

201225040A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

平成 25 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 24 年度 総括・分担研究報告書

平成 25 年 3 月

研究代表者

宮崎 義継

(国立感染症研究所)

平成 24 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
石野 敬子	昭和大学薬学部 薬物治療学講座 感染制御薬学部門	准教授
大野 秀明	国立感染症研究所 生物活性物質部	室長
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 24 年度）	・ ・ ・ ・ ・ 1
研究代表者：宮崎 義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）	
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	・ ・ ・ ・ 5
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）	
2. <i>Cryptococcus gattii</i> 感染症における病態解析	・ ・ ・ ・ 12
研究分担者：渋谷 和俊（東邦大学医学部 病院病理学講座）	
3. 本邦で初めて分離された <i>Cryptococcus gattii</i> VGIIa JP01 株の血清化学的解析 および系統学的近縁菌種 <i>Trichosporon</i> との比較ゲノム	・ ・ ・ ・ 20
研究分担者：杉田 隆（明治薬科大学 微生物学教室）	
4. 生体側の因子に関する研究/診断応用研究	・ ・ ・ ・ 26
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）	
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	・ ・ ・ ・ 32
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）	
6. <i>Cryptococcus gattii</i> の薬剤感受性決定因子に関する研究	・ ・ ・ ・ 34
研究分担者：石野 敬子（昭和大学薬学部 薬物療法学講座 感染制御薬学部門）	
7. 日本で分離された北米流行型 <i>Cryptococcus gattii</i> 株の病原性および菌学的性質の解明	・ 36
研究分担者：大野 秀明（国立感染症研究所 生物活性物質部）	
8. <i>Cryptococcus gattii</i> の免疫原性に関する研究	・ ・ ・ ・ 42
研究分担者：金子 幸弘（国立感染症研究所 生物活性物質部）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	

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 地域流行型真菌症とは、特定地域に生息する真菌による感染症の総称である。わが国では、渡航者の感染例が多く、渡航機会の増加を背景に、増加傾向にある。しかしながら、明らかな渡航歴のない感染例、特に、高病原性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、昨年度より、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実施している。本年度は、わが国の患者から分離された *Cryptococcus gattii* 3株の全ゲノム解析に基づく分子疫学解析を実施し、わが国特有の遺伝子型を有する株の存在が示唆された。わが国で分離された高病原性の *C. gattii* 株感染マウスを用いた解析では、高病原性に特異的な病理所見と宿主免疫応答が明らかとなった。*C. gattii* と *Trichosporon* との比較遺伝子学的解析では、類似遺伝子の詳細な解析を行い、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、本年度より、新たに *C. gattii* におけるアゾール低感受性の解析を開始した。

A. 研究目的

地域流行型真菌症とは、特定地域に生息する真菌による感染症の総称である。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

わが国の患者から分離された *Cryptococcus gattii* 3株の全ゲノム解析に基づく分子疫学解析を実施した。(宮崎)

2. *C. gattii* 感染症における病態解析

クリプトコックス属菌 (*C. gattii* 2株、*Cryptococcus neoformans* 1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

深在性真菌症のうち、クリプトコックス

症は健常人にも発症する特異な真菌症である。我が国ではnon-HIV患者におけるクリプトコックス症が他国に比べて多い。本研究では、我が国における本症の診断、治療の実態についてアンケートによる聞き取り調査により解析し、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

現代の医療において免疫抑制治療と抗真菌薬の進歩に伴う深在性真菌症の患者背景・菌種・薬剤感受性に变化について、生体肝移植後の患者に発症する感染症サーベイランスを行った。(高倉)

6. *C. gattii* の薬剤感受性決定因子に関する研究

C. gattii が、アゾール系抗真菌薬のうち特にフルコナゾール (FLCZ) に低感受性を示すことに着目し、標的分子である Lanosterol 14- α demethylase 遺伝子の同定とその構造比較を行なった。(石野)

7. 日本で分離された北米流行型 *C. gattii* 株の病原性および菌学的性質の解明

我が国で初めて分離された北米流行型 *C. gattii* 株2株 (JP01株、JP02株) について、マウス感染モデルを用いて病原性や感染病態、ならびに菌の病原因子について検討を行った。(大野)

8. *C. gattii* の免疫原性に関する研究

1) 樹状細胞を用いた *in vitro* での免疫原性

JAWSII 樹状細胞に *C. gattii* と *C. neoformans* の死菌または生菌を接種し、免疫応答性をIL-6産生能で比較した。(金子)

2) マウスを用いた *in vivo* での免疫原性

宿主応答と病原性との関連を解明するため、免疫不全状態における病原性を比較した。C57BL/6マウスに、CD4抗体を投与し、

CD4欠損状態とし、*C. gattii*と*C. neoformans*を経気管支的に投与して、その生存率を比較した。(金子)

C. 研究結果

1. 本邦における*C. gattii*感染症の現況

3株のうち1株は従来のMLST (multi locus sequencing type) のVGIIaに、1株はVGIIcに分類することが可能であったが、1株はVGIIa,b,cいずれにも該当しなかった。(宮崎)

2. *C. gattii*感染症における病態解析

菌株間の毒力の差に関わらず総じて*C. gattii*は*C. neoformans*よりも既存の肺構築改変を来たしやすく、大食細胞を介した細胞間相互作用を誘導させ難い特徴を有していると推測された。さらに、*C. gattii*の中でこれらの特徴がより顕在化した株が強毒株である可能性が示唆された。(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) 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) *C. gattii*と*C. neoformans*間の相同性が高い238遺伝子および*T. asahii*とさらに相同性が高い遺伝子の59を候補遺伝子として選別した。*Trichosporon* spp.に対するMLST開発の候補遺伝子の抽出を行なった。(杉田)

4. 生体側の因子に関する研究/診断応用研究

我が国のクリプトコックス症の実態が判

明し、患者の背景、治療薬の選択、治療期間について一定のデータが得られた。また、疾患感受性遺伝子の候補遺伝子の一つであるMBL遺伝子については有意なSNPs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

周術期の抗菌薬・抗真菌薬予防投与の進歩により、肝移植後1ヵ月以内の深在性真菌症は発症が抑制されていることが判明した。一方で院内酵母様真菌血症症例の解析により、免疫抑制や抗真菌薬投与歴と非カンジダ真菌血症の関連も示唆された。(高倉)

6. *C. gattii* の薬剤感受性決定因子に関する研究

FLCZ感受性株であるVGIIa型と低感受性株であるVGIIc型のとを比較した結果、1アミノ酸の置換 (N249D) を見出した。

7. 日本で分離された北米流行型*C. gattii* 株の病原性および菌学的性質の解明

マウスに対する病原性ではJP02株が最も強い致死性を示した一方、JP01株では観察期間中マウスの死亡は観察されなかった。また感染病態ではJP02株では他のクリプトコックス属と比較し全身臓器への易播種性があるものと考えられた。さらにメラニン産生能や莢膜厚とマウスに対する病原性との比較ではこれらに明確な相関は認めなかった。(大野)

8. *C. gattii*の免疫原性に関する研究

1) 樹状細胞を用いたin vitroでの免疫原性

*C. neoformans*を接種すると、JAWSII細胞はIL-6の産生が有意に上昇した。しかしながら、*C. gattii*を接種しても、IL-6の産生は非接種群と相違なかった。また、同時接種時のIL-6産生の結果から、*C. gattii*は、*C. neoformans*により誘導されたIL-6を抑

制しないことが明らかとなった。(金子)

2) マウスを用いたin vivoでの免疫原性

*C. neoformans*と比較し、有意に*C. gattii*の平均生存日数が短縮しており、*C. gattii*の臨床的な高病原性を反映する結果となった。一方、CD4欠損状態において、*C. neoformans*では、CD4欠損状態で有意に生存率が低下したが、*C. gattii*では相違を認めなかった。(金子)

D. 考察

分子疫学的解析結果から、わが国での*C. gattii*株は、必ずしも北米で流行している株とは一致せず、相当以前から、わが国に土着している可能性も考えられた。

比較ゲノム解析では、*C. gattii*と*T. asahii*に類似性が見いだされた。

生体側因子に関する検討において、疾患感受性遺伝子の候補であるMBLには、今回SNPsを認めなかったが、今後症例を増やして検討する余地がある。

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し、肝移植や免疫抑制等に関連した真菌血症の疫学を示した。

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、高病原性2株は、他のクリプトコックス属と比較し、全身臓器への易播種性があるものと考えられた。

in vitroでの免疫原性に関する結果から、*C. gattii*は、免疫細胞（抗原提示細胞）による認識が弱く、免疫応答を惹起しにくい可能性が示唆された。また、in vivoの結果から、*C. gattii*の免疫応答にCD4の有無は関係しないことが明らかとなった。

E. 結論

わが国に特有の*C. gattii*の存在が示唆され、国内でも感染しうることを考慮すべきと考えられた。特に、極めて病原性の強い*C. gattii*株のわが国への定着が懸念され、今後の公衆衛生学的対策の必要性が認められた。

また、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も必要である。さらに、来年度以降は、環境調査を含めた地域流行型真菌症の疫学調査についても検討している。

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	石川 淳	国立感染症研究所	生物活性物質部
	金子幸弘	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
	金城雄樹	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
	田邊公一	国立感染症研究所	生物活性物質部
	大野秀明	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実施した。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と患者情報を全国から収集し、検証した結果、2010年以降に少なくとも4株の *C. gattii* がわが国の患者から分離されていることが明らかとなった。これらの株のうち、3株についてゲノム解析による分子疫学に関する検討を行い、北米株とは必ずしも同一では無いと考えられる結果を得た。わが国でも固有の *C. gattii* 株存在の可能性も推測され、今後慎重に調査と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。

以上の背景から、*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、情報収集を継続している。

2. わが国で発生した患者から分離同定した *C. gattii* の解析

2012 年度も前年度にひき続き、下記概略のように *C. gattii* 株の収集と解析を行った。

① 菌種の同定

D1/D2 領域、intergenic spacer (IGS) 領域の塩基配列を決定し、BLAST 検索を行い、最終的に菌種を同定した。

② 薬剤感受性

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 分子疫学解析

わが国で分離された高病原性 *C. gattii* 分離株について、定法によりゲノム DNA を抽出し、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、Multi-Locus Sequence Typing (MLST) による分類を行った。

また、次世代シーケンサー (イルミナ) を用いて、全ゲノム配列を推定し、既知のゲノム情報と比較することにより、分子疫学的に解析した。

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

2010 年 4 月から 2012 年 12 月末までにわが国で発生した *C. gattii* 感染症は、感染研で確認しえた限り 3 症例であった。

2. わが国で発生した患者から分離同定した *C. gattii* の解析

① 菌種の同定

D1/D2 領域、IGS による解析で、わが国で分離された 4 株は、*C. gattii* であることが確定された。

② 薬剤感受性

わが国で分離された 4 株の *C. gattii* において、アゾール系抗真菌薬フルコナゾールの最小発育阻止濃度 (MIC) が 8 µg/mL の株があり、*C. neoformans* と比較して高い傾向にあったが、CLSI の耐性基準値以上の耐性はいずれの抗真菌薬に対しても確認されなかった。

③ 分子疫学解析

MLST 型により 4 株を分類したところ、VGI 型 1 株、VGII 型 3 株であった。VGII の 2 株は、さらに VGIIa と VGIIc の亜型に分類可能であった。残り 1 株の VGII 株は既知の VGIIa、VGIIb、VGIIc には分類されない VGII 亜型であると考えられた。わが国で分離され VGII に分類された 3 株について、MLST 分類と全ゲノムシーケンスに基づく系統樹を比較した。その結果、MLST 分類と全ゲノム系統樹は相関性が高いことが確認できた。また、日本株固有の配列の有無を検証する目的で、北米の VGIIa 株とわが国の VGIIa 株の一塩基多型 (SNPs) を検証したところ多数の SNPs が存在しており、同一の MLST 型であるものの、同一の株では無いことが推定された。さらに、北米 VGIIa 株とわが国の VGIIa の間で認めた SNPs の多くが、わが国で分離された VGIIa と VGIIc では保存されていた。

D. 考察

北米での *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、健常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* を新規に検出でき、当該症例が論文として報告され、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により、市中病院で菌種同定の必要性が理解され、*C. gattii* の検査同定依頼があった。今後も継続的に情報発信を行い、ガイドライン等で診断・治療法を示す必要がある。

また、今回の疫学調査において、新規に *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、症例数を蓄積し、さらに詳細

な分子疫学解析によりわが国への土着の可能性を明らかにする必要がある。

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. Miyasaka T, Aoyagi T, Uchiyama B, Oishi K, Nakayama T, Kinjo Y, Miyazaki Y, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M, Kawakami K. A possible relationship of natural killer T cells with humoral immune response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in clinical settings. *Vaccine*. 30:3304-3310, 2012.
2. Kimura M, Araoka H, Uchida N, Ohno H, Miyazaki Y, Fujii T, Nishida A, 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*. 50:412-416, 2012.
3. Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M. Cryptococcal Cellulitis in a Patient with Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol*. Epub ahead of print.
4. Miyazaki H, Kobayashi R, Ishikawa H, Awano N, Yamagoe S, Miyazaki Y, Matsumoto T. Activation of COL1A2

- promoter in human fibroblasts by *Escherichia coli*. FEMS Immunol Med Microbiol. 65:481-487, 2012.
5. Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya 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. Med Mycol. 50:631-636, 2012.
 6. Tarumoto N, Sujino K, Yamaguchi T, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y, Maesaki S. A first report of *Rothia aeria* endocarditis complicated by cerebral hemorrhage. Intern Med. 51:3295-3299, 2012.
 7. Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, Naka T, Umeyama T, Utena-Abe Y, Tarumoto N, Niimi M, Ohno H, Doe M, Fujiwara N, Kinjo Y, Miyazaki Y. The mannan of *Candida albicans* lacking β -1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. Med Mycol. Epub ahead of print.
 8. Tarumoto N, Kinjo Y, Ueno K, Okawara A, Watarai H, Taniguchi M, Maesaki S, Miyazaki Y. A limited role for iNKT cells in controlling systemic *Candida albicans* infection. Jpn J Infect Dis. 65:522-526, 2012.
 - 疫・アレルギー 3. アスペルギルス属と免疫・アレルギー. アレルギーの臨床. 32:615-618, 2012.
 2. 宮崎義継, 金子幸弘, 梅山 隆, 田辺公一, 大野秀明. *Cryptococcus gattii* 感染症. 感染症. 42:172-175, 2012.
 3. 宮崎義継, 大野秀明. 特集 感染症医薬品開発の現況 真菌症に関する診断法の現状と展望. 最新医学. 67:2566-2571, 2012.

学会発表

国際学会

1. Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
2. Umeyama T, Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Multi-locus sequence typing epidemiology of *Cryptococcus neoformans* strains clinically isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
3. Tanabe K, Ohno H, Umeyama T, Yamagoe S, Chibana H, Miyazaki Y. Genetic analysis of echinocandin-resistant *Candida glabrata* isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
4. Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O,

和文論文

1. 宮崎義継, 河野 茂. 特集: 真菌と免

Hakariya M, Ohno H, Miyazaki Y. Fungicidal effectiveness against biofilms of *Candida albicans*. 6th ASM conference of biofilms. September 29-October 4, 2012, Miami, USA.

国内学会

1. 金子幸弘, 小畑陽子, 西野友哉, 掛屋弘, 瀬藤光利, 宮崎義継, 古巢 朗, 河野 茂. 質量顕微鏡によるIgA腎症モデルの病態解析. 第109回日本内科学会. 4月13-15日, 2012年, 京都.
2. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. 新規抗真菌併用薬の探索. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
3. 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. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
4. 渋谷和俊, 大久保陽一郎, 大野秀明, 宮崎義継, 田辺公一, 金子幸弘, 山越智, 梅山 隆, 安藤常浩, 若山 恵. *Cryptococcus gattii* 感染症における病理組織学的解析. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
5. 泉川公一, 三原 智, 森永芳智, 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. 長崎大学病院における *Cryptococcus* の Multilocus Sequence Typing を用いた分子疫学調査. 第52回日本呼吸器学会学術講演会. 4月20-22日, 2012年, 神戸.
6. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質 B-11 の病原性の解析とサンドイッチ ELISA 系の構築. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
7. 樽本憲人, 金城雄樹, 大川原明子, 前崎繁文, 渋谷和俊, 宮崎義継. マウスモデルにおける自然免疫の活性化によるカンジダ症増悪の免疫学的解析. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
8. 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 知花博治, 宮崎義継. *Candida* 臨床分離株におけるミカファンギン感受性と FKS 遺伝子の解析. 第60回日本化学療法学会学術集会. 4月26-27日, 2012年, 長崎.
9. 名木 稔, 田辺公一, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* はユニークなステロールトランスポーターによりアゾール耐性となりうる. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
10. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. 侵襲性肺アスペルギルス症の主要原因菌 *Aspergillus fumigatus* による肺胞上皮細胞への接着と侵入. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月25-26日, 2012年, 長崎.
11. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* プロテインキナーゼの特異的阻害によ

- る病原性制御. 第 60 回日本化学療法学会学術集会. 4 月 26-27 日, 2012 年, 長崎.
12. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* の肺胞上皮細胞への接着と侵入機構. 第 33 回関東医真菌懇話会学術集会. 5 月 26 日, 2012 年, 東京.
 13. 金城雄樹, 樽本憲人, 笹井大督, 大川原明子, 上野圭吾, 井澤由衣奈, 篠崎稔, 竹山春子, 前崎繁文, 渋谷和俊, 宮崎義継. NKT 細胞の活性化によるカンジダ症増悪機序の免疫学的解析〜マウスモデルを用いた解析〜. 第 33 回関東医真菌懇話会. 5 月 26 日, 2012 年, 東京.
 14. 樽本憲人, 金城雄樹, 笹井大督, 大川原明子, 上野圭吾, 井澤由衣奈, 篠崎稔, 竹山春子, 前崎繁文, 渋谷和俊, 宮崎義継. NKT 細胞の活性化によるマウスカンジダ症増悪機序の解析. 第 23 回日本生体防御学会. 7 月 9-11 日, 2012 年, 東京.
 15. 宮崎義継, 荒岡秀樹, 梅山 隆, 田辺公一, 山越 智, 大野秀明. シンポジウム 2 症例から考える真菌症: 診断・治療の難しさ, 感染症としての面白さ 4) 接合菌症を疑うときに何をするか. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 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. 10 月 10-12 日, 2012 年, 東京.
 16. 金城雄樹, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. カンジダ細胞壁マンナンの構造と炎症性サイトカイン誘導の関係. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 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. 10 月 10-12 日, 2012 年, 東京.
 17. 宮崎義継. 気管支鏡検査 (TBLB および BAL) にて診断された肺コクシジオイデス症の一例. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 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. 10 月 10-12 日, 2012 年, 東京.
 18. 宮崎義継, 梅山 隆, 田辺公一, 山越智, 金城雄樹, 大野秀明. 教育講演・4 肺真菌症をいかに診断するか. 第 49 回日本臨床生理学会総会. 10 月 18-19 日, 2012 年, 長崎.
 19. 田辺公一, 名木 稔, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第 61 回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第 58 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. 10 月 10-12 日, 2012 年, 東京.
 20. 田辺公一, 名木 稔, 山越 智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込み活性化機構. 第 41 回薬剤耐性菌研究会. 10 月 25-26 日, 2012 年, 下呂.
 21. 宮崎義継. 侵襲性真菌症への対応について. 平成 24 年度医師卒後臨床研修. 10 月 23 日, 2012 年, 東京.
 22. 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. COX 阻害剤による *Candida albicans* の抗真菌薬感受性変化と排出ポンプ発現誘導. 第 56 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 10-11 日, 2012 年, 東京.

23. 木村雅友, 大野秀明, 梅山 隆, 宮崎義継. アスペルギルスとクリプトコックスによる肺混合感染の2手術例. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
24. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮崎義継, 根本哲生, 若山 恵, 栃木直文, 笹井大督, 石渡誉郎, 中山晴雄, 下平佳代子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 職 玉珠, 北原加奈子, 山本慶郎, 渋谷和俊. マウス肺クリプトコックス症モデルを用いた感染防御ならびに構築変換の解析. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
25. 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の生体内における病原因子; 鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
26. 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* の細胞壁、分泌蛋白質 B-11 の機能解析. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
27. 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越智, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata* の生体内における病原因子: 鉄欠乏における遺伝子発現調節. 第56回日本医真菌学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2012年, 東京.
28. 宮坂智充, 青柳哲史, 内山美寧, 國島広之, 賀来満夫, 石井恵子, 中山俊憲, 植村靖史, 大石和徳, 金城雄樹, 宮崎義継, 川上和義. 23 価肺炎球菌ワクチン接種後の抗体産生における NKT 細胞の役割に関する臨床免疫学的検討. 第16回日本ワクチン学会学術集会. 11月17-18日, 2012年, 横浜.
29. 宮坂智充, 外山真彦, 赤堀ゆきこ, 石井恵子, 金城雄樹, 宮崎義継, 中山俊憲, 岩倉洋一郎, 西城 忍, 大石和徳, 川上和義. 23 価肺炎球菌多糖体ワクチンによる血清型特異的 IgG 産生における NKT 細胞と Dectin-2 の役割. 第16回日本ワクチン学会学術集会. 11月17-18日, 2012年, 横浜.
30. 宮崎義継. 真菌症について. 平成24年度動物由来感染症対策技術研究会. 11月2日, 2012年, 東京.
31. 田辺公一, 名木 稔, 中山浩伸, 山越智, 梅山 隆, 大野秀明, 宮崎義継. 病原真菌 *Candida glabrata* における細胞外ステロール取り込み. 第35回日本分子生物学会年会. 12月11-14日, 2012年, 福岡.

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

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

*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	宮崎 義継 大野 秀明 畠山 修司 杉田 隆 亀井 克彦 篠崎 稔 大久保 陽一郎	国立感染症研究所 生物活性物質部 国立感染症研究所 生物活性物質部 東京大学医学部附属病院 感染症内科 明治薬科大学 微生物学教室 千葉大学 真菌医学研究センター 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 北米大陸での集団発生の報告を皮切りに、近年 *Cryptococcus gattii* が新たなクリプトコックス症の起因菌として注目されている。研究分担者らは、クリプトコックス属菌（*C. gattii* 2株、*C. neoformans* 1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、菌株間の毒力の差に関わらず総じて *C. gattii* は *C. neoformans* よりも既存の肺構築改変を来たしやすく、大食細胞を介した細胞間相互作用を誘導させ難い特徴を有していると推測された。さらに、*C. gattii* の中でこれらの特徴がより顕在化した株が強毒株である可能性が示唆された。

A. 研究目的

カナダ・バンクーバー島東海岸地方における集団発生を皮切りに、*Cryptococcus gattii* が新たなクリプトコックス症の起因菌として注目されている。しかしながら本菌の毒力を規定する因子や感染により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、研究分担者らは肺クリプトコックス感染症のマウスモデルを活用し、本真菌の毒力規定因子の一端の解明を試みた。

B. 研究方法

1. 使用動物ならびに菌株

本研究では 9 週齢の雌性 C57BL/6J マウスを使用した。また、国立感染症研究所にて管理された *C. neoformans* H99 株、*C.*

gattii 5815 株（VG I 型）、*C. gattii* R265 株（VG IIa 型）の合計 3 菌株を本実験に供した。

2. 感染致死毒力の比較

-80°C で凍結保存された各菌株は Yeast extract peptone glucose（YPG）液体培地にて、30°C で 48 時間培養後、生理食塩水に懸濁し OD600=0.5 に調整した。さらに 100 倍希釈した菌液 50µl（ $3.0\text{--}8.0\times 10^3$ CFU / mouse）をイソフルラン麻酔下におかれたマウス気管内に接種し、接種後 71 日間の状態を確認した。累積生存率の有意差検定は、Kaplan-Meier 法、Log-rank 検定を用いて評価し、 $p < 0.05$ を以って有意差ありと判定した。

図1. 各菌株接種後71日間の生存曲線

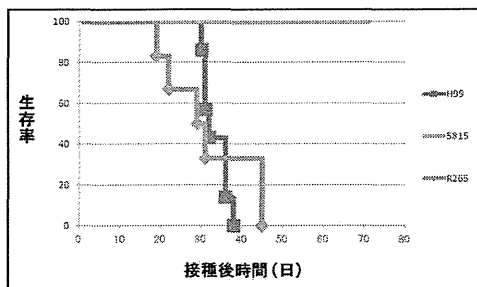
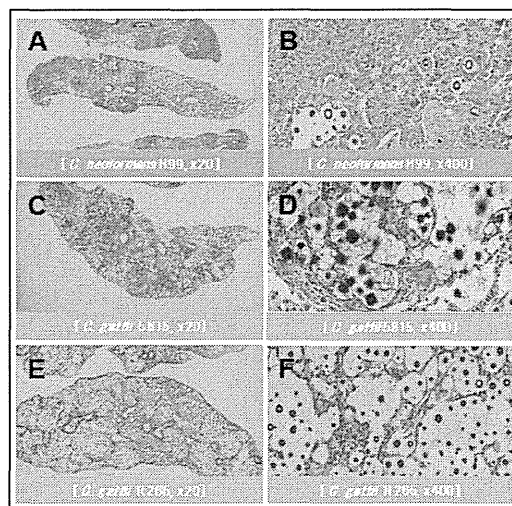


図2. 各菌株接種後14日目のマウス肺



3. 病理組織学的解析

1) 採取臓器の病理組織学的所見

C. neoformans H99 株, *C. gattii* 5815 株ならびに *C. gattii* R265 株の経気道感染モデルマウスを接種後 14 日目に 7 匹ずつ屠殺・剖検し、摘出臓器（脳、肺、肝、脾）は可及的速やかに 20%ホルマリンで固定した。固定後、詳細な肉眼観察の後に各臓器を切り出し、常法に従ってパラフィン包埋した。個々の検体は 4~5 μm の厚さに薄切し、Hematoxylin-eosin (HE) 染色、Periodic acid-Schiff (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築改変の分析

各個体の Elastica 単染色を施した肺組織切片を対物レンズ 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®」を用いて各群とも 2000 箇所以上測定し、平均値ならびにその標準偏差を比較した。平均値ならびに標準偏差の有意差検定は一元配置分散分析法（One-way Analysis of variance: One-way ANOVA）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) 画像解析による多核巨細胞の分析

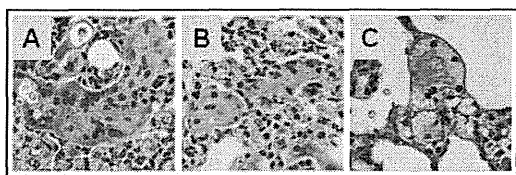
各個体の PAS 染色を施した肺組織切片上で、単位面積当たりの多核巨細胞数、個々の多核巨細胞に含まれる核数を計測した。次いで核数を個々の多核巨細胞の面積で除した値を計測し、多核巨細胞 細胞質内核密度とした。測定された各値の有意差検定は、ANOVA 検定を用いて検定し、 $p < 0.05$ を以って有意差ありと判定した。

C. 研究結果

1. 感染致死毒力の比較

C. gattii R265 株ならびに *C. neoformans* H99 株接種群ではそれぞれ接種後 19 日目、30 日目から死亡個体が確認され、観察期間中に全個体が死亡した。一方、*C. gattii* 5815 株接種群では観察期間中に死亡個体は確認されなかった（図1）。3群間の累積生存率を検定した結果、*C. gattii* 5815 株接種群は他の2群よりも有意に累積生存率が高かったが、*C. gattii* R265 株接種群と *C. neoformans* H99 株接種群の間に有意差は見出せなかった。

図 3. 各群で観察された多核巨細胞



2. 病理組織学的解析

1) 採取臓器の病理組織学的所見

C. neoformans H99 株接種群では肺剖面上で境界明瞭な結節性病変が多数確認された (図 2A)。菌体は結節性病変に局限しており (図 2B)、同部では多数かつ大型の多核巨細胞も認められた (図 3A)。一方、肺胞腔内を中心とした菌増殖、それに伴う肺胞腔の拡張と重積は明らかではなかった。

C. gattii 5815 株接種群は肺剖面上で若干肺容積が拡大しており、境界やや不明瞭な結節性病変も確認された (図 2C)。菌体は結節性病変部とその周囲にみられ、肺胞腔の拡張と重積も認められた (図 2D)。さらに、*C. neoformans* H99 株接種群のマウス肺と比較して多核巨細胞は少数かつ小型であった (図 3B)。

C. gattii R265 株接種群では肺剖面上で肺容積が著明に拡大していたが、結節性病変は認められなかった (図 2E)。菌体は多数かつびまん性に分布しており、肺胞腔の著明な拡張と周囲の重積を伴っていた (図 2F)。また、小型かつ淡明な細胞質を有する多核巨細胞がごく少数確認された (図 3C)。

2) 画像解析による肺の構築改変の分析

C. neoformans H99 株, *C. gattii* 5815 株ならびに *C. gattii* R265 株接種群におけるマウス肺交点間距離の平均値ならびに標準偏差は 49.3 ± 29.4 , 58.6 ± 36.5 ならびに $65.6 \pm 46.7 \mu\text{m}$ であった。3 群間における

交点間距離の平均値ならびに分散を ANOVA 検定ならびに F 検定を用いて検定したところ、いずれの検定においても全群間で有意差が認められた。

3) 画像解析による多核巨細胞の分析

C. neoformans H99 株, *C. gattii* 5815 株ならびに *C. gattii* R265 株接種群におけるマウス肺 1mm^2 あたりの多核巨細胞数 (平均値 \pm 標準偏差, 単位: μm) は 2.03 ± 0.38 , 0.43 ± 0.26 ならびに 0.11 ± 0.07 であった。個々の多核巨細胞に含まれる核数 (平均値 \pm 標準偏差, 単位: 個) はそれぞれ 7.87 ± 6.03 , 4.44 ± 2.53 ならびに 2.87 ± 1.05 であり、全群間で有意差が認められた (One-way ANOVA 検定)。多核巨細胞 細胞質内核密度 (平均値 \pm 標準偏差, 単位: 個/ mm^2) は 5660.76 ± 2144.50 , 4666.71 ± 1908.44 ならびに 4115.91 ± 1683.13 であり、全群間で有意差が認められた (One-way ANOVA 検定)。

D. 考察

本研究では *C. neoformans* 1 株ならびに *C. gattii* 2 株、合計 3 菌株を C57BL/6J マウスに接種した後に生存曲線や肺病変に対する病理組織学的解析を行い、*C. gattii* における毒力規定因子の解明を試みた

各菌株接種群におけるマウスの累積生存率を比較した結果、*C. gattii* 5815 株接種群は他の 2 菌株接種群よりも有意に生存率が高かったが、*C. neoformans* H99 株ならびに *C. gattii* R265 株接種群間では有意な差を見出せなかった。

一方、感染モデルマウス肺を比較したところ、*C. gattii* 株接種マウス肺はいずれも *C. neoformans* 株接種マウス肺よりも肺容