

et al. Med. Mycol. 40: 557-563, 2002)。本年度は、さらに、*Cryptococcus neoformans* 感染に対する生体防御における Myeloperoxidase (MPO) の役割を、MPO 欠損マウスを用いて固体レベルで解析した。

一方、真菌に由来する分子などによって、腎炎、SLE をはじめとする難治性血管炎が誘導されることが指摘されている。それに加え、好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全の誘発や、自己抗体の産生に関与するなど、真菌成分が、難治性血管炎の発症およびその要因になっていることが示唆されている。特に、カンジダ菌成分による血管炎誘導の際に、顕著に検出される。*Candida albicans* derived substances (CADS) の接種によって冠状動脈炎を発症するモデルマウスにおいて、血管炎発症にともない、好中球抗体 MPO-ANCA が誘導される。この MPO-ANCA 上昇には、MPO が関与していることを MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS/CAWS を接種して証明した。しかし、これまでの血管炎発症機構は、病理学的解析あるいは、*in vitro* での細胞機能やサイトカインの解析によっていた。そこで、本研究では、腎炎モデルマウスを作製して、イメージング観察する系を作製するとともに、真菌由来 glycoprotein, CAWS によって誘導される血管炎における、サイトカインの解析と、血管内皮細胞の apoptosis カスケードおよび *in vivo* イメージングによって直接解析した。

B. 研究方法

- 1) *C. neoformans* を肺に経口により接種した。
- 2) 血管炎誘導: *C. albicans* 由来物質 (CADS および CAWS) により誘導した。
- 3) マウスのリコンビナント MPO の調整: マウスのリコンビナント MPO は、ヒトのリコンビナント MPO と同様に作成した。
- 4) マウス血清中の MPO-ANCA 値: ヒトおよびマウス MPO の ELISA により測定した。
- 5) *In vivo* イメージング: C57BL/6 マウスに CAWS を iv 投与 3 時間後に anti-mMPO を投与した。さらに、5 日後に fMet-Leu-Phe (FMLP: 細菌由来トリペプチド) を iv 投与後、FITC-dextran を用いて血流状態を観察した。
- 6) CAWS 投与によるサイトカインレベルの変動: CAWS 投与直後の spleen でのサイトカインレベルの変動を解析した。
- 7) 血管内皮細胞 (HUVEC) apoptosis にかかわるシグナルの変動の解析: 抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法により MAPK 活性および Caspase 活性を測定した。

C. 研究結果

(1) *C. neoformans* 感染防御に必須のMPOの役割

C. neoformans 感染に対する生体防御における好中球ライソゾーム酵素である MPO の役割を、MPO 欠損マウスを用いて個体レベルで解析し、以下の知見を得た。

- 1) *C. neoformans* 肺感染 48 時間後における肺での残存菌数は、野生型マウスと MPO 欠損マウスで差異はなかった。
- 2) 野生型マウスは *C. neoformans* 肺感染後半年間まったく死亡しなかったが、MPO 欠損マウスは感染数日後から死亡し始め、2 ヶ月以内にすべてが死亡した。
- 3) 感染後 2 ヶ月間の諸臓器における残存菌数は、MPO 欠損マウスが野生型マウスよりも有意に高く、特に肺と脳において顕著であった。

(2) カンジダ誘導血管炎

1) CAWS によって、CADS 同様、冠状動脈炎が誘導された。その頻度は、100%近い値を示した。

2) *in vivo* イメージングにおいては、CAWS のほかに、anti-mouseMPO および fMet-Leu-Phe も加えることによって腎血管傷害が誘導された (図 1)。また、*in vivo* イメージングの解析では、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血

流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた (図 1)。

また、CAWS 投与時の脾臓からのサイトカインの産生は、IFN γ 、IL-6 および IL-10 が血管炎と連動した。

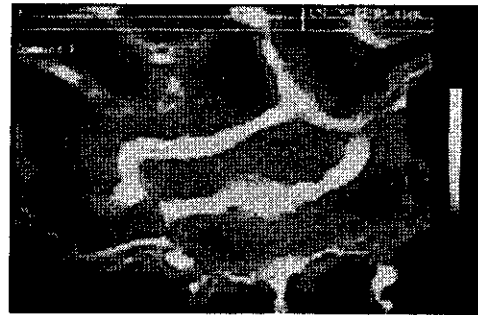


図 1 CAWS 誘導の腎血管傷害の *in vivo* イメージング CAWS + anti-mouseMPO + fMet-Leu-Phe 処理

一方、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードを検討した。その結果、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達の変化は、Caspase8 と連動する p38MAPK の関与がしていた (図 2)。また、好中球や脱顆粒成分によっても、この反応が誘導された。

20ng/ml TNF- α & 3 μ g/ml Cycloheximide

(-) 153060



Substrate of MKK3, MKK6 & MKK4(SEK1)

図 2. p38MAPK のリン酸化

D. 考察

MPO 欠損は *C. neoformans* に対する初期生体防御能には影響しないが、比較的長期の生体防御能の低下を導くことが判明した。

また、*Candida albicans* 由来糖ペプチドによって血管炎が誘導されたが、MPO および MPO-ANCA 産生と発症誘導に不可欠であることから、CAWS などの真菌由来分子がサイトカインと連動する活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる。CAWS によって、冠状動脈炎が誘導された。その頻度は、100%近い値を示した。また、分子が mannan-protein-glucan に特定できたことは、膜成分のうち本分子が強力に炎症を惹起していることが示唆された。

一方、CAWS 誘導血管傷害の *in vivo* イメージングにおいて、CAWS、anti-mouseMPO、fMet-Leu-Phe により、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた。この *in vivo* での現象が、カンジダによる腎血管傷害の誘導を説明できると思われるが、分子機構との関係を明らかにする必要がある。また、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達には、Caspase8 と連動する p38MAPK の関与が明らかとなったことは、内皮細胞固有のアポトーシスシグナルが存在することが示唆される。

E. 結論

C. neoformans 肺感染により、野生型マウスはまったく死亡しなかったが、MPO 欠損マウスは感染数日後から死亡し始め、2 ヶ月以内にすべてが死亡した。また、感染後 2 ヶ月間の諸臓器における残存菌数は、MPO 欠損マウスが野生型マウスよりも有意に高く、特に肺と脳において顕著であった。以上から、MPO 欠損は *C. neoformans* に対する初期生体防御能には影響しないが、比較的長期の生体防御能の低下を導くことが判明した。

一方、カンジダ菌体膜成分が血管炎を誘導し、難治性血管炎の病態マーカーの好中球自己抗体 ANCA も病態と連動した。その主要分子は Mannan-protein- glucan であるがわかった。一方、CAWS 誘導の腎炎の *in vivo* イメージング観察する系を作製した。また、さらに、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードに p38 が関与することを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Mie Ito, Oda, Yamagoe S. Suzuki K, Tanokura, M. Expression, oxidative refolding and characterization of six-

histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. Protein Expression Purif. in press.

2. Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono, and Karl-Heinz Krause. The HIV-1 Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation. *J Biol. Chem.* 277: 42136-43, 2002.

3. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H. : Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 40: 557-563, 2002.

4. Kohji Ichimori, Naoto Fukuyama, Hiroe Nakazawa, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Shunya Takizawa, Yosuke Kmeoka, Akiko Ishida-Okawara, Fumikazu Kohi and Kazuo Suzuki. Myeloperoxidase has directly-

opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research* in press.

5. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H. : Critical role of myeloperoxidase and NADPH-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 185: 1833-1837, 2002:

6. A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, Y. Hashimoto, Y. Aratani, H. Koyama, N. Maeda, S. Naoe, K. Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation* 25: 381-387, 2001

7. 鈴木和男 : SCG/KJ マウスと ANCA 関連血管炎—血管炎病態に関与する好中球機能 : 動物モデルを用いた解析から— *リウマチ科* 28:560-577, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金(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
主任研究者・上原至雅 国立感染症研究所 部長

研究要旨：真菌のアゾール剤耐性化は主に薬剤排出ポンプの機能亢進によってもたらされる。従って、排出ポンプ阻害剤をアゾール剤と併用しポンプの働きを阻止すれば、真菌細胞内でアゾール剤の有効濃度が保たれ、耐性菌の増殖を阻止することが期待される。16員環マクロライド構造を有するミルベマイシンは駆虫薬として用いられている他に、薬剤排出ポンプ阻害剤としての可能性を持つことが示唆されているため、数種のミルベマイシンについてその排出ポンプ阻害作用をしらべた。*Candida albicans* の薬剤排出にかかわる遺伝子 CDR1、CDR2（いずれも ABC 輸送体）または BEN^R（MFS 輸送体）を、7つの内在性の輸送体を破壊してフルコナゾールに高度感受性となったパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入・発現してフルコナゾールに高度耐性となった株を用い、排出ポンプ阻害活性をしらべた。その結果、ミルベマイシン単独では菌の増殖を阻止しなかったが、フルコナゾールとミルベマイシンを同時に使用することによって CDR1 および CDR2 発現株は感受性化し、低濃度のフルコナゾールによって耐性株の発育が強く阻止されるようになった。しかし、BEN^R 発現株には無効であった。さらにミルベマイシンは、薬剤排出ポンプ Cdr1p および Cdr2p の ATPase 活性を阻害したが、細胞膜[+H]ATPase (Pma1p) の活性は阻害しなかった。以上の結果から、ある種のミルベマイシンは特異的に ABC 輸送体を阻害してアゾール剤の効果を高める物質として有望であることが明らかになった。

A. 研究目的

生物の細胞膜には種々の生理的な役割を担う輸送体 (transporter) が局在している。そのうちのあるものはエネルギー依存的に有害な物質を細胞外に汲み出すポンプの役割を担い、毒物の作用を回避している。真菌においても例外ではなく、複数の細胞膜輸送体が細胞にとって有害な抗真菌剤を細胞外に排出し、その結果薬剤耐性を獲得する。1989 年

にアゾール系抗真菌剤のフルコナゾールが登場し、エイズ患者の口腔咽頭カンジダ症の治療に頻用されるようになると、フルコナゾール耐性 *Candida albicans* 臨床分離株が頻繁に分離されるようになってきた。これを契機に *C. albicans* の薬剤耐性機構の解明が進み、様々なメカニズムが関与することが分ってきたが、ほとんどの高度耐性株で ABC 輸送体または MFS 輸送体の薬剤排出機能が亢進し

ていることが明らかになっている。

元来、真菌はヒトの細胞と同様に真核細胞であるために、細菌に比べて選択毒性の高い薬剤が得られ難い。このような本質的な困難さが新しい抗真菌剤の開発をはばむ大きな障害になっており、真菌症の化学療法を困難にしている。しかしその中でアゾール系抗真菌剤は、人体に対する副作用が少なく、良好な血中濃度が得られるなどの理由により、最も広く使われ、またこれまで開発の焦点となってきた薬剤である。真菌の排出ポンプの機能が亢進してこの種の薬剤の作用が無効化するのであれば、その働きを阻止して薬剤の菌体内濃度を保ち、結果的に菌を感受性化してアゾール剤本来の抗菌力を生かせるように工夫することが出来るはずである。このように既存の抗真菌剤を生かす試みは、新規の抗真菌物質の探索と並行して、耐性菌問題を克服するための手段として欠かせないと考えられる。以上の理由により、新興・再興感染症研究事業において薬剤排出ポンプを標的分子とする阻害剤の探索を開始した。*Streptomyces* 属菌は二次代謝産物として16員環マクロライド構造を有する多種類のミルベマイシンを産生する(図1)。それらのあるものは駆虫薬として用いられ、また別のものはABC輸送体の阻害活性を有することが知られていた。今回はそれらとは異なる数種のミルベマイシンを用い、真菌の薬剤排出ポンプに対する阻害作用について詳細に調べた。

B. 研究方法

10種類のミルベマイシン原末($\alpha 11$, $\alpha 14$, $\alpha 20$, $\alpha 23$, $\alpha 25$, $\alpha 26$, $\alpha 27$, $\beta 9$, $\beta 10$, $\beta 11$)は三共株式会社より分与され、DMSOに溶解して実験に供した。排出ポンプ阻害剤スク

リーニングの評価系およびポンプ機能の解析としては、*C. albicans*の主要な排出ポンプ遺伝子のCDR1、CDR2、BEN^Rをそれぞれ*S. cerevisiae* AD株に発現させてアゾール剤に高度耐性になった*S. cerevisiae* AD/CDR1株、*S. cerevisiae* AD/CDR2株および*S. cerevisiae* AD/BEN^R株を用いた。*S. cerevisiae* AD株はあらかじめ7種の内在性ポンプが破壊されているのでアゾール剤に高度感受性であり、この株に外来性の排出ポンプ遺伝子を導入・発現することによりポンプ固有の排出機能を反映したアゾール剤耐性株が得られている。

ミルベマイシンによる菌の感受性化は *in vivo* および *in vitro* assay によって調べた。*In vivo* assay においては、先ずフルコナゾール共存下での阻止円の大きさを感受性ディスク法によって判定し、更に詳しい感受性化の程度をマイクロプレートを用いたマイクロ希釈チェッカーボード法で調べた。*In vitro* assay は、アゾール耐性菌から細胞膜を調整し、細胞膜上の各種排出ポンプ(Cdr1p, Cdr2p)のATPase活性および細胞膜[+H]ATPase活性に対する阻害効果をそれぞれの至適条件下で測定した。

C. 研究結果

1) 感受性ディスク法を用いたミルベマイシンによる感受性化 (*In vivo* assay)

アゾール剤耐性の *S. cerevisiae* CDR1 発現株に対するミルベマイシンのフルコナゾール感受性化を調べるには、YPD 寒天培地または8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のフルコナゾールを含むYPD 寒天培地に CDR1 発現株を接種し、10種類の

ミルベマイシン (30 μg) をそれぞれディスクにのせて24時間培養後、両培地上の阻止円の大きさを比較した。図2に示すように、ミルベマイシン単独では菌の増殖を阻止しなかったが、フルコナゾールを含む培地ではミルベマイシンの添加によって発育が阻止され、ディスク周辺に種々の大きさの阻止円を生じた。阻止円の大きさを基準としたミルベマイシンの阻止作用の強さは $\alpha 25$, $\alpha 26$, $\alpha 27$, $\alpha 23$, $\alpha 20$, $\beta 11$ の順であった。

2) ミルベマイシンによる耐性株の感受性化

次に最も強い作用を示したミルベマイシン $\alpha 25$ を用いてアゾール耐性 *S. cerevisiae* CDR1 発現株の感受性化をマイクロプレート上でマイクロ希釈チェッカーボード法によってしらべた (図3)。プレートの縦横にそれぞれフルコナゾールとミルベマイシンの希釈系列をつくり、各濃度の組み合わせにおけるCDR1 発現株の増殖の程度を測定すると、ミルベマイシン単独では 0.313 $\mu\text{g}/\text{well}$ 、フルコナゾール単独では 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度まで菌の発育に影響を及ぼさなかった。しかし、両者を組み合わせるとミルベマイシン 0.039 $\mu\text{g}/\text{well}$ の存在下で 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のフルコナゾールが CDR1 発現株の発育を完全に阻止し、両剤の強い相乗効果が認められた。 $\alpha 25$ 以外のミルベマイシンも、同様にフルコナゾール感受性化を示した。

3) Cdr1p-ATPase の阻害効果

以上のように in vivo assay によって、ミルベマイシンはフルコナゾール高度耐性の *S. cerevisiae* CDR1 発現株に対してフルコナゾールとの共存下で強い増殖阻止活性を示したので、その中から6種のミルベマイシンを選び、それぞれの Cdr1p-ATPase 活性に対する影響をしらべた。その結果、図4に示すように $\alpha 11$, $\alpha 20$ が最も強い ATPase 活性の阻害を示し、その効果は $\beta 11$, $\alpha 25$, $\alpha 26$, $\beta 9$ の順に低下した。

ミルベマイシンが Cdr1p-ATPase 活性を阻害するメカニズムの可能性のひとつとして、ATP 結合部位に対してミルベマイシンと ATP 分子が競合することが考えられる。このことを証明するために、予め ATP 結合部位に ATP を結合させた状態 (ATP protection) と ATP を結合させていない状態 (without protection) とでミルベマイシンをアッセイに加え、それぞれの阻害効果を比べた。その結果、両者における50%阻害濃度にはまったく違いが見られず、ミルベマイシンが ATP 結合部位に結合する可能性は否定された。

In vitro assay の結果から阻害効果の程度によってミルベマイシンを3つのグループに分けることができた。グループ1の $\alpha 11$ と $\alpha 20$ は最も高い阻害効果を持ち、50%阻害濃度はいずれも 0.156 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。グループ2は中等度の効果を示し、 $\beta 11$ は 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $\alpha 25$ と $\alpha 26$ は 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、であった。グループ3の $\beta 9$ は阻害効果が最も低く 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度であった。以上の in vivo ならびに in vitro の結果を総合的に見ると、in vivo の感受性ディスク法で強いフルコナゾール感受性化を示した数種のミルベマイシンは、in vitro assay においても概ね強い Cdr1p-ATPase 活性の阻害を示した。しかし、

ミルベマイシンのポンプ ATPase の阻害程度は、感受性ディスク法において得られた結果とは必ずしも一致しなかった。

4) Cdr2p-ATPase の阻害効果

Cdr2p はアゾール剤耐性に寄与するもう一つの ABC 輸送体であるが、Cdr2p-ATPase は Cdr1p-ATPase に比べ、もともと比活性が低い。しかしミルベマイシンは Cdr2p-ATPase 活性に対しても明らかな阻害効果を示した (図 5)。ミルベマイシンの Cdr2p-ATPase に対する阻害効果は、 $\alpha 25$ 、 $\alpha 11$ 、 $\alpha 20$ で最も高く、50% 阻害濃度はいずれも 0.156 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。以上のように Cdr1p-ATPase 活性阻害の結果と合わせ、 $\alpha 11$ 、 $\alpha 20$ が両ポンプ ATPase に強力な阻害活性を有することが明らかになった。また Cdr1p-ATPase と Cdr2p-ATPase は同じミルベマイシンに対しても異なる挙動を示すことも分かった。ミルベマイシンが直接排出ポンプに作用すると仮定すれば、この差はポンプタンパクの構造の差や機能を調節しているメカニズムの違いに基づいていることが考えられ、今後の各 ABC 輸送体の詳しい解析が必要であろう。

5) 細胞膜 [+H] ATPase に対する影響

さて、ミルベマイシンの *S. cerevisiae* 細胞膜 [+H] ATPase そのものに対する影響はどうか。[+H] ATPase はプロトン輸送を通して、エネルギー産生、栄養物質の輸送など細胞の恒常性維持に重要な役割を担っている。ミルベマイシンの [+H] ATPase に対する阻害効果を見ると、図 6 に示すように、

いずれのミルベマイシンもまったく影響を及ぼさないことが分かった。従って、これらのミルベマイシンは細胞膜 [+H] ATPase を阻害することなしに ABC pump を阻害すると思われる。

6) BEN^R に対するフルコナゾール感受性化

これまでの結果からミルベマイシンは細胞膜 [+H] ATPase はまったく阻害せず、ABC ポンプを強く阻害することがわかったが、MFS ポンプを阻害するかどうかは非常に興味深いところである。そこで、*C. albicans* の MFS 輸送体である BEN^R を過剰発現したフルコナゾール耐性 BEN^R/AD 株を用いて、ミルベマイシンによるフルコナゾール感受性化試験を行った。種々のミルベマイシン (30 $\mu\text{g}/\text{disk}$) についてしらべた結果、いずれのミルベマイシンも BEN^R/AD をフルコナゾール感受性化させる作用をもたなかった。従って、今回しらべた各種のミルベマイシンは MFS ポンプには阻害作用を示さず、ABC 輸送体を特異的に阻害すると言えよう。

D. 考察

これまでにフルコナゾールとの併用によってアゾール剤耐性 *C. albicans* の感受性を低下させる例としては、強力な免疫抑制剤の FK 506 が知られている。しかし、全身性カンジダ感染症は本来感染防御免疫の低下した宿主に発症するいわゆる日和見感染症であるため、免疫抑制作用を有する薬剤は用いることが出来ない。しかしこれまでのところ、ミルベマイシンが免疫抑制作用を有するという報告はない。従って、ミルベマイシンをリード

化合物とする排出ポンプ阻害剤の探索は、きわめて有望であると思われる。また今回明確に示されたようなポンプ ATPase 活性の阻害効果を直接に観察した例は見当たらない。また我々の開発した *S. cerevisiae* の発現系 (7 種の内在性ポンプを破壊し、アゾール剤に高度感受性の AD 株) に、外来性の排出ポンプ遺伝子を導入・発現させることによって、個々のポンプに固有の排出機能を示すアゾール剤耐性株が得られ、それらが排出ポンプ阻害剤スクリーニングの評価およびポンプ機能の解析にとって非常に優れているということが、改めて証明された。

E. 結論

ミルベマイシンは単独では菌の増殖を阻止しなかったが、フルコナゾールとの共存下で CDR1 および CDR2 発現株はフルコナゾールに感受性化し、低濃度のフルコナゾールでも耐性株の発育が強く阻止された。しかし BEN^R 発現株には無効であった。さらにミルベマイシンは排出ポンプの Cdr 1 p-ATPase および Cdr2p-ATPase を阻害したが、細胞膜[+H]ATPase は阻害しなかった。以上の結果から、ある種のミルベマイシンは ABC 輸送体の阻害剤として極めて有望であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 発表論文

Maebashi, K., Niimi, M., Kudoh, M.,

Fischer F. J., Makimura, K., Niimi, K., Piper, R. J., Uchida, K., Arisawa, M., Cannon, R. D., Yamaguchi, H. Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 527-536, 2001.

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* 45, 3366-3374, 2001.

Umeyama, T., Nagai, Y., Niimi, M. and Uehara, Y. Construction of FLAG tagging vectors for *Candida albicans*. *Yeast* 19, 611-618, 2002

Holmes, A.R., Niimi, M., Girgis, J.M.A., Boyd, D.H. and Cannon, R.D. Antifungal drug susceptibilities of commensal *Candida* isolates. *New Zealand Dental Journal* 98, 36-39, 2002

Wada, S., Niimi, M., Niimi, K., Monk, B.C., Holmes, A.R., Cannon, R.D. and Uehara, Y. *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Pdh1p expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters show phosphorylation-dependent pumping properties. *Journal of Biological Chemistry*.

277, 46809-46821, 2002.

Niimi, M., Nagai, Y., Niimi, K., Wada, S., Cannon R.D., Uehara, Y. and Monk, B.C. Identification of two proteins induced by exposure of the pathogenic fungus *Candida glabrata* to fluconazole. *Journal of Chromatography B* 782, 245-252, 2002.

本研究は、高野幸枝、和田俊一、梅山隆、永井有紀（以上、国立感染症研究所）、Brian C Monk、Richard D Cannon、Kyoko Niimi、Ann R Holmes、Erwin Lamping（以上、University of Otago, New Zealand）、Andre Goffeau、Anabelle Decottignies（以上、Unite de Biochimie Physiologique, Universite de Louvain, Belgium）との共同研究として行われたものである。

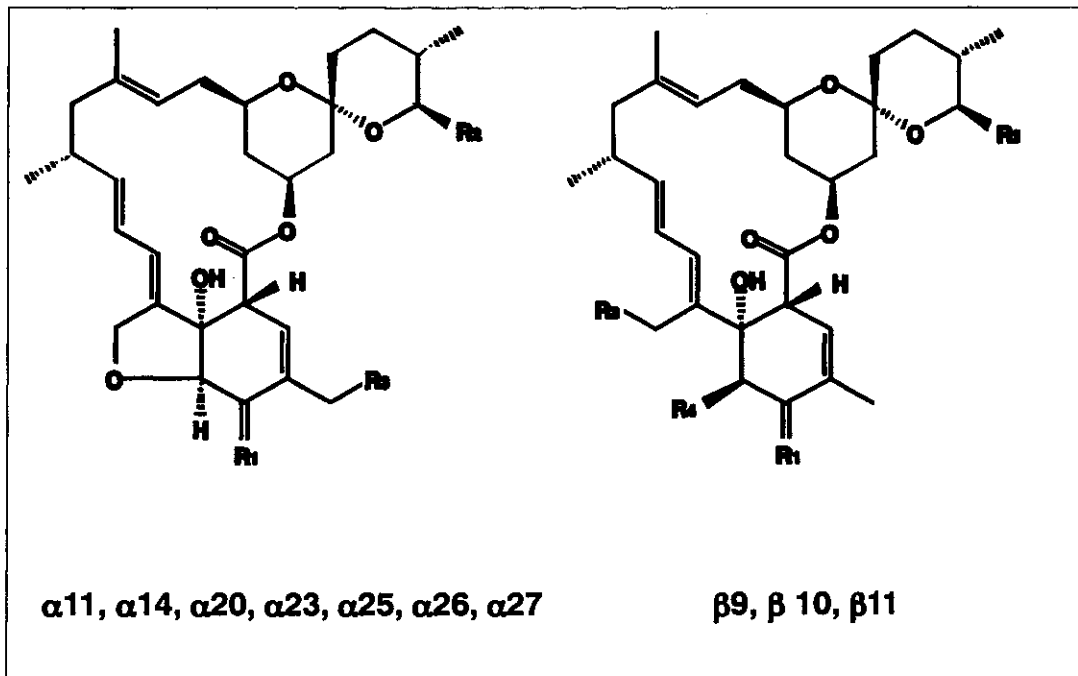


図1. *Streptomyces hygroscopicus* の産生する16員環マクロライド構造のミルベマイシン

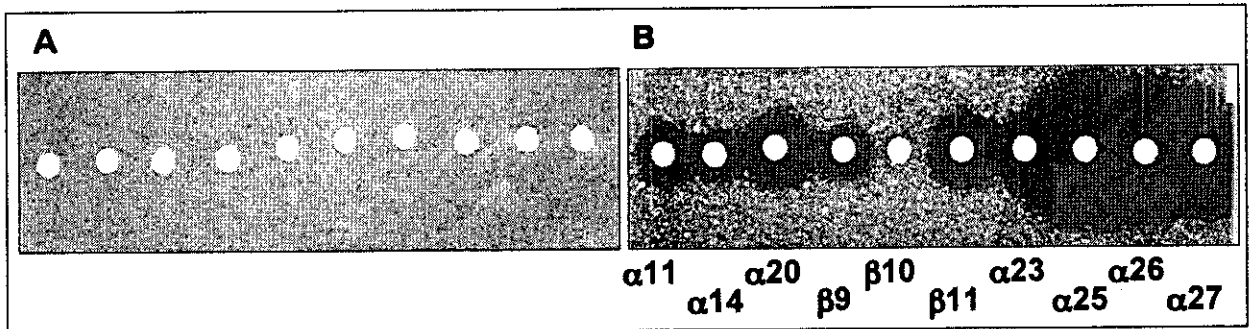


図2. アゾール剤耐性 *S. cerevisiae* AD/CDR1 発現株 (フルコナゾールの MIC=32 µg/ml) のミルベマイシンによる感受性化。YPD 寒天培地 (A) と 8 µg/ml のフルコナゾールを含む培地 (B) 全体に CDR1 発現株を接種し、10 種類のミルベマイシンの各々 30 µg を disk 上に乗せて 24 時間培養後に阻止円の大きさを比較した。

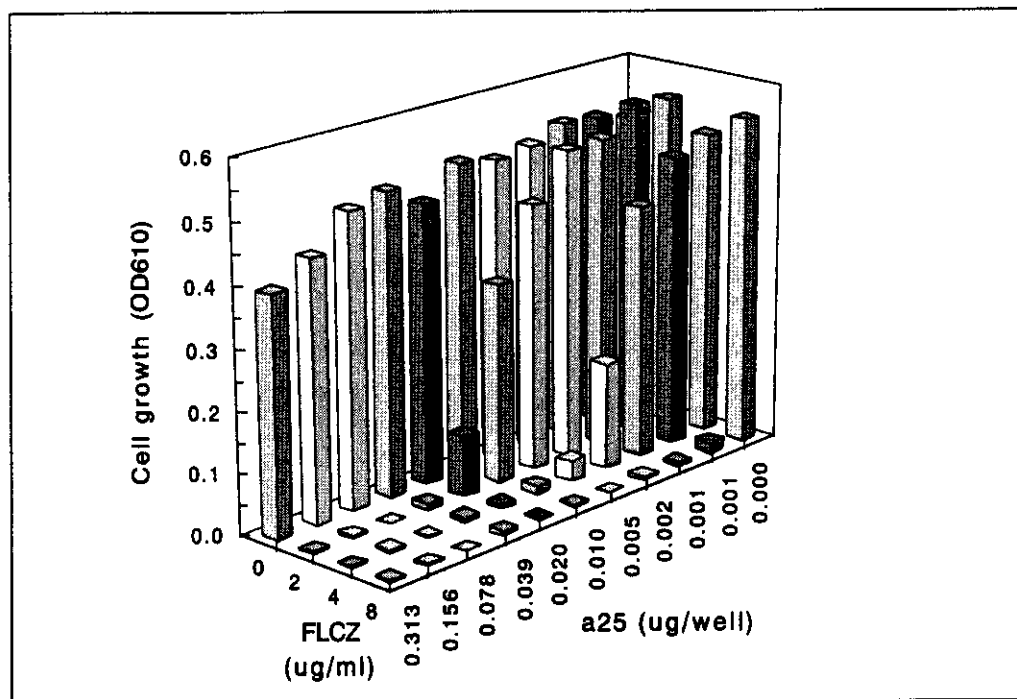


図3. アゾール剤耐性 *S. cerevisiae* AD/CDR1 発現株のミルベマイシン α25 による感受性化。マイクロタイタープレート上でマイクロ希釈法によってフルコナゾールとミルベマイシン (α25) の希釈系列をつくり、各濃度の組み合わせにおける CDR1 発現株の増殖の程度を棒グラフで表した。

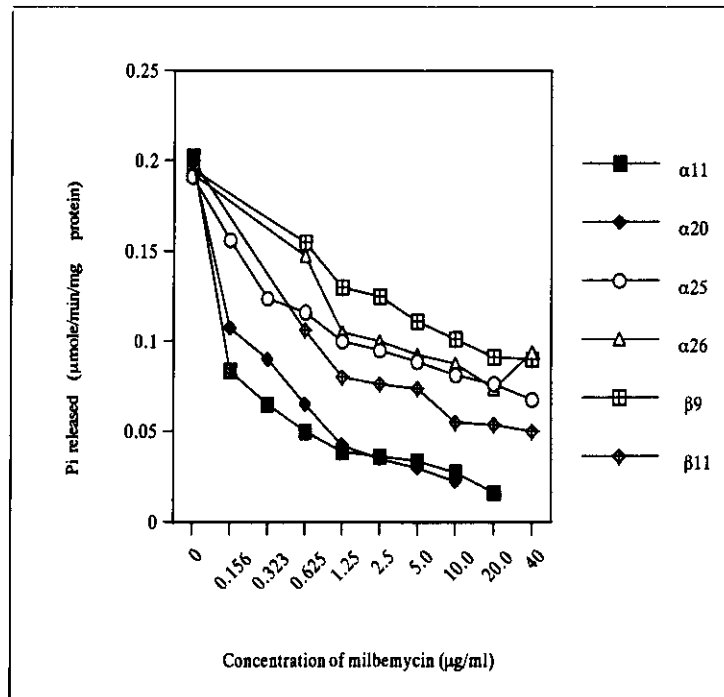


図4. *S. cerevisiae* AD/CDR1 発現株の Cdr1p-ATPase 活性に及ぼすミルベマイシンの影響。

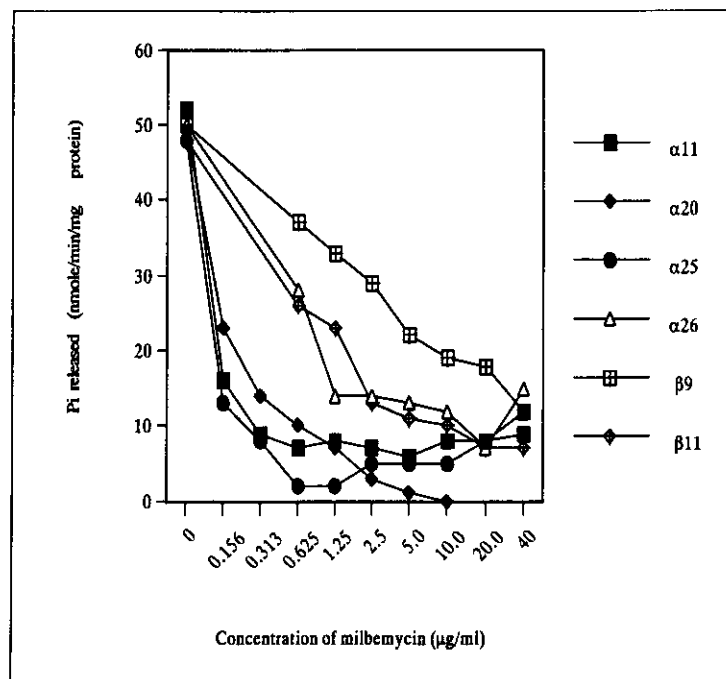


図5. *S. cerevisiae* AD/CDR2 発現株の Cdr2p-ATPase 活性に及ぼすミルベマイシンの影響。

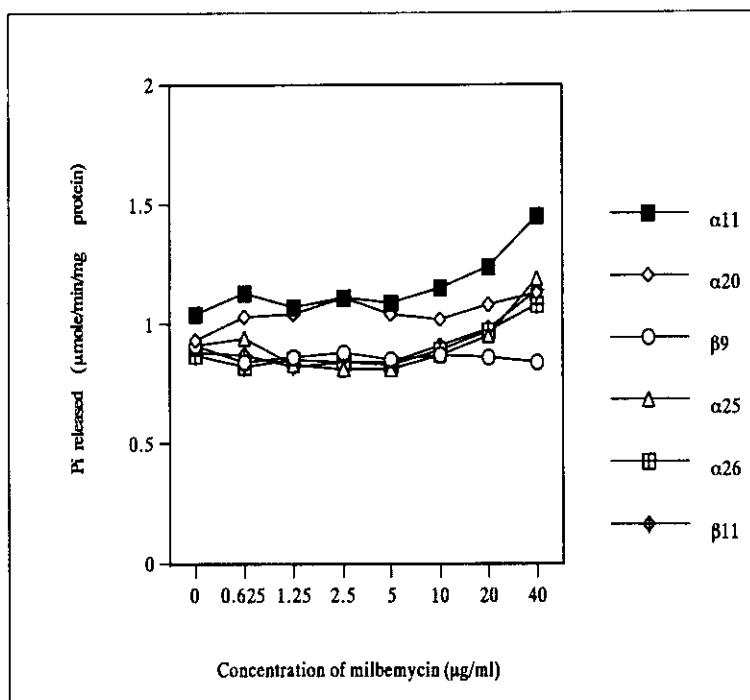


図6. *S. cerevisiae* の細胞膜[+H]-ATPase 活性に及ぼす
ミルベマイシンの影響。

平成14年度厚生労働科学研究費補助金
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 - - - - -	71
岡部 信彦 (国立感染症研究所感染症情報センター)	
微生物資源としての菌類 - - - - -	75
奥田 徹、沖 俊一 (玉川大学学術研究所)	
幹細胞移植の際の抗真菌剤使用実態調査：全国アンケート調査の結果 - - - - -	78
上 昌広 (国立がんセンター薬物療法部幹細胞移植療法室)	
実験用カニクイザル体表の真菌に関する研究 - - - - -	86
高鳥 浩介 (国立医薬品食品衛生研究所)	
糸状細菌による呼吸器感染症に関する臨床病理学的研究 - - - - -	89
馬場 基男 (国立療養所東京病院)	
コロニーダイレクト PCR による放線菌遺伝子の迅速検出 - - - - -	92
堀田 国元、石川 淳、土崎 尚史 (国立感染症研究所)	
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 - - - - -	96
三上 襄、矢沢 勝清 (千葉大学真菌医学研究センター)	
動物におけるヒストプラズマ症の現状と動物を介した新たなる輸入真菌症の可能性 - - - -	101
宮治 誠、西村和子、亀井克彦、佐野文子 (千葉大学真菌医学研究センター)	
新規抗真菌薬の開発状況に関する調査	
八木澤 守正 (財団法人日本抗生物質学術協議会) - - - - -	
112	
深在性カンジダ症とアスペルギルス症の血清診断の現状と新しい検査法の開発動向に関する 資料文献の収集と論評	
山口 英世 (帝京大学医真菌研究センター) - - - - -	
124	

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、重松美加 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14年12月末までのコクシジオイデス症の報告は6例であった。

A. 研究目的

土壌中の原因真菌 *Coccidioides immitis* の分節型分生子の吸入による肺感染であるコクシジオイデス症は、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。しかし米国疾病対策予防センター（CDC）発行の平成15年2月14日号のMMWRによると、アリゾナで、平成13年に2,203例、10万人当たりで43症例が報告されている。1995年来当該地区での感染者数が86%増加したことになり、日本人渡航者の増加と併せて感染機会の増加が懸念され、今後「輸入感染症」としての警戒が必要である。本疾患は、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。

本研究における目的は、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である。またそのほかの輸入真菌症に関する情報の交換を積極的に行い、国内での発生動向に注意を払うことも目的の一つである。

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、国立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（病原微生物検出情報：IASR）、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たっては、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。

本研究においては、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る。

なお、本症の届け出にあたっての症例定義、報告のための基準等は以下のようにしている。

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壤中

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14年12月末までのコクシジオイデス症の報告は6例のみであった。

その内訳は、平成11年の報告はゼロ、平成12年は1例、平成13年は2例、平成14年は3例であった（表1）。全6例とも成人男性で、女性の報告は無く、年齢群も20歳以上40歳未満が3人、40歳以上60歳未満が3人と、高齢者や幼児の報告も見られなかった。全員に発症前のアメリカあるいはメキシコへの渡航歴があり、都道府県別では石川県から2例、東京都、千葉県、大阪府、兵庫県から各1例ずつ報告されている。

平成14年に研究班が把握した症例は、2001年に診断された大阪府の症例を除き、感染症法による届け出と一致していたが、平成13年までは研究班の把握が若干上回っており、情報交換の結果、今後とも見届け例については研究班より届け出をすすめるようにした。また研究班が把握していない症例については、サーベイラ

表1. 平成11年4月1日から平成14年12月31日の間に報告されたコクシジオイデス症例の詳細

報告年	年齢 (歳)	性別	都道府県	初診—診断期間 (月)	病原体検査 (組織診を含む)	血清学的検査	推定感染地域 その他
平成12年	28	男性	東京都	1.5	病理診断		アメリカ合衆国 アリゾナ州 (留学)
平成13年	41	男性	石川県	1.5	病理診断 (生検)		アメリカ合衆国 アリゾナ州
	40	男性	兵庫県	1.0	培養		メキシコ (建設業に従事)
平成14年	31	男性	大阪府	3.9	なし	ID法陽性	アメリカ合衆国 (数年間居住、州名不明)
	51	男性	石川県	1.9	病理診断 (肺生検)	CF法	メキシコ (従事の為居住)
	37	男性	千葉県	2.2	なし	CF法	アメリカ合衆国 アリゾナ州とネバダ州(旅行)

ンスデーターを提供し、研究班における症例の把握を行った。

2001年10月に米国カリフォルニア州ベーカーズフィールド郊外のローストヒルズにおいて開催された、世界模型飛行機選手権大会の300名以上(30国)の参加者の間に、帰国後コクシジオイデス症の多発が認められた際には、WHO、CDCとの国際的連携により、速やかに国立感染症研究所感染症情報センターおよび細菌部(渡邊治雄部長)のもとに情報が届き、本研究班と連携のもと、分担研究者である千葉大学真菌医学研究センターを中心として日本人参加者20名に関する追跡調査を行う事が可能となった。

IASRでは海外での患者報告数についてVol.23、No.1~No.3 2002などで情報の提供を行うとともに、2002年3月号では、輸入真菌症の特集を行い本症に関する情報提供と啓発を行った。この特集編集にあたっては本研究班班員各位の多大な協力を頂いた。

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6例であった。報告数は少ないが、平成11年以来増加を示している。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、報告漏れ例がある事が指摘されている。主任研究者上原のアンケート調査によれば、本症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)への特集記事の掲載などにより、本症に関する理解を広く求めているところである。

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

じている。具体的な本症の問い合わせがあったのは複数の医療機関からの患者についての診断並びに検査の問い合わせ、患者自身からの診断方法についての問い合わせなどである。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ものもある。

今後本症に関するサーベイランスが強化され、疫学的情報が集積され、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と効果的予防に結びつくことが期待される。

F. 健康危険情報

我が国において、コクシジオイデス症は輸入感染症として存在しているが、その届け出状況は十分なものではない。第一線の診療従事者は、本疾患の蔓延地域に旅行歴のあるインフルエンザ様上気道炎症状を呈した患者、特に当該地域の冬期に渡航しているものにおいては、本疾患を疑い積極的な検査を考慮する事が勧められる。今後のサーベイランスの強化、サーベイランス情報の注目が必要である。

G. 研究発表

病原微生物検出情報 特集「輸入真菌症」
およびその関連情報 Vol.23 No.3 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

現時点でなし

平成14年度厚生労働科学研究費補助金（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特任教授

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構築を継続した。これまでに4,500株以上の多様性に富んだ菌類を分離し、15,000サンプル以上のライブラリーを完成した。ライブラリーの中から7,840サンプル（1,960株）をEfflux pumpスクリーニング・アッセイに供給し、25サンプル（8株）が活性ありと判断され、9サンプル（4株）の活性物質を単離精製した。このうち *Fusarium* sp. F 490 など3株の活性物質は depsihexapeptide の enniatin と同定された。

A. 研究目的

Penicillium citrinum から発見された三共のメバロチンと *Tolypocladium 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77,000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、人手と時間の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

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 µl ずつ分注し、40℃で減圧濃縮乾固した。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。

活性が認められた場合、最初の培養物の抽出物を再アッセイに供試し、再現性を確認した。次いで活性物質単離法の検討と高次のアッセイに供試するために再培養を行い、培養の再現性を確認後、予備分画操作を行った。

予備分画は抽出物を濃縮し、その一部をシリカゲル TLC に供試して適当な溶媒系で展開後、すべてのバンドをかき取り、抽出した。抽出物をアッセイに供試し、その活性部位を確認した。

（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4,500株以上を純粹分離した。

このうち、泥炭から分離した *Tolypocladium cylindrosporum*、*Acremonium guillematii*、各種菌茸類から分離した *Hypomyces armeniacus*、*Tylopilus valens* から分離した *Hypomyces completes*、*C. versicolor* から分離した *H. broomeanus*、*Crepidotus* sp. から分離した *Hypomyces tremellicola* は日本新産種であり、八丈島の土壌から分離した *Idriella* sp.、朽ち木から分離した *Chaetopshaeria* sp.、ヒダナシタケ目キノコの子実体より分離した2種の *Hypomyces* 属と1種の *Cladobotryum* 属菌は新種と考えられる。

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15,000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7,840サンプル（1,960株）を、*Candida* を用いたazole efflux pump 阻害剤スクリーニング・アッセイに供試した。その結果、25サンプル（8株）に活性が認められた。18サンプルに再現性が確認された。このうち4株の活性物質単離精製を試みた。青森県の畑土壌から洗浄濾過法で分離された *Fusarium* sp. F 490、青森県土壌から希釈平板法で分離された未同定糸状菌 F 605 および F 688、玉川大学内のアカマツ落葉から表面殺菌法で分離された *Fusarium* sp. F 2536 の活性物質は、環状depsihexapeptide の *enniatin* 類と同定された。*Enniatin* は *Fusarium* の代謝産物として知られている。神奈川県で採集した *Boletaceae* のキノコの子実体から分離され