

2: プローブの特異性について検討した結果、ALP プローブはアスペルギルス属の検出に有用であった (図 2)。また、*Afut-1* プローブは *A.funigatus* を特異的に検出できる可能性が示唆された (図 3)。手術摘出材料から得られた Papanicolaou 染色細胞診標本 (図 4) と剖検材料から得られたホルマリン固定パラフィン切片 (図 5) における本法の応用例を示した。

3: ALP および *Afut-1* プローブを使用した Two Color FISH 法を試みたところ、両者のプローブに由来するシグナルを観察することができ、同一標本上で同時に二種類の遺伝子を観察することが可能であった。

#### D. 考察

本年度は ALP および *Afut-1* プローブを用いた FISH 法における最適な前処理法を設定し、種々の病理診断材料に応用を試みた。われわれが使用している上記両プローブをホルマリン固定パラフィン切片に使用する際は高い pH 領域の緩衝液中における加熱処理と Proteinase K を用いた蛋白分解酵素処理による二重処理が有効であったが、使用するプローブの長さや種類、ターゲットとする核酸の種類により処理条件は異なることから、個々に条件設定が必要になると考えられた。また、感染動物モデル、手術摘出材料および剖検材料のホルマリン固定パラフィン切片、ならびに Papanicolaou 染色細胞診標本においてもシグナルを検出できることを確認した。これらの結果から、従来、不可能な場合が多かった菌形態による鑑別に際し、アスペルギルス属における菌種レベルまでの鑑別が可能であることが示唆された。

#### E. 結論

これまで、各種真菌の病原因子を探索する目的で遺伝学的アプローチがなされてきたが、既に知られている病原因子の候補は、それ自体が菌特異的なものが多く、これらをプローブとした ISH 法の病理細胞診材料を用いた診断への有用性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

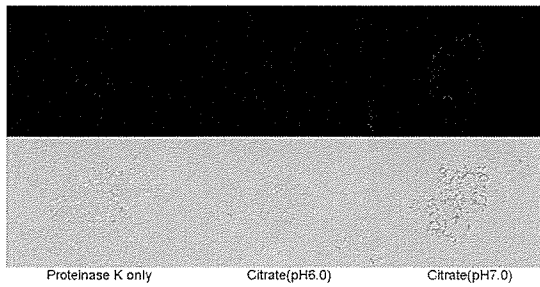
論文発表

1. Hiroi N, Yanagisawa R, Yoshida M, Hiroi M, Endo T, Kawase T, Tsuchida Y, Toyama K, **Shibuya K**, Nakata K, and Yoshino G. Retroperitoneal hemorrhage due to bilateral adrenal metastases from lung adenocarcinoma. *J Endocrinol Invest* 29: 551-4, 2006
2. **Shibuya K**, Paris S, Ando T, Nakayama H, Hatori T, and Latge J. Catalases of *Aspergillus fumigatus* and Inflammation in Aspergillosis. *Jpn J Med Mycol* 47: 249-55, 2006
3. **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, 2005n 71: 3551-62, 2003

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特記すべき事項なし

Comparison of fluorescent intensity of *Afut-1* FISH using different solutions as the unmasking solutions in formalin-fixed, paraffin-embedded sections



Comparison of fluorescent intensity of *Afut-1* FISH using different solutions as the unmasking solutions in formalin-fixed, paraffin-embedded sections

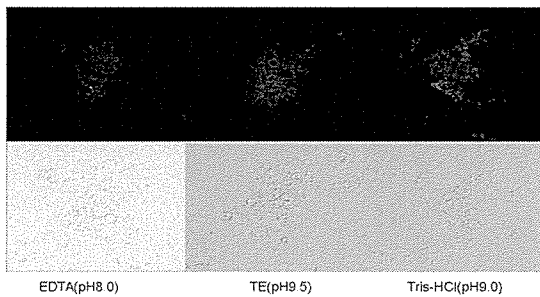


図 1 : ホルマリン固定パラフィン切片を用いた加熱処理溶液の pH と染色強度

Confirmation of ALP probe specificity using formalin-fixed, paraffin-embedded sections

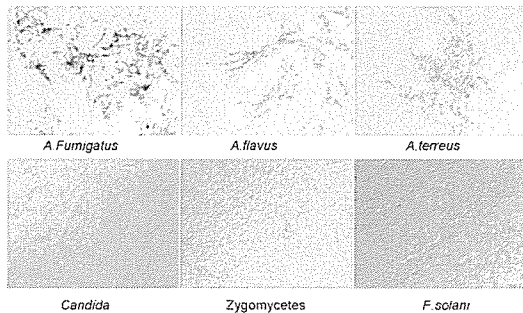


図 2 : ALP プローブの特異性に関する検討。

Confirmation of *Afut-1* probe specificity using formalin-fixed, paraffin-embedded sections

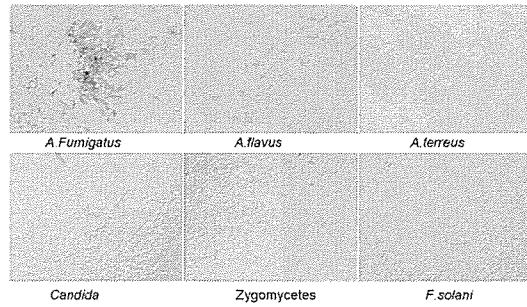
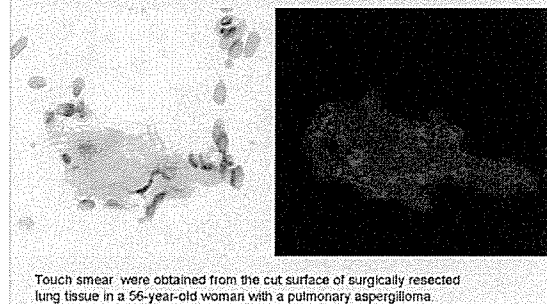


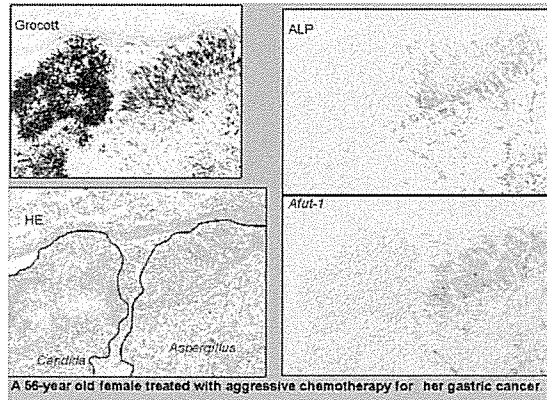
図 3 : *Afut-1* プローブの特異性に関する検討。

ALP FISH applied on previously Papanicolaou -stained touch smear obtained from the section of pulmonary tissue with *Aspergillus* infection



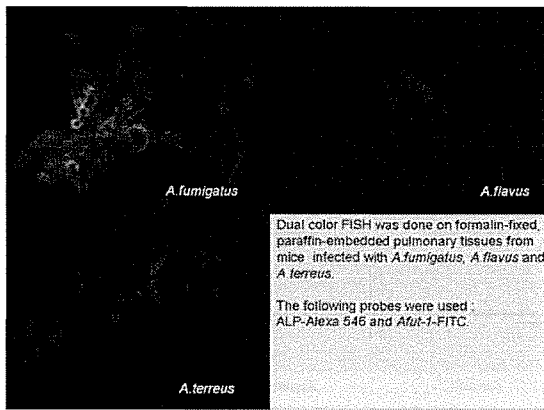
Touch smear were obtained from the cut surface of surgically resected lung tissue in a 56-year-old woman with a pulmonary aspergilloma

図 4 : Papanicolaou 染色標本における FISH 法の応用例。



A 56-year old female treated with aggressive chemotherapy for her gastric cancer

図 5 : アスペルギルスと仮性菌糸を形成するカンジダを同一視野で観察できた剖検症例における ISH 法。両者を明瞭に鑑別することが可能であった。



図：ALP および *Afut-1* プローブを異なる励起波長の蛍光色素で標識して2色FISH法を試みた。

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
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  
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  
研究協力者 久住 英二 東京大学医科学研究所

### 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、日本病理学会の剖検輯報をもとに、悪性腫瘍の原発臓器別に真菌症の頻度を解析した。また、固形癌と、造血器悪性腫瘍である悪性リンパ腫および白血病との頻度の比較をおこなった。真菌症は、カンジダ属、アスペルギルス属、クリプトコッカス属、接合菌について、1990年から4年毎に2002年までの頻度の年次推移を解析した。剖検総数は1990年が20100例、2002年が13371例であった。真菌症の実数は、1990年/2002年でカンジダ属54/35例、アスペルギルス属76/102例、クリプトコッカス属4/2例、接合菌15/9例であった。経時変化では、アスペルギルス属が1994年から1998年にかけて0.4%から0.9%へと頻度が倍増したことが特徴的であった。これは、画像診断や血清学的診断方法の進歩、および真菌症の国際的な診断基準が示されたことが関連していると考えられた。2002年の原発臓器別のアスペルギルス属感染症の頻度は、消化器癌0.9%、呼吸器癌1.2%、悪性リンパ腫4.5%、白血病14.0%であり、消化器癌や呼吸器癌における真菌症の頻度は高くないことが示された。しかしながら、これらの癌の罹患率は造血器悪性腫瘍と比較して高く、真菌感染症を合併する患者実数は多い。これらの癌腫の治療にあたる医師は、感染症合併時や原因不明の発熱時には真菌感染症を鑑別する必要がある。また、末期がん患者における原因不明の発熱に対して、抗真菌剤を用いた経験的治療をおこなうことが症状緩和療法となる可能性が示唆される。

#### A. 研究目的

白血病剖検例の30%程度に真菌症を認め、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。一方、固形癌患者では、白血病などの造血器悪性腫瘍と比較して、抗癌化学療法の治療強度が低く、原疾患および治療による骨髄抑制の

程度が軽度であり、日和見感染症の頻度は少ないと考えられていた。しかしながら、固形癌における真菌感染症の実態は不明であった。近年は化学療法の進歩により、これらの固形癌にも積極的な高強度の抗癌化学療法がおこなわれるようになってきており、これにより日和見感染症の起因菌や頻度も変化している

可能性がある。そこで、癌患者における真菌感染症の実態を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

## B. 研究方法

### 患者背景

日本病理学会の病理剖検輯報を用い、1990年、1994年、1998年、2002年度の剖検データを収集した。病理剖検輯報では、発行年の前年度のデータが記載されるため、1991年、1995年、1999年、2003年発行の輯報データベースを用いた。必要なデータは、データベースから電子データとして抽出した。

病理診断で癌を診断された症例について、カンジダ属、アスペルギルス属、クリプトコッカス属、接合菌の4種の真菌による感染症について調査研究した。

### 診断方法

癌および真菌症は、剖検した病理医により、肉眼的もしくは組織学的に診断された。真菌症の診断は、病理医の知識、および用いた診断方法により、診断精度に差があることが考えられる。

### 疾患分類

癌および真菌症は、『疾病及び関連保健問題の国際統計分類』(International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems)に基づき分類した。1994年以降のデータは10版(ICD-10)に基づき分類し、1990年のデータは9版(ICD-9)に基づいて分類した後、相当するICD-10の項目に振り分けた。

## C. 研究結果

### 剖検数

悪性新生物の原発臓器別の剖検数の推移を図1に示す。剖検数は、全般として減少傾向にある。全体の剖検率は4.7%であるのに対し、甲状腺癌、皮膚癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫における剖検率は高く、乳癌では低かった。

図1

ICD-10	Primary disease site	Number of autopsies				Number of deaths in 2003	Frequency of autopsy (%)
		1990	1994	1998	2002		
C00-C14	Lip, oral cavity & pharynx	418	337	386	273	5618	4.9
C15, C16, C18-C20, C22-C25	Digestive organs	12071	9178	8435	7702	170626	4.5
C32-C34	Respiratory organs	4152	3265	3004	2737	57705	4.7
C43-C44	Skin	129	126	126	140	1075	13.0
C50	Breast	533	437	367	326	9885	3.3
C53-C56	Female genital organs	868	587	509	408	9536	4.3
C61	Prostate	836	741	842	977	8418	11.6
C67	Bladder	417	351	331	306	5412	5.7
C73	Thyroid	676	559	511	502	1427	35.2
C81-C85	Malignant lymphoma	1049	692	678	690	8444	8.2
C91-C95	Leukemia	1222	911	791	727	7018	10.4
	Total	20100	15581	14541	13371	285164	4.7

### 固形癌、悪性リンパ腫、白血病における真菌症の総数

真菌症の実数および頻度(括弧内)を年次別に固形癌、リンパ腫、および白血病について集計し、図2に示した。固形腫瘍では、頻度は低いが、症例数が多いため、実数では造血器悪性腫瘍よりも多い。また、全ての癌において、1994年以前と比較して、1998年以降

に真菌症の頻度が倍増している。

図 2

Year	1990	1994	1998	2002
Solid cancer	205 (1.1%)	122 (0.9%)	334 (2.6%)	284 (2.4%)
Lymphoma	54 (5.1%)	28 (4.0%)	78 (11.5%)	66 (9.6%)
Leukemia	149 (12.2%)	108 (11.9%)	206 (26.0%)	148 (20.4%)

### 疾患カテゴリ別真菌症起因菌の推移

悪性新生物の発生した臓器系統別に、真菌症の実数を調査し、図 3 に示した。

図 3

ICD-10	Primary disease site	Candidiasis				Aspergillosis			
		1990	1994	1998	2002	1990	1994	1998	2002
C00-C14	Lip, oral cavity and pharynx	3	4	8	4	1	3	5	3
C15, C16, C18-C20, C22-C25	Digestive organs	62	37	75	57	26	21	62	66
C32-C34	Respiratory organs	16	10	34	26	20	12	49	32
C42-C44	Skin	1	0	0	1	1	0	1	0
C50	Breast	4	0	3	1	4	2	2	4
C53-C56	Female genital organs	6	4	7	0	4	1	6	7
C61	Prostate	5	2	17	6	2	6	15	16
C67	Bladder	3	2	2	9	1	2	6	5
C73	Thyroid	6	2	6	5	2	2	4	6
C81-C85	Malignant lymphoma	21	7	27	29	24	23	46	31
C91-C95	Leukemia	54	29	59	35	76	66	125	102

ICD-10	Primary disease site	Cryptococcosis				Mucormycosis			
		1990	1994	1998	2002	1990	1994	1998	2002
C00-C14	Lip, oral cavity and pharynx	1	0	1	1	1	1	0	0
C15, C16, C18-C20, C22-C25	Digestive organs	6	5	14	16	5	0	2	2
C32-C34	Respiratory organs	1	1	1	2	0	0	4	0
C42-C44	Skin	0	0	2	0	0	0	0	0
C50	Breast	0	0	1	0	0	0	0	1
C53-C56	Female genital organs	2	0	1	1	0	0	0	0
C61	Prostate	2	0	3	0	0	2	0	1
C67	Bladder	5	0	0	0	0	0	0	0
C73	Thyroid	1	1	1	3	3	2	0	1
C81-C85	Malignant lymphoma	3	0	1	4	6	1	4	2
C91-C95	Leukemia	4	2	5	2	15	11	16	9

### D. 考察

本研究は、白血病同様、悪性リンパ腫、固形癌のいずれにおいても、真菌症が問題であることを明らかにした。

これまで、白血病および骨髄異形成症候群における真菌症が注目されていたが、リンパ腫や固形癌患者における真菌感染症の情報は少なかった。しかしながら、本研究ではリンパ腫における真菌症の罹患率は白血病の半分と高く、固形癌でも白血病の 1/10 の頻度で真菌症を合併している。今後、リンパ腫や固形癌患者における真菌症の臨床、病理像に関するさらなる研究が必要である。

悪性リンパ腫では、化学療法に伴う顆粒球減少の程度は白血病より軽度だが、リンパ腫

自体および高用量ステロイドを使用することによる免疫不全が問題となりうる。本研究ではリンパ腫患者の 10% が真菌症を有していた。このことは、終末期リンパ腫患者において真菌症が common な合併症であることを示している。悪性リンパ腫における真菌症の起因菌はアスペルギルスの頻度が高く、この状況は白血病と同様である。しかしながら、悪性リンパ腫では白血病と比較してカンジダ症の頻度が相対的に高いということが特徴的である。この理由は明らかではないが、リンパ腫では抗真菌薬の予防的投与や経験的治療がおこなわれる頻度が低いことと関係すると考えられる。

固形癌患者における真菌症の頻度は 2.4% と、白血病患者における頻度の 1/10 程度であった。固形癌患者における真菌症の頻度を調査した先行研究における頻度は 1.7% であり、本研究と同等であった。また、本研究において、固形癌の癌種別の真菌症発症頻度に大きな差はなかった。このことは、抗癌治療を行わないような癌種においても真菌症が合併することを意味し、胆癌患者が免疫抑制状態にあるという考えを支持する。起因菌は、カンジダとアスペルギルスが同程度の頻度であり、癌種による明らかな偏りは認められなかった。

真菌症は、発熱および局所症状により進行癌患者の QOL を損ねている可能性がある。しかし、腫瘍医の多くはこの可能性を認識すべきである。本研究は、真菌症が進行癌患者の合併症であり、真菌症対策が症状緩和治療の一環として有用である可能性を示している。

94 年から 98 年にかけて、全ての癌種において真菌症の頻度が増加しているが、98 年から 02 年にかけては増加していない。真菌症の発症がそのような変化をするとは考えにくい。

したがって、真菌症の診断法に大きな変化があったことが示唆される。その理由として、95年から98年にかけて深在性真菌症に対する血清学的診断法、分子生物学的診断法、画像診断法の開発が進んだことが考えられる。診断法の進歩により、真菌症の見逃しが減少したため、真菌症の頻度が増加したものと考えられる。また、臨床医が積極的に深在性真菌症を疑うに従い、病理医も注意して剖検を行うようになったため、剖検診断の率も向上し、一層の真菌症の増加に繋がったと考えられる。

病原菌ごとの経年変化をみると、カンジダ症は1990年から2002年の間に頻度は増加していない。一方、アスペルギルス症は全ての癌種で増加している。このことは、カンジダ症と比較してアスペルギルス症に対する有効な予防法、治療法が確立されていないことを示唆する。ポリコナゾール、ミカファンギンなど新規抗真菌剤の登場により、アスペルギルス症の頻度は低下することが期待される。

本研究の限界として、真菌症の罹患臓器について詳細な記載が剖検輯報に無く、今回の調査では詳しく調べられなかった。深在性真菌症と表在性真菌症が区別されておらず、こ

れらは生命予後に与える影響が全く異なるため、何らかの方法でより詳しく調べることが必要である。本研究は剖検データを用いたため、対象患者にバイアスが存在する。また、真菌症の組織診断は時に難しく、本研究では真菌症の頻度を過小評価している可能性がある。

## E. 結論

真菌感染症は造血器悪性腫瘍のみならず、固形癌においても重大な合併症である。

## 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

なし

### 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。

厚生労働省科学研究費補助金（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動向調査に関する研究」  
分担研究報告書

国内コウモリ・グアノの菌叢解析と新興感染症の診断法開発

分担研究者 杉田 隆 明治薬科大学微生物学教室

研究要旨

1. 岡山県阿哲台を中心とする洞窟・風穴から採取されたコウモリ・グアノサンプルの菌相解析を継続して行った。26ヶ所、94サンプルから非培養法を用いて *Histoplasma* sp.の検出を試みたが、全てのサンプルから検出されなかった。しかしながら、88%の洞窟から *Trichosporon* が分離された。本菌は夏型過敏性肺臓炎の原因抗原であることから、入洞に伴う呼吸器症状は本菌が関与している可能性が改めて示された。これは平成 16 年度の結果に再現性がみられた。
2. *Trichosporon asahii* による深在性トリコスポロン症は予後不良な真菌症の一つである。rRNA 遺伝子を標的とした real-time PCR による非培養検出系を構築した。LA test 陰性検体に対しても本法は陽性を示した。
3. タイ人患者よりアムホテリシン B およびアゾール薬に耐性な新種酵母を分離し、*Candida pseudohamulonii* と命名した。

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が、国内感染と推定される症例が少なくない。南米を中心とした環境調査から本菌はコウモリあるいはその堆積糞(グアノ)からしばしば分離されている。このことから平成 16 年度に国内の洞窟に生息するコウモリの堆積糞の菌叢を解析した。*Histoplasma* は検出されなかったが、夏型過敏性肺臓炎の原因抗原である *Trichosporon* が高頻度に検出された。

本年度も継続して国内洞窟から採取したコウモリグアノから *Histoplasma* の検出を試みた。また、新興感染症の一つであるトリコスポロン症の起因菌 *T. asahii* の非培養検出法の開発を行い、新規な病原真菌の分離を行った。

B. 研究方法

I. コウモリグアノからの *Histoplasma* の検出

1) コウモリグアノサンプル

本研究班分担研究者である順天堂大学菊



池賢先生より分与頂いた 94 検体(26 洞窟)を実験に供した。

## 2) *Histoplasma* の検出

約 1 g のグアノにブレインハート インフュージョンブロースを加え 27°C で 3 日間培養、および滅菌生理食塩に懸濁し、真菌 DNA を抽出した。昨年度に構築した *Histoplasma* DNA 特異的 probe/primer を用いた real-time PCR を用いて *Histoplasma* DNA を検出した。

## 3) グアノサンプル中の真菌叢解析

約 0.5 g のグアノに YM ブロース(含、ペニシリン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール)を加え 27°C で 1 日培養し、培養液を同寒天培地に塗抹した。得られた酵母様コロニーの ITS1-5.8S-ITS2-D1/D2 26S rDNA 塩基配列解析を行ない、当該菌株の同定を行なった。

## II. 臨床検体からの *Trichosporon asahii* の検出

### 1) 患者血清

血液培養によりトリコスポロン症と診断された 21 患者の血清を用いた。

2) Real time PCR を用いた *T. asahii* の検出  
rRNA 遺伝子の IGS1 上に *T. asahii* 特異的な primer および TaqMan probe を設計した。PCR 増幅された IGS1 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) LA test

Serodirect Eiken Cryptococcus test を用いて

抗原検出を行った。

## III. 新規病原真菌の分離

### 1) 菌学的解析

タイ人患者血液より分離された酵母を実験に供した。ITS1-ITS2-D1/D2 26S rDNA の塩基配列から分子系統解析を行い、また EIKEN kit により薬剤感受性を調べた。

## C. 研究結果

### 1. コウモリグアノからの *Histoplasma* の検出

96 検体から *Histoplasma* は検出されなかった。しかしながら、平成 16 年度に続いて *Trichosporon* が高頻度で分離された。96 検体中、71 (76%)、26 洞窟中 23 (88%) から分離された。*Trichosporon* は 5 clades に大別されるが、Ovoides clade 以外のすべての clade から検出された。分離された菌種は系統樹として Fig. 1 に示す。

### 2. 臨床検体からの *Trichosporon asahii* の検出

*T. asahii* のみを検出できる primer/probe を設計した。 $10^1$ ~ $10^8$ /mL のプラスミド濃度では  $r^2=0.999$  の直線的な検量線が得られた。また、*Cryptococcus neoformans* や *Candida albicans* をはじめとした他の病原真菌 DNA とは、反応しなかった。21 検体中 16 検体が LA 反応陽性(1:4~1:64)となった。LA 反応陰性の 5 検体を含めた全検体とも real-time PCR では陽性となった。また、LA 反応による PS 抗原価とプラスミド数には良好な相関性が認められた( $r^2=0.9097$ ) (Fig. 2)。

### 3. 新規病原性真菌の分離

rDNA の塩基配列に基づく分子系統解析から、*Candida* 属に位置する新種と判断され、*Candida pseudohaemulonii* sp. nov. と命名した(Fig. 3)。本株はアムホテリシン B およびアゾール薬 (FCZ, ITZ, MCZ) に耐性を示した。形態を Fig. 4 に示す。

#### D. 考察

平成16年度より継続的に国内コウモリグアノ中からの *Histoplasma* の非培養系による検出を試みている。本年度は本邦で発症例のあった岡山県をサンプルリングの場所を選んだ。阿哲台の洞窟を中心に28ヶ所からサンプルリングしたが、*Histoplasma* は検出された。しかしながら、高頻度で *Trichosporon* が分離されたことと平成16年度の結果と併せると本邦の洞窟熱には *Trichosporon* が深く関与していると推定された。

*Trichosporon asahii* を起因菌とする深在性トリコスポロン症は予後が著しく不良である。特に、近年ではミカファンギンの投与によりブレイクスルー感染症としての報告が増加している。本法は抗原検出法に比べて感度が高いことから、新規診断法としての利用が期待される。

日和見真菌感染症の起因菌は多様化の一途である。これは医療的背景にも起因するが、同定技術の向上が大きく関わっている。この度、見出した *C. pseudohaemulonii* は *C. haemulonii* type 1, 2 と系統枝を形成していた。これらの菌種もアムホテリシ

ン B およびアゾール薬に耐性であることから、系統と薬剤感受性が相関する興味ある例である。なお、本邦では本菌の分離は確認されていない。

#### E. 結論

*Histoplasma* は検出できなかったが、症例が存在することから今後も継続的に分離を試みる必要がある。また、臨床応用可能なトリコスポロン症起因菌の非培養系定量検出法を提供した。日和見真菌感染症の起因菌は多様化の一途であることから、網羅的にこれらを検出するシステムの構築が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表 (原著)

1. [Sugita T](#), Takashima M, Poonwan N, Mekha N: A new amphotericin B and azole-resistant yeast species, *Candida pseudohaemulonii*, isolated from the blood of a patient from Thailand. *Microbiol. Immunool.* 50, 469-473, 2006.
2. [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, 2006.
3. [Sugita T](#), Shiraki Y, Hiruma M: Real-time PCR TaqMan assay for detecting *Trichophyton tonsurans*, a causative agent of tinea capitis, from hairbrushes. *Med. Mycol.* 44, 579-581, 2006.

4. Sugita T, Tajima M, Tsubuku H, Tsuboi R, Nishikawa A: A new calcineurin inhibitor, pimecrolimus, inhibits the growth of *Malassezia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2897-8, 2006.
5. Sugita T, Tajima M, Tsubuku H, Tsuboi R, Nishikawa A: Quantitative analysis of cutaneous *Malassezia* in atopic dermatitis patients using real-time PCR. *Microbiol. Immunol.* 50, 549-52, 2006.
6. Sugita T, Tsubuku H, Tajima M, Tsuboi R, Nishikawa A: Time-kill assay of itraconazole against *Malassezia* species. *Microbiol. Immunol.* 50, 625-627, 2006.
7. Morishita N, Sei Y, Sugita T. Molecular analysis of malassezia microflora from patients with pityriasis versicolor. *Mycopathologia.* 161, 61-5, 2006.
8. Shiraki Y, Hiruma M, Hirose N, Sugita T, Ikeda S. A nationwide survey of *Trichophyton tonsurans* infection among combat sport club members in Japan using a questionnaire form and the hairbrush method. *J Am Acad Dermatol.* 54, 622-626, 2006.
9. Kondo M, Kusunoki T, Kusunoki M, Shiraki Y, Sugita T. A case of *Trichophyton tonsurans* infection in which incubation time can be estimated. *J. Dermatol.* 33, 156-7, 2006.
10. Nakase T, Jindamorakot S, Sugita T, Am-in S, Kawasaki H, Potacharoen W, Tanticharoen M. *Trichosporon siamense* sp. nov., isolated from insect frass in Thailand. *Mycoscience* 47, 106-109, 2006.
11. Kondo M, Nakano N, Shiraki Y, Hiruma M, Ikeda S, Sugita T. A Chinese-Japanese boy with black dot ringworm due to *Trichophyton violaceum*. *J. Dermatol.* 33, 165-168, 2006.
12. Fungsin B, Takashima M, Sugita T, Artjariyasripong S, Potacharoen W, Tanticharoen M, Nakase T. *Bullera koratensis* sp. nov. and *Bullera lagerstroemniae* sp. nov., two new ballistoconidium-forming yeast species in the Trichosporonales clade isolated from plant leaves in Thailand. *J. Gen. Applied Microbiol.* 52, 73-81, 2006.
13. Kalkanci A, 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.* 44, 531-539, 2006.
14. Gabriel M, Kopecka M, Yamaguchi M, Svoboda S, Takeo K, Yoshida S, Ohkusu M, Sugita T, Nakase T. The cytoskeleton in the unique cell reproduction by conidiogenesis of the long-neck yeast *Fellomyces (Sterigmatomyces) fuzhouensis* *Protoplasma*, 229, 33-44, 2006
15. Ishibashi Y, Sugita T, Nishikawa A. Cytokine secretion profile of human keratinocytes exposed to *Malassezia* yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol.* In press
16. Kato H, Sugita T, Ishibashi Y, Nishikawa A. Detecting species-specific *Malassezia* IgE antibody in the serum of patients with atopic dermatitis using an ELISA method. *Microbiol. Immunol.* In press

17. Golubev W, Sugita T, Golubev N  
Ustilaginomycetous yeast, *Pseudozyma*  
*graminicola* sp. nov., isolated from the leaves of  
pasture plants. Mycoscience (Accepted)
18. Takahata Y, Sugita T, Hiruma M, Muto K.  
Quantitative analysis of *Malassezia* in the scale of  
patients with psoriasis using a real-time PCR  
assay. Br. J. Dermatol. (Accepted)

**H. 知的財産権の出願特許状況**  
なし。

真菌感染抵抗性の解析と治療の評価系の開発  
—真菌分子による好中球活性化—

分担研究者：鈴木和男 国立感染症研究所生物活性物質部 室長  
研究協力者：大川原明子 国立感染症研究所生物活性物質部  
大野尚仁 東京薬科大学薬学部

**研究要旨** 真菌由来糖たんぱく質 CAWS(*Candida albicans* water soluble fraction)が誘導する血管炎の初期動態に白血球の活性化が伴う。本年度は、その活性化にかかわる CAWS 内分子の影響を *Candida albicans* の培養時の pH を変えて調整したものを、マウスに投与して、末梢好中球の活性化およびサイトカイン、補体の活性化について検討した。pH 2 で培養した CAWS をマウスに投与 1 時間後の末梢好中球数は有意に増加し、pH 7 のものではその傾向はなかった。好中球を FMLP 刺激したときの MPO 放出能は、培養時の pH のちがいは影響なかったが、FMLP および PMA 刺激による活性酸素産生能はいずれも pH2 由来のもので有意に亢進した。同時に、炎症性サイトカインおよびケモカイン産生は、IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12(p40), TNF- $\alpha$ , Eotaxin, Rantes が pH2 のもので有意に高値を示した。さらに、補体の活性化も、pH 2 のものを投与 1 時間後で上昇し、16 時間後には元のレベルにもどった。これらの結果から、培養の条件により、CAWS の分子構成に変化が生じ、好中球活性化、補体や炎症性サイトカインの変動に影響を示すことがわかった。CAWS 内の分子構成の違いが、冠状動脈炎や腎臓をはじめとする血管炎の発症に関与すると推定される。

#### A. 研究目的

真菌感染の防御は、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おり、特に、好中球が産生する活性酸素 O<sub>2</sub><sup>-</sup>や OCI<sup>-</sup>は、主要な役割をしている。すでにわれわれは、OCI<sup>-</sup>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<sub>2</sub><sup>-</sup>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。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<sub>2</sub><sup>-</sup>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<sub>2</sub><sup>-</sup>そのものより OCI<sup>-</sup>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<sub>2</sub><sup>-</sup>産生不全は、その下流にある OCI<sup>-</sup>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<sup>-</sup>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、活性化され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) が病態と相関している。CAWS によって誘導される血管炎の初期の過程に好中球の活性化を介していることを示してきた (Ishida-Okawara, et al., Exp. Mol. Pathol., in press, 2007)。また、CAWS の主成分が mannose-protein-1,3- $\beta$ -glucan であることを示してきた。

そこで、本年度は、好中球の活性化にかかわる CAWS 内分子の作用を *Candida albicans* の培養時の pH を変えて調整し、マウスに投与して、末梢好中球の活性化および関連の炎症性分子について検討した。

## B. 研究方法

1) マウスへの CAWS の投与 : C57BL/6N マウス、6W、♂を SPF 環境下飼育し用いた。動物使用に際しては、飼育、薬剤投与、屠殺などすべての過程において国立感染症研究所実験動物ガイドラインの動物愛護の精神を遵守し実験を行った。

2) CAWS の調整と投与 : *C. albicans* IFO 1385 を完全合成培地で pH 2 (CAWS-pH2) あるいは pH7 (CAWS-pH7) にコントロールして培養し、

その培養上清より水溶性画分 CAWS を精製した。また、通常の方法によって培養した *C. albicans* から CAWS を精製した。PBS で 20 mg/ml に調整した CAWS をオートクレーブし、マウスに腹腔内投与 (4 mg/マウス) した。

3) 末梢好中球機能の解析 : CAWS 投与 1 時間後にヘパリン採血末梢血から比重法によって好中球を分離し、MPO 放出能、活性酸素産生能を指標として好中球の活性化について解析を行った。

4) サイトカイン、ケモカインの測定 : CAWS 投与 1 時間および 16 時間後に、末梢血から分離した血漿中の 23 種類のサイトカイン、ケモカインを Bio-Plex (Bio-Rad 社製) によって網羅的に測定した。

5) 補体活性化の検討 : 分離した血漿中の補体を、サンドイッチ ELISA 法によって、complement 3 (C3) を測定・定量し補体活性化の指標とした。

### (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

*C. albicans* IFO 1385 を完全合成培地で培養すると培地の pH は徐々に低下し、48 時間後の培養終了時に pH は 2 付近になった。この培養液より調整した CAWS をコントロールとした。これに対し、培養時の pH を培養開始時より 2 あるいは 7 にコントロールして精製した CAWS-pH2、CAWS-pH-7 による末梢好中球の活性化について検討した。

### 1) CAWS 培養 pH の違いによる好中球活性化の違い

CAWS をマウスに投与 1 時間後の末梢好中球数は CAWS-pH2 で有意に増加したが、CAWS-pH7 ではその傾向を認めなかった。FMLP 刺激 MPO 放出能は pH による差を認めなかったが、FMLP、PMA 刺激による活性酸素産生能はいずれも CAWS-pH2 で有意に亢進した (図 1a-d)。

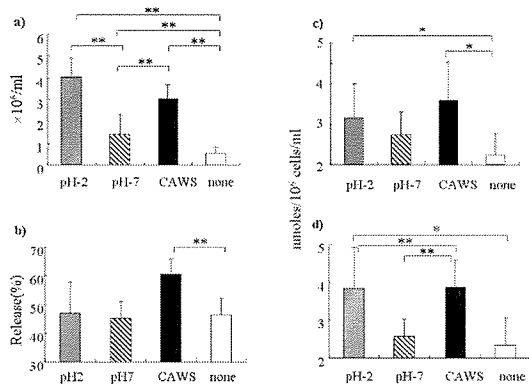


図 1. 培養時の pH の違いによる好中球活性化

a) 末梢好中球数、b) FMLP 刺激 MPO 放出、c) FMLP 刺激活性酸素産生、d) PMA 刺激活性酸素産生。\* P<0.05, \*\* P<0.01

## 2) CAWS 培養時の pH の違いによるサイトカイン・ケモカイン産生への影響

CAWS 投与 1、16 時間後の炎症性サイトカイン産生について検討したところ、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12(p40)、TNF- $\alpha$ が、またケモカイン産生では Eotaxin、Rantes が CAWS-pH2 で有意に高値を示した (図 2a-h、図 3a-e)。

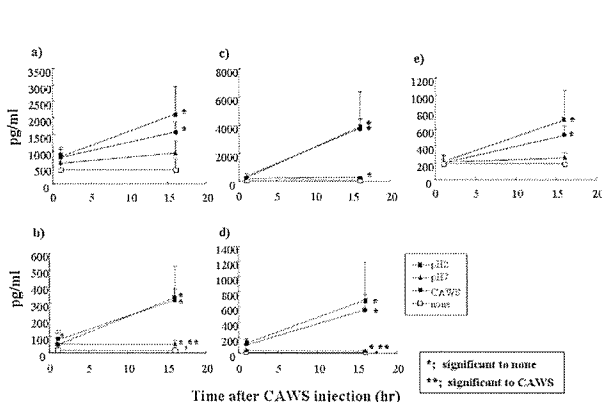


図 2. 培養時の pH の違いによるサイトカイン・ケモカイン産生 (1)

a) IL-1 $\alpha$ 、b) IL-1 $\beta$ 、c) IL-6、d) IL-12(p40)、e) TNF- $\alpha$ 、f) G-CSF

\* significant to none, \*\* significant to pH2

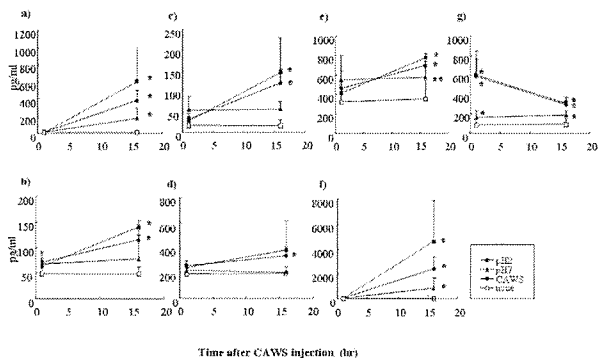


図 3. 培養時の pH の違いによるサイトカイン・ケモカイン産生 (2)

a) Eotaxin、b) KC、c) MCP-1、d) MIP-1 $\alpha$ 、e) RANTES

## 3) CAWS 培養 pH の違いによる補体活性化の違い

好中球活性化の原因のひとつとしての補体の活性化について検討したが、CAWS-pH2 で投与 1 時間後にその活性が増加し、16 時間後には元のレベルにもどった (図 4a、b)。

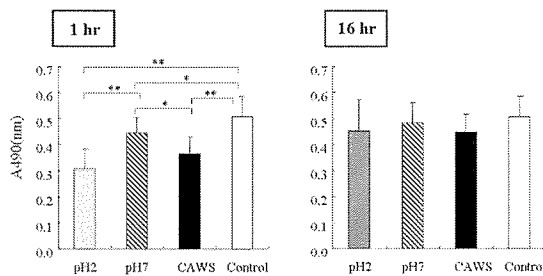


図 4. 培養時の pH の違いによる補体活性化

## D. 考察

培養時の pH を変えて調整した CAWS をマウスに投与し、末梢好中球の活性化について検討した。pH 2 で培養した CAWS をマウスに投与 1 時間後の末梢好中球数は有意に増加し、pH 7 のものではその傾向を認めなかった。好中球の FMLP 刺激 MPO 放出能は、培養時の pH のちがいによる差がなかったが、FMLP お

よびPMA刺激による活性酸素産生能はいずれもpH2由来のもので有意に亢進した。同時に、炎症性サイトカインおよびケモカイン産生は、IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12(p40), TNF- $\alpha$ , Eotaxin, RantesがpH2のもので有意に高値を示した。さらに、補体の活性化もpH2のものを投与1時間後で上昇し、16時間後には元のレベルにもどった。

これらの結果は、培養のpHの条件を変えることで、CAWSの分子内の構成に変化が生じたことを示しており、好中球活性化、補体や炎症性サイトカインの変動に影響をする分子構造を明らかにするきおとが重要と思われる。また、これらの、CAWSの分子構成の違いは、冠状動脈炎や腎臓をはじめとする血管炎の発症に関与すると分子を特定する上で有用であると思われる。

## E. 結論

本年度は、CAWS投与直後の白血球動態、サイトカイン産生および補体の活性化について、CAWS調整時のpHの違いによる作用分子の変化について解析した。

培養時のpHが異なるCAWSをマウスに投与し、末梢好中球の活性化およびサイトカイン、補体の活性化について検討した。pH2で培養したCAWSは、投与1時間後の末梢好中球数が有意に増加した。MPO放出能は、培養時のpHのちがいは影響なかったが、FMLPおよびPMA刺激による活性酸素産生能はいずれもpH2由来のもので有意に亢進した。同時に、炎症性サイトカインおよびケモカイン産生は、IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12(p40), TNF- $\alpha$ , Eotaxin, RantesがpH2のもの投与で有意に高値を示した。さらに、補体の活性化も、pH2のものを投与1時間後で一過的に上昇した。これらの結果から、培養のpHの変化により、CAWSの分子構成に変化が生じたと推定される。このCAWS分子構造の違いは、冠状動脈炎や腎臓をはじめとする血管炎の発症に関与すると推定される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagi-Miura, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Akinori Okumura, Hitoshi Tachikawa, Shin-ichiro Kashiwamura, Haruki Okamura, Naohito Ohno, Hidechika Okada, Peter. A. Ward, **Kazuo**

**Suzuki**. Neutrophil activation and induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein- $\beta$ -glucan complex (CAWS). Exp. Mol. Pathol. in press.

2. Tomokazu Nagao, Mimiko Matsumura, Ayako Mabuchi, Akiko Ishida-Okawara, Osamu Koshio, Haruyuki Minamitani, and **Kazuo Suzuki**. Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. Nephrol. Dialysis Transplant. 22: 77-87, 2007.
3. Shinohara Hiroyasu, Nagai-Miura Noriko, Ishibashi Ken-ichi, Adachi Yoshiyuki, Akiko Ishida-Okawara, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Shiro Naoe, **Kazuo Suzuki**, and Naohito Ohno. Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPs composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by *Candida albicans*. Biol. Pharm. Bull. 29: 1854-1861, 2006.
4. Shouichi Fujimoto, Shigehiro Uezono, Shuichi Hisanaga, Keiichi Fukudome, Shigeto Kobayashi, **Kazuo Suzuki**, Hiroshi Hashimoto, Hiroyuki Nakao, Hiroyuki Nunoi. Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture: The first population-based, retrospective epidemiological survey in Japan. Clinical Journal of American Society of Nephrology. 1: 1016-1022, 2006.
5. Yasuaki Aratani, Fumiaki Kura, Haruo Watanabe, Hisayoshi Akagawa, Yukie Takano, Akiko Ishida-Okawara, **Kazuo Suzuki**, Nobuyo Maeda, and Hideki Koyama. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against *Cryptococcus neoformans*. J. Med. Microbiol. 55: 1291-1299, 2006.
6. 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 13: 67-71, 2006.
7. 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, *Candida albicans* water-soluble fraction. Atherosclerosis 186: 310-320, 2006.



## 2. 学会発表

### 国際会議

1. Nozu T, Matsumura M, Nagao T, Kobayashi M, Okawara A, Hasegawa A, Nakayama T, Nagai A, Suzuki K Function of the primary pulmonary endothelial cells associated with activated neutrophils. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
2. Kobayashi M, Matsumura M, Nagano T, Hoshino A, Okawara A, Aratani Y, Minamitani H, Suzuki K
3. Glomerular endothelial cell activation in vasculitis Induced by anti-myeloperoxidase antibody and activated neutrophils. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
4. Tachikawa H, Okawara O, Suzuki K. Contribution of the systemic, splenic, and renal Th2 responses to the developing glomerulonephritis in NCA-associated crescent-forming glomerulonephritis mice. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
5. Tomizawa K, Suzuki R, Tanokura M, Suzuki K. Analysis of MPO-ANCA Binding Site of MPO Molecule Surface Regions. June 18-23, 2006
6. Hoshino A, Nagao T, Tokunaka K, Okawara A, Ihara T, Uno K, Muso E, Miura N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K Myeloperoxidase (MPO) on Activation Neutrophils and anti-MPO Antibody involve the Initiation of Glomerulonephritis and Vasculitis induced by *Candida albicans* Glycoprotein. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
7. Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Okawara A, Suzuki K, Maeda N, and Koyama H. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense against fungal infection. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006

### 国内会議

1. 永井厚志、近藤光子、野津朋子、鈴木和男 間質性肺炎における ANCA 陽性例の Prevalence と病態 第 103 回日本内科学会総会・年次講演会(横浜)4月14-16日
2. 太刀川仁、Mahmoud Ramadan、小玉 誠、大川原明子、三間 渉、伊藤正洋、柏村 健、広野 暁、鈴木和男、相澤義房 冠動脈疾患患者における MPO-ANCA の挙動 第 103 回日本内科学会総会・年次講演会(横浜)4月14-16日
3. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀機 クリプトコッカス感染防御におけるミエロペルオキシダーゼの関与 第 27 回関東医真菌懇話会(東京)5月27日
4. 鈴木和男 活性化好中球とMPO-ANCAによる糸球体内皮細胞傷害 第49回日本腎臓学会学術総会 シンポジウム「ANCA関連血管炎の病理と臨床」(東京)6月14-16日、
5. 小林美登里、松村実実子、長尾朋和、荒谷康昭、星野昭芳、大川原明子、山本健二、南谷晴之、鈴木和男 血管炎発症に関わる MPO-ANCA は直接糸球体内皮細胞へ作用する 第 17 回日本生体防御学会学術集会(札幌)7月27-29日
6. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀機 クリプトコッカス感染防御における MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup>系の関与 第 12 回MPO研究会(大阪)9月22-23日
7. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、Keiko Ozato、鈴木和男、大野尚仁 CAWS 血管炎における IRF-8 の役割 第 12 回MPO研究会(大阪)9月22-23日
8. 大川原明子、三浦 典子、大原関利章、高橋啓、岡田秀親、大野尚仁、鈴木和男 CAWS培養条件の違いによる好中球活性化への影響 第 12 回MPO研究会(大阪)9月22-23日
9. 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋啓、大川原明子、鈴木和男、大野尚仁 各種マウス系統を用いた CAWS 血管炎発症に関わる遺伝的素因の解析 第 12 回MPO研究会(大阪)9月22-23日
10. 駒井元彦、高野雄介、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁 CBA/J, CBA/N マウスにおける CAWS 血管炎の検討 第 12 回MPO研究会(大阪)9月22-23日
11. Suzuki K, Nauseef W ミエロペルオキシダーゼ (MPO)の生体防御における役割 第 12 回MPO

研究会(大阪)9月22-23日

12. 高橋啓、大原関利章、山田仁美、三浦典子、大野尚仁、村山研、野津朋子、松村実美子、大川原明子、鈴木和男、新井孝夫、荒谷康昭 CAWS 誘発血管炎モデルにおける合成免疫グロブリン(SyIG)の血管炎抑制作用 第12回MPO研究会(大阪)9月22-23日
13. 星野昭芳、猪原登志子、宇野賀津子、武曾恵理、山本健二、鈴木和男 抗MPO抗体誘導マウス全身血管炎モデルにおける活性化好中球からのサイトカイン産生 第12回MPO研究会(大阪)9月22-23日
14. 富澤一夫、大川原明子、雑賀寛、田之倉優、鈴木和男 急性進行性糸球体腎炎モデルSCG/KjマウスのMPO-ANCA病因エピトープは治療により減少する 第12回MPO研究会(大阪)9月22-23日
15. 星野昭芳、山本健二、鈴木和男 抗MPO自己抗体誘導マウス全身血管炎モデルにおける抗体の挙動を蛍光ナノ粒子標識QD抗MPO抗体でイメージングする 第15回バイオイメージング学会(盛岡)10月31-11月2日
16. Ishida-Okawara A., Nagi-Miura N., Oharaseki T., Takahashi K., Okada H., Ohno N., and Suzuki K. Neutrophil Activation by CAWS in

Different Cultured Condition」(CAWS調整時の異なった菌の培養条件による好中球活性化の相違)第36回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)12月11-13日

17. Hoshino, A., Okawara, A., Yamamoto, K., and Suzuki K. 星野昭芳、大川原明子、山本健二、鈴木和男 Activated neutrophils produce IL-17 and IL-23 by MPO-ANCA in Candida albicans-derived mannoprotein-induced murine systemic(カンジダ由来マンノプロテイン誘導のマウス全身性血管炎におけるMPO-ANCAによって活性化された好中球がIL-17とIL-23を産生)第36回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)12月11-13日
18. 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋啓、大川原明子、鈴木和男 CAWS血管炎の発症と重篤かに関わる遺伝的素因の各種マウス系統を用いた解析 第36回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)12月11-13日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究報告書

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 カイコガ幼虫感染実験系を用いて *C. albicans* の病原因子を検索した。一連のプロテインフォスファターゼ破壊株の中で、*CaPTC1* 破壊株が著しい病原性の低下を示した。この結果はマウスモデル感染実験においても再現性が得られた。*CaPTC1* 破壊株は寒天培地上で菌糸形成が阻害され、Protease 産生能の低下、酸化ストレスに感受性、マウス腎臓への定着率の低下などを示した。従って、これらが複合して病原性の低下につながったと考えられる。一方、*CaPTC1* 過剰発現相補株においては、増殖速度の上昇と、より強いホスファリパーゼ活性や Hemolysin 活性を示し、分泌酵素の産生が促進された。これらの要因によって相補株の病原性が増強したと推察される。以上の結果から、*CaPTC1* は *C. albicans* の重要な病原因子の一つであるといえる。

ABC タンパク質は、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 タンパク質は、病原微生物や癌細胞において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 *Saccharomyces cerevisiae* の ABC タンパク質である Pdr5p と阻害剤 FK506 の相互作用について変異タンパク質を用いた解析を行った。Pdr5p を大量発現する出芽酵母株を基質である fluconazole と FK506 を含む寒天培地上で培養し、FK506 非感受性化変異株を取得した。ほぼ全ての FK506 非感受性化変異株は *PDR5* 遺伝子上に 1 アミノ酸変異を引き起こす 1 塩基置換を有していた。変異が認められたアミノ酸残基はこれまでに報告のあった箇所とは異なり、主に細胞外領域に偏在していた。これらの変異タンパク質は野生型タンパク質と同程度の薬剤排出活性を保持していることから、変異部位は薬剤排出や基質認識にとっては重要ではないが、FK506 との相互作用に大きく影響を与える部位であると考えられた。

## I. カイコガ幼虫感染実験系を用いた真菌の病原因子の解析

### A. 研究目的

最近、哺乳類と類似の自然免疫系をもつカイコガ幼虫を使った真菌感染治療実験の報告があり、フルコナゾールやアンホテリシンBのED50/MIC値がマウスモデル感染実験で得られた結果と同様であったことが示されている。育種方法が確立されているカイコガを用いると、病原性解析が容易になり、哺乳動物の使用に伴う倫理的問題を回避することもできる。

そこで、本研究では、カイコガ幼虫感染実験系を使用して、一連の *C. albicans* プロテインフォスファターゼ破壊株の病原性を親株と比較し、プロテインフォスファターゼの病原性への関与の可能性を検討した。

### B. 研究方法

*C. albicans* 親株、およびマウスモデル感染実験ですでに病原性の低下が示されているプロテインフォスファターゼ *CaYvh1* 破壊株 (増殖速度の低下が病原性低下に関連する)、あるいは細胞壁β-1,6-グルカン合成酵素 *CaBig1* 破壊株 (細

胞形態の異常や形態変換の障害を伴う病原性低下)を用いて、カイコガ幼虫に対する病原性チェックを行った。その結果、それぞれの株は、カイコガ幼虫感染実験においてもマウスで得られた病原性の強さと同様の結果を示した。また、各遺伝子を再導入した相補株は病原性を回復することを確認した。以上のことから、カイコガ幼虫感染実験系が、*C. albicans*の病原性解析に有用であると判断した。そこで、合計21種のプロテインフォスファターゼ破壊株を作製し、それらのカイコガ幼虫に対する病原性を親株と比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症研究所実験動物計画書を提出して動物実験倫理委員会の承認を得、動物実験倫理委員会の規定に従い、動物愛護の指針にもとづいて行った。

#### C. 研究結果

21種のプロテインフォスファターゼ破壊株のうち、*CaSIT4*、*CaYVH1*、*CaPTC1*破壊株はカイコガ幼虫に対して再現性良く病原性が低下した。*CaSIT4*、*CaYVH1*破壊株はマウス全身感染に対する病原性の低下がすでに報告されているが、今回は新たに*CaPTC1*破壊株が病原性を失うことが分かった。そこで、*CaPTC1*破壊株のマウス全身感染に対する病原性をしらべたところ確かに再現性が認められ、*CaPTC1*過剰発現相補株においては、親株に比べてさらに強い病原性を示した。

*CaPTC1*破壊株は親株と比較して、細胞形態の異常や増殖には顕著な変化はみられなかったが、寒天培地上での菌糸形成が不良で、プロテアーゼ分泌量の低下、酸化ストレス感受性、マウスの腎臓への定着率の低下が認められ、これらの要因が重なって病原性が低下したのと考えられた(multi-factorial)。一方、過剰発現相補株においては、明らかな増殖速度の上昇、分泌酵素の産生促進があり、病原性が親株に比べて増強したのではないかと考えられた。また、*PTC1*は、*C. albicans*の増殖を発現調節している可能性があることを示唆している。

#### D. 考察

カイコガ幼虫を用いて*C. albicans*の病原性解析を行い、プロテインフォスファターゼの一種である*CaPTC1*が新たに病原性と関連する遺伝子であることを見出した。*CaPTC1*破壊株は親株と比較して寒天培地上で菌糸形成が阻害され、プロテアーゼ活性の減少が顕著であったことが、病原性の低下に結びついているのかもしれない。一方、過剰発現相補株においては増殖速度の顕著な上昇が見られたことから、*PTC1*発現レベルの強弱が*C. albicans*の増殖速度を制御している可能性を示唆している。

*S. cerevisiae*においては、タンパク質の脱リン酸化を担うプロテインフォスファターゼは、環境応答や細胞周期、細胞増殖のシグナル伝達系に重要な役割を演じている。出芽酵母における*PTC1*の欠失は、栄養飢餓、浸透圧の変化などの環境適応に対する応答に影響を与える。*CaPTC1*が*ScPTC1*と同様の機能を持っていることは容易に想像されるが、*CaPTC1*の破壊が菌糸形成に障害を及ぼすことは、*C. albicans*に特異的な現象であり、*CaPTC1*と*ScPTC1*との間の機能の違いが存在することも示唆している。一方、*CaPTC1*の過剰発現相補株は、ホスファリパーゼ活性や、Haemolysin活性の上昇をもたらし、結果として病原性の増強につながったものと推定される。

以上の結果から、*CaPTC1*は*C. albicans*において病原性に関与する重要な遺伝子であることは疑う余地がないことが明らかとなった。

#### E. 結論

カイコガ幼虫感染実験系を用いて一連のプロテインフォスファターゼ破壊株の病原性を解析したところ、*CaPTC1*破壊株が著しい病原性の低下を示した。*CaPTC1*破壊株は寒天培地上で菌糸形成が阻害され、Protease産生能の低下、酸化ストレスに感受性、マウス腎臓への定着率の低下などを示した。従って、これらが複合して病原性の低下につながったと考えられる。一方、