

表1 クリプトコックス血清ラテックス凝集反応の菌種交差性(1)

【Basidiomycota】	Strain	Serodirect		Pastrex	
		2-ME		2-ME	
		pre	post	pre	post
<i>Cryptococcus neoformans</i>	TIMM 5489	+ (1:2056)	+	+ (1:32)	+
<i>Trichosporon asahii</i>	CBS 2479	+ (1:256)	+	+	+
<i>Rhodotorula minuta</i>	TIMM 6222	-	ND	-	ND
<i>Schizophyllum commune</i>	IFO 030749	+ (1:32)	+	-	ND
<i>Bjerkandera adusta</i>	NBRC 106826	-	ND	-	ND
<i>Pleurotus ostreatus</i>	NBRC 6515	+ (1:8)	+	+ (1:4)	+
<i>Coprinus cinereus</i>	NBRC 30114	+ (1:256)	+	+ (1:4)	+
<i>Malassezia globosa</i>	CBS 7989	-	ND	-	ND
<i>Malassezia restricta</i>	CBS 7877	-	ND	-	ND

本研究に用いた真菌と目視によるCALAT結果のまとめ
 ()内は二倍段階希釈法による半定量解析結果
 +; positive, -; negative, ND; not done, 2-ME; 2-mercaptoethanol

表2 クリプトコックス血清ラテックス凝集反応の菌種交差性(2)

【Ascomycota】					
<i>Aspergillus fumigatus</i>	JCM 10253	-	ND	-	ND
<i>Penicillium expansum</i>	TIMM 1293	-	ND	-	ND
<i>Paecilomyces variotti</i>	TIMM 4066	-	ND	-	ND
<i>Fusarium solani</i>	TIMM 6214	-	ND	-	ND
<i>Fusarium oxysporum</i>	NBRC 31631	-	ND	-	ND
<i>Pseudallesheria boydii</i>	NBRC 32229	-	ND	-	ND
<i>Alternaria alternata</i>	NBRC 4026	+ (1:32)	+	-	ND
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	-	ND	-	ND
【Mucoromycotina】					
<i>Rhizopus oryzae</i>	TIMM 3181	-	ND	-	ND
<i>Mucor circinelloides</i>	TIMM 3177	+ (1:32)	+	-	ND
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	TIMM 3391	-	ND	-	ND
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	TIMM 3392	-	ND	-	ND

本研究に用いた真菌と目視によるCALAT結果のまとめ
 ()内は二倍段階希釈法による半定量解析結果
 +; positive, -; negative, ND; not done, 2-ME; 2-mercaptoethanol

図1 クリプトコックス血清ラテックス凝集反応検査キット

検査キット	ラテックス液の主成分	検出下限 (ng/mL)
Serodirect® クリプトコックス	抗クリプトコックスウサギ血清IgG (ポリクローナル抗体)感作ラテックス粒子	6.25
Pastrex™ クリプトプラス	抗グルクロナキシロマンナンマウス モノクローナル抗体感作ラテックス粒子	50

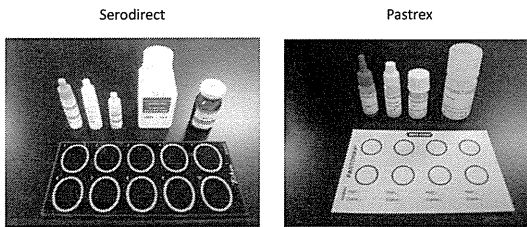


図2 被験者に見られたBlack dot tinea capitisの例

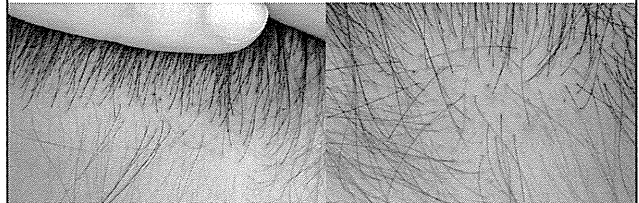
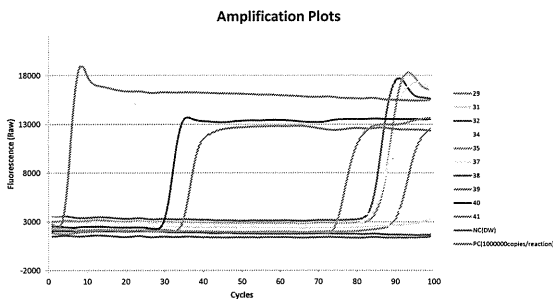


図3 Black dot tinea capitisを認めない男子柔道部員10名のLAMP結果



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

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、皮膚真菌症新興感染症の一つとして問題となっている。対象は、2014年度に東京学生柔道連盟に登録した大学柔道選手である。練習前に丸形 Hairbrush および歯ブラシで頭部を強く擦り、培養した。培養陽性者には、ガイドラインに基づいて治療した。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。調査した柔道選手は、1042名で、体部白癬の既往のある者は73.4%で、Hairbrush法陽性者は、5.7%であり、その全てが無症候性キャリアーであった。治療後3か月目の菌の陰性化率は、59名中58名陰性で98.3%であった。Hairbrush法と歯ブラシ法で得られた集落数の相関は、0.6464で、中等度の相関が認められた。分離された *T. tonsurans* 60株について、リボソームDNA (rDNA) のITS領域の遺伝子配列について解析したが、全ての株で99-100%の一致を認めた。これまで検診用に用いてきた格闘技選手用の「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」のパンフレットをもとにして、皮膚科医、一般医向けの「トンスランス感染症診断・治療のガイドライン」の作成中である。

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。

今回、われわれは、*T. tonsurans* 感染症の蔓延を阻止するために、2014年度の課題として、①東京学生柔道連盟加盟選手の集団検診な

どの本症の疫学に関する研究、②歯ブラシを用いた簡易検査法の検討、③検診で得られた菌の分子疫学の検討、④皮膚科医、一般医向けの「トンスランス感染症診断・治療のガイドライン」の作成を行った。

B. 研究方法

1. 対象

対象は、2014年度に東京学生柔道連盟に登録し、かつ検査を希望した大学柔道選手（17

大学チーム・1042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

(I) 2014年度東京学生柔道連盟の調査について：方法は、大学入学直後の2014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および歯ブラシで頭部を15～20回程度強く擦り、そのHairbrushと歯ブラシを各々別のポリ袋に入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日間培養し形成された集落数を数えた。

治療方法は、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示した。

抗真菌剤療法は、菌量が2集落以下の場合、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。この検診・治療サイクルは、2008年より行っており、過去の成績と比較した。

(II) Hairbrush法と歯ブラシ法で得られた集落数を数えて、両者の相関について検討した。

(III) 分離された *T. tonsurans* 60株について、リボソームDNA (rDNA) のITS領域の遺伝子

配列について解析した。

(IV) これまで検診用に用いてきた格闘技選手用の「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」のパンフレットをもとにして、皮膚科医、一般医向けの「トンスランス感染症診断・治療のガイドライン」の作成を行った。

C. 研究結果

1. 2014年度東京学生柔道連盟の調査について：調査した柔道選手は、16大学、1042名であった。過去に体部白癬の既往のある者は765名(73.4%)で、Hairbrush法陽性者は、59名(5.7%)であった。また、この59名は皮膚症状はみられず、無症候性キャリアーであった(表1)。学年別の陽性率は、1年生13%、2年生7.9%、3年生1.8%、4年生0%であった(表2)。培養陽性者には治療を指示し、治療後3か月目の菌の陰性化率は、59名中58名陰性で98.3%であった(表3)。

2. Hairbrush法と歯ブラシ法で得られた集落数の相関：結果は図1に示した。 $y = 1.15x + 18.1$, $r = 0.6464$, $n = 64$, 下側95% (0.4763), 上側95% (0.7699) , P値 (<.0001*) であり、中等度の相関が認められた。

3. 分離された *T. tonsurans* 株のリボソームDNA (rDNA) のITS領域の遺伝子配列解析：解析した60株の結果は全ての株で99-100%の一致を認めた。

4. これまで検診用に用いてきた格闘技選手用の「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」のパンフレットをもとにして、皮膚科医、一般医向けの「トンスランス感染症診断・治療のガイドライン」の作成した。現在、作成委員会の先生方を中心に、内容を検討中である。

D. 考察

1. 2014年度東京学生柔道連盟の調査について:われわれは、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検査および治療を過去7年間に亘って、同じ方法で実施し、本症の罹患状況の推移と治療の有用性を検討してきた。2014年度の調査結果の特徴は、過去に体部白癬の既往のある者は73.4%であり、過去7年間で最高であり、柔道競技現場では本感染症が継続していることを示した。Hairbrush法陽性者は、5.7%であり、2008年が11.3%であり、その後5-6%へ減少したが、これ以上の低下はみられなかった。一方、検査陽性者は100%が無症候性キャリアーであった。これは本症の特徴であるが、感染対策を講じる上では大きな障害となっている。

学年別の陽性率は、上級生になるに連れて低下する傾向はこれまでもみられており、これは検査・治療の繰り返しが発揮していることを示しているが、今回は初めて4年生が0%であり、これまでの努力がある意味で身を結んだと考えた。

培養陽性者には治療を指示し、治療後3か月目の菌の陰性化率は、98.3%であった。今回は指示した59名全員が治療を受けたことと、陰性化率が過去で一番良かったことも注目に値する。また、われわれが提示している診断・治療の試みは優れたものであると考える。

2. Hairbrush法と歯ブラシ法で得られた集落数の相関については、相関係数が、0.6464であり中等度の相関が認められた。Hairbrush法は優れた方法であるが、直径が9cm弱と大きく、一般臨床現場ではやや使い難いという欠点がある。今回歯ブラシを用いた理由は、どこでも入手でき、輸送にも定型郵便封筒で送ることができるからである。

3. 分離された *T. tonsurans* 株のリボソ-

ムDNA (rDNA) のITS領域の遺伝子配列解析は、全ての株で99-100%の一致を認めた。この結果はこの菌がoutbreak的に蔓延したことを示している。現在更に詳しい解析を行っている。

4. これまで検診用に用いてきた格闘技選手用の「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」のパンフレットをもとにして、皮膚科医、一般医向けの「トンスランス感染症診断・治療のガイドライン」を作成した。現在、作成委員会の先生方を中心に内容を検討中である。このようなガイドラインは世界的にみても存在せず、完成すればそれなりに評価されると考えている。

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7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ガイドラインに基づいた治療の試みは、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

1. Kanemaru M, Tashima S, Yamazaki A, Masuda K, Nagoshi H, Kobayashi T, Kuroda J, Hiruma M, Taniwaki M, Katoh N. Disseminated mucormycosis due to *Rhizopus oryzae* diagnosed by skin biopsy. *J Dermatol.* 2014 Dec 3. doi:

- 10.1111/1346-8138.12715.[Epub ahead of print]
2. Hiruma J, Kano R, Harada K, Monod M, Hiruma M, Hasegawa A, Tsuboi R. Occurrence of *Arthroderma benhamiae* Genotype in Japan. *Mycopathologia*. 2014 Nov 30. [Epub ahead of print]
 3. Hiruma J, Kano R, Kimura U, Takamori K, Suga Y, Hiruma M, Hasegawa A, Tsuboi R. Mating type gene for isolates of *Trichophyton mentagrophytes* from guinea pigs. *J Dermatol* 48:743-5. 2014
 4. Kano R, Tsui CK, Hamelin RC, Anzawa K, Mochizuki T, Nishimoto K, Hiruma M, Kamata H, Hasegawa A. The MAT1-1:MAT1-2 Ratio of *Sporothrix globosa* Isolates in Japan. *Mycopathologia*. 2014 Sep 18. [Epub ahead of print]
 5. Yamaguchi S, Sano A, Hiruma M, Murata M, Kaneshima T, Murata Y, Takahashi H, Takahashi S, Takahashi Y, Chibana H, Touyama H, Ha NT, Nakazato Y, Uehara Y, Hirakawa M, Imura Y, Terashima Y, Kawamoto Y, Takahashi K, Sugiyama K, Hiruma M, Murakami M, Hosokawa A, Uezato H. Isolation of dermatophytes and related species from domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *Mycopathologia* 178:135-43, 2014
 6. Kawai M, Suzuki T, Hiruma M, Ikeda S. A retrospective cohort study of tinea pedis and tinea unguium in inpatients in a psychiatric hospital. *Med Mycol J* 55: E35-41, 2014
 7. Hiruma M, Cho O, Hiruma M, Kurakado S, Sugita T, Ikeda S. Genotype analyses of human commensal scalp fungi, *Malassezia globosa*, and *Malassezia restricta* on the scalps of patients with dandruff and healthy subjects. *Mycopathologia* 177: 263-9, 2014
 8. Kano R, Sobukawa H, Suzuki M, Hiruma M, Shibuya K, Hasegawa A, Kamata H. Immunohistopathology of *Prototheca wickerhamii* in cutaneous lesions of protothecosis. *Med Mycol J* 55: E29-32, 2014.

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	ブラシ検査陽性	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%)
2014	1042	765(73.4%)	59(5.7%)	59(100%)
Total	8531	5041(66.1%)	547(6.4%)	507(92.7)

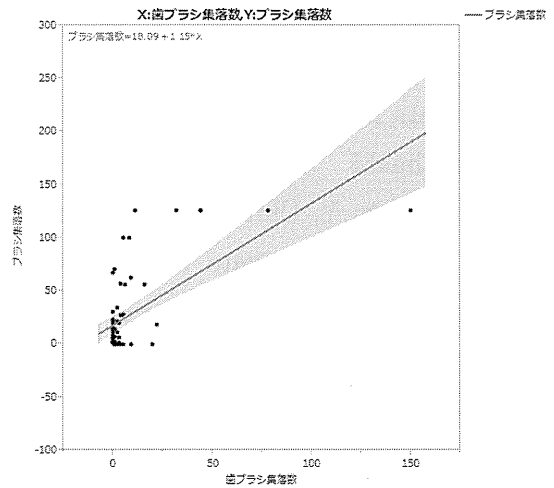
表 2. 東京学生柔道連盟登録選手の学年別 Hairbrush 培養検査結果

年度	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
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)	13.0% (33/253)
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)	7.9% (21/313)
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)	1.8% (5/279)
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)	0% (0/245)
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)	5.7% (59/1042)

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%)	
2014	59	59	58(98.3%)	
Total	547	525(96.0%)	460 (87.6%)	

図 1. Hairbrush 法と歯ブラシ法で得られた集落数の相関



$$y = 1.15x + 18.1 \quad r = 0.6464 \quad n = 64$$

下側 95% (0.4763) 上側 95% (0.7699) P 値 (<.0001*)

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

トリコフィトン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

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	竹田 公信	同上	講師
	安澤 数史	同上	助教
	牛上 敢	同上	助教
	坂田 祐一	同上	医員
	望月 弘和	同上	医員

研究要旨

(1) トリコフィトンズランス（以下 *T. tonsurans*）感染症の疫学調査のために全国19都県で2011年から2014年に分離され、金沢医科大学皮膚科に登録、保存された196株のうち168株についてリボソームRNA遺伝子のNTSの多型による分子疫学的検討を行った。その結果、NTS I型163株、NTS II型4株、NTS III型1株であり、2010年以前の報告例よりNTS I型の割合が高まっていた。2014年に当科で収集した *T. tonsurans* 株は54株あり、依然流行は続いている。

(2) 皮膚真菌症の診断能力の向上への取り組みとして、若手皮膚科医を対象とした真菌講習会を2014年3月に開催したが、現在 *T. tonsurans* 感染症対策をさらに充実させた内容へと見直しており、2015年3月に実施する予定である。

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ズランス（以下 *T. tonsurans*）感染症の感染制御には正確な診断法を提示すること、発症の現状を把握し発信すること、そして診療に当たる医療機関、皮膚科医の真菌症診断能力を向上させることが必要と考えられる。従来より我々は皮膚科の診療支援の一環として、他施設からの同定依頼の菌株や培養依頼の検体を受け入れているが、今回はその過程で収集された *T. tonsurans* 株について解析を行った。また当科では毎年真菌講習会を企画しているが、2015年3月に実施する講習会では *T. tonsurans* 感染症対策を充実させた内容とする予定で準備を行うこととした。

B. 研究方法

1. 疫学的研究

金沢医科大学病院皮膚科に2014年の1年間に全国の施設から菌種同定の依頼があった菌株や培養依頼があった検体から分離された菌株を形態、あるいはリボソームRNA遺伝子(rDNA)のITS領域の塩基配列などの分子生物学的方法で同定した。この *T. tonsurans* 株と、当科で行った集団検診の際に分離された *T. tonsurans* 株についてrDNAのNTS領域の制限酵素分析を用い、種内変異によるタイプ分けを行った。なお、この方法により本邦分離の *T. tonsurans* 株はNTS I型からVIII型の8つの遺伝子型にタイプ分けされることが知られている (T Mochizuki et al, Jpn J Infect Dis, 2007; 60 :188-92, T M

ochizuki et al, Jpn J Infect Dis, 2008;61:219-22)。さらにNTS I型の菌株の細分化を行うことを目的にNTSをPCRで増幅し、その多型をDel/Insの有無やSNPsのパターン(A Gaedigk et al, J Clin Microbiol, 2003;41,5478-87)で検討した。

C. 研究結果

1. 疫学的研究

当科において2014年に行った菌種同定の依頼があった菌株や培養依頼があった検体からの分離株の同定結果を表1に示す。得られた菌株は合計194株で、全て当科で同定を確認しているが、このうち *T. tonsurans* は54株で最多であった。これらの *T. tonsurans* 株を含め、2011年から2014年までに当科で収集、同定した *T. tonsurans* は196株となった。これらの株の分離地域は19都県におよぶが東海、北陸地方由来の菌株が多く、121株を占めていた。競技別に見ると、柔道競技者から120株、レスリング競技者から27株、相撲競技者から5株、他のスポーツ4株、家族・友人5株、感染源が不明・散発・問診不足で情報が無い株が35株であった。これらのうち168株についてNTS型を検討した結果を表2に示す。NTS型ではNTS I型が163株、II型が4株、III型が1株で、他の型は分離されなかった。NTS I型は柔道、相撲、レスリングや不明例の全例あるいはほとんどを占める。NTS II型は4株検出されたが、このうち3株はレスリング競技者からのもので、残り1株は沖縄で米兵から分離された株であった。競技別に見ると柔道、相撲由来株は全株NTS I型、レスリング競技者由来株は26株中NTS I型が22株、II型が3株、III型が1株であった。

NTS I型を細分化することを目的に、10株（福島、岩手、秋田、新潟、埼玉、東京、福井から2010-11年に分離）について、NTSの多型をSNPs、Del/Insの有無で検討したが、全て同じ遺伝子型（Gaedigkの1b型）であった。

表1:2014年に金沢医大皮膚科で同定した菌株

Fungal Species	Number of Strains
<i>Trichophyton tonsurans</i>	54
<i>T. rubrum</i>	42
<i>Microsporum canis</i>	31
<i>T. mentagrophytes</i>	19
<i>M. gypseum</i>	12
<i>T. glabrum</i>	2
<i>T. verrucosum</i>	2
<i>Candida</i> sp.	4
<i>Sporothrix</i> sp.	4
<i>Exophiala</i> sp.	4
<i>Aspergillus</i> sp.	3
<i>Penicillium</i> sp.	3
Other species	10
<i>Mycobacterium, Nocardia</i> sp.	4

表2:*Trichophyton tonsurans* 分離株のNTS型(2011年-2014年)

NTS type	柔道	レスリング	相撲	他の競技	家族、友人	散発例、問診不足	合計
I型	104	22	4	2	5	26	163
II型	0	3	0	0	0	1(米兵)	4
III型	0	1	0	0	0	0	1
IV型	0	0	0	0	0	0	0
合計	104	26	4	2	5	27	168

2. 真菌講習会の開催

前年度（2014年3月9日）に皮膚科の若手医師を対象とする真菌講習会を金沢医科大学で開催したところ、石川、福井、新潟、岐阜、和歌山、愛媛各県から18名の参加があった。講習内容は、講演「真菌性皮膚疾患序論」（金沢医大石崎 宏名誉教授）、特別講演「皮膚真菌症の臨床と研究」（済生会川口総合病院 加藤卓朗博士）、講演と実習「皮膚真菌症の検査法」（望月）、講演と実習「よく見る皮膚真菌症原因菌の同定」（安澤）であった。講習後のアンケートは11名から回収でき、内容では価値が高い（かなり、極めて併せて）が11/11、講習時間（9時から15時）については適切が11/11、内容は適当が6/11、やや難しいが5/11、開催の継続は（是非、した方が良い、を併せて）11/11であった。この際に用いたテキストのうち、*T. tonsurans*の記載を充実させたテキストを現在

作成中であり、平成27年3月8日に開催予定の今回の真菌講習会に使用する予定である。またこのテキスト（若手皮膚科医のための真菌講習会テキスト 第3版）は本年度中に当科のホームページに掲載予定である。

D. 考察

1. 疫学的研究

2014年の当科での同定株数は *T. tonsurans* が最多であるが、こちらの呼びかけによって集められ、また当科で行った集団検診により得られた株も含まれるので、同定菌種の割合が真菌叢を正確に反映するものではない。それでも1年で54株が収集されており、新規株の分離地域も石川、富山、福井、岐阜、愛知、長崎、長崎、神奈川、茨城、福島と多くの県にわたるため、なお全国的な発生が続いていることが窺われた。

分離株の遺伝子型では NTS I 型が圧倒的多数を占め 2010 年以前の株についての報告 (Anzawa K et al, Jpn J Infect Dis, 64:458-62, 2011) 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、真菌叢が変わってきた可能性もあるが、従来 NTS II 型が多く分布する近畿地方の菌株、検体が少なかったためとも考えられる。今回この NTS I 型の中の細分化に用いる分子マーカーとして NTS の SNPs、Del/Ins の検出を試みたが、菌株間に差は確認できなかった。次年度にかけて検体数を増やし、分離年代、競技の幅を広げて多様性の有無を検討したい。

2. 真菌講習会の開催

皮膚真菌症の診断法や診療のコツは、比較的最近まで大学の医局において先輩医師から後輩へと伝授されていた。しかし、近年の免疫学や皮膚生物学の急速な進歩にともなって皮膚科学者の興味は放散し、真菌症自体が研究テーマとして取り上げられることは少なくなった。その

ためか、研究とは異なる次元であるべき真菌症診療の教育までもが軽んじられてきた（望月隆ほか、Med Mycol J 2012;53:109-16.）。このため、日本医菌学会では医育機関で若手医師を指導する中堅医師の診断能力の向上が急務と考え、2013年より指導者講習会が企画、開催される事になった。これに先立って、当科では1988年より毎年1回若手皮膚科医（研修医）を対象とした真菌講習会を開催し（2009年から北陸真菌懇話会の主催）、昨年まで27回を重ねてきた。この間に *T. tonsurans* 感染症の集団発生が頻発し、その対策を求められるなど皮膚科医が社会から求められるものも変わりつつある。そこで、2013年に講習内容を一部見直し、テキストを編纂したが、本年はさらに本格的に改訂を行い、*T. tonsurans* 感染症を含む近年の知見を盛り込んだものを作成中である。このテキストに基づいた講習は2014年3月8日に実施予定であるが、これが *T. tonsurans* 感染症のみでなく皮膚真菌症全般の診療能力の向上に繋がると期待している。

E. 結論

皮膚真菌症の診療支援を行う過程で収集した *T. tonsurans* 分離株を用いた分子疫学的考察を行った。さらに皮膚科医の診療能力の向上のために真菌の講習会を企画し、その際に使用するテキストを改訂した。

F. 健康危険情報

平成26年度においても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。

G. 研究発表

論文発表

1. T Mochizuki, K. Takeda, K Anzawa: Molecular markers useful for epidemiology of dermatophytoses. J Dermatol (in press).

2. Y Sakata, A Kitayama, R Yoshimura, K Anzawa, T Fujii, K Fujimoto, H Yokoyama, T Mochizuki: Case of cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Phaeoacremonium* sp. in a renal transplant recipient. J Dermatol (in press).
3. 望月 隆: 皮膚真菌症をめぐる今日の問題点. 日臨皮誌 31:505-507, 2014.
4. 望月 隆, 安澤数史: 皮膚真菌症の診療に必要な菌の知識. 日皮会誌 124: 2689-2691, 2014.
5. 望月 隆: その真菌検査法 間違っていますか! 日皮会誌 124: 2777-2779, 2014.
6. 望月 隆, 石崎 宏: 真菌性皮膚疾患序説 若手皮膚科医のための真菌講習会テキスト 第3版 (望月 隆 著編)、金沢医科大学皮膚科学講座 (印刷中).
7. 竹田公信, 望月弘和, 坂田祐一、牛上 敢, 西部明子, 安澤数史、望月 隆, 花川博義、柳原 誠: アトピー性皮膚炎様の皮疹を呈した *Trichophyton tonsurans* による汎発性白癬. 日小皮誌 (投稿中)

学会発表

1. 望月 隆: 皮膚科領域の真菌検査 第25回日本臨床微生物学会総会(名古屋 平成26年2月)
2. 望月 隆: 皮膚真菌症をめぐる今日の問題 第30回日本臨床皮膚科医会 (横浜 平成26年4月)
3. 望月 隆: 皮膚真菌症の診療に必要な菌の知識 第113回日本皮膚科学会総会 (京都 平成26年5月)
4. 望月 隆: その真菌検査法 間違っていますか! 第113回日本皮膚科学会総会 (京都 平成26年5月)
5. 望月 隆: 皮膚真菌症の基礎と臨床をめぐる最近の進歩 日本臨床皮膚科医会東海北陸ブロック学術講演会 (名古屋 平成26年10月)
6. 望月 隆: 「皮膚真菌症の診断法 up-to-date」 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会 (岡山 平成26年10月)
7. 望月 隆: 皮膚真菌症の病原体と検査 第26回日本臨床微生物学会総会(東京 平成27年1-2月)
- 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. 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、管理・運営し、他施設の診療支援をおこなっている。
3. 若手皮膚科医の皮膚真菌症診療能力の向上を目指して平成27年3月8日に金沢医科大学において北陸真菌懇談会 真菌講習会を開催の予定である。

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

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

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・食品検査診断センター
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 我が国における輸入真菌症の国内発生の調査を行うとともに、ヒストプラズマ症のスクリーニング法開発を進めた。コクシジオイデス症（2例）、ヒストプラズマ症（5例：内3例は集団感染事例）に加えて、本年もマルネツフェイ型ペニシリウム症（1例）が確認され6年連続して国内発症が確認された。ヒストプラズマ症の一部は高齢化やCOPDを基礎として増悪したことが疑われ、今後の我が国社会に警鐘を鳴らすものと考えられた。スクリーニング法では開発を進めているELISAを用いた抗体検出法において急性肺ヒストプラズマ症で80%の陽性率を示すなど有用性が示唆された。また、新たに開発した*H. capsulatum* 特異的nested real-time PCRでは in vitro で高い特異度及び感度でDNAを検出することが示され、実際の症例において血清および病理組織、BALFから*H. capsulatum* 由来のDNAを検出することに成功し実用化への展望を示した。

1. 輸入真菌症の国内発生状況調査

A. 研究目的

輸入真菌症は感染力が強く健常人に容易に感染し重症化すること、また診療活動中の感染事故が起りやすいことから、その最新の国内発生状況を確認することは特に重要である。当班では輸入真菌症の危険性を考慮し、その国内発生動向の解析を続けている。今後、我が国では観光立国などの国際化の進展により、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。このため本研究班で解析を行い、これを基に国内の医療施設、医療従事者に対する啓蒙活動を進め医療レベルの向上を目指すことは、本研究班の目的に合致する重要な活動と考えられる。

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て検討した。国内で診断された症例の大部分はこの方法で収集されると思われるが、念のため、醫學中央雑誌、Medline などに掲載された報告症例を検索してデータの信頼性を高めた。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、厚労省に対する届け出と照合して情報を補完した。

C. 研究成果 (図1)

1) コクシジオイデス症

2014 年は計 2 例が確認され、総症例数は 75 例となった。ここ数年は年間 2-4 例とほぼ一定の患者数が認められるようになってきている。感染地では 2014 年の 2 例ともアリゾナでの感染と考えられたが、この点から過去の症例と比較してみると、一昨年からアリゾナとカリフォルニアが交互に感染地として確認されており、この両地域に集中している点で一定している。いずれも健常人に胸部結節・空洞影を呈し、病型は慢性肺コクシジオイデス症(空洞 1 例、結節影 1 例)と考えられた。なお、結節影の 1 例については他疾患と誤認されて治療されており、本疾患群に関する正しい医療知識の普及活動の重要性が改めて認識された。

2) ヒストプラズマ症

2012 年には 1 例にとどまっていたヒストプラズマ症であるが、2014 年は 5 例確認され総計は 83 例となった。感染地はメキシコが 3 例、ホンジュラスとパナマが各 1 例であった。いずれも明瞭な基礎疾患を持たず全身的な免疫能はほぼ健常人に近いものと推測されたが、メキシコ感染の症例では一時重篤な状態にいたった。本症例では軽度の COPD に相当する慢性肺病変を有しており、これが重症化の誘因となったものと考えられた。

病型はいずれも急性肺ヒストプラズマ症と考えられた。なお、メキシコでの感染例 3 例はいずれも同じ地域で同じ作業中に感染したことが疑われ、一種の集団感染と考えられる(時間経過では多少の前後あり)。重篤な病態に至った症例もあり、同地域での今後の活動に関して検討が必要と考えられた。

3) パラコクシジオイデス症

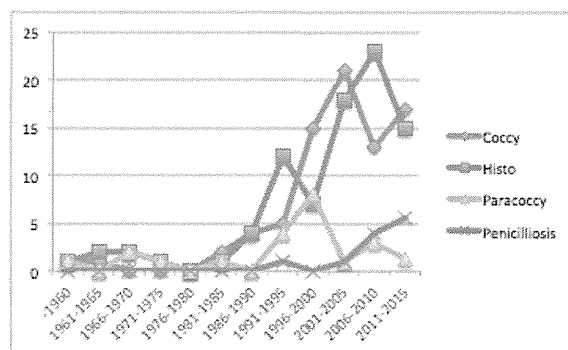
パラコクシジオイデス症は、本年は報告がなく、総計は 22 例のままであった。

4) マルネツフェイ型ペニシリウム症

マルネツフェイ型ペニシリウム症は過去 10 年あまりで様相を変えた輸入真菌症といえる。2006 年までは過去のすべての症例を検索しても 3 例しか発見されていなかったが、2009 年以降毎年確認されるようになり、2 例ないしは 1 例の発症が必ず発見されている。本年も引き続き 1 例報告され総計は 10 例となった。感染地はタイと推測され HIV 感染を基礎とする播種型であり、これまでの症例と比較しても典型的な例といえるが、今回は特に脳膿瘍を呈した点が特異であった。

5) その他の輸入真菌症

重要な endemic mycosis とされるブラストミセス症は本年も確認されなかった。



D. 考察

当研究班のこれまでの研究から 1980 年代から輸入真菌症症例はコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症を中心に急速な増加を始め、以後長期的な安定傾向にあること、誤診などにより必ずしも適切な診療を受けられていない例が少なくないこと等が明らかとなっている。

今年の集計では、ヒストプラズマ症の集団発生、マルネツフェイ型ペニシリウム症の定常化などが確認された。

コクシジオイデス症では、他疾患と誤診されて治療され増悪を見た症例が確認された。本疾患群についての医療関係者の知識や情報は、本研究班の活動などにより大きく向上し

たと考えられるが、さらなる啓蒙活動が必要と考えられる。

ヒストプラズマ症では集団感染例が確認された。過去においても本疾患では集団感染事例が認められており、改めてその特性に注意が必要と思われる。また、今回の症例では中年以降の症例が多く、また COPD を基礎として重症化した症例が見られた。近年、我が国では高齢者の海外旅行が盛んに行われており、中にはかなりの辺境地を目指したツアーも数多く企画されているようである。我が国社会の高齢化と COPD の増加に伴い、今後、COPD をはじめとする種々の合併症を有する高齢者が輸入真菌症の流行地を訪れて感染・帰国して発症するケースも増大していく可能性が懸念される。今後も注意深いモニタリングが必要であろう。

マルネツフェイ型ペニシリウム症は毎年確認され、稀な疾患として軽視することのできない存在となった。この要因については不明であるが、マルネツフェイ型ペニシリウム症が他の輸入真菌症とやや異なり、ある程度明瞭な全身免疫能の低下を基礎として発症する疾患であることや、我が国で見られる患者の多くが HIV 感染を基礎としてタイで感染したという事実が原因を理解するポイントとして重要と思われる。タイでは正確な疫学データがないためマルネツフェイ型ペニシリウム症の流行状態は不明であるが、本症の症例数は、以前この地域における代表的な *endemic mycosis* であったヒストプラズマ症の症例数を遙かに凌駕しているとされている。一方、我が国の HIV 感染者数は 2 万人を超えるなど、本症発症の基礎疾患を有する患者数は増加している。我が国とタイとは人事的交流も多いが、今後は本症の流行地域に含まれるとされているミャンマー、ベトナムなどとの交流も増加することが予想される。これらの地域におけるマルネツフェイ型ペニシリウム症の蔓

延度は不明であるが、古くから流行地として知られていたことから、本症の動向には今後ともとも注目する必要がある。

ブラストミセス症では、米国では最大級の *endemic mycosis* であり、また流行地域でも多くが通常の肺炎などと誤診されているとの報告がある。マルネツフェイ型ペニシリウム症などに比べると感染力が高く、健常人でも重篤な感染を起こすという点を鑑みると、現在報告が確認できないという事実を踏まえてもなお我が国で相当数の患者が発症する危険性は高く、今後間断なく注意する必要がある。

我が国の経済事情や、観光立国・オリンピックなどの政策・活動に伴い、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る。引き続き注意深く調査・研究を行うとともに医療従事者や一般社会に対する警告・啓蒙活動をいっそう強化することと並行して、疑診例に容易に用いることのできる簡便なスクリーニング法の開発が重要と考えられる。

E. 結論

昨年とほぼ同様にコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症、マルネツフェイ型ペニシリウム症などが報告された。疫学的にはマルネツフェイ型ペニシリウム症が毎年確実に報告されるようになったことが注目されるが、中高齢者にヒストプラズマ症の集団発生が見られたことから、今後の我が国の高齢化を踏まえ、更に注意深い調査・研究が必要と考えられる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

- Furusawa H, Miyazaki Y, Sonoda S, Tsuchiya K, Yaguchi T, Kamei K, Inase N: Penicilliosis marneffei Complicated with Interstitial Pneumonia. Intern Med 53(4): 321-323, 2014.
- 渡辺哲, 亀井克彦: ヒストプラズマ症. 感染症 44(6): 1224-229, 2014.
- Brummer E, Kamei K: *Histoplasma capsulatum*: Master Evader of Innate Immunity. Med Mycol J 55(4): E57-E62, 2014.
- 亀井克彦, 渡辺哲: マルネツフェイ型ペニシリウム症. 呼吸 33(10): 1024-1027, 2014.
- 亀井克彦, 渡辺哲: コクシジオイデス症. 感染症 44(4): 139-140, 149-153, 2014.
- 渡辺哲, 亀井克彦: 輸入真菌症の疫学と病態 1) コクシジオイデス症の疫学と病態. 感染症内科 2(6): 594-598, 2014.
- 渡辺哲, 亀井克彦: 旅行者真菌症. 呼吸 33(5): 444-449, 2014.
- 亀井克彦, 渡辺哲: 輸入感染症としての真菌症. 臨床検査 58(1): 111-116, 2014.
- 渡辺哲, 亀井克彦: 我が国における輸入真菌症へのアプローチ. 感染と抗菌薬 17(1): 43-47, 2014.
- 渡辺哲, 亀井克彦: 地域流行型真菌症 (いわゆる輸入真菌症). 小児内科 46(12): 1848-1852, 2014.
- 渡辺哲, 亀井克彦: 注目される感染症 輸入真菌症の現状と対策. 日内会誌 103(11): 2674-2679, 2014.
- 渡辺哲, 亀井克彦: 旅行医学から見た真菌症. 「目で見る真菌と真菌症」, 編者: 亀井克彦, p.152-162, 医薬ジャーナル社, 2014.6.20発行.

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

2. ヒストプラズマ症の迅速診断法改良・開発 へ向けた基礎的研究

A. 研究目的

1. 新規検体を用いた ELISA での実践的検討

我々はこれまでに、患者血清中抗体が認識する *Histoplasma capsulatum* 抗原タンパク質を新たに同定し、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た。また現在、これら組換えタンパク質を用いた ELISA の確立とその有用性を検討している。

AgH、AgM に加えて、N-acetylated α -linked acidic dipeptidase (NAALADase) がヒストプラズマ症患者群において健常人群よりも有意に高い抗体価を示すことが明らかとなり、Catalase P は有意差を認めなかったものの患者血清群で高い抗体価を示した (Toyotome, 2015)。また、これら 4 種の抗原タンパク質の併用についてもこれまでに検討を進めてきた。抗原のエピトープに関する検討では、AgM タンパク質に関して、その C 末領域のみからなるタンパク質 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が低減することが明らかとなった。

本年度はこれまでに確立した ELISA を用い、播種型ヒストプラズマ症患者 1 名および急性肺ヒストプラズマ症患者 5 名から採取した血清 7 検体について、検討を行った。

2. Real-time PCR による迅速診断法の開発

我々は、これまでに同定した新規抗原タンパ

ク質のうち、NAALADase 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、本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 NAALADase 遺伝子を特異的に検出可能な real-time PCR 法を確立した。しかし、本 real-time PCR は、検出特異性は高かったものの、血清などの臨床検体から *H. capsulatum* 由来の DNA を十分な感度で検出することができなかった。そこで本年度は、我々が開発した real-time PCR と検出感度に優れた nested PCR 法を組み合わせることにより、検出特異性と検出感度の両方に優れた nested real-time PCR の開発を試みた。さらに、本法を用いて臨床検体から *H. capsulatum* の検出を試みた。

B. 研究方法

1. 新規検体を用いた ELISA での実践的検討

AgH および AgM-F3、我々が同定した NAALADase および Catalase P の合計 4 種の *H. capsulatum* 抗原タンパク質は 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を形成していたため、8M 尿素で可溶化した。抗原タンパク質の精製はニッケルカラムを用いて行い、500mM イミダゾールを含むバッファで溶出した。最終精製画分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。AgH、AgM-F3、NAALADase、Catalase P の 4 抗原をコーティングバッファで混合し、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。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。

また、播種型ヒストプラズマ症患者 1 名から採取した血清 2 検体および急性肺ヒストプラズマ症患者 5 名から採取した血清 5 検体を用いて ELISA を行った。判定は健常人血清 10 検体の測定値から平均値および標準偏差 (SD) を求め、平均値 + 2SD を上回った患者検体を陽性と判定した。3 回の独立した実験を行い、陽性判定が一度以上出た検体を最終的に抗 *H. capsulatum* 抗体陽性と判定した。

2. Real-time PCR による迅速診断法の開発

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。また本法の検出特異性を *H. capsulatum* 15 株およびその他の真菌 37 株から抽出した DNA を用いて評価した。また、ターゲット遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を健常人血清に加えた検体から DNA を抽出し、本法の検出限界を評価した。さらに、播種型ヒストプラズマ症患者 1 名および急性肺ヒストプラズマ症患者 5 名から採取した血清 7 検体、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 3 検体、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織 3 検体を用い、本法の有効性を評価した。

C. 研究結果

1. 新規検体を用いた ELISA での実践的検討

急性肺ヒストプラズマ症患者 5 名から採取した血清においては、5 検体のうち 4 検体が陽性であった。これに対し、播種型ヒストプラズマ症患者 1 名から採取した血清 2 検体はいずれも陰性であった。健常人血清においては全てが陰性であった。

2. Real-time PCR による迅速診断法の開発

Nested real-time PCRの検出特異性の評価では、本法は*H. capsulatum*供試株のみを特異的に検出することができた。検出限界の評価では、本法は健常人血清に5コピーのプラスミド DNAを加えた検体からターゲット遺伝子を検出することが可能であった。臨床検体を用いた本法の有効性の評価においては、血清検体では7検体中3検体、BALF検体では3検体中1検体、FFPE組織検体では3検体中3検体から*H. capsulatum*の検出に成功した。

D. 考察

1. ELISA

播種型ヒストプラズマ症患者 1 名から採取した血清 2 検体においては、我々が確立した ELISA による測定結果がいずれも陰性であった。この 2 検体は市販の ELISA kit (Focus Diagnostics 社 : *Histoplasma* DxSelect kit) による測定結果も陰性であったことから、実際に抗体価が上がっていないと考えられた。免疫不全患者における播種型ヒストプラズマ症では抗体価が上がらないケースが知られており、本症例の患者は HIV 陽性であったことからこのケースに当てはまると考えられた。

急性肺ヒストプラズマ症患者の血清検体においては、5 検体のうち 1 検体が本 ELISA による測定結果が陰性であった。しかしこの 1 検体は市販の ELISA kit による測定では陽性であった。また、一部の検体では 3 回の独立した実験の結果にばらつきが見られた。今後、ELISA の感度および測定結果のばらつきを改

善するために、抗原を混合する割合や使用抗原の組み合わせにさらなる検討の余地があると考えられた。

今後より多くの新たに流行地において得られた患者検体について種々の検討と並行して本 ELISA を用いた解析を行い、比較検討を行うとともに、より簡便なスクリーニング法についても検討を行う予定である。

2. Real-time PCR による迅速診断法の開発

我々が新たに開発した *H. capsulatum* 特異的 nested real-time PCR は高特異性かつ高感度に *H. capsulatum* 由来の DNA を検出することができた。臨床検体を用いた本法の有効性評価では、FFPE 組織検体からの検出率が最も高かったが、血清検体および BALF 検体では検出率は高くなかった。この理由として、血清検体や BALF 検体においては患者の免疫状態や病態、検体の採取時期等が検体中に含まれる *H. capsulatum* 由来の DNA 量に影響し、本法による *H. capsulatum* 検出の成否にも少なからず影響していることが考えられた。今後さらに検体数を増やして本法の有効性を評価していく予定である。

E. 結論

国内で収集した7検体を対象とし、我々が確立したELISAを用いて解析したところ、急性肺ヒストプラズマ症の5検体中4検体において陽性を示し抗体の検出が可能であった。結果に関する比較解析を進めるとともに、今後のさらなる使用検体拡大により本ELISAの有用性が示せるものと期待する。

また、我々が新たに開発した*H. capsulatum* 特異的nested real-time PCRは高特異性かつ高感度に*H. capsulatum*由来のDNAを検出することができた。臨床検体を用いた本法の有効性評価においては、血清およびFFPE組織、BALFから*H. capsulatum*由来のDNAを検出

することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- Toyotome T, Watanabe A, Ochiai E, Kamei T: N-acetylated α -linked acidic dipeptidase is identified as an antigen of *Histoplasma capsulatum*. Biochem Biophys Res Commun. In press.

学会発表

- 村長保憲, 豊留孝仁, 渡辺哲, 亀井克彦: Real-time PCR を用いた臨床検体からの *Histoplasma capsulatum* 検出の試み. 第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 2014.11.1-2.
- 村長保憲, 豊留孝仁, 八尋真希, 関里亜, 渡辺哲, 亀井克彦: Nested real-time PCR を用いた臨床検体からの *Histoplasma capsulatum* 検出の試み. 真菌症フォーラム第 16 回学術集会, 東京, 2015.2.14.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

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

研究分担者 川上和義 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 本研究では、真菌感染症の「難治病態の基盤・応用研究」を目的とし、エイズなど免疫低下を背景に発症するクリプトコックス症と、近年「高病原性クリプトコックス症」として問題となっている *Cryptococcus gattii* 感染症の発症病態解明を目指して、本真菌に対する免疫応答機構の解析を実施した。今年度は以下の点について明らかにした。

1) 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トランスジェニック (Tg) マウスを用いてtissue-resident memory T (Trm) 細胞、長期メモリーT細胞からのIFN- γ 産生動態が明らかになった。2) クリプトコックス感染におけるTh1-Th2バランスのIL-17Aによる制御機構を見出した。3) クリプトコックス感染における獲得免疫成立機構を解明するために、卵白アルブミン (OVA) 遺伝子導入クリプトコックス株とOVA特異的T細胞受容体発現Tgマウスを用いた解析系を確立した。本研究を通して、クリプトコックス感染防御免疫でのTh1-Th2バランスの制御におけるIL-17の新たな役割が明らかになった。また、本研究により作製に成功したTgマウス及びOVA発現クリプトコックスを用いることで、エイズ合併クリプトコックス髄膜炎や高病原性クリプトコックス症の発症病態をより詳細に解明できるものと期待される。

A. 研究目的

Cryptococcus neoformans は、糖尿病、血液悪性疾患、膠原病、エイズなどの免疫低下宿主に合併する日和見病原真菌であり、このような症例では重篤な髄膜脳炎を引き起こし、臨床上問題となる。髄膜脳炎はたとえ標準治療を行った場合でも死亡率が2週後で12%、4週後で26%に達すると報告されており (*Clin Infect Dis* 28: 82-92, 1999)、また、世界のエイズ患者における死亡原因では結核に次いで第2位ともいわれている (*AIDS* 16: 1031-1038, 2002)。

免疫不全がない場合でも肺クリプトコックス症を起こすことがあるが（原発性肺クリプトコックス症）、限局性のことが多く、通常は髄膜脳炎にまで至ることは少ない。一方、細胞性免疫能が低下した状態では、しばしば中枢神経系への播種性感染が惹起される。このような違いは感染宿主の免疫状態によって大きく左右されるため、その対策を講じるには本真菌に対する感染防御免疫機構の理解が重要である。

近年では、クリプトコックス症が、結核と同様に不顕性感染後に潜伏感染し、免疫不全

に伴って内因性再燃することを示すエビデンスが報告されつつある (*Clin Vacc Immunol* 14: 1550, 2007; *Pediatrics* 107: e66, 2001; *J Clin Microbiol* 37: 3204, 1999; *J Med Vet Mycol* 30: 395, 1992)。これに一致して、本真菌はマクロファージの殺菌作用に対するエスケープ機構を有し、細胞内寄生しうることが知られている (*Trends Microbiol* 9: 273-278, 2001)。このように、本症は内因性再燃によって発症するとの認識に変わりつつあり (*Semin Respir Crit Care Med.* 25: 145-157, 2004)、エイズ合併クリプトコックス症の発症機序を見直す必要が出てきた。

本研究では、真菌感染症の「難治病態の基盤・応用研究」を行うことを目的とする。そのために、エイズなど免疫不全を背景に発症するクリプトコックス髄膜脳炎の発症病態解明を目指して、本真菌に対する免疫応答機構の解析を実施した。

B. 研究方法

1. マウス

IL-17A 受容体遺伝子欠損 (IL-17AKO) マウス (東京理科大学 岩倉洋一郎教授より供与)、卵白アルブミン (OVA) 特異的 T 細胞受容体 (TCR) を高発現するトランスジェニック (Tg) マウス (OT-II マウス) (東北大学 石井直人教授より供与) を用いた。野生型 (WT) マウスとして C57BL/6 マウス (日本クレア、東京) を用いた。

2. *C. neoformans*

血清型 A の臨床分離株である YC-13、及び血清型 D の荚膜欠損株 Cap67 (S.M. Levitz 教授, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA より供与)、その親株である B3501 (K.J. Kwon-Chung 博士, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA より供与) を potato dextrose agar (PDA) 培地 (栄研化学、東京) にて 30°C で

培養した。

3. *C. neoformans* 感染実験

マウスをペントバルビタールで麻酔後、気管内にカニューレを経口的に挿入して 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 /マウスの YC-13、 1×10^6 /マウスの Cap67、B3501 を接種した。実験によっては、OVA-YC-13 を接種した。

4. 肺内生菌数

感染後経時的にマウスから肺を摘出し、ステンレスメッシュですり潰した後、10 倍段階希釈液を作製し、PDA 培地にて培養し生菌数を測定した。

5. サイトカイン測定

肺ホモジネートやリンパ節細胞の培養上清中の IL-12p70、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-13 の濃度について ELISA キット (BioLegend, San Diego, CA, USA) を用いて測定した。

6. リアルタイム PCR

肺ホモジネートから RNA を抽出し、リアルタイム PCR により IL-12p35、IFN- γ 、IL-4、Tbet、GATA3 mRNA の発現を測定した。

7. フローサイトメトリー

肺ホモジネートから比重遠心により採取した白血球を抗 CD3、CD4、NK1.1、IL-12R β 2 抗体で表面、抗 IFN- γ 抗体で細胞内を染色し、フローサイトメトリー BD FACS Canto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いてそれぞれの発現を解析した。肺内のメモリー T (Tm) 細胞、tissue-resident Tm (Trm) 細胞を解析するために、肺内白血球を抗 CD4、CD8、CD44、CD127、CD69、CD103 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

8. リコンビナント IL-17A 投与

クリプトコックス感染における IL-17A の役割をさらに解析するために、リコンビナント IL-17A (BioLegend) をマウスの気管内に投与し、感染経過、肺内における免疫応答への影響について解析した。

9. MP98 特異的 T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウスの作製

クリプトコックスの主要な T 細胞抗原である分子量 98kDa のマンノプロテイン (MP98) に特異的な T 細胞ハイブリドーマ (P1D6) (S.M. Levitz 教授, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA より供与) から TCR α および TCR β の遺伝子をクローニングし、pHSE3'-TCR α および pHSE3'-TCR β のプロモーターから polyA シグナルまでのトランスジーンを Xho I を用いて切り出し、両断片を混合して BDF1 マウスの受精卵に注入した。遺伝子注入受精卵は偽妊娠マウス (ICR) に着床させ、得られた仔について TCR α および TCR β トランスジーンの有無を調べる目的でジェノタイピングを行い、3 匹のファウンダーマウス (メス 2 匹、オス 1 匹) を得た。これらを BDF1 マウス (日本クレア) に掛け合わせ、3 系統の Tg マウスを維持した。

10. OVA 発現クリプトコックスの作製

Gallus gallus の ovalbumin cDNA を組み込んだプラスミド pCI-neo-sOVA は Addgene Inc. (Cambridge, MA, USA) より購入した。nourseothricin acetyltransferase (NAT) 遺伝子および *C. neoformans* の Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) 遺伝子のプロモーター、ターミネーター配列を組み込んだプラスミド (千葉大学清水公徳先生作製) をベクターとして用いた。pCI-neo-sOVA の 760 bp の OVA 部分を PCR で増幅し、Gene Art (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いてベクターの GPD プロモーターの下流で GPD ターミネーターの上流となる部分に挿入し、pKIS607 を作製した。pKIS607 の NAT および GPD プロモーター、OVA、GDP ターミネーターを含む部分を PCR で増幅し、バイオリスティック法 (PDS-1000/He, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて *C. neoformans*

(YC-13 株など) に導入した。得られた nourseothricin 耐性菌について、OVA 遺伝子の存在を PCR で確認した。

11. 統計学的解析

実験結果はすべて平均値 \pm 標準偏差で表している。各群間の統計学的解析は Student's t-test を用いて行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

12. 倫理的配慮

すべての動物実験は、事前に東北大学の動物実験専門委員会及び、組換え遺伝子実験委員会の承認を得た上で実施した。関連法令を遵守し、動物は可及的に少ない頭数を用いるとともに、十分な麻酔を行い、人道的エンドポイントに達した動物は安楽死によって無用な苦痛が生じないように配慮した。

C. 研究結果

1. *C. neoformans* 感染マウスモデルを用いた感染防御免疫応答の分子機構の解析

これまでに我々は、ヒトにおけるクリプトコックス症の病態を理解するために、*C. neoformans* のマウス肺感染モデルを用いて免疫学的解析を行ってきた。今年度は、昨年度に引き続き、IL-17 の役割について遺伝子欠損マウスを用いた検討を行った。

IL-17 は、真菌の中ではカンジダ感染において好中球反応と関連して重要性が報告されている (*Cell Host Microbe* 11: 425-435, 2012)。しかし、クリプトコックス感染ではその役割は十分に理解されていない。IL-17A 遺伝子欠損 (IL-17AKO) マウスの肺内に *C. neoformans* を感染させると、野生型 (WT) マウスと比較して 14、28、56 日後の肺内生菌数と、56 日後における脳への播種性感染が有意に減少した。その機序について検討したところ、IL-17AKO マウスにおいて肺内での Th1 細胞への分化が有意に高まっており、さらに自然免疫の時相での NK 細胞、NKT 細胞