

200829023A

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 新見 昌一

平成 21 (2009) 年 3 月

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 新見 昌一

平成21年(2009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 生物活性物質部） - - - - - 1
- II. 分担研究報告書
1. 輸入真菌症の国内発生状況調査、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、ヒストプラズマ症の血清診断法に関する基礎的研究
亀井 克彦（千葉大学真菌医学研究センター） - - - - - 27
 2. 臨床検体から分離される *Candida* 主要4菌種 (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*) の簡便な同定方法の確立
菊池 賢（順天堂大学医学部感染制御科学 細菌学） - - - - - 35
 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） - - - - - 54
 4. ホルマリン固定パラフィン切片における *Fusarium* 属および *Histoplasma psulatum* の検出を目的とした PNA プローブを用いた *In situ* hybridization 法の開発
渋谷 和俊（東邦大学医学部病院病理学講座） - - - - - 71
 5. 新聞誌上における真菌感染症の報道状況
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） - - - - - 82
 6. 抗真菌薬シーズの開拓と新興感染症トリコスポロン症の分子疫学
杉田 隆（明治薬科大学 微生物学教室） - - - - - 85
 7. *Aspergillus fumigatus* 新規抗原検索と診断への応用
大野 秀明（国立感染症研究所 生物活性物質部） - - - - - 93
 8. 外科系真菌症に関する研究、臨床分離 *Candida tropicalis* にみられた micafungin の paradoxical effect
三嶋 廣繁（愛知医科大学大学院医学研究科 感染制御学） - - - 98
 9. *C. albicans* α 型マンノース転移酵素欠失株の網羅的作製とその解析
大川原 明子（国立感染症研究所 生物活性物質部） - - - - - 104
 10. カイコ感染実験モデルを用いた *Candida albicans* の病原性解析
上原 至雅（岩手医科大学薬学部 微生物薬品創薬学講座）
新見 昌一（国立感染症研究所 生物活性物質部） - - - - - 112
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 - - - - - 121

平成20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
研究代表者	新見 昌一	国立感染症研究所 生物活性物質部 第一室	室長
研究分担者	亀井 克彦	千葉大学真菌医学研究センター	教授
研究分担者	菊池 賢	順天堂大学医学部感染制御科学 細菌学	准教授
研究分担者	楨村 浩一	帝京大学医真菌研究センター	准教授
研究分担者	渋谷 和俊	東邦大学医学部病院病理学講座	教授
研究分担者	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
研究分担者	杉田 隆	明治薬科大学 微生物学教室	准教授
研究分担者	大野 秀明	国立感染症研究所 生物活性物質部 第三室	室長
研究分担者	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
研究分担者	大川原 明子	国立感染症研究所 生物活性物質部 第三室	主任研究官
研究分担者	三嶋 廣繁	愛知医科大学大学院医学研究科 感染制御学	教授
研究協力者	山越 智	国立感染症研究所 生物活性物質部 第三室	主任研究官

平成20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

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 - - - 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 細菌学)
槇村 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 探索医療ヒューマンネット
ワークシステム部門)
杉田 隆 (明治薬科大学 微生物学教室)
大野 秀明 (国立感染症研究所 生物活性物質部)
三嶋 廣繁 (愛知医科大学大学院医学研究科 感染制御学)
大川原 明子 (国立感染症研究所 生物活性物質部)
新見 昌一 (国立感染症研究所 生物活性物質部)
上原 至雅 (岩手医科大学薬学部 微生物薬品創薬学講座)

研究代表者

新見 昌一 国立感染症研究所生物活性物質部室長

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

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

研究代表者 新見昌一 国立感染症研究所 室長

研究要旨：(1) 輸入真菌症の疫学調査を行い、ヒストプラズマ症症例数の持続的増加およびコクシジオイデス症のコンスタントな発生が認められた。肺線維症における抗ヒストプラズマ抗体測定による潜在的ヒストプラズマ症患者の検索では、明確なヒストプラズマ症は認められなかった。ヒストプラズマ症血清診断法の開発について、新規抗原候補タンパク質について可溶化を行ない、有用性の基礎的検討を行った。(2) 深在性真菌症として頻度の高いカンジダ症の起因菌のほとんどを占める *Candida* 主要菌種の CHROM agar *Candida* と血液寒天を組み合わせる簡便な同定方法を確立した。(3) 新規カンジダ属酵母、新種酵母を記載し、迅速診断のための簡易遺伝子抽出系を考案した。(4) ホルマリン固定パラフィン切片における *Fusarium* 属および *Histoplasma capsulatum* の検出を目的とした PNA プローブを用いた *In situ hybridization* 法を開発した。(5) 新聞データベースを用い、真菌感染に関する情報がどの程度提供されているかを調査し、「かび」や「真菌」に関する情報が新聞誌上で扱われることは少ないことが分かった。(6) 抗真菌薬シーズの開拓と新興感染症トリコスポロン症の分子疫学を行い、*Trichosporon asahii* の遺伝子型は日本、タイ、米国株はそれぞれ特徴があった。(7) アスペルギルス症の診断法開発のため *A. fumigatus* の候補蛋白質を選択し、モノクローナル抗体を作製中である。(8) 臨床分離 *Candida tropicalis* にみられた micafungin の paradoxical effect について検討した。(9) *C. albicans* α型 マンノース転移酵素欠失株を網羅的に作製し、菌糸形成能が低下するものを認めたが、炎症性サイトカイン産生とは直接の関連はなかった。(10) 実験的マウスカンジダ感染症モデルにかわるカイコ感染実験モデルを確立し、未知遺伝子の病原性への関与を明らかにした。

研究分担者：

亀井克彦 千葉大学真菌医学研究センター・教授
横村浩一 帝京大学医真菌研究センター・准教授

渋谷和俊 東邦大学医学部病院病理学講座・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

菊池 賢 順天堂大学医学部感染制御科学・細菌学・准教授
杉田 隆 明治薬科大学・微生物学教室・准教授
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

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
三鴨廣繁 愛知医大・感染制御部学・教授
大野秀明 国立感染症研究所・生物活性物質部・室長

A. 研究目的

輸入真菌症および深在性真菌症は年々増加の傾向にあり、これらの感染症の発生動向を継続して調査する必要がある。特に輸入真菌症に関しては、本研究班が作成した輸入真菌症診断・治療ガイドライン等を通して、情報が医療従事者に十分に浸透するように努めなければならない。また培養に危険が伴うコクシジオイデス症や、ヒストプラズマ症の迅速遺伝子診断法および確実な血清診断法の開発と実用化が待たれている。ヒストプラズマ症については、国内での感染発症の可能性があるため、結核や肺線維腫症など類似疾患との鑑別が必要になっている。一方、深在性真菌感染症に関しても早期診断・早期治療が困難な症例が多く、医療の高度化、高齢化社会を迎え、深在性真菌症が終末感染となって患者が死に至る場合が少なくない。実際に、医療現場では真菌症の対応に苦慮しているのが現状である。

このような真菌症にかかわる現状をふまえ、本研究事業では、深在性および輸入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強

力に推進する。この目的のために、基礎・臨床を含む我が国の中核をなす真菌研究者の協力を仰ぎ、それらの施設との共同作業を通してこの困難に対処している。本事業では、輸入真菌症の発生動向調査、潜在的ヒストプラズマ症患者の抗体調査、遺伝子診断法および血清診断法の開発と実用化診断技術の普及、ガイドラインの配布と情報の提供、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、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

本年度は、宮崎義継 国立感染症研究所生物活性物質部部長に代わり、大野秀明第3室室長が加わり、また三鴨廣繁 愛知医大・感染制御部学教授が新たに参画した。研究代表者および10名の研究分担者に加えて、研究協力者として山越智 国立感染症研究所生物活性物質部主任研究員を加えた総勢12名の真菌研究チームとなった。

「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」に関する各研究分担者の分担研究課題は次のとおりである。

輸入真菌症の国内発生状況調査、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、ヒストプラズマ症の血清診断法に関する基礎的研究
(亀井 克彦)

臨床検体から分離される *Candida* 主要 4 菌種 (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*) の簡便な同定方法の確立
(菊池 賢)

輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発
(横村 浩一)

ホルマリン固定パラフィン切片における *Fusarium* 属および *Histoplasma capsulatum* の検出を目的とした PNA プローブを用いた *In situ* hybridization 法の開発
(渋谷 和俊)

新聞誌上における真菌感染症の報道状況
(上 昌広)

抗真菌薬シーズの開拓と新興感染症トリコスボロン症の分子疫学
(杉田 隆)

Aspergillus fumigatus 新規抗原検索と診断への応用
(大野 秀明)

外科系真菌症に関する研究、臨床分離 *Candida tropicalis* にみられた micafungin の paradoxical effect
(三鴨 廣繁)

C. albicans α型 マンノース転移酵素欠失株の網羅的作製とその解析
(大川原 明子)

カイコ感染実験モデルを用いた *Candida albicans* の病原性解析
(上原 至雅、新見 昌一)

C. 研究成果

輸入真菌症の国内発生状況調査

わが国の輸入真菌症の症例数はコクシジオイデス症およびヒストプラズマ症を中心として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が示されてきた。特にヒストプラズマ症は感染症法の対象となっていないため実態把握が困難であるが、これまでの調査によれば最も危険とされるコクシジオイデス症よりもさらに高い致死率が示されており、嚴重な実態の監視が必要と思われる。そこで本年度も引き続き輸入真菌症の実態調査を行った。

症例の収集は、これまでと同様に、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、菌株同定、抗体測定などの依頼があった症例を基礎データとし、これに醫學中央雑誌、Medlineなどに掲載された報告症例を加えて作成した。コクシジオイデス症に関しては、さらに感染症法 4 類報告を参照し、見落とし症例の無いように調査した。症例の詳細に関しては必要に応じて主治医に直接問い合わせ、情報を補完した。

1) コクシジオイデス症

2008 年は 2007 年と同様、計 3 例が確認され、総症例数は 59 例となった。2007 年、2008 年と連続して年間症例数が 3 例であり、これまでの増加傾向から安定へと移行する気配が見うけられた。感染地は 3 例とも米国 (アリゾナ州: 2 例、カリフォルニア州: 1 例) であった。病型では慢性肺コクシジオイデス症が 2 例、播種型コクシジオイデス症が 1 例であったが、播種型の 1 例は全く基礎疾患のな

い若年の健常者に 2008 年末に発生したもので、本年はじめに死亡した。死亡例は 2004 年に続き 4 例目であるが、本例のように全く基礎疾患のない若年の健常人が罹患し、死に至った例はわが国ではこれまで報告がなく、重大な症例と考えられる。

2) ヒストプラズマ症

2008年のヒストプラズマ症症例数は6例認められ総計は63例となり、昨年に引き続き増加傾向を示していた。感染地は東南アジアが4例を占め、うち3例はマレーシアの北端にあるランカウイ島で感染していた。残りの2例は南米（ブラジル、ペルー各1例）であった。マレーシアにおける感染は、3名からなる同一の旅行グループ（いずれも20歳代の健康成人）が同一のホテルにおける3日間の滞在中に感染した集団発生と考えられた。病型では、全6例のうち肺型3例、播種型2例、副腎1例であった。上記の集団発生例では3例とも急性呼吸器感染を中心とする病態と考えられたが、内1名では肺の多発結節が一時進行性に増悪するなど、比較的重篤な反応を示した。基礎疾患ではAIDSが2例、転帰では死亡1例であった。

その他の輸入真菌症では、パラコクシジオイデス症、マルネツフェイ型ペニシリウム症、プラストミセス症とも発生は認められなかった。

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

これまでの研究より、1)本邦におけるヒストプラズマ症の約15%に海外渡航歴がない。2)ヒストプラズマ症は特徴的臨床所見に乏しい一方で、自然治癒傾向があることから、正診に至らず看過された

症例が多数存在する可能性がある、3)前回の本研究班の研究から肺結核症のなかにヒストプラズマ症の混在を確認しており、結核症以外の疾患にもヒストプラズマ症が紛れている可能性が考えられる、などが明らかとなっている。一方、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ることがよく知られており、とくに線維化を伴うような場合は、診断に混乱を来しやすい。実際、肺線維症（特発性）に関しては不明な点が多く、かなり多様な疾患の集合体でさまざまな疾患が混入していることが推測されている。そこで、前年に引き続き、臨床像が近似し誤診されやすい線維症症例に潜在するヒストプラズマ症を検出する目的で、血清学的なスクリーニングを試みた。

なお、血清の収集等本研究の実施にあたっては、千葉大学真菌医学研究センター倫理審査委員会の承認を得た。また、血清の提供をいただいた協力病院に関してもそれぞれの機関の規約に則り同様の対応を行った。

被検者として、協力病院にて臨床的に肺線維症と診断された患者（サルコイドーシスなど、原因と思われる基礎疾患が存在している症例、および原因不明の特発性肺線維症を含む）計42名を対象とした。採血及び血清分離は、被検者の合意のもと、協力病院にて行い千葉大学真菌医学研究センターに輸送して測定を行った。抗ヒストプラズマ抗体の検出は、免疫拡散法（ID法）、ラテックス凝集法（LA法）、補体結合法（CF法）を用いた。

被検者42名からそれぞれ1検体ずつ採取、検討した。その結果、陽性はLA法で2名に認められたが、ID法、CF法ではいずれも陽性検体は認められなかった。このLA法はIgMを検出するためヒストプラ

ズマ症としては活動性が高い場合に反応するとされる。しかし、LA法は炎症性物質との間で偽陽性を生じやすいこと、この2名の血清が他の2つの測定法でいずれも陰性を示したことなどから、慎重に経過を観察している。

ヒストプラズマ症血清診断に関する基礎的研究

ヒストプラズマ症は本邦における主要な輸入真菌症の一つである。近年、症例数が増大しており、また海外渡航者増加等の要因により今後更に増大してゆくことが懸念されている。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、時間を要する上に感度の良い検出法とは言いがたい。迅速・簡便な診断法としてヒストプラズマ菌体由来する抗原もしくはそれに対する抗体を検出する血清試験がある。既に抗体検出を目的とした血清診断試薬が市販されているが、我が国の研究班において本邦の症例に対して検討した結果では十分な感度が得られなかった。このような背景からヒストプラズマ症血清診断法の開発・改良が求められている。これまでの研究において、まずは *Histoplasma capsulatum* より抗原を抽出する方法を確立し、患者血清中抗体により認識される *H. capsulatum* 抗原タンパク質の同定を行ってきた。さらに、同定した各抗原タンパク質を *H. capsulatum* total RNA よりクローニングし、大腸菌内での組換えタンパク質として大量発現させた。

本年度は精製した抗原タンパク質を用いて、現在保有するヒストプラズマ症患者血清中の抗体をELISA法で検討した。

H. capsulatum の主要な抗原として既に知られているH抗原およびM抗原を含め

た各抗原タンパク質は昨年度に構築したタンパク質大量発現ベクターを用いて、His-tag 融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。発現させたタンパク質はいずれも封入体として回収され、8M尿素で可溶化した。封入体からの抗原タンパク質の精製はニッケルカラムを用いて行った。得られたタンパク質を精製抗原タンパク質として以下の実験に用いた。

ELISA に用いる 96-well plate には MaxiSorp (Nunc)を用いた。抗原タンパク質のコーティングには 1 well あたり 200ng の精製タンパク質を用い、コーティングバッファ中で 16 時間、4℃にてコーティングを行った。TBS にて洗浄後、ブロッキングを行った。Protein Free Blocking Buffer solution (Pierce)によるブロッキングがBSAによるブロッキングよりもバックグラウンドを低減させることができたことから、Protein Free Blocking Buffer solution を用いることとした。1% Tween20 含有 TBS (TBS-T)で洗浄後、100倍希釈した患者血清を 2 時間、25℃にて反応させた。再度 TBS-T で洗浄し、Protein L-HRP を添加し、1 時間、37℃にて反応を行った。TBS-T による最後の洗浄を行い、TMB を用いた発色反応を室温で 30 分間行った。停止液 (1N 硫酸) にて反応を止めて速やかに 450nm における吸光度を測定した。

研究方法に示したように実験条件を設定し、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。

まず既知の抗原である H 抗原、M 抗原を用いて実験を行った。本研究で設定した条件下において ELISA を行った結果、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。

次にこれまでに我々が同定した抗原タ

ンパク質についても同様の条件下で ELISA を行った。その結果、Glutamate carboxypeptidase II (C 末 273 アミノ酸部分) と Catalase P に対する抗体価は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現在用いている条件では健常人群と患者群の間では有意な差が認められなかった。

臨床検体から分離される *Candida* 主要菌種の簡便な同定方法の確立

近年、様々な医療技術の進歩により、免疫不全患者の日和見感染症は増加の一步を辿っている。その代表の深在性真菌症は細菌感染症に比べ、治療薬が少なく、また、相手が我々と同じ真核生物であることから、診断・治療が中々困難である。深在性真菌症の中でも日常遭遇する機会の最も多いのがカンジダ症であり、その起因菌としては *Candida* 主要 4 菌種 (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*) で 90% 以上を占める。我々が 2000 年から 2001 年に行った国内 17 施設の 1 年間の前向き調査でも、188 例のカンジダ血症の分離菌のうち、上記の 4 菌種が 95% を占めていた。また、*C. glabrata* は fluconazole への有効性が良くなく、*C. parapsilosis* に対する micafungin の抗菌活性が劣るなど、4 菌種の同定は抗真菌薬選択に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。一方で、医療費削減の大方針の下、微生物検査は採算性の問題から、病院で微生物検査室を廃止したり、外部委託するケースが進んでいる。手間がかかる上に採算性も良くない真菌の同定検査は最早、多くの病院で実施されなくなっている。例えば一部の施設では、従来、菌種名で報告が出ていた同定結果が Yeast-like fungi や

Candida sp. などと報告されるようになっていいる。また、検査の外部委託により、検査結果報告がこれまで以上に時間がかかるようになり、早期治療が必要な深在性真菌症の診療上にも支障をきたすおそれが出ている。このため、余分な費用をかけず、迅速に簡便に深在性真菌症として頻度の高い菌種の同定方法が強く求められている。

CHROMagar *Candida* は酵素反応基質を含む真菌選択培地であり、*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* の 3 菌種が発育コロニーの性状と色により、明瞭に区別できるため、臨床検体からの真菌の選択分離と同時に *Candida* 属の簡易同定に微生物検査室に広く普及している。しかし、この培地では *Candida* 主要 4 菌種のうち、2 番目、3 番目に分離頻度の高い *C. parapsilosis*, *C. glabrata* がどちらも薄ピンク-紫系統の極めて類似したコロニー性状を呈することから、両者の区別は不可能である。この 2 菌種は前述のように抗真菌薬に対する感受性が異なり、同定結果次第で使用する抗真菌薬が変わる可能性がある。このため、両者を迅速・簡便かつ明確に区別できる同定方法が求められていた。このため、trehalose の利用能を指標にするいくつかの *C. glabrata* 簡易同定キットが発売され、臨床現場でも用いられている。しかし、これらのキットは価格が高く、また、それ程使用頻度がない在庫を抱える問題もあり、現実的にどこの検査室でも使用できるものとは言い難かった。無論、PCR などの技術を用いて、迅速診断を行うことは可能であるが、機器、手間、費用の問題がある。

本研究班で昨年度から継続している我が国における深在性真菌症由来菌株のカルチャーコレクション構築において、全国から寄せられた菌株の保存・同定を行

っている際に、偶然、*C. glabrata* がヒツジ血液寒天平板上でほとんど発育しないことを見いだした。このような性質を持つ真菌はヒトに病原性を示す酵母様真菌の中では、同菌に限られていた。このため、検査室にほお普及している CHROMagar Candida と微生物検査室ならどこでも常用している血液寒天平板、真菌培養によく用いられるサブローデキストロース寒天平板の 3 種を組み合わせれば、*Candida* 主要 4 菌種と *C. krusei* の 5 菌種が簡便に同定できるものと考え、検討を行った。

基準株及び 26S rRNA gene D1/D2 region の DNA sequence により菌種同定を行った CHROMagar 上で淡ピンク-紫を示すヒト感染症の起原菌として知られる *Candida* 8 菌種 (*C. parapsilosis* group-*C. parapsilosis* 34 株, *C. metapsilosis* 5 株, *C. orhtopsilosis* 2 株, 及び *C. lusitanaea* (*Clavispora lusitanaea*) 4 株, *C. guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*) 3 株, *C. utilis* (*Pichia jadinii*) 1 株, *C. pelliculosa* (*Pichia anomala*) 1 株, *C. glabrata* 46 株) と *C. parapsilosis* 近縁の *Lodderomyces elongisporus* 5 株の計 101 株を用いた。培地には微生物検査室で通常の臨床検体の分離培養に汎用されている血液寒天平板生培地 7 種類 (トリブチケースソイ 5% ヒツジ血液寒天-BD, ヒツジ血液寒天 (M)-BD, 5 血液寒天培地 (ウマ)-極東製薬、血液寒天培地 (ヒツジ)-極東製薬、ポアメディア羊血液寒天培地-栄研化学、ニッスイプレート羊血液寒天培地-日水製薬、緬羊血液寒天培地-コージンバイオ)、CHROMagar Candida (関東科学)、サブローデキストロース寒天 (コージンバイオ) を用いた。

各菌株は滅菌生理食塩水中で MacFarland 1.0 の菌液を作成し、滅菌綿棒

で各培地に分画接種した。37°C、好気培養を行い、24 時間後に増殖の有無を判定した。血液寒天での増殖性はサブローデキストロース寒天上での発育と比較し、血液寒天上での増殖が認められないか明らかに不良な場合 (コロニーサイズが 0.1 mm 以下) に陰性、ほぼ同等ないし血液寒天上でより良好な発育を認めるものを陽性とした。

また、臨床検体から直接 CHROMagar Candida 上で分離培養 (37°C、24 時間) されたピンク-紫色のコロニーについて、血液寒天上での増殖性で *C. glabrata*, *C. parapsilosis* の簡易同定を行い、遺伝子同定結果との比較を行った。

今回使用した血液寒天は、A 社 2 製品、B 社 2 製品、C 社、E 社各 1 製品の合計 6 製品はカゼインペプトンとソイペプトンを主な栄養源とするトリブチックソイベース、D 社はウシ心臓抽出液を栄養源とするハートインフュージョンベースである。トリブチックソイベース血液寒天の間には B 社製品に用いられている内容不明の「発育因子」以外には大きな構成成分の差は認められない。

血液寒天、サブローデキストロース寒天、CHROMagar Candida 上での各菌株の増殖については、*C. glabrata* 以外の菌種はいずれの培地上でも良好な発育が認められるが、*C. glabrata* だけは血液寒天上での発育が認められない。

7 種類の血液寒天を用いて 101 株の発育性を調べた。どの血液寒天においても *C. glabrata* はすべての株が発育陰性と判定されたが、A 社のウマ血液寒天、C 社のヒツジ血液寒天では *C. glabrata* の若干の発育を認めた。しかし、サブローデキストロース、CHROMagar Candida での発育に比して、血液寒天上での発育性はかなり劣っており、他の菌種とは明瞭に区

別できた。このように *C. glabrata* は、CHROMagar Candida 上では他菌種と同じ系統の色のコロニー性状を示すが、血液寒天上で発育能で判別が可能であることから、CHROMagar Candida を臨床検体の真菌初代分離培養に用い、得られたピンク-紫系統のコロニー39株について、血液寒天での発育性と 26S rDNA D1/D2 region sequence による菌種同定との比較を行った。血液寒天での発育性から *C. glabrata* と同定された27株は全て、遺伝子同定で同菌であることが確認され、結果は100%一致した。血液寒天上で良好に発育した株はすべて *C. parapsilosis* であった。

ヒト臨床検体より分離された新規カンジダ属酵母の記載

真菌症は免疫力の低下した患者にとって重篤な症状を起こす病害である。そのため、免疫力の低下した患者における微生物叢とその薬剤耐性を定期的に把握する必要がある。我々は外来患者の外耳道から新規 *Candida* 属酵母を得た。

国内病院での外来患者の外耳道から綿棒で掻き採ったスメアを分離源とした。純粋分離菌株の 26S rDNA D1/D2 領域 (26S) および ITS1+5.8S rDNA+ITS2 領域 (ITS) を用いた分子系統分類を行った。そのほかの試験項目は The Yeasts 4th ed に準じた。純粋分離菌 JCM15448 株は 26S の相同性が *Candida haemulonii* CBS5149^T とは 85.7%、*C. pseudohaemulonii* CBS10099^T とは 83.0% であった。ITS はそれぞれ 84.9%、81.4% であり、系統樹では *Candida* 属に分類されたが同一な種は認められなかった。本菌株は 42℃ およびピタミンフリー培地で生育陽性であり、

Candida 属としては特徴的な培養性質を示した。その他の培養性質から本菌株はグループ VI (イノシトール・硝酸カリウム・エリスリトール陰性、40℃陽性) に分類された。本グループは *C. albicans* をはじめとして病原性が報告されている種が複数属しているが、本菌株の病原性は不明である。ポリコナゾール・イトラコナゾール・フルコナゾール・5-FC に対する感受性は既知の種と差が認められなかった。これらの結果から、本菌株を新種と判断し *Candida auris* と命名した (type strain JCM15448^T = CBS10913^T = DSM21092^T)

動物園飼育下における輸入真菌症起因菌保菌動物から分離された新種酵母の記載

動物の鼻腔には様々な微生物が常在していることが知られているが、動物種ごとの微生物叢はまだ十分に調べられていない。動物園は生物多様性の保存を目的の1つとした施設であることから、動物園飼育下における各動物に固有の常在菌も同じく保存されている可能性が高い。今回、神戸市立王子動物園飼育のクイーンズランドコアラ 5頭の鼻腔スメアより菌株を分離した。

分離菌株の 26S rDNA D1/D2 領域 (26S) および ITS1+5.8S rDNA+ITS2 領域 (ITS) を用いた分子系統分類を行った。そのほかの試験項目は The Yeasts 4th ed に準じた。

異なる3頭から CHRMagar Candida に特徴的なルビー色を呈する3株の酵母を得た。3株の性状は一致し、ITSの相同性が *Sporobolomyces* 属菌と 88~92%、26S が *Sporobolomyces* 属菌と 95~99% であった。

偽菌糸の形成条件は近縁の *S. carnicolor* および *S. japonicus* とは異なっていた。したがってこれら 3 株は *Sporobolomyces* 属の新種であると判断した。本菌株は至適温度が 28~30°C, 32°C では生育しなかった。これらの結果から、本菌株を新種と判断し *Sporobolomyces koalae* と命名した (type strain JCM15063^T=DSMZ19992^T)。

市販簡易遺伝子抽出キットの病原糸状菌を用いた評価とその応用

真菌症の遺伝子診断、および起因菌の遺伝子解析・同定のためには、迅速かつ簡便な起因菌遺伝子の抽出法が必須である。*Candida* 属等の酵母については、細胞の性質上煮沸程度の単純な操作によって比較的容易にゲノム遺伝子が放出されることから、遺伝子増幅が必要な場合であっても抽出を経ることなく、菌体を直接反応試験管に投入することによって、多検体の PCR 増幅・解析が可能である (コロニー PCR と呼ばれる)。しかし、より細胞壁が強固であり、菌体量に比較してゲノム比率が少ない糸状菌においては、単純に菌体を反応試験管に投入したとしても、解析に耐える遺伝子を増幅出来ない場合が少なくない。そのため、糸状菌にも適用可能なコロニー PCR 系が求められてきた。島津製作所の Ampdirect[®] Plus は、各種生物組織を直接検体として PCR 反応に適用できるキットであるが、真菌に対する応用は限られており、至適条件は得られていなかった。そこで、本キットを糸状菌遺伝子増幅に応用・至適化することに着想した。

添付文書に基づいて、1 時間を要する

溶解過程を経た場合、*Candida* 属等の酵母ならびに *Aspergillus* 糸状菌を含む 63 株のすべてから Ampdirect[®] Plus kit 同梱の PCR バッファーを使用することによって PCR 法によるゲノム遺伝子の増幅が得られた。また、溶解過程を省略して一般的な PCR バッファーを用いた場合と、Ampdirect[®] Plus kit 同梱の PCR バッファーを用いた場合を比較してコロニー直接 PCR を施行したところ、前者では 31.43% の増幅に止まったが、後者では 97.14% の菌株から遺伝子が増幅された。

糸状菌の遺伝子を PCR によって増幅する場合、Ampdirect[®] Plus kit 同梱の PCR バッファーを用いることによって、検査工程の迅速化、多検体化が可能となろう。

葉緑体を持たない病原藻類：プロトテカに対する遺伝子同定法の開発

葉緑素を持たない藻類である *Prototheca zopfii* は、ヒトや犬・牛において全身に感染し Prototecosis (プロトテカ症) を引き起こす起因藻の一つとして知られる。言うまでもなく本病原体は真菌ではなく、むしろ 8 界説によれば植物界に帰属するが、病原体の表現形質が真菌と鑑別困難であり、病態が真菌症に類似していることから歴史的に医真菌学において取り扱われている。本藻は、ヒトの深在性の皮膚感染症や尿路感染症等の疾患、牛の乳房炎、犬の皮膚炎等を引き起こし症状はいずれも重篤である。治療については、早期の診断と有効な抗真菌薬を選択することが重要である為、菌種の同定が必要であると考えられる。本研究では、*Prototheca zopfii* に特異的な Primer の設計を試みた。

プライマーの作成は、GenBank に登録

のある *Chlorella* 属及び *Prototheca* 属の SSU 領域での塩基配列を参考に、*Prototheca zopfii* に特異的な領域 18PZF1 と 18PZR1 を設計した。また、その領域の外側に nested PCR をおこなう目的で O18SF1 と O18SR1 を設計した。これらのプライマーセットを使用した PCR 反応を行なう為、*Prototheca* 属については、JCM (理化学研究所) で保管されている *P. zopfii* 10 株、*P. wicherhamjii* 4 株、*P. stagnora* 2 株を用い、また、*Chlorella* (V-12) 1 株、及び *Candida* 属 4 株 (TIMM) も合わせ計 9 菌種 21 株をコロニー PCR により確認した。

領域 O18S のプライマーセットを用いた結果では、すべてが 586bp の目的増幅産物を得て、さらに 18PZ のプライマーセットにて nested PCR をおこなった結果、*P. zopfii* 10 株のみ 246bp の目的増幅産物を確認した。我々の作成した O18S 及び 18PZ のプライマーセットは *Prototheca zopfii* の同定において迅速で特異性が高く有用であると考えられた。

分類同定が容易ではなかった本薬に対する高感度・高特異度が期待できる遺伝子同定系が提供された。本研究結果は、本症の診断・治療のみならず、その起因菌の生物学的研究にもインパクトを与えるものと期待したい。

ホルマリン固定パラフィン切片における *Fusarium* 属および *Histoplasma capsulatum* の検出を目的とした PNA プローブを用いた *In situ hybridization* 法の開発

病理組織・細胞診断標本中の菌形態のみで菌種を特定することは困難な場合が少なくない。特に新興病原真菌と呼ばれ

る *Fusarium* 属の真菌は、組織内における形態学的類似性から *Aspergillus* 属との鑑別は事実上不可能である。また、主要な輸入真菌症のひとつであるヒストプラズマ症の起病菌である *Histoplasma capsulatum* は組織内における寄生形態などから他の酵母形態を示す真菌との鑑別が困難な場合も少なくない。これらの点を勘案し、昨年度までの報告において、その有用性が確認された PNA プローブを用いた ISH 法をこれらの菌の検出に応用するため、新規にプローブを設計し、感染動物モデルを中心としたホルマリン固定パラフィン材料において、その特異性の検証を行った。

さらに多くの病原真菌の rRNA を標的とした Panfungal PNA プローブを新たに設計し、rRNA の保存度の評価を目的とした ISH 法を確立した。

1) プローブ

Panfungal PNA プローブは 28S rRNA 遺伝子領域から多くの病原真菌に保存性が高い領域を選定し、N 末端に Fluorescein Isothiocyanate (FITC) 標識を施したアンチセンス PNA プローブを作製した。*Fusarium* 属および *H. capsulatum* PNA プローブは 28S rRNA 遺伝子領域からそれぞれに保存性が高い特異的な領域を選定し、同様に N 末端に FITC 標識を施したアンチセンス PNA プローブを作製した。それぞれの塩基配列を以下に記す。

Panfungal: TACTTGTGCGCTATCGGT

Fusarium 属: GATGATCAACCAAGCCCA

H. capsulatum: CACACGGGCGAGAC

2) ISH 法

ISH 法は昨年度までに我々が構築した DNA プローブを使用した ISH 法のプロトコルに準拠したが、ハイブリダイゼーション前の denature を行わず、ハイブリダイゼーションと洗浄の温度を 56°C に設

定した。以後、抗 FITC モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法によりシグナルを検出した。

3) 感染動物モデルおよび臨床材料における特異性の検証

Panfungal および *Fusarium* 属 PNA プロローブは仮性菌糸を形成した *C. albicans* と 5 種類の糸状菌 (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *F. solani*, *R. oryzae*) 感染マウスを用いて特異性を検証した。*H. capsulatum* PNA プロローブでは自施設における自験例 2 例および 2 種類の糸状菌 (*A. fumigatus*, *P. boydii*) と酵母形態を主体とした *C. albicans* の感染マウスを対象とした。

Panfungal PNA プロローブの特異性を 6 菌種の感染マウスの肺組織を用いて検討したところ、すべての菌においてその菌体に強い顆粒状のシグナルが検出された。

P. boydii, *A. terreus*, *F. solani* の感染マウスの肺組織のホルマリン固定パラフィン切片に対して、Panfungal プロローブによる ISH 法、*Fusarium* 属プロローブによる ISH 法を施行した。Panfungal プロローブにおいて強いシグナルが得られていることから、評価可能な rRNA が保存されている事が証明されると同時に、形態学的に鑑別を要する糸状菌における *Fusarium* 属 PNA プロローブの有用性が示唆された。

Fusarium 属 PNA プロローブの特異性を 6 菌種の感染マウスの肺組織を用いて検討したところ、*F. solani* に特異的なシグナルを認めた。

H. capsulatum PNA プロローブの特異性を *A. fumigatus* および *P. boydii* の感染マウスの肺組織と培養にて確認されているヒストプラズマ症患者の骨髓生検のホルマリン固定パラフィン切片において検討した。Panfungal プロローブによる ISH 法で 3 種の菌にシグナルが検出された。一方、*H. capsulatum* プロローブによる ISH 法にお

いては、*H. capsulatum* の菌体にのみシグナルを認めた。

さらに本症例の *H. capsulatum* を、*C. albicans* 感染マウスの腎組織で観察される菌体との比較を行った。*C. albicans* の 26S rRNA を標的とした PNA プロローブによる ISH 法において、*C. albicans* にシグナルを認め、*H. capsulatum* プロローブによる ISH 法においては *H. capsulatum* にシグナルを認めた。形態学的に類似している菌において、菌種特異的プロローブを併用する事で、それぞれの鑑別が可能であった。

今回提示したヒストプラズマ症は HIV 陽性のタイ人の男性患者で、培養で確認され、ホルマリン固定パラフィン切片からの ITS1 領域のシーケンス反応により、*H. capsulatum* に 100% の相同性がある事が確認されている。上記のようにホルマリン固定パラフィン切片において *H. capsulatum* PNA プロローブによる ISH 法でシグナルが検出された事から、本プロローブの臨床材料における応用が可能であると考えられた。

抗真菌薬シーズの開拓と新興感染症トリコスポロン症の分子疫学

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および海生菌の代謝産物に求めた。昨年、440 種のエキスから抗真菌活性を有する画分を見出した。今年度は、その活性画分の化学構造を決定した。

また、これまでに輸入真菌症ヒストプラズマ症の起因为 *Histoplasma capsulatum* やマルネッフィ型ペニシリウム症の起因为 *Penicillium marneffeii* の定量的検

出と種内多様性の解析を行ってきた。新興真菌感染症の一つであるトリコスポロン症は予後不良の感染症であり、1970年以降散発的にその感染が報告されてきた。近年ではキャンディン系抗真菌薬投与後のブレイクスルー感染症として注目されている。特に、致死率は70%以上でありカンジダ症のそれよりも高い。本年度は、本症の起因菌である *Trichosporon asahii* の種内多様性を調べ、諸外国患者由来株と比較を行うことにより本邦の真菌学的な特徴を比較検討した。

1) 抗真菌作用を有する化合物の探索

a. 分画エキス：海洋から分離した真菌 *Didymella bryoniae* の培養ろ液を常法に従い抽出エキスを得た。このうち、 CHCl_3 エキスに抗真菌活性が得られた (Fig. 1)。

b. 化学構造の決定： CHCl_3 エキスを Silica gel または Sephadex LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィーおよび HPLC により分離・精製し、2種の化合物を単離した(それぞれを DB-1 および DB-2 と名付けた)。なお本研究は、明治薬科大学生薬学教室、小山清隆准教授および大学院生田元宏樹君との共同研究として実施した。

化合物の化学構造：NMR および MS 等から決定された化学構造は、Figs 2 および 3 である。DB-1 は既知化合物であったが、DB-2 は新規であった。両者の差異は OH 基の有無のみである。DB-2 は *Candida albicans* や *Cryptococcus neoformans* 等の病原真菌に殺菌的な作用を示したが、細菌には作用を示さなかった。また DB-1 は、 $16 \mu\text{g/mL}$ 以上でも抗真菌作用を示さなかった。

2) トリコスポロン症起因菌 *T. asahii* の分子疫学調査

T. asahii の rRNA 遺伝子中の最も variable な領域である IGS1(intergenic spacer region)の DNA シーケンスを行い、

本邦、米国、タイ患者由来株についてその多様性を比較した。なお、本研究はタイ国立衛生研究所(NIH)真菌室との共同研究として実施した。

IGS1 は7種の遺伝子型に分類することができる。日本株は1型が約80%をしめ、3および4型がこれにつづいた。タイ株は1型と3型がほぼ40%程度であった。一方、米国株は3型と5型で100%をしめた。少なくとも3国間では、その遺伝子型分布は特徴的であった。

Aspergillus fumigatus 新規抗原検索と診断への応用

医療技術の進歩によりもたらされる免疫不全者の増加などに伴い深在性真菌症も近年増加傾向を示している。なかでもアスペルギルス属による感染症、とくに白血病などに合併する侵襲性アスペルギルス症は、比較的致死率の高い重篤な感染症である。現在、アスペルギルス感染症の早期診断を目的として使用されているガラクトマンナン抗原検出系は、血液悪性疾患の患者では約80%の感度を有しているが、他の基礎疾患では特異度が低く、より感染実態を反映するアスペルギルス感染症の早期診断系の確立が求められている。

このような背景のもと、われわれの研究室では侵襲性アスペルギルス症の原因真菌で最も多い *Aspergillus fumigatus* を対象に、早期診断系の作製を念頭に新たな標的抗原の検索を行った。

1) *A. fumigatus* RNA 抽出

A. fumigatus 臨床分離株 MF-13 の conidia を窒素制限培地 (50 mM Borate buffer (pH 7.6), 0.05% YCB) で 37°C で約7日間培養した。培地において分生子が菌糸形成し、直径1~10mmの球状に増殖した時点で集菌し ISOGEN を用いて total

RNAを抽出した。

2) シグナルシーケンストラップ法 (SST法)

抽出した *A. fumigatus* total RNA から cDNA を作成し、MPL^V 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、*A. fumigatus* 由来遺伝子と推定される遺伝子断片のシーケンシングを行った。

3) *Saccharomyces cerevisiae* 発現による分泌蛋白質の検出

SST 法で得られた分泌蛋白質、膜蛋白質をコードすると考えられる *A. fumigatus* 遺伝子の中から *A. fumigatus* のデータベースに記載されている annotation 情報と、得られたクローン数を考慮し、数種類を新規抗原候補として選択した。これら選択した遺伝子を HA tag を含む pADH-HA ベクターに挿入し、*S. cerevisiae* に導入し、分泌蛋白質をコードするかを確認した。

4) *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。

5) 同定された *A. fumigatus* 遺伝子

得られた SST クローンの総数は 403 個で、データベースを参照し約 70 個の *A. fumigatus* 遺伝子が同定された。約 9 個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。

6) *S. cerevisiae* での分泌確認

S. cerevisiae に導入した候補遺伝子のうち、全体の約半数近くで蛋白質の分泌が確認された。この分泌が確認されたものの中から一部を選択し、現在モノクローナル抗体を作製中である。

臨床分離 *Candida tropicalis* にみられた micafungin(MCFG)の paradoxical effect

MCFG は、真菌の細胞壁に特異的に存在しその強度維持に重要な役割を担っている 1,3-β-D-グルカンの生合成を阻害することにより抗真菌活性を発揮する。その結果、臨床的に最も重要とされている *Candida* 属及び *Aspergillus* 属に対して広域な抗真菌スペクトルを有する。MCFG は *Candida* 属全般の菌種に対して概ね殺菌的に作用し、動物モデルおよび臨床試験のいずれにおいてもカンジダ症に対して優れた治療効果を示すことが報告されている。また、2002 年の上市以来、本邦における臨床使用ならびに欧米での臨床試験を経た現在においても、MCFG に耐性化あるいは低感受性化した *Candida* の報告は非常に少ない。

侵襲性カンジダ症（腹膜炎・真菌血症）患者の血液より *Candida tropicalis* が分離された。CLSI の標準法 M27-A2 に準じた感受性試験において、通常感受性レベルよりも明らかに高い濃度域に、微少ではあるが肉眼的に確認できる菌の発育を認めた。治療成績を考慮すると耐性化が懸念されたため、分離株の性状を精査したところ、近年キャンディン系抗真菌薬（MCFG, caspofungin）において報告が散見される“paradoxical effect”を示す株であることが判明したので、詳細について検討することを目的とした。

MCFG を投与された侵襲性カンジダ症患者の血液より分離した *C. tropicalis* を用

いた。また、感染防御効果の検討における対照感受性株として、1996年に国内医療施設における患者血液より分離されて保存されているNo. 16004株を用いた。

マイクロ液体希釈法による感受性試験はCLSIの標準法M27-A2に準じた肉眼判定法にて行った。測定培地として終濃度165 mMのMOPS (3-Morpholinopropane sulfonic acid; 同仁化学) を加えたRPMI-1640 (L-glutamine含有, フェノールレッド不含, 炭酸水素ナトリウム不含; Sigma-Aldrich) および antibiotic medium 3 (AM3; Becton Dickinson) を用いた。MCFGは滅菌蒸留水に溶解, 測定培地で希釈して使用した。Amphotericin B (AMPH-B; Bristol-Myers Squibb), fluconazole (FLCZ; Pfyzer) および itraconazole (ITCZ; ヤンセン協和) はそれぞれ市販製剤を購入して有効成分を抽出して使用した。接種菌液はサブローデキストロース寒天 (SDA) 平板上で35°C, 24時間培養した被験菌株を滅菌生理食塩水に懸濁し, 血球計算盤で菌数を計測した後測定培地で希釈し, 最終接種菌量が約 1.0×10^3 cells/mL となるように調製した。薬剤をあらかじめ分注した96穴平底プレートに接種した後, 35°Cで好気培養し, 培養開始から24および48時間後にMICを判定した。肉眼判定はM27-A2に従い, 各ウェルの濁りの程度をスコア化して記録した。MCFGのMICエンドポイントはスコア0とし, 対照薬はM27-A2の記載に従った。また, 培養48時間後に感受性試験プレートの各ウェルを倒立型光学顕微鏡で観察した。

動物は感染時4週齢の雄性ICR系マウス (日本エスエルシー) を用いた。マウスには飼料及び飲料水を自由に摂取させた。接種4日前及び1日後に200 mg/kgのcyclophosphamide (Sigma-Aldrich) を腹腔

内投与して好中球減少状態を惹起したマウス (1群8例) に, 患者分離株および対照株 (No. 16004) の致死菌量をそれぞれ尾静脈内接種することにより播種性カンジダ症モデルを作製した。感染マウスには接種から1時間後に1回, 翌日より1日1回3日間の計4回MCFG (0.32, 1, 3.2及び10 mg/kg) を尾静脈内に投与した。感染14日後の生存数をもとに, probit法によりED₅₀値を推定した。

1) 患者分離株のMCFG感受性

RPMI培地で測定したMCFGの患者分離株に対するMICは, 培養24時間後では0.0625 µg/mLであった。培養48時間後になると, 24時間後には肉眼的に全く発育の認められなかった濃度域 (8~32 µg/mL) に微少ではあるが菌の発育が観察された。倒立顕微鏡下で観察した微少発育の形態は, 膨化した酵母状菌体が分離せずにぶどう房様の菌塊を呈するというものであった。一方, 対照感受性株に対するMCFGのMICは, 24時間後および48時間後で変化はなく0.0156 µg/mLであり, 高濃度域における微少発育は肉眼的にも顕微鏡下でもみられなかった。市販対照薬AMPH-B, FLCZおよびITCZに対する感受性において, 患者分離株および対照感受性株の間で差を認めなかった。測定培地としてAM3を用いて同様の検討を行った。患者分離株に対するMCFGのMICは, 培養24時間後, 48時間後ともに0.0156 µg/mLと, RPMIの場合と比較して4倍の低下を認めた。また, 高濃度域における発育は, 肉眼的にも顕微鏡下でもみられなかった。

2) 感染治療効果

患者分離株の最小致死菌量 (8.3×10^5 cfu) を単回静脈内接種された無治療control群のマウスは, 全例が観察期間中に死亡した。MCFGによる治療は用量依

存的な効果を示し、感染14日後の生存率から算出したED₅₀値は0.29 mg/kg/day (95%信頼区間0.18~0.41 mg/kg/day)であった。一方の対照感受性株 (最小致死菌量 3.6×10^4 cfu, control群は全例死亡) に対してもMCFGは用量依存的な効果を示し、ED₅₀値は0.35 mg/kg/day (95%信頼区間0.26~0.48 mg/kg/day) であった。

C. albicans α 型マンノース転移酵素欠失株の網羅的作製とその解析

病原性真菌 *C. albicans* と哺乳類の糖鎖付加構造は大きく異なっている。たんぱく質のアスパラギンと結合しているN型糖鎖では主鎖が α -1,6結合マンノース、側鎖は α -1,2、 α -1,3 および β -1,2結合マンノースからなり、その基本骨格に、りん酸化マンナンが結合する複雑な構造である。

C. albicans のマンノース鎖の根幹に当たるマンノース結合を触媒するマンノース転移酵素の欠失変異株に関する報告はあり、それらの構造、免疫学的性質、病原性について解析されている。しかし、生体と直接接する最外層の微細な糖鎖構造の違いによる生体認識・応答に関する報告はなく、真菌最表層のマンノースの役割を完全に解明するにはいたっていない。本研究で、われわれはゲノム上にコードされている糖付加酵素と予想される α 型のマンノース転移酵素、すなわち α -1,2、 α -1,3、 α -1,6マンノース転移酵素に着目し、25種類の遺伝子破壊株を網羅的に作製した。第1のグループはTUA4を親株とする α 型転移酵素単独欠失株14株、第2のグループはりん酸化マンナン欠失株(1株)を背景にして、さらに α 型マンノース転移酵素を欠失した4株(ダブル欠失株)である。残りの6株もマンノース転移酵素と推定される酵素の単独欠失株である。これらの酵素の

触媒によって付加すると考えられる α -1,2、 α -1,3、 α -1,6マンノースは細胞表面を構成し、これらの有無による細胞表面の微細な変化を解析し、役割を明らかにすることは重要と考えられる。そこで、われわれは菌学的性質、それらから精製したマンナンたんぱく(MP)刺激によるモノサイトの炎症性サイトカイン産生誘導について解析、比較を行った。

遺伝子破壊株の作製については、ウリジンとアルギニン要求性のTUA4(Ura3 Δ 、Arg4 Δ)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。遺伝子破壊株はウリジン要求性を相補すると考えられるのでウリジン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遺伝子で一方のアリルを遺伝子破壊した株に導入した。ウリジンとアルギニン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。総数25種類の遺伝子破壊株を網羅的に作製した。

液体培地中における菌の生育は、ウリジン加YPD培地で 1×10^4 cells/mlになるよう菌液を調整し、30°C、70rpmで振と