

201318066A

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

侵襲性真菌症例から分離された原因真菌の
分子疫学解析と疫学データベース化を用いた
院内感染対策の研究

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 田辺 公一

平成26(2014)年 3月

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

侵襲性真菌症例から分離された原因真菌の
分子疫学解析と疫学データベース化を用いた
院内感染対策の研究

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 田辺 公一

平成26（2014）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

侵襲性真菌症例から分離された原因真菌の分子疫学解析と疫学データベース化を用いた院内感染対策の研究----- 1

研究代表者（国立感染症研究所・生物活性物質部・田辺 公一）

I. 総括研究報告書

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）
総括研究報告書

侵襲性真菌症例から分離された原因真菌の分子疫学解析と
疫学データベース化を用いた院内感染対策の研究

研究代表者 田辺 公一
国立感染症研究所 真菌部 主任研究官

研究要旨

Candida 属や *Aspergillus* 属による侵襲性真菌症に関する疫学研究は乏しく、治療ガイドラインは設けられているが予後は一般に不良である。*Candida* 属は臨床検体から最も頻繁に分離される真菌であり、院内感染を引き起こすような高病原性株が存在することが報告されている。分離された *Candida* 属の疫学情報（遺伝学的系統解析結果や薬剤感受性試験結果）が充実すれば、高病原性株や薬剤耐性株の早期発見が可能になり、院内感染対策や治療方針の決定に大きく貢献できるものと期待される。本研究では、侵襲性感染を引き起こした *Candida* 属を医療機関から提供していただくネットワークを構築し、継続的サーベイランスを行うこと、また、提供された菌株の遺伝子型解析を行い、侵襲性感染や薬剤耐性化を起こしやすい株の予測を可能にすることを目的とした。

平成25年度は、医療機関より送付いただいた *Candida albicans* 株の MLST 遺伝子型解析と薬剤感受性生試験を行い、菌が分離された臓器や薬剤感受性と遺伝子型との相関について検討を行った。

A. 研究目的

本研究では、国内の主要医療機関において侵襲性感染を引き起こした *Candida* 属、特に分離頻度の高い *C. albicans* を収集し、感染症発生動向と分離菌の薬剤感受性を検証することを目的とする。分離された菌の菌学的解析、分子疫学的解析を通じて、これらに共通する特定の遺伝学的パターンや因子の存在を検討する。さらに、特定分子系統の菌種において発病がより高頻度に認められるのかの検討

を行い、最終的に分子疫学型と予後に関するデータベースを構築する。これにより、どのような症例により重大な関心を払うべきかや、発病リスクを低減する院内環境整備など内因性感染、院内感染対策に活用することで生命予後の改善を図るとともに、効果的な治療を通じた国民医療費軽減にも貢献することを目的とする。

平成25年度は、医療機関において分離される *Candida* 株を分離臓器の区別なく送付いただいた。菌種同定を

行い、*C. albicans*についてコロニーPCR産物を用いた迅速かつ簡便な実験手法で Multi Locus Sequence Typing (MLST) によって各株の遺伝子型解析を行った。また、対象とする菌株を用いて、簡易的な薬剤感受性試験を行い、耐性株の有無のみを調べた。以上の解析結果と、分離臓器との相関を検討した。

B. 研究方法

<菌株輸送のプロトコル>

埼玉医科大付属病院・検査部より月2回を目安に、臨床検体(皮膚、喀痰、血液、膿など)から分離された酵母様真菌を分与いただいた。介入は行わず検査の一環で分離された菌株のみを対象とした。

<Candida株遺伝子解析>

7遺伝子の特定の領域をコロニーPCRで増幅し、塩基配列を決定しMLST解析を行った。

<薬剤感受性試験>

臨床で用いられる代表的な抗真菌薬(フルコナゾール、ミカファンギン、アムホテリシンB)について耐性株の有無を調べた。96穴プレートのすべてのウェルに耐性株しか発育できない薬剤を含む培地を調製し、同じく96穴プレートの各ウェルに菌の懸濁液を調製し、トランスファープレートを用いて菌の接種を行った。この実験系によって耐性株の有無について一度に96株試験することができた。

(倫理面への配慮)

菌株が分離された臓器や患者の疾

患名など、臨床情報を利用した解析を予定しているため、埼玉医科大付属病院、国立感染症研ともに医学研究倫理審査委員会の承認を得る手続きを前年度に完了した。

C. 研究結果

<Candida株遺伝子解析>

MLST解析に必要な増幅する遺伝子名および遺伝子領域の長さは以下のとおりである。

表1 MLST解析に用いた遺伝子

| gene name | length(bp) |
|-----------|------------|
| AAT1a | 373 |
| ACC1 | 407 |
| ADP1 | 443 |
| MPIb | 375 |
| SYA1 | 391 |
| VPS13 | 403 |
| ZWF1b | 491 |

(<http://www.mlst.net/>)

比較的短い領域であるために、追加のプライマーは設定せず、増幅に用いたプライマーで双方の末端から塩基配列決定を行った。

埼玉医大より150株の*Candida*株を分与いただき、解析を行った。まずリボソームDNAの塩基配列を決定し、遺伝子データベース情報検索から104株(69.3%)が*C. albicans*であることを確認し、MLST解析に進めた。すべての*C. albicans*のMLSTを年度内に完了させることは不可能であるため、血液(侵襲性感染株)、尿(重症

感染と関連が低い) から分離された株から優先的に解析を進めた。

今年度、血液より分離された *C. albicans* 株は 11 株 (11/104=10.6%) であり、すべてについて MLST 解析が完了した。また、血液以外から分離された 28 株についても MLST 解析が完了した。遺伝子型については百種類以上が登録されており、互いに完全一致するケースは少ないが、配列の相同性を利用したクレード分類を行うことができる。血液培養分離株ではクレード番号 2、4、9 が多かったのに対して、それ以外の分離株はクレード番号 1 のものが多かった。

表 2 MLST 解析結果

| strain # | clade# |
|------------|----------|
| 尿 | |
| 1 | 3 |
| 2 | 1 |
| 3 | specific |
| 4 | 2 |
| 5 | 2 |
| 6 | 1 |
| 7 | 1 |
| 8 | 3 |
| 9 | specific |
| 10 | 1 or 15 |
| 11 | 1 |
| 12 | 1 |
| 13 | 11 |
| 呼吸器 (喀痰など) | |
| 1 | 3 |
| 2 | 1 |

| | |
|------|----------|
| 3 | 1 |
| 4 | 4 |
| 5 | specific |
| 6 | specific |
| 7 | |
| 8 | specific |
| 9 | 6 |
| 10 | 11 |
| 11 | 3 |
| 12 | 1 |
| 13 | specific |
| 14 | 1 |
| 15 | 17 |
| 16 | 1 |
| 血液培養 | |
| 1 | 2 |
| 2 | 2 |
| 3 | 4 |
| 4 | 4 |
| 5 | 9 |
| 6 | 9 |
| 7 | 9 |
| 8 | 9 |
| 9 | 4 |
| 10 | 1 |
| 11 | 9 |
| 12 | 4 |

分与いただいた *Candida* 株の薬剤感受性を調べた。耐性化が懸念される、アゾール系抗真菌薬、キャンディン系抗真菌薬についてまずはスクリーニングを行った。96 株の菌液を 96 穴プレートにそれぞれ調製し、耐性株だけが発育できるような液体培地を接種

した。この試験で発育してきた耐性化候補株について詳細に薬剤感受性試験を行った。その結果、8株のアゾール系抗真菌薬耐性株を同定した。キャンディン系抗真菌薬耐性株やアムホテリシン B 耐性株は検出されなかった。

D. 考察

本検討における遺伝子型解析を行った株数はまだ十分ではないが、血液培養分離株の遺伝子型は互いに共通性があることが予想された。欧州で行われた同様の検討においては、特定の遺伝子型クレードに属する *C. albicans* 株が血液培養から分離される頻度が高いという報告がある

(Eukaryot Cell. 2007

Jun;6(6):1041-52.)。これらの結果は、すべての *C. albicans* 株が同じ確率で重症の血流感染症を引き起こすのではなく、血流感染症を引き起こす確率は *C. albicans* 株によって異なることを示唆している。この仮説をさらに検証するために、さらに多数の検体を複数の医療機関から分与いただき、解析する必要はある。

薬剤感受性の簡易試験の結果、分与いただいた株の中に、8株のアゾール耐性 *C. albicans* 株が存在したが、分離された臓器の共通性や、遺伝子型の相同性もなかった。この結果は、それぞれのアゾール耐性株が独立して派生した可能性を示唆しており、多剤耐性黄色ブドウ球菌の院内集団感染例のように単一株の院内感染伝播の可

能性は低いものと考えられた。また、キャンディン耐性、ポリエン（アムホテリシン B）耐性株は、分与いただいた株の中にはいずれも存在しなかった。これらの抗真菌薬に対する耐性 *C. albicans* 株の発生頻度は極めて低いと考えられており、本検討で得られた結果は、これまでの予測と矛盾しないものであった。

MLST 解析と薬剤感受性試験結果より、*Candida* 株が一人の患者から派生して院内感染を引き起こす可能性は極めて低く、多くの *Candida* 感染症は各患者に常在していた菌が播種性感染を引き起こす孤発性のものであると考えられる。したがって本検討は、院内感染対策よりも、各患者の保有する菌株が重症感染症を引き起こすかどうかのリスク評価への応用を目指すべきであると考えられた。

E. 結論

C. albicans 株の MLST 解析結果から、血液培養分離株の遺伝子型には、互いに共通性があることを示唆する結果が得られた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Norkaew T, Ohno H, Sriburee P, **Tanabe K**, Tharavichitkul P, Takarn P, Puengchan T, Bumrungsri S, Miyazaki Y.

- Detection of Environmental Sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by Nested PCR. *Mycopathologia*. 2013;176(5-6):395-402
2. 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*. 2013;66(3):216-21.
 3. 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*. 2013 13(4):411-21
 4. 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*. 2013 88(2):371-81 (*Corresponding author)
 5. Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of Epidemiology of Clinically Isolated *Cryptococcus neoformans* Strains in Japan by Multilocus Sequence Typing. *Jpn J Infect Dis*. 2013;66(1):51-5
 6. Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother*. 2013 in press
- 学会発表
1. 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 シンポジウム 2013 年 9 月
2. 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 感染症の病態解析 第 57 回 日本医真菌学会総会 シンポジウム 2013 年 9 月
 3. 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 2013 年 9 月
 4. 犬飼達也、田辺公一、名木 稔、中山浩伸：病原真菌 *Candida glabrata* のマンノプロテイン TIR3 のステロール取り込みにおける役割 第 57 回 日本医真菌学会総会 2013 年 9 月
 5. 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 2013 年 9 月
 6. 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ならびに病原因子の解析 第 57 回 日本医真菌学会総会 2013 年 9 月
 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 2013 年 9 月
- H. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）
該当なし

