

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 1 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590634

研究課題名（和文）生育活性蛍光プローブを用いた酵母真菌細胞集団の定量的解析と臨床応用

研究課題名（英文）Quantitative analysis of yeast cell population by using viability-dependent fluorescent dyes and its Clinical application

研究代表者

山根 誠久（YAMANE NOBUHISA）

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80125682

研究成果の概要（和文）：ヒト生体内における酵母真菌の細胞様式を、選択的な膜透過性を持つ蛍光プローブを応用して患者尿検体を直接試料に用い、フローサイトメトリ法で解析する技術を確認した。Live/dead 染色した尿中酵母真菌は、悪性腫瘍、糖尿病、自己免疫疾患患者など易感染性が危惧される患者群とその種の病態にない患者群で大きく変化した。尿中酵母真菌の存在様式を直接フローサイトメトリ法で解析することにより、患者の病態、易感染性、薬剤による治療の予後予測の指標になる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：We established a technique to determine the viability of yeast cells in urine specimens by directly staining with fluorescent dyes, which have different permeability into yeast cells. After staining, yeast cells were analyzed by flow cytometer. Yeast cells in urine specimens from competent patients against infection were mostly classified as injured cells, whereas those from compromised patients were live cells. Also, the increased ratios of injured cells were observed along the improvement of clinical manifestation of compromised diseases. This established procedure provides us with a perspective prognostic indicator for a variety of diseases following the compromised against infections.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2010 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：酵母真菌，蛍光プローブ，生育活性，抗真菌薬，感染症

1. 研究開始当初の背景

酵母真菌による深在性真菌症は、日和見感染症として重要な位置を占め、エイズ、血液疾患、悪性腫瘍などに伴う免疫不全患者の増加、また易感染状態を来す高度先進医療の開発・応用を背景に、年々増加の傾向にある。これら易感染状態にある患者で深在性真菌

症を来すとしばしば致命的となり、真菌血症での死亡率は優に 50%を超える。その意味から有効な抗真菌薬の開発と臨床応用が強く望まれているが、未だ満足できる治療効果を得ることができない。

2. 研究の目的

本研究課題が目的とするところは、本来至適温度を25~30℃の低温とする酵母真菌が、至適な生存環境ではない37℃の環境にあるヒト体内臓器に感染した時に示す生育活性を指標とし、真菌細胞集団のviabilityとvitalityを定量的に解析し、さらに抗真菌薬を含む各種抗菌薬と接触した際の変化、また効果的に細胞死に至る機序を臨床的背景と比較し解明することから、その治療方法と予防対策を提案していくものである。

3. 研究の方法

酵母真菌細胞膜の障害の程度を反映する膜透過性蛍光プローブを用い、蛍光顕微鏡での直接観察とフローサイトメトリ法での酵母真菌細胞集団の分別定量から、深在性真菌症の患者に由来する臨床検体に含まれる酵母真菌を、生細胞から死細胞に至る各段階に分別して定量的に解析し、臨床症状と比較検討する。

(1) 酵母真菌細胞の vitality と viability を解析するための至適蛍光プローブの選別とフローサイトメトリ法での定量解析法の確立。

① 試験対象：琉球大学医学部附属病院の外來および入院患者 70 人を対象として、尿沈さで酵母真菌が 1+以上検出された尿検体を材料として用いた。検体は 4℃で一晩保存した後、1ml を 37℃で 5~10 分加温して用いた。

② Live/dead 染色法：BD Cell Viability Kit (Becton Dickinson) の TO (thiazole orange): 5μl (最終濃度 420nM), PI (propidium iodide): 5μl (最終濃度 43μM) に尿検体 1ml, 内部標準に BD Liquid Counting Beads 50μl を加え混和、遮光にて 37℃で 5 分間反応させた。

③ フローサイトメトリ法：②により染色された尿中酵母真菌細胞を FACS Calibur (Becton Dickinson) を用い、FSC versus SSC, FL1 versus FL3 において細胞の大きさ、核の内容物、蛍光色素の色調強度により細胞の viability を live cell/injured cell/dead cell の 3 段階に分画し定量解析した。

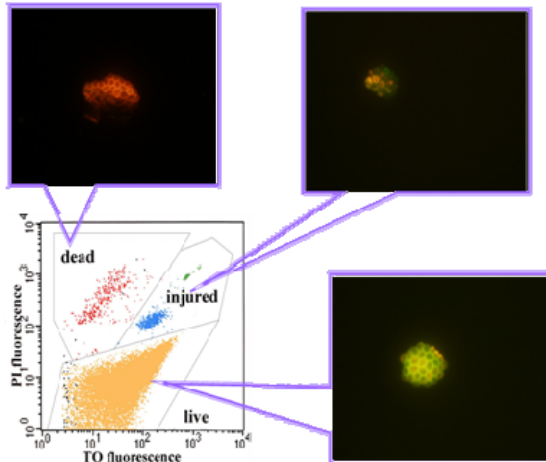


図1 蛍光色素 TO および PI で染色した酵母真菌: 傷ついた細胞膜のみを通過する PI に強い蛍光強度を示した dead cell 群, あらゆる細胞に広く取り込まれる TO に強い蛍光強度を示した live cell 群, 中等度の PI 蛍光と TO 蛍光を示した injured cell 群を蛍光顕微鏡でとらえた写真。

(2) 臨床的背景との比較

尿中酵母真菌細胞の存在様式が患者の臨床病態や、薬剤治療による影響をどのように受けているかを評価するために、測定期間中に尿中から酵母真菌が検出された患者の主な疾患によって、易感染性(免疫力低下)を疑う患者群, 疑わない患者群に分けて尿中酵母真菌の live cell/injured cell/dead cell の分画を比較検討した。免疫力低下を疑う患者群の主な疾患は、糖尿病, 慢性腎不全, 悪性腫瘍, 免疫疾患または免疫抑制剤を使用している患者とし、それ以外の疾患を免疫力低下を疑わない患者群とした。また、測定期間中継続的に尿中酵母真菌細胞が検出された患者の臨床病態や治療経過と、live cell/injured cell/dead cell の分画を比較検討した。

4. 研究成果

70 人の患者の尿中酵母真菌を測定した結果、研究測定期間中継続的に尿中酵母真菌細胞が検出された患者は 16 人, 単回のみ検出された患者は 54 人であった。また、患者の主な疾患で糖尿病, 慢性腎不全, 悪性腫瘍, 免疫疾患, 免疫抑制剤使用の免疫力低下を疑う群の患者は 70 人中 51 人, 免疫力低下を疑わない群の患者は 19 人であった。

表 1 免疫力低下が疑われる患者群の主な疾患(51名)

| | |
|---------------------|-------------------|
| 糖尿病 | 10 人 |
| 慢性腎不全(生体腎移植を 1 人含む) | 6 人 |
| 悪性腫瘍 | 10 人 |
| 免疫疾患 | 5 人 |
| 免疫抑制剤使用 | 5 人 |
| ----- | |
| 年齢：中央値 | 60 (2 ~ 84) |
| 性別：男性/女性 | 14/37 |
| 入院/外來： | 44/7 ^a |

表 2 免疫力低下を疑わない患者群の主な疾患(19名)

子宮頸管閉塞, 子宮筋腫, 卵巣腫瘍
鉄欠乏性貧血(2), 鼓膜形成, 慢性膀胱炎
肺炎(2), 高血圧, 尿失禁, 尋常性乾癬
網膜剥離, 口蓋部腫瘍, アルコール性膵炎
腎盂腎炎(2), シェーライン・ヘノッホ症候
群(無治療経過観察), 特発性血小板減少紫斑
病(ITP)(無治療経過観察)

| | |
|----------|-------------------|
| 年齢：中央値 | 50 (11 ~ 84) |
| 性別：男性／女性 | 2／17 |
| 入院／外来： | 8／11 ^a |

表 1, 2 において免疫力低下疑う患者群と、免疫力低下を疑わない患者群の間で、患者の年齢、性別、男女の別による差は見られなかったものの、入院／外来では、免疫力低下を疑う患者群では有意に入院患者が多かった(*Fisher exact probability test $p < 0.01$)。また疾患についても、免疫力低下を疑う患者群では、重篤で、入院治療経過が長い病態をたどった症例が多かった。表 2 の免疫力低下を疑わない患者群では、通院治療の症例が多く、免疫疾患を持つ 2 症例 (シェーライン・ヘノッホ症候群, 特発性血小板減少紫斑病(ITP)) も、特に免疫抑制をきたす薬剤治療は受けおらず、経過観察で通院している症例であった。

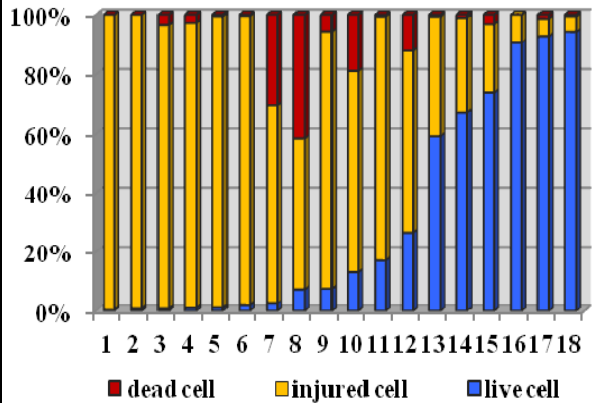


図 2 免疫力低下を疑わない患者群 live/injured/dead cell 比率の分布(18 例)

研究測定期間中、尿検体から酵母真菌細胞が 1 回検出された 54 人の患者の中で、免疫力低下を疑わない群に分けた 18 例の酵母真菌細胞を live/dead 染色法を行い、フローサイトメトリ法により直接定量測定した結果を、live/injured/dead cell の比率で表した。live cell 群や dead cell 群と比較して injured cell 群が有意に高い比率にあり ($p < 0.01$, Kruskal wallis H-test), また live cell の比率が 90% 以上の 3 例のうち 2 例は、慢性中耳炎による再度の鼓膜形成, アルコール性慢性膵炎で敗血症の患者で感染を伴った慢性的な疾患であった。残り 1 例は、口蓋部腫瘍で通院中の患者であった。

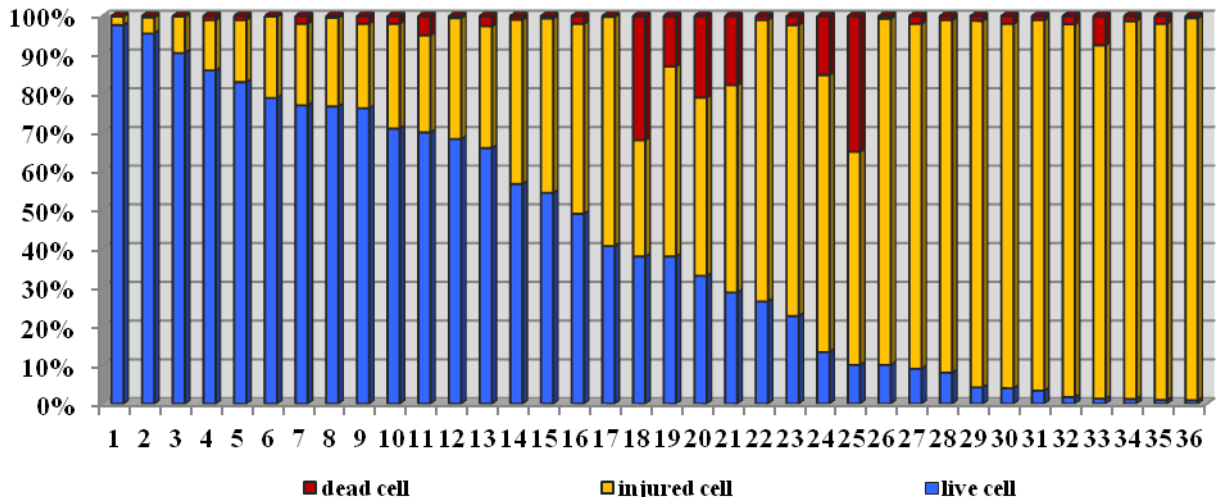


図 3 免疫力低下を疑う患者群での live/injured/dead cell 比率の分布(36 例)

研究測定期間中、尿検体から酵母真菌細胞が 1 回検出された 54 人の患者の中で、免疫力低下を疑う患者群に分けた 36 例の酵母真菌細胞の live/injured/dead cell の比率を表している。live cell, injured cell, dead cell の 3 群間では有意差はないもの(Kruskal wallis

cell H-test), live cell 群と injured cell 群および dead 群との比較では live cell 群が有意に高い比率にあった(Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$)。injured cell 群が 90% を超える症例は、年齢は様々で、糖尿病, 悪性腫瘍, 慢性腎不全, 免疫疾患を基礎疾患に持ち、そのほとんどが免疫抑制剤を施行された症例であった。

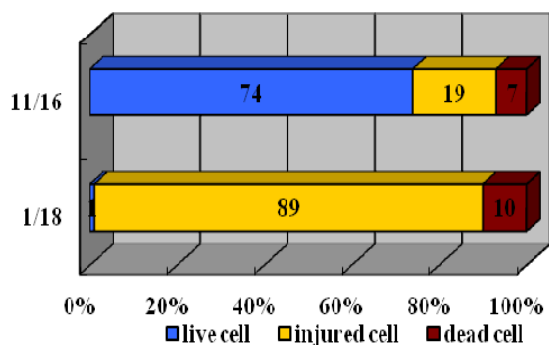


図 4 継続的に尿中に酵母真菌が検出された免疫疾患（全身性エリテマトーデス：SLE）の live/injured/dead cell 比率の分布

10月26日～11月4日にかけて2クール目のステロイドパルス療法を実施，2クール目の期間中のみ抗真菌薬内服。ステロイドパルス終了以降は，ステロイド剤を内服継続。11月16日検出された尿中酵母真菌の live/injured/dead cell 比率は live cell 群が 74%，injured cell 群が 19%を占めていた。12月16日退院。翌年1月18日経過観察のための通院時検出された尿中酵母真菌の live/injured/dead cell 比率は injured cell 群が 89%へと大きく比率が増加した。

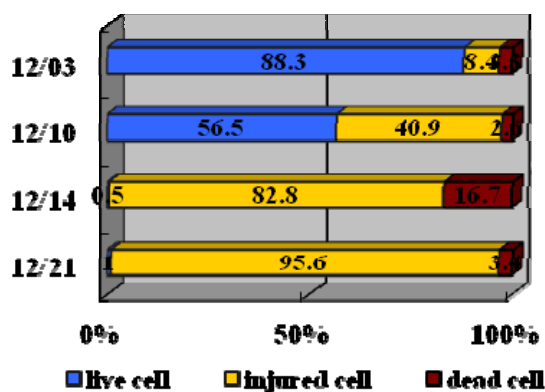


図 5 継続的に尿中に酵母真菌が検出された生体腎移植患者の live/injured/dead cell 比率の分布

11月25日に腎移植実施。移植前後で，免疫抑制のための免疫抑制剤を継続使用。同時に抗菌薬も使用。腎移植1週間後の12月3日の live/injured/dead cell 比率は，live cell が 88%の分布を占めたが，2週間後の12月10日では live cell が 57%まで減少した。以降12月24日退院前の12月21日では live cell はほとんど確認できず，live/injured/dead cell 比率では injured cell が著増した。

考察

Live/dead 染色した尿中酵母真菌細胞の存在様式を，直接フローサイトメトリ法で解析する技術の確立によって，live/injured/dead

cell の細胞群を定量的に測定することが可能となった。この技術を応用して，患者の臨床的背景と比較検討することで，尿中酵母真菌細胞の存在様式が患者の臨床病態や，薬剤治療による影響の程度を評価することが出来た。重篤で，治療経過が長くなる病態が目立つ免疫低下を疑う患者群では，live cell 群の比率が高く，免疫低下を疑わない患者群では injured cell 群の比率が高い傾向がみられた。両群間で dead cell 群の比率は低く，生体内の酵母真菌細胞の存在様式は，vitality に富んだ live cell と viability を残した injured cell の間を患者の病態や，治療に使用する薬剤から及ぼされる影響により変動していることが示唆された。尿中酵母真菌の存在様式を評価することが，患者の治療効果や，病態の改善あるいは悪化を反映する指標となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 17 件）

① Millet j., Shiohira M. C., Yamane N., Mokrousov I., Rastogi N. High-resolution MIRU-VNTRs typing reveals the unique nature of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Okinawa, Japan. Infect. Genet. Evol. 査読有 12 2011 637-641

〔学会発表〕（計 22 件）

①潮平知佳，渡嘉敷良乃，東上里康司，山根誠久；Live/Dead 染色を用いたフローサイトメトリ法での尿中酵母真菌細胞の解析；第 57 回日本臨床検査医学会；2010 年 9 月 22 日；東京京王プラザホテル

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hosp.u-ryukyu.ac.jp/lab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山根 誠久 (YAMANE NOBUHISA)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80125682

(2)研究分担者

潮平 知佳 (SHIOHIRA CHIKA)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50325833

東上里 康司 (HIGASHIUESATO YASUSHI)
琉球大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80381226