

201318018A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

平成 26 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 25 年度 総括・分担研究報告書

平成 26 年 3 月

研究代表者

宮崎 義継

(国立感染症研究所)

平成 25 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 真菌部	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 呼吸器病態制御学	助教
高倉 俊二	京都大学医学研究科 臨床病態検査学	准教授
石野 敬子	昭和大学薬学部 薬物療法学講座 感染制御薬学部門	准教授
大野 秀明	国立感染症研究所 真菌部	室長
金子 幸弘	国立感染症研究所 真菌部	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 25 年度） 研究代表者：宮崎 義継（国立感染症研究所 真菌部）	・ ・ ・ ・ ・ 1
II. 分担研究報告書	
1. <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）	・ ・ ・ ・ 5
2. 本邦で初めて分離された <i>Cryptococcus gattii</i> VGIIa JP01 株の細胞表層多糖の構造解析 研究分担者：杉田 隆（明治薬科大学 微生物学教室）	・ ・ ・ ・ 13
3. 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 呼吸器病態制御学）	・ ・ ・ ・ 17
4. 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（京都大学医学研究科 臨床病態検査学）	・ ・ ・ ・ 25
5. <i>Cryptococcus gattii</i> の薬剤感受性決定因子に関する研究 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）	・ ・ ・ ・ 29
6. 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 研究分担者：大野 秀明（国立感染症研究所 真菌部）	・ ・ ・ ・ 31
7. <i>Cryptococcus gattii</i> の免疫原性に関する研究 研究分担者：金子 幸弘（国立感染症研究所 真菌部）	・ ・ ・ ・ 37
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・ ・ ・ ・ 41

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 真菌部

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、平成22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。これまでに、わが国の患者から分離された *Cryptococcus gattii* 5株の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調査では、リスク因子や予後改善のための指標に関する知見が得られた。また、*C. gattii*のアゾール低感受性に関する分子機構を明らかにした。

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、

北米流行 *C. gattii*株と同一遺伝子型の VGIIa株による重症中枢神経系クリプトコックス症症例が報告された。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実施した。

B. 研究方法

1. *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、*C. neoformans* 1株) を用いた経気道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。本年度は組織学的解析に加えてDNAマイクロアレイ法を用いて肺における発現遺伝子の変化を網羅的に解析した。(渋谷)

2. 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

カナダ・バンクーバー島で集団発生した *C. gattii*感染症の優位な遺伝子型はVGIIa型である。本年度は、昨年度に続き特筆すべき渡航歴のない日本人から本邦で初めて分離されたVGIIa株の莢膜多糖の化学構造を検討した。(杉田)

3. 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病態について、①non-HIV populationにおけるクリプトコックス症の臨床病態解析、②non-HIV

populationにおけるクリプトコックス症の疾患感受性遺伝子解析、を行った。(泉川)

4. 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

免疫抑制治療と抗真菌薬治療の進歩に伴い、深在性真菌症の疫学に大きな変化がみられ、単なる診断・治療を越えた問題点が浮上している。京都大学病院におけるカンジダ血症患者の診療内容と予後の関連を後ろ向きに調査し、予後改善のための課題を検討した。(高倉)

5. *C. gattii* の薬剤感受性決定因子に関する研究

FLCZ低感受性株の薬剤排出能および薬剤排出関連遺伝子とエルゴステロール合成遺伝子の遺伝子発現解析を行った。(石野)

6. 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

日本で初めて分離された北米流行型 *Cryptococcus gattii*株2株 (JP01株、JP02株) について、昨年度に続いてマウス感染モデルを用いた病原性や感染病態、ならびに菌の病原因子について解析、検討を行った。(大野)

7. *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、または精製した莢膜多糖を添加し、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、その生存率等を比較した。(金子)

C. 研究結果

1. *C. gattii*感染症における病態解析

肺における網羅的発現遺伝子解析の結果、アウトブレイク型 *C. gattii* を用いた気道感染モデルマウス肺ではセリン合成酵素である、3-phosphoglycerate dehydrogenase の顕著な発現亢進が確認され、肺胞上皮細胞への高い接着能に関与している可能性が示唆された。(渋谷)

2. 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

VGIIa, b, c株の莢膜多糖の¹H-NMRスペクトルは、非常に類似していたが、JP01株は他の株と細部で差異がある可能性が示された。また、VGIIa株間の糖組成は、JP01株とバンクーバーR265株は類似したがその他のVGIIa株とはキシロース含量が異なっていた。(杉田)

3. 生体側の因子に関する研究/診断応用研究

我が国における本症の病態について患者の背景、治療薬の選択、治療期間などについて解析し、新たな知見をえた。また、疾患感受性遺伝子の候補遺伝子の一つであるMBL遺伝子について解析したが、有意なSNPsを認めなかった。(泉川)

4. 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

より早期からの経験的治療の対象とすべき群として、リスク因子の中でも高致死率に関わる因子(人工呼吸、腎不全、長期ICU)を同定した。また、肺移植後の肺アスペルギルス症について、予防抗真菌薬と発症状況、拒絶反応との鑑別についての検討を行った。イトラコナゾールによる予防は有効だが、投与期間を1年程度に延長することが

望ましいことが示唆された。(高倉)

5. *C. gattii* の薬剤感受性決定因子に関する研究

今回、FLCZ低感受性株で、R6G排出能の亢進および2種類の薬剤排出ポンプ関連遺伝子の発現上昇が認められた。(石野)

6. 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

感染病態の検討では *C. gattii*株では *C. neoformans*株と比較し、全身臓器への易播種性があるものと考えられ、病原性が強い *C. gattii*株ほど全身臓器への播種傾向が高いと考えられた。さらに菌学的性質として倍加時間や菌体外酵素の産生能について検討したが、倍加時間と病原性の間に明らかな相関は認めず、また、菌体外酵素の産生能もいずれの株でも認められなかった。(大野)

7. *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. gattii*は、*C. neoformans*と比較し、死菌、生菌、莢膜多糖成分いずれにおいても、樹状細胞の免疫応答誘導能が極めて低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*は、CD4欠損状態で有意に生存率が低下するが、*C. gattii*では、健常マウスとCD4欠損状態のマウスとで生存率に相違を認めなかった。*C. gattii*感染症において、健常マウスとCD4欠損状態のマウスとで肺内生菌数に相異を認めなかったが、脾臓への播種にはやや影響している可能性が示唆された。(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、必ずしも北米流行株とは一致し

ないことが明らかとなった。また、明らかに渡航歴のない患者での発症例があることから、国内でも感染しうることを考慮すべきである。

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、他の遺伝子でも検討する余地がある。

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。

*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、細胞表層の莢膜多糖の構造が影響していると考えられた。

また、わが国で多い、クリプトコックス症以外の真菌症についても、発症の危険因子・予後改善の指標に関する知見が得られた。

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。

今回、本研究での解析結果を、刊行予定の2014年度版深在性真菌症の診断・治療ガイドラインのクリプトコックス症および輸

入真菌症の各項目に反映させることができ、地域流行型真菌症対策としての大きな一歩となった。

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

*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 金子 幸弘 畠山 修司 杉田 隆 亀井 克彦 篠崎 稔 栃木 直文 大久保 陽一郎	国立感染症研究所 真菌部 国立感染症研究所 真菌部 国立感染症研究所 真菌部 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 臨床感染症分野 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 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、北米大陸におけるアウトブレイクの報告を皮切りに *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*)が本真菌感染症の新たな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、*Cryptococcus neoformans* 1株) を用いた経気道感染モデルマウスを作成し、*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。

本年度は組織学的解析に加えてDNAマイクロアレイ法を用いて肺における発現遺伝子の変化を網羅的に解析した。その結果、アウトブレイク型 *C. gattii* を用いた気道感染モデルマウス肺ではセリン合成酵素である、3-phosphoglycerate dehydrogenaseの顕著な発現亢進が確認され、肺胞上皮細胞への高い接着能に関与してい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。

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

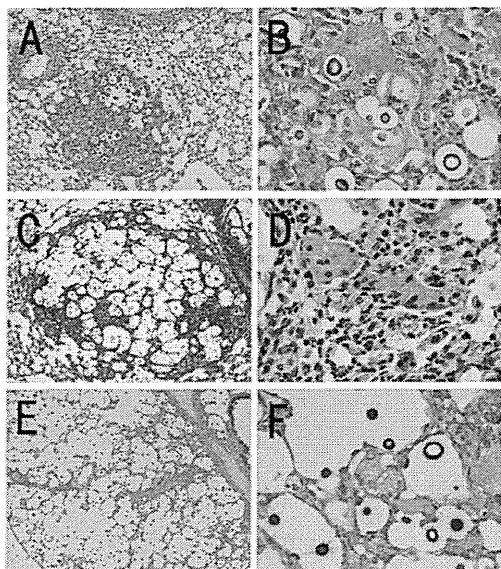
1. 使用動物ならびに菌株

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. 病理組織学的解析

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 3 匹ずつ屠殺・剖検し、摘出した肺組織を可及的速やかに 20%ホルマリンで固定した。固定後、

図 1. 各菌株接種後 14 日目のマウス肺



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。

3. 網羅的発現遺伝子変動の解析

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ならびにコントロールマウスの肺より RNA を抽出し、Affymetrix® 社製 GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array® にて DNA マイクロアレイ法を施行し、GeneSpring GX ソフトウェア®を用いることで発現遺伝子の網羅的解析を行った。

さらに、各菌株接種群で発現亢進を示す遺伝子を対象として Cytostage ソフトウェア®の“plugins”メニューの 1 つである“BiNGO”機能を用いて発現亢進を示す遺伝子の molecular function を調査した。

C. 研究結果

1. 病理組織学的解析

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

図 2. 発現遺伝子の解析結果

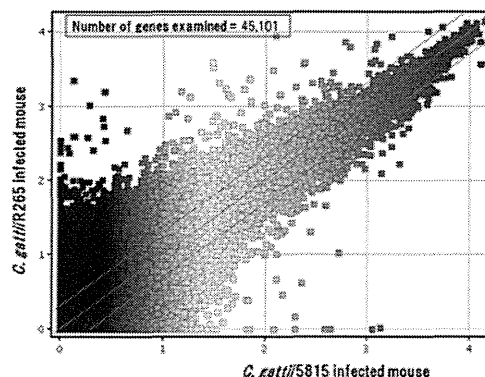
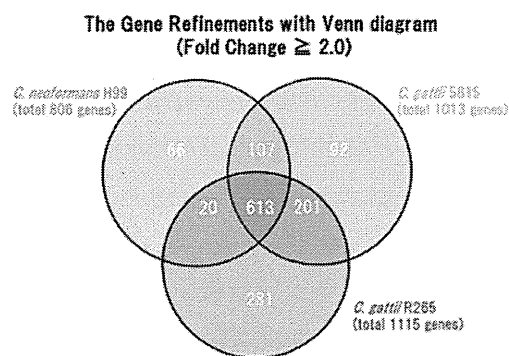


図 3. 各菌株接種群における Log₂ 倍以上の発現亢進を示す遺伝子数



た。菌体は結節性病変に局限しており (図 1A)、同部では多数かつ大型の多核巨細胞も認められた (図 1B)。一方、肺胸腔内を中心とした菌増殖、それに伴う肺胸腔の拡張と周囲の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。菌体は結節性病変部とその周囲にみられ、肺胸腔の拡張と周囲の重積も認められた (図 1C)。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 1D)。

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。菌体は多数かつびまん性に分布しており、肺胸腔の著明な拡張と周囲の重積を伴っていた (図 1E)。また、小型かつ淡明な細胞質を有する多核巨細胞

図 4. *C. neoformans* H99 株接種群で発現亢進を示す遺伝子の molecular function

GO analysis
(*C. neoformans* H99 infected mice, Fold Change ≥ 2.0)

The top 10 GO terms				
GO-ID	Description	% in Selection	% in Total	p-value
5488	binding	60.0%	35.5%	0.00E+00
5515	protein binding	33.3%	18.8%	0.00E+00
46914	transition metal ion binding	29.8%	16.8%	0.00E+00
8009	chemokine activity	19.3%	11.1%	3.28E-271
42379	chemokine receptor binding	19.3%	11.0%	9.90E-271
8270	zinc ion binding	19.0%	10.9%	8.15E-266
43169	cation binding	13.0%	7.1%	9.24E-257
43167	ion binding	11.6%	6.1%	3.57E-204
46872	metal ion binding	14.8%	8.5%	5.93E-204
3676	nucleic acid binding	11.1%	5.9%	4.57E-194

図 5. *C. gattii* 5815 株接種群で発現亢進を示す遺伝子の molecular function

GO analysis
(*C. gattii* 5815 infected mice, Fold Change ≥ 2.0)

The top 10 GO terms				
GO-ID	Description	% in Selection	% in Total	p-value
5488	binding	65.0%	35.5%	7.71E-57
5515	protein binding	41.4%	18.5%	5.77E-42
3676	nucleic acid binding	18.2%	8.4%	9.93E-16
43169	cation binding	21.6%	10.9%	2.36E-15
43167	ion binding	21.5%	11.0%	2.96E-15
46872	metal ion binding	21.0%	10.8%	2.72E-14
46914	transition metal ion binding	12.9%	5.3%	6.15E-14
3677	DNA binding	13.5%	5.7%	1.10E-13
8270	zinc ion binding	11.3%	4.5%	6.04E-13
3824	catalytic activity	27.4%	16.7%	5.61E-12

がごく少数確認された (図 1F)。

2. 網羅的発現遺伝子変動の解析

DNA マイクロアレイ法により 45101 遺伝子の発現変動が一次抽出された (図 2)。これらの遺伝子には実験信頼性の指標として “flag” が設定 (absent, marginal あるいは present) されており、GeneSpring GX ソフトウェア®を用いて absent を含む遺伝子を除外した後にコントロール群と比較して \log_2 倍以上の発現を示す遺伝子を抽出した。その結果、*C. neoformans* H99 株接種群で 806 遺伝子、*C. gattii* 5815 株接種群で 1013 遺伝子、*C. gattii* R265 株接種群で 1115 遺伝子が抽出され、613 遺伝子が 3 群で共通して発現亢進を示していた (図 3)。一方、コントロール群と比較して \log_2 倍以上の発現を示す遺伝子は *C. neoformans* H99 株接種群、*C. gattii* 5815 株接種群、

図 6. *C. gattii* R265 株接種群で発現亢進を示す遺伝子の molecular function

GO analysis
(*C. gattii* R265 infected mice, Fold Change ≥ 2.0)

The top 10 GO terms				
GO-ID	Description	% in Selection	% in Total	p-value
5488	binding	66.8%	35.5%	1.79E-70
5515	protein binding	42.4%	18.5%	3.39E-53
3824	catalytic activity	31.8%	16.7%	4.79E-25
43169	cation binding	22.5%	10.9%	1.38E-20
43167	ion binding	22.5%	11.0%	1.85E-20
46872	metal ion binding	21.5%	10.8%	5.07E-18
16787	hydrolase activity	15.9%	7.1%	7.20E-17
46914	transition metal ion binding	12.4%	5.3%	1.47E-14
5524	ATP binding	11.4%	4.7%	2.21E-14
32559	adenyl ribonucleotide binding	11.6%	4.8%	2.35E-14

C. gattii R265 株接種群でそれぞれ 66 遺伝子、92 遺伝子、281 遺伝子であった。これらの遺伝子の molecular function を Cytoscape ソフトウェア® (<http://www.cytoscape.org/>) の plugin 機能である “BiNGO” を用いて調査した結果、いずれの接種群においても多い順に binding に関与する遺伝子が最も多い結果となった (図 4-6)。尚、*C. gattii* R265 株接種群のみで \log_2 2 倍以上の発現を示す遺伝子は値の大きい順に、Pkg1 (4.09 倍)、Tnc (4.08 倍)、Slc7a2 (3.87 倍) であった (図 7)。

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、気道感染モデルマウスを作成した後に病理組織学的解析ならびに網羅的遺伝子発現解析を施行し、*C. gattii* における毒力規定因子の解明を試みた

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積を増しており、肺胞の拡張とその周辺における重積が目立った。以上の所見より、菌株間の毒力の差に関わらず総じて *C. gattii* は *C. neoformans* よりも肺腔に留まり易く、同部に留まってその基本構築を破綻さ

図 7. *C. gattii* R265 株接種群のみで発現亢進を示す遺伝子

Fold Change	Gene symbol	Gene name
4.086896	Pgk1	3-phosphoglycerate kinase
4.081602	Tnc	tenascin C
3.872107	Slc7a2	solute carrier family 7
3.501668	Tfp2	tissue factor pathway inhibitor 2
3.413169	Igf1	insulin-like growth factor 1
3.384405	Rgs5	regulator of G-protein signaling 5
3.33342	Gla	galactosidase, alpha
3.318258	Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6
3.199664	Emilin2	elastin microfibril interfacer 2
3.190153	Plau	plasminogen activator, urokinase
3.168624	F7	Factor VII heavy chain
3.116015	Acp5	acid phosphatase 5, tartrate resistant
3.090891	Tfrc	transferrin receptor
3.044305	Col5a2	collagen, type V, alpha 2
2.992885	Clcn5	chloride channel 5
2.968399	LOC100046344	Uncharacterized gene
2.932586	Tfrc	transferrin receptor
2.932041	Grina	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate-associated protein 1
2.885918	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III
2.849255	Rnf128	ring finger protein 128

せながら増殖するものと推測された。すなわち、*C. gattii* は肺胞上皮への高い接着能を有している可能性が示唆された。

この仮説を検証すべく、我々は DNA マイクロアレイ法を用いて気道感染モデルマウスにおける遺伝子の発現変動を確認し、各種解析を行った。各遺伝子に設定された“flag”を用いて二次抽出を行いデータの信頼性を高めた上で、*C. neoformans* H99 株接種群、*C. gattii* 5815 株接種群、ならびに *C. gattii* R265 株接種群接種群で log₂2 倍以上の発現亢進を示す遺伝子の molecular function を検索した結果、いずれも binding が最も多い結果となった。さらに、北米大陸アウトブレイク株である、*C. gattii* R265 株接種群接種群のみで log₂2 倍以上の発現を示す遺伝子は値の大きい順に、Pgk, Tnc, Slc7a2 であった。最も発現変動の大きい Pgk がコードする 3-phosphoglycerate dehydrogenase は解糖系の中間代謝産物 3-phosphoglycerate からセリンを合成する最初の反応を触媒する酵素であり、肺の基本構築の破綻に伴う嫌気的条件を反映している可能性が示唆された。さらに、ヒト上皮性悪性腫瘍においてはセリンプロテアーゼ阻害剤が接着因子の分解抑制機能を有し

ている事実を考慮するとセリン合成酵素である 3-phosphoglycerate dehydrogenase は肺胞上皮細胞と菌体の接着能に関与する可能性が示唆された。また、Tnc がコードする tenascin C は組織修復機能を有している事が報告されており、*C. gattii* 接種群における肺基本構築の著しい破綻を反映しているものと推測された。さらに、Slc7a2 がコードする solute carrier family 7 は抗炎症機能を有しているとの報告もあり、*C. gattii* が組織球を介した細胞間相互作用を誘導させ難い原因の 1 つである可能性が示唆された。今後、検索し得た遺伝子が我々の提唱する仮説とどのように関係しているのか、さらなる検索が必要である。

E. 結論

肺内で増殖する *C. gattii* は *C. neoformans* とは大きく異なる感染病態を惹起させる。具体的には、*C. gattii* は既存の肺胞構造を破綻させながら増殖するが、生体防御反応を誘導させにくい特徴を有していると推測された。さらに、網羅的遺伝子解析により、*C. gattii* の病原性への関与が示唆される候補遺伝子を抽出した。

本研究により得られたガッティ型クリプトコックス症の感染病態に関する基礎的な知見は今後、ヒト組織材料で病理組織学的に観察された病変の質的評価の一助となる。すなわち、ガッティ型クリプトコックス症の客観的な予後予測や診断・治療法の確立に貢献すると同時に、将来的にガイドライン等の収載において、当該領域における情報提供に資する事が期待できる。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

論文発表 (英文)

1. Zhi Y, Sasai D, Okubo Y, Shinozaki M, Nakayama H, Yamagata Murayama S, Wakayama M, Ide T, Zhang Z, Shibuya K. Comparison between the effectiveness of polymerase chain reaction and in situ hybridization in detecting the presence of pathogenic fungi by using the preserved DNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Jpn J Infect Dis.* 66:173-179,2013.
2. Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Jpn. J.Infect. Dis.* 66:216-221, 2013.
3. Okubo Y, Ishiwatari T, Izumi H, Sato F, Aki K, Sasai D, Ando T, Shinozaki M, Natori K, Tochigi N, Wakayama M, Hata Y, Nakayama H, Nemoto T, Shibuya K. Pathophysiological implication of reversed CT halo sign in invasive pulmonary mucormycosis: a rare case report. *Diagnostic Pathology* 17:82 (online journal), 2013.
4. Oda M, Saraya T, Wakayama M, Shibuya K, Ogawa Y, Inui T, Yokoyama E, Inoue M, Shimoyamada H, Fujiwara M, Ota T, Takizawa H, Goto H. Calcium oxalate crystal deposition in a patient with Aspergilloma due to *Aspergillus niger*. *J Thorac Dis.* 5:E174-178, 2013.
5. Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y, Yamaguchi H, Shibuya K. How histopathology can contribute to an understanding of defense mechanisms against cryptococci. *Mediators Inflamm.* 465319 (online journal), 2013.
6. Tochigi N, Okubo Y, Ando T, Wakayama M, Shinozaki M, Gocho K, Hata Y, Ishiwatari T, Nemoto T, Shibuya K. Histopathological implications of *Aspergillus* Infection in Lung. *Mediators Inflamm.* 809798 (online journal), 2013.
7. Ishiwatari T, Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Kobayashi J, Shinozaki M, Aki K, Sasai D, Yamamoto Y, Nakayama H, Shibuya K. Remodeling of the pulmonary artery induced by metastatic gastric carcinoma: a histopathological analysis of 51 autopsy cases. *BMC Cancer*, in press

著書 (和文)

1. 秋山一男, 大久保陽一郎, 太田利子, 久米田裕子, 坂元 仁, 渋谷和俊, 高鳥浩介, 高橋淳子, 田中真紀, 土戸哲

明, 椿 和文, 村松芳多子, 森永 力, 森山康司, 渡辺麻衣子. カビのはなし ミクロな隣人のサイエンス (高鳥浩介, 久米田裕子 編) ,pp86-95 (株) 朝倉書店, 東京, 2013

学会発表

国際学会

1. Tochigi N, Ando T, Shinozaki M, Ishiwatari T, Okubo Y, Wakayama M, Nemoto T, Shibuya K. Histological analysis of Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis. 2013 Congress of Asia Pacific Society for Medical Mycology, June 19-23, Chengdu, China
2. Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Shinozaki M, Ishiwatari T, Sasai D, Tochigi N, Hasegawa C, Mitsuda A, Nemoto T, Nakayama H, Shimodaira K, Yamamoto Y, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Difference in pathophysiology of experimental cryptococcosis between *C. gattii* and *C. neoformans*. 2013 Congress of Asia Pacific Society for Medical Mycology, June 19-23, Chengdu, China
3. Wakayama M, Shimodaira K, Nakayama H, Shinozaki M, Okubo Y, Ishiwatari T, Tochigi N, Hasegawa C, Mitsuda A, Nemoto T, Shibuya K. Age-Related Analysis of Autopsy Cases in Toho University on the prevalence of Invasive

Fungal Infections. 2013 Congress of Asia Pacific Society for Medical Mycology, June 19-23, Chengdu, China

4. Ishiwatari T, Okubo Y, Izumi H, Sato F, Sasai D, Ando T, Shinozaki M, Natori K, Yamamoto Y, Tochigi N, Hasegawa C, Wakayama M, Hata Y, Nakayama H, Nemoto T, Shibuya K. Pathophysiological Implication of Reversed CT Halo Sign in Invasive Pulmonary Mucormycosis: A rare Case Report. 2013 Congress of Asia Pacific Society for Medical Mycology, June 19-23, Chengdu, China

国内学会

1. 磯部和順, 秦 美暢, 鏑木教平, 小林 紘, 坂本 晋, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 高木啓吾, 本間 栄. 間質性肺炎 (IP) 合併肺癌の 2nd line 化学療法における治療後急性呼吸障害の検討. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会, 4 月 19-21 日, 2013 年, 東京.
2. 山本 愛, 磯部和順, 鏑木教平, 菊池直, 坂本 晋, 高井雄二郎, 秦 美暢, 渋谷和俊, 高木啓吾, 本間 栄. EGFR-TKI 中止後の急激な病勢増悪 (disease flare) の臨床的検討. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会, 4 月 19-21 日, 2013 年, 東京.
3. 根本哲生, 山本慶郎, 谷島 聡, 石渡 誉郎, 笹井大督, 大久保陽一郎, 栃木直文, 長谷川 千花子, 密田亜希, 若山 恵, 島田英昭, 渋谷和俊. 食道扁平上皮癌早期癌における DNA メチル化の網羅的解析. 第 102 回日本病理学会

- 総会, 6月6-8日, 2013年, 札幌.
4. 山本慶郎, 根本哲生, 石渡誉郎, 笹井大督, 大久保陽一郎, 宅間健介, 栃木直文, 長谷川千花子, 密田亜希, 岡野直樹, 若山 恵, 五十嵐良典, 渋谷和俊. 内視鏡的に切除された十二指腸乳頭部腫瘍の病理学的検討. 第102回日本病理学会総会, 6月6-8日, 2013年, 札幌.
 5. 石渡誉郎, 大久保陽一郎, 根本哲生, 若山 恵, 山本慶郎, 笹井大督, 栃木直文, 長谷川千花子, 密田亜希, 横瀬智之, 島田英昭, 五十嵐良典, 渋谷和俊. 癌細胞関連肺動脈構造変化に関する病理学的研究. 第102回日本病理学会総会, 6月6-8日, 2013年, 札幌.
 6. 若山 恵, 下平佳代子, 中山晴雄, 篠崎 稔, 大久保陽一郎, 笹井大督, 石渡誉郎, 職 玉珠, 栃木直文, 長谷川千花子, 密田亜希, 根本哲生, 渋谷和俊. 当院剖検例を用いた侵襲性真菌症の疫学的検討: 危険因子としての加齢の影響. 第102回日本病理学会総会, 6月6-8日, 2013年, 札幌.
 7. 栃木直文, 安藤常浩, 篠崎 稔, 石渡誉郎, 笹井大督, 大久保陽一郎, 若山恵, 根本哲生, 澁谷和俊. 慢性壊死性肺アスペルギルス症の病理組織学的検討. 第102回日本病理学会総会, 6月6-8日, 2013年, 札幌.
 8. 大久保陽一郎, 根本哲生, 栃木直文, 石渡誉郎, 笹井大督, 下平佳代子, 山本慶郎, 長谷川千花子, 密田亜希, 若山 恵, 青山 肇, 大倉康男, 桂 奏, 藤井丈士, 西上隆之, 横瀬智之, 渋谷和俊. 多施設共同研究によるgangliocytic paragangliomaの生物学的特性の解明. 第102回日本病理学会総会, 6月6-8日, 2013年, 札幌.
 9. 鍋木教平, 佐藤敬太, 関谷宗之, 佐野剛, 杉野圭史, 磯部和順, 坂本 晋, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 本間 栄. BCG膀胱内還流療法施行後、粟粒結核様所見を呈した全身性反応性肉芽腫の1例. 第204回日本呼吸器学会関東地方会, 5月25日, 2013年, 東京.
 10. 澁谷和俊. 医真菌: 技師にできること、医師にできること. 第34回関東医真菌懇話会ランチョンセミナー, 6月1日, 2013年, 東京.
 11. 澁谷和俊. 真菌感染症の今日の問題 - 疫学・診断・治療から研究的知見まで -. 1. 病理からみる侵襲性アスペルギルス症・侵襲性糸状菌症. 第87回日本感染症学会学術講演会. 第61回日本化学療法学会総会合同学会, 6月5-6日, 2013年, 横浜.
 12. 澁谷和俊. 真菌感染症の病理. 第102回日本病理学会総会ランチョンセミナー4, 6月6日, 2013年, 札幌.
 13. 高橋りえ, 清水雅子, 稲毛麻弥, 田辺なおみ, 篠崎 稔, 井手 忠, 栃木直文, 若山 恵, 渋谷和俊. 体腔液細胞診検体を用いたセルブロック標本の有用性に関する研究. 第54回日本臨床細胞学会総会(春期大会), 6月2日, 2013年, 東京.
 14. 下平佳代子, 若山 恵, 澁谷和俊, 佐地 勉. 実験的PAHモデルマウスの遺伝子発現変動解析によるヒト特異性PAHの病態関連因子の探索. 第2回日本肺循環学会学術集会, 6月22-23日, 2013年, 東京.
 15. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎稔, 宮崎義継, 山本 修平, 根本哲生, 若山恵, 栃木直文, 石渡誉郎, 中山晴雄,

下平佳代子, 安藝恭子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 渋谷和俊. ガッティ型肺クリプトコックス症に関する感染防御機構ならびに病原因子の解析. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会, 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.

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

16. 若山恵, 下平佳代子, 中山晴雄, 篠崎稔, 大久保陽一郎, 石渡誉郎, 二本柳康博, 栃木直文, 長谷川千花子, 密田亜希, 根本哲生, 渋谷和俊. 東邦大学病理剖検例を用いた侵襲性真菌症発生動向と加齢の及ぼす影響について—侵襲臓器を中心として—. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会, 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.
17. 安藝恭子, 篠崎稔, 大久保陽一郎, 石渡誉郎, 栃木直文, 若山恵, 渋谷和俊. 本邦におけるアスペルギルス症発症に関与する遺伝子多型の解析. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会, 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.
18. 篠崎稔, 栃木直文, 中山晴雄, 大久保陽一郎, 石渡誉郎, 若山恵, 村山そう明, 根本哲生, 渋谷和俊. 慢性型肺アスペルギルス症における細胞診断材料を用いた菌要素の検出に関する検討. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会, 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.
19. 栃木直文, 安藤常浩, 篠崎稔, 石渡誉郎, 大久保陽一郎, 後町杏子, 秦美暢, 村山そう明, 若山恵, 根本哲生, 渋谷和俊. 慢性壊死性肺アスペルギルス症の病理組織学的検討. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会, 9 月 27-28 日, 2013 年, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

本邦で初めて分離された *Cryptococcus gattii* VGIIa JP01 株の細胞表層多糖の構造解析

研究分担者 杉田 隆 明治薬科大学微生物学教室

研究協力者 張 音実 明治薬科大学微生物学教室

研究協力者 池田 玲子 明治薬科大学感染制御学教室

研究協力者 市川 智恵 明治薬科大学感染制御学教室

研究要旨

カナダ・バンクーバー島で集団発生した *C. gattii* 感染症の優位な遺伝子型は VGIIa 型である。本年度は、昨年度に続き特筆すべき渡航歴のない日本人から本邦で初めて分離された VGIIa 株の莢膜多糖の化学構造を検討した。VGIIa, b, c 株の莢膜多糖の ¹H-NMR スペクトルは、非常に類似していたが、JP01 株は他の株と細部で差異がある可能性が示された。また、VGIIa 株間の糖組成は、JP01 株とバンクーバー-R265 株は類似したがその他の VGIIa 株とはキシロース含量が異なっていた。以上、免疫応答に重要な莢膜多糖の化学構造では、JP01 株は他の株に比べて細部が異なることが示唆された。

A. 研究目的

われわれは 2010 年に特筆すべき渡航歴のない日本人での初の *Cryptococcus gattii* VGIIa 型の感染例を報告した。*Cryptococcus* spp. の免疫応答には細胞表層多糖が重要な役割を担っている。そこで本年度は本邦初の *Cryptococcus gattii* VGIIa 型感染症患者から分離した菌株 (JP01 株) の細胞表層多糖を解析した。

B. 研究方法

1) 莢膜多糖の ¹H-NMR スペクトル：2% グルコースおよび 1% カザミノ酸を含む Yeast

nitrogen base 培地で JP01 株を培養した。対照として、R265 (VGIIa)、M9030 (VGIIa)、VGIIb 株および VGIIc 株もあわせて用いた。各々の遺伝子型は MLST 法により再確認した。菌体を加熱後、上清を水で透析し、EtOH/AcOH (9:1, v/v) で粗多糖を得た。これを脱アセチル化して

Sodium

4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulphonate を内部標準物質として 400 MHz の ¹H-NMR スペクトルを測定した。

2) 莢膜多糖の糖組成分析：サンプルに 4 M

Trifluoroacetic acid を添加し、100°C で 3 時間の処理を行うことにより酸加水分解をおこなった。次に、無水酢酸を用いて N-アセチル化を行い、ABEE 化試薬にて蛍光標識を行い、これを分析に供した

C. 研究結果

1) 莢膜多糖の ¹H-NMR スペクトル (Fig. 1) : NMR スペクトル分析から JP01 株を含めて供した全株に O-アセチル基の存在が確認された。また *C. gattii* に特徴的なマンノース残基、キシロース/グルクロン酸およびキシロースも観察された。スペクトルの帰属はされていないが 5.30 ppm のケミカルシフトの強度が JP01 株が R265 株に比べると若干低かった。また、M9030 株も MLST 解析で VGIIa であることを確認した。この株は 5.44 ppm のシフトが出現するのに対して、JP01 株では出現していなかった。

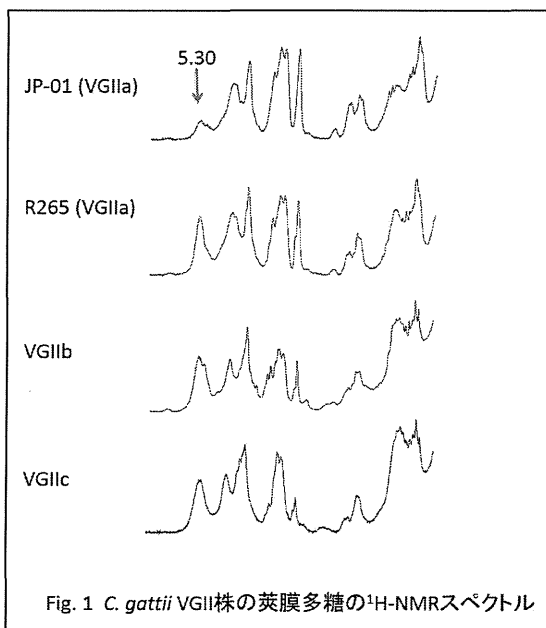


Fig. 1 *C. gattii* VGII株の莢膜多糖の¹H-NMRスペクトル

2) 莢膜多糖の糖組成分析 : Mannose、Xylose、Glucuronic acid、Glucose および Galactose が検

出されたが、主要な構成糖は前 3 糖であった (Fig. 2)。Mannose を 1 とした時の構成糖のモル比は、JP01 株と R265 株はほぼ同じで、Man:Xyl:GlcA=1:1:0.2 であった。しかし、M9030 株は Man:Xyl:GlcA=1:0.75:0.2 だったことから JP01 株は M9030 株より Xylose 含量が少なかった。

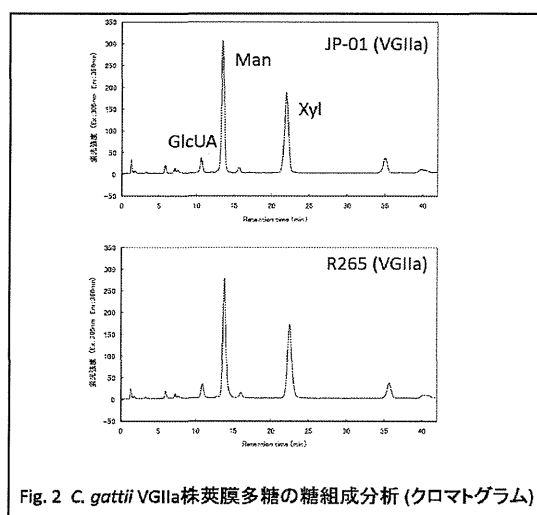


Fig. 2 *C. gattii* VGIIa株莢膜多糖の糖組成分析 (クロマトグラム)

D. 考察

昨年度に続き、本邦初の *C. gattii* VGIIa 感染患者から分離した JP01 株の莢膜多糖の化学構造の解析を行った。¹H-NMR スペクトル解析は莢膜多糖の化学構造を反映し、その構造的類似性あるいは差異を容易に推定することができる。JP01 株と他の VGII 株は非常にスペクトルが類似していたが、特定のケミカルシフト部分で差異が認められた。また糖組成についても VGIIa 株間では差異がみられたことから同じ血清型 B でも微細構造レベルでは多少の差異があることが推定された。本構造と免疫応答の関係が興味のあるところである。