

### C. 研究結果

#### 1) 鬱症状を呈する患者の HHV-6 潜伏感染蛋白に対する免疫反応

HHV-6 は、脳内に潜伏感染する。その潜伏感染細胞は、アストロサイトなどを中心とするグリア細胞であると考えられている。また、潜伏感染部位には偏りがあり、前頭葉や海馬領域に集中的にウイルスが潜伏感染していると考えられている (図 1)。このため、HHV-6 の潜伏感染細胞の増加や、潜伏感染蛋白の異常な発現は、アストロサイトの機能に影響を与え、高次中枢神経機能の異常をきたすことが考えられる。また、このような潜伏感染細胞または潜伏感染蛋白の増加は、潜伏感染蛋白に対する抗体価の上昇として観察されると考えられた。

潜伏感染細胞に対する抗体を蛍光抗体法にて検出することにより、HHV-6 潜伏感染蛋白に対する抗体価を検討した。その結果、健常人や臓器移植によって HHV-6 の再活性化を生じた人では潜伏感染蛋白に対する抗体がほとんど検出されないのに対し、慢性疲労症候群 (CFS) 患者や引きこもりとも呼ばれる小児の CFS 患者において抗体陽性者が存在することが判明した (図 2)。

CFS は、非常に高率に精神症状、特に鬱症状を呈し、精神科的には鬱病に分類されることが多い疾患である。そこで、CFS 患者の中でも特に鬱症状を呈する患者と、精神科に受診している患者の中で鬱症状を呈する患者における抗体価を検討した。また、今回検査を行った小児の CFS 患者のほとんどは、何らかの鬱症状を示している患者であった。この結果、CFS 患者の中で鬱症状を示している患者の約 7 割で、さらに、精神科に受診している鬱症状を呈する患者の約半数が HHV-6 の潜伏感染蛋白に対する抗体を保有することが判明した (図 3)。

さらに、これらの患者における通常の HHV-6 に対する抗体価測定を行ったところ、CFS 患者と健常人における有為な差は見られなかった (図 4)。通常のウイルス検査は、ウイルスの増殖感染時に発現する蛋白質(カプシド、エンベロープなど)に対する抗体価を蛍光抗体法にて測定する。この結果は、鬱症状を呈する患者における HHV-6 の影響は、再活性化などのウイルス増殖によって生じるのでは

なく、潜伏感染そのものの影響であることを示唆していた。

#### HHV-6の潜伏感染部位

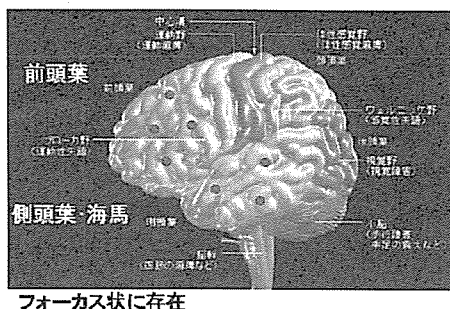


図 1: HHV-6 の潜伏感染部位  
HHV-6 の中でも特に世界中に広く分布する HHV-6 variant B は、脳内に潜伏感染する。その潜伏感染細胞は、アストロサイトなどを中心とするグリア細胞であると考えられている。また、潜伏感染部位には偏りがあり、HHV-6 DNA の検出の結果から、主として前頭葉や海馬領域に多くのウイルスが潜伏感染していることが判っている。

#### HHV-6潜伏感染蛋白に対する血清抗体価

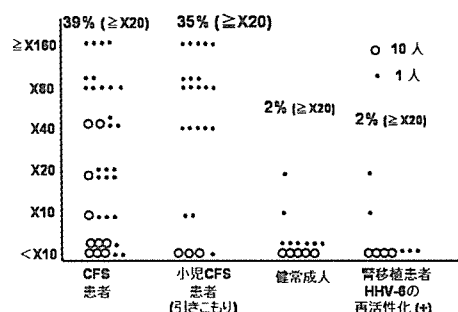


図 2: HHV-6 潜伏感染蛋白に対する抗体価  
HHV-6 潜伏感染蛋白に対する抗体価を検討した。抗体価は、潜伏感染細胞に対する抗体を蛍光抗体法にて検出した。健常人や臓器移植によって HHV-6 の再活性化を生じた患者では潜伏感染蛋白に対する抗体がほとんど検出されないのに対し、慢性疲労症候群(CFS)患者や引きこもりとも呼ばれる小児の CFS 患者において抗体陽性者が存在することが判った。

#### HHV-6潜伏感染蛋白に対する血清抗体価

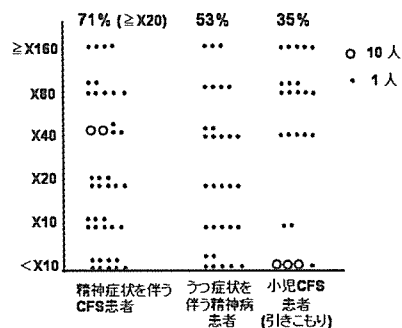


図 3: 鬱症状を呈する患者における抗体価  
CFS 患者の中でも特に鬱症状を呈する患者と、精神科に受診している患者の中で鬱症状を呈する患者における抗体価を示す。ここで示す小児の CFS 患者のほとんどは、何らかの鬱症状を示している。

HHV-6に対する通常の血清抗体価 (抗増殖感染蛋白抗体)

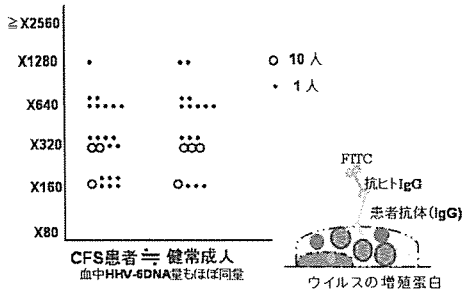


図 4: HHV-6 に対する通常の抗体価測定  
通常のウイルス検査は、ウイルスの増殖感染時に発現する蛋白質(カプシド、エンベロープなど)に対する抗体価を蛍光抗体法にて測定する。この抗体価は、CFS 患者と健康人において有為な差は見られなかった。

## 2) HHV-6 潜伏感染蛋白の機能解析

HHV-6 は、脳内ではアストロサイトなどを中心とするグリア細胞に潜伏感染していると考えられている (図 1)。また、鬱病の原因として、アストロサイトなどのグリア細胞におけるカルシウム濃度の異常が予想されている。

そこで、HHV-6 潜伏感染によるグリア細胞株内のカルシウム濃度の変化を検討するために、HHV-6 が潜伏感染したアストロサイト細胞株 U373 細胞におけるカルシウム濃度変化の測定を行った。潜伏感染蛋白を発現した細胞とそうでない細胞において、細胞外からのカルシウム流入を促進する刺激物質 Thapsigargin による細胞内カルシウム濃度の変化を、蛍光物質 Fura2 を用い、340nm と 380nm の 2 種類の励起光における蛍光の比率を計測することによって解析した。この結果、潜伏感染蛋白を発現している細胞では、そうでない細胞に比べて、細胞外からのカルシウムの流入が相当量増加することが判明した (図 5)。

### 細胞内カルシウム濃度の変化

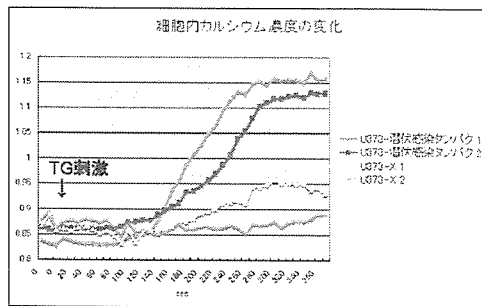


図 5: HHV-6 潜伏感染によるグリア細胞株内のカルシウム濃度の変化

アストロサイト細胞株 U373 細胞におけるカルシウム濃度変化の測定。潜伏感染蛋白を発現した細胞とそうでない細胞における刺激物質 Thapsigargin による細胞内カルシウム濃度の変化を、蛍光物質 Fura2 を用い 340nm と 380nm の 2 種類の励起光における蛍光の比率を計測することによって解析した。2 系統の潜伏感染細胞による実験結果を示す。

## D. 考 察

HHV-6 には、HHV-6 variant A と HHV-6 variant B の 2 種類のウイルスが存在する。世界中に広く分布し、突発性発疹の原因となるのは、HHV-6 variant B であり、本邦においても HHV-6 として検出されるのは、HHV-6 variant B であると考えてよい。HHV-6 (特に HHV-6 variant B) は、脳内に潜伏感染する。その潜伏感染細胞は、アストロサイトなどを中心とするグリア細胞であると考えられている。また、潜伏感染部位には偏りがあり、事故死体などにおける検討では、主として前頭葉や海馬領域に多くの HHV-6 DNA が検出される。また、臓器移植などの際の脳炎が前頭葉や海馬領域に集中することからも、ウイルスが潜伏感染しているのは、主として前頭葉や海馬領域であると考えられている。また、HHV-6 の脳内における増殖は、限局的な領域において生じることが知られているため、潜伏感染細胞もフォーカス状に分布していると考えられる (図 1)。

図 2、図 3 で示される様に、鬱症状を呈する患者において特異的に HHV-6 潜伏感染蛋白に対する抗体が検出される。これは、このような患者において、潜伏感染細胞数または潜伏感染蛋白の発現の増加が生じているものと考えられた。

最近、脳の機能に関するグリア細胞の重要性が非常に注目を集めている。中でもグリア細胞におけるカルシウム濃度の変化は、神経細胞のシナプス伝達の調整に極めて重要であると考えられている。HHV-6 がフォーカス状に潜伏感染している領域には数千の神経シナプスが含まれると考えられる。このため、この領域で図 5 に示す様な、グリア細胞内へのカルシウム流入の異常な亢進が生じた場合、高次中枢神経機能異常を呈する可能性は高い。また、HHV-6 が潜伏感染している部位が、前頭葉や海馬領域であることより、HHV-6 による中枢神経機能異常は、思考や情動に関係するものであると予測できる。別の研究によって、鬱症状とカルシウム流入の亢進が関係することが示唆されており、今回示された、HHV-6 の潜伏感染によるグリア細胞へのカルシウム流入の異常が、クローン病患者などにおける鬱症状の発生に深く関与する可能性がある。

## HHV-6の再活性化のメカニズム

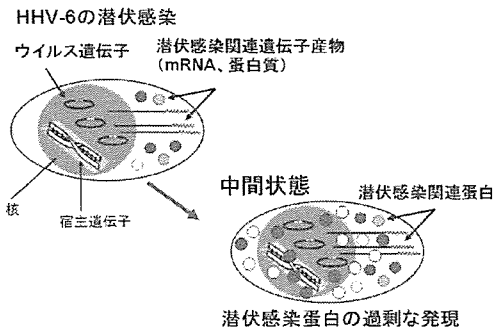


図 6: HHV-6 潜伏感染蛋白の発現

HHV-6 は安定した潜伏感染状態では、潜伏感染蛋白を少量しか発現しないが、再活性化刺激が加わると潜伏感染蛋白を大量に発現する中間状態をとる。この状態は、再活性化の準備段階であると考えられる状態であるが、比較的安定で 1~2 週間この状態を持続できる。

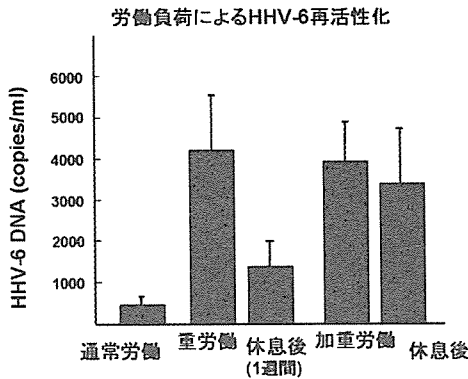


図 7: HHV-6 の再活性化に影響を与える因子

HHV-6 を再活性化に導く因子としては、仕事のストレスの蓄積による疲労状態など、生体へのストレスとその蓄積が強く働く。図に見られる様に、加重労働の場合の様にストレス刺激が長期間持続した場合は、再活性化が一方向的に進み、回復させることが困難になる。

## HHV-6潜伏感染蛋白に対する血清抗体価

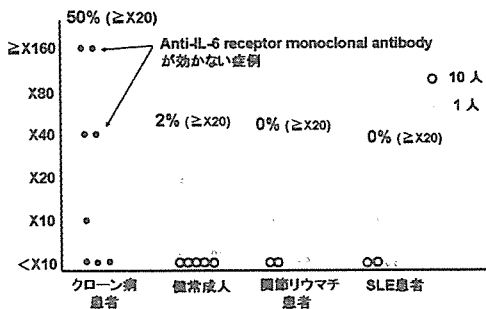


図 8: クロウン病患者における抗 HHV-6 潜伏感染

蛋白抗体価と治療抵抗性との関係: クロウン病患者における抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体価と、免疫抑制療法である抗 IL-6 受容体抗体治療に対する抵抗性を検討した。この結果、抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体を保有する患者では、免疫抑制療法に対する抵抗性があることが判った。また、関節リウマチや SLE などの他の自己免疫疾患の患者では、抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体は検出されなかった。

また、HHV-6 の潜伏感染蛋白は、図 6 に示す様に、潜伏感染細胞に再活性化刺激が加わった時により多く発現する。また、図 7 に示される様に、過労などの生体ストレスの蓄積は、HHV-6 の再活性化刺激である。このことは、過労が持続することによって鬱病が誘発されるという、良く知られた現象を説明できる可能性がある。

さらに、クローン病患者で鬱症状を示した場合、免疫抑制による治療に対する抵抗性を示すことが知られている。図 8 に示す様に、抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体を保有する患者は、免疫抑制治療に抵抗性を示す。また、同じ自己免疫疾患である関節リウマチや SLE の患者は、抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体を持たない。このことは、クローン病において、特に免疫反応の強い患者では HHV-6 の再活性化刺激因子が大量に産生され、脳内に潜伏感染している HHV-6 にも影響を与えるのではないかと想像される。この仮説は、昨年までに報告した、クローン病の患部において HHV-6 の潜伏感染蛋白を発現した免疫系細胞が多数観察されるという現象とも合致するものと考えられる。

## E. 結論

今回は、クローン病患者において、腸管の病変部において検出される HHV-6 の潜伏感染関連蛋白に対する抗体が、クローン病の増悪因子である鬱症状の発現と強く関係していることが判明した。このことは、クローン病患者における免疫現象が、HHV-6 の再活性化を強く誘導する刺激になっていることを示しており、クローン病に特異的な免疫状態の把握に寄与するものと考えられる。また、HHV-6 の潜伏感染関連蛋白に対する抗体と鬱症状との関係は、鬱病などのその他の疾患における鬱症状の発生とも関係していることも明らかとなった。これは、クローン病の病態や治療法の解明につながるだけでなく、現在大きな社会問題となっているストレスと鬱病との関係にも解決法を与えるものであると考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 近藤一博：疲労のバイオマーカーとしてのヘルペスウイルス再活性化. 第2回日本疲労学会（大阪）2006年7月
- 2) 鎌田美乃里、近藤一博：HHV-6感染 SCID-huマウスにおける HHV-6 感染様式の解析. 第54回日本ウイルス学会（名古屋）2006年11月
- 3) 嶋田和也、武本眞清、山西弘一、近藤一博：ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6) 初期遺伝子制御機構の解析－初期遺伝子プロモーター間の比較検討－. 第54回日本ウイルス学会（名古屋）2006年11月
- 4) 近藤一博、鎌田美乃里、小林伸行：ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 と HHV-7 の再活性化の誘導因子としての疲労. 第54回日本ウイルス学会（名古屋）2006年11月
- 5) 清水昭宏、近藤一博：ヒトヘルペスウイルス7 (HHV-7)の細胞指向性関連遺伝子領域の同定と機能解析：第54回日本ウイルス学会（名古屋）2006年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 4. 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染

分担研究者 山谷 睦雄 東北大学病院老年科 助教授

研究協力者 佐々木陽彦、浅田成紀、鈴木朋子、安田浩康、中山勝敏（東北大学病院・老年科）、矢内 勝（石巻赤十字病院・呼吸器科）、西村秀一（仙台医療センター・臨床研究部ウイルスセンター）、巽 浩一郎、栗山喬之（千葉大大学院・加齢呼吸器病態制御学）、久保恵嗣（信州大・内科学第1）、三上正志（埼玉医大総合医療センター・第三内科）、三嶋理晃（京大大学院・呼吸器内科学）、一ノ瀬正和（和歌山県立医大・内科学第三）、相澤久道（久留米大・第一内科）、西村正治（北大大学院・呼吸器内科学）、長瀬隆英（東大大学院・呼吸器内科）、永井厚志（東京女子医大・第一内科）、福地義之助（順天堂大・呼吸器内科）

研究要旨 1) 培養ヒト気管上皮細胞における、ライノウイルス感染に対するコリン性作動薬メサコリンの影響を調べた。メサコリンを培養ヒト気管上皮細胞に作用させると、培養液ライノウイルス量や可溶性細胞接着分子 ICAM-1 量は変化しなかった。メサコリンは気道におけるライノウイルス感染に影響しないことが示唆された。2) マクロライド抗生物質のRSウイルス感染抑制作用の機序を調べるために、RhoA 活性化に対する効果を検討した。バフィロマイシン、エリスロマイシン、およびクラリスロマイシンを培養ヒト臍帯静脈内皮細胞に作用させると、LPS (lysophosphatidic acid)による RhoA 活性化を抑制した。3) インフルエンザウイルスの細胞内進入・脱殻部位である酸性エンドゾームの pH 上昇作用を有する薬品の、インフルエンザウイルス感染抑制作用を検討した。マクロライドのバフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、プロトンポンプ阻害薬のランソプラゾール、オメプラゾール、およびアマンタジンはインフルエンザウイルス感受性細胞である MDCK 細胞において、A 香港型インフルエンザウイルスの培養液放出量を減少した。さらに、バフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、喀痰調整薬のL-カルボシステイン、およびアマンタジンはヒト気管上皮細胞において、培養液 A 香港型インフルエンザウイルス放出量とインターロイキン(IL)-6 放出量を減少した。酸性エンドゾーム pH 上昇作用を有する薬品のインフルエンザ感染抑制効果と気道炎症抑制効果が示唆された。4) 慢性肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患における風邪および急性増悪回数に及ぼす吸入ステロイドの効果を検討した。吸入ステロイドは中等症の慢性閉塞性肺疾患における急性増悪回数を減少した。慢性期の慢性閉塞性肺疾患の管理における吸入ステロイドの有用性が示唆された。5) 慢性肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患における風邪および急性増悪回数に及ぼす喀痰調整薬L-カルボシステインの効果について多施設研究を行なった。L-カルボシステインは慢性閉塞性肺疾患における風邪回数および急性増悪回数を減少した。慢性期の慢性閉塞性肺疾患の管理における L-カルボシステインの有用性が示唆された。

### A. 研究目的

1) 特定疾患である若年性肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患 (COPD) はウイルス感染が原因で急性増悪し、呼吸不全をきたすことが多い。ライノウイルス、インフルエンザウイルス、RS (Respiratory syncytial) ウイルスなどが同定され

る。ウイルス感染は気道上皮の剥離脱落や気道壁の浮腫を介して気道内腔を狭窄し、また、炎症性サイトカイン、ヒスタミンやロイコトリエン、あるいはウイルス感染そのものが気道炎症や気管支平滑筋収縮、喀痰分泌を生じて気流障害を促す。ライノウイルスは血清型が 100 種類

以上もあり、有効なワクチンは開発されていない。また、感染を抑制する抗ライノウイルス薬も実用化されていない。私たちはライノウイルス感染受容体である ICAM-1 の発現抑制やライノウイルス RNA 細胞内放出の場である酸性エンドゾーム減少を介したライノウイルス感染抑制薬を探求してきた。その結果、グルコシルコイドが ICAM-1 減少を介して、また、エリスロマイシン、プロトンポンプ阻害薬、および喀痰調整薬カルボシステインが ICAM-1 減少と酸性エンドゾーム減少を介してライノウイルス感染抑制効果を有すると報告してきた。COPD の治療薬として広く用いられている $\beta$ 2-刺激薬は急性増悪抑制効果が報告されている。昨年度は $\beta$ 2-刺激薬が感染受容体である ICAM-1 発現を減少して、ライノウイルス感染を抑制すると報告した。本年度は COPD 安定期管理薬で急性増悪抑制効果を有する抗コリン薬に関連して、コリン薬作動性薬のライノウイルス感染に及ぼす効果を検討した。

2) RS ウイルスは乳幼児の細気管支炎の原因ウイルスであると同時に気管支喘息や COPD の急性増悪の原因ウイルスである。RS ウイルスは感染を抑制する医薬品が実用化されていない。RS ウイルスの細胞側受容体として small GTP ase (RhoA) が細胞融合、ウイルス進入に関係すると報告されている。昨年度はバフィロマイシンを中心にマクロライドの RS ウイルス感染抑制作用を報告した。本年度はこれらの薬品の RhoA 機能抑制効果を検討した。

3) インフルエンザ感染はライノウイルスと同様、特に冬季における気管支喘息や COPD の急性増悪に関与する。インフルエンザワクチンは COPD の急性増悪による死亡率を低下させる。また、ノイラミニダーゼ阻害薬やアマンタジンはインフルエンザ治療薬として使用されている。他方で、インフルエンザウイルスの感染初期段階として、細胞接着とエンドゾームへのウイルス取り込みがある。インフルエンザウイルスはエンドゾームの酸性化により RNA を細胞質に放出する。しかし、エンドゾームの機能を抑制するインフルエンザ治療医薬品は開発されていない。私たちはこれまで、マクロライドや L-カルボシステイン、プロトンポンプ阻害薬などのヒト気管上皮細胞のエンドゾー

ム内 pH 上昇を報告したが、今年度はこれらの医薬品のインフルエンザウイルス感染抑制効果を検討した。

4) 本研究班において以前にグルコシルコイドのライノウイルス感染抑制作用を、培養上皮細胞を用いて調べ、報告した。また、グルコシルコイドは気道炎症抑制効果があり、気管支喘息や重症慢性閉塞性肺疾患の急性増悪抑制効果が報告されている。しかし、軽症や中等症の慢性閉塞性肺疾患における急性増悪抑制効果については一定の効果の報告がなされていない。本年度は中等症の慢性閉塞性肺疾患における急性増悪抑制効果について報告する。

5) 本研究班において、以前、私たちは喀痰調整薬 L-カルボシステインのライノウイルス感染抑制効果を、気道上皮細胞を用いた実験で明らかにした。また、慢性閉塞性肺疾患患者における風邪および急性増悪回数の減少を報告した。本研究は本邦 11 大学における多施設研究として、慢性閉塞性肺疾患患者における風邪および急性増悪回数を前向き研究で検討した。

## B. 研究方法

1) ヒト気管上皮細胞およびヒト気管上皮粘膜下腺細胞を試験管に培養し、ライノウイルス 14 型を感染させた。ライノウイルス感染 3 日前からメサコリン (10  $\mu$ M) を上皮細胞に作用させた。ライノウイルス感染前、感染後 24 時間、および 72 時間の時点で培養液を回収し、ライノウイルス量および可溶性 ICAM-1 量を測定した。

2) ヒト臍帯静脈内皮細胞をシャーレに培養し、バフィロマイシン (10<sup>-8</sup> M)、エリスロマイシン (10  $\mu$ M)、クラリスロマイシン (10  $\mu$ M) を 24 時間内皮細胞に作用させた。さらに、LPA (lysophosphatidic acid) を内皮細胞に 24 時間作用させ、活性化 RhoA を RhoA-GTP アッセイ法で測定した。

3) インフルエンザに感受性のある MDCK 細胞、およびヒト気管上皮細胞を試験管に培養し、A 香港型インフルエンザウイルス 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> units/ml (TCID<sub>50</sub>; tissue culture infective dose 50) を感染させた。インフルエンザウイルス感染 3 日前からバフィロマイシン (10<sup>-8</sup> M)、エリス

ロマイシン (10  $\mu\text{M}$ )、クラリスロマイシン (10  $\mu\text{M}$ )、アマンタジン (10  $\mu\text{M}$ ) を MDCK 細胞およびヒト気管上皮細胞に作用させた。また、プロトンポンプ阻害薬ランソプラゾール (10  $\mu\text{M}$ )、オメプラゾール (10  $\mu\text{M}$ ) を MDCK 細胞に、L-カルボシステイン (10  $\mu\text{M}$ ) をヒト気管上皮細胞に作用させた。インフルエンザウイルス感染前、感染後 24 時間、72 時間および 144 時間の時点で培養液を回収し、インフルエンザウイルス量を測定した。インフルエンザウイルス量の測定は、10 倍希釈した培養液を MDCK 細胞に感染させ、50%細胞変性効果を示す希釈倍率 (TCID<sub>50</sub>; tissue culture infective dose 50, units/ml) で求めた。また、ヒト気管上皮培養液インターロイキン-6 (IL-6) 放出量を測定した。

4) 慢性閉塞性肺疾患患者 79 名を対象とした。内訳は男性 58 名、女性 21 名、喫煙者 54 名、非喫煙者 25 名であった。肺機能は平均努力性肺活量 2.63L、平均一秒量 1.54L/秒、平均一秒率 58.6%であった。治療は吸入ステロイド (ベクロメサゾン 200  $\mu\text{g}$ /日)、テオフィリン徐放剤 200-400 mg/日、および $\beta$ 2-刺激薬 (プロカテロール 50  $\mu\text{g}$ /日あるいはツルブテロール 1-2 mg/日) を用いた。吸入ステロイド使用前 1 年間と使用中 1 年間における風邪および急性増悪の回数を観察した。

5) 慢性閉塞性肺疾患患者 142 名を対象とした。内訳は男性 130 名、女性 12 名、喫煙者 137 名、非喫煙者 5 名であった。平均一秒量はコントロール群で 1.24L/秒、カルボシステイン内服群で 1.33L/秒、平均一秒率 58.6%であった (表 1)。(倫理面への配慮)

ヒト気管上皮細胞培養について東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行なった。臨床研究は各大学の倫理委員会で承認されている。

### C. 研究結果

1) ライノウイルス感染後 3 日目におけるヒト気管上皮細胞およびヒト気管上皮粘膜下腺細胞の培養液ライノウイルス量はメサコリン (10  $\mu\text{M}$ ) 刺激で変化しなかった (図 1)。さらに、細胞培養液中可溶性 ICAM-1 濃度もメサコリン (10  $\mu\text{M}$ ) 刺激で変化しなかった (図 1)。

	コントロール群	カルボシステイン群
症例数	70	72
男性 / 女性	65 / 5	65 / 7
喫煙歴 (Y/N)	68 / 2	69 / 3
年齢 (歳)	70.5 $\pm$ 0.9	69.8 $\pm$ 0.9
一秒量 (L)	1.24 $\pm$ 0.08	1.33 $\pm$ 0.08
COPD重症度		
中等症	43 %	58 %
重症	43 %	33 %
最重症	14 %	8 %

表1 カルボシステインの風邪および慢性閉塞性肺疾患急性増悪抑制に関する多施設研究症例

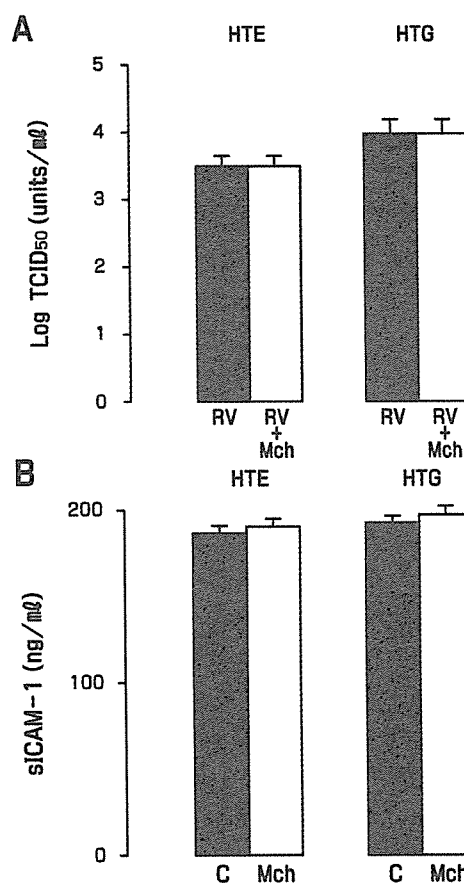


図1 メサコリンのライノウイルス感染および可溶性 ICAM-1 に及ぼす影響

ヒト気管上皮細胞(HTE)および粘膜下細胞(HTG)培養液に放出されるライノウイルス量(A)および可溶性 ICAM-1(B)は、メサコリン刺激(Mch)で変化しない。

2) バフィロマイシン、クラリスロマイシン、エリスロマイシンは LPA (lysophosphatidic acid) 刺激によるヒト臍帯静脈内皮細胞の活性化 RhoA (RhoA-GTP) の量を減少させた (図 2)。

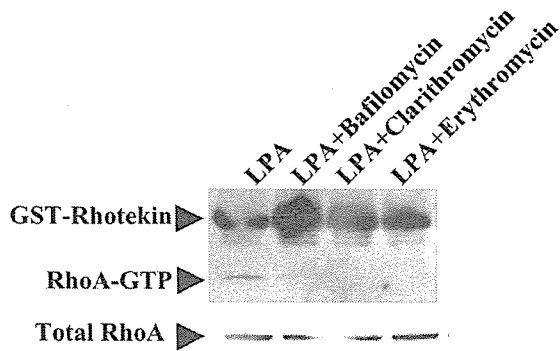


図2 ヒト臍帯静脈内皮細胞の RhoA 活性化に及ぼすマクロライドの抑制効果

LPA(lysophosphatidic acid)刺激で増加した活性化 RhoA(RhoA-GTP)はバフィロマイシン(bafilomycin)、クラリスロマイシン(clarithromycin)、エリスロマイシン(erythromycin)の前処理で減少する。

3) A 香港型インフルエンザウイルス  $10^4$  TCID<sub>50</sub> units/ml を感染させた後、MDCK 細胞およびヒト気管上皮細胞の培養液中のインフルエンザ放出量は時間とともに増加した(図3)。MDCK 細胞をバフィロマイシン ( $10^{-8}$  M) で作用させた場合、培養液放出量は減少した(図3A、図3A)。さらに、MDCK 細胞をエリスロマイシン ( $10 \mu\text{M}$ )、クラリスロマイシン ( $10 \mu\text{M}$ )、ランソプラゾール ( $10 \mu\text{M}$ )、オメプラゾール ( $10 \mu\text{M}$ )、アマンタジン ( $10 \mu\text{M}$ ) で作用させた場合、培養液放出量は減少した。インフルエンザウイルス放出量減少の程度はアマンタジンが最も減少の程度が強く、ウイルス量は 1/1000 であった(図4A)。次がバフィロマイシンで、ウイルス量は 1/100 であった。エリスロマイシン、クラリスロマイシン、ランソプラゾール、オメプラゾールによる減少の程度は弱かったが、1/10 に減少させた(図4A)。ヒト気管上皮細胞をバフィロマイシン ( $10^{-8}$  M) で作用させた場合も培養液放出量は減少した(図3B、図4B)。さらに、ヒト気管上皮細胞をエリスロマイシン ( $10 \mu\text{M}$ )、クラリスロマイシン ( $10 \mu\text{M}$ )、L-カルボシステイン ( $10 \mu\text{M}$ )、アマンタジン ( $10 \mu\text{M}$ ) で作用させた場合、培養液放出量は減少した。インフルエンザウイルス放出量減少の程度はアマンタジンとバフィロマイシンが強く、ウイルス量は 1/10000 であった(図4B)。エリスロマイシン、クラリスロマイシン、L-カルボシステインによる減少の程度は弱かったが、1/10 に減少させた(図4B)。

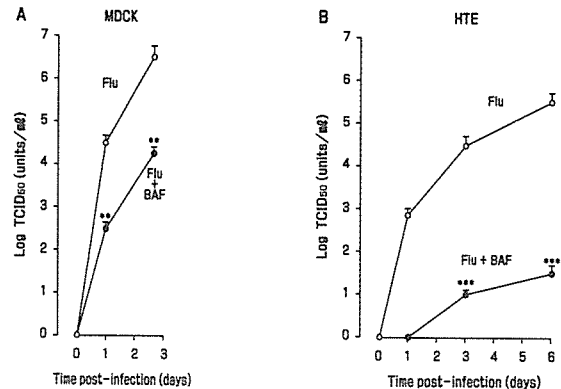


図3バフィロマイシンの培養液インフルエンザウイルス放出抑制効果

MDCK 細胞(A)およびヒト気管上皮細胞(HTE)(B) 培養液へのインフルエンザ放出量(Flu)は時間経過で増加する。バフィロマイシン(BAF)は培養液インフルエンザ放出量を減少する。  
\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ : インフルエンザウイルス感染に対する有意差

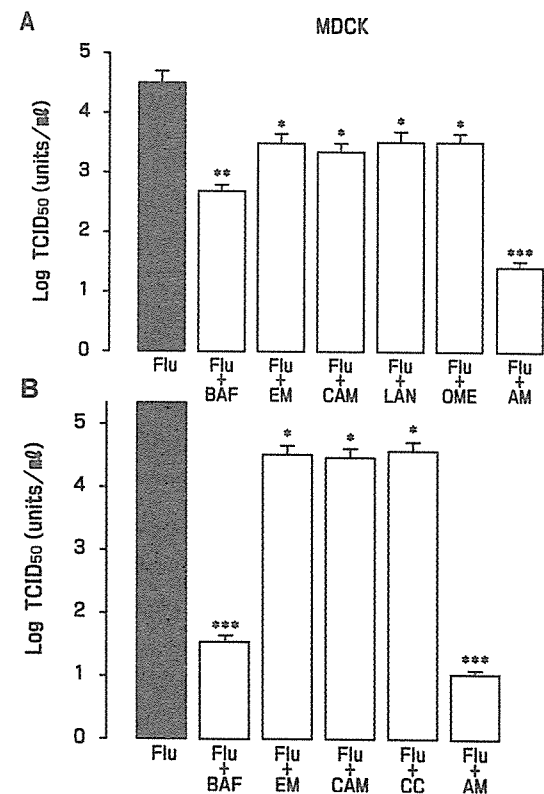


図4 各種薬品の培養液インフルエンザウイルス放出抑制効果 MDCK 細胞(A, day 3)およびヒト気管上皮細胞(HTE)(B, day 6) 培養液へのインフルエンザ放出量(Flu)はバフィロマイシン(BAF)、エリスロマイシン(EM)、クラリスロマイシン(CAM)、ランソプラゾール(LAN)、オメプラゾール(OME)、アマンタジン(AM)、L-カルボシステイン(CC)で減少する。 $*P < 0.05$ 、\*\*\* $P < 0.001$ : インフルエンザウイルス感染に対する有意差

インフルエンザを感染させる前において、バフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシンはヒト気管上皮細胞の培養液 IL-6



放出量を減少させた(図 5A)。しかし、アマンタジンは培養液 IL-6 放出量を変化させなかった(図 5A)。インフルエンザウイルス感染 24 時間後、培養液 IL-6 放出量は増加した(図 5B)。これに対して、バフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシンを処理したヒト気管上皮細胞ではウイルス感染のみの細胞に比較して、培養液 IL-6 放出量が減少した(図 5B)。アマンタジンはインフルエンザウイルス感染後も、培養液 IL-6 放出量を減少させなかった(図 5B)。

4) 風邪の診断は Jackson らの基準に沿って行なった。また、慢性閉塞性肺疾患急性増悪の診断は Anthonisen らの基準を用いた。風邪回数は 70 名の患者で観察できた。この対象において吸入ステロイド使用前の風邪総数は 141 回、平均 2.01 回、吸入ステロイド使用中の風邪総数は 171 回、平均 2.44 回と変化を認めなかった ( $P=0.45$ )。急性増悪は 79 名の患者で観察できた。この対象において吸入ステロイド使用前の増悪総数は 318 回、平均 4.02 回、吸入ステロイド使用中の増悪総数は 210 回、平均 2.78 回と、吸入ステロイド使用中の急性増悪回数が減少した ( $P=0.0004$ )。

5) 多施設研究において、風邪の回数はコントロール群で平均 2.79 回/年、カルボシステイン群で平均 1.07 回/年で、カルボシステイン群において風邪回数が減少した ( $P=0.0006$ )。さらに、急性増悪の回数はコントロール群で平均 1.01 回/年、カルボシステイン群で平均 0.28 回/年で、カルボシステイン群において急性増悪回数が減少した ( $P<0.01$ )。また、患者の症状を示す symptom score of SGRQ ( $P<0.01$ )、活動を示す activity score of SGRQ ( $P<0.01$ )、および影響(病気が日常生活や健康状態に与える心理的、社会的影響の程度)を示す Total QOL ( $P<0.01$ ) がいずれも改善した。

#### D. 考 察

1) ライノウイルスは風邪の主原因であり、かつ、慢性肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患や気管支喘息の急性増悪を惹起すると広く知られているが、これまで、ライノウイルスワクチンや抗ライノウイルス薬は開発されていない。急性

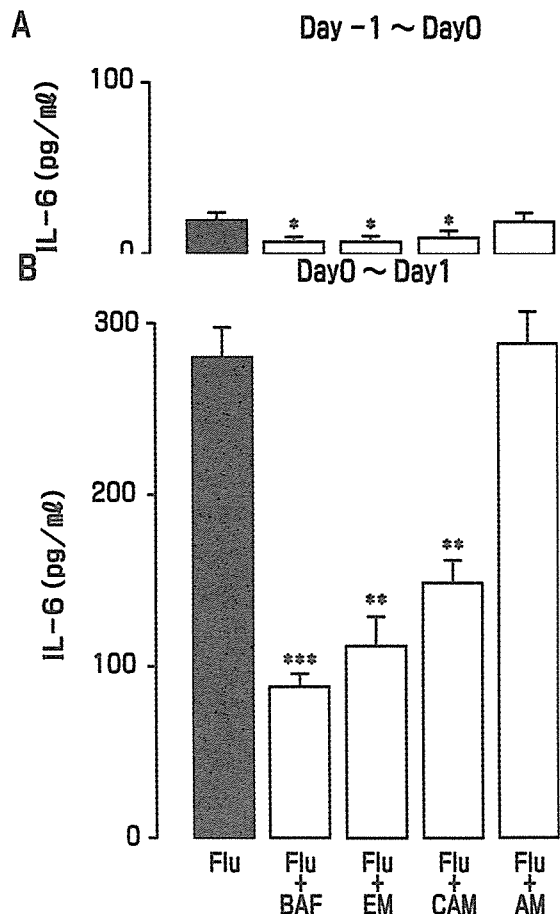


図 5 マクロライドのインフルエンザウイルス感染誘発 IL-6 培養液放出抑制効果

インフルエンザウイルス感染前(day 0, 5A)にヒト気管上皮細胞培養液に放出される IL-6 はバフィロマイシン(BAF)、エリスロマイシン(EM)、クラリスロマイシン(CAM)で減少する。インフルエンザウイルス感染(day 1)で IL-6 は増加する(5B)。バフィロマイシン(BAF)、エリスロマイシン(EM)、クラリスロマイシン(CAM)でインフルエンザウイルス感染後の培養液 IL-6 増加を抑制する。\* $P<0.05$ :コントロールに対する有意差。\*\* $P<0.01$ 、\*\*\* $P<0.001$ :インフルエンザウイルス感染(Flu)に対する有意差

増悪は呼吸不全による死亡や日常生活の質(QOL)の低下をもたらすため、急性増悪予防・治療法確立は重要である。私たちはこれまで、グルココルチコイドやエリスロマイシン、プロトンポンプ阻害薬、喀痰調整薬など、いくつかの薬品がライノウイルス感染抑制効果を持つことを発表してきた。またエリスロマイシンおよび喀痰調整薬の風邪予防効果を発表した。ライノウイルスの Major type は細胞接着分子 ICAM-1 を感染受容体として気道上皮細胞に感染する。感染後、一部のライノウイルス RNA は細胞表面から細胞内に放出されるが、他のライノウイルスは細胞内の酸性エンドソームに取り込まれて、ここでウイルス RNA を

放出する。私たちは ICAM-1 の発現抑制と酸性エンドゾームをアルカリにすることでライノウイルス感染抑制効果が出ると報告してきた。前年度、私たちは慢性閉塞性肺疾患の治療薬として広く用いられている  $\beta$ 2-刺激薬の急性増悪抑制効果に着目し、ヒト気管上皮細胞初代培養細胞を用いた *in vitro* 系で実験した。これらの結果から、塩酸プロカテロールが感染受容体である ICAM-1 を減少することによって、ライノウイルス感染抑制効果をもたらすことを明らかにした。また、炎症性サイトカインや ICAM-1 の減少は、ライノウイルス感染でもたらされる気道炎症を抑制する作用を塩酸プロカテロールが有している可能性を示した。今回、慢性閉塞性肺疾患安定期管理に広く用いられている抗コリン薬に関連して、コリン作動性薬であるメサコリンをヒト気管上皮細胞および粘膜下腺細胞に処理して、ライノウイルス感染に対する影響を調べた。抗コリン薬の急性増悪抑制効果は報告されている。このため、ライノウイルス感染抑制が急性増悪抑制に関与しているかどうか、細胞実験で調べた。その結果、メサコリンはライノウイルス感染に影響を与えなかった。また、ライノウイルス感染受容体の ICAM-1 の培養液可溶性成分である可溶性 ICAM-1 を測定したが、変化を認めなかった。従って、コリン作動性薬それ自体ではライノウイルス感染に影響を与えないことが示唆された。したがって、抗コリン薬は慢性閉塞性肺疾患急性増悪予防効果が報告されているが、ライノウイルス感染とは別の機序が働いていると考えられる。

2) RS ウイルスは乳幼児の急性細気管支炎の原因ウイルスとされていたが、最近になって高齢者の風邪あるいは COPD 急性増悪の原因ウイルスとしての存在が報告されるようになった。RS ウイルスの感染はウイルス蛋白として接着蛋白 (attachment protein : G 蛋白) および細胞融合蛋白 (fusion protein : F 蛋白) の存在が明らかになっている。また、感染する細胞側の受容体としてヘパラン硫酸および small GTP ase が報告されている。Small GTP ase は small GTP-binding protein RhoA とも呼ばれ、細胞骨格を制御する蛋白としての研究がこれまでなされ、呼吸器・循環器領域では血管内皮細胞の

透過性に関与する報告がなされてきた。RhoA は RS ウイルスの細胞内進入や RS ウイルスの細胞融合に関係する。RhoA の合成ペプチドは細胞実験において RS ウイルスの感染を抑制することが報告された。抗 RS ウイルスヒト化モノクローナル抗体 (パリビスマブ、製品名シナジス) は発売されているが、RS ウイルス感染を抑制する治療薬は開発されていない。前年度の研究で私たちは RhoA の機能抑制が報告されているマクロライド抗生物質バフィロマイシン、臨床で使用されているマクロライドであるエリスロマイシンおよびクラリスロマイシンが RS ウイルス感染を抑制することを明らかにした。本年度はこれらの薬品が RhoA の活性化を抑制していることを、血管内皮細胞を用いて明らかにした。気道上皮細胞で同様の機序が働くかどうか、さらに検討の予定である。

3) 本年度はこれまでの研究で検討してきたライノウイルスや RS ウイルスのほかに、インフルエンザウイルスの感染抑制効果も検討した。インフルエンザウイルスのうち、これまで大流行してきた A 香港型を用いた。インフルエンザ感染抑制薬としては、アマンタジンやノイラミニダーゼ阻害薬が臨床ですでに用いられている。アマンタジンは A 型インフルエンザウイルスの M2 蛋白で構成されるイオンチャネルの働きを阻害してウイルスの細胞進入、あるいは脱殻を阻害する。また、ノイラミニダーゼ阻害薬はウイルスの細胞外放出に際して必要なノイラミニダーゼを阻害する。他方で、インフルエンザウイルスの進入から複製、放出までの過程において、インフルエンザウイルスの感染初期段階として、細胞接着とエンドゾームへのウイルス取り込みがある。インフルエンザウイルスはエンドゾームの酸性化により RNA を細胞質に放出する。しかし、エンドゾームの機能を抑制するインフルエンザ治療医薬品は開発されていない。バフィロマイシンのエンドゾームの酸性化抑制を介したインフルエンザ感染抑制効果は、今回の研究でも使用した MDCK 細胞で明らかにされていた。しかし、ヒト気道上皮細胞における検討はなされていなかった。私たちはバフィロマイシンのエンドゾームの酸性化抑制を介したライノウイルス感染抑制効果に関してはこれまで報告してき

た。本研究では、それに加えて、MDCK 細胞、ヒト気管上皮細胞いずれにおいてもバフィロマイシンのインフルエンザ感染抑制効果が認められた。さらに、これまで私たちがエンドゾーム内 pH 上昇を報告してきたエリスロマイシンやクラリスロマイシン、L-カルボシステイン、プロトンポンプ阻害薬などの医薬品においても、インフルエンザ感染抑制効果が認められた。これらの医薬品のインフルエンザウイルス放出抑制効果はバフィロマイシンやアマンタジンに比べて弱いものであった。しかし、エリスロマイシンやクラリスロマイシンはインフルエンザ感染抑制に加えて、炎症性サイトカインである IL-6 の放出をバフィロマイシンと同じレベルに抑制した。したがって、インフルエンザ感染抑制効果に加えて、気道炎症抑制効果も期待できると考える。エリスロマイシンやクラリスロマイシン、L-カルボシステイン、プロトンポンプ阻害薬などが感染受容体発現など、インフルエンザウイルス感染の他の経路で抑制効果を有するかどうか、今後の検討課題である。

4) 本研究において、慢性肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患における風邪および急性増悪回数に及ぼす吸入ステロイドの効果を検討した。その結果、吸入ステロイドは中等症の慢性閉塞性肺疾患における急性増悪回数を減少した。これまで重症の病期分類に属する慢性閉塞性肺疾患における急性増悪回数に関して、吸入ステロイドによる減少効果は報告がなされていた。そのため、重症の病期分類に属する慢性閉塞性肺疾患の急性増悪を繰り返す患者における吸入ステロイドの使用は推奨されてきた。しかし、軽症あるいは中等症の患者に関しては報告がなかった。本研究の結果は安定期の慢性閉塞性肺疾患の管理における吸入ステロイドの有用性を示唆するものである。他方で、風邪回数は減少しなかった。ライノウイルスを実験的に接種する検討において、吸入ステロイドは感染を抑制しないとの報告が海外でなされている。私たちはライノウイルス放出量を減少する細胞実験の結果を報告したが、海外における研究ではライノウイルス感染そのものは防げなかった。今回の吸入ステロイドの効果検討において、慢性閉塞性肺疾患患者の風邪の回数は変化しなかったが、風邪の程度は軽減させ、その結果

急性増悪に結びつく回数が減少したと考えられる。

5) 呼吸不全に関する調査研究班の班員が所属する大学を含む、11 大学の多施設研究において L-カルボシステインの風邪および慢性閉塞性肺疾患急性増悪に対する抑制効果が明らかになった。ブラインド研究ではないが、前向き研究で行なわれた。この結果は私たちが以前に報告した私たちの施設で行なった研究結果と同じになり、私たちの研究を補強する形になった。L-カルボシステインのライノウイルス感染抑制効果、炎症性物質放出抑制効果などによって、このような臨床効果がもたらされると考えられる。また、細胞実験の成果が臨床研究に結びつき、呼吸不全に関する調査研究班の班員を含む多施設研究に発展した成果と位置付けられる。

## E. 結 論

コリン作動薬はヒト気管上皮細胞のライノウイルス感染に影響を及ぼさないことが示唆された。マクロライドによる RhoA 抑制効果が明らかにされ、RS ウイルス感染抑制作用の機序が示唆された。A 香港型インフルエンザのヒト気管上皮細胞および MDCK 細胞への感染は、バフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アマンタジン、プロトンポンプ阻害薬ランソプラゾール、オメプラゾール、喀痰調整薬 L-カルボシステインで抑制された。バフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシンはヒト気管上皮細胞の培養液 IL-6 放出を減少させ、気道炎症効果が示唆された。吸入ステロイドの慢性閉塞性肺疾患における急性増悪予防効果、および喀痰調整薬 L-カルボシステインの風邪および急性増悪予防効果、QOL 改善効果が示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, Inoue D, Nakayama K, Tomita N, Yoshida M, Sasaki H: Carbocisteine reduces frequency of

- common colds and exacerbations in COPD patients. *J Am Geriatr Soc* 54: 378-380, 2006.
- 2) Yamaya M, Suzuki T, Ishizawa K, Sasaki T, Yasuda H, Inoue D, Kubo H, Nakayama K, Nishimura N, Sekizawa K: COPD and macrolide *JMAJ* 49: 158-166, 2006.
  - 3) Inoue D, Yamaya M, Sasaki T, Hosoda M, Kubo H, Numazaki M, Tomioka Y, Yasuda H, Sekizawa K, Nishimura H, Sasaki H: Mechanisms of mucin production by rhinovirus infection in cultured human tracheal surface epithelium and submucosal glands. *Respir Physiol Neurobiol* 154: 484-499, 2006.
  - 4) Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, Inoue D, Nakayama K, Yamada M, Suzuki T, Sasaki H: Carbocysteine inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells. *Eur Respir J* 28: 51-58, 2006.
  - 5) Nakayama K, Kikuchi A, Yasuda H, Ebihara S, Sasaki T, Ebihara T, Yamaya M: Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and the decline in lung function in Japanese male subjects. *Thorax* 61: 921, 2006.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

- 1) 発明の名称：ライノウイルス感染予防剤  
出願者：山谷陸雄、安田浩康、佐々木英忠  
出願番号：特願 2004-98995 号 (特許申請中)

## 5. 自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与 —特に NV-F の関与の検討—

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 準教授

研究協力者 齊藤 聡 (横浜市立大学大学院分子消化管内科学 準教授)

研究要旨 自己免疫性肝炎の発症に関する Virus 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てきたが、現段階では自己免疫性肝炎に特異的に発現している遺伝子は、いくつかの候補は上がったものの特定するにはいたっていない。今回は 2006 年春に発表された新しい肝炎の原因と思われる NV-F と自己免疫性肝炎の関係を検討した。

### A. 研究目的

自己免疫性肝炎 (Autoimmune Hepatitis : 以下 AIH) は主として中年以降の女性に好発し、比較的短期間に肝硬変に進行する難治性疾患である。AIH の発症の原因として幾つか考えられているが、特にウイルスの関与が疑われている。

これまで AIH の発症に関与するウイルス感染を同定すべく、患者肝生検組織を用いて遺伝子発現の網羅的解析手法によってウイルス遺伝子の発現の同定を試みたが成功していない。原因としては特に肝炎発症直後の症例から得られた組織が異常発現をしているウイルス遺伝子の同定に有用と考えるが、このような症例が得られないのが現状である。

一方これまでと同様の古典的な手法ではあるが、あるウイルスに的を絞ってその自己免疫性肝炎との関与を検討することも行ってきた。そのなかには 2006 年春に発表された Novel Single-Stranded DNA Fragment (以下 NV-F) があるが、これは原因不明の肝炎患者から同定された single strand の DNA 物質である。このグループからの発表では A - E 型ではない肝炎の患者の 24.6% から検出されたとしている。その後 B 型肝炎、C 型肝炎患者に合併して感染していると報告している。

今回の研究ではこの NV-F と AIH の関係があるか否か、またこれが AIH 発症の原因となっているか否かを検討した。

### B. 研究方法

インフォームドコンセントを得たうえで採血した、HBs 抗原および HCV 抗体陰性で肝生検を施行し病理学的に診断された、1) AIH の患者 18 名、2) 原発性胆汁性肝硬変 (以下 PBC) の患者 16 名と、3) 肝障害を持たない患者 70 名の血清より DNA を抽出し nested-PCR をかけた。プライマーは論文に発表されているものを用いた (Fig.1)。

NV-F が陽性の患者が認められた場合、それが陰性の患者との間で病態に差があるか否かを検討した。

Fig.1 NF-F の遺伝子配列と nested-PCR のプライマー位置

```

1      NVF1          NVF2
gactgttggtagcaaaagcccccagcaagttggcaacccccgcctcactcagccctg
D C W W H K A P S E V G N P R R H S A L

61 caagaagccacttgcctctccacaactccccaaagtgttacttggttaccaatcggag
Q E A T C V L H N S P K L L L V Y Q S E

121 gcagccgaggggatgtnaaagaatagcaaggnaattcgcgnaagggaaggaaagag
A A E G M Y K E I A K E F A K G K G K K

181 gagagaaactaaagaagaaaaaatgctttcggattatcaggaagaaggttctccacg
E R K L K K K M L S G I T E E G S P Q

241 cagtcctctctgctcccgccctgagggagagagcagaccacaagaatgatgagcaaa
Q S S S A P G L E G E S E T T K H M S K

301 aaatccaagacatgacgaat
K F Q D M T H

```

(Chau-Ting Yeh *et al.*, JID193, 2006より)

### C. 研究結果

1) AIH では 4 名が陽性 (22.2%)、2) PBC では 4 名が陽性 (25%)、3) 肝疾患のない患者では 1 名の陽性 (1.4%) のみであった。AIH、

PBCそれぞれでNV-F陽性患者と陰性患者の間の差を検討した。性別、年齢、肝逸脱酵素(ALT)、アルブミン、血小板などを比較したがNV-Fの有無にかかわらず病態の差は認められなかった(Table.1)。

#### D. 考察

AIH など特定疾患の発症にはウイルスのような微生物が関与している可能性があることは、これまで多くの研究で報告されてきた。例えば本邦のAIHは約10%がC型肝炎感染を有していることが最新の全国集計でも示されている。今回の新しい肝炎の原因と疑われているNV-Fは、AIHやPBCとともに20%以上の合併を認められた。現段階ではNV-Fの存在は肝炎の発症の前であるか、後であるかは不明である。しかしC型肝炎の合併よりも高率でありNV-FがAIH、PBCの両疾患に関与していることが示唆される。昨年報告した遺伝子発現プロファイリング技術を用いた結果では①HTLV-1、②HBV(X)、③HPV E6、④Moloney leukemia virus、⑤MMTV、⑥Myeloblastosis virusなどから由来した遺伝子の発現が疑われたが、同方法でもNV-Fの関与が示せるかは今後の研究結果が待たれるところである。

今後は、1) まだ発表されていないNV-Fの全遺伝子配列の確認、2) NV-F抗体の同定、3) NV-F陽性者の臨床像の特徴を検討するなどが必要である。特に発症初期の患者において検討することが遺伝子発現プロファイリング技術を用いることも含めてきわめて重要であると考えられる。

#### E. 結論

自己免疫性肝炎の発症に関与するウイルスの同定のため遺伝子発現の網羅的解析を用いることを検討しているが、更なる発症初期の患者組織のサンプルが必要である。また新しい肝炎の原因であるNV-FはAIHやPBCの患者の20%以上が陽性であり、この関与が疑われた。ただしNV-F陽性患者と陰性との間で病態に大きな差は認めなかった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

Table.1. NV-F陽性患者と陰性患者における臨床背景の比較

AIH	人数	性別		年齢(才)	ALT (IU/ml)	Alb (g/dl)	血小板 ( $\times 10^9$ )
		男性	女性				
NV-F陽性	4	0	4	67.3 $\pm$ 4.5	35.8 $\pm$ 13.9	4.0 $\pm$ 0.6	21.4 $\pm$ 5.5
NV-F陰性	14	2	12	61.4 $\pm$ 10.5	28.1 $\pm$ 15.3	3.9 $\pm$ 0.6	24.3 $\pm$ 9.2
		p=0.42		p=0.30	p=0.38	p=0.79	p=0.56

PBC	人数	性別		年齢(才)	ALT (IU/ml)	Alb (g/dl)	血小板 ( $\times 10^9$ )
		男性	女性				
NV-F陽性	4	2	2	64.0 $\pm$ 10.7	24.8 $\pm$ 6.1	3.6 $\pm$ 0.8	24.1 $\pm$ 9.2
NV-F陰性	12	2	8	66.0 $\pm$ 10.6	37.0 $\pm$ 33.7	4.1 $\pm$ 0.3	20.2 $\pm$ 7.1
		p=0.41		p=0.75	p=0.50	p=0.09	p=0.42

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamada Y, Sekihara H, Omura M, Yanase T, Takayanagi R, Mune T, Yasuda K, Ishizuka T, Ueshiba H, Miyachi Y, Iwasaki T, Nakajima A, Nawata H: Changes in Serum Sex Hormone Profiles after Short-term Low-dose Administration of Dehydroepiandrosterone (DHEA) to Young and Elderly Persons. *Endocr J*, 2006 [Epub ahead of print]
- 2) Nomura S, Nakajima A, Ishimine S, Matsuishi N, Kadowaki T, Kaminishi M: Differential expression of peroxisome proliferators-activated receptor in histologically different human gastric cancer tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 25: 4438, 2006.
- 3) Schaefer CL, Takahashi H, Morales VM, Narris G, Barton S, Osawa E, Nakajima A, Saubermann, LJ: PPAR $\gamma$  inhibitors reduce tubulin protein levels by a PPAR $\gamma$  PPAR $\delta$  and proteasom-independent mechanism, resulting in cell cycle arrest, apoptosis and reduced metastasis of colorectal carcinoma cells. *Int J Cancer* 120: 702-713, 2006.

- 4) Takahashi H, Fujita K, Fujisawa T, Yonemitsu K, Tomimoto A, Ikeda I, Yoneda M, Schaefer K, Saubermann LJ, Shimamura T, Saitoh S, Tachibana M, Wada K, Nakagama H, Nakajima A: Inhibition of peroxisome proliferators-activated receptor gamma activity in esophageal carcinoma cells results in a drastic decrease of invasive properties. *Cancer Sci* 97(9):4906-4909, 2006.
- 5) Wada K, Arita M, Nakajima A, Katayama K, Kudo C, Kamisaki Y, Serhan CN: Leukotriene B4 and lipoxin A4 are regulatory signals for neural stem cell proliferation and differentiation. *FASEB J* 6:1785-1792, 2006.
- 6) Ito H, Funahashi S, Yamauchi N, Shibahara J, Midorikawa Y, Kawai S, Kinoshita Y, Watanabe A, Hippo Y, Ohtomo T, Iwanari H, Nakajima A, Makuuchi M, Fukayama M, Hirata Y, Hamakubo T, Kodama T, Tsuchiya M, Aburatani H: Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target. *Clin Cancer Res* 12(11 Pt 1): 3257-3264, 2006.
- 7) Hayashi M, Inamori M, Goto K, Akiyama T, Fujita K, Ikeda I, Fujisawa T, Takahashi H, Yoneda M, Hara K, Abe Y, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Ueno N, Nakajima A, Hamada Y, fukutomi H, Satsuta H. Blastocystis hominis infection in patient with regular dialysis. *J Gastroenterol* 41(6): 605-606, 2006.
- 8) Wada K, Nakajima A, Kazufumi K, Kudo C, Shibuya A, Kubota N, Terauchi Y, Tachibana M, Miyoshi H, Kamisaki Y, Mayumi T, Kadowaki T, Blumberg RS: Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ -mediated Regulation of Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation. *J Biol Chem* 18: 12673-12681, 2006.
- 9) Kayama H, Inamori M, Togawa J, Shimamura T, Tokita Y, Umezawa T, Sakaguchi T, Naitoh M, Nagase H, Nakajima A, Saito T, Tominaga S, Ueno N, Tanaka K, Sekihara H: Pleural Effusions following Endoscopic Injection Sclerotherapy for Cirrhotic Patients with Exophageal Varices. *Hepato-Gastroenterology* 53: 376-380, 2006.
- 10) Inamori M, Shimamura T, Nagase H, Abe Y, Umezawa T, Nakajima A, Saito T, Ueno N, Tanaka K, Sekihara H, Togawa J, Kaifu H, Tsuboi H, Kayama H, Tominaga S: mRNA Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase, Endothelial Nitric Oxide Synthase and Vascular Endothelial growth Gactor in Exophageal Mucosa Biopsy Specimens from Patients with Reflux Exophagitis *Hepat-Gastroenterology* 53: 361-365, 2006;
- 11) Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, Dohi-T: Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer* 118(9): 2232-2236, 2006.
- 12) Iwasaki T, Nakajima A, Yoneda M, Terauchi Y: Relationship between the serum concentrations of C-reactive protein and parameters of adiposity and insulin resistance in patients with type2 diabetes mellitus. *Endocr J* 53(3): 345-356, 2006.
- 13) Abe Y, Inamori M, Fujita K, Fujisawa T, Fujisawa N, Yoneda M, Takahashi H, Ikeda T, Hara K, Akiyama T, Kawamura H, Kato A, Kirikoshi H, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Sasaki T, Inayama Y, Ueno N, Nakajima A: Rectal polyp associated with schistosomiasis. *J Gastroenterol Hepatol* 21(7): 1216, 2006.
- 14) Inamori M, Ueno N, Fujita K, Fujisawa N, Yoneda M, Takahashi H, Ikeda T, Kawamura H, Abe Y, Kato A, Kirikoshi H, Kobayashi N, Shimamura T, Kubota K, Saito S, Sakaguchi T, Yamanaka S, Inayama Y, Nakajima A: Gastrointestinal metastases from malignant melanoma. *J Gastroenterol Hepatol* 21: 327, 2006.
- 15) Inamori M, Akiyama T, Akimoto K, Takahashi H, Abe Y, Nakajima A: Evaluation of postprandial 3 h pH monitoring for gastroesophageal reflux disease: is there a possibility of streamlining the 24 h test? *J*

- Gastroenterol Hepatol 21(11): 1751-1752, 2006.
- 16) Kubota K, Kakuta Y, Kawamura S, Abe Y, Inamori M, Kawamura H, Kirikoshi H, Kobayashi N, Saito S, Nakajima A: Undifferentiated spindle-cell carcinoma of the gallbladder: an immunohistochemical study. J Hepatobiliary Pancreat Surg 13(5): 468-471, 2006.
  - 17) Nagaishi T, Pao L, Lin SH, Iijima H, Kaser A, Qiao SW, Chen Z, Glickman J, Najjar SM, Nakajima A, Neel BG, Blumberg RS: SHP1 Phosphatase-Dependent T Cell Inhibition by CEACAM1 Adhesion Molecule Isoforms Immunity 209(Pt22): 4574-4579, 2006.
  - 18) Nagaishi T, Iijima H, Nakajima A, Chen D, Blumberg RS: Role of CEACAM1 as a regulator of T cells. Ann NY Acad Sci, Aug: 1072-1075, 2006.
  - Reducing Cellular Tubulin Concentration. DDW, May 2006, Los Angeles, USA.
  - 5) Kirikoshi H, Yoneda M, Fujita K, Saito S, Nakajima A: The Outcome of Combination of Transarterial Chemoembolization (TACE) and Percutaneous Ethanol Injection (PEI) Therapies for hepatocellular carcinoma (HCC). DDW, May 2006, Los Angeles, USA.
  - 6) Fujita K, Yoneda M, Endo H, Nozak Y, Kirikoshi H, Saito S, Nakajima A: Crucial Role of Extra Hepatic Derived Nitric Oxide in the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis. DDW, May 2006, Los Angeles, USA.
  - 7) Yoneda M, Fujita K, Endo H, Nozaki Y, Kirikoshi H, Saito S, Aburatani H, Nakajima A: Global Gene Expression analysis of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Compared with Nonalcohol Steatosis. DDW May 2006, Los Angeles, USA.

## 2. 学会発表

### 国際学会

- 1) Kirikoshi H, Saito S, Yoneda M, Fujita K, Akiyama T, Nakajima A: CO<sub>2</sub> US angiography is very useful in the detection and the treatment for small hepatocellular carcinoma. The Liver Meeting 2006, October 2006, Boston, USA.
- 2) Yoneda M, Fujita K, Fujisawa T, Chiba H, Mawatari H, Takahashi H, Goto A, Kirikoshi H, Yonemitsu K, Saito S, Nakajima A: Hepatitis C virus directly causes insulin resistance independent of the visceral adipose tissue area in non-obese and non-diabetic Japanese patients. The Liver Meeting 2006, October 2006, Boston, USA.
- 3) Takahashi H, Fujisawa T, Yonemitsu K, Tomimoto A, Nakajima A: Metabolic syndrome and precancerous lesions of colon cancer. Fifth Annual AACR International Conference, November 2006, Boston, USA.
- 4) Schaefer K, Takahashi H, Morales V, Nakajima A, Saubermann LJ: Inhibition of the Nuclear Transcription Factor PPAR $\gamma$  Prevents Growth of Colorectal Cancer By Directly

### 国内学会

- 1) 稲森正彦、藤澤信隆、秋山智之、池田郁子、藤澤聡郎、藤田浩司、米田正人、高橋宏和、原浩二、安崎弘晃、河村晴信、阿部泰伸、日下部明彦、桐越博之、川口義明、窪田賢輔、斉藤 聡、川名一朗、上野規男、中島 淳 : Peppermint oil 投与による胃排出能の変化について : Breath ID system を用いた連続呼気採取による評価. 第 92 回日本消化器病学会総会 (北九州) 平成 18 年 4 月
- 2) 日暮琢磨、桐越博之、藤澤信隆、米田正人、小林規俊、島村 健、窪田賢輔、阿部泰伸、河村晴信、稲森正彦、原 浩二、秋山智之、高橋宏和、藤澤聡郎、池田多聞、藤田浩司、上野規男、坂口 隆、斉藤 聡、中島 淳 : 門脈腫瘍塞栓 (Vp2) 合併進行肝細胞癌に対し、ペグインターフェロン $\alpha$ -2b (ペグイントロン) 併用 5-FU 動注科学療法が有効であった 1 例. 第 92 回日本消化器病学会総会 (北九州) 平成 18 年 4 月
- 3) 桐越博之、米田正人、小林規俊、島村健、窪田賢輔、阿部泰伸、河村晴信、稲森正彦、池田郁子、原 浩二、秋山智之、藤澤信隆、高橋宏和、藤澤聡郎、池田多聞、藤田浩司、上野規男、坂口 隆、斉藤聡、中島 淳 : (タ



- イトル?) 第 92 回日本消化器病学会総会 (北九州) 平成 18 年 4 月
- 4) 米田正人、中島 淳 前山史朗: 1 年間の栄養療法を施行した NAFLD 患者 50 例の臨床経過の検討. 第 92 回日本消化器病学会総会 (北九州) 平成 18 年 4 月
  - 5) 河村晴信、阿部泰伸、稲森正彦、藤澤聡郎、藤田浩司、池田多聞、池田郁子、秋山智之、高橋宏和、藤澤信隆、米田正人、加藤 暁、桐越博之、窪田賢輔、上野規男、斉藤 聡、中島 淳: 上部消化管出血における内視鏡的止血術後の再出血例の臨床的検討. 第 92 回日本消化器病学会総会 (北九州) 平成 18 年 4 月
  - 6) 藤田浩司 米田正人、秋山智之、池田多聞、池田郁子、藤澤聡郎、藤澤信隆、高橋宏和、原 浩二、河村晴信、加藤 暁、稲盛雅彦、阿部泰伸、桐越博之、窪田賢輔、斉藤 聡、上野規男、中島 淳: 肝外性 NO は非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 病態進展の有力因子である. 第 92 回日本消化器病学会総会 (北九州) 平成 18 年 4 月
  - 7) 谷田恵美子、窪田賢輔、池田郁子、秋山智之、藤田浩司、藤澤聡郎、高橋宏和、米田正人、原 浩二、加藤 暁、河村晴信、稲森正彦、阿部泰伸、桐越博之、斉藤 聡、上野規男、中島 淳、遠藤 格、嶋田 紘: 当院における十二指腸乳頭部腺腫に対する内視鏡的乳頭切除術の検討. 第 92 回日本消化器病学会総会 (北九州) 平成 18 年 4 月
  - 8) 高橋宏和、高山哲治、中島 淳、池田郁子、藤澤聡郎、藤田浩司、秋山智之、米田正人、稲森正彦、阿部泰伸、桐越博之、窪田賢輔、斉藤 聡、上野規男: 大腸前癌病変と生活習慣病. 第 92 回日本消化器病学会総会 (北九州) 平成 18 年 4 月
  - 9) 鈴木香峰理、窪田賢輔、池田郁子、秋山智之、藤田浩司、藤澤聡郎、高橋宏和、米田正人、原 浩二、加藤 暁、河村晴信、稲森正彦、阿部泰伸、桐越博之、斉藤 聡、上野規男、中島 淳、稲山嘉明: 複視で発症した原発不明の低分化型腺癌の一例. 第 92 回日本消化器病学会総会 (北九州) 平成 18 年 4 月
  - 10) 稲森正彦、日下部明彦、中島 淳: 胃ろう交換時における胃内留置の確認: ボタンからのアプローチの有用性について. 第 71 回日本消化器内視鏡学会総会 (東京) 平成 18 年 5 月
  - 11) 川口義明、安崎晃弘、日下部明彦、川名一朗、中島 淳: 急性消化管 GVHD の内視鏡像の検討. 第 71 回日本消化器内視鏡学会総会 (東京) 平成 18 年 5 月
  - 12) 窪田賢輔、藤澤聡郎、稲森正彦、阿部泰伸、桐越博之、斉藤 聡、中島 淳: precut を施行した選択的胆管挿管困難例の検討. 第 71 回日本消化器内視鏡学会総会 (東京) 平成 18 年 5 月
  - 13) Hiroyuki Kirikoshi, Koji Fujita, Masato Yoneda, Satoru Saito, and Atsushi Nakajima The Outcome of the Combined Trans Arterial Chemo Embolization (TACE) and Percutaneous Ethanol Injection (PEI) therapies for Hepatocellular Carcinoma (HCC). DDW 2006, May 2006, Los Angeles, USA.
  - 14) Masato Yoneda, Koji Fujita, Hiroyuki Kirikoshi, Satoru Saito, Atsushi Nakajima Hiroyuki Abratani Global Gene Expression Analysis of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) compared with nonalcohol steatosis DDW 2006, May 2006, Los Angeles, USA.
  - 15) Koji Fujita, Hiroyuki Kirikoshi, Masato Yoneda, Satoru Saito, Atsushi Nakajima Crucial role of extra hepatic derived Nitric Oxide in the development of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) DDW 2006, May 2006, Los Angeles, USA.
  - 16) 高橋宏和、高山哲治、中島 淳: 大腸前癌病変と生活習慣病. 第 65 回日本癌学会学術総会 (横浜) 平成 18 年 9 月
  - 17) 土肥多恵子、中島 淳: シンポジウム: 炎症と消化器発がん 炎症における TH2 免疫応答の偏りによる大腸炎症発癌の促進. DDW-Japan 2006 (第 14 回日本消化器関連学会週間) (札幌) 平成 18 年 10 月
  - 18) 稲森正彦、阿部泰伸、中島 淳: シンポジウム: 炎症と消化器発がん 胃炎十二指腸炎と自覚症状の対比: 症状は十二指腸に起因する? DDW-Japan 2006 (札幌) 平成 18 年 10 月

- 19) 高橋宏和、高山哲治、中島 淳：シンポジウム：消化器がん検診に有用な危険因子（H.pylori, ペプシノーゲン以外）大腸前癌病変と生活習慣病. DDW-Japan 2006（札幌）平成 18 年 10 月
- 20) 米田正人、中島 淳、前山史朗：ワークショップ 14：トランスクリプトーム・プロテオーム解析の肝疾患への応用 単純性脂肪肝患者と NASH 患者の患者の肝組織をトランスクリプトーム解析の比較し NASH に進展に関するトランスクリプトームを同定する試み. DDW-Japan 2006（札幌）平成 18 年 10 月
- 21) 窪田賢輔、藤澤聡郎、中島 淳：ワークショップ 12：自己免疫性膵炎の新局面 自己免疫性膵炎（AIP）の治療方針-IgG4 値および十二指腸乳頭部所見から. DDW-Japan 2006（札幌）平成 18 年 10 月
- 22) 秋本恵子、稲森正彦、藤田浩司、藤澤聡郎、秋山智之、池田多聞、池田郁子、高橋宏和、米田正人、安崎弘晃、原 浩二、日下部明彦、阿部泰伸、遠藤雄一、桐越博之、川口義明、窪田賢輔、斉藤 聡、川名一郎、上野規男、中島 淳：ポスターセッション 吐血を繰り返し、胃排出能の評価が臨床的に有用であった一例. DDW-Japan 2006（札幌）平成 18 年 10 月
- 23) 稲森正彦、秋本恵子、藤田浩司、藤澤聡郎、秋山智之、池田多聞、池田郁子、高橋宏和、米田正人、安崎弘晃、原 浩二、日下部明彦、阿部泰伸、桐越博之、窪田賢輔、斉藤聡、川名一郎、上野規男、中島 淳：質問紙法の簡便性に関する比較検討. DDW-Japan 2006（札幌）平成 18 年 10 月
- 24) 稲森正彦、平塚 伸、中島 淳、藤田雅巳：日本の non-erosive reflux disease 患者に対する lafutidine の効果に関する検討（pH モニタリングを用いて）. DDW-Japan 2006（札幌）平成 18 年 10 月
- 25) 桐越博之、米田正人、小林規俊、島村 健、窪田賢輔、阿部泰伸、河村晴信、稲森正彦、池田郁子、原 浩二、秋山智之、藤澤信隆、高橋宏和、藤澤聡郎、池田多聞、藤田浩司、上野規男、坂口 隆、斉藤 聡、中島 淳：経肝動脈的 CO<sub>2</sub> 造影超音波（CO<sub>2</sub>-US）を用いた、小肝細胞癌（Small HCC）に対する診断、内科的治療の有用性の検討. DDW-Japan 2006（札幌）平成 18 年 10 月
- 26) 高橋宏和、稲森正彦、野崎雄一、遠藤宏樹、富本彩子、米満恭子、秋本恵子、馬渡弘典、藤田浩司、秋山智之、藤沢聡郎、米田正人、阿部泰伸、桐越博之、窪田賢輔、坂口 隆、斉藤 聡、上野規男、中島 淳：大腸検査前処置のリスクマネージメント：腸閉塞、穿孔などの合併症は予測可能か？ DDW-Japan 2006（札幌）平成 18 年 10 月
- 27) 稲森正彦、秋本恵子、秋山智之、高橋宏和、後藤 歩、阿部泰伸、窪田賢輔、斉藤 聡、上野規男、中島 淳：食後 3 時間の pH モニタリングからみた胃食道逆流症. 第 39 回神奈川県消化器病医学会総会（横浜）平成 18 年 10 月
- 28) 米満恭子、高橋宏和、市川靖史、嶋田 紘、宇於崎宏、深山正久、油谷浩幸、児玉龍彦、伊藤行夫、相良三奈、宮澤ちひろ、中島 淳：大腸癌の新しい腫瘍マーカーシスチン SN の開発と臨床病理的検討. 第 3 回日本消化管学会総会学術集会（東京）平成 19 年 2 月
- 29) 高橋宏和、米満恭子、藤澤聡郎、富本彩子、馬渡弘典、秋本恵子、飯田 洋、秋山智之、藤田浩司、米田正人、後藤 歩、稲森正彦、阿部泰伸、桐越博之、窪田賢輔、坂口 隆、斉藤聡、上野規男、中島 淳：内臓脂肪は大腸前癌病変を増加させる. 第 3 回日本消化管学会総会学術集会（東京）平成 19 年 2 月

## 6. マイコプラズマ感染と特定疾患との関連性についての研究：

抗リン脂質抗体症候群における自己抗体とマイコプラズマの抗原交叉性、慢性呼吸器疾患と *M. amphoriforme* の関連ならびにリウマチ疾患と *M. fermentans* の関連についての検討

分担研究者 荒川 宜親 国立感染症研究所細菌第二部 部長

研究協力者 佐々木裕子（国立感染症研究所・細菌第二部）  
永田典代、原嶋綾子（国立感染症研究所・感染病理部）  
網 康至、須崎百合子（国立感染症研究所・動物管理室）  
山田耕二、三浦英靖、松田和洋（エム・バイオテック株式会社）  
有賀 正、川村信明、波多野典一（北大大学院・小児科学）  
佐々木次雄（国立感染症研究所・細菌第二部）

研究要旨 抗リン脂質抗体症候群（APS）、慢性呼吸器疾患、悪性リウマチを含むリウマチ疾患の発症機序へのマイコプラズマ感染の関与について三個のテーマについて検討した。APS については、診断基準の一つである抗カルジオリピン抗体価上昇の  $\beta 2$ -GP1 依存性に着目し、マイコプラズマ感染者血清中ならびに免疫動物血清中の IgG 抗体価を APS 診断用 ELISA にて測定した。梅毒などの細菌感染では上昇しない  $\beta 2$ -GP1 依存性抗カルジオリピン抗体価が、低～中抗体価ではあるものの陽性で、交叉抗原の存在が疑われた。慢性呼吸器疾患患者から新規に発見された *Mycoplasma amphoriforme* について、診断法開発を目指した特異抗原蛋白の解析を行い、4 個の抗原蛋白を見いだした。リウマチ疾患と *M. fermentans* の関連については、ウサギにおける感染モデル作成を行い、投与部位に肺炎（2 羽中 1 羽）および関節炎（3 羽中 2 羽）が認められた。*M. fermentans* 糖脂質 glycoglycerolipid (GGPL)-III に対する抗体価上昇も認められた。

### A. 研究の背景ならびに目的

抗リン脂質抗体症候群（APS）は、組織を問わない動脈、静脈双方における血栓症に起因する反復性血栓性静脈炎、冠動脈疾患、臓器梗塞、流産などを臨床症状とする特定疾患である。膠原病等の自己免疫疾患患者に起る続発性 APS に加え、他の基礎疾患を持たない原発性 APS が半数ほど存在する。APS の疫学からは、家族性の証拠は得られていない。検査所見としては、血液凝固因子の異常が認められ、以下の二つの所見のうちどちらかを満たす。ひとつは、ループスアンチコアグラント陽性。もうひとつは、抗カリジオリピン抗体陽性である。特に 1998 年の札幌クライテリア診断基準では、リン脂質であるカルジオリピンが結合する血中アポリポ蛋白 H 別名  $\beta 2$ -糖蛋白 1 ( $\beta 2$ -glycoprotein 1:  $\beta 2$ -GP1) 依存性を重視している。抗カリジオリ

ピン抗体は梅毒などの感染症でも上昇するが  $\beta 2$ -GP1 依存性ではないこと、抗  $\beta 2$ -GP1 抗体価は、活性化血小板におけるプロトンビネース活性や、第 Xa 因子の増加等を介して血液凝固異常を引き起こすことから、 $\beta 2$ -GP1 依存性抗カルジオリピン抗体、別名、抗カルジオリピン・ $\beta 2$ -GP1 複合体抗体の抗体価測定 ELISA 法が推奨されている。我々は、マイコプラズマ感染と抗カルジオリピン・ $\beta 2$ -GP1 複合体抗体産生の関連性を疑ったが、その理由は以下のとおりである。1) マイコプラズマは自前のゲノムに脂肪酸合成酵素を持たず、菌細胞膜の脂質二重膜の成分である脂質供給を宿主に依存している。また菌体成分には、リポ蛋白が多い、2) 肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) 感染症例で抗カルジオリピン IgG および IgM 抗体価上昇例が報告されている (Snowden N ら

1990)、3) マイコプラズマ・ペネトランス (*Mycoplasma penetrans*: 1990 年代にヒト泌尿器から発見された種) 気道感染後の原発性 APS 症例報告がある (Yané A.ら 1999)、4) ヒトを宿主とするマイコプラズマは、およそ 8 種あるが、そのうち臨床で診断可能なのは *M. pneumoniae* 1 種のみ、しかも呼吸器症状を呈した場合だけであり、その他の疾患や種では、感染の有無は不明である。これらの理由から、今回、マイコプラズマ感染者あるいは免疫動物血清中の  $\beta$ 2-GP1 依存性も含め抗カルジオリピン・ $\beta$ 2-GP1 複合体抗体を解析したので報告する。

また、マイコプラズマと特定疾患の関連について、APS に加えて以下のテーマについても検討を加えている。二番目として、2003 年にヒト下気道から発見された新種 *M. amphoriforme* (Webster, D ら, 2003) についての診断法を開発することを目的としている。マイコプラズマ感染による炎症像は、一般の細菌性肺炎の病態と異なり、呼吸器においては間質性肺炎を呈する既知の種もあることから、特発性間質性肺炎等との関連を調べる必要があり、そのためにも診断法の確立は急務である。三番目は、*M. fermentans* 感染ウサギを用いたりウマチ疾患動物モデルの解析である。炎症性関節リウマチと *M. fermentans* 感染の関連性については、すでに報告が多数なされているにもかかわらず、臨床における診断法すら確立されていない。我々は、*M. fermentans* 主要菌体成分である糖脂質 glycolipid(GGPL)-III (Matsuda K ら 1994) に注目し、感染動物モデルを用いて、診断法ならびに、関節リウマチ患者の 0.6% の方で発症する血管炎を伴い内臓における炎症へ波及する悪性関節リウマチの病態との関連について検討することを目的とした。今年度は、ウサギにおける動物モデル作成を行った。

## B. 研究方法

### 1) APS における自己抗体とマイコプラズマの抗原交叉性についての検討

*M. pneumoniae* 感染呼吸器疾患患者血清、*M. penetrans* 感染者血清、*M. hominis* 感染者を含む産褥熱患者血清ならびに健常者血清については、感染症研究用に当該研究室で保存していた検体を、個人情報との連結不可能検体であるこ

とを含めた倫理委員会による承認を得た後に用いた。陽性対照としては、抗カルジオリピン抗体が 144 unit/ml と高値を示すヒト自己抗体陽性血清 Hu Cardioliipin (IgG) Autoab (The Binding Site Ltd) を、陰性対照としては、上述のヒト自己抗体陽性抗体に付属の陰性血清に加え、30 人以上の健常人血清をプールした human sera protein (DAKO Ltd) (以下、プール血清) を用いた。マイコプラズマ免疫動物血清については、ウサギならびにマウスで作成した血清を 100 倍希釈し用いた。APS 診断基準の重要項目である  $\beta$ 2-GP1 抗体価測定には、IMMUCLONE Anti- $\beta$ 2-GP1 IgG ELISA (American Diagnostica Inc.) を、また、抗カルジオリピン・ $\beta$ 2-GP1 複合体抗体価 (IgG) 測定には、抗 CL・ $\beta$ 2-GP1 キット「ヤマサ」EIA (ヤマサ) を用い、プロトコールに従い、血清の希釈は 100 倍で測定した。免疫動物血清中の抗体価測定には、二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギあるいは抗マウス IgG 抗体 (DAKO Ltd) を ELISA 用の推奨希釈濃度で使用した。

また、抗カルジオリピン陽性自己抗体陽性抗体中にマイコプラズマ菌体成分と反応する抗体が存在するかについて、マイコプラズマ菌体成分を抗原とし、上述した陽性対照であるヒト自己抗体陽性血清を用いウエスタン、ブロット法により解析した。一部の反応蛋白を LC-MS/MS を用いたプロテオミクス (後述) により同定を試みた。

### 2) 慢性呼吸器疾患と *M. amphoriforme* の関連 —*M. amphoriforme* の診断用抗原蛋白の解析

昨年度に菌株ならびに遺伝子増幅法による遺伝子診断の国内導入を行った *M. amphoriforme* について、本年度は、マウス免疫抗体を作成し、認識抗原の同定を行った。電気泳動にて展開された *M. amphoriforme* 菌体成分を PVDF 膜に転写後、転写膜を抗 *M. amphoriforme* 抗体と反応させ抗原蛋白を解析した。LC-MS/MS を用いたプロテオミクスについては、以下の方法を用いた。すなわち、可視化された反応蛋白質のバンドは、切り取り、膜上にて還元、アルキル化処理の後、トリプシン消化を施し、反応液中に存在するペプチドについて、LC-MS (LCQ-DECA XP, Thermo electron)