

増加も誘導され、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し、最終的に血管炎に至ると推定される。本年度の研究から真菌がもたらす血管炎の誘発機序の初期状態とその後につづく内皮細胞傷害機構について明らかにすることができた。

本研究は、大川原明子、松村実美子（以上、国立感染研）、星野昭芳、山本健二（以上、国立国際医療センター研）、三浦典子、大野尚仁（以上、東京薬大・薬）、荒谷康昭（横浜市大・木原生物研）、高橋啓、大原関利章、直江史郎（以上、東邦大・医・大橋病院・病理）の各先生方の協力によった。

## E. 結論

本年度は、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。CAWS 投与後から好中球を主とする末梢白血球数の急速な増加があり、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。次いで、CAWS および MPO 抗体の投与によるサイトカインの動態の変動差を調べた結果、IL-1b, TNFa, IL-6, IL-12p40, G-CSF, RANTES の炎症性サイトカインが増加した。CAWS 誘導の標的細胞が MPO 抗体を介した腎臓をはじめとする血管内皮細胞にあることから、糸球体内皮細胞の初代培養用い MPO 抗体による内皮細胞傷害について検討した。この傷害の指標となる ICAM-1 の発現は MPO 抗体により誘導された。この誘導は、MPO-KO マウスを用い完全に 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。これらの結果は、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がおこり、MPO 抗体の増加も誘導され、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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Y. Hamano, K. Tsukamoto, M. Abe, G.D. Sun, D. Zhang, H. Fujii, S. Matsuoka, M. Tanaka, A. Ishida-Okawara, H. Tachikawa, H. Nishimura, K. Tokunaka, O. Hino, S. Hirose, and K. Suzuki.

## Genetic Dissection of Vasculitis, Myeloperoxidase-Specific Antineutrophil

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Y. Hamano, K. Tsukamoto, M. Abe, G.D. Sun, D. Zhang, H. Fujii, S. Matsuoka, M. Tanaka, A. Ishida-Okawara, H. Tachikawa, H. Nishimura, K. Tokunaka, O. Hino, S. Hirose, and K. Suzuki. Genetic Dissection of Vasculitis, Myeloperoxidase-Specific Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Production, and Related Traits in Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-Forming/Kinjoh Mice. *J. Immuno.*, in press, 2006.
2. W. Yumura, M. Itabashi, A. Ishida-Okawara, K. Tomizawa, J. Yamashita, Y. Kaneshiro, H. Nihei, and K. Suzuki. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis. *Microbiol.Immunol.* in press, 2006.
3. N. Nagai-Miura, T. Harada, H. Shinohara, K. Kurihara, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S., Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal pathogen, CAWS. *Atherosclerosis* in press, 2006.
4. A. S. Persad, Y. Kameoka, S. Kanda, Y. Niho, K. Suzuki. Arginine to Cysteine Mutation (R499C) Found in a Japanese Patient with Complete Myeloperoxidase Deficiency. *Gene Expression* in press, 2006.
5. H. Yasuda, N. Yoshizawa, K. Suzuki Modeling on social spread from immunity. *Jpn J Infect Dis*, 58, S14-S15, 2005
6. K. Suzuki, K. Yamamoto and H. Yoshikura. Focusing on Assessment of Risk to Communities in International Symposium on Infectious Agent Transmission Model Building. *Jpn J Infect Dis*, 58, S1-S2, 2005.
7. T. Matsuki, K. Isoda, R. Horai, A. Nakajima, Y. Aizawa, K. Suzuki, F. Ohsuzu, and Y. Iwakura. Involvement of TNF- $\alpha$  in the development of T cell-dependent aortitis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation* 112: 1323-1331, 2005.
8. T. Ito-Ihara, T. Ono, F. Nogaki, K. Suyama, M.

- Tanaka, S. Yonemoto, A. Fukatsu, T. Kita, K. Suzuki, and E. Muso. Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin for Patients with MPO-ANCA-associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract.* 102:c35-c42, 2005
9. R. Suzuki, K. Tomizawa, K. Suzuki, M. Tanokura. MPO-ANCA binding site on MPO molecule estimated from epitope mapping study and molecular modeling. *Bioimages* 12: 85-90, 2005.
  10. M. Fujieda, K. Suzuki, H. Sato, M. Hattori, N. Wada, M. Tsuchiya, N. Okamoto, T. Murata, M. Matsudaira, M. Shimizu, K. Ohta, K. Naruse, S. Sugihara and H. Wakiguchi. Epitope analysis of myeloperoxidase-specific antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (MPO-ANCA) in childhood onset Graves' disease treated with propylthiouracil. *Clinical Nephrology*, 63:437-445, 2005.
  11. T. Oharaseki, Y. Kameoka, F. Kura, A.S. Persad, K. Suzuki, S. Naoe. Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with *Candida albicans*-derived substances. *Microbiol.Immunol.* 49: 181-189, 2005.
  12. N. Nagai-Miura, Y. Shingo, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S. Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Induction of Coronary Arteritis with Administration of CAWS (*Candida albicans* Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 26:527-543, 2004.
2. 学会発表  
国際会議
1. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Cryptococcus neoformans*. 13th Gordon Research Conference, Connecticut, USA.
  2. K. Suzuki, K. Murayama, T. Nagao, T. Oharaseki, A. Hasegawa, A. I. Okawara, N. N. Miura, N. Watanabe, M. Handa, K. Takahashi, N. Ohno, H. Minamitani, T. Nakayama, T. Arai. Contribution of CD69 to the development of coronary arteritis induced with a vasculitis Inducer *Candida albicans* water soluble fraction. 13th Gordon Research Conference, Connecticut, USA.
  3. N. Ohno, N. N. Miura, H. Shinohara, H. Sankawa, Y. Adachi, A. I. Okawara, and K. Suzuki. Strain dependency of CAWS-induced coronary arteritis in mice. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  4. Eri Muso, Toshiko Ito-Ihara, Takahiko Ono, Enyu Imai, Kunihiro Yamagata, Akira Akamatsu, Kazuo Suzuki. Establishment of the evidence of beneficial effect of Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy on MPO-ANCA related polyangiitis combining rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) in Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  5. Toshiko Ito-Ihara, Kazuko Uno, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Toshiyuki Komiya, Akiko Ishida-Okawara, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Kazuo Suzuki, and Eri Muso. Sensitive detection of myeloperoxidase expression on neutrophil of patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  6. S. Fujimoto, S. Uezono, S. Hisanaga, K. Fukudome, S. Kobayashi, N. Tamura, K. Suzuki, H. Hashimoto, H. Nunoi. Incidence of primary renal vasculitis in Miyazaki, Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  7. S. Kobayashi, N. Tamura, T. Ihara, E. Muso, K. Suzuki, M. Yoshida, K. Nakabayashi, N. Tsuchiya, M. Kurosawa, Y. Inaba, S. Fujiomoto, H. Nunoi, H. Hashimoto. Prevalence of microscopic polyangiitis/Wegener's granulomatosis and the ratio of P-,MPO-/C-,PR-3- ANCA in ANCA-associated vasculitis in Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  8. A. Ishida-Okawara, N. Nagi-Miura, T. Oharaseki, N. Ohno, K. Takahashi, H. Okamura, P.A. Ward, K. Suzuki. Neutrophil activation as in

- initial step with CAWS in mouse. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
9. K. Suzuki, K. Murayama, T. Nagao, T. Oharaseki, A. Hasegawa, A. Ishida-Okawara, N. N. Miura, N. Watanabe, M. Handa, K. Takahashi, N. Ohno, H. Minamitani, T. Nakayama, T. Arai. Contribution of CD69 to the development of coronary arteritis induced with a vasculitis Inducer *Candida albicans* water soluble fraction. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  10. Hoshino, T. Nagao, K. Murayama, A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, K. Uno, E. Muso, N. Nagi-Miura, N. Ohno, S. Naoe, K. Tokunaka, M. Yasuhara, K. Yamamoto and K. Suzuki. Trace of antibody to myeloperoxidase (MPO) with nanocrystal quantum dots-labeled antibody recognizing activating neutrophils in glomerulonephritis and a vasculitis inducer CAWS-injected mice. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
  11. T. Ito-Ihara, K. Uno, T. Ono, A. Fukatsu, T. Kita, K. Suzuki, and E. Muso. Circulating myeloperoxidase and cytokine profiles in myeloperoxidase- antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 3rd World Congress of Nephrology. Singapore.
  12. Kura F, Kobayashi S, Amemura-Maekawa J, Aratani Y, Suzuki K, Watanabe H. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Legionella pneumophila*. 6th International Conference on Legionella. October 16-20, 2005, Chicago, USA.
  13. Miura NN, Komai M, Shingo Y. Adachi Y, Okawara AI, Oharaseki T, Takahashi K., Naoe S, Suzuki K, Ohno N. Cytokine synthesis of splenic lymphocytes in murine coronary arteritis model induced by CAWS (*Candida albicans* water-soluble fraction) administration. International Cytokine Society Conference 2005, October 27-31, 2005, Seoul, Korea.
  14. Suzuki K. Estimation of the development of rapid progressive glomerulonephritis (RPGN) by the Quantum Dots. International Symposium on Colloidal Quantum Dots for Bio-Medical Applications and Their Safety, November 26, 2005, Kobe, Japan.
  15. A. Hoshino, T. Nagao, K. Fujioka, T. Ito-Ihara, K. Uno, E. Muso, K. Murayama, A. Ishida-Okawara, N. Nagi-Miura, N. Ohno, S. Naoe, K. Tokunaka, M. Yasuhara, K. Yamamoto, and K. Suzuki. Trace of Antibody to Myeloperoxidase with Nanocrystal Quantum Dot-Labeled Antibody Recognizing Activating Neutrophils in Glomerulonephritis and Vasculitis Inducer *Candida albicans* Water-Soluble Glycoprotein-Injected Mice. The International Society for Optical Engineering-BIOS 2006 - Symposia - Photonics West 2006 - Program - Conferences 21-26 January 2006, San Jose, California, USA
  16. K. Suzuki. Needs of Synthetic IVIg in the World. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  17. T. Nozu, M. Kondo, K. Suzuki, A. Nagai, Prevalence and clinical manifestation of pulmonary fibrosis in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  18. K. Takahashi, K. Suzuki, et al. The Effect of Synthetic Immunoglobulin (SyIG) in Mice Vasculitis Model caused by CAWS. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  19. N. Ohno, K. Suzuki, et al. Culture condition modulates active moiety of CAWS, vasculitis inducer from *C. albicans*. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
  20. A.I. Okawara, K. Suzuki, et al. Activation of neutrophils in the initial step of arteritis induction by CAWS. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of

Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.

21. T. Ito-Ihara, K. Suzuki, et al. Circulating Levels of IL-12, 23 and IL-18 in Patients with MPO-ANCA-associated Vasculitis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
22. T. Ono, K. Suzuki, et al. The relationship between renal lesions and lung vascular lesions in SCG/Kj mice as a model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
23. W. Yumura, K. Suzuki, et al. A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis – Analysis of Pathogenesis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
24. Y. Yamanishi, K. Suzuki, et al. Usefulness of nMPO-ANCA in diagnosing and treating vasculitis - discrepancy between MPO-ANCA and nMPO-ANCA-. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.
25. M. Furutani, K. Suzuki, et al. Synthetic polyclonal immunoglobulin. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. February 7, 2006, Tokyo, Japan.

#### 国内会議

1. 荒谷康昭, 倉 文明, 渡辺治雄, 高野幸枝, 鈴木和男, 小山秀機 真菌感染と好中球機能 第78回 日本細菌学会総会シンポジウム 4月4日-5日 (東京)
2. 多田 壘, 三浦典子, 安達禎之, 鈴木和男, 大野尚仁 Candida albicans 菌体由来多糖画分と LPS (E. coli O9)の免疫化学・生物活性の交差反応性の解析 第78回日本細菌学会総会 4月4日-6日 (東京)
3. 鈴木和男 安全なガンマグロブリン製剤ー血管炎治療をめざしてー 第12回代替血液学会 6月6-7日 (東京)
4. 原田 敏江, 川南 裕美, 三浦 典子, 安達 禎之, 鈴木 和男, 大野 尚仁 真菌多糖による GM-CSF を介したサイトカイン産生誘導機構 生体防御機能ワークショップ 2005 -第2回香川ガレクチンカンファレンス共催 6月9日-10日 (高松)
5. 鈴木和男, 村山研, 長尾朋和, 大川原明子, 大原関利章, 高橋啓, 長谷川明洋, 三浦典子, 大野尚仁, 渡邊直英, 半田誠, 南谷晴之, 野津朋子, 永井厚志, 新井孝夫, 中山俊憲 Candida albicans water soluble fraction(CAWS)によって誘導される冠状動脈炎の発症への CD69 の関与 生体防御機能ワークショップ 2005 -第2回香川ガレクチンカンファレンス共催 6月9日-10日 (高松)
6. 猪原登志子, 古宮俊幸, 宇野賀津子, 田原佐知子, 辻井知美, 塚本達雄, 小野孝彦, 岸田綱太郎, 鈴木和男, 深津敦司, 北徹, 武曾恵理 MPO-ANCA 関連急速糸球体腎炎の血中サイトカインの動態 第48回日本腎臓学会学術総会 6月24日 (横浜)
7. 星野昭芳, 長尾朋和, 村山研, 大川原明子, 猪原登志子, 武曾恵理, 宇野賀津子, 三浦典子, 大野尚仁, 直江史郎, 徳中一寛, 安原真人, 山本健二, 鈴木和男 血管炎発症初期の好中球活性化に関与する血中サイトカインの変動と QD 標識 MPO 抗体の *in vivo* トレース 第70回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7月20-21日 (京都)
8. 長尾朋和, 村山研, 大川原明子, 大原関利章, 高橋啓, 長谷川明洋, 三浦典子, 大野尚仁, 渡邊直英, 半田誠, 南谷晴之, 野津朋子, 永井厚志, 新井孝夫, 中山俊憲, 鈴木和男 CD69 関与の血管炎発症に連動する8種サイトカインの挙動第70回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7月20-21日 (京都)
9. 猪原登志子, 宇野賀津子, 古宮俊幸, 辻井知美, 塚本達雄, 岸田綱太郎, 小野孝彦, 鈴木和男, 深津敦司, 北徹, 武曾恵理 ANCA

- 関連血管炎症候群における IL-12 と IL-18 の動態 第 70 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 7 月 20-21 日 (京都)
10. 武曾恵理、猪原登志子、古宮俊幸、宇野賀津子、岸田綱太郎、鈴木和男 シンポジウム 1 『生体防御異常が誘発する難治性疾患』難治性血管炎の発症機序と治療戦略第 16 回日本生体防御学会学術総会 8 月 4 日～8 月 6 日 (東京)
  11. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、高野幸枝、赤川久義、鈴木和男、小山秀機好中球の機能異常が誘発する真菌感染 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8 月 4 日～8 月 6 日 (東京)
  12. 亀岡洋祐、伊東玲子、笠間毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、鈴木和男 ミエロペルオキシダーゼ遺伝子コード領域の多型 (SNP) と炎症性疾患の重篤度との関係 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8 月 4 日～8 月 6 日 (東京)
  13. 倉文明、小林静史、前川純子、常彬、荒谷康昭、鈴木和男、渡辺治雄 シンポジウム 3 『生体防御の役割をになう新ファミリー NOX: 植物-動物』*Legionella pneumophila* に対する感染防御機構、NOX2 など 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8 月 4 日～8 月 6 日 (東京)
  14. 鈴木和男 パネルディスカッション『感染症防御-歴史と新しい研究アプローチに向けて』 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8 月 4 日～8 月 6 日 (東京)
  15. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、柏村信一郎、岡村春樹、大野尚仁、鈴木和男血管炎を誘導する CAWS 投与初期のマウス好中球活性化とサイトカインの変動 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8 月 4 日～8 月 6 日 (東京)
  16. 長尾朋和、村山研、野津朋子、大川原明子、大原関利章、高橋啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田誠、南谷晴之、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 CD69 分子と活性化好中球による血管炎発症 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8 月 4 日～8 月 6 日 (東京)
  17. 星野昭芳、長尾朋和、村山研、大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、宇野賀津子、三浦典子、大野尚仁、直江史郎、徳中一寛、安原真人、山本健二、鈴木和男量子ドット(QD)標識抗マウス MPO 抗体を用いた血管炎発症に関わる活性化好中球 MPO 分子の蛍光による検出 第 16 回日本生体防御学会学術総会 8 月 4 日～8 月 6 日 (東京)
  18. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのクリプトコッカス感染防御能の低下 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15～16 日 (福岡)
  19. 大野尚仁、篠原弘靖、三浦典子、石橋健一、安達禎之、大川原明子、鈴木和男、大原関利章、高橋啓、直江史郎 真菌由来の PAMPs, *Candida albicans* Water-soluble fraction (CAWS) の血管炎惹起能における  $\beta$ マンノース残基の影響 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15～16 日 (福岡)
  20. 亀岡洋祐、Persad A、鈴木和男 「ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチドに対する抗体の性状 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15～16 日 (福岡)
  21. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒト MPO 分子における MPO-ANCA エピトープ解析 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15～16 日 (福岡)
  22. 武曾恵理、鈴木進子、岩崎由加子、辻井知美、古宮俊幸、米本智美、塚本達雄、猪原登志子、宇野賀津子、鈴木和男 MPO-ANCA 関連腎炎血管炎に合併する悪性疾患症例の解析と考察 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15～16 日 (福岡)
  23. 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群における IL-12, IL-23 と IL-18 の動態 ANCA 関第 11 回 MPO 研究会 10 月 15～16 日 (福岡)
  24. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、柏村信一郎、岡村春樹、大野尚仁、鈴木和男 血管炎を誘導する CAWS 投与初期のマウス好中球活性化とサイトカインの変動 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15～16 日 (福岡)
  25. 鈴木和男、長尾朋和、村山研、大川原明子、大原関利章、高橋啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田誠、南谷晴之、野津朋子、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲 好中球血管炎発症にかかわる CD69 分子と活性化好中球 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15～16 日 (福岡)
  26. 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男血管炎発症機構の解析: MPO-ANCA と好中球の糸球

- 体内皮細胞への作用 第 11 回 MPO 研究会  
10 月 15～16 日 (福岡)
27. 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北徹、武曾恵理 ANCA 関連血管炎症候群における IL-12, IL-23 と IL-18 の動態 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15～16 日 (福岡)
  28. 鈴木和男、星野昭芳、長尾朋和、猪原登志子、宇野賀津子、徳中一寛、大川原明子、三浦典子、大野尚仁 Q ドットによる進行性糸球体腎炎の評価 第 11 回 MPO 研究会 10 月 15～16 日 (福岡)
  29. 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山 研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男血管炎発症機構の解析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用 第 14 回日本バイオイメージング学会 10 月 26～28 日 (東京)
  30. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒト MPO 分子における MPO-ANCA エピトープ解析 第 14 回日本バイオイメージング学会 10 月 26～28 日 (東京)
  31. 鈴木和男 好中球自己抗体 MPO-ANCA の抗原性と病態 第 33 回臨床免疫学会 10 月 28～30 日 (京都)
  32. 鈴木和男 血管炎発症機構における CD69 分子を介する好中球・血小板相互反応第 28 回日本血栓止血学会 11 月 23～25 日 (福岡)
  33. 飛田俊介、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、中山俊憲、大野 尚仁  $\beta$  グルカンをを用いたコラーゲン誘発関節炎モデルにおける CD69 の発現解析第 28 回分子生物学会 12 月 8～10 日 (福岡)
  34. 亀岡洋祐、笠間 毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男 ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチドの細胞内局在 第 28 回分子生物学会 12 月 8～10 日 (福岡)
  35. 松村 実美子、長尾 朋和、三川 浩輝、村山 研、大川原 明子、南谷 晴之、鈴木 和男血管炎発症機構の解析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用 第 28 回分子生物学会 12 月 8～10 日 (福岡)
  36. 野津朋子、松村実美子、大川原明子、長谷川明洋、中山俊憲、永井厚志、鈴木和男 活性化好中球関与の肺血管内皮細胞の機能解析第 28 回分子生物学会 12 月 8～10 日 (福岡)
  37. 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男 ヒト MPO 分子上の MPO-ANCA 結合部位エピトープ解析 第 28 回分子生物学会 12 月 8～10 日 (福岡)
  38. 長尾朋和、大原関利章、長谷川明洋、大川原明子、三浦典子、野津朋子、高橋啓、大野尚仁、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 CD69 contributes to the development of vasculitis 第 35 回免疫学会 12 月 13～15 日 (横浜)
  39. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、大野尚仁、鈴木和男 血管炎を誘導する CAWS 投与初期のマウス好中球活性化 第 35 回免疫学会 12 月 13～15 日 (横浜)
  40. 鈴木和男、星野昭芳、長尾朋和、猪原登志子、宇野賀津子、徳中一寛、大川原明子、三浦典子、大野尚仁 血管炎発症初期の好中球活性化に関する血中サイトカインの変動と QD 標識 MPO 抗体の *in vivo* トレース 第 35 回免疫学会 12 月 13～15 日 (横浜)
  41. 大野尚仁、三浦典子、石橋健一、安達禎之、高橋啓、大原関利章、直江史郎、大川原明子、鈴木和男 *Candida albicans* 由来の血管炎惹起物質 CAWS の活性部位の解析 第 35 回免疫学会 12 月 13～15 日 (横浜)
- G. 知的財産権の出願・登録状況**  
特になし
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

分担報告書

真菌の病原性および薬剤耐性機構の解明

分担研究者 新見昌一 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

主任研究者 上原至雅 国立感染症研究所 生物活性物質部 部長

研究要旨 ABC トランスポーターは、分子内に高度に保存された ATP 結合領域をもち、ATP の加水分解によって機能するタンパク質である。ある種の ABC トランスポーターは、病原微生物や癌細胞で薬剤を細胞外へ汲み出す排出ポンプとして働き、その発現亢進は薬剤耐性を招く。病原真菌の ABC タンパク質はアゾール系抗真菌薬を排出し耐性化する。我々は *C. glabrata* の ABC トランスポーターである Cdr1p について、N 末端側および C 末端側 NBD (nucleotide binding domain) の Walker A motif 内のアミノ酸置換を行ない、排出活性との相関をしらべた。その結果、N 末端側 NBD については、Walker A motif に位置する 188 番目のシステインをアラニンに置換しても排出ポンプ機能はほぼ正常であったが、C 末端側 NBD の Walker A motif 内の 899 番目のリジンをアラニンに置換するとフルコナゾール耐性が完全に失われた。2 つの ATP 結合領域はよく似ており ATP 結合および ATP の加水分解によって ABC トランスポーターの活性を調節する部位であるが、機能的には非対称的に働いていることが考えられる。

A. 研究目的

ABC トランスポーターは、分子内にアミノ酸配列のよく保存された ATP 結合領域をもち、ATP の加水分解を利用して物質の輸送を行うタンパク質である。この種のタンパク質には、トランスポーターだけでなく、レセプターやチャネル機能をもつものもあり、広く ABC タンパク質ファミリーとして知られている。ABC トランスポーターの一般的な構造は、ATP 結合領域 (nucleotide binding domain ; NBD) と細胞膜を 6 回貫通する疎水性領域 (transmembrane domain; TMD) からなり、これが 2 回繰り返された構造 [(NBD-TMD)<sub>2</sub> または (TMD-NBD)<sub>2</sub>

topology] を保っている。ATP 結合領域には Walker A および B motif と ABC signature motif と呼ばれる 3 つの領域 (ATP Binding Cassette) があり、この部分のアミノ酸は生物種を越えてよく保存されている (図 1)。NBD は、トランスポーターのエンジン部分に相当し、分子内の 2 つの ATP 結合部位で ATP が交互に加水分解され、生じたエネルギーによって薬剤を始めトランスポーターの基質となる物質の輸送を行うものと考えられている。近年、細菌や動物細胞における ABC トランスポーター解析の進展に伴って、病原真菌の ABC トランスポーターについても新しい知見が得られつつある。特に病原真

菌のアゾール剤耐性機構に ABC トランスポーターが深く関わっており、*Candida albicans* などの主要な病原真菌から薬剤排出を担う ABC トランスポーター遺伝子が次々とクローン化されてきた。今後はトランスポーターの遺伝的制御、多様な化合物に対する基質認識機構、ATP の結合と加水分解による薬剤排出のメカニズムおよび ABC トランスポーター本来の生理的役割の解明が一層進むことが予想される。本研究においては、*C. glabrata* の ABC トランスポーターである Cdr1p について、N 末端側および C 末端側 NBD の Walker A motif 内のアミノ酸置換を行ない、排出活性との相関をしらべた。

## B. 研究方法

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた遺伝子発現系を開発し、個々の輸送体を高発現させて、その機能をよりよく理解することを試みた。親株として、Pdr5p, Pdr10p, Pdr11p, Pdr15p, Snq2p, Yor1p, Ycf1p の 7 種の主要な ABC 輸送体が破壊されたアゾール剤高度感受性の *S. cerevisiae* AD1-8U 株を用いた。この株は ABC 輸送体の転写因子 *PDR1-3* 変異を有し、転写活性が常時亢進した状態になっている (The gain-of-function *PDR1-3* mutation)。一方、耐性遺伝子を宿主菌体に導入するためのプラスミドベクター pABC3 は、*PDR5* promoter、*PacI-NotI* multiple cloning site および *PGK* terminator を備えている。また *URA3* マーカーと *PDR5* の C-末端配列を染色体内に残しているので、*PDR5* promoter の下流に調べたい耐性遺伝子を挿入後、プラスミドを *AscI* で切断して線状の形質転換カセットを取り出し、これを相同組み換えによって AD1-8U 株の染色体中 (*PDR5* 残存部分) に容易に導入することができる。これまでに *C. albicans*, *C. glabrata*,

*C. krusei*, *C. neoformans* の ABC および MFS 輸送体や、抗癌剤耐性に寄与するヒトの P-glycoprotein をこの発現系を用いて高発現させることに成功している。今回はさらに *C. glabrata* Cdr1p の N 末端側および C 末端側 NBD の Walker A motif 内の機能に重要であると推定されるアミノ酸をアラニン置換し、得られたアミノ酸置換変異株と親株の薬剤感受性を比較した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、健常者や患者を直接対象とする診断・治療の研究は行わないため、倫理面における問題が生じることはない。また研究の過程で必要な動物実験は国立感染症研究所における動物実験倫理委員会の規定に従って実施した。

## C. 研究結果

医真菌の分野ではカンジダを中心に解析が進められているが、その他の病原真菌のアゾール剤耐性に関わる ABC トランスポーターもアミノ酸配列から推測してカンジダの CDR (*Candida* drug resistance) ファミリーのものと同様の構造を有していると考えられる。ATP 結合領域はトランスポーターが機能する上で非常に重要な部分であり、領域内へのランダム変異の挿入やアミノ酸置換の導入などの例を見ても明らかである。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の薬剤排出を担うトランスポーター Pdr5p では、C 末端側 NBD の Walker A motif に G905S と G908S の同時置換が生じた変異株はアゾール剤耐性を完全に失うという報告がなされている。*C. albicans* の ABC トランスポーター Cdr2p では、191 番目のシステインは N 末端側 NBD の Walker A motif 内に存在し ATP との結合あるいは加水分解活性の一端を担っていると想像されるが、これをリジンに置き換えるとアゾール剤耐性は野生



型の50%に減少し、C末端側NBDのWalker A motifにK899Cを導入すると耐性が完全に失われる。同様に*C. albicans* Cdr1pのN末端側NBDにD232KまたはG296D変異や、C末端側NBDにG995S変異が生じると耐性度が低下するという報告がある。今回の我々の研究では、*C. glabrata* Cdr1pのN末端側NBDのWalker A motifに位置する188番目のシステインをアラニンに置換しても排出ポンプ機能はほぼ正常であったが、C末端側NBDのWalker A motif内のK899A置換を行うとフルコナゾール耐性が完全に失われるという結果を得た(図1)。

#### D. 考察

病原真菌 *C. glabrata* の ABC タンパク質 Cdr1p と Pdh1p はアゾール系抗真菌薬を排出し、真菌に薬剤耐性を付与する。我々はこれまでに Cdr1p と Pdh1p を出芽酵母において大量発現させて、タンパク質のリン酸化状態と薬剤排出機能の相関を、抗リン酸化セリン・スレオニン抗体を用いたウエスタンブロット解析により調べた。その結果両者はそれぞれ異なる PKA の触媒サブユニットによってリン酸化されること、またそのリン酸化量がストレスや栄養条件によって変動することが明らかとなった。さらに、Cdr1p の予測されるリン酸化部位を変異させたタンパク質を用いて解析を行ったところ、307番目のセリンと、484番目のセリンをアラニンに置換させると、リン酸化量とATP加水分解活性が低下し、薬剤耐性能も低下することが分った。これらのリン酸化部位は近傍にあるNBD (nucleotide binding domain) の活性を調節し、タンパク質全体の薬剤輸送活性を調節するものと考えられる。今回はN末端側およびC末端側NBDのWalker A motif内の機能に重要であると推定されるアミノ酸を他のアミノ酸に置換して排出活性との相関をしらべ、両NBDは構造的には対称的な位置

にあるが、機能的にはそれぞれが特有の役割を担っていることを明らかにした。

ABCトランスポーターの構造、機能そして調節の仕組みは、これまで主として遺伝学的、生化学的な手法によって調べられて来た。しかしその多くはまだ断片的な観察の累積であり、トランスポーターの全体像を描くためにはこれらの知見を統合すると共に、タンパク質そのものの結晶構造の解析が必要である。膜タンパク質は、可溶性タンパク質に比べて取り扱いが著しく困難であり、その機能(活性)を維持したまま結晶化に成功するためには、タンパク質発現量の増加、膜脂質との相互関係の解明、構造的に均一な分子をそろえることなど解決すべき問題が残されている。今後これらの問題点を解決し、タンパク質の結晶構造が得られるようになれば、変異によって引き起こされるタンパク質の構造変化が機能にどのような影響を及ぼすかが一段とはっきりするようになるであろう。また化合物ライブラリーのスクリーニングによってABCトランスポーターの特異的な阻害剤を探し、タンパク質と阻害剤の共結晶が得られるようになれば、タンパク質の構造に基づいた新規薬剤の開発にも大きく貢献する筈である。

#### E. 結論

2つのATP結合領域は互いによく似ているものの、機能的には非対称的に働いていることが想像される。NBDでのATPの結合あるいは加水分解反応が阻害されると、エネルギー供給が断たれポンプ機能が失われることは容易に想像される。しかし2つのNBDが互いに非対称的に働くのであれば、それらはどのような関わり方をしているのだろうか。この点を解明することがABCトランスポーターの機能を知る上でひとつの重要な鍵になるであろう

この研究は国立感染症研究所・生物活性物質部の田邊公一、梅山 隆、高野幸枝の各氏、ニュージーランド・オタゴ大学の Erwin Lamping, Kyoko Niimi, Ann R. Holmes, Brian C. Monk および Richard D. Cannon の各博士との共同研究によって行われた。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表  
論文発表

1. Umeyama T, Kaneko A, Niimi M, Uehara Y. Repression of *CDC28* reduces the expression of the morphology-related transcription factors, *Efg1p*, *Nrg1p*, *Rbf1p*, *Rim101p*, *Fkh2p*, and *Tec1p*, and induces cell elongation in *Candida albicans*. *Yeast*, 2006 (In press).
2. Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K and Uehara Y. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 2006 (In press).
3. Holmes AR, Tsao S, Lamping E, Niimi K, Monk BC, Tanabe K, Niimi M and Cannon RD. Amino acid residue affecting drug pump functional in *Candida albicans*. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 2006 (In press).
4. Umeyama T, Kaneko A, Watanabe H, Hirai A,

Uehara Y, Niimi M and Azuma M. Deletion of the *CaBIG1* gene reduces  $\beta$ -1, 6-glucan synthesis, filamentation, adhesion, and virulence in *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 2006 (In press).

5. Murayama SY, Negishi Y, Umeyama T, Kaneko A, Oura T, Niimi M, Ubukata K, Kajiwara S. Construction and functional analysis of fatty acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans* *Microbiology*, 152, 1551-1558, 2006.
6. Niimi, K., Maki, K., Ikeda, F., Holmes A. R., Lamping, E., Niimi, M., Monk, B. C., and Cannon, R. D. Overexpression of *Candida albicans CDR1*, *CDR2*, or *MDR1* does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1148-1155, 2006.
7. Shimokawa O, Niimi M, Kikuchi K, Saito M, Kajiwara H, and Yoshida S. Relationship between MIC and minimum sterol 14  $\alpha$ -demethylation-inhibitory concentration as a factor in evaluating activities of azoles against various fungal species. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5547-5549, 2005.
8. Sugita T, Kikuchi K, Makimura K, Urata K, Someya T, Kamei K, Niimi M, Uehara Y. *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7626-7629, 2005.
9. Lamping E, Tanabe K, Niimi M, Uehara Y,

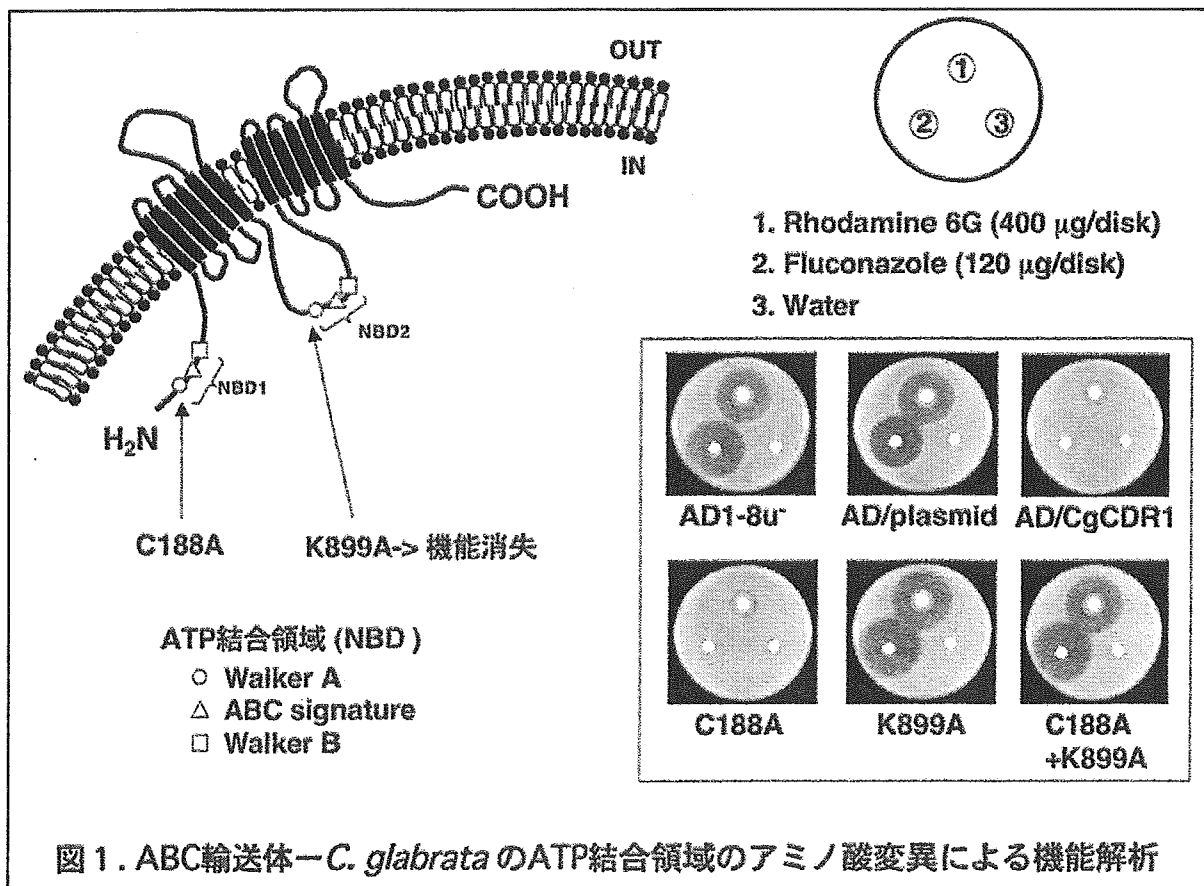
- Monk BC, Cannon RD. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae sec6-4* mutation and tools to create *S. cerevisiae* strains containing the *sec6-4* allele. *Gene* 361, 57-66, 2005.
10. Hanaoka N, Umeyama T, Ueno K, Ueda K, Beppu T, Fugo H, Uehara Y, and Niimi M. A putative dual-specific protein phosphatase encoded by *YVHI* controls growth, filamentation, and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology*, 151, 2223-2232, 2005.
11. 新見昌一、田辺公一、和田俊一、山崎亜希子、上原至雅、Kyoko Niimi, Erwin Lamping, Ann R Holmes, Brian C. Monk, Richard D. Cannon 病原真菌のABCトランスポーター 機能解析に関する最近の知見-日本医真菌学雑誌 46, 249-260, 2005
- 学会発表
1. Kikuchi K, Niimi M, Totsuka K, Uchiyama T. Reduced activity of micafungin against *Candida dubliniensis* strains isolated from blood 45th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 15-19 December, 2005 Washington DC, USA
2. Holmes AR, Tsao S, Niimi K, Lamping E, Niimi M, Kaneko A, Monk BC, Cannon RD. Amino acid residues critical for drug pump function in *Candida albicans* 2005 Joint Meeting of New Zealand Microbiology Society and New Zealand Society for Biochemistry and Molecular Biology 22-25 November, 2005 Dunedin, New Zealand
3. Niimi K, Maki K, Ikeda F, Holmes AR, Lamping E, Niimi M, Monk BC, Cannon RD. Micafungin is not an efflux pump substrate 2005 Joint Meeting of New Zealand Microbiology Society and New Zealand Society for Biochemistry and Molecular Biology 22-25 November, 2005 Dunedin, New Zealand
4. 田辺公一、高野幸枝、岡和田敦、上原至雅、新見昌一 病原真菌ABCタンパク質と機能阻害物質との相互作用部位の検討 第79回日本細菌学会総会 平成18年3月29-31日 金沢
5. 村山そう明、根岸由美子、梅山 隆、金子亜希、新見昌一、生方公子、梶原 将 *Candida albicans* 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子破壊株の作製とDNAアレイ解析 第79回日本細菌学会総会 平成18年3月29-31日 金沢
6. 村山そう明、根岸由美子、梅山 隆、金子亜希、新見昌一、生方公子、梶原 将 *Candida albicans* 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子破壊株の作製と機能解析 第49回日本医真菌学会総会 平成17年10月6-7日 幕張
7. Niimi K, Maki K, Ikeda F, Holmes AR, Lamping E, Niimi M, Monk BC, Cannon RD. Micafungin is not an efflux pump substrate 第49回日本医真菌学会総会 平成17年10月6-7日 幕張
8. 菊池賢、杉田隆、池田玲子、亀井克彦、榎村浩一、新見昌一、上原至雅 我が国の洞

窟探検家の抗ヒストプラスマ、抗トリコスポロン抗体価と洞窟入洞後の呼吸器症状との関連について 第49回日本医真菌学会総会 平成17年10月6-7日 幕張

雅、新見昌一 病原真菌のABCタンパク質の作用メカニズムの解明に向けて 第2回真菌若手研究会 平成17年9月30日-10月1日 千葉大学真菌医学研究センター

9. 田辺公一、Kyoko Niimi、Erwin Lamping、Richard D. Cannon、Brian C. Monk、上原至

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



分担報告書

コクシジオイデス症病原体検出用プライマーの設計とコクシジオイデス症遺伝子診断法の開発

上原至雅、梅山 隆 (国立感染症研究所生物活性物質部)、新見昌一、西村和子 (千葉大学真菌医学研究センター)、亀井克彦、佐野文子 (千葉大学真菌医学研究センター)

主任研究者 上原至雅 国立感染症研究所 生物活性物質部 部長

分担研究者 亀井克彦 千葉大学真菌医学研究センター 教授

分担研究者 新見昌一 国立感染症研究所生物活性物質部 室長

研究要旨 本研究において、コクシジオイデス症真菌に特異的な遺伝子領域に対して PCR 法プライマーを設計することにより、特異性に優れたコクシジオイデス症病原体遺伝子検出系を開発した。さらに、その検出系が *C. immitis* と *C. posadasii* を容易に区別できることを明らかにした。これにより真菌培養を介さない簡便かつ迅速なコクシジオイデス症診断が臨床現場で可能となり、検査室事故の危険性を軽減させることが出来る。また、産業上の利用可能性として本研究によるプライマーセットを用いた PCR 検出系は、コクシジオイデス症の体外診断薬としての実用化が期待できる。

A. 研究目的

コクシジオイデス症は感染症法第四類感染症全数把握疾患に規定された唯一の真菌症である。本症は米国西南部 (カリフォルニア州、ネバダ州、ユタ州、テキサス州、ニューメキシコ州、アリゾナ州)、メキシコ北部、アルゼンチンのパンパ地域、ベネズエラのファルコン州の半乾燥地域の風土病で、土壤中に生息する *Coccidioides immitis* および *Coccidioides posadasii* が原因真菌である。真菌としては最も感染力が強くて危険である。日本国内ではこれまで 42 例あまりが発症し、約 85% がアメリカ合衆国での感染例である。近年は増加が著しく、毎年 3-4 名の発病が確認されている。コクシジオイデス属は感染力が強いため健常者でも感染する例が多く、検査中の感染事故が起りやすい。

コクシジオイデス症は特異的抗体の検出に

よって診断がなされる場合が多い。しかし、深在性真菌感染症のリスクが特に高い免疫不全患者においては感染しても抗体が産生されない可能性があるため、診断できないという問題点がある。また、臨床検体から真菌を培養・同定することによって感染症の診断がなされる場合、培養はバイオセーフティーレベル 3 実験室に限られており、さらに、培養に数週間を要するため、真菌の培養を介さない診断検査法の開発が強く望まれている。近年、感染症の検査法として遺伝子診断が広く導入されるようになり、コクシジオイデス症においても ITS (internal transcribed spacer) 領域や proline rich antigen を標的とした PCR 検出法が報告されているが、非特異的検出の問題により実用化には到っていない。そのため、コクシジオイデス属真菌を特異的に検出する PCR 法プライマーの設計とその評価が必要であった。

*C. posadasii* は、以前は非カリフォルニア型 *C. immitis* として認識されていた菌種である。臨床症状、表現型にほとんど差が無いにも関わらず、その一塩基多型の多さから *C. immitis* とは別菌種として認識される経緯となった。これらの2つの種はマイクロサテライトを含む領域の長さや真菌酵素をコードする遺伝子内の変異によって識別される。現在のところ、临床上、2菌種を識別する重要性は低い、生息地域によって異なる遺伝子多型が存在している点で進化生物学的に興味深い対象として研究が行われている。

本研究は、PCR法によりコクシジオイデス属真菌遺伝子を実験的に検出し、*C. immitis* および *C. posadasii* を区別するためのプライマー配列を提供することを目的とした。

## B. 研究方法

これまで開発されている遺伝子診断法では、近縁種との交差増幅が頻繁に認められるなど、特異性に問題があった。この問題を解消するために、*Coccidioides* 属のDNAを検出可能かつ、*Coccidioides* 属以外の真菌由来のDNAでは陰性になるようなプライマーの開発が必要となる。そのために、米国 Broad Institute において既に公開されている *C. immitis* のゲノム配列より、PCRで720 bpを増幅できる領域を数ヶ所選別した。その領域を増幅するための20 merのプライマーを設計し、*C. immitis* のゲノムDNAに対してDNA増幅を行った。

## C. 研究成果

プライマーセット Coi9-1 を用いたPCR検出系により、5株の *C. immitis* 由来のDNAより720 bp、14株の *C. posadasii* 由来のDNAより630 bpのDNA断片を増幅することが示された。塩基配列の解析により、その増幅産物の長さの違いは90 bpの欠失によることが判明した。従来、2菌種の識別には数塩基の違いを検出するフラグメント解析や1塩基変異を検出するための塩基配列解析が必要であったが、本研究によって開発したPCR検出法によりアガロースゲル電気泳動による解析のみで識別が可能になった。

病原真菌に対するPCR検出系の特異性およびコクシジオイデス属真菌以外の病原真菌(60菌種、73株)に対する非特異性も検討した。本PCR検出系においてはコクシジオイデス属真菌

以外の病原真菌を検出しないことが示された。

以上、特異プライマーセットをPCR検出系に用いた場合、コクシジオイデス属真菌を実験的に検出し、分類学上非常に近い2菌種 *C. immitis* と *C. posadasii* を容易に識別できることを初めて明らかにした。

## D. 考察

本研究により、真菌培養を介さない簡便かつ迅速なコクシジオイデス症診断が、臨床現場で可能となる。それにより、検査室事故の危険性を軽減させることが出来る。また、産業上の利用可能性として本研究によるプライマーセットを用いたPCR検出系は、コクシジオイデス症の体外診断薬としての実用化が期待できる。

## E. 結論

コクシジオイデス症真菌に特異的な遺伝子領域に対してPCR法プライマーを設計することにより、特異性に優れたコクシジオイデス症病原体遺伝子検出系を完成した。さらに、その検出系が *C. immitis* と *C. posadasii* を容易に区別できることを明らかにした。

## F. 健康危険情報

なし。

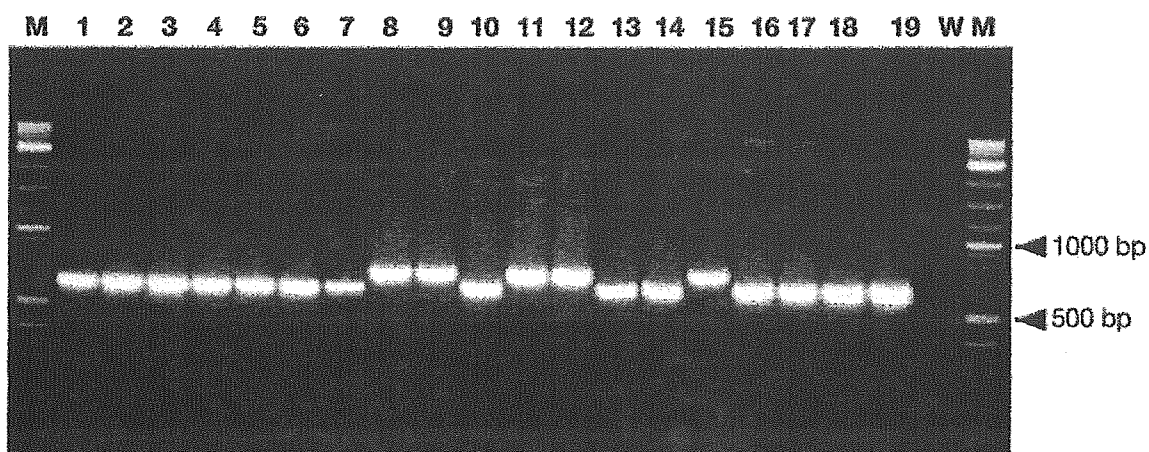
## G. 研究発表

論文発表

Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K and Uehara Y. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 2006 (In press).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中 上原至雅、梅山 隆、新見昌一、西村和子、亀井克彦、佐野文子 コクシジオイデス症病原体検出のためのプライマー



lane	IFM	Identification	lane	IFM	Identification
M	Marker		11	46868	<i>C. immitis</i>
1	4935	<i>C. posadasii</i>	12	50992	<i>C. immitis</i>
2	4945	<i>C. posadasii</i>	13	50993	<i>C. posadasii</i>
3	45809	<i>C. posadasii</i>	14	50994	<i>C. posadasii</i>
4	45810	<i>C. posadasii</i>	15	50995	<i>C. immitis</i>
5	45811	<i>C. posadasii</i>	16	51112	<i>C. posadasii</i>
6	45812	<i>C. posadasii</i>	17	54194	<i>C. posadasii</i>
7	45813	<i>C. posadasii</i>	18	54195	<i>C. posadasii</i>
8	45815	<i>C. immitis</i>	19	54196	<i>C. posadasii</i>
9	45816	<i>C. immitis</i>	W	Distilled water	
10	45817	<i>C. posadasii</i>	M	Marker	

図1. PCR 検出系による *C. immitis* と *C. posadasii* の識別

コクシジオイデス属真菌 DNA を用いて、プライマーセット Coi9-1 による PCR 増幅を行い、増幅産物をアガロースゲル電気泳動で解析した結果。*C. immitis* および *C. posadasii* 由来 DNA からの増幅産物はそれぞれ 720 bp および 630 bp を示し、DNA 断片のサイズの違いで識別が可能であることを示した。

平成17年度厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業  
研究協力者報告書

日本病理剖検輯報を検索対象とした深在性真菌症の疫学調査 - - - - - 91

久米 光 (北里大学医学部病理学講座)  
渋谷和俊 (東邦大学医学部病院病理学講座)  
上 昌広 (東京大学医科学研究所)

*Coccidioides* spp. の多種遺伝子配列に基づいた再同定 - - - - - 98

佐野 文子 (千葉大学真菌医学研究センター)



協力研究報告書

日本病理剖検輯報を検索対象とした深在性真菌症の疫学調査

研究協力者 久米 光 北里大学医学部病理学講座 講師

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

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 日本病理剖検輯報を検索対象として病理解剖例における深在性真菌症の発生動向を調査解析した結果、新規抗真菌薬の上市とも相俟って 1. 深在性真菌症は一時的にその発生頻度が減少の傾向を示したが、その後再び増加の傾向にあること。2. 発生頻度が減少傾向しはじめる 1990 年以降、従来最も頻度が高かったカンジダ症に代わってアスペルギルス症が最も高い頻度を占めるようになり、この傾向は白血病（MDS を含む）剖検例においてより顕著であった。

A. 研究目的

近年、造血器疾患や癌腫あるいは臓器移植や造血幹細胞移植例における重篤な深在性真菌感染例の増加が指摘されている。

このように、量的また質的に新たな様相を示しつつある深在性真菌症のわが国における現状について、日本病理剖検輯報を対象に検索した。日本病理剖検輯報から得られる情報の正確性について問題がない訳ではが、病理解剖は、ヒトの疾病を全身的視野で確実に捉え得る具体的な手法の一つである。加えて日本病理剖検輯報はわが国の大学病院、国公立病院および私立の大病院など、剖検施設を有する病院における全病理剖検例を集積したもので、検索母集団が全国レベルと極めて大きいことから、疫学的解析の対象として極めて

有用であり、かかる解析結果は本症に対する臨床的認識、本症の診断・治療との関わりに有益な情報を提供し得るものと考ええる。

B. 研究方法

検索対象および方法

検索対象：日本病理剖検輯報（日本病理学会編）を検索対象とした。なお、集載例のうち死産児については検索対象から除外した。

集計法と基準：剖検輯報に記載された 1 症例ごとに性別、年齢、臨床診断名、真菌感染様式（単独、重複）、起因真菌属名、直接死因（真菌症が主病変または○が付された副病変）か否か、感染類型（全身性、敗血症（菌血症））、罹患臓器、造血幹細胞移植の有無および移植例における移植片対宿主病（GVHD, The

graft-versus-host disease) の続発の有無をそれぞれ各年次ごとに解析用のデータベース (Filemaker Pro version3.0、Claris Co. 千代田区、東京) に入力・集積した (但し、1989 年以前のものについてはマークシートを用いた)。なお、データベースへの入力に際して、臨床診断名 (基礎疾患名) は、随時追加作成した大分類 (A 項、75 分類)、小分類 (B 項、130 分類) に従って、コード化したコード No. または略号を、また罹患臓器についても 35 臓器について同様にコード化したコード No. を用い、起因真菌名については属名の略号、年齢および起因真菌名以外の他の検索項目については各々数値および符号を用いた。なお、ニューモチスティス肺炎および真菌症類似疾患とされるノカルジア症ならびにアクチノミセス症は集計から除外した。

真菌症の重篤度の基準：剖検輯報に記載されたもののうち、真菌症が、1. 主病変 (死因にもっとも支配的となった疾患名) および番号に○が付された副病変 (直接死因となった副病変) として記載された症例、2. 真菌性菌血症、3. 真菌性敗血症、4. 全身性真菌症、5. 真菌性両側性気管支肺炎 (肺炎)、および 6. 真菌による罹患臓器が脳を含んだ 2 臓器系以上、あるいは 3 臓器系以上の症例を重篤型とした。なお、ここに云う臓器系とは消化器系、呼吸器系、循環器系および腎・尿路系の 4 臓器系および生殖系、神経系、内分泌系ならびに筋・運動系を一括したその他の臓器系の 5 臓器系である。

## C. 成績

### 1. 深在性真菌症の年次的推移

日本病理剖検輯報の記載から抽出した深在性真菌症の発現頻度を眺めて見ると、図 1 に示したように 1969 年以降、確実に増加の一途を辿っている。

しかしながら、剖検総数に対する頻度は 1989 年、1990 年の 4.6%、4.7% をピークに、その後減少傾向を示した (1994 年、3.2%) が 1997 年では 4.3%、最も新しい検索年次である 2001 年では 4.6% と、再び増加の傾向を示している。しかも減少し始める 1990 年以降、起因真菌別頻度が逆転し、カンジダ症に代わってアスペルギルス症が最も高い頻度を占めるようになり、経年的にその差は広がりつつある。

病理剖検例にみる深在性真菌症の近年にみる変貌の理由として、1. 新規抗真菌薬の登場 (フルコナゾール 1989 年) や本症に対する経験的治療の普及が大きく関わるが、他方 2. 重篤なカンジダ症やアスペルギルス症などにたいする治療に、2001 年の段階では限界があったこと、を示唆する。

### 2. 起因真菌別症例数

2001 年度の検索成績から、内臓真菌症例 1,165 例のうち真菌による重複感染例 40 例を除いた単独感染例 1,125 例の起因真菌別症例数を図 2 に示した。アスペルギルス症は 536 例と全体の 47.6% を占め、単に真菌症と記載された (病原真菌不明) 164 例のうち、半数近くの症例がアスペルギルス症であろうこと

を合わせ勘案すれば、剖検例にみる起因真菌別頻度はアスペルギルス症が 50%以上を占めよう。なお、重複感染 40 例の起因真菌別組み合わせは、*Aspergillus* + *Candida* が 21 例、*Aspergillus* + 接合菌が 8 例、*Aspergillus* + *Cryptococcus* が 5 例、*Aspergillus* + 病原真菌不明、*Candida* + *Cryptococcus* が各々 2 例、*Aspergillus* + *Fusarium*、*Trichosporon* + 病原真菌不明が各々 2 例、計 40 例であった。

### 3. 主な病型・罹患臓器別における起因真菌別頻度

同様に 2001 年度の検索成績から、主な病型・罹患臓器における起因真菌別頻度を図 3 に示した。罹患臓器・病型では呼吸器感染が最も多く、全体の 67.3%を示している。また、呼吸器感染例ではそのうち 61.7%がアスペルギルス症で、全身性と表記された症例においてもアスペルギルス症が 46.8%と高頻度であった。また、腎・尿路感染および敗血症ではカンジダ症の頻度が高く、約半数(48.5%、48.9%)を占めた。また、中枢神経系への感染ではクリプトコックス症が 41.3%と最も高頻度であった。なお、起因真菌別対象症例数はカンジダ症 229 例、アスペルギルス症 523 例、クリプトコックス症 75 例、接合菌症 42 例、トリコスポロン症 1 例(全身性)、ヒストプラズマ症 1 例(呼吸器感染)、病原真菌不明 136 例の計 1,007 例である。

### 4. 起因真菌別にみた重篤例の占める頻度

2001 年度に記載された全真菌症例 1,165 例の起因真菌別にみた重篤型の占める割合を

図 4 に示した。ヒストプラズマ症 2 例およびトリコスポロン症 1 例は何れも重篤型の範疇で、次いで重複感染例 40 例中 34 例(85%)、接合菌症 41 例中 33 例(80.5%)と重篤例が占める割合が極めて高かった。また、症例数として最も多かったアスペルギルス症では 536 例中 341 例(63.6%)が重篤なものであったが、非重篤型とした菌球症や片側性の気管支肺炎が少なくなかったことに起因しよう。カンジダ症および起因真菌不明の症例では、何れも重篤例の占める割合は半数以下であった(132 例/319 例(41.4%)および 74 例/164 例(45.1%)。

なお、ここでは成績を割愛したが真菌症の各年齢域別発現頻度は真菌症総数を母集団とした場合、何れの年次においても 60 歳台に最も高かった。また、男女別の罹患頻度は男性に多い傾向を示し、とくにこの傾向はアスペルギルス症、接合菌症などで明かであった。

### 5. 基礎疾患別内訳

剖検輯報 2001 年度における真菌症例総数を母集団とした場合の基礎疾患別頻度を図 5 に示した。従来からの指摘のごとく白血病、癌腫および悪性リンパ腫などに高い頻度でみられるが、従来と異なる最近の傾向として細菌感染症(肺炎、敗血症など起因菌の記載がないものは全て細菌感染症とした。ただし、間質性肺炎は基礎疾患を呼吸器疾患とした)に高い頻度でみられる。また、臨床的に真菌症と診断されていることも最近の大きな特徴である。なお、それぞれの基礎疾患別剖検総数を母集団とした場合、白血病に続発をみる頻度に大きな差はなく 20%から 25%であるが、例

えば癌腫では3.5%と図5で示した頻度よりかなり低い。

#### D. 結語

疫学的立場からみた、わが国における深在性真菌症の現状を明らかにすべく、日本病理剖検輯報を対象として検索、解析した。

そして、1993年以來、カンジダ症が減少傾向を示し、これに代わってアスペルギルス症の明らかな増加の傾向がみられ、このアスペルギルス症の増加の傾向は年次を追ってより顕著となりつつあることを指摘した。

なお、臨床的に遭遇する頻度ともあわせ勘案して、カンジダ症による死亡例が減少傾向にあることは事実であるが、臨床的に経験されるカンジダ症の頻度と死亡例や病理解剖において記載されるカンジダ症の頻度とは異なることを付記しておきたい。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

関連論文(著書、原著、2006年度)

1. 久米 光、田口文章、壇原宏文：  
第1編、第4章 微生物の分類学 p30-41  
第6章 微生物の構造体 p55-80

第7章 微生物の代謝 p81-100

第8章 微生物の増殖と培養 p101-130

第2編、第3章 病原体の病原性因子, p207-260  
基礎病原微生物学、壇原宏文、田口文章(編)、  
広川書店、東京、2006.

2. 久米 光：第3編、第2章 病原真菌学  
p504-522、第5編、第2章 真菌学実習 p700-713、  
基礎病原微生物学、壇原宏文、田口文章(編)、  
広川書店、東京、2006.

3. 久米 光、山崎敏和、阿部美知子、田沼弘之、奥平雅彦、岡安 勲：白血病(MDSを含む)剖検例における内臓真菌症の疫学-日本病理剖検輯報(1990、1994、1998、2002年版)の解析-日本医真菌学会誌 47: 15-24, 2006.

4. 遠藤平仁、吉田 秀、近藤啓文、久米 光、野村友清：両側の肺空洞病変にアスペルギル感染を合併し抗真菌薬、ミカファンギンとイトラコナゾールの併用療法が有効であった Wegener 肉芽腫症の一例 日本医真菌学会誌 47: 25-29, 2006.

#### G. 知的財産権

なし