

い。

### E. 結論

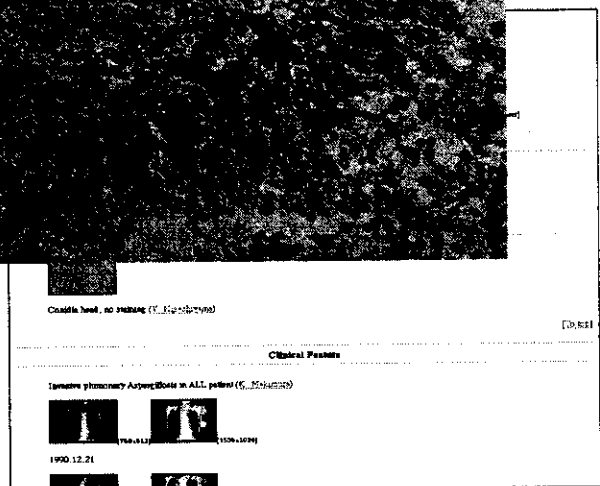
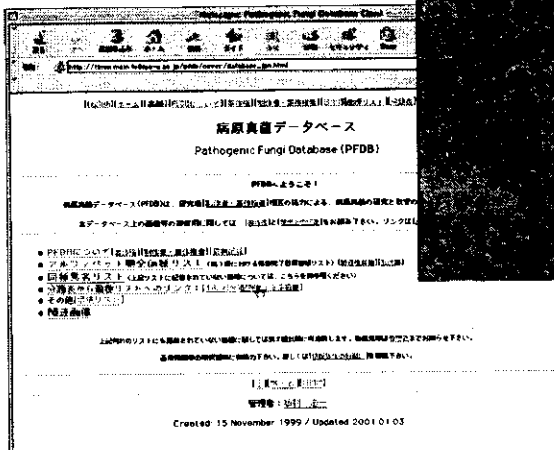
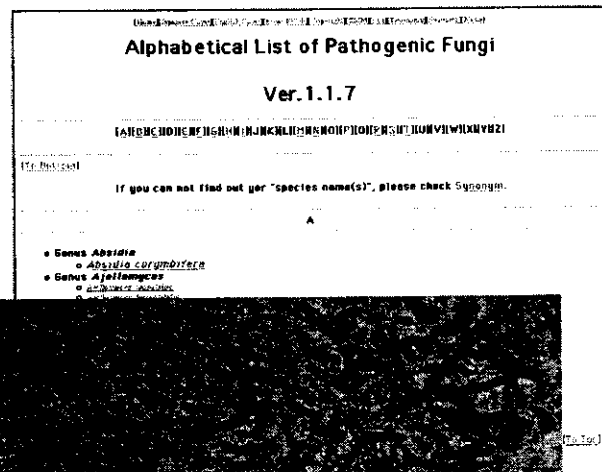
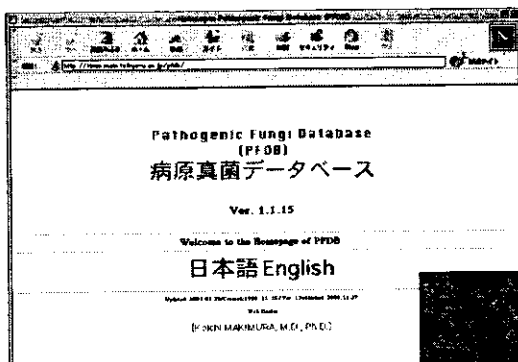
オンライン環境を利用した、医真菌研究者の  
共有的知的基盤の基礎の作成に成功した。

### F. 健康危険情報

ない

### G. 研究発表

1) 「オンライン病原真菌データベース」(英  
名: Pathogenic Fungi Database、略称: PFDB)  
<http://timm.main.teikyo-u.ac.jp/pfdb/>



20000517

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

**Species identification system for dermatophytes based on the DNA  
sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1.**

Makimura K.

Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2001;42(2):61-7

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

真菌感染成立に関与する Myeloperoxidase

分担者 鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨：真菌感染の成立に関与している生体防御機構の低下の分子機構を明らかにし、抗真菌薬開発に役立てることを目的とする。これまで、臨床疫学から好中球機能不全症、特に、真菌感染に関連して myeloperoxidase (MPO)欠損ではカンジダ症に、NADPH oxidase 欠損では慢性肉芽腫症として *Aspergillus* 感染による重篤症状を示すことが報告されているが、感染防御機構の詳細は不明である。そこで、本研究分担において好中球機能不全症のモデルマウスを作成し、好中球機能の殺真菌への関与を明らかにするとともに、真菌誘発の慢性疾患についても解析した。作成した MPO 欠損マウスは、*Candida albicans* の殺作用が野生型に比し著しく低下した。また、菌体成分により誘発され冠状動脈炎に伴って血清中の自己抗体 MPO-ANCA が上昇した。また、MPO 欠損マウスにより、これらの疾患には MPO および MPO-ANCA が関与していることを明らかにした。

A. 研究目的

真菌感染は、日和見感染によっていると考えられ、生体防御機構の低下によって成立する。しかし、それに関与する免疫機構の実態については、これまで詳細にはわからなかった。本研究において生体防御側がどのように真菌症成立に関与しているかを明らかにし、抗真菌薬開発に役立てることを目的とする。これまで、臨床疫学から好中球機能不全症、特に、MPO 欠損ではカンジダ症の傾向が強く、NADPH oxidase 欠損ではアスペルギルス症による死亡が重篤な疾患として報告されている。従来より欧米の研究や我々の本邦での調査により MPO 欠損頻度が算出され、臨床像との関連について調査されてきた。欧米では MPO 欠損の場合は、カンジダ症になりやすいと報告されているが、本邦では、その傾向は弱いと推定された。しかし、臨床からは感染成立にいたる生体側の関与を解明するのは極めて困難な状況であった。MPO は、好中球に存在する活性酸素の代謝酵素であり、過酸化水素から次亜塩素酸が生成される反応を触媒する。従来の *in vitro* の実験では、MPO 欠損患者から採取した好中球は微生物の殺菌力に低下がみられるが、MPO 欠損患者の大半は健常人と同様の生活を営んでお

り、わずかにカンジダ菌感染との相関性が示唆されているに過ぎない。したがって、MPO が個体の感染防御に本当に不可欠な酵素なのかどうか疑問視されている。

本研究分担において動物モデルを作成し、真菌症の成立にかかわる生体側の因子を明らかにすることが重要であると思われた。そこで、臨床像から予想されている MPO の殺真菌への関与について MPO 欠損マウスを作成して明らかにすることを目的とした。個体レベルでの MPO の機能を知るために、MPO のノックアウトマウス (MPO<sup>-/-</sup>) を作製し、このマウスの微生物感染防御能を解析した。

さらに、真菌誘発の慢性疾患について解析することも重要な真菌症の側面であり、本疾患への真菌の関与についても検討することを目的とした。また、*C. albicans* 菌体由来分子 (CADS) の接種により冠状動脈炎が発症することがわかっており、真菌感染誘導の血管炎の発症機序をあわせて解析し、真菌症と生体防御不全による動脈炎など慢性疾患誘導機構への MPO の関与を MPO 遺伝子欠損マウスにより解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) カンジダ感染：MPO 欠損マウスおよび

野生マウス C57BL/6 に *C. albicans* 菌を鼻腔内投与し、1週間まで観察した。また、48時間後の肺および腎における残存菌数を測定した。

2) カンジダと血管炎との関係：

MPO-KO 群、C57BL/6 (対照群) (4週、雄、各5) について、CADS を5日間腹腔接種し、3週間のインターバル後再び同様に接種した。3週後心採血にて屠殺、病理標本作製し血管炎の評価をした。MPO-ANCA はヒト MPO-III を抗原とする ELISA 法にて測定した。

・MPO-KO マウス：CADS 誘導の血管炎率と血清中の MPO-ANCA 値について野生型のそれと比較した。

### C. 研究結果

1) 作成した MPO 欠損マウスは、*C. albicans* の殺菌作用が野生型に比し、著しく低下して、早期に死亡した (図1)。MPO 欠損マウスの殺菌能が著しく低下した (図2、3)。

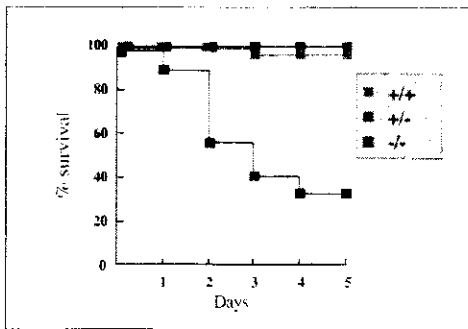


図1. *Candida albicans* 投与後のマウス生存率

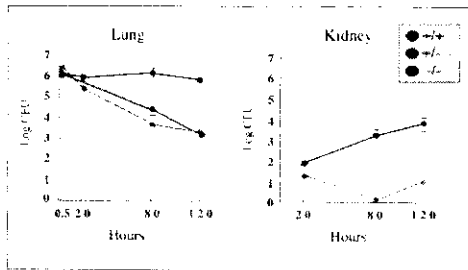


図2. 肺および腎でのコロニー数



図2. MPO-KO の肺の組織像

2) また、CADS 誘導の血管炎発症率と血清中の MPO-ANCA 値について野生型のそれと比較した結果、血管炎の発症率は、MPO-KO 群では40%と対照群100%より激減した。一方、血清 MPO-ANCA 値は MPO-KO 群では、95.8hEU で、対照群の234.1hEU と比較して有意に抑制されていた ( $p < 0.05$ )。 (図4)

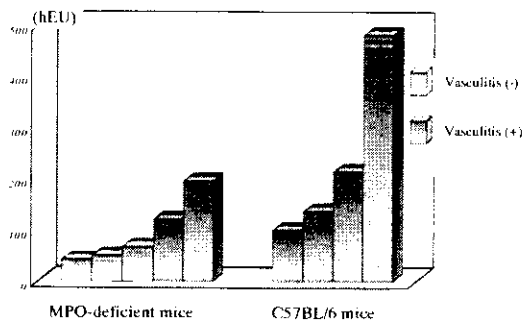


図4. CADS 誘導の血管炎発症と血清中の MPO-ANCA 値

3) マウス MPO (mMPO) の特異的抗体を作成するため、マウスリコンビナント MPO に対する抗体を作成し、mMPO 特異的抗体を得た。

4) 一方、IRF-8 欠損マウスにおいて加齢に伴い MPO-ANCA 値は上昇し、脾臓中の

好中球は、機能が低下していた。

#### D. 考察

これまで、真菌感染は、日和見感染によっていわれてきたがその実態についてはわからなかった。本研究において臨床的に示唆されていたMPO欠損ではカンジダ症の傾向が強いという報告を裏付ける結果としてMPOの殺真菌への関与についてMPO欠損マウスの結果から個体レベルで明らかになった。

さらに、真菌誘発の慢性疾患について解析することも重要な真菌症の側面であることから、CADS誘発の冠状動脈炎の発症において、MPO遺伝子欠損マウスを用いることによりMPOが主たる要因になっていることを明らかにした。しかし、MPO-ANCA産生には、MPO以外の抗原の存在も示唆された。また、好中球機能異常を示すIRF-8欠損マウスでもMPO-ANCAがあり、MPO-ANCA産生には好中球機能異常が関与することが示された。

リコンビナントMPO分子を作製し、抗体も作製できたので、今後は、フラグメントの作製にとりかかり、エピトープ解析を行う。

#### E. 結論

MPO欠損マウスは、*C. albicans*の殺作用が著しく低下していた。

また、CADS誘導の血管炎発症率と血清中のMPO-ANCA値について野生型のそれと比較した結果、血管炎の発症率は、MPO-KO群では40%と対照群100%より激減し、血清MPO-ANCA値はMPO-KO群では、有意に抑制されていた。

CADS誘導の冠状動脈血管炎に伴いMPO-ANCAは、MPO-KOマウスでは、野生型マウス比し著しく抑制された。MPO-KOマウスではCADS誘導の冠状動脈血管炎が激減した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujii, A., Tomizawa, K., Arimura, Y., Nagasawa, T., Y-Ohashi, Y., Hiyama, T., Mizuno, S. and K. Suzuki. Epitope analysis of myeloperoxidase-specific anti-neutrophil Cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated glomerulonephritis. Clin. Nephrology 53, 242-252, 2000.
- 2) Y. Kawai, A. Ishida-Okawara, H. Okuyama, F. Kura, K. Suzuki. "Modulation of chemotaxis, O2-production and myeloperoxidase release from human polymorphonuclear leukocytes by the ornithine-containing lipid and serineglycine-containing lipid of *Flavobacterium*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 28, 205-209, 2000.
- 3) Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda and M. Koyama. "Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. J. Infectious Diseases 182, 1276-1279, 2000.
- 4) K. Suzuki, H. Nuno, M. Miyazaki, F. Koi Book : The Peroxidase Multigene Family of Enzymes. Springer-Verlag: Berlin; 2000 Chapter 20 in Petrides P.E., Nauseef W.M. (Eds). "Prevalence of Inherited Myeloperoxidase Deficiency in Japan"
- 5) 鈴木和男 特集「血管炎の基礎と臨床」血管炎と自己抗体—抗好中球細胞質抗体を中心に— 最新医学 55; 2636-2646, 2000

##### 2. 学会発表

- 1) Kazuo Suzuki, Akiko Ishida-Okawara,

- Yuki Hashimoto, Toshikazu Shirai, Hiroshi Hashimoto. Risk epitope of MPO of vasculitis in Japanese population. 第9回国際血管炎 ANCA Workshop 4月12日—15日, グロニンゲン・オランダ
- 2) Kei Takahashi, Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Yuki Hashimoto, Shiro Naoe, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Kazuo Suzuki. MPO is not antigen for MPO-ANCA in candida extract (CE)-induced vasculitis: Observation using MPO-KO mice. 第9回国際血管炎 ANCA Workshop 4月12日—15日, グロニンゲン・オランダ
- 3) T. Ihara, E. Muso, S. Sasayama, A. Ishida-Okawara, Y. Hashimoto, K. Suzuki. Studies on Neutrophil Function and Glomerulonephritis. 第9回国際血管炎 ANCA Workshop 4月12日—15日, グロニンゲン・オランダ
- 4) 鈴木和男 シンポジウム「深在性真菌の発症機序とその対策—アスペルギルス症を中心として：真菌感染成立に関与する好中球機能」第74回日本感染症学会、4月20日—21日
- 5) 鈴木和男 シンポジウム「自己免疫抗原：血管炎の病態に関連するMPO-ANCAのリスクエピトープ」第44回日本リウマチ学会、5月13日—15日
- 6) 鈴木和男 「血管炎におけるMPO-ANCA」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 7) 大川原明子、雑賀 寛、根本久一、鈴木和男「SCG/kj マウスの糸球体腎炎の発症・進行における活性化好中球の役割」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 8) 猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、橋本ゆき、大川原明子、鈴木和男 「糸球体腎炎における好中球機能についての検討」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 9) 大原関利章、大川原明子、高橋 啓、
- 荒谷康昭、橋本ゆき、若山 恵、渋谷和俊、村田久雄、直江史郎、鈴木和男 「カンジダ菌抽出物を用いた川崎病血管炎モデルにおけるMPO-ANCAの検討：MPO ノックアウトマウスを用いた解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 10) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男 「ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの真菌および細菌に対する感染防御能の解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 11) 倉 文明、後藤紀久、前川純子、塚野尋子、Dinauer MC、荒谷康昭、小山秀機、鈴木和男 「Lgn1r あるいは NADPH oxidase によるマウスの致死性のレジオネラ肺炎の防御」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 12) 亀岡洋祐、安谷屋正明、鈴木和男 「新規MPO 完全欠損患者の遺伝子解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 13) 松岡俊行、橋本ゆき、大川原明子、Keiko Ozato、新井孝夫、鈴木和男 「ICSBP/IRF-8 ノックアウトマウスにおける好中球およびMPO-ANCA 産生に関する解析」第6回MPO研究会、6月24日—25日、熱海
- 14) Kazuo Suzuki Geneva Biology of Ageing Workshop 2000: Phagocytes, Inflammation and Ageing. September 1-2, 2000 in Geneva 加齢生物学ワークショップ ジュネーブ2000：食細胞、炎症および加齢
- 15) Kazuo Suzuki, Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Yuki Hashimoto, Yosuke Kameoka, Takeshi Saito, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Nobuyo Maeda, Shiro Naoe A Role of myeloperoxidase (MPO) for production of MPO-ANCA in Candida albicans-derived substances (CADS)-induced vasculitis in the coronary arteries using MPO-deficient mice and

- recombinant mouse MPO. The peoxidase superfamily II of animal and human enzymes: Biochemical basis and clinical application. September 3-8, 2000 in Vienna
- 16) Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda, and H. Koyama. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research, Oct. 16-20, Kyoto
- 17) 荒谷康昭, 倉 文明, 渡辺治雄, 赤川久義, 高野幸枝, 鈴木和男, Nobuyo Maeda, 小山秀機 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能の低下 第 73 回日本生化学会大会 10 月 11~14 日、横浜
- 18) 鈴木和男 血管炎における好中球と MPO-ANCA の役割第 5 回血管炎研究会 10 月 13~14 日、東京
- 19) 大原関利章、大川原明子、高橋 啓、荒谷康昭、直江史郎、鈴木和男 カンジダ菌体抽出物誘導の血管炎モデルマウスにおける血管炎と MPO-ANCA の相関(2)ーMPO ノックアウトマウスを用いた解析ー 5 回血管炎研究会、10 月 13~14 日、東京
- 20) 荒谷康昭、倉文明、鈴木和男、小山秀機 MPO ノックアウトマウスの真菌・細菌に対する感染防御能の低下 第 30 回日本免疫学会、11 月 14 日~16 日、仙台
- 21) 大原関利章、大川原明子、高橋 啓、荒谷康昭、直江史郎、鈴木和男 カンジダ菌体抽出物誘導の血管炎モデルマウスにおける血管炎と MPO-ANCA の相関(2)ーMPO ノックアウトマウスを用いた解析ー」第 30 回日本免疫学会、11 月 14 日~16 日、仙台
- 22) 大川原明子, 大原関利章, 高橋 啓, 橋本ゆき, 荒谷康昭, 直江史郎, 代田和恵, 鈴木和男 カンジダ菌体抽出物 (CADS) 誘導の血管炎モデルマウスにおける血管炎と MPO-ANCA の相関 ー MPO ノックアウトマウスを用いた解析 ー 第 23 回日本分子生物学会、12 月 13 日~16 日、神戸
- 23) 亀岡洋祐、Amanda Persad、安谷屋正明、鈴木和男 新規 MPO 完全欠損患者の遺伝子解析 第 23 回日本分子生物学会、12 月 13 日~16 日、神戸

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 12 年度厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)  
「輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究」

分担研究報告書

抗真菌剤耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索

分担研究者・新見昌一 国立感染症研究所 室長

「輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発」として分担研究者が行った以下の研究課題 (I. パン酵母を用いた病原真菌の薬剤排出ポンプの機能解析、II. 日和見真菌 *Candida glabrata* の抗真菌剤に対する耐性機構、III. 真菌の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索) に関して、平成 12 年度の成果を以下に報告する。

I. パン酵母を用いた病原真菌の薬剤排出ポンプの機能解析

A. 研究目的

フルコナゾールなどアゾール剤耐性の *Candida albicans* が臨床材料から数多く分離されており、临床上重要な問題になっている。耐性株の出現はカンジダ症及び深在性真菌症の予防と治療を一層困難にすることは疑う余地がない。真菌のアゾール剤耐性には主に ABC (ATP Binding Cassette) トランスポーターおよび MFS (Major Facilitator Superfamily) トランスポーターなどの薬剤排出ポンプが関与することが明らかになってきた。全ゲノム塩基配列が明らかになった *Saccharomyces cerevisiae* から予想されるように、50 種余りのトランスポーターが病原真菌細胞膜上に存在しており、個々のトランスポーターがどのような薬剤をどの程度排出する機能を保持しているかについては興味深く、また解明する必要がある。

そこで病原真菌の有する一連の主要な排出ポンプ遺伝子を、7 種の自己のポンプが破壊されたためにアゾール剤に高度感受性になった *S. cerevisiae* AD 株に導入・発現し、それぞれの排出ポンプの耐性を与える程度およ

び基質選択性など種々の性状を比較検討する。すでに *C. albicans* の主要な ABC 排出ポンプである *CDR1* を *S. cerevisiae* AD 株に導入し、多剤耐性となった AD/*CDR1* 株を得ており、AD 株が病原真菌の排出ポンプの発現系酵母として極めて有用であることが示された。今回はこの株に *C. albicans* の *CDR2* または *C. glabrata* の *CgCDR1* を導入、発現させてアゾール剤耐性株を作製することにした。

B. 研究方法

*C. albicans* または *C. glabrata* のゲノム DNA を鋳型にして、ORF 部分の両端に適当な制限酵素を付加したプライマーを用いてそれぞれのポンプ遺伝子を PCR 増幅した。これを制限酵素で消化後 pSK-PDR5 ベクターに挿入し、大腸菌にサブクローン化した。さらにパン酵母 AD 株を *CDR2* または *CgCDR1* 挿入プラスミドで形質転換し、ウラシルを栄養要求マーカーにして AD/*CDR2* 株または AD/*CgCDR1* 株を得た。形質転換株から細胞膜画分を抽出し、導入したポンプの発現を SDS-PAGE 後のクマシーブルー染色で確認し、親株およびポンプ導入株の抗真菌剤に対する感受性は感受性ディスク法



およびマイクロタイタープレートによる MIC によって比較した。

### C. 研究結果

*Saccharomyces* 酵母に導入したポンプ遺伝子のアミノ酸配列は導入前の *Candida* のゲノム DNA によってコードされる配列と完全に一致したので、PCR 増幅による変異が生じていないことが確認された。SDS-PAGE によって AD/*CDR2* 株の細胞膜画分には 170 kDa の蛋白が過剰に発現していた。AD 株、ベクターのみを挿入した AD/pSK-PDR5 株、AD/*CDR1* 株 (すでに作製済み)、および今回作製した AD/*CDR2* 株、AD/*CgCDR1* 株に対する各アゾール剤の MIC 値を Table 1 に示した。AD および AD/pSK-PDR5 株はアゾール剤のいずれに対しても高い感受性を示したのに対して、*C. albicans* の *CDR1* または *CDR2* あるいは *C. glabrata* の *CgCDR1* を導入した株ではアゾール剤 3 剤に対して交叉耐性を示した。

### D. 考察

このように異種の排出ポンプを *S. cerevisiae* AD 株に発現させて高度耐性株を作製することによって個々のポンプの詳細な生化学的解析、特に基質特異性、キネテックスおよびポンプ NTPase 活性等を解析することができ、ポンプ間の性状比較が可能となる。

今後はこれらのポンプ機能について明らかにすると共に、さらに *C. glabrata* の *CgCDR2* やその他の主要な病原真菌の *Cryptococcus neoformans* および *Aspergillus fumigatus* の各排出ポンプを同様の手法で *S. cerevisiae* AD 株に導入・発現し、それぞれの排出タンパクについての生化学的解析を行なう予定である。また排出タンパク検出のためのツールとして特異抗体が必須であるので、それぞれの排出タンパク特異抗体を Gene Fusion System によって作製する。

### E. 結論

*CDR1* のみならず *CDR2* および *CgCDR1* はパン酵母においても機能することが分かった。この発現系は他の病原真菌の排出ポンプの機能をしらべるためにも極めて有用であると思われる。

### F. 健康危険情報

ない。

### G. 研究発表

学会発表 (関連研究)

仲村健二郎、新見昌一: *Candida albicans* 薬剤排出ポンプ *Cdr1p* のパン酵母での機能発現。日本医真菌学会総会 平成 12 年 11 月 長崎

Table 1. Antifungal sensitivities of *S. cerevisiae* cells expressing a *Candida* efflux pump

<i>S. cerevisiae</i> strain	MIC <sub>50</sub> (μg/ml)		
	Fluconazole	Ketoconazole	Itraconazole
AD	0.5	0.13	0.031
AD/pSK-PDR5	0.5	0.063	0.031
AD/ <i>CDR1</i>	32	4	1
AD/ <i>CDR2</i>	64	2	1
AD/ <i>CgCDR1</i>	64	2	1

## II. 日和見真菌 *Candida glabrata* の 抗真菌剤に対する耐性機構

### A. 研究目的

最近、*Candida glabrata* や *C. krusei* など *C. albicans* 以外のカンジダ属菌による日和見真菌症が易感染性宿主を中心に増加し、分離されるカンジダ菌種のほぼ半数を占めている。これらの菌種はフルコナゾールなどのアゾール系抗真菌剤にある程度耐性を示し、比較的感受性の高い *C. albicans* と入れ変わるかのように数多く分離されている。しかしこれらの菌の耐性機構についてはよく分かっていない。そこで、*C. glabrata* のフルコナゾール耐性に関わると考えられる性質についてしらべた。

### B. 研究方法

*C. glabrata* の臨床分離株 3 株について、種々の培地を用いて好氣的、嫌氣的に培養してフルコナゾールその他の薬剤に対する感受性を感受性ディスク法およびマイクロタイタープレートによる MIC によって比較した。また、呼吸阻害剤オリゴマイシンまたは CCCP の sub-MIC 濃度を培地に添加して、呼吸活性が低下した状態でのフルコナゾールの感受性の変化をしらべた。さらに、好氣的または嫌氣的に培養した菌の細胞膜画分を抽出して SDS-PAGE による電気泳動後クマシーブルー染色によって膜蛋白の発現の違いを比較するとともに、耐性に関与していると思われる遺伝子をプローブとしてノーザン分析を行い、ACT1 mRNA の発現を internal control として各遺伝子 mRNA の発現レベルを比較した。

### C. 研究結果

*C. glabrata* を YEP を基にして好気培養すると、グリセロールに比べてグルコース中でフルコナゾールに対する感受性が低く、グルコース培地での嫌気培養菌は好気培養菌に

比べて感受性が低かった (Fig. 1)。グリセロールに呼吸阻害剤を加えて培養するとフルコナゾール感受性が著しく低下することも観察された。呼吸が低下している菌は他のアゾール剤 (イトラコナゾールとケトコナゾール) やセルレニンに対しても感受性が低下した。しかしポリエン抗生物質のナスタチンに対しては感受性の違いは認められなかった。

異なる培養条件のもとで増殖した菌の細胞膜画分について SDS-PAGE 後のクマシーブルー染色では膜蛋白の発現に大きな相違は認められなかった。またミクロソーム画分の SDS-PAGE によっても蛋白の発現に大差はなかった。ノーザン分析においては *CgSNQ2* および *CgCDR2* mRNA には培養条件の違いによる差は認められず、また *CgMDR1* mRNA はいずれの培養菌からも発現が検出されなかった。しかし *CgCDR1* および *CgERG11* mRNA の発現は低酸素状態で増殖した菌において顕著に亢進していた。

次に、*C. glabrata* をフルコナゾール含有または非含有 YEPD 培地で培養し、菌の細胞膜画分を分離した。SDS-PAGE で泳動してクマシーブルー染色すると、フルコナゾールを含む培地で増殖した菌では 170 kDa (ABC ポンプに相当) および 58 kDa (MFS ポンプまたは 14  $\alpha$ -demethylase に相当) のタンパク質が過剰に検出された。*CgCDR1* および *CgCDR2* の各 DNA 断片をプローブとしてノーザン分析を行なうと、フルコナゾールを含む培地で増殖した菌には *CgCDR1* mRNA の過剰発現が認められた。

### D. 考察

以上の結果から、*C. glabrata* のフルコナゾール感受性の低下は、呼吸の低下と密接に関連することが分かった。呼吸の低下がなぜフルコナゾール感受性の低下をもたらすのかは不明であるが、排出ポンプ (*CgCDR1*) の関与または 14  $\alpha$ -demethylase の過剰発現が推察される。即ち、発酵によって毒性の高

い代謝産物が細胞内に蓄積し、それをポンプが排除するのではないか、あるいはステロールの合成反応は酸化的に進むので、呼吸低下によって毒性の高い中間ステロールが蓄積してポンプの発現を誘導するのではないかということが想像される。一方、ステロール合成の脱メチル化が酸化的に起こることから嫌機的条件下では反応の低下を補うために 14  $\alpha$ -demethylase の発現が亢進するということもあり得る。これらの仮説をさらに検証する必要があるが、このような菌の性質を臨床に当てはめてみると、生体内の酸素分圧の低い環境ではフルコナゾール感受性が低下し、フルコナゾールに触れると菌はより耐性になるであろう。

#### E. 結論

*C. glabrata* においては低酸素状態、高グルコースまたは呼吸の低下がフルコナゾール感受性の低下をもたらすことが分かった。*C.*

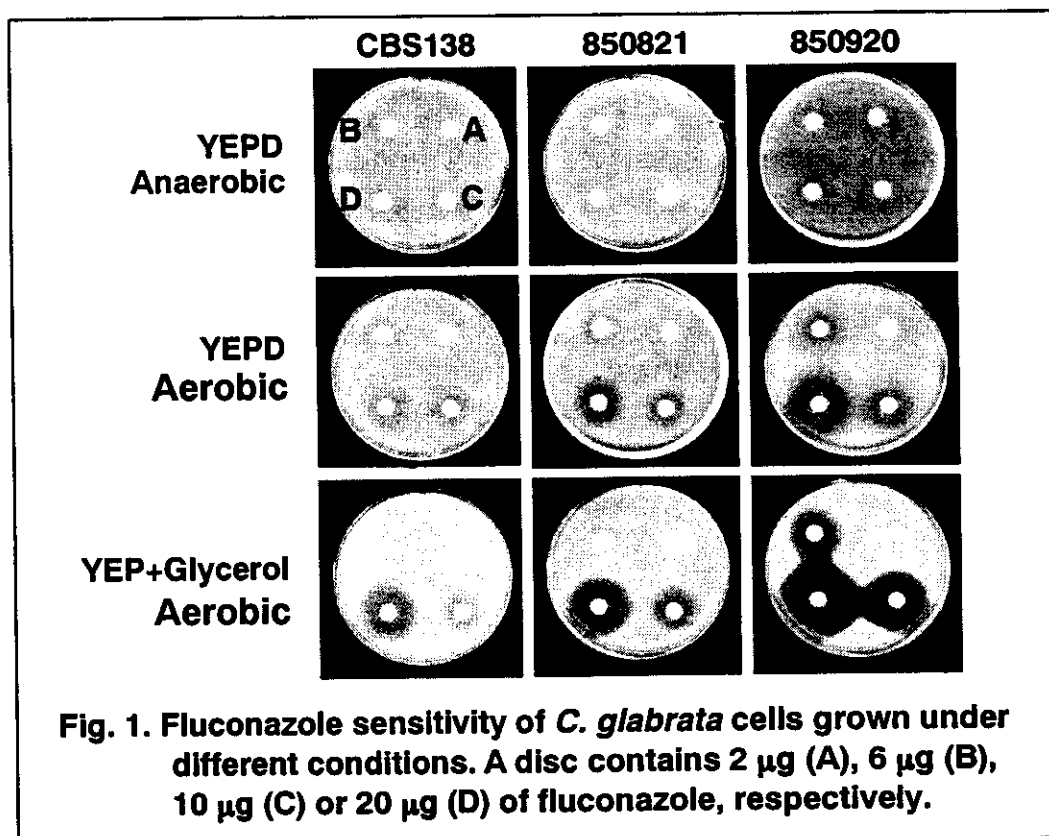
*glabrata* のフルコナゾール感受性の低下には ABC タイプの排出ポンプおよび 14  $\alpha$ -脱メチル化酵素の発現の可能性が示唆される。*C. glabrata* のこのような性質が *in vivo* でも起こるとすれば、生体内の酸素分圧の低下した環境ではフルコナゾール感受性は低下し、またフルコナゾールに曝されると菌はより耐性になることが推測される。

#### F. 健康危険情報

ない。

#### G. 研究発表 (学会発表)

新見昌一：日和見真菌 *Candida glabrata* のフルコナゾールに対する耐性機構。日本細菌学会関東支部総会、平成12年11月、東京  
 与倉貴子、高野幸枝、新見昌一：日和見真菌 *Candida glabrata* のフルコナゾールに対する耐性機構。真菌症フォーラム第2回学術集会 平成13年1月 東京



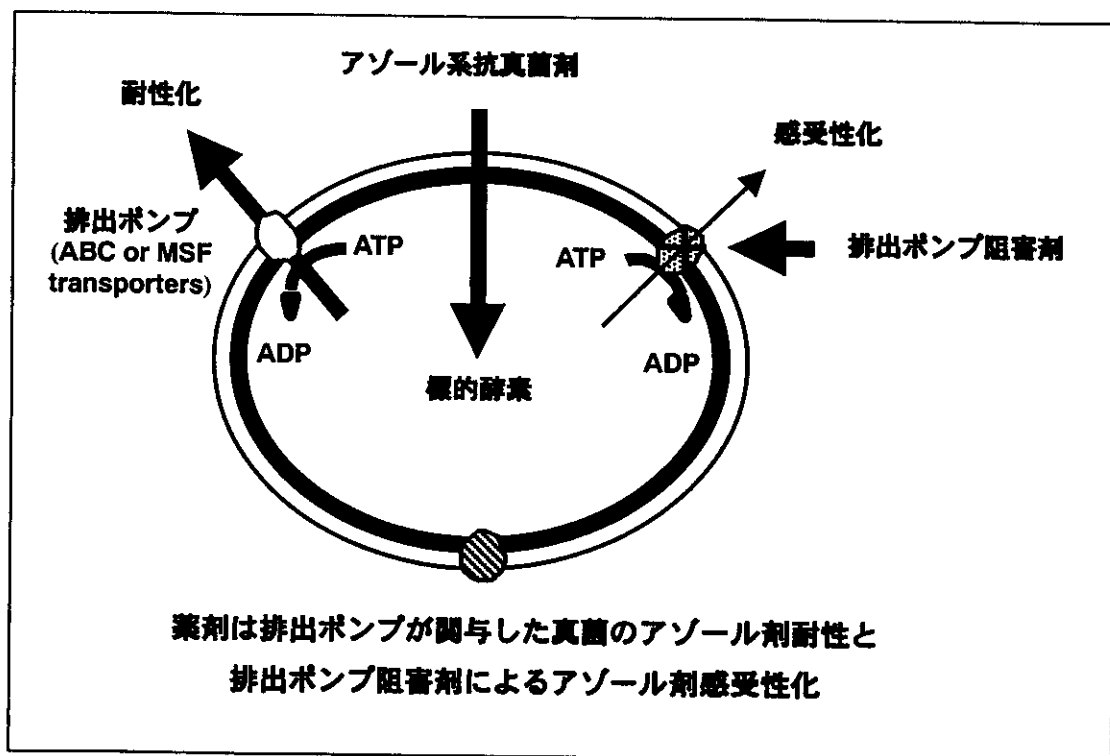
### III. 真菌の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索

#### A. 研究目的

薬剤排出ポンプ阻害物質の探索を目的とする。真菌はヒト細胞と同じ真核細胞であるために我々の区別が少なく、真菌のみを特異的・選択的に阻害する薬剤をみいだすのは難しい。このことが新しい抗真菌剤の開発をばむ大きな障害になっているが、アゾール剤耐性菌対策は緊急かつ現実の問題である。薬剤排出ポンプを阻害する物質をアゾール剤と併用すれば、アゾール剤はポンプに汲みだされることなく真菌細胞内で有効濃度が保たれ、耐性菌の増殖をも阻止することが期待される(下図)。このようにポンプを阻害することにより既存の抗真菌剤の活性を復活させる試みは、新しい抗真菌物質を探索することと並行して、耐性菌対策には有益であると考えられる。

当研究室には *Streptomyces* 属菌を主体とする土壌細菌を数千株を保有している。本研究では、これらの細菌の培養ろ液の中から薬剤排出ポンプを標的分子とする阻害剤を効果

的に探索することを企画した。スクリーニングの評価系としては、Prof. Andre Goffeau (Unite de Biochimie Physiologique, Universite de Louvain, Belgium) および Dr Brian C Monk (Molecular Microbiology Laboratory, University of Otago, New Zealand) が作製した *Saccharomyces cerevisiae* OE 株を用いる。この株は *S. cerevisiae* の薬剤排出ポンプ Pdr5p が過剰発現してフルコナゾールに高度耐性 (MIC = 600  $\mu\text{g/ml}$ ) となった変異株である。フルコナゾール共存下でこの耐性株の増殖を阻止する培養ろ液を検索する。また増殖阻害を示した培養ろ液についてはさらに先に *S. cerevisiae* AD 株に *C. albicans* の主要な排出ポンプ遺伝子 *CDR1* または *CDR2*、および *C. glabrata* の *CgCDR1* を導入し、アゾール剤耐性となった AD/*CDR1* 株、AD/*CDR2* 株および AD/*CgCDR1* 株に対する阻害効果を *S. cerevisiae* OE 株の場合と同様にしらべる。



## B. 研究方法

生物活性物質部・抗生物質室保存の *Streptomyces* 属菌 1357 株をペプトン・酵母エキス・グリセリン培地 (E 培地) および大豆粉・コーンスターチ培地 (F 培地) に培養し、その培養上清を得た。*S. cerevisiae* OE 株を 40  $\mu\text{g/ml}$  のフルコナゾールを含むまたは含まない YEPD 培地に加えて角形シャーレに流して固めた。次に培養上清を含ませたペーパーディスクを培地表面に置き、27°C で2日間培養した。フルコナゾールを含まない培地では菌の増殖を阻害せず、フルコナゾール存在下で増殖を阻止する培養ろ液を探した。活性を示した培養ろ液は、シリカゲルカラムを用いてアセトニトリルおよびクロロホルムで展開した。活性画分は各種溶剤を用いて TLC アッセイを行い純度を検討した。この画分を上述の方法で感受性ディスクテストを行い、*S. cerevisiae* OE 株、AD/CDR1 株、AD/CDR2 株および AD/CgCDR1 株に対する阻害効果をしらべた。

## C. 研究結果

1357 株のうち 1 株の培養ろ液 (780F) がフルコナゾール存在下でディスク周辺に大きな阻止円を形成し *S. cerevisiae* OE 株に対して強い増殖阻害効果を示した (1 次スクリーニング)。さらにクロマトグラフィーにより粗分画した活性物質は *S. cerevisiae* OE 株のみならず AD/CDR1 株、AD/CDR2 株、AD/CgCDR1 株に対してフルコナゾール存在下でのみ菌の阻害効果を示した。

## D. 考察

以上の結果からフルコナゾールと 780F 培

養ろ液との組み合わせはフルコナゾール耐性の *S. cerevisiae* のみならず、*C. albicans* や *C. glabrata* のポンプを発現しフルコナゾール耐性を獲得した *S. cerevisiae* に対しても有効であることが明かとなった。今後はマイクロタイタープレートを用いてフルコナゾールと 780F 培養ろ液との組み合わせによる感受性化テスト、フルコナゾールの細胞内蓄積に対する阻害効果、*in vitro* における排出ポンプ ATPase 阻害効果などをさらに検討する。

## E. 結論

*Streptomyces* 属菌の培養ろ液からフルコナゾール存在下でフルコナゾール耐性菌の増殖を阻止する 1 株の培養ろ液をスクリーニングした。*S. cerevisiae* OE 株はポンプ阻害剤スクリーニングの評価系として簡便で優れていることが証明された。

## F. 健康危険情報

ない。

## G. 研究発表

ない。

## H. 参考文献

Nakamura, K., Niimi, M., Niimi, K., Yates, J. E., Decottignies, A., Monk, B. C., Goffeau, A. and Cannon, R. D. Functional expression of the *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Submitted).

平成12年度厚生科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業  
研究協力者報告書

輸入真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究	
岡部 信彦（国立感染症研究所感染症情報センター）	75
微生物資源としての菌類	
奥田 徹、沖 俊一（玉川大学学術研究所）	78
後天性免疫不全症候群(AIDS)における真菌症に関する病理学的研究	
渋谷 和俊（東邦大学医学部大橋病院）	81
住環境にみる真菌とその生態	
高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所）	88
剖検からみた深在性真菌症の発生状況に関する観察	
直江 史郎（東邦大学医学部大橋病院）	92
放線菌の特定菌種に特異な遺伝子の迅速検出に関する研究	
堀田 国元（国立感染症研究所）	96
石川 淳、土崎 尚史（共同研究者）	
本邦における <i>Nocardia</i> 症の原因菌の分類同定に関する研究	
三上 襄（千葉大学真菌医学研究センター）	102
エイズ患者の口腔内における <i>Candida flora</i> の変遷	
宮治 誠（千葉大学真菌医学研究センター）	107
国内の抗真菌薬の現状と新規抗真菌薬の開発状況	
八木澤 守正（財団法人日本抗生物質学術協議会）	112
わが国における抗真菌薬の現状と将来に関する資料文献収集及び分析	
山口 英世（帝京大学医真菌研究センター）	122

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

研究報告書

輸入真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究

主任研究者 上原至雅 国立感染症研究所生物活性物質部

研究協力者 岡部信彦 国立感染症研究所感染症情報センター

研究要旨 本研究協力者は、主任研究者および亀井克彦分担研究者（輸入真菌症の疫学および制御）に協力し、感染症情報センターにおいて感染症サーベイランスから4類感染症として報告される真菌症(コクシジオイデス症)の状況をまとめ、研究班として入手されるデータとの比較等を行い、輸入真菌症の疫学調査を行うこととした。平成11年4月感染症法施行後、平成12年12月末までのコクシジオイデス症の報告は1例のみにとどまった。

A. 研究目的

米国西南部（カリフォルニア、アリゾナ、テキサス、ネバダ、ユタの諸州）、メキシコ西部、アルゼンチンのパンパ地域、ベネズエラのファルコン州の半乾燥地域の風土病で、我が国での報告は稀である。しかし、今後「輸入感染症」としての警戒は必要であり、平成11年より施行されている「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」では「4類感染症-全数報告疾患-」に指定され、その発生動向は国のサーベイランス対象疾患として調査されるように整備された。

上記の本症常在地では、土壌中にいる原因真菌である *Coccidioides immitis* の分節型分生子が強風や土木工事などで空中に舞い上がり、これら分生子の吸入によりヒトの肺に感染を起こす。患者の約0.5%は全身感染となり、その半数が致死性的となる。本症が発生した場合特別な注意が必要とされるといわれるのは、検査室研究室などで本菌の存在を意識することなく検体培養中のシャーレのふたを不用意

に開けるなど不適当な取扱いをすると、分生子が舞い上がることによって室内が汚染され、菌を取り扱う検査技師や研究者が危険に曝されることがあることによる。米国では過去に200名近い研究者および臨床検査技師が感染を経験しており、死亡例も少なくない。

本邦ではこれまでに25例が確認されている。主にカリフォルニア州やアリゾナ州への海外渡航歴を有する患者であるが、うち2例は渡航歴の無い綿花を扱う工場の従業員で、輸入された綿花に付着した原因菌により感染したものと考えられている（感染症週報掲載記事より）。

B. 研究方法

感染症法では、法律の対象となる感染症を1-4類、指定感染症および新感染症に分類してある。本症は、4類感染症—全数把握疾患—に分類されている。4類感染症は、サーベイランスを行い、その情報を提供・公開することによって、疾患の発生拡大を防止しようとするもので、全医師に診断から7日以内の届け

出を求めるもの（全数把握疾患）と、定点医療機関の協力を求めてその発生動向の傾向を求めるもの（定点把握疾患）に分かれている。本症はこの前者に分類される。

得られた1-4類感染症情報は報告のあった各地域でも解析・還元されるが、国利感染症研究所感染症情報センターにおいて国全体のデータとして解析し、還元が行われている。4類全数感染症の発生届け出は規定の書式にしたがって行われるが、個人を特定できる様な項目に関しては人権保護の立場から含まれていない。得られた情報は、感染症情報センターにおいて従来の印刷物による月報、年報等に加えて、ホームページ（<http://idsc.nih.go.jp/index-j.html>）の利用などによって、対象となっている1-4類感染症すべてについて、そのサーベイランス結果を感染症週報(Infectious Disease Weekly Report: IDWR)として最新情報の還元提供を行っている。なおこれらの情報の公表にあっても、すべての疾患について人権保護の立場から、氏名等の患者個人を識別できる情報は除かれている。

本研究にあたっては、このサーベイランス情報に基づいたコクシジオイデス症に関する疫学情報をまとめようとするものである。

なお本症の届け出にあたっての症例定義等は、以下のようになっている。

定義：カリフォルニア州、アリゾナ州、ニューメキシコ州をはじめとする米国西南部各州、メキシコの太平洋側の半乾燥地帯、ベネズエラのコロ地方、アルゼンチンのパンパ地域に発生する風土病で、原因菌は真菌で *Coccidioides immitis* である。

臨床的特徴：南北アメリカ、特にカリフォルニア州のサンホアキン溪谷で患者が多発し

ている。強風や土木工事などにより土壌中の *C. immitis* の分節型分生子が土埃と共に空中に舞い上がり、これを吸入することにより肺感染が起こり、そのうち約0.5%の患者が全身感染へと進み、約半数が死亡する最も危険な真菌症である。特に皮膚病巣は特徴があり、結節、潰瘍を繰り返し、花キャベツ状の腫瘤を形成する。

報告のための基準：

当該疾患を疑う症状や所見があり、かつ、以下のいずれかの方法によって病原体診断がなされたもの。

・病原体の検出

例、喀痰などからの分離・培養と菌の分離（鏡検）など

## C. 研究結果

平成11年4月感染症法施行後、平成12年12月末までのコクシジオイデス症の報告は1例のみであった。

報告は東京都からなされたものであり、アリゾナ州で感染したことが疑われる28歳男性例であった。周辺での感染拡大はなかったとされている。

IDWRでは、サーベイランスの結果などに加えて、海外における感染症情報を収集し、その主なものも掲載しているが、本症に関しては、「メキシコから（米国に）戻った旅行者におけるコクシジオイデス症(MMWR/CDC 2000年11月10日)」がある。教会建設のためにメキシコのHermesilloに1週間滞在した米国人旅行者30人うち8人が感染、そのうち7人に症状が見られたというものである。予後は良好であった。

## D. 考察と結論

感染症発生動向調査システムに基づいて届



け出がなされた症例は1例であった。分担研究者の亀井の報告によれば、この間数例の連絡が千葉大学真菌症センターにあり、報告漏れ例があふことが指摘されている。主任研究者上原のアンケート調査によれば、本性の届け出義務を知っていた医師は約48%と半数に至っておらず、今後の周知徹底が必要である。

感染症情報センターでは、本症に関する解説記事の感染症週報(IDWR)の掲載(平成12年51/52週号)、あるいは病原微生物検出情報(IASR:月報)への特集記事の編集などのより、本症に関する理解を広く求めることとした。

感染症情報センターには、これらのIDWR、IASRなどを介した読者からの問い合わせの他、インターネット、電子メール、電話等による一般からの問い合わせに対しても積極的に応じるようにしている。平成12年1年間に、具体的な本症の問い合わせがあったのは某医療機関からの患者についての問い合わせと、患者自身への診断についての問い合わせであった。前者については本研究班の分担研究者である亀井が所属する千葉大学医学部真菌センターを紹介することによって診断が確定、真菌センターへは患者登録がなされているが、4類感染症としての届け出はまだなされていない。患者からの問い合わせについては、電子メールによる当方からの回答のみであり、その後の経過について当方からの問いかけに対する回答はこれまでのところ得られていない。

しかし今後本症に関するサーベイランスが強化され、各分野の理解を広く得ることによって、本症の実態が明らかとなり、その結果は、第一線にある医療機関、公衆衛生機関にフィードバックされ、患者の早期発見と治療、そして疾患の拡大防止に結びつくことが期待される。

## 厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

### 研究報告書

#### 輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究

#### 微生物資源としての菌類

研究協力者 奥田 徹 玉川大学学術研究所教授

沖 俊一 玉川大学学術研究所客員教授

研究要旨 真菌症治療薬を天然物から発見することを目的とし、未知の部分の多い菌類を分離・培養しスクリーニング・サンプルのライブラリーを構築した。これまでに 2,500 株以上の多様性に富んだ菌類を分離し、4,000 サンプルのライブラリーを完成した。この課程で菌類の新しい分離法を開発、また新種と思われる菌類を得た。ライブラリーの中から 960 サンプルをスクリーニングに供給し、いくつかのヒットを認めた。

#### A. 研究目的

*Penicillium citrinum* から発見された三共のメバロチンと *Tblypocladium inflatum* の生産物であるサイクロスポリンが、それぞれ天然物由来の医薬品として脚光を浴びて以来、微生物を用いた生理活性物質スクリーニングが行われてきた。中でも菌類は、地球上に生息していると推定される 150 万種の約 5%、わずか 71,000 種しか明らかにされておらず、95% は未開拓資源である。しかも、そのうち培養可能な菌類は 5%であり、新規菌類の分離同定ならびに培養技術の開発が行なわれれば、さらに資源としての価値も高まる可能性がある。菌類は植物内生菌としての共生、動植物に対する寄生、様々な基質上での腐生的な栄養分と領域の奪い合いによる菌類の遷移など、相互作用の中で情報伝達、生理活性物質の産生など重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、それらの相互関係の研究から、有用な抗真菌物質が開発できる期待は大きい。

一方で、とくにアメリカを中心とした先進国ではコンビナトリアル・ケミストリーとハイスループット・スクリーニングが盛んに行われ、人手と時間がのにかかる天然物スクリーニングから撤退する企業が相次いでいる。しかし菌類の新規代謝産物発見はまだ増加傾向にあること、対象と方法を選び、ライブラリーを構築すれば、効率よいスクリーニングが可能となり、新規物質を発見できる可能性は高い。

#### B. 研究方法

玉川学園内、津軽地方、八丈島などで採集した土壌、泥炭、落葉、朽ち木、キノコなどを用い、洗浄濾過法、表面殺菌法、直接分離法などで菌類を分離し、純粋培養株を確立した。この課程ではとくに内生菌、植物病原菌、落葉分解菌、菌類寄生菌、核菌類をターゲットにした。

分離株は、仮同定をして、取捨選択し、10%グリセリン水に懸濁して-80℃で超低温保存した。

保存株を適宜スラントに復元し、固体培地（2種：押し麦、ソバの実を用いた培地）と液体培地（2種：グリセリンとペプトン、でんぷんと大豆粉）を 20 g または 20 ml 用い、容器は 250 ml 容三角フラスコを用いて静置培養した。培養温度は 25℃、培養日数は 12 から 15 日である。

培養物は等量のブタノールで抽出し、ブタノール層を 96 穴マイクロプレートに 150 ~ 200  $\mu$ l ずつ分注し、40℃で減圧濃縮乾燥した。これを無酸素下、-80℃でサンプル・ライブラリーとして保存した。

ライブラリーから 960 サンプルをスクリーニングに供試した。

すべてのデータはマイクロソフト・アクセスを用いて作ったデータベース STRAUSS に入力した。

（倫理面への配慮）

ヒト由来材料などは扱っていないので問題ない。

### C. 研究結果

玉川学園内、津軽地方、八丈島などで採集した土壌、泥炭、落葉、朽ち木、キノコなどから、洗浄濾過法、表面殺菌法、直接分離法などを用い、土壌菌、内生菌、植物病原菌、落葉分解菌、菌類寄生菌、核菌類など合計 2,500 株以上を純粋分離した。

このうち、津軽地方の泥炭から分離した *Tolypocladium cylindrosporum*、*Acremonium guillematii*、*Clitocybe* sp. や *Lactarius* sp. から分離した *Hypomyces armeniacus* などは日本新産種である。八丈島の土壌から分離した *Idriella* sp.、八丈島の朽ち木より分離した *Chaetosphaeria* sp. は新種と考えられる。

新しい分離法の検討結果、電解水を用いた表面殺菌法を開発した。これにより、植物内生菌のみならず表面に生息する菌も効率よく分離できた。

固体培地 2 種、液体培地 2 種を用いて培養した培養物をブタノール抽出し、合計 4,000 サンプル以上のスクリーニングサンプル・ライブラリーを構築した。

このライブラリーから 960 サンプルを polyHEMA スクリーニング、酵母の薬剤排出ポンプ阻害剤スクリーニングのために供試した。その結果、17 サンプルに活性が認められた。

### D. 考察

対象を明確にして、効率よい分離法を開発し、新種、日本新産種と思われる菌類を分離できたことは新規物質発見に寄与する大きな一歩と考えられる。また 960 サンプルから期待できるヒットが 17 サンプル得られたことは意義がある。

### E. 結論

今回のスクリーニングで得られた 17 サンプルのヒットについて、再培養を行い、再現性を確認し、活性物質のプロファイリング、単離精製など次のステップに進める必要がある。

### F. 健康危険情報

対象としている菌類はいずれも腐生菌か植物病原菌であり、ヒトの健康管理上問題ない。ただし、無菌操作はクリーンベンチ内で行い、また有機溶媒はドラフト内で操作することにより安全、健康管理を行った。実験操作終了後は手洗いなどを履行した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

常盤俊之・奥田徹 2000 日本産菌寄生核菌類 *Hypomyces* 属菌 3 種 日菌報 (投稿受理)

### 2. 学会発表

常盤俊之・奥田徹 2001 日本産菌寄生核菌類 *Hypomyces* 属菌 3 種 日本菌学会大会口頭発表予定 (5 月 20 日 日本獣医大学)

奥田徹・植木清子・渡辺京子・栗原正幸 2001 電解機能水を用いた菌類の分離 日本菌学会大会口頭発表予定 (5 月 20 日 日本獣医大学)

奥田徹・山本耕三・岸登 八丈島の菌類 (1) *Idriella* sp., *Exserticlava vasiformis*, *Brachiosphaera tropicalis* 日本菌学会大会口頭発表予定 (5 月 20 日 日本獣医大学)

T. Okuda, K. Yajima, K. Yamamoto, K. Watanabe, and K. Ueki 2001 Current status of natural product screening activities in japan – including some of our experience. 4<sup>th</sup> Asia-Pacific Biotechnology Congress, Waterfront Cebu City Hotel, Philippines, May 16-18

## H. 知的財産権の出願・登録状況

予定なし