

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05841

研究課題名(和文) 中国におけるクリプトコックス髄膜炎の発症状況と真菌学的、免疫学的背景の調査研究

研究課題名(英文) Study in the prevalence of cryptococcal meningitis and its mycological and immunological background in China

研究代表者

川上 和義 (Kawakami, Kazuyoshi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10253973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,800,000円

研究成果の概要(和文)：中国広東省の中山大学医学部附属第三医院及び江西省のがん南医科大学附属第一医院との共同研究により、中国におけるクリプトコックス症の発症状況と真菌学的、免疫学的背景について調査研究を行った。35例のクリプトコックス症患者の基礎疾患を解析し、60%でHIV感染を含めた免疫不全のないことが明らかとなった。さらに、潜在性感染の検出を目的としてIFN- γ -releasing assayの開発を行い、本真菌のT細胞認識抗原として知られている98kDaマンノプロテインを用いて患者の末梢血リンパ球を刺激し、対照と比較して高いIFN- γ 産生が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国同様に、中国でも免疫不全を背景にしないクリプトコックス髄膜炎が少なくないことを明らかにするとともに、結核以外では未だ報告がないクリプトコックスの潜在性感染を検出するためのIFN- γ -releasing assayの開発につながる研究として学術的、社会的意義を有する。本研究を通して潜在性クリプトコックス感染症を事前に検出することができれば、抗真菌薬治療によってエイズ合併クリプトコックス髄膜炎の発症予防につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the prevalence situation of cryptococcosis and its mycological and immunological background in China in collaboration with the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University and the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University in Guangdong and Jiangxi Province, respectively. We found that sixty percent of thirty-five cryptococcosis patients did not have any underlying diseases which affected their immune condition, including HIV infection. In addition, we attempted to develop IFN- γ -releasing assay for detection of latent infection with *Cryptococcus neoformans*. We detected higher IFN- γ production by peripheral blood lymphocytes from the patients upon stimulation with 98 kDa mannoprotein, a known T cell-specific antigen of this fungal pathogen, than those from control subjects.

研究分野：感染免疫学

キーワード：中国 クリプトコックス 髄膜炎 潜在性感染 免疫学的背景

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クリプトコックス髄膜炎は、エイズなど細胞性免疫不全に合併する日和見真菌感染症である。エイズ合併例は予後が悪く (*Clin Infect Dis* 28: 82, 1999)。世界的には年間 100 万人が発症、60 万人が死亡しており、世界のエイズ死因では結核に次いで第 2 位、サハラ砂漠以南のアフリカでは第 1 位とされている (*AIDS* 23: 525, 2009)。途上国ではクリプトコックス髄膜炎の 95% 以上、先進国では 85% がエイズと関連し、臓器移植後の免疫抑制剤投与、血液悪性疾患がこれに続く (*Clin Epidemiol* 6: 169, 2014)。原因真菌には *Cryptococcus neoformans* と *C. gattii* があり、わが国ではほとんどが前者による。*C. neoformans* は鳥類の堆積糞中で増殖し、乾燥し舞い上がった酵母を吸入することで感染する。本真菌は、マクロファージの殺菌作用に抵抗し細胞内寄生することが知られており (*Trends Microbiol* 9: 273-278, 2001)。不顕性感染後肺内に長期間潜伏する。近年では、クリプトコックス症は、結核と同様に免疫不全下での内因性再燃により発症すると考えられつつあるが (*Pediatrics* 107: e66, 2001; *Clin Vaccine Immunol* 14: 1550, 2007; *J Clin Microbiol* 37: 3204, 1999; *Semin Respir Crit Care Med* 25: 145, 2004)。未だ臨床的に十分なエビデンスが得られているわけではない。

一方、*C. gattii* はユーカリの木に棲息することから、その分布はオーストラリア、東南アジアなど熱帯・亜熱帯に限られていた。しかし、1999 年にカナダのバンクーバー島で、オーストラリアの遺伝子型 (VGI) とは異なる *C. gattii* (VGIIa) によるアウトブレイクが発生し、その後も米国ワシントン州、オレゴン州など北米太平洋沿岸地域に拡大しつつある (*MMWR* Vol.59, No.28, 2010)。 *C. neoformans* と異なり、健常者でも髄膜炎を発症し致死率が 20% と高いため、「高病原性クリプトコックス症」とも呼ばれる。わが国でも北米型 (VGIIa) による髄膜炎の国内感染例が報告されている (*Emerg Infect Dis* 16: 1155, 2010)。

このように、*C. neoformans* によるクリプトコックス髄膜炎は、エイズや血液悪性疾患など免疫不全患者に発症するのに対して、*C. gattii* は健常者でも発症するとの認識が確立されてきた (*Cold Spring Harbor Persp Med* 4: a019760, 2014)。しかし、世界的にはエイズ合併髄膜炎の報告が圧倒的に多く、非エイズ症例における髄膜炎はあまり顧みられず詳細な解析がなされてこなかった。わが国では、エイズ合併髄膜炎症例に限られるため、非合併症例に関する研究が中心に行われてきたが、その背景にある免疫学的要因の理解は未だ十分とは言い難い。その理由として、わが国におけるクリプトコックス髄膜炎症例の少なさがあげられる。一方で、同じ東アジアの中国や韓国では、エイズ非合併クリプトコックス髄膜炎が多く、わが国の状況と類似している (*MBio* 5: e00912, 2014; *FEMS Yeast Res* 10: 769, 2010)。特に、中国南部では、単一施設におけるクリプトコックス髄膜炎症例数が極めて多い。

このような背景から、わが国でみられる非エイズ合併クリプトコックス髄膜炎症例における宿主の免疫学的要因について、わが国と状況が類似する中国において解析を実施することは、その症例数の多さからも有用で意義のあることと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、中国南部に位置する広東省広州市と江西省贛州市を中心に、エイズ非合併クリプトコックス髄膜炎の発症状況と、その背景にある真菌学的及び宿主の免疫学的要因の解明を目指して調査研究を実施した。特に、クリプトコックス症の内因性再燃の可能性にアプローチする目的で、本真菌由来の T 細胞認識抗原に対する末梢血リンパ球の応答性についての解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、中国南部に位置し、人口約 1,200 万人と北京、上海に次ぐ第 3 番目の都市で

ある広東省広州市にある中山大学医学部第三付属病院の呼吸器内科、そして広東省の隣に位置する江西省贛州市にある贛南医科大学第一付属病院の呼吸器内科との共同研究を実施した。本研究は、中国の共同研究実施機関及び東北大学大学院医学研究科の倫理委員会から承認を得た上で実施した。

(2) 研究期間内に症例登録したクリプトコックス症の臨床検体から *Cryptococcus* 属菌を分離した。菌株から抽出した DNA をもとに、PCR にて *C. neoformans* と *C. gattii* の識別を実施した。さらに、臨床情報から症例ごとに免疫能に影響を及ぼす可能性のある基礎疾患の有無について検討した。

(3) 潜在性クリプトコックス感染 (Latent *Cryptococcus neoformans* infection: LCNI) 症例を検出することを目的として、潜在性結核 (Latent Tuberculosis Infection: LTBI) で実施されている Interferon- γ (IFN- γ) releasing assay (IGRA) を応用することの可能性について検討を行った。LTBI の IGRA では T 細胞抗原として結核菌に由来する Esat-6、CFP-10、B7.7 が用いられているが、LCNI では以前から *Cryptococcus neoformans* の主要な T 細胞特異抗原として知られていた 98kDa マンノプロテイン (MP98) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10422, 2001) の可能性について検討した。MP98 は、発現ベクターを大腸菌に導入することで作製したリコンビナント MP98 (rMP98) を用いた。rMP98 に混在するエンドトキシン (LPS) を除去するために、研究成果に示すような各種方法を試みた。

(4) エンドトキシン混在の問題を解消した rMP98 を用いて、中国のクリプトコックス症例及び対照群において、末梢血リンパ球を刺激し産生される IFN- γ を ELISA にて測定した。

4. 研究成果

(1) 研究期間内に 35 例のクリプトコックス症患者 (髄膜炎 34 例、肺クリプトコックス症 2 例、重複例 1 例) を研究登録できた。その中で 20 例について基礎疾患などの詳細な解析ができ、40% の症例が免疫不全をきたすような基礎疾患を有し、逆に 60% ではそのような基礎疾患を認めなかった。欧米ではクリプトコックス症の重要な基礎疾患として HIV 感染が認識されているが (Sloan DJ, Parris V, *Clin. Epidemiol.* 6: 169-182, 2014) 本研究で登録された症例では 2 例 (10%) に認められるのみであった。一方、HIV 感染以外の基礎疾患では、糖尿病 3 例、自己免疫疾患 1 例、腎疾患 1 例、免疫抑制剤投与 4 例がみられた。

(2) 本研究により 20 株のクリプトコックス菌株が得られ、すべてが髄液から採取された。菌株から得られた DNA の解析により、1 株を除きすべてが *C. neoformans* であり、また、*C. gattii* 1 株のジェノタイプは VGIIb であった。こうして本研究では、広州市及びその周辺という限られた地域ではあるが、現時点では中国での高病原性クリプトコックス・ガッティ感染症の蔓延は観察されなかった。

(3) LCNI を検出するための IGRA 開発を目的として、T 細胞刺激抗原として *C. neoformans* 由来の MP98 の作製を試みた。MP98 の発現ベクターを導入した大腸菌 BL21 株を大量培養し、その上清中から His tag カラムで精製することで rMP98 を得ることができた。ところが、大腸菌を用いて作製した rMP98 には多量の LPS が混在し、末梢血リンパ球を刺激する際に重大な影響を及ぼすことが懸念された。そのため、ポリミキシン B カラムやプロテオスピ法など各種方法を試みたが、LPS の除去や rMP98 の回収不良などの問題がみられた。最終的に、LPS 欠損大腸菌を用いることでヒトの TLR4 に作用することなく、非特異的な IFN- γ 産生を誘導しない rMP98 の作製に成功した。

(4) IGRA の臨床応用を考慮すると、極力臨床現場での手間を省く必要があると考えられ、

現行の LTBI でのクオンティフェロン®TB ゴールドのように全血のままに刺激することが望ましい。そのため、採血から刺激までの温度条件や時間について予備的検討を実施した。その結果、輸送時間は 24 時間まで、刺激までの温度は 37°C が望ましいが現実的ではないため、室温（24°C）程度とするのが妥当と考えられた。4°C では、逆に応答性の低下が認められ望ましくないとの結果であった。

（5）本研究で得られた rMP98 を用いて、中国の共同研究施設でのクリプトコックス症例、及び対照症例からの末梢血リンパ球を刺激し、産生される IFN- γ の測定を実施した。陽性コントロールとしてはマイトージェンであるコンカナバリン A (ConA) を用いた。クリプトコックス髄膜炎 12 例及び対照 4 例での最初の実施では、ConA 刺激を含めて IFN- γ 産生が全く検出できなかった。原因について検証したところ温度条件の問題が明らかとなったため、条件を見直した上でクリプトコックス髄膜炎 2 例、肺クリプトコックス症 1 例、対照 3 例からの末梢血リンパ球を rMP98 または ConA で再度刺激した。表のように、対照では rMP98 刺激による IFN- γ 産生指数が低値を示したのに対して、クリプトコックス症では IFN- γ 産生指数の上昇が認められた。また、対照 3 例中 2 例で IFN- γ 産生指数の軽度の上昇がみられた。

表 . rMP98 刺激による IFN- γ 産生指数

	rMP98 (μ g/ml)			
	0.1	0.3	1	3
患者 1	0.223	2.434	29.847	38.400
患者 2	0.522	2.760	1.754	2.369
患者 3	3.926	4.056	4.944	5.698
対照 1	0	0	0	1.214
対照 2	0	0	0	1.725
対照 3	0.756	0.996	0.353	0.626

これらの結果から、クリプトコックス症例とともに対照例の末梢血にも MP98 応答性を示すメモリー T 細胞が存在する可能性が示唆された。さらに、rMP98 を用いた IGRA により、クリプトコックス症の診断や潜在性感染の検出が可能となることが示唆され、今後さらに症例数を増やした解析が必要になると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) 川上和義: 深在性真菌症の感染危険因子と病態, 化学療法の領域 増刊号「深在性真菌症のすべて」, 34: 71-79, 2018. (査読なし)
- (2) 佐藤 光, 川上和義: クリプトコックス感染における宿主認識と生体防御機構, Med. Mycol. J. 58: 83-90, 2017. doi: 10.3314/mmj.17.011. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

川上和義: 真菌感染症の発症病態, 基調講演, 第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 2019.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：石井 恵子

ローマ字氏名：ISHII KEIKO

研究協力者氏名：張 天托

ローマ字氏名：ZHANG TIAN TUO

研究協力者氏名：朱 家馨

ローマ字氏名：ZHU JIAXIN

研究協力者氏名：袁 小亮

ローマ字氏名：YUAN XIAOLIANG

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。