

この方法では、供試菌の培養条件により蛋白発現が変化する可能性が存在する。このことを考慮し本研究では窒素制限培地での培養菌を用いたが、この培養条件は *A. fumigatus* のエラスターゼ産生が盛んに認められる条件との検討結果 (unpublished data) であり、ヒトにおける侵襲性アスペルギルス症の条件に近似していると考えられたことから、この条件での SST 法による網羅的な分泌蛋白質検出を試みた。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。

#### E. 結論

SST 法を用いて *A. fumigatus* の細胞外分泌蛋白質や膜蛋白質の網羅的検出を行った結果、新規アスペルギルス検出系の候補となる分泌蛋白質が得られた。現在それらに対するモノクローナル抗体、とくに接着因子と考えられる蛋白質に対する抗体を作製中であり、今後それらの診断、治療への応用を考えている。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ohno H, Matsuo N, Suyama N, Nagayoshi Y, Kohara N, Kazumi Y, Miyazaki Y, Kohno S. The first surgical treatment case of pulmonary *Mycobacterium malmoeense* infection in Japan. *Internal medicine* 47: 2187-2190, 2008.
- 2) 大野秀明  
各種迅速検査法 抗酸菌感染症  
感染症迅速検査アップデート  
*Medical Technology* 36: 1371-1378, 2008.
- 3) 大野秀明  
抗酸菌が陽性ならば  
レジデントのための呼吸器診療マニュアル (河野 茂, 早田 宏編)  
医学書院, p51-63, 東京, 2008.
- 4) 大野秀明  
肺外結核.  
*Medical Technology* 36: 159-164, 2008.

2. 学会発表
- 1) 山越 智、大川原明子、田辺公一、新見昌一、大野秀明、宮崎義継  
SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening) 法を用いた *Aspergillus fumigatus* の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的同定. 第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス、金沢、2008.
  - 2) 大野秀明  
伝播に関連した真菌の基礎知識.  
第 70 回 ICD 講習会 (第 52 回日本医真菌学会総会)、長崎、2008.
  - 3) 山越 智、橋本ゆき、大川原明子、田辺公一、新見昌一、大野秀明、宮崎義継  
シグナルシーケンストラップ法を用いた *Aspergillus fumigatus* の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的同定.  
第 52 回日本医真菌学会総会、長崎、2008.
  - 4) 金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野 茂、宮崎義継  
*Candida albicans* の biofilm に対するミカファンジンとポリコナゾール、アンフォテリシン B との併用効果.  
第 52 回日本医真菌学会総会、長崎、2008.
  - 5) 大川原明子、山越 智、橋本ゆき、大野秀明、新見昌一、宮崎義継  
*C. albicans* 細胞壁表層のマナン構造の違いによる初期免疫応答の解析.  
第 52 回日本医真菌学会総会、長崎、2008.
  - 6) 大野秀明  
シンポジウム I 分離された真菌の菌種決定法.  
衛生微生物研究協議会 第 29 回研究会、東京、2008.
  - 7) 福島喜代康、江原尚美、掛屋 弘、大野秀明、迎 寛、齋藤 厚、河野 茂  
QuantiFERON TB-2G を用いた潜在性結核感染の診断と治療の経験.  
第 83 回日本結核病学会総会、東京、2008.
  - 8) 江原尚美、福島喜代康、掛屋 弘、大野秀明、迎 寛、齋藤 厚、河野 茂  
肺結核における全血 QuantiFERON TB-2G と喀痰 PCR の比較検討.  
第 83 回日本結核病学会総会、東京、2008.
  - 9) 河野仁寿、朝永七枝、北崎 健、神田哲郎、大野秀明、河野 茂  
ショック症状をきたした結核性心内膜炎の一例.  
第 83 回日本結核病学会総会、東京、2008.
  - 10) 河野仁寿、大野秀明、河野 茂  
当院におけるクオンティフェロン TB-2G とツベルクリン反応の比較検討.  
第 83 回日本結核病学会総会、東京、2008.
  - 11) 福島喜代康、江原尚美、掛屋 弘、田代将人、大野秀明、迎 寛、齋藤 厚、河野 茂

肺抗酸菌症における QuantiFERON  
TB-2G の臨床的検討.

第 82 回日本感染症学会総会、島根、  
2008.

1 2) 大野秀明

耐性菌の迅速検査で院内感染を防ぐ

— 4. MDRTB (XDRTB も含めて) —.

第 61 回 ICD 講習会 (第 19 回日本臨  
床微生物学会総会)、東京、2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定  
を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



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

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

研究協力者 山岸 由佳<sup>[1]</sup> 中井 徹<sup>[2]</sup>  
研究分担者 愛知医科大学大学院医学研究科 感染制御学 教授 三嶋廣繁<sup>[1]</sup>  
[1] 愛知医科大学大学院医学研究科 感染制御学,  
[2] アステラス製薬株式会社, 薬理研究所

研究要旨 micafungin (MCFG) 投与中の患者血液より分離された *Candida tropicalis* が、通常感受性レベルより高濃度の MCFG 存在下に発育した。MCFG 耐性化の懸念があったため、感染防御効果を始めとする基礎検討により本菌株のプロファイリングを行った。CLSI の M27-A2 に準拠したマイクロ液体希釈法で測定した本菌株の MCFG 感受性は、培養 24 時間における判定では MIC 0.0625  $\mu\text{g/ml}$  と良好であった。培養 48 時間になると、8~32  $\mu\text{g/ml}$  の濃度域にごく微少な発育を肉眼的に認めた。発育した菌体を光学顕微鏡下に観察すると、ブドウの房様の菌塊状を呈しており、分散した酵母状を呈する薬剤無処理菌体の形態とは大きく異なっていた。Antibiotic medium 3 を感受性測定用培地として用いると、高濃度における発育はみられず、MIC 以上の濃度で殺菌的な効果が認められた。また、cyclophosphamide 処理して好中球を減少させた雄性 ICR 系マウスに、本菌株の致死菌量を尾静脈内接種して作成した播種性感染モデルに対する ED<sub>50</sub> 値は 0.29 mg/kg (95%信頼区間 0.18-0.41 mg/kg) であり、比較対照とした通常感受性株の 0.35 mg/kg (同 0.26-0.48 mg/kg) と同等であった。以上のプロファイルから、本菌株は通常感受性株と比較してやや浸透圧抵抗性が増大したことにより paradoxical effect を示すが、MCFG の in vivo 効果には影響がなかったことから MCFG 感受性と判断された。

A. 研究目的

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- $\beta$ -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。

## B. 研究方法

### 1) 菌株

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。

### 2) ミクロ液体希釈法による感受性試験

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-Morpholinopropanesulfonic 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有, 炭酸水素ナトリウム不含有; 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  $1.0 \times 10^3$  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, 各ウエ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エルを倒立型光学顕微鏡で観察した。

### 3) 感染治療効果

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ED<sub>50</sub>値を推定した。

### C. 研究結果

#### 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(Fig. 1)。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(Fig. 2)。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(Table 1)。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( $8.3 \times 10^5$  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ED<sub>50</sub>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 $3.6 \times 10^4$  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、ED<sub>50</sub>値は0.35 mg/kg/day(95%信頼区間0.26~0.48 mg/kg/day)であった。

### D. 考察

“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>\*)</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>\*)</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、高濃度における微少発育が培養 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。

#### E. 結論

*C. tropicalis* には通常感受性株と比較してやや浸透圧抵抗性が増大したために paradoxical effect を示す株が存在した。しかし、MCFG の in vivo 効果には影響がなかったことから、臨床的には、MCFG 耐性ではなく、感受性であると判断された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 三鴨廣繁、山岸由佳：深在性真菌症～新ガイドラインと最新知見 外科領域の深在性真菌症、医学のあゆみ 225(3)：237-242, 2008.
2. 山岸由佳、三鴨廣繁：深在性真菌症の経験的治療に関する無作為比較臨床試験からみた抗真菌薬の安全性評価、Physician's Therapy Manual (PTM) 5(5) NOV., 2008.

3. 三鴨廣繁、山岸由佳：産婦人科感染症診療マニュアル 総論 4. 感染症の診断 — 細菌・真菌、産と婦 75(11)：1369-1376, 2008.
4. 中井徹、松本哲、池田文昭、三鴨廣繁：臨床分離 *Candida tropicalis* にみられた micafungin の paradoxical effect、日化療会誌 56(2)：185-189, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし。

|      | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.13 | 0.06 | 0.03 | 0.016 | 0.008 | GC |
|------|----|----|----|---|---|---|---|-----|------|------|------|------|-------|-------|----|
| RPMI | 0  | 1  | 1  | 1 | 0 | 0 | 0 | 0   | 0    | 0    | 0    | 4    | 4     | 4     | 4  |
| AM3  | 0  | 0  | 0  | 0 | 0 | 0 | 0 | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0     | 4     | 4  |

Fig. 1 患者分離株の MCFG 感受性 MIC 判定スコア

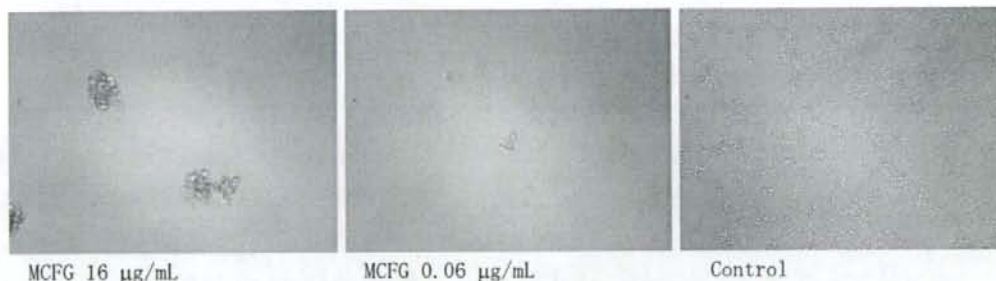


Fig. 2 MCFG 暴露時の倒立顕微鏡下で観察した微少発育の形態



Table 1 真菌感受性測定培地による感受性試験成績の差異

|        | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )* |             |        |
|--------|---------------------------|-------------|--------|
|        | RPMI/MOPS                 |             | AM3    |
|        | 24 h                      | 48 h        | 48 h   |
| MCFG   | 0.0625                    | 0.0625/64** | 0.0156 |
| FLCZ   | 2                         | 1           | N. T.  |
| ITCZ   | 0.5                       | 4           | N. T.  |
| AMPH-B | 2                         | 2           | N. T.  |

\* MCFG, AMPH-B : スコア 0 (肉眼的に透明) を示した最小濃度

FLCZ, ITCZ : スコア 2 (顕著な濁度の減少) を示した最小濃度

\*\* スキップ現象によりエンドポイントが 2 点存在

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

*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

研究分担者 大川原 明子

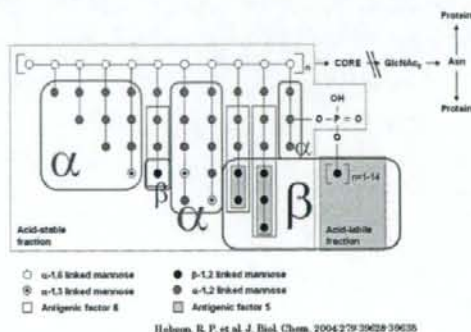
国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

本研究では、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て 25 種類の遺伝子破壊株を網羅的に作製し、菌学的性質、それから精製したマンナンたんぱく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を行った。30℃の液体培養における対数増殖期の倍加時間は、いずれの破壊株も親株と大きな差を認めなかった。同様に寒天培地中の菌糸形成能の解析、温度感受性試験を行ったところ、菌糸形成能が親株に比べて顕著に低下し、高温（42℃）感受性の傾向を示す株を見出した。一方、マンナンたんぱく刺激による、モノサイトの炎症性サイトカイン IL-6 産生誘導については、親株と比較して低下する株があったが、これらの株の菌糸形成能、温度感受性は親株と差を認めなかった。以上の結果より、今回作製した、表層を構成するマンノースの構造が変化していると考えられる *C. albicans* の変異株では、高温感受性で、菌糸形成能が低下するものを認めたが、これらの現象と炎症性サイトカイン産生とは直接の関連を示さなかった。

A. 研究目的

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（右図）。



*C. albicans* 細胞壁 N-link MP の構造

*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 $\alpha$ 型のマンノース転移酵素、すなわち $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3、 $\alpha$ -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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。これらの酵素の触媒によって付加すると考えられる $\alpha$ -1,2、 $\alpha$ -1,3、 $\alpha$ -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。

## B. 研究方法

### 1) 遺伝子破壊株の作製

ウリジンとアルギニン要求性の TUA4 (Ura3 $\Delta$ 、Arg4 $\Delta$ ) を用い遺伝子破壊を図1のように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 遺伝子で一アリルを遺伝子破壊した株に導入した (図 1)。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。

### 2) 液体培地中における菌の生育

ウリジン加 YPD 培地で  $1 \times 10^4$  cells/ml になるよう菌液を調整し、30°C、70rpm で振とう培養して (ADVANTEC TN1506) 対数増殖期の倍化時間を算出した。

### 3) 寒天培地における菌糸形成および温度感受性

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。

#### 4) MP の精製と抗原性の解析

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  $30^\circ\text{C}$ 、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、 $125^\circ\text{C}$  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。

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  
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  $\mu\text{l}$  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<sup>TM</sup> EIA) で IL-6 を測定し、産生量を算出した。

### C. 研究結果

#### 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 (表 1)。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 のグループはりん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  $30^\circ\text{C}$  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 (図 2)。

#### 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 (図 3a, )。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

(図 3b)。

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 (図 4)。シングル欠失株はいずれも高温感受性を示さなかった (data 示さず)。

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 (data 示さず)。

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 (図 5a-d)。 $\alpha$ -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。

#### D. 考察

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、りん酸化マンナンの欠失に加えて $\alpha$ 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。

#### E. 結論

りん酸化マンナンの欠失に加えて $\alpha$ 型のマンノース転移酵素を欠失すると推測される *C. albicans* 変異株では、高温感受性、菌糸形成能抑制を認めたが、これらの性質と炎症性サイトカイン産生を指標にした生体認識・応答とは直接の関連を示さなかった。病原性の比較、検討が必要と思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 大川原明子、山越 智、橋本ゆき、大野秀明、新見昌一、宮崎義継

*C. albicans* 細胞壁表層のマンナン構造の違いによる初期免疫応答の解析 第 52 回日本医真菌学会総会 (長崎)

2) 山越 智、橋本ゆき、大川原明子、

田辺公一、新見昌一、大野秀明、宮崎義  
継

シグナルシーケンストラップ法を用い  
た *Aspergillus fumigatus* の細胞表層お  
よび分泌蛋白質の網羅的同定の試み 第  
52回

日本医真菌学会総会（長崎）

3) 山越 智、大川原明子、田辺公一、  
新見昌一、大野秀明、宮崎義継 SST-REX  
(signal sequence trap by  
retrovirus-mediated expression  
screening)法を用いた *Aspergillus  
fumigatus* の細胞表層および分泌蛋白質  
の網羅的同定 第8回糸状菌分子生物学コ  
ンファレンス（金沢）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定  
を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



a) Ura3遺伝子による遺伝子破壊

b) Arg4遺伝子による遺伝子破壊



図1 遺伝子破壊

## Group 1; Single mutant

| Strain                 | 欠失酵素(推定)      |
|------------------------|---------------|
| 親株 TUA4 (wild)         | -             |
| $\Delta \alpha$ -1,2-1 | $\alpha$ -1,2 |
| $\Delta \alpha$ -1,2-2 | $\alpha$ -1,2 |
| $\Delta \alpha$ -1,2-3 | $\alpha$ -1,2 |
| $\Delta \alpha$ -1,2-4 | $\alpha$ -1,2 |
| $\Delta \alpha$ -1,2-5 | $\alpha$ -1,2 |
| $\Delta \alpha$ -1,3-1 | $\alpha$ -1,3 |
| $\Delta \alpha$ -1,3-2 | $\alpha$ -1,3 |
| $\Delta \alpha$ -1,3-3 | $\alpha$ -1,3 |
| $\Delta \alpha$ -1,3-4 | $\alpha$ -1,3 |
| $\Delta \alpha$ -1,3-5 | $\alpha$ -1,3 |
| $\Delta \alpha$ -1,3-6 | $\alpha$ -1,3 |
| $\Delta \alpha$ -1,6-1 | $\alpha$ -1,6 |
| $\Delta \alpha$ -1,6-2 | $\alpha$ -1,6 |
| $\Delta \alpha$ -1,6-3 | $\alpha$ -1,6 |

## Group 2; Double mutant

| Strain                 | 欠失酵素(推定)           |
|------------------------|--------------------|
| MNN412-17              | phosphomannan (PM) |
| $\Delta \alpha$ -1,2-1 | $\alpha$ -1,2      |
| $\Delta \alpha$ -1,2-2 | $\alpha$ -1,2      |
| $\Delta \alpha$ -1,3-1 | $\alpha$ -1,3      |
| $\Delta \alpha$ -1,6-1 | $\alpha$ -1,6      |

## Group 3; Single mutant

| Strain         | 欠失酵素(推定)   |
|----------------|--|
| 親株 TUA4 (wild) | -  |
| $\Delta$ MT-1  | mannosyltransferase                                    |
| $\Delta$ MT-2  | mannosyltransferase                                    |
| $\Delta$ MT-3  | mannosyltransferase                                    |
| $\Delta$ MT-4  | mannosyltransferase                                    |
| $\Delta$ MT-5  | mannosyltransferase                                    |
| $\Delta$ MT-6  | dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase |

表1 作製したマンノース転移酵素欠失株

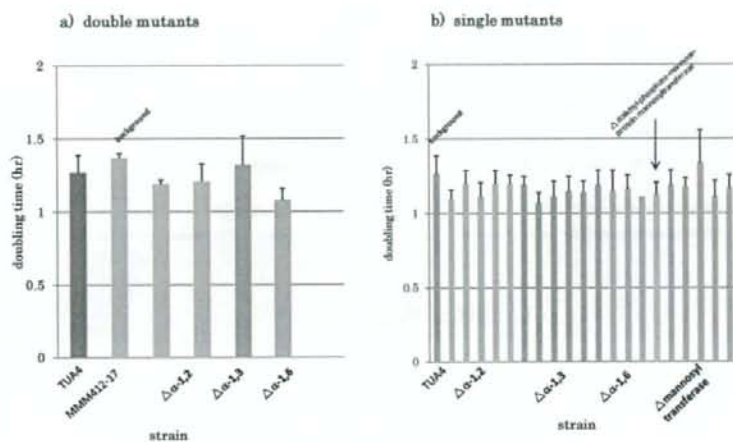


図2 対数増殖期の倍加時間の比較 (30°C)

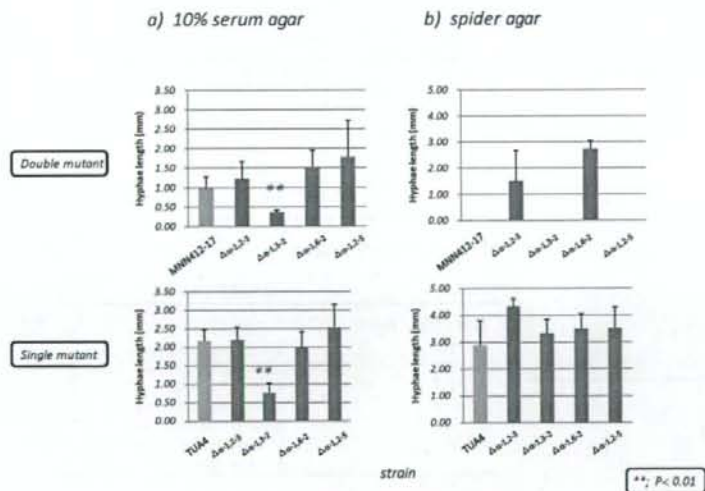


図3 菌糸形成能の比較

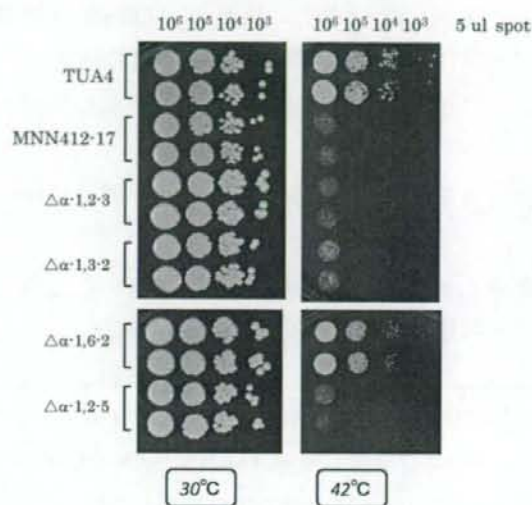


図4 温度感受性

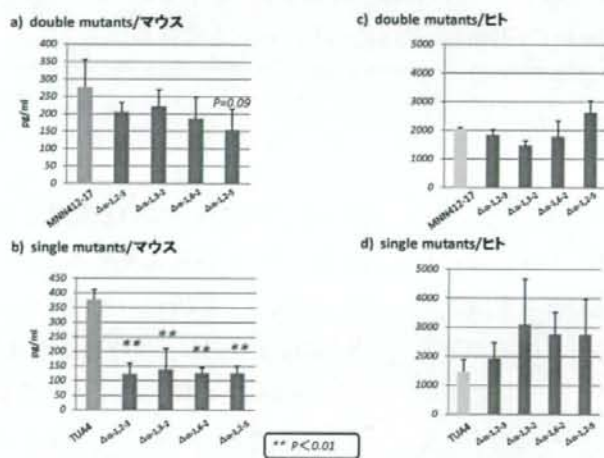


図5 マクロファージ・モノサイト刺激によるIL-6産生誘導



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

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

研究分担者・上原至雅 岩手医科大学 教授  
研究代表者・新見昌一 国立感染症研究所 室長

研究要旨:カイク感染実験モデルを用いて *C. albicans* プロテインフォスファターゼの病原性解析を行った。プロテインフォスファターゼをコードする 28 遺伝子のうち、21 遺伝子をそれぞれ破壊した欠損株を作製し、カイク感染実験モデルを用いて親株と病原性を比較した。その結果、*CaPTCI* 破壊株が著しい病原性の低下を示した。この結果はマウスモデル感染実験においても再現された。*CaPTCI* 破壊株は寒天培地上で菌糸形成が阻害され、*Protease* 産生能の低下、マウス腎臓への定着率の低下などを示した。従って、これらが複合して *C. albicans* の病原性の低下につながったと考えられる。

#### A. 研究目的

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 (Fig. 1)。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。

## B. 研究方法

*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  $1 \times 10^6$  CFU/50 $\mu$ l 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  $1 \times 10^6$  CFU/50 $\mu$ l 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. 研究結果

*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 PBS 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 *PPZ1*, *PTC7*, *MIH1*, *LTP1*, *PTP1*, *PPS1*(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。*SAL1*, *PPT1*, *PTC2/PTC3*, *PTC6*, *PTC5*, *PTC4*, *OCA1*, *SIW14*, *OCA6*, *PTP3*, *PPS1*(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、*YVH1*, *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 *YVH1*, *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 (Fig. 2)。

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 (Fig. 3)。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* 破壊株で比較した。*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 (Fig. 4,5)、プロテアーゼ産生能も低く (Fig. 6)、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 (Fig. 3C)。これらの結果を総合すると *PTC1* 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。

#### D. 考察

以上の結果から、カイコ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コ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コ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コ体内でどのような挙動を