

ISH and PCR results from formalin-fixed, paraffin-embedded sections												
Case	Age/sex	Organs	Underlying disease	Diagnosis	ISH		PCR					
					Afut-1	ALP	ALPns ALPnr	LTR1n LTR2n	AFUS AFUSAS	P58SL P26SL	ZM1 ZM3	Pbo1 SP2
1			Experimental invasive fusariosis Lung		-	-	-	-	-	+	-	-
2*	57/F	Lung	NHL	IPA	+	+	-	+	+	-	-	-
3*	68/M	Brain	NHL	Mucormycosis	-	-	-	-	-	-	+	-
4*	54/M	Lung	MM	IPA	+	+	-	-	-	-	-	-
5*	37/F	Lung	CML	IPA	+	+	-	-	+	-	-	-
6	69/F	Maxillary sinus	Paranasal aspergillosis		-	+	-	-	-	-	-	-

* Autopsy cases. IPA: Invasive pulmonary Aspergillosis. NHL: non Hodgkin's lymphoma.
MM: multiple myeloma. CML: chronic myelogenous leukemia.

表 2

5. 抗真菌剤耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索研究

病原真菌の多剤耐性に関わる排出ポンプを高発現した出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて海洋微生物由来の化合物および培養ろ液をスクリーニングし、真菌の ABC トランスポーターを阻害する新規物質を見出した。Cyclodepsipeptide の unnarmicin A および unnarmicin C が sub-MIC 濃度のフルコナゾール存在下で ScPdr5p, CaCdr1p, CgCdr1p および CgPdh1p 過剰発現耐性株の発育を強く阻止した。しかし Cdr2p または CaMdr1p 高発現株の発育は阻止しなかった。Unnarmicin A および unnarmicin C は CaCdr1p 過剰発現株のローダミン排出に対する阻害活性を有し、IC50 はそれぞれ 3.61 mM および 5.65 mM であった。また CaCdr1p の ATPase 活性も阻害し、IC50 はそれぞれ 0.495 mM および 0.688 mM であった。さらに重要な点として両阻害剤はフルコナゾール耐性 *Candida albicans* 臨床分離株に対しても感受性化効果を示した。以上のことから unnarmicin A および unnarmicin C は抗真菌薬療法の併用剤としての可能性を有した排出ポンプ阻害剤であることが分かった。

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

カイコ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、カイコ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、CaPTC1 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。CaPTC1 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。

7. *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に関する研究

深在性真菌症の原因菌として知られる *Candida albicans* の生存に必須なプロテインキナーゼ CaMPS1(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 CaMPS1 のキナーゼ活性を阻害する物質として化合物 X (分子量; 250.2) を得た。更に、化合物 X による *C. albicans* の増殖抑制効果も認められた。他のチロシンキナーゼ (ヒト由来の EGFR, VEGFR) の活性は阻害しないことから、化合物 X は CaMPS1 選択的に活性抑制作用を発揮し、*C. albicans* の増殖に影響を与えている可能性が高い。また、ヒトホモログである hMPS1 のキナーゼ活性を阻害することが報告されている staurosporine と SP600125 は CaMPS1 に対して阻害効果を示さなかった。薬剤感受性に違いがあることから、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。

8. メディアにおける真菌感染症の報道状況

A. 研究目的

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、我々は現状の真菌に対する認知度を調査した。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。

B. 研究方法

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・雑誌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。

対象となるメディア

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。

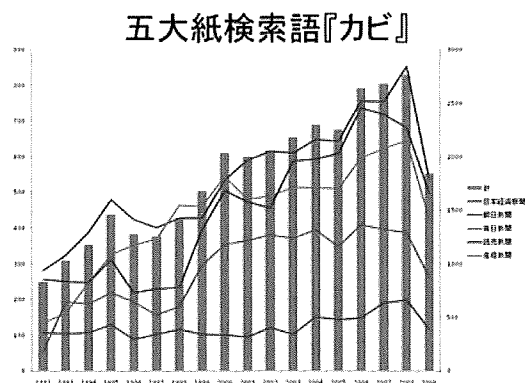
また、掲載されている107の雑誌を対象に同様の検索を行った。

C. 研究結果

「かび」に関する新聞記事数

対象五紙の真菌に関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年以降は横ばいで、2009年には減少していた。

図1

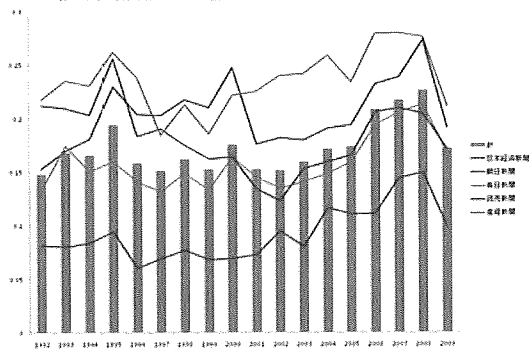


総記事に対する「かび」に関連する記事の割合

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。

(図2)

検索語『カビ』全新聞に占める割合

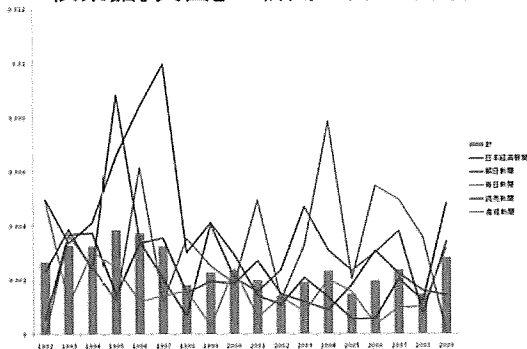


総記事に対する「真菌」に関連する記事の割合

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。

(図 3)

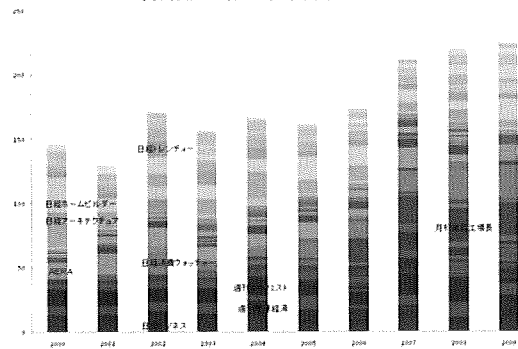
検索語『真菌』全新聞に占める割合



「かび」に関する雑誌記事数

(図 4)

雑誌 検索語『カビ』

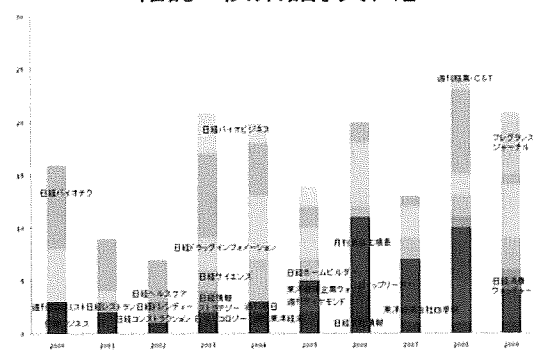


対象となった雑誌記事の年次推移を図 4 に示す。記事数は 2000 年以降、徐々に増加しているが、総数は新聞の約半分である。

「真菌」に関する雑誌記事数

(図 5)

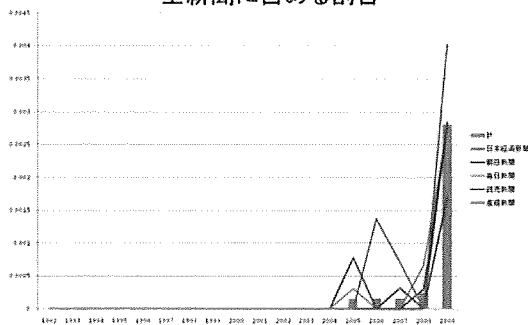
雑誌 検索語『真菌』



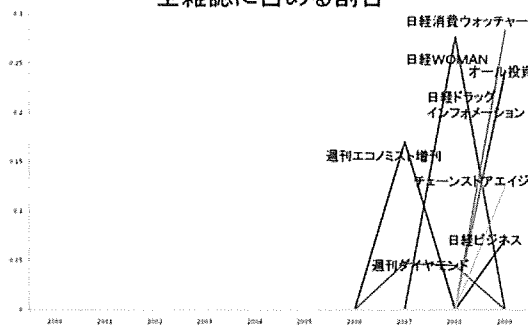
「真菌」という単語を用いている雑誌は極めて少ない。その変動に一定の傾向を認めない。

新型インフルエンザの流行が報道に与えた影響

検索語『新型インフルエンザ and (カビ or 真菌)』
全新聞に占める割合



検索語『新型インフルエンザand (カビ or 真菌)』
全雑誌に占める割合



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。

D. 考察

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。

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に過ぎない。これでは、国民が真菌感染に関する

知識を持つとは考えにくい。特に、2009年度は、記事数が減少している。これは、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。

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。

新聞の発行部数が、今後、大きく増えることは考えにくい。紙面の「分捕り合い」を、「カビ」の記事が勝ち抜くとは考えにくい。ウェブなど、他のメディアの利用を考えるべきであろう。

一方、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。

農大を舞台に菌を中心として描かれる漫画
「もやしもん」



2007年にはアニメ化もされた

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。

9. 抗真菌薬シーズの開拓

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ズをきのこおよび海生菌の代謝産物に求めた。きのこおよび海生菌の二次代謝産物からシードなる化合物の探索を試みた。クロロホルム、酢酸エチルおよびメタノールの3溶媒を用いて分画した。*Candida albicans* および *Cryptococcus neoformans* を用いてスクリーニングしたところ、440 サンプル中、4 サンプルに抗真菌活性を見出した。この中から特に活性が強いエキスから活性物質の単離を行いその化学構造を決定した。CHCl₃エキ

スをSilica gelまたはSephadex LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィーおよびHPLCにより分離・精製し、2種の化合物を単離した(それぞれをDB-1 およびDB-2 と名付けた)(図1)。

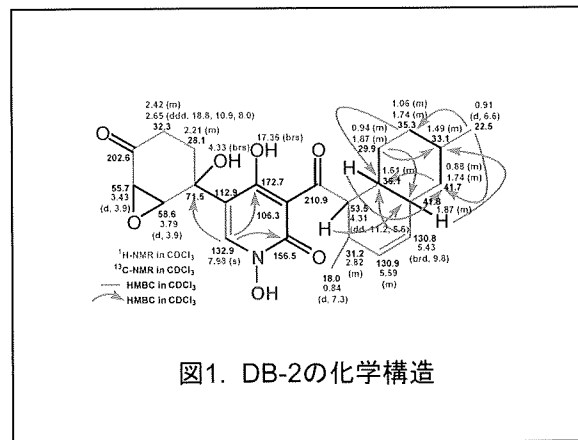


図1. DB-2の化学構造

両化合物の構造的差異は N-OH 基の有無であるが、DB-1 は抗真菌活性を示さないことから、この OH 基が活性に重要な役割を担っていると考えられた。DB-2 は、*Aspergillus* 等の糸状菌から酵母にわたり広い活性を示した(表1)。本化合物は既存の抗真菌薬とは全く構造がことなることから、新規抗真菌薬のリードとなりうる可能性がしめされた。さらに、エキス単品では抗真菌活性は示さないが、アゾール薬と相乗効果を示すエキス画分も見出した。フルコナゾールを8、4、2、1 μg/mL となるようにエキスに加え、アゾール薬耐性 *C. albicans* (フルコナゾール MIC > 32 μg/mL) に対する相乗効果を調べたところ、1 エキスにその効果を認めた(図2)。

表1 抗真菌スペクトルの検討

分類	菌株名	MIC (μg/mL)
糸状菌	<i>Aspergillus fumigatus</i> (1)	+
	<i>Aspergillus niger</i> (2)	+
	<i>Trichophyton meesei</i> (4)	+
	<i>Trichophyton reesei</i> (4)	+
酵母	<i>Metschnikowia</i> (2)	+
	<i>Candida glabrata</i> (5)	+
	<i>Candida lusitana</i> (2)	+
	<i>Cryptococcus neoformans</i> (10)	+
細菌	<i>Cryptosporidium parvum</i> (1)	+
	<i>Trichosporon asahii</i> (1)	+
	<i>Trichosporon cutaneum</i> (1)	+
	<i>Trichosporon longibrachium</i> (1)	+

1) の数字は菌株数を示す。
+ : 感受性あり、- : 感受性なし

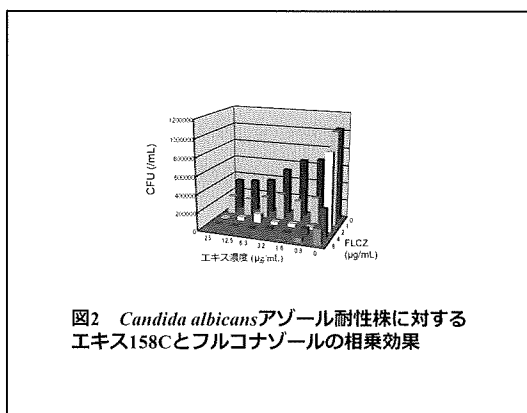


図2 *Candida albicans*アゾール耐性株に対する
エキシス158Cとフルコナゾールの相乗効果

10. 新興真菌感染症トリコスポロン症の分子疫学調査

新興真菌感染症の一つであるトリコスポロン症は予後不良の感染症であり、1970年以降散発的にその感染が報告されてきた。近年ではキャンディン系抗真菌薬投与後のブレークスルー感染症として注目されている。特に、致死率は70%以上でありカンジダ症のそれよりも高い。本年度は、本症の起因菌である *Trichosporon asahii* の種内多様性を調べ、諸外国患者由来株と比較を行うことにより本邦の真菌学的な特徴を比較検討した。本邦、タイおよびトルコ人患者から分離された *T. asahii* について、その rRNA 遺伝子中の最も variable な領域である IGS1 (intergenic spacer region) (図3) の DNA シーケンスを行った。本領域は系統的に9型に分類される(図4)。日本人、米国、タイおよびトルコ患者から分離されたそれぞれ74株、31株、101株および87株について検討した(合計293株)。日本およびトルコは1型が、タイでは1および3型が、米国では3および5型が優位であったことから、遺伝子型は感染国において特徴的であると考えられた(図5)。本解析

ツールは世界規模での分子疫学調査に用いることができる。

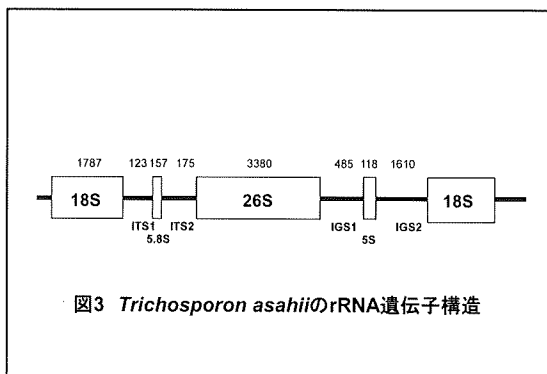


図3 *Trichosporon asahii* の rRNA 遺伝子構造

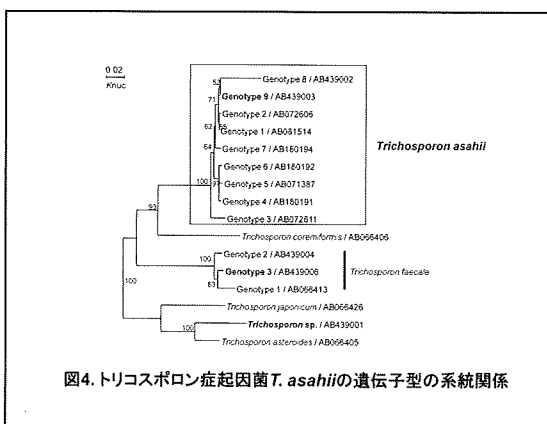


図4. トリコスポロン症起因菌 *T. asahii* の遺伝子型の系統関係

11. 輸入真菌感染症マルネッフィ型ペニシリウム症の菌学的診断法の開発

マルネッフィ型ペニシリウム症は *Penicillium marneffeii* を起因菌とし、タイをはじめとする東南アジアにおいて HIV 感染者の日和見真菌感染症の起炎菌として重要である。我が国では輸入真

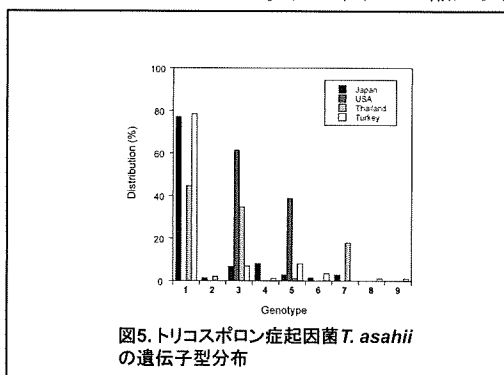


図5. トリコスポロン症起因菌 *T. asahii* の遺伝子型分布

感染症として位置づけられている。保存株およびタイ人患者血液から分離した50株について、そのIGSの全長約2200 bpを決定した。その領域からTaqMan Probeを設計し、起因菌*Penicillium marneffei*の定量的検出を構築した。定量限界は 10^1 copyであった。

12. 新規新興感染症起因菌の分離

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。タイ患者血液から新種に相当する*Pseudozyma*を複数分離した(図6)。すべてのアゾール薬およびミカファンギンに耐性である。これまでにタイでは、*Pseudozyma*による感染が報告されていることから、今後は注意を要する真菌感染症の一つであると考えられた。

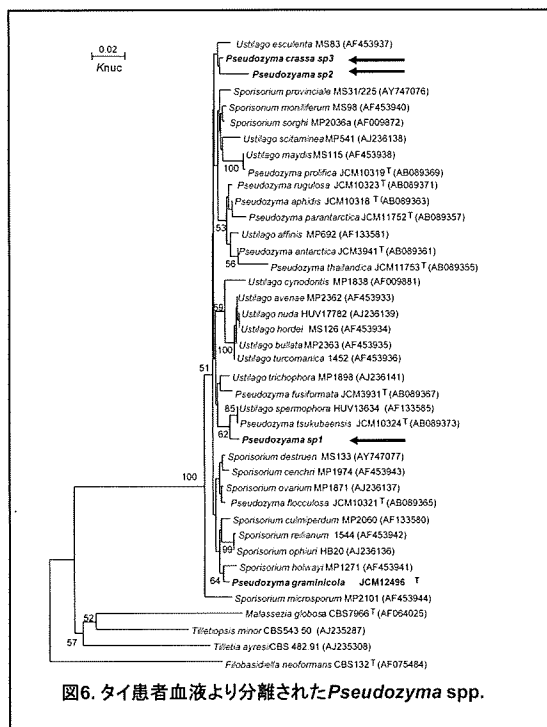


図6. タイ患者血液より分離された*Pseudozyma* spp.

13. 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

A. 研究目的

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いえない。

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。

B. 研究方法

マウス C57BL/6 マウスとともに、同じ遺伝的背景を有する CD1d 遺伝子欠損 (knockout : KO) マウス (順天堂大学竹田和由先生より供与)、Ja18KO マウス (千葉大学中山俊憲教授より供与)、TLR9KO マウス (大阪大学微生物病研究所審良静男教授より供与) を用いた。一部の C57BL/6 マウスは日本チャールス・リバーより購入した。なお、すべての動物実験は、東北大学の倫理委員会の承認を得た上で実施した。

C. neoformans 莢膜欠損株である Cap67 (Stuart M. Levitz 教授, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA より供与) を potato dextrose agar (PDA) 培地 (栄研化学、東京) にて 30°C で培養した。

骨髄由来樹状細胞 マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を 10 ng/ml GM-CSF (和光純薬、大阪) とともに 8 日間培養することで骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cells: BM-DC) を作製した。

C. neoformans 抗原でパルスした BM-DC による NKT 細胞の活性化 BM-DC に Cap67 または α -GalCer (フナコシ、東京) を加え 24 時間培養し、MACS 細胞分離装置 (ミルテニーバイオテク、東京) を用いて CD11c 陽性細胞を分離した。一方、マウスから肝臓を摘出し、比重遠心法によりリンパ球分画 (liver mononuclear lymphocytes: LMNC) を分離した。Cap67 または α -GalCer でパルスした BM-DC を LMNC とともに 48 時間培養し、培養上清中の IFN- γ 濃度を ELISA にて測定した。実験によっては、NKT

細胞として、NK1.2細胞(Mitchell Kronenberg 教授, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA, USA より供与)も使用した。

C. neoformans からの脂質抽出 Cap67 を multibeads shocker (安井機械、大阪) で破碎し、Folch 法にて脂質(総脂質)を抽出した。得られた総脂質から Sep-Pak plus silica cartridge (日本ウォーターズ、東京) を用いて中性脂質、糖脂質、リン脂質を分離し、さらに糖脂質を HPLC にて分析した。糖脂質のスタンダード標品として、アシルステリルグルコシド (ASG、大豆由来)、ステリルグルコシド (SG、大豆由来)、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG、小麦由来)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG、小麦由来)、セラミドモノヘキソシド (CMH、海綿由来) を使用した。

C. neoformans からの DNA 抽出 Cap67 を、1% SDS, 0.3M EDTA 添加 1M Tris-HCl (pH 7.5) に溶かし、定法に従って DNA を抽出した。DNA は使用するまで -20°C に保存し、OD260/OD280 比が 1.5 から 2.0 の間に収まるものを使用した。

PCR産物の調整と配列決定 サーマルサイクラー (PC320, ASTEC, 福岡) により、クリプトコックスに特異的なプライマーを用い、クリプトコックス由来の DNA の一部を増幅した。用いたプライマーの配列は以下の通りである。

ACG GTG AGG GCG GTA CTA TG (forward)、
AAG ACC TCT GAA CAC CGT AC (reverse)。
PCR mixture (TaKaRa Ex Taq, TaKaRa, 滋賀) に上記のプライマーと DNA 溶液を加え、(94°C 1分、63°C 1分30秒、72°C 1分) ×36 サイクルの条件で反応を行った。得ら

れた DNA 断片の塩基配列は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用い、ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Life Technologies) にて塩基配列を決定した。

サイトカイン測定 培養上清中の IL-12p40、IFN- γ 、IL-2 濃度はそれぞれの ELISA キットを用いて測定した。

DNA と TLR9 の共局在の観察 Rhodamine 標識 DNA を BM-DC と培養した後、細胞内の TLR9 を FITC 標識抗 TLR9 抗体 (IMGEX, San Diego, CA, USA) にて染色した。スライドガラスに細胞を塗布し、ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) で封入後、LSM 510 (Zeiss, Oberkochen, Germany) により解析を行った。

ヒト末梢血リンパ球 (PBMC) からの T-bet、GATA3 発現の解析 各年齢 (22~53 歳) の健常人ボランティア 5 名の末梢静脈血から PBMC を採取した。PBMC は Th1 刺激活性の強い *Mycobacterium bovis* BCG (日本 BCG、東京) や ConA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) の存在あるいは非存在下で 24 時間刺激培養し、一部にはタクロリムス (FK506)、シクロホスファミド (CPX)、デキサメサゾン (Dex) のような免疫抑制剤を添加した。培養後の PBMC から RNA を抽出し、得られた RNA は PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) により DNA に変換後、T-bet、GATA3、及び house-keeping gene として β -actin (ACTB) に特異的な TaqMan probe を用いてリアルタイム PCR を行った。**統計学的解析** 実験結果はすべて平均値 \pm 標準偏差で表している。各群間の統計学的解析は Student's t-test を用いて行い、 $p < 0.05$

をもって有意差ありとした。

C. 研究結果

***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 J α 18KO 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ソシド (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 gtcgtt 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。

UR45 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。

D. 考察

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。

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

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

2. シグナルシークエンストラップ法 (SST 法)

トランスフェクション：抽出した *A. fumigatus* total RNA から cDNA を作成し、MPL^V を含む発現ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作成した。リポフェクチンを用いてマウス由来 BAF 細胞にトランスフェクションし、自律増殖可能な細胞をスクリーニングした。

増殖可能な細胞からトランスフェクションにより導入したベクター配列を確認し、*A. fumigatus* 由来遺伝子と推定される遺伝子断片のシーケンスを行った。

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

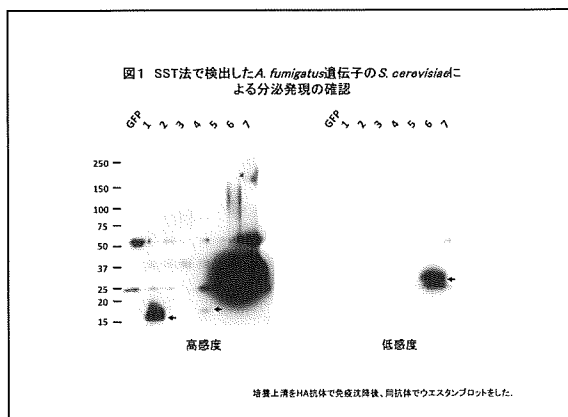
C. 研究結果

1. *A. fumigatus* における SST 法の有効性. 真菌である *A. fumigatus* 遺伝子をトランスフェクションによりマウス由来細胞に導入した場合でも、導入した糸状菌由来タンパク質のシグナルペプチドによりマウス細胞表面に移送されることが明らかになった。

2. 同定された *A. fumigatus* 遺伝子. 得られた SST クローンの総数は 403 個で、データベースを参照し約 70 個の *A. fumigatus* 遺伝子が同定された。約 9 個の既に報告されている *A. fumigatus* 遺伝子にコードされるタンパク質には、*A. fumigatus* の細胞表面に局在することが、以前示されている *Afm2p* など

が含まれていた。

3. *S. cerevisiae* に導入した候補遺伝子のうち、全体の約半数近くで蛋白質の分泌が確認された (図 1)。この分泌が確認されたものの中から一部を選択し、現在モノクローナル抗体を作製中である。



D. 考察

シグナルシーケンストラップ (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質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。

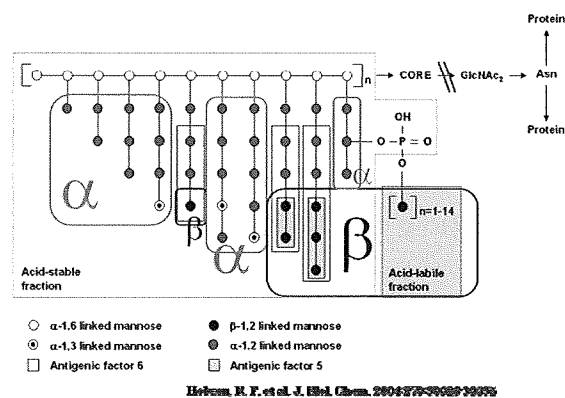
本研究では計 403 個のクローンから約 70 個

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。

15. *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

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。蛋白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、リン酸化マンナンが結合する複雑な構造である (右図)。



C. albicans 細胞表面に存在する 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 α 型のマンノース転移酵素、すなわち α -1,2、 α -1,3、 α -1,6 マンノース転移酵素に着目し、25種類の遺伝子破壊株を網羅的に作製した。第1のグループは TUA4 を親株とする α 型転移酵素単独欠失株14株、第2のグループはリン酸化マンナン欠失株(1株)を背景にして、さらに α 型マンノース転移酵素を欠失した4株(ダブル欠失株)である。残りの6株もマンノース転移酵素と推定される酵素の単独欠失株である。これらの酵素の触媒によって付加すると考えられる α -1,2、 α -1,3、 α -1,6 マンノースは細胞表面を構成し、これらの有無による細胞表面の微細な変化を解析し、役割を明らかにすることは重要と考えられる。そこで、われわれは菌学的性質、それらから精製したマンナン蛋白 (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 Δ 、Arg4 Δ) 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 1×10^4 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 9×10^5 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°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。

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 1×10^6 cells/ml の細胞 100 μ 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 OpTTM 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 α 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蛋白質欠失株 (1 株; MNN412-17) を背景にして、さらに α 型マンノース転移酵素を欠失した 4 株 (ダブル欠失株) である。残りの 6 株もマンノース転移酵素と推定される酵素の単独欠失株である。

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 (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、 α -1,3 型マンノース転移酵素を欠失すると考えら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、 α -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) マンナン蛋白質抗原性の解析

$\Delta\alpha$ -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)。

α -1,2、 α -1,3、 α -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% 血清寒天培地中の菌糸形成能を比較したところ、 α -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、リン酸化マンナンの欠失に加えて α 型のマンノース転移酵素 (α -1,2, α -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。 α -1,2, α -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。

16. 深在性真菌症の起原菌となっている真菌の菌種分布調査

1997年より2008年までに国内30以上の施設から集められた臨床分離真菌1200株を対象として、検体情報、分離患者の臨床背景、生化学的同定検査、抗菌薬感受性試験成績、遺伝子背景をデータベース化した。*Malassezia*, 糸状菌を除く酵母は923株あり、そのうちの主要4菌種である *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* について ITS1-5.8S rRNA-ITS2, 26S rRNA D1/D2 領域の遺伝的多様性を調べた。*C. glabrata* の ITS1-5.8S rRNA-ITS2 を除くほとんどの臨床分離株は一つの clade を形成していたが、従来の生化学的手法で同定された *C. albicans* には *C. dubliniensis* が、*C. parapsilosis* には *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *Lodderomyces elongisporous* がそれぞれ数株ずつ含まれていた。また、少なくとも26S rDNA D1/D2 領域の相同性から血液培養由来の *C. albicans* 1株、*C. parapsilosis* 1株、*C. tropicalis* 1株、*C. glabrata* 2株の5株の26S rRNA 配列は従来のどの菌種とも一致しないため、新菌種である可能性が示唆された。今回集積した菌株のほとんどが分離された感染症の診断、治療経過などの臨床背景が明らかな株であり、本データベースは我が国発生の深在性真菌症の基礎的・臨床的研究基盤として、疫学的解析、新たな診断法や抗真菌薬の開

発に不可欠な財産であると考えられる。我が国の深在性真菌症の疫学、正確な動向調査に臨床分離株のカルチャーコレクションを保存・管理・整備し、解析・蓄積したデータを研究者や臨床家がいつでも利用可能な情報源として提供していくことは本研究班の使命の一つである。

17. 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

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いが、マウスやラットはヒト真菌症起原菌に必ずしも感受性を示す訳ではなく、良い実験モデル動物とは言い難い。一方、鳥類は自然界や飼育環境下でカンジダ症を発症し、その起原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高度な免疫機構を保有し、全ゲノムも解明され、安価で動物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、各臓器への感染波及を確認した。*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。組織からは 10^{5-7} CFU/g の菌が回収された。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、顕著な仮性菌糸形成を呈しており、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。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。

18. 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

A. 研究目的

近年、様々な医療技術の進歩により、免疫不全患者の日見感染症は増加の一步を辿っている。その代表の深在性真菌症は細菌感染症に比べ、治療薬が少なく、また、相手が我々と同じ真核生物であることから、診断・治療が中々困難である。深在性真菌症の中でも日常遭遇する機会の最も多いのがカンジダ症であり、その起因菌としては *Candida* 主要4菌種 (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*) で90%以上を占める。我々が2000年から2001年に行った国内17施設の1年間の前向き調査でも、188例のカンジダ血症の分離菌のうち、上記の4菌種が95%を占めていた(図1)。また、*C. glabrata* は fluconazole への有効性が良くなく、*C. parapsilosis* に対する micafungin の抗菌活性が劣るなど、4菌種の同定は抗真菌薬選択に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。一方で、医療費削減の大方針の下、微生物検査は採算性の問題から、

病院で微生物検査室を廃止したり、外部委託するケースが進んでいる。手間がかかる上に採算性も良くない真菌の同定検査は最早、多くの病院で実施されなくなってきている。例えば一部の施設では、従来、菌種名で報告が出ていた同定結果が Yeast-like fungi や *Candida* sp. などと報告されるようになってきている。また、検査の外部委託により、検査結果報告がこれまで以上に時間がかかるようになり、早期治療が必要な深在性真菌症の診療上にも支障をきたすおそれが出ている。このため、余分な費用をかけず、迅速に簡便に深在性真菌症として頻度の高い菌種の同定方法が強く求められている。

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

にどこの検査室でも使用できるものとはい難かった。無論、PCR などの技術を用いて、迅速診断を行うことは可能であるが、機器、手間、費用の問題がある。

私はたまたま、本研究班で昨年度から続けている我が国における深在性真菌症由来菌株のカルチャーコレクション構築において、全国から寄せられた菌株の保存・同定を行っている際に、偶然、*C. glabrata* がヒツジ血液寒天平板上でほとんど発育しないことを見いだした。このような性質を持つ真菌はヒトに病原性を示す酵母様真菌の中では、同菌に限られていた。このため、検査室にほお普及している CHROMagar Candida と微生物検査室ならどこでも常用している血液寒天平板、真菌培養によく用いられるサブローデキストロース寒天平板の3種を組み合わせれば、*Candida* 主要4菌種と *C. krusei* の5菌種が簡便に同定できるものと考え、検討を行った。

B. 研究方法

基準株及び26S rRNA gene D1/D2 region の DNA sequence により菌種同定を行った CHROMagar 上で淡ピンク～紫を示すヒト感染症の起原菌として知られる *Candida* 8菌種 (*C. parapsilosis* group-*C. parapsilosis* 34株, *C. metapsilosis* 5株, *C. orhtopsilosis* 2株, 及び *C. lusitanae* (*Clavispora lusitaniae*) 4株, *C. guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*) 3株, *C. utilis* (*Pichia jadinii*) 1株, *C. pelliculosa* (*Pichia anomala*) 1株, *C. glabrata* 46株)と *C. parapsilosis* 近縁の *Lodderomyces elongisporus* 5株の計101株を用いた。培地には微生物検査室で通常の臨床検体の分離培養に汎用されている血液寒天平板生培地

7種類(トリプチックソイ 5%ヒツジ血液寒天-BD, ヒツジ血液寒天 (M)-BD, 5血液寒天培地(ウマ)-極東製薬、血液寒天培地(ヒツジ)-極東製薬、ポアメディア羊血液寒天培地-栄研化学、ニッスイプレート羊血液寒天培地-日水製薬、緬羊血液寒天培地-コージンバイオ)、CHROMagar Candida(関東科学)、サブローデキストロース寒天(コージンバイオ)を用いた。

各菌株は滅菌生理食塩水中で MacFarland 1.0 の菌液を作成し、滅菌綿棒で各培地に分画接種した。37°C、好気培養を行い、24時間後に増殖の有無を判定した。血液寒天での増殖性はサブローデキストロース寒天上での発育と比較し、血液寒天上での増殖が認められないか明らかに不良な場合(コロニーサイズが0.1 mm以下)に陰性、ほぼ同等ないし血液寒天上でより良好な発育を認めるものを陽性とした。

また、臨床検体から直接 CHROMagar Candida 上で分離培養(37°C、24時間)されたピンク～紫色のコロニーについて、血液寒天上での増殖性で *C. glabrata*, *C. parapsilosis* の簡易同定を行い、遺伝子同定結果との比較を行った(図2)。

C. 研究結果

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