

地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野・「感染症開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域)

AIDS 患者及びその他の免疫不全患者における新規診断法による

真菌症対策

(ブラジル連邦共和国)

平成22年度実施報告書

代表者： 亀井克彦

千葉大学真菌医学研究センター・教授

<平成21年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

真菌症は、HIV 感染や種々の疾患などにより免疫力の低下した人々にとって、生命を奪い、生活の質(QOL)を低下させる脅威である。ブラジルにおいては、高度病原性真菌に起因する風土病も加わり、これら免疫不全患者のおかれた状況がさらに悪化している。本研究では、ブラジル国カンピーナス大学病院や周辺医療機関を治療目的で訪れる HIV 感染者を始めとするさまざまな免疫不全患者に発症する真菌症の疫学調査を実施し、千葉大学真菌医学研究センターで開発した菌種同定用の DNA チップ、特殊な真菌の菌種同定用に開発した新しい LAMP 法や Real time PCR 法を利用した迅速簡便な診断・同定法を共同で開発する。さらに、それらを用いて原因となる真菌を正確・迅速かつ鋭敏に特定するとともに、より *in vivo* に近い状態で薬剤感受性を測定し、これらの結果に基づくより理論的な治療法を用いることにより、同地域はもとより同国がエイズ対策を進めるアフリカ・ポルトガル言語圏や中南米各国、日本における HIV 感染者など免疫不全患者の真菌症の克服、QOL の改善に役立てることを目的としている。

2. 研究グループ別の実施内容

① 研究のねらい

真菌症、とくに深部臓器に感染する深在性真菌症は、生活の質(QOL)の低下のみならず、しばしば致命的な結果をもたらす。HIV 感染や種々の疾患などにより免疫力の低下した人々は特に感染しやすく、世界各国において大きな問題であるが、ブラジルにおいては一般的な真菌症に加えて高度病原真菌に起因する風土病性の真菌症も存在することから、これらの免疫能の低下した人々にとって真菌症はより深刻な問題となっている。本研究では、ブラジル国カンピーナス大学病院や周辺医療機関を治療目的で訪れる HIV 感染者を始めとしたさまざまな免疫不全患者について、真菌症の疫学調査を実施し、千葉大学真菌医学研究センターで開発した菌種同定用の DNA チップ、さらに新たに開発作製した Real time PCR や LAMP 法に基づく特殊な真菌の同定システムを総合的に用い、迅速簡便な診断・同定法を共同で開発し、同地域はもとより同国がエイズ対策を進めるアフリカ・ポルトガル言語圏や中南米各国、日本における HIV 感染者など免疫不全患者の真菌症の克服、QOL の改善に役立てることを目的としている。

② 研究実施方法

ブラジル全体では、年間約1万人の新規のエイズ感染登録者があり、年間10万人以上が、治療を受けている。大部分は、サンパウロ、リオ・デ・ジャネイロ等の大都市に集中しているが、サンパウロ州の中心的な公的な医療機関であるカンピーナス大学病院にも常時約5,000人以上のエイズ患者が登録され治療を受けている。これらを始めとする免疫不全状態の患者の真菌感染症について、研究期間中に新規に登録される年間約30から50人程度の患者を目処として研究を行ない、3年間に延べ100人の患者データを採取することを目標とする。

これらの患者から採取した菌は、ブラジル側担当者と契約を交わし、原則的に日本に持ち帰って千葉大学真菌学研究センターで管理・保管し、必要データを追加して公表する。

DNA チップ法による菌の同定に関しては、高価なスキャナーなどを必要としない簡便で安価な方法である点が特徴である。DNA チップについては、その実用化を目的に、現在31種の病原真菌が検出できることが明らかになっているが、今年度は、実際に現地の患者から分離された病原真菌を選択して解析を行い、その有効性と正確性を確認するための実験を進めている。また、LAMP 法を応用した菌の同定法に

については、今年度は病原真菌の中でも治療が困難な感染症の原因となる *Aspergillus fumigatus* を含む 4 菌種の *Aspergillus* と、近年その感染例が多く、多くの薬剤に耐性である *Fusarium* 菌について、特異的に検出できるプライマーを設計するための実験を行う。Real time PCR 法による菌種の同定に関しては、ブラジル側からの要望でもある *Fusarium* 菌、特に *Fusarium solani* について特異的なプライマーを作製するための実験を行う。DNA チップ、Real time PCR 及び LAMP 法については、今年度中にブラジル側へ技術の移転を進める。これらの技術は、エイズ患者などにおける日和見真菌による感染症とは別に、ブラジルを始めとする南米地域で発生している高度病原性真菌による感染症（パラコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症など）の診断や治療にも直接応用することができ、同地域の感染症治療の進展に役立つことが期待できることから、これらの菌種への応用も進める。本研究期間中にブラジルで得られた疫学や診断技術開発に関する結果は、本研究センターとカンピーナス大学医学部の研究者によって解析し、インターネットや学術雑誌を通じて世界にその情報を発信する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

千葉大学は、相手国の研究機関であるカンピーナス大学とは、2001 年 9 月 3 日に大学間交流協定を締結しており、2006 年に 5 年間の協定の延長を行っている。

この交流協定のブラジル側の担当者は、今回のブラジルの対応機関であるカンピーナス大学医学部の感染症科の Maria Luiza Morretti 教授であることから、本プロジェクトの R&D の締結のために 2009 年に派遣された JICA の調査団がカンピーナス大学を訪問した時から、同大学病院の感染症科の医師である Plinio Trabasso 准教授や検査室の主任者である Angelica Zaninelli Schreiber 准教授を中心に、多くの真菌株を真菌症の患者から分離・保存してきており、これらを用いて新しい同定法を検討するための準備が始まっている。

i) 真菌医学研究センターで開発した DNA チップによる病原真菌の同定及びこれによる真菌症の診断
DNA チップに関しては、ブラジル側への供与機器の設置が遅れているが、この間、DNA チップの有効性の確認を日本で進めており、機器の設置後に速やかに技術移転が行えるように準備をしている。また、現在、2 名のブラジルからの研修生については、他の機器や技術研修以外に DNA チップに関する研究も行われている。

ii) β —グルカンによる真菌症の診断

同様に機材の供与と設置が遅れていたが、ブラジル側の C/P の中に、他の施設である程度まで機器を使用した経験者がいたことから、他施設の機器を借りて、ブラジル関係者への技術講習を行った。同時に、購入予定会社での機器の説明や講習会も開始されるなど、 β —グルカン診断による真菌症の診断が開始できる体制が整いつつある。

iii) Real time PCR 及び LAMP 法による真菌症の診断・原因菌の同定

これらの機器も調達が遅れていたが、間もなく供与・設置されることになった。Real time PCR については、すでにブラジル側との打ち合わせで、免疫不全患者の間で問題となっているフザリウム症の原因菌である *Fusarium* 菌、特に *Fusarium solani* に関する強い希望があったことから、これらの菌種を中心とする検出のための有効なプライマーの作成を進めており、その基本技術の移転が研修生を中心に進んでいる。また、これらの *Fusarium* 菌種の原因菌について、検出できるプライマーの特異性の検討を進めている。

LAMP 法については、最初の実験での検出対象真菌を *Aspergillus* 属菌と *Fusarium* 属菌にすること

をブラジル側との相談で決定しており、*Aspergillus fumigatus* を含む 4 菌種を、また *Fusarium solani* と *Fusarium oxysporum* を検出できるプライマーを作成するとともに、それらの有効性を研修生とともに検討する段階に至っている。

これらの Real time PCR や LAMP 法とは別に、患者由来の *Fusarium spp.* や *Candida* 株などについては、その正確な菌種の同定に関する遺伝子解析技術についての講習会が、千葉大から派遣された専門家により、ブラジルの大学院生や技術員を対象に進められた。これらの移転された技術では、rRNA 遺伝子の解析、特に ITS と D1/D2 領域の遺伝子の解析が中心で、すでに多くの菌種の確定が進んでいる。

特殊な真菌株について、遺伝子がブラジル側から真菌医学研究センターに分与され、その詳細な遺伝子解析に基づく同定が真菌医学研究センターで進められている。

iv) 薬剤最適投与法の検討

薬剤最適投与法については、はじめに MIC 値測定を行うことになっている。特に *Fusarium* の菌種については、本菌が植物病原菌であることから、我が国内外への移動には制限がある。しかし、すでに基準株を得るための手続きを開始した一方、日本から MIC 測定用のプレートの供与が行われて予備実験を開始するなど、本実験への準備が進んでいる。なお、MIC 値測定機器の供与と設置が遅れていたが、供与の手続きが開始されており、まもなく機器による測定も可能となる予定である。

v) 実験法や機器の測定法に関するマニュアルの作成

Real time PCR、DNA チップ、LAMP 法に関するポルトガル語テキストの作成のための日本語の原案の編集が進んだ。さらに β -グルカンや MIC 測定についてのテキストの作成を進めている。

④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側及び相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

DNA チップについては、日本からの作製機材の調達が生産上の理由により遅れているため技術移転は平成 23 年以降にスタートすることになるが、チップの作製法や、チップを利用した真菌種同定法等に関する情報提供についてはすでに着手している。

Real time PCR や LAMP 法を用いた解析技術に関しては、DNA チップと同様にブラジル側への機器の搬入が遅れていることにもない技術移転の遅延も余儀なくされている。

いずれの機材も、平成 23 年度の最初には、供与手続きが完了することが確認されており、今後、技術移転が大きく前進することが期待されている。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

3 月に発生した東日本大震災により、研究用試薬の入手が一時困難となり、研究の推進に支障を来した。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 4 件、国際 8 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 4 件、海外 8 件)

③ 論文詳細情報

- (1) Zhu J, Kang Y, Uno J, Taguchi H, Liu Y, Ohata M, Tanaka R, Moretti ML, Mikami Y. Comparison of genotypes between environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* based on microsatellite patterns. *Mycopathologia*; 169(1), 47-55. 2010 Jan.
- (2) Girish Kumar CP, Prabu D, Mitani H, Mikami Y, Menon T. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. *Mycoses*; 53(3), 262-4. 2010 May.
- (3) Ohji G, Kikuchi K, Inoue K, Imoto K, Yamamoto S, Hosokawa N, Kamei K, Iwata K. Progressive disseminated *histoplasmosis* in an immunocompetent patient as an underrecognized imported mycosis in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*; 16 (6), 443-445, 2010.
- (4) Watanabe A, Matsumoto K, Igari H, Uesato M, Yoshida S, Nakamura Y, Morita K, Shibuya K, Matsubara H, Yoshino I, Kamei K. Comparison between concentrations of amphotericin B in infected lung lesion and in uninfected lung tissue in a patient treated with liposomal amphotericin B (AmBisome). *International Journal of Infectious Diseases*; 14 (SUPPL. 3), e220-e223. 2010.
- (5) Oarada M, Igarashi M, Tsuzuki T, Kamei K, Hirasaka K, Nikawa T, Miyazawa T, Nakagawa K, Gono T. Effects of a high-protein diet on host resistance to *paracoccidioides brasiliensis* in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*; 74 (3), 620-626. 2010.
- (6) Yarita K, Sano A, Samerpitak K, Kamei K, de Hoog G S, Nishimura K. *Ochroconis calidifluminalis*, a sibling of the neurotropic pathogen *O. gallopava*, isolated from hot spring. *Mycopathologia*; 170 (1), 21-30. 2010.
- (7) Shimizu K, Li H-M, Virtudazo EV, Watanabe A, Kamei K, Yamaguchi M, Kawamoto S. Deletion of *CnLIG4* DNA ligase gene in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* elevates homologous recombination efficiency. *Mycoscience*; 51 (1), 28-33. Cited 1 time. 2010.
- (8) Takayama A, Itano E N, Sano A, Ono M A, Kamei K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. *Medical Mycology*; 48 (1), 64-72. Cited 1 time. 2010.
- (9) Virutudazo EV, Kawamoto S, Ohkusu M, Aoki S, Sipiczki M, Takeo K. The single Cdk1-G1 cyclin of *Cryptococcus neoformans* is not essential for cell cycle progression but has important roles in the proper commitment to DNA synthesis and bud emergence in this yeast. *FEMS Yeast Research*; 10 (5), 605-618. 2010.
- (10) Yamaguchi M, Ikeda R, Nishimura M, Kawamoto S. Localization by scanning immunoelectron microscopy of triosephosphate isomerase, the molecules responsible for contact – mediated killing of *Cryptococcus*, on the surface of *Staphylococcus*. *Microbiol Immunol*; 54, 368-370. 2010.
- (11) Li H-M, Virtudazo EV, Toh-e A, Yamaguchi M, Kawamoto S, Shimizu K. Non-homologous end joining pathway of the human pathogen *Cryptococcus neoformans* influences homologous

efficiency but not virulence. Mycoscience; 51, 272-280. 2010.

- (12) Abe F, Ohkusu M, Kubo T, Kawamoto S, Sone K, Hata K. Isolation of yeasts from palm tissues damaged by the red palm weevil and their possible effect on the weevil over wintering. Mycoscience; 51, 215-223. 2010.

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0 件、海外 0 件、特許出願した発明数 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 0 件)

4. プロジェクト実施体制

- (1) 「千葉大学グループ」グループ(AIDS 患者及びその他の免疫不全患者における新規診断による真菌症対策)

① 研究者グループリーダー名: 亀井克彦 (千葉大学・教授)

② 研究項目

- i) 真菌医学研究センターで開発した DNA チップによる病原真菌の同定およびこれによる真菌症の診断
- ii) β -グルカンによる真菌症の診断
- iii) Real time PCR 及び LAMP 法による真菌症の診断・原因菌の同定
- iv) 薬剤最適投与方法の検討

以上