

2. CAWS の活性中心における mannan 構造による血管炎の誘導の相違:CAWS は血管炎惹起物質であり, その主構成成分は 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 と温度の変動による活性条件を検討した。

通常の 27°C での培養では, 激しい冠状動脈炎が誘導された (図 2) に比し, 27°C, pH7 の培養では血管炎を誘導しなかった (図 3)。

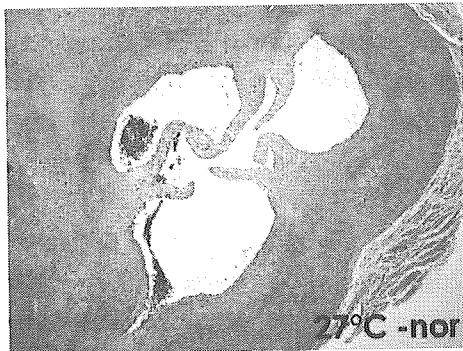


図2. 通常の 27°C での培養した CAWS による激しい冠状動脈炎の誘導

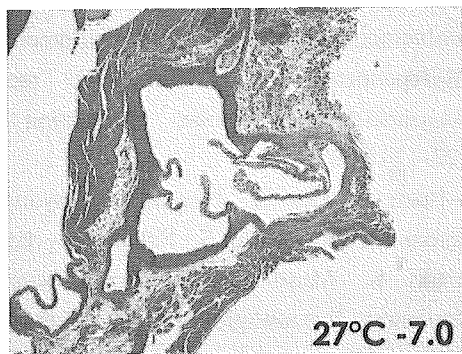


図3. 27°C, pH での培養した CAWS 投与による冠状動脈

ついで, DBA/2 マウスに培養条件の異なる CAWS を接種した時の生存率を検討した。27°C 通常培養(pH5.2)から得た CAWS を投与した場合に生存率が減少するのに比し, pH7.0 にて培養した CAWS を投与した場合では生存率が低下しなかった (図 4)。

D. 考察

CAWS 投与初期応答を検討し, CAWS 投与初期の血中細胞数, 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

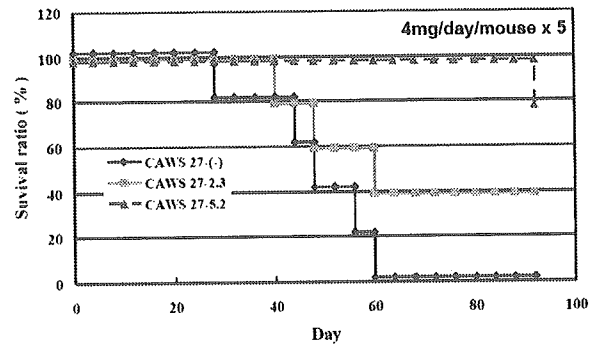


図4. DBA/2 マウスにおける各種培養条件により得た CAWS 投与による生存率の相違

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, *in vitro* の好中球機能解析から, 活性酸素産生および MPO 放出能が亢進した。このことは, 炎症誘導機構に初期好中球機能および炎症性サイトカインの上昇が引きがねになっていることと示した。

一方, CAWS の活性中心における mannan 構造による血管炎の誘導の相違を検討したところ, 通常の 27°C での培養では, 激しい冠状動脈炎が誘導されたのに比し, 27°C, pH7 の培養では血管炎を誘導しなかった。また, DBA/2 マウスに培養条件の異なる CAWS を接種した時の生存率を検討し, 27°C 通常培養 (pH5.2) から得た CAWS を投与した場合に生存率が減少するのに比し, pH7.0 にて培養した CAWS を投与した場合では生存率が低下しなかった。以上のことから, CAWS は mannan 主構成成分として血管炎を惹起しその活性中心にかかわる mannan 構造の変化が培養条件の変動による分子特性と関連することがわかった。

E. 結論

感染症によって誘発される難治性血管炎の原因を究明することを目的とした。特に, 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。殺菌酵素の不全を有する好中球機能の低下による日和見感染の結果として引き起こされることを示し, 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してきた。これらの自己免疫疾患などには, 活性化好中球や好中球自己抗体 ANCA

が病態と相関していることを明らかにした。

CAWS 投与初期応答をしらべ、CAWS 投与初期の血中細胞数、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、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、*in vitro* の好中球機能解析から、活性酸素産生および MPO 放出能が亢進した。このことは、炎症誘導機構に初期好中球機能および炎症性サイトカインの上昇が引きがねになっていることと示した。

一方、CAWS の活性中心における mannan 構造による血管炎の誘導の相違を検討したところ、通常の 27°C での培養では、激しい冠状動脈炎が誘導されたのに比し、27°C、pH7 の培養では血管炎を誘導しなかった。また、DBA/2 マウスに培養条件の異なる CAWS を接種した時の生存率を検討し、27°C 通常培養(pH5.2)から得た CAWS を投与した場合に生存率が減少するのに比し、pH7.0 にて培養した CAWS を投与した場合では生存率が低下しなかった。以上のことから、CAWS は mannan 主構成成分として血管炎を惹起しその活性中心にかかわる mannan 構造の変化が培養条件の変動による分子特性と関連することがわかった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamano Y, Tsukamoto K, Abe M, Sun GD, Zhang D, Fujii H, Matsuoka S, Tanaka M, Ishida-Okawara A, Tachikawa H, Nishimura H, Tokunaka K, Hino O, Hirose S, Suzuki K: Genetic Dissection of Vasculitis, Myeloperoxidase-Specific Antineutrophil Cytoplasmic Antibody Production, and Related Traits in Spontaneous Crescentic Glomerulonephritis-Forming/Kinjoh Mice. *J Immunol*, 2006. (in press)
- 2) Yumura W, Itabashi M, Ishida-Okawara A, Tomizawa K, Yamashita J, Kaneshiro Y, Nihei H, Suzuki K: A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis.

Microbiol Immunol, 2006. (in press)

- 3) Nagai-Miura N, Harada T, Shinohara H, Kurihara K, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, Ohno N: Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal pathogen, CAWS. *Atherosclerosis*, 2006. (in press)
- 4) Persad AS, Kameoka Y, Kanda S, Niho Y, Suzuki K: Arginine to Cysteine Mutation (R499C) Found in a Japanese Patient with Complete Myeloperoxidase Deficiency. *Gene Expression*, 2006. (in press)
- 5) Yasuda H, Yoshizawa N, Suzuki K: Modeling on social spread from immunity. *Jpn J Infect Dis* 58:S14-S15, 2005.
- 6) Suzuki K, Yamamoto K, Yoshikura H: Focusing on Assessment of Risk to Communities in International Symposium on Infectious Agent Transmission Model Building. *Jpn J Infect Dis* 58:S1-S2, 2005.
- 7) Matsuki T, Isoda K, Horai R, Nakajima A, Aizawa Y, Suzuki K, Ohsuzu F, Iwakura Y: Involvement of TNF- α in the development of T cell-dependent aortitis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation* 112: 1323-1331, 2005.
- 8) Ito-Ihara T, Ono T, Nogaki F, Suyama K, Tanaka M, Yonemoto S, Fukatsu A, Kita T, Suzuki K, Muso E: Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin for Patients with MPO-ANCA-associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract* 102:c35-c42, 2005.
- 9) Suzuki R, Tomizawa K, Suzuki K, Tanokura M: MPO-ANCA binding site on MPO molecule estimated from epitope mapping study and molecular modeling. *Bioimages* 12:85-90, 2005.
- 10) Fujieda M, Suzuki K, Sato H, Hattori M, Wada N, Tsuchiya M, Okamoto N, Murata T, Matsudaira M, Shimizu M, Ohta K, Naruse K, Sugihara S, Wakiguchi H: Epitope analysis of myeloperoxidase-specific antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (MPO-ANCA) in childhood onset Graves' disease treated with

propylthiouracil. *Clinical Nephrology*, 63:437-445, 2005.

- 11) Oharaseki T, Kameoka Y, Kura F, Persad AS, Suzuki K, Naoe S: Susceptibility loci to coronary arteritis in animal model of Kawasaki disease induced with *Candida albicans*-derived substances. *Microbiol Immunol* 49:181-189, 2005.
- 12) Nagai-Miura N, Shingo Y, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, Ohno N: Induction of Coronary Arteritis with Administration of CAWS (*Candida albicans* Water-Soluble Fraction) Depending on Mouse Strains. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 26:527-543, 2004.

2. 学会発表

国際会議

- 1) Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Maeda N, Koyama H: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Cryptococcus neoformans*. 13th Gordon Research Conference, CN, USA, 2005.
- 2) Suzuki K, Murayama K, Nagao T, Oharaseki T, Hasegawa A, Okawara AI, Miura NN, Watanabe N, Handa M, Takahashi K, Ohno N, Minamitani H, Nakayama T, Arai T: Contribution of CD69 to the development of coronary arteritis induced with a vasculitis Inducer *Candida albicans* water soluble fraction. 13th Gordon Research Conference, CN, USA, 2005.
- 3) Ohno N, Miura NN, Shinohara H, Sankawa H, Adachi Y, Okawara AI, Suzuki K: Strain dependency of CAWS-induced coronary arteritis in mice. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany, 2005.
- 4) Muso E, Ito-Ihara T, Ono T, Imai E, Yamagata K, Akamatsu A, Suzuki K: Establishment of the evidence of beneficial effect of Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy on MPO-ANCA related polyangiitis combining rapidly progressive glomerulonephritis (RPGN) in Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany, 2005.
- 5) Ito-Ihara T, Uno K, Hoshino A, Yamamoto K, Komiya T, Ishida-Okawara A, Fukatsu A, Kita T, Suzuki K, Muso E: Sensitive detection of myeloperoxidase expression on neutrophil of patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany, 2005.
- 6) Fujimoto S, Uezono S, Hisanaga S, Fukudome K, Kobayashi S, Tamura N, Suzuki K, Hashimoto H, Nunoi H: Incidence of primary renal vasculitis in Miyazaki, Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany, 2005.
- 7) Kobayashi S, Tamura N, Ihara T, Muso E, Suzuki K, Yoshida M, Nakabayashi K, Tsuchiya N, Kurosawa M, Inaba Y, Fujimoto S, Nunoi H, Hashimoto H: Prevalence of microscopic polyangiitis/Wegener's granulomatosis and the ratio of P-,MPO-/C-,R-3- ANCA in ANCA-associated vasculitis in Japan. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany.
- 8) Ishida-Okawara A, Nagi-Miura N, Oharaseki T, Ohno N, Takahashi K, Okamura H, Ward PA, Suzuki K: Neutrophil activation as in initial step with CAWS in mouse. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany, 2005.
- 9) Suzuki K, Murayama K, Nagao T, Oharaseki T, Hasegawa A, Ishida-Okawara A, Miura NN, Watanabe N, Handa M, Takahashi K, Ohno N, Minamitani H, Nakayama T, Arai T: Contribution of CD69 to the development of coronary arteritis induced with a vasculitis Inducer *Candida albicans* water soluble fraction. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany, 2005.
- 10) Hoshino A, Nagao T, Murayama K, Ishida-Okawara A, Ito-Ihara T, Uno K, Muso E, Nagi-Miura N, Ohno N, Naoe S, Tokunaka K, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K: Trace of antibody to myeloperoxidase (MPO) with nanocrystal quantum dots-labeled antibody

- recognizing activating neutrophils in glomerulonephritis and a vasculitis inducer CAWS-injected mice. 12th International ANCA workshop, Heidelberg, Germany, 2005.
- 11) Ito-Ihara T, Uno K, Ono T, Fukatsu A, Kita T, Suzuki K, Muso E: Circulating myeloperoxidase and cytokine profiles in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis. 3rd World Congress of Nephrology. Singapore, 2005.
 - 12) Kura F, Kobayashi S, Amemura-Maekawa J, Aratani Y, Suzuki K, Watanabe H: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Legionella pneumophila*. 6th International Conference on Legionella. Chicago, USA, October, 2005.
 - 13) Miura NN, Komai M, Shingo Y, Adachi Y, Okawara AI, Oharaseki T, Takahashi K., Naoe S, Suzuki K, Ohno N: Cytokine synthesis of splenic lymphocytes in murine coronary arteritis model induced by CAWS (*Candida albicans* water-soluble fraction) administration. International Cytokine Society Conference 2005. Seoul, Korea, October, 2005.
 - 14) Suzuki K: Estimation of the development of rapid progressive glomerulonephritis (RPGN) by the Quantum Dots. International Symposium on Colloidal Quantum Dots for Bio-Medical Applications and Their Safety. Kobe, Japan, November, 2005.
 - 15) Hoshino A, Nagao T, Fujioka K, Ito-Ihara T, Uno K, Muso E, Murayama K, Ishida-Okawara A, Nagi-Miura N, Ohno N, Naoe S, Tokunaka K, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K: Trace of Antibody to Myeloperoxidase with Nanocrystal Quantum Dot-Labeled Antibody Recognizing Activating Neutrophils in Glomerulonephritis and Vasculitis Inducer *Candida albicans* Water-Soluble Glycoprotein-Injected Mice. The International Society for Optical Engineering-BIOS 2006 - Symposia - Photonics West 2006 - Program - Conferences. San Jose, CA, USA, January, 2006.
 - 16) Suzuki K: Needs of Synthetic IVIg in the World. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. Tokyo, Japan, February, 2006.
 - 17) Nozu T, Kondo M, Suzuki K, Nagai A: Prevalence and clinical manifestation of pulmonary fibrosis in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. Tokyo, Japan, February, 2006.
 - 18) Takahashi K, Suzuki K, et al: The Effect of Synthetic Immunoglobulin (SyIG) in Mice Vasculitis Model caused by CAWS. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. Tokyo, Japan, February, 2006.
 - 19) Ohno N, Suzuki K, et al: Culture condition modulates active moiety of CAWS, vasculitis inducer from *C. albicans*. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. Tokyo, Japan, February, 2006.
 - 20) Okawara AI, Suzuki K, et al: Activation of neutrophils in the initial step of arteritis induction by CAWS. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. Tokyo, Japan, February, 2006.
 - 21) Ito-Ihara T, Suzuki K, et al: Circulating Levels of IL-12, 23 and IL-18 in Patients with MPO-ANCA-associated Vasculitis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. Tokyo, Japan, February, 2006.
 - 22) Ono T, Suzuki K, et al: The relationship between renal lesions and lung vascular lesions

in SCG/Kj mice as a model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. Tokyo, Japan, February, 2006.

- 23) Yumura W, Suzuki K, et al: A Novel Mouse Model for MPO-ANCA-Associated Glomerulonephritis – Analysis of Pathogenesis. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. Tokyo, Japan, February, 2006.
- 24) Yamanishi Y, Suzuki K, et al: Usefulness of nMPO-ANCA in diagnosing and treating vasculitis - discrepancy between MPO-ANCA and nMPO-ANCA-. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. Tokyo, Japan, February, 2006.
- 25) Furutani M, Suzuki K, et al: Synthetic polyclonal immunoglobulin. International Symposia on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between Basic Research and Clinical Research. Tokyo, Japan, February, 2006.

国内会議

- 1) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機：真菌感染と好中球機能。第 78 回日本細菌学会総会シンポジウム（東京）2005 年 4 月
- 2) 多田 壘、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁：Candida albicans 菌体由来多糖画分と LPS (E. coli O9) の免疫化学・生物活性の交差反応性の解析。第 78 回日本細菌学会総会（東京）2005 年 4 月
- 3) 鈴木和男：安全なガンマグロブリン製剤－血管炎治療をめざして－。第 12 回代替血液学会（東京）2005 年 6 月
- 4) 原田敏江、川南裕美、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁：真菌多糖による GM-CSF を介したサイトカイン産生誘導機構。生体防御機能ワークショップ 2005。第 2 回香川ガレクチンカンファレンス共催（高松）2005 年 6 月
- 5) 鈴木和男、村山 研、長尾朋和、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田 誠、南谷晴之、野津朋子、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲：Candida albicans water soluble fraction (CAWS) によって誘導される冠状動脈炎の発症への CD69 の関与。生体防御機能ワークショップ 2005。第 2 回香川ガレクチンカンファレンス共催（高松）2005 年 6 月
- 6) 猪原登志子、古宮俊幸、宇野賀津子、田原佐知子、辻井知美、塚本達雄、小野孝彦、岸田綱太郎、鈴木和男、深津敦司、北 徹、武曾恵理：MPO-ANCA 関連急速糸球体腎炎の血中サイトカインの動態。第 48 回日本腎臓学会学術総会（横浜）2005 年 6 月
- 7) 星野昭芳、長尾朋和、村山 研、大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、宇野賀津子、三浦典子、大野尚仁、直江史郎、徳中一寛、安原真人、山本健二、鈴木和男：血管炎発症初期の好中球活性化に関与する血中サイトカインの変動と QD 標識 MPO 抗体の *in vivo* トレース。第 70 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会（京都）2005 年 7 月
- 8) 長尾朋和、村山 研、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田 誠、南谷晴之、野津朋子、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男：CD69 関与の血管炎発症に連動する 8 種サイトカインの挙動。第 70 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会（京都）2005 年 7 月
- 9) 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北 徹、武曾恵理：ANCA 関連血管炎症候群における IL-12 と IL-18 の動態。第 70 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会（京都）2005 年 7 月
- 10) 武曾恵理、猪原登志子、古宮俊幸、宇野賀津子、岸田綱太郎、鈴木和男：シンポジウム 1 『生体防御異常が誘発する難治性疾

- 患』難治性血管炎の発症機序と治療戦略. 第 16 回日本生体防御学会学術総会 (東京) 2005 年 8 月
- 11) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、赤川久義、鈴木和男、小山秀機：好中球の機能異常が誘発する真菌感染. 第 16 回日本生体防御学会学術総会 (東京) 2005 年 8 月
 - 12) 亀岡洋祐、伊東玲子、笠間 毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、鈴木和男：ミエロペルオキシダーゼ遺伝子コード領域の多型 (SNP) と炎症性疾患の重篤度との関係. 第 16 回日本生体防御学会学術総会 (東京) 2005 年 8 月
 - 13) 倉 文明、小林静史、前川純子、常 彬、荒谷康昭、鈴木和男、渡辺治雄：シンポジウム 3『生体防御の役割をになう新ファミリー NOX : 植物 - 動物』*Legionella pneumophila* に対する感染防御機構、NOX2 など. 第 16 回日本生体防御学会学術総会 (東京) 2005 年 8 月
 - 14) 鈴木和男：パネルディスカッション『感染症防御 - 歴史と新しい研究アプローチに向けて』第 16 回日本生体防御学会学術総会 (東京) 2005 年 8 月
 - 15) 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋 啓、柏村信一郎、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 16 回日本生体防御学会学術総会 (東京) 2005 年 8 月
 - 16) 長尾朋和、村山 研、野津朋子、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田 誠、南谷晴之、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男：CD69 分子と活性化好中球による血管炎発症. 第 16 回日本生体防御学会学術総会 (東京) 2005 年 8 月
 - 17) 星野昭芳、長尾朋和、村山 研、大川原明子：猪原登志子、武曾恵理、宇野加津子、三浦典子、大野尚仁、直江史郎、徳中一寛、安原真人、山本健二、鈴木和男：量子ドット(QD)標識抗マウス MPO 抗体を用いた血管炎発症に関わる活性化好中球 MPO 分子の蛍光による検出. 第 16 回日本生体防御学会学術総会 (東京) 2005 年 8 月
 - 18) 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低下. 第 11 回 MPO 研究会 (福岡) 2005 年 10 月
 - 19) 大野尚仁、篠原弘靖、三浦典子、石橋健一、安達禎之、大川原明子、鈴木和男、大原関利章、高橋 啓、直江史郎：真菌由来の PAMPs, *Candida albicans* Water-soluble fraction (CAWS) の血管炎惹起能における β マンノース残基の影響. 第 11 回 MPO 研究会 (福岡) 2005 年 10 月
 - 20) 亀岡洋祐、Persad A、鈴木和男：ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチドに対する抗体の性状. 第 11 回 MPO 研究会 (福岡) 2005 年 10 月
 - 21) 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男：ヒト MPO 分子にける MPO-ANCA エピトープ解析. 第 11 回 MPO 研究会 (福岡) 2005 年 10 月
 - 22) 武曾恵理、鈴木進子、岩崎由加子、辻井知美、古宮俊幸、米本智美、塚本達雄、猪原登志子、宇野賀津子、鈴木和男：MPO-ANCA 関連腎炎血管炎に合併する悪性疾患症例の解析と考察. 第 11 回 MPO 研究会 (福岡) 2005 年 10 月
 - 23) 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北 徹、武曾恵理：ANCA 関連血管炎症候群における IL-12, IL-23 と IL-18 の動態. ANCA 関第 11 回 MPO 研究会 (福岡) 2005 年 10 月
 - 24) 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋 啓、柏村信一郎、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 11 回 MPO 研究会 (福岡) 2005 年 10 月
 - 25) 鈴木和男、長尾朋和、村山 研、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、長谷川明洋、三浦典子、大野尚仁、渡邊直英、半田 誠、南谷晴之、野津朋子、永井厚志、新井孝夫、中山俊憲：好中球血管炎発症にかかわる CD69 分子と活性化好中球. 第 11 回 MPO 研究会 (福岡) 2005 年 10 月

- 26) 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山 研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男：血管炎発症機構の解析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用。第 11 回 MPO 研究会（福岡）2005 年 10 月
- 27) 猪原登志子、宇野賀津子、古宮俊幸、辻井知美、塚本達雄、岸田綱太郎、小野孝彦、鈴木和男、深津敦司、北 徹、武曾恵理：ANCA 関連血管炎症候群における IL-12、IL-23 と IL-18 の動態。第 11 回 MPO 研究会（福岡）2005 年 10 月
- 28) 鈴木和男、星野昭芳、長尾朋和、猪原登志子、宇野賀津子、徳中一寛、大川原明子、三浦典子、大野尚仁：Q ドットによる進行性糸球体腎炎の評価。第 11 回 MPO 研究会（福岡）2005 年 10 月
- 29) 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山 研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男：血管炎発症機構の解析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用。第 14 回日本バイオイメージング学会（東京）2005 年 10 月
- 30) 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男：ヒト MPO 分子における MPO-ANCA エピトープ解析。第 14 回日本バイオイメージング学会（東京）2005 年 10 月
- 31) 鈴木和男：好中球自己抗体 MPO-ANCA の抗原性と病態。第 33 回臨床免疫学会（京都）2005 年 10 月
- 32) 鈴木和男：血管炎発症機構における CD69 分子を介する好中球・血小板相互反応。第 28 回日本血栓止血学会（福岡）2005 年 11 月
- 33) 飛田俊介、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、中山俊憲、大野尚仁： β グルカンを用いたコラーゲン誘発関節炎モデルにおける CD69 の発現解析。第 28 回分子生物学会（福岡）2005 年 12 月
- 34) 亀岡洋祐、笠間 毅、鈴木哲朗、猪原登志子、武曾恵理、橋本雄之、鈴木和男：ミエロペルオキシダーゼのリーダーペプチドの細胞内局在。第 28 回分子生物学会（福岡）2005 年 12 月
- 35) 松村実美子、長尾朋和、三川浩輝、村山 研、大川原明子、南谷晴之、鈴木和男：血管炎発症機構の解析：MPO-ANCA と好中球の糸球体内皮細胞への作用。第 28 回分子生物学会（福岡）2005 年 12 月
- 36) 野津朋子、松村実美子、大川原明子、長谷川明洋、中山俊憲、永井厚志、鈴木和男：活性化好中球関与の肺血管内皮細胞の機能解析。第 28 回分子生物学会（福岡）2005 年 12 月
- 37) 富澤一夫、鈴木倫太郎、田之倉優、鈴木和男：ヒト MPO 分子上の MPO-ANCA 結合部位エピトープ解析。第 28 回分子生物学会（福岡）2005 年 12 月
- 38) 長尾朋和、大原関利章、長谷川明洋、大川原明子、三浦典子、野津朋子、高橋 啓、大野尚仁、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男：CD69 contributes to the development of vasculitis。第 35 回免疫学会（横浜）2005 年 12 月
- 39) 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋 啓、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。第 35 回免疫学会（横浜）2005 年 12 月
- 40) 鈴木和男、星野昭芳、長尾朋和、猪原登志子、宇野賀津子、徳中一寛、大川原明子、三浦典子、大野尚仁：血管炎発症初期の好中球活性化に関与する血中サイトカインの変動と QD 標識 MPO 抗体の *in vivo* トレース。第 35 回免疫学会（横浜）2005 年 12 月
- 41) 大野尚仁、三浦典子、石橋健一、安達禎之、高橋 啓、大原関利章、直江史郎、大川原明子、鈴木和男：Candida albicans 由来の血管炎惹起物質 CAWS の活性部位の解析。第 35 回免疫学会（横浜）2005 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

1 1. *Stachybotrys chartarum* 吸入と原発性肺高血圧症との関連について

分担研究者 渋谷 和俊 (東邦大学医学部病院病理学講座)

研究協力者 亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究要旨 ヒトの居住環境内に存在する真菌である *Stachybotrys chartarum* をマウスに経気管的に反復投与することによって一部の個体で肺動脈壁の肥厚がびまん性に認められることを明らかにした。真菌の吸入によって、肺動脈壁のびまん性肥厚を作成した動物モデルの報告はなく、今までに病態が明らかではなかった難治性疾患、特に特発性肺高血圧症との関連を示唆する重要な知見であると考えられた。本研究では、この血管病変と既知の疾患との類似性を検討するとともに、この病変が形成されるための条件を検討した。この結果、肺動脈壁肥厚が、組織学的には内膜の対称性細胞線維性肥厚を主とする変化で、しばしば中膜肥厚を伴い内腔の著明な狭窄をきたすこと、接種菌数依存性に出現頻度を増すこと、肺動脈の変化に伴い右心室重量が増加することを明らかにした。以上の結果から、本モデルがヒト特発性肺高血圧症に極めて近似した病態モデルである可能性が示唆された。

A. 研究目的

Stachybotrys chartarum はヒトの居住環境内に存在する真菌である。我々はこれまでに、本菌をマウスに経気管的に反復投与することによって一部の個体で肺動脈壁の肥厚が見られることを明らかにした。真菌の吸入によってこのような病変が形成されるという報告はなく、このことは今までに知られていなかった疾患との関連を示唆する重要な知見であると考えられる。そこで本研究では、この血管病変と既知の疾患との類似性を検討するとともに、この病変が形成されるための条件を検討した。

B. 研究方法

使用菌株

S. chartarum (IFM53637)

Potato dextrose agar にて 25°C で 3 週間培養後、RPMI1640 で菌を洗浄してガラスフィルター (20–30 μm) に通し、遠心 (1190 × g, 15 min) して沈殿した分生子を回収し、RPMI1640 にて懸濁液を作製して用いた。

1. 経気管的反復投与によって形成される肺血管病変について

ddY マウス (6 週齢、オス) の腹腔内にケタ

ミンおよびキシラジンの混合液を注射し、麻酔下で気管内にカテーテルを挿管して、1 回の投与あたり分生子懸濁液 25 μl / mouse、 1×10^4 conidia / mouse を 2 週間に 3 回の頻度で計 6、8、10、12、18 回反復投与した。対照群のマウスには RPMI1640 を同様に投与した。反復投与終了後 1 日目または 4 日目に各マウスから肺、肝、腎、脾を摘出してホルマリンに固定後、パラフィンに包埋して薄切片を作製した。これらを原則としてヘマトキシリン・エオジン (HE) にて染色し、病理組織学的変化を検討した。また、計 12、18 回反復投与したマウスの体重、肝、腎、脾の重量を量ると共に、右心室と左心室 + 中隔の重量比 (RV/(LV + S)) から右心室肥大を検討し、*S. chartarum* の反復投与による影響を調べた。

2. 接種方法の相違が肺血管病変形成に及ぼす影響について

1) 経気管的反復投与の回数および実験期間による影響

1 と同様に麻酔下で ddY マウス (6 週齢、オス) に分生子懸濁液 4×10^4 conidia / g を経気管的に投与した。投与の頻度は①単回、②1 週間に 1 回、3 週間連続 (計 3 回投与)、③2 週間に

1回(計4、6回投与)、とした。実験期間は、①および②の投与群は投与開始から4、8週間、③は8、12週間とした。各期間終了後にそれぞれのマウスの肺、肝、腎、脾を摘出し、パラフィン切片を作製した後にHE染色を行い、病理組織学的変化を検討した。また、体重および各臓器の重さ、右心室肥大に対する影響を検討した。

2) 腹腔内注射による影響

ddYマウス(6週齢、オス)の腹腔内に単回および反復注射を行った。単回注射はマウスあたり分生子懸濁液 8×10^6 conidia / 400 μ l を注射し、注射後4、8週目に肺、肝、腎、脾を摘出した。反復注射はマウスあたり分生子懸濁液 4×10^6 conidia / 400 μ l を1週間に1回の頻度で繰り返して注射し、注射開始から4、8週目(計4、8回注射)に各臓器を摘出した。それぞれの臓器はパラフィン切片を作製した後にHE染色を行い、病理組織学的変化を検討した。また、体重および各臓器の重さ、右心室肥大への影響の検討を行った。

C. 研究結果

1. 経気管的反復投与によって形成される肺血管病変について(図1、2)

分生子を計6回(1ヶ月間)以上反復投与した一部のマウスで肺動脈壁の肥厚が認められた。反復投与回数の増加や実験期間の延長に伴って肺動脈壁の中膜および内膜の肥厚による腔の著しい狭窄が認められるようになるとともに、これらの病変が見られる個体数が増加した。このような肺動脈病変が認められたマウスの割合は、計12回(2ヶ月間)反復投与した場合に40%(4/10匹)、計18回(3ヶ月間)反復投与した場合に約64%(7/11匹)であった。肺動脈周囲の間質には、一時的に分葉核白血球を含む炎症細胞浸潤が見られたものの、血管内腔の狭窄の進行とともに消退した。肝、腎、脾に特記すべき病変は認められなかった。

また、計12、18回反復投与したマウスでは体重が有意に減少した。計18回反復投与したマウスにおいてはRV/(LV+S)が対照群のマウスと比べて有意に増加しており、右心室肥大が示された。その他の臓器について有意差は認められなかった。

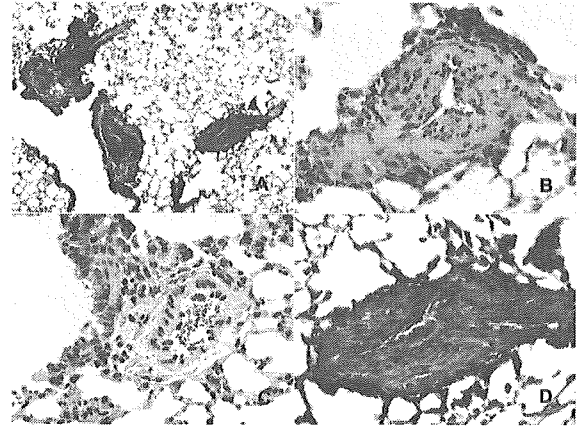


図1. 分生子を計18回反復投与したマウスの肺
A: 末梢肺動脈壁の肥厚と内腔狭窄(Elastica-Masson stain, $\times 40$)
B: 肺動脈内膜・中膜の肥厚による内腔狭窄(HE stain, $\times 400$)
C: Bと同等の分岐回数における未処置マウスの肺動脈(HE stain, $\times 400$)
D: 肺動脈内膜・中膜の肥厚による内腔狭窄(Elastica-Masson stain, $\times 400$)

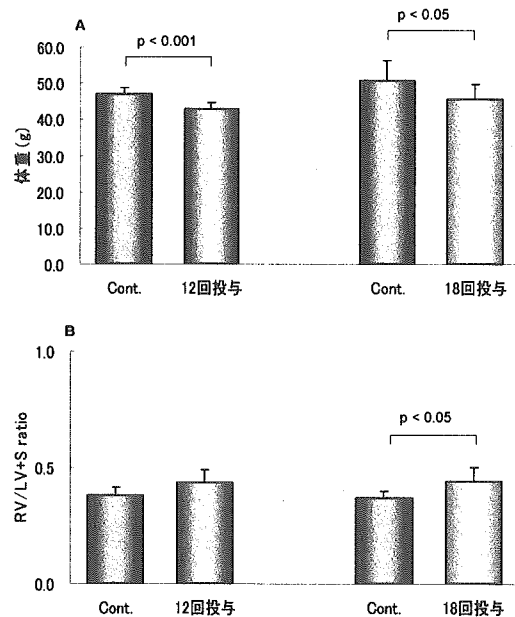


図2. 分生子懸濁液を経気管的に計12、18回反復投与したマウスの体重、RV/(LV+S) ratio: 18回投与群において右室重量の有意な増加が認められる($p < 0.05$)。

2. *Stachybotrys chartarum* 接種方法の相違と肺血管病変形成への影響について

1) 経気管的反復投与の回数および実験期間による影響

各投与群で肺動脈病変が見られた割合は、①単回投与群では投与後4、8週目にそれぞれ0%(0/6匹)、16.7%(1/6匹)、②1週間に1回、

3週間連続投与した群（共に計3回投与）では投与開始から4、8週目に16.7%（1/6匹）、0%（0/7匹）、③2週間に1回の投与群では投与開始から8、12週目（計4、6回投与）に両方とも28.6%（2/7匹）であった。①および②の投与群の一部で体重減少が見られたほかは、各臓器およびRV/(LV+S)に有意差は認められなかった。

2) 腹腔内注射による影響

分生子懸濁液の腹腔内への単回注射および反復注射では肺に炎症所見は認められず、肺動脈壁肥厚も形成されなかった。また、RV/(LV+S)は、単回注射後4週目に減少したものの、他の注射群および体重、諸臓器は、対照群と比べて差はなかった。

D. 考 察

本実験で認められたマウスの肺動脈壁の中膜および内膜の肥厚、およびこれらに起因する肺動脈壁の肥厚、内腔の狭窄は、病理学的にヒトの原発性肺高血圧症（PPH）との一致点が多く見られる。また、肺動脈壁の顕著な肥厚が見られたマウスでは、RV/(LV+S)の重量比が増加し肺動脈圧の上昇が示された。これらの所見より、本実験系はPPHの成因を理解する上で貴重なマウスモデルと考えることができる。

S. chartarum は我が国の居住環境でも広汎に生息している真菌である。本研究では、より実際の環境に近い状況を想定して、投与回数を少なくした場合に果たして同様の病変が形成されるかを確認した。その結果、8週間に4回の経気管的投与を行った場合でも、約30%のマウスで病変が形成され、少ない投与回数でもある程度長期間に及べば、病変が形成されることが示された。PPHと本菌との因果関係は明らかではないが、生活環境内においてヒトが空気中に浮遊する本菌に繰り返し暴露される可能性は十分に考えられ、注意すべき問題と思われる。

本菌のどのような成分が病変の形成に関与しているか、あるいはその機序については、今後、詳細な検討を行うことが必要であると考えられる。

E. 結 論

本研究により、*S. chartarum* の反復投与により比較的短時間にPPHに類似した病変が形成されることが明らかとなった。ヒトにおいても本菌の吸入によりPPHあるいはこれに類似した疾患が発症する可能性が示唆された。真菌の曝露によるこのような病変の形成は今までに報告のない知見であり、これまでに知られていなかった疾患を含めた肺循環障害の研究に寄与することが期待される。本菌による病変形成機序の解明については更なる検討が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakai T, Hatano K, Ikeda H, Shibuya K: Electron microscopic findings for micafungin-treated experimental pulmonary aspergillosis in mice. *Med Mycol* 43:439-445, 2005.

2. 学会発表

- 1) 落合恵理、亀井克彦、佐藤綾香、今泉忠淳、渋谷和俊：*Stachybotrys chartarum* の気道内投与がマウスの肺動脈に及ぼす影響について。第49回日本医真菌学会総会（千葉）2005年10月
- 2) 落合恵理、亀井克彦、佐藤綾香、渡辺哲、渋谷和俊：*Stachybotrys chartarum* の接種方法の相違がマウスの肺血管病変形成に与える影響について。真菌症フォーラム第7回学術集会（東京）2006年2月
- 3) The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, June 2006, Paris（準備中）

3. 総説 他

- 1) Shibuya K, Hirata A, Omuta J, Sugamata M, Katori S, Saito N, Murata N, Morita A, Takahashi K, Hasegawa C, Mitsuda A, Hatori T, Nonaka H: Granuloma and cryptococcosis.

J Infect Chemother 11:115-122, 2005.

- 2) Aikawa N, Kohno S, Shibuya K, Takesue Y, Maesawa S, Yoshida M, Tokimatsu I: Current status of diagnosis and treatment of invasive fungal infections in Japan: the influence of the new Japanese guidelines. J Infect Chemother 11:278-287, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録情報
なし。

12. クラミジア・リケッチアと特定疾患についての研究

分担研究者 岸本壽男 国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 室長

協力研究者 安藤秀二 (国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 主任研究官)
小川基彦 (国立感染症研究所 ウイルス第一部第五室 主任研究官)
川端寛樹 (国立感染症研究所 細菌第一部 第四室 室長)
古屋由美子 (神奈川県衛生研究所 専門研究員)
薬師神芳洋 (愛媛大学第一内科 助教授)
伴信太郎 (名古屋大学医学部総合診療部 教授)
西城卓也 (名古屋大学医学部総合診療部)

研究要旨 本研究ではクラミジア、リケッチア、Q熱コクシエラ等と特定疾患との関連について明らかにすることを目的とした。本年度はオウム病クラミジアと orbital MALT リンパ腫との関連について、また Q 熱コクシエラと慢性疲労症候群 (CFS) 様疾患との関連について検討を行った。orbital MALT リンパ腫症例 17 例の手術標本から抽出された DNA を用いて、クラミジア遺伝子検出を試み、患者血清については、micro-IF 法によってオウム病クラミジアに対する血清抗体を測定した。オウム病クラミジアの遺伝子は検出されず、またオウム病クラミジア特異 IgG、IgA、IgM 抗体を保有する症例はなかった。Q 熱コクシエラと慢性疲労症候群様疾患との関連についての検討では、CFS 疑いの患者 43 名 (臨床診断では、CFS12 名、CFS+精神疾患 5 名、精神疾患 13 名、器質的疾患 3 名、疾病利得群 3 名、その他診断保留 8 名) の血清 C.burnetii 抗体の測定と、血液からの遺伝子検出を行ったが、IgM および IgG 抗体価の有意な上昇を認める症例はなく、また C.burnetii の DNA が抽出された症例もなかった。引き続き症例数を増やして検討する予定である。

A. 研究目的

クラミジアおよびリケッチアは偏性細胞内寄生性の細菌で、それらの感染による感染症はよく知られているが、そのほかに原因不明の慢性疾患との関連も示唆されている。クラミジアでは、主なものとして肺炎クラミジアと動脈硬化性疾患のほか多発性硬化症 (MS) が、また最近、オウム病クラミジアと、眼の MALT リンパ腫との関連の疑いがあるとの報告がある。一方、最近までリケッチアに分類されていた Q 熱コクシエラは慢性疲労症候群様疾患との関連も疑われている。

しかし、いずれもこれらの慢性疾患への関与を結論付ける根拠は疫学、メカニズムも含めて不十分である。本研究ではクラミジア、リケッチアさらに Q 熱コクシエラも含めた細胞内寄生菌と特定疾患との関連についてその関連を明らかにすることを目的に、疫学に用いる診断法の確立と臨床サンプル確保を先ず行いつつ、

原因究明に向けての検討を進めることとした。本年度はオウム病クラミジアと orbital MALT リンパ腫との関連について検討した。また Q 熱コクシエラと慢性疲労症候群様疾患との関連についても疫学的検討を行った。

B. 研究方法

1) orbital MALT リンパ腫とオウム病クラミジアとの関連についての検討

典型的な orbital MALT リンパ腫は、中年女性の外側眼瞼に好発し、局所療法、特に手術療法が極めて有効である。最近、一部のグループから orbital MALT リンパ腫からオウム病クラミジア遺伝子を高率に検出し、その関連性を示唆する報告がなされている。そこで愛媛大学医学部において過去 8 年間に経験された orbital MALT リンパ腫症例を retrospective に検討し、その関与について検討した。

方法：1996年7月から2004年9月までに愛媛大学医学部附属病院で経験した、限局型 orbital MALT リンパ腫症例 17 例の手術標本から抽出された DNA を用いて、クラミジア属特異的 PCR (CM1, CM2: Yoshida H, et al) と *C. psittaci* 特異的 PCR (Cpsi-1, Cpsi-2: Cai Y, et al) によって遺伝子検出を試みた。さらにこれらの患者血清 17 検体について、クラミジア 3 種抗原を用いた micro-IF 法によってオウム病クラミジアに対する血清抗体を測定した。

2) 慢性疲労症候群様疾患患者における Q 熱コクシエラの関与についての検討

慢性疲労症候群 (以下 CFS) とは、少なくとも 6 ヶ月持続する、深刻な疲労感に特徴付けられ、様々な身体・精神症状を伴う疾患である。感染、精神的ストレス、身体的過労などが契機となると推定されているが、原因は未だ明らかではない。また、急性 Q 熱に罹患した後に全身倦怠感等が持続する Post-Q 熱症候群が CFS と臨床症状が極めて類似していることから、Q 熱が CFS の病因のひとつである可能性も考えられている。国内においても、CFS 様の経過を呈した Q 熱症例の報告もされているが、実態は不明な点が多い。そこで慢性疲労を訴える患者における *C. burnetii* 感染の頻度を調査し、その関連性について検討した。

方法：対象は平成 14 年 1 月から平成 17 年 8 月までの間に CFS を疑われ名古屋大学医学部附属病院総合診療部へ紹介されたり、本人が CFS を疑って来院した患者とした。対象患者数は、43 名であった。参加者の特徴は、男女比は、15:28 で、平均年齢は、35.8 歳であった。居住地の特徴は、愛知県を中心とした中部地区が主であった。ペットの飼育歴があるものは、24 名で、海外渡航歴 (居住) のあるものは 18 名であった。臨床診断では、1) CFS は 12 名、2) CFS+精神疾患は 5 名、3) 精神疾患は 13 名、4) 器質的疾患は 3 名、5) 疾病利得群は 3 名、その他は 8 名が診断保留となった。それらの患者は、書面でインフォームドコンセントを得た上で、同院の CFS 診療プロトコールに則って血清および EDTA 加全血を、治療開始前に採取した。

患者血清の抗体値の測定は、*C. burnetii* Nine

Mile 株 II 相菌の感染 Vero 細胞を抗原に間接蛍光抗体法 (IF 法) により行った。また遺伝子検出は *C. burnetii* 外膜蛋白質遺伝子 *com1* (Furuya Y, et al) を標的とした Nested-PCR 法により行った。

C. 研究結果

1) orbital MALT リンパ腫とオウム病クラミジアとの関連についての検討

限局型 orbital MALT リンパ腫 17 例からはオウム病クラミジアの遺伝子は検出されず、またオウム病クラミジア特異 IgG、IgA、IgM 抗体を保有する症例は認めなかった。

2) 慢性疲労症候群様疾患患者における Q 熱コクシエラの関与についての検討

今回検討した患者で、IgM および IgG 抗体価の有意な上昇を認める症例はなかった。また *C. burnetii* の DNA が抽出された症例も認めなかった。

D. 考察

1) orbital MALT リンパ腫とオウム病クラミジアとの関連についての検討

オウム病クラミジア感染症と限局型 orbital MALT リンパ腫との関連は見出せなかった。しかし 17 例と症例数が少ないため、さらに症例の追加が必要と思われる。

2) 慢性疲労症候群様疾患患者における Q 熱コクシエラの関与についての検討

日本において、動物や動物の排泄物との接触の多い人には、ある程度 Q 熱感染者が潜在するのではないかと示唆する報告もある。しかし、今回の研究で、中部地区の比較的都市型診療地域においては、CFS を疑わず慢性疲労を訴える患者群の中に、*C. burnetii* 抗体陽性者や遺伝子が検出された症例は認められなかった。引き続き CFS や CFS 様の慢性疲労を訴える患者における *C. burnetii* 感染の有無を検討するとともに、Post-Q 熱症候群の患者からの遺伝子検出率について検討を続ける必要性があると考えられた。

今後は肺炎クラミジアと中枢神経系疾患との関連性についても、多発性硬化症例の血清の提供を受けて検討する予定である。

E. 結 論

これまでの検討では、orbital MALTリンパ腫とオウム病クラミジアとの関連、ならびに慢性疲労症候群様疾患患者におけるQ熱コクシエラの関与ともに積極的に支持する結果は得られなかったが、さらに症例の追加をして検討する必要があると思われた。

F. 康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表なし。

2. 学会発表

- 1) 西城卓也、堀江典克、胡 暁晨、伴信太郎、安藤秀二、古屋由美子、小川基彦、岸本寿男：慢性疲労を訴える患者におけるQ熱リケッチア保菌の可能性に関する検討. 第23回日本クラミジア研究会、第12回リケッチア研究会合同研究発表会（東京）平成17年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。