

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。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 法を行ったところ、特異バンドの検出は認めれず、新規の抗原検査法としての確立は困難となった。

E. 結論

臨床プロテオミクスの手法により、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。残念ながら、本蛋白質はアスペルギルスに対する特異性に乏しく、今後の実用化は困難であるが、本手法による解析方法は確立でき、今後の新たな抗原検索に活かせる可能性は残されている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, Takazono T, Morinaga Y, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Kohno S. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. *Med Mycol.* 2011 Jan 5.
2. Kaku N, Seki M, Doi S, Hayashi T, Imanishi D, Imamura Y, Kurihara S, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. A case of intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL) with no abnormal findings on chest computed tomography diagnosed by random transbronchial lung biopsy. *Intern Med.* 49:2697-701, 2010.
3. Morinaga Y, Yanagihara K, Nakamura S, Hasegawa H, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. *Legionella pneumophila* induces cathepsin B-dependent necrotic cell death with releasing high mobility group box1 in macrophages. *Respir Res.* 11:158, 2010.
4. Kohno S, Izumikawa K. Posaconazole for chronic pulmonary aspergillosis: The next strategy against the threat of azole-resistant *Aspergillus* infection. *Clin Infect Dis.* 51:1392-4, 2010.
5. Izumikawa K, Takazono T, Kohno S. Chronic aspergillus infections of the respiratory tract: diagnosis, management and antifungal resistance. *Curr Opin Infect Dis.* 23:584-9, 2010.
6. Yamamoto Y, Izumikawa K, Hara A, Fujita H, Amenomori M, Sakamoto N, Seki M, Kakeya H, Yanagihara K, Takasaki K, Miyazaki T, Tsuchiya T, Yamasaki N, Tagawa T, Nagayasu T, Kohno S. Importance of controlling drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection: experience from lung transplantation in a cystic fibrosis case. *Intern Med.* 49:2353-8, 2010.
7. Morinaga Y, Yanagihara K, Araki N, Yamada K, Seki M, Izumikawa K,

- Takeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. In vivo efficacy of sivelestat in combination with pazufloxacin against *Legionella* pneumonia. *Exp Lung Res.* 36:484-90, 2010.
8. Kohno S, Izumikawa K, Ogawa K, Kurashima A, Okimoto N, Amitani R, Takeya H, Niki Y, Miyazaki Y. Intravenous micafungin versus voriconazole for chronic pulmonary aspergillosis: a multicenter trial in Japan. *J Infecion.* 61:410-8, 2010.
 9. Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Role of the Slt2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 10:343-52, 2010.
 10. Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:1639-43, 2010.
 11. 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.
 12. Izumikawa K, Nakano K, Kurihara S, Imamura Y, Yamamoto K, Miyazaki T, Sakamoto N, Seki M, Ishimatsu Y, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tsuchiya T, Yamasaki N, Tagawa T, Mukae H, Nagayasu T, Kohno S. Diffuse alveolar hemorrhage following itraconazole injection. *Intern Med.* 49:497-500, 2010.
 13. 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 *Chlamydomydia pneumoniae* in airway epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther.* 22: 580-6, 2009.
 14. 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.
 15. 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.
16. Takazono T, Izumikawa K, Mihara T, Kosai K, Saijo T, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya 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.
 17. Yamamoto K, Yanagihara K, Sugahara K, Imamura Y, Seki M, Izumikawa K, Kakeya 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.
 18. Nakamura S, Yanagihara K, Araki N, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya 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.
 19. Izumikawa K, Hashiguchi K, Sawai T, Inoue Y, Imamura Y, Seki M, Kakeya 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.
 20. 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.
 21. 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, Kakeya 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.
 22. Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya 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.
 23. Seki M, Kosai K, Hara A, Imamura Y,

- Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya 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.
24. Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya 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.
25. Seki M, Higashiyama Y, Imamura Y, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya 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.
26. 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: 125-31, 2009.
27. Imamura Y, Izumikawa K, Kohno S. [Candidiasis] *Nippon Rinsho.* 66: 2341-4, 2008.
28. Nakamura S, Yanagihara K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya 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.
29. Seki M, Suyama N, Hashiguchi K, Hara A, Kosai K, Kurihara S, Nakamura S, Yamamoto K, Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya 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 Mycobacterium tuberculosis infection *Intern Med.* 47: 2043-7, 2008.
30. Nakamura S, Yanagihara K, Mihara T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Soejima Y, Tashiro T, Kohno S. [Clinical characteristics of pneumonia in the oldest old patients] *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* 46: 687-92, 2008.
31. Morinaga Y, Yanagihara K, Nakamura S, Yamamoto K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. In vivo efficacy and pharmacokinetics of tomopenem (CS-023), a novel carbapenem, against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine chronic respiratory tract infection model. *J Antimicrob Chemother.* 62:1326-31, 2008.
32. Kakugawa T, Mukae H, Kajiki S,

- Tanaka A, Yamayoshi T, Inoue M, Ohtani H, Sakamoto N, Izumikawa K, Tasaki H, Ooe N, Kohno S. *Mycobacterium avium* pleuritis in a non-immunocompromised patient. Intern Med. 47: 1727-31, 2008.
33. Saijo T, Izumikawa K, Takazono T, Kosai K, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Fukushima K, Kohno S. A case of *Legionella pneumophila* pneumonia followed by invasive aspergillosis. Jpn J Infect Dis. 61: 379-81, 2008.
 34. Nakamura S, Higashiyama Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Mizuta Y, Kohno S. The roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* Jpn J Infect Dis. 61: 375-8, 2008.
 35. Tashiro M, Izumikawa K, Yoshioka D, Nakamura S, Kurihara S, Sakamoto N, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mukae H, Hayashi T, Fukushima K, Tashiro T, Kohno S. Lung fibrosis 10 years after cessation of bleomycin therapy. Tohoku J Exp Med. 216:77-80, 2008.
 36. Yanagihara K, Ohnishi Y, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. Efficacy of ME1036 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-insensitive *S. aureus* in a model of haematogenous pulmonary infection. Int J Antimicrob Agents. 32: 401-4, 2008.
 37. Nakamura S, Yanagihara K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Kohno S. A 52-year-old male with fever and rapidly progressive dyspnea Respiration. 76: 454-7, 2008.
 38. Hirakata Y, Yanagihara K, Matsuda J, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Tanaka H, Yoshida R, Aoki S, Kondoh A, Yamamoto K, Kaku M, Yamaguchi K, Kohno S. [Detection methods and changes in metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative rod isolates at Nagasaki University Hospital from 1991 to 2005] Kansenshogaku Zasshi. 82: 285-91, 2008.
 39. Yamamoto Y, Shiohita K, Takazono T, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Tashiro T, Otsuka Y, Ohkusu K, Kohno S. An autopsy case of *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis. 47: 1437-40, 2008.
 40. Ishimoto H, Yanagihara K, Araki N, Mukae H, Sakamoto N, Izumikawa K, Seki M, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Yasuda K, Kohno S. Single-cell observation of phagocytosis by human blood dendritic cells. Jpn J Infect Dis. 61:294-7, 2008.
 41. Nakamura S, Yanagihara K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H,

- Yamamoto Y, Miyazaki Y, Suyama N, Kohno S. Severe pulmonary tuberculosis complicating ileocecal intussusception due to intestinal tuberculosis: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 7:16, 2008.
42. Izumikawa K, Zhao Y, Motoshima K, Takazono T, Saijo T, Kurihara S, Nakamura S, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Hayashi T, Kohno S. A case of pulmonary cryptococcosis followed by pleuritis in an apparently immunocompetent patient during fluconazole treatment. *Med Mycol.* 9: 1-5, 2008.
43. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Imamura Y, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Spontaneous pyogenic spondylitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Intern Med* 47: 1121-4, 2008.
44. Kakeya H, Ehara N, Fukushima K, Seki M, Izumikawa K, Yamamoto Y, Yanagihara K, Saito A, Kohno S. Severe Legionnaires' disease successfully treated using a combination of fluoroquinolone, erythromycin, corticosteroid, and sivelestant. *Intern Med* 47: 773-7, 2008.
45. Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Fujimoto K, Mishima K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mizuta Y, Kitaoka T, Kohno S. Reversible visual disturbance due to cryptococcal uveitis in a non-HIV individual. *Med Mycol* 46: 367-70, 2008.
46. Kihara R, Yanagihara K, Morinaga Y, Araki N, Nakamura S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tsukamoto K, Kamihira S, Kohno S. Potency of SMP-601, a novel carbapenem, in hematogenous murine bronchopneumonia caused by methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2163-8, 2008.
47. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. abexate mesilate suppresses influenza pneumonia in mice through inhibition of cytokines. *J Int Med Res.* 36: 322-8, 2008.
48. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Two-dimensional gel electrophoresis analysis in simultaneous influenza pneumonia and bacterial infection in mice. *Clin Exp Immunol* 152: 364-71, 2008.
49. Hirakata Y, Yanagihara K, Kurihara S, Izumikawa K, Seki M, Miyazaki Y, Kohno S. Comparison of usefulness of plasma procalcitonin and C-reactive protein measurements for estimation of severity in adults with community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61: 170-4,

- 2008.
50. Kakeya H, Miyazaki Y, Senda H, Kobayashi T, Seki M, Izumikawa K, Yanagihara K, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Efficacy of SPK-843, a novel polyene antifungal, in comparison with amphotericin B, liposomal amphotericin B, and micafungin against murine pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1868-70, 2008.
51. Kakeya H, Miyazaki Y, Senda H, Kobayashi T, Seki M, Izumikawa K, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. Efficacy of SPK-843, a novel polyene antifungal, in a murine model of systemic cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1871-2, 2008.
52. Yanagihara K, Morinaga Y, Nakamura S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. Subinhibitory concentrations of telithromycin, clarithromycin and azithromycin reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 61: 647-50, 2008.
53. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Elevated levels of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in sera from patients with severe bacterial pneumonia coinfecting with influenza virus. *Scand J Infect Dis* 40: 38-42, 2008.
- 学会発表
1. Izumikawa K, Mihara T, Takazono T, Saijo T, Kurihara S, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. 4th Advanced against Aspergillosis (ローマ)
 2. Takazono T, Izumikawa K, Mihara T, Saijo T, Kurihara S, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Development of murine chronic pulmonary aspergillus colonization model 4th Advanced against Aspergillosis (ローマ)
 3. 第 11 回真菌症フォーラム ランチョンセミナー「真菌はいかにして抗真菌薬に耐性となるか ～耐性機序の理解から対策まで～」東京
 4. 第 84 回日本感染症学会総会 ワークショップ「簡易検査法の利点と限界 ～肺炎球菌抗原検出法の臨床的意義～」京都
 5. 第 50 回日本呼吸器学会総会 ランチョンセミナー「呼吸器感染症診断の現状と進歩 ～とくに押さえておきたいポイント～」京都
 6. 第 58 回日本化学療法学会総会 シンポジウム「慢性肺アスペルギルス症の新知見」長崎
 7. 第 54 回日本医真菌学会総会 シンポジウム「慢性肺アスペルギルス症 up

- to date」東京
8. 第 57 回日本化学療法東日本支部総会・第 59 回日本感染症学会東日本地方会 ランチョンセミナー「未来を見据えたよりよい感染症診療のために」東京
 9. 第 80 回日本感染症学会西日本地方会 ランチョンセミナー「呼吸器真菌症の病態、診断、治療の up to date ～日本から何が発信できるか～」松山
 10. APSR2010 「Bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis」Manila, Philippines
 11. 第 10 回真菌症フォーラム「イトラコナゾール注射薬により肺胞出血をきたした 1 例」名古屋
 12. ISHAM 2009 シンポジウム「Chronic Pulmonary Aspergillosis」東京
 13. 第 56 回日本化学療法東日本支部総会・第 58 回日本感染症学会東日本地方会 教育セミナー「呼吸器感染症とカルバペネム系薬使用の Appropriateness ～感染症専門医の果たす役割～」東京
 14. 第 79 回日本感染症学会西日本地方会 教育セミナー「呼吸器真菌症—最近のトピックス—」福岡
 15. 第 57 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 52 回日本感染症学会中日本支部総会 シンポジウム「深在性真菌症の診断・治療を再考する 慢性肺アスペルギルス症」名古屋
 16. 第 82 回日本感染症学会総会 ミニ特別講演「私たちの研究は今 肺真菌症の診断と治療」
 17. 第 48 回日本呼吸器学会総会 イブニングシンポジウム「呼吸器内科における深在性真菌症（特に治療について）」神戸
 18. 第 52 回日本医真菌学会総会 シンポジウム「The Frontline of Respiratory Fungal Infections in JAPAN」
 19. 第 55 回日本化学療法学会東日本地方会 教育セミナー「市中肺炎における注射用ニューキノロン系薬」
 20. 第 56 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 78 回日本感染症学会西日本支部総会 合同シンポジウム「感染制御の新時代に向けて：一基礎・臨床・コメディカルのパートナーシップー 真菌へのアプローチ」
- 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微生物側の病原因子に関する検証

研究分担者 亀井克彦 千葉大学真菌医学研究センター臨床感染症分野
研究協力者 豊留孝仁 千葉大学真菌医学研究センター臨床感染症分野

研究要旨 肺気腫では肺胞腔壁の破壊を伴い、拡大した気腔がときに糸状菌の感染巣となって慢性壊死性肺糸状菌感染症を引き起こす。*Aspergillus fumigatus*は慢性壊死性肺糸状菌感染症の重要な原因菌であり、本菌の病原因子とその感染成立の機構を解明することは本感染症の基盤的知見を得ることのみならず、本感染症治療法や治療薬開発にも役立つものと期待できる。本研究課題ではこれまでに*A. fumigatus*の生育に対する血清添加の影響について検討し、バイオフィーム様構造物の構築が血清添加により促進することを明らかとした。さらに血清成分を分画し、糖タンパク質の一つがバイオフィーム構築促進に重要な役割を果たしている事を明らかとしてきた。本年は血清やこの血清糖タンパク質添加時の薬剤感受性について検討を行うとともに、その微細構造の解析とその生育速度に関してBio-Cell Tracerシステムを用いて定量的解析を行った。今回の成果は血清がもたらす寄生体側バイオフィーム様構造構築機構をより詳細に明らかとするものである。

A. 研究目的

肺気腫は慢性気管支炎と並びCOPDの代表的な病態である。肺気腫では肺胞壁の破壊を伴い、この肺胞壁の破壊により気腔が著しく拡大する。このような拡大した気腔では病原真菌の胞子が侵入しても、宿主側の防御機構により十分に排除ができず感染が成立しやすい。このような感染形式では*Aspergillus fumigatus*によるものが最も重要であり、典型的な疾患として慢性壊死性肺アスペルギルス症が知られている。本症はCOPDに随伴する感染症として重要な位置を占めているにも関わらず、その感染機構や真菌側の病原因子はほとんど分かっていない。

我々は慢性型感染の局所において *A. fumigatus* が接する宿主血清成分が感染成立や病原因子の発現に寄与していると考えて研究を進めてきたが、これまでに *A. fumigatus* の生育における血清添加の影響について検討し、バイオフィーム様構造物の構築が血清添加により促進することを確認した。このバイオフィーム様構造物は Loussert らの報告(2009年)において、ヒトの症例やマウス感染実験での検討でも確認されており、このようなバイオフィーム様構造物が感染において重要な役割を果たしていることが示唆されている。これに引き続き、我々は血清成分中からバイオフィーム構築を促進する糖タンパク質を同定し、

さらに血清添加およびこの血清糖タンパク質単独添加が *A. fumigatus* に及ぼす影響について更に詳細に検討を行った。

B. 研究方法

1. 使用菌株

本研究では千葉大学真菌医学研究センター保存の *A. fumigatus* IFM49896 株を用いた。

2. *A. fumigatus* の分生子回収

PDA スラントで 25°C にて 2 週間培養した *A. fumigatus* へ 0.05% Tween-20 を添加し、その溶液中に分生子を懸濁した。懸濁液は 3G3 ガラス濾過器 (岩城硝子) により濾過し、菌糸を除去した。2 回 0.05% Tween-20 にて洗浄を行い、最終的に得られた孢子懸濁液を実験に用いた。

3. 感受性試験

感受性試験は以下のように、測定を行った。96 ウェルプレートに 100 μ l の Dulbecco's Modified Eagle's medium (DME)、もしくはこれにウシ胎児血清、BSA、またはこれまでに同定した血清糖タンパク質をそれぞれ 10%、10mg/ml、2mg/ml となるように添加した培地を入れ、各培地に 1.5×10^4 の *A. fumigatus* 孢子を接種し、37°C で 30 時間培養を行った。このあと酵母様真菌 FP 栄研 (栄研化学) の薬液を各ウェルに添加し、更に 24 時間培養を行った。この後、菌量についてクリスタルバイオレットを用いて定量を行い、各抗真菌薬の効果を評価した。

4. 蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡での観察試料は以下の通り行った。*A. fumigatus* IFM49896 株を DME

もしくは DME/10%FBS 中で 30 時間 37°C にて培養を行った。一部の菌体をプレパラート上に載せ、ファンギフローラ Y (バイオメイト/テクニコンインターナショナル) にて染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察を行った。

5. Bio-Cell Tracer システムでの観察

Bio-Cell Tracer (BCT) システムを用いて菌糸先端の成長速度測定を行った。ポリ-L-リジンコートした 35mm ディッシュ上で適当な培地中で 24 時間培養を行い、付着生育している菌糸を連続モニターし、一定時間における菌糸先端の移動距離からその菌糸生育速度を算出した。

C. 研究結果

1. 血清および血清糖タンパク質添加による *A. fumigatus* の抗真菌薬感受性への影響

血清添加時と血清非添加時で抗真菌薬の効果を比較した。血清非添加時でも既に生育をしている菌糸に対する薬剤の効果は分生子に対するものに比べてその効果は減弱していた。一方、血清添加時には唯一アムホテリシン B のみで 4 μ g/ml 以上において 60% 程度の生育阻害が見られたがその他の薬剤では菌の生育阻害が観察されなかった。

同様に前述のバイオフィーム形成促進能を持つ血清糖タンパク質を添加した条件下においても血清添加時と同様にアムホテリシン B のみで 4 μ g/ml 以上において 60% 程度の生育阻害が観察された。このことから血清や血清糖タンパク質を添加して形成させたバイオフィーム中の *A. fumigatus* はその薬剤感受性が著しく低下している可能性が示された。

2. バイオフィーム形成促進能を持つ血清糖

タンパク質添加による分枝の増大

前述のバイオフィーム形成促進能を持つ血清糖タンパク質を添加して生育させた菌糸について顕微鏡下で観察を行った。その結果、血清糖タンパク質添加条件下では*A. fumigatus*の分枝が著しく増大していることが明らかとなった(図1)。このような現象は同じ血清中の代表的タンパク成分であるウシ血清アルブミンなどでは観察されなかった。この結果から、この分枝の増大が血清糖タンパク質によるバイオフィーム形成に重要な役割を果たしている事を示唆していると考えられた。

3. バイオフィーム形成促進能を持つ血清糖タンパク質添加による菌糸伸長速度の増大

上記の血清糖タンパク質添加条件下で菌糸伸長速度を観察した。その結果、DME培地のみに比べ、有意に伸長速度が増大していた。一方、ウシ血清アルブミンについても血清糖タンパク質と同等の菌糸伸長速度が認められた。

D. 考察

本研究において、血清添加時の*A. fumigatus*バイオフィームについて詳細に解析を行ってきた。これまでに血清が*A. fumigatus*に対してバイオフィーム形成促進、バイオマスの増大効果、菌糸伸長速度増大効果などを示すことを明らかとしてきたが、今回の研究ではさらに血清添加条件下において形成させたバイオフィームでは抗真菌薬の効果が著しく減弱される事を示した。*Candida*などのバイオフィームでも同様に薬剤の効果が著しく減弱することが報告されており、*A. fumigatus*のバイオフィームでも同様の現象が認められたことになる。このメカニズムについては未だ不明

であり、今後さらなる検討が必要である。

更に血清成分の分画を行い、血清糖タンパク質の一つが強くバイオフィーム形成を促進することを明らかとしてきたが、この血清糖タンパク質添加条件下で菌糸発育及びバイオフィーム形成に関する詳細な解析を行った。まず、抗真菌薬に対する感受性を検討した結果、血清と同様に薬剤感受性の減弱が認められた。また、菌糸伸長速度について検討を行ったところ、有意に速度の増大が認められた。さらに顕微鏡下での観察により、菌糸の分枝が著しく増大している様子が認められた。

同様の検討を並行して行ったウシ血清アルブミンでは、菌糸伸長速度については血清糖タンパク質添加条件下とほぼ同等の効果であったが、薬剤感受性については血清や血清糖タンパク質添加条件下ほどには効果が減弱せず、さらに菌糸の分枝増大は観察されなかった。これまでにウシ血清アルブミンではバイオフィームが形成されないことは示してきたが、この違いは分枝の増大を誘導するか否かに起因する可能性が高いと考える。

E. 結論

血清添加により形成された*A. fumigatus*バイオフィームは各種抗真菌薬の効果を減弱させる。同様にバイオフィーム形成促進能を持つ血清糖タンパク質添加によっても効果が減弱することが明らかとなった。さらにこの血清糖タンパク質添加時には菌糸伸長速度の増大と菌糸の分枝増大が認められた。結果を総合すると、バイオフィームのような三次元的に発達した菌塊を形成する上で適度な分枝の増大が重要であり、宿主内でこの血清糖タンパク質の存在下でバイオフィームを形成すると推測される。

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. 豊留孝仁、渡辺哲、亀井克彦 *Aspergillus fumigatus* バイオフィルム構築を促進する血清成分の同定 第 24 回 Bacterial Adherence & Biofilm 2010 年。
2. 豊留孝仁、渡辺哲、亀井克彦 *Aspergillus fumigatus* のバイオフィルム構築を促進する血清糖タンパク質の同定 第 54 回日本医真菌学会総会 2010 年。
3. 渡辺哲、豊留孝仁、亀井克彦 *Aspergillus fumigatus* の感染進展に関与する因子 第 54 回日本医真菌学会総会 2010 年。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし



図 1：血清糖タンパク質単独の添加により、分枝の増大が観察される

*Aspergillus fumigatus*が産生するバイオフィームとFetuinの関連についての基礎的研究

研究分担者 渡邊 浩 久留米大学医学部 感染医学講座 臨床感染医学部門

研究協力者 秦 亮 久留米大学医学部 感染医学講座 臨床感染医学部門

研究要旨 *Aspergillus fumigatus*は侵襲性アスペルギルス症、アスペルギローマや慢性壊死性肺アスペルギルス症などを引き起こす临床上重要な病原体である。昨年の報告では、Fetuinが*A. fumigatus*のバイオフィーム産生に関与していることが確認されたが、今回は*A. fumigatus*のバイオフィーム産生とFetuinの濃度依存性についての検討を行った。DME mediumにFetuin 0.5 mg/ml、1 mg/ml及び2 mg/mlを添加した液体培地を調整し、*A. fumigatus*を上記の各培養液に接種し、96 wellsマイクロプレート上で培養し、それぞれのバイオフィーム産生をMicrotiter biofilm assayで検討した。その結果、*A. fumigatus*は、DME単独に比べ、Fetuin添加DMEにおいて、3日目には有意なバイオフィームを形成することが確認された。さらに、Fetuinのバイオフィーム産生に及ぼす影響は濃度依存的事であることが示唆され、共焦点レーザー顕微鏡においても同様の所見が確認された。

A. 研究目的

近年、*Aspergillus fumigatus*による感染の増加傾向が報告されている。*A. fumigatus*は主に経気道感染し、侵襲性アスペルギルス症、アスペルギローマや慢性壊死性肺アスペルギルス症などを引き起こす。また、肺病変から全身性播種性病変をつくることもあり、特に感染防御能の低下した患者において、アスペルギルス症などの深在性真菌症は、発症件数ならびに治療の困難さの面でも、臨床治療上重要な問題である。一方、組織に定着した病原体が隣接した病原体と互いに凝集するとその周囲に多糖体が産生され、この集合体をBiofilmと呼ぶ。抗菌薬はBiofilmを透過しにくいいため、病原体は抗菌薬の影響を受けず、Biofilm内での生育が可能となる。また、Biofilm内の病原体は、

免疫抵抗性を示す事も知られており、临床上問題となる多くの難治性感染症にBiofilmが関与していることが明らかとなっている。これまでに、*A. fumigatus*によるバイオフィームの報告はほとんどないが、本研究班の分担研究者である亀井らは*A. fumigatus*によるバイオフィーム様構造の産生を報告し、重要な生育因子としてFetuinを同定した。本研究はアスペルギルスのバイオフィーム産生能とFetuinの濃度依存性について明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. *A. fumigatus* を potato dextrose agar (PDA) 寒天培地上で発育し、分生子を回収する。Fetuin の人体内濃度に合わせ、0.5、1、2 mg/mlになるようにDulbecco's Modified

Eagle's Medium (DME) に添加し、培養液を調製した。

2. 上記の培養液を用いて、96 wells マイクロプレートに1菌種4穴ずつ、200 μ lずつ接種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂の条件下で培養し、24h、48h、72hにおいて、それぞれのバイオフィルムの産生能をMicrotiter biofilm assay (MBA) 法にて確認した。

3. 上記の培養液を用いて、光学顕微鏡下で *A. fumigatus* バイオフィルムの形態を直接観察し、またBiofilmの形態を共焦点レーザー走査型顕微鏡下で観察した。

C. 研究結果

MBA において、通常の培養液である DME に Fetuin 1 mg/ml 及び 2 mg/ml を加え、*A. fumigatus* を培養すると、DME 単独に比べ、培養 3 日目以降バイオフィルム産生が有意差をもって高くなることが判明した (図 1)。また、Fetuin は 1 mg/ml より高い濃度を添加すると濃度依存的にバイオフィルム産生を増加させることが示唆された (図 2)。

光学顕微鏡下で *A. fumigatus* バイオフィルムの形態を確認したところ、3 日目において、Fetuin 添加 DME では、DME 単独より、多くの菌糸が強くウェル壁に付着し、バイオフィルムの産生が増加することが観察された (図 3)。共焦点レーザー顕微鏡においても同様の所見が確認された。また、Fetuin を加えた培養液での *A. fumigatus* の増殖能、およびバイオフィルム産生能が高いことが確認され、MBA の結果と合致していた (図 4)。

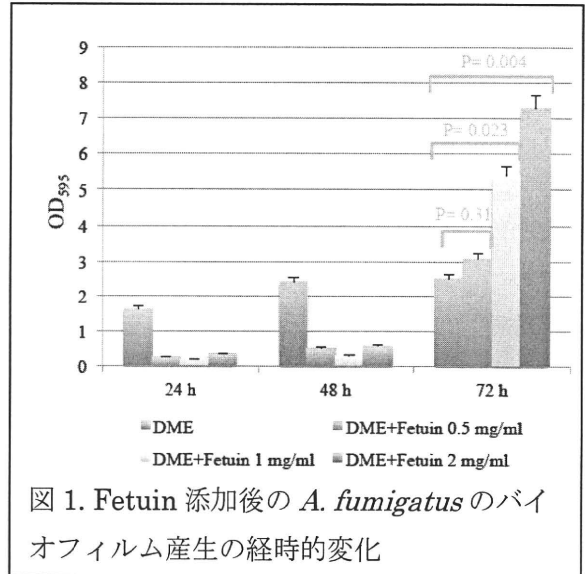


図 1. Fetuin 添加後の *A. fumigatus* のバイオフィルム産生の経時的変化

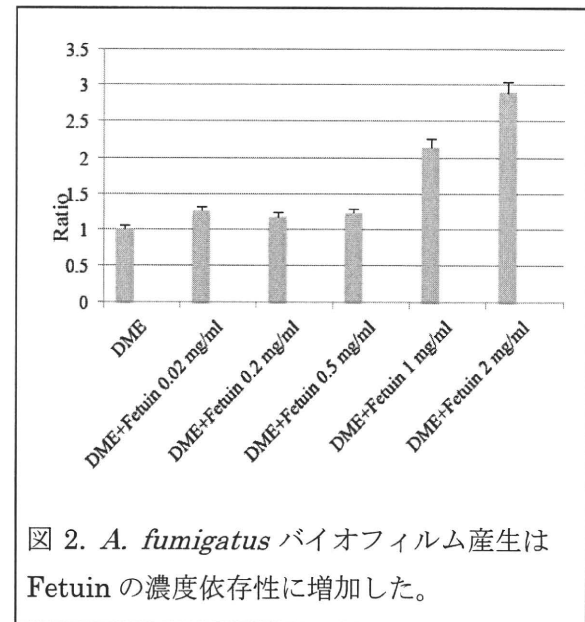


図 2. *A. fumigatus* バイオフィルム産生は Fetuin の濃度依存性に増加した。

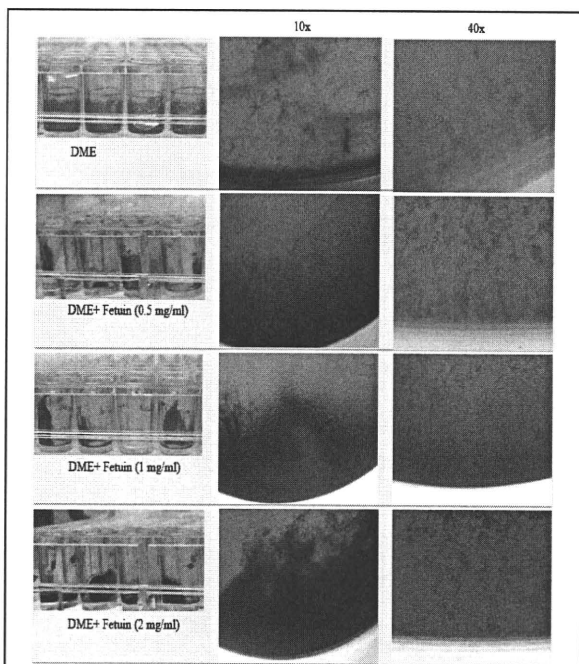


図 3. 顕微鏡下における *A. fumigatus* バイオフィルムの形態

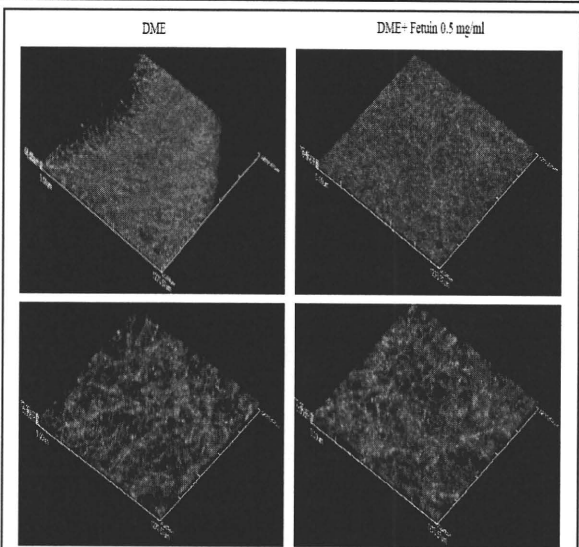


図 4. 共焦点顕微鏡下における *A. fumigatus* バイオフィルムの形態

D. 考察

A. fumigatus によるバイオフィルムを評価するシステムを構築できた。MBA 法や共焦点顕微鏡などの方法を用いて、Fetuin の添加により、3 日目に *A. fumigatus* によるバイオフィルム産生能が増強することが明らかとなった。また、Fetuin は濃度依存的にバイオフィ

ルム産生を増加させることが示唆された。今後、continuous flow cell や focused ion beam (FIB) を用いた scanning ion microscope (SIM) 等の方法による詳細な視覚的観察を行う予定である。

E. 結論

DME 単独に比べ、Fetuin 0.5、1 及び 2 mg/ml を添加した液体培地において、3 日目に有意な *A. fumigatus* のバイオフィルム産生が認められた。また、Fetuin は濃度依存的にバイオフィルム産生能を増加させることが示唆された。

本研究により呼吸器科領域におけるアスペルギルス症の難治化要因としてのバイオフィルムの関与についての解明も期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Yahara K, Miura M, Masunaga K, Matsumoto K, Miyao T, Tanimachi C, Hashimoto K, Sagawa K, and Watanabe H. Comparison of two control measures of weatherstripping in reducing blowing dust during hospital renovations. *J Infect Chemother*, 16: 431-435, 2010.
2. Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y, Hamada N, and Watanabe H. Artificial hybrids of influenza A virus RNA polymerase reveal PA subunit modulates its thermal sensitivity. *PLoS ONE* 5(12) e15140: 1-11, 2010.
3. Morinaga Y, Yanagihara K, Masunaga K, Hashiguchi M, Okamura T,

Watanabe H, Kohno S, and Kamiyama S. Invasive pneumococcal diseases in a traveler who returned from the philippines: A case report and in vivostudy of the isolate. J Travel Med, 17: 63-65, 2010.

4. 今村宜寛、濱田信之、大津 寧、原 好勇、渡邊 浩「九州北部でのヒト・メタニューモウイルスに対する中和抗体保有調査」 医学検査 59: 767-772, 2010.

学会発表

国際学会

1. Qin L, Zhou Z, Hu B, and Watanabe H. Pilot study of causative pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection in China. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 59th Annual meeting, Atlanta, USA. 2010.
2. Hidaka H, Watanabe H, and Gotoh K. Travel clinic in Kurume university hospital, Japan. 8th Asia-Pacific Travel Health Conference, Nara, 2010.
3. Hara K, Nakazono Y, Kashiwagi T, and Watanabe H. The N-terminal region of the PA subunit of influenza virus RNA polymerase contributes to the functional RNA formation. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong, 2010.
4. Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y, Hamada N, and Watanabe H. PA subunit of Influenza A virus RNA polymerase is involved in the stable RNA replication at high temperature. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong, 2010.

5. Watanabe H. Travel medicine and travel clinic. Joint Meeting of the 19th National Conference on Nosocomial Infection of Chinese Preventive Medicine Association (CPMA) and the 6th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Nanjing, China, 2010.
6. Liang Qin and Watanabe H. Bacterial biofilms and hospital-acquired infection. Joint Meeting of the 19th National Conference on Nosocomial Infection of Chinese Preventive Medicine Association (CPMA) and the 6th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Nanjing, China, 2010.
7. Qin L, Goto K, and Watanabe H. Concurrent administration of antibiotics, the role of antimicrobial effect of imipenem for the nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. 110th American Society for Microbiology General Meeting. San Diego, USA, 2010.
8. Watanabe H, Kashiwagi T, Hara K, Masunaga K, Kawano S, Miura M, Iwahashi J, Qin L, Imamura Y, and Hamada N. Infection control for the pandemic (H1N1)2009 in Kurume university hospital. Meeting of the global outbreak alert and response network (GOARN) partners from the western pacific region. Siem Reap, Cambodia, 2010.
9. Watanabe H, Goto K, and Hara K. Clinical study concerning the relationship between community-

acquired pneumonia and influenza in northern Thailand. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infections Panel. San Francisco, USA, 2010.

国内学会

1. 渡邊 浩 「久留米大学病院におけるパンデミックインフルエンザ流行時の感染対策」 第 51 回日本熱帯医学会大会、仙台、2010.
2. 三浦美穂、升永憲治、渡邊 浩「ICD・ICP 講習会、日本の深在性真菌症感染対策、病院建物解体工事に伴う院内での感染対策について」第 58 回日本化学療法学会西日本支部総会、大分、2010.
3. 秦 亮、渡邊 浩 「中国における市中気道感染症病原体についての臨床的調査」第 58 回日本化学療法学会西日本支部総会、大分、2010.
4. 濱田 信之、原 好勇、今村 宜寛、柏木 孝仁、後藤憲志、大津 寧、渡邊 浩 「新規ヒトメタニューモウイルス迅速診断キットの有用性の検討」 第 80 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、松山、2010.
5. 渡邊 浩 「教育講演 2、海外渡航関連感染症とトラベルクリニック」 第 80 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、松山、2010.
6. 原 好勇、渡邊 浩 「PA サブユニットは A 型インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの亜型間での親和性に重要である」 第 80 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、松山、2010.
7. 上村勇作、秦 亮、後藤憲志、渡邊 浩 「The role of antimicrobial effect of imipenem for the nontypable *Haemophilus influenzae* biofilms in vitro」 第 80 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、松山、2010.
8. 濱田 信之、原 好勇、柏木 孝仁、今村 宜寛、中園 陽子、千々和 勝己 「オセルタミビル耐性株と感受性株が同時に検出された新型インフルエンザウイルス A(H1N1/2009)の変異解析」 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
9. 原 好勇、中園 陽子、柏木 孝仁、今村 宜寛、濱田 信之、渡邊 浩 「A 型インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼサブユニットの亜型間での親和性解析 -PA(H3N2)の親和性決定部位について-」 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
10. 中園 陽子、原 好勇、柏木 孝仁、今村 宜寛、濱田 信之、渡邊 浩 「A 型インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼサブユニットの亜型間での親和性解析 -PB2(H5N1)の親和性決定部位について-」 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
11. 柏木 孝仁、原 好勇、中園 陽子、濱田 信之、岩橋 潤、今村 宜寛、渡邊 浩 「A 型インフルエンザウイルス遺伝子複製酵素の温度変化への適応」第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
12. 渡邊 浩 「Nontypable *Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィームに対する抗生物質の効果についての基礎的検討」 第 24 回 Bacterial Adherence and Biofilm 学術集会、東京、2010.
13. 秦 亮、渡邊 浩 「*Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィームに対する imipenem の抑制効果に関する基礎的検討」第 58 回日本化学療法学会総会、長崎、2010.

14. 渡邊 浩 「レクチャー3、呼吸器感染症のABC、細菌性肺炎の診断と治療」 第58回 日本化学療法学会総会、長崎、2010.
15. 原 好勇、渡邊 浩 「インフルエンザウイルスの遺伝子再集合における親和性について」 第84回日本感染症学会総会、京都、2010.
16. 秦 亮、木田 豊、渡邊 浩 「ワークショップ 29、バイオフィルム、Impaired *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide promotes biofilm formation」 第84回日本感染症学会総会、京都、2010.
17. 矢野寿一、山崎善隆、沖津尚弘、後藤憲志、新井和明、平潟洋一、賀来満夫、渡邊浩 「ワークショップ 29、バイオフィルム、急性中耳炎患児から分離されたインフルエンザ菌のバイオフィルム産生能と細胞内侵入性の検討」 第84回日本感染症学会総会、京都、2010.
18. 真崎宏則、秦 亮、渡邊貴和雄、渡邊 浩 「家庭における *Moraxella catarrhalis* 保菌状況についての追跡的調査」 第84回日本感染症学会総会、京都、2010.
19. 秦 亮、渡邊 浩 「中国上海における市中気道感染症についての臨床的調査」 日本国際保健医療学会 第28回西日本地方会、長崎、2010.
20. 稗田文代、加納昭子、田中真由美、坂井渚、酒井義朗、川野佐百里、大塚まり子、安達康子、升永憲治、渡邊 浩 「消毒薬・外用薬取り扱いマニュアルの改訂」 第25回日本環境感染学会総会、東京、2010.
21. 渡邊 浩 「タイ国北部地域における HIV 陽性患者に合併した市中肺炎の臨床的検討」 第2回福岡県医学会総会、福岡、2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) 感染症の
実態把握に関する研究

研究分担者	大野秀明	国立感染症研究所	生物活性物質部
研究協力者	田辺公一	国立感染症研究所	生物活性物質部
	草地弘子	国立感染症研究所	生物活性物質部
	梅山 隆	国立感染症研究所	生物活性物質部
	金子幸弘	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
	泉川公一	長崎大学医歯薬学総合研究科感染免疫学講座	
	河野 茂	長崎大学医歯薬学総合研究科感染免疫学講座	
	源 不二彦	東京大学医科学研究所	
	藤井 毅	東京大学医科学研究所	

研究要旨 COPD等の呼吸器疾患に合併する慢性糸状菌感染症に関する研究に加えて、新たな脅威となりつつある高病原性クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*) 感染症の実態把握に関する研究を開始した。本年度は、わが国で保存してあるクリプトコックス属と同定された株を対象に、血清型同定を行った。結果として、対象となった70株中、クリプトコックス属は69株であり、うち68株が血清型Aの*C. neoformans*、残る1株は*C. unigattlatus*と同定され、今回の検討では*C. gattii*株は検出されなかった。高病原性クリプトコックス症の侵入監視体制の強化は、わが国の公衆衛生学上も極めて重要な課題であり、今後もわが国で分離されたクリプトコックス属について、血清型同定など継続的な検討を行う必要がある。

A. 研究目的

COPD等の呼吸器疾患に合併する慢性糸状菌感染症に関する研究に加えて、本年度より、クリプトコックス・ガッティ (*C. gattii*) 感染症に関する調査・研究を開始した。

1999年よりカナダ・バンクーバー島を中心とした新たな遺伝子型の高病原性 *C.*

*gattii*によるクリプトコックス症のアウトブレイクは現在に至るまで持続しており、世界的にも関心を集めている新興感染症である。この高病原性クリプトコックス症は、従来型のクリプトコックス症に比べ、発病率、死亡率が高いと報告され、北米太平洋岸を中心とした発症地域の拡大傾向が指摘されている。2007年に北米型と同じ遺伝子

パターンをもつ *C. gattii* 株が、わが国のクリプトコックス症患者から分離され、その病歴から本症例は日本国内で感染した可能性があることが報告されたため、この高病原性の *C. gattii* 株の日本国内での生息実態について、早急な状況把握を目的として本研究を開始した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

日本国内の大学、研究機関にてクリプトコックス属と同定され保存されていた計70株を対象とした。地域別では、九州分離株60株、関東分離株10株であった。

2. クリプトコックス属血清型同定

本検討では基本的にPCR法、L-canavanine glycine bromothymol medium (CGB培地)での菌発育能をスクリーニングした後、PCR増幅産物が確認できなかった株およびCGB培地で発育した株について、D1/D2領域、intergenic spacer (IGS)領域の塩基配列を決定し、BLAST検索を行い最終的に菌株の血清型を決定した。

i) クリプトコックス属DNAの抽出

寒天培地上に発育した菌体の一部を掻き取り、YPD (pH5.6) 液体培地に接種し、2日間30°Cで振盪培養した菌液を供した。菌液の凍結、融解を繰返したのち、Genとるくん™ (Takara) を用いてゲノムDNAを抽出した。

ii) PCR法を用いたスクリーニング

Yanらの方法 (J Clin Microbiol, 2002) をもとに、クリプトコックス属のSTE20遺伝子の血清型A、Dならびに交配型α、a型に特異的な部位を増幅するプライマーを用いてPCRを行った。

iii) CGB培地発育能

PCR法にて明らかな増幅産物が得られなかった株は、CGB培地に接種後、30°Cで培養し、発育能を確認した。培養期間は14日間とし、コロニー発育ならびに培地色調の変化を観察した。

iv) 塩基配列決定法

D1/D2領域については汎用プライマーNL1、NL4を用いて、intergenic spacer (IGS)領域はSugitaらの方法 (Microbiol Immunol, 2001)を用いてPCRを行い、PCR産物のdirect sequenceで塩基配列を決定した。得られた塩基配列についてBLAST検索を行い、最終的に *C. gattii* であるか否かの決定を行った。

C. 研究結果

今回対象とした菌株は、1992年から2008年にかけて分離された株であり、1999年以前に分離された株が40株を占めていた。対象とした70株中67株については、血清型Aかつ交配型αを検出するPCR法 (STE20 Aα) で588 bpの増幅産物が得られた (図)。一方、残る3株の検討では、塩基配列の結果から1株が *C. neoformans* var. *grubii* (血清型A)、1株は *C. unigattlatus*、1株はカンジダ属と同定された。よって最終的にはクリプトコックス属69株中68株は血清型Aである *C. neoformans*、1株が *C. unigattlatus* となり、*C. gattii* は存在しなかった。

