

## 9. 真菌部

部長 宮崎 義継

### 概要

真菌部は真菌感染症の調査研究を主な任務としている。真菌症の病原真菌の病原因子や宿主免疫機構の解明、疫学研究、ならびに、実用化をめざした診断薬・治療薬・ワクチンの基盤研究を推進している。

わが国の三大侵襲性真菌症は、カンジダ症、アスペルギルス症、ならびにクリプトコックス症であるが、最近では新興真菌症として世界規模でアウトブレイクをおこしている*Candida auris*はじめ薬剤耐性真菌が公衆衛生的に重要となっており、これらの真菌症の制圧を目標として以下の様な調査研究を実施した。

令和元年は各種真菌に関する病原因子解明と宿主反応に関する基盤研究、糸状菌感染症における治療法、病原体診断に関する研究を行った。宿主因子に関しては、病原体の認識分子や自然免疫機構の役割、ワクチン基盤に関する研究を実施した。感染症制御薬に関しては、新規薬剤シーズの抗真菌活性探索や薬剤耐性機構の研究、細胞内シグナル制御の解明と応用に基づく感染症制御、既存薬の新規薬効の応用等に関する研究を行った。

主たる研究項目は下記のとおりである。

- I. 病原真菌の病原性解明と新しい診断・治療法開発と疫学研究
- II. 宿主因子と免疫制御の解明による難治性感染症の制圧に関する研究
- III. 微生物の有用遺伝子探索による感染症治療薬開発と薬剤耐性制御に関する研究
- IV. 新しい薬物活性評価系の研究、ならびに、細胞内シグナル伝達制御の解明に基づく感染症制御に関する研究

真菌部各室が実施した主な業務は、それぞれ以下のとおりである。

第一室は、真菌症の疫学研究、真菌病原因子に関する研究と真菌検査業務、真菌レファレンス業務を担当

した。侵襲性真菌症では国内最多の侵襲性真菌症であるカンジダ症を対象とし*C. glabrata*のマイトファジー、カンジダ眼内炎の病態、薬剤耐性機構、病原因子の解明に関する研究を実施した。

第二室は、免疫不全宿主にみられるアスペルギルス症やムーコル症等の糸状菌感染症に関して、アゾール系薬剤耐性機構、*A. fumigatus*の増殖機構、宿主因子に関する研究を行った。また、病原微生物の細胞内シグナル伝達分子の解析とそれを応用した疾病制御に関する研究を行った。

第三室は、クリプトコックス属や肺炎球菌、インフルエンザ等を対象として宿主因子や免疫機構の解明と、その制御に基づく難治性感染症の病態研究やワクチンに関する基盤研究を実施した。また、真菌検査業務のうち法的規制にかかる病原体の管理業務を担当した。

第四室は、真菌や放線菌の二次代謝産物等の探索と代謝経路の解明、バイオインフォマティクス研究等を実施した。また、検査業務として、病原真菌検査の標準作業手順書の改訂、後発医薬品の収去検査を実施した。

真菌部は行政対応として、真菌に関する各種行政検査、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の専門審査等を実施した。国際交流では、ベトナムNIHEを中心に、カンジダ症、クリプトコックス症に関する調査研究や検査技術研修を実施した。

### 業績

#### 調査・研究

#### I. 病原真菌の病原性解明と新しい診断・治療法開発と疫学研究

##### 1. 地域流行型真菌症の研究

- (1) 自然免疫回避機構における*Cryptococcus gattii*の莢膜多糖の生理作用

## 真菌部

樹状細胞(DCs)は、本菌の野生株を貪食できないが、莢膜欠損株は効率よく貪食する。DCsによる莢膜欠損株の認識機構や莢膜多糖の認識回避機構は不明であった。これまでに、我々は莢膜多糖が菌体の抗原を被覆しDCsによる貪食を回避するモデルを提唱している。2019年度は、菌体認識へのインテグリン様受容体 INTGxの関与を調べた。その結果、INTGx阻害抗体は、DCsによる莢膜欠損株の認識・貪食及び刺激後のサイトカイン産生を有意に抑制した。他のインテグリン様受容体INTGy、INTGzの関与は限定的であったが、INTGx依存的な菌体認識機構は、好中球やマクロファージでも観察された。可溶性組換えタンパク質INTGx-hisは、莢膜欠損株に結合したが、莢膜保有株及び莢膜多糖で事前に処理した莢膜欠損株には、INTGx-hisには結合しなかった。これらの結果から、莢膜多糖は、INTGxに認識される抗原を被覆し、自然免疫による認識を回避しているモデルが推察された。

[上野圭吾、柳原尚・清水公德 (東京理科大 基礎工学部)、宮崎義継]

### (2) *C. gattii*の環境変化に応じた抗原性の変化

一般的に、自然免疫は、C型レクチン受容体dectin-1やdectin-2を利用して、真菌細胞壁成分グルカンやマンナンを抗原として認識する。しかし、*C. gattii*や*C. neoformans*の場合、莢膜の有無に関わらず菌体表面に上記受容体は結合しない。2019年度は、菌体培養条件が、抗原性に与える影響を調べた。その結果、合成グルコース (SD) 培地では、莢膜の有無に関わらず、菌体表面にグルカン・マンナンが露出し、dectin-1及びdectin-2が菌体表面に結合した。一方、他の富栄養培地や合成培地及びHEPES緩衝剤を含む中性SD培地で菌体を培養した場合には、これら受容体の結合は認めなかった。SD培地で菌体を培養し、その菌体でDCsを刺激すると、対照群に比べて、リン酸化Syk, AKT, ERK1/2が増加し、炎症性サイトカインの産生も増加した。これらの結果は、環境変化、特にSD培地における培地酸性化にตอบสนองして、菌体の抗原性が増強することを示している。

[上野圭吾、柳原尚・中村匠・清水公德 (東京理科大 基礎工学部)、宮崎義継]

### 2. アスペルギルス症に関する研究

#### (1) *Aspergillus fumigatus* 菌体外タンパク質に対する新規抗体の作製

深在性真菌感染症は致死率が高く早期に適切な治療が必要とされることから、正確な早期診断が求められている。現在、真菌感染症の血清学的検査では血清中の真菌由来の細胞壁の構成成分、および抗マンナン抗体を検出する診断法が用いられているが、検出感度・特異度の面でも十分な検出系とは言えず、より抗原への特異性が高い抗体を用いた新たな検出系の開発が求められている。これまでに生体内で発現させた標的抗原を宿主に暴露することができる DNA 免疫法を用いて抗原候補の B11c に対する 12 種類のモノクローナル抗体作製した。このモノクローナル抗体は大腸菌由来組換え体、および *A. fumigatus* Af293 の培養上清に反応性が高く、*Candida albicans* および B11c 遺伝子破壊株の培養上清に対して低反応性を示すものを選択した。現在 B11c に引き続き、B11b や Y69 などその他の抗原候補に対する抗体作製を行っている。

[高塚翔吾、犬飼達也、山越智、伊達琴恵、橋本ゆき、梅山隆、名木稔、中村茂樹 (東京医科大学)、宮崎義継]

#### (2) *A. fumigatus* の分泌小胞に関する研究

##### i) *A. fumigatus*

YPD 培地での培養において、超遠心後に糖と考えられる大量の共雑物がゲル状に共沈殿し、分泌小胞の回収率に影響を与える。そこで密度勾配超遠心することによる糖等の除去件を検討した。

分泌小胞に含まれるリボゾーム RNA と small non-coding RNA をターゲットとする検出系の構築を試みた。超遠心法によって得られた分泌小胞を、ゲルろ過で精製した画分において、リボゾーム RNA を RT-PCR 法にて検出した。新規 small non-coding RNA については、おそらくは存在量が少ないために検出が難しく、現在感度を上

げるために PCR の条件を検討している。

### ii) *Cunninghamella bertholletiae*

液体培養において分泌小胞を得るための至適条件の検討を行った。各種培養液を用い、経時的に培養上清を調製し、電子顕微鏡にて分泌小胞の存在について検討した。いずれの培養でも数十 nm から 2-300 nm の直径の分泌小胞が検出された。超遠心法で得られた分泌小胞画分に含まれるタンパク質、RNA を電気泳動法にて確認した。前述のように *A. fumigatus* の分泌小胞の RNA の網羅的解析からリボソーム RNA を同定していたので、*C. bertholletiae* の分泌小胞においても同じように RT-PCR 法にてリボソーム RNA を増幅することができ、リボソーム RNA を含むことが明らかとなった。

[山越智、梅山隆、片野晴隆(感染病理部)、黒田誠(病原体ゲノム解析研究センター)、橋本ゆき、名木稔、犬飼達也、高塚翔吾、上野圭吾、中村茂樹、宮崎義継]

### (3) CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術による *Aspergillus fumigatus* ボリコナゾール耐性変異の検証

肺アスペルギルス症におけるアゾール薬耐性が近年問題となっている。

アゾール耐性の原因は、主に標的酵素である Cyp51A の遺伝子変異やプロモーターのタンデムリピート化による過剰発現 (TR) に起因している。これまでに、アゾール耐性臨床分離株において低感受性化に関連する Cyp51A の変異が数多く報告されているが、それらの変異が直接アゾール耐性に関わることを証明した研究は非常に少ない。さらに、臨床分離株の遺伝的背景が様々であるため、それらの変異・TR の耐性への貢献度を比較するのは困難である。同一の遺伝的背景で Cyp51A の様々な変異・TR による影響を比較した。単一アミノ酸変異 (G54E, L98H, P216L, M220I, T289A, G448S)、および、TR シリーズ (TR34, TR34 / L98H, TR46, TR46 / Y121F / T289A, TR53) について、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術により塩基置換やプロモータ配列挿入を行った。感受性試験を行った結果、過去の報告と同様の傾向を示した。TR シリーズの株では Cyp51A の高発現が確認され、標的酵素の過剰発現がアゾール低感受性化の原因であることを検証できた。特定の遺伝子の部位特異的変異導入は、

これまで時間がかかる上に導入効率が極めて低く、本法により簡便・高効率で可能になった。臨床分離株や他の遺伝子についても応用でき、今後、アスペルギルスの薬剤耐性メカニズムを解明するのに有用である。

[梅山隆、山越智、高塚翔吾、星野泰隆、犬飼達也、宮崎義継、館野円花・石野敬子(昭和大学薬学部)]

## 3. カンジダ症に関する研究

### (1) *C. glabrata* におけるマイトファジー必須遺伝子 *ATG32* の転写調節機構の解明

*C. glabrata* は鉄欠乏下でミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) を活性化させるが、その活性調節機構は不明である。鉄欠乏下で発現量が増加し、マイトファジーに必須である *ATG32* に着目し、*ATG32* の発現調節機構を解明することを本研究の目的とした。PCR によって様々な長さに調整した *ATG32* の上流領域を用いてレポーターアッセイを行い、*ATG32* の発現調節に関与する領域を探索した。*ATG32* 上流領域の一部を削除すると鉄存在下においても有意に *ATG32* の発現量が増加し、この領域が鉄依存的リプレッサー結合領域であると予想された。発現調節領域を含むプローブに鉄依存的に結合するタンパク質を質量分析によって複数同定した。現在、各候補タンパク質の遺伝子破壊株を作製し、*ATG32* 発現調節における役割を調べている。

[東祥嗣、名木稔、阿部雅広、田辺公一(龍谷大・農学部)、山越智、梅山隆、宮崎義継]

### (2) カンジダ属と腸内細菌叢の相互作用に関する解析

カンジダ属は腸管を初めとする粘膜組織に定着し、特に腸管からは、免疫不全・腸管粘膜障害を契機として全身性に播種することが知られている。腸管内では定着したカンジダ属と腸内細菌叢の相互作用が存在することが示唆されるが、この相互作用についての解析は少ない。本研究では、酢酸コルチゾンによる免疫抑制条件下での、カンジダ属と腸内細菌叢の関連について解析した。抗菌薬を投与して腸内細菌叢を変化させたマウスに、*Candida glabrata* を胃内接種し、腸管内への定着を生じさせた。また、胃内接種の前日・当日・翌日の 3 日間に酢酸コルチゾンを皮下注射し、

## 真菌部

免疫抑制を生じさせ、接種 7 日・14 日後の臓器への播種を検証した。結果として、広域抗菌薬投与群に比して、グラム陽性菌が腸管内に残る条件下の抗菌薬を投与した群で、有意に肝臓への播種が増加し、グラム陰性桿菌が腸管内に残る条件下の抗菌薬を投与した群で、有意に臓器への播種が減少した。これらのマウスの腸管内容物・便の次世代シーケンス解析により、播種が多い個体では、腸球菌や嫌気性菌が有意に多く、また、播種が少ない個体ではグラム陰性桿菌が有意に多いことが示された。今後は、これらの細菌の単離およびカンジダ属との直接的な相互作用を評価する予定である。

[阿部雅広、名木稔、東祥嗣、関塚剛史・黒田誠(病原体ゲノム解析研究センター)、宮崎義継]

### (3) *Candida auris* の国内分離株・海外分離株の病原性に関する解析

*Candida auris* は本邦で初めて耳漏より分離され、その後、世界中で報告されるようになった新規の菌種であるが、国内での分離が耳漏からに限られる一方、世界的には血流感染症患者からの分離が多く、その病原性には違いがあることが示唆される。本研究では、国内分離株・海外分離株を用い、マウスモデルを用いてその病原性を解析した。抗菌薬を投与して腸内細菌叢を変化させたマウスに、*C. auris* を胃内接種し、腸管内への定着を生じさせた。また、胃内接種の前日・当日・翌日の 3 日間に酢酸コルチゾンを経口投与し、免疫抑制を生じさせ、接種 7 日・14 日後の臓器への播種を検証した。結果として、国内分離株・海外分離株ともに腸管内への定着は確認されたが、便中真菌量は海外分離株で有意に多い結果であった。また、臓器への播種も海外分離株で有意に多く、biofilm 形成能も海外分離株で高い結果であった。しかしながら、腸管からの播種実験の系では、*C. auris* の病原性は *C. albicans* よりも低いことが示された。

[阿部雅広、名木稔、東祥嗣、菊池賢(東京女子医科大学)、片野晴隆・長谷川秀樹(感染病理部)、宮崎義継]

### (4) *C. glabrata* が行うマイトファジーの宿主貪食細胞

内生存における役割

*C. glabrata* におけるマイトファジーは、鉄欠乏条件によって活性化し、鉄欠乏条件におけるミトコンドリアの機能維持と長期生存に関与している。また、マイトファジーに必須な *ATG32* の破壊株では病原性が顕著に低下することが明らかにされたが、マイトファジーがどのように病原性に関与しているかは不明である。*C. glabrata* は、マイトファジーによって機能低下ミトコンドリアを分解することで、鉄欠乏環境である貪食細胞内において生存し、病原性を発揮しているという仮説を立て、この仮説を検証することを目的に研究を行った。

ヒト血液から調整した好中球と *C. glabrata* 野生株またはマイトファジー欠損株 (*ATG32* 遺伝子破壊株) を混合し、貪食効率および貪食後の生存率の測定を行った。野生株とマイトファジー欠損株における被貪食効率に有意な差はなかったが、貪食後の生存率においては、野生株が欠損株と比べて有意に高い事が明らかとなった。

[名木稔、東祥嗣、阿部雅広、田辺公一(龍谷大・農学部)、山越智、梅山隆、宮崎義継]

## II. 宿主因子と免疫制御の解明による難治性感染症の制圧に関する研究

### 1. *Cryptococcus gattii* に対する新規経鼻ワクチンの開発とその生体防御機構

これまでに、*C. gattii* 感染症に対する樹状細胞ワクチンを開発し、肺常在性記憶型 Th17 細胞・好中球・多核巨細胞の誘導を伴って感染を制御することを示した。2019 年度は、細胞移入を伴わない新規経鼻ワクチンの開発を試みた。ワクチン抗原には莢膜欠損株の死菌を使用し、アジュバントの有無が感染防御効果に与える影響を評価した。その結果、特定の培養条件で調製した莢膜欠損株を使用した場合や、核酸アジュバントを使用した場合に、樹状細胞ワクチンよりも優れた感染防御効果を認めた。ワクチン投与 2 ヶ月目には、肺常在性記憶型 T 細胞の誘導を認め、免疫抑制剤 FTY720 投与下においても経鼻ワクチンによる感染防御効果は消失しなかった。このことは、経鼻ワクチンによる感染防御作用に、循

## 真菌部

環性リンパ球の関与は限定的であることを示唆しており、肺常在性記憶型 T 細胞が経鼻ワクチンの感染防御効果に必要である可能性を示唆している。[上野圭吾、柳原尚・中村匠・清水公德（東京理科大 基礎工学部）、宮崎義継]

### 2. インフルエンザ続発性肺アスペルギルス症における宿主応答メカニズムに関する研究

近年、真菌感染症の中でもアスペルギルスを介した真菌症による死因が最も高くなっている。特にインフルエンザ罹患後に二次的にアスペルギルスに感染するインフルエンザ続発性肺アスペルギルス症では重症化し死亡する例も少なくない。そうした中で本研究ではマウスにおけるインフルエンザ続発性肺アスペルギルス症モデルを確立し、感染後の肺内菌数と生体内における宿主応答メカニズムの解析を行った。その結果、二次感染後の肺内ではアスペルギルスのクリアランスが進まず、生存率も有意に低下した。また同時に二次感染後の肺内において炎症性サイトカインの産生が著しく上昇しており、単球を中心とした免疫系細胞が集積し、炎症応答が進行していた。今回の結果はインフルエンザ続発性肺アスペルギルス症の重症化メカニズムの解明に貢献できるものと考えられる。

[高塚翔吾、壇辻百合香、小川伸子、伊達琴恵、犬飼達也、上野圭吾、阿部雅広、山越智、梅山隆、星野泰隆、澁谷和俊（東邦大学医学部）、宮崎義継]

### 3. 肺炎を予防する新規ワクチンの開発研究

肺炎は日本人の主な死因の一つであり、肺炎球菌はその起炎菌として最も多くの割合を占める。本研究では肺炎球菌に対する新規ワクチン開発を目指した基礎的検討を行っている。これまでに肺炎球菌蛋白・糖脂質経鼻ワクチンを接種したマウスでは、血中に抗原特異的 IgG 抗体価の上昇及び長期にわたる抗体価の持続が認められ、濾胞性ヘルパー NKT 細胞という特殊な細胞集団が誘導されることを明らかにした。今年度は、NKT 細胞において特異的に *Bcl6* 遺伝子を欠損したマウスを用いて、コントロールマウスでは検出される濾胞性ヘル

パー NKT 細胞が、NKT 細胞特異的 *Bcl6* 遺伝子欠損マウスでは誘導されないことを明らかにした。またこの欠損マウスではワクチン接種後に胚中心も形成されないことから、*Bcl6* 遺伝子が濾胞性ヘルパー NKT 細胞の分化誘導における責任遺伝子であること、さらにこの濾胞性ヘルパー NKT 細胞が胚中心の形成に直接関わることが示唆された。以上のより、新規肺炎球菌ワクチンによって誘導される濾胞性ヘルパー NKT 細胞が肺炎球菌感染防御に重要な役割を担う可能性が示唆された。[高塚翔吾、金城雄樹、林崎浩史、川久保俊、阿部雅広、上野圭吾、小野寺大志・高橋宜聖（免疫部）、朴貞玉（阪大微生物研究会）、明田幸宏（大阪大学微生物病研究所）、大石和徳（富山県衛生研究所）、宮崎義継]

## III. 微生物の有用遺伝子探索による感染症薬開発と薬剤耐性機構に関する研究

### 1. 感染症治療薬開発に関する研究

#### (1) *Emericella varicolor* のゲノム解析

神経突起生成の誘導活性を持つシマラクソンを生産する *E. varicolor* GF10 のゲノム配列を解析し、シマラクソン生合成遺伝子の発見ならびに生合成機構の解明に寄与した。

[石川淳、藤井勲（岩手医大）]

#### (2) 生物活性物質生合成遺伝子探索ツールの開発

感染症治療薬のシードとなる生物活性物質の生合成に与るタンパクに頻繁に見出されるドメインを指標として、放線菌ゲノムに含まれる生物活性物質生合成遺伝子クラスターを効率的に見出すためのウェブツール(2ndFind, <http://biosyn.nih.gov/2ndfind/>)を前年度に引き続き運用した。年度内に国内外から 47,266 回の利用があり、前年度より 9%減少した。

[石川淳]

#### (3) *Nocardithiocin* の誘導体における抗菌活性

*Nocardia pseudobrasiliensis* の生産するリボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチドである *Nocardithiocin* は、主にグラム陽性菌に対して抗菌活性を有している。そこで、*Nocardithiocin* の母骨格のアミノ酸をコードする遺伝子の改変および誘導体の生産を行い、薬剤耐性結核菌に

## 真菌部

対して抗菌活性を有した誘導体を得た。さらに、これらの活性のあった誘導体に関して、変異株の培養および誘導体の生産を行い、非定型抗酸菌等に対する活性等の検討を行った。

[星野泰隆、星野仁彦(ハンセン病研究センター)、酒井香奈江(神戸大学)]

### 2. 薬剤耐性機構に関する研究

#### (1) *Aspergillus fumigatus* におけるアゾール耐性メカニズムの解析

*Aspergillus fumigatus* におけるアゾール系抗真菌薬(アゾール)の耐性は、主にその標的タンパクである *cyp51A* の変異によって付与されているが、この *cyp51A* の変異に依存しないアゾール耐性株が臨床から分離され問題となっている。これまでに、*cyp51A* のプロモーター領域のタンデムリピートや HMG-CoA reductase の変異が耐性に関与するなどの報告なされているが、*cyp51A* の変異に依存しない耐性に関与するメカニズムはいまだ不明な点が多い。そこで、*cyp51A* に耐性の変異がないアゾール耐性の臨床分離株に関して解析を行った。アゾール耐性を示す臨床分離株、これまでに取得した耐性に関与すると予想される領域を実験室株に導入した変異株および感受性株を用いて、アゾール存在下でのステロールの組成の解析を行った結果、すべての株において、アゾール存在下でエルゴステロールの低下が確認された。したがって、アゾール耐性臨床分離株は、感受性株と同様にエルゴステロールの生合成がアゾール系抗真菌薬により阻害されることからアゾール耐性に寄与する何らかの代替手段があることが予想された。

[星野泰隆、梅山隆、山越智、宮崎義継、石川淳]

#### (2) カンジダ薬剤耐性メカニズムとしてのステロール合成・代謝に関連する研究

*Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込みは、嫌気条件や鉄欠乏条件などステロール生合成が阻害される条件において活性化するが、通常の好気条件では強く抑制されることが報告されている。好気条件ではステロールを取り込まない臨床分離株(L999株)と同一患者から経時的に分離された好気条件でもステロールを取り込

む臨床分離株(73246株)を用い、薬剤耐性におけるステロール取り込みの役割を調べた。構造の異なる様々なステロール類を用いて検討したところ、アムホテリシンBの感受性は、取り込まれるステロール種、特にステロイド骨格の7位に二重結合を有するかどうかによって大きく異なることが明らかになった。ステロイド骨格の7位に二重結合を有するステロール種(真菌の主要ステロールであるエルゴステロールを含む)添加条件ではアムホテリシンB感受性は高く、二重結合の無いステロール種(哺乳類の主要ステロールであるコレステロールを含む)添加条件では低感受性を示した。ヒトの主要ステロールはコレステロールであることから、*C. glabrata* が宿主体内においてコレステロールを取り込み、利用した場合、アムホテリシンBの感受性が低下することが予想される。

[名木稔、田辺公一(龍谷大・農学部)、阿部雅広、山越智、梅山隆、石川淳、宮崎義継]

### レファレンス業務

医療機関や研究機関、自治体、他省庁などからの要請にもとづき、真菌感染症の診断、真菌に関する調査、真菌症に関する相談業務などを行った。令和元年度は、真菌症疑いならびに診断困難例等の臨床検体からの真菌検出、血清診断、培養真菌の同定不能例における菌種同定依頼など計69件(菌株数:43件、臨床検体数:75件、環境検体数:10件、核酸検体数:1件、パラフィン検体数:7件、抗真菌薬感受性試験依頼数:34件、行政検査12件)の対応にあたった。これらの検査の結果、感染症法4類疾患の対象となるコクシジオイデス症の病原体 *Coccidioides immitis* は0件、感染症法5類全数把握疾患の対象となる播種性クリプトコックス症の病原体 *Cryptococcus neoformans* を検出したのは3件、*Cryptococcus gattii* を検出したのは0件であった。

[阿部雅広、中村茂樹、中山靖子、名木稔、星野泰隆、山越智、橋本ゆき、壇辻百合香、梅山隆、高塚翔吾、上野圭吾、宮崎義継]

### 品質管理に関する業務

#### 1. 収去検査による抗生物質医薬品の力価試験

令和元年度の医薬品等一斉監視指導・収去検査(後発医薬品品質確保対策)においては、抗生物質医薬品 24 ロット(アミカシン硫酸塩注射液12 ロット、注射用アミカシン硫酸塩 2 ロット、エピルビシン塩酸塩注射液 2 ロット、注射用エピルビシン塩酸塩 4 ロット、注射用イミペネム・シラスチンナトリウム 4 ロット)について力価試験を担当し、日本薬局方及び日本薬局方外医薬品規格の各条収載の液体クロマトグラフィー法に準拠した定量法により力価を測定した。その結果、いずれの収去品も含有量は規格範囲内にあり、すべて「適合」と判定された。

[石川淳、星野泰隆、犬飼達也、福山まり、小川伸子、宮崎義継]

## 国際協力関係業務

ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)ならびに Vietnam Military Medical University(VMMU)とヒストプラズマ症、クリプトコックス症およびカンジダ症の診断法と疫学調査に関する共同研究を実施した。今年度は、NIHE を介して臨床サンプル(喀痰、VATS、BALF 等)を収集し、クリプトコックス属菌およびカンジダ属菌の分離、収集を行った。それらの分離菌を用い、菌種同定および MLST 解析を行った。また、カンジダ属菌に関しては菌種同定を行った後、抗真菌薬感受性試験を行い、ベトナム国内におけるカンジダ属菌の菌種傾向および耐性発生状況の解明を試みた。また、NIHE の研究員および VMMU の研究者を 1 名ずつ招へいし、真菌同定および抗真菌薬感受性試験に関する研修会を行った。

[名木稔、宮崎義継]

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Abe M, Nakamura S, Kinjo Y, Masuyama Y, Mitsuyama J, Kaku M, Miyazaki Y. Efficacy of T-2307, a novel arylamidine, against ocular complications of disseminated candidiasis in mice. *J Antimicrob Chemother* 74(5);1327 – 1332. 2019
- 2) Ueno K, Yanagihara N, Otani Y, Shimizu K, Kinjo Y, Miyazaki Y. Neutrophil-mediated antifungal activity against highly virulent *Cryptococcus gattii* strain R265. *Medical mycology* 57(8) 1046

– 1054. 2019

- 3) Ueda T, Takesue Y, Tokimatsu I, Miyazaki T, Nakada-Motokawa N, Nagao M, Nakajima K, Mikamo H, Yamagishi Y, Kasahara K, Yoshihara S, Ukimura A, Yoshida K, Yoshinaga N, Izumi M, Kakeya H, Yamada K, Kawamura H, Endou K, Yamanaka K, Yoshioka M, Amino K, Ikeuchi H, Uchino M, Miyazaki Y. The incidence of endophthalmitis or macular involvement and the necessity of a routine ophthalmic examination in patients with candidemia. *PLOS ONE* 14(5) e0216956 . 2019
- 4) Mitsuki T, Kimura M, Araoka H, Kageyama K, Takagi S, Yamamoto G, Nakamura S, Miyazaki Y, Uchida N, Yoneyama A, Taniguchi S. Cryptococcal meningitis following umbilical cord blood transplantation, association between the occurrence of cryptococcal infection and tacrolimus discontinuation among allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *J Infect Chemother* 25(4) ;289 - 292 . 2019
- 5) Kobayashi K , Asakura T, Kawada I , Hasegawa H, Chubachi S, Ohara K, Junko Kuramoto J, Sugiura H, Fujishima S, Iwata S , Umeiyama T, Katano H, 8 , Uwamino Y , Miyazaki Y , Kamei K, HasegawaN , Betsuyaku T. Disseminated histoplasmosis from a calcified lung nodule after long-term corticosteroid therapy in an elderly Japanese patient: A case report. *Medicine* ;98(17):e15264. doi: 10.1097/MD.00000000000015264. 2019
- 6) Uchida T, Okamoto M, Fujikawa K, Yoshikawa D, Mizokami A, Mihara T, Kondo A, Ohba K, Kurohama K, Nakashima M, Sekine I, Nakamura S, Miyazaki Y, Kawakami A. Gastric mucormycosis complicated by a gastropleural fistula: A case report and review of the literature. *Medicine* 98(48) e18142. 2019
- 7) Yamairi K, Ido K, Nakamura S, Niki M, Imoto W, Shibata W, Namikawa H, Fujimoto H, Yamada K, Nakamae H, Hino M, Kaneko Y, Miyazaki Y, Kakeya H. Successful treatment of invasive pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus felis*, a cryptic species within the *Aspergillus* section Fumigati: A case report. *J Infect Chemother* 25(4); 307 – 310. 2019
- 8) Nakamura S, Iwanaga N, Hara S, Shimada S, Kashima Y, Hayasaka D, Abe K, Izumikawa K, Yanagihara K, Miyazaki Y, Morita K, Kohno S, Mukae H. Viral load and inflammatory cytokine dynamics associated with the prognosis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus

- infection: An autopsy case. J Infect Chemother 25(6) 480 – 484. 2019
- 9) Bac ND, Anh LT, Quang LB, Luc NK, Nga TTT, Nagi M, Miyazaki Y, Ha HTT, Anh DD, Quyet D, Anh DN. Prevalence of *Candida* bloodstream isolates from patients in two hospitals in Vietnam. Iran J Microbiol. 11(2):108-113, 2019.
- 10) Ito Y, Tanigawa M, Takemura T, Iwamoto K, Nigi A, Sasano H, Itani H, Kondo S, Tokui T, Nakamura S, Miyazaki Y. Chronic nodular pulmonary aspergillosis in a patient with rheumatoid arthritis. Intern Med. 58(7):979-984, 2019.
- 11) Miyazaki T, Nakamura S, Hashiguchi K, Kobayashi T, Fukushima K, Fukuda Y, Kondo A, Inoue Y, Koga H, Sasaki E, Nagayoshi Y, Higashiyama Y, Yoshida M, Takazono T, Saijo T, Morinaga Y, Yamamoto K, Imamura Y, Mikushi S, Izumikawa K, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H. The efficacy and safety of sitafloxacin and garenoxacin for the treatment of pneumonia in elderly patients: A randomized, multicenter, open-label trial. J Infect Chemother. 25 (11):886-893, 2019.
- 12) Miyazaki T, Fukushima K, Hashiguchi K, Inoue Y, Mihara T, Sawai T, Suyama N, Kobayashi T, Kondo A, Fukuda Y, Harada Y, Sasaki E, Kaku N, Ide S, Takazono T, Saijo T, Kosai K, Morinaga Y, Nakamura S, Yamamoto K, Imamura Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H. Efficacy and safety of cefditoren pivoxil for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: A prospective multicenter interventional study. J Infect Chemother. 25(9):702-707, 2019.
- 13) Nakamura S, Ikeda-Dantsuji Y, Jin L, Higashi Y, Abe M, Inukai T, Nagi M, Urai M, Miyazaki Y. Macrolides inhibit capsule formation of highly virulent *Cryptococcus gattii* and promote innate immune susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 63(6):e02364-18, 2019.
- 14) Nindita Y, Cao Z, Fauzi AA, Teshima A, Misaki Y, Muslimin R, Yang Y, Shiwa Y, Yoshikawa H, Tagami M, Lezhava A, Ishikawa J, Kuroda M, Sekizuka T, Inada K, Kinashi H, Arakawa K. The genome sequence of *Streptomyces rochei* 7434AN4, which carries a linear chromosome and three characteristic linear plasmids. Sci Rep. 9(1):10973, 2019.
- 15) Ueno K, Otani Y, Yanagihara N, Nakamura T, Shimizu K, Yamagoe S, Miyazaki Y. *Cryptococcus gattii* alters immunostimulatory potential in response to the environment. PLOS ONE. 14(8):e0220989, 2019.
- 16) Sekizuka T, Iguchi S, Umeyama T, Inamine Y, Makimura K, Kuroda M, Miyazaki Y, Kikuchi K. Clade II *Candida auris* possess genomic structural variations related to an ancestral strain. PLOS ONE. 14(10):e0223433, 2019.
- 17) Futatsuya T, Anzawa K, Mochizuki T, Shoji A, Hoshino Y, Abe M. Disseminated cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent elderly long-term pigeon fancier. J Dermatol. 47(5):551-553, 2020.
- 18) Fukazawa H, Fukuyama M, Miyazaki Y. Reconstitution of Bacterial Tyrosine Kinase-Modulator Interaction in a Human Cell Line. BPB Reports 3(1) 28 – 33. 2020
- 19) Ueno K, Yanagihara N, Shimizu K, Miyazaki Y. Vaccines and Protective Immune Memory against Cryptococcosis. Biol Pharm Bull. 43(2):230-239, 2020.
- 20) Yamanaka D, Takatsu K, Kimura M, Swamydas M, Ohnishi H, Umeyama T, Oyama F, Lionakis MS, Ohno N. Development of a novel  $\beta$ -1,6-glucan-specific detection system using functionally modified recombinant endo- $\beta$ -1,6-glucanase. J Biol Chem. 295(16):5362-5376, 2020.
- 21) Tashiro M, Takazono T, Saijo T, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Kakeya H, Ando T, Kenji K, Kishi K, Tokimatsu I, Hayashi Y, Fujiuchi S, Yanagihara K, Miyazaki Y, Ichihara K, Mukae H, Kohno S, Izumikawa K. Selection of Oral Antifungals for Initial Maintenance Therapy in Chronic Pulmonary Aspergillosis: A Longitudinal Analysis. Clin Infect Dis 70(5) 835 – 842. 2020
2. 和文発表
- 1) 犬飼達也、梅山隆、山越智、宮崎義継 真菌の環境適応術を紐解く *Aspergillus fumigatus* の血清存在下での増殖機構. 日本細菌学雑誌 75(1) 25 – 25. 2020
- 2) 阿部雅広、東祥嗣、榎村浩一、菊池賢、宮崎義継、名木稔 マウスモデルを用いた *Candida auris* 国内分離株・海外分離株の定着能・病原性の比較解析. 感染症学雑誌 94(2) 256 – 256. 2020
- II. 学会発表
1. 国際学会
- 1) Umeyama T, Inukai T, Tateno M, Yamagoe S, Takatsuka S, Hoshino Y, Miyazaki Y. Genome editing technology to elucidate the antifungal resistance mechanisms in filamentous fungi. The Asia Pacific Society for Medical Mycology Congress 2019. China, 2019

## 真菌部

- 2) Ueno K. Development of a novel intranasal vaccine against the highly virulent pulmonary mycoses. The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity. Chiba, Japan, 2020
  - 3) Umeyama T. Cas9/CRISPR genome editing to verify the contribution of known genetic alteration in the *cyp51A* gene to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity. Chiba, Japan, 2020
  - 4) Umeyama T., Inukai T., Tateno M., Yamagoe S., Takatsuka S., Hoshino Y., Ishino K., Miyazaki Y. CRISPR/Cas9 genome editing technology to verify the contribution of known mutations in the *cyp51A* gene and its promoter to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. 9th Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis. Lugano, Switzerland, 2020
  - 5) Arai T., Umeyama T., Inukai T., Watanabe A., Miyazaki Y., Kamei K. Hmg1 mutation conferring multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. 9th Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis. Lugano, Switzerland, 2020
  - 6) Miyazaki Y., Umeyama T., Tashiro M., Takazono T., K Izumikawa. Challenge for chronic pulmonary aspergillosis – a common but formidable disease. 9th Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis. Lugano, Switzerland, 2020
2. 国内学会等
- 1) 阿部雅広、金城雄樹、上野圭吾、賀来満夫、宮崎義継 ステロイド投与下の好中球非減少マウスにおける腸管からの *Candida* 属播種モデル構築に関する研究。第 93 回日本感染症学会総会、2019 年 4 月 5–7 日、名古屋
  - 2) 犬飼達也、梅山隆、宇田晶彦、山越智、東祥嗣、壇辻百合香、名木稔、中村茂樹、宮崎義継 病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の血清存在下の増殖に関与する病原因子の探索。第 93 回日本感染症学会総会、2019 年 4 月 5–7 日、名古屋
  - 3) 中村茂樹、壇辻百合香、金蓮今、阿部雅広、犬飼達也、名木稔、星野泰隆、梅山隆、山越智、宮崎義継 *Candida albicans* の腸管粘膜定着は Tight junction を開裂させ *Staphyrococcus aureus* 菌血症の発症を促進する。第 93 回日本感染症学会総会、2019 年 4 月 5–7 日、名古屋
  - 4) 中村茂樹 病態から考える抗 MRSA 薬の使い分け。第 67 回日本化学療法学会総会、2019 年 5 月 9–11 日、東京
  - 5) 阿部雅広、中村茂樹、名木稔、宮崎義継 ステロイド投与下の腸管からの *Candida glabrata* 播種マウスモデルと腸内細菌叢の関連に関する解析。真菌症フォーラム 2019、2019 年 5 月 18 日、大阪
  - 6) 犬飼達也、星野泰隆、浦井誠、梅山隆、山越智、高塚翔吾、名木稔、阿部雅広、東祥嗣、壇辻百合香、中村茂樹、宮崎義継 *Aspergillus fumigatus* の分泌蛋白 B11b 依存的な増殖を抑制する宿主成分の同定。真菌症フォーラム 2019、2019 年 5 月 18 日、大阪
  - 7) 上野圭吾、大谷淑子、柳原尚、山越智、宮崎義継 *Cryptococcus gattii* の病原性に荚膜は必要か？：環境適応と免疫回避機構における荚膜合成の意義。真菌症フォーラム 2019、2019 年 5 月 18 日、大阪
  - 8) 梅山隆、新居鉄平、渡辺哲、犬飼達也、亀井克彦、宮崎義継 non-Cyp51A 型アゾール耐性 HMG1 変異の *Aspergillus fumigatus* における直接検証：新技術 CRISPR/Cas9 ゲノム編集の導入。真菌症フォーラム 2019、2019 年 5 月 18 日、大阪
  - 9) 中村茂樹 深在性真菌症診断の現状と問題点。真菌症フォーラム 2019、2019 年 5 月 18 日、大阪
  - 10) 中村茂樹 薬剤耐性真菌感染症の現状。岩手県病院薬剤師会感染制御セミナー、2019 年 6 月 8 日、岩手
  - 11) 阿部雅広、金城雄樹、妹尾充敏、加藤はる、柴山恵吾、宮崎義継 *Candida albicans* 腸管定着が *Clostridioides difficile* 感染症に与える影響に関する解析。第 40 回関東医真菌懇話会、2019 年 6 月 1 日、東京
  - 12) 犬飼達也、梅山隆、山越智、星野泰隆、高塚翔吾、東祥嗣、阿部雅広、名木稔、中村茂樹、宮崎義継 血清存在下での *Aspergillus fumigatus* の増殖・バイオフィーム形成に関与する遺伝子の同定。第 33 回日本バイオフィーム学会学術集会、2019 年 7 月 5 日–6 日、久留米
  - 13) 名木稔 病原真菌 *Candida glabrata* におけるミトコンドリア選択的オートファジーの生理的役割。第 196 回酵母細胞研究会例会、2019 年 7 月 12 日、東京
  - 14) 山越智、犬飼達也、高塚翔吾、星野泰隆、岡本圭祐、上野圭吾、梅山隆、宮崎義継 *Aspergillus fumigatus* の細胞外小胞の解析。第 13 回アスペルギルス研究会、2019 年 9 月 14 日、東京
  - 15) 宮崎義継、阿部雅広 臨床で問題となる腸管感染症 消化管と真菌感染症。第 22 回日本臨床腸内微生物学会総会、2019 年 9 月 14 日、東京
  - 16) 高塚翔吾 IL-9 receptor signaling in memory B cells regulates humoral recall responses. 第 7 回ブリistol血液学アカデミー、2019 年 9 月 7 日、京都
  - 17) Abe M., Nakamura S., Higashi Y., Nagi M., Miyazaki Y. The interaction between *Candida* species and bacteria in murine intestine. 第 63 回日本医真菌学会総会、2019 年 10 月 11 日、千葉
  - 18) 犬飼達也、星野泰隆、浦井誠、梅山隆、高塚翔吾、

## 真菌部

- 山越智、東祥嗣、阿部雅広、名木稔、中村茂樹、宮崎義継 *Aspergillus fumigatus* B11b 破壊株の増殖を抑制する血清中の成分の同定。第 63 回日本医真菌学会総会、2019 年 10 月 11 日、千葉
- 19) 上野圭吾、柳原尚、清水公德、山越智、宮崎義継 高病原性クリプトコックス症に対する新規経鼻ワクチン—免疫賦活作用を増強したワクチン株の作製—。第 63 回日本医真菌学会総会、2019 年 10 月 11 日、千葉
- 20) 梅山隆、犬飼達也、山越智、高塚翔吾、星野泰隆、宮崎義継 *Aspergillus fumigatus* アゾール耐性株にみられる Cyp51A SNPs のゲノム編集による直接検証 第 63 回日本医真菌学会総会、2019 年 10 月 11 日、千葉
- 21) 高塚翔吾、林崎浩史、犬飼達也、山越智、梅山隆、星野泰隆、上野圭吾、宮崎義継 インフルエンザ続発性肺アスペルギルス症モデルの確立と重症化メカニズムに関する研究。第 63 回日本医真菌学会総会、2019 年 10 月 11 日、千葉
- 22) 東祥嗣、名木稔、鈴木健裕、知花博治、犬飼達也、阿部雅広、堂前直、山越智、中村茂樹、宮崎義継 *Candida glabrata* におけるマイトファジー活性調節機構の解明。第 63 回日本医真菌学会総会、2019 年 10 月 11 日、千葉
- 23) 星野泰隆、梅山隆、犬飼達也、高塚翔吾、山越智、石川淳、宮崎義継 アゾール系抗真菌薬耐性 *Aspergillus fumigatus* の耐性メカニズムの解析。第 63 回日本医真菌学会総会、2019 年 10 月 11 日、千葉
- 24) 阿部雅広、名木稔、東祥嗣、宮崎義継 マウスモデルを用いた *Candida auris* 国内分離株・海外分離株の定着能・病原性の比較解析。第 68 回日本感染症学会東日本地方会学術集会/第 66 回日本化学療法学会東日本支部総会、2019 年 10 月 16–18 日、仙台
- 25) 梅山隆、犬飼達也、山越智、宮崎義継 CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術による *Aspergillus fumigatus* Cyp51A アゾール耐性変異の検証。第 68 回日本感染症学会東日本地方会学術集会/第 66 回日本化学療法学会東日本支部総会、2019 年 10 月 16–18 日、仙台
- 26) Hayashizaki K、Takatsuka S、Kawakubo S、Kamii Y、Takahashi Y、Kawakami K、Kubo M、Kinjo Y. The protein and glycolipid vaccine induce long-term protection against pneumococcal infection through differentiation of follicular helper NKT cells. 第 48 回日本免疫学会総会、2019 年 12 月 11–13 日、浜松
- 27) 梅山隆 外部精度管理事業の概要。令和元年度希少感染症診断技術研修会、2020 年 1 月 29–30 日、東京
- 28) 壇辻百合香、星野泰隆、名木稔、阿部雅広、上野圭吾、中山靖子、橋本ゆき、東祥嗣、犬飼達也、高塚翔吾、梅山隆、山越智、宮崎義継 注意すべき糸状真菌 (*T. marneffeii* 含め)。第 31 回日本臨床微生物学会総会、2020 年 1 月 31 日–2 月 2 日、金沢
- 29) 壇辻百合香、星野泰隆、名木稔、阿部雅広、上野圭吾、中山靖子、橋本ゆき、東祥嗣、犬飼達也、高塚翔吾、梅山隆、山越智、宮崎義継 2016–2018 年 3 年間実施した Biosafety level 3 対応が必要な真菌検査について。第 31 回日本臨床微生物学会総会、2020 年 1 月 31 日–2 月 2 日、金沢
- 30) 壇辻百合香、星野泰隆、名木稔、阿部雅広、上野圭吾、中山靖子、橋本ゆき、東祥嗣、犬飼達也、高塚翔吾、梅山隆、山越智、宮崎義継 注意すべき糸状菌。第 31 回日本臨床微生物学会総会、2020 年 1 月 31 日–2 月 2 日、金沢
- 31) 犬飼達也、梅山隆、山越智、宮崎義継 *Aspergillus fumigatus* の血清存在下での増殖機構。第 93 回日本細菌学会総会、2020 年 3 月 23–25 日、名古屋
- 32) 上野圭吾、柳原尚、清水公德、山越智、宮崎義継 クリプトコックス症に対する新規経鼻ワクチンの開発とその作用機構：免疫賦活性に優れたワクチン株の作製。第 93 回日本細菌学会総会、2020 年 3 月 23–25 日、名古屋