

＜シンポジウム(3)-8-3＞中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩

真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断

大野 秀明¹⁾ 宮崎 義継¹⁾

要旨：真菌性脳髄膜炎は比較的頻度は少ないものの致命的な疾患であり，わが国では原因真菌として *Cryptococcus* 属，*Candida* 属，*Aspergillus* 属などが重要である．一般的に深在性真菌症の診断は困難なことが多いが，遺伝子診断法は迅速診断法として有用とされる一方，評価や標準法はいまだ定まっておらず，実際の運用においては研究室レベルである．真菌感染症診断における遺伝子診断法では，真菌一般を検出する方法と，特定の真菌を検出する方法があるが，菌種によっては日常生活環境に常在するものがあるため，臨床における応用においては常にコンタミネーションの可能性を考慮する必要がある．

(臨床神経 2013;53:1191-1193)

Key words：深在性真菌症，脳髄膜炎，クリプトコックス属，遺伝子診断

はじめに

真菌の菌種は，数万とも十数万ともいわれているが，そのうちヒトの真菌症の原因菌になることが確認されている真菌，いわゆる病原真菌は 400 種を超えるとされている．このように，一言で真菌感染症といっても原因菌は多種にわたるため，診断に際しては，ある真菌感染症における原因真菌の頻度や患者背景などを考慮し，適切な臨床検査による原因菌検索をおこなう必要がある．本稿では，真菌性脳髄膜炎について，おもな原因真菌や診断法における遺伝子診断法の現状などについて概説する．

中枢神経系真菌感染症の原因真菌

真菌感染症，なかでも深部臓器を侵す深在性真菌症は免疫不全宿主に多くみとめられる感染症である．深在性真菌症の一つである真菌性脳髄膜炎は比較的頻度は少ないものの致命的な疾患であり，神経疾患において鑑別が必要な感染症である．

中枢神経系真菌感染症の代表的疾患として *Cryptococcus* 属によるクリプトコックス脳髄膜炎があげられるが，きわめて免疫状態が悪いばあいには原因真菌として *Cryptococcus* 属以外にも *Candida* 属，*Aspergillus* 属，接合菌などもみとめられる (Table 1)¹⁾．*Cryptococcus* 属による脳髄膜炎は，HIV 感染者に合併するものが良く知られているが，(細胞性)免疫不全のない健常者においても発病することがみとめられることがあるため注意を要する．*Cryptococcus* 属は現在 20 種類以上の菌種が記載されているが²⁾，臨床的にクリプトコックス症の原因真菌となるのは主に *C. neoformans* と *C. gattii* である．わが国で分離される *Cryptococcus* 属は，ほとんどの例が

Table 1 Fungi causing central nervous system infection.

Meningitis	Space-occupying lesions
Common agents	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Aspergillus</i> spp.
<i>Coccidioides immitis</i>	Zygomycetes
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida</i> spp.
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Melanized fungi
Uncommon or rare agents	
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Coccidioides immitis</i>
Melanized fungi	<i>Pseudallescheria boydii</i>
<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.
Zygomycetes	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
<i>Sporothrix chenckii</i>	<i>Sporothrix chenckii</i>
	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
	<i>Penicillium</i> spp.
	<i>Ustilgo</i> spp.

(文献 1) より引用

C. neoformans (血清型 A) であるが，近年 *C. gattii* (おもに血清型 B) による中枢神経系感染症の報告もみとめられる³⁾．また，治療法において，この両者による真菌症に違いはないが，*C. gattii* 感染症では抗真菌薬による化学療法に対する反応が鈍い事例もあり⁴⁾，*Cryptococcus* 属が分離されたばあいは可能であれば菌種まで同定した方が望ましい．

また，その他の真菌性脳髄膜炎の原因真菌として *Coccidioides* 属，*Histoplasma* 属などがあげられる (Table 1)．これらの真菌による真菌症は地域流行型真菌症 (endemic mycosis) とよばれ，わが国ではなじみの少ない真菌症であるが，海外 (流行地) では比較的よくみとめられる疾患である．コクシジオイデス症は米国カリフォルニア州やアリゾナ

¹⁾ 国立感染症研究所真菌部 [〒162-8640 東京都新宿区戸山1丁目23-1]
(受付日：2013年5月31日)

州の乾燥地帯が、ヒストプラスマ症は米国ミシシッピ川流域や中南米、東南アジア、西アジアなどが主な流行地であり、海外渡航者の増加にともない、これらによる真菌症の国内発生も増加している。一方、中枢神経系の占拠性病変を呈する真菌症の病原真菌では *Aspergillus* 属、接合菌が比較的多いとされる。

真菌感染症の診断法

真菌感染症においても細菌感染症と同様に、診断の gold standard は培養法などによる菌の証明であるが、深在性真菌感染症においては原因真菌検出は必ずしも容易ではない。病理組織学的診断法も確定診断において重要な検査法であるが、組織生検に際し被験者の病態不良から検査が困難なばあも多い。また、臨床的には血清診断法が補助的診断法として広くもちいられるが、クリプトコックス症を除き感度、特異性でやや難があるのが現状である。一方、遺伝子診断法について、真菌感染症の分野ではその有用性について多数の報告があるが、診断法としての評価や標準法はいまだ定まっていない。このため、遺伝子診断法は研究レベルでの診断法として扱われている。真菌感染症診断における遺伝子診断法では、真菌一般を検出する方法と、特定の真菌を検出する方法がある (Table 2)。真菌一般を検出する方法は、多菌種共通のプライマーをもちいて PCR で遺伝子断片 (おもにリボゾム RNA 遺伝子領域) を増幅したのち、PCR 産物の塩基配列を解析することで菌種を同定する。この方法は、培養菌の同定のほか臨床検体中の真菌遺伝子の検出まで応用範囲が広いが、同時に臨床検体から真菌の遺伝子が検出されても真の原因真菌なのか否かの判断を慎重におこなう必要がある。すなわち、髄液など本来無菌的な臨床検体から真菌遺伝子が検出されたばあいは基本的に原因真菌である可能性は高いが、*Aspergillus* 属、接合菌は日常生活環境中に浮遊菌として、*Candida* 属はヒトの常在菌として存在するため、これらの真菌が検出されたばあい、colonization 検出やコンタミネーションの問題を常に考慮する必要がある。一方、特定の真菌を検出する PCR も研究レベルでの応用は進んでおり、われわれの研究室でも *Coccidioides* 属⁵⁾、*Histoplasma* 属⁶⁾、*Pneumocystis jirovecii* の検出に応用している。

Table 2 Molecular diagnosis against fungal diseases.

Popular method: PCR based method
Major applications:
1) identification of cultured fungi
2) character identification
3) detection of fungal DNA in clinical specimens (careful adaptation and assessment)
Target genes:
1) rRNA gene: broad spectrum
2) specific gene: pathogen specific
3) functional gene

米国における真菌性髄膜炎の集団発生事例

2012 年に米国内で発生した医原性の真菌性髄膜炎をふくむ深在性真菌感染症の集団発生事例は記憶に新しいところである⁷⁾。本事例は 2013 年 8 月時点でも終息しておらず、これまでに発症者 749 例、死亡 61 例と大規模なものとなっている⁸⁾。この集団発生では、*Exserohilum rostratum*、*Aspergillus* 属がおもな原因真菌であるが、これに関して 139 例を対象とした遺伝子診断法の成績が報告されている⁹⁾。それによると、PCR 法が陽性となった症例は全体の 29% であり、培養法の 14% より成績は良いものの、これをみても真菌感染症における遺伝子診断法は現状では満足できる状況ではないことが伺われる。

さいごに

これまで述べたように、真菌感染症における遺伝子診断法は、研究レベルでの臨床応用はなされているが、臨床側の要求を満足させるクオリティには残念ながらまだ到達していない部分が多い。しかし、補助的診断法としての価値は十分にあると考えられることから、症例によっては専門の施設に検査依頼することは臨床的に有用と考えられる。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) Chakrabarti A. Epidemiology of central nervous system mycoses. *Neurology India* 2007;55:191-197.
- 2) 杉田 隆, 高島昌子. 病原性酵母の分類と同定における最近の動向—第 5 版 *The Yeasts, A Taxonomic Study* から—。 *Med Mycol J* 2011;52:107-115.
- 3) Okamoto K, Hatakeyama S, Itoyama S, et al. *Cryptococcus gattii* genotype VGIIa infection in man, Japan, 2007. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1155-1157.
- 4) 堀内一宏, 山田萌美, 白井慎一ら. 脳室内抗真菌薬投与が奏功した *Cryptococcus gattii* による脳および肺クリプトコックス症の 1 例. *臨床神経* 2012;52:166-171.
- 5) Umeyama T, Sano A, Kamei K, et al. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *J Clin Microbiol* 2006;44:1859-1862.
- 6) Ohno H, Ogata Y, Suguro H, et al. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. *Inter Med* 2010;49:491-495.
- 7) Kainer MA, Reagan DR, Nguyen DB, et al. Fungal infections associated with contaminated methylprednisolone in Tennessee. *N Engl J Med* 2012;367:2194-2203.
- 8) Centers for Disease Control and Prevention. Multistate fungal meningitis outbreak investigation. (<http://www.cdc.gov/hai/outbreaks/meningitis.html>.)
- 9) Gade L, Scheel CM, Pham CD, et al. Detection of fungal DNA in human body fluids and tissues during a multistate outbreak of fungal meningitis and other infections. *Eukaryot Cell* 2013; 12:677-683.

Abstract**Genetic diagnosis against fungal cerebromeningitis**

Hideaki Ohno, M.D., Ph.D.¹⁾ and Yoshitsugu Miyazaki, M.D., Ph.D.¹⁾

¹⁾Department of Chemotherapy and Mycoses, National Institute of Infectious diseases

Fungal cerebromeningitis is one of deep seated mycoses and also a fatal fungal infectious disease. Regarding to causative pathogen of fungal cerebromeningitis in Japan, *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., *Aspergillus* spp., are popular fungi. In general, the diagnosis of deep seated mycosis is sometime difficult. The genetic diagnosis method such as PCR against deep seated mycosis has been developing and it has been also reported as one of useful diagnostic tests. However, PCR for fungal detection is still a research test that has not been cleared or approved officially, therefore it should not be used for diagnosis, or patient management routinely. The PCR which detect broad range of fungi or specific fungus is applied for clinical situation, a careful attention should be paid for avoiding contamination because many fungal species are available in living environment.

(Clin Neurol 2013;53:1191-1193)

Key words: deep seated mycosis, cerebromeningitis, *Cryptococcus* spp., genetic diagnosis
