

にて質量解析を行い、MS/MS 解析により得られたピークデータを、既知のゲノム配列情報由来の予想アミノ酸配列データベースと照合し、スコア化された情報をもとに蛋白質の同定を試みた。既知の蛋白情報にはヒットしない蛋白については、*M. amphoriforme* の全ゲノム配列が未解析の為、MS/MS ピークからの De Novo アミノ酸配列予測を行った。

3) リウマチ疾患と *M. fermentans* の関連—*M. fermentans* 感染ウサギによるリウマチ性疾患動物モデルの開発

ウサギ (NZ/W) 体重 2kg サイズの 5 頭に麻酔下において *M. fermentans* ヒトの呼吸器由来 M64 株新鮮培養菌 10^9 CFU を感染させた。感染ルートは 2 羽が気道内、3 羽が後肢膝蓋関節腔内に接種し、関節については、同一個体の左脚に菌液を、また、右足にマイコプラズマ培養用の培地のみを接種し陰性対照とした。経時的に採血を行い、*M. fermentans* 特異的糖脂質 GGPL-III に対する抗体価測定ならびにリウマチ疾患の際に血中値が上昇する炎症反応のマーカーである CRP の測定を行い、感染後 4 週目に剖検を行い、脳を除く全身主要臓器ならびに関節についての病理学的検査を行った。

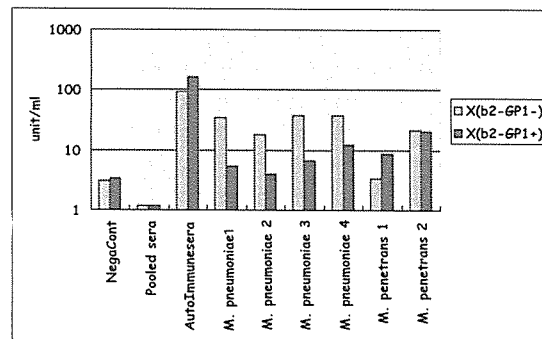
C. 研究結果

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

抗 β 2-GP1 抗体価測定の結果、健常者群 20 名に比べ、*M. pneumoniae* 感染呼吸器疾患患者群 20 名の血清中には、弱い抗体価上昇が見られた (arbitrary unit 健常者群平均 1.1 に対し、*M. pneumoniae* 群平均 3.0 で、 p 値=0.0192)。例数が少なく統計処理が不可能ではあるが 2 例の *M. penetrans* 感染者血清群平均は 7.9 を示した。産褥熱患者群平均は 2.0 で有意性は無かった。自己抗体陽性対照血清における抗体価は 44.7 と高く、陰性対照では 0.0 ならびにプール血清では 1.5 といずれも低値を示した。抗 β 2-GP1 抗体価のみでは、APS 診断基準を満たさないことから、次ぎに札幌クライテリアで重視された、 β 2-GP1 依存性抗カルジオリピン抗体価を測定した。抗 β 2-GP1 抗体価の比較的高かった 4 名の *M. pneumoniae* 感染者ならびに 2 名の *M. penetrans* 感染者の血清を用い、 β 2-GP1

依存性を区別した抗カルジオリピン抗体価を調べた結果を表 1 ならび図 1 に示す。 β 2-GP1 非依存は、抗カルジオリピン抗体価を示し、 β 2-GP1 依存は、ELISA 反応前にカルジオリピンのコートされた well に β 2-GP1 をあらかじめ入れた後に血清を加える、抗カルジオリピン・ β 2-GP1 複合体抗体価を示している。陽性対照血清については、 β 2-GP1 非依存抗体価 91.1 unit/ml、 β 2-GP1 依存抗体価 160.8 unit/ml と高値であり、複合体に対する抗体価が高い。マイコプラズマ感染者においては、使用した測定キットの基準では、カットオフ値が 3.5 unit/ml に設定されている為、供試した 6 名全てが複合体に対する抗体価が 3.5 unit/ml 以上で陽性ということになった。

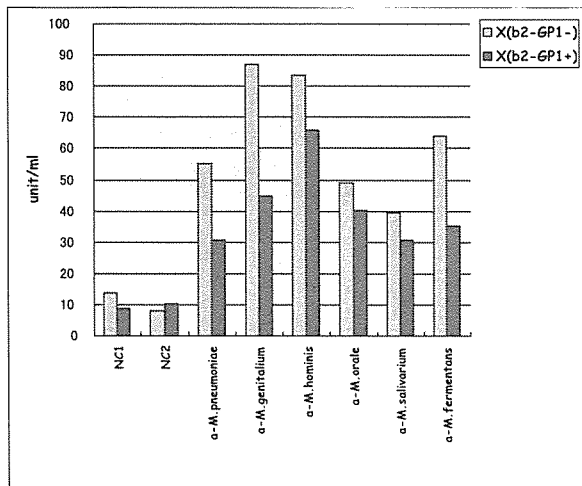
図 1. マイコプラズマ感染者血清中の抗カルジオリピン・ β 2-糖蛋白 (β 2-GP1) 複合体抗体価



ここまでの結果から、マイコプラズマ感染者においては、抗カルジオリピン抗体価の若干の上昇があることが示唆されたことから、ヒト由来マイコプラズマ数種の免疫血清における抗カルジオリピン・ β 2-GP1 抗体価の測定を行った (図 2)。結果は、非免疫ウサギやマウスにおいては、 β 2-GP1 依存、非依存にかかわらず、抗カルジオリピン抗体価上昇は低い値を示した (10 unit/ml 以下) のに対し、マイコプラズマ免疫動物血清中には、抗カルジオリピン・ β 2-GP1 複合体抗体も含め 30 から 70 unit/ml と中程度の抗体価が観察された。今回の解析では、ヒト由来種である *M. pneumoniae*, *M. penetrans*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. orale* ならびに *M. salivarium* 免疫血清において抗カルジオリピン・ β 2-GP1 複合体抗体価上昇が示唆され、これらマイコプラズマ種に共通した菌体成分が抗カルジオリピン・ β 2-GP1 複合体と抗原性に類似があるのではないかと疑われた。

一方、自己抗体陽性対照血清中のマイコプラズマ菌体成分認識抗体についてのウエスタン、ブロッティング解析では、ヒト由来マイコプラズマ3種 (*M. pneumoniae*, *M. penetrans* ならびに *M. fermentans*) において菌体と反応した。*M. pneumoniae* の抗原蛋白である付着蛋白 P1 や、DnaK、*M. fermentans* の 50 kDa 蛋白等に反応し、感染による抗 *M. pneumoniae* や、抗 *M. fermentans* 抗体が血清中に存在すると考えられた。比べて、*M. penetrans* のリポ蛋白画分ならびに全菌体成分との反応は、約 20-35kDa あたりに境界が不鮮明な陽性反応があり、一般に *M. penetrans* 感染者抗体で見られる約 35-40 kDa の P35 リポ蛋白群への反応とは異なり、非蛋白性の菌体成分と反応している可能性も考えられた。

A.



B.

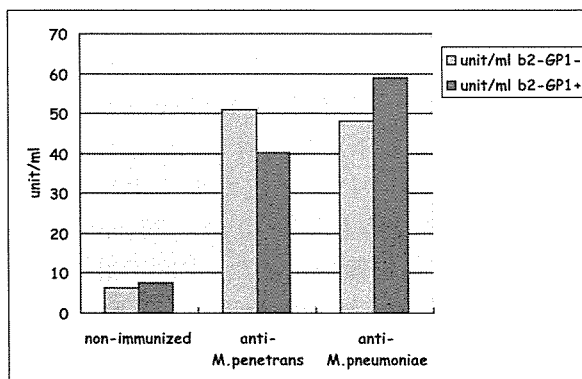


図2. マイコプラズマ免疫血清中の抗カリジオリピン・β2-糖蛋白(β2-GP1)複合体抗体価
免疫ウサギ血清(A)ならびに免疫マウス血清(B)

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

抗 *M. amphoriforme* 免疫マウス抗体が認識した *M. amphoriforme* 抗原蛋白は、以下の分子量の5つの蛋白であった。約 120kDa、約 70kDa、約 55kDa、約 35kDa、約 30kDa。そのうち、約 70kDa 蛋白は、*M. pneumoniae* の菌体成分とも反応したことや、プロテオミクス解析の結果からシャペロン蛋白である DnaK 蛋白である可能性が高かったことから、診断用抗原候補からはずされた。残り4個の抗原蛋白については、既知のデータベースにおいて高いホモロジーを有するものが無いことから、MS/MS ピークから直接アミノ酸配列を予測する De Novo 解析を行い、候補となるアミノ酸配列を得た。慢性呼吸器疾患患者の咽頭スワブからの菌分離ならびに遺伝子検出については、今年度、新たに4検体を追加検討したが、陽性結果を得られなかった。

3) リウマチ疾患と *M. fermentans* の関連—*M. fermentans* 感染ウサギによるリウマチ疾患動物モデルの開発

M. fermentans 感染ウサギにおいて、経気道感染2羽中1羽で肺炎像が、また経膝蓋関節腔感染3羽中2羽(うち1羽は炎症は弱い)で関節炎像(図3)が観察された。経気道感染群においては、関節炎は観察されなかった。その他、全身主要臓器の所見に顕著な異常はなかった。肺炎についての所見としては、肺野における巣状の細胞浸潤が見られ、主に組織球で充満していた。一部の気管支において気管支上皮の肥厚が認められ、上皮間には偽好酸球と思われる細胞の浸潤が認められた。頻度は少ないものの、一部の小動脈の中膜と内膜の肥厚、浮腫が見られたが肺炎との関連は不明である。関節炎についての所見としては、関節包に存在する滑膜の表層細胞層においてリンパ球、形質細胞の集属と繊維性増殖、水腫が観察された。これらの炎症反応は、一部の繊維層に波及していた。さらに、血中の *M. fermentans* 糖脂質 GGPL-III に対する抗体価上昇は、感染後3日から見られ、7日をピークとした。比較的強い関節炎像が観察された個体においては、GGPL-III に対する抗体価は低く、また、炎症反応の指標の一つである末梢血における CRP 値が上昇していた。この

ことから、今回のウサギモデルにおいては、肺炎ならびに関節炎の病理学的解析が可能であり、血中 CRP は経時的採血の際の関節炎の指標になり得ることが示唆された。マイコプラズマの検索については、今後、糖脂質 GGPL-III に対する抗体を用いた免疫染色を行う。

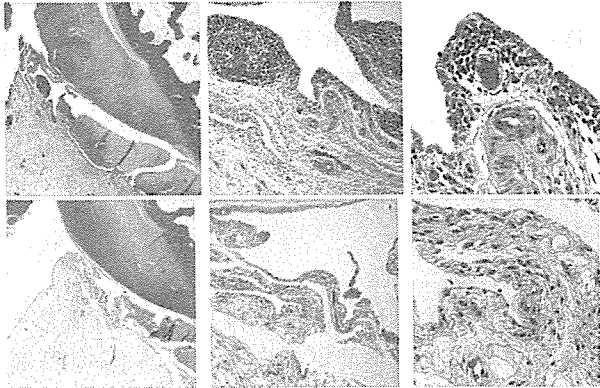


図 3. *M. fermentans* 感染ウサギの膝関節の病理像
 上段: 左から A, B, C; 下段: 左から D, E, F
 前後十字靭帯の交差する部分で大腿骨頭を含んだ骨組織標本で、経膝蓋関節腔感染個体の左膝蓋関節(A-C、関節炎を認める)ならびに経気道感染個体の左膝蓋関節(D-E、関節炎を認めない)

D. 考 察

APS 症例において抗体が作成されるリン脂質は単一ではないが、今回検討を加えた診断基準の一つであるカルジオリピンは、自然界においては、細菌における生体膜を構成するリン脂質であり、ヒトにおいては、ミトコンドリア内膜に局在する。ヒト細胞がアポトーシスを起こす際には、ミトコンドリアへのチトクローム c の細胞質への遊離が細胞傷害に先立ち起ることがわかっているが、カリジオリピンは、チトクローム c をはじめとするミトコンドリア蛋白と結合することから細胞のアポトーシスとの関連が示唆されている。APS におけるカルジオリピンの供給がヒト細胞のミトコンドリアなのか、あるいは細菌の場合があるのかについての結論は、出ていないと理解している。一方、APS における抗カリジオリピン抗体は、リン脂質と結合するリポ蛋白である $\beta 2$ -GP1 との複合体であることが血液凝固異常にとって重要である。梅毒トレポネーマを含む細菌カリジオリピンに由来する抗カリジオリピン抗体の場合には、 $\beta 2$ -GP1 依存性は無いという前提で診断

クライテリアが作成されたと考えられる。今回、マイコプラズマという栄養要求性が一般細菌とは異なり、脂質合成を宿主に依存しているグループに着目し抗カリジオリピン・ $\beta 2$ -GP1 複合体抗体を測定した結果、 $\beta 2$ -GP1 依存性が無いとは言いきれず、特に免疫血清の解析からは、むしろ、診断用 ELISA に反応するマイコプラズマ菌体成分が存在する可能性が示唆された。免疫動物血清において抗カリジオリピン抗体価が高いことに関しては、マイコプラズマの培養において、脂質供給源として馬血清を使用していることによる影響が無いとはいえないが、言い換えれば、ヒト体内で増殖中のマイコプラズマがヒト由来の脂質を利用していることと抗リン脂質抗体との関連をも疑うべき根拠となりうる。しかしながら、リポ蛋白である $\beta 2$ -GP1 については、抗原交叉性が、マイコプラズマ蛋白に由来するものか、あるいは、マイコプラズマのリポ蛋白がヒト血清中のカリジオリピンに結合する性質があるか、少なくとも二つの可能性が考えられる。 $\beta 2$ -GP1 の蛋白構造ならびにリン脂質結合領域については、以下のことがわかっている。すなわち、 $\beta 2$ -GP1 (326 アミノ酸) は、5つのドメインからなり、リン脂質がドメイン 5 に結合することにより、隠れていたエピトープが現れる。リン脂質結合に必須な配列は、316 番目の Trp に加えて、CKNKEKKC のモチーフにある。 $\beta 2$ -GP1 の配列を我々が解析した *M. penetrans* ゲノム配列と比較したところ、リン脂質結合モチーフ中の KNKEKK と完全一致するアミノ酸配列が *M. penetrans* 遺伝子 MYPE4450 という予測分子量 18kDa の機能未知遺伝子の N 末近くに見つかる。報告されている *M. penetrans* 感染後原発 APS 患者における抗カリジオリピン抗体価は、100 GPL units と高く、4 ヶ月後から 12 ヶ月後においても維持されていることから、本研究班においても、APS 患者における *M. penetrans* 感染についても検討を加えていく予定である。一方で、肺炎マイコプラズマ (*M. pneumoniae*) 感染者における抗カリジオリピン・ $\beta 2$ -GP1 複合体抗体の抗体価は、今回調べた 20 例ではカットオフ値より高いものの高抗体価ではなく、当然ながら、APS 診断のクライテリアを満たす症例は無いと考えられる。これまでに報告されて

いる肺炎マイコプラズマ感染者における抗カルジオリピン IgG, IgM 抗体価上昇は、重症肺炎患者、寒冷凝集反応陽性者あるいは、肺外病変を有する患者で見られている。今回の解析に用いた自己抗体陽性対照血清が *M. pneumoniae* を含む数種のマイコプラズマ菌体成分と反応したことについては、ヒト血清中には病態とは無関係の抗体も存在することから、今の段階では、自己抗体と関連づけることは出来ない。今後、臨床との共同研究により、*M. pneumoniae* 感染者の病態と β 2-GP1 依存性の関連や、APS 患者血清が認識するマイコプラズマ共通抗原について解析する必要があると考えられた。

二番目のテーマである慢性呼吸器疾患と *M. amphoriforme* との関連性については、本年度は、4 個の抗原蛋白候補を見いだすという基礎的解析にとどまり、継続中の慢性呼吸器疾患患者からの菌分離ならびに遺伝子検出では陽性結果を得られなかった。例数がいまだ少ないことから、国内における本菌の分離を含め、臨床との共同研究を継続していきたい。イギリスにおける *M. amphoriforme* 感染症例においては、肺炎マイコプラズマの治療に用いられるマクロライド系抗菌薬による除菌はできず、動物用抗菌剤の使用により菌数の減少が見られ、菌数減少に伴い慢性呼吸器疾患における痰の量が激減したことから、病態との関連が疑われているがいまだ不明な点の多い種である。診断法確立の今後の手順としては、特異抗原候補の遺伝子同定へと進めていくことで、血清診断に加えて遺伝子診断法においても既知の 16S rRNA 遺伝子による遺伝子増幅法に加えて、特異遺伝子を用いた新たな展開を目指している。

最後に三番目のテーマであるリウマチ疾患と *M. fermentans* についての動物モデル作成については、ウサギにおける肺炎ならびに関節炎の形成に成功したが、感染例全てに病変を起こすことはできなかったことから、今後、反復感染も含めて発症率の向上をめざす。一般にマイコプラズマは宿主特異性が強く、ヒト由来マイコプラズマの動物モデル開発には困難があるが、今回のウサギにおいては、炎症像もリンパ球を主体とするマイコプラズマの自然宿主への自然感染で見られる像に類似した所見が得られている。今後、*M. fermentans* 特異的糖脂質

GGPL-III の局在等を明らかにしていく予定である。以前、我々が行った *M. fermentans* のカニクイザルへの静脈内投与実験においては、軽度ではあるが脾臓における静脈炎（リンパ球、形質細胞の内皮細胞下への浸潤）ならびに腎糸球体ボウマン嚢メサンギウム領域における細胞増生に加え、病変部である血管内皮や腎糸球体への *M. fermentans* 菌体局在が観察されている。悪性関節リウマチにおいては、血管炎が病態との深い関わりを有していることから、血管炎についても注目して解析をおこなう必要があると考えている。

E. 結 論

抗カリジオリピン抗体陽性を示す APS 診断基準に重要なアポリポ蛋白 H、別名 β 2-GP1 依存性について、マイコプラズマ感染者血清ならびに免疫動物血清における IgG 抗体価測定を行った。結果、これらの血清においては、抗体価は低～中程度であるものの β 2-GP1 依存性抗カリジオリピン抗体が存在することを示唆するものであった。二番目のテーマとしてヒトの下気道に感染する *M. amphoriforme* についての診断用特異抗原の解析を行い 4 個の候補蛋白を得た。三番目のテーマとしてリウマチ疾患と *M. fermentans* の関連についての過去に報告された疫学調査における陽性報告を受けて、ウサギにおける感染動物モデル作成を試み、投与部位における肺炎ならびに関節炎形成を観察した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) Snowden N, Wilson PB, Longson M, Pumphrey RS: Antiphospholipid antibodies and *Mycoplasma pneumoniae* infection. Postgrad Med J 66(775): 356-362, 1990.

- 2) Yanéz A, Cedillo L, Neyrolles O, Alonso E, Prévost M-C, Rojas J, Watson HL, Blanchard A, Cassell G.H: *Mycoplasma penetrans* bacteremia and primary antiphospholipid syndrome. *Emerg. Infect Dis* 5: 164-167, 1999.
- 3) Webster D, Windsor H, Ling C, Windsor D, Pitcher D: Chronic bronchitis in immunocompromised patients: association with a novel *Mycoplasma* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 530-534, 2003.
- 4) Pitcher DG., Windsor D, Windsor H, Bradbury JM, Yavari C, Jensen JS, Ling C, Webster D: *Mycoplasma amphoriforme* sp. nov., isolated from a patient with chronic bronchopneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2589-2594, 2005.
- 5) Matsuda K, Kasama T, Ishizuka I, Handa S, Yamamoto N, Taki T: Structure of a novel phosphocholine-containing glycoacylcerolipid from *Mycoplasma fermentans*. *J Biol Chem* 269(52): 33123-33128, 1994.

Table 1. マイコプラズマ感染者ならびに免疫血清中の抗カルジオリピン・ β 2-GP1複合体抗体価

	unit/ml	unit/ml
カット、オフ値(ヒト)	3.5	3.5
マイコプラズマ感染者血清	β 2-GP1非依存	β 2-GP1依存
Negative sera	3.1	3.4
Pooled sera	1.2	1.2
aCL-positive autoantibody	91.1	160.8
<i>M. pneumoniae</i> 感染者1	34.3	5.5
<i>M. pneumoniae</i> 感染者2	17.8	3.9
<i>M. pneumoniae</i> 感染者3	38.1	6.8
<i>M. pneumoniae</i> 感染者4	37.9	12.3
<i>M. penetrans</i> 感染者1	3.4	8.8
<i>M. penetrans</i> 感染者2	21.7	20.6

免疫血清		
非免疫ウサギ血清1	13.9	8.9
非免疫ウサギ血清2	8.0	10.3
抗 <i>M. pneumoniae</i> ウサギ血清	55.1	30.6
抗 <i>M. genitalium</i> ウサギ血清	87.1	45.0
抗 <i>M. hominis</i> ウサギ血清	83.6	65.9
抗 <i>M. orale</i> ウサギ血清	49.0	4.0
抗 <i>M. salivarium</i> ウサギ血清	39.3	30.7
抗 <i>M. fermentans</i> ウサギ血清	64.1	35.1

非免疫マウス血清	6.4	7.6
抗 <i>M. penetrans</i> マウス血清	51.1	40.2
抗 <i>M. pneumoniae</i> マウス血清	48.3	58.8

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 助教授

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 ギラン・バレー症候群（GBS）の臨床亜型（ビッカースタッフ脳幹脳炎、急性口咽頭筋麻痺、急性外眼筋麻痺、失調型 GBS）を惹き起こす *Campylobacter jejuni* の特徴を明らかにする。各亜型患者の糞便から分離された菌株（各 1-3 株）を用いて、血清型、リポオリゴ糖(LOS)合成酵素遺伝子座（クラス A~F）、*cst-II* 遺伝子多型（Thr/Asn51）、LOS 上ガングリオシド・エピトープを検討した。分離株の多くは、血清型 HS:2/HS:4-complex で、クラス A/B LOS 合成酵素遺伝子座と *cst-II*（Asn51）を有していた。抗体プローブ法で LOS 上に GQ1b エピトープを検出した。質量分析で、ビッカースタッフ脳幹脳炎および急性外眼筋麻痺患者からの分離株に、GD1c 様 LOS を検出した。これら亜型症例において、分離菌株 LOS はそれぞれの患者血清 IgG と強い反応性を示したのに対し、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）症例においては、菌体 LOS と患者血中 IgG/IgM との反応性はみられなかった。今回検討した GBS 亜型分離菌株は、従来から報告されているフィッシャー症候群分離株と同様の特徴を示した。先行感染の観点からは、これら GBS 亜型の発症機序はフィッシャー症候群と同様である。CIDP 患者からも本菌が分離培養されたが、少なくとも LOS における分子相同性の観点からは、これらの症例における本菌の関与は否定的と考えられた。

A. 研究目的

各種細菌の全ゲノムが解読されていることを受け、ギラン・バレー症候群（GBS）を惹き起こしやすい *Campylobacter jejuni* の特徴が次第に明らかにされている。つまり、ガングリオシド様構造の生合成に関わる糖転移酵素遺伝子がすべて揃っていることにより、GM1/GD1a 様リポオリゴ糖（LOS）が菌体表面に発現し、GBS 発症のリスクを高めていると考えられる。

GBS には外眼筋麻痺を主徴とするフィッシャー症候群（FS）をはじめ、中枢神経障害を伴うビッカースタッフ脳幹脳炎（BBE）など様々な臨床亜型が存在する。これらの臨床亜型の発症前に *C. jejuni* 腸炎が先行しえることが報告されているが、FS 以外の GBS 亜型と本菌感染との因果関係は明らかにされていない。以前、本研究班において、シアル酸転移酵素遺伝子である *cst-II* 遺伝子の多型が Asn51 型であること

で、シアル酸転移酵素の器質特異性が変わり GQ1b エピトープの合成が促され、フィッシャー症候群（FS）を惹き起こしやすくなることを報告した。今回、FS 以外の GBS 亜型をきたしやすい菌の特徴を明らかにすべく、検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象：GBS・FS 以外の各種神経疾患の患者糞便より分離・保存された *C. jejuni* 8 株（BBE [N=3]、急性口咽頭筋麻痺[AOP; N=2]、急性外眼筋麻痺[AO]/失調型 GBS/慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー[CIDP][各 N=1]）を用いた。

2) 菌 LOS と患者血清との反応性：各症例の血清中 IgG/IgM と分離菌 LOS との反応性を、TLC 免疫染色で検討した。

3) 菌の分析: Penner 血清型別は受身赤血球凝集反応、LOS 合成酵素遺伝子座同定 (クラス A ~ F) は PCR 法、*cst-II* 遺伝子多型分析 (Thr/Asn51) はダイレクト・シークエンシング法、LOS 上ガングリオシド・エピトープ分析 (GM1/GD1a/GQ1b) は、各ガングリオシドに特異的に反応する患者血清を用いた TLC 免疫染色により行った。

4) 質量分析: BBE および AO 各 1 株について、CE-ESI-MS 法により LOS 上のガングリオシド構造を決定した (Gilbert 博士 [National Research Council Canada] に依頼)。

(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) BBE/AOP/AO/失調型 GBS 分離株の LOS は、各患者血清 IgG と強く反応したが、CIDP 分離株は IgG/IgM いずれとも反応しなかった。

2) BBE/AOP/AO/失調型 GBS 分離株の多くは、血清型 HS:2/HS:4-complex、LOS 合成酵素遺伝子座はクラス A/B、*cst-II* 遺伝子は Asn51 型であり、LOS 上に GQ1b エピトープを検出した (Table)。

3) 質量分析にて、BBE 株 (GC124)、AO 株 (GC057) の LOS の糖鎖構造は、GD1c と類似することがわかった。

D. 考察

BBE/AOP/AO/失調型 GBS 分離株は、いずれも LOS とそれぞれの患者血清 IgG との間に強い反応性がみられた。この所見は、菌体 LOS がトリガーとなり患者血中に IgG 抗ガングリオシド抗体の産生を誘導したことを示唆する。GBS と同様にこれらの GBS 亜型の発症に、菌体成分とヒト生体組織との間の分子相同性の存在が重要であると考えられる。さらに、今回明らかとなった BBE/AOP/AO/失調型 GBS 分離株の特徴は、いずれも FS 分離株の特徴と一致していた。先行感染病原体の観点からは、これらの GBS 亜型の発症機序は FS と同様であり、多様な臨床像は患者側因子により決定されると推測される。

CIDP 患者からも本菌が分離されたが、菌 LOS と患者血清 IgG/IgM との反応性はみられず、少なくとも LOS における分子相同性の観点からは、CIDP 症例における本菌の関与は否定的と考えられた。

E. 結論

GBS の亜型である BBE、AOP、AO、失調型 GBS の発症機序は FS と同様である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table Bacterial characteristics of *Campylobacter jejuni* isolates

Isolate	Patient	Patients' diagnosis	Serotype	LOS locus class	<i>cst-II</i> genotype	Ganglioside mimic on LOS		
						GM1	GD1a	GQ1b
GC078	1	BBE	HS:4-complex	B	Asn51	-	-	-
GC124	2	BBE	HS:2	A	Asn51	-	-	+
GC159	3	BBE	HS:4-complex	B	Asn51	-	-	+
GC183	4	acute oropharyngeal palsy	HS:4-complex	A	Asn51	-	-	+
GC229	5	acute oropharyngeal palsy	HS:2	B	Thr51	-	-	-
GC057	6	acute ophthalmoparesis	HS:2	B	Asn51	-	-	+
GC216	7	ataxic GBS	Untypeable	A	Asn51	-	-	+
GBS ^a			HS:19 (67%)	A or B (85%)	Thr51 (64%)	70%	60%	16%
FS ^a			HS:2 or HS:4-complex (78%)	A or B (84%)	Asn51 (70%)	20%	10%	70%

^a Serotype data from Takahashi et al. (*J Clin Microbiol* 2005). LOS locus classification data from Koga et al. (*J Infect Dis* 2006). *cst-II* genotype data from Koga et al. (*Neurology* 2005). and ganglioside mimicking LOS data from Koga et al. (*Neurology* 2005).

BBE. Bickerstaff's brainstem encephalitis; GBS, Guillain-Barré syndrome. FS. Fisher syndrome; LOS, lipo-oligosaccharide.

8. 難治性気道感染症における細菌感染

—Nontypeable *Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィルムに対する 抗生物質の抑制効果に関する研究—

分担研究者 渡邊 浩 久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門

研究協力者 加地千春、渡辺貴和雄（長崎大熱医研・感染症予防治療分野）

研究要旨 Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) が産生したバイオフィルムに対する各種抗生物質の抑制効果について β -lactamase-negative ampicillin-susceptible (BLNAS) 株及び β -lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR) 株の間で比較検討した。Biofilm production assay において、マイクロプレートで NTHi を 4 時間培養後に ampicillin, cefaclor 及び clarithromycin をそれぞれ 1 時間加えた場合、BLNAR 株では BLNAS 株に比べ、いずれにおいても低濃度の抗生物質の存在下でバイオフィルムの産生が高まる傾向がみられた。また NTHi を 2 日間培養後に各種抗生物質を繰り返し加えた場合、ampicillin や cefaclor では薬剤の濃度を上げて BLNAS 株、BLNAR 株ともに NTHi が産生するバイオフィルムの抑制効果はみられなかったが、erythromycin や levofloxacin ではいずれの株においても濃度依存性のバイオフィルムの抑制効果が認められた。

A. 研究目的

近年、人に中耳炎や下気道感染症を引き起こし、びまん性汎細気管支炎の増悪にも関わることがある Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) がバイオフィルムを産生するという報告がなされるようになった。最近、本邦では β -lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR) 株の増加に伴い、特に小児の難治性中耳炎症例が増え、臨床上の問題となっている。我々は、NTHi が産生したバイオフィルムに対する抗生物質の抑制効果について基礎的研究を行った。

B. 研究方法

バイオフィルム産生能をもつことが確認された β -lactamase-negative ampicillin-susceptible (BLNAS) 株及び BLNAR 株を 96 穴マイクロプレートに接種し、in vitro でバイオフィルムを産生させ、その後経時的に各種抗生物質 (ampicillin (ABPC), cefaclor (CCL), erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), levofloxacin (LVFX)) を添加し、biofilm production assay を行うことにより各種抗生物質のバイオフィルムに対する効果について比較検討した。

1. NTHi (BLNAS and BLNAR) を 0, 1, 4, 24 時間及び 2 日間培養後に各種抗生物質 (ABPC, CCL, CAM) をそれぞれ 0.01MIC, 0.1MIC, 1MIC, 10MIC の濃度で 1 時間加えた後、それぞれのバイオフィルム産生を biofilm production assay で測定した。
2. NTHi (BLNAS and BLNAR) を 2 日間培養後に各種抗生物質 (ABPC, CCL, EM, LVFX) をそれぞれ 0.01MIC, 0.1MIC, 1MIC, 10MIC の濃度で 1 時間加えた後、抗生物質を除去し、medium 交換を行うという作業を 12 時間おきに 4 回繰り返した後、それぞれのバイオフィルム産生を biofilm production assay で測定した。

C. 研究結果

マイクロプレートで NTHi を 4 時間培養後 ABPC, CCL, CAM それぞれ 1 時間加えた場合、BLNAS 株ではいずれの薬剤でもコントロールに比較してバイオフィルム産生は低かったが、BLNAR 株ではいずれの抗生物質存在下でもコントロールに比較してバイオフィルム産生は高く、かつ低濃度の抗生物質の存在下でバイオフィルムの産生が高まる傾向がみられた (図 1)。

NTHiを2日間培養後にABPC, CCL, EM, LVFXを繰り返し加えた場合、ABPCやCCLでは薬剤の濃度を上げててもBLNAS, BLNARともにNTHiが産生するバイオフィルムの抑制効果はみられなかったが、EMやLVFXでは濃度依存性のバイオフィルムの抑制効果が認められた(図2, 3)。

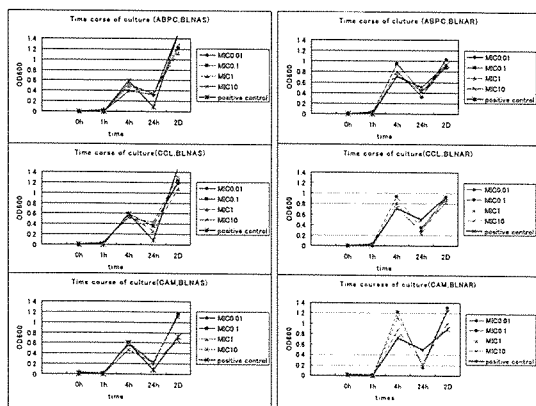


図1. Biofilm change after one dose antibiotics administration

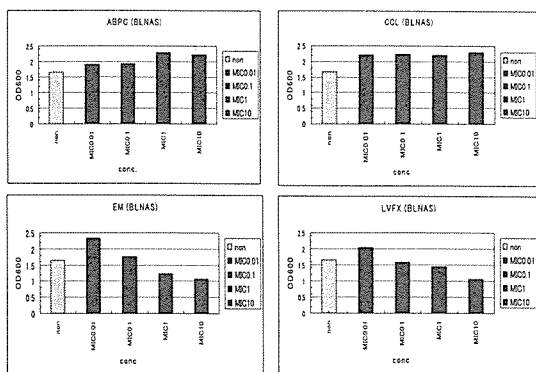


図2. BLNAS株が産生するバイオフィルムに対する抗生物質の抑制効果

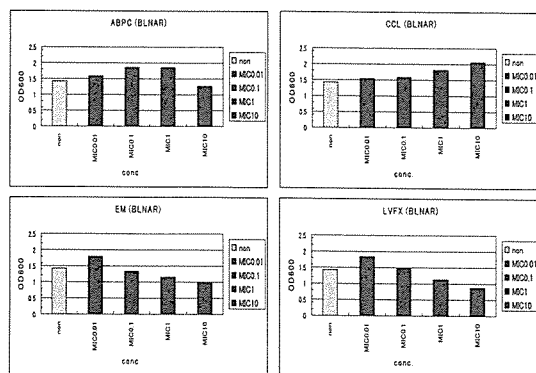


図3. BLNAR株が産生するバイオフィルムに対する抗生物質の抑制効果

D. 結論および考察

ペニシリン剤やセフェム剤などにはNTHiが産生するバイオフィルムの抑制効果はみられず、マクロライド剤やキノロン剤には薬剤耐性、感受性に関係なくNTHiが産生するバイオフィルムの抑制効果があることが示唆された。今後、この抑制効果を生かした投与方法を検討することが重要と考えられる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyama J, Ahmed K, Zhao J, Saito M, Onizuka S, Oma K, Watanabe K, Watanabe H, Oishi K: Strain-specific pulmonary defense achieved after repeated airway immunizations with non-typeable *Haemophilus influenzae* in a mouse model. *Tohoku J Exp Med.* (in press)
- 2) Qin L, Watanabe H, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Mizota T, Nagatake T: Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with respiratory tract infections between 1987 and 2000, including β -lactamase-negative ampicillin-resistant strains. *Epidemiol Infect* 6: 1-4, 2006.
- 3) Kurita S, Koyama J, Onizuka S, Motomura K, Watanabe H, Watanabe K, Senba M, Apicella MA, Murphy TF, Matsushima K, Nagatake T, Oishi K: Dynamics of dendritic cell migration and the subsequent induction of protective immunity in the lung after repeated airway challenges by nontypeable *Haemophilus influenzae* outer membrane protein. *Vaccine* 24: 5896-5903, 2006.
- 4) Qin L, Watanabe H, Yoshimine H, Guio H, Watanabe K, Kawakami K, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Kudoh S, Shimada K, Matsumoto K, Nagatake T, Mizota T, Oishi K: Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with community-

acquired pneumonia and molecular analysis of multidrug-resistant serotype 19F and 23F pneumococci in Japan. *Epidemiol Infect* 2: 1-7, 2006.

- 5) 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* 11: 429-436, 2006.
- 6) Masaki H, Nagatake T, Asoh N, Yoshimine H, Watanabe K, Watanabe H, Oishi K, Rikitomi N, Matsumoto K: Significant reduction of nosocomial pneumonia after introduction of disinfection of upper airways using povidone-iodine in geriatric wards. *Dermatology* 212;suppl 1: 92-96, 2006.

2. 学会発表

- 1) 渡邊 浩：薬剤耐性菌による市中呼吸器感染症の現状. 第 55 回日本感染症学会東日本地方会総会・第 53 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会教育セミナー（東京）2006 年 4 月
- 2) Watanabe H: Symposium, Travel associated infections-Travel clinic in Japan. 10th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Dec 2006, Fukuoka, Japan.

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 室長

研究協力者 楠 進、宮本勝一（近畿大学 医学部 神経内科）

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明らかにするために、ライム病ボレリア組換え抗原を用いた Western blotting 法により、MS 患者における抗ライム病抗体検索をおこなった。近畿大学より分与頂いた MS 患者 21 例中、抗ライム病 IgG 抗体陽性例は 2 例 (9.5%) であった。この結果は 1993 年に米国で行われた血清疫学調査結果(陽性率=6.7%) に近似する一方、欧州での調査結果 (陽性率=14.2-38.5%) より低値であった。本法による偽陽性は、抗体検査法の事前評価によってほぼ否定されている一方、ペア血清による調査では顕著な抗体変動は見られなかったことから、MS 患者ではライム病ボレリアに交差性のある何らかの抗原に対して持続的に抗体産生がなされている可能性が考えられた。本研究で見出されたボレリア抗原と交差性を示す抗原の起源については、現時点で不明である。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) は中枢神経系の脱髄疾患であり、難病に指定されている重要な疾患の一つである。MS は欧米の白人に多く、北欧では人口 10 万人あたり 50-100 人程度の患者が報告されている。わが国では比較的まれな疾患で、患者数は 10 万人あたり 1~5 人程度とされていたが、最近の各地での疫学調査や全国臨床疫学調査などにより、わが国全体で約 1 万人、人口 10 万人あたり 8~9 人程度と推定されるようになった。ヒトは微生物感染など外敵からの攻撃から免疫系によって自身の体を防御している。一方でこの免疫系が何らかの要因で自己を攻撃するようになる。これを自己免疫疾患と呼ぶ。MS は髄鞘ミエリンに対する自己免疫疾患として位置づけられているが、なぜこのような自己抗体が体内で産生されるかについては明確な答えは得られていない。遺伝的要因も関係する事が指摘されているが詳細は不明である。他方、近年、環境因子、特に微生物感染症に続発して MS が発症している可能性が指摘されている。そこで本研究では、海外で関与が疑われているライム病ボレリア感染症に絞って、国内 MS 疾患との因果関係を血清疫学的に調べることを目的とした。

B. 研究方法

組換え抗原型ライム病血清診断キットによる国内 MS 患者中の抗体検索

1) 被検血清

近畿大学にて保存されていた MS 患者血清を用いた。患者数 21 名 (被検血清 26 検体、5 ペア血清を含む。男 : 女 = 4 : 17。年齢 16-67 歳、平均 38.6 歳) の血清を用いた。病変部位は脊髄 22、視神経 2、大脳 2 である。対照血清には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 検体をキット標準化供試血清とした。これら対照血清は前年度の本研究に使用した血清である。

2) 抗体検査法

Western blotting 法 (常法)

使用抗原は、*B. garinii* および *B. afzelii* を用いた。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。診断抗原の調製、Western blotting 法は昨年度の報告書に準拠する。Western blotting 法による結果の判定は米国 CDC 推奨基準に従った。

3) 組換え型抗原を用いた kit による抗ライム病ボレリア抗体の検出

Mikrogen 社の recomBlot Borrelia_{NB} IgM および IgG を用いた。方法は添付プロトコールに従って行った。

4) 結果の判定

キットに添付された判定法に基づき Positive、Borderline、Negative を決定した。

(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) 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

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) を調べ、昨年度実施した非組換え抗原型血清診断キットと同等の結果が得られることを確認した。

IgM について：常法の感度 (55%) に比べ、同等 (55%; Borderline 判定を含まない) もしくは高感度 (85%; Borderline 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で十分に 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。

以上の結果により、欧州で製造された *B. burgdorferi*、*B. garinii* および *B. afzelii* を診断用組換え抗原として組み入れた本キットにより、多発性硬化症 (MS) の血清疫学調査を適用出来ることが確認できた。

2) 組換え抗原型ライム病血清診断キットを用いた MS 症例におけるライム病抗体の検索

MS 症例 21 例、ペア血清を含む 26 検体におけるライム病抗体の有無を調べた。21 例中抗ライム病抗体 IgM(+), IgG 抗体(+): 1 例(4.8%)、同 IgM(-)、IgG(+): 1 例(4.8%)、同 IgM(+), IgG(boderline): 1 例 (4.8%)、同 IgM(-)、IgG(borderline): 2 例(9.5%)であった。以下結果を表 1 にまとめた。

表 1. MS 症例におけるライム病ボレリア抗体保有状況

抗体反応および症例数	血清番号 ()内はペア血清番号
IgM(+)	2004-319
IgG(+)	(2005-769)
N=1	
IgM(-)	
IgG(+)	2005-868
N=1	
IgM(+)	
IgG(Borderline)	2004-780
N=1	
IgM(-)	
IgG(Borderline)	2004-497
N=2	2005-143
	2004-085
	2004-331
	2004-443
IgM(+ or Borderline)	(2005-825)
IgG(-)	2004-639
N=7	2005-767
	(2006-002)
	2005-803
	2005-850
	2004-316
	(2004-447)
	2004-325
	2004-492
	2004-596
IgM(-)	2004-722
IgG(-)	2004-828
N=9	2004-832
	2004-843
	2005-010
	(2005-791)

抗ボレリア IgM 抗体：本キットにより 26 検体中、42.3% (Borderline を含む 46.1%) で IgM 陽性と判定された (表 2、図 1)。患者血清が反応した抗原は VlsE(26.9%)、P41(34.6%)、P39(7.7%)、OspC(34.6%)であった。OspC に対する抗体は健常者ではほとんど見出されず (data not shown)、本抗原に対する反応が MS 症例においては有意に高い結果が得られた。

抗ボレリア IgG 抗体：本キットにより 26 検体中、7.7% (Borderline を含む 23.1%)で IgG 陽性と判定された (表 3、図 2)。患者血清が反応した抗原は P100 (3.8%)、VlsE (15.4%)、P41 (84.6%)、OspA (11.5%)、OspC (3.8%)であった。

ペア血清による追跡調査では、5 症例中 3 症例で IgM 陽性、1 症例で IgM、IgG 陽性となったが、IgM 陽性例で IgG 抗体の有意の上昇は見出されなかった。

海外では MS 発症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。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% (Triulzi F and Scotti G. 1988)、38.5%/19.4% (Chmielewska-Badora J et al. 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。

対照的に、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としている。また、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、また、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)。本研究に先立ち、分担研究者の川端は、北海道大学・古田康博士と共同で、顔面神経麻痺を指標としたライム病血清疫学調査を行い、これら患者ではヘルペス系ウイルスで

ある、HSV-1、HSV-2、VZV の再活性化が主因となっている一方、ライム病ボレリア感染に起因する症例は低頻度であること、さらに、これら症例では高率で抗ボレリア IgM 抗体、特に OspC に対する抗体反応が見出されることを明らかにしている (Furuta et al. 2001, 2005)。本 MS 症例群においても高頻度で IgM 陽性例が見出されているが、これら血清は OspC に反応しており、MS 症例でも顔面神経麻痺同様の血清反応が見出されたことになる。相互の関連性は不明であるが、血清反応に同様の傾向が見出されたことは、今後 MS 発症の機序を解明する上で重要である可能性がある。

昨年度の本研究では、MS を除く 10 症例について非組換え型抗原によるライム病ボレリア抗体調査を行い、IgG 陽性 2 例 (20%) を見出している。試験法が異なるため同列の比較は困難ではあるが、MS 症例でのボレリア抗体陽性率が同様の基準 (IgG 陽性) では 9.5%であることから、現時点では MS とライム病の相関は否定的である。一方で統計学的な有意差は現状では得られないことから、今後症例数を増やして追加検討する必要があると思われる。

我が国におけるライム病起因ボレリア種は *Borrelia garinii* であり、欧州の現状と良く似ている一方で、我が国の MS 症例は、ライム病患者報告地域とは大部分で重ならないことから、MS とライム病との相関に関する調査は行われていなかった。本研究にて、はじめて血清疫学調査が行われ、その抗体保有率の一端が明らかとなった。

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血清疫学調査を行った。近畿大学の協力を得て、ライム病抗体の調査を行った。健常人と比較し、IgM での抗体陽性例が多く見られた一方、ペア血清による IgG 抗体の変動は見られなかった。今後は症例数を増やし、因果関係の有無を、統計学的に明確にする必要がある。

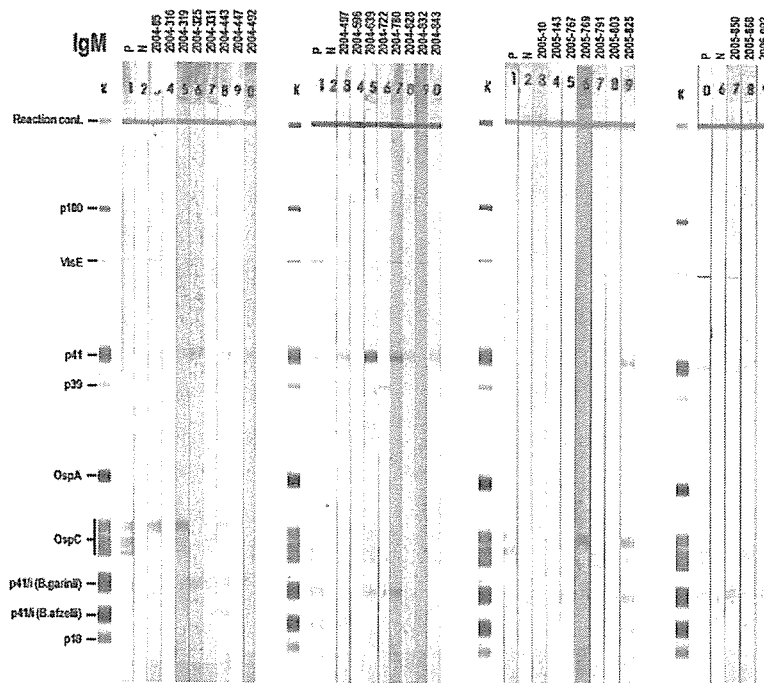


図 1. MS 患者血清を用いた抗ライム病ボレリア抗体 (IgM) の有無

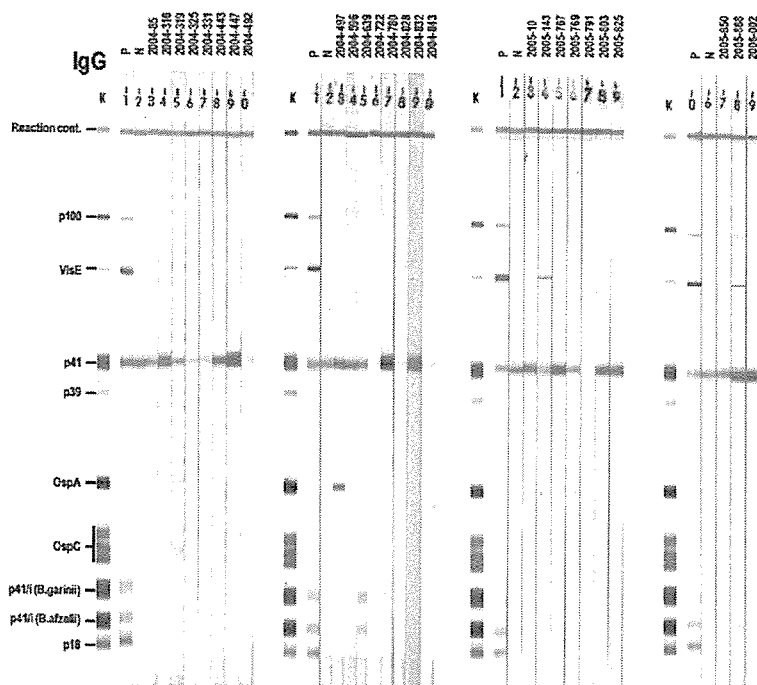


図 2. MS 患者血清を用いた抗ライム病ボレリア抗体 (IgG) の有無

表 2. MS 患者血清中の IgM 抗体反応ライム病ボレリア抗原

患者番号	ライム病ボレリア抗原										判定	
	p100 <i>B. afzelii</i>	VisE Fusion protein	p41 <i>B. burgdorferi</i>	p39 <i>B. afzelii</i>	OspA <i>B. afzelii</i>	OspC <i>B. garinii</i> 1	OspC <i>B. burgdorferi</i> + <i>B. afzelii</i>	OspC <i>B. garinii</i> 2	p41/I <i>B. garinii</i>	p41/I <i>B. afzelii</i>		p18 <i>B. afzelii</i>
2004-85	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
2004-316	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-319	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
2004-325	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2004-331	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
2004-443	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
2004-447	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-492	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-497	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-596	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-639	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
2004-722	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-780	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
2004-828	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-832	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-843	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-143	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-767	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
2005-769	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2005-791	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-803	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
2005-825	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
2005-850	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	E
2005-868	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2006-002	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+

表 3. MS 患者血清中の IgM 抗体反応ライム病ボレリア抗原

患者番号	ライム病ボレリア抗原											判定
	p100 <i>B. afzeli</i>	VisE Fusion protein	p41 <i>B. burgdorferi</i>	p39 <i>B. afzeli</i>	OspA <i>B. afzeli</i>	OspC <i>B. garinii</i> 1	OspC <i>B. burgdorferi</i> + <i>B. afzeli</i>	OspC <i>B. garinii</i> 2	p41/1 <i>B. garinii</i>	p41/1 <i>B. afzeli</i>	p18 <i>B. afzeli</i>	
2004-85	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-316	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-319	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
2004-325	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-331	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-443	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-447	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-492	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-497	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	E
2004-596	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-639	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2004-722	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-780	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	E
2004-828	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-832	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2004-843	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-010	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-143	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	E
2005-767	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-769	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	E
2005-791	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-803	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-825	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-850	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2005-868	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2006-002	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

E. 研究発表

1. 論文発表、著書

- 1) Saito-Ito A, Kasahara M, Kasai M, Dantrakool A, Kawai A, Fujita H, Yano Y, Kawabata H, Takada N. Survey of *Babesia microti* infection in field rodents in Japan: records of the Kobe-type in new foci and findings of a new type related to the Otsu-type. *Microbiol Immunol* 51: 15-24, 2007.
- 2) Botkin DJ, Abbott A, Stewart PE, Rosa PA, Kawabata H, Watanabe H, Norris SJ. Identification of potential virulence determinants by *Himar1* transposition of infectious *Borrelia burgdorferi* B31. *Infection and Immunity*. 74: 6690-6699, 2006.
- 3) Tabara K, Hoshina K, Itagaki A, Katayama T, Fujita H, Kadosaka T, Yano Y, Takada N, Kawabata H: Epidemiological study on Japanese spotted fever and scrub typhus in Shimane Prefecture, Japan. *Jpn J Infec Dis* 59: 204-205, 2006.
- 4) Masuzawa T, Okamoto Y, Une Y, Takeuchi T, K, Koizumi N, Kawabata H, Ohta S, Yoshikawa Y. Leptospirosis in human exposed to Southern flying squirrel (*Graecomys volans*) imported from USA to Japan. *Emerging Infectious Diseases*. 12: 1153-1155, 2006.
- 5) Kawabata H, Sakakibara S, Imai Y, Masuzawa T, Fujita H, Tsurumi M, Sato F, Takano A, Nogami S, Kaneda K, Watanabe H: First record of *Leptospira borgpetersenii* isolation in the Amami Islands, Japan. *Microbiol Immunol* 50: 429-434, 2006.
- 6) Kawabata H, Ando S, Kishimoto T, Kurane I, Takano A, Nogami S, Fujita H, Tsurumi M, Nakamura N, Sato F, Takahashi M, Ushijima Y, Fukunaga M, Watanabe H: First detection of *Rickettsia* in soft-bodied ticks associated with seabird, Japan. *Microbiol Immunol* 50: 403-406, 2006.
- 7) 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. *Microbiol Immunol* 50: 45-51, 2006.
- 8) 増沢俊幸、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。獣医畜産新報。59(4): 295-297, 2006.
- 9) 川端寛樹：回帰熱（回帰熱ボレリア感染症）relapsing fever. ダニと新興再興感染症。SADI 組織委員会編。全国農村教育協会。（印刷中）
- 10) 川端寛樹、高崎智彦：警戒すべきウイルス感染症「マダニが関わる出血熱と西ナイル熱」。ダニと新興再興感染症。SADI 組織委員会編。全国農村教育協会。（印刷中）
- 11) 川端寛樹、高野愛、渡邊治雄：ライム病。日本臨床 2007 増刊「新感染症学（下）」-新時代の基礎・臨床研究-」（印刷中）
- 12) 川端寛樹：ライム病。日常臨床に役立つ小児感染症マニュアル。日本小児感染症学会編。233-243, 2007.
- 13) 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, 2006.

2. 学会発表

- 1) 石橋哲也、千々和勝己、山本正悟、藤田博己、片山 丘、古屋由美子、田原研司、御供田睦代、大瀬戸光明、荻野和正、川端寛樹：福岡県の紅斑熱患者発生地における媒介マダニの調査。リケッチア・クラミジア研究会（北九州）2006年10月
- 2) 近藤玲子、大瀬戸光明、稲荷公一、豊嶋千俊、市川高子、井上博雄、田原研司、山本正悟、御供田睦代、古屋由美子、藤田博己、川端寛樹、高野 愛：愛媛県の日本紅斑熱発生地域におけるマダニ類の *Rickettsia japonica* 保有状況。リケッチア・クラミジア研究会（北九州）2006年10月
- 3) 井上 快、丸山総一、壁谷英則、山田直樹、佐藤雪太、湯川真嘉、大橋典男、増沢俊幸、川森文彦、角坂照貴、高田伸弘、藤田博己、小泉信夫、川端寛樹：わが国の野生齧歯類における *Bartonella* 属菌の分布。第14回

SADI(ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー) (青森) 2006年6月

- 4) 川端寛樹、齋藤 幹、小泉信夫、藤田博己、高野 愛、渡邊治雄：海外での *Borrelia valaisiana* 近縁種感染によるライム病輸入例. 第14回 SADI (ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー) (青森) 2006年6月
- 5) 高野 愛、新田芳樹、角坂照貴、藤田博己、御供田睦代、本田俊郎、増沢俊幸、河村好章、江崎孝行、渡邊治雄、川端寛樹：南西諸島における *Borrelia valaisiana* 近縁種の浸潤. 第14回 SADI (ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー) (青森) 2006年6月
- 6) 田原研司、保科 健、新井 智、辻 正義、川端寛樹、角坂照貴、藤田博己、矢野泰弘、高田伸弘：島根県下に生息する野ネズミからの *Babesia microti* SSU rRNA 遺伝子の検出. 第58回日本衛生動物学会大会 (長崎) 2006年4月
- 7) 田原研司、板垣朝夫、藤田博己、角坂照貴、矢野泰弘、高田伸弘、川端寛樹：島根県産アカネズミ寄生個体に基づくタヌキマダニ幼虫期確定. 第58回日本衛生動物学会大会 (長崎) 2006年4月
- 8) 角坂照貴、藤田博己、後藤郁夫、川端寛樹：石垣島におけるカメキララマダニ幼虫の人体寄生例. 第58回日本衛生動物学会大会 (長崎) 2006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 (東邦大学大橋病院病院病理)
星野昭芳 (国立国際医療センター研究所)

研究要旨 感染症によって誘発される難治性血管炎にかかわる真菌分子により誘発される生体側反応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。CAWS 投与初期の生体の炎症誘導機構を、myeloperoxidase (MPO) 抗体の移動と、本抗体とともに変動する血漿中の 17 種類のサイトカインレベルを解析した。とりわけ、顕著な変動があった IL-12 の p40 を共有する IL-23 と、その作用の下流にあるとされる IL-17 の発現を解析した。その結果、*in vivo* での解析から、本抗体は、早期に、肺および腎糸球体に好中球とともに集積し、IL-23 と IL-17 レベルは増加した。また、*in vitro* で好中球の IL-23 と IL-17 の mRNA 発現を解析した。腹腔好中球を CAWS および抗体で刺激することで、IL-23 と IL-17 の mRNA 発現が増加した。これらのことから、CAWS は、CAWS 投与により産生される MPO 抗体と連動して、好中球から IL-23 と IL-17 が放出され、さらに好中球の活性化を亢進し、血管炎への進展が示唆される。

A. 研究目的

真菌感染によって腎炎、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、真菌に由来する分子が関与していることが報告されている。また、難治性血管炎の死因として、*Candida* 感染症や *Aspergillus* 感染症がある。このように、難治性血管炎と真菌の関係は深い。これまで、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、難治性血管炎にも関連することが指摘されている。

真菌感染の初期防御には、主として好中球が関与し、とりわけ好中球ライソゾーム酵素 myeloperoxidase (MPO) が H_2O_2 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 欠損マウスを用いた実験によって証明した (Aratani et al. J. Infectious Diseases 182, 1276-1279, 2000) し、*C. albicans* の不活性化には、MPO は不可欠である。真菌感染により、

MPO が好中球から大量に細胞外に放出たり発現を誘発することにもなる。その結果として、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ことが報告されている。

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 (Arimura et al. Clinical Nephrology 40, 256-264, 1993, L. Harper, et al. Arthritis Rheumatism 44:921-930, 2001)、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 (Ishida-Okawara et al. Exp. Mol. Pathol., in press.)。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、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てきた。

そこで、本年度の研究では、その投与初期に誘導される MPO 抗体との CAWS による炎症誘導機構サイトカインの変動から解析した。

B. 研究方法

1) CAWS 投与による好中球および MPO 抗体の移動： PBS に懸濁した CAWS および MPO 抗体（あるいは、Quantam Dots(QD)で標識したもの： QD-MPO 抗体）を、C57BL/6N マウス(♂, 6w)腹腔内に前投与し、5 日後に再度投与後、24 時間後に屠殺して、組織を HE および凍結切片にて蛍光観察した。

2) CAWS 投与初期応答： PBS に懸濁した CAWS および MPO 抗体（あるいは、QD-MPO 抗体）を、C57BL/6N マウス(♂, 6w)腹腔内に前投与し、5 日後に再度投与後、24 時間後に屠殺して、末梢好中球数、末梢好中球の機能、血漿中のサイトカインレベルを Bio-Plex により解析した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) CAWS 投与初期の好中球の移動

CAWS および MPO 抗体投与初期の好中球移動をしらべたところ、肺および腎系球体に集積した。(図 1、矢印)。

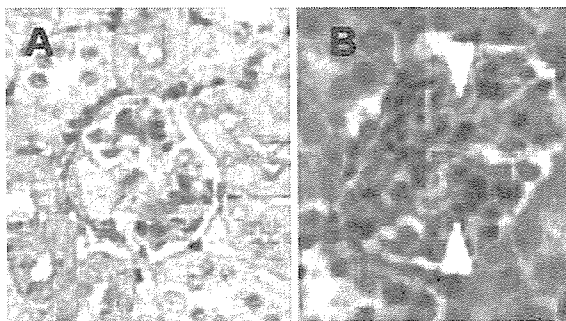


図 1. CAWS および MPO 抗体投与 24 時間後の好中球の腎系球体への集積

A: 対象 IgG 投与, B: MPO 抗体投与

2) CAWS 投与初期の QD-MPO 抗体の腎系球体への集積

CAWS および QD-MPO 抗体投与初期の移動をしらべたところ、肺および腎系球体に集積した。(図 2B、赤いドット)。

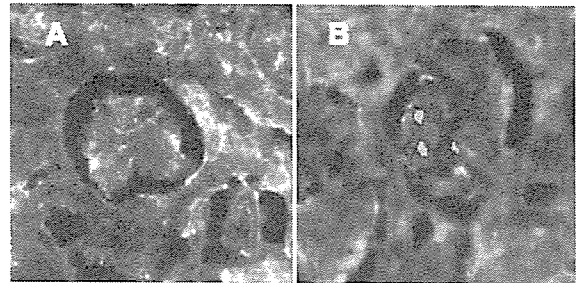


図 2. CAWS 投与初期の QD-MPO 抗体の腎系球体への集積(蛍光)

A: 対象 IgG 投与, B: QD-MPO 抗体投与

3) CAWS 投与初期の血中サイトカインの変動について、C57BL/6 マウスに、CAWS および MPO 抗体を投与し、24 時間後の血清中のサイトカインを測定し、中でも、図 3 に示すサイトカインのレベルの変動が認められた。

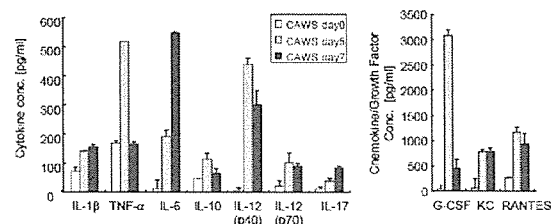


図 3. CAWS 投与初期の血中サイトカインの変動 Bio-Plex の測定による。

4) CAWS および MPO 抗体投与による血中の IL-17 および IL-23 の増加

また、CAWS および MPO 抗体を接種した時に変動が顕著な IL-12 に関する IL-17 および IL-23 のレベルを調べた。その結果、CAWS および MPO 抗体の接種によって、IL-17 および IL-23 が増加した (図 4)。

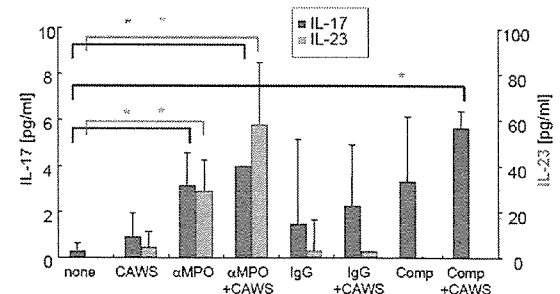


図 4. CAWS および MPO 抗体投与による血中の IL-17 および IL-23 の増加: