

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* が *C. albicans* の病原因子としての役割を担っていることが分かった。

この研究は国立感染症研究所・生物活性物質部第一室に所属する東京農工大学大学院博士課程の花岡 希大学院生の研究の一部をなす。

II. 真菌の ABC タンパク質 Pdr5p と FK506 の相互作用

A. 研究目的

抗がん剤に耐性化したがん細胞は、臨床で用いられている主要な抗がん剤に対して交差耐性を示し、がん治療において大きな問題になっている。耐性獲得の本体は、がん細胞の細胞膜に局在する ABC タンパク質の P 糖タンパク質 (ABC1) や MRP1 (ABCC1) の発現亢進である。これらの輸送体が薬剤を細胞外に排出するため、がん細胞内の薬物が有効濃度に到達せず、がん細胞は生き残る。そこで、癌細胞の多剤耐性を克服するために、抗がん剤と他の薬剤を併用して抗がん剤排出ポンプの働きを阻害し、抗がん剤の治療成績の向上を目指した研究が精力的になされている。その中で、シクロスポリンや FK506 などの免疫抑制剤が強い耐性克服作用を有することが分かり、これらの阻害剤と ABC タンパク質との相互作用の解明に向けた研究がなされてきた。しかし、その詳細はいまだ不明である。

一方、病原真菌においても、最も頻用されているアゾール剤に交差耐性を示す株が頻りに分離され、临床上重要な問題になっている。真菌のアゾール剤耐性にも主に ABC タンパク質が関与しており、個々の ABC タンパク質の遺伝的制御、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 タンパク質本来の生理的役割についての研究が精力的に進められている。がん細胞の ABC タンパク質と同様に真菌の ABC タンパク質に対してもシクロスポリンや FK506 などの免疫抑制剤が強い阻害効果を示すことが知られている。しかし、真菌 ABC タンパク質に対するこれらの阻害剤の作用機構は未解明である。

そこで、本研究においては、モデル真菌である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の ABC タンパク質 Pdr5p と、その阻害剤である FK506 との相互作用について、FK506 非感受性変異タンパク質を用いた解析を行った。

B. 研究方法

S. cerevisiae を用いた遺伝子発現系において Pdr5p を大量発現させる実験系を構築した。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 (AD 株) を用いた。この株は ABC 輸送体の転写因子 *PDR1* に変異を有し、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-末端配列もプラスミド上にのせているので、*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 株の染色体中に容易に導入することができる。Pdr5p を大量発現させた出芽酵母株 (AD/PDR5) を基質である fluconazole と阻害剤 FK506 を含む寒天培地上で培養し、FK506 に非感受性化した変異株を取得する。変異株における *PDR5* 遺伝子上の変異の有無を調べ、薬剤感受性試験を行った。

(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。また今回の研究の過程では動物実験は必要としなかった。

C. 研究結果

AD/PDR5 を、40 µg/ml fluconazole と 10 µg/ml FK506 を含む寒天培地上で培養し、FK506 に非感受性化した変異株を取得した。取得した FK506 非感受性化変異株の *PDR5* 遺伝子を PCR によって増幅し、親株 (AD1-8U 株) に導入すると遺伝子導入株は予想通り FK506 に対して非感受性であった。従って、変異株の *PDR5* 遺伝子上のなんらかの変異が FK506 非感受性化を引き起こしているものと考えられた (図 1 参照)。同様の手法で合計 48 株の変異株を調べた結果、31 株 (約 65%) が *PDR5* 遺伝子上の変異によって FK506 に対して非感受性化していた。遺伝子変異を有する *PDR5* ORF の塩基配列を決定したところ、全ての ORF 上には 1 アミノ酸置換を生ずるような 1 塩基置換が認められた (うち 2 株だけは塩基置換が 2 箇所存在した) (図 2 参照)。FK506 非感受性化に関わる遺伝子変異は、もっぱら膜貫通領域に生じるという報告がこれまでになされているが、本研究で明らかになった遺伝子変異は、膜貫通領域のみならず細胞外ループにも多く存在し、特定のアミノ酸に集積しているわけではなかった。以上の結果から、FK506 は Pdr5p の複数のアミノ酸残基と相互作用して薬剤排出を阻害するものと推測された。さらに、これらの遺伝子変異株の薬剤感受性を調べたところ、ほぼ全ての株において fluconazole 耐性などの Pdr5p の機能は低下しておらず、単離した遺伝子変異が FK506 による阻害効果をキャンセルする部位であることが示唆された。また、蛍光基質である rhodamine 6G を用いて変異 Pdr5p による薬剤排出能を評価した結果、変異タンパク質の中には FK506 によって rhodamine 6G の排出が阻害されないものが多く含まれていた。この結果は fluconazole と rhodamine 6G

の基質認識機構の相違を示唆するものであり、タンパク質・阻害剤の相互作用と基質輸送との間に特異性が存在することを示していた。

D. 考察

ABC タンパク質は抗癌剤耐性や抗生物質耐性の主要な原因となっているために、その阻害剤の開発研究は臨床において重要視されている。実際に、抗がん剤治療における ABC タンパク質 P-糖タンパク質の阻害剤の研究は 20 年以上にわたり精力的に行われてきた。病原真菌における抗真菌薬耐性化も治療薬の選択肢が少ない現状を鑑みると大きな問題であり、癌化学療法の場合と同様に ABC タンパク質阻害剤の研究は有効な治療法の開発につながるものと期待される。

出芽酵母 Pdr5p は Multi Drug Resistance (MDR) 型の ABC タンパク質であり、その遺伝子欠損は細胞を多くの薬剤に対して感受性化する。出芽酵母は実験手法、データベースが充実していることから、Pdr5p も真菌 ABC タンパク質のモデルとして盛んに研究が行われてきた。Pdr5p の阻害剤に関しては複数の報告があるが、いずれの研究も物質の単離あるいは限定された変異タンパク質の解析にとどまっている。

本研究では、FK506 非感受性化変異株を大量に取得し、その遺伝子変異を調べた。その結果、驚くべきことに、大半の変異株は *PDR5* 遺伝子上にアミノ酸置換を引き起こす点変異を 1 箇所だけ有していたことが判明した。従って、本実験系は PCR や変異原を用いた他の遺伝子変異導入方法と比較するときわめて効率よく系統的に遺伝子変異を解析できる手法であることが明らかになった。

真菌 ABC タンパク質に対する FK506 の阻害作用を無効にするような遺伝子変異は 11 番目の膜貫通領域に存在するという報告がなされているが、そのような情報はきわめて断片的であるといわざるをえない。本研究において遺伝子変異が認められた部位はこれまでに報告のある遺伝子変異とは全く異なり、細胞外領域に多く認められた。以上の結果から、FK506 は膜貫通ドメイ

ンの複数のアミノ酸と相互作用することが推測され、我々が遺伝子変異を多数見出した細胞外領域は、基質が通過する輸送孔の出口部分に相当するのではないかと推測している。これまでに細胞外ループ領域に着目したABCタンパク質の研究は少なく、本研究によって得られた知見は、他のABCタンパク質の基質輸送メカニズムの解明に大いに貢献できるものと期待できる。

E. 結論

本研究では、真菌ABCタンパク質とその阻害剤FK506との相互作用について変異タンパク質発現株を用いた解析を行った。FK506に対して非感受性化するような遺伝子変異は細胞外領域に多く認められたが、特定のアミノ酸に集積することは無く、比較的広範囲に分散していた。この結果はFK506が数多くのアミノ酸と相互作用する可能性を示唆しており、ABCタンパク質の基質認識メカニズムの複雑さを象徴しているといえる。病原真菌のABCタンパク質においても同様の実験を行うことで、ABCタンパク質と阻害剤との相互作用部位を同定し、その立体構造の予測を行うこともできると期待される。

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. Holmes AR, Tsao S, Lamping E, Niimi K, Monk BC, Tanabe K, Niimi M and Cannon RD. Amino acid residue affecting drug pump function in *Candida albicans*. Japanese Journal of Medical Mycology, 47, 275-281, 2006.

2. Kaneko A, Umeyama T, Utena-Abe Y, Yamagoe S, Niimi M, Uehara Y. Tcc1p, a novel protein containing tetratrico peptide repeat motif, interacts with CaTup1p to regulate morphological transition and virulence in *Candida albicans*. Eukaryotic Cell, 5, 1894-1905, 2006.

3. Holmes AR, Tsao S, Ong S-W, Lamping E, Niimi K, Monk BC, Niimi M, Kaneko A, and Cannon RD. Inter- and intra-allelic functional variation in the *Candida albicans* efflux pump genes *CDR1* and *CDR2*. Molecular Microbiology, 62, 170-186, 2006.

4. 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, 23, 537-552, 2006.

5. 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 44, 1859-1862, 2006.

6. Umeyama T, Kaneko A, Watanabe H, Hirai A, Uehara Y, Niimi M and Azuma M. Deletion of the *CaBIG1* gene reduces β -1, 6-glucan synthesis, filamentation, adhesion, and virulence in *Candida albicans*. Infection and Immunity, 74, 2373-2381, 2006.

7. 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.

8. 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.
9. 新見昌一 戸田新細菌学 改訂 33 版 真菌学総論 南山堂 2007 (印刷中)

学会発表

1. Kyoko Niimi, Katsuyuki Maki, Fumiaki Ikeda, Ann R. Holmes, Erwin Lamping, Masakazu Niimi, Brian C. Monk, Richard D. Cannon. Over-expression of *Cdr1p*, *Cdr2p* or *Mdr1p* in *Candida albicans* does not cause significant changes in candidin susceptibility. The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 25-29 June, Paris, France.
2. Kyoko Niimi, David R. K. Harding, Erwin Lamping, Ann R. Holmes, Masakazu Niimi, Richard D. Cannon, Brian C. Monk. Identification and characterization of a drug efflux pump inhibitor specific to *Candida albicans* ABC transporter *Cdr1p*. The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 25-29 June, Paris, France.
3. Somay Yamagata Murayama, Yumiko Negishi, Takashi Umeyama, Aki Kaneko, Takahiro Oura, Masakazu Niimi, Kimiko Ubukata, Susumu Kajiwara. Construction and functional analysis of fatty acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans*. The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 25-29 June, Paris, France.
4. 新見昌一、田辺公一 病原真菌 *C. albicans* の ABC トランスポーター *Cdr1p* と FK506 の相互作用 第 80 回日本細菌学会総会 平成 19 年 3 月 26-28 日 大阪
5. 中山浩伸、田辺公一、新見昌一、知花博治 病原真菌 *Candida glabrata* のステロールトランスポートを介したアゾール耐性機構 第 80 回日本細菌学会総会 平成 19 年 3 月 26-28 日 大阪
6. 村山琮明、川本進、新見昌一、生方公子 *Candida albicans* 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*CaFADs*) 破壊株の表現型とトランスクリプトーム解析 第 80 回日本細菌学会総会 平成 19 年 3 月 26-28 日 大阪
7. 梅山 隆 二形性真菌 *Candida albicans* の形態チェックポイントキナーゼによる菌糸生育の制御機構 4 ラボセミナー VIII 平成 18 年 12 月 22 日 東京
8. 竹森大樹、Martin Bard、田辺公一、新見昌一、Sung Wu、Wesley Hodgson、青山俊弘、知花博治、中山浩伸 病原性真菌 *Candida glabrata* のステロールトランスポート *CgAUS1* の薬剤感受性への関与 日本分子生物学会フォーラム 平成 18 年 12 月 6-8 日 神戸
9. 花岡希、普後 一、新見昌一 カイコガ幼虫感染実験モデルを用いた *Candida albicans* 病原性関連プロテインホスファターゼの同定 第 3 回 真菌分子細胞研究会 平成 18 年 11 月 28 - 29 日 千葉
10. 梅山 隆、金子亜希、新見昌一、上原至雅 *Candida albicans* 形態チェックポイントキナ

- 一ゼによる菌糸生育制御機構 第3回真菌分子細胞研究会 平成18年11月28-29日千葉
11. Lamping E, Niimi K, Holmes AR, Monk BC, Tanabe K, Niimi M and Cannon RD. Studying drug resistance mechanisms of pathogenic fungi. 第3回 真菌分子細胞研究会 平成18年11月28-29日千葉
12. 田辺公一 病原真菌 ABC タンパク質と基質の相互作用 第3回 真菌分子細胞研究会 平成18年11月28-29日千葉
13. 中山浩伸、田辺公一、竹森大樹、青山俊弘、知花博治、新見昌一 *Candida glabrata* におけるステロールトランスポーター*AUS1* の薬剤感受性への関与 第3回 真菌分子細胞研究会 平成18年11月28-29日千葉
14. 村山琮明、根岸由美子、梅山 隆、金子亜希、大浦隆宏、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 (*CaFADs*) 破壊株の DNA アレイと real-time PCR 法による transcriptome 解析 第3回 真菌分子細胞研究会 平成18年11月28-29日千葉
15. 新見昌一 病原真菌 ABC トランスポーターの阻害剤の探索 第3回 真菌分子細胞研究会 平成18年11月28-29日千葉
16. Lamping E, Nakamura K, Ranchod A, Holmes AR, Niimi K, Niimi M and Cannon RD. Investigating the innate resistance of *Candida krusei* to azole antifungal drug. 第50回日本医
- 真菌学会総会 平成18年10月21-22日 東京
17. Niimi K, Harding DRK, Holmes AR, Lamping E, Niimi M, Cannon RD and Monk BC. Identifying novel aspects of ABC transporter structure and function using surface-active chemosensitizers. 第50回日本医真菌学会総会 平成18年10月21-22日 東京
18. 花岡希、普後 一、新見昌一 カイコガ幼虫を用いた *Candida albicans* 病原性関連プロテインホスファターゼの探索 第50回日本医真菌学会総会 平成18年10月21-22日 東京
19. 中山浩伸、田辺公一、知花博治、新見昌一 *Candida glabrata* のステロール取り込みに関わる遺伝子群の解析 第50回日本医真菌学会総会 平成18年10月21-22日 東京
20. 梅山 隆、佐野文子、新見昌一、亀井克彦、西村和子、上原至雅 コクシジオイデス症原因菌 *Coccidioides immitis* および *Coccidioides posadasii* の同定および分類:新しいアプローチによる遺伝子診断用プライマーの開発 第50回日本医真菌学会総会 平成18年10月21-22日 東京
21. 新見昌一 出芽酵母を利用した *C. albicans* ABC輸送体の遺伝子解析 第27回関東医真菌懇話会平成18年5月27日 東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

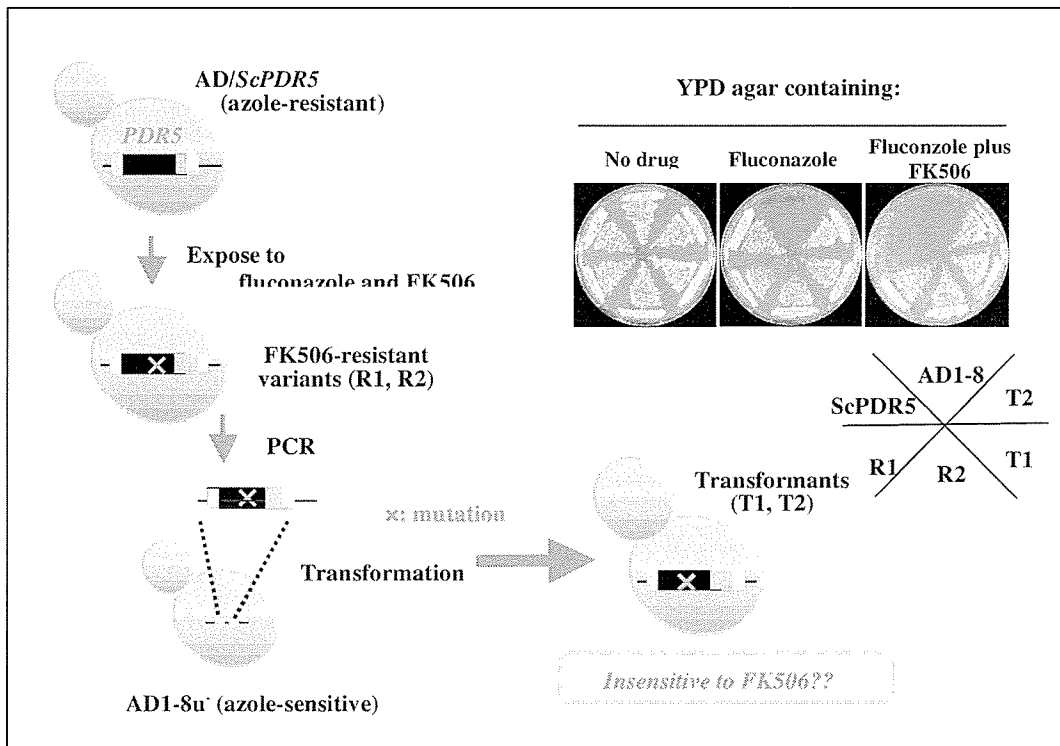


図 1. *S. cerevisiae* の ABC タンパク質遺伝子 PDR5 への FK506 非感受性化変異の導入

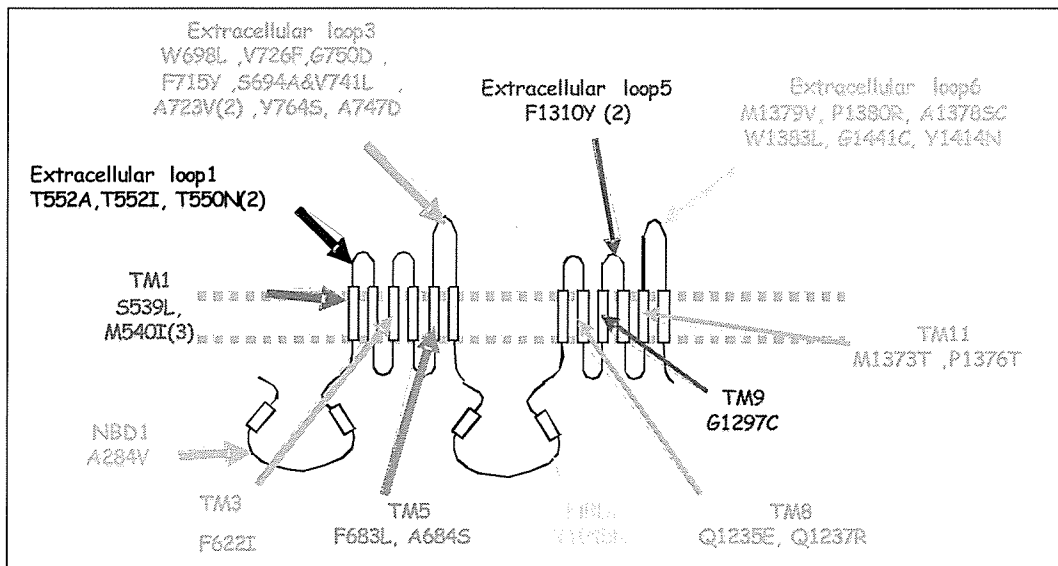


図 2. *S. cerevisiae* の ABC タンパク質 Pdr5p における FK506 非感受性化変異部位

平成18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

日本人口動態統計(2001年度)に示された白血病死者に占める深在性
真菌症罹患者数—日本病理剖検輯報の解析結果からの推計値— ----- 63

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)

千葉大学真菌医学研究センターで保存している *Coccidioides* spp.の
形態学的観察 ----- 69

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

日本人口動態統計(2001年度)に示された白血病死者に占める
深在性真菌症罹患患者数—日本病理剖検輯報の解析結果からの推計値—

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

研究要旨 前年度に日本病理剖検輯報を検索対象とした病理解剖例における深在性真菌症の発生動向の解析結果を示した。今回はこの解析結果のうち基礎疾患として最も高頻度にみられたMDSを含む白血病を対象に、人口動態統計に示された同疾患を死因とした方のうちに占める深在性真菌症罹患患者を、剖検例における解析結果から推計値として算出することを試みた。その結果、1. 2001年度に死因が白血病（MDSを含む）とされた人数は8,976名であった。2. 日本病理剖検輯報の解析成績から推計された人数は8,976名のうち、死亡時に何らかの深在性真菌症に罹患していたであろう人数の推計値は2,409名であった。3. この2,409名のうち、真菌症が死因かまたは死因に大きくかかわったであろうと推計される人数は1,556名であった。4. ちなみに日本人口動態統計で真菌症が死因とされた人数は全死亡者中665名であった。

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、その概要について前年度の本研究報告書で報告した。今回、前年度に報告した解析結果から、我が国で深在性真菌症が最も高い頻度でみられる白血病死者のうち、実際にどれ程の人が死亡時に深在性真菌症に罹患し、どれ程の人が当概感染症で死亡したか、または当概感染症が死因に大きく関わったか推計

値として算出することを試みた。

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）を検索対象としたもののうち、2001年度における白血病（含：骨髄異形成症候群MDS）剖検例を対象とした解析結果¹⁾および日本人口動態統計（2001年度）²⁾に記載された性別・死因（死因基本分類）別死亡者のうち白血病およびMDSによる死亡者数を推計値算出の対象とした。なお、日本人口動態統計で表記してある白血病病型分類は病理剖検輯報の解析に用いた白血病病型分類に比較してかなり細

かく分類されているが、本報告における推計値算出の基本となる病型が病理剖検輯報における病型別頻度であることから、人口動態で類別されている白血病病型をそれぞれ剖検輯報における白血病病型に帰属させた。

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。これらの病型のものは真菌症が直接死因かまたは死因に大きく関わるものである。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. 人口動態統計における白血病死者の病型別死亡人数

人口動態統計の性別・死因（死因基本分類）別死亡数のうち、コード No. C90.1 および C91-C95 の範疇に入る白血病死者数 6,966 名、コード No. D-46 の範疇に入る、いわゆる骨髄異形成症候群（MDS）による死亡者 2,010 名、計 8,976 名の病型別内訳を表 1 に示した。

急性骨髄性白血病が最も多く、約 37% を占め、次いで MDS が 22.4%、成人 T 細胞性白血

病 12%、急性リンパ性白血病および慢性骨髄性白血病が夫々 8.6% および 8.4%、急性白血病 5.2% が主なものであった。

2. 白血病死者（人口動態統計）に占める深在性真菌症罹患患者数の推計値

日本病理剖検輯報の解析から、白血病の病型によって深在性真菌症の発生頻度が異なることから、人口動態統計にみる病型別死亡者数に剖検例における病型別にみた真菌症の発生頻度を乗じ、病型別死亡者に占める真菌症罹患患者数を算出した。ここに算出された人数の総和は 2,409 名、また、白血病剖検例にみられた真菌症の発生頻度の平均値（25.07%）を乗じた人数は 2,250 名であった（表 2-1）。剖検例の検索において症例数の多い病型ほど真菌症の発生頻度が高い傾向にあったことから、上記算出人数のうち病型別に算出した人数の総和である 2,409 名を推計値とした。

剖検例の解析結果より、起因真菌別に重篤型の占める頻度が異なることから、上記の真菌症罹患患者推計人数 2,409 名の起因真菌別罹患患者数を算出した。すなわち 2,409 に剖検例における起因真菌別頻度を乗じて各々の人数を算出した結果、個々の頻度を乗じて得られた人数の総和は 2,408 名と、当然ながら 2409 名に近似する人数であった（表 2-2）。

次いで、上記の白血病死者のうち死亡時に何らかの真菌症に罹患していたであろう 2,408 名の起因真菌別算出人数に、剖検例における起因真菌別にみた重篤例の頻度を乗じ、白血病死時に重篤な真菌感染を続発していたであろう人数を算出した。各起因真菌別重篤感染例の算出人数の総和、重篤例の発生頻度の平

均値で求めた人数、ともに1,556名であった。

D. 結語

結語に代えて、今回の検索成績を図1に纏めてみた。ちなみに、2001年度の人口動態統計に集計記載された全死亡者にみられた真菌による死亡者の男女別、起因真菌別内訳を参考として示した。今回のごとき試みは他に類をみないものであり、我が国における深在性真菌症の疫学的動向をみる上で有益な情報となろうことを指摘したい。今後は、全ての基礎疾患、入院死亡者数を対象に解析する予定である。

参考文献

1. 日本人口動態統計（厚生労働省大臣官房統計情報局編）、**2001**。

2. 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.

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

表1 白血病患者(人口動態統計 2001 年)の病型別内訳

A-10 Leukemia Code No Diagnostic type of leukemia/MDS	2001 年度、人口動態にみる病型別死亡人数
B-49 Acute leukemia	471
B-50 Chronic leukemia	13
B-51 Acute myeloid leukemia	3,321
B-52 Chronic myeloid leukemia	758
B-53 Acute lymphatic leukemia	770
B-54 Chronic lymphatic leukemia	212
B-55 Monocytic leukemia	40
B-56 Blastic leukemia	9
B-57 Other leukemia	297
B-58 Adult Tcell leukemia	1,075
B-59 Myelodysplastic syndrome	2,010

人口動態で類別されている病型を剖検例で規定した病型に類別した場合に、その病型に帰属される白血病患者(人口動態統計)の人数。

Code No.は剖検例の検索集計時に規定した病型のコード No.

表 2-1 白血病人病型別頻度からの推計値

日本病理剖検輯報 (2001 年度) における病型別真菌症の症例数			A 2001 年度、人口動態 にみる病型別死亡人数	B 剖検例における 真菌症の発現頻度	C (A x B)
白血病人病型	症例数 (頻度)	真菌症例数 (頻度)			
1.急性白血病	55 (5.3%)	12/55 (21.8)	471	0.218	102.68=103
2.慢性白血病	8 (0.8%)	1/8 (12.5)	13	0.125	1.63= 2
3.急性骨髄性白血病	357 (34.4%)	106/357 (29.7)	3,321	0.297	986.34=986
4.慢性骨髄性白血病	78 (7.5%)	13/78 (16.7)	758	0.167	126.59=127
5.急性リンパ性白血病	93 (9.0%)	20/93 (21.5)	770	0.215	165.55=166
6.慢性リンパ性白血病	39 (3.8%)	6/39 (15.4)	212	0.154	32.65= 33
7.単球性白血病	41 (4.0%)	4/41 (9.8)	40	0.098	3.92= 4
8.芽球性白血病	38 (3.7%)	4/38 (10.5)	9	0.105	0.95= 1
9.成人Tリンパ性白血病	113 (10.9%)	28/113 (24.8)	1,075	0.248	266.60=267
10.その他の白血病	29 (2.8%)	4/29 (13.8)	297	0.138	40.99= 41
11.骨髄異形成性白血病	186 (17.9%)	62/186 (33.3)	2,010	0.338	679.38=679
計					C 2,409
	1,037 (100%)	260/1,037(25.07)	8,976	0.2507	D 2,250

C;白血病患者のうち、剖検例における病型別頻度を評価した人数。 D;白血病人剖検例における頻度の平均値で算出した人数。

病型別症例数にかなりの差があり、しかも症例数の多い病型ほど頻度が高いことからCの数値を推計値とする。

表 2-2 起因真菌別頻度からの推計値

起因真菌	日本病理剖検輯報における起因 真菌別症例数 (頻度)	人口動態統計における白血病患者の起因真菌別罹患患者数
<i>Aspergillus</i>	141/260(54.2)	2,409 x 0.542= 1305.68 =1306
<i>Candida</i>	44/260(16.9)	2,409 x 0.169= 407.12 = 407
<i>Cryptococcus</i>	5/260(1.9)	2,409 x 0.019= 45.77 = 46
Zygomycetes	24/260(9.2)	2,409 x 0.092= 221.63 = 222
その他の真菌	1/260(0.4)	2,409 x 0.004= 9.64 = 10
起因真菌不明	33/260(12.7)	2,409 x 0.127= 305.94 = 306
重複感染例	12/260(4.6)	2,409 x 0.046= 110.81 = 111
計		A 2, 408
計	260/260(100)	2,409 x 1.00= B 2,409

A: 剖検例における起因真菌別頻度を表 3-1 の推計値 2,409 をもとに起因真菌別死亡数を算出したものである。
(剖検例で起因真菌別頻度が異なる結果であったことから、かかる算出法が妥当と考えます)

B: 単純に平均値で算出したものある。

表 2-3 起因真菌別にみた重篤型の占める頻度からの推計値

起因真菌	日本病理剖検輯における重篤例		(%)	人口動態統計における白血病死者
	症例数			
Agent	非重篤例	重篤例		
Aspergillus	45	96	96/141 (68.1)	1306 x0.681=889.38
Candida	25	19	19/44 (43.2)	407 x0.432=175.82
Cryptococcus .	0	5	5/5 (100)	46 x1 = 46
Zygomycetes	5	19	19/24 (79.2)	222 x0.792=175.82
その他の真菌	0	1	1/1 (100)	10 x1 = 10
起因真菌不明	15	18	18/33 (54.5)	306 x0.545=166.77
重複感染例	2	10	10/12 (83.3)	111 x0.833= 92.46
計	92	168	168/260 (64.6)	2408 x0.646=A=B=1556

* 項の A は重篤例の占める割合の平均値で算出した人数、B は起因真菌別に重篤例の占める割合から算出した人数の和である。

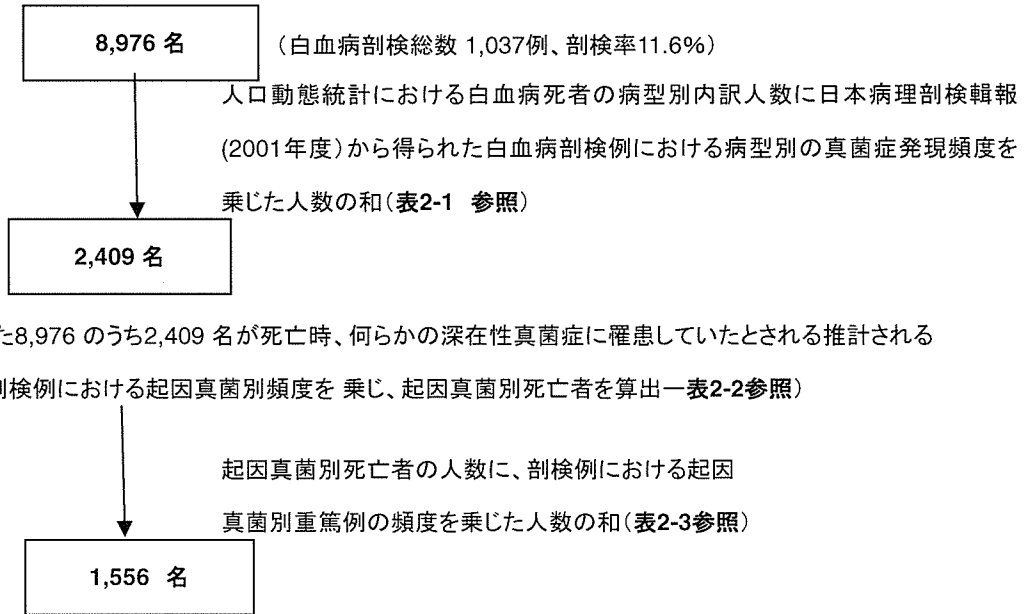
参考

性別・死因(死因三桁基本分類)別死亡数(日本人口動態統計)

2001年	真菌症	男	女	計
B35-B49	真菌症	418	247	665
B35	皮膚糸状菌症	0	0	0
B36	その他の表在性真菌症	0	0	0
B37	カンジダ症	91	74	165
B38	コクシジオイデス症	0	0	0
B39	ヒストプラズマ症	0	0	0
B40	プラストミセス症	0	0	0
B41	パラコクシジオイデス症	0	0	0
B42	スポロトリコ-シス	0	0	0
B43	クロモミコーシス			
	フェオミコーシス性膿瘍	0	0	0
B44	アスペルギルス症	199	53	252
B45	クリプトコッカス症	11	15	26
B46	接合菌症	1	0	1
B47	菌腫	0	0	0
B48	その他の真菌症	0	0	0
B49	詳細不明の真菌症	116	105	221

2001年度、人口動態統計に集計された真菌症による死亡者の起因真菌別人数。

白血病が死因とされた人数(人口動態統計、2001)



白血病が死因とされた8,976のうち2,409名が死亡時、何らかの深在性真菌症に罹患しており、そのうち1,556名が真菌症が死因かまたは死因に真菌症が大きく関わっていた、と推計される。

図1. 白血病剖検例(病理剖検輯報,2001年度)の解析成績から得られた、人口動態統計(2001年度)に示された白血病患者に占める真菌症罹患患者数の推計

協力研究報告書

千葉大学真菌医学研究センターで保存している

Coccidioides spp.の形態学的観察

研究協力者 佐野文子 千葉大学真菌医学研究センター 助教授

研究要旨 コクシジオイデス症の原因菌 *Coccidioides immitis* および *C. posadasii* の菌学的画像情報は限られている。今回、レファレンスとして、千葉大学真菌医学研究センターで保存されている *Coccidioides* spp.20 株について集落、光学的顕微鏡的観察に基づいた画像を作製した。生育は 25°C よりも 35°C の方がすぐれていた。着色を伴った集落は主に 35°C 培養で観察された。分節型分生子のほかにラケット状菌糸、球状体様構造物、大分生子様構造物、孢子嚢孢子様構造物などが観察された。

1. 輸入真菌症の実態調査

A. 研究目的

コクシジオイデス症の原因菌 *Coccidioides immitis* および *C. posadasii* の菌学的画像情報は限られている。分離同定するためのレファレンスとして公開することを目的とした。

B. 研究方法

使用菌株は Table 1 に示した。

サブロー寒天平板培地 (SDA)、ポテト・デキストロース寒天平板培地 (PDA) にポテト・デキストローススラントで 25°C にて 1 週間培養した菌体を中央に接種し、25°C および 35°C で 3 週間培養した。

ホルマリン原液で 1 週間固定後、集落から菌の 1 部を掻き取り、新たなスラントに接種し、室温で 1 週間観察し、菌の生育が無いことを確

かめた。その後、集落の写真を撮影し、一部を掻き取り標本にてラクトフェノール・コトンプルーにて再固定・マウントし、光学顕微鏡で観察した。

C. 研究成果および考察

各集落の写真および裏面に色素を産生した株の例を Figures 1 -5 に示した。集落の特徴は Table 2 に示した。また、顕微鏡的特徴は Figures 6-8 および Table 3 に示した。

教科書的に *Coccidioides* spp. の集落は色素を伴う株も有り、多型があることは知られているが、カラーで示されている例はほとんどない。また、海外の病原真菌の画像を伴ったホームページでも *Coccidioides* spp. を掲載しているところは少ない。表面に着色を伴った集落は主に

35°C培養で観察された。また、裏面の色素産生も35°Cで助長されていた。

白色綿毛状の集落は皮膚糸状菌,
Schizophyllum commune, *Scedosporium apiospermum*, *Arthrographis kalrae*,
Colletotrichum gloeosporioides, *Chaetomium* spp.
および皮膚糸状菌等と類似しているため、これらとの鑑別はよく知られている。

しかし、一部の集落は *Paecilomyces lilacinus* の色調に類似し、*Mortierella wolfii* の葉状に発育する集落や皮膚糸状菌を35°Cで培養した時に生じる同心円を形成する集落と類似していた。

生育は25°Cよりも35°Cの方がすぐれていた。また発育はポテト・デキストロース寒天よりもサブロー寒天培地のほうが優れる傾向が見られた。

温度による発育差から、35°Cでの培養はより危険と考えられる。35°Cでは集落はフェルト状で、辺縁も不整形になりやすい傾向があった。培地はポテト・デキストロース寒天のほうが特殊構造物を形成しやすい傾向があると考えている。

顕微鏡的観察では、分節型分生子のほかにラケット状菌糸、球状体様構造物、大分生子様構造物、孢子嚢孢子様構造物などが観察された。尚、これらの構造物は種特異的ではなかった。

教科書的には、分節型分生子と特殊培地等を用いて35-40°C培養したときにできる球状体様構造物の記載は有るが、その他の構造物についてはラケット状菌糸が稀に観察されることが Dr. Fungus (<http://www.doctorfungus.org/>) で述べられているだけである。

大分生子様構造物、孢子嚢孢子様構造物などは数株で観察された構造物なので、

Coccidioides spp.はこれらの構造物も形成すると言えよう。また、一部の株では菌糸束構造を形成し、その部分に多数の分節型分生子を形成していたことも付け加えておく。

D. まとめ

今回観察した *C. immitis* と *C. posadasii* に形態学的な差異はないが、いずれもバイオセーフティーレベル3の病原真菌なので、取り扱い上の注意は言うまでもない。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1) 原著論文

1. Sano A, Miyaji M, Kamei K, Mikami Y, Nishimura K: Reexamination of *Coccidioides* spp. reserved in the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, based on a multiple gene analysis. *Jpn J Med Mycol* 47: 113-117, 2006.

2. Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y: Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *J Clin Microbiol* 44: 1859-1862, 2006.

3. Murata Y, Sano A, Ueda Y, Inomata T, Takayama A, Poonwan N, Nanthawan M, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, Kamei K: Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Med Mycol*. 2007. In press.

4. Pavanelli WR, Kaminami MS, Geres JR, Sano A, Ono MA, Camargo ICC, Itano EN: Protection induced in BALB/c mice by the High-Molecular-Mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia, 2007. In press.

2) 学会発表

1. Itano E, Tristao F, Bejar V, Ono E, Camargo Z, Sano A: partial characterization of immunogenic components of *Histoplasma capsulatum* and circulating specific IgG and soluble antigens in experimental murine histoplasmosis. Le Palais des Congres de Paris, Paris, France, Abstract: P-0607, 2006.6.25-29, Paris, France.

2. Sano A: Emerging fungal infections in Animals in Japan (Symposium). 8 th International Mycological Congress 21-25 August. 2006 Cairns Convention Centre, Queensland, Australia. Abstract: pp142, Cairns, Australia, August 21-25, 2006.

3. 高山 明子, Itano Eiko Nakagawa, 佐野文子, Ono Mario Augusto, 鎗田 響子, 宮治 誠, 亀井 克彦, 西村 和子, 宇野 潤, 三上 襄: 多遺伝子解析でアウトグループに位置した *Paracoccidioides brasiliensis* IFM 54648 株について. 第 50 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増 1), p17, 東京, 2006.10.21-22.

4. 上原雅江, 井出京子, 永井啓子, 羽毛田牧夫, 佐野文子, 亀井克彦, 西村和子: タイ人 AIDS 患者の菌血症から分離された *Penicillium marneffei*. 第 50 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47(S1): 77, 東京, 10 月 21~22 日, 2006.

5. 梅山隆, 佐野文子, 亀井克彦, 新見昌一, 西村和子, 上原至雅: コクシジオイデス症原因菌 *Coccidioides immitis* および *Coccidioides posadasii* の同定および分類: 新しいアプローチによる遺伝子診断用プライマーの開発. 第 50 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47(S1): 82, 東京, 10 月 21~22 日, 2006.

6. 伊藤 淳二, 佐野文子, 亀井 克彦, 西村 和子, 宮治 誠, 三上 襄: *Coccidioides* 属のトポイソメラーゼ II 遺伝子 (TOP2) 及び関連遺伝子 (TRF4) による同定法について. 第 50 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増 1), p 27, 東京, 2006.10.21-22.

3) 総説その他

著書

佐野文子 (分担): 病原真菌の真菌学・免疫・薬剤感受性: Q8 人獣共通の真菌症があるか? 「深在性真菌症 Q & A」, 河野 茂編, pp31-33, 医薬ジャーナル社, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. *Coccidioides* spp. isolates.

Isolate				
IFM No.	Strain	Identification	Origin	Country
4935	Nagoya	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan
4945	Ohashi	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan
45809	Silviera (SAP2)	<i>C. posadasii</i>	Animal passage 11	USA
45810	Silveira (SAP3)	<i>C. posadasii</i>	Animal passage 111	USA
45811	Arizona	<i>C. posadasii</i>	Human case	USA
45812	San Antonio	<i>C. posadasii</i>	Human case	USA
45813	New York	<i>C. posadasii</i>	Human case	USA
45815	91-48	<i>C. immitis</i>	Human case	USA
45816	91-153	<i>C. immitis</i>	Human case	USA
45817	Nicols	<i>C. posadasii</i>	Human case	USA
46868	Yokohama	<i>C. immitis</i>	Human case	Japan
50992	90-242	<i>C. immitis</i>	Human case	USA
50993	Kanazawa	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan
50994	Toranomon	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan
50995	Handai	<i>C. immitis</i>	Human case	Japan
51112	Himeji	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan
54194	Nagano	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan
54195	Fukunaga	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan
54196	Chiba	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan
No number	Gumma	<i>C. posadasii</i>	Human case	Japan

Table 2. Remarked macro- structures of 19 *Coccidioides* spp. isolates.

	25°C		35°C	
	SDA	PDA	SDA	PDA
Reverse pigment	0	1	10	7
Colored surface	0	0	10	5
Rought margin	0	0	9	10
Concentric circle	0	0	2	5
Lacy	0	0	0	2
Diameter	4.85±0.124	4.67±0.117	5.49±0.252	5.28±0.397

Table 3. Remarked micro- structures of 19 *Coccidioides* spp. isolates except for arthroconidia.

	25°C		35°C	
	SDA	PDA	SDA	PDA
Sporangiun-like	7	4	4	6
Synnema-like bundled hyphae	1	1	1	0
Racquet hyphae	0	4	0	2
Blastoconidia	0	1	0	0
Chlamydospore-like	0	0	0	4
Aleurioconidia	0	0	0	1



Fig. 1. Colonies of *Coccidioides* spp.-1. SDA; Sabouraud dextrose agar, PDA; potato dextrose agar. Numbers in red letters; *C. immitis*, blue; *C. posadasii*.



Fig. 2. Colonies of *Coccidioides* spp.-2.



Fig. 3. Colonies of *Coccidioides* spp.-3.

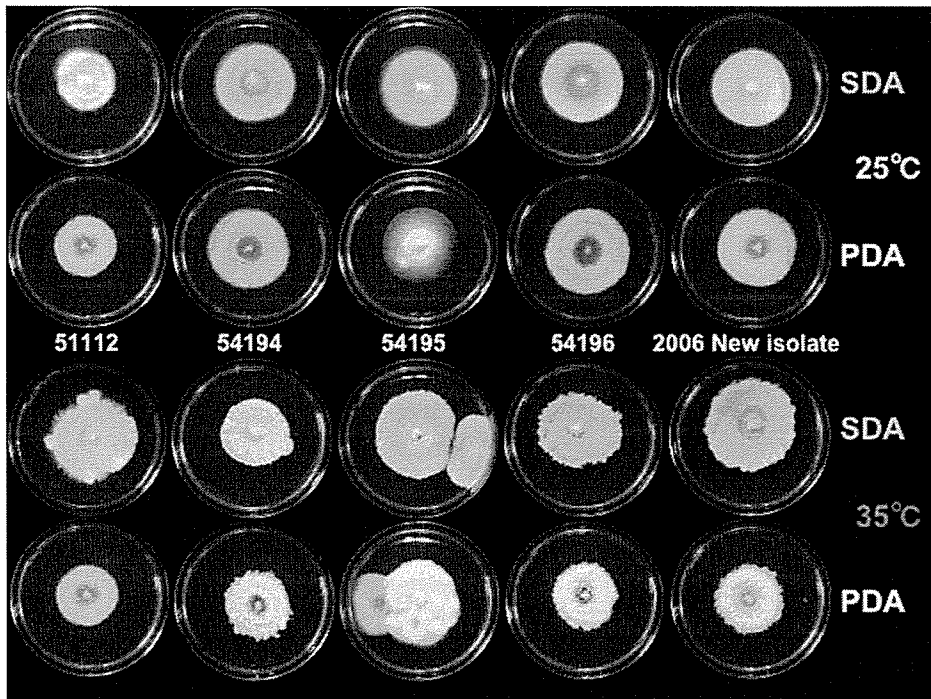


Fig. 4. Colonies of *Coccidioides* spp.-4.

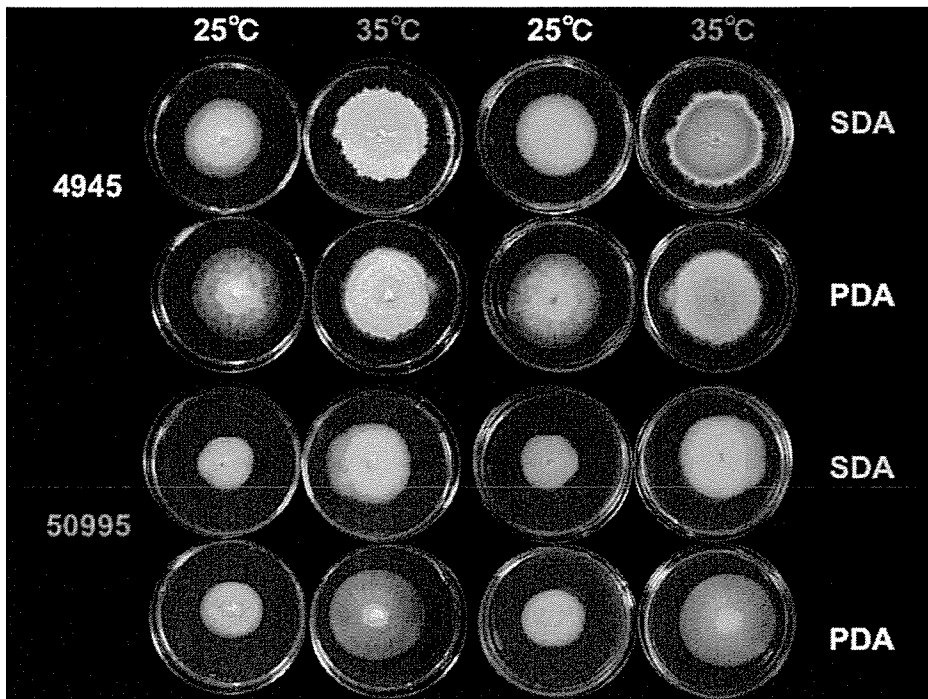


Fig. 5. Colonies of *Coccidioides* spp.-5. Comparisons of surface and reverse textures and colors. SDA; Sabouraud dextrose agar, PDA; potato dextrose agar. Numbers in red letters; *C. immitis*, blue; *C. posadasii*.

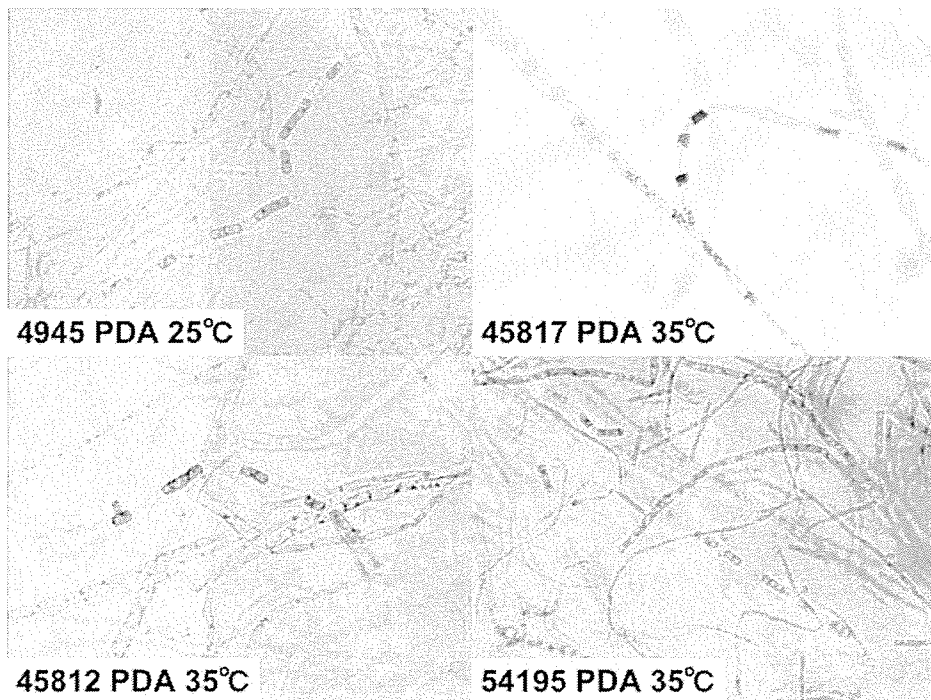


Fig. 6. Arthroconidia.