

う培養して(ADVANTEC TN1506)対数増殖期の倍化時間を算出した。

寒天培地における菌糸形成能は 10% 血清入り寒天培地および spider 寒天培地に  $9 \times 10^5$  cells スポットして、それぞれ 37°C、30°C で 1 週間培養し、コロニー辺縁に形成された菌糸長を測定した。温度感受性テストは、ウリジン加 YPD 培地に  $10^6$  から  $10^3$  まで 10 倍幅で希釈した菌液をスポットして培養し、形成されたコロニーを 48 時間後に観察した。

MP の精製と抗原性の解析は既報の方法に従って、各遺伝子破壊株から MP の精製を行った。概略は以下のとおりである。ウリジン加 YPD 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、生理食塩水、水で洗った後、20 mM の citrate buffer を加え、125°C で 90 分のオートクレーブを 2 回行って 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。MP を PBS に溶かし、炭酸バッファーで希釈して ELISA 用 96 well マイクロプレートにオーバーナイトでコーティングし、血清因子 (ヤトロン、カンジダチェック) との反応性を定量的に解析した。

ヒトモノサイト、マウス腹腔マクロファージによるサイトカイン産生誘導について、ヒトモノサイトは、健常人のヘパリン加採血末梢血から比重、接着性の違いで精製を行った。マウスマクロファージは 1% チオグリコレート培地 1ml をマウス腹腔に接種し、3 日後に腹腔に誘導された細胞から接着する細胞として精製を行った。いずれも  $1 \times 10^6$  cells/ml の細胞 100  $\mu$ l を 96-well 組織培養用プレートにまき、MP(マウスマクロファージの場合

10 ng/ml GM-CSF 共存) で刺激した。24 時間培養後に培養上清を回収し、ELISA キット (BD OpT™ EIA) で IL-6 を測定し、産生量を算出した。

#### 1) 遺伝子破壊株の作製

トータル 25 種類の遺伝子破壊株を作製した。第 1 のグループは TUA4 を親株とする  $\alpha$  型マンノース転移酵素単独欠失株 14 株、第 2 のグループはリン酸化マンナンたんぱく質欠失株 (1 株; MNN412-17) を背景にして、さらに  $\alpha$  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。

#### 2) 液体培地中における菌の生育

いずれの破壊株も 30°C ウリジン加 YPD 中の倍加時間は親株と比較して著しい差を認めなかった。

#### 3) 寒天培地における菌糸形成および温度感受性テスト

作製したすべての株について、10% 血清培地中の菌糸形成能を調べたところ、 $\alpha$ -1,3 型マンノース転移酵素を欠失すると考えられる欠失株のシングル、ダブル欠失株共に、菌糸形成能が抑制される傾向を示した。これらの株について、spider 培地における菌糸形成についても検討したところ、ダブル欠失株で著しい抑制が認められた。

一方、 $\alpha$ -1,6 型マンノース転移酵素を欠失すると考えられる欠失株以外の欠失株では高温 (42°C) に対して感受性の傾向を示した。シングル欠失株はいずれも高温感受性を示さなかった。

#### 4) マンナンたんぱく質抗原性の解析

$\Delta\alpha$ -1,2,  $\Delta\alpha$ -1,3,  $\Delta\alpha$ -1,6 それぞれのシングル、ダブル欠失株について市販のキットを用いた解析を行ったが、当該キットでは構造変化を検出できなかった。

5) ヒトモノサイト、マウス腹腔マクロファージによるサイトカイン産生誘導

菌糸形成能、温度感受性で親株と異なる性質を示したダブル変異株について、ヒトモノサイトおよびマウス腹腔マクロファージによる IL-6 産生能を検討した。 $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3、 $\alpha$ -1,6 マンノース転移酵素を欠失すると推測される変異株では、マウス腹腔マクロファージによる IL-6 産生が親株と比較して有意に低下していた。

#### カイコ感染実験モデルを用いた *Candida albicans* の病原性解析

カンジダの病原因子としては、付着因子、酵母形から菌糸形への形態変換、プロテアーゼやホスホリパーゼなどの分泌酵素が有力な候補である。さらに感染の成立にはカンジダの複数の病原因子と生体側の因子が複雑にからみ合っていることが推察されている。

ある遺伝子産物が特定の形質発現または病原性に関与しているかどうかを調べるには、遺伝子破壊を行うのが常法である。*C. albicans* は2倍体であるために相同の遺伝子を破壊しなければならない。例えば病原性チェックを行うには、その遺伝子を正常に持っている親株と破壊した菌株を用いた感染実験をおこない、病原性（致死率、各臓器からの菌の回収率など）に差が見られるかどうかを比較する。もし破壊した菌株の病原性が低下したと認められた場合には、その遺伝子を破壊株に戻し、菌の病原性が回復するかどうかを見る。つまり、微生物感染の原因を特定する「コッホの原則」を踏襲した遺伝子機能の解析である。

しかし、マウスなど哺乳類を用いた動物実験に対しては倫理面などの配慮が必要となっている。近年、この点を考慮してマウス感染実験モデルに代わるさまざまな感染実験モデルが工夫されてきた。線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、ガ (*Galleria mellonella*)、アメーバ (*Dictyostelium discoideum*)、カイコ (Silkworm)などがその例で、従来の動物実験を相補する結果が得られている。大腸菌、連鎖球菌などの病原性の有無および抗生物質の治療効果の判定にカイコ感染実験モデルが利用され、良好な結果を生んでいる。

真菌は常に様々なストレスに晒され、それらに対応しながら生命を営んでいる。真菌細胞が外界からストレスを受けると、細胞はただちに応答して危機に対応した遺伝子発現調節をして生存する。プロテインフォスファターゼはプロテインキナーゼとともに、細胞内のシグナル伝達など、ネットワークを構成する様々なタンパク分子集団のリン酸化状態を調節する。そこで、*C. albicans* のプロテインフォスファターゼが病原性発現に関与するか否かを、遺伝子破壊株を作製してカイコ感染実験モデルを用いてスクリーニングした。

*C. albicans* (Ura3-, Arg4-) 株を用いてプロテインフォスファターゼをコードする28遺伝子の破壊を常法に準じて2段階で行い、21遺伝子をそれぞれ破壊した欠損株を作製した。これらのプロテインフォスファターゼ欠損株をカイコに接種して感染実験を行い、親株と病原性を比較した。1群合計30匹のカイコを用い、菌量



1×10<sup>6</sup>CFU/50μl PBS に調整した各種菌株をカイコ体節より注射して経時的にカイコの生存率を調べた。菌接種 12 時間後のカイコの病理組織切片を作製し、菌の形態を観察した。マウス感染実験は 1 群を 6 匹とし、菌量 1×10<sup>6</sup>CFU/50μl PBS に調整した各種菌株をマウス尾静脈より接種して経時的に生存率を調べた。また接種 5 日後に、腎臓への菌の定着率を比較した。その他、親株、破壊株、相補株の血清添加培地における集落の形状および菌糸形成能、血清アルブミン添加培地でのプロテアーゼ産生能、抗真菌薬および種々のストレスに対する感受性等の表現型は、それぞれ常法を用いて比較した。

*C. albicans* のプロテインフォスファターゼ 21 遺伝子のうち *YVHI*, *CMPI*, *SIT4*, *PTC7* についてはすでに論文があり、*PTC7* を除く 3 遺伝子については、それらの破壊株が、親株に比べてマウスに対する病原性が低下することが報告されている。そこで、*YVHI*, *CMPI*, *SIT4* 遺伝子破壊株は、カイコ感染実験モデルにおいても病原性の低下が見られるか否か、またその他のプロテインフォスファターゼ遺伝子破壊株は病原性に影響するか否かについて検証した。

親株を接種したカイコ (30 匹) はすべて感染後 1 日で死亡したが、菌を含まない同量の生理食塩水を接種したカイコはすべて 5 日以上生存した。プロテインフォスファターゼ遺伝子破壊株を接種した群では、出芽酵母の *PPZI*, *PTC7*, *MIHI*, *LTP1*, *PTP1*, *PPSI*(7033) に相当する遺伝子を破壊した株は 24 時間以内に死亡したため、親株と同様の病原性を依然有す

ると判断した。*SALI*, *PPT1*, *PTC2/PTC3*, *PTC6*, *PTC5*, *PTC4*, *OCA1*, *SIW14*, *OCA6*, *PTP3*, *PPSI*(4450) の 11 破壊株はわずかに病原性の低下を認めた (生存率 50%以下)。一方、*YVHI*, *CMPI*, *SIT4*, *PTC1* 破壊株は 63%以上のカイコが生存し、明らかに顕著な病原性の低下を示した。上述のように *YVHI*, *CMPI*, *SIT4* についてはすでにマウス感染実験において病原性に関与することが分かっているため、今回のカイコを用いた感染実験でもそれを相補する結果となった。しかし、*PTC1* については文献的な報告はなく、新たな病原性に関与するプロテインフォスファターゼ遺伝子である可能性が浮上した。

そこで、*PTC1* の病原性との関連をさらに詳しく調べるために、*PTC1* を破壊株に戻し、菌の病原性が回復するかどうかをしらべた。親株、相補株はマウス、カイコいずれにも病原性を示したが、*PTC1* はいずれの感染実験モデルを用いても明らかに病原性の低下が見られた。従って、カイコの感染モデルの結果はマウス感染を相補するより簡便な感染実験モデルを提供することが明らかになった。

では、なぜ *PTC1* が病原性と関連するのであろうか。この点を検証するために、病原性と関係があるといわれるいくつかの表現型について親株、相補株、*PTC1* 破壊株と比較した。*PTC1* 破壊株の菌糸形成能は、*in vitro*, *in vivo* のいずれの環境下でも親株、相補株に比べて顕著に劣り、プロテアーゼ産生能も低く、抗真菌薬ミカファンギンに感受性を示した。また、マウス腎での菌の定着率も親株および相補株に比べて劣っていた。これらの結果を

総合すると *PTCI* の欠損によって *C. albicans* の病原性に関与する種々の因子が影響を受け、結果としてマウスおよびカイコに対する病原性の低下を招いたと考えられる。

### 新聞誌上における真菌感染症の報道状況

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。

日経テレコン 21

(<http://telecom21.nikkei.co.jp/>) のデータベースを利用し、1992年から2007年の真菌感染に関する報道数を調べた。日経テレコン 21 の基本データベースには、国内で発行されている新聞紙の記事内容が登録されている。検索語を入力すると、登録されている「タイトル」「内容」「キーワード」から該当するデータが抽出される。

対象となる新聞

掲載されている新聞紙の中から、「朝日新聞」「毎日新聞」「読売新聞」「産経新聞」「日本経済新聞」のいわゆる五大紙を対象として検索した。すべての新聞紙のデータベースが完備しているのが1992年以降であるため、1992年以降を対象とした。

総記事数

対象となった五紙の総記事数のデー

タベースの登録数は、90年代前半から増加し、2000年以降はほぼ横ばいである。2000年以降、朝日、読売、毎日新聞は、日経新聞、産経新聞と比較して約3倍の記事データが登録されている。

「かび」に関する記事数

対象となった五紙の真菌に関係する記事数の年次推移を図1に示す。データベースの登録数は、90年代前半から増加し、2000年以降はほぼ横ばいである。総記事に対する「かび」に関連する記事の割合

総記事数に対する「かび」関係の記事の割合はほぼ一定であった(図2)。5紙を比較すると、産経新聞の割合が高く、日経新聞が低かった。

総記事に対する「真菌」に関連する記事の割合

総記事に占める「真菌」関連の記事数を示す(図3)。何れの新聞においても真菌の記事数は少なく、研究期間中に大きな変化を示さなかった。

新聞は国民への情報提供の強力な手段である。近年、医療や医学に関する新聞記事は増加傾向にあり、がん対策や産科・小児科問題を啓発する上で大きな役割を果たしていると考えられている。

本研究では、真菌感染症に関する新聞記事報道は極めて少なく、新聞を通じて真菌感染情報が国民には伝わっていないことを明らかにした。これは抗真菌剤が製薬企業にとり大きな売り上げを占めること、水虫がありふれた病気であることを考慮すれば奇異な感じがする。その正確な理由は来年度以降の研究課題としたいが、新聞という有力な媒体を、真菌感染症の啓蒙活動に利用できていないことについては、研究者は深く考える必要が



あるだろう。一方、真菌感染症領域で興味深いのは、『もやしもん』という真菌感染を対象とした漫画が発売され、映画化されていることである。

漫画の影響力を考慮した場合、このような動向は極めて興味深い。来年度の主たる研究テーマと考えている。

近年、さまざまなメディアが発達し、国民に多様な医療情報を提供している。しかしながら、その詳細については不明な点が多い。真菌感染症対策の徹底を考慮した場合、このようなメディアの特性を理解し、効率的に利用することが重要であろう

#### D.考察

##### 輸入真菌症の疫学調査、肺線維症における潜在的ヒストプラズマ症患者の検索およびヒストプラズマ症血清診断法の開発

輸入真菌症の国内発生状況については、コクシジオイデス症およびヒストプラズマ症が上位を占め基本的には従来と同様の傾向を示したが、過去数年にわたり増加を示していたコクシジオイデス症で新規患者数の増加がやや頭打ちの状態となった一方で、ヒストプラズマ症が増加を続けている点が注目された。特に基礎疾患のない患者で集団感染がみられたこと、また、その感染地域がこれまでにほとんど日本人の感染報告のないマレーシアであったことが注目される。この地域は近年ペナン島と共にマレーシアを代表するビーチリゾート地として注目されており、日本における認知度も急速に上がっている。この地域の特徴はブーケット、バリなどとは異なって人間の手が入っていない大自然にあるとされており、事実、今回の症例で感染したと思われる地域では

ホテルの周囲を熱帯林が半ばとり囲むような地形となっていた。その点を考慮すると今後もこの地域ではヒストプラズマ症が繰り返し発生する可能性は否定できないと思われる。

コクシジオイデス症では、2年ぶりに死亡例がみられた。前回は70歳代の高齢者(米国人)で Wegener 肉芽腫症を基礎疾患とするなど免疫抑制状態での発症例であったが、今回の症例は10歳代の健康な成人であるにもかかわらず、カリフォルニア滞在中に感染し、帰国後、著しい好酸球性肺炎として発症した。病像が一般的なコクシジオイデス症と必ずしも一致しなかったこともあり容易に正診にいたらず、最終的には救命し得なかった。わが国の医療関係者における輸入真菌症の知識は、本研究グループが活動を開始した2000年頃と比べると大幅に向上したとはいえ、本例のようなやや非典型的な経過をとる症例に関しては、診断・治療に迅速に対応しきれない状態とは言い切れない。今後、このようなことが繰り返されぬよう、より精密な疫学調査を行うとともに、医療従事者、研究者へいっそうの情報提供が必要と考えられる。

特発性肺線維症の患者数は10万人あたり10-20人、労作時呼吸困難感などの自覚症状がない状態の患者数はさらに10倍程度存在することが推定されており(呼吸器系疾患調査研究班:びまん性肺疾患)、その0.1%にヒストプラズマ症が混入していたと仮定しても、その患者数は膨大なものとなる。本研究においてどの程度の被検者数で検討を行うべきかは明確ではないが、今回の検討では強くヒストプラズマ症を示唆するような症例は見られなかった理由として、症例数が42例と少ないことがまず考えられる。昨年度よりは大幅に増加したとはいえ、この

対象症例数がまだ十分でないことに加え、検出方法として用いている抗体検出法が必ずしも十分な感度を有していない点なども、潜在するヒストプラズマ症を検出し得なかった原因となっている可能性が考えられる。

今後はこのプロジェクトの目的を達成するにあたっては、さらに検体数の増加をはかるとともに、次項にある血清診断法の改良が必要と考えられる。また、本州に比べてヒストプラズマの生息により適した環境にあると推測される小笠原諸島、沖縄などでの調査を含めて検討したいと考えている。

ヒストプラズマ症血清診断法の開発については、血清診断への応用に向けた新規 *H. capsulatum* 抗原タンパク質の同定を行ってきた。そこで、本年度は血清診断法への応用の第一歩として、これまでに得られている組み換え精製抗原タンパク質を利用した ELISA 法への応用を試みた。

まずは既知の *H. capsulatum* 抗原タンパク質である M 抗原および H 抗原を組み換えタンパク質として大腸菌内で産生させ、精製後、ELISA に用いた。この結果、M 抗原および H 抗原に対する抗体価が患者群において健常人群に比べ有意に高いことが明らかとなり、本研究で用いた組換え H 抗原および M 抗原が *H. capsulatum* 培養上清中の H 抗原および M 抗原と同様に利用できる可能性が示された。このことは病原体 *H. capsulatum* を直接用いず、安定的な抗原タンパク質の供給が可能となることを示している。

我々が同定してきた抗原タンパク質についても同様の検討を行った。これまでに同定してきた抗原タンパク質の中で Catalase P と Glutamate carboxypeptidase II (C 末 273 アミノ酸部分タンパク質) に

対する患者群の抗体価が健常人群に比べて有意に高いことが示された。この結果からこれら二つの抗原タンパク質については上記の M 抗原、H 抗原とともに ELISA 法への応用が強く期待される。現在、他の輸入真菌症患者血清を用いて、交差反応についての検討を進めている。

さらに上記以外の 6 種の抗原タンパク質については本実験で用いた条件下では現在のところ患者群と健常人群で抗体価に有意な差は認められていない。今後、一層の条件検討が必要と考えられる。また、本実験で用いている抗原タンパク質はいずれも大腸菌内で封入体を形成し、不溶化している。補体結合法などの迅速診断法への応用を考えた場合、タンパク質の可溶化は非常に重要である。今後は抗原タンパク質の可溶化について検討を行い、ELISA 以外の迅速診断法への応用の可能性を探る予定である。

#### 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

CHROMagar *Candida* は臨床検体から直接、各種真菌を分離培養でき、かつ酵素反応による発色に基づき、*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* の 3 菌種の簡易同定が同時にできることから、微生物検査室に急速に広く普及した。しかし、ヒト感染症から分離される頻度が高く、抗真菌薬に対する感受性の異なる *C. glabrata*, *C. parapsilosis* の鑑別が困難であった。今回検討した血液寒天を CHROMagar *Candida* に組み合わせる培養方法は、この欠点を補い、臨床現場で遭遇する頻度の高い主要な *Candida* 5 菌種はすべて同定可能となった。この方法には微生物検査室ならどこでも汎用している安価な血液寒天とサブローデキストロース寒天があれば良



く、非常に簡便で設備投資も不要である。使用する血液寒天はトリブチックソイベースでもハートインヒュージョンベースでも可能であるが、種類によっては若干の発育を認めるものがあることから、予め、精度管理に使用可能な陽性コントロール、陰性コントロール株で発育性を確認することが望ましいと思われた。また、添加血液としてはウマ血液よりもヒツジ血液の方が良いことがわかった。CHROMagar Candida 上でピンク-紫系統の色を示す菌種は多く、今回の結果でも *C. lusitanae*, *C. guilliermondii* などの *C. glabrata* 以外の菌種は今回の方法では区別できない。但し、臨床検体から *C. parapsilosis* 以外の上記菌種が検出されることは比較的稀であり、検査室の日常業務では「*C. parapsilosis* 疑い」として報告を行い、血液、無菌部位などの分離株については同定キットや遺伝子同定などを考慮すれば良いと思われる。実際、臨床検体からランダムに得られた 39 株では *C. glabrata*, *C. parapsilosis* 以外の菌種は分離されなかった。これらの結果を踏まえ、現在、7 箇所まで施設検討を開始しており(資料 1)、臨床現場での有用性について、次なる課題としておきたい。

近年、医療技術の進歩により、深在性真菌症のリスクを抱える患者はどんどん増加している。その一方で、感染症の迅速な対応に不可欠な微生物検査の外部委託が押し進められ、採算性の良くない微生物検査室を廃止してしまう病院も少なくない。真菌検査は専門家が少なく、対応に苦慮することが少なくない。簡便で費用をかけず、確実に迅速に臨床で問題となる頻度の高い真菌の同定方法が望まれる所以である。また、世界的に見ても抗生物質のみならず抗真菌薬の開発は頭打ちであり、耐性菌を含めた深在性真菌

症の疫学を正確に把握することは、本研究班の役割としても非常に重要である。今回、開発した真菌同定方法は、本研究班の活動を通じて、大きく深在性真菌症の診断・治療に貢献できるものと考えられた。

#### 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

Panfungal PNA プローブによる材料と手技の評価を目的とした ISH 法を確立した。我々が ISH 法において標的としている rRNA は真菌の細胞質に多量に存在する事が想定される。しかし、病理診断で常用されるホルマリン固定パラフィン切片においては、固定、標本作製過程等で、化学的に不安定な RNA は消失する可能性も否定できず、RNA の保存度の検討を行う事は必須の操作と考えている。今回我々が作製した Panfungal PNA プローブは、検討したすべての菌において十分なシグナルが得られ、rRNA の保存度の評価に有用であると考えられた。

*Fusarium* 属 PNA プローブによる ISH 法を構築した。感染モデルにおいてその特異性が検証されたことから、臨床検体における応用が期待される。

*H. capsulatum* PNA プローブはヒストプラズマ症患者におけるホルマリン固定パラフィン切片において良好な反応性を示し、臨床応用が可能である事が示唆された。今後さらに、形態学的に鑑別が難しい酵母形態を有する菌における特異性の検証が望まれる。

#### 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

創薬にはまず有用なシードを見出すことが基本である。新規化合物の探索のために、ほとんど検討されていないきのこや海生菌に着目した。この代謝産物から約1%の確率で子嚢菌と担子菌の両方に抗真菌活性を有するエキス分画が存在することを昨年度見出した。今回、化学構造を決定したDB-1と-2はわずかに-OH基の有無しか差がない。このことは今後、活性を至適化する上で貴重な知見である。しかも、子嚢菌と担子菌の両方に活性を示すことから広域スペクトル化が期待できる。

トリコスボロン症が報告されて30年がすぎた。深在性真菌症に占める本症の割合は、本邦ではおおよそ5%程度と推定されている。タイNIHの調査でも同程度であった。しかもゆるやかながらその発症頻度は上昇している。この度、世界規模での分子疫学調査を実施したところ、その遺伝子型には地域特異性が見出された。各々の遺伝子型と患者背景についての相関は今後の調査課題であるが興味のあるところである。

## *Aspergillus fumigatus* 新規抗原検索と診断への応用

SST法は、細胞膜あるいは細胞外へ分泌される蛋白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)。今回われわれはこの手法を糸状菌、とくに*A. fumigatus*に応用することで、新たな診断系の標的となりうる可能性のある分泌蛋白質の網羅的検出を試みた。

この方法では、供試菌の培養条件により蛋白発現が変化する可能性が存在する。このことを考慮し本研究では窒素制限培地での培養菌を用いたが、この培養条件

は*A. fumigatus*のエラスターゼ産生が盛んに認められる条件との検討結果(unpublished data)であり、ヒトにおける侵襲性アスペルギルス症の条件に近似していると考えられたことから、この条件でのSST法による網羅的な分泌蛋白質検出を試みた。

本研究では計403個のクローンから約70個の遺伝子が同定されたが、約半数が何らかのモチーフを持つと考えられ、実際に分泌が予想され、その機能がまだ未解明な蛋白質と考えられるものも認められた。今回はこの中から新規抗原となりうるものを選択を行ったが、選択にあたっては得られたクローン数を参考にした。このうち*S. cerevisiae*を用いて蛋白質発現を確認したが、一部の候補遺伝子では発現が確認されなかった。これは分泌蛋白質というよりはむしろ膜蛋白質である可能性が高いと考えられた。現在、分泌が確認された蛋白質や、アスペルギルスの感染、定着を考慮し、とくに接着に関与する蛋白質に焦点をあてモノクローナル抗体を作製中であり、今後これら抗体を利用した*A. fumigatus*感染の検出の可能性、さらにはアスペルギルス感染症の予防、治療効果について検討する予定である。一方、他の多くのスクリーニングされた蛋白質については、今後局在の確認が必要と考えられた。

## 臨床分離 *Candida tropicalis* にみられた micafungin の paradoxical effect

“Paradoxical effect”とは、一旦ある濃度で抗菌活性を示しながら、より高濃度で活性が減弱するという現象で、過去にはペニシリン系抗菌薬において“Eagle



effect”として注目された。近年では、MCFGと同じキャンディン系抗真菌薬である caspofungin において類似の現象が報告され、臨床効果への影響が懸念されている。Caspofunginに限って言えば、この現象は比較的幅広い *Candida* 属菌種 (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*) に認められ<sup>2)</sup>、さらには *Aspergillus fumigatus* においても発現することが知られている。現在までに、発現メカニズムに関する知見はいくつか報告されており、細胞壁強度の維持を掌る PKC pathway 上の calcineurin A によるキチン生合成の up regulation という説が有力である。動物モデルにおける in vivo 効果に対する影響を検討した報告は、我々の知る限りでは *C. albicans* および *A. fumigatus* に関して各 1 報ずつしかないが、いずれにおいても caspofungin の除菌効果に多少なりとも反映されることが記されている。

我々は、これらの報告に先駆けて 2002 年、MCFG の paradoxical effect が *C. tropicalis* において発現することを報告した<sup>3)</sup>。この現象は、株によって程度の差がみられ、最も軽い株では培養 72 時間後になってようやく発現する。一方、最も程度の重い株では、高濃度における微小発育が培養 24 時間での MIC 以上の全濃度域にみられ、発育菌量も最大でスコア 2 (発育対照と比べて顕著な濁度の減少) に達した。しかし、この株でさえ播種性感染モデルにおける MCFG の除菌効果に影響を及ぼさなかった。その後の検討により、この現象は浸透圧の低い AM3 培地では発現せず、AM3 に添加物を加えて浸透圧を増大させると再び発現することが明らかとなり、paradoxical effect の発現は浸透圧抵抗性の増大に因ることが推察された。このことは、caspofungin の

paradoxical effect においてキチン生合成の up-regulation が起こっているという Stevens らの報告と矛盾しないものである。

今回分離された株のプロファイルは、この paradoxical effect を示す *C. tropicalis* のプロファイルと完全に一致した。MCFG の高濃度域に発育した菌量 (Fig. 1) や形態 (Fig. 2) から考えると、この株の paradoxical effect の程度は軽いものであり、やはり MCFG の in vivo 効果には影響がなかった。以上の結果から、この株は MCFG 感受性と判断して差し支えないものと考えられる。

これまでに *C. tropicalis* においてしか確認されていない paradoxical effect は、その程度が最も強い株でさえ、MCFG の治療効果に影響を及ぼさなかった。したがって、今回の基礎的な検討結果からは、現状では、MCFG に関して、paradoxical effect を重視する必要はないと考えられる。しかし、今後も paradoxical effect が認められた株に対しては、耐性化などの可能性も考慮しながら慎重に検討していく必要があると考える。

#### *C. albicans* $\alpha$ 型 マンノース転移酵素欠失株の網羅的作製とその解析

生育許容温度での対数増殖期における倍加時間は、すべての変異株で親株と大きな違いを認めなかった。次に、10% 血清寒天培地中での菌糸形成能を比較したところ、 $\alpha$ -1,3 マンノース転移酵素を欠失すると推測される変異株では著しい抑制を認め、spider 寒天培地でも同様の傾向を認めた。さらに、りん酸化マンナン欠失に加えて  $\alpha$ 型のマンノース転移酵素 ( $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 マンノース転移酵素) を欠失すると推測される変異株では、高温感

受性を認めたが、菌糸形成能、炎症性サイトカイン産生と直接の相関は示さなかった。 $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 マンノースは細胞壁最表層を構成するマンノースであり、これらの微細な構造変化によって、菌の性質が変化する可能性が示唆された。今後、変異株を用いて病原性の確認をする予定である。

#### カイク感染実験モデルを用いた *Candida albicans* の病原性解析

カイク感染実験モデルを用いた *C. albicans* の病原性評価は、マウスとほぼ同等の結果をもたらし、マウスと同様に病原性の有無を評価できることが明らかになった。従って、マウス感染実験モデルを相補する病原性スクリーニングの代替方法として、容易でかつ、倫理上の問題を含まない信頼性の高いカイク感染実験モデルが今後益々盛んに用いられる可能性が期待できる。

さらにより安定したカイク感染実験モデルを確立するためには、病原性を失った菌株がカイク体内でどのような挙動を示しているのかを調べ、また自然免疫との関連性についても興味深い。

いくつかの課題は検討しなければならないが、カイクを用いた *C. albicans* の病原性の評価が確立し、フォスファターゼ遺伝子破壊株のみならず新規病原性関連遺伝子の同定や、*C. albicans* 以外にもアスペルギルス等の他の日和見感染菌の病原因子の解析が進むことが期待される。

#### E. 結語

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性を行ない、有用性の基礎的検討を行った。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。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。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。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。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。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。臨床分離 *Candida tropicalis* にみられた micafungin の paradoxical effect について検討した。*C. albicans*  $\alpha$ 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。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。

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

II. 分担研究報告書

- 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
- 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
- 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 (帝京大学医真菌研究センター) - - - - - 54
- 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 (東邦大学医学部病院病理学講座) - - - - - 71
- 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
- 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
- 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
- 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
- C. albicans*  $\alpha$ 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
- カイコ感染実験モデルを用いた *Candida albicans* の病原性解析  
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) - - - 112



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」

分担研究報告書

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

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

研究要旨 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。特にヒストプラズマ症ではマ  
レーシアにおける集団感染事故が確認され、危険情報公開の観点からも注目された。ま  
た、昨年度から開始さ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、本年度は被検者数を増やして40例あまりで実施した  
が、明確なヒストプラズマ症は認められなかった。しかし、ヒストプラズマ症の増加が  
続いていること、さらに本症がきわめて多彩な病態を示すため流行地域内の医療機関に  
おいても誤認される例が多いこと等から、今後も検討を続ける必要があると考えられ  
た。また、ヒストプラズマ症血清診断法の開発について、昨年度に抽出された新規抗原  
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。

1. 輸入真菌症の国内発生状況調査

A. 研究目的

これまでの当研究班の研究から、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つつ  
あることが示されてきた。特にヒストブ  
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  
での結果では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。

B. 研究方法

症例の収集は、これまでと同様に、当  
センターに対し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。症例の詳細につい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。

### C. 研究成果 (図1)

#### 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。

輸入真菌症症例数の変動

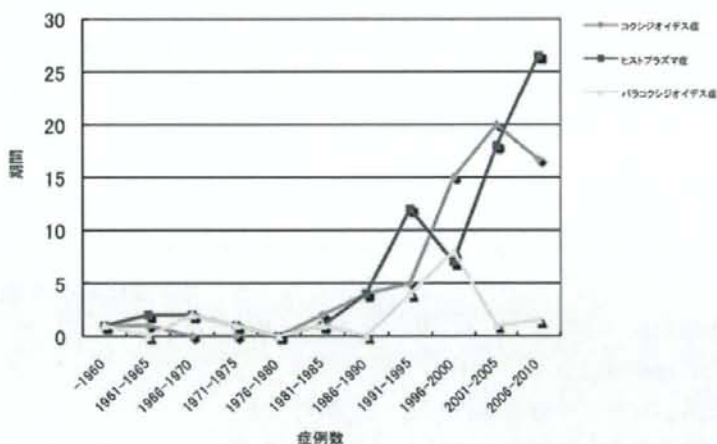


図1: 我国の輸入真菌症症例数の変遷

ヒストプラズマ症の増加傾向の継続が明らかである。(● コクシジオイデス症、■ ヒストプラズマ症、◆ パラコクシジオイデス症)。コクシジオイデス症のうちの1例は若年健常人における死亡例であった。またヒストプラズマ症ではマレーシアでの集団発生が見られ、今後の対応の必要性が示唆された。



## 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。

## 3) その他の輸入真菌症

その他の輸入真菌症では、パラコキシジオイデス症、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。

## D. 考察

今回の検討では、コキシジオイデス症およびヒストプラズマ症が上位を占め基本的には従来と同様の傾向を示したが、過去数年にわたり増加を示していたコキシジオイデス症で新規患者数の増加がやや頭打ちの状態となった一方で、ヒストプラズマ症が増加を続けている点が注目された。特に基礎疾患のない患者で集団感染がみられたこと、また、その感染地

域がこれまでにほとんど日本人の感染報告のないマレーシアであったことが注目される。この地域は近年ペナン島と共にマレーシアを代表するビーチリゾート地として注目されており、日本における認知度も急速に上がっている。この地域の特徴はブーケット、バリなどとは異なって人間の手が入っていない大自然にあるとされており、事実、今回の症例で感染したと思われる地域ではホテルの周囲を熱帯林が半ばとり囲むような地形となっていた。その点を考慮すると今後もこの地域ではヒストプラズマ症が繰り返し発生する可能性は否定できないと思われる。

コキシジオイデス症では、2年ぶりに死亡例がみられた。前回は70歳代の高齢者(米国人)でWegener肉芽腫症を基礎疾患とするなど免疫抑制状態での発症例であったが、今回の症例は10歳代の健康な成人であるにもかかわらず、カリフォルニア滞在中に感染し、帰国後、著しい好酸球性肺炎として発症した。病像が一般的なコキシジオイデス症と必ずしも一致しなかったこともあり容易に正診にいたらず、最終的には救命し得なかった。わが国の医療関係者における輸入真菌症の知識は、本研究グループが活動を開始した2000年頃に比べると大幅に向上したとはいえ、本例のようなやや非典型的な経過をとる症例に関しては、診断・治療に迅速に対応しきれる状態とは言い切れない。今後、このようなことが繰り返されぬよう、より精密な疫学調査を行うとともに、医療従事者、研究者へいっそうの情報提供が必要と考えられる。

#### E. 結論

今年度の発生状況調査にてコクシジオイデス症に加えて、ヒストプラズマ症の重要性が明らかとなった。今後とも多面的な情報提供、研究が必要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

最後にまとめて記載。

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

### 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

#### A. 研究目的

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。

#### B. 研究方法

・被検者：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。

・血清：被検者の合意のもと、協力病院にて採血及び血清分離を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。

・抗体検出法：免疫拡散法(ID法)、ラテックス凝集法(LA法)、補体結合法(CF法)にて抗ヒストプラズマ抗体を検出した。

#### C. 研究成果

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。

#### D. 考察

特発性肺線維症の患者数は10万人あたり10-20人、労作時呼吸困難感などの自覚症状がない状態の患者数はさらに10倍程度存在することが推定されており（呼吸器系疾患調査研究班：びまん性肺疾患）、その0.1%にヒストプラズマ症が混入していたと仮定しても、その患者数は膨大なものとなる。本研究においてどの程度の被検者数で検討を行うべきかは明確ではないが、今回の検討では強くヒストプラズマ症を示唆するような症例は見られなかった理由として、症例数が42例と少ないことがまず考えられる。昨年度よりは大幅に増加したとはいえ、この対象症例数がまだ十分でないことに加え、検出方法として用いている抗体検出法が必ずしも十分な感度を有していない点なども、潜在するヒストプラズマ症を検出し得なかった原因となっている可能性が考えられる。

今後はこのプロジェクトの目的を達成するにあたっては、さらに検体数の増加をはかるとともに、次項にある血清診断法の改良が必要と考えられる。また、本州に比べてヒストプラズマの生息により適した環境にあると推測される小笠原諸島、沖縄などでの調査を含めて検討したいと考えている。

#### E. 結論

今年度の研究範囲では、肺線維症患者内に明らかなヒストプラズマ症の存在は確認されなかった。今後、方法の改良を含めさらなる研究が必要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

最後にまとめて記載。

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

### 3. ヒストプラズマ症の血清診断法に関する基礎的研究

#### A. 研究目的

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。

#### B. 研究方法

*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トニングには 1 well あたり 200ng の精製タンパク質を用い、コートニングバッファ中で 16 時間、4°C にてコートニングを行った。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°C 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°C 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。

#### C. 研究結果

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(図2)。

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。

#### D. 考察

これまでに我々はヒストプラズマ症の血清診断への応用に向けた新規 *H. capsulatum* 抗原タンパク質の同定を行ってきた。そこで、本年度は血清診断法への応用の第一歩として、これまでに得られている組み換え精製抗原タンパク質を利用したELISA法への応用を試みた。

まずは既知の *H. capsulatum* 抗原タンパク質であるM抗原およびH抗原を組み換えタンパク質として大腸菌内で産生させ、精製後、ELISAに用いた。この結果、M抗原およびH抗原に対する抗体価が患者群において健常人群に比べ有意に高いことが明らかとなり、本研究で用いた組換えH抗原およびM抗原が *H. capsulatum* 培養上清中のH抗原およびM抗原と同様に利用できる可能性が示された。このことは病原体 *H. capsulatum* を直接用いず、安定的な抗原タンパク質の供給が可能となることを示している。

我々が同定してきた抗原タンパク質についても同様の検討を行った。これまでに同定してきた抗原タンパク質の中でCatalase PとGlutamate carboxypeptidase II (C末273アミノ酸部分タンパク質)に対する患者群の抗体価が健常人群に比べて有意に高いことが示された。この結果からこれら二つの抗原タンパク質については上記のM抗原、H抗原とともにELISA法への応用が強く期待される。現在、他の輸入真菌症患者血清を用いて、交差反応についての検討を進めている。

さらに上記以外の6種の抗原タンパク質については本実験で用いた条件下では現在のところ患者群と健常人群で抗体価に有意な差は認められていない。今後、一層の条件検討が必要と考えられる。

また、本実験で用いている抗原タンパク質はいずれも大腸菌内で封入体を形成し、不溶化している。補体結合法などの迅速診断法への応用を考えた場合、タンパク質の可溶化は非常に重要である。今後は抗原タンパク質の可溶化について検討を行い、ELISA以外の迅速診断法への応用の可能性を探る予定である。

#### E. 結論

今回新しく作製した組み換え精製抗原タンパク質を用いた基礎実験で、これらの抗原の有用性が示唆された。今後さらに実用化に向けた検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

最後にまとめて記載。

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

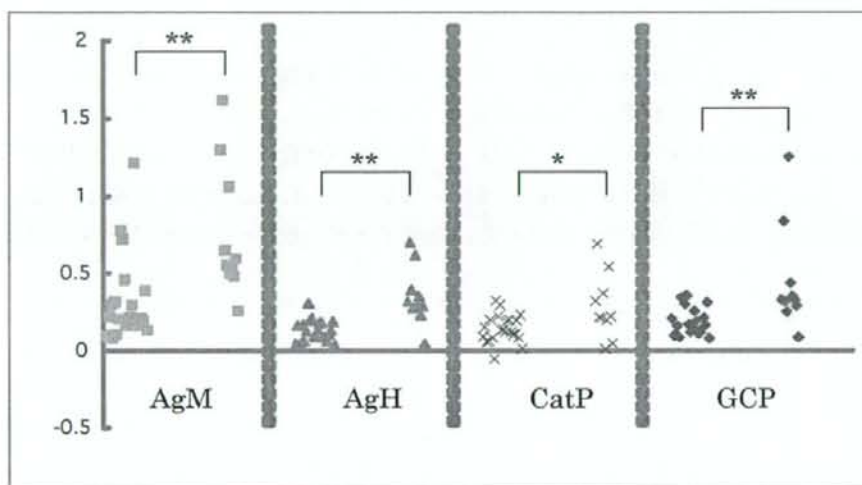


図2：抗原タンパク質を用いた ELISA

各抗原タンパク質を用いたデータにおいて左側は健常人血清 (N=22)、右側は患者血清 (N=10) の結果を示している。AgH：H抗原；AgM：M抗原；CatP：catalase P；GCP：glutamate carboxypeptidase II C末側 273a. a。Mann-Whitney のU検定により、\*： $p \leq 0.05$ 、\*\*： $p \leq 0.01$  で有意差ありと判定された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 上原雅江, 佐野文子, 鎗田響子, 亀井克彦, 羽毛田牧夫, 井出京子, 永井啓子, 高山義浩, 西村和子：タイ人AIDS患者の菌血症例から分離された *Penicillium marneffeii*. 日本医真菌学会雑誌 3：205-209, 2008.

2) Ken Kikuchi, Takashi Sugita, Koichi Makimura, Kensaku Urata, Takashi Someya, Takashi Sasaki, Katsuhiko Kameji, Masakazu Niimi, Keiichi Hiramatsu and Yoshimasa

Uehara. Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? *Microbiology and Immunology* 52 (9):455-459,2008.

##### 2. 学会発表

1) 豊留孝仁ら：*Histoplasma capsulatum* H抗原およびM抗原タンパク質の発現・精製およびこれらを用いたヒストプラズマ症患者血清中抗体検出法についての検討. 真菌症フォーラム第10回学術集会、名古屋, 2月21日、2009 (真菌症フォーラム優秀賞受賞)。