

厚生労働科学研究研究費補助金  
新興・再興感染症研究事業

深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と  
抗真菌薬の開発、並びに病原因子の解明に向けた  
ポストゲノムの基盤的研究

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 新見 昌一

平成 20 (2008) 年 3 月

# 目 次

I. 総括研究報告書：深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究 新見 昌一（国立感染症研究所）	1
II. 分担研究報告書	
1. コクシジオイデス症およびヒストプラズマ症など輸入真菌症国内発生状況の調査、肺線維症症例に潜在するヒストプラズマ症のスクリーニングに関する研究、およびヒストプラズマ症の血清診断法に関する研究 亀井 克彦（千葉大学真菌医学研究センター）	33
2. 我が国における臨床分離株のカルチャーコレクション構築と生化学的手法で同定された <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> の遺伝学的多様性解析について 菊池 賢、佐々木 崇（順天堂大学医学部感染制御科学）	41
3. 輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発 榎村 浩一（帝京大学医真菌研究センター）	50
4. 病理診断で常用されるホルマリン固定パラフィン切片を用いた病原糸状菌の遺伝学的判別に関する基礎的検討 篠崎 稔（東邦大学医療センター大森病院病理部） 中山晴雄、渋谷和俊（東邦大学医学部病院病理学講座）	64
5. 真菌に関する認知度調査 上 昌広、田中祐次（東京大学医科学研究所）	71
6. 抗真菌薬シーズの開拓と <i>Penicillium marneffeii</i> 定量的検出と種内多様性の解析 杉田 隆（明治薬科大学）	75
7. 病原真菌の細胞壁マンナンに対する宿主の認識・応答 大川原 明子（国立感染症研究所）	83
8. 抗真菌薬耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索 新見 昌一（国立感染症研究所） 上原 至雅（岩手医科大学薬学部）	87
9. 輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発 宮崎 義継（国立感染症研究所） 山越 智（国立感染症研究所） 岡部 智也（株式会社 ACTgen 取締役・事業開発部長） 大川原 明子（国立感染症研究所） 新見 昌一（国立感染症研究所）	96
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	101

平成19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)  
「深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、  
並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究」名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	新見 昌一	国立感染症研究所生物活性物質部第一室	室長
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	菊池 賢	順天堂大学医学部感染制御科学	准教授
分担研究者	楨村 浩一	帝京大学医真菌研究センター	准教授
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探索医療ヒューマンネットワークシステム部門	客員准教授
分担研究者	杉田 隆	明治薬科大学微生物学教室	准教授
分担研究者	上原 至雅	岩手医科大学薬学部微生物薬品創薬学講座	教授
分担研究者	大川原 明子	国立感染症研究所生物活性物質部・第三室	主任研究員
分担研究者	宮崎 義継	国立感染症研究所生物活性物質部	部長
研究協力者	山口 英世	帝京大学医真菌研究センター	名誉教授
研究協力者	倉島 篤行	NHO 東京病院臨床研究部	部長
研究協力者	久米 光	北里大学医学部病理学講座	講師
研究協力者	山越 智	国立感染症研究所生物活性物質部	主任研究員

平成19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

## I. 総括研究報告書

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 - - - - - 1

亀井 克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)  
菊池 賢 (順天堂大学医学部感染制御科学)  
榎村 浩一 (帝京大学医真菌研究センター)  
渋谷 和俊 (東邦大学医学部病院病理学研究室)  
上 昌広 (東京大学医科学研究所)  
杉田 隆 (明治薬科大学微生物学教室)  
上原 至雅 (岩手医科大学薬学部)  
大川原 明子 (国立感染症研究所生物活性物質部)  
宮崎 義継 (国立感染症研究所生物活性物質部)

主任研究者

新見昌一 国立感染症研究所生物活性物質部 第一室室長

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、  
並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

総括研究報告書

主任研究者 新見昌一 国立感染症研究所 室長

研究要旨：(1) 輸入真菌症の国内発生状況については、ヒストプラズマ症が増加傾向にあった。潜在的ヒストプラズマ症患者を検索する目的で肺線維症（3例）の抗ヒストプラズマ抗体検査を行ったが、陽性症例はなかった。ヒストプラズマ症血清診断法の開発については抗原抽出法を確立し、新規抗原候補タンパク質の検索を行った。(2) LAMP法を用いたニューモシスチス症遺伝子診断法および主要マラセチア症起因菌の表現形質による同定法を開発し、臨床的有用性が示唆された。(3) アスペルギルス症の早期診断方法に関する研究を開始し、*Aspergillus fumigatus*の細胞表面あるいは細胞外に存在する、診断標的となる可能性が高い分子の検索を行った。(4) 真菌症の病理診断において、PCR法に加えて形態診断の補助診断法であるISH法を併用すると、診断精度が向上することが示唆された。(5) 臨床応用可能なマルネッフィー型ペニシリウム症起因菌の非培養系定量検出法を開発し、また新規抗真菌薬の開発を目指し子嚢菌および担子菌の両方に抗真菌活性を有する海生菌由来のエキスを見出した。(6) 臨床背景の明らかな1200臨床分離株をデータベース化した。*Candida*属菌の遺伝的多様性をしらべ、新菌種の可能性が示唆される菌株も見出された。本データベースは疫学的解析などに有用であると考えられる。(7) 海洋微生物由来の化合物および培養ろ液をスクリーニングし、その中から真菌の薬剤耐性に関わるABCトランスポーターを阻害する新規物質unnarmicin Aおよびunnarmicin Cを見出した。(8) 炎症惹起に関与する*C.albicans*のmannoproteinを解析するためマンノース転移酵素遺伝子の破壊株作製に着手した。9種類のマンノース転移酵素破壊株を作製し、基礎検討を行った。(9) 患者側の真菌症に対する認知度の調査および情報入手経路の調査を行った。その結果、認知度が低いことが分かり、医学雑誌などのメディアを用いることが認知度向上のために有効であると思われた。

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	菊池 賢	順天堂大学医学部大学院感染制御科学 COE・准教授
榎村浩一	帝京大学医真菌研究センター・准教授	杉田 隆	明治薬科大学・微生物学教室・准教授
渋谷和俊	東邦大学医学部病院病理学講座・教授	上原至雅	岩手医科大学薬学部微生物薬品創薬学講座・教授
上 昌広	東京大学医科学研究所・探索医療ヒューマンネットワークシステム部門・客員准教授	大川原明子	国立感染症研究所・生物活性物質部・主任研究官
		宮崎義継	国立感染症研究所・生物活性物質部・部長

## A. 研究目的

深在性真菌症および輸入真菌症は確実に増加の傾向にあり、これらの発生動向を注意深く継続する必要がある。輸入真菌症に関しては、培養に危険が伴うコクシジオイデス症が感染症法の4類に規定されているため、その原因菌の迅速遺伝子診断法を開発し、加えてヒストプラズマ症原因菌についても迅速遺伝子診断法を開発した。今後は実際に臨床材料を用いて、これらの遺伝子診断法の実用化を目指し、診断技術の普及に努めなければならない。またヒストプラズマ症については国内でも感染発症する可能性があるため、結核菌陰性で結核を疑う患者の血清をしらべたところヒストプラズマ抗体陽性が検出され、さらに詳細な調査が必要となった。このように輸入真菌症の重要性が高まっていることから、輸入真菌症診断・治療ガイドラインを作成して全国の主要病院に配布し、情報が医療従事者に十分に浸透するように努めている。

一方、深在性真菌感染症に関しても早期診断や早期治療の困難なものが多く、真菌血症や全身性深在性真菌症による多臓器不全など重篤な症状に陥ることが少なくなく、実際に医療現場では真菌症の対応に難渋しているのが現状である。本事業で

は、深在性真菌症起因菌診断法の開発、病原性にかかわる分子機構の解明および真菌感染に対する生体側の防御機構の解明、診断・治療薬の開発につながる研究を推進する。しかし、我が国の真菌研究者は数が限られており、真菌感染症を取り巻く諸問題を解決するためには、国立感染症研究所の果たす役割は極めて大きい。他施設との共同作業を通してこの困難に対処することにする。本事業では、1) 輸入真菌症の発生動向調査、2) 潜在的ヒストプラズマ症患者の抗体調査、3) 遺伝子診断法の実用化（コクシジオイデス、ヒストプラズマ）、4) ニューモシスチス症など深在性真菌症の早期迅速診断法の開発、5) 講習会等による診断技術の普及、ガイドラインの配布と情報の提供、6) サーベイランスネットワークの強化とレファレンス体制の確立、7) 真菌感染に対する生体防御機構、真菌の病原因子の解析、抗真菌薬耐性機構、新規抗真菌薬の探索などを包括した真菌症発症機序の解明に関するポストゲノムの基盤的研究を目的としている。

## B. 研究方法

本研究は主任研究者および9名の分担研究者に加えて、研究協力者として山口英世 帝京大学医真菌研究センタ

一名誉教授、倉島篤行 NHO 東京病院臨床研究部長、久米光 北里大学医学部講師および山越智 国立感染症研究所生物活性物質部主任研究員を迎え、研究チームを編成した。

「深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究」に関する各分担研究者の分担研究課題は次のとおりである。

1. わが国における潜在的ヒストプラズマ症患者の基礎的研究 (担当: 亀井克彦)
2. 真菌症ならびに起因菌に対する診断・検査系の研究開発 (担当: 榎村浩一)
3. 輸入真菌症および深在性真菌症の病理細胞診検体を用いた診断法の精度向上ならびに剖検輯報を用いた国内発生動向調査 (担当: 渋谷 和俊)
4. 癌治療における深在性真菌症の早期診断方法、新規抗真菌剤利用の現状調査 (担当: 上 昌広)
5. 深在性真菌症の発生動向、薬剤耐性と分子疫学調査 (担当: 菊池 賢)
6. 抗真菌薬シーズの開拓 (担当: 杉田 隆)
7. 天然物等からの抗真菌創薬探索に関する研究 (担当: 上原至雅)
8. 病原真菌の細胞壁マンナンに対す

る宿主の認識・応答 (担当: 大川原明子)

9. 病原真菌の真菌抗原スクリーニング、新規診断法開発の研究 (担当: 宮崎義継)
10. 研究全体の統括および抗真菌薬耐性機構 (担当: 新見昌一)

本研究班のその他の活動を紹介するため、この冊子の末尾に日本洞窟学会発行の情報誌ケイビングジャーナルに掲載予定の菊池 賢分担研究者による「洞窟関連ヒストプラズマ症について」を掲載した。また2007年1月7日(水)午後2時から国立感染症研究所で開催したミニシンポジウム「真菌と真菌症: 先端知識のアップデート2007」の演者と抄録を掲載した。

## C. 研究成果

### 1. 輸入真菌症の実態調査

我々は、わが国の輸入真菌症の症例数がコクシジオイデス症およびヒストプラズマ症を中心に増加しつつあること、その他の輸入真菌症も散発的ながら確実に増加していることを示した。ヒストプラズマ症は感染症法の対象ではないため実態把握が困難であるが、コクシジオイデス症よりも高い致死率を示すため、発生動向を厳重に監視する必要がある。千葉大学真菌

医学研究センターに真菌症のコンサルテーション、菌株の同定、抗体の測定などの依頼があった症例を収集して基礎データとし、これに醫學中央雑誌、Medline などの報告症例を照合した。コクシジオイデス症については、感染症法 4 類報告とも照らし合わせた。必要に応じて症例の内容を主治医に直接問い合わせた。

コクシジオイデス症は 2007 年に 3 例が確認され、総症例数は 56 例となった。3 例はいずれも基礎疾患のない患者であった。年間症例数はやや減少傾向が見られたが、2 例は重症例であった。そのうち 1 例は実験室内感染であり、コクシジオイデス症の増加に伴い、検査室や実験室での感染事故の増加が懸念される。感染地は、実験室内例を除く 2 例とも米国（1 例はアリゾナ、もう 1 例は不明）であった。2007 年のヒストプラズマ症症例数は 5 例で、総計は 57 例となり、5 年ごとの症例数は緩やかな増加傾向にあると考えられた。感染地は東南アジア 2 例（ラオス、タイ）、メキシコおよびアメリカが 1 名ずつ、不明が 1 名であった。本症の流行地の一大拠点である米国ミシシッピー川流域での感染例が含まれており、インディアナポリスを中心とするミシシッピー川流域には今後も十分な注意を払う必要があることが改めて示された。病型では肺型 2

例、全身播種 2 例、副腎 1 例であり、基礎疾患では AIDS が 1 例であったが、全身播種 2 例のうち 1 例は明らかな基礎疾患を有しておらず、本症の危険性を改めて示した形になった。サルコイドーシスと診断されステロイドを投与された後の死亡例が 1 例あり、全身のヒストプラズマ感染が確認された。パラコクシジオイデス症、マルネッフェイ型ペニシリウム症は認められなかった。

輸入真菌症の増加、特にヒストプラズマ症は確実に増えているが、1) 基礎疾患のない患者に播種型感染が見られたこと、2) 欧米で慢性肺ヒストプラズマ症との鑑別が問題となっているサルコイドーシスと診断・治療された症例からヒストプラズマ症の死亡例があったことなどが重要である。後者の例は、わが国における潜在的なヒストプラズマ症の存在を考える上で示唆に富む症例と考えられる。米国においては、コクシジオイデス症の実験室内および検査室内感染は多数報告されており完全に予防するのは困難であるが、本症の患者が一般病院を受診する機会が増加することを考えると、我が国でも頻発する可能性が高い。このようなことが繰り返されぬよう医療従事者、研究者へ十分な啓蒙が必要である。



## 2. 肺線維症症例に潜在するヒストプラズマ症のスクリーニングに関する研究

本邦のヒストプラズマ症の約15%は海外渡航歴がなく、特徴的臨床所見に乏しい上、自然治癒する傾向があるため看過されやすい。我々は肺結核症と診断された症例の中にヒストプラズマ症が混在することを確認しており、他の疾患にもヒストプラズマ症が紛れている可能性があると思われる。欧米ではサルコイドーシスとヒストプラズマ症の鑑別が時に問題となり、診断が混乱する場合は報告されている。今回は、臨床像が近似し誤診されやすい肺線維症を対象にして血清学的なスクリーニングを試みた。被検者は臨床的に肺線維症と診断された患者3名で、免疫拡散法（ID法）、ラテックス凝集法（LA法）、補体結合法（CF法）を用いて血清中のヒストプラズマ抗体の有無をしらべた。しかし、いずれの方法においても陽性検体は認められなかった。

## 3. ヒストプラズマ症血清診断に関する基礎的研究

本症の診断には病理組織観察や培養による菌の検出等が行われるが、いずれも特殊な設備と時間を要し、感度もよくない。ヒストプラズマ抗原または抗体を検出する血清診断法はより

迅速・簡便である。抗体検出用血清診断試薬が市販されているが、本邦の症例に対して十分な感度が得られていない。我々はヒストプラズマ症血清診断法の開発・改良を目的として、*Histoplasma capsulatum* の抗原抽出法を確立し、患者血清中の抗体と反応する抗原タンパク質の同定を試みてきた。昨年度は同定した各抗原タンパク質遺伝子をクローニングし、大腸菌に大量発現させて組換えタンパク質を精製した。本年度はヒストプラズマ症患者血清を用いて、ELISA法への応用を検討した。*H. capsulatum* のH抗原およびM抗原を含む抗原タンパク質をHis-tag融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。これらのタンパク質はいずれも封入体として回収し、尿素で可溶化後、ニッケルカラムを用いて精製した。これを精製抗原タンパク質として実験に用いた。

MaxiSorp (Nunc) 96-well plate に抗原タンパク質をコーティングし、健常人血清 22 サンプルとヒストプラズマ症患者血清 10 サンプルを用いて ELISA を行った。既知抗原の H 抗原、M 抗原を用いた場合、健常人群と患者群の間で抗体価に有意な差が認められた。我々が同定した抗原タンパク質については、Glutamate carboxypeptidase II (C 末 273 アミノ酸部分) と Catalase P に対する抗体価が健常人群に比べて

患者群が有意に高かった。他の抗原タンパク質については有意な差が認められなかった。

#### 4. ニューモシスチス症診断用 LAMP 法の研究開発

ニューモシスチス症の診断は熟練した臨床検査技師の直接検鏡に頼る部分が多く容易ではない。PCR法を用いた *P. jirovecii* の DNA 検出が商業的に行われているが、まだ十分に活用されていない。そこで、迅速性と特異性に優れた LAMP (loop-mediated isothermal amplification)法を用いた遺伝子診断法の研究開発を行った。

近縁の菌種、4本のプライマー、鎖置換型 DNA ポリメラーゼ、基質 (dNTPs) と反応バッファーの混合液を作り、鋳型 DNA を入れ、一定温度 (60~65°C) でインキュベーションした。検出はリアルタイム検出の他、濁度あるいは蛍光試薬添加による目視判定で行った。本研究によって開発された LAMP 法は、各種病原真菌と交差せず *P. jirovecii* に特異的であった。また、感度はリアルタイム測定では plasmid 当たり 10 コピー、肉眼的には 100 コピーが検出下限と考えられた。臨床的にニューモシスチス症が疑われた 18 症例の気道検体に於いて、熟練した検者による鏡検、LAMP、および PCR 法 (ゲル電気泳動法) を比較

したところ、本 LAMP 法は PCR 法より優れ、鏡検とほぼ同等の検出陽性結果が得られた。

#### 5. 主要マラセチアの典型的表現形質発現頻度と培養同定法の研究

*Malassezia* 属は癬風や脂漏性湿疹の原因として知られ、発育に脂質を要求する酵母である。脂質輸液製剤の使用等に伴って近年カテーテル感染症の起因菌としても報告されている。このような酵母は従来見落とされていたものと考えられるが、発育因子の添加によって *Candida* と同時に *Malassezia* を分離培養することができる培地を我々は既に報告した。本属菌種の同定にはゲノム塩基配列の解析が必須であったが、今回は培養形質に基づく同定法を開発した。

まず、本属各菌種の同定指標となる形質をリストアップし、その確からしさを臨床分離株により検討した。その結果、従来同定の指標とされていた原記載の表現形質が必ずしも安定でないことが分かり、一方、新たに同定の指標を選び直してフローチャートとすることによって、主要マラセチア症起因菌の同定が可能となることを明らかにした。

#### 6. 輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発

今年度は、*Aspergillus fumigatus* による真菌症の診断標的として、使用可能な抗原の検索を行った。診断標的として使用する場合、真菌細胞の細胞質外に局在することが検出に有利であると考え、細胞膜あるいは細胞外に分泌されるタンパク質を検索する方針とした。シグナルシーケンスストラップ (SST) 法は、細胞膜あるいは細胞外へ分泌されるタンパク質を同定する手法として Tashiro らにより報告された (Tashiro et al. *Science*. 1993)。細胞内輸送に必要なシグナルペプチドを有するタンパク質を網羅的に検出することで、様々な状態にある真菌を検出可能と推察できる。酵母細胞などでも SST 法の応用可能性は示されていたため (Klein et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996)、われわれは SST 法を応用して糸状菌の細胞外分泌蛋白の検出を行った。

*A. fumigatus* の conidia を YEPD 培地で 35°C で培養後、集菌して RNA を抽出した。cDNA を作製し、MPL<sup>V</sup> を含む発現ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作製した。リポフェクチンを用いてマウス由来 BAF 細胞にトランスフェクションし、自律増殖可能な細胞をスクリーニングした。増殖可能な細胞からトランスフェクションにより導入したベクター配列を確認し、真菌由来遺伝子と推定される遺伝子

片のシーケンスを行った。

*A. fumigatus* 遺伝子をトランスフェクションによりマウス由来細胞に導入した場合でも、導入した糸状菌由来タンパク質のシグナルペプチドによりマウス細胞表面に移送されることが明らかになった。データベースを参照し約 71 の *A. fumigatus* 遺伝子が同定された。約 16 の既に報告されている *A. fumigatus* 遺伝子にコードされるタンパク質には、*A. fumigatus* の細胞表面に局在することが、以前示されている Afm2p などが含まれていた。

7. 病理診断で常用されるホルマリン固定パラフィン切片を用いた病原糸状菌の遺伝子学的判別に関する基礎的検討

日常病理診断に常用されるホルマリン固定パラフィン切片上に観察される病原糸状菌の判別に関して、In situ hybridization (ISH) 法を応用するための基礎的検討を行い、適切な前処理法の条件設定と新たな検出系の構築を行った。また、従来真菌の検出に応用がほとんど行われていない PNA (Peptide nucleic Acid) プローブの有用性についても検討した。さらに、多数例を解析する際、精度管理上不可欠であるコントロールアレイブロックを培養死菌を用いて作製し、ISH および FISH の一般・実用化を前提とした検

討を行った。一方、現在、PCR法の試料としてのホルマリン固定パラフィン包埋材料の特性はほとんど解析されていない状況であり、中でも真菌DNA抽出法に関しては、一般化された手技は、一切確立されていない。そこでホルマリン固定パラフィン包埋材料を対象とした真菌に関連するDNA抽出法の基礎的検討を行い、実際の診断への利用を前提とした精度および妥当性を検討した。

その結果、PNAプローブを用いたISH法は60分から120分で良好なシグナルが得られ、簡便、迅速かつ精度が高い診断法としての有用性が示唆された。今回作製したコントロールアレイブロックは被検サンプルと同一スライドに貼付することで、良好なコントロールブロックとして使用可能であり、多数例を解析する際の制度管理に貢献すると思われた。ホルマリン固定パラフィン切片から、真菌DNAを抽出する際の最適な処理法を設定した。本条件を用いることで、比較的核酸の保持が良好でない剖検症例からも効率的に真菌DNAが得られ、PCR法に供することが可能であった。今回の検討で選定したプライマーを使用したPCR法とALPおよびAfu-1プローブを用いたISH法を併用することで、ホルマリン固定パラフィン切片における真菌を対象とした精度が

高い遺伝子診断が可能であることが示唆された。

## 8. *Penicillium marneffe*i 定量的検出と種内多様性の解析

輸入真菌症の一つであるマルネッフィ型ペニシリウム症を選びその起因菌である*Penicillium marneffe*iの定量的検出と種内多様性の解析も合わせて行った。

定量的検出系の構築：rRNA遺伝子のIGS (intergenic spacer region) 上に*Penicillium marneffe*i特異的なprimerおよびTaqMan probeを設計した。PCR増幅されたIGS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。IGS領域からprimer/probeを設計した。 $10^1$ – $10^8$ では $r^2=0.999$ の直線的な検量線が作成された。

種内多様性の解析：オランダの菌株保存機関であるCBSより*Penicillium marneffe*iを入手した。また、タイ人患者の血液より分離された*Penicillium marneffe*iを含めた合計50株のrRNA遺伝子中のIGS領域を解析した。なお、DNAは本研究班の分担研究者である榎村浩一先生に調製して頂いた。プライマーでIGSの全長の塩基配列が決定された。約2200bpであり、複数の反復配列が見出された。詳細な疫学的

見地からの多様性解析は次年度に行う予定である。

## 9. 抗真菌薬シーズの開拓

現在、上市されている抗真菌薬は抗細菌薬や抗ウイルス薬に比べればその数は格段に少ない。また、ヒトと同じ真核細胞であるため選択毒性となる作用機序も限られる。そこで新たな抗真菌薬シードをきのこおよび海生菌の代謝産物に求めた。

### エキスの作製と抗真菌活性

きのこは粉状に、海生菌は培養ろ液を調整した。クロロホルム、酢酸エチルおよびメタノールの3溶媒を用いて分画した。調整されたエキスの抗真菌活性を *Candida albicans* および *Cryptococcus neoformans* 株を用いて評価した。また、アゾール耐性株を用いて。アゾール薬とエキス成分との相乗効果も併せて評価した。

### 抗真菌活性物質の探索

a. エキスの評価：440 サンプル中、4 サンプルに *C. albicans* および *C. neoformans* の両菌種に抗真菌活性が認められた。いずれのエキスも濃度異存的に両菌種の増殖を阻害し、かつその作用は致死的であった。

b. アゾール薬との相乗効果：フルコナゾールを 8、4、2、1 mcg/mL となるようにエキスに加え、アゾール薬耐性 *C. albicans* に対する増殖抑制効果を

求めた。2 mcg/mL のフルコナゾールの添加で相乗効果が示された。なお供試株の薬剤感受性は、フルコナゾール、イトラコナゾールおよびボリコナゾールに対してそれぞれ、>32、>8>、8 mcg/mL である。

10. 我が国における臨床分離真菌菌株のカルチャーコレクション構築と生化学的手法で同定された *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* の遺伝的多様性解析について

近年、深在性真菌症に関して様々な大規模な多国間疫学調査が行われるようになってきたが、我が国における大規模調査はまだまだ少なく、解析された菌株の保存・公開はほとんどなされていない。臨床背景の明らかな菌株のカルチャーコレクション構築は深在性真菌症の疫学解析、予防、新しい診断法や抗真菌薬の開発などには不可欠である。しかし、我が国における臨床分離株の大規模な真菌カルチャーコレクションの整備は産業用菌株と違い、千葉大学真菌医学研究センター、帝京大学医真菌研究センターなどのごく一部の組織を除いて、ほとんど実施されてこなかった。我々は 1997 年より国内での深在性真菌症の発生動向調査や他の医療施設からの真菌菌種同定・感受性試験依頼、カルチャ

ーコレクション移管、などにより約1200株の臨床分離真菌菌株を集積し、保存・管理してきた。これらの菌株の多くは分離された患者の診断・治療経過・臨床背景などが明らかであり、そのデータベース整備は本研究班の目的である新しい深在性真菌症診断法や抗真菌薬の開発に重要な役割を果たす。このため、我々は研究者への個人情報以外の情報公開・菌株譲渡も視野に入れた真菌臨床分離株データベース作成を行い、集められた菌株のうち、最も多かった *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* についてしらべた。

真菌血症由来酵母 353 株中、327 株 (92.6%) とほとんどが *Candida* 属であった。*Candida* の菌種では、*C. albicans* が 150 株と最も多かったが、Non-*albicans* 全体が 177 株と、過半数を占めた。Non-*albicans* では *C. parapsilosis* が 89 株と多く、次いで *C. glabrata* 41 株、*C. tropicalis* 28 株の順であり、*C. albicans* を加えた主要 4 菌種の占める割合は *Candida* 327 株中 308 株 (94.2%) とほとんどを占めた。

*C. albicans* との鑑別が困難であり、本邦の真菌血症由来株としては報告のみられなかった *C. dubliniensis* は 3 株認められた。従来、*C. parapsilosis* に含まれていた *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* もそれぞれ 3, 1 株ずつ検

出された。

*Candida* 属以外の酵母では *C. curvatus* が 9 株と最も多く、次いで *C. neoformans* の 5 株と、*Cryptococcus* 属が多かった。また、従来、本邦の真菌血症を含む深在性真菌症の起因菌としてはほとんど報告のみられない *Rhodotorula mucilaginosa*, *Lodderomyces elongisporus* が 4, 3 株ずつ認められた。

従来法による同定と遺伝子同定との比較をすると、両者の一致率は 95% であった。*C. dubliniensis* はすべて従来法では *C. albicans* と、*C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* は *C. parapsilosis* と同定されていた。*Lodderomyces elongisporus* は従来法では *C. parapsilosis*, *C. sake* と同定されていた。

従来法で *C. albicans* と同定された 137 株の group I intron typing について、group I intron type では *C. albicans* は A, B, C, E の 4 type に、*C. dubliniensis* は D type に分かれ、両者を区別することが可能である。今回、ITS1-26S rDNA sequence にて *C. dubliniensis* と同定された 3 株は全て D type と判定された。従来報告では分離頻度は A, B, C の順であるとされ、今回の結果もそれを裏付けていたが、PCR でバンドの検出できない non-typeable 株が 31 株と A type に次いで多かった。

*C. dubliniensis* の検出患者背景につ

いて、1例は単心室で手術後の患者で、カンジダ性食道潰瘍が先行し、その後 fluconazole 投与にもかかわらず、感染性心内膜炎で死亡した症例であった。

*C. dubliniensis* 3株に対する各種抗真菌薬の MIC については、近年問題となっている、azole 耐性は認められなかったが、TWCC 13452 に対する micafungin の MIC は 16 と高かった。

近年、真菌の遺伝子同定方法がほぼ確立し、*Candida* 属では *C. dubliniensis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* などが従来の *C. albicans*, *C. parapsilosis* から分離された。*C. dubliniensis* では HIV 患者の口腔カンジダ症からの検出が多いこと、azole 耐性が多いのではないかと報告が相次ぎ、注目を集めている。これまでに本邦での真菌血症例からの分離報告はなく、今回見出された 3 症例は初めての症例と考えられた。*C. dubliniensis* と *C. albicans* は今回用いた CHROMO agar 上での発育、Vitek2, rapid ID32C などの同定キットで区別可能とされているが、*C. dubliniensis* 3株はいずれも *C. albicans* と同定されており、その同定は困難であった。実際の臨床現場で *C. dubliniensis* は見逃されている可能性が示唆される。

*C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* は従来、genotype II, III *C. parapsilosis* と呼ばれていたもので、最近独立種として

扱われることが提案された (J Clin Microbiol 43: 284-292, 2005)。病原性の違い等について今後の臨床検討が必要と考えられる。今回の検討では、*C. curvatus*, *R. mucilaginosa*, *L. elongisporus* など、真菌血症からは本邦を含めてほとんど報告されていない菌種が含まれており、その臨床背景については、注意すべき新興深在性真菌症の一つとして、その位置付けについて更なる検討が必要と考えられた。これらの菌は今後、院内感染として更に増加、蔓延する危険性を孕んでおり、疫学、発生動向などの調査を続行すべきであると思われた。

#### 1 1 .抗真菌剤耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索

カンジダ症やアスペルギルス症などの深在性真菌症が確実に増加している。これらの真菌症は、エイズ、悪性腫瘍、血液疾患などの基礎疾患を持つ患者や臓器・骨髄移植を受けた患者に多発しており、医療の先進・高度化ならびに人口の高齢化に伴う日和見感染症として、今後もさらに増加することが危惧されている。真菌症を克服するための新薬の開発が待たれているが、病原真菌と宿主であるヒトの間には共通した遺伝子や生体分子が多いために、選択毒性の高い薬剤が得られ難い。既存の抗真菌薬の中では、ア

ゾール系抗真菌剤が最も広く使われ、ヒトに対する副作用が少なく、良好な血中濃度が得られるため新薬開発の中心をなしてきた。特にフルコナゾールは、エイズ患者の口腔咽頭カンジダ症の予防・治療に用いられてきたが、本薬に対して耐性の *Candida albicans* 臨床分離株が頻繁に分離されるようになった。これを契機に *C. albicans* のアゾール剤に対する耐性機構の解明が進み、真菌細胞膜に局在する薬剤排出ポンプの過剰発現がアゾール耐性の主な原因であることが明らかになった。

そこで真菌の薬剤排出ポンプの働きを止めてアゾール剤の菌体内濃度を保つことにより、薬剤本来の抗菌力を発揮する方法を考えた。これは既存の抗真菌剤を生かすことにもなり、新規の抗真菌物質の探索と並行して、耐性菌問題を克服するための手段として欠かせないと考えられる。本研究においては病原真菌の薬剤排出ポンプを高発現した出芽酵母発現系を用いて真菌の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索を行った。

海洋バイオテクノロジー研究所より分与された海洋微生物由来の 80 化合物および 8640 培養ろ液を実験に供した。排出ポンプ阻害剤スクリーニングの評価系およびポンプ機能の解析としては、*C. albicans* の主要な排出

ポンプ遺伝子 *CDR1*、*CDR2*、*MDR1*、*C. glabrata* の *CgCDR1* および *CgPDH 1*、*S. cerevisiae* の *ScPDR5* をそれぞれ *S. cerevisiae* AD 株に導入した排出ポンプ高発現株を用いた。*S. cerevisiae* AD 株はあらかじめ 7 種の内在性ポンプが破壊されているのでアゾール剤に高度感受性であり、この株に外来性の排出ポンプ遺伝子を導入・発現することによりポンプ固有の排出機能を反映したアゾール剤耐性株が得られている。さらにアゾール耐性 *C. albicans* 臨床分離株 2 株を用いた。

海洋微生物由来の化合物および培養ろ液による菌の感受性化は *in vivo* および *in vitro assay* によってしらべた。*In vivo assay* においては、sub-MIC 濃度のフルコナゾールを含む寒天培地で菌を培養し、感受性ディスク法を用いて阻止円の大きさを判定し、またマイクロプレートを用いたマイクロ希釈チェッカーボード法でしらべた。さらにローダミン 6G の排出活性阻害効果を測定した。一方、*In vitro assay* はアゾール耐性菌から細胞膜を調整し、排出ポンプ (*Cdr1p*、*Cdr2p*) の ATPase 活性に対する阻害効果を測定した。

#### 1) 真菌 ABC トランスポーターの特異的阻害剤のスクリーニング

*unnarmicin A* および *unnarmicin C* は元々抗細菌活性を示す化合物として



分離されたもので、4個のアミノ酸と異なる長さの3-hydroxy fatty acid となる cyclodepsipeptides である。Sub-MIC 濃度のフルコナゾール存在下で感受生ディスク試験を行うと、両化合物はいずれもアゾール剤耐性 *S. cerevisiae* AD/CaCDR1 株の発育を阻害し、ディスク周辺に大きな阻止円を生じた。この阻害活性は AD/CaCDR1 に特異的であり、AD/CaCDR2 および AD/CaMDR1 に対して感受性化は認められなかった。unnarmicin A および unnarmicin C の AD/CaCDR1 に対する効果は既知の排出ポンプ阻害剤 FK506 の阻害効果に匹敵するものであった。unnarmicin A および unnarmicin C はそれぞれ単独ではいずれのポンプ発現株に対しても増殖阻止効果はなかった。unnarmicin A および unnarmicin C の広範囲の真菌排出ポンプ阻害活性の有無をしらべるために、*C. glabrata* の CgCdr1p および CgPdh1p、*S. cerevisiae* の ScPdr5p 過剰発現耐性株、さらにフルコナゾール耐性 *C. albicans* 臨床分離株に対する阻害効果を検討した。その結果、*C. glabrata* の ABC トランスポーターである CgCdr1p、CgPdh1p 発現株は発育が強く阻害された。その阻害効果は FK506 のそれに相当した。同様に ScPdr5p 発現株もフルコナゾール共存下で増殖が阻害された。臨床から分離

された *C. albicans* 2株は CDR1 および CDR2 を過剰発現しているフルコナゾールおよびケトコナゾールに耐性の株であるが、unnarmicin A および unnarmicin C はこれらの臨床分離株に対しても同様に感受性化し、特に CaAD 株に対して顕著であった。

## 2) *C. albicans* 排出ポンプ発現株の感受性化

次に unnarmicin A および unnarmicin C の相乗効果を評価するためにアゾール耐性 *S. cerevisiae* CDR1 発現株の感受性化をマイクロプレート上でミクロ希釈チェッカーボード法によってしらべた。プレートの縦横にそれぞれフルコナゾールと unnarmicin A (または C) の希釈系列をつくり、各濃度の組み合わせにおける AD/CaCDR1 発現株の増殖の程度を測定した。AD/CaCDR1 発現株に対するフルコナゾール単独の MIC は 320  $\mu\text{g/ml}$  であったが、10  $\mu\text{M}$  unnarmicin A または 1.25  $\mu\text{M}$  unnarmicin C が共存するとフルコナゾールの MIC は 5  $\mu\text{g/ml}$  に低下した。しかし、AD/CaCDR2 および AD/CaMDR1 に対しては unnarmicin A および unnarmicin C はフルコナゾールの MIC は低下しなかった。AD/CaCDR1 発現株の発育阻止に対するフルコナゾールと FK506, unnarmicin A および unnarmicin C のそ

それぞれの FIC Index は 0.266、0.141、0.031 であり、unnarmicin A および unnarmicin C 両剤の強い相乗効果が示された。またフルコナゾール耐性 *C. albicans* 臨床分離株の発育阻止に対するフルコナゾールと FK506、unnarmicin A および unnarmicin C のそれぞれの FIC Index も相乗効果を示した。

### 3) CaCdr1p 発現株のローダミン 6G 排出および ATPase 活性に対する阻害効果

ABC タンパク質の薬剤排出活性は、蛍光基質であるローダミン 6G によって定量的に測定できる。CaCdr1p のローダミン 6G 排出活性に及ぼす両剤の影響について検討した。AD/CaCDR1 株および AD/CaCDR2 株を 2-deoxy glucose 存在下で培養し、細胞内の ATP を枯渇させて ABC タンパク質が機能しない状態にして、ローダミン 6G を細胞内にとりこませた。その後、グルコース添加によって ATP 合成を回復させてローダミン 6G を排出させ、その排出量を測定した。その結果、CaCdr1p のローダミン排出活性は unnarmicin A および unnarmicin C のいずれによっても濃度依存的に阻害されたが (IC50 はそれぞれ 3.61  $\mu\text{M}$  と 5.65  $\mu\text{M}$ )、CaCdr2p のローダミン 6G 排出活性は阻害されなかった。

ABC タンパク質は ATPase 加水分解エネルギーによって薬剤を排出する。unnarmicin A および unnarmicin C の CaCdr1p の ATPase 活性に及ぼす影響について検討した。AD/CaCDR1 株および AD/CaCDR2 株より細胞膜画分を調製し、リン酸モリブデン法によって ATPase 活性を測定した。その結果、CaCdr1p の ATPase 活性は unnarmicin A および unnarmicin C のいずれによっても濃度依存的に阻害されたが (unnarmicin A および unnarmicin C による IC50 はそれぞれ 0.495  $\mu\text{M}$  と 0.688  $\mu\text{M}$ )、CaCdr2p の ATPase 活性はいずれによっても阻害されなかった。

## 1 2. 病原真菌の細胞壁マンナンに対する宿主の認識・応答

遺伝子破壊株の作製、発現解析によって、*C. albicans* のゲノム上にコードされている糖付加酵素と予想される遺伝子のうち、 $\beta$ -1,2-マンノースを付加する糖転移酵素を同定する。また、遺伝子破壊株の解析により、細胞表層における  $\beta$ -1,2-マンノース付加の生体防御反応における重要性を明確にする。遺伝子改変により樹立した *C. albicans* の遺伝子変異株の生菌、死菌あるいは培養液より調整した水溶性の mannoprotein (MP) を使い、マウスマクロファージ、マウスマクロファージ様

細胞株 (J774A.1) を活性化し、生体防御反応の違いについて比較、検討を行うことによって、細胞表層の構造変化と初期の免疫応答の因果関係を明らかにする。

### 1) 遺伝子破壊株の作製

Uridine と Arginine 要求性の TUA4 (Ura3  $\Delta$ 、Arg4  $\Delta$ ) を用い遺伝子破壊を2段階で行った。破壊する遺伝子の翻訳領域の上流 200-300bp とハイグロマイシン遺伝子の一部 hph200(約 200bp)と Ura3 遺伝子の一部を連結した DNA 断片 (合計約 2kbp)を PCR 法にて増幅した。同じように遺伝子翻訳領域の下流 200-300bp と hph200 と Ura3 の一部を連結した DNA 断片 (約 2kbp)を増幅し、両方の DNA 断片を混合後、TUA4 株に常法にて DNA 導入した。遺伝子破壊株は Uridine 要求性を相補すると考えられるので Uridine を除いた最小培地を用い候補の株を選択し、PCR 法にて一方のアリルの遺伝子コーディング領域を相同組み換えにより欠失した株を同定した。残りの一方のアリルも同様に遺伝子破壊を行った。破壊遺伝子の翻訳領域上流あるいは下流の 200-300bp と Arg4 遺伝子の一部を連結した DNA 断片を PCR 法にて増幅し、両 DNA 断片をすでに Ura3 遺伝子で一アリルを遺伝子

破壊した株に導入した。Uridine と Arginine を除いた選択培地にて得られた遺伝子ホモ破壊株を PCR 法にて同定した。現在までに9種類の遺伝子破壊株を作製した。

### 2) 遺伝子破壊株の解析

YPDU 培地で  $1 \times 10^4$  cells/ml になるよう菌液を調整し、30°C、70rpm で培養し倍化時間を算出した。また、菌糸形成能は 10 %血清入り寒天培地に植菌して 37°Cで培養し、一週間後に形成された菌糸を観察した。対数増殖期の倍加時間は親株の TUA-4 で 1.2 時間であり、各破壊株ともだいたい同じであった。一方、10% 血清固形培地中における菌糸形成能にも差を認めなかった。

### 3) MP 精製

YPDU 培地で 30°C、200 rpm で一晩前培養した菌を 48 時間本培養した。培養液を遠心して菌体を集めた、生理食塩水等で洗った後、20 mM の citrate buffer を加え、125°Cで 90 分オートクレーブし MP を抽出した。抽出液に3倍量のメタノールを加えて一晩攪拌して遠心し、その沈殿に水を加えて溶解した。水に対して透析を行い、遠心エバポレーターで乾燥した。

#### 4) MP 表面構造の解析

血清因子（ヤトロン製；抗 $\beta$ -1,2 マンナンラビットポリクローナル抗体）を用いてマンナン表面構造の解析を行った。精製した MP を ELISA プレートにコーティングし、翌日 ELISA アッセイを行った。それぞれの破壊株から精製した MP は親株と同様にいずれも血清因子 5,6 に反応したことから表面に  $\beta$ -1,2 結合型のマンノースが存在すると考えられた。

#### 5) MP によるマウスマクロファージ活性化の検討

親株 (TUA-4) およびリン酸基を介したマンナンを欠失した MNN4 の 2 株を用いて基礎検討を行った。 $1 \times 10^6$  cells/ml の J774A.1 細胞 360  $\mu$ l を 48-well 組織培養用プレートにまき、18 時間後に培地交換し、10 ng/ml の GM-CSF 共存下、MP で刺激した。24 時間培養後に培養上清をとり IL-6, TNF- $\alpha$  両サイトカインを定量した。親株 TUA-4、リン酸基を介したマンナンを欠失した MNN4 いずれも 10 ng/ml の GM-CSF 共存下、IL-6, TNF- $\alpha$  両サイトカインの産生能を認めた。

### 1.3 真菌に関する認知度調査

近年、抗真菌薬の開発が進み、治療選択も増えてきている。真菌症の治療において、治療のコンプライアンスを

あげ迅速な治療を行うためには患者や家族に対して十分な説明と理解を得る必要がある。そのためには患者側の真菌に対する知識と理解が増えることが期待される。

そこで、今回我々は現状の真菌に対する認知度を調査し現状の把握を行った。また、情報入手経路を調査することで今後の真菌に関する情報発信に関して考察した。院内フリーマガジン「ロハス・メディカル」の紙面を利用してはがきによるアンケート調査を行った。ロハス・メディカルは 22 万部発行している無料の雑誌で、毎月 20 日に発行している。都内 120 病院に 12 万部、新聞の販売促進物で 10 万部配られている。今回のアンケート調査は 2008 年 1 月 20 日。アンケート回収期間は 2008 年 1 月 20 日から 2 月 20 日。

#### 対象者背景

回答総数 468 名（男性 187 名、女性 281 名）、年齢中央値 53 歳（18-87）、疾患内訳：がん 67 人、皮膚疾患 99 人、その他 322 人であった。

#### 真菌の認知度

表在性真菌症に関しては表在性真菌症としてではなく、一般名のミズムシ（452 人）、インキン（391 人）、シラクモ（301 人）として認知度は高い。

重症感染症を引き起こす深在性真