

C. neoformans をマウスの肺に感染させると、肺内で経時的な NKT 細胞の集積が観察されることや、Ja18KO マウスでは感染が増悪することなどから、NKT 細胞が *C. neoformans* 感染防御に深く関係することが予想されていた。本研究では、*C. neoformans* の菌体内に NKT 細胞の認識抗原が存在するか否かについて検討した。そのために、本真菌をパルスした BM-DC で NKT 細胞を刺激したところ、CD1d に依存して IFN- γ や IL-2 の産生が誘導された。これらの結果から、*C. neoformans* には CD1d に結合して 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予想された。

これまでの報告から、CD1d に拘束された形で NKT 細胞を活性化する抗原のほとんどが糖脂質であることから、今回は脂質に焦点を絞って解析を行った。粗糖脂質画分には NKT 細胞の刺激活性を検出できなかったばかりでなく、 α -GalCer パルス BM-DC による NKT 細胞の活性化までも抑制したことから、この画分には何らかの阻害物質が混入している可能性を考え、さらに HPLC による精製を試みた。その結果、*C. neoformans* 由来の主要な糖脂質として MGDG と CMH の 2 つが検出された。これまでの報告では、細菌から得られた両方のタイプの糖脂質に NKT 細胞刺激活性が検出されたことから、本真菌の糖脂質にもこのような活性が存在する可能性が考えられ、今後のさらなる解析が必要である。

今回解析した *URA5* 遺伝子は、クリプトコックスなどが持つ orotidine mono phosphate pyrophosphorylase をコードし、ウラシルの生合成に関与していることが知られている。そして、この *URA5* 遺伝子に変異を有するクリプトコックス株は、野生株と比較して、マウスへの経静脈感染において病原性が弱まることが報告されている。したがって、*URA5* 遺伝子は、何らかの形で病原性を決定する鍵となる遺伝子であることが推察される。本研究から、この *URA5* 遺伝子の一部が、いわゆる「CpG モチーフ」を持たないにも関わらず、TLR9、MyD88 および NF- κ B を介し、CpG-ODN と同様の経路により、BM-DC を活性化することが明らかになった。これらの研究成果は、真菌感染の免

疫病態を理解する上で新たな視点を提起するものであり、重要な知見であると考えられる。

最後に、リアルタイム PCR 解析の結果より、末梢血リンパ球から Th1/Th2 細胞分化の決定に重要な転写制御因子 T-bet 及び GATA3 mRNA の発現を定量的に解析できることが分かり、さらに T-bet/GATA3 は Th1 サイトカインである IFN- γ 産生と強い正の相関を示すことも明らかとなった。興味深いことに、T-bet/GATA3 が年齢と負の相関を示しており、加齢による細胞性免疫能への影響と何らかの関係がある可能性が考えられた。今後は、T-bet/GATA3 比を指標とすることで、真菌感染症と宿主免疫能との関連について臨床的な解析を行っていきたい。

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

C. albicans の生存必須のプロテインキナーゼ CaMPS1 の活性阻害作用を持つ化合物 X は、*C. albicans* の増殖抑制効果も示すことを見出した。即ち、化合物 X による選択的な CaMPS1 キナーゼ活性阻害が細胞増殖に影響を及ぼしている可能性が高い。また、hMPS1 のキナーゼ阻害剤は CaMPS1 活性を阻害しないことから、MPS1 の構造は種間で異なることが予想され、選択性の高い抗真菌薬開発の可能性が示された。

E. 結語

輸入真菌症の発生动向調査を行い、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ッ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。ニワトリを用いたカンジダ実験感染モデルを作成した。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。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。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。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。*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。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。*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。

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
II. 分担研究報告書

| | |
|---|----|
| 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 |
| 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 細菌学) | 28 |
| 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 |
| <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 ープ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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| <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 |

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・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

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

分担研究者 亀井克彦・千葉大学真菌医学研究センター・教授

研究要旨

輸入真菌症の発生動向調査を行い、ヒストプラズマ症およびコクシジオイデス症が比較的安定した経緯をとっているのと対照的に、しばらく症例が現れていなかったパラコクシジオイデス症とマルネッフェイ型ペニシリウム症の発症（いずれも2例ずつ）が確認された。とくにマルネッフェイ型ペニシリウム症はこれまで総数でも3例しか報告がなく、今回まとめて2例発生したことは、輸入真菌症が多様化しつつある可能性を示唆するものと考えられた。一方、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、昨年度までに抽出された新規抗原候補タンパク質について検討を進め、エピトープ部位絞り込みのための部分タンパク質の発現・精製に成功した。また、この過程で得られたタンパク質をコードする遺伝子の解析から、あらたな特異的 PCR 開発の可能性を示された。

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、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。

C. 研究成果 (図1)

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い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) マルネツ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。

D. 考察

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され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。

E. 結論

今年度の発生状況調査にてパラコキシジオイデス症の再増加やマルネツフェイ型ペニシリウム症の増加が示され、輸入真菌症の多彩化が明らかとなった。今後とも多面的な情報提供、研究が必要と考えられる。

F. 健康危機情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

2. 抗*Histoplasma capsulatum* 抗体

検出法の開発

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。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。このため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（以前の本邦厚労科研究事業での成果）。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

で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。

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。

B. 研究方法

1. *H. capsulatum*部分タンパク質のクローニング、精製・発現および部分タンパク質を用いたELISA

*H. capsulatum*の主要な抗原として既に知られているAgHおよびAgMを含めて、合計4種の抗原タンパク質について図1に示した部分タンパク質遺伝子

をクローニングし、発現ベクターへ組み込んだ。これらの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可溶化せず、封入体として回収されたため、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い、250mMイミダゾールを含むバッファで溶出した。得られたタンパク質を精製抗原タンパク質とした。

ELISAは以下の通り行った。抗原タンパク質をコーティングバッファ中でMaxiSorp (Nunc)に16時間、4℃にてコーティングした。TBSにて洗浄後、Protein Free Blocking Buffer solution (Pierce)によるブロッキングを行った。0.1% 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。

2. *H. capsulatum*抗原Hc1遺伝子の相同性検索と各真菌種相同遺伝子との系統樹の作成

公共データベース上からえられたHc1遺伝子と相同性がある真菌遺伝子66配列を比較した。配列はGENETYX Ver. 9上のClustalWでアライメントを行い、近隣結合法により系統樹を作図した。

(倫理面への配慮)

千葉大学真菌医学研究センター倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1. 部分タンパク質の精製・発現

研究方法に示した精製により、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。

2. *H. capsulatum*抗原Hc1遺伝子の応用利用

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、また主要な輸入真菌症原因菌である*C. immitis*、*C. posadasii*、*P. brasiliensis*、*B. dermatitidis*、*P. marneffeii*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. brasilie*

nsis、*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. marneffeii*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菌種の本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*属の本ホモログも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。

D. 考察

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Hc1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。Hc1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、Hc1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Hc1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。

E. 結論

エピトープ部位絞り込みのための部分タンパク質の発現・精製に成功した。また、予備的解析を開始しており、今後エピトープ部位の同定を行う事に

より、*Histoplasma*抗原を用いたELISAにおける感度上昇、バックグラウンド低減を達成できると期待する。

また、これまでに同定してきた抗原をコードする遺伝子がPCRをベースとした迅速診断法へ利用できる可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

(1) 豊留孝仁, 渡辺哲, 落合恵理, 亀井克彦: *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, 2009

(2) Takahito Toyotome, Akira Watanabe, Eri Ochiai, Hideaki Taguchi, Katsuhiko Kamei: The utility of recombinant proteins of H and M antigens of *Histoplasma capsulatum* in the detection of specific antibodies in patients' sera. The 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Tokyo, 2009.

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

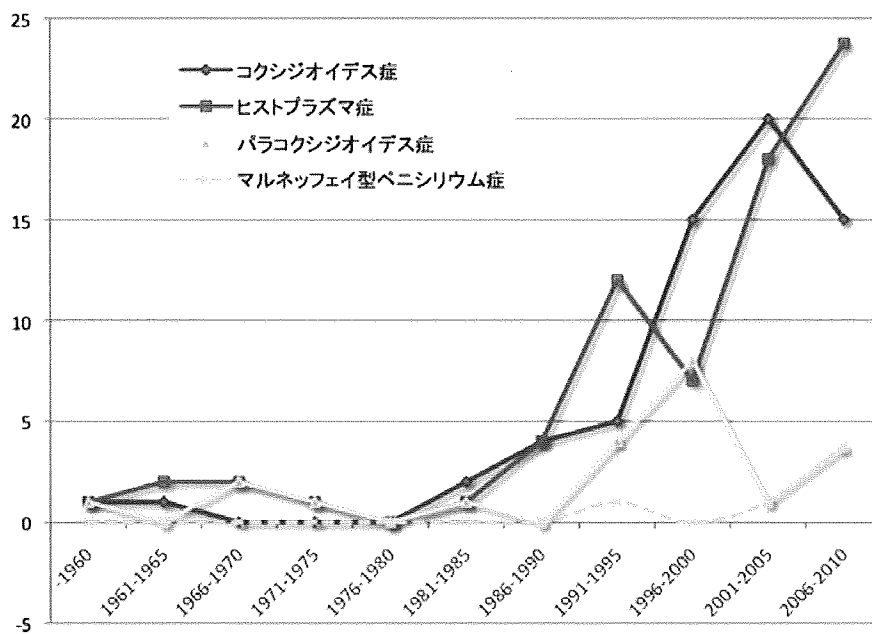
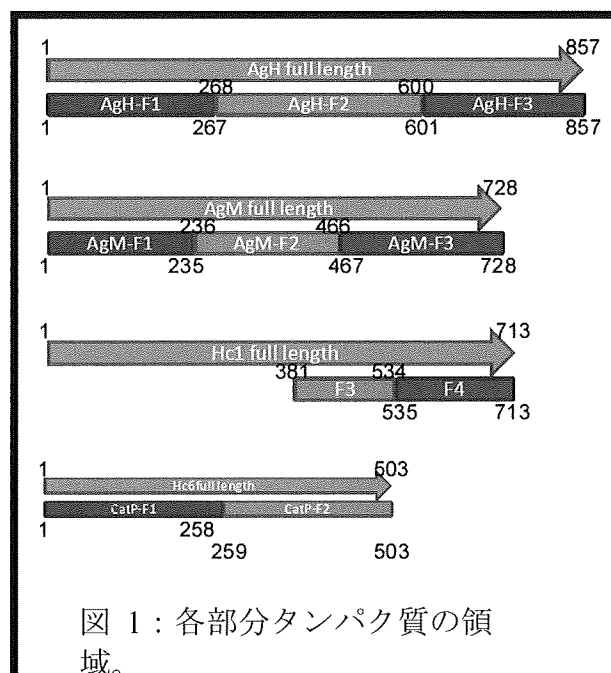
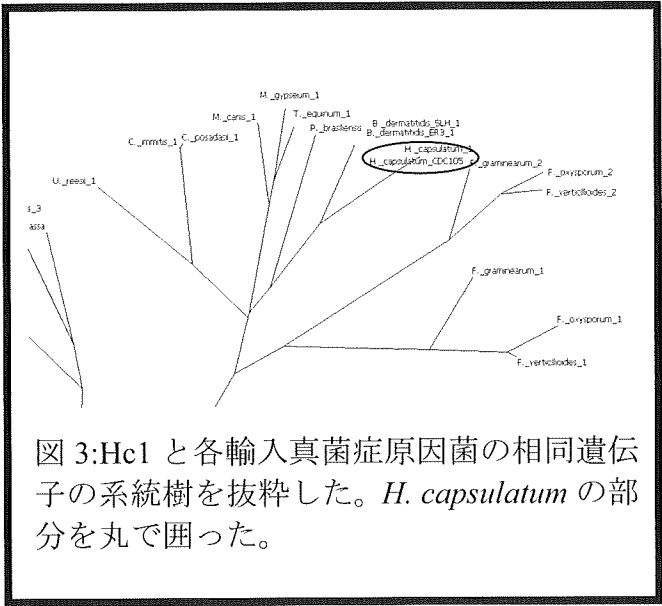
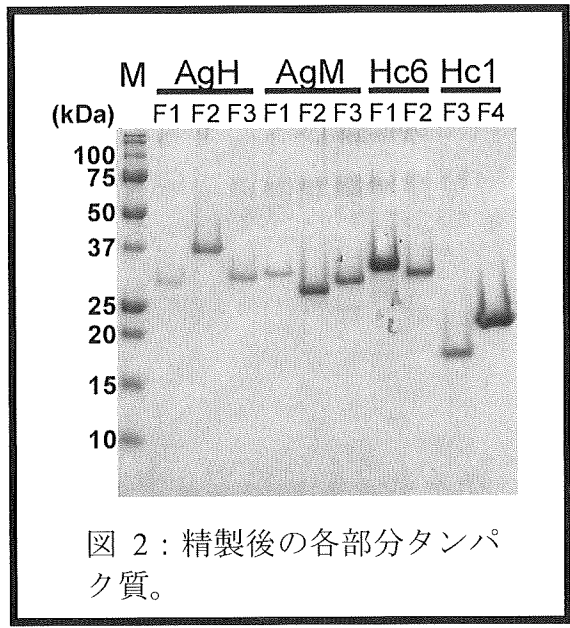


図1：我国の輸入真菌症症例数の変遷 落ち着きつつあるコクシジオイデス症症例数に対し、パラコクシジオイデス症、マルネツフェイ型ペニシリウム症の増加が目立ち、多様化が進んでいる様子が窺える。一方、ヒストプラズマ症は増加傾向が定着し、わが国でもっとも重要な輸入真菌症となりつつある。(● コクシジオイデス症、■ ヒストプラズマ症、◆ パラコクシジオイデス症、× マルネツフェイ型ペニシリウム症)。





2009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）
分担研究報告書

「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」班

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

順天堂大学医学部 感染制御科学・細菌学・総合診療科学 准教授
研究分担者 菊池 賢

研究協力：畜産生物科学安全研究所 西村昌晃、村松昌武、平山紀夫
東邦大学医学部病院病理学 渋谷和俊、篠崎 稔、大久保陽一郎
帝京大学医学部医真菌センター 榎村浩一
生化学バイオビジネス（株） 田村弘志
コージンバイオ 大川三郎

研究要旨

ニワトリを用いたカンジダ実験感染モデルを作成した。白色レグホン 2 週齢雄を用い、*Candida albicans* JICC 60040, CBS 6589, *Candida tropicalis* CBS 94, JICC 51418, *Candida glabrata* JICC 13351 を経口接種した。*C. albicans* 群では両株ともいずれの菌量接種でも明瞭な thrush 様の病変を crop に認めた。組織所見では角質層の肥厚、過形成、錯角化、淡明層の消失が認められた。組織内での *C. albicans* は顕著な仮性菌糸形成（水平方向と一部、垂直方向への増殖）を呈しており、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。一方、*C. tropicalis*, *C. glabrata* 群では crop を含むいずれの臓器からも菌は回収されず、*C. albicans* 感染にみられた病理所見も認められなかった。この *C. albicans* crop infection モデルを用い、dexamethasone, cyclophosphamide 治療を行なうことによりカンジダ全身感染を誘発できるかどうか検討した。いずれの投与群でも crop 感染はコントロールと比べて、肉眼的所見、組織内の菌数の有意の差は認められなかった。また、cyclophosphamide 高容量（150 mg/Kg, 250mg/Kg）投与群では顕著な死亡率が認められたが、*Pseudomonas aeruginosa* の全身感染を起こしており直接の死因はカンジダ全身感染によるものではないと判断した。本モデルは何の免疫抑制剤や抗菌薬投与をしなくても再現性良く *C. albicans* による crop infection を成立させることができ、その病理所見からヒト食道カンジダ症のモデルとして有用と考えられた。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

Candida albicans JICC 60040（ヒト播種性カンジダ全身感染- 感染性心内膜炎患者血液培養由来株）、*Candida albicans* CBS 6589（ヒト膣由来株）、*Candida tropicalis* JICC 51418（ヒト播種性カンジダ全身感染- 剖検膿瘍由来株）、*Candida tropicalis* CBS 94（type strain, ヒト喀痰由来株）、*Candida glabrata* JICC 13351（ヒトカンジダ敗血症患者血液培養由来株）の計5株を用いた。菌株は50% glycerol中で-85℃に保存し、要時、サブローブドウ糖寒天平板（Oxoid）で37℃、24時間好気培養し、実験に供した。動物実験は畜産生物科学安全研究所（神奈川県相模原市）内の鳥類BSL2感染実験室で実施し、実験プロトコールは同研究所の倫理委員会の審査を受け、同委員会の許可を得た。ニワトリは白色レグホン雄の初生ヒナを埼玉実験動物供給所（埼玉県北葛飾郡杉戸町）から購入し、BSL2 isolator内で飼育した。各菌種を用いた感染モデルの検討（実験1）の実験プロトコールを図1に示す。ニワトリは2週目にゾンデを用い、PBSに 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mlとなるよう浮遊させた各菌液1 ml（コントロールはPBSを投与）を経口接種した。ニワトリは期間中、毎日、生存と健康状態のチェックを行なった。2週間後、体重変化を記録後、剖検し、脳、口腔、crop（そ嚢）、前胃、胃（砂嚢）、腸管、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、肺、ファブリキウス嚢などの肉眼的所見を観察後、病変の認められた臓器については菌の回収と菌

数測定を行なった。実験終了時には各ニワトリから採血を行ない、0.8 mlをVersaTrek Redox 1 bottleに接種し、全自動血液培養検査装置 VersaTrek Blood Culture System (Model 240)を用いて血液培養を実施した。血液培養は1週間培養観察した。臓器はMesh #6のグラスビーズと共にBioMasherでホモジュネートを作成し、滅菌生理食塩水で10倍希釈系列を作成後、カンジダクロム寒天培地（コージンバイオ）にて30°C、48時間培養し、生菌数を測定した。残りの臓器は10%中性ホルマリンにて固定し、病理標本を作成し、HE、PAS染色で観察を行なった。実験1でcrop infection成立が確認できた*C. albicans* JICC 60040を用い、次に免疫抑制治療による全身感染誘発モデルの作成を検討した。図2に実験プロトコルを示す。ニワトリは実験1と同様に2週目に*C. albicans* JICC 60040を 10^8 CFU/mlとなるよう浮遊させた菌液1 mlを経口接種した。菌接種2週間後にPBS 0.5 ml（コントロール）、dexamethasone（デカドロン注射液 萬有製薬）1mg/Kg, 2 mg/Kg, cyclophosphamide (Sigma) 100 mg/Kg, 150 mg/Kg, 250 mg/Kgをそれぞれ1群6羽ずつに3日間連続で筋肉注射した。ニワトリは0、14、28日目に体重測定を行ない、菌接種18日、21日、28日目に血液培養を施行した。菌接種28日目に剖検して、実験1同様に臓器の肉眼的観察、菌回収-生菌数測定、病理組織標本作製を行なった。

C. 研究結果

図3には実験1における各菌接種2週間後の体重変化（菌接種時の体重からの増加）を示す。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（図4）。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（所見未提示）。*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（図4）。図5に各群のcrop組織中の*Candida*生菌数を示す。*C. albicans* JICC 60040, *C. albicans* CBS 6589 投与群では 10^{6-7} CFU/gの生菌数が回収された。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。図6に*C. albicans* JICC 60040 10^9 CFU/chick投与ニワトリのcrop病理組織像（PAS染色）を示す。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）。図7には*C. albicans* CBS 6589 10^9 CFU/chick投与ニワトリのcrop病理組織像（PAS染色）を示す。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。

実験2では実験1で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。図8に免疫抑制剤投与2週間での体重変化(増加率)を示す。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。図9には免疫抑制治療後の生存曲線を示す。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(未提示)。図10には各群のcropの外観を示す。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。図11にcrop組織中の*C. albicans*生菌数を示す。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。実験2の病理所見は現在、標本作成・解析中のため、報告書には記載しなかった。

D. 考察

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。その起原菌のほとんどは*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原菌のほとんどが*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 BSL2 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、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。

E. 結論

本モデルは何の免疫抑制剤や抗菌薬投与をしなくても再現性良く *C. albicans* による crop infection を成立させることができ、その病理所見か

らヒト食道カンジダ症のモデルとして有用と考えられた。ニワトリは実験動物としては一般的ではないため、実験実施施設の問題があるが、費用は極めて廉価であり、動物の供給体制も整っていることから、今後のカンジダ実験感染モデルとして、その応用が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表：なし

学会発表：

菊池 賢、西村昌晃、村松昌武、平山紀夫、渋谷和俊、篠崎 稔、大久保陽一郎、槇村浩一、田村弘志、平松啓一 ニワトリを用いた実験カンジダ感染モデル 第83回日本細菌学会総会 横浜 2010（発表予定）。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

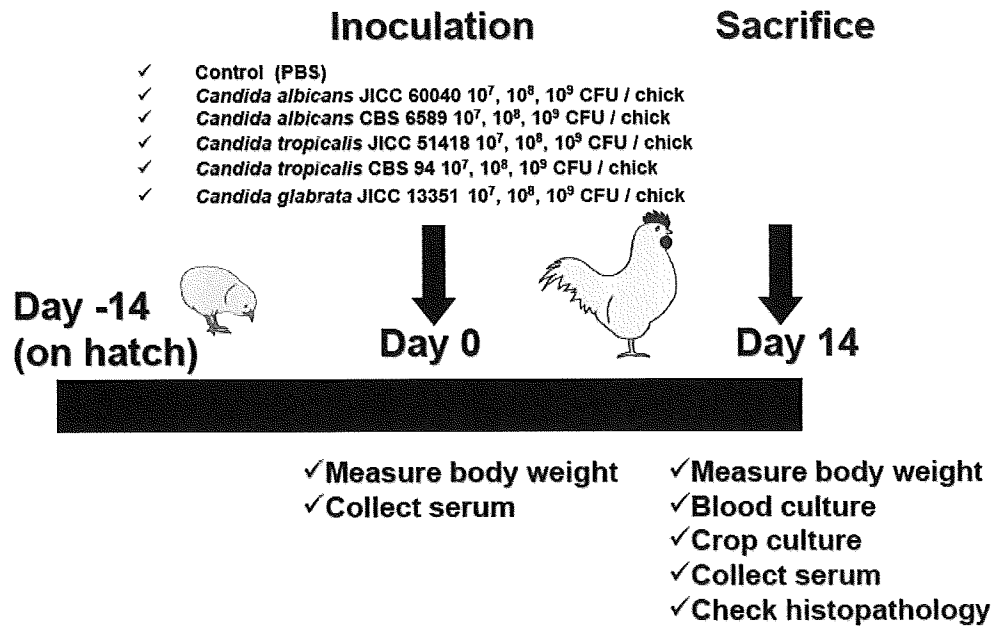


Figure 1. Schematic representation of *Candida* crop infection model in chicks

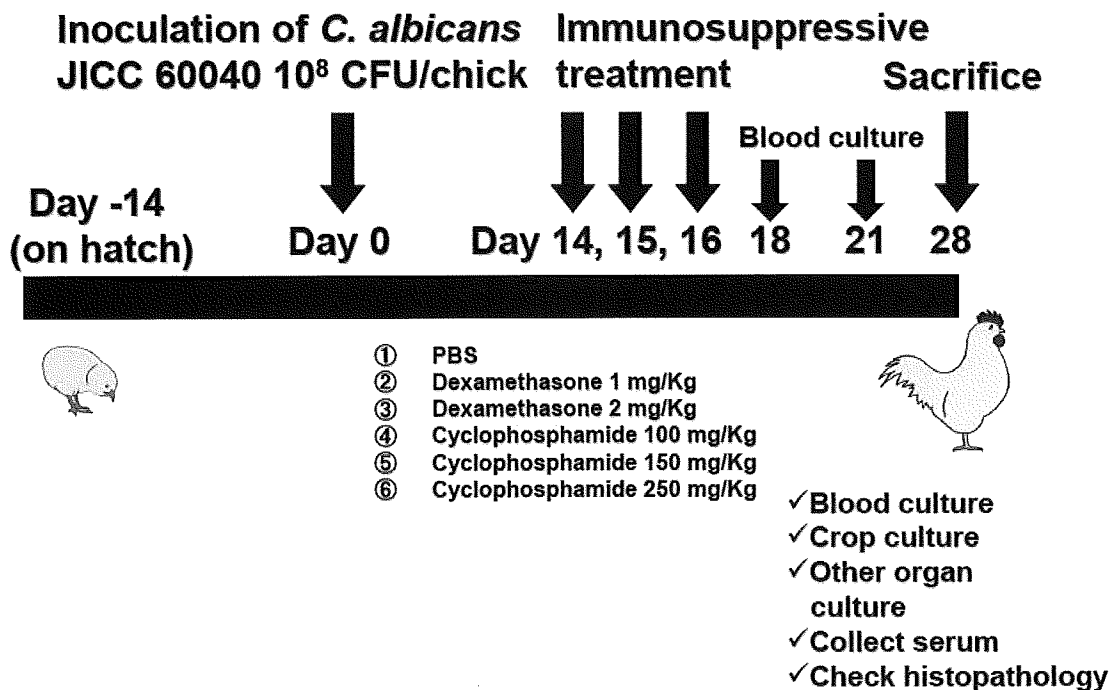


Figure 2. Schematic representation of *Candida* crop infection model in chicks with immunosuppressive treatment

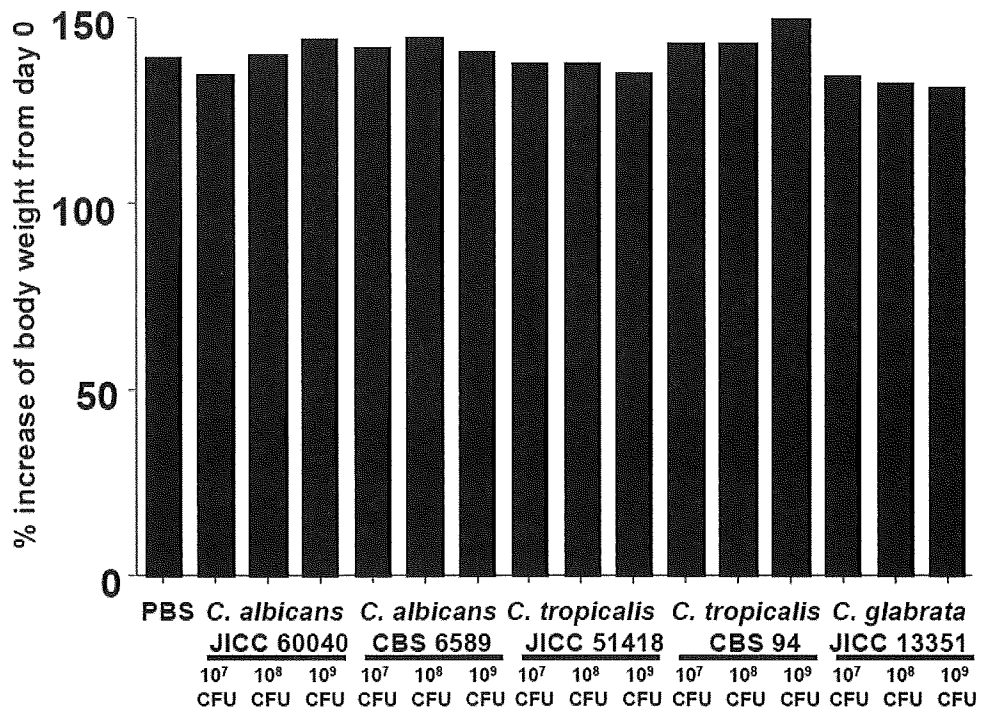


Figure 3. Increase of body weight of chicks infected various *Candida* strains (% Δ body weight increase 2 weeks after infection)

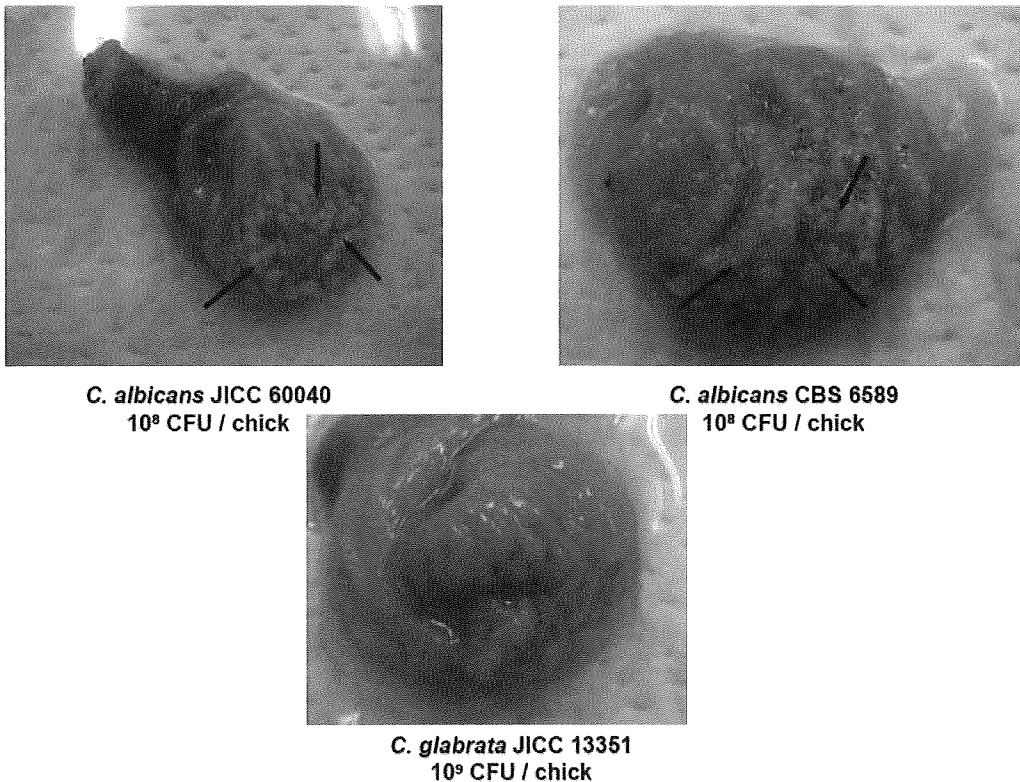


Figure 4. Macrofinding of crop infected with *Candida*. Each arrow indicates white plaque (thrush-like) lesion.

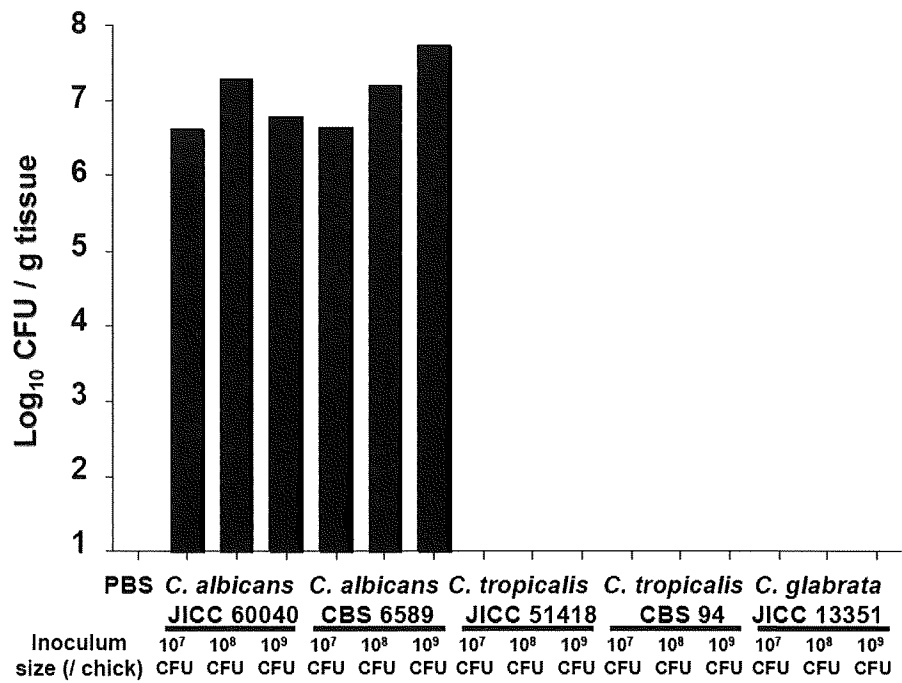


Figure 5. Recovery of *Candida* (CFU / g tissue) from crops 2 weeks after infection

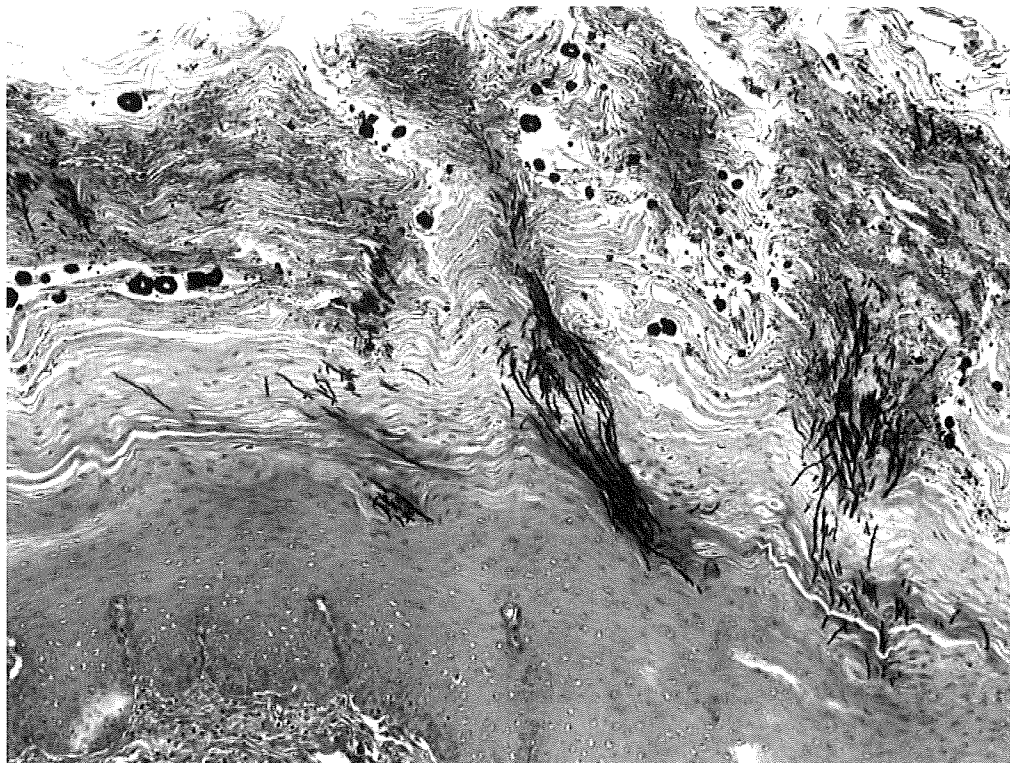


Figure 6. Pathology of crop infected with *C. albicans* JICC 60040 (10⁹ CFU / chick), PAS staining