

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）

分担者研究報告書

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワーク
の促進と共同研究体制の強化に関する研究（H23 - 新興—指定—020）

ベトナムにおけるヒストプラズマ症の基礎的、臨床的研究

研究分担者：大野秀明

国立感染症研究所 真菌部 室長

研究協力者：田辺公一、梅山 隆、山越 智、宮崎義継（国立感染症研究所真菌部）

Thi Thu Ha Hoang, Pham Thanh Hai, Nguyen Thuy Tram (National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam) , Nguyen Van Tien, Nguyen Quang Tuan (Bach Mai Hospital, Vietnam) , Nguyen Thai Son (103 Hospital, Vietnam), Nguyen Van Hung (National Lung Hospital, Vietnam)

研究要旨:ベトナムとの真菌症に関する共同研究の一つとしてベトナムにおけるヒストプラズマ症の疫学研究、ヒストプラズマ属の環境中生息状況調査を行った。ハノイ市における医療機関で呼吸器感染症が疑われた症例を対象にしたヒストプラズマ症の疫学調査では、提出された 258 検体中 9 検体がヒストプラズマ属特異的 PCR 法で陽性を示した。また、血清中の抗ヒストプラズマ抗体の保有状況の検討では、144 検体中 26 検体で抗体陽性と判定された。我々の検討から、ベトナムにおいても他の東南アジア地域と同様に、ヒストプラズマ症は決して稀な真菌症ではないことが伺われた。

A. 研究目的

ヒストプラズマ症は別名「洞窟熱」ともいわれ、高病原性真菌（BSL3）であるヒストプラズマ属（*Histoplasma capsulatum*）を原因真菌とし、HIV 感染者など免疫不全者に加え、健常人にも発病が認められる真菌感染症である。ヒストプラズマ属は通常土壌中に生息し、コウモリや鳥類の糞中で盛んに増殖する真菌

で、世界的に広く生息が確認されているが、なかでも米国ミシシッピー川流域や中南米、西アジア、東南アジア、オーストラリアが大きな侵淫地域であり、本感染症は地域流行型真菌症の性格をもつ。日本人のヒストプラズマ症患者は年々増加傾向を示し、その多くは北中米と東南アジアでの感染であることが考えられているが、東南アジア地域でのヒスト

プラズマ症の実態、流行状況、感染源、危険因子等については未解明な点が多く、日本人現地在住者、日本人旅行に対する適切な感染危険情報も少ない。このような状況を鑑み、本研究では、東南アジア地域での本症の実態把握、流行状況調査、診断能力の向上ならびに分離されたヒストプラズマ属の各国での疫学的解析や基礎研究の推進・発展主要内容として、それぞれの国の感染症研究機関との共同研究ネットワークを構築することを目的とした。

B. 研究方法

昨年度と同様に、ベトナムの国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemiology: NIHE, Vietnam) の希少細菌研究室と、ハノイ市の Bach Mai Hospital、103 Hospital、National Lung Hospital との共同研究として検討を行った。検討内容としては、呼吸器感染症疑い患者での肺ヒストプラズマ症 (急性、慢性) の状況調査 (疫学調査) 診断支援、ヒストプラズマ属生息状況に関する調査、環境リスク因子の同定を行った。

1) 北部ベトナム地域におけるヒストプラズマ症の疫学調査

NIHE ならびにハノイ市 Bach Mai Hospital、103 Hospital、National Lung Hospital の感染症部門検査部が主体となり、これら医療機関を受診した(不明熱)患者で、ヒストプラズマ症を含めた侵襲性真菌症が疑われる患者から診断目的で検査に提出された臨床検体を用いて培養検査、遺伝子検査、抗体検査を実施した。患者のエントリー基準と

して、1) 無症状だが胸部 X 線検査で肺野に陰影を認める、2) 急性呼吸器症状を呈する (発熱、胸痛、倦怠感、咳嗽など)、3) 結核様の慢性の呼吸器症状を呈し徐々に悪化する症例 (結核は否定する)、4) 免疫不全、口腔内潰瘍、中枢神経症状を呈した症例を対象とした。対象検体は喀痰、気管支洗浄液、髄液、胸水、血液、生検組織などで、状況に応じ培養法、遺伝子診断法 (PCR 法)、血清診断法を行った。PCR 法については我々が行っているヒストプラズマ属検出用 PCR 法 (Ohno H, et al. J Infect Chemother, 2013) を行い、また血清診断法についても我々が診断目的で使用しているキット (Histoplasma DxSelect, Focus Diagnostics, Cypress, CA) を用いて抗ヒストプラズマ抗体の有無を検出した。

2) ヒストプラズマ属生息状況に関する調査

ハノイ市内ならびに近郊の公共エリア、住宅地、病院周辺、洞窟などでコウモリや家禽類の糞で汚染された土壌検体を対象としてサンプリングを行った。得られた土壌検体は冷蔵保存の上 NIHE へ運搬し、以後のヒストプラズマ属培養法、PCR 法へ供した。

(倫理面からの配慮について)

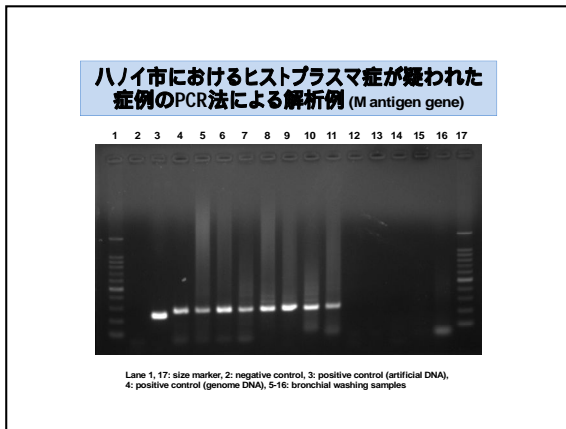
本検討においては NIHE の倫理委員会 (No.01 IRB) ならびに国立感染症研究所倫理委員会 (No.365, No.460) の承認を受けた。

C. 研究結果

1) 北部ベトナム地域におけるヒストプラズマ症の疫学調査

現在まで喀痰、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 258 検体、生検組織 1 検体、血清 144 検体が NIHE へ検査目的にて供された。BALF については培養法、PCR 法を行い、培養法陽性例は認めなかったが、PCR 法陽性は計 9 例 (3.5%) で認めた (図 1)。また、PCR 法で陽性となった検体について、その増幅産物の塩基配列を確認したところ、*Ajellomyces capsulatus* と 97-99% の相同性が確認された。さらに、増幅産物の塩基配列の一塩基多型について検討した結果、米国株やタイ株とは違った塩基配列パターンが認められた (図 2)。この塩基配列をもとに、系統樹を作成すると、ベトナムでの検体に含まれていたヒストプラズマ属由来と考えられる DNA は、タイの分離株とは明らかに違うクレードで、むしろ米国株に近いクレードを形成することが伺われた (図 3)。一方、血清についてはすべて血清診断法に供され、26 検体 (18%) が抗ヒストプラズマ抗体陽性と判定された (図 4)。基礎疾患として HIV 感染の有無別で抗体陽性率を検討したところ、HIV 陽性検体 15 検体中 3 検体 (20%)、HIV 陰性検体 129 中 23 検体 (18%) が抗体陽性であった (図 4)。

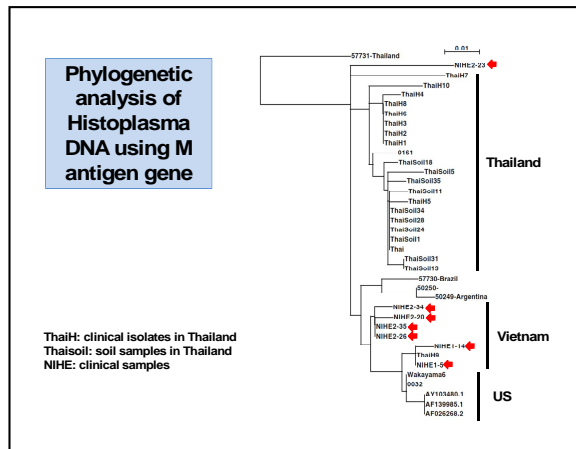
(図 1)



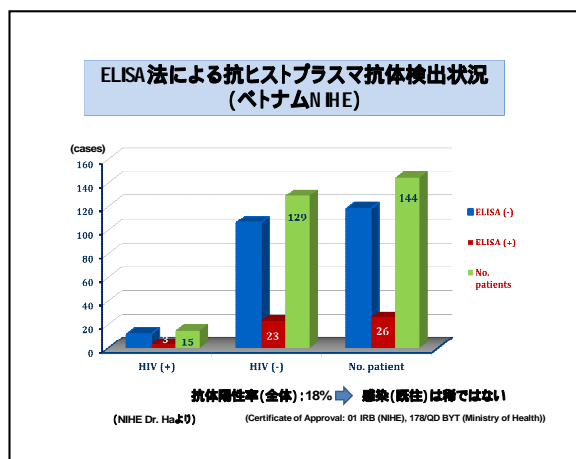
(図 2)



(図 3)



(図 4)



2) ヒストプラズマ属生息状況に関する調査
本年度は現在まで、コウモリ糞や家禽類の糞汚染土壌検体計 152 検体が採取された。

これらを対象に検討した結果、培養法で陽性例は認めなかったが、PCR 法陽性が 3 例で確認された。

D. 考察

ヒストプラズマ症は、わが国では海外で感染し国内で発病する、いわゆる輸入真菌症とされているが、東南アジア、とくにタイでは HIV 感染者を中心に比較的高い頻度で認められる真菌症である。本感染症は基本的にヒト-ヒト感染がないことや、培養陽性率が極めて低いことから診断が困難であり、ベトナムにおいては本症の疫学情報の不足が認められる。このような背景から、ベトナムにおけるヒストプラズマ症の実態や感染源と考えられる環境の検討を行った。

昨年度までは培養法、PCR 法で陽性となった症例は認めなかったが、本年度は気管支肺胞洗浄液検体から初めて PCR 法でヒストプラズマ属 DNA 陽性となった検体が認められた。これら陽性例はすべて培養法陰性であったが、臨床症状や PCR 産物の解析からヒストプラズマ症と診断できると考えられる。すなわちベトナム北部における、微生物学的検査成績をともなった初のヒストプラズマ症例となる。この事実は、ベトナムにおいても呼吸器感染症としてのヒストプラズマ症は決して稀ではない深在性真菌症であることが伺われ、今回同時に検討した抗体検出率の値もこの点を支持しているものと考ええる。また、M 抗原遺伝子の一塩基多型解析では、タイ型とは離れ、むしろ米国型に近いクレードを形成することが認められることから、東南アジアにお

けるヒストプラズマ属の遺伝的多型性を示唆する結果が認められたことは興味深いと考えられた。今後、更なる症例の蓄積が求められる。

さらに本研究では、ヒストプラズマ属の感染源となりうる環境の検討も行ったが、3 検体のみで PCR 法が陽性であった。これについて一定の見解はまだ付与できないと考えるが、我々のタイでの検討の結果を考慮すると、ベトナムにおいても家禽類の糞汚染土壌が感染源である可能性は高い。

本研究は日本とベトナムとの真菌症に関する共同研究の先駆けであり、今後継続的な研究体制を維持しながら発展させていくことが重要と考えられる。

E. 結論

ハノイ市を中心とする北部ベトナムにおいて、急性呼吸器感染症が疑われる症例から得られた臨床検体中に、ヒストプラズマ属の遺伝子が検出された症例を経験した。また、抗ヒストプラズマ抗体保有状況の検討から、この地域におけるヒストプラズマ症は決してまれな真菌症ではないことが推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1)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.

2) Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother* 19 (5): 999-1003, 2013.

3) 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.

4) 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.

5) Kaneko Y, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against *Candida albicans*. *J Infect Chemother* 19 (6): 1141-1145, 2013.

6) 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 and Shibuya K. How histopathology can contribute to an understanding of defense mechanisms against *Cryptococci*. *Mediators of Inflammation*, volume 2013, article ID 465319, 2013.

7) Norkaew T, Ohno H, Sriburee P, Tanabe K, Tharavichitkul P, Takarn P, Puengchan T, Burmrungsri S, Miyazaki Y. Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand by nested PCR. *Mycopathologia* 176 (5): 395-402, 2013.

8) 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.

9) 大野秀明. 結核感染症の病態-結核発症の危険因子とは?-. *治療* 95 (6): 1159-1163, 2013.

10) 大野秀明、荒岡秀樹、梅山 隆、金子幸弘、宮崎義継. 接合菌症. *臨床検査* 58 (1): 97-103, 2014.

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, Yokohama, 2013.

2) Sriburee P, Puengchan T, Ohno H, Tanabe K, Siriaunkul S, Lamaroon A, Chanwong S, Khamwan C, Khantawa B, Miyazaki Y. Early diagnosis of histoplasmosis by nested PCR. 6th Trends in Medical Mycology, Copenhagen, 2013.

3) Tanabe K, Ohno H, Hoang Thi Thu Ha, Nguyen Thuy Tram, Miyazaki Y. Histoplasmosis. NIID-NIHE review meeting on collaborative research program, Hanoi, 2013.

国内学会

1) 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日-6月1日、東京、2013.

2) 秋根 大、加藤幹朗、辻 浩史、榎村浩一、大野秀明、小林裕幸. 2 cases of cryptococcal meningitis in HIV-uninfected healthy patients. 第87回日本感染症学会、第61回日本化学療法学会総会合同学会、6月5日-6日、横浜、2013.

3) 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、東京、2013.

4) 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、東京、2013.

5) 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、東京、2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし