

表13 PCR-RFLP 法による *Malassezia* 属の簡易遺伝子同定系被検標準株

Species	Type strains	Standard strains
<i>M. furfur</i>	CBS* 1878M9970, M9971	
<i>M. globosa</i>	CBS 7966	CBS 8744, CBS 8745, CBS 7989, isolate 15, isolate 16
<i>M. restricta</i>	CBS 7877	CBS 8747, CBS 7991
<i>M. pachydermatis</i>	CBS 1879 isolate A-3, isolate B-3, isolate C-1, and isolate D-2	
<i>M. sympodialis</i>	CBS 7222	M 9978, M9979
<i>M. obtusa</i>	CBS 7876 M 9974, M9975	
<i>M. slooffiae</i>	CBS 7956	M 9980, M 9981
<i>M. dermatis</i>	JCM** 11348	JCM 11469, JCM 11470
<i>M. nana</i>	JCM 12085	JCM 12086, JCM 12087, JCM 12088, JCM 12089
<i>M. japonica</i>	CBS 9431	
<i>M. yamatoiensis</i>	CBS 9725	

*CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, ** JCM: Japanese Collection of Microorganism

図1 AIDS 症例にみる感染症の頻度と推移 (Morris A, et al. EID10(10):1713-1720, 2004)

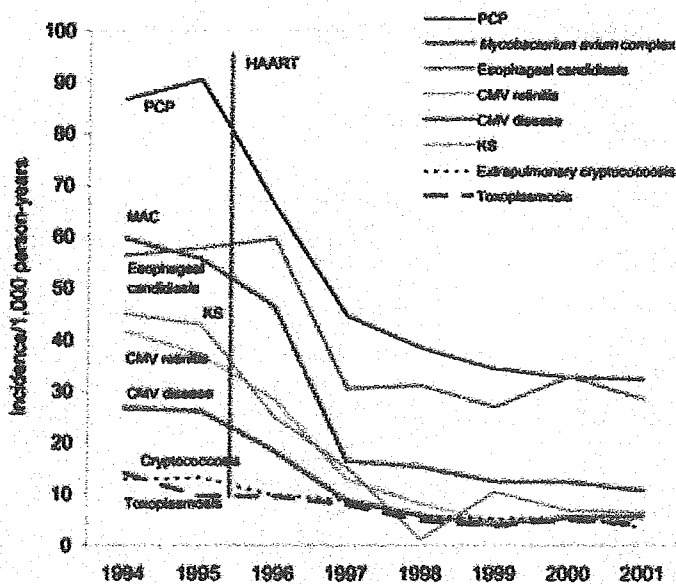
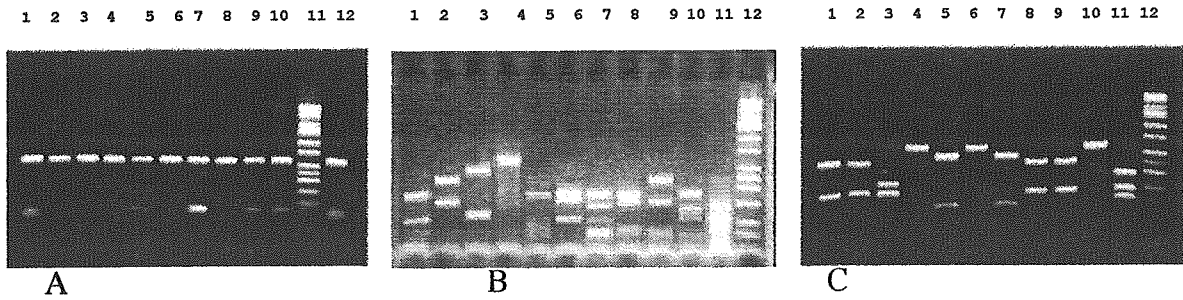


図2 PCR-RFLP 法による *Malassezia* 属の簡易遺伝子同定結果電気泳動像



26s rDNA PCR products before digestion(A) (Lanes 1 to 12: *M.furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M.dermatis*, *M.obtusa*, 100 bp ladder and *M. yamatoiensis*) and after digestion with *Cfo*I (B) (Lane 1 to 12: *M.furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M.dermatis*, *M.obtuse*, *M. yamatoiensis* and 100bp ladder.) and *Bst*F51 (C) (Lane 1 to 12: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M.dermatis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. pachydermatis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. slooffiae*, *M. yamatoiensis* and 100bp ladder)

分担報告書

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いた病理細胞診検体に認められる病原糸状菌の判別に関する基礎的検討

篠崎 (稔東邦大学医療センター大森病院病理部), 渋谷和俊

分担研究者 渋谷和俊 東邦大学医学部病院病理学講座 教授

A. 研究目的

細胞診や組織診などの病理診断材料の中に真菌の菌体要素を認めることはしばしば経験するが、形態学的観察から菌種を同定することは困難場合も多く、その確定診断には培養が必須である。しかし、培養が不成功の場合には、免疫組織学的診断や遺伝子診断等の病理組織学的補助診断法に頼らざるを得ない。特に近年、糸状菌に対して異なる抗真菌活性を示す新規抗真菌剤が上梓され、菌種の判断については、より精度の高い技術の開発が望まれている。

我々は、種々の病理・細胞診検体を用いて、FISH 法を応用し、診断に有用な真菌遺伝子を証明するための基礎的検討を行った。

B. 研究方法

① 培地上から採取した *Aspergillus fumigatus* のエタノール浮遊液から DNA を抽出し、alkaline proteinase (ALP) 遺伝子のプライマーペアを用いて PCR 法にて遺伝

子増幅時に FITC-12-d-UTP を取り込み、FISH 用プローブに供した。

② プローブの特異性を 6 種のエタノール固定真菌 (*Aspergillus (A) fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *Scedosporium apiospermum*, *Mucor circinelloides*, *Fusarium solani*) を用いて検討した。標本は、それぞれの菌について塗沫標本ならびにパラフィン包埋切片を作製し、FISH 法を行い検証した。

③ ALP プローブを用いた FISH 法にて、以下 3 種のシグナル検出法の比較をホルマリン固定パラフィン切片で行った。

- (1) 直接蛍光観察
- (2) Tyramide signal Amplification (TSA) 法を用いた増感法
- (3) アルカリフォスファターゼ標識抗 FITC 抗体、NBT/BCIP 発色

④ ALP プローブを用いた FISH 法施行時の検体前処理法、特に、熱処理、蛋白分解酵素処理さらに、溶菌酵素処理の有無の検討。

C. 研究結果

① *A. fumigatus* の ALP 遺伝子特異的プライマーを用いて標識反応を行った結果、583bp の FITC 標識 DNA プローブが作製された。

(図 1) プローブを連続希釈し、ナイロン膜上で 10^{-4} 希釈まで免疫化学的に検出されることを確認した。

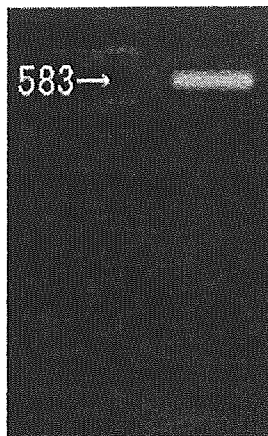


図 1: PCR 法にて増幅された ALP 遺伝子産物

② 塗抹標本ならびにパラフィン包埋切片を用いてプローブの特異性を検討した結果、*A. fumigatus*、*A. terreus* において強いシグナルが観察された。*A. niger*、*Scedosporium apiospermum* においては弱いシグナルが観察された。一方、*Mucor circinelloides*、*Fusarium solani* ではシグナルが得られなかった。(図 2, 表 1)

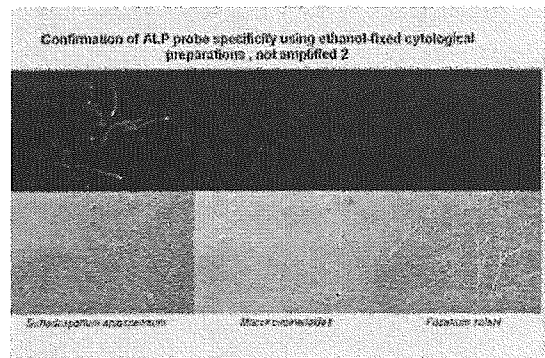
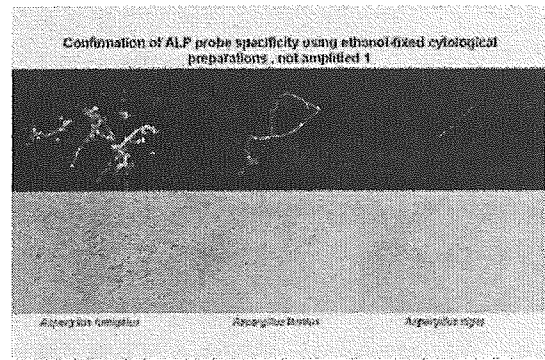


図 2 培地状で発育した菌をエタノール固定し、スライドガラス上に塗抹した標本における ALP probe を用いた FISH 法 (上段) とその微分干渉顕微鏡像 (下段)

<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>	<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Fusarium solani</i>
+	+	±	±	-	-

表 1

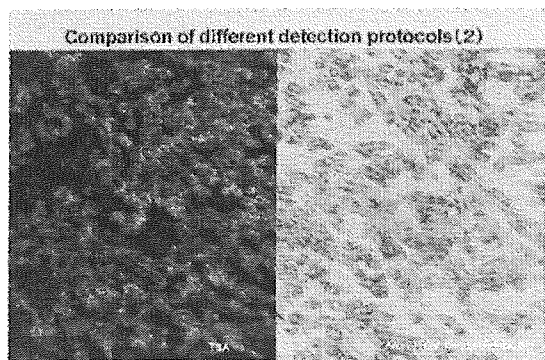


図 3: TSA 法で増幅した蛍光シグナルとアルカリフォスタファアーゼ標識抗体を用いた発色反応によるシグナルの比較。

③ エタノール固定標本では直接蛍光観察が可能であったが、ホルマリン固定標本ではシグナルを観察することが出来ず、何らかの間接検出法あるいはシグナルを増幅する必要があった。TSA 法を用いた増幅法では標本の背景にややノイズがみられるものの、劇的なシグナルの増感がみられ、通常法に比べプローブを 100 倍に希釈して使用することが可能であった。また、比較した既存の検出法とほぼ同様のシグナルの局在を示した。(図 3)

④ FISH 法の前処理において熱処理と蛋白分解酵素処理を併用することで、それぞれの単独処理よりもシグナルの増強が認められた。また、溶菌酵素処理は一部の症例で有効だった。(表 2)

	Enzymation		Pretreatment (TSA)			
	Direct	TSA	Heat	Proteinase	Lysozyme	Lysozyme
Chrom. dead cytotoxic aspergilli (Cultured fungi)	-	+++	++	+++	+++	+++
Chrom. dead paraffin aspergilli (Cultured fungi)	-	+++	-	+++	-	+++
Formalin fixed paraffin aspergilli (Tissue section)	-	++	-	+	-	++

Degree of fluorescent intensity is indicated as follows: negative, -; weak, +; definite, ++; intense, +++

表 2 : FISH 法の前処理の比較検討結果

D. 考察

本法を用いることにより、Aspergillus 属と最も形態的な鑑別を要すると同時に薬剤感受性も異なる Fusarium 属や接合菌を高精度に鑑別しうる可能性が示唆された。特に、エタノール固定標本での反応性が優れていたことから、細胞診標本での応用の可能性が示唆された。また、TSA 法を用いることにより、ホルマリン固定パラフィン切片や菌の鮮度が悪

く、遺伝子の保存が良くない症例においても高感度に真菌遺伝子を検出できることが期待される。

E. 結論

病理組織診や細胞診標本で真菌が証明された検体において、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて診断精度の向上を図るための基礎的検討を行った結果、その応用の可能性が示唆された。今後、これらのデータをもとに病理診断材料に本法を展開していきたい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) **Shibuya K**, Hirata A, Omuta J, Sugamata M, Katori S, Saito N, Murata N, Morita A, Takahashi K, Hasegawa C, Mitsuda A, Hatori T, and Nonaka H. Granuloma and cryptococcosis. J Infect Chemother 11: 115-22, 2005
- 2) Nakai T, Hatano K, Ikeda H, and **Shibuya K**. Electron microscopic findings for micafungin-treated experimental pulmonary aspergillosis in mice. Med Mycol 43: 439-45, 2005
- 3) Aikawa N, Kohno S, **Shibuya K**, Takesue Y, Maesawa S, Yoshida M, Tokimatsu I. Current status of diagnosis and treatment of invasive fungal infections in Japan: the influence

of the new japanese guidelines. J Infect Chemother 11: 278-87, 2005

- 4) Ando T, Shibuya K. Clinical Management of Pulmonary Aspergillosis. JMAJ 48(12): 601-6, 2005
- 5) 安藤常浩, 若山 恵, 武村民子, 高橋 啓, 折津 愈, 渋谷和俊. 肺感染症の病理 肺真菌症. 病理と臨床 23(5): 484-9, 2005
- 6) 渋谷和俊. アスペルギルス症の病理. 深在性真菌症 1(1): 38-40, 2005
- 7) 渋谷和俊, 三宅洋子, 前田陽子, 平田晶子, 長谷川千花子, 浜谷茂治, 羽鳥 努, 野中

博子. 呼吸器系細胞診検体に関する真菌検出感度と形態による菌種推定に関する研究. 平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生动向調査に関する研究. 研究報告書 72-9, 2005

H. 知的財産権の出願・登録情報なし。

分担研究報告書

「深在性真菌症及び輸入真菌症対策に向けた総合的基盤研究」班
造血器悪性腫瘍患者における深在性真菌症の頻度

分担研究者 上 昌広 東京大学医科学研究所 客員助教授

研究要旨 我が国における悪性腫瘍患者における真菌感染症の実態は明らかでない。我々は、虎の門病院、東京都立駒込病院、東京大学において、1980年1月から2001年6月までに血液内科に入院し、剖検を行った720人の病歴・剖検記録を調査した。720人の患者のうち、252人(35%)で深在性真菌感染症が病的に確認された。起因菌の種類はカンジダ属 (n=94)、アスペルギルス属 (n=91)、接合菌 (n=34)、クリプトコッカス属 (n=7)、トリコスポロン (n=11)、フザリウム (n=1)、不明 (n=20)であった。研究期間中にカンジダ感染の頻度は著明に減少した。その頻度は1980年代には13.5%であったが、1990年代には9.6%に減少した。アスペルギルス感染症の頻度は研究期間中に一貫して増加した。その頻度は1980年代には9.1%であったが、90年代以降は26.7%であった。1990年代には、アスペルギルスが造血器悪性腫瘍患者における最も高頻度に認められる病原真菌となった。本研究は真菌感染が造血器悪性腫瘍の主要な合併症であり、その起因菌は変化しつつあることを示している。

A. 研究目的

免疫抑制患者における真菌感染症の頻度は増加傾向で、白血病剖検例の30%程度に播種性深在性真菌症を認め、白血病の化学療法後、或いは骨髄移植例の50%が真菌感染症に罹患するとの報告もある。腎臓、心臓移植では真菌感染症頻度は10-20%である事を考えれば、造血器悪性腫瘍における真菌感染症の頻度は際だっている。しかしながら、我が国における悪性腫瘍患者における真菌感染症の実態は明らかでない。

B. 研究方法

患者背景

虎の門病院、東京都立駒込病院、東京大学において、1980年1月から2001年6月までに血液内科に入院し、剖検を行った720人の病歴・剖検記録を調査した。患者年齢の中央値は63歳(18-93歳)であった。原疾患は、AML 262人、CML 182人、ALL 87人、悪性リンパ腫115人、MDS 54人、その他20人であった。646人は原疾患が化学療法抵抗性であった。

上記3施設において真菌感染の管理方法に特記すべき差異はなかった。1980-93年の間は真菌感染予防のために、非吸収性の抗真菌剤を投与していた(oral amphotericin B (AMPH-B))。真菌感染を疑う、或いは確定診断の場合には、AMPH-Bを0.5-1.0 mg/kgを投与した。1994年以降は、吸収性抗真菌剤(通常はfluconazole 100-400 mg/day)を真菌感染予防目的に投与した。抗生剤不応性の発熱が生じた場合にはPizzoらの報告に従い対処した(Pizzo et al., NEJM, 1993)。1996年以降は真菌感染目的にアスペルギルス感染に対するラテックス凝集反応法、(1-3)-beta-D glucan assay、およびアスペルギルス感染に対する早期診断目的の胸部CT検査を行った。

診断基準

深在性真菌症の診断基準は、EORTC/NIH 規準を用いた。この規準で、Definiteの規準をみたす患者を深在性真菌症患者と定義した。

主要評価項目と統計学的手法

単変量解析にはカイ二乗検定、Man-Whitney 検定、および多変量解析にはコックス比例ハザードモデルを用いた。有意水準は5%とした。

C. 研究結果

深在性真菌感染症の頻度

720人の患者のうち、252人(35%)で深在性真菌感染症が病的に確認された。輸入真菌による深在性真菌症と診断された患者はいなかった。6人の患者では2種類の真菌による混合感染を確認した。1980年以降の深在性真菌感染症の頻度の推移を図1に示す。

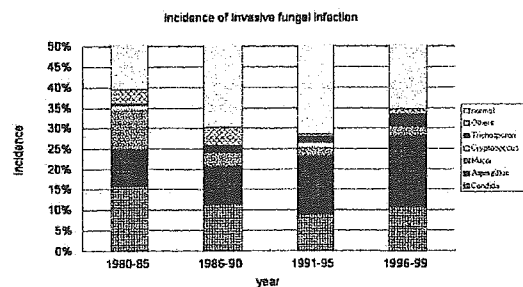


図1：造血器悪性腫瘍患者における深在性真菌感染症の推移

起炎菌の種類はカンジダ属(n=94)、アスペルギルス属(n=91)、接合菌(n=34)、クリプトコッカス属(n=7)、トリコスポロン(n=11)、フザリウム(n=1)、不明(n=20)であった。

カンジダ属

研究期間中にカンジダ感染の頻度は著明に減少した。その頻度は1980年代には13.5%であったが、1990年代には9.6%に減少した(Table 1)。61人の患者では培養にてカンジダの種が同定された。その内訳は以下である。C. albicans (n=37)、C. tropicalis (n=9)、C. glabrata (n=6)、C. krusei (n=5)、C. guilliermondii (n=4)、C. parapsilosis (n=1)。1980年代はC. albicansが主流で、全カンジダ感染の74.4%を占めたが、1990年以降減少している。一方、非カンジダ属の感染が緩徐に増加している。

Table 1: Incidences and sensitivity of blood cultures of invasive fungal infection

Year	Number of patients who died	Number of patients	Number of isolates (n/total)	Candida	Aspergillus	Zygomycetes*	Trichosporon*	Histoplasma*	Penicillium	Unknown fungi
1980-84	787	441	384 (325/6)	16/73	4/18	1/19	0/3	1/1	0/0	0/7
1985-89	924	763	277 (369/2)	5/52	6/25	0/9	0/1	3/3	0/0	1/12
1990-94	629	720	214 (295/2)	2/19	6/21	0/0	0/3	2/2	0/0	0/1
1995-99	1143	723	92 (193/2)	3/31	0/16	0/2	0/3	0/1	1/1	0/0
Total	3423	2647	720	28/94	16/61	0/3	1/7	5/11	1/1	1/12

*Fungi other than the number of patients with positive blood cultures was number of patients who underwent autopsy

アスペルギルス属

91人の患者でアスペルギルス感染症が病的に証明された。91例中、88例は侵襲性肺アスペルギルス症と診断された。残りの2例は気管支、腎臓に感染していた。

アスペルギルス感染症の頻度は研究期間中に一貫して増加した。その頻度は1980年代には9.1%であったが、90年代以降は26.7%であった。1990年代には、アスペルギルスが造血器悪性腫瘍患者における最も高頻度に認められる病原真菌となった。

その他の真菌

カンジダ・アスペルギルス感染症以外の起炎菌としては接合菌 (n=34)、クリプトコッカス (n=7)、トリコスポロン (n=11)、フザリウム (n=1)が同定された。残りの20人に関しては、起炎菌は同定されなかった。

1980年代、接合菌は剖検時に同定された病原真菌の17.0%を占めたが、90年以降6.5%まで減少した。

D. 考察

本研究は剖検患者の40%程度が深在性真菌感染を合併することを示した。この頻度は、過去の海外からの報告とほぼ同様であり、深在性真菌症が造血器悪性腫瘍患者における重大な合併症で、終末期造血器悪性腫瘍

患者のQOLを損ねている可能性を示唆した。真菌感染症対策は治療関連死亡の予防以外に、終末期造血器腫瘍患者のQOL改善を念頭におくべきである。患者のQOL改善のためには、非侵襲的な検査方法の開発、および至適治療法の確立を検討しなければならない。

1980年代以降、真菌感染症の頻度は大きな変化を認めないが、起炎菌の種類は変化している。カンジダ属、特にカンジダアルビカンスが減少し、アスペルギルス属、および非アルビカンス系のカンジダ属が増加している。これは海外の報告とも一致し、フルコナゾールなどアゾール系抗真菌剤の開発が関係しているのであろう。

本研究では接合菌やフザリウムなどのrare fungiに関しては、一定の傾向を認めなかった。前者は近年減少傾向で、後者は研究機関に1例しか発症していない。近年の欧米の報告では、いずれの真菌も近年増加傾向であり、本研究とは一致しない。今後の検証が必要である。近年、話題になっている輸入真菌症に関しては、1例も診断されていない。これは臨床医・病理医の認識不足、診断の困難さによるものか、或いは、実際に発症例がないためか解釈が困難である。このようなタイプの真菌に関しても今後の検証が必要である。

本研究は造血器悪性腫瘍患者における真菌感染症の重要な情報を提供したが、言及すべき幾つかの問題が存在する。まず、患者選択に剖検というバイアスが存在することが挙げられる。担当医にとり興味深い症例が選択されたかもしれない。次に、死亡前には集中的な抗真菌療法が施されたため、生前に真菌感染に罹患した症例であっても剖検では検出されなかった可能性が否定できない。

本研究は真菌感染の頻度を過小評価している
かもしれない。

E. 結論

深在性真菌症は造血器悪性腫瘍の重大な合
併症である。近年、アスペルギルス感染症の
頻度が増加し、対策の改善が求められる。

F. 健康危機情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Antifungal prophylaxis following reduced
intensity stem-cell transplantation.
Masahiro Kami, Naoko Murashige, Yuji
Tanaka and Hiroto Narimatsu, Transplant
Infect Dis, in press

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を 含む。）

特記すべき事項はなし。

分担報告書

非培養系による *Histoplasma* の定量的検出と種内多様性の解析

分担研究者 杉田 隆 明治薬科大学微生物学教室 講師

研究要旨 輸入真菌感染症の一つであるヒストプラズマ症の起因菌 *Histoplasma capsulatum* の臨床材料からの非培養系による定量的検出を指向し、TaqMan probe を用いた real time PCR 検出系を開発した。定量限界は 10^1 copy であったことから、実際の臨床材料を用いての定量的な検出が期待できる。

さらに、様々な分離源由来の *H. capsulatum* 株を菌株保存機関 CBS より入手し 18S rRNA 遺伝子中に存在する Group I intron の解析を行った。60%の株に Group I intron が挿入され、DNA 塩基配列解析の結果から多型が存在することが明らかになった。本解析領域は世界規模での分子疫学調査に応用できる可能性が考えられた。

A. 研究目的

Histoplasma capsulatum を起因菌とするヒストプラズマ症は主要な輸入真菌症の一つである。確定診断には菌の培養が不可欠であるが、本菌は培養に時間を要することから非培養系の検出が迅速性の点からは好ましい。一方、本症は中南米およびアフリカで認められるが、輸入感染症として国内症例がしばしば報告されている。感染経路(原産国)を明らかにするには本菌の種内多様性の解析が適している。

そこで本年度は、1) 早期診断法の開発を指向し real time PCR を用いた非培養検出系の開発、および 2) 様々な分離源由来の菌株の種内多様性を解析した。

B. 研究方法

1) 使用菌株

オランダの菌株保存機関である CBS に保存

されている 25 株を用いた。本菌株からの DNA 抽出は本研究班分担研究者である帝京大学榎村浩一先生に実施して頂いた。

2) Real time PCR を用いた *Histoplasma* の検出
rRNA 遺伝子の LSU 上に *Histoplasma* 特異的な primer および TaqMan probe を設計した。PCR 増幅された LSU 領域を pCR 2.1 プラスミドに挿入し、 10^1 から 10^8 copy までの希釈系列を用いて検量線を作製した。測定機器は AB 7500 システムを用いた。

3) 種内多様性の解析

18S rRNA 中に挿入されている Group I intron を挟むように PCR primer を作製し、PCR を行った。PCR 陽性産物はダイレクトシーケンスにより DNA 塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。

C. 研究結果

1. Real time PCR を用いた *Histoplasma* の検出

H. capsulatum には3変種 (variety *capsulatum*, variety *duboisii*, variety *farciminosum*)が存在するが、全変種を検出できるように primer/probe を設計した (Fig. 1)。 10^1 – 10^8 では $r^2=0.999$ の直線的な検量線がいずれの変種に対しても作成された (Fig. 2)。アフリカ・中南米に渡航歴のある日本人患者病理組織サンプルから本定量系を用いて解析したところ、約 10^3 copy の rRNA 遺伝子が検出できた。

2. 種内多様性の解析

CBS 由来の 25 株を実験に供した。このうち 15 株 (=60%) から intron が検出された (Fig. 3)。PCR 産物は塩基配列解析から group I intron であることを確認した (Fig. 4)。今回塩基配列を決定した 15 株と既に GenBank に登録されている 3 株の intron 配列から系統樹を作製したところ、7 グループに大別された。Variety *capsulatum* は多系を示したが、variety *farciminosum* は互いに系統枝を形成した。なお、variety *duboisii* からは intron は検出されなかった。

D. 考察

本年度は *Histoplasma* の非培養定量系を構築し、また *H. capsulatum* の種内多様性を解析した。*Histoplasma* の培養には時間を要することから患者からの迅速な菌の検出が必要である。今回は多くの臨床検体を入手できなかったが、供試した剖検サンプルから比較的多量の DNA を定量的に検出することができた。今

後の臨床応用を期待したい。

これまでに *Histoplasma* の多様性解析は主に機能遺伝子について行われている。rRNA 遺伝子中に intron の挿入が確認されている菌種はごく一部に限られる。Intron は水平伝播であることから疫学的解析には適していると考えられる。限られた菌株数の検討であるが variety *farciminosum* に顕著な変種内多様性は認められなかった。一方、variety *capsulatum* は顕著な多様性が認められた。アフリカ・中南米に渡航歴のある日本人患者病理組織サンプルからもこの intron が検出でき、系統的には suriname 株の配列と一致した (Fig. 5 の矢印部分)。このことからただちに当該患者が中米で感染したとは言えないが、今後更に多くの菌株を検討することで分子疫学調査に応用したいと考えている。

E. 結論

本年度の研究から、臨床応用可能なヒストプラズマ症起因菌の非培養系定量検出法ならびに世界規模での分子疫学調査のためのツールを開発した。今後多くの菌株を用いて検討することにより、本法の有用性を明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (原著)

1. Arai R, Sugita T, Nishikawa A. Reassessment of the *in vitro* synergistic effect of fluconazole with the nonsteroidal

- anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*
Mycoses 48, 38-41, 2005.
2. Sugita T, Takeo K, Hama K, Virtudazo E, Takashima M, Nishikawa A, Kucsera J, Dorogi J, Komori S, Nakagaki K, Vollekova A, Slavikova E, Farkas V. DNA sequence diversity of intergenic spacer 1 region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals.
Med. Mycol. **43**, 21-26, 200
3. Nagao K, Sugita T, Ouchi T, Nishikawa T. Genetic identification of *Trichophyton rubrum* from pathological specimen in Trichophytia Profunda Acuta of the Glabrous skin. Jpn. J. Med. Mycol. **46**, 129-132, 2005
4. Sugita T, Tajima M, Ito T, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A. Antifungal activities of tacrolimus and azole agents against the eleven currently accepted *Malassezia* species. J. Clin. Microbiol. **43**, 2824-2829, 2005
5. Sugita T, Kikuchi K, Makimura K, Urata K, Someya T, Kamei K, Niimi M, Uehara Y. Species from Guano Samples in Bat-Inhabited Caves in Japan. Applied Env. Microbiol. **71**, 7626-7629, 2005
6. Sugita T, Shiraki Y, Hiruma M. Genotype analysis of the variable internal repeat region in the rRNA gene of *Trichophyton tonsurans* isolated from Japanese Judo wrestlers.
Microbiol. Immunol. **50**, 57-60, 2005
7. Otag F, Kuyucu N, Erturan Z, Sen S, Emekdas G, Sugita T. An outbreak of *Pichia ohmeri* infection in the paediatric intensive care unit: case reports and review of the literature.
Mycoses. 2005 Jul;48(4):265-9. Review.
8. Kalkanci F, Kustimur S, Sucak GT, Senol E, Sugita T, Adams G, Verkleij G, Summerbell R. A case of fulminating fungal sinusitis due to *Valsa sordida*, a plant pathogen, in an immunocompromised patient
Med. Mycol. (in press)
9. Gabriell M, Kopecká M, Yamaguchi M, Svoboda A, Takeo K, Yoshida S, Ohkusu, M Sugita T, Nakase T. Cytoskeleton in Unique Cell Division and Conidiogenesis of “Long Neck Yeast” *Fellomyces (Sterigmatomyces) fuzhounesis*
Protoplasma (in press)
10. Morishita N, Sei Y, Sugita T. Molecular analysis of malassezia microflora from patients with pityriasis versicolor.
Mycopathologia. **161**(2):61-5, 2006
- H. 知的財産権の出願特許状況
なし。

Fig. 1

Real time PCRによる*Histoplasma*の検出

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum*
Histoplasma capsulatum var. *duboisii*
Histoplasma capsulatum var. *farciminosum*

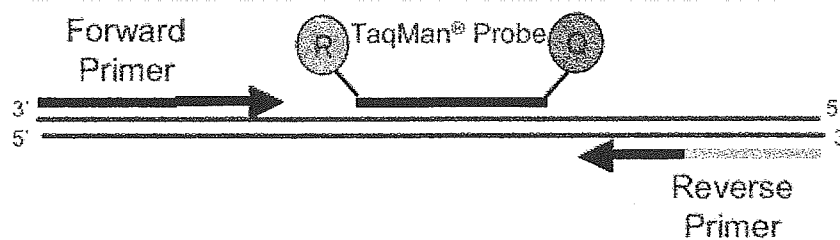


Fig. 2

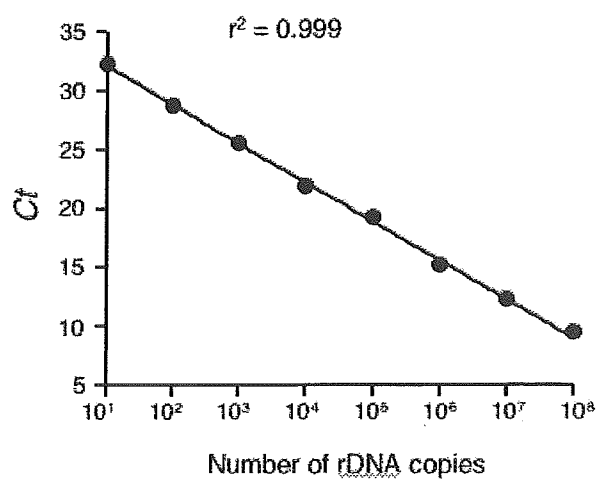
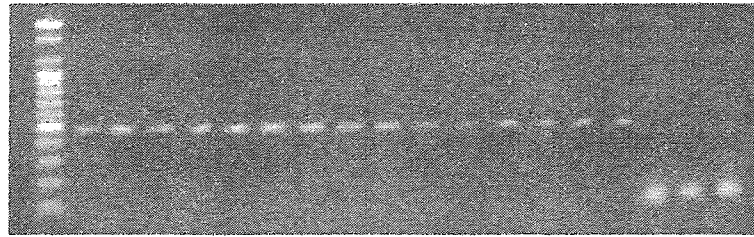


Fig. 3

18S rRNA中のGroup 1イントロン



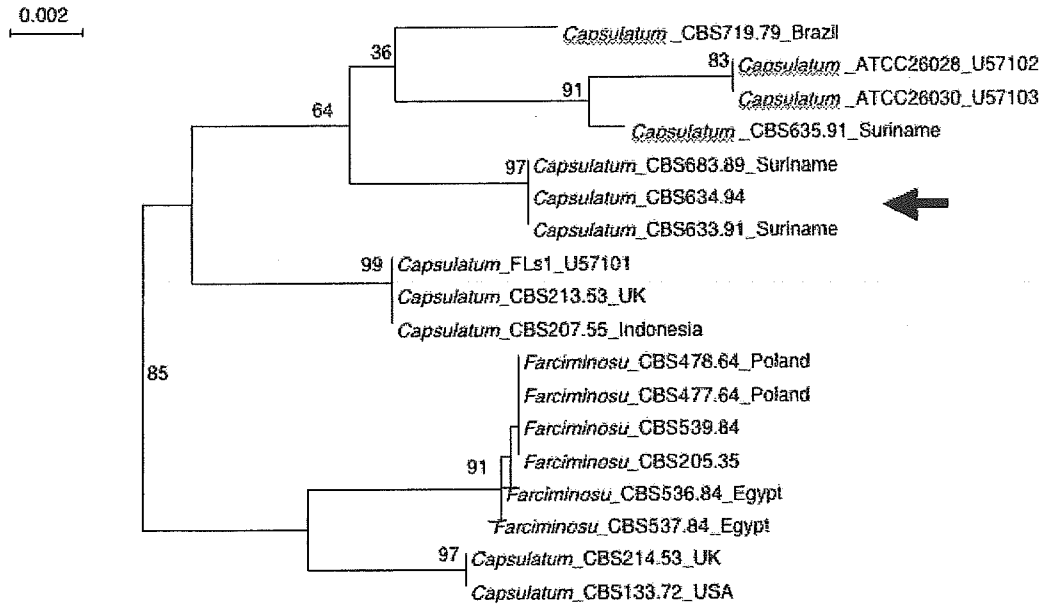
イントロン含有率60%(15/25)

Fig. 4

```
TGCCGCAGCAACTCTGCGCCGAAAAGCAGCCCGAAAAGGGTGATGTGGTGCCCTTGGACAAA
AATATTAAATGCTAGTCCGGCCTTCTCACAGGCTGGGCGACACACTCAAACCTGCGGGAAAC
CCCTAAAGCCTTCACTACCAAGCCATGTTTCGAAAGGACATGGTGGCCAGGTTAATTGGCT
P element
CGGGTACGGTCAACAACGTGAAGGATGTTCCAATGGGCBAATCCGCAGCCAAGCCCCTACGTG
P element Q element
CAGTGTCCGTAATACAGACATTTTCATATGGGGAAGGTTTCAGAGACTAAATGGGTGTGGGTG
R element
CGTTACTTGAAGTGACAAGCTTAAGATATAGTCCGGCTCCAGTAGAAATGCTGGAGATTCA
S element
GGTTCATCTGTGATTAAAACGGGAGCCTGCG
```

Fig. 5

Group 1イントロンの系統樹



分担研究報告書

真菌感染抵抗性の解析と治療の評価系の開発

分担研究者 鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質 室長

研究要旨 真菌由来糖たんぱく質 CAWS(*Candida albicans* water soluble fraction)投与直後の白血球動態、MPO 抗体との相乗作用、血管内皮細胞傷害への影響について解析した。投与後から好中球を主とした末梢白血球数の急速な増加、CAWS および MPO 抗体の投与より IL-1b, TNFa, IL-6, IL-12p40, G-CSF, RANTES が増加した。また、糸球体内皮細胞の初代培養において、ICAM-1 の発現が Myeloperoxidase(MPO)抗体により誘導され、MPO-KO マウスでも確認できたことから、MPO 以外の分子に MPO 抗体が結合し、内皮細胞傷害を誘導すると推定される。これらの結果から、真菌由来分子の増加により急速な補体や炎症性サイトカインの誘発と白血球の末梢血への動員と MPO 抗体の増加が誘導され、CAWS と MPO 抗体が腎臓をはじめとする血管内皮細胞に作動して内皮細胞傷害をおこすと推定される。

A. 研究目的

真菌感染防御は、自然免疫、獲得免疫によって維持されている。感染初期には、好中球、マクロファージが主要な役割を担っている。特に、好中球が産生する活性酸素 O_2^- や OCI^- は、主要な役割をしている。すでにわれわれは、 OCI^- 部の産生酵素 Myeloperoxidase (MPO)欠損マウス (MPO-KO)により、真菌感染に必須であることを証明した(Aratani et al. 1998)。また、重篤な O_2^- 産生不全（慢性肉芽腫症）は、NADPH オキシダーゼ欠損であり、*Aspergillus* 真菌症から肉芽を造り、死亡する疾患である。真菌感染初期防御には、主として好中球がかかわり、なかでも好中球ライソゾーム酵素 myeloperoxidase(MPO)が H_2O_2 と Cl^- を基質として OCI^- を産生し強力に *Candida. albicans* を殺菌することを、MPO 欠損マウスを用いて証明した。このように真菌、特に、*C. albicans* の不活性化には、MPO は不可欠である。

さらに、これまで、殺真菌の要因が、単純に、 O_2^- 産生不全によっているとされていたが、MPO-KO と NADPH オキシダーゼの構成酵素 gp91-phox の欠損(gp91-KO)のダブルノックアウト

トマスと各単独ノックアウトマスの実験結果から、真菌感染抵抗には、 O_2^- そのものより OCI^- が主要であることを明らかにした(Aratani et al. J. Infectious Diseases 182, 1276-1279, 2000)。すなわち、 O_2^- 産生不全は、その下流にある OCI^- をも産生できず、単独の作用と考えられていたが、ノックアウトマウスの結果から、以上の結論を得た。

一方、このように MPO が産生する OCI^- は、自己組織を傷害することがあり、感染が誘導する組織傷害をもたらす。真菌に由来する分子などによって、腎炎、冠状動脈炎をはじめとする難治性血管炎が誘導されることが指摘されている。また、難治性血管炎の主たる死因が、*Candida* 感染症や *Aspergillus* 感染症がトップに挙げられているなど、難治性血管炎と真菌の関係は深い。すなわち、上記に記した殺菌酵素（MPO や NADPH オキシダーゼ）の不全による好中球機能の低下による日和見感染の結果が、*Candida* 症や *Aspergillus* 症を誘発し、難治性血管炎もその例外ではないと思われる。このように、MPO が大量に細胞外に放出されることにより MPO 自己抗体の上昇などを誘発することにもなりかねな

い。事実、*C. albicans* 由来分子 CADs (Murata et al. Microbiol. Immunol. 23:825-831, 1979; Takahashi et al. Inflamm. Res. 53:72-77, 2004) や CAWS (Nagai-Miura et al. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 26: 527-543, 2004) が MPO-ANCA を増加させ、冠状動脈炎を誘発する。

さらに、血管炎の発症の要因には、活性化した好中球の関与が推定されている (Arimura et al. Clinical Nephrology 40, 256-264, 1993, L. Harper, et al. Arthritis Rheumatism 44:921-930, 2001)。このような好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全の誘発や、自己抗体の産生に関与するなど、難治性血管炎の発症要因への可能性が強く示唆されている。これらの自己免疫疾患などには、活性化好中球や病態マーカーとして臨床検査として広く利用されている好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) が病態と相関し、血管炎を誘導する *C. albicans* 由来分子が mannose-protein-1,3- β -glucan であることを示してきた。

そこで、本年度は、*C. albicans* 由来分子の CAWS によって誘導される血管炎における CAWS の作用を解析した。

本年度は、昨年度に引き続き、CAWS 投与直後の白血球動態を解析するとともに、MPO 抗体との相乗作用、血管内皮細胞傷害への影響について詳細に検討した。主に、CAWS 投与直後の白血球動態、MPO 抗体との相乗作用、血管内皮細胞傷害への影響について解析した。

B. 研究方法

1) CAWS 誘導血管炎初期の MPO 抗体の関与の動態解析

CAWS (カンジダ標準株 IFO1385 由来) を 0.4 mg/mouse を C57BL/6 に投与し、その作用を白血球動態、MPO との相互作用、サイトカイン発現について以下の方法で測定した。

2) CAWS の作用の初期動態

CAWS を PBS に懸濁して C57BL/6N マウス(♂, 6w) 腹腔内に投与後、10 分から 16 時間で経時的に屠殺して、末梢好中球数、末梢好中球の機能を解析すると共に、骨髓、末梢血の分画 profile を解析した。

3) CAWS・MPO の 2 回投与によるサイトカイン間の変動差の同時測定解析

CAWS 0.4 mg/mouse とマウスリコンビナント MPO 抗体を C57BL/6 に iv 投与し、5 日後に、再度 CAWS と QD-antiMPO を iv 投与し、1、2、5 日後に固定し、腎、肺、脾、肝への QD-antiMPO の移動を観察するとともに、心臓から採血して得た血漿 50mL を用いて、BioPlex により 18 種類のサイトカインを同時測定した。

4) 糸球体内皮細胞の初代培養

C57BL/6N マウスの腎臓を採取し髓質を切除後、コラゲナーゼ処理によって単一細胞を取得した (differential sieving technique)。継代培養を繰り返し内皮細胞培養のプライマリカルチャー系を確立した。抗マウス CD31 抗体により内皮細胞を特定した。

5) MPO-ANCA の内皮細胞への作用

MPO-ANCA による内皮細胞障害の指標として、血管内皮接着分子 ICAM-1 の発現を RT-PCR および Cell-ELISA により測定した。

6) MPO 遺伝子欠損(MPO-KO)マウスの血漿およびプライマリー糸球体内皮細胞を用いた時の MPO-ANCA による内皮細胞障害

C57BL/6N マウスからプライマリー糸球体内皮細胞に必要な量の血漿を MPO-KO マウスから採取後、非動化し、MPO-KO マウス由来のプライマリー糸球体内皮細胞の培養に使用した。傷害の方法は、野生型と同時に行った。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

1) CAWS 投与後の白血球動態

CAWS 投与後から末梢白血球数が急速に増加し、特に、好中球の増加が著しかった (図 1)。その白血球動態の背景には、CAWS 誘導による骨髓からの白血球の移動が考えられた。

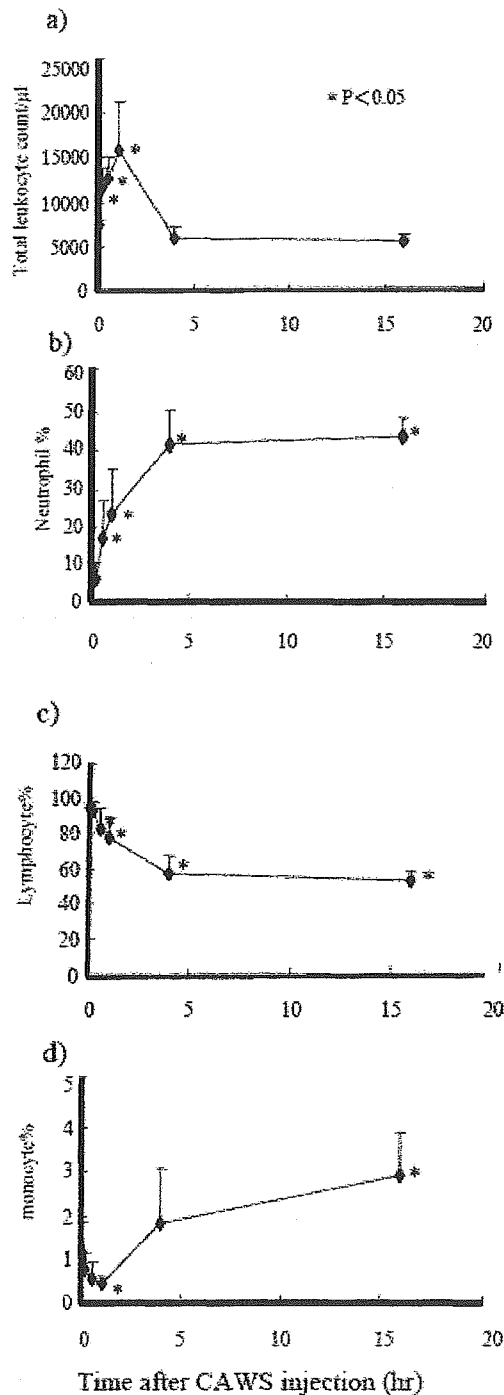


図1. CAWS 投与後の末梢血中の白血球分画

そこで、骨髓から供給されていると推定し、骨髓細胞の白血球動態を解析した。その結果、骨髓の細胞分布の FACS 解析から、好中球の末梢血への移動が示唆された（表）。

2) CAWS・MPO の2回投与による同時測定によるサイトカイン間の変動差

次に、CAWS 投与による白血球動態の激しい変動や MPO 抗体の上昇があることから、CAWS および MPO を2回投与することによるサイトカインの動態を BioPlex により同時測定してサイトカイン間の変動差を調べた。

その結果、IL-1b, TNF α , IL-6, IL-12p40, G-CSF, RANTES が増加した（図2）。

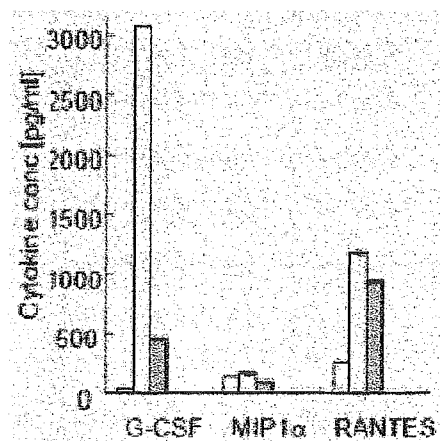
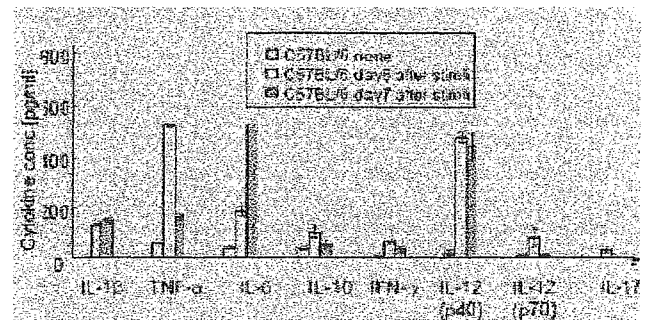


図2. CAWS および MPO 抗体投与によるサイトカインの変動

Table Change of Gr1⁺ cells ratio after CAWS injection

	0	0.17	0.5	1	4	16
	Time after CAWS injection (hr)					
BM	19.47±5.35	15.85±1.89	9.65±1.34 *	10.42±1.26 *	7.39±1.97 *	11.73±6.58
Peripheral	5.24±6.92	5.30±0.36	10.35±2.00 *	9.78±3.59	8.06±6.69	6.12±5.34

* P < 0.05

3) 糸球体内皮細胞の初代培養とそれを用いた MPO 抗体の作用の解析

マウスの腎臓から糸球体を採取し、継代培養繰り返すことで内皮細胞を単離した。MPO 抗体が内皮細胞への結合に結合した (図 3)。

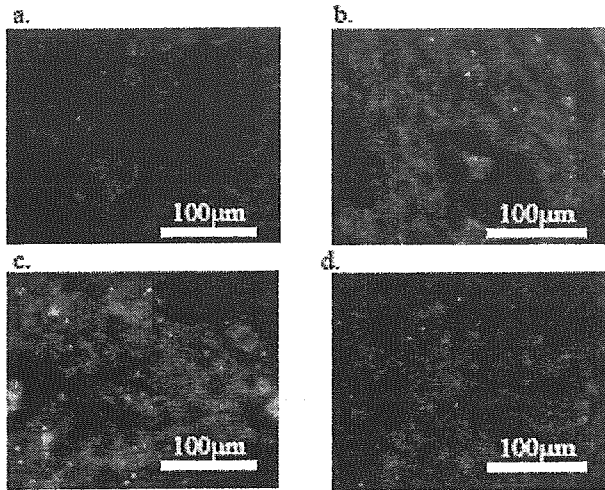


図 3. MPO 抗体の結合

a. non-treatment, b. TNF-a stimulation
c. anti-mMPO antibody stimulation, d. Control IgG stimulation:

4) MPO 抗体による MPO-欠損マウス由来血清により培養した MPO-欠損マウス由来内皮細胞の ICAM-1 の発現の誘導

次に、内皮細胞を anti-mMPO で刺激し 4 時間後の ICAM-1 の mRNA 発現を解析した。ICAM-1 の発現は anti-mMPO 刺激に対して有意に上昇した。タンパクレベルの発現も抗体濃度依存的に増加した (図 4 <WT>)。また、MPO-欠損マウス由来の内皮細胞をおよび血清を用い、MPO 抗体を投与しても ICAM-1 の発現を誘導した (図 4 <MPO-KO>)。

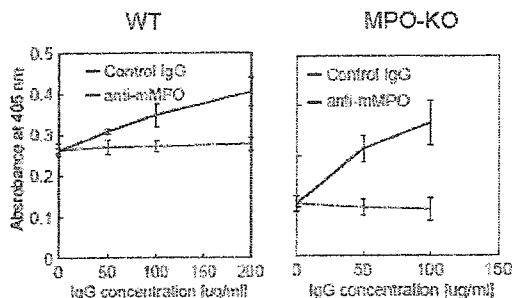


図 4. MPO 欠損マウスにおける ICAM-1 の発現の増加

D. 考察

本年度の結果は、昨年度に引き続き、CAWS 投与直後の白血球動態、MPO 抗体との相乗作用、血管内皮細胞傷害への影響について詳細に解析した。

CAWS 投与後から 16 時間までの初期段階での解析で、末梢白血球数が急速に増加し、特に、好中球の増加が著しかった。その白血球動態の背景には、CAWS 誘導による骨髄からの白血球の移動が考えられた。そこで、骨髄から供給されていると推定し、骨髄細胞の白血球動態を解析した。その結果、骨髄の細胞分布の FACS 解析から、好中球の末梢血への移動が示唆された。これは、CAWS によって、急激な炎症が誘導され、末梢の白血球の急激な増加を補填することで、骨髄から末梢血に白血球が動員されると推定される。

次に、CAWS 投与による白血球動態の激しい変動や MPO 抗体の上昇が認められたことより、CAWS および MPO の両者による炎症拡大があるかを検討した。18 種類のサイトカイン間の変動差を調べた結果、IL-1b, TNF α , IL-6, IL-12p40, G-CSF, RANTES が増加し、代表的な炎症性サイトカインの上昇があった。

さらに、CAWS の炎症拡大によって誘導されると考えられる糸球体での炎症拡大について検討した。糸球体での炎症拡大は、CAWS によって誘発された MPO 抗体の糸球体内皮細胞への作用と関連があると推定されたことから、糸球体内皮細胞の初代培養系を開発し、それを用いた MPO 抗体の作用を解析した。MPO 抗体は、内皮細胞に結合し、MPO 抗体により内皮細胞の傷害マーカーである ICAM-1 の発現を誘導した。しかし、MPO は、内皮細胞に発現していないことから、血清から由来した MPO 分子が内皮細胞に結合しているか、あるいは、cross-reactive な分子が存在しているかについて検討するため、MPO-KO マウス由来血清を用いて培養した MPO-KO マウス由来内皮細胞により MPO 抗体の反応を解析し、野生型での反応と同様 ICAM-1 の発現が誘導された。この誘導が、MPO-KO マウスを用いた MPO フリーの系でも確認できたことから、MPO 以外の分子に MPO 抗体が結合し、内皮細胞傷害を誘導すると推定される。

以上から、真菌由来分子が増加すると、その初期反応では、急速な補体や炎症性サイトカインの誘発が起こり、ほぼ同時に骨髄から白血球の末梢血への動員が始まる。また、MPO 抗体の