

昇が38%しか見られなかったことからすると、RP35抗原を用いてツベルクリン反応と同様の皮内反応を検討した場合、サ症患者における反応陽性率が上昇することは十分考えられ得る。また、過去のPCR定量解析の結果によれば、サ症病変部から*P. granulorum*の菌体DNAも検出されていることから、今回RP35に対して末梢血単核球幼若化反応の上昇が見られなかった患者の中には*P. granulorum*が発症に関与しているものが含まれていると考えることが出来る。

以上のように、サ症患者におけるRP35に対するPBMCの反応陽性率は低かったとはいえ、それは疾患特異的であった。このことから、サ症患者のみが*P. acnes*に感染しているという解釈もし得るが、サ症以外の肺疾患患者においてもRP35に対する血清抗体価の上昇が見られたので、この解釈はありえそうにもない。より可能性のある解釈としては、サ症患者においてTh1細胞が遺伝的にRP35に対して強く反応するが、サ症以外の患者のTh1細胞はRP35に全く反応しないか、あるいは、反応するにしても弱くなるよう制御されている可能性がある。T細胞依存性の抗原に対する反応が上昇するか否かは、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)が支配していて、サブレッサーT細胞を活性化させることで反応を起らないようにしているのかもしれない。また、一部の民族でサ症が家族性に発症しているという報告は、少なくとも一部の患者においては遺伝性素因があることを示唆している。欧州2国で行われた臨床・免疫遺伝学の研究における調査でHLA-A1、B8、DR3型とサルコイドーシスの関連が示され、HLA-B12とDR4には関連が示されなかったという報告もある。

このような宿主固有の遺伝的素因とアレルギー性疾患の発症との関連は、実験的に用いた近交系動物のアレルギー性甲状腺炎でも示されている。RT1^{a v 1} 遺伝子型のラット(DA系ラット)にサイログロブリンをアジュバントとともに免疫注射すると、アレルギー性甲状腺炎を引き起こすが、RT1^C 遺伝子型をもつ別系統ラット(PVG系ラット)には発症は見られない。甲状腺炎はDA系ラットでは肉芽腫形成を伴って強い炎症が認められるにも関わらず、PVG系ラットには何の炎症もみられない。しかし、サイログロブリンに対する液性抗体価の上昇は両者において認められる。今回の研究においても、同じ抗原に対する体液性免疫応答と細胞性免疫応答の不一致現象が認められた。すなわち、RP35に対する血清IgGとIgA抗体価はサ症患者のみならず対照群でも高い値を示したが、この抗原に

対するPBMCにおける細胞性免疫反応はサ症患者のみににおいて認められた。

サ症以外の患者においてRP35に対するPBMCの免疫応答が低かったのは、RP35反応性T細胞のクローナルな欠落に原因を帰すべきか、能動的な免疫応答の抑制機構が働いたことによるものかは確定しえないが、能動的抑制という説明のほうがありえそうである。なぜなら、RP35に対する抗体は、一部のサ症以外の患者でも誘導されていたからである。サ症の病状の程度やその持続期間が何によって支配されているかは明確ではないが、原因となる抗原物質に対する細胞性免疫応答が環境要因によって影響され、その結果として、病状が良くなったり、悪くなったりしているのかもしれない。

細菌が関連する疾患においては、外因性感染症だけでなく、内因性感染症も考慮しておく必要がある。サ症の病因を常在性細菌が関与する”内因性感染症”という観点でとらえ、本研究は進められたが、常在性細菌由来の抗原に対する過敏性免疫反応(Coomb's IV型アレルギー反応)が誘導され、病態の基本となる肉芽腫形成に至るまでの過程には、サ症患者に特異的な免疫応答がその背景にあるはずである。患者の免疫遺伝学的素因が抗原に対する感受性を決定し、発症へと導いている可能性がある。先述したようにサ症に特異的な疾患感受性の存在はKveim現象からも明らかである。サルコイドーシスはpropionibacteria由来の抗原(一種もしくは数種)へのTh1細胞性免疫応答が関与し、患者個人の遺伝的素因もしくは後天的に獲得された免疫システムの異常性に起因して引き起こされる疾患である可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishige I, Usui Y, Takemura T, and Eishi Y. Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. Lancet 1999; 354: 120-3

Ebe Y, Ikushima S, Yamaguchi T, Kohno K, Azuma A, Sato K, Ishige I, Usui Y, Takemura T, and Eishi Y. Immune response to Propionibacterium acnes trigger factor in sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. (in submission)

2. 学会発表

長雄一郎、臼井裕、江部由紀、鈴木好美、

江石義信：Propionibacterium acnes由来60kDa heat shock protein遺伝子クローニングおよびリコンビナント蛋白を用いたサルコイドーシス患者免疫反応性の検討「第88回日本病理学会総会」1999年4月、東京

江部由紀、鈴木好美、安藤登、白井裕、江石義信：患者血清を用いて遺伝子クローニングされた Propionibacterium acnes 79kDa蛋白抗原に対するサルコイドーシス患者免疫反応性の検討「第88回日本病理学会総会」1999年4月、東京

石下郁夫、白井裕、武村民子、江石義信：サルコイドーシス病変部における propionibacteria および結核菌 DNA の

QPCR法による定量解析「第88回日本病理学会総会」1999年4月、東京

江部由紀、鈴木好美、安藤登、白井裕、江石義信：患者血清を用いて遺伝子クローニングされた Propionibacterium acnes 79kDa蛋白抗原に対するサルコイドーシス患者免疫反応性の検討「第19回RMCB研究会」1999年7月、東京

Eishi Y, Ihsige I, Ebe Y, Cho Y, Minami J, Yamada T, Kobayashi D, Suzuki Y, Ando N, and Takemura T. Propionibacteria as a possible etiologic agent of sarcoidosis. The 6th WASOG Meeting, Kumamoto Japan, 10, 1999.

9. サ症患者におけるプロピオニバクテリアの細菌学的検討 ～Propionibacterium acnes を分離するための選択培地作製の試み～

分担研究者 渡邊 邦友（岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設）
研究協力者 田中 香お里（岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設）

研究要旨 腸管において優位に存在する偏性嫌気性菌や通性嫌気性菌の代表的な菌種と *P.acnes* を用いて、各菌種が腸管に通常存在すると考えられる菌量で存在した際に *P.acnes* を選択的に発育させる培地の薬剤の配合を検討した。メトロニダゾール、ゲンタマイシンおよび多くのグラム陽性菌に強い抗菌力を示す薬剤（A）を種々の濃度で配合したところ、*P.acnes* が発育する配合では通性嫌気性グラム陰性桿菌の発育は完全に阻止できなかった。ゲンタマイシンの添加に問題があると考えられたので、代わりにアジ化ナトリウムによる通性嫌気性グラム陰性桿菌の発育阻止を検討したところ、125 mg/L の添加が適当と考えられた。

A. 研究目的

Propionibacterium acnes はサルコイドーシスへの関与が疑われている嫌気性菌である。サルコイドーシスの成因は今だ明確にはなっておらず、病巣にみられるという *P.acnes* の由来についても分かっていない。本菌種は主に皮膚に常在するが、腸管内にも少ないながら常在と言われており、サルコイドーシスにおいては腸管からの由来が疑われている。この点を明確にするためには本症患者の腸管における本菌種の存在の優位性、あるいは分離された本菌種が患者以外の腸管から分離された本菌種と異なる何らかの特異性を持つことが証明されなければならない。しかしながら、本菌種は腸管においては劣勢な菌種であり、現在使用されている選択培地を用いては糞便からの本菌種の分離は不可能に近い。そこで本研究では糞便からの *P.acnes* の分離を容易にするための選択培地を作製することを目的に検討を行った。

B. 研究方法

腸管内容物からの *P.acnes* の選択培地に添加する薬剤とその配合を決定するため、腸管において優位な偏性嫌気性菌と通性嫌気性菌および *P.acnes* を用い、*P.acnes* 以外の発育を抑制する薬剤の配合を検討した。

まず、基礎培地として BHI 寒天を用い、これ

にメトロニダゾール（4 または 8 mg/L）、ゲンタマイシン（8、16、32 mg/L）、および多くのグラム陽性菌に強い抗菌力を示す薬剤（A）（4、8、16 mg/L）の 3 剤を添加し選択培地とした。

この培地に偏性嫌気性菌（*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp.）、及び通性嫌気性菌（*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus faecalis*）、計 23 株を腸管に通常存在すると考えられる菌量（*Bacteroides* spp. および *Bifidobacterium* spp. : 108 cfu/spot, *E.coli* : 106 cfu/spot, *Lactobacillus* spp., *E.faecalis*, および *Klebsiella* spp. : 105 cfu/spot）で、また、*P.acnes* を 103 cfu/spot 接種した。8 日間嫌気培養した後、各菌株の発育の有無を観察した。

次の検討として BHI よりも *P.acnes* の発育がよいブルセラ HK 血液寒天培地を基礎培地とし、これにアジ化ナトリウム 15.6 ~ 500 mg/L を添加した培地を作製した。これに通性嫌気性菌グラム陰性桿菌 (*E.coli*, *Klebsiella* spp. 他 : 105 ~ 106 cfu/spot) 18 株と *P.acnes* (103 cfu/spot) 9 株を先の検討と同様に接種した。嫌気培養 4 日目における各菌株の発育を観察し

た。

C. 研究結果

最初の BII を基礎培地とした検討では、培養 2 日目に薬剤不含の培地で全ての株が発育していたものの、*P.acnes* を含めて一部の偏性嫌気性菌の発育が悪く、*P.acnes* が充分発育するまで培養を継続した。培養 8 日目の判定では、*P.acnes* を除く全ての嫌気性菌は、何れの選択培地でも発育を阻止されていた。*P.acnes* はゲンタマイシン 8 mg/L を含む培地では発育したものの、16、32 mg/L の培地では発育を阻止された。一方、通性嫌気性菌の一部は 8 および 16 mg/L のゲンタマイシンを含む培地で発育しており、ここで設定した何れの配合でも *P.acnes* のみを発育させ、他の菌種の発育を抑えることはできなかった。

先の配合ではゲンタマイシンの配合に問題があったと考えられたのでこれに代わるものとしてアジ化ナトリウムを検討した。ブルセラ HK 血液寒天を基礎培地としたこの検討では、培養 4 日目で *P.acnes* の充分な発育が得られ、アジ化ナトリウム 250 mg/L を添加した培地でも試験した *P.acnes* 9 株全てが発育した。一方、通性嫌気性グラム陰性桿菌は 125 mg/L で試験した 18 株全ての発育が阻止された。

D. 考察

最初、主に偏性嫌気性菌グラム陰性桿菌の発育を抑える目的でメトロニダゾール、通性嫌気性グラム陰性桿菌を抑ええる目的でゲンタマイシン、*P.acnes* 以外のグラム陽性菌の発育を抑えるために薬剤 (A) を種々の濃度で配合し、腸管に常在する主要な菌種を通常存在していると考えられる菌量で接種し、発育の抑制を観察した。*P.acnes* については腸管における菌量が不明のため測定上可能な範囲で低い菌量とした。

この検討では、ゲンタマイシンの通性嫌気性菌に対する効果が低く、*P.acnes* が発育しうる薬剤濃度では通性嫌気性グラム陰性桿菌の発育を阻止できなかった。これは嫌気培養のためゲンタマイシンの抗菌力が好気培養時と比べて低くなったことと、*P.acnes* の菌量が低かったためと考えられた。*P.acnes* は炭酸ガス培養で発育することもあるが、臨床材料からの初代分離では必ずしも発育しないことから、嫌気培養の条件は固定すべきと考えられた。また、*P.acnes* の菌量についても少ない菌量からの回収を目的

としているため固定することとした。

この条件下でゲンタマイシンを他のアミノ配糖体に変更しても、効果的な結果は得られないと考えられたので、次の検討ではゲンタマイシンに代わって、通性嫌気性グラム陰性桿菌を抑制する薬剤としてアジ化ナトリウムを添加し、その効果と *P.acnes* への影響を調べることにした。また、先の検討から BII では、*P.acnes* の発育がやや弱いと考えられたので、基礎培地をブルセラ HK 血液寒天培地に変更した。結果として、より短い培養日数で *P.acnes* の充分な発育が得られるようになった。また、アジ化ナトリウムは、*P.acnes* の発育に影響しない濃度で今回検討した通性嫌気性グラム陰性桿菌の発育を十分に抑え、選択培地への配合に適していると考えられた。

今後、3 剤の最終的な配合値の決定と臨床材料を用いた検討を行う予定である。

E 結論

腸管内容物中の優勢な偏性・通性嫌気性菌の発育を抑制し、劣勢と考えられる *P.acnes* を選択するための培地としては、ブルセラ HK 血液寒天培地にメトロニダゾール、薬剤(A)、アジ化ナトリウムを配合したものが適していると考えられた。

10. IgA 腎症発症に関わる病原体の解明

分担研究者 荒川 宜親 (国立感染症研 細菌・血液製剤部)
共同研究者 佐々木 裕子・谷口 理恵・永田 典代
(国立感染症研 安全性研究部)
堀田 修・宮崎真理子 (仙台社会保険病院 内科・腎臓)
松谷幸子 (仙台日赤病院 耳鼻咽喉科)
松尾 清一・湯沢 由紀夫 (名古屋大医 第三内科腎臓研究室)

研究要旨 IgA 腎症患者におけるリンパ球活性化の促進因子として口腔内細菌、とくにマイコプラズマを疑い、患者咽頭、末梢血、扁桃からの菌の分離、PCR での特異的 DNA 検出を試みた。4 患者の咽頭からの *Mycoplasma orale* 分離ならびに、1 患者の咽頭、2 患者の末梢血単核細胞からの *M. fermentans* と同サイズの DNA 産物の増幅が確認された。さらに、患者 plasma 中の抗マイコプラズマ抗体価を測定し、末梢の活性化リンパ球の割合と比較した結果、PCR で *M. fermentans* 陽性が疑われた患者 3 名で、T リンパ球の慢性活性化マーカーである HLA-DR 発現細胞が、T 細胞中 46%、28% および 25% と高く、末梢 T リンパ球活性化とマイコプラズマのマイトゲン活性の関連が疑われた。

A. 研究目的

IgA 腎症 (IgA nephropathy, IgA glomerulonephritis) では、腎臓の症状 (蛋白尿等) に先行して、呼吸器症状を呈する患者のいることが知られている。また、IgA 腎症の発症機構として血管内皮細胞の炎症、末梢 T リンパ球活性化 (TGF- β 1 等の T リンパ球由来サイトカインが、B リンパ球からの IgA 産性を促進させる等) の関与が考えられているが、持続的刺激物質は未解明のままである。我々は、口腔内微生物の病態成立あるいは病状悪化への関与を疑い、IgA 腎症患者咽頭からの菌の分離を複数の臨床施設において行っている。今回は、リンパ球へのマイトゲン活性を有することが知られているマイコプラズマのうち、ヒトの口腔内あるいは末梢血中からの分離報告がある 3 種について IgA 腎症患者における抗体値、感染の有無について検索したので報告する。

B. 材料と方法

Mycoplasma fermentans, *M. Orale*, *M. salivarium* (以下 Mf, Mo, Ms と略す) の 3 種について検討した。IgA 腎症と診断された

患者より血清、咽頭スワブ、末梢血単核細胞 (PBMCs)、扁桃を採取し、血清は ELISA による抗マイコプラズマ IgG および IgM 抗体の測定 (n=35)、咽頭スワブはマイコプラズマの培養 (n=16) ならびに *M. fermentans* 特異的 PCR (n=38)、PBMCs はフローサイトメトリーによるリンパ球表面の活性化マーカーの検索 (n=30) ならびに *M. fermentans* 特異的 PCR (n=23)、扁桃 (n=9) は *M. fermentans* 特異的 PCR に供試した。

C. 研究結果

35 人の患者血清中の抗マイコプラズマ抗体測定の結果、大方の患者で IgM 抗体価が OD 値 0 であるにもかかわらず、OD 値 0.1 以上を示した患者が、抗 Mf 抗体 5 人、抗 Mo 抗体 5 人、抗 Ms 抗体 3 人存在し (非患者 4 人中では、それぞれ 1 人、0 人、1 人)、特に患者 No.20 では抗 Ms 抗体価が OD 1.6 と高値を示した。患者 No.20 は 3 種のマイコプラズマに対する IgG 抗体価も各々 OD 0.7 以上と高かった。患者 TA の咽頭スワブより Mf と同サイズの PCR 産物が検出された。また、末梢 T リンパ球の慢性的活性化を示す HLA-DR 発現細胞は、T 細胞の 46% (患

者平均 12.4% (n=30, 非患者平均 4%, n=3) と検索患者中最高値を示した。No.20 の咽頭から Mo が分離されたが、Mf は分離できなかった。他患者 2 例 No.24, No.25 の PBMC から Mf-PCR 産物と同サイズの DNA が増幅され、抗 Ms-IgG 抗体が OD0.6 と高かった。この例における HLA-DR 発現細胞は、各々 25%, 28% と高かった。

D. 考察

IgA 腎症患者における T および B リンパ球活性化、特に T リンパ球表面への CD69 および HLA-DR の発現、B リンパ球表面への CD69 および CD25 発現は顕著であった。CD69 がリンパ球における刺激後初期に発現する感度の良いマーカーであることから、患者におけるリンパ球活性化刺激が、採血時にも継続していた可能性が考えられる。IgM 抗体の検索は、感染後初期の抗体をとらえることから、IgM 抗体上昇と CD69 マーカーの関連について検討すると、今回調べたマイコプラズマ 3 種のうち、抗 Mf に対する IgM:0.15 の患者 No.1 で、30% の T リンパ球における CD69 発現が認められた (データ、示さず)。リンパ球における CD69 発現が増強されている他の患者における抗マイコプラズマ IgM 抗体上昇は、認められなかったが、IgG 抗体価上昇を示す例が T リンパ球について 1 例、B リンパ球について 11 例観察された。一方、T リンパ球における慢性的活性化を示す HLA-DR 陽性細胞増加と抗マイコプラズマ IgG 抗体価上昇については、今回解析した患者中、3 名で関連が疑われた。IL-2 依存性シグナルによるリンパ球活性化マーカーである CD25 発現が B リンパ球において増強している患者 6 名中、1 名で抗 Mf.IgM 抗体、1 名で抗 Ms.IgM 抗体、2 名で抗 Ms および抗 Mo.IgG 抗体価上昇が観察された。抗マイコプラズマ IgG 抗体価については、今後、IgA 腎症以外の疾病あるいは健常人における抗体価測定を行う必要がある。

マイコプラズマのマイトゲン活性機序については、菌体成分がマクロファージを活性化し、サイトカインを経由してリンパ球活性化をもたらすものと考えられているが、分離した PBMCs にマイコプラズマを感染させると、T および B リンパ球での CD69, HLA-DR, CD25 発現の増強してくることを、以前に報告した (Sasaki, Y. et al. 1995, Infection and Immunity)。今回検討したマイコプラズマ、

とりわけ、低頻度ながら健常人の PBMCs に感染している可能性がある (PCR での DNA 分離報告がある) *M. fermentans* については、末梢血でのリンパ球と微生物の interaction が想定しうる。今回 PCR にて陽性とされた IgA 腎症患者 2 例における PBMCs への *M. fermentans* 感染も疑われることから、今度、菌分離を試みていく予定である。

E. 結論

約 30 例の IgA 腎症患者のうち、少なくとも 3 名において末梢 T リンパ球活性化と、*M. fermentans* 特異的 PCR による DNA 複製、ならびに抗マイコプラズマ抗体価上昇の関連の可能性が疑われた。

F. 研究発表

未定

G. 知的所有権の取得状況

なし

謝辞

患者検体を供戴きました協力病院の方々に深謝いたします。

大沢 弘 (弘前大学医・第二内科)、今井 祐一 (秋田大学医・第三内科)、政金 生人 (山形大学医・第一内科)、佐藤 博 (東北大学医・第二内科)、加藤 哲夫 (福島県立医科大学・第三内科)、中林 巖 (防衛医科大学校・第二内科)、中林 滋 (名古屋大学大幸医療センター・内科)、安永 親雄 (済生会八幡総合病院・内科)、原田 孝司 (長崎大学医・腎疾患治療部)

Patient No. 20 (図中、●)

Sex: male

Age: 36

Diagnosis: CGN (IgA-N, s/c)

First symptom: at 22 years old

Main symptom: Proteinuria (蛋白尿)
Hematuria (血尿)

Laboratory data:

1. 抗マイコプラズマ抗体

anti-*M. salivalium* IgM: OD 1.6

anti-*M. salivalium* IgG: OD 0.8

anti-*M. fermentans* IgG: OD 0.9

anti-*M. olaric* IgG: OD 0.8

2. T リンパ球活性化

HLA-DR 発現: Tcell 中の 46%

3. 咽頭からの *M. fermentans* と同サイズの

DNA 増幅

4、咽頭からのマイコプラズマ分離、*M. orale*

Patient No. 24 (図中、■)

Sex: male

Age: 51

Diagnosis: IgA-N

First symptom: 3-4 years before

Main symptom: Proteinuria (蛋白尿)

Laboratory data:

1、抗マイコプラズマ抗体

anti-*Mycoplasma* IgM: Not detected

anti-*M. salivalium* IgG: OD 0.6

anti-*M. fermentans* IgG: OD 0.16

anti-*M. orale* IgG: OD 0.3

2、Tリンパ球活性化

HLA-DR 発現: Tcell 中の 25%

3、PBMCs からの *M. fermentans* と同サイズの DNA 増幅

Patient No. 25 (図中、▲)

Sex: female

Age: 31

Diagnosis: Nephropathy (腎炎)

First symptom: since 1980

Main symptom: Proteinuria (蛋白尿)

Laboratory data:

1、抗マイコプラズマ抗体

anti-*Mycoplasma* IgM: Not detected

anti-*M. salivalium* IgG: OD 0.5

anti-*M. fermentans* IgG: OD 0.13

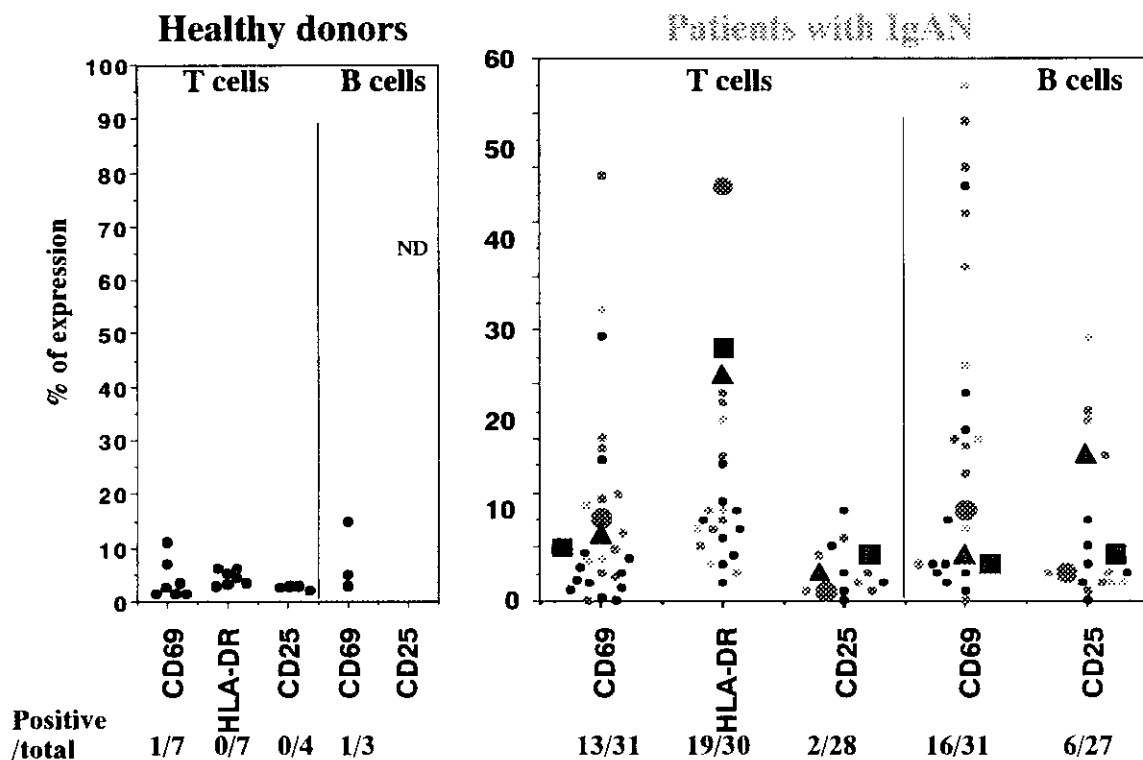
anti-*M. orale* IgG: OD 0.4

2、Tリンパ球活性化

HLA-DR 発現: Tcell 中の 28%

3、PBMCs からの *M. fermentans* と同サイズの DNA 増幅

Cell activation markers on peripheral lymphocytes from healthy donors and patients with IgAN



11. びまん性肺疾患または呼吸不全における細菌感染

分担研究者 永武 毅 (長崎大学熱帯医学研究所)

A. 研究目的

びまん性肺疾患あるいは呼吸不全の原因となる慢性疾患の中で難治化要因として病原細菌や非病原性の常在細菌がいかに関与しているかの研究を行う。特に感染症の成立過程での最初のステップとなる上皮細胞への細菌付着のメカニズムを解明することで、びまん性肺疾患の微生物学的原因究明を行なうと共に将来の感染予防に役立つ薬剤の発見やワクチンの開発をも目指すものである。

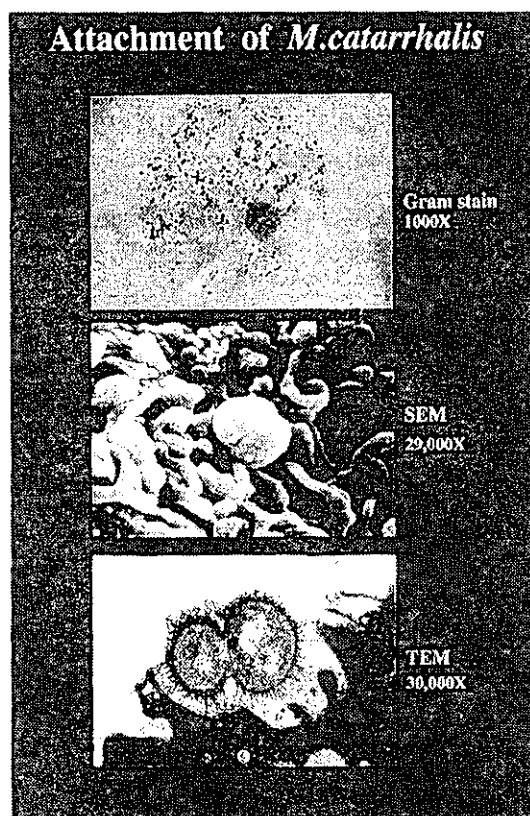
B. 研究方法

びまん性肺疾患または呼吸不全の原因となる細菌感染の代表的起炎菌の上皮細胞側の付着因子については各菌種毎にヒト咽頭上皮細胞表面の各種糖鎖についてそれぞれ特異的であることを *in vitro* 付着実験を通して明らかにする。病原細菌としてはいずれも呼吸器感染症患者から分離同定されたインフルエンザ菌 (*nontypable*)、ブランハメラ (モラクセラ・カタラーリス)、さらにはメリオイドシスの病原菌である *Burkholderia pseudomallei* の中から菌株を選び、菌数を調整した。一方、ヒト咽頭上皮細胞については健康者群と慢性呼吸器疾患群について十分な *informed consent* を得た後で咽頭上皮細胞を綿棒にて採取後、遠心洗浄後1定量に調整した。付着実験では各種糖鎖のいかなるものが上皮細胞表面上の付着に関与しているかを明らかにし、これまで慢性下気道感染症の感染エピソードの減少に貢献していることが臨床的に推察されていた一部の去痰薬について細菌の上皮細胞への付着に影響がみられるか否かについても検討した。

C. 研究結果

これまでの長年の臨床的研究から上気道とりわけ口腔咽頭付着病原細菌の付着性と下気道感染症発症が相関することをすでに明らかにしてきた。今回はびまん性肺疾患または呼吸不全の原因となる細菌の関与について、病原性発現と発症メカニズムの重要な要因となる咽頭上皮細胞への細菌付着の細胞側レ

セプターの検討を行なった。これまで明らかにしていたブランハメラ (*B.catarrhalis*) のGM2、インフ



ルエンザ菌 (*H. Influenzae*) のGD2に加えて東南アジア地域における難治重症感染症であるメリオイドシスの原因菌である *Burkholderia pseudomallei* の付着因子としても糖鎖の重要性を明らかにした。さらにこれまでの日常的に呼吸器感染症疾患患者に去痰薬として用いられてきた一部の薬 (S-Carboxymethyl cysteine, N-Acetylcysteine) で咽頭上皮細胞への細菌付着性を阻害する作用がみられることを初めて明らかにした。

RECEPTOR OF NONTYPABLE *H. INFLUENZAE*

Table 1. Attachment of *H. influenzae* to pharyngeal epithelial cells after treatment with different gangliosides

Gangliosides	Amount (µg/ml)	Test*	Significance of difference in attachment effect compared to the control
GM1	125	106.0 ± 26.0	NS ^b
	12.5	107.4 ± 15.4	NS
	1.25	102.9 ± 9.4	NS
GM2	125	58.3 ± 8.99	NS
	12.5	80.2 ± 33.6	NS
	1.25	90.4 ± 14.9	NS
GM3	125	148.7 ± 10.1	NS
	12.5	132.7 ± 45.5	NS
	1.25	107.1 ± 9.7	NS
GD1a	125	65.5 ± 3.0	< 0.05
	12.5	68.9 ± 4.4	< 0.05
	1.25	72.7 ± 18.2	NS
GD1b	125	55.1 ± 2.7	< 0.01
	12.5	58.6 ± 13.0	< 0.05
	1.25	64.4 ± 16.8	< 0.05
GT1b	125	62.5 ± 21.1	NS
	12.5	60.4 ± 15.8	NS
	1.25	65.7 ± 14.6	NS
GD2	1.25	38.2 ± 8.8	< 0.001
	0.125	49.5 ± 11.6	< 0.001
	0.0125	55.8 ± 11.2	< 0.001
	0.00125	75.3 ± 21.0	NS
GD3	125	104.0 ± 8.84	NS
	12.5	93.5 ± 8.52	NS
	1.25	109.6 ± 19.3	NS
Asialo-GM1	125	119.1 ± 38.7	NS
	12.5	94.2 ± 29.9	NS
	1.25	109.5 ± 33.3	NS

* Attachment of bacteria after treatment with gangliosides are expressed as the percentage of bacterial attachment in the control.

^b Not significant.

D. 考察と結論

びまん性肺疾患または呼吸不全における細菌感染の関与として、これまで通常の呼吸器親和性の病原細菌が中心をなすものと考えられてきた。特に急性憎悪の原因菌としてインフルエンザ菌、肺炎球菌、ブランハメラなどの院外発症起炎菌と緑膿菌、黄色ブドウ球菌、肺炎桿菌などの院内感染起炎菌とに大きく分けられることはすでに多くの臨床研究から明らかである。そして、これらの呼吸器親和性病原細菌の多くはまず上気道上皮細胞への付着性を感染発症のファースト・ステップとすることから上気道のクリーニング（ガーグリングなど）で上皮細胞への菌付着を減らすことで下気道感染症を減少させることが出来る。また、ブランハメラのような細菌で上気道上皮細胞への菌付着性に季節変動があり冬に付着率が増加し、夏に付着率が減少することと本菌の下気道感染症の症例数が比例して増減することからも細菌感染症における上気道と下気道のかかわりを明らかにした。これらの上皮細胞と菌との付着因子

として細胞表面の糖鎖が重要な役割を担っており、細菌の種類によって付着に関与する糖鎖の種類がそ

Receptors and adhesins for attachment, determined from the Department of Internal Medicine, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

Bacteria	Adheins	Receptor
<i>M. catarrhalis</i>	Fimbriae/pili	Ganglioside GM2
Nontypable <i>H. influenzae</i>		Ganglioside GD2
<i>B. pseudomallei</i>		Asialoganglioside AGM1-AGM2

れぞれ異なることから、糖鎖をブロックすることで感染発症防止につながる薬物の存在を証明しつつある。今後びまん性肺疾患または呼吸不全における細菌感染の関与について精細な検討を行うと共にこれらの細菌感染の治療・予防にも新しい展望が開けるものと考えられる。

F. 研究発表

1. Ahmad Hamid Gori, Kamruddin Ahmed, Glenda Martinez, Hironori Masaki, Kiwao Watanabe, Tsuyoshi Nagatake : Mediation Of Attachment Of *Burkholderia Pseudomallei* To Human Pharyngeal Epithelial Cells By The Asialoganglioside GM1-GM2 Receptor Complex. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 61(3):473-475, 1999
2. M. Tao, H. Yamashita, K. Watanabe, T. Nagatake : Possible virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse septic model. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 23 : 1335-146, 1999
3. Samir. K. Saha, N. Rikitomi, M. Ruhulamin, H. Masaki, M. Hanif, Maksuda Islam, K. Watanabe, K. Ahmed, K. Matsumoto, R. B. Sack, T. Nagatake : Antimicrobial Resistance and Serotype Distribution of *Streptococcus pneumoniae* Strains Causing Childhood Infections in Bangladesh, 1993 to 1997. Journal of Clinical Microbiology, 37 (3) : 798-800, 1999
4. Can Hong Zheng, Kamruddin Ahmed, Naoto Rikitomi, Glenda Martinez, Tsuyoshi Nagatake: The effect of S-Carboxymethylcysteine and N-Acetylcysteine on the Adherence of *Moraxella*

catarrhalis to Human Pharyngeal Epithelial Cells. Microbiol. Immunol. 43(2);107-113,1999

5. Kenji Kawakami, Kamruddin Ahmed, Yoshiaki Utsunomiya, Naoto Rikitomi, Akihiro Hori, Kazunori Oishi, Tsuyoshi Nagatake: Attachment of Nontypable Haemophilus influenzae to Human Pharyngeal Epithelial Cells Mediated by a Ganglioside Receptor. Microbiol. Immunol. 42(10);697-702,1998

12. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全におけるウイルス感染

分担研究者 山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院老人科）

研究要旨 ライノウイルス感染と慢性肺気腫および気管支喘息急性増悪の関係を一層明らかにするため、RT-PCR法でライノウイルスの検出を行った。24例の上気道症状患者からうがい液、鼻汁、咽頭ぬぐい液を採取し、5例でライノウイルスが検出された。従来の細胞接種法に比べて高い陽性率を示した。ヒト培養気管上皮細胞を用いて喀痰の構成物質であるムチン合成を調べた。ライノウイルス感染後、上皮細胞のムチン遺伝子発現増加と培養液ムチン放出増加を明らかにした。

A. 研究目的

気管支喘息や慢性気管支炎と同様に、慢性肺気腫も感冒を機会に急性増悪すると知られているが、起因ウイルスの同定や病態の把握はこれまでなされていない。昨年度、慢性肺気腫および気管支喘息の急性増悪においてインフルエンザウイルス等のウイルス感染と低酸素血症、ピークフロー値の低下、呼気CO₂値上昇、血中可溶性ICAM-1およびIL-6上昇を報告したが、細胞接種法ではライノウイルスを検出出来なかった。気管培養細胞を用いて、炎症性サイトカイン、ICAM-1、LDL受容体合成亢進を報告してきたが、気道狭窄の原因としての喀痰分泌亢進機序は不明であった。本年度は1)慢性肺気腫の急性増悪とライノウイルス感染の関係を明らかにすること、2)気管上皮細胞のムチン合成に対するライノウイルス感染の効果を明らかにすることにつき、研究を行った。

B. 研究方法

①当科通院中の慢性肺気腫患者20人、気管支喘息71人を対象に気道感染症状に随伴した急性増悪時に咽頭ぬぐい液、鼻汁、うがい液を採取しRNAを抽出してRT-PCR法にてライノウイルスRNAの存在を調べた。患者の肺機能を検討するため、動脈血血液ガス分析とピークフロー値を測定した。急性増悪時の血中因子の変化を検討するため、

血中IL-6および可溶性ICAM-1を測定した。

②剖検気管上皮細胞を培養し、14型ライノウイルスを感染させた。感染後、上皮細胞を回収しRNAを抽出した。RT-PCR法によりムチン遺伝子の内、MUC1、MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC7mRNAを検索した。また、感染後に培養液を回収し、MUC5ACに特異的なモノクローナル抗体（Chemicon International, Temecula, CA）を用いてELISA法にてムチン放出量を測定した。

C. 研究結果

①対象患者の内平成11年4月から12月の期間で慢性肺気腫患者20例中5例、気管支喘息71例中19例が急性上気道炎症状と呼吸困難症状を呈した。この内、慢性肺気腫2例、気管支喘息3例でライノウイルスRNAが検出された。ライノウイルスRNAは咽頭ぬぐい液1例、うがい液2例、鼻汁2例で陽性であった。これに対して、1999年12月まで細胞接種によるウイルス検出法で行った慢性肺気腫17例、気管支喘息54例の急性上気道炎ウイルス検査の内、ライノウイルスは1例も細胞接種で検出されなかった。ライノウイルスRNAが検出された5例は、これまで他のウイルスが検出された場合と同様に呼吸困難感、動脈血酸素濃度低下、ピークフロー値低下、血中IL-6お

よび血中可溶性 ICAM-1 の増加を示した。

(2)ライノウイルス 14 型感染後、培養ヒト気管上皮細胞においてムチン遺伝子 MUC5AmRNA の発現が増加した。ELISA 法で調べた培養液ムチン放出量は 4-8 時間後においてコントロールに比べて 1.2-1.3 倍に有意に増加した。

D. 考察

本年度の研究で、上気道感染を伴った慢性肺気腫および気管支喘息の急性増悪時にライノウイルスが同定された。RT-PCR 法を用いたライノウイルス RNA 検索が従来の細胞接種法に比べて検出感度の高いことが明らかになった。これらの結果は気管支喘息患者に対して行った最近の報告に一致している。陽性率が 20%前後とまだ低いが、陰性の検体は上気道炎症症状の出現から 3 日以上経過したものが多い傾向がある。今後、検体採取を早める工夫が必要である。ライノウイルス陽性症例において、ライノウイルス以外のウイルスと同様に動脈血酸素濃度低下、ピークフロー値の低下などの肺機能低下を認めた。また、IL-6 や可溶性 ICAM-1 などの血中炎症性因子の上昇を認めた。上気道炎症を反映するものと思われる。

培養細胞を用いた研究において、気管上皮細胞からのムチン合成および放出亢進を認めた。ライノウイルス感染による気道内喀痰増加には神経性あるいは液性因子を介したムチン分泌、水分分泌が関与すると考えられているが、今回の研究では気管上皮細胞に対するライノウイルスの直接作用によるムチン合成亢進が明らかになった。ムチン合成の細胞内機序も今後の研究課題として残っている。

E. 結論

RT-PCR 法を用いたライノウイルス検出法は慢性肺気腫におけるライノウイルス感染の同定に有用である。ライノウイルス感染はヒト気管上皮細胞のムチン合成を促進する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnui T, Funayama T, Sekizawa K, Yamaya M, Sasaki H. Effects of

inhaled beclomethasone dipropionate on serum IgE levels and clinical symptoms in atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 1999;29:357-361.

- 2) Sekizawa K, Yanai M, Yamaya M, Arai H, Sasaki H. Amantadine and pneumonia in elderly stroke patients. *Lancet* 1999;353: 2157.
- 3) Yamaya M, Sekizawa K, Ishizuka S, Monma M, Sasaki H. Exhaled carbon monoxide levels during treatment of acute asthma. *Eur Respir J* 1999;7:757-760.
- 4) Yamaya M, Sekizawa K, Suzuki T, Yamada N, Furukawa M, Ishizuka S, Nakayama K, Terajima M, Numazaki Y, Sasaki H. Infection of human respiratory submucosal glands with rhinovirus: effects on cytokine and ICAM-1 production. *Am J Physiol* 1999;277:L362-L371.
- 5) Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Lie R, Suzuki T, Nakayama K, Takeda A, Yamaguchi T, Itoyama Y, Sekizawa K, Sasaki H. Protective effects of heme oxygenase-1 against oxidant-induced injury in the cultured human tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:428-435.
- 6) Nakasato H, Ohnui T, Sekizawa K, Matsui T, Yamaya M, Tamura G, Sasaki H. Prevention of severe premenstrual asthma attacks by leukotriene receptor antagonist. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:585-588.
- 7) Monma M, Yamaya M, Sekizawa K, Ikeda K, Suzuki N, Kikuchi T, Takasaka T, Sasaki H. Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1537-1541.
- 8) Masu K, Ohno I, Yamaya M, Kawamura T, Sasaki H, Shirato K. Inhibition of tracheal smooth muscle cell proliferation by phosphodiesterase inhibitors. *Allergology International* 1999;48:259-264.

13. 慢性肺疾患における細菌の関与とその治療法の開発

分担研究者 村田 幸作 (京都大学食糧科学研究所)

研究要旨 難治性肺疾患の一つである緑膿菌バイオフィーム感染症の新規な治療法として、バイオフィームアルギン酸を微生物酵素で分解し、抗生物質との併用により感染菌を除去する方法を提案している。アルギン酸を分解除去する *Sphingomonas* 属細菌由来のアルギン酸リアーゼの抗原性に関して以下の知見を得た。ポリエチレングリコール(PEG)修飾により調製した酵素は、免疫反応性が低下したが、依然として抗体産生能を有し、動物実験で軽度のアナフィラキシー症状を引き起こした。これは、PEG の分解、或いは PEG による抗原決定基のマスクングが不十分なためと考えられた。そこで、本酵素の抗原決定基を決定するため、6種類の低分子化酵素を調製するとともに、本酵素のX線結晶構造を明らかにした。

A. 研究目的

難治性細菌感染症における感染要因(バイオフィームの構造、機能、除去法)を解析し、新規な治療法を開発する。現在バイオフィーム感染症の治療には、抗生物質の大量・長期投与が経験的に行われているが、高齢者の体力問題や耐性菌の出現などの問題が生じている。本研究では、緑膿菌バイオフィーム構成多糖であるアルギン酸を細菌酵素：アルギン酸リアーゼで溶解・除去し、抗生物質との併用によって感染菌を除去する方法論を確立する。

B. 研究方法

土壌分離細菌 *Sphingomonas* sp. A1 由来のアルギン酸リアーゼ(A1-III)を大腸菌で発現させ、その組み換え体酵素を実験に供した。酵素の PEG 処理、免疫活性、X線結晶構造解析は既報の方法に準じた。
(倫理面への配慮)

動物実験は、京都大学食糧科学研究所が策定した動物実験ガイドラインに則って行った。

C. 研究結果

A1-III を緑膿菌感染症の治療に応用するため、その抗原性除去に関する検討を行った。PEG 修飾により抗原性をほぼ完全に除去した A1-III(PEG-A1-III)は、動物実験で軽度のアナフィラキシー症状を引き起こした。こ

れは、血中環流中で微量の抗体が産生されたことが原因であった。

抗原決定基に関する知見を得るため、A1-III の X 線結晶構造を決定した。本酵素はヘリックス構造のみからなり、新規な $\alpha 6/\alpha 5$ バレル構造を有していた。

D. 考察

PEG 修飾 A1-III は、免疫反応性低下には明らかな効果を有していたが、依然として抗体産生能を有し、アナフィラキシー反応を回避する以上の抗体を産生させることが示唆された。その原因として、PEG 鎖内のエステル結合が一部加水分解され PEG 鎖で覆われていた抗原決定基が露出した、或いは PEG 鎖によるマスクが完全でない抗原決定基が存在したと考えられた。

E. 結論

殆ど抗原性を示さない PEG 修飾 A1-III は、動物実験で軽度なアナフィラキシー反応を惹起した。PEG 修飾に関しては、膨大かつ詳細な検討を行ったので、A1-III の抗原性除去に PEG による化学修飾は適用できないと結論した。今後、立体構造及び低分子化酵素の抗原性評価により抗原決定基を同定し、A1-III のエピトープ部位特異的変異体を作製することにより完全無抗原性酵素の創出が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Momma, M. Okamoto, Y. Mishima, S. Mori, W. Hashimoto, and K. Murata: A novel bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporter system that allows uptake of macromolecules. Submitted for publication.
- (2) W. Hashimoto, O. Miyake, K. Momma, S. Kawai, and K. Murata: Molecular identification of oligo-alginate lyase of *Sphingomonas* sp. strain A1 as one of the enzymes required for complete depolymerization of alginate. Submitted for publication.
- (3) 榊原裕之、久野智弘、橋本 渉、鈴木健彦、村田幸作: PEG 修飾 Alginate Lyase のインビトロ緑膿菌バイオフィルムに対する破壊効果に関する基礎的検討. 投稿中.
- (4) H. Sakakibara, T. Tamura, T. Suzuki, M. Mizobe, T. Hisano, W. Hashimoto, and K. Murata: Preparation and properties of alginate lyase modified with polyethylene glycol. Submitted for publication.
- (5) H.-J. Yoon, W. Hashimoto, O. Miyake, M. Okamoto, B. Mikami, and K. Murata: Overexpression in *Escherichia coli* and characterization of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyases. *Protein Expr. and Purif.*, (in press)(2000).
- (6) H.-J. Yoon, W. Hashimoto, Y. Katsuya, Y. Mezaki, K. Murata, and B. Mikami: Crystallographic analysis of alginate lyase A1-II from *Sphingomonas* species A1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1476(2), 382-385(2000).
- (7) H.-J. Yoon, B. Mikami, W. Hashimoto, and K. Murata: Crystal structure of alginate lyase A1-III from *Sphingomonas* species A1 at 1.78 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 290, 505-514(1999).
- (8) W. Hashimoto, K. Momma, H. Miki, Y. Mishima, E. Kobayashi, O. Miyake, S. Kawai, H. Nankai, B. Mikami, and K. Murata: Enzymatic and Genetic Bases on Assimilation, Depolymerization,

and Transport of Heteropolysaccharides in Bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, 87(2), 123-136(1999).

- (9) K. Momma, W. Hashimoto, O. Miyake, H.-J. Yoon, S. Kawai, Y. Mishima, B. Mikami, and K. Murata: Special cell surface structure, and novel macromolecule transport/depolymerization system of *Sphingomonas* sp A1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 23(4/5), 425-435(1999).

1. 学会発表

- (1) 門間敬子、三島由美子、河井重幸、橋本 渉、村田幸作: *Sphingomonas* sp. A1 の細胞表層構造と新規高分子取り込み機構(ABC トランスポーター). 日本農芸化学会関西支部例会(第 409 回). 京都(1999).
- (2) 門間敬子、森 茂太郎、三島由美子、橋本 渉、村田幸作: *Sphingomonas* sp. A1 細胞表層における体腔形成と高分子アルギン酸取り込みトランスポーターの構造と機能. 日本農芸化学会中部・関西支部合同大会(第 411 回). 岐阜(1999).
- (3) 門間敬子、三島由美子、森 茂太郎、橋本 渉、村田幸作: *Sphingomonas* sp. A1 の特異な細胞表層構造と高分子を取り込む新規な ABC トランスポーター. 日本生化学会年次大会(第 72 回). 横浜(1999).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- (1) 特願平 8-307250 『PEG 修飾アルギン酸リアーゼ及びその用途』(出願人: 田辺製薬株式会社、グンゼ株式会社)
- (2) 特願平 5-113149 『アルギン酸リアーゼ発現遺伝子及びアルギン酸リアーゼの製造法』(出願人: 大塚化学株式会社、グンゼ株式会社)
- (3) PCT/JP93/00227 『嚢胞性腺維症の治療薬 (国際特許)』(出願人: 大塚化学株式会社、グンゼ株式会社、坂口健二)
- (4) 特願平 4-348465 『アルギン酸リアーゼ』(出願人: 大塚化学株式会社、グンゼ株式会社)
- (5) 特願平 3-164899 『細菌によるアルギン酸分解法』(出願人: 大塚化学株式会社)