

2013/8042A

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及び検査・治療法の確立と
サーベイランスに関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成26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及び検査・治療法の確立と
サーベイランスに関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成26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 25 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及び検査・治療法の確立とサーベイランスに関する研究」

班員名簿

氏 名	所 属	職 名
河 野 茂	長崎大学大学院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 真菌部	部 長
三 嶋 廣 繁	愛知医大病院 感染制御部	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	帝京大学大学院医学研究科 医真菌学	教 授
比留間 政太郎	お茶の水真菌アレルギー研究所	所 長
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 感染分子病態解析学分野	教 授
宮 崎 泰 可	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座	助 教
山 越 智	国立感染症研究所 真菌部	主任研究官
掛 屋 弘	大阪市立大学 臨床感染制御学	准 教 授

目 次

I. 真菌感染症の病態解明及び検査・治療法の確立とサーベイランスに関する研究 総括研究報告書（平成 25 年度）	1
河野 茂（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 呼吸器病態制御学講座）	
II. 分担研究報告書	
1. 臨床サンプルを用いた新規アスペルギルス症診断法の検討	5
宮崎 義継（国立感染症研究所 真菌部）	
2. 外科系・救急領域のカンジダ血症における β -D-グルカンの臨床的意義に関する研究	11
三嶋 廣繁（愛知医科大学感染症科）	
3. 病状と病原性に関する研究	14
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. 遺伝子補助診断法を活用した病理診断リファレンス活動の現状に関する研究	16
渋谷 和俊（東邦大学医学部 病院病理学講座）	
5. 新興・日和見真菌症の管理に寄与する実験室的診断法等の開発に関する研究	24
横村 浩一（帝京大学大学院 医学研究科 宇宙環境医学研究室）	
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 —5年間にわたる調査結果とガイドラインの有用性検討—	38
比留間 政太郎（お茶の水真菌アレルギー研究所）	
7. トリコフィトン トンスランス感染症の集団検診法・迅速診断法の開発と、診療能力の 向上に関する応用研究	44
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	48
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. マウスモデルを用いた難治性クリプトコックス症の発症病態の解明	55
川上 和義（東北大学大学院医学系研究科）	
10. 病原真菌 <i>Candida glabrata</i> における多剤耐性機序の解明	61
宮崎 泰可（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座）	
11. 診断治療研究・アスペルギルス症	67
山越 智（国立感染症研究所 真菌部）	
12. 血液疾患における糸状菌感染症の新規診断キットの有用性に関する研究	71
掛屋 弘（大阪市立大学 臨床感染制御学）	

I. 総括研究報告書

真菌感染症の病態解明及び検査・治療法の確立とサーベイランスに関する研究

研究代表者 河野 茂 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 呼吸器病態制御学講座

研究要旨

一般施設で診断・治療が困難な真菌症のサーベイランス体制の構築・維持ならびに、公衆衛生学的に重要な真菌症に関するガイドライン等の充実により疫学情報や治療指針の充実を図ることを最終目標として、呼吸器、血液内科、皮膚科、外科、病理、希少真菌症、渡航者感染症の各領域において臨床と基盤研究グループとが連携し、課題に関する研究を行った。得られた結果を基にガイドラインの改訂や評価を行った。

A. 研究目的

わが国における真菌症対策において、他先進諸国と比較して疫学情報や診療指針が不足している。したがって、本研究班では病態の解明や診断治療法の研究と共に情報発信のためのサーベイランスネットワークの構築・維持、ならびに、ガイドラインの充実によって真菌感染症の診断治療を充実させることを主たる目的とする。

B. 研究方法

各分担研究者は、深在性真菌症や皮膚真菌症における、診断検査、病態解析、新規抗真菌薬開発のそれぞれの専門領域で問題となる課題に対し、臨床と基盤研究グループとが連携して、解決をはかるための研究を推進する。具体的には疫学調査や、ガイドライン等に記載すべき診断・治療方法の確立を目指した応用研究を行いエビデンスの創成を図る。

1. 深在性真菌症

1) ネットワークを利用した疫学調査と診療支

援の実施

- ① 輸入真菌症の発生動向調査を行った。
- ② 造血幹細胞移植領域における侵襲性カンジダ感染症の調査研究を行った。
- ③ 病理組織診断ネットワークを運用し、真菌症診断支援を実施した。

2) 診断法の構築・検討

- ① カンジダ血症における β -D-グルカン値と予後との関連について検討した。
- ② ISH (in situ hybridization) 法において、*Pseudallescheria* 属の検出を目的とした Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 アンチセンス Peptide Nucleic Acid (PNA) プロローブを新たに作成した。
- ③ 新規ヒストプラズマ抗原を用いた ELISA 法の有用性について、臨床検体を用いた検証を行った。

3) 病態解析・開発研究

- ① 主要原因真菌である *Aspergillus fumigatus* の細胞外蛋白質のうち、病原性に関与し治療薬標的になる候補としてシグナルシークエンス トラップ (SST-REX) 法により網羅的に同定し

たが、複数のタンパク質についてELISA検出方の評価を行った。

② *Cryptococcus neoformans*の肺感染モデルを用いて免疫学的解析を行い、今年度はIL-17Aとtype I IFNの役割についてそれぞれの遺伝子欠損マウスを用いた検討を行った。

③クリプトコックス特異的T細胞抗原受容体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作成を行い、並行してクリプトコックス感染免疫応答機序の解明を行った。

④ *Candida glabrata*において多剤耐性を獲得する新たな遺伝子変異の同定を行った。

4)ガイドライン

①深在性真菌症診断・治療ガイドライン2014年版のパブリックコメントの募集を行い、2014年中に出版予定である。

2. 皮膚真菌症

1)疫学調査・サーベイランスネットワークの構築・維持

①格闘技選手、学校内、家族、友人の間で流行しており、真菌症新興感染症の一つとして問題となっている *Trichophyton tonsurans*感染症に関して実態調査、追跡調査、集団検診を施行した。

②前回までに *Trichophyton tonsurans*感染症に対して作成したガイドラインに基いた治療の成功率について検討した。

2)診断法の構築・検討

① *T. tonsurans*特異的LAMP系を臨床検体に適用するために、反応時間の加速・感度向上などを目的としてLoop primerを開発した。

②TOF-MSを用いた *Malassezia*属同定のためのデータベースを開発した。

③ *T. tonsurans* の迅速同定法としての硬膜胞子様構造物鏡検法の有用性を検討した。

④新たに真菌として再分類された *Microsporidia* (微孢子虫) の培養・検出法を確立し、診断法・抗真菌薬感受性測定法および

感染病態メカニズム解析の基盤を構築した。

3)病態解析

① *T. tonsurans*感染症の発症機序に関する各種サイトカインの動態を解明を行った。

② *T. tonsurans* 感染症の臨床症状について解析を行った。

5)ガイドライン

①2012年度に公表した「*Trichophyton tonsurans*感染症 ブラシ検査・治療・予防のガイドライン第5版」の評価を行った。

C. 研究結果

1. 深在性真菌症

1)疫学調査・サーベイランスネットワークの構築・維持

①千葉大学真菌医学研究センター及び国立感染症研究所に対する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を集計、基礎データを作製し、輸入真菌症の疫学調査を行った。更に報告症例等のデータを補完した。2013年はコクシジオイデス症4例、ヒストプラズマ症1例、パラコクシジオイデス症1例、マルネツフェイ型ペニシリウム症1例が報告されていた。

②2008年12月から2012年11月までに、虎の門病院で同種造血幹細胞移植を受けた513例(臍帯血361例、骨髄101例、末梢血幹細胞51例)を対象に、後ろ向き調査を行った。19例(3.7%)でカンジダ血症(breakthrough candidemia)が生じた。原因菌種は *C. parapsilosis* (6例), *C. glabrata* (5例), *C. guilliermondii* (3例), *C. albicans* (1例), *C. krusei* (1例), *C. tropicalis* (1例), *Candida* spp. (2例)であった。

③東邦大学医学部病理学講座において2013年4月~2014年1月における他施設からの真菌症診断依頼は12例であった。判定された菌種については、*Aspergillus*属0件、*Mucor*2件、*P*

seudallescheria 0 件、*Fusarium* 0 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現時点で菌種が確定できなかった症例が 2 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 件であった。また光顕標本で病原真菌が認められなかった症例が 5 件あり、この中には標本中に混入した食物残渣や環境由来菌による汚染と思われた症例がみられた。

2) 診断法の構築・検討

① *A. fumigatus*, *A. terreus*, *P. boydii*, *F. solan* 感染マウスにおける *Pseudallescheria* 属を標的とした PNA プローブの特異性に関する検討では、*P. boydii* の菌体に特異的なシグナルを認め、他の 3 菌種ではシグナルを認めなかった。一方、Panfungal プローブによる ISH 法では全ての菌の菌体にシグナルが認められ、評価可能な核酸の保存性が検証された。

② 新規ヒストプラズマ抗原を用いた ELISA 法検討で用いた検体において、90 検体中 1 検体のみが抗原との十分な反応を示した。この陽性検体が限られていた理由として、上記の高バックグラウンドが一つの要因と考えられるが、更にヒストプラズマ症と確定診断された検体が少なく、一部は HIV 陽性でもあり、ELISA によって陽性となる可能性が十分に高くなかったために 90 検体中 1 検体のみが抗原との十分な反応を示す結果となったと推測された。

3) 病態解析

① カンジダ血症において初期の β -D-グルカン値 < 259 pg/mL で、治療成功を予測することが可能であることが示唆された。その場合の感度は 70%、特異度は 35% であった。また、菌種別、血液培養初回陽性時の β -D-グルカン値は、*C. glabrata* が他菌種に比べ優位に高い値であった。

② *A. fumigatus* の細胞外蛋白質の中で機能不明だが構造上ユニークな Y69 蛋白質の病原

性を調べた。*A. fumigatus* の Y69 遺伝子欠損株を解析した結果、血清存在下で生育速度が低下し、マウス感染モデルで病原性に関与することが明らかとなった。

2. 皮膚真菌症

1) 疫学調査・サーベイランスネットワークの構築・維持

① *T. tonsurans* 感染症の疫学調査のために全国 16 都県で 2011 年から 2013 年秋までに分離され、登録されてた 117 株についてリボソーム RNA 遺伝子のタイプによる分子疫学的検討を行った。その結果、NTS I 型 113 株、NTS II 型 3 株、NTS III 型 1 株であり、2010 年以前の報告例より NTS I 型の割合が高かった。一方、金沢医科大学病院皮膚科外来において 2011 年の 1 年間に原因菌種の決定を試みた白癬 433 病巣のうち *T. tonsurans* に起因するものはなかった（菌種確定は 433 検体中 327 検体、75.5%）。

② 2008 年～ 2013 年までの東京学生柔道連盟加盟柔道選手（50 大学チーム・延べ 7,489 名）に対して介入研究を行った。毎年 4 月に Hairbrush 培養検査を行い、陽性者は治療を行った。本症の罹患状況は、白癬の既往のある者は、約 65% で、Hairbrush 培養陽性者は、2008 年度には 11.3% であったが、その後は 6.5% へ低下した。培養陽性者における無症候キャリアについては、毎年のは平均は 92.0% であり、症状のある者は集団全体からみると 0.65% であった。

2) 診断法の構築・検討

① *T. tonsurans* 検出の為の LAMP 系に対して、検出速度を倍増できる Loop primer を開発し、その有用性を確認した。

② *T. tonsurans* の迅速同定法の一つとして前年度までに有用と考えられた硬膜胞子様構造物 (chlamyospore-like structures) の検鏡法に関する感度を検討した。培養 5 日目に判定

した場合、感度は 92%、培養 8 日目で判定した際の感度は 100%であった。

D. 考察

深在性真菌症、皮膚真菌症共に発生動向や患者数などの疫学調査はサーベイランスネットワークを維持し、特に重篤な糸状菌感染症やトリコフィトン・トンズランス感染症など感染性の高い疾患について今後も継続する必要がある。

診断法として ISH 法を用いた診断法や *T. tonsurans* の迅速同定法として硬膜孢子様構造物の観察の有用性を検討するなど新たな診断法については今後も検討が必要である。

E. 結論

上記の調査・研究より得られた結果を基にガイドラインの改訂や評価を行っていく。

F. 健康危険情報

各分担報告書参照

G. 研究発表

論文発表

各分担報告書参照

学会発表

各分担報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

各分担報告書参照

実用新案登録

各分担報告書参照

その他

特になし

Ⅱ. 分担研究報告書

臨床サンプルを用いた新規アスペルギルス症診断法の検討

研究分担者 宮崎義継 国立感染症研究所 真菌部
研究協力者 大野秀明、山越 智、梅山 隆
国立感染症研究所 真菌部第一室

研究要旨 アスペルギルス症の診断にはアスペルギルスガラクトマンナン抗原が比較的信頼性の高い検査として使用されているが、未だに感度、特異度など課題の多い検査である。本研究では、それを克服する新しい検査システムの構築を目指している。これまでに *Aspergillus fumigatus* の細胞外蛋白質の網羅的同定を行い、その中から 3 種類の細胞外蛋白質についてサンドイッチ ELISA 系構築をした。今年度は、ヒト血清を対象とした場合の問題点を解決するために条件検討を行った。

A. 研究目的

高齢化や医療水準の向上、あるいは移植等医療技術の普及に伴い、免疫力の低下した患者の増加し深在性真菌症も近年増加傾向を示している。その中でもアスペルギルス症はもっとも頻度が高いと考えられている。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、血液悪性疾患の患者では約 80%の感度を有しているが、慢性肺疾患等の基礎疾患では特異度が低く、迅速で適切な治療をするためには、より感染実態を反映する新しい診断系の確立が求められている。

このような背景のもと、これまでに、アスペルギルス症の原因真菌で最も多い *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) を対象とし、早期診断系の作製を念頭に、新たな標的抗原の検索を行い、3 種類の細胞外蛋白質に対するサンドイッチ ELISA 系構築してきた。しかし、サンプルとして血清を用いた場合、バックグラウンド、感度に於いて問題があったので、今年度は、ヒ

ト健常人血清を用いてバッファ系等条件検討を行い系の再構築を行った。

B. 研究方法

1. 大腸菌による組換え蛋白質の作製

シグナルシーケンストラップ (SST-REX) 法を用いた網羅的スクリーニングによって得られた 3 種類の細胞外蛋白質 (Y1, B11a, B11b) の cDNA を pGEX-6P-His6-FLAG pMAL-c4X-Strep-tagII に組み込み、大腸菌を使い大量産生を行った。GST あるいは MBP との融合蛋白質を、Glutathione Sepharose カラムあるいはアミロース resine カラムにより精製し、サンドイッチ ELISA の添加回収サンプルに使用した。

2. 抗体の精製

各蛋白質に対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、いずれも protein G セファロースカラムにより精製した。

3. サンドイッチ ELISA

各蛋白質に対するモノクローナル抗体を 1

次抗体として用いた。2次抗体として各蛋白質のポリクローナル抗体を、NHS-LC-biotin (PIEACE 社) にてビオチン化したものを用いた。1次抗体を 100 mM 炭酸 Buffer (pH 9.5) 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、ブロッキング試薬でブロッキングを 1 時間室温で行った。サンプルを載せ、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。Neutravidin-POD 溶液を加え、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、2 N の塩酸を加え反応停止し、450 nm で吸光度を測定した。

ヒト健康人血清に、大腸菌により作製した組換え体蛋白質を加えサンプルとし、1次抗体の種類、抗体の希釈度、希釈溶液について、高い回収率が得られる条件を検討した。

C. 研究結果

これまで構築したプロトタイプ ELISA 系は、ヒト血清を用いた場合バックグラウンドが上昇し、感度が下がることが明となったので、健康者の血清に対して組換え蛋白質を加える添加回収実験を指標に条件検討を行った。

1. Y1 蛋白質サンドイッチ ELISA 法

4 種類のモノクローナル抗体の選択および希釈度、ブロッキング溶液、1次抗体希釈溶液、2次抗体希釈溶液の検討を行った。

	添加量	ng/ml		期待値	回収率
		測定値	二重測定平均		
血清 1 ・ 2 5 %	0.00	565.47	700.87	-	-
		836.27			
	1000.00	1150.79	1055.74	1700.87	35%
		960.69			
5000.00	2487.06	2448.89	5700.87	35%	
	2410.73				

図 1. 80 倍希釈の血清に対する Y1 組換え体蛋白質の添加回収実験

感度については数百 ng/ml を保つことが出来たが、もっとも高感度だった実験系でも図 1 のように 80 倍希釈した血清を用いても回収率が 30 % 程度と低いものであった。

2. B11a 蛋白質サンドイッチ ELISA 法

6 種類のモノクローナル抗体の選択および

	添加量	ng/ml		期待値	回収率
		測定値	二重測定平均		
血清 1 ・ 2 5 %	0.00	0.18	0.17	-	-
		0.17			
	1.00	0.39	0.39	1.17	22%
		0.40			
5.00	1.31	1.31	5.17	23%	
	1.32				

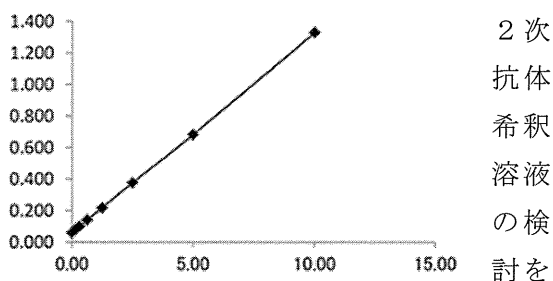
希釈度、ブロッキング溶液、1次抗体希釈溶液、2次抗体希釈溶液の検討を行った。

図 2. 80 倍希釈の血清に対する B11a 組換え体蛋白質の添加回収実験

感度については数百 ng/ml を保つことが出来たが、もっとも良かった系でも図 2 のように 80 倍希釈した血清を用いても回収率が 20 % 程度と低いものであった。

3. B11b 蛋白質サンドイッチ ELISA 法

9 種類のモノクローナル抗体の選択および希釈度、ブロッキング溶液、1次抗体希釈溶液、



行った。

図 3. 再構築した B11b サンドイッチ ELISA 系の標準曲線

	ng/ml				回収率
	添加量	測定値	二重測定平均	期待値	
血清 1 2 5 %	0.00	0.00	0.01	-	-
		0.01			
		0.98			
	1.00	1.02	1.00	1.01	99%
		5.01	4.75	5.01	95%
		5.00			

図 4. 80 倍希釈の血清に対する B11b 組換え体蛋白質の添加回収実験

図 3 のように感度については 100-300 ng/ml を保つことが出来た。さらに図 3 のように 80 倍希釈した血清を用いて回収率が 100 %近い値を得た。同じ系で 40 倍希釈の血清を用いても約 8 割の回収率を得ている。

D. 考察

今年度は、ヒト健常人血清を用いて、添加回収実験を行った。Y1 および B11a 蛋白質に関しては血清の希釈が 80 倍であっても血清の影響があり十分な感度が得られなかった。抗体の質が問題と考えられ、今後モノクローモノクロの系で再構築し検討をする必要がある。B11b に関しては、80 倍希釈でほぼ添加した量を検出することが出来た。また、20 倍希釈であっても 50 %程度の回収率を得ており、今後患者血清を使用しその有用性を検討することが可能と考えられた。

E. 結論

SST-REX 法を用いて得られた *A.fumigatus* の細胞外蛋白質のなかで 3 つの蛋白質 Y1, B11a, B11b について、ヒト健常人血清を用いた添加回収実験により条件検討し、サンドイッチ ELISA 法の再構築を行った。その結果、B11b のサンドイッチ ELISA 系は患者血清を使ってその有用性を確かめるのに最も適していることが分かった。他の 2 つの蛋白質に関しては、今後モノクローモノクロの系を構築する予定である。

G. 研究発表

論文発表

英文

1. Nagi M, Tanabe K, Ueno K, Nakayama H, Aoyama T, Chibana H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y. The *Candida glabrata* sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter Aus1p, is regulated by iron limitation. *Mol Microbiol.* 88:371-381, 2013.
2. Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol.* 51:252-260, 2013.
3. 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.* 51:385-395, 2013.
4. Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Matsumoto S, Ohno H, Miyazaki Y. Real-time microscopic observation of *Candida* biofilm development and effects due to micafungin and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2226-2230, 2013.
5. Hosogaya N, Miyazaki T, Nagi M, Tanabe K, Minematsu A, Nagayoshi Y, Yamauchi S, Nakamura S, Imamura Y,

- Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kugiyama K, Kohno S. The heme-binding protein Dap1 links iron homeostasis to azole resistance via the P450 protein Erg11 in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 13:411-421, 2013.
6. Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Infect Dis.* 66:216-221, 2013.
 7. Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y, Yamaguchi H, Shibuya K. How Histopathology Can Contribute to an Understanding of Defense Mechanisms against Cryptococci. *Mediators Inflamm.* 2013:465319, 2013.
 8. Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother.* 19:999-1003, 2013.
 9. Miyasaka T, Akahori Y, Toyama M, Miyamura N, Ishii K, Saijo S, Iwakura Y, Kinjo Y, Miyazaki Y, Oishi K, Kawakami K. Dectin-2-dependent NKT cell activation and serotype-specific antibody production in mice immunized with pneumococcal polysaccharide vaccine. *PLoS One.* 8:e78611, 2013.
 10. Kaneko Y, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against *Candida albicans*. *J Infect Chemother.* 19:1141-1145, 2013.
 11. Tarumoto N, Kinjo Y, Kitano N, Sasai D, Ueno K, Okawara A, Izawa Y, Shinozaki M, Watarai H, Taniguchi M, Takeyama H, Maesaki S, Shibuya K, Miyazaki Y. Exacerbation of Invasive *Candida albicans* Infection by Commensal Bacteria or a Glycolipid Through IFN- γ Produced in Part by iNKT Cells. *J Infect Dis.* in press.
- 邦文
1. 宮崎義継, 田辺公一, 梅山 隆, 名木 稔, 金子幸弘, 山越 智, 上野圭吾, 金城雄樹, 大川原明子, 大野秀明. アスペルギルス症. *感染症道場.* 2:20-23, 2013.
 2. 町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 小原一記, 池田康紀, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田 健. 経気管支鏡肺生検および気管支肺胞洗浄にて診断された慢性肺コクシジオイデス症の1例. *日本呼吸器学会雑誌.* 2:274-278, 2013.
 3. 大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 -新興・再興感染症 up to date-. *化学療法の領域.* 29 S-1:1144-1151, 2013.
 4. 金子幸弘, 浦井 誠, 宮崎義継. カラーグラフィック連載「目で見る真菌と真菌症」 4. 治療薬の選択と投与. *化学療法の領域.* 29:4-14, 2013.
 5. 大野秀明, 宮崎義継. 真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断. *臨床神経学.* 53:1191-1193, 2013.
 6. 浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継. ミニ特集 22 微生物の共存・共生と相互作用 ヒト

vs 真菌 vs 細菌-人類の敵の敵は、味方か敵か. 日本乳酸菌学会誌. 24:177, 2013.

7. 梅山 隆, 宮崎義継. 幅広い微生物検査を目指して一検出度は低い医学的に重要な細菌・真菌感染症の検査法. 臨床と微生物. 40:616-620, 2013.

学会発表 国際学会

1. Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y. Epidemiology of imported mycoses in Japan-its past and the present status. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. June 5-8, 2013.
2. Umeyama T, Yamagoe S, Tanabe K, Nagi M, Kaneko Y, Kinjo Y, Ohno H, Miyazaki Y. Mps1 kinase is required for normal nuclear segregation in *Aspergillus fumigatus*. 2013 Congress of Asia Pacific Society for Medical Mycology. June 19-23, 2013, Chengdu, China.

国内学会

1. 金子幸弘, 宮崎義継. 重篤な真菌感染症. 知の市場. 5月28日, 2013年, 東京.
2. 大野秀明, 宮崎義継. 中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩-真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断-(シンポジウム). 第54回日本神経学会学術大会. 5月29-6月1日, 2013年, 東京.
3. 金子幸弘, 宮崎義継. リアルタイム観察によるカンジダバイオフィルムに対するミカファンギンの効果の解析. 第87回日本感染症学会学術講演会、第61回日本化学療法学会総会. 6月5-6日, 2013年, 横浜.
4. 細萱直希, 宮崎泰可, 田辺公一, 武田和明, 吉田將孝, 井手昇太郎, 平野勝冶, 峰松明日香, 永吉洋介, 森永芳智, 中村茂樹, 今

村圭文, 泉川公一, 掛屋 弘, 柳原克紀, 宮崎義継, 田代隆良, 河野 茂. *Candida glabrata* において鉄欠乏がアゾール系抗真菌薬感受性を誘導する分子生物学的機序の解明. 第87回日本感染症学会学術講演会、第61回日本化学療法学会総会. 6月5-6日, 2013年, 横浜.

5. 金城雄樹, 樽本憲人, 北野尚樹, 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. 細菌・カンジダ共感染モデルでの真菌感染増悪における NKT 細胞の関与. 第24回日本生体防御学会学術総会. 7月10-12日, 2013年, 熊本.
6. 宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. パネルディスカッション 病原体サーベイランスの現状と課題 「国立感染症研究所の立場から」. 衛生微生物技術協議会第34回研究会. 7月11-12日, 2013年, 名古屋.
7. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木 稔, 金子幸弘, 金城雄樹, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* の Polo-like キナーゼは菌糸伸長と分生子形成を制御している. 第57回日本医真菌学会総会・学術集会. 9月27-28日, 2013年, 東京.
8. 金城雄樹, 樽本憲人, 笹井大督, 大川原明子, 上野圭吾, 篠崎 稔, 渋谷和俊, 前崎繁文, 宮崎義継. 細菌・カンジダ共感染マウスモデルを用いた真菌感染増悪機構の免疫学的解析. 第57回日本医真菌学会総会. 9月27-28日, 2013年, 東京.
9. 樽本憲人, 金城雄樹, 大川原明子, 上野圭吾, 宮崎義継, 前崎繁文. 全身性 *Candida albicans* 感染症における iNKT 細胞の役割. 第57回日本医真菌学会総会. 9月27-28日, 2013年, 東京.
10. 浦井 誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans* のアゾール感受性に対する併用薬の影響と

- 作用機構に関する検討. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.
11. 名木 稔, 田辺公一, 中山浩伸, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 梶原 将, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* における ABC タンパク質 Aus1p の細胞外ステロール取り込みと病原性における役割. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.
 12. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 名木 稔, 知花博治, 亀井克彦, 宮崎義継. 日本のキャンディン耐性カンジダの現状. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.
 13. 大野秀明, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染書の病態解析 (シンポジウム 4). 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.
 14. 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, 石渡誉郎, 中山晴雄, 下平佳代子, 安藝恭子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 渋谷和俊. ガッティ型クリプトコックス症に関する感染防御機構ならびに病原因子の解析. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会. 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.
 15. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木 稔, 金子幸弘, 金城雄樹, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* の Mps1 キナーゼは正常な核の分裂に必要である. 第 7 回アスペルギルス研究会. 9 月 7 日, 2013 年, 東京.
 16. 金城雄樹, 金子幸弘, 朴 貞玉, 川上和義, 大石和徳, 宮崎義継. 肺炎球菌蛋白・糖脂質併用ワクチンのマウスモデルによる評価. 第 62 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 60 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 10 月 30-11 月 1 日, 2013 年, 東京.
 17. 渡邊祐里絵, 宮坂智充, 石井恵子, 金城雄樹, 宮崎義継, 大石和徳, 川上和義. 肺炎球菌莢膜多糖ワクチンによる Dectin-2 依存的な NKT 細胞活性化と抗体産生. 第 62 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 60 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 10 月 30-11 月 1 日, 2013 年, 東京.
- 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

外科系・救急領域のカンジダ血症における β -D-グルカンの臨床的意義に関する研究

研究分担者 三嶋 廣繁 愛知医科大学感染症科

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 外科系・救急領域におけるカンジダ血症において、代表的な血清学的補助診断法である β -D-グルカン値と最終死亡率に関する検討から、初期の β -D-グルカン値が259pg/mL未満であれば治療成功を予測することが可能であることが明らかになった。

A. 研究目的

侵襲性カンジダ症の診断法として、菌体の細胞壁構成成分の(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンの測定法が知られており、近年、高 β -D-グルカン値症例の死亡率が高いことが報告されている。今回、深在性真菌症を疑い β -D-グルカン値を測定したカンジダ血症についてその予後との関連について検討した。

B. 研究方法

2005年2月～2013年6月までの間に愛知医科大学病院検査室から検出された血液培養由来カンジダ検出例597例のうち、重複例を除外した初回検出例で、初回血液培養採取前後3日目以内の β -D-グルカンのデータが得られた177例と対象とした。

β -D-グルカン値の測定はファンギテックGテストMK IIを用いた。

ロジスティック回帰分析を用いて、従属変数に14日予後、28日予後、最終予後の3群に分け、独立変数を初回 β -D-グルカン値で検討し、 $p < 0.05$ と有意差が得られたモデル式からROC曲線を作成しBDGのカットオフ値を算出した。

菌種ごとに群分けし、Student t -testを用い $p < 0.05$ を有意とした。その後、菌種と予後別の生存率を検出した。

統計解析にはJMP®8を用いた。

C. 研究結果

1. 患者背景

階層対象は177例で男性123 (65.9%)であった。年齢は 65.9 ± 19.1 歳 (3～94歳)であった。検出菌種は*Candida albicans* 79株 (44.6%)、*Candida parapsilosis* 44株 (24.9%)、*Candida glabrata* 27株 (15.3%)、*Candida tropicalis* 18株 (10.2%)、*Candida guilliermondii* 7株 (4.0%)、その他の*Candida*属2株 (1.1%)であった。

2. 予後と β -D-グルカン

14日死亡、28日死亡、最終死亡の3群において、 β -D-グルカン値を独立変数としてロジスティック回帰分析を実施したところ、14日死亡、28日死亡ではモデル式に有意差は認められなかった (14日死亡 ; $p=0.74$ 、28日死亡 ; $p=0.27$)。一方で、最終予後 (死亡率) と β -D-グルカン値では有意なロジスティック回帰

モデルが得られ、ROC曲線のAUC=0.692でβ-D-グルカン値が259 pg/mLであり、初期のβ-D-グルカン値<259 pg/mLで、治療成功を予測することが可能であることが示唆された。その場合の感度は70%、特異度は35%であった。

3. 菌種別β-D-グルカン値

各菌種におけるβ-D-グルカン（平均値、標準偏差）は、*C. albicans* 794.97±1176.25、*C. parapsilosis* 723.75±988.95、*C. glabrata* 2269.69±4604.49、*C. tropicalis* 1492.39±1523.77、*C. guilliermondii* 265.33±259.96で、*C. glabrata*はβ-D-グルカン値が*C. albicans*および*C. parapsilosis*と比較し高値であった（Student's-t-test; $p<0.05$ ）

検出菌別にみた、14日生存率、28日生存率、最終生存率はそれぞれ、*C. albicans* 73.2%、58.9%、51.8%、*C. parapsilosis* 74.3%、70.6%、64.7%、*C. glabrata* 88.9%、88.9%、72.2%、*C. tropicalis* 63.6%、45.5%、27.3%、*C. guilliermondii* 85.7%、85.7%、57.4%であり、全体に*C. glabrata*の生存が高く、*C. tropicalis*の生存が低い結果であった。

D. 考察

カンジダ血症における初期のβ-D-グルカン値カットオフ値に関する検討では、Jaijakuらが、初期のβ-D-グルカン値（Fungitell）を<416pg/mLとすることで治療成功を予測することが可能であり（感度62%、特異度58%、陽性的中率89%、陰性的中率21%）、治療成功例では、連続的に測定したβ-D-グルカン値が減少スロープを描く傾向にあり、逆にβ-D-グルカン値の増加スロープは、治療失敗と関連があったと報告している（Jaijakul et al. Clin Infect Dis. 2012;55(4):521-526）。今回の自験例では<259pg/mL（MK法）で最終予後を予測することが可能であることが示唆された（感度70%、特異度35%）。

菌種間のβ-D-グルカンの違いについては、

過去にもβ-D-グルカン（Fungitell）中央値が*C. dublinensis*が高く、*C. albicans*や*C. glabrata*では高くないがいずれの菌種においても範囲にばらつきが大きいことを示した報告がある（Mokaddas E, et al. Clin Microbiol Infect. 2011; 17: 1549-1553）。菌種間のβ-D-グルカンについては菌量や菌糸の状態などに影響を受ける可能性が高く、今後の検討課題の一つと考えられる。

E. 結論

菌種別、血液培養初回陽性時のβ-D-グルカン値は、*C. glabrata*が他菌種に比べ優位に高い値であった。血液培養初回陽性時のβ-D-グルカン値と14日死亡率、28日死亡率に有意な相関はえられなかった。血液培養初回陽性時のβ-D-グルカン値と最終予後に相関が得られ、初期のβ-D-グルカン値<259 pg/mLで、治療成功を予測することが可能であった（感度70%、特異度35%）

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. Terada M, Ohki E, Yamagishi Y, Nishiyama Y, Satoh K, Uchida K, Yamaguchi H, Mikamo H. Fungal peritonitis associated with *Curvularia geniculata* and *Pitheomyces* species in a patient with vulvar cancer who was successfully treated with oral voriconazole. J Antibiot. 2013 Oct 30. doi: 10.1038/ja.2013.108.
2. Yamagishi Y, Hamada Y, Hagihara M, Mikamo H. Population pharmacokinetics of itraconazole in Japanese patients with invasive fungal peritonitis. Jpn J Antibiot. 2013 Jun;66(3):159-168

3. Hamada Y, Tokimatsu I, Mikamo H, Kimura M, Seki M, Takakura S, Ohmagari N, Takahashi Y, Kasahara K, Matsumoto K, Okada K, Igarashi M, Kobayashi M, Mochizuki T, Nishi Y, Tanigawara Y, Kimura T, Takesue Y. Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of voriconazole: a consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. *J Infect Chemother.* 2013 Jun;19(3):381-392
4. Mochizuki K, Murase H, Yasuda Y, Sumatsu H, Yamagishi Y, Mikamo H. Discrepancy of in-vitro data and clinical efficacy of micafungin against *Candida tropicalis* endophthalmitis. *J Infect Chemother.* 2012 Oct;18(5):786-789

学会発表

1. H. Mikamo, Y. Hamada, Y. Yamagishi: Pharmacokinetics-Pharmacodynamics (PK-PD) of Liposomal Amphotericin B (L-AMB) in Patients with Candidemia Complicated with Diabetes Mellitus. 53rd ICAAC M-233, Denver, USA, Sep. 10-13, 2013

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、侵襲性カンジダ感染症の疫学、その臨床像を把握するため、後ろ向き調査を行った。2008年12月から2012年11月までに、虎の門病院で同種造血幹細胞移植を受けた513例中、19例（3.7%）でカンジダ血症が生じていた。その全例が抗真菌薬投与下で生じるbreakthrough candidemiaであった。カンジダ血症を発症した多くの患者はステロイドや免疫抑制薬投与、GVHD、好中球減少症などの高度免疫不全状態を有していた。30日後死亡率は36.8%（7/19）であった。

A. 研究目的

造血幹細胞移植領域における侵襲性カンジダ感染症の疫学、その臨床像を把握する。

その多くは抗真菌薬投与下で生じるbreakthrough candidemiaである。

B. 研究方法

2008年12月から2012年11月までに、虎の門病院で同種造血幹細胞移植を受けた513例（臍帯血361例、骨髄101例、末梢血幹細胞51例）を対象に、後ろ向き調査を行った。

C. 研究結果

1. 侵襲性カンジダ感染症の発症

513例のうち19例（3.7%）でカンジダ血症（breakthrough candidemia）が生じた。

2. 原因菌種

C. parapsilosis (6例), *C. glabrata* (5例), *C. guilliermondii* (3例), *C. albicans* (1例), *C. krusei* (1例), *C. tropicalis* (1例), *Candida* spp. (2例) であった。

3. 発症時に投与されていた抗真菌薬

ミカファンギン; MCFG (11例), リポソー

マル・アムホテリシン B; L-AMB (4例), イトラコナゾール; ITCZ (2例), ボリコナゾール; VRCZ (2例) であった。

4. 19例の発症患者背景の解析

16例が臍帯血移植、3例が骨髄移植で生じていた。Grade III以上のGVHD、好中球減少、ステロイド投与、免疫抑制薬投与、中心静脈カテーテル挿入患者に多く生じていた。

5. 予後

30日後死亡率は36.8%（7/19）であった。

D. 考察

侵襲性カンジダ感染症を発症した多くの患者はステロイドや免疫抑制薬投与、GVHD、好中球減少症などの高度免疫不全状態を有していた。30日後死亡率は既報（38% : Cancer 2009; 115: 4745-52.）とほぼ同率であった。今後は、PCR法などを加えた遺伝学的な菌種の特定制法を用いた正確な菌種の同定と、標準法である微量液体希釈法での薬剤感受性試験を実施予定である。