

験においても同様の結果が得られた。反応したバンドについて、PVDF膜上でのトリプシン消化後、プロテオミクスにより解析し、*M. penetrans* についてのアミノ酸配列データベースと照合した結果、チオール、ペルオキシデース (X core>1.0 にて Bioworks スコア=50, hit peptides 5 個) を含むいくつかの蛋白質が予想された。しかしながら、この方法では、抗体と反応していない PVDF 膜上の蛋白質の混入があり結果の評価が難しいことから、今回の予備的実験からは、抗カリジオリピン抗体陽性者血清と反応する *M. penetrans* 菌体成分についての結論を出せず、別の実験方法をも行う必要があると考えられた。

D. 考察

報告されている *M. amphoriforme* 特異的 amph-F, amph-R プライマーセットは、分離菌株の同定には有用なものの、臨床検体抽出 DNA への使用については、感度の低さならびに非特異的増幅遺伝子の存在から、今後の改良、新規開発が必要であることが示唆された。すなわち、最低でも nested-PCR が可能なプライマーセットの設計ならびに、非特異的増殖遺伝子の軽減がなされるべきであろう。一般に、細菌において菌種同定に用いられる 16SrRNA をコードする *rrnA* 遺伝子は、多くの種においてゲノム中に複数個存在することから検出感度を上げる為にも用いられるが、ゲノムサイズの小さいマイコプラズマにおいては、*rrnA* 遺伝子は 1 個しか存在しない。従って、他の種特異的遺伝子、例えば、宿主細胞への付着蛋白をコードする遺伝子も研究室における診断に利用される。今回、*M. pneumoniae* の主要蛋白 P1 をコードする *p1* 遺伝子に対する PCR プライマーの 2 セット ADH4、NCN2 ならびに ADH4、N1 は、*M. amphoriforme* 遺伝子を増幅した。増幅遺伝子は、*M. amphoriforme* における *M. pneumoniae* の *p1* オーソログではなかったが、増幅サイズが類似していたことから、呼吸器疾患患者の臨床検体における *p1* 遺伝子解析の際には、*M. amphoriforme* の混入についても注意を払う必要が示唆された。*M. pneumoniae* の *rrnA* 遺伝子をもとに作製された Mpn-1F, Mpn-1R は、*M. amphoriforme* の遺伝子を増幅せず特異性が確

認された。今回の臨床検体を用いた遺伝子検索で、咳を伴う Wiskott-Aldrich 症候群患者の咽頭スワブから、Mpn-1F/ Mpn-1R ならびに Mpn-2F/ Mpn-2F を用いて *M. pneumoniae* 遺伝子が増幅された。*M. pneumoniae* による肺炎は、間質性肺炎に分類され、宿主免疫応答が肺炎形成に関与していると考えられており、肺炎にいたらない上気道炎も多い一方、肝機能低下、リンパ節腫大、関節炎や貧血等肺外病変 [8] や、わずかながら菌血症や呼吸窮迫あるいは多臓器不全を起こして死に至る劇症例も報告されている [9,10]。免疫不全者においては、免疫不全のタイプによって宿主免疫応答が異なることから、通常見られない病変形成や、宿主からの排除が困難な場合も考えられ、今回の調査においても共同研究者である臨床医との連携により、適切な診断、治療が行われるようにしていきたい。

抗原交差性については、*M. pneumoniae* 全菌体に対する抗体が、*M. amphoriforme* の House Keeping 遺伝子産物である DnaK を始めとする複数の蛋白質を認識したことから、両種の抗原性が交差することは強く示唆された。現在、臨床で *M. pneumoniae* 感染症の特異的血清診断に使用されている ELISA 法を用いたキットやイムノカードに用いられている抗原との交差性については、今回、検討を行っていないが、国内における *M. amphoriforme* 保有者状況によっては、検討する必要がある。*M. amphoriforme* についての血清診断法開発においては、抗原性の強い蛋白質を用いると同時に今回の解析結果をふまえ抗原選定にあたる予定である。

抗カリジオリピン抗体陽性者血清に反応するマイコプラズマ菌体成分の解析結果は、予備的実験ではあるものの、*M. pneumoniae* ならびに *M. amphoriforme* 菌体成分とは反応せず *M. penetrans* 菌体成分と反応を示した。抗カリジオリピン抗体そのものは、梅毒感染者血清中に見られることが以前より知られており、また、細菌ゲノム情報により、リン菌を始め多くの細菌がカリジオリピン合成酵素 (cardiolipin synthase) を有していることが知られている。マイコプラズマ属においては、*M. penetrans* においてはカリジオリピン合成酵素遺伝子 (MYPE2810) が確認されるが、*M. pneumoniae* や *M. genitalium* では見つからない。また、近

縁のウレアプラズマ属の *Ureaplasma parvum* というヒトの生殖器から頻りに分離される種においても、カルジオリピン合成酵素の遺伝子が確認されている (UU588 遺伝子)。今回の解析で用いた3種のマイコプラズマのうち、カルジオリピン合成酵素を有する *M. penetrans* のみが血清と反応したことから、反応物質に蛋白質以外が関与している可能性も考慮すべきかもしれない。文献的には、APS で見られる血液凝固系の異常をもたらす原因物質は、カルジオリピンを始めとするリン脂質そのものではなく、リン脂質に結合する血漿蛋白質 (例えば、カリジオリピンであれば β 2-GPI と呼ばれる糖蛋白質) すなわち、血液凝固系の反応因子であることが明らかになっており、それら血液凝固因子に対する自己抗体産生が、機能的血液凝固因子の欠乏を招くとされている。今回の予備的実験は、ヒト血液凝固因子とマイコプラズマとの分子相同性、抗原性 mimicry についての解析する必要性を示唆したものと考えられる。

E. 結論

2005年に同定された新種のマイコプラズマアンフォリフォルム (*M. amphoriforme*) の遺伝子診断系を国内に導入した。既知の遺伝子増幅法では、分離株の同定は可能だが、臨床検体抽出DNAについての解析には、感度が低い等の問題点のあることが示唆された。肺炎マイコプラズマ (*M. pneumoniae*) との抗原交差性について検討した結果、DnaKを含む蛋白質において抗原交差性があることが強く示唆された。新たな遺伝子診断系ならびに、血清診断系開発の必要性が示唆された。

新たに国内導入を行った *M. amphoriforme* 遺伝子診断系をも含め、先天性免疫不全患者で慢性呼吸器疾患患者5名の咽頭スワブ等からのマイコプラズマ遺伝子の検出を行ったところ、咳を伴う Wiskott-Aldrich 症候群患者1名より *M. pneumoniae* 遺伝子が検出された。

原発性抗リン脂質抗体症候群 (APS) とマイコプラズマ感染の関連を調べる為、予備的に抗カルジオリピン抗体陽性者血清とマイコプラズマ菌体の反応性を調べた結果、カルジオリピン合成酵素遺伝子を有する *M. penetrans* とは反応したが、その遺伝子を欠く *M. pneumoniae* と

は反応しなかった。反応物質については、今回は未同定である。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 参考文献

1. Lo SC, Hayes MM, Wang RY, Pierce PF, Kotani H, Shih JW. (1991) Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. Lancet 338:1415-1418.
2. Webster D, Windsor H, Ling C, Windsor D, Pitcher, D. (2003) Chronic bronchitis in immunocompromised patients: association with a novel Mycoplasma species. Eur. J Clin Microbiol Infect Dis 22:530-534.
3. Lo SC, Hayes MM, Tully JG, Wang RY, Kotani H, Pierce PF, Rose DL, Shih JW. (1992) Mycoplasma penetrans sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. Int J Syst Bacteriol 42:357-364.
4. Pitcher DG, Windsor D, Windsor H, Bradbury JM, Yavari C, Jensen JS, Ling C, Webster D. (2005) Mycoplasma amphoriforme sp. nov., isolated from a patient with chronic bronchopneumonia. Int J Sys Evol Microbiol 55:2589-2594.
5. Yanéz A, Cedillo L, Neyrolles O, Alonso E, Prévost M-C, Rojas J, Watson HL, Blanchard A, Cassell GH. (1999) Mycoplasma penetrans bacteremia and primary antiphospholipid syndrome. Emerg. Infect Dis 5:164-167.
6. Sasaki T, Nishiyama T, Shintani M, Kenri T. (1997) Evaluation of a new method for identification of bacteria based on sequence homology of 16S rRNA gene. PDA J Pharmaceut Sci Tech 51:242-247.
7. Sasaki Y, Ishikawa J, Yamashita A, Oshima K, Kenri T, Furuya K, Yoshino C, Horino A, Shiba T, Sasaki T, Hattori M. (2002) The complete genomic sequence of Mycoplasma penetrans, an intracellular bacterial pathogen in humans. Nucleic Acids Res 30:5293-5300.
8. Narita M, Yamada S, Nakayama T, Sawada H, Nakajima M, Sageshima S. (2001) Two cases

of lymphadenopathy with liver dysfunction due to *Mycoplasma pneumoniae* infection with mycoplasma bacteraemia without pneumonia. J Infect 42:154-165.

9. Koletsky RJ, Weinstein AJ. (1980) Fulminant *Mycoplasma pneumoniae* infection. Am Rev Respirator Dis 122:491-496.
10. Takiguchi Y, Shikama N, Aotsuka N, Koseki H, Terano T, Hirai A. (2001) Fulminant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Internal Med 40:345-348.

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 佐々木裕子、新開・大内史子、川上隆雄、見理 剛、堀野敦子、山河芳夫、荒川宜親、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* のプロテオミクス。日本マイコプラズマ学会雑誌 32, 2005. (印刷中)

2. 学会発表

- 1) 佐々木裕子、見理 剛、堀野敦子、佐々木次雄：プロテオミクス技術を用いた *Mycoplasma penetrans* の新規抗原蛋白の同定ならびに診断法への応用。第 78 回日本細菌学会総会（東京）2005 年 4 月
- 2) 佐々木裕子、新開・大内史子、川上隆雄、見理 剛、堀野敦子、山河芳夫、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* のプロテオミクス。第 32 回日本マイコプラズマ学会学術集会（久留米）2005 年 5 月

Table 1. Detection of mycoplasma DNA from clinical specimens.

NIID ID No.	Diagnosis	Symptoms	Sample 1	Sample 2	PCR for <i>M. amphoriforme</i>	PCR for <i>M. pneumoniae</i>	PCR for Genus <i>Mycoplasma</i>
				primer sets for the 1st PCR	amphF/ amphR	Mpn-F1/R1	Genus <i>Mycoplasma</i> - F1/R1
				primer sets for the 2nd nested-PCR	None	Mpn-F2/R2	Genus <i>Mycoplasma</i> - F2/R2
1	Wiskott-Aldrich 症候群	咳、鼻水	咽頭swab		Negative	Positive	Negative
2	慢性肉芽腫	咳、鼻水	咽頭swab		Negative	Negative	Negative
3	低ガンマグロブリン症	咳、痰		痰	Negative	Negative	Negative
4	高IgM症候群	副鼻腔炎	咽頭swab		Negative	Negative	Positive
5	高IgM症候群	副鼻腔炎	咽頭swab		Negative	Negative	Positive

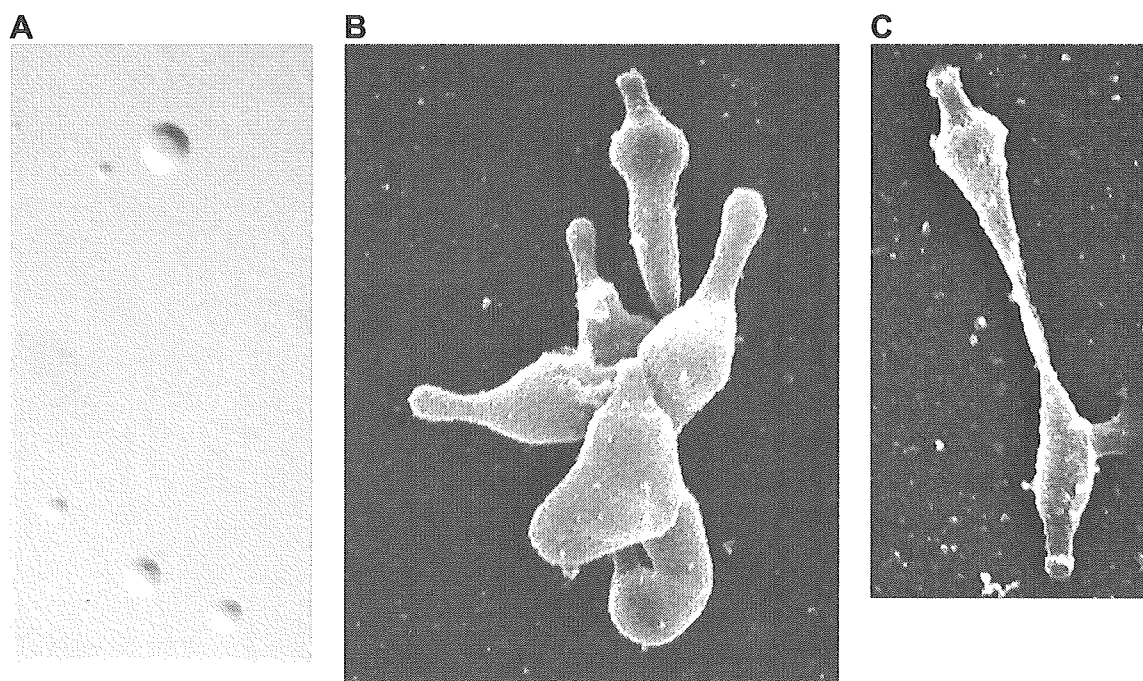


図 1. Modified Frii's 寒天平板上の *Mycoplasma amphoriforme* のコロニー(A)ならびに、*M. amphoriforme* の SEM 観察像(6 個の菌体が集合している B ならびに分裂中と思われる C)

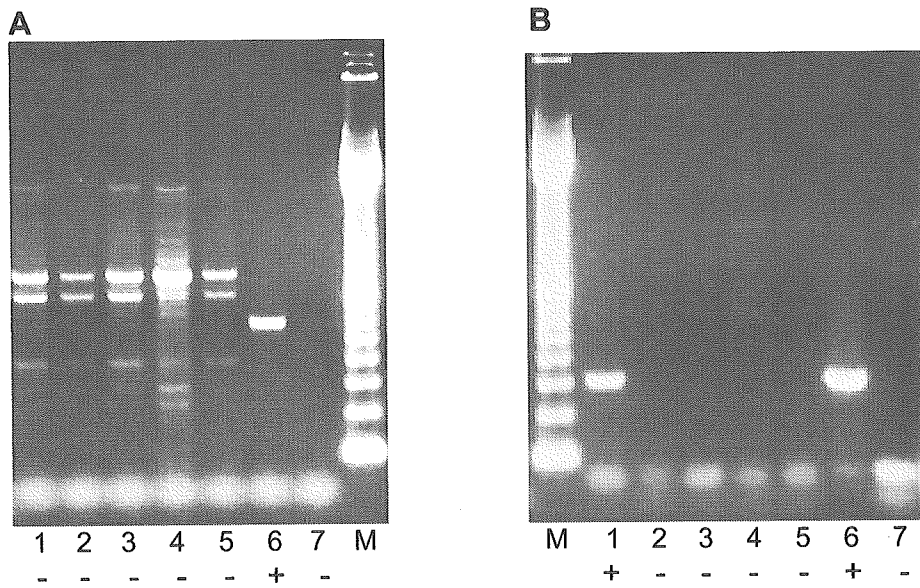


図2. 臨床検体抽出 DNA(レーン 1-5)ならびに陽性マイコプラズマ DNA(レーン 6)、陰性対照(レーン 7)を鋳型に PCR 遺伝子増幅法を行った結果。*M. amphoriforme* に対するプライマーセット amph-F/ amph-R による増幅結果; レーン6は *M. amphoriforme* (A)。*M. pneumoniae* に対するプライマーセット Mpn-F1/R1 ならびに nested-PCR 用 Mpn-F2/ R2 による増幅結果; レーン6は、*M. pneumoniae* (B)

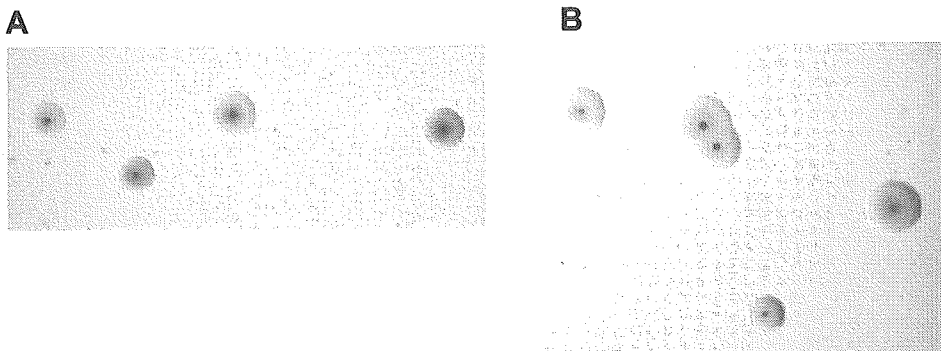


図3. 2名の患者の咽頭スワブから分離されたマイコプラズマのコロニー (AならびにB)

7. ギラン・バレー症候群の発症に関わる カンピロバクター遺伝子

分担研究者 結城 伸泰（獨協医科大学神経内科）

研究協力者 古賀道明、平田幸一（獨協医科大学神経内科）
高橋正樹（東京都健康安全研究センター微生物部）

研究要旨 目的：ギラン・バレー症候群（GBS）の発症リスクを高める *Campylobacter jejuni* 遺伝子を同定する。方法：GBS や類縁疾患患者の糞便より分離された *C. jejuni* 138 株を用いて、リポオリゴ糖（LOS）合成酵素各遺伝子の有無を PCR 法で決定し、遺伝子組成パターンを A から F（Gilbert ら）にクラス分けした。結果：GBS 株の 68% がクラス A で、腸炎株（103 株中 17%）と比べ有意に高頻度であった。クラス A 遺伝子座には GM1/GD1a 様 LOS 合成に必要な糖転移酵素がすべて含まれ、クラス A 株の多くは GM1 様 LOS（79%）や GD1a 様 LOS（76%）を有し、クラス A 株が分離された患者血中には抗 GM1/GD1a 抗体が高頻度に検出された。ロジスティック回帰分析でも、HS:19 型とクラス A 遺伝子座が GBS 発症の危険因子であることが確認された。考察：*C. jejuni* クラス A 遺伝子座により GM1 や GD1a 様 LOS が合成され、抗ガングリオシド抗体産生、GBS 発症が促される。

A. 研究目的

Campylobacter jejuni 腸炎患者の 1000 人に 1 人がギラン・バレー症候群（GBS）を続発するが、GBS 発症の規定因子は不明である。本邦では腸炎患者由来株と比べ GBS 由来株は血清型 HS:19 の頻度が高いと報告されている。しかしその意義は明らかにされていないばかりでなく、欧米諸国では同様の傾向は確認されていない。本菌感染後 GBS の発症に、菌体リポオリゴ糖（LOS）上に存在するガングリオシド様構造が重要と考えられることから、その生合成に関わる酵素遺伝子座の解析がオランダ、ベルギーの GBS 由来株を用いて行われ、GBS 由来株はクラス A 遺伝子座を有する頻度が高いことが報告された（Godschalk *et al. J Clin Invest* 2004）。今回、同様の傾向が本邦でもみられるかを検討し、さらに GBS 発症の細菌側危険因子に関して包括的に解析をした。

B. 研究方法

1. 対象：GBS や関連疾患患者の糞便より分離培養された *C. jejuni* 138 株。対照として、腸炎患者由来 *C. jejuni* 103 株を用いた。

2. 菌の分析：各 LOS 合成酵素遺伝子座（クラス A-F）に特異的に存在する遺伝子（Gilbert *et al. J Biol Chem* 2002）を PCR 法にて増幅させることにより、LOS 遺伝子座のクラスを決定した。遺伝子多型 *cst-II* (Thr/Asn51) はダイレクトシークエンシングで、LOS 上ガングリオシド・エピトープ（GM1、GD1a、GQ1b）の分布はモノクローナル抗体をプローブとして用いた ELISA 法で、Penner 血清型は受身赤血球凝集反応で決定した。
3. 患者血中抗ガングリオシド抗体：患者の急性期血清を用いて、各種ガングリオシド（GM2、GM1、GD1a、GalNAc-GD1a、GD1b、GD2、GT1b、GQ1b）に対する IgG 抗体を ELISA 法により測定した。
4. 統計解析：単変量解析は Fisher の直接確率法、多変量解析はロジスティック回帰分析法で行った。

（倫理面への配慮）

データ処理を行うにあたり、*C. jejuni* が分離された患者名は匿名化してデータベースを作成した。

C. 研究結果

1. LOS 合成酵素遺伝子座：GBS 株の 68% がクラス A であり、腸炎株 (17%) と比べ高頻度であった ($p < 0.001$)。
2. ガングリオシド様 LOS：クラス A の菌株は、GM1 と GD1a エピトープの両者を有していることが多く、このような傾向は他のクラスの菌株ではみられなかった (図 1)。

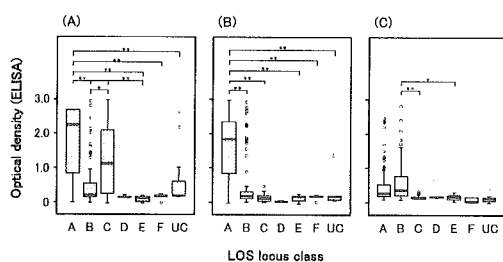


図 1 LOS 合成酵素遺伝子座 (Class A to F) と LOS 上ガングリオシド・エピトープ

(A) 抗 GM1、(B) 抗 GD1a、(C) 抗 GQ1b モノクローナル抗体との反応性を示す。

3. 患者血中抗ガングリオシド抗体：クラス A 菌が分離された患者の血中には、IgG 抗 GM1、抗 GD1a 抗体が高頻度に検出された (各 72%、51%)。
4. Penner 血清型：クラス A の菌株の多くは HS:19 であり、クラス A の菌株の中でも GBS 株では腸炎株と比べ HS:19 の割合が高く、より高頻度に GM1/GD1a エピトープを発現していた。
5. GBS の危険因子：単変量解析では GBS の危険因子として、クラス A 遺伝子座、HS:19、GM1 様 LOS、GD1a 様 LOS、*cst-II* (Thr51) が検出された。これらを変数としてロジスティック回帰分析を行った結果、HS:19 型 (オッズ比, 16.5; 95%信頼区間, 4.0-68.8; $p < 0.001$) とクラス A 遺伝子座 (オッズ比, 5.6; 95%信頼区間, 2.1-15.1; $p = 0.001$) が独立した危険因子として検出された。

D. 考察

今回の検討の結果、欧米と本邦とで共通する GBS 発症危険因子としてクラス A LOS 合成酵素遺伝子座が初めて同定された。クラス

A 遺伝子座には、ガングリオシド様 LOS 合成に必要な糖転移酵素の遺伝子が全て含まれている (図 2)。さらに、*cst-II* (Thr51) 型は GM1/GD1a エピトープ合成を促す器質特異性を有し、HS:19 型と密接に関連することから、クラス A 遺伝子座に加え HS:19 型であることで、GM1/GD1a 様 LOS の合成が促進され、患者血中に抗 GM1/GD1a 抗体を誘導し、GBS 発症のリスクを高めると考えられる。

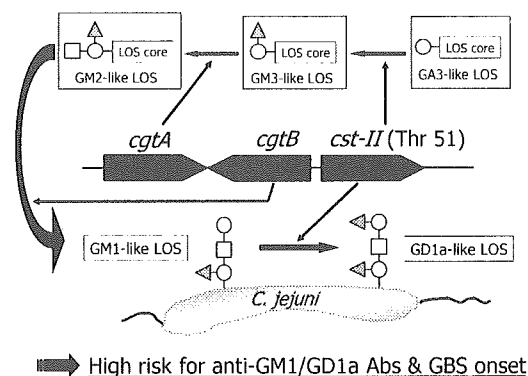


図 2 Class A LOS 合成酵素遺伝子座とガングリオシド様 LOS 生合成

E. 結論

特定の遺伝子座を有する *C. jejuni* は、菌体上にガングリオシド様 LOS を発現する結果、GBS を惹起しやすくなることがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koga M, Gilbert M, Takahashi M, Li J, Koike S, Hirata K, Yuki N: Comprehensive analysis of bacterial risk factors for developing Guillain-Barré syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis. J Infect Dis. (in press)
- 2) Tatsumoto M, Odaka M, Hirata K, Yuki N: Isolated abducens nerve palsy as a regional variant of Guillain-Barré syndrome. J Neurol Sci. (in press)
- 3) Takahashi M, Koga M, Yokoyama K, Yuki N: Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré and

- Fisher syndromes in Japan. *J Clin Microbiol* 2005, 43:335-339.
- 4) Goodfellow JA, Bowes T, Sheikh K, Odaka M, Halstead SK, Humphreys PD, Wagner ER, Yuki N, Furukawa K, Furukawa K, Plomp JJ, Willison HJ: Overexpression of GD1a ganglioside sensitizes motor nerve terminals to anti-GD1a antibody-mediated injury in a model of acute motor axonal neuropathy. *J Neurosci* 2005, 25:1620-1628. (selected for the 'This Week in The Journal' section in the issue)
 - 5) Kuwabara S, Yuki N: Does *Campylobacter jejuni* infection elicit "demyelinating" Guillain-Barré syndrome?: reply. *Neurology* 2005, 64:767.
 - 6) Hiraga A, Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Kanesaka T, Koga M, Yuki N, Hattori T, Mori M: Patterns and serial changes in electrodiagnostic abnormalities of axonal Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2005, 64:856-860.
 - 7) Koga M, Gilbert M, Li J, Koike S, Takahashi M, Furukawa K, Hirata K, Yuki N: Antecedent infections in Fisher syndrome: a common pathogenesis of molecular mimicry. *Neurology* 2005, 64:1605-1611.
 - 8) Odaka M, Tatsumoto M, Hoshiyama E, Hirata K, Yuki N: Side effects of combined therapy of methylprednisolone and intravenous immunoglobulin in Guillain-Barré syndrome. *Eur Neurol* 2005, 53:194-196.
 - 9) Odaka M, Tatsumoto M, Susuki K, Hirata K, Yuki N: Intractable chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy treated successfully with ciclosporin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005, 76:1115-1120.
 - 10) Yuki N, Odaka M. Ganglioside mimicry as a cause of Guillain-Barré syndrome. *Curr Opin Neurol* 2005, 18:557-561.
 - 11) Li J, Koga M, Brochu D, Yuki N, Chan K, Gilbert M: Electrophoresis-assisted open-tubular liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of lipooligosaccharide expressed by *Campylobacter jejuni*. *Electrophoresis* 2005, 26:3360-3368.
 - 12) Yuki N: Carbohydrate mimicry: a new paradigm of autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2005, 17:577-582.
 - 13) Pandey JP, Koga M, Yuki N: Immunoglobulin KM allotypes are associated with the prevalence of autoantibodies to GD1a ganglioside, but not with susceptibility to the disease, in Japanese patients with Guillain-Barre syndrome. *Neurogenetics* 2005, 6:225-228.
 - 14) Overell J, Hseih T, Odaka M, Yuki N, Willison HJ: Treatment of Miller Fisher syndrome and other related disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 2004, (2):CD004761.
 - 15) Koga M, Takahashi M, Masuda M, Hirata K, Yuki N: *Campylobacter* gene polymorphism as a determinant of clinical features of Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2005, 65:1376-1381. (selected for the 'Highlights' section in the issue)
 - 16) Subject of an Editorial A way out of the maze: *Campylobacter jejuni* gene polymorphisms define Guillain-Barré syndrome. by Wokke JH, van den Berg LH. in the same issue. (*Neurology*2005;65:1350-1351)
 - 17) Koga M, Koike S, Hirata K, Yuki N: Ambiguous value of *Haemophilus influenzae* isolation in Guillain-Barré and Fisher syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005, 76:1736-1738.
 - 18) Kamitani T, Kuroiwa Y, Susuki K, Kishida H, Miyazaki Y, Yuki N: Rhinolalia after diarrhea: a sole motor symptom occurring in postinfectious neuropathy associated with anti-ganglioside antibodies. *Eur J Neurol.* (in press)
2. 学会発表
- 1) Yuki N: Carbohydrate mimicry is a cause of autoimmune disease. *Glycoimmunology and*

Glycoimmunopathology. XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Florence, Italy, September, 2005.

- 2) Yuki N: Optimal use of IVIG in GBS, IVIG in Neurological Disease 2st Asia Pacific Symposium, Katoomba, Australia. November, 2005.
- 3) Yuki N: Guillain-Barré syndrome. Teaching courses. Recent advance in peripheral nerve diseases. XIII World Congress of Neurology. Sydney, Australia. November, 2005.
- 4) Yuki N: Fisher syndrome and Bickerstaff's brainstem encephalitis. Teaching courses. Acute and chronic demyelinating neuropathy. XIII World Congress of Neurology. Sydney, Australia. November, 2005.
- 5) Yuki N: Guillain-Barré syndrome. Muscle and nerve. Advances in neuromuscular diseases: Immune-mediated neuromuscular disorders. XIII World Congress of Neurology. Sydney, Australia, November, 2005.
- 6) Susuki K, Baba H, Tohyama K, Furukawa K, Hirata K, Yuki N: Gangliosides are important for formation and maintenance of ion channel clusters in myelinated peripheral nerve. (Oral) Peripheral Nerve Society. Tuscany, Italy, July, 2005.
- 7) Tatsumoto M, Odaka M, Koga M, Hirata K, Kuwabara S, Yuki N: The spectrum of neurological disease associated with antibodies to minor gangliosides GM1b and GalNAc-GD1a. (Poster) Peripheral Nerve Society. Tuscany, Italy, July, 2005.
- 8) Susuki K, Baba H, Tohyama K, Furukawa K, Furukawa K, Hirata K, Yuki N: Gangliosides are important for formation and maintenance of ion channel clusters in myelinated nerve fibers. (Oral) XVIII International Symposium on Glycoconjugates. Florence, Italy, September, 2005.
- 9) Koga M, Takahashi M, Masuda M, Hirata K, Yuki N: *Campylobacter* gene polymorphism as a determinant of clinical features of Guillain-Barré syndrome. (Poster) Gordon Research Conferences. Glycolipid &

Sphingolipid Biology. Ventura(CA), USA, January, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

8. 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—莢膜とバイオフィーム発現の関連について—

分担研究者 渡辺 浩 (長崎大学医学部・歯学部
附属病院感染症内科)

研究協力者 加地千春、渡辺貴和雄、大石和徳
(長大熱医研・感染症予防治療分野)

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 production assay, 走査型電子顕微鏡および confocal laser scanning microscopy 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、一部の Hib はバイオフィーム形成能を有していたが、これらの株の多くで莢膜が脱落していた。Hib においては莢膜の脱落がバイオフィーム形成能に関与している可能性が高いものと考えられた。

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 23 株の Hib (上気道由来 3 株、髄液由来 20 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 production 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および confocal laser scanning microscopy (CSLM) 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 0.08 (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 (図 1)。走査型電子顕微鏡および CSLM 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。また Hib の莢膜に対する PCR および sequence を行ったが、バイオフィーム形成がみられた Hib の多くで莢膜の脱落が確認された。

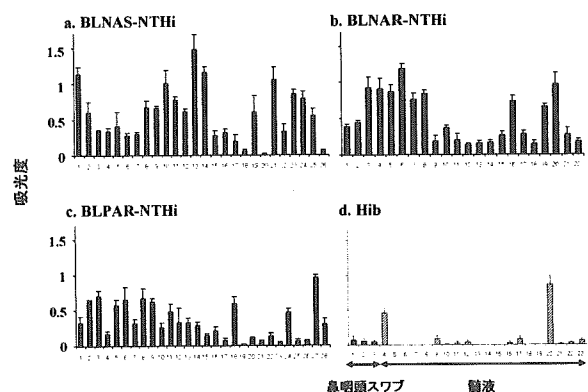


図 1

D. 結論および考察

多くのHibはNTHiに比べてバイオフィルム形成能は乏しいと考えられた。Hibにおいては莢膜の脱落がバイオフィルム形成能に関与している可能性が高いものと考えられた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oishi K, Yoshimine H, Watanabe H, Watanabe K, Tanimura S, Kawakami K, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kudoh S, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Shimada S, Matsumoto K, Nagatake T: Drug-resistant genes and serotypes of pneumococcal strains of community-acquired pneumonia among adults in Japan. *Respirology*. (in press)
- 2) Jurcisek J, Greiner L, Watanabe H, Zaleski A, Apicella MA, and Bakaletz LO: Role of sialic acid and complex carbohydrate biosynthesis in biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla middle ear. *Infect Immun* 73:3210-3218, 2005.
- 3) Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Guio H, Qin L, Kaji C, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T: Molecular analysis of intrafamilial transmission in *Moraxella catarrhalis*. *Int J Med Microbiol* 295:187-191, 2005.
- 4) 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, Oishi K: A comparative molecular analysis of *Haemophilus influenzae* isolates from young children with acute lower respiratory tract infections and meningitis in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* 43:2474-2476, 2005.
- 5) Asoh N, Masaki H, Watanabe H, Watanabe K, Mitsusima H, Matsumoto K, Oishi K, and Nagatake T: Molecular characterization of the transmission between the colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus to human and environmental contamination in geriatric long-term care wards. *Intern Med* 44:41-45, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

9. ライム病ボレリアと不明神経疾患

分担研究者 川端 寛樹（国立感染症研究所細菌第一部）

研究要旨 多発性硬化症（MS）など不明疾患における微生物感染の有無を血清疫学調査により行うためには、偽陽性、偽陰性を示さない、標準化された方法を採用し調査を行うことが重要である。そこで本年度はまず、非組換え型抗原を用いたライム病血清診断キットの感度特異性をしらべ、常法である Western blot 法と比較検討し、血清疫学調査への適否を検討した。

A. 研究目的

疫学調査を行う上での、非組換え抗原型ライム病血清診断キットの標準化

ライム病は慢性の多彩な症状を示す、マダニ媒介性の人獣共通ボレリア感染症である。本邦では年間数例-十数例程度とその報告数は少ない一方で、近年海外感染例も散見されるようになってきた。本邦の流行ボレリア種は、欧州で神経ライム症の起因種 *Borrelia garinii* が主要な感染種である。

本邦でのライム病実験室診断は、国内分離の *B. garinii* 株による血清診断が感染症研究所などごく一部の機関で年間数十件行われている。一方で臨床検査会社による受託検査数は年間1000件以上に達するが、これら血清診断のほとんどは、米国の臨床検査ラボに委託されている。

一方でこれら血清診断は、本邦に存在しない北米流行株 (*B. burgdorferi*) によって検査されておりその精度（感度、特異性）には不明な部分がある。

海外委託の上で、国内流行株とは異なる種を診断抗原として用いざるを得ない理由として、国内流行種 (*B. garinii*) を抗原として用いた、精度管理された診断キットが国内には存在しない事が背景として存在する。

従い、対応策としては、1) 国内流行株を抗原とする精度管理された新規診断キットの開発、2) 本邦での流行種 *B. garinii* を診断抗原とする海外診断キットの導入、3) 流行種に依存しない血清診断キットの導入、4) *B. garinii* を診断抗原とする臨床検査ラボラトリーへの委託、が考えられる。

そこで本研究では、本邦での主要流行種であ

る *B. garinii* に加え、*B. afzelii* を検査抗原とするウエスタン・ブロットキットを用い、国内感染例におけるその検査感度、特異性について検討した。

B. 研究方法

1. 被検血清

感染症研究所細菌第一部に依頼検査があった血清のうち、感染確定例13例20検体、健常者血清17血清をキット標準化供試血清とした。また不明神経疾患（含むMS2症例、3検体）12例18検体についても同様にライム病抗体測定を行った。

2. 抗体検査法

Western-blotting 法（常法）

1) 血清診断に使用した抗原

使用抗原は、*B. garinii* および *B. afzelii* をもちいた。使用菌株は、HP1 株 (*B. garinii*、北海道、シュルツェマダニ由来)、P/Gau 株 (*B. afzelii*、旧西ドイツ、患者髄液由来) である。

2) 診断抗原の調製

2-1) 血清診断用菌体を BSK-H 培地を用いて培養した。培養温度は 34-37°C で late-log phase まで培養を行った。培養の結果 OspC を十分発現していることを CBB 染色で確認済みである。

2-2) 培養菌株は遠心により集菌・洗浄した。集菌・洗浄には冷 PBS を用いた。菌体洗浄は3度行った。

2-3) 集菌・洗浄後、湿菌重量を測定し、滅菌精製水を用いて最終 100 mg/ml に懸濁させた。100 mg/ml 抗原液を 2X sample buffer と等量混和後、boil し抗原液とした。

- 3) Western blotting 法
- 3-1) 常法に従い SDS-PAGE を行った。市販の 10-20% グラジエントゲルにて 20 mA 定電流で 105 分泳動した。
- 3-2) PVDF メンブラン (Bio-Rad) を用い、1.5 mA 定電流/cm² で 90 分泳動、ゲルから抗原をブロットした。
- 3-3) メンブランをブロッキング溶液中、1 時間室温で振盪後、翌日まで 4°C で保存した。
- 3-4) 血清を上記ブロッキング溶液に 1/100 量加え、1 時間室温で振盪。
- 3-5) 洗浄液で 5 分×3 回洗浄。
- 3-6) 2 次抗体を含む上記ブロッキング溶液中で 1 時間室温で振盪。
- 3-7) 洗浄液で 5 分×3 回洗浄。
- 3-8) 至適条件下で化学発光させた。

ブロッキング溶液

- 1% Blocking reagent (Roche)
- 0.1 M マレイン酸ナトリウム
- 0.15 M NaCl

洗浄液

- 0.3% Tween 20
- 0.1 M マレイン酸ナトリウム
- 0.15 M NaCl

注) 2 次抗体にペルオキシダーゼラベル抗体を用い、アマシャム社 ECL キットにて化学発光させ、最終的に X 線フィルム上にて反応抗原検出を行った。

d) Western blotting 法による結果の判定

判定は米国 CDC 推奨基準に従った。基準は以下に示す。

[判定基準]

米国 CDC が推奨している Two-step 法に準拠。

第 1 ステップ

Enzyme immunoassay (EIA) 或いは Immunofluorescent assay (IFA) により試験する。

第 2 ステップ

EIA 或いは IFA で陽性、擬陽性であった検体には Western blot (WB) 法を行い、以下の場合最終的に抗体陽性とする。

- i) WB 法で主要表層抗原 C (OspC)、ボレリア膜タンパク質 A (BmpA)、鞭毛抗原のうち少なくとも 2 つ以上に対して IgM 価が上昇していること。

- ii) WB 法で 18kDa 抗原、21kDa 抗原 (OspC)、28kDa 抗原、30kDa 抗原、39kDa 抗原 (BmpA)、41kDa 抗原 (鞭毛抗原)、45kDa 抗原、58kDa 抗原 (not GroEL)、66kDa 抗原、93kDa 抗原のうち少なくとも 5 つ以上に対して IgG 価が上昇していること。

非組換え型抗原を用いた kit による検出

Trinity 社の MarDX Lyme を用いた。方法は添付プロトコールに従って行った。

(倫理面への配慮)

本研究は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査により承認された(受付番号 83)。

C. 結果と考察

1) 非組換え抗原型ライム病血清診断キットおよび Western blotting 法による抗体検査

非組換え抗原型ライム病血清診断キットを用いた試験実施例を Fig.1 に、ライム病患者血清をもちいた IgM 検査および IgG 検査結果を Fig.2 および Fig.3 に示した。

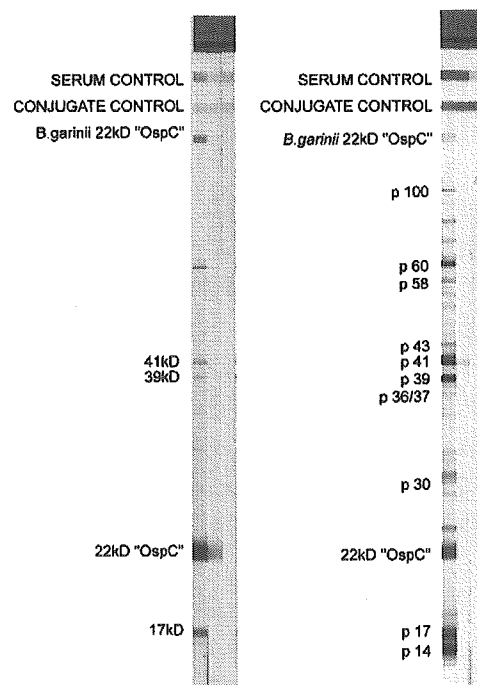


Fig.1. MarDX キットを用いた実施例(添付のコントロール群による) 1:陽性対照,2:cut off 対照,3:陰性対照

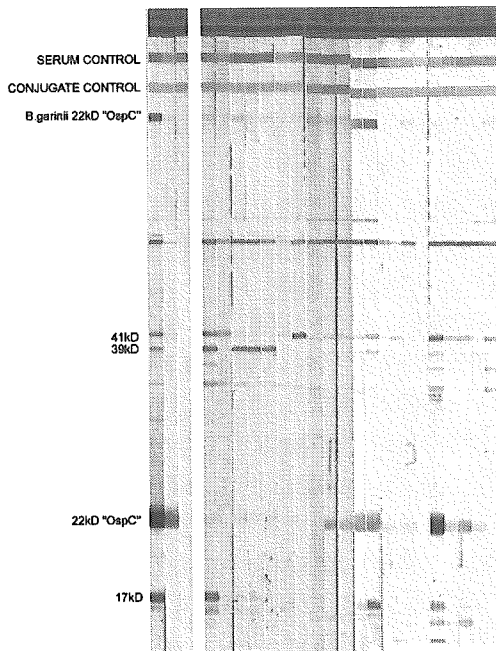


Fig.2.
IgM: ライム病患者血清を用いた非組換え抗原型ライム病血清診断キットの反応性

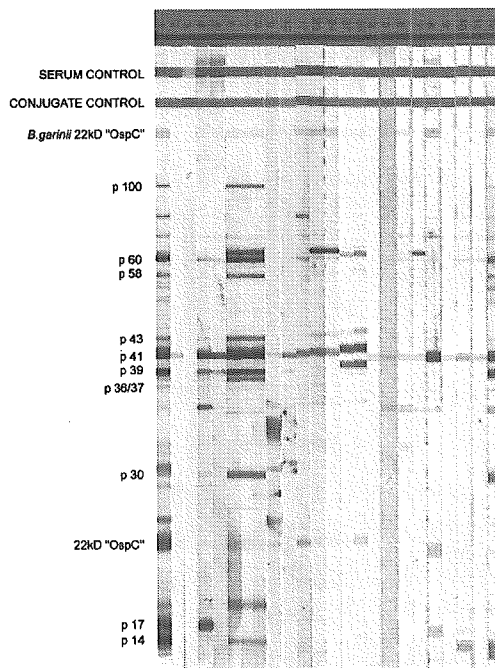


Fig.3.
IgG: ライム病患者血清を用いた非組換え抗原型ライム病血清診断キットの反応性

非組換え抗原型ライム病血清診断キットの感度、特異性、Positive predict value (PPV) 及び Negative predict value (NPV) の結果を Table 1 にまとめた。

Table 1. 非組換え抗原型ライム病血清診断キットおよび Western blotting 法 (常法) による試験精度

組換え型ライム病血清診断キット

IgM

Sensitivity 55%^{*1} & 85%^{*2} (11/20 & 17/20)

Specificity 100% (17/17)

PPV 100%, NPV 85%

*1: (Positive)

*2: (Positive and Indeterminate)

IgG

Sensitivity 50%^{*1} & 70%^{*2} (10/20 & 14/20)

Specificity 100% (17/17)

PPV 100%, NPV 74%

*1: (Positive)

*2: (Positive and Indeterminate)

Western blotting 法(常法)

IgM

Sensitivity 55% (11/20)

Specificity 100% (17/17)

PPV 100%, NPV 65%

IgG

Sensitivity 75% (15/20)

Specificity 100% (17/17)

PPV 100%, NPV 77%

IgM について：常法の感度（55%）に比べ、同等（55%；Ind. 判定を含まない）もしくは高感度（85%；Ind. 判定を含む）である事が明らかとなった。また国内分離株を用いた常法を golden standard と設定した場合においても PPV 値は 82%であること、健常者血清における特異性も 100%であったこと（data not shown）から本キットにおいては非特異的反応等による偽陽性の可能性は低いと考えられる。

IgG について : IgG 検出では常法 (75%) と比較して感度はほぼ同等 (70%) か低い (50%) 結果となった。一方で特異性、PPV が共に 100% であること、NPV に関しても既存の方法とほぼ同等 (kit-73.9, conventional=77.3%) であったことが明らかとなった。一方で常法、キットともに検出感度が 75%以下であったが、これは急性期の患者血清 (6 検体) が含まれていたため十分に IgG 抗体価が上昇していなかったためと考えられる。特異性に関しては、キット、常法ともに 100%であり、非特異性反応等による偽陽性の可能性は低いと考えられる。

現在までに梅毒、インフルエンザ患者、ヘルペスウイルス感染 (EB、VZV、HSV 等) の場合ライム病抗体検査において偽陽性が生じる可能性が多数報告されている。今回これら偽陽性を示す可能性がある疾患については、我々は試験していないが、本キット作製時に製造者によってこれら疾患についても試験されており、本邦においても同様に偽陽性を示す可能性は低いと考えられる。

以上の結果から、MarDX ライム病診断キットによる感度、特異性ともに常法によるライム病診断法とほぼ同等もしくは優れていることが示された。

本邦でのライム病血清診断は、ほとんどすべての検体において、米国の臨床検査ラボラトリーへ委託されるかたちで行われている。一方で米国検査ラボラトリーでの抗体検査は、使用する抗原が本邦での流行種とは異なる事 (*Borrelia burgdorferi*) から、その感度については不明な点がある。また海外への委託を行っている理由として、国内流行種である *B. garinii*、*B. afzelii* を抗原として使用したウエスタン法検査キットが入手困難であるためであると考えられる。一方で常法による試験は、菌株の維持が困難である事、方法の項目でも記したが、その工程は複雑で手技の標準化が難しい事、などから一般の検査室、地方衛生研究所などではほとんど実施されていない。本キットは試験時間が約 2 時間であり、かつ IgM に関しては常法ウエスタン法より高感度であることから、感染早期の血清検査には有用であると考えられる。また、本研究により、欧州で製造された *B. garinii* や *B. afzelii* を診断抗原として組み入

れたキットにより常法と同等の感度、特異性が示されたことから、今後、多発性硬化症 (MS) など不明疾患の血清疫学調査を、ライム病を対照として行う上で、欧州のキットを用いた調査が適用出来る可能性が示された。

2) 非組換え抗原型ライム病血清診断キットによる MS 症例を含む原因不明神経疾患におけるライム病抗体の検索

不明神経疾患 12 症例 (18 検体) において、非組換え抗原型ライム病血清診断キットによるライム病抗体検索を行い、5 症例 (10 検体) および 6 症例 (10 検体) でライム病抗体陽性と判定された。使用した 12 症例中 2 症例 (3 検体) は MS と診断された患者由来血清であった。MS 2 症例 (3 検体) による抗ライム病ボレリア抗体の検出結果を Fig. 4 に、また結果の一覧を表 2 にまとめた。

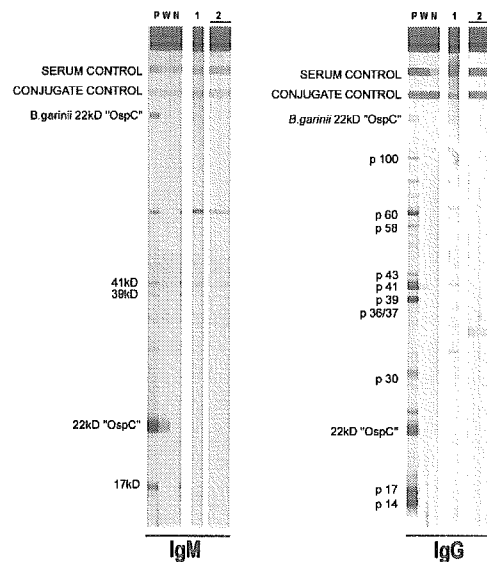


Fig.4 MS 2 症例(3 検体)による抗ライム病ボレリア抗体の検出

MS2 症例のうち 1 症例 (ID:34) では、抗ボレリア抗体 IgM 陽性と判定された。これは患者血清が 41 kDa 抗原および 39 kDa 抗原に反応したためである。しかしながら、ペア血清を用いた追跡調査では IgG 抗体の上昇が見出されなかったことから、本症例は偽陽性である可能性が考えられた。また、別の MS1 症例 (ID:8) は抗ボレリア抗体 (IgM および IgG) 陰性であった。

海外では MS とライム病の相関についていくつか報告がなされている。Coyle ら (Coyle et al. 1989, 1993) は、米国における MS 患者によるライム病抗体保有頻度を調べ、いずれも 6.7%以下であったこと、一方で非 MS 性の不明神経症状患者におけるライム病抗体陽性率は 18.2%であることから、ライム病ボレリア起因性の MS は極めて低頻度であることを示した。対照的に、欧州では、MS 症例/非 MS 症例中のライム病抗体陽性率は各々 14.2%/25.2% (Austria, 1988)、38.5%/19.4% (Poland, 2000) であり、未だライム病と MS の相関について、結論を見ていない状況にある。

一方で Bednarova らは、Czech におけるボレリア抗体陽性の MS 症例は 26.2%である一方で、measles、rubella、varicella zoster 各ウイルスに対する抗体陽性率 (MRZ reaction) は 88%であること、一方、神経ボレリア症 (Neuroborreliosis) におけるボレリア抗体/MRZreaction は各々 89%/7.4%であることを報

告し、MS は何らかの Virus 感染による可能性を示唆した (Bednarova et al. 2005)。

我が国の MS 症例は、ライム病患者報告地域とは異なること、また国内ライム病患者症例では重篤な神経症状は見出されないことから MS とライム病との相関については否定的であると推定されてきた。しかしながらこれまで、MS 症例におけるライム病ボレリア抗体の保有率など血清疫学調査は行われておらず、未だ結論を得ていないことから、今後本研究により、標準化された方法により、MS とライム病の相関が明らかにすることは極めて重要であると考えられる。

D. 結 論

国内における MS とライム病との因果関係を検証するための標準化された血清診断方法を確立した。今後は症例数を増やし、因果関係の有無を明確にする必要が有る。

Table 2. 不明神経疾患における、非組換え抗原型ライム病血清診断キットによるライム病抗体検索

IgM		IgG		Diagnosis	Serum	ID
MarDX	NIID	MarDX	NIID			
Positive	+	Positive	-	Neuro、 unknown	Convalescence	4-1
Positive	+	Positive	-	Neuro、 unknown	Convalescence	pair 4-2
Negative	+	Positive	-	Neuro、 unknown	Convalescence	4-3
Positive	-	Positive	-	Neuro、 unknown	Convalescence	12
Negative	-	Indeterminate	-	Neuro、 unknown	Convalescence	Pair
Negative	-	Indeterminate	-	Neuro、 unknown	Convalescence	
Positive	-	Indeterminate	-	Neuro、 unknown	Convalescence	Pair 7-1
Positive	-	Indeterminate	-	Neuro、 unknown	Convalescence	
Negative	-	Indeterminate	-	Syphilis、 dentimia		Single 17
Indeterminate	-	Indeterminate	-	Neuro、 unknown		Single 19
Indeterminate	+	Negative	-	Neuro、 unknown		pair 33-1
Indeterminate	+	Negative	-	Neuro、 unknown		
Positive	+	Negative	-	MS		pair 34-1
Positive	+	Negative	-	MS		
Negative	-	Negative	-	Neuro、 unknown		Single 21
Negative	-	Negative	-	Meningitis、 lymphocytoma		Single 36
Negative	-	Negative	-	MS	Convalescence	Single 8
Negative	-	Negative	-	Neuro、 unknown		Single 16

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naitou H, Kawaguchi D, Nishimura Y, Inayoshi M, Kawamori F, Masuzawa T, Hiroi M, Kurashige H, Kawabata H, Fujita H, Ohashi N: Molecular Identification of *Ehrlichia* species and 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. *Microbiology and Immunology* 50: 45-51, 2006.
- 2) Furuta Y, Ohtani F, Aizawa H, Fukuda S, Kawabata H, Bergström T: Varicella-zoster virus reactivation is an important cause of acute peripheral facial paralysis in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 24: 97-101, 2005.
- 3) 齋藤 幹、伊東高章、大野 実、浅島信子、川端寛樹、渡邊治雄、小泉信夫、藤田博己: 海外での *Borrelia valaisiana* 近縁種感染によるライム病の報告. *病原微生物情報* 26(11):20-21, 2005.
- 4) 川端寛樹: 節足動物媒介性感染症と媒介動物のインターフェイス: cutting edge. *ダニ類研究会報*, 2005.
- 5) 川端寛樹: ライム病とボレリアの遺伝子改変技術. *日本細菌学会ニュース*, 2005.
- 6) 御供田睦代、中山浩一郎、吉國謙一郎、石谷完二、新川奈緒美、蔵元 晁、宮田義彦、本田俊郎、藤田博己、高田伸弘、川端寛樹: 鹿児島県内の野鼠及びダニ類の調査について. *鹿児島県環境保健センター所報* 67-70, 2005.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Masuzawa T, Sakakibara S, Kawabata H, Imai Y: Classification of *Leptospira* Reference Strains Based on DNA Gyrase B Subunit Gene Sequences. *International Leptospirosis Society 4th Scientific Meeting*. Thailand, November, 2005.
- 2) Takano A, Kishimoto T, Ando S, Satou K, Arakawa K, Ogawa M, Nogami S, Kawabata H, Fujita H: Prevalence of *Borrelia*,

Ehrlichia and *Rickettsia* in ticks (Acari: Ixodidae), Japan. The 1st Scientific Meeting of the Asian Zoo & Wildlife Medicine 2005, Thailand, October, 2005.

国内学会

- 1) 三宅浩行、山口全一、加藤理子、馬場俊一、藤田博己、川端寛樹、齋藤範夫: フタトゲチマダニ若虫刺咬症の小児例. *日本皮膚科学会東京地方会*. 2006年1月.
- 2) 増澤俊幸、岡本能弘、宇根有美、竹内隆浩、塚越啓子、川端寛樹、小泉信夫、吉川泰弘: 輸入動物 (アメリカモモンガ) に起因するレプトスピラ症感染事例. 第5回人と動物の共通感染症研究会学術集会 (東京) 2005年11月.
- 3) 増澤俊幸、岡本能弘、宇根有美、竹内隆浩、塚越啓子、川端寛樹、小泉信夫、吉川泰弘: 輸入動物に起因するレプトスピラ症感染事例の診断と感染源の特定. 第87回日本細菌学会関東支部会 (東京) 2005年11月.
- 4) 川端寛樹: ライム病とボレリアの遺伝子改変技術. 第87回日本細菌学会関東支部会 (東京) 2005年11月.
- 5) 安藤秀二、高野 愛、鶴見みや古、仲村 昇、佐藤文男、高橋 守、岸本寿男、野上貞雄、川端寛樹、藤田博己: *Carios* 属ダニの病原体ベクターとしてのリスク評価. 第12回リケッチア研究会 (場所) 2005年10月.
- 6) 高野 愛、岸本寿男、安藤秀二、佐藤 梢、荒川香南子、小川基彦、野上貞雄、川端寛樹、藤田博己: 日本国内で採取されたマダニにおけるライム病病原体ボレリアの浸潤状況. 第11回日本野生動物医学会 (帯広) 2005年9月.
- 7) 高野 愛、鶴見みや古、仲村 昇、佐藤文男、高橋 守、岸本寿男、安藤秀二、野上貞雄、川端寛樹、藤田博己: *Carios* 属から見出された *Rickettsia*. 第13回 SADI (ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー) (静岡) 2005年9月.
- 8) 田原研司、板垣朝夫、川端寛樹、角坂照貴、藤田博己、矢野泰弘、高田伸弘: 島根県におけるつつがむし病の発生状況と

Orientia tsutsugamushi の流行株. 島根県獣医学会 (松江) 2005 年 8 月.

- 9) 矢野泰弘、田原研司、板垣朝夫、藤田博己、角坂照貴、川端寛樹、高田伸弘：隠岐諸島および島根県本土域におけるツツガムシ病の疫学的特性. 第 57 回日本衛生動物学会大会 (札幌) 2005 年 6 月.
- 10) 石畝 史、高田伸弘、藤田博己、矢野泰弘、溝口二郎、田原研司、川端寛樹、増沢俊幸：島嶼を含む列島各地におけるライム病関連ボレリアの調査、2004 年の成績と考察. 第 57 回日本衛生動物学会大会 (札幌) 2005 年 6 月.
- 11) 中原マキ子、佐々木年則、佐々木次雄、久保田眞由美、川端寛樹、Poudel, SKS、星野啓太、比嘉由紀子、伊澤晴彦、富田隆史、澤邊京子、荒川宜親、小林睦生：再興感染症としての塹壕熱および回帰熱に対する疫学的試み. 第 57 回日本衛生動物学会大会 (札幌) 2005 年 6 月.
- 12) 藤田博己、川端寛樹、小泉信夫、角坂照貴、新田芳樹：沖縄本島のミナミネズミマダニからの紅斑熱群リケッチア分離例. 第 57 回日本衛生動物学会大会 (札幌) 2005 年 6 月.
- 13) 新田芳樹、柳田千夏、川端寛樹、小泉信夫、藤田博己、角坂照貴：*Leptospira flaB* nested PCR の検討と野外応用. 第 42 回レプトスピラシンポジウム (東京) 2005 年 4 月.

10. 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子

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)

研究協力者 大川原明子 (国立感染症研究所生物活性物質部)
大野尚仁 (東京薬科大学薬学部)、高橋 啓 (東邦大学病院病理)

研究要旨 感染症によって誘発される難治性血管炎の真菌関与の菌側因子を解明し、それにより誘発される生体側対応分子との相互関係を明らかにすることを目的とした。*C. albicans* 由来分子 CAWS が血管炎を誘発し、活性化好中球や好中球自己抗体 (anti-neutrophilcytoplasmic antibodies: ANCA) と関連することを示した。CAWS 投与初期の炎症誘導機構について、血中細胞数、血漿中のサイトカイン、好中球機能の経時的変動により解析した。投与直後 10 分から、末梢好中球数の増加、血漿中 complement 3 の減少、IL-1 β 、IL-12、MIP-2、G-CSF、ICAM-1 の増加を認め、心大動脈局所では組織傷害のマーカーである ICAM-1 の遊離と mRNA 発現が増加した。*in vitro* の CAWS 刺激による好中球機能を解析し、活性酸素産生および myeloperoxidase (MPO) 放出能の亢進、IL-6 産生が認められた。また、*C. albicans* 由来の血管炎誘導分子 CAWS が、mannose-protein-1,3- β -glucan であることから、その培養条件と血管炎誘導、生存率との関連から CAWS の血管炎惹起活性の強度が *Candida mannan* の構造によって制御されていることが強く示唆された。

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。感染により、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 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、本年度の研究では、その投与初期の炎症誘導機構を、血中細胞数、血漿中のサイトカイン、好中球機能の経時的変動について解析した。また、*C. albicans* 由来の血管炎誘導分子 CAWS が、mannose-protein-1,3- β -glucan であることから、血管炎惹起活性にかかわる mannan 構造についても解析した。

B. 研究方法

1. CAWS 投与初期応答：PBS に懸濁した CAWS を、C57BL/6N マウス(♂, 6w)腹腔内に投与後、10分から16時間で経時的に屠殺して、末梢好中球数、末梢好中球の機能を解析すると共に、骨髓、末梢血の分画 profile を解析した。一方、無処置マウスから単離した末梢好中球に、CAWS を作用させ、好中球活性化の原因について解析した。また、心大動脈局所における ICAM-1 の発現について検討した。

2. CAWS の活性中心における mannan 構造の解析：CAWS は *Candida albicans* の産生する強力な血管炎惹起物質であり、主構成成分は mannan であることから、CAWS の活性中心にかかわる mannan 構造解析した。pH を 2,5,7 ならびに培養温度を 27,37°C として *C. albicans* IFO1385 菌株を完全合成培地で培養し、得られた菌体外多糖画分を得た。各々の成分を DBA/2 マウスに接種し生存率を比較した。また血管炎惹起活性は冠状動脈起始部を組織化学的に比較した。致死活性ならびに血管炎惹起活性は 37 度培養 (CAWS-37) や pH2 (CAWS-27-2) での培養で比較した。

(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承認を得て、動物愛護の指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

1. CAWS 投与初期応答：CAWS 投与初期の炎症誘導機構を、血中細胞数、血漿中のサイトカイン、好中球機能の経時的変動について解析した。投与直後 10 分から、末梢好中球数が増加し、IL-1 β 、IL-12、MIP-2、G-CSF、ICAM-1 の有意な増加を認めた (図 1)。また、*in vitro* の好中球機能解析から、活性酸素産生および myeloperoxidase (MPO) 放出能が亢進した。

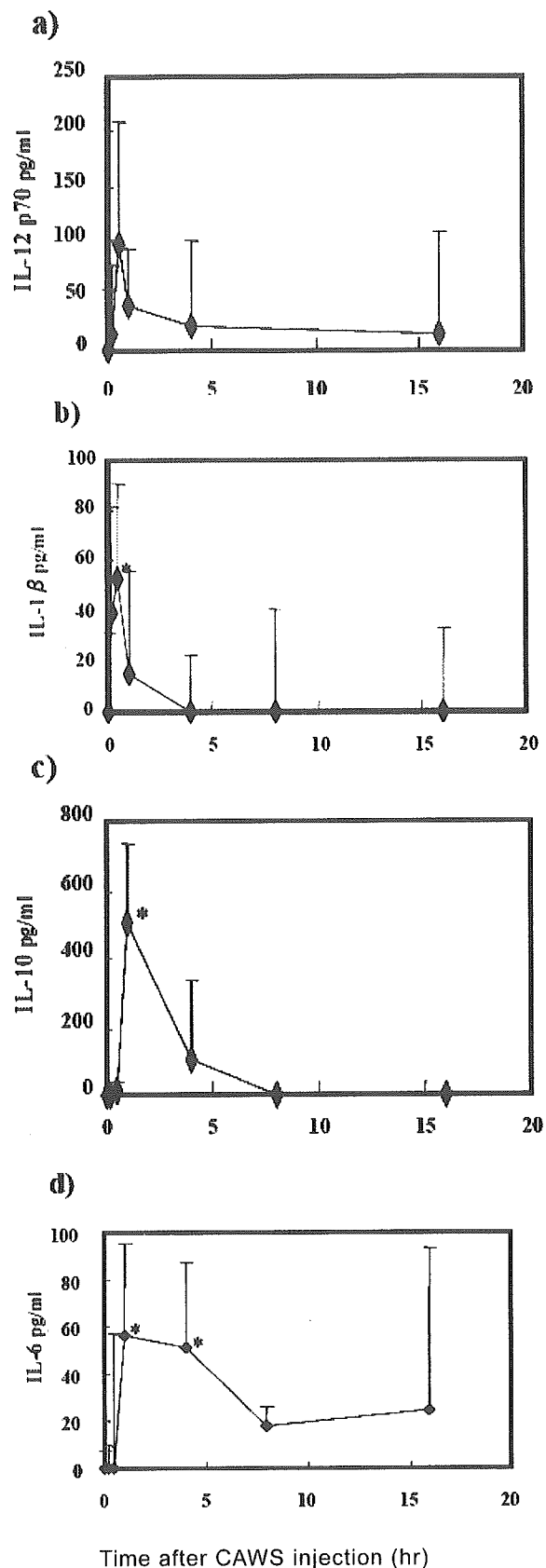


図 1. CAWS 投与直後の血中サイトカインの変動