

パンデミック真菌カンジダ・アウリスを1時間以内に
検出・診断できる遺伝子診断法を開発・発表

—国内流行に備えた実証試験へ—

帝京大学大学院医学研究科医真菌学（榎村浩一教授）の研究グループは、パンデミック真菌：カンジダ・アウリスを1時間以内に検出・診断できる遺伝子診断法を開発し、米国微生物学会のジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオロジー誌9月号で報告しました。

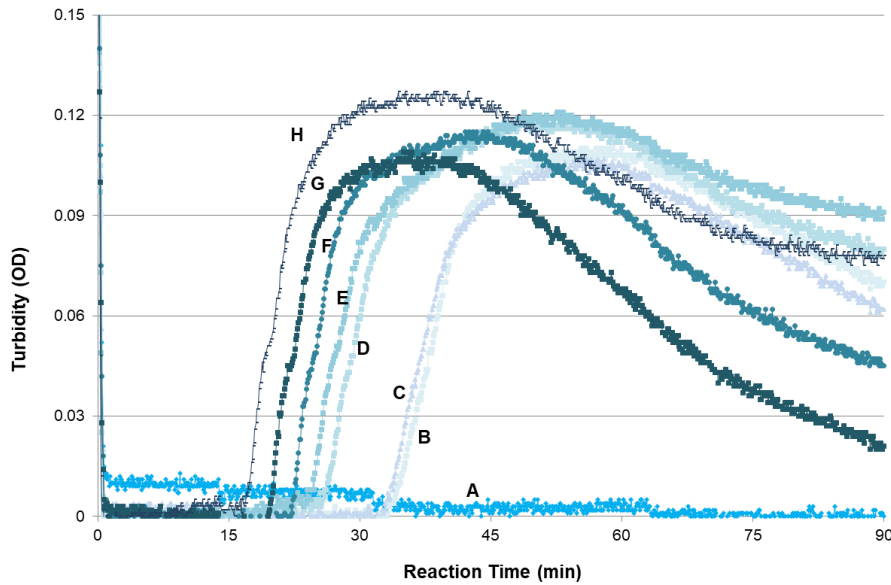
院内感染としてパンデミックを生じている新種の病原真菌カンジダ・アウリスが北米・欧州をはじめとした全世界で問題となっています。この菌は多くの薬剤に耐性（多剤耐性 AMR）である上、病原性・致命率が高いことが知られていますが、限られた高価な機器を使用しなければ感染の診断ができず、有効な対策が取れません。そこで、帝京大学大学院医学研究科医真菌学（榎村浩一教授）の研究グループは、臨床検体、環境サンプル、および分離された菌株から本菌を1時間以内に検出し菌名を特定できる遺伝子診断法を開発し、米国微生物学会のジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオロジー誌9月号（注1）で報告しました。

本研究は、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(AMED)による新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業の支援を得て行われたものであり、海外研究機関の協力の下に流行地における実証試験が予定されています。

開発されたカンジダ・アウリス遺伝子診断法（LAMPauris）の特徴

- LAMPauris は極めて高い感度（プラスミド DNA は2コピー、細胞は10個以上）でカンジダ・アウリスを検出できる（図1, 表1）。
- 主要病原真菌の中でLAMPaurisによって検出されたのはカンジダ・アウリスのみであった。また、通常の検査でカンジダ・アウリスと間違えて判定される菌種は何れもLAMPaurisで検出されなかった（表2）。
- LAMPauris によれば、患者から得られた検体だけではなく、様々な微生物に汚染された院内環境から得られた検体（器具やベットなどを拭いたものなど）からであっても、カンジダ・アウリスの有無を直接調べることが可能（表1）。
- LAMPauris 検査に必要な時間は1時間以内、費用は実費として1検体1000円程度。
- LAMPauris の開発に当たっては、カンジダ・アウリスの全ての遺伝子情報を調べ、本菌にだけ見つかるDNA塩基配列を標的とした。
- 遺伝子増幅法は、日本で開発されたLAMP法（一定の温度で迅速・特異的に標的DNA塩基配列を検出できる）を用いるため、迅速・高感度・高精度であり、検出に必要な機械も安価である。

図1 LAMPaurisの感度（検出下限）



反応の誘型（検出するプラスミドDNA）の量が増えるほど検出に必要な時間は短くなる。この実験ではLAMPauris反応あたり2コピー（2個）のプラスミドがあれば34分で反応結果が得られた。

A: 陰性コントロール(蒸留水；無反応), B: プラスミド2コピー／反応 (反応時間34 分), C: プラスミド20コピー／反応 (反応時間33 分), D: プラスミド200コピー／反応 (反応時間26 分), E: プラスミド 2千コピー／反応 (反応時間24 分), F: プラスミド2万コピー／反応 (反応時間24 分), G: プラスミド2百万コピー／反応 (反応時間22 分), H: プラスミド2億コピー／反応 (反応時間17 分)。

表1 ヒト常在菌または環境菌が混在した模擬環境検体におけるLAMPauris反応

生理的食塩水または 模擬環境検体に 含まれる カンジダ・アウリス細胞数	LAMPauris 反応液に含まれる カンジダ・アウリス 細胞数	平均反応時間(標準偏差)		
		生理的 食塩水	常在・環境 菌混在 パターンA	常在・環境 菌混在 パターンB
10個	0.1個	無反応	無反応	無反応
100個	1個	無反応	無反応	無反応
1千個	10個	29 分 (2.8)	38分 (17)	30分 (2.9)
1万個	100個	22分 (1.6)	21分 (0.8)	22分 (0)
10万個	1千個	19分 (1.4)	20 分 (0.6)	20分 (0)

ヒト常在菌または環境菌が混在した模擬環境検体においても、生理的食塩水中のカンジダ・アウリスと概ね同等の感度で検出が可能であった。

パターンAは、模擬環境検体としてカンジダ・アウリスの他に常在または環境真菌としてアオカビおよび マラセチア各100細胞と、同じく細菌として黄色ブドウ球菌と枯草菌各1千細胞が加えられた。

パターンBは、模擬環境検体としてカンジダ・アウリスの他に常在または環境真菌としてアオカビおよび マラセチア各1千細胞と、同じく細菌として黄色ブドウ球菌と枯草菌各1万細胞が加えられた。

表2 LAMPaurisの特異性

菌種	菌株	LAMPauris 反応
<i>Acremonium curvulum</i>	NBRC32242	—
<i>Aspergillus fumigatus</i>	TIMM0108	—
<i>Aspergillus niger</i>	TIMM0115	—
<i>Candida albicans</i>	LSEM11-828	—
<i>Candida auris</i>	世界各国から集めた20株の<i>Candida auris</i>	+
<i>Candida duobushaemulonii</i>	CBS7799	—
<i>Candida famata</i>	NBRC0083, NBRC0623	—
<i>Candida glabrata</i>	CBS138, NBRC0005	—
<i>Candida guilliermondii</i>	TIMM0257	—
<i>Candida haemulonii</i>	JCM3762	—
<i>Candida krusei</i>	TIMM3378	—
<i>Candida lusitanae</i>	NBRC1019, NBRC10059	—
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC22019	—
<i>Candida pseudoaemulonii</i>	JCM12453	—
<i>Candida sake</i>	NBRC0435	—
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC750, TIMM0313	—
<i>Chaetomium globosum</i>	TSY-0369	—
<i>Cladosporium carrionii</i>	TIMM3048	—
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	TIMM3392	—
<i>Exophiala jeanselmei</i>	TSY-0396	—
<i>Fusarium oxysporum</i>	TSY-0351	—
<i>Fusarium solani</i>	TSY-0403	—
<i>Malassezia furfur</i>	CBS1878 [†] , LSEM51-3422	—
<i>Malassezia restricta</i>	CBS7877	—
<i>Microsporium gypseum</i>	NBRC5948	—
<i>Mucor circinelloides</i>	TIMM3177	—
<i>Paecilomyces variotii</i>	NBRC4855	—
<i>Penicillium citrinum</i>	LSEM34-2305	—
<i>Pseudallescheria boydii</i>	TIMM0886	—
<i>Rhodotorula glutinis</i>	LSEM 20-1447	—
<i>Rhodotorula minuta</i>	TIMM6222	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LSEM 14-1013	—
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	NBRC4843	—
<i>Scopulariopsis brumptii</i>	NBRC6441	—
<i>Scytalidium lignicola</i>	NBRC104988	—
<i>Trichophyton benhamiae</i>	SM103	—
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	TIMM2789	—
<i>Trichophyton rubrum</i>	TIMM2659	—
<i>Trichophyton tonsurans</i>	NBRC5928	—

主要病原真菌の中で調べた限りLAMPaurisに反応したのは世界各国から集めた20株のカンジダ・アウリスのみであった。

通常の検査でカンジダ・アウリスと間違っ判定される菌種を赤字で示したが、何れも反応を認めなかった。

パンデミックを生じているカンジダ・アウリス（パンデミック型）感染症の特徴（注2）

- 院内感染として概ね2013年以降全世界的規模の流行（パンデミック）を引き起こしている。
- 多くは薬剤耐性（AMR）であり、多剤耐性の菌も少なくない（一部の菌にはいかなる薬剤も効かない）。
- 感染症状は敗血症や髄膜炎などを含む全身感染だが、外傷や皮膚などの感染もあり（米国では400名程度）、また皮膚や粘膜に無症状のまま住み着いていることもある（米国では700名程度）。
- 全身感染の致死率は高い（30-60%）。
- 流行地は、米国、欧州、南米、南アフリカ、およびインド等をはじめ全世界。
- カンジダ・アウリスは、患者または健康な人が流行地から他の国に拡散している。
- 中国のアウトブレイク（パンデミック型による院内感染）が今年報告された。

国内におけるカンジダ・アウリス（在来型）感染症

- 日本国内から見つかったカンジダ・アウリス（在来型）はパンデミック型と異なり、薬剤耐性の程度は軽く、病気も引き起こしにくい。
- 感染症としては、外耳道炎から11株が見つかった。
- 今後、国際交流、メディカルツーリズム、および東京オリンピックを背景にパンデミック株が国内に流入し、アウトブレイクを生じる可能性がある。
- 本菌を確実に見つける方法（今回の研究を含む）と、アウトブレイク株と在来株を識別する方法の開発が必要である。

カンジダ・アウリスとは

- カンジダ・アウリス（オーリスと表記されることもある：学名は *Candida auris*）は、2005年(平成17年)に東京で初めて発見され、帝京大学の槇村教授らが2009年(平成21年)に新種として報告した病原真菌（酵母）である（図2、注3）。

図2 培地に発育したカンジダ・アウリスと顕微鏡像



培地（クロモアガー・カンジダ）に発育した
カンジダ・アウリス

カンジダ・アウリス顕微鏡像（1000倍）

（注1） Yamamoto M, Alshahni MM, Tamura T, Satoh K, Iguchi S, Kikuchi K, Mimaki M, Makimura K: Rapid Detection of *Candida auris* Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *J Clin Microbiol*. 2018 Aug 27;56(9). pii: e00591-18. doi: 10.1128/JCM.00591-18. Print 2018 Sep.

(<https://jcm.asm.org/content/early/2018/06/21/JCM.00591-18>)

（注2） 米国疾病管理センター（CDC）カンジダ・アウリス情報：

<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/index.html>

（注3） Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H: *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol*, Jan;53(1):41-4, 2009.

(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x>)