

200931008A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野秀明

平成22年(2010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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大野秀明

平成22年(2010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 大野 秀明（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と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）	19
2. ニワトリを用いた新しい実験カンジダ感染モデルの作成 菊池 賢（順天堂大学医学部感染制御科学	28
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）	39
4. <i>In situ</i> hybridization 法における制度管理を目的としたアレイブロックの作製とプローブの特異性に関する検討 渋谷 和俊（東邦大学医学部病院病理学講座）	54
5. メディア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）	66
6. 抗真菌薬シーズの開拓と新興真菌感染症の分子疫学 杉田 隆（明治薬科大学 微生物学教室）	71
7. 病原真菌 <i>Candida albicans</i> 薬剤排出ポンプの基質認識機構解明を目標とした研究 大野 秀明（国立感染症研究所 生物活性物質部）	79
8. 真菌感染症における宿主免疫機構の解明とその臨床的評価法の開発 川上 和義（東北大学大学院医学系研究科）	85
9. <i>Candida albicans</i> のプロテインキナーゼを標的とする抗真菌物質の探索及び基礎的解析 上原 至雅（岩手医科大学薬学部 微生物薬品創薬学講座）	92
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	96

平成21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	大野 秀明	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	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
研究分担者	川上 和義	東北大学大学院医学系研究科	教授
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

平成21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)
楨村 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)
三嶋 廣繁 (愛知医科大学大学院医学研究科 感染制御学)
川上 和義 (東北大学大学院医学系研究科)
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

大野 秀明 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 大野秀明 国立感染症研究所 室長

研究要旨：(1) 輸入真菌症の発生動向調査を行い、ヒストプラズマ症、コクシジ
オイデス症、パラコクシジオイデス症およびマルネツフェイ型ペニシリウム症
の発症を確認した。ヒストプラズマ症の新たな血清診断法の開発については、
新規抗原候補タンパク質の発現・精製を行い、同タンパク質をコードする遺伝
子の塩基配列を解析し PCR 法への応用を検討した。(2) ニワトリを用いたカン
ジダ実験感染モデルを作成した。複数の *Candida* 株を経口接種した結果、*C.*
albicans 群では明瞭な thrush 様の病変が crop に認められた。組織内での *C.*
albicans の形態からヒト食道カンジダ症に酷似した外観と病理所見と考えられ
た。この *C. albicans* crop infection モデルを用い、免疫抑制によるカンジダ
全身感染モデルの確立を試みた。(3) 真菌症として扱われる新種プロトテカ藻
の病原性と診断、環境真菌の気道感作・感染の惹起、接合菌の病原的意義と診
断に関して研究を行った。(4) 30 菌種のホルマリン浮遊液を同一ブロック上に集
約して配置させたアレイブロックの作製法を確立し、プローブの特異性を検証
した。また、ホルマリン固定が PCR 法による核酸の増幅に及ぼす影響を検討し
た。(5) 新聞データベースと週刊誌を調査対象として、真菌感染に関する情報が
国民にどの程度提供されているかを調査した。(6) 1. 新規抗真菌薬の開発を目
指して、海生菌の二次代謝産物から幅広い殺菌活性をもつ新規化合物を同定し
た。またトリコスポロン症の世界レベルでの疫学調査を継続し手行い、起因菌
である *Trichosporon asahii* の遺伝子型の地域的特長を明らかにした。さらに、タ
イ患者から新規な *Pseudozyma* spp. を分離した。(7) *Candida albicans* 薬剤排出ポン
プの基質認識機構解明として、ABC タンパク質とその阻害剤である FK506 の相
互作用に特異的なアミノ酸残基の同定を行った。(8) クリプトコックス菌体中に
CD1d 拘束性に NKT 細胞によって認識される糖脂質を同定した。また、クリプ
トコックス DNA による樹状細胞の活性化機序には、CpG モチーフとは異なる機
序の関与を示唆する結果を得た。(9) *Candida albicans* の生存に必須なプロテイン
キナーゼ *CaMPSI*(mono-polar spindle-1) を新規抗真菌剤の標的候補分子とし、そ
のキナーゼ活性阻害物質の探索を行った。*in vitro* キナーゼ活性評価法を構築し、
化合物ライブラリを利用したスクリーニングから *CaMPS 1* のキナーゼ活性を阻
害する物質として化合物を得た。

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
楨村浩一 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
三嶋廣繁 愛知医大・感染制御部学・教授
川上和義 東北大学大学院医学系研究科・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

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。さらに、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っている。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

同作業を通して問題に対処している。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、川上和義教授（東北大学大学院医学系研究科）が新たに参画した。研究代表者および9名の研究分担者で総勢10名の真菌研究グループとなった。

「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と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)

ニワトリを用いた新しい実験カンジダ感染モデルの作成

(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
(槇村 浩一)
*In situ hybridization*法における制度管理を目的としたアレイブロックの作製とプローブの特異性に関する検討
(渋谷 和俊)
メディア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真菌感染症の分子疫学
(杉田 隆)
病原真菌 *Candida albicans* 薬剤排出ポンプの基質認識機構解明を目標とした研究
(大野 秀明)
真菌感染症における宿主免疫機構の解明とその臨床的評価法の開発
(川上和義)
Candida albicans のプロテインキナーゼを標的とする抗真菌物質の探索及び基礎的解析
(上原 至雅)

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対する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。また、同様に国立感染症研究所に対する依頼症例も重要な情報源として利用した。なお、感染症法 4 類に指定されているコクシジオイデス症に関しては、同法に基づく報告を確認しダブルチェックを行うとともに、同報による報告の認知度も確認した。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

2009 年は計 2 例が確認され、総症例数は 61 例となった。2007 年以降、3 例、3 例、2 例と比較的症例数は落ち着いてきており、これまでの増加傾向が落ち着きつつあるものと思われた。感染地は 2 例とも米国（アリゾナ州およびカリフォルニア州：1 例）であり、病型では 2 例とも肺の孤立結節影を主訴とする慢性肺コクシジオイデス症であった。いずれも大きな基礎疾患はなく、健常人に感染する典型例と考えられた。

2) ヒストプラズマ症

2009 年のヒストプラズマ症症例数は 3 例認められ総計は 68 例となった。感染地は東南アジア（タイ 2 例）、南米（グアテマラ 1 例）であり、うち 2 例は HIV 感染を基礎としていた。病型は 2 例が肺感染、1 例が全身播種型ヒストプラズマ症であった。昨年のような集団感染は見られなかった。

3) パラコクシジオイデス症

2006 年を最後に 2 年間ほど発症の見られなかったパラコクシジオイデス症であるが、2009 年は 2 例認められた。いずれも滞日中の南米人であり、ブラジルおよびボリビアに居住していた際に感染したものと思われた。病型は 2 例とも肺線維症+口腔粘膜などの潰瘍を呈するものであった。

4) マルネッフェイ型ペニシリウム症

これまでわずかに 3 例の症例が認められたのみであったが、2009 年には新たな 2 例が相次いで発見され、計 5 例となった。いずれも東南アジア（タイ及びベトナム）での感染であり、HIV 感染を基礎疾患とする全身感染であった。

5) その他の輸入真菌症

その他の輸入真菌症に関しては、ブラストミセス症を含め発生は認められなかった。

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。これまでの本研究班の調査においても本邦における輸入真菌症症例数はヒストプラズマ症を中心に増大を続けており、その後も海外

な輸入真菌症の一つである。これまでの本研究班の調査においても本邦における輸入真菌症症例数はヒストプラズマ症を中心に増大を続けており、その後も海外渡航者増加等の要因により更に増大していることが懸念される。このたま引き続きヒストプラズマ症、コクシジオイデス症を中心とする輸入真菌症の実態調査を行った。また、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、非常に重要な意義を持っている。しかしながら、いずれも感度が低く、また特殊な設備、時間を要するという大きな欠点を持っており、これらの手法と同時に迅速・簡便な診断法が求められている。ヒストプラズマ菌体に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迅速診断法として用いられているが、現行の血清診断試薬を用いた本邦の症例に対する検討では十分な感度が得られないことが明らかとなった（以前の本邦厚生労働科学研究事業での成果）。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、患者血清中抗体により認識される *H. capsulatum* 抗原タンパク質を同定してきた。さらにこれまで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、精製を進めた。精製した抗原タンパク質の ELISA 法への応用を現在保有するヒストプラズマ症患者血清を用い検討を行った結果、これまでに既知の抗原である M 抗原(AgM)および H 抗原(AgH)では、我々が精製した組換えタンパク質においても患者群において健常人群に比べその抗体価は優位に高い値を示すことがわかり、これら組換えタンパク質が今後、血清診断に利用可能であることが示唆された。また、その他複数の新規抗原においても健常人群に比べヒストプラズマ症患者群の血清中抗体と有意に強く反応することがわかり、今後の応用が期待できる。また、複数の抗原タンパク質を可溶化状態で精製することに成功しており、これらは今後の *H. capsulatum* 抗原の幅広い応用の道を拓くものと期待される。

一方で、各抗原タンパク質のエピトープ部分に関する情報はこれまでに全く知

られていない。患者血清中抗体が認識する主要なエピトープ部分が同定できれば、エピトープではないタンパク質部分の除去、複数のエピトープ複合タンパク質の作製により、これまでより感度高く検出ができると期待される。そこでエピトープを同定するための部分タンパク質発現ベクターの構築およびそれらタンパク質の発現・精製を行った。AgM、AgH、Hc1 と Hc6 の部分タンパク質について封入体を形成したがいずれについても発現・精製をすることができた(図 2)。

現在、これらの部分タンパク質と昨年度までに精製した全長抗原タンパク質を 96 ウェルプレートにコーティングをして、患者血清中抗体がどの部分と反応しているかを検討している。患者血清 3 検体を用いた予備実験の結果から Hc1 では 2 検体は F3 部分タンパク質、1 検体は F4 部分タンパク質と反応しており、それぞれの部分タンパク質上に主要なエピトープ部位が存在すると示唆された。また、Hc6 では 1 検体で F1 部分タンパク質と強く反応が認められ、F1 部分タンパク質上にエピトープ部位が存在していることが示唆された。

迅速診断の一つとして PCR ベースの迅速診断法が行われている。これまでに同定した新規抗原タンパク質のうち、一つが PCR による迅速診断法に応用可能である可能性が明らかとなってきたため、その検討も同時に行った。Hc1 遺伝子と相同性が見られる遺伝子を各真菌種より検索した。*H. capsulatum* も検索対象とし、主要な輸入真菌症原因菌である *C. immitis*、*C. posadasii*、*P. brasiliensis*、*B. dermatitidis*、*P. marneffei* の遺伝子を含め、66 の配列を比較した。

H. capsulatum において Hc1 遺伝子のパラログと推測される遺伝子が 2 つ見つかった。これらは Hc1 遺伝子とおよそ 45% の相同性を有していた。

相同性検索と NJ 法による解析から *C. immitis*、*C. posadasii*、*P. brasiliensis*、*B. dermatitidis* においても *H. capsulatum* と同様に Hc1 と相同性が最も高いホモログの他に 2 つのパラログを持っていること、またそれぞれがグループを形成し、相同性を基に大きく 3 つのグループに分けられることが明らかとなった。*P. marneffei*

のみこれら 3 グループのうち、Hc1 遺伝子が含まれるグループと相同性が高い遺伝子を有していないことも明らかとなった。Hc1 遺伝子が含まれるクレードを図 3 に示した。

Candida 属については 6 菌種のホモログ遺伝子配列を解析に用いたが、これらの遺伝子は *Candida* 独自のグループを形成しており、Hc1 を含む 3 つの遺伝子との相同性はいずれも 50%程度であった。*Aspergillus* 属菌の相同遺伝子も Hc1 遺伝子のパラログと同じグループに入るものはあったが、Hc1 遺伝子との相同性はおよそ 50%と高いものではなかった。*Rhizopus* 属や *Cryptococcus* 属のホモログも Hc1 遺伝子やそのパラログとは系統樹上、同一のグループに入らないことが明らかとなった。

ニワトリを用いた新しい実験カンジダ感染モデルの作成

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、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カンジダ症は口腔、咽頭、消化管、外陰部などの常在菌叢から感染が成立する内因性感染が主体であると考えられている。また、常在菌叢破綻から口腔カンジダ症（鵝口瘡）、食道カンジダ症、膣カンジダ症などもしばしば生じる。食道カンジダ症は AIDS 発症の指標疾患の一つであり、しばしば全身感染の危険因子としても問題となる。

真菌症の診断・治療の評価のためには、ヒト感染を再現できる動物実験モデルでの検証が欠かせなく、これまでにカンジダ実験感染モデルは全身感染モデル、食道カンジダ症モデル、口腔カンジダ症モデル、膣カンジダ症モデルなど、いずれにもマウスやラットが用いられてきた。しかし、マウスやラットの常在菌叢を構成するカンジダの菌種はヒトとは大きく異なっており、これらの動物が必ずしもヒトカンジダ症から分離される菌に良好な感受性を示す訳ではなかった。このため、モデル作成には複数の抗菌薬投与による常在菌叢の抑制、免疫抑制剤投与、局所粘膜障害などを組み合わせる必要が

あり、再現性の良いモデル作成は非常に困難であった。一方、鳥類は自然界や飼育環境下でカンジダ症を発症し、その起因菌種ほぼヒトと同一で、ヒトに極めて類似した真菌感受性を示す。ニワトリは解剖学的・生理学的にはヒトと違いがあるもののヒト同様の高度な免疫機構を保有し、既に全ゲノムも解明されている。実験動物としても安価で供給体制が確立している。このため、我々はニワトリを用いたカンジダ実験感染モデルの検討を行った。

各菌接種 2 週間後において、いずれの群においても体重変化に顕著な差は認められなかった。菌接種後の 2 週間の観察期間中、どの菌接種群もコントロールと比較して目立った外見上の変化も認められなかった。剖検での肉眼所見では *C. albicans* JICC 60040, *C. albicans* CBS 6589 投与群ではヒト食道カンジダ症に酷似した白色の偽膜様病変 (thrush様病変) が認められた。一方、*C. tropicalis* 2 菌種を接種したニワトリの crop には何の病変も認められなかった。*C. glabrata* 接種群で粘膜下出血斑が認められたが、*C. albicans* 投与群にみられたような thrush 様病変は観察されなかった。各群の crop 組織中の *Candida* 生菌数は、*C. albicans* JICC 60040, *C. albicans* CBS 6589 投与群において 10^{6-7} CFU/g であった。一方、他の 2 菌種及びコントロール (PBS 投与群) では crop 組織中に *Candida* 生菌は認められなかった。*C. albicans* JICC 60040 10^9 CFU/chick 投与ニワトリの crop 病理組織像より、crop 角質層の肥厚、過形成、錯角化、淡明層の消失が認められ、組織内での *C. albicans* は顕著な仮性菌糸形成と垂直方向への増殖を呈していた。少ない菌量接種群では仮性菌糸の垂直方向への浸潤が低く、主に水平方向への増殖に留まっていた (未提示)。*C. albicans* CBS 6589 10^9 CFU/chick 投与群の crop 病理組織像 (PAS 染色) より、仮性菌糸の垂直方向への浸潤像は *C. albicans* JICC 60040 に比べ、やや軽微ではあったが、同様の病理所見が確認された。これらの病変は粘膜下層、筋層には及んでおらず、ヒト食道カンジダ症の病理像に酷似した所見と考えられた。一方、他の 2 菌種接種ニワトリの crop にはこのような病理変化、*Candida* の浸潤像は認められなかった。血液培養ではいずれの群からも

菌は検出されなかった。

crop infectionが確認でき、より病理変化が強かった*C. albicans* JICC 60040 を用い、crop infection成立後、各種免疫抑制剤投与により、カンジダ全身感染が誘発されるかどうか、検討した。観察期間内に 5/6羽が死亡した cyclophosphamide 250 mg/Kg投与群を除き、残りの治療 4 群ではいずれもコントロール群に比べて、有意に体重増加が抑制されていた。また、cyclophosphamide 250 mg/Kg投与群では 5/6羽 (83%)、cyclophosphamide 150 mg/Kg投与群では 1/6羽 (16%) が観察期間中に死亡した。死亡例では直前に行なわれた血液培養から、いずれも *Pseudomonas aeruginosa* が陽性となった。コントロール (免疫抑制剤未投与) 群を含め、いずれの群の crop にも thrush 様病変が認められた。その程度は各群間で大きな相違は認められなかった。いずれの組織からも *C. albicans* 生菌が回収されたが、その生菌数にはばらつきがみられた。各群間には有意差は認められなかった。死亡した 6羽の肝臓、腎臓は変色し、内部に多発する膿瘍形成が認められた。肝臓、腎臓の培養からはいずれも 10^{2-3} CFU/g の *C. albicans* が回収されたが、 10^{8-9} CFU/g の *P. aeruginosa* が同時に検出されており (データ未提示)、死因は *C. albicans* ではなく、*P. aeruginosa* による全身感染と考えられた。

真菌症として扱われる新種プロトテカ藻の記載、およびプロトテカ藻の病原性と診断に関する研究

1) 新種プロトテカ藻の記載：市中病院の検査室において、臨床分離され、表現形質に基づいて *Prototheca wickerhamii* と同定されていた株を再検討し、表現形質および遺伝形質の解析結果から新種と断定し、その記載を行った。本症の病理組織像および培養像は、*P. wickerhamii* と明らかには矛盾するものではなかったが、やや典型的ではなかったことから、核リボソーム RNA 遺伝子 18S 領域の塩基配列を解析した。その結果、本分離株は *Prototheca* 属の新種であることが樹形図上示された。そこで、必要な解析を追加し、本株をプロトテカ属の新種 *Prototheca cutis* sp. nov. として記載した。

2) *Prototheca wickerhamii* の血液分離株

の系統解析：プロトテカ藻の中でも、我が国の研究者によって記載され、かつ全世界的にも最も症例数が多い *P. wickerhamii* について、その血液感染例分離株を入手 (岐阜大学大学院医学系研究科 大楠 清文 先生ならびに若草第一病院臨床検査課 森友 久美子 先生との共同研究) し、分子系統解析から病原株の遺伝的性状を解析した。国内分離の *P. wickerhamii* には、新種に相当する遺伝的多様性が内在しているものと考え、本藻の血液感染例を含む臨床分離株並びに保存株の分子系統解析を施行した。その結果、すでに DDBJ/EMBL/GenBank 遺伝子データベースに登録されている塩基配列を含めて、*P. wickerhamii* 自体が単系統ではない上に、同一株からも多数の塩基配列が得られることが明らかとなった。

環境真菌と気道感作・感染の惹起に関する研究

近年、担子菌ヤケイロタケ *Bjerkandera adusta* の上気道定着と慢性咳嗽との関連が報告され、その診断および治療上の対策が議論されている (済生会金沢病院 小川 晴彦 先生他との共同研究: *Journal of Asthma* 46:407-12, 2009. ; *Journal of Asthma* 46:849-55, 2009. ; および *Respiratory Medicine* 103:1492-7, 2009.)。本菌は、環境中にありふれたキノコ (子実体) であるが、本菌感作による慢性咳嗽の発症には季節性が見られず、冬期の石川県 (本菌の子実体は認められない) における初発症例咽頭からも本菌が分離されることから、症例が本菌に曝露する機序が不明であった。そこで、症例分離株を用いて、本菌の浮遊菌体形成能を検討した。慢性咳嗽との関連が深いヤケイロタケを、適切な培地に接種後、冬期の屋内あるいは床下等に相当する 4°C から体内に相当する 37°C にわたる温度域の各孵卵器に設置し、子実体形成によらない浮遊菌体 (分生子) 形成能を観察した。その結果、発育と着生の多寡はあるものの、全ての温度域において本菌は $2 \times 5 \mu\text{m}$ 程度の分節型分生子を形成することが示された。

接合菌の病原的意義と診断に関する研究

接合菌感染症は、深在性真菌症起因菌として、最もその診断ならびに治療が困

難な真菌症である。その起因菌は多様な接合菌であるが、本症の生前診断が困難であることから、臨床分離株の分離も容易ではなく、起因菌レベルにおける病原性の研究並びに感受性試験等は十分なされていない。そこで、帝京大学医真菌研究センターカルチャーコレクション (TIMM) に保存されている臨床分離株を用いることによって、吸入 (呼吸器) 感染原となる分生子 (孢子嚢胞子) の感染指標として知られている粒子径を測定し、併せて既存の深在性真菌症を適用にもつ抗真菌薬に対する感受性を検討した。

In situ hybridization 法における制度管理を目的としたアレイブロックの作製とプローブの特異性に関する検討

病理組織・細胞診断標本中にみられる病原真菌の鑑別を目的とした ISH 法においては、適切にその手技が施行され、十分な特異性が得られている事を検証するコントロール実験が必須である。

制度管理に関して、昨年度まで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。本年度は、形態学的に鑑別を要すると考えられる 30 菌種を集約して、同一ブロックに整列させて再包埋したコントロールアレイブロックの作製法を検討し、プローブの特異性を確認した。さらに、今後予定している多数例の解析による発生動向調査を実施するに当たり、ホルマリンが解析試料に及ぼす影響を把握する事は重要である。そこで、ホルマリンによる固定時間と PCR 法における遺伝子増幅結果の関連性について検討した。

アガロースゲルを支持体としたセルブロック作製法は、分散しやすい *Candida* 属をはじめとする酵母菌をパラフィン包埋する際、特に有効であった。本法を用いた PAS 染色や Alcian-Blue 染色などの粘液染色において良好な染色結果が得られた。また、*C. albicans* 26S rRNA を標的とした ISH 法においては、*C. albicans* の菌体に一致した良好なシグナルが得られ、病理診断材料中で鑑別を要する *Trichosporon asahii* の菌体にはシグナルは認めなかった。

アレイブロックを用いた ALP 遺伝子

DNA プローブの特異性に関する検討において、*Aspergillus* 属で中等度から強い蛍光シグナルが検察された。*Pseudallescheria boydii* においてもシグナルが得られたが、その蛍光強度は弱く、部分的であった。

Fusarium 属 PNA プローブにおいては *Fusarium solani* および *F. oxysporum* において、びまん性且つ、菌体内に強い顆粒状のシグナルが得られた。*P. boydii* においても、弱い部分的なシグナルが得られた。

H. capsulatum PNA プローブにおいては分離培養菌が用意できなかったため、培養にて確認されているヒストプラスマ症患者の骨髓生検のホルマリン固定パラフィン切片を使用して検討した結果、その菌体内に強い陽性シグナルが検出された。アレイブロックにおける 30 菌種ではシグナルは全く得られなかった。

なお、*H. capsulatum* に関しては、上記の骨髓生検例を含む基礎疾患のある 2 例では、ISH 法において、菌要素に一致した陽性シグナルが認められた。しかし、他施設から提供された基礎疾患のない症例 3 例では、組織学的には *H. capsulatum* 感染が明確であるものの、ISH 法、PCR 法ともに良好な陽性結果が得られなかった。

ホルマリンによる固定時間と PCR 法における遺伝子増幅の関連性を検討した結果、固定時間が長いほど PCR 法による増幅が困難になる傾向が明確となった。特に増幅産物のサイズが 700bp 程のプライマー B2F/B4R による PCR 法において顕著にこの傾向がみられ、3 日以上固定されたものでは増幅が困難であった。増幅サイズが小さいプライマー 18SF1/58SR1 による PCR 法においては、バンドは薄いのが 10 日間固定された試料においても増幅が確認された。

メディア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。

「かび」に関する新聞記事数

対象となった五紙の真菌に係る記事数は、90年代前半から増加し、2000年以降はほぼ横ばいで、2009年には減少していた。

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。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。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。

「かび」に関する雑誌記事数

対象となった雑誌記事の年次推移を図4に示す。記事数は2000年以降、徐々に増加しているが、総数は新聞の約半分である。

「真菌」に関する雑誌記事数

「真菌」という単語を用いている雑誌は極めて少ない。その変動に一定の傾向を認めない。

新型インフルエンザの流行が報道に与えた影響

新聞、雑誌の何れにおいても、新型インフルエンザ関連のカビ・真菌記事が増加している。

抗真菌薬シーズの開拓と新興真菌感染症の分子疫学

1. 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。昨年、抗真菌活性を有する画分の化学構造 DB-2 を決定した。本年度は DB2 に対する詳細な抗真菌スペクトルについて検討した。新規抗真菌化合物 DB-2 の抗菌スペクトル：糸状菌 6 菌種 17 株、酵母 7 菌種 45 株はすべて $1 \mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で増殖が阻止された(表 1)。またそれは殺菌的であった。細菌についてはグラム陽

性・陰性菌ともに作用は全く示さなかった。DB-2 は病原真菌に対して幅広い抗真菌活性を示すことが判明した。

2. 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る。近年ではキャンディン系抗真菌薬投与後のブレークスルー感染症として、患者数は増加傾向である。特に、致死率は 70% 以上とカンジダ症のそれよりも高い。昨年より継続して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。IGS 解析から 107 株中 87 株が *T. asahii* であった。この内、78%が 1 型を示し、次いで 5 型が 8%と続いた。米国とは著しくその分布は異なるが、トルコは本邦と類似したパターンを示していた。既存の抗真菌薬に対する感受性は、ポリコナゾールが最も効果が高かった。なお、107 株中 20 株が *T. faecale* 等の non-*asahii* *Trichosporon* であった。1 株は新種に相当した。

3. 易感染性宿主の増加に伴い、これに発症する日和見感染症患者も増加している。これには起因菌の多様化も連動する。タイ患者血液から分離した新規な真菌についても検討を加えた。新興真菌感染症起因菌 *Pseudozyma*: タイ患者の血液より分離された菌株について系統解析を行ったところ、*Pseudozyma* に属する新種と判明した。また、アムホテリシン B 以外の薬剤にはすべて耐性あるいは低感受性であった。

病原真菌 *Candida albicans* 薬剤排出ポンプの基質認識機構解明を目標とした研究

薬剤耐性化の主たる原因は薬剤排出ポンプ、ATP binding cassette (ABC) タンパク質の機能亢進である。ABC タンパク質の基質特異性と排出メカニズムを詳細に明らかにすることは、病原真菌の薬剤耐性機構を理解し制御するために必要であり、新たな抗真菌薬の開発にも大きく貢献するものと考えられる。本研究では、病原真菌 *Candida albicans* の薬剤耐性に関わる ABC タンパク質の基質特異性を決定するメカニズム、基質相互作用部位を明らかにすることを目的として研究を進める。病原真菌 *C. albicans* の ABC タンパク質 CaCdr1p を大量発現している出芽酵母

株において、阻害剤と基質の共存下で *CaCDRI* 遺伝子への変異を誘発し、導入された遺伝子変異の解析を行う。この実験手法を用いて、ABC タンパク質の基質輸送や阻害剤との相互作用に重要なアミノ酸を網羅的に同定し、基質または阻害剤となる薬剤の構造との相関を明らかにする。*CaCdr1p* を大量発現している出芽酵母株 (*AD/CaCDRI*) を *fluconazole* と阻害剤である *FK506* を含む寒天培地上で培養し、*FK506* 非感受性化株を 50 株以上単離した。そのうち 44 株の *CaCDRI* 遺伝子を PCR によって増幅し、*AD* 株に導入したところ、ほぼ全ての遺伝子導入株は *FK506* に対して非感受性であった。非感受性化株の *CaCDRI* 遺伝子の ORF の塩基配列を決定したところ、ORF 上には少なくとも 1 箇所以上の 1 アミノ酸置換を引き起こすような変異が認められた。

同定された遺伝子変異の多くは、細胞外領域に存在する、あるいは一部の膜貫通領域に集中しており、これまでに報告のあった *FK506* 非感受性化変異とは全く異なるものであった。さらに、作製した遺伝子変異株について薬剤感受性試験を行い、*fluconazole*、*itraconazole*、*nystatin*、*rhodamine 6G* に対する感受性は野生型株とほぼ同じであることを明らかにした。

一番目の細胞外領域に遺伝子変異をもつ変異タンパク質発現株の中に、イオノフォアである *nigericin* に対する感受性が特異的に低下するものがあった。それらの遺伝子変異は 4 アミノ酸以内の領域に集中しており、*nigericin* との相互作用部位である可能性も考えられた。

また、本研究で作製した変異株の *fluconazole* 排出活性は構造の異なる *CaCdr1p* の阻害剤 *enniatin B*、および *beauvericin* によっては阻害されなかった。野生株 (最上段) と比較して *FK506* による阻害は変異株 (二段目以降) において完全に消失しているのに対して、*enniatin B* や *beauvericin* による阻害は野生型と同等あるいは阻害を受けやすくなっている変異株も認められた。

以上の、薬剤感受性試験、阻害剤の相互作用実験から、本実験で変異が認められたアミノ酸残基は *FK506* による阻害効果の特異的に無効にする部位、すなわち *FK506* との相互作用部位を示している

考えられた。

真菌感染症における宿主免疫機構の解明とその臨床的評価法の開発

Cryptococcus neoformans は、糖尿病、血液悪性疾患、膠原病、エイズなどの免疫低下宿主に合併する日和見病原真菌であり、このような症例では重篤な髄膜脳炎を引き起こし、临床上重要な問題になっている。本真菌は、ハトをはじめとする鳥類の堆積糞中で増殖し、乾燥によって空気中に飛散する。初感染は、空気中に飛散した真菌酵母を経気道的に吸入することによって起こる。免疫低下のない場合でも肺クリプトコックス症を起こすことがあるが、限局性のことが多く、通常は髄膜脳炎にまで至ることは少ない。一方、エイズや白血病などのように細胞性免疫能が低下した場合には、感染を局所に封じ込めることができずに中枢神経系に播種性感染を惹起する。このような違いは感染宿主の免疫状態によって大きく左右されるため、その対策を講じるためには本真菌に対する感染防御免疫機構の理解が重要である。

近年、*C. neoformans* は、マクロファージによる貪食・殺菌からのエスケープ機構を備えており、細胞内で増殖可能な病原微生物として認識されており、そのため感染防御には細胞性免疫の成立が必須であり、 $CD4^+$ ヘルパーT細胞が重要な役割を果たすことが知られている。感染後の病態には、*Th1/Th2* サイトカインのバランスが大きく関係しており、宿主の免疫反応が *Th1* 側に傾くと生体では感染防御に働き、逆に *Th2* 側に傾くと感染は憎悪に向かう。この *Th1/Th2* バランスは自然免疫機構によって制御されており、マクロファージや樹状細胞による病原微生物の認識や、*natural killer (NK)* 細胞、*NKT* 細胞、 $\gamma\delta T$ 細胞などの自然免疫リンパ球が重要な役割を担っていることが報告されている。

免疫低下宿主における日和見感染症では、治療に抵抗性を示し、重症化する症例が少なくないことから、いち早くその存在を検出し早期に治療を開始することが重要である。そのために、微生物感染の迅速診断法の開発が進歩してきた。しかしながら、宿主側の免疫能を正確に評価する方法に関しては、未だ十分とは言

えず、その早期の開発が待ち望まれている。感染防御機構は、主に好中球に依存するものと、細胞性免疫が中心的な役割を演ずるものに大別することができる。その中で細胞性免疫については、リンパ球数やそのサブセット解析、末梢血リンパ球の幼弱化試験、ツベルクリン反応などが知られているが、必ずしも正確な評価が得られるわけではなく、細胞性免疫低下に起因する日和見感染症の発症を予測するためには十分とは言い難い。

このような背景から、本研究では、*C. neoformans* の肺内感染後における自然免疫の活性化機序を解明することを目的として、特に樹状細胞による TLR9 を介した本真菌の認識機構とともに、NKT 細胞の活性化機序について、マウス感染モデルを用いて解析を行った。併せて、宿主の細胞性免疫能をよりの確に評価するための検査法を開発する目的で、Th1/Th2 バランスの規定要因と考えられる T-bet、GATA3 に焦点を当て、リアルタイム PCR 法を用いて、末梢血リンパ球からこれら master transcriptional regulators の発現検出を試みた。

***C. neoformans* による CD1d に依存した NKT 細胞の活性化**

C. neoformans に NKT 細胞を活性化する何らかの菌体成分が存在しないか検討するために、先ず BM-DC を Cap67 と 24 時間共培養した後、MACS カラムにて精製した BM-DC を LMNC に加えさらに 24 時間培養後上清中に産生された IFN- γ の測定を行ったところ、Cap67 をパルスした BM-DC との共培養にて LMNC から明らかな IFN- γ 産生が検出された。この反応は、抗 CD1d 抗体を添加することで完全に抑制された。さらに、CD1dKO マウスに由来する BM-DC を用いて同様な実験を行ったところ、LMNC からの IFN- γ 産生が完全に消失した。一方、LMNC を Ja18KO マウスから作製し、Cap67 パルス BM-DC と培養したところ、WT マウス由来 LMNC と比較して IFN- γ 産生が有意に減少した。これらの結果から、*C. neoformans* に NKT 細胞によって認識される何らかの抗原が存在する可能性が示唆された。

***C. neoformans* からの脂質抽出**

これまでの報告から、微生物に由来する NKT 細胞抗原の多くが糖脂質であるこ

とから、*C. neoformans* でも糖脂質抗原が NKT 細胞を活性化している可能性を調べるために、Folch 法を用いて Cap67 から脂質を抽出した。Cap67 に含まれる脂質の大部分は中性脂質であり、他にも微量ではあるがリン脂質、糖脂質も含まれていた。得られた糖脂質に NKT 細胞刺激活性が存在するか調べるために、Cap67 由来糖脂質でパルスした BM-DC と NK1.2 細胞と共培養し上清中に産生される IL-2 を測定したところ、明らかな活性は検出されなかった。しかし、強力な NKT 細胞抗原である α -GalCer でパルスした BM-DC を用いた場合には NK1.2 細胞から大量の IL-2 産生がみられた。興味深いことに、 α -GalCer で BM-DC をパルスする際に糖脂質を添加すると、これらの反応が濃度依存的に抑制されたのに対して、中性脂質やリン脂質ではそのような抑制は認められなかった。このことから、糖脂質画分には何らかの抑制物質が存在するために目的の活性が検出できなかった可能性が考えられることから、Cap67 由来の糖脂質から HPLC を用いてさらに精製を行ったところ、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) とセラミドモノヘキサノイド (CMH) の 2 つのピークが検出された。

***C. neoformans* 由来 URA 5 遺伝子による TLR9 を介した BM-DC の活性化**

C. neoformans DNA による BM-DC の活性化機序を解明するために、Cap67 DNA からクリプトコックス特異的なプライマーを用いて 345 塩基対の DNA 断片を増幅した。得られた DNA 断片は、BM-DC からの IL-12 産生を誘導し、この反応は TLR9 遺伝子欠損によって完全に消失した。この DNA 断片の塩基配列を調べたところ、URA 5 遺伝子であることが明らかになったが、その中には TLR9 認識モチーフとして知られている gacgtt 及び gtcggt のいずれも存在しなかった。

C. neoformans URA 5 遺伝子による BM-DC 活性化機序を明らかにするために、345 塩基対からさらに分割し、20 塩基前後の DNA 断片を合成し、それぞれの BM-DC 刺激活性を調べたところ、活性の強い断片 (例えば #112) から活性のない断片 (例えば #123) まで様々であった。これらの活性は、TLR9KO マウス由来の BM-DC では完全に消失し、TLR9 遺伝子

を導入した HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼ・リポーターアッセイにおいて 119 塩基対の DNA 断片で刺激活性が検出されたことなどから、TLR9 に依存したものであることが明らかになった。24 塩基の #112 では CG 配列を有しており、この配列を欠失させたり、GC に置換することで活性が消失したことから、従来からの CpG モチーフが関与している可能性が考えられた。しかしながら、いわゆる CpG モチーフが存在しないこと、主鎖のリン酸基部分の酸素原子を硫黄原子に置き換えた場合に従来の CpG-ODN と異なり活性が消失したことから、これまでの CpG モチーフとは異なる機序で TLR9 と相互作用している可能性が考えられた。

URA5 遺伝子由来 DNA 断片と TLR9 の共局在 次に、#112 と #123 で BM-DC に対する刺激活性が異なる機序について調べるために、Rhodamin 標識された各種 DNA 断片を、BM-DC と培養した後に、FITC 標識抗 TLR9 抗体で染色したものを共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、#112 はわずかながらではあるが TLR9 との共局在が認められたのに対して、#123 に関しては共局在が検出されなかった。

PBMC からの T-bet、GATA3 mRNA 発現の解析

リアルタイム PCR による T-bet、GATA-3 の発現を調べたところ、T-bet/ACTB、T-bet/GATA-3 は無刺激の時に比べて、BCG 刺激、ConA 刺激で増加しており、特に T-bet/GATA-3 は年齢との間に有意な負の相関が認められた。また、免疫抑制剤として用いた FK506、Dex は、抗原によって刺激された PBMC の T-bet/ACTB、T-bet/GATA-3 を低下させることが判明した。一方、CPX は抗原によって刺激された PBMC の T-bet/ACTB、T-bet/GATA-3 を低下させる作用は認められなかった。この結果は、ELISA による IFN- γ の濃度測定の結果とも基本的によく一致しており、特に T-bet/GATA-3 との間には強い正の相関が観察された。

Candida albicans のプロテインキナーゼを標的とする抗真菌物質の探索および基礎的解析

カビによる全身性の感染症である深在性真菌症は増加の一途を辿っており、年々

問題が深刻になってきている。しかし、真菌はヒトと同じ真核生物であることが選択毒性を有する新薬の開発を困難にしているのが現状である。本研究では、「新しい作用機序を持ち」「副作用がなく」「広い抗菌スペクトラムを有する」という性質を兼ね備えた新しい治療薬の開発を目的として標的候補因子としてプロテインキナーゼに着目した。

C. albicans にコードされている 93 種類のプロテインキナーゼのうち既に論文等で報告されていた 19 種類を除いて、74 種類のプロテインキナーゼについて遺伝子破壊を試み、遺伝子破壊株が取得できなかったもののうち、*C. albicans* の生育に必須なキナーゼであることが確認されたのが MPS1 である。

MPS1 は元々、酵母の細胞分裂において紡錘体極複製に必須な因子として見出された (EMBO J., 14, 1655-1663, 1995) が、最近では細胞分裂におけるチェックポイントキナーゼとしての機能が明らかになってきており、癌化との関連も示唆され、抗癌剤の標的候補としても有望視されている。

ヒトホモログとの相同性も比較的低い (36% identity) ことから、CaMPS1 を抗真菌剤の新たな標的候補分子とし、機能阻害物質の探索、及び解析を行った。

1. CaMPS1-KD の活性測定

MBP へのリン酸化を指標にしたキナーゼアッセイ系において、リン酸化 MBP は ATP、MBP、CaMPS1-KD 全てが揃った時にのみ検出されたことから、MBP は ATP 依存に CaMPS1-KD によりリン酸化されることが確認された。

2. CaMPS1-KD 活性阻害物質の同定

CaMPS1-KD のキナーゼ活性阻害物質の探索には微生物、及び植物由来の化合物ライブラリを利用した。純粋化合物が 2442 種、菌培養上清が 800 種、計 3242 サンプルのスクリーニングを行った。その結果、陽性化合物が 4 種 (有効濃度; $>1\mu\text{M}$) 得られた。そのうちの 하나가化合物 X (分子量; 250.2) である (図 2)。

3. 化合物 X の *C. albicans* 増殖能への影響

CaMPS1-KD の活性阻害効果を持つ化合物 X の *C. albicans* 増殖能への影響について検証した。その結果、 $50\mu\text{M}$ 以上の

濃度で強い増殖抑制効果が認められた。

4. 化合物 X の他のキナーゼ活性への影響
化合物 X のキナーゼ活性阻害効果が CaMPS1 特異的か否かを検証するために他のキナーゼ(ヒト由来の EGFR, VEGFR)の活性に対する影響を解析した。その結果、いずれのキナーゼに対しても阻害効果は認められなかった。

5. staurosporine、SP600125 の CaMPS1-KD への阻害効果の検証

非選択的なキナーゼ阻害剤である staurosporine、JNK 阻害剤として知られる SP600125 は human MPS1 (hMPS1/TTK) の活性を阻害することが報告されている (Nature Biotech. 3, 329-336, 2005/ EMBO Rep. 6, 866-872, 2005)。しかし、これら阻害剤は CaMPS1 に対して活性阻害作用は示さないことが分かった。また、菌増殖への影響を検討した結果、staurosporine には化合物 X と同程度の増殖抑制効果があることが分かった。つまり、staurosporine は MPS1 非依存の機構で細胞増殖を抑制していると考えられる。

D. 考察

輸入真菌症の国内発生状況調査

今回の検討では、コクシジオイデス症はやや減少傾向、ヒストプラズマ症も急速な増加からやや落ち着きを取り戻しつつあるように見える。しかし、一方では、これまで長い間症例の認められなかったパラコクシジオイデス症およびメルペニシリウム症の患者が相次いで発見され、輸入真菌症の多様化が進行していることが示された。これに対して、ブラストミセス症はまだわが国で1例も信頼に足る報告がなされていないが、同疾患の広い感染地域(米国五大湖周辺を中心とする)や、米国での患者数の多さを考えると、今後わが国でも確実に発生するものと予想され、診断体制、治療体制を完備しておく必要があると考えられる。

今回の調査では、一時コンスタントに症例が見られたパラコクシジオイデス症が復活したこと、そして、わが国で報告の見られる輸入真菌症の中でもっとも稀なものとしていたマルネツフェイ型ペニシリウム症で2例がまとまって認められ

たことが特徴といえる。マルネツフェイ型ペニシリウム症は昨年までは総計でも3例の報告しか認められず、輸入真菌症の中でもきわめて稀なものと考えられていた。しかし、その内容を見てみると、1998年に第1例が報告された後、2002年、2006年にそれぞれ1例ずつ報告され、今回2例まとめて報告されたことになる。着実な増加が認められ、主要な輸入真菌症の1つとなる可能性が懸念される。本症は特にその多くが HIV を基礎としており、わが国でも今回の例を含め全例が HIV 陽性者である。わが国で潜在的な HIV 陽性者が増加していくと、更に深刻な問題となる可能性も考えられる。今回の調査では、症例総数の増加よりもその多様化が目立った。これには、HIV 感染の広がりや社会構造の変化等が起因していると思われる。さらにこれらの高度病原性真菌はいずれも比較的高温を好む性質を持っているため、地球温暖化により流行地での感染機会の増加はもちろん、起因菌がわが国に定着できるようになる可能性もあり、今後の展開を注視しておく必要がある。

ヒストプラズマ症血清診断に関する基礎的研究

本研究課題においてこれまでに *H. capsulatum* の新規抗原を同定し、それらの組換えタンパク質の精製、ELISA への応用を進めてきた。これまでに既知の抗原に加えて2種の抗原タンパク質で患者群と健常人群の間で抗体価に有意な差が見られることを明らかとしてきた。さらに感度の上昇とバックグラウンドの低減を目指して、エピトープ部位の同定を進める。今年度はそのための部分タンパク質の発現・精製をすすめた。4種の抗原タンパク質の部分タンパク質合計10種について発現および精製に成功した。これらのタンパク質のうち、Hc1 および Hc6 の部分タンパク質を用いて予備的解析を行った結果、Hc1 では患者により F3 もしくは F4 の部分タンパク質に主要なエピトープが存在し、Hc6 では主要なエピトープが F1 部分タンパク質に存在することが示唆された。更に患者血清の数を増やし、またさらに詳細にエピトープ部位の解析を進める予定である。これらの解析が感度の上昇とバックグラウンド

の低減などに資するものと期待している。

また、これまでに同定してきた HcI 抗原遺伝子が *H. capsulatum* 同定に有用であることが遺伝子解析の結果から明らかとなってきた。HcI を含む遺伝子グループは我が国における主要な真菌症原因菌 *A. fumigatus*、*C. neoformans*、*Candida* 属菌では存在しない。*B. dermatitidis* は有性世代は *H. capsulatum* と同じ *Ajellomyces* 属であり、HcI 遺伝子とそのホモログの間での相同性は 78% と非常に高い。その他の輸入真菌症原因菌では *P. brasiliensis* が最も相同性が高いが、その相同性は 66% にとどまる。このことから *H. capsulatum* を特異的に検出するための標的遺伝子として HcI 遺伝子が有望と推測される。現在、本遺伝子の 2 領域を標的として検討を進めている。これらの解析を進めることにより、PCR をベースとした迅速診断法の開発につながれると期待する。

ニワトリを用いた新しい実験カンジダ感染モデルの作成

crop は鳥類に広くみられる食道の一部が盲端の袋状（嚢状）になった臓器で、一時的に食物を溜めておく器官である。その組織像は基本的に食道粘膜と変わらない。*Candida* crop infection は鳥類でしばしばみられる感染症で、時に養鶏場などで集団発生することが知られている。その起因菌のほとんどは *C. albicans* であるが、*C. tropicalis*、*C. parapsilosis*、*C. rugosa* などによる感染も報告されている。crop に感染を起こし易いのはそこに留まり、菌が増殖する機会があるためと考えられる。本実験では少なくとも *C. albicans* に関しては何ら免疫抑制剤や抗菌剤を投与すること無く、また、粘膜傷害手技を必要とせず再現性の良いニワトリの crop infection model を作成することが可能であった。肉眼的所見でも病理組織所見でも病変はヒト食道カンジダ症に酷似しており、また、高濃度の菌が病変部位から回収されたことから、この実験モデルはヒト食道カンジダモデルとして例えば、*Candida* の病原性の解明や抗真菌薬の効果判定などに利用できるのではないかと考えられた。本実験で *C. tropicalis*、*C. glabrata* では明らかな病変形成が認められなかったが、ヒト食道カンジダ症もその起因菌のほとんどが *C. albicans* であり、

それ以外の菌種が稀であることから、むしろニワトリの実験動物としての菌種の感受性がヒトと類似していることを裏付けるものであり、実験モデルとしては好ましい結果であると考えられた。実験 2 では *C. albicans* による crop infection という局所感染が免疫抑制治療によって全身感染—播種性病変形成を誘発できるかどうか検討を行った。しかし、cyclophosphamide による白血球減少モデルで死亡例がみられたものの、血液培養や肝臓、腎臓などの臓器から検出された菌は *P. aeruginosa* が優位であり、同菌による全身感染と判断された。その理由としては、今回使用したニワトリは初生ヒナ（生直後）を BSL 3 の動物実験室で飼育していたが、無菌動物ではなく、環境に存在する *P. aeruginosa* をおそらくは経口によって獲得したものが、白血球減少によって消化管から侵入し、全身感染をおこしたものと考えられた。検出された *P. aeruginosa* の抗菌薬感受性試験は均一ではなく、ceftazidime、piperacillin、imipenem、gentamicin、amikacin などに対する耐性パターンも様々であったが、いずれも ciprofloxacin には感受性であり（データ未提示）、ciprofloxacin 投与による内因性感染防止により、*Candida* 全身感染モデル（translocation model）作成は可能ではないかと考えられた。

真菌症として扱われる新種プロトテカ藻の記載、およびプロトテカ藻の病原性と診断に関する研究

従来と同定法では本病原藻の遺伝的多様性を明らかにできないことが示された。本藻の病原的意義とその管理について論じる上でも、一層の病原研究の必要性が明らかである。また、本藻の分類学自体も再検討の余地が大きいことが分子系統解析の結果から示された。併せて同一株内における遺伝的多様性も、その進化および病原性獲得機序を論ずる上において興味深い。

環境真菌と気道感作・感染の惹起に関する研究

ヤケイロタケによる周年性感作の機序として、本菌菌糸における分節型分生子形成が関与している可能性が示唆された。この分生子粒子径は、咽頭等の上気道に

付着し、定着するのに適当な大きさであり、定着部において生育可能な37℃発育可能性が示されている。このことから、本菌をはじめとした担子菌系糸状菌が気道に定着し、過敏反応を惹起しうることが明らかとなった。また、実際に微生物検査室において、気道検体から同定不能な菌糸の発育はしばしば経験されるが、そのような例の中にも本菌のような担子菌が含まれている可能性があることから、留意が求められる。

接合菌の病原的意義と診断に関する研究

一般に下気道感染を生じると考えられている接合菌の分生子（孢子嚢胞子）の粒子径が、菌株によっては5 μmを超え、10 μmにも及ぶことが示された。これは、*Aspergillus fumigatus* の分生子径が2.5 μmに過ぎないことと比べると十分大きいことから、本菌の感染経路が本当に下気道か否かを再検討する必要をも示唆するものである。粒子の下気道到達性については、粒子径のみならず、粒子表面の荷電、疎水性等多種の因子が関与しているものと考えられることから、これら勘案しつつ検討を続ける必要があるものと考えられる。また、抗真菌薬感受性についても、菌株によっては、意外にも現行抗真菌薬に感受性を示すものもあり、治療上の選択肢として考える余地が期待できる。本菌同定の必要性と併せて検討したい。

In situ hybridization 法における制度管理を目的としたアレイブロックの作製とプローブの特異性に関する検討

ISH 法においては対象試料と手技の評価を目的としたコントロール実験が必須である。そこで、我々はホルマリン固定した30菌種のホルマリン浮遊液からセルブロックを作製し、集約して同一の包埋ブロックに配置させたコントロールアレイブロックの作製について検討した。その際、分離培養菌のホルマリン浮遊液からパラフィン包埋する際にアガロスを支持体とする事で、効率的に包埋することが可能であった。特に *C. albicans* など浮遊液中で分散しやすい酵母菌において特に有効であった。この様に作製されたパラフィン切片では ISH 法をはじめと

する種々の特殊染色が可能である事が証明された。

アレイブロックにおけるプローブの特異性に関する検討では、ALP 遺伝子 DNA プローブはこれまでの検討と同様に、概ね *Aspergillus* 属の検出が可能であった。*Fusarium* 属 PNA プローブにおいては *F. solani* および *F. oxysporum* で陽性シグナルが得られた事から *Fusarium* 属の菌を検出できる可能性が示唆された。さらに、*H. capsulatum* PNA プローブにおいてもその特異性が確認された。標的とした以外の一部の菌で認められたシグナルは弱く、部分的でプローブの特異性に影響する事はないと判断された。

しかし、*H. capsulatum* に関しては、宿主の免疫状態が保たれている条件下で形成される病変では、防御担当細胞による *Histoplasma* の核酸の変性が大きく、本研究で用いた 28S 領域 ribosomal RNA を標的とした PNA probe による検出が困難である可能性が示唆され、今後 ISH の普及・均霑化を企図する上で重要な課題と考えられた。

これまで、ホルマリン固定は核酸の断片化等を誘導し、分子生物学的解析法に影響を与える事は知られているが、具体的な固定条件における検討は十分に成されていない。我々の検討ではホルマリンの固定時間は PCR 法による DNA の増幅に影響をあたえる重要な因子であることが分かった。特に増幅産物のサイズが大きいほど顕著にこの傾向が認められた。実際の病理診断材料を想定した場合は、増幅産物のサイズをより短く設定する必要がある。

メディアにおける真菌感染症の報道状況

新聞・雑誌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・雑誌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。昨年度までの研究で、大手新聞では平均して、毎日1回程度、「カビ」という単語が用いられていることが明らかとなった。2009年度は、記事数が減少しているのは、

新型インフルエンザの流行により、紙面が制約されたためと考える。

ただ、新聞で報道されている「カビ」の記事の多くは医療とは無関係のものである。事実、「真菌」という記載がある記事は、「カビ」という記載がある記事の20分の1程度である。以上の事実は、新聞が真菌感染の啓蒙に果たす役割は少なく、戦略の見直しを考える必要があることを示唆する。

雑誌の状況は、もっと悲惨である。登録されている雑誌すべて合わせて「カビ」の記載がある記事は200程度に留まる。それも、醸造など食品関係の雑誌に偏る。雑誌は、新聞では書くことができない専門性が高い情報を提供することが可能である。真菌感染も、その範疇に入りうる。雑誌を用いた啓蒙活動についても、検討が必要である。

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。

抗真菌薬シーズの開拓と新興真菌感染症の分子疫学

天然物にはいまだ未知の新規化合物が多く存在している。本研究で見出された新規抗真菌活性物質 DB-2 の詳細な抗菌スペクトルを調べた。その結果、子嚢菌と担子菌の両方に抗真菌活性を示すことから広域スペクトル化が期待できる。今後は本化合物をリードとして抗真菌活性の至適化が期待される。

トリコスポロン症の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。本研究で、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。トルコ人患者における遺伝子型分布は本邦の患者と類似している。しかしながら、*non-asahii Trichosporon* については本邦にない著しい多様性が見出された。本邦ではまだ報告はないがタイではすでに *Pseudozyma* 症患者が何例か報告されている。本邦でも日和見感染症患者の増加にともない起因菌も多様化していることが予想されるため、この様な未知な菌種

についての同定・検出系を構築しておくことが大事である。

病原真菌 *Candida albicans* 薬剤排出ポンプの基質認識機構解明を目標とした研究

本研究において単離された全ての遺伝子変異は FK506 に対する応答性のみを変化させて、他の基質に対する応答性にはほとんど影響を及ぼさなかった。これまでに報告のある FK506 非感受性遺伝子変異は他の薬剤排出活性を大幅に低下させるような変異であったことと比較すると、今回のスクリーニング系は FK506 との特異的相互作用のみを変化させる遺伝子変異を検出できたといえる。

本研究で作製した変異株は試験した抗真菌薬や薬剤に対する感受性が野生株と同等のものであったことから、本研究で同定した変異は CaCdr1p の基本的な薬剤排出機能自体には影響を及ぼさずに FK506 による阻害効果のみを失わせたと考えられる。また、構造の異なる阻害剤は変異株の薬剤排出活性を野生型同様に阻害できたことから、本研究で同定した変異は複数の阻害剤に対して非感受性化させるのではなく FK506 による阻害効果のみを特異的に失わせたと推測された。以上の考察より、本研究で変異が認められた CaCdr1p の細胞外ループ領域あるいは8番目、10番目の膜貫通 α ヘリックスが FK506 との特異的な相互作用に重要な部位であることが強く示唆された。さらに変異の位置関係より、FK506 は他の基質と同様に ABC タンパク質によって細胞内から細胞外へと輸送され、その過程においてタンパク質のいずれかの領域（おそらくは、細胞外領域）でトラップされることで他の基質の輸送を阻害しているものと推測された。

これまでの報告のある変異導入実験は、ヒト ABC タンパク質の情報をもとに、ある特定の部位特異的な変異を導入し解析したものであり、客観的な実験結果に基づいた変異の箇所ではなかった。本研究における遺伝子変異のスクリーニング法は客観的なものであり、阻害剤や基質の相互作用部位を網羅的に解析するきわめて有効な手法であるといえる。

真菌感染症における宿主免疫機構の解明とその臨床的評価法の開発