

9. 金沢医科大学皮膚科学講座：若手皮膚科医のための真菌講習会テキスト 第2版（望月 隆編）. 石川県内灘 金沢医科大学皮膚科学講座 pp 1-29, 2013.

学会発表

1. Mochizuki T: Outbreaks of community-acquired and nosocomial dermatophytoses in Japan. The 18th Congress of International Society of Medical and Veterinary Mycology, Berlin, Germany (June 13, 2012, Symposium)

2. 坂田祐一、坂元とも子、渡部絢子、牛上 敢、安澤数史、望月 隆：石川県下中学校柔道部における *Trichophyton tonsurans* 感染症の集団検診結果 第433回日本皮膚科学会北陸地方会（金沢市 平成24年2月26日）

3. 望月 隆、安澤数史、藤広満智子：*Trichophyton tonsurans*に見られる厚膜胞子様構造-迅速同定への応用について- 第433回日本皮膚科学会北陸地方会（金沢市 平成24年2月26日）

4. 望月 隆、安澤数史、藤広満智子：*Trichophyton tonsurans*の培地内にみられる厚膜胞子様構造について 第61回神奈川医真菌研究会（横浜市 平成24年5月13日 一般）

5. 望月 隆、安澤数史、藤広満智子：*Trichophyton tonsurans*の培地内に形成される厚膜胞子様構造物の微細構造 第100回関西真菌懇談会（大阪市 平成24年7月29日 一般）

6. 望月 隆、安澤数史、坂田祐一、藤広満智子：*Trichophyton tonsurans*の厚膜胞子様構造は培養早期のスクリーニングに有用である 第56回日本医真菌学会総会（八王子市 平成24年11月10-11日 一般）

7. 望月 隆：白癬菌 *Trichophyton tonsurans*の厚膜胞子様構造物の臨床的意義について 金沢医科大学総合医学研究所研究セミナー（内灘町 平成25年2月8日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

1. 本研究の成果の一部は皮膚科関連学会、皮膚科関連講演会、医師会講演会で紹介し、皮膚科医や家庭医の啓発に用いた。

2. 平成24年10月開催の日本医真菌学会総会において、優秀演題賞を受賞した。

3. 金沢医科大学皮膚科学講座が母体となり、北陸真菌懇談会の企画として開催している真菌講習会において使用するテキスト「若手皮膚科医のための真菌講習会テキスト」（2012）、同第2版（2013）を編纂し、本研究の成果を皮膚科医の教育に用いている。また第2版は皮膚科学講座のHome Pageに掲載することで広く研究成果を公表している。

4. 教育現場の不安解消のために「トンスランス感染症蔓延防止 内灘中学校武道必修化に向けた研修会」（内灘町 平成24年8月）において感染症の概要を解説し、合わせて防御策の策定に助言を行った。

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

研究分担者 亀井 克彦 千葉大学真菌医学研究センター臨床感染症分野

研究協力者 豊留 孝仁 千葉大学真菌医学研究センター臨床感染症分野

研究要旨 輸入真菌症の国内発生状況調査を行ない、昨年までの状況と比較検討した。昨年、再増加の見られたコクシジオイデス症をはじめ、ヒストプラズマ症とも1、2例にとどまり比較的安定していたが、これまで輸入真菌症の中でも希少と考えられていたマルネツフェイ型ペニシリウム症が4年連続して発見され、安定してわが国に持ち込まれていることが明らかとなった。さらに今回の症例はこれまでにない病型であることが明らかとなり、排菌が持続していたことから更なる警戒を要すると思われた。ヒストプラズマ症の迅速診断法の改良・開発については、新規抗原候補タンパク質について検討を進め、*H. capsulatum* の抗原タンパク質を組み合わせることにより、感度の上昇を、さらにAgMの部分タンパク質を組み合わせることによりバックグラウンドを低下させることができた。また上記タンパク質のコード遺伝子を対象に新たに設計したサイクリングプローブ（Hist1-probe3）とプライマー（hcN2F, hcN1R）を用いたリアルタイムPCR法では、高い検出感度と優れた検出特異度が示され、更なる改良による実用化が期待された。

1. 輸入真菌症の国内発生状況調査

A. 研究目的

いわゆる輸入真菌症は原因菌に危険度分類3に属する高度病原菌が多く含まれ、これらは健常人に容易に感染することから、その国内発生状況の確認は重要である。本疾患群について当研究班では毎年モニタリングを継続し、コクシジオイデス症の増加、次いでヒストプラズマ症の増加を中心とした報告を行い、国内の医療施設、医療従事者に対する啓蒙活動

を行ってきたが、その後の状況を把握するため本年も発生状況調査を行った。

B. 研究方法

昨年度と同様に千葉大学真菌医学研究センター及び国立感染症研究所に対する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を中心とし、これに醫學中央雑誌、Medlineなどに掲載された報告症例を検索してデータを補完した。

またコクシジオイデス症のみは感染症法（4類）に指定されているため、保健所を介した報告例も確認し情報の補完に努めた。

C. 研究成果（図 a）

1) コクシジオイデス症

2012年は計2例が確認され、総症例数は68例となった。2007年の3例以降、3→3→2→1→4→2とほぼ安定して症例が報告される傾向がみられた。感染地はいずれも米国アリゾナで、いずれも胸部結節影を呈し、病型は慢性肺コクシジオイデス症と考えられた。

2) ヒストプラズマ症

2012年のヒストプラズマ症1例が認められ総計は74例となった。病型は急性肺ヒストプラズマ症と考えられた。

3) パラコクシジオイデス症

パラコクシジオイデス症は、昨年に引き続き発生が認めらず、2009年の2例以降症例が報告されていない（計21例）。わが国におけるパラコクシジオイデス症は多くが収穫などで来日中のブラジル人に発症しており、本症の報告数はブラジル人の流入者人口に左右される面が強いと推測され、今後の動向に注意が必要と考えられた。

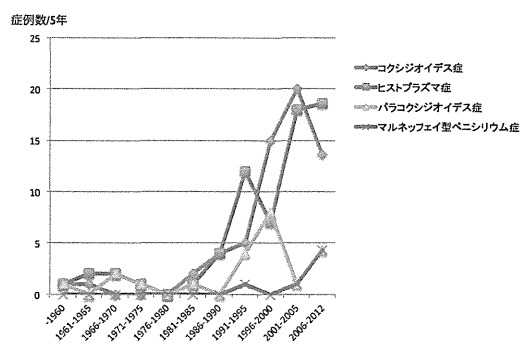
4) マルネツフェイ型ペニシリウム症

2009年（2例）、2010年（1例）、2011年（1例）と連続して報告されたが、本年も引き続き1例報告されており、総計は8例となった。本症は2006年までは計3例しか発見されておらずごく散発的に症例が見られるのみであったが、近年コンスタントに報告されるようになった点が注目される。また、今年の症例は一時的な少量の経口ステロイド薬使用と軽度の糖尿病以外に明らかな免疫異常がなく、既存の肺嚢胞内に感染したものと考えられ、これまでにない新しい病型と思われた。本例ではこれまで見られた全身播種型と異なり、喀痰中に持続的な排菌が見られていることから、

今後の注意深い観察が必要である。なお、感染地はタイと推測された。

5) その他の輸入真菌症

ブラストミセス症を含め、上記以外の輸入真菌症は本年は認められなかった。



（図 a）

D. 考察

昨年に比べると全体に落ち着いていたが、これまでも輸入真菌症の症例数は年により大きく変動しており、今後の経過については予断を許さない。特にコクシジオイデス症のように流行地で周期的に大流行が見られる疾患では注意深いモニタリングが必要であろう。また、特にマルネツフェイ型ペニシリウム症では明らかな増加傾向が見られるとともに、本年はこれまで見られたような「AIDSを基礎疾患としタイで感染して発病した全身感染」という構図ではなく、明らかな基礎疾患を持たない患者の気道に局所的に感染し、持続的に排菌するなど、病態が多様化している点も注目される。この病態はこれまで報告が見いだされなかったが、わが国では肺結核後遺症など慢性的な気管支肺病変を有する患者が多いことや、この種の病態では持続的な排菌が起りがちと推測されることから、今後、この種の病型を含めて、マルネツフェイ型ペニシリウム症には十分な警戒が必要と思われる。

E. 結論

今年度の発生状況調査にてコクシジオイデス症、ヒストプラズマ症ともほぼコンスタントな症例数であったが、マルネツフェイ型ペニシリウム症については明らかな増加傾向が示され、加えて病型が多様化している可能性が示唆された。今後とも注意深く調査・研究を行なうべきと考えられる。

2. 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

A. 研究目的

ヒストプラズマ症の診断においては病理組織検査や培養による菌の検出が非常に重要な意義を持っている。しかしこれらの診断法は、強い病原性を持つ真菌であることから、その培養に特殊な設備や長時間を要したり、あるいは侵襲的手技が必要とされるという欠点を持っている。そこでこれらの手法に先行してもしくは並行して行うことが可能な迅速・簡便な診断法が求められている。ヒストプラズマ菌体に由来する抗原もしくはそれに対する抗体を検出する血清診断法が迅速診断法の一つとして用いられているが、現行の血清診断試薬を用いた本邦の症例に対する検討では十分な感度が得られないとの結果が得られている。このような背景からヒストプラズマ症血清診断法の開発・改良が求められている。

これまでの研究において、患者血清中抗体により認識される新規の *Histoplasma capsulatum* 抗原タンパク質を同定してきた。これらの新規抗原タンパク質および既知の M 抗原タンパク質 (AgM)、H 抗原タンパク質 (AgH) を組換えタンパク質として発現・精製し、ELISA 法への応用にむけた検討を行ってきた。これらのタンパク質の中で AgH、AgM、Hc1、Hc6 の 4 種類の抗原タンパク質がヒストプラズマ症患者群において健常人群に比べて優位に高い抗体価を示すことが明らかとなった。さら

に、これら組換えタンパク質 4 種を組み合わせ用いることにより、単独で用いた場合に比べて感度の点で改善を図ることが可能となっている。さらにこれまでの検討により、AgM タンパク質の中間部分が健常人群血清との非特異的反応の原因となっており、一方で AgM タンパク質の C 末領域が患者血清群でエピトープとして認識されており、AgM の全長タンパク質に代えて AgM タンパク質 C 末領域のみの部分タンパク質 AgM-F3 と他の 3 種の抗原を用いる事により、健常人群血清との非特異的反応を抑えることが可能となった。

本年度の研究では現在の ELISA 法を簡便化するために抗原をウェルにコートしたプレートの予製が可能であるかどうかについて検討を行った。予製プレートの作製が可能であれば、ELISA 法の簡便化が図れるだけでなく、今後の海外への輸送や他施設の研究者の利用に大きく貢献すると期待できる。

さらに、我々は、これまでに同定した新規抗原タンパク質のうち、近縁の菌種間であっても Hc1 遺伝子の塩基配列相同性が低いことに着目し、Hc1 遺伝子を標的にしたリアルタイム PCR による診断法の開発を進めてきた。リアルタイム PCR には、DNA と RNA のキメラプローブ (サイクリングプローブ) と RNase H の組み合わせによる高感度かつ特異性の高いサイクリングプローブ法を採用し、*H. capsulatum* の Hc1 遺伝子を特異的に検出可能なプローブとプライマーを設計した。また、それらの検出特異性と検出感度の評価を行った。さらに、ヒストプラズマ症の患者から採取した臨床検体を用いて、本リアルタイム PCR の迅速診断法としての有効性を評価した。

B. 研究方法

1) 複数の *H. capsulatum* 抗原タンパク質を用いた ELISA

H. capsulatum の主要な抗原として既に知

られている AgH および AgM-F3、我々がこれまでに同定してきた Hc1 および Hc6 の合計 4 種の抗原タンパク質について His-tag 融合タンパク質として大腸菌内で発現させた。発現させたタンパク質はいずれも可溶化せず、封入体として回収されたため、8M 尿素で可溶化した。封入体からの抗原タンパク質の精製はニッケルカラムを用いて行い、250mM イミダゾールを含むバッファで溶出した。得られたタンパク質を精製抗原タンパク質として、ELISA に用いた。

ELISA は以下の通り行った。抗原タンパク質をコーティングバッファ中で MaxiSorp (Nunc) に 16 時間、4°C にてコーティングした。TBS にて洗浄後、Protein Free Blocking Buffer solution (Pierce) によるブロッキングを行った。ブロッキング後の乾燥は Protein Free Blocking Buffer solution を除いた後、室温にて 2 時間放置することにより行った。乾燥後のプレートは 4°C において 3 日間もしくは 10 日間保管を行った。100 倍希釈した健康人もしくは患者血清を 1 時間、25°C にて反応させた。再度 TBS-T で洗浄し、Protein L-HRP を添加し、1 時間、37°C にて反応を行った。TBS-T による最後の洗浄を行い、TMB を用いた発色反応を室温で 30 分間行った。停止液 (1N 硫酸) にて反応を止めて速やかに 450nm における吸光度を測定した。

本研究では健康人血清 20 検体、患者血清 10 検体を用いて検討を行った。

2) リアルタイム PCR による迅速診断法の開発

H. capsulatum の Hc1 遺伝子を特異的に検出可能なプローブとプライマーを設計した。*H. capsulatum* 供試株 (19 株) をすべて検出可能であったプローブ (Hist1-probe3) とプライマー (hcN2F, hcN1R) について、その検出特異性と検出感度の評価を行った。検出特異性の評価には、*H. capsulatum* 以外の真菌 37 種から抽出した DNA を用いた。検出感度の評価には、標的遺伝

子である Hc1 遺伝子を組み込んだプラスミド DNA (スタンダード DNA) を最終濃度が 1-10⁵ copies/reaction となるように段階希釈し、リアルタイム PCR に用いた。さらに、ヒストプラズマ症の患者から採取した血清および口腔粘膜のホルマリン固定パラフィン包埋切片から DNA を抽出し、本リアルタイム PCR による *H. capsulatum* の検出を試みた。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いる研究については必要に応じて千葉大学真菌医学研究センター倫理委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

1) 予製プレートでの性能評価

AgH、AgM-F3、Hc1、Hc6 の 4 抗原全てを 1 つのウェルにコーティングして、ELISA による検討を行った。ブロッキング後に従来通りの方法で ELISA を行った場合に加えて、ブロッキング後に室温にて 2 時間乾燥後、4°C で 3 日間もしくは 10 日間の保管を行い、その後に血清添加以降の操作を行った。

図 1 に示したように 3 日乾燥後および 10 日乾燥後においても健康人群に比べて患者群は有意に高い値 ($p < 0.01$) を示し、あらかじめ抗原をコートして 10 日間の乾燥後であってもそのプレートの性能は維持されていると考えられる。10 日間乾燥後には健康人群、患者群共に値が低くなっているがこれは不コーティングウェルの非特異的反応が見られたためであった。この理由は分からないが、ブロッキング後の乾燥において生じた可能性が考えられた。

2) リアルタイム PCR による迅速診断法の開発

H. capsulatum 以外の真菌 37 種のうち、35 種ではリアルタイム PCR による増幅は認められなかったが、*Rhodotorula mucilaginosa* および *Ochroconis gallopava* においては 35 サ

イクル以降に若干の増幅が認められた。また、検出感度の評価では、リアルタイム PCR は 10 copies/reaction の標的遺伝子まで検出可能であった。また、ヒストプラズマ症の患者から採取した口腔粘膜のホルマリン固定パラフィン包埋切片からは、スタンダード DNA と同様の強い蛍光が検出された。血清からは、34 サイクル以降に弱い蛍光が検出された。口腔粘膜ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いたリアルタイム PCR 産物をシーケンス解析した結果、その塩基配列は *H. capsulatum* NAm1、G186AR、H143、H88 株と 99.5% (1 塩基違い) の相同性であった。

D. 考察

我々はこれまでに *H. capsulatum* の抗原タンパク質を同定し、これら抗原の組換えタンパク質を用いた ELISA 法の開発を進めてきた。現在までに既知の抗原タンパク質 AgM の部分タンパク質 AgM-F3 および AgH 全長タンパク質に加えて我々が同定してきた抗原タンパク質 Hc1、Hc6 を組み合わせた ELISA システムを確立している。ELISA の簡便化を図るために本年度は予製プレート作製の可能性を検討した。その結果、抗原をコートしたプレートを作製後、乾燥させて 10 日間 4°C にて保存したのちでもその性能の低下は見られず、患者群において健康人群に比べて有意に高い抗体価を示した。このことは予製プレートを作製して低温下に保存可能であることを示している。現在は当センターで国内症例に対して本 ELISA システムを用いているが、今後は他施設・機関や海外での使用において、このような予製プレートが貢献できると期待する。更に長期の保存期間での検討や不コーティングウェルでの非特異的反応の解明を行って、予製プレートの作製および測定法の確立を目指したい。

並行して、我々は、高感度かつ特異性の高いサイクリングプローブ法を用いて、*H.*

capsulatum の Hc1 遺伝子を特異的に検出するリアルタイム PCR の開発を進めてきた。新たに設計したプローブ (Hist1-probe3) とプライマー (hcN2F, hcN1R) を用いたリアルタイム PCR の検出感度は高く、10 copies/reaction まで検出可能であった。検出特異性の評価では *Rhodotorula mucilaginosa* および *Ochroconis gallopaval* において若干の増幅が認められたが、この増幅は 35 サイクル以降に認められたこととその増幅曲線の形から、非特異的反応である可能性が高く、充分識別可能と考えられた。また、ヒストプラズマ症の患者から採取した口腔粘膜のホルマリン固定パラフィン包埋切片からは、スタンダード DNA と同様の強い蛍光が検出され、PCR 産物のシーケンス解析でも高い相同性が示されたことから、本リアルタイム PCR 法が臨床検体にも応用可能であることが示唆された。血清からは、34 サイクル以降に弱い蛍光が検出されたが、リアルタイム PCR 産物の増幅量が少なかったため、シーケンス解析を行うことは出来なかった。今後さらに臨床検体数を増やし、本リアルタイム PCR 法がヒストプラズマ症の迅速診断に有効であることを示していきたい。

E. 結論

抗原をあらかじめコートした予製 ELISA プレート作製可能性を示し、今後、海外を含めて他施設・他機関でも使用しやすい ELISA システム確立に貢献した。

新たな遺伝子をターゲットにしたリアルタイム PCR 法を開発し、臨床検体から *H. capsulatum* を検出することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 倉井華子, 大曲貴夫, 伊藤健太, 河村一郎, 鈴木純, 羽田野義郎, 遠藤正浩, 飯田善幸, 沖中敬二, 亀井克彦: 咽頭癌を疑われたパラコキシジオイデスの 1 例. *Med Mycol J* 53(1): 49-52, 2012.
2. 吉村幸浩, 立川夏夫, 大澤孝行, 小菅葉子, 亀井克彦: 重度の副腎機能不全を伴ったパラコキシジオイデス症の 1 例. *感染症誌* 86(3): 291-294, 2012.
3. 石黒卓, 高柳昇, 土屋裕, 杉田裕, 河端美則, 亀井克彦: mediastinal granuloma を合併した肺ヒストプラズマ症の 1 例. *日呼吸誌* 1(4): 343-348, 2012.
5. Sakai K, Trabasso P, Moretti ML, Kamei K, Gono T: Visible DNA microarray system: Easy and rapid method to identify fungal pathogens in clinical samples. ISHAM2012, *Mycoses* 55(Suppl. 4): 283, Berlin, Germany, June 11-15, 2012.
6. 町田安孝, 福島康次, 三好祐顕, 吉田敦, 奥住捷子, 亀井克彦, 宮崎義継, 福田健: 気管支鏡検査 (TBLB および BAL) にて診断された肺コキシジオイデス症の 1 例. 第 61 回日本感染症学会東日本地方学会術集会・第 59 回日本化学療法学会東日本支部総会・第 95 回日本細菌学会関東支部総会, プログラム・抄録 p.323, 東京, 2012. 10. 10-12.

学会発表

1. 永松麻希, 高木妙子, 黒沢未希, 積田奈津希, 竹村弘, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継, 亀井克彦: 邦人 AIDS 患者より *Penicillium marneffeii* が分離された 1 例. 第 23 回日本臨床微生物学会総会, *日臨微誌* 21(4): 235, 横浜, 2012. 1. 21-22.
 2. 大野秀明, 田辺公一, 杉田隆, 畠山修司, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 金城雄樹, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継: マウス感染モデルを用いたアウトブレイク型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性ならびに病原因子の解析. 真菌症フォーラム第 13 回学術集会, プログラム/抄録集 p.49, 新橋, 2012. 2. 18.
 3. 亀井克彦: 教育講演 7 わが国における輸入真菌症の実態とその対策—困難な症例にどう対応するか. 第 86 回日本感染症学会総会学術講演会, *感染症学雑誌* 86:(臨時増刊号): 115, 長崎, 2012. 4. 25.
 4. 大野秀明, 田辺公一, 杉田隆, 畠山修司, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 梅山隆, 山越智, 金城雄樹, 渋谷和俊, 亀井克彦, 宮崎義継: 北米流行型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性, 病原因子の解析 国内臨床分離株を中心に. 第 86 回日本感染症学会総会学術講演会, *感染症学雑誌* 86:(臨時増刊号): 420, 長崎, 2012. 4. 25-26.
 7. 尾又有紀, 荻原繁広, 鈴木弘倫, 奥住捷子, 吉田敦, 亀井克彦: Antiretroviral Therapy(ART) 中断中に発症した *Penicillium marneffeii* 症. 第 24 回日本臨床微生物学会総会, 横浜, *日臨微誌* 22(4): 171, 2013. 2. 2-3.
 8. 伊藤純子, 矢口貴志, 亀井克彦: 千葉大学真菌医学研究センターに寄せられた病原真菌・放線菌の同定依頼のまとめ. 第 24 回日本臨床微生物学会総会, 横浜, *日臨微誌* 22(4): 282, 2013. 2. 2-3.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

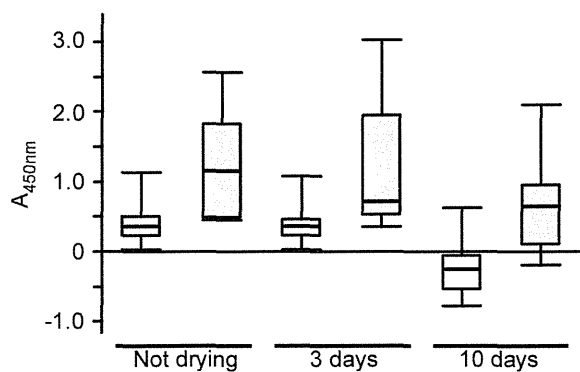


図 1 : AgH, AgM-F3, Hc1, Hc6 の混合抗原を各ウェルにコートしてブロッキングを行い、直後(Not drying)、乾燥させて 3 日後(3 days)、10 日後(10 days)に患者血清添加以降の操作を行った結果。白い箱ひげは健常人群、灰色の箱ひげは患者群の結果を示している。

10. 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

研究分担者 川上和義、東北大学大学院医学系研究科

研究要旨 本研究では、真菌感染症の「難治病態の基盤・応用研究」を目的とし、エイズなど免疫低下を背景に発症するクリプトコックス症の発症病態解明を目指して、本真菌に対する免疫応答機構の解析を実施した。今年度は以下の点について明らかにした。1) クリプトコックスの潜伏感染・内因性再燃モデルを確立することができた、2) 感染3日後の肺では、CD4⁺、CD8⁺ メモリーT (Tm) 細胞が急激に増加し、その後潜伏感染期に向けて減少した、3) 傍気管リンパ節では感染3日～7日後でCD4⁺、CD8⁺ Tm 細胞がピークとなり、脾臓ではCD4⁺、CD8⁺ Tm 細胞が、未感染マウスと比較して感染3日後に減少した、4) IFN- γ 発現 Tm 細胞が感染後3日～7日をピークに肺内で増加した、5) 感染7ヶ月後にデキサメサゾンを投与すると、脾臓内でTm細胞が著明に減少した、6) 本研究を通して*C. neoformans* から見出した新たな免疫刺激 DNA (ODN112) がin vitro及びin vivoの系で強力な免疫アジュバント効果を示した。今後、難治性真菌感染症においても、ODN112が有用なアジュバント治療薬となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

Cryptococcus neoformans は、糖尿病、血液悪性疾患、膠原病、エイズなどの免疫低下宿主に合併する日和見病原真菌であり、このような症例では重篤な髄膜脳炎を引き起こし、臨床的大きな問題となる。髄膜脳炎はたとえ標準治療を行った場合でも死亡率が2週後で12%、4週後で26%に達すると報告されており (*Clin. Infect. Dis.* 28: 82-92, 1999)、また、世界のエイズ患者における死亡原因では結核に次いで第2位ともいわれている (*AIDS* 16: 1031-1038, 2002)。

免疫低下のない場合でも肺クリプトコック

ス症を起こすことがあるが（原発性肺クリプトコックス症）、限局性のことが多く、通常は髄膜脳炎にまで至ることは少ない。一方、細胞性免疫能が低下した状態では、感染を局所に封じ込めずに中枢神経系に播種性感染を惹起する。このような違いは感染宿主の免疫状態によって大きく左右されるため、その対策を講じるには本真菌に対する感染防御免疫機構の理解が重要である。

近年では、クリプトコックス症が、結核と同様に不顕性感染後に潜伏感染し、免疫不全に伴って内因性再燃することを示すエビデンスが報告されつつある (*Clin. Vacc. Immunol.*

14: 1550, 2007; *Pediatrics* 107: e66, 2001; *J. Clin. Microbiol.* 37: 3204, 1999; *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 395, 1992)。これに一致して、本真菌はマクロファージの殺菌作用に対するエスケープ機構を有し、細胞内寄生しうることが知られている (*Trends Microbiol.* 9: 273-278, 2001)。このように、本症は内因性再燃によって発症するとの認識に変わりつつあり (*Semin. Respir. Crit. Care Med.* 25: 145-157, 2004)、エイズ合併クリプトコックス症の発症機序を見直す必要が出てきた。この新たな発症様式については、全く病態解明がなされていないのが現状であり、その理解のためにはエイズの進行に伴い本真菌に対する免疫記憶機構がどのように破綻するのかを明らかにする必要がある。

本研究では、真菌感染症の「難治病態の基盤・応用研究」を行うことを目的とする。そのために、エイズなど免疫低下を背景に発症するクリプトコックス髄膜脳炎の発症病態解明を目指して、本真菌に対する免疫応答機構の解析を実施した。

B. 研究方法

1. マウス

C57BL/6 マウス♂ (日本クレア、東京) を 7~8 週齢で用いた。

2. *C. neoformans*

莢膜欠損株である Cap67 (Stuart M. Levitz 教授, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA、米国より供与)、及びその親株である B3501 (K.J. Kwon-Chung 博士、National Institute of Health, Bethesda, MD、米国より供与) を potato dextrose agar (PDA) 培地 (栄研化学、東京) にて 30°C で培養した。実験によっては、臨床分離株である YC-11、YC-13 も用いた。

3. *C. neoformans* 感染実験

マウスをペントバルビタールで麻酔後、気管内にカニューレを経口的に挿入して

1×10^6 /ml の Cap67、B3501 を接種した。

4. 肺内生菌数

感染後経時的にマウスから肺を摘出し、ステンレスメッシュですり潰した後、10 倍段階希釈液を作製し、PDA 培地にて培養し生菌数を測定した。

5. 肺内白血球の分離とフローサイトメトリー解析

感染後経時的にマウスから肺を摘出し、ステンレスメッシュですり潰した後コラゲナーゼ、DNase と 37°C、60 分インキュベートし、比重遠心法にて白血球分画を採取した。得られた細胞を各種抗体で染色し、細胞内 IFN- γ 産生及び、CD4⁺ または CD8⁺ エフェクター T (Teff) 細胞 (CD44^{bright}CD127⁺)、メモリー T (Tm) 細胞 (CD44^{bright}CD127⁺) の肺内動態についてフローサイトメトリー (FACS Canto II、BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて解析した。

6. *C. neoformans* 由来オリゴ DNA の合成

C. neoformans の病原因子である *URA5* 遺伝子 (345 塩基) から得られた免疫刺激活性を有する、あるいは有さない 20 塩基前後の長さのオリゴ DNA (ODN) を合成した。その中で、免疫刺激活性のある ODN112 と刺激活性のない ODN123 を用いた。また、従来から知られている CpG モチーフを有し、強い免疫刺激活性のある CpG1826 も人工合成した。

7. *C. neoformans* 感染実験

マウスに対して強毒株の YC-11 (1×10^5 /マウス) を経気道感染させた C57BL/6 マウスの腹腔内に *URA5* 由来の各種 ODNs または CpG1826、PBS を投与後、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のサイトカイン濃度と、感染 2 週後の肺内生菌数を測定した。

8. 骨髄由来樹状細胞の刺激

マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を 10 ng/ml GM-CSF とともに 8~9 日間培養することで骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived

dendritic cells: BM-DCs) を作製した。BM-DC 刺激に、*C. neoformans* の病原遺伝子 *CNLAC1*、*CAP59*、*URA5* 由来の各種 ODNs の他に、*C. neoformans* (B3501 とその莢膜欠損株 Cap67、臨床分離株 YC-11、YC-13)、*Candida albicans* (ATCC18804)、*Saccharomyces cerevisiae*、 β -1,3-グルカン (OX-CA:東京薬科大学 大野尚仁先生より供与)、*Saccharomyces cerevisiae* 由来マンナン (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、大腸菌由来 LPS (Sigma-Aldrich) も用いた。BM-DCs (1×10^5 /ml) を各種刺激剤とともに 24 時間培養した上清を回収し、IL-12p40 濃度を ELISA にて測定した。

9. 統計学的解析

実験結果はすべて平均値 \pm 標準偏差で表している。各群間の統計学的解析は Student's t-test を用いて行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

10. 倫理的配慮

すべての動物実験は、事前に東北大学の動物実験専門委員会及び、組換え遺伝子実験委員会の承認を得た上で実施した。関連法令を遵守し、動物は可及的に少ない頭数を用いるとともに、十分な麻酔を行い、人道的エンドポイントに達した動物は安楽死によって無用な苦痛が生じないように配慮した。

C. 研究結果

1. *C. neoformans* による潜伏感染・内因性再燃モデルの作製

C. neoformans 感染後経時的に肺内の生菌数を調べたところ、Day0 で 10^6 CFU だった菌数が、1 週後で 10^5 CFU、1 ヶ月後で 10^4 CFU と減少し、3 ヶ月、7 ヶ月では 10^2 CFU 程度で維持されることが明らかになった。3 ヶ月後の病理学的解析では、肺内に潜伏する PAS 陽性の酵母細胞が観察された。さらに、7 ヶ月の時点でデキサメサゾン を 1 週間投与すると、コント

ロールの生食投与群と比較して肺内生菌数が増加することを確認した。こうして、我々のモデルは *C. neoformans* の潜伏感染・内因性再燃モデルとなりうる可能性が示唆された。

2. 感染初期における Tm 細胞の動態

クリプトコックス感染後経時的に Tm 細胞の動態を検討した。感染初期 (感染 3 日から 7 日後) における $CD4^+$ Tm、 $CD8^+$ Tm 細胞の動態では、感染後 3 日後において急激に増加しその後徐々に減少した (図 1)。傍気管リンパ節では、感染 7 日後で $CD4^+$ Tm 細胞数がピークとなった。 $CD8^+$ Tm 細胞は感染 5 日後で減少し、7 日後で回復した。脾臓では、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ ともに Tm 細胞数が未感染マウスと比較して 3 日後に減少し、5 日後で回復した。

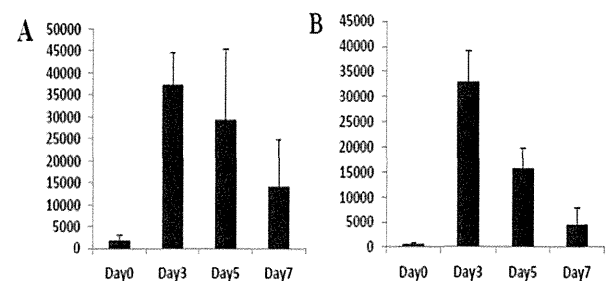


図1. クリプトコックス感染急性期の肺内におけるTm細胞
A: $CD4^+$ Tm細胞 B: $CD8^+$ Tm細胞 (縦軸は細胞数/Lung)

3. 感染後期・潜伏感染期における Tm 細胞の動態

感染後 7 日、14 日、1 ヶ月、3 ヶ月、7 ヶ月で観察すると、3 日後をピークに増加した肺内 $CD4^+$ Tm、 $CD8^+$ Tm 細胞が徐々に減少していった (図 2)。傍気管リンパ節においても、感染 7 日後をピークに、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ ともに Tm 細胞数が減少した。脾臓では、7 日、14 日後を境に Tm 細胞数が徐々に減少していった。

4. 自然免疫・獲得免疫期における IFN- γ 発現 Tm 細胞の動態

自然免疫 (感染後 7 日まで)、獲得免疫 (感染 7 日から 14 日後) での IFN- γ を発現している $CD4^+$ Tm 細胞は感染 7 日、14 日後をピークに

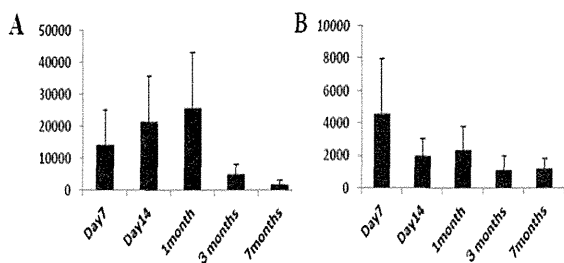


図2. クリプトコックス潜伏感染期の肺内におけるTm細胞
A: CD4+Tm細胞 B: CD8+Tm細胞 (縦軸は細胞数/Lung)

増加し、その後減少した。一方、IFN- γ を発現している CD8⁺Tm 細胞は感染 3 日後をピークとして増加するものの、獲得免疫の時期では発現が顕著に減少した。

5. 潜伏感染期における IFN- γ 発現 Tm 細胞の動態

感染 1 ヶ月、3 ヶ月、7 ヶ月後で肺、脾臓における CD4⁺、CD8⁺Tm 細胞内 IFN- γ 発現を検討した。肺における IFN- γ 発現 CD4⁺、CD8⁺Tm 細胞数は潜伏感染期の 1 ヶ月、3 ヶ月、7 ヶ月後で安定して存在していた。傍気管リンパ節は慢性潜伏感染期へと向かうにつれて縮小し肉眼的に観察できなくなるため、同じ二次リンパ組織である脾臓での Tm 細胞を解析した。脾臓における CD4⁺Tm 細胞、CD8⁺Tm 細胞内 IFN- γ 発現も大きな変動はなく安定して存在していた。感染後 1 ヶ月を過ぎると、IFN- γ 発現 Tm 細胞は肺、二次リンパ組織ともに、一定の数でプールされていた。

6. 内因性再燃期における IFN- γ 発現 Tm 細胞の動態

Tm 細胞が安定的に存在する感染 7 ヶ月のマウスに連日 1 週間デキサメサゾンを投与したところ、肺内白血球数、脾細胞数ともにコントロール群と比較して有意な減少を示した。肺内での CD4⁺、CD8⁺Tm 細胞は両群間では有意な差は認められなかったが、脾臓における CD4⁺、CD8⁺Tm 細胞はコントロール群と比較してデキサメサゾン投与群で顕著に減少していた (図 3)。

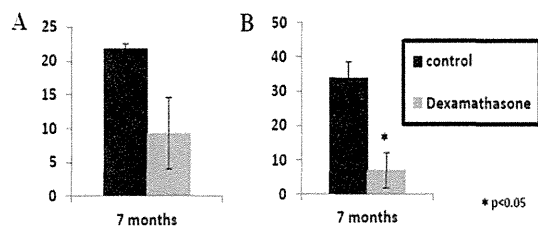


図3. デキサメサゾン投与による脾臓内Tm細胞の減少
A: CD4+Tm細胞 B: CD8+Tm細胞 (縦軸は%)

7. クリプトコックス抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作製

これまでの解析は、C57BL/6 マウスを用い、表面抗原解析のみで Tm 細胞の同定を行っていることから、必ずしもクリプトコックス抗原特異的な Tm 細胞を検出していない。そこで、特異的な Tm 細胞の解析を行うために、本真菌の主要な T 細胞抗原であるマンノプロテイン (MP98) に特異的に応答する T 細胞ハイブリドーマ P1D6 から T 細胞受容体 α 鎖、 β 鎖遺伝子のクローニングを試み成功した。現在、遺伝子を受精卵に導入し、得られた産仔のジェノタイプングを実施している。

8. クリプトコックスから見出した樹状細胞活性化作用を有するオリゴ DNA の免疫アジュバント活性

昨年度までの研究により見出した樹状細胞活性化作用のある *URA5* 以外の病原遺伝子として、*CNLAC*、*CAP59* についても PCR 増幅 DNA により BM-DC を刺激したところ、いずれにも IL-12 産生誘導活性がみられた。特に、*CNLAC1* には強い活性が検出された。*CNLAC* と *CAP59* のシーケンス解析では、*URA5* で見出した活性化モチーフは存在しなかった。*URA5* 由来の活性配列 ODN112 は各種クリプトコックス株刺激による BM-DC の IL-12 産生を顕著に増強したが、非活性配列 ODN123 ではそのような効果はみられなかった。同様な効果は、BM-DC を *Candida albicans*、*Saccharomyces cerevisiae*、LPS、

β-1,3-グルカン、マンナンで刺激した場合でも検出された。また、マウスにクリプトコックス強毒株 YC-11 を経気道感染させる際に ODN112 を腹腔内投与すると、YC-11 感染のみの場合と比較して肺内での IFN-γ 産生が増加するとともに、肺及び脳内生菌数の有意な減少が観察された (図 4)。

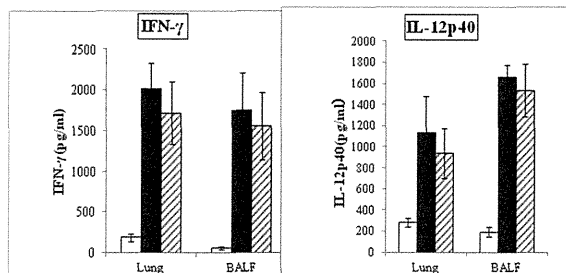


図4. ODN112による難治性クリプトコックス症の治療効果
Open: PBS Closed: ODN112 Hatched: CpG1826

D. 考察

今回の研究により、以下のことが明らかとなった。1) クリプトコックスの潜伏感染・内因性再燃モデルを確立することができた、2) 感染3日後の肺で、CD4⁺、CD8⁺ Tm細胞が急激に増加し、その後潜伏感染期に向けて減少した。3) 傍気管リンパ節では感染7日後でCD4⁺Tm細胞がピークとなり、脾臓ではCD4⁺、CD8⁺ Tm細胞とともに、未感染マウスと比較して感染3日後で減少した。4) IFN-γ 発現 Tm細胞が感染後3日～7日をピークに肺内で増加した。5) 感染7ヶ月後にデキサメサゾン投与すると、脾臓内でIFN-γ 発現 Tm細胞が著明に減少した、6) *C. neoformans* から見出した新たな免疫刺激 DNA が in vitro 及び in vivo の系で強力なアジュバント効果を示した。

クリプトコックス感染3日後、即ち自然免疫の時期に、細胞内にIFN-γを発現したCD4⁺、CD8⁺ Tm細胞が肺内で著明に増加した。この時期に獲得免疫が成立するのは考えにくいいため、それまでに暴露された抗原に対して獲得された Tm細胞が循環血中から肺内へ集積することによって増加したと推察された。その

根拠として、感染3日後に肺内で Tm細胞が増加する一方、末梢血中では Tm細胞が減少することがあげられる。循環血中の Tm細胞の由来は現時点では不明であるが、感染3日後に脾臓の Tm細胞が未感染マウスと比較して減少したことから、二次リンパ組織である脾臓の関与が示唆された。一方、感染7日後にかけて Tm細胞が減少したのは、自然免疫時で機能する Tm様細胞が減少し、クリプトコックス特異的なエフェクターT細胞へと置き換わるためと推察している。これが正しいかどうかは、クリプトコックス抗原に特異的な T細胞受容体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いた解析が必要であると考えられる。

クリプトコックス感染1ヶ月から7ヶ月後にかけて肺内における炎症反応は沈静化し、7ヶ月後でCD4⁺、CD8⁺ Tm細胞が未感染マウスと同程度にまで減少した。感染7ヶ月後では、傍気管リンパ節は確認できないくらいに縮小しており、そのために同じ二次リンパ組織である脾臓を用いて解析を行った。その結果、獲得免疫の時期である感染後7日から14日後を境として Tm細胞が徐々に減少し、3ヶ月以降では病理学的解析で未だ軽度の炎症が残存するものの Tm細胞数は未感染マウスと同程度にまでなった。これらのことから、肺、即ち末梢組織においても、二次リンパ組織においても、潜伏感染期では Tm細胞が安定的に維持される時期(メモリー期)であることが示唆された。したがって、我々のモデルでは、感染後3ヶ月から7ヶ月にかけてメモリー期が安定的に維持されており、潜伏感染しているクリプトコックスが再活性化しないように、末梢組織及び二次リンパ組織で Tm細胞がバランスをとって存在しているとの推察された。

クリプトコックス感染7ヶ月後では Tm細胞が安定的に存在していることから、デキサ

メサゾン投与によって免疫を抑制させることで Tm 細胞への影響を検討した。肺における CD4⁺、CD8⁺ Tm 細胞は、デキサメサゾン投与群でもコントロール群と比較して有意な差はみられなかった。一方、脾臓では、これらの細胞はデキサメサゾン投与群で著明に減少した。自然免疫の時期でも確認されたように、デキサメサゾン投与においても、脾臓の IFN- γ 発現 CD4⁺、CD8⁺ Tm 細胞が肺へ集積し、そのために肺ではこれらの細胞に変化がみられなかったことが推察された。その根拠として、デキサメサゾン投与群での肺内では、明らかにナイーブ T 細胞や Teff 細胞の割合が減少し、Tm 細胞の割合が増加していた。これらのことから、IFN- γ を発現していない Tm 細胞も含め、肺へ Tm 細胞が集積されていることが示唆された。

本研究を通して、我々は、*C. neoformans* から新たな免疫刺激 DNA (ODN112) を見つけてきた。今年度は、ODN112 が CpG オリゴ DNA のように免疫アジュバント活性を有するかについて検討した。in vitro での種々の PAMPs による樹状細胞の活性化において ODN112 は強力なアジュバント活性を示した。さらに、*C. neoformans* による難治性クリプトコックス髄膜炎モデルにおいても、ODN112 は著明な Th1 免疫応答の誘導と脳内生菌数の減少効果を示した。現在、気管支喘息の動物モデルを用いて同様な検討を実施しており、良好な治療効果を得ている。こうして、我々が発見した新規 DNA アジュバントを用いることで、難治性感染症だけでなく、悪性疾患やアレルギー疾患などの治療・予防へ向けた臨床応用の可能性が期待できる。

E. 結論

本研究により以下の点が明らかになった。

1) CD4⁺、CD8⁺ Tm 細胞は潜伏感染期において、クリプトコックス感染防御に重要な役割

を担っていると示唆された。

2) 感染 3 日後のように非常に早い時期にも IFN- γ を発現した CD4⁺、CD8⁺ Tm 細胞が肺内で急激に増加することが明らかとなり、その感染防御における重要性が示唆された。

3) 今後は、クリプトコックス抗原に特異的な T 細胞受容体遺伝子を発現したトランスジェニックマウスを用いることで、より特異的なメモリー応答機構や、免疫不全による破綻のメカニズムを明らかにしたい。

4) 本研究を通して *C. neoformans* から見出した新たな免疫刺激 DNA (ODN112) が in vitro 及び in vivo の系で強力な免疫アジュバント効果を示した。今後、難治性真菌感染症においても、ODN112 が有用なアジュバント治療薬となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. 石井恵子, 川上和義: *Cryptococcus neoformans* 感染におけるパターン認識と感染防御, 日本医真菌学会雑誌, 53: 247-254, 2012.
2. 川上和義: 真菌感染における分子パターン認識機構と感染防御における役割, 感染・炎症・免疫, 42: 90-97, 2012.
3. 石井恵子, 川上和義: Toll様受容体による真菌の認識と免疫応答, 化学療法の領域, 28: 49-58, 2012.
4. 川上和義: 深存在性真菌症の免疫機構: up to date - クリプトコックス症を中心に, 感染症, 42: 9-14, 2012.
5. 石井恵子, 川上和義: クリプトコックス感染と免疫応答, アレルギーの臨床, 32: 619-623, 2012.

学会発表

1. Kawakami K: C-type lectin receptors and memory T cell response in cryptococcal infection, **Gordon Research Conference**, Galveston, STX, USA, January 2013.
2. Yamamoto H, Nakamura Y, Takahashi Y, Sato K, Yamamoto N, Ishii K, Hara H, Kawakami K: Signaling via an adaptor molecule CARD9 is essential for the host defense to infection with *Cryptococcus neoformans*. **Immunology 2012, The American Association of Immunologists**, Boston, May 4-8, 2012.
3. Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, Matsumura K, Yamamoto N, Ishii K, Hara H, Kawakami K: Role of Card9-mediated signaling in innate-phase IFN- γ production and Th17 differentiation in the host defense to cryptococcal infection, Oral presentation, Workshop, 第41回日本免疫学会学術集会, December 5-7, 2012.
4. Sato K, Nakamura Y, Yamamoto H, Matsumura K, Ishii K, Kawakami K: Immune-adjuvant activity of oligonucleotide DNA from *Cryptococcus neoformans*, Oral presentation,

Workshop, 第41回日本免疫学会学術集会, December 5-7, 2012.

5. Matsumura K, Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, Ishii K, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: Effect of Dectin-2 deficiency on the host inflammatory response during infection with *Cryptococcus neoformans*, Oral presentation, Workshop, 第41回日本免疫学会学術集会, December 5-7, 2012.

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

接合菌の診断系構築に関する研究

研究分担者 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 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接合菌症の早期診断に有用と考えられる血清診断法の開発研究を試みた。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クエ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て、抗原蛋白（候補A抗原）を候補に選出。候補A抗原を検出するELISAキットを作成し、その評価を行った。その結果、候補A抗原は、*R. oryzae*、*R. microspores*、*R. microspores var var. rhizopodiformis*培養上清中に検出された。また、それらの感染マウス血清中からも候補A抗原は検出可能であることが示唆された。

A. 研究目的

接合菌症は白血病などの高度の免疫抑制患者に発症する深在性真菌症である。その頻度は稀であるが、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り、特に、白血病（MDSを含む）の剖検例では、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である。さらにその頻度は近年増加傾向にある。（深在性真菌症の診断・治療ガイドライン2007、協和企画）その治療薬は、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、その予後は極めて不良で初期の抗真菌薬選択が重要となる。一方、その診断は、専ら培養による真菌学的検査と病理組織学的検査に限られ、補助診断としての血清学的検査は実用化していない。

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クエンストラップ法を

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た後に、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。

前年度は、シグナルシークエンストラップを用いて膜蛋白および分泌蛋白遺伝子の検出を試み、302 の候補蛋白のシークエンスおよび *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。その中から、最も多い163のクローンを占めた蛋白（候補A: hypothetical protein、226 アミノ酸から構成される約 23 k Da の蛋白）および2番目に多い45のクローンが得られた蛋白（候補B: predicted protein、486 アミノ酸から構成される約 46 k Da の蛋白）を蛋白抗原の候補として選出した。二つの候補蛋白はシグナルシークエンスを有し、後者はそのシークエンス

の特徴から細胞壁の 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。はじめに、候補 A 遺伝子をクローニングし、その後大腸菌による候補 A 抗原の候補 A-遺伝子発現ベクターを用いて目的蛋白の発現を確認。さらに蛋白を生成して、ウサギに免疫。血清を採取した後に ELISA キットを作成した。本年度はそのキットの評価を行った。

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

B. 研究方法

1. ELISA キットの評価

ELISA の感度を測定した。

2. 真菌培養上清中の候補 A 抗原の検出

液体培地 (sabouraud dextrose broth) にて各真菌を振とう培養 (200rpm)。培養 6 時間、24 時間、48 時間後に培養上清を回収。遠心 (3000rpm, 20min) 後に、 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターにて濾過後、濃度を ELISA キットで測定した。

3. 感染マウス血清中の抗原検出

感染 2 日前および感染日に Cortisone acetate 250mg/kg と Cyclophosphamide 200mg/kg を投与して免疫を抑制したマウスに接合菌 (*R. oryzae*、*R. microspores*、*R. microspores var var. rhizopodiformis*) を経気道感染。感染 4 日目に採血を行い、遠心後血清を保存。後日、ELISA キットにて候補 A 抗原の検出を試みた。

4. 候補 A 抗原の局在

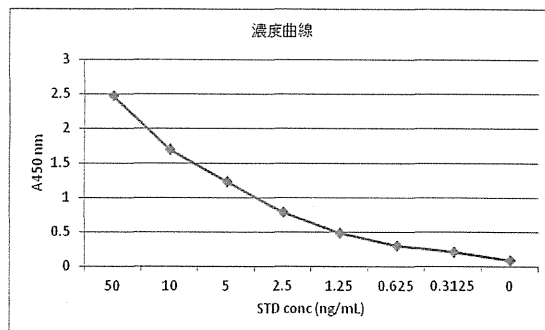
免疫抑制マウスに接合菌 (*R. oryzae* MF1030) を感染。感染 4 日目に Sacrifice して、マウス肺の摘出。その後、抗 (候補 A 蛋白) 抗体により肺組織の免疫染色を行った。

C. 研究結果

1. ELISA キットの評価

R. oryzae の候補 A 抗原 (23kDa 蛋白) を検出する ELISA キットの検量線を示す (図 1)。

図 1



3. 真菌培養上清中の候補 A 抗原の検出

R. oryzae、*R. microspores*、*R. microspores var var. rhizopodiformis* の培養上清中に候補 A 抗原が検出されたが、*Aspergillus fumigatus* や *Candida albicans*、*Cryptococcus neoformans*、他の接合菌種の培養上清中には検出されなかった (図 2)。また、候補 A 抗原は、*R. oryzae*、*R. microspores*、*R. microspores var var. rhizopodiformis* の培養上清中に経時的に増加していた (図 3)。

図 2

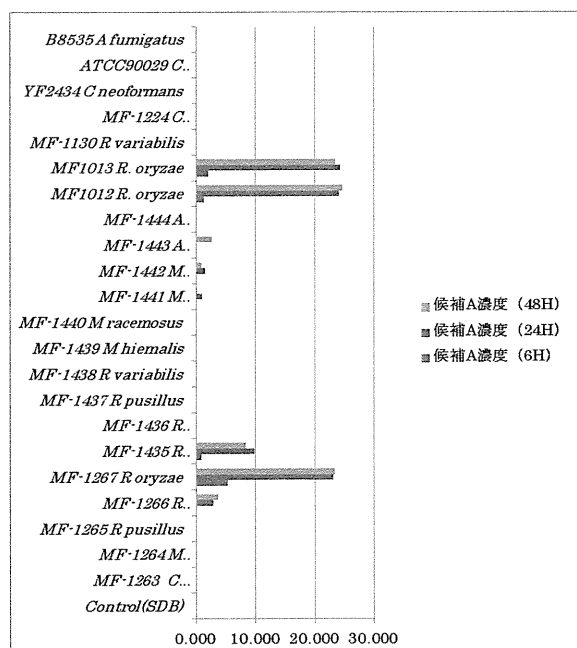
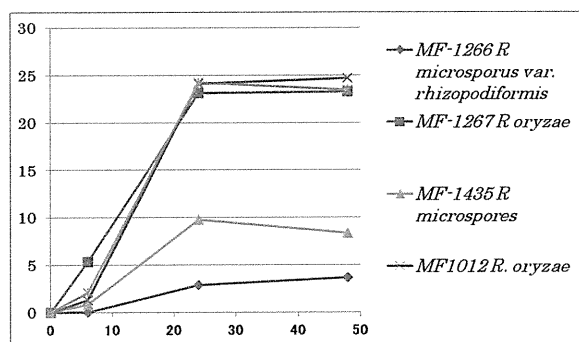


図 3

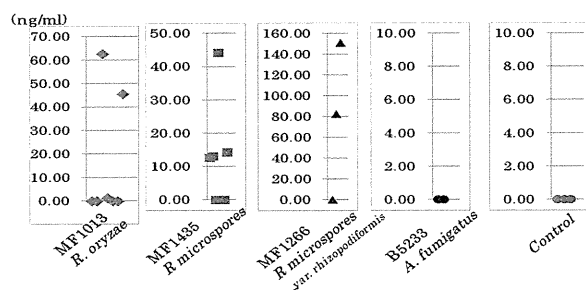
単位 ng/ml



感染マウス血清中の抗原検出

R. oryzae, *R. microspores*, *R. microspores var. rhizopodiformis* 感染マウス血清中に、候補 A 抗原が検出された (それぞれ 2/7 匹、4/7 匹、2/3 匹陽性)。一方、候補 A 抗原は、*A. fumigatus* 感染マウスや非感染マウスの血清中には検出されなかった (図 4)。

図 4



4. 候補 A 抗原の局在

肺組織の免疫染色にて、候補 A 抗原は *R. oryzae* の菌体表面に存在する可能性が示唆された (図 5)。

図 5



抗 (候補 A 蛋白 23kDa) 抗体にて染色

D. 考察

新規蛋白抗原である候補 A 抗原 (23 kDa 蛋白) は、*Rhizopus* 感染症の早期診断に有効である可能性が示唆された。

現在、候補 B 抗原 (46kDa 蛋白) に関しても、大腸菌による蛋白発現・精製に成功しており、ELISA キットの評価を行っている。

今後、接合菌症の早期診断法としてのさらなる評価を試みる。

E. 結論

接合菌 *R. oryzae* の新規蛋白抗原である候補 A 抗原 (23 kDa 蛋白) は *Rhizopus* 属感染症の早期診断に有効である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. なし

学会発表

1. 第14回真菌症フォーラム

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

1. なし

実用新案登録

1. なし

その他

1. なし

アスペルギルス症の診断系構築

研究分担者 山越 智 国立感染症研究所 生物活性物質部

研究要旨 アスペルギルス症の診断はアスペルギルスガラクトマンナン抗原検出法が比較的信頼性の高い検査として使用されているが、未だに感度、特異度など課題の多い検査である。昨年度までに、*Aspergillus fumigatus* の分泌蛋白質の網羅的同定を行い、その中から B11a 遺伝子とそのホモログ B11b 遺伝子を選択し、遺伝子産物に対するサンドイッチ ELISA 系構築を試みた。今年度はさらに感度を上げるために条件検討を行い、培養上清、マウス感染モデルでの有効性の検討を行った。

A. 研究目的

医療技術の進歩によりもたらされる免疫不全者の増加などに伴い深在性真菌症も近年増加傾向を示している。その中でもアスペルギルス症はもっとも頻度が高いと考えられている。現在、アスペルギルス感染症の早期診断を目的として使用されているガラクトマンナン抗原検出系は、血液悪性疾患の患者では約 80%の感度を有しているが、他の基礎疾患では特異度が低く、より感染実態を反映する早期診断系の確立が求められている。

このような背景のもと、昨年までに、アスペルギルス症の原因真菌で最も多い *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) を対象とし、早期診断系の作製を念頭に、新たな標的抗原の検索を行い、その中から B11a 遺伝子とそのホモログ B11b 遺伝子産物に対するサンドイッチ ELISA 系構築を試みた。そこで今年度はさらに感度を上げるために条件検討を行い、培養上清とマウス感染モデルでの有効性の検討を行った。

B. 研究方法

1. 大腸菌による組換え蛋白質の作製

シグナルシーケンストラップ (SST-REX) 法を用いた網羅的スクリーニングによって得られた分泌蛋白質、膜蛋白質をコードすると考えられる遺伝子の中で、B11a 遺伝子とそのホモログ B11b 遺伝子の cDNA を pGEX-6P-His6-FLAG、pMAL-c4X-Strep-tagII に入れ、大腸菌を使い大量産生を行った。GST あるいは MBP との融合蛋白質を、Glutathione Sepharose カラムあるいはアミロース resin カラムにより精製し、抗体の産生、ウエスタンブロット、サンドイッチ ELISA のコントロールに使用した。

2. 抗体の精製

B11a, B11b に対するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、いずれも protein G セファロースカラムにより精製した。

3. ビアコアによる抗体の解析

BIACORE 2000 を使用し、Mouse Antibody Capture Kit にて CM5 のセンサーチップに