

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：24406032
研究課題名(和文) 中国における高病原性クリプトコックス・ガッティ感染症の浸淫状況に関する調査研究

研究課題名(英文) Analysis on the prevalence situation of highly virulent *Cryptococcus gattii* infection in China

研究代表者
川上 和義 (KAWAKAMI, KAZUYOSHI)
東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10253973
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,400,000円

研究成果の概要(和文)：中国広州市にある中山大学医学部附属第三医院との共同研究により、中国における高病原性クリプトコックス・ガッティ感染の浸淫状況について調査研究を行った。37例のクリプトコックス症患者を登録し、38菌株を分離した。36株は*C. neoformans*、2株は*C. gattii*であり、今回の研究では高病原性クリプトコックス・ガッティ感染の蔓延は観察されなかった。*C. neoformans*について、7遺伝子によるmulti-locus sequence typing (MLST) 解析を行ったところ、32株(88.9%)がsequence type (ST) 5であり、日本や韓国からの報告と同様な結果であった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the prevalence situation of highly virulent *Cryptococcus gattii* infection in Guangzhou City, Guangdong Province, China by collaborating with Department of Respiratory Diseases and Department of Infectious Diseases in the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University. Thirty seven cryptococcosis patients, including thirty five meningitis, one pulmonary cryptococcosis and one cutaneous cryptococcosis, were enrolled, and 38 strains of *Cryptococcus* spp. were isolated. Among them, 36 strains were *C. neoformans*, all of which were classified in VNI, and 2 strains were *C. gattii*, including one VGI and one VGII. Thus, in the present study, prevalence of cryptococcosis caused by *C. gattii* infection was not observed in the south area of China. In addition, we conducted multi-locus sequence typing (MLST) analysis with 7 genetic loci in *C. neoformans*, which found 88.9% of the strains to be in sequence type 5. These data are similar to the reports in Japan and South Korea.

研究分野：感染症内科

キーワード：クリプトコックス・ガッティ 中国 高病原性 遺伝子型

1. 研究開始当初の背景

クリプトコックス症の病原体には *Cryptococcus neoformans* と *C. gattii* があり、わが国ではほとんどが前者による。*C. neoformans* は鳩など鳥類の堆積糞中に存在し、乾燥により舞い上がった酵母を吸入することで感染するが、多くは不顕性に終わりそのまま潜伏感染する。宿主の免疫能が低下した際に内因性再燃し、特にエイズでは高頻度に髄膜脳炎を発症し難治化することが少なくない。

一方、*C. gattii* はユーカリの木に棲息し、コアラなどの動物に感染するとともに、ヒトにおいても呼吸器・中枢神経感染症を引き起こす。*C. gattii* は、その棲息環境から特有な地理的分布を示し、ほとんどがオーストラリア、東南アジアなど熱帯・亜熱帯地域に限られていたが、1999年にカナダのバンクーバー島でアウトブレイクが発生し状況が変わってきた。2007年までにバンクーバーを含むブリティッシュコロンビア州で218例の *C. gattii* 感染症が報告され、それまでオーストラリアでの遺伝子型が VGI であったのと異なり、95%が VGIIa (メジャータイプ)、5%が VGIIb (マイナータイプ) であった。さらに、2004年からは米国ワシントン州、オレゴン州、カリフォルニア州などでも患者がみられるようになり、2010年までに60例が報告されている (MMWR Vol.59, No.28, 2010)。その遺伝子型の多くがバンクーバータイプ VGIIa であり、加えて新たな VGIIc も出現している。*C. neoformans* と異なり、健常者でも中枢神経感染症を発症し、脳内に腫瘤形成 (クリプトコクcoma) を示すことが多く、薬剤耐性傾向が強く、死亡率も20%と高い (高病原性クリプトコックス症)。2007年には、わが国でも、国内感染例と考えられるバンクーバー型 *C. gattii* によるクリプトコックス症例が報告された (Okamoto K et al, Emerg. Infect. Dis. 16: 1155-1157, 2010) ことから、今後新興真菌感

染症として大きな問題に発展する可能性があり、注意深い観察が必要である。

一方、中国は南北に広大な国土を有しており、南部では熱帯・亜熱帯地域が広がっていることから、以前より *C. gattii* VGI の存在は知られていた。しかし、最近、バンクーバーアウトブレイクにおけるマイナータイプ (VGIIb) が検出されたとの報告がなされており (Feng X et al, Wei Sheng Wu Xue Bao 50: 1460-1465, 2010) 今後の動向を注視する必要がでてきた。また、中国において *C. gattii* 感染症の報告はないが、隣国であること、今後も盛んな人的・物的交流が予想されることから、ひとたび中国でアウトブレイクが発生したら、わが国にも大きな影響を及ぼすことは想像に難くない。

このような背景から、将来わが国でも発生が懸念される高病原性クリプトコックス・ガッティ感染症のアウトブレイクに備えて、日本国内だけでなく、近隣国でのサーベイランスが重要になる。

2. 研究の目的

本研究では、中国の、特に亜熱帯地域に位置する広東省広州市を拠点に、1) *C. gattii* 感染症の発生動向を調査することで本真菌の浸淫状況を明らかにすること、2) *C. neoformans* を含めたクリプトコックス症患者からの全菌株について multi-locus sequence typing (MLST) により遺伝子型を解析し日本や韓国からの報告と比較検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、中国南部に位置し、人口約1,200万人と北京、上海に次ぐ第3番目の都市である広東省広州市にある中山大学医学部第三付属病院の呼吸器内科と感染性内科との共同研究を実施した。研究期間内に症例登録したクリプトコックス症の臨床検体から

Cryptococcus 属菌を分離した。菌株から抽出した DNA をもとに、PCR にて *C. neoformans* と *C. gattii* の識別、mating type の確定を行うとともに、*C. neoformans* については CAP59、GPD1、IGS1、LAC1、PLB1、SOD1、URA5 の 7 遺伝子を用いた multi-locus sequence typing (MLST) を行い、各遺伝子の allele type、sequence type、molecular type を決定した。さらに、日本から報告された *C. neoformans* 株 (Mihara T et al. Med. Mycol. 51: 252-260, 2012; Umeyama T et al. Jpn. J. Infect. Dis. 66: 51-55, 2013) との関係について系統樹解析を行った。個々の症例に対しては、患者背景や臨床経過、治療状況について調査を行い、クリプトコックス症の臨床病態について解析を実施した。

4. 研究成果

中国の広東省広州市にある中山大学医学部附属第三医院の呼吸器内科と感染性疾病科を訪問し、クリプトコックス症の患者背景や臨床経過について調査を行った。研究期間内に 37 例のクリプトコックス症患者 (髄膜炎 35 例、肺クリプトコックス症 1 例、皮膚クリプトコックス症 1 例) を研究登録できた。その中で、68% の症例が免疫不全をきたすような基礎疾患を有し、逆に 32% ではそのような基礎疾患を認めなかった。欧米ではクリプトコックス症の重要な基礎疾患として HIV 感染が認識されているが (Sloan DJ, Parris V, Clin. Epidemiol. 6: 169-182, 2014) 本研究で登録された症例では 8% に認められるのみであ

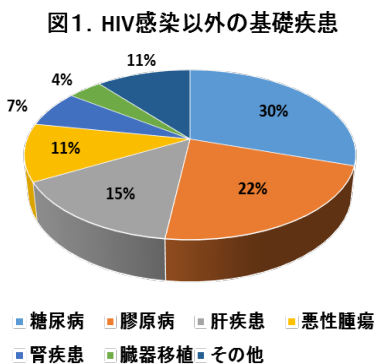


表1. *C. neoformans* の MLST 解析

菌株	遺伝子型							ST
	CAP59	GPD1	IGS1	LAC1	PLB1	SOD1	URA5	
CH1	1	3	1	5	2	1	1	5
CH3	1	3	1	5	2	1	1	5
CH4	1	3	1	5	2	1	1	5
CH5	1	3	1	5	2	1	1	5
CH6	1	3	1	5	2	1	1	5
CH7	1	3	1	5	2	1	1	5
CH9	1	3	1	5	2	1	1	5
CH10	1	3	1	5	2	1	1	5
CH11	1	3	1	5	2	1	1	5
CH12	1	3	1	5	2	1	1	5
CH13	1	3	1	5	2	1	1	5
CH14	1	3	1	5	2	1	1	5
CH15	1	3	1	5	2	1	1	5
CH16	1	3	1	5	2	1	1	5
CH17	1	3	1	5	2	1	1	5
CH18	1	3	1	5	2	1	1	5
CH19	1	3	1	5	2	1	1	5
CH20	1	3	1	5	2	1	1	5
CH21	1	3	1	5	2	1	1	5
CH22	1	3	1	5	2	1	1	5
CH23	1	3	1	5	2	1	1	63
CH24	7	1	1	18	1	1	1	5
CH25	1	3	1	5	2	1	1	5
CH26	1	3	1	5	2	1	1	5
CH28	1	3	1	5	2	1	1	5
CH29	23	3	1	5	2	1	1	310
CH30	1	3	1	5	2	1	1	5
CH31	1	3	1	5	2	1	1	5
CH32	1	3	1	5	2	1	1	5
CH33	1	3	1	5	2	1	5	193
CH34	1	3	1	5	2	1	1	5
CH35	1	3	1	5	2	1	1	5
CH36	1	1	1	3	2	1	5	6
CH37	1	3	1	5	2	1	1	5
CH39	1	3	1	5	2	1	1	5
CH40	1	3	1	5	2	1	1	5

(ST: sequence type)

った。

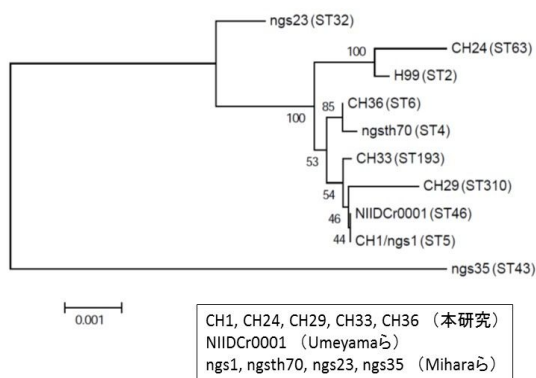
一方、HIV 感染以外の基礎疾患では、糖尿病、膠原病、肝疾患、悪性疾患、腎疾患、臓器移植などがみられた (図 1)。

本研究により、クリプトコックス症患者 37 例から 38 株の菌株が得られ、そのうち 34 株は髄液、2 株は血液、1 株は気管支肺胞洗浄液 (BALF)、1 株は皮膚創部浸出液からの分離であった。菌株から得られた DNA の PCR 解析により、36 株が *C. neoformans*、2 株が *C. gattii* であること、molecular typing では *C. neoformans* のすべてが VNI、*C. gattii* の 1 株が VGI、1 株が VGII であること、得られたすべての菌株で mating type が α であることが判明した。こうして本研究では、広州市及びその周辺という限られた地域ではあるが、現時点では中国での高病原性クリプトコック

ス・ガッティ感染症の蔓延は観察されなかった。

C. neoformans 36 株について 7 遺伝子の MLST 解析を行ったところ、32 株 (88.9%) が sequence type (ST) 5 であり主要な遺伝子型と考えられた。他には、ST6 が 1 株、ST63 が 1 株、ST193 が 1 株、ST310 が 1 株みられた(表 1)。これは、日本や韓国からの報告(それぞれ ST5 が 77.8%、95.7%)(Mihara T et al. Med. Mycol. 51: 252-260, 2012; Park SH et al. Mycobiol. 42: 73-78, 2014)と同様な結果であった。さらに、本研究で得られた *C. neoformans* 株と日本から報告された菌株について系統樹解析を行ったところ、Umeyamaらの報告で 78.5%に検出された ST46 と今回中国で 88.9%にみられた ST5 はほぼ同一と考えられた。また、Mihara らによって報告された ngs1 株は ST5 であり中国の主要株と同一であった。他の菌株でも、ngs35 と ngs23 を除けば中国の菌株と類似していた(図 2)。

図2. 系統樹解析



2014 年 11 月に、中国から 2 人の共同研究者とともに、国内の真菌研究者を仙台に招聘し、輸入真菌感染症フォーラムを開催し、本研究で得られた研究成果とともに、国内外で問題となっている真菌感染症の現状と今後の展望について講演を実施するとともに、今後のさらなる研究協力へ向けた議論を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

T. Zhang, J. Zhu, T. Zong, K. Ishii, K. Kawakami: Cryptococcal infection in China, 輸入真菌感染症フォーラム - クリプトコックス・ガッティ感染症を含めて, 東北大学加齢医学研究所スマートエイジング棟国際会議室(仙台), 2014 年 11 月 21 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 和義 (KAWAKAMI KAZUYOSHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10253973

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石井 恵子 (ISHII KEIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00291253

(4) 研究協力者

張 天托 (ZHANG TIAN TUO)
中山大学・医学部附属第三医院・教授

謝 希峰 (XIE QI FENG)
中山大学・医学部附属第三医院・教授

朱 家馨 (ZHU JIA XIN)
中山大学・医学部附属第三医院・副主任検査技師