

- 器学会関東地方会 合同学会, 東京, 9/20, 2014
17. 渋谷和俊. 白血病に関わる糸状菌感染症. 血液疾患領域 肺真菌症 Meeting, 栃木, 10/16, 2014
 18. 渋谷和俊. 白血病と真菌症. 第14回血液疾患フォーラム 特別演題 2. 東京, 10/18, 2014
 19. 中山晴雄, 渋谷和俊. ABPC/SBT の腫瘍内濃度を計測することが可能であった脳腫瘍の1例. 第63回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会 第61回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会, 東京, 10/29-31, 2014
 20. 渋谷和俊. 医真菌学の中の病理. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会 教育講演 4, 横浜, 11/1-2, 2014
 21. 金城雄樹, 上野圭吾, 浦井 誠, 金子幸弘, 大久保陽一郎, 清水公德, 大野秀明, 亀井克彦, 川本 進, 渋谷和俊, 宮崎義継. クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発. シンポジウム 3 病原真菌の感染成立機構. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 11/1-2, 2014
 22. 大櫛 瞳, 安藝恭子, 篠崎 稔, 大久保陽一郎, 若山 恵, 栃木直文, 渋谷和俊, 加納 塁, 村山琮明. FISH 法による臨床病理検体からのムーコル目真菌検出系の開発. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 11/1-2, 2014
 23. 大久保陽一郎, 大野秀明, 安藝恭子, 篠崎 稔, 石渡誉郎, 栃木直文, 若山 恵, 根本哲生, 下平佳代子, 中山晴雄, 田辺公一, 山越 智, 金子幸弘, 宮崎義継, 亀井克彦, 渋谷和俊. *Cryptococcus gattii* 株における病原性発現機構の解明. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 11/1-2, 2014
 24. 中山晴雄, 本城小径, 渋谷和俊. 脳神経外科領域におけるカテーテル関連酵母血症の傾向. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 11/1-2, 2014
 25. 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, 渋谷和俊, 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, 横浜, 11/1-2, 2014
 26. 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井 誠, 川本 進, 亀井克彦, 大野秀明, 渋谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチンの作用. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 11/1-2, 2014
 27. 若山 恵, 篠崎 稔, 三宅洋子, 大久保陽一郎, 石渡誉郎, 安藝恭子, 富士原弘子, 高安健人, 栃木直文, 密田亜希, 根本哲生, 渋谷和俊. 呼吸器細胞診標本に検出された真菌の臨床的意義. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 11/1-2, 2014
 28. 篠崎 稔, 若山 恵, 三宅洋子, 大久保陽一郎, 石渡誉郎, 安藝恭子, 富士原弘子, 高安健人, 栃木直文, 密田亜希, 村山琮明, 根本哲生, 渋谷和俊. 慢性肺アスペルギルス症における細胞診断材料を用いた菌要素の検出に関する検討-第2報- 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 11/1-2, 2014
 29. 栃木直文, 安藤常浩, 篠崎 稔, 安藝恭子, 石渡誉郎, 大久保陽一郎, 後町杏子, 秦 美暢, 村山琮明, 若山 恵, 根本哲生, 渋谷和俊. 慢性肺アスペルギルス症の病理組織学的検討. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 横浜, 11/1-2, 2014
 30. 稲毛麻弥, 篠崎 稔, 石渡誉郎, 若山

恵, 石井真由美, 佐々木久美子, 井手忠, 釘宮剛城, 根本哲生, 渋谷和俊. 腹水細胞診中に出現した神経内分泌腫瘍の一例. 第53回日本臨床細胞学会秋期大会, 下関, 11/8-9, 2014

31. 渋谷和俊, 侵襲性ムーコル症の病態, アムビゾームエリアフォーラム in 岐阜, 岐阜, 11/14, 2014

32. 後町杏子, 伊藤貴文, 石田文昭, 菊池直, 佐藤敬太, 佐野 剛, 磯部和順, 坂本晋, 高井雄二郎, 若山 恵, 植草利公, 渋谷和俊, 本間 栄. 加湿器使用による再燃症状軽減型の慢性過敏性肺炎と診断した IVATS 例. 第212回日本呼吸器学会関東地方会, 横浜, 11/22, 2014

33. 渋谷和俊. 侵襲性糸状菌症の病理と病態. 第6回中杉血液内科感染症講演会. 東京, 12/2, 2014

34. 渋谷和俊. 侵襲性糸状菌症の病態. 第14回血液疾患感染症カンファレンス. 名古屋, 1/16, 2015

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

病原真菌 *Candida albicans* の病原因子
分泌性アスパラギン酸プロテアーゼ阻害薬の探索

担当責任者 杉田 隆 明治薬科大学微生物学教室

研究協力者 張 音実 明治薬科大学微生物学教室

研究要旨 カンジダ症は我が国の二大真菌感染症の一つであり、その主要な起因菌は *Candida albicans* である。本菌の新しい制御法として病原因子(分泌性アスパラギン酸プロテアーゼ：SAP)の阻害について検討した。探索の結果、既存医薬品の中から16種が潜在的にSAPを抑制する能力を有することが示された。これはSAPタンパク質と当該医薬品とのドッキングシミュレーションでも検証できた。これらの化合物をリードとして新しい真菌感染症治療薬の開発が期待できる。

A. 研究目的

Candida albicans はヒトの腸管、口腔あるいは皮膚に常在する真菌であるが、易感染性宿主にカンジダ症を引き起こす。本菌の主要な病原因子の一つに分泌性アスパラギン酸プロテアーゼ (SAP) がある。SAP は SAP1-10 におよぶ 10 の遺伝子ファミリーが存在する。SAP 遺伝子の発現は温度や pH 等の様々な環境因子に依存するが、中でも SAP2、5、9、10 は最も頻繁に発現し宿主細胞への侵入に寄与する。*C. albicans* はアゾール系あるいはエキノキャンディン系抗真菌薬に感受性を示すが、耐性株も徐々に出現しているため、常に新規な抗真菌薬の開発が求められている。真菌細胞もヒトと同様に真核細胞であるため、真菌特異的な選択毒性を見いだすことは、細菌やウイルスに比べて一般に困難である。

そこで、本研究では菌体を直接殺滅するのではなく、病原因子 SAP を制御する方法について検討した。

B. 研究方法

- 1) 使用菌株：カンジダ症患者血液より分離した *C. albicans* 4 株を用いた。
- 2) 被験薬：FDA-approved drug library, Screen-Well™, Japanese version (Cosmo-Bio) に含まれる 635 化合物を用いた。
- 3) 薬剤感受性試験：被験薬に直接的な抗菌作用を有するか否かを検討するために、CLSI 27A3 ガイドラインに従って感受性試験を実施した。
- 4) 抗 SAP 作用の検討：YYG 培地(1.17% yeast carbon base, 0.01% yeast extract, 0.27% glucose)に *C. albicans* 株と被験薬を加えて 37°C で 48 時間培養した。培養上清に BSA 含有クエン酸緩衝液を加えてさらに、37°C で

48 時間培養した。遠心上清に TCA 溶液を加えて遊離アミノ酸の吸光度を測定した。なお、SDS-PAGE でも BSA 分解能を観察した。

5) SAP2 タンパクとリガンドの相互作用
SAP を抑制した化合物が、SAP タンパクと相互作用を示すかドッキングシミュレーションを行なった。

5-1) SAP2 タンパク質構造の加工：PDB より当該タンパク質の X 線結晶解析像を取得した。

5-2) ドッキングシミュレーション：リガンドとなる化合物の安定配座の推定構造を構築した。この初期配座を MOE に入力し、LowmodeMD 法により各リガンド化合物がとりえる多様な配座を発生させた。

5-3) QSAR 解析：Dragon を用いて、Docking study で得た活性配座の三次元構造から構造記述子を算出し、logIC との相関分析を行なった。

C. 研究結果

1) 抗 SAP 作用阻害薬の探索：16 化合物が MIC 以下の濃度で BSA の分解を抑制した。その作用は濃度依存的であった (Table 1, Fig. 1)。代表的な SDS-PAGE を Fig. 2 として示した。

2) SAP タンパクとリガンドの相互作用：リガンドの SAP2 タンパクに対する相互作用解析を行なったところ、全てのリガンドの Udock および Uele 値が負値を示した。Uvdw は正値を示す化合物もみられた (Table 2)。また阻害実験に用いた化合物濃度 (IC) の対数値 (log₁₀) と ASEScore は有意な正の相関を示した (Fig. 3)。QSAR 解析により、logIC と「酸素間トポロジカル距離=6 における酸素原子ペア数」を示す構造パラメーターである F0[O-O] との間により負の相関がみられた (Fig. 4)。MOE を用いた SAP2 タンパクの基質親和性ポケット内でリガンドのとりうる多様な配座を発生させ周囲のアミン酸との

相互作用を解析した。Fig 5 に代表例として Bleomycin を示した。【本シミュレーションは明治薬科大学・植沢博士の支援を得て実施した】

D. 考察

Candida albicans はヒト常在菌であるため病原因子のみを制御して疾患克服することも治療の選択肢の一つになりえると考えた。SAP は最も研究されている病原因子であるため動物実験においてもその病原因子としての意義は確認されている。加えて、新薬の開発が困難な今日においては既存薬に新しい作用を見いだすドラックリプロファイリング研究も有用である。これは薬物動態や副作用等の情報が蓄積されているため開発期間の短縮も期待できるからである。本研究では、635 種のうちから 16 もの SAP にドッキングする既存医薬品を見いだした。これらの医薬品がカンジダ症の治療にすぐに応用できるわけではないが、当該医薬品をリードとしてあたらな創薬研究に展開できる可能性が示された。

E. 結論

病原真菌 *Candida albicans* の病原因子である分泌性アスパラギン酸プロテアーゼを制御可能な化合物を既存医薬品中に見いだした。今後の創薬研究へ展開ができることが期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (原著)

1. Mekha N, Takashima M, Boon-Long J, Cho O, Sugita T. Three new basidiomycetous yeasts, *Pseudozyma alboarmeniaca*, sp. nov., *P. crassa* sp. nov., *P. siamensis* sp. nov. isolated from Thai patients. *Microbiol. Immunol.* **58**, 9-14,

- 2014.
2. Li C, Ran Y, Sugita T, Zhang E, Xie Z, Cao L. *Malassezia* associated hyperkeratosis of the nipple in young females: report of three cases. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **80**, 79-81, 2014.
 3. Hiruma M, Cho O, Hiruma M, Kurakado S, Sugita T, Ikeda S. Genotype analyses of human commensal scalp fungi, *Malassezia globosa*, and *Malassezia restricta* on the scalps of patients with dandruff and healthy subjects. *Mycopathologia.* 2014 Jun;177(5-6):263-9.
 4. Cho O, Shiokama T, Ando Y, Aoki N, Uehara C, Maeda E, Matsumoto S, Kurakado S and Sugita T, Screening of compounds from an FDA-approved drug library for the ability to inhibit aspartic protease secretion from the pathogen yeast *Candida albicans*. *Pharm. Reg. Affairs*, 2014, 3: 5.
 5. Matsumoto S, Kurakado S, Shiokama T, Ando Y, Aoki N, Cho O, Sugita T. In vitro synergistic effects of anthracycline antitumor agents and fluconazole against azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *J. Develop. Drugs*, 2014, 3:125.
 6. Takemoto A, Cho O, Morohoshi Y, Sugita T, Muto M. Molecular characterization of the skin fungal microbiome in patients with psoriasis. *J. Dermatol.* 42: 166-170, 2015
 7. Ikeda R, Ichikawa T, Miyazaki Y, Shimizu N, Ryoike T, Haru K, Sugita T, Takashima M. Detection and characterization of plasminogen receptors on clinical isolates of *Trichosporon asahii*. *FEMS Yeast Res.* 14: 1186-95, 2014

学会発表 (国際)

1. Sugita T. Skin microbites and related skin diseases. 21th Annual Meeting of Korean Society of Medical Mycology, 2014/05, Seoul, Korea
2. Sugita T. Monitoring skin fungal microbiome of astronauts. 8th International

Space Life Science Working Group on Space Microbiology, 2014/05, Osaka

3. Sugita T. Medical mycological research builds. 1st Congress of Turkish Medical Mycology, 2014/09, Ankara, Turkey

学会発表 (国内)

1. 張 音実、高島昌子、中島早苗、坪井良治、杉田 隆、ゲノム情報を基にした *Trichosporon asahii* に対する MLST 法の開発、第 35 回関東医真菌懇話会、2014/06、東京
2. 比留間翠、張 音実、比留間政太郎、中島早苗、杉田 隆、池田志孝、フケ症患者と健常人頭皮における *Malassezia globosa* と *Malassezia restricta* の遺伝子型解析、第 35 回関東医真菌懇話会、2014/06、東京
3. 浦井 誠、金子幸弘、田辺公一、梅山隆、山越 智、上野圭吾、金城雄樹、大野秀明、杉田 隆、宮崎義継、高病原性 *Cryptococcus gattii* 由来莖膜多糖の免疫細胞に及ぼす影響、第 88 回日本感染症学会総会、2014/06、博多
4. 比留間 翠、張 音実、比留間政太郎、西川 朱實、杉田 隆、池田 志孝、フケ症患者の頭皮真菌叢の網羅的解析と *Malassezia* 遺伝子多型の検討、第 113 回日本皮膚科学総会、2014/5、京都
5. 杉田 隆、張 音美、倉門早苗、坪井良治、荻島大貴、シンポジウム「ビッグデータ時代に向けた次世代細菌学・真菌学研究」、第 97 回日本細菌学会関東支部総会、2014/11、東京
6. 杉田 隆、トリコスポロン研究の Up-to-date 第 58 回日本医真菌学会総会、2014/11、横浜
7. 杉田 隆、ゲノム解析から見えてきたマラセチアの病原因子、第 58 回日本医真菌学会総会、2014/11、横浜
8. 杉田 隆、脂漏性皮膚炎とマラセチア、第 58 回日本医真菌学会総会、2014/11、横浜

9. 倉門早苗、杉田 隆、*Candida albicans* のバイオフィルム形成関連遺伝子の検索、第 58 回日本医真菌学会総会、2014/11、横浜
10. 張 音実、谷畑 望、坪井良治、杉田隆、紫外線照射により色型別される角栓中に存在する微生物（真菌および細菌）の網羅的解析、第 58 回日本医真菌学会総会、2014/11、横浜
11. 浦井 誠、金子幸弘、上野圭吾、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* の莢膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響、第 58 回日本医真菌学会総会、2014/11、横浜
12. 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、澁谷和俊、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、2014/11、横浜
13. 市川知恵、張 音実、杉田 隆、池田玲子、*Cryptococcus gattii* 細胞表層多糖類の糖鎖プロファイリング、第 58 回日本医真菌学会総会、2014/11、横浜
14. 鈴木詠律子、杉田 隆、加納 塁、村山琮明、*Trichosporon asahii* の PFGE 法による核型解析、第 58 回日本医真菌学会総会、2014/11、横浜
15. 二木芳人、坪井良治、杉田隆、槇村浩一、宮崎義継、望月隆、渋谷和俊、真菌感染症の検査法と臨床、第 26 回日本臨床微生物学会総会・学術集会、2015/1、東京

H. 知的財産権の出願特許状況
なし。

移植等の易感染性患者に発症する深在性真菌症の臨床疫学的研究

担当責任者	高倉俊二	京都大学医学研究科	臨床病態検査学
研究協力者	長尾美紀	京都大学医学研究科	臨床病態検査学
	山本正樹	京都大学医学研究科	臨床病態検査学
	一山 智	京都大学医学研究科	臨床病態検査学

研究要旨 移植領域において、侵襲性真菌症の予防と治療は移植の成否を左右するが、移植臓器の違いや術後経過の患者差によって発症リスクが異なる。抗真菌薬予防投与による発症抑制の困難な晩期の侵襲性真菌症のリスク因子の解析を行い、症例対照研究を実施した。2007～2013年の間に肝移植を受けた患者において、侵襲性真菌症を発症した患者は269例中15例(5.6%)であり、3ヵ月目以降の発症はその約半数の7例(2.6%、アスペルギルス症5例、カンジダ・クリプトコッカス症各1例)であった。多変量解析により、術前からの免疫抑制、術後3ヵ月以内の菌血症および再開腹術が独立した因子であることが判明した。

A. 研究目的

- (1) 侵襲性真菌症の非発症例、早期発症例、晩期発症例に分け、移植臓器と術式、術前・術後の臨床因子を後ろ向きに調査する。
- (2) 上記因子について統計解析を行い、とくに晩期発症（術後3ヵ月以降）のリスク因子に注目し、臓器移植における侵襲性真菌症の発症リスク因子を解明する。

B. 研究方法

2007年～2013年までの京都大学病院において実施した16歳以上の肝移植において、術後侵襲性真菌症の発症を調査した。診療録のレビューを行い、侵襲性真菌症の発症の有無をEORTC/MSG基準にしたがって判定した。臨床背景、術前・術後の臨床因子統計解析し、発症リスク因子を検索した。

C. 研究結果

期間内（7年間）に269例の肝移植術が実施され、うち術後に侵襲性真菌症の発症は15例（5.6%）でみとめた。うち、3ヵ月目以降の晩期発症例は、7例（2.6%）に認められた。原因真菌はアスペルギルス5例、カンジダ・クリプトコッカスが各1例であった。

術前・術後因子から危険因子を統計解析したところ、多変量解析により、術前からの免疫抑制、術後3ヵ月以内の再開腹術、術後3ヵ月以内の菌血症発症歴の3つが、独立した、晩期の侵襲性真菌症のリスク因子であった。

D. 考察

肝移植後にみとめられる解剖学的改変、抗菌薬投与による常在細菌叢のかく乱、細胞性免疫抑制はすべての患者に共通する因子であるが、それらの中でも免疫抑制剤の投与期間の長さ、および術後の細菌感染症や開腹術による侵襲と抗菌薬による細菌叢の変化が

さらに易感染性の高まった一群の患者が存在し、これらの影響が晩期に至るまで侵襲性真菌感染症のリスクを高めていると推定された。当初想定していた拒絶反応、免疫抑制剤の種類や量、サイトメガロウイルス感染などは今回の研究で独立因子となった3つの因子と比較して相対的に関与が弱いことが判明した。

E. 結論

肝移植を例にとって解析した移植術後晩期発症の侵襲性真菌感染症のリスク因子は術前からの免疫抑制、術後3ヵ月以内の再開腹術、術後3ヵ月以内の菌血症発症歴の3つであった。移植領域における侵襲性真菌症の発症予防や早期治療は高リスク群にフォーカスを当てる必要性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

(2015年 第89回日本感染症学会総会にて発表予定)

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。

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）
酵母様真菌感染症の病原性解明と疫学・診断法・制御法の研究

酵母様真菌感染症の疾患感受性・病態解明・治療研究

I. non-HIV populationにおけるクリプトコックス症の発症因子の臨床的解析

- ① 疾患感受性遺伝子の同定
- ② 抗IFN- γ 抗体保有率の解析

II. カンジダ症の新治療開発

- ① *in vitro*バイオフィルムモデルにおける抗真菌薬（新薬も含む）の効果検討

担当責任者 泉川公一 長崎大学大学院医歯薬総合研究科
感染免疫学講座 臨床感染症学

研究要旨

A. 研究目的

クリプトコックス感染症は世界的にはHIV患者の増加に伴い、罹患頻度が高く、死亡率も高い感染症である。本邦においては、HIV患者は多くない一方で、クリプトコックス症の罹患率は低くはない。また、必ずしも基礎疾患を有さなくても感染を起こすことが知られているものの、感染する危険因子や宿主側の因子などは不明のままであり、この点を解明することは感染予防、発症予防に有用である。

深在性真菌症においてもっとも頻度の高いカンジダ症について、新しい抗真菌薬の登場により、予後が改善してきているが、カテーテル感染は少なくない。また、基礎疾患によりカテーテルが抜去できない患者にカンジダ血症が発症するとカテーテル局所でバイオフィルムが形成され、抗真菌薬もその活性が限られてくる。バイオフィルムが形成された状態で、最善の治療をめざすために基礎

的な検討が必要である。

B. 研究方法

1. 非 HIV 患者におけるクリプトコックス症の臨床病態解析と疾患感受性検討

1) 臨床解析・自験例

非 HIV 患者におけるクリプトコックス症について、長崎大学病院における非 HIV 患者に発症したクリプトコックス症自験例について、後方視的に解析する。

2) 疾患感受性遺伝子解析

長崎大学病院と関連施設におけるクリプトコックス症例を対象に、患者血液から gDNA を抽出し、おもに Pattern Recognition Receptor (PRR) について Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) 解析を行う。

（倫理面への配慮）

研究プロトコールについて、長崎大学病院の倫理委員会で承認され、かつ、患者本人より

承諾が得られた場合にのみ行う。

3) 抗 IFN- γ 抗体の保有率調査

長崎大学病院と関連施設におけるクリプトコックス症例を対象に、患者血液における抗 IFN- γ 抗体の保有について ELISA 法にて行う。

(倫理面への配慮)

研究プロトコールについて、長崎大学病院の倫理委員会で承認され、かつ、患者本人より承諾が得られた場合にのみ行う。

2. カンジダ症における *in vitro* バイオフィルムモデルにおける抗真菌薬 (新薬も含む) の効果検討

Silicon elastomer (SE) シートを用い、*in vivo* に近い状態におけるバイオフィルム形成モデルを作成し、抗真菌薬の効果について検討する。対象にするカンジダは、カテーテル感染症を起こしやすい *Candida parasilosis* などの *non-albicans Candida* を用いる。

C. 研究結果

1. 非 HIV 患者におけるクリプトコックス症の臨床病態解析と疾患感受性検討

1) 臨床解析・自験例

151 症例について後方視的解析を行い、67 例 (44.4%) は基礎疾患を有していなかった。

主な基礎疾患は糖尿病(32.1%)、血液疾患(22.6%)、膠原病(22.6%)であった。胸部画像所見では、肺野末梢に結節影、腫瘍影を呈することが多く見られた。基礎疾患を有する例では、右中葉に見られることが多く、気管支透亮像を呈することも多く認められた。脳髄膜炎を有しないクリプトコックス症ではアゾール系薬が治療の主流であり、基礎疾患を有さない場合は、平均 2.87 ヶ月、有する場合は 6.64 ヶ月で治療を行われていた。血清クリプトコックス抗原値は治療終了の目安にはならないことが証明された。予後に関しては、高齢、低タンパク血症、低アルブミ

ン血症、ステロイド使用、高い CRP 値、脳髄膜炎が予後因子として同定された。

2) 疾患感受性遺伝子解析

長崎大学病院の倫理委員会に申請中である。

3) 抗 IFN- γ 抗体の保有率調査

長崎大学病院の倫理委員会では承認済みであり、臨床検体を前向きに収集中である。

2. カンジダ症における *in vitro* バイオフィルムモデルにおける抗真菌薬 (新薬も含む) の効果検討

複数の *non-albicans Candida* を用いて、バイオフィルム形成を行っている。培養液の流速により、SE シート上におけるバイオフィルム形成が安定しておらず、流速や向きなどについて条件を検討中である。

E. 結論

本邦における非 HIV 患者におけるクリプトコックス感染症の患者背景、治療実態、ならびに予後不良因子については、一定の成績を得ることができた。一方で、疾患感受性については、今後、倫理審査で承認された後に続けて行っていく。また、カンジダのバイオフィルム感染症の *in vitro* モデル開発についても条件設定などで改善を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kohno S, Takeya 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.* 21: 23-30, 2015

2. Izumikawa K, Tashiro T, Tashiro M, Takazono T, Kosai K, Morinaga Y, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Takeya 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. 20: 208-212, 2014
 3. Walker B, Izumikawa K, Tsai HF, Bennett JE. Milbemycin A4 oxime as a probe of azole transport in *Candida glabrata*. FEMS Yeast Res. 14:755-761, 2014
 4. Takeya 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. 53:1685-1692, 2014
 5. Takeya 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. 53:1385-1390, 2014
 6. Nagayoshi Y, Miyazaki T, Minematsu A, Yamauchi S, Takazono T, Nakamura S, Imamura Y, Izumikawa K, Takeya H, Yanagihara K, Kohno S. Contribution of the Slt2-regulated transcription factors to echinocandin tolerance in *Candida glabrata*. FEMS Yeast Res. 14: 1128-1131, 2014
 7. Mihara T, Takeya 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. 20: 104-108, 2014
2. 学会発表
 1. Kohno S, Takeya 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. 9th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis (Amsterdam, The Netherlands)
 2. Nishikawa H, Hirano K, Takazono T, Nakamura S, Imamura Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. Antifungal activities of T-2307 an arylamidine compound against *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen. 9th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis (Amsterdam, The Netherlands)
 - H. 知的財産権の出願・登録状況
 1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

*Cryptococcus gattii*の免疫原性に関する研究

担当責任者 金子幸弘 大阪市立大学大学院医学研究科 細菌学
研究協力者 大野秀明 埼玉医科大学 総合医療センター 感染症科・感染制御科
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 高病原性クリプトコックス症病原体 *Cryptococcus gattii* の免疫原性について *in vivo* および *in vitro* での解析を行った。マウス肺感染症モデルでは、*C. neoformans* に比べて、*C. gattii* は肉芽腫形成が弱く、炎症細胞の集積をほとんど認めなかった。また、*in vitro* での解析では、*C. gattii* から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にくく、莢膜多糖構造の違いによることが明らかとなった。以上のことから、*Cryptococcus gattii* は、免疫を誘導しないために肉芽腫形成が弱い可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、米国 CDC から、致死率が高い真菌症として、*Cryptococcus gattii* の注意喚起がなされ、北米西海岸からの拡大が危惧されている。わが国においても平成 22 年に初めて、北米流行 *C. gattii* 株と同一遺伝子型の VGIIa 株による重症中枢神経系クリプトコックス症症例が報告された。細胞性免疫不全者で重症化しやすい近縁種の *Cryptococcus neoformans* に比べて、*C. gattii* は、健常人での死亡例も多く、*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. マウス肺感染モデルにおける肉芽腫形成能

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 株および *C. gattii* JP02 株を用いた。マウスに経気管的に菌を接種し、生存率の比較と、15 日目の肺の病理組織を検討した。

2. *in vitro* での免疫応答

C. neoformans H99 株および *C. gattii* JP02 株から莢膜多糖を抽出、精製し、C57BL/6 由来の樹状細胞に接種して 24 時間培養後、上清中に産生されるサイトカイン産生量を ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

1. マウス肺感染モデルにおける肉芽腫形成能

生存期間の比較では、*C. neoformans* は約 30 日、*C. gattii* は約 20 日で、*C. gattii* の方が、感染致死性が高いことが示された。また、肺病理の比較では、*C. neoformans* に比べて、*C. gattii* は肉芽腫形成が弱く、炎症細胞の集積をほとんど認めなかった (図 1)。

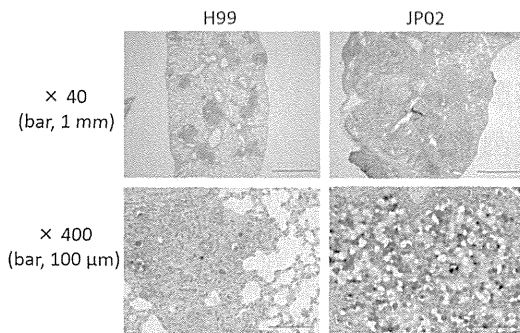


図 1. 感染肺切片の Alcian blue 染色像

2. in vitro での免疫応答

H99 株から精製した莢膜多糖は濃度依存的に IL-6 または IL-12 の産生を誘導したが、JP02 株ではほとんど誘導しなかった (図 2)。

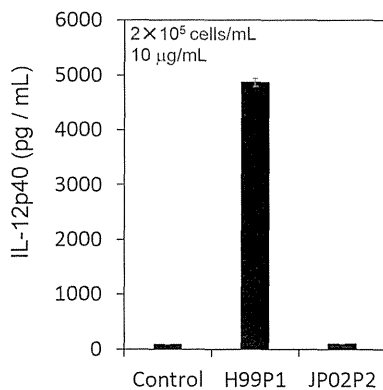


図 2. 精製多糖のサイトカイン産生誘導能

D. 考察

クリプトコックス症病原体の感染致死性の原因として、いくつかの要因が考えられるが、免疫応答を誘導しにくいこともその要因の一つになりうる。本研究で用いた株のうち、*C. gattii* JP02 株は、in vitro でも in vivo でも免疫応答を誘導しにくいことが確認された。莢膜多糖の成分の比較等から、莢膜多糖の構造の違いが免疫誘導能に関連している

可能性が示唆された。

E. 結論

クリプトコックス症病原体の感染致死性の要因のひとつとして、*C. gattii* の免疫誘導能の低さが関連している可能性が示唆され、莢膜多糖の構造の違いに起因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 Ueno K, Kinjo Y, Okubo Y, Aki K, Urai M, Kaneko Y, Shimizu K, Wang D, Okawara A, Nara T, Ohkouchi K, Mizuguchi Y, Kawamoto S, Kamei K, Ohno H, Niki Y, Shibuya K, Miyazaki Y. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. *Infection and Immunity*. 2015, in press.
- 2 Urai M, Kaneko Y, Niki M, Inoue M, Tanabe K, Umeyama T, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Potent drugs that attenuate anti-*Candida albicans* activity of fluconazole and their possible mechanisms of action. *J Infect Chemother*. 20(10):612-615, 2014.

和文

- 1 宮崎義継, 金子幸弘, 樽本憲人. V. 感染症検査・真菌. パーフェクトガイド検査値事典[第2版]. 477-481, 2014年, 総合医学社.
- 2 金子幸弘. 特集/呼吸器感染症研究における新しい展開. *呼吸器内科*. 26(1), 2014年.

- 3 金子幸弘, 浦井 誠, 宮崎義継. III 診断・治療法から見た大切な真菌症、4 治療薬の選択と投与. 目で見る真菌と真菌症. p192-202, 2014年, 医薬ジャーナル社, 大阪.
- 4 大野秀明, 金子幸弘, 田辺公一. *Cryptococcus neoformans* 感染の各種病態: 免疫不全において. 感染症内科. 2(6):567-574, 2014年.

学会発表
国際学会
なし

国内学会

- 1 金城雄樹, 上野圭吾, 浦井 誠, 金子幸弘, 大久保陽一郎, 清水公德, 大野秀明, 亀井克彦, 川本 進, 澁谷和俊, 宮崎義継. シンポジウム 3 病原性真菌の感染成立機構 クリプトコックスの莢膜多糖による免疫回避機構の解析及びその制御法の開発. 第 58 回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
- 2 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井 誠, 川本 進, 亀井克彦, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチンの作用. 第 58 回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
- 3 浦井 誠, 金子幸弘, 上野圭吾, 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* の莢膜多糖成分が免疫細胞に及ぼす影響. 第 58 回日本医真菌学会総会. 11月1-2日, 2014年, 横浜.
- 4 水口裕紀, 上野圭吾, 金子幸弘, 朴 貞玉, 明田幸宏, 川原一芳, 大石和徳, 金城雄樹. NKT 細胞の活性化を介した肺炎球

菌蛋白ワクチンの効果. 第 97 回日本細菌学会関東支部総会. 10月30-31日, 2014年, 東京.

- 5 上野圭吾, 金城雄樹, 大久保陽一郎, 浦井 誠, 金子幸弘, 大野秀明, 亀井克彦, 澁谷和俊, 宮崎義継. 高病原性 *Cryptococcus gattii* の感染防衛に寄与する樹状細胞ワクチン. 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.
- 6 多田明子, 山本剛伸, 藤本亘, 河口 豊, 浦井 誠, 梅山 隆, 宮崎義継. 黒色菌糸症の 1 例. 第 263 回日本皮膚科学会岡山地方会. 9月21日, 2014年, 岡山.
- 7 上野 圭吾, 大久保陽一郎, 清水公德, 金子幸弘, 浦井 誠, 水口裕紀, 奈良拓也, 川本 進, 大野秀明, 澁谷和俊, 宮崎義継, 金城雄樹. 高病原性クリプトコックス症に対する樹状細胞ワクチンの効果. 第 25 回日本生体防御学会学術総会. 7月9-11日, 2014年, 仙台.
- 8 水口裕紀, 井澤由衣奈, 北野尚樹, 上野圭吾, 浦井 誠, 金子幸弘, 朴 貞玉, 明田幸宏, 川上和義, 竹山春子, 川原一芳, 大石和徳, 金城雄樹. NKT 細胞の活性化を介する肺炎球菌ワクチンの感染防御効果解析. 第 25 回日本生体防御学会学術総会. 7月9-11日, 2014年, 仙台.
- 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, 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.
- 10 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.
- 11 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.

12 金城雄樹, 金子幸弘, 梅山 隆, 川上和義, 大石和徳, 宮崎義継. マウスモデルでの肺炎球菌蛋白・糖脂質併用ワクチンの感染防御効果の解析. 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.

13 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.

14 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.

15 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* 由来荚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

(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

薬剤感受性機構の解明に関する研究

担当責任者 石野敬子 昭和大学 薬学部 薬物療法学講座 感染制御薬学部門

研究要旨 *Cryptococcus gattii* 感染症は難治性であり、治療期間の延長を余儀なくされることより、標準治療法の確立が急務である。国内分離株の *C. gattii* のフルコナゾール(FLCZ)低感受性株は感受性株と比較し、薬剤排出能が亢進していたため、これに関与する薬剤排出関連遺伝子の探索を行なった。

A. 研究目的

Cryptococcus gattii 感染症の治療は、*C. neoformans* と比較し、長期化、難治化することが知られている。本研究は、*C. gattii* の薬剤感受性低下因子を解析することで、本菌感染症の標準的治療法確立のための基盤を提供することを目的とする。FLCZ 低感受性株が薬剤排出能の上昇を認めたため、これに関与する遺伝子の同定を行なうことを目的とした。

B. 研究方法

1. 使用菌株

C. gattii IFM5815 株および JP01 株、JP02 株を使用した。

2. mRNA 抽出と RT-PCR

対数増殖期まで培養した菌株をビーズ破砕後、セパゾール I(ナカライテスク)で RNA 抽出を行ない、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アゾール系抗真菌薬のターゲットである *erg11* およ

び 10 種の薬剤排出関連遺伝子を抽出し、特異的プライマーを設計した。ハウスキーピング遺伝子として *act1* を用いた。

C. 研究結果

No.1, 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 株で優位な発現上昇を認めた(図 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(図 1)。

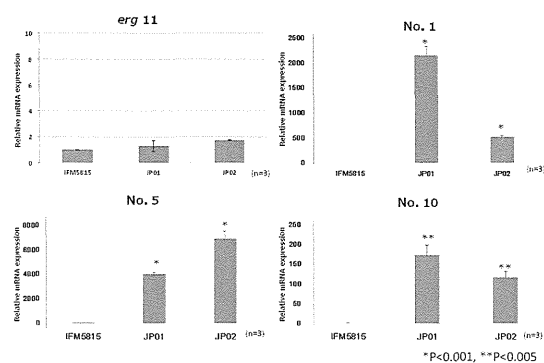


図 1 *erg11*および薬剤排出ポンプ関連遺伝子の発現量の比較

D. 考察

薬剤排出能の亢進を認めた国内分離 FLCZ 低感受性株 2 株で、3 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。No.1 は MFS タイプの薬剤排出ポンプ遺伝子と同一性を認めた。MFS タイプの排出ポンプはアゾール系抗真菌薬のうち、フルコナゾールに特異性が高いことが知られている。また、

No.5は *C. neoformans* の ABC transporter の相同遺伝子であり、No.10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だった。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ために遺伝子破壊、あるいは感受性株への過剰発現による証明を行なう必要がある。また、両遺伝子は 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

国内臨床分離 *C. gattii* の FLCZ 低感受性株は、薬剤排出能が亢進しており、薬剤排出に関与する候補遺伝子として MFS 型、および ABC 型薬剤排出ポンプ遺伝子が見出された。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① カルバペネム系薬投与患者における耐性菌選択リスク因子の検討：前田真之，大戸祐治，村山純一郎，峯村純子，馬場俊之，吉田仁，金子堯一，茅野博行，小林洋一，石野敬子．昭和学会雑誌，74：67-72，2014
- ② Antimicrobial stewardship team による血液培養陽性患者ラウンドのアウトカム評価：前田真之，詫間隆博，吉川雅之，内藤結花，土屋亜由美，大戸祐治，峯村純子，宇賀神和久，小司久志，石野敬子，二木芳人．日本化学療法学会雑誌、印刷中，2015
- ③ 薬学生・薬剤師レジデントのための感染症学・抗菌薬治療テキスト．じほう p. 355-360，2015（分担執筆）

2. 学会発表

(1) 国際学会

- ① Clinical analysis of prognostic factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: association with 30-day mortality: Maeda M, Shoji H, Shirakura T, Takuma T, Fukuchi K, Ishino K, Niki Y. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 10-13 May 2014 Barcelona, Spain.
- ② Validation of vancomycin minimum inhibitory concentration and clinical outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from blood culture: Shoji H, Maeda M, Shirakura T, Takuma T, Fukuchi K, Ishino K, Niki Y. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 10-13 May 2014. Barcelona, Spain.

(2) 国内学会

- ① カルバペネム系薬投与患者における菌交代現象リスク因子の検討：前田 真之，峯村純子，石野敬子．第 62 回日本化学療法学会総会，2014 年 6 月 18 日-20 日，福岡
- ② *Clostridium difficile* 関連腸炎の臨床的検討：詫間隆博，前田真之，石野 敬子，小司久志，二木芳人．第 62 回日本化学療法学会総会，2014 年 6 月 18 日-20 日，福岡
- ③ MRSA の vancomycin に対する感受性と予後の検討：前田真之，小司久志，白倉哲郎，詫間隆博，宇賀神和久，福地邦彦，石野敬子，二木芳人．第 5 回 MRSA フォーラム，2014 年 7 月 12 日，東京
- ④ 患者中心の感染症対策に向けたラウンドシートの作成と評価：土屋亜由美，峯村純子，内藤結花，大戸祐治，吉川雅之，前田真之，宇賀神和久，詫間隆博，石野敬子，二木芳人，村山純一郎．第 24 回日

本医療薬学会年会, 2014年9月27-28日, 名古屋

⑤ Antimicrobial stewardship team による血液培養陽性患者ラウンドおよびアウトカムの評価: 前田真之, 詫間隆博, 峯村純子, 宇賀神和久, 内藤結花, 土屋亜由美, 大戸祐治, 小司久志, 石野敬子, 二木芳人. 第24回日本医療薬学会年会, 2014年9月27-28日, 名古屋

⑥ Antimicrobial stewardship team による血液培養陽性患者ラウンドのアウトカム評価: 前田真之, 詫間隆博, 峯村純子, 宇賀神和久, 内藤結花, 土屋亜由美, 小司久志, 石野敬子, 二木芳人. 第61回日本化学療法学会東日本支部総会, 2014年10月29-31日, 東京

⑦ *Cryptococcus gattii* のフルコナゾール低感受性化の機構解析: 石野敬子, 名木稔, 田辺公一, 宮崎義継. 第58回日本医真菌学会総会・学術集会, 2014年11月1-2日, 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

ミカファンギン耐性 *Candida* 株の疫学と耐性化機構に関する研究

担当責任者	田辺公一	国立感染症研究所	真菌部
研究協力者	名木 稔	国立感染症研究所	真菌部
	梅山 隆	国立感染症研究所	真菌部
	山越 智	国立感染症研究所	真菌部

研究要旨 キャンディン系抗真菌薬は優れた治療効果を有するため、侵襲性カンジダ症の第一選択薬として広く使用されるようになった。しかし近年、キャンディン低感受性のカンジダ属の分離頻度が上昇し、またキャンディン耐性株が報告されるようになった。本研究ではキャンディン耐性 *Candida glabrata* をモデルとしてキャンディン耐性化機構を解明することを目的とした。今年度は耐性化に関係すると考えられている薬剤の標的酵素遺伝子 *FKS* の変異を調べ、変異を有する複数の *FKS* 遺伝子変異の中で耐性に寄与寄与する変異を同定した

A. 研究目的

キャンディン系抗真菌薬は真菌の細胞壁 1,3- β グルカン合成酵素活性を阻害し、菌の発育を阻止する。薬剤の標的部位が哺乳類には存在しないため、副作用が少ない有効な治療薬としての利用が期待された。日本ではミカファンギンが 2000 年代初頭に上市され、既存の抗真菌薬低感受性の真菌にも有効であったことから、侵襲性カンジダ症の第一選択薬として広く使用されるようになった。

しかし近年、キャンディン低感受性のカンジダ属 (*Candida parapsilosis*) の分離頻度が上昇し、またキャンディン耐性化株が報告されるようになった。日本国内でも *C. krusei* や *C. glabrata* といったカンジダ属において耐性化の傾向が認められている。

本研究ではキャンディン耐性 *Candida glabrata* をモデルとしてキャンディン耐性化機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1. 血液培養から *C. glabrata* が分離され、ミカファンギンによる治療でいったん菌が陰性化し、治療を継続するうちに菌の陽転が認められた症例が報告された。経時的に分離された *C. glabrata* 株において、キャンディン耐性化に関係すると考えられている *FKS* 遺伝子 (*FKS1* および *FKS2*) の塩基配列を決定した。
2. キャンディン耐性 *C. glabrata* 株の *FKS* 遺伝子にはこれまでに報告のない遺伝子変異がみとめられた。この変異がキャンディン耐性に寄与する可能性を検証するために、*FKS* 遺伝子をプラスミドにクローニングし、感性の *C. glabrata* 株に導入してキャンディン感受性の変化を検討した。

C. 研究結果

1. ミカファンギン治療前に分離された *C.*

glabrata 株の *FKS1* および *FKS2* 遺伝子は NCBI に登録された野生型株の塩基配列と完全一致はしなかったが、アミノ酸配列では相違は認められなかった (表 1)。一方、ミカファンギン耐性株では *FKS2* 上にすでに報告のある F659Δ 変異が認められ、さらに F659Δ 変異を含む約 250bp の領域と *FKS1* の相同領域との間で相同組み換えが生じていた (図 1)。既報の F659Δ 変異がキャンディン耐性化を引き起こした可能性が考えられたが、同一の変異は耐性化直前に分離された株にも認められたため、耐性化の原因ではないと推測された。

表 1 経時的に分離された *C. glabrata* 株の *FKS* 遺伝子変異

Strain (MIC for MCFG)	<i>FKS1</i>	<i>FKS2</i>
NO1 (<0.015)	Wild type	Wild type
NO2 (<0.015)	Wild type	Wild type
NO3 (<0.015)	Wild type	F659Δ+L1767Δ
NO4 (2)	Gene conversion*	F659Δ
NO5 (4)	Gene conversion*	F659Δ

※分離された順に記載。

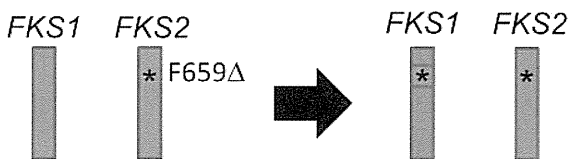


図 1 *FKS1* と *FKS2* の間で生じた gene conversion の模式図

2. 耐性株の *FKS1* および *FKS2* 遺伝子を *C. glabrata* 内で自己複製するプラスミドにクローニングし、それぞれ *FKS1* 破壊株 (*fks1Δ*)、*FKS2* 破壊株 (*fks2Δ*) に導入した (図 2)。F659Δ 変異をもつ *FKS2* を導入した株はミカファンギン感性のままであったが、*FKS1* を導入した株は元の耐性株と同様にミカファンギン耐性を示した。

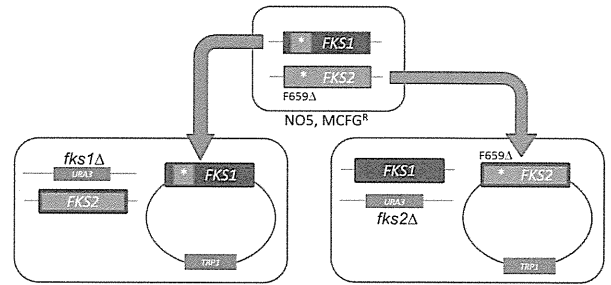


図 2 *C. glabrata* 実験室株への *FKS* 遺伝子導入過程の模式図

以上の結果より、ミカファンギン耐性株の *FKS2* から gene conversion によって変異が移された *FKS1* 遺伝子がキャンディン耐性化を引き起こすことを明らかにした。

D. 考察

本研究ではミカファンギン耐性 *C. glabrata* 株にこれまで報告のなかった *FKS* 変異 (gene conversion) が存在し、実際に耐性化に寄与することを実験的に証明できた。また、これまで耐性化に関係すると考えられていた *FKS2* 上の F659Δ が単独では耐性化を引き起こすことができないことを明らかにした。

C. glabrata のキャンディン耐性化は *FKS* 遺伝子上の点変異によって引き起こされると考えられていたが、機能的な検証はこれまでほとんどなされてこなかった。大半のキャンディン耐性株の *FKS* 遺伝子に共通性のある遺伝子変異が認められることから *FKS* 遺伝子上の点変異はキャンディン耐性化に何らかの役割を持つ可能性は高い。まだ、発見されていない *FKS* 遺伝子以外の耐性化因子 (おそらく遺伝子変異) を発見できれば、キャンディン耐性化の詳細なメカニズムの解明につながり、キャンディン耐性株の発生動向の予測に貢献するものと期待される。

E. 結論

ミカファンギン耐性 *C. glabrata* 株にこれまで報告のなかった *FKS* 変異 (gene conversion) が存在し、実際に耐性化に寄与