

78.6%、クリプトコックス症の 65.5%、ムコール症の 55.6%に見られ、そのうち約 70%は呼吸器のみの感染であった。中でも、肺に常在しやすいニューモシスチス症は、全例が肺のみの罹患で、IFI が直接死因であり、日和見状態における組織侵襲の強さが明らかであった。皮膚や消化管の常在菌であるカンジダ症でも、49.6%で呼吸器に感染していた。そのうち約 70%は、他臓器への感染を伴った全身播種症例であった。

泌尿器への感染は、呼吸器に次いで多く、カンジダ症の 30%に、クリプトコックス症とムコール症の 20%に認められた。

また、カンジダ症の約 30%に心血管系の感染を、クリプトコックス症とムコール症の約 20%に神経系への感染を認めた。重複感染例では、単一菌感染例と比較し、全身播種の頻度が 3-4 倍であった。

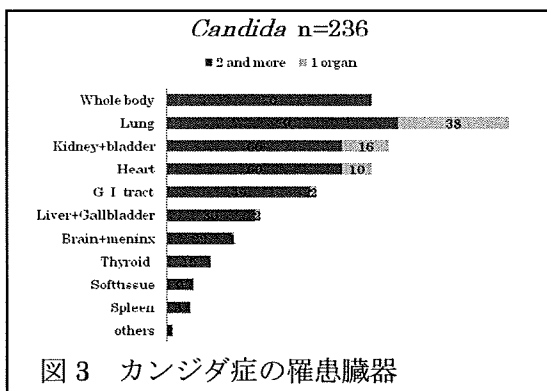


図 3 カンジダ症の罹患臓器

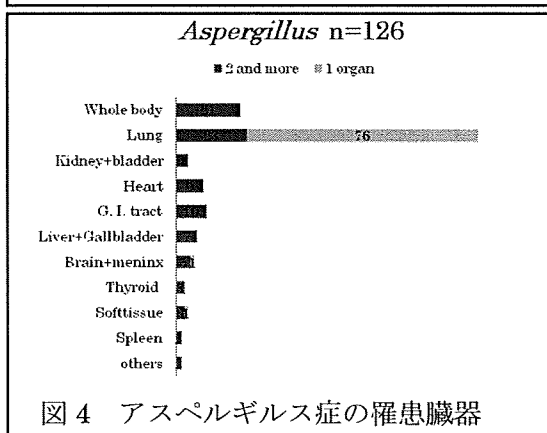


図 4 アスペルギルス症の罹患臓器

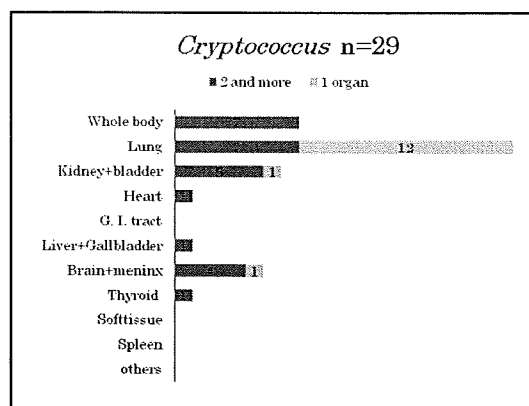


図 5 クリプトコックス症の罹患臓器

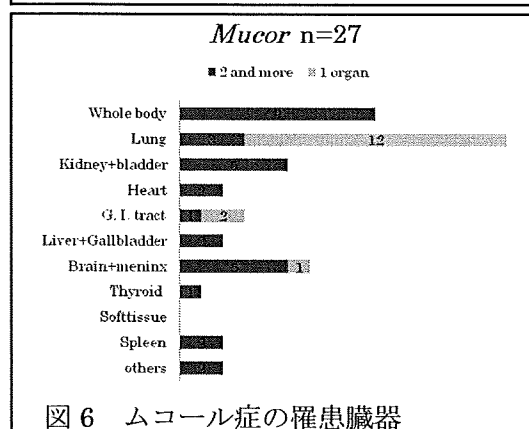


図 6 ムコール症の罹患臓器

4. 年齢 (図 7、8)

70代が最も多く (22.3%)、60歳以上で 51.8%を占め、20歳未満は 17.3%であった。新生児例の全例がカンジダ症で、10代ではムコール症、20-30代ではクリプトコックス症、30代ではアスペルギルス症、40代では重複感染例、70代ではニューモシスチス症の割合が高く、IFI 全体の約 2-4 倍であった。

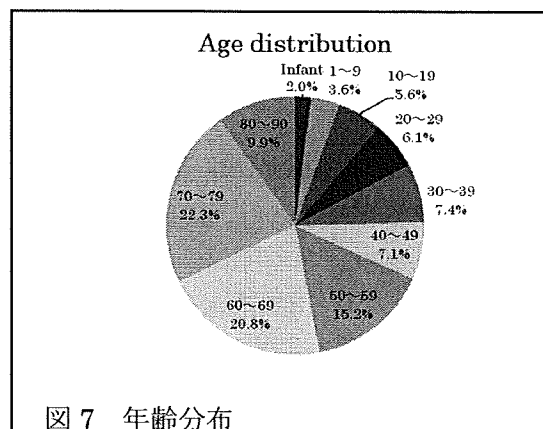


図 7 年齢分布

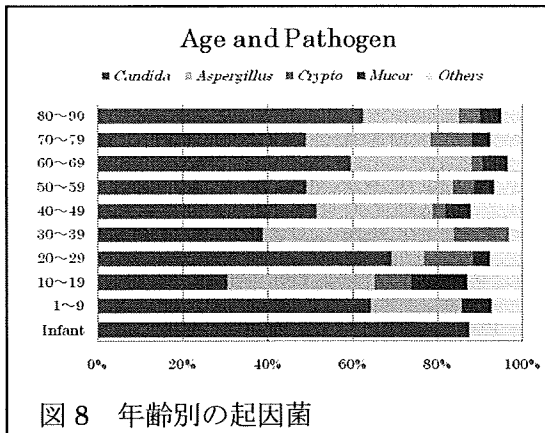


図 8 年齢別の起因菌

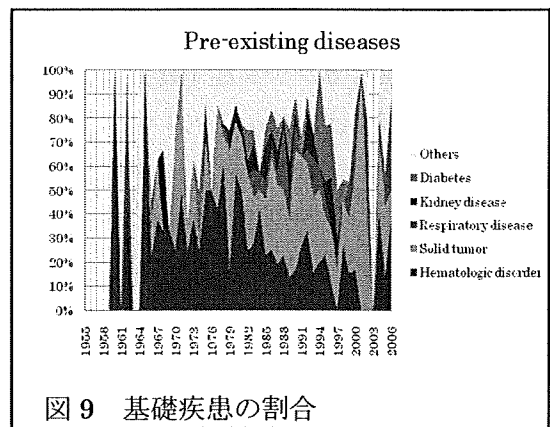


図 9 基礎疾患の割合

5. 基礎疾患 (図 9)

血液疾患 32.1%、固形臓器腫瘍 30.0%、呼吸器疾患 9.5%、腎疾患 7.2%、糖尿病 6.7%と、血液疾患と固形腫瘍を合わせた悪性疾患が、約 60%を占めていた。重複感染例においても同様の分布であった。

新生児例は、先天奇形の術後状態や早産児であった。特に、乳児を除く 20 歳未満の 78.9%が血液疾患患者で、50 代では肝疾患 (11.8%)、80 代では肺疾患 (19.6%) の有病率が、IFI 全体と比べ約 2 - 3 倍であった。

菌種別にみると、特にムコール症では、血液疾患の有病率が 46.9%と、IFI 全体に比べ 1.5 倍であった。

血液疾患と固形腫瘍の有病率の経年的な推移は差異が無く、1980 年代までは各約 30%を占め、その後漸増し、1992 - 1993 年の 40.0%をピークに、減少傾向を示した。

呼吸器疾患の有病率は 1983 年より増加の一途をたどっていた。

近年 (2001 - 2006 年) でも、血液疾患 (25.8%) と固形腫瘍 (35.5%) で約 60%を占め、次いで呼吸器疾患 (22.6%) も多くを占めていた。1999 年以後、腎疾患と糖尿病の患者は見られなかった。このように、基礎疾患は、悪性疾患が多く、加えて呼吸器疾患の患者が増加傾向にあった。

6. 血液疾患症例 (図 10)

白血病 66.7%、悪性リンパ腫 15.2%と、両者で約 85%を占めていた。白血病では急性、骨髄性の症例が 71.3%であった。

経年的には、白血病は減少傾向、悪性リンパ腫は漸増傾向にあり、近年では各 25%を占めていた。IFI の内訳はカンジダ症 (39.3%) とアスペルギルス症 (33.6%) で約半数を占め、ムコール症 (10.7%) の割合は IFI 全体と比べ約 2 倍で、幹細胞移植症例 (n=5) では約 3 倍であった。

経年的推移は IFI 全体と同様であった。血液疾患症例においても、近年 (2001 - 2006 年) は、アスペルギルス症 (50.0%) とムコール症 (37.5%) といった糸状菌感染症がほとんどを占め、カンジダ症は見られなくなった。特に、ムコール症は全例が血液疾患患者であった。

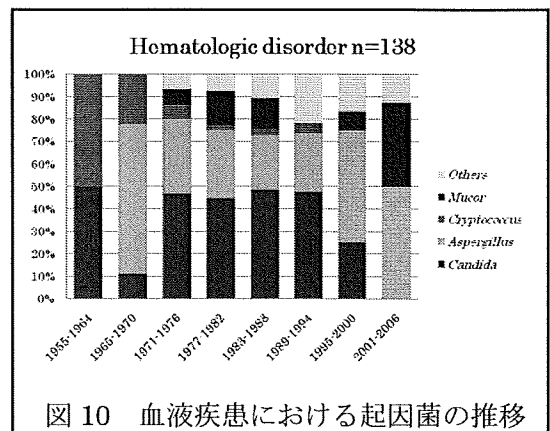


図 10 血液疾患における起因菌の推移

7. 固形臓器腫瘍症例 (図 11、12)

IFI の内訳はカンジダ症 (61.6%)、アスペルギルス症 (22.5%)、クリプトコックス症 (8.7%) で、IFI 全体とほぼ同様であった。経年的な推移も全体と変わらず、近年 (2001~2006 年) では、アスペルギルス症が 63.6% を占め、次いでカンジダ症が 18.2% に見られた。

固形臓器腫瘍の侵襲臓器は、多いものより、肺、胃、結腸および直腸、肝臓、胆嚢胆管、食道であった。同期間の日本全体の部位別癌罹患数の割合と比較すると、IFI では肺癌の罹患患者が多かった(2)。IFI では経年的に肺癌患者が増加の一途を辿り、近年では固形臓器腫瘍患者の約 40% を占めていた。IFI 全体と比べると、肺癌では、アスペルギルス症が 1.6 倍 (44.4%)、クリプトコックス症は 3.4 倍 (22.2%) であった。

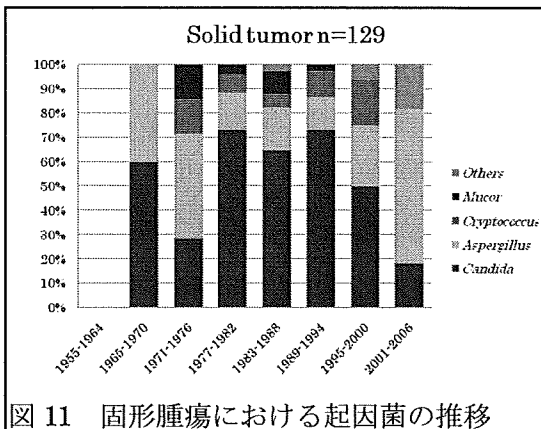


図 11 固形腫瘍における起因菌の推移

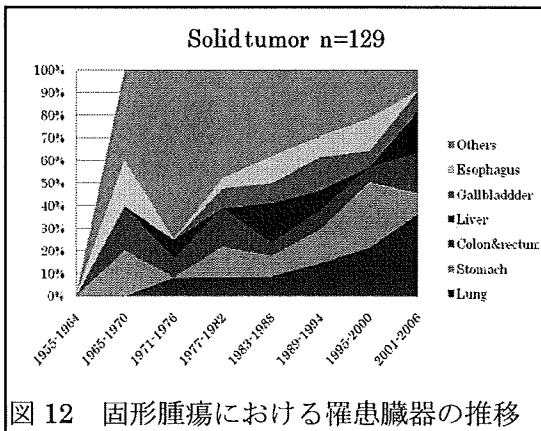


図 12 固形腫瘍における罹患臓器の推移

8. 呼吸器疾患症例 (図 13)

肺結核 39.0%、間質性肺炎 31.7%、肺気腫 19.5% であった。IFI 全体と比べ、アスペルギルス症 (46.3%) は 1.6 倍、クリプトコックス症 (9.8%) は 1.5 倍であった。経年的推移は IFI 全体と同様であった。

近年 (2001~2006 年) でも、アスペルギルス症の割合は (85.7%) と、IFI 全体と比べ 1.6 倍と頻度が高く、またその他は全例カンジダ症 (14.3%) であった。

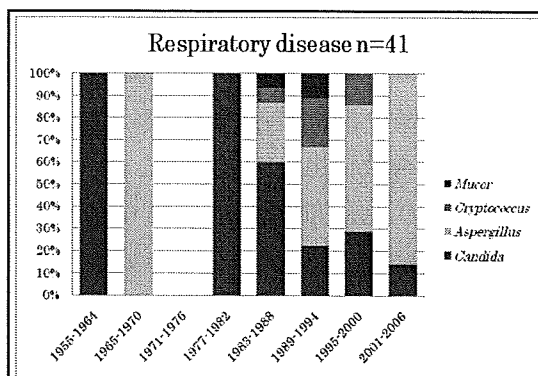


図 13 呼吸器疾患における起因菌の推移

9. 基礎疾患の無い症例

基礎疾患の無い症例は、IFI 全体の 1.9% (n=8) で、IFI が直接死因であった。

78 歳以上の高齢者が多く、カンジダ症 (66.7%) やアスペルギルス症 (16.7%) による全身播種であった。また、30 代のクリプトコックス症による脳髄膜炎例が 2 例あり、罹患率は総剖検数の 0.02%、IFI の 0.5% であった。1999 年以後、基礎疾患の無い症例は見られなかった。

D. 考察

当院における IFI に関して、1955 年から 2006 年の 52 年間に渡る剖検記録に基づく発生動向について検討した。

52 年間の剖検総数に対する IFI の総罹患率は 4.2% であり、罹患率は 1966 年より 1989 年を頂 (9.4%) とする漸増傾向を

示し、カンジダ症がそのほとんどを占めていた。これは、世界的にも抗菌薬の使用や血管内留置カテーテルの使用によるカンジダ症の急激な増加が問題となっていた時期である(3, 4)。

その後、Fluconazole (FLCZ) が承認され、総罹患率とこれに占めるカンジダ症とクリプトコックス症の割合は漸減した。これらは FLCZ の病原酵母に対する秀逸な効果の象徴と理解される。

一方、アスペルギルス症やムコール症等の侵襲性糸状菌感染症が IFI を占める割合は増加傾向にあった。これらの傾向は、1969 年から検討されていた日本全体の剖検輯報を用いた既存の報告とほぼ同様であった(5-8)。

使用可能な抗真菌薬は増えているが、近年でも総罹患率は未だに 4.2%と 52 年間の平均と同様で、侵襲性糸状菌感染症が IFI の 60%以上を、カンジダ症が IFI の 20%を占めていることが確認された。

特に、アスペルギルス症は、呼吸器疾患患者のほとんどの起因菌であり、ムコール症例は、全て血液疾患患者であった。人は毎日無数の真菌を吸い込んでいるため肺が最も感染しやすい臓器である。実際に *Candida* 以外の菌種による IFI は、約 75% が肺単独の感染であった。特に、ニューモシスチス症は、全例が肺単独の感染症であり、また、直接死因ともなっており、その侵襲性の強さが示唆された。また、肺癌を含めた呼吸器疾患患者における IFI の発症率は、52 年間を通して増加の一途を辿っていた。これは、抗腫瘍薬やステロイド治療による日和見患者の増加に加え、糸状菌の侵入門戸となる呼吸器の構造改変に基づく解剖生理学的易感染性の獲得による IFI 罹患率の増加が伺われる。カンジダ

症例では、肺病変を有する症例の約半数が多臓器感染をきたしており、カンジダ症による肺病変の多くは全身性カンジダ症の部分症であると考えられた。

クリプトコックス症も侵入門戸は肺であるが、本症は不顕性感染が知られており、一般にその罹患率は不明である(9)。中枢神経親和性が高く、日和見状態では急速に進行する致死性の感染症であり、我々の検討では基礎疾患を有さない30代での髄膜炎症例を全剖検数の0.02%、IFIの0.5%に認めた。2000年以後クリプトコックス症の剖検例はなく、抗真菌薬の感受性が良好であることや環境整備が改善された影響がうかがえた。

E. 結論

IFI は、近年でも剖検数の 4.2%に見られ、これは 52 年間の平均と一致した。近年では、アスペルギルス症やムコール症といった侵襲性糸状菌感染症が 60%を、また、カンジダ症も未だに 20%を占めていた。糸状菌に対する有効な抗真菌薬は限られており、また、酵母であっても菌種よる薬剤感受性の相違や耐性化が報告されている。したがって、適切な治療薬選択の合理的な根拠となる、迅速で高精度の診断法の開発が喫緊の要件である(10)。

参考文献

1. 社団法人 日本病理学会 剖検輯報とデータベース
<http://jsp.umin.ac.jp/public/autopsy/index.html>
2. 国立がんセンター 癌対策センター
<http://ganjoho.jp/public/index.html>
3. Jeffrey J et al. Hospital-Acquired Funginemia. Am J Med. 67: 51-8,

1979.

4. Victoria J et al. Candidemia in a Tertiary Care Hospital: Epidemiology, Risk Factors, and Predictors of Mortality. *Clin Infect Dis.* 15:414-21, 1992.
5. 久米光ら 白血病 (MDS を含む) 剖検例における内臓真菌症の疫学 日本病理剖検輯報 (1990,1994,1998,2002年版)の解析 日本医真菌学会雑誌 47: 15-24,2006.
6. Yamazaki T et al. Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in annual of the pathological autopsy cases in Japan. *J Clin Microbiol.* 37: 1732-8, 1999.
7. Kume H et al. Increase in aspergillosis and severe mycotic infection in patients with leukemia and MDS: comparison of the data from the Annual of the Pathological Autopsy Cases in Japan in 1989, 1993 and 1997. *Pathol Int.* 53: 744-50, 2003.
8. 蔦幸治 剖検例よりみた深在性真菌症の解析と課題 日本臨床 58: 969-76, 2000.
9. 山口英世 著 病原真菌と真菌症 南山堂
10. Sofia P et al. Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. *Clin. Infect. Dis.* 35: 1073-80, 2002

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. Shimodaira K, Nakayama H, Saji T, Shibuya K. A Road of Invasive Fungal Infection in Toho University. The 6TH Joint Seminar on Biomedical Sciences among Prince of Songkla Univ, Chiang Mai Univ, Kuming Medical Univ, and Toho Univ. Tokyo, Japan, 2009.
2. 下平佳代子、中山晴雄、篠崎 稔、大久保陽一郎、職 珠玉、若山 恵、井手忠、渋谷和俊 病理からみた東邦大学における侵襲性糸状菌感染症の変遷。第3回アスペルギルス研究会、千葉2009年。

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）
「COPD等における難治性感染症の病態把握等に関する研究」班
分担研究報告書

慢性壊死性肺糸状菌感染症における新たな抗原検索に関する研究

研究分担者	山越 智	国立感染症研究所	生物活性物質部
研究協力者	大野秀明	国立感染症研究所	生物活性物質部
	岡部智也	株式会社ACTgen	
	梅山 隆	国立感染症研究所	生物活性物質部
	田辺公一	国立感染症研究所	生物活性物質部
	宮崎義継	国立感染症研究所	生物活性物質部

研究要旨 慢性壊死性肺アスペルギルス症（CNPA）は、COPD等において、時に致死性である。その診断においては、アスペルギルスガラクトマンナン抗原検出法が、比較的信頼性の高い検査として使用されているが、感度・特異度が十分とはいえず、より有用な診断系の開発が望まれている。このような背景のもと、CNPAの早期診断系樹立を目的として、前年度、細胞外蛋白質を網羅的に同定できるシグナルシーケンストラップ（SST-REX）法を用い、*Aspergillus fumigatus*の細胞外蛋白質をコードする75種類の遺伝子を同定した。その中から、遺伝子情報とクローニング数を考慮し、21種類を選出し、さらに出芽酵母発現系により分泌が確認された10種類を候補蛋白質として選択し、モノクローナル抗体（mAb）を作製した。候補蛋白質の中で最も多く分泌を認めたY-1蛋白質に対しては、ポリクローナル抗体（pAb）も作製し、mAbとpAbによるサンドイッチELISA法を構築した。Y-1蛋白質に対するサンドイッチELISA法は、感度・特異度とも良好であり、今後、新規診断系への応用が期待される結果となった。

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等に伴い、近年、深在性真菌症も増加傾向を示している。特に、慢性壊死性肺アスペルギルス症（CNPA）は、COPD等に発症しやすい疾患であり、時に致死性である。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、CNPAの早期診断系樹立を目的として、前年度、哺乳類の細胞表層および分泌蛋白質を網羅的に同定できるシグナルシーケンストラップ（SST-REX）法を用い、*Aspergillus*

fumigatus (*A. fumigatus*) の膜蛋白質、分泌蛋白質の同定を行い、75種類の遺伝子を得ることができた。今年度は、その成果を診断系に応用することを目標として、分泌蛋白質の検出系の確立を試みた。

B. 研究方法

1. *A. fumigatus* RNA の抽出

A. fumigatus 臨床分離株 MF-13 の分生子を YPD 培地に接種し、37°C で 3 日間培養した。分生子が菌糸を形成し、直径約 5-10mm の球状になるまで培養し、集菌した後、total RNA を調整した。

2. 遺伝子のクローニング

クローニングの対象として、SST-REX 法で同定された分泌蛋白質ないし膜蛋白質をコードすると考えられる 75 種類の遺伝子の中から、ゲノムデータベースに記載されているアノテーション情報と、得られたクローン数を考慮し、21 種類の遺伝子を選出した。

1 で得られた RNA から、oligo-dT をテンプレートとした逆転写反応により、cDNA を合成した後、対象とした 21 種類の遺伝子のコーディング領域を PCR 法により増幅し、pBluescript II を用いてクローニングした。

3. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) 発現系による分泌の確認

クローニングした遺伝子を、蛋白質の C 末端に HA tag を付加することのできる pADH-HA 発現ベクターに挿入し、*S. cerevisiae* に導入した。培養上清を回収後、抗 HA 抗体により免疫沈降したのち、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロット (WB) を行い、分泌蛋白質であるかを確認した。

4. 大腸菌による組換え蛋白質の作製

クローニングした遺伝子を pGEX-6P-1 に入れ、大腸菌による大量培養を行い、標的蛋白質 (Y-1、Y-58、Y-68 蛋白質) のグルタチオン S - トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質を作製した。GST 融合蛋白質は、Glutathione Sepharose カラムにより精製した。

精製した蛋白質は、WB およびサンドイッチ ELISA のコントロールとして用いた。Y-1 蛋白質においては、ウサギによるポリクローナル抗体 (pAb) 作製のための抗原としても使用した。

5. サンドイッチ ELISA 系の構築

モノクローナル抗体 (mAb) あるいは pAb を、NHS-LC-biotin (PIEACE 社) を用いビオチン化した。大腸菌で作製した蛋白質を、5 mg/ml、50 μ l/well で 96 穴マイクロプレートに吸着させ、抗原プレートを作製し、これを用いてビオチン化した抗体の力価を確認し、サンドイッチ ELISA 法の 2 次抗体として濃度を検討した。

サンドイッチ ELISA 法の条件検討のため、修飾していない各濃度の mAb あるいは pAb を用いた抗体感作プレートを作製し、1 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.01 μ g/ml、0 μ g/ml の各濃度の組換え体蛋白質を反応させ、さらに 2 次反応としてあらかじめ濃度を決めたビオチン化抗体を反応させた。3 次反応として Neutravidin-POD を反応させた後、酵素発色基質を加え発色させ、吸光度を測定した。

C. 研究結果

1. *S. cerevisiae* を用いた発現系による分泌の確認

クローニングした 21 種類の候補遺伝子

のうち、10種類の遺伝子において蛋白質の分泌が確認された。

2. mAb の作製と評価

分泌が確認された 10 種類の蛋白質について mAb の作製を行った。SST-REX 法により作製された SST クローン (BA/F3 細胞にそれぞれの遺伝子が導入され、膜表面にその産物が提示されている細胞) を直接マウスに免疫して、mAb を産生するハイブリドーマを樹立した。Y-1、Y-58、Y-68 遺伝子については、複数のハイブリドーマが得られた (各 4、9、10 個)。

Y-1、Y-58、Y-68 遺伝子について、それぞれのハイブリドーマの培養上清を用い、大腸菌で作製した融合蛋白質を抗原とする WB 法および ELISA 法を行い、力価と特異性を検討した。

残りの 7 遺伝子については現在ハイブリドーマのスクリーニングを行っている。

3. Y-1 蛋白質検出のためのサンドイッチ ELISA 系の構築

SST-REX 法により最も多く同定された Y-1 蛋白質に対するサンドイッチ ELISA 系の構築を試みた。得られた 4 種類の mAb を用い、全ての組み合わせで構築を試みたが、組換え体 Y-1 蛋白質の濃度依存性を示す結果が得られなかった。そこで、mAb と pAb によるサンドイッチ ELISA の構築を試みた。

まず、ウサギに Y-1 組換え体を免疫し、pAb を作製した。サンドイッチ ELISA の 1 次抗体として 4 種類の mAb を、2 次抗体としてビオチン化した pAb を用いた。

その結果、4 種類の mAb のうち、いずれの mAb を用いても、組換え体 Y-1 蛋白質の濃度依存性を示す結果が得られた。また、

0.3 ng/ml までの感度が得られた (図 1)。

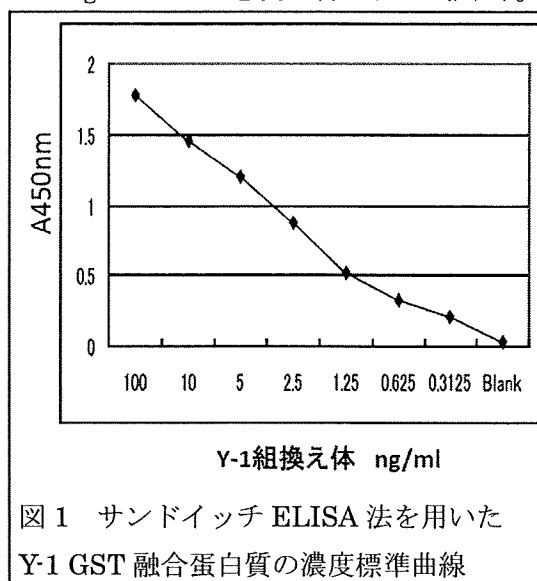


図 1 サンドイッチ ELISA 法を用いた Y-1 GST 融合蛋白質の濃度標準曲線

4. Y-1 サンドイッチ ELISA 系の評価: *A. fumigatus* 培養上清中の Y-1 蛋白質の測定

A. fumigatus を様々な種類の培地を用いて 30°C で振盪培養を行い、その培養上清中の Y-1 蛋白質の量を、図 1 と同様の条件で測定した。その結果、培地により Y-1 蛋白質の分泌量が変化することが判明した (図 2)。

また、培地に 10% の血清を加えて培養すると、バックグラウンドが高くなり、測定不能となることが判明した。

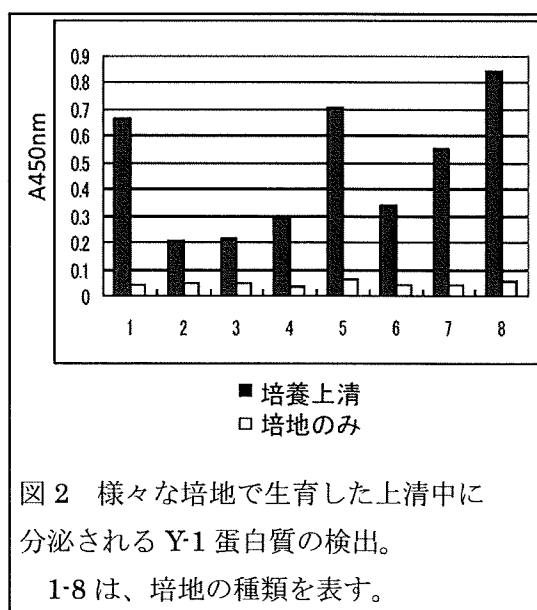


図 2 様々な培地で生育した上清中に分泌される Y-1 蛋白質の検出。
1-8 は、培地の種類を表す。

D. 考察

前年度、本研究では計 465 個のクローンから 75 種類の遺伝子が同定された。そのうち、本年度は、バイオインフォーマティクスの手法等を用い、21 種類の分泌候補蛋白質を選出した。さらに、*S. cerevisiae* 発現系により分泌が確認された 10 種類の蛋白質を、診断系の標的蛋白質候補とした。

まず初めに、最も多く分泌していることが推定された Y-1 蛋白質に対する検出系の構築を試みた。mAb のみによる ELISA では検出できなかったため、mAb と pAb を組み合わせたサンドイッチ ELISA 系を構築した。1 次抗体として用いた 4 種類の mAb のうち、2 種類に関しては再現性の確認をし、同程度の感度が得られること、また、培養上清中の Y-1 蛋白質検出の定量性もほとんど差がないことを確認した。したがって、構築したサンドイッチ ELISA 系が、特異的に Y-1 蛋白質を検出していることが示唆された。

同じサンプル(培養上清)を用いて、mAb または pAb による WB を試みたが、Y-1 は検出できなかった。この結果から、WB に比べ、サンドイッチ ELISA 法が、感度の点で有効であると考えられた。

mAb だけでサンドイッチ ELISA 系を組めなかった理由として、これらの mAb が、同じエピトープを認識している可能性が考えられた。

また、10%血清添加培地を用いると、バックグラウンドが高くなり、ELISA 系での測定ができなかった。この点については、ELISA 系の感度を上げ、サンプルを希釈することで血清の影響を排除できないか等、さらに条件を検討する必要がある。

他の分泌蛋白質の候補についても、同様に、抗体の作製、および ELISA 系の構築を

行う予定である。

E. 結論

SST-REX法を用いて*A. fumigatus*の細胞外蛋白質の網羅的検出を行ない、新規分泌蛋白質をターゲットとして、サンドイッチ ELISA系を構築した。

Y-1蛋白質に対するサンドイッチ ELISA 系は、感度・特異度、および定量性に関して良好な成績が得られ、今後、新規診断系への応用が期待される結果となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. Internal Medicine (in press).
2. Okumura A, Suzuki T, Dohmae N, Okabe T, Hashimoto Y, Nakazato K, Ohno H, Miyazaki Y, Yamagoe S. Identification and assignment of three disulfide bonds in mammalian leukocyte cell-derived chemotaxin 2 by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. BioScience Trends. 3:139-143, 2009.

学会発表

国際学会

1. Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Evaluation of Mycological Character and Early Immune Response against Different Structures of Cell Surface Mannan of *Candida albicans*. 109th General meeting of American Society for Microbiology, Philadelphia 2009.
2. Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Characterization of mycological features of putative α -type mannosyltransferase deleted *Candida albicans*. 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Tokyo 2009.
- 同研究者：斎藤 武、大野秀明、宮崎義継) ガラクトサミン/LPS肝障害モデルを用いたLECT2の機能解析 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009。
5. 大森深雪、安藤一義、上芝 秀博、有村祐、山越 智、鈴木和男、八木 淳二 敗血症におけるLECT2の役割 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

国内学会

1. 大川原明子、山越 智、金子幸弘、大野秀明、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83回 日本感染症学会 2009。
2. 田辺公一、名木稔、新見昌一、山越智、梅山隆、大野秀明、宮崎義継 血清による *Candida albicans*のazole系抗真菌薬感受性の変化の検討 第58回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第56回日本化学療法学会東日本支部総会・合同学会 2009。
3. 山越 智、大野秀明、宮崎義継 アスペルギルス属の表層蛋白質をターゲットとしたアスペルギルス症の新しい診断・治療法開発の試み 第30回関東医真菌懇話会 2009
4. 奥村彰規、大川原明子、山越智 (共

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「COPD等における難治性感染症の病態把握等に関する研究」班
分担研究報告書

*Aspergillus fumigatus*の遺伝子破壊と機能解析について

研究分担者 宮崎義継 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究協力者 梅山 隆 国立感染症研究所 生物活性物質部
山越 智 国立感染症研究所 生物活性物質部
田辺公一 国立感染症研究所 生物活性物質部
大野秀明 国立感染症研究所 生物活性物質部

研究要旨 慢性壊死性肺アスペルギルス症（CNPA）は、COPD等において、時に致死的となる感染症の一つである。その治療法は限られているため、新たな治療法の確立が求められている。一方、診断系を確立する目的で、これまでに、シグナルシーケンストラップ（SST-REX）法を用いて、CNPAの主要原因真菌である*Aspergillus fumigatus*の細胞外蛋白質を複数同定してきた。細胞外蛋白質の一部は、病原因子として分泌されていると考えられ、SST-REX法により同定された蛋白質の機能を解明することは、新たな治療法の開発につながると期待される。今回は、同定された遺伝子中で最も発現量が高いと推定されたY-1遺伝子の破壊株を作製し、その性状解析を行った。その結果、Y-1遺伝子は孢子形成に関連していることが示唆され、CNPAの病態を解明する有用な手掛かりが得られた。

A. 研究目的

慢性壊死性肺アスペルギルス症（CNPA）は、COPD等において、時に致死的であり、合併する感染症として重要であるにも関わらず、その感染機構、病原因子についてはほとんど分かっていない。

一方、診断系を確立する目的で、これまでに、シグナルシーケンストラップ（SST-REX）法を用いて、CNPAの主要原因真菌である*Aspergillus fumigatus*（*A. fumigatus*）の細胞外蛋白質を複数同定してきた。細胞外蛋白質の一部は、病原因子として分泌されていると考えられ、SST-REX法により同定された蛋白質の機能を解明す

ることは、新たな治療法の開発につながると期待される。

今回、同定された蛋白質とCNPAの発症機構との関連を解明する目的で、最も発現量が高いと推定されたY-1遺伝子の破壊株を作製し、その性状を解析した。

B. 研究方法

1. 遺伝子破壊に用いた *A. fumigatus* 株

Fungal Genetics Stock Center から、臨床分離株 D141 に由来する Afs35 を購入し、破壊株作製に用いた。この株は *akuA* 遺伝子が欠失しており、相同組換えの頻度が高くなっている。

2. 遺伝子のクローニング

遺伝子破壊に用いる DNA 断片（遺伝子破壊用 DNA 断片）は、以下のようにして調整した。

Afs35 株のゲノム DNA を精製し、PCR にて、Y-1 遺伝子の 5'側および 3'側のそれぞれの non-coding 領域、約 500bp ずつを増幅させ、薬剤耐性遺伝子（ハイグロマイシン）の両側に連結して pBluescript II へクローニングした。シークエンスにより、期待される組換え体を確認後、それを鋳型として遺伝子破壊用 DNA 断片を PCR で増幅した。

3. *A. fumigatus* プロトプラストへの遺伝子破壊用 DNA 断片の導入

Afs35 株を培養後、細胞壁を酵素処理により消化し、プロトプラストを調整した。その後、CaCl₂ と PEG を用い、遺伝子破壊用 DNA 断片を導入し、寒天培地に播き、ハイグロマイシン 200µg/ml で選択した。30°C で培養し、出現したコロニーを分離後、それぞれの胞子を直接 PCR にかけて Y-1 遺伝子の破壊株（Y-1 破壊株）を同定した。

4. 各種培地での生育の比較

アスペルギルス最少培地、SD 培地、PDA 培地、YPD 培地、Spider 培地、YG 培地、および、それらに新生子牛血清（NCS）を 10% 加えた寒天培地を調整した。それらの培地に胞子懸濁液をスポットし、30°C、3 日間培養し、生育を親株と比較した。

5. Y-1 蛋白質の分泌量の比較

親株 Afs35 株を、上記の各培地で培養し、培養上清中の Y-1 蛋白質の分泌量を、サンドイッチ ELISA 法を用いて測定した（分担報告書「慢性壊死性肺炎糸状菌感染症にお

ける新たな抗原検索に関する研究」参照）。

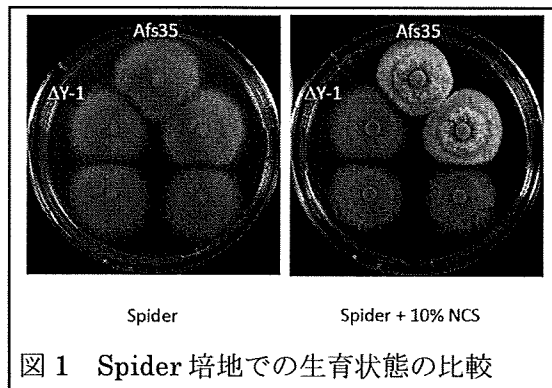
C. 研究結果

1. Y-1 破壊株の同定

ハイグロマイシンで選択された 9 コロニーのうち、PCR による同定の結果、6 コロニーが期待される Y-1 破壊株であることが確認された。

2. Y-1 破壊株と親株の生育状態の比較

Y-1 破壊株 3 株とその親株 Afs35 株を、アスペルギルス最少培地、SD 培地、PDA 培地、YPD 培地、Spider 培地、および、それらに 10%NCS を添加した寒天培地で殖菌し、生育状態を比較した。どの培地においても、生育速度には差が見られなかった。しかし、10%NCS 添加 Spider 培地（Spider+10%NCS）において、コロニー表面の状態に差を認めた（図 1）。



3. Y-1 蛋白質の分泌量に及ぼす培地の影響

Spider+10%NCS での表現型の相違の原因を解明するため、Y-1 蛋白質の分泌量に及ぼす培地の影響を検討した。

最少培地および Spider 培地で、Y-1 蛋白質が多く分泌されることが確認された。しかしながら、10%NCS 添加培地での分泌量が測定できず、分泌量を比較することができなかった。検出に用いたサンドイッチ ELISA 系自体が、血清添加の影響を受ける

ためと考えられ、今後、測定法を改良して再検討する必要がある。

D. 考察

本研究では、選択培地で分離された 9 コロニーのうち、6 株の Y-1 破壊株が得られた。このように高頻度で破壊株が得られたのは、親株の性質によるものと考えられる。

Spider+10%NCS において、コロニー表面の性状に差を認めたが、この差は孢子形成異常に由来すると推察され、Y-1 遺伝子は孢子形成に関連していることが示唆された。

また、今回は検出系の限界により比較できなかったが、Y-1 蛋白質の分泌に及ぼす培地および血清の影響を解明すれば、Y-1 蛋白質の生成およびその制御メカニズムを知る手掛かりとなる可能性がある。さらに、Y-1 蛋白質の病原性との関連が明らかになれば、Y-1 蛋白質生成の制御は治療法の開発にも寄与することが期待される。

今後は、*in vitro*での解析を継続するとともに、マウス感染モデルを用いた*in vivo*での解析も検討中である。

E. 結論

*A. fumigatus*のY-1破壊株を作製し、その性状解析を行った。その結果、Y-1遺伝子は孢子形成と関連のあることが示唆された。孢子形成は病原性に関連していると推測されるため、Y-1蛋白質の分泌量は、CNPAの活動性の指標となりうる。

また、本研究の成果は、CNPAの病態を解明する有用な手掛かりとなり、治療への貢献も期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. Intern Med. (in press).
2. Nagi M, Tanabe K, Takano Y, Kikuchi K, Miyazaki Y, Niimi M: Serum or bile affects the *in vitro* azole susceptibilities of *Candida* spp. Jpn J Infect Dis. 62:306-308, 2009.
3. Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Pulmonary cryptococcosis in late pregnancy and review of published literature. Mycopathologia 167:125-131. 2009.
4. Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. The effects of an hsp90 inhibitor on the paradoxical effect. Jpn J Infect Dis. 62:392-393. 2009.
5. Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Anti-*Candida*-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90-related stress responses. Med Mycol. (in press).

学会発表

国際学会

1. Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Evaluation of Mycological Character and Early Immune Response against Different Structures of Cell Surface Mannan of *Candida albicans*. 109th General meeting of American Society for Microbiology, Philadelphia 2009.
2. Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Characterization of mycological features of putative α -type mannosyltransferase deleted *Candida albicans*. 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology Tokyo 2009.
3. Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Hsp90 inhibitor preferentially attenuates postnadir resistance to micafungin and tolerance to voriconazole of *Candida albicans*. 109th General Meeting, American Society for Microbiology Philadelphia 2009.
4. Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Voriconazole attenuates the effect of micafungin against *Candida* biofilms in vitro possibly via stress responses. 109th General Meeting, American Society for Microbiology Philadelphia 2009.
5. Tanabe K, Nagi M, Lamping E, Monk BC, Cannon RD, Miyazaki T, Niimi M. Domain-shuffled chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal structural determinants affecting substrate and inhibitor specificities. 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology Tokyo 2009.
6. Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Combination therapy of micafungin with voriconazole and amphotericin B against *Candida* biofilms. 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology Tokyo 2009.
7. Miyazaki Y. Management of Invasive fungal Infections focusing on Respiratory Tract Infections. International Symposium joined with 49th Congress of Japanese Respiratory Society Tokyo 2009.
8. Miyazaki Y. Antifungal Agent Update : Candins. 26th International Congress of Chemotherapy and Infection Toronto 2009.
9. Saito Y, Ogawa K, Kurashima A, Amitani R, Okimoto J, Niki Y, Miyazaki Y, Izumikawa K, Kakeya H, Kohono S. A First Randomized Trial Comparing Micafungin and Voriconazole for Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis in Japan. 49th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy San Francisco 2009.
10. Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Effects of Antifungal Combinations Against *Candida* Biofilms and Stress Responses. 49th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents

and Chemotherapy San Francisco
2009.

国内学会

1. 大川原明子、山越 智、金子幸弘、大野秀明、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83回 日本感染症学会 2009。
2. 田辺公一、名木稔、新見昌一、山越智、梅山隆、大野秀明、宮崎義継 血清による *Candida albicans* のazole系抗真菌薬感受性の変化の検討 第58回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第56回日本化学療法学会東日本支部総会・合同学会 2009。
3. 山越 智、大野秀明、宮崎義継 アスペルギルス属の表層蛋白質をターゲットとしたアスペルギルス症の新しい診断・治療法開発の試み 第30回関東医真菌懇話会 2009。
4. 宮崎義継 わが国の深在性真菌症ガイドラインの特徴と課題 第83回日本感染症学会総会学術講演会 2009。
5. 宮崎義継 真菌感染症のこれからの診断法 第83回日本感染症学会総会学術講演会 2009。
6. 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 micafungin と voriconazole、amphotericin Bとの併用効果 第83回日本感染症学会総会・学術講演会 2009。
7. 宮崎義継 教育講演「真菌感染症治療のパラダイム」 第57回日本化学療法学会総会 2009。
8. 金子幸弘、大野秀明、河野 茂、宮崎義継 難治性緑膿菌感染症に対するガ

リウム治療の効果および耐性機序に関する検討 第57回日本化学療法学会総会 2009。

9. 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継 難治性緑膿菌呼吸器感染症に対するガリウム治療の呼吸機能等に与える影響 第49回日本呼吸器学会学術講演会 2009。
10. 宮崎義継 難治性呼吸器真菌感染症の現況と制御へのアプローチ 第49回呼吸器学会学術講演会 2009。
11. 田辺公一、名木稔、新見昌一、山越智、梅山隆、大野秀明、宮崎義継 血清による *Candida albicans* のazole系抗真菌薬感受性の変化の検討 第58回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第56回日本化学療法学会東日本支部総会・合同学会 2009。
12. 宮崎義継 内臓真菌症に対する治療戦略 第30回関東医真菌懇話会 2009。
13. 宮崎義継 未承認薬を考えるーポソコナゾール 第52回日本感染症学会中日本地方会学術総会 第57回日本化学療法学会西日本支部総会 2009。

H. 知的財産権の出願・登録状況
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）
「COPD等における難治性感染症の病態把握等に関する研究」班
分担研究報告書

新たな抗原検索と診断応用に関する研究

研究分担者 掛屋 弘 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学
研究協力者 泉川公一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学

研究要旨 肺アスペルギルス症は、COPDや肺結核後遺症等の慢性呼吸器疾患を有する患者における難治性感染症の一つである。診断には真菌培養検査の他に、血清診断等があるが、その診断率は低いため、信頼性の高い新たな診断法の開発が必要である。そこで、新規診断法の樹立を目的として、臨床プロテオミクスの手法により、患者血清に特異的に検出される抗原を網羅的に検索した。検出された蛋白質のうち、アスペルギルス属に特異的な抗原として、アスペルギルス由来ユビキチン様蛋白質を同定した。さらに、本蛋白質に対する新しい抗体を作製することに成功し、現在、western blotting法等による有用性の検証作業を行っている。今後、臨床検体での評価も行い、新規診断法として開発を進める。

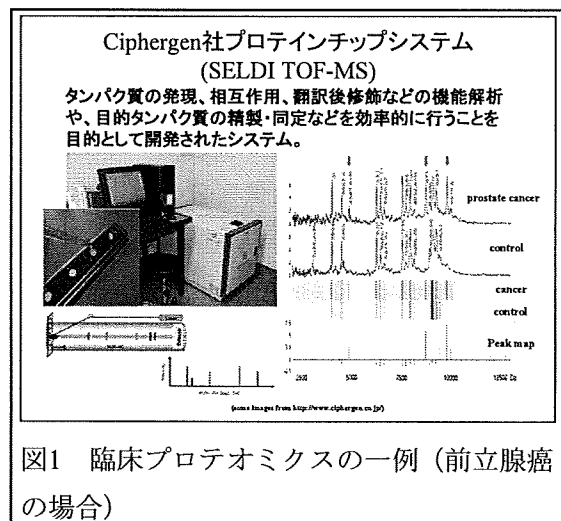
A. 研究目的

COPD等における難治性感染症として肺アスペルギルス症があげられるが、その診断率は低く、精度の高い診断システムが求められている。本研究の目的は、臨床プロテオミクスの手法により、患者血清に特異的に検出されるアスペルギルス由来の蛋白質を同定し、肺アスペルギルス症の早期診断に有用な診断系を確立することである。

B. 研究方法

1) 候補蛋白質のスクリーニング

Ciphergen社プロテインチップシステム（図1）を用いて、*Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) MF13 菌体抽出物 (Fungus)、侵襲性肺アスペルギルス症患者血清 (IPA)、健康人血清 (Healthy) 中の蛋白質を網羅的に比較した。



2) 候補蛋白質の汎用性・特異性の確認

a. アスペルギルス属間の比較

候補蛋白質が、アスペルギルス属の他の菌種にも応用可能であるかどうか、他の3菌種 (*A. niger*、*A. flavus*、*A. vesicolor*) を用いて検討した。

b. 他の病原微生物との比較

候補蛋白質の特異性を確認するため、他の病原微生物 (MSSA (メチシリン感受性黄色ブドウ球菌)、MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)、緑膿菌、*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)、および *Candida albicans* (*C. albicans*)) を用いて検討した。

3) 標的蛋白質の同定

標的蛋白質を精製後、ポリアクリルアミドゲルを用いた二次元電気泳動法、peptide mass fingerprint 法、アミノ酸シーケンスにより、標的蛋白質を同定した。

4) 標的蛋白質に対する特異抗体の作製

アミノ酸配列から、標的蛋白質に特異的と推定されたタンデムな繰り返し配列に対する抗体を作製した。

C. 研究結果

1) 候補蛋白質のスクリーニング

Fungus、IPA、Healthy 中の蛋白質のプロファイリングを行った。

Fungus および IPA に共通し、かつ、Healthy には認めない特異的な蛋白質のピークを複数発見した (図 2)。

上記のうち最も顕著であったピークを示す蛋白質を候補蛋白質とした (図 2 の丸で囲んだ部分)。

2) 候補蛋白質の汎用性・特異性の確認

アスペルギルス属の他菌種、および他の病原微生物由来の抽出蛋白質を比較した。候補蛋白質 (分子量: 8560 m/z) は、他のアスペルギルス属にも広く存在し、かつ、アスペルギルス属に特異的である可能性の高いことが示された (図 3)。

以上より、候補蛋白質の汎用性と特異性が推定されたため、この候補蛋白質を標的蛋白質とした。

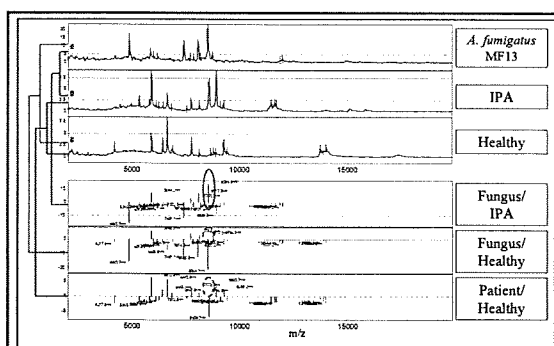


図 2 アスペルギルス菌体抽出物 (Fungus)、侵襲性肺アスペルギルス症患者の血清 (IPA)、健常人の血清 (Healthy) 中の蛋白質のプロファイリング。

上段 3 つは、各検体の各ピークを表す。

下段 3 つは、それぞれを比較 (例えば Fungus/IPA では Fungus と IPA) した場合。共通: +方向、片方のみ: -方向。

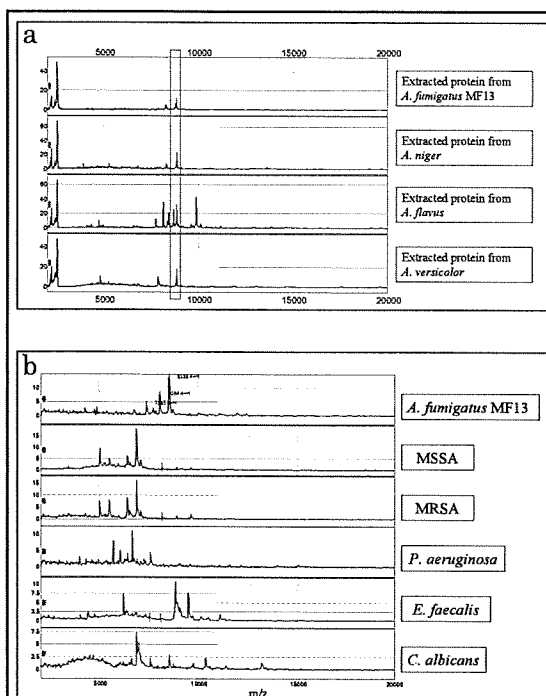


図 3 菌体抽出物中の蛋白質のプロファイリング

a. アスペルギルス属間比較

標的蛋白質は、アスペルギルス属の他の菌種にも認められた。

b. *A. fumigatus* と他の病原微生物の比較

標的蛋白質は、他の病原微生物には認められなかった。

3) 標的蛋白質の同定

標的蛋白質を精製し、再度プロファイリングを行った (図4)。さらに、アミノ酸シークエンス等により、標的蛋白質がアスペルギルス由来ユビキチン様蛋白質であることが判明した。

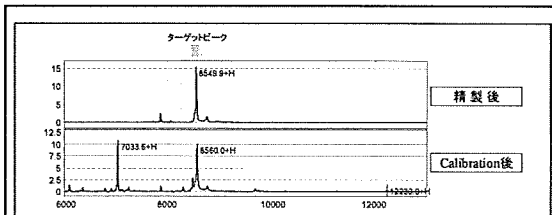


図4 標的蛋白質 (8560 m/z) 精製後のプロファイリング

4) アスペルギルス由来ユビキチン様蛋白質に対する抗体の作製

アスペルギルス由来ユビキチンとヒト由来ユビキチンは図5のように極めて類似した構造である。しかしながら、つなぎ目の配列がタンデムに3回繰り返されている点で、ヒト由来とは異なっている。

図5に示す手法により、この繰り返し領域に対する特異的抗体の作製を試みた。

得られた複数のクローンの中から、2回のELISA法による特異度・感度の確認後、1種類の抗体に絞り込んだ (図6)。

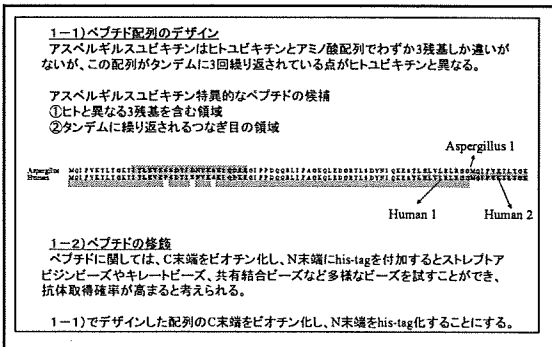


図5 アスペルギルス由来ユビキチンに特異的な抗体作製のためのデザイン

図は、アスペルギルス由来ユビキチンとヒト由来ユビキチンのアミノ酸配列を示している。

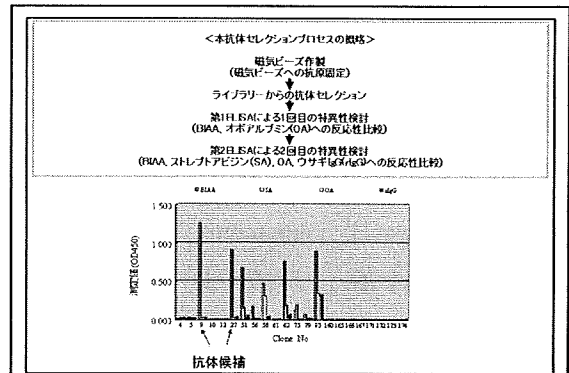


図6 アスペルギルス由来ユビキチンに特異的な抗体の作製方法 (カイオムバイオサイエンス社の協力による)

D. 考察

臨床プロテオミクス的手法により、肺アスペルギルス症に特異的と推定される標的蛋白質を見出した。標的蛋白質は、アスペルギルス由来ユビキチン様蛋白質であり、診断に有用な新規抗原となる可能性が示された。

ユビキチンは進化的な保存性が高く、全ての真核生物で似たようなアミノ酸配列を有するために、ヒト由来のユビキチンとの鑑別が必要である。現在、ヒト由来との鑑別も含め、抗体の特異性を確認するため、western blotting法等により、さらに検証を行っている。

E. 結論

臨床プロテオミクス的手法により、アスペルギルス症患者の血清に特異的に検出されるアスペルギルス由来の蛋白質を同定した。同蛋白を抗原とする特異抗体の作製にも成功し、その診断への応用が期待される結果となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Saijo T, Miyazaki T, Izumikawa K, Mihara T, Takazono T, Kosai K, Imamura Y, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Skn7p Is Involved in Oxidative Stress Response and Virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*. 169:81-90, 2010.
2. Morinaga Y, Yanagihara K, Miyashita N, Seki M, Izumikawa K, Takeya H, Yamamoto Y, Mukae H, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. Azithromycin, clarithromycin and telithromycin inhibit MUC5AC induction by *Chlamydomphila pneumoniae* in airway epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther*. 22: 580-6, 2009.
3. Yanagihara K, Kihara R, Araki N, Morinaga Y, Seki M, Izumikawa K, Takeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Tsukamoto K, Kamihira S. Efficacy of linezolid against Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse model of haematogenous pulmonary infection. *Int J Antimicrob Agents*. 34: 477-81, 2009.
4. Izumikawa K, Tomiyama Y, Ishimoto H, Sakamoto N, Imamura Y, Seki M, Sawai T, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mukae H, Yoshimura K, Kohno S. Unique mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene of three cases of cystic fibrosis in Nagasaki, Japan. *Intern Med* 48: 1327-31, 2009.
5. Takazono T, Izumikawa K, Mihara T, Kosai K, Saijo T, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Efficacy of combination antifungal therapy with intraperitoneally administered micafungin and aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 3508-10, 2009.
6. Yamamoto K, Yanagihara K, Sugahara K, Imamura Y, Seki M, Izumikawa K, Takeya H, Yamamoto Y, Hirakata Y, Kamihira S, Kohno S. In vitro activity of garenoxacin against *Streptococcus pneumoniae* mutants with characterized resistance mechanisms *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 3572-5, 2009.
7. Nakamura S, Yanagihara K, Araki N, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S. In vivo efficacy of sitafloxacin in a new murine model of non-typeable *Haemophilus influenzae* pneumonia by sterile intratracheal tube. *Int J Antimicrob Agents*. 34: 210-4, 2009.
8. Izumikawa K, Hashiguchi K, Sawai T, Inoue Y, Imamura Y, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. [Study on the blood concentration and clinical efficacy of ceftazidime, a cephem antibiotic at dose of one gram q.i.d, for adult hospital-acquired pneumonia patients] *Jpn J Antibiot*. 62: 9-16, 2009.
9. Yanagihara K, Izumikawa K, Higa F, Tateyama M, Tokimatsu I, Hiramatsu K, Fujita J, Kadota J, Kohno S. Efficacy of azithromycin in the treatment of community-acquired pneumonia, including patients with macrolide-resistant

- Streptococcus pneumoniae* infection. Intern Med. 48: 527-35, 2009.
10. Izumikawa K, Akamatsu S, Kageyama A, Okada K, Kazuyama Y, Takayanagi N, Nakamura S, Inoue Y, Higashiyama Y, Fukushima K, Ishida T, Sawai T, Yoshimura K, Nakahama C, Ohmichi M, Kakugawa T, Nishioka Y, Aoki N, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum samples from patients with lower respiratory tract infection. Clin Vaccine Immunol. 16: 672-8, 2009.
 11. Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S. Multiplex real-time polymerase chain reaction for rapid detection of beta-lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 64: 64-9, 2009.
 12. Seki M, Kosai K, Hara A, Imamura Y, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Mukae H, Tashiro T, Kohno S. Expression and DNA microarray analysis of a platelet activating factor-related molecule in severe pneumonia in mice due to influenza virus and bacterial co-infection. Jpn J Infect Dis. 62: 6-10, 2009.
 13. Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S. Melting curve analysis for rapid detection of topoisomerase gene mutations in *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 47: 781-4, 2009.
 14. Seki M, Higashiyama Y, Imamura Y, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. A clinical comparative study of piperacillin and sulbactam/ampicillin in patients with community-acquired bacterial pneumonia. Intern Med. 48: 49-55, 2009.
 15. Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Pulmonary cryptococcosis in late pregnancy and review of published literature. Mycopathologia. 167: 125-31, 2009.
 16. Imamura Y, Izumikawa K, Kohno S. [Candidiasis] Nippon Rinsho. 66: 2341-4, 2008.
 17. Nakamura S, Yanagihara K, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Mukae H, Tashiro T, Kohno S. [Efficacy of sivelestat for acute lung injury due to severe bacterial pneumonia with systemic inflammatory response syndrome] Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi. 46: 793-7, 2008.
 18. Seki M, Suyama N, Hashiguchi K, Hara A, Kosai K, Kurihara S, Nakamura S, Yamamoto K, Imamura Y, Izumikawa K, Kakaya H, Yanagihara K, Yamamoto Y, Mukae H, Tashiro T, Kohno S. A patient with fulminant influenza-related bacterial pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae* followed by