

マウスモデルを用いた難治性クリプトコックス症の発症病態の解明

研究分担者 川上和義 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨 本研究では、真菌感染症の「難治病態の基盤・応用研究」を目的とし、エイズなど免疫低下を背景に発症するクリプトコックス症の発症病態解明を目指して、本真菌に対する免疫応答機構の解析を実施した。今年度は以下の点について明らかにした。1) IL-17A遺伝子欠損マウスの肺内にクリプトコックスを感染させると、肺内でのTh1免疫応答が亢進し菌の排除が高まった、2) I型インターフェロン受容体遺伝子欠損マウスでは、Th1免疫応答とともにTh2免疫応答が亢進するとともに、気管支上皮細胞からのムチン産生が増加し菌の排除が高まった、3) クリプトコックスを肺内に感染させることで長期潜伏し、免疫を低下させることで内因性再燃するモデルの作製に成功した、4) クリプトコックスの主要なT細胞抗原である分子量98kDaのマンノプロテイン（MP98）に特異的なT細胞受容体を発現するトランスジェニックマウスの作製に世界に先駆けて成功した、5) このトランスジェニックマウスからの脾細胞はMP98刺激によりIL-2、IFN- γ を産生するとともに増殖反応を示したが、遺伝子が導入されていないマウスではそのような反応はみられなかった。本研究を通して、クリプトコックス感染防御免疫でのTh1-Th2バランスの制御におけるIL-17、I型インターフェロンの新たな役割が明らかになった。また、今回作製に成功した内因性再燃モデルとトランスジェニックマウスを用いることで、エイズ合併クリプトコックス髄膜炎の発症病態をより詳細に解明できるものと期待される。

A. 研究目的

Cryptococcus neoformans は、糖尿病、血液悪性疾患、膠原病、エイズなどの免疫低下宿主に合併する日和見病原真菌であり、このような症例では重篤な髄膜脳炎を引き起こし、臨床的大きな問題となる。髄膜脳炎はたとえ標準治療を行った場合でも死亡率が2週後で12%、4週後で26%に達すると報告されてお

り（*Clin. Infect. Dis.* 28: 82-92, 1999）、また、世界のエイズ患者における死亡原因では結核に次いで第2位ともいわれている（*AIDS* 16: 1031-1038, 2002）。

免疫低下のない場合でも肺クリプトコックス症を起こすことがあるが（原発性肺クリプトコックス症）、限局性のことが多く、通常は髄膜脳炎にまで至ることは少ない。一方、細

胞性免疫能が低下した状態では、中枢神経系に播種性感染を惹起する。このような違いは感染宿主の免疫状態によって大きく左右されるため、その対策を講じるためには本真菌に対する感染防御免疫機構の理解が重要である。

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

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

B. 研究方法

1. マウス

IL-17A、type I IFN 受容体遺伝子欠損 (IL-17A、IFNAR1KO) マウス (それぞれ、東京理科大学 岩倉洋一郎教授、Aguet 教授、University Hospital Zürich、Zürich、スイスより供与) を用いた。野生型マウスとして

C57BL/6 マウス (日本クレア、東京) を用いた。

2. TCR α および TCR β の遺伝子クローニング
クリプトコックスの主要な T 細胞抗原である分子量 98kDa のマンノプロテイン (MP98) に特異的な T 細胞ハイブリドーマ (P1D6) (Stuart M. Levitz 教授, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, 米国より供与) から RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen, 東京) を用いて抽出した。SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (タカラバイオ、大津) を用いて cDNA ライブラリーを作製し、その中から TCR α の未知の V \cdot J 領域および TCR β の未知の V \cdot D \cdot J 領域を 5'-RACE (5'-Rapid amplification of cDNA end) 法を用いて増幅した。その際に、PCR 用酵素として TITANIUM Taq DNA Polymerase (タカラバイオ、大津) を用い、C 領域のプライマーとして、TCR α -683R: GTGGCATCACAGGGAACGTCTGAAC および TCR β -865R: CATATAGGGTGGCCTCC TAGGAT を用いて、94°C 30 秒、68°C 30 秒、72°C 3 分の反応を 25 サイクル繰り返した。得られた増幅産物のシーケンシングを行い (北海道システム・サイエンス、札幌)、塩基配列から TCR α および TCR β の遺伝子構成を決定した。

3. トランスジェニックマウスの作製

pHSE3'-TCR α および pHSE3'-TCR β のプロモーターから polyA シグナルまでのトランスジーンを Xho I を用いて切り出し、両断片を混合して BDF1 マウスの受精卵に注入した。遺伝子注入受精卵は偽妊娠マウス (ICR) に着床させた。得られた仔について、TCR α および TCR β トランスジーンの有無を調べる目的でジェノタイピングを行い、3 匹のファウンダーマウス (メス 2 匹、オス 1 匹) を得た。これらを BDF1 マウス (日本クレア) に掛け合わせ、3 系統のトランスジェニックマウスを

維持した。

4. *C. neoformans*

荚膜欠損株である Cap67 (Stuart M. Levitz 教授, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, 米国より供与)、及びその親株である B3501 (K.J. Kwon-Chung 博士, National Institute of Health, Bethesda, MD, 米国より供与) を potato dextrose agar (PDA) 培地 (栄研化学、東京) にて 30°C で培養した。

5. *C. neoformans* 感染実験

マウスをペントバルビタールで麻酔後、気管内にカニューレを経口的に挿入して 1×10^6 /ml の Cap67、B3501 を接種した。

6. 肺内生菌数

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

7. サイトカイン測定

培養上清中の IL-12p40、IFN- γ 、IL-17A、IL-23、TNF- α 濃度はそれぞれの ELISA キットを用いて測定した。

8. 統計学的解析

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

9. 倫理的配慮

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

C. 研究結果

1. *C. neoformans* 感染マウスモデルを用いた感染防御免疫応答の分子機構の解析

これまでに我々は、ヒトにおけるクリプトコックス症の病態を理解するために、*C. neoformans* のマウス肺感染モデルを用いて免疫学的解析を行ってきた。今年度は、新たに IL-17A と type I IFN の役割についてそれぞれの遺伝子欠損マウスを用いた検討を行った。

1) IL-17 の役割

IL-17 は、真菌の中ではカンジダ感染において好中球反応と関連して重要性が報告されている (Cell Host Microbe. 11: 425-435, 2012)。しかし、クリプトコックス感染ではその役割は十分に理解されていない。IL-17A 遺伝子欠損 (IL-17AKO) マウスの肺内に *C. neoformans* を感染させると、野生型 (WT) マウスと比較して 14 日後の肺内生菌数の有意な減少が観察された (図 1)。肺内での IFN- γ 産生が IL-17AKO マウスで有意に増加していたことから、肺内での真菌排除の更新は IFN- γ 産生増加によると考えられた。

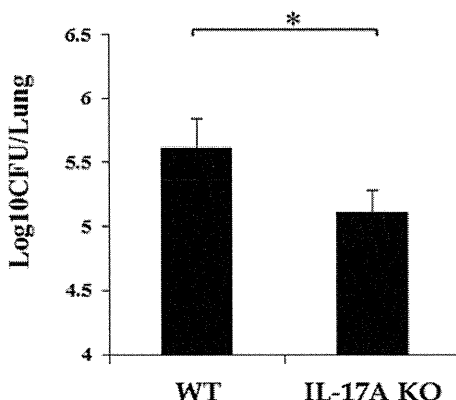


図1. IL-17A欠損によるクリプトコックス排除の亢進

2) type I IFN の役割

type I IFN は免疫系に限らずほとんどの細胞から産生され、ウイルス感染防御に重要なことがよく知られているが、真菌感染においてはほとんど検討されていない。Type I IFN 受容体遺伝子欠損 (IFNAR1KO) マウスの肺内に *C. neoformans* を感染させると、IL-17AKO マウスと同様に、WT マウスと比較して感染 14 日後の肺内生菌数が有意に減少した。さらに、肺内でのサイトカイン産生を調べたところ、IFN- γ 産生は同様に増加がみられたが、IL-17AKO マウスと異なり IL-4、IL-5、IL-13 といった Th2 サイトカインの産生増加も観察された。次に、Th2 サイトカイン産生増加の意義について調べるために、気管支上皮細胞から産生されるムチンについて検討したところ、IFNAR1KO マウスで有意な増加がみられた (図 2)。さらに、気道ムチンの主要なコアタンパク質である MUC5AC の増加もみられ、これは抗 IL-4 抗体の投与によって完全に抑制された。以上の結果から、type I IFN は気道粘膜における機械的な感染防御において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

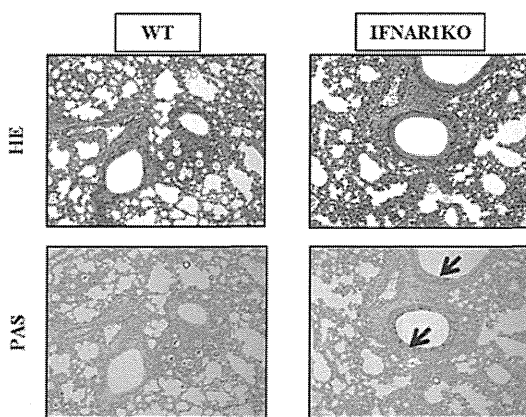


図2. 1型インターフェロン欠損におけるクリプトコックス感染後の気管支上皮細胞からのムチン産生の亢進 矢印:ムチン

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

C. neoformans 感染後経時的に肺内の生菌

数を調べたところ、Day0 で 10^6 CFU だった菌数が、1週後で 10^5 CFU、1ヶ月後で 10^4 CFU と減少し、3ヶ月、7ヶ月では 10^2 CFU 程度で維持された。3ヶ月後の病理学的解析では、肺内に潜伏する PAS 陽性の酵母細胞が観察された。さらに、7ヶ月の時点でデキサメサゾン を 1 週間投与すると、コントロールの生食投与群と比較して肺内生菌数が増加することを確認した。このように、本モデルは *C. neoformans* の潜伏感染・内因性再燃モデルとなりうることを示された。

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

クリプトコックス抗原特異的な T 細胞の解析を行うために、本真菌の主要な T 細胞抗原であるマンノプロテイン (MP98) に特異的に応答する T 細胞ハイブリドーマ P1D6 から T 細胞受容体 α 鎖、 β 鎖遺伝子のクローニングを試み成功した。MP98 を認識する P1D6 の TCR α 鎖の構成は Va17-Da50-Ca、 β 鎖は VB1-DB2-JB2-7-CB2 であった。これらの TCR α 鎖および β 鎖の発現ベクターを BDF1 マウスの受精卵に導入し、導入遺伝子を有する 3 系統のトランスジェニックマウスを得ることができた。いずれの系統のトランスジェニックマウスでも、脾臓において MP98 特異的 TCR α/β の mRNA の発現が認められ、脾細胞を MP98 で

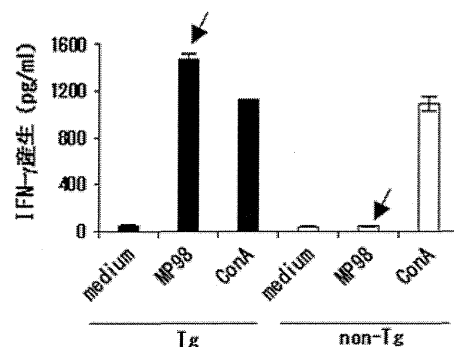


図3. トランスジェニックマウス脾細胞の抗原特異的応答性 Ig: トランスジェニックマウス non-Ig: 遺伝子導入していないマウス

刺激すると細胞増殖および IL-2、IFN- γ の産生が認められたが、遺伝子を導入していないマウスの脾細胞では認められなかった(図 3)。このことから、今回の検討により MP98 を特異的に認識する T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウスの作製に成功したことが明らかとなった。

D. 考察

IL-17 は、真菌の中ではカンジダ感染において好中球反応と関連して重要性が報告されている (Cell Host Microbe. 11: 425-435, 2012)。しかし、クリプトコックス感染ではその役割は十分に理解されていない。IL-17A 遺伝子欠損 (IL-17AKO) マウスの肺内に *C. neoformans* を感染させると、野生型 (WT) マウスと比較して 14 日後の肺内生菌数の有意な減少が観察された。肺内での IFN- γ 産生が IL-17AKO マウスで有意に増加していたことから、肺内での真菌排除の更新は IFN- γ 産生増加によると考えられた。

type I IFN は免疫系に限らずほとんどの細胞から産生され、ウイルス感染防御に重要なことがよく知られているが、真菌感染においてはほとんど検討されていない。クリプトコックスに関しては、Biondo らが IFNAR1KO マウスや IFN- β KO マウスを用いて感染が悪化することを報告している (J. Immunol. 181: 566-573, 2008)。一方、本研究では、IFNAR1KO マウスで Th1 免疫応答が亢進し菌の排除が高まることが明らかになり、Biondo らの報告と異なる結果であった。この原因については不明であるが、菌株やマウスの遺伝的背景の相違などが関係しているのかもしれない。さらに、本研究では、IFNAR1KO マウスで Th2 免疫応答の亢進が観察され、気管支上皮細胞からのムチン産生が増加することを見出した。これらの結果から、type I IFN は Th1 型の免疫応答のみならず、Th2 免疫応

答を介して気管支粘膜における機械的バリア機構にも影響している可能性のあることが明らかになった。

さらに今回の研究から、クリプトコックスの主要な T 細胞抗原である MP98 を特異的に認識する TCR 遺伝子を導入し発現させたトランスジェニックマウスを作製することに世界に先駆けて成功した。このマウスの脾臓 T 細胞は MP98 およびクリプトコックス由来のマノノプロテインに反応し、増殖反応およびサイトカイン産生を行うことが明らかになった。今後は、MP98 特異的 TCR に対するモノクローナル抗体を作製するとともに、このマウスを用いることでメモリー T 細胞への分化および詳細な局在および機能を解析するとともに、免疫低下状態では免疫記憶がどのように破綻し、潜伏感染から内因性再燃をきたすのか明らかにしていきたい。

E. 結論

本研究により以下の点が明らかになった。

- 1) IL-17A 遺伝子欠損マウスの肺内にクリプトコックスを感染させると、肺内での Th1 免疫応答が亢進し菌の排除が高まった、
- 2) I 型インターフェロン受容体遺伝子欠損マウスでは、Th1 免疫応答とともに Th2 免疫応答が亢進するとともに、気管支上皮細胞からのムチン産生が増加し菌の排除が高まった、
- 3) クリプトコックスを肺内に感染させることで長期潜伏し、免疫を低下させることで内因性再燃するモデルの作製に成功した、
- 4) クリプトコックスの主要な T 細胞抗原である分子量 98kDa のマノノプロテイン (MP98) に特異的な T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウスの作製に世界に先駆けて成功した、
- 5) このトランスジェニックマウスからの脾細胞は MP98 刺激により IL-2、IFN- γ を産生するとともに増殖反応を示したが、遺伝子が導入されていないマウスではそのような反応

はみられなかった。本研究を通して、クリプトコックス感染防御免疫での Th1-Th2 バランスの制御における IL-17、I 型インターフェロンの新たな役割が明らかになった。また、今回作製に成功した内因性再燃モデルとトランスジェニックマウスを用いることで、エイズ合併クリプトコックス髄膜炎の発症病態をより詳細に解明できるものと期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, Takahashi Y, Nomura T, Miyasaka T, Ishii K, Hara H, Yamamoto N, Kanno E, Iwakura Y, Kawakami K: Defect of CARD9 leads to impaired accumulation of IFN- γ -producing memory-phenotype T cells in lungs and increased susceptibility to pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. in press.
2. 石井恵子, 川上和義: 真菌に対する免疫学的防御機構, 臨床免疫・アレルギー科, 60: 411-418, 2013.

学会発表

1. Sato K, Yamamoto H, Ishii K, Kawakami K: Defect of type I interferon receptor leads to improved infection with *Cryptococcus neoformans* in parallel to increased production of IFN- γ and MUC5AC in lungs. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張, 2013年12月11日~13日.
2. Yamamoto H, Nakamura Y, Sato K, Matsumura K, Ishii K, Hara H, Kawakami K: CARD9-mediated innate IFN- γ production and host defense to cryptococcal

infection: involvement of memory-phenotype T cells. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張, 2013年12月11日~13日.

3. Matsumura K, Ishii K, Miyamura N, Nakamura Y, Tamura T, Kawakami K: Generation of transgenic mice expressing TCR $\alpha\beta$ specific for mannoprotein from *Cryptococcus neoformans*. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張, 2013年12月11日~13日.
4. 野村俊樹, 石井恵子, 川上和義: クリプトコックス感染防御における IL-17A 欠損の影響. 第62回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 東京, 2013年10月30日~11月1日.
5. 松村香菜, 佐藤 光, 石井恵子, 安達禎之, 大野尚仁, 川上和義: 免疫細胞による *Cryptococcus neoformans* 認識における C-type lectin receptors の役割: Mincle を中心とした検討. 第57回日本医真菌学会総会学術集会, 東京, 2013年9月27日, 28日.
6. 石井恵子, 川上和義: クリプトコックス感染防御とサイトカインによる制御, シンポジウム4「クリプトコックス症の基礎と臨床」, 第57回日本医真菌学会総会学術集会, 東京, 2013年9月27日, 28日.
7. 松村香菜, 中村優里, 山本秀輝, 佐藤 光, 石井恵子, 山崎 晶, 原 博満, 安達禎之, 大野尚仁, 館 正弘, 川上和義. *Cryptococcus neoformans* と C-type lectin receptors との相互作用. 第24回日本生体防御学会総会学術集会, 熊本, 2013年7月10日~12日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

病原真菌 *Candida glabrata* における多剤耐性機序の解明

研究分担者 宮崎泰可 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座

研究要旨 病原真菌 *Candida glabrata* において、多剤耐性株の増加が近年問題視されているため、その耐性機序の解明を目指して研究を行った。*C. glabrata* を低濃度のキャンディン系薬に暴露させると、容易に低感受性株が選択されてきた。更に、この株は作用機序が異なるアゾール系薬にも高度耐性を獲得しており、これらの表現型は不可逆的なものであった。cDNAライブラリーを用いた相補的解析および全ゲノムシーケンスによって、責任遺伝子の変異が同定され、この単一のアミノ酸変異を野生株に導入することによって、キャンディン系薬およびアゾール系薬に対する感受性が低下することを確認できた。更なる解析によって、細胞膜脂質成分の変化と薬剤排出ポンプの過剰発現がそれぞれの主な耐性機序であることが証明された。この変異株は病原性が低下していなかったため、臨床的にカンジダ症の原因菌になりうる可能性が示唆された。単一変異によって異なる系統の抗真菌薬耐性が誘導されるという報告はこれまでになく、今後、詳細な機序の解明に加え、他菌種や臨床分離株における解析を予定している。

A. 研究目的

医療の進歩や HIV/AIDS 患者の増加に伴い、日和見感染症は増加の一途にある。カンジダ症やアスペルギルス症をはじめとする深在性真菌症は、有効な抗真菌薬が限られており、治療に難渋することも少なくない。そのような中で、多剤耐性病原真菌の出現は、人類において、特に免疫不全患者にとってはきわめて重大な問題である。

近年、アゾール系薬のみならずキャンディン系薬にも耐性を示す *Candida glabrata* の増加が問題視されている（Pfaller MA et al.

Diagn Microbiol Infect Dis. 69:45-50, 2011）。

本研究は、*C. glabrata* における抗真菌薬耐性機序の詳細を解明し、今後の治療戦略や新規薬剤開発へ応用していくことを目的としている。

B. 研究方法

1. Micafungin (MCFG) 低感受性株の誘導

C. glabrata の野生株 CBS138 をキャンディン系薬の一つである MCFG を含有した YPD 固形培地に接種した。増殖してきたコロニーを順次 MCFG 濃度を増加させた培地で継代

培養したところ、MCFG 低感受性株が選択された。表現型の可逆性を検討するために、これらの株は MCFG を含まない培地で 23 日間継代培養した。

2. 抗真菌薬感受性試験

抗真菌薬感受性は、標準的に行われている spot dilution assay, E-test, 微量液体希釈法 (ASTY) を用いて評価した (Miyazaki T et al. PLoS Pathog. 9:e1003160, 2013)。

3. 遺伝子発現解析およびフローサイトメトリ解析

qRT-PCR や rhodamine 6G (R6G) を用いたフローサイトメトリ解析は、これまでに報告されている手法を用いて行った (Miyazaki T et al. PLoS Pathog. 9:e1003160, 2013, Prasad T et al. Antimicrob Agents Chemother. 50:3597, 2006)。

4. 播種性カンジダ症マウスモデルを用いた病原性の検討

C. glabrata の病原性は、播種性カンジダ症マウスモデルを用いて解析した (Miyazaki T et al. PLoS Pathog. 9:e1003160, 2013)。

BALB/cマウス、8週齢、雌 (Charles River Laboratories Japan Inc.) の尾静脈から 0.2 ml の *C. glabrata* 懸濁液 (4×10^8 cells/ml) を接種した。7日後、マウスから肝、腎、脾を摘出し、臓器内菌数を解析した。

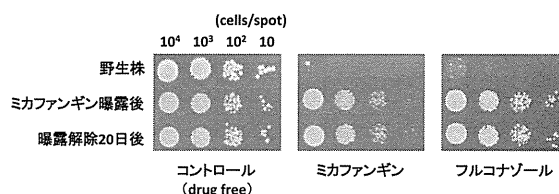
倫理的配慮

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

C. 研究結果

1. *C. glabrata* における MCFG 低感受性化の誘導

低濃度の MCFG に継続的に暴露されることによって、MCFG 低感受性の *C. glabrata* 株が *in vitro* で選択された。これらの株は MCFG を含まない培地で 23 日間継代培養を行ったが、MCFG 低感受性は不可逆的なものであった。



2. MCFG 低感受性 *C. glabrata* 株の表現型解析

驚くべきことに、今回実験的に選択された MCFG 低感受性 *C. glabrata* 株は、作用機序が異なるアゾール系薬に対しても同時に高度耐性を獲得していた。

	最小発育阻止濃度 (MIC)		
	FLC	ITC	VRC
野生株	16	2	0.5
ミカファンギン曝露後	>256	>32	>32
曝露解除20日後	>256	>32	>32

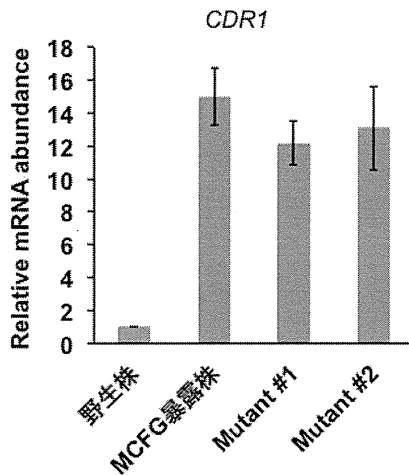
(μg/ml)

3. 全ゲノムシーケンスおよび cDNA ライブラリーを用いた相補的解析による責任遺伝子の同定

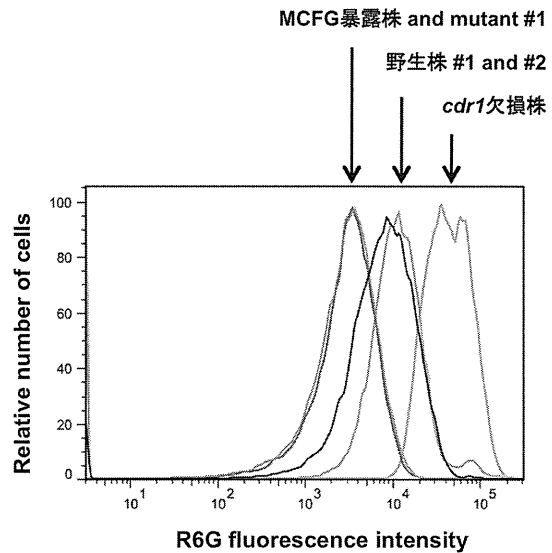
MCFG 暴露株の全ゲノムシーケンスを行ったところ、複数の遺伝子変異が検出されたが、cDNA ライブラリーを用いた相補的解析によって、単一の責任遺伝子変異が同定された。更に、この変異を野生株に導入したところ、全ての表現型が再現された。

4. アゾール耐性機序の解明

主要なアゾール耐性機序として、標的分子である14 α -demethylase (Erg11p) の変異や過剰発現、薬剤排出ポンプ (Cdr1, Pdh1) の活性化が知られている。この変異株では、*ERG11*遺伝子の変異は認めず、発現量も野生株と同等であった。一方、*CDR1*は約12倍、*PDH1*は約2倍の発現量増加が変異株において認められた。



更に、フローサイトメトリーを用いて、Cdr1の基質の一つであるrhodamine 6G (R6G) の細胞内濃度を解析した。薬剤排出ポンプを不活化した状態で受動的に細胞内に取り込まれるR6G濃度は野生株と変異株で同等であった。一方、通常の増殖環境で検討したところ、変異株では野生株よりも明らかにR6Gの細胞内濃度が低下しており、主にCdr1の過剰発現による薬剤排出の促進が示唆された。コントロールとして使用した*cdr1*欠損株では、予想通り細胞内R6G濃度の上昇が確認された。



5. 播種性カンジダ症マウスモデルを用いた病原性の検討

今回同定された遺伝子変異が *C. glabrata* の病原性に与える影響を検討した。経静脈感染7日後の腎および脾内菌数は、野生株と変異株で有意差はなく、播種性カンジダ症マウスモデルにおいては、この変異が *C. glabrata* の病原性を低下させないことが証明された。

D. 考察

近年、世界的にキャンディン系薬の使用頻度が増えており、アゾール系薬のみならずキャンディン系薬にも耐性を示す *C. glabrata* 臨床分離株の増加が報告されている。*FKS* 遺伝子と *ERG11* 遺伝子の産物が、それぞれキャンディン系薬とアゾール系薬の薬剤標的として知られている。薬剤標的の変異は薬剤親和性の低下をもたらすため、重要な耐性機序の一つであるが、今回我々が作製した耐性誘導株においては、いずれの標的遺伝子にも変異を認めなかった。ところが、ある遺伝子のわずか一つのアミノ酸変異が、病原性を低下させることなく、異なる系統の抗真菌薬耐性を誘導することが本研究により示された。

既存の抗真菌薬に対する耐性機序の解明は、

今後新たな薬剤や治療戦略の開発に重要な情報をもたらすものと考えられる。

E. 結論

本研究により、新規の抗真菌薬耐性機序が明らかになった。これは、病原性を低下させることなく、多剤耐性をもたらすものであり、臨床現場で実際に起こりうる可能性がある。分子生物学的手法を用いた更なる解析に加え、この耐性機序が他の菌種でも同様に存在するのか、また、実際に多剤耐性臨床分離株においてどの程度関与しているのかを今後検証していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Miyazaki T, Kohno S. ER stress response mechanisms in the pathogenic yeast *Candida glabrata* and their roles in virulence. *Virulence* 2013 Dec 11;5(2). [Epub ahead of print]
2. Hosogaya N, Miyazaki T, Nagi M, Tanabe K, Minematsu A, Nagayoshi Y, Yamauchi S, Nakamura S, Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kugiyama K, Kohno S. The heme-binding protein Dap1 links iron homeostasis to azole resistance via the P450 protein Erg11 in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 13(4):411-21, 2013.
3. Izumikawa K, Tashiro T, Tashiro M, Takazono T, Kosai K, Morinaga Y, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Kakeya H, Hayashi T, Yanagihara K, Nagayasu T, Kohno S. Pathogenesis and clinical features of chronic pulmonary aspergillosis - Is it possible to distinguish CNPA and CCPA clinically? *J Infect Chemother.* 2013 Dec 11. doi: 10.1016/j.jiac.2013.10.016. [Epub ahead of print]
4. Mihara T, Kakeya H, Izumikawa K, Obata Y, Nishino T, Takazono T, Kosai K, Morinaga Y, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. Efficacy of aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary mucormycosis. *J Infect Chemother.* 2013 Dec 11. doi: 10.1016/j.jiac.2013.09.002. [Epub ahead of print]
5. Izumikawa K, Izumikawa K, Takazono T, Kosai K, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yanagihara K, Hara K, Kohno S. Clinical features, risk factors and treatment of fulminant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: A review of the Japanese literature. *J Infect Chemother.* 2013 Dec 11. doi: 10.1016/j.jiac.2013.09.009. [Epub ahead of print]
6. Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrroj 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(3):252-60, 2013.
7. Inoue Y, Hirayama T, Kondo A, Tomari S, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H,

- Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. A case of influenza pneumonia following pneumococcal infection in an adult patient with concurrent encephalopathy with a lesion in the splenium of the corpus callosum. *Kansenshogaku Zasshi*. 87(4):451-6, 2013.
8. Yamada K, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Hasegawa H, Yasuoka A, Kohno S. In vivo efficacy of biapenem with ME1071, a novel metallo- β -lactamase (MBL) inhibitor, in a murine model mimicking ventilator-associated pneumonia caused by MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 42(3):238-43, 2013.
 9. Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Hayashi T, Nagayasu T, Kohno S. A case series of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis and a new proposal. *Jpn J Infect Dis*. 66(4):312-6, 2013.
 10. Iwanaga N, Fukuda Y, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Soda H, Tashiro T, Kohno S. Necrotizing pneumonia due to femoral osteomyelitis caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Intern Med*. 52(13):1531-6, 2013.
 11. Yamada K, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Hasegawa H, Kohno S. Azithromycin attenuates lung inflammation in a mouse model of ventilator-associated pneumonia by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 57(8):3883-8, 2013.
 12. Migiyama Y, Kaneko Y, Yanagihara K, Morohoshi T, Morinaga Y, Nakamura S, Miyazaki T, Hasegawa H, Izumikawa K, Kakeya H, Kohrogi H, Kohno S. Efficacy of AiiM, an N-acylhomoserine lactonase, against *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model of acute pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 57(8):3653-8, 2013.
 13. Tanaka A, Nakamura S, Seki M, Fukudome K, Iwanaga N, Imamura Y, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Kohno S. Toll-like receptor 4 agonistic antibody promotes innate immunity against severe pneumonia induced by coinfection with influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Vaccine Immunol*. 20(7):977-85, 2013.
 14. Harada Y, Yanagihara K, Yamada K, Migiyama Y, Nagaoka K, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Hasegawa H, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Kohno S. In vivo efficacy of daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a mouse model of hematogenous pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 57(6):2841-4, 2013.
 15. Yamamoto Y, Izumikawa K, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y,

- Miyazaki T, Tsukamoto M, Kakeya H, Yanagihara K, Yasuoka A, Kohno S. Prospective randomized comparison study of piperacillin/tazobactam and meropenem for healthcare-associated pneumonia in Japan. *J Infect Chemother.* 19(2):291-8, 2013.
16. Miyazaki T, Nakayama H, Nagayoshi Y, Kakeya H, Kohno S. Dissection of Ire1 functions reveals stress response mechanisms uniquely evolved in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog.* 9(1):e1003160, 2013.
- 学会発表
1. 宮崎泰可. 深在性真菌症の今後の治療戦略. 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. 横浜. 2013.
2. 峰松明日香、宮崎泰可、他. Vacuolar H⁺-ATPaseの阻害が *Candida glabrata*の抗真菌薬耐性と病原性に与える影響. 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. 横浜.
3. Yohsuke Nagayoshi, Taiga Miyazaki, et al. Unexpected effects of the monoamine oxidase A inhibitor clorgyline on antifungal susceptibility of *Candida glabrata*. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. Yokohama. 2013.
4. 宮崎泰可. カンジダの小胞体ストレス応答と病原性. 第57回日本医真菌学会総会・学術総会. 東京. 2013.
5. 宮崎泰可. 「カンジダ vs. 抗真菌薬」. 第57回日本医真菌学会総会・学術総会. 東京. 2013.
6. 宮崎泰可. カンジダ血症. 第57回日本医真菌学会総会・学術総会. 東京. 2013.
7. 宮崎泰可. 深在性真菌症の今後の治療戦略. 第57回日本医真菌学会総会・学術総会. 東京. 2013.
8. 峰松明日香、宮崎泰可、他. 病原真菌 *Candida glabrata*における Vacuolar H⁺-ATPaseの役割
9. 宮崎泰可. COPDの安定期、増悪期、肺炎合併時の抗菌薬治療について. 第71回日本呼吸器学会・日本結核病学会 九州支部秋季学術講演会. 福岡. 2013.
10. 宮崎泰可. 深在性真菌症治療における各種抗菌薬の位置づけを考える一日頃の疑問に答えるー内科臨床医の立場より. 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. 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
特になし
- 実用新案登録
特になし
- その他
特になし

診断治療研究・アスペルギルス症

研究分担者 山越 智 国立感染症研究所 真菌部

研究要旨 侵襲性肺アスペルギルス症は、免疫能の低下した易感染性宿主に発病し、病態が急速に進行し致死性となることから、発病早期の診断ならびに適切な治療が予後の改善に重要である。アスペルギルス属に使用可能な抗真菌薬に限られた現状では、抗真菌薬の新たな開発が望まれている。これまで我々は、侵襲性肺アスペルギルス症の原因真菌として最も多い *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) を対象とし、シグナルシークエンストラップ(SST-REX)法を用い、膜蛋白質、分泌蛋白質の網羅的同定を行い75種類の遺伝子を得ている。それらの中には病原性に関わる蛋白質も含まれると考えられ、その機能を解析し病原性の発現機構を解明することは、それをターゲットとした新たな治療法の開発につながると期待される。同定された多くの遺伝子は機能不明であったが、その中で機能不明だが構造上ユニークな Y69蛋白質の病原性を調べることを目的として、*A. fumigatus*の遺伝子破壊株の解析を行った。侵襲性肺アスペルギルス症のマウスモデルによりY69蛋白質が病原性に関わることが明らかとなった。

A. 研究目的

侵襲性肺アスペルギルス症は、免疫能の低下した易感染性宿主に発病し、病態が急速に進行し致死性となることから、発病早期の診断ならびに適切な治療が予後の改善に重要である。アスペルギルス属に使用可能な抗真菌薬に限られた現状では、抗真菌薬の開発が望まれている。

主要原因真菌である *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) の細胞外蛋白質の中に、病原性に関与し、治療薬の標的になるものもあると考え、哺乳類の細胞外蛋白質を網羅的に同定できるシグナルシークエンストラップ(SST-REX)法を応用し、*A. fumigatus* の細胞外蛋白質を網羅的に同定した。その中で機能不明だが構造上ユニークな Y69 蛋白質の病原性を調べることを目的として、*A. fumigatus* の遺伝子破壊株の解析を行った。

B. 研究方法

1. 遺伝子改変に用いた *A. fumigatus* 株

Fungal Genetics Stock Center から 臨床分離株 D141 に由来する Afs35 を購入し破壊株の作製に用いた。この株は *akuA* 遺伝子が欠失されており相同組換えの頻度が高くなっている。

2. *A. fumigatus* プロトプラストへの DNA 断片の導入

Afs35 株を培養後、細胞壁を酵素処理により消化し、プロトプラストを調整した。その後、CaCl₂ と PEG を用い Y69 遺伝子相補株作製用 DNA 断片を導入し、寒天培地に播き 0.2 ug/ml pyriithiamine で選択した。30°C で培養し出現したコロニーを分離後、それぞれの胞子を直接 PCR にかけて遺伝子欠損株を同定した。

3. 各種培地での生育の比較

アスペルギルス最少(AMM)培地、PDA 培地、

ならびにそれらにウシ新生仔血清を 10 % 加えた寒天培地を調製し、親株 Afs35、遺伝子欠損株の胞子を各々スポットし、30 °C または 37 °C にて 2 日培養した。

4. 侵襲性肺アスペルギルス症マウスモデル

親株 Afs35、遺伝子欠損株を ICR マウス (メス) に感染させた。菌接種の前日、当日、1 日後にそれぞれ酢酸コルチゾン 200 mg/kg 皮下投与し免疫抑制の前処理を行った。そして、このモデルマウスに *A. fumigatus* の胞子 5×10^6 個を気管内投与し、生存率の推移を調べた。

C. 研究結果

1. Y69 遺伝子破壊株の作製

親株 Afs35 を用い、Y69 遺伝子欠損株を作製した。遺伝子を破壊するために用いた DNA 断片は、精製した Afs35 株のゲノム DNA を鋳型として Y69 遺伝子の 5'側の非コーディング領域約 500 bp と 3'側の非コーディング領域約 500 bp を PCR にて増幅し、薬剤耐性遺伝子 (ハイグロマイシンチミジンキナーゼ融合蛋白質) の両側に連結してクローニングした。得られたプラスミドが期待される組換え体であることをシーケンスにより確認した後、それを鋳型として PCR 法にて増幅することにより、Y69 遺伝子破壊用 DNA 断片を調製した。

Afs35 株を培養した後、細胞壁を酵素処理により消化し、プロトプラストを調製した。その後、CaCl₂ と PEG を用いて Y69 遺伝子破壊用 DNA 断片をプロトプラストに導入し、寒天培地に播き、ハイグロマイシン 200 ug/ml で選択した。そして、30 °C で培養して出現したコロニーを分離した後、それぞれの胞子を直接 PCR にかけて遺伝子破壊株を同定した。その結果、Y69 遺伝子破壊株として、8 株を得ることができた。

2. Y69 遺伝子欠損株は、10%血清を含む寒天平板培養で生育速度が低下する。

Y69 遺伝子欠損株は、AMM, PDA 培地を用

いた 30 °C または 37 °C の培養で、親株 Afs35 と生育速度に差は見られなかった (図 1)。しかし、AMM 培地にウシ新生仔血清を加え 10 % にしたところ、37 °C では差は見られなかったが 30 °C では、生育速度の低下がみられた (図 2)。

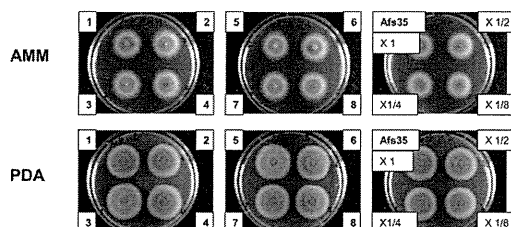


図 1. Y69 遺伝子欠損株の平板培地で生育

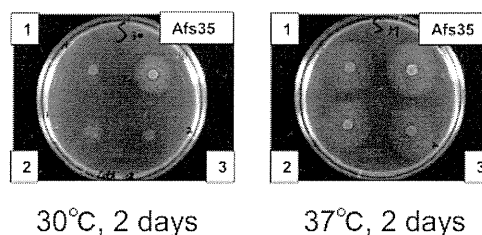


図 2. Y69 遺伝子欠損株の 10 % 血清存在下での生育

3. 侵襲性肺アスペルギルス症マウスモデルによる Y69 遺伝子の病原性への関与

親株 Afs35、遺伝子欠損株 5×10^6 個の胞子をそれぞれ 6 個体の ICR マウスの気管に直接投与し、生存率を調べた。その結果、Y69 遺伝子欠損株では、生存率の上昇が見られた (図 3)。

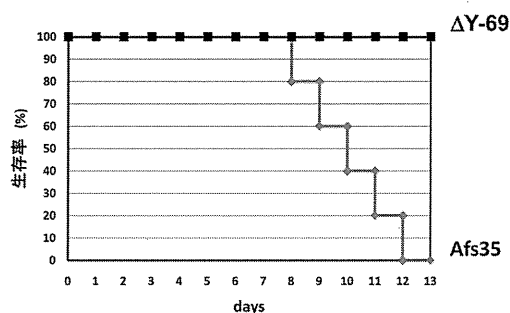


図 3. アスペルギルスマウス感染モデルを用いた Y69 遺伝子の病原性

D. 考察

Y69 遺伝子破壊株を作製し、Y69 遺伝子産物の機能解析を行った。

アスペルギルス感染マウスモデルでの Y69 遺伝子破壊株の致死率の低下は、Y69 遺伝子産物が病原性に関わることを示している。Y69 遺伝子破壊株は、通常の培養条件では親株と生育速度に差は見られなかったが、血清存在下では 30 °C において差が見られた。マウスモデルの結果を考え合わせると、Y69 蛋白質がないと生体内では増殖低下を引き起こし病原性の低下につながる可能性を示唆する。

また、Y69 蛋白質は、植物細胞に対して毒性を持つモチーフを持つ。今後、動物細胞を使って同様な作用があるかどうか検証する必要がある。

E. 結論

A. fumigatus の Y69 遺伝子欠損株を解析した。その結果、Y1 遺伝子は、血清存在下で生育速度が低下し、マウス感染モデルで病原性に関与することが明らかとなった。

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. Nagi M, Tanabe K, Ueno K, Nakayama H, Aoyama T, Chibana H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y. The *Candida glabrata* sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter *Aus1p*, is regulated by iron limitation. *Mol Microbiol.* 88:371-381, 2013.
2. 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.

3. 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.
4. 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.

学会発表

国際学会

1. 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

1. 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.
2. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

実用新案登録

特記事項なし。

その他

特記事項なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

特記事項なし。

血液疾患における糸状菌感染症の新規診断キットの有用性に関する研究

研究分担者 掛屋 弘 大阪市立大学 臨床感染制御学

研究協力者 山越 智 国立感染症研究所 真菌部

研究要旨 血液疾患などの高度免疫抑制患者に発症する深在性真菌症である侵襲性肺アスペルギルス症と接合菌症の早期診断に有用と考えられる血清診断法の開発研究を試みた。我々は、真菌研究における新しいアプローチであるシグナルシークエンストラップ法を利用して得られた *Aspergillus fumigatus* の抗原（Y1 蛋白、B11a 蛋白、B11b 蛋白）と接合菌（*Rhizopus oryzae*）の抗原蛋白（候補 A 抗原）を検出する ELISA キットを作成し、血液疾患患者血清を用いてその評価を行った。

A. 研究目的

医療技術の進歩によりもたらされる免疫不全患者の増加に伴い深在性真菌症も近年増加傾向を示している。その中でもアスペルギルス症は、我が国の剖検例の報告では最も頻度が高い深在性真菌症である。現在、アスペルギルス感染症の早期診断に使用されているガラクトマンナン抗原検出系は、血液悪性疾患の侵襲性肺アスペルギルス症患者では約 80% の感度が報告されているが、偽陽性要因も多いため、更に感度・特異度の高い検査法の開発が期待されている。また、呼吸器系の基礎疾患を有する慢性アスペルギルス症では、抗原検査の特異度は低く、より感染実態を反映する早期診断系の確立が求められている。

一方、ムーコル症（接合菌症）は、白血病などの高度の免疫抑制患者に発症する深在性真菌症である。白血病（MDS を含む）の剖検例では、ムーコル症はアスペルギルス症、カンジダ症に次ぐ、第 3 位にあたり、血液疾患の主要な深在性真菌症であり、その頻度は近年増加傾向にある。その治療薬は、わが国で

は未発売のボサコナゾールとアムホテリシン B 製剤のみが有効であるが、その予後は極めて不良で初期の抗真菌薬選択が重要となる。その診断は、培養による真菌学的検査と病理組織学的検査に限られ、補助診断としての血清学的検査は実用化していない。

我々は真菌研究における新しいアプローチであるシグナルシークエンストラップ法を利用し、真菌の診断ツールならびに治療薬候補を応用することが期待される膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定した後に、新規抗原を選定した。その後モノクローナル抗体を開発して、アスペルギルス抗原およびムーコル症の早期診断法を確立することを目的に研究開発を試みた。

アスペルギルス抗原検出キットは、国立感染症研究所真菌部（宮崎義継、山越 智ら）にて開発中で、*Aspergillus fumigatus* より得られた Y-1 蛋白、B11a および B11b 蛋白抗原を検出する ELISA キットを作成した。

ムーコル抗原検出キットは、ムーコル症の原因真菌で最も多い *Rhizopus oryzae* より得

られたA抗原 (26kDa蛋白) を検出するELISAキットを作成し、その評価を行った。前年度までの研究で候補A抗原は *R. oryzae*、*R. microspores*、*R. microspores var. rhizopodiformis* 培養上清中およびそれらの感染マウス血清中からも検出され、新たな抗原検出法となる可能性が示唆されている。

本研究により、本診断キットがアスペルギルス症およびムーコル症の補助診断法として用いることが臨床現場で可能になれば、今後の糸状真菌症診断率の飛躍的な向上ならびに予後の改善につながることを期待される。

B. 研究方法

1. 患者血清

大阪市立大学医学部附属病院の血液疾患に合併するアスペルギルス属およびその他の糸状菌による侵襲性真菌感染症患者 (疑い例を含む) を対象に検討した。(倫理委員会承認済)

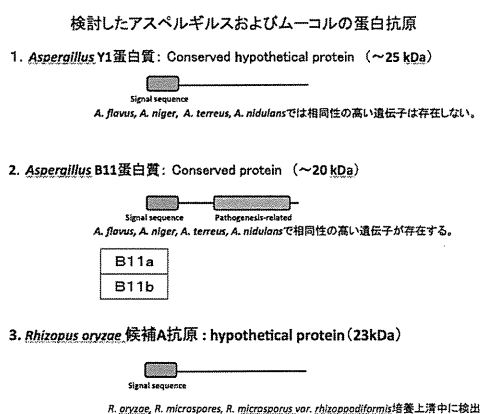
2. 検討したアスペルギルスおよびムーコルの蛋白抗原 (図1)

Aspergillus Y1 蛋白

Aspergillus B11 蛋白 (B11a, B11b)

Rhizopus oryzae 候補 A 抗原

図1



3. 対象患者

侵襲性肺アスペルギルス症 (Probable ~ possible) 患者血清 (11 検体)

Rhizopus oryzae 肺感染症患者の血清と BAL 検体: 1 例

Healthy Volunteer 血清 (5 検体)

上記検体を用いてそれぞれの ELISA キットにて目的抗原の検出を試みた。

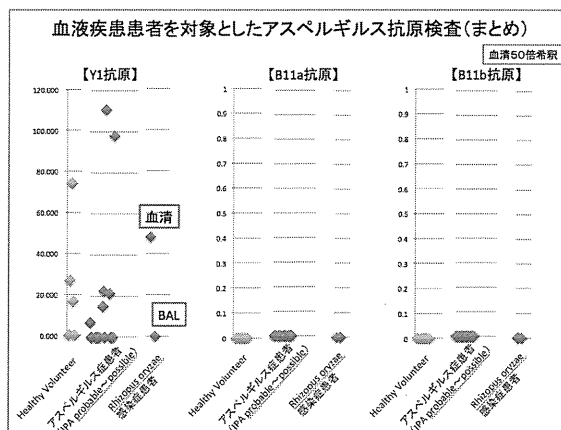
C. 研究結果

1. アスペルギルス抗原検査

侵襲性肺アスペルギルス症 (Probable ~ possible) 患者の6検体に Y-11 抗原を検出した。一方 Healthy Volunteer の3名も陽性であった。また Y-1 抗原は *R. oryzae* 肺感染患者の検体も検出された。

B11a 抗原および B11b 抗原は、どの検体も感度以下であった。

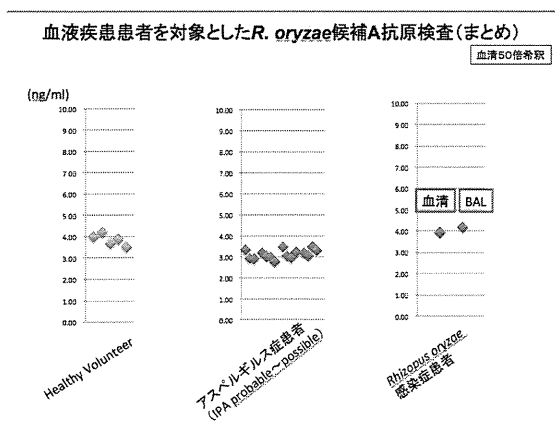
図2



2. *R. oryzae* 抗原検出

R. oryzae 肺感染症患者の血清および BAL は Healthy Volunteer やアスペルギルス症患者よりやや高い値が得られた。

図 3



D. 考察

侵襲性肺アスペルギルス症 (Probable-possible) および *Rhizopus oryzae* 肺感染症患者の臨床検体を用いてELISAキットの評価を行った。アスペルギルス抗原3種の中で、Y-11蛋白を検出する検体が多かったが、Healthy Volunteerにも抗原が検出され、その特異度に問題を残していることが考えられた。また対象としたアスペルギルス症患者は、血清ガラクトマンナン値もしくはβグルカン値により欧州癌研究治療機関/真菌症研究グループ (EORTC/MSG) の診断基準により選出された推定診断例 (probable fungal case) および可能性症例 (possible fungal case) であり、確定診断例 (proven fungal case) は1例もなかった。

一方、*Rhizopus oryzae* 肺感染症症例は確定診断例であったが、検討した症例は1例に限られるため、今後の検体の集積が重要と考えられた。

E. 結論

それぞれの検出キットは早期診断に有効である可能性が示唆されたが、さらに症例を重ねて検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. なし

学会発表

1. なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

1. なし

実用新案登録

1. なし

その他

1. なし

