

クリプトコックス症の臨床研究

河 野 茂

長崎大学大学院医歯薬総合研究科感染分子病態学講座

要 旨

クリプトコックス症は、わが国で3番目に頻度の高い深在性真菌症の病原真菌である。我々は、感染疫学、病原性および肺クリプトコックス症の臨床研究を行っている。本稿では、感染源、病原因子と臨床像や難治性感染症の治療法に関する研究を紹介する。

Key words: cryptococcosis, capsule, *ERG11*, azole antifungals

1. 感染源に関する研究

クリプトコックス症は健常人にも発症する深在性真菌症の一つであるが、AIDS患者においては、クリプトコックス髄膜炎が致死的な経過をとるため問題となっている。タイはHIV感染者が多い地域であり、クリプトコックス髄膜炎の発症率が16.8%と、日本や米国が3~4%であるのに対し極めて高率である。クリプトコックス症の主要な感染経路は、鳩の糞中で増殖し飛散した *Cryptococcus neoformans* の経気道的吸入によると一般に考えられているが、タイに多くの鳩が存在するわけではない。そこで我々は、民家のほとんどが家畜として飼育している鶏の糞を感染源と予想して、*C. neoformans* の分離同定を行った。方法はTable 1に示すように、タイ北部の3郡(合計50村150軒)において高床式住居床下より採取した鶏の糞を、濾過後にバードシード培地で培養した。オクサカラーキットを用いて菌を同定し、血清型はクリプトチェックキットを用いて同定した。各地域における *C. neoformans* の分離率と血清型をTable 1に、季節における分離率の違いをTable 2に示す。異なる地域の鶏糞から高率に *C. neoformans* が分離され、さらに、糞が乾燥し菌が飛散しやすいと考えられる乾季の方が有意に高い分離率を示した。クリプトコックス髄膜炎を合併した現地のAIDS患者から分離された菌株(14株)も全て血清型Aであり、鶏糞が感染源として強く示唆された。現在、遺伝子学的手法を用いて臨床分離株と環境分離株のタイピングを行っている。今後は、糞の清掃を励行することでクリプトコックス髄膜炎発症予防が可能か否かの研究が必要である。

2. 病原因子に関する研究

C. neoformans の毒性に関する因子のひとつに莢膜が挙げられる。莢膜の厚い株は薄い株に比較して毒性が高いことが知られている。我々は、莢膜の厚さの異なる株(莢膜の厚い順にYC-11株>YC-5株>YC-27株>YC-13株)を使用し、肺胞マクロファージの食食能に対する莢膜の厚さの影響を検討した(Fig. 1)。その結果、血清を加えないコントロール群では、マクロファージの食食率は各株で有意な差は認められなかったが、血清添加群では莢膜の薄い株が厚い株に比較して高い食食率を示し、莢膜の厚さがマクロファージの食食抵抗に関わっていることを明らかにした¹⁾。

クリプトコックス症の免疫研究では、その感染防御に細胞性免疫、特にTh-1反応が重要であることが報告されているが、我々はマウス肺クリプトコックスモデルの気管支肺胞洗浄液中のTh-1、Th-2関連サイトカインを解析した。その結果、莢膜が薄い弱毒株(YC-13)ではTh1反応が優位となり、免疫は肺内増殖に抑制的に働いているのに対して、莢膜が厚い強毒株(YC-11)ではTh2反応を示し、*C. neoformans* の排除に抵抗性を示すことを明らかにした²⁾。前後して、当科出身である琉球大学の川上らは、IL-12やIL-18、IFN- γ やそれぞれの抗体の投与、さらにそのノックアウトマウスを使用して、クリプトコックス感染防御におけるTh-1反応の役割に関する研究をさらに発展させている。

平成14年4月現在までに当科及び関連施設にて経験した104例の肺クリプトコックス症の検討において、細胞性免疫の関与するパラメータに注目すると、リンパ球減少やツベルクリン反応陰性、CD4/8比の低下さらに低アルブミン血症が、基礎疾患を有する続発性患者に高率にみられた。またこれの患者のうちステロイド投与を受けている患者が多くみられ、易感染に関わる薬剤であることを示した。その反面、基礎疾患を有さない患者(原発性)は総患者の約半数であり、まだ明らかにされてな

別刷請求先: 河野 茂

〒852-8501 長崎市坂本 1-7-1

長崎大学大学院医歯薬総合研究科感染分子病態学講座

い因子が関わっていることを示唆している。

3. 肺クリプトコックス症の臨床

次に肺クリプトコックス症の臨床について概説する。当科では肺クリプトコックス症の臨床像に関して『肺クリプトコックス症の104例』を検討している。これは対象を①病巣局所から採取された検体から墨汁染色で *C. neoformans* と考えられる酵母様真菌を確認するか、②培養陽性であるか、もしくは③病理組織学的に肺クリプトコックス症と確定診断された症例として集計したものである。

肺クリプトコックス症の背景因子として、基礎疾患を

Table 1. Isolation rate of *C. neoformans* in each district

District	No. of houses	No. of villages	Serotype
Chiang Muan	18/90 (20.0%)	14/30 (46.6%)	all type A
Pong	4/30 (13.3%)	3/10 (30.0%)	all type A
Chiang Kahm	14/30 (46.6%)	7/10 (70.0%)	all type A

Table 2. Seasonal difference in *C. neoformans* isolation

Season	No. of houses	No. of villages	Serotype
dry	31/150 (24.0%)*	24/50 (48.0%)*	all type A
rainy	6/150 (4.0%)	6/150 (12.0%)	all type A

*p<0.05, comparison between dry and rainy seasons.

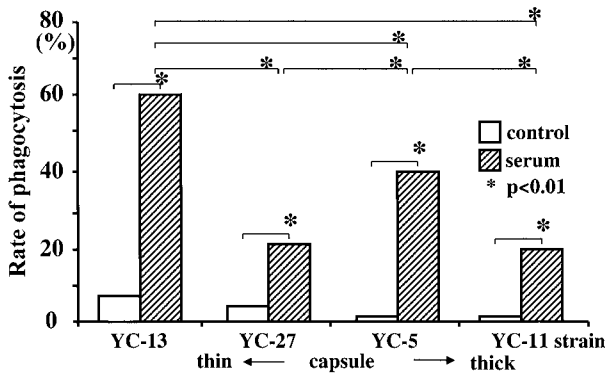


Fig. 1. Effect of capsular thickness of *C. neoformans* on macrophage phagocytosis.

有さない原発性45例に対し何らかの基礎疾患を有する続発性が59例と続発性が多い。そしてその基礎疾患で最も多かったのは糖尿病であり、それに固形癌、腎疾患、血液疾患、膠原病、高脂血症、肝硬変と続く。ここで特筆すべきは、このうち20例においてステロイド、もしくは抗癌剤による治療を行われているという点である。すなわち免疫抑制状態を医原的に発生させることによって発症のリスクを増しているとも言える。これら疾患の治療はもちろん重要なことであるが、治療経過中に胸部異常陰影を認めた場合は、鑑別疾患として肺クリプトコックス症も念頭に入れた検査及び治療を行うことが重要である。

次に自覚症状であるが、原発性、続発性の間に大きな違いはないが、無症状である場合が最も多く、咳嗽、喀痰、と続く。続発性においてはこれに続いて発熱の頻度が高く、原発性には見られない特徴である。ただし、AIDS患者においては喀痰、発熱に続き呼吸困難の頻度が高いことが報告されている。これは細胞性免疫の低下に伴い重症例が多くなっていることが原因であろうと考えられる。

胸部単純X線所見では、原発性で多発結節影が最も多く、孤立結節影と合わせると実に78%の症例で結節影を取る。これに浸潤影(18%)が続くが、原発性においては結節影こそが肺クリプトコックス症の典型的所見と言えよう。また、この結節影の51%に空洞が見られることも特徴的である。これは病理組織学的に肺クリプトコックス症が肉芽腫形成性の疾患であることを示すものである。続発性では孤立結節影(33%)が最も多く、原発性で最も多かった多発結節影は25%と半減している。これに代わって浸潤影が30%と増加している。これはやはり続発性の場合、免疫能の低下によって重症化しやすいという事を反映したものであろう。空洞形成は続発性においても42%と多くの症例に見られ、やはり肉芽腫性病変を形成していることを示す所見と思われる。そして肺クリプトコックス症の画像所見で間質性の所見が捕らえられることは極めて稀である。胸部CTではさらに詳細に画像所見を捕らえることが可能である。結節影の性状は spiculation や pleural indentation といった肺腺癌との鑑

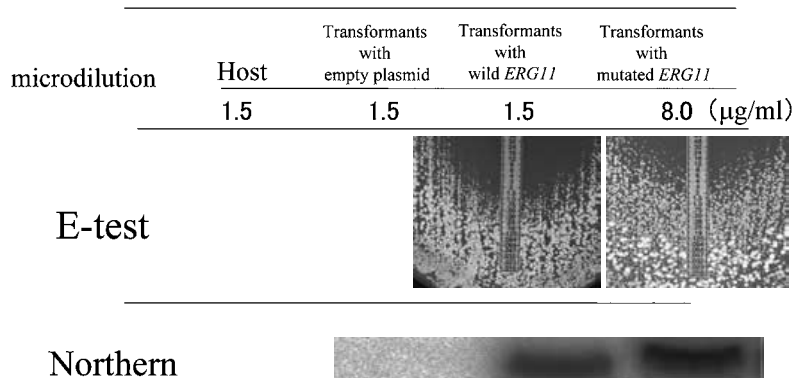


Fig. 2. Azole susceptibilities and *ERG11* mRNA level in *S. cerevisiae* transformants.

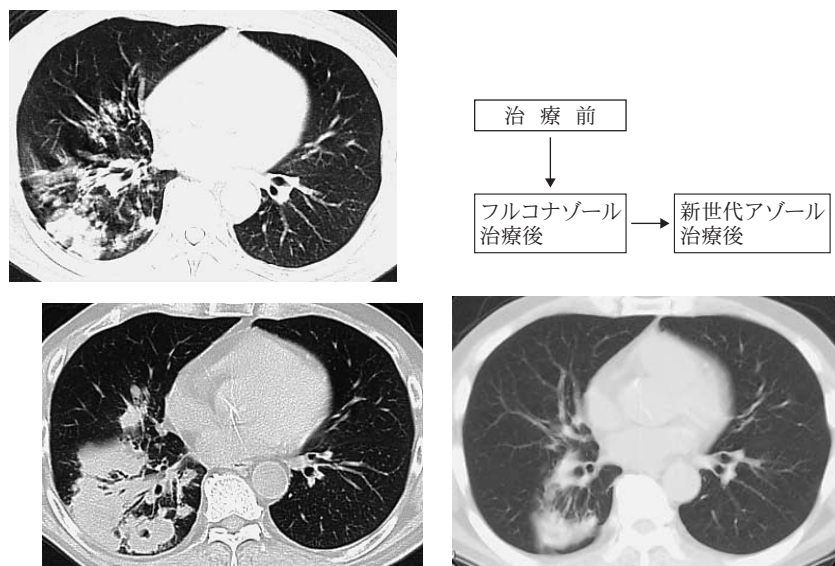


Fig. 3

別が困難である所見を呈するものが58%と半数以上を占めている。また空洞形成するものも42%と多く、肺結核などの鑑別も困難である。しかし、リンパ節の腫大を認めるものは11%と少なく、石灰化を示す症例は一例もなかったことからこれらの所見を総合的に見ることで除外診断を行うことは必ずしも不可能なことではないのかもしれない。さらなる症例の蓄積によって明らかにしていくことが今後の課題である。

次に血清抗原価と胸部X線所見の関連性についてであるが、ここに明らかな関連性は認められない。しかし原発性と続発性の間には違いが認められる。それは続発性の方が高い抗原価を有する症例が多いという点である。このことは続発性の方が重症例が多いことに関連していると考えられ、血清抗原価が肺クリプトコックス症の重症度の評価に利用できる可能性があることを示唆している。しかしこのデータはprospective studyではなくretrospective studyであるため個々の症例の病期が一致していないという問題点を含む。また症例数も少ないため現在の段階で何らかの結論を出すことは時期尚早であろう。

4. 重症例に対する新しい治療法に関する研究

肺クリプトコックス症の治療にはフルコナゾールが頻用されるが、HIV感染では長期にわたる投与がおこなわれるために、*C. albicans*で証明されているようにアゾール系抗真菌薬低感受性株の出現が懸念される。実際に、*C. neoformans*でフルコナゾール耐性を示す株が分離されたため、そのメカニズムに関する検討を行った。アゾール系抗真菌薬の標的酵素をコードする*ERG11*遺伝

子の配列を調べたところ、耐性株では野生型と比較して一つのアミノ酸の変異が起こっていることが解った³⁾。この変異が耐性に関与していることを調べるために変異型遺伝子と野生型遺伝子をベクターに組み込み、*Saccharomyces cerevisiae*で発現させ薬剤感受性を調べた結果、変異型では感受性が低下しておりこの点変異が耐性と関連することが示された (Fig. 2)。

このような耐性株のほか、宿主の細胞性免疫が低下した状態では一般的な治療に抵抗性を示す場合もある。そこで、開発中の新世代アゾール系抗真菌薬の有効性を検討した⁴⁾。フルコナゾール治療に抵抗性で増悪を示した肺クリプトコックス症においても、新世代アゾール系抗真菌薬は有効性を示した (Fig. 3)。

文 献

- 1) Yasuoka A, Kohno S, Yamada H, Kaku M, Koga H. Influence of molecular sizes of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide on phagocytosis. *Microbiol Immunol* **38**: 851-856, 1994.
- 2) Abe K, Kadota J, Ishimatsu Y, Iwashita, Tomono K, Kawakami K, Kohno S. Th1-Th2 cytokine kinetics in the bronchoalveolar lavage fluid of mice infected with *Cryptococcus neoformans* of different virulences. *Microbiol Immunol* **44**: 849-55, 2000.
- 3) Nakamura K, *et al.* Substitution of G484S amino acid of lanosterol 14 α -demethylase (*ERG11p*, *CYP51p*) accounted for azole resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* submitted.
- 4) Miyazaki Y *et al.* Voriconazole treatment in pulmonary cryptococcosis. 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002.

Clinical and Mycological Features of Cryptococcosis

Shigeru Kohno

Nagasaki University Postgraduate School of Medical Biosciences, Department of
Molecular Microbiology & Immunology, Division of Molecular & Clinical Microbiology,
1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan

Cryptococcosis is the third most common deep mycosis in Japan. *Cryptococcus neoformans* is known to grow in pyres of pigeon feces. Chicken feces in Thailand were tested for whether *C. neoformans* could be isolated, because there is considerable prevalence of cryptococcal meningitis in patients with HIV in that country. We isolated *C. neoformans* from chicken feces in as many as at 70 % of the villages tested. Chicken as well as pigeon feces were believed to be an origin of infection. We have studied the relation between in vitro virulence and thickness of polysaccharide capsules. Strains with thicker capsules such as YC-11 or YC-5 showed more resistance to macrophage phagocytosis than strains with thinner capsules like YC-27 or YC-13. This finding was consistent with the cytokine dynamic state in mice cryptococcosis. Th1 was dominant in infections with thinner capsule strains, although Th2 was relatively dominant in those with thick capsules. The clinical features of 104 cases with pulmonary cryptococcosis were summarized. Radiological findings of pulmonary cryptococcosis varied depending on the time course of the disease and on immunological status. There were no specific symptoms and signs except for positive glucuronoxylomannan. Those in azole class were the most commonly prescribed antifungals. New generation antifungals voriconazole and intravenous itraconazole showed potent clinical efficacy in pulmonary cryptococcosis.

(平成14年度日本医真菌学会賞受賞論文)