

氏名(本籍)	阿部 美知子(岩手県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第22号
学位授与年月日	平成22年12月8日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	真菌症の臨床微生物学的検査法、とくに検体の前処理、分離培養および ミカファンギン(MCFG)の感受性測定法の確立に関する検討
論文審査委員	(主査) 福山 正文 (副査) 松田 基夫 山本 静雄

### 論文内容の要旨

真菌症の微生物学的検査(直接鏡検・分離培養)に関する検査法の標準化は遅れている。一般に真菌検査は、細菌検査に準じた方法で実施されているが、真菌は細菌より発育が遅いなどの特徴があり、必ずしも臨床材料からの真菌検出は十分でなく、真菌に適した検査法の確立が望まれている。そこで、臨床材料からの真菌の直接鏡検および分離培養検査の実態を把握するため、北里大学病院の臨床検査室で取り扱った真菌検査成績について、1) 直接鏡検の検出率、2) 呼吸器系疾患材料から分離された真菌(カンジダ属を除く)の菌種別分離頻度および集落数、3) 内科系疾患材料からのアスペルギルスおよびクリプトコックス分離例ならびに皮膚科材料からの皮膚糸状菌分離例における集落形成までの培養日数などを回顧的に調査した。さらに、カンジダ、アスペルギルスおよびクリプトコックスの保存菌株、各3株を用いて検体の前処理としての遠心分離の有用性、至適接種量および至適培養温度について検討した。

次に、抗真菌薬における最小発育阻止濃度〔minimum inhibitory concentration (MIC)〕の測定法は、米国のClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が世界に先駆けて酵母用および糸状菌用の各検査法を発表したが、その後も改良が続く状況にあり、我が国では、日本医真菌学会(JSMM)がCLSI法を改良した検査法を提案している。2002年に新規の作用機作である真菌細胞壁中の(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの合成を阻害するキャンディン系抗真菌薬のミカファンギン(MCFG)が我が国で開発され上市されたが、キャンディン系薬のMIC測定法は制定されていなかった。

そこで、著者はCLSI法およびJSMM法の準拠を基本として、ヒト臨床材料由来のカンジダ48株、アスペルギルス13株、精度管理用菌株2株(*Candida krusei* ATCC6258、*C. parapsilosis* ATCC22019)および参照菌株(*Aspergillus fumigatus* ATCC26430)の計64株を供試して、MCFGのMIC測定法のうちMIC値への影響が大きい終末点の判定基準および適正接種菌量について検討した。

その概要は以下のとおりである。

1) 内臓アスペルギルス症と診断された27例中10例(37%) および内臓クリプトコックス症と診断された10例の12検体中10検体(83.3%) から、直接鏡検でそれぞれの真菌が確認された。

2) 呼吸器系疾患材料から分離されたカンジダを除く真菌69株の菌種別内訳は、*Aspergillus fumigatus* 43株(62.4%)、*Aspergillus* spp. 13株(18.8%)、*Cryptococcus neoformans* 10株(14.5%) および *Cryptococcus* spp. 3株(4.3%) であった。アスペルギルスが分離された102検体の分離集落数は、1~3集落のものが74検体(72.5%) と最も多く、数百集落以上は8検体(7.9%) に過ぎなかった。クリプトコックスが分離された14検体では、1~3集落が7検体(50.0%)、数百集落以上は2検体(14.3%) であった。

3) アスペルギルスが分離された65検体の初発集落形成までの培養日数は、1日が3検体(4.6%)、残り62検体(95.4%) すべてのアスペルギルス検出には6日必要であった。クリプトコックスが分離された3検体では、4日が1検体、5日が2検体であった。皮膚科材料から皮膚糸状菌が分離された46検体では、7日目までに集落を認めたのは29検体(63.1%) で、残り17検体すべての皮膚糸状菌検出には14日必要であった。

4) 保存菌株のカンジダ、クリプトコックスおよびアスペルギルスのそれぞれについて10~10<sup>4</sup>cells/ml相当の菌液を作製し、遠心分離の有無による培養集落数を比較した。その結果、10<sup>4</sup>cells/mlの菌液を遠心せずに一白金耳量(約10 $\mu$ l) 塗抹した場合には集落が認められなかったが、2,000G、15分遠心後の沈渣を同様に塗抹したところ、1~3集落が認められた。また、10<sup>2</sup>cells/ml相当の各菌液を用いて、1日目と2日目の培養温度をそれぞれ35 $^{\circ}$ C、27 $^{\circ}$ Cとした場合、および2日間27 $^{\circ}$ Cで培養した場合の集落直径を比較した。その結果、前者の培養温度の方が、カンジダは1.2~1.4倍およびアスペルギルスは3.3~3.9倍大きくなったが、クリプトコックスは0.7~0.8倍と小さくなった。アスペルギルスは27 $^{\circ}$ C、24時間培養では集落が認められなかったが、35 $^{\circ}$ C、24時間培養で集落が認められたことから、35 $^{\circ}$ Cの培養条件はアスペルギルスの早期検出に有用であると考えられた。

5) MCFGのMIC測定時の終末点を仮設定後、MIC測定を行った結果、カンジダに対するMICはCLSI法およびJSMM法ともに目視および吸光度測定の内判定法で $\leq 0.0039 \sim 1\mu\text{g/ml}$ とほぼ一致した。一方、アスペルギルスに対するMICはCLSI法の目視判定および吸光度を測定しIC<sub>50</sub>による判定で、ともに0.0078~0.0313 $\mu\text{g/ml}$ を示したが、IC<sub>80</sub>で判定した場合には $> 4\mu\text{g/ml}$ と大幅に異なる結果が得られた。JSMM法は両判定法ともに $\leq 0.0039 \sim 0.0156\mu\text{g/ml}$ であった。その際のCLSI法での精度管理および参照菌株の各ウエルの吸光度値は、カンジダ2株ではMICより高濃度域で发育コントロールの0~1%の吸光度に激減したが、アスペルギルスは目視判定のMICより高濃度域で发育コントロールの28~48%の吸光度を示していた。そのためMIC測定後の各ウエル内の培養液中の菌体を光学顕微鏡で鏡検すると、目視判定の1/2MICでカンジダは菌体の膨化、アスペルギルスは菌糸先端の破裂などの形態変化(変形菌体)がそれぞれ認められたが、カンジダはMICより高濃度域で菌体を認めないのに対し、アスペルギルスは最高濃度まで変形菌体が認められた。

次いで、MIC測定後の各ウェルにニュートラルレッド液を添加してウェル内の生菌を染色し、その呈色液の吸光度を測定して各濃度別残存生菌量を測定した。その結果、カンジダはMICより高濃度域で発育コントロールの2～6%の生菌量であったが、アスペルギルスでは目視判定のMICより高濃度域で12～19%相当の生菌が残存することを確認した。

6)  $10^2 \sim 10^6$  cells/mlの範囲で適正接種菌量を検討した結果、カンジダはCLSI法およびJSMM法ともに、いずれの接種菌量でも同じMICを示した。アスペルギルスはJSMM法ではいずれの接種菌量もほぼ同じ値を示したが、CLSI法では $10^5$  cells/ml以上では、それ以下の接種菌量より9管以上高いMICを示した。

以上のように、臨床検査成績の精査によって、呼吸器系疾患材料に含まれる真菌は少量であることが明らかになった。喀痰を検体とする場合はプロテアーゼなどの溶解剤を用いて液化後、遠心分離した沈渣を塗抹標本および分離培養の試料とすること、分離培養の接種量は一滴（約30 $\mu$ l）の大量とすること、アスペルギルスおよびカンジダを対象とする場合は初日の培養温度を35 $^{\circ}$ Cとすること、培養期間は内科系疾患材料では7日、皮膚科材料は3～4週間は必須であることを明らかにした。

また、MCFGのMIC測定法は、カンジダはCLSI法およびJSMM法のいずれでも問題がないが、アスペルギルスは多用されるCLSI法で問題が多く、接種菌量は $10^4$  cells/mlを越えないこと、目視判定では「ウェル内の菌塊から菌糸の発育を認めない」点、吸光度測定ではIC<sub>50</sub>を、あらたな終末点とする必要性を明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

真菌症の微生物学的検査法（直接鏡検・分離培養）は、細菌感染症の検査法に比べ、標準化が遅れている。一般に真菌は細菌に比べて発育が遅いなどの特徴があり、必ずしも臨床材料からの真菌検出は十分でなく、真菌に適した検査法の確立が望まれている。一方、抗真菌薬における最小発育阻止濃度〔minimum inhibitory concentration (MIC)〕の測定法は、米国のClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が世界に先駆けて酵母用および糸状菌用の各検査法を発表したが、その後も改良が続く状況にある。我が国でも、日本医真菌学会 (JSMM) がCLSI法を改良した検査法を提案している。また、2002年に真菌細胞壁中の(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンの合成を阻害する新規の作用機序をもつキャンディン系抗真菌薬のミカファンギン (MCFG) が我が国で開発され上市されたが、キャンディン系薬のMIC測定法は制定されていないのが実情である。そこで、著者は臨床材料からの真菌の直接鏡検および分離培養検査の実態を把握するため、北里大学病院の臨床検査室で取り扱った真菌検査成績について、1) 直接鏡検による検出状況、2) 呼吸器系疾患材料から分離された真菌（カンジダ属を除く）の菌種別分離頻度および集落数、3) 内科系疾患材料からのアスペルギルスおよびクリプトコックス分離例ならびに皮膚科疾患材料からの皮膚糸状菌分離例における集落形成までの培養日数などを回顧的に調査した。さらに、カンジダ、アスペルギルスおよびクリプトコックスの保存菌株、各3株を用いて検体の前処理として、遠心分離の有用性、至適接種量および至適培養温度について検討した。

さらに、著者は CLSI 法および JSMM 法に準拠することを基本として、ヒト臨床材料由来のカンジダ 48 株、アスペルギルス 13 株、精度管理用菌株 2 株 (*Candida krusei* ATCC6258、*C. parapsilosis* ATCC22019) および基準菌株 1 株 (*Aspergillus fumigatus* ATCC26430) の計 64 株を供試して、MCFG の MIC 測定法のうち MIC 値への影響が大きい終末点の判定基準および適正接種菌量について検討した。その概要は以下のとおりである。

1) 直接鏡検では、内臓アスペルギルス症と診断された 27 例中 10 例 (37%) および内臓クリプトコックス症と診断された 10 例の 12 検体中 10 検体 (83.3%) からそれぞれ真菌が検出された。

2) 呼吸器系疾患材料から分離されたカンジダを除く真菌 69 株の菌種別内訳は、*Aspergillus fumigatus* 43 株 (62.4%)、*Aspergillus* spp. 13 株 (18.8%)、*Cryptococcus neoformans* 10 株 (14.5%) および *Cryptococcus* spp. 3 株 (4.3%) であった。それらの分離培養における集落数は、アスペルギルスが分離された 102 検体では、1~3 集落数のものが 74 検体 (72.5%) と最も多く、数百集落数以上は 8 検体 (7.9%) に過ぎなかった。クリプトコックスが分離された 14 検体では、1~3 集落数が 7 検体 (50.0%)、数百集落数以上は 2 検体 (14.3%) であった。

3) 初発集落形成までの培養日数は、アスペルギルスが分離された 65 検体で 1 日が 3 検体 (4.6%)、残り 62 検体 (95.4%) が 6 日であった。クリプトコックスが分離された 3 検体では、4 日が 1 検体、5 日が 2 検体であった。皮膚科疾患材料から皮膚糸状菌が分離された 46 検体では、7 日目までに集落を認めたのが 29 検体 (63.1%)、残り 17 検体は 14 日であった。

4) 遠心分離の有無による培養集落数の比較を保存菌株のカンジダ、クリプトコックスおよびアスペルギルスについて、それぞれ  $10 \sim 10^6$  cells/ml 相当の菌液を用いて実施した。その結果、10 cells/ml の菌液を遠心せずに一白金耳量 (約  $10 \mu\text{l}$ ) を塗抹した場合には集落が認められなかったが、2,000G、15 分遠心後の沈渣を同様に塗抹したところ、1~3 集落が認められた。また、 $10^2$  cells/ml 相当の各菌液を用いて、培養温度を 1 日目  $35^\circ\text{C}$  と 2 日目  $27^\circ\text{C}$  で培養した場合、および 2 日間  $27^\circ\text{C}$  で培養した場合の集落直径を比較した。その結果、後者に比べ、前者の培養温度の方がカンジダでは 1.2~1.4 倍、アスペルギルスでは 3.3~3.9 倍大きくなったが、クリプトコックスは 0.7~0.8 倍と小さくなった。アスペルギルスは  $27^\circ\text{C}$ 、24 時間培養では集落が認められなかったが、 $35^\circ\text{C}$ 、24 時間培養で集落が認め、アスペルギルスの早期検出には  $35^\circ\text{C}$  の培養温度が有用であることを実証した。

5) MCFG の MIC 測定時の終末点を仮設定後、MIC 測定を行った結果、カンジダに対する MIC は CLSI 法および JSMM 法ともに目視および吸光度測定の内判定法で  $\leq 0.0039 \sim 1 \mu\text{g/ml}$  とほぼ一致した。一方、アスペルギルスに対する MIC は CLSI 法の目視判定および吸光度を測定する  $\text{IC}_{50}$  による判定では、ともに  $0.0078 \sim 0.0313 \mu\text{g/ml}$  を示したが、 $\text{IC}_{80}$  で判定した場合には  $> 4 \mu\text{g/ml}$  と大幅に異なることを明らかにした。JSMM 法は両判定法ともに  $\leq 0.0039 \sim 0.0156 \mu\text{g/ml}$  であった。その際の CLSI 法での精度管理および基準菌株の各ウエルの吸光度値は、カンジダ 2 株では MIC より高濃度域で発育コントロールの 0~1% の吸光度に激減したが、アスペルギルスは目視判定の MIC より高濃度域で発育コントロールの 28~48% の吸光度を示した。そのため MIC 測定後の各ウエル内の培養液中の菌体を光学顕微

鏡で鏡検すると、目視判定の1/2MICでカンジダでは菌体の膨化、アスペルギルスでは菌糸先端の破裂などの形態変化（変形菌体）がそれぞれ認められた。また、カンジダはMICより高濃度域で菌体を認めなかったが、アスペルギルスでは最高濃度まで変形菌体が認められた。

次いで、MIC測定後の各ウエルにニュートラルレッド液を添加してウエル内の生菌を染色し、その呈色液の吸光度の測定を行い各濃度別残存生菌量を測定した。その結果、カンジダはMICより高濃度域でコントロールに対して2～6%相当の生菌が残存していた。アスペルギルスでは目視判定のMICより高濃度域で12～19%相当の生菌が残存していることを明らかにした。

6)  $10^2 \sim 10^6$  cells/mlの範囲で適正接種菌量を検討した結果、カンジダはCLSI法およびJSMM法ともに、いずれの接種菌量でも同じMICを示した。アスペルギルスはJSMM法ではいずれの接種菌量もほぼ同じ値を示したが、CLSI法では $10^6$  cells/ml以上では、それ以下の接種菌量より9管以上高いMICを示した。

上述のことから、臨床検査成績の精査によって、呼吸器系疾患材料に含まれる真菌は少量であることが明らかになった。喀痰を検体とする場合はプロテアーゼなどの溶解剤を用いて液化後、遠心分離した沈渣を塗抹標本および分離培養の試料とすること、分離培養の接種量は一白金耳量（約 $10 \mu\text{l}$ ）ではなく、一滴（約 $30 \mu\text{l}$ ）とすること、アスペルギルスおよびカンジダを対象とする場合は初日の培養温度を $35^\circ\text{C}$ とすること、培養期間は内科系疾患材料では7日、皮膚科疾患材料は3～4週間は必須であることをそれぞれ明らかにした。

また、MCFGのMIC測定法は、カンジダはCLSI法およびJSMM法のいずれでも測定して問題がないが、アスペルギルスでは多用されているCLSI法には問題が多く、接種菌量は $10^4$  cells/mlを越えないこと、目視判定では「ウエル内の菌塊から菌糸の発育を認めない」点、吸光度測定では $\text{IC}_{50}$ を、あらたな終末点とする必要性等を明らかにした。

以上のように、本研究は真菌症からの微生物学的検査に適した検査法や我が国で新規開発されたMCFGのMIC測定法を提案したものであり、臨床検査学、真菌学ならびに感染症の治療法に関する研究に寄与するところ大であり、博士（学術）の学位を授与するにふさわしい業績であると全審査員が認めた。