

9. 諸外国サルコイドーシス患者からの生検リンパ節における細菌 DNA の検出と定量解析

分担研究者 江石義信 東京医科歯科大学大学院病因・病理学助教授

研究要旨 東京・熊本・ドイツ・イギリス・イタリアの4カ国5施設におけるサルコイドーシス患者からの生検リンパ節を収集し、定量系 PCR 法を用いて組織内細菌ゲノム数を解析した結果、5施設すべてのサルコイドーシス患者の生検リンパ節 108 症例中、106 例（98%）において *Propionibacterium acnes* あるいは *P. granulorum* が高濃度に検出された。

A. 研究目的

サルコイドーシス（以下サ症）の原因は不明である。日本では、*Propionibacterium acnes* がサ症リンパ節病変から分離培養され、定量系 PCR 法により、すべてのサ症リンパ節組織から多量の *P. acnes* あるいは *P. granulorum* DNA が検出された。今回の国際共同研究では、国外のサ症患者においても日本と同様な所見が認められるか否かを検討する。

B. 研究方法

材料としては、診断用目的で生検されたリンパ節のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いており研究における倫理的問題は生じないものと判断した。今回の共同研究のために、各施設から病理診断名の記載のない滅菌チューブに薄切切片を入れて送付してもらい、すべての解析が終了した時点で診断名が公開されデータの解析が行われた。サ症リンパ節は日本人 43 症例、イタリア人 17 症例、ドイツ人 33 症例、英国人 15 症例を解析した。検索対照として、結核性リンパ節炎検体を日本人 28 症例、イタリア人 17 症例、ドイツ人 5 症例、英国人 15 症例を用い、また、反応性リンパ節炎検体を日本人 40 症例、イタリア人 16 症例、ドイツ人 15 症例、英国人 15 症例を用いた。各菌種に特異的なプライマーとプローブを作成し、TaqMan PCR 法にて

組織から抽出した DNA 総量 500 μ g あたりの菌ゲノム数を定量し、50 以上を検出陽性検体として解析をおこなった。

C. 研究結果

4カ国いずれの施設においても検出率に有意差はなく、*P. acnes* ゲノムはサ症患者検体の 80~100%から検出され、*P. granulorum* ゲノムは患者の 35~80%で検出された。2例の例外を除いてサ症患者のほとんど（98%）でいずれかの種の *propionibacteria* が検出された。*P. acnes* のみが検出されたのはサ症患者の 20~60%で、*P. granulorum* のみが検出されたのは患者の 0~20%であった。*M. tuberculosis* ゲノムは結核患者では 65~80%で検出されたが、サ症患者で検出された症例は 0~10%で、その検出量も同一検体で検出される *propionibacteria* ゲノム量に比較してごく微量であった。常在菌の対照として大腸菌ゲノム数をすべての検体で同時に解析したが、多くの検体で検出されず検出されたものでもごく微量であった。結核症例の多くても3分の1で、また、反応性リンパ節炎症例の 20~60%で *propionibacteria* ゲノムが検出されたが、その検出量はサ症における検出量に比較してごく微量であった。

D. 考察

マイコバクテリアをはじめとして、これまで多くの微生物がサ症の原因として候補にあがってきたが、病変部から分離培養され証明されたものはない。これとは対照的に propionibacteria はこれまでに日本人サ症患者の病変部から分離培養される唯一の微生物であり、今回すべてのサ症病変部から本菌 DNA が検出されたことを考え合わせると、諸外国のサ症検体においても日本人と同様に、本菌が分離培養可能ある可能性が高い。これまでの病変部リンパ節の免疫病理学的解析からは、propionibacteria の病変部における存在様式はすべて細胞内であり、L 型菌を含めて細胞内共生菌としての本菌の細菌学的特性を精査する必要がある。また、常在性の細菌である propionibacteria がサ症患者のみに類上皮細胞肉芽腫を形成するとすれば、本菌由来の抗原物質に対してサ症患者特有の IV 型アレルギー反応が存在している可能性が高く、この点に関しても今後免疫学的な観点から徹底的に調査していく必要がある。責任抗原のエピトープ解析は将来のサ症の治療に脱感作的免疫療法の道をひらく重要なテーマである。サ症の原因が propionibacteria であったとしても、腸内細菌叢の大腸菌が抗生物質の投与により消滅しないと同時に、これを抗生物質の投与で体内から消滅させることは不可能であり、本菌の異所性増殖の問題と、患者に特有な細胞性免疫型のアレルギー反応の問題が今後もっとも重要な研究課題である。

E. 結論

propionibacteria は、日本人のサ症患者のみならず、結核菌原因説が長年のあいだ提唱されてきた歴史を有するヨーロッパ諸国のサ症患者においても、高率・多量に検出された、他方では結核菌の検出率は低率かつ微量であったことから、ヨーロッパ諸国においても propionibacteria がサ症の原因となっている可能性が高い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takizawa T, Koike M, Takemura T, Kudoh S, Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma Om P, Ando M. Sarcoidosis and propionibacteria: an international study by quantitative PCR of propionibacterial DNA in biopsy samples of sarcoid lymph nodes. *Ann Int Med* (in submission).
- 2) Kobayashi D, Eishi Y, Ohkusa T, Ishige I, Cho Y, Minami J, Yamada T, Takizawa T, Koike M. Quantitative analysis of Helicobacter pylori infection in biopsy samples from gastric mucosa. *Ann Int Med* (in submission).
- 3) Mimura M, Tanaka N, Kimijima Y, Eishi Y, Amagasa T, Okada N. Melanotic neuroectodermal tumor of infancy: immunohistochemical and ultrastructural study. *Asian J Oral Maxillofac Surg* 2000; 12: 217-224
- 4) Ebe Y, Ikushima S, Yamaguchi T, Kohno K, Azuma A, Sato K, Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y. Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from Propionibacterium acnes DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2000; 17: 256-265.
- 5) Ohkusa T, Fujiki K, Takashimizu I, Kumagai J, Tanizawa T, Eishi Y. Endoscopic and histological comparison of nonulcer dyspepsia with and without Helicobacter pylori infection evaluated by the modified Sydney system. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2195-2199.

- 6) Kato C, Sato K, Wakabayashi A, Eishi Y.
The effects of allopurinol on immune function in normal BALB/c and SCID mice. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 547-556.
- 7) Tanaka M, Kawaguchi Y, Yokofujita J, Takagi M, Eishi Y, Hirai K. Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP2A gene in gastric carcinoma in Japan. *Virus Genes* 1999; 19: 103-111.
- 8) Kato C, Sato K, Eishi Y, Nakamura K. The influence of initial exposure timing to beta-lactoglobulin on oral tolerance induction. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 870-878.
- 9) Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y. Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet* 1999; 354: 120-123.
- 10) Eishi Y, Ishige I, Usui Y, Ebe Y, Tamemura T. Propionibacteria as a possible causative agent of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999; 16: 8-10.
- 11) Akashi T, Miyagi T, Ando N, Suzuki Y, Nemoto T, Eishi Y, Nakamura K, Shirasawa T, Osa N, Tanaka N, Burgeson RE. Synthesis of basement membrane by gastrointestinal cancer cell lines. *J Pathol* 1999; 187: 223-228.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

10. 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教授
研究協力者 田中 香お里 同施設助手

研究要旨 前年度の検討に基づいて選択培地に添加する薬剤の一部と基礎培地の変更を行い、変更後の薬剤の配合を検討した。メトロニダゾール(M)、アジ化ナトリウム(SA)、抗菌薬 A (A) を種々の濃度で添加した培地に、低い菌量に設定した *P.acnes* 9 株と通常腸管に存在すると考えられる菌量に調製した代表的な腸管常在菌種 11 菌種 40 株を接種し培地の選択性を試験した。その結果、選択培地としては、ブルセラ HK 血液培地に M 4mg/L、SA 125mg/L、A 16mg/L を添加したものの、嫌気培養は 4 日までが適当と考えられた。この配合の培地を用い、20～60 代の健康人 70 人の糞便における *Propionibacterium* spp. の検索を行った。試作培地は *Propionibacterium* spp. に良好な選択性を示した。29 検体 (41.4%) から平均 2×10^2 cfu/ml の *Propionibacterium* spp. が検出され、うち *P.acnes* は 23 検体 (32.8%) にみられた。この検討から、培地の有用性と成人の約 4 割の腸管内に少ない菌量の *Propionibacterium* が存在することが示された。

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

I. 選択培地の作成

前年度の検討に基づき、ブルセラ HK 寒天培地（極東製薬）に 5% 羊溶血血液を添加して基礎培地とし、これにメトロニダゾール (M : 4、8 mg/L)、アジ化ナトリウム (SA : 125、250 mg/L)、薬剤 (A) (A : 4、8、16 mg/L) の 3 剤をそれぞれの組み合わせで添加し選択培地とした。これらの培地に腸管常在菌 11 菌種 (*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium* spp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus*

spp.) 計 40 株を通常存在すると考えられる菌量で、また、*P.acnes* 9 株を 10^5 cfu/mL で接種した。これらを嫌気培養し、培養 3、5、7 日目に各菌株の発育の有無を観察した。

II. 糞便検体を用いた検討

20~60 代の健康人 70 人の糞便を一白金耳 (約 65 mg) 採り、試作した培地 (M: 4 mg/L, SA: 125 mg/L, A: 16 mg/L) に直接塗布した後、嫌気培養した。培養 3 日目から選択培地上に発育した菌を観察し、分離同定した。分離された菌の同定は、コロニーの外観、グラム染色所見、カタラーゼ試験、簡易同定キット、LBS 培地・EF 培地・BBE 培地での発育、終末代謝産物分析などにより行った。

C. 研究結果

I. 選択培地の作成

培養 3 日目の時点で、全ての配合の培地に *P.acnes* 全 9 株が発育した。発育の度合いは、薬剤無添加の培地とほぼ同等であった。その他の 11 菌種 40 株については、全ての配合において、*Lactobacillus* spp. の一株を除いた 39 株が発育が阻止された。*Lactobacillus* spp. の 1 株については、A を 8mg/L 添加した培地の一部と、4mg/L 添加した全ての培地で発育がみられた。この株は、培養 5 日目には、それまで発育を抑制されていた A を 16 ないし 8mg/L 添加した培地でも極微弱ながら発育がみられるようになった。このほか培養 5 日目では、A を 4mg/L 添加した培地で新たに *Lactobacillus* spp. 1 株と *E.faecalis* 2 株の極微弱な発育が確認された。これらの結果から、選択培地における薬剤の配合を M 4mg/L, SA 125mg/L, A 16mg/L とし、目的菌種の分離は培養 4 日目までを目安とすることとした。

II. 糞便検体を用いた検討

培養 4 日目の時点では、カタラーゼ陽性で主要代謝産物としてプロピオン酸を産生し、形態その他から *Propionibacterium* spp. と同定された株は、70 検体中 29 検体 (41.4%) から 31 株検出された。31 株の内訳は、*P.acnes* 23 株、*Propionibacterium*

granulosum 4 株、*Propionibacterium* spp. 4 株であった。菌量の検出検体当たりの平均は、*Propionibacterium* spp. 全体では 2.08×10^2 cfu/g、*P.acnes* のみでは 1.4×10^2 cfu/g であった。個々の菌量は、 1.5×10^2 cfu/g (塗抹平板上の集落数が 10 個以下) 以下から 1.5×10^3 cfu/g (集落数が 100 個) 以上まで差が見られたが、全体の約 7 割にあたる 23 株の菌量は 1.5×10^2 cfu/g 以下であった。

各年代での検出率は、20 歳代 (n=23) 47.8% (11 検体)、30 歳代 (n=15) 20.0% (3 検体)、40 歳代 (n=20) 45.0% (9 検体)、50 歳代 (n=10) 60.0% (6 検体)、60 歳代 (n=2) 0% であった。

試作培地の選択性は、培養 4 日目では良好であった。この時点で 70 検体中 22 検体に目的外の菌の発育がみられたが、うち 15 検体では集落の外観から容易に目的菌との判別が可能であった。これらの検体にみられた目的外の菌種は、*Bacteroides* spp. (7 株)、*Enterococcus* spp. (1 株)、*Lactococcus* spp. (1 株)、*Micrococcus* spp. (1 株)、*Lactobacillus* spp. (5 株) であった。7 検体では、集落の外観からの判別が困難あるいは判別者の熟練度によっては困難と考えられたものがみられた。これらは、*Lactobacillus* spp. (6 株) と *Enterococcus* spp. (1 株) で、何れもグラム染色で容易に判別可能であった。培養 7 日目では、培地中の選択薬の効力低下から、目的外の菌の発育がみられたものが 55 検体になったが、5 日目以降に新たに *Propionibacterium* spp. が検出された検体はなかった。

D. 考察

今回検討した選択培地は、分離株を用いた検討では優れた選択性を示した。これは、ゲンタマイシンに代えて添加したアジ化ナトリウムが菌量の多い腸内細菌科の抑制に十分な効果を示したこと、おそらく *P.acnes* の菌量が少ないために前回の検討で *P.acnes* の発育を予想外に強く抑制したと考えられるゲンタマイシンが除かれた一方、ブレイン・ハート・インフュージョンに代えて *P.acnes* の発育支持力がより強いと考えられる血液加ブルセラ HK を基礎培地としたことで、

菌数の少ない目的菌の十分な発育が得られるようになったためと考えられた。しかしながら、先のメトロニダゾール/ゲンタマイシン/薬剤 A を配合した培地では、完全に発育を阻止されていた *Lactobacillus* spp.のうち一部の菌種が、培養 3 日目の時点で薬剤 A の配合量の少ない培地で発育し、培養 5 日目以降は、最高濃度の薬剤 A を含む培地でも発育がみられるようになった。これは、*Lactobacillus* spp.の一部の菌種に対しては元来薬剤 A の抗菌力がやや劣っており、先の培地ではゲンタマイシンによって発育抑制されていた *Lactobacillus* spp.が今回の培地では発育可能になったためと考えられる。そのため、低濃度のゲンタマイシンを培地に添加することも有効と考えられたが、糞便における

Propionibacterium spp.の菌量が全く未知数であるため、目的菌への影響を考え、糞便検体を用いた検討では、メトロニダゾール/アジ化ナトリウム/薬剤 A の 3 剤の配合にとどめるのが適当と考えられた。

糞便検体を用いた検討でも、試作培地は良好な選択性を示したが、予想通り一部の検体で *Lactobacillus* の発育がみられた。集落の外観だけでは目的菌との鑑別が困難な株もあったが、グラム染色で容易に鑑別可能であり、*Lactobacillus* spp.の選択培地である LBS 培地を併用することにより鑑別の確認も容易であった。従って、鑑別の点では問題ないと考えられたが、*Lactobacillus* spp.が存在する菌量によっては目的菌の分離が困難になる可能性も考えられた。腸管におけるこの菌種の存在は個人差が大きく、*Lactobacillus* spp.を含む食品や製剤の摂取も菌量に影響していると考えられる。現状では培地選択性の向上は困難であるため、患者検体からの *P.acnes* の検索に際しては、この点に関して考慮する必要があると考えられた。

目的菌の分離に関しては、健康成人の糞便検体の 41.4%から *Propionibacterium* spp.が検出され、*P.acnes* は 32.8%から検出された。検出検体当たりの平均は、菌種全体では 2.08×10^3 cfu/g、*P.acnes* のみでは 1.4×10^2 cfu/g(摂取量当たり 15 cfu 以下) と分離菌を用いた培地作成過程での設定菌量 (10^3 cfu/spot ; 摂取量当たり 1000 cfu) より低い菌量であった。

今回試作した選択培地では、*P.acnes* 以外に *P.granulosum* と簡易同定キットでは菌種を確定できない *Propionibacterium* spp.が検出された。これは、薬剤 A が *Propionibacterium* spp.全般に抗菌力を示さないため、分離後の

Propionibacterium spp.から *P.acnes* のみを鑑別するには、簡易同定キットや PCR による菌種の同定が必要である。簡易同定キットについては、この菌種に関するデータベースが糞便由来の菌株の性状を考慮していないことから、菌種同定できなかった菌株についても、皮膚常在菌と生化学性状がことなる *P.acnes* である可能性が否定できない。したがって、簡便性の点からは同定キットは有用であるが、菌種の最終同定に関しては、PCR による確認が必要と考えられた。

E. 結論

羊溶血血液加ブルセラ HK 血液寒天培地にメトロニダゾール、アジ化ナトリウム、薬剤 A を添加し、4 日間嫌気培養することにより糞便検体から極めて劣勢な *P.acnes* を分離可能であった。しかし、この培地は *Propionibacterium* spp.全般を選択的に発育させるため、*P.acnes* と確定同定するためには PCR 等での同定が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

11. 微生物の感染とIgA腎症の関連に関する研究

分担研究者	荒川 宣親 国立感染症研究所細菌・血液製剤部長
研究協力者	佐々木 裕子、永田 典代（国立感染症研・安全性研究室）
	網 康至、須崎 百合子（国立感染症研・動物管理室）
	堀田 修、宮崎 真理子（仙台社会保健病院・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 由起夫（名古屋大医・第三内科腎臓研究室）

研究要旨 IgA腎症（IgA nephropathy, IgA glomerulonephritis）の発症機構として、我々は、扁桃等の呼吸器に感染後、血流へと移行したマイコプラズマ等の微生物が、末梢リンパ球を活性化し、さらにリンパ球障害等を誘発した結果、血管内皮に障害を惹起することが、腎臓への病変成立にとって重要であるという作業仮説を立て、1) 患者扁桃からのマイコプラズマ分離ならびに、2) カニクイザルへのマイコプラズマ感染実験を行った。1) 扁桃スワブの42%からマイコプラズマが分離された。2) *M. fermentans* 感染サルは、体重減少、体温上昇を示さず、所見上健康であり、ウロビリノーゲン、タンパク等尿性状は、正常であったが、末梢血における異形リンパ球の一過性出現、リンパ球表面の活性化分子の発現増加、PBMCのin vitroにおける自発的アポトーシスの昂進を示した。リンパ球活性化ならびにPBMCにおけるアポトーシス昂進は、IgA腎症患者で昨年度、我々が解析した結果と共通である。剖検時（感染29日目）の腎臓所見で、メサングウム領域の増生が観察され、メサングウム増殖性糸球体腎炎であるIgA腎症と共通の病変を形成したことになる。このことから、扁桃に付着したマイコプラズマが血流へ移行した場合、IgA腎症類似の病変を形成する可能性があることを示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

IgA腎症は、先行する上気道炎などに続発して若年者に好発する蛋白尿、血尿を主症状とする慢性の進行性腎疾患であるが、その原因ははっきりしていない。かねてより、パラインフルエンザ菌などの細菌や各種のウイルス感染がその誘因になっていると指摘されているが、病原体は特定されていない。

我々のこれまでの研究から、口腔や上気道に常在する細菌による継続的な抗原刺激による免疫系の非特異的活性化状態の継続が、本疾患の発症や慢性的な病態の進行の背景に有ると考え、特に、強力なマクロファージ活性化物質であるリポペ

プチドを産生するマイコプラズマに着目し解析を行ってきた。IgA腎症は、病理的には腎臓メサングウム領域の増生、同領域へのIgA沈着等の所見を特徴とする。腎臓病変の発生機構に末梢リンパ球活性化の関与が報告されており、我々の解析でも患者の末梢リンパ球表面への活性化マーカーCD69等の発現昂進を確認してきた。今回、IgA腎症発症へのマイコプラズマ感染の関与を検討する為、以下の実験を行った。

- 1) 患者扁桃スワブからのマイコプラズマ分離
- 2) 血行性にマイコプラズマが感染した場合の末梢リンパ球活性化ならびに腎臓病変形成の確認を、カニクイザルへのマイコプラズマ感染実験により行った。

B. 研究方法

- 1) マイコプラズマ分離: IgA 腎症患者の扁桃部分の咽頭スワブを PPLO 液体培地中にて、凍結保存 (-80°C) 後、解凍し、PPLO 寒天に接種した。得られたマイコプラズマコロニーをグルコースあるいはアルギニン添加 PPLO 液体培地に接種、培養し、栄養要求性を確認するとともに、増菌した。分離菌の一部については、抗マイコプラズマ抗体による代謝阻止試験により菌種の同定を行った。
- 2) カニクイザルへの感染実験: 国立感染症研究所筑波霊長類センターにて育成、飼育後、村山庁舎にて飼育のカニクイザル 2 頭を用いた。培養した *Mycoplasma fermentans* を 10 の 8 乗 CFU を PBS にて洗浄後、静脈内接種した。感染後、系時的に採尿ならびに採血を行い、尿性状検査ならびに血液塗抹、血清分離、PBMC の分離を行った。血液塗抹にて血液細胞の観察、血清については生化学的性状の解析を行った。分離された PBMC は、一部を *ex vivo* におけるリンパ球表面マーカーの解析用、一部を RPMI 培地中にて 16 時間培養後、自発的アポトーシスによる細胞障害の解析用に用いた。細胞の免疫学的解析にはサイトフローメトリー FACSscalibur (Beckton Dickinson) を用いた。感染 29 日目に屠殺、解剖し、主要臓器を採取、マイコプラズマの培養ならびに病理学的解析を行った。

C. 研究結果

- 1) マイコプラズマの分離: 1998 年 8 月から 2000 年 12 月までに得られた 49 検体中、マイコプラズマが分離された陽性例/陰性例は、20/27 で、42% からマイコプラズマコロニーが分離された。種の同定を行った 3 株中、*M. orale* と同定されたものが 1 株。残りの 17 株については、種は未同定である。(図 1)
- 2) カニクイザルへの感染実験:
症状: カニクイザル 2 頭は特筆すべき症状は示さなかった。
尿性状: ウロビリノーゲン、タンハク、pH、

潜血、ケトン体、ブドウ糖すべて正常値の範囲内であった。

血液細胞の形態: 血液塗抹により、2 頭中 1 頭で、感染 1 日後に分葉核を有する異形リンパ球が認められ、異形リンパ球の割合は、末梢リンパ球の 70% を占めた。

血清の生化学的性状: LDH の軽度な上昇が見られた。CRP は検出限界以下。腎臓機能と関連する BUN, CRE ならびに肝臓機能と関連する GPT, GOD は正常の範囲内であった。

末梢リンパ球活性化: 活性化マーカーの一つ CD69 の T リンパ球における発現が、感染 2 ~ 7 日に昂進していた (2 頭中 1 頭)。

1 日培養後の PBMC における自発的アポトーシス: 感染 3 日後から増加し、感染 7 日目のピーク時には、PBMC の 75% がアポトーシスによる細胞死に陥った。感染 10 日、14 日後と、アポトーシスに陥る細胞の割合は減少し、感染 21 日で感染前のレベルまで戻った。(図 2)

剖検時の主要臓器の培養: マイコプラズマの分離結果は陰性であった。

剖検所見: 2 頭に共通する病変として、肝臓全体の類洞内において、内皮細胞の壊死とクッパー星細胞による食食、単核系細胞の集ぞくがみられた。また、非共通病変として、腎臓メサンギウム領域の軽度な増加、動脈血管内皮の空胞化が目立った。(図 3)

D. 考察

カニクイザルへの感染実験からは、マイコプラズマ感染によるリンパ球への細胞障害が強く示唆された。剖検時の所見からも血管内皮に対する一過性の軽度の傷害が存在した可能性が示唆された。尿、血液所見に顕著な異常は無いことから、これらの病変の程度は軽度であるものの、血流中へのマイコプラズマの感染が血管内皮の障害、腎臓のメサンギウム領域の細胞増生を引き起こす可能性が考えられた。

以前行った IgA 腎症患者 4 例の摘出扁桃組織からの PCR 法によるマイコプラズマ検出結果は 4 例とも陽性を示したが、今回扁桃スワブの 42% からマイコプラズマが分離できたことは、マイコプラズマが扁桃における常在菌である事を示唆すると同時に、扁桃が血流への移行の門戸となる

可能性をより強く疑わせた。文献的には PCR 法で健常人の咽頭の 18% から *M. fermentans* が検出できるが PBMC からは検出できないという報告がある(*J. infect* 40:138-140)。さらに *M. fermentans* の MALP-2 (macrophage-activating lipopeptide 2) のみならず、*M. salivarium* にも宿主マクロファージを活性化するリポタンパク Lp44 が存在し、TNF- α , IL-6 等のサイトカイン産生や細胞障害を誘発するとの報告がある。以前我々が行った IgA 腎症患者血清中の抗マイコプラズマ抗体測定 (*M. fermentans*, *M. salivarium* および *M. orale*) の結果でも、抗 *M. salivarium*-IgM 抗体の OD 1.6 と上昇した患者で、T 細胞の 46% が活性化マーカー HLA-DR を発現していた 1 例も経験しており、*M. salivarium* も含めて口腔内マイコプラズマと IgA 腎症発症の関連をつめるべきだと考えている。今後、患者からの分離株の同定を急ぐと同時に、咽頭以外の患者部位におけるマイコプラズマの存在を確認し、マイコプラズマの血流移行への根拠を探る必要がある。

E. 結論

- 1) IgA 腎症患者の扁桃スワブ 49 例中、20 例 (42%) から、マイコプラズマコロニーを分離した。
- 2) 血行性に *M. fermentans* を 10^8 CFU を 1 回感染させたカニクイザルにおいて、PBMC のアポトーシスによる細胞障害の昂進ならびに腎臓メサンギウム領域の細胞増生という IgA 腎症患者に類似した所見を観察した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

予定なし

I. 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)



図1 扁桃より分離したマイコプラズマの一形態

Induction of spontaneous apoptosis after one-day culture in PBMCs of cynomolgus monkeys infected with *M. fermentans*.

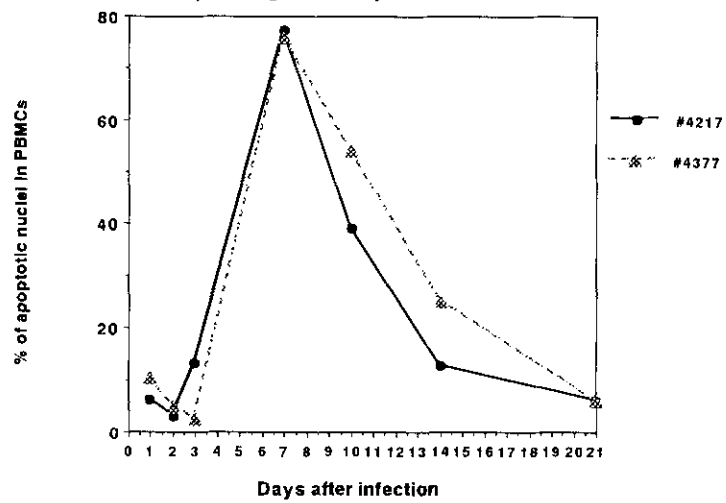


図2 *M. fermentans* 感染カニクイザル由来 PBMC における自発的アポトーシスの系時的变化

M. fermentans 感染サル

M. fermentans 感染サル

陰性対象 (非感染サル)

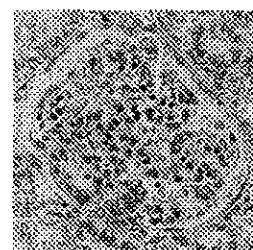
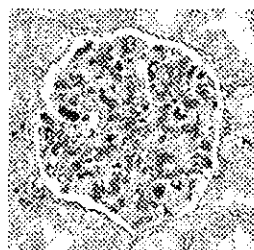
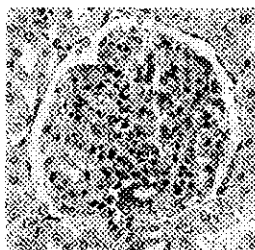


図3 *M. fermentans* 感染カニクイザルの剖検時の腎臓所見：
メサンギウム領域の増加と尿細管上皮の軽度な変性

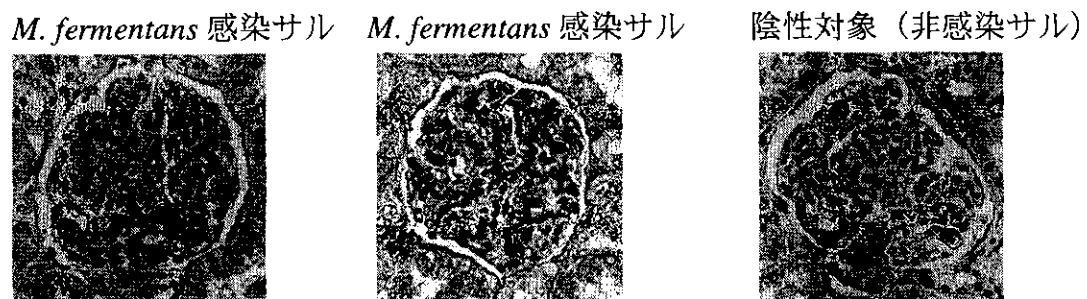


図3. *M. fermentans* 感染カニクイザルの剖検時の腎臓所見：
メサンギウム領域の増加と尿細管上皮の軽度な変性

12. 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所長

研究要旨 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いかなる細菌類が関与しているかの研究を行う。難治性呼吸器感染症の発症メカニズムの解明に、重要な病原細菌の気道上皮細胞付着の要因について研究し、同時に感染予防薬の開発をもめざす。呼吸器感染における細菌の上気道付着メカニズムに上皮細胞表面の糖鎖の重要性については、いくつかの病原細菌ですでに明らかにした。これまではこれらの菌と細胞の表面がマイナスに荷電しているとされており、不明であった菌と細胞が互いにいかなる機序で付着に到るかが、原子力間顕微鏡（AFM）を用いることで解明し得た。今後、これらの細菌付着からびまん性肺疾患または呼吸不全に到るメカニズムの解析と共に病原菌の上気道付着を阻止する薬物についての感染予防薬としての可能性をも追求している。

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。

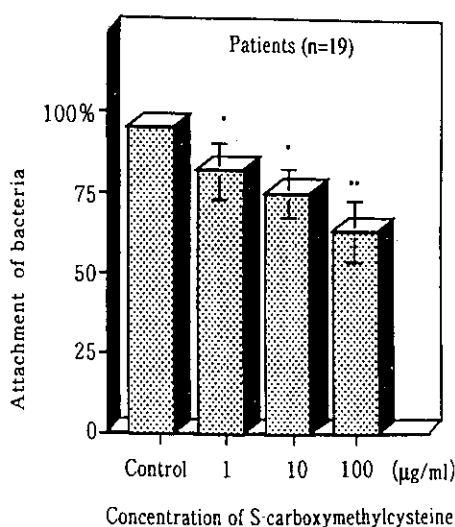
B. 研究方法

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に発現している各種糖鎖にそれぞれ特異的に付着するものであることを *in vitro* 付着実験を通して明らかにする。呼吸器親和性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）、肺炎球菌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常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細菌の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。今回は新しく原子力間顕微鏡（AFM）を用いて、細菌と細胞間での表面荷電の調査研究を加えることにより基礎研究の進展を計った。

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



ブランハメラ (*Branhamella catarrhalis*) のヒト咽頭上皮細胞の付着に及ぼす *S-carboxymethyl cysteine* の影響 (in vitro) - 濃度依存性に付着抑制がみられる

(*B.catarrhalis*) では糖鎖の中で付着に重要なものとして GM 2 に加えて新しい糖鎖の関与についての可能性も検討しつつある。さらに、インフルエンザ菌 (*H.Influenzae*) については GD 2 ブランハメラ (*Branhamella catarrhalis*) のヒト咽頭上皮細胞の付着に及ぼす *S-carboxymethyl cysteine* の影響 (in vitro) - 濃度依存性に付着抑制がみられるが付着因子となる糖鎖であることを明らかにした。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。また、AFM と電子顕微鏡による研究によりブランハメラとインフルエンザ菌の菌体表面の荷電がマイナスであり、ヒトの咽頭上皮細胞のプリキエ (突起) 部分がプラス荷電であることから、細菌と細胞の付着における荷電の関与をも明らかにしつつある。

D. 考察と結論

今回の検討で、これまで不明確であった菌と細胞が付着するその最初のステップで、菌と細胞の荷電について AFM を用いて研究した。さらにその結果を電子顕微鏡下に再確認することでマイナスに荷電した病原細菌がヒト咽頭上皮細胞の突

起部分がプラスに荷電していることを世界的に初めて明らかにすることで感染症発症メカニズムにとって重要な知見の一部を解明した。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てきた。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も証明しつつある。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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiroshi Watanabe, Hironori Masaki, Norichika Asoh, Kiwao Watanabe, Kazunori Oishi, Shinobu Kobayashi, Akiyoshi Sato, Tsuyoshi Nagatake: Molecular Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a Causative Agent of Bronchopulmonary Infection: Relation to Colonization in the Upper Respiratory Tract. *Journal Of Clinical Microbiology* 38(10)3867-3869, 2000
- 2) Kazunori Oishi, Masashi Hayano, Hiroyuki Yoshimine, Sitemano Bugruka Tugume, Anthony Kebba, Roy Mugerwa, Peter Mugenyi, Atsushi Kumatori, Kouji Matsushima, Tsuyoshi Nagatake: Expression of Chemokine Receptors on

- CD4+ T Cells in Peripheral Blood from HIV-Infected Individuals in Uganda. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 20. 597-602, 2000
- 3) Kamruddin Ahmed, Tomomi Nakagawa, Yamaji Nakano, Glenda Martinez, Akitoyo Ichinose, Can Hong Zheng, Mayumi Akaki, Masamichi Aikawa, Tsuyoshi Nagatake : Attachment of *Moraxella catarrhalis* occurs to the positively charged domains of pharyngeal epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* 28. 203-209, 2000
- 4) Hiroshi Watanabe, Satoshi Sato, Kenichi Kawakami, Kiwao Watanabe, Kazunori Oishi, Naoto Rikitomi, Tsuyoshi Ii, Hideaki Ikeda, Akiyoshi Sato, Tsuyoshi Nagatake : A comparative clinical study of pneumonia by penicillin - resistant and - sensitive *Streptococcus pneumoniae* in a community hospital. *Respiratory*. 5.59-64, 2000
- 5) Borann Sar, Kazunori Oishi, Akihiro Wada, Toshiya Hirayama, Kouji Matsushima, Tsuyoshi Nagatake : Induction of monocyte chemoattractant protein - 1 (MCP - 1) production by *Pseudomonas* nitrite reductase in human pulmonary type II epithelial - like cells. *Microbial Pathogenesis* 28.17-23, 2000
- 6) Hideaki Amano, Hidefumi Yamamoto, Masachik Senba, Kazunori Oishi, Shoichi Suzuki, Kenichi Fukushima, Naofumi Mukaida, Kouji Matsushima, Katsumi Eguchi, Tsuyoshi Nagatake : Impairment of Endotoxin - Induced Macrophage Inflammatory Protein 2 Gene Expression in Alveolar Macrophages in Streptozotocin - Induced Diabete in Mice. *Infection and Immunity*. 68 (5) 2925-2929, 2000
- 7) Can Hong Zheng, Kamruddin Ahmed, Naoto Rikitomi, Glenda Martinez, T. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし

13. 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助手

研究要旨 (1)上気道炎に随伴する気管支喘息および慢性肺気腫急性増悪において、ライノウイルスやインフルエンザウイルスが検出され、血中 ECP やヒスタミン、尿中 LTE4 の増加が認められた。(2)ライノウイルス感染による気道炎症細胞活性化を調べるため、マスト細胞および好塩基球の継代細胞にライノウイルスを感染した。感染後、炎症性サイトカインやヒスタミンの合成放出の亢進を認めた。

A. 研究目的

(1) 気管支喘息や慢性気管支炎はウイルス感染が引き金になって急性増悪し、呼吸不全をきたすことが多い。ライノウイルス、インフルエンザウイルス、RS ウイルスなどが同定され、二次性の細菌感染が更に症状を悪化させる。ウイルス感染は気道上皮の剥離脱落や気道壁の浮腫を介して気道内腔を狭窄すると言われている。また、炎症性サイトカイン、ヒスタミンやキニンが気道炎症や気管支平滑筋収縮を生じて気流障害を促すと考えられている。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し、また、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した。また、これまで、急性増悪時の血中 IL-6 および血中可溶性 ICAM-1 増加など炎症性因子増加を報告したが、気道収縮や気道過分泌に関係する化学伝達物質の動態は不明であった。また、気管支喘息を中心に気道炎症に関係すると言われている好酸球の活性化についての研究もウイルス感染急性増悪時に行われていなかった。そこで、今年度は気管支喘息、慢性肺気腫増悪時の気道ウイルスを同定し、同時に血中ヒスタミン、血中好酸球塩基性蛋白(ECP)、尿中 LTE4 を測定して病態との関係を検討した。

(2) 慢性肺気腫や気管支喘息はライノウイルスなどの気道ウイルス感染で急性増悪し、呼吸不全になることがある。この病態を解析するため、これまで、気道上皮細胞にライノウイルスを感染させて炎症性サイトカインやムチン合成に対する亢進作用を報告してきた。実験的にライノウイルスを人に感染した場合、気管支壁に好酸球や単球、好中球などが増加するとの論文がすでに報告されている。したがって、ライノウイルスが気道に感染した場合、上皮のみならず、いわゆる炎症性細胞も活性化する可能性がある。ライノウイルスが単球を活性化してインターフェロン放出を促進すると報告されているが、その他の細胞についての研究は行なわれていない。今回は特に豊富な化学伝達物質を産生放出すると知られているマスト細胞および類似細胞の好塩基球を用いて、炎症性サイトカインおよびヒスタミンの放出を調べた。

B. 研究方法

(1) 当科通院中の慢性肺気腫患者 40 人、気管支喘息 120 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を用いて細胞接種法によりインフルエンザなどのウイルスを同定するとともに、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。急性増悪時の血中および尿中因子の変化を検討するため、血中ヒスタミンおよび好酸球塩基性蛋白 (ECP)、尿中ロイコ

トリエン E4 (LTE4) を測定した。

本研究を行なうに当たり、患者には研究の主旨を説明し、承諾の上ウイルス検査および種々の因子の検討を行なった。

- (2) 継代化したマスト細胞および好塩基球にライノウイルスを感染させ、培養液ヒスタミンおよびサイトカイン(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、GM-CSF)を測定した。

C. 研究結果

- (1) 対象患者のうち平成 11 年 4 月から 12 年 12 月の期間で慢性肺気腫患者 40 例中 11 例、気管支喘息 120 例中 30 例が急性上気道炎症状を呈し、この内、慢性肺気腫 2 例、気管支喘息 7 例でライノウイルス RNA が検出された。また、慢性肺気腫 2 例、気管支喘息 9 例で細胞接種によるウイルス検出によって A 型インフルエンザウイルスを中心にウイルスが検出された。急性増悪をきたした気管支喘息 30 例において尿中 LTE4 (510 ± 195 pg/mg \cdot creatinine)と血中ヒスタミン濃度(0.52 ± 0.08 ng/ml)はコントロール(121 ± 7 pg/mg \cdot creatinine、LTE4; 0.11 ± 0.01 ng/ml、ヒスタミン)に比べて上昇した。ステロイド投与による症状改善後、尿中 LTE4 および血中ヒスタミン濃度はコントロール対象者の値に戻った。また、血中 ECP 値も気管支喘息急性増悪時に上昇し(17.4 ± 1.3 μ g/l)、症状改善後、低下した(9.6 ± 0.3 μ g/l)。急性増悪時の尿中 LTE4、血中ヒスタミン、血中 ECP 値はアトピー型喘息患者で、非アトピー型喘息患者に比べて高い値を示した。慢性肺気腫患者においても、尿中 LTE4、血中ヒスタミン、血中 ECP 値ともに急性増悪時にコントロール対象者に比べて上昇した。慢性肺気腫患者におけるこれらの因子の上昇の程度は非アトピー型喘息患者と同じ程度であった(267 ± 48 pg/mg \cdot creatinine、LTE4; 0.27 ± 0.03 ng/ml、ヒスタミン; 11.0 ± 1.7 μ g/l、ECP)。
- (2) マスト細胞、好塩基球ともにライノウイルスに感染し、細胞内にライノウイルス RNA の増加を認め、また、培養液中のライノウイルスも増加した。ライノウイルス感染自体では炎症性サイトカインの増加を引き起こさなかったが、カルシウムイオノフォア + フォルボルエステル刺激で放出されるサイトカインの放出量(IL-6; 2115 ± 322

pg/ml、IL-8; 2006 ± 280 pg/ml、GM-CSF; 6.8 ± 0.8 pg/ml)をライノウイルス感染が増加した(IL-6; 4207 ± 314 pg/ml、IL-8; 2712 ± 256 pg/ml、GM-CSF; 11.2 ± 1.1 pg/ml)。マスト細胞では IL-8 と GM-CSF が合成放出を認め、好塩基球では IL-6 が増加した。同様に、ライノウイルス(1.1 ± 0.1 % コントロール、マスト細胞; 1.5 ± 0.1 % コントロール、好塩基球)あるいはカルシウムイオノフォア + フォルボルエステル刺激のみ(1.2 ± 0.1 % コントロール、マスト細胞; 2.2 ± 0.2 % コントロール、好塩基球)ではヒスタミン放出は変化しなかったが、ライノウイルス感染後にカルシウムイオノフォア + フォルボルエステル刺激によって著明なヒスタミン放出増加を認めた(20.5 ± 1.2 % コントロール、マスト細胞; 16.5 ± 1.6 % コントロール、好塩基球)。

D. 考察

好酸球塩基性蛋白(ECP)は好酸球から放出される顆粒蛋白の一種である。この顆粒蛋白は細胞傷害性があり、気道上皮細胞傷害や気道過敏性をもたらして気管支喘息の増悪に関係すると報告されている。血清 ECP 値は気管支喘息患者における好酸球活性化の指標として知られている。今回の研究で気管支喘息で認めた血清 ECP 値はこれまでに報告された気管支喘息における値と同じレベルであった。気道ウイルス感染は、ライノウイルス実験感染で明らかになったように、気管支喘息において好酸球性気道炎症を生じていると示唆される。慢性肺気腫においてもウイルス感染が好酸球性蛋白放出を促進していると考えられる。

ロイコトリエンは気道平滑筋収縮や気道分泌作用が知られている。LTE4 はロイコトリエンの安定な代謝物であり、生体におけるロイコトリエン合成の指標と考えられている。今回の研究で、気道ウイルス感染による尿中 LTE4 の増加が明らかになった。特に、アトピー型気管支喘息における尿中 LTE4 レベルは以前に報告された喘息発作と同程度であった。従って、気道ウイルス感染は気道あるいは循環血液中にロイコトリエンを合成し、気管支喘息や慢性肺気腫の増悪に関係すると考えられる。

急性増悪時の気管支喘息における血漿ヒスタミン値は以前に報告されたライノウイルス感染後の抗原負荷時と同様の値を示した。血漿ヒスタミン値は血清 ECP や尿中 LTE4 と同様にアトピー型喘息でより高い値を示した。

今回の研究で気道ウイルス感染に伴う急性増悪時に気管支喘息患者および慢性肺気腫患者において、血清 ECP、尿中 LTE4 および血漿ヒスタミンの上昇を認めた。これらの因子は気道ウイルス感染における気道炎症や急性増悪の病態と関係していると考えられる。

今回の私たちの報告にみられるように、気道のウイルス感染は喀痰や気道洗浄液、あるいは血液中の炎症性サイトカインやヒスタミンの濃度を上昇させるが、産生細胞は不明であった。炎症性サイトカインは気道上皮細胞で合成されるため、血中に増加した IL-6 の一部は気道上皮由来の可能性があった。今回の結果から、マスト細胞や好塩基球も多彩なサイトカイン合成をライノウイルス感染によって行なうことが明らかとなった。血中 IL-6 の起源の一つが好塩基球である可能性がある。また、ライノウイルス感染がヒスタミン放出を促進する初めての結果が得られた。マスト細胞から放出されたヒスタミンが気管支喘息の急性増悪に関与していると思われる。炎症性サイトカイン、ヒスタミンともに気管支の炎症や喀痰分泌を生じ、慢性肺気腫や気管支喘息患者の呼吸不全を生ずると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, Sasaki H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 2000 66: 187-195.
- 2) Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Yamada N, Nakayama K, Ishizuka S, Kamanaka M, Morimoto T, Numazaki Y, Sasaki H. Effects of dexamethasone on rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Physiol* 2000 278: L560-L571.
- 3) Yamaya M, Nakayama K, Hosoda M, Yanai M, Sasaki H. A rockwool fibre worker with lung fibrosis. *Lancet* 2000 355: 1723-1724.
- 4) Shinkawa M, Yanai M, Yamaya M, Matsui

T, Sasaki H. Depression state and common cold. *Lancet* 2000 356: 942.
Suzuki T, Yamaya M, Kamanaka M, Jia Y-X, Nakayama K, Hosoda M, Yamada N, Nishimura H, Sikizawa K, Sasaki H. Type 2 rhinovirus infection of cultured human tracheal epithelial cells: role of LDL receptor. *Am. J. Physiol.* 280: L409-L420, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

14. 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教授

協力研究者 橋本 渉 京都大学食糧科学研究所助手

研究要旨 緑膿菌感染症のようなバイオフィーム依存性細菌感染症の治療として、細菌酵素（アルギン酸リアーゼ）を応用する方法論の開発を進めている。既に、酵素のバイオフィーム除去の有効性を試験管内実験、及び動物試験で確認したが、本酵素の抗原性が若干問題になることが明らかになった。そこで、抗原性部位の特定とそのタンパク質工学的除去を検討した。抗原性部位のアミノ酸を部位特異的変異で他のアミノ酸に変換した変異酵素を作製し、その抗原性を動物実験で確認している。

A. 研究目的

環境の悪化に伴い、新興・再興細菌感染症が増加の傾向にあり、「感染現象の生物学的理解」と「感染症の克服」が重要な課題になってきている。特に、欧米では、ゲノム解析や宿主・固体間相互作用の分子基盤の解析と基礎研究から臨床応用を目指した探索医療的研究が求められている。本研究では、経験的治療法にのみ依存している緑膿菌感染症のようなバイオフィーム感染症に対する探索的な方法論として、細菌酵素「アルギン酸リアーゼ」を応用した新規な治療法を確立し、よって国民の福祉に貢献することを目的としている。

B. 研究方法

スフィンゴモナス属細菌（A1株）が産生するアルギン酸リアーゼを体内に導入するため、その抗原性を除去し安全な酵素への転換を図る。そのため、本酵素のX線結晶構造解析結果に基づいて抗原性（エピトープ）部位を同定し、そこに含まれるアミノ酸を部位特異的変異により他のアミノ酸に置換する。変異酵素を大腸菌で大量発現させ、精製後に動物（ラット）試験により抗原性の有無を確認する。尚、動物実験は、京都大学食糧科学研究所が規定している動物実験ガイドラインに則って行った。

C. 研究結果

X線結晶構造解析により、本酵素の高次構造を1.78Åの分解能で決定し、抗原性エピトープ部位を酵素のN末端側 27Ser~44Cys に特定した(図1)。この部位における各アミノ酸の表面露出度は、それぞれ Ser(77)-Gly(81)-Gln(98)-Leu(23)-Asp(30)-Asp(75)-Arg(10)-Leu(0)-Lys(57)-Ala(66)-Ala(12)-Lcu(41)-Pro(22)-Lys(81)-Glu(47)-Tyr(34)-Asp(57)-Cys(7)であり、タンパク質構造学的にもこの配列が強い抗原性を提示すると予想された(図2)。この中

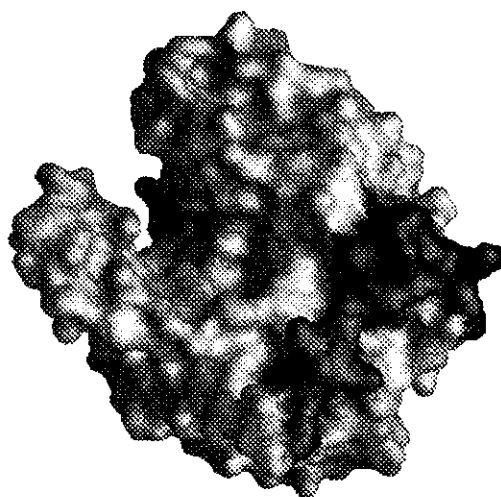


図1. 酵素表面の抗原性エピトープ部位 (27Ser-44Cys; 黒く強調した部位)

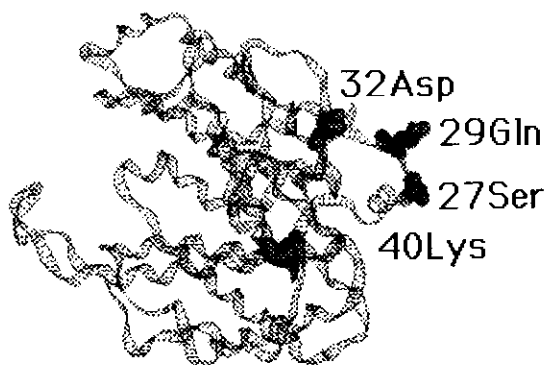


図2.部位特異的変異によるアミノ酸置換
(32Asp,29Gln,27Ser,40Lys を Ala に置換)

で、抗原性決定に関与の程度が高いと考えられるアミノ酸残基として、27Ser, 29Gln, 32Asp 及び 40Lys に着目し、各アミノ酸を部位特異的変異により Ala に置換した変異酵素を作製した。これらの変異酵素を大腸菌で大量発現させたが、40Lys → Ala 変異体は強固な封入体となり、活性低下を起こさない可溶化条件を見いだせなかった。他の3種類の変異酵素を精製し、現在、動物試験により抗原性を評価している。

D. 考察

細菌 *Sphingomonas* sp. A1 株が生産するアルギン酸リアーゼ(A1-III)のX線結晶構造を決定した。本酵素の一次構造に基づいたコンピュータ予測とX線結晶構造解析により、抗原エピソード部位を同定した。抗原性除去の方法論としては、部位特異的変異による抗原性関連アミノ酸残基の他のアミノ酸残基への変換、抗原性部位全体の除去などが考えられるが、同定された抗原性部位は本酵素の活性(同定された抗原性部位は、触媒中心からは遠隔しているが、酵素の折りたたみに重要な機能を有している)と密接な関連があり、大幅な変換は不可能と判断された。そこで、活性への影響がなく、かつ抗原性に強く関与しているアミノ酸を同定し、部位特異的変異によるアミノ酸、特に酵素表面露出度の高いアミノ酸残基の置換を行った。個々の変異酵素を大腸菌で大量発現させ、現在、抗原性の有無を検討中である。平成13年2月中には結果が得られる予定である。

E. 結論

細菌酵素アルギン酸リアーゼの抗原性除去が、本研究の成否を左右する重要な課題になっている。

る。これまでに、ポリエチレングリコールによる化学修飾法などを検討したが効果は見いだせなかった。今回、タンパク質工学的手法で作製した変異酵素の無抗原性を期待したい。バイオフィルム性細菌感染症治療は、現在、抗生物質の長期・大量投与に依存しているが、耐性菌が出始めている現在、新たな治療法が求められることは間違いない。細菌アルギン酸リアーゼの応用は、その先端にあることが米国で評価されており [Annu.Rev.Microbiol.,54:289-340(2000)]、是非とも完成させたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) W. Hashimoto, Y. Mishima, O. Miyake, H. Nankai, K. Momma, and K. Murata: Biodegradation of alginate, xanthan, and gellan. In "Biopolymers" (Ed. A. Steinbüchel), Wiley-VCH, in press (2001).
- (2) H.-J. Yoon, W. Hashimoto, O. Miyake, B. Mikami, and K. Murata: Crystal structure of alginate lyase A1-III complexed with trisaccharide product at 2.0Å resolution. *J. Mol. Biol.*, in press (2001).
- (3) W. Hashimoto, Y. Mishima, O. Miyake, K. Momma, and K. Murata: Super-channel in bacteria: function, regulation, and structure in macromolecule import. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press (2001).
- (4) Y. Mishima, K. Momma, O. Miyake, W. Hashimoto, and K. Murata: Super-channel in bacteria: function, regulation, and structure. *FEMS Microbiol. Lett.*, in press (2001).
- (5) H.-J. Yoon, W. Hashimoto, O. Miyake, M. Okamoto, B. Mikami, and K. Murata: Overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyases. *Protein Expr. Purif.*, 19(1), 84-90 (2000).
- (6) H.-J. Yoon, W. Hashimoto, Y. Katsuya, Y. Mezaki, K. Murata, and B. Mikami: Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of alginate lyase

A1-II from *Sphingomonas* species A1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1476(2), 382-385 (2000).

- (7) K. Momma, M. Okamoto, Y. Mishima, S. Mori, W. Hahsimoto, and K. Murata: A novel bacterial ATP-binding cassette transporter system that allows uptake of macromolecules. *J. Bacteriol.*, 182(14), 3998-4004 (2000).
- (8) T. Itoh, B. Mikami, I. Maru, Y. Ohta, W. Hashimoto, and K. Murata: Crystal structure of *N*-acyl-D-glucosamine 2-epimerase from porcine kidney. *J. Mol. Biol.*, 303(5), 733-744 (2000).
- (9) W. Hashimoto, O. Miyake, K. Momma, S. Kawai, and K. Murata: Molecular identification of oligoalginate lyase of *Sphingomonas* sp. strain A1 as one of the enzymes required for complete depolymerization of alginate. *J. Bacteriol.*, 182(16), 4572-4577 (2000).

2. 学会発表

- (1) W. Hashimoto, K. Momma, H.-J. Yoon, Y. Mishima, O. Miyake, S. Kawai, B. Mikami, and K. Murata: Special apparatus for assimilation, transport, and depolymerization of alginate in *Sphingomonas* sp. A1. Abstract for Fifth International Symposium on Environmental Biotechnology, Kyoto, July 9-13 (2000).
- (2) 三島由美子, 門間敬子, 橋本 渉, 村田幸作: *Sphingomonas* sp. A1 の高分子資化: 新規高分子取り込み機構 (ABC トランスポーター) における AlgH(ATPase) の機能解析. 平成 12 年度日本農芸化学会大会, 東京 (2000).
- (3) 三宅 統, 門間敬子, 河井重幸, 橋本 渉, 村田幸作: *Sphingomonas* sp. A1 の高分子資化: オリゴアルギン酸を分解する新規酵素 (オリゴアルギン酸リアーゼ) の性質と遺伝子構造. 平成 12 年度日本農芸化学会大会, 東京 (2000).
- (4) 門間敬子, 三島由美子, 橋本 渉, 三上文三, 村田幸作: *Sphingomonas* sp. A1 の高分子取り込み ABC トランスポーター: 基質結合タンパク質 AlgQ1, Q2 の構造と機能. 平成 12 年度日本農芸化学会関西支部大会, 奈良 (2000).
- (5) 三島由美子, 門間敬子, 橋本 渉, 三上文三, 村田幸作: 細菌「超チャネル」全構造の決定に

向けて: 高分子結合タンパク質とエンジンタンパク質の機能と予備的 X 線結晶構造解析. 平成 12 年度日本農芸化学会関西支部例会, 神戸 (2000).

H. 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 『囊胞性線維症の治療薬』 出願国: 米国、出願人: 全発明者、特許登録 1996/12/10 出願国: 西欧、出願人: 大塚化学株式会社 グンゼ株式会社 坂口健二) 特許登録済み
- (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) : 審査請求 1999/01/28
- (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 グンゼ株式会社)