

- 58回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 山形 (2011.10)
- 17) 大野秀明, 宮崎義継. 真菌症診断の現状と課題. 第128回ICD講習会, 東京 (2011.10)
- 18) 梅山隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越智, 宮崎義継. 標準化MLST解析法を用いたわが国のクリプトコックス属臨床分離株の分子疫学解析. 第55回日本医真菌学会学術集会, 東京 (2011.10)
- 19) 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 杉田隆, 畠山修司, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii* 臨床分離株の実験的病原性解析. 第55回日本医真菌学会学術集会, 東京 (2011.10)
- 20) 三原智, 泉川公一, 井手昇太郎, 平野勝治, 峰松明日香, 細萱直希, 永吉洋介, 田代将人, 中村茂樹, 今村圭文, 宮崎泰可, 掛屋弘, 山本善裕, 柳原克紀, 梅山隆, 大野秀明, 宮崎義継, 田代隆良, 河野茂. 長崎大学における *Cryptococcus* の Multilocus Sequence Typing (MLST) を用いた分子疫学解析. 第55回日本医真菌学学術集会, 東京 (2011.10)
- 21) 大野秀明, 田辺公一, 梅山隆, 金子幸弘, 山越智, 宮崎義継. クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*). 衛生微生物技術協議会 第32回研究会 東京 (2011.06)
- 22) 大野秀明, 田辺公一, 杉田隆, 畠山修司, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 亀井克彦, 宮崎義継. 国内で初めて分離されたVGIIa型 *Cryptococcus gattii* 株の薬剤感受性と病原性についての検討. 第59回日本化学療法学会総会, 札幌 (2011.06)
- 23) 徳山承明, 眞木二葉, 竹村弘, 高木妙子, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継, 亀井克彦, 長谷川泰弘. 日本人AIDS患者に発症したマ
- ルネツフェイ型ペニシリウム症の一例. 第32回関東医真菌懇話会, 東京 (2011.05)
- 24) 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 杉田隆, 畠山修司, 亀井克彦, 宮崎義継. 国立感染症研究所における地域流行型真菌症への対応と現状. 第32回関東医真菌懇話会, 東京 (2011.05)
- 25) 梅山隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越智, 渡邊浩, 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からの分離株のMLST法による疫学的検討. 第85回日本感染症学会総会, 東京 (2011.04)
- 26) 筋野恵介, 樽本憲人, 山口敏行, 前崎繁文, 梅山隆, 大野秀明, 宮崎義継. *Rothia* 属菌により出血性脳梗塞を合併した感染性心内膜炎の1例. 第85回日本感染症学会総会, 東京 (2011.04)
- 27) 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 宮崎義継. 遺伝子診断法を用いた土壌中に生息するヒストプラスマ属検出の試み. 第85回日本感染症学会総会, 東京 (2011.04)
- 28) 佐々木純, 上野智規, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 後藤希代子. PML法を用いた上皮細胞間におけるHCMV臨床分離株の感染経路の検討. 第26回ヘルペスウイルス研究会, 大阪 (2011.06)
- 29) Sasaki J, Ueno T, Katano H, Sata T, Ogawa-Goto K. Analysis for cell-to-cell spread of HCMV in epithelial cells by using the PML assay: The IUMS2011 Congress, XV, International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 30) 加藤俊一. 造血幹細胞移植の現状と展望. 第28回日本医学会総会. 東京 (2011.04)

- 31) Kato S, et al. High incidence of radiation-induced cavernous hemangioma (RICH) in long-term survivors who underwent blood and marrow transplantation (BMT) in childhood. ESLCCC2011, Amsterdam (2011.09)
- 32) Kato S, et al. Early and quantitative assay to detect HHV-6 viremia and evaluation of cellular response specific against HHV-6 after hematopoietic stem cell transplantation. The Joint Meeting of The XVIIth International Symposium on Gnotobiology and The XXXIVth Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease, Yokohama (2011.09)
- 33) 石上雅敏, 大西康晴, 伊藤孝司, 山口尚子, 坪井千里, 片野義明, 木内哲也, 後藤秀実. 当院におけるHBV関連肝移植症例における再発予防戦略. 第29回日本肝移植研究会, 仙台 (2011. 07)
- 34) 石上雅敏, 木内哲也, 後藤秀実. 当院における肝移植後原疾患再発対策. 第39回日本肝臓学会西部会, 岡山 (2011. 12)
- 35) 鈴木道雄, 鳥居ゆか, 河野好彦, 木村宏, 伊藤嘉規. 肝移植後成人および小児例におけるインフルエンザワクチン接種の有効性・安全性についての検討. 第15回日本ワクチン学会学術集会, 東京 (2011. 12)
- 36) Ito T, Onishi Y, Ishigami M, Kiuchi T. Osteoporosis before and after adult living donor liver transplantation: 2011 Joint International Congress of ILTS, ELITA, and LICAGE, Valencia, Spain (2011. 06)
- 37) Ishigami M, Onishi Y, Ito T, Katano Y, Kiuchi T, Goto H. Risk factors of LDLT in patients with liver cirrhosis in recent era of comprehensive indication: significance of recipient age and preoperative fasting blood glucose: 2011 Joint International Congress of ILTS, ELITA, and LICAGE, Valencia, Spain (2011. 06)
- 38) Koike H, Kiuchi T, Iijima M, Ueda M, Ando Y, Morozumi S, Tomita M, Kawagashira Y, Watanabe H, Katsuno M, Shimoyama Y, Okazaki Y, Kamei H, Sobue G. Systemic but asymptomatic transthyretin amyloidosis eight years after domino liver transplantation: VIIIth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Kumamoto, Japan (2011.11)
- 39) Kimura H, Gotoh K, Maruo S, Takada K, Iwata S, Goshima F, Nishiyama Y, Ito Y.: Ex vivo model for Epstein-Barr virus primary infection using human tonsil tissue explants. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011. 09)
- 40) 木村宏. EBウイルスリンパ関連T/NKリンパ増殖性疾患. 第43回, 日本小児感染症学会, 教育講演. 岡山(2011. 10)
- H. 知的財産権の出願・登録
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

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)

分担研究報告書

臓器移植患者の予後および QOL の向上のための真菌やウイルス感染症

の予防・診断・治療に関する研究(H21-新興一般-009)

DNA ポリメラーゼ変異によるアシクロビル耐性 HSV-1 感染症に対する治療戦略構築に関する研究

研究代表者

西條政幸

国立感染症研究所ウイルス第一部・部長

研究要旨:造血幹細胞移植患者等,免疫不全状態にある患者においては単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)感染症の発生頻度は高まり,また,症状が重くなることがある。臓器移植患者においては抗 HSV-1 活性のあるアシクロビル(acyclovir, ACV)の予防投与がなされ,発症時には ACV 投与による治療がなされる。そのため,臓器移植患者では,ACV に耐性を示す HSV-1 感染症が発生することがある。ACV に耐性を示す HSV-1 には,ACV をリン酸化する活性を有するウイルス性チミジンリン酸化酵素または DNA ポリメラーゼ(DNApol)に変異が認められる。本研究では,DNApol における変異が原因で ACV に耐性を示す HSV-1(DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1)感染症の治療法や診断法を開発する目的で,DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の性状を解析した。DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の多くは,フォスカルネットとビダラビンに交叉耐性を示すものの,シドフォビル,ガンシクロビル(GCV),ブリブジン,ソリブジンに感受性または高度感受性を示した。多くはマウスにおける病原性が低下していたが,親株とほぼ同等の病原性を呈する DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 も存在した。DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 感染症に対して,マウス動物モデルを用いて ACV と GCV による治療効果を解析したところ,ACV には抵抗性を示したものの,GCV の治療効果は認められた。臓器移植患者における HSV-1 感染症に治療に対しては,迅速な薬剤感受性試験と適切な抗ウイルス薬投与による治療が必要であることが示唆された。

研究協力者

(1) 国立感染症研究所ウイルス第一部

王麗欣,伊藤睦代,林昌宏

(2) 福島県立医科大学微生物学教室

錫谷達夫

造血幹細胞移植患者においては,極度に免疫能が低下することにより,潜伏感染している単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)や 2 型(HSV-2)が再活性化し,それらのウイルスによる皮膚粘膜感染症が重症化し,また,難治化することが多い。さらに,症状は起こさなくても無症候性に排出することが多い。本研究班のこれまでの研究では,

A. 研究目的

造血幹細胞移植患者では、比較的高い頻度で ACV 耐性 HSV-1 が出現し、その一部は DNA ポリメラーゼ (DNApol) に認められた変異が原因となっていることが示された。また、これまでの報告から、ACV 耐性 HSV-1 の約 95% はウイルス性チミジンリン酸化酵素 (viral thymidine kinase, vTK) における変異に、残りの約 5% は DNApol における変異に原因があるとされている。本研究では、実験的に DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 を作製し、その性状を解析することにより、DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 感染症に対する診断法や治療法、予防に資する知見を得た。

B. 研究方法

1) ウイルス

vTK 非関連抗ウイルス薬 S2242 (2-Amino-7-(1, 3-dihydroxy-2-propoxymethyl) purine, 20 μ g/ml) 存在下で、30 クローンの HSV-1 TAS を独立した条件で増殖させ、各クローンから得られた S2242 存在下で増殖したウイルスをそれぞれクローニングし、S2242 および ACV に耐性を示した 3 株 (S2242-ACVr CL16, 24, 30) を用いた。また、ACV 存在下で増殖させ得られた 3 株の DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 (AAC 47:1707-1713, 2003) を用いた。

2) 抗ウイルス薬

vTK 関連抗 HSV-1 薬として、ACV、ガンシクロビル (ganciclovir, GCV)、ペンシクロビル (penciclovir, PCV)、ブリブジン (brivudine, BVDU)、ソリブジン (sorivudine, BVaraU)、および、スポンゴチミジン (*spongothymidine*, 1- β -arabinofuranosylthymine, ara-T) を用いた。

また、非 vTK 関連抗 HSV-1 薬として S2242、シドフォビル (cidofovir, CDV)、フォスカルネット (foscarnet, FOS)、および、ビダラビン (vidarabine, ara-A、日本では商品名がアラセナ A) を用いた。CDV は De Clercq E (Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit, Leuven, Belgium) から、S2242 は Gerhard Jahane (Hoechst, Frankfurt, Germany) から、BVaraU は N Ashida (Yamasa Corporation, Chiba, Japan) から供与された。

3) 薬剤感受性試験

各ウイルスの ACV, GCV, PCV, ara-A, に対する感受性は、24 穴の細胞培養プレートに増殖させた Vero 細胞を、BVDU, BVaraU, ara-T に対する感受性は 24 穴の細胞培養プレートに増殖させたヒト胎児肺繊維芽細胞を用いてプラーク減少法により測定した。対照 (薬剤が加えられていないウエルのプラーク数) に対して、50% のプラーク数を形成する時の ACV 濃度 (50% inhibitory concentration, IC₅₀) を求めた。IC₅₀ がコントロールウイルス 5 株の IC₅₀ の log₁₀ 値の平均値 +2SD 以上の IC₅₀ を示した場合を耐性、平均値 \pm 2SD を示した場合を感受性、平均値 -2SD を示した場合を高度感受性と判定した。

4) DNApol 関連 ACVr HSV-1 の DNApol 遺伝子の解析

作製された DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 (S2242-ACVr CL16, 24, 30) の DNApol 遺伝子の塩基配列はダイレクトシーケンス法により決定した (AAC 49:601-611, 2005)。

5) DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 のマウスにおける神経毒性

親株 TAS 株および 6 株の DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 のそれぞれを、10 倍階段希釈して脳内接種(30 μ l/頭, 各希釈段階 5 頭)し、50 % Lethal Dose (LD₅₀)を決定した。各 DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の LD₅₀ の log10 値を TAS 株のそれで除した値を antigenicity index とした。Antigenicity index が高い程病原性が低下し、その値が 2 であるときには病原性が 10² 倍低下していることを示す。

- 6) DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 感染症に対する ACV および GCV の治療効果
- ACV に耐性を示し、親株 TAS とほぼ同等の神経病原性を示した株 (S2242-ACVr CL24) と TAS 株(それぞれ LD₅₀ の 10 倍量)を、それぞれ BALB/c マウスに感染させ、ACV または GCV の腹腔内投与方法により投与し、その治療効果を解析した。

(倫理面からの配慮について)

本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認のもとに実施された。

C. 研究結果

- 1) DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の薬剤感受性
- 6 株の DNApol 関連 ACVr HSV-1 株は、傾向として FOS および ara-A に交叉耐性を示し、CDV, GCV, BVDU, BVaraU, ara-T に感受性、または、高度感受性を呈した。PCV に対しては 1 株を除いて感受性を示した(表1)。
- 2) DNApol 関連 ACVr HSV-1 の DNApol 遺伝子における変異

各 DNApol 関連 ACVr HSV-1 の DNApol 遺伝子に認められた塩基配列およびアミノ酸変異部位を図 1A および表 1 にまとめた。多くは保存領域 II および III に認められた。

- 3) DNApol 関連 ACVr HSV-1 の一段階増殖能
- 感染 12 時間後の増殖能を比較すると、親株、耐性株ともに同等の一段階増殖能を示した(図 1B)。
- 4) DNApol 関連 ACVr HSV-1 のマウスにおける神経毒性
- 6 株の DNApol 関連 ACVr HSV-1 のうち、1 株(S2242-ACVr CL24)を除いて 100 倍以上の病原性の低下が認められた。S2242-ACVr CL24 のマウスにおける神経毒性は親株の TAS のそれとほぼ同等であった(図 1C)。
- 5) DNApol 関連 ACVr HSV-1 感染症に対する ACV および GCV の治療効果

TAS とほぼ同等の神経毒性を示した S2242-ACVr CL24 と TAS によるマウスにおける感染症に対する ACV と GCV による治療効果について解析した(図 1D)。S2242-ACVr CL24 感染マウスにおいて、ACV 投与されたマウスは抗ウイルス薬が投与されない対照と同程度の死亡率が認めら、一方 GCV 投与されたマウスは全頭生存した(図 1D 左図)。GCV の治療効果が認められた。TAS 感染マウスにおいては、ACV と GCV による治療効果はほぼ同等であった(図 1D, 右図)。

D. 考察

本研究班では、造血幹細胞移植術を受ける血液疾患患者において、前方視的に HSV-1 の排出状況について検討している。このような患者では、ACV に耐性を示す HSV-1 が出現する。また、

ACVr HSV-1 の耐性誘導責任遺伝子が DNAPol に認められることも明らかにされている。造血幹細胞移植患者におけるHSV-1 感染症に対する治療および診断法の確立は重要な課題である。

本研究で明らかにされた事項は以下の様になる。1)DNAPol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の多くは CDV, GCV, BVDU に感受性, または, 高度感受性を示し, さらに, PCV に対しては感受性を示し, 耐性を示したとしてもその耐性の程度は低い, 2)多くはマウスにおける神経病原性が低下しているが, 中には, 親株と同等の病原性を示すものが存在する, 3)GCV による治療が有効である, 等である。

臓器移植患者等で発症することの多い ACV 耐性 HSV-1 感染症の適切な治療を行うには, 原因 HSV-1 の薬剤感受性を迅速に調べる必要があることが示された。一般的に ACV 耐性 HSV-1 感染症に対しては, ACV 耐性 HSV-1 における責任遺伝子変異が vTK に認められることから, ara-A(アラセナ A), CDV, FOS が用いられる。しかし, 頻度が少ないものの DNAPol 関連 ACVr HSV-1 による感染である場合があり, それには CDV が有効であると考えられる。さらに, このような感染症のほぼ全てに対しては比較的副作用の少ない PCV や GCV も有効であることが示された。今回, 調べられてはいないが, これまでの報告では, ACV の高力価持続点滴静注用法も有効であると考えられる。

我が国においては, HSV-1, HSV-2, および, 水痘帯状疱疹ウイルスの薬剤感受性を測定するコマーシャルラボは存在しない。また, そのような検査が可能な研究室も限られている。今後, 臓器移植患者がさらに増加することが予想され, そのような患者において問題となる可能性の高い薬剤

耐性ヘルペスウイルス感染症に適切な治療を行う必要がある。薬剤感受性を迅速に検査できる施設を整備することが必要である。

E. 結論

臓器移植患者において出現することの多い DNAPol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の多くは, CDV, GCV, BVDU, BVaraU, ara-T に感受性, または, 高度感受性を示す。DNAPol 関連 ACV 耐性 HSV-1 感染症には, 一般的に用いられることの多い CDV に加えて GCV, BVDU 投与による治療も効果的である可能性が示唆された。臓器移植患者における HSV-1 感染症の治療には, 原因ウイルスの迅速な解析が不可欠であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiota T, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. Long-term observation of HSV-1 infections in a child with Wiskott-Aldrich syndrome and possible mechanism of TK-negative HSV-1 in humans. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 64:121-126, 2011
- 2) Shiota T, Wang L, Ito M, Iizuka I, Ogata M, Tsuji M, Nishimura H, Taniguchi S, Morikawa S, Kurane I, Mizuguchi M, Saijo M. Expression of herpes simplex virus type 1 recombinant thymidine kinase and its application to a rapid antiviral sensitivity assay. *Antiviral Research*

91:142-149, 2011

- 3) Nakamichi K, Kurane I, Saijo M. Evaluation of a quantitative real-time PCR assay for detection of JC polyomavirus DNA in cerebrospinal fluid without the need for nucleic acid extraction. Japanese Journal of Infectious Diseases 64:211-216, 2011

2. 学会発表

- 1) 西條政幸. ヘルペスウイルスによる中枢神経感染症. 第 16 回日本神経感染症学会学術集会, 東京(2011. 11)
- 2) 中道一生, 林昌宏, 倉根一郎, 西條政幸. 進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に出現する JC ポリオーマウイルスゲノムの転写調節領域における変異パターンの解析. 第 16 回日本神経感染症学会学術集会, 東京(2011. 11)
- 3) Wang, L., Tsuji, M., Taniguchi, S., Nishimura, H., Ito-(Takayama), M., Yamaguchi-(Kinoshita), H., Saijo, M.: Shedding of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and emergence of drug-resistant HSV-1 in patients with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. XV International Congress of Virology,

Sapporo, Japan (2011.09)

- 4) Nakamichi, K., Kurane, I., Saijo, M.: Detection of JC polyomavirus DNA in cerebrospinal fluids collected from patients suspected as having progressive multifocal leukoencephalopathy in Japan. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.09)
- 5) 王麗欣, 辻正徳, 谷口修一, 西村秀一, 伊藤(高山)睦代, 山口(木下)一美, 西條政幸. 造血幹細胞移植患者における単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)の口腔内への排出状況と薬剤耐性 HSV-1 の出現. 第 21 回抗ウイルス療法研究会, 金沢(2011.05)
- 6) 西條政幸. 臓器移植患者と薬剤耐性ヘルペスウイルス感染症. 第 21 回感染研シンポジウム, 東京(国立感染症研究所)(2011.05)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

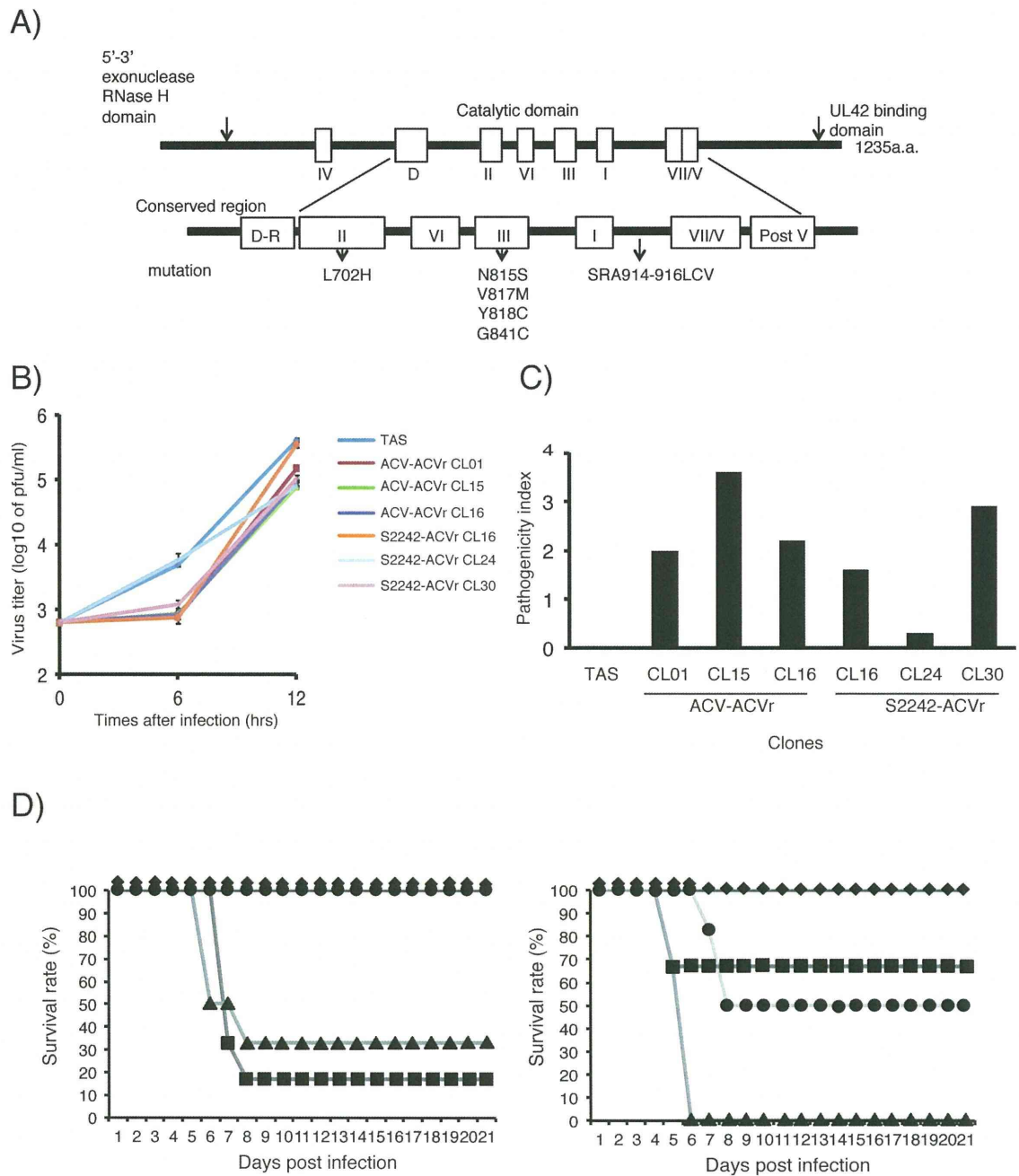


図 1. DNApol 関連 HSV-1 の性状 [DNApol におけるアミノ酸変異(A), 一段階増殖能(B), マウスにおける神経病原性(C), S2242-ACVr LC24 (D, 左図)および TAS (D, 右図)感染マウスに対する ACV と GCV による治療効果(D)]

表 1. DNApol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の抗 HSV-1 に対する感受性

ACVr HSV-1	DNApol における遺伝子変異	IC ₅₀ of the indicated drug (μg/ml)									
		クローン	(塩基/アミノ酸, 変異部位)	ACV	PCV	GCV	BVDU	BVaraU	araT	FOS	CDV
S2242-	16 A2453G/Y818C, III	<u>7.0</u>	<u>1.45</u>	0.070	0.050	<0.0040	0.045	>100	<u>0.57</u>	<u>2.3</u>	
ACV ^r CL											
	24 A2444G/N815S, III	<u>85</u>	<u>1.45</u>	0.005	0.19	<0.0040	0.011	16	<0.1	0.40	
	30 G2449A/V817M, III	<u>5.0</u>	0.70	0.025	0.060	0.0090	0.07	>100	0.16	<u>20</u>	
ACV-A	01 G2521T/G841C, III	<u>8.0</u>	0.60	0.015	0.023	0.0080	0.76	>100	0.21	<u>24</u>	
CV ^r -CL	15 C2739-2749T/SRA914-916L	<u>3.4</u>	0.23	0.017	0.074	0.0080	0.40	>100	<0.10	6.6	
	CV, Inter I-V II										
	16 T2105A/L702H, II	<u>7.8</u>	0.58	0.014	0.032	0.012	0.25	>100	<0.10	<u>27</u>	

TAS 株 5 クローンの IC₅₀ の平均値+/-2 標準偏差の値は, ACV に対しては 0.075-0.14-0.20 μg/ml, PCV に対しては 0.28-0.46-0.75 μg/ml, GCV に対しては 0.017-0.11-0.43 μg/ml, BVDU に対しては 0.0077-0.076-0.44 μg/ml, BVaraU に対しては 0.014-0.021-0.15 μg/ml, ara-T に対しては 0.12-0.21-0.36 μg/ml, FOS に対しては(34-44-56 μg/ml, CDV に対しては 0.085-0.20-0.33 μg/ml), ara-A に対しては(4.3-8.5-9.0 μg/ml) であった. 下線とともに表示されている IC₅₀ 値は耐性を示す.

臓器移植患者の予後および QOL の向上のための真菌やウイルス感染症

の予防・診断・治療に関する研究(H21-新興-一般-009)

生体肝移植後感染症の臨床疫学調査

研究分担者 一山 智 (京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学 教授)

研究要旨: 2011 年 1 月以降, 京都大学医学部附属病院にて実施した生体肝移植術後の全症例について術後の感染症発症の有無を調査した. 術後 1 ヶ月間フォローした 55 例のうち, 手術部位感染は 20 例(36.4%)に発生し, その 90% (18 例)は臓器・体腔感染であった. 血流感染は 15 例(27.3%)に発生し, その 73%が手術部位感染を伴う例であった. この中に有意な真菌感染症の発症例はなかった.

研究協力者

(1) 京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学

高倉 俊二

(倫理面からの配慮について)

本研究では個人情報や匿名化され, 診断は後ろ向きで新たな医療介入も伴わないため倫理面への配慮は不要である. ただし, 疫学研究倫理指針に基づいて研究計画を立て, 必要に応じて大学の医の倫理委員会の承認をえて行った.

A. 研究目的

生体肝移植術後の全症例について術後の感染症発症の有無を調査しシステムの評価をすると共に, 診療や予防策を考える上で必要な疫学的データを集積し解析する.

C. 研究結果

術後 1 ヶ月間フォローした 55 例のうち, 手術部位感染は 20 例(36.4%)に発生し, その 90%(18 例)は臓器・体腔感染であった. 血流感染は 15 例(27.3%)に発生し, その 73%が手術部位感染を伴う例であった. 原因菌では *Enterococcus faecium*, Coagulase-negative staphylococci, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. が多く, この 4 菌種で 70%以上を占めていた. また, *E. coli*, *Klebsiella* sp.の約半数が ESBL 産生菌であった. この 55 例に有意な真菌感染症は発症しなかった.

B. 研究方法

「生体肝移植後感染症の臨床疫学調査」の計画を立案し, 京都大学医の倫理委員会の承認をえた上で, 2011 年 1 月以降, 京都大学医学部附属病院にて実施した生体肝移植術後の全症例について術後の感染症発症の有無を調査した. 症例票を作成してカルテレビューを行い, 細菌培養検査結果を参照しつつ, 担当医に照会してフォーカス, 原因菌を確認した. 抗真菌薬の予防投与について方針を定め, 真菌感染症の発症について評価した.

D. 考察

生体肝移植後感染症において、深部手術部位感染(臓器・体腔感染)と血流感染の強い相関性が示された。抗真菌薬の予防投与を一定の方針で行うことで真菌感染症が抑制されることが示唆された。ESBL 産生グラム陰性桿菌の増加への院内感染予防対策、ドレーン・血管内カテーテルの管理の向上が喫緊の課題であると考えられた。

E. 結論

生体肝移植後の感染症は深部手術部位感染から血流感染を誘発しやすく、耐性菌感染にもつながりやすい。これらへの対策を講じつつ抗真菌薬予防投与を体系化することが真菌感染症抑制に有効であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Yamamoto M, Takakura S, Hotta G, Matsumura Y, Matsushima A, Miki N, Ito Y, Ichiyama S. Clinical Characteristics and Risk Factors of Non-*Candida*

Fungaemia in a Tertiary-Care University Hospital in Japan. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012. In submission.

- 2) Nagao M, Saito T, Hotta G, Doi S, Yamamoto M, Matsumura Y, Matsushima A, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. Clinical characteristics of ocular candidiasis. When should fundoscopy be performed to rule out ocular candidiasis? Clin Microbiol Infect. 2012. In submission.

2.学会発表

- 1) 高倉俊二. 肝移植後感染症の特性と対策:第13回肝移植術後管理検討会, 京都(2012. 1)
- 2) Takakura S. Changing Epidemiology of Nosocomial Yeast Fungemia. IUMS 2011 Congress, Sapporo (2011, 9)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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)
分担研究報告書

臓器移植患者の予後および QOL の向上のための真菌やウイルス感染症
の予防・診断・治療に関する研究(H21-新興-一般-009)

感染初期過程を阻害する新規抗ヘルペスウイルス化合物の作用点解析

研究分担者 井上 直樹 国立感染症研究所ウイルス第一部 第四室長

研究要旨:新規抗ヘルペスウイルス薬開発を目的として、これまでにランダム化合物のスクリーニングにより、いくつかの化合物を同定した。今年度は、抗 VZV 化合物のひとつ triazin-4-one 誘導体 35B2 に対する耐性株の解析などから、この化合物が主要カプシド蛋白を標的としてカプシド形成を阻害する新規の作用機序を持つ化合物であることを明らかにした。主要カプシド蛋白はヘルペスウイルス科のウイルス内で共通性の高い配列をもつことから、全てのヘルペスウイルスに効果を有する薬剤を検索するためのリードとなると考えられる。

A. 研究目的

現在用いられている、ないしはFDAにより認可されている抗ヘルペスウイルス薬は、サイトメガロウイルス(CMV)の前初期蛋白 IE2 に対するアンチセンス RNA であるフォミビルセンを除き、DNA 複製を阻害する核酸基質アナログである。これらの核酸基質アナログの抗ウイルス薬は有効であるが、耐性株の出現、副作用、投与方法などのため使用上の制約があり、作用機序の異なる新規薬剤の開発が求められている。

新規抗ヘルペスウイルス薬の検索や耐性株の検出には、依然として感染性ウイルス力価を計測する生物学的方法が有効であるが、増殖の遅い CMV 及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)では、時間と労力がかかりすぎ、迅速な対応が求められる耐性株検出やマススクリーニングが伴う新規薬剤の検索には困難が生じている。既存薬に対する耐性株の検出については、耐性が予想される変異を遺伝子レベルで同定する方法が普及しつつあるが、すべての耐性変異に対応することは現実的ではない。

我々は、ウイルス前初期蛋白により活性化される初期遺伝子プロモーターを利用し、酵素反応による化学発光を指標として容易に力価を測定できるレポーター細胞株を CMV 及び VZV についてそれぞれ樹立し、これらの細胞株を用いて両ウイルスの感染初期過程を阻害する化合物の検索をこれまで行ってきた。今年度は、スクリーニングで同定された抗 VZV 化合物について、その抗ウイルス活性の作用機序を解析した。

B. 研究方法

1) プラーク形成阻害アッセイ

12 穴プレートにまき込んだ線維芽細胞に 50-100PFU/穴でウイルスを接種し 1-2 時間培養後、接種液を除き、2 倍階段希釈した薬剤、1%メチルセルロース、4%FBS を含む MEM 培地で培養した(VZV 7-8 日, MCMV 4-5 日)。2% crystal violet を含む 10%ホルマリンで固定染色後プラーク数を実体顕微鏡下で測定し、薬剤によるプラーク形成阻害率を薬剤濃度に対する linear regression 法にて解析し EC50 を求めた。また、プラーク形成の代わりに、VZV ではメチルセルロースを用いることなく感染 3-4 日後に細胞を 3.5%ホルマリンで 5 分固定し、TritonX-100 処理後、抗 VZV IE62 モノクローナル抗体(Chemicon)、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体と順次反応させ、最終的に DAB を用いて染色し、抗原陽性のフォーカスを計数する方法も用いた。

2) ウイルス DNA の定量

感染細胞からの核酸精製は、市販キットを用いた。リアルタイム PCR には、市販キット(TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosciences)を用いた。VZV のゲノムコピー数の測定は、IE62 遺伝子を標的とした。細胞当たりのコピー数を求めるために、ヒトアルブミン遺伝子(Gault et al. 2001)ないしはモルモット β アクチン遺伝子(Nozawa et al. 2008)のコピー数を求めた。

3) 塩基配列の決定

感染細胞から精製したDNAを材料として、各遺伝子特異的なプライマーを用いてPCR増幅を行い、各遺伝子DNA断片を得た。増幅にはPfuIポリメラーゼを用いた。DNA断片を精製後、塩基配列をBigDye terminator circle sequence法により決定した。

4) 抗体の作製、レーザー顕微鏡による抗原の検出

ORF40の309-929アミノ酸領域をpGEX6-1にクローニングし、GSTとの融合蛋白をBL21で産生させ、2M尿素処理不溶性画分として部分精製し、ウサギの免疫に用いた。得られた抗血清を用いて、蛍光抗体法を行い、レーザー顕微鏡(Zeiss)を用いてORF40産物(MCP)を検出した。

5) 透過型電子顕微鏡による観察

感染細胞を回収し、2.5% glutaraldehyde 入り 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) で 2 時間固定後、1% osmium tetroxide 処理を行い、Epon に包埋した。そこから得た薄片を uranyl acetate/lead citrate 処理後、電子顕微鏡観察を行った。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験は、機関内承認に基づき、法を順守して行った。

C. 研究結果

1. 新規抗 VZV 化合物 35B2 耐性株の耐性試験

昨年度、MeWo 細胞を用いて、triazin-4-one 誘導体 35B2 に対する耐性株 R1 から R4 までの 4 株を作出した。本年度は GPL 細胞を用いて、さらに 20 株の耐性株を作出した。VZV は細胞フリーウイルスの作製に困難さがあるため、これらの耐性株の EC50 を感染細胞からのフォーカス形成の減少を指標に決定した。その結果、親株の 2 倍から 20 倍程度の耐性を獲得していた(表 1)。

フォーカス減少法の結果を別の方法で確認するため、10 μ M もしくは 25 μ M 35B2 存在下で 3 日培養した感染細胞中のウイルス DNA 量をリアルタイム PCR 法により決定し、相対的 DNA 量と EC50 の値に相関があることを明らかにした(図 1)。

2. 35B2 耐性株の遺伝子解析

35B2 耐性変異を同定するために、耐性株 R1 の感染細胞 DNA を調製し、各遺伝子の翻訳領域を PCR により増幅後、塩基配列を決定し、薬剤感受性の親株配列との比較を行った。その結果、約 120kb のゲノム中に 9 か所の塩基配列の違いを認め、内 4 変異が ORF0, ORF1, ORF31, ORF40, ORF62 にアミノ酸変異をもたらすものであった。なお、ORF0 と ORF1 はオーバーラップがあるため、1 変異で 2 つの遺伝子に変異が見られている。変異が見られる 5 遺伝子産物のいずれが耐性に関与するかを明確にするために、R2, R3, R4 の 3 株について、5 遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、3 株全てに ORF40 に、2 株に ORF62 に変異が見られたことから、このいずれかの遺伝子が関与すると考えられた。そこで、本年度作出した 10 株について、ORF40 と ORF62 の塩基配列を解析したところ、全て ORF40 に変異が見られ ORF62 には変異はなかった。このことから、35B2 は ORF40 遺伝子産物を標的とする抗 VZV 化合物であることが明らかとなった。ORF40 は、主要カプシド蛋白 MCP をコードしており、これまでにこの蛋白を標的とする化合物は知られていない。

主要カプシド蛋白の配列は、ヘルペスウイルス間で良く保存されたもののひとつであり、単純ヘルペスウイルス(HSV)の主要カプシド蛋白 VP5 と VZV の MCP のアミノ酸配列間には、51%の同一性、86%の相同性がある。HSV の VP5 の構造は、upper, middle, bottom の 3 つのドメインからなることが報告されており、このうち bottom ドメインはカプシド形成の裏打ち構造の核となる scaffold 蛋白のカルボキシル末端と相互作用する。今回同定した 35B2 耐性株に見られた変異はクラスターをなしており、大半が HSV の bottom ドメインに位置した。

3. 35B2 によるカプシド形成阻害

35B2 が VZV MCP を標的とすることから、MCP と GST 蛋白との融合蛋白を産生し、ウサギを免疫して特異的抗体を調製した。この抗体を用いて、感染細胞での MCP の局在を解析したところ、図 2 に示すように、核内で広く分布していた MCP のが、35B2 処理により、核膜に近い位置に比較的大きなドット状に局在していた。一方、耐性株では、35B2 処理、未処理ともに核内に広く分布する親株の未処理と同様な局在であり、MCP のドット状の局在と 35B2 感受性に相

関があった。

こうしたドット状の局在は、HSV でカプシド形成が正常に行えなくなった変異に報告されていることから、次に、透過型電顕によりカプシド形成が正常に行われているかを検討した。その結果、35B2 未処理(図 3A, 3B) では、DNA を持たない前駆体カプシド、DNA を有する成熟カプシドの両者を含む細胞が 50 個の細胞あたり 1 個に観察された。この頻度は、MOI=0.02 感染に対応している。一方、35B2 処理細胞(図 3C, 3D)では、500 細胞を観察しても、ひとつとしてカプシド形成を認めることはなかった。従って、35B2 はカプシド形成を阻害する化合物であることが示された。

D. 考察

核酸アナログの抗ヘルペスウイルス薬の開発は、側鎖を修飾し生体への吸収効率をあげることや、ポリメラーゼ認識部位の特異性を上げることで、副反応を減少させることを重点に進んできており、シドホビル誘導体を中心に臨床試験が進められている。移植症例の増大する中で、耐性株の出現も問題となることから、現行治療薬のバックアップとなる次世代薬剤が求められている。しかしながら、非核酸アナログで次世代の抗ウイルス薬剤として期待されてきた Marivabir をはじめとしたいくつかの薬剤が第2相臨床試験などで十分な効果が証明できないとして開発が中断・中止されている。こうした状況の中で、新たな抗ウイルス薬の標的やリードとなり得る化合物を探索し、そのひとつ 35B2 がカプシド形成阻害という新たな標的に作用することを示したことの意義は大きいと考える。ヘルペスウイルス間でのカプシド配列や構造の類似性から考えると、この化合物をリードとして、ヘルペスウイルス科のすべてのウイルスに作用するような有用性の高い薬剤が今後開発可能ではないかと考えられる。

E. 結論

新規抗 VZV 化合物 35B2 の作用点が主要カプシド蛋白であり、カプシドの形成阻害をしていることを明らかにした。

F. 健康危険情報

該当項目なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue, N., Matsushita, M., Fukui, Y., Yamada, S., Tsuda, M., Higashi, C., Kaneko, K., Hasegawa, H., Yamaguchi, T.: Identification of an antiviral compound that targets the varicella-zoster virus major capsid protein (ORF40) and inhibits the normal capsid maturation. 投稿中
- 2) 井上直樹, 橋本楓, 福地早希: 新規抗ヘルペスウイルス薬開発の現状. 日本臨床 印刷中
- 3) Yamada, S., Taniguchi, R., Kosugi, I., Inoue, N.: Cytomegalovirus, *In:* (Eds) Singh SK & Ruzek D. "Neuroviral Infection" Taylor & Francis CRC Press. 印刷中
- 4) Ishibashi, K., Tokumoto, T., Tanabe, K., Shirakawa, H., Hashimoto, K., Kushida, N., Yanagida, T., Shishido, K., Aikawa, K., Toma, H., Inoue, N., Yamaguchi, O., Suzutani, T.: The lack of antibodies against the AD2 epitope of cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) is associated with CMV disease after renal transplantation in recipients having gH serotypes same as their donors. *Transplant Infect Dis* 13:318-323, 2011.

2. 学会発表

- 1) Inoue, N., Matsushita, M., Fukui, Y., Tsuda, M., Higashi, C., Yamaguchi, T.: Identification and characterization of an antiviral compound that targets major capsid protein (ORF40) of varicella zoster virus. 15th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Italy (2011.10)
- 2) Inoue, N., Matsushita, M., Fukui, Y., Tsuda, M., Higashi, C., Yamaguchi, T.: Identification of an antiviral compound that targets the varicella-zoster virus major capsid protein (ORF40). XV International Congress of Virology. Sapporo, (2011.9)
- 3) Kiao, H., Lee, J-H., Inoue, N., Miyado, K., Fujiwara, S., Nakamura, H.: Characterization of human cytomegalovirus UL136 gene product. XV International Congress of Virology. Sapporo, (2011.9)

- 4) 松下実里, 福井良子, 津田美穂子, 東知寿香, 山口十四文, 井上直樹: 耐性変異株の解析による新規抗VZV化合物の標的蛋白の同定. 第26回ヘルペスウイルス研究会, 大阪 (2011.6)
- 5) 生田和史, 石岡賢, 佐藤友香, 石橋啓, 浅野仁寛, 今村孝, 藤原成悦, 久保隆彦, 中井英剛, 吉川哲史, 森内浩幸, 古谷野伸, 井上直樹, 錫谷達夫: リアルタイムPCR法によるサイトメガロウイルスの型別定量判別. 第26回ヘルペスウイルス研究会,

- 大阪 (2011.6)
- 6) 松下実里, 福井良子, 津田美穂子, 東知寿香, 山口十四文, 井上直樹: 耐性変異株の解析による新規抗水痘帯状疱疹ウイルス化合物の標的蛋白の同定. 第23回抗ウイルス療法研究会, 金沢 (2011.5)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1 35B2耐性株のEC50とアミノ酸変異

Clone	EC50/FRA (μM) [*]	アミノ酸変異				
		ORF40	ORF62	ORF0	ORF1	ORF31
V-Oka	1.8 \pm 0.2					
V-OkaYSR	1.1 \pm 0.5					
R1	37.6 \pm 4.1	L196F	H275R	S197G	L57P	S88A
R2	4.2 \pm 0.2	F1110S	V733A,Q1215R	-	-	-
R3	3.5 \pm 0.5	V80A, A1078T	-	-	-	-
R4	28.8 \pm 1.6	F1093S	several	-	I125V	-
G01	14.0 \pm 2.8	T12I	-	nd	nd	nd
G02	26.3 \pm 3.8	T192A	-	nd	nd	nd
G03	32.8 \pm 4.5	C93R	-	nd	nd	nd
G04	9.4 \pm 1.3	F1110S	-	nd	nd	nd
G08	6.0 \pm 0.7	V184F	-	nd	nd	nd
G09	17.3 \pm 1.3	F79L	-	nd	nd	nd
G11	16.4 \pm 1.5	V1094F	-	nd	nd	nd
G15	18.5 \pm 1.6	V1094F	-	nd	nd	nd
G17	25.2 \pm 0.7	V343I	-	nd	nd	nd
G18	25.0 \pm 0.3	F96C	-	nd	nd	nd
G10	10.8 \pm 0.2	F1110S	nd	nd	nd	nd
G13	nd	F1110S	nd	nd	nd	nd
G16	nd	C93R	nd	nd	nd	nd
G28	>40	L196F	nd	nd	nd	nd
G29	31.5 \pm 0.6	T192A	nd	nd	nd	nd
G31	>40	F79I	nd	nd	nd	nd
G32	6.1 \pm 0.3	Q962L	nd	nd	nd	nd
G36	nd	C93R	nd	nd	nd	nd
G40	22.2 \pm 1.2	V343I	nd	nd	nd	nd
G41	nd	F1110S	nd	nd	nd	nd

^{*}フォーカス減少試験 (FRA)により求めたEC50値, nd:解析せず, -: 変異なし

図1 フォーカス減少法EC50値と感染細胞中ウイルス量

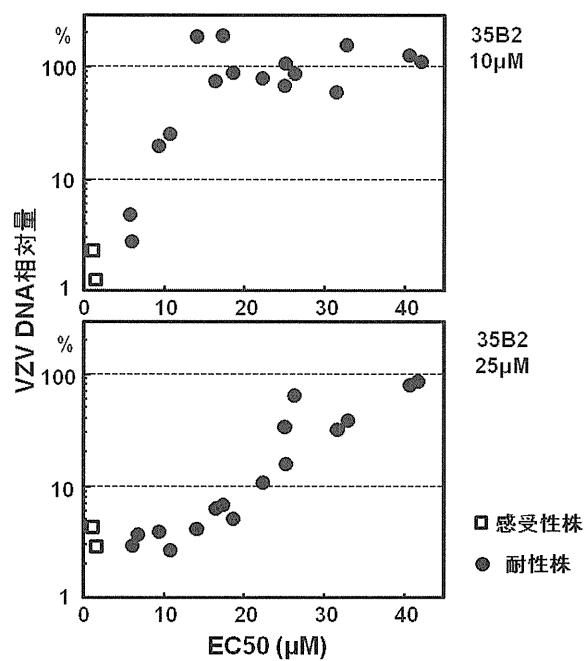


図2 35B2による主要カプシド蛋白の細胞内局在の変化

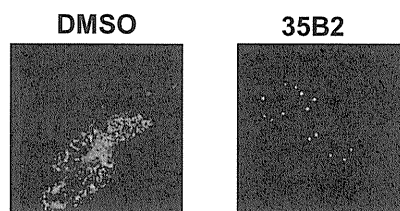
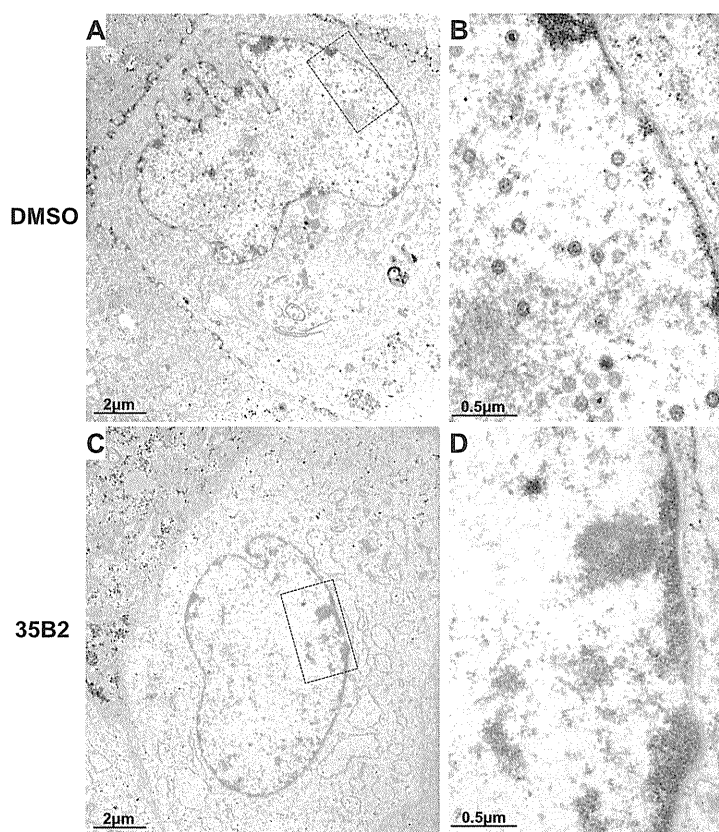


図3 35B2によるカプシド形成阻害



臓器移植患者の予後および QOL の向上のための真菌やウイルス感染症
の予防・診断・治療に関する研究(H21-新興一般-009)

- 1) わが国で初めて分離された北米型 *Cryptococcus gattii* の病原性に関する研究
- 2) クリプトコックス属の細胞表層蛋白を標的とした感染検出法開発に関する検討

研究分担者 大野秀明

国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

研究要旨: 1) 北米太平洋岸で多発発生した *Cryptococcus gattii* 感染症は、高病原性であることや従来の株と遺伝子型が異なっている点で新興感染症と考えることができる。一方、わが国においてもこの北米型と同じ遺伝子型を持つ *C. gattii* 株(JP01 株)が渡航歴のない日本人患者から分離されたことを受けて、その病原性を検討した。JP01 株のマウスにおける致死性は *C. neoformans* H99 株や北米分離株である *C. gattii* R265 株より強く、*Cryptococcus* 属の中でも極めて高病原性であることが疑われた。今後わが国における重要な公衆衛生学的監視対象となりうるものと考えられ、その動向を注意深く観察することが求められる。2) *C. neoformans* 細胞表層蛋白(CnHip1p)を標的とした *Cryptococcus* 属感染の新たな検出系の開発を目的として検討を行った。現時点で、本蛋白に対するモノクローナル抗体として5クローンの抗体が得られ、サンドイッチ ELISA 系の構築を進めている。

研究協力者

- (1) 国立感染症研究所 生物活性物質部
田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹,
宮崎義継

- (2) (株)ACTGen
梶川益紀

- 1) わが国で初めて分離された北米型
Cryptococcus gattii の病原性の研究

A. 研究目的

Cryptococcus 属は *Cryptococcus neoformans* と *C. gattii* とに大別され、*C. neoformans* は世界的に広く分布し、免疫不全宿主とくに HIV 感染者にみられる日和見感染症の原因真菌として良く知られている。一方、*C. gattii* は教科書的には熱帯から亜熱帯地域に分布し、基礎疾患を持たないヒトに感染症を引き起こすものとされてきた。しかし、1990 年台終わりから現在に至るまで、北米太平洋岸(カナダ・バンクーバーから米国ワシントン州、オレゴン州付近)を中心とした *C. gattii*

による感染症が多発していることが報告され、その原因菌として3つの亜型(VGIIa, VGIIb, VGIIc)の *C. gattii* が存在し、しかもそのうちの2種(VGIIa, VGIIc)の菌は高病原性で致死性も高く、かつ免疫不全宿主にも発病を認めている点で注目されている。

この北米型の *C. gattii* については、2007年にわが国の北米への渡航歴を持たないクリプトコックス症患者から分離されていたことが2010年に報告され、わが国への侵入経路、感染経路とともに、その病原性、病原因子の解明やわが国での生息状況、広がりなどの調査、移植患者などの免疫不全宿主はもとより日本国民を対象とした感染対策等が課題として考えられている。このような背景のもと、本研究ではわが国で初めて臨床分離されたこの北米型 *C. gattii* 株の病原性に関して検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象菌株

本邦分離北米型 *C. gattii* 株(JP01株)を対象とし、病原性比較のための対照株として *C. gattii* R265株(VGIIa, 北米流行株)、*C. gattii* 5815株(VGI, 本邦分離株)、*C. neoformans* H99株(標準株)、*C. neoformans* YC-11株(臨床分離株)とした。

2) マウスに対する病原性(致死性)の検討

C57BL/6Jマウスに経気管的に *Cryptococcus* 属を接種後、経時的に観察し致死性を検討した。接種 *Cryptococcus* 属として、 -80°C 保存株をYPD液体培地(pH5.6)で 30°C 、約48時間培養した菌を遠心後集菌し、PBSにて1回洗浄後、再度PBSに懸濁した菌液を用いた。

JP01株の接種菌量別の病原性については、1群6匹のメス、9週齢、C57BL/6Jマウス(日本クレア)をイソフルランで麻酔し、経気管的に 10^2 、 10^3 、 10^4 CFU/mouseの菌量を接種した。また、接種菌別の病原性比較では、同様に1群6-7匹のメス、9週齢、C57BL/6Jマウスを麻酔後、各 *Cryptococcus* 属 $1.7-4.0 \times 10^3$ CFU/mouseの菌量を経気管的に接種し検討した。

(倫理面からの配慮について)

本研究は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て、規定に従い実施した。

C. 研究結果

1) JP01株の菌量別病原性の検討

図1に示すように、JP01株 10^2 CFU/mouseを接種したマウスでは約30日後から死亡するマウスが観察され、40日までに全例が死亡した。一方、 10^3 CFU/mouseを接種した群では18日目から死亡するマウスが認められ数日のうちに全例が死亡し、 10^4 CFU/mouse接種群では全例が17日目に死亡した。このように、接種菌量に依存して生存期間が短縮すること、比較的少量の菌量でも致死性が生じることが認められた。

2) クリプトコックス属の病原性の比較(図2)

検討に使用したクリプトコックス属5株を接種したマウス群のうち、JP01株接種群は接種14日目を経過した頃より死亡する個体が観察され、21日目までにはすべてのマウスが死亡した。また、北米分離株であるR265株接種マウス群では、JP01株より若干遅れた21日目より死亡する個体が認められ、30日目までにほとんどのマウスが死亡した。一方、*C. neoformans* 株である

H99 株, ならびに YC-11 接種群では, JP01 株, R265 株接種群より遅れた 30 日後あたりから死亡しはじめ, 35 日過ぎたあたりで全例が死亡し, *C. gattii* 5815 株は 44 日目から死亡する個体が観察されはじめた。

この検討は計 2 回行ったが, 同様の結果が得られ, マウスに対する致死性では JP01 株, R265 株, H99 株=YC-11 株, 5815 株の順に強いと判定された。また, JP01 株と R265 株間では, 有意差をもって JP01 株の方が致死性が強いことがわかった ($P<0.05$)。

図 1 *C. gattii* JP01株感染マウスの生存率検討

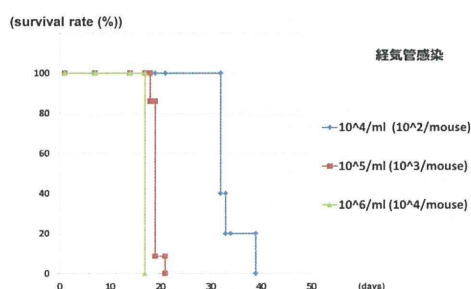
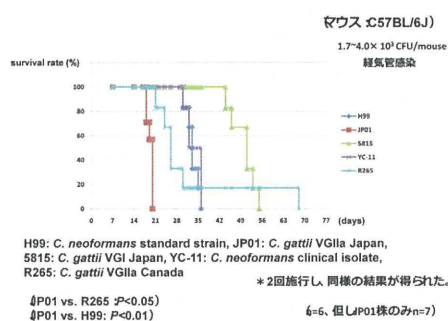


図 2 各クリプトコックス属感染マウスの生存率の比較



D. 考察

Cryptococcus 属において *C. gattii* は主に健康人に好発することが従来から知られていたが, 発生地域が比較的限られた地域であったため, *C. neoformans* ほどその病態, 病原性が解析されてきたとは言い難い。また, *C. neoformans* は

主に免疫不全宿主に日和見感染を起こすことは知られていたが, *C. gattii* が免疫不全者にどの程度合併するかは十分な知見が得られていなかった。一方, 北米での *C. gattii* 多発発生事例をうけたカナダ・ブリティッシュコロンビア州の CDC による調査では, 北米流行株は従来の *C. gattii* とは遺伝子型の違う株 (VGIIa, VGIIb) が流行していること, 免疫不全宿主にも感染者が多発していること, 全体の致死率は 10%程度であることが判明した。一方, 米国太平洋岸のワシントン州, オレゴン州などでは新たな遺伝子型の *C. gattii* (VGIIc) が発生しており, その感染者の致死率は 25%程度にも上がることが報告された。このように新たな遺伝子型を持つ北米型 *C. gattii* によるクリプトコックス症は新興感染症として脅威であるが, わが国でもこの型の *C. gattii* 株 (JP01 株) による感染症発生がすでに発生したことは, 日本においても本感染症に対する対策を講ずる必要があることを示している。わが国で分離された JP01 株については, 侵入経路もしくは発生原因, 感染経路, 生息状況はもとより病原性, 病原因子, 感染リスク等が北米株と同等に保たれているのか解明されておらず, 本研究ではその病原性について, マウスに対する致死性の点より検討することとした。

JP01 株を経気管的に接種したマウスにおいては, 10^2 CFU/mouse と比較的少量の菌数においても十分に致死性を示すこと, 10^4 CFU/mouse では比較的短期間で 100%の致死性を示すことから感染時の菌数が致死性に影響を与えることが示された。一方, 他の *Cryptococcus* 属との比較では, JP01 株においては一般的に高病原性とされる *C. neoformans* H99 株や臨床分離株で