

HAART開始後のCD4数の増加と元のCMV病変の大きさに相関があることが明らかとなった(表4)。HAART開始後3か月以内にCD4が50/mm³以上増加した症例を増加群、50未満であった症例を不変群として検討してみると、不変群では21例

中1例(4.8%)にのみ眼病変がみられたが、増加群では12例中5例(41.7%)に病変がみられた。また、網膜炎の大きさが1象限未満では21例中2例(7.4%)にしか眼病変がみられなかったが、1象限以上では6例中4例(66.7%)例にみられた。

表1. 経過観察中に新たな眼病変が出現した症例

	症例数	経過観察中に新たな眼病変が出現した症例(%)
全症例	75	13 (17.3%)
HAARTを施行し得なかった症例	42	0
HAARTを施行した症例	33	13 (39.4%)

表2. 眼病変が出現した症例の基礎データ

症例数	33名
年齢	38.8才(17-64)
性別	男29名、女4名
CD4数 [/mm ³]	38.3 (1-201)
CD8数 [/mm ³]	374.0 (9-1,497)
HIV RNA量 [Log ₁₀]	4.2 (2.6-5.8)

表3. 眼病変の特徴

	例数(%)	発症時CD4数	HAART開始～発症までの平均月数
硝子体炎	6例(18.2%)	188 (41-358)	2.3 (1~6)
網膜前線維症	6例(18.2%)	167 (18-477)	16.0 (3-30)
CMV網膜炎の悪化	2例(6.1%)	191	2 (1, 3)
視神経乳頭新生血管	1例(3.0%)	477	16
嚢胞様黄斑浮腫	1例(3.0%)	257	12

表4. 眼病変の出現とCMV網膜炎の大きさ・CD4数変化の相関

CD4数 大きさ	不変群	増加群	計
1象限未満	0/19	2/8	2/21 (7.4%)
1象限以上	1/2	3/4	4/6 (66.7%)
計	1/21 (4.8%)	5/12 (41.7%)	6/33 (18.2%)

考察

CMV 網膜炎後の免疫再構築症候群を検討するために網膜炎後に出現してくる眼病変を検討したが、HAART 開始後6ヶ月以内に起きる免疫再構築症候群と思われる硝子体炎及び網膜炎の悪化以外に、6ヶ月以降に起こってくる眼病変（網膜前線維症、視神経乳頭新生血管、嚢胞様黄斑浮腫）も存在することが明らかとなった。後者については、その出現時期から狭義の免疫再構築症候群とはいえないかもしれない。しかし、患者の眼病変の早期発見という意味では注意すべき病態であり、特に網膜病変が大きく HAART 後の CD4 数の上昇が速やかな症例は注意深く眼科診察を受ける必要がある。

結論

CMV 網膜炎の既往のある症例では、HAART 開始後に 39.4 % の割合で何らかの眼病変を生じることが明らかとなった。2年以上経過した後に出現する病変もあり、HAART 開始後も注意深い眼科診察が必要である。

健康危険情報

特記すべきことなし。

研究発表

論文発表

- 1) Yamada, T., Watanabe, N., Nakamura, T and Iwamoto, A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity via a humoral immune epitope of Nef protein expressed on the cell surface. *J. Immunology*. 172: 2401-6, 2004.
- 2) Takeshi Fujii, Tetsuya Nakamura, Aikichi Iwamoto. Current Concept of SARS Treatment. *J Infect Chemother*.10: 1-7, 2004.
- 3) Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A. Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. *J Virol*. 78: 8437-45, 2004.
- 4) D Zhu, H Taguchi-Nakamura, M Goto, T Odawara, T Nakamura, H Yamada, H Kotaki, W Sugiura, A Iwamoto & Y Kitamura. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly active

antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy* 9:929-35, 2004.

学会発表

本研究と関連したものはない

知的財産権の出願・登録状況

特に予定をしていない。

HAART時代の日和見合併症に関する研究 分担研究報告書

急性期病院の第1線医師、検査技師等に対する 啓蒙・診断技術移転法の解析

分担研究者：竹内 勤（慶應義塾大学医学部）

研究協力者：有菌 直樹¹、井関 基弘²

（¹京都府立医科大学、²金沢大学医学部）

■研究要旨

わが国におけるエイズの増加に対処するため、エイズ診療拠点病院のみならず、むしろ急性期疾患を扱う病院のエイズに伴う日和見原虫感染症の診断技術向上、更には技術レベル維持を目的とした自己点検・評価システムの構築のため、日和見原虫感染症の講習会を開催し、それを通して効率的な情報伝達、技術移転の方法の検索を行った。今年度は情報周知の徹底のため、昨年度のアンケートに基づいて、拠点病院の臨床検査部の技師長に案内を送付し、また臨床検査医学会のみならず、寄生虫学会、熱帯医学会、感染症学会のホームページにも開催案内を掲載し、申込書もダウンロードできるようにした。更に技術の確実な定着を促進するため、講習会の回数を3回に増やし、再参加を積極的に受け入れる事とした。第1回目の講習会は平成17年1月に京都府立医大で、2月には慶大医学部で実施した。3月には第3回目を慶大医学部にて開催予定である。参加者は1回目47名、2回目87名であった。3回目は92名が予定されている。今回の企画では、昨年のアンケートに基づいて情報伝達法を変えたせいか、拠点病院約360ヶ所から意思表示があったのは124件と、昨年の88件に比べ改善傾向が見られた。急性期病院を含む拠点病院以外からの応募も1～2回合わせて15名前後に達し、やはり昨年に比べ変化があった。再参加者も明らかに増加しつつあり、単一の施設からの参加者も最大9名に達している。また、昨年度のアンケートからは技術レベルの維持、自己点検・評価のためには講習会の内容のCD化、参加者とのネットワーク化を行い、それを通じた質疑を行う、等の希望が出されたので、今年度は講義、実習内容のCD化を計り、第2回目参加者からはまずクリプトスポリジウムのCDを配付した。今後他の病原体のCDを配付する予定である。また、コンピューターネットワーク上での自己点検システムの開発をも行っており、近々ホームページを立ち上げ、その情報に参加者がアクセスできるようにしておき、評価をそのシステムを通して行う事を試みている。また第2回目からは始めて寄生虫学会のホームページを介したコンサルテーションシステムの紹介をも行った。事後のアンケートでは使用希望があったが、これも今後様子を見てゆきたい。

はじめに

従来のHIV/AIDSの日和見感染症に関する研究班（平成9～11年度：HIV感染症に関する臨床研究、平成12～14年度：日和見感染症の治療に関する研究、何れも主任研究者は東京大学、木村哲教授）において、都合6年間の間に日和見原虫感染症の病原体の生物学、感染疫学、病態、診断、治療に関する講習会を慶大医学部において、エイズ診療拠点病院の中央臨床検査施設の医師、検査技師を対象として、合計9回開催した。参加者数は毎回80～100名に達していたので、かなり多数の対象者について講習を実施したこととなる。しかしながら、この一連の講習会の対象は上述のようにエイズ診療の拠点病院のみであって、一般の急性期病院に関しては、全くアプローチはされておらず、辛うじて最後の1～2回臨床検査医学会の事務局を通して案内を出しただけであった。このチャンネルを通して、何名が参加したのかについては残念ながら検討していないが、あっても1～2名ではなかったかと推測している。また、この講習会では、毎回実習終了後に参加者に対してアンケート調査を行ったが、講習会開催の時期、方法、場所などについての希望を聞いたのみで、参加者の技術のレベルの調査、あるいは自己再学習の必要性の有無、技術の定着度など、技術移転が確実に行われたのかどうかの調査、あるいは情報伝達法の改善の試みは行った事がなかった。この点は、講習会を担当した筆者らにとって大きく反省すべき点である。

一方、最近わが国においてはエイズは減少傾向を示さず、むしろ明瞭な増加傾向を示している。感染者あるいは患者の絶対数はまだ少ないものの、公衆衛生上、あるいは臨床上大きな問題となりつつある。本研究は、以上の状況に鑑み、エイズの日和見感染症のなかで、現今の医学、臨床検査学の教育の状況から判断するに、臨床検査分野で診断技術等の普及が遅れている、あるいは知識、経験に乏しいと思われた原虫疾患ならびに近縁の疾患に関して、全国約360ヶ所のエイズ診療拠点病院だけでなく急性期病院の医師、臨床検査技師を対象として講習会を開催し、診断技術の移転を計り、その成果を評価することによって、より効果的な技術移転法の確立を行う事、及び診断技術の維持に関する自己点検法、評価法の確立を目的としている。すなわち、これまでのエイズ診療拠

点病院のみならず、一般の急性期病院をも対象とし、上記講習会への参加を呼び掛け、診断技術の普及を計ると同時に、従来の参加者ではどの程度まで診断技術が定着しているか、また今後どのようにすれば、より一層効果的な技術移転ができるかを検討の目的としたものである。

今年度は、前年度のアンケートに基づき、講習会の案内の送付先の変更、ホームページ掲載範囲の拡大、再学習を可能とするような方策の一つとして、講義・実習内容のCD化などを試みた。その上で、前年度の講習会とは異なったアンケートを行い、コンピューターネットワークによる点検システムの構築等に対する意見の聴取をも試みた。

対象及び実施経過

1. 講習会の準備、内容

平成16年秋にこれまでと同様、下記の内容の講習会の案内を全国約360ヶ所のエイズ診療拠点病院の中央臨床検査施設の技師長あてに送付した。同時に臨床検査医学会、寄生虫学会、熱帯医学会、感染症学会の各事務局の了解を得て、各学会のホームページに全く同じ案内を掲載し、同時に申込書もダウンロードできるようにした。この際に、従来と異なって検査診断技術の維持のため、再参加を積極的に推進する事も合わせて掲示した。

前年度のアンケートの結果、潜在的な参加希望者がかなり多い事が想定できたので、今年度は西日本地区で1回、東日本で2回開催することとした。幸い京都府立医科大学医動物学教室、有菌直樹教授が研究協力者として今年度も本事業に参加してくれることとなったので、平成17年1月22日、23日には京都府立医科大学の施設を使って講習会を開催した。第2回目は当初の予定通り、慶大医学部で2月19、20日に開催した。第3回目は3月19、20日に慶大医学部にて開催する予定である。

講習会の内容は以下の通りである。

第1日目 日和見感染を起こす原虫(従来原虫とされていたが、近年真菌に再分類されたニューモシスティスとミクロスポリジウムを含む)の生物学、感染経路、疫学、病態、診断、治療に関する講義を以下の担当者が行った。

総論：

竹内 勤（慶大医学部）

赤痢アメーバ：

竹内 勤

トキソプラズマ：

浅井 隆志（慶大医学部）

ニューモシスティス：

塩田 恒三（京都府立医大、現ルイ・パスツール医学研究センター）

クリプトスポリジウム、イソスポーラ、ミクロスポリジウム、サイクロスポーラ：

井関 基弘（金沢大学医学部）

第2日目 赤痢アメーバ、トキソプラズマ、ニューモシスティス、クリプトスポリジウムに関する実習。この実習内容の詳細は昨年度の報告書に記載したので、今年度は掲載しないが、特長としては以下の点が挙げられる。

具体的には、できるだけ多数の研究者の参加を得て、監督者として実習に参加してもらい、参加者各自に1台ずつ顕微鏡を与えて、参加者ができるだけ監督者にコンタクトしやすいようにして実施した。幸い京都府立医科大学のスタッフの全面的協力が得られたので、今年度も約50名の参加者に対して、10名の指導者の関与のもとで実習を行った。第2回目の慶大医学部での実習には7名が指導者として参加した。第3回目も同様の規模を考えている。実習内容としては、まず事故による感染が起こらない事が確かな場合は、できるだけ生鮮標本を使用して観察に供した。また、手技に関する実習もニューモシスティスとクリプトスポリジウムでは実施した。すなわち、前者ではニューモシスティスの検出、特にカッコ状構造物の検出にも有用なセルフロール蛍光染色、後者ではシヨ糖遠沈浮遊法、簡易シヨ糖浮遊法、抗酸染色の実技を実施した。また病原体の形態的な観察だけでなく、組織病理標本を多く供覧し、病態の理解をも深める事を計った。更に、多くの参加者が所属施設に帰った後に、講習内容の伝達を行う必要性が前から指摘されていたため、クリプトスポリジウムのオーシストを多量に含むマウスのホルマリン固定糞便試料、抗酸染色用のクリプトスポリジウムを塗布したスライドグラス、セルフロール染色用にニューモシスティスの未染色感染肺切片を載せたスライドグラス等を参加者全員に配付した。また、第2回目には寄生虫学会で運営している公式ウェブサイト(<http://jsp.tm.nagasaki-u.ac.jp/welcome-2.html>)を介した医療関係者のみに限定した診断コンサルテーションシステムの紹介、

使用方法の説明を行った。このシステムは寄生虫学会の情報処理委員会にアクセスできるもので、情報処理委員会でコンサルテーションの内容を検討し、個人情報のカバー等を行った後に、寄生虫学会員のクローズドなメーリングリストに質問の内容が公開される。この質問に対して、適当な専門家が回答すると、その回答は直接、又はメーリングリストを介して質問者に送られる。画像や動画等、情報量の多いものは学会員だけがアクセスできるウェブページ上に掲載され、意見が求められている。

2. 講習会への参加者の構成、その他の実施経過

今年度も上述のように約360ヶ所の全国のエイズ診療の拠点病院に対してまず案内を送付し、臨床検査医学会に加え、関連する寄生虫学会、熱帯医学会、感染症学会のホームページにも案内を掲載した。しかし、エイズ学会の方へのアプローチが行われなかったため、平成17年度はエイズ学会と各都道府県の臨床検査技師会を対象に加えるべきと思われた。今年度は1～3月に涉って3回開催するため、それぞれ締め切りの期日を変えてあるが、昨年同様参加者がいない場合も返事を送付するように依頼した。その結果、参加者は第1回目に47名、2回目が87名であった。3回目は92名がこれまでに申し込みをしており、拠点病院約360ヶ所の反応は不参加の返事も含めて124ヶ所よりあった。これは昨年88ヶ所に比べ、好転していると判断できよう。しかし、これでも全体の1/3であり、これまでの本講習会の経過を考えると、余りにも病院間での意識レベルの差異が大きい。例えば、多い場合には1施設から9名もの参加者が有り、これまでの10回以上の講習会に一度もレスポンスがない施設もある事は、わが国のエイズ診療体制がこのままで良好に推移して行くか、疑念を持たざるを得ない面もある。

また、本来の目的である急性期病院からの参加者をみると、アンケートで自分の病院のカテゴリーに混乱した例も少数あったが、少なくともエイズ診療拠点病院の中央臨床検査施設以外からの参加者は着実に増加している。既に1回目、2回目を通して15人前後がこれに該当しており、その中には大学医学部の寄生虫学、その他の分野の教授、助教授クラスも含まれていた。少なくとも、この講習会の存在が次第に広く知られるようになって

きている事は間違いないものと思われる。

昨年の講習会の課題の一つは如何にして自己点検、再学習の方法を確立するかであった。そのため今年度は赤痢アメーバ、トキソプラズマ、ニューモシステイス、クリプトスポリジウムと4種類のCD-ROMを作成し、講義内容、診断方法手技、病原体の形態的所見、組織病理所見などを含めた形にした。既にクリプトスポリジウムのCDは作成を終わり、第2回目の参加者には全員配付した。近々赤痢アメーバ、他も完成予定であり、第1回目の参加者をも合わせて配付する予定である。

今年度の特長の一つは、案内にも再参加を積極的に推奨したせいであろうと思われるが、2回以上の参加者が比較的多く、第1回目ではそれまで1回参加した事がある者が3名いたのみであったが、第2回目ではこれまでに3回参加したものが1名、2回参加し、今回が3回目の者が6名、1回参加し、今回が2回目の者が11名もいた。この事は、本講習会が上述のように広く知られてきただけでなく、必要性も認識されて来ている事を示すものかも知れない。しかし、他方1回程度の講習では確実な診断技術の定着が危ぶまれると云う事態も考えられ、今後の対応の際に考慮を払うべき問題と思われる。この意味で、ホームページを利用した評価システムの導入や、寄生虫学会のコンサルテーションシステムの積極的な活用の推進を計って行くべきと考える。

3. アンケートの内容と解析

効果的な診断技術移転法の確立について、参加者の意見を聞くことは極めて重要であることは明らかである。今回からは昨年のアンケートと内容を替え、資料1に示したアンケートとした。回収率は、第1回目参加47名中45名、第2回目参加87名中83名であった。上述のように、エイズ拠点病院以外からの参加者も次第に増加しつつある事は、本研究の目的に合致するものと言える。

今回のアンケートでは、再参加を積極的に推進した事もあって、以前の講習会の参加者に対しては、技術の定着度について自己評価を尋ねたが、2回以上これまで参加した者ではある程度定着しており、感染症医の短時間研修にもこの講習会で得た経験が有用であったとの回答もあった。また、やはり繰り返して参加し、検査手法、形態的特徴等に慣れることが有用であると云う意見は複数回

参加者のほぼ全員がかなり強く持っている事が明らかになった。すなわち1回の参加では、現場に戻ればこのような原虫性疾患の診断の機会がそうあるわけではなく、自信をもって診断に当たる事はまず不可能であるとする意見に基づくもので、繰り返して講習会やその他のメディアにアクセスする事が肝要であると云う見解に一致する。

今年度よりCD-ROMによる再学習を可能としたり、コンピューターネットワーク上で診断技術の点検ができたり、学会のホームページを通して、専門家に依頼するルートなど、いわば補助的な診断手法移転法は次第に確立されてきたものと考えられる。事実アンケートにおいてもCD-ROM配布は全員が希望し、8割以上がネット上での診断技術点検に参加したいと云う希望を示した。しかしながら、診断技術移転について今回のアンケートで、初めての参加者と複数回の参加者を比較してみると、恐らくこのような情報ネットワーク関連手段を講じて、エイズの日和見感染に対応すべき人材育成という面から考えると、Face to Faceで行う講習会の必要性は診断技術移転についてみればそれほど変わらないのではないかと考えている。確かに、診断可能なリソースそのものへのアクセスルートは多様化されてゆくであろうが、本講習会のように、できるだけ多数の実習担当講師を起用し、ひとつひとつ疑問に対する答えを講師から得ながら、時間をかけて技術を自分の中で定着させて行くのが経済的には非効率的ではあるが、最も理想的な方法であろう。恐らくCD-ROMやネットワーク上の点検は、上述のようにその補助的な役割を担うに過ぎないものと思われる。しかし、重要な事は繰り返して接する事であり、その意味では講習会と情報技術を用いた補助手段を併用する事が技術移転には最も良好な方法である。従って、今年度再参加を積極的に推進した事は良い影響を与えたものと言えよう。今後もこの方向を堅持すべきであろう。この点を今後の検討で確認し、最終的に効果的な診断技術移転策を確立したい。

まとめ

今次研究班における本研究分担者の研究目的は、エイズに伴う日和見原虫感染症の講習会開催を行うと同時に、それを通して、効率的な情報・技術移転方法を確立し、自己点検・評価法も検討して、一連のスキームを作成する事である。当然

このスキームは他の診断技術の講習会に際しても適用されることが期待される。また、今回と従来の講習会の大きな差異はエイズ診療拠点病院だけでなく、急性期疾患を扱う病院をも今回は対象としていることで、このようなアプローチがうまく機能すれば、わが国で増加しつつある HIV 感染症のみならず、他の感染症の診断技術移転などにも応用可能となるものと期待される。

今年度は昨年アンケートの結果をも考慮して、合計 3 回の開催を予定し、既に 2 回を終了した。今年度はまた技術移転の改善のため、再参加を積極的に推進し、またエイズ拠点病院、臨床検査医学会だけでなく、寄生虫学会、熱帯医学会、感染症学会のホームページにも案内を掲載し、申し込みの便宜を計った。その結果と思われるが、以前の講習会の参加者の著しい増加や、拠点病院からの反応の増加、あるいは拠点病院の中央臨床検査施設以外からの参加者も以前と比較しても増加し、かつ参加者の所属施設の多様化も見られた。講習会の内容も CD 化し、参加者が再学習を行なえるように計った。ネットワーク上での自己点検システムの参加の希望も多数あった。

謝辞

今年度第 1 回目の講習会開催に際しては、京都府立医科大学の御厚意で講義施設、顕微鏡を含む実習施設を使用させて頂いた。また実習の監督者としても、研究協力者の有菌教授以外にも同大学医動物学教室のスタッフ、及びやはり研究協力者である金沢大学、井関教授の教室の方々の全面的な協力が得られた。記載して、謝意を表したい。

論文

- 1) Jimba M, Waikagul J, Kojima S & Takeuchi T Beyond deworming. *Lancet*, 2005 (in press)
- 2) Kobayashi S, Imai E, Haghighi A, Khalifa SA, Tachibana H & Takeuchi T Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in the newly designed Yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. *J Parasitol*, 2005 (in press)
- 3) Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T & Nozaki T Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protoan parasite, *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*, 2004, 279, 2316-2323.
- 4) Tachibana H, Cheng X-J, Masuda G, Horiki N & Takeuchi T Evaluation of recombinant fragments

of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol*, 2004, 42, 1069-1074.

「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

参加者各位

次回の参考に致したく、恐縮ですが以下のアンケートにお答えの上、実習終了時までにご準備の箱にお入れ下さい。

該当する項目に○を付けて下さい。その他の場合は回答を御記入下さい。

① 今までにこの講習会（今年度第1回目が延べ11回目になります）に参加した事がありますか？

1. ある （ 回）
2. ない

② 今までに参加された方は、従来の講習会が診断技術の向上に寄与したとお考えですか？また、診断技術の定着度は御自分でどのように判断されておりますか？

③ 今回の講習会をどのようにして知られましたか？

1. エイズ診療拠点病院への案内で
2. 学会のホームページで
3. その他（宜しければそのきっかけを下にお書き下さい）

④ ご所属についてお聞かせ下さい。

1. エイズ診療拠点病院
 - a. 医師 b. 臨床検査技師 c. その他（ ）
2. 一般急性期病院
 - a. 医師 b. 臨床検査技師 c. その他（ ）
3. その他の施設 （ ）

⑤ 技術の自己点検評価手法の確率のためネット上で種々の診断に関する問題を提示し、希望する方にはその評定結果をお知らせするシステムを構築しつつあります。このシステムに参加を希望される場合は下記にメールアドレスを御記入下さい。なお、情報保持には十分注意し、この目的以外には使用致しません。

メールアドレス：

⑥ 繰り返し学習を可能とするために講義内容や形態的特徴を纏めたCDを作成しつつあります。講習会終了後、準備が整い次第希望される方全員に御送付いたしますが、希望される場合、下記に送付先を御記入下さい。

1. 希望する

送付先：
2. 希望しない

⑦ 今回の講習会は有用でしたでしょうか？講習会全般、あるいは特定の項目に関して御意見があれば自由にお書き下さい。

⑧ 御氏名、御所属（上記自己点検評価システムに参加を希望されない場合は無記名でも結構です）

御協力有難うございました。

HAART時代の日和見合併症に関する研究 分担研究報告書

難治性クリプトコッカス症に対する免疫療法の開発と免疫再構築症候群の病態解明に関する研究

分担研究者：川上 和義

(琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座 分子病態感染症学分野)

研究協力者：宮城 一也、仲村 究

(琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座 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、HIV感染末期の極度に細胞性免疫が低下した状態で難治性の髄膜脳炎を引き起こす。また、HAARTによる免疫能の回復に伴い免疫再構築症候群がみられ、たとえ治療に成功したとしても中枢神経系に高度の後遺症を起こすことがあり、重要な問題となっている。
- このような背景から、免疫不全状態におけるクリプトコッカス症の発症病態を理解し、免疫制御による新たな治療法を開発することは重要な研究課題である。本研究では、難治性クリプトコッカス症のマウスモデルを用いて、非メチル化CpGモチーフを有するオリゴDNA (CpG-ODN) による感染防御効果について免疫学的な解析を行っている。
- 今年度は、CpG-ODNが予防投与のみならず、感染後に投与を開始する治療投与でも十分な効果を発揮すること、そしてCD4+T細胞を欠失したマウスに投与しても有効であることを明らかにし、CpG-ODNのBRMとしての有用性を示した。さらに、その作用機序にアプローチするために、真菌培養濾液抗原をパルスした樹状細胞(DC)を、感染マウスから得られた所属リンパ節細胞と共に培養しサイトカイン産生及び増殖反応について検討を行った。その結果、Th1細胞の誘導に関わる真菌抗原が存在すること、そしてCpG-ODNがこの過程を強く促進することを明らかにした。現在この抗原についてさらに詳細な解析を行っており、その一部がマンノプロテインである可能性を示すデータも得られつつある。
- これらの研究成果から、CpG-ODNをアジュバントとして用いたワクチンの開発や、抗真菌薬治療におけるCpG-ODNのBRMとしての応用の可能性が高まり、さらには、これまで不明であった免疫再構築症候群の発症病態における真菌抗原の役割についての解析が可能になるものと考えられる。

研究目的

1980年代始め、徳永らにより結核菌由来のDNAが免疫賦活化作用を有することが初めて報告されたが¹⁾、その機序については長らく明らかにされてこなかった。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、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明らかになっている³⁾。一方、審良らは、CpG-ODN が Toll-like receptor (TLR) 9 に特異的に作用し、MyD88 を介して活性化シグナルを伝達することを明らかにした⁴⁾。

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、細胞性免疫の低下した宿主に感染、発症し、高率に中枢神経系に播種して難治性の髄膜脳炎を発症させる。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⁾。昨年度の研究では、致死性クリプトコッカス肺感染マウスモデルを用いて感染防御免疫応答に対する CpG-ODN の影響について検討を行った。CpG-ODN は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、そして感染局所において Th1 サイトカイン産生を誘導することなど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より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症に対する CpG-ODN を用いた免疫療法の可能性について検討を行った。

研究方法

1. マウス

7～9週齢雌の CDF-1 マウスを使用した。実験によっては、C57Bl/6 と同じ遺伝的背景の CD4KO マウスとコントロールとして C57Bl/6 マウスを用いた。すべてのマウスは、琉球大学医学部附属実験動物センターにおいて SPF 環境下で飼育された。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* (Cn) 臨床分離株 YC-11 (河野 茂教授より供与)、莢膜欠損変異株 Cap67 (ボストン大学 Stuart M. Levitz 教授より分与) 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、2～3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 50μ 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週ではほぼ全例が死亡する⁸⁾。実験によっては、これらの真菌を Yeast nitrogen 液体培地で5日間培養後、得られた上清を培養濾液抗原として用いた。また、培養濾液中のマンノブロテインを ConA カラムにて精製した。

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 20μ 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。実験によっては、感染3日後から合成 DNA の投与を開始した。

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 (BAL) を行い、得られた BAL 液中のサイトカイン濃度を ELISA キットにて測定した。

5. リンパ節細胞の *in vitro* 抗原再刺激

マウスに CpG-ODN を投与し、感染7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した。培養2日後に上清中のサイトカイン濃度を ELISA キットにて測定するとともに、4日後には ³H-thymidine の取り込みによって増殖反応についても検討した。

6. 細胞内IFN- γ 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。

7. 骨髄由来樹状細胞の作製

骨髄細胞をGM-CSFと9~10日間培養することで樹状細胞(DC)を作製した。DCをCn(YC-11またはCap67)、培養濾液抗原、またはマンノプロテインと、CpG-ODN存在、非存在下で24時間共培養後、マイクロビーズ結合抗マウスCD11c抗体を反応させ、磁気細胞分離装置(MACS)に2回通すことでCD11c陽性細胞(DC)を分離精製した。得られたDCは、Cn感染、CpG-ODN投与マウスから得られた旁気管リンパ節細胞と培養し、2日後に培養上清中のサイトカイン濃度をELISAキットにて測定するとともに、4日後には³H-thymidineの取り込みによって増殖反応についても検討した。

研究結果

1. CpG-ODNによるクリプトコッカス感染治療効果

昨年度の研究で、CpG-ODNを感染3日前から前投与するとマウスを致死性クリプトコッカス感

染から防御することを明らかにした。しかし、実際の臨床の場を考えると、感染後の投与によって効果があるかどうかは重要な問題である。そこで我々は、感染3日後からCpG-ODNの投与を開始し感染前投与と比較したところ、図1に示すように感染後投与においても感染前投与と同程度に生存期間の延長効果を示すことがわかった。

また、昨年度の解析でCD4+T細胞を除去することでCpG-ODNの効果が消失することを示し、末期のHIV感染者におけるCpG-ODNの効果に疑問が生じてきた。しかしこの結果は、CD4+T細胞が減少している状態でのCpG-ODNの効果を否定するものではなく、そのためCD4KOマウスを用いてこの点について検討した。その結果CpG-ODNは、CNT-ODN投与に比較して、CD4KOマウスにおいても肺におけるCnの排除を有意に促進できることが明らかになった(図2)。

2. CpG-ODNの効果におけるDCの役割

CpG-ODNのクリプトコッカス感染防御効果におけるDCの役割について明らかにするために、マウスに抗CD11c抗体を投与することでDCを除去し、その影響について解析を行った。図3に示すように、マウスからDCを除去するとCpG-ODNの感染防御効果が完全に消失した。この結果に一致して、CpG-ODNによる肺内Th1細胞の誘導効果も、同様に著明に低下した(図4)。

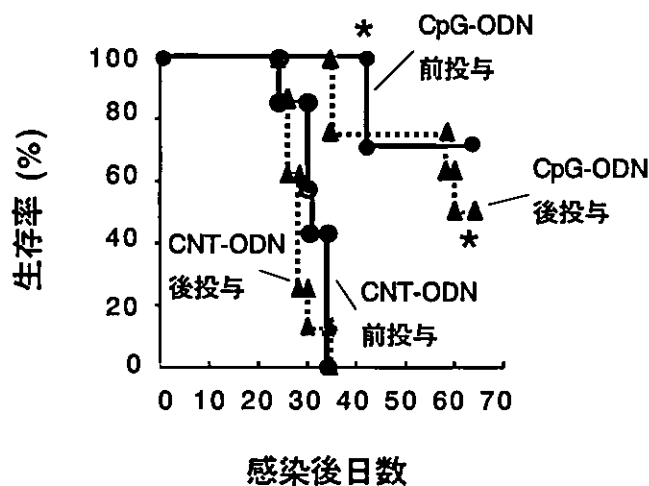


図1. CpG-ODNの治療効果

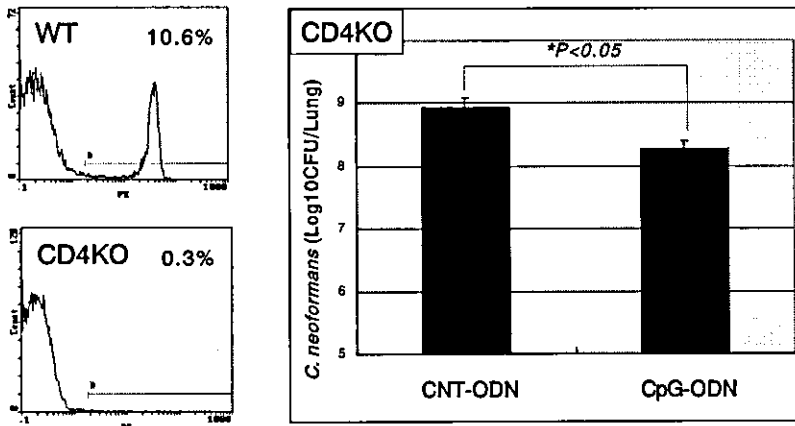


図2. CD4⁺T細胞欠損状態下でのCpG-ODNの治療効果

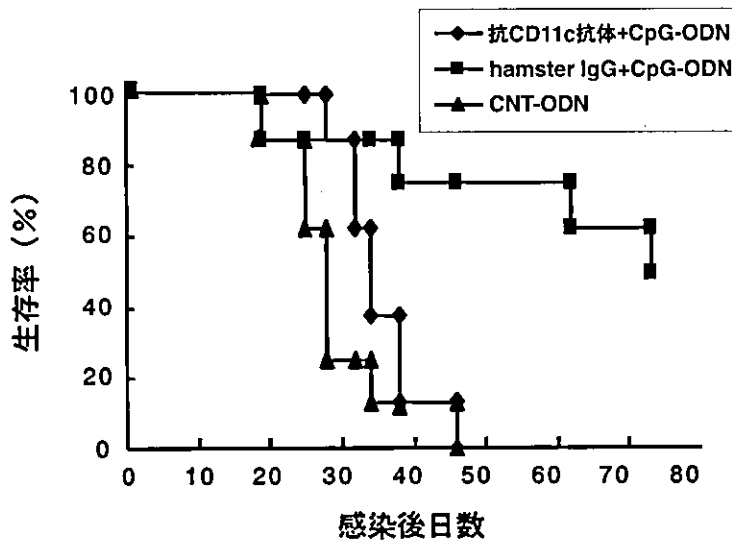


図3. CpG-ODNの治療効果における樹状細胞の役割

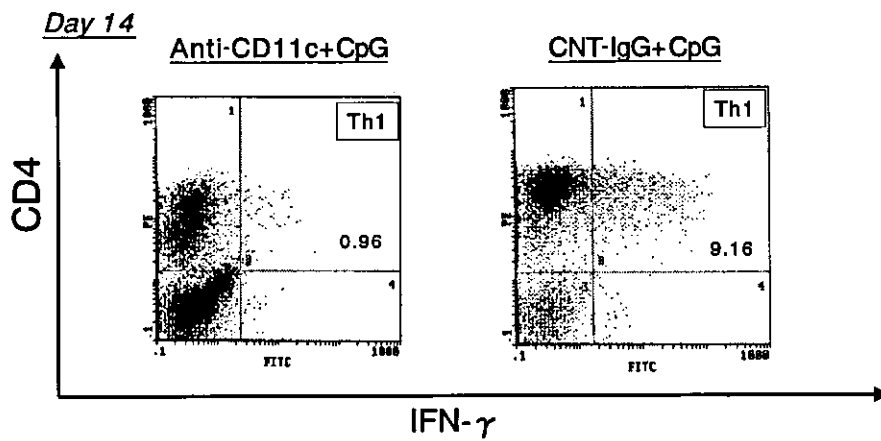


図4. CpG-ODNのTh1細胞誘導効果における樹状細胞の役割

3. CpG-ODNによるDCのTh1細胞誘導の増強効果

DCを *in vitro* で Cn と共に培養し、磁気細胞分離装置を用いて Cn を除去後、感染マウスから得られたリンパ節細胞に添加して IFN- γ 産生及び増殖反応について検討を行った。その結果、DC を Cn のみと培養した場合でもある程度の反応を誘導できたが、DC と Cn との培養に CpG-ODN を添加するとこれらの反応は有意に増強された (図5)。さらに、これらの DC をマウスの気管内に投与1日後に Cn を感染させ14日後に BAL 液中の IFN- γ を測定したところ、図6に示すように Cn とともに CpG-ODN を添加して培養した DC のみが肺内における明らかな IFN- γ の産生を誘導した。これらの結果から、DC が CpG-ODN の存在下にクリプトコッカス由来の抗原を提示して特異的な Th1 細胞の分化を誘導している可能性が推察された。

4. Th1細胞の分化を誘導するクリプトコッカス抗原の存在

クリプトコッカス特異的 Th1 細胞の誘導に関わるタンパク抗原の存在の可能性を探るために、莢膜を欠損したクリプトコッカス変異株 (Cap67) を用いて同様の解析を行ったところ、DC は Cap67 由来の抗原を取り込み、CpG-ODN が存在しない条件下でもリンパ節細胞に著明な IFN- γ 産生を誘導できることが明らかになった。さらに、Cap67 の代わりにその培養濾液抗原を用いた場合でも、DC にクリプトコッカス特異的な Th1 細胞を誘導でき、この反応は CpG-ODN の添加によって有意に増強した。以上の結果から、Cap67 培養濾液の中に、クリプトコッカス特異的な Th1 細胞の分化誘導に深く関わるタンパク抗原が存在する可能性が示唆された。

これまでにクリプトコッカス由来のマンノプロテイン (MP) が T 細胞に対する主要な抗原である可能性が報告されていたため¹³⁾、次に我々は、

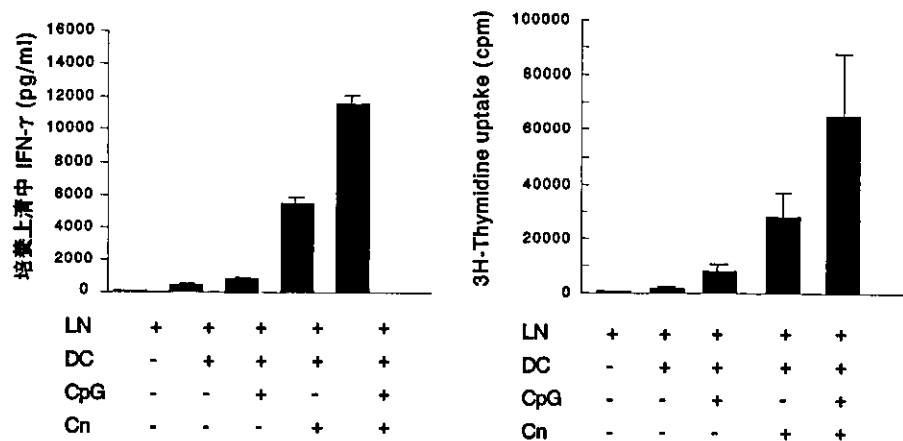


図5. CpG-ODNによる樹状細胞のTh1細胞誘導効果の増強 (*in vitro*)

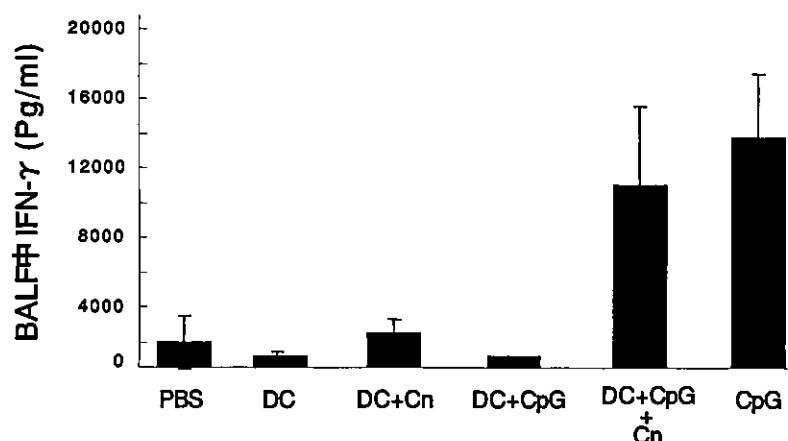


図6. CpG-ODNによる樹状細胞のTh1細胞誘導効果の増強 (*in vitro*)

ConA カラムを用いて Cap67 培養濾液から MP を精製し、得られた MP を *in vitro* で添加培養した DC を感染マウスから得られたリンパ節細胞に加えて培養し、IFN- γ 産生と増殖反応を測定した。その結果、MP にも Cap67 培養濾液と同様なクリプトコッカス特異的 Th1 細胞の分化を誘導できる可能性が推察された。

考察

クリプトコッカス症は HIV 感染の末期に合併する日和見真菌感染症であり、初感染臓器である肺から中枢神経系に血行性播種を起こして致死的な髄膜脳炎を引き起こす。2000 年に米国感染症学会から発表されたガイドライン¹⁴⁾では、HIV 合併クリプトコッカス症の治療は、最初の 2 週間のアンホテリシン B とフルシトシンによる導入療法に引き続き、フルコナゾールの静注による 10 週間の地固め療法、そして生涯にわたるフルコナゾール内服による維持療法が必要とされている。また、このような標準治療を行っても、2 週後に 12%、10 週後に 26% が死亡すると報告されており、HAART 時代の現在においてもなお予後の悪い疾患である¹⁵⁾。

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のマウスクリプトコッカス感染モデルを用いて検討を行ってきた¹²⁾。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。さらに、CpG-ODN による感染防御には、CD4+T 細胞及び CD8+T 細胞が重要であり、感染 1 週後の IFN- γ 産生には CD8+T 細胞が、2 週後の IFN- γ 産生には CD4+T 細胞が主として関与することを明らかにした。

本年度の研究では、CpG-ODN の作用機序をさらに明らかにすることを目的に解析を行っている。抗 CD11c 抗体投与によって DC を除去すると CpG-ODN の Th1 細胞誘導及び感染防御効果が完全に消失したことから、DC が必須の細胞であることが明らかになった。DC には plasmacytoid (p) DC と myeloid (m) DC があることが知られている¹⁶⁾が、いずれも CD11c を発現することから我々の実験系で機能している DC がどちらであるかま

だ特定できていない。しかし、我々の系で IL-12、IFN- γ が重要な役割を担っていることを考えると、mDC がより中心的に働いている可能性が示唆される。今後のより詳細な解析が必要である。

一方、クリプトコッカス由来の菌体成分の中で、MP が Th1 細胞及び感染防御免疫応答を誘導するための重要な抗原であることを示唆する結果も得られている。MP を DC にパルスすることで、感作リンパ球の中の Th1 細胞が活性化され、IFN- γ 産生が著明に誘導された。これらの結果は MP がクリプトコッカス感染に対する防御免疫を誘導するためのワクチン抗原となりうることを示唆している。また、CpG-ODN はそのワクチン活性を増強し、より効果的に Th1 依存性防御免疫を誘導するためのアジュバントとして機能することが期待できる。これまでに Levitz ら¹⁷⁾は、同じ Cap67 から得られた MP を投与することで、クリプトコッカスによる致死感染からマウスを防御しうることを報告しており、この可能性を支持するものである。今後は、MP 粗精製物の中からより抗原活性の強い分子を特定するとともに、Cap67 培養濾液抗原から MP 以外の防御抗原が存在する可能性についても検討し、より効率的なワクチンの開発を目指す必要があると考えられる。

ここで、エイズ患者におけるクリプトコッカスワクチン開発の意義について考えておく必要がある。HIV 感染者では経過とともに CD4+T 細胞数が減少するため、HAART 前にワクチンを実施してもその効果が期待できない可能性が高い。一方、HAART 後には CD4+T 細胞数の上昇とともにその機能が回復することが示されており、インフルエンザワクチンに対する反応性も増加するとの報告もみられる¹⁸⁾。したがって、HAART 後にワクチンを接種することによって、クリプトコッカスに対する感染防御免疫を賦与することで、生涯必要とされる抗真菌薬の投与を中断でき、再燃から免れることができれば意義のあることだと考えられる。

CpG-ODN は、ワクチンのアジュバントとして以外に、難治性クリプトコッカス症に対する抗真菌薬治療のアジュバントとしても有用性が期待できる。近年 Pappas ら¹⁹⁾は、エイズ合併難治性クリプトコッカス髄膜炎患者を対象として、抗真菌薬を用いた標準化学療法における IFN- γ のアジュバント効果について臨床治験を実施した。その結果

彼らは、IFN- γ が重篤な副作用もなく化学療法の治療効果を増強できたと報告している。我々のこれまでの研究から、CpG-ODNのこのような臨床応用に関してもその有用性が期待できるものと考えている。

HAART時代のクリプトコッカス症では、免疫能の回復にともない免疫再構築症候群 (Immune Reconstitution Syndrome: IRS) がみられ、たとえ治療に成功したとしても中枢神経系に高度の後遺症を起こすことがあり、重要な問題となっている。その発症機序については不明な点が多いが、過剰な免疫応答が基盤になっている可能性が予想される。そのため、クリプトコッカスに対する宿主の免疫応答における責任抗原が明らかになれば、IRSの病態解明へのアプローチが可能になるばかりでなく、得られた知見を用いることでクリプトコッカス症にとまなうIRSの予防及び治療法の開発の端緒となることも期待できる。今後は、その方向での研究も進めていきたい。

結論

CpG-ODNは、致死性クリプトコッカス症マウスモデルにおいて、DC依存性に感染局所でのTh1細胞の分化誘導を促進し、マウスを真菌感染から防御した。CpG-ODNの作用機序として、DCによる抗原特異的Th1細胞誘導能の増強及び誘導されたTh1細胞からのIFN- γ 産生の増加が考えられた。クリプトコッカス特異的なTh1細胞の誘導には何らかの抗原の関与が予想されるが、その中でマンノプロテインが重要なタンパク抗原の一つであると考えられた。本年度の研究結果から、難治性クリプトコッカス症に対するCpG-ODNを用いた免疫療法の可能性とともに、CpG-ODNをアジュバントとしたクリプトコッカスワクチンの可能性が期待された。今後は、上記の可能性に対するさらなる解析と、未だ病態が不明なIRSにおける真菌抗原の役割に関して検討していきたいと考えている。

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) Hemmi 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) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Kawakami K: Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. *J Immunother* 25: S12-9, 2002.
- 11) Kawakami K: Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases. *J Infect Chemother* 9: 201-209, 2003.
- 12) Miyagi K, Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Nakamura K, Saito A: CpG-oligodeoxynucleotides promote the host protective response against infection with *Cryptococcus neoformans* through induction of interferon-gamma production by CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol*. in press.
- 13) Levitz SM, Nong S, Mansour MK, Huang C, Specht CA: Molecular characterization of a

mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T cell responses to *Cryptococcus neoformans*. Proc Natl Acad Sci USA. 98: 10422-10427, 2001.

- 14) Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE: Practice guidelines for the management of cryptococcal diseases. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2000; 30: 710-8.
- 15) Robinson PA, Bauer M, Leal MA, Evans SG, Holtom PD, Diamond DA, Leedom JM, Larsen RA: Early mycological treatment failure in AIDS-associated cryptococcal meningitis. Clin Infect Dis. 28: 82-92, 1999.
- 16) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 18:767-811, 2000.
- 17) Mansour MK, Yauch LE, Rottman JB, Levitz SM. Protective efficacy of antigenic fractions in mouse models of cryptococcosis. Infect Immun. 72: 1746-1754, 2004.
- 18) Kroon FP, Rimmelzwaan GF, Roos MT, Osterhaus AD, Hamann D, Miedema F, van Dissel JT: Restored humoral immune response to influenza vaccination in HIV-infected adults treated with highly active antiretroviral therapy. AIDS 12:F217, 1998.
- 19) Pappas PG, Bustamante B, Ticona E, Hamill RJ, Johnson PC, Reboli A, Aberg J, Hasbun R, Hsu HH. Recombinant interferon- gamma 1b as adjunctive therapy for AIDS-related acute cryptococcal meningitis. J Infect Dis. 189: 2185-2191, 2004.

健康危険情報

特になし

研究発表

論文発表

- 1) Miyagi K, Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Nakamura K, Saito A: CpG oligodeoxy nucleotides promote the host protective response against infection with *Cryptococcus neoformans* through induction of interferon-gamma production by CD4+ T cells. Clin Exp Immunol. in press, 2005.
- 2) Kawakami K: Innate immunity in the lungs to cryptococcal infection, In: Fungal Immunology Book (Haffnagle GB, Fidel P, eds), Kluwer Publishers, in press, 2005.
- 3) Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo Y, Kinjo

T, Ishikawa H, Saito A: Accumulation of $\gamma \delta$ T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. J Immunol, 2004; 172: 7629-7634.

- 4) Kawakami K: Regulation of innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. Jpn J Infect Dis, 57: 137-145, 2004.
- 5) Kawakami K: Possible immunotherapy with interleukin-18 in intractable infectious diseases. In: Immunomodulators as promising therapeutic agents against infectious diseases (Kawakami K, Stevens D, eds), Research Signpost, pp.89-104, 2004.
- 6) Kinjo Y, Kawakami K: α -Galactosylceramide: NKT cell-based immunotherapy in intractable infectious diseases. In: Immunomodulators as promising therapeutic agents against infectious diseases (Kawakami K, Stevens D, eds), Research Signpost, pp.105-122, 2004.

学会発表

- 1) Miyagi K, Kawakami K, Kinjo T, Uezu K, Nakamatsu M, Yamashiro S, Saito A: Unmethylated CpG oligodeoxynucleotides Modulate Th-1-Th-2 balance and enhance host defense against fatal pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. The 12th International Congress of Immunology, Montreal, July 2004.
- 2) Kinjo T, Kawakami K, Miyagi K, Uezu K, Ishikawa H, Saito A: The Regulatory Roles of $\gamma \delta$ T cells in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. The 12th International Congress of Immunology, Montreal, July 2004.
- 3) 宮城一也、川上和義、金城武士、仲村 究、仲松正司、山城 信、斎藤 厚: 致死性クリプトコッカス感染マウスモデルにおける CpG-DNA の感染防御効果 --- 樹状細胞の役割。第 34 回日本免疫学会総会、札幌、2004 年 12 月。

知的財産権の出願・登録状況

特になし

HAART 時代の日和見合併症に関する研究 分担研究報告書

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

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、荚膜 (*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
荚膜 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	<i>CNA1</i>
RAS-specific signaling cascade	<i>RAS1</i>
Phospholipase	<i>PLB1</i>
食食の調節	<i>App1</i>

まで明らかにされているが、いずれも真菌血症モデルにおける病原因子である。しかし、*C. neoformans* は先ず経気道的に感染することが知られており、侵入門戸である肺における *C. neoformans* の定着や増殖に関与する病原因子の存在が予測される。しかし、肺感染モデルでは現在まで貪食能の調節 (*APPI*¹³⁾)以外の検討は行われていない (表1)。今回我々はマウスの肺クリプトコックス症モデルを用い、肺感染時に発現量が増加する *C. neoformans* の病原遺伝子の同定を試みた。

方法

1. *in vivo* passage モデル (図1)

C. neoformans YC-5 株のフローズンストック (-80 °C) よりサブロー培地を用いて 30 °C で二日間培養。シングルコロニーからクロラムフェニコール 100 μ g/ml を添加した YPD (Yeast Extract Polypepton D-glucose) 液体培地にて over night で培養。この菌液を 3000rpm で 20 分遠心分離。ペレットを PBS (リン酸干渉生理食塩水) で溶解し、菌量を 2×10^6 CFU/ml に調整。調整した菌液 50 μ l をマウス (CDF1, female) に経気管支的に感染させ、マウスの生存期間を観察した。観察期間中、死亡直前のマウスより肺を摘出し、摘出した肺を YPD 液体培地中に入れ、*C. neoformans* YC-5 を分離培養 (これを YC-5FP 株とした)。その際、一般細菌のコンタミネーションを防ぐためクロラムフェニコール 100 μ g/ml を YPD 液体培地中に添加した。次に YPD 液体培地で培養した YC-5FP 株を YC-5 株と同様に遠心分離。上清を捨て、PBS にて 2×10^6 CFU/ml に菌量調整し、マウスに感染させ、マ

ウスの生存期間を観察した。同様の手法を用いてマウス感染を繰り返し、YC-5FP 株感染マウスより分離された株を YC-5SP 株、YC-5SP 株をフローズンストックした株を YC-5SPF 株と名付けた。親株 YC-5 株、と感染を繰り返すことで得られた YC-5FP 株、YC-5SP 株、YC-5SPF 株のマウス感染モデル間でマウスの生存期間を検討した。

2. RNA 抽出

C. neoformans YC-5 株、YC-5FP 株、YC-5SP 株、YC-5SPF 株より RNA を BIO101 社の FastRNA™ Kit-RED を用いて抽出した。

3. PCR-Select Subtraction 法

生存期間に有意な変化のみられた *C. neoformans* YC-5SP 株より抽出した RNA と YC-5 株より抽出した RNA を用いて PCR-Select™ Subtraction 法 (CLONTECH : CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit) を用い、発現量に差のある遺伝子のクローニングを行った。

4. 遺伝子解析

クローニングした遺伝子を PERKIN ELMER ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer にてシーケンスを行った。得られた遺伝子配列は NCBI (The National Center for Biotechnology Information) BLAST search、TIGR (The Institute for Genomic Research)、SGTC (Stanford Genome Technology Center) などのデータベースを用いて解析した。

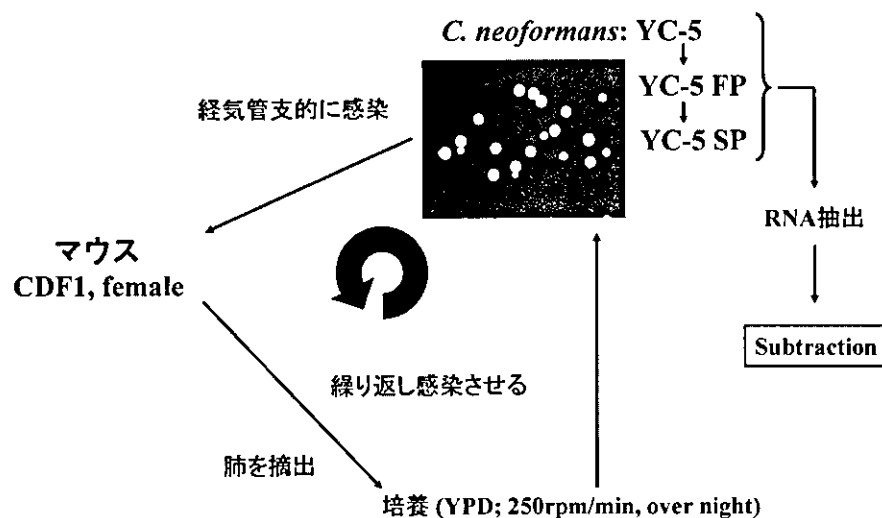


図1. マウス肺感染モデル

5. *cis*-prenyltransferase 遺伝子の knock out mutant の作成 (図 2)

Subtraction 法によって得られた遺伝子片のうち、*C. neoformans* における *cis*-prenyltransferase と思われる遺伝子の塩基配列をクリプトゲノムプロジェクトの情報とホモロジーサーチを行い、total の *cis*-prenyltransferase 遺伝子を推定した。そして *URA5* をセレクションマーカーとした knock out construct を作成し、*C. neoformans* B4500FOA 株 (*URA5* mutant) を用い、相同組み替えによる置換破壊を行った。菌体内への knock out construct の導入はジーンガンを用いて行った。

6. *cis*-prenyltransferase 遺伝子 knock out mutant (B4500CISD) 株のスクリーニング

Minimal 培地を用いて *URA5* が菌体内に導入されたことを確認。培養された菌株のうち、特異的に標的遺伝子の部位で knock out construct が相同組み替えを起こしていることを Southern blot にて確認した。

7. B4500CISD 株の表現形の検討

Minimal 培地を用いてコロニーの形態を観察。墨汁染色にて菌体を観察。Minimal 液体培地にて 37℃での発育速度を検討した。発育速度を検討は菌液を BIO-RAD 社 Semi-Micro Cuvettes に 1 μ l 注入し、BECKMAN 社 DU®640 SPECTROPHOTOMETER を用い OD600 にて吸光度を測定した。

8. B4500CISD 株の E-test による薬剤感受性の検討

B4500 株と B4500CISD 株の MIC (minimal inhibitory concentration) を、AB BIODISK 社のストリップを用いてアムホテリシン B (AMPH-B)、フルシトシン (5-FC)、イトラコナゾール (ITCZ)、フルコナゾール (FLCZ) について判定した。今回の判定には minimal 培地を用いた。

9. B4500CISD 株のマウスに対する病原性の検討

1) *Cryptococcus neoformans* 全身感染モデル

B4500 株と B4500CISD 株のマウスに対する病原性を検討するため、菌量を 1×10^7 CFU/ml に調整。調整した菌液 100 μ l をマウス (CDF1, female) に尾静脈より接種。マウスの生存期間を観察した。また、接種より 4 週間後に各群 10 匹ずつ屠殺し脳内の菌数を計測した。同時に脳組織を顕微鏡的に観察した。

2) *Cryptococcus neoformans* 経気道感染モデル

B4500 株と B4500CISD 株のマウスに対する病原性を検討するため、菌量を 1×10^8 CFU/ml に調整。調整した菌液 50 μ l をトリアムシノロンにて免疫抑制を行ったマウス (CDF1, female) に経気道的に接種。マウスの生存期間を観察した。

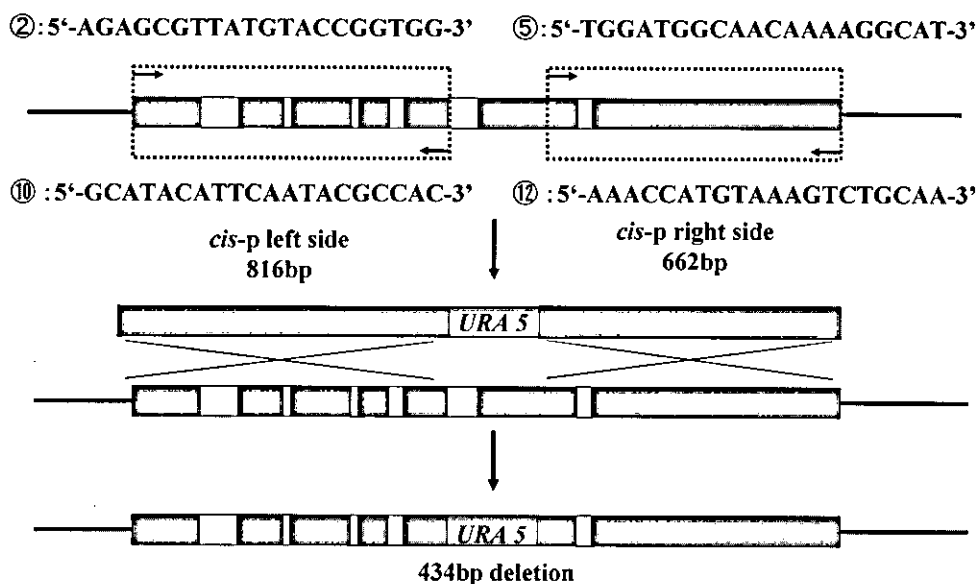


図 2. 相同組み換えによる遺伝子の置換配置