

201028040A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と国内
診断・治療ネットワークの構築に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23年 3 月

研究代表者

河野 茂

(長崎大学医歯薬学総合研究科)

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と国内
診断・治療ネットワークの構築に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23年 3 月

研究代表者

河野 茂

(長崎大学医歯薬学総合研究科)

目 次

I. 真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と国内診断・治療ネットワークの構築に関する研究	
総括研究報告書（平成22年度）	1
研究代表者：河野 茂（長崎大学医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座）	
II. 分担研究報告書	
1. 接合菌の診断系構築に関する研究	7
研究分担者：河野 茂（長崎大学医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座）	
2. MLSTによるクリプトコックスの分子疫学	12
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所・生物活性物質部）	
3. 外科真菌症の診断や疫学－カンジダ症発症の因子－	16
研究分担者：三嶋 廣繁（愛知医科大学大学院医学研究科 感染制御学）	
4. 病状と病原性に関する研究	26
研究分担者：谷口 修一（国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 血液内科）	
5. 真菌症剖検症例を用いた後方視的疫学観察研究	28
研究分担者：渋谷 和俊（東邦大学医学部 病院病理学講座）	
6. 新興再興真菌症・診断構築（遺伝子）	
様々な検体からの遺伝子診断法のシステム化	38
研究分担者：榎村 浩一（帝京大学医真菌研究センター）	
7. 日本における <i>Trichophyton tonsurans</i> 感染症の疫学とその感染対策に関する研究	47
研究分担者：比留間 政太郎（順天堂大学医学部附属練馬病院皮膚アレルギー科）	
8. トリコフィトントズランス感染症の診断治療法の構築と、 病原性解明に関する応用研究－トズランス感染症の診断法構築－	52
研究分担者：望月 隆（金沢医科大学 医学部 皮膚科学部門）	
9. 輸入真菌症の国内発生状況調査とヒストプラズマ症の 迅速診断法改良・開発へ向けた基礎的研究	55
研究分担者：亀井 克彦（千葉大学 真菌医学研究センター）	
10. クリプトコックス感染による自然免疫活性化機序の解明と新規免疫検査法の開発	61
研究分担者：川上 和義（東北大学 大学院医学系研究科）	

I. 総括研究報告書

真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と
国内診断・治療ネットワークの構築に関する研究

研究代表者 河野 茂 長崎大学大学院医歯薬学研究科 感染免疫学講座

研究要旨

診療ならびに検査ラボネットワークの構築を最終目標として、内科、皮膚科、外科、検査、基盤研究の観点から、ネットワークで共有すべき対象疾患や診断法を明らかにするために調査研究を実施した。深在性真菌症、皮膚真菌症、外科真菌症に関して現行の組織で把握可能な真菌症疫学や診断法・治療法の現状を調査した。また、新規診断方法の構築を行い、免疫学的側面から病態解明に関する知見を得た。

A. 研究目的

我が国には、真菌症診断治療のガイドラインが存在するが、我が国の医療事情や新しいエビデンスに基づく診療普及のためには、診療機関のネットワーク構築が必要である。同時に、真菌の確定診断ができるラボは限定されており、真菌症の診療支援や疫学情報共有のためのネットワークの構築を並行して行うことを最終目的とする。

さらにネットワーク構築過程において、内科領域と皮膚科領域、外科領域、検査領域のそれぞれにおいて現状における真菌症の課題の解決を図る。

B. 研究方法

各分担研究者は、深在性真菌症と皮膚真菌症、外科真菌症、診断検査、病態解析のそれぞれの専門領域で問題となる課題を設定し、これを解決する過程において相互に連携する。

さらに、専門領域に関して研究協力者とも連携することで、真菌症に対する診療とラボネットワーク構築を図る。

1. 深在性真菌症.

1) 真菌症の疫学研究. ①造血幹細胞移植症例を前向きコホート登録し、追跡調査を行った。②旅行者真菌症のコンサルテーションおよび菌株の同定、抗体の測定依頼などの依頼があった症例に基づいて基礎データを作製した。これに医学中央雑誌、Medlineなどに掲載された報告症例も検索したデータを使用した。③同一地区で1年間に発生しアウトブレイクが疑われた事例について、*Cryptococcus neoformans* 7株を対象としてMLST (Multi-Locus Sequence Typing) により株の異同を検討した。

2) 接合菌の診断法構築. シグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法) (Kojima T, Kitamura T. A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor. Nat Biotechnol,17:487-490, 1999) を接合菌に応用し、

細胞からの分泌蛋白質および膜蛋白質を選択的に検出した。

2. 皮膚科領域.

1) *Trichophyton tonsurans* 感染症の疫学研究. 対象者は、東京学生柔道連盟に競技登録した全大学柔道選手 (50 大学チーム) 1293 名のうち、本研究の主旨に賛同した 1281 名である。調査方法は、調査用紙に従って年齢、性別、身長、体重、居住様式、同居者数、運動時間、過去および現在における白癬様皮疹の有無、治療内容などを記入させた。検体採取は 2010 年 5 月 1 日から 5 月 31 日に各大学において練習前に丸形ブラシ (126 スパイク) で頭部を 15~20 回程度強く擦り、ブラシをポリ袋に入れて送付させた。培養はマイコセル寒天平板培地、25°C で 14 日間培養後判定した。

2) *Trichophyton tonsurans* 感染症の診断治療法の構築. 迅速同定法に用いる形態的特徴の検討、ならびに分子生物学的に分類し (NTS 領域の制限酵素分析、以下 NTS-RFLP により、格闘技からの分離株は NTS I, II, III の 3 つの molecular type)、臨床分離株の形態学的な差異、抗真菌剤への感受性の差異について検討した。薬剤感受性は微量液体希釈法により測定した。

3. 外科領域.

CYP2C19 遺伝子解析結果からみたポリコナゾール血中濃度モニタリングの臨床的意義、および、成人カンジダ血症 30 症例の背景や薬剤感受性等、解析を解析した。

4. 検査法・診断法.

1) 病理組織からの確定診断法の構築に関しては、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法と *in situ* hybridization (ISH) 法を基幹とした遺伝子検出法を開発し、有用性について 59 臨床試料で検討した。2) クリプトコックス属の検出法.

C. neoformans および *C. gattii* の塩基配列から TaqMan® プローブおよびプライマーを設計した。

5. 真菌症の病態解明.

クリプトコックス症における宿主免疫応答機序を解明するために、特に感染後の宿主免疫による菌体の認識機構と各種 Th サブセットの分化誘導との関連性、特に多糖の認識に重要な Dectin-2 のような C-type lectin receptors (CLRs) とそのシグナル伝達分子の CARD9 について検討した。

C. 研究結果

1. 深在性真菌症

1) 疫学. ① 移植関連の真菌症については、全国 30 施設から計 577 件 (2010 年 11 月 30 日現在) の造血幹細胞移植症例の登録があり、真菌症の発症は Proven fungal disease 2 例、Probable fungal disease 17 例、Possible fungal disease 22 例 (EORTC/MSG の基準) であった。うち、菌種が特定されたものが 3 例あった。② 旅行者真菌症については、コクシジオイデス症が 2010 年は 1 例が確認され、総症例数は 62 例となった。2010 年のヒストプラズマ症は 3 例が認められ総計は 71 例となった。③ クリプトコックス症の地域的アウトブレイクの調査の結果は、全株が同一の起源による株と考えられた。

2) 接合菌の診断法構築. 211 クローンを得、最も多い 163 のクローンを占めた蛋白 (候補 A) は、226 アミノ酸から構成される約 23 k Da の蛋白で、アミノ酸配列解析の結果、シグナルシークエンスを有することが確認された。また 2 番目に多い 45 のクローンが得られた蛋白 (候補 B) は、predicted protein に分類され、486 アミノ酸から構成される約 46 k Da の蛋白で、同様にシグナルシークエンスを有し、一部は細胞壁

のβグルカン合成酵素に関連するタンパク質である可能性が示唆された。

2. 皮膚真菌症

1) *Trichophyton tonsurans* 感染症の疫学研究. 検査を実施した 1281 名 (男 1083 名、女 198 名) 中、ブラシ培養陽性者は 76 名 (5.4%) (男 71 名、女 5 名) であった。体部白癬が発症している者は 1281 名中 33 名 (2.6%) であった。ブラシ培養陽性者 76 名のうち、現在の体部白癬発症者は 7 名 (9.2%) で、残りの 69 名 (90.8%) は無症候性キャリアであった。ブラシ検査陽性者 76 名のうち 74 名が 2 回目のブラシ培養検査を受け、64 名 (86.5%) で菌陰性化していた。

2) *Trichophyton tonsurans* 感染症の診断治療法の構築. molecular type 分類による形態学的変化は一定の傾向が見られなかった。経時的観察では接種後 102h では栄養菌糸のみ見られたが、106h では、102h 以降、新たに伸展した菌糸に介在性の硬膜胞子の形成が見られた。薬剤感受性についても、NTS I は TBF x1-x1/2 (n=9), ITCZ 0.13-0.001 µg/ml, FCZ 16-0.5µg/ml, GRF 2-0.25µg/ml, NTS II は TBF x4-x1/2 (n=10), ITCZ 0.03-0.002 µg/ml, FCZ 32-0.5µg/ml, GRF 2-0.5µg/ml, NTS III は TBF x2-x1/4, ITCZ 0.002-0.004µg/ml, FCZ 8-0.5µg/ml, GRF 4-1µg/ml であり molecular type 別では一定の傾向は見られなかった。

3. 外科領域.

CYP2C19 遺伝子解析の結果、3 名中 2 名は poor metabolizer であり 1 名に副作用が発現した。カンジダ血症例の解析では、リスク因子として血管内カテーテル留置 27 例 (90.0%)、その他の医療器具留置 26 例 (86.7%)、先行する 3 日以上抗真菌薬投与例 26 例 (86.7%)、低アルブミン血症 (血清アルブミン値 ≤ 3.0mg/dL) 23 例 (76.6%) があり、最終予後は、生存 15 例、

死亡 15 例であった。抗真菌薬の薬剤感受性は、*C. albicans* は、MCFG 感性が 93.3% (14/15) であり、アゾール系抗真菌薬に対して感性株は、F LCZ が 86.7% (13/15)、VRCZ が 100% であった。

4. 検査法・診断法

1) 病理組織標本からの確定診断法. PCR 法における陽性率および陽性試料数はヒトβ-グロビン遺伝子 (110 bp) 61% (36/59)、ヒトβ-グロビン遺伝子 (250 bp) 17% (10/59)、汎真菌 (300 bp) 22% (13/59)、汎真菌 (230 bp) 12% (7/59)、*Aspergillus* 属 (236 bp) 19% (11/59)、(146 bp) 47% (28/59)、*Fusarium* 属 (170 bp) 0% (0/59)、接合菌 (170 bp) 8% (5/59)、*Scedosporium* 属 (172 bp) 0% (0/59) であった。ISH 法における陽性試料数および陽性率は汎真菌 59% (35/59)、*Aspergillus* 属 (ALP 遺伝子) 64% (38/59)、*Fusarium* 属 0% (0/59)、*C. albicans* 8% (5/59) であった。PCRダイレクトシーケンス法においては汎真菌 PCR 法 (300bp) にて ITS-1 領域が増幅された試料のうち、菌種の特定につながる結果が得られたのは 9/59 試料であった。

2) クリプトコックス属の検出法. 標的遺伝子を組み込んだプラスミドでは、どちらのプロープも 5 コピーから検出可能であり、プロープおよび鋳型を複数混ぜることによる阻害は認めなかった。プロープ系の特異度は、保存菌株によって確認できた。コアラおよびその飼育環境から分離し、塩基配列で同定された約 200 株の酵母に対する試験では偽陽性・擬陽性共に認めず、コアラ鼻腔スワブからも直接本菌を DNA 検出できた。

5. 真菌症の病態解明.

C. neoformans による BM-DCs 刺激における Dectin-2 の役割について、Dectin-2KO マウスでは TNF-α 産生が完全に消失したが、Dectin-2KO マウスに B3501 を感染させ、2 週後に肺内における生菌数、IL-12p40、IFN-γ、

IL-17A、TNF- α を調べたところ、両マウス間に有意差は認められなかった。Dectin-2 遺伝子を導入した GFP リポーター細胞を Cap67 あるいは B3501、*C. albicans* で刺激したところ、*C. albicans* 刺激では活性化が認められたにも関わらず、*C. neoformans* 刺激ではそのような活性は全く検出できなかった。一方、*C. neoformans* 感染防御における CARD9 の役割 CARD9KO マウスで有意な菌数の増加が認められ、さらに、2 週後の肺病理所見では、野生型マウスに比べて CARD9KO マウスでは炎症反応の減弱と肺胞腔内における真菌の著明な増加が観察された。

D. 考察と結論

カンジダ症を中心とする深在性真菌症、コクシジオイデス症、ヒストプラズマ症、トリコフィトントンズランスの発生動向については、関連する危険因子や予後を含めてひきつづき検討する必要がある。検査診断法に関しては、培養陰性である場合に確定診断に替わる方法として、病理組織からの菌成分を検出する方法が

構築されつつある。病原性に関して、健常者に発症するクリプトコックス症を対象として、自然免疫機構の解明に基づく診断・治療法のスキームを構築する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

各分担報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

平成 22 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
「真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と国内診断・治療ネットワーク
の構築に関する研究」班員名簿

氏 名	所 属	職 名
河野 茂	長崎大学医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座	教授
宮崎 義継	国立感染症研究所 生物活性物質部	部長
三嶋 廣繁	愛知医科大学 大学院医学研究科 感染制御学	教授
谷口 修一	国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 血液内科	部長
渋谷 和俊	東邦大学医学部 病院病理学講座	教授
槇村 浩一	帝京大学医真菌研究センター	准教授
比留間政太郎	順天堂大学医学部附属練馬病院 皮膚・アレルギー科	教授
望月 隆	金沢医科大学 環境皮膚科学	教授
亀井 克彦	千葉大学 真菌医学研究センター	教授
川上 和義	東北大学 大学院医学系研究科	教授

II. 分担研究報告書

1. 接合菌の診断系構築に関する研究

研究分担者 河野 茂 長崎大学医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座

研究協力者 掛屋 弘 長崎大学医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座

研究協力者 山越 智 国立感染症研究所 生物活性物質部

研究要旨 接合菌症は主に血液疾患などの免疫抑制患者に発症する深在性真菌症であるが、現在その診断は培養と病理学的診断のみに頼らざるをえず、血清診断などの補助診断の開発が期待されている。我々は真菌研究における新しいアプローチであるシグナルシーケンストラップ法を利用し、接合菌 (*Rhizopus oryzae*) の膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定した。その結果、既知の蛋白質を含む302のクローンが得られた。その中から今後の研究に用いる蛋白質抗原の候補を選出した。

A. 研究目的

接合菌症は白血病などの免疫抑制患者にみられる深在性真菌症であり、剖検症例の報告では深在性真菌症の原因としてアスペルギルス、カンジダ、クリプトコックスに次ぐ原因真菌である。一方、白血病 (MDS を含む) 剖検例における主要深在性真菌症の年次別頻度からみれば、接合菌症はアスペルギルス症、カンジダ症に次ぐ、第 3 位にあたり、血液疾患の主要な死因と考えられる (深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2007、協和企画)。現在その診断は、専ら培養と病理学的診断に頼っているが、患者の全身状態は不良で侵襲的検査は限られるため、生前診断が困難な場合が多い。発症頻度の多いアスペルギルス症やカンジダ症、クリプトコックス症の診断には、血清抗原や抗体検査、 β -グルカン検査が使用されているが、接合菌症の早期診断法は未だ

開発されていない。また、接合菌症の治療には、(わが国では未発売のボサコナゾールと) アムホテリシン B 製剤のみが有効であるが、その予後も大変不良で初期の抗真菌薬選択が重要となる。そのためその早期診断法の開発は急務と考えられる。

我々は真菌研究における、新しいアプローチであるシグナルシーケンストラップ法を利用し、真菌の診断ツールならびに治療薬候補を応用することが期待される膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定し、モノクローナル抗体開発して、接合菌症の早期診断法を確立することを計画した。

B. 研究方法

「シグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法)」(Kojima T, Kitamura T. A signal sequence trap based on a

constitutively active cytokine receptor. Nat Biotechnol, 17:487-490, 1999) とよばれる細胞からの分泌蛋白質および膜蛋白質を選択的に同定するシステムが開発され、様々な蛋白質をコードする遺伝子群(cDNA ライブラリー)から、シグナルシーケンス(分泌蛋白質および膜蛋白質に共通して存在する疎水性のアミノ酸配列)を有する分泌蛋白質および膜蛋白質を選択的に同定することが可能となった。SST-REX 法は、現在前立腺癌などの癌研究の分野で応用されている技術であるが、真菌症においても様々な真菌から飛躍的に多くの新規抗原を検索できると考えられ、新しい抗原検査法の候補をより効率的にスクリーニングできることが期待される。

平成 22 年度は、接合菌より RNA を抽出して cDNA を作成し、シグナルシーケンストラップ法によって膜蛋白および分泌蛋白遺伝子を網羅的に同定した。またその後、その中から接合菌に特異的な蛋白の候補の選出を行った。

C. 研究結果

1. シグナルシーケンストラップによる膜蛋白および分泌蛋白遺伝子の検出

接合菌の代表菌種である *Rhizopus oryzae* (臨床分離株) を使用し、37°C、48時間培養後に RNA を抽出し、cDNA を作成した。その後シグナルシーケンストラップを行い、膜蛋白および分泌蛋白の候補として計 302 のクローンを得た(国立感染症研究所との共同研究)。

2. 候補抗原の選択

302 の候補蛋白のシーケンスおよび *R. oryzae* のデータベース (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html) より遺伝子の同定を行った。その結果、得られたクローンの中には、Lipase (クローン 4 つ) や phosphoglycerate kinase (クローン 2 つ)、heat shock protein 70 (クローン 1 つ) などの既知の蛋白も含まれていた

が、多くはその機能が未知な hypothetical protein や predicted protein であった(表)。

211 クローンが得られた hypothetical protein の中でも最も多い 163 のクローンを占めた蛋白(候補 A) は、226 アミノ酸から構成される約 23 kDa の蛋白で、アミノ酸配列解析の結果、シグナルシーケンスを有することが確認された。また 2 番目に多い 45 のクローンが得られた蛋白(候補 B) は、predicted protein に分類され、486 アミノ酸から構成される約 46 kDa の蛋白で、同様にシグナルシーケンスを有し、一部は細胞壁の β グルカン合成酵素に関連するタンパク質である可能性が示唆された。

(個々のクローンの遺伝子名は、今後の特許申請等にも関係があるため本稿には未記載。)

表. シグナルシーケンストラップ法により得られたクローンの内訳

	クローン数
hypothetical protein	211
predicted protein	72
既知の蛋白	19
計	302

D. 考察

初年度の研究結果からは、シグナルシーケンスの結果、得られたクローンには既知の酵素や heat shock protein 70 など認められたが、多くは未知の蛋白であり、現段階では接合菌の遺伝子に関する情報が十分ではなく、その点が接合菌研究の発展の支障となっていることも示唆された。

今回の研究で比較的多くのクローンが得られた 2 種類の蛋白抗原は、膜蛋白質および分泌蛋白質である可能性を示すシグナルシーケンスを有し、今後の研究の候補として選出した。H23 年以降は、ゲノム遺伝子の抽出および

びクローニング、さらには大腸菌や酵母細胞を利用した抗原蛋白の精製を行い、抗体作成を予定している。その後、実験感染マウス検体を用いて診断マーカーとしての評価を行うことを計画している。また最終的には、患者由来の検体を用いた再評価を行うことが必要である。

今回の研究で接合菌からのRNA抽出は、37°Cで酸素や栄養も豊富な条件下で培養された接合菌より抽出された。一方、感染宿主内では温度やpH、酸素濃度、栄養条件などが異なり、病原真菌にとってはストレス条件下であることも考えられる。そのような条件下では異なる膜蛋白や分泌蛋白のプロファイルが得られる可能性もある。

E. 結論

接合菌の代表菌種である*R. oryzae*よりシグナルシーケンストラップ法を用いて膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定した。その中から今後の研究の蛋白抗原の候補を選出した。

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, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Skn7p Is Involved in Oxidative Stress Response and Virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* 2010 169 : 81-90.
2. Mukae H, Urabe K, Yanagihara K, Ishimoto H, Sakamoto N, Ishii H, Nakayama S, Ishimatsu Y, Abe K, Shirai R, Kohno S. Low expression of T-cell co-stimulatory molecules in bone marrow-derived dendritic cells in a mouse

model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Tohoku J Exp Med* 2010 220 : 59-65.

3. Ide S, Soda H, Hakariya T, Takemoto S, Ishimoto H, Tomari S, Sawai T, Nagashima S, Furukawa M, Nakamura Y, Kohno S. Interstitial pneumonia probably associated with sorafenib treatment: An alert of an adverse event. *Lung Cancer* 2010 67 : 248-250.
4. Amenomori M, Mukae H, Sakamoto N, Kakugawa T, Hayashi T, Hara A, Hara Shintaro, Fujita H, Ishimoto H, Ishimatsu Y, Nagayasu T, Kohno S. HSP47 in lung fibroblasts is a predictor of survival in fibrotic nonspecific interstitial pneumonia. *Respir Med* 2010.
5. Kakugawa T, Mukae H, Hishikawa Y, Ishii H, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Fujii T, Koji T, Kohno S. Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Virchows Arch* 2010.
6. Amenomori M, Sakamoto N, Ashizawa K, Hayashi T, Kohno R, Yamamoto K, Ishimoto H, Mukae H, Kohno S. Dyspnea with a Slow-Growing Mass in the Breast. *Respiration* 2010 79 : 346-350.
7. Ishii H, Isomoto H, Shikuwa S, Hayashi T, Inoue N, Yamaguchi N, Ohnita K, Nanashima A, Ito M, Nakao K, Kohno S. Peyer's Patches in the Terminal Ileum in Ulcerative Colitis: Magnifying Endoscopic Findings. *J Clin Biochem Nutr* 2010 46 : 111-118.
8. Chan CC, Isomoto H, Ohnita K, Mizuta Y, Kohno S, Hayashi T. Colonic invasion of malignant peritoneal mesothelioma. *Gastrointest Endosc* 2010 71 : 397-398.
9. Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Role of the Slf2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in

- Candida glabrata*. FEMS Yeast Res 2010.
10. Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya 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 2010 54 : 1639-1643.
 11. Hara A, Mukae H, Hara S, Amenomori M, Ishimoto H, Kakugawa T, Fujita H, Sakamoto N, Ishii H, Ishimatsu Y, Kohno S. Drug-induced eosinophilic pneumonia with pulmonary alveolar hemorrhage caused by benzbromarone. Intern Med 2010 49 : 435-438.
 12. Matsushima K, Isomoto H, Inoue N, Nakayama T, Hayashi T, Nakayama M, Nakao K, Hirayama T, Kohno S. MicroRNA signatures in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. Int J Cancer 2010.
 13. Fukahori S, Matsuse H, Tsuchida T, Kawano T, Tomari S, Fukushima C, Kohno S. *Aspergillus fumigatus* Regulates Mite Allergen-pulsed Dendritic Cells in the Development of Asthma. Clinical & experimental allergy 2010.
 14. Inoue N, Isomoto H, Matsushima K, Hayashi T, Kunizaki M, Hidaka S, Machida H, Mitsutake N, Nanashima A, Takeshima F, Nakayama T, Ohtsuru A, Nakashima M, Nagayasu T, Yamashita S, Nakao K, Kohno S. Down-regulation of microRNA 10a expression in esophageal squamous cell carcinoma cells. Oncology Letters 2010 1 : 527-531.
 15. Kozu R, Jenkins S, Senjyu H, Mukae H, Sakamoto N, Kohno S. Peak power estimated from 6-minute walk distance in Asian patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. Respirology 2010 15 : 706-713.
 16. Kozu R, Senjyu H, Jenkins SC, Mukae H, Sakamoto N, Kohno S. Differences in Response to Pulmonary Rehabilitation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Respiration 2010.
 17. Amenomori M, Mukae H, Ishimatsu Y, Sakamoto N, Kakugawa T, Hara A, Hara S, Fujita H, Ishimoto H, Hayashi T, Kohno S. Differential effects of human neutrophil peptide-1 on growth factor and interleukin-8 production by human lung fibroblasts and epithelial cells. Exp Lung Res 2010 36 : 411-419.
 18. Matsumoto A, Isomoto H, Nakayama M, Hisatsune J, Nisihi Y, Nakashima Y, Matsushima K, Kurazono H, Nakao K, Hirayama T, Kohno S. *Helicobacter pylori* VacA reduces cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-X, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. Dig Dis Sci 2010.
 19. Ogawara D, Fukuda M, Nakamura Y, Kohno S. Efficacy and safety of amrubicin hydrochloride for treatment of relapsed small cell lung cancer. Cancer Management and Research 2010 2 : 191-195.
 20. Yoshioka D, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kakugawa T, Ishii H, Mukae H, Kadota J, Kohno S. Primary ciliary dyskinesia that responded to long-term, low-dose clarithromycin. Intern Med 2010 49 : 1437-1440.
 21. Obata Y, Furuu A, Nishino T, Ichinose H, Ohnita A, Iwasaki K, Taguchi T, Kohno S. Membranous nephropathy and Kimura's disease manifesting a hip mass. A case report with literature review. Intern Med 2010 49 : 1405-1409.
 22. Araki N, Yanagihara K, Morinaga Y, Yamada K, Nakamura S, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. Azithromycin inhibits nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced MUC5AC expression and secretion via inhibition of activator protein-1 in human airway epithelial cells. Eur J Pharmacol 2010 644 : 209-214.

学会発表

1. なし

実用新案登録

1. なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

その他

1. なし

特許取得

1. なし

2. MLSTによるクリプトコックスの分子疫学

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

研究要旨 クリプトコックス症は、主に *Cryptococcus neoformans* を原因菌をとする深在性真菌症である。福岡県久留米市周辺の地域で1年間に8例のクリプトコックス症患者が認められた。分離された7株についてMLST法により疫学解析を行ったところ、6株が同一な遺伝子型を示した。その結果、この地域における環境からの感染・発病が強く示唆された。

A. 研究目的

クリプトコックス症は、主に *Cryptococcus neoformans* を原因菌をとする深在性真菌症であり、環境中に浮遊する *C. neoformans* が経気道的に感染し肺病変や脳髄膜炎等を起こすが、わが国の限定された地域でほぼ同時期に多発した報告はほとんどない。福岡県久留米市周辺の筑後地区で2008年7月から2009年7月の間に8例のクリプトコックス症の発症が認められた。その分離株に対し疫学的解析を行なうことによって、院内感染やアウトブレイクの可能性について検討することを目的とする。

B. 研究方法

培養検査あるいはクリプトコックス抗原陽性が確認された8症例から分離培養された *C. neoformans* 7株を対象とした。これらの分離株よりゲノムDNAを抽出し、多遺伝子系統解析 (MLST; Multi-Locus Sequence Typing) を行った。MLSTはISHAM(The international society for human and animal mycology)委員会の推奨方法に則って、反応条件を少し変更して行った。分離した *C.*

neoformans の培養液より Gen とるくん(タカラバイオ社)を用いてゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAより表1に示すプライマーを用いて、CAP59, GPD1, LAC1, SOD1, PLB1, URA5, IGS1のそれぞれの領域をPCRで増幅

Gene locus	Primer name	Primer sequence
CAP59	CAP59F	CTCTACGTCGAGCAAGTCAAG
	CAP59R	TCCGCTGCA CAAGTGATACCC
GPD1	GPD1F	CCACCGAACCC TTCTAGGATA
	GPD1R	CTTCTGGCA CCTCCCTGAG
LAC1	LAC1F	AACATGTTCCCT GGGCCTGTG
	LAC1R2	TCGGACTATTAATCTCCAAACTC
PLB1	PLB1F	CTTCAGGCGGA GAGAGGTTT
	PLB1R	GATTTGGCGT TGGTTTCAGT
SOD1	SOD1CNF	AAGCCTCT CATCCATATCTT
	SOD1CNR	TTCACCAC GAATATGTA
URA5	URA5F	ATGTCCTCCA AGCCCTCGAC
	URA5R	TTAAGACCTCT GAACACCGTACTC
IGS1	IGSF	ATCCTTTGCAGA CGACTTGA
	IGSR	GTGATCAGTGC ATTGCATGA

表1 MLSTの各遺伝子を増幅するためのPCRプライマーした。

PCR増幅にはタカラバイオ社のMightyAmp DNA polymeraseを用いた。反応条件は、GPD1を除いた6種類については98°C 2 min; (98°C, 10 sec; 60°C, 15 sec; 68°C, 1 min)x40

cycles;68, 3 min で行った。GPD1 の反応条件は、94°C 3 min; (94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 1 min)x40 cycles;72, 3 min で行った。

アガロース電気泳動後 (図1)、切り出したゲルから DNA を回収し、その DNA 断片の塩基配列を決定した。得られた塩基配列をデータベース入力用に編集し、*C. neoformans* MLST データベース (<http://cneoformans.mlst.net>) を利用して MLST 解析を行った。系統樹解析は <http://pubmlst.org> にある web 型ソフトウェアを用いて行った。

C. 研究結果

患者背景では 8 例中 2 例は健常者、6 例はハイリスク者であった。年齢分布は 10 歳代 1 例、50 歳代 2 例、60 歳代 3 例、70 歳以上 2 例であった。臨床症状は 8 例ともクリプトコックス症を疑う症状を呈していた。

分離された 7 株について MLST による系統解析を行った結果、6 株が同一型であり、過去に日本で分離された株 id46 と遺伝子型が一致した (図2)。

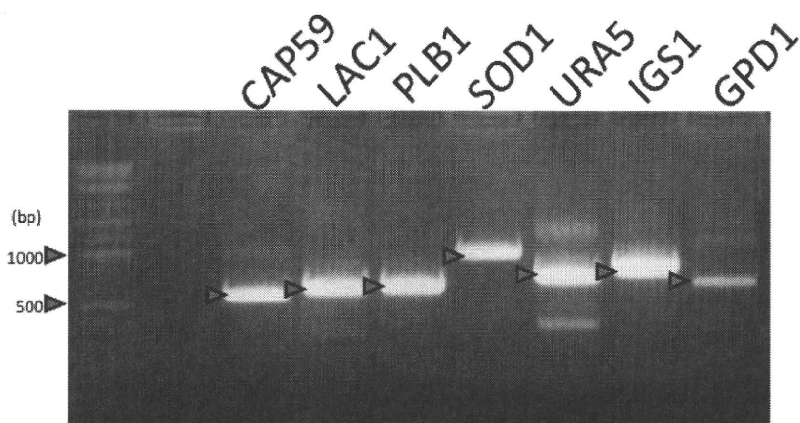


図1 クリプトコックスの MLST 解析に必要な遺伝子領域の PCR 増幅

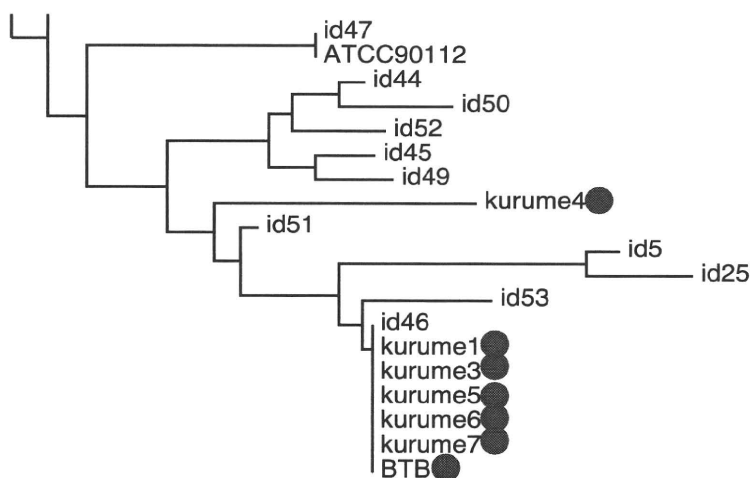


図2 MLST のデータを基にした各分離株の系統樹解析。本研究で解析した分離株を●で示す

D. 考察

*C. neoformans*の分子疫学法として、今回用いたMLST法は2009年にISHAMのワーキンググループによって提唱された国際標準である。従来の分子疫学研究はRAPD等のゲル電気泳動上のバンドパターンを比較するようなものが多く、再現性に難があり、他国・他機関との比較が困難であった。MLST法は塩基配列の組み合わせで比較するので、得られる情報は絶対的なものであり、全世界の分離株の比較が可能になるという点で多大なメリットがある。PCRの簡便さや塩基配列解析のコストダウンによって解析が容易になり、*C. neoformans*以外の菌種についてもMLST法が分子疫学の国際標準として汎用化されていくことが予想される。

今回の8例については居住地が比較的狭い地域に限られている以外、既往歴や職業などに接点はなかった。分離された株の間で遺伝子型がほぼ一致していたことから、この地域における環境からの感染・発病が強く示唆された。今後の本症の発生動向に注意する必要がある。現在、他の地域の*C. neoformans*分離株についてMLST系統解析を行い、本病原体の地域流行性について検討を行っている。

分子疫学は、わが国の真菌症の感染源に関する基盤データとなり、対策を講じる上で必須である。様々な地域や病院等でのアウトブレイクにおいて、対策に有用な判断指標を提供できると考えられる。

E. 結論

クリプトコックス症の分子疫学解析としてMLST法を確立した。この分子疫学法は真菌症対策を講じる上で必須である。

F. 健康危険情報

環境中のクリプトコックスが地域流行的感染を引き起こす可能性があるため、注意が必要

である。

G. 研究発表

論文発表

1. Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Jpn J Infect Dis.* 63:355-357, 2010.
2. Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya 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(4): 1639-43, 2010
3. Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Role of the Slr2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 10(3):343-52, 2010
4. 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.* 48(4):606-12, 2010.
5. Hoshino Y, Fujii S, Shinonaga H, Arai K, Saito F, Fukai T, Satoh H, Miyazaki Y, Ishikawa J. Monooxygenation of rifampicin catalyzed by the *rox* gene product of *Nocardia farcinica*: structure elucidation, gene identification and role in drug resistance. *J. Antibiot.* 63:23-8, 2010
6. 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 49:491-495, 2010.

7. 河野 茂、二木芳人、網谷良一、小川賢二、倉島篤行、宮崎義継：肺アスペルギルス症に対する micafungin の臨床効果。日本化学療法学会誌 58, 128-139. 2010

学会発表

1. 梅山 隆、大野秀明、棚町千代子、橋本好司、佐川公矯、田辺公一、山越 智、宮

崎義継：福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコックス症多発発生例の疫学的検討、第22回日本臨床微生物学会総会。岡山、2011年1月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

特になし。

実用新案登録

特になし。

その他

特になし

3. 外科真菌症の診断や疫学 —カンジダ症発症の因子—

研究分担者 三嶋 廣繁 愛知医科大学大学院医学研究科 感染制御学 教授

研究協力者 山岸 由佳 愛知医科大学病院 感染制御部 助教

研究要旨 外科領域における深在性真菌症治療における各種抗真菌薬の臨床的位置づけを明らかにするべく、以下の3項目について検討した。(1)ポリコナゾールの血中濃度モニタリングの評価により、臨床現場におけるポリコナゾールの使用法を明らかにした。(2)血液培養からカンジダ属が検出された成人30症例の解析から以下のことが明らかになった。カンジダ血症は死亡率が高いため、真菌血症を疑った時点で早期に抗真菌薬の全身投与が必須である。カンジダの菌種によって抗真菌薬の薬剤感受性が明らかに異なり、真菌血症など無菌的な検体から検出された真菌については、菌種レベルまで同定することが患者のアウトカムにつながると考えられる。無菌的な検体から検出された真菌については、可能な限り抗真菌薬の薬剤感受性試験を行うことで、オーダーメイド治療が可能となると考えられる。

A. 研究目的

1. 外科領域における深在性真菌症治療における各種抗真菌薬の臨床的位置づけを明らかにできる。
2. 外科領域において分離されたカンジダ属のアンチバイオグラムを作成できる。
3. 外科領域における深在性真菌症(侵襲性カンジダ症)の診断および治療に役立つレファレンスネットワークの構築を期待する。

(1) CYP2C19遺伝子解析結果からみたポリコナゾール血中濃度モニタリングの臨床的意義
深在性真菌症は診断が容易ではなく、病態によっては必ずしもよい治療効果が得られていない現状がある。深在性真菌症の多くは、重篤な基礎疾患を有し、免疫能が低下した易感染性宿主に日和見感染として発症する。したがって、

深在性真菌症は、今後も高度医療の普及や高齢化により増加することが予想される。

トリアゾール系の抗真菌薬のポリコナゾール(VRCZ)は、カンジダ属、アスペルギルス属、クリプトコックス属、フサリウム属、スケドスポリウム属など幅広い抗真菌スペクトルを有している。VRCZは深在性真菌症の診断・治療ガイドライン2007においてアスペルギルス症の第一選択薬として位置づけられているが、有害事象として重篤な肝障害、視覚障害などが現れることがある。海外においては、血中濃度と肝機能障害や視覚異常の発現には相関が認められている^{1), 2)}。また、VRCZはCYP2C19やCYP3A4、CYP2C9で代謝されるが、日本人の約20%がCYP2C19欠損者(poor metabolizer; PM)とされており³⁾、PMではVRCZの代謝が遅延し、EMと比較して血