

4. 4. mRNA 抽出と RT-PCR

対数増殖期まで培養した菌株をビーズ破碎後、セパゾール I (ナカライテスク) で RNA 抽出を行い、ReverTraAce-plus (TOYOBO) で cDNA 合成した。RT-PCR 反応は、SYBR premix ExTaq (TAKARA) を用い、リアルタイム PCR 解析装置 (BioRad) で測定した。

Cryptococcus gattii の JP01 株、JP02 株ゲノムデータおよびデータベースより 10 種の薬剤排出関連遺伝子および *erg11* の塩基配列を得、プライマーを設計した。ハウスキーパー遺伝子として *act1* を用いた。

C. 研究結果

1. Lanosterol 14- α demethylase の構造比較

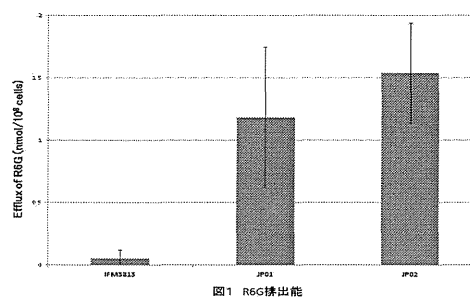
C. gattii の VGIIa 型である JP01 株および R265 株由来の Lanosterol 14- α demethylase をアミノ酸レベルで比較した結果、100% identity であった。VGIIa 型と VGIIc 型 (JP02 株) の比較の結果、1 アミノ酸置換 (N249D) が存在した。VGI 型と VGIIa の比較の結果、99.98% identity であった。また、*C. gattii* と *C. neoformans* を比較した結果、VGI との比較では 96.70%、VGIIa との比較では、97.45% の相同性を示した。

2. *C. gattii* の薬剤感受性

FLCZ の MIC50/MIC90 ($\mu\text{g/ml}$) は、IFM5815 株で 4/4、JP01 株で 8/32、JP02 株で 16/32 を示した。アムホテリシン B (AMPH-B) の MIC90 は、全ての株で <0.25 だった。

3. R6G 排出能

R6G 排出能を検討した結果、IFM5815 株と比較し、JP01 株、JP02 株で顕著に亢進していた (図 1)。



4. 薬剤排出ポンプ関連遺伝子の発現

No.5 および No.10 の 2 種類の薬剤排出関連遺伝子で、IFM5815 株と比較した場合、JP01 株、JP02 株で 100 倍以上の発現上昇を認めた (表 1)。また、これら 3 株間で *erg11* の発現量には差を認めなかった (表 1)。

表 1 *erg11* および薬剤排出ポンプ関連遺伝子の発現量の比較

	<i>erg11</i>	No.5	No.10
IFM5815	1	1	1
JP01	1.3 (0.97-1.61)	490 (107-873)	612 (89-1136)
JP02	1.7 (1.56-1.74)	750 (284-1218)	1422 (491-2353)

*独立した 2 回の実験の平均値 (実験値の範囲)

D. 考察

本研究では *C. gattii* の FLCZ 低感受性化に関与する候補因子としてターゲット分子である *erg11* 遺伝子と薬剤排出能に関する検討を行なった。*erg11* 遺伝子については、FLCZ 低感受性化が知られる VGIIc 型で 1 アミノ酸の置換 (N249D) を伴う遺伝子変異を見出した。しかし、Gast らも同様の VGIIc 型で遺伝子変異を見出し (Antimicrob. Agents Chemother. 57:5478-5485, 2013)、本遺伝子の FLCZ 感受性 *S. cerevisiae* への導入実験を行ったところ FLCZ 低感受性化を認めなかった。また、感受性株と低感受性株の *erg11* 発現に差を認めなかったことより、本研究での *erg11* の低感受性化への関与は低いと考えられる。一方、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。特に No.10 遺伝子は、*C. albicans* でアゾール耐性に関与する CDR ファミリーの相同遺伝子であり、*C. gattii*でも同様の機能に関与している可能性がある。今後、これらの遺伝子が *C. gattii*の FLCZ 排出に直接的な関与を証明する必要がある。また、これらの遺伝子は FLCZ 感受性株にも存在するため、遺伝子発現上昇のメカニズムを解析する必要がある。

E. 結論

*C. gattii*の FLCZ 低感受性化に、エネルギー依存性の薬剤排出能の亢進の関与が示唆された。今後、薬剤感受性の継続的なモニタリングおよび、国内外への情報発信する拠点の構築が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 前田真之、三浦遼子、石野敬子：特定抗菌薬届出制導入による抗菌薬処方への影響とその教育的効果。日本病院薬剤師会雑誌 48：341-345, 2012

学会発表

国際学会

特記事項なし

国内学会

1. 星野泰隆, 石野敬子, 石川淳. *Nocardia farcinica* のゲノム情報から見出したシデロフォア. 第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 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.

合同総会. 10月10-12日, 2012年, 東京.

2. 石野敬子, 渋谷健太, 星野泰隆, 石川淳. 病原性放線菌ノカルジアの LtsA の宿主細胞応答への関与. 第56回日本薬学会関東支部大会. 10月13日, 2012年, 東京.
3. 前田真之, 石野敬子. 抗菌薬適正使用に関連する因子についての解析. 第61回日本化学療法学会総会・学術講演会. 6月5-6日, 2013年, 横浜.
4. 詫間隆博, 前田真之, 石野敬子, 小司久志, 二木芳人. クロストリジウム・デフィシルレ関連腸炎の臨床的検討. 第61回日本化学療法学会総会・学術講演会. 6月5-6日, 2013年, 横浜.

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

平成23年度-25年度

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

日本で分離された北米流行型 *Cryptococcus gattii* 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 室長

研究協力者 田辺公一、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、宮崎義継

(国立感染症研究所 真菌部)

大久保陽一郎、渋谷和俊

(東邦大学医学部病院病理学講座)

研究要旨 我が国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、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。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。また病理組織学的検討では、JP02株、R265株感染マウスでは炎症細胞の出現や肉芽腫の形成に乏しく、肺の既存構造の破壊が著しかった。さらに菌学的性質としてクリプトコックス属の病原因子とされる表現型について検討し、病原性との関連も検討したが、莢膜厚やメラニン産生能、倍加時間などの因子と病原性の間に明らかな相関は認めなかった。我々の検討から、極めて病原性の強い *C. gattii* 株の我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。

A. 研究目的

1999年から現在に至るまで、北米太平洋岸（カナダ・バンクーバーから米国ワシントン州、オレゴン州付近）を中心とした *Cryptococcus gattii* による感染症が多発していることが報告され、その原因菌として3つの亜型（VGIIa、VGIIb、VGIIc）の *C. gattii* が存在し、しかもそのうちの2種（VGIIa、VGIIc）の菌は高病原性で致死性

も高く、かつ免疫不全宿主にも発病を認めている点で注目されている。

この北米流行型の *C. gattii* については、2007年にわが国の北米への渡航歴を持たないクリプトコックス症患者から分離されていたことが2010年に報告され、わが国への侵入経路、感染経路とともに、その病原性、病原因子の解明やわが国での生息状況、広がりなどの調査、移植患者などの免疫不

全宿主はもとより日本国民を対象とした感染対策等が課題として考えられている。このような背景のもと、本研究ではわが国で初めて臨床分離されたこの北米型 *C. gattii* 株の病原性に関して検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象菌株

本邦分離北米流行型 *C. gattii* 株 (JP01 株 (VGIIa)、JP02 株 (VGIIc)) を対象とし、病原性比較のための対照株として *C. gattii* R265 株 (VGIIa、北米流行株)、*C. gattii* 5815 株 (VGI、本邦分離株)、*C. neoformans* H99 株 (標準株) とした。

2. マウスに対する菌接種法

メス、9 週齢、C57BL/6J マウスにイソフルラン麻酔後経気管的に *Cryptococcus* 属を接種し、各種検討に供した。接種 *Cryptococcus* 属として、対象菌株の -80°C 保存株を YPD 液体培地 (pH5.6) で 30°C、約 48 時間培養した菌を遠心後集菌し、PBS にて 1 回洗浄後、再度 PBS に懸濁した菌液を用いた。接種菌数は接種液を段階希釈後 PDA 培地に接種し、生菌数として算出した (10^3 CFU/mouse)。

3. *Cryptococcus* 属感染マウスの生存率検討

1 群 6-7 匹のメス、9 週齢、C57BL/6J マウスにイソフルラン麻酔後経気管的に *Cryptococcus* 属を接種し、経時的に観察し致死性を検討した。菌接種法は 2.の方法に従った。

4. *Cryptococcus* 属感染マウスの病態解析

上記対象菌株を感染させたマウスについ

て肺、肝、脾、脳の生菌数測定、ならびに肺の病理組織学的解析を行った。各 *Cryptococcus* 属を 2.の方法で感染させ、14 日後に安楽死のうえ各臓器を摘出し、PBS と懸濁したうえでホモジネートした。その後ホモジネート液を PDA に接種し(一部は段階希釈を行った液) 分離菌数を算出した。また、肺の病理組織学的検討では右上葉を切除し、10%ホルマリン溶液に浸漬したのち、肉眼的比較、および東邦大学で顕微鏡的解析を行った。

4. 菌学的性質の検討

1) メラニン産生能と莢膜厚の検討

Cryptococcus 属において病原性に関与するとされているメラニン産生能と、菌の莢膜の厚さについて各菌株に対し検討を行った。メラニン産生能についてはバードシート寒天培地 (日本 BD) を用いて、菌を接種後 30°C で 7 日間培養し、産生の有無について判定した (この場合対照として YC-13 株を使用した)。一方、莢膜厚については 30°C で 24 時間前培養した菌を Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME) に懸濁し、菌数を 10^7 cell/ml に調整後、37°C、5%CO₂ 濃度下で 72 時間培養した菌を用いた。計測は墨汁法を使用し、100 菌体以上を対象としてオリンパス微分干渉顕微鏡 (IX81) で観察・撮影し、画像解析ソフトウェア LuminaVision により行った。計測値は平均値をとり μm 表示とした。

2) 37°Cでの発育能、菌体外酵素産生能の検討

37°Cでの発育能は brain heart infusion (BHI) 液体培地 (pH7.4) を使用し、OD660nm での吸光度から倍加時間を測定した。また、プロテアーゼ産生能、フォスフォリパーゼ産生能については Fotedar の

方法 (Fortedar R, et al. Mycoses 48, 2005) により測定した。

(倫理面からの配慮について)

本研究は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て、規定に従い実施した。

C. 研究結果

1. マウスに対する病原性 (致死性) の検討

基礎的検討とした JP02 株の接種菌量別の病原性についての検討では、JP02 株 10^2 CFU/mouse を接種したマウスでは約 30 日後から死亡するマウスが観察され、40 日までに全例が死亡した。一方、 10^3 CFU/mouse を接種した群では 18 日目から死亡するマウスが認められ数日のうちに全例が死亡し、 10^4 CFU/mouse 接種群では全例が 17 日目に死亡した。このように、接種菌量に依存して生存期間が短縮すること、比較的少量の菌量でも致死性が生じることが認められた。

一方、各クリプトコックス属の病原性の比較検討では、JP02 株接種群は接種 14 日目を経過した頃より死亡する個体が観察され、21 日目までにはすべてのマウスが死亡した。また、北米分離株である R265 株接種マウス群では、JP02 株より若干遅れた 21 日目より死亡する個体が認められ、30 日目までにほとんどのマウスが死亡した。*C. neoformans* 株である H99 株、ならびに YC-11 接種群では、JP02 株、R265 株接種群より遅れた 30 日後あたりから死亡しはじめ、35 日過ぎたあたりで全例が死亡し、*C. gattii*5815 株は 44 日目から死亡する個体が観察されはじめた。しかしながら、JP01 株は 100 日間の観察期間では全例の生存が確認された。この検討は計 2 回行ったが、同様の結果が得られ、マウスに対す

る致死性では JP02 株、R265 株、H99 株 = YC-11 株、5815W 株の順に強いと判定され、JP01 株はほとんど致死性を示さない株と判断された。

2. 感染マウスモデルにおける各臓器からの分離菌数

感染 14 日目の各臓器菌数を検討したところ、肺からはいずれの感染群からも $10^6 \sim 10^7$ CFU/g tissue のクリプトコックス属が分離された。一方、他の臓器を見てみると、*C. gattii* 株では肝、脾、脳から菌が分離される個体が多く認められるのに対し、*C. neoformans* 株である H99 株は菌が分離される個体は認められなかった。また *C. gattii* 株の中でも JP02 株、R265 株、5815 株ではほぼ全例で肺以外の臓器からも菌が分離されるのに対し、JP01 株ではこれら臓器から菌が分離される個体は少なく、とくに脳からは全く分離されなかった。

3. 肺の病理組織学的検討

肺の肉眼的所見では、JP02 株、R265 株接種マウスの肺は著明な容積増加と膿汁様物質の貯留が認められた (図 2)。一方、H99 株感染マウスでは肺表面からも観察される多数の白色結節が観察されたが、肺容積の増加はあまり認められなかった。また、5815 株、JP01 株感染マウスでは、若干の容積増加と少量の膿汁様物質の貯留が認められた。

さらに、顕微鏡的組織像 (図 3) では、H99 株感染マウスでは、炎症細胞による肉芽腫形成が比較的よく形成されているのに対し、JP02 株、R265 株感染マウスでは炎症細胞の出現や肉芽腫の形成に乏しく、肺の既存構造の破壊が著しかった。また、5815 株、JP01 株感染マウスではその中間的な病理組織学的所見であった。

4. 菌学的性質の検討

1) メラニン産生能と莢膜厚の検討

メラニン産生は JP01 株、JP02 株、R265 株、H99 株いずれにおいても産生が認められた (YC-13 株においては肉眼的には産生は認めなかった)。一方、莢膜厚については JP01 株、JP02 株、R265 株、5815W 株、H99 株、YC-11 株の順に平均で 5.01、5.65、3.22、6.31、2.33、2.55 (単位 μm) であった。

2) 37°Cでの発育能、菌体外酵素産生能の検討

37°Cにおける倍加時間では、JP01 株、JP02 株、R265 株、5815 株、H99 株それぞれ 3.40、3.22、4.49、6.28、3.60 時間であった (図 4)。また、プロテアーゼ産生能、フォスホリパーゼ産生能については、今回検討した株全てにおいて産生能は確認されなかった。

D. 考察

我が国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、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継続して行った。その結果、新たな知見や興味深い事象が観察された。

全体を俯瞰して見ると、なぜわが国で VGIIa 型と VGIIc 型の *C. gattii* 株が分離されるに至ったのかが極めて興味あることであるが、これについてはゲノム情報などを基にした検討結果が待たれる。一方、我々の検討では、VGIIc 型である JP02 株は極めて毒性の強い株であること、VGIIa 型である JP01 株は毒性の弱い株であることは、昨年度も述べたことであるが、非常に興味深いデータである。

本検討では、この病原性が病態にどう反映されるのか、菌側の因子は何かを検討した。その結果、1) 強毒型の *C. gattii* では肺における生体の反応、いわゆる炎症反応が極めて弱く、菌が認識されていない可能性が高い、2) 強毒型の *C. gattii* ほど全身に播種する傾向が強い、3) マウスの死亡は肺構造の破壊、ならびに全身臓器への播種が大きく関与していると考えられる、4) 従来のカリプトコックス属の病原因子とされている因子と今回の検討での病原性とは必ずしも相関しない、などの知見が得られた。これらの結果は、*C. gattii* における病原性を考察する上で、重要な所見と考えられるが、では *C. gattii* の病原性が何によって規定されるのか、は更なる検討が必要である。また、この問いについては JP01 と R265 の比較ゲノムの検討が有用である可能性は排除できない。

新興感染症としての *C. gattii* 感染症は今後もわが国の公衆衛生学上、監視を続けていく必要のある感染症と考えられるが、我々の検討が理解の一助となれば幸いと考える。

E. 結論

わが国で分離された北米型 *C. gattii* 株のうち JP01 株はマウスへの病原性は低く、一方 JP02 株は *Cryptococcus* 属の中でも極めて高い病原性を示す株であることが示された。また、*C. gattii* 株は *C. neoformans* 株に比較し、全身への易播種性があると考えられた。さらに、従来から考えられているカリプトコックス属の病原因子の発現と我々が検討した *C. gattii* 株の病原性との間での明らかな相関は認められなかった。

F. 健康危険情報

高病原性の北米流行型 *C. gattii* 株が流行地域（北米太平洋岸）への渡航歴のない日本人から分離された。

G. 研究発表

論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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. *Internal Medicine* 51: 3295-3299, 2012.
- 4) Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrong P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol* 51: 252-260, 2013.
- 5) Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwarara S, Miyazaki Y. Serum cholesterol promotes the growth of *Candida glabrata* in the presence of fluconazole. *J Infect Chemother* 19: 138-143, 2013.
- 6) 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* 93: 187-188, 2013.
- 7) Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis* 66: 51-55, 2013.
- 8) Nagi M, Tanabe K, Ueno K, Nakayama H, Aoyama T, Chibana H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwarara S, Miyazaki Y. The *Candida glabrata* sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter Aus1p, is regulated by iron limitation. *Mol Microbiol* 88 (2): 371-381, 2013.
- 9) 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* 51: 385-395, 2013.
- 10) Ohno H, Tanabe K, Umeyama T,

- Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother* 19 (5): 999-1003, 2013.
- 11) Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Matsumoto S, Ohno H, Miyazaki Y. Real-time microscopic observation of *Candida* biofilm development and effects due to micafungin and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2226-2230, 2013.
- 12) 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.
- 13) Kaneko Y, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against *Candida albicans*. *J Infect Chemother* 19 (6): 1141-1145, 2013.
- 14) 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 and Shibuya K. How histopathology can contribute to an understanding of defense mechanisms against Cryptococci. *Mediators of Inflammation*, volume 2013, article ID 465319, 2013.
- 15) Norkaew T, Ohno H, Sriburee P, Tanabe K, Tharavichitkul P, Takarn P, Puengchan T, Burmrungsri S, Miyazaki Y. Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand by nested PCR. *Mycopathologia* 176 (5): 395-402, 2013.
- 16) 大野秀明、金子幸弘、田辺公一、梅山隆、宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 - 新興・再興感染症 up to date-. *化学療法の領域* 29 S-1: 1144-1151, 2013.
- 17) 大野秀明. 結核感染症の病態-結核発症の危険因子とは?-. *治療* 95 (6): 1159-1163, 2013.
- 18) 大野秀明、荒岡秀樹、梅山 隆、金子幸弘、宮崎義継. 接合菌症. *臨床検査* 58 (1): 97-103, 2014.
- 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. Berlin, 2012.
- 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) Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y. Epidemiology of imported mycoses in Japan-its past and the present status. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, Yokohama, 2013.

5) Sriburee P, Puengchan T, Ohno H, Tanabe K, Siriaunkul S, Lamaroon A, Chanwong S, Khamwan C, Khantawa B, Miyazaki Y. Early diagnosis of histoplasmosis by nested PCR. 6th Trends in Medical Mycology, Copenhagen, 2013.

6) Tanabe K, Ohno H, Hoang Thi Thu Ha, Nguyen Thuy Tram, Miyazaki Y. Histoplasmosis. NIID-NIHE review meeting on collaborative research program, Hanoi, 2013.

国内学会

1) 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、4 月 25, 26 日、長崎、2012.

2) 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、4 月 25, 26 日、長崎、2012.

3) 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総会、4 月 26, 27 日、長崎、2012.

4) 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 回日本医真菌学会学術集会、11 月 10, 11 日、東京、2012.

5) 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 回日本医真菌学会学術集会、11 月 10, 11 日、東京、2012.

6) 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 日-6 月 1 日、東京、2013.

7) 秋根 大、加藤幹朗、辻 浩史、槇村浩一、大野秀明、小林裕幸. 2 cases of cryptococcal meningitis in HIV-uninfected healthy patients. 第 87 回日本感染症学会、第 61 回日本化学療法学会総会合同学会、6 月 5 日-6 日、横浜、2013.

8) 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、東京、2013.

9) 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、東京、2013.

10) 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、東京、2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

特記事項なし

平成23年度-25年度

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*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
研究協力者	大野秀明	国立感染症研究所	真菌部
	浦井 誠	国立感染症研究所	真菌部
	金城雄樹	国立感染症研究所	真菌部
	上野圭吾	国立感染症研究所	真菌部

研究要旨 *Cryptococcus gattii*の病原性解明のため、その免疫原性についてin vivoおよびin vitroでの解析を行った。in vivoの解析では、hydrocortisoneまたはCD4陽性細胞欠損による免疫抑制マウスに対して*C. gattii*を経気管的に感染させたが、健常マウスと比較して生存期間に有意な相違は認められなかった。一方、CD4陽性細胞欠損マウスでは健常マウスと比較して有意に肺重量が減少していた。肺内生菌数に差異は認められなかったため、菌の形態が免疫状態に応じて変化する可能性が示唆された。また、死菌ワクチンを用いた検討では、免疫の誘導に莢膜の有無が関与している可能性が示唆された。in vitroでの解析では、*C. gattii*の生菌、死菌および精製した莢膜多糖は*C. neoformans*と比較して樹状細胞の免疫応答を刺激しなかった。両種間で莢膜中の多糖組成が異なっていたことから、莢膜多糖構造の違いによる*C. gattii*の低い免疫原性がin vivoでの高病原性に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

*Cryptococcus neoformans*は、HIV感染症などの細胞性免疫不全者に感染しやすく、重篤化しやすいが、*Cryptococcus gattii*は、健常人での感染例も多く、宿主の免疫状態との関連性は不明である。*C. gattii*の病原性を知る上で、感染免疫に関する基礎的検討はきわめて重要である。

本研究では、*C. gattii*の病原性を免疫学的視点から解明することを目的として、in vivo および in vitro での検討を行った。

B. 研究方法

1. *C. gattii*の病原性および免疫原性

① 免疫抑制状態における病原性

モデル動物として、8週齢、メス、C57BL/6 マウスを用い、菌株は *C. neoformans* H99 株、*C. gattii* JP01 株または JP02 株を用いた。健常マウス、hydrocortisone により免疫抑制状態にしたマウスまたは CD4 抗体により CD4 陽性細胞欠損状態としたマウスに、経気管的に菌を接種し、生存期間を比較した。また、CD4 陽性細胞欠損マウスについては肺重量と肺内生菌数を測定した。

② 免疫における莢膜の関与

菌株は *C. gattii* 5815 株を用い、高浸透圧の培地を用いて、莢膜産生を抑制した菌 Cap(-)と、通常の培地で培養した莢膜を有する菌 Cap(+)を作製した。両者を加熱処理(60℃、1 時間)にて不活化した死菌を C57BL/6 マウスの腹腔内に投与した。また、コントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を投与した。その 10 日後に、5815 株の生菌を経気道的に感染させ、感染 14 日目の肺内生菌数を比較した。

2. in vitro での免疫応答

C57BL/6 の樹状細胞(JAWSII 細胞)に、*C. neoformans* H99 株および *C. gattii* JP01 株または JP02 株の死菌または生菌を接種し、培養上清中に産生される IL-6 を ELISA 法で測定した。

また、*C. neoformans* H99 株および *C. gattii* JP02 株から莢膜多糖を抽出、精製し、同様に JAWSII 細胞に対する IL-6 産生誘導能を測定した。さらに、両株の莢膜多糖を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、その溶出パターンを比較した。

C. 研究結果

1. *C. gattii* の病原性および免疫原性

① 免疫抑制状態における病原性

健常マウスと比較して hydrocortisone による免疫抑制状態では、いずれの菌株においても平均生存期間に影響しなかった。また、CD4 陽性細胞欠損マウスにおいては、H99 株で平均生存期間が短くなったが、JP02 株では影響を受けなかった。このとき、健常マウスに対して感染させた時と比較して、CD4 陽性細胞を欠損させることにより有意に肺重量が減少していたが、肺内生菌数に差異は認められなかった。

② 免疫における莢膜の関与

莢膜を有する菌体ワクチン Cap(+)は、莢膜のない菌体ワクチン Cap(-)よりも、肺内生菌数を低下させる点において、ワクチン効果が優れていたが、その差はわずかであった。

2. in vitro での免疫応答

H99 株は死菌でも生菌でも IL-6 の産生を誘導したが、JP01 株および JP02 株は IL-6 の産生をほとんど誘導しなかった。また、JP02 株は H99 株が誘導する IL-6 の産生を抑制しなかった。

H99 株から精製した莢膜多糖は濃度依存的に IL-6 の産生を誘導したが、JP02 株ではほとんど誘導しなかった。また、両株の莢膜多糖を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供した結果、その溶出パターンに顕著な違いが認められた。

D. 考察

クリプトコックス症は、免疫不全者における発病が多く、また重篤化しやすいことが知られているが、*C. gattii* の免疫不全者における病原性については明らかにされていない。hydrocortisone や CD4 陽性細胞の欠損による免疫抑制は、*C. gattii* の病原性に影響を及ぼさないが、菌の形態が免疫状態に応じて変化する可能性が示唆された。このことは、JP02 株のように高病原性のクリプトコックス病原体の場合、健常人でも重篤になり得ることを支持する結果である。

また、*C. gattii* は厚い莢膜を有するが、莢膜の免疫防御能に与える影響については現在まで諸説あり、一定していない。死菌ワクチンを用いた検討の結果、in vivo での免疫応答には、莢膜の有無がある程度寄与していることが示唆された。

in vitro での解析では、高病原性の *C.*

gattii は *C. neoformans* に比べて IL-6 産生誘導能が低かった。また、JP02 株が H99 株によって誘導された IL-6 の産生を抑制しなかったことから、JP02 株は積極的に IL-6 の産生を抑制しているのではないと考えられる。

さらに、JP02 株から精製した莢膜多糖が H99 株と比較して樹状細胞の免疫応答を刺激しにくく、その莢膜中の多糖組成も異なっていたことから、JP02 株の莢膜多糖構造の違いによる低い免疫原性が *in vivo* での高病原性に寄与している可能性が示唆された。

E. 結論

C. gattii の高病原性は、毒素産生といった宿主細胞への攻撃的なメカニズムではなく、*C. neoformans* とは異なる莢膜多糖構造による宿主免疫からの回避という防御的な因子が関与している可能性が示唆された。

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 Kinjo Y, Illarionov PA, Vela JL, Pei B, Girardi E, Li X, Li Y, Imamura M, Kaneko Y, Okawara A, Miyazaki Y, Gomez-Velasco A, Rogers P, Dahesh S, Uchiyama S, Khurana A, Kawahara K, Yashilkaya H, Andrew PA, Wong CH, Kawakami K, Nizet V, Besra GS, Tsuji M, Zajonc DM, Kronenberg M. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol.* 12:966-974, 2011.
- 2 Kaneko Y, Obata Y, Nishino T, Kakeya H, Miyazaki Y, Hayasaka T, Setou M, Furusu A, Kohno S. Imaging mass spectrometry analysis reveals an altered lipid distribution pattern in the tubular areas of hyper-IgA murine kidneys. *Exp Mol Pathol.* 91:614-621, 2011.
- 3 Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect.* 15:45-55, 2013.
- 4 Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of Epidemiology of Clinically Isolated *Cryptococcus neoformans* Strains in Japan by Multilocus Sequence Typing. *Jpn J Infect Dis.* 66:51-55, 2013.
- 5 Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Matsumoto S, Ohno H, Miyazaki Y. Real-time microscopic observation of *Candida* biofilm development and effects due to micafungin and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2226-2230, 2013.
- 6 Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Retinoids and rexinoids inhibit

- hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling. *Microbes Infect.*, 2013.
- 7 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.
 - 8 Migiyama Y, Kaneko Y, Yanagihara K, Morohoshi T, Morinaga Y, Nakamura S, Miyazaki T, Hasegawa H, Izumikawa K, Kakeya H, Hasegawa H, Kohno S. Efficacy of AiiM, an N-acylhomoserine lactonase, against *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model of acute pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:3653-3658, 2013.
 - 9 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.* 2013:465319, 2013.
 - 10 Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother.* 19:999-1003, 2013.
 - 11 Kaneko Y, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against *Candida albicans*. *J Infect Chemother.* 19:1141-1145, 2013.
- 和文
- 1 金子幸弘, 宮崎義継. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて VI. 主な感染症に対する実地医科の抗菌薬使用の実際/A. 主要感染症から見た抗菌薬の選択と使用の実際 43. カンジダ症, アスペルギルス症, クリプトコックス症. *M. P. Medical Practice臨時増刊号.* 28:483-490, 2011.
 - 2 宮崎義継, 金子幸弘. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて II. 抗菌薬の特徴とそれに基づいた使い方のコツとポイント 11. 抗真菌薬. *M. P. Medical Practice臨時増刊号.* 28:137-141, 2011.
 - 3 金子幸弘, 宮崎義継. 特集・病原真菌と真菌症の新たな理解に向けて 臨床 4. 深在性真菌症診断の現状と今後の展望. 化学療法の領域. 28:89-97, 2012.
 - 4 金子幸弘, 宮崎義継. 4章 真菌感染症 4-3 コクシジオイデス症. 感染症事典編集委員会編. 感染症事典. p251-254, 2012年, オーム社, 東京.
 - 5 金子幸弘, 宮崎義継. 内科医にとって必ず知っておくべき感染症を診る IV. 緊急性の高い感染症を診る 2. 血液培養陰性でも敗血症(severe sepsis). 前崎繁文・大曲貴夫・山口敏行編. 臨床感染症ブックレット 5巻. p62-71, 2012年, 文光堂, 東京.
 - 6 堀内一宏, 山田萌美, 白井慎一, 高橋育

- 子, 加納崇裕, 金子幸弘, 秋沢宏次, 梅山 隆, 宮崎義継, 矢部一郎, 佐々木秀直. 脳室内抗真菌薬投与が奏功した *Cryptococcus gattii*による脳および肺クリプトコックス症の一例. 臨床神経学. 52:166-171, 2012.
- 7 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.
- 8 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 宮崎義継. <特集関連情報>*Cryptococcus gattii*によるクリプトコックス症. 病原微生物検出情報. 34:4-5, 2013.
- 9 金子幸弘, 宮崎義継. 新薬の最近の話題 カスポファンギン. 分子呼吸器病. 17:107-110, 2013.
- 10 宮崎義継, 田辺公一, 梅山 隆, 名木 稔, 金子幸弘, 山越 智, 上野圭吾, 金城雄樹, 大川原明子, 大野秀明. アスペルギルス症. 感染症道場. 2:20-23, 2013.
- 11 大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山隆, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii*感染症 -新興・再興感染症up to date-. 化学療法の領域. 29 S-1:1144-1151, 2013.
- 12 金子幸弘, 浦井 誠, 宮崎義継. カラーグラフィック連載「目で見る真菌と真菌症」 4. 治療薬の選択と投与. 化学療法の領域. 29:4-14, 2013.
- 13 浦井 誠, 金子幸弘, 宮崎義継. ミニ特集22 微生物の共存・共生と相互作用 ヒトvs真菌vs細菌・人類の敵の敵は、味方か敵か?. 日本乳酸菌学会誌. 24:177, 2013.
- 学会発表
国際学会
- 1 Kinjo Y, Illarionov PA, Vela JL, Pei B, Li XJ, Kaneko Y, Miyazaki Y, Nizet V, Kawakami K, Tsuji M, Kronenberg M. NKT cells recognize glycolipids from *Streptococcus pneumoniae* and GBS. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011). September 6-10, 2011, Sapporo.
- 2 Kaneko Y, Ohno H, Miyazaki Y. Farnesol attenuates the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011). September 6-10, 2011, Sapporo.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, 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.

- 6 Umeyama T, Yamagoe S, Tanabe K, Nagi M, Kaneko Y, Kinjo Y, Ohno H, Miyazaki Y. Mps1 kinase is required for normal nuclear segregation in *Aspergillus fumigatus*. 2013 Congress of Asia Pacific Society for Medical Mycology. June 19-23, 2013, Chengdu, China.
- 国内学会
- 7 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida albicans*の代償機構の解明とその制御による治療の可能性. 第108回日本内科学会. 4月17-18日, 2011年, 東京.
- 8 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. カンジダバイオフィームにおけるストレス応答とその阻害効果. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
- 9 金城雄樹, 金子幸弘, 樽本憲人, 大川原明子, 川上和義, 宮崎義継. 自然リンパ球による肺炎球菌認識機構の解析. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
- 10 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 宮崎義継. 遺伝子診断法を用いた土壤中に生息するヒストプラスマ属検出の試み. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
- 11 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Candida*バイオフィームにおける抗真菌薬耐性関連遺伝子の発現調節. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
- 12 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.
- 13 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.
- 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 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.
- 16 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.
- 17 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.
- 18 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.

- 19 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.
- 20 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.
- 21 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.
- 22 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.
- 23 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.
- 24 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.
- 25 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.
- 26 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. アゾール薬との併用薬の探索. 真菌症フォーラム第13回学術集会. 2月18日, 2012年, 東京.
- 27 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.
- 28 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.
- 29 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.
- 30 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.

- 31 右山洋平, 柳原克紀, 金子幸弘, 原田陽介, 山田康一, 長岡健太郎, 森永芳智, 宮崎泰可, 中村茂樹, 今村圭文, 泉川公一, 掛屋 弘, 山本善裕, 田代隆良, 上平 憲, 河野 茂. *N-Acyl homoserine lactonase (AiiM)* による緑膿菌の病原性制御. 第60回日本化学療法学会学術集会. 4月26-27日, 2012年, 長崎.
- 32 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.
- 33 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.
- 34 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.
- 35 金子幸弘. シンポジウム10 バイオフィルム研究をめぐる最近の潮流 (学際企画) 4) 真菌バイオフィルム. 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.
- 36 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.
- 37 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.
- 38 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カ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.
- 39 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.
- 40 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.
- 41 右山洋平, 柳原克紀, 金子幸弘, 賀来敬仁, 原田陽介, 山田康一, 長岡健太郎, 森永芳智, 宮崎泰可, 中村茂樹, 今村圭文, 泉川公一, 掛屋 弘, 田代隆良, 河

- 野 茂. マウス緑膿菌性肺炎モデルにおけるN-アシルホモセリンラクトナーゼ aiiMの効果. 第47回緑膿菌感染症研究会. 2月22-23日, 2013年, 札幌.
- 42 湯川清孝, 森 梢, 金子幸弘, 高木瑛実子, 秦田勇二. 酸性バチルス溶菌酵素の探索. 日本農芸化学2013年度大会. 3月24-28日, 2013年, 仙台.
- 43 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.
- 44 井澤由衣奈, 大川原明子, 朴 貞玉, 金子幸弘, 川上和義, 竹山春子, 大石和徳, 金城雄樹. 肺炎球菌感染に対する蛋白・糖脂質併用ワクチンの防御効果. 第24回日本生体防御学会学術総会. 7月10-12日, 2013年, 熊本.
- 45 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.
- 46 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.
- 47 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.
- 48 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.
- 49 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.
- 50 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.
- 51 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.
- 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

III. 附記

「*Cryptococcus gattii*感染症の取り扱い指針」