

- 会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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, 札幌.
 15. 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.
 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, 札幌.
 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, 東京.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.

24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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. B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.
29. 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.
30. 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. 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.
31. 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.
32. 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ズマ属の検出. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
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. 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.
35. 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.
36. 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.
 37. 堀内一宏, 山田萌美, 加納崇裕, 金子幸弘, 秋本幸子, 秋沢宏次, 梅山 隆, 大野秀明, 矢部一郎, 宮崎義継, 佐々木秀直. *Cryptococcus gattii*によるクリプトコッカス症の1例. 第16回日本神経感染症学会学術集会. 11月4-5日, 2011年.
 38. 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.
 39. 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.
 40. 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. 1月21-22日, 2012年, 横浜.
 41. 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.
 42. 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. アンダー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.
 43. 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 山越智, 知花博治, 宮崎義継. キャンディン耐性*Candida glabrata*株の遺伝子解析. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
 44. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* Mps1 キナーゼのケミカルジェネティクスによる解析. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
 45. 三原 智, 泉川公一, 井手昇太郎, 平野勝治, 岩永直樹, 峰松明日香, 細萱直希, 田中章貴, 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. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
 46. 金城雄樹, 樽本憲人, 笹井大督, 篠崎稔, 大川原明子, 上野圭吾, 前崎繁文, 渋谷和俊, 宮崎義継. 自然リンパ球の活性化を介した播種性カンジダ症マウスモデルの免疫学的解析. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
 47. 上野圭吾, 大川原明子, 山越 智, 中崇, 梅山 隆, 樽本憲人, 大野秀明, 土江松美, 藤原永年, 金城雄樹, 宮崎義継. *Candida albicans*の細胞壁マンナンによる炎症性サイトカインの誘導- β -1,2-マンノシドの抑制的関与について. 真菌症フォーラム第13回学術集会.

- 2月18日, 2012年, 東京.
48. 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. 2月18日, 2012年, 東京.
49. 大野秀明, 宮崎義継. シンポジウム「深在性真菌症、病像の背景を探る」、ミニレクチャー「注意したいクリプトコックス症」. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
50. 井口光孝, 杉浦奈々, 杉浦一充, 大野秀明, 宮崎義継, 八木哲也. 院内発症の蜂窩織炎として顕在化した全身性クリプトコックス症の一例. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
51. 大久保陽一郎, 大野秀明, 篠崎 稔, 宮崎義継, 若山 恵, 笹井大督, 中山晴雄, 石渡誉郎, 職 玉珠, 田辺公一, 金子幸弘, 山越 智, 梅山 隆, 渋谷和俊. *Cryptococcus gattii*感染症におけるマウス肺の病理組織学的解析. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 町田安孝, 福島康次, 三好祐頭, 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. 上野圭吾, 金城雄樹, 大川原明子, 山越 智, 中 崇, 梅山 隆, 樽本憲人, 大野秀明, 土江松美, 藤原永年, 宮崎義継. サイトカイン産生誘導における *Candida albicans*マンナン抗原の作用・β-1,2-マンノシドがもたらす抑制的

- 作用について. 真菌症フォーラム 第14回学術集会. 2月16日, 2013年, 東京.
83. 大野秀明, 宮崎義継. 真菌感染症について. 平成24年度希少感染症診断技術研修会. 2月27日, 2013年, 東京.
84. 金子幸弘, 宮崎義継. 重篤な真菌感染症. 知の市場. 5月28日, 2013年, 東京.
85. 大野秀明, 宮崎義継. 中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩-真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断- (シンポジウム). 第54回日本神経学会学術大会. 5月29-6月1日, 2013年, 東京.
86. 金子幸弘, 宮崎義継. リアルタイム観察によるカンジダバイオフィルムに対するミカファンギンの効果の解析. 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 . 6月5-6日, 2013年, 横浜.
87. 細萱直希, 宮崎泰可, 田辺公一, 武田和明, 吉田将孝, 井手昇太郎, 平野勝治, 峰松明日香, 永吉洋介, 森永芳智, 中村茂樹, 今村圭文, 泉川公一, 掛屋弘, 柳原克紀, 宮崎義継, 田代隆良, 河野 茂. *Candida glabrata*において鉄欠乏がアゾール系抗真菌薬感受性を誘導する分子生物学的機序の解明. 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 . 6月5-6日, 2013年, 横浜.
88. 金城雄樹, 樽本憲人, 北野尚樹, 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. 細菌・カンジダ共感染モデルでの真菌感染増悪におけるNKT細胞の関与. 第24回日本生体防御学会学術総会. 7月10-12日, 2013年, 熊本.
89. 宮崎義継, 砂川富正, 大石和徳. パネ
ルディスカッション 病原体サーベイランスの現状と課題 「国立感染症研究所の立場から」. 衛生微生物技術協議会第34回研究会. 7月11-12日, 2013年, 名古屋.
90. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木 稔, 金子幸弘, 金城雄樹, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus*のPolo-likeキナーゼは菌糸伸長と分生子形成を制御している. 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.
91. 金城雄樹, 樽本憲人, 笹井大督, 大川原明子, 上野圭吾, 篠崎 稔, 渋谷和俊, 前崎繁文, 宮崎義継. 細菌・カンジダ共感染マウスモデルを用いた真菌感染増悪機構の免疫学的解析. 第57回日本医真菌学会総会. 9月27-28日, 2013年, 東京.
92. 樽本憲人, 金城雄樹, 大川原明子, 上野圭吾, 宮崎義継, 前崎繁文. 全身性*Candida albicans*感染症におけるiNKT細胞の役割. 第57回日本医真菌学会総会. 9月27-28日, 2013年, 東京.
93. 浦井 誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans*のアゾール感受性に対する併用薬の影響と作用機構に関する検討. 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.
94. 名木 稔, 田辺公一, 中山浩伸, 梅山隆, 山越 智, 知花博治, 梶原 将, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida glabrata*におけるABCタンパク質Aus1pの細胞外ステロール取り込みと病原性における役割. 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.
95. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山

隆, 山越 智, 名木 稔, 知花博治, 亀井克彦, 宮崎義継. 日本のキャンディン耐性カンジダの現状. 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.

96. 大野秀明, 大久保陽一郎, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii*感染書の病態解析 (シンポジウム4). 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.
97. 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, 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.
98. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木 稔, 金子幸弘, 金城雄樹, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus*のMps1キナーゼは正常な核の分裂に必要である. 第7回アスペルギルス研究会. 9月7日, 2013年, 東京.
99. 金城雄樹, 金子幸弘, 朴 貞玉, 川上和義, 大石和徳, 宮崎義継. 肺炎球菌蛋白・糖脂質併用ワクチンのマウスモデルによる評価. 第62回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第60回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 10月30-11月1日, 2013年, 東京.
100. 渡邊祐里絵, 宮坂智充, 石井恵子, 金城雄樹, 宮崎義継, 大石和徳, 川上和義. 肺炎球菌莢膜多糖ワクチンによるDectin-2依存的なNKT細胞活性化と抗体産生. 第62回日本感染症学会東日本

地方会学術集会・第60回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 10月30-11月1日, 2013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

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

総合研究報告書

*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 榎村 浩一 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 帝京大学医学部 宇宙医学研究室 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 北米大陸での集団発生の報告を皮切りに、近年 *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) がクリプトコックス症の起原菌として注目されている。研究分担者らは、異なる毒力を有するクリプトコックス属菌 (*C. gattii* TIMM4097、TIMM4903、5815株、R265株、*C. neoformans* TIMM4920、TIMM4922、ならびにH99株) を用いた肺クリプトコックス症モデルマウスを作成し、診断・治療の開発のための重要な基盤となる情報である *C. gattii* の毒力規定因子ならびに感染病態の解明を目的とした研究を遂行した。

その結果、菌株の肺胞上皮への高い接着能が *C. gattii* 特有の毒力規定因子である可能性が示唆された。また、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こと、強毒株 *C. gattii* ではこれらの特徴がより顕在化していることを明らかとした。

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、近年その起原菌として *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

C. gattii 特有の毒力規定因子の一端を

解明すべく、国内動物園飼育下のコアラに由来し、帝京大学医真菌研究センターにて同定・保存された9菌株 (*C. gattii* TIMM 4097、TIMM4901-4906、*C. neoformans* TIMM4920ならびにTIMM4922)を実験に供した。この中で、毒力の異なる*C. gattii* 2株 (TIMM4097・TIMM4903)を用いた肺クリプトコックス症モデルマウスを作成したが、その際には5週齢の雄性ICRマウスを使用した。

次いで、*C. neoformans*感染症と*C. gattii*感染症の相違点を明らかにすべく、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菌株を実験に供した。これらの菌株を用いた肺クリプトコックス症モデルマウスの作成時には9週齢の雌性C57BL/6Jマウスを使用した。

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、培地の混濁度を3段階(−, ±, +)で評価した。

3) 37°C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。具体的な方法は以下の通り。

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。

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。

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。

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

C. gattii TIMM4097ならびにTIMM4903を用いた実験では、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0.75mを50μlの生理食塩水に添加した作製したミクスチャー60ml/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 $20 \mu\text{l}$ (5×10^5 cells/mouse) をマイクロピペットにて鼻腔内に滴下・接種し、接種後 100 日間の状態を確認した。

C. neoformans H99 株、*C. gattii* 5815 株 (VG I 型)、*C. gattii* R265 株を用いた実験では -80°C で凍結保存された各菌株を 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 $50 \mu\text{l}$ ($3.0\text{--}8.0 \times 10^3$ 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。

いずれの実験においても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。

4 *C. gattii* の分子型検索

対象は *C. gattii* TIMM4097 ならびに TIMM4901-4906 の計 7 菌株であり、multilocus sequence typing (MLST) 型解析を用いてそれぞれの分子型を検索した。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 $500 \mu\text{l}$ 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、の 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、分子型を決定した。

5 病理組織学的解析

1) 標本作成

C. gattii TIMM4097 ならびに TIMM4903 を用いた実験では接種後 5、10、15、30 日目に 5 匹ずつ、屠殺・剖検した。

C. neoformans H99 株、*C. gattii* 5815 株、ならびに *C. gattii* R265 株を用いた経気道感染モデルマウスに関しては接種後 14 日目に 7 匹ずつ屠殺・剖検した。いずれの実験においても、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 $4\text{--}5 \mu\text{m}$ 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。

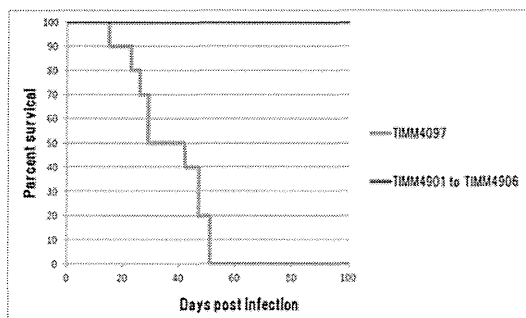
2) 画像解析による肺の構造変化の分析

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。測定された平均値の有意差検定は Mann-Whitney U 検定あるいは一元配置分散分析法 (One-way Analysis of variance: One-way ANOVA)、標準偏差の有意差検定は、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

対象は *C. gattii* TIMM4097 ならびに TIMM4903 を用いた肺クリプトコックス症モデルマウス肺。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、

図1. *C. gattii* TIMM4097、TIMM4901-4906接種後の生存曲線



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。

4) 画像解析による多核巨細胞の分析

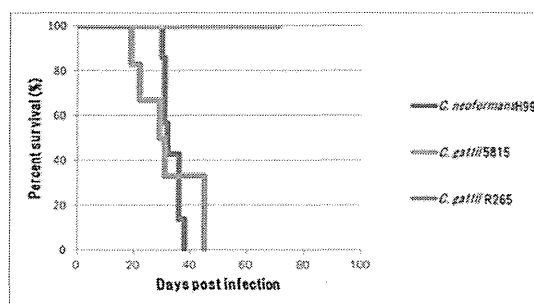
対象は *C. neoformans* H99 株、*C. gattii* 5815 株、ならびに *C. gattii* R265 株を用いた肺クリプトコックス症モデルマウス肺。各個体の PAS 染色を施した肺組織切片上で、単位面積当たりの多核巨細胞数、個々の多核巨細胞に含まれる核数を計測した。次いで核数を個々の多核巨細胞の面積で除した値を計測し、多核巨細胞 細胞質内核密度とした。測定された各値の有意差検定は、ANOVA 検定を用いて検定し、 $p < 0.05$ を以って有意差ありと判定した。

4 網羅的発現遺伝子変動の解析

各菌株接種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

図2. *C. neoformans* H99株、*C. gattii* 5815 15株ならびにR265株接種後の生存曲線



伝子の molecular function を調査した。

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、*C. gattii* TIMM4097、TIMM4901-4906、*C. neoformans* TIMM4920ならびにTIMM4922において、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

C. gattii TIMM4097ならびにTIMM4903接種群において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率は100日目まで40%に満たなかった（図1）。

C. neoformans H99株、*C. gattii* 5815株、ならびに*C. gattii* R265株接種群では

図3. *C. gattii* TIMM 4097接種マウス肺組織像

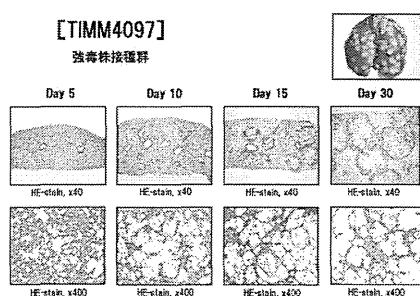
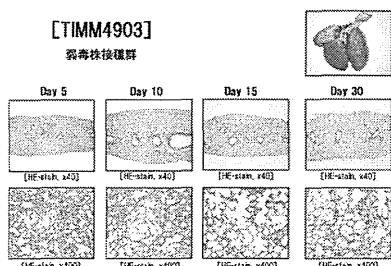


図4. *C. gattii* TIMM 4903接種マウス肺組織像



C. gattii R265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2)。3群間の累積生存率を検定した結果、*C. gattii* 5815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接種群と *C. neoformans* H99接種群の間に有意差は見出せなかった。

3 *C. gattii* の分子型検索

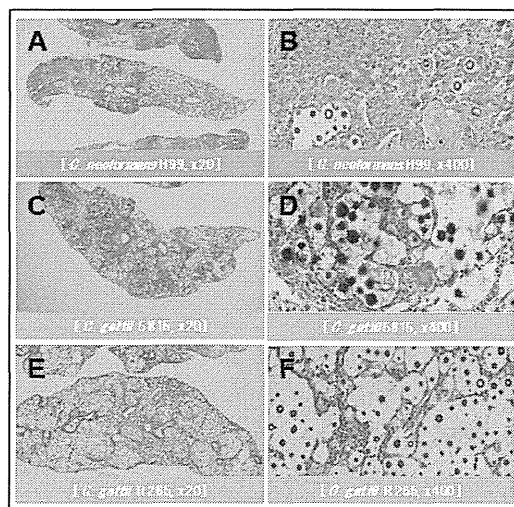
MLST 型解析を用いて分子型を検索した結果、本研究で用いた *C. gattii* TIMM4097ならびに TIMM4901-4906、計7株はいずれも VGI 型であった。

4 病理組織学的解析

1) 肺の病理組織学的所見

C. gattii TIMM4097 接種マウス肺では接種後10日目以降より肺胞腔の拡張とその周囲における重積が目立つようになり、接種後30日目には大型の結節性病変が肺

図5. *C. neoformans* H99株、*C. gattii* 5815株、ならびに R265株接種後14日目の肺組織像

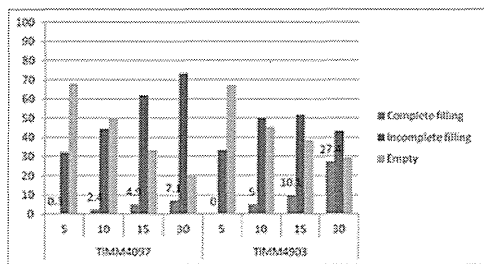


のほぼ全域にみられ、菌体は広範囲に分布し、肺構築変化の破綻が顕著である(図3)。*C. gattii* TIMM4903 接種マウス肺では *C. gattii* TIMM4097 接種群で確認された、肺胞腔内を中心とした著明な菌増殖とそれに伴う肺胞腔の拡張と重積は目立たなかった。一方、*C. gattii* TIMM 4903 接種群にみられた特徴的な所見として、気管支内を主体とした菌分布が、特に接種後10日目以降に確認された(図4)。

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5A)。菌体は結節性病変に局限しており(図5B)、同部では多数かつ大型の多核巨細胞も認められた。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5C)。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5D)。さらに、*C. neoformans* H99 株接種群と比較して多核巨細胞は少数かつ小型であった。

図6. 菌の分布に関する評価



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 5E)。菌体は多数かつ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 5F)。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。

2) 肺交点間距離計測

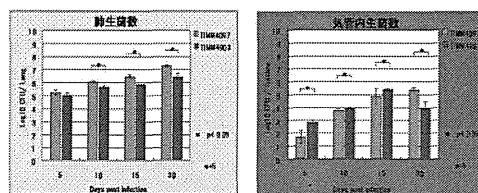
C. gattii TIMM4097 接種群では平均交点間距離が経時的に延長している一方で、*C. gattii* TIMM4903 接種群では延長が目立たない。平均交点間距離ならびにその分散について両群を比較したところ、接種後 15 日目ならびに 30 日目において *C. gattii* TIMM4097 接種群の平均交点間距離が有意に長く、より大きな分散を示した。

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) 菌の分布に関する評価

接種後 10, 15, 30 日目において、充満型の気管支の占める割合は、*C. gattii* TIMM4903 接種群が 5.0%、10.1%、27.4% である一方、*C. gattii* TIMM4097 株接種群では 2.4%、4.9%、7.1% であり、両者ともに感染

図7. 肺ならびに気管支内生菌数



10 日目から 30 日目にかけて漸増傾向を示したが、その程度は TIMM4903 でより著明であった (図 6)。さらに、両株接種後マウスにおける肺および気管内の生菌数を比較した。全観察期間中、肺生菌数は両株接種群ともに経時的な増加を示したが、一貫して *C. gattii* TIMM4097 の肺生菌数が *C. gattii* TIMM4903 よりも多かった。一方、気管内の生菌数では、両株接種群ともに感染 15 日目まで経時的な増加を示したものの、*C. gattii* TIMM4903 と比べて *C. gattii* TIMM4097 の生菌数が少ない傾向を示した (図 7)。

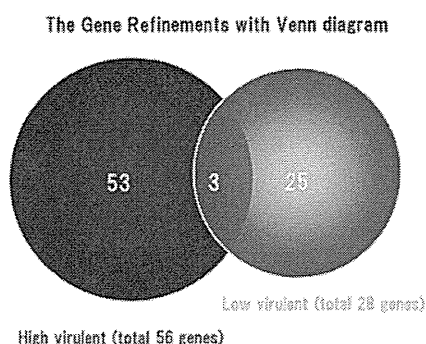
4) 画像解析による多核巨細胞の分析

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)。

5 遺伝子発現変動による解析

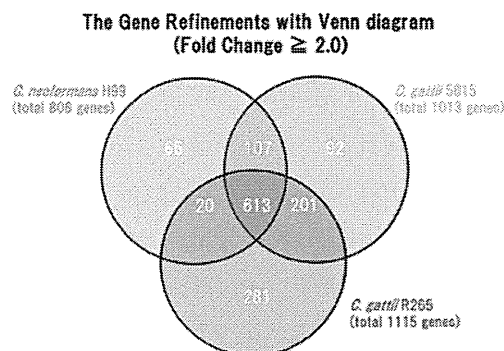
いずれの解析においてもマイクロアレイ法により 45101 遺伝子の発現変動が明らかとなった。これらの遺伝子には実験信頼性

図 8. *C. gattii* TIMM4097 及び 4903 接種群で Log₂ 倍以上の発現亢進を示す遺伝子数



の指標として “flag” が設定 (absent、marginal あるいは present) されており 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 log₂2.0 倍以上の発現を示す遺伝子を抽出した。その結果、*C. gattii* TIMM4097 接種群で 56 遺伝子、*C. gattii* TIMM4903 接種群で 28 遺伝子であり、その内 3 遺伝子が両群に共通していた (図 8)。*C. gattii* TIMM4097 接種群のみで log₂ 2 倍以上の発現を示す 53 遺伝子の molecular function は多い順に、binding : 31 遺伝子、protein binding : 16 遺伝子、catalytic activity : 11 遺伝子であった。さらに、*C. gattii* TIMM4097 接種群のみで log₂ 2 倍以上の発現を示す遺伝子は値の大きい順に、3-phosphoglycerate dehydrogenase (4.4 倍)、resistin like alpha (3.7 倍)、dyskerin (3.0 倍) であった。*C. neoformans* H99 株、*C. gattii* 5815 株、ならびに R265 株接種群でコントロール群と比較して log₂2.0 倍以上の発現を示す遺伝子数は *C. neoformans* H99 接種群で 806 遺伝子、*C. gattii* 5815 接種群で 1013 遺伝子、*C. gattii* R265 接種群で 1115 遺伝子であり 613 遺伝子が 3 群で共通して発現亢進を示していた (図 9)。各菌株接種群のみで Log₂ 2 倍以上の発現亢進を示す遺伝子数は *C. neoformans* H99 株接種群、

図 9. *C. neoformans* H99 株、*C. gattii* 5815 株及び R265 株接種群で Log₂ 2 倍以上の発現亢進を示す遺伝子数



C. gattii 5815 株接種群、*C. gattii* R265 株接種群それぞれで 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 を調査した結果、いずれの接種群においても binding に関する遺伝子が最も多い結果となった。また、*C. gattii* R265 接種群のみで log₂ 2 倍以上の発現を示す遺伝子は値の大きい順に、Pgk1 (4.09 倍)、Tnc (4.08 倍)、Slc7a2 (3.87 倍) であった。

D. 考察

本研究では先ず国内動物園飼育下のコアラに由来するクリプトコックス属菌 9 菌株を用いて、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ついて比較したが、用いた菌株間で有意な差を見出せなかった。一方、各菌株の経鼻接種マウスの死亡率は大きく異なっており、特に *C. gattii* TIMM4097 接種群は他の *C. gattii* 菌株接種群と比較して死亡率が有意に高い。その原因が異なる分子型による可能性を考慮し、*C. gattii* 7 菌株に対して MLST 型解析を行なったがいずれも VGI 型であった。以上の結果より、同一分子型 (VGI 型) *C. gattii* の菌株間においても感染致死毒力が大きく異なることが明らかとなり、分子型

は必ずしも毒力を規定する因子では無いことが明らかとなった。より詳細に毒力規定因子を検討すべく、*C. gattii* TIMM4097 ならびに TIMM 4903 の肺クリプトコックス症モデルマウスを作成し、病理組織学的検索を行った。特にここでは、肺胞の拡張や隔壁の重積などの構築改変の客観的指標として、任意に設定した線分との交点間の線分上での距離の平均と分散を求めて、比較を行った。この結果、強毒株である *C. gattii* TIMM4097 接種群は *C. gattii* TIMM4903 接種群よりも平均交点間距離が有意に長く、より大きな分散を示した。すなわち、*C. gattii* TIMM4097 接種群では時間経過に伴って肺胞腔の拡張と重積が進行したと考えられる。一方、菌の分布に関する評価、肺内ならびに気管内生菌数の測定結果はいずれも *C. gattii* TIMM4903 が肺胞より気管支に分布しやすいことを示唆している。以上の所見より、*C. gattii* TIMM4097 が肺胞腔に留まり易く、同部に留まってその構造を破綻させながら増殖するが、*C. gattii* TIMM4903 は比較的容易に肺胞から気管支へ移動するため、肺胞構造の変化に乏しく、気管内分布が目立ち、気管内生菌数も多くなったと推測した。すなわち、菌株の肺胞上皮への接着能の相違が感染致死毒力規定因子の 1 つである可能性が示唆された。

次いで、研究分担者らは *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* の毒力規定因子の解明のみならず、*C. gattii* 感染症と *C. neoformans* 感染症の相違点の抽出を試みた。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 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。北米大陸における集団発生の起菌である *C. gattii* R265 株と、通常は易感染性宿主に重篤な感染症を発症させる *C. neoformans* H99 株が同じ死亡率を示した理由として、死亡に至る過程が異なるからであると考えられた。すなわち、*C. gattii* R265 株接種群では肺胞腔内で菌体が増殖し、肺構築改変が進行することで肺呼吸面積が減少したのに対して、*C. neoformans* H99 株接種群では菌に対する生体反応として防御担当細胞（大食細胞）が動員される事で肺呼吸面積が減少したからであるためと推測された。以上の所見より、*C. gattii* と *C. neoformans* 感染症では異なる感染病態が惹起される可能性が示唆された。

また、感染モデルマウス肺を比較したところ、*C. gattii* 接種マウス肺はいずれも *C. neoformans* 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。さらに、*C. gattii* 接種群はいずれも *C. neoformans* 接種群よりも平均交点間距離が有意に長く、より大きな分散を示した。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* よりも肺胞腔に留まり易く、同部に留まってその基本構築を破綻させながら増殖するものと推測された。すなわち、本実験からも *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。

一方、菌体に対する宿主認識能の客観的指標として感染モデルマウス肺における単位面積あたりの多核巨細胞数、多核巨細胞に含まれる核数、多核巨細胞 細胞質内核密度を比較した。これら項目はいずれも多核巨細胞の成熟度を反映するが、本研究ではいずれの解析においても *C. gattii* 接種群

では *C. neoformans* 接種群よりも未熟な多核巨細胞が出現することを支持していた。さらに、*C. gattii* 5815 接種群よりも *C. gattii* R265 接種群の多核巨細胞がより未熟であった。

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* よりも肺構築改変を来し易く、大食細胞を介した細胞間相互作用を発生させ難いこと、*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。

この仮説を検証すべく、我々はマイクロアレイ法による遺伝子の発現変動を確認し、各種解析を行った。その結果、北米大陸アウトブレイク株である *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、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 は肺胞上皮と菌体の接着能に関与す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

異なる毒力を有する菌株を用いた肺クリプトコックス症モデルマウスを検索した結果、菌体の肺胞上皮への高い接着能が *C. gattii* 特有の毒力規定因子である可能性が

示唆された。

さらに、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。加えて、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. Nagayoshi M, Tada Y, West J, Ochiai E, Watanabe A, Toyotome T, Tanabe N, Takiguchi Y, Shigeta A, Yasuda T, Shibuya K, Kamei K, Tatsumi K. Inhalation of *Stachybotrys chartarum* Evokes Pulmonary Arterial Remodeling in Mice, Attenuated by Rho-Kinase Inhibitor. *Mycopathologia*. 172: 5-15, 2011.
2. Takahashi H, Yokoyama Y, Terajima F, Hasegawa K, Suguro T, Shibuya K, Wada A. Isolated neck extensor myopathy causing a dropped head: a case report. *Journal of Orthopaedic*

- Surgery. 19:104-107, 2011.
3. Okubo Y, Shibuya K, Namiki A, Takamura K, Kameda N, Nemoto T, Mitsuda A, Wakayama W, Shinozaki M, Hiruta N, Kitahara K, Ishiwatari T, and Yamazaki J. Leiomyosarcoma with partial rhabdomyoblastic differentiation: First case report of primary cardiac origin. *BMC Cancer*. 11: 76 (online journal), 2011.
 4. Wakui N, Iida K, Kanayama M, Nagai H, Watanabe M, Ishii K, Kudo T, Kaneko H, Shibuya K, Sumino Y. Splenic artery aneurysm that gradually increased in size over 4 years until threatening rupture. *J Med Ultrasonics*. 38:167-171, 2011.
 5. Shimamura T, Kubota N, Nagasaka S, Suzuki T, Mukai H, Shibuya K. Establishment of a Novel Model of Onychomycosis in Rabbits for Evaluation of Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 55:3150-3155, 2011.
 6. Isobe K, Nagata R, Ota H, Sugino K, Shibuya K, Homma S. A case of small-cell lung cancer associated with paraneoplastic limbic encephalitis during Chemotherapy. *Nihon Kogyaku Gakkai Zasshi*. 49: 602-606, 2011.
 7. Shiozawa K, Watanabe M, Igarashi Y, Ichimori M, Hirano N, Nakano S, Maeda T, Yamazaki K, Okubo Y, Nemoto T, Shibuya K, Sumino Y. Gastrointestinal Stromal Tumor Mimicking Arteriovenous Malformation of the Jejunum. *Case Rep Gastroenterol*. 5: 558-64, 2011.
 8. Isobe K, Hata Y, Kobayashi K, Hirota N, Sato K, Sano G, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Takagi K, Honma S. Clinical Significance of Circulating Tumor Cells and Free DNA in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 32:3339-3344, 2012
 9. Isobe K, Hata Y, Sakaguchi S, Sato F, Takahashi S, Sato K, Sano G, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Mitsuda A, Terahara A, Shibuya K. Pathological response and prognosis of stage III non-small cell lung cancer patient treated with induction chemoradiation. *Asia -Pac J Clin Oncol*. 8:260-266, 2012.
 10. Sakamoto S, Kikuchi N, Ichikawa A, Sano G, Satoh K, Sugino K, Isobe K, Takai Y, Shibuya K, Homma H. Everolimus-induced Pneumonitis after Drug-eluting Stent Implantation: A Case Report. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 36:1151-1154, 2012.
 11. Shimodaira K, Okubo Y, Nakayama H, Shinozaki M, Sasai D, Takahashi K, Saji T, Shibuya K. Trends in incidence of invasive fungal infections emerged from analysis of annual records of autopsy cases of Toho University. *Mycoses*. 55:435-443, 2012.
 12. Ishikawa Y, Akasaka Y, Akishima-Fukasawa Y, Iuchi A, Suzuki K, Uno M, Abe E, Yang Y, Li CP, Mukai K, Niino H, Tanaka M,

- Kawahara Y, Sugiura H, Shinagawa T, Morinaga S, Ogata K, Onuma J, Yanagida-Iida M, Taki K, Komatsu A, Satoh H, Yamada K, Shimokawa R, Shibuya K, Takahashi K, Ishii T. Histopathologic profiles of coronary atherosclerosis by myocardial bridge underlying myocardial infarction. *Atherosclerosis*. S0021-9150:00721-00726, 2012.
13. Shimamura T, Kubota N, Shibuya K. Animal model of dermatophytosis. *J Biomed Biotechnol*. 2012:125384, 2012.
 14. Watanabe M, Shiozawa K, Takahashi M, Wakui N, Otsuka Y, Kaneko H, Tanikawa K, Shibuya K, Kamiyama N, Sumino Y. Evaluation of sorafenib for hepatocellular carcinoma by contrast-enhanced ultrasonography: A pilot study. *WJG*. 18:5753-5758, 2012.
 15. Shinozaki M, Okubo Y, Sasai D, Nakayama H, Ishiwatari T, Murayama S, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Shibuya K. Development and Evaluation of Nucleic Acid-Based Techniques for an Auxiliary Diagnosis of Invasive Fungal Infections in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded (FFPE) Tissues. *Med Mycol J*, 53:241-5, 2012.
 16. Shimodaira K, Okubo Y, Nakayama H, Wakayama M, Shinozaki M, Ishiwatari T, Sasai D, Nemoto T, Takahashi K, Ishii T, Saji T, Shibuya K. Trends in the prevalence of invasive fungal infections from an analysis of annual records of autopsy cases of Toho University: *Mycoses*. 55:435-443, 2012
 17. Togano T, Shibuya K, Kume H. Estimated numbers of visceral mycoses in case of leukemia and MDS in Japan: Analysis of the data from the annual of the pathological autopsy cases and vital statistics in Japan. *Med Mycol J*. 53:53-8, 2012.
 18. Sugino K, Gocho K, Ishida F, Kikuchi N, Hirota N, Sato K, Sano G, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Hata Y, Shibuya K, Uesaka T, Kurosaki A, Homma S. Acquired Hemophilia A Associated with IgG4-related Lung Disease in a Patient with Autoimmune Pancreatitis. *Intern Med*. 51:3151-4, 2012.
 19. Shimodaira K, Okubo Y, Ochiai E, Nakayama H, Katano H, Wakayama M, Shinozaki M, Ishiwatari T, Sasai D, Tochigi N, Nemoto T, Saji T, Kamei K, Shibuya K. Gene expression analysis of a murine model with pulmonary vascular remodeling compared to end-stage IPAH lungs. *Respir Res*.13:103, 2012.
 20. Shinozaki M, Okubo Y, Sasai D, Nakayama H, Murayama S, Ide T, Wakayama M, Ishiwatari T, Tochigi N, Nemoto T, Shibuya K. Development of a Peptide Nucleic Acid Probe to *Trichosporon* Species and Identification of *Trichosporonosis* using *In Situ*

- Hybridization in Formalin-Fixed and Paraffin-embedded (FFPE) Sections. 51:295-8, 2013.
21. Sasai D, Okubo Y, Ishiwatari T, Sugita T, Kaneko T, Murayama SY, Shimamura T, Shinozaki M, Hasegawa C, Mitsuda A, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Shibuya K. Histopathological evaluation of the efficacy of antifungals for experimental *Trichosporon* bloodstream infection. *Jpn J Infect Dis.* 66:133-139, 2013.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Ishiwatari T, Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Nemoto T, Kobayashi J, Shinozaki M, Aki K, Sasai D, Yamamoto Y, Nakayama H, Shibuya