

201123052A

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

地域流行型真菌症の疫学調査、
診断治療法の開発に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

平成 24 年 3 月

研究代表者

宮崎 義継

(国立感染症研究所)

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

地域流行型真菌症の疫学調査、
診断治療法の開発に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

平成 24 年 3 月

研究代表者

宮崎 義継

(国立感染症研究所)

平成 23 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

「地域流行型真菌症の疫学調査、診断治療法の開発に関する研究」班

班員名簿

氏 名	所 属	職 名
宮崎 義継	国立感染症研究所 生物活性物質部	部長
渋谷 和俊	東邦大学医学部 病院病理学講座	教授
杉田 隆	明治薬科大学 微生物学教室	准教授
泉川 公一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学	助教
高倉 俊二	京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学	准教授
金子 幸弘	国立感染症研究所 生物活性物質部	主任研究官

目 次

I. 地域流行型真菌症の疫学調査、診断治療法の開発に関する研究 総括研究報告書（平成 23 年度） 研究代表者：宮崎 義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）	・・・・・・・・・・ 1
II. 分担研究報告書	
1. 本邦における <i>Cryptococcus gattii</i> 感染症の現況 研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）	・・・・・・・・ 5
2. <i>Cryptococcus gattii</i> 感染症における病態解析 研究分担者：渋谷 和俊（東邦大学医学部 病院病理学講座）	・・・・・・・・ 12
3. 本邦で初めて分離された <i>Cryptococcus gattii</i> VGIIa JP01 株の血清学的解析 および比較ゲノム 研究分担者：杉田 隆（明治薬科大学 微生物学教室）	・・・・・・・・ 22
4. 生体側の因子に関する研究/診断応用研究 研究分担者：泉川 公一（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学）	・・・・・・・・ 28
5. 移植等の易感染性患者に発症する深在性真菌症の臨床疫学的研究 研究分担者：高倉 俊二（京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学）	・・・・・・・・ 37
6. <i>Cryptococcus gattii</i> の免疫原性と診断応用の研究 研究分担者：金子 幸弘（国立感染症研究所 生物活性物質部）	・・・・・・・・ 39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・・・・・・・・ 45

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

研究代表者 宮崎義継 国立感染症研究所 生物活性物質部

研究要旨 地域流行型真菌症は、特定地域に生息する真菌による感染症であり、わが国では、渡航者の感染例が多い。近年では、渡航機会の増加を背景に、地域流行型真菌症の総数は増加傾向にある。また、明らかな渡航歴のない感染例も報告されるようになり、特に、高病原性のクリプトコックス症の国内発生例が報告され、注目されつつある。本研究では、わが国で問題となり得る地域流行型真菌症に対応するため、クリプトコックス症をはじめとする真菌症の疫学調査および診断・治療等に関する研究を開始した。クリプトコックス症の疫学調査では、本症の原因菌の多くは、従来型の *Cryptococcus neoformans* であることが判明した。また、今回の検討では、*Cryptococcus gattii* による感染例を一例認めたが、遺伝子型は高病原性の北米型とは異なっていた。わが国で分離された高病原性の *C. gattii* 株について、マウスを用いたクリプトコックス症の病原性解析を行い、高病原性株に特徴的な病理学所見が得られ、高病原性株ではマウスの生存率も顕著に低下することが判明した。*C. gattii* と *Trichosporon* との比較遺伝子学的解析では、その類似性が見いだされ、診断等への応用が期待される結果となった。生体側因子に関する検討では、疾患感受性遺伝子の検出系を構築した。クリプトコックス症との鑑別が必要な酵母様真菌による感染症に関する疫学調査では、非カンジダ真菌血症の予測・予後に関する因子として細胞性免疫抑制の重要性、カンジダ眼内炎の発症に関する菌種 (*Candida albicans*) と血中 β -Dグルカンとの関わりが明らかとなった。また、クリプトコックス症における免疫応答と病原性の関連を *in vivo* および *in vitro* で解析し、*C. gattii* の低い免疫誘導能が、高病原性に寄与している可能性が示唆された。新規技術を用いた診断法への応用に関する検討では、質量分析計を駆使した検出系の有用性が期待される結果となった。

A. 研究目的

地域流行型真菌症は、特定地域に生息する真菌による感染症であり、わが国では、渡航者の感染例が多いが、渡航機会の増加を背景に、その総数は増加傾向にある。また、明らかな渡航歴のない感染例も報告さ

れるようになってきた。

近年、米国CDCから、コクシジオイデス症より致死率が高い地域流行型真菌症として、*Cryptococcus gattii* の注意喚起がなされ、北米西海岸からの拡大が危惧されている。わが国においても平成22年に初めて、

北米で流行する *C. gattii* と同一の遺伝子型 VGIIa の株が、渡航歴のない重症中枢神経系クリプトコックス症患者から分離された。既に高病原性 *C. gattii* が、わが国に定着している可能性が示唆され、①疫学調査、②簡易診断法の構築、および③診療指針の策定が急務となった。

疫学調査、簡易診断系構築および診療指針の策定は、直接的に公衆衛生学的に有益であり、感染症法等により把握すべき疾患か否かの判断根拠として行政施策に活用できる。

また、病原性や遺伝子学的解析による病原体の基礎的研究は、新たな治療法や診断法の開発に必要であり、クリプトコックス症などとの鑑別が必要となる酵母様真菌による感染症、特にカンジダ症の疫学調査も重要である。

このようなわが国で問題となり得る地域流行型真菌症に対応するため、クリプトコックス症をはじめとする真菌症の臨床・疫学調査および基礎的研究を開始した。

B. 研究方法

1. 本邦における *C. gattii* 感染症の現況

本邦における *C. gattii* 感染症の現況を把握することを目的として、本症に関する情報発信・収集、本邦におけるクリプトコックス症の疫学調査、および、本邦で分離された高病原性の *C. gattii* 株のゲノム解析を開始した。(宮崎)

2. *C. gattii* 感染症における病態解析

国内動物園で飼育下のコアラ由来クリプトコックス属真菌 (*C. gattii* 7 株、*Cryptococcus neoformans* 2 株) を用いた感染モデルマウスを作製し、*C. gattii* の毒力規定因子の解明を目的とした研究を遂行した。(渋谷)

3. 本邦で初めて分離された *C. gattii* VGIIa JP01 株の血清学的解析および比較ゲノム

1) 渡航歴のない日本人から本邦で初めて分離された VGIIa 株の血清学的性状および莢膜多糖の化学構造を検討した。(杉田)

2) JP01 株の病原因子を特徴づけるために、系統的に近縁な *Trichosporon asahii* 株の全ゲノムを決定し、比較ゲノム解析を行った。(杉田)

4. 生体側の因子に関する研究/診断応用研究

わが国における本症の病態解析を、臨床的・微生物学的に解析し、さらに宿主の疾患感受性解析によりアプローチした。(泉川)

5. 移植等の易感染性患者に発症する深在性真菌症の臨床疫学研究

現代の医療が発症リスクに密接に関連し増加が見込まれる深在性真菌症は、診断や抗真菌薬の進歩に伴ってその疫学(患者背景・菌種・薬剤感受性)には大きな変化がみられる。入院中の易感染性患者における真菌血症の菌種の変化、合併症としての真菌性眼内炎の発症に関する疫学解析を行った。(高倉)

6. *C. gattii* の免疫原性と診断応用の研究

1) 病原性解明のため、*in vivo* および *in vitro* の解析を行った。*in vivo* の解析では、マウス感染モデルにおいて、*C. gattii* と *C. neoformans* の病原性と免疫能との関連を比較した。*in vitro* での解析では、*C. gattii* と *C. neoformans* の死菌を樹状細胞に接種し、免疫応答性を IL-12 および IL-6 の産生能で比較した。(金子)

2) 質量分析計を駆使した新規技術の診断

法への応用検討を開始した。(金子)

C. 研究結果

1. 本邦における *C. gattii* 感染症の現況

国立感染症研究所のホームページ上に高病原性クリプトコックス症に関する情報を掲載するなどの情報発信を行い、また、外部からの問い合わせに対応するとともに情報収集を行った。

疫学調査では、クリプトコックス症病原体を全国から収集し、同定した結果、一株のみが *C. gattii* であり、大部分は血清型Aの *C. neoformans* であることが判明した。

84株の *C. neoformans* の薬剤感受性検査では、経年的な変化はほとんどなく、多くの株はアムホテリシンBやアゾール系抗真菌薬に対して比較的良好な感受性を有していることが明らかとなった。*C. gattii* の薬剤感受性は、*C. neoformans* の臨床分離株と比較し、明らかな差異は見られなかった。

わが国で分離された高病原性株のゲノム解析の結果、わが国固有の *C. gattii* 株存在の可能性も推測され、今後慎重に解析を進める必要がある。(宮崎)

2. *C. gattii* 感染症における病態解析

従来の研究で毒力規定因子と推定されている各種生物学的諸性状に関しては、用いた菌株間で有意な差はなかった。一方、本研究で利用した *C. gattii* 7株の分子型は全てVGI型であることが判明した。各種接種経路で異なる感染致死毒力を示した *C. gattii* 2株 (TIMM4097・TIMM4903) を用いてマウスの肺感染病変を作製し、これを組織学的に比較したところ、菌株の肺胞上皮への接着能の相違に由来する可能性が示唆された。

3. 本邦で初めて分離された *C. gattii* VGIIa JP01株の血清学的解析および

比較ゲノム

1) 日本株(JP01株)およびバンクーバー集団発生株(R265)の因子血清を用いた定量的反応性は同一であった。また、両菌株の莢膜多糖の¹H-NMRスペクトルは、非常に類似していた。このことから両菌株は血清・化学的に同等であると考えられた。(杉田)

2) *T. asahii* 株は9,711のCDSから構成され、*C. gattii* とは1,396のCDSで高い相同性が認められた。今後の比較ゲノム解析のための情報を得ることができた。(杉田)

4. 生体側の因子に関する研究/診断応用研究

現時点までに、複数の本症の感染危険因子を同定し、治療法についてもわが国独自のエビデンスを明らかにできている。微生物学的には、遺伝子学的に非常に類似しているVNI株が優勢で、韓国や中国と同様の結果であった。疾患感受性遺伝子の候補遺伝子の一つであるTLR9については、その一部について有意なSNPを認めなかった。(泉川)

5. 移植等の易感染性患者に発症する深在性真菌症の臨床疫学研究

非カンジダ真菌血症の予測・予後に関する因子として細胞性免疫抑制の重要性、カンジダ眼内炎の発症に関する菌種 (*Candida albicans*) と血中β-Dグルカンとの関わりが明らかとなった。(高倉)

6. *C. gattii* の疫学・薬剤感受性および免疫原性と診断応用の研究

1) *in vivo* の解析では、有意に *C. gattii* の平均生存日数が短縮しており、*C. gattii* 株の臨床的な高病原性を反映する結果となった。一方、免疫と病原性との関連を解析するため、

hydrocortisoneによる免疫抑制マウスを作製し比較したが、有意な相違は見られなかった。また、免疫の誘導には、莢膜の有無が一部関与している結果となった。in vitroでの解析では、*C. gattii*は、*C. neoformans*に比べて、樹状細胞の免疫応答を刺激しにくく、in vivoでの病原性に寄与している可能性が示唆された。(金子)

- 2) 新規技術を用いた診断法への応用に関する検討では、質量顕微鏡やガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) といった検出系の有用性が期待される結果となった (金子)

D. 考察

わが国におけるクリプトコックス症は、ほとんどが血清型Aの*C. neoformans*による感染症であることが、あらためて確認された。また、本研究を通じて収集した株が*C. gattii*であったことは、菌株同定の啓発等を行う上で重要な情報源となった。また、わが国で分離された高病原性の*C. gattii*株のゲノム解析の結果、わが国独自の株である可能性が示唆された。

比較ゲノム解析では、*C. gattii*と*T. asahii*との遺伝学的類似性が見いだされた。生体側因子に関する検討では、疾患感受性遺伝子の検出系を構築した。新規技術を用いた診断法への応用に関する検討では、質量分析計を駆使した検出系の応用を試み、有用性と発展が期待される結果となった。

クリプトコックス症との鑑別が必要な酵母様真菌による感染症に関する疫学調査では、非カンジダ真菌血症の予測・予後に関する因子として細胞性免疫抑制の重要性、カンジダ眼内炎の発症に関する菌種

(*Candida albicans*) と血中 β -Dグルカンとの関わりが明らかとなった。

わが国で分離された高病原性の*C. gattii*株の病原性解析では、高病原性株に特徴的な病理学所見が得られ、高病原性株ではマウスの生存率も顕著に低下することが判明した。また、クリプトコックス症における免疫応答と病原性の関連をin vitroおよびin vivoで解析し、*C. gattii*の低い免疫誘導能が、高病原性に寄与している可能性が示唆された。

E. 結論

クリプトコックス症の疫学調査では、わが国では高病原性株による感染症はまれであると考えられるが、さらなる情報発信・収集と菌株等の解析を含めた調査が必要である。加えて、新規診断法・治療法の開発に寄与する基礎的な研究の継続が必要である。

また、来年度以降は、ヒストプラズマ症などのわが国で問題となり得る他の地域流行型真菌症の疫学調査などについても検討を行う。

F. 健康危険情報

1. カナダ・バンクーバー島周辺ならびに米国太平洋岸を中心とした高病原性クリプトコックス症の集団感染事例、ならびにこれら地域への旅行者での発病。
2. 上記地域への渡航歴のない日本人におけるアウトブレイク型*C. gattii*株 (強毒型) によるクリプトコックス症の発生。

G. 研究発表

各々の研究分担報告書を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

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）
「地域流行型真菌症の疫学調査、診断治療法の開発に関する研究」班
分担研究報告書

本邦における *Cryptococcus gattii* 感染症の現況

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	大野秀明	国立感染症研究所	生物活性物質部
	石川 淳	国立感染症研究所	生物活性物質部
	大川原明子	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

研究要旨 本邦における *Cryptococcus gattii* 感染症の現況を把握することを目的として、高病原性のクリプトコックス症に関する情報発信・収集、薬剤感受性等を含めた疫学調査、および、微生物学的解析等を開始した。国立感染症研究所のホームページ上に注意喚起の情報を提供し、菌種同定の啓発を行い、外部からの問い合わせ等に対応するとともに、情報を収集した。疫学調査では、クリプトコックス症病原体を全国から収集し、同定した結果、一株のみが *C. gattii* であり、大部分は *Cryptococcus neoformans* であることが判明した。*C. neoformans* の薬剤感受性は、経年的に大きな変化はなく、*C. gattii* の薬剤感受性は、*C. neoformans* の臨床分離株と比較し、明らかな差異は見られなかった。また、わが国で分離された高病原性株のゲノム解析の結果、わが国固有の *C. gattii* 株存在の可能性も推測され、今後慎重に解析を進める必要がある。

A. 研究目的

Cryptococcus gattii（血清型 B、C）は、クリプトコックス症の原因真菌の一つであり、近年まで、本菌種はオーストラリアを中心に生息し、コアラの病原体として知られ、ヒトへの感染発病は稀と考えられ、*Cryptococcus neoformans*（血清型 A、D、AD）が、わが国を含む全世界に分布するクリプトコックス症の主たる病原体であると考えられてきた。しかしながら、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が発生し、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 年には、

わが国のクリプトコックス症患者からも、北米型と同じ遺伝子パターンをもつ *C. gattii* が初めて分離された。病歴から、日本国内で感染した可能性のあることが報告されたため、*C. gattii* によるクリプトコックス症の日本国内での実態把握が必要となった。

このような背景から、*C. gattii* 感染症に関する情報発信・収集、クリプトコックス症原因病原体の収集と同定、微生物学的解析等を行った。

B. 研究方法

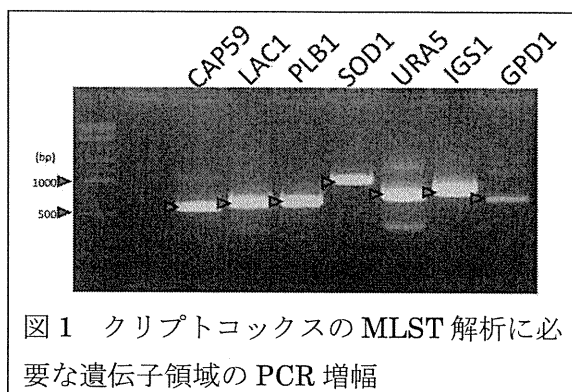
1. 高病原性クリプトコックス症に関する情報発信および収集

わが国初の高病原性 *C. gattii* 症例に関する 2010 年の報告を受けて、国立感染症研究所のホームページ上に注意喚起の情報を提供し、問い合わせ等に対応、情報を収集した。

2. わが国におけるクリプトコックス症病原体の収集と解析

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株、および、同定依頼のあった株を収集し、解析した。

クリプトコックス属血清型同定は、PCR 法と L-canavanine glycine bromothymol medium (CGB) 培地における菌発育能で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。さらに、CAP59, GPD1, LAC1, SOD1, PLB1, URA5, IGS1 遺伝子領域を PCR で増幅し、塩基配列を決定し、多遺伝子系統解析 (MLST: Multi-Locus Sequence Typing) による分類を行った (図 1)。



また、*C. neoformans* 臨床分離株 84 株、わが国で分離された VGIIa 型 *C. gattii* JP01 株、北米で分離された VGIIa 型 *C. gattii* R265 株、VGI 型の *C. gattii* 5815 株、および北大病院で分離された VGI 型の *C.*

gattii 株について薬剤感受性試験を行った。国際的標準法 CLSI-M27-A3 (酵母) に準拠し、アムホテリシン B (AMPH-B)、5-FC、フルコナゾール (FLCZ)、イトラコナゾール (ITCZ)、ボリコナゾール (VRCZ)、ポサコナゾール (PSCZ) の薬剤感受性を測定した。

3. わが国で分離された高病原性 *C. gattii* 分離株の全ゲノム配列解析

C. gattii 一株について、定法によりゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、全ゲノム配列を解析した。

C. 研究結果

1. 高病原性クリプトコックス症に関する情報発信および収集

ホームページに注意喚起の情報を掲載後、高病原性クリプトコックス症に関する問い合わせと同定依頼が計 4 件寄せられた。このうち、難治性中枢神経クリプトコックス症の症例から分離された株が、*C. gattii* (VGI 型) であることが判明した。

2. わが国におけるクリプトコックス症病原体の収集と解析

① 血清型および MLST 型

血清型は、ほとんどが A 型であり、また、MLST 型はほとんどが 46 型であった。1 株のみ、血清型 B の *C. gattii* が同定され、MLST 型による判別の結果、VGI 型に分類されることが判明した。

2001 年を境として、*C. neoformans* の薬剤感受性推移を比較したが、両者の傾向に相違はほとんど見られず、多くの株は比較的良好な薬剤感受性を維持していた (表 1)。

表1 国内分離 *C. neoformans* 84 株の抗真菌薬に対する感受性

	2000年まで(n=21)			2001年以降(n=63)		
	最小値	最大値	MIC ₉₀	最小値	最大値	MIC ₉₀
AMPH-B	0.25	1	1	0.12	2	1
5-FC	0.25	8	4	0.12	32	8
FLCZ	0.5	8	4	0.25	8	4
ITCZ	0.015	0.25	0.12	0.015	0.25	0.25
VRCZ	0.015	0.12	0.12	0.015	0.12	0.06
PSCZ	0.015	0.12	0.12	0.015	0.5	0.25

(μg/ml)

C. gattii の薬剤感受性の比較では、今回検討した株は、*C. neoformans* と顕著な差は見られなかった (表 2)。

表2 *C. neoformans* と *C. gattii* の薬剤感受性比較

	AMPH-B	5-FC	FLCZ	ITCZ	VRCZ
JP01株 (VGIIa)	1	2	8	0.06	0.12
R265株 (VGIIa)	1	2	4	0.25	0.06
5815株 (VGI)	1	4	4	0.25	0.12
北大株 (VGI)	0.12	0.5	2	0.03	0.06
<i>C. neoformans</i> 2001以降 (MIC ₉₀)	1	8	4	0.25	0.06

(μg/ml)

3. わが国で分離された高病原性 *C. gattii* 分離株の全ゲノム配列解析

約 6 千万リードをアセンブルした結果、約 500 個のコンティグ (1kb 以上) が得られ、その総計 (ゲノムサイズ) は約 17Mb であり、約 7000 個の遺伝子が予測された。

D. 考察

クリプトコックス症は、血清抗原価と臨床症状を主体に診断されることが多く、また、菌が分離された場合でも、菌種まで同定されることは少ない。北米で *C. gattii* によるクリプトコックス症のアウトブレイクが発生したが、日本での実態については、これまで調査が行われておらず不明であった。今回の検討で、あらためて分離菌の菌種を同定し、*C. neoformans* による感染症

がほとんどであることが推測される結果となった。しかしながら、*C. gattii* は、健康者において発病する症例が多いことから、今後の動向にも注意が必要である。

高病原性株によるクリプトコックス症に関する情報発信が、菌種同定の啓発に寄与し、情報発信の有用性を示す結果となった。特に、1 株のみではあるが、*C. gattii* を検出でき、当該症例が論文として報告される予定となっており、今後治療指針等を作成する際の貴重な資料となった。

また、わが国で分離された VGII 型の *C. gattii* 株の全ゲノム解析の結果、これまで報告されてきた株のいずれとも一致しない遺伝子配列が検出され、わが国に特有の株である可能性も示唆された。

E. 結論

高病原性株によるクリプトコックス症に関する情報発信が、菌種同定の啓発に寄与しており、今後も継続的に行う必要がある。

また、今回の疫学調査では、*C. gattii* と同定された株は 1 株のみであり、わが国におけるクリプトコックス症の大多数は、*C. neoformans* による感染症であることが推測された。しかしながら、わが国における *C. gattii* による感染症の実態把握のためには、症例数を増やして解析し、ゲノム解析等も詳細に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

1. 日本人における高病原性 *C. gattii* 株によるクリプトコックス症の発生の危険性。

G. 研究発表

論文発表
英文論文

1. Kohno S, Izumikawa K, Kakeya H, Miyazaki Y, Ogawa K, Amitani R, Niki Y, Kurashima A. Clinical efficacy and safety of micafungin in Japanese patients with chronic pulmonary aspergillosis: a prospective observational study. *Med Mycol.* 49:688-693, 2011.
2. Miyazaki T, Izumikawa K, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Yasuoka A, Kohno S. The glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl protease Yps1 is transcriptionally regulated by the calcineurin-Crz1 and Slt2 MAPK pathways in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 11:449-456, 2011.
3. Tomita H, Muroi E, Takenaka M, Nishimoto K, Kakeya H, Ohno H, Miyazaki Y, Utani A. Rhizomucor variabilis infection in human cutaneous mucormycosis. *Clin Exp Dermatol.* 36:312-314, 2011.
4. Kinjo Y, Illarionov PA, Vela JL, Pei B, Girardi E, Li X, Li Y, Imamura M, Kaneko Y, Okawara A, Miyazaki Y, Gomez-Velasco A, Rogers P, Dahesh S, Uchiyama S, Khurana A, Kawahara K, Yashilkaya H, Andrew PA, Wong CH, Kawakami K, Nizet V, Besra GS, Tsuji M, Zajonc DM, Kronenberg M. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol.* 12:966-974, 2011.
5. Kaneko Y, Obata Y, Nishino T, Kakeya H, Miyazaki Y, Hayasaka T, Setou M, Furusu A, Kohno S. Imaging mass spectrometry analysis reveals an altered lipid distribution pattern in the tubular areas of hyper-IgA murine kidneys. *Exp Mol Pathol.* 91:614-621, 2011.
6. Tanabe K, Lamping E, Nagi M, Okawada A, Holmes AR, Miyazaki Y, Cannon RD, Monk BC, Niimi M. Chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal features of pleiotropic drug resistance transporter structure and function. *Mol Microbiol.* 82:416-433, 2011.
7. *Cryptococcus gattii*による脳および肺クリプトコックス症の1例. *臨床神経学 in press.*
8. 金子幸弘, 宮崎義継. 内科医にとって必ず知っておくべき感染症を診る IV. 緊急性の高い感染症を診る 2. 血液培養陰性でも敗血症(severe sepsis). *臨床感染症ブックレット* 5巻. p62-71, 2012年, 文光堂, 東京.
9. 金子幸弘, 宮崎義継. 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 VI. 主な感染症に対する実地医科の抗菌薬使用の実際/A. 主要感染症から見た抗菌薬の選択と使用の実際 43. カンジダ症, アスペルギルス症, クリプトコックス症. *M. P. Medical Practice臨時増刊号.* 28:483-490, 2011.
10. 宮崎義継, 金子幸弘. 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 II. 抗菌薬の特徴とそれに基づいた使い方のコツとポイント 11. 抗真菌薬. *M. P. Medical Practice臨時増刊号.* 28:137-141, 2011.
11. 金子幸弘, 宮崎義継. 特集・病原真菌と真菌症の新たな理解に向けて 臨床 4. 深在性真菌症診断の現状と今後の展望. 化学療法の領域. 28:89-97, 2012.
12. 宮崎義継. 各論 II. 各病原体別にみた病態, 診断, 治療 H. 真菌感染症1. カンジダ症. 社団法人日本化学療法学会編. 感染症専門医テキスト 第I部 解説編. p1073-1076, 2011年, 南江堂, 東京.
13. 宮崎義継. 各論 II. 各病原体別にみた病態, 診断, 治療 H. 真菌感染症2. クリプトコックス症. 社団法人日本化学療法学会編. 感染症専門医テキスト 第I部 解説編. p1077-1079, 2011年, 南江堂, 東京.
14. 宮崎義継. 第II章 中級編 20.腎炎治療中に肺異常陰影を呈した症例. 社団法人日本化学療法学会編. 感染症専門医テキスト 第II部 ケーススタディ編. p239-244, 2011年, 南江堂, 東京.
15. 金子幸弘, 宮崎義継. 4章 真菌感染症 4-3 コクシジオイデス症. 感染症事典編集委員会編. 感染症事典. p251-254, 2012年, オーム社, 東京.

学会発表

国際学会

1. Kinjo Y, Illarionov PA, Vela JL, Pei B, Li XJ, Kaneko Y, Miyazaki Y, Nizet V, Kawakami K, Tsuji M, Kronenberg M. NKT cells recognize glycolipids from *Streptococcus pneumoniae* and GBS. *International Union of*

和文論文

1. 堀内一宏, 山田萌美, 白井慎一, 高橋育子, 加納崇裕, 金子幸弘, 秋沢宏次, 梅山隆, 宮崎義継, 矢部一郎, 佐々木秀直. 脳室内抗真菌薬投与が奏効した

- Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011). September 6-10, 2011, Sapporo.
2. Kaneko Y, Ohno H, Miyazaki Y. Farnesol attenuates the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011). September 6-10, 2011, Sapporo.
 3. Kinjo Y, Tarumoto N, Ueno K, Okawara A, Shinozaki M, Shibuya K, Miyazaki Y. *Candida* sepsis induced by iNKT cell activation. The 6th International Symposium on CD1 and NKT. September 23-27, 2011, Chicago, USA.
 4. Umeyama T, Yamagoe S, Tanabe K, Ohno H, Miyazaki Y. Mps1 kinase is essential for the growth in *Aspergillus fumigatus*. 5th Advances Against Aspergillosis (AAA2012). January 26-28, 2011 Istanbul, Turkey.
 7. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. カンジダバイオフィームにおけるストレス応答とその阻害効果. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
 8. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus*のMps1キナーゼの新たな抗真菌薬ターゲットとしての可能性の検討. 第59回日本化学療法学会総会. 6月23-25日, 2011年, 札幌.
 9. 金城雄樹, 金子幸弘, 樽本憲人, 大川原明子, 川上和義, 宮崎義継. 自然リンパ球による肺炎球菌認識機構の解析. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
 10. 樽本憲人, 金城雄樹, 大川原明子, 上野圭吾, 篠崎 稔, 渋谷和俊, 宮崎義継. 糖脂質投与マウスの播種性カンジダ症増悪における免疫学的解析. 第22回日本生体防御学会. 6月29-7月1日, 2011年, 那覇.
 11. 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壤中に生息するヒストプラズマ属検出の試み. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年.

国内学会

1. 宮崎義継, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 渋谷和俊, 大野秀明. 診断ワークショップ5 深在性真菌症の病理 深在性真菌症における臨床的課題. 第100回日本病理学会総会. 4月28-30日, 2011年.
2. 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カス症多発発生例からの分離株のMLSTによる疫学的検討. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
3. 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・学術講演会. 4月21-22日, 2011年.
4. 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ウム症の一例. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
5. 金城雄樹, 樽本憲人, 上野圭吾, 大川原明子, 篠崎 稔, 渋谷和俊, 宮崎義継. カンジダ敗血症マウスモデルにおける炎症反応の解析. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
6. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans*の代償機構の解明とその制御による治療の可能性. 第108回日本内科学会. 4月17-18日, 2011年, 東京.
12. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida*バイオフィームにおける抗真菌薬耐性関連遺伝子の発現調節. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
13. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 橋本ゆき, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus*属分泌蛋白質を標的にしたサンドイッチELISA法によるアスペルギルス症診断系構築の試み. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
14. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 金城雄樹, 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学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
15. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans*のbiofilmにおける抗真菌薬に対する代償性の遺伝子発現. 第59回日本化学療法学会総会. 6月23-25日, 2011年, 東京.
16. 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. 6月23-25日, 2011年.
17. 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. 6月29-30日, 2011年.
18. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans*に対する既存薬と抗真菌薬との併用効果についての検討. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 19. 宮崎義継. 教育講演「抗真菌薬耐性の基礎と臨床」. 第81回日本感染症学会西日本地方会学術集会. 10月6-8日, 2011年, 小倉.
 20. 金城雄樹, 樽本憲人, 大川原明子, 上野圭吾, 篠崎 稔, 渋谷和俊, 宮崎義継. 自然免疫の活性化による播種性カンジダ症マウスモデルの解析. 基礎・臨床シンポジウム4「真菌と感染防御」. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 21. 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継. アスペルギルス属の病原性制御にむけたアプローチ. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 22. 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) を用いた分子疫学調査. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 23. 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. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 24. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* MPS1キナーゼの化学的・遺伝学的アプローチによる解析. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
 25. 大川原明子, 金城雄樹, 上野圭吾, 山越智, 梅山 隆, 樽本憲人, 大野秀明, 新見昌一, 宮崎義継. β 結合型マンノースを欠失したカンジダマンナンは樹状細胞の炎症性サイトカイン産生を増強する. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 26. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. フルコナゾール感受性調整物質の探索. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
 27. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 橋本ゆき, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus*の分泌蛋白質B-11およびそのホモログの検出系と病原性について. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 28. 大野秀明, 大川原明子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 泉川公一, 藤井 毅, 竹村 弘, 岸 一馬, 河野 茂, 宮崎義継. 日本国内で分離された *Cryptococcus* 属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. ワークショップ3 深在性真菌症の新たな展開—重症例、難治症例の病態と治療—. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
 29. 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継. 日本とタイにおける遺伝子検出法を用いた環境生息ヒストプラスマ属の検出. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 30. 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. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 31. 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 宮崎義継. *Candida glabrata* 臨床分離株におけるキャンディン感受性とFKS遺伝子の解析. 真菌分子細胞研究会. 11月12-13日, 2011年, 香川.
 32. 名木 稔, 田辺公一, 中山浩伸, 知花博治, 梶原 将, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール獲得機構の解明. 真菌分子細胞研究会. 11月12-13日, 2011年, 香川.
 33. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 畠山修司, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 国内分離株の病原因子解析. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
 34. 名木 稔, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* の鉄欠乏ストレス応答. 2011年インターラボセミナー(日本細菌学会関東支部). 12月10日, 2011年, 東京.
 35. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 抗真菌併用薬探索を目的とした既知化合物ライブラリースクリーニング. 2011年インターラボセミナー(日本細菌学会関東支部). 12月10日, 2011年, 東京.

36. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 緑膿菌におけるquorum sensing欠損株とホモセリンラクトナーゼ*aiiM*誘導株の病原性比較. 第53回緑膿菌感染症研究会. 2月17-18日, 2012年, 東京.
37. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. アゾール薬との併用薬の探索. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
38. 宮崎義継. わが国における地域流行型真菌症の現況. 第三回長崎メディカルシンポジウム. 7月9日, 2011年, 長崎.
39. 宮崎義継. 最近話題の真菌症—*Cryptococcus*症など—. 臨床微生物研究会. 9月16日, 2011年, 岡山.
40. 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. 10月22日, 2011年, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

特記事項なし

実用新案登録

特記事項なし

その他

特記事項なし

分担研究報告書

*Cryptococcus gattii*感染症における病態解析

研究分担者	渋谷 和俊	東邦大学医学部病院病理学講座
研究協力者	楨村 浩一 大久保 陽一郎 笹井 大督 中山 晴雄 石渡 誉郎 篠崎 稔	帝京大学医学部宇宙医学研究室 東邦大学医学部病院病理学講座 東邦大学医学部病院病理学講座 東邦大学医学部病院病理学講座 東邦大学医学部病院病理学講座 東邦大学医学部病院病理学講座

研究要旨 近年クリプトコックス症の起因菌として *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) が注目されている。研究分担者らは、国内動物園で飼育下のコアラ由来クリプトコックス属菌 (*C. gattii* 7株、*Cryptococcus neoformans* 2株) を用いた感染モデルマウスを作製し、*C. gattii* の毒力規定因子の解明を目的とした研究を遂行した。その結果、従来の研究で毒力規定因子と推定されている各種生物学的諸性状に関しては、用いた菌株間で有意な差はなかった。一方、本研究で利用した *C. gattii* 7株の分子型は全てVG I型であることが判明した。各種接種経路で異なる感染致死毒力を示した *C. gattii* 2株 (TIMM4097・TIMM4903) を用いてマウスの肺感染病変を作製し、これを組織学的に比較したところ、菌株の肺胞上皮への接着能の相違に由来する可能性が示唆された。

A. 研究目的

クリプトコックス症は易感染患者のみならず健常人においても発症し得るが、近年その起因菌として *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) が注目されている。

本真菌感染症はカナダのバンクーバー島東海岸地方での集団発生が報告され、2010年には発生地域への渡航歴のない日本人での発症例が報告されている。これらの事実からは、*C. gattii* 感染発生地域の世界的な拡大傾向が危惧されるが、本真菌の毒力に関わる基本的な生物学的性状や感染時に惹起される病態等については、詳細に検討した報告が少ないのが現状である。

このような背景のもと、研究分担者らはクリプトコックス属菌 (*C. gattii* 7株、

Cryptococcus neoformans 2株) を用いた感染モデル(マウス)を活用し、本真菌の毒力規定因子の解明を目的とした各種解析を行った。

B. 研究方法

1. 使用動物ならびに菌株

本研究では5週齢の雄性ICRマウスを使用した。また、使用菌株は帝京大学医真菌研究センターにて同定・保存された *C. gattii* TIMM4097ならびにTIMM4901-4906、*C. neoformans* TIMM4920ならびにTIMM4922の計9株であり、いずれも国内動物園飼育下のコアラに由来する。

2. 生物学的諸性状の検索

1) 莢膜の厚さ

各菌株は Yeast extract peptone glucose

(YPG) 液体培地にて、37°C で 24 時間培養後、墨汁染色を施し、顕微鏡下で菌体周囲の莢膜の厚さを測定した。

2) 発育温度

各菌株を、YPG 液体培地に接種し、25, 27, 30, 35, 40°C 設定のウォーターバス内で静置培養し、培養 24, 48, 72 時間後に、発育の指標として、培地の濁度を 3 段階 (−, ±, +) で評価した。

3) 37°Cにおける増殖能

a) YPG 培地を用いた振盪培養における増殖能：各菌株は Sabouraud Dextrose Agar (SDA)培地にて前培養後、YPG 液体培地に接種し、37°C設定のウォーターバスにて振盪培養をおこなった、培養 3 時間毎に生菌数を測定し、増殖曲線を作成し比較した。

b) 生理的条件に近似した環境下における増殖能：各菌株は SDA 培地にて前培養後、5%牛胎児血清添加(Roswell Park Memorial Institute) RPMI 培地に接種し、37°Cに設定した 5% CO₂ インキュベータ内で静置培養し、72 時間後に生菌数を測定し比較した。

4) 加水分解酵素活性

3 種類の加水分解酵素(ウレアーゼ、プロテアーゼ、フェノルオキシダーゼ)の活性は各種専用培地におけるコロニーレベルの観察により確認された。

a) ウレアーゼ活性：各菌株は SDA 培地にて前培養後、クリステンセン尿素培地に接種し、37 °Cのインキュベータ内で 48 時間培養し、培地色の変化(赤橙色から鮮桃色への呈色反応)の確認を以って活性の有無を判定した。

b) プロテアーゼ活性：各菌株は SDA 培地にて前培養後、YCB・BSA・Pp 培地に穿刺し、コロニー周囲に形成されたタン

パク分解帯形成の確認を以って活性の有無を判定した。

c) ホスホリパーゼ活性：各菌株は SDA 培地にて前培養後、卵黄培地に穿刺し、30°Cのインキュベータ内で適当時間培養後、形成されたコロニーの直径をホスホリパーゼ陽性コロニー周囲にみられる明瞭な白色帯の直径で除した比率 (Pz 値)を算出することで、活性の有無を判定した。判定基準は Pz =1.00 をホスホリパーゼ産生陰性、Pz < 0.64 をホスホリパーゼ産生陽性とした。

5) メラニン合成関連酵素活性(フェノルオキシダーゼ活性)

各菌株は SDA 培地にて前培養後、バードシード培地に接種し、形成されたコロニー色のクリーム色からメラニン産生を意味する茶褐色への変化を以って活性の有無を判定した。

3. 感染致死毒力の比較

ペントバルビタール 30mg、キシラジン 6mg およびジモルホラミン 0.75mg を 50ml の生理食塩水に添加して作製したミクスチャー 60μl/g を腹腔内投与することで麻酔下におかれたマウス鼻腔内に、 2.5×10^7 cells/ml に調整した菌液 20μl (5×10^5 cells/mouse) をマイクロピペットにて滴下し経鼻感染モデルを作製し、接種後 100 日間の状態を確認した。

4. *C. gattii* の molecular type 検索

C. gattii 7 菌株に対し、multilocus sequence typing (MLST) 型解析を用いてそれぞれの molecular type を検索した。具体的には、各菌株をプラスチック製白金耳ループにて少量採取し Solution A 500 μl に溶解した。次いで、TaKaRa Gen とるくん(酵母用)®を使用して DNA 抽出を行い、以下の 7 つの遺伝子について PCR による増幅

を行った：CAP59、GPD1、LAC1、PLB1、SOD1、URA5、および IGS1。さらに、ExoSAP-IT® (GE ヘルスケア社)を用いて上記 PCR 産物を精製した上、ABI 3730xl®により配列の決定を行い、molecular type を決定した。

5. 病理組織学的解析

1) 標本作製

C. gattii TIMM4097 ならびに 4903 の経気道感染モデルマウスを接種 5、10、15、30 日目に 5 匹ずつ屠殺・剖検し、摘出した肺は速やかに 20%ホルマリンで固定した。詳細な肉眼観察ののち、左右の肺葉の中心を矢状面で切り出し、常法に従ってパラフィン包埋した。それらの検体は 4~5 μ m の厚さに薄切し、Hematoxylin-eosin 染色(HE 染色)、PAS 反応、ならびに Elastica 単染色を施し、組織学的検索に供した。

2) 画像解析による肺の構造改変の分析

各個体の Elastica 単染色を施した肺組織切片上を対物レンズ 20 倍で撮影し、得られた画像上に任意の線分を設定した。次いで、これらの線分上で、線分と肺胞壁との交点間距離を画像解析ソフト「Image J®」を用いて各個体とも 2000 箇所以上測定し平均値およびその標準偏差を比較した。測定された平均値ならびに標準偏差の有意差検定は、Mann-Whitney U 検定ならびに F 検定を用いて評価し、いずれも $p < 0.05$ を以って有意差ありと判定した。

3) 菌の分布に関する評価

接種された菌体の肺胞内での定着力と上部気道への逆流の関係性を評価することを目的に、切片上にみられるすべての気管支の種類を、内腔を占める菌量の差により 3 段階(充満・壁着・不在)に設定し、各段階の気管支数を数えることで、菌増殖の分布を半定量的に評価した。この評価の対象とす

る気管支は、周囲に気管支軟骨を欠くもので、切片上、気管支断面の全弧が結ばれ(円形~楕円形)、ほぼ均等に粘膜上皮が裏打ちしているものとした。

C. 研究結果

1. 生物学的諸性状の検索

病原性に関与すると推定されている生物学的諸性状について比較検討した結果、莢膜の厚さ、設定された温度における発育速度、生理的条件に近似した環境における発育速度において菌株間の差は明らかではなかった。また、加水分解酵素(ウレアーゼ・プロテアーゼ・ホスホリパーゼ B)ならびにメラニン合成関連酵素(フェノールオキシダーゼ)の活性を比較したが、いずれの菌株においてもほぼ同等の活性が示された。

2. 感染致死毒力の比較

各菌株の経鼻接種群により死亡率は大きく異なった。特に *C. gattii* TIMM4097 接種群では、感染早期(菌接種15日前後)からマウスの死亡が確認され、60日の観察期間を待たずに、全例が死亡した。一方、その他の菌株接種群におけるマウスの死亡例は、菌接種後40日を過ぎてから確認されたものの、全観察期間中に全例の死亡を確認した群はなく、いずれの接種群においても死亡率は100日目まで40%に満たなかった(図1)。

図 1. 菌接種後 100 日間の死亡曲線

