

総 説

真菌症に挑む・内科領域の深在性真菌症

泉 川 公 一 河 野 茂

長崎大学医学部・歯学部附属病院第二内科

要 旨

内科領域の深在性真菌症は医療技術、機器の発達に伴い、免疫能の低下した状態でも生存可能な患者が増えたため確実に増加傾向にある。主要な原因真菌は、アスペルギルス属、カンジダ属、クリプトコックス・ネオフォルマンズであるが、中でもアスペルギルス症は顕著に増加している。また、交通手段の発達に伴い、輸入真菌症も少なからず散見され、内科領域では特に見逃さない注意が必要である。多様化している深在性真菌症は、一般に、他の病原微生物による感染症と比較して確定診断率や治療奏率が低く、概して予後が悪い。臨床現場の主要な問題点として、アスペルギルス症の低診断率、慢性アスペルギルス症の治療エビデンスが少ないこと、特にHIV/AIDS患者におけるクリプトコックス脳髄膜炎の予後が悪いこと、アゾール低感受性カンジダ症が増加していることなどが重要である。我々は、アスペルギルス症の新規診断法の開発、慢性肺アスペルギルス症の治療エビデンス創成のための臨床試験、クリプトコックスの病原因子検索の基礎実験、アゾール低感受性カンジダ症の抗真菌薬に代わる代替療法などについて検討を行っている。いずれの研究も中途段階ではあるが、深在性真菌症診療に対し将来的に有用であると思われる。

Key words : アスペルギルス症 (aspergillosis), カンジダ症 (candidiasis), クリプトコックス症 (cryptococcosis)

はじめに

日進月歩の医療現場において、化学療法や移植技術などの進歩はめざましい。治療効果の向上が目指される一方、宿主が容易に免疫不全に陥り、日和見感染症、特に深在性真菌症などを来しやすい状況にある。内科領域の深在性真菌症の主要な原因真菌は、アスペルギルス属、カンジダ属、クリプトコックス・ネオフォルマンズであるが、久米らの報告から、近年はアスペルギルス感染症の増加は顕著であると思われる¹⁾。

内科領域の深在性真菌症については、他の病原微生物による感染症と比較して、① 診断率が低い、② 使用できる抗真菌薬が少ない上に副作用も多く、治療奏率が低い、③ 治療薬選択におけるエビデンスに乏しいなどの様々な問題がある。2006年に改訂された「深在性真菌症の診断・治療ガイドライン2007」²⁾では、診断から治療にいたる深在性真菌症に対する基本方針がまとめられているが、同時に、治療根拠となるエビデンスレベルの記載、様々な補助診断法の欠点や利点にも触れられており、本ガイドラインの解説を詳細に読み込むことで、内科領域の深在性真菌症診療における問題点も浮き彫りになってくる。

深在性真菌症を専門とする我々にとって、これらの問

題に立ち向かい、深在性真菌症における予後の改善に挑んでいく必要があるが、臨床現場における問題点をベースにした基礎的検討はきわめて重要であり、内科領域の深在性真菌症の主な臨床的問題点とそれに対する我々の教室における試みについて紹介する。

内科領域における深在性真菌症の問題点

アスペルギルス症、クリプトコックス症、カンジダ症のそれぞれの問題点について、順次、概説する。

1) 侵襲性肺アスペルギルス症

① 侵襲性肺アスペルギルス症の問題点 (低診断率)

特に血液悪性腫瘍を基礎疾患にもち、高度な免疫不全を背景に発症する侵襲性肺アスペルギルス症 (IPA: invasive pulmonary aspergillosis) は、きわめて予後不良である³⁾。IPAの予後を改善するためには、早期診断がきわめて重要であることに異論はない。IPAの確実な確定診断法は、病理学的検査と培養による真菌学的検査によるが、宿主の全身状態が不良なために侵襲的な組織採取が困難なことが多いことや、環境からの汚染による培養陽性例も多いこともあって、必然的に血清診断や画像診断などの補助診断法の重要性が増してくる。ELISA法によるアスペルギルスガラクトマンナン抗原

検出法は、臨床的に汎用されている方法であるが、cut off値が従来の1.5から0.5になり感度は高くなったものの、特異度は低下し、また偽陽性因子も問題となる。別の血清学的診断法である β -D-グルカン検出検査においても、様々な偽陽性因子があり、やはり補助診断法の域をでない。臨床的には、非侵襲的で、既存のガラクトマンナン抗原検査より感度、特異度に優れた、迅速性のある診断法が求められる。

② 臨床プロテオミクスを用いた肺アスペルギルス症の迅速診断法の開発

プロテインチップシステム・プロテオミクスを用い、肺アスペルギルス症について、早期に原因菌由来の特異タンパク質を検出・同定し、臨床に応用できる診断系の開発を目指している。プロテインチップシステムは、タンパク質の発現、相互作用、翻訳後修飾などの機能解析や、目的タンパク質の精製・同定などを効率的に行うことを目的として開発されたシステムである。タンパク質解析に適した様々な化学的性質を表面に持たせたチップを用いることにより、少量のサンプル（血清や尿、培養液、細胞破碎液など多くのタンパク質を含むサンプル）からチップに対する親和性を利用し、サンプルに含まれるタンパク質をプロファイリング、捕捉し、質量数などを測定できる。本システムによる解析は、おもに悪性腫瘍疾患領域において盛んに行われており、前立腺ガン、卵巣ガンの診断に有用な新たな複数の腫瘍マーカーも発見され臨床応用に向けて研究が行われており、注目を集めているシステムである⁴⁾。我々の研究は、実際のIPA患者と健常人の血清、ならびにアスペルギルスより抽出したタンパク質のプロファイリングを行い、アスペルギルス菌由来の新規抗原の候補を検索し、精製・同定を行い、本抗原に対する抗体を作成し、最終的にELISA法などの迅速診断キットへ発展させるものである。IPA患者血清と菌由来抽出タンパク質とのプロファイリングで得られたピークのうち、お互いにオーバーラップし、かつ、そのピークが健常人血清のピークとオーバーラップしないピークについては、アスペルギルス感染症のバイオマーカー候補となる。我々の検討において、ある一定の条件下で、上記の条件を満たしたピーク抗原に着目し解析を進めた。本ピークは、他のアスペルギルス属の抽出タンパク質に共通して認められるものの、他の病原真菌の抽出タンパク質や黄色ブドウ球菌などの一般細菌の抽出タンパク質のプロファイリングでは認められなかった。また、実際のIPA感染症症例の患者血清と、本ピークの発現の関係を検討したところ、IPA発症に伴い本ピークの検出を認め、感染の消長に従い消失したことより、IPAのバイオマーカー候補となる可能性が示された。本抗原に関して、ポリアクリルアミドゲルを用いた二次元電気泳動法、peptide mass fingerprint法、アミノ酸シーケンシングを行い、精製と同定を行った結果、タンパク質の分解、DNA修復、翻訳調節、シグナル伝達などさまざまな生命現象に関わる76個のアミノ酸からなるubiquitin

であることが判明した。本タンパク質は、進化的な保存性が高く、すべての真核生物でほとんど同じアミノ酸配列を有している⁵⁾。従って、ヒトのubiquitinとも相同性が高いことより、同部に対する抗体でアスペルギルス感染のバイオマーカーとすることは、困難が予想される。しかしながら、本タンパク質の立体構造は、アスペルギルスとヒト由来のものでは、わずかに異なっており、同部を認識可能な抗体作成の可能性について検討を進めている。本プロテインチップシステムの利点は、ubiquitinのような低分子のタンパク質を、比較的簡単にスクリーニングできることが挙げられ、かつ、精製は、本システムを用いて行うことも可能である点である。今回の結果は、アスペルギルスの*in vitro*での抽出タンパク質をある一定の培養条件のもとで検討したものであり、より*in vivo*に近い条件で行うことにより、新たな抗原を検索可能である。

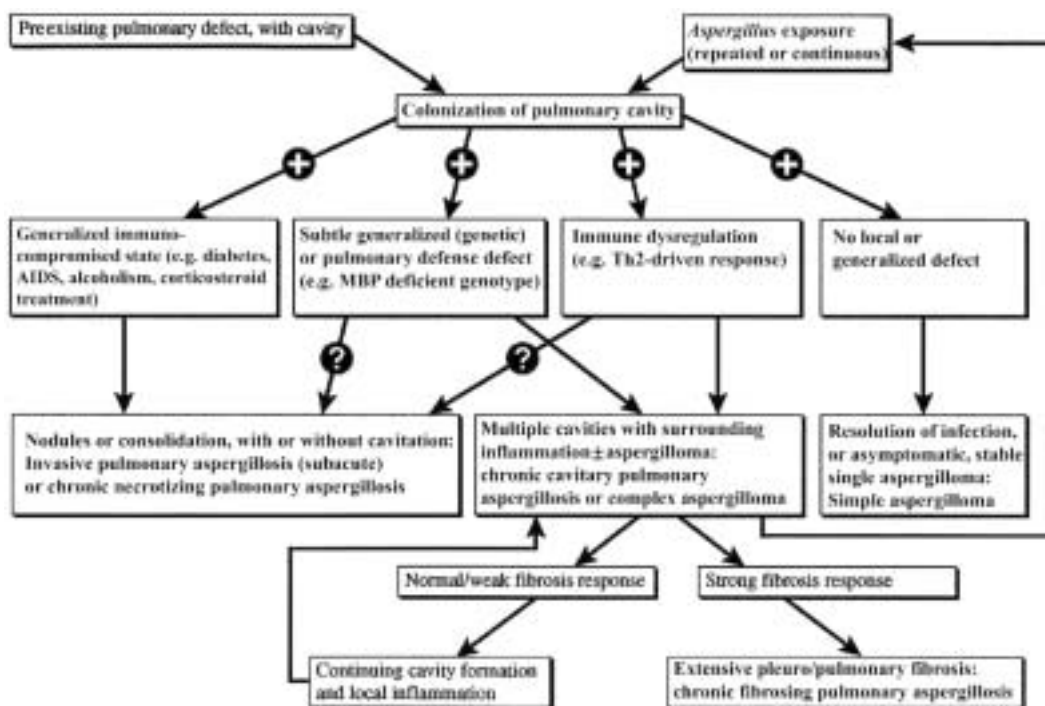
2) 慢性肺アスペルギルス症

① 慢性肺アスペルギルス症の問題点（治療エビデンスの乏しさ）

肺結核後遺症後の空洞などに、アスペルギルス菌球を形成するアスペルギローマや、空洞周囲に進展する慢性壊死性肺アスペルギルス症などは、診断基準や治療の開始・中止基準などについて世界的なコンセンサスが得られていないのが現状である。これら慢性肺アスペルギルス症の成因と分類については、近年、Denningらにより、新しい名称が提唱されているものの、複雑で混乱を来している（Fig. 1）⁶⁾。疾患概念が統一されないため、疫学的情報はもとより、治療成績についても施設間や地域別の比較解析が不能となる。このような背景も影響してか、慢性肺アスペルギルス症に対する治療薬に関するエビデンスは、少数の症例をまとめた報告（Table 1）⁷⁾に留まり、無作為比較試験などの臨床的なエビデンスは存在しておらず、疾患概念の世界的な統一化と治療エビデンスの創成が急務である。

② 慢性肺アスペルギルス症の治療エビデンスの創成

慢性肺アスペルギルス症は、COPDや陳旧性肺結核などの肺の器質的疾患を有する患者において、糖尿病やステロイド使用などの誘因が加わることにより発症する疾患と考えられている。肺の器質的疾患を有するために、一般に治療抵抗性であり、かつ長期間行う必要がある。抗真菌薬選択において、アスペルギルスに対する抗真菌活性を有することは必須であるが、その種類、剤型、投与期間などの選択や、治療のメルクマールになる指標も明らかではない。我々は、いわゆる急性期の点滴治療におけるエビデンス創成のために、当科を中心とした全国35施設の協力を得て、臨床試験を行っている。本臨床試験は、NEOCI-0001と呼ばれ、慢性肺アスペルギルス症を対象とし、治療薬としては安全性の高いmicafungin (MCFG) とIPAの第一選択薬であるvoriconazole (VRCZ) を無作為に比較する臨床試験である。目標解



Dennis DW, et al.: Clin Infect Dis 37 Suppl 3: S265-80, 2003.

Fig. 1. Classification and pathogenesis of chronic pulmonary aspergillosis.

析症例数は100例で、平成19年11月現在、約60症例が登録済みで進行中である。また、医療経済的な観点からは、外来通院治療における内服薬の維持療法も必要である。現在、抗アスペルギルス活性を持つ抗真菌薬で内服剤型を有するものは、itraconazole (ITCZ) と VRCZのみであるが、これら薬剤の比較試験についても、やはり臨床試験を組み立てて、初期治療とその後続く維持療法の治療選択におけるストラテジーを構築する必要がある。

3) クリプトコックス症

① HIV/AIDS時代のクリプトコックス症の問題点 (高い死亡率)

本邦では、先進諸国の中で唯一、HIV/AIDS患者が増加傾向にあるが、HIV/AIDS患者の日和見真菌感染症のうち、クリプトコックス感染症、特に脳髄膜炎は死因の上位を占める重要な感染症である (Fig. 2)⁸⁾。クリプトコックス感染症は、肺を侵入門戸とし感染が成立するとされているが、全身播種や脳髄膜炎発症の機序は不明である。当科における100例以上のクリプトコックス症例の検討でも、基礎疾患を有しない場合の脳髄膜炎症例は、抗真菌剤の投与でほとんど治癒しているのに対し、基礎疾患を有する場合は、適切な抗真菌薬を使用しているにもかかわらず、きわめて予後不良であった。宿主の免疫状態を改善することは当然ではあるが、やはり抗真菌薬以外の別のアプローチによる治療も考慮する必要がある。

② クリプトコックスの病原因子の検索

クリプトコックス感染症の治療において、抗真菌薬以外の治療選択の一つとして、病原因子抑制という戦略について検討している。クリプトコックスの病原因子については、現在までに、莢膜 (CAP59 など)⁹⁾、メラニン産生能 (CNLAC 1)、交配型 (MAT α など)、37°Cでの発育能 (CNA 1 など)¹⁰⁾ などに関する病原因子が明らかにされている (Table 2)。新規の因子を検索するために下記のような検討を行っている。クリプトコックスをマウスに経静脈的に感染させ、回収した菌をさらにマウスに感染させる (passage) と病原性が増す。passageさせ病原性の増した株と、親株とのmRNAレベルでの遺伝子発現の比較をPCR-Select™ Subtraction法 (CLONTECH: CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit) を用いて行い、発現量に差のある遺伝子の検索を行う。検索できた遺伝子について、そのノックアウト株を作成し、病原性の変化を検討した。まず、*in vivo* passageによる病原性の変化の検討では、親株である臨床分離YC-5株と2回マウスに感染させたYC-5SP株のマウスに対する病原性比較で、YC-5SP株は、YC-5株と比較して有意に生存期間を減少させた。これらの株においては、コロニー形態には相違を認めず、莢膜の厚さや増殖速度にも有意差は認めなかった。両株から抽出されたRNAを用いたPCR-Select™ Subtraction法では、発現量に差のある遺伝子片17個をクローニングしえた。これらの遺伝子のうち、*Saccharomyces cerevisiae*において37°Cでの発育能に関係するとされているcis-prenyl-transferase 遺伝子について解析を行った。本遺伝子の

Table 1. Clinical efficacy of antifungals to chronic pulmonary aspergillosis

Case#	Age	Sex	Underlying disease	Symptoms	Cultured strain	MCFG dose (mg/day)	Duration (days)	Combined agents	Overall efficacy
1	62	F	BE, Previous lung resection	Cough, Sputum	<i>A. fumigatus</i>	150	56	-	successful
2	49	F	Radiation pneumonitis, previous lung resection	Sputum, Fever	<i>A. niger</i>	150~300	79	AMPH-B	successful
3	58	M	Old Tbc, BE.	Sputum	<i>Aspergillus</i> spp.	150~300	57	-	no change
4	83	M	Old Tbc, PE	Hemoptisium, Fever	<i>A. fumigatus</i>	150	29	ITCZ	no change
5	72	M	PE	Sputum, Fever	<i>A. fumigatus</i>	100	72	-	successful
6	20	M	Dermatomyositis, collagen lung (NSIP), steroid	Cough, Sputum, Fever	<i>A. fumigatus</i>	300	96	AMPH-B/ITCZ	successful
7	77	M	Old Tbc, Interstitial pneumonia	Sputum, Fever	<i>A. niger</i>	300	42	AMPH-B/ITCZ	successful
8	66	M	DM, NTM	Hemoptisium	<i>A. fumigatus</i>	150~300	60	ITCZ	successful
9	70	M	Previous lung resection, DM	Cough, Sputum	<i>A. fumigatus</i>	300	42	-	successful

Izumikawa K, *et al.*: Med Mycol 45: 273-278, 2007.

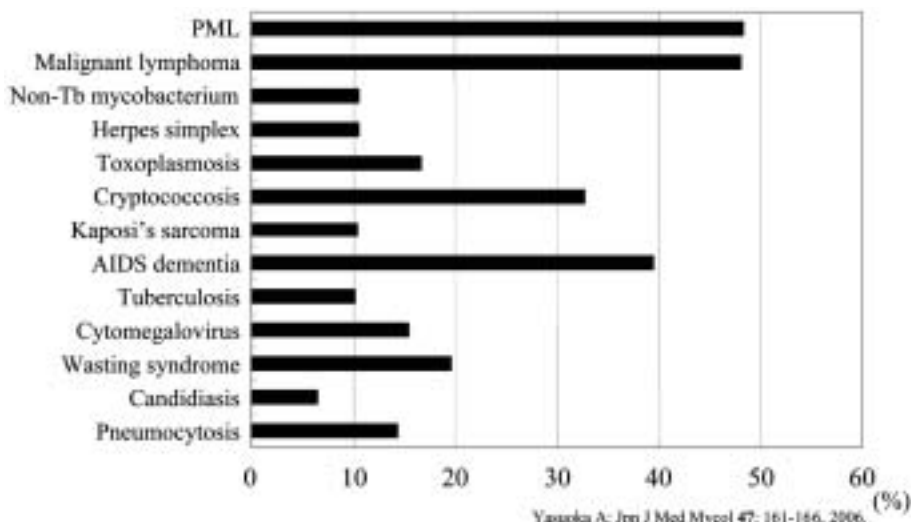


Fig. 2. Percentage of deaths with AIDS-related opportunistic infections.

Table 2. The pathogenic factors of *Cryptococcus neoformans*

Pathogenic factors	Related genes
Capsule	<i>CAP59 CAP60 CAP64</i>
Phosphomannose isomerase	<i>MAN1</i>
Melanin	
Laccase (phenoloxidase)	<i>CNLAC1</i>
Mating type (MAT α)	<i>MAT α STE12 α STE11 α STE20 α</i>
Growth at 37°C	
Calcineurin	<i>CNA1</i>
RAS-specific signaling cascade	<i>RAS1</i>
Phospholipase	<i>PLB1</i>

ノックアウト株を biolistic 法にて作成し、親株との比較を行ったところ、ノックアウト株 (B4500CISD) は親株 (B4500) と比較して、30°Cでの発育速度は有意差がなかったものの、37°Cでの発育速度は有意に遅かった。この検討より、本遺伝子が、クリプトコックスの発育温度にも関与する因子であることが証明され、本システムが有効に機能することが証明された。この結果をもって、治療に直接的に利用するという試みは、まだ、困難であるが、残りの遺伝子候補について、そのノックアウト株の作成を順次行っており、新たな病原因子同定の試みを行っている。

4) カンジダ症

① non-*albicans Candida* の台頭 (アゾール低感受性菌の出現)

カンジダ症においては、近年、アゾール系抗真菌薬に耐性の non-*albicans Candida* が世界的に問題とされている。長崎大学医学部・歯学部附属病院でも、*Candida glabrata* を中心とした non-*albicans Candida* は近年、増加傾向にあり危惧されている (Fig. 3)。

我々の検討では、フルコナゾールを中心としたアゾール系抗真菌薬の予防投与が、薬剤排出ポンプを介した耐性獲得に関与しており¹¹⁾、治療選択薬に限られるという問題がある。本邦においても、臓器移植の発達や、血液疾患領域の治療の進歩も相まって、著しい免疫不全の患者が増加している現状があり、今後、臨床的に重要となる問題である。

② 中国漢方薬の抗真菌作用

新しい抗真菌活性を有する薬剤として、漢方薬に関する検討を行っている。十全大補湯が、カンジダ感染マウスモデルにおいて、TNF- α の産生抑制を緩和する作用をもつことが、安部らによって報告されている¹²⁾。漢方薬の間接的な免疫賦活作用を検討した報告であるが、現在までに、漢方薬の直接的な抗真菌活性を検討した報告はない。我々は、中国より漢方薬の組成をなす数十種類の漢方エキスを入手し、臨床分離 *C. glabrata* 株に対する抗真菌活性を *in vitro* で検討している。CLSI-M27A の変法を用いた検討では、十全大補湯にも含まれる桂枝 (けいし) をはじめとした数種類の漢方薬について、高濃度になると *C. glabrata* の発育を有意に抑制することが証明され、現在、マウスを用いた動物感染、治療実験も行っており、今後の成績が待たれるところである。

ま と め

科学技術や医療資材の進歩に伴い、感染症全体に関する診断法や治療法、治療薬に関する進歩には目を見張るものがある。一方、内科領域における深在性真菌症は、日和見感染症の中でも最も予後不良な感染症であるが、診断能や治療薬、治療法については、臨床家が十分に満足できるレベルには到達しておらず、我々、専門家に託されたタスクはきわめて大きい。今後、ますます、深在性真菌症に罹患する患者が増えることが予想されるため、これらの問題点を解決することは急務であり、より一層の努力が求められる。

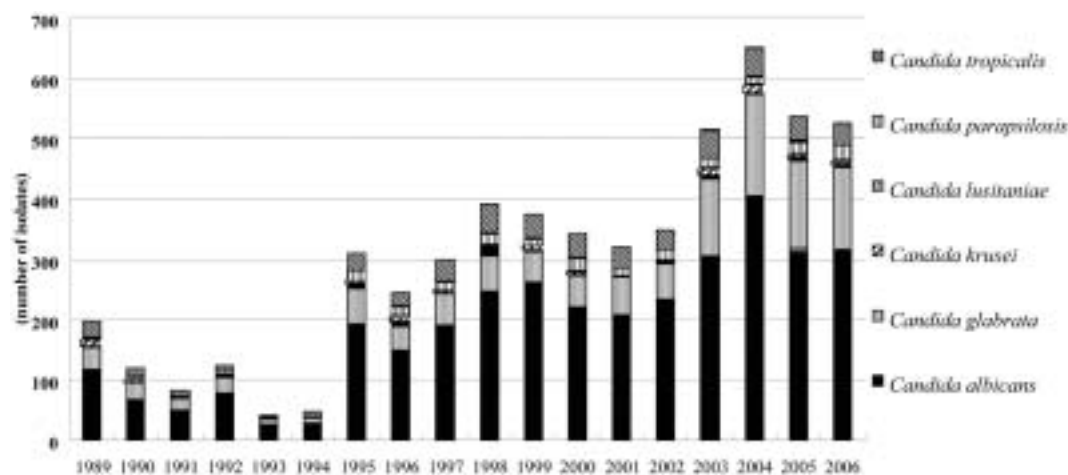


Fig. 3. The number of *Candida* species isolated from clinical samples in Nagasaki University Hospital.

文 献

- 1) Kume H, Yamazaki T, Abe M, Tanuma H, Okudaira M, Okayasu I: Epidemiology of visceral mycoses in patients with leukemia and MDS-analysis of the data in annual of pathological autopsy cases in Japan in 1989, 1993, 1997 and 2001. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **47**: 15-24, 2006.
- 2) 深在性真菌症の診断・治療ガイドライン2007 (深在性真菌症のガイドライン作成委員会 編), 協和企画, 東京, 2007.
- 3) Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM: Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis* **32**: 358-366, 2001.
- 4) Petricoin EF: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* **359**: 572-577, 2002.
- 5) Jentsch S: The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* **26**: 179-207, 1992.
- 6) Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H: Chronic cavitory and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin Infect Dis* **37**: S265-280, 2003.
- 7) Izumikawa K, Ohtsu Y, Kawabata M, Takaya H, Miyamoto A, Sakamoto S, Kishi K, Tsuboi E, Homma S, Yoshimura K: Clinical efficacy of micafungin for chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol* **45**: 273-278, 2007.
- 8) Yasuoka A: Fungal infections in HIV-infected patients. *Jpn J Med Mycol* **47**: 161-166, 2006.
- 9) Chang YC, Kwon-Chung KJ: Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol* **14**: 4912-4919, 1994.
- 10) Cruz MC, Sia RA, Olson M, *et al.*: Comparison of the roles of calcineurin in physiology and virulence in serotype D and serotype A strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **68**: 982-985, 2000.
- 11) Bennett JE, Izumikawa K, Marr KA: Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1773-1777, 2004.
- 12) 安部 茂, 赤川 元, 丹生 茂, 越智尚子, 大隅正子, 小松靖弘, 内田勝久, 山口英世: *Candida albicans* 感染マウスにおける腫瘍壊死因子産生能の低下とそれに対する十全大補湯の緩和作用. *真菌誌* **38**: 183-187, 1997.

Our Efforts to Curb Systemic Fungal Infections

Koichi Izumikawa, Shigeru Kohno

Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki 852-8501, JAPAN

The number of systemic fungal infection (SFI) cases is going due to the increase in immunocompromised hosts associated with advanced chemotherapy and high-tech medical devices. *Aspergillus*, *Candida* and *Cryptococcus* are major etiologies of SFIs and a remarkable increase of aspergillosis has been noted. The problems of SFIs in general are lower diagnostic rate and worse prognosis compared to infections by other pathogens. Clinical concerns of SFIs are the low diagnostic rate of aspergillosis, lack of evidence for treatment of chronic aspergillosis, poor outcome of cryptococcal encephal meningitis of immunocompromised hosts, and increasing low azole-susceptible *Candida*. Our final goal is to overcome these problems and to develop a newer rapid diagnostic tool for aspergillosis, establish clinical trials for chronic aspergillosis, discover new pathogenic factors of *Cryptococcus* and evaluate alternative treatment for low azole susceptible *Candida* infections. We believe research advances in these areas will be useful in the diagnosing and treatment of SFIs in the future.