

5. ギラン・バレー症候群の病因因子の解明と その制御に関する研究

— *Campylobacter jejuni* 菌体抗原感作による実験的神経炎の作成 —

分担研究者 高 昌星 (信州大学医学部保健学科教授)

研究協力者 三好征司、小穴こず枝(信州大学医学部保健学科)
江原孝史 (信州大学医学部病理学)
京ヶ島守 (愛知県がんセンター分子病態学部)
Taekyun Shin (National Cheju University)

研究要旨 ギラン・バレー症候群 (GBS) に発展した *Campylobacter jejuni* (*C. j*) 腸炎患者糞便より *Campylobacter jejuni* (*C. j*) を分離後、培養した Penner の血清型 O-19 株を抗原とし、Freund の完全アジュバントと共に C57BL/6 マウスおよび Lewis rat に感作し、実験的神経炎の作成を試みた。C57BL/6 マウスでは臨床症状の発現はみられなかったが、Lewis rat では感作後 15 日～18 日目に尾の麻痺で発症し、上行性に進行し、その後回復した。発症率は 9/13 (69.2%) であった。今回、我々は世界で初めて *C. j* 菌体抗原感作による実験的神経炎の作成に成功した。神経系では坐骨神経および馬尾神経に炎症性細胞浸潤がみられたが、脳脊髄など中枢神経系には炎症はみられず、また肝臓・腎臓・副腎など神経以外の臓器にも炎症はみられず、*C. j* 菌体抗原感作による実験的神経炎は末梢神経に特異的であった。こうした炎症性細胞浸潤の出現は、今回の実験的神経炎の発症に液性免疫よりも細胞性免疫が強く関与していることを示唆するものと考えられる。*C. j* 菌体抗原感作による実験的神経炎の作成により、今後 *C. j* 感染後 GBS の発症機序の解明が大きく発展することが期待される。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群 (GBS) の 10～30% に *Campylobacter jejuni* (*C. j*) の先行感染があり、発症との関連が注目されているが、その詳細な機序は未だ不明である。GBS の発症機序の解明に動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAN) は大きく貢献してきた。EAN は上行性の進行性麻痺を来し、一過性の末梢神経系の炎症性脱髄疾患で臨床的・病理学的特徴が GBS と酷似している。EAN の発症機序の解明は GBS の発症機序の解明に大きく役立つとともに、GBS の治療とその予防にも貢献できることが期待される。一方 *C. j* 菌体抗原感作による実験的神経炎の作成は *C. j* 感染後 GBS の発症機序の解明に大きく貢献するが、これま

で成功したことがない。今回、我々は *C. j* 菌体抗原感作による実験的神経炎の作成を試み、世界で初めて尾の麻痺など神経炎を作り出すことに成功し、病理組織学的に検索した。

B. 研究方法

ギラン・バレー症候群 (GBS) に発展した *Campylobacter jejuni* (*C. j*) 腸炎患者糞便より *C. j* を分離後、培養した Penner の血清型 O-19 株 (図 1) を抗原とし、Freund の完全アジュバントと共に C57BL/6 マウスおよび Lewis rat に感作し、実験的神経炎の作成を試みた。感作後、毎日臨床症状を観察するとともにスコア化した。感作後、臨床症状発現後、および 21 日

目(回復期)に屠殺し,種々の臓器,脳・脊髄,馬尾神経および坐骨神経を採取し,4%パラフォルムアルデヒドで固定した.固定後,病理組織学的に検討した.

C. 研究結果

C57BL/6 マウスでは臨床症状の発現はみられなかったが, Lewis rat では感作後15日~18日目に尾の麻痺で発症し,上行性に進行し,その後回復した.発症率は9/13(69.2%)であった.神経系では坐骨神経および馬尾神経に炎症性細胞浸潤がみられたが,脳脊髄など中枢神経系には炎症はみられなかった.また肝臓・腎臓・副腎などの一般臓器には細胞浸潤はみられなかった.坐骨神経では神経束内血管周囲に炎症性細胞浸潤がみられた(図2).また馬尾神経には著明な炎症性細胞浸潤がみられた(図3~5).こうした炎症性細胞浸潤の出現は今回の作成し得た実験的神経炎の発症に細胞性免疫が関与していることを強く示唆するものと考えられる.

Campylobacter jejuni

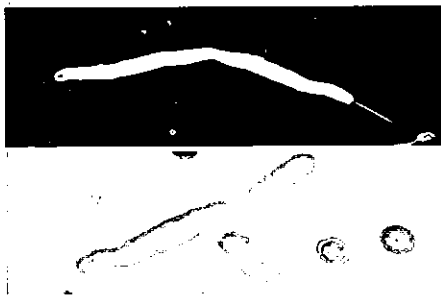


図1: *Campylobacter jejuni* (C. j) 抗原

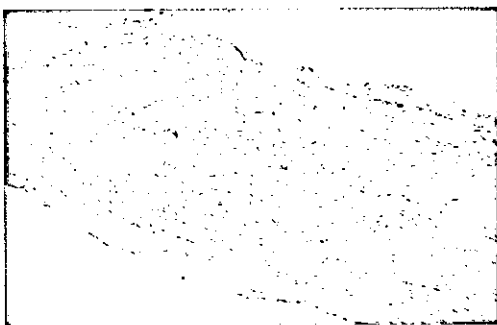


図2: 坐骨神経の血管周囲に細胞浸潤がみられる。

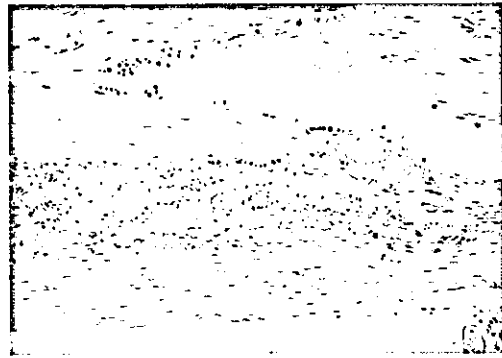


図3: 馬尾神経: 著明な炎症性細胞浸潤がみられる。

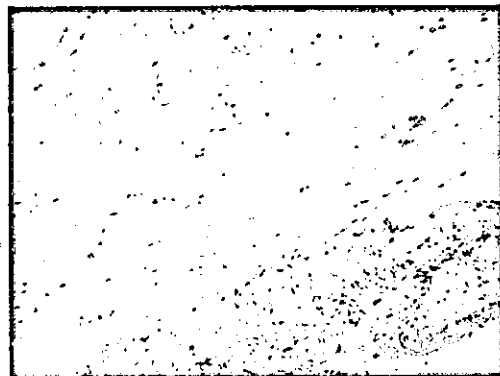


図4: 脊髄には細胞浸潤はみられず,馬尾神経のみに炎症性細胞浸潤がみられる。

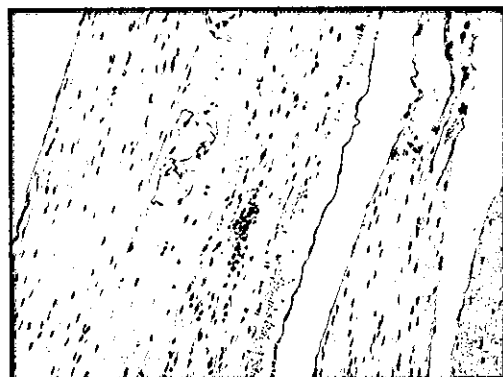


図5: 馬尾神経に炎症性細胞浸潤と,一部に炎症性細胞の集束がみられる。

D. 考察

今回、我々は初めて *C. j* 菌体抗原感作による実験的神経炎の作成に成功した。臨床的には遠位部の尾の麻痺から症状は始まり次第に上行した。神経系では坐骨神経および馬尾神経に炎症性細胞浸潤がみられたが、脳脊髄など中枢神経系には炎症はみられなかった。今回作成し得た *C. j* 菌体抗原感作による実験的神経炎は末梢神経に特異的である可能性が示唆された。こうした炎症性細胞浸潤の出現は、今回の実験的神経炎の発症に液性免疫よりも細胞性免疫が強く関与していることを示唆するものと考えられる。*C. j* 菌体抗原感作による実験的神経炎の作成により、今後 *C. j* 感染後 GBS の発症機序の解明が大きく発展することが期待され、*C. j* 感染後 GBS の治療と予防に大きく役立つことが期待される。

E. 結論

世界で初めて *C. j* 菌体抗原感作による実験的神経炎の作成に成功した。炎症は神経系では主として坐骨神経と馬尾神経など末梢神経に限定され、脳脊髄など中枢神経系にはみられなかった。*C. j* 菌体抗原感作による実験的神経炎の作成により、今後 *C. j* 感染後 GBS の発症機序の解明が大きく発展することが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moon C, Ahn M, Jee Y, Heo S, Kim S, Kim H, Sim KB, Koh C-S, Shin YG, Shin T: Sodium salicylate-induced amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is associated with the suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenases. *Neurosci Lett*, 356(2): 123-6, 2004.
2. Shin T, Koh C-S: Immunohistochemical detection of osteopontin in the spinal cords of

mice with Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *Neurosci Lett*, 356(1): 72-4, 2004

3. Nakayama K, Nagase K, Tokutake Y, Koh C-S, Hiratochi M, Ohkawara T, Nakayama N: Multiple POU-binding motifs, recognized by tissue-specific nuclear factors, are important for Dll1 gene expression in neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 325(3):991-6, 2004
4. Ahn M, Lee Y, Moon C, Jin JK, Matsumoto Y, Koh C-S, Kim HM, Shin T: Upregulation of osteopontin in Schwann cells of the sciatic nerves of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis. *Neurosci Lett*. 372(1-2):137-41, 2004
5. Ahn M, Moon C, Lee Y, Koh C-S, Kohyama K, Tanuma N, Matsumoto Y, Kim HM, Kim SR, Shin T: Activation of extracellular signal-regulated kinases in the sciatic nerves of rats with experimental autoimmune neuritis. *Neurosci Lett*. 372(1-2): 57-61, 2004
6. Moon C, Ahn M, Kim HM, Lee Y, Koh C-S, Matsumoto Y, Shin T: Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the early and peak of autoimmune neuritis in rat sciatic nerves. *Brain Research* (in press)
7. Moon C, Ahn M, Wie MB, Kim HM, Koh C-S, Hong SC, Kim MD, Tanuma N, Matsumoto Y, Shin T: Phenidone, a dual inhibitor of cyclooxygenases and lipoxygenases, ameliorates rat paralysis in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing its target enzymes. *Brain Research* (in press)

2. 学会発表

1. Koh C-S: Immune Apherisisi in Demyelinating Diseases. *World Apherisis Asociatiton*. 2004.
2. Koh C-S: Guillain-Barre Syndrome and *Campylobacter jejuni*-Localization of GM1 in the nervous tissue and *Campylobacter jejuni*. 第6回国際神経免疫学会.2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

6. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明

分担研究者 近藤 一博 (東京慈恵会医科大学微生物学講座第1教授)

研究協力者 猿田雅之 (東京慈恵会医科大学消化器肝臓内科)
伊藤裕章 (大阪大学大学院医学系研究科消化器内科)
山西弘一 (大阪大学大学院医学系研究科微生物学講座)

研究要旨 様々な慢性難治性疾患の原因として、多くのウイルスが候補に挙げられている。我々はこれまでに、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6)の潜伏感染がクローン病や慢性疲労症候群と関係するかどうかを検討し、両疾患の患者が HHV-6 の潜伏感染特異的蛋白に対して、健常人では見られない異常な抗体産生をしていることを見出してきた。今回は、クローン病患者において、この免疫反応が生体のどの様な状態を反映しているかに関する検討を行った。この結果、患者において、潜伏感染蛋白に対する低 affinity 抗体が健常人よりも大量に産生された後、患者のみに検出される高 affinity な抗体の産生が生じることが判明した。このことは、患者において潜伏感染蛋白の産生の亢進があることを示すものであると考えられた。また、この様な潜伏感染蛋白産生の亢進の原因を検討するために、HHV-6 の再活性化誘導因子を検討したところ、仕事によるストレスや疲労が再活性化の誘因となることが判明した。このことは、クローン病や慢性疲労症候群がストレスや疲労によって発症するという現象の機序を説明可能にするものであると考えられた。

A. 研究目的

β -ヘルペスウイルスは、免疫系細胞および神経系細胞で潜伏感染を生じ、多くの慢性難治性疾患患者でウイルスの再活性化が生じていることが観察されている。しかし、このウイルスの再活性化は、疾患の結果として生じたのか、再活性化を生じることが疾患の原因や増悪因子となっているのかは、現在の技術では調べることができない。本研究は、この問題を解決するために、i) β -ヘルペスウイルスの潜伏感染と再活性化を直接検査できる方法を開発し、これを用いて β -ヘルペスの関与が疑われる疾患と潜伏感染・再活性化の関係を再検討し、 β -ヘルペスによる慢性難治性疾患の発症機序を解明して行くことを目的とした。また、ii) ストレスや疲労がクローン病や慢性疲労症候群 (chronic fatigue syndrome: CFS)の発症を誘導する現象と、ウイルスとの関係の解明も目的とした。

B. 研究方法

i) 潜伏感染特異的産物を用いた関連疾患の同定と発症機序に関する検討

β -ヘルペスウイルス[サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス(HHV-)6、7]の潜伏感染特異的蛋白の宿主細胞や免疫機構への影響を検討することにより、ヘルペスウイルスの潜伏感染と疾患との関係を、神経疾患および消化器疾患を中心に検討した。

今回は特に、これまでにクローン病患者において疾患特異的な抗体反応が見られた HHV-6 の潜伏感染特異的蛋白を用いて、患者における抗体陽性率の検討と健常人における抗体の存在に関する精査を行なった。この蛋白は、HHV-6 の潜伏感染時に特異的に発現する mRNA にコードされ

ているものである。抗原蛋白は、ヒト細胞 (HEK293T) で発現させたものと、大腸菌において潜伏感染蛋白をヒスチジン・タグと glutathion S-transferase (GST) との融合蛋白として発現・精製したものをを用いた。ヒト細胞で発現させたものは、蛍光抗体法によって、大腸菌を用いて発現精製した蛋白は、高感度な ELISA システムを構築して抗体測定を行なった。また、潜伏感染蛋白に関する抗体の性質を検討するために、ピアコア法を用いた affinity 測定をおこなった。

ii) 疾患発症の環境要因とウイルスとの関係の解析

クローン病や CFS は、最近非常に増加傾向が見られる疾患であり、重要な発症の要因として、ストレスや疲労が挙げられている。そこで我々は、疲労・ストレスが HHV-6 の潜伏感染に影響を与え、このために疾患が発症または増悪するのではないかと考え、ストレスや疲労が β -ヘルペスウイルスの潜伏感染・再活性化に与える影響を検討した。

方法としては、再活性化した HHV-6 が唾液中に放出される性質を利用し、連休の前後で唾液中の HHV-6 DNA を検出・定量することによった。合わせて、労働時間や主観的な疲労感との関係も検討し、疲労・ストレスと HHV-6 の再活性化との関係を検討した。また、他のヘルペスウイルスとの比較も行い、疲労・ストレスとの関係が HHV-6 に特異的な現象であるかどうかも検討した。

C. 研究結果

i) 潜伏感染特異的産物を用いた関連疾患の同定と発症機序に関する検討

潜伏感染蛋白をヒト細胞で発現させた抗体を用いて、間接蛍光抗体法によって潜伏感染特異的遺伝子蛋白に対する患者の血清抗体の反応を検討したところ、クローン病患者の 20 人中 13 人 (65%) と CFS 患者の 39% で陽性となることが判明した。健康成人ではこの反応が見られなかった

ので、これはクローン病および CFS と HHV-6 の関連を示すものと考えられた。次に、潜伏感染蛋白を大腸菌で発現させて高感度の ELISA 法で抗体価の測定をおこなったところ、クローン病患者の 70% (20 人中 14 人) で陽性となることが判明した。しかし、この検査の場合、健康成人でも約 20% の弱陽性者がおり、両検査法による測定結果の不一致が見られた。

この解離が両者の認識する抗原エピトープにあると考え、この抗体の認識する抗原エピトープおよび抗体の結合 affinity を検討した。すると、抗体には大腸菌で発現させたタンパク一次構造に対する抗体は、ピアコア法を用いた検討により低 affinity な抗体であることが示され、ヒト細胞で発現させたタンパクに対する高 affinity な抗体とは性状の異なる抗体であることが判明した。また、健康人でも微量に存在する抗体は、低 affinity な抗体であることが判明し、体内の HHV-6 潜伏感染細胞数を反映するものと考えられた。クローン病患者では、この低 affinity 抗体も多量に存在することが見出され、体内の潜伏感染細胞数とクローン病とに何らかの関係があることが見出された。高 affinity な抗体は、患者にのみ検出され、ヒト細胞内で何らかの修飾を受けた HHV-6 潜伏感染蛋白に対する、疾患特異的な免疫反応の存在が示唆された。

ii) 疾患発症の環境要因とウイルスとの関係の解析

クローン病や CFS の発症要因である疲労・ストレスとウイルスの潜伏感染・再活性化の動態との関連を調べるために、サイトメガロウイルス、HHV-6、HHV-7 と EB ウイルスの唾液中への再活性化と、就労時間との関係を検討した。この結果、HHV-6 の再活性化が疲労・ストレスによって上昇しており、再活性化率が休息後は 24% なのに対し、就労中は 88% であり、唾液中に放出されるウイルス量も上昇していた。このことから、HHV-6 の再活性化が仕事の疲労・ストレスで増強することが判明した。また、HHV-6 の再活性化は、慢性疲労症候群患者の免疫抑制との関係は見ら

れず、HHV-6 の再活性化の増強が、宿主の免疫状態に影響を受けるものではないことも判明した。

D. 考察

抗潜伏感染蛋白抗体の存在する理由として、クローン病患者と CFS 患者において、潜伏感染蛋白が体内に多く存在することが示唆された。これまでに我々は、HHV-6 には潜伏感染と再活性化の間に比較的安定な中間状態が存在し、中間状態では潜伏感染遺伝子の影響で細胞機能が修飾されていることと、潜伏感染蛋白がこの中間状態時に活発に発現されることを見出している。上記の低 affinity 抗体量がクローン病患者で多いことは、クローン病患者においては、健常人よりも多数の HHV-6 潜伏感染マクロファージが潜伏感染遺伝子・蛋白によって機能不全を生じていることが示唆される。このことは、クローン病患者においてマクロファージ機能の異常が見られるとする臨床研究と一致する。

また、この中間状態細胞は、再活性化誘導刺激によって出現することも我々は明らかにしている。HHV-6 の再活性化が現代社会の仕事のストレスや疲労で誘導されるという今回の結果は、疲労・ストレスによって HHV-6 の中間状態にあるマクロファージが増加し、マクロファージが機能不全を生じるためにクローン病が発症するという発症病理を推察させるものであると考えられた。

CFS も現代病の一つであり、疲労・ストレスが引き金になることが知られている。このため、HHV-6 の再活性化誘導による中間状態細胞の増加は CFS の発症においても作用する可能性があると考えられた。

E. 結論

ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) の潜伏感染特異的な遺伝子・蛋白を同定し、これがクローン病と慢性疲労症候群の患者で異常産生されていることを見出した。また、抗体の性状の検討によりこの異常産生の原因が、HHV-6 が活性化された潜伏感染状態である中間状態をとっ

ているマクロファージが、体内で異常に増加することとクローン病が関係することが示唆された。また、仕事による疲労・ストレスが HHV-6 の再活性化を誘導することを見出し、疲労・ストレスとクローン病発症との関係の一端を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K.Tanaka-Taya, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, Okada S, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 (HHV-6) transmits from parent to child by integration form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *Journal of Medical Virology* 2004; 73 (3): 465-73.
2. Takemoto M, Mori Y, Ueda K, Kondo K, Yamanishi K. Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis. *Journal of General Virology* 2004; 85 (4):869-79.
3. Shimada K, Kondo K, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein interacts with heterogeneous ribonucleoprotein k and casein kinase 2. *Microbiology and Immunology* 2004; 48 (3):205-10.

2. 学会発表

1. 近藤 一博、大橋 隆明、倉恒 弘彦 生理的疲労とヒトヘルペスウイルス(HHV-) 6 の再活性化との関係 第 52 回日本ウイルス学会 (平成 16 年 11 月 21-23 日 横浜)
2. 嶋田和也、山西弘一、近藤一博 ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) 前初期遺伝子 IE2 とスプライシング関連因子 SART3 の相互作用によるウイルス遺伝子の転写後調節 第 52 回日本ウイルス学会 (平成 16 年 11 月 21-23 日 横浜)
3. Kazuhiro Kondol, Takaaki Ohashil, and Hirohiko Kuratsunc. Enhancement of human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation during the work-induced fatigue. 2nd International congress of fatigue science (Feb. 9-11, 2005).

Karuizawa)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中

7. 難治性血管炎と真菌の関与の研究

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 真菌によって誘発される難治性血管炎の原因の解析を目的とした。本年度の研究は、CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction) 投与直後の反応と要因を解析した。投与後 10 分から、末梢白血球数・好中球数増加、好中球機能 (活性酸素産生、myeloperoxidase (MPO) 放出能) 亢進、IL-1 β 、IL-12p70、IL-6、IL-10 の有意な増加を認めた。CAWS によって誘導される血管炎発症のごく初期に、サイトカインと連動する活性化好中球の関与が示唆された。

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。また、難治性血管炎の主たる死因に、*Candida* 感染症や *Aspergillus* 感染症が挙げられているなど、難治性血管炎と真菌の関係は深い。すなわち、われわれが示してきた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 *Candida* 症や *Aspergillus* 症が引き起こされることであり、難治性血管炎もその例外ではないと思われる。

真菌感染初期防御には、主として好中球がかかわり、なかでも好中球ライソゾーム酵素 myeloperoxidase (MPO) が H₂O₂ と Cl⁻ を基質として OCl⁻ を産生し強力に *Candida albicans* を殺菌することを MPO 欠損マウスを用いて証明した (Aratani et al. J. Infectious Diseases 182, 1276-1279, 2000)。このように真菌、特に、*C. albicans* の不活性化には、MPO は不可欠である。一方、MPO が大量に細胞外に放出されたり、発現を誘発することにもなる。これにより MPO 自己抗体の上昇などを誘発することにもなりかねない。事実、*C. albicans* 由来分子 CADS (Murata et al. Microbiol. Immunol. 23:825-831, 1979; Takahashi et al. Inflamm. Res. 53:72-77, 2004) や CAWS (Nagai-Miura et al. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 26: 527-543, 2004) が MPO-ANCA を増加させ、冠状動脈炎

を誘発する。

血管炎の発症の要因には、活性化した好中球の関与が推定されている (Arimura et al. Clinical Nephrology 40, 256-264, 1993, L. Harper, et al. Arthritis Rheumatism 44:921- 930, 2001)。このような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要因への可能性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広く利用されている好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) が病態と相関し、血管炎を誘導する *C. albicans* 由来分子が mannose-protein-1,3- β -glucan であることを示してきた。

そこで、本研究では、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein 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。CADS/CAWS が誘導する血管炎には、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てきた。さらに、16 年度は、CAWS 投与初期の反応について調べ、血管炎誘導にいたる要因について解析した。

B. 研究方法

1) CAWS によるマウス血管炎発症の病理学

的解析

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(*Candida albicans* - derived substances) および CAWS (*Candida albicans* water soluble fraction) により誘導した。

C57BL/6 マウス (4.5 w オス) に、CAWS 4mg/0.2mL/mouse を腹腔内に接種し、その直後から心採血 (ヘパリン処理)・解剖し採血後、以下の項目について測定した。各臓器は、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

2) マウス血清中の MPO-ANCA 値

マウス MPO の ELISA により測定した。

3) CAWS 投与直後の血液像、炎症反応、血漿中のサイトカインの経時的変動の解析

CAWS 4 mg を ip 投与直後 10 分から 16 時間まで、心臓からヘパリン採血し、血漿、血球を分離した。血中細胞数、血漿中のサイトカインを ELISA 法により定量した。また、好中球機能の経時的な変動を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、国立感染症実験動物計画委員会の動物愛護の指針にもとづいて行った。

D. 考察

1) CAWS 投与直後の血液像の変動：

CAWS 投与直後 10 分から、末梢血球数は著しく増加し、特に好中球は、数、割合共に増加が顕著であった。

2) CAWS 投与直後好中球機能の活性化：

好中球機能のうち、活性酸素産生および MPO 放出の亢進を認めた。

一方、in vitro において CAWS を直接好中球活に添加しても活性化は認めなかった。

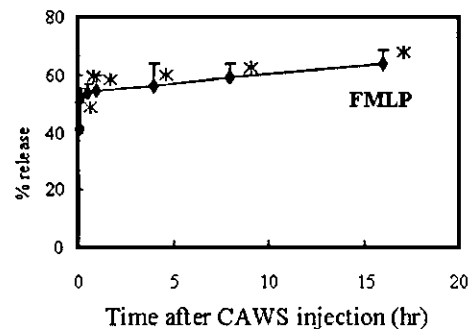
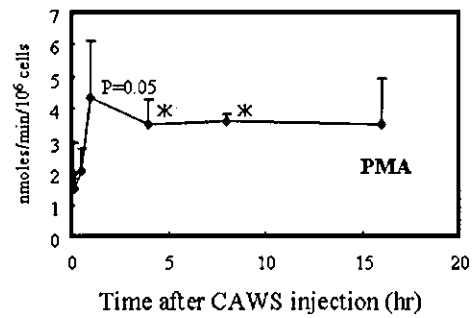


図 1. 好中球の活性化の経時変化

活性酸素産生能 (上段)、MPO 放出能 (下段) * : $p < 0.05$

3) CAWS 投与直後サイトカイン変動：

また、CAWS 誘導の血管炎発症初期のサイトカイン変動を解析したところ、好中球数の増加と活性化に伴い、血清中の IL-12p70, IL-1 β および IL-10 の有意な増加を認めた。

D. 考察

本年度の研究において、

CAWS 投与直後の血液像の変動： CAWS 投与直後 10 分から、末梢血球数は著しく増加し、特に好中球は、数、割合共に増加が顕著であったことから、初期に好中球の活性化が関与していることが示唆された。

CAWS 投与直後好中球機能の活性化： 好中球機能のうち、活性酸素産生および MPO 放出の亢進を認めた。これは、血管傷害に

関与する活性酸素の産生がかかわっている可能性を示唆している。

CAWS 投与直後サイトカイン変動：

また、CAWS 誘導の血管炎発症初期に好中球の活性化が関与しており、これらを調節しているサイトカイン変動を解析したところ、好中球数の増加と活性化に伴い、血清中の IL-12p70, IL-1 β および IL-10 の有意な増加を認めた。

本研究は、大川原明子（国立感染研）、高橋啓（東邦大・医・大橋病院・病理）、大原関利章（東邦大・医・大橋病院・病理）、三浦典子（東京薬大・薬）、直江史郎（東邦大・医・大橋病院・病理）、大野尚仁（東京薬大・薬）の各先生方の協力によった。

E. 結論

本年度の結果は、CAWS 投与直後好中球機能の活性化—活性酸素産生およびMPO放出の亢進を認め、血管傷害に関与する活性酸素の産生がかかわっている可能性を示唆している。CAWS 投与直後サイトカイン変動—CAWS 誘導の血管炎発症初期に血清中の IL-12p70, IL-1 β および IL-10 の有意な増加を認めた。CAWS 投与直後から、末梢白血球・好中球数は著しく増加し、初期に好中球の活性化が関与していることが示唆された。

以上から、CAWS 投与直後好中球機能の活性化にともなうサイトカイン IL-12p70, IL-1 β および IL-10 の増加が発症に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Oharaseki, Y. Kameoka, F. Kura, A.S. Persad, K. Suzuki, S. Naoe. Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with *Candida*

albicans-derived substances. Microbiol. Immunol. in press.

2. A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, S. Nakayama, M. Suga, Y. Yamaguchi, K. Suzuki, K., M. Yasuhara, K. Yamamoto. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells Microbiol. Immunol. 48: 985-994, 2004
3. N. Nagai-Miura, Y. Shingo, Y. Adachi, A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, S. Naoe, K. Suzuki and N. Ohno. Induction of Coronary Arteritis with Administration of CAWS (*Candida albicans* Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 26:527-543, 2004.
4. Y. Kameoka, A. S. Persad and K. Suzuki. Genomic variations in myeloperoxidase gene in the Japanese population. Jpn. J. Infect. Dis. 57: S12-13, 2004
5. Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, M.C. Dinauer, N. Maeda, and H. Koyama. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. Jpn. J. Infect. Dis. 57: S15, 2004
6. E. Muso, T. Ito-Ihara, T. Ono, E. Imai, K. Yamagata, A. Akamatsu, K. Suzuki. Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 57: S17-18, 2004
7. Shiohara A, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, and Yamamoto K. On the cyto-toxicity caused by quantum dots. Microbiol. Immunol.48:669-676, 2004.
8. Ito, M., Nagata, N., Yumoto, F., Yamagoe, S., Suzuki, K., Adachi, K. and Tanokura, M.: ¹H, ¹³C, ¹⁵N resonance assignments of the cytokine LECT2. Journal of Biomolecular NMR 29:543-544, 2004.
9. C. Ovejero, C. Cavard, A. Perianin, T. Hakvoort, J. Vermeulen, C. Godard, M. Fabre, P. Chafey, K. Suzuki, B. Romagnolo, S. Yamagoe, C. Perret. Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin2 (LECT2) as a direct target gene of s-catenin in the liver. Hepatology 40:167-176, 2004.
10. T. Saito, A. Okumura, H. Watanabe, M. Asano, A. Ishida-Okawara, J. Sakagami, K. Sudo, Y. Hatano-Yokoe, T. Abo, Y. Iwakura, K. Suzuki, and S. Yamagoe. Increase of Hepatic NKT Cells in LECT2-Deficient Mice Contributes to Severe Concanavalin A-Induced Hepatitis. J Immunol. 173:579-585, 2004.
11. S. Suzuki, K. Honma, T. Matsuyama, K. Suzuki, K. Toriyama, K. Yamamoto, K.

- Miyazaki, M. Nakamura, K. Yu, A. Kumatori. Critical roles of Interferon regulatory factor-4 in CD11bhighCD8- dendritic cell development Proc Natl Acad Sci USA. 101:8981-8986, 2004.
12. A. Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, E. Muso, T. Ono, K. Saiga, K. Nemoto, K. Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. Nephrol., Dial. Transplant. 19:1708-1715, 2004.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 鈴木和男「バイオイメージングが切り開く新たな診断・治療評価技術」医学のあゆみ 210 巻 171
 16. 長尾朋和、鈴木和男「血管炎初期反応のイメージング」医学のあゆみ 210 巻 196-199
 17. 長尾朋和、村山 研、越尾 修、大野尚仁、三浦典子、高橋 啓、馬淵綾子、南谷晴之、鈴木和男 腎臓血管傷害のイメージング PharmaMedica22: 185-189, 2004 (医療薬学雑誌)
- ## 2. 学会発表
1. Kazuo Suzuki, Eri Muso, Shigeto Kobayashi, Toshiko Ito-Ihara, David Scott, Richard Watts, Oliver Flossmann, Suzanne Lane, and David Jayne. Japan-UK Vasculitis Epidemiology Study - First meeting, Emmanuel College, Cambridge, UK
 2. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M., Maeda, N., and Koyama, H: In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. The 4th international Peroxidase Meeting, October, 2004 (Japan).
 3. Suzuki K, Muso E, Nauseef WM: Contribution of peroxidases in host-defense, diseases and cellular functions. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30 (Kyoto)
 4. Muso E, Ito-Ihara T, Ono T, Imai E, Yamagata K, Akamatsu A, Suzuki K: Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan 2004. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30, Kyoto
 5. Akiyoshi Hoshino, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Masato Yasuhara, Taeko Dohi, Kenji Yamamoto, and Kazuo SUZUKI Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots - MPO expressed on surface of activated neutrophils with Quantum dot-conjugated antibody. 4th International Peroxidase Meeting. Oct 27-30, 2004, Kyoto
 6. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 血管炎における活性化好中球のCD69分子 第34回京都腎臓免疫研究会、京都、5月22日
 7. 宇野賀津子、猪原登志子、田原佐知子、田中麻理、米本智美、塚本達雄、深津敦司、鈴木和男、岸田綱太郎、武曾恵理 腎炎患者における末梢血リンパ球分画のIL12/IL18への反応性の検討 第34回京都腎臓免疫研究会、京都、5月22日
 8. 猪原登志子、小野孝彦、深津敦司、北徹、鈴木和男、武曾恵理。ANCA関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン(IVIg)治療15例における治療効果と6ヶ月予後の検討。第47回日本腎臓病学会学術総会。平成16年5月27日。栃木
 9. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、村田久雄、高橋 啓 カンジダ誘導マウス動脈炎モデルにおける動脈炎成立過程の組織学的検討 第93回日本病理学会総会、2004/6/9-11、札幌
 10. 活性化好中球による血管炎発症への関与—MPO-ANCAによる糸球体内皮細胞傷害—生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004年6月17-18日(沖縄)
 11. 長尾朋和、松村実美子、馬淵綾子、越尾修、南谷晴之、鈴木和男 MPO-ANCAの糸球体内皮細胞への作用 生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004年6月17-18日(沖縄)
 12. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼと真菌感染 生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004年6月17-18日、

(沖縄)

13. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能 第26回日本フリーラジカル学会学術集会、2004年6月24~25日(山形)
14. 大原関利章、高橋 啓、三浦典子、大川原明子、村山 研、土田和徳、金城義明、金子健二、大野尚仁、鈴木和男 川崎病類似マウス系統的動脈炎モデルにおけるヒト免疫グロブリンの治療効果の検討 第40回日本小児循環器学会総会、抄録、2004/6/30~7/2、東京
15. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 第15回日本生体防御学会(長崎)「血管炎における活性化好中球のCD69分子」
16. 長尾朋和、松村実美子、馬淵綾子、越尾修、南谷晴之、鈴木和男 「MPO-ANCAによる糸球体内皮細胞の粘着分子 Up-regulation」第15回日本生体防御学会(長崎)鈴木和男 第11回代替血液学会(札幌)「免疫グロブリンの血管炎抑制効果と人工化」
17. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、岡村春樹、大野尚仁、鈴木和男「血管炎を誘導する CAWS 投与初期のマウス好中球活性化とサイトカインの変動」第69回日本インターフェロン・サイトカイン学会(三沢)
18. 小野孝彦、猪原登志子、劉寧、北徹、雑賀寛、根本久一、武曾恵理、大川原明子、鈴木和男 第16回腎とフリーラジカル研究会(京都)「好中球活性化、活性酸素産生とフィブリン沈着を介した SCG/Kj マウスにおける半月体形成機序」
19. Youhei Koshimizu, Satoshi Yamagoe, Kazuo Suzuki, and Michiko Ohtomi. "Expression and localization of LECT2 in mouse brain 第27回日本神経科学会・第47回日本神経化学会合同大会(大阪)
20. Akiyoshi Hoshino, Ken Murayama, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Noriko N. Miura, Naohito Ohno, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, and Kazuo Suzuki. MPO Expressed on the Surface of Activated Neutrophils with Quantum Dot-conjugated Antibody. 第13回バイオイメージング学会学術集会 11/4-6、京都
21. H. Sankawa, Y. Kameoka, N. Miura, N. Ohno, and K. Suzuki. Gene Expression in Splenocyte Response to CAWS Injection of Two Murine Strains. The 4th International Peroxidase Meeting Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004. 11. 15 京都
22. 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男 cDNA マイクロアレイによる血管炎惹起物質 *C. albicans* 由来菌体外多糖 第34回日本免疫学会総会・学術集会 2004. 12. 01 札幌
23. 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男 cDNA マイクロアレイ解析による血管炎に関与する炎症性分子の遺伝子発現 第27回日本分子生物学会年会 2004. 12. 08 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

8. 自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与

分担研究者 中島 淳 (横浜市立大学大学院分子消化管内科学助教授)

研究要旨 自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与を近年急速に進歩してきた遺伝子発現の網羅的解析により同定することを行った。現在各5万個の遺伝子の解析中である。
今後解析手法を工夫してさらに解析を進めていく予定である。

A. 研究目的

自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与を近年急速に進歩してきた遺伝子発現の網羅的解析により同定することを目的とした。また、最近急速に患者数が増加している非アルコール性脂肪肝炎 (Non-Alcoholic Steato-Hepatitis) についても解析する。

B. 研究方法

自己免疫性肝炎,非飲酒者における脂肪肝および非アルコール性肝炎 (NASH) 患者の肝生検組織における網羅的遺伝子発現解析のデータベースから Virus 由来の遺伝子の発現の有無を Bioinformatics の手法を用いて検索する。

(倫理面への配慮)

平成15年10月に学内倫理委員会において承認を得たのち、十分な患者様の同意を得て検体を採取している。

C. 研究結果

学内倫理委員会の承認を得た上で、現在自己免疫性肝炎4例、脂肪肝5例、NASH6例の遺伝子発現の網羅的解析を行った。現在各6万個の遺伝子の解析中である。

D. 考察

特定疾患の発症に微生物が関与していることはこれまで多くの研究者がその可能性を示唆してきているが、方法論的にそれを確認することができなかった。今回の研究では、これまで特定の微生物に狙いを定めた研究手法が主だったものであった当該領域において、近年急速に進歩してきた遺伝子発現プロファイリング技術を用いて、患者組織における5万個を超える遺伝子発現の網羅的解析を行い微生物の関与を調べた方法論が学術的にはこれまでの手法にないアプローチであることが特記される。決め手となる治療法のない本疾患に virus などの特定微生物の関与を証明できれば本疾患で苦しむ多くの患者に対する福音になるばかりか、現在社会的に深刻な医療費の抑制にもつながりその社会的意義は計り知れない。

E. 結論

網羅的遺伝子発現解析のデータベースから Virus 由来の遺伝子の発現の有無を Bioinformatics の手法を用いて検索した範囲では現在までのところ Virus 特異的遺伝子は見つけることができなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwasaki T, Mukasa K, Yoneda M, Ito S, Yamada Y, Mori Y, Fujisawa N, Fujisawa T, Wada K, Sekihara H, Nakajima A. Marked Attenuation of Production of Collagen Type I from Cardiac Fibroblasts by Dehydroepiandrosterone. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Jan
2. Shaefer KL, Wada K, Takahashi H, Matsuhashi N, Ohnishi S, Wolfe MM, Turner JR, Nakajima A, Borkan SC, Saubermann LJ. PPAR γ Inhibition Prevents Adhesion to the Extracellular Matrix and Induces Anoikis in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Research* 2005 in press
3. Yoneda M, Wada K, Katayama K, Nakajima N, Iwasaki T, Osawa E, Mukasa K, Yamada Y, Blumberg RS, Sekihara H, Nakajima A. A Novel Therapy for Acute Hepatitis Utilizing Dehydroepiandrosterone in the Murine Model of Hepatitis. *Biochemical Pharmacology.* 2004 Dec;68(11):2283-9
4. Shimamura T, Yasuda J, Ino Y, Gotoh M, Tsuchiya A, Nakajima A, Sakamoto M, Kanai Y, Hirohashi S. Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2004 Oct;64(19):6989-95.
5. Katayama K, Wada K, Nakajima A, Kamisaki Y, Mayumi T. Nuclear receptors on stem cells: the role of nuclear receptors during nural stem cell proliferation and differentiation. *J Pharmacological Science* 2004 in press.
6. Nakajima A, Wada K. Nuclear Receptors on Diseases; Nuclear receptors as Targets for Drug Development. *J Pharmacological Science* 2004 in press.
7. Yoshii T, Mizuno K, Hirose T, Nakajima A, Sekihara H, Ohno S. sPAR-3, a splicing variant of PAR-3, shows cellular localization and expression pattern different from that of PAR-3 during enterocyte polarization.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 [Epub ahead of print].

8. Wada K, Nakajima A, Takahashi H, Yoneda M, Fujisawa N, Ohsawa E, Kadowaki T, Kubota N, Terauchi Y, Matsuhashi N, Saubermann LJ, Nakajima N, Blumberg RS: Protective effect of endogenous PPAR γ against acute gastric mucosal lesions associated with ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 ;287:G452-G458.

2. 学会発表

1. Fujisawa N, Yoneda M, Takahashi H, Nakajima A, Matsuhashi N The Role of PPAR γ in Colon Carcinogenesis, and Its Relation to b-Catenin The 105th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association New Orleans, LA May 18, 2004
2. Osawa E, Dohi T, Nakajima A Cytokine balance effects on colon carcinogenesis in new rodent model of IBD (Poster) The 3rd International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis ICGC' 札幌 04 Aug. 19, 2004
3. 稲森正彦、島村健、小林規俊、河村晴信、阿部泰伸、桐越博之、坂口隆、高邑知生、中島淳、上野規男 シアノクリレートによる止血後、バルーン下逆行性経静脈的塞栓術(B-RTO)を施行した胃静脈瘤の1例 第78回日本消化器内視鏡学会関東地方会 東京 平成16年6月11日
4. 小林規俊、藤澤信隆、高橋宏和、米田正人、藤田浩司、藤澤聡郎、小倉孝氏、阿部泰伸、稲森正彦、河村晴信、桐越博之、島村健、窪田賢輔、坂口隆、齊藤聡、中島淳 先天性門脈閉塞症に肝腫瘍を合併した1例 第280回日本消化器病学会関東支部例会 東京 平成16年7月10日
5. 藤澤信隆、米田正人、高橋宏和、藤澤聡郎、藤田浩司、島村健、中島淳 大腸発癌におけるPPAR γ の役割 \sim β -cateninとAPCとの関係(ワークショップ1、消化器癌の前癌病変)第15回日本消化器癌発生学会 札幌 ロイトン札幌 平成16年8月
6. 高橋宏和、島村健、中島淳 大腸がん細胞におけるPPAR γ インヒビターの作用について 第63回日本癌学会 福岡国際会議場 平成16年9月

8. 細野邦広、島村健、高橋宏和、稲森正彦、小林規俊、阿部泰伸、河村晴信、桐越博之、坂口隆、高邑知生、中島淳、上野規男 ポスターセッション 大腸炎症(6) アレルギー性紫斑病の大腸病変の一例 第46回日本消化器病学会大会 福岡 平成16年10月22日
9. 小林規俊、中島 淳、上野規男 膵管内乳頭腺種における K-ras codon 12 点突然変異、P16 変異、P53 点変異の臨床的意義の検討 (シンポジウム I PMTの診断と治療戦略) 第46回日本消化器病学会大会 福岡国際会議場 平成16年10月22日
10. 前田晃延、小林規俊、稲森正彦、阿部泰伸、河村晴信、桐越博之、島村健、坂口隆、高邑知生、中島淳、上野規男 ポスターセッション 膵腫瘍症例(1) 膵悪性リンパ腫の1例 第46回日本消化器病学会大会 福岡 2004年10月24日
11. 永瀬 肇、中島 淳 糖の吸収・代謝と摂食調節におけるガラニン、エンテロスタチンの役割 (シンポジウム 消化管ホルモンと消化吸収に関する新しい展開) 第46回日本消化器病学会大会 福岡国際会議場 平成16年10月23日
12. 米田正人、岩崎知之、高橋宏和、藤沢信隆、藤沢聡郎、藤田浩司、河村晴信、稲森正彦、阿部泰伸、島村 健、小林規俊、桐越博之、窪田賢輔、斉藤 聡、坂口隆、上野規男、中島 淳 2型糖尿病患者に合併する non-alcoholic fatty liver disease の解析 第8回日本肝臓病学会大会 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

9. 難治性気道感染症における細菌感染 Nontypeable *Haemophilus influenzae* と *H. influenzae* type b のバイオフィーム産生 に関する比較研究

分担研究者 大石 和徳 長崎大学熱帯医学研究所助教授)

研究協力者 渡辺 浩、加地千春、渡辺真和雄 長崎大学熱帯医学研究所)

研究要旨 Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi)と *H. influenzae* type b (Hib)のバイオフィーム産生能の違いについて比較検討した。biofilm growth assay と走査型電子顕微鏡による観察で、多くの Hib は NTHi に比べバイオフィーム形成能は乏しいと考えられた。一方、NTHi では耐性菌と感受性菌の間でバイオフィーム産生に差はなく、いずれのタイプでもバイオフィーム産生の多い株と少ない株が存在すると思われた。

A. 研究目的

近年、小児の中耳炎や成人に下気道感染を引き起こす代表的な細菌である NTHi がバイオフィームを産生するという報告がなされている。我々は、NTHi と小児髄膜炎の主要な起炎菌である Hib のバイオフィーム産生能を比較検討することを目的として基礎的研究を行った。

B. 研究方法

血清型判定により b 型と判定された 25 株の Hib (上気道由来 4 株、髄液由来 21 株)、血清型判定および PCR による耐性遺伝子検索を行った上で判定された 22 株の β -lactamase-negative ampicillin (ABPC)-resistant (BLNAR) NTHi (上気道由来 16 株、眼脂由来 3 株、中耳由来 3 株)、26 株の β -lactamase-negative ABPC-susceptible (BLNAS) NTHi (上気道由来 13 株、喀痰由来 13 株)、28 株の TEM-1 型 β -lactamase-producing ABPC-resistant (BLPAR) NTHi (上気道由来 16 株、喀痰由来 12 株) を対象としてマイクロプレートを用い、24 時間後の biofilm growth assay を行った。このうちバイオフィ

ーム産生株、非産生株の間で走査型電子顕微鏡を用いて経時的なバイオフィーム産生の画像的变化を比較検討した。

C. 研究結果

Hib, BLNAR-NTHi, BLNAS-NTHi, BLPAR-NTHi の biofilm growth assay における OD₆₀₀ の平均値はそれぞれ 0.09 (range: 0-0.86), 0.50 (range: 0.13-1.19), 0.57 (range: 0.01-1.48), 0.34 (0.01-0.96)であった。走査型電子顕微鏡による観察では BLNAR-NTHi, BLNAS-NTHi, BLPAR-NTHi 間のバイオフィーム形成はほぼ同様であったが、Hib では数株を除いて菌の表面への付着が乏しく、バイオフィーム形成もほとんどみられなかった。

D & E. 結論及び考察

多くの Hib は NTHi に比べてバイオフィーム形成能は乏しいと考えられた。一方、NTHi では耐性菌と感受性菌の間でバイオフィーム産生に差はなく、いずれのタイプでもバイオフィーム産生の多い株と少ない株が存在すると思

われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe H, Kaji C, Anh DD, Huong PLT, Anh NTH, Huong VT, Phuong HVM, Thi NT, Suu PT, Nguyet NTT, Rusizoka OS, Watanabe K, Nagatake T, and Oishi K. A comparative molecular analysis of *Haemophilus influenzae* among children less than 5 years of age with acute lower respiratory tract infections and meningitis in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* (in press).
2. Greiner LL, Watanabe H, Phillips NJ, Shao J, Morgan A, Zaleski A, Gibson BW, and Apicella MA. Nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 2019 produces a biofilm containing *N*-acetylneuraminic acid that may mimic sialylated O-linked glycans. *Infect Immun*, 72: 4249-4260, 2004.
3. Motomura K, Masaki H, Terada M, Onizuka T, Furumoto A, Asoh N, Oishi K, Nagatake T. A retrospective analysis of community-acquired pneumonia between 2000 and 2002 in a community hospital. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 42: 68-74, 2004.
4. Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T. Possible high rate of transmission of nontypeable *Haemophilus influenzae*, including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant strains, between children and their parents. *J Clin Microbiol*. 42: 362-365, 2004.
5. Amano H, Morimoto K, Senba M, Wang H, Ishida Y, Kumatori A, Yoshimine H, Oishi K, Mukaida N, Nagatake T. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. *J Immunol*. 17: 398-409, 2004.
6. Nagatake T. Positioning of various anti-bacterial agents and their appropriate use in the era of multiple bacterial drug resistance. Tetracyclines. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 92: 2141-2148, 2003.
7. Saha SK, Baqui AH, Darmstadt GL,

Ruhulamin M, Hanif M, El Arifeen S, Santosham M, Oishi K, Nagatake T, Black RE. Comparison of antibiotic resistance and serotype composition of carriage and invasive pneumococci among Bangladeshi children: implications for treatment policy and vaccine formulation. *J Clin Microbiol*. 41: 5582-5587, 2003.

8. Takahashi H, Oishi K, Yoshimine H, Kumatori A, Moji K, Watanabe K, Nalwoga H, Tugume SB, Kebba A, Mugerwa R, Mugenyi P, Nagatake T. Decreased serum opsonic activity against *Streptococcus pneumoniae* in human immunodeficiency virus-infected Ugandan adults. *Clin Infect Dis*. 37: 1534-1540, 2003.
9. Watanabe H, Asoh N, Hoshino K, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Kunsuikmengrai K, Kahintapong S, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, Nagatake T. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* and molecular characterization of multidrug-resistant serotype 19F, 6B, and 23F pneumococci in northern Thailand. *J Clin Microbiol*. 41: 4178-4183, 2003.
10. Masaki H, Asoh N, Kawazoe K, Watanabe K, Onizuka T, Shimogama S, Yamaro T, Watanabe H, Oishi K, Nagatake T. Possible relationship of PFGE patterns of *Moraxella catarrhalis* between hospital- and community-acquired respiratory infections in a community hospital. *Microbiol Immunol*. 47: 379-385, 2003.
11. Yamaro T, Oishi K, Yoshimine H, Tsuchihashi Y, Matsushima K, Nagatake T. Fourteen-member macrolides promote the phosphatidylserine receptor-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 47: 48-53, 2003.
12. Asoh N, Watanabe H, Fines-Guyon M, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Kunsuikmengrai K, Kahintapong S, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, Nagatake T. Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* with several types of mutations in the *rpoB* gene among AIDS patients in northern Thailand. *J Clin Microbiol*. 41: 2337-2340, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

10. 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 (京都大学大学院農学研究科教授)

研究協力者 橋本 渉、河井重幸 (京都大学大学院農学研究科)

研究要旨 緑膿菌は、アルギン酸を主成分とするバイオフィーム(BF)を分泌し、周囲から隔離されたエコシステムを示す。BF は抗生物質などの効果を低減させるため、緑膿菌 BF 感染症は難治性となる。この感染症に対する治療法を確立するためには、緑膿菌の BF が関わるエコシステムの理解が必要である。本年度は、緑膿菌における BF 分解機構に焦点を当て、それに関わる酵素(ペリプラズム AlgL;細胞質 PA1167)の高次構造解析を行った。その結果、AlgL は α_6/α_5 パレル構造を有し、トンネル様のクレフトの上部にループを配置すること、及び PA1167 は β サンドイッチ構造を示し、シートが片側に湾曲したグローブ構造を形成することが明らかになった。

A. 研究目的

緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)はヒトに対して日和見的に感染し、体内でアルギン酸(マンヌロン酸 M とグルロン酸 G から成り、MM, MG ブロック構造を持つ)を主成分とするバイオフィーム(BF)を形成すると重篤な呼吸器疾患を発症する。鞭毛と線毛を持ち活発な運動性を示す緑膿菌は、環境条件に応じて菌体外に多糖アルギン酸を分泌し、これを BF として周囲から隔離された生存様式(エコシステム)を示す。BF は、自然環境下における微生物の重要なエコシステムであるが、その系の複雑さのために十分な解析が進んでいない。実際、緑膿菌は菌株により BF の主成分(糖質や DNA)を変動させることが、最近報告されている。緑膿菌の BF 関連エコシステムは、(i)浮遊性菌の鞭毛運動による宿主細胞表面への移動と付着、(ii)線毛の伸縮運動によるマイクロコロニーの形成、(iii)アルギン酸の合成・分泌による BF の形成、(iv)BF 分解による BF からの遊離と伝播、の 4 つのプロセスから成っている(図 1)。

緑膿菌の BF 形成には、膜結合型と考えられるポリリン酸キナーゼ(PPK)によって合成されたポリリン酸に依存する運動性が関与していることが示唆されている(PNAS,

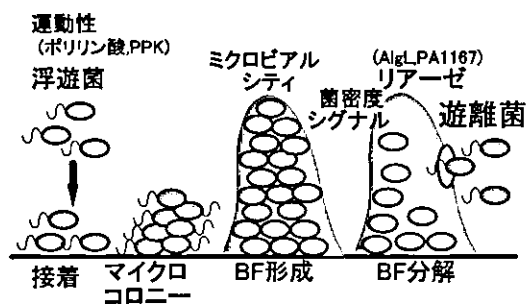


図 1 緑膿菌 BF 形成過程

97:9636,2000)。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。そのため、PPK 阻害剤は、BF 合成と病原性発現を抑制すると期待される。また、BF 分解・遊離は、緑膿菌が別の感染部位に伝播することを容易にし、BF 感染症の重篤化に繋がる。従って、緑膿菌の生存様式(エコシステム)に関する微生物学的特性の理解と緑膿菌感染症の治療には、BF の形成・分解制御機構の詳細な解析が必要である。既にアルギン酸の合成・分泌機構はよく研究されているため、本研究では、緑膿菌 BF に焦点を当て、BF 形成に関わる

PPK の触媒反応機構、及びアルギン酸分解酵素(ペリプラズム局在性 AlgL,多糖リアーゼファミリーPL-5; 細胞質局在性 PA1167, ファミリーPL-7)が関わる BF 分解・除去機構を明らかにすることを目的としている(図 1)。今年度は、アルギン酸リアーゼ (AlgL,PA1167)の高次構造解析を行った。

B. 研究方法

先に決定したスフィンゴモナス属細菌由来アルギン酸リアーゼ A1-III を構造モデルとして、緑膿菌由来 AlgL の高次構造を決定した。

緑膿菌由来 PA1167 は、NaCl を沈澱剤とした蒸気拡散平衡法により、良質な結晶を与えた。SPring-8 で 2.0 Å 分解能の native データを得た後、in-house で KAuCl₄, K₂PtCl₄, CdCl₂, PrCl₃, Sm₂(SO₄)₃, LuCl₃ 誘導体を用いた重原子同形置換法により位相を決定した。3.5 Å 分解能のマップ(figure of merit は 0.925)に基づいて、モデリングと CNS プログラムによる精密化を繰り返し PA1167 の構造を決定した。最終的な R-factor は 18.7%、free R-factor は 24.0%であった。

(倫理面への配慮)

組み換え DNA 実験は、文部科学省の組み換え DNA 実験の指針に則って行った。

C. 研究結果

ホモロジーモデリングにより、AlgL は、 α 6/ α 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ことが明らかになった(図 2)。



図 2 ファミリーPL-5 酵素の高次構造 (左,A1-III;右,AlgL)

PA1167 の結晶は、単斜晶系で P21 の空間群に属し、格子定数は $a=43.4, b=70.2, c=67.3$ Å ($\beta=94.8^\circ$) であり、非対称単位当たり 2 分子の酵素を含む。2.0 Å までの回折データを用いて R=18.7% まで精密化したモデルは、444 個のアミノ酸残基(222/分子)及び 298 個の水分子(149/分子)を含んでいた。PA1167 は、8 本のストランド[シート A(A1-8)]、7 本のストランド[シート B(B1-7)]、及び 3 本のヘリックスから成る β -サンドイッチ構造を示し、シートが片側に湾曲したグロブのような構造を形成していた(図 3)。

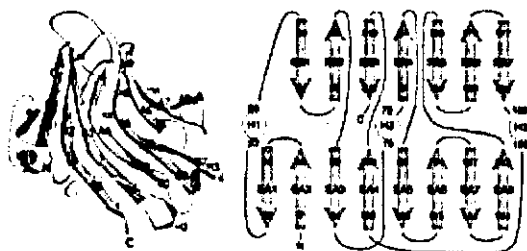


図 3 PA1167 の高次構造(左,リボンモデル; 右, 2次構造トポロジー)

この構造は、他の多糖リアーゼファミリーの基本構造(平行 β -ヘリックス、 α/α -バレル、 α/α -バレル+逆平行 β -シート)とは異なり、新規なフォールディングであることが分かった(図 4)。

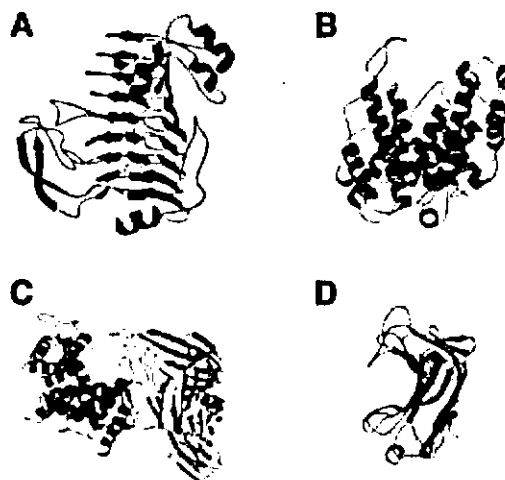


図 4 多糖リアーゼの基本骨格

(A)平行 β -ヘリックス (B) α/α -バレル (C) α/α -バレル+逆平行 β -シート (D) β -サンドイッチ

D. 考察

AlgL は A1-III と同様の高次構造を有し、A1-III の触媒反応に関わる His192 と Tyr246 に各々相当する AlgL の His202 と Tyr256 が A1-III のそれと同様の配置をしている(図 2)。また、H202A 及び Y256F は、顕著な活性低下を示すことから、AlgL の反応機構は、以下の通りであることが示唆された(図 6)。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 Tyr67 が、触媒中心である Tyr256 と水素結合を形成することにより Tyr256 を活性化する。活性化された Tyr256 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、His202 は、マンヌロン酸を活性部位に固定する機能を果たす。

PA1167 の分子表面における保存残基は、シート A(SA3,4,5)に集中していた。ファミリー PL-7 で提唱されていた 2ヶ所のモチーフ配列は、SA3 と SA4 にそれぞれ位置しており、SA5 上のアミノ酸残基は、新たに見出された触媒作用に重要な配列であることが示唆された。A1-III において、His と Tyr が活性残基として機能することが明らかになっているため、分子表面に保存されている His104、Tyr193、Tyr199 の 3 残基が、ファミリー PL-7 酵素においても重要な役割をしていると考えられた(図 5)。

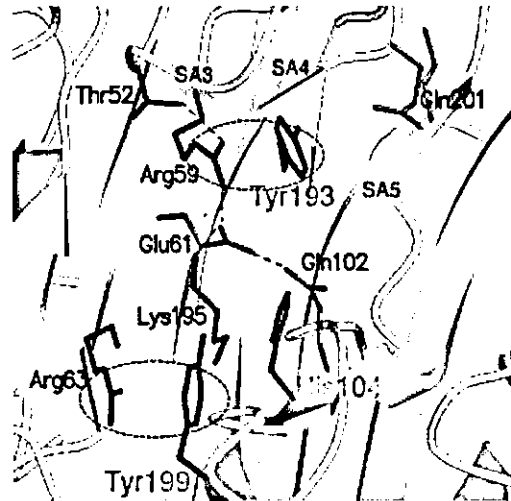


図 5 PA1167 の活性部位

E. 結論

緑膿菌におけるアルギン酸の分解経路並びに分解に関わる酵素/遺伝子(AlgL, PA1167)とそれらの高次構造を決定することにより(図 6)、アルギン酸リアーゼを標的とするリード化合物の設計が可能となることが示唆された。

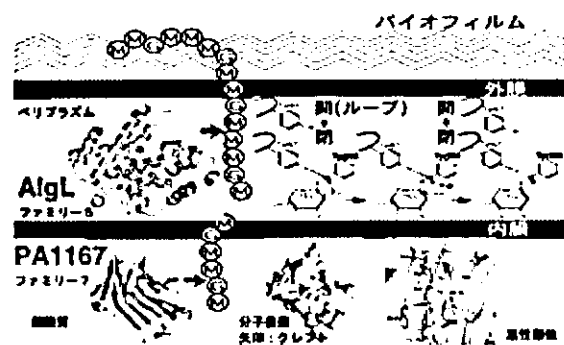


図 6 緑膿菌におけるアルギン酸代謝

F. 健康危険情報

特になし