

## 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6月18日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22659086

研究課題名（和文）

揮発性有機化合物を指標とした真菌感染症の早期診断法の開発

研究課題名（英文）

Development of early diagnostic method for Deep mycoses by monitoring volatile organic compounds

研究代表者

岩口伸一（Iwaguchi, Shin-ichi）

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：40263420

研究成果の概要（和文）：

深在性真菌症の発症に伴い、宿主の呼気中に見いだされる揮発性有機化合物（VOCs：Volatile Organic Compounds）を特定し、真菌感染症の早期診断、感染のモニタリングなどの指標として有効であるかどうかについて検討を加えた。*Aspergillus fumigatus*動物感染モデルを構築し、呼気採取のための装置を作成した。マウスの呼気はSPMEフィールドサンプラーで捕集し、ガスクロマトグラフィー質量分析計により揮発性有機化合物を同定した。マウス容器内から排出されたVOCとして、2-ethyl-1-decanol、2,3,6-trimethyl-octane、Isothiocyanatocyclohexane、1,4-Methanoazulene (Longifolene)が見つかったが、感染マウスと感染していないマウスから採取した気体成分のTICクロマトグラムには、明らかな違いを確認することはできなかった。今後、感染条件を再検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the availability of VOCs (volatile organic compounds) as the biomarker during the pulmonary invasive aspergillosis in murine infection model. We established the murine infection model and developed the apparatus for trapping of VOCs in murine breath. The detection of VOCs was performed by the SPME (solid phase microextraction)/GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) method. Although we found several VOCs (2-ethyl-1-decanol、2,3,6-trimethyl-octane、Isothiocyanatocyclohexane、1,4-Methanoazulene (Longifolene)) in mouse chamber, there is no significant difference in TIC chromatograph between healthy and infected mouse. Thus we must reconsider the method for fungal infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：診断、真菌感染症

## 1. 研究開始当初の背景

真菌感染症は表在性と深在性の感染状態をとり、表在性真菌症では感染部位が限定され、診断・治療も比較的容易であり重篤に至ることも少ない。これに対し深在性真菌症では診断方法が限られている上に、早期に検出することは非常に困難であり、治療も難しい。特に、免疫力の低下した患者において発症した場合には難治性となり、死亡率が高い疾患である。しかしながら、深在性真菌感染症を早期に診断できる有効な方法はほとんどないのが現状である。深在性真菌感染症の起原菌の多くはありふれた環境真菌であり、菌の存在が直ちに感染症の発症に結びつくわけではない。宿主の防衛能力が病原真菌の能力を上回ったとき感染が成立する。真菌感染症の検出は、培養検査、鏡検、病組織学的検査を経て確定診断されるが、時間がかかる上に検査方法についての習熟が要求される。また、遺伝子診断法では菌種の特定は困難で、その高い精度ゆえに擬陽性の可能性も大きい。

真菌から放出される二次代謝産物であるMVOCsには1-octen-3-ol、3-octanolのようにカビに普遍的に見られるものと、属や種に特異的にみられるものが知られている。これまでMVOCsは専ら屋内環境の整備あるいは食品汚染の観点から行われるものが多く、真菌感染の過程で放出されるMVOCsについての知見は非常に乏しい。真菌の放出するMVOCsは属や種間で差があり、増殖過程において異なる分子種が検出されることは我々の研究からも明らかとなっている。MVOCs種を使ったアスペルギルス症の診断の試みも行われている

(Syhreら、2008)。我々は、*A. fumigatus*を用いてMVOCsの検出を行い、出芽開始時期

に現れるもの(2-Ethyl-1-hexanol)や孢子形成時に多く分泌されるもの(セスキテルペンなど)を検出しており、感染の成立過程においても宿主応答に反応した形態的、生理的に変化に伴いMVOCs種が変化することが予想された。Syhreらの検出した2-Pentylfuranは我々の系では検出されていない。

病原性真菌の増殖過程、宿主応答に対する菌の反応を経時的にモニタリングすることは従来の方法では不可能であったが、本研究で使用する非常に微量なMVOCsを検出できる固相マイクロ抽出-ガスクロマトグラフィー質量分析(SPME-GC/MS)法では、*in vitro*での培養実験だけでなく、動物感染実験モデル(*in vivo*)においてモニタリングができる感染の成立過程における宿主応答に反応した病原真菌の形態的、生理的な変化をMVOCs種の変化として捉えることが可能となれば、真菌感染を早期に発見できる新たな診断方法として大きく期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、「揮発性有機化合物を指標とした真菌感染症の早期診断法の開発」というテーマで、深在性真菌症の起原菌が宿主への感染過程、宿主応答に対して放出する微生物由来揮発性の低分子化合物(MVOCs: Microbial Volatile Organic Compounds)あるいは真菌感染に応じて宿主が放出するVOCs(Volatile Organic Compounds)を特定し、真菌感染症の早期診断、感染のモニタリングなどの指標としてMVOCsあるいはVOCsが有効であるかどうかについて検討を加えることを目的としており、従来とは異なる新たな診断方法の開発を目指している。

カビをはじめとする微生物からは多様な二次代謝産物が放出される。分子量が200程度までのものは微生物由来揮発性物質 (MVOCs) と呼ばれ、微生物の種類に特有なMVOCs が分泌されていることが、Fischer ら (1999) によってアスペルギルス属やペニシリウム属の真菌で報告されて以来、菌の分類同定法への応用の観点から多くの研究報告がなされてきた。MVOCs は、カビに普遍的にみられる 3-methyl-1-butanol, 1-octen-3-ol のほか、さらに種特異的にみられる多数の物質群に分けられる。

病原真菌による感染現象の成立過程では、宿主応答に反応した形態的、生理的に変化に伴い MVOCs 種が変化することが予想される。また、宿主においても真菌感染に応じて呼気中に放出される VOCs の種類が変化することが予想される。本研究課題では、深在性真菌症 (アスペルギルス症) の代表的菌種を用いて、エアーを循環させて MVOCs あるいは VOCs を検出するための実験装置を作成し、感染と宿主応答時に特異的に放出される MVOCs あるいは VOCs を特定し、その存在を指標として真菌感染症の早期診断への利用の可能性について検討することを目的としている。

### 3. 研究の方法

深在性真菌感染症 (アスペルギルス症) の起因菌である *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) について、培養の段階ごとに経時的にサンプリングを実施し、生育段階で放出される MVOCs の検出を行っている。そして培養初期で検出されるもの (Heptanal) や孢子形成時に多く分泌されるもの (セスキテルペンなど) を特定した。すでに *A. fumigatus* 株では培養条件下での放出される MVOCs 種については基礎データが得られているため、動物実験において感染時に特異的に放出される MVOCs を特定することが可能となる。そこで、*A. fumigatus* に絞って、真菌感染時に

放出される MVOCs の検出を動物感染実験モデル (マウス) を用いて行った。アスペルギルス症は宿主免疫力の一時的あるいは慢性的な低下により引き起こされる。そこで、免疫抑制剤 (シクロフォスファミド) の投与により易感染状態にした動物感染実験モデルを構築した。

#### (1) 呼気採取装置の作成

動物感染実験モデル (マウス) において、真菌感染時に放出される揮発性有機化合物の検出を行うための装置を作成した。装置からの VOC の放出を避けるために材質は主としてガラス、テフロンを使用した。装置の作成にあたっては、大久保衛氏 (現、エックスレイプレジジョン) に設計、作成を依頼した。活性炭中を通過させた空気を使用し、実験室中からのニオイ成分の除去を行っている。流速計により毎分 50 ml に調節し、マウス固定装置 (テフロン製) に導入し、マウス呼気を SPME フィールドサンプラー (SPELCO) で捕集するというシステムを作成した。なお、栓やチューブ等はテフロン製のものを使用した。

#### (2) 呼気採取条件の検討

作成した装置で呼気中の揮発性有機化合物が計測できるかを確かめるために、健康マウスを使用して呼気の採取条件を検討した。

#### (3) 動物感染実験モデル

アスペルギルス症は宿主免疫力の一時的あるいは慢性的な低下により引き起こされる。そこで、健康なマウスに対して感染させる実験と免疫抑制剤 (シクロフォスファミド) の投与により易感染状態にしたマウスに対する実験を想定して、動物感染実験モデルを構築する。

1. マウス. マウスは Crj:CD-1 (ICR)、雄、5 週齢を使用し、感染させる予定日の 1 週間前に入荷し、入荷時の体重を測定、記録した。個体識別のため、ピクリン酸で印をつけた。
2. 免疫抑制. 免疫抑制剤

(Cyclophosphamide、(10mg/ml)) を菌接種予定日の 4 日前と 1 日前にマウスの体重を

測定し、体重 10g 当たり 0.2ml を腹腔内投与した。

3. 接種菌液の調製. *Aspergillus fumigatus* IFM40808 株を使用した。PD 寒天培地のスラントで 27°C、10 日間培養した後、0.1% Tween80 含有生理食塩水、約 2ml に分生子を懸濁させ、菌数カウントして濃度を算出し、接種したい濃度の菌液を調製した。

4. 麻酔方法. マウスに対して菌を接種する際には、イソフルラン麻酔器で麻酔した。

5. マウスへの菌の接種方法

a. 経鼻接種方法. イソフルラン麻酔後、ピペットで 25  $\mu$ l 菌液をとり、チップの先端を鼻の中に差し込みゆっくりと接種した。

b. 経気管接種法. イソフルラン麻酔後、マウスを仰向けに台に固定し、皮の部分のみ切開し、気管に平行になるように注射針を刺し、菌液 25  $\mu$ l を接種した。

c. 経口的経気管支接種法. イソフルラン麻酔後、マウスを仰向けに台に固定し、ベニユーラ留置針 24G $\times$ 1 を声門から内針も一緒に気管に挿入し、気管に入ったことが見えたなら内針を抜く。外筒を通して菌液 50  $\mu$ l を接種した。

(4) 揮発性有機化合物のガスクロマトグラフィー質量分析による検出・同定

菌感染2日後のマウス、無感染マウスを呼気採取装置に入れ、2~3時間、呼気を SPME フィールドサンプラー (SPELCO) に捕集した。その後、GC-MS 装置 (島津) に挿入し、呼気を成分について計測、同定した。

(5) 逆培養

呼気採取後のマウスを安楽死させ、肺を摘出し、逆培養を行い、菌が肺に達しているかを確認した。

(6) グロコット染色法

肺組織での菌の存在を確認するために、摘出した肺をパラフィン包埋し、切片を作成し、グロコッ

ト染色法により、菌体を染色した。

4. 研究成果

(1) 呼気採取装置の作成

真菌感染時に放出される MVOCs の検出を動物感染実験モデル (マウス) を用いて行うための装置を作成した (図 1)。装置からの VOC の放出を避けるために材質は主としてガラス、テフロンを使用した。マウスの呼気から MVOCs の採取は固相マイクロ抽出法

(SPME) を用いて行うが、感染実験および呼気の採取は千葉大学真菌医学研究センターで実施し、MVOCs の測定を奈良女子大学で行う。そのため、移動時における VOC の吸着等を極力避けるために SPME 部位を格納できるフィールドサンプラーを使用し、これを設置できるように装置を設計した。

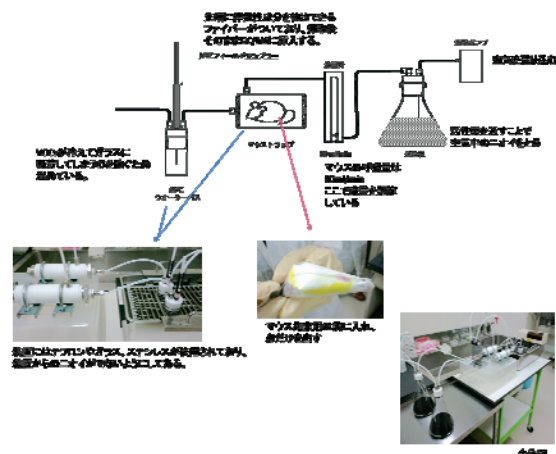


図 1. 呼気採取用装置. 模式図 (上図) および各部位の写真。

まず、装置の有効性を確かめるために、健康マウスを使用して呼気中に含まれる VOC が検出できるかについて実験を行い、呼気を SPME に吸着させる際、装置を 65°C に保温することにより効率的に VOC を検出できることを確認した。

(2) 免疫抑制剤を投与したマウスに濃度の異なる菌液、3 種類の接種方法で接種し逆培養した。経鼻接種法では 22 匹中 3 匹しか肺

から菌が回収できなかったが、経気管接種法、経口的経気管支接種法ではどちらも100%回収できた。また、生存率は経気管接種法では $5 \times 10^6$ CFU/マウスの濃度では、5日経っても死亡せず、 $2 \times 10^7$ CFU/マウスの濃度では感染3日目から死亡するマウスも見られた。 $4 \times 10^7$ CFU/マウスの濃度では、感染日の翌日から死亡するマウスが見られた(図2)。経口的経気管支接種法では $5 \times 10^6$ CFU/マウスの濃度で感染2日目から死亡するマウスが見られ、3日目では多くのマウスが死亡した。経口的経気管支接種法では手術による影響も考えられるため、本研究では経気管接種法により $2 \times 10^7$ CFU/マウスの濃度で実験を行うこととした。

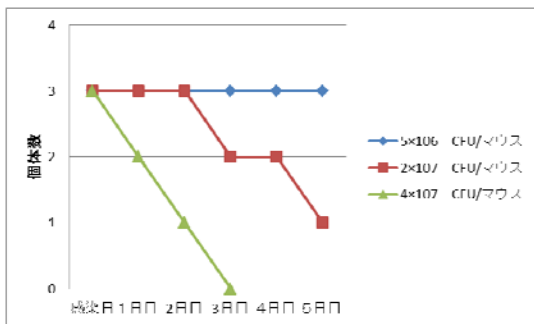


図2. 経気管接種により感染させたマウスの5日までの生存率。

また、グロコット染色法により感染マウスでは菌が肺組織に充満していることが確認できた。

### (3) マウス呼気中の揮発性有機化合物の検出、同定

免疫抑制剤を投与したマウスに *A.*

*fumigatus* 菌液を接種し、感染日から2日目のマウスの呼気を、固相マイクロ抽出法 (SPME法) で3時間採取した。その後、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) によってVOCsを同定した。

マウス容器内から排出されたVOCとして、2-ethyl-1-decanol、2,3,6-trimethyl-octane、Isothiocyanatocyclohexane、1,4-Methanoazulene

(Longifolene)が見つかったが、感染マウスの呼気のみ検出されるVOCsは見いだされなかった。

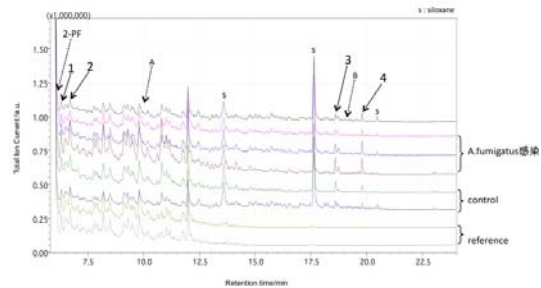


図3. 呼気分析の結果 (TICクロマトグラム) . *A. fumigatus*感染を感染させたマウス (*A. fumigatus*感染)、無感染マウス (control) から採取した呼気的气体クロマトグラフィー質量分析の結果。図中の矢印は同定されたVOCを示している (2-ethyl-1-decanol (1); 2,3,6-trimethyl-octane (2)、Isothiocyanatocyclohexane(3); 1,4-Methanoazulene (Longifolene)(4)。点線矢印はこれまで報告されているVOCsの予想される検出位置を示している (2-Pentyl Furan (2-PF); 2-ethyl-1-hexanol (A); 2-Undecanone (B)。) 縦軸はTIC、横軸は保持時間 (分) を示している。

感染マウスと感染していないマウスから採取した気体成分のTICクロマトグラムには、明らかな違いを確認することはできなかった。TICクロマトグラムの差分をとる必要があるが、今回の採取した気体には、マウスの呼気以外の成分 (マウスの体臭や排泄物からのVOC) などの環境物質がターゲットのマウス呼気量にくらべ多量にあるので、差分に大きな誤差が含まれている可能性がある。2-PFが予想される低分子領域でのバックグラウンドが高くなっており、環境中のVOCの除去が必要と思われる (図3)。

さらにマウスへの感染条件についても再検討が必要である。

細菌感染させたマウスの呼気分析では感染時に検出される VOCs をフィンガープリントとして感染の指標として使用する試みが行われている (Zhu et al., 2013)。この研究では高性能呼吸機能解析システム (flexiVent, SCIreq) 使用されている。アスペルギルス感染マウスにおいてもそのような装置の使用することで呼気分析が可能になるかもしれない。

#### 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 1 件)

1. Takae Takeuchi, Tomoko Kimura, Haruna Tanaka, Sachiyo Kaneko, Shoko Ichii, a Masato Kiuchi and Takahito Suzuki. (2012).

Analysis of volatile metabolites emitted by soil-derived fungi using head space solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry: I. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani* and *Penicillium paneum*. Surf. Interface Anal. 2012, 44, 694–698

[学会発表] (計 8 件)

1. Takahito Suzuki. (2012). Physiological activity of microbial volatile organic compounds (MVOCs) as growth regulators in fungi. JSPS International Scientific Exchange: Joint Seminar between Japan and Hungary. 7月8日、奈良

2. Takae Takeuchi (2012). Analysis of Microbial Volatile Organic Compounds for Conservation Technology of Cultural Heritage. JSPS

International Scientific Exchange: Joint Seminar between Japan and Hungary. 7月8日、奈良

3. 岩口伸一, 横山耕治, 鈴木孝仁. (2012). 病原真菌 *Candida albicans* の核相変換関連遺伝子. 日本医真菌学会. 11月10日、東京

4. Shin-ichi Iwaguchi. (2011). Genomic Instab

ility in medically important fungi, *Candida albicans*. University of Leicester, Microbial Seminar. 11月15日、レスター大学、連合王国

5. Sachiyo Kaneko, Haruna Tanaka, Tomoko Kimura, Takae Takeuchi, Masato Kiuchi, Shin-ichi Iwaguchi, Koji Yokoyama and Takahito Suzuki. (2011). Physiological activity of microbial volatile organic compounds (MVOCs) as a growth regulator in the soil-derived fungal organisms. IUMS (International Union of Microbiological Societies) 2011 congress. 9月10、札幌

6. T. Takeuchi, T. Kimura, H. Tanaka, M. Kiuchi, S. Kaneko, S. Iwaguchi, T. Suzuki. (2010). Characterization of fungi using SPME-GC/MS of MVOCs emitted from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium solani* and *Penicillium paneum*. 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. 6月6日、米国

7. 金子幸代, 田中春菜, 竹内孝江, 木内正人, 岩口伸一, 鈴木孝仁 (2010). カビの他感作用物質としての 2-Pentadecanone. 日本植物学会. 9月9日、名古屋

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩口伸一 (Iwaguchi, Shin-ichi)  
奈良女子大学・自然科学系・准教授  
研究者番号：40263420

(2) 研究分担者

竹内孝江 (Takeuchi, Takae)  
奈良女子大学・自然科学系・准教授  
研究者番号：80201606

鈴木孝仁 (Suzuki, Takahito)  
奈良女子大学・自然科学系・教授  
研究者番号：60144135

(3) 連携研究者

横山耕治 (Yokoyama, Koji)  
千葉大学・真菌医学研究センター・准教授  
研究者番号：80092112