

地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「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)

平成 23 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、Quality of Life) を低下させる脅威であり、ブラジル(以下「ブ」国と略す)においては、免疫不全患者のおかれた状況は深刻である。本プロジェクトでは、「ブ」国におけ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(以下「千葉大真菌セ」と略す)で開発した菌種同定の DNA チップ及び新しい LAMP 法やリアルタイム PCR 法を利用した迅速簡便な診断・同定法、更に真菌症のより優れた治療法を共同で開発することを第一の目的にしている。これらの成果に基づいて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も目的とする。

プロジェクト開始後 2 年になる現在、「ブ」国においては共同研究に必要な主な供与機材が納入され、それらの供与機材を用いて患者から分離した病原真菌の菌種同定が現地の研究者により迅速かつ詳細に進むようになった。その結果、「ブ」国において、分離された病原真菌数はすでに 300 株に達している。とりわけ患者数の多いフザリウム症の原因菌の菌種の正確な同定法の開発が求められていたが、この 1 年間で DNA チップにおいては「ブ」国の希望に基づいて新しい *Fusarium* 菌の菌種が新たに DNA チップに加えられるなど改良された。さらに新しい特異性の高いリアルタイム PCR や LAMP 法のためのプライマーも作製されて、原因菌の同定が迅速に進むことができるようになった。

効果的な国際共同研究を展開するためのみならず、高度研究能力の持続可能性を確保するうえでも必要不可欠となる「ブ」国側の「研究基盤」の強化については、日本側からの粘り強い働きかけにより、人員(常勤検査技師 1 名増員)や研究室改築資金が新たに獲得され、より効率的な研究実施体制の整備に繋がった。

「千葉大真菌セ」の真菌感染症にかかる総合的な識見、ノウハウの技術移転がこの一年間で急速に進み、平成 24 年度の協力期間内に期待される研究・事業成果ともに導ける見通しが現在つきつつある現在、「ブ」国における患者の QOL の改善が着実に進展することが期待できる状態となっている。

2. 研究グループ別の実施内容

千葉大学と「ブ」国の共同研究(研究グループ)/研究題目「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」

① 研究のねらい

本研究では、「ブ」国カンピーナス大学付属病院を中心施設として、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、「千葉大真菌セ」で開発した菌種同定の DNA チップ、さらに新たに開発作製したリアルタイム PCR や LAMP 法に基づく病原真菌の迅速簡便な診断・同定法を共同で開発し、「ブ」国を中心とした 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する。

② 研究実施方法

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。

DNA チップ法による菌の同定に関しては、その有効性と正確性を確認すると同時に、必要な場合は新たな菌種検出プライマーの追加のための実験を進める。LAMP 法を応用した菌の同定法については、*Aspergillus* を中心に、またリアルタイム PCR 法に関しては、特に *Fusarium solani* 菌種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、リアルタイム PCR 及び LAMP 法については、「ブ」国側へ改良した点も含めた技術の移転を進める。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

研究項目毎の実験計画の進捗状況は以下の通りである。

1. より良い抗真菌治療や真菌感染症研究に役立つための免疫不全患者におけるブラジルの真菌感染症の研究

1-1. エイズ及び免疫不全患者から採取した新鮮分離株の保存

MTA 締結後千葉大学に提供された菌株については凍結・L 乾燥法で保存し、正確な臨床情報を付け加えて、関連する研究者に広く利用されるために Web で公開する準備を進めている。

1-2. 患者分離株の形態的、生理生化学的、遺伝学的な手法による同定

平成 22 年の 11 月～12 月に滞在した短期在外研究員によって、病原真菌から簡易な処理で遺伝子を増幅する方法を用いた遺伝子解析技術が「ブ」国に導入され、特に眼科領域より分離の 43 株の *Fusarium* 属の真菌については、遺伝的な手法での同定結果と「ブ」国の検査室で行われた形態学的な観察結果を併せてデータベース化されて保存されている。

1-3. 同定された真菌分離株の遺伝子型解析

Cryptococcus neoformans 及び *Cryptococcus gattii* 株については、30 株以上について、更に *Candida parapsilosis* 株についても 30 株について ITS 領域の塩基配列による遺伝子型解析が進行した。特に、23 株の *C. neoformans* var. *grubii* 属菌については、マクロサテライト遺伝子を用いた遺伝子型解析が完了した。

1-4. 薬剤最適投与法の検討

MIC 値の測定結果に基づいて、さらにバイオセルトレーサー (BCT) や薬剤の併用実験を進めて、薬剤最適投与法の検討を開始した。この結果の一部は 2012 年の 6 月にドイツで開催される第 18 回国際医真菌学会 (ISHAM) で発表されることになっている。

1-5. 真菌種と感染源、病巣部位、検査データ及び免疫抑制状態などの患者データとの関連性

感染源、病巣部位、検査データなどや患者の免疫状態を含めた詳細なデータ解析が進んだ。

(1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 については Master Plan や PDM に沿って順調に研究が進行している)

2. 真菌感染症の迅速診断法及び病原真菌株の同定法のブラジルでの実用性の確認

2-1. 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

2011 年 7 月及び 2012 年の 1 月及び 2 月には短期在外研究員により「ブ」国研究員に対する DNA チップ作製から同定利用に関する研修を繰り返して行った。DNA チップでは新たに *Fusarium* 菌種の同定用チップの追加により改良された。現在、「ブ」国で分離された 173 株の *Candida* 株について種のチップによる同定が進んでいる。DNA チップの目視のための発色試薬について、全ての反応系で現地で利用可能な試薬に置き換えが可能となり、菌種同定が安価となり実用性の高い方法となった。

2-2. β グルカン測定キットによる真菌感染症の迅速診断

測定機器の機材供与により、カンピーナス大学付属病院集中治療室の真菌症患者の血清を用いて市販の β グルカン測定キット (Fungitell と Fungitec の 2 種) の性能比較分析が日本と「ブ」国で分担して進んでいる。また、カンジダ血症が疑われる患者については β グルカン値などを含むバイオマーカーの解析が新たに追加された。

2-3. リアルタイム PCR 及び LAMP 法による真菌症の診断・原因菌の同定

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* 属菌、特に *Fusarium*

solani 株を中心とする菌種の詳細で簡易な同定を行うための有効なプライマーが作製され、その技術移転が完了して現在「ブ」国で有効利用されている。

LAMP法については、当初の目標であった *Aspergillus fumigatus* を含む4菌種から、主要な *Aspergillus* 属菌を5菌種に菌数を増加するための有効なプライマーが作製できた。

Fusarium 属菌等については、患者分離株の遺伝子が「ブ」側から「千葉大真菌セ」に分与され、その詳細な遺伝子解析に基づく同定が同センターで引き続いて進められている。

2-4. 真菌感染症診断のための病原性真菌同定法の普及

リアルタイム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作成が日本側で進められ、DNAチップとリアルタイムPCRについてはポルトガル語への翻訳が開始された。さらにβグルカンやMIC測定についてのテキストの作成が進んでいる。

(2-1, 2-3, 2-4については、Master Plan や PDM に沿って進み、2-3については、実際の菌株での解析が進み新しい展開となった)

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、リアルタイムPCRやLAMP法の機器の納入がMaster Plan や PDM の予定通りには進まなかったが、関係者の努力で2011年の3月までには、機器の納入が完了した。それらの機器を用いての実験環境作りや一部では技術改良進み新しい技術として移転が完了した。

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)

⑤-1 供与機材調達の遅れ

供与機材(βグルカン測定器、MIC測定器、DNAチップ作製装置、リアルタイムPCR)が予定通り供与されていなかったが、その後、JSTやJICA関係者の積極的な対応により、2011年3月末までに、予定の機材についてはすべてが納入された。

⑤-2 東日本大震災の影響

2011年3月11日に発生した東日本大震災は本プロジェクトの活動においては幸いにして「千葉大真菌セ」に大きな物損被害はなかった。原発事故を受けて「ブ」国政府が自国民に対して日本への渡航延期または自粛勧告を当初発出したこともあり、予定されていた招へい外国人研究者受入事業においても計画変更があったが、予定の招へい研究者の派遣はすべて行うことができている。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

① 本年度発表総数(国内 5件、国際 10件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 1件、海外 2件)

- (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.
- (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.
- (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 under-recognized imported mycosis in

- Japan. Journal of Infection and Chemotherapy; 16 (6), 443–445, 2010.
- (4) Kamei K. *Coccidioidomycosis* and *paracoccidioidomycosis*. Nippon Rinsho. Japanese journal of clinical medicine; 68 Suppl 6, 267–270. 2010.
 - (5) Oarada M, Igarashi M, Tsuzuki T, Kamei K, Hirasaka K, Nikawa T, Miyazawa T, Nakagawa K, Gonoi 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) 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.
 - (7) 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.
 - (8) Virtudazo 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.
 - (9) 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.
 - (10) 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.
 - (11) 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.
 - (12) E.V. Virtudazo, A. Suganami, Y. Tamura, S. Kawamoto. Towards understanding cell cycle control in *Cryptococcus neoformans*: Structure-function relationship of G1 and G1/S cyclins homologue CnCln1. Biochem Biophys Res Commu 416(1-2). 217–221. 2011.
 - (13) Y. Matsumoto, S. Miyazaki, D-H. Fukunaga, K. Shimizu, S. Kawamoto, K. Sekimizu. Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*. J Appl Microbiol. 112(1). 138–146. 2011.
- 【In Press】
- (14) Fernanda Simas Corrêa Biancalana, Luzia Lyra, Maria Luiza Moretti, Katsuhi Kamei, Angélica Zaninelli Schreiber. Standardization of hyphal growth inhibition rate as a means of evaluating *Microsporum* spp. In vitro susceptibility to terbinafine, griseofulvin, and ciclopiroxolamine. Mycopathologia; DOI 10.1007/s11046-011-9433-7. 2011 May.
 - (15) Fernanda Simas Corrêa Biancalana, Luzia Lyra, Maria Luiza Moretti, Angélica Zaninelli Schreiber. Susceptibility testing of terbinafine alone and in combination with amphotericin B, itraconazole, or voriconazole against conidia and hyphae of dematiaceous molds. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 2011.

(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) 薬剤最適投与法の検討

以上