

- 会学術集会, 徳島(2010.11)
- 7) 王麗欣, 木下一美, 中道一生, 伊藤睦代, 錫谷達夫, 倉根一郎, 西條政幸. DNA ポリメラーゼ変異によるアシクロビルやフォスカルネット耐性単純ヘルペスウイルス 1 型の他の抗ウイルス薬に対する薬剤感受性. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島(2010.11)
- 8) 岸田修二, 水澤英洋, 中道一生, 西條政幸. 予後調査からみた PML. 第 15 回日本神経感染症学会, 福島(2010.10)
- 9) 中道一生, 伊藤睦代, 倉根一郎, 西條政幸. 脳脊髄液中の JC ポリオーマウイルスの検査支援を介した日本国内における進行性多巣性白質脳症(PML)の発生状況の解析. 第 15 回日本神経感染症学会, 福島(2010.10)
- 10) 中道一生, 伊藤睦代, 倉根一郎, 西條政幸. 定量的リアルタイム PCR による脳脊髄液中 JC ウイルスゲノムの検出に基づく進行性多巣性白質脳症の診断支援. 第 84 回日本感染症学会総会学術集会, 京都(2010.4)
- 11) Shiota, T., Saijo, M.: Antiviral resistant herpes virus infections: BIT's 1st World Congress of Virus and Infections-2010, Busan, Korea (2010.6-7)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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

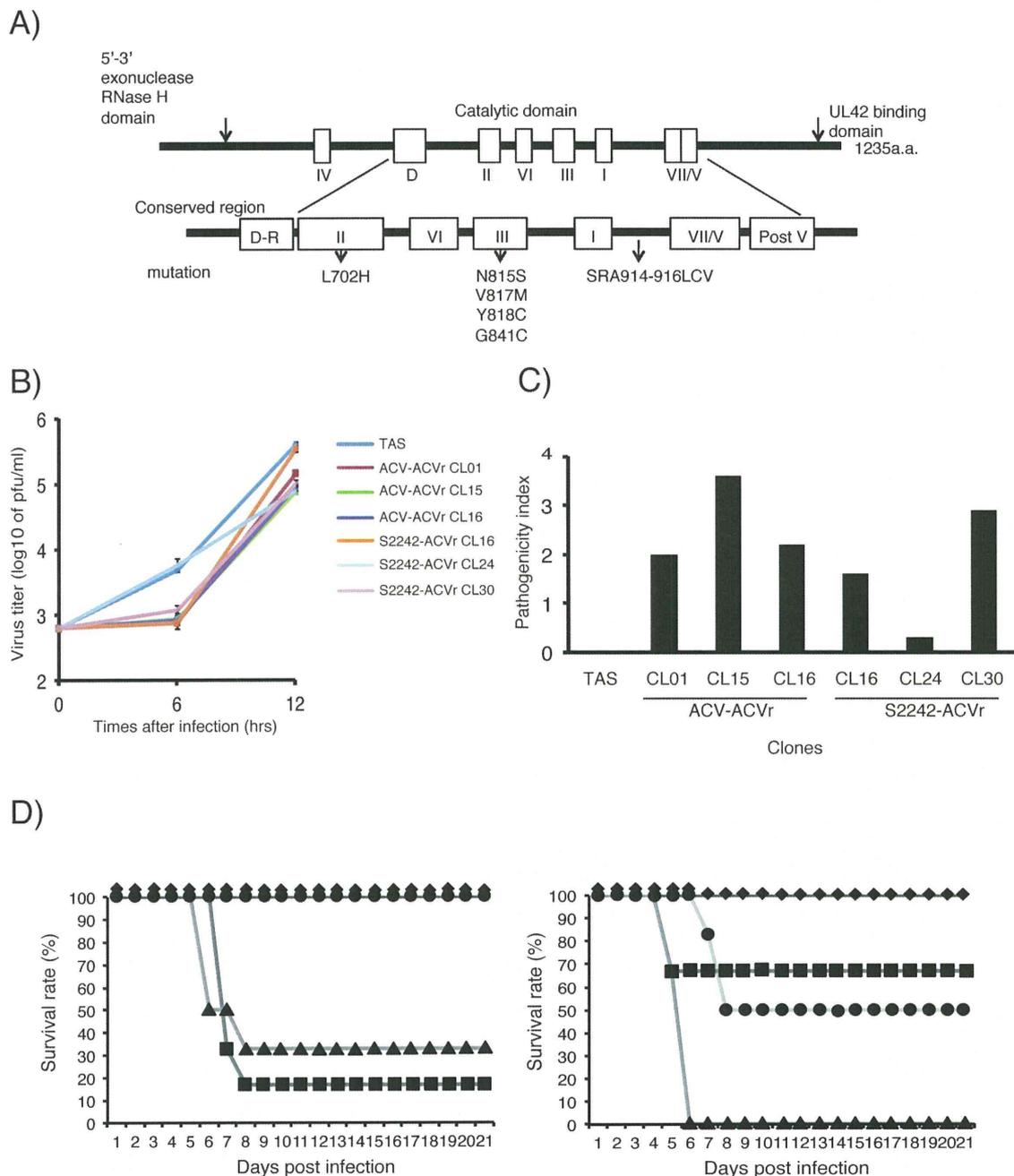


図 1. DNApol 関連 HSV-1 の性状 [DNApol におけるアミノ酸変異 (A), 一段階増殖能 (B), マウスにおける神経病原性 (C), S2242-ACVr LC24 (D, 左図) および TAS (D, 右図) 感染マウスに対する ACV と GCV による治療効果 (D)]

表 1. 複数回 HSV-1 が咽頭スワブ検体から分離された

患者	ウイルス分離成績(上段)と ACV に対する感受性(μg/ml)(下段)											
	移植後の週数(週)											
	-1W	0W	1W	2W	3W	4W	5W	6W	7W	8W	9W	10W
患者 1	なし	陰性	陰性	陽性 0.27	陽性 1.7	陽性 1	陰性	陽性 1.3	陰性	陰性	死亡退院	
患者 2	陰性	陰性	陰性	陽性 0.1	陽性 0.1	陽性 0.24	陽性 0.54	陽性 0.56	陽性 0.54	判定不能	陰性	退院
患者 3	陰性	陰性	陽性 0.21	陽性 0.19	陽性 0.17	陽性 10	陽性 8.2	陰性	陰性	陰性	死亡退院	

判定不能: ウイルス分離検査において真菌や細菌によるコンタミネーションによる.

表 2. 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 <sub>50</sub> of the indicated drug (µg/ml)								
		ACV	PCV	GCV	BVDU	BVaraU	araT	FOS	CDV	AraA
クローン	(塩基/アミノ酸, 変異部位)									
S2242-	16 A2453G/Y818C, III	<u>7.0</u>	<u>1.45</u>	0.070	0.050	<0.0040	0.045	<u>&gt;100</u>	<u>0.57</u>	<u>2.3</u>
ACV <sup>r</sup> 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	<u>&gt;100</u>	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	<u>&gt;100</u>	0.21	<u>24</u>
CV <sup>r</sup> -CL	15 C2739-2749T/SRA914-916L	<u>3.4</u>	0.23	0.017	0.074	0.0080	0.40	<u>&gt;100</u>	<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	<u>&gt;100</u>	<0.10	<u>27</u>

TAS 株 5 クローンの IC<sub>50</sub> 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.

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)

分担総合研究報告書

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)

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:生体肝移植後感染症の疫学調査として、過去の真菌血症例のレビューを行うとともに、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ヵ月間フォローした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。過去の真菌血症症例のレビューから、カンジダ性眼内炎のリスク因子(*C. albicans*,  $\beta$ -D グルカン陽性)、非カンジダ真菌血症の臨床像(免疫抑制の強い重症例で発症、カンジダ血症に比べて予後不良)を明らかにした。

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

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。

B. 研究方法

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。過去の生体肝移植後真菌血症例をレビューし、合併症、特殊病態について考察した。

(倫理面からの配慮について)

本研究では個人情報匿名化され、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。

### C. 研究結果

術後 1 カ月間フォローした 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%以上を締めていた。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。

過去の真菌血症に関するレビューから、カンジダ性眼内炎のリスク因子として *C. albicans* 感染症であること、 $\beta$ -D グルカンの陽性が相関する因子であることが判明した。非カンジダ真菌血症の臨床像について解析し免疫抑制の強い重症例で発症しカンジダ血症に比べて予後不良であることを示した。

### D. 考察

生体肝移植後感染症において、深部手術部位(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ったことで真菌感染症が抑制されることが示唆されていた。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 (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 (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

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1部 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。本研究では、こうした化合物の抗ウイルス活性の評価と作用機序の解析を行った。抗 VZV 化合物のひとつ triazin-4-one 誘導体 35B2 は、耐性株の解析などから、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。また、GFP 発現組換えマウスサイトメガロウイルス(MCMV-GFP)を用いた in vivo imaging 法を確立した。この評価法において、スクリーニングで同定した化合物 DPPC が一定の効果を示した。今後さらに構造活性相関や作用点の解析を積み上げることにより、実用性のある化合物の開発につながる事が期待された。

#### 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。特に、臓器移植においては CMV 感染症を防ぐために核酸基質アナログであるガンシクロビル(GCV)が用いられているが、骨髓機能抑制の副作用により好中球減少が生じ、結果として細菌・真菌などの日和見感染症を増悪化させるため、生存率など移植全体としてみた場合には、決して満足できる結果をもたらさない。さらに、欧米では移植時の CMV 感染症の予防の観点から、移植当初から GCV 投与を行なう方策がとられており、このことは耐性

株の出現頻度を高める結果に繋がる可能性をもっている。

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カ価を計測する生物学的方法が一般的であるが、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キ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。

有望視され第3相臨床試験まで進んだ抗CMV薬剤マリバビルも十分な効果が得られず、ヘリケース・プライメース阻害剤として注目されたアステラス社の抗 VZV 薬 ASP2151 も詳細は不明であるが有害事象のため第2相試験で打ち切られた。第3相まで進んだ薬剤はなく、

非核酸アナログ薬剤の開発状況は、あまり捗々しくない。

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 それぞれに樹立し、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。本研究では、これらのスクリーニングで同定された化合物について、その抗ウイルス活性をさらに評価するとともに作用機序を明らかにする。さらに、こうした新規化合物を少数の動物を用いて迅速に評価できる系を構築した。

## B. 研究方法

### 1) 組換えウイルス

EGFP 発現 MCMV 及び DsRed2 発現 MCMV は、相同組換え法により m128 遺伝子領域に MCMV<sub>e1</sub> プロモーターに制御される EGFP もしくは DsRed 発現カセットを導入することにより構築された(浜松医大小杉博士より分与)。

### 2) 抗ウイルス活性及び細胞毒性評価

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 50%阻害濃度(EC<sub>50</sub>)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。細胞毒性は、生存細胞が産生する ATP 量に基づいて生存細胞数を測定するアッセイを用いて測定した。

### 3) ウイルス DNA 定量・塩基配列決定

感染細胞から市販キットを用いて精製した DNA 中のウイルス DNA をリアルタイム PCR 法により測定した。また、精製 DNA を材料として、PCR により各翻訳領域に対応した DNA 断片を増幅後精製し、塩基配列を決定した。

### 4) 抗体作製・レーザー顕微鏡による抗原検出

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、部分精製後ウサギを免疫して抗血清を得、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

回収した感染細胞を固定・包埋後、薄片を uranyl acetate/lead citrate 処理し電子顕微鏡観察を行った。

### 6) マウス感染実験と in vivo imaging

組換え MCMV 感染マウスを麻酔し、体毛による蛍光を避けるため除毛後、撮影を行った。蛍光シグナルは in vivo imaging 装置 Maestro を用いて検出した。取り込んだ蛍光データは色変換を行い、グレースケールの個体イメージに重ね合わせた。シグナル強度は、単位面積当りの蛍光量として測定した。

## (倫理面への配慮)

動物実験は、実験動物委員会の承認を得て、動物愛護の精神のもとに適切に行った。組換え DNA 実験は、機関内承認及び大臣確認承認を得ることを含め、法に基づき適切に行った。

## C. 研究結果

### 1. 新規抗 VZV 化合物の評価

#### 1) HSV に対する抗ウイルス活性

スクリーニングにより同定された抗 VZV 化合物について、VZV に加え HSV-1 に対する抗ウイルス活性を、感染細胞中のウイルス DNA をリアルタイム PCR で定量することで検討した。同じアルファヘルペスであっても各化合物の抗 HSV 活性には違いがあった(図1)。

#### 2) ACV 耐性株の増殖阻害

図1中の 133G4 は抗 VZV と抗 CMV 活性があり、前初期蛋白による遺伝子活性化を阻害するユニークな化合物であることをすでに明らかにしている。抗 VZV 活性が強いと思われる thiadiazino-thiophenopyrimidin-one 誘導体の 141B3 と triazin-4-one 誘導体 35B2 の 2 化合物について EC<sub>50</sub> をプラーク減少法により決定した。アシクロビル(ACV)の EC<sub>50</sub> が 8.9μM (2μg/ml)の条件下で、それぞれ 0.32 μM 及び 0.80 μM であった。また、ACV 耐性株の増殖も、これら化合物で阻害された。

### 3) 作用機序の解析

VZV DNA の感染後の細胞内量を経時的に解析すると、141B3 と 35B2 は、ともに初期遺伝子の転写発現が減少させる一方、141B3 のみが前初期遺伝子 ORF62 の転写発現を阻害した。V-Oka 感染後、薬剤を途中から添加もしくは非添加などの処理をすると、35B2 では感染 5-20 時間に効果を発揮した。従って、141B3 は前初期遺伝子発現以前を、35B2 は感染初期に作用すると推定した。

### 4) 35B2 耐性株の解析

35B2 に対する耐性株 24 株を作出し、フォーカス形成の減少を指標に EC50 を決定した。24 株ともに親株の 2 倍から 20 倍程度の耐性を獲得していた(表 1)。耐性変異を同定するために、耐性株 R1 の全翻訳領域の塩基配列を決定した。ORF0, ORF1, ORF31, ORF40, ORF62 の 5 つの領域に変異があるため、これらの遺伝子について解析を進めた結果、35B2 は ORF40 がコードする主要カプシド蛋白 MCP を標的とする抗 VZV 化合物であることが明らかとなった。これまでに MCP を標的とする化合物は知られていない。MCP 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ることから、cryomicroscopy 解析から立体構造が予測されている HSV VP5 との対応で、35B2 耐性変異部位を見ると、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 bottom ドメインに変異があることが判明し、このことから scaffold 蛋白と MCP の相互作用を阻害しているのではないかと推定された。なお、141B3 についても耐性株の取得を試みたが、うまくいかなかった。

### 5) 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 を GST 蛋白との融合蛋白として産生させ、ウサギを免疫して特異的抗体を調製した。これを用いて、MCP の局在を解析したところ、核内で広く分布していた MCP 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(図 2)。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 処理細胞(図 3C, 3D)では、500 細胞を観察したが、カプシド形成を認められなかった。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。

## 2. 新規抗 CMV 化合物の評価

### 1) In vivo imaging での評価法の確立

GFP-MCMV 感染マウスを用いた in vivo imaging (図 4)において、接種後毎日測定したシグナル強度の面積積分値(AUC: area under curve)が接種ウイルス量と良く相関することから、定量性があることを示した(図 5)。

### 2) 新規抗 CMV 化合物 DPPC の in vivo 活性

我々が同定した新規化合物 DPPC もしくは既存薬 GCV を腹腔内(ip)もしくは皮下(sc)に投与し、in vivo imaging で感染阻害を検討した。腹腔内 100mg/kg や皮下 50mg/kg の ACV 接種では、MCMV-GFP の増殖を有意に阻害した(図 6)。一方、新規化合物 DPPC は、腹腔内 50mg/kg 投与では部分的効果しか見られないものの、皮下 50mg/kg DPPC 投与では、感染 2 日後の一点でも AUC の比較でも有意に抗ウイルス効果を示した。

### 3) GCV 耐性が疑われた臨床材料の検討

原因不明の劇症肝炎にて入院後、保存的治療にて改善がないため生体肝移植が施行された 1 歳児症例を含め移植後の CMV 感染症に対する GCV 治療効果が見られなかった 4 例について、薬剤耐性を疑い UL97 及びポリメラーゼ遺伝子断片を増幅し塩基配列を決定したが、耐性に関与すると思われる塩基置換は見出されなかった。また、内 2 例については、ウイルス分離も行い、生物学的にも検査したが GCV 耐性ではなかった。

## 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やポリメラーゼ認識部位

の特異性の向上により、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。一方、いくつかの非核酸アナログ薬剤が第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。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。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本研究で同定したこと、同定した新規抗 VZV 化合物が現行薬剤より細胞培養レベルで優れたものであったこと、新規抗 CMV 化合物が個体レベルでも活性があったことなど、実用化の可能性を提示できた意義は大きいと考える。

In vivo imaging による評価は、毒性や薬物動態などの解析を行うことはできないが、培養細胞レベルで選定された多数の候補化合物を迅速に絞り込むことにより、効率的な抗ウイルス薬の開発の方向性を示したと考える。

#### E. 結論

- 1) 新規抗 VZV 化合物の評価において、新規化合物が ACV 耐性株にも有効であることを明らかにした。
- 2) triazin-4-one 誘導体 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。
- 3) 新規抗 CMV 化合物を迅速に個体レベルで評価できる in vivo imaging 系を確立した。
- 4) 新規抗 CMV 化合物 DPPC は、個体レベルでも効果があった。
- 5) 臨床的に GCV 耐性を疑った 4 例を解析したが、感受性株であった。

#### 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 Infec Dis* 13:318-323, 2011
- 5) Inoue, N.: Chapter 84 Human herpesvirus 5 (cytomegalovirus), pp949-962. *In:* (Ed) Liu D, "Molecular detection of human viral pathogens" Taylor & Francis CRC Press. 2011
- 6) Yamada, S., Kosugi, I., Katano, H., Fukui, Y., Kawasaki, H., Arai, Y., Kurane, I., Inoue, N.: In vivo imaging assay for the convenient evaluation of antiviral compounds against cytomegalovirus in mice. *Antiviral Res*, 88:45-52, 2010
- 7) Yamada, S., Nozawa, N., Katano, H., Fukui, Y., Tsuda, M., Tsutsui, Y., Kurane, I., Inoue, N.: Characterization of the guinea pig cytomegalovirus genome locus that encodes homologs of human cytomegalovirus major immediate-early genes, UL128, and UL130. *Virology* 391:99-106, 2009.
- 8) Kurashina, Y., Liu, X., Kato, C., Inoue, N., Saneyoshi, M., Yamaguchi, T.: Influence of 3'-azido-2',3'-dideoxyguanosine treatment on telomere length in human telomerase-immortalized human fibroblast cells. *Nucleic Acids Symp.* 53:249-250, 2009

## 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. 15<sup>th</sup> 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, 浅野仁覚, 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) 松下実理, 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)
- 7) Yamada, S., Kosugi, I., Katano, H., Fukui, Y., Kawasaki, H., Arai, Y., Kurane, I., Inoue, N.: In vivo imaging assay for the convenient evaluation of antiviral compounds against cytomegalovirus in mice: 2010 Congenital Cytomegalovirus Conference, France (2010.9)
- 8) 山田壮一, 小杉伊三夫, 片野晴隆, 福井良子, 河崎秀陽, 新井義文, 福地早紀, 橋本楓, 倉根一郎, 井上直樹: GFP 発現組換えマウスサイトメガロウイルスを用いた in vivo imaging による抗ヘルペスウイルス薬 in vivo 評価系の確立: 第 25 回ヘルペスウイルス研究会, 静岡 (2010.5)
- 9) 中道一生, 井上直樹, 伊藤(高山)陸代, 王麗欣, 木下一美, 倉根一郎, 西條政幸: 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現量の解析: 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 10) Yamada, S., Kosugi, I., Shindo, K., Fukui, Y., Katano, H., Yashiro, K., Higashi, C., Tsuda, M., Kurane, I., Inoue, N.: Screening and characterization of chemical compounds that inhibit early phase of CMV and VZV infections. 第 14 回国際ヘルペスウイルス感染症学会, 大阪 (2009.10)
- 11) Yamada, S., Kato, M., Katano, H., Fukui, Y., Tsuda, M., Tsutsui, Y., Nozawa, N., Kurane, I., Inoue, N.: Characterization of guinea pig CMV GP129 and GP131, orthologs of HCMV UL128 and UL130, which are essential for efficient viral growth in vivo but not in vitro. 第 14 回国際ヘルペスウイルス感染症学会, 大阪 (2009.10)
- 12) 山田壮一, 小杉伊三夫, 片野晴隆, 倉根一郎, 井上直樹: GFP 組換えマウスサイトメガロウイルスを用いた in vivo imaging による抗ヘルペスウイルス薬 in vivo 評価系の確立 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 東京 (2009.10)
- 13) 井上直樹, 神道慶子, 福井良子, 永野瑛子, 倉根一郎, 山口十四文: 水痘帯状疱疹ウイルス及びサイトメガロウイルスの前初期蛋白による転写活性化機能を阻害する抗ウイルス化合物の解析 第 19 回抗ウイルス療法研究会, 東京 (2009.6)

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 ( $\mu\text{M}$ ) <sup>*</sup>	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 抗VZV化合物の抗HSV効果

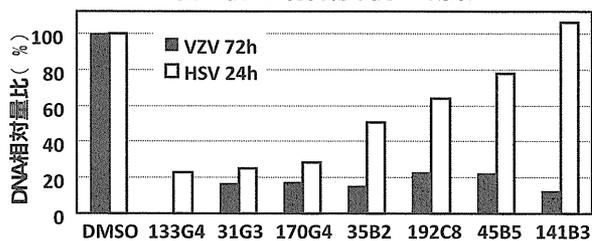


図2 35B2による主要カプシド蛋白の細胞内局在の変化

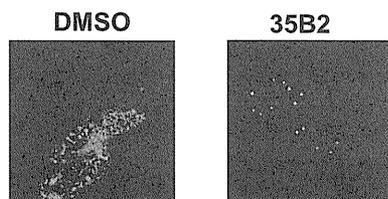


図3 35B2によるカプシド形成阻害

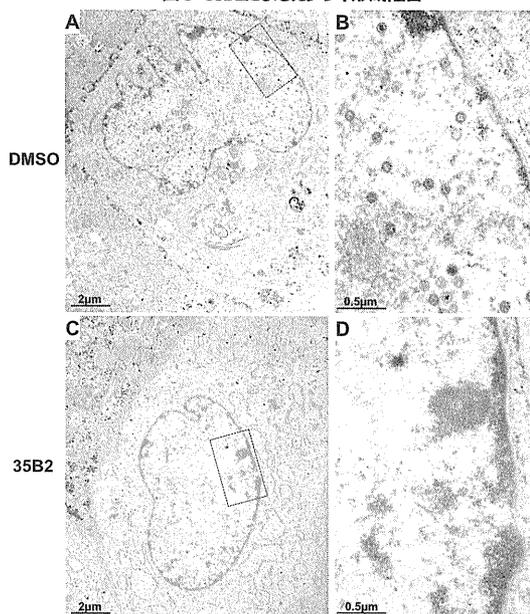


図4 組換え MCMV とイメージングの再現性

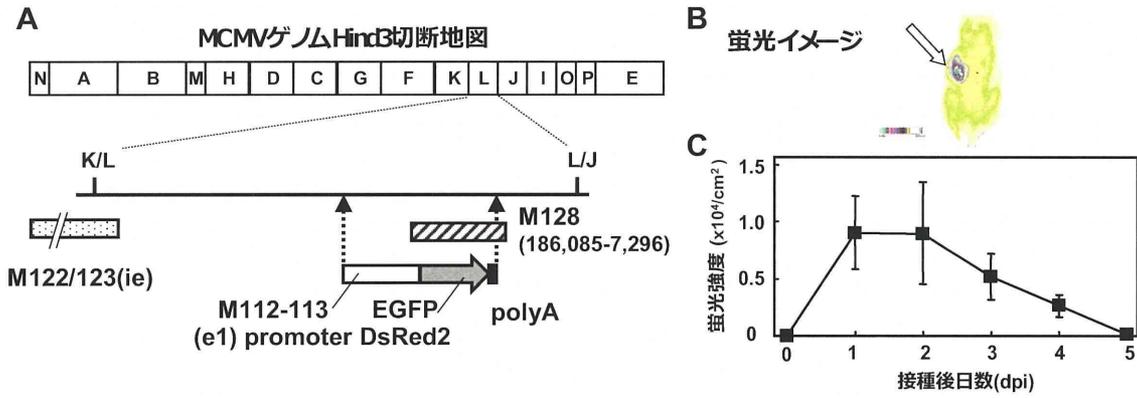


図5 イメージングの定量性

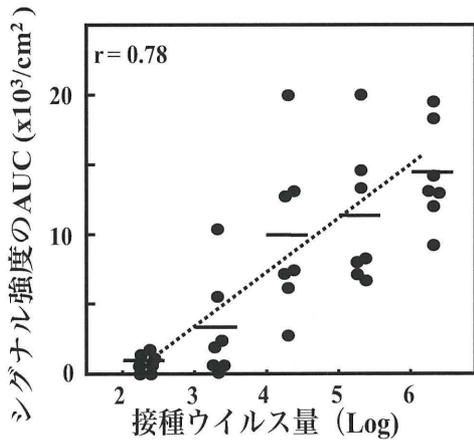
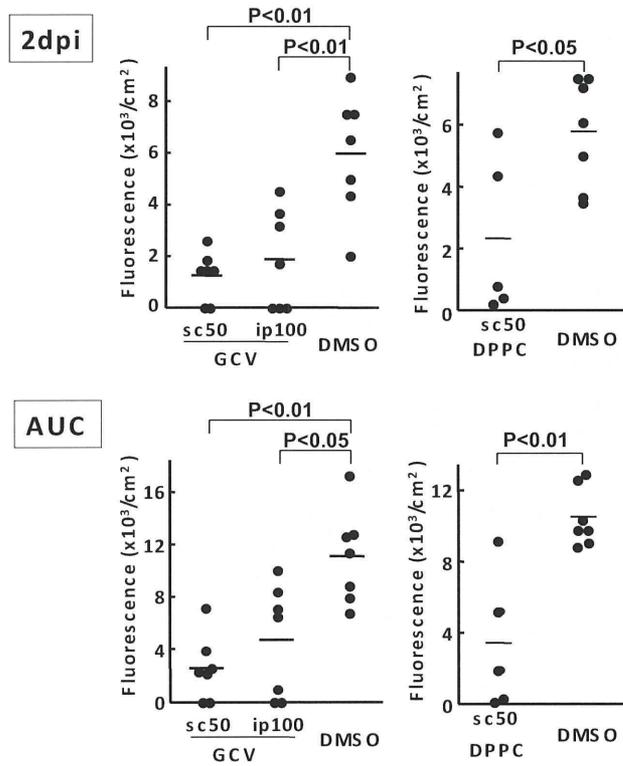


図6 DPPC の個体における効果



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)

分担総合研究報告書

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)

- 1) 真菌の潜伏感染メカニズムの解明とその検出法に関する研究
- 2) 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

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) 臓器移植に合併する深在性真菌症の予後は比較的不良であり、致死率も高い。このような背景から臓器移植時に合併しやすい真菌症のなかでクリプトコックス症について、クリプトコックス属の細胞壁表層・分泌蛋白を標的とした潜伏感染診断系の基盤的研究を行い、クリプトコックス蛋白 CnHip1p を標的としたモノクローナル抗体として 5 クローン抗体を作成し、サンドイッチ ELISA 系の構築を進めている。

2) 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。

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) 真菌の潜伏感染の検出法に関する研究

A. 研究目的

高度先進医療の発達に伴い、それに合併する日和見感染症としての深在性真菌症対策は医療現場において重要な位置を占めるものと考えられる。とくに臓器移植患者に合併する侵襲性真菌感染症では死亡率も高いと報告されており、

今後のわが国での移植医療においても真菌症対策は避けては通れない問題である。

米国の移植医療に合併する真菌感染症の大規模疫学調査では、固形臓器移植に合併した深在性真菌症のうち、クリプトコックス症は約10%程度に認め、合併頻度としては多くはないものの、半数以上の例では播種型もしくは中枢神経系病変を合併している。また、移植患者に合併したクリプトコックス症の死亡率は全体で15%程度と報告されているが、中枢神経系病変を伴うと死亡率は40~50%に上昇するなど、予後は不良であり、カンジダ症、アスペルギルス症とならび感染症対策が重要な疾患である。

カンジダ属やアスペルギルス属と比較し、クリプトコックス属においては近年ヒトにおいて潜伏感染が認められることが明らかとなり、臓器移植後に発病するクリプトコックス症の大部分が、移植前に感染した菌の再活性化によると報告されている。このことから、臓器移植に合併するクリプトコックス症では、移植前の感染診断がその後の移植医療の成否の鍵を握るものとも考えられる。

以上の背景のもと、本研究では移植医療の現場におけるクリプトコックス属の潜伏感染検出系の開発を念頭に、クリプトコックス属の細胞壁、分泌蛋白抗体を標的とした検出系の開発について検討した。

## B. 研究方法

### 1. クリプトコックス属の細胞表面蛋白・分泌蛋白の同定

本研究の遂行にあたり、基盤的研究としてクリプトコックス属の細胞膜表面蛋白、分泌蛋白を

網羅的に解析する方法である SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening)法を用いて分泌蛋白等の同定を行った。

#### 1) クリプトコックス属 RNA 抽出

*Cryptococcus neoformans* ATCC90112 株を 100 ml の brain heart infusion (BHI) 液体培地 (pH7.4) で 24 時間培養し、遠心にて集菌後 1 回洗浄を行った。その後等量の BHI 培地に再懸濁し、500 ml のカルチャーボトルへ注入し、嫌気ジャーにカルチャーボトルを蓋を開放したままの状態に収納した後、アネロパック® (三菱ガス化学) を添えジャーを密封した。カルチャーボトルを収納した嫌気ジャーを 37°C で 14 時間ゆっくりと攪拌しながら培養したのち集菌を行い、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出した。

#### 2) SST-REX 法

トランスフェクション：抽出した *C. neoformans* の total RNA から cDNA を作成し、MPL<sup>V</sup> を含む発現ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作成した。リポフェクションを用いてマウス由来 BAF 細胞にトランスフェクションし、自律増殖可能な細胞をスクリーニングした。増殖可能な細胞からトランスフェクションにより導入したベクター配列を確認し、*C. neoformans* 由来遺伝子と推定される遺伝子断片のシーケンスを行った。

#### 3) *C. neoformans* SST クローン蛋白の細胞内局在性の検討

嫌気条件下で誘導された SST クローンのうち、比較的発現量の多かった SST クローン蛋白についてその局在を確認し、分泌の可

能性について検討した。

#### ① 遺伝子のクローニング

得られた mRNA より oligo-dT をテンプレートとし逆転写酵素により 1st strand cDNA を合成した。コーディング領域を PCR 法により増幅し、pBluescript II へクローニングした。

#### ② *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) 発現による分泌蛋白質の検出とその局在

クローニングした遺伝子を、HA tag を蛋白質の C 末端に付加する pADH-HA 発現ベクターに挿入し、*S. cerevisiae* に導入した。細胞での局在は、細胞質、細胞膜、細胞壁の画分に分けウエスタンブロットに供し、抗 HA-抗体で検出した。培養上清は、抗 HA 抗体で免疫沈降し、ウエスタンブロットに供し、抗 HA-抗体で検出した。

#### 4) *C. neoformans* SST クローン蛋白質に対するモノクローナル抗体の作成

得られた SST クローンの一部については、マウスに免疫した後、マウスのリンパ節細胞を用いてハイブリドーマを作製し、SST クローンに対する抗体作製を試みた。

(倫理面からの配慮について)

マウス免疫に際しては、作製発注先(株式会社 ACTGen)の倫理規定に従って実施した。

### C. 研究結果

#### 1. クリプトコックス属の細胞表面蛋白・分泌蛋白の同定

嫌気条件下で培養した *C. neoformans*

ATCC90112 株の total RNA を用いた SST-REX 法により、SST クローン総数 286 個、取得因子 72 個の結果が得られ、これらから計 47 遺伝子が同定された。このうち 42 遺伝子については細胞表面もしくは分泌蛋白であることが推測された。また機能的には糖代謝に関与すると推測される遺伝子が比較的多く、機能不明な遺伝子も 16 遺伝子検出された。この SST 法で情報が得られた遺伝子のうちクローン発現数が最も多かった *CnHIP1* について抗体作製を試み、現在までに 5 クローンの抗体候補を得ることができ、現在この *CnHIP1* 検出用の ELISA 法を作成中である。

#### 2. *C. neoformans* CnHip1p の細胞内局在性の検討

*CnHIP1* 遺伝子発現酵母では細胞質と細胞壁に CnHip1p 蛋白質を検出した。また、細胞膜にはほとんど検出できなかった。一方、今回の検討系では培養細胞上清には蛋白質は検出できなかった。

### D. 考察

臓器移植に伴う免疫不全状態は深在性真菌症のリスクファクターの一つであり、一旦発病すると致死率も高いなど移植医療現場にとって常に考慮しなければならない合併症である。クリプトコックス感染症の臓器移植での合併は全体の 10%弱程度と報告されているが、播種型など重症型が多く死亡率も 40%にのぼる。さらにクリプトコックス属は潜伏感染することが次第に明らかとなっており、移植後に発病し、はじめて本菌に感染していたことが判明する症例もある。本研究では、クリプトコックス属の潜伏感染の検出法につ

いて、細胞表層蛋白・分泌蛋白を標的とした検出系開発の基盤研究を行った。

本研究では SST-REX 法を用いて得られたクローン数が最も多かった *CnHIP1* を第一候補に検討を進めた。今回は、この *CnHIP1* について発現酵母を用いてその局在について確認したところ、細胞壁、細胞質に発現が確認された。一方、培養上清での発現は明らかなものは認められなかったが、これは酵母の違いに由来するものと考えている。従って、*CnHip1p* の局在から、確かに細胞壁での発現が認められ、ある程度の量については細胞壁から遊離してくるのではないかと推測され、これを標的とした診断系の開発については十分可能なものと考えている。また、*CnHip1p* に対する抗体を作成し、サンドイッチ ELISA 系の構築を行ったが、現時点では抗体は 5 クローン作製可能であったが、これらを用いた ELISA では非特異的な結合が強い結果であった。この原因は現時点では特定できていないが、補完法としてウエスタンブロットによる検出系の検討を行い、応用を目指している。一方、*CnHip1p* が病原性に関与しているとするならば、本抗体による病原性制御の可能性も考えられ、今後の検討課題として推進することが期待された。

#### E. 結論

1) クリプトコックス属に対し SST-REX 法を応用し、細胞表層蛋白・分泌蛋白の同定を行ったところ、約 40 個の蛋白遺伝子が検出された。またこのうちの *CnHip1p* につき発現の局在を確認したところ細胞壁での発現が認められた。

2) 抗 *CnHip1* 抗体作製を試み、これを標的とした ELISA 系の構築を行っている。

#### 5) 健康危険情報

特記事項なし

#### 2) 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

##### 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(VGIa, VGIIb, VGIIc)の *C. gattii* が存在し、しかもそのうちの 2 種(VGIa, 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。

このうち VGIIa 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、 $-80^{\circ}\text{C}$  保存株を YPD 液体培地 (pH5.6) で  $30^{\circ}\text{C}$ 、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

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

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 株の致死性の方が強いことがわかった ( $P < 0.05$ )。

#### 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* 多発発生事例を受けたカナダ・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) による感染症患者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性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 株や臨床分離株である YC-11 株より短時間で 100%致死性を示すこと、VGIIa 型北米分離株である R265 株よりも有意に致死性が強いことから、クリプトコックス属のなかでも極めて高い病原性を持つ株であることが伺われた。また、従来から *C. gattii* の病原性は *C. neoformans* より低いとされており、その意味では今回検討に用いた 5815 株は典型的な株と考えられるが、この株との比較においても如何に JP01 株が高病原性であるかが示されるものであろうと考えられる。北米太平洋岸での事例をわが国に直接あてはめることはできないが、仮に JP01 株がわが国でその生息域を拡大しているとすれば、大いなる脅威の新興感染症となるものと考えられ、十分な対策が必要であろう。

JP01 株の疫学的検討や病態解明、病原因子、感染リスク等の検討は今後他の研究課題に譲るが、本感染症の存在は医療従事者のみならず広く国民へも情報を発信していかねばならぬものと考ええる。

#### E. 結論

わが国で分離された北米型 *C. gattii* 株 (JP01 株) は、マウスの検討においては *Cryptococcus* 属の中でも極めて高い病原性を示す株であることが示された。

## F. 健康危険情報

高病原性とされる北米型 *C. gattii* 株による感染症が、流行地域(北米太平洋岸)への渡航歴のない日本人に発生した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nagi M, Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Aoyama T, Okano M, Higashi S, Ueno K, Chibana H, Niimi M, Yamagoe S, Umeyama T, Kajiwara S, Ohno H, Miyazaki Y. Transcription factors CgUPC2A and CgUPC2B regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. *Genes Cells* 16: 80–89, 2011.
- 2) Tomita H, Muroi E, Takenaka M, Nishimoto K, Takeya H, Ohno H, Miyazaki Y, Utani A. *Rhizomucor variabilis* infection in human cutaneous mucormycosis. *Clin Exp Dermatol* 36: 312–314, 2011.
- 3) Kobayashi T, Takeya H, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis. *Jpn J Infect Dis* 64: 292–296, 2011.
- 4) Kimura M, Araoka H, Uchida N, Ohno H, Miyazaki Y, Fujii T, Nishida K, Izutsu K, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A. *Cunninghamella bertholletiae* pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation. *Med Mycol* Posted online on 22 Nov 2011. DOI: 10.3109/13693786.2011.631153.
- 5) Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S. A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Medical Mycology* : 1–6. Posted online on 13 Dec 2011. DOI: 10.3109/13693786.2011.639036.
- 6) 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.
- 7) 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. *Medical Mycology* 48: 606–612, 2010.
- 8) 大野秀明. 中枢神経系真菌感染症における最近の動向. *最新医学* 66: 997–1004, 2011.
- 9) 大野秀明. 髄膜炎, 脳炎. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて (Medical Practice 臨時増刊号). 文光