

4. α -GalCerによるクリプトコッカス特異的 Th1細胞の分化誘導

α -GalCerによるTh1細胞誘導活性の有無について調べるために、クリプトコッカス感染マウスから7日目に脾細胞を分離、*in vitro*で種々の濃度のクリプトコッカス抗原と48時培養後の上清中のIFN- γ 濃度を測定した。この際、感染マウスに α -GalCer又はvehicleを感染直後及び3日目に投与し、その影響について検討した。感染マウスにvehicle投与して採取した脾細胞からは、抗原再刺激によりわずかなIFN- γ 産生しか検出されなかったのに対して、 α -GalCer投与マウスでは著明なTh1細胞の分化誘導が観察された。一方、非感染マウスに α -GalCer又はvehicleを投与後採取した脾細胞では全くIFN- γ 産生は認められなかった。

5. α -GalCerによるNK細胞、NKT細胞の増加:

クリプトコッカス感染マウスに、感染直後及び3日目に α -GalCer又はvehicleを投与、3日目及び7日目に脾細胞を採取し、細胞数をカウントした。その一部は、FITC標識抗CD3抗体/PE標識抗B220

抗体、FITC標識抗CD3抗体/PE標識抗CD8抗体、FITC標識抗CD3抗体/PE標識抗NK1.1抗体にて染色後フローサイトメトリーにて解析し、得られた各細胞の割合を細胞数に乗じることで細胞数を計算した。その結果、 α -GalCer投与によってNK細胞及びNKT細胞数の明らかな増加が観察された。一方、T細胞、B細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞数はわずかな増加又は減少を示した。

6. CD4KOマウスにおける α -GalCerの感染防御効果

エイズ患者のようにCD4+T細胞数が極度に減少した患者における α -GalCerの感染防御効果の有無についてCD4KOマウスを用いて実験的に検討した。CD4KO又は野生型マウスにクリプトコッカスを感染させ、感染直後及び3日後に α -GalCer又はvehicleを投与し、7日後の肺及び脾臓内生菌数を調べた。その結果、CD4KOマウスにおいても野生型と同様に α -GalCerによる感染防御効果が観察された(図4)。

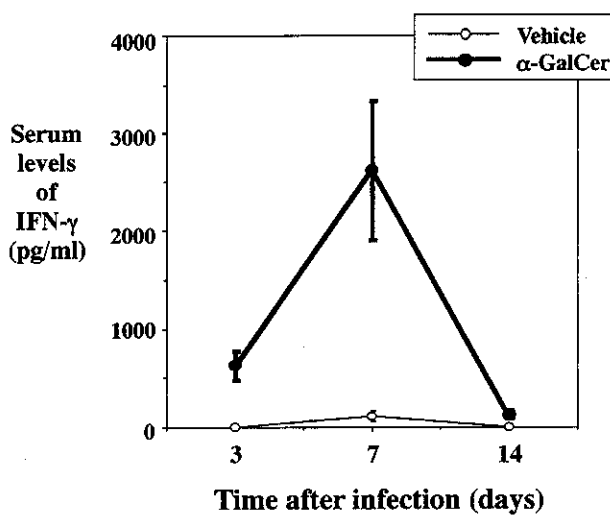


図3 α -GalCerによるIFN- γ 産生誘導

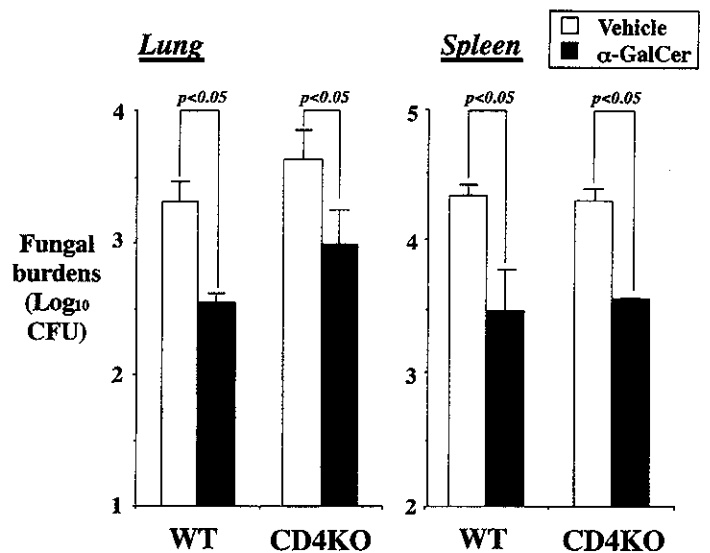


図4 CD4KOマウスにおける α -GalCerの効果

考察と結論

HIV感染者では、末梢血のCD4+T細胞数の減少に伴って種々の日和見感染症を発症する。特に、CD4+T細胞が200/ μ l以下になると高頻度に日和見感染症を合併するが、中には50/ μ l以下になっても明かな日和見感染症を起ささない症例もみられる。その原因については未だ明かではないが、CD4+T細胞以外のリンパ球が低下したヘルパー細胞の機能を代償している可能性が考えられる。その中には、CD8+T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞、NKT細胞などが含まれる。CD8+T細胞はCD4+T細胞と同様にIFN- γ を産生するTc1細胞とIL-4を主に産生するTc2細胞に分かれることが知られている⁷⁾。これまでの報告では、CD8+T細胞はHIV感染の後期まではその数が保たれているが、末期になると減少し日和見感染症の頻度が増加する。一方、末梢血の $\gamma\delta$ T細胞についてはむしろ増加^{8,9)}、NK細胞はその数及び機能ともに低下する^{10,11)}との報告が多くみられる。しかし、HIV感染者におけるNKT細胞の挙動については未だ報告がみられない。

T細胞とNK細胞の特長を合わせ持つNKT細胞は、T細胞、B細胞、NK細胞に次ぐ第4のリンパ球といわれており、大きな特長として抗原受容体のレパートリーが極めて乏しいことが知られている。マウスでは、V α 14/V β 8、7、3のみ、ヒトではV α 24/V β 11のみから構成されている⁴⁾。最近、これらの抗原受容体を持つNKT細胞が樹状細胞上のCD1dに結合した糖脂質である α -GalCerを認識することが報告され注目を集めている⁵⁾。さらには、 α -GalCerをパルスされた樹状細胞をメラノーマの担癌マウスに戻してやると著明な抗腫瘍効果を発揮することが見出され、新たな癌治療薬として大いに期待されている⁶⁾。その効果は、直接NKT細胞の抗腫瘍活性の誘導を介したものと、NKT細胞からのIFN- γ のようなサイトカイン産生を介したものが明らかにされつつある。後者のサイトカインを介した免疫調節作用は、 α -GalCerが腫瘍免疫のみならず感染免疫においても有効である可能性を示唆している。

本研究はこの様な背景をもとに開始されたが、今年度はエイズに合併する重要な日和見感染真菌

であるクリプトコッカスの動物感染モデルに対して α -GalCerが明かな感染防御効果を示すことが明らかになった。この効果はIFN- γ 産生とよく相関しており、実際 α -GalCerの投与によってクリプトコッカスに特異的なTh1細胞が誘導されること、さらには感染早期においてはNK細胞からのIFN- γ 産生が誘導されることと一致していた。これらの結果から、 α -GalCerがクリプトコッカス感染においてTh1-Th2サイトカインバランスをTh1側にシフトすることによって効いている可能性が示唆された。エイズ患者では免疫系のTh1-Th2バランスがTh2側にシフトしているとの報告もみられ¹²⁾、そのためにもクリプトコッカス感染が重篤化しやすいとも考えられる。

ニューモシスチスカリニ、非定型抗酸菌、トキソプラズマなどエイズに合併する多くの日和見病原微生物は、クリプトコッカスと同様にその感染防御にTh1型のサイトカイン反応を必要とすることがよく知られている。このことから α -GalCerがクリプトコッカスのみならず広くエイズに合併する日和見感染症に対しても有効である可能性があり、これらの感染症についてもさらに動物モデルを用いて解析する必要があるものと考えられる。

エイズ患者では末期になると末梢血中のCD4+T細胞数が極度に減少するため、このような状態の中で α -GalCerがその効果を発揮できうるか疑問が残る。そこで、CD4+T細胞を欠損したCD4KOマウスにおいて α -GalCerが感染防御効果を示しうるか検討してみた。その結果、これらのマウスでも野生型マウスと同様にクリプトコッカス感染に対して明かな感染防御効果を示したことから、 α -GalCerがCD8+T細胞あるいはその他の非CD4+リンパ球に強力に働くことでCD4+T細胞の存在をバイパス出来る可能性を示唆しており、エイズ患者への臨床応用の可能性を考える上では極めて興味深い。

これまで動物実験を重ねる中で、 α -GalCerによる副作用は観察しておらず、IFN- γ やIL-12そのものを投与するサイトカイン療法に対して比較的 safely 使用できる可能性が期待される。これまでに報告された多くの免疫療法は、効果の不十分さ、作用機序の不明確さ、あるいは効果は強くてもその副作用のために臨床応用が阻まれてきた。今

後、 α -GalCerが難治性感染症の治療に有効に使用されるためには、その投与によって生体内で起こる様々な反応を動物モデルを用いてさらに詳細に解析していくことが重要であると考えられる。

参考文献

- 1) Hill, J. O., and A. G. Harmsen. 1991. Intrapulmonary growth and dissemination of an avirulent strain of *Cryptococcus neoformans* in mice depleted of CD4+ or CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173: 755-758.
- 2) Huffnagle, G. B., J. L. Yates, and M. F. Lipscomb. 1991. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173: 793-800.
- 3) Mody, C. H., M. F. Lipscomb, N. E. Street, and G. B. Toews. 1990. Depletion of CD4+ (L3T4+) lymphocytes *in vivo* impairs murine host defence to *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 144: 1472-1477.
- 4) 河野 鐵, 谷口 克: 第4のリンパ球系列-NKT細胞の機能 最新医学 1999; 54: 2352-2359.
- 5) Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, et al.: CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278: 1626-1629.
- 6) Toura, I, T. Kawano, Y. Akutsu, et al.: Inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with α -galactosylceramide. *J. Immunol.* 1999; 163: 2387-2391.
- 7) Sad, S., R. Marcotte, and T. R. Mosmann.: Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995; 2: 271-279.
- 8) DePaoli, P., D. Gennari, P. Martelli, et al.: A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1991; 83: 187-191.
- 9) Boullier, S., G. Dadaglio, A. Lafeuillade, et al.: V delta 1 T cells expanded in the blood throughout HIV infection display a cytotoxic activity and are primed for TNF-alpha and IFN-gamma production but are not selected in lymph nodes. *J. Immunol.* 1997; 159: 3629-3637.
- 10) Ullum, H., P. C. Gotzsche, J. Victor, et al.: Defective natural immunity: an early manifestation of human immunodeficiency virus infection. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 789-799.
- 11) Sepulveda, C., J. Puente, C. Weinstein, et al.: Enhancement of natural killer cell activity in HIV-1-infected subjects by a mixture of the calcium ionophore A23187 and the phorbol ester TPA: lack of response to a similar challenge with interleukin-2 or alpha-interferon. *Am. J. Ther.* 1997; 4: 413-421.
- 12) Clerici, M., and G. M. Shearer: A Th1 \rightarrow Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* 1993; 14: 107-111.



クリプトコッカス症に対するIFN- γ 誘導 サイトカインを用いた免疫療法の基礎的検討

川上 和義、高口 善信、金城 雄樹、屋良さとみ、齋藤 厚

琉球大学医学部 第一内科

研究要旨

クリプトコッカス症は、エイズのように極度に細胞性免疫能が低下した症例では高頻度に中枢神経系への播種性感染をきたすとともに治療に難渋することも少なくない。また、抗真菌剤による治療が成功した症例でも長期間の予防投与を必要とする場合が多く、有効な免疫療法の開発が望まれている。我々は、マウスクリプトコッカス感染モデルを用いて感染防御機構の解析を行ってきたが、今回はIL-12、IL-18遺伝子を欠損したマウスを用いることによってこれらサイトカインの役割について検討した。その結果、これらサイトカインはともにクリプトコッカス感染防御に必須であり、特にIL-12がより重要な役割を担っていることが明らかになった。さらに、IL-12とIL-18は致死感染モデルに対して治療効果を示し、両サイトカインを併用するとそれぞれ至適濃度よりも少ない量で有意な感染防御効果を示した。これらの結果から、IL-12とIL-18は単独又は併用でエイズに合併する難治性クリプトコッカス感染症に対して臨床応用できる可能性が示唆された。しかし、今回の検討でも両サイトカインを感染マウスに併用投与することによりカヘキシアが認められ今後克服すべき課題と考えられた。

分担研究者：齋藤 厚

研究協力者：川上和義、高口善信、金城雄樹、屋良さとみ

A basic approach for immunotherapy with IFN- γ -inducing cytokines against intractable cryptococcosis

Kazuyoshi Kawakami, Yoshinobu Koguchi, Yuki Kinjo, Satomi Yara and Atsushi Saito

The First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

目 的

真菌はエイズ患者に最も高頻度に合併する日和見病原微生物とされている。その中でクリプトコッカス症はそれほど多くはないが、高頻度に中枢神経系など全身に播種性感染を起こし、また抗真菌剤による化学療法に抵抗性を示ししばしば治療に難渋することからエイズ患者においては重要な合併真菌感染症のひとつである。

Cryptococcus neoformans (Cn) に対する感染防御は主として細胞性免疫によって担われている。特に CD4 陽性 T 細胞が重要であり、エイズ患者に合併しやすいことから容易に想像できる。動物実験では、抗体を用いて CD4 陽性 T 細胞を除去することによって肺内生菌数の増加、脳への播種性感染の悪化、生存率の低下が観察されている¹⁻³⁾。

近年、ヘルパー T (Th) 細胞はそのサイトカイン産生パターンに応じて 1 型 (Th1) 及び 2 型 (Th2) 細胞に分類されている。IL-2、IFN- γ 、TNF- β を産生する Th1 細胞は細胞性免疫の成立に重要であり、結核菌など細胞性増殖細菌に対する感染防御に中心的な役割を担っていることが知られている。一方、IL-4、-10、-13 を産生する Th2 細胞はアレルギーの成立に重要であるが、Th1 サイトカインを抑制することで感染防御には拮抗的に働く。こうして、種々の病原微生物に対する感染防御が Th1-Th2 サイトカインバランスによって巧妙に調節されていることが明らかになりつつある⁴⁾。

Th1 細胞の分化誘導には、マクロファージや樹状細胞から産生される IL-12、IL-18 が重要な役割を担う。IL-12 は必須のサイトカインであるが、IL-18 は単独で Th1 細胞の分化を誘導できないが、IL-12 の作用を相乗的に増強するとの報告もみられる。さらには、これらサイトカインの感染防御における重要性も明らかにされつつある^{5,6)}。

本研究では、クリプトコッカス感染防御における IL-12、IL-18 の役割を明らかにする目的で、それぞれの遺伝子欠損動物を用い肺内感染に及ぼす影響について解析した。そしてさらに、得られた知見に基づき致死感染モデルに対して両サイトカインを用いた免疫療法を試み、併せてその作用機序についても解析した。

方 法

1. マウス

7~15 週齢の IL-12p40 (Jackson Laboratory、米国)、IL-18 (大阪大学微生物病研究所癌抑制遺伝子研究分野 審良静男教授より分与)、IFN- γ (東京大学医科学研究所 岩倉洋一郎教授より分与) 遺伝子欠損 (IL-12KO、IL-18KO、GKO) マウスを用いた。IL-12KO と IL-18KO マウスを交配させることにより両サイトカインの遺伝子を欠損した IL-12/IL-18KO マウスを得た。野生型コントロールとして遺伝子背景が同一の C57BL/6 マウス (SLC Japan、浜松) を用いた。実験によっては、7~9 週齢雌の (Balb/cxDBA-2)F1 マウスを用いた。マウスは全て SPF 環境下で飼育し、感染実験は P2 から P3 レベルで行った。本研究で行った動物実験は、あらかじめ琉球大学動物実験委員会の承認を得ている。また各種遺伝子欠損マウスを用いた実験は、あらかじめ琉球大学遺伝子実験委員会の承認を得ている。

2. *C. neoformans*

長崎大学第二内科で樹立された臨床分離株 YC-11 または YC-13 (河野 茂教授より供与) を使用した。YC-11 はマウスに致死性感染を起こし、YC-13 は感染後速やかに排除される。

3. マウスクリプトコッカス肺感染モデルの作成

マウスの気管内に Cn YC-13 株 (1×10^6 CFU) を接種しマウスクリプトコッカス肺感染モデルを作成した。このマウスは感染後から経時的な真菌の排除がみられ中枢神経系への播種性感染をほとんど認めない。実験によっては、マウスの気管内に Cn YC-11 株 (1×10^5 CFU) を接種した。このマウスでは、感染後から肺内真菌の著明増加がみられ、3 週間には明らかな脳播種をきたして 6 週までに全例が死亡した。

4. 肺及び脳内生菌数の測定:

Cn 感染後経時的に肺及び脳を摘出、ホモジナイズの後蒸留水で適当に希釈してその 100 μ l を PDA 培地に接種し 2~3 日後コロニー数を調べ希釈倍率を乗じて各臓器内の生菌数とした。

5. 血清及びBALFサイトカイン濃度の測定:

血清又はBALF中のIFN- γ (Endogen社、米国)、IL-12p40 (Genzyme社、米国)、IL-18 (MBL社、群馬)、IL-4 (Endogen社)及びIL-13 (R&D社、米国)はELISAキットを用いて測定した。実験によっては、血清中のレプチン濃度も同様に測定した(ELISAキットはR&D社より購入)。

6. 抗体

抗IL-18抗体は、マウスリコンビナントIL-18でウサギを免疫して得られた血清からIgGを精製した。50 μ g/mlの抗IL-18抗体は50ng/mlのIL-18の活性を完全に中和した。

7. 抗体による内因性IL-18活性の阻害

内因性に産生されたIL-18の生物活性を中和するために抗IL-18抗体を感染前1日前、感染当日、感染3、7日後に腹腔内に投与した。

8. IL-12、IL-18を用いたサイトカイン療法

リコンビナントマウスIL-12 (0.1 μ g/mouse)又はIL-18 (10 μ g/mouse)をYC-11感染直後より1週間連日腹腔内に接種し、感染3週後の肺及び脳内菌数、そして生存率を調べ治療の有効性を評価した。また実験によっては、至適下量のリコンビナントマ

ウスIL-12 (0.005 μ g/mouse)、IL-18 (2 μ g/mouse)を感染直後より単独又は併用して1週間連日腹腔内に接種し、感染マウスの生存率及び3週後の肺及び脳内生菌数を調べ治療の有効性を評価した。

9. 統計学的解析

統計学的解析はStatview II softwareを用いて行った。群間の比較にはFischer PLSD test、生存率の比較にはgeneralized Wilcoxon testを用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

成果

1. Cn感染防御におけるIL-12、IL-18の役割

Cn感染防御におけるIL-12及びIL-18の役割を明らかにするために、IL-12KO、IL-18KOマウスを用いてYC-13感染3週後の肺及び脳内生菌数調べた。IL-12KOマウスでは、YC-13感染に対して肺内での真菌排除の遅延にみられるような感染防御能の低下が観察された(図1A)。さらに、これまで全く脳内への播種性感染を認めなかったYC-13が明らかに脳内に検出されるようになっており、IL-12遺伝子欠損によってCnの肺から脳への播種抑制機構に破綻が生じている可能性が考えられた(図1B)。

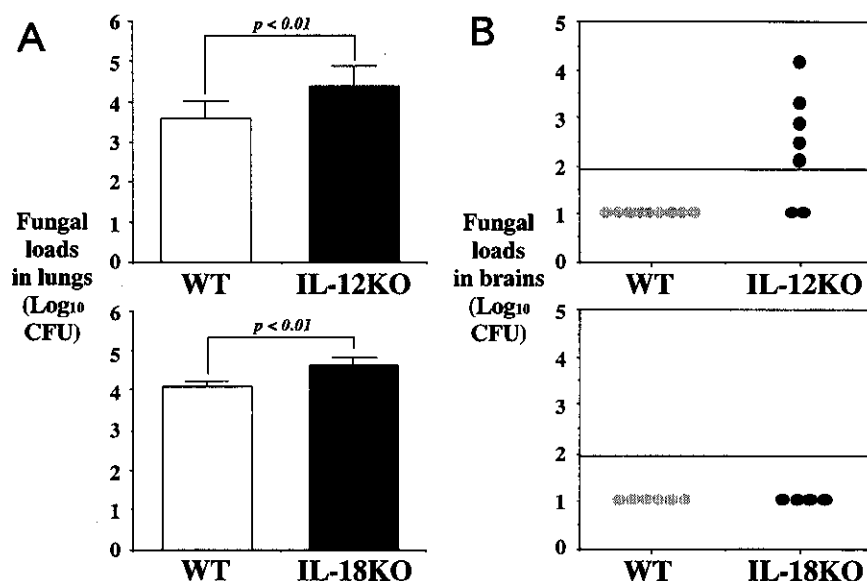


図1 クリプトコッカス感染防御におけるIL-12、IL-18の役割

一方、IL-18KO マウスでは、YC-13 感染 3 週後の肺内生菌数が野生型マウスと比べ有意に増加していたが、IL-12KO マウスと比較するとその程度は軽度であった。また、IL-12KO マウスと異なり IL-18KO マウスでは脳への明らかな播種性感染は認めなかった。

2. Cn 感染防御における IL-18 の意義

上記の結果からは Cn 感染防御における IL-18 の役割が IL-12 ほどには明確ではなかったため、さらに詳細に解析する目的で IL-12KO マウスに抗 IL-18 中和抗体を投与することによって IL-12KO マウスで認められた免疫不全がさらに悪化するかどうかを検討した。図 2A に示すように、IL-12KO

マウスでは野生型マウスに比べ感染 3 週後の肺内生菌数が有意に増加したが、抗 IL-18 抗体を投与すると真菌排除のさらなる遅延が観察された。脳内生菌数においても同様な結果が得られた(図 2B)。

さらに、IL-12KO、IL-18KO、IL-12/IL-18KO、GKO マウスを用いて YC-13 感染 3 週後の肺内生菌数を調べ比較検討した。図 3 に示すように、IL-12KO、IL-18KO マウスでは野生型マウスに比べ有意な菌数の増加がみられたが、やはりその程度は IL-12KO マウスの方が大きかった。IL-12/IL-18KO マウスでは、それぞれ単独の遺伝子欠損マウスよりも肺内生菌数のさらなる増加が観察され、その程度は GKO マウスと同様であった。

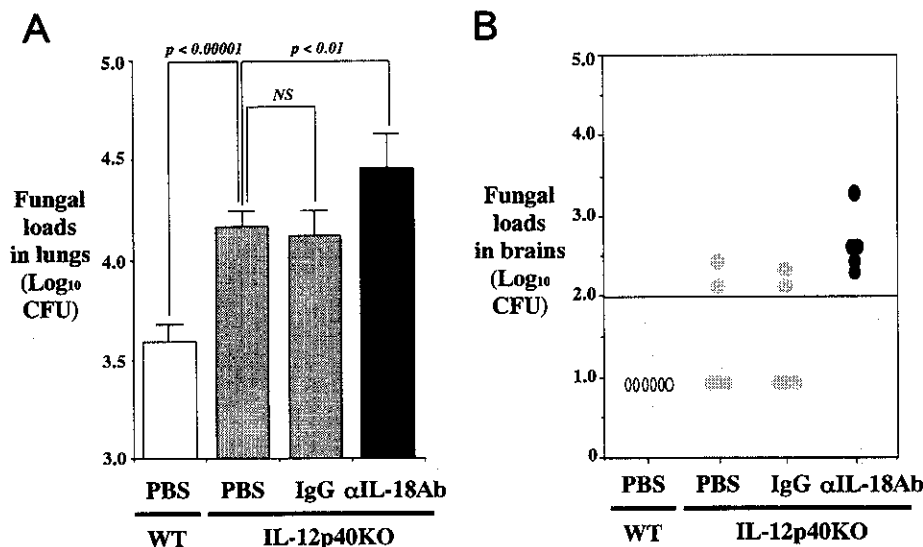


図 1 クリプトコッカス感染防御における抗 IL-18 抗体の影響

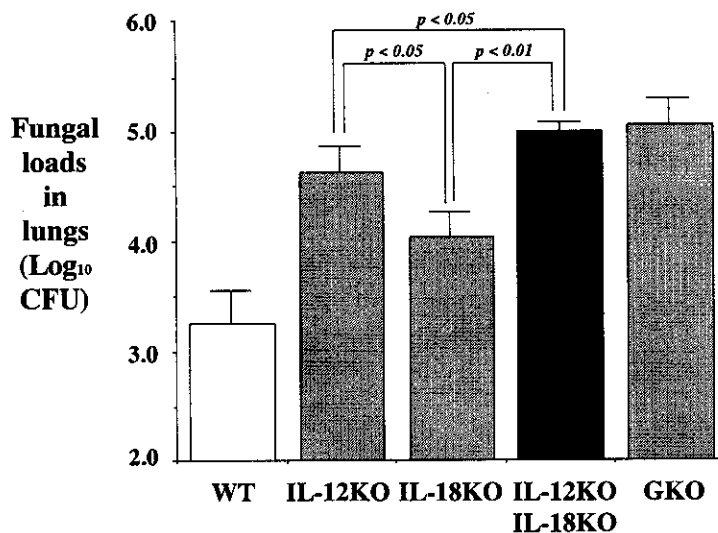


図 3 クリプトコッカス感染防御における IL-18 の意義

3. 血清サイトカインの解析

IL-12KO、IL-18KO マウスにおいてYC-13 感染後の血清Th1型サイトカイン(IFN- γ 、IL-12p40、IL-18)及びTh2サイトカイン(IL-4、IL-13)濃度を経時的に調べた。両系統のマウスとも野生型マウスと比較して血清 IFN- γ 、IL-12p40、IL-18 濃度が有意に低下しており、その程度はIL-12KOマウスにおいてより著明であった(図4A)。一方、Th2サイトカインについては明かな傾向は認めなかった(図4B)。

4. IL-12、IL-18の感染防御効果:

YC-11 を感染させたマウスに、それぞれ0.1 μ g/マウス、10 μ g/マウスのIL-12、IL-18を感染直後から1週間投与したところ、ともに生存期間の有意な延長が認められた。その効果はIL-12においてより著明であった。肺及び脳内生菌数を調べると、サイトカイン投与群では無治療群に比べ感染3週後で有意な菌数の減少が認められた(図5、図6)。

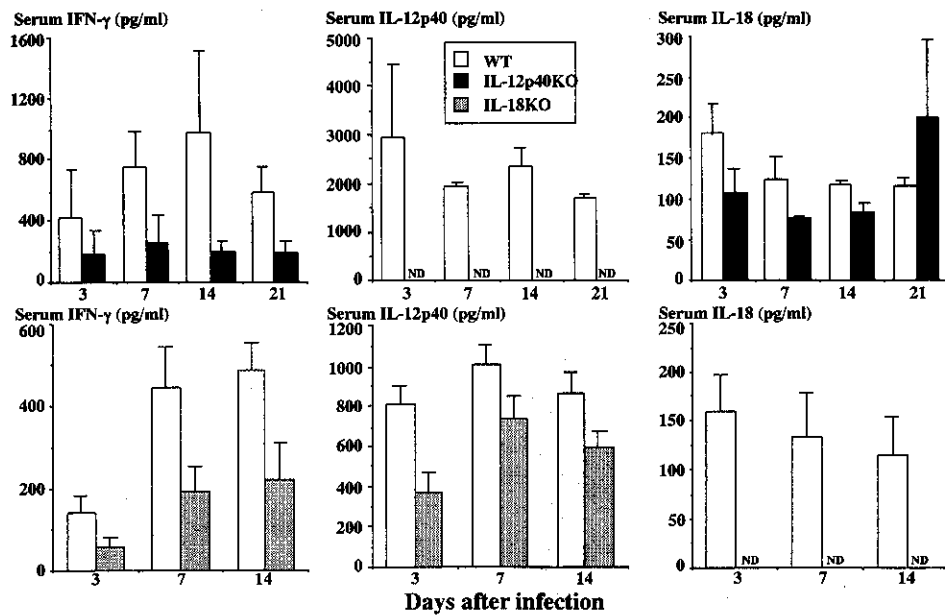


図4 血清Th1タイプサイトカインの経時的变化

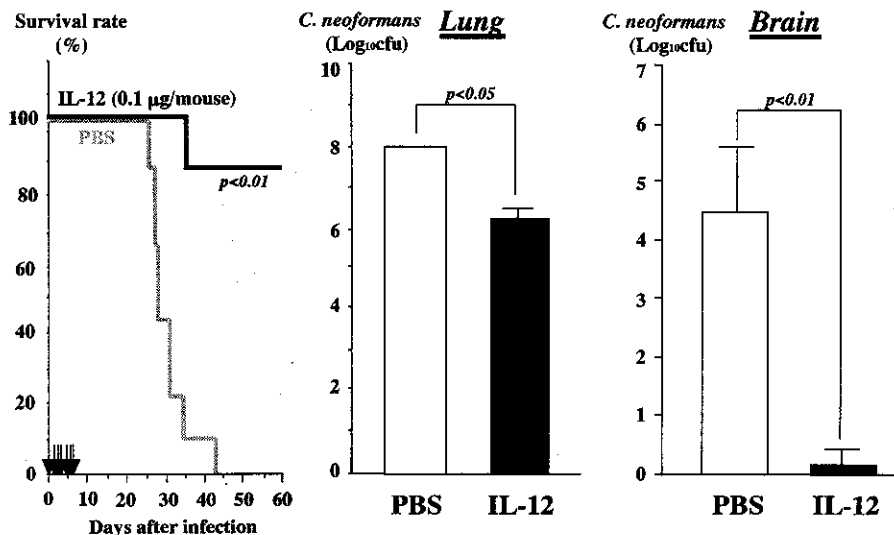


図5 IL-12の感染防御効果

5. IL-12とIL-18による併用治療効果

YC-11 感染マウスは、無治療群では感染後4週以内に全例が死亡したのに対して、IL-12、IL-18の少量単独投与群(それぞれ0.005 μ g/マウス、2 μ g/マウス)ではほとんど生存延長効果はみられなかった。しかし、両サイトカインを併用して投与すると感染マウスの生存期間が著明に延長した。また、同様の効果が肺及び脳内生菌数についても観察され、IL-12、IL-18の少量単独投与では肺及び脳内生菌数はPBS投与群とほとんど変わらなかったが、両サイトカインの併用により有意な生菌数の減少がみられた(図7)。

の減少がみられた(図7)。

6. IL-12とIL-18投与による肺内Th1-Th2サイトカインバランスの調節

YC-11 感染後経時的にBALF中のIL-4産生がみられたが、IFN- γ はほとんど検出されなかった。IL-12、IL-18の少量単独投与では肺内のIFN- γ 、IL-4産生にほとんど影響を与えなかったが、両サイトカインを併用するとIFN- γ の産生がみられるようになり、一方IL-4産生は著明に抑制された(図8)。

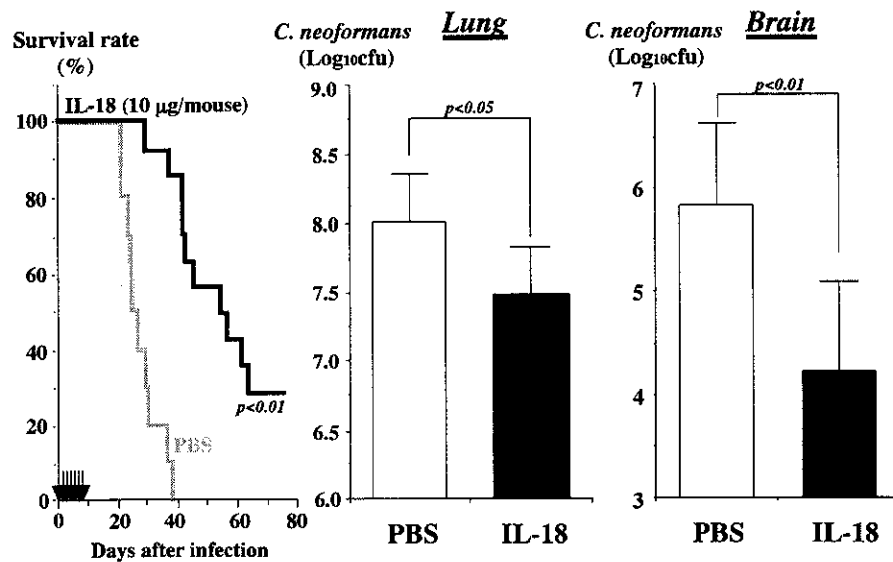


図6 IL-18の感染防御効果

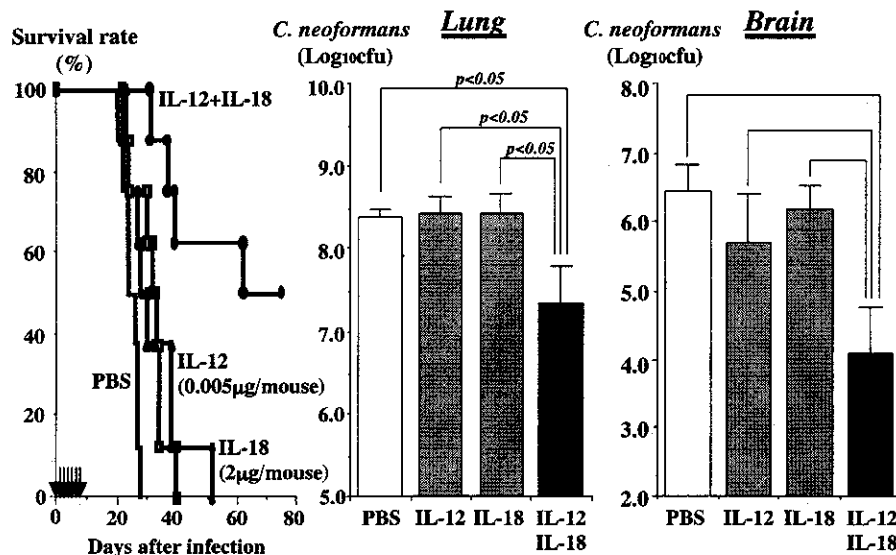


図7 IL-12とIL-18の相乗的感染防御効果

7. IL-12、IL-18併用治療による体重減少

IL-12とIL-18の併用投与による副作用について検討するために、YC-11感染マウスに各サイトカインをそれぞれ0.005 μ g/マウス、2 μ g/マウス1週間連日腹腔内に投与し、経時的に体重、飲水量、摂

食量、そして血清レプチン濃度を測定した。飲水量と摂食量は感染後0日～3日、3日～5日、5日～7日のマウス1匹当たりに換算して示した。図9に示すように、サイトカイン投与によって各パラメーターの経時的な低下が観察された。

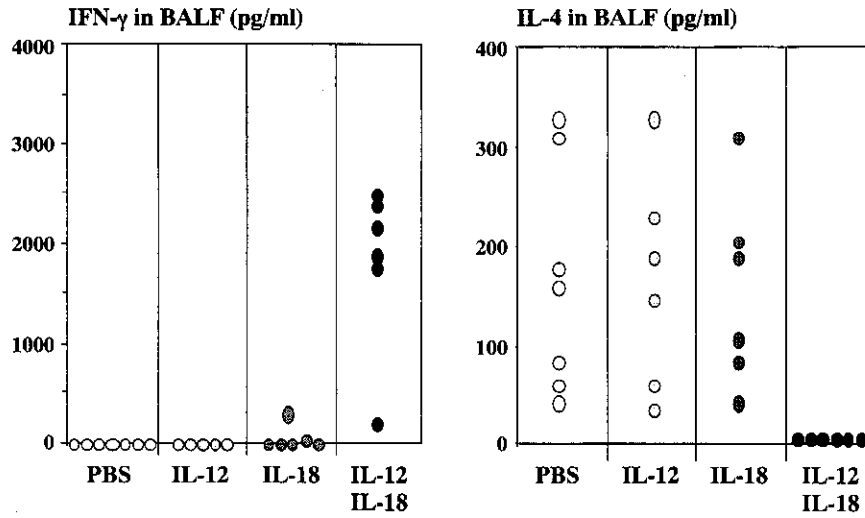


図8 IL-12/IL-18 併用投与による Th1-Th2 バランスの調節効果

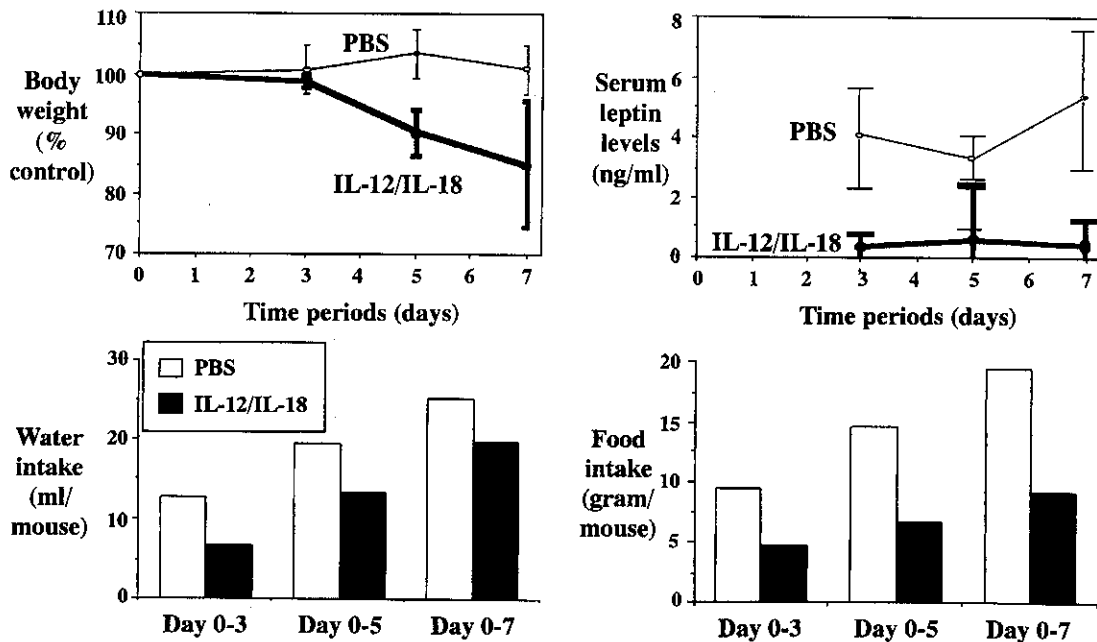


図9 IL-12/IL-18 併用投与による体重減少

考 察

クリプトコックス感染症は元来それほど多い疾患ではなかったが、HIV感染者の増加にともないその日和見感染症として問題になっている。特にHIV感染者のような細胞性免疫が極度に低下した宿主では、容易に中枢神経系への播種性感染を起こし、抗真菌薬による治療に抵抗性を示して致命的になる場合も少なくなく、また治療成功例でも高頻度に再発がみられるなど臨床上多くの問題を有している。このことから、より強力な抗真菌薬の開発とともに、低下した感染抵抗力を高めるような新たな治療法の開発が望まれている。

Cnの感染防御機構は主として細胞性免疫によって担われており、特にCD4陽性T細胞が肺局所での防御及び脳への播種抑止に重要である¹⁻³⁾。近年、Th細胞がIFN- γ を産生するTh1細胞とIL-4、IL-10、IL-13を産生するTh2細胞に分かれることが明らかになった⁴⁾。Th1細胞の分化にはマクロファージや樹状細胞から産生される2つのIFN- γ 誘導因子(IL-12、IL-18)が重要な役割を担っている^{5,6)}。本研究では、IL-12とIL-18に着目し、これらサイトカインのクリプトコックス感染防御における役割を解析した。IL-12KO及びIL-18KOマウスではともに肺内での真菌の排除が遅延したが前者においてその程度は著明であった。一方、脳への播種性感染においてはIL-12KOのみにおいて認められた。このことからIL-12がより重要な役割を担っていることが推測された。この仮説は、以下の2つの実験結果からも証明された。第1に、IL-12KOマウスに抗IL-18抗体を投与することで内因性に産生されるIL-18を中和すると肺内における真菌の排除がさらに遅延した。そして第2に、IL-12p40とIL-18遺伝子を同時に欠損するマウスではそれぞれ単独で欠損するマウスよりもCn感染に対して感受性となり、その程度はGKOマウスとほぼ同程度であった。以上の結果から、IL-12のみならずIL-18もCn感染防御において重要な役割を果たしていることが明らかになった。その作用機序については、最近の我々の検討からNK細胞からのIFN- γ 産生誘導とIL-12によるCn特異的Th1細胞の分化誘導を増強することにあると考えている。

IL-12とIL-18はともにクリプトコックスの致死感染に対して明かな治療効果を示した。肺内における真菌の排除を促進するとともに、肺から脳への播種性感染を有意に抑制し、感染マウスの生存期間を延長することができた。その効果はIL-18に比べてIL-12においてより著明であった^{7,8)}。IL-12とIL-18に関してさらに興味深いのは、IFN- γ 産生誘導において両サイトカインが相乗効果的に作用する点である。このことは、T、B、NK細胞そしてマクロファージにおいて報告されている⁹⁻¹²⁾。我々は、マウス腹腔滲出細胞内のNK細胞がIL-12とIL-18の作用で相乗効果的にIFN- γ を産生し、マクロファージのCnに対する殺真菌活性を効率的に誘導することを報告した¹¹⁾。この作用は、マクロファージからのNO産生を増加させることによっており、この反応にTNF- α が加わり殺真菌活性をさらに高めるという非常に巧妙に構築された防御機構が存在している¹³⁾。

IL-12とIL-18による併用効果は、*in vitro*のみならずCn感染モデルでも観察された。致死感染モデルに低用量の各サイトカインを単独で投与してもほとんど効果がみられなかったのに対して、両サイトカインを併用すると明らかな感染防御効果が認められた。この効果は、肺内におけるTh1サイトカインの産生誘導及びTh2サイトカインの産生抑制と相関していた¹⁴⁾。この結果は2つの意義を有すると考えられる。第1はIL-12とIL-18を併用することでそれぞれの感染防御効果をさらに増強しうる可能性を有する点であり、第2には各サイトカインの投与量を減ずることでそれぞれの副作用を弱めうる可能性のあることである。特に後者は、サイトカインを用いた治療法を臨床応用する上で重要なポイントである。しかしながら、IL-12とIL-18を併用することでマウスの飲水量及び摂食量の低下、体重の減少すなわちカヘキシアの進行が認められた。また、両サイトカインの併用で小腸上皮細胞のアポトーシスが誘導され下痢が誘発されるとの報告もみられる。今後は、このような副作用の発生機序の解明とそれに対する対応策の開発がIL-12とIL-18によるサイトカイン療法を安全に実施するために重要と考えられる。また、これらサイトカインを投与することでTNF- α を介してHIVウイルスの増殖を促進する可能性も

指摘されており今後の検討課題である。

結 語

本研究では、近年見出された2つのIFN- γ 産生誘導サイトカインであるIL-12とIL-18による難治性クリプトコッカス感染症における治療的有用性について明らかにした。両サイトカインはTh1細胞の分化誘導において重要な役割を担うとの報告もあり、感染防御機構において細胞性免疫が重要な感染症においては有効な補助的治療法になり得る可能性がある。しかし本研究でも示されたように、これらのサイトカインには克服すべき副作用が多く存在し、実際に臨床応用されるためにはその軽減が先ず考慮すべき最重要課題になるものと考えられる。

参考文献

- Hill, J. O., and A. G. Harmsen. 1991. Intrapulmonary growth and dissemination of an avirulent strain of *Cryptococcus neoformans* in mice depleted of CD4+ or CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173: 755-758.
- Huffnagle, G. B., J. L. Yates, and M. F. Lipscomb. 1991. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173: 793-800.
- Mody, C. H., M. F. Lipscomb, N. E. Street, and G. B. Toews. 1990. Depletion of CD4+ (L3T4+) lymphocytes *in vivo* impairs murine host defence to *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 144: 1472-1477.
- Mosmann, T. R., and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17: 138-146.
- Trinchieri, G. 1998. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv. Immunol.* 70: 83-243.
- Okamura, H., H. Tsutsui, S. Kashiwamura, T. Yoshimoto, and K. Nakanishi. 1998. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv. Immunol.* 70: 281-312.
- Kawakami, K., M. Tohyama, Q. Xie, and A. Saito. Interleukin-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. 1996. *Clin. Exp. Immunol.* 104: 208-214.
- Kawakami, K., M. H. Qureshi, T. Zhang, H. Okamura, M. Kurimoto, and A. Saito. 1997. IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- γ production. *J. Immunol.* 159: 5528-5534.
- Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 378: 88-91.
- Yoshimoto, T., H. Okamura, Y. Tagawa, Y. Iwakura, and K. Nakanishi. 1997. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- γ production from activated B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3948-3953.
- Zhang, T., K. Kawakami, M. H. Qureshi, H. Okamura, M. Kurimoto, and A. Saito. 1997. Interleukin (IL)-12 and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of interferon- γ by natural killer cells. *Infect. Immun.* 65: 3594-3599.
- Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann, and M. Modolell. 1998. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187: 2103-2108.
- Kawakami, K., M. H. Qureshi, Y. Koguchi, T. Zhang, H. Okamura, M. Kurimoto, and A. Saito. 1999. Role of TNF- α in the induction of fungicidal activity of mouse peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* by IL-12 and IL-18. *Cell. Immunol.* 193: 9-16.
- Qureshi, M. H., Zhang, T., Koguchi, Y., Nakashima, K., Okamura, H., Kurimoto, M., and Kawakami, K. 1999. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Immunol.* 29: 643-649.



HIV感染者から分離された*Cryptococcus neoformans*株における抗真菌薬薬剤感受性とアゾール耐性

河野 茂、王 莉、前崎 繁文、宮崎 義継

長崎大学医学部 第二内科

研究要旨

Cryptococcus neoformans は HIV 感染者の日和見感染症の一つであるクリプトコックス髄膜炎の原因真菌である。クリプトコックス髄膜炎は amphotericin B と flucytosine の初期治療の後、一生におよぶ fluconazole (FLCZ) の維持療法が必要となる。近年、HIV感染者の口腔カンジダからアゾール系抗真菌薬に高度耐性を示す *Candida albicans* 株の分離が報告され、*C. neoformans* も耐性菌の出現が懸念されていた。今回、我々は本邦 (14 株) および米国 (18 株) の HIV 感染者から分離された *C. neoformans* 株の各種抗真菌薬に対する薬剤感受性を測定した。その結果、本邦の HIV 感染者のクリプトコックス髄膜炎から分離された 1 株 (1148 株) が FLCZ に対して 16 µg/ml の耐性を示した。さらにこの菌株は治療前の感受性株 (1147 株) と同一の遺伝学的多型性を有することが Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) によって示され、薬剤によって耐性が誘導されたことが示唆された。また、マウス肺クリプトコックス症において耐性菌感染群は FLCZ 20mg/kg の投与にても生存率の改善および肺内菌数の減少を認めなかった。

研究分担者：河野 茂

研究協力者：王 莉、前崎繁文、宮崎義継

Azole-resistant *Cryptococcus neoformans* isolated from the patients with HIV infection

Shigeru Kohno, Wang Li, Shigefumi Maesaki and Yoshitsugu Miyazaki

Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine

目 的

クリプトコックス髄膜炎はHIV感染者に発症する日和見感染症の一つとして臨床的に重要な疾患である。原因真菌である *Cryptococcus neoformans* は鳩の糞便や土壌などの自然界に広く生息し、経気道的に感染し、肺に病巣を形成する。さらにHIV感染者では高率に髄膜炎を併発し、抗真菌薬の治療が十分に行えないアフリカやアジア諸国のHIV感染者では死亡の原因となる感染症である。

HIV感染者に発症したクリプトコックス髄膜炎の治療には、初期治療として amphotericin B (AMPH-B) と flucytosine (5-FC) の併用療法が行われる。しかし、その後ほぼ一生におよぶ fluconazole (FLCZ) の維持療法が必要となる。近年、HIV感染者に発症する口腔カンジダ症に対して反復し、長期間の FLCZ の投与の結果、高用量の投与にも関わらず難治性の症例が増加し、そのような患者から FLCZ などアゾール系抗真菌薬に高度耐性を示す *Candida albicans* 株が分離されている。さらにこれらの菌株は薬剤の投与によって耐性が誘導されることが、臨床的にも分子生物学的にも示唆されており、*C. neoformans* 株においても耐性菌の出現が危惧されていた。

アゾール系抗真菌薬の耐性機構は、①アゾール系抗真菌薬の標的酵素であるチトクロームP450の細胞内の量が増加し、アゾール系抗真菌薬が十分にその酵素活性を阻害できなくなる耐性、②標的酵素のチトクローム P450 の質的変化によってアゾール系抗真菌薬との結合親和性が低下する耐性、③アゾール系抗真菌薬を選択的に細胞外に排出する機構が作用し、薬剤の細胞内濃度が低下する耐性などが考えられている。しかし、これらの耐性機構は *C. albicans* 株で研究された結果であり、同じ酵母状真菌である *C. neoformans* 株にも同様の耐性機構があるか否かはいまだ十分に検討されていない。

今回、我々は本邦と米国のHIV感染者のクリプトコックス髄膜炎から分離された *C. neoformans* 株における各種抗真菌薬の薬剤感受性を測定し、本邦のHIV感染者のクリプトコックス髄膜炎から分離された1株(1148株)のみが FLCZ に対して 16 μ g/ml と耐性を示したため、この患者の治療前に分離

された感受性株(1147株)と比較検討を行うことによって *C. neoformans* 株におけるアゾール耐性機構の解明を目的として、研究を行った。

方 法

1. 使用菌株

今回の研究で用いた菌株は全て *C. neoformans* var. *neoformans* であり、本邦の分離株14株は全て HIV感染者に発症したクリプトコックス髄膜炎から分離された株で、国立国際医療センターの安岡博士より分与された。米国分離株は米国各地のHIV感染者の髄液から13株、血液から5株から分離された合計18株を用いた。菌株はすべて Duke University Medical Center の Shell 博士より分与された。

菌株はすべて -80 $^{\circ}$ C で冷凍保存し、使用直前にポテトデキストロース寒天培地で 30 $^{\circ}$ C で 48 時間培養し、そのなかの1コロニーを同様にポテトデキストロース寒天培地に接種し、30 $^{\circ}$ C で 48 時間培養した菌を試験菌株とした。

2. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は NCCLS 標準測定法に準じた日本医真菌学会の測定法によって測定した。試験薬剤は amphotericin B (AMPH-B) (Bristol-Myers Squibb)、fluconazole (FLCZ) (Pfizer Central Research)、itraconazole (ITCZ) (Janssen Research Foundation)、flucytosine (5-FC) (Sigma) を用いた。薬剤はすべて DMSO に溶解した。

試験菌株を 5ml の YEPD 液体培地に接種し、30 $^{\circ}$ C で 24 時間振盪培養した後、3000 回転で 5 分間遠心した。滅菌生理食塩水を用いて Mcfarland 0.5 の菌液を作成して、RPMI-1640、MOPS 培地にて 1000 倍希釈液を作成した。96 穴平底マルチウェルプレートに予め RPMI-1640、MOPS 培地で作成した 2 倍希釈系列の抗真菌薬をそれぞれのウェルに 100 μ l 加え、さらに 1000 倍希釈菌液 100 μ l を加えた。培養は 30 $^{\circ}$ C にて 48 時間静置培養し、肉眼的に菌の発育を認めない最小の薬剤濃度を最小発育阻止濃度(MIC)とした。

3. *C. neoformans* 増殖抑制試験

C. neoformans 菌株を 5ml の RPMI-1640、MOPS 培

地にそれぞれ異なる濃度の薬剤 (FLCZ; 16, 32, 64 μ g/ml, AMPH-B;0.25, 0.5, 2 μ g/ml) 添加し、30 $^{\circ}$ C で静置培養し、0, 2, 4, 14, 18, 22, 24, 48 時間後に 50 μ l をサブロー寒天培地に接種した後 30 $^{\circ}$ C、48 時間培養し、菌数を測定した。

4. Rhodamine6G の細胞内濃度の測定

-80 $^{\circ}$ C の保存菌液を 100ml の YEPD 液体培地に接種し、30 $^{\circ}$ C で 24 時間振盪培養した後、3000 回転で 5 分間遠心集菌し、20ml の PBS 溶液にて 2 回洗浄した。遠心後沈渣を 5ml の PBS 溶液にて溶解し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪培養した。その後 10 μ M の rhodamine 6G (Sigma) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間振盪培養した。その後 1ml の菌液を 2ml のエッペンチューブに移し、10,000 回転で 2 分間遠心し、750 μ l の上清をキュウビックに移し、残りの菌液は 3000 回転で 5 分間遠心した後、上清を捨て、4ml の 1M glucose 添加 PBS 溶液に沈渣を溶解した。菌液は同様に 37 $^{\circ}$ C で 15 分間振盪培養して、1ml の菌液を同様の方法によって遠心し、上清 750 μ l をキュウビックに移した。最後にそれぞれのキュウビックに PBS 溶液 750 μ l を加え、吸光度 524 および 600nm を Spectrophotometer DU670 (Beckmann) によって測定し、得られた吸光度より細胞外の rhodamine6G 濃度を計算した。

5. Randomly Amplified polymorphic DNA (RAPD)

C. neoformans 菌体からの DNA の抽出法は以前我々が報告した方法に準じて行った¹⁾。作製した primer も既に我々が報告した R28 および OPH02 を用いた。PCR の条件は 94 $^{\circ}$ C、4 分、1 サイクル、92 $^{\circ}$ C、45 秒、30 サイクル、34 $^{\circ}$ C、60 秒、72 $^{\circ}$ C、90 秒、72 $^{\circ}$ C。10 分をそれぞれ 1 サイクル行った。

6. マウス肺クリプトコックス症モデルによる治療効果

BALB/c マウス、6 週令、雄 (Charles River Inc., 横浜) を Nembutal の腹腔内投与にて麻酔した後、 1×10^5 cells の *C. neoformans* 菌株を 50 μ l の滅菌した生理食塩水に浮遊させ、経気管的に接種した。接種 2 時間後より 20mg/kg の FLCZ を経口的に 5 日間、1 日 1 回投与し、生存率を観察した。さらに感染 14 日後にマウスを屠殺し、両肺を摘出した後、2ml の滅菌した生理食塩水を加え、Polytron homogenizer でホモジネートし、10 倍希釈系列を作製し、その中の 50 μ l をサブロー寒天培地に接種し、30 $^{\circ}$ C で 48 時間培養後、菌数を測定した。

7. 統計学的検定

マウス肺クリプトコックス症の生存率は generalized Wilcoxon 検定にて、細胞内 rhodamine6G 濃度およびマウス肺クリプトコックス症の肺内菌数は t 検定を行い、P 値が 0.05 未満を有意差有りと判定した。

結 果

1. 臨床分離 *C. neoformans* 株における各種抗真菌薬の薬剤感受性 (表 1)

臨床分離 *C. neoformans* 株では日本分離株および米国分離株ともに AMPH-B が最も優れた薬剤感受性を示した。次に ITCZ が優れた抗真菌活性を認めた。FLCZ に対しては米国分離株では MIC 域は 0.25 ~ 2 μ g/ml と耐性を示す株は認められず、MIC₉₀ 値も 1 μ g/ml と全ての菌株において良好な薬剤感受性を示した。しかし、日本の HIV 感染者のクリプトコックス髄膜炎から分離された 1148 株の 1 株のみが FLCZ に対して 16 μ g/ml と耐性を示した。また、

表 1 臨床分離 *Cryptococcus neoformans* 株における各種抗真菌薬の薬剤感受性

抗真菌薬	日本株			米国株		
	MIC 域 (μ g/ml)	MIC ₅₀ (μ g/ml)	MIC ₉₀ (μ g/ml)	MIC 域 (μ g/ml)	MIC ₅₀ (μ g/ml)	MIC ₉₀ (μ g/ml)
Fluconazole	0.25-16	1	2	0.25-2.0	0.5	1
Itraconazole	0.0313-0.1	0.025	0.05	0.00313-0.1	0.0125	0.025
Amphotericin B	0.0313-0.1	0.025	0.1	0.00625-0.1	0.0125	0.05
Flucytosine	0.5-4	2	4	1-8	2	4

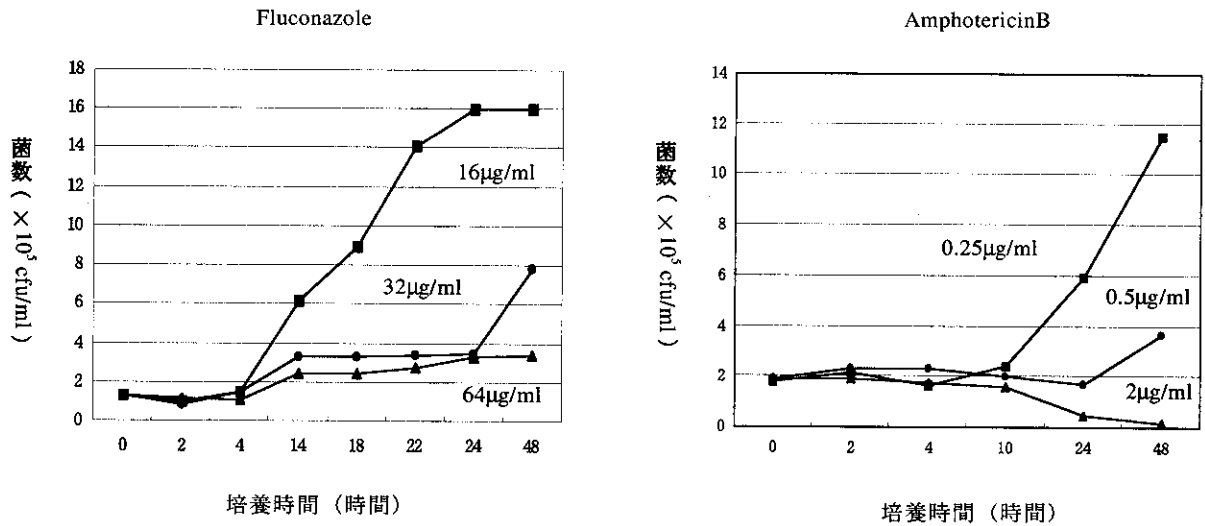


図1 アゾール耐性株1148株における抗真菌薬による増殖抑制

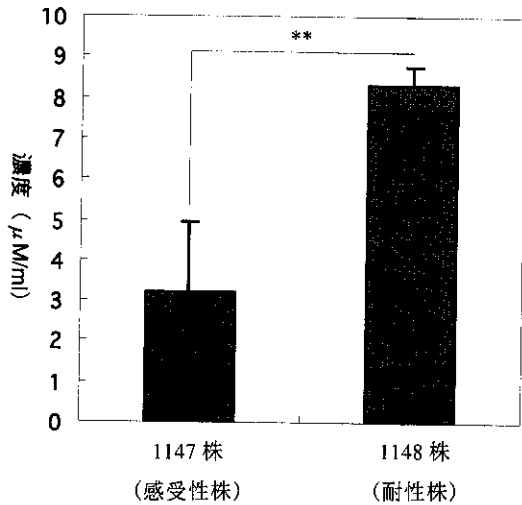


図2 アゾール耐性株1148株と感受性株1147株における細胞内 rhodamine6G 濃度。 ** ; p<0.05 (七検定)

5-FCに対するMICは米国株で若干高く、8µg/mlを示す株を認めたが、日本分離株ではMIC域は0.5~4µg/mlと優れた薬剤感受性を示した。

2. アゾール耐性株1148株における抗真菌薬による増殖抑制 (図1)

FLCZ 耐性株1148株を用いてFLCZとAMPH-B添加液体培地における菌数の変化を観察した。その結果、FLCZ添加では16µg/mlの濃度で全く菌数の減少を認めなかった。AMPH-B添加培地では0.25µg/mlの濃度では増殖抑制を認めなかったが、2µg/mlの薬剤存在下では殺菌的に菌の増殖を抑制した。

3. アゾール耐性株1148株と感受性株1147株における細胞内rhodamine6G (R6G) 濃度 (図2)

これまで我々は *C. albicans* 株において細胞内のR6G濃度は薬剤排出遺伝子の一つである *CDR1* の mRNAの発現量と逆相関することを報告してきた²⁾。すなわち耐性菌では *CDR1* の発現が増加し、R6Gと同様に薬剤が細胞外に排出され、細胞内の薬剤濃度が低下することによって耐性を獲得することを報告してきた。今回、このR6Gの細胞内濃度を測定し、*C. neoformans* 株における *C. albicans* 株と同様の薬剤排出機構の存在の有無を検討した。その結果、予想に反して感受性株1147株が耐性株1148株に比べて有意に低いR6G濃度を示した。

4. 耐性菌1148株と感受性菌1147株の遺伝学的多型性 (図3)

感受性株1147株と耐性株1148株は同じHIV感染者から分離された菌株であるため、耐性株がFLCZの投与によって耐性を獲得したのか、あるいは環境に存在した耐性株が感染したかを検討するためにRAPDによる遺伝子多型性を比較した。その結果、この二つの菌株は同一の遺伝多型性を示し、耐性菌が薬剤の投与によって誘導されたことが示唆された。

5. FLCZ治療によるマウス肺クリプトコックス症の治療効果

抗真菌薬の薬剤感受性は接種した菌量、培養温度あるいは培養時間によって測定値にバラツキが多く。さらに *in vitro* の薬剤感受性成績と感染動物の治療成績あるいは臨床効果に隔たりが認められることもある。そのため、耐性菌感染マウス肺クリプトコックス症における FLCZ の治療効果を検討した。その結果、耐性菌 1148 株感染マウス肺クリプトコックス症では FLCZ 20mg/kg、5 日間経口投与に関わらず、無治療群と比べて全く同様の生存率を示し、治療群、無治療群ともに感染 30 日後には全てのマウスが死亡した (図 4)。感受性菌 1147 感染群では無治療群は感染 55 日にすべてのマウスが死亡したが、治療群では感染 60 日後も 30% のマウスが生存した。また肺内菌数も感受性菌感染マウスでは治療によって有意な肺内菌数の減

少を認めたが、耐性菌感染マウスでは治療によっても肺内菌数の減少は全く認められなかった (図 5)。

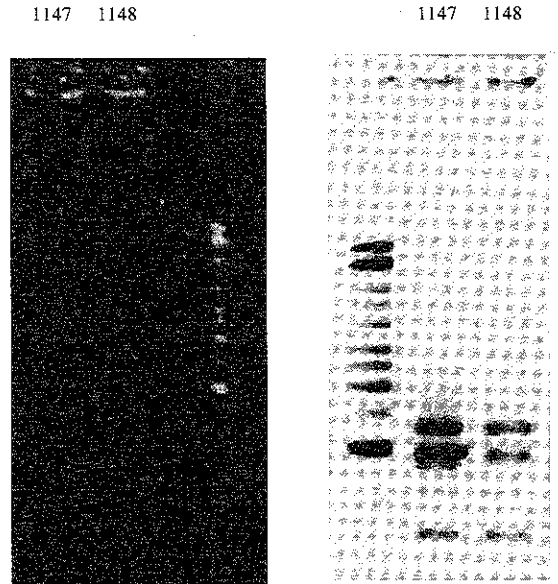


図3 耐性菌 1148 株と感受性菌 1147 株の遺伝学的多型性図

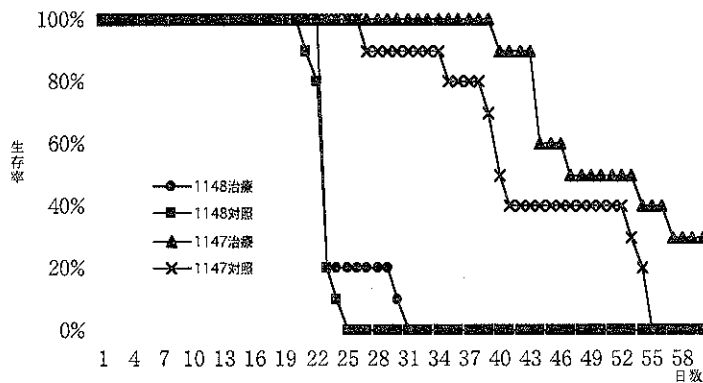


図4 FLCZ 治療によるマウス肺クリプトコックス症モデルの生存率

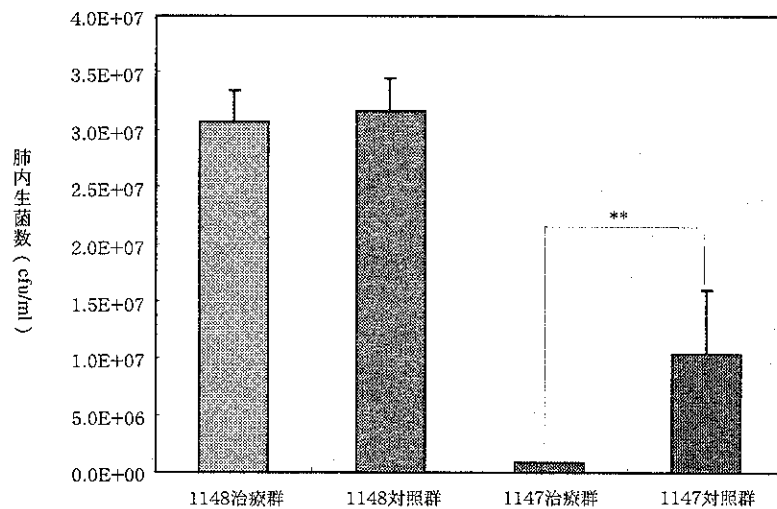


図5 FLCZ 治療によるマウス肺クリプトコックス症モデルの肺内菌数

考 察

細菌感染症では多くの抗菌薬に対して耐性菌が出現し、臨床的に重要な問題となっており、その耐性機構の解析とともに新たな治療法の開発は急務を要する課題である。真菌感染症では幸いなことにこれまで臨床的に耐性菌が問題となることは少なかった。しかし、近年、HIV感染者に発症する口腔カンジダ症において反復し、長期に及ぶアゾール系抗真菌薬であるFLCZが投与された結果、高用量の治療に関わらず、難治性の症例が多く経験され、これらの患者からFLCZに高度耐性を示す*C. albicans*株が多く分離されている³⁾。また、分子生物学的な解析の結果、この耐性菌は薬剤の投与によって誘導されてことが示唆され、今後さらに耐性菌が増加することが懸念されている。

HIV感染者に併発するクリプトコックス髄膜炎の治療には長期間におよぶFLCZの維持療法が必要となり、*C. albicans*と同様に酵母状真菌である*C. neoformans*における耐性化が危惧されていた。しかしながら、*C. neoformans*におけるFLCZ耐性株の報告は極めて少なく、今回の我々の検討でも本邦のHIV感染者から分離された1株のみが耐性菌であった。この耐性菌が分離された患者はFLCZによるクリプトコックス髄膜炎の長期間の治療にも関わらず、病状の悪化により死亡しており、臨床的にもFLCZ耐性*C. neoformans*髄膜炎と考えられた。

アゾール耐性*C. albicans*株に関してはこれまで分子生物学的な研究からいくつかの耐性機構の関与が考えられている。しかし、*C. neoformans*におけるFLCZ耐性機構の研究はいまだ少なく、その耐性機構の解明が必要と考えられる。*C. albicans*株では薬剤排出ポンプによる薬剤の細胞内濃度の低下が耐性の一つの原因と考えられているため、我々も細胞内rhodamine6G濃度を測定することによってその関与を検討した。しかし、結果的には耐性菌において細胞内R6G濃度の有意な増加を認め、*C. albicans*株とは全く反対の結果となった。この理由としては本来R6Gの測定系は*C. albicans*株で測定されたもので、他の菌種でも同様な結果が得られる否かは疑問がある。しかし、塩基配列から推定して*C. neoformans*のATP結合性の薬剤排出

遺伝子と考えられている*CneMDR*遺伝子をPCR法によって1147株と1148株のDNAから増幅した結果、感受性株1147株ではその存在を認めたが、耐性株1148株では遺伝子は増幅されなかった(未発表データ)。その結果から考えても耐性株1148株において薬剤排出遺伝子に何らかの変異が生じている可能性も考えられ、今後はmRNAにおける*CneMDR*の発現量の差や実際にRI標識されたFLCZを用いた細胞内薬剤濃度測定などの確認が必要と考えられた。

これまで*C. neoformans*株におけるFLCZ耐性菌の報告はごく限られているが、すべて薬剤感受性成績の結果から耐性菌と判断されている⁴⁾。しかし、耐性菌動物感染モデルでの治療効果における検討は少ない。*C. neoformans*に関しても耐性菌による肺クリプトコックス症あるいは髄膜炎の抗真菌薬による治療効果の研究は少ない。我々はこれまで感受性菌によるマウス肺クリプトコックス症を確立し、さまざまや新規抗真菌薬の治療効果の検討を行って来た⁵⁾。今回はそのマウス肺クリプトコックス症を用いてFLCZ耐性菌感染における治療効果を検討した。その結果、試験管内の薬剤感受性試験の結果と、感染動物における治療効果は相関することが示された。さらにこの耐性菌感染モデルを用いて、新規抗真菌薬のアゾール耐性クリプトコックス症における治療効果の検討を行う予定である。

参考文献

- 1) Yamamoto Y, Kohno S, Koga H, Kakeya H, Tomono K, Kaku M, Yamazaki T, Arisawa M and Hara K. Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. *J Clin Microbiol* 33:3328-3332, 1995
- 2) Maesaki S, Marichal P, Vanden Bossche H, Sanglard D and Kohno S. Rhodamine 6G efflux for the detection of CDR1-overexpressing azole-resistant *Candida albicans* strains. *J Antimicrobal Chemother* 44:27-31, 1999
- 3) Heald AE, Cox GM, Schell WA, Bartlett JA and Perfect JR. Oropharyngeal yeast flora and fluconazole resistance in HIV-infected patients receiving long-term continuous versus intermittent fluconazole therapy. *Aids* 10:263-268, 1996

- 4) Mondon P, Petter R, Amalfitano G, Luzzati R, Concia E, Polacheck I and Kwon CK. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1856-1861, 1999
- 5) Hossain MA, Maesaki S, Kakeya H, Noda T, Yanagihara K, Sasaki E, Hirakata Y, Tomono K, Tashiro T and Kohno S. Efficacy of NS-718, a novel lipid nanosphere-encapsulated amphotericin B, against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1722-1725, 1998

分担研究報告書

G. 症 例