

通常型移植では 109 人が HLA 適合血縁ドナーから、28 人が HLA 1 座不適合血縁ドナーから移植を受けていた。56 人が G-CSF を用いて誘導した末梢血幹細胞、81 人が骨髄を移植されていた。ミニ移植では、98 人が HLA 適合血縁ドナーから、21 人が HLA 1 座不適合ドナーから移植されていた。幹細胞ソースは 104 人が末梢血、15 人が骨髄であった。GVHD 予防は、通常型移植ではシクロスポリンと短期 MTX を用い、ミニ移植ではシクロスポリン単剤を用いた。

移植時には、全患者が Laminar Air Flow を装備した個室に入室し、ST 合剤、フルオロキノロン、フルコナゾール、アシクロビルを予防的に投与した。抗菌剤の予防投与は、免疫抑制剤投与中は継続した。

侵襲性アスペルギルス症の診断基準

侵襲性アスペルギルス症の診断基準は、EORTC/NIH 規準を用いた。この規準で、Definite、および Probable の規準をみたく患者を侵襲性アスペルギルス症例と定義した。

主要評価項目と統計学的手法

本研究の主要評価項目は、ミニ移植後の侵襲性アスペルギルス症の頻度である。副次的評価項目は、ミニ移植後の侵襲性アスペルギルス症の臨床像、および危険因子の評価である。侵襲性アスペルギルス症の発症頻度は、2002 年 12 月末日時点での、累積発生率とした。単変量解析にはカイ二乗検定、Mann-Whitney 検定、および多変量解析にはコックス比例ハザードモデルを用いた。有意水準は 5%とした。

C. 研究結果

患者背景と侵襲性アスペルギルス症発症

頻度

ミニ移植、および従来型移植を受けた患者背景は、通常の移植を受けた患者と比較してミニ移植を受けた患者は高齢である傾向があること以外には、有意な差を認めなかった。

侵襲性アスペルギルス症の頻度は患者全体で 35/664 (5.3%)、3 年の累積発症率は、従来型移植で 4.5%、ミニ移植で 8.2%であった ($p=0.045$) (図 1)。

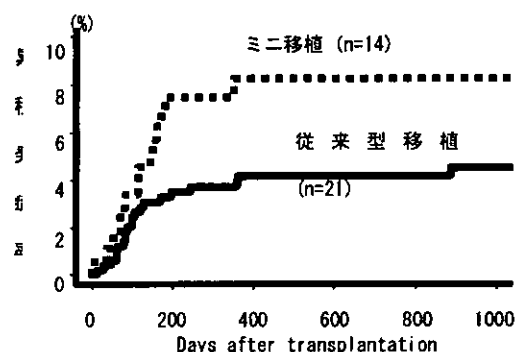


図 1 : ミニ移植、従来型移植後の侵襲性アスペルギルス症累積発症率

侵襲性アスペルギルス症の臨床像

生着前に侵襲性アスペルギルス症を発症している患者は存在しなかったが、ミニ移植患者 3 人、通常移植患者 3 人は、発症時に好中球数が低下していた。侵襲性アスペルギルス症の発症日中央値は、ミニ移植が 127 日、通常移植が 97 日であった ($p<0.01$)。致死率は、従来型移植、ミニ移植で、76%、86%であった。

危険因子

多変量解析にて、侵襲性アスペルギルス症の危険因子は、50歳以上の患者 (relative risk: 2.12, 95% CI: 1.08–4.17, $p=0.03$)、GVHD (relative risk: 6.2, 95% CI: 2.4–16.4, $p=0.0002$)であった。

D. 考察

本試験では、侵襲性アスペルギルス症の頻度はミニ移植と通常型移植で有意な差を認めなかった。双方とも致死率が高いため、早期診断・早期治療が必要である。

アスペルギルススペル感染症の危険因子を同定することは、ハイリスク群を同定し、重点的な感染対策を行ううえで重要である。本試験では、その危険因子はステロイドの使用であった。ステロイドの使用はGVHDと高度に相関するため、両者を分離して考えることはできない。GVHDに伴うステロイド使用、あるいはそれに伴う免疫回復遅延がIA発症と関連していると考えられる。GVHDの頻度はミニ移植でも低下しないことを考慮すれば、侵襲性アスペルギルス症はミニ移植においても従来型移植と同様に重大な合併症であることは当然である。

本試験の問題点は侵襲性アスペルギルス症の診断基準である。侵襲性アスペルギルス症と診断されたうちで、組織学的、真菌学的検討がなされた例は少なく、大部分はEORTC/NIH基準を用いて臨床的に診断されている。侵襲性アスペルギルス症発症例は、骨髄抑制による出血傾向や易感染性などの合併症を抱えることが多く、生前に組織診断することが難しい。このため、組織診断された例の多くは剖検例である。EORTC/NIH基準は、その妥当性が十分に検証されているが、

感度・特異度ともに十分とはいえない。たとえば、Possible aspergillosis という診断基準が存在する。臨床医が侵襲性アスペルギルス症を疑い、早期に治療したため、血清学的、画像診断にて特異的な所見を呈さなかった場合が含まれる。今回の研究を含め、アスペルギルス症に関する多くの研究では、possible aspergillosis は侵襲性アスペルギルス症に含めていない。このため、多くの研究では侵襲性アスペルギルス症の頻度を過小評価している可能性が高い。本研究は、ミニ移植における侵襲性アスペルギルス症の頻度が通常型移植と比較し、減少しないことを示すことができたが、侵襲性アスペルギルス症の実際の頻度に関しては更なる検討が必要である。

本研究は、侵襲性アスペルギルス症がミニ移植の重大な合併症であることを示した。ミニ移植においても、従来型移植と同様、その致死率は高く、治療関連死亡の主因となっている。本研究は、ステロイド投与が独立した危険因子であることを示した。GVHD治療のため、ステロイドを投与されている症例に関しては、特別な対策を講じる必要がある。ミニ移植における侵襲性アスペルギルス症の発症中央値は移植後100日以降であり、この時期の患者は外来で治療されている。このため、侵襲性アスペルギルス症の予防として有効性が証明されているHEPAフィルターを用いることは現実的ではない。近年、アスペルギルスに抗菌力を有する新規薬剤が開発されている。このような薬剤を用いたchemoprophylaxisは有望な方法であろう。あるいは、在宅におけるアスペルギルス感染経路を解明し、環境対策に重点をおくことも有望であろう。このような予防方法の確立により、移植後晩期の侵襲性アスペルギルス症

の発症頻度は減少し、移植の成績向上にも寄与すると考える。

E. 結論

侵襲性アスペルギルス症は、従来型移植と同様にミニ移植においても重大な合併症である。早期診断、早期治療方法を確立する必要がある。

F. 健康危機情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared to transplantation with a conventional regimen. Rie Kojima, Masahiro Kami, Yasuhito Nannya, Eiji Kusumi, Miwa Sakai, Yuji Tanaka, Yoshinobu Kanda, Shin-ichiro Mori, Shigeru Chiba, Shigesaburo Miyakoshi, Kinuko Tajima, Hisamaru Hirai, Shuichi Taniguchi, Hisashi Sakamaki, Yoichi Takaue. (Submitting)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特記すべき事項はなし。

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）

「深在性真菌症及び輸入真菌症対策に向けた総合的基盤研究」

分担研究報告書

コウモリ・グアノからの *Histoplasma* の検出および菌相解析

分担研究者 杉田 隆 明治薬科大学微生物学教室 講師

研究要旨

国内の洞窟・風穴から採取された 60 のコウモリ・グアノサンプルから非培養法を用いて *Histoplasma* sp. の検出を試みたが、全てのサンプルから検出されなかった。また、グアノ中から多数の酵母様真菌を分離し菌相解析を行なったところ、主要構成菌種は夏型過敏性肺炎の原因抗原である *Trichosporon* であった。このことから、入洞に伴う呼吸器症状との関連性に興味もたれる。今後も継続的な真菌学的な調査が必要である。

A. 研究目的

Histoplasma capsulatum を起因菌とするヒストプラズマ症は主要な輸入真菌症の一つであるが、国内感染と推定される症例が少ない。また、動物における国内感染例も報告されている。このことから *Histoplasma* は我が国に存在している可能性が考えられる。南米を中心とした環境調査から本菌はコウモリあるいはその堆積糞(グアノ)からしばしば分離されている。本研究では、我が国に *Histoplasma* が存在するか否かを調べるために様々な地域の洞窟・風穴から採取されたグアノから *Histoplasma* の検出を非培養法を用いて行なった。またグアノの菌相解析も併せて実施した。

B. 研究方法

1) コウモリ・グアノサンプル

本研究班分担研究者である東京女子医科大学感染症対策科菊池賢先生より分与頂いた 60 サンプルを実験に供した。採取場所を Table 1 に示す。

2) *Histoplasma* の検出

サンプル中の *Histoplasma* DNA 検出法の概略を Fig. 1 に示す。約 1 g のグアノにブレインハート インフュージョンブロースを加え 27℃で 3 日間培養、および滅菌生理食塩に懸濁し、真菌 DNA を抽出した。ITS 領域上に、*H. capsulatum*、*H. duboisii* および *H. farciminosus* の 3 変種に共通な DNA 塩基配列を見出し特異プライマーを作成した。Nested PCR 後、PCR 産物を TA クローニングし、DNA 塩基配列を決定した。

3) グアノサンプル中の真菌相解析

約 0.5 g のグアノに YM ブロース(含、ペ

ニシリン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール)を加え 27℃で 1 日培養し、培養液を同寒天培地に塗抹した。得られた酵母様コロニーの ITS1-5.8S-ITS2-D1/D2 26S rDNA 塩基配列解析を行ない、当該菌株の同定を行なった。なお、菌相解析は 44 サンプルについて行なった。

C. 研究結果

1. *Histoplasma* の検出

Histoplasma 保存株の DNA(分担研究者 横村浩一先生より分与)を用いて PCR の特異性を確認後、60 サンプルについて *Histoplasma* の検出を試みた。1 サンプルが PCR 陽性となったが DNA 塩基配列解析から陰性と判定された。本検出条件下では *Histoplasma* DNA は検出できなかった。

2. グアノサンプル中の真菌相解析

44 サンプル中 18 サンプルから酵母様コロニーが得られ、その内の 150 株の DNA 塩基配列を解析した。担子菌系酵母として、*Trichosporon prosum*、*T. laibachii* および unknown *Trichosporon* spp.、*Cryptococcus podzolicus*、および *Tremella* sp.が、子囊菌系酵母は、*Candida palmioleophila*、*C. lusitaniae*、*Debaryomyces hansenii*、*Hanseniaspora* sp. および *Saccharomyces cerevisiae* が分離・同定された。酵母陽性サンプル(18)中の各々の菌種の分離頻度を Fig. 2 に示す。特に、*Trichosporon* spp.が高頻度に分離された(67%, 12/18)。既知菌種に同定できなかった株は、分子系統解析から新種(7 菌種)と推

定された。

D. 考察

今回、関東から九州に至る洞窟・風穴から採取されたコウモリ・グアノ中の *Histoplasma* の検出を試みたが、全てのサンプルから検出されなかった。南米を中心とした環境調査からコウモリあるいはそのグアノ中からの分離例は多く報告されていることから、今後も継続して分離を試みる必要があると思われる。

Histoplasma の分離は出来なかったもののグアノ菌相解析から興味深い知見を得た。分離された酵母の大部分は日和見真菌感染症の起原菌であること、また酵母陽性サンプルの大部分から *Trichosporon* が分離された。*Trichosporon* は深在性真菌症の起原菌のみならず我が国固有のアレルギー疾患とされている夏型過敏性肺炎の原因抗原でもある。これは環境中の *Trichosporon* の分生子を反復吸入することによって発症する III/IV 型のアレルギーである。*Trichosporon* spp.は血清学的には 4 型(I, II, III, I-III 型)に大別されるが、グアノから分離された株は II 型以外のすべての血清型が含まれていた。データには示さないが入洞後、呼吸器症状を呈した 3 例のうち 2 例から I および III 型に対する抗 *Trichosporon* 特異抗体が検出された。これは菌相解析の結果とよく相関する。従って、呼吸器症状の原因あるいは原因の一部に *Trichosporon* が関与している可能性が考えられる。今後も継続的な血清学および真菌学的な調査が必要である。

E. 結論

非培養法により洞窟・風穴から採取されたコウモリ・グアノ中の *Histoplasma* の検出を試みたが、全てのサンプルから検出されなかった。この結果から直ちに本邦に *Histoplasma* が存在しないとは結論づけられないため、更に広範囲な調査が必要である。またコウモリ・グアノの主要な構成菌は *Trichosporon* であった。本菌は夏型過敏性肺炎の原因抗原であることから、入洞に伴う呼吸器症状との関連性が示唆される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表 (原著、総説、書籍)

- 1) Sugita T, akashima M, Poonwan N, Mekha N, Malaithao K, Thungmuthasawat B, Kudo T. The first isolation of ustilaginomycetous anamorphic yeasts, *Pseudozyma* species, from patients' blood and a description of two new species: *P. parantarctica* and *P. thailandica*. *Microbiol. Immunol.* 47:183-190, 2003.
- 2) Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol. Immunol.* 47:271-277, 2003.
- 3) Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex:

Cryptococcus aureus, *Cryptococcus*

carnescens and *Cryptococcus peneaus*.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1187-1194, 2003

4) Sugita T, Nishikawa A. Fungal identification method based on DNA sequence analysis: Reassessment of the methods of the Pharmaceutical Society of Japan and the Japanese Pharmacopoeia. *J. Health Sci.* 49:531-533, 2003

5) Lopandic K, Sugita T, Zelger S, Prillinger H. Zwei neue *Trichosporon*-Arten aus Kase. *Arbeitsgemeinschaft landwirtschaftlicher Versuchsanstalten - Jahrestagung.* 179-182, 2003

6) Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A. New analytic significance of rDNA sequences in pathogenic fungi. *Research Advance in Microbiology*, vol. 3, pp.97-101, 2003, Global Research Network, Kerala, Indida

7) 杉田隆. 日和見感染症および夏型過敏性肺炎の原因菌種としての *Trichosporon asahii* の多様性解明. *日本医真菌学会雑誌* 44, 7-12, 2003

8) 杉田隆. DNA 塩基配列解析による真菌の同定 ~Microseq™ System を用いた環境および臨床材料由来真菌の同定例~ *Bio WAVE* 24, 18-19, 2003

H. 知的財産権の出願特許状況

なし

Table 1. グアノサンプルの採取場所

採取地	洞窟名	サンプル数
東京都西多摩郡	日原鍾乳洞	3
茨城県日立市	大久保風穴	1
山梨県北都留郡	宵岩鍾乳洞	1
山梨県青木ヶ原	神坐風穴	2
群馬県多野郡	こうもり穴	1
福島県相馬郡	立石の大穴	2
熊本県球磨郡	球泉洞	1
山口県美祿郡	秋芳台：秋芳洞	11
山口県美祿郡	秋芳台：こうもり穴	5
山口県美祿郡	秋芳台：千佛洞	7
福岡県北九州市	目白鍾乳洞	3
三重県	勝迷支洞	1
福岡県北九州市	宵龍洞	6
鹿児島県沖永良部島	昇竜洞、第2洞	2
福岡県北九州市	こむそう穴	1
埼玉県秩父市	仏石山鍾乳洞	3
福岡県田川郡	岩屋第1洞	1
熊本県球磨郡	九折瀬洞	5
山口県美祿郡	秋芳台、秋芳洞	2
山口県福栄村	佐々運洞	2

60

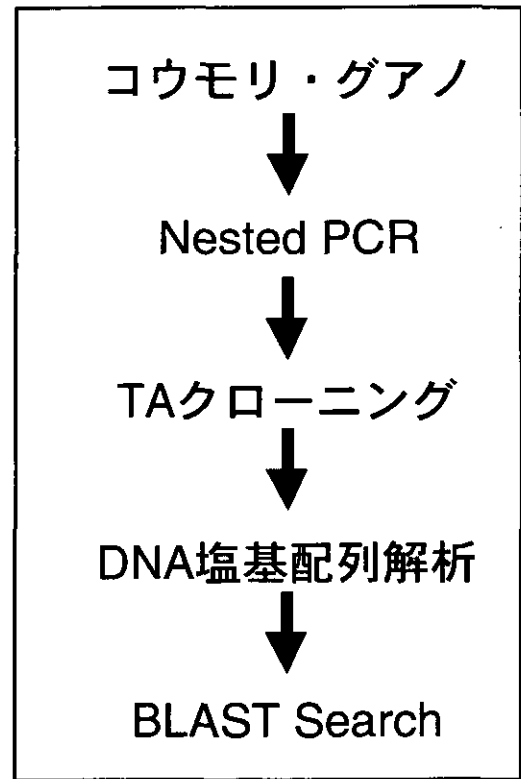


Fig. 1. コウモリグアノ中からの *Histoplasma* spp. の検出法概略

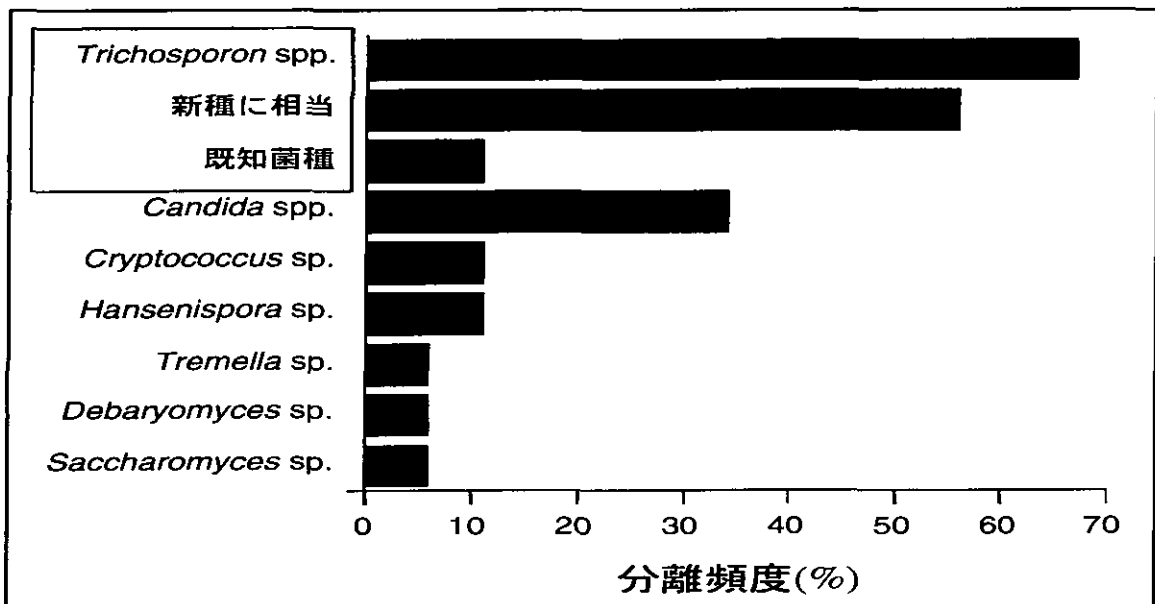


Fig. 2. コウモリ・グアノ中の酵母分離頻度

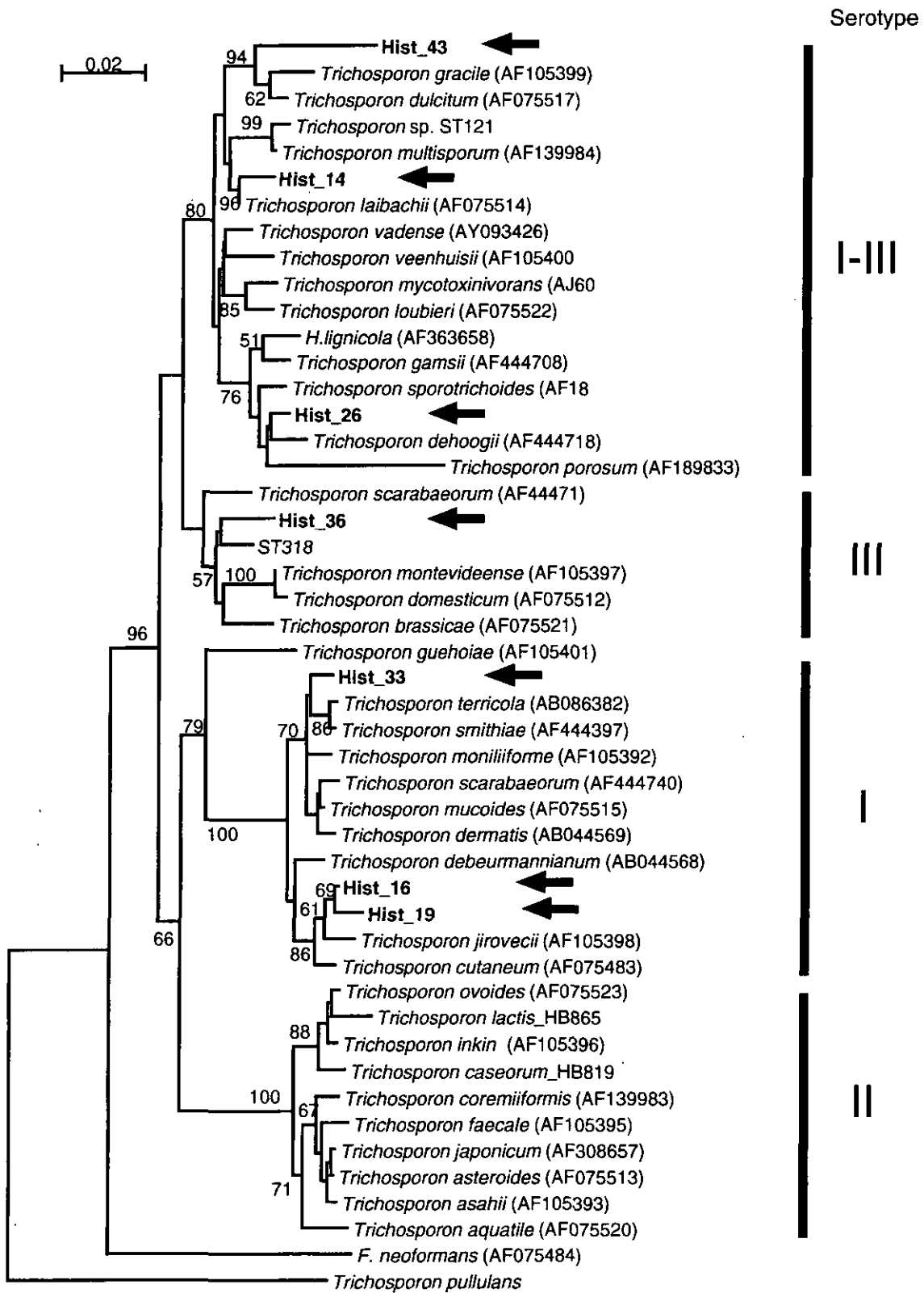


Fig. 3. コウモリグアノから分離された新種酵母

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業)

「深在性真菌症及び輸入真菌症対策に向けた総合的基盤研究」

分担研究報告書

真菌分子によって誘発する慢性炎症・難治性血管炎

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: *Candida* 症や *Aspergillus* 症は、主に好中球機能の低下にともなった日和見感染で、その主たる原因は、好中球殺菌酵素の不全によるものである。本年度は、クリプトコッカスに対する易感染性における MPO の重要性を知るために、野生型マウスおよび myeloperoxidase 欠損マウス(MPO-KO)により比較し、MPO 欠損により顕著に低下することが明らかにした。一方、好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全を誘発し、自己抗体産生性の難治性血管炎の発症に関与することが強く示唆されている。とりわけ、われわれは、真菌由来分子によって誘導される好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) が、難治性血管炎の病態に相関していることを明らかにしてきた。また、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein CADS/CAWS による血管炎においてマウスの系統差があることに着目し、遺伝子マップ解析をした。また、CADS/CAWS での誘導にかかわるサイトカインや好中球の活性化を検討し、TNF α 、IL-6 および IL-10 の関与を認めた。また、CAWS 投与初期には、好中球が血中に一過的動員され活性化状態にあることがわかった。

A. 研究目的

これまで、*Candida* 症や *Aspergillus* 症が、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が報告されている (Med.Mycol,2002, J.Infect.Dis. 2002, J.Infect.Dis.1 2000)。さらに、われわれは、マウスの MPO 遺伝子欠損の実験から、好中球の殺菌酵素の不全を要因とする好中球機能の低下が、カンジダ症やアスペルギルス症を誘発している報告してきた (Infection Immunity 1999, J. Infectious Diseases 2000)。一方、クリプトコッカス

(*Cryptococcus neoformans*) の肺感染について検討しており、2 日後の肺での残存菌数は、野生型マウスと MPO-KO マウスの間での差異は全く認められなかった。しかし、長期観察が必要と考え、本年度は、クリプトコッカスを感染させたマウスの生存率と各臓器における感染の程度の経時的変化をさらに長期間追跡した。

一方、難治性疾患の腎炎、SLE をはじめ難治性血管炎は、好中球機能不全により誘導されることが指摘されていること。また、真菌由来分子によって引き起こされる好中球顆粒内殺菌酵素の不全が、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を示してきた。難治性血管炎の1つの病態の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、血管炎の病因と深く関与していることも明らかにしてきた。

自己抗体 MPO-ANCA 抗体が好中球を活性化し、生体側に不利な細胞傷害を引き起こす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おいても、MPO-ANCA が血清に顕著に検出される。そこで、われわれは、真菌由来分子が MPO-ANCA 産生と活性化好中球による難治性血管炎の発症に関与しているかについて病態モデルマウスでの解析を進め、真菌由来分子によって、殺菌酵素の不全をともなって血管炎の誘導が引き起こされることを示した (Inflammation, 2001)。そこで、本研究では、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein CADS/CAWS が血管炎を誘導するが、マウスの系統差があることに注目し、CADS/CAWS 誘導に反応する遺伝子群を特定することにした。CADS/CAWS による誘導でのサイトカイン産生におけるマウスの系統差および好中球の機能を解析した。また誘導の際のマウスの系統差を利用して遺伝子マップ解析もあわせて検討した。

B. 研究方法

1) クリプトコッカスの感染：クリプトコッカス (*Cryptococcus neoformans*, ATCC24067) を野生型マウスおよび MPO-KO マウスに鼻腔内投与し、180 日間生存率を測定した。また、MPO-KO マウスは 60 日間、野

生型マウスは 180 日間の肺、脳、心臓、肝臓、腎臓、および脾臓に残存する菌数を測定した。各臓器を滅菌生理食塩水でホモジナイズし培養して生育したコロニー数 (CFU) を測定した。また、各組織をホルマリン固定し、ヘマトキシリン/エオジン染色、もしくはグロコット染色を施し、病的に解析した。

2) 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。

3) DBA/2, C57BL/6, C3H/HeN, CBA/2 マウスに CADS/CAWS を 5 日間 ip 投与を第 1、5 週に施行し、9 週後に冠状動脈炎の病理評価により染色体マーカとのリンクを算出した。また、別途、初期投与 1 週間後に、脾臓細胞を分取し培養し、CADS/CAWS を加えて、培養液中へのサイトカインの遊離を ELISA 法により測定した。

4) 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。

C. 研究結果

1) クリプトコッカス感染による MPO の関与：野生型マウスおよび MPO-KO マウスにクリプトコッカスを鼻腔内投与したところ、野生型マウスは半年間ほとんど死亡しなかったが、MPO-KO マウスは感染後 1 ヶ月目頃から急激に死亡し始め、2 ヶ月目にはほとんどのマウスが死亡した (図 1)。また、その間の肺での残存菌数を測定した。野生型マウスでは感染直後に一過的な増加をしたのち、

経時的に徐々に減少し、MPO-KO マウスでは、感染直後に顕著に増加したまま 60 日目まで減少することはなかった。

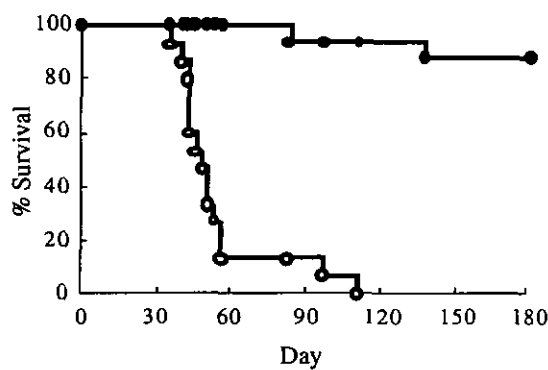


図 1. *C. neoformans* を鼻腔内感染の生存率。野生型マウス (●)、MPO-KO マウス (○)

MPO-KO マウスの肝臓における菌数は一過的な増加をし、野生型マウスよりも減少速度は緩やかであった。脳と腎臓では、経時的に著しい増加を示した。感染 2 ヶ月後の肺の組織切片の病理解析では、野生型マウスの肺にはほとんど炎症は認められなかったが、MPO-KO マウスでは大量の炎症細胞が侵出していた。

2) CAWS 誘導の血管炎: CAWS によって冠状動脈炎が誘導された。冠状動脈炎の頻度は、DBA/2 で 100% 近い値を示した。冠状動脈炎の程度は、DBA/2, C57BL/6, C3H/HeN の順であり、CBA/2 は冠状動脈炎がほとんど検出されなかった。

3) CAWS 誘導血管炎のサイトカインレベル: 各種系統マウスの脾臓を CAWS の種々の濃度で刺激し、産生されたサイトカインを測定した。その結果、冠状動脈炎の程度と連

動して、炎症性サイトカイン $TNF\alpha$ 産生は、DBA/2 で高値を示した。しかし、CBA/2 では殆ど検出されなかった。一方、他の炎症性サイトカインも同様の結果を示した。しかし、抗炎症性サイトカイン IL-10 はそれとは逆の結果を示した。

4) 誘発性および抑制性遺伝子の染色体マップ: 冠状動脈炎は、増殖性肉芽腫性炎の像を呈した。個体間で明らかな組織学的差異は見出せなかった。一方、サイトカインの誘導は、マウス系統によって異なり、顕著にあらわれたサイトカインは、Interferon- γ , $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6, IL-10 であり、CAWS 誘導の冠状動脈炎との相関が認められた。このことから、本モデルにおける冠状動脈炎発生抑制には複数の遺伝子の関与が考えられた。遺伝子の染色体マップ解析から、少なくとも 3 個の染色体上に抑制遺伝子がマッピングされた。真菌由来分子によって誘導されるサイトカイン産生と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遺伝子群は、Chr-1, Chr-4 は誘導遺伝子、Chr-4 は抑制性の 3 箇所の候補部位があがった。

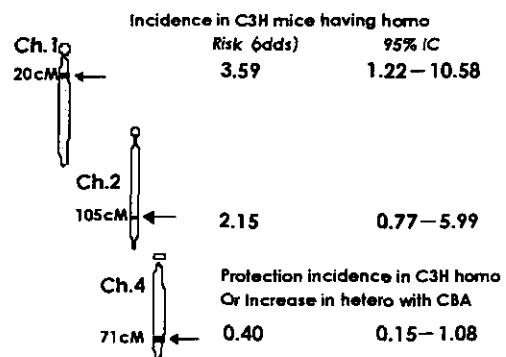


図 2. 誘発性および抑制性遺伝子の染色体マップ

D. 考察

本研究では、野生型マウスと MPO-KO マウスにクリプトコッカスを感染させて易感染性を比較し野生型マウスは、半年間という長期間観察したにもかかわらず全く死亡しなかったのに対して、MPO-KO マウスは2ヶ月以内という短期間にそのほとんどが死亡するという興味ある結果が得られた。この結果は、クリプトコッカス感染に対する生体防御において、MPO の触媒によって産生される好中球由来の次亜塩素酸が極めて重要であることを意味している。

米国やイタリアでの易学調査によると、MPO 欠損者は 2,000~4,000 人に 1 人の割合で存在していると報告されている。また、我が国では 57,000 人に 1 人の割合で存在していると最近報告された。本研究は、活性酸素産生欠如という好中球機能異常が、感染に対する深刻なリスクを負うことを示唆しており、真菌感染症はこれら自然免疫力の低下によって発症することが十分考えられる。本研究は、自然免疫系を標的とした新たな治療法の開発による真菌感染症対策を試みるための基礎研究として重要な知見を提供した。

一方、*Candida albicans* 由来糖ペプチドにより冠状動脈炎が誘発され、MPO 遺伝子欠損マウスを用いた研究から、好中球殺菌酵素 MPO およびその自己抗体 MPO-ANCA の産生が発症誘導に不可欠であることをわれわれは報告してきている。CAWS などの真菌由来分子が炎症性サイトカインを誘導し、それと連動する好中球の活性化が重要な役割を担っているものと考えられる。また、本年度は、マウス系統により発症頻度に差が認められて

いることから、その系統差を利用して染色体マップをし、3箇所の候補部位があがった。

E. 結論

まず、クリプトコッカスに対する易感染性における MPO の重要性を知るために、野生型マウスおよび myeloperoxidase 欠損マウス(MPO-KO)により比較し、MPO 欠損により顕著に低下することが明らかにした。また、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、カンジダ菌由来分子が血管炎を誘導し、難治性血管炎の病態マーカーである好中球自己抗体 ANCA も病態と連動した。これに関連して、マウス系統により発症頻度に差が認められている。そこで、その系統差を利用した染色体マップから Chr-1、Chr-4 は誘導遺伝子、Chr-4 は抑制性の遺伝子として、3箇所の候補部位があがった。*Candida albicans* 由来糖ペプチドが、発症誘導に不可欠で、サイトカインと連動する活性化好中球が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、亀岡洋祐、倉文明（以上一国立感染研）、荒谷康昭（横浜市立大）、直江史郎、高橋啓、大原関利章（以上一東邦大・医）、大野尚仁、三浦典子（以上一東京薬大）の諸先生方の協力により行なわれた研究をもとに記載した。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

(1)誌上発表

1. Akiko Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, Eri Muso, Takahiko Ono, Kan Saiga, Kyuichi Nemoto, Kazuo Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrology, Dialysis and Transplantation*, 2004 in press
2. Ohashi, Y.Y., Kameoka, Y., Persad, A.S., Kohi, F., Yamagoe, S., Hashimoto, K., and Suzuki, K.. Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene* 327: 195-200, 2004.
3. Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K., Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 314: 46-53, 2004.
4. Ichimori, K., Fukuyama, N., Nakazawa, H., Aratani, Y., Koyama, H., Takizawa, S., Kameoka, Y., Ishida-Okawara, A., Kohi, F., and Suzuki, K.. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - Study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research* 37: 481-489, 2003.
5. Murata, K., Inami, M., Kubo, S., Kimura, M, Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K, Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S.F., H., Nakayama, T. CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type-II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 15: 987-992, 2003.
6. Nunoi, H., Kohi, F., Kajiwara, H., Suzuki, K. Prevalence of Inherited Myeloperoxidase Deficiency in Japan. *Microbiol Immunol.* 47: 527-531, 2003.
7. Sakamoto, M., Hasegawa, A., Sugaya K., Hashimoto, K., Kimura, M., Yamashita, M., Suzuki, K., Nakayama, T. Distinct calcium response induced by T-cell antigen receptor stimulation in thymocytes and mature T cells. *Bioimages* 11: 1-8, 2003.
8. Suzuki, K. Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis *Internal Med.* 42: 552-553, 2003.
9. Kamei, K., Sano, A, Kikuchi, K., Makimura, K., Niimi, K., Suzuki, K., Uehara, Y., Okabe N., Nishimura, K., Miyaji, M. The trend of imported myucoses in Japan. *J. Infect. Chemother.* 9: 16-20, 2003.
10. 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. 27: 272-278, 2003.

11. 鈴木和男 血管炎をめぐる世界の動き
「医学のあゆみ」206:123-126, 2003
12. 鈴木和男 血管炎発症機構の解析研究_
活性化好中球の関与「医学のあゆみ」
206:133-139, 2003
13. 鈴木和男 ANCA 関連血管炎の発症機序
_活性化好中球の関与_リウマチ科
29:228-236, 2003.
14. 大川原明子、鈴木和男、猪原登志子、小
野孝彦、武會恵理、雑賀 寛、根本久一：
半月体形成性腎炎モデルとしての
SCG/Kj マウスの好中球機能 Pharma
Medica 21: 157-161, 2003.

(2)学会発表

1. Kazuo Suzuki Seminar in the
Department of Biochemistry, Cornell
University, Medical School (New York
City, USA). "Role of activated
neutrophils in vasculitis development:
in-vivo imaging", June 6, 2003, New
York City, USA.
2. 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 nicotianamide
adenine dinucleotide phosphate-
oxidase in high-burden systemic
infection of mice with *Candida*
albicans." Gordon Research

Conferences, June 8-13, 2003, New
London, USA.

3. Kazuo Suzuki "Role of activated
neutrophils in vasculitis development".
Gordon Research Conferences, June
8-13, 2003, New London, USA.
4. Nagao, T., Koshio, O., Mabuchi, A.,
Ohno, N., Takahashi, K., Minamitani,
H., Suzuki, K. "Imaging of renal
microvascular injury induced by
immune abnormality" Gordon
Research Conferences, June 8-13,
2003, New London, USA.
5. Koshio, O, Nagao, T., Ishida-Okawara,
A., Mabuchi, A., Suzuki, K. "The
contribution of PMN and the
degranulated substances to the
activation of p38 MAPK and Caspase 8
in the introduction of Apoptosis of
human Endothelial cell" Gordon
Research Conferences, June 8-13,
2003, New London, USA.
6. Kazuo Suzuki Seminar in Marine
Biological Laboratories. "Role of
activated neutrophils in vasculitis
development: in-vivo imaging" USA,
June 13, 2003, Woods Hole.
7. 猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、
鈴木和男、武會恵理「ANCA 関連腎炎・
血管炎に対するヒト免疫グロブリン
(IVIg) 治療効果の検討」第 46 回日本腎
臓病学会学術総会、2003 年 5 月 23 日、
東京
8. Kazuo Suzuki International

- Symposium Sponsored by Center of Excellence for Advanced Life Science on the Base of Bioscience and Nanotechnology, Sapporo (北海道大学 21 世紀 COE プログラム - バイオとナノを融合する新生命科学拠点 - ナノ・イメージングによって切り開く新たなバイオ医療 “In-vivo Imaging of Vasculitis”, 2003 年 7 月 19 日、札幌
9. Manger, B., Suzuki, K. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium, “Chair Talk: The Use of IVIG in Collagen Vascular Diseases, Vasculitis and Atherosclerosis”, September 25-27, 2003, Interlaken, Switzerland
 10. Ito-Ihara, T., Suzuki, K., Ono, T., Nogaki, F., Suyama, K., Kita, T., Muso, E. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium. “Beneficial effect of intravenous immunoglobulin for patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated rapidly progressive glomerulonephritis”, September 25-27, 2003, Interlaken, Switzerland
 11. 鈴木和男「血管炎の研究がめざす新たな展開：特に ANCA 関連血管炎」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 12. 高橋啓、大原関利章、鈴木和男、直江史郎「マウス系統的血管炎誘発モデルにおける動脈病変の免疫組織学的検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 13. 武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、鈴木和男「ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 14. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁「真菌多糖の in vitro における IFN- γ 産生増強作用の検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 15. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲「関節炎および血管炎の発症における CD69 分子の役割」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 16. 越尾修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「血管炎への好中球の関与と炎症性サイトカインによるヒト

- 血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討」第5回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ2003、第6回肝臓生物学研究会合同年会、2003年7月17日～18日、札幌
17. 鈴木和男「レビュートーク：血管炎に関するインターフェロン γ 」第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003年7月23日～24日、東京
 18. 三浦典子、新郷裕子、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大川原明子、鈴木和男、大野尚仁「Candida albicans 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性」第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003年7月23日～24日、東京
 19. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、栗原和記、Keiko Ozato、鈴木和男、大野尚仁第「真菌多糖の樹状細胞分化の調節におよぼす影響—IRF-8 欠損マウスの解析から—」第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003年7月23日～24日、東京
 20. 越尾修、長尾朋和、石田大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「血管炎に関するTNF α およびIL-1 β によるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討」第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003年7月23日～24日、東京
 21. 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦「血管炎発症における活性化好中球の関与」第14回日本生体防御学会、2003年7月31日～8月2日、京都
 22. 鈴木和男、松岡俊行、栗原和記、佐々木健夫、Keiko Ozato「血管炎に関する異常好中球：IRF-8 ノックアウトマウスによる解析」第14回日本生体防御学会、2003年7月31日～8月2日、京都
 23. 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦「血管炎発症における活性化好中球の関与」第14回日本生体防御学会、2003年7月31日～8月2日、京都
 24. 鈴木和男、南谷晴之、山本健二、眞島利和「日本バイオイメージング学会と化学工学会の連携による『ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成』シンポジウム—公開シンポジウム「ナノとバイオの融合 学理構築、産業基盤形成」開催から学ぶ—」、2003年9月10日～11日、松島
 25. 鈴木和男、長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾修、馬淵綾子、南谷晴之「新しいイメージング技術へ向けて—IVI 技術 (in-vivo imaging) —」2003年9月10日～11日、松島
 26. 大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、小野孝彦、雑賀寛、根本久一、鈴木和男「糸球体腎炎の発症、進行における好中球活性化の役割—SCG/KJ マウスを用いた解

- 析 -」第15回腎とフリーラジカル研究会、2003年9月20日、東京
27. Mabuchi, A., Nagao, T., Koshio, O., Suzuki, K., and Wheatley, A.M. "Induction of F4/80^{high+} Mac-1^{high+} nonparenchymal adherent liver cell suppressor function in T cell-mediated murine hepatic injury: involvement of nitric oxide?" American Association of Liver Diseases in 2003, October 24-28, 2003, Boston, USA..
28. 鈴木和男、長尾朋和、越尾 修、馬淵綾子、大野尚仁、高橋 啓、南谷晴之、直江史郎「In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析」第8回血管炎研究会、2003年10月18日、秋田
29. 三浦典子、三川浩輝、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日-25日、八王子
30. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲「関節炎の発症におけるCD69分子の役割」第9回MPO研究会、2003年10月24日-25日、八王子
31. 川上真紀子、鈴木和男、F. Vilhardt, K-H Krause, 澤田誠 「脳内細胞ミクログリアのMPO産生」第9回MPO研究会、2003年10月24日-25日、八王子
32. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機 「ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのクリプトコッカス感染防御能の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日-25日、八王子
33. 長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾 修、馬淵綾子、南谷晴之、鈴木和男 「In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日-25日、八王子
34. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、山田仁美、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、高橋 啓「カンジダ菌体抽出物誘導動脈炎モデルにおける動脈炎形成過程の経時的検討」第9回MPO研究会、2003年10月24日-25日、八王子
35. 三浦典子、三川浩輝、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日-25日、八王子
36. 大川原 明子、武曾 恵理、猪原 登志子、高野 薫、野口 洋子、松田 潤一郎、鈴木 和男 「遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウス ICGN の好中球活性化の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日-25日、八王子
37. 亀岡洋祐、Amanda Persad、池田文恵、仁保善之、鈴木和男「新規ミエロペルオキシダーゼ欠損症患者に同定された遺伝子変異」第9回MPO研究会、2003年10

- 月 24 日—25 日、八王子
38. 鈴木和男「MPO-ANCA 関連血管炎」第 9 回 MPO 研究会、2003 年 10 月 24 日—25 日、八王子
 39. 越尾修、長尾朋和、大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human Endothelial cell」第 76 回日本生化学会大会、2003 年 10 月 16 日—18 日、横浜
 40. 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二「生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用」第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日—31 日、横浜
 41. 鈴木和男「細胞・組織障害のメカニズム解析—血管炎を分子とバイオイメージングで解析する—」第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日—31 日、横浜
 42. 長尾朋和・長谷川明洋・越尾 修・馬淵綾子・南谷晴之・中山俊憲・鈴木和男「活性酸素誘導の血小板血栓形成における CD69 の役割」第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日—31 日、横浜
 43. 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二「生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用」第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日—31 日、横浜
 44. 三川浩輝、三浦典子、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 由来菌体外多糖画分 CAWS による致死の血管炎誘発メカニズムの解析」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日—10 日、福岡
 45. 大川原明子、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男「*C. albicans* 由来物質 CAWS によって誘起されるマウス冠状動脈炎発症における活性化好中球の役割について」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日—10 日、福岡
 46. 村田薫、稲見真倫、長谷川明洋、久保秀一、宮本健志、木村元子、山下政克、長尾朋和、鈴木和男、谷口克、中山俊憲「CD69 ノックアウトマウスにおける抗 type II コラーゲン抗体誘導性関節炎発症の抑制」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日—10 日、福岡
 47. 長尾朋和、長谷川明洋、越尾 修、馬淵綾子、南谷晴之、中山俊憲、鈴木和男「活性酸素誘導性の血小板血栓形成における CD69 の役割」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日—10 日、福岡
 48. 村山 研、長尾朋和、越尾 修、長谷川明洋、中山俊憲、新井孝夫、鈴木和男「活性化好中球における CD69 分子の表面局在」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日—10 日、福岡
 49. 濱野慶朋、広瀬幸子、鈴木和男「MPO-ANCA 関連半月体形成性腎炎自然発症モデル SCG/KJ マウスの遺伝的解析」第 33

回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡

50. 武曾恵理、大川原明子、鈴木和男「遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウス ICGN の好中球活性化の解析」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
51. 鈴木和男 “Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis” 第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
52. Aratani, Y., Kura, F., Suzuki, K., and Koyama, H. “*In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense against fungal and bacterial infections.” 第33回日本免疫学会総会・学術集会、福岡、2003年12月8日～10日、福岡
53. 荒谷康昭、倉 文明、鈴木和男、小山秀機「*Cryptococcus neoformans* 感染に対する生体防御におけるミエロペルオキシダーゼの役割」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
54. 亀岡 洋祐、Persad Amanda、橋本 雄之、鈴木 和男「ミエロペルオキシダーゼの第8ヘリックスにおける日本人集団の変異頻度」第26回日本分子生物学会年会 2003年12月10—13日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)

「深在性真菌症及び輸入真菌症対策に向けた総合的基盤研究」

分担研究報告書

真菌の病原性および薬剤耐性機構の解明

分担研究者 新見昌一 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

主任研究者 上原至雅 国立感染症研究所 生物活性物質部 部長

研究要旨

アゾール系抗真菌剤に対する耐性獲得には種々の機構が関与しているが、真菌細胞膜に局在する二種の排出ポンプ、ABC (ATP binding cassette) または MFS (Major facilitator superfamily) 輸送体の寄与はきわめて大きい。これらの輸送体の機能をよりよく理解するために、またポンプ阻害剤の探索を行うために、我々はパン酵母を用いた発現系を開発した。7種の主要な ABC 輸送体を破壊しアゾール剤高度感受性の *S. cerevisiae* AD1-8U 株を親株として用い、*PDR5* promoter、*URA3* マーカーおよび *PDR5* C-末端配列を持つプラスミドベクター pABC3 を作製した。promoter の下流に調べたい耐性遺伝子を挿入後、このカセットを相同組み換えによって AD1-8U 株の破壊された *PDR5* 残存部分に導入した。この発現系を用いると *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans* の ABC 輸送体のみならず、抗癌剤耐性に寄与するヒトの P-glycoprotein の発現も可能であった。膜画分に発現する排出ポンプは特異抗体または MALDI-TOF 質量分析により同定した。これらのポンプ発現株を用いることによって MIC 値、基質特異性、ローダミン 6G の排出、ポンプ NTPase 活性などの比較が容易になった。*C. albicans* においては Cdr1p (ABC 輸送体)、Ben[®]p (MFS 輸送体)、Erg11p の順に強い耐性を示した。さらに *C. glabrata* の Cdr1p, Pdh1p がグルコース依存的にリン酸化することを認めた。以上のことからパン酵母発現系を用いることにより、耐性遺伝子の性状比較、ポンプ阻害剤の探索、さらには膜蛋白質の解析等が一段と進展することが期待される。

A. 研究目的

カンジダやアスペルギルス、クリプトコッカスなどによる重篤な真菌症の感染例は、国内においても次第に増加している。これらの真菌症は、エイズ、悪性腫瘍、血液疾患などの基礎疾患を持つ患者や臓器・骨髄移植を受けた患者を中心に発生しており、医療の先進・高度化ならびに人口の高齢化に伴う日和見感染症として、

今後もさらに増加することが危惧されている。

このような状況の中で、真菌症を克服するためのさまざまな取り組みが基礎および臨床面からなされてきた。基礎領域においては近年、特に遺伝子の単離、発現、破壊、機能解析等に必要種々のツールが急速に整備されつつあり、分子遺伝学的手法を駆使した研究の発展がめざましい。またいくつかの病原真菌のゲノムシーク