

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）

委託業務成果報告書（総括）

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの推進と共同研究体制の強化に関する研究（H26-新興実用化 一般 011）

市中感染型真菌症の基礎的、臨床的研究にかかる
アジアの感染症研究機関との共同研究ネットワークの構築

担当責任者：宮崎義継（国立感染症研究所 真菌部 部長）

研究協力者：田辺公一、名木 稔、梅山 隆、山越 智（国立感染症研究所真菌部）

Thi Thu Ha Hoang, Pham Thanh Hai, Nguyen Thuy Tram (National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam) , Nguyen Van Tien, Nguyen Quang Tuan (Bach Mai Hospital, Vietnam) , Nguyen Thai Son (103 Hospital, Vietnam), Nguyen Van Hung (National Lung Hospital, Vietnam), Pojana sriburee (Chiang Mai University), Nanthawan Mekha (NIH, Bangkok)

研究要旨：平成25年度までに、ベトナム、ハノイ市における医療機関で呼吸器感染症が疑われた症例を対象にしたヒストプラズマ症の疫学調査を行い、複数のヒストプラズマ抗体陽性検体を確認した。同様の検討を NIHE との共同研究に加えて、タイ王国チェンマイ大学、タイ王国 NIH との共同研究にて行い、コウモリや家禽類の糞で汚染された土壤中にヒストプラズマ DNA を検出した。ベトナム、タイともにヒストプラズマが環境中に生息しており、ヒストプラズマ症は決して稀な真菌症ではないことが伺われた。

A. 研究目的

ヒストプラズマ症は別名「洞窟熱」ともいわれ、高病原性真菌（BSL3）であるヒストプラズマ属（*Histoplasma capsulatum*）を原因真菌とし、HIV 感染者など免疫不全者に加え、健常人にも発病が認められる真菌感染症である。ヒストプラズマ属は通常土壤中に生息し、コウモリや鳥類の糞中で盛んに増殖する真菌

で、世界的に広く生息が確認されているが、なかでも米国ミシシッピ川流域や中南米、西アジア、東南アジア、オーストラリアが大きな侵淫地域であり、本感染症は地域流行型真菌症の性格をもつ。日本人のヒストプラズマ症患者は年々増加傾向を示し、その多くは北中米と東南アジアでの感染であることが考えられているが、東南アジア地域でのヒスト

プラズマ症の実態、流行状況、感染源、危険因子等については未解明な点が多く、日本人現地在住者、日本人旅行に対する適切な感染危険情報も少ない。このような状況を鑑み、本研究では、東南アジア地域での本症の実態把握、流行状況調査、診断能力の向上ならびに分離されたヒストプラズマ属の各国での疫学的解析や基礎研究の推進・発展主要内容として、それぞれの国の感染症研究機関との共同研究ネットワークを構築することを目的とした。

また、今年度は北米で集団感染が認められた *Cryptococcus gattii* についてタイ王国における疫学調査および生息環境調査を開始した。クリプトコックス症は一般的に *C. neoformans* によって引き起こされると考えられているが、*C. gattii* による感染症の流行地である熱帯・亜熱帯地域では *C. gattii* 感染が見過ごされている可能性が高い。そこで、すでにクリプトコックス症患者より分離された菌を収集し、*C. gattii* の存在を検討した。また、土壌や植物表面から採取したサンプルより分離されたクリプトコックス属についても *C. gattii* の存在を検討した。

B. 研究方法

昨年度と同様に、ベトナムの国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemiology: NIHE, Vietnam) の希少細菌研究室と、ハノイ市の Bach Mai Hospital、103 Hospital、National Lung Hospital との共同研究として検討を行った。検討内容としては、呼吸器感染症疑い患者での肺ヒストプ

ラズマ症 (急性、慢性) の状況調査 (疫学調査) 診断支援、ヒストプラズマ属生息状況に関する調査、環境リスク因子の同定を行った。

1) 北部ベトナム地域におけるヒストプラズマ症の疫学調査

前年度と同様、NIHE ならびにハノイ市 Bach Mai Hospital、103 Hospital、National Lung Hospital の感染症部門検査部が主体となり、これら医療機関を受診した (不明熱) 患者で、ヒストプラズマ症を含めた侵襲性真菌症が疑われる患者から診断目的で検査に提出された臨床検体を用いて研究を遂行した。今年度は多検体を迅速に処理し、培養検査による生菌分離を主目的とした。患者のエントリー基準として、1) 無症状だが胸部 X 線検査で肺野に陰影を認める、2) 急性呼吸器症状を呈する (発熱、胸痛、倦怠感、咳嗽など)、3) 結核様の慢性の呼吸器症状を呈し徐々に悪化する症例 (結核は否定する)、4) 免疫不全、口腔内潰瘍、中枢神経症状を呈した症例を対象とした。対象検体は喀痰、気管支洗浄液、髄液、胸水、血液、生検組織などで、状況に応じ培養法、遺伝子診断法 (PCR 法) を行った。PCR 法については我々が行っているヒストプラズマ属検出用 PCR 法 (Ohno H, et al. J Infect Chemother, 2013) を行った。

2) タイ王国におけるヒストプラズマ属生息状況に関する調査

バンコク周辺地域のコウモリが生息する寺院において、コウモリや家禽類の糞で汚染された土壌検体を対象としてサンプリングを行った。チェンマイでは主に家禽類の糞で汚染

された土壌を対象とした。得られた土壌検体は冷蔵保存の上 NIHE へ運搬し、以後のヒストプラズマ属培養法、PCR 法へ供した。

3) タイ王国における *Cryptococcus gattii* の疫学および生息状況調査

チェンマイおよびタイ王国内共同研究先あるいは医療機関より収集したクリプトコックス属真菌について CGB 寒天培地による発育試験により、*C. gattii* のスクリーニングを行った。CGB 培地で *C. gattii* 陽性となった菌株について、ゲノム DNA をチェンマイ大学にて抽出し、国立感染症研・真菌部においてリボソーム遺伝子の塩基配列決定により菌種同定を行った。

(倫理面からの配慮について)

本検討においては NIHE の倫理委員会 (No.01 IRB) ならびに国立感染症研究所倫理委員会 (No.365, No.460) の承認を受けた。

C. 研究結果

1) 北部ベトナム地域におけるヒストプラズマ症の疫学調査

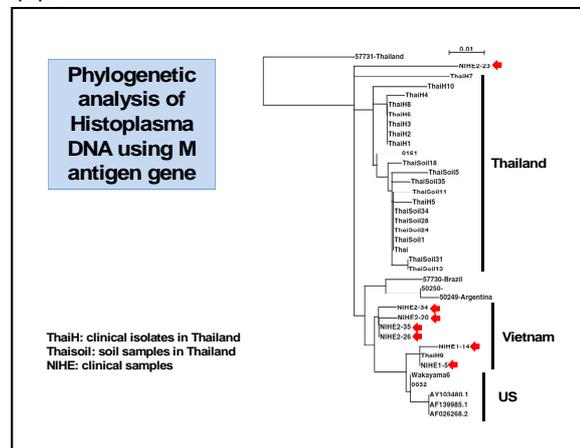
2014 年度は喀痰 150、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 66 検体が NIHE へ検査目的にて供された。喀痰および BALF について培養法、PCR 法を行い、培養法陽性例は認めなかったが、PCR 法陽性は計 6 例 (3.5%) で認めた。

(図 1)

2) タイ王国におけるヒストプラズマ属生息状況に関する調査

バンコク NIH ではコウモリ糞汚染土壌検体計 36 検体を採取し、これらを対象に検討した結果、培養法で陽性例は認めなかったが、PCR 法陽性が 14 例 (39%) で確認された。増幅された M 抗原遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹を作成すると、ベトナムで分離された株とタイで分離された株は異なるクレードに分類されることが明らかになった。

図 1



3) タイ王国における *Cryptococcus gattii* の生息状況調査

タイで分離されたクリプトコックス株 81 株について CGB 寒天培地による試験を行ったところ、6 株が *C. gattii* の可能性が高いと判定された。6 株のゲノム DNA を用いてリボソーム遺伝子解析を行ったところ、2 株の臨床分離株と 1 株の環境分離株が *C. gattii* であると判定された。

D. 考察

ヒストプラズマ症は、わが国では海外で感染し国内で発病する、いわゆる輸入真菌症と

されているが、東南アジア、とくにタイでは HIV 感染者を中心に比較的高い頻度で認められる真菌症である。本感染症は基本的にヒト - ヒト感染がないことや、培養陽性率が極めて低いことから診断が困難であり、ベトナムにおいては本症の疫学情報の不足が認められる。このような背景から、ベトナムにおけるヒストプラズマ症の実態や感染源と考えられる環境の検討を行った。

NIHE における解析では、ELISA による抗ヒストプラズマ抗体検出および PCR 法において陽性サンプルが複数認められていたため、培養法でのヒストプラズマ属の分離が成功するものと期待された。真菌の分離培養については、臨床検体を冷蔵にて長期間培養すると分離成功率が著しく低下するため、採取当日に検体を寒天培地に塗布してもらうように依頼した。200 検体以上試験し、そのうち PCR 陽性のサンプルも含まれていたにも関わらず、すべてのサンプルが培養陰性となった。米国におけるヒストプラズマ症では菌の培養は陽性になりやすく、アジアの株では陽性率は比較的低いという情報を得ている（私信）。我々の真菌検査においても米国人患者からはヒストプラズマの分離培養に成功している。以上の結果より、米国株とアジア株では栄養要求性や検体中での生存率などに相違があると推測される。アジアのヒストプラズマ株を分離するためには培養に用いる培地や温度などの検討を行う必要があると考えられた。

また、M 抗原遺伝子の一塩基多型解析では、タイ分離株はベトナム分離株と明確に異なるクレードに分類されることが明らかになった。

この解析を継続的に行い、データを集積することで、東南アジアしかも国ごとに生息するヒストプラズマ属の伝搬状況、感染地の推定も可能になるものと考えられる。

タイ王国においてクリプトコックス症の原因菌の血清型を調べたところ、4.3%が血清型 B すなわち *C. gattii* であったという報告がこれまでになされている。本検討でも 2 株（2.5%）の臨床分離株が *C. gattii* であった。*C. gattii* は元々熱帯・亜熱帯が生息地域であるため、タイ王国ではヒトへの感染も少なからず発生しているものと考えられる。一方、日本でも渡航歴のない *C. gattii* 感染患者が報告されているため、日本の環境中にも *C. gattii* は生息しているのかもしれないが、タイ王国よりも寒冷な日本では生息地は狭く、感染事例も少ないものと推測される。ただし、1999 年を皮切りに北米大陸西岸において特定の遺伝子型の *C. gattii* 集団感染も報告されていることから、*C. neoformans* 感染症も含めてクリプトコックス症の発生動向を注視する必要があると言える。

本研究は日本とベトナムとの真菌症に関する共同研究の先駆けであり、タイ王国との共同研究とも研究材料と実験手法を共有しながら、発展させていくことが重要と考えられる。

E. 結論

ハノイ市を中心とする北部ベトナムにおいて、急性呼吸器感染症が疑われる症例から得られた臨床検体中に、ヒストプラズマ属の遺伝子が検出された症例を経験した。また、抗ヒストプラズマ抗体保有状況の検討から、こ

の地域におけるヒストプラズマ症は決してまれな真菌症ではないことが推測された。

また、ヒストプラズマ症同様、健常者にも報告の多いクリプトコックス症の原因菌は *Cryptococcus neoformans* だけではなく、少数の *Cryptococcus gattii* が含まれていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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, Uneyama 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 ~、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.

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—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.