

ANNUAL REPORT OF
MEDICAL MYCOLOGY
RESEARCH CENTER (MMRC)

CHIBA UNIVERSITY 2008

12

千葉大学
真菌医学研究センター報告

平成20年

目 次

はじめに	
病原真菌研究部門 真菌感染分野	3
病原真菌研究部門 系統・化学分野	14
病原真菌研究部門 真菌資源開発分野	21
病原真菌研究部門 生態分野	25
分子機能研究部門 機能形態分野	28
分子機能研究部門 高分子活性分野	37
分子機能研究部門 活性応答分野	48
病原真菌・放線菌管理室（微生物保存事業報告）	49
Review Article（生態分野）	
Feng-Yan Bai: Recent developments in molecular typing of <i>Candida albicans</i>	53
Review Article（活性応答分野）	
渋谷和俊：遺伝子解析を用いた真菌症の病理診断法	62
平成 20 年度共同利用研究・共同利用研究会一覧	66
平成 19 年度共同利用研究報告	69
平成 20 年度共同利用研究会報告	97
第 22 回千葉大学真菌医学研究センター講習会	101
第 4 回千葉大学真菌医学研究センター外国人講習会	102
第 4 回千葉大学真菌医学研究センター公開市民講座	103
講演会（第 114 回～第 118 回）	104
2008 真菌医学研究センター報告会	105
真菌医学研究センター 2008 年度ベスト論文賞	106

はじめに

地球の構成員である我々は、単独では生活ができないことを、実例を持って知ったのが世界的な連鎖型不況でした。経済のグローバル化により、米国の金融危機が世界経済に与えた影響は大きく、世界中で多くの失業者が出ています。世界は新たな知恵を出して、この100年に一度の変化に対応することが求められています。我々の研究においても、学問の継続性の問題ではどうにもならない、新たな流れが生じています。

国立大学が法人化してから5年が経過し、間もなく6年目を迎えようとしています。真菌医学研究センターは、外部評価を受けて、それに基づいて新しい改革が進みつつありますが、大きな改革の一つとして、センター長の選考方法が変わりました。大学内に外部の有識者を含む拡大センター長選考委員会が設けられることになり、これにより、センターおよび大学の内外からのセンター長の選考が可能となりました。千葉大学の2つの全国共同利用研究施設が同じ体制となりますが、これらは、学長の指導力の強化が、その目指すところです。これまでになかった新しい体制で、真菌医学研究センターは進むこととなりますが、センター全職員が一丸となって更に発展に向けて進むことが期待されます。

文部科学省は、国公私立大学を通じた共同利用・共同研究を推進するために、全国の共同利用・共同研究拠点の制度的な位置付けを明確にするために、学校教育法施行規則に新たな規定を設け、文部科学大臣による共同利用・共同研究拠点の認定の基準や手続き等を定める告示が制定されました。これらに基づき、それぞれのセンターは、共同利用・共同研究拠点化を目指して申請を行うこととなります。その期限が3月末であり、真菌医学研究センターもその準備を進めています。

真菌医学研究センターは国家プロジェクトであるナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)では、中核機関として二期目に入っていますが、21年度からは当センターと大阪大学では代表者が変わるなど新たな体制に移って行きます。リソースの重要性は、認識されていますが、これらの急激な変化は、時には貴重な資源の逸失にも繋がりがかねないことにもなりますので、慎重に進むことが必要です。

科学技術振興調整費「真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成」事業は、この3月をもって終わりになります。この事業の成果を発表する機会として、8月に長春で、China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forumと共同で、病原真菌とマイコトキシンに関する国際的なシンポジウムを開催し、盛会裏に終わることが出来ました。日本からは、講演者以外に科学技術振興機構(JST)の担当者にも出席していただきました。本シンポジウムの開催については、中国の北京大学病院の李若瑜教授、中山大学医学院の席麗艷教授、吉林大学基礎医学院の王麗教授、貴陽医学院の王和教授など関係者の全面的なご協力をいただきました。

人事面では、教員の定員については、定員削減の対象となっており、若い研究者の採用もなく、極めて厳しい状況が続いています。センター長として責任を痛感していますが、新しいセンター長のもとで、若い人の採用が進むことを切に希望しています。活性応答分野の客員教授には、東邦大学医学部病院病理学の渋谷和俊先生に、また外国人客員教授には、中国科学院微生物研究所の白逢彦先生に来ていただき研究・教育に参加していただきました。20年の3月31日付で事務長の菱木一夫が定年退職になり、4月1日付で後任に附属病院から小網政敏が着任しました。また、総務担当の吉田敏文が附属病院への異動に伴い平野秀行が着任し、会計担当の伊藤浩が附属図書館への異動に伴い、新たに中川光治及び非常勤職員として緑川治夫が着任しました。高分子活性分野の技術職員である矢澤勝清が定年退職となりましたが、非常勤職員として病原真菌・放線菌管理室に採用となりました。

平成20年12月

千葉大学真菌医学研究センター長

三 上 襄

病原真菌研究部門 真菌感染分野

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Fungal Infection)

教授：亀井克彦

○学内委員 目標・策定委員会委員，学内評価委員会専門部会（研究活動等）委員，海洋バイオシステム研究センター連絡協議会委員，国際教育開発センター連絡協議会委員，国際展開企画室国際交流連絡会委員（3月まで），研究用微生物安全管理委員会委員（3月まで），国際展開企画室国際交流連絡会委員（3月まで），医学研究院大学院教育委員会委員，亥鼻地区防災対策本部設置準備委員会委員，亥鼻地区安全衛生委員会委員（安全衛生管理者），千葉大学附属病院 ICT，真菌医学研究センター安全衛生管理者・作業主任者，病原真菌研究部門の危害防止主任者

○センター内委員 総務委員会委員，共同利用委員会委員長（3月まで），微生物・保存管理施設運営委員会委員長，自己点検・評価委員会委員，倫理審査委員会副委員長，研究推進チームメンバー，組織・機能改善委員会委員長，研究部門連絡会委員，微生物管理保存WG委員長，個人評価WG委員長，市民相談等対応グループメンバー，拠点申請検討会委員，運営協議会委員，教員会議委員，共焦点レーザー顕微鏡システムの調達に関する仕様策定委員

○学協会への貢献 日本医真菌学会評議員・学術集会委員，日本感染症学会編集委員・評議員，日本化学療法学会抗真菌薬臨床評価委員（呼吸器系）・深在性真菌症に対する抗真菌剤の適正使用等のガイドライン作成委員，日本臨床微生物学会編集・ホームページ委員会委員，日本呼吸器学会代議員，Mycopathologia 編集委員（3月まで），Journal of Infection and Chemotherapy 編集委員，真菌症フォーラム世話人，関東深在性真菌症研究会世話人・会長，肺真菌症研究会世話人，関東医真菌懇話会幹事・世話人，千葉真菌症研究会代表世話人，千葉真菌症カンファレンス世話人，深在性真菌症ガイドライン作成委員会世話人，関東呼吸器真菌症研究会世話人，Advances Against Aspergillosis（国際アスペルギルス症学会）Scientific Committee & Faculty

○所属学会 日本内科学会，日本呼吸器学会，日本医真

菌学会，日本感染症学会，日本化学療法学会，日本細菌学会，日本臨床微生物学会，日本環境感染学会，日本防菌防黴学会，室内環境学会，International Society for Human and Animal Mycology，American Society for Microbiology

○受賞 分担：真菌症フォーラム第9回学術集会奨励賞：豊留孝仁，安達禎之，渡辺 哲，落合恵理，大野尚仁，亀井克彦「*Aspergillus fumigatus* により誘導される宿主AP-1 活性化とTNF- α 産生についての解析」（2008. 2. 9）

分担：千葉大学真菌医学研究センターベスト論文賞：Toyotome T, Adachi Y, Watanabe A, Ochiai E, Ohno N, Kamei K「Activator protein 1 is triggered by *Aspergillus fumigatus* beta-glucans surface-exposed during specific growth stages」Microb Pathog 44(2): 141-150, (2007. 12. 28)

分担：日本農芸化学会 B. B. B. 論文賞：Oarada M, Gono T, Tsuzuki T, Igarashi M, Hirasaka K, Nikawa T, Onishi Y, Toyotome T, Kamei K, Miyazawa T, Nakagawa K, Kashima M, Kurita N「Effect of dietary oils on lymphocyte immunological activity in psychologically stressed mice」(2008. 3. 26)

○その他 東京医科大学兼任教授，福島県立医科大学非常勤講師，千葉大学発ベンチャー株式会社ファーストラボラトリーズ顧問，ヤンセンファーマ株式会社 イトラコナゾール内用液臨床試験に係る効果安全性評価委員，ヤンセンファーマ株式会社 製造販売後調査に係る医学専門家，萬有製薬株式会社 独立安全性評価委員

准教授：佐野文子

○センター内委員 教員会議委員，総務委員会委員，共同利用委員会委員，広報委員会委員

○学協会への貢献 日本医真菌学会評議員

○国および地方公共団体への貢献 千葉県獣医師会感染症研究委員会委員

○所属学会 日本医真菌学会，日本菌学会，日本感染症

学会, 日本熱帯医学会, 獣疫学会, 人と動物の共通感染症研究会, 日本臨床微生物学会, 日本細菌学会, 狂犬病臨床研究会, 獣疫史学会, International Society for Human and Animal Mycology, American Society for Microbiology

助教: 栗田啓幸

- センター内委員 有害廃棄物委員
- 学協会への貢献 日本医真菌学会評議員
- 所属学会 日本医真菌学会, 日本農芸化学会
- 受賞 分担: 日本農芸化学会 B. B. B. 論文賞: Oarada M, Gonoi T, Tsuzuki T, Igarashi M, Hirasaka K, Nikawa T, Onishi Y, Toyotome T, Kamei K, Miyazawa T, Nakagawa K, Kashima M, Kurita N 「Effect of dietary oils on lymphocyte immunological activity in psychologically stressed mice」(2008. 3. 26)

助教: 大荒田素子

- 学内委員 セクシャルハラスメント防止委員会委員
- センター内委員 共用備品委員, 防災対策委員, 放射線同位元素委員, 光熱水料節減プロジェクト WG 委員
- 所属学会 日本農芸化学会, 日本栄養・食糧学会, 日本食品免疫学会, 日本油化学会
- 受賞 代表: 日本農芸化学会 B. B. B. 論文賞: Oarada M, Gonoi T, Tsuzuki T, Igarashi M, Hirasaka K, Nikawa T, Onishi Y, Toyotome T, Kamei K, Miyazawa T, Nakagawa K, Kashima M, Kurita N 「Effect of dietary oils on lymphocyte immunological activity in psychologically stressed mice」(2008. 3. 26)

助教(兼任): 渡辺 哲

- 学内委員 附属病院 ICT 委員, 附属病院病院感染管理委員, 附属病院保険委員, 附属病院ベッドマネージャー委員, 附属病院手術部小委員
- 所属学会 日本内科学会, 日本呼吸器学会, 日本感染症学会, 日本医真菌学会, 日本細菌学会, 日本結核病学会, 日本臨床微生物学会, 日本病理学会
- 学協会への貢献 千葉真菌症研究会世話人, 千葉真菌症カンファレンス世話人
- その他 千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部助教

非常勤講師: 高橋容子 (きさらづ皮膚科クリニック)

非常勤講師: 多部田弘士 (船橋市立医療センター呼吸器内科)

特任教員: 豊留孝仁

技術職員: 鎗田響子

技術補佐員: 落合恵理

技術補佐員: 佐藤綾香, 高山明子

技術補佐員: 井上京子

大学院医学薬学府 博士課程: 永吉 優

大学院医学薬学府 博士課程: 村田佳輝

大学院医学薬学府 博士課程: 高橋英雄

大学院医学薬学府 修士課程: 岩崎 彩

研究概要 (共同研究を含む)

1. ヒストプラズマ症における抗ヒストプラズマ抗体検出法の改良

現在市販されているヒストプラズマ症検査・診断薬では検出している *Histoplasma capsulatum* 抗原は H 及び M 抗原タンパク質のみである。我々は新たな抗原候補を探索し, 得られた情報を元にした新たな抗ヒストプラズマ抗体検出法の研究を進めている。これまでに生体内寄生形態である酵母形の *H. capsulatum* を材料とし, 界面活性剤を用いた表層タンパク質抽出法による新規抗原の検索を行ってきた。その結果, この方法により得られた抽出物に患者血清によって認識される抗原タンパク質が複数含まれていることを確認し, さらにこれらタンパク質を質量分析法により同定を行った。これらタンパク質は不溶性ながら抗原タンパク質の大量発現と精製に成功しており, ヒストプラズマ症迅速診断の開発・改良に向けた有用な抗原候補として, 現在 ELISA 等への応用を試みている。また, 共同利用研究において可溶性抗原タンパク質の精製を試みている。

2. β -グルカン受容体 Dectin-1 を含む宿主側の *Aspergillus fumigatus* 認識受容体に関する研究

近年, 感染初期の自然免疫応答が注目を浴びている。細菌やウイルスでは病原体を認識する受容体について盛んに研究が行われている。しかしながら, 真菌についてはその研究は緒についたばかりである。

我々は樹状細胞株 DC2.4 細胞に *A. fumigatus* を感染させると宿主側転写因子 AP1 の活性化が惹起されることを見出した。この AP-1 活性化は *A. fumigatus* 膨化分子において最も強く惹起された。膨化分子表面に β -グルカンが露出されることを確認し, β -グルカン受容

体 Dectin-1 が AP-1 活性化に重要と推測した。種々の実験より、Dectin-1 が *A. fumigatus* 表面の β -グルカンと会合することによって AP-1 活性化が惹起されることを明らかとし、さらに Dectin-1 細胞質ドメインで会合する Syk チロシンキナーゼが AP-1 活性化に重要であることも確認した。また、宿主細胞からの TNF- α 産生にも β -グルカン認識による Dectin-1/Syk/AP-1 のシグナルが重要であることを示した。現在、Syk チロシンキナーゼ下流で本シグナル伝達に関わっていると考えられる MAP キナーゼについても解析を進めるとともに、Dectin-1 以外の *A. fumigatus* 認識受容体を探索する試みも開始している。

3. *Aspergillus fumigatus* 成長に血清成分が及ぼす影響

侵襲性肺アスペルギルス症では肺の血管内に *A. fumigatus* が侵入している像が認められ、より重篤な播種性アスペルギルス症では血行性に多臓器へと菌が播種する。また、感染局所では出血を伴うことも多く、*A. fumigatus* と血液は感染過程において多くの接点を有している。我々はこれまでにウシ胎児血清もしくはヒト血清を含有した培地において *A. fumigatus* 成長が著しく亢進しバイオフィーム様の構造を構築することを報告してきた。血清成分の中ではウシ血清アルブミンが *A. fumigatus* の生育を促進することが報告されているが、我々の検討ではウシ血清アルブミン単独添加では血清のような十分な生育促進効果が認められなかった。そこで血清中に含まれるウシ血清アルブミン以外の *A. fumigatus* の生育を促進する因子について解析を行った。小麦胚凝集素レクチンカラムに結合する血清中の糖タンパク質を分離し、培地に添加したところ、*A. fumigatus* の生育が促進され、分離した糖タンパク質画分中に生育促進因子が含まれることが明らかとなった。これを質量分析で検討した結果、このタンパク質が Fetuin A であることが確認された。現在、血清やその成分が *A. fumigatus* 生育に及ぼす影響について更に詳細に検討を行っている。

4. 真菌の吸入による肺高血圧症に関する研究

これまでに *Stachybotrys chartarum* の胞子を経気管的に反復投与したマウスで肺動脈壁中膜・内膜の肥厚および狭窄、右室圧の上昇が生じることを確認し、これらがヒトの肺高血圧症に非常に類似していることを確認

してきた。本年は室内環境内に多く浮遊する菌種を用い、本病変形成の菌種間差および菌株間差について検討を進めた。その結果、*S. chartarum*, *Aspergillus fumigatus* および *Cladosporium cladosporioides* では、各々複数の株で同様の肺動脈病変が形成されることを確認した。このうち、*C. cladosporioides* では本病変形成に大量の胞子を必要とする株もあった。これらに対し、*Penicillium citrinum*, *P. chrysogenum* ではこの病変形成は認められず、菌種により本病変の形成能が異なる可能性が示された。更に菌種および菌株を増やして本病変形成の検討を行っている。

一方、*S. chartarum* および *A. fumigatus* のマイコトキシン産生性を検討したところ、*S. chartarum* から trichothecene を検出した。さらに *S. chartarum* の複数株について系統解析を行ったところ、*S. chartarum* とされていた菌株は *S. chartarum* と *S. chlorohalonata* の 2 種に大別された（系統・化学分野/矢口准教授との共同研究）。これら菌種の相違と本病変形成との関係については、今後更に検討を進めたい。

また、本病変の形成機序を検討するためにヒト肺動脈血管内皮細胞または血管平滑筋細胞を *S. chartarum* の胞子洗浄液に曝露したところ、前者の培地中において IL-8 産生の増加を認めた。また、*S. chartarum* 投与モデルに Rho-kinase inhibitor の長期経口投与を行ったところ、肺動脈 remodeling が有意に抑制されることが示された。今後、肺血管病変の形成における cytokine や RhoA/Rho-kinase 経路の関与についての検討を予定している。

5. 人獣共通真菌症に関する研究

ペット、動物園水族館・学校飼育動物、魚介類、野生動物、産業用動物等の真菌症の症例検討、疫学、診断・治療法の開発などを行っている。

- 1) ヒト 6 名、ネコ 4 頭の *Arthroderma vanbreuseghemii* の集団感染例で分離された株は、全て同一の遺伝子型であり、人獣共通真菌感染症として問題となった。そこで野良猫の皮膚糸状菌症原因菌保有率を調べるため、公園に生息している野良ネコ 80 頭を調査したところ、現在、全て陰性であった。他の共通感染症原因も含めて今後検討する予定である。
- 2) 沖縄美ら海水族館で飼育されているイルカの一部は呼気より病原性酵母 *Candida* spp. を 1 呼気あたり数百個噴出している個体がいる事から、免疫不全の基礎疾患をもつ観客が至近距離で接触することは危険

であることが示唆された。また分離された病原性酵母の遺伝子型を分子疫学的に解析したところ環境、飼育職員と共通する遺伝子型の存在が判明した。

- 3) 畜産領域に置ける日和見真菌症原因菌の生態として、沖縄県のニワトリ飼育関係者からニワトリから感染したと推測される皮膚糸状菌症が発生した事を受け、養鶏場、学校飼育ニワトリを調査している。また、ウシの *Scopulariopsis brevicaulis* による感染例を経験した。
- 4) 獣医師のヒストプラズマ症に関する認識アンケート調査の結果、ヒストプラズマ症の病名と原因を正しく理解している獣医師が約 2/3、仮性皮疽がヒストプラズマ症の病型で、ウマの場合は届け出伝染病であり国内症例も発生していることの知識を有する獣医師は 1 割以下であった。今後、ヒストプラズマ症は我が国に土着で存在する唯一の高度病原性真菌症の虞があることを周知・徹底する必要がある。
- 5) 我が国のヒストプラズマ症土着症例がウマの仮性皮疽の異種寄生として存在する可能性が分子疫学的に示唆されている。また、かつて、主にアフリカに分布すると言われていた *variety* が我が国にも存在する事が示唆されていたことがあったが、最近経験した国内感染と思われるイヌ症例より検出された遺伝子型は、アフリカ特有の *variety* であった。よって分子疫学的に我が国にもこのアフリカ特有の遺伝子型の存在が支持された。

6. 病原真菌感染防御能に及ぼす食餌タンパク質の影響
病原真菌感染防御能と宿主の栄養状態に関する研究の一環として、*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) 感染症に及ぼす宿主のタンパク質摂取レベルの影響について検討した。標準レベルのタンパク質を含む餌を摂取した実験動物(マウス)と比べて、低レベルのタンパク質を含んだ餌を摂取したマウスで、予想に反して Pb 菌に対する抗菌活性が増強した。感染に伴う標的臓器での炎症メディエーターの産生量が、低タンパク質摂取により抑制されたことが、増強の一因と示唆された。

7. 河川から分離された *Ochroconis* 属新菌種に関する研究

箱根の温泉流入河川水より *Ochroconis gallopava* 関連菌として 2004 年に分離された 2 菌株は、以下の研究結果

より新種であることが判明した。2 菌株はコロニー表面の形状、分生子の大きさおよび形成能において差があったが、これらを含む形態の特徴、最高発育温度、ゼラチン分解能、シクロヘキシミド感受性等の生理学的性状は *O. gallopava* と鑑別不能であった。薬剤感受性はミカファンギンに対し *O. gallopava* より感受性が低かった。病原性は *O. gallopava* が脳に強い親和性を持つのに比し、主な病巣は腎臓であり脳の病変は軽微であった。この 2 菌株のリボゾーナル RNA 遺伝子配列は、small subunit-ITS1-5.8S-ITS2-large subunit の 1696 bp で 100%一致し、同一菌種であった。一方 *O. gallopava* との相同性は ITS 領域で 79.2%、D1D2 領域で 95.9%であった。

以上の結果よりこの 2 菌株を新種と判定し、現在 CBS の de Hoog 博士の協力で新種登録の準備を進めている。

研究成果の発表

1. 著書

- 1) 亀井克彦(分担): 最新臨床検査項目辞典, 櫻林郁之介, 熊坂一成監修, 医歯薬出版, 2008. 3. 20.
- 2) 亀井克彦(分担): 輸入真菌症. 「皮膚科サブスペシャリティーシリーズ 1 冊でわかる皮膚真菌症皮膚真菌症スペシャリストへの第一歩」, 望月 隆, 宮地良樹, 清水 宏編, pp.78-79, 文光堂, 2008.
- 3) 亀井克彦(分担): 医真菌学. 医科細菌学 改訂第 4 版. 笹川千尋, 林 哲也編, pp.313-318, 南江堂, 2008.
- 4) 亀井克彦, 矢口貴志(共著): PCR 法(真菌). KEY WORD 感染症 第 2 版, 山口恵三, 戸塚恭一編, pp.252-253, 先端医学社, 2008.
- 5) 佐野文子(分担): 皮膚糸状菌症, 日和見真菌症. 輸入真菌症. 「人と動物の共通感染症ミニ知識 ガイダンス」, 東京都中医師会感染症予防検討協議会編, 社団法人 東京都獣医師会, 東京, pp.60-65, 2008.
- 6) 佐野文子(分担): ミニレクチャー 人獣共通感染症. 「1 冊でわかる皮膚真菌症皮膚真菌症スペシャリストへの第一歩」, 望月 隆編, 文光堂, 東京, pp.56-57, 2008.

2. 原著

英文

- 1) Toyotome T, Adachi Y, Watanabe A, Ochiai E,

- Ohno N, Kamei K: Activator protein 1 is triggered by *Aspergillus fumigatus* beta-glucans surface-exposed during specific growth stages. *Microb Pathog* 44: 141-150, 2008. (査読有)
- 2) Oarada M, Tsuzuki T, Gono T, Igarashi M, Kamei K, Nikawa T, Hirasaka K, Ogawa T, Miyazawa T, Nakagawa K, Kurita N: Effects of dietary fish oil on lipid peroxidation and serum triacylglycerol levels in psychologically stressed mice. *Nutrition* 24: 67-75, 2008. (査読有)
- 3) Ochiai E, Kamei K, Watanabe A, Nagayoshi M, Tada Y, Nagaoka T, Sato K, Sato A, Shibuya K: Inhalation of *Stachybotrys chartarum* causes pulmonary arterial hypertension in mice. *Int J Exp Pathol* 89: 201-208, 2008. (査読有)
- 4) Mochizuki T, Kawasaki M, Anzawa K, Fujita J, Ushigami T, Takeda K, Sano A, Takahashi Y, Kamei K: Epidemiology of sporadic (non-epidemic) cases of *Trichophyton tonsurans* infection in Japan based on PCR-RFLP analysis of non-transcribed spacer region of ribosomal RNA gene. *Jpn J Infect Dis* 61: 219-222, 2008. (査読有)
- 5) Takahashi H, Takahashi-Kyuhachi H, Takahashi Y, Yarita K, Takayama A, Inomata T, Sano A, Nishimura K, Kamei K: An intrafamilial transmission of *Arthroderma benhamiae* in Canadian porcupines (*Erethizon dorsatum*) in a Japanese zoo. *Med Mycol* 46: 465-473, 2008. (査読有)
- 6) Sugiyama K, Sano A, Murakami M, Ogawa T, Mishima H, Otake H, Kamei K, Sugiyama: Three isolations of *Chaetomium globosum* from erythematous epilation of canine skin. *Med Mycol* 46: 505-510, 2008. (査読有)
- 7) Kikuchi K, Sugita T, Makimura K, Urata K, Someya T, Sasaki T, Kamei K, Niimi M, Hiramatsu K, Uehara Y: Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? *Microbiol Immunol* 52: 455-9, 2008. (査読有)
- 8) Kobayashi H, Sano A, Aragane N, Fukuoka M, Tanaka M, Kawaura F, Fukuno Y, Matsuishi E, Hayashi S. Disseminated infection by *Bipolaris spicifera* in an immunocompetent subject. *Med Mycol* 46: 361-365, 2008. (査読有)
- 9) Kano R, Sano A, Makimura K, Watanabe S, Nishimura K, Yamaguchi H, Hasegawa A. A new genotype of *Arthroderma benhamiae*. *Med Mycol* 46: 739-744, 2008. (査読有)
- 10) Ogawa S, Shibahara T, Sano A, Kadota K, Kubo M: Generalized hyperkeratosis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* in a Japanese Black calf. *J Comp Pathol* 138: 145-150, 2008. (査読有)
- 11) Hirasaka K, Tokuoka K, Nakao R, Yamada C, Oarada M, Imagawa T, Ishidoh K, Okumura Y, Kishi K, Nikawa T: Cathepsin C propeptide interacts with intestinal alkaline phosphatase and heat shock cognate protein 70 in human Caco-2 cells. *J Physiol Sci* 58: 105-111, 2008. (査読有)

和文

- 1) 服部憲幸, 織田成人, 仲村将高, 安部隆三, 中田孝明, 大島 拓, 仲村志芳, 亀井克彦: Micafungin sodium 投与中に *Trichosporon asahii* 感染を生じた重症急性膀胱炎の1例. *日外感染症会誌* 5(1): 79-83, 2008. (査読有)
- 2) 上原雅江, 佐野文子, 鎗田響子, 亀井克彦, 羽毛田牧夫, 井出京子, 永井啓子, 高山義浩, 西村和子: タイ人 AIDS 患者の菌血症例から分離された *Penicillium marneffei*. *真菌誌* 49(3): 205-209, 2008. (査読有)
- 3) 塩原順子, 御子柴舞子, 境澤香里, 光楽文生, 林宏一, 宇原 久, 斉田俊明, 春日恵理子, 松本竹久, 佐野文子, 西村和子: *Exophiala moniliae* による黒色分芽菌症の1例. *皮膚科の臨床* 50(8): 696-972, 2008. (査読有)
- 4) 井隼ミキ, 山下 厚, 溝本朋子, 香本頴利, 吉田正明, 佐野文子: 漢方生薬配合薬の抗真菌活性と牛白癬の治療効果. *日獣会誌* 61(2): 136-138, 2008. (査読有)

3. 総説・解説・その他

- 1) 亀井克彦, 落合恵理: 住宅環境に生息する病原性カビ, 特にマイコトキシン産生カビによる真菌症について. *Mycotoxins* 58(1): 47-51, 2008.
- 2) 亀井克彦: 特集-深在性真菌症 稀に見られる真菌とその感染症. *アニムス* 2008 冬 51号 p. 40-44, 2008.

- 3) 亀井克彦: 海外旅行と真菌症—その注意点. 医学のあゆみ 225(3): 232-236, 2008.
- 4) 亀井克彦: コクシジオイデス症. 最新医学 63 (6月増刊号): 1188-1207, 2008.
- 5) 亀井克彦: 真菌の同定と保存の現状: 日本のネットワーク. 真菌誌 49(3): 187-189, 2008.
- 6) 亀井克彦, 矢口貴志: 真菌の検査法 培養・同定. Medical Technology 36(7): 695-700, 2008.
- 7) 山口英世 (司会), 亀井克彦, 渋谷和俊, 福田隆浩: 非アスペルギルス性糸状菌真菌症の動向と対策—接合菌症を中心として—. 深在性真菌症—SFI Forum—4(2): 4-14, 2008.
- 8) 豊留孝仁, 渡辺 哲, 亀井克彦: ゲノムプロテオーム解析による真菌病原因子の解明と抗真菌薬創薬への期待. 日本臨床 66(12): 2255-2260, 2008.
- 9) 亀井克彦: 肺フザリウム症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.8 呼吸器症候群 (第2版) I—その他の呼吸器疾患を含めて—, p.178-180, 2008.
- 10) 亀井克彦: 肺コクシジオイデス症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.8 呼吸器症候群 (第2版) I—その他の呼吸器疾患を含めて—. pp.172-174, 2008.
- 11) 渡辺 哲, 猪狩英俊, 亀井克彦: 肺ノカルジア症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.8 呼吸器症候群 (第2版) I—その他の呼吸器疾患を含めて—. pp.246-248, 2008.
- 12) 渡辺 哲, 豊留孝仁, 亀井克彦: ヒストプラズマ症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.8 呼吸器症候群 (第2版) I—その他の呼吸器疾患を含めて—. pp.184-187, 2008.
- 13) 亀井克彦: 原因菌と治療薬を巡って. Jpn J Antibiot 61(5): 349-352, 2008.
- 14) 渡辺 哲, 橋本佳江, 日暮浩実, 落合恵理, 豊留孝仁, 永吉 優, 亀井克彦: 深在性真菌症起因菌の病原因子の探索—*Aspergillus fumigatus* を中心として—. 真菌誌 49(4): 263-267, 2008.
- 15) 佐野文子 (分担): 報告書 動物由来真菌症等の診断, 予防法に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究」, 平成 19 年度研究成果報告書 pp.169-198, 2008.
- 16) 亀井克彦 (分担): 報告書 1. コクシジオイデス症およびヒストプラズマ症など輸入真菌症国内発生状況の調査 2. 肺線維症症例に潜在するヒストプラズマ症のスクリーニングに関する研究 3. ヒストプラズマ症の血清診断法に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発, 並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究」平成 19 年度総括・分担研究報告書 pp.33-40, 2008.
- 17) 渋谷和俊 (分担), 亀井克彦 (研究協力者): 報告書 真菌感染と特性疾患—*Stachybotrys chartarum* 吸入と原発性肺高血圧症との関連について—. 厚生労働科学研究費補助金難病疾患克服研究事業「特性疾患の微生物的原因究明に関する研究」平成 19 年度総括・分担報告書 pp.61-65, 2008.

4. 学会・シンポジウム・研究会での招待講演

- 1) 亀井克彦: 教育セミナー 難治性真菌感染症とその対策. 第 57 回日本感染症学会東日本地方学術集会, 第 55 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, プログラム・抄録集 p.71, さいたま, 10月23～24日, 2008.
- 2) 亀井克彦: 特別シンポジウム カビによるアレルギーとその他の疾患について. 平成 20 年室内環境学会総会・研究発表会, 講演集 p.45-48, 船堀, 12月1～2日, 2008.
- 3) 佐野文子: 顕微鏡でわかる Zoonosis「真菌症について: 肉眼, 顕微鏡, 臭覚? を動員して原因菌を同定する」, 日本小動物獣医師学会 (東京), 講演集 p.48-52, 7月19～20日, 2008.
- 4) 渡辺 哲: シンポジウム「環境内真菌と疾患」ICT の立場から見た院内真菌症の現状. 第 29 回関東医真菌懇話会, プログラム/抄録集 p.29, 東京, 5月31日, 2008.
- 5) 豊留孝仁, 渡辺 哲, 亀井克彦: 宿主からの攻撃に対する *Aspergillus fumigatus* の戦略—具有する飛び道具と鎧—. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49(増1): 52, 長崎, 9月10～11日, 2008.
- 6) 永吉 優, 渡辺 哲, 多田裕司, 長岡鉄太郎, 佐藤弘一, 笠原靖紀, 田邊信宏, 渋谷和俊, 亀井克彦, 栗山喬之: *Stachybotrys chartarum* による肺血管病変の形成に関与する因子の検討. 第 48 回日本呼吸器

学会学術講演会, 日呼吸会誌 46 (増): 257, 神戸, 6月15～17日, 2008.

- 7) 清水公德, 李 皓曼, 吉見 啓, 田中千尋, 阿部敬悦, 渡辺 哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本 進: *Cryptococcus neoformans* の環境適応に関する二成分シグナル伝達系の解析. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 102, 長崎, 9月10～11日, 2008.

5. 一般発表

国際学会

- 1) Toyotome T, Adachi Y, Watanabe A, Ochiai E, Ohno N, Kamei K: Superficial-exposed β -glucans of *Aspergillus fumigatus* trigger the activation of activator protein 1. 3rd Advances Against Aspergillosis, Abstract Book p114, Miami, USA, January 16-19, 2008.
- 2) Itano EN, Fredrich AL, Marquez AS, Kaminami MS, Nagashima LA, Massuda TYC, Sano A, Ono MA: High-molecular-mass (HMM) fraction in clinical isolated *Paracoccidioides brasiliensis*: XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology: II Extra Section of Clinical Immunology, Riberão Preto, Brazil, October 22, 2008.
- 3) Nagashima LA, Leonello PC, Sano A, Kamei K, Nishimura K, Itano EN: Hemolytic and hemagglutination activity of *Arthrographis kalrae* antigens. XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology: II Extra Section of Clinical Immunology, Riberão Preto, Brazil, October 22, 2008.

国内学会

- 1) 福田砂織, 阿部教行, 中村彰宏, 亀井克彦: 当院で分離同定したヒストプラズマ症の一例. 第19回日本臨床微生物学会総会, 日臨微誌 17(4): 155, 東京, 1月26～27日, 2008.
- 2) 落合恵理, 亀井克彦, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 永吉 優, 渋谷和俊: マウス肺動脈病変形成における胞子処理及び菌種の相違による影響. 真菌症フォーラム第9回学術集会, プログラム/抄録集 p. 132, 東京, 2月9日, 2008.
- 3) 豊留孝仁, 安達禎之, 渡辺 哲, 落合恵理, 大野尚仁, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* により誘導される宿主 AP-1 活性化と TNF- α 産生についての解析.

真菌症フォーラム第9回学術集会, プログラム/抄録集 p.123-124, 東京, 2月9日, 2008.

- 4) 村田佳輝, 井上敬子, 武藤伸吾, 林 大輔, 熊谷肇, 高橋英雄, 高山明子, 鎗田響子, 亀井克彦, 佐野文子: 小動物における消化管穿孔に伴った真菌性腹膜炎4症例. 平成19年度日本獣医師会学会年次大会 (香川), 抄録集 p. 251, 高松, 2月9～11日, 2008.
- 5) 豊留孝仁, 渡辺 哲, 落合恵理, 田口英昭, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 成長に血清が与える影響についての解析. 第82回日本感染症学会総会学術講演会, 感染症誌 82 (臨増): 240, 松江, 4月17～18日, 2008.
- 6) 落合恵理, 亀井克彦, 永吉 優, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* による肺動脈病変の形成におけるマウス系統差について. 第82回日本感染症学会総会学術講演会, 感染症誌 82 (臨増): 241, 松江, 4月17～18日, 2008.
- 7) 渡辺 哲, 猪狩英俊, 渡辺正治, 中村安孝, 村田正太, 長谷川敦, 戸来依子, 佐藤武幸, 亀井克彦: 当院における真菌分離状況と注射用抗真菌薬の使用動向. 第82回日本感染症学会総会学術講演会, 感染症誌 82 (臨増): 243, 松江, 4月17～18日, 2008.
- 8) 長谷島伸親, 山元正之, 小田智三, 松島秀和, 竹澤信治, 亀井克彦: *Candida intermedia* によるカンジダ血症の1例. 第82回日本感染症学会総会学術講演会, 感染症誌 82 (臨増): 245, 松江, 4月17～18日, 2008.
- 9) 鳴嶋善聡, 田中昭成, 山崎和俊, 田口英昭, 亀井克彦, 鶴川昌弘, 中室克彦: 新規機能性抗菌剤の開発. 日本医療・環境オゾン研究会第13回研究講演会, 会報 15(2): 28, 東京, 4月20日, 2008.
- 10) 渡辺 哲, 照井慶太, 齋藤 武, 菱木知郎, 吉田英生, 戸来依子, 猪狩英俊, 佐藤武幸, 亀井克彦: *Aureobasidium pullulans* によるカテーテル感染が疑われた一例. 第13回千葉真菌症研究会学術講演会, 千葉, 6月28日, 2008.
- 11) 田中玲子, 亀井克彦, 五ノ井 透, 横山耕治, 矢口貴志, 三上 襄: NBRP・ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」真菌・放線菌. 日本微生物資源学会第12回大会, 千葉, 6月30日～7月2日, 2008.

- 12) 高橋英雄, 植田啓一, 宮原弘和, 内田詮三, 鎗田響子, 村田佳輝, Eiko Itano-Nakagawa, 高山明子, 猪俣智夫, 矢口貴志, 佐野文子, 亀井克彦: イルカの呼気, スタッフおよび飼育環境から分離された病原性酵母の分子疫学的解析. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 76, 長崎, 9 月 10 ~ 11 日, 2008.
- 13) 村田佳輝, 高橋英雄, 佐野文子, 亀井克彦: Web 登録されている ITS 領域 rDNA 配列に基づいたヒストプラズマ症の分子疫学的解析. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 76, 長崎, 9 月 10 ~ 11 日, 2008.
- 14) 田口英昭, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 佐藤綾香, 落合恵理, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* に対する caspofungin と voriconazole の併用効果の検討. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 80, 長崎, 9 月 10 ~ 11 日, 2008.
- 15) 高橋容子, 佐野文子, 西村和子, 亀井克彦: 千葉県内の 1 中高一貫校相撲部における最近 2 年間の皮膚糸状菌症について. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 95, 長崎, 9 月 10 ~ 11 日, 2008.
- 16) 佐野文子, 高橋英雄, 村田佳輝, 亀井克彦: 小動物臨床獣医師を対象としたヒストプラズマ症に関する調査. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 100, 長崎, 9 月 10 ~ 11 日, 2008.
- 17) 西村和子, 佐野文子, 鎗田響子: 神奈川県温泉河川水から分離された *Ochroconis* 属の新種. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 81, 長崎, 9 月 10 ~ 11 日, 2008.
- 18) 落合恵理, 亀井克彦, 佐藤綾香, 永吉 優, 渡辺哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊: 真菌胞子の吸入と肺動脈壁肥厚の形成について. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 104, 長崎, 9 月 10 ~ 11 日, 2008.
- 19) 田村 純, 福井 翔, 佐野文子, 村田佳輝, 平山和子, 谷山弘行, 廉澤 剛: 全身症状を伴う難治性の真菌症を呈した犬の 1 例, 平成 20 年度日本小動物獣医学会 (北海道), p. 22, 9 月 12 ~ 13 日, 2008.
- 20) 豊留孝仁, 渡辺 哲, 田口英昭, 落合恵理, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 成長を促進する血清中因子の同定. 第 57 回日本感染症学会東日本地方学術集会, 第 55 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, プログラム・抄録集 p. 155, さいたま, 10 月 23 ~ 24 日, 2008.
- 21) 清水公德, 李 皓曼, 吉見 啓, 田中千尋, 阿部敬悦, 渡辺 哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* は二成分シグナル伝達系を介して外部環境を感知する. 第 91 回日本細菌学会関東支部総会, 講演抄録集 p. 25, 千葉, 10 月 23 ~ 24 日, 2008.
- 22) 佐野文子, 高橋英雄, 村田佳輝, 亀井克彦: 日本固有のヒストプラズマ症原因菌の遺伝子型. 第 49 回日本熱帯医学会大会・第 23 回日本国際保健医療学会学術大会 (東京), プログラム抄録集 p. 126, 東京, 10 月 25 ~ 26 日, 2008.
- 23) 佐野文子, 高橋英雄, 村田佳輝, 亀井克彦: 小動物臨床獣医師を対象としたヒストプラズマ症に関する認識調査. 第 8 回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 講演要旨集 p. 9, 東京, 11 月 1 日, 2008.
- 24) 渡辺 哲: 進行食道がんに合併した肺アスペルギルス症の切除例. 第 3 回呼吸器感染症ネットワーク in CHIBA, 千葉, 11 月 6 日, 2008.
- 25) 落合恵理, 永吉 優, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊, 亀井克彦: 環境内真菌の吸入と難治性肺疾患の発症に関する検討. 平成 20 年室内環境学会総会・研究発表会, 講演集 p. 202-203, 船堀, 12 月 1 ~ 2 日, 2008.
- 26) 三上 襄, 本田武司, 江崎孝行, 平山謙二, 亀井克彦, 五ノ井透, 横山耕治, 矢口貴志, 田中玲子: NBRP「病原微生物」: 新たな感染症研究への迅速な支援を目指して. 第 31 回日本分子生物学会年会, 第 81 回日本生化学会合同大会 (BMB2008) 特別企画「ナショナルバイオリソースプロジェクト, 神戸, 12 月 9 ~ 12 日, 2008.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 佐野文子 (代表): パラコキシジオイデス症の迅速遺伝子診断法の検討, Eiko Nakagawa Itano 準教授 (ブラジル連邦共和国パラナ州立ロンドリーナ大学生物科学研究所).
- 2) 鎗田響子 (代表): 河川から分離された *Ochroconis* 属新菌種に関する研究, Sybren de Hoog 博士 (オランダ)

ダ Centraalbureau voor Schimmelcultures).

2. 共同利用研究以外の国内共同研究

- 1) 佐野文子: 沖縄美ら海水族館で飼育されているイルカ, マナティー, ウミガメの真菌症対策, 植田啓一, 宮原弘和, 内田詮三 (沖縄美ら海水族館).
- 2) 佐野文子: 病理組織からの遺伝子検出による真菌症診断, 木村久美子, 播谷 亮 (動衛研), 木村雅友 (近畿大医学部病理).
- 3) 佐野文子: 複合漢方薬のウシ白癬菌症に対する治療効果 西片奈保子 ((財)宮崎県産業支援財団).
- 4) 佐野文子: 鳥類由来と考えられる皮膚糸状菌症原因菌の生態調査, 細川 篤 (琉球大).
- 5) 佐野文子: 分子生物学的手法を用いた魚類病原真菌の同定に関する研究, 畑井喜司雄 (日獣大).

国際交流

1. 海外渡航

- 1) 亀井克彦: アメリカ合衆国, マイアミ, 3rd Advances Against Aspergillosis に出席のため, 1月15～22日, 2008 (研究推進費).
- 2) 豊留孝仁: アメリカ合衆国, マイアミ, 3rd Advances Against Aspergillosis に出席, 演題発表のため, 1月15～22日, 2008 (生体防御機能奨学寄附金).

学会等活動 (主催学会, 座長, コンビナーなど)

- 1) 亀井克彦: アスペルギルスの病原性因子 座長. 真菌症フォーラム第9回学術集会, 東京, 2月9日, 2008.
- 2) 亀井克彦: ランチョンセミナー11 司会. 第82回日本感染症学会総会学術講演会, 松江, 4月18日, 2008.
- 3) 亀井克彦: 当番世話人. 第29回関東医真菌懇話会, 東京, 5月31日, 2008.
- 4) 亀井克彦, 宮崎義継: 肺感染症 真菌・原虫2 座長. 第48回日本呼吸器学会学術講演会. 日呼吸会誌 46(増): C-111, 神戸, 6月15～17日, 2008.
- 5) 亀井克彦: ランチョンセミナー2 座長. 第52回日本医真菌学会総会, 長崎, 9月10日, 2008.
- 6) 亀井克彦: 会長. 第7回関東深在性真菌症研究会,

東京, 11月22日, 2008.

- 7) 亀井克彦: 特別講演座長. 第7回関東深在性真菌症研究会, 東京, 11月22日, 2008.

教育活動

講義

亀井克彦: 1) 医学部(細菌学): 授業テーマ「病原真菌と真菌症」, 2) 医学部(感染症ユニット): 授業テーマ「真菌感染症(深在性)」, 3) 薬学部(微生物学・感染症学): 授業テーマ「真菌学(1)」「真菌学(2)」, 4) 看護学部(病態学II 微生物学・免疫学): 授業テーマ「真菌と真菌感染症」, 5) 大学院医学薬学府博士課程(特別講義「研究方法論」): 授業テーマ「微生物の取り扱いと感染事故」, 6) 同博士課程(真菌感染症学): 授業テーマ「医真菌学特論」「医真菌学演習」「医真菌学実習」, 7) 同修士課程(基礎医科学): 授業テーマ「生体防御医学特論」, 8) 融合科学研究科(真菌感染機構論), 9) 東京医科大学(微生物学): 授業テーマ「病原真菌の基礎とその感染症の臨床像」, 10) 福島県立医科大学(微生物学): 授業テーマ「病原真菌と真菌症」, 11) 長崎大学熱帯医学研究所熱帯医学研修課程: 授業テーマ「真菌性疾患」, 12) 同大学院医歯薬学総合研究科熱帯医学専攻修士課程(特別講義): 授業テーマ「Tropical fungal infections」.

佐野文子: 1) 千葉大学大学院医学薬学府(真菌感染症学分野), 2) 千葉大学大学院自然科学研究科(真菌感染学), 3) 普遍教育コア8生命科学(真菌感染に対する生体防御機構), 4) コア科目(真菌(かび)と人とのかかわり合い).

社会活動

テレビ・ラジオ

- 1) 亀井克彦: TBS テレビ「ニュース23」で真菌に由来する疾患や病原性に関するインタビューと環境内から採取した真菌の培養写真を提供, 取材日6月24日, 2008.

センター講習会

- 1) 亀井克彦: 第20回病原真菌講習会講師「真菌感染症概論」(講義), 「真菌のバイオハザード」(講義), 7月8～11日, 2008.

- 2) 渡辺 哲: 第 20 回病原真菌講習会講師「臨床材料の取り扱い」(講義), 「薬剤感受性試験法」(講義), 「測定と解析」(実習), 7月8～11日, 2008.

講演など

- 1) 亀井克彦: 難治性の深在性真菌症に対する最近のアプローチ～糸状菌感染を中心に. 第 14 回南大阪感染症フォーラム, 大阪, 2月16日, 2008.
- 2) 亀井克彦: 深在性真菌感染症～原因菌と治療薬を巡って～. 第 4 回東京血液感染症セミナー, 東京, 3月13日, 2008.
- 3) 亀井克彦: Endemic mycoses (いわゆる輸入真菌症)の臨床. 第 33 回国際小児保健研究会, テーマ: 「国際保健を目指す小児科医に必要な感染症の臨床」, 東京, 4月26日, 2008.
- 4) 亀井克彦: 難治性の深在性真菌症に対する最近のアプローチ～糸状菌感染を中心に～. 第 2 回佐倉・北総地区感染症セミナー, 佐倉, 6月25日, 2008.
- 5) 亀井克彦: 難治性深在性真菌症における最近の動向. 第 6 回血液・腫瘍セミナー, 津, 7月11日, 2008.
- 6) 亀井克彦: 呼吸器真菌症 - 診断と治療の pitfalls -. 第 41 回千葉呼吸器感染症研究会. 千葉, 7月18日, 2008.
- 7) 亀井克彦: 難治性深在性真菌症における最近の動向. 第 10 回新潟血液疾患真菌症フォーラム, 新潟, 7月25日, 2008.
- 8) 亀井克彦: 難治性の深在性真菌症に対する最近のアプローチ～糸状菌感染を中心に～. VFEND 発売 3 周年記念講演会, 東京, 8月30日, 2008.
- 9) 亀井克彦: 原因菌から見た肺真菌症の動向. 第 30 回記念呼吸器感染症京都セミナー, 京都, 9月20日, 2008.
- 10) 亀井克彦: 深在性真菌症における最近の動向. 第 4 回北海道小児血液真菌症研究会, 札幌, 10月31日, 2008.
- 11) 亀井克彦: アスペルギルス症とその周辺疾患 update. 第 2 回大阪真菌症研究会, 大阪, 11月5日, 2008.
- 12) 亀井克彦: 最近の病原真菌と抗真菌薬を巡って. 第 10 回東北呼吸器真菌症研究会, 仙台, 11月15日, 2008.

外部資金

科学研究費補助金

- 1) 亀井克彦 (分担): 平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発, 並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究」, 平成 19～21 年度, 400 万円 (間接経費 0 円).
- 2) 亀井克彦 (分担): 平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「COPD 等における難治性感染症の病態把握等に関する研究」, 平成 20～22 年度, 200 万円 (間接経費 0 円).
- 3) 亀井克彦 (研究協力者): 平成 20 年度厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究」, 平成 20～22 年度, 100 万円 (間接経費 0 円).
- 4) 亀井克彦, 豊留孝仁: 2007 年シオノギ創薬イノベーションコンペ FINDS 共同研究, 平成 19～20 年度, 270 万円 (間接経費 130 万円).
- 5) 亀井克彦 (連携協力者): 平成 20 年度科学研究費補助金 (研究基盤 C) 「肺・気道の免疫応答における新しい Toll 様受容体関連シグナル分子の意義」, 平成 17～20 年度, 0 円.
- 6) 亀井克彦 (分担): 平成 20 年度科学研究費補助金 (研究基盤 C) 「在宅療養者宅等におけるペットの飼育状況とペット飼育に関連する疾患に関する研究」, 平成 17～20 年度, 0 円.
- 7) 亀井克彦 (分担): 独立行政法人科学技術振興機構平成 20 年度先端計測分析技術・機器開発事業「高性能バイオセンシングシステムの開発」, 平成 20～22 年度, 670 万円 (間接経費 201 万円).
- 8) 佐野文子 (分担): 厚生労働省新興・再興感染症研究事業「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究 - 伴侶動物等に由来する真菌症等の診断, 予防法に関する研究」, 平成 18 年度～20 年度 (平成 20 年度は 380 万円).
- 9) 豊留孝仁: 平成 20 年度科学研究費補助金 (若手研究 B) 「*Aspergillus fumigatus* 各形態を認識する宿主因子の探索」, 80 万円 (間接経費 24 万円).

その他の外部資金

- 1) 亀井克彦: 奨学寄附金「真菌症の発生機序及び治療

法の研究」および、「真菌症の診断及び治療法の研究」, 3社から総額 700 万円.

2) 亀井克彦: 奨学寄附金「真菌症の診断及び治療法の研究」, 高橋容子 (きさらづ皮膚科クリニック), 70 万円.

3) 佐野文子: 海洋博覧会記念公園管理財団 調査研究・技術開発助成事業 49 万円.

4) 渡辺 哲: 奨学寄附金「病院内における深在性真菌症の発症状況と抗真菌薬の使用動向の推移についての調査・研究」, 1社から 100 万円.

病原真菌研究部門 系統・化学分野

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Phylogenetics)

教授：五ノ井 透

- 学内委員 大学院医学薬学府（医学系運営）委員会委員，大学院融合科学研究科教授会委員，光熱水料削減プロジェクト部局リーダー，情報化推進企画室図書館専門部会亥鼻分館分科会委員
- センター内委員 運営協議会委員，教員会議委員，総務委員会委員，図書 WG 長，共用備品委員会委員長，ククリス部局システムマネージャー，共同利用委員長，自己点検・評価委員会委員，倫理審査委員会委員，研究部門連絡会委員
- 学協会への貢献 日本放線菌学会理事
- 所属学会 日本医真菌学会，日本微生物資源学会，日本細菌学会，日本放線菌学会，日本分子生物学会
- 受賞 分担：Award for Excellence to Authors Publishing in “*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*” in 2007. Oarada M, Gonoi T, Tsuzuki T, Igarashi M, Hirasaka K, Nikawa T, Onishi Y, Toyotome T, Kamei K, Miyazawa T, Nakagawa K, Kashima M, Kurita N. (2008. 3. 26)

准教授：矢口貴志

- 学内委員 生涯学習推進委員会委員
- センター内委員 教員会議委員，総務委員会委員，共用備品委員会委員，共同利用委員，微生物・保存管理施設運営委員会委員，有害廃棄物委員会委員長，広報委員会委員，自己点検・評価委員会委員，将来計画委員会委員，図書 WG 委員，実験動物 WG 委員，市民相談等対応グループ，光熱水量削減プロジェクト WG 委員，機種選定委員
- 学協会への貢献 日本菌学会・評議員・将来計画構想委員会委員・関東支部幹事
- 所属学会 日本医真菌学会，日本微生物資源学会，日本菌学会，日本顕微鏡学会，マイコトキシン学会，Mycological Society of America

助教：田中玲子

- 学内委員 放射性同位元素委員会専門委員会委員
- センター内委員 微生物・保存管理室施設運営委員会委員，放射性同位元素委員会委員，放射性同位元素取

扱主任者，防災対策委員会委員，研究推進チーム委員，微生物管理保存 WG 委員，個人評価 WG 委員

- 学協会への貢献 日本医真菌学会編集委員会幹事
- 所属学会 日本医真菌学会，日本菌学会，日本微生物資源学会，日本分子生物学会，日本臨床環境医学会，日本感染症学会，American Society for Microbiology
- 受賞 分担：第 97 回日本病理学会総会学生ポスター賞：古賀俊輔，古屋充子，高橋葉子，田中玲子，安福和弘，吉野一郎，熊坂利夫，岸本 充，谷澤 徹，廣島健三，中谷行雄：臨床病理所見から Birt-Hogg-Dube 症候群が疑われ，分子生物学的検討によって診断が確定した多発性肺嚢胞の検討．金沢，2008 年 5 月 15～17 日．

技術職員（医学薬学府博士課程）：松澤哲宏

非常勤講師：堀江義一（千葉県立中央博物館）

非常勤講師：安西弘行（茨城大学遺伝子実験施設 教授）

研究機関研究員：松尾高稔（2008. 5～）

実験補助員：土屋由紀子

大学院融合科学研究科博士課程：芝崎あずさ（2008. 4～）

大学院医学薬学府修士課程：弘 佑介

大学院医学薬学府修士課程：志賀祐介（2008. 4～）

大学院医学薬学府特別研究生：山田暁洋（2008. 4～2008. 10）

千葉大学真菌医学研究センター外国人研究生：Juhaer Mijiti（～2008. 7）

千葉大学真菌医学研究センター外国人研究生：Yordan Khaedir（2008. 10～）

研究概要（共同研究を含む）

1. 病原性放線菌の分子系統および同定法の確立

Nocardia, *Gordonia* などの病原性放線菌について遺伝子配列などを基にした分類・同定法を開発し，菌種間の分子系統学的な関連を明らかにしている。

2. 病原性放線菌の二次代謝産物生合成遺伝子の解析

二次代謝産物の生合成に用いられるポリプレニル 2 リン酸合成酵素などをプローブとして、様々なノカルジア菌株ゲノムのスクリーニングを行い、二次代謝産物生合成遺伝子の探索を進めている。新規化合物の探索や化合物生合成経路の解明に役立つと期待される。

3. レクチン・マイクロアレイを用いた真菌細胞表面糖鎖の解析

各種のレクチンをスライドガラスに貼り付けたレクチン・マイクロアレイを用いて、病原性酵母を中心とした真菌細胞表面糖鎖の種類、相対的な量を種・属横断的に解析している。菌の感染機構等の解明に役立つと期待される。

4. DNA マイクロアレイを用いた真菌同定システムの開発

DNA マイクロアレイを用い、短時間で簡便に病原真菌など酵母・カビを同定できるシステムを開発している。

5. 病原性 *Aspergillus* および関連菌の分類学的研究

当センターに保存されている *Aspergillus fumigatus* を研究材料とし、 β -tubulin, hydrophobin, calmodulin, actin 遺伝子による系統解析を実施した。*A. fumigatus* とは系統的に異なる *A. lentulus*, *A. udagawae* は、薬剤感受性の違いから临床上問題となっている。これら 3 種を迅速に識別できる方法を PCR, LAMP 法で開発した。非典型的な *A. fumigatus* の分布調査を日本、中国などでを行い、*N. udagawae* との近縁菌の交配試験による菌学的位置付けを検討している。

Emericella および関連菌の分類学的研究では、 β -tubulin, hydrophobin, *afIR* 遺伝子による系統解析を実施し、分子系統と子のう胞子の微細構造、最高生育温度との相関性を検討した。分子系統と形態は一部相関が確認された。分子系統的に既知種とは区別された菌種は、その他の性状を検討した結果、新種と考えられた。さらに、薬剤感受性の違いのある *E. nidulans*, *E. ruglosa* の迅速識別法を検討している。

6. 耐熱性菌の多相分類および検出法の開発

食品の製造過程で事故原因菌として問題となる耐熱性

菌 *Byssoschlamys*, *Talaromyces*, *Hamigera*, *Neosartorya* などの系統解析および形態の詳細な検討を実施し、菌学的な位置づけを明らかにした。耐熱性菌各属のみに特異的な塩基配列の探索により新たにプライマーを設計し、迅速に識別できる方法を PCR, LAMP 法で開発した。

7. 病原酵母の疫学的研究

新たに寄託されたイヌ分離株である *Malassezia pachydermatis* について、RAPD-PCR 法を用いた genotyping により疫学的検討を行った。4 種類のプライマーを用いて 13 種類にタイプ分けできたが、テストした 59 株のうち、44 株がほぼ同じタイプに属し、残りの 15 株でそれぞれ特徴的なタイプが示された。同一株の中にタイプの異なる細胞が混在していないかどうかを確認するために単コロニー培養したところ、混在は否定された。また、同一個体より繰り返し分離された菌株（採取時期や部位が異なっている）では、1 組だけ異なったタイプとなったが、その他はすべて同じタイプであった。本分離株はすべて皮膚病変からの分離で、愛玩動物としてのイヌを介したヒトあるいは他個体への伝播が本手法により解明可能であることが示された。

院内感染が疑われた *Candida albicans* については、株識別ツールの改良 (μ TGGE の応用) により、新生児 ICU で同時期に発症した 3 名の新生児のカンジダ症は、双生児の 2 名とその母親が同一タイプの株であり、他の 1 名は別タイプであることが判明した。

8. 病原真菌の系統分類学的研究

新種 (*Exophiala xenobiotica*) の報告を受けて、センター保存の *Exophiala* 属菌株の見直しを行った。また、これまで本属菌種として同定されていたものの種名が明確になっていなかった菌株を中心に系統関係の見直しを行っている。また、新疆医科大学との共同研究で頭部白癬原因菌を中心に系統解析と疫学的検討を行っている。今回の共同研究では、日本では分離例が非常に少ない菌株 (*Trichophyton schoenleinii*, *Microsporum ferrugineum*) が多数寄託されたので、より信頼性の高い系統解析が期待される。

9. 酵母・カビのもつイオン・チャネル、RNA 干渉関連遺伝子などの機能解析

研究成果の発表

1. 著書

- 1) 矢口貴志: 菌類と動物・ヒト. 菌類のふしぎ 形とはたらきの驚異の多様性 (国立科学博物館編) 東海大学出版. 東京. pp.132-135, 2008.
- 2) 矢口貴志: 真菌. 新 GMP 微生物試験法 (佐々木次雄, 棚元憲一, 川村邦夫編) じほう. 東京. pp. 138-157, 2008.
- 3) 亀井克彦, 矢口貴志: PCR 法 (真菌). KEYWORD 感染症第 2 版 (山口恵三, 戸塚恭一編) 先端医学社. 東京. pp. 252-253, 2008.

2. 原著

英文

- 1) Oarada M, Tsuzuki T, Gonoi T, Igarashi M, Kamei K, Nikawa T, Hirasaka K, Ogawa T, Miyazawa T, Nakagawa K, Kurita N: Effects of dietary fish oil on lipid peroxidation and serum triglyceride levels in psychologically stressed mice. *Nutrition* 24: 67-75, 2008. (査読有)
- 2) Hanafy A, Kaocharoen S, Jover-Botella A, Katsu M, Iida S, Kogure T, Gonoi T, Mikami Y, Meyer W: Multilocus microsatellite typing for *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. *Med Mycol* 46(7): 685-696, 2008. (査読有)
- 3) Nakadate S, Nozawa K, Sato H, Horie H, Fujii Y, Nagai M, Hosoe T, Kawai K, Yaguchi T, Fukushima K: An antifungal cyclic depsipeptide, eujavanicin A, isolated from *Eupenicillium javanicum*. *J Nat Prod* 71: 1640-1642, 2008. (査読有)
- 4) Kang Y, Iida S, Yamamoto S, Kogure T, Tanaka R, Mikami Y: *Trf4* is a useful gene for discrimination of *Candida tropicalis* from other medically important *Candida* species. *Jpn J Med Mycol* 49: 39-43, 2008. (査読有)

邦文

- 1) 大内健嗣, 佐藤友隆, 吉澤奈穂, 杉浦 丹, 永尾圭介, 矢口貴志, 畑 康樹: 外傷後に生じた皮膚 *Pseudallescheria boydii* 感染症の 1 例. *真菌誌* 49: 119-124, 2008. (査読有)

3. 総説・解説・その他

- 1) 矢口貴志, 田中玲子: 病原真菌の分類と系統解析. *日本臨床* 66(12): 2261-2267, 2008.
- 2) 矢口貴志, 高島昌子, 川崎浩子, 横村浩一: 病原真菌研究におけるカルチャーコレクションの役割と利用法. *真菌誌* 49(3): 221-228, 2008.
- 3) 亀井克彦, 矢口貴志: 真菌の検査法 培養・同定. *Medical Technology* 36(7): 695-700, 2008.

4. 学会・シンポジウム・研究集会での招待講演 国際学会

- 1) Gonoi T: Microsatellite typing of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Proceedings p.56, Changchun, China, Jul. 28 - Aug. 2, 2008.
- 2) Yaguchi T: Classification of the genus *Neosartorya* based on morphology. 25th Annual Conference Microscopy Society of Thailand, Proceedings pp.4-5, Phitsanulok, Thailand, Jan. 9 - 11, 2008.
- 3) Yaguchi T: Identification of pathogenic *Aspergillus*. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Proceedings p.210, Changchun, China, Jul. 28 - Aug. 2, 2008.
- 4) Yaguchi T, Horie Y, Matsuzawa T, Tanaka R, Abliz P, Hui Y: Polyphasic taxonomy of pathogenic *Aspergillus fumigatus* and related species in Japan and Xinjiang, China. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Proceedings p.53, Changchun, China, Jul. 28 - Aug. 2, 2008.

国内学会

- 1) 矢口貴志: 病原真菌の分類, 同定における最近の動向とトピックス. 第 96 回関西真菌懇談会. 神戸, 7 月 26 日, 2008.
- 2) 矢口貴志: 真菌同定の最新の傾向と問題点 - 形態, 色と分子系統の関連 -. 日本微生物系統分類研究会 第 28 回年次大会, 東京, 9 月 26 日, 2008.

5. 一般発表

国際学会

- 1) Matsuzawa T, Yaguchi T, Tanaka R, Horie Y, Hui Y, Abliz P: Polyphasic analysis of the genus *Emericella* and new species. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology

Forum Symposium, Proceedings p.198, Changchun, China, Jul. 28 - Aug. 2, 2008.

- 2) Hong SB, Varga J, Frisvad JC, Yaguchi T, Samson RA: Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. The 2008 meeting of the Mycological Society of America. Pennsylvania, USA, Aug. 9 - 13, 2008.
- 3) Koga S, Furuya M, Takahashi Y, Tanaka R, Yasufuku K, Yamaguchi A, Yoshino I, Kumasaka T, Nakatani Y: A case of multiple pulmonary cysts associated with Birt-Hogg-Dubé gene mutation. 1st International Symposium on Birt-Hogg-Dubé Syndrome, Denmark, Sep. 4 - 6, 2008.

国内学会

- 1) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄: DNA マイクロアレイ関連技術の開発. 平成 19 年度ライフサイエンス分野融合会議・ライフサイエンス部会バイオテクノロジー分科会合同研究発表会, つくば, 1月31日, 2008.
- 2) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄: DNA マイクロアレイ関連技術の開発. 平成 19 年度ライフサイエンス分野融合会議・ライフサイエンス部会バイオテクノロジー分科会成果・事例発表会, つくば, 2月1日, 2008.
- 3) 古賀俊輔, 古屋充子, 高橋葉子, 田中玲子, 安福和弘, 吉野一郎, 熊坂利夫, 岸本 充, 谷澤 徹, 廣島健三, 中谷行雄: 臨床病理所見から Birt-Hogg-Dubé 症候群が疑われ, 分子生物学的検討によって診断が確定した多発性肺嚢胞の検討. 第 97 回日本病理学会総会, 金沢, 5月15~17日, 2008.
- 4) 弘 祐介, 松澤哲宏, 細谷幸一, 中山素一, 徳田一, 矢口貴志: 耐熱性 *Talaromyces* 属および関連菌の系統分類と検出法の検討. 日本菌学会第 52 回大会, 講演要旨集 p.52, 三重, 5月30~6月1日, 2008.
- 5) 松澤哲宏, 矢口貴志, 堀江義一, 田中玲子, 五ノ井透: *Emericella* 属の多相分類と新種について. 日本菌学会第 52 回大会, 講演要旨集 p.63, 三重, 5月30~6月1日, 2008.
- 6) 矢口貴志, 堀江義一, 松澤哲宏, 田中玲子, Abliz, Paride, Hui, Yan: *Aspergillus* section *Fumigati* に分類される非 *A. fumigatus* について. 日本菌学会第 52 回大会, 講演要旨集 p.93, 三重, 5月30~6月1日, 2008.
- 7) 志保沢里奈, 大楠悦子, 田中玲子, 五ノ井 透, 三上 襄: 病原真菌同定用のオリゴアレイについて. 第 13 回千葉真菌症研究会学術講演階, 千葉, 6月28日, 2008.
- 8) 田中玲子, 亀井克彦, 五ノ井 透, 横山耕治, 矢口貴志, 三上 襄: NBRP・ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」-真菌・放線菌. 日本微生物資源学会第 15 回大会, 日本微生物資源学会誌 24: 56, 千葉, 7月1~2日, 2008.
- 9) Zhu J, Hanafy A, Gonoï T, Meyer W, Mikami Y: Strain typing for *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* by analysis of multilocus microsatellites. 日本微生物資源学会第 15 回大会, 日本微生物資源学会誌 24: 65, 千葉, 7月1~2日, 2008.
- 10) Mijiti J, Tanaka R, Pu XM, Erfan A, Yaguchi T: Genotyping of *Candida albicans* isolated from AIDS patients in Xinjiang, China. 日本微生物資源学会第 15 回大会, 日本微生物資源学会誌 24: 65, 千葉, 7月1~2日, 2008.
- 11) 弘 佑介, 松澤哲宏, 細谷幸一, 中山素一, 徳田一, 矢口貴志: 耐熱性 *Talaromyces* 属および関連菌の系統分類と検出法の検討. 日本微生物資源学会第 15 回大会, 日本微生物資源学会誌 24: 69, 千葉, 7月1~2日, 2008.
- 12) 五ノ井 透, 武田健二郎, 志賀祐介, 松澤哲宏, 三上 襄: *gyrB* 遺伝子による *Nocardia* 属菌群の分類 (multilocus sequence typing を目指して). 2008 年度日本放線菌学会, 山梨, 7月10~11日, 2008.
- 13) 矢口貴志, 松澤哲弘, 弘 佑介, 田中玲子: 病原性 *Aspergillus fumigatus* および関連菌種の多相分類と迅速同定法の検討. 第 2 回アスペルギルス研究会, 千葉, 7月19日, 2008.
- 14) 若菜大悟, 細江智夫, 板橋武史, 河合賢一, 矢口貴志, 滝澤香代子, 福島和貴: *Malbranchea filamentosa* から得られる新規セスキテルペンの構造. 第 55 回日本生薬学会, 長崎, 7月19~20日, 2008.
- 15) 板橋武史, 細江智夫, 河合賢一, 矢口貴志: *Neosartorya* 属菌の“新種”とプロファイルされた A159 菌株の成分研究. 第 55 回日本生薬学会, 長崎, 7月19~20日, 2008.
- 16) 松澤哲宏, 矢口貴志, 田中玲子, 堀江義一, 五ノ井

- 透: *Emericella* 属の多相分類と新種について. 第5回真菌分子細胞研究会, 千葉, 8月21~22日, 2008.
- 17) 五ノ井 透: 病原性放線菌の国内同定システムの確立と運用. 第2回真菌ワーブ研究会, 千葉, 8月23日, 2008.
- 18) 五ノ井 透, ハナフィアメド, メーヤーウィランド, 三上 襄: *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* のマイクロサテライト多型とその世界分布. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 84, 長崎, 9月10~11日, 2008.
- 19) 神戸俊夫, 服部尚生, 田中玲子, 知花博治: RPS/ALT およびマイクロサテライトに基づいた *Candida albicans* のタイピングの評価と genotype variation. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 86, 長崎, 9月10~11日, 2008.
- 20) 矢口貴志, 弘 祐介, 松澤哲宏, 田中玲子, 細谷幸一, 中山素一, 徳田 一: 病原性 *Aspergillus* section *Fumigati* の分類と識別法の検討. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 81, 長崎, 9月10~11日, 2008.
- 21) 矢口貴志, 堀江義一, 松澤哲宏, 田中玲子, Paride Abliz, Hui Yan: 病原性 *Aspergillus fumigatus* の系統解析と形態. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 81, 長崎, 9月10~11日, 2008.
- 22) 松澤哲宏, 矢口貴志, 堀江義一, 田中玲子, 五ノ井透: 病原性 *Emericella* 属菌の特異的・迅速的な検出法の開発. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 82, 長崎, 9月10~11日, 2008.
- 23) 弘 祐介, 松澤哲宏, 細谷幸一, 中山素一, 徳田 一, 矢口貴志: 耐熱性 *Talaromyces* 属および関連菌の系統分類と識別法の検討. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 81, 長崎, 9月10~11日, 2008.
- 24) Tanaka R, Mijiti J, Yaguchi T: Genotyping of *Candida albicans* isolated from AIDS patients in Xinjiang, China. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 84, 長崎, 9月10~11日, 2008.
- 25) 細谷幸一, 中山素一, 徳田 一, 弘 祐介, 松澤哲宏, 矢口貴志: 食品危害耐熱性カビ主要4属の迅速識別・同定技術の確立. 日本防菌防黴学会第35回年次大会, 要旨集 p.176, 浜松, 9月11~12日, 2008.
- 26) 中山素一, 朱 丹, 細谷幸一, 矢部信一, 徳田 一, 弘 祐介, 松澤哲宏, 矢口貴志: 飲料におけるカビ, 酵母の迅速検査法および検出菌の遺伝子解析による迅速識別・同定法の確立. 日本防菌防黴学会第35回年次大会, 要旨集 p.177, 浜松, 9月11~12日, 2008.
- 27) 窪田宜昭, 長岡 浩, 窪田正昭, 窪田 規, 滝澤香代子, 矢口貴志: 銀微粒子の粒子径制御と抗真菌活性について. 日本防菌防黴学会第35回年次大会, 要旨集 p.133, 浜松, 9月11~12日, 2008.
- 28) 五ノ井 透, Ahmed Hanafy, Wiland Meyer, 三上 襄: Multilocus microsatellite sequence による病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* 多型性の世界分布解析. 第91回日本細菌学会関東支部会, 千葉, 10月23~24日, 2008.
- 29) 矢口貴志, 川良 希, 上田成一, 宇田川俊一: 変敗果実加工品から分離されたカビ *Neosartorya laciniosa* の同定と耐熱性. 第29回日本食品微生物学会学術総会, 講演要旨集 p.53, 広島, 11月12~13日, 2008.
- 30) 矢口貴志, 弘 祐介, 松澤哲宏, 田中玲子, 細谷幸一, 中山素一, 徳田 一: *Aspergillus* section *fumigatus* 関連菌種の形態, 分子系統の相違と迅速同定法の検討. 第29回日本食品微生物学会学術総会, 講演要旨集 p.54, 広島, 11月12~13日, 2008.
- 31) 細谷幸一, 中山素一, 徳田 一, 弘 祐介, 松澤哲宏, 矢口貴志: 食品危害耐熱性カビ主要4菌種同定法 1. PCR法の確立. 第29回日本食品微生物学会学術総会, 講演要旨集 p.55, 広島, 11月12~13日, 2008.
- 32) 弘 祐介, 矢口貴志, 松澤哲宏, 細谷幸一, 中山素一, 徳田 一: 食品危害耐熱性カビ主要4菌種同定法 2. LAMP法による高度化と分子系統解析. 第29回日本食品微生物学会学術総会, 講演要旨集 p.56, 広島, 11月12~13日, 2008.
- 33) 三上 襄, 本田武司, 江崎孝行, 平山謙二, 亀井克彦, 五ノ井 透, 横山耕治, 矢口貴志, 田中玲子: 新たな感染症研究への迅速な支援を目指して. BMB2008, 神戸, 12月9~12日, 2008.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 矢口貴志, 田中玲子: 中央アジアにおける真菌症原因菌および関連菌の生態研究 (文部科学省科学研究費補助金), 恵 艶教授, 中華人民共和国, 新疆医科大学附属第一病院皮膚科.
- 2) 矢口貴志, 田中玲子: 新疆ウイグル地区における病原真菌の形態と系統解析による分類研究 (五峯ライフサイエンス研究助成), Juhaer Mijiti 助教授, 中華人民共和国, ウイグル人民病院皮膚科.

2. 共同利用研究以外の国内共同研究

- 1) 田中玲子: 生体試料を用いた民族識別法における指標の研究, 桜田宏一博士, 警視庁科学警察研究所, 佐藤慶太講師, 鶴見大学歯学部.
- 2) 田中玲子: *Trichosporon* 属の系統分類的再評価, 今西由巳博士, NBRC.
- 3) 田中玲子: Birt-Hogg-Dube 症候群の確定診断のための分子生物学的検討, 古屋充子准教授, 横浜市立大学医学部.
- 4) 田中玲子, 松澤哲宏, 宇野 潤, 五ノ井 透, 三上 襄: *Malassezia* 属菌の免疫不活化作用に関する研究, 齊藤 隆博士, 山崎 晶博士, 独立行政法人理化学研究所・免疫アレルギー科学総合研究センター.

国際交流

1. 海外渡航

- 1) 矢口貴志: タイ, バンコック, The 25th Annual Conference of the Microscopy Society of Thailand に出席, 招待講演, 情報収集のため, 1月6~11日, 2008 (科学研究費補助金).
- 2) 矢口貴志: アメリカ, マイアミ, 3rd Advances Against Aspergilosis に出席, 情報収集のため, 1月15~21日, 2008 (奨学寄付金).
- 3) 矢口貴志: 中華人民共和国, ウルムチ, 新疆医科大学附属第一病院皮膚科 恵 艶教授との共同研究の打ち合わせ, 討議のため, 2月17日~28日, 2008 (科学研究費補助金).
- 4) 五ノ井 透, 矢口貴志, 松澤哲宏: 中華人民共和国, 長春, Japan-China Pan Asia Pacific Mycology Forum,

Changchun 出席のため, 7月28日~8月5日, 2008 (科学技術振興調整費, 奨学寄付金).

- 5) 矢口貴志, 田中玲子: 中華人民共和国, ウルムチ, 新疆医科大学附属第一病院皮膚科 恵 艶教授との共同研究の打ち合わせ, 討議, 研究サンプル収集のため, 10月17日~28日, 2008 (科学研究費補助金).

2. 海外研究者の受け入れ

- 1) Yordan Khaedir (インドネシア, インドネシア大学医学部), 2008年10月~(文部科学省) 国費留学生 (五ノ井 透).
- 2) Juhaer Mijiti 助教授 (中華人民共和国, ウイグル人民病院), ~7月24日, 2008 (五峯ライフサイエンス研究助成), 共同研究 (矢口貴志).
- 3) Abliz Paride 助教授 (中華人民共和国, 新疆医科大学附属第一病院), 11月17日~12月17日, 2008 (科学研究費補助金), 共同研究 (矢口貴志).

学会等活動 (主催学会, 座長, コンビナーなど)

コンビナー, 座長

- 1) Yaguchi T: Workshop. The recent progress on the identification of clinically important fungi. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Changchun, China, Jul. 28 - Aug. 2, 2008.

座長

- 1) Gono T: Symposium. Medical Mycology. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Changchun, China, Jul. 28 - Aug. 2, 2008.

教育活動

講義

- 1) 五ノ井 透: 千葉大学大学院医学薬学府医科学専攻修士課程 (先端生命科学).
- 2) 矢口貴志: 千葉大学大学院自然科学専攻修士課程 (融合科学 真菌分子細胞生物学)
- 3) 五ノ井 透, 矢口貴志: 千葉大学普遍教育 (真菌 (カビ) と人との関わり合い).
- 4) 矢口貴志, 田中玲子: 千葉大学医学部微生物実習.
- 5) 矢口貴志: 千葉大学園芸学部細胞工学

社会的活動

新聞など

- 1) 身近な病原 かに注意 上, 下. 日本農業新聞 (2008年6月12, 19日).

センター講習会

- 1) 矢口貴志, 田中玲子: 第22回病原真菌講習会講師 (2008年7月8~11日).
- 2) 五ノ井 透, 矢口貴志, 田中玲子: 5th Workshop on Pathogenic Fungi and Actinomycetes in MMRC in 2008, July 15 - 18, 2008.

講演など

- 1) Yaguchi T: Polyphasic taxonomy for pathogenic fungi. Lecture at Kunyang University. Daejeon, Korea, 2008. 6. 19.
- 2) Yaguchi T: Polyphasic taxonomy for pathogenic fungi. Lecture at KACC, NIAB. Suwon, Korea, 2008. 6. 20.

特許

- 1) 「PCR法による耐熱性カビ4属の検出, アスペルギルス フミガタス類緑菌の検出方法」など関連計7件.

外部資金

科学研究費補助金

- 1) 矢口貴志 (代表) 田中玲子 (分担): 基盤研究 B 18405005 海外学術調査 中央アジアにおける真菌症原因菌および関連菌の生態研究, 平成18~21年度. (平成20年度は330万円 (間接経費99万円)).

- 2) 田中玲子 (代表), 矢口貴志 (分担): 基盤研究 C 18510201 病原真菌の系統分類学および生態学的研究, 平成18~20年度 (平成20年度は90万円, (間接経費27万円)).

その他の外部資金

- 1) 矢口貴志 (分担): (財)発酵研究所第1回特定研究助成「我が国における微生物の多様性解析とインベントリーデータベースの構築-亜熱帯地域と冷温帯地域の比較から, 平成19~21年度 (平成20年度は100万円).
- 2) 矢口貴志, 田中玲子 (分担): ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」, 平成19~23年度.
- 3) 矢口貴志, 田中玲子 (分担): 科学技術振興調整費 アジア科学技術協力推進戦略・地域共通課題解決型 国際共同研究: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 平成18~20年度.

共同研究

- 1) 矢口貴志 (代表): 花王 (株) 平成20年度 食品危害カビの迅速同定識別法確立に関する研究, 154万円 (間接経費46万円).

受託研究

- 1) 矢口貴志 (代表): 独立行政法人農業生物資源研究所 平成20年度 農業生物資源ジェンバンク事業が保存する *Aspergillus* 属及び *Penicillium* 属菌類の学名更新, 50万円.

奨学寄附金

- 1) 矢口貴志 (代表) リファイン (株) 30万円.

病原真菌研究部門 真菌資源開発分野

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Fungal Resources and Development)

准教授：横山耕治

○学内委員 総合メディア基盤センター運用専門委員，
亥鼻地区ネットワーク連絡会議委員，亥鼻地区職員駐
車場地域利用委員，部局情報管理者

○学外委員 日本医真菌学会評議員，日本マイコキシ
ン研究会幹事

○センター内委員 総務委員会委員，共同備品委員会委
員，共同利用委員会委員，微生物・保存管理施設委員
会委員，広報委員会委員，放射性同位元素委員会委員
長，自己点検・評価委員会委員，地域連携委員会委員，
研究推進チーム委員，個人評価WG委員，光熱水量節
減プロジェクトWG委員

○所属学会 日本医真菌学会，日本細菌学会，日本菌
学会，日本微生物資源学会，日本農芸化学会，日本マ
イコキシソ学会，International Society of Human and
Animal Mycology

非常勤講師：村山琮明（北里大学 北里生命科学研
究所&大学院感染制御科学府）

技術補佐員：各務清美

技術補佐員：屋久玲子

外国人研究員：王 麗（中国吉林大学）（2008. 9. 7～
9. 21）

外国人研究員：張 雲峰（中国吉林大学）（2008. 7. 13
～7. 20）

研究概要

1. 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成

文部科学省・振興調整費－アジア科学技術協力の戦略
的推進・地域共通課題解決型国際共同研究－プロジェ
クトにおいて、「研究課題：真菌症原因菌の疫学的研究
と真菌症対策拠点形成」で，これまでの実績と組み
が評価され，研究調査が進められることになった．今年
は，長春市吉林農業大学で行なわれた日中菌学フォー
ラムにおいて，マイコキシソと医真菌のシンポジウムを
開催した．吉林大学においては日中共同研究会議を開催

した．長春－吉林大学，貴陽－貴陽医学院を訪問し，土
壌の採取を行い吉林大学で真菌の分離作業を行い，セン
ターでチトクローム *b* 遺伝子解析により分離株の同定
を行った．貴陽医学院とは，この訪問で部局間交流協定
を結ぶことで同意された．このプロジェクトは，平成 20
年度で終了するが，今後も病原真菌の疫学，生態の研究
を続ける（横山耕治，王 麗，各務清美，屋久玲子）．

2. 病原真菌の疫学的，生態学的研究

a. 中国東北部における真菌感染症調査および真菌症疫 学，生態研究

日中医学協会奨学寄付金（2006 年単年度）獲得をき
っかけに，中国吉林省長春 吉林大学白求恩医学院を訪問
し，真菌症の調査を行っており，振興調整費の支援で，
長春に於いてシンポジウムを開催した．今後も共同研究
を進展させ真菌症の疫学と病原真菌の生態に関する研究
を継続する（横山耕治，王 麗，賀 丹，各務清美，屋
久玲子）．

b. 真菌の個体識別法を用いた病原真菌の疫学，生態学 的研究

真菌の個体識別法の一つである AFLP (Amplified
Fragment Length Polymorphisms) 解析により，輸入真菌
症原因菌 *P. marneffei* の感染株の由来を明らかにし，患
者が感染した地域を推定できた．この方法を皮膚真菌症
原因菌 *M. canis* に応用し解析したが，増幅バンドの数が
多すぎたためパターンに特徴が示せなかった．今後は，
増幅バンドを制限する方法を用いて再度解析する．さら
に，菌株の個体識別は真菌症疫学にとって重要な要素で
あり，株間類縁関係解析に AFLP 解析は欠かせないので，
現在進めている *Aspergillus section Nigri* や他の菌群
に応用して，真菌症の疫学，真菌の生態の研究を進める
（横山耕治，王 麗，各務清美）．

3. 病原真菌の及び関連菌のチトクローム *b* 遺伝子解析

a. 病原真菌の同定・系統解析および真菌症の迅速診断 チトクローム *b* 遺伝子の解析は，継続し行われている

研究テーマで、すでに病原性の *Aspergillus* 属菌、*Candida* 属菌、*Cryptococcus* 属菌、*Rhodotorula* 属菌、*Exophiala* 属菌、*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, var. *gattii*, *Trichosporon* 属菌については、8年間で15報の論文を発表している。真菌症原因菌の迅速診断のためのプライマーセットなどの特許を千葉大学から申請し、迅速診断に係わる申請数は、5件となった。昨年は、希に真菌症を起こす *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Graphium*, *Beauveria* 菌群の解析を進めている。これらの菌群には既存のPCRプライマーでは増幅できない菌種、株を含むためプライマーの設計を行っている。今年も、病原菌でもありごく一般的な環境菌でもある *Alternaria* 属菌を中心に解析を行った。本属菌は多くの種を含むが形態的な特徴も乏しく、DNAシーケンスによるDNA型も種の数ほどないことが明らかになった。健康に関連している環境菌やマイコトキシン産生菌のDNA型解析を進め、真菌同定の精度を高め、保存菌の品質確保に努める。輸入真菌症の原因菌を中心に、既存PCRプライマーの評価と新たにプライマーの設計を検討している。DNAマイクロアレイによる迅速同定化に関する検討も続けている(横山耕治, 王麗, Biswas KS, 賀丹, 各務清美)。

b. 真菌の進化系統解析

既に解析の済んでいる病原真菌と関連菌のチトクローム *b* 遺伝子からアミノ酸配列を推定し、真核生物のチトクローム *b* のアミノ酸配列と比較し、化石年代、地質年代とを考慮して、各真菌の進化系統を推定している。化石年代から推定する場合に、現存種の古代化石なのか絶滅種の化石なのかの判定は困難であるが、誤差を考慮して推定している。成長様式、繁殖様式など生物種固有の様式を進化と関連して考慮すべきであることが考えられた。生物におけるミトコンドリア遺伝子、核遺伝子、形態発現を総合的に考察して真菌の進化の謎を解明する(横山耕治, 各務清美, 高橋治男, 王麗, Biswas KS)。

4. 病原性発現遺伝子、形態形成関連遺伝子の解析

Candida albicans の二形性に関する研究を続けており、本菌の遺伝子をスライドグラスにプリントしてマイクロアレイの作成を試みている。DNAマイクロアレイは、遺伝子発現を調べるために有効な手法であるが、遺伝子の発現制御やリン酸化などによるシグナル伝達などの変化は解析しにくい。このため放射性同位元素を用いた解析を含めて今後検討する予定である。形態変換能を示

す *Candida tropicalis* や二形性を示す病原真菌との遺伝子、遺伝子発現の研究から真菌の病原性を明らかにする(横山耕治, 各務清美, 岩口伸一, 村山琮明)。

5. 真菌資源の長期安定保存法の開発

菌糸形細胞は、酵母形や分生子と異なり乾燥保存には耐えにくく、保存中に死滅する場合が多い、特に分生子を作らない株や作りにくい種においては、従来のL-乾燥保存には耐えられない、そこで、乾燥前の処理に工夫を凝らし、分散媒や乾燥保護剤を検討してL-乾燥で保存できる方法を開発した。このテーマで(財)発酵研究所から研究助成(平成16年9月～19年3月)を受けた。自作のコルクボーラーを用いて、培地ごとL-乾燥させる方法を用いて、従来のL-乾燥法では保存できない菌株が保存可能となった。しかし、一部の株にはこの保存法が適用できないため、更に検討している(横山耕治, 伊藤純子)。

研究成果の発表

1. 原著

- 1) Iwaguchi S, Suzuki M, Sakai N, Yokoyama K, Suzuki T: The loss of parts of chromosome 7 followed by the insertion of URA cassette into RB2 on MRS in *Candida albicans* strain CAI-4. *Med Mycol* 46: 655-63, 2008.

2. 総説・解説・その他

- 1) 横山耕治, 川上裕司, 陰地義樹, 久米田裕子, 高橋治男: ぶどう園における section *Nigri* の分布と分離株のオクラトキシン産生性. *Mycotoxins* 58(2): 143-149, 2008.
- 2) 横山耕治(分担): 振興調整費成果報告書(2007年度)。

3. 学会・シンポジウム・研究会での招待講演

国際学会(ワークショップ)

- 1) Yokoyama K: Epidemiology of *Penicillium marneffei*. Special Symposium: China-Japan Medical Mycology Project in Asia. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, Changchun July 28 - August 5, 2008.
- 2) Wang L, Yokoyama K, Dan HE, Yang YQ, Liu JH: Identification of *Aspergillus fumigatus* and diagnosis of

aspergillosis. Special Symposium: China-Japan Medical Mycology Project in Asia. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, Changchun July 28 - August 5, 2008.

- 3) Dan HE, Yokoyama K, Takahashi H, Onji Y, Wang L: Classification and mycotoxin production of aflatoxin-producing strain and section *Nigri* isolated from soil and agricultural product in China. Special Symposium: China-Japan Medical Mycology Project in Asia. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, Changchun July 28 - August 5, 2008.

4. 一般発表

国内学会

シンポジウム

- 1) 横山耕治, 川上裕司, 陰地義樹, 久米田裕子, 高橋治男: ぶどう園における section *Nigri* の分布と分離株のオクラトキシン産生性. 日本マイコトキシン学会第 63 回学術講演会, シンポジウム, 東京, 1 月 11 日, 2008.

一般講演

- 1) 王 麗, 各務清美, 横山耕治: チトクローム *b* 遺伝子に基づく *Alternaria* 属菌の系統解析. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 83, 長崎, 9 月 10 日~11 日, 2008.
- 2) 康 穎倩, 矢沢 勝清, 横山耕治, 三上 襄: 中国貴陽医学院で分離された病原性酵母の分類学的研究. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 84, 長崎, 9 月 10 日~11 日, 2008.
- 3) 横山耕治, 各務清美, 賀 丹, 王 麗: 希な真菌症原因菌を含む *Aspergillus section Nigri* のチトクローム *b* 遺伝子解析による生態学的研究. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 84, 長崎, 9 月 10 日~11 日, 2008.
- 4) 各務清美, 王 麗, 横山耕治: 皮膚糸状菌 *Microsporum canis* の AFLP 解析による疫学的研究. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 85, 長崎, 9 月 10 日~11 日, 2008.
- 5) 岩口 伸一, 横山耕治, 鈴木 孝仁: 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* 由来の揮発性有機化合物 (Microbial Volatile Organic Compounds; MVOCs). 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 103, 長崎, 9 月 10 日~11 日, 2008.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 横山耕治: チトクローム *b* 遺伝子に基づく菌類の同定と系統解析. 王 麗 教授 (中国 吉林大学).
- 2) 横山耕治: チトクローム *b* 遺伝子に基づく酵母類の同定と系統解析. Biswas SK 博士 (アメリカ合衆国ペンシルバニア医科大学).
- 3) 横山耕治: 中国東北部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 王 麗 教授 (中国 吉林大学).
- 4) 横山耕治: 中国東中部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 李 若瑜 教授 (中国 北京大学).
- 5) 横山耕治: 中国東南部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 席 麗艷 教授 (中国 広州 中山大学).
- 6) 横山耕治: 中国南西部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 王 和 教授 (中国 貴陽医科大学).
- 7) 横山耕治: 中国西部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 惠 艷 教授 (中国 新疆医科大学).
- 8) 横山耕治: 中国南西部における真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, Paride Abliz 助教授 (中国 新疆医科大学).

国際交流

1. 海外渡航

- 1) 横山耕治: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 (文部科学省振興調整費) 中国吉林省長春市吉林大学白求恩医学院, 農案, 松原, 瀋陽 2 月 24 日~3 月 2 日, 2008.
- 2) 横山耕治: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 (文部科学省振興調整費) 中国吉林省長春市吉林大学白求恩医学院, 北京, 杭州 6 月 15 日~22 日, 2008.
- 3) 横山耕治: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 (文部科学省振興調整費) 中国吉林省長春市吉林大学白求恩医学院, 吉林農業大学 7 月 27 日~8 月 3 日, 2008.

- 4) 横山耕治: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成 (文部科学省振興調整費) 中国吉林省長春市吉林大学白求恩医学院, 貴陽医科大学, 威海 10月12日 ~ 10月19日, 2008.

2. 海外研究者の受け入れ

横山耕治

- 1) 張 雲峰 (中国吉林大学), 2008年7月13日 ~ 2008年7月20日, 外国人向け病原真菌講習会参加, 共同研究.
- 2) 王 麗 教授 (中国吉林大学), 2008年9月7日 ~ 9月21日, 共同研究.

学会等活動 (主催学会, 座長, コンビナーなど)

- 1) 横山耕治: Organizing Committee: China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, Changchun July 28-August 5, 2008.
- 2) 横山耕治: Chair person: Special Symposium: China-

Japan Medical Mycology Project in Asia, China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, Changchun July 28-August 5, 2008.

教育活動

講義

- 1) 横山耕治: 医学部4年次医学生命科学特論・研究 (2007).
- 2) 横山耕治: 普遍教育.

外部資金

その他の外部資金

- 1) 横山耕治 (分担): 文部科学省振興調整費. プログラム名: アジア科学技術協力の戦略的推進地域共通課題解決型国際共同研究. 課題名: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成.

病原真菌研究部門 生態分野

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Ecology)

外国人客員教授：白 逢彦

(中国科学院微生物研究所 研究員 (教授), 副主任)

○学会および社会における活動等

Editorial Board Member: FEMS Yeast Research; Acta Microbiologica Sinica; Mycosystema; Journal of Fungal Research and Bulletin of Biology.

Memberships: Mycological Society of China; Chinese Society for Microbiology; American Society for Microbiology.

Vice Director of the CAS Key Laboratory of Systematic Mycology and Lichenology.

Vice Director of the Committee on Mycology, Chinese Society for Microbiology.

助教：田口英昭

○学内委員 亥鼻地区職員等駐車区域利用者委員会, 亥鼻地区 ISO 実行委員会, 光熱水料節減リーダー会議, 亥鼻地区光熱水料節減委員会, 亥鼻地区職員等駐車区域利用者委員会平成 20 年度会計監査員, 亥鼻地区平成 20 年度 ISO 内部監査員

○センター内委員 共用備品委員会, 微生物・保存管理施設運営委員会, 有害廃棄物委員会, 放射性同位元素委員会, 防災対策委員会, 組織・機能改善委員会, 図書 WG, 光熱水量節減プロジェクト WG, 微生物管理保存 WG

○学協会への貢献 日本医真菌学会評議員

○国および地方公共団体への貢献 千葉市環境影響評価審査会委員, 千葉大学・千葉市の共同研究事業「水辺づくりにおける市民と行政のパートナーシップ形成」

○所属学会 日本感染症学会, 日本医真菌学会, 日本防菌防黴学会, 日本内分泌攪乱化学物質学会, 日本臨床微生物学会

技術職員：滝澤香代子

非常勤講師：久米 光 (日本医科大学・客員教授)



研究概要 (共同研究を含む)

1. 抗真菌剤の作用機序と形態変化の研究
上市されている全身投与可能な抗真菌剤の最適な併用方法を検討。
2. シード化合物の抗真菌効果の研究
自然界からのシード化合物と既存の抗真菌剤との薬剤効果の比較および併用による抗真菌効果の検討。
3. 真菌の同定および分子疫学的研究の為の基礎的研究
形態学, 生理生化学的手法による同定では確定できない真菌の同定を目的に, 分子生物学的手法による同定法を検討している。また急務事項でもある感染経路の特定のための疫学的クライテリアを探索している。

研究成果の発表

1. 著書

英文

- 1) Fan SR, Bai FY, Liao QP, Li J, Liu XP, Liu ZH: Genotype distribution of *Candida albicans* strains associated with different conditions of vulvovaginal candidiasis, as revealed by microsatellite typing. Sex Transm Infect 84: 103-106, 2008. (査読有り)
- 2) Li J, Fan SR, Liu XP, Li DM, Nie ZH, Li F, Lin

- H, Huang WM, Zong LL, Jin JG, Lei H, Bai FY: Biased genotype distributions of *Candida albicans* strains associated with vulvovaginal candidosis and candidal balanoposthitis in China. *Clin Infect Dis* 2008. (in press) (査読有り)
- 3) Liu XP, Fan SR, Bai FY, Li J, Liao QP: Atifungal susceptibility and genotypes of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses* 2008. (Published online, OI: 10.1111/j.1439-0507.2008.01539.x) (査読有り)
- 4) Wang QM, Li J, Wang SA, Bai FY: Rapid differentiation of phenotypically similar yeast species by single-strand conformation polymorphism of ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 74: 2604-2611, 2008. (査読有り)
- 5) Ji ZH, Bai FY: *Ogataea ganodermae* sp. Nov., a methanol-assimilating yeast species isolated from basidiocarps of *Ganoderma* sp. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1502-1506, 2008. (査読有り)
- 6) Wang QM, Bai FY: Molecular phylogeny of basidiomycetous yeasts in the *Cryptococcus luteolus* lineage (Tremellales) based on nuclear ribosomal RNA and mitochondrial cytochrome *b* gene sequence analyses: proposal of *Dexomyces* gen. nov. and *Hannaella* gen. nov., and description of eight novel *Dexomyces* species. *FEMS Yeast Research* 8: 799-814, 2008. (査読有り)
- 7) Wang QM, Jia JH, Bai FY: Diversity of basidiomycetous phyloplane yeasts belonging to the genus *Dioszegia* (Tremellales) and description of *Dioszegia athyrium* sp. nov., *Dioszegia cream* sp. nov. and *Dioszegia zingshanensis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 93: 391-399, 2008. (査読有り)
- 8) Wang SA, Bai FY: *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a new yeast species from tree bark. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 510-514, 2008. (査読有り)
- 9) Wang SA, Jia JH, Bai FY: *Candida alocasiicola* sp. nov., *Candida hainanensis* sp. nov., *Candida heveicola* sp. nov. and *Candida musiphila* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species isolated from plants. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 257-265, 2008. (査読有り)
- 10) Melo NR, Taguchi H, Culhari VP, Kamei K, Mikami Y, Smith SN, Vilela MS: Oral candidiasis of HIV-infected

children undergoing sequential HIV therapies. *Med Mycol* 2008. in press. (査読有り)

2. 一般発表

- 1) 豊留孝仁, 渡辺 哲, 落合恵理, 田口英昭, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 成長に血清が与える影響についての解析. 第 82 回日本感染症学会, 講演抄録 p. 240, 島根, 4月17~18日, 2008.
- 2) 田口英昭, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 落合恵理, 佐藤綾香, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* に対する caspofungin と voriconazole の併用効果の検討. 第 52 回日本医真菌学会総会. 真菌誌 49 (増刊 1号): 80, 長崎, 9月10~11日, 2008.
- 3) 豊留孝仁, 渡辺 哲, 田口英昭, 落合恵理, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 成長を促進する血清中因子の同定. 第 57 回日本感染症学会東日本地方会, 抄録集 p.170, 大宮, 10月23~24日, 2008.
- 4) 鳴嶋善聡, 田中昭成, 山崎和俊, 佐藤綾香, 田口英昭, 亀井克彦, 鶴川昌弘, 中室克彦: 新規機能性抗菌剤の開発. 第 13 回日本医療環境オゾン研究会, 東京, 4月20日, 2008.
- 5) 窪田宣昭, 長岡 浩, 窪田正昭, 窪田 規, 滝澤香代子, 矢口貴志: 銀微粒子の粒子径制御と抗真菌活性について. 日本防菌防黴学会第 35 回年次大会. 要旨集 p.133. 静岡, 9月11~12日, 2008.
- 6) 滝澤香代子, 田中博二, 新矢恭子, 小菅旬子, 福島和貴: イヌの骨髄炎起因菌として分離された *Schizosphaera commune* の同定. 第 52 回日本医真菌学会総会. 真菌誌 49 (増刊 1号): 85, 長崎, 9月10~11日, 2008.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 自然界からのシード化合物の抗真菌効果の研究, Park JC 准教授, 韓国, 延世大学医学部. (田口)
- 2) 病原性放線菌の同定に関する研究. 席 麗艶教授, 中国中山大学附属第二医院皮膚科. (滝澤)

社会的活動

センター講習会

- 1) 第 22 回病原真菌講習会講師「 β -グルカンによる診断」(田口).

外部資金

奨学寄附金

- 1) 滝澤香代子(分担): リファイン株式会社, 20 万円.

分子機能研究部門 機能形態分野

(Department of Molecular Function, Division of Ultrastructure and Function)

教授：川本 進

- 学内委員 大学院医学系運営委員会委員，大学院融合科学研究科教授会委員，学内評価委員会委員，分析センター連絡協議会委員，アイソトープ実験施設連絡協議会委員，バイオメディカル研究センター教員会議委員，遺伝子組換え実験安全委員会委員，遺伝子組換え実験安全主任者，分子機能研究部門危害防止主任者，機能形態分野作業主任者，海外協定校コンタクトパーソン（ハンガリー共和国デブレツェン大学），亥鼻地区留学生担当教員
 - センター内委員 運営協議会委員，教員会議委員，総務委員会委員，広報委員会委員長，地域連携委員会委員長，倫理審査委員会委員長，研究推進チームチームリーダー，自己点検・評価委員会委員，研究部門連絡会委員，再審査制度検討委員会委員，実験室内感染事故調査委員会委員，共焦点レーザー顕微鏡システム調達関係委員
 - 学協会への貢献 日本医真菌学会（Japanese Journal of Medical Mycology, Editorial Board），日本細菌学会・本部評議員・関東支部評議員・関東支部活性化推進委員会委員，日本生化学会・本部評議員・本部代議員・関東支部幹事・関東支部運営委員・関東支部副読本作成委員会委員，日本神経化学会評議員，ニューヨーク科学アカデミー会員，酵母細胞研究会運営委員，Mycopathologia (Associate Editor)
 - 所属学会 日本細菌学会，日本医真菌学会，日本菌学会，日本生化学会，日本分子生物学会，日本神経化学会，日本神経科学学会，酵母細胞研究会，American Society for Biochemistry and Molecular Biology, American Society of Microbiology, International Society for Human and Animal Mycology, Society for Neuroscience, New York Academy of Sciences
 - その他 横浜市立大学医学部 客員教授，認定 NPO 法人・総合画像研究支援 正会員
- 准教授：山口正視
- 学内委員 真菌医学研究センター教員系過半数代表

者，両立支援室室長

- センター内委員 教員会議委員，総務委員会委員，共用備品委員会委員，共同利用委員会委員，広報委員会委員（年報担当 WG 委員長），自己点検・評価委員会委員，地域連携委員会委員，将来計画委員会委員，光熱水料削減プロジェクト WG 委員，国際規制物質（酢酸ウラニル）管理者，個人情報保護担当者
 - 学協会への貢献 日本顕微鏡学会（本部監事・Journal of Electron Microscopy 編集委員・技術認定試験委員会委員・微生物研究部会幹事・本部評議員・関東支部幹事・関東支部評議員），日本医真菌学会評議員，日本菌学会評議員，日本メンデル協会評議員，Member of the American Biographical Institute's distinguished Research Board of Advisors, USA.
 - 所属学会 日本顕微鏡学会，日本医真菌学会，日本菌学会，日本植物形態学会
 - 受賞
 - 1) (代表) 日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会，優秀ポスター賞。山口正視，岡田 仁，Radostin Danev，西山清人，菅原敬信，永山國昭：氷包埋したインフルエンザウイルスの位相差電子顕微鏡観察。京都，5 月 22 日，2008.
 - 2) (代表) 第 5 回真菌分子細胞研究会・第 2 回真菌ワークショップ研究会，ベストプレゼンテーション賞（ポスドク・教員の部）。山口正視：凍結置換電顕法による酵母細胞のストラクチャー解析。千葉，8 月 22 日，2008.
 - その他 認定 NPO 法人・総合画像研究支援 正会員・研究協力者，キトロギア会員
- 助教：伊藤恵美子
- センター内委員 動物 WG 委員，図書委員会委員，有害廃棄物委員会委員，放射性同位元素委員会委員
 - 学協会への貢献 Association of Official Analytical Chemist (AOAC) メンバー
 - 所属学会 International Society on Toxicology

助教：清水公徳

○センター内委員 総務委員会委員，微生物・保存管理施設運営委員会委員，防災対策委員会委員，研究推進チーム委員，個人評価 WG 委員，光熱水料削減プロジェクト WG 委員

○学協会への貢献 日本菌学会評議員・広報幹事

○所属学会 日本菌学会，日本医真菌学会，日本細菌学会，糸状菌分子生物学研究会，糸状菌遺伝子研究会，Fungal Genetics Conference

○その他 産業技術総合研究所 外来研究員

技術職員：大楠美佐子

非常勤講師：明石 敏（大正製薬株式会社医薬研究所・開発薬理研究室次席研究員・グループマネージャー）

非常勤講師：園田智子（横浜市立大学医学部）

特任教員：Eric V. Virtudazo

日本学術振興会外国人特別研究員：Zuzana Moranova（2008. 10～）

技術補佐員：大畑美穂子（～2008. 10）

技術補佐員：岡田 仁

実験補助員：相田直子（2008. 11～）

大学院医学薬学府博士課程：李 皓曼

大学院融合科学研究科修士課程：清水 誠

大学院医学薬学府修士課程：山口哲朗（～2008. 9）

園芸学部：並木侑一（2008. 4～）

日本大学生産工学部：増田恵美（2008. 4～）

大使館推薦国費外国人研究留学生：Jon Ander Ochoa de Eribe Casas（～2008. 3）

研究概要（共同研究を含む）

1. *Cryptococcus neoformans* のプロテオーム解析

C. neoformans 細胞破碎抽出液を用いて，二次元電気泳動，タンパク質スポットの解析，アミノ酸配列解析，質量分析，データベース解析などプロテオーム解析を進めつつある．また，酵母プロテオームの変動を探索する目的で，酵母破碎抽出液のタンパク質発現ダイファレンシャル解析法（DIGE）を行い，発現量の増減の顕著なスポットの検索，同定，解析を進めている．各種培養条件の相違などによるタンパク質発現量の差異について比較プロテオーム解析を行い，考察を進めている．

2. *Cryptococcus neoformans* の細胞周期制御の分子機構解析

C. neoformans には，他の酵母には見られない，特異な細胞周期制御現象が観察され，本酵母の病原性にも深く関わっていると思われる．我々はこれまでに，*C. neoformans* の細胞周期制御の中心に位置する Cdk1（サイクリン依存性キナーゼ1）とそれと相互作用する制御因子 cyclin について分子クローニングを行い，解析を進めている．それらの分子間相互作用を明らかにするために，タンパク質間相互作用のモデリングなど *in silico* 解を行い，ウェットデータとの組み合わせなどでこれらの細胞周期制御の分子機構について考察している．また，脱リン酸化酵素 Cdc25 分子についても，分子クローニング，機能解析を進めている．

3. *Cryptococcus neoformans* の低酸素状態応答遺伝子の同定，解析

C. neoformans は肺，で感染後，脳髄膜へ移行して病原性を発揮して行く際，高酸素環境から低酸素環境への酸素欠乏ストレス条件に打ち勝って増殖して行く．我々は，本菌ゲノムへのランダム挿入遺伝子変異体を構築し，変異体の低酸素状態への応答解析などを通して，本菌において低酸素ストレス応答に関与する遺伝子の同定を目指している．今後，同定された遺伝子群のうち，ヒトには存在しない遺伝子が見出されれば，新規の抗真菌剤標的遺伝子候補にもなり得る．

4. *Cryptococcus neoformans* の薬剤耐性機構の分子解析

近年，*C. neoformans* の薬剤耐性株が分離されクリプトコックス症の治療効果にも影響を及ぼしており薬剤耐性獲得の分子機構解析は重要である．我々は AIDS 患者などから分離された臨床分離株 100 株を用いて，fluconazole について感受性試験を実施し，更に，感受性株，耐性株間の比較プロテオーム解析を行い，アガロース二次元電気泳動で有意に違いのみられたスポットをインゲル消化後，質量分析計（LC-MS/MS）にて同定した．耐性株と感受性株の選別に有用なマーカー候補について，更に検討を進めている．

5. 低温位相差電子顕微鏡による微生物の構造観察

岡崎統合バイオサイエンスセンターの永山國昭教授との共同研究で，インフルエンザ A ウイルスは，外皮の構

造から3つのタイプが存在すること、糖タンパク質スパイクはウイルス1個あたり450本存在すること、リボ核タンパク質は1+7の配置をとることなどを明らかにした(J Struct Biol 162: 271-276, 2008, 2008年5月日本顕微鏡学会学術講演会で優秀ポスター賞を受賞)。また、この成果は、毎日新聞(2008年4月6日)およびNHKサイエンスZERO(2008年12月13日, 18日, 19日)で報道された。現在、さらに立体構造を明らかにする目的で、トモグラフィー(電子線断層撮影)を行っている。

6. 酵母のストラクチャー解析

2006年、細胞の電子顕微鏡レベルのすべての定量的、三次元的構造情報を、structomeと呼ぶことを提唱した(Current Trends in Microbiology 2: 1-12)。本年は、サッカロミセス細胞の自然な形態を保ったまま、効率よく連続超薄切片を作製する方法を開発した(論文投稿中, 2008年8月真菌分子細胞研究会でベストプレゼンテーション賞を受賞)。現在、32個の細胞の連続切片撮影に成功しており、G1期の細胞のストラクチャー解析を開始した。

7. *Candida glabrata* のキチン合成遺伝子の機能解析

高分子活性分野の知花班との共同研究で、キチン合成遺伝子である*CHS3*の欠損株を用いて、微細形態学的側面から解析を行っている。本年は、凍結置換法を用いて、細胞微細構造の解析を行ったほか、プロトプラスト化した菌体の細胞壁を再生させ、その再生過程における形態学的差異などの解析を行った。

8. 藻類由来の食中毒の解析

パリトキシンの論文は投稿中。下痢性貝毒の原因毒である、オカダ酸グループ、ペクテノトキシングループのマウスを使った病理モデル実験は終了し、残る3番目のイエソトキシングループについて実験を行なっている。

9. タンパク脱リン酸化酵素阻害剤としてみたオカダ酸とアオコの毒マイクロシスチン-LRの作用の解析

両者のモードオブアクションはPP1, PP2A酵素阻害で説明されている。いずれに対してもマイクロシスチンの方が高レベルの活性があるため、両者の肝臓への病理作用とその代謝過程産物のペプチドの動態を明らかにし、

酵素阻害作用のレベルの違いから導かれる両トキシンの性質を明らかにする。

10. *Cryptococcus neoformans* の二成分シグナル伝達系の分子遺伝学的解析

C. neoformans の二成分シグナル伝達系構成因子(HHKおよびRR)をコードする各遺伝子計9個について遺伝子破壊による機能解析を行ってきた。本年は、とくにRR遺伝子*CnSKN7*および*CnSSK1*二重破壊株を取得し、これらの遺伝子がフルジオキソニル耐性、浸透圧感受性、高温感受性および病原性に対して相加的に機能していることを明らかとした。

11. *C. neoformans* のHspコード遺伝子の機能解析

*C. neoformans*の熱ショックタンパク質(Hsp)をコードする遺伝子*CnPDR131*, *CnPDR132*, *CnPDR133*各遺伝子について遺伝子破壊による機能解析を行った。その結果、*CnPDR133*遺伝子破壊株は低温での生育が極端に遅延するとともにフルシトシンに対する高い感受性を示した。

研究成果の発表

1. 原著

- 1) Takeuchi T, Yoshida Y, Fukaya S, Sakimura K, Kawamoto S, Watanabe M, Mishina M, Hirano T: Enhanced long-term depression induction and optokinetic response adaptation on mice lacking Delphilin. PLoS ONE 3(5): e2297 (pp.1-11), 2008. (査読有)
- 2) Yamaguchi M, Danev R, Nishiyama K, Sugawara K, Nagayama K: Zernike phase contrast electron microscopy of ice-embedded influenza A virus. J Struct Biol 162: 271-276, 2008. (査読有)
- 3) Kitahara H, Kobayashi Y, Yamaguchi M, Fujimoto Y, Nameki M, Nakayama T, Kuroda N, Komuro I: Damage to polymer of undelivered sirolimus-eluting stents. J Invasive Cardiol 20: 130-133, 2008. (査読有)
- 4) Ito E., Suzuki T, Oshima Y, Yasumoto K: Studies of diarrhetic activity on pectenotoxin-6 in the mouse and rat. Toxicon 51: 707-716, 2008. (査読有)
- 5) Ozaki K, Ohta A, Iwata C, Horikawa A, Tsuji K, Ito E,

Ikai Y, Harada K: Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds: *Chemosphere* 71: 1531-1538, 2008. (査読有)

- 6) Tanaka E, Shimizu K, Imanishi Y, Yasuda F, Tanaka C: Isolation of basidiomycetous anamorphic yeast-like fungus *Meira argovae* found on Japanese bamboo. *Mycoscience* 49: 329-333, 2008. (査読有)

2. 総説, 解説, その他

- 1) 川本 進: 新規タンパク質を発見, そして, 命名: 内藤記念科学振興財団時報 81: 29, 2008.
- 2) 山口正視, 岡田 仁, Radostin Danev, 西山清人, 菅原敬信, 永山國昭: 位相差電子顕微鏡によるウイルス観察. *顕微鏡* 43(2): 115-120, 2008.
- 3) 山口正視: シンポジウムのまとめ B-21 *Mycology and parasitology* (Frontier studies in fungal research). *顕微鏡* (第 16 回国際顕微鏡学会会務記録) 42 (捕冊): 93, 2008.
- 4) 山口正視: シンポジウムのまとめ B-21 *Mycology and parasitology* (Frontier studies in fungal research). 第 16 回国際顕微鏡学会議 (IMC16) 記念集: 93, 2008.
- 5) 山口正視: 第 1 回ワークショップの前半のまとめと感想. 可視化技術の最前線 '04 ~ '06: 123-124. 認定 NPO 法人総合画像研究支援. 東京, 2008.

3. 学会・シンポジウム・研究会での招待講演

国際学会

- 1) Kawamoto S, Virtudazo E, Ohata M, Ohkusu M, Takeo K: Molecular approach to understanding cell regulation in a pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, Changchun 2008 Changchun, China, July 28-August 5, 2008.
- 2) Kawamoto S, Virtudazo E, Ohata M, Ohkusu M, Shimizu K, Yamaguchi M, Miklos I, Sipiczki M, Moranova Z, Raclavsky V, Takeo K: Towards molecular understanding of cell cycle regulation and cell signaling in *Cryptococcus neoformans*. 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. Nagasaki, Sep. 11-14, 2008.
- 3) Yamaguchi M: Dynamics of the spindle pole body in

a pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* by electron microscopy. Japan-China Pan Asia Pacific Mycology Forum. Abstract p.57, Changchun, China. Jul 27-Aug. 5, 2008.

- 4) Shimizu K: Signal transduction pathways involved in environmental responses in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. Japan-China Pan Asia Pacific Mycology Forum. Abstracts p.137, Changchun, China, July 28-31, 2008.
- 5) Shimizu K, Li H-M, Yoshimi A, Tanaka C, Abe K, Watanabe A, Kamei K, Yamaguchi M, Kawamoto S: Two component signaling system in *Cryptococcus neoformans* is involved in sensing high temperature, high osmolarity and antibiotics. 2008 Japan-Korea Fungal Genetics and Biology Conference. Abstracts p. 63-64. Kanazawa, Japan, November 19-20, 2008.

国内学会

- 1) 山口正視, 岡田 仁, 大楠美佐子, 川本 進: 酵母サッカロミセス細胞のストラクチャー解析. 日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会, 発表要旨集: 18. 京都, 5月 21 ~ 23 日, 2008.
- 2) 山口正視: 位相差電子顕微鏡によるウイルス観察. 日本顕微鏡学会第 52 回シンポジウム, 発表要旨集, *顕微鏡* 43 (Supplement 1): 98-101. 千葉, 10月 17 ~ 18 日, 2008.
- 3) 清水公德: ヒト病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* のシグナル伝達系と病原性. 農芸化学会 2008 年度大会. 講演要旨集 p.シ27. 名古屋, 3月 27 ~ 29 日, 2008.

4. 一般発表

国際学会

- 1) Kawamoto S, Virtudazo E, Ohkusu M, Sonoda T, Miyagi Y, Okuda K, and Takeo K: Structural and functional analysis of cell control genes in *Cryptococcus neoformans*. 2008 Annual Meeting American Society for Biochemistry and Molecular Biology (Experimental Biology 2008), San Diego, California, USA, Apr. 5-9, 2008.
- 2) Eribe Casas J, Virtudazo E, Li H-M, Shimizu K, Yamaguchi M, Kawamoto S: RNA interference in *Cryptococcus neoformans*: complications and solutions.

- RNAi World Congress, Boston, USA, Apr. 30- May 2, 2008.
- 3) Ohkusu M, Ohata M, Shimizu K, Kawamoto S: Influences of capsule thickness on the physiology and virulence in *Cryptococcus neoformans*. 7th International Conference on Cryptococcus & Cryptococcosis. Program and abstracts p. 80, Nagasaki, Japan, Sep. 11-14, 2008.
 - 4) Virtudazo EV, Ohata M, Ohkusu M, Miklos I, Sipiczki M, Takeo K, Kawamoto S: Cloning and functional analysis of the *Cryptococcus neoformans* Cdc25/Mih1 phosphatase homologue. 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. Program and abstracts p. 108, Nagasaki, Japan, Sep. 11-14, 2008.
 - 5) Ohata M, Virtudazo EV, Ohkusu M, Takeo K, Kawamoto S: Analysis of the role of upstream ORFs in the regulation of CnCln1 expression in *Cryptococcus neoformans*. 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. Program and abstracts p. 96, Nagasaki, Japan, Sep. 11-14, 2008.
 - 6) Moráňova Z, Husičková V, Ohkusu M, Kawamoto S, Raclavský V: Study of hypoxia response in *Cryptococcus neoformans*. 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. Program and abstracts p. 116, Nagasaki, Japan, Sep. 11-14, 2008.
 - 7) Yamaguchi M, Ohkusu M, Kawamoto S: Dynamics of the spindle pole body during the cell cycle in *Cryptococcus neoformans* examined by freeze-substitution electron microscopy. 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. Program and abstracts p. 106, Nagasaki, Japan, Sep. 11-14, 2008.
 - 8) Yamaguchi M, Okada H, Ohkusu M, Kawamoto S: Structure of yeast cells by freeze-substitution and serial ultrathin sectioning electron microscopy. 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju, Republic of Korea, Nov. 2-7, 2008.
 - 9) Yamaguchi M, Okada H, Danev R, Nishiyama K, Sugawara K, Nagayama K: Zernike phase contrast electron microscopy of ice-embedded influenza A virus. 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju, Republic of Korea, Nov. 2-7, 2008.
 - 10) Yamaguchi M, Okada H, Danev R, Nishiyama K, Sugawara K, Nagayama K: Zernike phase contrast electron microscopy of ice-embedded influenza A virus. 39th NIPS International Symposium "Frontiers of Biological Imaging", pp. 106, Okazaki, Japan, Nov. 10-12, 2008.
 - 11) Ito E, Yasumoto T: Desulfated yessotoxin causes fatty degeneration and delayed intestinal fluid accumulation in mice: 13th International Conference on Harmful Algae, Program and abstracts p. 56. Hong Kong, China, Nov. 3-7, 2008.
 - 12) Miura D, Oba A, Shintani T, Shimizu K, Nishimura M, Gomi K: The novel transcription activator AtrR regulates gene expression of ABC transporters and contributes to azole resistance in filamentous fungi, 5th International Aspergillus Meeting (Asperfest). abstracts p. 11, Edinburgh, UK, Apr. 5-8, 2008.
 - 13) Miura D, Oba A, Shintani T, Shimizu K, Nishimura M, Gomi K: The novel transcription activator AtrR regulates gene expression of ABC transporters and contributes to azole resistance in filamentous fungi, 9th European Conference on Fungal Genetics. abstracts p. 162, Edinburgh, UK, Apr. 5-8, 2008.
 - 14) Shimizu K, Li H-M, Yoshimi A, Tanaka C, Abe K, Watanabe A, Kamei K, Yamaguchi M, Kawamoto S: High temperature, high osmolarity and antibiotics are sensed through two component signaling system in *Cryptococcus neoformans*. 7th International Conference on Cryptococcus & Cryptococcosis. Program and abstracts p. 96, Nagasaki, Japan, Sep. 11-14, 2008.
 - 15) Shimizu M, Shimizu K, Li H-M, Ohkusu M, Kawamoto S: Analysis of genes involved in drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. 7th International Conference on Cryptococcus & Cryptococcosis. Program and abstracts p. 80, Nagasaki, Japan, Sep. 11-14, 2008.

国内学会

- 1) 川本 進, Virtudazo EV, 大楠美佐子, 竹尾漢治, 田村 裕, Moranova Z, Raclavsky V: 病原酵母クリプトコックスの細胞周期制御の分子的理解に向けて. 第2回真菌ワーブ研究会, 千葉, 8月21日, 2008.
- 2) 大楠美佐子, 清水公德, 川本 進: *Cryptococcus*

- neoformans*の莢膜の厚さと性状および病原性に与える影響. 第81回日本細菌学会総会, 抄録集 p.169, 京都, 3月24~26日, 2008.
- 3) 大楠美佐子, 大畑美穂子, 清水公德, 川本 進: 莢膜の厚さが変異した *Cryptococcus neoformans* 株の性状および病原性. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 101, 長崎, 9月10~11日, 2008.
 - 4) 大楠美佐子, 大畑美穂子, 清水公德, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の莢膜の厚さが性状および病原性に与える影響. 第91回日本細菌学会関東支部総会, 講演抄録集 p.24, 千葉, 10月23~24日, 2008.
 - 5) Virtudazo EV, Ohkusu M, Ohata M, Miklos I, Sipiczki M, Takeo K, Kawamoto S: Structural and functional analysis of the single G1 cyclin CnCln1 in *Cryptococcus neoformans*. 第91回日本細菌学会関東支部総会, 講演収録集 p.26. 千葉, 10月23~24日, 2008.
 - 6) ヴィルトウダゾ・エリック, 大畑美穂子, 大楠美佐子, Ida Miklos, Matthias Sipiczki, 竹尾漢治, 川本 進. *Cryptococcus neoformans* の Cdc25 ホスファターゼホモログのクローニングと構造機能解析. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 103, 長崎, 10月10~11日, 2008.
 - 7) 大畑美穂子, ヴィルトウダゾ・エリック, 大楠美佐子, 竹尾漢治, 川本 進. *Cryptococcus neoformans* の細胞周期制御における G1 サイクリン遺伝子 upstreamORF の役割. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 102, 長崎, 10月10~11日, 2008.
 - 8) Kitahara H, Kobayashi Y, Yamaguchi M, Nameki M, Fujimoto Y, Aioi S, Himi T, Komuro I: Damage to polymer of sirolimus-eluting stents. 第72回日本循環器学会総会・学術集会, 福岡, 3月29日, 2008.
 - 9) 山口正視, 岡田 仁, Radostin Danev, 西山清人, 菅原敬信, 永山國昭: 氷包埋したインフルエンザウイルスの位相差電子顕微鏡観察. 日本顕微鏡学会第64回学術講演会, 発表要旨集, 198, 京都, 5月21~23日, 2008.
 - 10) 山口正視, 岡田 仁, Radostin Danev, 西山清人, 菅原敬信, 永山國昭: 位相差電子顕微鏡で見たインフルエンザウイルス (写真コンクール). 日本顕微鏡学会第64回学術講演会, 発表要旨集, 243, 京都, 5月21~23日, 2008.
 - 11) 山田博之, 水野和重, 角 泰人, 御手洗聡, 山口正視: 急速凍結固定置換法 (サンドイッチ法) による結核菌の透過電子顕微鏡観察. 日本顕微鏡学会第64回学術講演会, 発表要旨集, 45, 京都, 5月21~23日, 2008.
 - 12) 山口正視, 岡田 仁, 大楠美佐子, 川本 進: 酵母サッカロミセス細胞のストラクチャー解析. 日本微生物資源学会第15回大会, 要旨集, 62, 千葉, 6月30日~7月2日, 2008.
 - 13) 山口正視: 凍結置換電顕法による酵母細胞のストラクチャー解析. 第5回真菌分子細胞研究会・第2回真菌ワーブ研究会, プログラム・要旨集, 12, 千葉, 8月22日, 2008.
 - 14) 山口正視, 大楠美佐子, 川本 進: 酵母細胞のストラクチャー解析. 千葉大学オープンリサーチ. 千葉大学オープンリサーチ 2008, 34, 千葉, 9月6日, 2008.
 - 15) 山口正視, 大楠美佐子, 川本 進: 酵母細胞のストラクチャー解析. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 101. 長崎, 9月10~11日, 2008.
 - 16) 山田博之, 御手洗聡, 水野和重, 近松桐代, 角 泰人, 山口正視: 急速凍結置換固定法 (サンドイッチ法) で調整した結核菌体の透過電子顕微鏡観察. 第40回日本臨床分子形態学会, 福岡, 10月3日, 2008.
 - 17) 清水 誠, 清水公德, 李 皓曼, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の薬剤耐性に関する遺伝子の機能解析. 第52回日本菌学会大会. 講演要旨集 p.80, 津, 5月31~6月1日, 2008.
 - 18) 清水公德, 李 皓曼, 吉見 哲, 田中千尋, 阿部敬悦, 渡辺 哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本 進: *Cryptococcus neoformans* の環境適応に関する二成分シグナル伝達系の解析. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 102, 長崎, 9月10~11日, 2008.
 - 19) 清水 誠, 清水公德, 李 皓曼, 大楠美佐子, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の薬剤耐性に関する遺伝子の研究. 第52回日本医真菌学会総

会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 102, 長崎, 9 月 10 ~ 11 日, 2008.

- 20) 清水公德, 李 皓曼, 吉見 哲, 田中千尋, 阿部敬悦, 渡辺 哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* は二成分シグナル伝達系を介して外部環境を感知する. 第 91 回日本細菌学会関東支部総会, 講演抄録集 p.25, 千葉, 10 月 23 ~ 24 日, 2008.
- 21) 清水公德, 李 皓曼, 吉見 哲, 田中千尋, 阿部敬悦, 渡辺 哲, 亀井克彦, 山口正視, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の二成分シグナル伝達系に関する分子遺伝学的解析. 第 8 回糸状菌分子生物学研究会, 講演要旨集 p.81, 金沢, 11 月 17 ~ 18 日, 2008.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 川本 進, 山口正視, 清水公德, 大楠美佐子: Regulators of cell cycle and transcription in yeasts as potential pathogenic factors. (Hungarian-Japanese Intergovernmental S&T Cooperation Programme), Matthias Sipiczki 教授, Ida Miklos 准教授, ハンガリー共和国, デブレツェン大学遺伝学教室.
- 2) 川本 進, Eric Virtudazo: G1 Cdk1-cyclin ホモログ遺伝子のクローニングと解析, Matthias Sipiczki 教授, Ida Miklos 准教授, ハンガリー共和国, デブレツェン大学遺伝学教室.
- 3) 川本 進, Zuzana Moranova, 大楠美佐子, Eric Virtudazo: *Cryptococcus neoformans* の hypoxia への応答研究, Vladislav Raclavsky 博士, チェコ共和国, パラツキー大学医学歯学部微生物学教室.
- 4) 川本 進, 山口正視: *Cryptococcus neoformans* の細胞周期解析法に関する研究, Vladislav Raclavsky 博士, チェコ共和国, パラツキー大学.
- 5) 山口正視: 真菌の細胞骨格に関する細胞生物学的研究, Marie Kopecka 准教授, Miroslav Gabriel 准教授, Augustin Svoboda 教授, チェコ共和国, マサリク大学医学部.

2. 共同利用研究以外の国内共同研究

- 1) 川本 進, 大楠美佐子: *Cryptococcus neoformans* のプ

ロテオミクス解析, 平野久教授, 山中結子, 横浜市立大学国際総合科学研究科.

- 2) 山口正視: 低温位相差電子顕微鏡によるインフルエンザウイルスの構造観察, 永山國昭教授, 岡崎統合バイオサイエンスセンター, 西山清人上級研究員, 菅原敬信部長, 化学及血清療法研究所.
- 3) 山口正視: 冠動脈石灰化病変におけるサイファーステントポリマーの損傷についての研究, 小室一成教授, 小林欣夫副部長, 千葉大学医学部附属病院.
- 4) 山口正視: 結核菌の急速凍結法による電子顕微鏡観察, 山田博之研究員, 財団法人結核予防会結核研究所.
- 5) 山口正視: 分裂酵母シゾサッカロミセスの胞子形成過程の電子顕微鏡観察, 高木智子研究員, 日本女子大学.
- 6) 清水公德: *Aspergillus fumigatus* のプロテアソーム研究, 東江昭夫研究員, 東京都臨床医学研究所.

国際交流

1. 海外渡航

- 1) 川本 進: アメリカ合衆国, サンディエゴ, 米国生化学・分子生物学学会年会に出席, 発表のため, 4 月 4 ~ 10 日, 2008 (研究推進).
- 2) 川本 進: 中国, 長春, 日中菌学フォーラムに出席, 座長, 発表のため, 7 月 27 日 ~ 8 月 3 日, 2008 (科学技術振興調整費).
- 3) 山口正視: 中国, 長春, 日中菌学フォーラムに出席, 発表のため, 7 月 27 日 ~ 8 月 3 日, 2008 (科学技術振興調整費).
- 4) 山口正視: 韓国, 済州島, 第 9 回アジア・太平洋顕微鏡学会議に出席, 発表のため, 11 月 2 ~ 7 日, 2008 (科学研究費補助金).
- 5) 清水公德: 中国, 長春, 日中菌学フォーラムに出席, 発表のため, 7 月 27 日 ~ 8 月 3 日, 2008 (科学技術振興調整費).

2. 海外研究者の受け入れ

- 1) Zuzana Moranova (チェコ共和国パラツキー大学医学歯学部), 2008 年 10 月 ~ 2009 年 8 月, 日本学術振興会外国人特別研究員 (欧米短期) 受け入れ, 共同研究 (川本 進).

- 2) Jon Ander Ochoa de Eribe Casas (スペイン), 2006年4月～2008年3月, 大使館推薦国費外国人研究留学生受け入れ, 共同研究 (川本 進).
- 2) Gyula Batta (ハンガリー, デブレツェン大学), セミナー開催, 10月26～30日, 2008 (川本 進).
- 3) Matthias Sipiczki 教授 (ハンガリー, デブレツェン大学), 共同研究, 11月12～16日, 2008 (川本 進).

学会等活動 (主催学会, 座長, コンビナーなど)

- 1) 川本 進: China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum, Changchun 2008, 座長, Changchun, China, July 28-August 5, 2008.
- 2) 川本 進: 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis, 組織委員, および招待講演 Nagasaki, September 11-14, 2008.
- 3) 川本 進: 第81回日本細菌学会総会, 座長, 真菌の生理・病原性, 京都, 3月24～26日, 2008.
- 4) 川本 進: 第15回日本微生物資源学会総会, 優秀発表者選考委員会委員長, 千葉, 6月30日～7月2日, 2008.
- 5) 川本 進: 第91回日本細菌学会関東支部総会, 座長, 千葉, 10月23～24日, 2008.
- 6) 川本 進: 第53回ぶどう球菌研究会, 座長, 東京, 9月18～19日, 2008.
- 7) 山口正視: 日本顕微鏡学会第32回関東支部講演会「顕微鏡の挑戦: 目で観る生命科学・物質科学」. 実行委員会委員. 東京, 3月8日, 2008.
- 8) 山口正視: The China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum 2008, Member of organizing committee. Changchun, China, July 28 - August 5 2008.
- 9) 山口正視: 日本微生物資源学会第15回大会実行委員会委員. 千葉, 6月30日～7月2日, 2008.
- 10) 山口正視: 日本顕微鏡学会第52回シンポジウム実行委員会委員. 千葉, 10月17日～18日, 2008.
- 11) 清水公徳: The China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum 2008, Member of steering committee, Changchun, China, July 28 - August 5 2008.

教育活動

講義

- 1) 川本 進: 千葉大学大学院医学薬学府医科学専攻修士課程 (先端生命科学), 博士課程 (真菌感染症学), 千葉大学大学院融合科学研究科博士前期課程 (真菌分子細胞生物学), 博士後期課程 (真菌分子細胞生物学), 横浜市立大学大学院医学研究科 (分子生体防御学), 横浜市立大学医学部医学科 (微生物学), 医学部看護学科 (微生物学).
- 2) 山口正視: 千葉大学大学院医学薬学府博士課程 (真菌細胞生物学, 超微形態学), 千葉大学自然科学研究科博士後期課程 (生命機構学, 高次生体制御学, 形態応答学), 千葉大学普遍教育 (授業科目: 真菌 (カビ) と人との関わり合い, 真菌の形態), 千葉大学園芸学部 (授業科目: 応用細胞工学, 細胞の構造と電子顕微鏡).
- 3) 清水公徳: 千葉大学普遍教育 (授業科目: 真菌 (カビ) と人との関わり合い, 真菌による食品への被害), 千葉大学園芸学部 (授業科目: 応用細胞工学, 真菌の二次代謝), インターンシップ生受け入れ1名 (日本大学生産工学部応用化学科).

社会的活動

新聞・テレビ

- 1) 山口正視: インフルエンザウイルス 詳細な姿撮影成功. 毎日新聞 (全国版) 2008年4月6日.
- 2) 山口正視: 新型インフルエンザ 感染爆発に備えろ. 電顕写真提供. NHK サイエンス ZERO 2008年12月13日, 18日, 19日.

センター講習会

- 1) 川本 進: 第3回病原真菌外国人講習会「Workshop on Medical Mycology」講師. 「Proteome analysis and new techniques in molecular medical mycology」(2008. 7. 18).
- 2) 川本 進: 第22回病原真菌講習会講師「法律から見た真菌の取扱い (感染症新法・危険度分類)」(2008. 7. 11).
- 3) 山口正視: 第22回病原真菌講習会講師「真菌細胞概論」(2008. 7. 8).
- 4) 山口正視: 第4回病原真菌外国人講習会講師

「Electron microscopy of fungal cells」(2008. 7. 17).

特許

- 1) Jon Ander Ochoa de Eribe Casas, 川本 進: アメリカ合衆国特許 (U. S. Provisional Patent, Application #61039906) 出願: 2008 年 3 月 (2008).
- 2) Invention of pCryptoRNAi plasmid for RNA interference in *Cryptococcus neoformans*.

その他

- 1) 川本 進 (地域連携委員会委員長): 真菌医学研究センター主催公開市民講座「カビ!? ~そろそろ気になりますね~ Part 3」, 千葉, 5 月 18 日, 2008.

外部資金

科学研究費補助金

- 1) 川本 進 (代表): 文部科学省科学研究費補助金 (基盤 C) 「病原真菌クリプトコックス細胞の生存と死の分子解析」平成 20 ~ 22 年度 (平成 20 年度, 直接経費 150 万円 (間接経費 45 万円)).

- 2) 山口正視 (代表): 科学研究費補助金 基盤研究 C 19570053 酵母サッカロミセス細胞のストラクチャー解析, 平成 19 ~ 20 年度 (平成 20 年度は直接経費 160 万円, 間接経費 48 万円).

その他の外部資金

- 1) 川本 進 (代表): 日本学術振興会外国人特別研究員 (欧米短期) 事業「病原酵母クリプトコックスの細胞周期制御の分子解析: 低酸素状態応答遺伝子の同定」平成 20 ~ 21 年度 (平成 20 年度, 250 万円).
- 2) 川本 進 (分担): 文部科学省科学技術振興調整費, アジア科学技術協力推進戦略・地域共通課題解決型国際共同研究 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 平成 18 ~ 20 年度 (平成 20 年度, 50 万円) (代表: 三上 襄).
- 3) 川本 進 (分担): 文部科学省研究推進経費「新興真菌症・放線菌症の対策に関する基礎研究」(代表: 三上 襄).
- 4) 清水公德 (代表): 研究支援プログラム (科学研究費補助金への申請支援), 90 万円.

分子機能研究部門 高分子活性分野

(Department of Molecular Function, Division of Molecular Biology and Therapeutics)

教授: 三上 襄

○学内委員 教育研究評議会委員, 部局長連絡会議委員, 大学法人化対応委員, 自己点検・評価委員会委員, 施設整備委員会委員, 放射線同位元素委員会委員, セクシャルハラスメント防止委員会委員, 先端的科学技術共同研究推進会議委員, 部局情報システム管理責任者, 亥鼻地区埋蔵文化財調査委員会委員, 亥鼻地区安全衛生委員会委員, 大学院自然科学研究科教授会委員, 医学研究科(医学系運営)委員会委員, 劇物毒物等管理責任者, 真菌医学研究センター運営協議会議長, 国立大学附置研究所・センター長会議委員

○センター内委員 真菌医学研究センター長, 運営協議会議長, 教員会議議長, 総務委員会議長, 自己点検・評価委員長

○学協会への貢献 日本細菌学会評議員, 日本医真菌学会理事・編集委員長, 日本放線菌学会理事・編集委員, 日本微生物資源学会理事, Microbiology and Immunology (associate editor)

○国および地方公共団体への貢献 千葉県薬剤師会検査センター評議員, 大学共同利用機関法人国立遺伝学研究所「大腸菌小委員会および NBRP 大腸菌運営委員会委員, 知的基盤創世・利用促進研究開発事業「新規抗真菌剤(抗カビ剤)開発のための標的遺伝子知的基盤研究開発」研究計画評価委員会委員, 生物遺伝資源委員会委員, NBRP-情報運営委員会委員, 理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料検討委員会委員, 日本学術会議特任連携会員

○所属学会 日本細菌学会, 日本医真菌学会, 日本放線菌学会, 日本微生物資源学会, 日本菌学会, ISHAM

○受賞

1) 日本微生物資源学会ポスター賞 Zaki S, Ibrahim N, Aoyama K, Shetaia Y, Abdel-Ghany KM Mikami Y: 「Epidemiology of dermatophyte infections in Cairo, Egypt (2008. 7. 2)

2) 日本微生物資源学会 第15回日本微生物資源学会総会ポスター賞(知花博治等)(共著)

○その他 ベンチャー企業「ファーストラボラトリー」顧問

准教授: 知花博治

○学内委員 遺伝子組換え実験安全委員会委員, スペース・コラボレーション・システム事業実施委員会委員

○センター内委員 教員会議委員, 総務委員会委員, 広報委員会委員, 共同利用委員会委員, 自己点検・評価委員会委員, 地域連携委員会委員, 個人評価WG委員, センター報告会WG長, 研究推進チーム委員, 組織機能改善委員会委員, 将来計画委員会委員, 光熱水量削減プロジェクトWG委員, 機種選定委員, 放射性同位元素委員会委員

○所属学会 日本微生物ゲノム学会, 日本分子生物学会, 日本細菌学会, 日本医真菌学, 酵母細胞研究会, 酵母遺伝学フォーラム, アメリカ微生物学会, アメリカ遺伝学会

○受賞

1) 微生物資源学会ポスター賞, 知花博治, 上野圭吾, 中山浩伸, 宇野潤, 三上襄「*Candida glabrata*の全ゲノムから抽出した抗真菌薬標的候補遺伝子の機能解析」(2008. 7. 2)

2) 医真菌学会論文賞(共著)

○その他 琉球大学医学部非常勤講師

助教: 宇野 潤

○学内委員 動物実験委員会委員, 医学部付属動物実験運営委員会

○センター内委員 共用備品委員会委員, 微生物保存管理施設運営委員会委員, 有害廃棄物委員会委員, 防災対策委員会委員, 図書WG委員, 実験動物WG委員, 光熱水料節減プロジェクトWG委員

○学協会への貢献 日本医真菌学会評議会委員・標準化委員会委員, 日本細菌学会評議会委員

○所属学会 日本医真菌学会, 日本細菌学会, 日本化学療法学会, 日本薬学会, 日本防菌防黴菌学会

○受賞 第15回日本微生物資源学会総会ポスター賞(共著)

○その他 東邦大学薬学部非常勤講師，危険物保安監督者，普通第一種圧力容器取扱い作業主任者，安全衛生作業主任者

非常勤講師：石渡堅一郎（医療社団法人六治会）

非常勤講師：佐藤謙一（元第一製薬株式会社研究所・所長）

非常勤講師：鈴木健一郎（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）

非常勤講師：福島和貴

特任教員：松浦 学（2008. 5～）

特任教員：大野道代（2008. 7～）

外国人研究員：朱 鍵（中国貴陽医学院講師）（2008. 1～）

外国人研究員：Sherif Mohamed Zaki（エジプロアイン シヤム大学講師）（～2008. 7）

研究支援推進員：向後弘子

受託研究員：笹本 要（2008. 3～）

研究支援員：木下妻智子

研究支援員：加藤直子（～2008. 6）

研究支援員：島田五月

技術補佐員：大岩真理（2008. 7～）

技術補佐員：大畑美穂子

大学院医学薬学府 博士課程（学振特別研究員－DC1）：
上野圭吾

大学院医学薬学府 博士課程：康 穎倩

大学院医学薬学府 修士課程：青山一紀

大学院医学薬学府 修士課程：志保沢里奈

大学院医学薬学府 修士課程：田中博子

大学院医学薬学府 修士課程：三谷宏樹

真菌医学研究センター 研究生：田淵史晃（2008. 4～）

研究概要（共同研究を含む）

1. 医療機関の依頼に基づく病原性放線菌の同定

2008年に同定した病原性放線菌は現在まで86株であり，本邦の医療機関から依頼を受け同定した病原性放線菌は総数67株であった．内訳は*Nocardia*が56株：*N. araoensis*（1株），*N. arthritidis*（1株），*N. asiatica*（4株），*N. beijingensis*（4株），*N. brasiliensis*（3株），*N. cyriacigeorgica*（2株），*N. elegans*（6株），*N. farcinica*（22株），*N. nova*（5株），*N. otitidiscaviarum*（5株），*N. transvalensis*（1株），*N. wallacei*（2株），他に*Actinomadura*

sp. 4株，*Corynebacterium* sp. 1株，*Mycobacterium* sp. 2株，*Streptomyces* sp. 1株，*Tsakumurella* sp. 3株であった．国外からの同定依頼はタイのNIHから14株（*Brevibacterium* sp. 2株，*Gordonia* sp. 1株，*Micrococcus* sp. 1株，*Mycobacterium* sp. 1株，*Streptomyces* sp. 2，*Saccharopolyspora* sp. 1株，*N. araoensis* 1株，*N. asiatica* 1株，*N. cyriacigeorgica* 2，*N. otitidiscaviarum* 2株）であった．台湾CDCからは*Nocardia*について5株の同定依頼があり，その内訳は*N. brasiliensis* 4株，*N. cyriacigeorgica* 1株であった（青山，矢沢）．

2. *Gordonia* および *Nocardia* 属の放線菌の新種の提案

2007年までに臨床及び環境から分離された*Gordonia*属と疑われる全35株について，16S rRNA遺伝子を解析した．その結果，既知菌種との相同性が99.9%以上得られた株が31株あった．しかし，その他の4株は既知菌株との相同性が98%以下であった．これら4株は，*Gordonia*属では16S rRNA遺伝子の相同性から新種であることが考えられた．そこで，ミコール酸，メナキノン，脂肪酸，GC含量を測定した結果，これら4株は*Gordonia*属の特徴を示していた．既知菌株とのハイブリダイゼーションの結果は，50%以下であり，さらに生理生化学的性状からも近縁種と異なる特徴を示したため，新種として提案する準備を進めている．2006年8月に臨床より分離され，放線菌症が疑われた患者由来*Nocardia*株について，形態観察，メナキノン，脂肪酸，GC含量，ミコール酸分析，生理生化学的性状の解析を行った結果，*Nocardia*属の菌種であることが確認された．16S rRNA遺伝子を用いた相同性の検索の結果，既知菌種との相同性が97.6%あった．既知菌株とのハイブリダイゼーションの結果，50%以下であり，新種として扱うことが適当であると判断した（青山，康，矢澤）．

3. 病原放線菌 *Rothia* 属のキノロン耐性機構の解析

*Rothia*属はグラム陽性で，ミコール酸およびジアミノピメリン酸を含有しない，好気性の病原放線菌である．現在，6種知られており，そのうち3種で病原性が確認されている．我々の調査では1997年から年間1～2件の割合で分離されており，注目すべきことは20代の年齢的に若い方や基礎疾患のないヒトにも感染があることである．当センターで保存されている*Rothia*属17株を用い，薬剤感受性試験を行った．その結果，*Rothia*属に

はペニシリン系薬剤や ST 合剤など多くの薬剤が有効なことが確認された。しかし、一部の株で、キノロン系薬剤やセフェム系薬剤、アミノグリコシド系薬剤に耐性が見られた。キノロン系薬剤は臨床での使用頻度が高いことから、*Rothia* 属におけるキノロン系薬剤の耐性機構を解明したところ、キノロン系薬剤の耐性機構において多く見られる DNA gyrase 上の変異が確認された (青山)。

4. アゾール系抗真菌剤の *Nocardia farcinica* に対する生育阻害作用メカニズムの解明

N. farcinica において、いくつかのアゾール系抗真菌剤は生育阻害効果を示す。さらに濃度を上げることで殺菌効果も観察されている。また、生育阻害作用を示すものはミコナゾール等のイミダゾール類では観察されたが、トリアゾール類では確認できなかった。これは、イミダゾール抗真菌剤で観察される、膜障害性によるものであることが考えられた。これらの仮説を基に、膜損傷に関する実験と、真菌での標的酵素であるチトクローム P450 酵素群に関する実験を行った。

膜損傷については、細胞内 ATP 量の減少と細胞外 ATP 量の増加により、細胞内 ATP の流出が観察され、膜損傷が起きていることが示唆された。更に、細胞内 ATP の流出が始まる濃度は MIC と相関のとれる濃度であった。チトクローム P450 酵素群が標的である可能性については、真菌の *ERG11* に最も相同性の高い *cyp51* を過剰発現、遺伝子破壊を行ったが、薬剤感受性に変化が見られなかった。更に、他のチトクローム P450 遺伝子についても過剰発現を行ったが、薬剤感受性に差は見られなかった。これらのことから、アゾール剤の *Nocardia* への作用は、真菌とは異なる作用メカニズムであることが示唆され、薬剤添加の結果として ATP 流出が起きていることも明らかとなった (志保沢)。

5. 抗結核剤 rifampicin のグルコシル化による耐性機構

Nocardia brasiliensis はリファンピシンの 21 位の水酸基をグリコシル化することで不活化する耐性機構があり、南アフリカピッツ大学との共同研究により、その耐性遺伝子が明らかとなっている。この耐性遺伝子がコードしている、リファンピシングリコシルトランスフェラーゼの機能解析を行った。この遺伝子を過剰発現ベクターに組み込み、大腸菌で発現させた酵素を用い、リファンピシンと反応させた所、リファンピシンを不活

化することを確認した。ホモロジーモデリング、ドッキング解析により得られた構造から、活性中心と予測された、248 位の Ser と 311 位の His をそれぞれ Ala に置換した変異体を作成し、それぞれの酵素活性への影響を調べた。S248A では Kcat が約 15 倍減少し、H311A では UDP-Glucose との Km が 6 倍増加した。このことから、248S は基質の修飾に重要な残基であり、311H は酵素と UDP-Glc の結合に重要であることが判明した。また、これにより、予測された構造の妥当性が支持された。現在、この酵素の結晶化も試みている (志保沢)。

6. *Cryptococcus* sp. nov., isolated from the *Cassia* tree in India

A strain isolated from the tropical shower tree in south India fits the general morphological and physiological characterization of the genus *Cryptococcus*. Phylogenetic analyses of the sequences of the D1/D2 regions and the adjacent internal transcribed spacer (ITS) regions of the large-subunit rDNA of this strain place it into the *Tremellales* clade of the *Hymenomycetes*. On the D1/D2 phylogenetic tree, the closest phylogenetic relatives of this strain are *C. podzolicus* and *Bullera ninbbinhensis*. But the type strain of *Cryptococcus* sp. differs from *C. podzolicus* and *Bullera ninbbinhensis*. In terms of the ITS1-5.8S-ITS2 sequence data for this new isolate, it is different from *C. podzolicus* by 29 bp substitutions and from *Bullera ninbbinhensis* by 33 bp substitutions respectively. The physiological characteristics distinguishing the novel species from other *Cryptococcus* species are obviously presented (康)。

7. *Candida pararugosa* (tentative name) nov., a sister species of *C. rugosa* isolated from pneumonic patient in Guiyang, China

During the clinical yeasts study in Guiyang, a novel *Candida* strain was isolated from a patient from the local hospital. On the D1/D2 phylogenetic tree, the closest phylogenetic relatives of this strain are *C. rugosa* and *C. pseudorugosa*, both of which are isolated from environment as well. But the type strain of *Cryptococcus* species, differs from *C. rugosa* by 5 bp and from *pseudorugosa* by 25 bp substitutions and mismatches, respectively. In terms of the ITS1-5.8S-ITS2 sequence data for this new isolate, it is different from

C. rugosa by 36 bp substitutions, and from *C. pseudorugosa* by 68 bp substitutions, respectively. Other tests of fungal growth condition including the assimilation test and vitamin free test were processed (康).

8. *Gordonia* sp. nov., isolated with *G. araii* from a patient with bacterial pneumonia in Japan

G. araii (IFM 10211), a novel species (proposed in 2006) was isolated from Japanese patient with bacterial pneumonia. In August 18, 2003, a new *Gordonia* sp IFM 10348 was isolated from the same Japanese patient after the treatment of levofloxacin. This strain was suspected as a reference strain of *G. araii* but with higher drug resistant towards levofloxacin and levofloxacin. During the period of our taxonomic study on *Gordonia* interspecies relationship based on *gyrB* and *secA1* genes, we found the similarities between this strain IFM 10348 and the type strain of *G. araii* showed only 96.6% in 16S rRNA, 82.0% in *gyrB* and 83.7% in *secA1* genes. With the comparison of its sequence data based on the above three genes and those both derived from GenBank and submitted in this study, the similarities between the strain IFM 10348 and other *Gordonia* specie show the enough discrimination to differentiate it from other *Gordonia* species (康).

9. *GyrB* and *secA1* genes as useful taxonomic characteristics

According to their sequence data, the phylogenetic trees of *Gordonia gyrB* and *secA1* genes were built and analyzed using software, *Clustal W* (1.83). The *gyrB* and *secA1* phylogenies showed agreement with that constructed using 16S rRNA gene sequences. The degrees of divergence of the *gyrB* and *secA1* genes were approximately 3.4 and 1.7 times greater, respectively, than that of 16S of rRNA gene. The *gyrB* gene showed more discriminatory power than either the *secA1* or 16S rRNA gene, facilitating clear differentiation of any two *Gordonia* species using *gyrB* gene analysis. Our data indicate that *gyrB* and *secA1* gene sequences are useful as markers for phylogenetic study and identification at the species level of the genus *Gordonia* (康, 武田).

10. New ITS genotype of *Cryptococcus gattii* isolated from an AIDS patient in Brazil

Based on combinations of nine variable nucleotides at nine

different base positions in the internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) region, *C. gattii* strains were classified into six genotypes. A new genotype of *C. gattii*, designated as ITS type 8, was isolated from an AIDS patient in Brazil. The ITS type 8 strain is closely related to the ITS type 4 strain, which has been frequently isolated in Brazil and the USA, but which shows ITS-signatured nucleotide difference at each nucleotide position. The ITS type 8 strain is also differentiated from all heretofore reported ITS types of *C. gattii* strains in the RAPD band patterns and IGS sequence information (康, 田中).

11. Multilocus microsatellite typing of environmental and clinical isolates of the *C. neoformans* var. *grubii*

C. neoformans var. *grubii* isolates from Brasil: 52 environmental isolates and 39 clinical isolates of the var. *grubii* were classified into 11 MLMT types. Compared the previous study, among these strains, 36 strains were classified into new MLMT types (9 types). 39 clinical isolates of the var. *grubii* were numbered into following 9 MLMT types: MLMT-2 type (4 strains), 12 (3 strains), 13 (19 strains), 14 (1 strain), 17 (5 strains), 31 (1 strains), 32 (3 strains), 33 (2 strains) and 35 (1 strain). MLMT-13 type was a major type among the clinical isolates, but such type was not observed in environmental isolates. In 52 environmental strains of the var. *grubii*, MLMT-36 type was a major one, followed by MLMT-2 type (9 strains), and their prevalence frequencies were 47.4 and 17.3% respectively. MLMT-36 type was not discovered from clinical strains (朱, 大楠).

12. Multilocus microsatellite typing of the var. *grubii* from China and Japan

Prevalence of one major type of the var. *grubii* strain was confirmed in the isolates from environments and clinical isolates of *C. neoformans*. MLMT-17 type was prevalent in China and Japan (82.5, and 92.9% respectively). In comparison with our previous study, one new type (MLMT-2 type) was found in Japan, and 6 new types were found in China following as MLMT-14, MLMT-16, MLMT-29, MLMT-40, MLMT-41 and MLMT-42. The major MLMT-17 was found in the environmental strains as well as the clinical strains (朱, 大楠, 劉).

13. 放線菌の生物活性二次代謝産物に関する研究

病原性放線菌を中心に抗菌活性物質の探索を目的にスクリーニング系を立ち上げて、活性物質の探索を行った。被検菌として、*Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Gordonia bronchialis* および *Corynebacterium xerosis* を用いて、センターの臨床分離株について活性の有無を検討した。その結果、サイクリック系のペプチド化合物を単離して、構造解析を行った結果、新規物質であることが明らかとなり、論文投稿した（青山，矢沢）。

14. *Candida glabrata* フェノームプロジェクト（知花）

本プロジェクトでは、*C. glabrata* の全遺伝子について組換え株を構築し、機能解析を行うことにより、病原真菌の普遍性と多様性を見いだすことをめざしている。応用研究として①抗真菌薬の開発、②常在性と病原性の解明、③医学・工学的利用などの研究を進め、インターネットを介して情報を発信し、世界中の病原真菌の研究の発展のために貢献する事をめざしている。2008年の各サブプロジェクトの進捗状況を以下に記す。

14-1 第1章 全遺伝子 (5,300) の組換え株構築: *C. glabrata* の全遺伝子を網羅的に解析するためには、より精度の高いゲノム情報とアノテーション情報が必要になった。そこで、本年は未同定遺伝子、定量的発現解析、遺伝子開始点、アンチセンス遺伝子などの情報獲得を目的とした網羅的 cDNA 5' 解析を行った。cDNA は INITIA 法を用い、シークエンス解析にはイルミナ社 solexa (次世代シークエンサー) を用いた。約 100 万リードのタグ配列を、鈴鹿高専青山俊弘先生、中山浩伸先生とともに解析を進め、ゲノム情報のリアノテーションを行った。現在論文執筆中である（知花，上野）。解析の結果得られた知見を基に網羅的に組換え株の構築を進めており、本年は *C. glabrata* の遺伝子、約 500 について組換え株の作製を構築した（木下，上野，三谷，笹本，大岩，加藤，島田）。また、組換え機構の解析（上野）、組み換えツールの開発（上野，松浦，小暮）、組換え株の保存・分譲システム（大岩，木下，島田）を研究開発中である。

14-2 第2章 抗真菌薬の開発: 昨年までに、全ゲノム 5,300 の中から抽出した 187 の標的候補遺伝子についてテットプロモーターを各遺伝子の 5' 領域に導入した株 (Tet 株) を体系的に構築し、各遺伝子の生育に対する抑制効果の即効性や殺菌性などを *in vitro* で定量的に解析

した。また、医学部田村 裕准教授と上野が、*in silico* の手法により、生育必須タンパクに対する抗真菌ペプチドの設計と合成ならびに評価などを開始した（上野）（論文執筆中）。本年は、*C. glabrata* のハイスループットなマウス感染実験系を構築し、*in vitro* 解析によって見いだされた抗真菌薬の標的候補の Tet 株の感染時実験を行った（三谷，宇野，木下，笹本，上野）（論文執筆中）。その結果をもとに見いだされた有力候補タンパクに対して親和性高いペプチドを設計，合成し，解析を現在，進めている（上野）。

14-3 第3章 病原性・常在性の研究: 感染宿主との相互作用を解析する目的で真菌が宿主に対してファーストコンタクトを行う細胞壁に着目した。昨年は、細胞壁の合成に関する遺伝子情報をゲノムから 140 遺伝子抽出し、組換え株の構築を開始した（三谷，上野）。今年は、140 遺伝子の組み換え株を完成させ、これらの株を用いて薬剤耐性を含む、様々なストレス耐性度、細胞壁の形質の変化などの表現型の解析を行った（三谷，上野）。今後は、感染モデル系の構築と、組み換え株を用いて各種細胞壁構成成分に対する宿主のレセプター解析を進める。

14-4 第4章 応用工学的研究: これまでのカンジダフェノームプロジェクトの研究過程では、解糖系を始めとする代謝系の組換え株も多く構築して来た。これらの株を用いて、エタノールやビタミンなど有用産物の生産至適条件の解析を行い、さらに、プロモーター操作などの技術開発、高生産株スクリーニング系の開発などを進めている（笹本，松浦，大野，小暮）。

15. 抗真菌作用増強物質および免疫賦活物質の探索

糸状菌・酵母に対してポリエン抗生物質の抗真菌作用を増強する物質をチェッカーボード法により農薬，抗原虫薬および駆虫薬などを探索した。薬剤の併用により抗非定型細菌，原虫薬の中に相乗作用が若干観察される物質を見いだした。免疫賦活物質は、インド由来植物樹皮から *Candida albicans* と *Cryptococcus neoformans* および *Aspergillus fumigatus* の *in vivo* 実験で感染防御効果を示す NJ8a と NJ8b を見いだした（宇野）。

研究成果の発表

1. 著書

- 1) 明見能成, 三上 襄 (分担): 口腔臨床に必要な真菌学, pp. 11-17, 尾崎登喜雄編『口腔内科学』飛鳥出版社, 2008.
- 2) 三上 襄 (分担): 放線菌関連菌 -, pp. 390-391, 「医科細菌学 - 改訂第4版」, 笹川千尋, 林 哲也, 南江堂, 2008.
- 3) 三上 襄 (分担): 微生物の辞典 (渡辺 信他編, 朝倉書店, 2008.
- 4) 宇野 潤 (分担): 真菌感染症. pp. 525-535, 百瀬弥寿徳編, ファーマシユチカルノート, 医学評論社, 2008.

2. 原著論文

英文

- 1) Hayashi Y, Matsuura N, Toshima H, Itoh N, Ishikawa J, Mikami Y, Dairi T: Cloning of the gene cluster responsible for the biosynthesis of brasilicardin A, a unique diterpenoid. J Antibiot 61: 164-174, 2008. (査読有)
- 2) Hanafy A, Kaocharoen S, Jover-Botella A, Katsu M, Iida S, Kogure T, Gonoi T, Mikami Y, Meyer W: Multilocus microsatellite typing for *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. Med Mycol 46: 685-696, 2008. (査読有)
- 3) Araki A, Kubota T, Tsuda M, Mikami Y, Fromont J, Kobayashi J: Nagelamides K and L, dimeric bromopyrrole alkaloids from sponge *Agelas* species. Org Lett 10: 2099-2102, 2008. (査読有)
- 4) Tanaka N, Kubota T, Ishiyama H, Araki A, Kashiwada Y, Takaishi Y, Mikami Y, Kobayashi J: Petiolins A-C, phloroglucinol derivatives from *Hypericum pseudopetiolatum* var. *kiusianum*. Bioorg Med Chem 16: 5619-5623, 2008. (査読有)
- 5) Ono M, Kobayashi Y, Shibata T, Maruyama D, Sung-Won K, Watanabe T, Mikami Y, Tobinai K: *Nocardia exalbida* brain abscess in a patient with follicular lymphoma. Int J Hematol 88: 95-100, 2008. (査読有)
- 6) Melo NR, Taguchi H, Culhari VVP, Kamei K, Mikami Y, Smith SN, Vilela MMS: Oral candidiasis of HIV

infected children undergoing sequential HIV therapies. Med Mycol 2008, in press.

- 7) Ishiyama H, Kozawa S, Aoyama K, Mikami Y, Fromont J, Kobayashi J: Halichonadin F and the Cu (I) complex of halichonadin C from the sponge *Halichondria* sp. J Nat Prod 71: 1301-1303, 2008. (査読有)
- 8) Myoken Y, Sugata T, Mikami Y, Murayama SY, Fujita Y: Identification of *Aspergillus* species in oral tissue samples of patients with hematologic malignancies by in situ hybridization: a preliminary report. J Oral Maxillofac Surg 66: 1905-1912, 2008. (査読有)
- 9) Kubota T, Ito J, Mikami Y, Fromont J, Kobayashi J: Nakijiquinones G-I, new sesquiterpenoid quinones from marine sponge. Bioorg Med Chem 16(16): 7561-7564, 2008. (査読有)
- 10) Kang Y, Tanaka H, Moretti MR, Mikami Y: New ITS genotype of *Cryptococcus gattii* isolated from an AIDS patient in Brazil. Microbiol Immunol 2008, in press.

3. 総説・解説・その他学術刊行物

- 1) 三上 襄: 病原真菌の分子系統分類および遺伝子型解析とそれらに基づく同定診断法の開発. Jpn J Med Mycol 49: 151-155, 2008.
- 2) 三上 襄: NBPR (ナショナルバイオリソースプロジェクト) 紹介 - 感染症研究に必須のリソース: 病原微生物 - 特に病原真菌と病原放線菌について -. Biophia 4(4): 53-56, 2008.
- 3) 三上 襄 (分担): 病原体等安全取扱・管理指針 (共同編纂), 日本細菌学会編, 2008年.
- 4) 長 環, 豊田美香, 中山浩伸, 知花博治, 上西秀則, Richard A Caderon: 真菌誌 49: 281-86, 2008.
- 5) 毛利 忍, 渡辺晋一, 楠 俊雄, 渋谷和俊, 西山彌生, 阿部美智子, 宇野 潤, 小栗豊子, 前崎繁文, 池田玲子, 安部 茂: 爪白癬の治療について - 日本医真菌学会標準化委員会提案 2007 -. 真菌誌 49: 1-4, 2008.

4. 学会・シンポジウム・研究集会での招待講演 国際

- 1) Mikami Y: Overview 「Epidemiological research on pathogenic fungi in China and development of research

bases for mycotic infection]. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium. 2008.

- 2) Hiroji Chibana, Phenome Project in *Candida glabrata*, GCD yeast club, Minneapolis USA, 2008. 9. 17.

国内

シンポジウム

- 1) 五ノ井 透, ハナフィーアメド, メーヤーウイランド, 三上 襄: *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* のマイクロサテライト多型とその世界分布. 第 52 回日本医真菌学会総会プログラム・抄録集 p. 84, 長崎, 9月10日~11日, 2008.

ワークショップ・セレクトェッド

- 1) 知花博治, 上野圭吾, 笹本 要, 中山浩伸, 青山俊弘, 宇野 潤, 三上 襄: 病原真菌フェノームプロジェクト 第 1 章 - *Candida glabrata* - を用いた抗真菌菌ゲノム創薬 -, 第 2 回日本ゲノム微生物学会 セレクトェッドオーラル, 大阪, 3月6~8日, 2008.
- 2) 田辺公一, 中山浩伸, 知花博治, 宮崎義継, 新見昌一: 病原真菌の ABS タンパク質の抗真菌耐性との関わり, 第 81 回日本細菌学会総会, ワークショップ, 発表要旨抄録集 p. 62. 京都, 3月24~26日, 2008.
- 3) Chibana H, Ueno K, Sasamoto K, Mitani H, Tamura Y, Aoyama T, Kinoshita S, Kato N, Uno J, Nakayama H, Mikami Y: Target prioritization and lead generation for development of antifungal drug based on *Candida glabrata* phenome project. The 8th Awaji Interational Forum on Infection and Immunity, selected oral, Abstracts p. 111, Awaji, Sep 7-11, 2008.
- 4) 田辺公一, 中山浩伸, 山越 智, 知花博治, 新見昌一, 宮崎義継: *Candida glabrata* ステロールトランスポーターのアゾール耐性化における役割, 第 52 回医真菌学会総会, セレクトェッドシンポジウム, 発表要旨抄録集 p. 28. 長崎, 9月10, 11日, 2008.

5. 一般発表

国際学会

- 1) Luo Z, Kang Y, Wang H, Mikami Y: Morphological and taxonomic studies on pathogenic yeasts isolated from Guizhou, China. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Changchun Jul 27-Aug, 2008.
- 2) Gonoï T, Hanafy A, Meyer W, Mikami Y: Multilocus

microsatellite analysis in *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from the world. China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Changchun Jul 27-Aug 5, 2008.

- 3) Chibana H, Sasamoto K, Ueno K, Aoyama T, Kinoshita S, Nakayama H, Uno J, Mikami Y: Drug target selection as the first goal of *Candida glabrata* functional genomics. Japan-China Pan Asia Pacific Mycology Forum Symposium, Abstract p. 58, Changchun, China, Jul 27-Aug. 5, 2008.

国内学会

- 1) 田中玲子, 亀井克彦, 五ノ井 透, 横山耕治, 矢口貴志, 三上 襄: NBRP・ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」-真菌・放線菌. 日本微生物資源学会第 15 回大会要旨集 p. 37, 千葉, 6月30日~7月2日, 2008.
- 2) Zaki S, Ibrahim N, Aoyama K, Shetaia Y, Abdel-Ghany K, Mikami Y: Epidemiology of dermatophyte infections in Cairo, Egypt. 日本微生物資源学会第 15 回大会要旨集 p. 38, 千葉, 6月30日~7月2日, 2008.
- 3) Zhu J, Hanafy A, Gonoï T, Meyer W, Mikami Y: Strain typing for *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* by analysis of multilocus microsatellites. 日本微生物資源学会第 15 回大会要旨集 p. 39, 千葉, 6月30日~7月2日, 2008.
- 4) 志保沢里奈, 小暮高久, 三上 襄: アゾール系抗真菌剤 clotrimazole の *Nocardia farcinica* における標的分子の探索. 日本微生物資源学会第 15 回大会要旨集 p. 39, 千葉, 6月30日~7月2日, 2008.
- 5) 青山一紀, 矢澤勝清, 三上 襄: 新たに臨床材料から分離された *Rothia* sp. について. 日本微生物資源学会第 15 回大会要旨集 p. 39, 千葉, 6月30日~7月2日, 2008.
- 6) 田中博子, 山本撰也, 三上 襄: 嫌気性細菌の生産する二次代謝産物の研究. 日本微生物資源学会第 15 回大会要旨集 p. 39, 千葉, 6月30日~7月2日, 2008.
- 7) 岩澤真理, 外川八英, 松江弘之, 三上 襄: *Nocardia brasiliensis* による皮膚ノカルジア症の 2 例. 第 52 回日本医真菌学会総会プログラム・抄録集 p. 92, 長崎, 9月10日~11日, 2008.

- 8) 宮崎久美子, 大園詩子, 照井 正, 青山一紀, 三上 襄: リンパ型スポロトリコーシスの1例. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 93, 長崎, 9月10日~11日, 2008.
- 9) 康 穎倩, 矢沢勝清, 横山耕治, 三上 襄: 中国貴陽医学院で分離された病原性酵母の分類学的研究. 第52回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊1号): 84, 長崎, 9月10日~11日, 2008.
- 10) 三上 襄, 五ノ井 透: 千葉大学オープンリサーチ2008. 人や動物に病気を起こすカビ, 酵母, 病原放線菌の研究 (平成20年9月6日, 千葉大学 けやき会館 (西千葉キャンパス)).
- 11) 知花博治, 宇野 潤, 田村 裕: 真菌フェノームプロジェクト第2章: 標的の決定とインシリコ抗真菌薬ペプチドの創出. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」班会議, 東京, 1月12日~13日, 2008.
- 12) 上野圭吾, 田村 裕, 中山浩伸, 知花博治, 三上 襄: *Candida* フェノームプロジェクトから抗真菌剤の設計へ—コンピュータを活用した抗真菌剤の設計—. 第6回感染症沖縄フォーラム, 沖縄北谷, 要旨集 p.21, 2月14日~16日, 2008.
- 13) 中山浩伸, 田辺公一, 青山俊弘, 竹森大樹, 知花博治, 新見昌一: 病原真菌 *Candida glabrata* のステロールとランスポータの発現機序. 第6回感染症沖縄フォーラム, 沖縄北谷, 要旨集 p.18, 2月14日~16日, 2008.
- 14) 上野圭吾, 中山浩伸, 三上 襄, 知花博治: *Candida* フェノームプロジェクトによる標的の選定とコンピュータによる抗真菌剤の設計. 第81回日本細菌学会総会, 発表要旨抄録集 p.167. 京都, 3月24日~26日, 2008.
- 15) 知花博治, 上野圭吾, 笹本 要, 木下妻智子, 三谷宏樹, 小暮高久, 加藤直子, 宇野 潤, 青山俊弘, 中山浩伸, 三上 襄: カンジダフェノームプロジェクトにおける網羅的遺伝子組み換え株の構築. 日本微生物資源学会第15回大会, 発表要旨抄録集 p.62. 千葉, 6月30日~7月2日, 2008.
- 16) 三谷宏樹, 上野圭吾, 知花博治, 三上 襄: *Candida glabrata* を用いた細胞壁合成遺伝子の網羅的機能解析. 第5回真菌分子細胞研究会 要旨集 p.1, 千葉, 8月21日~22日, 2008.
- 17) 中川元斗, 上野圭吾, 岩田哲郎, 青山俊弘, 知花博治, 中山浩伸: 病原性 *Candida glabrata* の GDP-mannose 合成遺伝子の機能解析. 第5回真菌分子細胞研究会 要旨集 p.2, 千葉, 8月21日~22日, 2008.
- 18) 上野圭吾, 田村 裕, 中山浩伸, 三上 襄, 知花博治: コンピューターシミュレーションによるペプチド性リード化合物の設計. 第5回真菌分子細胞研究会 要旨集 p.4, 千葉, 8月21日~22日, 2008.
- 19) 青山俊弘, 上野圭吾, 三谷宏樹, 田淵史晃, 中山浩伸, 知花博治: *Candida glabrata* における RNA5' 末端塩基配列の解析. 第5回真菌分子細胞研究会 要旨集 p.6, 千葉, 8月21日~22日, 2008.
- 20) 田淵史晃, 上野圭吾, 三上 襄, 知花博治: クオラムセンシングに関する遺伝子の網羅的解析—*Candida glabrata* をモデルとして—. 第5回真菌分子細胞研究会 要旨集 p.8, 千葉, 8月21日~22日, 2008.
- 21) 田辺公一, 名木 稔, 中山浩伸, 知花博治, 宮崎義継, 新見昌一: 病原真菌ステロールトランスポータの発芽酵母での発現解析. 第5回真菌分子細胞研究会 要旨集 p.13, 千葉, 8月21日~22日, 2008.
- 22) 中山浩伸, 田辺公一, 青山俊弘, 岡野 誠, 知花博治, 新見昌一: 病原真菌 *Candida glabrata* のステロール輸送機構の解明. 第5回真菌分子細胞研究会 要旨集 p.14, 千葉, 8月21日~22日, 2008.
- 23) 岡野 誠, 田辺公一, 青山俊弘, 知花博治, 新見昌一, 中山浩伸: *Candida glabrata* のステロールトランスポーター *AUS1* を制御する転写因子の検索. 第5回真菌分子細胞研究会 要旨集 p.8, 千葉, 8月21日~22日, 2008.
- 24) 知花博治, 三谷宏樹, 笹本 要, 上野圭吾, 田村裕, 青山俊弘, 木下妻智子, 加藤直子, 大岩真理, 宇野 潤, 中山浩伸, 三上 襄: *Candida glabrata* フェノームプロジェクト第2章標的の探索から抗真菌薬の創出へ. 第2回真菌ワープ研究会 要旨集 p.34, 千葉, 8月23日, 2008.
- 25) 菅波晃子, 上野圭吾, 安達禎之, 知花博治, 田村裕: *in silico* 分子進化法による抗真菌薬の創製. 第2回真菌ワープ研究会 要旨集 p.35, 千葉, 8月23日, 2008.
- 26) 知花博治, 宇野 潤, 中山浩伸, 青山俊弘: カンジダ酵母における網羅的発現制御株の構築と応用—病

原性ゲノム機能学－特定領域「ゲノム4領域2008年度合同班会議」神戸, 8月25日～27日, 2008

- 27) 知花博治, 宇野 潤, 中山浩伸, 青山俊弘: カンジダ酵母における網羅的発現制御株の構築と応用－病原性ゲノム機能学－微生物ゲノム合同班会議, 金沢, 11月12日～14日, 2008.
- 28) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄: DNAマイクロアレイ関連技術の開発. 平成19年度ライフサイエンス分野融合会議・ライフサイエンス部会バイオテクノロジー分科会合同研究発表会, つくば, 1月31日, 2008.
- 29) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄: DNAマイクロアレイ関連技術の開発. 平成19年度ライフサイエンス分野融合会議・ライフサイエンス部会バイオテクノロジー分科会合同研究発表会, つくば, 2月1日, 2008.
- 30) 五ノ井 透, Ahmed Hanafy, Wieland Meyer, 三上 襄: Multilocus microsatellite sequence による病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* 多型性の世界分布解析. 第91回日本細菌学会関東支部会, 千葉, 10月23日～24日, 2008.
- 31) 五ノ井 透, 武田健二郎, 志賀祐介, 松澤哲宏, 三上 襄: *gyrB* 遺伝子による *Nocardia* 属菌群の分類 (multilocus sequence typing を目指して). 2008年度日本放線菌学会, 山梨, 7月10日～11日, 2008.
- 32) 三上 襄, 本田武司, 江崎孝行, 平山謙二, 亀井克彦, 五ノ井 透, 横山耕治, 矢口貴志, 田中玲子: 新たな感染症研究への迅速な支援を目指して. BMB2008, 神戸, 12月9日～12日, 2008.

共同研究

1. 国際共同研究

- 1) 三上 襄: 抗酸菌の薬剤不活化に関する研究: Eric R. Dabbs 教授, ウィットウオータース大学教授, 南アフリカ.
- 2) 三上 襄: 病原性放線菌および真菌の分子分類学的研究: N. Poonwan 博士, タイ国立衛生研究所, タイ.
- 3) 三上 襄: 病原真菌 *Cryptococcus* の系統解析: W. Meyer 准教授, シドニー大学病院, オーストラリア.
- 4) 三上 襄: 病原真菌の疫学的研究: M. L. Moretti-

Branchini 教授, キンピーナス大学医学部, ブラジル.

- 5) 知花博治: *Candida* の分子生物学的の研究, Judith Berman 教授, アメリカ合衆国, ミネアポリス, ミネソタ大学.
- 6) 知花博治: *Candida* の分子生物学的の研究, Richard Cannon 教授, ニュージーランド, ダニエデン, オタゴ大学.

2. 共同利用研究以外の国内共同研究

- 1) 田中玲子, 松澤哲宏, 宇野 潤, 五ノ井 透, 三上 襄: *Malassezia* 属菌の免疫賦活化作用に関する研究, 斉藤 隆, 山崎 晶, 独立行政法人理化学研究所・免疫アレルギー科学総合研究センター.
- 2) 知花博治: *Candida* の薬剤耐性機構に関する研究, 新見昌一, 田辺公一・国立感染症研究所, 中山浩伸・鈴鹿高専.

国際交流

1. 海外渡航

- 1) 三上 襄: 文部科学省科学技術振興調整費: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 中国吉林大学 (長春), 7月27日～8月3日, 2008.
- 2) 三上 襄: 文部科学省科学技術振興調整費: 真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成, 貴陽医学院 (貴州), 10月12日～19日, 2008.
- 3) 三上 襄: 二国間共同実験 (学術振興会), 共同実験の開始のため南アフリカウィットウオータース大学訪問, 11月7日～16日, 2008.
- 4) 知花博治: アメリカ合衆国, ミネソタ大学 (ミネアポリス), 文部科学省「平成20年度大学教育の国際化加速プログラム」カンジダを用いた真菌病原因子の網羅的研究, 7月9～7月25日, 2008.
- 5) 知花博治: 中国吉林大学, 文部科学省「平成20年度大学教育の国際化加速プログラム」カンジダを用いた真菌病原因子の網羅的研究, 7月27～8月3日, 2008.
- 6) 知花博治: アメリカ合衆国, ミネソタ大学 (ミネアポリス), 文部科学省「平成20年度大学教育の国際化加速プログラム」カンジダを用いた真菌病原因子の網羅的研究, 8月28～9月8日, 2008.

- 7) 知花博治: アメリカ合衆国, ミネソタ大学 (ミネアポリス), 文部科学省「平成 20 年度大学教育の国際化加速プログラム」カンジダを用いた真菌病原因子の網羅的研究, 9 月 13 ~ 10 月 3 日, 2008.
- 8) 知花博治: ニュージーランド, オタゴ大学 (ダニーデン), 文部科学省「平成 20 年度大学教育の国際化加速プログラム」カンジダを用いた真菌病原因子の網羅的研究, 11 月 16 ~ 12 月 16 日, 2008.

2. 海外研究者の受け入れ

- 1) Youtaro Shibayama 院生 (南アフリカウイトウォーターズ大学) 12 月 18 日, 2007 ~ 1 月 18 日, 2008. (二国間共同研究費), 共同研究.
- 2) Eric Dabbs 教授 (南アフリカウイトウォーターズ大学) 12 月 24 日, 2007 ~ 1 月 18 日, 2008. (二国間共同研究費), 共同研究.
- 3) 朱 鍵 外国人研究員 (中国貴陽医学院病院講師) 1 月 7 日, 2008 ~ . (中国内陸部人材育成事業経費), 研修および共同研究.
- 4) Maria Luiza Branchinii 教授 (ブラジルカンピーナス大学), 1 月 21 日 ~ 2 月 2 日, 2008.
- 5) Ademar Yamanaka 教授 (ブラジルカンピーナス大学) 4 月 20 日 ~ 28 日, 2008. (ブラジルカンピーナス大学経費), 大学間交流協定.
- 6) Sherif Mohamed Zaki 講師 (エジプトアインシャム大学) ~ 7 月 16 日, 2008.
- 7) Jiang Yanping 医師 (中国 北京第一病院) 7 月 13 日 ~ 20 日, 2008.
- 8) Thanpicha Thongin 技師 (タイ国立衛生研究所) 7 月 13 日 ~ 21 日, 2008.
- 9) Sugitra Manakul 主任 (タイ国 スラッタニ地域病院) 7 月 13 日 ~ 21 日, 2008.
- 10) Natteewan Poonwan 部長 (タイ国立衛生研究所) 7 月 13 日 ~ 26 日, 2008.

学会等活動 (主催学会, 座長, コンビナーなど)

- 1) 三上 襄: 日本微生物資源学会第 15 回大会長, 千葉大学けやき会館, 千葉, 6 月 30 日 ~ 7 月 2 日, 2008.
- 2) 知花博治: 日本微生物資源学会第 15 回事務局長, 千葉大学けやき会館, 千葉, 6 月 30 日 ~ 7 月 2 日,

2008.

- 3) 宇野 潤: 日本微生物資源学会第 15 回実行委員, 千葉大学けやき会館, 千葉, 6 月 30 日 ~ 7 月 2 日, 2008.
- 4) 向後弘子: 日本微生物資源学会第 15 回実行委員, 千葉大学けやき会館, 千葉, 6 月 30 日 ~ 7 月 2 日, 2008.
- 5) 知花博治: 第 81 回細菌学会総会コンビナー.
- 6) 知花博治: 第 6 回感染症沖縄フォーラム実行委員.
- 7) 知花博治: 第 5 回真菌分細胞研究会・真菌ワーブ研究会実行委員長.
- 8) 大野道代: 第 5 回真菌分細胞研究会・真菌ワーブ研究会実行委員.
- 9) 上野圭吾: 第 5 回真菌分細胞研究会・真菌ワーブ研究会実行委員.

教育活動

講義

- 1) 三上 襄: 千葉大学大学院医学研究科 (真菌感染症学分野 - 高分子活性学), 千葉大学大学院自然科学研究科博士後期課程 (分子生態機能学 - 真菌感染応答論 I), 千葉大学大学院自然科学研究科博士前期課程 (分子生態機能学), 普遍講義 (真菌 (かび) と人との関わり合い).
- 2) 知花博治: 千葉大学普遍教育, 真菌とくらし, 真菌のゲノムと応用, 2 コマ. 琉球大学医学部講義, 微生物学 (細菌学) 2 コマ, 千葉大学園芸学部講義 1 コマ, 千葉大学大学院自然科学研究科特論, 真菌活性応答論, 真菌 (かび) と人との関わり合い, 平成 18 年 12 月 14 日, 21 日.
- 3) 宇野 潤: 真菌 (かび) と人との関わり合い (選択毒性) 平成 18 年 11 月 13 日, 東邦大学薬 (薬物治療学 - 感染症).

インターンシップ生 (実習生) の受け入れ

- 1) 志思沢里奈, 三上 襄: 日本大学生産工学部応用化学科の 3 年生 1 名を実験の実習生として (平成 20 年 7 月 ~ 9 月).

社会的活動

- 1) 知花博治: 市民公開講座「カビ!」実行委員.
- 2) 宇野 潤: 市民公開講座「カビ!」実行委員.

センター講習会

- 1) 三上 襄: 第 22 回病原真菌講習会講師「病原性放線菌」(2006. 7. 26).
- 2) 三上 襄: 病原真菌外国人講習会.
- 3) 宇野 潤: 第 22 回病原真菌講習会世話人.

特許

- 1) 「糖鎖認識受容体の新規用途」- 理化学研究所との共同出願.
- 2) 「カンジダ・グラブラータ (*C. glabrata*) を用いるエタノール製造方法」.

外部資金

科学研究費補助金

- 1) 三上 襄 (代表): 科学研究費補助金 基盤研究 C 19590441 ゲノム情報に基づく病原性放線菌 *Nocardia* の新しい同定法の確立, 平成 18 年~ 20 年 (平成 20 年度は 130 万円, 含む間接経費 39 万円).
- 2) 三上 襄 (代表): 平成 20 年度文部科学省科学技術振興調整費「真菌症原因菌の疫学的研究と真菌症対策拠点形成」(平成 20 年度は 2,051 万円, 含む間接経費 615 万円).
- 3) 三上 襄 (代表): ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」(平成 20 年度は 910 万円, 含む間接経費 83 万円).
- 4) 知花博治 (代表), 宇野 潤 (分担): 特定領域「応

用ゲノム」カンジダ酵母における病原性ゲノム機能学-網羅的遺伝子発現制御株の構築と応用, 平成 20~21 年度 (平成 20 年度は 580 万円).

- 5) 知花博治 (代表): 特定領域「感染マトリックス」カンジダフェノームプロジェクト第 2 章: 標的の決定とインシリコ抗真菌ペプチドの創出, 平成 19~20 年度 (平成 20 年度は 790 万円).

その他の外部資金

- 1) 三上 襄 (代表): 日本学術振興会 2 国間交流事業: 南アフリカとの共同研究, 病原性放線菌 *Nocardia* 及び関連菌の薬剤感受性に関する研究, 平成 18 年, 19 年度 (平成 20 年度の 6 月までは 30 万円).
- 2) 知花博治 (分担): 文部科学省「平成 20 年度大学教育の国際化加速プログラム」カンジダを用いた真菌病原因子の網羅的研究 (282 万円).
- 3) 知花博治 (代表): 民間との共同研究, 株式会社大正製薬 平成 19~20 年度, (平成 20 年度は 91 万円).
- 4) 知花博治 (分担): 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) バイオマスエネルギー高効率転換技術開発 (先導技術開発) 平成 19 年~20 年 (平成 20 年度は 391 万円, 含む間接経費 51 万円).
- 5) 知花博治 (分担): 「千葉県持続可能な国際都市づくりのための新たな担い手育成支援事業」(平成 20 年度 400 万円).
- 6) 知花博治 (代表): 沖縄県「先端バイオ研究基盤高度化事業」平成 20~22 年度 (平成 20 年度は 475 万円).
- 7) 知花博治 (代表): (株) Biomaterial in Tokyo 受託研究: (51 万円, 含む間接経費 9 万円).

分子機能研究部門 活性応答分野

(Department of Molecular Function, Division of Biological Specification)

本年度の客員教授は、東邦大学医学部病院病理部教授 渋谷和俊博士が就任した。渋谷教授の最近の業績は以下の通りである。

教授：渋谷和俊（客員）

学会および社会における活動等

- 1) 日本医真菌学会理事，評議員，用語委員，標準化委員，疫学調査委員，ウェブサイト運営委員，日本病理学会学術評議員，Pathology International 編集委員
- 2) 秋田大学大学院医学研究科非常勤講師，上海中医薬大学（中国）客員教授，（千葉大学真菌医学研究センター客員教授）
- 3) 真菌症フォーラム世話人，関東医真菌懇話会世話人，肺真菌症研究会世話人
- 4) 厚生労働省科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発，ならびに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究」分担研究者
- 5) 厚生労働省研究費補助金難治性疾患克服研究事業「特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究」分担研究者

センターでの 20 年度の共同研究

Stachybotrys chartarum 吸入と原発性肺高血圧症に関する病理学的検討

従来，当センターと共同で環境内に多く存在する *Stachybotrys chartarum* をマウスに経気管的に投与することによって肺高血圧症が惹起されることを明らかにし，このモデルの病態について検討を行ってきた。本年度の共同研究では，trichothecene 類等の *S. chartarum* が産生する生物活性物質が肺循環動態攪乱に強く関与している可能性が示され，難治疾患の一つである原発性肺高血圧症の病態解明の一助となる知見として評価されている。



研究成果の発表

原著

- 1) Ochiai E, Kamei K, Watanabe A, Nagayoshi M, Tada Y, Nagaoka T, Sato K, Sato A, Shibuya K. Inhalation of *Stachybotrys chartarum* causes pulmonary arterial hypertension in mice. Int J Exp Pathol 89: 201-8, 2008.

病原真菌・放線菌管理室（微生物保存事業報告）

(Culture Collection of Pathogenic Fungi and Actinomycetes)

技術職員：伊藤純子
研究支援推進員：大楠悦子
研究支援推進員：佐海知子
非常勤技術職員：矢澤勝清

業務概要

病原真菌・放線菌管理室は、真菌、放線菌の保存と維持管理を主な業務とし、新規登録株の受付（台帳および

びアンプルの作製）、既に登録されている菌株のアンプルの補充や菌株情報の整備（データベースの更新）を行っている。本年の新規登録は真菌が1,471株、放線菌が100株であった。またナショナルバイオリソースプロジェクトの支援により研究用菌株の分譲業務も担当し、その分譲実績は以下の表に示すとおりである。

技術職員矢澤勝清が平成20年3月31日をもって退職後、非常勤技術職員として引き続き放線菌の同定や管理業務を担当している。

2008年 分譲件数と分譲株数

		国内	国外	合計
件数（株数）	真菌	35 (562)	5 (119)	40 (681)
	放線菌	17 (165)	1 (1)	18 (166)

2008 年 患者検体から分離された菌株の同定

患者検体から分離された菌株で起因菌の可能性の高いもののみを示す。

真菌	放線菌
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Actinomadura</i> sp. (3)
<i>Arthriniium</i> sp.	<i>Brevibacterium linens</i>
<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	<i>Brevibacterium aureum</i>
<i>Aspergillus caelatus</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Gordonia hydrophobica</i>
<i>Aspergillus niger</i> (2)	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Candida glabrata</i> (2)	<i>Mycobacterium conceptiomense</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Mycobacterium</i> sp. (2)
<i>Candida lusitanae</i>	<i>Nocardia farcinica</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Nocardia araoensis</i> (2)
<i>Ceriporia lacerata</i>	<i>Nocardia araoensis</i>
<i>Cryptococcus curvatus</i>	<i>Nocardia arthritidis</i>
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (3)	<i>Nocardia asiatica</i> (4)
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>lata</i>	<i>Nocardia beijingensis</i> (12)
<i>Exophiala dermatitidis</i>	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> (5)
<i>Exophiala xenobiotica</i>	<i>Nocardia elegans</i> (5)
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	<i>Nocardia farcinica</i> (19)
<i>Fusarium solani</i>	<i>Nocardia nova</i> (4)
<i>Malassezia slooffiae</i>	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> (6)
<i>Microsporium gallinae</i>	<i>Nocardia transvalensis</i>
<i>Phanerochaete sordida</i>	<i>Nocardia wallacei</i> (2)
<i>Pichia holstii</i>	<i>Saccharopolyspora gloriosa</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Streptomyces carpaticus</i>
<i>Scedosporium apiospermum</i>	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>
<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Streptomyces</i> sp.
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Tsukamurella inchonensis</i> (2)
<i>Trichophyton verrucosum</i>	<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i>
合計 31 件	合計 81 件

(): 同定株数 (記載がない場合は 1 菌株)

保存菌株の原産国別分類

North America	976
Bahamas	1
Canada	113
Costa Rica	243
Cuba	11
Dominican Republic	1
Gulf of Mexico	1
Honduras	5
Jamaica	3
Mexico	29
Nicaragua	2
Panama	4
Puerto Rico	9
USA	554
South America	2,204
Argentina	18
Brazil	1,963
Chile	16
Colombia	61
Ecuador	7
French Guiana	5
Guyana	3
Peru	3
Surinam	4
Uruguay	7
Venezuela	117
Africa	219
Argeria	1
Central African Republic	1
Congo	1
Egypt	59
Ethiopia	2
Gabon	1
Ghana	19
Guinea	4
Ivory Coast	6
Kenya	8
Madagascar	4

Malawi	3
Morocco	2
Mozambique	4
Namibia	1
Nigeria	12
Rwanda	2
Somalia	2
South Africa	68
Sudan	3
Togo	1
Uganda	4
Zaire	10
Zimbabwe	1
Asia	6,905
Bhutan	2
Ceylon	3
China	1,076
India	87
Indonesia	32
Iran	5
Iraq	1
Israel	4
Japan	5,075
Kazakhstan	1
Korea	43
Kuwait	5
Malaysia	4
Myanmar	1
Nepal	8
Pakistan	8
Saudi Arabia	2
Sri Lanka	55
Tadzhikistan	1
Taiwan	72
Thailand	385
Turkey	9
Uzbekistan	3
Vietnam	23

Europe	1,627
Austria	44
Belgium	20
Bohemia	1
Bulgaria	3
Croatia	1
Czech Republic	331
Czechoslovakia	16
Denmark	23
Eritrea	1
Estonia	1
Finland	241
France	67
Germany	127
Greece	3
Hungary	46
Ireland	2
Irish Republic	1
Italy	113
Luxembourg	1
Netherlands	153
Norway	16
Poland	7
Portugal	16

Rumania	2
Russia	25
Slovakia	32
Spain	64
Sweden	35
Switzerland	28
UK	195
Ukraine	6
USSR	5
Yugoslavia	1
Oceania	196
Antarctic Ocean	14
Antarctica	19
Australia	77
Bougainville island	1
New Zealand	68
Papua New Guinea	4
Philippines	2
Samoa	1
Solomon Islands	7
Tahiti	2
Tonga	1
unknown	2,344
total	14,471

Recent Developments in Molecular Typing of *Candida albicans*

Feng-Yan Bai

(Department of Pathogenic Fungi, Division of Ecology)

Guest Professor of the Medical Mycology Research Center, Chiba University (2008).

Present address: Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

E-mail: baify@im.ac.cn

Introduction

Candida albicans is a dimorphic fungus which usually occurs as a commensal microorganism in the mucosa of humans. It can be found in the intestinal and urogenital tracts and in the oral cavities of healthy individuals. The species is also the most common opportunistic fungal pathogen of humans. It causes from benign infections such as oral and vaginal candidiasis to fatal, systematic disease in immunocompromised or critically ill patients. Nearly three-quarters of all healthy women experience at least one episode of candida vulvovaginitis during their lifetime and about 5-10% endure recurrent bouts of the disease¹⁾. Due to the growing population over the last two to three decades of transiently or permanently immunocompromised patients, invasive infections caused by *C. albicans* have become an increasingly important clinical problem. It is recognized as the fourth leading cause of nosocomial infections^{2,3)}. As a result of the difficulties in the early accurate diagnosis of systemic candidiasis, a limited number of suitable and effective antifungal drugs and the increasing drug resistance of the etiologic agents, mortality rates from systemic candidiasis remain high⁴⁾. Even mucosal infections caused by *C. albicans*, such as vaginal candidiasis, often constitute a management problem because of the high rate of recurrence. Fundamental issues with regard to diagnosis, epidemiology, and pathogenesis of both mucosal and invasive candidiasis remain to be elucidated.

In addition to improved therapy, the rapid and accurate identification of the disease-causing strains is crucial for diagnosis, clinical treatment and epidemiological studies of candidiasis. A variety of methods for typing strains of

C. albicans have been described. The most commonly used methods will be discussed in this review, with the focus on recently developed molecular typing or DNA fingerprinting strategies.

Biotyping Based on Phenotypic Characters

The methods based on phenotypic characteristics, referred to as biotyping methods, were first employed for strain typing of *C. albicans*. Serotyping based on antigenic properties is one of the first biotyping strategies used to discriminate among *C. albicans* strains. This strategy was used to type strains for a few decades and three serotyping methods were established for *C. albicans*, including Hasenclever's antisera HSN1 and HSN2^{5,6)}, the Iatron *Candida* Check factor 6 typing antiserum (IF6)⁷⁾, and agglutination with the monoclonal antibody H9⁸⁾. However, the discriminatory power of these methods is limited. Separation of an entire species into a few groups does not provide meaningful resolution for the majority of epidemiological questions to be addressed. In addition, it was found that antigen expression could be affected by phase of growth and culture conditions, which placed in question the serotyping methodology^{7,9)}.

Odds and Abbott in the early 1980s developed a complex biotyping protocol for distinguishing among *Candida* species and among strains of a species based on a set of physiological assays^{10,11)}. The assays testing for growth at pH 1.4; production of secreted acid proteinase; resistance to flucytosine, boric acid, and safranin; assimilation of urea, sorbose, and citrate; and sensitivity to high salt were originally developed for discriminating among species. Four additional assays, including resistance to tetrazolium salts,

sodium periodate, and cetrinide and growth on MacConkey agar, were then used as supplement tests for discrimination among strains within a *Candida* species. The protocol was modified by Childress et al.¹²⁾ to make it more amenable to general use. This biotyping strategy was effectively used in a number of epidemiological studies¹³⁾. However, the system was found to have poor interlaboratory reproducibility¹⁴⁾; the use of the biotyping method in clinical research is therefore limited.

In addition to the serotyping and biotyping methods mentioned above, a number of other typing methods based on phenotypic characters have been used for *C. albicans* strain discrimination, namely morphotyping, sugar assimilation typing, killer yeast typing, resistotyping, and drug susceptibility typing¹³⁾. Although theoretically the phenotype reflects genetic background of an organism, biotyping methods have fundamental problems that limit their use in epidemiological investigation. First, results of the tests, even the expression of serotypes, can be easily affected by growth conditions^{7,8)}. If the growth conditions and time of cell harvesting are not precisely controlled and duplicated among experiments and laboratories, intralaboratory and interlaboratory reproducibility of the results obtained from biotyping methods will be compromised. Second, a number of general phenotypes of *C. albicans* undergo spontaneous high-frequency switching^{15,16)}, which may result in phenotypic differences for the same strain grown under the same conditions.

Multilocus Enzyme Electrophoresis

Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) assesses isozyme or allozyme polymorphism by starch gel electrophoresis, polyacrylamide gel electrophoresis, or isoelectric focusing under native conditions. The enzymes are visualized in the gels by specific enzyme staining procedures. This method directly reflects allelic differences at defined loci. Any enzyme (protein) that can be selectively stained can be the target of analysis. If the protein bands are variable, they are considered to be alleles on the basis of mobility. Both alleles in a diploid can be observed; thus, the method can assess codominant markers in diploids for each locus. If enzymes are carefully selected, MLEE can discriminate

among the gene products of different alleles for a number of loci. For instance, Pujol et al.¹⁷⁾ tested 21 enzymes of *C. albicans* using MLEE on 29 isolates. Thirteen exhibited variability and were therefore used in the analysis. This study demonstrated further that if enough markers are used, MLEE will reveal microevolution within strains¹⁷⁾. The technique has been effectively used to fingerprint *C. albicans* and a number of other *Candida* species^{13,18)}. Although the enzyme patterns detected by MLEE are actually phenotypes, the protocol outperforms several popular DNA fingerprinting methods in assessing genetic relatedness among strains.

The shortcomings of this method include: *i*) it is relatively time-consuming, because at least 10 enzymes that provide variability among isolates must be analyzed; *ii*) it assays the variability at protein level, so that much variation at the nucleotide level may go undetected because nucleotide substitutions do not necessarily change the amino acid composition; and *iii*) changes in amino acid composition do not necessarily change the electrophoretic mobility of the protein and, as a consequence, alleles that are considered to be the same protein alleles from different individuals may represent different gene alleles.

Electrophoretic Karyotyping

The numbers of chromosomes in the cell as well as deviations from the basic number provide useful information for genetics and systematics of organisms. The use of the information in fungi was hampered because of the difficulty in counting the chromosomal number in fungal cells by using cytological methods as usually used in higher plants and animals. The invention of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and other similar systems in the middle of 1980s partially resolved the problem¹⁹⁾. Chromosome-sized DNA fragments of the yeast genome can be readily separated according to size in a gel with the PFGE apparatus such as contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis (CHEF) and can be visualized by ethidium bromide staining. The chromosomal numbers and genome sizes of many fungi have been estimated by using this method²⁰⁾. A striking discovery is that most fungal species have rather variable karyotypes among strains. The polymorphism has been observed in both asexual and sexual

fungi and most likely results from both mitotic and meiotic processes. The phenomenon which is called chromosome length polymorphism (CLP) has been employed for fingerprinting of yeast strains.

Electrophoretic karyotyping has been used extensively for *C. albicans* strain typing¹³⁾. Sangeorzan et al.²¹⁾ demonstrated that patterns generated by electrophoretic karyotyping were highly reproducible among experiments, relatively insensitive to preparation methods within the same laboratory, and unaffected by high-frequency phenotypic switching. Electrophoretic karyotyping has been shown to be the most powerful method for *Saccharomyces cerevisiae* strain typing²²⁾, however, its discriminatory ability for *C. albicans* strains is limited because of the relatively lower chromosomal number and larger molecular sizes of individual chromosomes of the species. The protocol can not distinguish chromosomal DNA molecules with slight differences in sizes. The discriminatory power of electrophoretic karyotyping as a fingerprinting method can be increased dramatically by digesting chromosome-length DNA with endonucleases prior to PFGE^{23,24)}. By increasing the complexity of the pattern in this way, electrophoretic karyotyping could serve as an effective fingerprinting system.

Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) is one of the first molecular methods used to assess genetic diversity or relatedness of strains within a pathogenic fungal species. RFLP analysis shows the DNA sequence variation by electrophoretic banding patterns of DNA samples which are digested by one or more restriction enzymes. Restriction enzymes recognize very specific sequences of nucleotides in DNA. DNAs from different individuals rarely have exactly the same array of restriction sites and distances between these sites. By cutting a DNA sample with a particular restriction enzyme, DNA fragments of different length are obtained. These fragments are separated by gel electrophoresis, resulting in a pattern of bands that is unique for the particular DNA being analyzed. Any region of DNA (locus) can be used for RFLP analysis. Restriction patterns can be generated directly if the target exists in multiple copies, e.g.

mitochondrial DNA (mDNA) or nuclear rDNA, or, more frequently, through two indirect approaches. First, the total nuclear DNA is subjected to gel electrophoresis after being digested with a particular restriction enzyme, transferred to a membrane by southern blotting and then hybridized with a radioisotope-labeled particular DNA probe; the banding pattern is finally visualized by radiography. The second approach called PCR-RFLP is simpler: a specific gene or DNA fragment is amplified by PCR and then digested with particular restriction enzymes; the fragments are then separated by gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

RFLP analysis has been extensively applied to fingerprint strains and to assess population structure, mode of reproduction, and microevolution of *C. albicans* and related species^{13,18,25)}. A variety of probes have been developed including single-gene probes, rDNA probes, mDNA probes, and repetitive and complex DNA probes²⁶⁾. DNA fingerprinting with the complex probe Ca3 has revealed five *C. albicans* clades with geographical specificity: clades I, II, III, SA and E. Clade SA is relatively specific to or highly enriched in South Africa; clade E is relatively specific to Europe; and clade II is absent in the Southwest USA and South America. The results of these studies also have identified clade-specific drug resistance. The majority of isolates within clade I are moderately or highly resistant to 5-fluorocytosine, while the great majority of isolates within the four other clades (II, III, SA, E) are not²⁶⁾. These results showed the promising of RFLP analysis with complex DNA probes in assessing the population structure of *C. albicans* worldwide. However, the use of this method is limited by the complexity of analysis procedure, the need of radioisotopes and the difficulty in inter-laboratory comparison. RFLP analysis without hybridization probes, especially PCR-RFLP is straightforward and easy to use without the requirement of special equipment. However, the discriminative power of the analysis is usually limited and sequence differences occurred outside the restriction sites can not be detected, consequently, fragments with identical sizes do not necessarily have identical sequences.

Randomly Amplified Polymorphic DNA

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) or arbitrarily primed PCR (AP-PCR) analysis assays DNA sequence variation in PCR priming regions. RAPD analysis uses one short PCR primer (ca. 10 bp) and a low annealing temperature to generate several fragments in one amplification. Nucleotide substitutions in the PCR priming regions, particularly the 3' ends, can prevent primer annealing and PCR amplification, resulting in the differences in PCR products. Amplicons are separated on an agarose gel and stained with ethidium bromide. RAPD is technically simple but its resolving power can be dramatically increased by increasing the number of oligonucleotide primers that provide variability among independent isolates. It often detects variation among isolates that are invariant with RFLP analysis, and thus has evolved as the most popular method for DNA fingerprinting the infectious fungi, including *C. albicans* and other *Candida* species^{13,18,25}. However, a number of shortcomings of RAPD analysis must be considered.

The main drawback of RAPD analysis is poor reproducibility. The problem may occur not only among laboratories but also within a laboratory over time. Almost every technical aspect of PCR can affect reproducibility of RAPD analysis. Another problem is that bands of equal electrophoretic mobility may not be homologous. Rieseberg²⁷ demonstrated that a disturbingly large fraction (13%) of RAPD bands with equal mobility from hybrid plants were not homologous. Sequencing of the RAPD bands has been used to confirm their identity^{28,29}.

Multilocus Sequence Typing

Multilocus sequence typing (MLST) was initially developed for clone identification or strain typing of pathogenic bacteria³⁰. The method analyses nucleotide polymorphisms of the sequences of approximately 500 bp internal fragments (loci) of housekeeping genes. For each locus, the different sequences present within a species are assigned as distinct alleles. The alleles at each of the sequenced loci define an allelic profile or sequence type of an isolate. Each isolate of a species can therefore be unambiguously characterized by a series of alleles at the housekeeping loci studied. The direct assignment of alleles based on nucleotide

sequence polymorphisms of internal fragments from multiple housekeeping genes (usually six to eleven are required for bacteria) allows high levels of discrimination between isolates. A major advantage of MLST over other typing methods is that sequence data can be easily shared among laboratories in different countries and continents, thus permitting the establishment of one expanding online global database for each species concerned, and enabling exchange of molecular typing data via the Internet for global epidemiology³⁰.

Although not formally called MLST, the method has been used by mycologists to study basic evolutionary features of pathogenic fungi³¹⁻³⁴. Bougnoux et al.³⁵ examined the usefulness of MLST for characterization of clinical isolates of *C. albicans*. They sequenced the internal regions (loci) of six selected housekeeping genes of *C. albicans* and observed a wide variety of genotypes among the isolates studied. The high frequency of heterozygosity increased sequence diversity at each locus, thus allowed the identification of a greater number of genotypes or diploid sequence types (DSTs). The results showed that MLST is a highly discriminatory and reproducible method for unambiguous characterization of *C. albicans*. The method was then validated and optimized for *C. albicans*^{36,37}, as a consequence, a set comprising the fragments of seven housekeeping genes *CaAAT1a*, *CaACC1*, *CaADP1*, *CaMPIb*, *CaSYA1*, *CaVPS13*, and *CaZWF1b* is recommended for MLST with *C. albicans* (Table 1). A central internet database (<http://calbicans.mlst.net>) has been set up for deposition and analysis of *C. albicans* MLST data from any global source.

Robles et al.³⁸ assessed the value of MLST relative to those of other DNA fingerprinting tools including RAPD, MLEE and RFLP with Ca3 probe hybridization techniques for discriminating among strains of *C. albicans*. The results demonstrated that the discriminatory power of MLST (99.6%) was higher than those of the other three methods compared. MLST analysis of *C. albicans* isolates recovered from the digestive tract of individuals within different families revealed intrafamilial transmission and microevolutions of the species. The data showed frequent colonization of a subject or several members of the same family by genetically indistinguishable or genetically close isolates. The genetically close isolates differed by loss-of-heterozygosity events at one

Table 1. A set of gene fragments recommended as an international standard for multilocus sequence typing of *C. albicans*

Locus	Gene product	Chromosome	Primer sequence (5' → 3')	Amplicon sizes (bp)
AAT1a	Aspartate aminotransferase	2	Fwd ACTCAAGCTAGATTTTTTGGC Rev CAGCAACATGATTAGCCC	478
ACC1	Acetyl-coenzyme A carboxylase	3	Fwd GCAAGAGAAATTTTAATTCAATG Rev TTCATCAACATCATCCAAGTG	519
ADP1	ATP-dependent permease	1	Fwd GAGCCAAGTATGAATGATTTG Rev TTGATCAACAAACCCGATAAT	537
MPIb	Mannose phosphate isomerase	2	Fwd ACCAGAAATGGCCATTGC Rev GCAGCCATGCATTCAATTAT	486
SYA1	Alanyl-RNA synthetase	6	Fwd AGAAGAATTGTTGCTGTTACTG Rev GTTACCTTTACCACCAGCTTT	543
VPS13	Vacuolar protein sorting protein	4	Fwd TCGTTGAGAGATAATCGACTT Rev ACGGATGGATCTCCAGTCC	741
ZWF1b	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1	Fwd GTTTCATTTGATCCTGAAGC Rev GCCATTGATAAGTACCTGGAT	702

or several of the MLST loci, suggesting the high frequency of microevolutions of commensal diploid *C. albicans* through the loss of heterozygosity^{39,40}. MLST on a panel of 416 isolates of *C. albicans* from separate sources recognized a population structure comprising four major clades and eight minor clades⁴¹. The relationship between clades of isolates and their properties of clinical relevance was showed from the data obtained. Different clades of *C. albicans* may differ significantly in the proportions of isolates from blood, the oropharynx, the vagina, and other sites. When a larger panel of *C. albicans* isolates (1,391) were subjected for MLST, the number of clades recognized increased to 17⁴². ABC types (based on the presence or absence of an intron in rDNA⁴³) and geographical origins showed statistically significant variations among clades, but anatomical source and antifungal susceptibility data were not significantly associated. Computational haplotype analysis of the gene fragments sequenced for MLST showed a high frequency of recombination events, which suggests that *C. albicans* isolates had mixed evolutionary histories resembling those of a sexually reproducing species⁴². In addition to nucleic housekeeping genes, mitochondrial genes have been demonstrated to be promising targets for genotyping and population genetics of *C. albicans*⁴⁴.

Microsatellite Analysis

In recent years, short tandem repeats (STRs) or

microsatellites have been increasingly used as molecular markers for population genetics and genotyping of different organisms. The technique exploits the hypervariability of DNA regions made of 10 to 20 or more tandem repeats of nucleotide couplets, triplets, or quadruplets. Several polymorphic microsatellite loci have been identified in the genome of *C. albicans* and used in strain typing of the species (Table 2)⁴⁵⁻⁴⁹. The microsatellite loci EF3⁴⁵, CDC3, and HIS3⁴⁶ locate near coding regions, while the loci ERK1, 2NF1, CCN2, CPH2, and EFG1⁴⁷ locate inside coding regions. More recently, several microsatellite loci called CAI, CAIII, CAV, CAVI, and CAVII located in noncoding regions have been employed for strain typing of *C. albicans*^{48,49}. The polymorphisms of microsatellite loci are usually detected using GeneScan or alike analysis with an automatic DNA sequencer and quantitatively designated by either the total lengths of the alleles^{45,46} or the total number of repeat units in the alleles^{48,49}. The quantitative designation has the same advantages as MLST in inter-laboratory data sharing and comparisons and database construction.

The discriminatory power for *C. albicans* strain typing with the microsatellites located near or inside coding regions was between 0.77 (for CDC3) and 0.91 (for HIS3). A higher value (0.97) was obtained when combining three loci (CDC3, EF3, and HIS3) in a single multiplex amplification reaction⁴⁶. Among the microsatellites used for *C. albicans* strain typing so far, the locus CAI located in a noncoding

Table 2. Microsatellites in the genome of *C. albicans* that have been characterized for strain typing of the species

Locus	Chromosome	Repetitive motif	Primer sequence (5' → 3')	
CDC3	1	(AGTA) _n	Fwd	CAGATGATTTTTTGTATGAGAAGAA
			Rev	CAGTCACAAGATTTAAATGTTCAAG
EF3	5	(TTTC) _n (TTC) _n	Fwd	TTTCTCTTCTTTTCATATAGAA
			Rev	GGATTCAGTAGCAGCAGACA
HIS3	2	(ATTT) _n	Fwd	TGGCAAAAATGATATTCCAA
			Rev	TACTACTATGCCCCAAACACA
ERK1	-	(CAGGCT) _n (CAAGCT) _n (CAA) _n	Fwd	CGACCACGTCATCAATAGAAATCG
		(GCCGCA) _n (CTT) _n	Rev	CGTTGAATGAAACTTGACGAGGGG
CAI	4	(CAA) ₂ CTG(CAA) _n	Fwd	ATGCCATTGAGTGGAAATTGG
			Rev	AGTGGCTTGTGTTGGGTTTT
CAIII	5	(GAA) _n	Fwd	TTGGAATCACTTCACCAGGA
			Rev	TTTCCGTGGCATCAGTATCA
CAIV	-	(ATT) _n	Fwd	TGCCAAATCTTGAGATAACAAGTG
			Rev	CTTGCTTCTCTTGCTTTAAATTG
CAV	3	(ATT) _n	Fwd	TGCCAAATCTTGAGATAACAAGTG
			Rev	CTTGCTTCTCTTGCTTTAAATTG
CAVI	2	(TAAA) _n	Fwd	ACAATTAAGAAATGGATTTTAGTCAG
			Rev	TGCTGGTGCTGCTGGTATTA
CAVII	1	(CAAAT) _n	Fwd	GGGGATAGAAATGGCATCAA
			Rev	TGTGAAACAATTCTCTCCTTGC

region appeared to be the most polymorphic one, exhibiting a discriminatory power of 0.97 alone^{48,49}. Sequence analysis has revealed three different levels of polymorphism in microsatellites, (i) the total lengths or the number of repeats, (ii) the structure of the repeated region, and (iii) point mutations outside the repeated region⁴⁸. In addition to the high cost, sequencing of microsatellites of *C. albicans* is a complicated procedure, because *C. albicans* is a diploid organism and the microsatellite loci are mostly heterozygous, thus can not be sequenced directly. GeneScan technique which accurately determines DNA fragment sizes is therefore commonly used in microsatellite analysis of *C. albicans*. The method can only detect the first level of microsatellite polymorphism, but the second and third levels of variation may contribute to further differentiation of *C. albicans* strains.

Li and Bai⁵⁰ investigated an alternative approach to reveal the polymorphisms of microsatellites by utilizing the technique of single-strand conformation polymorphism (SSCP), a technique initially developed for point mutation detection in human DNA^{51,52}. Strain typing of a panel of 76 independent clinical isolates by PCR-SSCP analysis of CAI achieved a discriminatory power of 0.99⁵⁰. Sequence comparison showed the advantage of SSCP over

GeneScan analysis in the detection of point mutations in the microsatellite⁵⁰. The study demonstrated that PCR-SSCP analysis can reveal the three different levels of polymorphism in microsatellites simultaneously, thus being a powerful and economical approach for rapid strain typing of *C. albicans*. Genotyping of *C. albicans* strains associated with different conditions of vulvovaginal candidosis (VVC) using PCR-SSCP analysis of CAI revealed for the first time that most *C. albicans* strains causing VVC possessed specific genotypes and that the genotype distribution of *C. albicans* strains correlated with the severity of VVC⁵³. The result provides a new clue and approach to elucidating the infection source of VVC.

The genotype distributions of *C. albicans* strains associated with VVC of women and balanoposthitis of men and strains from various extragenital sites were investigated further by using GeneScan analysis of CAI⁵⁴. The result showed that the CAI genotypes of independent *C. albicans* strains isolated from extragenital sites were mostly of individual specificity. In contrast, strains associated with VVC were mainly concentrated to a few genotypes, with CAI genotypes 30–45 and 32–46 being the most common. The distribution frequencies of *C. albicans* strains with the two dominant genotypes were significantly correlated with the

severity of VVC. A similar genotype distribution pattern of *C. albicans* strains associated with balanoposthitis was also revealed. The genetic similarity of strains with the dominant genotypes associated with both VVC and balanoposthitis was confirmed by sequence analysis of three housekeeping genes *CaADP1*, *CaSYA1* and *CaVPS13*⁵⁴). The results suggest *i*) the existence of vaginopathic *C. albicans* strains with enhanced virulence and tropism for the vagina; *ii*) the high possibility of sexual transmission of genital *C. albicans* infections; and *iii*) the significant role of strain differences in the etiology of VVC. Identification of specific genotypes that correlate with severity of VVC is therefore of diagnostic and therapeutic significance.

References

- 1) Sobel JD: Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 369: 1961-1971, 2007.
- 2) Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP: Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 29: 239-244, 1999.
- 3) Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP: National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 31: 327-332, 1998.
- 4) Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D: Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 37: 1172-1177, 2003.
- 5) Hasenclever H F, Mitchell WO: Antigenic studies of *Candida*. I. Observations of two antigenic groups in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 82: 570-573, 1961.
- 6) Hasenclever HF, Mitchell WO: Antigenic studies of *Candida*. III. Comparative pathogenicity of *Candida albicans* group A, group B, and *Candida stellatoidea*. *J Bacteriol* 82: 578-581, 1961.
- 7) Poulain D, Hopwood V, Vernes A: Antigenic variability of *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* 12: 223-270, 1985.
- 8) Brawner DL, Cutler JE: Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 27: 1335-1341, 1989.
- 9) Brawner DL: Comparison between methods for serotyping of *Candida albicans* produces discrepancies in results. *J Clin Microbiol* 29: 1020-1025, 1991.
- 10) Odds FC, Abbott AB: A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia* 18: 301-317, 1980.
- 11) Odds FC, Abbott AB: Modification and extension of tests for differentiation of *Candida* species and strains. *Sabouraudia* 21: 79-81, 1983.
- 12) Childress CM, Holder IA, Neely AN: Modifications of a *Candida albicans* biotyping system. *J Clin Microbiol* 27: 1392-1394, 1989.
- 13) Soll DR: The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 13: 332-370, 2000.
- 14) Odds FC, Auger P, Krogh P, Neely AN, Segal E: Biotyping of *Candida albicans*: results of an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 27: 1506-1509, 1989.
- 15) Slutsky B, Buffo J, Soll DR: High frequency "switching" of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 230: 666-669, 1985.
- 16) Soll DR: High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 5: 183-203, 1992.
- 17) Pujol C, Joly S, Lockhart S, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR: Parity of MLEE, RAPD and Ca3 hybridization as fingerprinting methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 35: 2348-2358, 1997.
- 18) Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V: The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin Microbiol Rev* 12: 126-46, 1999.
- 19) Schwartz DC, Cantor CR: Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75, 1984.
- 20) Walz M: Electrophoretic karyotyping. *In* The Mycota II: Genetics and Biotechnology (ed. L. Kuck), pp.

- 61-73. Springer-Verlag : Berlin Heidelberg, Germany, 1995.
- 21) Sangeorzan JA, Zervos MJ, Donabedian S, Kauffman CA: Validity of contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis as a typing system for *Candida albicans*. *Mycoses* 38: 29-36, 1995.
 - 22) Schuller D, Valero E, Dequin S, Casal M: Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol Lett* 231: 19-26, 2004.
 - 23) Cormican MG, Hollis RJ, Pfaller MA: DNA macrorestriction profiles and antifungal susceptibility of *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 25: 83-87, 1996.
 - 24) Pontieri E, Gregori L, Gennarelli M, Ceddia T, Novelli G, Dallapiccola B, De Bernardis F, Carruba G: Correlation of *SfiI* macrorestriction endonuclease fingerprint analysis of *Candida parapsilosis* isolates with source of isolation. *J Med Microbiol* 45: 173-178, 1996.
 - 25) Xu J: Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *Curr Issues Mol Biol.* 8: 75-89, 2006.
 - 26) Soll DR, Pujol C: *Candida albicans* clades. *FEMS Immunol Med Microbiol* 39: 1-7, 2003.
 - 27) Rieseberg LH: Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol Ecol* 5: 99-105, 1996.
 - 28) Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW: Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 770-773, 1996.
 - 29) Gräser Y, Volovsek M, Arrington J, Schonian G, Presber W, Mitchell TG, Vilgalys R: Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12473-12477, 1996.
 - 30) Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG: Multilocus sequence typing - a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3140-3145, 1998.
 - 31) Koufopanou V, Burt A, Taylor JW: Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5478-5482, 1997.
 - 32) Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG: Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Ecol* 9: 1471-1481, 2000.
 - 33) Anderson JB, Wickens C, Khan M, Cowen LE, Federspiel N, Jones T, Kohn LM: Infrequent genetic exchange and recombination in the mitochondrial genome of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 183: 865-872, 2001.
 - 34) Fisher MC, Koenig GL, White TJ, San-Blas G, Negroni R, Alvarez IG, Wanke B, Taylor JW: Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4558-4562, 2001.
 - 35) Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C: Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 40: 1290-1297, 2002.
 - 36) Bougnoux ME, Tavanti A, Bouchier C, Gow NA, Magnier A, Davidson AD, Maiden MC, D'Enfert C, Odds FC: Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 41: 5265-5266, 2003.
 - 37) Tavanti A, Gow NA, Senesi S, Maiden MC, Odds FC: Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 41: 3765-3776, 2003.
 - 38) Robles JC, Koreen L, Park S, Perlin DS: Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 42: 2480-2488, 2004.
 - 39) Bougnoux ME, Diogo D, François N, Sendid B, Veirmeire S, Colombel JF, Bouchier C, Van Kruiningen H, d'Enfert C, Poulain D: Multilocus sequence typing reveals intrafamilial transmission and microevolutions of *Candida albicans* isolates from the human digestive tract. *J Clin Microbiol* 44: 1810-1820, 2006.

- 40) Odds FC, Davidson AD, Jacobsen MD, Tavanti A, Whyte JA, Kibbler CC, Ellis DH, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA: *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 44: 3647-3658, 2006.
- 41) Tavanti A, Davidson AD, Fordyce MJ, Gow NA, Maiden MC, Odds FC: Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 43: 5601-5613, 2005.
- 42) Odds FC, Bougnoux ME, Shaw DJ, Bain JM, Davidson AD, Diogo D, Jacobsen MD, Lecomte M, Li SY, Tavanti A, Maiden MC, Gow NA, d'Enfert C: Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 6: 1041-1052, 2007.
- 43) McCullough M, Clemons KV, Stevens DA: Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 29: 1220-1225, 1999.
- 44) Wang H, Guo H, Sun S, Xu J: Abundant sequence variation around the mitochondrial origin of replication in the human opportunistic yeast pathogen *Candida albicans* from a tropical island in China. *Fungal Genet Biol* 44: 991-1001, 2007.
- 45) Bretagne S, Costa JM, Besmond C, Carsique R, Calderone R: Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. *J Clin Microbiol* 35: 1777-1780, 1997.
- 46) Botterel F, Cesterke C, Costa C, Bretagne S: Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J Clin Microbiol* 39: 4076-4081, 2001.
- 47) Metzgar D, van Belkum A, Field D, Haubrich R, Wills C: Random amplification of polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre- and post-treatment isolates of *Candida* sp. from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. *J Clin Microbiol* 36: 2308-2313, 1998.
- 48) Sampaio P, Gusmão L, Alves C, Pina-Vaz C, Amorim A, Pais C: Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol* 41: 552-557, 2003.
- 49) Sampaio P, Gusmão L, Correia A, Alves C, Rodrigues AG, Pina-Vaz C, Amorim A, Pais C: New microsatellite multiplex PCR for *Candida albicans* strain typing reveals microevolutionary changes. *J Clin Microbiol* 43: 3869-3876, 2005.
- 50) Li J, Bai FY: Single-strand conformation polymorphism of microsatellite for rapid strain typing of *Candida albicans*. *Med Mycol* 45: 629-635, 2007.
- 51) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770, 1989.
- 52) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879, 1989.
- 53) Fan SR, Bai FY, Liao QP, Liu ZH, Li J, Liu XP: Genotype distribution of *Candida albicans* strains associated with different conditions of vulvovaginal candidiasis, as revealed by microsatellite typing. *Sex Transm Infect* 84: 103-106, 2008.
- 54) Li J, Fan SR, Liu XP, Li DM, Nie ZH, Li F, Lin H, Huang WM, Zong LL, Jin JG, Lei H, Bai FY: Biased genotype distributions of *Candida albicans* strains associated with vulvovaginal candidosis and candidal balanoposthitis in China. *Clin Infect Dis* 47: 1119-1125, 2008.

遺伝子解析を用いた真菌症の病理診断法

渋谷 和 俊

(千葉大学真菌医学研究センター活性応答分野客員教授・
東邦大学医学部病院病理学講座)

1. はじめに

高度医療の発展に伴い、深在性（内臓）真菌症の発生頻度は経年的に増加傾向にある。日常の病理診断においては真菌要素の検出による確定診断は言うまでもなく、適切な真菌化学療法を施行する観点から、菌種の推定を行うことが望ましい。しかし、病理組織内では治療や宿主の反応等により、感染した真菌が必ずしも典型的な菌形態を示すとは限らず、菌種の推定は困難な場合が少なくない。そのため病理診断に応用可能な迅速で精度の高い診断技術の開発が望まれている。

近年、Polymelase Chain Reaction (PCR) 法を基幹とした核酸増幅法による分子生物学的解析法を深在性真菌症の診断に応用する試みが盛んに行われている。病理・細胞診断領域においては真菌遺伝子の検出を目的とした *In situ* hybridization (ISH) 法も確立されつつあり、今後、真菌症診断のための有力な補助診断法となる可能性がある。

本稿では我々がこれまで取り組んできた病理診断材料を用いた *in situ* hybridization (ISH) 法および PCR 法に焦点を当て言及する。

2. *In situ* hybridization 法

ISH 法のプローブとして、我々は PCR プローブおよび Peptide Nucleic Acid (PNA) プローブを使用している。真菌の病原因子をコードする病原遺伝子は菌種を特徴づけるマーカー遺伝子として使用可能な事は知られており、PCR プローブを利用してそれらを標的としている。このプローブは PCR 反応により fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識塩基を取り込む事で標識を施している。この方法を使用して、これまで *Aspergillus (A) fumigatus* の alkaline proteinase (*ALP*: 583bp)¹⁾ および retrotransposon *Afut-1* の long terminal repeat (LTR) 遺伝子領域 (245bp)²⁾ を標的として ISH 法を行っている。マウス感染モデルを用いた *ALP* 遺伝子領域を標的とした ISH 法において

特異性に関する検討を行った結果、アスペルギルス症の原因となる主たる *Aspergillus* 属の菌を検出することが可能であった。*Afut-1* 遺伝子領域を標的とした場合には *A. fumigatus* を特異的に検出できることを確認しており、同じアスペルギルス属でありながら、ポリエンマクロライド系抗真菌剤に抵抗性を示すことで知られている *A. terreus* を否定できる点で有用性が高い。

PNA プローブを使用する場合は、菌種ごとの配列情報が豊富で、属あるいは菌種内での保存性が高い rRNA を標的としている。rRNA はコピー数が多く感度の上昇が期待できる。プローブの標識は、通常の核酸の 5' 末端に相当する N 末端に二つのリンカーを介して合成時に FITC を標識しており、15 ~ 18 mer の長さで設計している。我々はこれまで、*Candida (C.) albicans* 26S rRNA³⁾ および *Fusarium (F)* 属 28S rRNA (未発表データ) を標的とした PNA プローブを使用した ISH 法を行ってきた。これらのプローブで *C. albicans* と *F. solani* をそれぞれ特異的に検出できることをマウス感染モデルにおいて確認した。

PNA プローブは、N-グリシンを骨格としてそれらが酸アミド結合（ペプチド結合）でオリゴマーを形成している通常の核酸のアナログで、強い結合力が特徴である。既にこれまでの検討で、PNA プローブが特異性と迅速性に優れていることが立証されており、今後新たな菌種特異的プローブの開発と信頼性の立証を企図している。

通常病理診断で利用されるホルマリン固定パラフィン材料に ISH 法を応用する際には、標本の前処理が必須である。これはホルマリンによる周囲の蛋白質との間で形成される架橋反応により埋没した標的核酸を露出させる操作である。我々は 1 mM EDTA (pH8.0) 溶液による加熱処理と Proteinase K (10 μg/ml) による二重処理を施すことにより、良好な結果を得ている。*A. fumigatus* 感染マウスにおける *Afut-1* ISH 法において、種々の溶液

を用いた加熱処理の効果を検討したところ、高い pH 値の溶液による加熱処理が有効であった。Papanicolaou 染色細胞診標本に応用する際は EDTA 溶液による軽い処理が有効である。過剰な処理は細胞の剥離が顕著であった。

病理標本中において、標的としている真菌の rRNA の保存度を評価することは必須の操作である。我々は 28S rRNA を標的とした際、多くの真菌を検出し得る Panfungal PNA プローブを設計して利用している。このプローブは我々が使用している他の菌種特異的 PNA プローブと同様の条件で設計しているので、ハイブリダイゼーション可能な rRNA の保存度の評価と条件設定に利用する事ができる (図 1)。

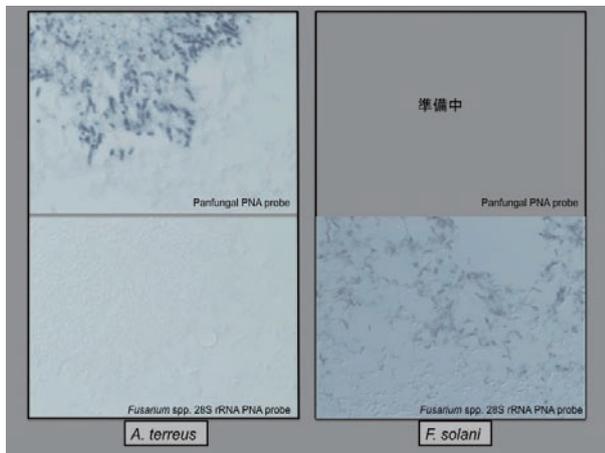


図 1 28S rRNA を標的とした Panfungal PNA プローブによる RNA の保存度の検討。A. terreus (下段左) は Panfungal ISH 法の染色強度から、十分に RNA は保存されている事が想定される。一方、Fusarium spp. 28S rRNA を標的とした PNA プローブによる ISH 法では陰性である。F. solani ではともに陽性である。

3. PCR 法

PCR 法に供するための真菌 DNA 抽出法において、真菌は強固な細胞壁を有するため、Proteinase K による組織の溶解処理のみでは十分な収量が得られない場合がある。我々は溶菌酵素 Lyticase を用いることで良好な結果を得ている。A. fumigatus の分離培養菌から作製したホルマリン固定パラフィン切片を用いて Lyticase の至適濃度を検討した結果、50 ~ 100 U/100 μl で効果が得られた。他にサンプルの加熱処理も効果的で収量の増加が期待できる。我々は状況により両者を使い分けている。

通常の PCR 法を病理診断材料に応用した報告は rDNA や Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域などリボ

ゾーム関連遺伝子群を対象としているものが散見される^{4,5)}。感度と特異性を高める観点から nested PCR 法を用いた報告が多い。我々は Aspergillus 属、Fusarium 属、Pseudallescheria 属、接合菌、A. fumigatus など属および種特異的プライマーを準備しておくことで、形態診断に基づいた PCR 法を行っている。F. solani 感染マウスのホルマリン固定パラフィン切片において、ALP プローブによる ISH 法と Fusarium 属の 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA 遺伝子領域に対する PCR 法⁴⁾を施行した例を示す (図 2)。ALP プローブによる ISH 法は陰性であるが、PCR 法にて Fusarium 属に特異的な 329 bp の明瞭なバンドが検出された。さらに、Fusarium 属 28S rRNA を標的とした PNA プローブによる ISH 法と PCR 直接塩基配列決定法により同領域の塩基配列を検証した (図 3)。

この他、ITS 領域を対象とした直接塩基配列決定法⁶⁾や標的遺伝子を簡便に定量的増幅が可能であるリアルタイム PCR 法を病理診断材料に応用した報告も少数ながらみられる⁷⁾。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は熱変性を必要とせず、一定温度で核酸を増幅する。真菌症の診断にも応用されている安価で迅速な核酸増幅法であり⁸⁾、病理・細胞診断材料にも応用が期待される。

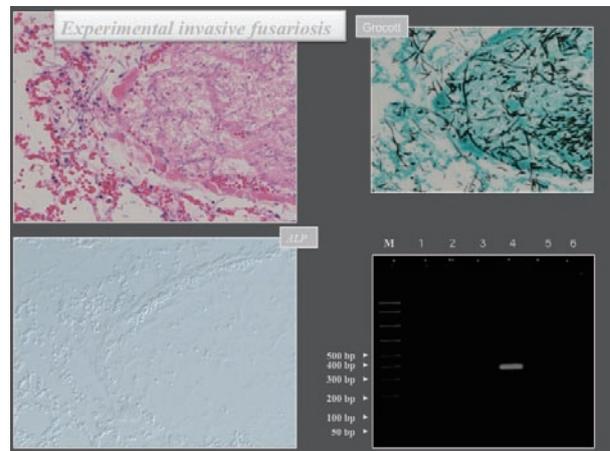


図 2 F. solani 感染マウスにおける検出例。肺組織のホルマリン固定パラフィン切片を用いた ALP 遺伝子を標的とした ISH 法 (下段左) と特異的プライマーを用いた PCR 法 (下段右) Fusarium 属 5.8S rRNA, ITS 2, 28S rRNA 遺伝子領域に対する PCR 法で明瞭な 329 bp のバンドが観察された (Lane 4)。A. fumigatus ALP 遺伝子を標的とした ISH 法では陰性であった。

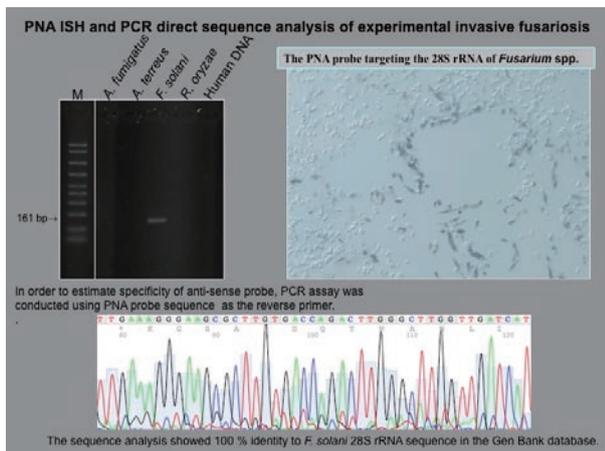


図3 *Fusarium* 属 28S rRNA を標的とした PNA プローブによる ISH 法 (上段右) と PNA プローブをリバースプライマーとした際の PCR 所見 (上段左), PCR 直接塩基配列決定法により同領域の塩基配列を検証した (図下段)。

4. 病理診断材料を使用した ISH 法と PCR 法の実際

日常の病理診断材料に応用した例を以下に示す。 *A. fumigatus* による侵襲性肺アスペルギルス症により死亡した慢性骨髄性白血病患者の剖検症例における肺組織のホルマリン固定パラフィン切片に対して、 *ALP* 遺伝子を標的とした ISH 法と種々のプライマーを用いた PCR 法を施した。 *Aspergillus* 属を検出可能な *ALP* ISH 法において菌体に明瞭なシグナルが観察された。また、 *Aspergillus* 属

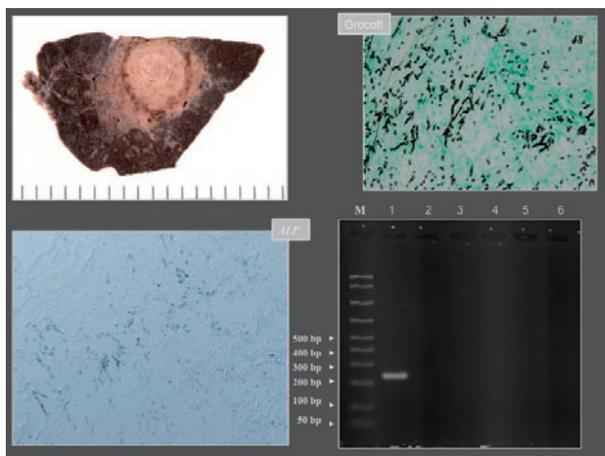


図4 慢性骨髄性白血病患者の剖検症例における検出例。肺組織のホルマリン固定パラフィン切片を用いた *ALP* プローブによる ISH 法 (下段左) と特異的プライマーを用いた PCR 法 (下段右)。 *Aspergillus* 属の 18S rRNA 遺伝子を標的とした nested PCR 法 (Lane 1) で特異的な 236 bp のバンドが得られた。 *A. fumigatus* *ALP* 遺伝子を標的とした ISH 法では陰性であった。

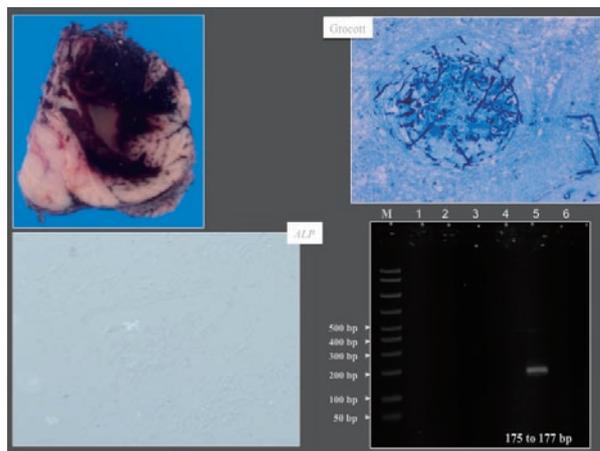


図5 接合菌症患者の剖検症例における検出例。脳組織のホルマリン固定パラフィン切片を用いた *ALP* プローブによる ISH 法 (下段左) と特異的プライマーを用いた PCR 法 (下段右)。接合菌の 18S rRNA 遺伝子に対する nested PCR 法 (Lane 5) で特異的なバンドが得られた。 *A. fumigatus* *ALP* 遺伝子を標的とした ISH 法では陰性であった。

電気泳動図

M: サイズマーカー; Lane1: *Aspergillus* 属 18S rRNA 遺伝子; Lane 2: *A. fumigatus* *ALP* 遺伝子; Lane 3: *A. fumigatus* *Afut-1* 遺伝子; Lane 4: *Fusarium* 属 5.8S rRNA, ITS 2, 28S rRNA 遺伝子; Lane 5: 接合菌 18S rRNA 遺伝子; Lane 6: *Pseudallescheria* 属 5.8S rRNA, ITS2 遺伝子。

の 18S rRNA に対する nested PCR 法⁹⁾で 236 bp の特異的なバンドが検出された (図4)。

全身性の接合菌症により死亡した悪性リンパ腫患者の剖検症例における検出例を示す。脳組織のホルマリン固定パラフィン切片に対して、 *ALP* プローブによる ISH 法と特異的プライマーを用いた PCR 法を施行した。 *ALP* ISH 法は陰性であったが、接合菌の 18S rRNA 遺伝子を標的とした nested PCR 法⁵⁾で 175 bp の特異的なバンドが得られた (図5)。

長期に亘るホルマリン固定や極端に死後時間が長い剖検例等の組織では、DNA の断片化が亢進し、遺伝子の増幅が不可能になる恐れがあるので、陽性および陰性対象実験による検体の質の評価は、診断への応用には必須の過程であろう。我々はヒト β -globin 遺伝子および真菌の 28S rRNA 遺伝子を標的とした PCR 法を同時に施行して検体の評価を行っている。また、 *Aspergillus* 属菌をはじめ多くの糸状菌は環境中に広く汚染菌として生息しており、いうまでもなく非無菌的に処理されている病理・細胞診断材料を用いた PCR 法で陽性の結果が得られたとしても、その評価は慎重に行う必要がある。この

ようなことから病理診断材料を用いた PCR 法においては形態学的診断と関連づけて判断すべきである。我々は病理診断学的立場から、PCR 法が有するコンタミネーションや真菌の DNA 抽出の困難さ¹⁰⁾と言った欠点を ISH 法が補うことが出来ると考え、両者を併用している。

5. おわりに

抗真菌薬の感受性は概ね原因真菌の分子系統学的分類に基づく分類群に一致しており、適切な真菌化学療法を施す観点から病理・細胞診断標本上においても菌種の同定は重要である。しかし、分子生物学的解析法を病理・細胞診断材料に応用した報告は少なく、今後、使用するプローブやプライマーの選定をはじめ、ホルマリン固定パラフィン材料や Papanicolaou 染色細胞診断材料を利用する際の手技の標準化が望まれる。

また、本法を病理・細胞診標本上において *Aspergillus* 属菌と形態学的に鑑別が難しい非 *Aspergillus* 性糸状菌である *P. boydii* (*Scedosporium apiospermum*) また、事実上補助診断法が存在しない接合菌症などに展開することが、今後の重要な課題と考えている。

本稿で紹介した知見の一部は、厚生労働省科学研究補助金「新興・再興感染症研究事業 輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究」ならびに「難治性疾患克服事業 特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究」(いずれも平成 17 年度, 18 年度および 19 年度) の補助により遂行された研究によることを記す。

文 献

- 1) Hanazawa R, Murayama SY, Yamaguchi H: In-situ detection of *Aspergillus fumigatus*. J Med Microbiol 49: 285-290, 2000.
- 2) Neugeglise C, Sarfati J, Latge JP, Paris S: Afut1, a retrotransposon-like element from *Aspergillus fumigatus*. Nucleic Acids Res 24: 1428-1434, 1996.
- 3) Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS, Reller LB, Roberts GD, Hall GS, Alexander BD, Procop GW: Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. J Clin Microbiol 43: 2909-2912, 2005.
- 4) Hue FX, Huerre M, Rouffault MA, de Bievre C: Specific detection of *fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. J Clin Microbiol 37(8): 2434-2438, 1999.
- 5) Bialek R, Konrad F, Kern J, Aepinus C, Cecenas L, Gonzalez GM, Just-Nübling G, Willinger B, Presterl E, Lass-Flörl C, Rickerts V: PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. J Clin Pathol 58(11): 1180-1184, 2005.
- 6) Lau A, Chen S, Sorrell T, et al.: Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. J Clin Microbiol 45: 380-385, 2007.
- 7) Rantakokko-Jalava K, Laaksonen S, Issakainen J, Vauras J, Nikoskelainen J, Viljanen MK, Salonen J: Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol 41(9): 4304-4311, 2003.
- 8) Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H, Kikuchi Y, Abe S, Kudoh S: Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. J Med Microbiol 57: 50-57, 2008.
- 9) Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mösch C, Hehlmann R: Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. J Clin Microbiol 37(12): 3865-3871, 1999.

平成 20 年度共同利用研究・共同利用研究会一覽

共同利用研究

共同利用研究 A

研究課題 '08-01

環境内真菌の吸入と非感染性ヒト疾患との関連に関する研究

渋谷和俊（東邦大学医学部）

亀井克彦（千葉大学真菌医学研究センター）

研究課題 '08-02

Aspergillus 及び関連菌の分子系統解析と形態学的研究との比較研究

堀江義一（千葉県立中央博物館）

矢口貴志（千葉大学真菌医学研究センター）

研究課題 '08-03

病原酵母の株識別法の検討

神戸俊夫（名古屋大学大学院医学系研究科）

田中玲子，知花博治（千葉大学真菌医学研究センター）

研究課題 '08-04

Candida albicans 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子破壊株のアレイ解析

村山琮明（北里大学北里生命科学研究所）

横山耕治，知花博治（千葉大学真菌医学研究センター）

研究課題 '08-05

病原真菌 *Candida tropicalis* の二形性変換のゲノム・ネットワーク

鈴木孝仁，岩口伸一（奈良女子大学理学部）

横山耕治（千葉大学真菌医学研究センター）

研究課題 '08-06

Aspergillus section Nigri の分子分類などによる類別とオクラトキシン産生

高橋治男（千葉県衛生研究所）

陰地義樹（奈良県保健環境研究センター）

大橋正孝（奈良県生活環境部）

田端節子（東京都健康安全研究センター）

久米田裕子（大阪府立公衆衛生研究所）

川上裕司（（株）エフシージー総合研究所）

横山耕治（千葉大学真菌医学研究センター）

研究課題 '08-07

Cryptococcus neoformans 薬剤耐性のスクリーニングと分子機構解析

野村文夫（千葉大学大学院医学研究院）

川本 進，大楠美佐子（千葉大学真菌医学研究センター）

研究課題 '08-08

海洋生物を素材とした抗真菌物質の探索

小林淳一（北海道大学大学院薬学研究院）

三上 襄（千葉大学真菌医学研究センター）

研究課題 '08-09

Trichophyton tonsurans の分子疫学的研究

望月 隆，河崎昌子，藤田 純（金沢医科大学）

亀井克彦，高橋容子，佐野文子（千葉大学真菌医学研究センター）

研究課題 '08-10

真菌から得られる新規生理活性化合物の探索

河合賢一，細江智夫，板橋武史（星薬科大学）

野沢幸平（奥羽大学薬学部）

矢口貴志（千葉大学真菌医学研究センター）

研究課題 '08-11

DNA マイクロアレイ技術を用いた病原真菌検出技術の確立

岡 千寿 (千葉県産業支援技術研究所)

五ノ井 透 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-12

真菌症原因菌に対するカテキン誘導体の影響評価

玄 丞侏 (京都大学再生医科学研究所)

高鳥浩介 (東京農業大学)

朴 奉柱 (国立医薬品食品衛生研究所)

田口英昭, 亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-13

カイコ幼虫の感染モデルを用いた *Cryptococcus neoformans* の病原性遺伝子の同定

関水 and 久, 垣内 力 (東京大学大学院薬学系研究科)

川本 進, 清水公德 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-14

病原真菌 *Cryptococcus neoformans* サイクリン依存性キナーゼの構造機能相関

田村 裕 (千葉大学大学院医学研究院)

川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-15

Candida albicans 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子破壊株の形態学的解析

村山琮明 (北里大学北里生命科学研究所)

山口正視, 川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-16

亜硝酸塩を代謝する真菌の超微細構造

高谷直樹 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)

山口正視, 川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-17

Candida glabrata の増殖形態変化調節機構の解析

渡部俊彦, 松本達二, 三上 健, 小笠原綾子 (東北薬科大学)

山口正視, 知花博治, 川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-18

臨床材料より分離した放線菌の二次代謝産物に関する研究

原田健一 (名城大学薬学部)

石川 勉 (千葉大学大学院薬学研究院)

三上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-19

千葉大学附属病院における深在性真菌症症例の動向

猪狩英俊, 渡邊 哲, 渡辺正治 (千葉大学医学部附属病院)

亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-20

宿主による *Aspergillus fumigatus* 認識機構の解明

安達 禎之 (東京薬科大学薬学部)

亀井克彦, 豊留孝仁 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-21

真菌の産生するマイコトキシンの分析に関する研究

小西良子 (国立医薬品食品衛生研究所)

亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-22

ヒト遺体より分離された真菌相の解析と鑑識への応用の検討

徳留省悟, 石井 清 (獨協医科大学)

矢口貴志 (真菌医学研究センター)

研究課題 '08-23

Cryptococcus neoformans の分子間相互作用解析

奥田研爾, 園田智子 (横浜市立大学大学院医学研究科)

川本 進, 大楠美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-24

病原糸状菌の薬剤排出系 ABC トランスポーター遺伝子発現に関与する転写因子の機能解析

五味勝也 (東北大学大学院農学研究科)

川本 進, 清水公德 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-25

真菌と細菌の菌種間相互作用に関与する分子の免疫電子顕微鏡的解析

池田玲子 (明治薬科大学)

山口正視, 川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-26

ヤシオオオサゾウムシ外部共生酵母の特定と生態の解明

畑 邦彦 (鹿児島大学農学部)

川本 進, 大楠美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-27

放線菌・細菌由来のキトサン加水分解酵素の抗菌活性についての研究

安藤昭一, 齋藤明広 (千葉大学大学院融合科学研究科・園芸学部)

西田芳弘 (千葉大学大学院園芸学研究科・園芸学部)

三上 襄, 山口正視 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-28

病原性のカビが持つテルペノイド生合成遺伝子群の解析

大利 徹 (富山県立大学工学部)

三上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-29

植物由来の抗真菌物質の探索

深井俊夫 (横浜薬科大学)

宇野 潤, 三上 襄, 知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

共同利用研究 B

研究課題 '08-B1

H. capsulatum 抗原の可溶化タンパク質の発現技術の確立とその利用

瀧口正樹 (千葉大学大学院医学研究院)

高木広明, 草野賢一 ((株) プロテイン・エクスプレス)

亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究課題 '08-B2

Candida glabrata のステロール合成系異常を利用した farnesol トランスポーター解析

長 環 (福岡歯科大学)

中山浩伸, 青山俊弘 (鈴鹿工業高等専門学校)

知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究会

研究会 1

名称: 真菌分子細胞研究会

課題: 真菌研究のための情報交換

研究会 2

名称: 第2回アスペルギルス研究会

課題: アスペルギルス症をはじめとした本菌に由来する疾患に関する研究の討議を行う

平成 19 年度 共同利用研究報告

研究課題 '07-01

Aspergillus fumigatus の病原性に関する研究

石橋 正己 (千葉大学大学院薬学研究院)
大槻 崇 (千葉大学大学院薬学研究院)
関根 利一 (城西国際大学薬学部)
渡辺 哲 (千葉大学附属病院感染症管理治療部)
亀井 克彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

研究成果

現在最も重要な病原真菌の一つと考えられる *Aspergillus fumigatus* の病原性を検討する目的で, 本菌培養上清をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分画し, 各画分をマウスマクロファージに対する細胞傷害活性を測定した. 活性が残存している画分について, 更に HPLC を用いて成分分析を行ったところ, 複数の物質の存在が明らかとなり, そのうちのいくつかの化合物の構造決定を行うことができた. 本菌培養上清中に含まれる細胞傷害性物質として主要なもの 1 つは gliotoxin であり, 千葉大学真菌医学研究センター真菌感染分野における研

究も含め過去さまざまな研究成果がある. 今回明らかとなった物質はいずれも gliotoxin とは構造が異なり, また本画分には gliotoxin を含まれていない. よって本画分に含まれる, gliotoxin 以外の物質が細胞傷害活性を有する可能性が強く示唆された.

今回分析対象となった試料は極めて少量であり, 計画していた in vivo, in vitro による細胞傷害性・組織傷害性確認実験を行うことはできなかったが, 今後さらに培養上清からの活性物質収集を行い, 各化合物の活性の確認を行いたい.

研究課題 '07-02

真菌細菌の菌種間相互作用における超微細構造

池田 玲子 (明治薬科大学微生物学教室)
山口 正視 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)
川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

Cryptococcus neoformans と他の菌種との相互作用に着目したところ, *Staphylococcus aureus* 細胞が *C. neoformans* へ

付着し, *C. neoformans* の死滅が誘導される現象を見いだした. そこで, 両細胞の付着に関与する各細胞表層物質の解析を行った結果, *C. neoformans* 側では莢膜多糖

類の主成分グルクロノキシロマンナン (GXM) の主鎖 α -(1→3)-mannan の 3 残基 (M3) 以上が相互作用に関わっていることが示された。一方, *S. aureus* 側では, 解糖系酵素のひとつであるトリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) が付着因子として同定された。そこで, GXM の *S. aureus* 細胞への結合を免疫電子顕微鏡法により検討した。すなわち, *S. aureus* 細胞と GXM, 抗 GXM ウサギ抗体, 金コロイド標識プロテイン A を順次反応させ走査電子顕微鏡で観察した。その結果, *S. aureus* 細胞表面に GXM との反応を示す金粒子が観察された。しかし, さらに最適な反応条件を検討して設定する必要があった。

研究発表

原著論文

- 1) Ikeda R, Saito F, Matsuo M, Kurokawa K, Sekimizu K, Yamaguchi M, Kawamoto S: Contribution of the mannan backbone of cryptococcal glucuronoxylomannan

and a glycolytic enzyme of *Staphylococcus aureus* to contact-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol 189: 4815-4826, 2007.

学会発表

- 1) Ikeda R, Saito F, Matsuo M, Kurokawa K, Sekimizu K, Yamaguchi M and Kawamoto S: The contribution of the mannan backbone of cryptococcal glucuronoxylomannan and a glycolytic enzyme of *Staphylococcus aureus* to contact-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, September 1-5, 2007.
- 2) 池田玲子, 齊藤史人, 松尾美記, 黒川健児, 関水和本久, 山口正視, 川本 進: 細菌 *Staphylococcus* 付着による病原真菌 *Cryptococcus* の死滅誘導 - 真菌・細菌相互作用の新規分子機構. BMB 2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会), 横浜, 12月 11 ~ 15日, 2007.

研究課題 '07-03

人獣共通真菌症の症例検討: ふれあい動物園, 学校飼育動物などの真菌保有率の調査

猪 股 智 夫 (麻布大学獣医学部獣医学科実験動物学研究室)

佐 野 文 子 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

亀 井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

研究概要

本研究は, 人獣共通真菌感染症の観点から動物の深在性真菌症, 皮膚糸状菌症, 日和見真菌症等の症例を収集・検討し, 分子疫学的解析を加える。特に, 動物園飼育動物でふれあいコーナーに関係した動物, 学校飼育動物の真菌症を検討することである。平成 19 年度は, 今, 注目されている海産哺乳類とのふれあいによる共通感染症の危険について示唆および注意を喚起するために沖縄美ら海水族館を選び, イルカの呼気および飼育環境の病原真菌保有率を解明することにした。

その結果, イルカは個体によっては 1 呼気あたり数百個の病原性酵母を吹き上げていることが判明し, 免疫状

態が低下している場合, 至近距離での接触は, このような病原性酵母を吸入する危険性が示唆された。

また, イルカ類の呼気から分離された病原性酵母の遺伝子型は飼育関係者および飼育環境由来株の間で共通するものが確認され, 飼育関係者および観客を含めた環境からの影響が示唆された。

研究成果

原著論文

- 1) Takahashi H, Takahashi-Kyuhachi H, Takahashi Y, Yarita K, Takayama A, Inomata T, Sano A, Nishimura K, Kamei K: An intrafamilial transmission

of *Arthroderma benhamiae* in Canadian porcupines (*Erethizon dorsatum*) in a Japanese zoo. *Med Mycol* 46: 465-473, 2008.

学会発表

- 1) 高橋英雄, 植田啓一, 宮原弘和, 内田詮三, 鎗田響子, 村田佳輝, Eiko Itano-Nakagawa, 高山明子, 猪

股智夫, 矢口貴志, 佐野文子, 亀井克彦: イルカの呼気, スタッフおよび飼育環境から分離された病原性酵母の分子疫学的解析. 第 52 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 49 (増刊 1 号): 76, 長崎, 9 月 10 ~ 11 日, 2008.

研究課題 '07-04

ヒト遺体より分離された真菌の分類・同定

徳 留 省 悟 (獨協医科大学医学部法医学教室)

石 井 清 (獨協医科大学医学部生物学教室)

矢 口 貴 志 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)

研究成果

ヒト遺体に生育する真菌はしばしば発見される現象であるが, 法医学の観点からほとんど研究されていない。そこで, ヒト遺体に生育する真菌のフローラおよび生活環の特徴の解明を試みた。

白骨化したもしくは乾燥が進んだサンプルは, エタノール処理により表面に付着している雑菌を殺菌し, 検体内部に侵入した真菌の分離を試みた。水分量の多いサンプルは, 表面殺菌を行わず, 検体表面(皮膚, 筋肉など)を分解していると考えられる真菌の分離を試みた。本年新たに 5 検体の遺体から真菌の分離を実施した。遺体の分解の程度, 水分量により分離されてくる真菌が異なったが, 同一遺体の各部位から分離される真菌

には, 種差は見られなかった。水分量が少なくなった検体からは *Eurotium* 属の他に好塩性を示す *Scopulariopsis* 属が分離された。

今後は, 検体数を増やし遺体の分解段階と出現する真菌の相関から, 遺体が遺棄されてからの時間経過の推測に繋げたい。

研究発表

原著論文

- 1) Ishii K, Hitosugi M, Yaguchi T, Tokudome S: The importance of forensic mycology. *Legal Medicine* 9: 287, 2007.

病原酵母のプロテオーム解析

奥 田 研 爾 (横浜市立大学大学院医学研究科分子生体防御学)

園 田 智 子 (横浜市立大学大学院医学研究科分子生体防御学)

川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

大 楠 美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

モデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノム解読は、1996年、真核生物としては、他の生物種に先駆けて最も早く完了しており、近年、病原酵母 *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* などについても、それらのゲノム解読が完了している。我々は、このような状況を踏まえ、各病原酵母のプロテオーム解析を行って、分子レベルでの分類系統学的な検討、病原因子の作用機構の解析、また、「ゲノム・プロテオーム創薬」を目指して、抗真菌剤の開発及び作用機作の解析等に本手法を活用するため、プロテオーム解析を進めている。

C. neoformans 細胞破碎抽出液を用いて、二次元電気泳動、タンパク質スポットの解析、アミノ酸配列解析、質量分析、データベースでの検索、同定などの解析を進めており、切り出したタンパク質スポットを in-gel digestion 後、LC/MS/MS 法などによりデータベースと照合しつつ、それらのタンパク質を同定することを

行っている。更に、比較プロテオーム解析を行うべく、DIGE 解析法についても検討している。酵母プロテオームの変動を探索する目的で、酵母破碎抽出液のタンパク質発現ダイファレンシャル解析法 (DIGE) を行い、発現量の増減の顕著なスポットの検索、同定、解析を進めている。各種培養条件の相違などによるタンパク質発現量の差異について比較プロテオーム解析を行い、考察を進めている。

研究発表

学会発表

- 1) Kawamoto S, Virtudazo E, Ohkusu M, Sonoda T, Miyagi Y, Okuda K, Takeo K: Structural and functional analysis of cell control genes in *Cryptococcus neoformans*. Experimental Biology 2008 (2008 Annual Meeting of American Society for Biochemistry and Molecular Biology), San Diego (USA), 2008.

Trichophyton tonsurans 感染状態の形態学的, 細胞生物学的検討

比留間 政太郎 (順天堂大学練馬病院)

川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

大 楠 美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

症状は目立ちにくいですが, 非常に感染力が強く, 短期間で広がる特徴のある「新型水虫」とも言うべき, 白癬菌 *Trichophyton tonsurans* が外国から日本に持ち込まれた結果, 柔道など格闘技選手の間で体部白癬, 頭部白癬になる人が急増して問題になっている. この菌は感染力が強く, 家族・友人に伝染し易く, 一度感染すると治りにくい. また, 特に頭に全く症状がないのに, 多量の菌が寄生している保菌者 (無症候性キャリアー) が多く, 危険な感染源となっている. しかるに, 本菌の宿主への感染時の形態学的, 細胞学的状態の基礎的な知見はまだまだ乏しく, 今回, 頭部などへの感染時, 本菌がどのような細胞状態で存在しているのかを, 形態学的, 細胞学的に検

討することを目的とした.

患者頭部に感染している *Trichophyton tonsurans* 細胞を採取して細胞状態の解析を試みた. 患者にヘアブラシを使用してもらい, このブラシより菌体を回収する方法について検討したところ, 界面活性剤を添加したバッファーを入れたビーカーにブラシを直接入れ, 数分間攪拌後, 遠心分離する方法が最も適していた. また, 集菌した菌をファンギフローラで処理後, 蛍光顕微鏡で観察したところ, 細胞壁の厚い菌体が観察され, 細胞周期状態の解析には細胞壁の酵素処理が必要であることが示唆され, 酵素処理に適した各種条件を試み, また, 細胞周期の状態を検討するとともに形態などを解析した.

研究課題 '07-07

共生・寄生性二形性真菌の形態と生態に関する研究

畑 邦彦 (鹿児島大学農学部)

川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

大 楠 美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

真菌類における菌糸・酵母の二形性は様々な分類群・生態群中に存在しており, 真菌類の形態形成を考察する上で重要な問題の一つとなっている. とりわけ医真菌学では良く知られており, 環境中では菌糸, 体内では酵母として生育する病原菌はヒトの病原菌の中でも重要な位置を占めている. その一方, 森林においても二形性真菌

は普遍的に存在しており, 特に植物と昆虫の寄生菌や共生菌ではしばしば見られるが, 森林環境における二形性の意義は十分明らかになっていない.

報告者らは, 当研究センターにおいて以前行っていた共同利用研究において, いわゆるアンプロシア菌と黒色真菌を中心に培養形態の観察を行ったが, それらの結果から, 寒天培地・液体培地という基質の物理的な特性が

これら二形性真菌の形態形成に重要な意味を持つことを示した。今回の共同利用研究においては、前回の成果を更に深めるべく、昆虫に寄生または共生する森林性の真菌類を中心に事例を増やすことを試みた。

昆虫病原菌 *Beauveria bassiana* および *Nomuraea rileyi* を主な対象として行った液体培地および寒天培地における培養試験では、*B. bassiana* においては液体培地における酵母化が観察され、基質への反応についてアンブロシア菌などの昆虫関連菌における結果と同様な傾向が見られたが、同じ昆虫病原菌である *N. rileyi* においては酵母形

態自体が観察されず、単純に生態のみではこれらの傾向を説明できないことが明らかとなった。

なお、この年はこれまでのデータより学会への成果発表を行っている (1)。

研究発表

原著論文

- 1) 畑 邦彦, 大楠美佐子, 川本 進, 曾根晃一; 森林性二形性真菌の培養形態, 九州森林研究 60: 9-12, 2007.

研究課題 '07-08

真菌が生産する抗アスペルギルス物質の研究

深 井 俊 夫 (東邦大学薬学部)

宇 野 潤 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

三 上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

本研究は、前年度までに有用物質探索用のため教室に保存されていた ITANO 株 (*Penicillium pseudocitrinum*) から抗菌活性成分は 3 種見出し、その中で最も多く存在する物質を精製分離し ITANO-LP (microsphaerone A) を単離した。この物質の抗真菌活性は、アスペルギルス属と一部の白癬菌に強く抗真菌活性を示した。さらに、H16-109N 株 (*Strobilurus trullisatus*) から抗真菌活性物質 4 種を見だし、その中の主要成分 Strobilurin A (C16H18O3) を精製・分離した。Strobilurin A は、*Aspergillus fumigatus*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Candida*

albicans および *Cryptococcus neoformans* 等に広く抗真菌作用を示した。これらの物質は fluconazole を除いた miconazole, ketoconazole, itraconazole, voriconazole などのアゾール系抗真菌薬と併用により抗真菌作用の増強が観察された。

本年は、これらの物質の抗真菌作用を増強する物質をチェッカーボード法により農薬、抗原虫薬および駆虫薬などに広げ探索した。薬剤の併用により抗非定型細菌、原虫薬の中に相乗作用が若干観察される物質を見いだした。

環境内真菌の吸入と非感染性ヒト疾患との関連に関する研究

渋谷 和 俊 (東邦大学医学部)

亀井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

研究成果

ヒトの生活環境内には多様な真菌が存在しており、我々は日常的にこれらの吸入を繰り返している。しかし、真菌の吸入はヒトに様々な影響を与えていることが推測されるものの、その影響については明らかになっていない点が多くある。これまでに我々が見いだした *Stachybotrys chartarum* 胞子の経気管的反復投与によるマウス肺高血圧の惹起もその一つであり、発症の条件や機序等に関しては未解明な部分が多い。そこで本研究では、*S. chartarum* と肺高血圧症との関連について、病変形成頻度の確認や病変形成条件等について検討を進めるとともに、環境内から *S. chartarum* よりも高頻度に検出される真菌による本病変形成についても予備的検討を行った。

まず、*S. chartarum* の経気管的反復投与ではおよそ70%の高い再現性をもってマウスで肺動脈病変が形成されることを確認した。次いで、投与を反復せず、単回投与した場合にも投与する胞子数を多くすることで低頻度ながら同病変が形成されることを明らかにした。また、*S. chartarum* の胞子をメタノール処理または凍結融解処理によって死菌にしてマウスに反復投与すると、メタノール処理をした場合には肺動脈病変が形成されないことから、メタノールによって除去される何らかの物質が本病変形成に関与している可能性が示唆された。一方、*Penicillium citrinum* および *Cladosporium cladosporioides* を1株ずつ用いてマウスに反復投与し、肺への影響を検討したところ、*S. chartarum* と等量の胞子数ではどちらの菌種でも肺動脈病変の形成は認められなかった。

研究発表

原著論文

- 1) Ochiai E, Kamei K, Watanabe A, Nagayoshi M, Nagaoka T, Sato K, Sato A, Shibuya K: Inhalation of *Stachybotrys chartarum* causes pulmonary arterial hypertension in mice. *Int J Exp Path* 89: 201-208, 2008.

学会発表

- 1) 落合恵理, 亀井克彦, 永吉 優, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* 単回投与によるマウス肺高血圧症の形成に関する検討. 第81回日本感染症学会, 京都, 2007. 4.
- 2) 永吉 優, 多田裕司, 長岡鉄太郎, 佐藤弘一, 笠原靖紀, 田辺信宏, 栗山喬之, 渋谷和俊, 亀井克彦: *Stachybotrys chartarum* の反復気管内投与によって誘発されるマウス肺高血圧に関する検討. 第47回日本呼吸器学会学術講演会, 日呼吸会誌 45 (増): 292, 東京, 2007. 5.
- 3) 永吉 優, 落合恵理, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 多田裕司, 長岡鉄太郎, 佐藤弘一, 笠原靖紀, 田辺信宏, 栗山喬之, 渋谷和俊, 亀井克彦: *Stachybotrys chartarum* の反復気管内投与により惹起されるマウス肺高血圧に関する検討. 第1回 iPUC-II (Integrated Pulmonary Circulation Research-II), 東京, 2007. 6.
- 4) 落合恵理, 亀井克彦, 渡辺 哲, 永吉 優, 豊留孝仁, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* 胞子のメタノール処理とマウス肺動脈病変の形成について. 第51回日本医真菌学会総会, 高山, 真菌誌 48 (増刊1号): 90, 11月, 2007.

分子生物学的手法を用いた魚類病原真菌の同定に関する研究

畑 井 喜司雄 (日本獣医生命科学大学獣医学部魚病学教室)

和 田 新 平 (日本獣医生命科学大学獣医学部魚病学教室)

佐 野 文 子 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

亀 井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

研究成果

日本における魚類養殖は、年々養殖対象魚種が増え、過密で飼育される傾向にある。このことに関係し、病気の発生は大きな問題となっている。その中で、真菌病の発生も少なくない。特に、日本人は魚介類を生食することが多いため、それらが真菌に汚染されていることは十分に考えられる。しかし、魚類から分離される真菌の同定に関する研究は十分になされていない。とくに、分子生物学的手法を用いた研究は、菌の同定だけではなく、病気の早期診断にも重要な検討課題である。また、日本近海で漁獲される魚介類や水族館などで飼育されている魚類にも真菌病が発生しているが、それらに関しても原因菌が特定されているものは少ない。

国内の魚類真菌症の症例収集、原因菌分離、培養法の研究および形態的手法による分類同定に遺伝子解析を加え、魚病真菌症の原因菌の同定と系統学的解析により、今まで報告されていなかった菌種による感染が示唆さ

れ、現在、新種記載を含めて検討している。

また関連菌種として、養殖魚から分離された非定型抗酸菌を実験的にマウスに接種し、病原性を検討したところ、哺乳類に対する病原性は低いことが示唆された。

研究発表

原著論文

- 1) Y. Muraosa, K. Morimoto, A. Sano, K. Nishimura, K. Hatai: A new peronosporomycete, *Haliotricula noduliformans* gen. et sp. nov., isolated from white nodules in the abalone *Haliotis* spp. from Japan. *Mycoscience* 50, 2009 (in press).
- 2) C. Munchan, O. Kurata, S. Wada, K. Hatai, A. Sano, K. Kamei, N. Nakaoka: *Exophiala xenobiotica* infection in cultured marine fish, striped jack *Pseudocaranx dentex* in Japan. *Journal of Fish Diseases*, 2009 (accepted).

家畜・家禽等の真菌症の病原学のおよび病理学的診断

木村 久美子（動物衛生研究所細菌・寄生虫病研究チーム／牛病理ユニット）

播谷 亮（動物衛生研究所細菌・寄生虫病研究チーム／牛病理ユニット）

芝原 友幸（動物衛生研究所研究チーム／豚病理ユニット）

佐野 文子（千葉大学真菌医学研究センター，真菌感染分野）

三上 襄（千葉大学真菌医学研究センター，高分子活性分野）

亀井 克彦（千葉大学真菌医学研究センター，真菌感染分野）

研究概要

真菌感染症は人獣共通感染症のひとつであり，日和見感染症としても重要である．家畜・家禽においても多数発生がみられるが，ウイルスあるいは細菌性の感染症に比べると軽視される傾向があるため，その発生実態は明らかにされていない．また，生前診断が困難なための確な採材が為されず，原因菌が不明な場合も多い．

病原学的診断法において，平成 15 年度より 3 年間行った共同研究において遺伝子診断による接合菌の種の特定がある程度可能となった．

病理学的診断法については，パラフィン包埋した真菌リファレンスアレイを用いた検索により，抗アスペルギルス抗体を用いた免疫組織化学的手法が，数種のアスペルギルス属菌の検出に有用であることを明らかにした．また，接合菌症との鑑別にも免疫組織化学的手法は有用である．

病原学のおよび病理学的診断法を組み合わせることにより，今後，病原真菌の種を同定することも期待できる．

さらに，新たな真菌感染症の野外例を診断し，臨

床所見，菌分離成績，病理組織学的検査結果から *Scopulariopsis brevicaulis* 感染症との総合判断した．今後，出来る限り，培養を試み，培養菌体との整合性により，診断精度を向上させようと考えている．

研究発表

原著論文

- 1) 朴 天鎬，吉田英二，佐野文子，木村久美子，安藤貴朗，渡辺大作，大塚浩通，小山田敏文：黒毛和種牛における *Absidia corymbifera* と *Candida tropicalis* の重感染症．日本獣医師会雑誌 60: 497-500, 2007.
- 2) Ogawa S, Shibahara T, Sano A, Kadota K, Kubo M: Generalized hyperkeratosis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* in a Japanese Black calf. J Comp Pathol 138: 145-150, 2008.
- 3) Naota M, Shimada A, Morita T, Kimura K, Ochiai K, Sano A: Granulomatous pericarditis associated with systemic mucormycosis in a finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*). J Comp Pathol 140: 64-66, 2009.

Aspergillus 及び関連菌の分子系統解析と形態との比較研究

堀 江 義 一 (千葉県立中央博物館)

矢 口 貴 志 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)

研究成果

Aspergillus fumigatus およびその関連テレオモルフである *Neosartorya* 属は、真菌症原因菌として重要である。当センターに保存されている *Aspergillus fumigatus* およびその関連菌を研究材料とし、 β -tubulin, hydrophobin, calmodulin 遺伝子による系統解析を実施した。*Fumigati* 節は5つのクラスターに分かれ、*A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. viridinutans* とは系統的に異なる菌群が見出され、*Neosartorya udagawae* と系統的に近縁であった。*A. fumigatus* 関連菌は分子系統と分生子の微細構造、生育温度、マイコトキシン生産性との間には相関が見られたが、薬剤耐性においては差が認められなかった。非典型的な *A. fumigatus* の分布調査を日本、中国などで行い、*N. udagawae* との近縁菌の交配試験による菌学的位置付けを検討している。

研究発表

原著論文

- 1) Yaguchi T, Horie H, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K: Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical

specimens in Japan. *Jpn J Med Mycol* 48: 37-46, 2007.

学会発表

- 1) Yaguchi T, Tanaka R, Matsuzawa T, Horie Y: Polyphasic classification on *Aspergillus* section *Fumigati*. The 24th Annual Conference of the Microscopy Society of Thailand, Bangkok. February 14-16, 2007
- 2) 矢口貴志, 堀江義一, 松澤哲宏, 田中玲子: 遺伝子解析による *Neosartorya* 属の評価と新分類について. 日本菌学会第51回大会, 講演要旨集 p.67, つくば, 5月26~27日, 2007.
- 3) 矢口貴志, 伊藤純子, 田中玲子, 松澤哲宏, 堀江義一, 五ノ井 透: 病原性 *Aspergillus* section *Fumigati* の分類とその性状. 第51回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊1号): 71, 高山, 11月9~10日, 2007.
- 4) 矢口貴志, 松澤哲宏, 田中玲子, Abliz Paride, Hui Yan, 堀江義一: 中国乾燥地帯における *Aspergillus fumigatus* と *Neosartorya* の分布と系統解析. 第51回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊1号): 70, 高山, 11月9~10日, 2007.

病原酵母の株識別法の検討

神戸俊夫 (名古屋大学大学院医学研究科)
田中玲子 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)
知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

初年度 (平成 18 年度) にデザインした 2 種類のプライマーセット (P-II と AS-I) を用い, 同一患者のカンジダ感染部位および非感染部位 (常在部位) より分離した *Candida albicans* と, 同一患者から時間経過を追って分離した *C. albicans* について, RPS 領域に基づくタイピングを行った. 結果, 同一患者由来の *C. albicans* は, 分離部位に関係なく同じ増幅パターンを示した. これは, 同一患者由来の複数の株間でも同じであった. これに対し, 患者間で比較すると, 明らかに増幅パターンが各患者で異なり, *C. albicans* のタイプは各個人にユニークであることが分かった. さらに, RPS type の安定性 (保存性) を, 時間経過 (6 ヶ月から 2 年) を追って分離した株を使って調べた結果, いずれの例も, 分離期間を通して同じ増幅パターンを示した. さらに, *C. albicans* マイクロサテライト (4 カ所) のフラグメント解析を行い, P-II および AS-I による PCR タイピングと比較した. 結

果, RPS に由来する DNA 増幅パターンでは区別困難な株のいくつかはフラグメント解析により区別された. 逆に, フラグメント解析で区別できない株が RPS 領域により区別可能となった.

研究発表

学会発表

- 1) 服部尚生, 田中玲子, 知花博治, 富田 靖, 神戸俊夫: 反復配列 RPS と内部反復配列 ALT を標的とした PCR によるカンジダ・アルビカンスの genotyping. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 33, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 2) 服部尚生, 田中玲子, 知花博治, 富田 靖, 神戸俊夫: RPS およびマイクロサテライトに基づいた *C. albicans* の株識別. 第 32 回東海医真菌懇話会, 名古屋, 2 月 9 日, 2008.

Candida albicans 不飽和化酵素遺伝子破壊株のアレイ解析

村山 琮 明 (北里大学大学院感染制御科学府 & 北里生命科学研究所)
横山 耕 治 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌資源開発分野)
知花 博 治 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

CaFAD2 破壊株のアレイ解析の t 検定で 4 倍以上の変化のあった 15 遺伝子, 多重検定で 1.5 倍以上の変化

のあった 34 遺伝子を, real-time PCR で確認した. ギ酸脱水素酵素, カタラーゼ, 菌糸形成に関わる転写因子 EFG1 など, 13 の遺伝子の発現が低下していた. EFG1

破壊株を低酸素条件下で長期培養すると多価不飽和脂肪酸の量が低下しているとの報告がある。CaFADs は、低

酸素下などのストレス条件下で機能していることが示唆される。

研究課題 '07-15

病原真菌 *Candida tropicalis* の二形性変換のゲノム・ネットワーク

鈴木 孝 仁 (奈良女子大学理学部)

岩 口 伸 一 (奈良女子大学理学部)

横 山 耕 治 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌資源開発分野)

研究成果

不完全真菌 *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) は、ヒトや動物の体内からも分離され、近縁種の *Candida albicans* と共に日和見真菌感染症の原因菌としても知られている。また、アゾール系抗真菌剤に対して、高度の耐性を示すために臨床において問題となっている。*C. tropicalis* は、グルコースを炭素源とする合成液体培地にエタノールを 2.5% 添加すると高率に菌糸 (偽菌糸) を誘導することが可能である。酵母型と菌糸型との二形性変換能力は、病原性に必要であることが示唆されている。

C. tropicalis の近縁種である *C. albicans* では、ゲノムプロジェクトが完了、ポストゲノムシーケンシングプロジェクトが進行しており、その一環として DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的な解析が可能となっている。現在千葉大学真菌医学研究センターでは、*C. albicans* のマイクロアレイ解析システムが稼働している。*C. tropicalis* と *C. albicans* の遺伝子の相同性は高く、我々が単離した *C. tropicalis* の MAP キナーゼ *CtEK1* も *C.*

albicans の MAP キナーゼと非常に高い相同性を示した。そこで、*C. albicans* の DNA マイクロアレイ解析システムを用いて、*C. tropicalis* の菌糸形成過程において遺伝子発現レベルの変化する遺伝子について網羅的な調査を行うことを計画した。*C. tropicalis* は *C. albicans* とは異なり、経時的に菌糸形成過程を追跡できるため、各過程での遺伝子発現を解析することが可能である。本研究では野生株の対照培養、エタノール添加培養から mRNA を調製し、Cy3, Cy5 で標識した cDNA を *C. albicans* の DNA マイクロアレイへハイブリダイゼーションさせ、どのような遺伝子が発現しているかを調べた。培養初期、中期について、対照培養とエタノール添加培養の比較を行ったところ、異なる ORF が発現していることが明らかとなった。しかしながら、発現量に上昇あるいは低下の見られた ORF はいずれも既知の遺伝子と相同性の認められないものであった。今後はリアルタイム PCR 法によりその変動を詳細に検討する必要がある。

研究課題: *Aspergillus section Nigri* の分子分類などによる 類別とオクラトキシン産生

高橋 治 男 (千葉県衛生研究所)

横山 耕 治 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌資源開発分野)

一戸 正 勝 (東京家政大学)

陰地 義 樹 (奈良県衛生研究所)

大橋 正 孝 (奈良県衛生研究所)

田端 節 子 (都立衛生研究所)

久米田 裕 子 (大阪府公衆衛生研究所)

研究成果

山梨県内のブドウ園土壌、浮遊菌、ブドウ果およびワイナリー製造環境からの section *Nigri* の分離と分離株のオクラトキシン産生

ブドウ園の土壌や浮遊菌などから 140 株、また、ワイナリーの製造環境など 28 株、計 168 株の section *Nigri* を分離し、チトクローム *b* などによる遺伝子解析から同定を行った。その結果、ブドウ園の土壌、浮遊菌などでは *A. japonicus* が大部分 (約 80%) を占め、*A. niger* がこれに次いだ (19%)。これに対して、ワイナリー製造環境では *A. niger* が優位を占め (74%)、*A. japonicus* (約 16%) がこれに次いだ。*A. carbonarius* は、ブドウ園の浮遊菌とワイナリー製造環境から、それぞれ 1 株、計 2 株が分離された。これらの分離株から、*A. niger* 10 株、*A. japonicus* 8 株、*A. carbonarius* 2 株を選びオクラトキシン産生性を調べた。その結果、*A. carbonarius* 2 株にオクラトキシン

A 産生性が認められたが、他の株には認められなかった。

中国落花生畑土壌 *A. niger* 分離株のオクラトキシン産生性

中国広州の落花生畑土壌から分離され、チトクローム *b* の遺伝子解析により *A. niger* と同定された 5 株について、オクラトキシン産生性を調べた。その結果、1 株に微量の産生が認められた他は、非産生であった。

走査電顕を用いた section *Nigri* の同定

使用培地は、ツァペック・ドックス平板培地が、麦芽寒天培地やポテトデキストロース寒天培地よりも適し、培養日数も分生子がよく成熟する 7 日間が適した。食品類などから通常分離される、*A. carbonarius*、*A. niger* および *A. japonicus* の類別が可能であり、同定に有効な手段であった。

Cryptococcus neoformans 薬剤耐性のスクリーニングと分子機構解析

野村 文夫 (千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学)

川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

大楠 美佐子 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

Cryptococcus neoformans は免疫不全患者, 特に AIDS 患者に重篤な日和見感染を引き起こすことのある病原性酵母である。近年, *C. neoformans* の薬剤耐性株が分離されクリプトコッカス症の治療効果に影響を及ぼしているが, その研究例は非常に少なく, 薬剤耐性獲得の分子機構解析は重要である。そこで本研究では抗真菌剤に対する薬剤耐性株と感受性株のプロテオーム解析を行い, その選別に有用なマーカー候補を見出すことを目的としている。

AIDS 患者など巣ら分離され濁株 100 株を用いて, fluconazole (FLCZ) について Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準じた感受性試験を実施した。感受性株・4 株, 耐性株・4 株を用いて, タンパク質発現解析を行うための条件検討 (タンパク質抽出溶液, アセトン沈殿の有無, 二次元電気泳動に用いるゲルの濃度及びタンパク質量) を行った。条件検討により得られた至適条件に基づき, それぞれの株をアガロース二次元電気泳動で比較し, 有意に違いのみられたスポットをインゲル消化後, 質量分析計 (LC-MS/MS)

にて, 同定を進めている。感受性試験の結果, 感受性の低い株 16 株, 感受性の高い株 84 株となった。条件検討の結果, タンパク質抽出溶液には homogenizing buffer (50 mM Tris-HCl pH 9.0, 2 mM EDTA·2Na, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を用い, アセトン沈殿は行わない。アガロース二次元電気泳動は, 7.5% - 12% 勾配ゲル, タンパク質量は 400 μ g となった。この至適条件を用いて, 感受性株 4 株と耐性株 4 株の比較を行った結果, 感受性株で増加し濁スポット, 耐性株で増加し濁スポット, 各数個が認められ, 同定を進めつつある。そしてこれらのタンパク質が耐性株と感受性株の選別に有用なマーカーとして臨床に応用でき, 実用的なマーカーであるのか考察を進めている。

研究発表

学会発表

- 1) 大楠美佐子, 石井知里, 清水 誠, 戎野棟一, 野村文夫, 川本 進: 病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* の薬剤感受性測定法に関する検討, 第 18 回日本臨床微生物学会総会, 長崎, 2 月 17 ~ 18 日, 2007.

海洋生物を素材とした抗真菌物質の探索

小林 淳一 (北海道大学大学院薬学研究院)

三上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

海綿 *Agelas* sp. より単離したブロモピロールアルカロイド Nagelamide 類 J ~ L に抗菌活性ならびに抗真菌活性が、また、海綿 *Penares* sp. より単離した penaresidin A のアゼチジン環部分の可能なジアステレオマーを合成した結果、一部のジアステレオマーに抗菌活性ならびに抗真菌活性が認められた。

一方、軟体サンゴ *Cespitularia taeniata* より単離した数種の Verticillene タイプのジテルペン化合物に抗菌活性、抗真菌活性が認められた。さらに、ヒカゲノカズラ科植物やミソハギ科植物より単離した数種のアルカロイドや、オトギリソウ科植物より単離したフロログルシノール誘導体に抗真菌活性が認められた。

今後は、特異性の高い抗真菌活性を示す化合物の探索を継続して行う予定である。

研究発表

原著論文

- 1) Ishiuchi K, Kubota T, Mikami Y, Obara Y, Nakahata N, Kobayashi J: Complanadines C and D, new dimeric alkaloids from *Lycopodium complanatum*. *Bioorg Med Chem* 15: 413-417, 2007.
- 2) Araki A, Tsuda M, Kubota T, Mikami Y, Fromont J, Kobayashi J: Nagelamide J, a novel dimeric bromopyrrole alkaloid from a sponge *Agelas* species. *Org Lett* 9: 2369-2371, 2007.
- 3) Ohshita K, Ishiyama H, Takahashi Y, Ito J, Mikami Y, Kobayashi J: Synthesis of penaresidin derivatives and its biological activity. *Bioorg Med Chem* 15: 4910-4916, 2007.
- 4) Watanabe K, Kubota T, Shinzato T, Ito J, Mikami Y, Kobayashi J: Sarusubine A, a new dimeric Lythraceae alkaloid from *Lagerstroemia subcostata*. *Tetrahedron Lett* 48: 7502-7504, 2007.
- 5) Shen Y-C, Cheng Y-B, Kobayashi J, Kubota T, Takahashi Y, Mikami Y, Ito J, Kuo Y-H: Nitrogen-containing verticillene diterpenoids from Taiwanese soft coral *Cespitularia taeniata*. *J Nat Prod* 70, 1961-1965, 2007.
- 6) Tanaka N, Kubota T, Ishiyama H, Araki A, Kashiwada Y, Takaishi Y, Mikami Y, Kobayashi J: Petiolins A-C, phloroglucinol derivatives from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Bioorg Med Chem* 16: 5619-5623, 2008.
- 7) Araki A, Kubota T, Tsuda M, Mikami Y, Fromont J, Kobayashi J: Nagelamides K and L, dimeric bromopyrrole alkaloids from sponge *Agelas* species. *Org Lett* 10: 2099-2102, 2008.

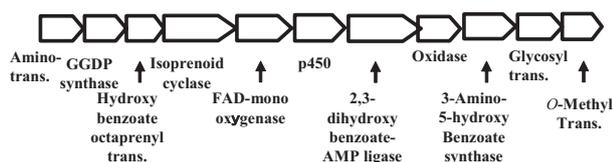
Nocardia 属細菌が持つイソプレノイド生合成遺伝子資源の探索

大 利 徹 (富山県立大学工学部)

三 上 襄 (真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

分子機能研究部門高分子活性分野・三上 襄らにより分離・同定された *Nocardia* 属放線菌は, *Streptomyces* 属細菌には見られない特異的な構造を持つ二次代謝産物を生産する. 中でも, 三上 襄らにより取得されたジテルペン化合物, brasilicardin A は, ジテルペン骨格に芳香環, L-rhamnose とアミノ酸誘導体が付加したユニークな構造を有し, その生理活性も特異であることから医薬のリード化合物として有用である. 従って, その生合成遺伝子を取得・改変する事により新規な関連化合物の生産を誘導することは大変興味深い. そこでこれまでに, brasilicardin A 生産菌である *Nocardia brasiliensis* IFM 0406 株から, ジテルペン化合物の共通出発原料であるゲラニルゲラニル 2 リン酸を生成する酵素 (イソペンテニル 2 リン酸を 4 つ縮合し, 炭素数 20 の直鎖状前駆体を生成する) 遺伝子を取得し, その周辺領域を探索することにより, 以下の brasilicardin A 生合成遺伝子クラスターと推定される DNA 断片を取得している.



今回, この中の isoprenoid cyclase 遺伝子を破壊することにより, これら遺伝子群が実際に brasilicardin A の生産に関与することの証明を試みた. 通常, 放線菌の形質転換はプロトプラスト・PEG 法で行われるが, *Nocardia brasiliensis* IFM 0406 株はプロトプラスト化が困難なため接合による遺伝子導入と相同組換えによる遺伝子破壊を行った. 上図の DNA 断片中, isoprenoid cyclase 遺伝子のみを thiostrepton 耐性遺伝子で置換したのち接合ベクターに導入した. 接合後 thiostrepton 耐性株を取得し PCR で確認した結果, 何れの耐性株も予想通り isoprenoid cyclase 遺伝子のみが thiostrepton 耐性遺伝子と置換されていた. そこでこれらの破壊株を培養した結果, brasilicardin A の生産性は消失していたことから上記 isoprenoid cyclase 遺伝子が brasilicardin A の生産に関与することを証明できた.

研究発表

原著論文

- 1) Hayashi Y, Matsuura N, Toshima H, Itoh N, Ishikawa J, Mikami Y and Dairi T: Cloning of the gene cluster responsible for the biosynthesis of brasilicardin A, a unique diterpenoid. *J Antibiot* 61: 164-174, 2008.

高度病原真菌 *Coccidioides* 属のトポイソメラーゼ遺伝子 (*TOP2*) による同定法の研究

安 藤 昭 一 (千葉大学大学院自然科学研究科)
雨 宮 良 幹 (千葉大学園芸学部)
斉 藤 明 広 (千葉大学園芸学部)
三 上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)
矢 沢 勝 清 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

わが国では輸入真菌症が問題となっており, その中でも最も重要な感染症としてコクシジオイデス症がある. 原因菌である *Coccidioides immitis* と *C. posadasii* は危険度レベルが3にランクされる病原菌であり, 2菌種とも形態的な特徴はなく早期の同定が困難で, また検査室等での取り扱いが危険であることから遺伝子レベルで迅速な同定法の開発が望まれる. 本研究では機能遺伝子の *TOP2* 及び *TRF4* に着目し, 原因菌の菌種を簡易的で迅速に同定法する方法を開発した.

その結果, *TOP2* 遺伝子では, *C. posadasii* は開発したプライマーでは, 700 bp を, また *C. immitis* では 400 bp

に増幅バンドが観察され, *TRF4* 遺伝子では, 500 bp と 250 bp にバンドが観察された. このプライマーセットを混ぜプライマーミックスとして使用し, PCR 上で他菌種と *Coccidioides* 属を分類するだけでなく, *Coccidioides* 属の2種を同定することが可能となった.

さらに今年度は, 新たに *C. immitis* の ITS 領域の塩基配列を使った DNA チップを作製することができた. この DNA チップは他の4種の高度病原真菌とは反応せず, 区別も可能であったが, *C. immitis* と *C. posadasii* との区別は不可能であった. 本 DNA チップは, 肉眼的にも検出が可能でありその応用研究を進めている (共同研究者: 伊藤淳二, 亀井克彦, 佐野文子).

カンジダ酵母の遺伝子の組換え技術に基づく機能解析

長 環 (福岡歯科大学)
豊田美香 (福岡歯科大学)
中山浩伸 (国立鈴鹿工業高等専門学校)
青山俊弘 (国立鈴鹿工業高等専門学校)
水野貴之 (徳島文理大学)
宮川洋三 (山梨大学工学部)
小笠原綾子 (東北薬科大学)
知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)
三上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

Candida glabrata は、好氣的条件でエルゴステロールを合成している場合は外からステロールを取り込まないという教科書的な知識に反し、培地に加えた血清中のステロールを細胞内に輸送し、さらにアゾール剤耐性を示した。我々は変異体解析の結果、このステロール輸送を ABC トランスポーター *CgAUS1* が担うことを明らかにした。また、この遺伝子の破壊株では、血清によるアゾール剤耐性が起こらなくなることも明らかできた。さらに、血清添加で ABC トランスポーター *CgAUS1* の発現が誘導されることから、本真菌の感染機構と何らかの関わりがある事が示唆された。そこで、*CgAUS1* の発現を制御する転写因子を同定するために、出芽酵母から知見を参考にゲノム情報を用いて候補遺伝子を選定し、それらの破壊株を作成し、それらの中から、フルコナゾールによるエルゴステロール合成阻害が血清の添加によって回避さない株を同定することで、絞り込みを行った。結果、Zn-finger モチーフをもつ転写因子 (CAGL0F07865g) が候補として見つかった。さらに、ドキシサイクリンを添加することによってステロール要求性になる条件変異株 (tet-ERG9) でこの遺伝子を破壊したところ、血清添加培地中でドキシサイクリン感受性となり、CAGL0F07865g が *CgAUS1* の発現制御を行う因子であることが、強く示唆された。

研究発表

原著論文

- 1) Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, Aoyama T, Kumaraswami N, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M: The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *J Antimicrob Chemother* 60: 1264-72, 2007.
- 2) Cho T, Aoyama T, Toyoda M, Nakayama H, Chibana H, Kaminishi H: Transcriptional changes in *Candida albicans* genes by both farnesol and high cell density at an early stage of morphogenesis in N-acetyl-D-glucosamine medium. *Jpn J Med Mycol* 48: 159-167, 2007.
- 3) Ueno K, Uno J, Nakayama H, Sasamoto K, Mikami Y, Chibana H: Development of a highly efficient gene targeting system induced by transient repression of *YKU80* expression in *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 6: 1239-47, 2007.

総説

- 1) 長 環, 青山俊弘, 豊田美香, 中山浩伸, 知花博治, 上西秀則, Richard A Calderone: *Candida albicans* の quorum-sensing 分子 farnesol. *Jpn J Med Mycol* 49: 281-286, 2008.

学会発表

- 1) Niimi K, Maki K, Hatakenaka K, Niimi M, Nakayama

- H, Chibana H, Monk BC, Cannon RD: Clinically significant micafungin resistance in *Candida glabrata* requires mutations in both FKS1 and FKS2. 9th Candida and Candidosis, New Jersey USA, March 24-28, 2008.
- 2) Nakayama H, Tanabe K, Okano M, Aoyama T, Chibana H, Miyazaki Y, Niimi M: Characterization of sterol transporter *AUS1* in *Candida glabrata*. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, p. 126, Awaji, Sep. 7-11, 2008.
- 3) 田辺公一, 名木 稔, 中山浩伸, 山越 智, 臺 由紀, 知花博治, 新見昌一, 宮崎義継: *Candida glabrata* ステロールトランスポーターによるアゾール剤耐性化. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008), 神戸, 12 月 9 ~ 12 日, 2008.
- 4) 知花博治, 宇野 潤, 青山俊弘, 中山浩伸: カンジダ酵母における網羅的発現制御株の構築と応用 - 病原性ゲノム機能学 -. 平成 20 年度特定ゲノム 4 領域・領域横断微生物研究会, 金沢, 11 月 12 ~ 14 日, 2008.
- 5) 中山浩伸, 田辺公一, 青山俊弘, 岡野 誠, 知花博治, 新見昌一: 病原真菌 *Candida glabrata* のステロール輸送機構の解明. 第 5 回真菌分子細胞研究会, 千葉, 8 月 21 ~ 23 日, 2008.
- 6) 青山俊弘, 上野圭吾, 三谷宏樹, 田淵史晃, 中山浩伸, 知花博治: *Candida glabrata* における RNA5' 末端塩基配列の解析. 第 5 回真菌分子細胞研究会, 千葉, 8 月 21 ~ 23 日, 2008.
- 7) 中山浩伸, 田辺公一, 知花博治, 新見昌一: 病原真菌 *Candida glabrata* のステロールトランスポータの発現機序. 第 2 回細菌学若手コロッセウム, 葉山, 8 月 3 ~ 5 日, 2008.
- 8) 知花博治, 上野圭吾, 笹本 要, 木下妻智子, 三谷宏樹, 小暮高久, 加藤直子, 宇野 潤, 青山俊弘, 中山浩伸, 三上 襄: カンジダフェノームプロジェクトにおける網羅的遺伝子組換え株の構築. 日本微生物資源学会第 15 回大会, 千葉, 6 月 30 日 ~ 7 月 2 日, 2008.
- 9) 田辺公一, 中山浩伸, 宮崎義継, 知花博治, 新見昌一: 病原真菌 ABC タンパク質の抗真菌薬耐性との関わり. 第 81 回日本細菌学会総会, ワークシヨッ
プ, 京都, 3 月 24 ~ 26 日, 2008.
- 10) 上野圭吾, 中山浩伸, 三上 襄, 知花博治: *Candida* フェノームプロジェクトによる標的の選定とコンピューターによる抗真菌剤の設計. 第 81 回日本細菌学会総会, 京都, 3 月 24 ~ 26 日, 2008.
- 11) Chibana H, Sasamoto K, Ueno K, Aoyama T, Kinoshita S, Uno J, Nakayama H, Mikami Y: Functional genomics in pathogenic fungi *Candida glabrata* achieved to prioritization of antifungal targets. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, p. 125, Awaji, Sep. 1-5, 2007.
- 12) Nakayama H, Bard M, Tanabe K, Aoyama T, Takemori D, Hodgson W, Wu S, Kumaraswari N, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M: The *Candida glabrata* sterol transporter CgAUS1 protects against azole toxicity in the presence of serum. The 7th Awaji Interational Forum on Infection and Immunitiy, Abstracts p. 126, Awaji, Sep. 1-5, 2007.
- 13) 倉内寿孝, 上野将明, 小笠原綾子, 渡部俊彦, 三上 健, 山口正視, 知花博治, 松本達二: *Candida glabrata* 増殖形態に及ぼす亜硫酸ナトリウムの影響. 第 51 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊 1 号): 93, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.
- 14) 岩田哲郎, 長 環, 西川和範, 青山俊弘, 上野圭吾, 知花博治, 中山浩伸: 病原性酵母 *Candida glabrata* における GDP-mannose pyrophosphorylase 遺伝子の機能解析. 第 30 回日本分子生物学会プログラム p. 781, 横浜, 12 月 11 ~ 15 日, 2007.
- 15) 長 環, 豊田美香, 知花博治, 中山浩伸, 小倉理恵子, 上西秀則: *Candida albicans* の Quorum-sensing 分子に対する初期応答. 第 80 回日本細菌学会総会ワークショップ 6, 発表要旨集 p. 63, 大阪, 3 月 26 ~ 28 日, 2007.
- 16) 中山浩伸, 田辺公一, 新見昌一, 知花博治: 病原性真菌 *Candida glabrata* のステロールトランスポーターを介したアゾール耐性機構. 第 80 回日本細菌学会総会ワークショップ 1, 発表要旨集 p. 52, 大阪, 3 月 26 ~ 28 日, 2007.
- 17) 小山友嗣, 川 良香, 宇野 潤, 知花博治, 三上 襄, 中山浩伸, 飯村 穰, 宮川洋三: 病原性酵母 *Candida* に対する抗真菌剤の標的候補: 必須遺伝子群の分離と同定. 第 51 回日本医真菌学会総会セレ

- クテッドシンポジウム, 真菌誌 48 (増刊1号): 73, 高山, 11月9~10日, 2007.
- 18) 宮川洋三, 宇野 潤, 知花博治, 三上 襄, 中山浩伸: 病原性酵母 *Candida* 抗真菌剤の標的候補, 必須遺伝子群の分子生物学的解析. 第80回日本細菌学会総会, 発表要旨集 p.190, 大阪, 3月26~28日, 2007.
- 19) 中山浩伸, 岩田哲郎, 長 環, 青山俊弘, 上野圭吾, 知花博治: 病原性酵母 *Candida glabrata* における GDP-mannose pyrophosphorylase 遺伝子の解析. 第4回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p.11, 千葉, 8月26~27日, 2007.
- 20) 青山俊弘, 中山浩伸, 知花博治: *Candida glabrata* データベース. 第4回真菌分子細胞研究会, 要旨集 p.24, 千葉, 8月26~27日, 2007.
- 21) 中山浩伸, 田辺公一, 知花博治, 青山俊弘, 新見昌一: *Candida glabrata* ステロールトランスポーター *AUS1* の機能発現. 第51回日本医真菌学会総会, 真菌誌 48 (増刊1号): 65, 高山, 11月9~10日, 2007.

研究課題 '07-22

Trichophyton tonsurans の分子疫学的研究

- 望 月 隆 (金沢医科大学 環境皮膚科学部門, 同 総合医学研究所, 皮膚真菌学部門 (ノバルティス ファーマ))
- 河 崎 昌 子 (金沢医科大学 環境皮膚科学部門, 同 総合医学研究所, 皮膚真菌学部門 (ノバルティス ファーマ))
- 藤 田 純 (金沢医科大学 環境皮膚科学部門)
- 亀 井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)
- 高 橋 容 子 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)
- 佐 野 文 子 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

研究成果

核 ribosomal RNA 遺伝子の NTS 領域の分子多型の検討により, 多くの真菌において種内変異の検出が試みられている. 近年格闘技競技者の間で集団感染の out break が知られている好人性皮膚糸状菌 *Trichophyton tonsurans* においても, 先に我々は NTS I 型から VI 型の 6 型が認められ, 格闘技競技者からの分離株については, このうち NTS I, II, III 型のみが認められることを報告した (Mochizuki T, et al, Jpn J Infect Dis 60: 188-, 2007). 今回は散発例 (診断時, 格闘技との関係が伺い知る事のできなかつた例) における菌の origin を明らかにするため, 散発例分離株を収集し, これら 10 株について分子疫学的検討を行った. 方法は以前の報告 (Mochizuki T, et al, Jpn J Infect Dis 60: 188-, 2007) と同様である. 菌より

抽出した全細胞 DNA を鋳型とし, NTS 領域を PCR で増幅し, これを制限酵素 *Mva* I ならびに *Ava* I で消化したのち電気泳動のパターンを観察して型分けを行った. primer pair は L663 (5'-TTCTAGGCTCCCAACCAC) ならびに R 1145 (5'-ACAAGGGCGGAACATATCAGAC) を用いた. 新しい分子型と思われたものは定法に従って L663-R1145 産物の塩基配列を決定の上, 制限酵素消化後の泳動パターンの予測を試み, 実際のパターンとの比較を行った. その結果, 散発例 10 株は NTS III を除く 5 型, ならびに今回新たに検出された 2 型の合計 7 型に分類されること, このうち NTS IV 型が最も多い事が明らかになった. NTS I 型は, 乳児からの分離株であるが後に母親が柔道の引退選手である事, またこれを契機に母親に NTS I 型の菌による頭部白癬が認められた事より,

格闘技集団から社会への蔓延を証拠づける事例として注目される。現在も格闘技から新たに分離、集積された菌株について分子疫学的検討を継続中であるが、散発例分離株について論文を作成した。

研究発表

原著論文

- 1) Mochizuki T, Kawasaki M, Fujita J, Ushigami T, Takeda K, Sano A, Takahashi Y, Kamei K: Epidemiology of sporadic (non-epidemic) cases of *Trichophyton tonsurans* infection in Japan based on RFLP analysis of non-transcribed spacer region of ribosomal RNA gene. Jpn J Infect Dis, 2009 (in press).

研究課題 '07-23

真菌から得られる新規生理活性化合物の探索

河合賢一 (星薬科大学薬学部, 薬化学教室)

野沢幸平 (奥羽大学薬学部, 薬化学分野)

細江智夫 (星薬科大学薬学部, 薬化学教室)

板橋武史 (星薬科大学薬学部, 薬化学教室)

矢口貴志 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)

研究成果

新たに分離した菌株の培養エキスを使用して生物活性試験法を併用ながら TLC, HPLC 等で成分の検索を行い、活性成分を含めた新規化合物の単離を行なった。化合物の構造については、NMR をはじめとする種々のスペクトルデータの解析、化学反応および X 線結晶解析等を併用して決定した。得られた新規化合物について毒性試験をはじめとする各種活性試験を実施し、医薬品のリード化合物としての可能性の検討を行う予定である。本年、*Eupenicillium javanicum* IFM 54704 株から単離された新規物質の構造を確定し、抗真菌活性、構造活性相関の検討を行なった。

研究発表

原著論文

- 1) Nakadate S, Nozawa K, Horie H, Fujii Y, Nagai M, Tomoo Hosoe T, Kawai K, Takashi, Yaguchi T, Fukushima K: Eujavanicols A-C, decalin derivatives from *Eupenicillium javanicum*. J Nat Prod 70: 1510-1512, 2007.

学会発表

- 1) 中楯 奨, 野沢幸平, 堀江 均, 藤井祐一, 佐藤博泰, 細江智夫, 河合賢一, 矢口貴志, 福島和貴: *Eupenicillium javanicum* の産生する新規抗真菌環状デプシペプチド. 第 127 回日本薬学会, 講演要旨集 4: 109, 富山, 3月 28 ~ 30 日, 2007.

DNA マイクロアレイ技術を用いた病原真菌検出技術の確立

岡 千 寿 (千葉県産業支援技術研究所)

五ノ井 透 (千葉大学真菌医学研究センター, 系統・化学分野)

研究成果

病原真菌検出用マイクロアレイのモデル系として *Candida* 属の系統分類を目的としたマイクロアレイ・チップを試作し, 真菌センターの保有菌株を用いて *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* の5菌種について検討した。

C. albicans IFM 40107, *C. glabrata* IFM 5768, *C. krusei* IFM 5462, *C. parapsilosis* IFM 5774, *C. tropicalis* IFM 5446 のゲノム DNA を調製し, これらを試料として ITS 領域を PCR によって蛍光ラベル化した。これらの蛍光ラベル化 DNA をそれぞれの菌種に対応する ITS 領域のオリゴ・プローブ¹⁾を搭載した菌種判別アレイにハイブリダイズさせ, 蛍光を検出することにより, 上記の *Candida* 属の5菌種の判別が試作したマイクロアレイ・チップで可能であることを確認した。さらに, 真菌センターとの共同研究成果である DNA マイクロアレイ・チップの再利用技術 (特願 2006-120641 「プローブポリヌクレオチド固定化担体の再生方法」) についても実験を行い, この菌種判別アレイにおいては, 1枚のアレイスライドで5回以上の再利用が可能であることを明らかにした。なお, DNA マイクロアレイの試作において, アレイ・スポットターを, また, 蛍光の検出においては, マイクロアレイ・スキャナー等の真菌センターの機器を使用した。

これらの実験結果を踏まえて, 現在, 対象となる菌株

を広げて実験を行っている。さらに, アゾール系の抗真菌剤に対する耐性機構の1つとして報告されている *C. albicans* の *ERG11* 遺伝子の SNP 検出についても実験を行い, 試作した DNA マイクロアレイの有用性について検討する予定である。

研究発表

学会発表

- 1) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄: DNA マイクロアレイ関連技術の開発。千葉県産業支援技術研究所 研究成果発表会, 千葉市, 8月7日, 2007.
- 2) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄: DNA マイクロアレイ関連技術の開発 (第2報)。千葉県産業支援技術研究所 研究報告 No.5: 10-13, 2007.
- 3) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄: DNA マイクロアレイ関連技術の開発。平成19年度ライフサイエンス分野融合会議・ライフサイエンス部会バイオテクノロジー分科会 成果・事例発表会, つくば市, 2月1日, 2008.
- 4) 岡 千寿, 前田 浩, 五ノ井 透, 三上 襄: DNA マイクロアレイ関連技術の開発。平成19年度ライフサイエンス分野融合会議・ライフサイエンス部会バイオテクノロジー分科会合同研究発表会, つくば市, 1月31日, 2008.

真菌症原因菌に対するカテキン誘導体の影響評価

玄 丞 休 (京都大学再生医科学研究所)
高 鳥 浩 介 (国立医薬品食品衛生研究所)
田 口 英 昭 (千葉大学真菌医学研究センター, 生態分野)
亀 井 克 彦 (千葉大学真菌医学研究センター, 真菌感染分野)

EGCg (Epigallocatechin 3-O-gallate) の細胞膜親和性と安定性を高める目的で合成された誘導体を用いて, 皮膚糸状菌である *Trichophyton mentagrophytes* 6 株, *Trichophyton rubrum* 6 株, *Microsporum canis* 6 株に対する抗真菌効果を検討した.

得られた MIC 値を比較したところ, いずれの菌株でも *M. canis* および *T. mentagrophytes* に対する抗真菌効果

は EGCg と同程度であり将来的な臨床応用の可能性を認めた. *T. rubrum* に対しては他の 2 菌種と比較し効果を示唆するものではなかった. 今後は EGCg と現在上市されている全身投与可能な抗真菌剤との併用効果について評価し, EGCg によるカンジダ症に対する新たな治療法の可能性について検討する.

カイコ幼虫の感染モデルを用いた *Cryptococcus neoformans* の病原性遺伝子の同定

関 水 和 久 (東京大学大学院薬学系研究科)
伊 藤 貴 浩 (東京大学大学院薬学系研究科)
川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)
清 水 公 徳 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

関水らの研究グループは, 「カイコ幼虫による感染モデル」が, 黄色ブドウ球菌, レンサ球菌など細菌類に対する病原性解析モデルとして適用できることを既に報告している (Mol Microbiol 56: 934-944, 2005 など). 本研究では, まず, 野生型 *Cryptococcus neoformans* がカイコ幼虫を殺傷することを明らかにし, 病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* のカイコ幼虫を用いた病原性検定法を確立しつつある. 細菌類と同様に真菌類についてもそれが可能であるという知見を得ており, 従来のマウス等の代替実験生物として,

カイコ幼虫を真菌の病原性解析のための感染モデル生物として用い, 「カイコ幼虫による真菌感染モデル」を真菌の新しい病原性解析法として開発しつつある.

本研究の目的は, 病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* のカイコ幼虫を用いた病原性検定法を確立するとともに, 本菌の病原性遺伝子を同定する点にある. 病原性遺伝子の網羅的解析により, この菌の病原性発現機構を分子レベルで明らかにできるであろう. また, 同定された遺伝子の産物は, 抗真菌治療薬の標的となり得ることが期待される.

病原性 *Cryptococcus neoformans* サイクリン依存性 キナーゼの構造機能相関

田 村 裕 (千葉大学大学院医学研究院生命情報学)
川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

病原真菌 *Cryptococcus neoformans* の細胞周期を制御している中心分子, サイクリン依存性キナーゼ Cdk1 の, 制御因子サイクリンとの結合部位 PSTAIRE モチーフは, 他の生物種に於いて極めて高い保存性を示しているにも関わらず, 本菌では例外的に PSTSIRE に変異している. そこで, この変異による細胞周期制御の分子機構の特徴を, タンパク質立体構造の観点から理論的, 実験的に解明, 検証することを目的とする. 構造生物学的, バイオインフォマティクスによる理論的解析と生化学的, 分子生物学的実験による解析, 検証とを行って, 検討を進めた.

本年度は, 病原真菌 *Cryptococcus neoformans* の Cdk1 と G1 サイクリンである CnCl₁ ならび G2/M サイクリンである CnCl₂ の立体構造をバイオインフォマティクス

を活用することにより構築した. 続いて, Cdk/CnCl₁ ならび Cdk/CnCl₂ の結合構造に関する計算化学的実験を行い, それらの予想結合構造を構築すると共にその際の予想結合力を算出した.

今後は, 本菌より分子クローニングした各遺伝子の発現ベクターを用いてタンパク質の発現と, 分子間相互作用解析装置等を用いた解析と検証を行う.

研究発表

学会発表

- 1) 川本 進, E. Virtudazo, 大楠美佐子, 竹尾漢治, 田村 裕, Z. Moranova, V. Raclavsky: 病原酵母クリプトコックスの細胞周期制御の分子的理解に向けて. 第2回真菌ワーブ研究会, 千葉, 8月21日, 2008.

Candida albicans 不飽和化酵素遺伝子破壊株の形態学的解析

村 山 琮 明 (北里大学大学院感染制御科学府 & 北里生命科学研究所)
山 口 正 視 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)
川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

30°C 培養の対数増殖期において, CaFAD2, CaFAD3破壊株及び復帰株の増殖速度, および透過型電子顕微鏡による観察を行った. どちらの温度においても, 増殖速度, 透過型電子顕微鏡による観察で, 破壊株と復帰株の間で

差異は認められなかった. しかし, トランスクリプトーム解析をし, real-time PCR でその発現を確認したところ, ギ酸脱水素酵素, カタラーゼ, 菌糸形成に関わる転写因子 EFG1 などの遺伝子の発現が低下していた. 発現の変化のあった遺伝子をみると, 細胞内オルガネラで行

われる種々の代謝系に本遺伝子の破壊が関わっていることが推測された。

研究発表

学会発表

- 1) 村山琮明, 山口正視, 川本 進, 新見昌一, 梶原 将: *Candida albicans* 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (CaFADs) 破壊株の表現型とトランスクリプトー

ム解析. 第 51 回日本医真菌学会総会, 高山, 11 月 9 ~ 10 日, 2007.

- 2) 村山琮明, 山口正視, 生方公子: *Candida albicans* 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 CaFAD2 及び CaFAD3 破壊株の遺伝子発現の比較と表現型観察. 第 81 回日本細菌学会総会, 京都, 3 月 24 ~ 26 日, 2008.

研究課題 '07-29

Candida albicans バイオフィーム特異遺伝子破壊株の微細構造

杉 田 隆 (明治薬科大学微生物学教室)
山 口 正 視 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)
川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

バイオフィームは菌体と菌体外分泌多糖から構成される膜であり, 薬剤耐性化をもたらす. *Candida albicans* のバイオフィーム (BF) 特異遺伝子を見出すために, BF と planktonic (PK) 状態での遺伝子発現を, サブトラクション法および DNA マイクロアレイを用いて解析し

た. 見出された BF 関連遺伝子を破壊したところ, 破壊株の BF 形成能は PK に比べて有意に低下した. バイオフィーム形成過程を電子顕微鏡を用いて比較観察したが遺伝子破壊株の微細構造に大きな変化は認められなかった.

研究課題 '07-30

亜硝酸塩を代謝する真菌の超微細構造

高 谷 直 樹 (筑波大学生命環境科学研究科)
山 口 正 視 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)
川 本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

Aspergillus 属などの真菌は, 生育のための窒素源として硝酸塩や亜硝酸塩を利用可能である. また, 嫌気条件下では, これらをアンモニアへと還元する. そこで, 本研究では, *A. nidulans* をモデルとして真菌の多様な亜硝

酸塩代謝・応答に焦点を当て, その機構解明を目指している. *A. nidulans* の亜硝酸耐性を付与する遺伝子として, ポルホピリノーゲンデアミナーゼ (PBG-D) をコードする *ANO121* を単離した. 本遺伝子を増強させた形質転換体 (PD1 株) の細胞抽出液中の亜硝酸塩還元酵素

(Nir) 活性も約 7 倍上昇していた。PD1 株では、野生型株で見られる亜硝酸塩による菌糸の形態異常や分生子の発芽阻害を示さなかった。また、透過型電子顕微鏡を用いて、この時の細胞内超微細構造を観察したところ、野生株が異常な細胞内構造を示すのに対して、PD1 株のそれは正常であることが明らかとなった。現在のところ、PBG-D と Nir の関係の詳細は不明であるが、PBG-D は

ヘム生合成経路に含まれる酵素であり、Nir はシロヘムを構造内に有していることから、*AN0121* の発現が上昇することにより PBG-D 活性が上昇しシロヘムの生成量が増える可能性が考えられる。また、*A. nidulans* は、高濃度の亜硝酸塩に曝露されたとき、Nir の働きによって亜硝酸塩を消費し、亜硝酸に耐性化すると予想される。

研究課題 '07-31

Candida glabrata の増殖形態変化調節機構の解析

松本 達二 (東北薬科大学, 微生物学教室)
三上 健 (東北薬科大学, 微生物学教室)
渡部 俊彦 (東北薬科大学, 微生物学教室)
小笠原 綾子 (東北薬科大学, 微生物学教室)
山口 正視 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)
知花 博治 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)
川本 進 (千葉大学真菌医学研究センター, 機能形態分野)

研究成果

我々は、*C. glabrata* を亜硫酸ナトリウム存在下で培養すると、菌が肥大化する現象を見出した。この菌体の肥大化は、増殖速度の低下と細胞壁強度の低下を引き起こす可能性があり、これまで知られている抗真菌剤の作用とは異なる機構で菌に障害を与えている可能性が示唆された。本研究では、*C. glabrata* の肥大化現象の発生要因の解析を行った。その結果、亜硫酸ナトリウム処理された *C. glabrata* の増殖能は著しく低下し、肥大化した菌体では、その細胞強度も低下していた。肥大化した菌体の構造を、透過型電子顕微鏡で解析したところ、液胞の肥大と、細胞壁構造の崩壊が確認された。これらの結果

から、亜硫酸ナトリウム処理による *C. glabrata* の肥大化は、細胞内圧の上昇と細胞壁強度の低下が要因であると推察された。

研究発表

学会発表

- 1) 渡部俊彦, 上野将明, 小笠原綾子, 三上 健, 山口正視, 知花博治, 松本達二: *Candida glabrata* の亜硫酸ナトリウム処理による細胞壁崩壊現象の解析. 第 82 回日本細菌学会, 名古屋, 3 月 12 日~ 14 日, 2009.

臨床材料より分離した放線菌の二次代謝産物に関する研究

原 田 健 一 (名城大学薬学部)

石 川 勉 (千葉大学大学院薬学研究院)

三 上 襄 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

矢 沢 勝 清 (千葉大学真菌医学研究センター, 高分子活性分野)

研究成果

病原性放線菌 IFM 0757 株は、分類学的な研究から、本邦では希なノカルジア症の起原因菌である *Nocardia pseudobrasiliensis* と同定された。本菌株の培養液は、*Mycobacterium smegmatis* などのグラム陽性菌に対して活性を示す物質を生産することが明らかになったことから、培養液を菌体と口液に分け、Diaion HP-20 にて吸着し、MeOH で溶出し、AcOEt で抽出した。活性成分をシリカゲルカラムにより精製して、さらに液クロやゲルろ過での精製をくり返すことにより 3 L の培養液から 3.9 mg の活性成分を得た。

本化合物は、その詳細な解析から thiopeptide 系の新規化合物で分子量 1160 で、加水分解よりスレオニンとサイアゾール環を含むパリンは、L-体であることも明らかになった。

本化合物は、抗酸性の病原性細菌である *Gordonia bronchialis* や *Corynebacterium xerosis*, さらにある種の *Nocardia* 等に極めて強い活性を示すことが明らかになり、その後の研究から rifampicin 耐性の *Mycobacterium tuberculosis* に対しても強い活性があることが確認された。

本化合物の構造と活性については、現在論文を作成中である (共同研究者: 向井 啓)。

2007年度 共同利用研究報告書 研究成果集計累計

発表年	2007年	2008年	2009年
原著論文	14	6	4
学会発表	27	17	1
総説	0	1	0

平成 20 年度 共同利用研究会報告

1. 第 2 回小動物真菌症症例検討会

(代表: 池田忠生 - 日本大学医学部, 世話人: 亀井克彦 (佐野文子))

本症例検討会は千葉, 東京, 埼玉, 静岡, 沖縄から獣医師, 動物医療関係者等 18 名により, 平成 20 年 1 月 12 日 (土) 14:30 - 17:00 に開催され, 小動物等の真菌症症例および検査方法 4 題と特別講演 1 題が発表された.

<プログラム>

開会の言葉: 池田忠生 (日本大学医学部)

I. 症例検討

座長: 村田佳輝 (むらた動物病院, 千葉大学真菌医学研究センター)

- 1) 沖縄美ら海水族館で飼育されているイルカの呼気, 飼育スタッフ口腔内および飼育環境より分離された *C. albicans* と *C. tropicalis* の分子疫学的解析: 高橋英雄 (エイランドおゆみの動物病院, 千葉大学真菌医学研究センター)

- 2) 臨床的に簡便な, 皮膚の真菌検査法: 伊東彰仁 (千葉県獣医師会京葉支部)

座長: 高橋英雄 (エイランドおゆみの動物病院, 千葉大学真菌医学研究センター)

- 3) 小動物における消化管穿孔に伴った真菌性腹膜炎の 4 症例の検討: 村田佳輝 (むらた動物病院, 千葉大学真菌医学研究センター)
- 4) 膿性鼻汁を主訴とした犬のアスペルギルス症の一例: 兼島 孝 (みずほ台動物病院・埼玉県, 琉球動物医療センター・沖縄県)

II. 特別講演

座長: 池田忠生 (日本大学医学部)

深在性真菌症の臨床と研究の現状:

亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

閉会の言葉: 兼島 孝 (みずほ台動物病院・埼玉県, 琉球動物医療センター・沖縄県)

2. 第2回アスペルギルス研究会開催（亀井）

わが国のアスペルギルス症研究者を一堂に会して、研究成果を発表し討議する目的で開始されたアスペルギルス会は昨年初めて開催されたが、今年は第2回目として当センターで行われた。Closedで行われた会であるにもかかわらず、飛び入りの参加などがあり、東北地方から九州まで全国から約30名の方々が参加された。

研究テーマはアスペルギルスの細胞としての基礎的な菌学から、アスペルギルス症の最新の診断・治療方法まできわめて多岐にわたっていたが、各方面の研究者が自由に討論しあうというこの会の特色が生かされた形となった。

大変好評であり、2009年はさらに発展された形での開催が予定されている。

日時：2008年7月19日（土）13:00 - 17:00

場所：当センター講堂

代表：倉島篤行（複十字病院呼吸器科）

発表演題は以下のとおりである。

開会の挨拶：複十字病院呼吸器内科 倉島篤行（代表）

- 1) 「*Aspergillus* 属が産生する病原因子としてのエラストラーゼと新規エラストラーゼ阻害因子の基礎的研究」
名城大学薬学部，国立病院機構東名古屋病院呼吸器内科*
○奥村欣由，小川賢二*，打矢恵一，小森由美子
二改俊章
- 2) 「慢性肺アスペルギルス症マウスモデルの開発」
長崎大学第二内科
○高園貴弘，泉川公一，三原 智，西條知見
今村圭文，関 雅文，掛屋 弘，山本喜裕
柳原克紀，河野 茂
- 3) 「病原性 *Aspergillus fumigatus* および関連菌種の多相分類と迅速同定法の検討」
千葉大学真菌医学研究センター
○矢口貴志，松澤哲弘，弘 佑介，田中玲子

- 4) 「病原性糸状菌の鑑別を目的とした新規 PNA プローブの検討」
東邦大学病院病理学講座
○中山晴雄，篠崎 稔，大久保陽一郎，渋谷和俊
- 5) 「アスペルギルス ELISA 抗原検査の臨床的評価」
長崎大学第二内科
○泉川公一，高園貴弘，三原 智，西條知見
今村圭文，関 雅文，掛屋 弘，山本喜裕
柳原克紀，河野 茂
特別発言 国立病院機構東京病院呼吸器内科
○鈴木純子
- 6) 「空洞切開術後に生じたアスペルギルス肺炎の1例」
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター呼吸器外科，同臨床研究センター感染症研究部*
○桂 浩，大瀬尚子，松村晃秀，中村幸生
北原直人，伊藤則正，阪口全宏，鈴木克洋*
追加発表 「肺アスペルギローマに対する空洞切開」
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター呼吸器外科
○井内敬二
- 7) 「膀胱癌に対する BCG 膀胱内注入療法中に発症したアレルギー性気管支肺アスペルギルス (ABPA) の1例」
大阪赤十字病院呼吸器科
○黄 文禧 (ファン ムンヒ)，網谷良一
- 8) 「造血管腫瘍患者のアスペルギルス症対策の臨床試験」
自治医科大学附属さいたま医療センター血液科
○大島久美，神田善伸

閉会の挨拶：千葉大学真菌医学研究センター 亀井克彦

懇親会

第5回真菌分子細胞研究会， 感染現象のマトリックス
第2回真菌ワープ研究会

日時： 8月21日 - 23日

場所： 真菌医学研究センター A棟 B1 講堂

代表者： 国立感染症研究所 新見昌一

世話人： 高分子活性分野 知花博治

真菌分子細胞研究会は、情報交換、共同研究の推進、若手研究者の育成を目的に開催されており、5回目を迎えた今回は30演題の発表があった。今回は特に学部生や大学院生などの若手研究者の発表技術のレベルアップが顕著であり、参加者の投票によって選ばれた3名に優秀発表賞が授与された。

科研費特定領域研究「感染現象のマトリックス」が共催する真菌ワープ研究会とジョイント形式で開催しており、前回に引き続き、領域長 野本明男先生、事務局長 北 潔先生をお招きし、多くのコメントを頂き、活発な意見交換がなされた。最後に野本領域長より感染症研究における基礎研究の重要性が強調されたことを受けて、参加者一同真菌における感染症基礎研究の発展を誓い合いながら閉幕となった。

実行委員として高分子活性分野 大野道代，上野圭吾，島田五月，三谷宏樹，木下妻智子，松浦 学，笹本要，田淵史晃が担当した。

- 1) 三谷宏樹（千葉大学真菌医学研究センター高分子活性）*Candida glabrata* を用いた細胞壁合成遺伝子の網羅的機能解析
- 2) 中川元斗（鈴鹿工業高等専門学校）病原酵母 *Candida glabrata* の GDP-mannose 合成遺伝子の機能解析
- 3) 石橋健一（東京薬科大学薬学部免疫学教室）真菌細胞壁 β -グルカンに対するモノクローナル抗体の結合性と活性
- 4) 上野圭吾（千葉大学真菌医学研究センター高分子活性）コンピューターシミュレーションによるペプチド性リード化合物の設計
- 5) 吉見 啓（東北大学未来科学技術共同研究センター）糸状菌ゲノム情報を利用した抗真菌剤創薬標的解析システムの構築
- 6) 青山俊弘（鈴鹿工業高等専門学校）*Candida glabrata*

における RNA5' 末端塩基配列の解析

- 7) 永尾潤一（福岡歯科大学機能生物化学講座感染生物学分野）*Candida albicans* のクオラムセンシングを介した病原性発現における新規ストレス応答遺伝子 MSI3 の機能解析
- 8) 田淵史晃（千葉大学真菌医学研究センター高分子活性）クオラムセンシングに関する遺伝子の網羅的解析～*Candida glabrata* をモデルとして～
- 9) 松澤哲宏（千葉大学真菌医学研究センター系統・化学）*Emericella* 属の多相分類と新種について
- 10) 弘 佑介（千葉大学真菌医学研究センター系統・化学）耐熱性 *Talaromyces* 属および関連菌の系統分類と検出法の検討
- 11) 上野将明（東北薬科大学微生物学教室）赤色酵母 *Rhodotorula rubra* の培養温度の変化における栄養要求性の違いについて
- 12) 山口正視（千葉大学真菌医学研究センター機能形態）凍結置換電顕法による酵母細胞のストラクチャー解析
- 13) 田辺公一（国立感染症研究所生物活性物質部）病原真菌ステロールトランスポーターの出芽酵母での発現解析
- 14) 中山浩伸（鈴鹿工業高等専門学校）病原真菌 *Candida glabrata* のステロール輸送機構の解明
- 15) 岡野 誠（鈴鹿工業高等専門学校）*Candida glabrata* のステロールとランスポータ AUS1 を制御する転写因子の検索
- 16) 名木 稔（国立感染症研究所生物活性物質部）血清添加による *Candida albicans* のアゾール剤非感受性化メカニズムの解明
(第2回真菌ワープ研究会)
- 17) 川本 進（千葉大学真菌医学研究センター機能形態）病原酵母クリプトコックスの細胞周期制御の分子的理解に向けて
- 18) 三上 健（東北薬科大学微生物学教室）*Candida albicans* 増殖形態の呼吸経路による制御
- 19) 五ノ井 透（千葉大学真菌医学研究センター系統・化学）病原性放線菌の国内同定システムの確立と運用
- 20) 水野貴之（徳島文理大学工学部）*C. glabrata* の鶏常在化システムの構築と予防医学，スクリーニングへの応用

- 21) 荒川明子 (京都大学皮膚科) *Candida* への免疫反応 – 慢性粘膜カンジダ症患者の解析から –
- 22) 安達禎之 (東京薬科大学薬学部免疫学教室) 真菌 β -グルカンに対する免疫認識分子の反応特異性
- 23) 川上和義 (東北大学大学院医学系研究科) クリプトコックス感染における Th1-Th2 バランスと TLR 及び C-type lectin receptor による制御機構
- 24) 長 環 (福岡歯科大学歯学部感染生物学) 病原真菌におけるクオラムセンシング機構センサーの探索
- 25) 梶原 将 (東京工業大学大学院生命理工学研究科) 脂質分子が関与する *Candida albicans* の病原性発現機構
- 26) 新見昌一 (国立感染症研究所) *Candida glabrata* を用いた抗真菌薬の標的の選出 – 真菌のステロール恒常性のメカニズムの解明からのアプローチ –
- 27) 山田 剛 (帝京大学医真菌研究センター) 白癬菌へのテトラサイクリン系抗生物質による遺伝子発現制御システムの導入
- 28) 阿部敬悦 (東北大学未来科学技術共同研究センター) *Aspergillus* 属糸状菌ゲノム情報を活用した感染関連因子の探索
- 29) 知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性) *Candida glabrata* フェノームプロジェクト 第2章 標的の探索から抗真菌薬の創出へ
- 30) 田村 裕 (千葉大学大学院医学研究院生命情報科学) *in silico* 分子進化法による抗真菌薬の創製

ベストプレゼンテーション賞

学生の部

- 三谷 宏樹 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野)
 上野 圭吾 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野)
 松澤 哲宏 (千葉大学真菌医学研究センター系統・化学分野)

ポスドク・教員の部

- 永尾 潤一 (福岡歯科大学機能生物化学講座感染生物学分野)
 山口 正視 (千葉大学真菌医学研究センター機能形態分野)
 中山 浩伸 (鈴鹿工業高等専門学校応用生物化学)

特別招待者

- 東江 昭夫 (東京都臨床医学総合研究所)
 野本 明男 (東京大学大学院医学系研究科微生物学教室)
 北 潔 (東京大学大学院医学系研究科生物医化学教室)

参加者

- 横山 耕治 (千葉大学真菌医学研究センター真菌資源分野)
 矢口 貴志 (千葉大学真菌医学研究センター系統・化学分野)
 宇野 潤 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野)
 豊留 孝仁 (千葉大学真菌医学研究センター真菌感染分野)
 大野 道代 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野)
 松浦 学 (千葉大学真菌医学研究センター高分子活性分野)
 芝崎あずさ (千葉大学真菌医学研究センター系統・化学分野)
 迫 あゆみ (千葉大学大学院 自然科学研究科)
 仙石祐美子 (千葉大学大学院 自然科学研究科)

第 22 回千葉大学真菌医学研究センター講習会

担当: 宇野 潤

病原真菌講習会は、病原真菌・放線菌の基本的取り扱いの知識と技術を習得するために、本センターが実習を中心にして実施している講習会で、年 1 回定員 12 名で開催している。本年度は第 22 回目で、累積受講生は 280 名余になる。本年も定員の 3 倍を超える応募があり、講習は好評の内に終了した。

期日: 平成 20 年 7 月 8 日 (火) ~ 7 月 11 日 (金)

会場: 千葉大学真菌医学研究センター講習会室

内容 (実習・講義): 病原性酵母 病原性アスペルギルス 皮膚科領域真菌症原因菌 輸入および新興病原真菌 病原性接合菌 病原性放線菌 薬剤感受性試験法 菌株保存法

職種内訳: 臨床検査関係 (病院・企業)	6 名
教育関係	3 名
行政関係	1 名
バイオ関連企業 (検査を除く)	2 名

地域別受講者: 関東 (東京を除く)	2 名
東京	6 名
中部	1 名
近畿	1 名
四国	1 名
九州・沖縄	1 名

プログラム:

(講師: 亀井克彦, 山口正視, 矢口貴志, 渡辺 哲, 鎗田響子, 田口英昭, 田中玲子, 西村和子, 三上 襄, 矢沢勝清, 横山耕治, 伊藤純子, 川本 進)

7 月 8 日 (火)	オリエンテーション (宇野) 真菌感染症概論 (亀井) 真菌細胞概論 (山口) 基本手技 (矢口) 臨床材料の取り扱い (渡辺) 薬剤感受性試験法 (渡辺・鎗田) β -グルカンによる診断 (田口)
7 月 9 日 (水)	主な病原性酵母 (田中) 主な病原性糸状菌 (矢口)
7 月 10 日 (木)	皮膚科領域真菌症原因菌 (西村) 病原性放線菌 (三上・矢沢) DNA アレイによる病原真菌の同定 (三上)
7 月 11 日 (金)	輸入真菌症と新興真菌症原因菌 (横山) 菌株保存法 (横山・伊藤) 法律から見た真菌取扱い (川本) 真菌のバイオハザード (亀井)

第4回千葉大学真菌医学研究センター外国人講習会

担当: 横山 耕治

外国人講習会は4回目となり、タイ国から2名、中国から3名の参加者と中国の2名の見学者を迎えて、病原真菌の同定と取り扱いについての講義と実習が行われた。

期間: 2008年7月15日(火)～18日(金)

場所: 千葉大学真菌医学研究センター 講習会室

参加者:

タイ国

Thanpitcha Thongin (National Institute of Health)

Sujitra Manakul (Suratthani Regional Hospital)

中国

Jiang Yan-Ping (Peking University First Hospital)

Chen Yan (The First affiliated Hospital of Xinjiang Medical University)

Zhang Yun-feng (Normaan Bethune Medical School Jilin University)

5名

見学者:

中国

Juhaer Mijiti (The People Hospital of Xinjiang)

Zhu Jian (The affiliate hospital of Gui Yang Medical College)

2名

プログラム:

(講師: 三上 襄, 矢口貴志, 亀井克彦, 田中玲子, 横山 耕治, 西村和子, 山口正視, 矢沢勝清, 五ノ井 透, 川本 進, Natteewan Poonwan)

7月15日(火) Introduction of this work shop: Dr. Mikami
Lecture: Basic mycology (Dr. Yaguchi)
Lecture: Laboratory diagnosis (Dr. Kamei)

Practice: Laboratory techniques (Dr. Yaguchi)

Practice: Lecture and observation of *Aspergillus* and related fungi (Dr. Yaguchi)

7月16日(水) Practice: Observation of pathogenic yeasts (Dr. Tanaka)

Lecture: Dermatophytes and dematiaceous fungi (Dr. Nishimura)

Practice: Dermatophytes and dematiaceous fungi (Dr. Nishimura)

Lecture & Practice: Emerging fungal pathogens (Dr. Yaguchi)

7月17日(木) Practice 1: Electron microscopic observation (Dr. Yamaguchi)

Practice 2: Scanning electron microscopic observation (Dr. Yaguchi)

Lecture and Practice: *Nocardia* identification by physiological and chemotaxonomic methods

(Dr. Poonwan N, Dr. Gono, Dr. Yazawa and Ms. Kang)

7月18日(金) Lecture & practice: Molecular identification of pathogenic fungi (Dr. Yokoyama)

Lecture: Proteomic analysis and new techniques in molecular medical mycology (Dr. Kawamoto)

Lecture and practice: Application of microarray for the identification of pathogenic fungi

(Ms. Shiboswawa, Ms. Ohkusu, and Dr. Gono, Dr. Mikami)

Closing ceremony with Tea party:

With Drs. Nishimura, Mikami, Poonwan, Kamei, Kawamoto, Gono, Yamaguchi, Yokoyama, Yaguchi and Tanaka

Visit the Central Clinical Laboratory in Chiba University Hospital

第4回千葉大学真菌医学研究センター公開市民講座開催

2008年5月18日(日)、西千葉キャンパスけやき会館にて第4回目となる真菌医学研究センター主催の公開市民講座を開催した。参加者は約230名を数え、会場から寄せられた多くの質問から、カビに対する一般市民の関心の高さがうかがえた。

テーマ:「カビ!? ～そろそろ気になりますね～ Part 3」

演題:カエルツボカビってどんな生き物?

宇根有美

(麻布大学獣医学部病理学研究室准教授)

皮膚につくカビ-真菌とスキントラブル

松丸薫巳

(持田ヘルスケア株式会社学術マネージャー)

カビってクスリの材料に?

三上 襄

(千葉大学真菌医学研究センター長)

講演内容:

湿度の高い季節がある我が国ではカビは非常に身近な存在である。食物に生えたり家の中に入り込んできたりするカビは嫌われているが、一方でカビの力を利用して作られる酒、味噌、醤油などの発酵食品は我が国の食生活になくはないものとなっている。さらに植物、動物が土に還っていくプロセスを考えれば地球環境にカビの存在は必要欠くべからざるものである。このように、ヒトの生活にとって、カビは良い面と悪い面とがあることは良く知られている。本講座では、まず、麻布大学、宇根准教授が、世界的規模の両生類の絶滅、減少に関係する新興病原体とされ、最近、日本でも演者自身らがそれによるカエルの大量死を初めて発見、報告した、カエルツボカビについて、その経緯などを講演した。次に、持田ヘルスケア株式会社、松丸学術マネージャーが、水虫、たむし、フケ症など、ヒトのスキントラブルの原因となっている、真菌による皮膚疾患や、それらをどう防いだらよいかなどについて紹介し、更に、三上真菌医学研究センター長は、カビがクスリの材料としてどのように役立っているかなどについて、本研究センターの研究成果なども交えて解説した。

講演会（第114回～第118回）

- 第114回 1月28日
場所：センター講堂
原 清一博士（キッコーマン株式会社）
麹菌の低水分環境への適応現象
（担当：三上 襄）
- 第115回 2月28日
場所：センター講堂
Maria Luiza Morettii 教授（ブラジル・カン
ピーナス大学医学部）
Candidemia and Candidiasis
（担当：三上 襄）
- 第116回 3月10日
場所：センター講堂
関水 和久教授（東京大学大学院薬学系研究科
微生物薬品化学）
カイコ幼虫の真菌感染モデルを用いた病原性
遺伝子の探索
（担当：川本 進）
- 第117回 10月28日
場所：センター講堂
Gyula Batta 博士（Department of Genetics
& Molecular Biology, University of Debrecen,
Hungary）
Transcriptional regulation of the fission yeast cell
separation
（担当：川本 進）
- 第118回 11月14日
場所：センター講堂
日英菌学会交流講演会
Geoffrey M. Gadd 教授（The University of
Dundee; College of Life Sciences）
演題：
“Fungi as geoactive agents; metal, radionuclide
and mineral transformations and relevance to
weathering, elemental cycles and bioremediation”
Geoff Robson 博士（The University of
Manchester; Faculty of Life Sciences）
演題：
“Programmed cell death in filamentous fungi”
（担当：横山 耕治）

2008 真菌医学研究センター報告会

日時: 平成 20 年 12 月 26 日 12:50 ~ 17:30

会場: B1 講堂

真菌医学研究センター報告会は、毎年最終金曜日に開催され、今回で第 4 回目を迎えた。本会はセンター教員の情報交換を目的として「研究の総括・業績・その他活動」について「報告と目標」の発表を行っており、センターの研究方向性を決める上で重要な場となっている。

系統・化学分野

五ノ井 透 教授
矢口貴志 准教授
田中玲子 助教
松澤哲宏
松尾高稔
芝崎あずさ
弘 佑介
志賀祐介

高分子活性分野

三上 襄 教授
知花博治 准教授
宇野 潤 助教

真菌資源, 生態分野

横山耕治 准教授
田口英昭 助教

機能形態分野

川本 進 教授
山口正視 准教授
清水公德 助教
伊藤恵美子 助教

真菌感染分野

亀井克彦 教授
佐野文子 准教授
栗田啓幸 助教
大荒田素子 助教
渡辺 哲 助教
豊留孝仁
落合恵理

報告会ワーキンググループ

知花博治
伊藤恵美子
滝澤香代子
松澤哲宏
鎗田響子

真菌医学研究センター 2008 年度ベスト論文賞

研究者の研究意欲の向上を目指して、昨年度に創設したベスト論文賞については、2年目となる今年も研究推進チームのリーダーとサブリーダー（川本教授、亀井教授）に選考を依頼しました。その結果、ポスドク相当で、落合恵理さんの論文『Inhalation of *Stachybotrys chartarum* causes pulmonary arterial hypertension in mice』と、博士課程の院生の康 穎情の論文『*Trf4* is a useful gene for discrimination of *Candida tropicalis* from other medically important *Candida* species を含む 3 報の原著』の推薦がありましたので、2008 年度のベスト論文賞として、発表し、1月5日に授与式を行いました。

落合さんの論文は、真菌胞子の吸入による肺高血圧症に関する研究で、*Stachybotrys chartarum* の胞子を経気管的に反復投与したマウスで肺動脈壁中膜・内膜の肥厚および狭窄、右室圧の上昇が生じることを確認し、これらがヒトの肺高血圧症に非常に類似していることを発見したことに基づく研究です。この研究はその後更に発展し、室内環境内に多く浮遊する真菌の菌種を用い、本病変形成の菌種間差および菌株間差について検討を進め、*S. chartarum*, *Aspergillus fumigatus* および *Cladosporium cladosporioides* では、各々複数の株で同様の肺動脈病変が形成されることを確認するなど、新たな知見が見出された優れた研究で、ヒト疾患モデルとして治療にも通じる将来が楽しみな研究です。

康さんの研究は、病原真菌の新しい同定法の開発や、病原真菌クリプトコックスの新しい遺伝子型の発見の論文です。さらには、康さんは、病原放線菌である *Gordonia* について、これまで分類に用いてきた 16S rRNA 遺伝子情報による分類や同定方法より優れた分類体系としての *gyrB* や *secA1* 遺伝子を用いた新しい分類体系を構築した論文です。康さんは、これらの研究で、医学薬学府の博士課程の1年間の短縮が認められて、3月

には修了することが出来ることになっています。

残念ながら、今年度は教員については、推薦が有りませんでしたでしたが、すでに理化学研究所や阪大との共同研究として、当センターの教員が行ったマラセチア属真菌に関する研究で、その病原性の発現に C-type レクチンである Mincle が関与していることを明らかにした研究成果で、米国科学アカデミー紀要『Proceedings of the National Academy of Sciences』1月19日の週にオンライン掲載されるなど、新しい分野での研究も進展しています。

今後、センターの教員が世界的な研究を積極的に進めて、選考委員会が困る程の成果がでることを期待しています。

(B) ポスドク：落合恵理

Ochiai E, Kamei K, Watanabe A, Nagayoshi M, Tada Y, Nagaoka T, Sato K, Sato A, Shibuya K: Inhalation of *Stachybotrys chartarum* causes pulmonary arterial hypertension in mice. *Int J Exp Pathol* 89: 201-208, 2008.

(C) 院生：康 穎情

- 1) Kang Y, Iida S, Yamamoto S, Kogure T, Tanaka R, Mikami Y: *Trf4* is a useful gene for discrimination of *Candida tropicalis* from other medically important *Candida* species. *Jpn J Med Mycol* 49: 39-43, 2008.
- 2) Kang Y, Takeda K, Yazawa K, Mikami Y: Phylogenetic studies of *Gordonia* species based on *gyrB* and *secA1* gene analyses. *Mycopathologia*, 2008, in press.
- 3) Kang Y, Tanaka H, Luiza Moretti M, Mikami Y: New ITS genotype of *Cryptococcus gattii* isolated from an AIDS patient in Brazil. *Microbiol Immunol* 2008, in press.

————— 編 集 委 員 会 —————

川 本 進 (分子機能研究部門 機能形態分野・委員長)

佐 野 文 子 (病原真菌研究部門 真菌感染分野)
大荒田 素 子

矢 口 貴 志 (病原真菌研究部門 系統・化学分野)

横 山 耕 治 (病原真菌研究部門 真菌資源開発分野)

山 口 正 視 (分子機能研究部門 機能形態分野・ワーキンググループ長)

知 花 博 治 (分子機能研究部門 高分子活性分野)

平成 21 年 3 月発行

編集発行者

千葉大学真菌医学研究センター

〒 260-8673

千葉市中央区亥鼻 1 丁目 8 番 1 号

電話 043 (222) 7171 (代)

印刷社 株式会社 正文社

〒 260-0001

千葉市中央区都町 1-10-6

電話 043 (233) 2235 (代)

POST CARD

〒260-8673 千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号

千葉大学真菌医学研究センター 御中

Medical Mycology Research Center (MMRC),
Chiba University

1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673
Japan

郵便はがき

2608673

No. _____

千葉大学真菌医学研究センター報告 第12巻 受領書
Annual Report of Medical Mycology Research Center (MMRC),
Chiba University, No.12 (2008)

日付 Date: _____

機 関 名

Institution: _____

所 在 地 (〒 -)

Address : _____

1. この刊行物を今後も必要とします
Further issues of this publication are wanted.
2. この刊行物を必要としません
This publication is no more wanted.

署 名

Signature: _____



CHIBA UNIVERSITY
2008