Cryptococcus の菌学

池 田 玲 子

明治薬科大学微生物学教室

1. はじめに

Cryptococcus 属は担子菌類に分類され、重篤な髄膜炎を惹起する菌種を含んでいる。1833年に Kützing により *Cryptococcus mollis* が記載され、The Yeasts, A Taxonomic Study の第3版までは本菌種が基準種であった。その後、*C. neoformans* が新たな基準種として取り扱われ、一方ではアナモルフが発見されるなど分類と命名に変遷を重ねてきた¹⁾。2005年には *C. neoformans* のゲノムが解読され²⁾、分子生物学的手法も含めて研究対象の広がりや進展の速さをみせている。本稿では、クリプトコックス症の原因菌 *Filobasidiella/Cryptococcus neoformans* species complex について、歴史的背景、生活環、遺伝型、表層構造、病原因子を中心に概説する。

2. 歴史的背景³⁾

クリプトコックス症は、1894-1895年に Busse と Buschke により最初に記載された。肉腫様病巣に円形ないし卵円形の細胞を観察して分離するとともに、その病原性を確認した。一方、同年に Sanfelice は、ピーチジュースから莢膜を有する酵母を分離し *Saccharomyces neoformans* と命名し、さらに類似の菌をウシのリンパ節からも分離した。1901年に Vuillemin により Busse と Sanfelice の菌株はそれぞれ *Cryptococcus hominis* および *C. neoformans* と名付けられた。1916年には Stoddard と Cutler が髄膜炎患者より真菌を分離し、*Torula histolytica* と命名し、1935年に Benham は、これらの菌を *C. hominis* として統一している。血清学的には、1949年に Evans が A、B および C に分類されることを報告し⁴⁾、そのおよそ20年後に Wilson らにより serotype D が追加された⁵⁾。1950年に Benham は、病名として cryptococcosis を提唱し、原因菌種名を *Cryptococcus neoformans* とした。Vanbreusenhgen と Takashio は、1970年に Gatti と Eeckels により分離された株が伸長した細胞を形成する特徴を示すことから、これを *C. neoformans* var. *gattii* と命名し、Kwon-Chung は形態学的、生化学的および血清学的性状の相違に基づき *C. neoformans* を *C.*

neoformans var. *neoformans* と *C. neoformans* var. *gattii* の2変種に分類した。2011年に出版された第5版 The yeasts, A taxonomic Study では、それぞれは別種の *C. neoformans* および *C. gattii* とされている^{1,6)}。*C. neoformans* は、出芽増殖する円形から卵円形の細胞である。しかし、Shadomy はクランプ様構造をもつ菌糸形成を1970年に見出し⁷⁾、Kwon-Chung は、1975年に血清型AとD株各々の異なる交配型間で有性生殖の結果、担子胞子を形成するテレオモルフを発見し⁸⁾、1976年には血清型BとC株についても有性生殖過程を見出した⁹⁾。現在は、テレオモルフはそれぞれ *Filobasidiella neoformans* および *Filobasidiella bacillispora* と命名されている¹⁾。両菌種の比較を Table 1 にまとめて示した。

クリプトコックス症の原因菌種は、*Filobasidiella neoformans/Cryptococcus neoformans-Filobasidiella bacillispora/Cryptococcus gattii* complex が大部分を占めている。*Filobasidiella neoformans* と *Filobasidiella bacillispora* はテレオモルフに、*Cryptococcus neoformans* と *Cryptococcus gattii* はアナモルフに対して命名されているが、医真菌領域では通常アナモルフ名が使われている。その他の *Cryptococcus* 属菌種が臨床材料から分離される場合があるが、そのおよそ80%は *C. albidus* および *C. laurentii* である。

3. 生活環

Cryptococcus 属菌種は出芽増殖する無性生殖過程のみならず有性生殖環が発見された^{8,9)}。異なる交配型 a と α 間で接合し、2核の菌糸を形成してその先端に担子器が生じる。菌糸にはかすがい連結（クランプ）が認められる。核融合が担子器内で起こり、減数分裂の結果担子器の外側に交配型 a または α の担子胞子を同数形成する (Fig. 1)。担子胞子の形態は、*Filobasidiella neoformans* では球形から楕円形 ($1.8-3 \times 2-5 \mu\text{m}$) であるのに比して *Filobasidiella bacillispora* では桿状 ($1-1.8 \times 3-8 \mu\text{m}$) である。

臨床材料や自然界から分離された株の大部分の交配型は α で a 型はきわめてまれである。したがって、有性生殖過程の結果もたらされる多様性の出現と自然あるいは動物体内環境への適応に優れた株が生じる機序は謎で

Fig. 1. Life cycle of *C. neoformans*.Table 1. Comparison of features between *Filobasidiella neoformans*/*Cryptococcus neoformans* and *Filobasidiella bacillispora*/*Cryptococcus gattii*

Teleomorph	<i>Filobasidiella neoformans</i>			<i>Filobasidiella bacillispora</i>	
Anamorph	<i>Cryptococcus neoformans</i>			<i>Cryptococcus gattii</i>	
Canavanine glycine bromothymol blue (CGB) agar	yellow-orange			blue/blue-green	
Serotype (Antigenic formula)	A (1,2,3,7)	D (1,2,3,8)	AD hybrid (1,2,3,7,8)	B (1,2,4,5)	C (1,4,6)
Genotype	VNI, VNII, VNB	VNIV	VNIII	VGI, VGII, VGIII	VGIII, VGIV
Distribution	world wide	mainly Europe, South America		tropical, subtropical, temperate	
Host range	immunocompromised (immunocompetent)			immunocompetent (immunocompromised)	

あった。しかし、2005年に α 型株間での同一交配型による有性生殖過程が見いだされた¹⁰⁾ (Fig. 1)。1999年以降、バンクーバー島および北米大陸の太平洋側北西部における病原性の強い *C. gattii* の大流行^{11,12)} は、 α 型間での交配の結果生まれた新しい株によるものとも考えられている。

4. 遺伝型

C. neoformans および *C. gattii* 株のゲノムタイピングについては多くの報告がなされてきたが、2007年に国際的合意が得られ、multilocus sequence typing (MLST) 解析に用いる遺伝子として、*CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* のハウスキーピング遺伝子と *IGS1* の計7つが選択された¹³⁾。この中には、病原性

と関係の深い *CAP59* (莢膜合成), *LAC1* (メラニン産生), *PLB1* (細胞侵襲) も含まれている。その結果、各菌種はそれぞれ4つの型に分類されている (Table 1)。

前出の、バンクーバー島とその付近で流行の *C. gattii* について、主要な株はVGIIのサブタイプVGIIaである。本邦でも *C. gattii* VGIIa が渡航歴のない患者より分離されている¹⁴⁾。さらに、新しい型の *C. gattii* VGIIc が米国オレゴン州で見出されており、今後これらおよび新たな高病原性株に対する監視がますます必要になると考えられる。

5. 表層構造

細胞最表層に莢膜を有することが形態学的な特徴で、malt agar 上の集落は粘稠である。莢膜は、墨汁法によ

Fig. 2. *C. neoformans* (India ink method)

Fig. 3. Chemical structures of glucuronoxylomannan. GA: glucuronic acid, M: mannose, X: xylose

Fig. 4. Cell surface and virulence factors of *C. neoformans*.

リ観察することができ (Fig. 2), クリプトコックス症の早期診断法に利用されている。莢膜は主に酸性ヘテロ多糖類のグルクロノキシロマンナンで構成され、その化学構造の相違は血清型と関連している^{15,16)} (Fig. 3)。莢膜多糖類は可溶性として血清、髄液などに検出されるため、抗体感作ラテックス凝集反応による抗原検出法は、特異度と感度にすぐれた本症の迅速な血清学的診断法として使用されている¹⁷⁾。細胞壁にはグルカン、キチン等の多糖類、マンノプロテイン等のタンパク質が存在する。また、ジフェノール類の存在下でメラニンが合成され、*Cryptococcus* 細胞が褐色～黒色細胞になるが^{18,19)}、メラニンの存在部位として細胞壁が示されている (Fig. 4)。

6. 病原因子

C. neoformans は、ハトなど鳥類の糞、土壌、朽ち木等から分離される。クリプトコックス症は、白血病、がん、サルコイドーシス、リウマチなどの基礎疾患を有する免疫不全者に多く、1980年代以降は AIDS 患者の死亡原因としてランクが高い。しかし、*C. gattii* は、ユーカリの木をはじめとする複数の樹木とその近くの土壌から分離され、そのほとんどが serotype B である²⁰⁾。*C. gattii* は、熱帯と亜熱帯地域から分離されていたが、1999 年以降、温帯地域での *C. gattii* によるクリプトコックス症の報告が増加している。*C. neoformans* と

比較すると免疫適格性患者での髄膜炎患者が多く AIDS 患者からの分離はむしろまれである。Serotype C 株については、サハラ以南の AIDS 患者から serotype C 株の分離が増えているとの報告がある²¹⁾。

Cryptococcus は経気道的に侵入し、肺クリプトコックス症、髄膜炎および皮膚クリプトコックス症を引き起こす。なかでも髄膜炎は、治療がなされなければ致死的転機をたどる感染症である。代表的な病原因子として古くから 37°C での増殖能や莢膜が知られている。莢膜の作用としては抗食作用性、T 細胞への抗原提示阻止、炎症性サイトカイン産生抑制、補体消費等が報告されている。メラニン、細胞を強固にするとともに紫外線防御作用がある。また、活性酸素を消去することから細胞内殺菌抵抗性を賦与している^{22,23)}。さらに、抗真菌薬感受性を低下させ、病原因子のひとつとして認識されるようになった。

これらの病原因子の発現は複数のシグナル伝達系による協同作用により制御されている²⁴⁾。例えば、代表的な病原因子の莢膜は、生体内のより高い CO₂ 濃度下でプロテインキナーゼ A/サイクリック AMP シグナル伝達系などを介して合成が促進される。莢膜形成遺伝子の発現は、フェロモン応答性の MAP キナーゼ経路を介しても増強される。また、37°C での増殖制御機構に MAP キナーゼ経路の他に Ca²⁺/カルモジュリン/カルシニューリン経路の重要性も示されている (Fig. 4)。

一方、*Cryptococcus* 側の因子とともに発症と病態には宿主応答や共存する微生物がかかわってくる²⁵⁾。近年、獲得免疫と自然免疫の両面から解析が進行し、受容体認識とサイトカインの産生機序、あるいは血行性の全身播種や血液脳関門通過機構が研究され、感染制御に応用が期待される知見が蓄積されつつある²⁶⁾。

文 献

- 1) Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T: The Yeasts, A Taxonomic Study 5th ed. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 2011.
- 2) The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J, Miranda M, Anderson IJ, Fraser JA, Allen JE, Bosdet IE, Brent MR, Chiu R, Doering TL, Donlin MJ, D'Souza CA, Fox DS, Grinberg V, Fu J, Fukushima M, Haas BJ, Huang JC, Janbon G, Jones SJ, Koo HL, Krzywinski MI, Kwon-Chung JK, Lengeler KB, Maiti R, Marra MA, Marra RE, Mathewson CA, Mitchell TG, Perteau M, Riggs FR, Salzberg SL, Schein JE, Shvartsbeyn A, Shin H, Shumway M, Specht CA, Suh BB, Tenney A, Utterback TR, Wickes BL, Wortman JR, Wye NH, Kronstad JW, Lodge JK, Heitman J, Davis RW, Fraser CM, Hyman RW: Science **307**: 1321-1234, 2005.
- 3) Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A: In *Cryptococcus*: From Human Pathogen to Model Yeast. ASM Press, Washington, DC, 2011.
- 4) Evans EE: An immunologic comparison of twelve strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*). Proc Soc Exp Biol Med **71**: 644-646, 1949.
- 5) Wilson DE, Bennett JE, Bailey JW: Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. Proc Soc Exp Biol Med. **127**: 820-823, 1968.
- 6) 杉田 隆, 高島昌子: 病原性酵母の分類と同定における最近の動向. Med Mycol J **52**: 107-115, 2011.
- 7) Shadomy HJ: Clamp connections in two strains of *Cryptococcus neoformans*. Spectrum Monogr Ser **1**: 67-72, 1970.
- 8) Kwon-Chung KJ: A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycologia **67**: 1197-1200, 1975.
- 9) Kwon-Chung KJ: A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. Mycologia **68**: 943-946, 1976.
- 10) Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, Allen A, Stajich JE, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J: Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. Nature **437**: 1360-1364, 2005.
- 11) Datta K, Bartlett KH, Baer R, Byrnes E, Galanis E, Heitman J, Hoang L, Leslie MJ, MacDougall L, Magill SS, Morshed MG, Marr KA: *Cryptococcus gattii* Working Group of the Pacific Northwest. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. Emerg Infect Dis **15**: 1185-1191, 2009.
- 12) Ma H, Hagen F, Stekel DJ, Johnston SA, Sionov E, Falk R, Polacheck I, Boekhout T, May RC: The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. Proc Natl Acad Sci USA **106**: 12980-12985, 2009.
- 13) Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, Fisher M, Gilgado F, Hagen F, Kaocharoen S, Litvintseva AP, Mitchell TG, Simwami SP, Trilles L, Viviani MA, Kwon-Chung J: Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med Mycol **47**: 561-570, 2009.
- 14) Okamoto K, Hatakeyama S, Itoyama S, Nukui Y, Yoshino Y, Kitazawa T, Yotsuyanagi H, Ikeda R, Sugita T, Koike K: *Cryptococcus gattii* genotype VGIIa infection in man, Japan, 2007. Emerg Infect Dis **16**: 1155-1157, 2010.
- 15) Bhattacharjee AK, Bennett JE, Glaudemans CP: Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. Rev Infect Dis **6**: 619-624, 1984.
- 16) Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L: Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. J Clin Microbiol **16**: 22-29, 1982.
- 17) 山口英世, 内田勝久, 久米光, 篠田孝子, 渡辺一功, 楠俊雄, 比留間政太郎, 石崎宏: 日本医真菌学会標準化委員会報告 (1992-1994 年). 真菌誌 **36**: 61-86, 1995.
- 18) Staib F: *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia*

- abyssinica* (syn. *G. Oleifera* D. C.). Z Hyg **148**: 466-475, 1962.
- 19) Polacheck I, Hearing VJ, Kwon-Chung KJ: Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol **150**: 1212-1220, 1982.
- 20) Ellis DH, Pfeiffer TJ: Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol **28**: 1642-1644, 1990.
- 21) Litvintseva AP, Thakur R, Reller LB, Mitchell TG: Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. J Infect Dis **192**: 888-892, 2005.
- 22) Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Popkin TJ: Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. J Bacteriol **150**: 1414-1421, 1982.
- 23) Jacobson ES, Emery HS: Catecholamine uptake, melanization, and oxygen toxicity in *Cryptococcus neoformans*. J Bacteriol **173**: 401-403, 1991.
- 24) Kozubowski L, Lee SC, Heitman J: Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. Cell Microbiol **11**: 370-380, 2009.
- 25) 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.
- 26) Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J: Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. Nat Rev Microbiol **9**: 193-203, 2011.