

201447010A

厚生労働科学研究委託費

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

酵母様真菌感染症の病原性解明と
疫学・診断法・制御法の研究

平成26年度 委託業務成果報告書

平成27(2015)年3月

業務主任者

宮崎 義継

(国立感染症研究所)

委託業務成果報告書への標記について

委託業務に係る成果報告書の表紙裏に、次の標記を行うものとする。

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（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）による委託業務として、宮崎 義継 が実施した平成26年度「酵母様真菌感染症の病原性解明と疫学・診断法・制御法の研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

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

酵母様真菌感染症の病原性解明と
疫学・診断法・制御法の研究

平成26年度 委託業務成果報告書

平成27（2015）年3月

業務主任者

宮崎 義継

（国立感染症研究所）

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
酵母様真菌感染症の病原性解明と疫学・診断法・制御法の研究-----	1
業務主任者 宮崎義継（国立感染症研究所 真菌部）	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. ACTIONsバンドル2014を用いたカンジダ症の診断・治療と、治療効果、 予後の関連性における多施設調査 -----	9
担当責任者 竹末芳夫（兵庫医科大学 感染制御学）	
2. 酵母血流感染症に関する遺伝子学的補助診断法の確立ならびに多施設共同 後方視的発生動向調査 -----	11
担当責任者 渋谷和俊（東邦大学医学部 病院病理学講座）	
3. 病原真菌 <i>Candida albicans</i> の病原因子分泌性アスパラギン酸プロテアーゼ 阻害薬の探索 -----	18
担当責任者 杉田 隆（明治薬科大学 微生物学教室）	
4. 移植領域における難治性カンジダ症の原因解析 -----	22
担当責任者 高倉俊二（京都大学医学研究科 臨床病態検査学）	
5. 酵母様真菌感染症の疾患感受性・病態解明・治療研究 -----	24
担当責任者 泉川公一（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座 臨床感染症学分野）	
6. <i>Cryptococcus gattii</i> の免疫原性に関する研究 -----	27
担当責任者 金子幸弘（大阪市立大学大学院医学研究科 細菌学）	
7. 薬剤感受性機構の解明に関する研究 -----	31
担当責任者 石野敬子（昭和大学 薬物療法学講座 感染制御薬学部門）	
8. ミカファンギン耐性 <i>Candida</i> 株の疫学と耐性化機構に関する研究 -----	34
担当責任者 田辺公一（国立感染症研究所 真菌部）	
III. 学会等発表実績 -----	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	61

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（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）
委託業務成果報告（総括）

酵母様真菌感染症の病原性解明と疫学・診断法・制御法の研究

業務主任者 宮崎義継 国立感染症研究所 真菌部

研究要旨 菌血症あるいは脳髄膜炎の原因として頻度が高い酵母様真菌であるカンジダ属とクリプトコックス属を中心に、疫学および病原性の解析に基づく診断法と治療法を目指す研究を実施した。

健康者に発症し致命的な経過を取りうる *Cryptococcus gattii* 感染の症例検証や発生動向調査は、感染症法改定等に際し有益な情報源となり行政施策上有益である。疫学調査の成果として渡航歴の無い国内の中枢神経系疾患から *C. gattii* が確認され、播種性クリプトコックス症が五類全数把握疾患に指定される一根拠となった。菌血症の重要な原因であるカンジダの薬剤感受性についてはガイドライン等に記載される診療エビデンスとして直接的に利用可能であり有益である。さらに、薬剤耐性機構や病原因子の解明は、新たな診断法や治療法への開発のための基盤情報となり医療産業にとって有益な情報となりうる。

臨床グループでは治療抵抗性（初期治療失敗）あるいは薬剤耐性株が分離された症例、ならびに、該当する真菌株の解析を実施する。基盤研究グループでは、難治例からの分離株や薬剤耐性株の病原因子の同定や感受性機構の解析を行った。

A. 研究目的

わが国において血液又は脳脊髄液から分離培養される病原体のうち、カンジダ属とクリプトコックス属は検出数として上位を占める。

致命率が高いカンジダ血症における病原因子を解析し迅速な診断法や治療法の開発につなげる。またカンジダ属は原因菌種毎に異なる薬剤感受性を示すため、感受性動向を明らかにし、耐性獲得機構を解明することは医療現場においては極めて有益な情報となる。

一方、クリプトコックス属はわが国では主たる脳脊髄液からの分離菌であるが、特に治

療抵抗性として知られる *Cryptococcus gattii* がわが国でもヒトから分離されていることをこれまでに明らかにしたが、継続的に分子疫学調査を実施することにより、わが国における発生動向を目的とする。また、免疫応答性が低い *C. gattii* の免疫原性を規定する因子に関する検討を行う。

B. 研究方法

1. 菌種不明の酵母様真菌感染症の調査

菌血症、あるいは、脳髄膜炎等の患者から分離された酵母様真菌について、ITS領域とD1/D2領域の塩基配列を決定し、データベースと照合し遺伝学的に菌種同定を行った。

2. ACTIONsバンドル2014の有用性の検証

予後の関連性における多施設調査Key項目をカンジダ血症とエムピリック治療でそれぞれ設定し、各項目の達成状況並びに遵守率(全項目達成)を評価。遵守と臨床成績(治療効果と28日死亡)との相関性を検討した。

3. 遺伝子学的補助診断法の確立と後方視的発生動向調査

東邦大学医療センター大森病院および国内多施設より深在性真菌症が記録された可及的多数の剖検症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を収集した。次いで、収集し得た組織切片に対して *C. albicans* および *Trichosporon* 属 28S rRNA を標的とした Peptide Nucleic Acid (PNA) probe を用いた *in situ* hybridization (ISH) 法を行った。

4. *Candida albicans* 分泌性アスパラギン酸プロテアーゼ阻害薬の探索

化合物ライブラリー、635 化合物を用い、*C. albicans* の発育および分泌性プロテアーゼ (SAP) 活性阻害効果を検討した。ヒット化合物が SAP タンパクと相互作用を示すかドッキングシミュレーションを行なった。

5. 侵襲性真菌症のリスク因子の解析

2007 年～2013 年までの京都大学病院において実施した 16 歳以上の肝移植において、術後侵襲性真菌症の発症を調査した。診療録のレビューを行い、侵襲性真菌症の発症の有無を EORTC/MSG 基準にしたがって判定した。臨床背景、術前・術後の臨床因子統計解析し、発症リスク因子を検索した。

6. non-HIV population におけるクリプトコックス症の発症因子解析

非 HIV 患者におけるクリプトコックス症について、長崎大学病院における非 HIV 患者

に発症したクリプトコックス症自験例について、後方視的に解析する。クリプトコックス症例を対象に、患者血液から gDNA を抽出し、おもに Pattern Recognition Receptor (PRR) について Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を行った。

7. カンジダ症における *in vitro* バイオフィルムモデルにおける抗真菌薬の効果検討

Silicon elastomer (SE) シートを用いたバイオフィルム形成モデルを作成し、抗真菌薬の効果について検討した。

8. *Cryptococcus gattii* の免疫原性に関する研究

C. neoformans H99 株および *C. gattii* JP02 株をマウスに経気管的に菌を接種し、生存率の比較と、15 日目の肺の病理組織を検討した。

C. neoformans、*C. gattii* から莢膜多糖を抽出、精製し、C57BL/6 由来の樹状細胞に接種して血中に産生されるサイトカイン産生量を ELISA 法で測定した。

9. *Cryptococcus gattii* の薬剤低感受性に関する検討

アゾール低感受性の *C. gattii* 株より RNA を抽出し、realtime PCR により薬剤耐性に関わると推定される遺伝子の発現量を調べた。

10. ミカファンギン耐性 *Candida* 株の耐性化機構に関する研究

キャンディン耐性 *C. glabrata* 株の *FKS* 遺伝子をプラスミドにクローニングし、感性の *C. glabrata* 株に導入してキャンディン感受性の変化を検討した。

C. 研究結果

1. 菌種不明の酵母様真菌感染症の調査

クリプトコックス属と菌種同定された真菌のうち1株が*C. gattii*であった。患者は海外渡航歴が無かったことから、*C. gattii*が国内に定着し国内発生の原因となる可能性を示唆する事例であった。この成果は、播種性クリプトコックス症を5類全数把握疾患に指定される行政資料となった。

2. ACTIONsバンドル2014の有用性の検証

バンドル遵守率と予後改善に相関が認められた。中心静脈カテーテル抜去、臨床症状改善から最低2週間治療、治療開始3-5日目に臨床効果評価が臨床成績改善と相関することも明らかになった。

3 2. 遺伝子学的補助診断法の確立と後方視的発生動向調査

二形成性酵母が確認された95症例中、26例(86.7%)が*C. albicans*を標的としたISH法、4例が*Trichosporon*属を標的としたISH法で陽性シグナルを発現していた。

4. *Candida albicans*分泌性アスパラギン酸プロテアーゼ阻害薬の探索

16化合物が*C. albicans*の発育阻害効果および分泌性アスパラギン酸プロテアーゼ阻害効果を呈した。

5. 侵襲性真菌症のリスク因子の解析

期間内(7年間)に269例の肝移植術が実施され、うち術後に侵襲性真菌症の発症は15例(5.6%)でみとめた。術前・術後因子から危険因子を統計解析したところ、多変量解析により、術前からの免疫抑制、術後3ヵ月以内の再開腹術、術後3ヵ月以内の菌血症発症歴の3つが、独立した、晩期の侵襲性真菌症のリスク因子であった。

6. non-HIV populationにおけるクリプトコックス症の発症因子解析

151症例について後方視的解析を行い、67例(44.4%)は基礎疾患を有していなかった。主な基礎疾患は糖尿病(32.1%)、血液疾患(22.6%)、膠原病(22.6%)であった。高齢、低タンパク血症、低アルブミン血症、ステロイド使用、高いCRP値、脳髄膜炎が予後因子として同定された。

8. *Cryptococcus gattii* の免疫原性に関する研究

*C. neoformans*に比べて、*C. gattii*は肉芽腫形成が弱く、炎症細胞の集積をほとんど認めなかった。また、*C. neoformans*の莢膜多糖がIL-6またはIL-12の産生を誘導したのに対して、*C. gattii*はそれらのサイトカイン産生をほとんど誘導しなかった

9. *Cryptococcus gattii* の薬剤低感受性に関する検討

アゾール低感受性*C. gattii*株において、2種類の薬剤排出関連遺伝子の発現量が感性株よりも高値を示した。3株間でアゾールの標的酵素遺伝子*ERG11*の発現量には差を認めなかった

10. ミカファンギン耐性 *Candida* 株の耐性化機構に関する研究

ミカファンギン耐性*C. glabrata*において新規の遺伝子変異を同定し、この変異がキャンディな耐性化を引き起こすことを実験的に明らかにした。

D. 考察

カンジダ症診断治療ガイドライン(ACTIONsバンドル2014)の遵守率が予後

改善に相関すること、また移植領域における臨床情報の後方視野的解析により複数の要素が侵襲性カンジダ症のリスク因子として特定された。クリプトコックス症に関しても基礎疾患および複数の臨床因子が予後因子として特定することができた。これらの解析結果より、科学的根拠に基づいた侵襲性真菌症の治療が可能になると期待される。

PNAプローブを用いたISH解析は治療方針が大きく異なる *Trichosporon* 感染と *Candida* 感染を迅速に鑑別する有効な手法になると考えられた。

Cryptococcus gattii 感染症については、莢膜多糖の免疫原性の低さが、免疫応答の低さと重症化に関連するものと考えられた。また薬剤排出トランスポーター遺伝子の発現亢進がアゾール系抗真菌薬低感受性の一因を担っている可能性が示唆された。これらの基盤的研究から得られた情報は、治療実績に少ない *C. gattii* 感染症の治療方法の確立に貢献できるものと考えられる。

Candida albicans 分泌性アスパラギン酸プロテアーゼ阻害薬の候補物質の発見は、菌自体の発育を阻止するものではなく、宿主との相互作用を阻害するものであり、新たな観点からの抗真菌薬開発の可能性を示唆している。

侵襲性カンジダ症治療薬の主流を担うキャンディン系抗真菌薬の耐性化は、今後の真菌症治療において大きな問題となる。耐性化機構の詳細な解析は、キャンディン系抗真菌薬による治療の効率化に欠かすことのできない情報であり、耐性化の兆候を見出すツールともなりうるであろう。

E. 結論

免疫不全患者の増加、臓器移植をはじめとした高度医療の発達によって、酵母様真菌感

染症の症例数は増加し、また原因菌種は多様化した。新興感染症である *Cryptococcus gattii* 感染症や薬剤耐性菌の出現は真菌症治療の障壁となっている。

この難局を打開するために、疫学的解析をはじめとして臨床研究、基礎研究共にさらなる進展と知見の蓄積が必要であり、診断技術、治療方法などにも改善の余地がある。

本研究班では臨床研究と基礎研究の両方を推進し、有機的な情報交換を通して真菌症治療の問題点を克服していくものである。今後はこれまでの研究課題に加えて、原因菌種の疫学解析を推進する体制を整備し、各担当責任者間での情報共有を進めていくことが重要である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

論文発表

原著論文

英文

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.

総説 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～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.
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～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.

国内学会

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.

II. 委託業務成果報告（業務項目）

ACTIONs バンドル 2014 を用いたカンジダ症の診断・治療と、治療効果、 予後の関連性における多施設調査

担当責任者 竹末芳夫 兵庫医科大学感染制御学 主任教授

研究要旨 カンジダ血症の治療においてガイドラインで示されているkey項目を6つ選び、それを遵守することによる臨床成績の改善について検討した。遵守（全項目達成）は独立した治療成功、予後改善因子であり、24時間以内の中心静脈抜去、2週間以上治療、3-5日目の治療効果の判定、は独立した治療成功の因子であった。

A. 研究目的

侵襲性カンジダ症の診断・治療のガイドライン具体的な項目を箇条書きに明記し、それを個々に捉えるのではなく、bundle（束）にして実施することにより臨床成績の改善を得ることを目的とした ACTIONs bundleの有用性の検証

B. 研究方法

Key項目をカンジダ血症（バンドルA）は6つ、エムピリック治療（バンドルB）は5つ決め、各項目の達成状況並びに遵守率（全項目達成）を評価。遵守と臨床成績（治療効果と28日死亡）との相関性を検討。

（倫理面への配慮）

バンドルは診断や治療に有効であるエビデンスが既に示されたものであり、患者への治療上の不利益は生じない。バンドルは治療方針を制限するものではない。カンジダ症の治療経過における項目の達成を評価するため、患者への同意書の提出を求めない。

C. 研究結果

有効率は遵守93.1%、非遵守 72.6%であり、バンドル遵守は独立した治療成功の因子であった（オッズ比 4.42, 95% CI 2.05-9.52）、死亡率は遵守 10.3%、非遵守 30.5%であり、バンドル遵守は独立した予後改善因子であった（オッズ比 0.27, 95% CI 0.13-0.57）。

臨床成績を改善する独立した項目は、カンジダ血症診断後24時間以内に中心静脈カテーテル抜去（治療成功：オッズ比 2.97,95% CI 1.51-5.85; 死亡：オッズ比 0.41, 95% CI 0.23-0.74）、血液培養陰性化、臨床症状改善から最低2週間治療（治療成功：オッズ比 4.65.,95% CI 2.35-9.19; 死亡：オッズ比0.23, 95% CI 0.13-0.40）、治療開始3-5日目に臨床効果評価（オッズ比5.53,95% CI 2.54-12.04）であった

D. 考察

今回の結果でガイドラインのkey項目を調査することにより、ガイドラインの遵守状況やその有用性が評価された。またACTIONs

Bundle の推進は clinical evidences と bedside practice のギャップを埋める可能性が示唆された。中心静脈24時間以内抜去による予後改善は他の報告と同様であったが、血液培養陰性化、臨床症状改善から最低2週間治療に関しては、重要であることは認識されていたが、明確なエビデンスはなく、今回の結果で証明された。

E. 結論

ACTIONs bundle の遵守はカンジダ血症の臨床成績を改善することが検証された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takesue Y, Ueda T, Mikamo H, et al: Management bundles for candidaemia: the impact of compliance on clinical outcomes.

J Antimicrob Chemother. 2015;70:587-93

2. 学会発表

1) 竹末 芳生: 日本医真菌症学会2014, 11,2, 教育講演: 外科系、救急集中治療領域における 侵襲性カンジダ症の診断と治療

2) 植田貴史、竹末芳生: 真菌症フォーラム 2015, 2, 14, ポスター発表 A-05、ACTIONs bundle 2014を用いた侵襲性カンジダ症の診断・治療の評価

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得: 特になし

2. 実用新案登録: 特になし

3. その他: 特になし

厚生労働科学研究委託費（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）
委託業務成果報告（業務項目）
酵母様真菌感染症の病原性解明と疫学・診断法・制御法の研究

酵母血流感染症に関する遺伝子学的補助診断法の確立ならびに
多施設共同後方視的発生動向調査

担当責任者	渋谷 和俊	東邦大学医学部	病院病理学講座
研究協力者	篠崎 稔	東邦大学医学部	病院病理学講座
	栃木 直文	東邦大学医学部	病院病理学講座
	大久保 陽一郎	東邦大学医学部	病院病理学講座

研究要旨 近年、医療技術の高度化によって深在性真菌症が急激に増加しているが、中でも酵母血流感染症は極めて予後不良な深在性真菌症である。本感染症は今までカンジダ血流感染症がほとんどを占めていると考えられていたが、近年、トリコスポロン血流感染症の割合増加が懸念されている。安全性の観点から広く用いられているキャンディン系抗真菌薬がトリコスポロン属に感受性を有していないため両者の鑑別は極めて重要となってきた。しかしながら、両者の形態学的鑑別は事実上不可能であり、培養検査も短時間での同定が困難であることから、迅速かつ簡便な診断法確立が喫緊の課題である。現在、我々は組織学的診断に応用可能な遺伝子学的補助診断法の確立ならびに酵母血流感染症に関する全国規模の後方視的発生動向調査を進めている。具体的には、国内多施設の剖検例を対象にホルマリン固定パラフィン包埋切片を蒐集し、これらの切片においてin situ hybridization (ISH)法を施行した。その結果、約6%の頻度でトリコスポロン血流感染症が検出された。今後、症例を重ね、組織学的診断に応用可能な遺伝子学的補助診断法の確立に加えて、経年的動向を含め本邦における酵母血流感染症の詳細を明らかにしたい。

A. 研究目的

近年、医療技術の高度化によって深在性真菌症が急激に増加しているが、中でも酵母血流感染症は極めて予後不良な深在性真菌症である。本感染症は今までカンジダ血流感染症がほとんどを占めていると考えられていたが、近年、トリコスポロン血流感染症の割合増加が懸念されている。また、安全性の観点から広く用いられているキャンディン系抗真菌薬がトリコスポロン属に感受性を有

していないため両者の鑑別は極めて重要となってきた。しかしながら、両者の形態学的鑑別は事実上不可能であり、培養検査も短時間での同定が困難であることから、迅速かつ簡便な診断法確立が喫緊の課題である。研究分担者らは形態学的診断に遺伝子学的補助診断法を

図 1 Nucleotide sequences of the probes used in the study

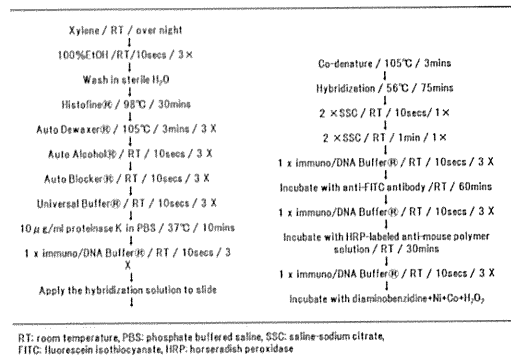
Probe target	Nucleotide sequence	Probe length	Probe labeling
<i>Candida albicans</i> 26S rRNA	ACAGCAGAAGCCGTG	15 mer PNA	N terminus: FITC
<i>Trichosporon</i> spp. 28S rRNA	CGGACAATCGAAGAC	15 mer PNA	N terminus: FITC

PNA: Peptide Nucleic Acid

組み合わせることで、*Candida* 属ならびに *Trichosporon* 属の迅速かつ正確な鑑別方法の確立を試みている。さらに、未だ不明な酵母血流感染症に関する詳細を明らかにすべく、全国規模の後方視的発生動向調査を併せて遂行している。

B. 研究方法

必ずしも生前の確定診断ができない酵母血流感染症では、剖検例を用いた後方視的発生動向調査が全国規模の実態解明に有用である。そこで、先ず東邦大学医療センター大森病院で保管する剖検症例のうち、剖検記録にカンジダ症もしくは酵母様真菌感染の診断記載がある症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを収集した。また、国内多施設より深在性真菌症が記録された可及的多数の剖検症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を収集した。次いで、収集し得た組織切片に対してPAS反応を施行し、形態学的に二形成性酵母を確認し得る組織切片を抽出し、これらの組織切片を資料として *C. albicans* 26S rRNA を標的とした Peptide Nucleic Acid (PNA) probe (N-ACA GCA GAA GCC GTG) ならびに *Trichosporon* 属 28S rRNA を標的とした PNA probe (N-CGG ACA ATC GAA GAC) を用いて (図1)、*in situ* hybridization (ISH)法を施行し (図2) Protocol for *in situ* hybridization using formalin fixed and paraffin embedded tissue sections



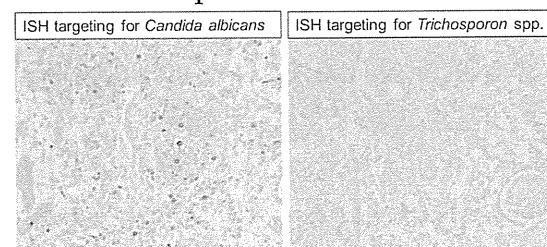
た。具体的な手法としては1 mM EDTA (pH 8.0)溶液による加熱処理と proteinase K (10µg/ml)による二重処理を施した上で、0.5µg/mlに濃度調整したPNA probeを用いて hybridization を施行。次いで、抗 fluorescein isothiocyanate (FITC)抗体を用いた酵素抗体法によりシグナルを検出し菌種の遺伝子同定を行った (図2)。

尚、本研究は東邦大学医学部 倫理委員会の承認を得た上で遂行している (受付番号: 24027、研究課題名: 病理検体を用いた分子生物学的解析法による酵母血流感染症の国内発生動向調査)。

C. 研究結果

国内多施設より深在性真菌症が記録された剖検例を対象として可及的多数の剖検例ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の収集を試みた結果、351剖検例の組織切片を収集し得た。これら収集し得た組織切片に対してPAS反応を施行した結果、95症例で二形成性酵母が確認された。ISH法による解析が終了している53症例において平均年齢は52.6歳 (0歳~88歳)、

図3 *In situ* hybridization with peptide nucleic acid probes.



性別は男性31例、女性22例であった。ISH法の施行結果であるが、30症例で *C. albicans*

あるいは *Trichosporon* 属に対する陽性シグナルが得られ、この中で26例 (86.7%)が *C. albicans* を標的としたISH法 (図3)、4例 (13.3 %)が *Trichosporon* 属を標的としたISH法 (図4)で陽性シグナルを発現していた。

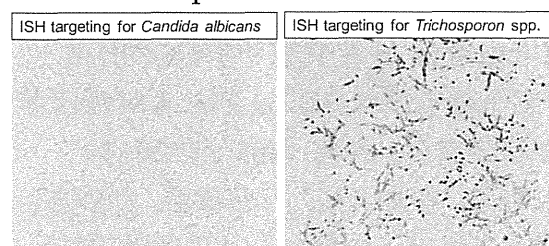
D. 考察

高度医療の発展に伴い深在性真菌症の発生頻度は経年的に増加傾向にあるが、適切な治療を施す観点から菌種の同定は重要である。残念ながら酵母血流感染症において形態学的に *Candida* 属と *Trichosporon* 属を鑑別することは極めて困難であり、今後は分子生物学的手法を組み合わせることで、より精度の高い診断を下す必要がある。特に、PNA probe を用いた ISH 法は菌体の形態や周囲組織の反応を観察しつつ菌体に一致した陽性シグナルを確認することができる点でも優れており、形態学的診断と組み合わせる事でより精度の高い診断が可能になると考えられる。さらに、我々の調査からは酵母血流感染症の中でトリコスポロン血流感染症が一定の割合を占めているものと推測された。今後、症例数を重ねることで酵母血流感染症の詳細をより明らかにしたい。

E. 結論

深在性真菌症の発生頻度は経年的に増加傾向にある。多様化しつつある

図4 *In situ* hybridization with peptide nucleic acid probes.



抗真菌薬を選択して有効な治療法に結びつけるために正確な菌種同定が重要となるが、形態学的診断に遺伝子学的補助診断法を組み合わせる事でより精度の高い診断が可能

になると考えられる。また、我々の調査からは酵母血流感染症の中でトリコスポロン血流感染症が一定の割合を占めているものと推測された。今後、症例数を重ねることで酵母血流感染症の詳細をより明らかにしたい。

さらに、得られた知見は将来的にガイドライン等の収載において、当該領域における情報提供に資する事が期待できる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. Yamamoto Y, Nemoto T, Okubo Y, Nihonyanagi Y, Ishiwatari T, Takuma K, Tochigi N, Okano N, Wakayama M, Igarashi Y, Shibuya K. Comparison between the location and the histomorphological/immunohistochemical characteristics of noninvasive neoplasms of the ampulla of Vater. Human Pathology 1910-1917 Vol.45 No.9, Sep 2014
2. Sasaki Y, Fujii T, Shiono N, Katayanagi T, Okuma S, Wakayama M, Shibuya K, Watanabe Y. Interrupted Aortic Arch With Massive Saccular Collateral Aneurysm in an Adult. The Annals of Thoracic Surgery. Vol.98 No.1, July 2014
3. Muramatsu Y, Isobe K, Sugino K, Kinoshita A, Wada T, Sakamoto S, Takai Y, Sato F, Hata Y, Wakayama M, Shibuya K, Uekusa T, Iyoda A, Homma S. Malignant pleural mesothelioma mimicking the intrapulmonary growth pattern of epithelioid hemangioendothelioma. Pathology International. 358-360 Vol.64, Issue 7, July 2014
4. Sato F, Hata Y, Otsuka H, Makino T,

- Koezuka S, Sasamoto S, Wakayama M, Shibuya K, Sekijima Y, Iyoda A. Isolated Nodular Thymic Amyloidosis Associated With Diplopia. *Ann Thorac Surg.* 1470-2 Vol.98, Issue4, Oct 2014
5. Nakamura Y, Hata Y, Koezuka S, Makino T, Otsuka H, Sato F, Sasamoto S, MD, Okubo Y, Shibuya K, Iyoda A. Tracheal Leiomyoma Resected With Endobronchial Electrocautery Snare, *J Bronchol Intervent Pulmonol.* 90-3 Vol22 No.1 Jan 2015
 6. 栃木直文, 大久保陽一郎, 澁谷和俊. ムーコル症. 検査と技術. 434-8 医学書院 Vol.42 No.5 2014
 7. 澁谷和俊. アスペルギルス属のアゾール耐性にかかわる諸問題. 133-40 化学療法の領域. Vol.30, 2014 年増刊号
 8. 栃木直文, 澁谷和俊, 逸見仁道. 医学英語教育の重要性を考える: 本学における臨床医学英語口述試験の実施と岐阜大学 English OSCE 見聞録. 125-28 東邦医学会雑誌. Vol.61, No.3, May 2014
 9. 根本哲生, 山本慶郎, 澁谷和俊. 表在型 Barrett 食道腺癌の生検病理診断の問題点. 515-21 消化器内視鏡 Vol.26 No.4 2014
 10. 栃木直文, 大久保陽一郎, 澁谷和俊. 肺アスペルギルス症の病理学的考察. 22-26. 呼吸器内科. Vol.26 No.1 July 2014
 11. 澁谷和俊. アルトマンの曲線. 19 化学療法の領域. Vol.30 No.9 Sep 2014
 12. 樽本憲人, 金城雄樹, 北野尚樹, 澁谷和俊, 前崎繁文, 宮崎義継. 全身性カンジダ症の増悪における iNKT 細胞の関与. 115-122. *Med.Mycol.J.* Vol.55, No3, 2014
 13. 若山 恵, 澁谷和俊. 真菌感染症がいま注目される理由—全体像と小児の特徴—. 1726-1729. *小児内科.* Vol.46 No.12, December 2014
 14. Aki K, Okubo Y, Nanjo H, Ishiwatari T, Nihonyanagi Y, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Fukutake K, Shinozaki M, Hori Y, Masuda H Shibuya K. Genomic analysis for single nucleotide polymorphisms (Asp299Gly and Thr399Ile) in Japanese patients with invasive aspergillosis. *Jpn J Infect Dis*, in press
 15. Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, Urai M, Kaneko Y, Shimizu K, Wang DN, Okawara A, Nara T, Ohkouchi K, Mizuguchi Y, Kawamoto S, Kamei K, Ohno H, Niki Y, Shibuya K, Miyazaki Y. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. *Infect Immun.* pii: IAI.02827-14. Feb 2015 [Epub ahead of print]

著書

1. 若山 恵, 斉藤円佳, 澁谷和俊. 真菌症診断の新しい病理学, 目で見る真菌と真菌症 (亀井克彦 編), pp203-12 (株) 医薬ジャーナル社, 大阪, 2014

学会発表

1. 澁谷和俊. 侵襲性ムーコル症の病態. 造血管腫瘍感染症研究会, 東京, 4/16, 2014
2. 和田智博, 磯部和順, 佐藤敬太, 佐野剛, 坂本 晋, 高井雄二郎, 秦 美暢, 伊豫田明, 栃木直文, 澁谷和俊, 本間 栄. 肺病変に対する EBUS-TBNA の有用性・安全性も検討. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会, 大阪, 4/25-27, 2014
3. 後町杏子, 杉野圭史, 一色琢磨, 澁谷和俊, 植草利公, 本間 栄. 上葉優位型特発性間質性肺炎も臨床病理学的特徴. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会, 大阪, 4/25-27, 2014
4. 大久保陽一郎, 安藝恭子, 篠崎 稔, 中

- 山晴雄, 石渡誉郎, 栃木直文, 若山 恵, 根本哲生, 笹井大督, 山本慶郎, 下平佳代子, 二本柳康博, 小林純子, 渋谷和俊. 酵母血流感染症に関する遺伝子診断法の確立ならびに多施設共同後方視的発生動向調査. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, 4/24-26, 2014
5. 根本哲生, 山本慶郎, 平野直樹, 大久保陽一郎, 栃木直文, 石渡誉郎, 二本柳康博, 小林純子, 若山 恵, 渋谷和俊. 非癌食道粘膜および早期食道扁平上皮癌における上皮乳頭内血管の密度. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, 4/24-26, 2014
 6. 二本柳康博, 大塚由一郎, 小林純子, 松清美彩, 山本慶郎, 石渡誉郎, 長谷川千花子, 大久保陽一郎, 栃木直文, 若山 恵, 根本哲生, 鏡 哲, 皆川輝彦, 船橋公彦, 金子弘真, 渋谷和俊. 術後肝肉芽腫の 1 例. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, 4/24-26, 2014
 7. 山本慶郎, 根本哲生, 二本柳康博, 石渡誉郎, 大久保陽一郎, 栃木直文, 若山 恵, 五十嵐良典, 渋谷和俊. 十二指腸乳頭部腫瘍 (非浸潤症例) の局在と組織形態学的、免疫組織学的特徴との関連. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, 4/24-26, 2014
 8. 石渡誉郎, 大久保陽一郎, 小林純子, 二本柳康博, 山本慶郎, 栃木直文, 長谷川千花子, 若山 恵, 根本哲生, 渋谷和俊. 胃癌細胞転移による肺動脈構築改変. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, 4/24-26, 2014
 9. 若山 恵, 下平佳代子, 中山晴雄, 篠崎稔, 大久保陽一郎, 石渡誉郎, 二本柳康博, 小林純子, 山本慶郎, 安芸恭子, 栃木直文, 密田亜希, 根本哲生, 渋谷和俊. 当院剖検例を用いた侵襲性真菌症の疫学的検討 II: 侵襲臓器と加齢の影響について. 第 103 回日本病理学会総会, 広島, 4/24-26, 2014
 10. 渋谷和俊. 肉芽腫と真菌症. 第 89 回日本結核病学会総会 モーニングセミナー, 岐阜, 5/10, 2014
 11. 伊藤貴文, 石田文昭, 後町杏子, 菊池直, 佐野 剛, 磯部和順, 坂本 晋, 高井雄二郎, 井内亜美, 渋谷和俊, 本間 栄. 吸入誘発試験で診断し得た加湿器肺の 2 症例. 第 209 回日本呼吸器学会関東地方会, 千葉, 5/24, 2014
 12. 稲毛麻弥, 大久保陽一郎, 篠崎 稔, 若山 恵, 渋谷和俊. 十二指腸 Gangliocytic paraganglioma の超音波内視鏡下穿刺吸引(EUS-FNA)標本の細胞像. 第 55 回日本臨床細胞学会総会, 横浜, 6/5-7, 2014
 13. 渋谷和俊. 真菌感染症の病理. 第 35 回関東医真菌懇話会 特別公演. 東京, 6/7, 2014
 14. 根本匡章, 上田啓太, 長尾孝晃, 福島大輔, 梶田博之, 野本 淳, 近藤康介, 原田直幸, 周郷延雄, 大久保陽一郎, 渋谷和俊. 「Olfactory groove shwannoma の 1 例」. 第 17 回脳神経外科疾患の臨床と病理の JOINT CONFERENCE, 東京, 6/28, 2014
 15. 砂川泉子, 菊池 直, 石田文明, 廣田直, 佐藤啓太, 佐野 剛, 杉野圭史, 磯部和順, 坂本 晋, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 本間 栄. 多彩な肺病理所見を認め長期経過を追えた MPO-ANCA 陽性間質性肺炎(PLV)の一例. 第 166 回日本結核病学会関東支部学会 第 211 回日本呼吸器学会関東地方会 合同学会, 埼玉, 9/20, 2014
 16. 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 gatti* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン. 第 166 回日本結核病学会関東支部学会 第 211 回日本呼吸