

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。

## B. 研究方法・結果

*Aspergillus fumigatus* 株からの RNA 抽出：*A. fumigatus* の conidia を YEPD(yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%)培地で 35°C で培養した。培地において分生子が菌糸形成し、直径 1～10 μm の球状に増殖させ、集菌し RNA を抽出した。

トランスフェクション：抽出した RNA から cDNA を作成し、MPL<sup>V</sup> を含む発現ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作成した。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。

1. *A. fumigatus* における SST 法の有効性。真菌である *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。

2. 同定された *A. fumigatus* 遺伝子。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。

## C. 考察

本研究によって、糸状菌のシグナルシーケンスがマウス細胞内で機能することが証明された。細胞膜あるいは細胞外に局在すると推察される *A. fumigatus* タンパク質をコードする遺伝子をクローニングした。そのうち、16 の遺伝子は既に *A. fumigatus* 遺伝子として報告されており、細胞表面に局在することが証明されているものもあった。例えば、Afmp2p は、菌糸の表面に局在し、アスペルギローマや侵襲性アスペルギルス症の患者で特異抗体が検出できることが既に発表されているタンパク質であった (Chong et al. *J Clin Microbiol*, 2004)。また、Aspf2p (Banerjee et al, *Infect Immun.* 1998) のように、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症において患者 IgE と結合し、アスペルギルスにおけるアレルゲンの一つと考えられているタンパク質も含まれていた。他にも fos-1 のように、遺伝子欠損によりは感染モデルに於いて病原性が低下する putative histidine kinase など含まれていた (Clemons et al. *Med Mycol* 2002)。

しかし、他の多くのスクリーニングさ

れたタンパク質については、局在の確認が必要と考えられた。

今後は、抗体を作成し、今回検索した抗原群が患者血清で検出可能か否かに関する検討が成されるべきと考えられた。

#### D. 結論

*fumigatus* タンパク質のうち細胞表面、あるいは細胞外に局在すると推定されるタンパク質をコードする遺伝子を検出した。

#### E. 健康危険情報

ない。

#### F. 研究発表

(論文)

1. Inoue Y, Miyazaki Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Kakeya H, Sawai T, Hirakata Y, Kohno S. Pulmonary Cryptococcosis presenting as endobronchial lesions in a patient under corticosteroid treatment. Intern Med. 2007;46(8):519-23.

2. Kohno Y, Ohno H, Miyazaki Y, Higashiyama Y, Yanagihara K, Hirakata Y, Fukushima K, Kohno S. In Vitro and In Vivo Activities of Novel Fluoroquinolones Alone and in Combination with Clarithromycin against Clinically Isolated Mycobacterium avium complex Strains in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Nov;51(11):4071-6.

3. Izumikawa K, Morinaga Y, Kondo A, Hara K, Izumikawa K, Miyazaki Y, Kohno S, Igari N, Akaboshi M, Kawakami J, Eguchi K. Adult Still's disease associated with cytomegalovirus infection. J Infect Chemother. 13(2):114-7, 2007.

4. 宮崎義継、河野 茂. 深在性真菌症の治療. 臨床環境医学会雑誌 16(1):17-20, 2007

5. 中村茂樹, 宮崎義継, 三原 智ほか. A case of multiple nodular pulmonary amyloidosis complicated with primary Sjogren syndrome. 呼吸器学会雑誌 2007 ;45(4):356-60

6. 宮崎義継. 中枢神経系の深在性真菌症に対する治療の進歩. 神経治療学 Vol.24, No.6,Nov. 2007 ; 659-661

(学会)

1. Miyazaki Y. Management of Invasive fungal infections in Japan. 14th Annual Meeting of Korean Society of Mycology. 6月23日. ソウル.

2. 第55回日本化学療法学会西日本支部総会、第50回日本感染症学会中日本地方会学術集会・合同学会(神戸) 教育講演「アスペルギルス症研究の進歩」

3. Kaneko, Y., Yanagihara, K. and Miyazaki, Y. New strategies for control of chronic respiratory infections - focusing on microbial biofilms-

First Indo-Japanese International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalant in Asian Countries. 東京.

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

著者氏名	論文 タイトル名	書籍全体 の編集者 名	書籍名	出版社 名	出版 地	ページ	出版年
亀井克彦、渡辺 哲	Q4 海外渡航者で気をつ けるべき真菌症とその 対策は？	河野茂	改訂版 深 在性真菌症 Q&Aー2007 ガイドライ ンを踏まえ て	医薬ジ ャーナ ル社		18-20	2007
亀井克彦、渡辺 哲	輸入真菌症ーコクシジ オイデス症, プラスト ミセス症, ヒストプラ ズマ症, 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	宮治誠	病原性真菌 ハンドブッ ク	医薬ジ ャーナ ル社		132-139	2007
亀井克彦	カンジダ症, クリプト コッカス症, アスペル ギルス症, ムーコル症, ムコール症, 輸入真菌 症		内科学第 9 版	朝倉書 店		341-346	2007
深在性真菌症の ガイドライン作 成委員会 (委員 長: 河野茂, 顧 問: 山口英世, 委員: 荒木恒敏, 岡慎一, 海江田 哲, 上昌広, 亀 井克彦, 木内哲 也, 久米光, 渋谷 和俊, 相馬一 玄, 高田徹, 竹 末芳生, 田中秀 治, 田村和夫, 二木芳人, 福田 隆浩, 前崎繁文, 榎村浩一, 三鴨 廣繁, 光武耕太 郎, 宮崎義継, 森健, 森雅亮, 矢野啓子, 吉田 耕一郎, 吉田稔)	深在性真菌症の診断・ 治療ガイドライン 2007			協和企 画	東京		2007

槇村浩一	(1) 抗真菌剤はなぜ効く？たくさんあるけどどこが違うの？、1塗り薬、2 ノーベル賞級の水虫治療薬はもう完成している？ 第4章 達人伝授の治療法	渡辺晋一、 宮地良樹	水虫最前線 皮膚科診療 最前線シリ ーズ	メディ カルレ ビュー	東京	178-181	2007
槇村浩一	深在性真菌症の遺伝子診断は有用か？	河野茂	改訂版 深 在性真菌症 Q&A-2007 ガイドライ ンを踏まえ て-	医 薬 ジ ャ ー ナ ル 社	大阪	79-81	2007
槇村浩一	真菌症の遺伝子診断法	宮地誠	病原性真菌 ハンドブック	医 薬 ジ ャ ー ナ ル 社	大阪	100-104	2007
新見昌一	真菌学総論		戸田細菌学 改訂33版	南山堂			2007

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	Japan. Med Mycol	45 (3)	233-247	2007
亀井克彦, 渡辺哲	真菌感染症におけるトピックス 輸入真菌症	臨床と微生物	34(6)	729-734	2007
亀井克彦, 渡辺哲	輸入肺真菌症	呼吸器科	11(1)	35-42	2007
亀井克彦	深在性真菌症とその対策	感染防止	17(40)	1-9	2007
亀井克彦, 渡辺哲	感染症学各論 微生物の病原因子 真菌の病原因子	日本臨床	65(増刊号 3 新感染症学(下) —新時代の基礎・臨床研究—)	451-453	2007
佐野文子, 亀井克彦	感染症学各論 感染症法分類 発症・病態・診断・治療 四類感染症 コクシジオイデス症	日本臨床	65(増刊号 3 新感染症学(下) —新時代の基礎・臨床研究—)	223-228	2007
Natsu Uemura, Koichi Makimura, Masanobu Onozaki, Yoshihito Otsuka, Yasuhiro Shibuya, Hirohisa Yazaki, Yoshimi Kikuchi, Shigeru Abe, and Shoji Kudoh	Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing <i>Pneumocystis</i> pneumonia	Journal of Medical Mycology	57(Pt 1)	50-7	2008

上村なつ、榎村浩一	Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) 法の原理と真菌症への応用	呼吸器科	11 巻 1 号	80-85	2007
Takamasa Kaneko, Koichi Makimura, Michiko Abe, Ryoko Shiota, Yuka Nakamura, Rui Kano, Atsuhiko Hasegawa, Takashi Sugita, Shuichi Shibuya, Shinichi Watanabe, Hideyo Yamaguchi, Shigeru Abe, and Noboru Okamura	A revised culture based identification system for <i>Malassezia</i>	Journal of Clinical Microbiology	45(11)	3737-42	2007
Bii CC, Makimura K, Abe S, Taguchi H, Mugasia OM, Revathi G, Wamae NC, Kamiya S	Antifungal drug susceptibility of <i>Cryptococcus neoformans</i> from clinical sources in Nairobi, Kenya	Mycoses	50(1)	25-30	2007
Tani K, Adachi M, Nakamura Y, Kano R, Makimura K, Hasegawa A, Kanda N, Watanabe S.	The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes.	Dermatol Research	[Epub ahead of print]		2007
Liu C, Matsushita Y, Shimizu K, Makimura K, Hasumi K	Activation of prothrombin by two subtilisin-like serine proteases from <i>Acremonium</i> sp.	Biochem Biophys Res Commun	358(1)	356-62	2007
Hossein Mirhendi, Kambiz Diba, Parivash Kordbacheh, Nilufar Jalalizand and Koichi Makimura	Identification of pathogenic <i>Aspergillus</i> species by a PCR-restriction enzyme method	Journal of Medical Mycology	56(Pt 11)	1568-70	2007
Takamasa Kaneko, Koichi Makimura, Michiko Abe, Ryoko Shiota, Yuka Nakamura, Rui Kano, Atsuhiko Hasegawa, Takashi Sugita, Shuichi Shibuya, Shinichi Watanabe, Hideyo Yamaguchi, Shigeru Abe, and Noboru Okamura	A revised culture based identification system for <i>Malassezia</i>	Journal of Clinical Microbiology	45(11)	3737-42	2007
Natsu Uemura, Koichi Makimura, Masanobu Onozaki, Yoshihito Otsuka, Yasuhiro Shibuya, Hirohisa Yazaki, Yoshimi Kikuchi, Shigeru Abe, and Shoji Kudoh	Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing <i>Pneumocystis pneumonia</i>	Journal of Medical Mycology	57(Pt 1)	50-7	2008
Tsuyoshi Yamada, Koichi Makimura, Tatsuya Hisajima, Maki Ito, Yoshiko Umeda, Shigeru Abe	Genetic transformation of the dermatophyte, <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , based on the use of G418 resistance	Journal of Dermatological Science	49(1)	53-61	2008

	as a dominant selectable marker.				
柴田 明佳, 金子 孝昌, 榎村 浩一, 小野崎 正修, 荻原 利彦, 柴田 裕子, 菊池 賢, 安部 茂	合成酵素基質を用いた酵母様真菌分離鑑別培地ポアメディア Vi カンジダ寒天培地ならびに CHROMagar Candida の発育支持および菌種鑑別能に関する比較検討	真菌誌	49	33-38	2008
榎村浩一	【検査業務にかかわる感染をどう防ぐか】各種検査業務からみた職業感染予防策 微生物検査に伴う感染とその予防策 呼吸器検体からの真菌感染	Medical Technology	35 巻 1 号	P43-46	2007
榎村浩一	【新感染症学 新時代の基礎・臨床研究】感染症学総論 感染症の診断原因微生物の検索 真菌の各種検査法	日本臨床	65 巻増刊 2	169-173	2007
榎村浩一	【新感染症学 新時代の基礎・臨床研究】感染症学総論 抗菌薬 薬剤耐性化と対策 薬剤耐性化真菌の耐性化機	日本臨床	65 巻増刊 2	466-470	2007
榎村浩一	病原真菌と真菌が関与する疾患 現状と展望	Progress in Medicine	27 巻 2 号	472-482	2007
榎村浩一	クリプトコックスとクリプトコックス症：その診断・治療	日本医事新報	85	4339	2007
榎村浩一	真菌による日和見感染症. 特集 日和見感染症	Medical Technology	35 巻 7 号	710-715	2007
榎村浩一	我が国における病原真菌と健康障害ならびに対策の現状	日本細菌学会雑誌	62(2)	295-312	2007
榎村浩一	真菌の多様性と病原性-特集 2 微生物の生残戦略と病原性の関連-	JVM 獣医畜産新報	60(7)	587-588	2007
小野崎正修, 榎村浩一	カンジダ, ニューモシスチス. 世界的にみた感染症の検査法	臨床と微生物	34 (4)	335-339	2007
大森雅之, 石岡憲明, 泉龍太郎, 江崎孝行, 大石浩隆, 太田寛行, 加藤憲二, 喜多正和, 東端晃, 福井啓二, 藤本信義, 榎村浩一, 山崎丘	宇宙微生物学研究班 WG 活動報告	Space Utiliz Res	23	353-354	2007
榎村浩一	深在性真菌症の検査法-主流となる最新技術-特集 深在性真菌症	アニムス	51	24-28	2008

杉野圭史, 長谷川千花子, 木村一博, 佐野 剛, 磯部和順, 渋谷和俊, 本間 栄	白血病に合併した侵襲性肺アスペルギルス症の臨床病理学的検討	感染症学雑誌	81	261-7	2007
磯部和順, 村岡 成, 杉野圭史, 山崎陽子, 菊池 直, 濱中伸介, 高井雄二郎, 清水邦彦, 木村一博, 廣井直樹, 渋谷和俊, 本間 栄	ポリコゾナルによる抗利尿ホルモン分泌異常症候群を認めた肺アスペルギルス症の一例	日本呼吸器学会雑誌	45	489-93	2007
Omuta J, Uchida K, Yamaguchi H, Shibuya K	Histopathological Study On Experimental Endophthalmitis Induced by Bloodstream Infection with <i>Candida albicans</i> .	Jpn J Infect Dis	60	33-9	2007
Taguchi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Kawabata T, Wakayama M, Ogoshi T, Iwabuchi S, Shibuya K, Nishimura K, Takahashi K	Allergic fungal sinusitis caused by <i>Bipolaris spicifera</i> and <i>Schizophyllum commune</i> .	Med Mycol	45	559-64	2007
Ochiai E, Kamei K, Watanabe A, Nagayoshi M, Nagaoka T, Tada Y, Sato A and Shibuya K	Inhalation of <i>Stachybotrys chartarum</i> causes pulmonary arterial hypertension in mice.	Int J Exp Pathol			accepted
渋谷和俊	深在性真菌症の病理	上尾市医師会報	108	6-10	2007
篠崎 稔, 井手 忠, 中山晴雄, 渋谷和俊	病理細胞診断材料を用いた真菌DNA抽出法について.	バイオメジャー・ニュースレター	7	8-9	2007
Golubev W, Sugita T, Golubev N	Ustilaginomycetous yeast, <i>Pseudozyma graminicola</i> sp. nov., isolated from the leaves of pasture plants.	Mycoscience	48	29-33	2007
Mekha N, Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A, Poonwan N	Real-time PCR assay to detect DNA in sera for the diagnosis of deep-seated trichosporonosis.	Microbiol. Immunol	51	633-5	2007
Takahata Y, Sugita T, Hiruma M, Muto K	Quantitative analysis of <i>Malassezia</i> in the scale of patients with psoriasis using a real-time PCR assay	Br. J. Dermatol.	157	670-3	2007
Amaya M, Tajima M, Okubo Y, Sugita T, Nishikawa A, Tsuboi R: J	Molecular analysis of <i>Malassezia</i> microflora in the lesional skin of psoriasis patients.	Dermatol. Sci.	34	619-24	2007
Kato H, Sugita T, Ishibashi Y, Nishikawa A	Evaluation of the levels of specific IgE against <i>Cryptococcus diffluens</i> and <i>Cryptococcus liquefaciens</i> in patients with atopic dermatitis	Microbiol Immunol	51	945-50	2007
Nakajima M, Sugita T, Mikami Y	Granuloma associated with <i>Trichosporon asahii</i>	Med Mycol		[Epub ahead of	2007



	infection in the lung: Unusual pathological findings and PCR detection of <i>Trichosporon</i> DNA.			print]	
Takahata Y, Sugita T, Kato H, Nishikawa A, Hiruma M, Muto M	Cutaneous <i>Malassezia</i> flora in atopic dermatitis differs between adults and children.	Br. J. Dermatol.	157	1178-1182	2007
Prillinger H, Lopandic K, Sugita T, Wuczowski M	<i>Asterotremella</i> gen.nov., an anamorphic tremelloid yeast isolated from the agarics <i>Asterophora lycoperdoides</i> and <i>Asterophora parasitica</i>	J.Gen.Appl.Microbiol	53	167-175	2007
Kajikazawa T, Sugita T, Nishikawa A	Comprehensive Identification of Bacteria in Processed Fresh Edible Sea Urchin Using 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis: The Products Contain Various Food Poisoning-related Bacteria and Opportunistic Bacterial Pathogens	J. Health Sci.	56	756-759	2007
Kajikazawa T, Sugita T, Nishikawa A, Nakajima F, Ohyama M, Shoji N, Kosaka M, Wada Y	Microbiological investigation of fresh edible raw sea urchin and its expiration	J. Health Sci.	56	397-400	2007
Ağırbaşı H, Bilgen H, Özcan K, Otlu B, Sinik G, Çerikçioğlu N, Durmaz R, Can E, Yalman N, Gedikoğlu G, Sugita T	Two Possible Cases of <i>Trichosporon</i> Infections in Bone Marrow Transplanted Children: The First Case of <i>T. japonicum</i> Isolated From Clinical Specimens	Jpn. J. Infect. Dis.			In press
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 Arteritis Induced by <i>C. albicans</i> Water-soluble Mannoprotein- $\beta$ -glucan Complex (CAWS)	Experimental Molecular Pathology	82	220-6	2007
Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, Aoyama T, Kumaraswami N, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M	The <i>Candida glabrata</i> putative sterol transporter gene <i>CgAUS1</i> protects cells against azoles in the presence of serum.	Journal of Antimicrobial Chemotherapy	60	1264-1272	2007
Tanabe K, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, Niimi	Inhibition of fungal ABC transporters by unnarmicin A and unnarmicin C, novel	Biochem Biophys Res Commun	364	990-995	2007

M and Uehara Y.	cyclic peptides from marine bacterium.				
Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, and Monk BC	<i>Candida albicans</i> drug resistance – another way to cope with stress.	Microbiology	153	3211-3217	2007
Lamping E, Monk BC, Niimi K, Holmes AR, Tsao S, Tanabe K, Niimi M, Uehara Y, and Cannon RD	Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eukaryotic Cell	6	1150-1165	2007
Inoue Y, Miyazaki Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Kakeya H, Sawai T, Hirakata Y, Kohno S.	Pulmonary Cryptococcosis presenting as endobronchial lesions in a patient under corticosteroid treatment.	Intern Med	46(8)	519-23	2007
Kohno Y, Ohno H, Miyazaki Y, Higashiyama Y, Yanagihara K, Hirakata Y, Fukushima K, Kohno S.	In Vitro and In Vivo Activities of Novel Fluoroquinolones Alone and in Combination with Clarithromycin against Clinically Isolated Mycobacterium avium complex Strains in Japan.	Antimicrob Agents Chemother.	51(11)	4071-6	2007
Izumikawa K, Morinaga Y, Kondo A, Hara K, Izumikawa K, Miyazaki Y, Kohno S, Igari N, Akaboshi M, Kawakami J, Eguchi K.	Adult Still's disease associated with cytomegalovirus infection.	J Infect Chemother.	13(2)	114-7	2007
宮崎義継、河野 茂	深在性真菌症の治療	臨床環境医学会雑誌	16(1)	17-20	2007
中村茂樹, 宮崎義継, 三原智ほか	A case of multiple nodular pulmonary amyloidosis complicated with primary Sjogren syndrome	呼吸器学会雑誌	45(4)	356-60	2007
宮崎義継	中枢神経系の深在性真菌症に対する治療の進歩.	神経治療学	24 (6)	659-661	2007