

からの IFN- γ 産生が有意に増加していた。一方、肺内での Th2 細胞への分化には影響がみられなかった。Th1 細胞への分化に重要な IL-12p70 の産生、そしてマスター転写制御因子である Tbet の発現が WT マウスに比べ IL-17AKO マウスにおいて有意に更新していたが、Th2 細胞分化に重要なマスター転写制御因子 GATA3 の発現には影響はなかった。逆に、WT マウスに rIL-17A を投与すると、IFN- γ 、Tbet、IL-12R β 2 の発現が有意に低下し感染が悪化した。感染早期における IL-17A の産生細胞を検討したところ、3 日後の肺で $\gamma\delta$ T 細胞が主要な細胞であることが明らかとなった。

2. 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 Tg マウスを用いた Tm 細胞の解析

Tg マウスの脾細胞を *C. neoformans* 生菌で刺激すると IFN- γ が産生されたが、non-Tg マウスでは産生がみられなかった。*C. neoformans* を感染させると、14 日後での肺内生菌数が non-Tg マウスに比べ Tg マウスにおいて有意に低下した。肺内における IFN- γ 産生は、感染 7 日、14 日後において Tg マウスで有意な増加がみられた。

肺内における Tm 細胞は、Tg マウス、non-Tg マウスともに感染後時間経過に伴い増加したが、14 日、28 日後の細胞内 IFN- γ は Tg マウスにおいてより多くの発現が観察された。

3. クリプトコックス感染後の Tm 細胞の動態とサイトカイン産生

クリプトコックス感染モデルでは、感染 3 日後に肺内で顕著な IFN- γ 産生が検出される。その産生細胞を解析する過程で、近年存在が明らかとなり注目されている tissue-resident Tm (Trm) 細胞 (*Immunity* 41: 886-897, 2014) が重要な役割を担うことを見出した。Tg マウスでも同様な所見が得られ、特に、

CD69⁺CD103⁻、CD69⁻CD103⁺、CD69⁺CD103⁺ と異なる 3 種類のサブセットの中では、CD69⁺CD103⁻ Trm 細胞が感染 3 日後に最も顕著な増加を示した。

4. OVA 発現クリプトコックスの作成と免疫応答の解析

OVA 発現、非発現 *C. neoformans* を、OVA 特異的 TCR を高発現する OT-II マウスの肺内に感染させ、2 週間後に採取した傍気管リンパ節細胞を *in vitro* で OVA により再刺激し培養上清中に産生された IFN- γ を測定した。OVA 非発現 *C. neoformans* を感染させたマウスでは OVA 再刺激により IFN- γ は産生されなかったが、OVA 発現 *C. neoformans* を感染させたマウスでは顕著な IFN- γ 産生が観察された。また、OVA 発現 *C. neoformans* を感染させたマウスの肺ホモジネートでは、OVA 非発現 *C. neoformans* 感染マウスと比較して有意に高い IFN- γ 産生がみられた。

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。昨年度の研究では、IL-17AKO マウスにおいて肺での *C. neoformans* の排除及び IFN- γ 産生が亢進することを明らかにした。本年度の研究ではその機序について解析を試み、 $\gamma\delta$ T 細胞から産生される IL-17A が NK 細胞、NKT 細胞のような自然免疫リンパ球からの IFN- γ 産生を抑制するとともに、ヘルパー T 細胞における IL-12R β 2 及び Th1 細胞分化に重要なマスター転写制御因子 Tbet の発現を抑制することを明らかにした。今回得られた研究成果から、これまで Th1-Th2 バランスによってクリプトコックス感染の病態が理解されてきたが、Th17 免疫応答も考慮する必要があることが

示された。

昨年度の研究で、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Tgマウスを作製することに世界に先駆けて成功した。本年度は、このマウスを用いることでクリプトコックス感染後の肺内におけるTm細胞の動態を解析し、non-Tgマウスと比較してTgマウスにおいてIFN- γ を発現するTm細胞がより早期に出現し長期間存在すること、その結果に一致して肺における真菌の排除が促進することを明らかにした。さらに、近年存在が明らかとなり注目されているTrm細胞 (*Immunity* 41: 886-897, 2014) が、クリプトコックス感染3日後という早期に肺内で増加しIFN- γ 産生に関与する可能性を示す結果が得られた。この細胞がどのようにして出現し増加するのか未だ不明な点が多く、今後さらなる検討が必要である。

クリプトコックス症の原因真菌には *C. neoformans* と *C. gattii* があり、わが国ではほとんどが前者による。一方、1999年のバンクーバーでのアウトブレイクに端を発し、それまでは主に熱帯亜熱帯地域で流行していた *C. gattii* 感染症が温帯地域でも患者がみられるようになり問題となっている (*MMWR* Vol.59, No.28, 2010)。わが国でも数例の患者の報告がみられ今後増加する可能性も懸念される (*Emerg Infect Dis* 16: 1155-1157, 2010; *日本医真菌学会雑誌* 55: 51-54, 2014; *脳神経外科* 42: 123-127, 2014)。*C. gattii* 感染症は、*C. neoformans* 感染症とは異なり、健常者にも中枢神経系感染症を起こすことも少なくなく致死率も高いことから「高病原性クリプトコックス症」とも呼ばれ警戒されている。この *C. gattii* の高病原性機序には宿主の免疫応答性が深く関与していることが想像に難しく、特に我々のこれまでの研究成果から Th1、Th2、Th17 細胞への分化がどのように影響を

受けるのかについて検討することが重要と考えられる。そのためには、本研究により開発した Tg マウスを用いるとともに、*C. gattii* と *C. neoformans* による感染下で共通抗原に対する免疫応答性を比較検討することが有用である。このような背景から、本研究では共通抗原として OVA を発現する *C. gattii* と *C. neoformans* の作製を試み、*C. neoformans* 由来株 (YC-13) について成功した。今後は両真菌種についてより多くの株に OVA 遺伝子を導入し、共通抗原 OVA に対する免疫応答性、特に Th 細胞の分化能への影響について詳細な解析を行っていきたい。

E. 結論

本研究により以下の点が明らかになった。

1) クリプトコックス抗原特異的T細胞受容体を高発現する Tg マウスを用いて Trm 細胞、長期メモリーT細胞からの IFN- γ 産生動態が明らかになった。2) クリプトコックス感染における Th1-Th2 バランスの IL-17A による制御機構を見出した。3) クリプトコックス感染における獲得免疫成立機構を解明するために、OVA 遺伝子導入株と OVA 特異的T細胞受容体発現 Tg マウスを用いた解析系を確立した。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 の新たな役割が明らかになった。また、本研究により作製に成功した Tg マウス及び OVA 発現クリプトコックスを用いることで、エイズ合併クリプトコックス髄膜炎や高病原性クリプトコックス症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. Nakamura Y, Sato K, Yamamoto H, Matsumura K, Matsumoto I, Nomura T, Miyasaka T, Ishii K, Kanno E, Tachi M, Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: Dectin-2 deficiency promotes Th2 response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 83: 671-681, 2015
2. 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.* 82: 1606-1615, 2014 (SPOTLIGHTに選出される)
3. 川上和義: クリプトコックス感染に対する免疫応答と免疫記憶 - 内因性再燃発症の可能性と免疫記憶との関連について - 日本化学療法学会雑誌 62: 674-680, 2014
4. 石井恵子, 川上和義: クリプトコックス感染における防御免疫機構の up to date, 日本医真菌学会雑誌, 55: 107-114, 2014
5. 川上和義: クリプトコックスに対する感染防御免疫反応, 臨床免疫・アレルギー科 62: 557-563, 2014
6. 川上和義: クリプトコックス症の診断と治療, 深在性真菌症を学ぶ, 臨床検査 58: 90-96, 2014
7. 川上和義: クリプトコックス症: 診断の実際とピットフォール, 肺真菌症の診断・治療におけるピットフォール, 呼吸器内科 25: 14-19, 2014
8. 石井恵子, 川上和義: 真菌感染における自

然免疫活性化の分子機構, 化学と生物 (日本農芸化学会) 52, No2, 2014

学会発表

1. Kawakami K: Defect of type I interferon signaling leads to promoted Th1 response, IL-4-dependent mucin production and clearance of *Cryptococcus neoformans*. Oral presentation, Symposium, The 9th International Conference of Cryptococcus and Cryptococcosis, Amsterdam, May 15-19, 2014.
2. Kawakami K: Host Immune Response to *Cryptococcus neoformans*. Special lecture, The First National Conference on Fungal Infection and Host Immunity, Changzhou, October 18, 2014.
3. Matsumoto I, Nakamura Y, Sato K, Yamamoto H, Ishii K, Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: Dectin-2 deficiency leads to increased Th2 response and mucin production in lungs after infection with *Cryptococcus neoformans*. Oral presentation, Workshop, 第43回日本免疫学会学術集会, 京都, December 10-12, 2014.
4. Nomura T, Sato K, Yamamoto H, Matsumoto I, Ishii K, Iwakura Y, Kawakami K: Detrimental role of IL-17A in the Th1 response and host defense to cryptococcal infection. Poster, 第43回日本免疫学会学術集会, 京都, December 10-12, 2014.
5. 松本郁美, 佐藤 光, 山本秀輝, 野村俊樹, 石井恵子, 宇野賀津子, 川上和義: クリプトコックス感染防御における1型インターフェロンの役割. 第25回日本生体防御学会学術総会, 仙台, July 9-11, 2014.

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
研究協力者 峰松明日香 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医療科学講座

研究要旨 深在性真菌症に対して有効な治療薬はきわめて限られている。そのような中で、近年、多剤耐性 *Candida glabrata* の増加傾向が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。まず、*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おらず、臨床的にカンジダ症の原因菌となりうる可能性が示唆された。これまで、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ない。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

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。

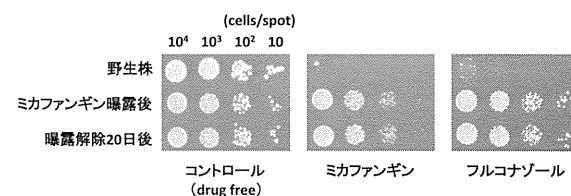
倫理的配慮

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。

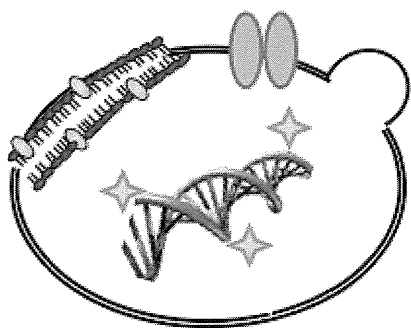
| | 最小発育阻止濃度 (MIC) | | |
|------------|----------------|-----|-----|
| | FLC | ITC | VRC |
| 野生株 | 16 | 2 | 0.5 |
| ミカファンギン曝露後 | >256 | >32 | >32 |
| 曝露解除20日後 | >256 | >32 | >32 |

(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。

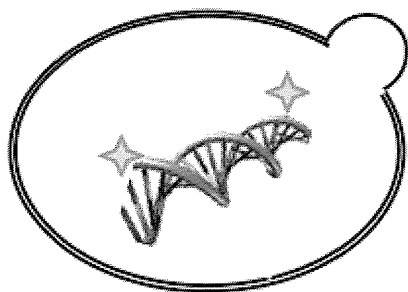
**MCFG暴露株
(multiple mutations)**



アゾール耐性
キャンデイン耐性



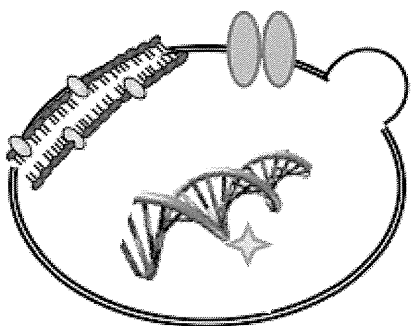
単一遺伝子変異回復株



アゾール感受性
キャンデイン感受性



**責任遺伝子変異再導入株
(single mutation)**



アゾール耐性
キャンデイン耐性

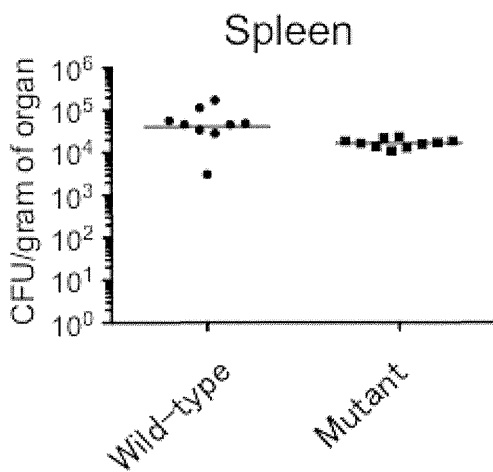
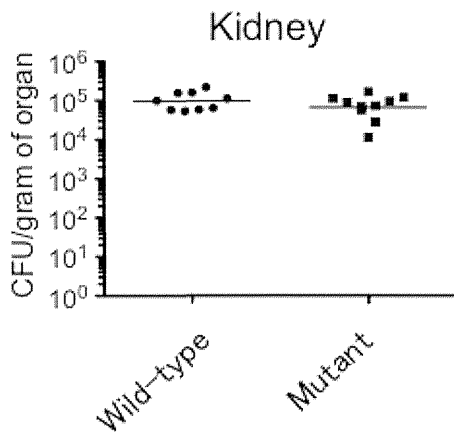
4. アゾール耐性機序の解明

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、世界的にカ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カ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、それぞれカ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*. 2014 Feb 15;5(2):365-70.
2. Miyazaki T. Elucidation of multiantifungal resistance mechanisms in pathogenic fungi and their clinical impacts. *Jpn J Antibiot*. 2014 Aug;67(4):263-71.
3. Kohno S, Kakeya H, Izumikawa K, Miyazaki T, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mitsutake K, Miyazaki Y, Maesaki S, Yasuoka A, Tashiro T, Mine M, Uetani M, Ashizawa K. Clinical features of pulmonary cryptococcosis in non-HIV patients in Japan. *J Infect Chemother*. doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.025. Epub 2014 Oct 29.

4. Nagayoshi Y, Miyazaki T, Minematsu A, Yamauchi S, Takazono T, Nakamura S, Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Kohno S. Contribution of the Slt2-regulated transcription factors to echinocandin tolerance in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 2014 Nov;14(7):1128-31.
5. Kakeya H, Izumikawa K, Yamada K, Obata Y, Nishino T, Takazono T, Kosai K, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. Three cases of concurrent infection with *Mycobacterium tuberculosis* and *Cryptococcus neoformans*. *Intern Med.* 2014;53(15):1685-92.
6. Kosai K, Izumikawa K, Imamura Y, Tanaka H, Tsukamoto M, Kurihara S, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Miyazaki T, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. Importance of functional assessment in the management of community-acquired and healthcare-associated pneumonia. *Intern Med.* 2014;53(15):1613-20.
7. Kakeya H, Izumikawa K, Yamada K, Narita Y, Nishino T, Obata Y, Takazono T, Kurihara S, Kosai K, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yanagihara K, Takenaka M, Tashiro T, Kohno S. Concurrent subcutaneous candidal abscesses and pulmonary cryptococcosis in a patient with diabetes mellitus and a history of corticosteroid therapy. *Intern Med.* 2014;53(12):1385-90.
8. Yamada K, Morinaga Y, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Uno N, Nakamura S, Imamura Y, Hasegawa H, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Mikamo H, Kohno S. Azithromycin inhibits MUC5AC induction via multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in human airway epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther.* 2014 Aug;28(2):165-70.
9. Takazono T, Nakamura S, Imamura Y, Yoshioka S, Miyazaki T, Izumikawa K, Sawai T, Matsuo N, Yanagihara K, Suyama N, Kohno S. A retrospective comparative study of recombinant human thrombomodulin and gabexate mesilate in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation patients. *J Infect Chemother.* 2014 Aug;20(8):484-8.
10. Kaku N, Yanagihara K, Morinaga Y, Yamada K, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, Matsuda J, Uno N, Hasegawa H, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Kohno S. Influence of antimicrobial regimen on decreased in-hospital mortality of patients with MRSA bacteremia. *J Infect Chemother.* 2014 Jun;20(6):350-5.
11. Kakeya H, Seki M, Izumikawa K, Kosai K, Morinaga Y, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. Efficacy of combination therapy with oseltamivir phosphate and azithromycin for influenza: a multicenter, open-label, randomized study. *PLoS One.* 2014 Mar 14;9(3):e91293.
12. Takazono T, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Kohno S. Paradoxical response to disseminated

- non-tuberculosis mycobacteriosis treatment in a patient receiving tumor necrosis factor- α inhibitor: a case report. BMC Infect Dis. 2014 Feb 28;14:114.
13. Tanaka A, Nakamura S, Seki M, Iwanaga N, Kajihara T, Kitano M, Homma T, Kurihara S, Imamura Y, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Kohno S. The effect of intravenous peramivir, compared with oral oseltamivir, on the outcome of post-influenza pneumococcal pneumonia in mice. Antivir Ther. 2014 Feb 12.
 14. 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. 2014 Mar;20(3):208-12.
 15. 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. 2014 Feb;20(2):104-8.
 16. 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. 2014 Mar;20(3):181-5.
- 学会発表
1. Taiga Miyazaki. A single amino acid substitution in Ipi1 confers multi-antifungal resistance without affecting virulence in *Candida glabrata*. 12th ASM Conference on Candida and Candidiasis. New Orleans, USA. 2014.
 2. 峰松明日香、宮崎泰可、他. *Candida glabrata*のV-ATPase活性と薬剤耐性との関連. 真菌症フォーラム第15回学術集会. 東京. 2014.
 3. 宮崎泰可. *Candida glabrata*で特有の進化を遂げた小胞体ストレス応答機序. 第62回日本化学療法学会・第84回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同学会. 岡山. 2014.
 4. 西川博、宮崎泰可、他. 病原真菌 *Candida glabrata*のvacuolar H⁺-ATPaseが酸化ストレス応答に及ぼす影響. 第62回日本化学療法学会・第84回日本感染症学会西日本地方会学術集会 合同学会. 岡山. 2014.
 5. 宮崎泰可. 病原真菌におけるストレス応答機序の解明と新規治療戦略への応用. 第73回日本呼吸器学会九州地方会学術集会. 鹿児島. 2014.
 6. 宮崎泰可. 最新のガイドラインから読み取れる深在性真菌症診療の現状と課題. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 横浜. 2014.
 7. 宮崎泰可. カンジダの病原性とストレス応答. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 横浜. 2014.
 8. 本川奈々、宮崎泰可、他. 肺アスペルギローマとの鑑別が困難であった *Pseudallescheria boydii*肺菌球症の1例.

第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 横浜. 2014.

9. 西川博、宮崎泰可、他. 病原真菌 *Candida glabrata* の vacuolar H⁺-ATPase が酸化ストレス応答に及ぼす影響. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会. 横浜. 2014.

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

研究協力者 大西和夫 国立感染症研究所 免疫部

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患者に発病し、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・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が限られた現状では、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、膜蛋白質、分泌蛋白質の網羅的同定を行い、病原性に関わる蛋白質を複数解析してきた。昨年度、その中で機能不明で、構造上ユニークな Y69 蛋白質について解析した結果、病原性に関わることが明らかとなった。今年度は、Y69 蛋白質をターゲットとした新たな診断系の確立を目的として、同蛋白質を検出するサンドイッチ ELISA 系の構築を行った。

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。現在、アスペルギルス感染症の早期診断は、ガラクトマンナン抗原を検出する系であり、血液悪性疾患の患者では約 80% の感度を有しているが、他の基礎疾患では特異度が低く、迅速で適切な治療をするためには、より正確な診断ができる新しい検出系の確立が求められている。

主要原因真菌である *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) の細胞外蛋白質の中に、感染後体液に放出され、診断の標的になるものがあると考え、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ケンストラップ (SST-REX) 法を応用し、*A. fumigatus* の多くの細胞外蛋白質を同定した。Y69 蛋白質もその中

の 1 つで機能不明であるが構造上ユニークな特徴を持つ。今年度は、それをターゲットとした新たな診断系の確立を目的として、サンドイッチ ELISA 系の構築を行った。

B. 研究方法

1. 大腸菌による組換え蛋白質の作製

Y69 蛋白質の cDNA を pGEX-6P-His6-FLAG、pMAL-c4X-Strep-tagII にクローニングし、大腸菌を使い大量産生を行った。GST あるいは MBP との融合蛋白質を、Glutathione Sepharose カラムあるいはアミロースレジンカラムにより精製した。

2. 抗 Y69 蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

GST-Y69-His6-FLAG 20 ug を BALB/c マウスに免疫した。抗体価の上昇したマウスに関して、尾静脈よりブースト (5 ug) を 2 回か

け、脾臓細胞を調整後、エレクトロフュージョンによるミエローマ細胞(Sp2/O-Ag14)との細胞融合を行った。HAT 培地によりハイブリドーマのセレクションを行ない、増殖してきたハイブリドーマの培養上清を用い、MBP-Y69-S を吸着させた 96 穴プレートで ELISA 法により抗 Y69 抗体産生細胞を選んだ。マウスの使用にあたっては、「国立感染症研究所・動物実験計画指針」等の規則に基づいて、動物愛護に細心の注意を払って実験を行なった。

3. 抗体の精製

各蛋白質に対するモノクローナル抗体は、いずれも protein A あるいは G セファロースカラム、あるいは大腸菌で作成した Y69 組換え体蛋白質を樹脂にカップリングしたカラムを作成し精製した。

4. 2 次抗体のビオチン化

2 次抗体を 0.1M NaHCO₃ 溶液に透析し 20 倍のモル濃度のビオチン試薬 (NHS-LC-biotin (PIEACE 社)) を加え、遮光条件下で 4 時間反応した。反応後、PBS に透析した。

5. サンドイッチ ELISA

精製したモノクローナル抗体を 1 および 2 次抗体として用いた。2 次抗体は、ビオチン化したものを使用した。1 次抗体を 100 mM 炭酸 Buffer (pH 9.5) で希釈し、ELISA プレートに 12 時間 4°C で吸着させ、PBS-T (0.05%Tween20 in PBS) にて洗った後、ブロッキングを 1 時間室温で行った。サンプルを加え、2 時間室温で放置後、PBS-T で洗浄した。さらに 2 次抗体を加え、室温で 1 時間放置後、PBS-T で洗浄した。Neutravidin-POD 溶液を加え、室温で 30 分放置後、酵素発色基質を加え発色させた、2 N 塩酸で反応停止し、450 nm で吸光度を測定した。

市販のヒト健常人血清を希釈し、大腸菌により作製した組換え体蛋白質を 1 ng/ml の濃度で加えサンプルとし、ELISA 系を行なった (添加回収実験)。

C. 研究結果

1. モノクローナル抗体の作製

Y69 遺伝子産物についてモノクローナル抗体の作製を行った。この蛋白質は、約 25 kDa の分子量を有し、他のアスペルギルス属、他の糸状菌 *Penicillium marneffe* 等にも保存される蛋白質である。大腸菌により大量産生した、GST-Y69-His6-FLAG 蛋白質をマウスに免疫し、MBP-Y69-S 蛋白質をコートした ELISA にて抗体価の上昇を確認、ブーストをかけたのち、脾臓細胞を調整した。ミエローマと細胞融合を行い、得られたハイブリドーマクローンを ELISA にてスクリーニングし、最終的に Y69 に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ 3 種類 (21A4B8, 83H10C6, 100C7D4) を得た。タイピングにより産生さ

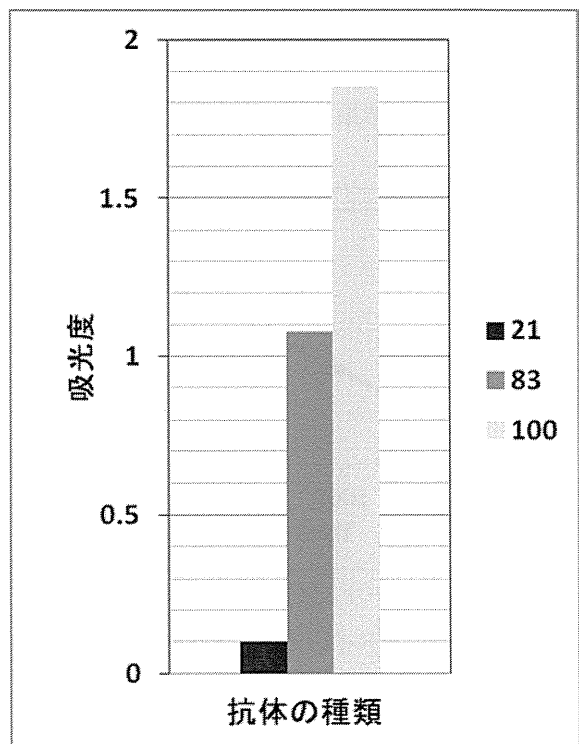


図 1. 各抗体の力価

れる抗体はそれぞれ IgM, IgG1, IgG2b であることが分かった。それぞれのハイブリドーマから産生抗体を精製し、大腸菌で作製した融合蛋白質を用い、ウエスタンブロット法および ELISA 法を行い力価、特異性の検討をした (図 1)。

2. Y69 蛋白質検出のためのサンドイッチ ELISA 系の構築

Y69 遺伝子産物に対するサンドイッチ ELISA 系として 2 種類のモノクローナル抗体で挟む系を構築することを試みた。二次抗体としてビオチン化したモノクローナル抗体を使用した。発色には Neutravidin-POD を 2 次抗体に吸着させ、TMB で発色させる系を条件検討した。一次抗体は、得られたモノクローナル抗体 (83H10C6) を選び、条件検討の後、最終的に一次抗体 10 ug/ml、二次抗体 (100C7D4) 2 ug/ml の濃度に決めた。ブロッキング剤は 5% BSA を用いた。標準蛋白質として大腸菌で作製した MBP との融合蛋白質を用い、1 次抗体 83H10C6、2 次抗体 100C7D4 の組み合わせで 30 pg/ml までの検出感度を得た (図 2)。逆の抗体の組み合わせでもほぼ同様の結果を得た。

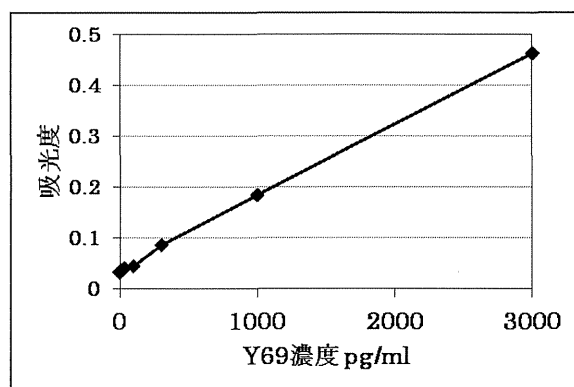


図2. モノクローナル抗体83H10C6, 100C7D4を用いたサンドイッチELISAの標準曲線

3. 血清の影響

表 1 のように、ヒト血清の 2.5% から 10%

の範囲であり回収率の低下は観察されず、40-50%の回収率を示した。

表 1. 血清存在下での標準蛋白質の回収率

| 血清濃度 (%) | 吸光度 | 回収率 (%) |
|----------|--------|---------|
| 0 | 0.184 | |
| 2.5 | 0.0964 | 52.4 |
| 5 | 0.0826 | 45.0 |
| 10 | 0.0768 | 41.7 |

D. 考察

得られたモノクローナル抗体のうち 21A4B8 は IgM であり、他の 2 つの抗体に比べて抗体価は低かった。そこで残りの 2 つの抗体を使いサンドイッチ ELISA 系が組めるか検討したところ、どちらが 1 次抗体でも同程度の感度が得られた。このことから、2 つの抗体が違うエピトープを認識する可能性が高いことが考えられた。血清存在下、10%以下では、どの濃度でもほぼ半分程度の回収率であったことから、血清の濃度が高くても極端な感度の低下がなく測定できる可能性が考えられ、将来的に患者血清を用いた場合、あまり血清の希釈が必要なくなることから、結果的に検出限界の上昇につながると考えられる。

E. 結論

A. fumigatus の細胞外蛋白質 Y69 蛋白質についてプロトタイプのスンドイッチ ELISA 系の構築を行った。大腸菌で合成した標準蛋白質を用いて 30 pg/ml 程度の感度を得、血清の影響が見られるものの、濃度に依存した感度の低下が少ない系が構築できた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

和文

1. 宮崎義継, 名木 稔, 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一. *Candida* 属. 感染道場. 4: 23-26, 2015 年, メディカルレビュー社.

学会発表

1. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 名木 稔, 大野秀明, 宮崎義継. アスペルギルスの抗真菌薬耐性. 第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 1-2 日, 2014 年, 横浜.
2. 壇辻百合香, 大野秀明, 梅山 隆, 上野圭吾, 大久保陽一郎, 田辺公一, 名木 稔, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 澁谷和利, 宮崎義継. マクロファージの貪食を指標とした *Cryptococcus gattii* 感染病態の評価. 第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会. 11 月 1-2 日, 2014 年, 横浜.
3. 名木 稔, 田辺公一, 石野敬子, 梅山 隆, 山越 智, 大野秀明, 宮崎義継. 真菌の薬剤耐性の現状と課題. 第 63 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 10 月 29-31 日, 2014 年, 東京.
4. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継. カンジダ属の抗真菌薬耐性. 第 35 回関東医真菌懇話会. 6 月 7 日, 2014 年, 東京.
5. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 荒木光二, 皿谷 健, 宮崎義継. ミカファンギン耐性 *Candida glabrata* 株の *in vitro* 性状解析. 第 35 回関東医真菌懇話会. 6 月 7 日, 2014 年, 東京.
6. 浦井 誠, 金子幸弘, 稲垣浩司, 狩谷哲芳, 政本大二郎, 水谷 真, 名木 稔, 上野圭吾, 山越 智, 田辺公一, 梅山 隆, 大川原明子, 金城雄樹, 大野秀明, 宮崎義継. 腹膜透析中に発症した *Cryptococcus laurentii* による腹膜炎の一例. 第 35 回関

東医真菌懇話会. 6 月 7 日, 2014 年, 東京.

7. 梅山 隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越 智, 名木稔, 宮崎義継. 症例から学ぶ感染症セミナー—ムーコル症の真菌同定検査. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18 日-20 日, 2014 年, 福岡.
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. 病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の Polo-like キナーゼ遺伝子破壊株の菌糸成長・分生子形成・抗真菌薬感受性への影響. 第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18 日-20 日, 2014 年, 福岡.
9. 田辺公一, 大野秀明, 名木 稔, 浦井 誠, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 亀井克彦, 宮崎義継. カンジダ属の抗真菌薬感受性の変貌. 第 88 回日本感染症学会学術講演会第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18-20 日, 2014 年, 博多.
10. 浦井 誠, 金子幸弘, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 金城雄樹, 大野秀明, 杉田 隆, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* 由来莢膜多糖の免疫細胞に及ぼす影響. 第 88 回日本感染症学会学術講演会第 62 回日本化学療法学会総会合同学会. 6 月 18-20 日, 2014 年, 博多.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

ムーコル症新規診断キットの有用性の検討

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 金子幸弘 大阪市立大学 細菌学
仁木満美子 大阪市立大学 細菌学
山越 智 国立感染症研究所 真菌部

研究要旨 深在性真菌症であるムーコル症の原因真菌 (*Rhizopus oryzae*) の抗原蛋白 (候補 A 抗原) を検出する ELISA キットの評価を行った。ELISA の実験条件を変更して、その感度を高めることが可能となった。さらに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

ムーコル症は稀な深在性真菌症であるが、血液疾患患者の剖検例では、アスペルギルス症、カンジダ症に次ぐ第3位で、近年その患者数の増加が注目されている。ムーコル症の原因真菌には *Rhizopus*、*Absidia*、*Cunninghamella*、*Rhizomucor* などがある。ムーコル症の診断は、病理組織学的検査によって形態的に特徴的な菌糸を同定することや病変部位より真菌を培養同定することによってなされるが、基礎疾患の状態によっては侵襲的な検査が困難な場合も多い。その治療薬はアムホテリシン B 製剤 (D-AMB, L-AMB) と我が国では未発売のボサコナゾールのみが有効であるが、その予後は極めて不良であるため初期の治療薬選択が重要となる。

遷延する抗菌薬不応性の発熱性好中球減少症患者では、侵襲性カンジダ症や肺アスペルギルス症、肺ムーコル症などが鑑別として挙げられ、血液培養や胸部 CT、血清学的検査 (アスペルギルスガラクトマンナン抗原、 β -D-グルカン) 等の検査にてスクリーニングが行われる。画像所見は非特異的であり、原因を推

定することは難しい。そのため血清診断が有用となる。真菌の細胞壁の成分である β -D-グルカンを検出する血清診断検査は、カンジダ血症ではある程度の感度・特異度を有する。アスペルギルスガラクトマンナン抗原検査は、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。一方、ムーコル症に特異的な血清診断は実用化していないため、感度・特異度の高い検査法の開発が期待されている

我々は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ている。

ムーコル抗原検出キット (ELISA) として、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ることを明らかとし、新たな抗原検出法となる可能性が示唆されていたが、その感度や特異度が限られており、本年度は検出法の条件を見直すことを計画した。

B. 研究方法

1. ELISA 法条件の変更

従来使用していた ELISA プレートおよびブロッキングバッファー、抗体の希釈濃度を変更し、良い条件を検討した。

2. サンプル精製条件の検討

前年度の実験では、サンプルの血清濃度を 100% (希釈なし)で行っていたが、血清濃度が高濃度すぎて測定に影響を与えた可能性も考えられた。そのため、できるだけ高濃度で、かつ測定を阻害しない血清濃度を検討した。

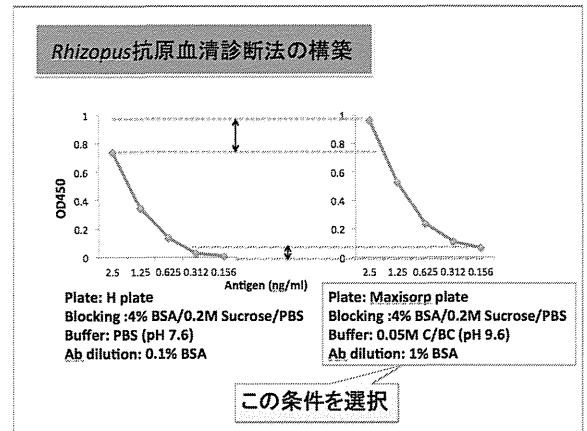
3. 患者血清による検討

当院血液内科にて肺真菌症が疑われ、抗真菌薬が投与された症例の血清を使用して、ELISA 法により *R.oryzae* 候補 A 抗原の検出を試みた。

C. 研究結果

1. ELISA 法条件の変更 (図 1)

ELISA プレートおよびブロッキングバッファー、抗体の希釈濃度を変更することで、候補 A 抗原を検出する感度を変更することに成功した。



2. サンプル精製条件の検討 (図 2)

できるだけ高濃度で、かつ測定を阻害しない血清濃度を検討した。その結果、血清濃度が 1~20% の範囲では、測定結果への影響はほとんど認められないことが判明した。

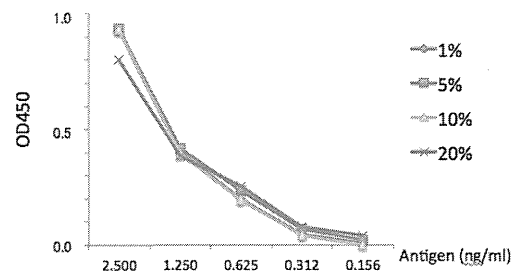


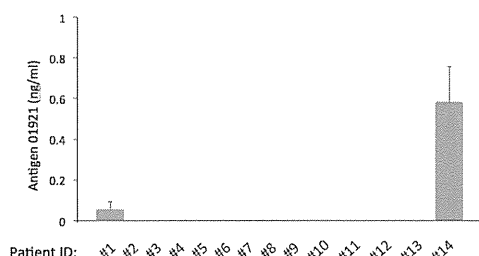
図 2 : 血清が測定数値に及ぼす影響

3. 患者血清による検討

深在性真菌症が疑われ、抗真菌薬が投与された 14 症例の中で #14 のみが陽性に検出された。

#14 症例は、急性リンパ性白血病にて末梢血幹細胞移植を受け、その後に慢性 GVHD や閉塞性気管支炎等にて治療中の 33 歳の女性であるが、発熱を主訴に来院。来院時の WBC 8000/ μ L、CRP 10.94mg/dl であった。右上葉に浸潤影が認められた。広域抗菌薬 (TAZ/PIPC) および抗真菌薬 (CPFPG) にて治療が開始されるも改善傾向を認めず、抗真

菌薬を CPFG より L-AMB へ変更。その後炎症所見および症状の改善が認められた。経過中、喀痰培養よりムーコル属（遺伝子同定中）が検出された。基礎疾患および経過より肺ムーコル症と診断した。



#1～#12、#14:肺真菌症が疑われ、抗真菌薬が投与された症例(血液内科)
 #13:副鼻腔Mucor症症例(治療後)

図3 患者血清による検討

D. 考察

今回我々は、ELISAの感度・特異度を上げるために再度実験条件を見なおした。血清サンプルの希釈濃度が1～20%の範囲では、測定結果への影響はほとんど認められないことが明らかとなったため、その濃度を採用した。肺真菌症が疑われた血液疾患患者の血清を用いた検討では、肺ムーコル症と診断された患者の血清のみが陽性を示し、本検査の有用性が示唆された。陽性を示した症例は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

R. oryzae の 26kDa 蛋白抗原を検出する ELISA 検査の実験条件を変更することで、検査キットの感度を高めることが可能となった。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

