

意識調査はない。そこで今回、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。

## B. 研究方法

外科領域における調査は、医育機関名簿 2011-2012<sup>1)</sup>より外科系診療科を抽出し、それぞれホームページが開設されている施設においては抽出医療機関に誤りがないか確認し各科・部長宛 147 施設に「外科の施設対象の真菌性腹膜炎に関するアンケート調査」を送付した。さらに、日本病院会会員名簿 2010<sup>2)</sup>より外科系診療科（消化器外科、産婦人科、泌尿器科、小児外科等）を標榜している病院を抽出し、医育機関名簿 2011-2012<sup>1)</sup>抽出機関から重複を除外した病院長あて 2102 施設に「外科の施設対象の真菌性腹膜炎に関するアンケート調査」を送付した。

透析実施施設における調査は、医育機関名簿 2011-2012<sup>1)</sup>より透析を実施していることが推測される診療科（腎臓内科、泌尿器科）をすべて抽出し、それぞれホームページが開設されている施設においては抽出医療機関に誤りがないか確認し各科・部長宛 112 施設に「透析（CAPD 含む）施設対象の真菌性腹膜炎に関するアンケート調査」を送付した。さらに、日本病院会会員名簿 2010<sup>2)</sup>より内科、泌尿器科を標榜している病院を抽出し、病院長あてに「透析（CAPD 含む）施設対象の真菌性腹膜炎に関するアンケート調査」を送付した。

医育機関名簿 2011-2012<sup>1)</sup>から抽出した医療機関については、外科系アンケートのみ送付 147 施設、透析施設対象アンケートのみ送付 112 施設、日本病院会会員名簿 2010<sup>2)</sup>より抽出した医療機関については、外科系アンケートのみ送付 16 施設、透析施設対象アンケートのみ送付 275 施設、両方のアンケート送付 2102 施設で、計 2652 施設が対象となった。

調査項目は、図 1 に示したように真菌性腹膜炎の診断経験の有無、経験数、真菌の菌種同定および薬剤感受性試験実施状況、リファレンスセンターへの期待、血清学的診断法の実施状況、真菌性腹膜炎と診断された場合の抗真菌薬投与の適応（透析施設対象アンケートでは、CAPD 液からカンジダが検出された場合の抗真菌薬投与の適応）、抗真菌薬の選択、真菌性腹膜炎の診断治療に関するフローチャートなどの必要性について計 9 問行った。

アンケートは返信用封筒をいれた封筒で送付し、無記名回答可で FAX または返信用封筒での返信で回収した。

## C. 研究成果

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。

### 1. 施設規模

回答が得られた施設の病床数は全体で平均  $378.2 \pm 268.9$  (中央値 319) (3~1700) 床で、19 床以下 0.3% (2 施設)、20 床以上 300 床未満 35.7% (227 施設)、300 床以上 500 床未満 35.7% (227 施設)、500 床以上 1000 床未満 21.6% (137 施設)、1000 床以上 2.8% (18 施設)、無回答 14.5% (92 施設) であった (図 2)。

### 2. 真菌性腹膜炎の診断経験

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。1 年間あたりの経験症例数は全体で 1 例 63.1% (70 施設)、2 例 14.4% (16 施設)、3 例 10.8% (12 施設)、4 例 0.9% (1 施設)、5 例以上 4.5% (5 施設)、10 例以上 0.9% (1 施設) で、外科施設の方が透析施設より経験症例数が多かった (表 1)。

### 3. 真菌の菌種同定、薬剤感受性試験実施状況

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で 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。糸状菌は菌種同定のみ実施し感受性試験は実施していない施設が全体の 0.6% (4 施設) あった (表 2)。

菌種同定および薬剤感受性試験の両方とも実施していない施設に真菌に関するリファレンスセンターなどに菌種の同定や薬剤感受性試験を依頼できるシステムがあれば利用したいかについては、利用したいが 63.8% (51 施設)、利用しないが 20.0% (16 施設)、その他が 11.3% (9 施設) で、検査料金や菌株の送付方法などが解決されれば考えるとの回答があった (表 3)。

菌種同定、薬剤感受性試験を実施している施設に対する実施場所については、自施設 52.4% (284 施設)、外注 34.7% (188 施設)、その他 2.4% (13 施設) で、その他の内訳は菌種同定は自施設、感受性試験は外注: 7 施設、菌種同定は自施設、薬剤感受性未実施: 4 施設、不明 3 施設であった (表 4)。

#### 4. 血清学的診断法について

各施設における (1→3) - $\beta$ -D グルカンは、外科施設、透析施設とも  $\beta$ -グルカンテストワコー (和光純薬) が最多で全体の 28.5% (181 施設) であった。不明としたのは全体の 40.2% (255 施設) でその理由が記載されていたのはすべて外注のためであった (表 5)。

カンジダ抗原は外科施設、透析施設ともカンジテック (ラムコジャパン・和光純薬) が最多で、全体では 46.3% (294 施設) を占めていた。一方、不明が 40.0% (254 施設)、未実施が 0.9% (6 施設) であり、不明の理由で記載されていたのは外注によるためであった (表 5)。

#### 5. 抗真菌薬投与の適応について

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。投与しないも 1.4% (5 施設) に認められた。その他の自由記載内容としては、経験がないため分からない 1.9% (7 施設)、施設として基準がない (2 施設)、主治医の判断に任せる 0.3% (1 施設)、感染症専門家に相談して決める 0.3% (1 施設)、監視培養複数箇所から検出された時 0.3% (1 施設)、腹腔内から真菌が検出されたとき 0.3% (1 施設)、腹膜透析カテーテルを抜去して対応する 0.3% (1 施設) であった。

透析施設での「CAPD 液からカンジダが検出された場合」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 40.2% (109 施設) と最多で、次いで、全例に投与 32.1% (87 施設)、ハイリスク患者 19.2% (52 施設)、血清診断陽性時 13.3% (36 施設) の順であった。投与しないも 0.4% (1 施設) 認められた。その他の自由記載内容としては、カテーテル抜去 1.1% (3 施設)、腹水の性状で決める 0.4% (1 施設)、腹膜炎症状のあるとき 0.4% (1 施設) であった。

#### 6. 選択する抗真菌薬

内訳は、外科施設はキャンディン系 65.4%、アゾール系 53.8%、ポリエン系 36.0% の順に多かったが、透析施設ではアゾール系 53.1%、キャンディン系 50.2%、ポリエン系 36.5% の順に多かった (表 7)。

#### 7. 真菌性腹膜炎の診断治療に関するフローチャート (Bundle) の利用の可能性

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。

#### D. 考察

腹膜炎は、その炎症反応過程により一次性、二次性、三次性に分類される。一次性は腸管損傷を伴わない腹膜炎である。二次性腹膜炎は、最も多い腹膜炎で、腸管穿孔などの消化管損傷を伴う腹膜炎と定義される。三次性腹膜炎は、二次性腹膜炎の適切な初期治療後にみられる持続性または反復性腹膜炎として考えられている<sup>3)</sup>。特に、二次性では外科や ICU などで頻度が高くみられ<sup>4)</sup>、*Candida* 属は院内感染型腹膜炎(nosocomial peritonitis)の原因微生物として特に重要である<sup>5)6)</sup>。また、腹膜炎患者は在院日数や ICU 滞在期間、人工換気の期間を長くする要因でもある<sup>7)</sup>。腹膜炎に占める真菌の割合は、40%にまで上昇すると報告されており<sup>6)8)9)</sup>、特に、*Candida* による腹膜炎では CAPD<sup>10-12)</sup>、消化管穿孔性腹膜炎<sup>13-15)</sup>、壊死性肺炎<sup>16-17)</sup>、三次性腹膜炎<sup>18-19)</sup>がリスクとなりうる。

日本での真菌性腹膜炎の診断基準としては、「深在性真菌症の診断・治療ガイドライン」<sup>20)</sup>の産婦人科領域に掲載されているものがある。それによると、a. 下腹部痛または下腹部圧痛を示すもの。b. 2 種類以上の抗菌薬が 7 日間以上投与され、嫌気性菌もターゲットにした抗菌化学療法に不応性の発熱を示すもの。c. 本来、無菌とされる腹水などの検体から真菌が検出されるか、または培養検査前の顕微鏡検査で本来、無菌とされる部位の検体から真菌が確認されたもの。d. コンタミネーションが予測されるドレーン排液などの検体から連続して 2 回以上真菌が検出されるか、または、培養検査前の顕微鏡による塗抹検査でコンタミネーションが予測されるドレーン排液などの検体から連続して 2 回以上真菌が確認されたもの。e. 血清診断で陽性 ( $\beta$ -D-グルカ

ン値など) であるもの。このうち、少なくとも a と b と c、または a と b と d と e を満たしたものを真菌性腹膜炎と判定することとなっている。しかし、今回のアンケート調査では定義が浸透しているとはいえず、施設によって診断基準が異なることが判明した。

真菌性腹膜炎に限らず、真菌の菌種同定や、薬剤感受性試験は医療機関によっては自施設ではなく外注しているところもあるが、今回のアンケート調査では、菌種同定は自施設で、感受性試験は外注でという施設も多く、結果が判明するまでより時間を要することが示唆され、標的治療においては感受性結果が判明していなくても菌種が判明した時点で適切な抗真菌薬を選択することが現実的であることが判明した。

真菌性腹膜炎の治療については、市中発症の重症や院内発症の場合で septic shock のような重症の場合が治療対象とされるが、その際には血清診断も十分参考にすることが必要である。アンケート調査では血清診断としての  $\beta$ -D-グルカンの測定法にはばらつきが多く、またカンジダ抗原については測定した経験がない施設があることが判明した。治療薬の選択は外科施設と透析施設で回答に差がみられたが、キャンディン系薬またはアゾール系薬が第 1 選択薬となっており、深在性真菌症の診療における初期選択薬として遜色ない結果であった。

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。

#### 【文献】

- 1) 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

- 2) 社団法人日本病院会. 日本病院会会員名簿 2010、堺常雄発行、東京、2011年2月
- 3) Blot S, De Waele JJ: Critical issues in the clinical management of complicated intra-abdominal infections. *Drugs*. 65:1611-1620, 2005
- 4) Lamme B, Boermeester MA, Belt EJ, et al: Mortality and morbidity of planned relaparotomy versus relaparotomy on demand for secondary peritonitis. *Br J Surg*. 91:1046-1054, 2004
- 5) Montravers P, Dupont H, Gauzit R, et al: *Candida* as a risk factor for mortality in peritonitis. *Crit Care Med*. 34:646-652, 2006
- 6) Sandven P, Qvist H, Skovlund E, et al: Significance of *Candida* recovered from intraoperative specimens in patients with intra-abdominal perforations. *Crit Care Med*. 30:541-547, 2002
- 7) Lamme B, Boermeester MA, Belt EJ, et al: Mortality and morbidity of planned relaparotomy versus relaparotomy on demand for secondary peritonitis. *Br. J. Surg*. 91:1046-1054, 2004
- 8) Dupont H, Bourichon A, Paugam-Burtz C, et al: Can yeast isolation in peritoneal fluid be predicted in intensive care unit patients with peritonitis? *Crit Care Med*. 31:752-757, 2003
- 9) Eggimann, P., P. Francioli, J. Bille, R. Schneider, M. M. Wu, G. Chapuis, R. Chiolerio, A. Pannatier, J. Schilling, S. Geroulanos, M. P. Glauser, and T. Calandra.: Fluconazole prophylaxis prevents intra-abdominal candidiasis in high-risk surgical patients. *Crit. Care Med*. 27:1066-1072, 1999
- 10) Matuszkiewicz-Rowinska J. Update on fungal peritonitis and its treatment. *Perit Dial Int*. 2009 Feb;29 Suppl 2:S161-5.
- 11) Wang AY, Yu AW, Li PK, Lam PK, Leung CB, Lai KN, Lui SF. Factors predicting outcome of fungal peritonitis in peritoneal dialysis: analysis of a 9-year experience of fungal peritonitis in a single center. *Am J Kidney Dis*. 2000 Dec;36(6):1183-92.
- 12) Prasad KN, Prasad N, Gupta A, et al.: Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis: a single center Indian experience. *J Infect* 2004; 48:96-101
- 13) Sandven P, Qvist H, Skovlund E, et al: Significance of *Candida* recovered from intraoperative specimens in patients with intra-abdominal perforation. *Crit Care Med* 2002; 30:541-547
- 14) Dupont H, Bourichon A, Paugam-Burtz C, Mantz J, Desmonts JM. Can yeast isolation in peritoneal fluid be predicted in intensive care unit patients with peritonitis? *Crit Care Med*. 2003 Mar;31(3):752-7
- 15) Lee SC, Fung CP, Chen HY, et al. *Candida* peritonitis due to peptic ulcer perforation: incidence rate, risk factors, prognosis and susceptibility to fluconazole and amphotericin. *B. Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 23-7
- 16) Hoerauf A, Hammer S, Müller-Myhsok B, Rupprecht H. Intra-abdominal *Candida* infection during acute necrotizing pancreatitis has a high prevalence and is associated with

increased mortality. Crit Care Med. 1998;26:2010-5.

- 17) De Waele JJ, Vogelaers D, Blot S, et al.: Fungal infections in patients with severe acute pancreatitis and the use of prophylactic therapy. Clin Infect Dis 2003; 37:208-213
- 18) Solomkin JS, Flohr AB, Quie PG, et al.: The role of *Candida* in intraperitoneal infections. Surgery 1980;88:524-530
- 19) Calandra T, Bille J, Schneider R, et al.: Clinical significance of *Candida* isolated from peritoneum in surgical patients. Lancet 1989; 2(8677):1437-1440
- 20) 深在性真菌症のガイドライン作成委員会編：深在性真菌症の診断・治療ガイドライン第1版。pp11、医歯薬出版株式会社、東京、2003

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Hagihara M, Suwa M, Ito Y, Muramatsu Y, Kato Y, Yamagishi Y, Mikamo H. Preventing surgical-site infections after colorectal surgery. J Infect Chemother. 2012; 18(1):83-89.
2. Takesue Y, Oda S, Fujishima S, Mikamo H, Aikawa N. Clinical efficacy

and safety of intravenous itraconazole in the management of invasive candidiasis in patients of surgery and critical care. J Infect Chemother. 2012; 18(4): 515-521.

3. 川澄紀代、山岸由佳、萩原真生、藤巻恵理子、杉田隆、三嶋廣繁：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、日本化学療法学会雑誌、2012; 60: 18-23.
4. 廣瀬士朗、大塚博巳、森島達観、佐藤啓二、山岸由佳、三嶋廣繁：人工関節感染治療における整形外科とICTとの連携について。日本骨・関節感染症学会雑誌 2012; 25: 131-135
5. 竹末芳生、三嶋廣繁：今日のカンジダ症について語る カンジダ症フローチャートの活用とアムホテリシン B リポソーム製剤。 Jpn J Antibiot. 2012;65: 111-119
6. 河野茂、網谷良一、亀井克彦、二木芳人、宮崎義継、掛屋弘、吉田稔、岡慎一、木内哲也、竹末芳生、三嶋廣繁、村瀬年宣、下河恵子、白沢博満、中條英司、山口英世、正岡徹、日本化学療法学会抗真菌薬臨床評価委員会：日本化学療法学会抗真菌薬臨床評価委員会 指針。日本化学療法学会雑誌 2012; 60: 348-353
7. 竹末芳生、大曲貴夫、笠原敬、関雅文、高倉俊二、高橋佳子、時松一成、松元一明、三嶋廣繁、木村利美、谷川原祐介、五十嵐正博、岡田賢二、木村匡男、小林昌宏、西圭史、浜田幸宏、望月敬浩、日本化学療法学会抗菌薬TDMガイドライン作成委員会：抗菌薬TDMガイドライン。日本化学療法学会雑誌 2012; 60: 393-445

##### 学会発表

1. H. Mikamo, Y. Yamagishi: Pharmacokinetics of intravenous itraconazole followed by itraconazole

- oral solution in patients with candidaemia. ECCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), London, United Kingdom, Mar 31-Apr 3., 2012
2. Y. Yamagishi, N. Kawasumi, M. Hagihara, T. Sugita, H. Mikamo: Investigation on Isolation of "*Trichosporon*" Species in Clinical Practice. 52th ICAAC M-328, San Francisco, California USA, Sep. 9-12, 2012
  3. Y. Yamagishi, H. Mikamo: Risk factor and epidemiology of Candidemia by "*Candida guilliermondii*". 52th ICAAC M-325, San Francisco, California USA, Sep. 9-12, 2012
  4. Y. Takesue, S. Takakura, H. Mikamo, S. Odam Y. Kitagawa, S. Kohno, ACTION Project Committee: Management bundles for invasive candidiasis (IC): The impact of compliance on clinical efficacy and mortality. 52th ICAAC M-1231, San Francisco, California USA, Sep. 9-12, 2012
- 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た。症例登録期間は終了し、全国39施設から計744件の症例登録があった。Proven fungal disease 7例、Probable fungal disease 26例のIMIが発症した。IMIの12ヶ月累積発症率は5.3%であった。現在、論文化に向けた作業を継続している。

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744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 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 fumigatus* 2株、*Aspergillus*

*terreus* 1株、*Fusarium solani* 2株、*Fusarium dimerum* 1株）あった。

3. 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。

D. 考察

海外の疫学データ（CID 2010; 50: 1091-1100.）と比較して、発症率に大きな差はないと思われる。移植ソース別の発症率が算出できた点が、海外の疫学データにはない本研究の特色である。

E. 結論

本邦の造血幹細胞移植領域におけるIMIの発症率が明らかになった。

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. Matsuno N, Taniguchi S, et al. Rapid T-cell chimerism switch and memory T-cell expansion are associated with pre-engraftment immune reaction early after cord blood transplantation. *Br J Haematol* 160:255-258, 2013
2. Kimura M, Araoka H, Taniguchi S, et al. *Cunninghamella bertholletiae* pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation. *Med Mycol* 50(4):412-416, 2012
3. Araoka H, Taniguchi S, et al. Rapidly progressive fatal hemorrhagic pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in hematologic malignancy. *Transpl Infect Dis* 14(4):355-363, 2012

## 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

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

分担研究者 渋谷和俊<sup>[2]</sup> 東邦大学医学部病院病理学講座

研究協力者 篠崎 稔<sup>[1]</sup> 若山 恵<sup>[2]</sup>

[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 これまでの深在性真菌症に対する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において、Polymerase Chain Reaction (PCR)法と *in situ* hybridization (ISH)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有用な補助診断法であることを報告してきた。

昨年度までに新たに設計した *Trichosporon* 属を標的とした ISH 法における Peptide Nucleic Acid (PNA)プローブを用いて、11 症例の酵母血流感染症の剖検症例を解析したところ、2 症例で陽性所見が得られ、形態学的に *Candida* 症と診断されている症例から、*Trichosporon* 症を指摘・抽出し得る可能性が示唆された。

真菌症の病理診断コンサルテーションについては、昨年度と同様、*Aspergillus* と *Mucor* の鑑別を目的とした依頼が多かったが、形態学的にこれら以外の糸状菌が疑われる症例の解析依頼も増加しており、ISH 法、PCR 法ともにより様々な真菌に対する probe、primer を開発し、検討する必要があると思われた。また、より門戸を広げた対応をするためには、方法論的なプロトコールの確立のみならず、支援を行う人材の育成が急務と思われた。

従来の形態診断を踏まえて、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（東邦大学医学部倫理委員会承認番号：20047）。

#### A. 研究目的

深在性真菌症の病理診断に対する遺伝子病理組織学的診断法を確立し、同時にこの技術を応用する事で、後方視的発生動向調査および実地医療機関における真菌症診断を支援することは、我が国における深在性真菌症の診療の質の保証と精度向上に寄与すると考えられる。

これまで我々が確立した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、これらの手法を用いて行った真菌症剖検症例の解析(平成22年度本事業報告)では、酵母血流感染症の病理診断における *Candida*属と *Trichosporon*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、この両者の

間で形態学的鑑別が問題である事を指摘した。そこで、これまでに新たに設計した *Trichosporon* 属を標的とした PNA プローブによる ISH 法を酵母血流感染症の剖検症例に応用する事で、本手法の妥当性を検証した。

## B. 研究方法

1. 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 症例を抽出した (慢性骨髄性白血病 1 例、急性骨髄性白血病 2 例、急性リンパ性白血病 1 例、広範熱傷 2 例、固形癌術後 2 例、劇症肝炎 1 例、肺炎 1 例、超未熟児 1 例 : 図 1)。

ISH 法は我々が昨年度新規に設計した *Trichosporon* 属の検出を目的とした Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 アンチセンス PNA プローブを使用した。このプローブは 26S rRNA 遺伝子領域から *Trichosporon* 属に保存性が高い領域を選定して作製した (N -CGG ACA ATC GAA GAC)。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 Oliveira らが開発した *C. albicans* の 26S rRNA を標的とした PNA プローブ (N -ACA GCA GAA GCC GTG) による ISH 法を施行した。

染色結果の評価に関しては染色された細胞の占有率と染色強度の両者を評価する Allred score システムに若干の変更を加えて score 1 ~ 3 に評価した。

	<i>C. albicans</i>	<i>Trichosporon sp.</i>	剖検主診断	副所見(真菌についての記載)
症例1	0	0	CML急性転化	カンジダ症
症例2	0	0	AML	全身性カンジダ感染症
症例3	0	3	AML	全身真菌感染
症例4	3	0	熱傷による皮膚移植後	全身性カンジダ症
症例5	0	3	ALL	カンジダ症
症例6	3	0	二重癌 + 全身性カンジダ症	
症例7	2	0	広範熱傷	カンジダ性敗血症
症例8	1	0	劇症肝炎	[敗血症] カンジダ性臓器
症例9	2	0	食道癌術後	カンジダ性肺炎
症例10	0	0	気管支肺炎	カンジダ症
症例11	2	0	全身カンジダ症 + 超未熟児 (在胎35週, 750g)	

図 1. ISH 法による解析症例の一覧と染色結果

2. 過去 1 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 2 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。

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 probe である Panfungal、*C. albicans* に特異的な塩基配列を用いた probe、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、*Afut-1*、及びフサリウム属に特異的な塩基配列を用いた probe、前述のトリコスポロン属に特異的な塩基配列を用いた probe の各 probe 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、フサリウム属をターゲットとした nested PCR を随時行った。

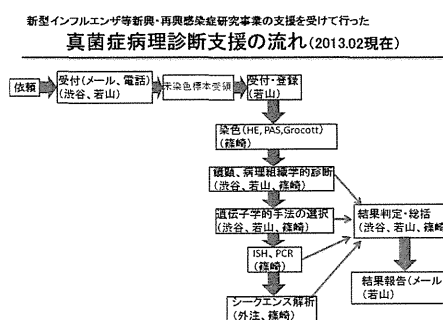


図 2. 真菌症病理診断コンサルテーションシステム

## C. 研究結果

1. 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 (図 1)。

両者のプローブで同時に陽性所見が得られた症例はなかった。3症例で両者のISH法が陰性だった。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(図3、4)。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、核酸の保存性は確認されている事から、*C. glabrata*を除く non-*albicans Candida*の可能性が示唆された。

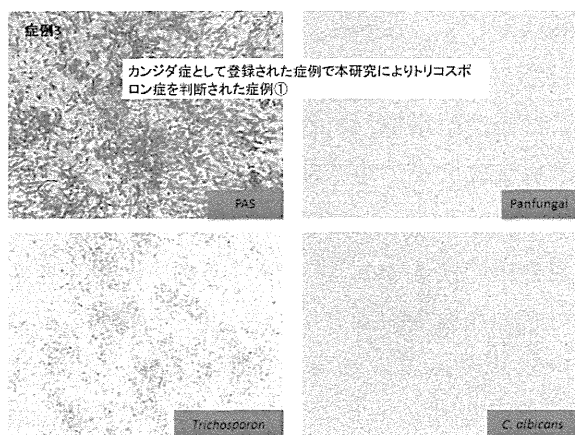


図3. *Candida*症として登録された症例で本研究により *Trichosporon*症と判断された症例

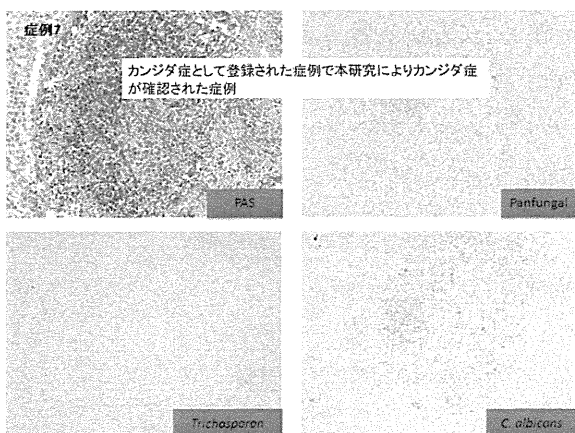


図4. *Candida*症として登録された症例で本研究により *Candida*症が確認された症例

2. 2012年4月～2013年1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13件であった。

依頼経路としては、担当医から直接の依頼が9件、関連施設を経由した依頼が4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11件、他、染色済み組織標本のみの提供が1件、染色済み組織標本とPCR用切片の提供が1件であった。

未染色標本またはPCR用切片が提供された12件については、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1件、PCR法のみが11件であった。PCR法のみを行った11件中、1件ではシーケンス解析も施行した。なお1件は組織学的にムコールが疑われたが、遺伝子補助診断法は現在、検討中である。

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。

#### D. 考察

*Trichosporon*属ISH法で陽性所見が得られた2症例については当初、*Candida*症と判断されていた症例であったが、本染色にて陽性所見が得られた事から、形態学的再評価を行ったところ、*Trichosporon*症としても矛盾しない菌形態であった。また、*Candida*属ISH法にて陽性所見が得られた6症例についての形態学的再評価では *Candida*属に矛盾しない菌形態であった。したがって、これらのプローブによるISH法は、組織標本上で形態学的に判断が難しい *Trichosporon*属と *Candida*属を判別するために有用な手法と考えられた。

真菌症の病理診断コンサルテーションについては、13件中12件において未染色標本またはPCR用切片が提供されており、形態学的診断に加えて遺伝子補助診断が望まれる症例数

が増加していた。

また、昨年度と同様、*Aspergillus*と*Mucor*の鑑別を目的とした依頼が多かったが、それに加えて、*Scedosporium*や*Fusarium*など稀な真菌症を対象として、培養検査で検出された菌と組織標本にみられた菌の確認を目的とする依頼もみられた。さらに、形態学的に*Aspergillus*や*Mucor*以外の糸状菌である可能性のある症例の解析依頼も増加しており、酵母状真菌においてもカンジダか否か確定困難な症例があった。これらから、ISH法、PCR法ともにより様々な真菌に対するprobe、primerを開発し、検討する必要があると思われる。

今後、形態学的に診断困難な真菌の依頼がさらに増加する可能性が示唆されており、より微量の菌や菌の状態に対応可能なプロトコルの開発が望まれる。また、より門戸を広げた対応をするためには、遺伝子補助診断法を安定して行うためのプロトコルの確立のみならず、支援を行う人材の育成が急務と思われる。

## E. 結論

昨年度、新たに設計した*Trichosporon*属を標的としたISH法におけるPNAプローブの妥当性が検証された。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

英文

Journal

1. Sasai D, Okubo Y, Ishiwatari T, Sugit

a T, Kaneko T, Murayama SY, Shimamura T, Shinozaki M, Hasegawa C, Mitsuda A, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Shibuya K. Histopathological evaluation of the efficacy of antifungals for experimental *Trichosporon* bloodstream infection. *Jpn J Infect Dis*, in press.

2. Zhi Y, Sasai D, Okubo Y, Shinozaki M, Nakayama H, Murayama SY, Wakayama M, Ide T, Zhang Z, Shibuya K. Testing for the DNA preservation in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues with comparison in usefulness for detection of fungi between polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Jpn J Infect Dis*, in press.
3. Shinozaki M, Okubo Y, Sasai D, Nakayama H, Murayama S, Ide T, Wakayama M, Ishiwatari T, Tochigi N, Nemoto T, Shibuya K. Development of a Peptide Nucleic Acid Probe to *Trichosporon* Species and Identification of *Trichosporon*osis using *In Situ* Hybridization in Formalin-Fixed and Paraffin-embedded (FFPE) Sections. 51:295-8, 2013.
4. Shimodaira K, Okubo Y, Ochiai E, Nakayama H, Katano H, Wakayama M, Shinozaki M, Ishiwatari T, Sasai D, Tochigi N, Nemoto T, Saji T, Kamei K, Shibuya K. Gene expression analysis of a murine model with pulmonary vascular remodeling compared to end-stage IPAH lung. *Respir Res*. 13:103, 2012.
5. Isobe K, Hata Y, Kobayashi K, Hirota N, Sato K, Sano G, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Takagi K, Honma S. Clinical Significance of Circulating Tumor Cells and Free DNA in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 32:3339-3344, 2012.
6. Isobe K, Hata Y, Sakaguchi S, Sato F, Takahashi S, Sato K, Sano G, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Mitsuda A, Terahara A, Shibuya K. Pathological response and prognosis of stage III non-small cell lung cancer patient treated with induction chemoradiation. *Asia-Pac J Clin Oncol*. 8:260-266, 2012.
7. Sakamoto S, Kikuchi N, Ichikawa A, Sano G, Satoh K, Sugino K, Isobe K, Takai Y, Shibuya K, Homma H. Everolimus-induced Pneumonitis after Drug-eluting Stent Implantation: A Case Report. *Cardiovasc Intervent Radiol*. [Epub ahead of print], 2012.
8. Ishikawa Y, Akasaka Y, Akishima-Fukawara Y, Iuchi A, Suzuki K, Uno M, Abe E, Yang Y, Li CP, Mukai K, Niino H, Tanaka M, Kawahara Y, Sugiura H, Shina

- gawa T, Morinaga S, Ogata K, Onuma J, Yanagida-Iida M, Taki K, Komatsu A, Satoh H, Yamada K, Shimokawa R, Shibuya K, Takahashi K, Ishii T. Histopathologic profiles of coronary atherosclerosis by myocardial bridge underlying myocardial infarction. *Atherosclerosis*. S0021-9150:00721-00726, 2012.
9. Shimamura T, Kubota N, Shibuya K. Animal model of dermatophytosis. *J Biomed Biotechnol*. 2012:125384, 2012.
  10. Watanabe M, Shiozawa K, Takahashi M, Wakui N, Otsuka Y, Kaneko H, Tanikawa K, Shibuya K, Kamiyama N, Sumino Y. Evaluation of sorafenib for hepatocellular carcinoma by contrast-enhanced ultrasonography: A pilot study. *WJG*. 18:5753-5758, 2012.
  11. Shinozaki M, Okubo Y, Sasai D, Nakayama H, Ishiwatari T, Murayama S, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Shibuya K. Development and Evaluation of Nucleic Acid-Based Techniques for an Auxiliary Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded (FFPE) Tissues. *Med Mycol J*. 53:241-5, 2012.
  12. Shimodaira K, Okubo Y, Nakayama H, Wakayama M, Shinozaki M, Ishiwatari T, Sasai D, Nemoto T, Takahashi K, Ishii T, Saji T, Shibuya K. Trends in the prevalence of invasive fungal infections from an analysis of annual records of autopsy cases of Toho University: *Mycoses*. 55:435-443, 2012.
  13. Togano T, Shibuya K, Kume H. Estimated numbers of visceral mycoses in case of leukemia and MDS in Japan: Analysis of the data from the annual of the pathological autopsy cases and vital statistics in Japan. *Med Mycol J*. 53:53-8, 2012.
  14. Sugino K, Gocho K, Ishida F, Kikuchi N, Hirota N, Sato K, Sano G, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Hata Y, Shibuya K, Uesaka T, Kurosaki A, Homma S. Acquired Hemophilia A Associated with IgG4-related Lung Disease in a Patient with Autoimmune Pancreatitis. *Intern Med*. 51:3151-4, 2012.

#### Book

1. Okubo Y, Shinozaki M, Wakayama M, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Tochigi N, Naobumi T, Shibuya K. *Applied Gene Histopathology: Identification of Fusarium Species in FFPE Tissue Sections by In Situ Hybridization*. Louise O'Connor and Barry Glynn (eds), *Methods in Molecular Biology*, 1<sup>st</sup> ed, 141

-7, 2013, Humana Press, New York

#### 和文雑誌

1. 若山 恵、篠崎 稔、渋谷和俊. 教育シリーズ: Basic mycology 病理診断. *Med Mycol J* 54: 27-37, 2013.
2. 中山晴雄, 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法による深在性真菌症に対する分子生物学的診断法の現状. *日本外科感染症学会誌*9(4):343-8, 2012.

#### 図書

1. 大久保陽一郎, 渋谷和俊. 感染症. 高島浩介・久米田裕子 編. 第1版. 印刷中, 朝倉書店, 東京.

#### 学会発表 国際学会

1. Okubo Y, Makimura K, Shinozaki M, Nakayama H, Wakayama M, Nemoto T, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Zhi Y, Ide T, Takahashi R, Shibuya K. Biological, histopathological, and genetic analyses of mice infected with *Cryptococcus gattii*. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
2. Wakayama M, Shimodaira K, Nakayama H, Shinozaki M, Okubo Y, Sasai D, Ishiwatari T, Zhi Y, Tochigi N, Hasegawa C, Mitsuda A, Nemoto T, Shibuya K. Age-related analysis on the prevalence of invasive fungal infections from autopsy records in Toho University. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
3. Shinozaki M, Okubo Y, Sasai D, Nakayama H, Murayama SY, Ide T, Wakayama M, Nemoto T, Shibuya K. Diagnosis of fungal infections by molecular techniques from formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues: A retrospective autopsy analysis of 49 cases. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, June 11-15, 2012, Berlin, Germany.

#### 国内学会

1. 杉野圭史, 石田文昭, 太田宏樹, 菊池直, 廣田 直, 佐藤敬太, 佐野 剛, 磯部和順, 坂本 晋, 高井雄二郎, 高木啓吾, 渋谷和俊, 植草利公, 黒崎敦子, 本間 栄. びまん性小粒状・すりガラス状陰影で発症し、自然軽快、再発を呈した1例. 第52回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 4/20-22, 2012

2. 小林 紘, 磯部和順, 市川敦央, 菊池直, 廣田 直, 佐野 剛, 佐藤敬太, 杉野圭史, 坂本 晋, 秦 美暢, 黒崎敦子, 渋谷和俊, 高木啓吾, 本間 栄. Gefitinib既治療後のErlotinib投与例の検討. 第52回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 4/20-22, 2012
3. 黒澤武介, 磯部和順, 菊池 直, 廣田直, 佐藤敬太, 佐野 剛, 杉野圭史, 坂本 晋, 高井雄二郎, 黒崎敦子, 渋谷和俊, 秦 美暢, 高木啓吾, 本間 栄. 悪性胸膜中皮腫の治療法別予後の検討. 第52回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 4/20-22, 2012
4. 後町杏子, 杉野圭史, 佐藤敬太, 坂本晋, 高木啓吾, 渋谷和俊, 植草利公, 本間 栄. 間質性肺炎合併肺癌における術後急性増悪の臨床病理学的検討. 第52回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 4/20-22, 2012
5. 磯部和順, 秦 美暢, 菊池 直, 廣田直, 佐藤敬太, 佐野 剛, 杉野圭史, 坂本 晋, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 黒崎敦子, 高木啓吾, 本間 栄. Non-UIP pattern間質性肺炎 (IP/nonUIP) 合併肺癌における治療後急性呼吸障害の検討. 第52回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 4/20-22, 2012
6. 中山晴雄, 渋谷和俊. DPCデータを用いた脳神経外科領域における深在性真菌症治療による医療経済効果. 第86回日本感染症学会総会学術講演, 長崎, 4/25, 2012
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, 長崎, 4/25, 2012
8. 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, 長崎, 4/25, 2012
9. 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, 長崎, 4/25, 2012
10. 若山 恵, 安藤常浩, 渋谷和俊. 東邦大学病理剖検例における過去52年間の深在性真菌症の発生動向調査. 第86回日本感染症学会総会学術講演, 長崎, 4/25, 2012
11. 笹井大督, 大久保陽一郎, 石渡誉郎, 島村 剛, 篠崎 稔, 根本哲生, 若山 恵, 杉田 隆, 金子健彦, 渋谷和俊. トリコ
- スポン血液感染症の発症機序と病態解析に関する病理学的研究. 第101回日本病理学会総会, 東京, 4/26, 2012
12. 石渡誉郎, 大久保陽一郎, 根本哲生, 若山 恵, 笹井大督, 密田亜希, 横瀬智之, 島田英昭, 五十嵐良典, 渋谷和俊. 胃癌細胞転移による肺動脈機構改変に関する研究. 第101回日本病理学会総会, 東京, 4/26, 2012
13. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮崎義継, 根本哲生, 若山 恵, 笹井大督, 石渡誉郎, 中山晴雄, 田辺公一, 金子幸弘, 山越 智, 梅山 隆, 渋谷和俊. *Cryptococcus gattii*気道感染マウスにおける肺の病理組織学的解析. 第101回日本病理学会総会, 東京, 4/26, 2012
14. 渋谷和俊. 侵襲性真菌症・臨床像 病出までの道のり. Antifungal Therapy Master Class Program 2012, 大阪, 4/14, 2012
15. 佐々木久美子, 高橋りえ, 井手 忠, 宅間健介, 根本哲生, 渋谷和俊. IPMN症例の膵液・膵管擦過標本に於ける細胞像の検討. 第53回日本臨床細胞学会総会(春期大会), 千葉, 6/1-3, 2012
16. 小林照明, 清水雅子, 千葉暢子, 羽鳥努, 密田亜希, 若山 恵, 根本哲生, 金澤真作, 渋谷和俊. 粘液様様の細胞像を示した乳腺神経内分泌癌の1例. 第53回日本臨床細胞学会総会(春期大会), 千葉, 6/1-3, 2012
17. 間崎和夫, 釘宮剛城, 青木千津, 清水雅子, 若山 恵, 石渡誉郎, 根本哲生, 渋谷和俊, 大村 剛, 森田峰人. 乳癌術後に発症した子宮腺肉腫の1例. 第53回日本臨床細胞学会総会(春期大会), 千葉, 6/1-3, 2012
18. 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. NK T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学術総会, 東京, 7/9-11, 2012
19. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮崎義継, 根本哲生, 若山 恵, 柄木直文, 笹井大督, 石渡誉郎, 中山晴雄, 田辺公一, 金子幸弘, 山越 智, 梅山 隆, 職玉珠, 北原加奈子, 渋谷和俊. クリプトコックス感染症のマウスモデルにおける肺の病理学的解析. 第23回日本生体防御学会学術総会, 東京, 7/9-11, 2012
20. 笹井大督, 杉田 隆, 金子健彦, 大久保陽一郎, 石渡誉郎, 島村 剛, 篠崎 稔, 職玉珠, 山本慶郎, 柄木直文, 若山 恵, 根本哲生, 渋谷和俊. トリコロン血流感染症のマウスモデルを用いた抗真菌薬治療効果の病理組織学的検討. 第23回日本生体防御学会学術総会, 東京, 7/9-11, 2012
21. 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, 職 珠玉, 栃木直文, 長谷川千花子, 密田亜希, 根本哲生, 渋谷和俊. 東邦大学病理解剖例における深在性真菌症発生动向調査. 第23回日本生体防御学会学術総会, 東京, 7/9-11, 2012
22. 鈴木 琢, 島村 剛, 久保田信雄, 渋谷和俊. 爪白癬動物モデルにおける病理組織学的検討. 第23回日本生体防御学会学術総会, 東京, 7/9-11, 2012
23. 石渡誉郎, 大久保陽一郎, 篠崎 稔, 中山晴雄, 根本哲生, 若山 恵, 栃木直文, 密田亜希, 長谷川千花子, 笹井大督, 山本慶郎, 職 珠玉, 渋谷和俊. *Cryptococcus gattii*感染症における病態解析. 第23回日本生体防御学会学術総会, 東京, 7/9-11, 2012
24. 中村 豊, 亀井克彦, 渋谷和俊, 山内広平. 岩手沿岸地方における津波肺*Scedosporium*感染症. 第23回日本生体防御学会学術総会, 東京, 7/9-11, 2012
25. 渋谷和俊. 深在性真菌症:画像の背景を考える. 第10回岐阜深在性真菌症フォーラム, 岐阜, 7/13, 2012
26. 渋谷和俊. 深在性真菌症における病変形成と変化. 東埼玉真菌症フォーラム, 大宮, 7/18, 2012
27. 金澤真作, 緒方秀昭, 齋藤芙美, 根本哲生, 渋谷和俊, 金子弘真. 造影の有無で比較した超音波による乳癌術前化学療法の経過観察. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 9/19-21, 2012
28. 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カス症モデルを用いた感染防御ならびに肺構築変換の解析. 第56回 日本医真菌学会総会, 東京, 11/10-11, 2012.
29. 若山恵, 下平佳代子, 中山晴雄, 篠崎稔, 大久保陽一郎, 笹井大督, 石渡誉郎, 職玉珠, 栃木直文, 長谷川千花子, 密田亜希, 根本哲生, 渋谷和俊. 東邦大学病理解剖例を用いた過去56年間の侵襲性真菌症発生动向と加齢の及ぼす影響について. 第56回 日本医真菌学会総会, 東京, 11/10-11, 2012.
30. 篠崎稔, 中山晴雄, 大久保陽一郎, 笹井大督, 職玉珠, 栃木直文, 若山恵, 村山琮明, 根本哲生, 渋谷和俊. 剖検例を用いた腸管真菌症における疫学のおよび病理組織学的検討. 第56回 日本医真菌学会総会, 東京, 11/10-11, 2012.
31. 石渡誉郎, 大久保陽一郎, 和泉春香, 佐藤史朋, 篠崎稔, 笹井大督, 中山晴雄, 栃木直文, 根本哲生, 名取一彦, 秦美暢, 若山恵, 渋谷和俊. 侵襲性肺接合菌症におけるreversed CT halo sign描出部の病

変構築. 第56回 日本医真菌学会総会, 東京, 11/10-11, 2012.

## 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

6. 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 一朗 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」のために必要となる、種特異的塩基配列の検索を行い、LAMP法をはじめとする広範な遺伝子診断法に応用可能な標的配列の取得に成功した。

A. 研究目的

一般に真菌症は特異的所見に乏しいことから、確定診断が困難である。また、真菌症起因菌の同定は困難であることから、正確な菌種同定がなされない場合が多い。そのため、現状では、必ずしも起因菌種に応じた適切な治療がなされているとは言えない。したがって、簡便かつ信頼性が高い診断ならびに起因菌同定法が必要である。

そこで、本研究では各種真菌症に対して、迅速な遺伝子診断系を開発する。また、各起因菌種に対して、信頼性の高い同定・型別法を開発する。これによって、臨床的/疫学的サンプルの内、一般的に同定不能な株を確実に同定し、国内病原真菌叢を明らかにし、起因菌に応じた適切な治療法の選択、感染等の管理を可能にすることを目的とする。

数ある真菌症のなかでも、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た、

*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。

その診断と適切な治療のためには、病原真菌としての本菌を同定する必要がある。しかし、菌種間の近縁性が極めて高い白癬菌（図1）の中で、本菌を同定できる皮膚科医は限られており、また、細菌検査室は伝統的に皮膚科検体由来真菌の扱いに不慣れであることから、本菌の同定による確実な病原診断を経ずして診断・治療がなされているケースも少なくない。

そこで前年度より、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（Loop-mediated isothermal AMplification）系を用いた迅速遺伝子検査法の研究・開発に必要な種特異的塩基配列の取得とその検討を試みている。



しかし、系統的に近縁関係にある白癬菌の中で、特定の菌種に特異的な一定（数百塩基対）以上の塩基長を有する配列を見出すことは容易ではない。昨年までの検討によって、既に報告されている核リボソーム RNA 遺伝子等を標的とした LAMP 系を開発していたが、作成したプライマーセットの中で最も特異性が高いものを利用した場合であっても、*T. tonsurans* に極めて近い *T. mentagrophytes* を識別することは困難であった（図 2）。これは、PCR 法では見られない、特異性を担保する 2 対 6 箇所の特異的配列領域から作成されるプライマー（図 3）を要求する LAMP 法特有の問題である。

そこで、むしろ既存の配列に依ること無く、本菌に特異的な新規の配列を見出し、これを遺伝子診断・同定法に利用するための研究を行うこととした。

## B. 研究方法

1. 全ゲノム塩基配列の決定に基づく *T. tonsurans* 特異的塩基配列領域の取得：新規の配列を見出すために、国立感染症研究所の石川淳博士ならびに黒田誠博士にご協力頂き、本菌と LAMP 系において識別されない *T. mentagrophytes* の全ゲノム情報を新規に取得した（表 1）。次に、DDBJ/EMBL/GenBank などに登録されている *T. tonsurans* をはじめとした、主要白癬菌のゲノム情報を取得し、*T. tonsurans* の SuperContig に対する Megablast 解析を実施（図 4、5 および表 2）した。この解析によって、理論上は *T. tonsurans* のみに存在し、他の主要白癬菌には存在しないユニークかつ相当に長い塩基配列が取得できたことになる。

ここで得られた塩基配列が、*T. tonsurans* の同定並びに同菌感染症の診断に利用出来るか否かを確認するための方法は、分子生物学的に何通りも想起される。しかし、その中も

実際的に最も容易に実施できるのは、当該配列から設計した別個の充分数の PCR プライマー対を用いた PCR 法の実施である。すなわち、同領域からいくつもの作成したプライマー対による PCR が *T. tonsurans* の異なった菌株では全て同じように陽性となり、同時に他の白癬菌種からは陽性結果が得られなければ概ね充分な結果と考えられる。

## C. 研究結果

図 6 に示されるように、本研究によって取得できた、ある特異断片から作成した *T. tonsurans* 特異的プライマーセット 10 対を用いた PCR 反応では、何れも *T. tonsurans* 種内変異は認めず、陽性の結果を得た。しかし、*T. mentagrophytes* ゲノムを含む主要白癬菌および、その他の病原真菌ゲノムの何れも陽性の結果を示さなかった。

## D. 考察

本研究によって、真に *T. tonsurans* に対してのみ特異的な塩基配列を取得できた。これは、本菌を特異的に同定し、本菌感染症を診断できる標的塩基配列を得た事を意味する。また、本法の応用として特異配列を取得する方法論が確立したことから、遺伝子診断法賦活化への基盤的な技術となることも期待できる。今後、具体的な解析系を研究開発することが必要となろう。

## 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。

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/起原因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因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

##### 論文発表

1. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, Hoog GS, Shidfar MR, Satoh K, Najafzadeh MJ, Mirhendi H: Multilocus differentiation of the relative dermatophytes *Microsporum canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. *J Med Microbiol*, Jan;61(Pt 1):57-63, 2012
2. Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K : Chronic cough in a tsunami-affected town. *Pulm Pharmacol Ther*, Feb;25(1):11, 2012
3. Kaneko T, Murotani M, Ohkusu K, Sugita T, Makimura K: Genetic and

biological features of catheter-associated *Malassezia furfur* from hospitalized adults *Med Mycol*, 50:74-80, 2012

4. Zhang E, Tanaka T, Tsuboi R, Makimura K, Nishikawa A, Sugita T: Characterization of *Malassezia* microbiota in the human external auditory canal and on the sole of the foot. *Microbiol Immunol*, Apr;56(4):238-44, 2012
5. Kido N, Makimura K, Kamegaya C, Shindo I, Shibata E, Omiya T, Yamamoto Y: Long-term surveillance and treatment of subclinical cryptococcosis and nasal colonization by *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complex in captive koalas (*Phascolarctes cinereus*). *Med Mycol*, Apr;50(3): 291-298, 2012(case reports)(04 June 2011 accepted)
6. Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K, Satoh K: The definitive diagnostic process and successful treatment for ABPM caused by *Schizophyllum commune*: A report of two cases. *Allergology International* 61(1) : 163-9, 2012 ( accepted in 2011 July 1)
7. Fujisaki R, Yamamura M, Abe S, Shimogawara K, Kasahara M, Nishiya H, Makimura M, Makimura K: A case study of measles vaccination for university students during measles outbreak in Tokyo, Japan, 2007. *J Infect Chemother*, 18:341-346, 2012
8. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, De Hoog GS, Shidfar MR, Satoh K, Najafzadeh MJ, Mirhendi H:

- Discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton equinum* by PCR-RFLP and by  $\beta$ -tubulin and Translation Elongation Factor 1- $\alpha$  sequencing. *Med Mycol*, 50(7):760-764, 2012
9. Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K: Possible roles of 2 basidiomycetous fungi in allergic fungal respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*, Jul;130(1):279-80, 2012 (2012 March 25 accepted)
  10. Yamazaki T, Ito M, Nishiyama Y, Okubo Y, Makimura K: Phenotypic characterization of *Aspergillus niger* and *Candida albicans* grown under simulated microgravity using a three-dimensional clinostat. *Microbiol Immunol*, Jul;56(7):441-446, 2012
  11. Zarrinfar H, Saber S, Makimura K, Fata A, Geramishoar M, Mirhendi H: Mycological microscopic and culture examination of 400 bronchoalveolar lavage (BAL) samples. *Iran J Publ Health* Jul;41(7): 70-76, 2012
  12. Yamada Y, Nishioka G, Makimura K, Oka M : Localized cutaneous fusariosis after long-term topical application of corticosteroids in a healthy elderly woman. *Eur J Dermatol*, Jul-Aug;22(4):555-9, 2012
  13. Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K: Hypothesis for future management of *Schizophyllum* allergy in asthma control. *Pulm Pharmacol Ther*, Aug;25(4):335-336, 2012
  14. Iwata A, Alshahni MM, Nishiyama Y, Makimura K, Abe S, Yamada T: Development of a tightly regulatable copper-mediated gene switch system in dermatophytes. *Appl Environ Microbiol*, Aug;78(15):5204-5211, 2012
  15. Goto K, Yamamoto M, Asahara M, Tamura T, Matsumura M, Hayashimoto N, Makimura K: Rapid Identification of *Mycoplasma pulmonis* isolated from laboratory mice and rats using Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *J Vet Med Sci*, Sep;74(8):1083-1086, 2012 (2012 April 13 accepted)
  16. Li H, Takeshita T, Furuta M, Tomioka M, Shibata Y, Shimazaki Y, Makimura K, Yamashita Y: Molecular characterization of fungal populations on the tongue dorsum of institutionalized elderly adults. *Oral Dis*, Nov;18(8):771-777, 2012
  17. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, de Hoog S, Shidfar MR, Zaini F, Eshraghian M, Naghan PA, Mirhendi H: Molecular epidemiology of dermatophytosis in Tehran, Iran, a clinical and microbial survey. *Med Mycol*. 2012 May 15. [Epub ahead of print]
  18. Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, Makimura K: Role of fungal colonization for sensitization in asthma. *Clin Exp Allergy*, Oct;42(10):1540-1, 2012
  19. Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, Shidfar M, Zaini F, Eshraghian M, Jalalizand N, Nouripour-Sisakht S, Hosseinpour L, Mirhendi H: Use of Single-enzyme PCR-restriction Digestion Barcode Targeting the

- Internal Transcribed Spacers (ITS rDNA) to Identify Dermatophyte Species. Iran J Public Health, 41(3):82-94, 2012
20. Miyajima Y, Satoh K, Uchida T, Yamada T, Abe M, Watanabe SI, Makimura M, Makimura K: Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. J Dermatol Sci 2012 Dec 5.in press
21. Haruhiko Ogawa, Masaki Fujimura, Koichi Makimura and Yasuo Takeuchi: Clinical experience with low-dose itraconazole in chronic idiopathic cough. Cough, 2013. Jan 1 accepted
22. Hossein Zarrinfar et al: Incidence of pulmonary aspergillosis and correlation of conventional methods with Nested-PCR and Real-time PCR assay using BAL fluid in Intensive Care Unit patients. J Clin Lab Anal, accepted in 2013. Jan 4
23. 山浦真理子、榎村浩一: 【真菌と免疫・アレルギー】環境真菌とアレルギー(解説/特集). アレルギーの臨床, Jul;32(7):629-632, 2012
24. 榎村浩一: 「真菌症のゲノム診断」<シンポジウム I>ゲノムから見た感染症. Neuroinfection, 17(1):17:42-17:47, 2012
25. 榎村浩一: 病原体と遺伝子検査「真菌 (*Pneumocystis jirovecii* を含む)」微生物に関連した分子生物学的検査の基礎から応用まで 2.応用編. 臨床と微生物(近代出版), 39(増刊号): Oct;557(069)-562(074), 2012

## 学会発表

- 1) 1) 浜野 真紀, 矢野 正一郎, 大西 誉光, 渡辺 晋一, 榎村 浩一: スポロトリコーシスの1例(会議録/症例報告) 日本皮膚科学会雑誌 122 (1): 114, 2012.01
- 2) 榎村浩一: 仮題: 真菌に関する最近のトピックスなど. 第26回感染症コンサルテーションの会, 東京 (東京都済生中央病院), 2012年1月21日(土) **特別講演**
- 3) 榎村浩一: 汚染指標菌の迅速検査・同定法とその実際: カビ. 第2回製品の微生物品質を確保する迅速検査・同定技術, 東京 (飯田橋レインボービル), 2012年3月9日(金)
- 4) 榎村浩一: 人工的閉鎖環境における真菌と関連する健康障害. 室内環境学会微生物分科会, 東京, 2012年3月15日(木)
- 5) Kazuo Satoh, Koichi Makimura: Classification of new species and analysis of the basidiomycetous yeast biota of the koala. 第85回日本細菌学会総会, 長崎 (長崎ブリックホール), 2012年3月27~28日 (日本細菌学会, 67(1):120 No.30, 2012) ポスター
- 6) Somay Murayama, Tsuyoshi Yamada, Koichi Makimura: Electrophoretic Karyotyping of *Trichophyton mentagrophytes sensu lato*. 第85回日本細菌学会総会, 長崎(長崎ブリックホール), 2012年3月27~28日 (日本細菌学会, 67(1):121 No.30, 2012) ポスター
- 7) Koichi Makimura, Tsuyoshi Yamada, Kazuo Satoh, Somay Murayama, Makoto Kuroda, Yasutaka Hoshino, Jun Ishiyama: Draft genome analysis of tinea pathogen: *Trichophyton mentagrophytes*. 第85回日本細菌学会総会, 長崎 (長崎ブリックホール), 2012年3月27~28日 (日本細菌