

201225008A

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24年度 総括・分担研究報告書

平成25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24年度 総括・分担研究報告書

平成25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 24 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
榎 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	准 教 授
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 24 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. レファレンスラボネットワークと深在性真菌症診断	7
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	15
分担研究者：三嶋 廣繁（愛知医科大学大学院医学研究科 臨床感染症学）	
3. 病状と病原性に関する研究	22
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. 酵母血流感染症における遺伝子補助診断法の新たな展開と 病理診断支援活動の実際	24
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（順天堂大学医学部附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 皮膚科学講座）	
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	57
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	64
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	71
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	75
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、本研究で構築過程のネットワークを通じて各領域で調査研究を実施した。深在性真菌症、皮膚真菌症、外科真菌症に関して現行の組織で把握可能な真菌症疫学や診断法・治療法の現状を調査した。また、新規診断方法の構築と検証を行い、免疫学的側面から高病原性真菌の潜伏感染病態解明に関する知見を得た。

A. 研究目的

我が国にも真菌症診断治療に関する診断・治療ガイドラインが存在するが、我が国独自の医療事情や新しいエビデンスに基づく診療の普及のためには、診療や疫学情報のネットワーク構築や逐次更新された治療法等に関する情報発信が必要となる。現在、真菌症の確定診断のための真菌学的検査、遺伝子検査、病理組織学検査ができる検査室や研究機関は限定されているため、国内の真菌症に関する発生動向を把握し真菌症の診療支援や診断治療法の情報を共有するためのネットワーク構築を行いうことを、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に対する研究を実施するが、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連携することにより真菌症に対する診療とラボネットワーク構築を行いながら下記の成果を得た。

1. 深在性真菌症.

1) 造血幹細胞移植症例を前向きコホート登録し、39施設から登録された計744例の解析を行った。

2) 渡航者真菌症（輸入真菌症）の疫学に関して、感染症法に基づく届け出事例、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。これに医学中央雑誌、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。

3) 診断ネットワーク. 真菌症の病理診断コンサルテーション例について、HE染色、PAS反応、Grocott染色を行い菌種を推定、その後、遺伝

子補助診断法として、ISH法、PCR法を適宜選択、施行し全体の概要と得られた結果について検討した。

2. 皮膚科領域.

1) 若年運動選手における *Trichophyton tonsurans* 感染症の疫学研究. 対象は、2012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) 1382 人、および、石川県下の中学校柔道部員 178 名とした。各大学において、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し、マイコセル寒天培地(平板) 25°Cで 14 日間培養後判定した。各選手の年齢、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疹の有無、治療内容等を調査した。中学生群では真菌感染症が疑われる部位からストリッピングを行い(テープ法) 検体を採取した。

2) *Trichophyton tonsurans* 感染症の診断治療法の研究. ①治療プロトコルの検証. ガイドラインに沿った治療による除菌率により検証した。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.

医育機関名簿 2011-2012 (ヨドプロダクト編. 医育機関名簿 2011-'12、一戸裕子発行、羊土社、東京、2011年12月1日) より外科系診療科を抽出した 635 施設に真菌性腹膜炎の診断治療に関するアンケート調査を実施した。

4. 検査法・診断法.

1) 病理組織標本からの確定診断法.真菌症剖検症例から、組織学的に酵母形態の真菌が確認されている11症例を抽出し、*C. albicans*のPNAプローブ(N-ACA GCA GAA GCC GTG)によるISH法を検証、染色結果をスコア化を試みた。

2) ヒストプラスマの診断法. *H. capsulatum*の主要な抗原として既に知られているAgHおよびAgM-F3、さらに亀井らがこれまでに同定してきたHc1およびHc6を抗原とするELISAを作成し有効性を検証した。また、*H. capsulatum*のHc1遺伝子を標的としてリアルタイムPCRによる検出系の構築を試みた。

3) *T. tonsurans*分離株の薬剤感受性試験株を1/10サブロー寒天培地に接種し30°C、7日培養したものを被検菌とした。発育した菌を滅菌生理食塩水に懸濁した後、滅菌ガーゼにてろ過を行い、マクファーランドNo. 1に調整し分生子懸濁液とした。この懸濁液を10倍希釈した後、感受性測定用培地100μLづつを分注したプレートに接種針を使用して接種を行なった。菌を接種したプレートは30°C、7日培養した後判定を行なった。判定はアモロルフィン、テルビナフィン、ブテナフィン、ケトコナゾール、イトラコナゾール、ビフォナゾールについてはコントロールの80%以上阻止したものを発育陰性としMIC値を測定した。また、ミカファンギンについては発育状況に始めて変化のみられたウェルをMEC値として測定した。

4) アスペルギルス属. *Aspergillus fumigatus*の分泌蛋白質の網羅的同定に基づくB11に関してサンドイッチELISA系構築に関し、今年度は感度を上げるために条件検討を行い、培養上清、マウス感染モデルでの有効性の検討を行った。Y1のELISAプロトタイプについては、血清使用の至適条件検討のため各種バッファーを用いてバックグラウンドの軽減を試みた。

5) 接合菌. *Rhizopus oryzae*の膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定して、抗原蛋白(

候補A抗原)を候補として選別し候補A抗原を検出するELISAキットを作成し、細胞内局在やマウスモデルでの検出を試みた。

5. 真菌症の病態解明.

C. neoformans 莢膜欠損株である Cap67、及び、その親株である B3501、臨床分離株である YC-11、YC-13 を使用し、免疫系細胞は C57BL/6 マウス♂7~8 週齢から採取し、内因性再増悪モデルの構築や、莢膜の免疫系への影響とクリプトコック由来オリゴ DNA の感染防御効果等について検討した。

C. 研究結果

1. 深在性真菌症

1) 移植患者の真菌症. ①Proven fungal disease 7 例、Probable 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 fumigates* 2 株、*Aspergillus terreus* 1 株、*Fusarium solani* 2 株、*Fusarium dimerum* 1 株) あった。② IMI の 12 ヶ月累積発症率. IMI の 12 ヶ月累積発症率は 5.3% であった。移植ソース別の発症率は、骨髄移植 5.4%、臍帯血移植 9.1%、末梢血幹細胞移植 2.2% であった。

2) 渡航者真菌症については、2012 年は計例が確認され、総症例数は 66 例となった。コクシジオイデス症 2 例、ヒストプラズマ 1 例、マルネツフェイ型ペニシリウム症 1 例、パラコクシジオイデス症などその他は報告がなかった。

3) 診断ネットワーク. 病理コンサルト12件により判定された菌種については、*Aspergillus* 属 2 件、*Mucor* 3 件、*Scedosporium* 1 件、*Fusarium* 1 件、*Candida* 属 1 件であった。この他、病理組織標本の観察では糸状菌と思われたが遺伝子補助診断法で菌種が確定できなかった症例が 3 件、二形性酵母が推測されたが菌種

が確定できなかった症例が 2 件あった。

2. 皮膚真菌症

1) *Trichophyton tonsurans* 感染症の疫学研究.

①大学柔道部. 2012 年度の陽性率は 93 名 (6.7%) で 2011 年度の 71 名 (5.4%) から増加し、93 名中 82 名 (88.2%) は無症候性キャリアであった。そのうち新入生の割合は 49 名 (52.7%) であった。②中学生の集団検診. ブラシ法では、第 1 回検診では、参加者 106 名中 2 名 (1.9%) が陽性であったが、第 2 回検診では、参加者 72 名全員が陰性であった。皮疹のテープ法による培養では、第 1 回検診では 3 名 (8.1%、全体の 2.8%) が陽性であったが、第 2 回検診ではすべて陰性であった。

2) *Trichophyton tonsurans* 感染症の診断治療法の研究.

①疫学調査研究で真菌陽性であった 93 名に対するイトラコナゾール 400mg/日 1 週間内服、あるいは、テルビナフィン 125mg/日 6 週間、または、500mg/日 1 週間による除菌効果は 80 名 (90.9%) に認めた。②迅速形態診断指標. 培養 5 日で 92%、8 日で 100% の感度で厚膜孢子様構造物の形成を確認した。

3. 外科領域.

真菌性腹膜炎を診断した経験がある施設は、全体の 17.5% (111 施設) で、外科施設の 15.7% (57 施設)、透析施設の 19.9% (54 施設) であった。真菌の菌種同定、薬剤感受性試験のどちらも実施していない施設は全体の 12.6% (80 施設)、外科系では 11.8% (43 施設)、透析施設では 13.7% (37 施設) であった。一方、菌種同定のみ実施しているのは全体の 38.0% (241 施設)、菌種同定および薬剤感受性試験のどちらも実施している施設は全体の 46.8% (297 施設) であった。(1→3) -β-D グルカン は測定は全体の 28.5% (181 施設) であった。

4. 検査法・診断法

1) 病理組織標本からの確定診断法.

解析した 11 症例のうち、2 症例で *Trichosporon* 属 ISH 法が陽性、6 症例で *C. albicans* ISH 法が陽性と判断された。得られた陽性所見はその菌体内に顆粒状の強いシグナルとして認められた。両者の ISH 法が陰性であった 3 症例においては、2 例で Panfungal ISH 法が陰性または弱陽性で、核酸の保存性が十分ではなかった可能性が示唆される一方、1 例においては Panfungal ISH 法が陽性で、*C. glabrata* を除く non-*albicans Candida* の可能性が示唆された。

2) ヒストプラスマ診断系. ①ELISA プレートについては、3 日乾燥後および 10 日乾燥後においても健常人群に比べて患者群は有意に高い値 ($p < 0.01$) を示し、あらかじめ抗原をコートして 10 日間の乾燥後であってもそのプレートの性能は維持されていた。②リアルタイム PCR は 10 copies/reaction の標的遺伝子まで検出可能であった。また、ヒストプラスマ症の患者から採取した口腔粘膜のホルマリン固定パラフィン包埋切片からは、スタンダード DNA と同様の強い蛍光が検出された。

3) アスペルギルス診断系. B11 b の ELISA 系については様々な抗体濃度を試し 1 次抗体濃度 2.5 ug/ml、2 次抗体濃度 1 ug/ml で昨年より感度が上がる条件が見つかったが、マウス実験系からの検出では再現性が不十分であった。Y1 については検出感度を 100 ng/ml 程度まで改善することができた。

4) 接合菌. 肺組織の免疫染色にて、候補 A 抗原は *R. oryzae* の菌体表面に存在する可能性が示唆された

5. 真菌症の病態解明.

1) *C. neoformans* の潜伏感染・内因性再燃モデル構築について、感染 7 ヶ月の時点でデキサメサゾン を 1 週間投与すると、コントロー

ルの生食投与群と比較して肺内生菌数が増加することを確認した。

2) メモリー T 細胞 (Tms 細胞) 動態. クリプトコックス感染初期 (感染 3 日から 7 日後) における $CD4^+Tm$ 、 $CD8^+Tm$ 細胞の動態では、感染後 3 日後において急激に増加しその後徐々に減少した。IFN- γ 発現 Tm 細胞は肺、二次リンパ組織ともに、一定の数でプールされていた。

3) クリプトコックスから見出した樹状細胞活性化作用を有するオリゴ DNA の免疫アジュバント活性. *C. neoformans* の *URA5* 由来の活性配列 ODN112 は各種クリプトコックス株刺激による BM-DC の IL-12 産生を顕著に増強したが、非活性配列 ODN123 ではそのような効果はみられなかった。

D. 考察と結論

コクシジオイデス症、ヒストプラスマ症、トリコフィトンズランズの発生動向をアップデートし、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したことで真菌症疫学の一端が明らかになった。なった。若年者の *T. tonsurans* 疫学調査の結果、大学柔道部では高い菌保持率が確認され継続的な調査研究が必要と考えられ、中学検診では今後教員主導でヘアブラシやセロファンテープによるサンプリングを行なう事ができれば随時検査を行うことができ、感染の把握が速やかに行えると考えられた。また、*T. tonsurans* の厚膜胞子様構造の光学顕微鏡での観察は分子マーカーを適応できない施設や、スライド培養などのテクニックがない施設においても、分離培養と同時に *T. tonsurans* が同定が可能になる方法として重要である。今後皮膚科医の教育に際して、本菌がこの特徴的形質を示す事を広く認知させることで診断がより正確になることが期待される。

真菌性腹膜炎は、外科施設、透析施設とも、

真菌性腹膜炎の診断基準や、抗真菌薬の投与開始基準、選択薬剤にばらつきがあることが判明し、統一した基準の作成が急務であると考えられた。

新規診断法に関して、これまでに本事業で確立した遺伝子病理組織学的診断法による真菌症の補助診断法の応用は、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。

アスペルギルス症については、同定した Y1, B11a, B11b はいずれも分泌蛋白質であり、構築した ELISA 系で *A. fumigatus* の培養上清中の蛋白質が検出できたことは、糖鎖修飾されていても native な蛋白質を検出できることが分かった。接合菌 *R. oryzae* についても新規蛋白抗原である候補 A 抗原 (23 kDa 蛋白) は *Rhizopus* 属感染症の早期診断に有効である可能性が示唆された。

潜伏感染病対の解析については、メモリーT細胞の潜伏感染に対応する動態が明かになり、また、*C. neoformans* 由来の配列のアジュバント効果が確認できた。

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、情報共有しながら次々と明らかになる臨床や公衆衛生学的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

各分担報告書参照

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

レファレンスラボネットワークと深在性真菌症診断

研究分担者 宮崎義継 国立感染症研究所 生物活性物質部

研究要旨 前年度までに、真菌感染症の診療支援や情報共有のために全国にわたる5つの地域の大学および研究所と協力体制を構築し、真菌同定法の統一化を図った。今年度は、そのために必要となる深在性真菌症診断法の一つとして*Aspergillus fumigatus*を原因とするアスペルギルス症の新しい診断系の再構築を行った。現行では比較的信頼性の高い検査としてアスペルギルスガラクトマンナン抗原検出による診断法が使用されているが、未だに感度、特異度など課題が多い。そこで、これまでに分子生物学的手法とバイオインフォマティクスの手法を用い、細胞表面に分泌される蛋白質の中から標的候補Y1を選びプロトタイプのサンドイッチELISA系構築してきた。しかし、血清存在下で測定できないという問題点があったため測定系の条件検討を行い、感度を下げることなくその問題を解決することが出来た。

A. 研究目的

医療技術の進歩によりもたらされる免疫不全者の増加などに伴い深在性真菌症も近年増加傾向を示している。カンジダ症、アスペルギルス症、クリプトコッカス症などが多く見られるが、その中でもアスペルギルス症は、頻度が高く特に侵襲性肺アスペルギルス症は非常に重篤な病態である。主に白血病などで免疫機能が著しく低下した時に合併症として発症し、予後は極めて不良である。そのため早期診断が重要となるが、現在、アスペルギルス感染症の早期診断を目的として使用されているガラクトマンナン抗原検出系は、感度、特異性の面で十分とは言えず、より感染実態を反映するアスペルギルス感染症の早期診断系の確立

が求められている。

このような背景のもと、アスペルギルス症の原因真菌で最も多い *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) を対象に、新たな早期診断系の確立を念頭に新規標的抗原の検索を行った。

哺乳類の細胞表層および分泌蛋白質を網羅的に同定できるシグナルシーケンストラップ法を用い、*A. fumigatus*の膜蛋白質、分泌蛋白質の網羅的同定を行い75種類の遺伝子を得ることができた。その中から、バイオインフォマティクスの手法等を用い10種類の蛋白質を診断等への応用が可能な新規抗原となりうる候補蛋白質として選択した。今年度は、その中から、Y1と名付けた蛋白質検出のためのサンドイッチELISA

系の再構築を行うことを目的とした。これまでにプロトタイプの手サンドイッチELISA系は構築していたが血清存在下で測定が出来なかったからである。

B. 研究方法

サンドイッチ ELISA

1次抗体として用いたY1モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ4B6より精製した。2次抗体として用いたY1ポリクローナル抗体は、ウサギに大腸菌で作製したGST融合Y1蛋白質を免疫して得られたウサギポリクローナル抗体を精製し、NHS-LC-biotin (PIEACE社)にてビオチン化したものを10 µg/mlの濃度で用いた。1次抗体をPBSにて希釈して、ELISAプレートに12時間4°Cで吸着させ、PBS-T (0.05%Tween20 in PBS)にて洗った後、ブロッキング試薬N101 (日油株式会社)でブロッキングを1時間室温で行った。大腸菌で作製したGST融合Y1蛋白質溶液を加え、1時間室温で放置後、PBS-Tで洗浄した。2次抗体を加え、室温で1時間放置後、PBS-Tで洗浄した。20,000倍に希釈したNeutravidin-PODを加え室温で30分放置後、PBS-Tで洗浄し、酵素発色基質を加え発色させた、1.5 Nのリン酸を加え反応停止し、450 nmで吸光度を測定した。サンプル等の希釈に用いたCanGet Signalは、東洋紡社のものを使用した。

C. 研究結果

これまでにプロトタイプの手サンドイッチELISA系は構築していたが血清存在下で測定が出来なかった。そこでこの問題点を克服するべく、条件検討を行い、検出感度を

維持し、ヒト血清存在下でも検出可能な系を構築することを試みた。

1. バックグラウンドの軽減

1次抗体の濃度を1, 3, 10 µg/mlの3点を取り、測定するサンプルにはヒト血清を1%になるように加え、表1のbufferの条件で、バックグラウンドを下げる条件を検討した。Buffer1-8には、さらにスキムミルクを1%加えた条件も検討した。その結果、buffer 3, 5を用いる条件が良いと考えられた。

表1

buffer	サンプルの希釈	2次抗体の希釈
1	0.1% BSA / PBS	0.1% BSA / PBS
2	0.1% BSA / PBS	CanGet Signal 2
3	1% BSA / PBS	1% BSA / PBS
4	1% BSA / PBS	CanGet Signal 2
5	CanGet Signal 1	0.1% BSA / PBS
6	CanGet Signal 1	1% BSA / PBS
7	CanGet Signal 1	CanGet Signal 2
8	0.1% BSA / PBS-T	0.1% BSA / PBS-T

そこでサンプルの希釈にCanGet Signal 2を用いる実験を加え、サンプルに大腸菌で作製したGST-Y1蛋白質10 ng/mlを用い、表2の条件で検討をした。

その結果、buffer 3, 5, 5'を用いた場合、バックグラウンドが低く、GST-Y1蛋白質の検出も高かった。

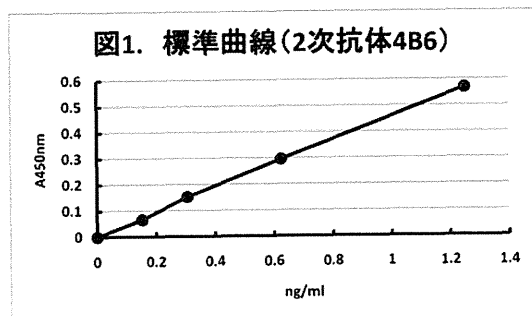
表2

buffer	サンプルの希釈	2次抗体の希釈
3	3	3
3S	3 + 1% skim milk	3 + 1% skim milk
5	5	5
5S	5 + 1% skim milk	5 + 1% skim milk
5'	CanGet Signal 2	5
5'S	5'	5'
1S	1 + 1% skim milk	1 + 1% skim milk
8S	8 + 1% skim milk	8 + 1% skim milk

各番号は表1のbufferの番号

次に、この3条件で、GST-Y1蛋白質の濃度依存性 (10 µg/mlの2倍の希釈系列) 調べた。1次抗体の濃度を3, 10 µg/mlの2点を用いた。1次抗体の濃度が10 µg/mlでbuffer 5'を用いる系の結果が最も良かった。図1に結果を示した。これにより100 ng/ml

程度の感度が得られることが分かった。



D. 考察

これまでの検討でプロトタイプの ELISA 系は、1 次抗体として 4B6 のモノクローナル抗体を用いると最もバックグラウンドが少なく、感度も高いことが分かっていた。しかし、血清が存在すると測定できないことが分かっていたので、今回は 1 % の血清存在下で、様々な条件検討を行った。その結果、血清が存在しても感度の点で従来の系と同程度の系が確立できた。今後は、菌の培養系に血清を入れて培養し、細胞外に分泌される Y1 蛋白質を検出できるか、さらにヒト検体を用いた実験を計画している。

E. 結論

A. *fumigatus* を原因とするアスペルギルス症の新しい診断系の構築を行った。Y1 蛋白質検出のためのサンドイッチ ELISA 系の、血清存在下で測定できないという問題点を、感度を変えることなく解決することができた。今後、ヒト臨床検体を用いて有用性を検討することができる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

英文

1. Miyasaka T, Aoyagi T, Uchiyama B, Oishi K, Nakayama T, Kinjo Y, Miyazaki Y, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M, Kawakami K. A possible relationship of natural killer T cells with humoral immune response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in clinical settings. *Vaccine*. 30:3304-3310, 2012.
2. Kimura M, Araoka H, Uchida N, Ohno H, Miyazaki Y, Fujii T, Nishida A, Izutsu K, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A. *Cunninghamella bertholletiae* pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation. *Med Mycol*. 50:412-416, 2012.
3. Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M. Cryptococcal Cellulitis in a Patient with Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol*. , 2012.
4. Miyazaki H, Kobayashi R, Ishikawa H, Awano N, Yamagoe S, Miyazaki Y, Matsumoto T. Activation of COL1A2 promoter in human fibroblasts by *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 65:481-487, 2012.
5. Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T,

- Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S. A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Med Mycol.* 50:631-636, 2012.
6. Tarumoto N, Sujino K, Yamaguchi T, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y, Maesaki S. First Report of *Rothia aeria* Endocarditis Complicated by Cerebral Hemorrhage. *Intern Med.* 51:3295-3299, 2012.
 7. Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, Naka T, Umeyama T, Utena-Abe Y, Tarumoto N, Niimi M, Ohno H, Doe M, Fujiwara N, Kinjo Y, Miyazaki Y. The mannan of *Candida albicans* lacking β -1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. *Med Mycol.* , 2012.
 8. Tarumoto N, Kinjo Y, Ueno K, Okawara A, Watarai H, Taniguchi M, Maesaki S, Miyazaki Y. A limited role for iNKT cells in controlling systemic *Candida albicans* infection. *Jpn J Infect Dis.* 65:522-526, 2012.
- 一, 大野秀明. *Cryptococcus gattii* 感染症. *感染症.* 42:172-175, 2012.
3. 宮崎義継, 大野秀明. 特集 感染症医薬品開発の現況 真菌症に関する診断法の現状と展望. *最新医学.* 67:2566-2571, 2012.

学会発表

国際学会

1. Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
2. Umeyama T, Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Multi-locus sequence typing epidemiology of *Cryptococcus neoformans* strains clinically isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
3. Tanabe K, Ohno H, Umeyama T, Yamagoe S, Chibana H, Miyazaki Y. Genetic analysis of echinocandin-resistant *Candida glabrata* isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
4. Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Ohno H, Miyazaki Y. Fungicidal effectiveness against

和文

1. 宮崎義継, 河野 茂. 特集: 真菌と免疫・アレルギー 3. アスペルギルス属と免疫・アレルギー. *アレルギーの臨床.* 32:615-618, 2012.
2. 宮崎義継, 金子幸弘, 梅山 隆, 田辺公

biofilms of *Candida albicans*. 6th ASM conference of biofilms. September 29-October 4, 2012, Miami, USA.

国内学会

1. 金子幸弘, 小畑陽子, 西野友哉, 掛屋弘, 瀬藤光利, 宮崎義継, 古巢 朗, 河野 茂. 質量顕微鏡によるIgA腎症モデルの病態解析. 第109回日本内科学会. 4月13-15日, 2012年, 京都.
2. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 新規抗真菌併用薬の探索. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
3. 大野秀明, 田辺公一, 杉田 隆, 畠山修司, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 渋谷和俊, 亀井克彦, 宮崎 義継. 北米流行型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性、病原因子の解析-国内臨床分離株を中心に-. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
4. 渋谷和俊, 大久保陽一郎, 大野秀明, 宮崎義継, 田辺公一, 金子幸弘, 山越智, 梅山 隆, 安藤常浩, 若山 恵. *Cryptococcus gattii* 感染症における病理組織学的解析. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
5. 泉川公一, 三原 智, 森永芳智, 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. 長崎大学病院における *Cryptococcus* の Multilocus Sequence Typing を用いた分子疫学調査. 第52回日本呼吸器学会学術講演会. 4月20-22日, 2012年, 神戸.
6. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質 B-11 の病原性の解析とサント・イッチ ELISA 系の構築. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
7. 樽本憲人, 金城雄樹, 大川原明子, 前崎繁文, 渋谷和俊, 宮崎義継. マウスモデルにおける自然免疫の活性化によるカンジダ症増悪の免疫学的解析. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
8. 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 知花博治, 宮崎義継. *Candida* 臨床分離株におけるミカファンギン感受性と FKS 遺伝子の解析. 第60回日本化学療法学会学術集会. 4月26-27日, 2012年, 長崎.
9. 名木 稔, 田辺公一, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* はユニークなステロールトランスポーターによりアゾール耐性となりうる. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
10. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. 侵襲性肺アスペルギルス症の主要原因菌 *Aspergillus fumigatus* による肺胞上皮細胞への接着と侵入. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.

11. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* プロテインキナーゼの特異的阻害による病原性制御. 第60回日本化学療法学会学術集会. 4月26-27日, 2012年, 長崎.
12. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* の肺胞上皮細胞への接着と侵入機構. 第33回関東医真菌懇話会学術集会. 5月26日, 2012年, 東京.
13. 金城雄樹, 樽本憲人, 笹井大督, 大川原明子, 上野圭吾, 井澤由衣奈, 篠崎稔, 竹山春子, 前崎繁文, 渋谷和俊, 宮崎義継. NKT細胞の活性化によるカンジダ症増悪機序の免疫学的解析〜マウスモデルを用いた解析〜. 第33回関東医真菌懇話会. 5月26日, 2012年, 東京.
14. 樽本憲人, 金城雄樹, 笹井大督, 大川原明子, 上野圭吾, 井澤由衣奈, 篠崎稔, 竹山春子, 前崎繁文, 渋谷和俊, 宮崎義継. NKT細胞の活性化によるマウスカンジダ症増悪機序の解析. 第23回日本生体防御学会. 7月9-11日, 2012年, 東京.
15. 宮崎義継, 荒岡秀樹, 梅山 隆, 田辺公一, 山越 智, 大野秀明. シンポジウム2 症例から考える真菌症: 診断・治療の難しさ、感染症としての面白さ 4) 接合菌症を疑うときに何をするか. 第61回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第58回日本化学療法学会東日本支部総会/第95回日本細菌学会関東支部総会. 10月10-12日, 2012年, 東京.
16. 金城雄樹, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. カンジダ細胞壁マンナンの構造と炎症性サイトカイン誘導の関係. 第61回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第58回日本化学療法学会東日本支部総会/第95回日本細菌学会関東支部総会. 10月10-12日, 2012年, 東京.
17. 宮崎義継. 気管支鏡検査 (TBLB および BAL) にて診断された肺コクシジオイデス症の一例. 第61回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第58回日本化学療法学会東日本支部総会/第95回日本細菌学会関東支部総会. 10月10-12日, 2012年, 東京.
18. 宮崎義継, 梅山 隆, 田辺公一, 山越智, 金城雄樹, 大野秀明. 教育講演-4 肺真菌症をいかに診断するか. 第49回日本臨床生理学会総会. 10月18-19日, 2012年, 長崎.
19. 田辺公一, 名木 稔, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第61回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第58回日本化学療法学会東日本支部総会/第95回日本細菌学会関東支部総会. 10月10-12日, 2012年, 東京.
20. 田辺公一, 名木 稔, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込み活性化機構. 第41回薬剤耐性菌研究会. 10月25-26日, 2012年, 下呂.
21. 宮崎義継. 侵襲性真菌症への対応について. 平成24年度医師卒後臨床研修.

- 10月23日, 2012年, 東京.
22. 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. COX 阻害剤による *Candida albicans* の抗真菌薬感受性変化と排出ポンプ発現誘導. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
 23. 木村雅友, 大野秀明, 梅山 隆, 宮崎義継. アスペルギルスとクリプトコックスによる肺混合感染の2手術例. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
 24. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮崎義継, 根本哲生, 若山 恵, 栃木直文, 笹井大督, 石渡誉郎, 中山晴雄, 下平佳代子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 職 玉珠, 北原加奈子, 山本慶郎, 渋谷和俊. マウス肺クリプトコックス症モデルを用いた感染防御ならびに構築変換の解析. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
 25. 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の生体内における病原因子; 鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
 26. 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* の細胞壁、分泌蛋白質 B-11 の機能解析. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
 27. 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の生体内における病原因子: 鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
 28. 宮坂智充, 青柳哲史, 内山美寧, 國島広之, 賀来満夫, 石井恵子, 中山俊憲, 植村靖史, 大石和徳, 金城雄樹, 宮崎義継, 川上和義. 23 価肺炎球菌ワクチン接種後の抗体産生における NKT 細胞の役割に関する臨床免疫学的検討. 第16回日本ワクチン学会学術集会. 11月17-18日, 2012年, 横浜.
 29. 宮坂智充, 外山真彦, 赤堀ゆきこ, 石井恵子, 金城雄樹, 宮崎義継, 中山俊憲, 岩倉洋一郎, 西城 忍, 大石和徳, 川上和義. 23 価肺炎球菌多糖体ワクチンによる血清型特異的 IgG 産生における NKT 細胞と Dectin-2 の役割. 第16回日本ワクチン学会学術集会. 11月17-18日, 2012年, 横浜.
 30. 宮崎義継. 真菌症について. 平成24年度動物由来感染症対策技術研究会. 11月2日, 2012年, 東京.
 31. 田辺公一, 名木 稔, 中山浩伸, 山越智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* における細胞外ステロール取り込み. 第35回日本分子生物学会年会. 12月11-14日, 2012年, 福岡.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得
なし
実用新案登録
なし

その他
なし

3. 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 臨床感染症学

研究協力者 山岸 由佳 愛知医科大学病院 感染症科

研究要旨 日本では、これまで外科領域の真菌性腹膜炎および透析に伴う真菌性腹膜炎の疫学データはない。今回、外科領域および透析実施施設における真菌性腹膜炎に関するアンケート調査を実施した。アンケートの回答は、外科施設 364 施設、透析施設 271 施設の計 635 施設から得られ、総回答率は 23.9%であった。真菌性腹膜炎を診断した経験がある施設は、全体の 17.5% (111 施設) で、外科施設の 15.7% (57 施設)、透析施設の 19.9% (54 施設) であった。真菌の菌種同定、薬剤感受性試験のどちらも実施していない施設は全体の 12.6% (80 施設)、外科系では 11.8% (43 施設)、透析施設では 13.7% (37 施設) であった。一方、菌種同定のみ実施しているのは全体の 38.0% (241 施設)、菌種同定および薬剤感受性試験のどちらも実施している施設は全体の 46.8% (297 施設) であった。(1→3) - β -D グルカンは、外科施設、透析施設とも β -グルカンテストワコー®が最多で全体の 28.5% (181 施設) であった。しかしながら、依然としてガイドラインでは推奨されていないカンジテック®を使用している施設も認められた。外科施設における「真菌性腹膜炎と診断された場合」の抗真菌薬の適応についての判断は、発熱などの臨床症状を伴うとき投与するが 55.2% (201 施設) と最多で、次いで全例に投与する 34.3% (125 施設)、ハイリスク患者に投与する 31.3% (114 施設)、血清診断が陽性のとき投与する 20.1% (73 施設) の順であった。真菌性腹膜炎の診断や治療に関しフローチャート (Bundle) への期待は、あれば利用する 78.6% (499 施設)、どちらもともいえない 15.0% (95 施設)、あっても利用しない 1.9% (12 施設) の順であった。今回のデータは日本における外科領域の真菌性腹膜炎診療の現状を示す重要な成績である。

A. 研究目的

- 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。
- 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。
- 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。

【外科領域および透析実施施設対象における真菌性腹膜炎に関する全国アンケート調査】

日本では外科領域の深在性真菌症発症頻度に関する疫学データがないため、抗真菌薬治療指針作成の際に参考となるエビデンスが乏しい。また、日本では透析実施施設における真菌性腹膜炎の疫学データや、透析施行医の