

厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

(総括・分担) 研究報告書

新型コロナウイルス感染症による他疾患を含めた医療・医学に与えた影響の解明に向けた研究

-今後の新興感染症発生時の対策の観点から-

(21HA2011)

基礎医学部門に関する研究

④基礎医学グループ

研究分担者	飯野 正光	一般社団法人日本医学会連合			副会長
研究 1					
研究協力者	泉川 公一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	臨床感染症学		教授
研究協力者	田代 将人	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	臨床感染症学		講師
研究 2					
研究協力者	掛屋 弘	大阪公立大学大学院	医学研究科臨床感染制御学		教授
研究 3					
研究協力者	金子 幸弘	大阪公立大学大学院	医学研究科細菌学		教授
研究 4					
研究協力者	宮崎 義継	国立感染症研究所	真菌部		部長
研究 5					
研究協力者	澁谷 和俊	東邦大学医学部	病院病理学講座		教授

研究要旨

COVID-19 に続発する深在性真菌感染が、重篤化することが知られている。しかし、我が国では、COVID-19 関連真菌症のみならず、その前提となる糸状菌症、特にムーコル症の発生動向自体も明らかではない。本研究では、ムーコル症の発生動向並びに COVID-19 関連深在性真菌症の発生動向を明確化すると同時に、政策策定に資する症例・病態解析及び新規診断法の確立を目的とした。疫学調査として①全国規模のアンケート調査及び②単独施設における分子疫学調査を行った。①では7年6ヶ月の観察期間中に確定例および臨床診断例 82 例を含むムーコル症 99 例を収集した。120 日死亡率は 54.2%、感染臓器は肺が 70.7%と最多であった。COVID-19 関連ムーコル症は2例で、いずれも死亡の転帰をとった。②は大阪公立大学医学部附属病院に入院した COVID-19 から分離されたアスペルギルス属を対象とした。解析結果より、122 名中 11 例からアスペルギルス属が検出され、いずれも遺伝子型が異なることより市中感染が示唆された。また 5 例の臨床診断例における死亡率は 80%に達した。その他の基礎研究として③リゾプス抗原に対する血清診断法に COVID-19 が影響しないこと、④動物実験により COVID-19 とアスペルギルスの重感染が肺炎の重症化に相乗的に寄与していること、並びに⑤開発した病理組織学的自動診断システムの診断補助ツールとしての有用性を明らかにした。

④基礎医学グループ

研究 1

研究協力者 泉川 公一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 臨床感染症学 教授

研究協力者 田代 将人 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 臨床感染症学 講師

④基礎医学グループ

研究 1. ムーコル症全国アンケート調査

A. 研究目的

COVID-19 パンデミックにより、COVID-19 に続発するムーコル症の報告が世界各地で相次いでいる。ムーコル症は糸状真菌であるムーコル目が原因病原体となり、全死亡率は 40% から 80% と極めて高い感染症である。ムーコル症は診断の困難さや発症頻度の低さから本邦における疫学情報や診断および治療の実態が未だに不明なため、ムーコル症の早期診断につながる正確な疫学情報や、ムーコル症の治療の成否にかかわる因子の情報が、強く求められている。

本研究では、本邦におけるムーコル症の正確な疫学情報、発生頻度の経時的変化、死亡のリスク因子、診断や治療の実態、および治療内容と予後の関係の解明を目的とした。本研究により、ムーコル症の実態や COVID-19 との関連を解明し、ムーコル症による死亡リスクが明らかとなる。さらに治療内容と予後の関係を解析することで、救命に必要な治療を明らかにできる可能性がある。

B. 研究方法

1. 研究デザイン

本調査は、日本医真菌学会が主体となり、日本血液学会および日本感染症学会の協力のもとで実施した全国規模の多施設共同レトロスペクティブ研究である。日本血液学会研修施設、日本感染症学会認定施設、および日本医真菌学会会員を対象とし、2015 年 1 月 1 日から 2022 年 6 月 30 日ま

で培養、PCR、あるいは病理検査の結果に基づいて診断された症例の情報を収集した。

2. データ収集

収集した情報は、日本国内の地域、診断年、感染部位、ムーコル目の種類、年齢、性別、診断時の基礎疾患、外科的治療状況、および抗真菌薬治療情報とした。感染部位は臓器別に情報を収集し、播種性の定義は 2 つ以上の臓器で感染巣を確認した場合とした。リスク因子として、好中球数の減少、造血器悪性腫瘍、基礎疾患に対する複数の免疫抑制剤（副腎皮質ステロイドの長期使用、T 細胞または B 細胞免疫抑制剤）を調査した。さらにムーコル症に特異的なリスク因子として、高血糖、代謝性アシドーシス、集中治療、鉄過剰症、および COVID-19 罹患の有無も調査した。

3. ムーコル症の疫学と死亡例の解析

患者は確定例、臨床診断例、および診断外症例に分類した。確定例と臨床診断例について疫学情報を記述し、診断後 120 日目における生存群と死亡群の間で各変数の差を比較した。解析項目は、患者数の年次推移、感染部位、ムーコル目の種類、発症患者の特徴、および治療内容とした。また、日本におけるムーコル症患者およびムーコル目の地理的分布も解析した。

4. 高用量アムホテリシン B リポソーム製剤の有効性の検討

標準治療薬であるアムホテリシン B リポソーム製剤 (L-AMB) の投与量がムーコル症の予後へ与える影響を明らかにするため、最大投与量 5 mg/kg の L-AMB を投与された症例と 5 mg/kg を超える投与量が使用された症例について患者背景、治療、および治療成績を比較分析した。L-AMB の治療効果を評価する十分な治療期間を確保するた

め、L-AMBの投与期間が7日に満たない症例は除外した。解析した患者背景は、感染部位、ムーコル目の種類、年齢、性別、診断時の基礎疾患および好中球数とした。治療内容は、感染病巣の切除時期、診断時に使用した抗真菌薬、治療に使用した抗真菌薬の種類、および5 mg/kg以上のL-AMBの投与開始時期を解析した。比較したアウトカムは、L-AMBの不耐性による中止、死後診断、診断後30、60、および120日目の生存確率とした。

5. 統計解析

まず適切な記述統計学を用いて、グループ別に各項目を要約した。すべてのカテゴリー変数における差の検定には、フィッシャーの正確検定または χ^2 二乗検定を用いた。次にL-AMBの投与量と予後の関連を評価するため、5 mg/kg群と>5 mg/kg群のそれぞれについてKaplan-Meier法を用いて生存確率を推定し、logrank検定を用いて差を検定した。さらにアウトカムを120日後死亡、説明変数にはL-AMBの最大用量(5 mg/kgまたは>5 mg/kg)をダミー変数としてCox比例ハザードモデルを実施した。この解析では、臨床的にムーコル症の予後への影響が明らかな交絡因子として、年齢(>65歳)、好中球減少の長期化、および感染病巣の切除を説明変数に含めた。本モデルにより、ハザード比(HR)およびその95%信頼区間(CI)を推定した。これらの統計解析は、JMP 16.0ソフトウェア(SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて行った。全ての検定は両側確率で、 $P < 0.05$ を統計的有意とみなした。

(倫理面への配慮)

患者情報は匿名化し、各施設から収集した。本研究は長崎大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得ている(承認番号22091210)。

C. 研究結果

1. データの収集結果と地域分布

全国46都道府県(青森県以外の全県)の317施設より回答を得た。ムーコル症の原因菌種には地域の偏りを認めなかった($p = 0.394$)。

2. ムーコル症の疫学的特徴

情報を収集した99症例の内、確定例および臨床診断例の82症例を対象に、疫学や治療実態を解析した。2015年以降、COVID-19パンデミック期となってもムーコル症の症例数は変化を認めなかった。感染巣は肺が70.7%と最も多く、播種性35.4%、副鼻腔19.5%、皮膚15.9%、脳11.0%、血液9.8%、腸管8.5%、および他組織17.1%であった。予後は、死後剖検診断が10.8%、30日死亡が42.2%、および120日死亡率が54.2%であった。生存群と120日死亡群で、感染臓器や菌種に差を認めなかった。

3. 死亡症例の特徴

年齢、性別、および免疫抑制状態を含む複数の患者背景は、生存群と死亡群で差を認めなかった。一方で、生存群は死亡群よりも好中球数500未満10日以上以上の症例が少数だった(13.5% vs. 42.2%、 $p = 0.007$)。COVID-19関連ムーコル症は2例で、いずれも死亡の転帰をとっていた。1名は重症COVID-19でVV-ECMOを実施した症例で、腸管出血に対して腸管の外科的切除を行い、腸ムーコル症と診断された。本症例は重症COVID-19以外にムーコル症のリスクファクターを有していなかった。もう1名はB細胞リンパ腫を基礎疾患に有し、重症COVID-19に対して集中治療中に、播種性ムーコル症を発症した。好中球減少や持続する高血糖などのムーコル症のリスクファクターを有していた。本研究の代表者(澁谷)が共同で行っているウイルス関連アスペルギルス症の病態研究(投稿準備中)では糸状菌の細胞壁成分多糖がトリガーとなり免疫攪乱を誘導することを明らかにしている。また現在、ムーコルの細胞壁成分による免疫攪乱を示唆する臨床的な知見が報告されており、この件に関する検証を本研究事業とは異なる別途の開発研究として実施している。

4. ムーコル症の治療実態

生存群が死亡群よりも多く外科的切除を受けていた (62.2% vs 21.2%, $p < 0.001$)。診断前の L-AMB 投与が生存群では死亡群よりも多く行われていた (40.5% vs 17.8%, $p = 0.028$)。抗真菌薬の種類/併用の有無、L-AMB の用量、および 5 mg/kg 以上の L-AMB の開始タイミングは生存群と死亡群で差を認めなかった。生存群の L-AMB 投与期間は中央値 34 日 (IQR 0-76) だった。

5. 5 mg/kg を超える L-AMB 投与症例の特徴

L-AMB 4mg/kg 以下の症例や L-AMB の投与期間が 7 日未満の症例を除外した 49 症例 (5 mg/kg 群 34 症例、>5 mg/kg 群 15 症例) を対象に、L-AMB の用量の違い (5 mg/kg と >5 mg/kg) が予後へ与える影響を評価した。脳以外の感染巣、菌種、年齢、性別、および背景疾患は両群で差を認めなかったが、唯一、脳ムーコル症 5 例全例の L-AMB 用量は >5 mg/kg だった ($p = 0.002$)。また、外科的切除、診断前抗真菌薬、併用療法の内容、および L-AMB 開始タイミングのいずれも両群で違いを認めなかった。

6. L-AMB 5 mg/kg と >5 mg/kg の治療効果比較

5 mg/kg 群と >5 mg/kg 群で、生存率 (30 日、60 日、120 日) のいずれも違いを認めなかった。L-AMB 不耐による治療中断や死後診断数も、両群で差を認めなかった。ムーコル症患者の予後に影響を与えうる年齢、好中球数、および外科的切除の 3 つの交絡因子を説明変数に加え、>5 mg/kg の L-AMB の予後への影響を Cox 比例ハザードモデルで検証した結果、5 mg/kg に対する >5 mg/kg のハザード比は 0.93 (95%CI 0.4-2.3) と、120 日死亡への影響を認めなかった。

D. 考察

本調査は、日本国内のムーコル症の疫学および治療実態を明らかとした初の報告である。本調査により 54.2% とムーコル症の高い死亡率が明らか

となった。さらに本邦においても COVID-19 関連ムーコル症の存在が示された。死亡症例に特異的な特徴は少なく、患者背景に関わらず発症した時点で死亡率が高いことも判明した。

ムーコル症の薬物治療として L-AMB が第一選択薬として一般的に使用されている。しかし L-AMB の用量は 5mg/kg 以上と考えられているものの、5 mg/kg を超える高用量の治療効果は不明のままであった。今回の我々の検討では、5 mg/kg を超える投与量は 5 mg/kg と予後へ与える影響に違いがない可能性が示唆された。L-AMB の高用量が予後へ与える影響を直接分析した研究は本調査が世界初であり、臨床現場におけるムーコル症の治療方針決定に有用な情報である。

E. 結論

本調査により、日本におけるムーコル症の疫学的特徴や COVID-19 関連ムーコル症が複数発生している事実が初めて明らかとなった。また死亡症例には好中球減少以外の特別な背景を認めなかった。5 mg/kg を超える用量の L-AMB は 5 mg/kg と予後へ与える影響は同等であり、5 mg/kg を超える用量を選択するメリットは明らかではなかった。未だに高い死亡率が判明したムーコル症に対し、今後も有効な治療戦略の開発が求められる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 今後、各種学会での発表および論文投稿予定

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

④基礎医学グループ

研究 2

研究協力者 掛屋 弘 大阪公立大学大学院 医学研究科臨床感染制御学 教授

④基礎医学グループ

研究 2. COVID-19 患者より分離された *Aspergillus* 属に関する微生物学的検討

A. 研究目的

侵襲性肺アスペルギルス症は COVID-19 の重要な合併症であり、COVID-19 associated pulmonary aspergillosis(CAPA)と呼ばれ、予後不良な合併症として知られている。

症例報告や疫学的な報告がある一方、分離された菌株に関するまとまった報告は少ない。そこで入院中の COVID-19 患者より分離された *Aspergillus* 属に関して、菌種や感受性、遺伝学的相同性について検討を行った。

B. 研究方法

1. 研究デザイン

2020 年 12 月から 2021 年 6 月までの期間に、COVID-19 にて大阪公立大学医学部附属病院に入院加療中の患者の呼吸器材料（気管支洗浄液、吸引痰、もしくは喀出痰）の培養検査にて分離された *Aspergillus* 属を対象とした。菌種同定・薬剤感受性試験・分離された *A. fumigatus* の分子疫学調査を実施し、さらにカルテより患者情報を収集した。

2. 菌種同定

形態学的もしくはシーケンス解析を用いて同定した。シーケンス解析には 18S rDNA と 28S rDNA の間である Internal Transcribed Spacer(ITS)領域を用い、必要に応じて 28S rDNA の部分配列である D1/D2 領域および β -tubulin を追加した。得られた塩基配列は Mycobank

(<https://www.mycobank.org/page/Home>) のデータベースと相同性検索し、菌種を決定した。

3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は CLSI M38-A2 に準拠した微量液体希釈法にて、amphotericin B(AMPH-B), itraconazole ITCZ, voriconazole(VRCZ), micafungin(MCFG), caspofungin(CPFG) の 5 薬剤を測定した。

4. *Aspergillus fumigatus* の分子疫学調査

分離された *A. fumigatus* の相同性解析は TRESPERG を用いて実施した。すなわち MP-2 antigenic galactomannan protein (MP2; Afu2g05150), a hypothetical protein with a CFEM domain (CFEM; Afu6g14090), cell surface protein A (CSP; Afu3g08990), および C-24 sterol reductase (ERG4B; Afu1g07140) の 4 領域について PCR で増幅後、シーケンスにて配列獲得し、相同性を確認した。

5. 患者背景の調査

Aspergillus 属が分離された患者情報（年齢、性別、診断名、基礎疾患、既往症、血液検査結果、画像検査結果、使用薬剤および治療歴）を電子カルテより抽出した。

(倫理面への配慮)

患者情報は匿名化した。本研究は大阪公立大学医学部附属病院臨床研究倫理委員会の承認を得ている（承認番号 2022-069）。

C. 研究結果

1. 菌種同定

対象期間中 122 名の COVID-19 患者より呼吸器培養検査の提出があり、11 名（9%）の患者から *Aspergillus* 属が検出された。最も多く検出されたのは *A. fumigatus* 8 株であり、以下 *A. aureolus*, *A.*

nidulans, *A. niger*, *A. terreus* がそれぞれ 1 株ずつ分離された。なお、11 名中 1 名からは *A. fumigatus* と *A. niger* が検出された。

2. 薬剤感受性試験

下表に示す通り概ね良好な結果であったが、*A. fumigatus* の類縁種である *A. aureolus* は VRCZ に対して MIC=4 μ g/mL と高値を示した。

	MIC (μ g/mL)			MEC (μ g/mL)	
	AMPH-B	ITCZ	VRCZ	MCFG	CPFG
<i>A. fumigatus</i> (n = 8)	0.5	0.12– 0.5	0.5–1	\leq 0.015	0.12– 0.25
<i>A. aureolus</i>	1	0.5	4	\leq 0.015	0.25
<i>A. nidulans</i>	1	0.25	0.5	\leq 0.015	0.25
<i>A. niger</i>	0.5	0.5	0.5	\leq 0.015	0.12
<i>A. terreus</i>	2	0.5	1	\leq 0.015	1

3. TRESPERG

CSP は 6 株が同一の型であり、CFEM は 3 株一致した型が 2 種類、MP2 は 2 株一致した型が 2 種類存在し、ERG4B は 5 株一致した型と 2 株一致した型があったが、4 つとも型が一致した株はなかった。

4. 患者情報

年齢中央値は 68.5 歳、男性の方が多かった (7 名、63.6%)。最も多い基礎疾患は高血圧症で 7 名、次いで糖尿病が 6 名、癌と心臓病が 4 名、高脂血症が 3 名であった。また、慢性閉塞性肺疾患は 1 名であった。11 名の患者のうち、10 名は *Aspergillus* 属が検出される前に抗菌剤とステロイドの投与を受けており、6 名は人工呼吸器を装着していた。COVID-19 の治療では、5 人が remdesivir と favipiravir、3 人が remdesivir 単剤、1 人が favipiravir 単剤、1 人が tocilizumab 単剤、1 人が remdesivir と baricitinib で治療を受けていた。抗真菌薬の投与は 6 名 (54.5%) であり、 β -D-glucan および

Aspergillus ガラクトマンナン抗原のいずれかもしくは両方が陽性であったのに対し、非投与であった 5 名は陰性もしくは未検査であった。また、ECMM/ISHAM 診断基準を適用した結果、抗真菌薬投与を受けた 6 名のうち 5 名が probable CAPA と診断され、うち 4 名が死亡した。一方、抗真菌薬が投与されなかった 5 名は possible CAPA と診断され、全員生存した。

D. 考察

COVID-19 における CAPA の発症率は 2.4～35% と報告されており、当院の *Aspergillus* 属の検出率 9.0% は決して高くない数字と考える。また 11 名中 8 名からは *A. fumigatus* が分離されており、一部病室が同一であったことから院内の環境からの獲得の可能性を考慮し、TRESPERG を用いた分子疫学解析を実施した。しかし、遺伝子タイプはすべて異なる型であったため、院内由来の特定株によるアウトブレイクは考えにくく、患者自身の持ち込みであった可能性が考えられる。CAPA は症状が非典型的であり、また画像所見からの鑑別も困難であることから、診断には微生物学検査が重要である。材料は肺生検組織もしくは気管支肺胞洗浄液が良いとされているが、COVID-19 患者においてはエアロゾル発生・暴露の危険性があるため、喀痰培養の実施が現実的である。一方で、喀痰培養より *Aspergillus* 属が検出された場合には汚染の可能性が考慮されるため、血液検査や臨床所見を合わせて総合的に判断する必要がある。また、CAPA の予後に影響を与える菌側の因子としてアゾール系薬への耐性があげられている。今回の調査ではアゾール耐性 *A. fumigatus* の検出は認めなかったが、VRCZ の MIC=4 μ g/mL と高値を示す *A. fumigatus* の類縁種である *A. aureolus* が検出された。類縁種は形態学的な鑑別が困難であるが、薬剤感受性試験結果が異なるため、正確な菌種同定が重要である。

E. 結論

CAPA は致死的で早期の治療開始が求められ、細菌検査室から臨床現場への迅速な報告が期待される。一方、喀痰より *Aspergillus* 属が検出された場合であっても定着である可能性も考慮されるため、他の検査結果を踏まえた診断が必要である。今回の結果により、*Aspergillus* 属が環境由来ではなく保菌している株により感染症が引き起こされた可能性が示唆された。COVID-19 患者の中でも、人工呼吸器の使用や高用量のステロイド使用等の CAPA を合併する可能性の高い患者においては、*Aspergillus* 属の検出を目的とした積極的な培養の実施が有用と考える。また、検出された場合には CAPA の合併に注視し、菌種同定や薬剤感受性試験結果を踏まえた早期の適切な抗真菌薬を投与することが重要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 第 33 回日本臨床微生物学会総会・学術集会
2. 第 66 回日本医真菌学会総会・学術集会
3. 第 97 回日本感染症学会総会・学術講演会
4. Characterization of *Aspergillus* spp. isolated from patients with coronavirus disease 2019 : J Infect Chemother. doi: 10.1016/j.jiac.2023.02.001.

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

④基礎医学グループ

研究 3

研究協力者 金子 幸弘 大阪公立大学大学院 医学研究科細菌学 教授

④基礎医学グループ

研究 3. ムーコル症に関する血清診断法の開発

A. 研究目的

SARS-CoV-2 の感染拡大に伴い、免疫能が低下した COVID-19 重症患者における真菌感染症の併発が深刻な問題となっている。2021 年に COVID-19 の流行第 2 波に見舞われたインドにおいては、5 月時点で約 1 万 5 千人のムーコル症患者が発生したとの報告もある (Raut et al. Lancet Respir Med. 2021)。ムーコル症は *Rhizopus oryzae* をはじめとするムーコル目に属する真菌を原因とする感染症の総称であり、真菌感染症のなかでも致死率の高い疾患の一つとして知られている。ムーコル症は有効な抗菌薬が少なく、発症すると急速に進行することから早期診断が予後の改善につながるが、本症は特徴的な臨床所見に乏しく、確定診断は困難かつ時間がかかることが治療の妨げとなっていた。本グループは、*R. oryzae* の特異分泌抗原を指標とした血清診断法の確立を目標とし、これまでに本抗原に対するモノクローマ抗体を用いたイムノクロマトキットを開発している。本研究では、COVID-19 とムーコル症を併発した患者において、イムノクロマトキットによるムーコル症の血清診断の感度に与える影響の有無について検討を行った。また、同じく SARS-CoV-2 血清診断イムノクロマトキットにおいても *Rhizopus* 特異抗原の存在が検出感度に影響を与えるか検討を行ったのであわせて報告する。

B. 研究方法

1. SARS-CoV-2 抗原がムーコル症血清診断に及ぼす影響

独自に開発した *Rhizopus* 特異抗原に対するウサギモノクローナル抗体を用いたイムノクロマトキット (株式会社ニッポン・ジーン) を用い、*Rhizopus* 特異抗原を段階希釈した検体に SARS-CoV-2 抗原を添加した際の検出感度への影響について検討を行った。まず、模擬検体として 0.1% BSA 含有 PBS (0.1%BSA/PBS) に *Rhizopus* 特異抗原を 0~20 ng/mL まで段階希釈したものを調製し、これに SARS-CoV-2 N 抗原もしくは S 抗原 (SIN Sino Biological Inc.) を 100 ng/mL 添加した。調製した検体をイムノクロマトに 100 μ L 滴下し、室温で 20~30 分静置した際の検出感度を SARS-CoV-2 抗原を含まない検体を滴下したときの結果と比較した。イムノクロマトの結果は目視による評価を行った。

2. *Rhizopus* 特異抗原が SARS-CoV-2 血清診断に及ぼす影響

SARS-CoV-2 イムノクロマトキット (SARS-CoV-2 ラピッド抗原テスト、Roche Diagnostics) を用い、SARS-CoV-2 N 抗原を段階希釈した検体に *Rhizopus* 特異抗原を添加した際の検出感度への影響について検討を行った。模擬検体として 0.1%BSA/PBS に SARS-CoV-2 N 抗原 (SIN SINO) を 0~20 ng/mL まで段階希釈したものを調製し、これに *Rhizopus* 特異抗原を 100 ng/mL 添加した。調製した検体をイムノクロマトに 50 μ L 滴下し、室温で 15 分静置した際の検出感度を *Rhizopus* 特異抗原を含まない検体を滴下したときの結果と比較した。イムノクロマトの結果は目視による評価を行った。

(倫理面への配慮)

該当せず。

C. 研究結果

1. SARS-CoV-2 抗原がムーコル症血清診断に及ぼす影響

SARS-CoV-2 抗原を含まない検体を用いた際のイムノクロマトの結果は、サンプル滴下 20 分後 *Rhizopus* 特異抗原 5 ng/mL のものに薄い反応が見られ、反応 30 分で明瞭なバンドが確認された。同様に、検体に SARS-CoV-2 N 抗原もしくは S 抗原を添加した場合でも、*Rhizopus* 特異抗原 5 ng/mL を含む検体で 30 分後明瞭なバンドが確認された。

2. *Rhizopus* 特異抗原が SARS-CoV-2 血清診断に及ぼす影響

Rhizopus 特異抗原を含まない検体を用いた際のイムノクロマトの結果は、サンプル滴下 15 分後に SARS-CoV-2 N 抗原 5 ng/mL のものに明瞭なバンドが確認され、1 ng/mL でも目視可能なバンドが認められた。同様に、*Rhizopus* 特異抗原を添加した場合でも、バンドは 1 ng/mL まで目視可能であった。

D. 考察

ムーコル症と同様に、COVID-19 パンデミック下で急増した真菌症として肺アスペルギルス症が知られているが、この 2 つの感染症は鑑別が困難である一方で、ムーコル症はアスペルギルス症よ

り抗真菌薬への反応性が不良であることや、治療には化学療法と同時に感染病巣の外科的除去が必要なことから、COVID-19 と併発した場合には迅速かつ正確な診断が必須であると考えられる。今回の結果では、SARS-CoV-2 感染による本グループ開発のムーコル症イムノクロマトキットの診断結果への影響は認められないと推察された。今後も新たな感染症の出現に伴い、真菌症の増加は避けられないものと考えられることから、より精度の高い迅速診断法のさらなる開発が望まれる。

E. 結論

本グループ開発の *Rhizopus* 特異抗原に対する血清診断法は COVID-19 との併発時でも感度に影響がないことが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

④基礎医学グループ

研究 4

研究協力者 宮崎 義継 国立感染症研究所 真菌部

部長

④基礎医学グループ

研究 4. 病態解明に関する動物モデルを用いた基礎的研究

A. 研究目的

近年、COVID-19の流行と共にアスペルギルス
の重感染による重篤な肺アスペルギルス症が問題
視されている。しかしこのようなウイルス感染に
続発する肺アスペルギルス症は重症化メカニズム
も解明されておらず投薬による治療方針につい
ても臨床研究の場で議論されている。そのためマ
ウス等の動物モデルを用いた宿主応答の解析が急務
であり、マウス順化した SARS-CoV-2 株を用いた
Aspergillus fumigatus の重感染モデルを確立し
たい。

B. 研究方法

国立感染症研究所で樹立したマウス順化
SARS-CoV-2 株(QHmusX 株)を用いて、QHmusX
株と *Aspergillus fumigatus* の感染系を検討し、
COVID-19 続発性肺アスペルギルス症のマウスモ
デルを構築した。

(倫理面への配慮)

該当せず

C. 研究結果

事前の条件検討の結果、QHmusX 株の感染はウ
イルス量が多くウイルスによる肺炎を重症化させ
るほど、その後の *Aspergillus fumigatus* の感染
による症状が重篤化した。感染させるウイルス量

を増やす程、体重が明確に減少し、致死的になる
マウスの割合も増加した。

D. 考察

インフルエンザ続発性肺アスペルギルス症のマ
ウスモデルと比較して体重減少を指標とした評価
では多少緩やかな減少率を示した。これは実際の
臨床研究から得られている知見と一致するが、イ
ンフルエンザと SARS-CoV-2 はウイルスの特性も
異なるため実際には同じ指標で比較するのは難し
い。今後は重症化に関わる宿主側および菌側の因
子を探索していく必要がある。

E. 結論

QHmusX 株を事前に感染させておくことによ
り、その後の *Aspergillus fumigatus* の感染によ
る肺炎症状が重篤化した。QHmusX 株や
Aspergillus fumigatus の単独感染では急激な体
重減少や致死的な表現系を認めなかったため、
Aspergillus fumigatus の重感染が肺炎の重症化
に相乗的に寄与していることが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

④基礎医学グループ

研究 5

研究分担者 澁谷 和俊 東邦大学医学部 病院病理学講座

教授

④基礎医学グループ

研究 5. ヒト深在性糸状菌症病変の組織学的画像解析による病態解析と自動診断システムの構築

A. 研究目的

従前、気管支洗浄液等の臨床検体からの真菌の検出率は、一般病原微生物と比して低いことが知られており、実臨床では、臨床検体の直接鏡検や病理組織検査による診断が求められる場合が多い。しかし、純粋な形態診断、特に糸状菌の診断には熟練を要するため、診断精度の均霑化強く求められている。本研究では、SARS-CoV-2 との共感染することで重症化が指摘されているムーコルとアスペルギルスについて、病理組織学的に鑑別を補助するための人工知能を基盤とする自動診断システムの開発を目的とした。

B. 研究方法

ホルマリン固定パラフィン包埋組織から増幅した遺伝子により菌種が確定されている試料を教師データとして使用した。これらの組織から切片を作成し、真菌検出・診断を目的とした標準的染色であるグロコット染色を施し、デジタル画像を取得し、画像中の菌糸の概説矩形を自動認識するプログラムを作成した。この概説矩形をデータベース化し、先行研究でムーコルとアスペルギルス組織学的な鑑別に関する有用性が確認されている指標である菌糸相互の交点角と個々の菌糸の褶曲度を抽出・数値化し、2次元プロットを作成して両者の鑑別精度について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、後方視的観察研究、課題名：「糸状菌感染症における菌糸相互の交点角検討」として東

邦大学医学部倫理委員会により承認され、実施した（承認番号 A20040_A17123）。

C. 研究結果

1つの画像から100個以上の菌糸に対して概説矩形を認識可能なものでは極めて高精度の鑑別が可能となる（図1）。更に130個以上の概説矩形が認識可能な試料では、すべてのアスペルギルスとムーコルが識別可能な識別曲線を作成することが可能であった（図2）。

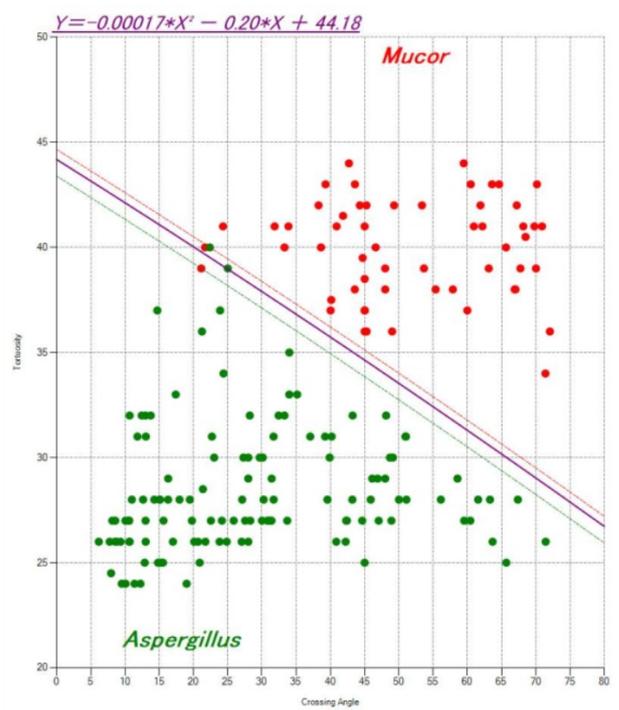


図 1

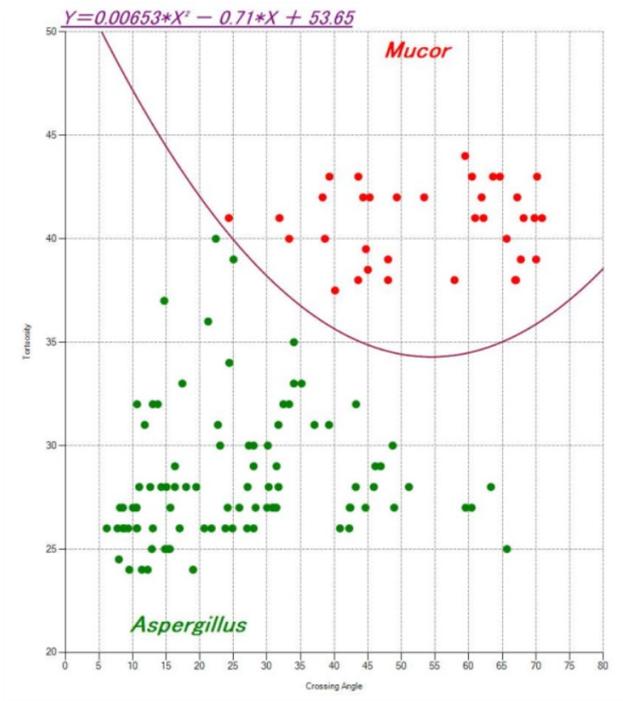


図 2

D. 考察

前述のごとく、深在性真菌症の診断は、病理組織学的な形態診断に依存せざるを得ない場合が多い一方、診断に精通した病理医は希少であり、迅速で精度の高い補助診断法が求められている。本研究では、真菌症の診断に精通していない病理医でも、糸状菌を検出した場合に簡便かつ正確な補助診断法としての有用性が証明された。今後、更に多数の教師データを入力することで深層学習を促進したい。

E. 結論

本研究により病理医の診断適切に補助することが可能な自動診断システムの開発を行った

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. Artificial Intelligence in the Diagnosis of Invasive Mold Infection: Development of an Automated Histologic Identification System to Distinguish Between Aspergillus and Mucorales. Med Mycol J. 2022;63(4):91-97. doi: 10.3314/mmj.22-00013. PMID:36450568.

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし