

図3

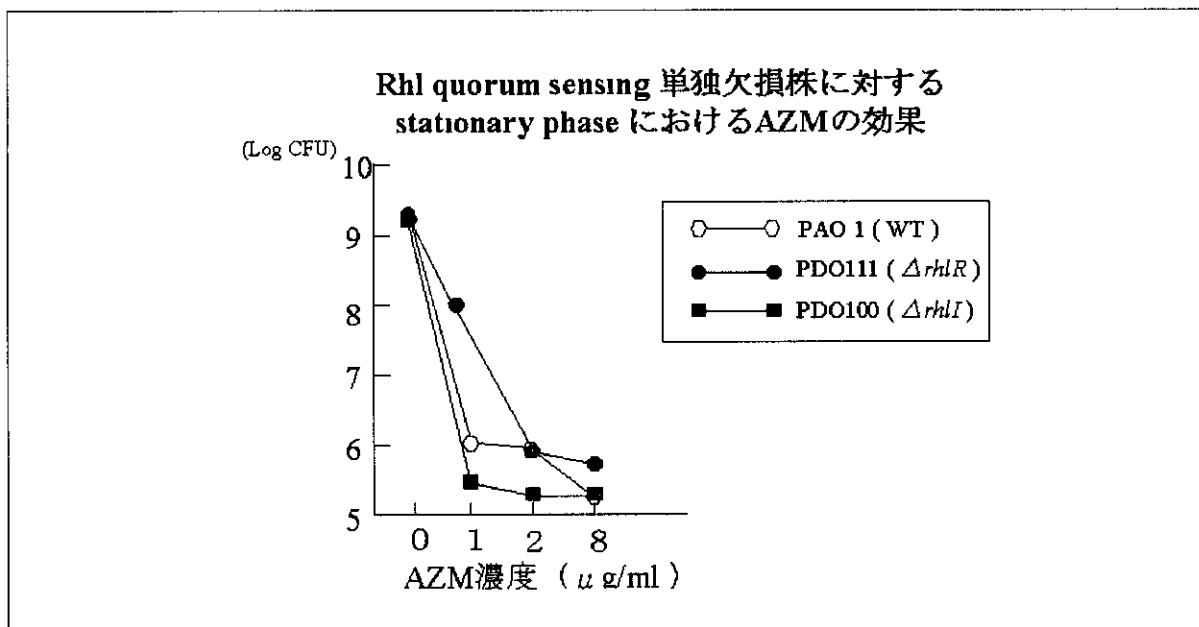


図4

考 察

様々な増殖相の菌が混在する慢性感染症では、各増殖相で変化する薬剤感受性も念頭に置いて抗菌薬を選択することが望ましい。しかし、現在一

般に行われている薬剤感受性検査は exponential phaseの菌のみを対象としたものであり、このことが慢性感染症における薬剤感受性と臨床効果の乖離という現象の一つの要因であると考えられる。実際CAZはexponential phaseと比べstationary phaseでは緑膿菌に対する抗菌活性が著しく低下して

いた。これは CAZ が β -ラクタム系抗菌薬である為、菌が増殖する exponential phase ではその作用機序である細胞壁合成阻害作用により強い抗菌活性を示すものの、菌が増殖しない stationary phase では抗菌活性を示さなくなったものと思われる。一方で細胞壁を直接障害するアミノ配糖体系抗菌薬の TOB や DNA ジャイレース阻害作用を持つニューキノロン系抗菌薬の CPFX は exponential phase、stationary phase の両相で良好な抗菌活性を示した。一般に緑膿菌感染症の治療で選択されるセフェム系薬、カルバペネム系薬、フルオロキノロン系薬などの薬剤に、アミノ配糖体系抗菌薬を併用する投与法は、各薬剤の増殖相別の抗菌活性を考慮すると非常に効果的選択であることが裏付けられたといえる。

マクロライド系抗菌薬は緑膿菌に対して (exponential phase では) ほとんど抗菌活性を持たないにも関わらず慢性緑膿菌性感染症、とくにびまん性汎細気管支炎 (DPB) に対する Sub MIC 量の持続投与療法が大きな効果をもたらした (Kudoh S Jpn J Thorac Dis 1987)。Sub MIC 量であることからこれまでその効果は主に宿主側に作用するものと考えられてきた (Morikawa K Antimicrob Agents Chemother 1996, Takizawa H Am J Respir Crit Care Med 1997, Villagrana V Gen Pharmac 1997, Khan AA Int J Antimicrob Agents 1999, Desaki M Biochem Biophys Res Commun 2000, Abe S Am J Respir Cell Mol Biol 2000)。今回我々の研究では exponential phase における Sub MIC 量のマクロライド系抗菌薬 AZM が stationary phase では緑膿菌に対し殺菌的に作用することが明らかとなった。慢性気道感染では緑膿菌の多くは stationary phase の状態にあるものと思われ、マクロライド系抗菌薬が緑膿菌に対して殺菌的にも作用している可能性が示唆された。

またこの作用は緑膿菌の Las quorum-sensing 活性に依存的なものであることも明らかとなった。緑膿菌の quorum-sensing 機構は緑膿菌が stationary phase の状態で外毒素蛋白産生を活性化させるために用いるシステムであり、近年の報告では biofilm 形成や宿主の免疫応答にも影響を及ぼすといわれている (Dimango E J Clin Invest 1995, Davis DG Science 1998, de Kievit TR Infect Immun 2000, de Kievit

TR Appl Environ Microbiol 2001, Smith RS J Immunol 2001)。したがってこの機構を有する菌のみを選択的に殺菌するマクロライド系抗菌薬の作用は大変興味深いものと考えられる。

結 論

マクロライド系抗菌薬である AZM は stationary phase において Sub MIC の濃度で緑膿菌に対する殺菌能を示し、この殺菌能は quorum-sensing 機構活性を有する菌に対してのみ発揮された。Quorum-sensing 機構は菌が病原性を強く発揮する為の機構であり、マクロライド系抗菌薬がこの機構をターゲットとして抗菌活性を発揮するという事実は、抗菌薬開発の新たな可能性を示すものであり非常に興味深いものと思われる。

健康危険情報

なし

研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

朝野和典「緑膿菌の増殖相別薬剤感受性」第 50 回化学療法学会西日本地方会

知的財産権の出願・登録状況

なし



Delta-5,6-desaturaseの欠損が *Candida albicans*の抗真菌薬感受性及び 病原性に与える影響

宮崎 泰可^{1,2)}、掛屋 弘²⁾、宮崎 義継²⁾、宮越 俊一³⁾、川村 陽子³⁾、河野 茂^{1,2)}

- ¹⁾長崎大学大学院医学研究科 新興感染症病態制御学系専攻
感染分子病態学講座 病態生理制御学分野
²⁾長崎大学医学部第二内科
³⁾三共株式会社 探索研究所

研究要旨

*Candida albicans*において、*ERG3*遺伝子によってコードされている delta-5,6-desaturase の欠損が、抗真菌薬感受性及び病原性に与える影響について検討した。heterozygous *erg3* disruptantの抗真菌薬感受性は親株と同様の結果であったが、homozygous *erg3* disruptantはアゾール系抗真菌薬 (以下、アゾール) に対して極めて高度な耐性を示し、*ERG3* revertant では感受性の回復が確認された。heterozygous *erg3* disruptant と *ERG3* revertant は共に親株 CA14 と同しステロール構成パターンを示し、MICと相関する結果が得られた。一方、homozygous *erg3* disruptantは、エルゴステロールに代わり ergosta-7,22-dien-3 β -ol が細胞膜ステロールの約50%を占め、感受性株でみられるようなアゾール投与による toxic sterol (14 α -methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol) の蓄積が認められなかった。しかし、*in vitro*での感受性結果とは対照的に、*in vivo*ではフルコナゾールに治療感受性であり、血清添加培地を使用した感受性試験ではアゾールMICの低下が観察された。今回、血清の存在は細胞膜のステロール構成には影響しなかったが、フルコナゾールは血清中の何らかの酵素もしくは蛋白成分と併用効果を示したと推察された。一方、病原性への影響を検討したところ、homozygous *erg3* disruptantによるカンジダ血症マウスは、コントロール株の場合と比較して有意に生存率が延長しており、*in vitro*でも Sodium dodecyl sulfate (SDS) に対する抵抗性の減弱が確認された。今回の研究によって、*C. albicans*における delta-5,6-desaturaseの欠損は、現行の感受性試験ではアゾール耐性を誘導するが*in vivo*でのフルコナゾール感受性には影響を与えず、著明に病原性を低下させることが明らかになった。

分担研究者 河野 茂

研究協力者・宮崎泰可、掛屋 弘、宮崎義継、宮越俊一、川村陽子

Effects of defective delta-5,6-desaturase on antifungal susceptibilities and virulence in *Candida albicans*

Taiga Miyazaki^{1, 2)}, Hiroshi Kakeya²⁾, Yoshitsugu Miyazaki²⁾, Shunichi Miyakoshi³⁾, Yoko Kawamura³⁾ and Shigeru Kohno^{1, 2)}

¹⁾Division of Molecular and Clinical Microbiology, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Medical Sciences ²⁾Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine and ³⁾Fermentation Group, Sankyo co. Ltd

研究目的

欧米諸国ではエイズ患者に対してアゾール系抗真菌薬(以下、アゾール)を頻用した結果、難治性慢性口腔咽頭カンジダ症からアゾール耐性 *Candida albicans* が分離されるようになり、現在新たな問題に直面している。*Candida glabrata* のような non-*albicans* *Candida* が増加傾向にあるが、依然として *C. albicans* は最も高頻度にみられる病原真菌の一つであり、アゾール耐性株への対策は急務である。現在のところ、薬剤排出ポンプによる細胞内薬剤濃度の減少と標的酵素である lanosterol demethylase (14 α -demethylase) の変異によるアゾール親和性の低下が主要な耐性機序とされている(*C. albicans* においては、14 α -demethylase をコードしている *ERG11* の過剰発現がアゾール耐性を誘導するかについて賛否両論である)¹²⁾。その他にもいくつかの機序が考えられており、その一つに、*ERG3* 遺伝子によってコードされる delta-5,6-desaturase の欠損が示唆されている。本酵素は細胞膜の主成分であるエルゴステロールの生合成に関与しており、14 α -demethylase よりも下流に位置している。*S. cerevisiae* のアゾール耐性株が、細胞膜の表現型に delta-5,6-desaturase の変異を有していたことより、本酵素の欠損はアゾール耐性機序の一つであると提唱されたが、*C. glabrata* においては無

関係であることが証明されており、菌種間での相違がみられる^{3,4)}。臨床的に最も重要である *C. albicans* については、本酵素の欠損がアゾール耐性の原因となるのか否かの分子生物学的な証明はなされていない。以前我々は、野生型の *C. albicans* から delta-5,6-desaturase をコードしている *ERG3* 遺伝子の欠損株を実験的に作製し、homozygous *erg3* disruptant は *in vitro* でアゾールに高度耐性を示すことを報告した⁵⁾。今回は、実際に delta-5,6-desaturase の欠損が細胞膜のステロール成分や *in vivo* での治療感受性および病原性に与える影響について検討したい。

研究方法

1. Strains and creation of *erg3* disruptants

今回使用した *C. albicans* 10株の遺伝子型を Table 1 に示す。*ERG3* の中心部を *hisG-URA3-hisG* cassette⁶⁾ で置き換えた disruption construct を作製し、アゾールに感受性株である *C. albicans* CA14⁶⁾ に対して相同組換えによる遺伝子破壊を行った。*C. albicans* は diploid であるため、heterozygous *erg3* disruptant (CAD1U, CAD1, CAD2U, CAD2) と homozygous *erg3* disruptant (CAE3DU, CAE3D) を作製した。これら形質転換株の確認には Southern blot 法を用いた⁵⁾。

表1 *C. albicans* strains used in this study

Strain	Parent strain	Genotype
SC5314		Wild-type azole-susceptible strain
CAF2-1	SC5314	<i>URA3/ura3Δ imm434</i>
CA14	CAF2-1	<i>ura3Δ imm434/ura3Δ imm434</i>
CAD1U	CA14	<i>erg3Δ hisG-URA3-hisG/ERG3</i>
CAD1	CAD1U	<i>erg3Δ hisG/ERG3</i>
CAD2U	CA14	<i>ERG3/erg3Δ hisG-URA3-hisG</i>
CAD2	CAD2U	<i>ERG3/erg3Δ hisG</i>
CAE3DU	CAD2	<i>erg3Δ hisG/erg3Δ hisG-URA3-hisG</i>
CAE3D	CAE3DU	<i>erg3Δ hisG/erg3Δ hisG</i>
CAE3RU	CAE3D	<i>erg3Δ hisG/erg3Δ hisG + ERG3-URA3</i>

2. Antifungal susceptibility assays

抗真菌薬感受性試験は National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, M27-A) 法⁷⁾に基づいて行い、フルコナゾール、イトラコナゾール、アムホテリシン B においては E-test (AB BIODISK) も併用した。血清添加培地として、最終血清濃度を 10% に調整した RPMI 培地 (pH 7.4) を使用した。血清の加熱処理は 56°C および 65°C で 30 分間、分子量による分離には CENTRIPLUS (Millipore) を使用した。Sodium dodecyl sulfate (SDS) 感受性は、最終 SDS 濃度を 0.01% に調整した YEPD 培地で振とう培養を行い (250 rpm, 30°C)、希釈培養液の生菌数で判定した。

3. Sterol analysis

C. albicans の細胞膜ステロール成分は、gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) を用いて解析した。フルコナゾールおよびイトラコナゾールの投与量は、0.1 および 100 µg/ml で行ったが、Table 2 にはフルコナゾール 100 µg/ml の結果を示している。

4. *In vivo* studies

in vivo でのカンジダ血症モデルは、immunocompetent BALB/c mouse (female, 8 weeks) の尾静脈より菌液 (0.2 ml) を接種して作製した。フルコナゾールによる治療は菌液接種 1 時間後より、1 日 1 回の経口投

表 2

	抗真菌薬感受性					(µg/ml)
	FLCZ	ITCZ	MCZ	VCZ	AMPH-B	5-FC
CAI4 (<i>ERG3/ERG3</i>)	0.5 (0.38)	0.125 (0.064)	0.5	0.016	0.25 (0.19)	>64 (>32)
CAD1 (<i>erg3/ERG3</i>)	0.5 (0.38)	0.5 (0.125)	0.5	0.03	0.25 (0.19)	>64 (>32)
CAD2 (<i>ERG3/erg3</i>)	0.5 (0.38)	0.5 (0.125)	0.5	0.03	0.25 (0.19)	>64 (>32)
CAE3D (<i>erg3/erg3</i>)	>1024 (>256)	>32 (>32)	>16	>4	0.5 (0.38)	>64 (>32)
CAE3RU (<i>erg3/erg3</i> + <i>ERG3</i>)	0.5 (0.38)	0.25 (0.25)	0.5	0.016	0.25 (0.5)	>64 (>32)

NCCLS M27-A (括弧内は E-test の結果を示す)

表 3 Sterol compositions

FLCZ	Fungal sterols (%)									
	CAI4		CAD1		CAD2		CAE3D		CAE3RU	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Ergosterol (Ergosta 5 7 22-trien-3β-ol)	58.1	-	58.8	6.8	57.9	9.6	-	62.4	4.9	-
Ergosta 7 22-dien-3β-ol	-	-	-	-	-	-	47.0	52.5	-	-
Lanosterol (Lanosta-8 24-dien-3β-ol)	10.4	14.0	9.6	18.8	7.9	18.4	2.0	9.4	10.2	18.4
14α-Methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3β 6α-diol	-	9.0	-	18.3	-	20.9	-	-	-	22.0
4,4,14α-Trimethyl-ergosta-8,24(28)-dien-3β-diol	-	7.2	-	11.8	-	11.0	-	6.9	-	14.4
5,6-dihydroergosterol analog	-	-	-	-	-	-	9.8	3.3	-	-
4,4-dimethyl-14-demethylated sterol	8.4	14.6	6.8	17.0	5.8	17.0	10.3	15.2	4.5	7.7
24 methylated sterol	-	12.6	-	18.1	-	17.2	-	10.3	-	23.3
Others	23.1	42.6	24.8	9.2	28.4	5.9	30.9	2.4	22.9	9.3

与を5日間行った。また、コントロール(無治療)群には生理食塩水を投与した。

(尚、本研究は長崎大学医学部 大学院医学研究科における遺伝子研究倫理委員会の承認のもと実施された。承認番号 [0205170648])

結果

1 Antifungal susceptibilities (Table 2)

*URA3*の欠損は発育速度を低下させるが、*ERG3*の欠損のみでは*in vitro*の発育速度に影響を与えなかった⁵⁾。heterozygous *erg3* disruptant (CAD1, CAD1U, CAD2, CAD2U)の抗真菌薬感受性は親株 CAI4 と同様の結果であったが、homozygous *erg3* disruptant (CAE3D, CAE3DU)は極めて高度なアゾール耐性を示し、CAE3D株に対して野生型の*ERG3*を再導入するcomplementation study (CAE3RU)にてアゾール感受性の回復が確認された。

2 Sterol analysis (Table 3)

通常、細胞膜の主要成分であるエルゴステロールは、フルコナゾールの投与によって合成が阻害される。しかし、CAE3Dの主要成分であるergosta-7,22-dien-3 β -olはフルコナゾール投与の影響を受けず、toxic sterolである14 α -methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diolの蓄積も認めなかった。heterozygous *erg3* disruptants (CAD1 and CAD2)と*ERG3* revertant (CAE3RU)はそれぞれ親株 CAI4 と同じステロール構成パターンを示し、MICと関連する結果が得られた。

3 Effects of the *ERG3* disruption on fluconazole susceptibility *in vivo* (Figure 1)

*In vitro*でアゾール高度耐性を示したhomozygous *erg3* disruptantに対して、*in vivo*でのフルコナゾール治療感受性をカンジダ血症マウスモデルで検討した。*URA3*欠損株は著しく病原性が低下しているため⁸⁾、今回*ERG3* disruptantとしてCAE3DU株を用いてカンジダ血症モデルを作製した。1 \times 10⁷ CFU/mouseのCAE3DUで、全てのマウスが4日以内に致死的な感染を惹き起こした。ところが、フルコナゾール 20 mg/kg 投与群 (p<0.001) および 40 mg/kg投与群 (p<0.001)では有意に生存期間の延長

を認め、フルコナゾールによる用量依存的かつ静菌的な治療効果が確認された。

4 Fluconazole susceptibilities of the *erg3* disruptant in the presence of serum *in vitro* (Figure 2)

CAE3DおよびCAE3DUは、従来のMIC測定法では高度なアゾール耐性を示したか、RPMI培地にhuman serumを加えた血清添加培地ではフルコナゾールのMICが2 μ g/mlまで低下した。非働化血清(56 $^{\circ}$ C熱処理により血清中の補体のみを非働化)を加えた場合も同等のMICの低下を認めたか、65 $^{\circ}$ Cで血清中の酵素を不活化した場合や50 kDa以下の血清成分ではMICの低下は認めなかった。他のアゾール(イトラコナゾール、ミコナゾール、ポリコナゾール)でも同様に血清との併用効果が確認された。熱処理の有無に関わらず、血清による菌の生育阻害は認められなかった。

5 Effects of the *ERG3* disruption on virulence *in vivo* (Figure 3)

*ERG3*の欠損か病原性に与える影響を*in vivo*で検討するために、カンジダ血症マウスモデルを作製した。*URA3*の有無や存在部位が病原性に与える影響⁸⁾を排除するため、コントロールとしてCAD1U(*erg3 Δ hisG-URA3-hisG ERG3*)、*erg3*欠損株としてCAE3DU(*erg3 Δ hisG-URA3-hisG erg3 Δ hisG*)を使用した。尚、CAD1UとCAE3DUは*in vivo*で同等の発育率を示し、それぞれCAD1、CAE3Dと同様の抗真菌薬感受性パターンを示した。CAD1Uを1 \times 10⁶ CFU/mouse接種したマウスは全て11日以内に死亡したが、CAE3DUの場合は90%のマウスが21日間の生存を確認された(p<0.001)。また、菌液接種後7日目までは親株と同等の腎内菌数であったが、8日目からはCAD1Uの腎内菌数が有意に増加傾向を示した(data not shown)。

6 Effects of the *ERG3* disruption on SDS sensitivity (Figure 4)

細胞膜脂質に作用するSDS(0.01%)の存在により、CAE3DUの生育は著明に阻害された。(尚、発育環境因子として培養温度(16 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C)、pH(2~10)、イオン濃度(NaCl 200~500 mM, CaCl₂

200 ~ 1000 mM, KCl 500 ~ 750 mM, LiCl 10 ~ 25 mM, NH₄Cl₂ 300 mM, CH₃COONa 50 ~ 100 mM)、また、外的ストレスとしてH₂O₂ (0.02 ~ 0.04%) お

よびUV (50 ~ 1000 J/m²) に対する抵抗性を検討したが、いずれも親株との有意差は認めなかった (data not shown)。

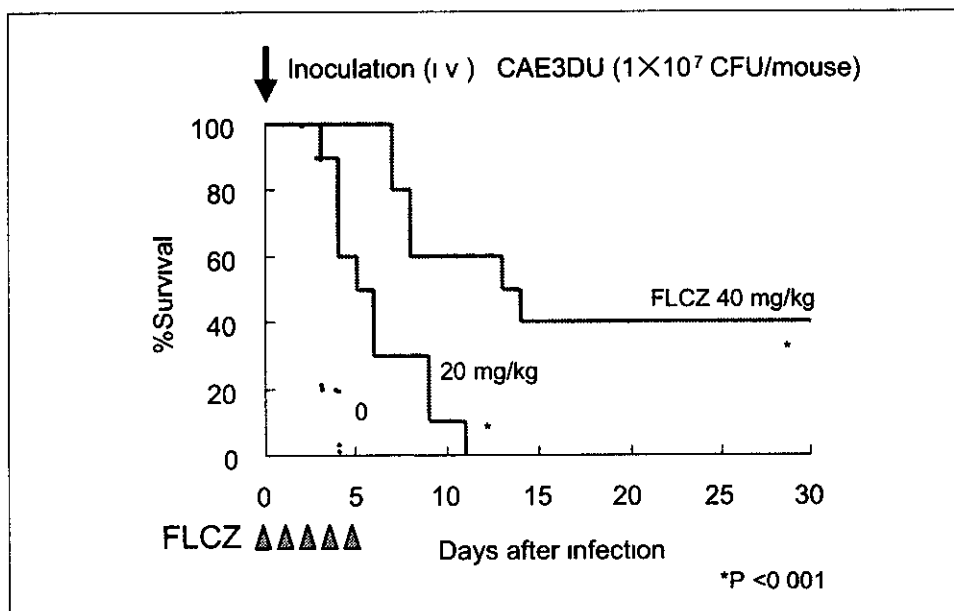


図 1

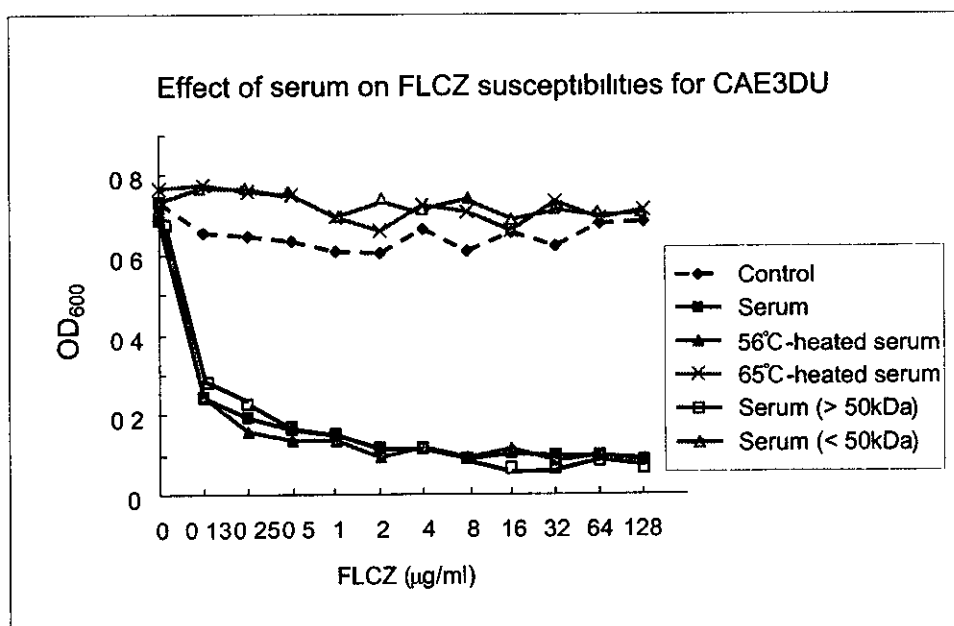


図 2

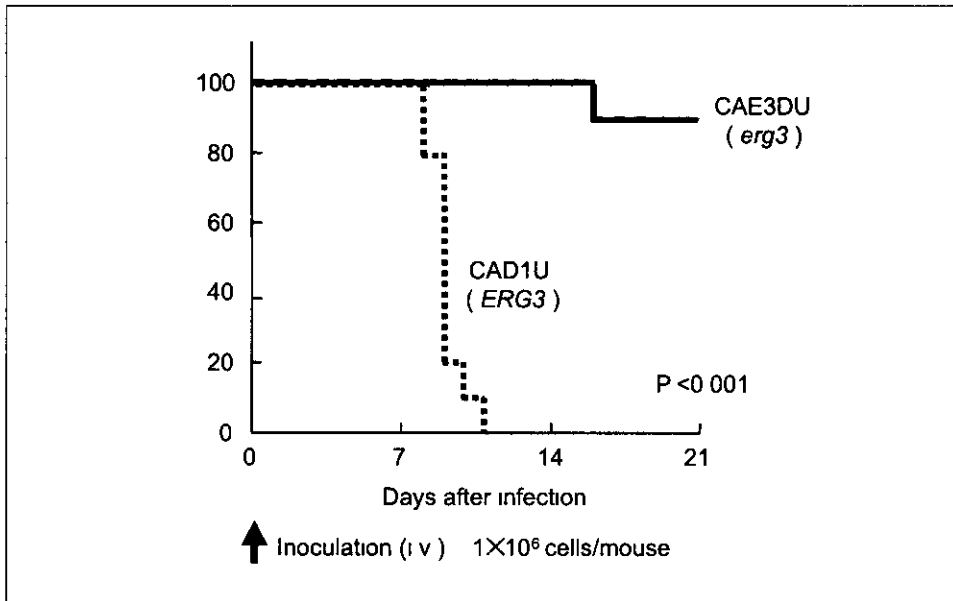


図3

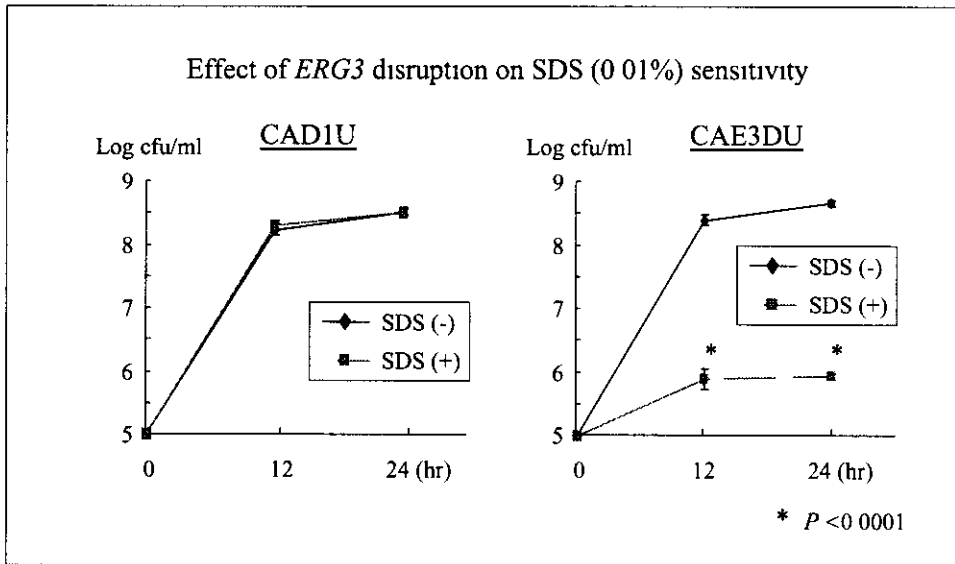


図4

考 察

以前我々は、*C. albicans*において、delta-5,6-desaturaseの欠損が発育速度や抗真菌薬感受性に与える影響について、現行の感受性試験法(NCCLS M27-A法およびE-test)を用いて検討した。親株として使用したCAI4のERG3 ORFには2箇所 allelic base diversitiesが存在するが、いずれもERG3 mRNAの発現や発育速度、抗真菌薬感受性に影響しないことが確認されている⁹⁾。heterozygous *erg3*

disruptantは親株CAI4と同様の抗真菌薬感受性を示したが、homozygous *erg3* disruptantは極めて高度なアゾール耐性を示し、complementation studyにおいて感受性の回復が確認されたため、*C. albicans*におけるdelta-5,6-desaturaseの欠損はアゾール高度耐性を誘導する一つの原因であると推察された。今回は、実際にdelta-5,6-desaturaseの欠損が細胞膜の表現型に及ぼしている影響を解析するとともに、*in vivo*における治療感受性と病原性への影響についても検討した。

アゾールによる14 α -demethylaseの阻害は、エルゴステロールの代わりに14 α メチルステロール、特に14 α -methyl fecosterolとdiolである14 α -methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diolの蓄積をもたらす。このようにステロールの構成成分が変化すると、細胞膜の流動性や透過性に影響を与え、宿主による殺菌作用に対しても抵抗力を失う。さらに、diolの蓄積は細胞の発育を阻害することが*S cerevisiae*や*C albicans*で知られているが、delta-5,6-desaturase欠損株ではdiolが蓄積しないため、アゾール存在下でも生育が可能であると推測されている³⁹⁾。一方、アムホテリシンBは直接エルゴステロールと結合することにより、細胞膜構造の破壊及び機能障害を惹起する。そのため、アムホテリシンB耐性は、細胞膜構造やステロール-リン脂質比の変化と関連していると考えられており、細胞膜変異株ではアゾールとのcross resistanceを呈する場合もある²⁹⁾。しかし、今回のCAE3Dは細胞膜のエルゴステロールが欠落しているにもかかわらず、親株CAI4とほぼ同等のアムホテリシンB感受性を示した。アムホテリシンBの作用機序は複雑でありその全容は解明されていないが、複数の標的分子が存在するためと考えられる。

また、今回の実験では*in vitro*での感受性結果とは対照的に、*in vivo*でdelta-5,6-desaturase欠損株に対するフルコナゾールの容量依存的な治療効果が確認された。現行の感受性試験法はclear cutなend pointを持たず、特にtrailing growthを呈する株に対しては解釈が困難であるが¹⁰⁾、今回のdelta-5,6-desaturase欠損株は24時間後の判定で既に高度耐性を示しており、*in vitro*と*in vivo*におけるフルコナゾール感受性の相違はtrailing growthによるものではなかった。また、フルコナゾールによるサイトカインやmonocytesなど免疫細胞の活性化も*in vivo*での結果に寄与しているかもしれないが、用量依存的で静菌的な治療効果を示したことより、やはりフルコナゾールによる直接的な抗真菌作用によるものと推察される。エルゴステロールの合成阻害が真菌に与える影響は環境要因に左右されるため、*in vitro*での抗真菌活性が*in vivo*での治療効果に反映されないこともある。さらに、*in vivo*におけるフルコナゾールの薬物動態(pharmacodynamics)に関しても未だ不明な点が多

い。菌株によっては、フルコナゾールはイトラコナゾールと比較して血清の存在下ではMICが低下する場合が多く、protein bindingの効率(フルコナゾール, 11%, イトラコナゾール, 99.8%)との関連性も示唆されているが¹¹⁾、明確な機序は明らかにされていない。今回、細胞膜ステロール成分の変化は血清存在下でもTable 3と同様の結果であったが、フルコナゾールは血清中の何らかの酵素もしくは蛋白成分と併用効果を示したと推察される。現在までに、delta-5,6-desaturaseの欠損を耐性化の原因と推察した幾つかのアゾール耐性株がエイズ患者や白血病患者から分離されているが^{9) 12)}、他の耐性機序が存在していた可能性がある。delta-5,6-desaturase欠損株は、現行の抗真菌薬感受性試験ではアゾール高度耐性を示すが、*in vivo*ではフルコナゾールに治療感受性であり、臨床上問題とならないことが今回の実験で確認された。

また、delta-5,6-desaturaseの欠損により細胞膜成分が変化すると、細胞膜脂質に作用するSDSのような外的ストレスに対して抵抗力が減弱し、カンシダ血症マウスモデルにおいても、有意に生存率の延長が確認された。以上より、*C albicans*におけるdelta-5,6-desaturase(*ERG3*)の阻害は、*in vivo*治療感受性に影響を与えずに病原性を著明に低下させると考えられ、抗真菌薬の新しい作用機序としても期待される。

結 論

*C albicans*におけるdelta-5,6-desaturase欠損株は、現行の感受性試験ではアゾール高度耐性を示すが、*in vivo*ではフルコナゾールに治療感受性であり、フルコナゾールと血清の併用効果も認められた。また、細胞膜ステロール成分が大幅に変化しており、病原性の著明な低下も確認された。

参考文献

- 1) Ghannoum, M A and Rice, L B Antifungal agents Mode of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance *Clin Microbiol Reviews* 12 501-517, 1999
- 2) White, T C et al Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance *Clin Microbiol Reviews* 11 382-402, 1998

- 3) Kelly, S L et al Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol *Biochem Biophys Res Commun* 207 910-915, 1995
- 4) Geber, A et al Deletion of the *Candida glabrata* *ERG3* and *ERG11* genes effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility *Antimicrob Agents Chemother* 39 2708-2717, 1995
- 5) 宮崎泰可、他 *Candida albicans*における $erg3$ 変異株の抗真菌薬感受性について。厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業。「日和見感染症の治療に関する研究」平成13年度報告書 94-100, 2002
- 6) Fonzi, W A and Irwin, M Y Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans* *Genetics* 134 717-728, 1993
- 7) National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts Approved standard M27-A National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa
- 8) Lay, J et al Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies *Infect Immun* 66 5301-5306, 1998
- 9) Kelly, S L , et al Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta (5,6) desaturation *FEBS Lett* 400 80-82, 1997
- 10) Revankar, S G , et al Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards Method *J Clin Microbiol* 36 153-156, 1998
- 11) Zhanel, G G , et al Influence of human serum on antifungal pharmacodynamics with *Candida albicans* *Antimicrob Agents Chemother* 45 2018-2022, 2001
- 12) Nolte, F S , et al Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia *Antimicrob Agents Chemother* 44 196-199, 1997
- 2) Miyazaki, T , Miyazaki, Y , Kakeya, H , Miyazaki, H , Nakamura, K and Kohno, S Disruption of delta-5,6-desaturase gene in *Candida albicans* affected azole susceptibility 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) , 2001
- 3) 宮崎泰可、掛屋 弘、宮崎義継、平潟洋一、朝野和典、田代隆良、河野 茂 *Candida albicans*におけるdelta-5,6-desaturaseの機能解析。第49回日本化学療法学会西日本支部総会、2001
- 4) 宮崎泰可、掛屋 弘、宮崎義継、田代隆良、河野 茂 *Candida albicans*におけるdelta-5, 6-desaturaseの機能解析。第45回日本医真菌学会総会、2001

知的財産権の出願・登録状況

- (1) 特許取得
なし
- (2) 実用新案登録
なし
- (3) その他
なし

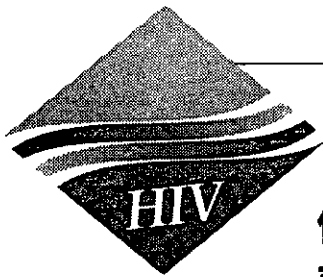
健康危険情報

特になし

研究発表

2 学会発表

- 1) Miyazaki, T , Miyazaki, Y , Kakeya, H , Miyakoshi, S , Kawamura, Y , Yanagihara, K , Hirakata, Y , Tomono, K , Tashiro, T and Kohno, S *ERG3* dis-



侵襲性アスペルギルス症における 菌糸の血管内侵入に関する好中球の影響

渋谷 和俊¹⁾、川上 和義²⁾、長谷川千花子¹⁾、斎藤 厚²⁾

¹⁾ 東邦大学医学部病院病理

²⁾ 琉球大学医学部第一内科

研究要旨

アスペルギルス症の病変形成の動的過程を追跡する目的で、*Aspergillus fumigatus*の分生子浮遊液をラットの腸間膜上に滴下し、菌糸の発育伸長および白血球の応答の動態を微速度撮影により観察した。Cyclophosphamide(CY)非投与ラットの腸間膜上の分生子は、接種後6時間以内に、その大半が好中球によって貪食され、菌糸の伸長や血管壁への侵入は認められなかった。一方、CY投与ラットでは、接種後9時間以内に、腸間膜上での分生子の出芽と菌糸の伸長が起こり、一部の菌糸は血管内に侵入し、約30時間で血栓形成や出血が観察された。また、初期の菌糸侵入部においては、内膜面に中心陥凹を伴った隆起が認められ、この陥凹部から菌糸の先端が内腔に侵入する像が観察された。

以上の結果から、腸間膜組織において分生子は白血球遊走を刺激すること、発育菌糸の伸長による物理的な破壊効果のみならず、何らかの細胞障害性菌体成分が組織破壊に関与している可能性が示唆された。

分担研究者 斎藤 厚

研究協力者 渋谷和俊、川上和義、長谷川千花子

Histopathological study on correlate between neutrophils and angioinvasiveness of hyphae of invasive pulmonary aspergillosis

Kazutoshi Shibuya¹⁾, Kazuyoshi Kawakami²⁾, Chikako Hasegawa¹⁾ and Atsushi Saito²⁾

¹⁾Department of Pathology Toho University School of Medicine and ²⁾The first department of Internal Medicine University of Ryukyus

研究目的

アスペルギルス症は、*Aspergillus fumigatus*をはじめとし、*A. niger*, *A. terreus* などいくつかの病原性 *Aspergillus spp* に起因する代表的な深在性真菌症であり、その多くは、日和見感染症として発症する^{1,2)}。通常、*Aspergillus spp* は、枯死植物や動物の排泄物、屍体などを栄養源として、土壤中に腐生的に生息し、家屋の壁面や塵埃中に多数認められる。こうした環境中で豊富に形成された分生子を吸入することで経気道感染が成立する^{1,2)}。本症の主な病型としては、菌球型、侵襲型、アレルギー型があり³⁾、そのほかに慢性壊死性肺アスペルギルス症³⁾など知られている。病理組織学的には、菌球型アスペルギルス症を除き、病巣内での菌はY字状に分岐する真性菌糸性増殖を示し、固有の組織構築単位に関係なく全方向性に侵入増殖することが特徴とされている。また、組織内では血管への親和性も強く、感染巣では出血壊死や梗塞を形成することが多い⁴⁾。

今回我々は、本症の特徴である組織内での *Aspergillus* 菌糸の伸長と血管壁への侵入の様子や防御に関与する細胞の動態を、ラットの腸間膜モデルを用いて実験的に再現し、微速度撮影装置によって動的に観察した。

研究方法

1 菌株

帝京大学医真菌研究センターに保存されている侵襲型肺アスペルギルス症患者からの臨床分離株、*Aspergillus fumigatus* TIMM1776を本実験に供した。

2. 動物

ウィスター系ラット (SPF/VAF Crj Wister、体重 200-230g、雌性) を用いた。このラットを室温 25℃の実験室で、固形飼料 (MF オリエンタル酵母工業) および蒸留水の自由飲水により、1週間の予備飼育を行った後に、実験に用いた。

3. 菌液の作製

A. fumigatus TIMM1776をポテトデキストロース

寒天斜面培地 (日水製薬) に 27℃、96 時間培養した。その後、0.05% (w/v) Tween80 添加滅菌生理食塩水を斜面上に重層し、培地上から分生子を遊離させ、この分生子浮遊液をパスノールピペットで回収した。得られた浮遊液中の分生子数を Burkerturk 血球計算板で計測し、0.05% (w/v) Tween80 添加滅菌生理食塩水で希釈して、 1×10^6 個/ml の菌液を作製した。

4 動物の前処置

動物を2群に分け、一方を薬剤無処置、他方を処置群とした。後者では、各動物に cyclophosphamide (CY エンドキサン、塩野義製薬) 200mg/kg を菌接種6日前に腹腔内投与した。

5 微速度撮影による連続的観察

ラットに ethyl carbamate 1750mg/kg を皮下注射し、十分な麻酔が得られた後に、腹部正中切開を加え、腸間膜を無菌的に引き出した。この後に、150×150mm 大、厚さ 1.5mm のカリガラスで作成したスライドガラス上にラットの躯体および展開した腸間膜を粘着テープで固定した。この腸間膜上に *A. fumigatus* TIMM1776 の分生子浮遊液 0.05ml を滴下し、表面を滅菌したポリ塩化ビニリデン製のラノプフィルム (旭化成工業株式会社) で被い、37℃に設定した恒温保温板をステーシ上に装着したノマルスキー型微分干渉顕微鏡 (Ortholux-II, Leitz 社) で観察した。分生子が付着した近傍の腸間膜静脈の末梢を選んで観察視野を決定し、微速度撮影装置を組み込んだ 16mm カメラ (Arriflex 16ST、Arnold & Richter 社) を用いて、1frame/20sec の撮影条件で 30 時間の連続撮影を行った。このフィルムを映写速度 24frame/sec で映写し、腸間膜上での菌糸の伸長や遊走する細胞の動態および形態の動的変化を追跡した。

研究結果

対照群 (CY 非投与群) では、接種後約 1 時間から、腸間膜上の分生子に向かう分葉核白血球の遊走を認め、3~4 時間後には、白血球が盛んに分生子を貪食している像が観察された。6 時間以降では、腸間膜上の分生子はほとんどが貪食され、新

たに血管外へ遊走する白血球数も次第に減少した。この観察時間内には、菌糸の伸長は全く認め

られなかった(Fig. 1)。

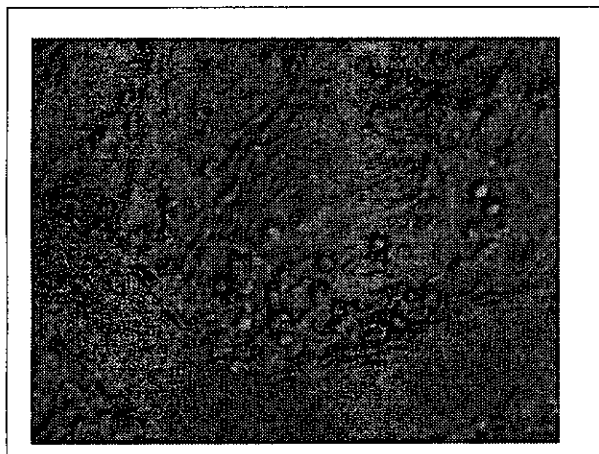


Fig 1a

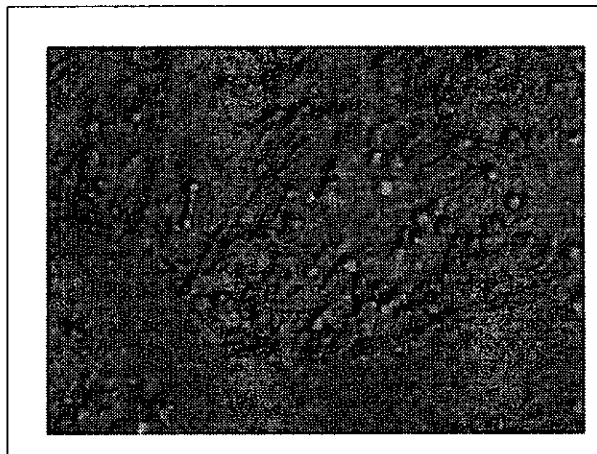


Fig 1b

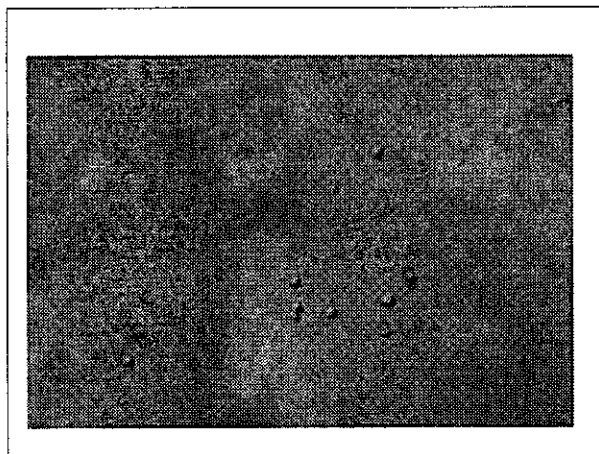


Fig 2a

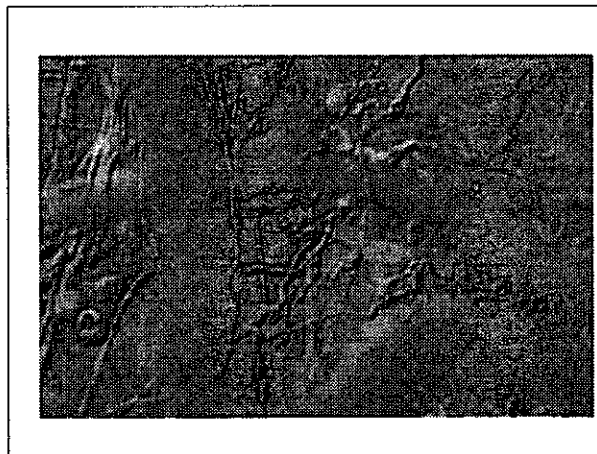


Fig 2a



Fig 2c



Fig 2d

Fig 1 Cinemicrographs demonstrating the interaction of migrating leukocytes with conidia of *A. fumigatus* implanted onto the mesenterium of anesthetized normal rats

Fig 2 Cinemicrographs demonstrating the invasion of growing hyphae of *A. fumigatus* into the mesenteric venule after implantation of the fungal conidia onto the mesenterium of anesthetized rats which had been pretreated with cyclophosphamide

これに対し、CY投与群では、腸間膜上への白血球の遊走はほとんど認められず、接種後6から9時間目から、接種した分生子の出芽と無方向性の菌糸の伸長が観察された。これらの菌糸はさらに伸長を続け、その先端が細静脈壁に直角に近い角度で接したものは、細静脈壁を突き破り、内腔に突出した。このような菌糸の細静脈壁への侵入は、接種時の血管と接種された分生子との距離によっても異なるか、約18～22時間後から認められ、血栓形成に基づく血流停止や出血は、29時間以降に観察された。

考 案

これまでに *Aspergillus* spp の生体内における増殖形態については詳細な研究がなされ、既存の組織構築に無関係な菌糸の伸長や、静脈破壊に基づく出血性病変を形成しやすい点などの特徴が明らかとなっている⁴⁵⁾。これらは、人体例における病理組織学的な検索結果の集積から明らかにされた事実であるが、その病変の成立過程、すなわち分生子の侵入から出血巣の形成までを連続的かつ動的に観察し得た報告は、我々の渉猟の限りではみられていない。

そこで今回我々は、この問題を追及することを目的としてラット腸間膜上に分生子を滴下し、約30時間にわたる微速度撮影を行って、菌糸の伸長や白血球の遊走の動態について観察した。対照群では、分生子に向かう分葉核白血球の遊走ならびに盛んな貪食を認めたが、この白血球は、早期から細静脈外に遊走すること、旺盛な運動能と貪食能を示すことなどから、その大多数が好中球であると推定される。この点は、アスペルギルス症ヒト症例で観察される病変の多くに、好中球の浸潤が認められる事実と一致するか、ヒト症例ではこれに付随して壊死巣を認めることが多い。しかしながら、本実験で好中球の遊走開始から1時間以内に腸間膜の壊死が生じたとは考えにくく、分生子自体に好中球の走化性を刺激する因子が存在する可能性が示唆される。ところで、発症から好中球浸潤までの時間が比較的正確に知られているヒト疾患の代表として心筋梗塞があげられる。この場合、心筋の凝固壊死が先行して起こり、発症後

10時間以上を経過した時点で、はじめて光学顕微鏡下で好中球が認められる⁹⁾。このように、細胞の壊死のみによって招来される好中球浸潤の発現には通常約10時間要するのに比較して、今回の観察結果は、好中球の反応が格段に早く起こることを示している。*Aspergillus* spp の感染巣では、壊死の有無にかかわらず侵入した分生子に向かう好中球浸潤が、感染後速やかに起こることか推察される。

結 論

Aspergillus spp は、多数の生物活性物質を産生することが知られており⁷⁾、この中に好中球の走化性を刺激する因子が含まれている可能性も考えられる。対照群では、接種後約6時間以内に、腸間膜上の分生子の大半が、好中球によって貪食され、分生子からの出芽は認められない。これに対して、CY投与群では接種後6～9時間目に、分生子からの出芽をみたか、この時間内では好中球の遊走は全く認められなかった。従って、生体組織内に定着した分生子の出芽に要する時間は6ないし9時間と推定され、対照群では、この時間を待たずして分生子が処理されたと考える。この後、接種約20時間で、菌糸の細静脈への侵入像が観察された。

腸間膜は、基底膜上に一層に配列する中皮細胞とわずかな線維性結合組織を介して毛細血管や毛細血管後細静脈等の血流に接する構造をもち、分泌上皮を持たない末梢の呼吸領域、すなわち呼吸細気管支から肺胞にわたるヒトでの肺アスペルギルス症の感染好発領域に外捜しうる環境と考えた。加えて、実験感染を好氣的条件下で成立させ、好中球の遊走が比較的容易な環境にあることなどを考慮すると、腸間膜上で観察されたこれらの逐次的現象は、ヒト肺アスペルギルス症の感染初期の病態の少なくとも一部とは共通するものであり、本症の複雑な病態の解明に有用な情報と考えられた。

本研究遂行に際して、株式会社アイカムに多大なご協力をいただいたことを記し、深い感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 渋谷和俊、若山 竜、高橋啓、直江史郎 アスペルギルス症。病理と臨床 9 1279-1284, 1991
- 2) 内田勝久、山口英世 アスペルギルスの菌学的検査法、Aspergillosis。(池本秀雄編)、p 13-20、協和企画通信、1989
- 3) Binder RE, Falang LJ, Pugatch RD, Mahasaen C And Snider GL Chronic necrotizing pulmonary Aspergillosis A discrete clinical entity Medicine 61 109-124, 1982
- 4) 奥平雅彦 Opportunistic fungus infectionの病理。日病会誌 74 61-91, 1985
- 5) 発地雅夫 アスペルギルス症の組織学的同定と病理学的所見、Aspergillosis (池本秀雄編)、p 21-26、協和企画通信、1989
- 6) 鈴木庸之 心筋梗塞、基準病理学。(青木重久、小泉富美朝編)、p7-10、南江堂、1992
- 7) Hearn VM Antigenicity of *Aspergillus* species Journal of Medical and veterinary Mycology 30 11-25, 1992
- transplantation patients, MYCOSES45, 146-151 (2002)
- 5) Shibuya K, Walter F Coulson, Naoe S Histopathology of Deep-Seated fungal Infections and Detailed Examination of Granulomatous Response Against Cryptococci in Patients with Acquired Immunodeficiency, JPN J Med Mycol 43, 143-151, 2002
- 6) 榎村浩一、岩口伸一、加納 壘、杉田 隆、渋谷和俊、前崎繁文、望月 隆 (病原真菌データベース) Pathogenic fungi Database (PFDB) の公開、臨床検査、46 919-924, 2002
- 7) 上原至雅、亀井克彦、菊池 賢、榎村浩一、鈴木和男、新見昌一、上 昌広、馬場基男、堀田国元、渋谷和俊、直江史郎 深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査アスペルギルス症について-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)のワーキンググループ、THE JAPANESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, 55, 446-481, 2002

2 学会発表

- 1) 安藤常浩、渋谷和俊、大原関利章、若山 竜、高橋 啓、折津 愈、武村民子、直江史郎 肺真菌症における血中(1-3)- β -D-グルカンの臨床的検討 第76回日本感染症学会総会、東京、2002, 4
- 2) 杉野圭史、木村一博、山田浩之、磯部和順、佐野 剛、廣井真弓、外山勝弘、梁 英富、北條貴子、渋谷和俊 抗凝固剤との併用療法にて改善し得たカンジダ血症の一例 第23回関東医真菌懇話会、東京、2002, 6
- 3) 渋谷和俊 侵襲性アスペルギルス症の病理 第4回新潟血液疾患真菌症フォーラム、2002, 6
- 4) 佐藤大輔、横山圭子、篠澤陽子、斎藤義人、山城義広、水井洋子、内田 耕、長谷川千花子、赤坂喜清、渋谷和俊 間質性腎炎をともなったサルコイドーシスの一例 第150回日本呼吸器学会関東地方会、東京、2002, 7
- 5) 渋谷和俊 クリプトコックス症の病理 病変形成に関わる菌と生体の可変性因子(特別講演) 第5回皮膚のアレルギー 免疫疾患研究会、東京、2002, 10
- 6) 渋谷和俊 真菌感染症への臨床病理学的アプローチ 第51回日本感染症学会東日本地方会総会、仙台、2002, 10
- 7) 上原至雅、亀井克彦、菊池 賢、榎村浩一、鈴木和男、新見昌一、渋谷和俊、上 昌広、馬場基男、堀田国元、直江史郎 深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査アスベ

健康危険状況

特になし

発表論文

1 発表論文

- 1) 渋谷和俊、長谷川千花子、川上和義、直江史郎、斎藤 厚 CD4障害下におけるヒクリプトコックス肉芽種に関する病理組織学的検討 厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業、日和見感染症の治療に関する研究 平成13年度報告書 87-93, 2002
- 2) 渋谷和俊、直江史郎 ラット腸間膜上でのアスペルギルスの血管侵襲に関する微速撮影による動態的観察 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 平成13年度報告書 101-108, 2002
- 3) Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH Zhang T, Kinjo Y, Yara S, Uezu K, Shibuya K, Naoe S, Saito A Anti-CD11 b monoclonal antibody suppresses brain dissemination of *Cryptococcus neoformans* in mice, Microbiol Immunol 46(3) 181-6
- 4) Wakayama M, Shibuya K, Ando T, Oharazeki T, Takahashi K, Naoe S, and W F Coulson Deep-seated mycosis as a complication in bone marrow

- ルギルス症について 第46回日本医真菌学会
総会、東京、2002, 9
- 8) 若山 恵、渋谷和俊、安藤常浩、横内 幸、
大原関利章、高橋 啓、直江史郎 カンジダ
の腎病変と抗真菌剤投与の影響に関する病理
組織学的検討 第46回日本医真菌学会総会、
東京、2002, 9
 - 9) 槇村浩一、渋谷和俊、加納 壘、杉田 隆、
岩口伸一、前崎繁文、望月 隆 病原真菌
データベース PFDB2002 第46回日本医真
菌学会総会、東京、2002, 9
 - 10) 渋谷和俊、長谷川千花子、浜谷茂治、三浦妙
太、Coulson F Walter、直江史郎 クリプト
コクス肉芽腫に出現する多核巨細胞に関す
る組織学的研究 第46回日本医真菌学会総
会、東京、2002, 9
 - 11) 杉野圭史、木村一博、梁 英富、廣井真弓、
外山勝弘、磯部和順、山田浩之、佐野 剛、
北條貴子、長谷川千花子、渋谷和俊 血液疾
患患者に合併した侵襲型肺アスペルギルス症
に関する臨床病理学的検討。第46回日本医真
菌学会総会、東京、2002, 9
 - 12) 渋谷和俊 侵襲性肺アスペルギルス症への臨
床病理学的アプローチ 第6回ABO血液型不適
合移植研究会、東京、2002, 10
 - 13) 渋谷和俊 (班長 木村 哲) <日和見感染症
の治療に関する研究> 班平成14年度第1回班
会議、東京、2003, 1
 - 14) Shibuya K Clinicopathological correlates of inva-
sive fungal infections Focus on Fungal Infections
13, Hawaii, March, 2003

知的財産権の出願・登録状況

特になし



クリプトコッカス感染におけるCpG DNA によるTh1細胞誘導とその感染防御効果に ついての検討

宮城 一也、川上 和義、金城 雄樹、上江洲香織、金城 武士、斎藤 厚

琉球大学第一内科

研究要旨

エイズの重要な日和見病原真菌であるクリプトコッカスは免疫低下宿主に感染、発症し、高率に中枢神経系に播種して致命的な経過をたどる。その感染に対する防御の主体は細胞性免疫であり、Th1サイトカインが重要な役割を担っている。また近年、非メチル化CpGモチーフを有するオリゴDNA (CpG-ODN) が自然免疫細胞を活性化し、TNF- α やIL-12、IFN- γ などのTh1型サイトカインを産生誘導、さらにその機能成熟を促すことが判明した。我々はこのCpG-ODNに注目し、その感染防御効果を致死性マウスクリプトコッカス感染症モデルを用いて検討した。

CpG-ODN投与群、コントロール投与群にクリプトコッカスを感染させその感染経過について比較検討したところ、CpG-ODN投与群にて有意な生存期間の延長、肺及び脳内からの真菌排除の亢進が認められた。その結果と一致して、感染後7日目、14日目における気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のIFN- γ 及びIL-12はCpG-ODN投与群にて有意にその産生の増加を認めた。さらに、CpG-ODNを投与した感染マウスからの傍気管支リンパ節細胞は*in vitro*抗原再刺激によって有意に高いIFN- γ 産生能を示した。以上の結果より、CpG-ODNは致死性マウス肺クリプトコッカス症モデルマウスにおいてTh1サイトカイン誘導して感染防御に働くことが明らかになった。

次に免疫不全状態におけるCpG-ODNの効果を調べるためCD4陽性T細胞を除去したマウスにCpG-ODNを投与したところ、除去していないマウス群と比べて、BALF中のIFN- γ 産生が有意に減少していた。また、HAART施行例もしくは非施行例のHIV患者のPBMCを採取し*in vitro*にてCpG-ODN、SAC、LPSでそれぞれ刺激したところSAC、LPSでは健常群と比較してその産生に大きな差は認めなかったが、CpG-ODNで刺激した際のIL-12産生は、健常群と比べてHIV患者群で減少している傾向を認めた。さらにHAART施行例、非施行例を比べてもHAART非施行例でよりIL-12の産生が低下している傾向があり、CpG-ODNによるTh1反応の誘導にはCD4陽性T細胞の存在が重要であることが明らかになった。したがってエイズ患者ではCpG-ODNによるTh1反応の誘導が十分には期待できない可能性が示唆され今後のさらなる検討が必要と考えられた。

研究の目的

1984年、徳永らにより結核菌由来のDNAが抗腫瘍効果を有することが初めて報告された¹⁾。またKriegらは、合成したオリゴDNA (ODN) による免疫細胞の活性化作用を報告し、その活性には特定の配列である非メチル化CpGモチーフ (5'-Pu-Pu-CpG-Pyr-Pyr-3') が必要であることを示した²⁾。このCpG-ODNはマクロファージ、樹状細胞、NK細胞などの自然免疫細胞を活性化し、TNF- α やIL-12、IFN- γ などのTh1型サイトカインを産生誘導、さらにその機能成熟を促すことが知られている³⁾。その作用機序は従来不明であったが、審良らはCpG-ODNがMyD88を介してシグナルを伝達させることを見出し、そのレセプターがToll-like receptor (TLR) 9であることを明らかにした⁴⁾。

このようにCpG-ODNは、他のアジュバントと比べても少ない副作用でTh1反応を誘導することができ、さらにその作用機序も徐々に解明され始めていることから、現在、癌やアレルギーを始めとした臨床治療が進行中である⁵⁾。

エイズの重要な日和見病原真菌であるクリプトコッカスは免疫低下宿主に感染、発症し、高率に中枢神経系に播種して致命的な経過をたどる。その感染に対する防御の主体は細胞性免疫であり、Th1サイトカインが重要な役割を担っている^{6, 11)}。そこで我々は、致死性クリプトコッカス感染モデルマウスを用いてクリプトコッカスに対するCpG-ODNの治療効果について検討を行った。

研究方法

1 動物

7～9週令の雌のCDF-1マウスを使用した。全てのマウスは琉球大学医学部附属実験動物センターにおいて特定の病原体から隔離して飼育さ

れ、また実験のプロトコールは当大学の実験動物倫理委員会の承認を得て行った。

2 病原真菌および感染方法

病原真菌として長崎大学第二内科で樹立された *Cryptococcus neoformans* 臨床分離株 YC-11 (河野茂教授より供与) を使用した。真菌はホテトデキシトロース寒天培地にて培養し、2日後に 2×10^6 / ml に調整し、25ゲージのサーフロ針の外筒を用いて 50 μ l を直接気管内に接種した。YC-11 をマウスに経気道的に感染させると、感染は肺にととまらず脳播種を起こして約2ヶ月ではほぼ全例が死亡する⁷⁾。

3 CpGオリゴデオキシヌクレオチド (CpG-ODN) および投与方法

CpG-ODNはS化した合成DNAのCpGオリゴヌクレオチド (CpG-ODN TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT) を使用した。また、コントロールとして同しくS化したコントロール合成DNA (CNT-ODN TCC ATG AGC TTC CTG AGC TT) を用いた。それぞれの合成DNAを感染3日前、3日後、7日後に10 μ g、20 μ g、40 μ g/マウスを腹腔内に投与した。また、感染当日は菌とともに気管支内に同量を投与した。

4 肺胞内サイトカインの測定

CpG-ODN および CNT-ODN 40 μ g を感染マウスに投与し、感染後7および14日目に25ゲージのサーフロ針の外筒を用いて生理食塩水1mlにて気管支肺胞洗浄 (BAL) を行った。

5 リンパ節細胞の *in vitro* 抗原再刺激

マウスにCpG-ODNもしくはCNT-ODNを投与し、クリプトコッカスを感染後12日目に傍気管リンパ節細胞を分離精製した。得られた細胞を $2 \times$

分担研究者 斎藤 厚

研究協力者 川上和義、宮城一也、金城雄樹、上江州香織、金城武士

CpG DNA-induced Th1 response and host defense against cryptococcal infection

Kazuya Miyagi, Kazuyoshi Kawakami, Yuki Kinjo, Kaori Uezu, Takeshi Kinjo and Atsushi Saito

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

10⁶/mlに調整し、10%FCS 添加RPMI1640培地中で種々の濃度のクリプトコカスとともに培養、48時間後に培養上清を回収し、ELISAキットを用いてIFN- γ 濃度を測定した。

6 エイズ患者末梢血単核球のCpG刺激によるIL-12産生の検討

琉球大学第一内科入院または外来通院中のインフォームドコンセントの得られたHIV感染者6人(HAART施行前2人、HAART施行後4人)、および健常者6人からEDTA存在下に採血した。Ficoll-Paque(Pharmacia社、スウェーデン)にて末梢血単核球(PBMC)を分離した。得られた細胞を2×10⁶/mlに調整し、CpG-ODN(3mg/ml)、LPS(Sigma社、米国 1mg/ml)、*Staphylococcus aureus* Cowan-1株(SAC Pansorbin、Calbiochem社、米国 1000倍希釈)とともに48時間培養し、その上清を回収した。

7 サイトカイン濃度の測定

マウスIFN- γ (Endogen社、米国)、IL-12(BioSource社、米国)、IL-4(Endogen社、米国)、ヒトIL-12(R&D社、米国)はELISAキットを用いて測定した。

研究成果

1 CpG-ODNによるクリプトコカス感染防御効果

CpG-ODN投与群、CNT-ODN投与群にクリプトコカスを感染させ、その際の生存率を比較した。CpG-ODNの10 μ g、20 μ g投与群いずれにおいてもコントロール群と比べて有意に生存率の延長がみられた。また、その傾向は20 μ g投与群においてより顕著に認められた(データ未発表)。

さらに、CpG-ODNもしくはCNT-ODNを40 μ g投与しクリプトコカス感染後23日目の肺内および脳内の生菌数を比較したところいずれの臓器においてもCpG-ODN投与群で有意な生菌数の減少が認められた(データ未発表)。

以上の結果より致死性クリプトコカス感染モデルにおいてCpG-ODNは感染防御に働き、その生存率を延長させることが明らかになった。

2 CpG-ODNによるTh-1サイトカイン誘導効果

感染後7日目および14日目のBALF中におけるIL-12およびIFN- γ 濃度を測定した。BALF中ではCpG-ODN投与群で感染後14日目のIFN- γ 、感染後7日、14日目のIL-12の産生がコントロール群と比べて有意に増加していた。その際のTh-2サイトカインであるIL-4は、感染後7日目のBALF中ではCpG-ODN投与群で有意にその産生の低下が認められた(データ未発表)。また、感染後12日目に傍気管支リンパ節細胞を精製して真菌抗原とともに培養し、48時間後に上清中のIFN- γ を測定した。CpG-ODN投与群ではCNT-ODN投与群と比べて、IFN- γ 産生の増加が認められた(データ未発表)。

以上の結果より、CpG-ODNは致死性のマウス肺クリプトコカス症モデルマウスにおいてTh-1サイトカインであるIFN- γ を誘導することにより感染防御に働くことが明らかになった。

3 免疫不全状態におけるCpG-ODNの効果

CpG-ODNを投与したマウスに抗CD4抗体もしくはコントロールラットIgGを投与、クリプトコカスを感染させて14日目におけるBALF中のIFN- γ 濃度を測定した。抗CD4抗体投与群ではコントロール群と比べて、BALF中のIFN- γ の産生が有意に低下しており、その量はCNT-ODN投与群と同じレベルであった(データ未発表)。

さらに、HAART治療群もしくは未治療群のHIV患者のPBMCを採取しCpG、SAC、LPSでそれぞれを刺激して48時間後のIL-12を測定した。SAC、LPSでは両群間に顕著な差は認めなかったが、CpG-ODN刺激では健常群と比べてHIV感染者群でIL-12の産生が低下している傾向があり、さらにHAART治療群と比べて、未治療群でその産生がより低下している傾向を認めた(図1)。

以上の結果より、CpG-ODNによるTh1反応の誘導にはCD4⁺T細胞の存在が重要であることが明らかになり、エイズ患者ではCpG-ODNによるTh1反応の誘導が十分には期待できない可能性が示唆された。

考察と結論

真菌感染症、特に日和見真菌感染症はエイズや血液悪性疾患を代表とする免疫低下宿主に合併し、その予後に大きく関与している。

クリプトコカス症はそのような日和見真菌感染症の一つであり、多くは免疫能の低下したいわゆる immuno-compromised host に肺病変を形成し、高率に中枢神経系に播種して、しばしば致死的な経過をとる。最近の研究によってクリプトコカスが細胞内増殖菌であることが明らかになり⁶⁾、このことに一致してその感染防御機構は主に細胞性免疫によって担われることが示されている⁷⁻¹¹⁾。従って、感染防御にはTh1サイトカインが重要であり、Th2サイトカインとのバランスがTh1側にシフトした場合に感染は治癒の方向に向かうと考えられる。最近、この理論に従って、米国でエイズ合併クリプトコカス髄膜炎症例を対象にIFN- γ 治療の無作為二重盲験試験が実施された¹²⁾。方法は、標準化学療法を10週間実施する際に、プラセボ、または2種類の投与量のIFN- γ を併用するものであり、評価項目として臨床症状、髄液所見、そして副作用について解析を行っている。その結果、プラセボ群と少量及び高容量のIFN- γ 群との間に明らかな違いはみられていない。しかし、これは感染症治療に対するIFN- γ を用いた初めての臨床試験であり、ここまで重篤な副作用がみられていないことから、今後とも投与方法などを改善

した新たなトライアルが実施されるものと期待している。

我々もこれまでに、致死性マウスクリプトコカス症モデルを用いて、IFN- γ 、IL-12、IL-18、 α -galactosylceramideを用いたTh1-Th2バランスの人為的制御による難治性クリプトコカス症に対する免疫療法の可能性について検討し報告してきた^{7,10,13)}。しかし、いずれも副作用やTh1、Th2反応制御の難しさなどの問題点を抱えているため、新たなオプションとしての免疫制御物質を検索してきた。

本研究では、非メチル化CpGモチーフを含むオリゴDNAのクリプトコカス感染防御における効果について致死性マウスクリプトコカス感染モデルを用いて検討した。このモデルでは、CpG-ODNを投与するとCNT-ODNと比べてTh1反応および感染防御能が増強した。このことから、CpG-ODNがクリプトコカス感染後においてIFN- γ の産生を誘導して感染防御に働くことが明らかとなった。これまでの報告では、CpG-ODNは樹状細胞、マクロファージ、NK細胞、B細胞といった自然免疫細胞上のTLR9によって認識され、MyD88を介してシグナルを伝達しそれぞれの細胞を活性化しその機能を成熟させると考えられている^{3,4)}。樹状細胞はCpG-ODNによって刺激を受けると、活性化されMHC class II-やICAM-1の他にCD40、CD80、CD86といった分子を細胞表面に発現するようになる¹⁴⁾。さらに、TNF- α の他に、IL-6、IL-

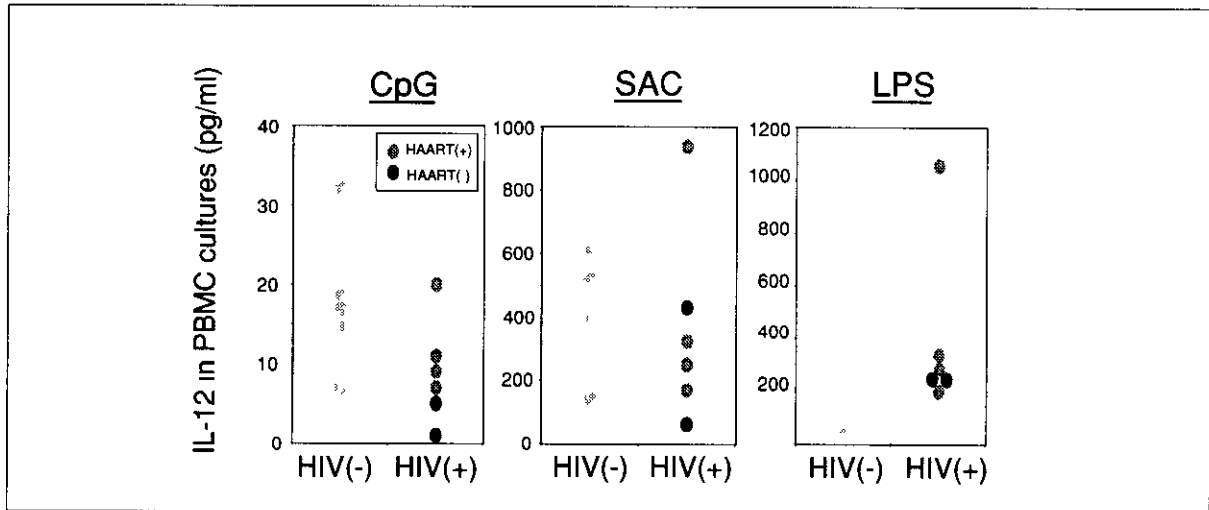


図1 CpG刺激エイズ患者PBMCからのIL-12産生低下