

ラザホテル 2013 年 9 月 28 日

76. 中村孝子、アルシャフニ モハマド  
マハディ、山崎 丘、榎村浩一：微胞子虫  
による感染症の診断及び治療方法の検討。  
第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会  
ポスター 東京都新宿京王プラザホテル  
2013 年 9 月 28 日
77. 山崎 丘、楊 彩佳、藤崎竜一、榎  
村浩一：真菌検出用の LAMP プライマー  
の設計とその利用。第 57 回日本医真菌学  
会総会・学術集会 ポスター 東京都新宿  
京王プラザホテル 2013 年 9 月 28 日
78. 黒川正美、石川里枝、大石貴幸、萩  
原真二、佐々木雅一、柴崎真由美、田村順  
子、藤田留美、石垣しのぶ、川上小夜子、  
榎村浩一、菊池 賢：東日本における真菌  
検査方法の実態調査。第 57 回日本医真菌  
学会総会・学術集会 ポスター 東京都新  
宿京王プラザホテル 2013 年 9 月 28 日
79. 榎村浩一：真菌が引き起こす健康障  
害：LAMP 法の応用。中国 LAMP 研究会  
第 4 回大会 (The Fourth National LAMP  
Research Form, Cheng Du, China)、成都、  
中国、2013 年 10 月 29 日～11 月 3 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 特許取得

1. LAMP法による *T. tonsurans* 感染症診  
断法 (出願予定)

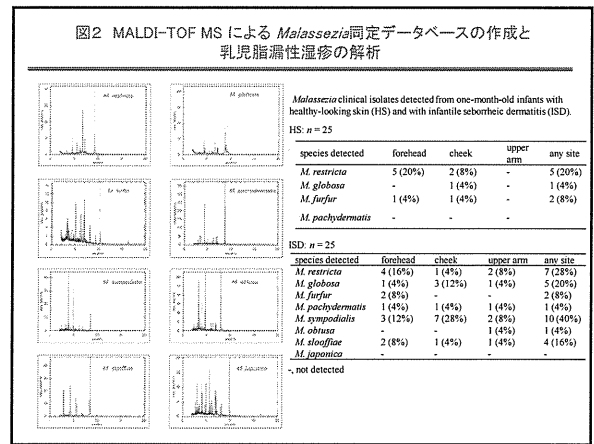
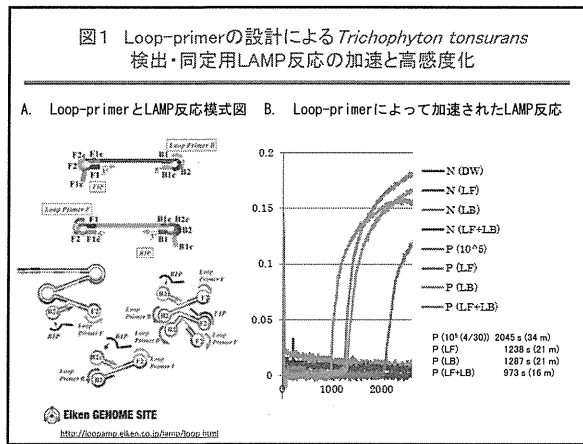


表1 MALDI-TOF MSによる *Malassezia* 臨床分離株の同定結果

MALDI-TOF MS	スコアバリュー			塩基配列 (D1/D2)
	1.7未満	1.7以上 2.0未満	2.0以上	
<i>M. restricta</i>	0	6	9	<i>M. restricta</i>
<i>M. globosa</i>	0	2	4	<i>M. globosa</i>
<i>M. furfur</i>	0	0	4	<i>M. furfur</i>
<i>M. pachydermatis</i>	0	2	1	<i>M. pachydermatis</i>
<i>M. sympodialis</i>	2	13	3	<i>M. sympodialis</i>
<i>M. obtusa</i>	0	1	0	<i>M. obtusa</i>
<i>M. slooffiae</i>	0	2	5	<i>M. slooffiae</i>
total	2	26	26	

表2 一箇月乳児における *Malassezia* 検出率

皮膚群	採取部位	検出率
健全皮膚乳児 (N=25人)	額	8 (32%)
	頬部	8 (32%)
	上腕内側	1 (4%)
	いずれかの部位	11 (44%)
乳児脂漏性皮膚炎患児 (N=25人)	額	12 (48%)
	頬部	11 (44%)
	上腕内側	6 (24%)
	いずれかの部位	17 (68%)

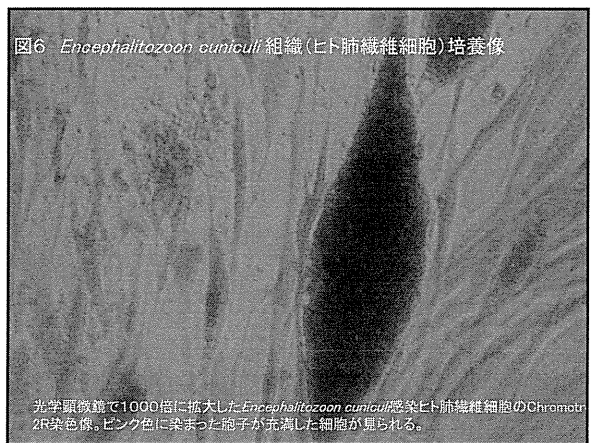
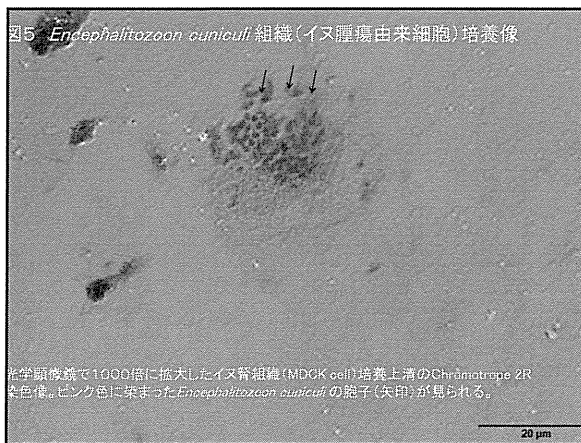
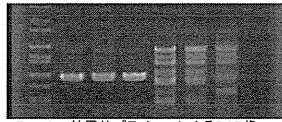


図7 Microsporidiaに対するPCR検出・同定系

*E. cuniculi* からDNAを抽出し、  
*E. cuniculi* 特異的および  
Microsporidiaユニバーサル・プ  
ライマーを使用して、*E. cuniculi*  
遺伝子の増幅を確認した。



*E. cuniculi*特異的プライマーによるPCR像  
左からマーカー、*E. cuniculi*DNA3本、培養細  
胞DNA3本



Microsporidiaユニバーサル・プライマーによる  
PCR像  
左からマーカー、*E. cuniculi*DNA3本、培養細  
胞DNA3本

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

日本における *Trichophyton tonsurans* 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 —

研究分担者	比留間 政太郎	お茶の水真菌アレルギー研究所
研究協力者	小川 祐美	順天堂大学医学部皮膚科講座
	廣瀬 伸好	順天堂大学スポーツ健康科学部 柔道研究室
	野口 博光	のぐち皮膚科医院

**研究要旨** 日本においては、*Trichophyton tonsurans* 感染症は、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。本感染症に対してガイドラインに基いて感染コントロールを行った。方法：対象は、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）である。調査方法は、毎年4月にHairbrush培養検査を行い、陽性者は治療を行った。3ヶ月後に再度ブラシ検査を行い陽性者は同じ治療を行った。この検査・治療サイクルは、選手が柔道連盟に参加している間は毎年行った。結果：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。学年別の陽性者数の推移は、学年を上がるごとに菌陽性率が少しずつ減少し、4年生の陽性率をみると、2008年が8.8%で2013年には1.3%へ減少した。治療後3か月目の再検査結果は、菌の陰性化率は、76.1-90.9%（平均86.3%）であった。4年間に行った5回の調査では、個々の個人別の調査人数は、2,139名で、この内1,361名が複数回の検査を受けていた。複数回の検査で、全ての検査が陽性であったのは0.15%であった。一方、複数回検査し1回のみ陽性であったものは、23.4%であった。一方、全ての検査で陰性であったのは73.1%であった。考案：われわれの提唱したガイドラインは、毎年のは検査結果で十分な効果を示し、さらに個々の選手についての経時的検査に於いても、一度菌が陰性化した者の多くは、再度陽性になる確率は低かった。これらの結果は極めて満足すべき結果と考えた。

#### A. 研究目的

日本においては、*Trichophyton tonsurans* 感染症が格闘技選手の国際交流試合を通じて持ち込まれ、2000年頃より格闘技選手、学校内、家族、友人の間で流行するようになり、真菌症新興感染症の一つとして大きな社会問題となっている。

われわれは、*T. tonsurans* 感染症の蔓延を阻止するために、全国的な簡易調査のネットワーク構築、東京学生柔道連盟の集団検診などの本症の疫学に関する研究、簡易検査法の開発、分離菌のMIC測定などの本症の診断に関する研究、治療プロトコルの検証、ガイドラインの改定などの本症の治療と予防の研究

などを行ってきた。

今回は、2008年～2013年までの過去5年間に学生柔道連盟登録全選手を対象にして、*T. tonsurans* 感染症に対するガイドラインに基づいた検査・治療の有用性について検討したので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 対象

対象は、2008年～2013年度に東京学生柔道連盟に加盟した全ての大学柔道選手（50大学チーム・902—1382人/年度、延べ7,489名）である。調査はそれぞれの施設の倫理委員会の承認を得て、検査にあたっては各個人より文章による承諾を得た。各個人は番号を付けて処理し、個人の特定ができないように配慮して統計処理を行った。

### 2. 方法

調査方法は、大学入学の毎年度4月中旬に各大学において、各選手は、調査用紙に従って年齢、性別、身長、体重、過去および現在における白癬皮疹の有無、治療内容などを記入させた。さらに、練習前に丸形Hairbrushで頭部を15～20回程度強く擦り、そのHairbrushをポリ袋にいれて研究室へ送付した。培養はマイコセル寒天培地（平板）25℃で14日間培養後判定した。

治療方法は、Hairbrush培養陽性者には、ガイドラインに基づいて、集落数と治療のプロトコルを記載した紹介状を持たせて、最寄りの医療機関を受診させ下記の治療を受けさせた。投薬内容と服薬状況は服薬終了後報告させた。さらに治療終了後3ヶ月目に再度ブラシ検査をおこなった。また、柔道場の掃除、柔道着、下着の洗濯など、日常の予防対策についても指導した。

抗真菌剤療法は、菌量が2集落以下の場合は、ミコナゾール含有シャンプーのみ使用、菌量が3集落以上の者は内服治療を指示した。内

服の内容はイトラコナゾールでは400mg/日を1週間内服、テルビナフィンでは125mg/日を6週間、または500mg/日を1週間とした。3か月後の2回目の検査陽性者は、再度同じ治療を受けさせた。この治療サイクルは、選手が柔道連盟に加盟している間は、毎年検査、治療、追跡調査を行った。

## C. 研究結果

本調査における過去5年間の*T. tonsurans* 感染症の調査結果を以下にまとめた。

### 1. 本症の罹患状況について

質問紙調査では、対象者の平均65%が「過去に白癬の既往があった」と回答した。Hairbrush培養検査は、2008年度には陽性者が11.3%であったの対し、2009年度には6%と約1/2程度に低下した。その後、陽性者は2010年：5.9%、2011年：5.4%、2012年：6.7%、2013年：5.2%とゆるやかな減少傾向を示した（表1）。

### 2. Hairbrush培養陽性者における無症候キャリアについて

Hairbrush培養陽性者のうち検査時に「症状が無い」と回答したものは、86.3%～98.6%であり、平均92.0%であった。即ち、検査陽性者の10%程度しか症状がなく、これは集団全体からみると0.65%であった（表1）。

### 3. 学年別の陽性者数の推移について

Hairbrush培養検査陽性者を学年別に示した（表2）。1年生では、12.9-16.2%の陽性率を示した。これは、入学前の高校時代から感染していることを示している。2008年における学年の陽性率は、1年生12.9%、2年生12.7%、3年生10.7%、4年生8.8%であり、各学年の陽性率に差は見られなかった。新入生は翌年には2年生になり、進級して行くが、検査・治療を開始した翌年の2009年では、高学年になるにつれて陽性率が低下した。学年を上がるごとに菌陽性率が少しずつ減少することは

明らかであった。4年生の陽性率をみると、2008年が8.8%、翌年は2.7%と減少し2013年には、1.3%へ減少した。

#### 4. Hairbrush 培養陽性者における治療開始3か月後の再検査結果について

治療開始から3か月後の再ブラシ検査の結果を表3に示した。菌陰性化率は、2008年：88.5%、2009年：85.7%、2010年：86.5%、2011年：87.3%、2012年：90.9%、2013年76.1%が陰性化し、平均86.3%であった（表3）。

#### 5. 複数回の Hairbrush 培養検査を受けた選手の検査結果の推移について

1-4までの検査結果は、毎年度における東京学生柔道連盟の集団の検査結果である。大学は4年制であり集団は入団・脱退を繰り返して毎年更新されているため、経時的に複数回の Hairbrush 検査を受けた選手の毎年の検査結果の推移を調査することは、ガイドラインの有用性を検証する上で重要である。2008年から2012年までの4年間に行った5回の検査・治療について調査すると、調査延べ人数は、6,133名で、複数回数の検査を受けた者を1名と数えると、全体で2,139名で、このうち1回のみ検査を受けた人数は、778名で、2回以上の検査を受けた人数は、1,361名（2回：655名、3回：493名、4回：213名）であった（表4）。

番号を付けて処理された選手の毎年の検査結果の推移を、表3に示した。4年間（4回）経過を追えた選手は213名で、この間1回以上菌が陽性になったものは71名（33%）であり、その内訳は4回とも陽性は2名（0.9%）、3回陽性1名（0.5%）、2回陽性11名（5.2%）、1回陽性57名（26.8%）であった。3年間（3回）経過を追えた選手は493名で、この間1回以上菌が陽性になったものは102名（20.7%）であり、その内訳は3回とも陽性は3名（0.6%）、2回陽性14名（2.8%）、

1回陽性86名（17.4%）であった。2年間（2回）経過を追えた選手は655名で、この間1回以上菌が陽性になったものは193名（29.5%）であり、その内訳は2回とも陽性は16名（2.4%）、1回陽性177名（27.0%）であった。

また、陽性・陰性の推移は、複数回の検査を受けた1,361名についてみると、1,318名（96.8%）は、入学時陽性であったもので、検査・治療によって、徐々に陰性化した。一方、入学時陰性であったものが後に陽性となった人数は、1,361名中43名（3.1%）であった。1年間（1回）経過を追えた選手は778名で、この菌が陽性になったものは93名（12.0%）であった。

一方、検査陰性例についてみると、4年間（4回）経過を追えた選手は213名で、この間全て陰性であったものは142名（66.7%）であった。3年間（3回）経過を追えた選手は493名で、この間全て陰性であったものは391名（79.3%）で、2年間（2回）経過を追えた選手は655名で、この間全て陰性であったものは462名（70.5%）であった。最後に1年間（1回）経過を追えた選手は778名で、陰性であったものは685名（88.0%）であった。

#### D. 考察

今回の報告は、東京柔道連盟登録柔道選手を対象に *T. tonsurans* 感染症に関する質問紙調査と Hairbrush 検査および治療を5年間にわたり実施し、罹患状況の推移と拡大阻止啓蒙と治療の有用性を検討するものである。

2009年度からの質問紙調査によると、全対象者の65%が過去に白癬の既往歴があると回答し、このことは、柔道競技現場における本感染症の感染が未だ広範囲にわたり、低下傾向を認めないことを示している。しかし、東京柔道連盟においては、本症の啓蒙、検査、治

療を行っており、陽性者数は、なだらかな減少傾向がみられている。とくに 2009 年度からは陽性者数が半減するとともに 1 年生（新入生）の占める割合が約 14%を占めた。それにともない上級生（2—3 年生）の陽性者数は毎年ごとに減少傾向を示し、罹患率は低下した。この結果は、毎年調査を行い指導を継続した結果、罹患率が減少したと考えた。検査および治療などの啓発活動を十分に指導することにより、競技を継続しながら、チーム全体の感染コントロールは可能であると考えた。

ガイドラインにそった治療をおこなった陽性者は、3 か月後の陰性化率が毎年 85%と優れた結果であり、東京学生柔道連盟における検査と治療の指導の取り組みが毎年の菌陽性の罹患率の抑制に有効と考えた。しかし、陽性者は、5.0%までに留まり、それ以上の低下はみられていない。この調査・治療システムの限界を示していると考えた。この試みを中止すれば、必ず感染拡大へ繋がると危惧される。

Hairbrush 検査陽性者における無症候性キャリアの存在については、平均 92%で高率で推移してきた。無症候性キャリアは自覚症状がないために、本人の感染の自覚が困難であり、治療においても完治しないまま終了するケースや患者が途中で治療を放棄するケースも多い。競技現場では、症状を認めるものは、全体からみて 0.65%であり、*T. tonsurans* 感染症は、柔道選手にとって、外見上はほとんど問題ないと感じられても仕方がないと考えた。無症候キャリアを発見し、治療しない限り本症を撲滅することはできない。今後も重要な問題である。

以上のような問題点を抱えながら、集団の感染コントロールを行って来たが、毎年度の検査結果は、入団・脱退を繰り返す毎年更新される流動的な集団であり、個々の選手の毎年の Hairbrush 培養検査結果の推移を調査することは、ガイドラインの有用性を検討する上で

重要である。

4 年間に行った 5 回の調査では、延べ 6,133 名を検査・治療し、個々の個人の調査人数は、2,139 名であり、この内 1,361 名が複数回の検査を受けていた。検査毎、陽性者には治療を指示して来たが、全ての検査で陽性であったのは 21 名で、複数回の検査を受けた全体に対して 0.15%で、複数回検査し 1 回以上陽性であった 366 名中でみると 5.7%であり極めて低率であった。検査結果が 2 回以上陽性であった者については、治療が徹底して行われたかについて再度調査が必要であり、本人にも厳しい注意を与える必要があるといえる。

一方、複数回検査し 1 回のみ陽性であったものは 319 名で、複数回検査し 1 回以上陽性であった 366 名中でみると 87.2%であった。従って一旦菌が陰性化すると再度陽性になる確率は低かった。複数回の検査を受けて、全ての検査で陰性であったのは 995 名（73.1%）であり、本感染症が良く啓蒙された団体では、本菌に汚染された環境中でも感染拡大は低率であると考えた。

東京柔道連盟加盟柔道選手は、日本を代表する柔道選手であり、練習・試合は最も厳しい集団である。以上の結果をみると、われわれが提唱しているガイドラインは有効なものであり、極めて満足すべき結果と言える。この試みは、1,300 名前後の限られた集団での試みであるが、これを一つの良いモデルとして、様々な格闘技集団で試みられることが望まれる。

#### E. 結論

*T. tonsurans* 感染症の撲滅のためには、各年代層に全国的な簡易調査と治療のネットワークを構築する必要がある。その一例として過去 6 年間にわたって行ってきた東京学生柔道連盟の集団検診と治療の試みは、個々の選手を経時的に追跡しても優れた結果であった。

今後は、われわれのガイドラインに基づいて、格闘技団体、医療機関、一般市民との連携を一層強め、感染コントロールを継続する予定である。

F. 健康危険 情報  
なし

G. 研究発表

論文発表

Fukai T, Hiruma M, Ogawa Y, Ikeda S, Ikeda H, Sano A, Makimura K. A case of phaeohyphomycosis caused by *Exophiala oligosperma* successfully treated with local hyperthermia. *Med Mycol J.* 2013; 54: 297-301.

Kano R, Anzawa K, Mochizuki T, Nishimoto K, Hiruma M, Kamata H, Hasegawa A. *Sporothrix schenckii* (sensu strict *S. globosa*) mating type 1-2 (MAT1-2) gene. *J Dermatol.* 2013; 40: 726-30.

Kano R, Isizuka M, Hiruma M, Mochizuki T, Kamata H, Hasegawa A. Mating type gene (MAT1-1) in Japanese isolates of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia.* 2013;175:171-3.

Hiruma M, Kano R, Sugita T, Mochizuki T, Hasegawa A, Hiruma M. Urease gene of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii*. *J Dermatol.* 2013; 40: 111-3.

比留間 政太郎. 日本における *Trichophyton tonsurans* 感染症の疫学とその感染対策に関する研究 順天堂醫事雑誌 2013; 59: 246-250.

比留間 政太郎, 比留間 翠. *Trichophyton tonsurans* 感染症. 化学療法の領域. 2013; 29: 1152-1159.

比留間政太郎、小川祐美、廣瀬伸良：トンスランス感染症 ブラシ検査・治療・予防のガイドライン 第5版. 正明堂、東京、2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

表 1. 東京学生柔道連盟登録選手の調査結果

年度	調査人数	体部白癬の既往	ブラシ培養陽性	ブラシ陽性者の内の無症候性キャリアー
2008	902	ND	102 (11.3%)	88 (86.3%)
2009	1260	812 (64.4%)	76 (6.0%)	70 (92.1%)
2010	1281	828 (64.4%)	76 (5.9%)	69 (90.8%)
2011	1308	859 (65.6%)	71 (5.4%)	70 (98.6%)
2012	1382	950 (68.0%)	93 (6.7%)	82 (88.0%)
2013	1356	909 (67.5%)	70 (5.2%)	63 (91.3%)
Total	7489	4276 (64.9%)	488 (6.5%)	448 (92.0%)



表2. 東京学生柔道連盟登録選手の学年別Hairbrush培養検査結果

年度	2008	2009	2010	2011	2012	2013
1年生	12.9% (30/233)	13.6% (42/309)	16.2% (45/277)	15.2% (47/309)	14.2% (49/345)	14.4% (45/313)
2年生	12.7% (30/236)	5.3% (19/359)	4.3% (16/369)	3.7% (13/353)	7.0% (26/372)	3.4% (13/382)
3年生	10.7% (22/205)	2.4% (8/328)	2.2% (7/323)	1.7% (6/348)	2.4% (8/334)	2.2% (8/356)
4年生	8.8% (20/228)	2.7% (7/264)	2.6% (8/312)	1.7% (5/298)	3.0% (10/331)	1.3% (4/304)
計	11.3% (102/902)	6.0% (76/1260)	5.9% (76/1281)	5.4% (71/1308)	6.7% (93/1382)	5.2% (70/1356)

表3. Hairbrush培養陽性者における治療開始3か月後の再検査結果

年度	治療前		治療後	
	陽性者	治療者	治療者	菌陰性化率
2008	102	96	85	(88.5%)
2009	76	70	60	(85.7%)
2010	76	74	64	(86.5%)
2011	71	71	62	(87.3%)
2012	93	88	80	(90.9%)
2013	70	67	51	(76.1%)
Total	488	466	402	(86.3%)

表4. 複数回のHairbrush培養検査を受けた選手の経時的検査結果の推移について

観察期間・回数・人数	陽性例数 (%)	陽性回数	例数 (%)	陰性回数	陰性例数 (%)
4年間・4回・213名	71 (33.0%)	4回とも陽性	2 (0.58%)	4回とも陰性	142 (66.7%)
		3回陽性	1 (0.5%)		
		2回陽性	11 (5.2%)		
		1回のみ	57 (26.8%)		
3年間・3回・493名	102 (20.7%)	3回とも陽性	3 (0.6%)	3回とも陰性	391 (79.3%)
		2回陽性	14 (2.8%)		
		1回のみ	85 (83.3%)		
2年間・2回・655名	193 (29.5%)	2回とも陽性	16 (2.4%)	2回とも陰性	462 (70.5%)
		1回のみ	177 (27.0%)		
1年間・1回・778名	93 (12.0%)	1回陽性	93 (12.0%)	1回陰性	685 (88.0%)
総数・2,139名	459 (21.5%)				1,680 (78.5%)

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

研究分担者 望月 隆 金沢医科大学医学部皮膚科学講座 教授

研究協力者 安澤 数史 金沢医科大学医学部皮膚科学講座 助教

## 研究要旨

(1) トリコフィトン トンスランス（以下 *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、金沢医科大学皮膚科に登録、保存されている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。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%）。因に2006年以降本院外来で分離された *T. tonsurans* は2008年5株、2010年1株のみであった。(2) *T. tonsurans* の迅速同定に有用と考えられる硬膜胞子様構造物 (chlamyospore-like structures) の形成を、光学顕微鏡により菌が接種されたマイコセル培地の裏面からコロニーを観察することで経時的に確認した。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。よって迅速同定には培養5日目での判定を試みるのが奨められる。

## A. 研究目的

格闘技競技者間に蔓延しているトリコフィトン トンスランス（以下 *T. tonsurans*）感染症の感染制御と、中学生における武道必修化などにもなう一般社会への拡散を防止するためには、感染発症の現状を把握すること、そして迅速診断のための分離株の迅速同定法の改良が必要である。さらには診療に当たる医療機関、皮膚科医の真菌症診断能力の向上が求められる。今年度は疫学については発症の実態把握ならびに原因菌の分子生物学的性状を検討し、同定法の改良としては形態学的マーカーと考えられる培地内の硬膜胞子様構造物 (chlamyospore-like structures, 以下

CLS) の迅速同定における有用性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 疫学的研究

金沢医科大学病院皮膚科の2011年1年間に経験された皮膚真菌症の新患患者全例より真菌培養またはリボソームRNA遺伝子 (rDNA) のITS領域の制限酵素分析を行い、原因菌の種を決定した。また、国内の他施設からの要望に応じて真菌の分離や分離株の同定を行うことで、全国の施設の診療を支援しつつ *T. tonsurans* の分離株の収集を行い、これらについて分子疫学的研究を行った。分子疫学的手法としては、rDNAの non-transcribed

spacer 領域の制限酵素分析、(以下 NTS-RFLP) を用い、種内変異のタイプ分けを行った。なお、この方法により本邦で分離された *T. tonsurans* は NTS I 型から VIII 型の 8 つの遺伝子型に分けられることが知られている (T Mochizuki et al, Jpn J Infect Dis,2007;60:188-192, T Mochizuki et al, Jpn J Infect Dis,2008; 61:219-222)。

## 2. 迅速同定法の検討

*T. tonsurans* では培養早期から培地内に CLS が形成されることは報告されていた (藤広満智子 真菌誌 2008; 49:191-195)。今回は *T. tonsurans* 25 株をマイコセル平板に接種し、27°C で保温しつつ連日コロニー裏面より 100 倍の光学顕微鏡で観察した (図 1)。CLS が確認できれば(+)、100 倍の 5 視野で複数個確認できれば(++)、100 倍の 1 視野に多数個あれば(+++) (図 2) と判定した。また同様の構



図 1 光学顕微鏡で培地裏面から観察する。



図 2 培地内に多数観察された CLS. (+++) と判定。

造物を形成することが知られている *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* 各 5 株との比較を行うことで CLS の形成が本菌の迅速同定に有用であるか検討した。

## C. 研究結果

### 1. 疫学的研究

金沢医科大学病院皮膚科の 2011 年の 1 年間に経験された皮膚真菌症の新患者は 465 名 (のべ患者数 20333 名)、うち白癬 411 名 (88.4%)、カンジダ症 33 名 (7.1%)、マラセチア症 21 名 (4.5%) であった。白癬 411 名には 433 病巣が認められ、そこから検体が採取された。この 433 検体の内訳は足白癬 260 検体 (60.0%)、爪白癬 118 検体 (27.3%)、体部白癬 33 検体 (7.6%)、股部白癬 10 検体 (2.3%)、手白癬 10 検体 (2.3%)、頭部白癬 2 検体 (0.5%) であった。これらのうち原因菌種を確定できたものは 327 検体 (75.5%) であった。その内訳は *T. rubrum* 210 検体 (64.2%)、*T. mentagrophytes* 115 検体 (35.1%)、*Microsporum canis* 2 検体 (0.6%) であった。2011 年は外来で *T. tonsurans* は全く認められなかった。ちなみに *T. tonsurans* について 2006 年以降の外来検体からの分離株数は 2006 年 0 株、2007 年 0 株、2008 年 5 株、2009 年 0 株、2010 年 1 株であった。

全国 16 都県で 2011 年から 2013 年秋までに分離され、金沢医科大学皮膚科において同定し保存した *T. tonsurans* は 117 株であった。このうち柔道競技者から 72 株、レスリング競技者から 17 株、相撲競技者から 3 株、他のスポーツ競技者ではテニス、野球から各 1 株 (接触の機会は不明) が分離、柔道、レスリング競技者からの 2 次感染が疑われた例から 3 株、スポーツ歴のない例から 8 株、背景が不明な例から 11 株が分離されている。NTS 型では NTS I 型が 13 株、II 型が 3 株、III 型が 1 株で他の型は分離されなかった。柔道、相撲競技者由来は全株 N

TS I 型、レスリング由来株は17株中、NTS I 型が15株、II 型が2株であった。NTS II 型3株のうちの残り1株は沖縄県で米兵から分離された株であった。

## 2. 迅速同定法の検討

*T. tonsurans*では5日で23株、8日で25株全てにCLSが確認できた。CLSの数は大部分の株できわめて豊富で、4日で既に11/25株が(++), 5日で14/25株が(+++), 7日で16/25株が(+++)であった(図3)。とくに成長が比較的遅く、のちに褐色に色づいた株では常に大量に観察可能であった。一方*T. rubrum*、*T. mentagrophytes*、*T. verrucosum*では同様の構造物の出現は遅く、またすべての株に見

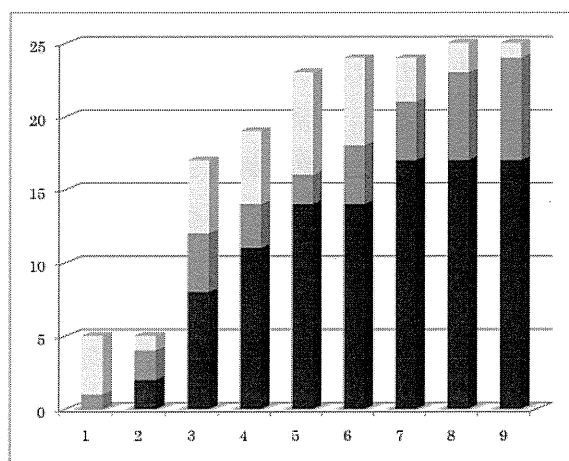


図3 *T. tonsurans*のCLS形成の経時的変化  
縦軸:25株中の陽性株数、濃青(+++), 淡青(++), 緑青(+), 横軸:培養後の日数

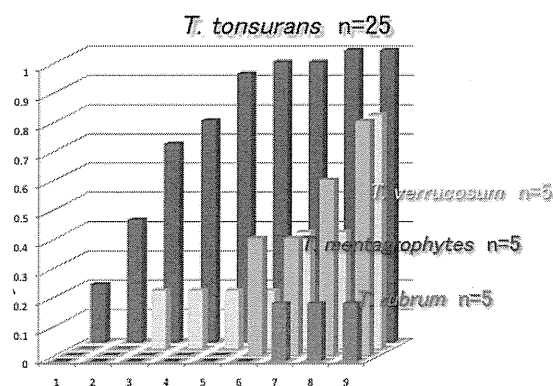


図4 菌種別のCLSの形成  
縦軸:出現の割合、横軸:培養日数(日)

られるわけではなかった。出現数も少なく、(+)- (++) に留まった(図4)。今回の検討では培養5日目にCLSの有無で *T. tonsurans* と同定した際の感度は92%、特異度93.3%、培養8日目の判定では感度は100%、特異度60.0%であった。

## D. 考察

### 1. 疫学的研究

2011年から2013年秋までの *T. tonsurans* 分離株 117株の由来は全国16都県にわたり、なお全国的な発生が続いていることが窺われた。一方本院の外来での分離株は2011年には皆無であり、大学の皮膚科受診患者のみを対象とした *T. tonsurans*感染症の調査には限界があると考えられた。2011年から2013年の石川県における新規分離株は35株あり、培養法を組み込んだ検診(坂田祐一ほか、日小皮誌 2013;32:121-126)による積極的な患者の発掘により始めて実態が解明できると考えられる。

分子疫学的検討では、NTS I 型113株、NTS II 型3株、NTS III 型1株と従来の報告よりNTS I 型が多く、他の型が少ない傾向があった。これはNTS I 型とNTS II 型の病原性・感染性に差があり、分離頻度が変わってきた可能性もあるが、サンプル数が少なかったこと、サンプル採取に偏りがあったことに起因する可能性があり、サンプリングに一層の工夫が必要と考えられた。また大多数を占めるNTS I 型の中のサブタイプの有無の検討に用いる分子マーカーの開発、例えばmicrosatelliteや効果的なSNPs検出の方法、が必要であろう。これまで使用していた制限酵素分析法をもちいたNTSの解析の限界が示されたとも言える。NTS II 型は従来よりレスリングに関連する株がほとんどであったが今回の検討でも3株中2例がレスリング競技者からの分離株であった。しかし1株は沖縄の米兵から分離されたものであった。移民や帰国子女では格闘技関連株と異な

る遺伝子型を示す例がまれならず認められ (T Mochizuki et al, Jpn J Infect Dis, 2008; 61:219-222)、多様性があることから、この分離株がレスリング分離株と同じ塩基配列を持つかは興味のあるところである。したがって NTS II 型についてもさらなるサブタイプの検出法が検討されるべきであろう。

## 2. 迅速同定法の検討

培養早期から培地内に CLS が形成されることは *T. tonsurans* の特徴であることが今回の検討で改めて確認された。通常培地に特有のマホガニーレッドと呼ばれる褐色の色調が確認できるか、気生菌糸に特有の分生子が形成されるのに約 2 週間かかるため、CLS の形成は最も迅速な形態学的マーカーと言える。他の厚膜胞子あるいは CLS を形成することが知られている菌にもこの構造の発育が認められたが、出現の程度、日数とも *T. tonsurans* と著しい差があり、特に培養 5 日目に CLS の有無を判定することで *T. tonsurans* の迅速同定が可能と考えられた。8 日目には感度は 100% となるが、他の菌種の中には少数ながら CLS を形成する株があるため、以降は培地に拡散する色調など、他の性状を参考に同定を行う必要がある。

## E. 結論

*T. tonsurans* の迅速同定に有用と考えられる CLS の出現を観察したところ、培養 5 日目の感度は 92% であった。以上より CLS は迅速同定に有用な形質であることが明らかになった。

## F. 健康危険情報

依然格闘技グループでは集団感染が持続し、新しい患者の発生が持続している。背景が不明、あるいは競技者以外からの分離例の増加が懸念され、一般社会への拡大について注意を要する。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. T Mochizuki, K Anzawa, Y Sakata, M Fujihira: Simple identification of *Trichophyton tonsurans* by chlamyospore-like structures produced in culture media. J Dermatol, 2013; 40:1027-1032.
2. 坂田祐一、柳田久美子、坂元とも子、渡部絢子、若狭麻子、村本睦子、北山明日香、吉村理枝子、牛上 敢、石崎康子、藤井俊樹、阿部真也、西部明子、安澤数史、望月 隆: 金沢医科大学病院における 2011 年の皮膚真菌症の疫学調査 (仮題) (論文執筆中) .

### 学会発表

1. T Mochizuki, K Anzawa, M Fujihira: Morphogenesis and species specificity of chlamyospore-like structures of *Trichophyton tonsurans* . 2013 Congress of Asia Pacific Society for Medical Mycology (Cheng du, China, June 18, 2013).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

1. 本研究の成果の一部は皮膚科関連学会において紹介し、皮膚科医や家庭医の啓発に用いた。
2. 他施設の診療支援策として金沢医科大学皮膚科学講座のホームページに医療者向け皮膚真菌症相談コーナーを開設している。

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・開発に向けた基礎的研究

研究分担者 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

研究協力者 豊留 孝仁 帯広畜産大学動物・食品衛生研究センター  
村長 保憲 千葉大学真菌医学研究センター臨床感染症分野

研究要旨 輸入真菌症の国内発生状況調査を行った。コクシジオイデス症の4例をはじめ、ヒストプラズマ症、パラコクシジオイデス症各1例が確認された点はこれまでとほぼ同様であったが、これまであまり問題視されていなかったマルネツフェイ型ペニシリウム症が5年連続して確認され、重要な輸入真菌症となりつつあることが認識された。ヒストプラズマ症の迅速診断法の改良・開発については、新規抗原候補タンパク質と既存のAgMの部分タンパク質を組み合わせることにより感度やバックグラウンドの向上が得られた。また上記タンパク質のコード遺伝子を用いたサイクリングプローブ法による遺伝子検出法では、特にnested PCRを用いた際に病理組織から高い検出感度を示した。しかし、ベトナムで保存されていた血清を用いたこれらの抗体検出法、遺伝子検出法の性能確認では十分な結果を得られず、更なる手技の改良に加えて、状態の良い臨床検体を得る工夫が必要と思われた。

## 1. 輸入真菌症の国内発生状況調査

### A. 研究目的

原因菌の大部分が高度病原菌（危険度レベル3）である輸入真菌症は、健常人に容易に感染することから、その国内発生状況の確認を確認することは重要である。これまでの研究から1980年代から輸入真菌症症例は急速に増加を始め、以後長期的な増加傾向にあることに加え、誤認により不幸な転帰をとる例の存在が明らかになってきた。一方、観光立国などの国際化の進展により、今後、輸入真菌症の動向は大きく変化していくことが予想される。このため医療施設、医療従事者に対する啓蒙活動を行うことにより、本疾患群に対

する知識を周知徹底し、医療レベルの向上をもたらすことを目的として最新の発生動向を知るために調査を行った。

### B. 研究方法

昨年度と同様に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中心とし、これに医学中央雑誌、Medlineなどに掲載された報告症例を検索してデータを補完した。またコクシジオイデス症のみは感染症法（4類）に指定されているため、保健所を介した報告例も確認し情報の信頼性向上に努めた。

## C.研究成果 (図1)

### 1) コクシジオイデス症

2013年は計4例が確認され、総症例数は72例となった。2007年の3例以降、3→2→1→4→2→4というほぼ一定の経過である。しかし、感染地からみると昨年のアリゾナとは異なって本年は全例カリフォルニアであった。いずれも健常人に胸部結節影を呈し、病型は慢性肺コクシジオイデス症と考えられた。

### 2) ヒストプラズマ症

2013年のヒストプラズマ症は2012年に引き続き1例が認められ総計は75例となった。健常人に発生したメキシコでの感染例と推測され、病型は急性肺ヒストプラズマ症と考えられたが、教科書的に high risk とされる屋外での活動には明確なものがなく、都市での通常の活動の中で感染したものと考えられた。

### 3) パラコクシジオイデス症

パラコクシジオイデス症は2009年の2例以降症例が報告されていなかったが、本年は1例(在日中のボリビア人)が認められた(計22例)。これまでの分析から、わが国におけるパラコクシジオイデス症はその多くが、中南米諸国から出稼ぎのため来日中発症しており、日本経済の消長や来日外国人の数に影響されることが推測される。経済の復活が広く指摘されている中、今後再度増加する可能性が高く注意が必要と考えられる。

### 4) マルネッフェイ型ペニシリウム症

本症は2006年までは計3例しか発見されておらず輸入真菌症の中でも稀な疾患であったが、2009年(2例)を皮切りに、2010年(1例)、2011年(1例)、2012年(1例)と連続してコンスタントに報告されるようになり、本年も引き続き1例報告された(総計は9例)。近年コンスタントに報告されるようになった点が注目される。今年の症例はHIV感染を基礎としてタイ人に播種型として発症したものであり、これらの点で典型的な症例であった。

これまでわが国ではコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症が二大輸入真菌症であったが、マルネッフェイ型ペニシリウム症は5年連続して症例が見られたことや主な感染地であるタイなどの東南アジアとの関係が近年強化されていることから、今後重要な疾患となっていく可能性が考えられる。

### 5) その他の輸入真菌症

5つ目の重要な輸入真菌症とされているブラストミセス症は、本年は認められなかったが、その重篤性や米国における患者数の多さを考えると、今後十分注意しておくべき疾患である。

## D.考察

今年の集計から、ヒストプラズマ症が全体に落ち着いた傾向が見られたが、ヒストプラズマ症に限らず輸入真菌症は流行地での大流行の影響を受けるため、これまでも症例数の変動が見られていることから、今後も注意深いモニタリングが必要であろう。また、特にマルネッフェイ型ペニシリウム症では明瞭な増加傾向が見られており、明らかに輸入真菌症の重要疾患の一角を占めるようになった。また、今年は2009年を最後に発症の報告がみられていなかったパラコクシジオイデス症が発見されている。

現在の経済状況や観光立国、オリンピック招致といった施策に伴い、今後海外との交流はさらに増加していくものと予想されており、輸入真菌症の増加は必須と考えられる。今後も注意深く調査・研究を行ない、必要に応じて、医療従事者や一般社会に対する警告・啓蒙活動が重要と考えられる。

## E. 結論

昨年に引き続きマルネツフェイ型ペニシリウム症が報告され、わが国の定常的な輸入感染症に加わった。コクシジオイデス症、ヒストプラズマ症ともほぼコンスタントな症例数であったが、パラコクシジオイデス症が再び出現するようになっており、今後とも注意深く調査・研究を行なうべきと考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

- ・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. 日呼吸誌 2(3): 274-278, 2013
- ・亀井克彦: 〈特集関連情報〉BSL3対応が必要な渡航者真菌症. 病原微生物検出情報 34(1): 3-4, 2013.
- ・渡邊哲, 亀井克彦: 肺ノカルジア症. ヒストプラズマ症. プラストミセス症. 「別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.24 感染症症候群 (第2版) 上 病原体別感染症編」 p.265-267, p.599-602, p.603-605, 2013.
- ・亀井克彦, 渡邊哲: パラコクシジオイデス症. 「別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.24 感染症症候群 (第2版) 上 病原体別感染症編」 p.583-585, 2013.
- ・亀井克彦, 渡邊哲, 豊留孝仁: マルネツフェイ型ペニシリウム症. 「別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.24 感染症症候群 (第2版) 上 病原体別感染症編」 p.606-608, 2013.
- ・亀井克彦, 渡邊哲: 世界に広がるトロピカルディーズ 8. 真菌感染症. 化学療法の領域 29(8): 1718-1725, 2013.
- ・亀井克彦, 渡邊哲: 輸入真菌症. 臨床と微生物

物 40(増刊号): 611-615, 2013.

- ・亀井克彦, 渡邊哲: ヒストプラズマ症. コクシジオイデス症. 「別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.26 神経症候群 (第2版) (I) —その他の神経疾患を含めて—」, p.874-877, p.878-881, 2013.

### 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

## 2. ヒストプラズマ抗原を用いたELISA法による抗体検出法の実証

### A. 研究目的

これまでの研究において、患者血清中抗体により認識される新規の *Histoplasma capsulatum* 抗原タンパク質を同定し、これらの新規抗原タンパク質および既知の M 抗原タンパク質(AgM)、H 抗原タンパク質(AgH)を組換えタンパク質として発現・精製することに成功してきた。これら組換えタンパク質を用いた ELISA 法の確立を進めている。これまでに AgH、AgM に加えて、Hc1、Hc6 の抗原タンパク質がヒストプラズマ症患者群において健常人群に比べて優位に高い抗体価を示すことが明らかとなった。さらに、これら組換えタンパク質 4 種を組み合わせて用いることにより、単独で用いた場合に比べて感度の点で改善を図ることが可能となっている。また、AgM の全長タンパク質に代えて AgM タンパク質 C 末領域のみの部分タンパク質 AgM-F3 と他の 3 種の抗原を用いる事により、健常人群血清との非特異的反応を抑えることが可能となった。

本年度はこれまでに確立してきた ELISA 法を実際に流行地 (ベトナム) の検体を用いて検討を行った。



## B. 研究方法

### 1. ELISA

AgH および AgM-F3、我々がこれまでに同定してきた Hc1 および Hc6 の合計 4 種の *H. capsulatum* 抗原タンパク質について His-tag 融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。発現させたタンパク質はいずれも封入体として回収され、8M 尿素で可溶化した。封入体からの抗原タンパク質の精製はニッケルカラムを用いて行い、250mM イミダゾールを含むバッファで溶出した。得られたタンパク質を精製抗原タンパク質として、ELISA に用いた。

ELISA は以下の通り行った。抗原タンパク質をコーティングバッファ中で MaxiSorp (Nunc) に一夜、4°C にてコーティングした。

TBS にて洗浄後、Protein Free Blocking Buffer solution (Pierce) によるブロッキングを行った。ブロッキング後の乾燥は Protein Free Blocking Buffer solution を除いた後、室温にて 2 時間放置することにより行った。乾燥後のプレートは使用するまでの 3 日間室温にて保管した。100 倍希釈した患者検体を 1 時間、25°C にて反応させた。PBS-0.1% Tween 20 (PBS-T) で洗浄後に Protein L-HRP を添加し、1 時間、37°C にて反応を行った。TBS-T による洗浄後、TMB を用いた発色反応を室温で行った。停止液にて反応を止めて速やかに 450nm における吸光度を測定した。

本研究で用いた血清検体はベトナム・バクマイ病院感染症科を受診した呼吸器感染症が疑われる 90 検体を用いた。一部は *Histoplasma* DxSelect kit (Focus Diagnostics 社) による検討がなされている。

## C. 研究結果

### 1. ELISA での検討結果

AgH、AgM-F3、Hc1、Hc6 の 4 抗原全てを 1 つのウェルにコーティングしたプレートで検討を行った。今回の検討では全体として高

バックグラウンドとなる結果が得られた。

90 検体について ELISA で解析し、その結果、得られた吸光度の平均値+2SD の値を上回った検体が 1 検体あった。本検体を含む 32 検体については *Histoplasma* DxSelect kit での検討が共同研究者らによって現在進められている。

すでに *Histoplasma* DxSelect kit にて測定が行われている 55 検体について今回の ELISA の結果と比較した。55 検体中で *Histoplasma* DxSelect kit にて陽性の検体 30 検体、陰性の検体 25 検体に分けて、我々の確立した ELISA 法で得られた吸光度を比較したが 2 群の間に有意な差は得られなかった。

## D. 考察

今回の検討では全体として高バックグラウンドとなる結果が得られた。この原因として 2 つの可能性が考えられた。第一に今回は海外の流行地に実際にコーティングおよびブロッキング済みの ELISA プレートを持ち込み、検討を行っている。今回プレートを輸送するにあたり、3 日間室温で保管を行っている。これまでの検討では 4°C、3 日間保管条件下ではバックグラウンドの上昇が認められていなかった。しかしながら、4°C においても 10 日間保管後にバックグラウンドの上昇が認められていることから、室温での輸送・保管がより早いバックグラウンド上昇要因となったと推測される。海外の流行地などで使用するにあたり、当面はコーティングとブロッキングをアッセイの直前に行うことが必要と考えられる。また、プレートを予製して用いるにはさらなる検討が必要と考える。もう一つの可能性として、検体については一部沈殿が生じていた等、現地での検体の保存状態が必ずしも万全でなかったことが高バックグラウンドにつながった可能性がある。今後の検討においてはこれらの高バックグラウンドの要因を考慮し

て検討を進めるとともに、検体の品質の改善も併せて検討する必要がある。

本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る。*Histoplasma DxSelect kit* における陽性検体と陰性検体の 2 群に分けて比較を行ったが、我々が確立した ELISA 法により得られた吸光度の値に有意な差は得られていない。今回の検体では被験者の選択は *Histoplasma DxSelect kit* による抗体陽性のみで行われておりヒストプラズマ症の確証は得られていない。他の ID 法、CF 法の結果も併せて検討を行うことにより被検者の信頼性が向上し、また本 ELISA の有用性が更に明らかになると考える。

今後新たに流行地において得られた患者検体および健常人について ID 法、CF 法、*Histoplasma DxSelect kit* と共に本 ELISA でも解析を行い、比較検討を行う予定である。なお、流行地では症例数が多い反面、多くは発展途上国であることから診断の確実性は低くなる傾向にある。検体収集先も検討する必要性が考えられるが、この種の研究の宿命でもあり、パートナーとの信頼関係をさらに醸成させながら、改善していきたい。

#### E. 結論

流行地の 90 検体を用いて我々が確立した ELISA を用いて解析し、1 検体において抗原と強い反応性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

### 3. real-time PCR による迅速診断法の開発

#### A. 研究目的

我々は、これまでに同定した新規抗原タンパク質のうち、Hc1 遺伝子の塩基配列相同性が近縁の菌種間であっても低いことに着目し、Hc1 遺伝子を標的にした real-time PCR による診断法の開発を進めてきた。real-time PCR には、DNA と RNA のキメラプローブ（サイクリングプローブ）と RNase H の組み合わせによる高感度かつ特異性の高いサイクリングプローブ法を採用し、*H. capsulatum* の Hc1 遺伝子を特異的かつ高感度に検出可能な real-time PCR 法を確立した。臨床検体から *H. capsulatum* の Hc1 遺伝子を検出する試みでは、菌由来の DNA が豊富に含まれると考えられるホルマリン固定パラフィン包埋組織切片からは高い蛍光シグナルが検出されたが、菌由来の DNA が少量しか含まれないと考えられる血清からは弱い蛍光シグナルしか検出されなかった。そこで、本年度の研究では、さ

らに本 real-time PCR の検出感度を上げるために nested real-time PCR の検討を行った。

## B. 研究方法

通常の real-time PCR に使用するプライマー対の外側に新たなプライマー対を設計し、それらを用いて通常の PCR (1st PCR) を行った後、さらに 1st PCR 産物を鋳型に real-time PCR (2nd PCR) を行った。検体には同一のヒストプラズマ症患者から抗真菌薬治療前と治療後に採取した血清をそれぞれ 1 検体とベトナム・バクマイ病院感染症科を受診した HIV 陽性・抗ヒストプラズマ抗体陽性の患者から採取した血清 10 検体を用いた。コントロールには HIV 陽性・抗ヒストプラズマ抗体陰性の血清 10 検体を用いた。血清からの DNA 抽出には NucleoSpin® Plasma XS (マッハライ・ナーゲル社) を用いた。

## C. 研究結果

通常の real-time PCR では抗真菌薬治療前に採取したヒストプラズマ症患者血清 1 検体から 34 サイクル以降に弱い蛍光ではあるもののシグナルが検出された。nested real-time PCR では通常の real-time PCR が陽性であった上述の 1 検体のみから強い蛍光シグナル(スタンダード DNA と同様の強度)が検出された。コントロールを含むその他の検体からは通常の real-time PCR および nested real-time PCR とともに蛍光シグナルは検出されなかった。

## D. 考察

今回の検討では、通常の real-time PCR で弱い蛍光シグナルが認められた検体のみで nested real-time PCR により蛍光シグナルを増幅させることに成功した。しかし、通常の real-time PCR により蛍光シグナルが認められなかった検体では nested real-time PCR においても蛍光シグナルは検出されなかった。

また、同一患者から採取した検体のうち抗真菌薬治療を受ける前の検体からはヒストプラズマが検出されたが治療後の検体からは検出されなかった。このことから nested real-time PCR 法を用いても蛍光が検出されなかった原因の一つとして抗真菌薬治療が血中の菌由来 DNA を検出可能な量以下に減少させている可能性が考えられた。ベトナムの検体においては抗ヒストプラズマ抗体が陽性であったにもかかわらず、nested real-time PCR ではヒストプラズマは検出されなかった。この原因についても抗真菌薬治療による影響の可能性が原因の一つとして考えられたが、残念ながら臨床情報が得られなかったため、正確な評価が行えなかった。

臨床検体数が豊富な反面、検体の質に限界が有る点は抗体測定系と同様であった。今後新たに臨床情報が明らかな、あるいは臨床情報をたどって調査すること可能な患者検体を集め、本 real-time PCR および nested real-time PCR の有効性評価を引き続き行う予定である。

## E. 結論

通常の real-time PCR で弱い蛍光シグナルしか検出されなかった 1 検体において nested real-time PCR 法を用いることにより蛍光シグナルを増幅させることに成功した。しかし、その他の検体では nested real-time PCR 法を用いても蛍光は検出されなかった。その原因の一つとして抗真菌薬治療が影響している可能性が考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

準備中

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

図 1

わが国における輸入真菌症患者数の推移

