

II. 原虫・寄生虫感染症の検査診断 各論

1. 原虫性疾患

d. クリプトスポリジウム症

キーポイント

- 診断には糞便からオーシストを検出すればよいが、ホルマリン・エーテル法など通常の虫卵・原虫検査法では検出できない。
- 蔗糖遠心沈殿浮遊法、抗酸染色法、蛍光抗体法などが必須である。
- 重症例では胃液、胆汁、喀痰などからも検出される。
- 腸粘膜層生検材料のヘマトキシリン・エオシン染色標本では虫体は刷子縁に顆粒状物体として見えるが、確定には蛍光抗体染色や電顕観察が必要である。

キーワード クリプトスポリジウム, クリプトスポリジウム症, 検査法

はじめに

クリプトスポリジウム症は腸管寄生原虫である *Cryptosporidium* の感染によって起こる下痢症で、世界中に分布し、感染率は下痢起因病原体の中でも上位にランクされる。まだ確実に有効な治療薬はないので、免疫機能が正常な患者では免疫力による自然治癒を待つしかなく、免疫機能の低下した患者、特に HIV 感染者やエイズ患者が感染した場合は、激しい下痢が長期間持続し、難治性で致死的になることも少なくない。小児下痢症、旅行者下痢症の原因としても重要である。

近年、先進諸国では汚染された水道水による集団感染が頻発し、大きな問題になっている。わが国も例外ではなく、1996年には埼玉県で約9000人の集団感染が発生した。

本症は1999年4月から届出感染症に指定される。検査法は簡単なので、下痢症の病原体検索に際してルーチン検査の一つとして定着させていきたい。

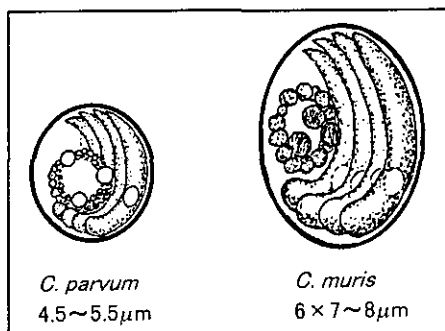
I. クリプトスポリジウムの種(species)とオーシストの形態

Cryptosporidium は多くの動物に寄生している。哺乳類には腸に寄生する *C. parvum* や *C. wrairi*、胃に寄生する *C. muris*、ニワトリには *C. baileyi*、シチメンチョウには *C. meleagridis*、ヘビには *C. serpentis*、魚類には *C. nasorum* などが知られており、まだ種名が付けられていないものも数種ある。

ヒトに感染し下痢の原因として重要なのは *C. parvum* であるが、*C. muris* 感染もみられるし、エイズ患者では本来ヒトには感染しないはずの *C. baileyi* が感染して死亡した例もある。したがって、糞便材料からオーシストが検出された場合には種の鑑別が必要になるが、オーシストは5μm前後と小さく、基本的形態は互によく似ているので、顕微鏡的に種を同定するのは極めて困難である。現在、PCR法による鑑別法が開発されつつある。

オーシストの基本構造を図1に示した。オーシスト壁の中にはバナナ状のスプロゾイトが4個と、液胞と顆粒の集塊からなる残体1個とが包蔵される。

—臨床病理—

図1 *Cryptosporidium* のオーシストの構造

オーシストの大きさは *C. parvum* であれば長径 5~5.5 μm の短楕円形、*C. muris* は長径 7~8 \times 短径約 6 μm の楕円形、*C. baileyi* は長径約 6 μm \times 短径 4.5 μm の楕円形を示す。鏡検に際して $\times 1000$ の倍率で長径と短径を計測するよう心掛ける。

感染はオーシストの経口摂取による。小腸粘膜上皮細胞の微絨毛の中で無性生殖と有性生殖を繰り返しながら激しく増殖し、感染力のあるオーシストが糞便に多数排出される²⁾。

II. 検査材料と検体の保存

A. 糞便

通常は水様下痢便や泥状下痢便が検査対象になるが、下痢終息後の軟便や普通便にも 2 週間程度は多数のオーシストが排出されるので検査が必要になる。検体が微量では適切な検査ができない。下痢便の場合は少なくとも 5ml 以上、普通便でも 2g 程度は必要である。

検査には新鮮な検体を使用するにこしたことはないが、オーシストは変性しにくいので、容器にフタをして冷蔵保存すれば 1~2 週間後でも使用できる。また、10%ホルマリン水や MIF (merthiolate-iodine-formalin) 液、SAF (sodium acetate-acetic acid-formalin) 液などで固定した糞便からも検出可能である。MIF 液および SAF 液の処方³⁾を参照されたい。固定液を糞便の約 10 倍量加え、よく攪拌して室温に保存すればよい。固定すればオーシストは当然死滅する。オーシストを生きた状態で長期間保存したい場合には 2.5% の重クロム酸カリウム液を糞便量の 2 倍以上加えて攪拌し、冷蔵保存すれば 2~3 か月は保存できる。冷凍すると解凍時にオーシストは崩壊し、検出できなくなる。

B. 胃液・胆汁・喀痰

エイズ患者などにおける重症感染例では胃液や胆汁、喀痰などからも検出される。検体の取り扱いには糞便に準ずるが、単なる診断目的であれば、糞便検査だけで十分である。

C. 腸粘膜層の生検材料

本症の診断には糞便検査を最優先すべきであるが、下痢の原因究明のために腸生検材料パラフィン切片のヘマトキシリン・エオシン (H & E) 染色がなされることがある。病理切片の鏡検による確定診断は困難なことがあるので、未染色切片を脱パラして抗クリプトスポリジウム抗体を用いて蛍光抗体染色をするか、脱パラしたあと、電顕用に固定・包埋して電顕観察で確認する必要がある。

III. 検査室内および下水の汚染防止対策

患者の糞便には極めて多数のオーシストが排出される。1 ml 当たり $10^6 \sim 10^7$ 個という例も少なくない。したがって、1 μl 程度の微量の糞便でも数千個~数万個が含まれていることになる。しかもオーシストの感染力は非常に強く、数個~数 10 個の経口摂取で感染・発症するので、患者糞便による汚染には十分注意する必要がある。

オーシストは検査室などで使用される各種消毒液に対する抵抗性が細菌やウイルスに比べて著しく強く、通常の使用濃度では不活化できない。乾燥や 70 $^{\circ}\text{C}$ 以上の加熱では簡単に死滅するので、消毒には乾燥か加熱で対応する。

検査で糞便が付着した器具や検体の残り、アスピレートした廃液などもすべて煮沸してから廃棄する。生きたオーシストが下水に入ると環境水を汚染し、水系感染の原因になる。

IV. 検査方法

A. 糞便からの検出

本症の診断は糞便材料からオーシストを検出するのが最も簡単で確実である。しかし、直接塗抹法やホルマリン・エーテル法など、通常の方法では検出できない。オーシスト検出には次に示す 4 方法があるので、状況に応じて選択する。

1. 簡易迅速蔗糖浮遊法

手技は最も簡単で、日常検査として下痢便のスクリーニングに適している。少量の下痢便と比重 1.3 の蔗糖液とをスライドグラスに採り、両者をカバー

表1 簡易迅速蔗糖浮遊法

〔試薬: Sheatherの蔗糖液(比重は約1.3)〕	
サッカロース(試薬1級)	100 g
蒸留水	64 ml
液状フェノール	1 ml
加温しながらスターラーで攪拌溶解する。室温で長期間保存可能。	
〔手技〕	
1) スライドグラスに下痢便の少量(25 μ l程度)と、その横に約2倍量の蔗糖液を採る。	
2) 18 \times 18 mmのカバーグラスの角で両者をよく混和し、そのカバーグラスを液面に載せる。	
3) 約5分間静置してから \times 400 \sim 600の倍率で鏡検する。顕微鏡のコンデンサーを下げてコントラストを付け、ピントは液の最上層すなわちカバーグラスの下面に合わせる。	
〔所見〕	
オーシストは液との比重差で液面に浮上する。直径約5 μ mの類円形のオーシストは背景よりも明るく白く見え、薄くピンク色を帯びてみえることもある。内部には特徴的な残体の顆粒が必ず存在する。オーシストの大きさはほぼ均一である。類似の酵母などは薄緑色を帯び、大小不同なので鑑別は容易である。	
〔注意〕	
粘液を多く含む便のときは、オーシストは粘液に埋没しているのので、あらかじめ水か生理食塩水を2倍量程度加え、ピペットで十分に攪拌してから実施するのがよい。	

グラスの角で混和し、そのカバーグラスを試料に載せて5分間ほど静置してから鏡検する。オーシストの比重は1.06程度なので液の最上層に浮遊し、特徴的な鏡検像を示すので、検出や酵母などの鑑別も容易である。本症が原因の下痢であれば、前述のように多数のオーシストが排出されるので、大半の症例はこの方法だけでも診断をつけることができる。手技は表1に示した。

2. 蔗糖遠心沈殿浮遊法

比重1.2の蔗糖液を使ってオーシストを浮遊・濃縮して鏡検する方法である。糞便を比重1.2の蔗糖液に懸濁して遠心するとオーシストは液面に浮遊し、比重が1.2以上の夾雑物や蔗糖液が内部に浸透した夾雑物など大半の夾雑物は管底に沈殿する。オーシストは濃縮され、鏡検に際して視野中の夾雑物が少ないので検出が容易であり、簡易迅速蔗糖浮遊法に比べて50 \sim 100倍程度の糞便量を使用するので検出効率もよくなる。手技は簡単で結果は20 \sim 30分で出せる。

虫卵検査に用いられる飽和食塩水(比重1.2)や原虫のシスト検出に用いられる33%硫酸亜鉛液(比重1.18)でもオーシストは浮遊する。蔗糖液が奨用されるのは、蔗糖液とオーシスト内部の液との屈光性の差によるものと思われるが、鏡検に際してオーシストの内部が白く、あるいは薄いピンク色に輝くよう

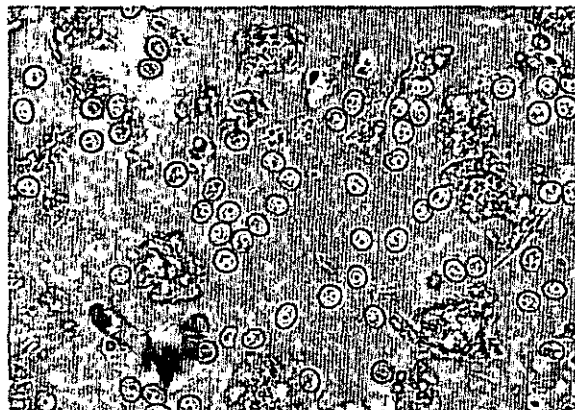


写真1 蔗糖遠心沈殿浮遊法によるオーシストの所見
(巻頭カラー3頁参照)

に見えるし、内部の残体の顆粒も明瞭に見えて検出しやすいからである(写真1)。他の浮遊液ではそのような所見は得られない。手技は表2にまとめた。

なお、粘液や脂肪を多量に含む便、乳幼児の乳成分を多量に含む便などは、そのままでは便の大半が浮遊するので鏡検できない。粘液便は粘液溶解剤で、脂肪便はエーテルで、乳成分は蛋白溶解剤で前処理してから使用するのがよい。

3. 抗酸染色法

抗酸染色法ではオーシストは赤染し、類似の形態を示す酵母や夾雑物は青く染まるので検出および鑑

—臨床病理—

表2 蔗糖遠心沈殿浮遊法

<p>〔蔗糖液(比重 1.2)〕 サッカロース(試薬1級) 500 g 蒸留水 650 ml 攪拌・溶解すれば比重は1.2になる。液状フェノールを1%の割りに加えておけば室温で長期間保存できる。</p>
<p>〔手 技〕 1) 10~15ml 短試験管に約2mlの下痢便を採る。このとき金網製茶こしに湿ったガーゼ2枚で糞便を濾過して大きな夾雑物を除去する。糞便が濃くて濾過しにくい場合は水を加えて薄める。 2) 蔗糖液を5mlほど加えてピペットでよく攪拌する。 3) 蔗糖液をさらに加えながら攪拌し、液面が試験管口から約1cm下になる液量とする。あまり液が多いと遠心の際に遠心機を汚染する心配がある。 4) 遠心。2000~2500回転(約500×G)で5分。 5) 液の表面に白金耳のループ(ループの直径約7mm)を接触させて、液をスライドグラスに3~4回採り、18×18mmのカバーグラスを載せて×400~600の倍率で鏡検する。 6) 顕微鏡のコンデンサーの位置や絞りを調節してコントラストを付け、ピントは液の最上層、すなわちカバーグラスの下面に合わせる。</p>
<p>〔所 見〕 オーシストの見え方は簡易迅速蔗糖浮遊法の場合と変わらないが、視野中の夾雑物が少ないので検出は容易である。</p>
<p>〔注 意〕 液の表面をピペットで採取すると検出されるオーシスト数は著しく減少する。ループエーゼを必ず使用する。ループの直径が小さいと何度も採取しなければならない。電熱コイルを焼き延ばして、1ml用ツベルクリン注射筒に巻いて作ればちょうどよい大きさになる。</p>

表3 抗酸染色法

<p>〔試 薬〕 1) 石炭酸フクシン液：市販のチール氏・カルポール・フクシン液(武藤化学薬品)を使用。 2) 1% メチレンブルー水溶液 3) 5% 硫酸水</p>
<p>〔手 技〕 1) 糞便を清浄なスライドグラスに塗抹。 2) 室温で乾燥。ヘアドライヤーの使用は冷風で。 3) メタノールで固定(2~5分)。 4) カルポール・フクシン液を塗抹面に載せて室温で染色(5~10分)。 5) 緩やかな流水で軽く水洗。 6) 5% 硫酸水で脱色(数秒~10秒程度)。 7) 水洗。肉眼的に塗抹面の赤色がほぼ消える程度がよい。脱色不十分なときは再度硫酸水で処理する。 8) メチレンブルー液で後染色(室温で1分)。 9) 水洗して乾燥。 10) キシレンを通し、バルサムで封入。 操作(9)のあと、塗抹面に油浸オイルを1滴載せ、カバーグラスをかけてすぐに観察してもよいが、永久標本として保存する場合はバルサムで封入する。</p>
<p>〔所見と注意〕 本文参照。蔗糖浮遊法で集めたオーシストをそのまま塗抹・染色するとオーシストは剥落してしまう。</p>

—特：108—

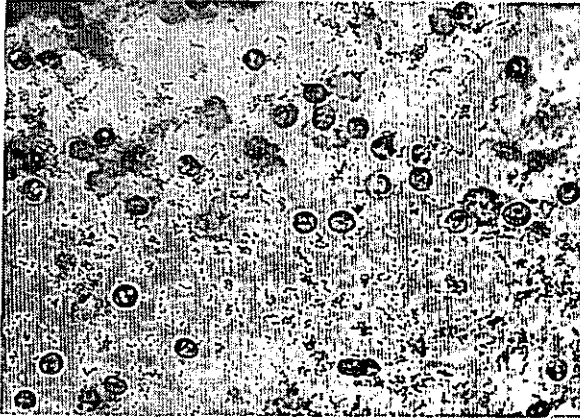


写真2 抗酸染色法によるオーシストの所見
(巻頭カラー3頁参照)

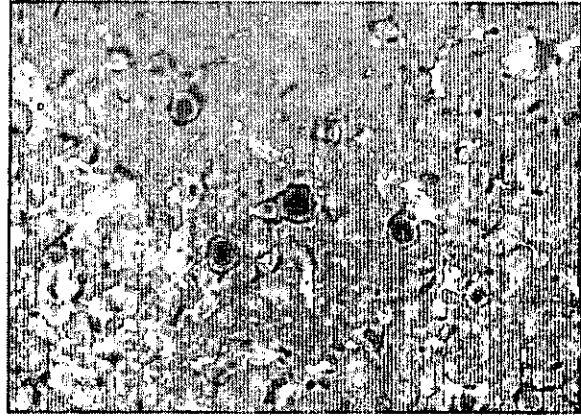


写真3 オーシストではないが抗酸染色で紛らわしく赤染する物体(巻頭カラー3頁参照)

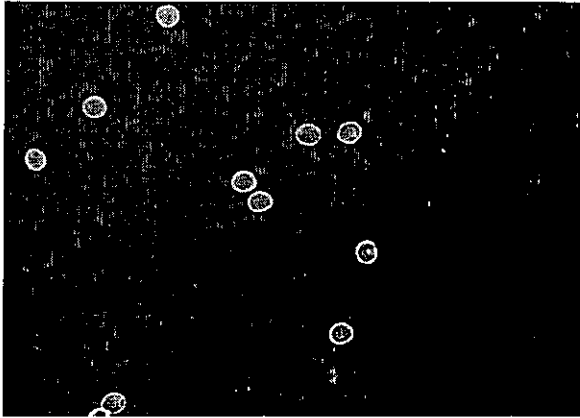


写真4 蛍光抗体法によるオーシストの所見
(巻頭カラー3頁参照)

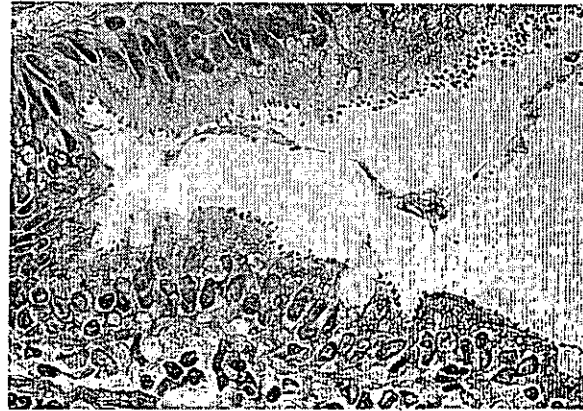


写真5 腸生検材料の病理切片 H & E 染色標本
にみられる虫体(巻頭カラー3頁参照)

別が容易になる。また、永久標本として保存できる利点もある。市販の試薬で対応でき、室温で固定、室温で染色する。手技は簡単で、20～30分で結果を出せる。試薬と手技は表3に示した。以前、筆者はKinyounの石炭酸フクシン液を用いる染色法を紹介したが⁹⁾、色素液が濃厚で脱色に時間がかかるなどの難点がある。

オーシスト壁が染まるのではなく、内部のスプロゾイトや残体が赤く染まる。濃赤色から明るい赤、薄いピンクに染色されるが、まったく染まらないものも混在する。*C. parvum* のオーシストは直径約5 μm のほぼ均一な大きさの類円形であるが、内部構造の状態によって、円形のものや中央部が白く抜けた馬蹄形あるいはドーナツ状のもの、半月形を示すものなどが見られる。また、内部に黒褐色の顆粒が1～3個存在するものもある(写真2)。1000倍に拡大

すれば不鮮明ではあるがオーシスト壁が確認できる。その直径を測ってオーシストの大きさとする。

標本によってはオーシストではない類似物が赤染することがある。これは大小不同(2～6 μm)の円形で油滴のように無構造である(写真3)。オーシストと間違えてはいけない。

蔗糖遠心沈殿浮遊法で集めたオーシストを抗酸染色する場合は、そのまま塗抹するとメタノール固定や染色操作中にオーシストは剥落してしまう。水を入れた微量遠心管にループエーゼで液面を数回採取して遠心し、上清を捨て、再度水を加えて遠心洗浄した沈渣にアルブミンか血清を少量加えて攪拌したものを塗抹すればよい。

4. 直接蛍光抗体法

オーシスト壁に対するモノクローナル抗体にFITC (fluorescent isothiocyanate) をラベルした試薬

—臨床病理—



写真6 H & E 染色で虫体と紛らわしい腸刷子縁の膨化病変(巻頭カラー 3 頁参照)



写真7 腸パラフィン切片にみられる虫体の電顕像(巻頭カラー 3 頁参照)

を使って蛍光抗体法の直接法で検出する方法である。直接法なので染色時間は短く、低倍率($\times 200$)でも検出できるので、鏡検時間を短縮できる。抗酸染色のように類似の物体が染まることもないので、判定は容易である(写真4)。

試薬には米国で市販されているもの(MerifluorTM, Meridian 社)や、国内で開発されたもの(クリプトスポリジウム検出キット, 和光純薬工業社)もある。後者は筆者の教室と共同開発したもので、*C. parvum* 以外に *C. muris* および *C. baileyi* のオーシストの検出もできる。すでに水試料からの検出用に市販されているが、現在、家畜用およびヒト用の体外診断薬としての認可を申請中である。蔗糖浮遊法や抗酸染色法ではオーシストの鏡検像に慣れないと判定に苦慮することがあるが、蛍光抗体法では誰でも自信をもって確定診断することができるので、診断薬として使用可能になれば利用価値は高いと思われる。

B. 胃液・胆汁・喀痰などからの検出

通常の患者ではこれらの検査材料から検出されることはほとんどないが、エイズ患者における重症例では検出される。検出方法は糞便の場合に準じて行えばよい。喀痰は粘液溶解剤で前処理する。

C. 生検材料からの検出

腸生検材料パラフィン切片のヘマトキシリン・エオシン染色標本では、虫体は刷子縁に付着した顆粒のように見える(写真5)。 $\times 1000$ の倍率で観察すると、各種発育段階にある虫体の核が濃染している。核が確認できない場合は虫体と判定してはいけない。微絨毛が単に膨化していたり、分泌中の粘液が紛らわしく見えることがあるからである(写真6)。

確定が困難な場合は、未染色切片を脱パラして抗クリプトスポリジウム抗体を用いて蛍光抗体染色をするか、脱パラしたあと、電顕用に固定・包埋して電顕観察で確認するのがよい。虫体であれば蛍光抗体法で特異蛍光が見られるし、電顕像では膨化した微絨毛の膜に包まれた虫体の特徴的な構造が見られる(写真7)。各種発育段階の虫体の電顕像については文献⁵⁾を参照されたい。

なお、病理染色標本で疑わしい物体が検出された場合には、糞便検査を必ず実施すべきである。

V. 血清抗体の検査

感染によって血清抗体価が上昇する。しかし、健常人では血清抗体が陽性を示す頃には下痢は終息するので、抗体検査による診断的価値はない。ただし、エイズ患者では抗体価が強陽性でもオーシストの排出は長期間持続する例が多い。

血清学的疫学調査には有用で、間接蛍光抗体法やELISA法などが用いられる。抗原には精製したオーシストや、濃厚感染させた動物の腸のパラフィン切片などを使用する。

筆者らの経験では、10倍や20倍程度に希釈した被検血清は大半が陽性反応を示すので、判定基準をしっかりと定めないと、判断を誤ることになる。

おわりに

これまで、集団下痢が発生しても下痢患者が病院を受診しても、下痢の原因検索にあたって原虫検査、特にクリプトスポリジウムの検査はほとんど実施されなかった。近年、国内でもエイズ患者や旅行者下

痢症における症例は増加しているし、水系集団感染も発生している。これからは届出感染症になるので、下痢便の日常検査の一つとして、どこの検査室でも是非実施していただきたい。

文 献

- 1) 井関基弘：クリプトスポリジウム症—注目される新顔の下痢起因原虫症。メディアサークル 37：11～19, 1992
- 2) 井関基弘：クリプトスポリジウム症，サイクロスポーラ症。新興再興感染症(山口恵三，編)，日本医事新報社，1997. p 44～49
- 3) 井関基弘，木俣 勲：寄生虫と検査，a. 原虫類。臨床病理 特集第107号(臨床検査 Yearbook '98)：119～128, 1998
- 4) 井関基弘，高田季久：クリプトスポリジウム症の診断法の開発，寄生虫疾患の診断法の開発と症例検討(神原廣二，編)，医薬ジャーナル社，1991. p 41～61
- 5) Iseki M： *Cryptosporidium felis* sp. n.(Protozoa：Eimeriorina) from the domestic cat. Jpn J Parasitol 28：285～307, 1979

(井 関 基 弘)

確定診断のためのカリニ肺炎診断法の実際

京都府立医科大学医動物学教室 塩田恒三

1. 検査材料の採取

検査材料中にカリニが多数存在し、夾雑物が少なければ、検査法の如何に関わらずカリニの検出は容易で高い検出率が得られる。ゆえに検査材料の採取方法およびその処理は重要である。

1) 気管支肺胞洗浄 (BAL)

気管支鏡を用いたBALは、リスクの高い患者にも比較的安全に行え、しかもカリニの検出率は80~100%と高く、同時にカリニ以外の肺炎起因病原体等の検査にも供せるため、現在最も広く用いられている。液量としては、小児を除き5 ml以上あることがのぞましい。

2) 誘発喀痰

超音波あるいはジェットネブライザー等を用いて3%食塩水を吸入させて得られる誘発喀痰は、患者に与える侵襲がほとんどなく、カリニの検出率もBALの69~94%と比較的高いため、米国等ではAIDS患者のみならず、AIDS以外の患者や小児科においても第1次選択として用いられている。

3) 気道吸引物

挿管下にある患者の気道吸引物あるいは吸引に使用したチューブ内に留まった粘液はよい材料である。3日間の経日的検査を行う。

4) 喀痰

カリニ肺炎の臨床症状の特徴の一つとして、空咳で喀痰が出にくいことが挙げられている。しかし、発病初期の軽度感染例では抗カリニ剤投与後は喀痰が出やすく、また喀痰中にカリニを検出しやすいと考えられる。この理由は、I型肺胞上皮に接着寄生しているカリニが抗カリニ剤の作用で肺胞腔内へ脱落・遊離した後、肺サーファクタントと気管支内面を覆う線毛上皮の線毛運動等による肺クリアランス作用により、上部気道へ運ばれて喀痰に混じって検出されるためと考えられる。しかし、初期治療が行われず本肺炎が進行した例では、肺胞腔は増殖したカリニ、脱落した上皮、変性した遊走細胞およびフィブリン等が器質化した大きな集塊をなしており、このような例では上記肺クリアランス作用のみではこれらの集塊の上部気道への運搬は困難と考えられ、次に述べる気管支肺胞洗浄液や誘発喀痰が適している。

喀痰の採取に当たっては、清浄な広口瓶を患者のベッドサイドに置き、努めて咳をさせて喀出痰を集める。一日以上蓄痰する場合は、採取瓶に抗生剤・抗真菌剤を適量入れておく。3日間の経日的検査を行う。

2. 検査材料の処理

採取した検査材料は喀痰液化剤 dithiothreitol (DTT) (SPUTASOL, OXIOD社等) で37C, 30分処理(液化)し, 3000rpm, 10分遠沈した後, 沈さを3枚の清拭したスライドガラスに塗抹, 風乾, メタノール固定を5分行う. 喀痰液化剤処理塗抹標本の cellufluor 蛍光色素やメテナミン銀 (GMS)の染色結果は, 塗抹が均一の厚さとなるため染色性のばらつきはなく, カリニの集塊もよく保存されているためカリニを検出しやすい. また, 集シスト効果があるため標本枚数が少数ですみ, 染色に要する時間と鏡検時間が短縮される. 挿管下にある患者の気道吸引物採取に使用したチュウブ内に留まった粘液もよい材料である. チュウブは約1cmに細切して喀痰液化剤を入れた容器内で37C, 30分処理する. 時々振盪するとチュウブ内に付着した粘液は剥離・液化しやすい.

3. 染色法

(A) cellufluor (calcofluor white) 蛍光色素染色 (Fungi-Fluor kit; Polysciences, Inc.等)

本蛍光色素はカリニの嚢子壁に含まれる多糖に結合し, 紫外線下で淡青色の蛍光を発する. 真菌類の細胞壁の多糖も同様に蛍光を発する. カリニ嚢子と真菌類の鑑別は, カリニ嚢子に特異的に存在し, 本法では強い蛍光を発する明瞭な”括弧状構造物”により行う. 検査材料中に含まれる種々の細胞は本色素では染まらないのでカリニ嚢子は検出しやすい.

(1) 前記メタノール固定塗抹標本の塗抹部を cellufluor 溶液(A)約6滴で覆い, 1分静置染色. 塗抹材料が含水して粘液状になり, スライドガラスから剥がれ落ちやすくなる

(2) 染色液を捨てないで標本を水平に近い角度でピンセットで保持し, スライドガラスの高い方から蒸留水を滴下し続けてスライドガラス全面を覆い, 静かにスライドガラスを傾けて染色液を同低い方から洗い落とす. 本法での最も注意すべき点である.

(3) スライドガラスを数分立てかけて, 余分な水を自然に落とすと同時に含水した粘液状の材料を半乾燥させて容量を減少させる. 非塗抹部の面が乾く位がよい. この減量により鏡検時, 検査材料の焦点深度の幅が浅くなり, 見落としを防止して鏡検による検出率を上昇させるとともに, 検査時間を短縮させる.

(4) 半乾燥の状態のカバーガラスをかける. 乾燥しきるとよくない.

(5) 蛍光顕微鏡 (U励起; 例Zeiss UG-1)で観察. 40倍対物レンズ使用, 写真撮影.

(6) カリニ嚢子は淡青色の蛍光色に見える。嚢子は円形（実際は球形）で、直径約5（4～6） μm 。嚢子壁は真菌の細胞壁よりも薄く染まる。嚢子内にあるように見える”括弧状構造物”が強く染まって観察される。この構造物はあたかも双球菌のごとく常にペアをなしている。なお、この構造物は肺内に認められる真菌類（カンジダ、アスペルギルス、クリプトコッカス等）には認めないので、カリニの確定診断に用いる。この構造物が円形の嚢子壁内面にくっついて見える場合（側面像）は桿状に見える。カリニの栄養型は染まらない。

(B) ゴモリのメテナミン銀染色 Gomori's methenamine silver nitrate (GMS) stain, Grocott's variation (グロコット染色)

GMS染色はcellufluor染色と同じく、カリニの嚢子壁および真菌類の細胞壁を染める。これらに含まれる多糖類をクロム酸で酸化すると遊離アルデヒド基ができる。これにメテナミン銀を反応させると銀粒子の沈着（鍍銀）を生じ、括弧状構造物を含むカリニの嚢子壁や真菌類は同等に黄褐色～黒褐色に染まる。カリニの嚢子は円形（球状）あるいはカップ状（例えば、軟式テニスボールの空気を抜いた状態）で、直径は約5(4～7) μm である。嚢子壁に皺を有する嚢子を時に認めるが、皺は真菌類には認めないので鑑別の参考になる。

注意点：メテナミン反応時間が長すぎると、嚢子は過染して真っ黒に染まり、括弧状構造物や皺が判別できなくなり、同じ大きさの真菌の胞子との鑑別が困難となることがある。過染しないように時々染色容器より取り出してカバーガラスをかけウェットの状態で鏡検する。この時に真菌類が染まっていればカリニ嚢子も同等に染まるので指標になる。顆粒球の顆粒もカリニ嚢子と同等に染まる。これらが黄褐色に染まってきた時点で反応を止める。もしカリニの嚢子が含まれていれば、括弧状構造物を含め嚢子壁は黄褐色に染まり、この時点で診断がつく。この場合は簡略法として、以下の染色段階を中止して、軽く水洗、風乾、包埋して永久標本としてもよい。

ニューモシスチス・カリニ染色標本の観察（顕微鏡実習資料）

- 1) カリニ肺炎患者の気管支肺胞洗浄液（BALF），GMS染色標本
- 2) カリニ肺炎で死亡した患者の剖検肺，パラフィン包埋切片，GMS染色標本

DEMO

- 1) カリニ肺炎で死亡した患者の剖検肺，パラフィン包埋切片，cellufluor蛍光色素染色標本
- 2) その他

資料2 本年度の講習会で使用したアンケート

「HAART時代の日和見合併症に関する研究班」主催：日和見原虫感染症に関する講習会
アンケート

参加者各位

次回の参考に致したく、恐縮ですが下記のアンケートにお答え下さい。

- ① 今までにこの講習会に参加したことがありますか。
 - a. ある (回数: 回)
 - b. ない

- ② 参加されたとお答えの方は従来行った講習会が日和見原虫感染症の診断技術の向上に役立ったとお考えですか。また役立たなかったとお考えの方はその理由をお聞かせ下さい。(例えば年1回の講習会では繰り返しての学習が出来ない。実習時間が少ない。標本数が少ないなど。)

- ③ なぜ今回の講習会に参加しようと考えましたか。

- ④ 参加者が実際に病院等で行う原虫感染症の鑑別・診断の妥当性に対し自己点検・評価を行う場合、今回の講習会参加前と後では異なってくるとお考えですか。

- ⑤ 繰り返して自己点検・評価するためにはどのような方策を希望されますか。複数回答可。その他とご回答の方は空欄にそのお考えをお書き下さい。
 - a. 講習会内容を収めたCD ROMの配布
 - b. コンピュータネットワークを通しての質問受付
 - c. 原虫標本の配布
 - d. 希望者には随時1日程度の実習の機会を設ける
 - e. その他

御所属・御氏名(無記名でもかまいません。実習終了時までには備え付けの箱にお入れ下さい) 御協力ありがとうございました。

難治性クリプトコッカス髄膜炎に対する 非メチル化 CpG オリゴ DNA を用いた 免疫療法の可能性

分担研究者：斎藤 厚

(琉球大学大学院医学研究科感染症制御学講座 分子病態感染症学分野)

研究協力者：川上 和義、宮城 一也、金城 武士

(琉球大学大学院医学研究科感染症制御学講座 分子病態感染症学分野)

■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、極度な細胞性免疫低下状態で高率に中枢神経系に播種性感染を起こし、致死的な経過をたどる。その感染防御機構の主体は細胞性免疫であり、IFN- γ を代表とする Th1 関連サイトカインが重要な役割を担っている一方、非メチル化 CpG モチーフを有するオリゴ DNA (CpG-ODN) は TLR9 を介して自然免疫細胞を活性化し、TNF- α や IL-12、IFN- γ といった Th1 関連サイトカインの産生を誘導することが明らかにされてきた。最近では、CpG-ODN を用いた悪性疾患やアレルギー疾患に対する臨床試験が進行しており、将来的に臨床の場に登場してくることが予想される。

そこで我々は、この CpG-ODN に注目し、その感染防御効果について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ている。CpG-ODN 投与によって、感染マウスの有意な生存期間の延長、肺及び脳内からの真菌排除の促進効果が確認され、感染 7、14 日後における IFN- γ 及び IL-12 の肺内産生増加が認められた。CpG-ODN を投与した感染マウスからの傍気管リンパ節細胞は、*in vitro* での抗原再刺激によって有意に高い IFN- γ 産生能を示した。また、肺及び所属リンパ節細胞についてフローサイトメトリーを用いて解析したところ、感染 7 日後では CD8 陽性 T 細胞、14 日後では CD4 陽性 T 細胞が IFN- γ 産生の主要なポピュレーションであることが分かった。この結果に一致して、抗原刺激リンパ節細胞からの IFN- γ 産生及び CpG-ODN による感染防御効果は CD4 または CD8 陽性 T 細胞を除去することで強く抑制された。一方、自然免疫リンパ球である NK、NKT、 $\gamma\delta$ T 細胞を除去しても CpG-ODN による感染防御効果には影響を与えなかった。

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 サイトカイン誘導を介して感染防御に働くことが明らかになった。今後は、エイズに合併する難治性クリプトコッカス髄膜炎に対する CpG-ODN を用いた免疫療法の可能性についてさらに解析していく必要があると考えられる。

研究目的

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')が重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関連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、現在は悪性疾患やアレルギー疾患を対象とした臨床試験が進行中である⁵⁾。近い将来CpG-ODNが臨床の現場に登場してくることも十分に予想される。

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⁾。これまでに我々は、致死性クリプトコッカス肺感染マウスモデルを用いてクリプトコッカスに対するCpG-ODNの影響について検討を行い、肺からの真菌の排除を促進するのみならず、中枢神経系への播種性感染を予防する効果のあることを明らかにしてきた¹²⁾。そこで本研究では、CpG-ODNの作用機序について詳細な解析を行うとともに、エイズに合併する難治性クリプトコッカス髄膜炎に対する治療の可能性について見当を行った。

研究方法

1. マウス

7~9週令雌の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SPF環境下で飼育され、また実験のプロトコルは当大学の動物実験倫理委員会の承認を得ている。

2. *C. neoformans*

長崎大学医学部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。真菌はポテトデキストロース寒天培地にて培養、2日後に生理食塩水で 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、感染は肺にとどまらず脳播種を起こして3~6週で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じく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、20、40 μ g/マウスを腹腔内に投与した。また、感染当日は真菌とともに気管支内に同量を投与した。

4. 気管支肺胞洗浄

CpG-ODNまたはCNT-ODNを感染マウスに投与し、感染7および14日後に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を行い、得られた検体(BALF)はサイトカインの測定まで-70 $^{\circ}$ Cにて凍結保存した。

5. リンパ節細胞の *in vitro* 抗原再刺激

マウスにCpG-ODNまたはCNT-ODNを投与し、感染12日後に傍気管リンパ節細胞を分離精製した。得られた細胞を 2×10^6 /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ッカスとともに培養、48時間後に培養上清を回収しサイトカイン測定まで-70 $^{\circ}$ Cにて凍結保存した。

6. サイトカイン濃度の測定

マウスIFN- γ (Endogen社, 米国)、IL-12p40 (BioSource社, 米国)、IL-4 (Endogen社, 米国)はELISAキットを用いて測定した。

7. 細胞内IFN- γ 産生の解析

リンパ節細胞、肺リンパ球中のIFN- γ 産生細胞

を解析するために、分離精製した細胞をPMA (5ng/ml) +ionomycin (2 μ M) の存在下で4時間インキュベートした後、細胞表面マーカーCD4、CD8をPE標識抗体で染色、さらに細胞内に産生されたIFN- γ をFITC標識抗体で染色しフローサイトメーターを用いて解析を行った。

8. 各種免疫細胞除去の影響

NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、樹状細胞を除去するために、それぞれ抗アシアロGM1、 $\gamma\delta$ TCR、抗CD4、抗CD8、抗CD11c抗体400 μ gを感染3日前、当日、3および7日後マウス腹腔内に接種した。また、V α 14+NKT細胞の役割を調べるために、Ja281遺伝子欠損マウス(千葉大学大学院医学研究院免疫発生学 谷口 克教授より供与)及びコントロールとして遺伝的背景の同一なC57Bl/6マウスを用いた。

研究結果

1. CpG-ODNによるクリプトコッカス感染防御効果

CpG-ODNまたはCNT-ODN投与マウスにクリプトコッカスを感染させ、その際の生存率を比較したところ、CpG-ODN投与群においてもコントロール群と比べて有意に生存期間の延長がみられた(図1A)。さらに、CpG-ODN投与マウスでは、感染23日後の肺および脳内の生菌数がコントロールマウスと比べて有意に減少していた(図1B)。

2. CpG-ODNによるTh-1サイトカイン誘導効果

クリプトコッカス感染7および14日後のBALF中IL-12p40およびIFN- γ 濃度を測定したところ、CpG-ODN投与マウスにおいて感染14日後のIFN- γ 、感染7、14日後のIL-12p40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Th-2サイトカインであるIL-4は、感染7日後でCpG-ODN投与群において有意にその産生の低下が認められた(図2)。

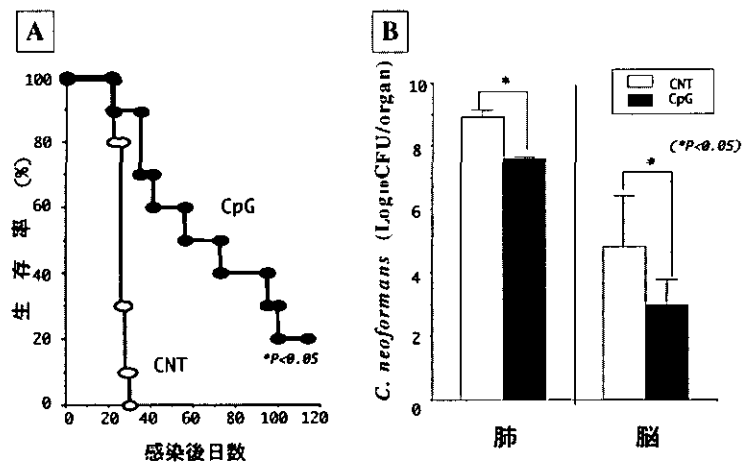


図1. CpG-ODNによるクリプトコッカス感染防御効果

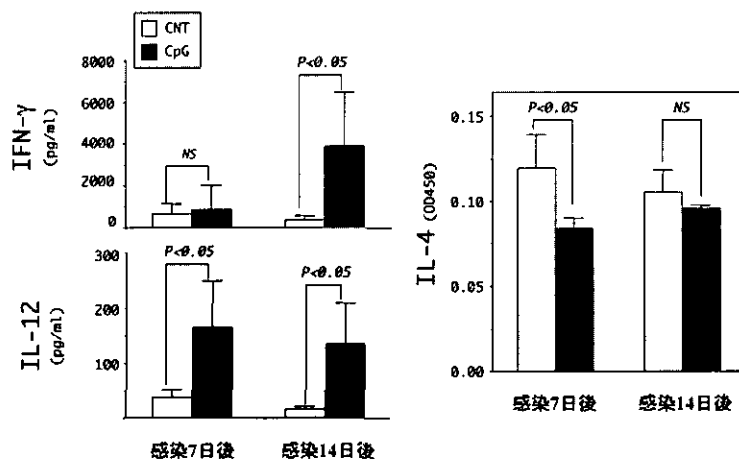


図2. CpG-ODNによるTh1-Th2バランスへの影響

また、感染後 12 日目に分離精製した傍気管リンパ節細胞を *in vitro* で真菌抗原とともに培養し 48 時間後に上清中の IFN- γ を測定したところ、CpG-ODN 投与群では CNT-ODN 投与群と比べて IFN- γ 産生が増加していた (図 3)。一方、培養上清中の IL-4 濃度は両群間で大きな違いはみられなかった (未発表データ)。

3. 細胞内 IFN- γ 産生の解析

CpG-ODN の投与によって感染マウスに誘導される IFN- γ 産生がいずれの細胞に起因するかを明らかにする目的で、感染 7、14 日後に得られた所属リンパ節細胞及び肺内白血球表面上の CD4 または CD8 分子とともに、細胞内の IFN- γ を蛍光標識した抗体で染色後フローサイトメーターを用いて解析を行った。感染 7 日後ではリンパ節細胞及び肺内リンパ球ともに CD8+T 細胞が主として IFN- γ を産生しており、一方、感染 14 日後では肺内リンパ球において CD4+T 細胞が主要な IFN- γ 産生細胞であった (図 4)。

4. CpG-ODN の感染防御効果に対する各種自然免疫細胞除去の影響

CpG-ODN を投与したクリプトコッカス感染マウスに抗アジアロ GM1、 $\gamma\delta$ TCR、CD4、CD8、CD11c 抗体もしくはコントロールウサギ、ハムスター、ラット IgG を投与して、CpG-ODN の感染防御効果に及ぼす NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、樹状細胞除去の影響について解析を行った。NK 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞の除去では CpG-ODN の効果に全く影響を及ぼさなかったものの、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、または樹状細胞を除去するとその感染防御効果はほぼ完全に抑制された (図 5、データ未発表)。また、V α 14+NKT 細胞の関与についても調べるために、遺伝的にこの細胞が存在しない J α 281 遺伝子欠損マウスとその野生型コントロールマウスとで比較検討したところ、両マウス間で CpG-ODN の効果はほとんど差が認められなかった (データ未発表)。

また、同様の方法を用いて CpG-ODN 投与によって誘導される IFN- γ の産生誘導における各種免

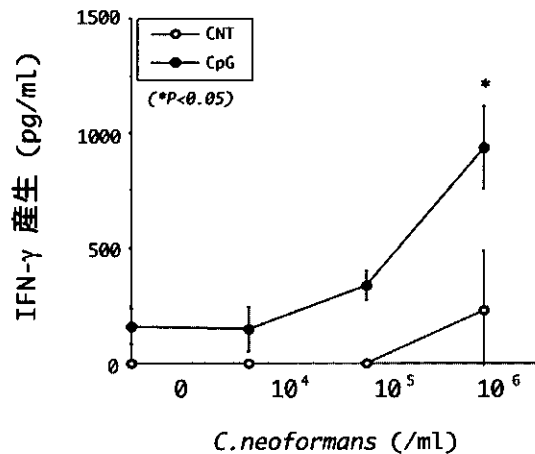


図 3. CpG-ODN による Th1 細胞の分化誘導作用

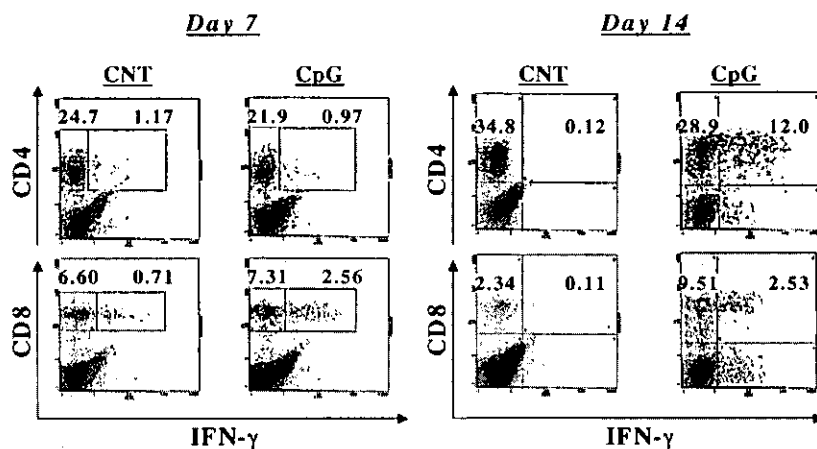


図 4. CpG-ODN による肺リンパ球内 IFN- γ 産生の誘導

疫細胞除去の影響について検討したところ、CD4+T細胞、CD8+T細胞、そして樹状細胞が深く関わっていることが明らかになった（データ未発表）。

考察

真菌感染症はエイズに合併する日和見感染症として最も頻度が高く、その予後に大きな影響を及ぼしている。クリプトコッカス症はそのような日和見真菌感染症の一つであり、多くはエイズを始めとした immuno-compromised host に肺病変を形成し、高率に中枢神経系に播種性感染を起こし、しばしば致命的な経過をたどる。

最近の研究によってクリプトコッ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サイトカインが必須であり、逆にTh2サイトカインは感染を悪化させる方向に向かわせると考えられる。最近、この理論に従って、米国でエイズに合併する難治性クリプトコッカス髄膜炎症例を対象にIFN- γ 治療の無作為二重盲検ケースコントロール試験が実施された¹³⁾。方法は、標準化学療法としてアンホテリシンB (AmB) 0.7mg/kg i.v. \pm 5FC 100mg/kg p.o.を2週間実施後（導入療法）、さらにフルコナゾール (FCZ) 400mgを8週間投与し（地固め療法）、合計10週間の治療が行われ、これにプラセボ、100 μ gまたは200 μ gのIFN- γ 1bを週3回併用投与する形で行われた。評価項目としては、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（表）。その結果、プラセボ投与群と比べIFN- γ 投与群にお

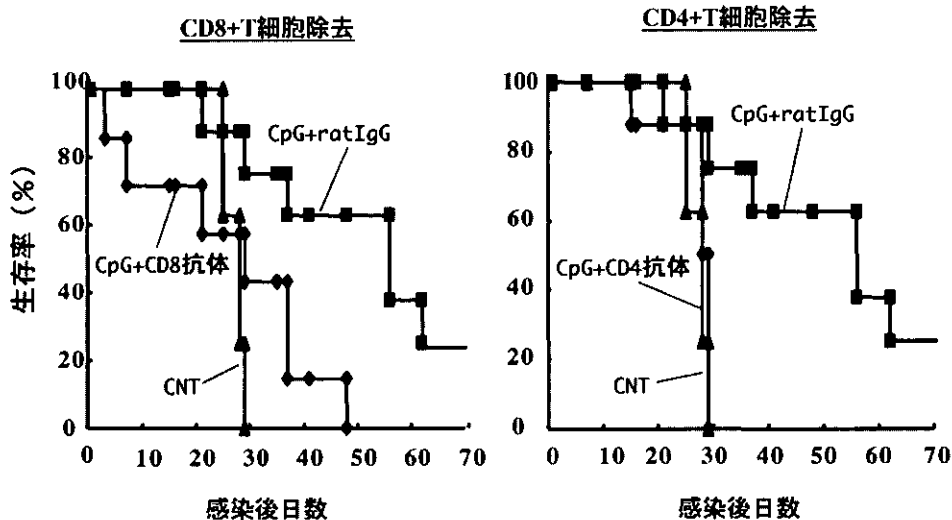


図5. CpG-ODNの感染防御効果におけるCD4+、CD8+T細胞の役割

表1. AIDS合併難治性クリプトコッカス髄膜炎におけるIFN- γ 療法

1) 対象症例：クリプトコッカス髄膜炎患者 (n=75)
(全例HIV陽性、HAART前；髄液培養陽性、髄液抗原陽性)

2) 方法

グループA (n=25)：*標準化学療法 + プラセボ週3回、10週間
グループB (n=26)：標準化学療法 + IFN- γ 1b100 μ g 週3回、10週間
グループC (n=24)：標準化学療法 + IFN- γ 1b200 μ g 週3回、10週間
(* 標準化学療法：AmB 0.7mg/kg i.v. \pm 5FC 100mg/kg p.o. 2週間
→ FCZ 400mg i.v. 8週間)

(**各グループ間で年齢、性、人種、臨床所見に有意差なし)

3) 評価

臨床症状
髄液所見 (ルーチン検査、培養、GXM抗原)：2、10週後
有害事象

いて僅かであるが、臨床的、真菌学的効果が報告されている。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ッカス症モデルを用いて、IFN- γ 、IL-12、IL-18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ッ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)}。しかし、いずれも副作用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。

これまでに我々は、CpG-ODNのクリプトコッカス感染防御における治療効果について致死性マウスクリプトコッカス感染モデルを用いて検討してきた。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がクリプトコッ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)}。

この結果から、CpG-ODNを用いた新たな免疫療法がエイズに合併した難治性クリプトコッカス感染症患者において有用である可能性が推察された。そこで本研究では、CpG-ODNの作用機序を明らかにすることを目的に解析を行っている。CpG-ODNを投与されたマウスでは、感染局所においてIL-12及びIFN- γ 産生が高まり、逆にIL-4産生が低下を示した。この結果に一致して、CpG-ODN投与マウスから得られた所属リンパ節細胞は、抗原再刺激によってIFN- γ 産生が著明に亢進していた。さらに、CpG-ODN投与によって誘導されるIFN- γ 産生細胞を明らかにするために、リンパ節細胞及び肺内リンパ球の細胞内IFN- γ についてフローサイトメーターを用いて検討したところ、感染7日後ではCD8+T細胞、14日後ではCD4+T細胞が主要なIFN- γ 産生細胞であることが明らかとなった。このようにIFN- γ 産生細胞が感染時期によって異なっている理由については不明であるが、CD4+T細胞のみならずCD8+T細胞ま

でもがIFN- γ 産生に関与している点は、エイズにおいて比較的末期までCD8+T細胞数が保たれることを考慮すると重要な知見であると考えられる。

CpG-ODNはTLR9を介して各種自然免疫細胞に作用することが知られている。我々は、抗体投与によって細胞を除去することでNK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、そして樹状細胞の、そして遺伝子欠損マウスを用いることでV α 14+NKT細胞のCpG-ODNの治療効果における役割について解析を行った。その結果意外なことに、NK細胞、V α 14+NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞といった自然免疫リンパ球の関与を証明することはできなかった。しかし、抗CD11c抗体を用いて樹状細胞を除去すると完全にCpG-ODNの感染防御効果が消失したことから、樹状細胞はCpG-ODNの作用に必須の細胞であることが明らかとなった。この点からみると、TLR9を発現してCpG-ODNに反応すると考えられる形質細胞様の樹状細胞数がエイズの進行とともに減少するという最近の報告¹⁴⁾は、CpG-ODNの臨床応用にとって一つの重要な問題点を提起する可能性がある。

最近では、CpG-ODNをアジュバントとしてエイズに対するワクチン開発に応用しようという動きもみられる¹⁵⁻¹⁷⁾。これまでの報告ではCpG-ODNを用いた臨床試験で特に重篤な副作用は認められていない¹⁸⁾。また、我々の動物実験でもこれといった副作用は観察されておらず、新たな免疫療法として比較的安全に使用できる可能性が期待される。今後ともエイズに合併する難治性クリプトコッカス髄膜炎に対するCpG-ODN投与の治療的有用性について解析を進めていきたい。

参考文献

- 1) Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka Y, Sudo T: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 72: 955-62, 1984.
- 2) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 6546-49, 1995.
- 3) Arthur M, Krieg AM, Hermann W: Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol*

- Today 21: 521-26,2000.
- 4) Henmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-45, 2000.
 - 5) Agrawal S, Kandimalla ER: Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA. *Trends Mol Med* 8:114-21, 2002.
 - 6) Lim TS, Murphy JW: Transfer of immunity to cryptococcosis by T-enriched splenic lymphocytes from *Cryptococcus neoformans* sensitized mice. *Infect Immun* 30: 5-11, 1980.
 - 7) Kawakami K, Tohyama M, Teruya K, Kudaken N, Xie Q, Saito A: Contribution of interferon-gamma in protecting mice during pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 13: 123-30, 1996.
 - 8) Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, Saito A: IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. *Clin Exp Immunol*. 104: 208-14, 1996.
 - 9) Kawakami K, Qureshi MH, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, Saito A: IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- γ production. *J Immunol* 159: 5528-5534, 1997.
 - 10) Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Miyazato A, Yara S, Kinjo Y, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Kurimoto M, Saito A: IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN- γ production by NK cells. *J Immunol*. 165: 941-947, 2000.
 - 11) Kawakami K: Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. *J Immunother* 25:S12-9, 2002.
 - 12) Kawakami K: Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases. *J Infect Chemother*. 9: 201-209, 2003.
 - 13) Papas PG, Bustamante B, Ticona E, Hamill RJ, Johnson PC, Reboli A, Aberg J, Hasbun R, Hsu HH: Recombinant interferon gamma as adjunctive therapy for AIDS-related acute cryptococcal meningitis. *J Infect Dis* in press.
 - 14) Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, Whinney SM, Wilson CC: Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus I infected individuals. *J infect Dis* 187: 26-37, 2003.
 - 15) Cafaro A, Titti F, Fracasso C, Maggiorella MT, Baroncelli S, Caputo A, Goletti D, Borsetti A, Pace M, Fanales-Belasio E, Ridolfi B: Vaccination with DNA containing tat coding sequences and unmethylated CpG motifs protects cynomolgus monkeys upon infection with simian/human immunodeficiency virus (SHIV89.6P). *Vaccine* 19: 2862-2877, 2001.
 - 16) Kojima Y, Xin KQ, Ooki T, Hamajima K, Oikawa T, Shinoda K, Ozaki T, Hoshino Y, Jounai N, Nakazawa M, Klinman D, Okuda K. Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine*. 20: 2857-2865, 2002.
 - 17) Tritel M, Stoddard AM, Flynn BJ, Darrah PA, Wu CY, Wille U, Shah JA, Huang Y, Xu L, Betts MR, Nabel GJ, Seder RA: Prime-boost vaccination with HIV-1 Gag protein and cytosine phosphate guanosine oligodeoxynucleotide, followed by adenovirus, induces sustained and robust humoral and cellular immune responses. *J Immunol* 171: 2538-2547, 171.
 - 18) Krieg AM: Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy. *J Gene Med* 1: 56-63, 1999.

健康危険情報

特になし

研究発表

論文発表

- 1) Kawakami K, Kinjo K, Uezu K, Miyagi K, Kinjo T, Yara S, Koguchi Y, Shibuya K, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Saito A: Interferon- γ production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes Infect*, in press.
- 2) Koguchi Y, Kawakami K, Uezu K, Fukushima K, Kon S, Maeda M, Nakamoto A, Own I, Kuba M, Kudaken N, Yara S, Shinzato T, Higa F, Tateyama M, Kadota J, Mukae H, Kohno S, Uede T, Saito A: High plasma osteopontin level and its relationship with IL-12-mediated Th1 response in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1355-1359, 2003.
- 3) Zhang T, Kawakami K, Qureshi MH, Tang Y, Saito A: Combined therapy of interleukin-12 and interleukin-18 against *Cryptococcus neoformans* infection in a murine model. *Chin Med J* 116: 669-672, 2003.
- 4) Kawakami K: Immunotherapy with Th1-related cytokines against infectious diseases. *J Infect Chemother* 9: 201-209, 2003.

学会発表

- 1) Kawakami K: Innate immunity lymphocytes and protective immunity. In symposium on the cellular immunity. The 15th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. San Antonio, May 2003.
- 2) Miyagi K, Kawakami K, Uezu K, Kinjo T, Saito A: CpG DNA induction of Th1 response and host protection against fatal pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. The 15th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. San Antonio, May 2003.
- 3) Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo T, Kishihara K, Matsuzaki G, Saito A: The kinetics and the role of $\gamma\delta$ T cells in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*. The 15th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. San Antonio, May 2003.
- 4) Kinjo T, Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Miyagi K, Takeda K, Akira S, Iwakura Y, Saito A: Th1 response and host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection independent of IL-12, IL-18 and IL-23. The 90th Annual Meeting for American Association of Immunologists. Denver, May 2003.
- 5) 金城武士、川上和義、上江洲香織、宮城一也、仲松正司、山城 信、岸原健二、石川博通、斎藤 厚：クリプトコッカス感染防御における $\gamma\delta$ T細胞の役割：NKT細胞との比較検討。第33回日本免疫学会総会、福岡、2003年12月。
- 6) 宮城一也、川上和義、上江洲香織、金城武士、仲松正司、山城 信、山本夏男、仲宗根 力、斎藤 厚：致死的クリプトコッカス感染マウスモデルにおけるCpG DNAによるTh1細胞誘導とその感染防御効果。第33回日本免疫学会総会、福岡、2003年12月。

知的財産権の出願・登録状況

特になし

経気道感染における *Cryptococcus neoformans* の 病原因子探索に関する研究

分担研究者：河野 茂（長崎大学医学部附属病院 第二内科）

研究協力者：小林 奨、宮崎義継（長崎大学医学部附属病院 第二内科）

■研究要旨 *Cryptococcus neoformans* は日和見真菌感染症の原因として重要な病原真菌である。*C. neoformans* は先ず経気道的に感染することが知られているが、肺における定着や増殖に関与する因子や肺から全身に播種し、髄膜へ移行する際に働く因子については検討されていない。今回、我々はマウスの肺感染モデルを用いた検討で *C. neoformans* の肺感染時に発現量が増加する 41 の遺伝子を Subtraction 法にてクローニングした。クローニングした遺伝子には、すでに *C. neoformans* の病原因子として知られている *CNLAC1*¹⁾ も含まれていた。今回、クローニングした遺伝子に含まれていた *cis*-prenyltransferase 遺伝子について knock out mutant を作成し、この遺伝子が 37℃における発育能に関連した遺伝子であることを証明した。*In vivo* における knock out mutant の病原性に関しては現在検討中である。

はじめに

Cryptococcus neoformans は AIDS(acquired immunodeficiency syndrome)や悪性腫瘍に対する化学療法、免疫抑制剤の使用による免疫抑制状態の患者のみならず、健常者にも感染する病原真菌で

ある。その病原因子として、莢膜 (*CAP59*²⁾、*CAP60*³⁾、*CAP64*⁴⁾、*MAN1*⁵⁾)、メラニン (*CNLAC1*)、交配型 (*MAT α* ⁶⁾、*STE11 α* ⁷⁾、*STE12 α* ⁸⁾、*STE20 α* ⁹⁾)、37℃での発育能 (*CNA1*¹⁰⁾、*RAS1*¹¹⁾)、ホスホリパーゼ (*PLB1*¹²⁾) などが現在

表 1. *Cryptococcus neoformans* の病原因子

病原因子	関連する遺伝子
莢膜 Phosphomannose isomerase	<i>CAP59</i> <i>CAP60</i> <i>CAP64</i> <i>MAN1</i>
Laccase (phenoloxidase) メラニン	<i>CNLAC1</i>
交配型 (<i>MATα</i>)	<i>MATα</i> <i>STE11α</i> <i>STE12α</i> <i>STE20α</i>
37℃での発育能 Calcineurin RAS-specific signaling cascade	<i>CNA1</i> <i>RAS1</i>
Phospholipase	<i>PLB1</i>
食食の調節	<i>App1</i>