

A1-III とアルギン酸との複合体の X 線結晶構造解析により決定された A1-III の反応機構は以下の通りである (図 4)。

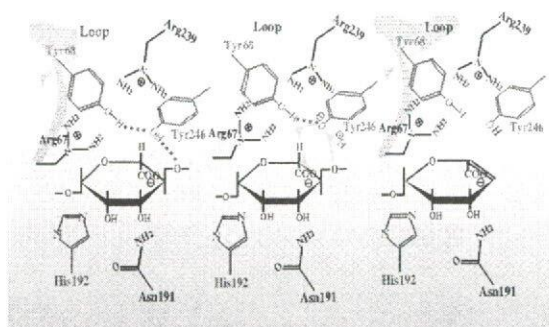


図 4 A-III の  $\beta$  脱離反応機構

A1-III は、 $\alpha_5/\alpha_5$  バレル構造を有し、トンネル様のクレフトの上部にループを配置している。基質の活性部位への固定と分解物の遊離は、ループの運動 (開閉) を伴う。活性部位に基質が挿入されると、ループが閉じた構造をとる。ループ上の Tyr68 が、触媒中心である Tyr246 と水素結合を形成することにより Tyr246 を活性化する。活性化された Tyr246 は、マンヌロン酸の C5 位のプロトンを引き抜き、そのプロトンをグリコシド結合に受け渡す。その結果、グリコシド結合が切断され、マンヌロン酸の C4-C5 位に二重結合が生成する。触媒反応の間、His192 は、マンヌロン酸を活性部位に固定する機能を果たす。このループの開閉を伴う Tyr 1 残基による触媒機構は、他の多糖リアーゼには見られない新規な  $\beta$  脱離反応である。A1-III の触媒残基 (His192 及び Tyr246) に相当する AlgL の His202 及び Tyr256 を各々 Ala 及び Phe に置換した変異体 (H202A 及び Y256F) は、酵素活性を示さなかった。

#### D. 考察

緑膿菌 PPK は膜結合型であると示唆されており、大量発現の報告例がない。そのため、本酵素の構造機能相関に関する研究が遅れている。本研究では、PPK にヒスチジン 6 残基から成るタグ配列を付加することにより、PPK の可溶性発現率が上昇し、精製も極めて容易になった。

現在、PPK の X 線結晶構造解析を行うべく、結晶化を行っている。

緑膿菌はアルギン酸分解酵素 (AlgL) を有しているが、その遺伝子はアルギン酸合成遺伝子群と同一オペロンに存在している。AlgL の遺伝子 (mRNA) と機能 (活性) 発現との相関が不明なため、AlgL の生理的意義と BF 分解制御は殆ど未知である。AlgL 変異体 H202A 及び Y256F は野生型とは異なり、酵素活性が認められないことから、His202 及び Tyr256 は、AlgL の活性発現に必須であることが明らかになった。今回、同定した活性残基の知見に基づいて、緑膿菌ゲノム上の AlgL 遺伝子に変異を導入することにより、アルギン酸合成系を修飾することなく、AlgL の機能のみを欠失させた変異株の作製が可能となる。

#### E. 結論

PPK は、主要な病原性細菌 (チフス菌、肺炎菌、結核菌、コレラ菌など) に局在し、病原性発現への関与が示唆されているが、動物細胞にはその存在が認められていない。従って、PPK 阻害剤は、バイオフィーム合成と病原性発現を抑制すると期待される。本研究で構築された可溶性 PPK の大量発現系は、結晶化のみならず、阻害剤の探索も可能にする。

従来 AlgL の機能解析は、挿入や削除による遺伝子破壊株で行われていたが、AlgL がアルギン酸合成オペロンの一遺伝子であることから、AlgL 遺伝子破壊株では AlgL 遺伝子下流にも影響が出ていたため、AlgL 単独の生理機能解析が不可能であった。本研究では、A1-III の構造生物学的研究に基づいて、不活性な AlgL 発現株を作製して AlgL の生理機能を解析するため、直接的な AlgL の生理的意義が明らかとなる。このような AlgL による分解制御機構の解析は、緑膿菌バイオフィームを自身の AlgL で分解し、遊離菌を抗生物質で処理する治療法の開発に繋がる。

#### F. 健康危険情報

特になし



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yumiko Mishima, Keiko Momma, Wataru Hashimoto, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata: Crystal structure of AlgQ2, a macromolecule (alginate) -binding protein of *Sphingomonas* sp. A1, complexed with an alginate tetrasaccharide at 1.6 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, In press.
2. Wataru Hashimoto, Hirokazu Nankai, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata: Crystal structure of *Bacillus* sp. GL1 xanthan lyase, which acts on the side chains of xanthan. *J. Biol. Chem.*, In press.
3. Hiroyuki Sakakibara, Takashi Tamura, Takehiko Suzuki, Tomohiro Hisano, Shiro Abe, and Kousaku Murata: Preparation and properties of alginate lyase modified with poly (ethylene glycol). *J. Pharm. Sci.*, 91 (4): 1191-1199 (2002).
4. Hirokazu Nankai, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: Molecular identification of family 38  $\alpha$ -mannosidase of *Bacillus* sp. strain GL1 responsible for complete depolymerization of xanthan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (6): 2731-2736 (2002).
5. Yumiko Mishima, Keiko Momma, Osamu Miyake, Wataru Hashimoto, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata: Super-channel in bacteria: macromolecule uptake and depolymerization systems of *Sphingomonas* sp. A1 with special cell surface structure. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 19:105-119 (2002).
6. Keiko Momma, Bunzo Mikami, Yumiko Mishima, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: Crystal structure of AlgQ2, a macromolecule (alginate) -binding protein of *Sphingomonas* sp. A1 at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 316:1061-1069 (2002).
7. Yoshiyuki Hayama, Yasuki Fukuda, Shigeyuki Kawai, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: Extremely

simple, rapid, and highly efficient transformation method for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using glutathione and early log phase cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 94 (2), 166-171, 2002.

8. 橋本 渉、三上文三、村田幸作:細菌「超チャンネル」の構造と高分子輸送機能. *生化学*, 74, 563-567, 2002.
9. Wataru Hashimoto, Yumiko Mishima, Osamu Miyake, Hirokazu Nankai, Keiko Momma, and Kousaku Murata: Biodegradation of alginate, xanthan, and gellan. In "Biopolymers" volume 7: Polysaccharides I (Ed. A. Steinbchel), Wiley-VCH, pp175-199, 2002

### 2. 学会発表

1. 橋本 渉、三上文三、村田幸作:多糖リアーゼの構造・機能相関:キサンタンリアーゼのプロセッシングと結晶化、平成 14 年度 (2002) 日本農芸化学会大会 (3 月 27 日) 東北学院大学
2. 葉山善幸、河井重幸、福田泰樹、橋本 渉、村田幸作:酵母の自然形質転換現象の解析と高効率形質転換法の確立、平成 14 年度 (2002) 日本農芸化学会大会 (3 月 27 日) 東北学院大学
3. 三島由美子、門間敬子、橋本 渉、三上文三、村田幸作:細菌 *Sphingomonas* sp. A1 の高分子結合タンパク質の X 線結晶構造解析、平成 14 年度 (2002) 日本農芸化学会大会 (3 月 27 日) 東北学院大学
4. 南海浩一、橋本 渉、村田幸作: *Bacillus* sp. GL1  $\alpha$ -マンノシダーゼの諸性質、遺伝子、及びキサンタン分解との関連、平成 14 年度 (2002) 日本農芸化学会大会 (3 月 27 日) 東北学院大学
5. 鈴木佐知子、尹 惠珍、勝矢良雄、橋本 渉、三上文三、村田幸作:多糖リアーゼの構造・機能相関:アルギン酸リアーゼ A1-I の X 線結晶構造解析、平成 14 年度 (2002) 日本農芸化学会大会 (3 月 27 日) 東北学

- 院大学
6. 橋本 渉、三島由美子、三上文三、村田幸作：細菌「超チャンネル」の構造と機能-体腔依存高分子物質取り込み ABC トランスポーター- (シンポジウム)、平成 14 年度 (2002) 日本農芸化学会大会 (3 月 25 日) 東北学院大学
  7. 橋本 渉、三島由美子、三上文三、村田幸作：細菌「超チャンネル」の構造と高分子輸送機能、第 75 回日本細菌学会総会 (2002 年 4 月 6 日) パシフィコ横浜
  8. 橋本 渉：細菌「超チャンネル」の構造と高分子輸送機能 (ワークショップ)、第 75 回日本細菌学会総会 (2002 年 4 月 6 日) パシフィコ横浜
  9. 橋本 渉、上野雄介、三島由美子、三宅 統、門間敬子、尹 惠珍、河井重幸、三上文三、村田幸作：細菌 *Sphingomonas* sp. A1 の全ゲノム構造、第 424 回日本農芸化学会関西支部例会 (2002 年 5 月 11 日) 京都府立大学
  10. 三島由美子、門間敬子、橋本 渉、三上文三、村田幸作：細菌「超チャンネル」の構造と機能：高分子 (アルギン酸) 結合タンパク質 (ホロ体) の X 線結晶構造解析、第 424 回日本農芸化学会関西支部例会 (2002 年 5 月 11 日) 京都府立大学
  11. 鈴木佐知子、三宅 統、尹 惠珍、橋本 渉、三上文三、村田幸作：X 線結晶構造解析による細菌多糖リアーゼの構造・機能相関、第 424 回日本農芸化学会関西支部例会 (2002 年 5 月 11 日) 京都府立大学
  12. 河井重幸、葉山善幸、福田泰樹、南海浩一、橋本 渉、村田幸作：酵母の形質転換現象の解析と新規形質転換法、第 424 回日本農芸化学会関西支部例会 (2002 年 5 月 11 日) 京都府立大学
  13. 三上文三、鈴木佐知子、三宅 統、尹 惠珍、橋本 渉、村田幸作：アルギン酸リアーゼ A1-III の変異体と基質複合体の X 線結晶構造解析、日本生化学会近畿支部例会 (2002 年 5 月 25 日) 京都大学農学部
  14. Bunzo Mikami, Sachiko Suzuki, Hye-Jin Yoon, Osamu Miyake, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: X-ray structural analysis of alginate lyase A1-III mutants/substrate complexes: activation of a catalytic tyrosine residue by a flexible lid loop. IUCr XIX 国際結晶学会 (スイス) (2002 年 8 月 7 日~15 日)
  15. 三宅 統、橋本 渉、村田 幸作：エキソ型多糖リアーゼ (オリゴアルギン酸リアーゼ) の大量発現系構築と精製酵素の諸性質、日本農芸化学会関西支部大会 (2002 年 10 月 6 日) 近畿大学農学部
  16. 橋本 渉、南海浩一、三上文三、村田幸作：細菌多糖リアーゼの構造・機能相関：枯草菌 *Bacillus* sp. GL1 由来キサントランリアーゼの X 線結晶構造、平成 14 年度 (2002) 日本生化学会大会 (2002 年 10 月 15 日) 国立京都国際会館
  17. 橋本 渉、南海浩一、三上文三、村田幸作：細菌多糖リアーゼの構造・機能相関：枯草菌 *Bacillus* sp. GL1 由来キサントランリアーゼの活性クレフト構造、平成 14 年度 (2002) 日本生物工学会大会 (2002 年 10 月 29 日) 大阪国際会議場
  18. 三島由美子、門間敬子、橋本 渉、三上文三、村田幸作：高分子アルギン酸特異的 ABC トランスポーター：基質結合タンパク質の X 線結晶構造解析と機能相関、平成 14 年度 (2002) 日本生物工学会大会 (2002 年 10 月 29 日) 大阪国際会議場
  19. 河井重幸、葉山善幸、福田泰樹、南海浩一、橋本 渉、村田幸作：酵母の新規形質転換法と形質転換現象の解析、平成 14 年度 (2002) 日本生物工学会大会 (2002 年 10 月 29 日) 大阪国際会議場
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
    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. 国際特許 PCT/JP93/00227『囊胞性線維  
症の治療薬』(出願人:大塚化学株式会  
社 グンゼ株式会社)
  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)

## 8. 難治性血管炎発症に関与する真菌由来分子の作用と その新しい評価系

分担研究者 鈴木 和男 (国立感染症研究所生物活性物質部室長)

**研究要旨** 真菌感染に由来する分子などによって、腎炎、SLEをはじめとする難治性血管炎が誘導されることが指摘されている。カンジダ症やアスペルギルス症は、好中球機能の低下による日和見感染の結果として引き起こされる。それに加え、好中球機能低下は、難治性血管炎の発症要因になっていることが強く示唆されている。また、カンジダ菌体膜成分が血管炎を誘導し、難治性血管炎の病態マーカーとして臨床検査として現在広く利用されている好中球自己抗体 ANCA も連動した。そこで、*C. albicans* 由来の分子を Mannan-protein- glucan であることを特定した。一方、これまでの病理学的解析あるいは細胞機能やサイトカインによっていた病態解析に加え、腎炎モデルマウスを作製して、*in vivo* イメージング観察する系を作製した。また、さらに、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードに p38 が関与することを明らかにした。以上から、*Candida albicans* 由来糖ペプチドが、MPO および MPO-ANCA 産生と発症誘導に不可欠であり、サイトカインと連動する活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる。

### A. 研究目的

真菌感染に由来する分子などによって、腎炎、SLEをはじめとする難治性血管炎が誘導されることが指摘されている。カンジダ症やアスペルギルス症は、殺菌酵素の不全を有する好中球機能の低下による日和見感染の結果として引き起こされることをわれわれは報告してきた。それに加え、好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全の誘発や、自己抗体の産生に関与するなど、難治性血管炎の発症およびその要因になっていることが強く示唆されている。これらの自己免疫疾患などには、活性化好中球や病態マーカーとして臨床検査として現在広く利用されている好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) が関与していることを明らかにされてきている。

難治性血管炎のなかでも、MRA などの顕微鏡所見では多くの好中球浸潤が認められることがあるなど、血管炎の病態に炎症細胞が関与していることが病理所見から観察されている。しかし、関与の状態がどのようであるかについては、ほとんど推定の範囲を越えていない。血管

炎の組織には、マクロファージ、好中球、リンパ球の炎症細胞の浸潤が観察される。本来、炎症細胞は外来異物などを排除する生体防御機能として作用するが、血管傷害もひきおこしていると推定されている。これと関連して、血管炎患者には血清中に ANCA が上昇するや、好中球抗体と好中球が血管炎に関与していることが明らかになってきたことや、好中球浸潤のある血管炎が認められている。したがって、好中球がその抗体 ANCA とともに血管炎に関与していることが容易に想像できるようになってきた。

自己抗体 MPO-ANCA 抗体が好中球を活性化しているのではないかとされている。この様にして、生体側に不利な細胞傷害を引き起こす好中球の活性化には、その抗体 ANCA が深く関わっていることが報告されてきている。特に、MPO-ANCA の関与についての解析が進んでいる。この MPO-ANCA と活性化好中球の関与が難治性血管炎のキーになっていることがわかってきている。

臨床のデータに加えて、モデルマウスにおいても明らかにされてきている。特に、カンジダ菌



成分による血管炎誘導の際に、顕著に検出される。*Candida albicans* derived substances (CADS) の接種によって冠状動脈炎を発症するモデルマウスにおいて、血管炎発症にともない、好中球抗体 MPO-ANCA が誘導される。この MPO-ANCA 上昇には、MPO が関与してことを MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種して証明した。

これまでの血管炎発症機構は、in vivo での病理学的解析あるいは、in vitro での細胞機能やサイトカインの解析によっていた。そこで、本研究では、腎炎モデルマウスを作製して、イメージング観察する系を作製するとともに、真菌由来 glycoprotein, CAWS によって誘導される血管炎における、サイトカインの解析と、血管内皮細胞の apoptosis カスケードおよび in vivo イメージングによる直接解析を用いて、血管炎発症機構を検討した。

## B. 研究方法

1) 血管炎モデルマウスの調整: 本疾患モデルは、川崎病リスクの冠状動脈炎発症モデルとして作られ、罹患児糞便から分離した *C. albicans* 由来物質 (CADS および CAWS) により誘導した。

2) マウスのリコンビナント MPO の調整: マウスのリコンビナント MPO は、ヒトのリコンビナント MPO と同様に作成した。

3) マウス血清中の MPO-ANCA 値: ヒトおよびマウス MPO の ELISA により測定した。

4) MPO-KO の MPO-ANCA 産生と血管炎発症の検討: CADS 誘導の血管炎率と血清中の MPO-ANCA 値について野生型のそれと比較した。MPO-KO 群、C57BL/6 (対照群) (4 週、雄、各 5) について、CADS を 5 日間腹腔接種し、3 週間のインターバル後再び同様に接種した。3 週後心採血にて屠殺、病理標本を作製し血管炎の評価をした。MPO-ANCA はヒト MPO-III を抗原とする ELISA 法にて測定した。

5) In vivo イメージング: C57BL/6 マウスに CAWS を iv 投与 3 時間後に anti-mMPO を投与した。さらに、5 日後に fMet-Leu-Phe (FMLP: 細菌由来トリペプチド) を iv 投与後、

FITC-dextran を用いて血流状態を観察した。

6) CAWS 投与によるサイトカインレベルの変動: CAWS 投与直後の spleen でのサイトカインレベルの変動を解析した。

7) 血管内皮細胞(HUVEC)apoptosis にかかわるシグナルの変動の解析: 抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法により MAPK 活性および Caspase 活性を測定した。

## C. 研究結果

1) CAWS によって、CADS 同様、冠状動脈炎が誘導された。その頻度は、100%近い値を示した。

2) in vivo イメージングにおいては、CAWS のほかに、anti-mouseMPO および fMet-Leu-Phe も加えることによって腎血管傷害が誘導された (図 1)。また、in vivo イメージングの解析では、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた (図 1 下)。

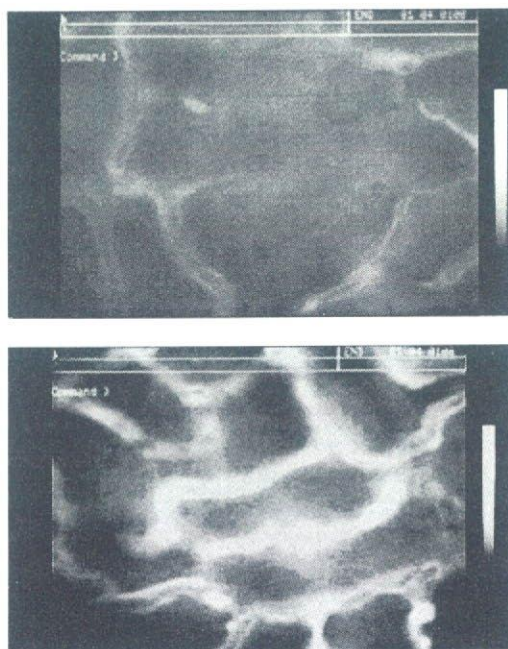


図 1 CAWS 誘導の腎血管傷害 in vivo イメージング  
上: PBS control  
下: CAWS + anti-mouseMPO + fMet-Leu-Phe



CAWS 投与時の脾臓からのサイトカインの産生は、IFN $\gamma$ 、IL-6 および IL-10 が血管炎と連動した。

さらに、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードを検討した。その結果、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達の変化は、Caspase8 と連動する p38MAPK の関与がしていた。また、好中球や脱顆粒成分によっても、この反応が誘導された。

#### D. 考察

これらの血管炎誘導モデルにおいては、*Candida albicans* 由来糖ペプチドが、MPO および MPO-ANCA 産生と発症誘導に不可欠であることから、CAWS などの真菌由来分子がサイトカインと連動する活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる。

本モデルマウスは、今回主としておこなった CAWS の実験の他にも CADS の接種によって誘発される冠状動脈炎を発症するモデルマウスとして、Murata らが作製している。本動脈炎誘発モデルマウスでは、増殖性肉芽腫性炎を冠状動脈に高率に惹起させることが可能であり、病変の組織像および分布の類似性から川崎病動脈炎モデルとして考えられている。本モデルマウスは、カンジダ菌体抽出物をマウス腹腔内に接種することにより系統的動脈炎を惹起させるものである。すなわち、本実験系では、マウスの系統により C3H/HeN を代表とする高発症の冠状動脈炎が見られたり、CBA/JN を代表とする低発症マウスなど、系統により発症頻度に差が認められている。この発症の原因に MPO と MPO-ANCA にあるのではないかと考え、MPO 遺伝子欠損マウスを用いて血管炎発症と好中球抗体 MPO-ANCA の誘導との関係を調べた。すなわち、MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種することで、CADS 誘導の血管炎の頻度が 40% に低下するとともに、MPO-ANCA が PBS コントロールレベルまで低下したことから、活性化した好中球から MPO が放出されて、抗原になっていることが示唆されている。

また、本研究では、CAWS によって、CADS 同様、冠状動脈炎が誘導された。その頻度は、100% 近い値を示した。また、分子が mannan-protein-glucan に特定できたことは、膜成分のうち本分子が強力に炎症を惹起してい

ることが示唆された。また、in vivo イメージングにおいても、CAWS、anti-mouseMPO、fMet-Leu-Phe により、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた。この in vivo での現象が、腎血管傷害の誘導を説明できると思われるが、分子機構との関係を明らかにする必要があり、今後も引き続き、検討する予定である。この血管内皮細胞の関与が示唆されることから、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達の変化を解析し、Caspase8 と連動する p38MAPK の関与が明らかとなった。また、好中球や脱顆粒成分によっても、この反応が誘導された。このことは、内皮細胞固有のアポトーシスシグナルが存在することが示唆される。

#### E. 結論

真菌感染に由来する分子などによって、腎炎、SLE をはじめとする難治性血管炎が誘導される。とりわけ、カンジダ菌体膜成分が血管炎を誘導し、難治性血管炎の病態マーカーの好中球自己抗体 ANCA も病態と連動した。そこで、*C. albicans* 由来の分子を特定 CAWS し、Mannan-protein-glucan であるがわかった。一方、CAWS 誘導の腎炎モデルマウスを作製して、in vivo イメージング観察する系を作製した。また、さらに、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードに p38 が関与することを明らかにした。以上から、*Candida albicans* 由来糖ペプチドが、MPO および MPO-ANCA 産生と発症誘導に不可欠であり、サイトカインと連動する活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる。

本研究は、大川原明子、長尾朋和、越尾修 (国立感染症研)、直江史郎 (東邦大・医)、高橋啓 (東邦大・医)、大原関利章 (東邦大・医)、大野尚仁 (東京薬大)、三浦典子 (東京薬大) の諸先生方の協力のもとに行なわれた。

#### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

リウマチ科 28:560-577, 2002

### 1. 論文発表

1. Mie Ito, Oda, Yamagoe S. Suzuki K, Tanokura, M. Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. *Protein Expression Purif.* in press.
2. Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono, and Karl-Heinz Krause. The HIV-1 Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation. *J Biol. Chem.* 277: 42136-43, 2002.
3. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H : Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 40: 557-563, 2002.
4. Kohji Ichimori, Naoto Fukuyama, Hiroe Nakazawa, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Shunya Takizawa, Yosuke Kmeoka, Akiko Ishida-Okawara, Fumikazu Kohi and Kazuo Suzuki. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research* in press.
5. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H : Critical role of myeloperoxidase and NADPH-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 185: 1833-1837, 2002:
6. A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, Y. Hashimoto, Y. Aratani, H. Koyama, N. Maeda, S. Naoe, K. Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation* 25: 381-387, 2001.
7. 鈴木和男：SCG/Kj マウスと ANCA 関連血管炎—血管炎病態に関与する好中球機能：動物モデルを用いた 解析から—

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



## 9. 微生物の慢性感染が関与する特定疾患における マイコプラズマの探索

分担研究者 荒川宜親 (国立感染症研究所細菌第二部長)

研究協力者 佐々木裕子(同上)

共同研究者 古賀道明、結城伸泰(獨協医科大・神経内科)  
見理 剛(国立感染症研究所・細菌第二部)  
永田典代、原嶋綾子(国立感染症研究所・感染病理部)

**研究要旨** ギラン・バレー症候群 (GBS) 患者血清中の抗マイコプラズマ抗体を測定した。ヒトに感染する3種のマイコプラズマ、*M. pneumoniae*, *M. fermentans* ならびに *M. penetrans* について、全菌体超音波破碎物 (*M. pneumoniae*, *M. fermentans*) あるいは Triton X-114 抽出物 (*M. penetrans*) を抗原とし ELISA 法にて抗体価を測定した。抗 *M. pneumoniae*-IgG ならびに IgM 抗体の両者が、平均値+2SD 以上を陽性とする、陽性者は、GBS 117 例中 2 例 (1.7%)、他群では 0 例であった。このうち 1 例は、臨床においても寒冷凝集反応 2048 倍と高値を示し、*M. pneumoniae* 感染後 GBS と診断された。GBS の一亜型であるフィッシャー症候群 (FS) 31 例では 0 例、他疾患群 142 例では 5 例 (3.5%)、健常者では 1 例 (3.1%) であった。一方、*M. fermentans* 抗体価については、平均値+3SD 以上を陽性とする、IgG 抗体については、GBS で 2 例 (1.7%)、MFS で 0 例 (0%)、他疾患で 5 例 (3.5%)、健常者で 0 例 (0%)、IgM 抗体については、GBS で 4 例 (3.4%)、FS で 1 例 (3.2%)、他疾患で 2 例 (1.4%)、健常者で 1 例 (3.1%) であった。*M. fermentans* 感染後 GBS については、抗体陽性者は少ないものの、先行感染が不明熱等の患者も 1 例あり、個々の患者について検討する必要があると考えられた。

全菌体を抗原とする ELISA のマイコプラズマ種特異性を改良する為に、リコンビナント蛋白を用いた血清診断系について検討した。*M. pneumoniae* 宿主細胞付着因子 P1 蛋白の部分配列を大腸菌で発現させた rP1-8 蛋白の抗原特異性ならびに反応性を調べた。rP1-8 は、抗 *M. pneumoniae* ならびに近縁の *M. genitalium* 抗血清には反応したが、抗 *M. salivarium*, *M. olare* ならびに *M. fermentans* 抗血清には反応しなかった。rP1-8 は、*M. pneumoniae* 肺炎患者血清に反応したが、同時に、健常者 2 名中 1 名の血清にも反応し、健常者血清中に存在する抗 *M. pneumoniae* 抗体については、リコンビナント蛋白の系でも解決できなかったものの、特異性の改良が示唆され、リコンビナント蛋白が血清診断に使用可能であると考えられた。

### A. 研究の背景ならびに目的

微生物とくに細菌の慢性感染が、病巣形成あるいは、病態悪化に関与する事が予想される特定疾患には、IgA 腎症、ギラン・バレー症候群 (GBS)、悪性関節リュウマチならびに突発性

間質性肺炎等があげられる。これらの疾患は先行症状として起こる、呼吸器感染、消化器感染あるいは関節炎が、その後の慢性疾患成立の一因になっているのではないかと推察される。これらの疾患における感染微生物についての検索は、例えば、IgA 腎症とヘモフィルス菌、GBS



とキャンピロバクター菌、関節リュウマチとマイコプラズマ、バイオフィルム形成と緑膿菌などが過去になされている。我々は、臨床細菌検査で見落とされがちであるマイコプラズマに着目し、特定疾患への関与を調査している。ヒトに感染するマイコプラズマは、8種あり、いずれもヒトのみを宿主とする完全寄生細菌である。マイコプラズマは、一般細菌の持つ細胞壁を欠き、細胞膜のみで覆われた細菌で、宿主上皮細胞へと感染し、種によっては細胞内へ侵入する。主として、呼吸器ならびに泌尿器に感染し、常在するものからヒトへの病原性を示す種まである。最も病原性が強い種は *M. pneumoniae* で、呼吸器症状が主病状であるが、肺外病変として脳炎、髄膜炎などの中枢神経系、造血器系、肝臓、腎臓への障害等を合併する例もある。稀ではあるが、人工呼吸器装着を要する重度の呼吸窮迫を呈する患者が *M. pneumoniae* ならびに *M. penetrans* 感染症で見られ、*M. pneumoniae* 感染例では死に至る劇症例もあり、症状の多彩さを示す。一方、関節炎の病因菌として、20年前から *M. fermentans* が報告されており、関節腔内浸潤液あるいは、関節の滑膜組織から DNA あるいは抗原が検出されている。これらのマイコプラズマが、持続的にヒトへ感染し、抗原刺激を与え続ける事で、例えば、関節リュウマチ疾患患者の中のある種の未知の宿主要因を持つ人に悪性関節リュウマチ（特定疾患）患者が出るのではないかとこの仮説が考えられる。

この研究の目的は、臨床検査室における細菌検査では網羅しきれないマイコプラズマ感染症についての血清診断ならびに抗原検出法の改良ならびに、特定疾患患者における血清調査等を行う事である。マイコプラズマ感染症へは、有効な抗生物質治療が存在する為、こうした基礎的調査は、将来的に患者の治療へと結びついていく事が期待される。

今年度は、特に、以下の2点について検討を行ったので、報告する。

I. ギランバレー症候群患者における抗 *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. penetrans* 抗体の検出

II. リコンビナント抗原を用いた、*M. pneumoniae* 特異的血清診断法の改良

## B. 研究方法

I. ギランバレー症候群患者における抗 *M.*

*pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. penetrans* 抗体の検出

患者ならびに健常者血清：同研究班における GBS と微生物感染の研究を行っている獨協医科大、神経内科教室で収集された血清を使用した。GBS 患者群 117 例、GBS の一亜型であるフィッシャー症候群 (FS) 患者群 31 例、年齢・性別をマッチさせた GBS 以外の疾患患者群 142 例ならびに健常者 (GBS 患者家族を含む) 32 例を調べた。

ELISA 法：*M. pneumoniae* ならびに *M. fermentans* については、全菌体の超音波破碎物を抗原として用いた。*M. penetrans* については、主要抗原がリポ蛋白層であることがすでに報告されている事から、TritonX-114 抽出層を抗原として用いた。enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法は、抗原を 96well plate にコーティングし、患者血清の 1:100 倍希釈液を well に入れて反応させ、洗浄後、アルカリフォスファターズ標識抗ヒト IgG 抗体を二次抗体として反応させ、洗浄後に発色させた。

統計処理：全菌体を抗原として用いた ELISA 系の結果については、バックグラウンドが高いため、吸光度の平均値+2SD あるいは 3SD 以上の値を陽性として解析を行った (古賀による)。

II. リコンビナント抗原を用いた、*M. pneumoniae* 特異的血清診断法の改良

全菌体を抗原に用いた ELISA 法におけるバックグラウンドの高さを軽減させる為、リコンビナント蛋白を抗原に用いた血清診断法の作成を試みた。

1. *M. pneumoniae* 細胞付着蛋白の部分発現

*M. pneumoniae* の主要抗原である宿主細胞付着蛋白 P1 遺伝子配列をもとに PCR プライマーを作成し、*M. pneumoniae* 遺伝子断片を増幅させ、大腸菌に組み込み発現させた。UGA コドンは、マイコプラズマではトリプトファンと翻訳されるが、大腸菌をはじめユニバーサルなコドン使用では、終始コドンと認識され蛋白発現が停止される。P1 遺伝子内にも多数の UGA コドンが存在するため、P1 の全長を発現させることは諦め、部分的に発現させた。今回、発現に用いた plasmid は、P1 蛋白 1628aa (約 170kDa) の一部の 404aa (約 43kDa) に相当する部分を pET30 ベクターに繋いだ pTKP1-8 で、pTKP1-8 を *E. coli* BL21 (DE3) 株に導入し、IPTG 刺激に



より約 50kDa の fusion 蛋白を発現させ、ニッケルカラムにて His-tag の付いた蛋白を精製した。以下、この抗原を rP1-8 と称する。

## 2. rP1-8 の特異性ならびに抗原性の確認

*M. pneumoniae* Mac 株全菌体超音波破碎物あるいは rP1-8 を抗原とし、血清との反応をウエスタンブロッティング法にて行った。マイコプラズマの種に対する特異性の検討には、抗マイコプラズマ血清を用いた。全菌体の超音波破碎物を抗原としてウサギに過剰免疫し、ブースター免疫を行った後、全採血をした血液の血清を抗血清とした。抗 *M. pneumoniae*, 抗 *M. genitalium*, 抗 *M. hominis*, 抗 *M. salivarium*, 抗 *M. orale* ならびに抗 *M. fermentans* 抗体 1:100 倍希釈液を用いた。感染者における抗原性の確認には、*M. pneumoniae* 肺炎患者ならびに健常人の血清 1:100 倍希釈液を用いた。抗原を電気泳動した後、ゲル内の蛋白をニトロセルロース膜に転写し、スキムミルクでブロッキング後、血清と反応させた。ペルオキシダーズ標識抗ウサギあるいは抗ヒト IgG 抗体 1:1000 倍希釈液を二次抗体として反応させ、洗浄後、発色した。

## C. 研究結果

### I. ギランバレー症候群患者における抗 *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. penetrans* 抗体の検出

#### 1. 抗体価測定

抗 *M. pneumoniae*-IgG 抗体価が平均値+2SD 以上を示す場合を陽性とする、表 1 に示す通り、陽性者は、GBS で 2 例 (1.7%)、FS で 0 例 (0%)、他疾患で 5 例 (3.5%)、健常者で 1 例 (3.1%) であった。抗 *M. pneumoniae*-IgM 抗体価が平均値+2SD 以上を示す陽性者は、GBS で 7 例 (6%)、FS で 1 例 (3.2%)、他疾患で 7 例 (4.9%)、健常者で 4 例 (12.5%) であった。IgG ならびに IgM 抗体価双方が平均値+2SD 以上を示す陽性者は、GBS で 2 例 (1.7%)、他群では 0 例であった。このうちの 1 例は、臨床においても寒冷凝集反応が 2048 倍と高値を示した。寒冷凝集反応は、*M. pneumoniae* 感染特異的試験ではないが、*M. pneumoniae* 感染においても上昇することから臨床で使われる試験法であり、この患者は、*M. pneumoniae* 感染後 GBS と診断された。抗 *M. fermentans* 抗体価については、IgG なら

びに IgM 抗体価双方が平均値+2SD 以上を示す陽性者が居なかった為、平均値+3SD 以上を陽性とした。抗 *M. fermentans*-IgG 抗体価が平均値+3SD 以上を示す陽性者は、表 2 に示す通り、GBS で 2 例 (1.7%)、FS で 0 例 (0%)、他疾患で 5 例 (3.5%)、健常者で 0 例 (0%) であった。抗 *M. fermentans*-IgM 抗体価が平均値+3SD 以上を示す陽性者は、GBS で 4 例 (3.4%)、FS で 1 例 (3.2%)、他疾患で 2 例 (1.4%)、健常者で 1 例 (3.1%) であった。他疾患患者の中には、脊髄小脳変性症、気管支喘息、脳梗塞、てんかんの患者が含まれた。

抗 *M. penetrans* 抗体価は、全例で陰性であった。

### 2. 抗 GM1 抗体価、抗キャンピロバクター抗体との関連

GBS 成立に、*Campylobacter jejuni* のリポ多糖とヒト GM1 の糖との間に分子類似性が存在すること、および患者血清中に抗 GM1-IgG 抗体が検出されることから、*C. jejuni* 感染に伴い、GM1 と反応する抗体が産生され、これが自己抗体として末梢神経障害を惹起すると想定されている。このことから、獨協医科大学において測定された患者血清中の抗 GM1-IgG 抗体価と抗マイコプラズマ抗体価の関連を検討した。*M. pneumoniae* 感染後 GBS 例については、ここでは省略する (同研究班の別項参照)。抗 *M. fermentans*-IgG 陽性者の 2 例全員、ならびに抗 *M. fermentans*-IgM 陽性者については、GBS 患者 2 例 (4 例中)、FS 患者 1 例が抗 GM1-IgG 抗体が陽性であった。しかしながら、この 5 例全員が、抗 *C. jejuni* 抗体も陽性であることから、抗 GM1 抗体の由来を推定することは困難であった。特に下痢を先行症状とした GBS 患者 2 例については、*C. jejuni* との関連が疑われる。

### II. リコンビナント抗原を用いた、*M. pneumoniae* 特異的血清診断法の改良

*M. pneumoniae* 全菌体抗原の他種との交差反応について：*M. pneumoniae* 全菌体を抗原に用い、ヒトに感染する各種マイコプラズマに対する抗血清と反応させると、*M. pneumoniae* のみならず、*M. genitalium* と強い反応を示し、両種に対する抗血清は、*M. pneumoniae* の P1 蛋白を認識した。また、抗 *M. orale* 血清は、*M. pneumoniae* 抗原の分子量、約 50kDa 蛋白を認識した。

rP1-8 抗原の特異性について：*M. pneumoniae* の細胞付着蛋白 P1 配列の一部を大腸菌で発現



させた rP1-8 抗原は、抗 *M. pneumoniae* ならびに抗 *M. genitalium* 抗体（ウサギ免疫血清）に反応したが、抗 *M. salivarium*, 抗 *M. fermentans* ならびに抗 *M. orale* 抗体には反応しなかった。抗 *M. hominis* については、判定保留とした（図 2）。

感染者における rP1-8 抗原の抗原性について：rP1-8 は、*M. pneumoniae* 肺炎患者の血清 5 例（6 例中）に反応し、健常者 1 例（2 例中）に反応した（図 3）。

#### D. 考察

全菌体を抗原とした ELISA 法では、健常者血清中に抗 *M. pneumoniae* 抗体の存在することは、我々もこれまでに報告してきた。今回の抗血清を用いたウエスタンブロッティングの結果は、*M. pneumoniae* の全菌体抗原が、近縁である *M. genitalium* のみならず、*M. orale* とも交差反応を示すことを示唆した。*M. orale* は、広く健常人の口腔内に常在することから、健常人血清中の抗体価を測定するのに障害になると考えがえられた。*M. pneumoniae* の細胞付着蛋白 P1 の部分配列を用いたリコンビナント蛋白を抗原に用いた系において、種特異性に関する改良を行った。rP1-8 抗原は、*M. pneumoniae* と *M. genitalium* には反応したが、両種は、遺伝的にも非常に近縁であり、ゲノムサイズの小さい *M. genitalium*（580kb）の持つ全ての予想 ORF470 個は、*M. pneumoniae* ゲノム(816kb)中にオーソログが存在する。*M. pneumoniae* の細胞付着蛋白 P1 のオーソログが *M. genitalium* には MgPa（140kDa）として存在することから、交差反応の生じる事は予想されていた。一方、rP1-8 は、少なくとも、他のマイコプラズマ種 *M. salivarium*, *M. orale* ならびに *M. fermentans* との交差反応が無い。rP1-8 は、健常者における抗 *M. pneumoniae*-P1 抗体とは反応するものの、*M. salivarium*, *M. orale*, *M. fermentans* との交差反応に由来する非特異反応は軽減できることが予想される。尚、抗原検出法について *M. pneumoniae* と *M. genitalium* の PCR 法による鑑別プライマーをすでに我々は報告しており、血清診断に加えて抗原検出を行うことにより、両種の感染症の鑑別を行うことは可能である。今後、リコンビナント *M. fermentans* 抗原の作成を検討していく予定である。

GBS 患者における *M. pneumoniae* 感染先行例は、文献では約 5%程度であるが、今回の全菌体を

抗原とした ELISA 法では、IgG ならびに IgM 抗体価が平均値+2SD である例は、1.7%にとどまった。文献では、*M. pneumoniae* 感染後 GBS 患者の血清における抗ガラクトセレブロシド（Gal-C）抗体上昇が報告されている 1)。さらに抗 Gal-C 抗体価上昇者は、GBS 患者の 12% あり、その全てが *M. pneumoniae* 感染と関連していること、抗 Gal-C 抗体が *M. pneumoniae* 抗原と交差反応することが報告されている 2)。しかしながら、マイコプラズマにおける糖脂質の Gal-C 類似構造は、いまだ明らかではない。共同研究者の結城らは、*C. jejuni* リポ多糖の末端糖鎖配列が(Gal\_\_1-3 GalNAc\_\_1-4[NeuAc\_\_2-3]Gal\_\_1)であり、ヒト GM1 の糖鎖配列と一致していることを報告し 3)、GBS の先行感染の約 20-30%程度を占める *C. jejuni* 感染後の軸索型 GBS 成因説の研究が進められている。マイコプラズマ糖脂質とヒト糖脂質との分子類似構造が、今後解明されることで、GBS 先行感染としての呼吸器感染の一原因としてのマイコプラズマ感染症の解析が進むことが予測される。*M. pneumoniae* のみならず *M. fermentans* の糖脂質は、強い抗原性を有することが知られている。今回の血清調査では、例数は少ないものの抗 *M. fermentans* 抗体陽性者の存在が見つかり、*M. fermentans* 感染と GBS についても疑いをかける必要を示唆する結果と考えられた。

#### E. 結論

GBS の先行感染として、少なくとも 1.7%が *M. pneumoniae* 感染であることが血清学的に予測された。*M. fermentans* 感染後の GBS については、高い抗体価を有する例が数例あるものの、確証には至らなかった。

血清反応の種特異性を向上する為、*M. pneumoniae* ならびに *M. genitalium* にのみ反応し、*M. salivarium*, *M. orale* ならびに *M. fermentans* に反応しないリコンビナント蛋白を用いて、血清診断法の改良を行った。

#### F. 参考文献

- 1) Kusunoki S., Shiina M and Kanazawa I. Anti-Gal-C antibodies in GBS subsequent to mycoplasma infection: evidence of molecular mimicry. *Neurology* 28: 736-738, 2001



- 2) Ang CW, Tio-Gillen AP, Groen J, Herbrink P, Jacobs BC, Van Koningsveld R, Osterhaus AD, Van der Meche FG, van Doorn PA. Cross-reactive anti-galactocerebroside antibodies and *Mycoplasma pneumoniae* infections in Guillain-Barré syndrome. *J. Neuroimmunol.* 130:179-83, 2002
- 3) Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Handa S, Miyatake T. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J. Exp. Med.* 178: 1771-1775, 1993

#### G. 健康危険情報

特になし

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

計画中

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 1. 抗 *M. pneumoniae* 抗体価測定の結果

	GBS		MFS		Hospital		Family	
	n	%	n	%	n	%	n	%
>mean+2SD								
IgG 0.469	2	1.7	0	0.0	5	3.5	1	3.1
IgM 0.337	7	6.0	1	3.2	7	4.9	4	12.5
both IgG and IgM>mean+2SD	2	1.7	0		0		0	

表 2. 抗 *M. fermentans* 抗体価測定の結果

	GBS		MFS		Hospital		Family	
	n	%	n	%	n	%	n	%
>mean+3 SD								
IgG 0.206	2	1.7	0	0.0	5	3.5	0	0.0
IgM 0.178	4	3.4	1	3.2	2	1.4	1	3.1



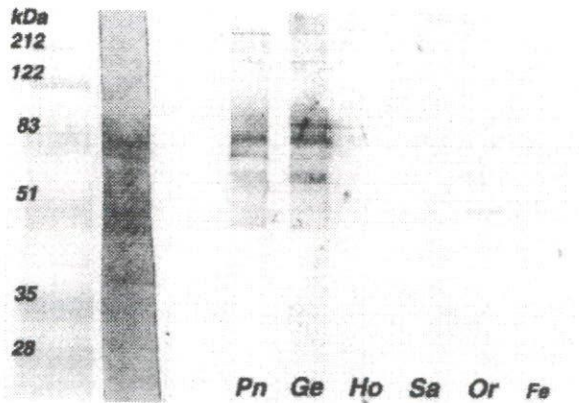


図 1. *M. pneumoniae* 全菌体抗原のマイコプラズマ種特異性についての検討、全菌体超音波破碎物抗原を泳動し膜に転写後、抗マイコプラズマ抗血清と反応させた Western Blotting の結果：抗血清はウサギ免疫血清を用い、左のレーンから、分子量マーカ、抗原のクマシー染色、抗 *M. pneumoniae* 血清、抗 *M. genitalium* 血清、抗 *M. hominis* 血清、抗 *M. salivarium* 血清、抗 *M. orale* 血清ならびに抗 *M. fermentans* 血清。抗 *M. pneumoniae* 血清、抗 *M. genitalium* 血清、抗 *M. orale* 血清で陽性を示す。

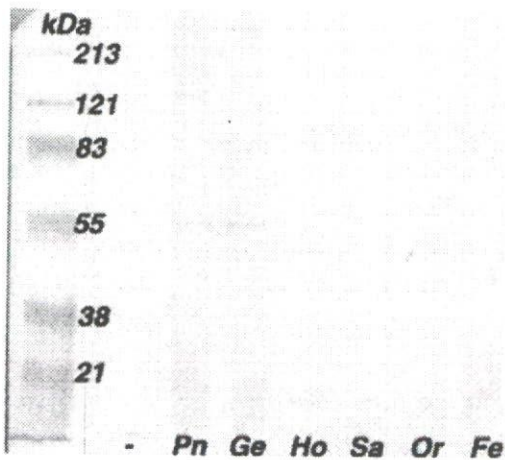


図 2. rP1-8 抗原のマイコプラズマ種特異性についての検討、rP1-8 (約 50kDa) 抗原を泳動し膜に転写後、抗マイコプラズマ抗血清と反応させた Western Blotting の結果：抗血清はウサギ免疫血清を用い、左のレーンから、分子量マーカ、陰性血清、抗 *M. pneumoniae* 血清、抗 *M. genitalium* 血清、抗 *M. hominis* 血清、抗 *M. salivarium* 血清、抗 *M. orale* 血清ならびに抗 *M. fermentans* 血清。抗 *M. pneumoniae* 血清、抗 *M. genitalium* 血清でのみ陽性を示す。

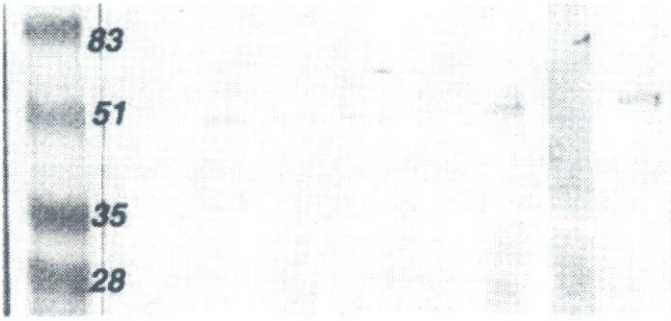


図3. rP1-8の反応性に関する検討、rP1-8抗原を泳動し膜に転写後、健常人ならびに *M. pneumoniae* 肺炎患者血清と反応させた：左のレーンから、分子量マーカ、健常人1, 2, 肺炎患者1, 2, 3, 4, 5, 6。健常人2ならびに肺炎患者1, 2, 3, 4, 6で陽性を示す。



## 10. 末梢肺と縦隔リンパ節に常在するアクネ菌に関する検討

分担研究者 江石義信 (東京医科歯科大学病因・病理学助教授)

**研究要旨** 末梢肺およびリンパ節に *P. acnes* (アクネ菌)が常在しているか否かを検証するため、VATS 法により上気道を経由することなく直接採取された末梢肺組織および外科的に切除された肺・胃・大腸の所属リンパ節からの細菌培養を試みた。末梢肺の 56%、肺所属リンパ節の 73%から本菌が分離され、その大部分は *P. acnes* が単独で分離された。胃および大腸の所属リンパ節からも本菌は分離されたが、それらは腸内細菌を中心とした多量の他菌種の分離を伴っていた。さらに、各種正常臓器分離株間に遺伝子的差異があるか否かを RAPD 法により解析したところ、それぞれの臓器から分離された株は臓器ごとに異なる遺伝子型を有していた。以上の結果より、アクネ菌は皮膚や腸管だけでなく肺やリンパ節にも常在しており、それらは臓器ごとに異なる遺伝子型を有していることが示唆された。肺や縦隔リンパ節のサルコイドーシス病変は、宿主の本菌に対する過敏性免疫反応を背景に、局所に常在するアクネ菌の異常増殖が引き金となって形成されている可能性がある。

### A. 研究目的

これまでのサルコイドーシス(サ症)病因に関する研究の過程で *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)が非サ症肺組織およびリンパ節に常在している可能性が示唆された。そこで今回は末梢肺組織およびリンパ節における *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)の常在の有無および他菌種の存在の有無に関して検討するために、Video-assisted thoracoscopic surgery 法により切除された末梢肺組織および外科手術により切除された癌非転移所属リンパ節からの細菌分離培養を試みた。さらに、各種正常臓器から分離された *P. acnes* 株の遺伝子的差異を検討する目的で Random Amplified Polymorphic DNA 法を用いて遺伝子タイピングを行った。

### B. 研究方法

細菌分離培養の検体として VATS 切除された末梢肺組織 45 例、外科手術により切除された癌非転移所属リンパ節 38 例を用いた。無菌的に採取された組織の重量を測定し、GAM broth 中でホモジナイズした懸濁液を 5 種類の平板

培地に塗布し、好気および嫌気下にて培養した。その後、肉眼上同一なコロニーをカウントすると同時に同定試験を実施した。細菌数は組織 1g あたりの colony forming unit として評価した。RAPD 法による遺伝子タイピングの対象菌株として細菌分離培養において分離された正常肺分離株 25 株および正常リンパ節分離株 21 株に加え、健康人皮膚分離株 35 株、健康人結膜分離株 16 株および健康人腸管(糞便)分離株 16 株を使用した。各菌株から DNA を抽出し、2 種類のランダムプライマーを用いて PCR およびアガロースゲル電気泳動を実施した。各株の泳動パターンから解析ソフトを用いて各株間の類似係数を算出し、系統樹を作成した。

### C. 研究結果

*P. acnes* は末梢肺組織では 45 例中 25 例(56%)、肺所属リンパ節では 11 例中 8 例(73%)、胃所属リンパ節では 20 例中 10 例(50%)、大腸所属リンパ節では 13 例中 3 例(23%)において分離された。末梢肺組織および肺所属リンパ節において *P. acnes* が分離された症例のうち各 1 例で *Staphylococcus* spp.が同時に分離された以外は、



すべて *P. acnes* が単独で培養され、それぞれの単独培養率は 53%、64%であった。これとは対照的に、胃および大腸の各所属リンパ節においては *P. acnes* が分離された症例の大部分で多量の腸内細菌を中心とした他菌種の分離を伴い、*P. acnes* の単独培養率はそれぞれ 30%、8%であった。

今回使用した 2 種類のプライマーによって得られたすべての株間の類似係数は有意に相関していた ( $r = 0.87$ ,  $P = 0.001$ ) ことより、これら 2 種類のプライマーは以降の解析において遺伝子的差異を検討するに適していた。それぞれの株間の類似係数に基づいて系統樹を作成したところ、両プライマーにおいても由来臓器ごとに各株がクラスター (集団) を形成する傾向が見られた。また、各株間の類似係数の平均値を比較すると、皮膚分離株・結膜分離株間を除けば、同種の正常臓器から分離された株間においては、異なる正常臓器から分離された株間においてよりも有意に (すべて  $P < 0.001$ ) 高い平均値を示した。

#### D. 考察

今回の研究ではコンタミネーションを避けるために VATS 法を用いて直接、末梢肺組織の検体を採取した。その結果、半数弱の肺においては細菌が分離されず、肺組織の清浄性が証明されたが、半数以上の検体から *P. acnes* が分離された。このことは、*P. acnes* が正常末梢肺に常在していることを示唆するものであり、さらに、これら分離された株が他の臓器から分離された株と遺伝的に異なることから、今回の分離は他の部位からのコンタミネーションによるものではなく、確かに末梢肺組織に常在している株由来であることを示している。サ症を、結核と結核菌に代表される体外から侵入した病原菌に対する外因性感染症ではなく、正常細菌叢に存在する *P. acnes* に対する内因性感染症であると仮定した場合、今回の結果は肺および縦隔リンパ節に主要な病変を有するというサ症の病態に矛盾するものではない。

#### E. 結論

*P. acnes* は末梢肺組織および肺所属リンパ節 (縦隔リンパ節) に高率に常在し、それらは各

臓器ごとに異なる遺伝子型を有していた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### 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. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes from Japanese and European patients with sarcoidosis. *J Clin Microbiol* 40(1): 198-204, 2002.
2. Tetsuo Yamada, Yoshinobu Eishi, Satoshi Ikeda, Ikuo Ishige, Takashige Suzuki, Tamiko Takemura, Touichiro Takizawa, and Morio Koike. *In situ* localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. *J Pathol* 2002; 198: 541-547.
3. Kobayashi D, Eishi Y, Ohkusa T, Ishige I, Suzuki T, Minami J, Yamada T, Takizawa T, Koike M. Gastric mucosal density of *Helicobacter pylori* estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading. *J Med Microbiol* 51: 1-7, 2002.
4. Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, Koike M. Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 37: 509-516, 2002.
5. Ishimaru H, Kageyama Y, Hayashi T, Nemoto T, Eishi Y, Kihara K. Expression of matrix metalloproteinase-9 and bombesin/gastrin-releasing peptide in human prostatic cancers and their lymph node metastases. *Acta Oncologica* 41(3): 289-296, 2002.
6. Hiroshi Kawachi, Touichiro Takizawa, Yoshinobu Eishi, Shinichiro Shimizu, Jiro Kumagai, Nobuaki Funata, Morio Koike.



Absence of either gastric or intestinal phenotype in microscopic differentiated gastric carcinomas. J Pathol 2003; 200: (in press).

7. 江石義信、サルコイドーシスとプロピオニバクテリア、呼吸器科（科学評論社）Vol.1(1):45-53, 2002.
8. 江石義信、サルコイドーシスの成因論、日本臨床 809: 1668-1671, 2002.
9. 江石義信、成因にかかわる候補起因体研究の最新動向、日本臨床 809: 1688-1696, 2002.
10. 石下郁夫、江石義信 定量系リアルタイムPCR法の原理とその応用 細胞（ニュー・サイエンス社）34: 507-511, 2002.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

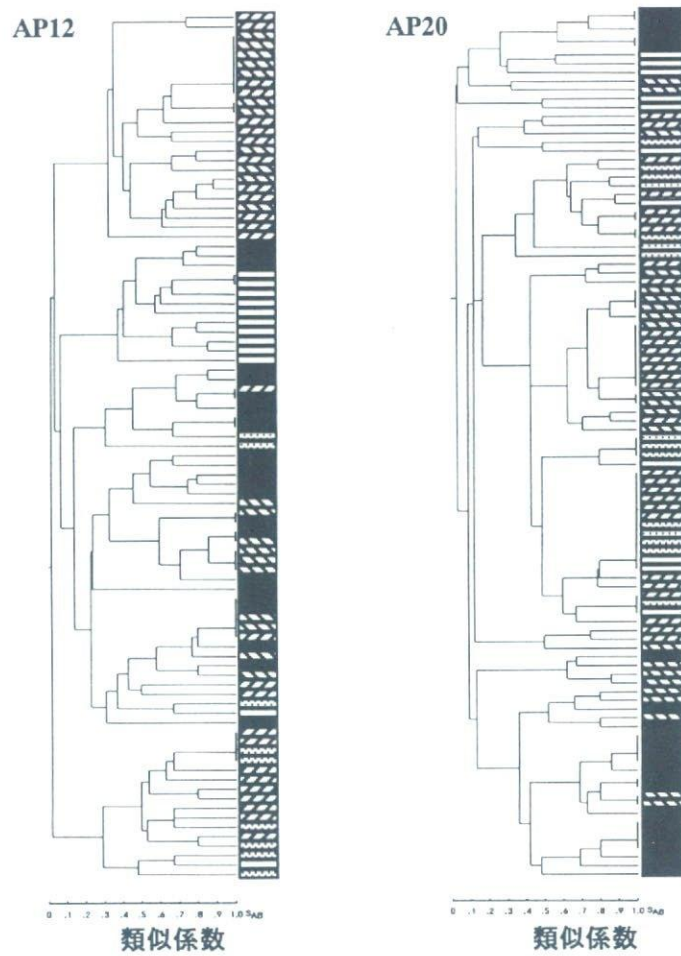


図1 RAPD法による系統樹解析結果

リンパ節分離株(■)、肺分離株(▨)、皮膚分離株(▩)、  
結膜分離株(□)、腸管分離株(□)。