Enhances Severity of Cough Symptom in Patients with Fungus-Associated Chronic Cough (FACC). Med Mycol J, 52(3):205-12, 2011.

5) Haruhiko Ogawa, Masaki Fujimura, Yasuo Takeuchi, Koichi Makimura: Two cases of *Schizophyllum* asthma: Is this a new clinical entity or a precursor of ABPM? Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, 24:559-562, 2011

6) Alshahni MM, Makimura K, Satoh K, Nishiyama Y, Kido N, Sawada T: *Cryptococcus yokohamensis* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from trees and Queensland koala kept in a Japanese zoological park. Int J Syst Evol Microbiol, Dec;61(Pt 12):3068-71, 2011.

7) Zhang E, Sugita T, Tsuboi R, Yamazaki T, Makimura K: The opportunistic yeast pathogen *Trichosporon asahii* colonizes the skin of healthy individuals: analysis of