

201420029A

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26年度 総括・分担研究報告書

平成27年3月

研究代表者

河野 茂

(長崎大学大学院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26年度 総括・分担研究年度終了報告書

平成27年 3 月

研究代表者

河野 茂

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

平成 26 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

「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	教 授
宮 崎 義 継	国立感染症研究所 真菌部	部 長
三 嶋 廣 繁	愛知医科大学大学院医学研究科 臨床感染症学	教 授
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	医 員
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 宇宙環境医学研究室	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 医学部 皮膚科学講座	教 授
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	教 授
川 上 和 義	東北大学大学院 医学系研究科	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	講 師
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	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	
総括研究年度終了報告（平成 26 年度）	1
河野 茂（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）	
II. 分担研究年度終了報告	
1. 臨床サンプルを用いたアスペルギルス症診断系の検討	5
宮崎 義継（国立感染症研究所 真菌部）	
2. 外科系・救急領域における深在性真菌症の診断法・治療法・予防法の確立に 関する研究	11
三嶋 廣繁（愛知医科大学大学院医学研究科 臨床感染症学）	
3. 病状と病原性に関する研究	16
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）	
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	19
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	28
槇村 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	
比留間 政太郎（お茶の水真菌アレルギー研究所）	36
7. トリコフィトントズ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	41
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	45
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	52
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	59
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	66
山越 智（国立感染症研究所 真菌部）	
12. ムーコル症新規診断キットの有用性の検討	70
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

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、解決すべき課題に関する研究を行った。え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、ガイドライン等を充実させることにより真菌感染症の対策に資することを目的とする。

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関し、臨床と基盤研究グループとが連携して研究を推進する。具体的には疫学調査、ならびに、ガイドライン等に記載すべき診断・治療方法のエビデンスの創成を図る。

1. ガイドラインに関して

- ① 真菌に関する院内感染防止対策の必要性や、「深在性真菌症の診断治療ガイドライン2007年」出版以降に承認された新規抗真菌薬の情報を踏まえて、ガイドラインの改訂を行った。
- ② トンズランス感染症対策のために患者向けガイドライン及び医科向けガイドラインの発刊・改定を行った。

2. サーベイランスに関して

- ① 輸入真菌症、ならびに、新興真菌感染症の発生動向を届け出、学会発表と論文のモニタリングにより、国内発生状況の把握を行った。
- ② 造血幹細胞移植領域におけるアスペルギルス、接合菌、およびその他の糸状菌による侵襲性真菌感染症の臨床研究により、疫学と臨床像を把握した。
- ③ 外科系・救急領域における深在性真菌症に関する発生動向が不明なため、アンケート等

によりデータの集積・解析を行った。

④ トンズランス感染症は、格闘技選手より学童、幼児、家族内へ拡大しており、ハイリスク群の検診等により発生動向を推定した。

### 3. 真菌感染症の診断法に関する問題

① アスペルギルス感染症：新規検査キットの患者検体を用いた評価を行った。

② トンズランス感染症：*T. tonsurans* の迅速同定に有用な CLS(硬膜胞子様構造物, Chlamyospore-like structure)の観察の観察が有用である事が明らかにされている。これを実際に格闘技競技者の集団検診などに用いる際の問題点を明らかにし、より簡便、迅速な検診法を提示した。

③ ムーコル感染症（接合菌症）：簡便な検査キットの開発を目指し、ISH 法・PCR 法を応用したムーコル症の病理診断領域における有用な補助診断法の開発と評価を行った。

④ クリプトコックス感染症：潜在性クリプトコックス感染の検査法の開発を行った。

⑤ ヒストプラズマ感染症：新規ヒストプラズマ抗原を用いた ELISA 法と新たな遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法による診断法について、実証実験を進めた。

### 4. 病態の解明真菌感染症の診断法に関する問題

① *Aspergillus fumigatus* の遺伝子改変株作製により病原性に関わる蛋白質の同定、機能解析を行った(Y69蛋白質の性状と病原性の解析)。

② クリプトコックス抗原特異的T細胞受容体を高発現するTgマウスを用いてT<sub>RM</sub>細胞、長期メモリーT細胞からのIFN- $\gamma$ 産生動態を明らかにした。クリプトコックス潜伏感染モデルを用いて免疫記憶応答機序の解明を行った。

### 5. 新規抗真菌薬の開発に関して

① カンジダにおける抗真菌薬耐性機序を解明することにより、新たな薬剤標的分子の探索と新規抗真菌薬の開発を行った。

② 侵襲性アスペルギルス症の病原性に関与する新しい分泌蛋白質を見つけそれを標的とする治療薬開発につなげる。

### C. 研究結果

#### 1. ガイドラインに関して

① 一般臨床医に役立つ診療指針の提供、エビデンスのupdateと使いやすさに留意して「深在性真菌症の診断・治療ガイドライン」の改訂を行った。

② トンズランス感染症対策のために患者向けガイドライン、医科向けガイドラインの発刊・改定を行った。

#### 2. サーベイランスに関して

① 輸入真菌症の2年間のモニタリングにより発生動向をまとめ、ヒストプラズマ症、コクシジオイデス症が多く発生していること、マルネツフェイ型ペニシリウム症が急速に増加していることなどを示した。

② 造血幹細胞移植レシピエントにおいて、Breakthrough candidemia を発症した症例について、その臨床像を検討した。Breakthrough candidemia を起こした 19 例中 15 例から分離された 15 株を収集した。

③ 病理組織学的真菌症診断に関する、真菌症診断支援ネットワークのホームページを開設し診断支援を実施した。2013年4月～2014年11月における他施設からの真菌症診断依頼は28例であった。結果の内訳は、アスペルギルス2例、ムーコル3例、その他の糸状菌が7例、カンジダ3例、クリプトコックス2例、ヒストプラズマ2例、標本中に明らかな真菌が確認できなかった症例が7例、光顕的には

二形性酵母であったが遺伝子学的補助診断法で検出できなかった症例が2例であった。

### 3. 真菌感染症の診断法に関して

① アスペルギルス感染症：これまでに構築した *A. fumigatus* より分泌される蛋白質の ELISA 系を、ヒト血清の影響が少なくなるように再構築し、臨床サンプルを用いて検証した。

② トンズランズ感染症：

a) TOF-MS を用いた *T. tonsurans* 検出の為に LAMP 系を開発し、柔道選手由来検体を用いてその有用性を確認した。

b) *T. tonsurans* の迅速同定法として、培地内の硬膜胞子様構造物が培養早期から培地内に出現し、これが本菌に特徴的である事を確認した。

③ ムーコル感染症：

a) 28S rRNA 遺伝子 (rDNA) の D1/D2 領域において、ムーコル目真菌に対して特異性が高い 232bp の領域を選定し、FITC を標識した二本鎖 DNA プローブを作製した。

b) *Rhizopus oryzae*, *A. fumigatus*, (他5菌種) のマウス感染モデルにおける腎組織を用いた本プローブの特異性の検証を施行し、*R. oryzae* の菌要素のみに陽性所見が得られた。

c) 血液疾患患者の深在性真菌症を疑う症例を対象に、*R. oryzae* の検出キットの評価を行った。

④ クリプトコックス感染症：潜在性クリプトコックス感染の検査法の開発へ向けた基礎的研究を行った。

⑤ ヒストプラズマ感染症：新規ヒストプラズマ抗原を用いた血清診断法の研究を進めた。新規リアルタイム PCR 法によるヒストプラズマ症の診断法開発について臨床検体を用いて検討を進め、実用化に向けて高い有用性を確認した。

⑥ 新たに真菌として再分類された *Microsporidia* の培養・検出系を確立し、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。

### 4. 病態の解明

① *A. fumigatus* の病原性に関与すると考えられる新規の分泌蛋白質 Y69 を見出し、機能解析、およびモノクローナル抗体を作成し、サンドイッチ ELISA 系を構築した。

② クリプトコックス特異的 T 細胞抗原受容体を発現するトランスジェニックマウスの作成とクリプトコックス感染免疫応答機序の解明を行った。クリプトコックス潜伏感染モデルを用いた免疫記憶応答機序の解明を行った。

### 5. 新規抗真菌薬の開発に関して

① *Candida glabrata* における多剤耐性機序の概要を解明した。In vitro でのスクリーニングを行い、新規治療薬として期待される化合物が複数同定された。

## D. 考察

真菌症のサーベイランスとして研究分担者によって輸入真菌症の発生動向調査、造血幹細胞移植領域における侵襲性真菌感染症の調査、外科・救急領域での真菌感染症、トンズランズ感染症の全国レベルでの診断・治療ネットワークの構築など様々な分野での真菌症感染症について疫学的な調査やネットワークの構築を行った。

また、様々な真菌感染症について新しい診断法や、検査キットが開発中である。臨床サンプルを用いた具体的な検討を行っているものもあり、今後も検討を行う。

## E. 結論

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た。今後は改訂されたガイドラインの評価を行っていく。



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アスペルギルス症診断系の検討

研究分担者 宮崎義継 国立感染症研究所 真菌部

研究要旨 現在用いられているアスペルギルス症の診断は、感度、特異度などに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。今年度は昨年度に引き続きヒト血清を対象とした場合の問題点を解決するために抗体の組み合わせの条件検討を行った。

A. 研究目的

近年、高齢化、医療技術の進歩に伴い、免疫の低下した患者が増加し深在性真菌症も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は、ガラクトマンナン抗原を検出する系であり、血液悪性疾患の患者では約80%の感度を有しているが、他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、より正確な診断ができる新しい検出系の確立が求められている。

我々はこれまでに、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、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るため、今年度は、ヒト健常人血清を用いて、これまでに作成した数種類のモノクローナル抗体の組み合わせをすべて調べ、検出系の再構築を試みた。

B. 研究方法

1. 大腸菌による組換え蛋白質の作製

3種類の細胞外蛋白質 (Y1, B11a, B11b) の cDNA を pGEX-6P-His6-FLAG、pMAL-c4X-Strep-tagII にクローニングし、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レジンカラムにより精製した。

2. 抗体の精製

各蛋白質に対するモノクローナル抗体は、いずれも protein A あるいは G セファロースカラム、あるいは大腸菌で作成している各組換え体蛋白質を樹脂にカップリングしたカラムを作成し精製した。

3. 2次抗体のビオチン化

2次抗体を 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 溶液に透析し 20 倍のモル濃度のビオチン試薬 (NHS-LC-biotin (PIEACE 社)) を加え、遮光条件下で 4 時間反応した。反応後、PBS に透析した。

4. 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 および 2 次抗体として用いた。2 次抗体は、

ビオチン化したものを使用した。1次抗体を100 mM 炭酸 Buffer (pH 9.5) で希釈し、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、ブロッキングを 1 時間室温で行った。サンプルを加え、1 時間室温で放置後、PBS-T で洗浄した。さらに 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、酵素発色基質を加え発色させた、2 N 塩酸で反応停止し、450 nm で吸光度を測定した。

市販のヒト健常人血清に、大腸菌により作製した組換え体蛋白質を 5 ng/ml の濃度で加えサンプルとし、ELISA 系を行い、バックグラウンドが低く、高い回収率が得られる条件を検討した (添加回収実験)。

### C. 研究結果

#### 1. Y1蛋白質の検出系

これまでに4種類マウスモノクローナル抗体 (1B4C, 2G11, 3G4, 4B6) を作成しており、それらを用い1次抗体および2次抗体としてすべての組み合わせでサンドイッチELISA系の構築を試みたが、どの組み合わせも作成できなかった。

#### 2. B11a蛋白質の検出系

これまでに6種類マウスモノクローナル抗体 (E4B4, E4D12, E5D10, E9F11, E9H10, E9D1) を作成しており、それらを用い1次抗体および2次抗体としてすべての組み合わせでサンドイッチELISA系の構築を試みた。

回収率が悪かった例は、図1の様に1次抗体E9H10、2次抗体E9F11の組み合わせで数十 ng/ml程度の感度を示し、回収率の検討では、表1の様にヒト血清の濃度依存的に回収率の低下がみられ、血清濃度が2.5%において40%程度の回収率が得られた。

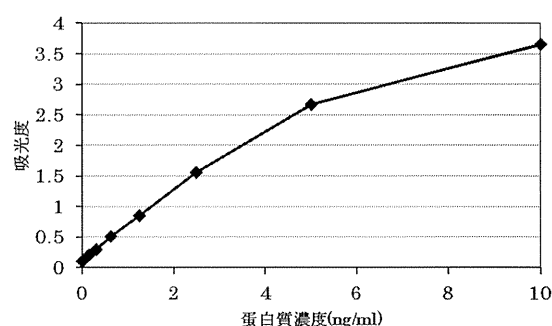


図1. 1次抗体E9H10、2次抗体E9F11の組み合わせの標準曲線

表1. 1次抗体E9H10、2次抗体E9F11の組み合わせの添加蛋白質の回収率

	血清濃度	回収率
血清 3	20%(5 倍希釈)	3%
	10%(10 倍希釈)	8%
	5%(20 倍希釈)	22%
	2.5%(40 倍希釈)	48%
	血清濃度	回収率
血清 4	20%(5 倍希釈)	1%
	10%(10 倍希釈)	3%
	5%(20 倍希釈)	16%
	2.5%(40 倍希釈)	43%

一方、回収率のよかった例は、1次抗体E9F11、2次抗体E4D12の組み合わせで数百 ng/ml程度の感度を示し (図2)、表2のように、ヒト血清の濃度依存的に回収率の低下がみられるものの5%血清存在下で、80%程度の回収率を示した。

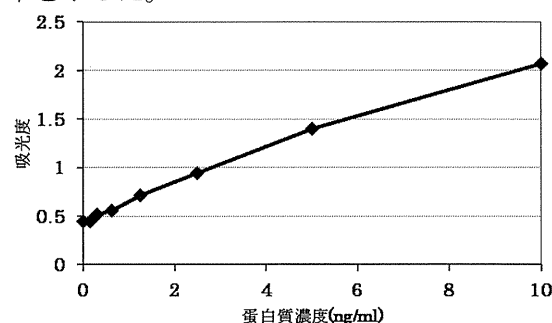


図2. 1次抗体E9H10、2次抗体E9F11の組み合わせの標準曲線

表2. 1次抗体E9H10、2次抗体E9F11の組み合わせの添加蛋白質の回収率

	血清濃度	回収率
血清 5	20%(5 倍希釈)	56%
	10%(10 倍希釈)	67%
	5%(20 倍希釈)	83%
	2.5%(40 倍希釈)	85%
	血清濃度	回収率
血清 6	20%(5 倍希釈)	54%
	10%(10 倍希釈)	68%
	5%(20 倍希釈)	80%
	2.5%(40 倍希釈)	85%

### 3. B11b蛋白質の検出系

これまでに8種類マウスモノクローナル抗体 (A1C12, A1C11, A1G4, A2D4, A3E6, A8F9, A9D10, A9F14) を作成しており、それらを用い1次抗体および2次抗体としてのすべての組み合わせでサンドイッチELISA系の構築を試みた。

回収率が悪かった例は、1次抗体A1C12、2次抗体A8F9の組み合わせで100 ng/ml程度の感度を示し (図3)、表3のように、ヒト血清の濃度依存的に回収率の低下がみられ、血清濃度が2.5%において40%程度の回収率が得られた。

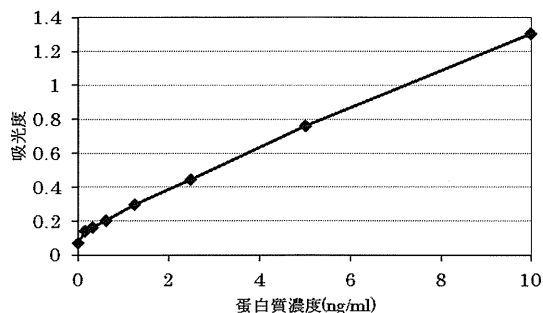


図3. 1次抗体 A1C12、2次抗体 A8F9 の組み合わせの標準曲線

一方、回収率のよかった例は、1 次抗体 A1C12、2 次抗体 A1C11 の組み合わせで 100

ng/ml 程度の感度を示し (図 4)、表 4 のように、ヒト血清の濃度依存的に回収率の低下がみられるものの 5%血清存在下で、80-90%の回収率を示した。

表3. 1次抗体 A1C12、2次抗体 A8F9 の組み合わせの添加蛋白質の回収率

	血清濃度	回収率
血清 1	20%(5 倍希釈)	8%
	10%(10 倍希釈)	18%
	5%(20 倍希釈)	39%
	2.5%(40 倍希釈)	47%
	血清濃度	回収率
血清 2	20%(5 倍希釈)	0%
	10%(10 倍希釈)	10%
	5%(20 倍希釈)	30%
	2.5%(40 倍希釈)	43%

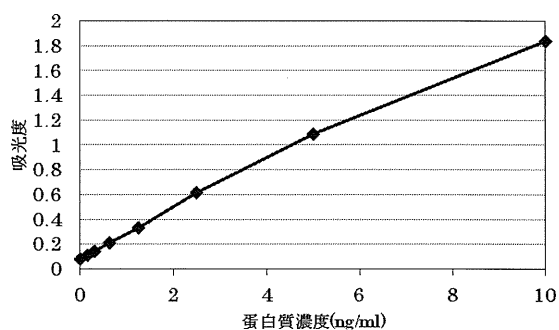


図4. 1次抗体 A1C12、2次抗体 A1C11 の組み合わせの標準曲線

### D. 考察

4種類のY1抗体でサンドイッチELISA系が組めなかった理由として、4種類の抗体の認識するエピトープが近接している可能性が考えられ、現在新たなモノクローナル抗体の作成を行っている。

B11 蛋白質検出系では、ng オーダーの感度で、血清の影響の少ない組み合わせがいくつか見つかった。今後、ブロッキング剤、バッファ等の条件検討、新たなモノクローナル抗

体の作成により、より良い系が組める可能性があると考えている。

表 4. 1次抗体 A1C12、2次抗体 A1C11 の組み合わせの添加蛋白質の回収率

	血清濃度	回収率
血清 1	20%(5 倍希釈)	61%
	10%(10 倍希釈)	76%
	5%(20 倍希釈)	91%
	2.5%(40 倍希釈)	97%
	血清濃度	回収率
血清 2	20%(5 倍希釈)	42%
	10%(10 倍希釈)	58%
	5%(20 倍希釈)	74%
	2.5%(40 倍希釈)	86%

#### E. 結論

今年度は、1次抗体、2次抗体としてモノクローナル抗体で系を構築し、これまでと同レベルの感度が保たれ、かつ血清の影響の少ないサンドイッチELISA系が組めた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

##### 欧文

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.

##### 和文

1. 宮崎義継. 特集 感染症動向 2015 播種性クリプトコックス症. *メディカル朝日*. 1: 16-17, 2015 年, 朝日新聞社.
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, 宮崎義継. 侵襲性カンジダ症の診断ー血清診断ー遺伝子診断. . 侵襲性カンジダ症. 115-117, 2014 年, 医薬ジャーナル社.
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. 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌症ー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.
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. 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．

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. 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～、I 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．

#### 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, 澁谷和俊, 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, 澁谷和利, 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, 澁谷和俊, 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, 澁谷和俊, 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* 由来莢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  
なし。



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

外科系・救急領域における深在性真菌症の診断法・治療法・予防法の確立に関する研究

研究分担者 三嶋 廣繁 愛知医科大学大学院医学研究科 臨床感染症学

研究協力者 山岸 由佳 愛知医科大学病院 感染症科 / 感染制御部

研究要旨 外科系・救急領域で使用頻度が高いカンディン系薬に低感受性を示す菌株が、*Candida glabrata*で増加傾向にあり、今後の動向に注意する必要があることが明らかになった。外科系・救急領域で頻用されるカンディン系抗菌薬であるミカファンギンは、真菌性腹膜炎を治療する上で腹腔内浸出液中へ十分な濃度が移行することが明らかになった。深在性真菌症のリスク因子であるカンジダ腔炎の治療に頻用されている局所性抗真菌薬は、薬剤感受性は保たれていることが明らかになった。難治性腔炎をきたしやすいとされる *C. glabrata*にはオキシコナゾールが最も優れた感受性を有していることが明らかになった。

#### A. 研究目的

外科系・救急領域における主要な深在性真菌症の原因となる酵母様真菌による感染症の診断法、医療関連感染（院内感染）も含めた予防策の確立を目指すことを目的として研究を実施した。

(1) 外科系・救急領域で分離されたカンジダ属に対するカンディン系薬低感受性株の検出頻度に関する検討

愛知県、岐阜県、三重県の3県下の外科・救急領域において血液から分離されたカンジダ属を対象として、カンディン系薬低感受性株の検出頻度を検討した。

(2) 腹膜炎患者の血漿中および腹腔内浸出液中におけるミカファンギン（MCFG）の薬物動態

カンジダ属による腹膜炎は外科系・救急領域では代表的な侵襲性真菌症の一つである。抗真菌薬の治療効果を確実にするためには初回投与で感染部位において薬物濃度が十分なレベルに到達しなければならないが、腹腔内浸出液中の抗真菌薬の薬物動態に関しては不明な点が多い。

MCFGは、真菌性腹膜炎に有効かつ安全なカンディン系薬であり、外科系・救急領域では第一選択薬として用いられている。しかしながら、真菌性腹膜炎患者におけるMCFGの薬物動態や腹腔液への分布に関する報告は少ない。そこで、腹膜炎患者においてMCFG初回投与後の血漿中および腹腔内浸出液中の薬物動態を評価した。

(3) 腔カンジダ症患者由来カンジダ属の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性

外科系・救急領域における侵襲性カンジダ症のリスク因子として、女性腔内のカンジダ属過増殖によるカンジダ腔炎があげられる。日本では、カンジダ腔炎に関しては、抗真菌腔錠による局所療法が主体である。しかしながら、新しい分離真菌株に対する薬剤感受性試験成績が存在しないため、腔カンジダ症患者由来カンジダ属の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 外科系・救急領域で分離されたカンジダ属に対するキャンディン系薬低感受性株の検出頻度に関する検討

2013年に愛知県、岐阜県、三重県の3県下の外科系・救急領域において血液から分離されたカンジダ属 (*Candida albicans* 47株、*Candida glabrata* 20株) を対象として、CLSIの微量液体希釈法に基づいてキャンディン系薬ミカファンギン (MCFG) およびカスポファンギン (CPFG) の薬剤感受性を測定し、CLSIが2012年12月に定めたブレイクポイントから判断して低感受性株と判定された菌株について各種抗真菌薬 (フルコナゾール: FLCZ、イトラコナゾール: ITCZ、ボリコナゾール: VRCZ、アムホテリシン B: AMPH-B) の薬剤感受性を検討した。

### (2) 腹膜炎患者の血漿中および腹腔内浸出液中におけるミカファンギン(MCFG)の薬物動態

2007年から2012年に愛知医科大学病院において前向き観察および薬物動態試験を実施した。院内の倫理委員会によって試験実施計画書の承認を受け、すべての被験者から同意を得た。対象は、腹腔内外科手術後に腹膜炎または腹腔

内真菌感染症と診断された、あるいは疑われたためMCFGによる治療を受けた8例であった。人口統計学的背景、APACHEスコア、臨床背景ならびにMCFG治療内容に関するデータを収集した。

すべての患者に腹腔ドレナージを実施し、MCFG 150mg を1時間以上かけて静脈内に単回投与した。MCFGの投与前および終了後1, 3, 5, 8 および24時間時に採血して直ちに血漿を分離し、同時に腹腔ドレナージにより腹腔内浸出液を採取して、薬物濃度解析まで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。MCFG濃度は高速液体クロマトグラフィーにより測定した。内部標準物質を含むアセトニトリルで血漿タンパクを沈殿させて分離した。検量線は、 $0.1 \sim 25 \text{ mg/L}$ の範囲で直線であった。測定日間および測定日内での精度は15%未満、真度は標準液に対して15%以内であった。

### (3) 腔カンジダ症患者由来カンジダ属の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性

2014年に愛知県のカンジダ腔炎患者から分離されたカンジダ属 (*Candida albicans* 54株、*Candida glabrata* 19株) を対象として、CLSIの微量液体希釈法に基づいて各種抗真菌薬の薬剤感受性を測定した。

## C. 研究結果

### (1) 外科系・救急領域で分離されたカンジダ属に対するキャンディン系薬低感受性株の検出頻度に関する検討

キャンディン系薬低感受性株の検出頻度は、*Candida albicans* 2.13% (1/47)、*Candida glabrata* 10.00% (2/20)であった。キャンディン系薬低感受性株の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性結果を表1に示した。

表1 キャンディン系薬低感受性株の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性

	FLCZ	ITCZ
<i>C. albicans</i>	0.125	0.0313
<i>C. glabrata</i>	4	0.5
<i>C. glabrata</i>	8	0.5

VRCZ	MCFG	CPFG	AMPH-B
0.002	0.0625	0.25	1
0.0625	0.0313	0.25	1
0.125	0.5	0.125	2

(2) 腹膜炎患者の血漿中および腹腔内浸出液中におけるミカファンギン(MCFG)の薬物動態

対象患者の内訳は、男性4例、女性4例、平均年齢は65.5歳(標準偏差[SD]18.5)であった。APACHEスコアは平均18.5(SD8.0)、6例が重症敗血症であった。血漿中および腹腔内浸出液中のMCFG濃度を表2に示した。

表2 MCFGの血漿中濃度および腹腔内浸出液濃度(平均値)

	0時間	1時間
平均血漿中濃度(mg/L)	0	8.80
SD		0.76
平均腹腔内浸出液中濃度(mg/L)	0	0.28
SD		0.03
腹腔内浸出液中濃度/血漿中濃度比	-	0.03

3時間	5時間	8時間	24時間
5.40	3.85	3.53	2.22
0.92	0.23	0.23	0.20

1.05	1.62	1.51	0.95
0.04	0.07	0.06	0.04
0.19	0.42	0.43	0.43

(3) 腔カンジダ症患者由来カンジダ属の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性

腔カンジダ症患者由来カンジダ属の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性を表3に示した。

表3 腔カンジダ症患者由来カンジダ属の薬剤感受性

Organism	(No. of isolates)	Drug	MIC (µg/mL)			
			Range	50%	90%	
<i>Candida albicans</i> (54)		Miconazole	≤0.015	1	0.12	0.25
		Itraconazole	≤0.004	0.5	0.06	0.12
		Fluconazole	≤0.06	2	0.25	1
		Clotrimazole	≤0.005	0.12	0.03	0.06
		Osiconazole	≤0.008	0.5	0.03	0.12
		Isoconazole	≤0.005	0.5	0.06	0.12
		Bifonazole	0.25	2	1	1
<i>Candida glabrata</i> (19)		Miconazole	0.06	2	0.5	1
		Itraconazole	0.06	4	0.5	1
		Fluconazole	1	≥64	4	8
		Clotrimazole	0.06	4	0.25	0.5
		Osiconazole	≤0.009	0.25	0.03	0.25
		Isoconazole	0.03	1	0.12	0.5
		Bifonazole	0.06	2	0.5	1

#### D. 考察

(1) 外科系・救急領域で分離されたカンジダ属に対するキャンディン系薬低感受性株の検出頻度に関する検討

外科系・救急領域で使用頻度が高いキャンディン系薬低感受性の菌株の検出頻度が、日本でも*C. glabrata*で10%程度存在することが明らかになった。

(2) 腹膜炎患者の血漿中および腹腔内浸出液中におけるミカファンギン(MCFG)の薬物動態

MCFG は腹腔内に十分に分布しており,最高濃度は平均で 1.62 mg/L であった。MCFG は投与後 5~8 時間後に腹腔内浸出液中で最大濃度に達した。これらの結果より、腹膜炎に対する MCFG 治療の有用性が確認されたと考える。

## (2) 腔カンジダ症患者由来カンジダ属の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性

*C. glabrata* に対してはオキシコナゾールの抗真菌活性が最も高いことが明らかになった。

### E. 結論

外科系・救急領域で分離されるカンジダ属のうち *C. glabrata* では、キャンディン系薬低感受性株が増加傾向になることが明らかになった。外科系・救急領域で頻用される MCFG は、真菌性腹膜炎治療に十分な濃度が腹腔内浸出液中に移行することが明らかになった。深在性真菌症のリスク因子であるカンジダ腔炎の原因菌の一つである *C. glabrata* に対しては、難治性である場合、オキシコナゾールの有効性が期待できることが明らかになった。

### 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. Takesue Y, Ueda T, Mikamo H, Oda S, Takakura S, Kitagawa Y, Kohno S; ACTIONs Project. Management bundles for candidaemia: the impact of compliance on clinical outcomes. J Antimicrob Chemother. 2015; 70: 587-593.
2. Terada M, Ohki E, Yamagishi Y,

Nishiyama Y, Satoh K, Uchida K, Yamaguchi H, Mikamo H. Fungal peritonitis associated with *Curvularia geniculata* and *Pithomyces* species in a patient with vulvar cancer who was successfully treated with oral voriconazole. J Antibiot (Tokyo). 2014; 67(2): 191-193.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### 学会発表

1. 加藤秀雄、浜田幸宏、萩原真生、川澄紀代、平井潤、山岸由佳、三嶋廣繁. 当院で経験したボリコナゾール (VRCZ) 投与中に視覚障害をきたした 3 例. 真菌症フォーラム第 16 回学術集会 一般演題 A-04、東京、2015.2.14.
2. 平井潤、山岸由佳、三嶋廣繁. *Candida lusitanae* による感染症の後方視的検討. 真菌症フォーラム第 16 回学術集会 一般演題 A-04、東京、2015.2.14.
3. 山岸由佳、平井潤、矢口貴志、亀井克彦、三嶋廣繁. 血液培養から *Rhodotorula mucilaginosa* が検出された 2 症例. 真菌症フォーラム第 16 回学術集会 一般演題 D-04、東京、2015.2.14.
4. Yamagishi Y, Mikamo H, Hirai J. Pharmacokinetics of micafungin (MCFG) in plasma and peritoneal fluid in patients with peritonitis. 54th ICAAC A-701, Washington, DC, USA, September 9-10, 2014.
5. 山岸由佳、三嶋廣繁. (1→3)- $\beta$ -D-グルカン. 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 シンポジウム 13 「感染症診療におけるバイオマーカーを考える」、福岡、2014.6.19
6. 山岸由佳、三嶋廣繁: MALDI-TOF の微