

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  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

バイオテロに使用される可能性のある真菌感染症の迅速診断法の確立  
*Coccidioides* 属および *Histoplasma* 属の LAMP 法による検出系の改良

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 名木 稔、梅山 隆、田辺公一 国立感染症研究所 真菌部第一室

研究要旨：バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌として、BSL3 に分類されるコクシジオイデス属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*)、ヒストプラスマ属 (*Histoplasma capsulatum*) が想定される。これらの病原真菌は感染性が高く、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、培養を要しない検査技術の開発が望まれる。本研究は、喀痰などの臨床検体からヒストプラスマなどの高病原性真菌 DNA の検出法を検討し、より簡便で成績の良い DNA 検出法を開発し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とする。今年度は、LAMP 法によるコクシジオイデスおよびヒストプラスマ DNA の高感度検出系の実用化を目指し、乾燥ポリメラーゼの有用性を検討し、菌体取り扱いマニュアル、プライマーセットおよび乾燥ポリメラーゼを使用した検査キットを作製して集団感染時に検査機関、医療機関に送付する準備を整えた。

A. 研究目的

真菌症は HIV 感染患者や臓器移植、抗癌剤治療などの免疫不全患者のみでみられる感染症と誤解され、公衆衛生の観点から重要性が認識されにくかった。しかし従前からクリプトコックス症やコクシジオイデス症、ヒストプラスマ症などは健常者に起こることが知られており、健常者における集団感染事例や院内感染事例が報告されるようになってきたことから、他の病原体同様にサーベイランスや疫学研究の重要性が増してきた。

バイオテロに用いられる可能性のある病原真菌としては、BSL3 に分類されるコクシジオイデス属 (*Coccidioides immitis*, *C. posadasii*) とヒストプラスマ属 *Histoplasma capsulatum*、BSL2 に分類されるクリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) 等が想定される。いずれの真菌も感染性が高く健常者でも感染が成立し、播種性感染に進行すると致死率は極めて高くなるが、これらの病原真菌は日本国内には定着していないと考えられてきた。しかし、近年では海

外の流行地への渡航歴のないヒストプラズマ、クリプトコックス・ガッティ感染患者が報告されるようになり、国内にも感染源が存在する可能性が示唆されている。また、コクシジオイデス属、ヒストプラズマ属については、分離培養で大量の分生子を飛散させる危険性があることから、検査室での分離培養は飛散胞子による集団感染を引き起こす危険性が考えられる。

本研究では、分離培養された BSL3 真菌の安全かつ簡便な診断系を構築し、バイオテロを含めた集団感染事例が起きた際の迅速診断に役立てることを目的とする。今年度は、コクシジオイデス属およびヒストプラズマ属の簡便かつ高感度な検査法である LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を実用化レベルまで改良する目的で、乾燥ポリメラーゼの有用性の検討、乾燥ポリメラーゼを用いた LAMP 法キットの作製、感度および特異度の検討、菌体取り扱いマニュアルの作製を行った。

## B. 研究方法

コクシジオイデス属検出のための LAMP 法の標的配列として、以前開発したコクシジオイデス特異的 PCR の標的である Coi9-1 領域を用いた。ヒストプラズマの標的配列として、M 抗原遺伝子を用いた。4 種類の LAMP プライマーおよび loop プライマーは LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp>) で設計したものをを用いた。

LAMP 反応は栄研化学の Loopamp DNA 増幅試薬キットおよび検出試薬として Loopamp 蛍光・目視検出試薬を用いた。専用の 200  $\mu$ l PCR チューブを用い、サーマルサイクラーで 63 で反応を行った。検討に用いた *C. immitis*、*Coccidioides posadasii* および *H.*

*capsulatum* の DNA は臨床分離株 (各 4 株ずつ) から抽出した。陰性コントロールとして *Aspergillus fumigatus* AfS35 と *Candida albicans* SC5314 の DNA を用いた。反応後、UV 写真撮影装置で検出を行った。

(倫理面からの配慮について)

本実験では臨床検体などは使用せず、分離された菌の DNA を用いるのみであったことから、倫理面に関する配慮は不要であった。

## C. 研究結果

### 1) 乾燥ポリメラーゼを使用した LAMP 法の検討

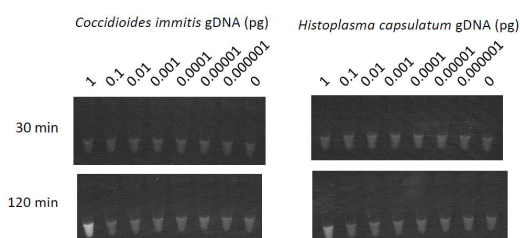


図 1. 乾燥ポリメラーゼを使用した LAMP 法の感度測定

*C. immitis* および *H. capsulatum* から抽出したゲノム DNA を定量し、10 倍ずつの希釈系列を作製して、乾燥ポリメラーゼを使用して LAMP 反応を行った。(図 1)

*C. immitis*、*H. capsulatum* 共に 2 時間反応後の検出限界は 1 pg であった。以前行った、通常のポリメラーゼ (液体品) を用いた検討では、*Coccidioides* の検出限界は 100 fg であった (*Histoplasma* は未実施)。乾燥ポリメラーゼを用いた場合、感度は 10 分の 1 に低下したが、十分に高感度であると考え、長期間保存可能である乾燥ポリメラーゼを用いて今後の検討を行うこととした。

### 2) 複数の *Coccidioides* および *Histoplasma*

## 臨床分離株を用いた検討

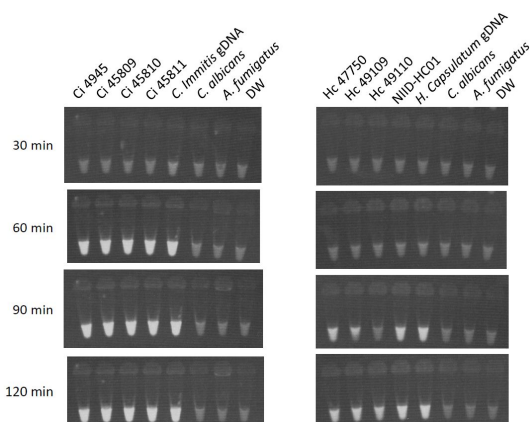


図 2. 複数の臨床分離株を用いた LAMP 法特異度の検討

これまで、*Coccidioides* 属、*Histoplasma* 属各 1 株ずつの臨床分離株から抽出し、精製した DNA を用いて LAMP 法の検討を行ってきた。千葉大学真菌医学医療センターから両菌種複数株の臨床分離株を分与して頂き、それらの菌株を用いて LAMP 法の特異度を検討した(図 2)。また、検査をより簡便に行うことを目的に、DNA 抽出には精製キット等を使用せず、エタノール滅菌後の菌体を煮沸した上清を用いた。今回検討した各 4 株の臨床分離株は全て LAMP 法によって検出された。また、120 分の反応では陰性コントロールは検出されなかった。さらに、DNA を精製することなく菌体煮沸液を用いて検査を行うことができることがわかった。

## D. 考察

ヒストプラズマ属やコクシジオイデス属がテロ目的で使用され、国内感染者が発生した場合には、検体から菌が分離されるかどうか予想できないので、医療機関の検査室でこれらの菌を偶発的に培養してしまう可能性が考えられる。

病原体の検出法について、PCR 法はサーマルサイクラー・増幅酵素の性能や操作者の技術への依存が強く、検査実施機関によって結

果が異なることも多い。LAMP 法は非常に簡素で、反応温度が定温であるため、サーマルサイクラーの性能に依存しないという利点がある。しかも、短時間で微量 DNA を検出することが可能であり、本実験で確立した LAMP 法を用いればコクシジオイデスおよびヒストプラズマを迅速簡便に検出できる。現時点では菌体から調製した DNA でしか検証できていないが、臨床検体を用いて本研究で確立した LAMP 法が可能になれば、上記のような危険を伴う菌の培養を回避することも可能であるため、今後検討を進めていきたい。

## E. 結論

LAMP 法によるコクシジオイデス属およびヒストプラズマ属の迅速診断キットを作製し、集団感染時に検査機関、医療機関に送付する準備を整えた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

英文原著

1. Saraya T, Tanabe K, Araki K, Yonetani S, Makino H, Watanabe T, Tsujimoto N, Takata S, Kurai D, Ishii H, Miyazaki Y, Takizawa H, Goto H. Breakthrough invasive *Candida glabrata* in patients on micafungin: a novel *FKS* gene conversion correlated with sequential elevation of MIC. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(7):2709-2712, 2014.
2. Urai M, Kaneko Y, Niki M, Inoue M, Tanabe K, Umeyama T, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Potent drugs that attenuate anti-*Candida albicans* activity

of fluconazole and their possible mechanisms of action. J Infect Chemother. 20(10):612-615, 2014.

3. Ikeda I, Ohno T, Ohno H, Miyazaki Y, Nishimoto K, Fukushima S, Makino T, Ihn H. A case of Fusarium paronychia successfully treated with occlusive dressing of antifungal cream. J Dermatol. 41(4):340-2, 2014.
4. 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- $\gamma$  Produced in Part by iNKT Cells. J Infect Dis. , 2014.
5. Seki M, Ohno H, Gotoh K, Motooka DNAkamura S, Iida T, Miyazaki Y, Tomono K. Allergic bronchopulmonary mycosis due to co-infection with *Aspergillus fumigatus* and *Schizophyllum commune*. IDCases. 1:5-8, 2014.

#### 和文総説

1. 梅山 隆, 宮崎義継. 侵襲性カンジダ症の診断～血清診断～遺伝子診断. . 侵襲性カンジダ症. 115-117, 2014年, 医薬ジャーナル社.
2. 宮崎義継, 金子幸弘, 樽本憲人. V. 感染症検査・真菌. パーフェクトガイド検査値事典[第2版]. 477-481, 2014年, 総合医学社.
3. 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌症-よく目にする真菌症から今後注意すべき真菌症まで

-Aspergillus: 病態と抗原価の関連. 感染症内科. 2(6):575-580, 2014年.

4. 金子幸弘, 浦井 誠, 宮崎義継. III 診断・治療法から見た大切な真菌症、4 治療薬の選択と投与. 目で見る真菌と真菌症. p192-202, 2014年, 医薬ジャーナル社, 大阪.
5. 河野 茂, 亀井克彦, 二木芳人, 宮崎義継. 座談会: 深在性真菌症の診断・治療ガイドラインを読み解く. 呼吸. 33(5):435-43, 2014年.
6. 大野秀明, 宮崎義継. 日本にも現れたクリプトコックス・ガッティ. 日経サイエンス. 44(5):76p76, 2014年, 日本経済新聞出版社, 東京.
7. 田辺公一, 宮崎義継. 耐性病原体 up-to-date ~ 耐性メカニズムから治療戦略まで ~、1 抗微生物薬に対する耐性メカニズム、2 抗真菌薬耐性. 化学療法の領域. 30(S-1):20-5, 2014年.
8. 宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. ミニ特集: 病原体サーベイランス体制とその利用、国立感染症研究所の立場から. 小児科. 55(4):403-6, 2014年.
9. 浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継. 深在性真菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見えてくる今後の治療展望. どう変わり、どう攻める? 深在性真菌症の新しい治療. 感染と抗菌薬. 1:5-13, 2014年.
10. 浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継. どう変わり、どう攻める? 深在性真菌症の新しい治療: 深在性真菌症における治療薬の選択の変化 ガイドライン改訂から見えてくる今後の治療

展望. 感染と抗菌薬. 17(1):5-13, 2014年.

11. 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. ムーコル症: 診断の実際とピットフォール. 呼吸器内科. 25(1):32-7, 2014年.
12. 樽本憲人, 金城雄樹, 北野尚樹, 渋谷和俊, 前崎繁文, 宮崎義継. 全身性カンジダ感染増悪における iNKT 細胞の関与. Med Mycol J. 55J:J115-J122, 2014年.
13. 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年.

## 2. 学会発表

1. 金城雄樹, 上野圭吾, 浦井 誠, 金子幸弘, 大久保陽一郎, 清水公德, 大野秀明, 亀井克彦, 川本 進, 渋谷和俊, 宮崎義継. シンポジウム 3 病原性真菌の感染成立機構 クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
2. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木 稔, 大野秀明, 宮崎義継. アスペルギルスの抗真菌薬耐性. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
3. 壇辻百合香, 大野秀明, 梅山 隆, 上野圭吾, 大久保陽一郎, 田辺公一, 名木 稔, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 渋谷和利, 宮崎義継. マクロファージの貪食を指標とした *Cryptococcus gattii* 感染病態の評価. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
4. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井 誠, 川本 進, 亀井克彦, 大野秀明, 渋谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチンの作用. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
5. 浦井 誠, 金子幸弘, 上野圭吾, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の莢膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響. 第58回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
6. 田辺公一, 宮崎義継. カンジダ症における薬剤耐性. 第97回日本細菌学会関東支部総会. 10月30-31日, 2014年, 東京.
7. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 浦井 誠, 金子幸弘, 大野秀明, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10月29-31日, 2014年, 東京.
8. 名木 稔, 田辺公一, 石野敬子, 梅山 隆, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌の薬剤耐性の現状と課題. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10月29-31日, 2014年, 東京.
9. 本川奈々, 福田雄一, 今村圭文, 宮崎泰可, 泉川公一, 大野秀明, 柳原克紀, 宮崎義継, 早田 宏, 田代隆良, 河野茂. 肺アスペルギローマとの鑑別が困難であった *Pseudallescheria boydii* による肺菌球症の1例. 第62回日本化学療法学会西日本支部総会・第57回日本感染症学会中日本地方会学術集会・

- 第 84 回日本感染症学会西日本地方会  
学術集会 合同開催. 10月23日-25日,  
2014年, 岡山.
10. 多田明子, 山本剛伸, 藤本亘, 河口 豊,  
浦井 誠, 梅山 隆, 宮崎義継. 黒色菌  
糸症の1例. 第263回日本皮膚科学会  
岡山地方会. 9月21日, 2014年, 岡山.
  11. 上野 圭吾, 大久保陽一郎, 清水公德,  
金子幸弘, 浦井 誠, 水口裕紀, 奈良拓  
也, 川本 進, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮  
崎義継, 金城雄樹. 高病原性クリプト  
コックス症に対する樹状細胞ワクチン  
の効果. 第25回日本生体防御学会学術  
総会. 7月9-11日, 2014年, 仙台.
  12. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井  
誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎  
義継. カンジダ属の抗真菌薬耐性. 第  
35回関東医真菌懇話会. 6月7日, 2014  
年, 東京.
  13. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井  
誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 荒木  
光二, 皿谷 健, 宮崎義継. ミカファン  
ギン耐性 *Candida glabrata* 株の in  
vitro 性状解析. 第35回関東医真菌懇  
話会. 6月7日, 2014年, 東京.
  14. 浦井 誠, 金子幸弘, 稲垣浩司, 狩谷  
哲芳, 政本大二郎, 水谷 真, 名木 稔,  
上野圭吾, 山越 智, 田辺公一, 梅山  
隆, 大川原明子, 金城雄樹, 大野秀明,  
宮崎義継. 腹膜透析中に発症した  
*Cryptococcus laurentii* による腹膜炎  
の一例. 第35回関東医真菌懇話会. 6  
月7日, 2014年, 東京.
  15. 金城雄樹, 金子幸弘, 梅山 隆, 川上和  
義, 大石和徳, 宮崎義継. マウスモデ  
ルでの肺炎球菌蛋白・糖脂質併用ワク  
チンの感染防御効果の解析. 第88回日  
本感染症学会学術講演会・第62回日本  
化学療法学会総会合同学会. 6月18日  
-20日, 2014年, 福岡.
  16. 梅山 隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越  
智, 名木稔, 宮崎義継. 症例から学ぶ  
感染症セミナームーコル症の真菌同定  
検査. 第88回日本感染症学会学術講演  
会・第62回日本化学療法学会総会合同  
学会. 6月18日-20日, 2014年, 福岡.
  17. 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. 病原糸状菌 *Aspergillus  
fumigatus* の Polo-like キナーゼ遺伝子  
破壊株の菌糸成長・分生子形成・抗真  
菌薬感受性への影響. 第88回日本感染  
症学会学術講演会・第62回日本化学療  
法学会総会合同学会. 6月18日-20日,  
2014年, 福岡.
  18. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井  
誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 知花  
博治, 亀井克彦, 宮崎義継. カンジダ  
属の抗真菌薬感受性の変貌. 第88回日  
本感染症学会学術講演会第62回日本  
化学療法学会総会合同学会. 6月18-20  
日, 2014年, 博多.
  19. 浦井 誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山  
隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉  
田 隆, 宮崎義継. 高病原性  
*Cryptococcus gattii* 由来荚膜多糖の免  
疫細胞に及ぼす影響. 第88回日本感染  
症学会学術講演会第62回日本化学療  
法学会総会合同学会. 6月18-20日,  
2014年, 博多.
  20. 宮崎義継. 真菌感染症について: 薬剤  
耐性真菌. 第3回日本微生物学連盟市  
民公開フォーラム<薬が効かない感染  
症の話-薬剤耐性感染症の現状とその  
対策>. 4月26日, 2014年.

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