

5) *in vitro* での好中球からの IL-17 および IL-23 の発現

さらに、好中球から IL-17 および IL-23 が発現しているかを *in vitro* で検討した。その結果、好中球から IL-17 および IL-23 が発現していることが示された (図 5)。

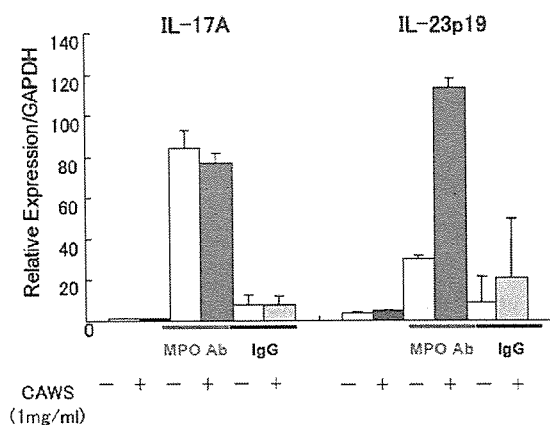


図 5. MPO 抗体刺激による好中球からの IL-17 および IL-23 の mRNA の発現

#### D. 考 察

CAWS 投与初期応答を検討し、CAWS 投与初期の好中球と MPO 抗体の移動、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。

CAWS および MPO 抗体投与初期では、好中球は肺および腎系球体に集積した。また、QD-MPO 抗体で抗体の移動をしらべたところ、肺および腎系球体に集積した。この結果は、CAWS 投与によって、好中球が活性化され、肺および腎系球体に集積し、好中球の表面に表出している MPO を MPO 抗体が認識しているものと推定させる。

一方、このときの血中サイトカインのレベルを網羅的に調べると、種々の炎症性サイトカインのレベルが上昇しているのが認められ、特に、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 のレベルの上昇が際立った。IL-17 および IL-23 の産生細胞が好中球ではないかと推定し、*in vitro* での好中球からの IL-17 および IL-23 の mRNA の発現を検討した結果、好中球から IL-17 および IL-23 が発現していることが示された。

これらのことから、真菌分子の CAWS によって活性化された好中球は、MPO 抗体とともに、IL17 を中心としたサイトカインを産生し、好中球をさらに活性化して血管炎の進展へと向かうと推定される。

#### 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。

真菌由来分子 CAWS および MPO 抗体の投与により、好中球およびその MPO 抗体が肺および腎系球体に集積することで、組織特異性があることが示唆された。また、血中サイトカインのレベルの網羅的解析から IL-12 に関する IL-17 および IL-23 のレベルの上昇が際立ち、これらは、好中球から発現・産生されていることがわかった。

これらのことから、真菌分子の CAWS によって活性化された好中球は、MPO 抗体とともに、IL17 を中心としたサイトカインを産生し、好中球をさらに活性化して血管炎の進展へとつながっている可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ishida-Okawara A, Nagi-Miura N, Oharaseki T, Takahashi K, Okumura A, Tachikawa H, Kashiwamura S, Okamura H, Ohno N, Okada, Peter H: A. Ward, Kazuo Suzuki: Neutrophil activation and induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein- $\beta$ -glucan complex (CAWS). *Exp Mol Pathol.* (in press)

- 2) Nagao T, Matsumura M, Mabuchi A, Ishida-Okawara A, Koshio O, Minamitani H, Suzuki K: Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrol Dialysis Transplant* 22: 77-87, 2007.
  - 3) Shinohara H, Nagai-Miura, N, Ishibashi K, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, Ohno N: Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPs composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by *Candida albicans*. *Biol Pharm. Bull* 29: 1854-1861, 2006.
  - 4) Fujimoto S, Uezono S, Hisanaga S, Fukudome K, Kobayashi S, Suzuki K, Hashimoto H, Nakao H, Nunoi H: Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture: The first population-based, retrospective epidemiological survey in Japan. *Clinical J Am Soc Nephrol* 1: 1016-1022, 2006.
  - 5) Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Ishida-Okawara A, Suzuki K, Maeda N, Koyama H: Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against *Cryptococcus neoformans*. *J Med Microbiol* 55: 1291-1299, 2006.
  - 6) 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 Exp* 13: 67-71, 2006.
  - 7) 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, *Candida albicans* water-soluble fraction. *Atherosclerosis* 186: 310-320, 2006.
2. 学会発表  
国際会議
- 1) Nozu T, Matsumura M, Nagao T, Kobayashi M, Okawara A, Hasegawa A, Nakayama T, Nagai A, Suzuki K: Function of the primary pulmonary endothelial cells associated with activated neutrophils. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
  - 2) Kobayashi M, Matsumura M, Nagano T, Hoshino A, Okawara A, Aratani Y, Minamitani H, Suzuki K
  - 3) Glomerular endothelial cell activation in vasculitis Induced by anti-myeloperoxidase antibody and activated neutrophils. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
  - 4) Tachikawa H, Okawara O, Suzuki K. Contribution of the systemic, splenic, and renal Th2 responses to the developing glomerulonephritis in NCA-associated crescent-forming glomerulonephritis mice. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
  - 5) Tomizawa K, Suzuki R, Tanokura M, Suzuki K. Analysis of MPO-ANCA Binding Site of MPO Molecule Surface Regions. June 18-23, 2006
  - 6) Hoshino A, Nagao T, Tokunaka K, Okawara A, Ihara T, Uno K, Muso E, Miura N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K: Myeloperoxidase (MPO) on Activation Neutrophils and anti-MPO Antibody involve the Initiation of Glomerulonephritis and Vasculitis induced by *Candida albicans* Glycoprotein. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006
  - 7) Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Okawara A, Suzuki K, Maeda N, and Koyama H. In vivo role of myeloperoxidase for the host defense against fungal infection. 20th Int. Cong. Biochem. and Mol. Biol., Kyoto, June 18-23, 2006

## 国内会議

- 1) 永井厚志、近藤光子、野津朋子、鈴木和男：間質性肺炎における ANCA 陽性例の Prevalence と病態 第 103 回日本内科学会総会・年次講演会（横浜）2006 年 4 月
- 2) 太刀川仁、Mahmoud Ramadan、小玉 誠、大川原明子、三間 渉、伊藤正洋、柏村 健、広野 暁、鈴木和男、相澤義房：冠動脈疾患患者における MPO-ANCA の挙動 第 103 回日本内科学会総会・年次講演会（横浜）2006 年 4 月
- 3) 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀機：クリプトコッカス感染防御におけるミエロペルオキシダーゼの関与 第 27 回関東医真菌懇話会（東京）2006 年 5 月
- 4) 鈴木和男：活性化好中球と MPO-ANCA による糸球体内皮細胞傷害 第 49 回日本腎臓学会学術総会 シンポジウム「ANCA 関連血管炎の病理と臨床」（東京）2006 年 6 月
- 5) 小林美登里、松村実実子、長尾朋和、荒谷康昭、星野昭芳、大川原明子、山本健二、南谷晴之、鈴木和男：血管炎発症に関わる MPO-ANCA は直接糸球体内皮細胞へ作用する 第 17 回日本生体防御学会学術集会（札幌）2006 年 7 月
- 6) 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、大川原明子、鈴木和男、小山秀機：クリプトコッカス感染防御における MPO-H2O2-Cl<sup>-</sup>系の関与 第 12 回 MPO 研究会（大阪）2006 年 9 月
- 7) 原田敏江、三浦典子、安達禎之、Keiko Ozato、鈴木和男、大野尚仁：CAWS 血管炎における IRF-8 の役割 第 12 回 MPO 研究会（大阪）2006 年 9 月
- 8) 大川原明子、三浦 典子、大原関利章、高橋 啓、岡田秀親、大野尚仁、鈴木和男：CAWS 培養条件の違いによる好中球活性化への影響 第 12 回 MPO 研究会（大阪）2006 年 9 月
- 9) 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋 啓、大川原明子、鈴木和男、大野尚仁：各種マウス系統を用いた CAWS 血管炎発症に関わる遺伝的素因の解析 第 12 回 MPO 研究会（大阪）2006 年 9 月
- 10) 駒井元彦、高野雄介、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁：CBA/J, CBA/N マウスにおける CAWS 血管炎の検討 第 12 回 MPO 研究会（大阪）2006 年 9 月
- 11) Suzuki K, Nauseef W：ミエロペルオキシダーゼ(MPO)の生体防御における役割 第 12 回 MPO 研究会（大阪）2006 年 9 月
- 12) 高橋啓、大原関利章、山田仁美、三浦典子、大野尚仁、村山 研、野津朋子、松村実実子、大川原明子、鈴木和男、新井孝夫、荒谷康昭：CAWS 誘発血管炎モデルにおける合成免疫グロブリン(SyIG)の血管炎抑制作用 第 12 回 MPO 研究会（大阪）2006 年 9 月
- 13) 星野昭芳、猪原登志子、宇野賀津子、武曾恵理、山本健二、鈴木和男：抗 MPO 抗体誘導マウス全身血管炎モデルにおける活性化好中球からのサイトカイン産生 第 12 回 MPO 研究会（大阪）2006 年 9 月
- 14) 富澤一夫、大川原明子、雑賀 寛、田之倉優、鈴木和男：急性進行性糸球体腎炎モデル SCG/Kj マウスの MPO-ANCA 病因エピソードは治療により減少する 第 12 回 MPO 研究会（大阪）2006 年 9 月
- 15) 星野昭芳、山本健二、鈴木和男 抗 MPO 自己抗体誘導マウス全身血管炎モデルにおける抗体の挙動を蛍光ナノ粒子標識 QD 抗 MPO 抗体でイメージングする 第 15 回バイオイメージング学会（盛岡）2006 年 10 月
- 16) Ishida-Okawara A, Nagi-Miura N, Oharaseki T, Takahashi K, Okada H, Ohno N, Suzuki K：Neutrophil Activation by CAWS in Different Cultured Condition」(CAWS 調整時の異なった菌の培養条件による好中球活性化の相違) 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)2006 年 12 月
- 17) Hoshino A, Okawara A, Yamamoto K, Suzuki K, 星野昭芳、大川原明子、山本健二、鈴木和男：Activated neutrophils produce IL-17 and IL-23 by MPO-ANCA in Candida albicans-derived mannoprotein-induced murine systemic (カンジダ由来マンノプロテイン誘導のマウス全身性血管炎にお

る MPO-ANCA によって活性化された好中球が IL-17 と IL-23 を産生) 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)2006 年 12 月

- 18) 三浦典子、安達禎之、大原関利章、高橋 啓、大川原明子、鈴木和男：CAWS 血管炎の発症と重篤かに関わる遺伝的素因の各種マウス系統を用いた解析. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会(大阪)2006 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

# 1 1. 真菌感染と特定疾患

## —*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 教授

研究協力者 亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター 教授)

研究要旨 これまでに、ヒトの居住環境内から分離された *Stachybotrys chartarum* をマウスに経気管的に反復投与することによって肺動脈壁の中膜および内膜の肥厚など、ヒトの肺高血圧症に類似した病変が形成されることを明らかにした。これは原発性肺高血圧症のような肺高血圧症の中でも原因が明らかでない場合における本菌との関連性を疑わせるものでもあり、本疾患のメカニズムの解明にとって重要な知見であると考えられる。本研究では、この病変と肺高血圧症との類似性を更に検討するとともに、病変形成に関わる物質を検討するためにマイコトキシン産生能の異なる *S. chartarum* を用いて検討を行った。この結果、計 18 回 (12 週間) 反復投与した場合には右室収縮期圧の上昇を伴うことを明らかにした。また、肺動脈病変の形成には trichothecene 産生株が産生する物質が関与する可能性が示された。

### A. 研究目的

我々はこれまでに、ヒトの居住環境内に生育する *Stachybotrys chartarum* を経気管的に反復投与することによって、マウスの肺動脈壁中膜および内膜の肥厚、内腔の狭窄が引き起こされることを確認した。肺動脈壁の顕著な肥厚が見られたマウスにおいて右室 / (左室 + 中隔) [RV/(LV + S)] 重量比の増加が確認できたことより肺動脈圧の上昇も推測された。これらは病理学的にヒトの原発性肺高血圧症 (IPAH または PPH) との一致点が多く、真菌の吸入と肺高血圧症 (PAH) との関連についてはこれまでに報告がなかったことから、PAH と本菌とのこれまでに知られていなかった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、*S. chartarum* による血管病変形成時の右室圧を測定して血行動態的にも PAH が惹起されていることを確認するとともに、*S. chartarum* のマイコトキシン産生能の異なる株を用いて、この病変の形成に関わるトキシンを検討した。

### B. 研究方法

1) *S. chartarum* を経気管的反復投与したマウスの右室圧測定について

*S. chartarum* (IFM53637) を 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 に懸濁して用いた。

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て麻酔下で気管内にカテーテルを挿管し、1 回の投与あたり分生子懸濁液 25 μl / mouse、 $1 \times 10^4$  conidia / mouse を 2 週間に 3 回の頻度で 12 週間にわたって計 18 回反復投与した。対照群のマウスには RPMI1640 を 25 μl / mouse ずつ同様に反復投与した。反復投与終了後 4 日目に体重を量り、tribromoethanol (400 mg / kg) にて麻酔後、トランスデューサーに接続した針で各マウスの右心室を穿刺して右室収縮期圧 (RVSP)、心拍数を測定した。測定終了後にマウスを解剖して肺、肝、腎、脾を摘出し、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。

2) *S. chartarum* の経気管的反復投与による肺

### 動脈の中膜肥厚への影響

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 25  $\mu\text{l}$  / mouse、 $1 \times 10^4$  conidia / mouse を経気管的に計 12 回および 18 回投与した (それぞれ 8 週間、12 週間にわたって反復投与)。反復投与終了後 1 日目にマウスを解剖し、肺のパラフィン切片を作製してエラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色をした。これらの中から肺動脈壁の肥厚が認められるマウスの標本を選び、そこからさらに各投与群から 4 匹分ずつの標本の顕微鏡写真を撮り、直径 50–100  $\mu\text{m}$  の肺動脈 (1 匹あたり 10 本ずつ) について、次の式により中膜肥厚を測定した。

$$\text{中膜の厚さ } (\mu\text{m}) / \text{血管半径 } (\mu\text{m})$$

測定には ImagJ 1.36b (NIH) を使い、血管半径は血管外周長より算出し、中膜の厚さは血管外周から内弾性板までの厚さとした。

3) マイコトキシン産生能の相違が肺血管病変形成に及ぼす影響について

*S. chartarum* の trichothecene 産生株 (ATCC201211) および atranone 産生株 (trichothecene 非産生株、ATCC201863) を用いた。

1) と同様に培養して作製した分生子懸濁液 25  $\mu\text{l}$  / mouse、 $1 \times 10^4$  conidia / mouse を麻酔下で ddY マウス (6 週齢、オス) に 4 週間にわたって計 6 回経気管的に反復投与した。投与終了後 7 日目に肺、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、RV/(LV + S)重量比による右心室肥大への影響を検討した。

### C. 研究結果

1) *S. chartarum* を経気管的反復投与したマウスの右室圧測定について (図 1)

*S. chartarum* を計 18 回 (3 ヶ月間) 反復投与した群 (n=7) では RPMI1640 のみを同様に反復投与した Control 群 (n=8) と比べて有意に右室収縮期圧の上昇が確認された (*S. chartarum* 投与群  $20.01 \pm 5.7$  mmHg、Control 群  $11.8 \pm 2.3$  mmHg)。これらのマウスでは、個体により程度に差があるものの病理組織学的

にも肺動脈壁の肥厚が確認された。肺を除く他の臓器 (肝、腎、脾) にはこのような病変は認められなかった。

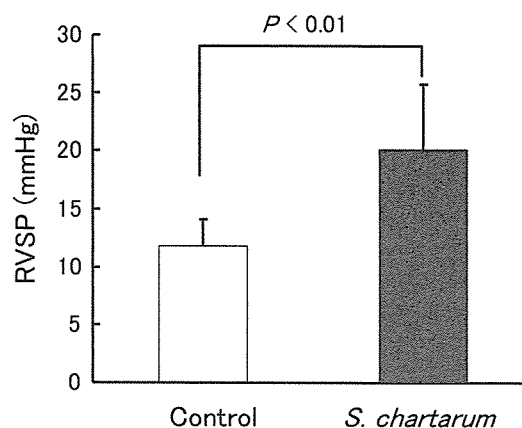


図 1. 分生子懸濁液を経気管的に計 18 回反復投与したマウスの右室収縮期圧: *S. chartarum* 投与群における RVSP の有意な増加が認められた。

2) *S. chartarum* の経気管的反復投与による肺動脈の中膜肥厚への影響 (図 2)

*S. chartarum* を反復投与すると、計 12 回および計 18 回の両方の投与群で中膜肥厚が確認された (*S. chartarum* 投与群  $0.23 \pm 0.07$ 、 $0.19 \pm 0.08$ 、Control 群  $0.09 \pm 0.02$ 、 $0.10 \pm 0.03$ )。中膜肥厚の値はいずれも Control 群と比べて有意差があった。

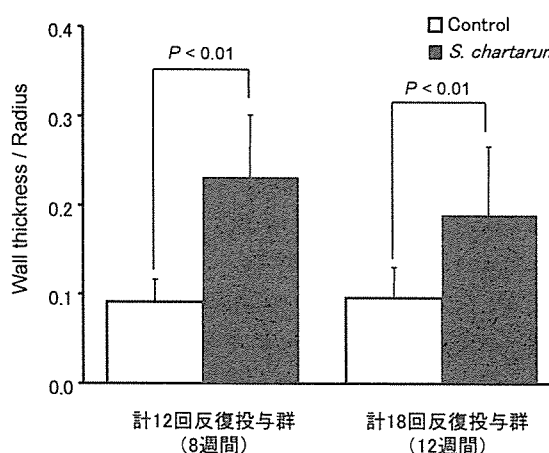


図 2. 分生子懸濁液を経気管的に計 12、18 回反復投与したマウスの肺動脈の中膜肥厚: 両投与群とも Control 群より有意に中膜が肥厚した。

3) マイコトキシン産生能の相違が肺血管病変形成に及ぼす影響について (図 3、4)

Trichothecene 産生株を反復投与したマウスでは 10 匹中 4 匹で肺動脈壁の中膜および内膜の肥厚が確認された。一方、atranone 産生株 (trichothecene を産生しない株) を反復投与した場合にはこのような病変は形成されなかった。Trichothecene 産生株では肺動脈病変が認められたものの、RV/(LV + S) 重量比による右室肥大は確認されなかった。体重は trichothecene 産生株を投与した場合に有意に減少した。いずれの投与群においても肝、腎、脾に病変は認められず、これらの重量にも変化はなかった。

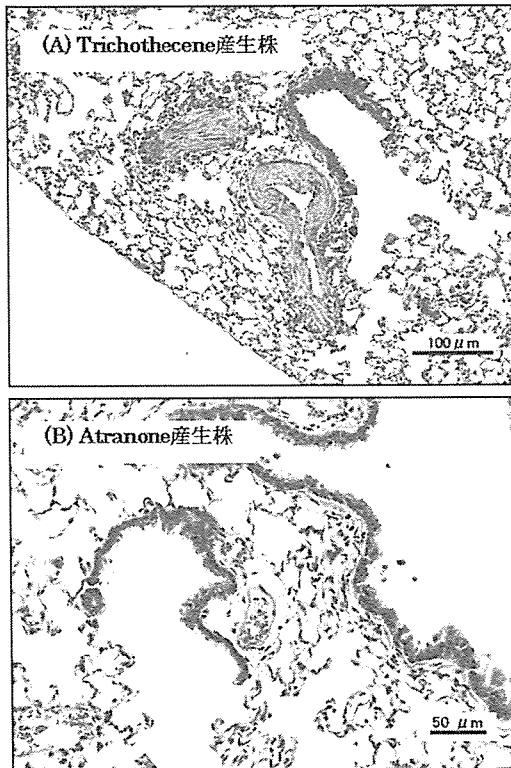


図 3. マイコトキシン産生能の異なる株の分生子懸濁液を経気管的に計 6 回 (4 週間) 反復投与したマウスの肺: Trichothecene 産生株を投与した場合に肺動脈壁の肥厚が見られた。

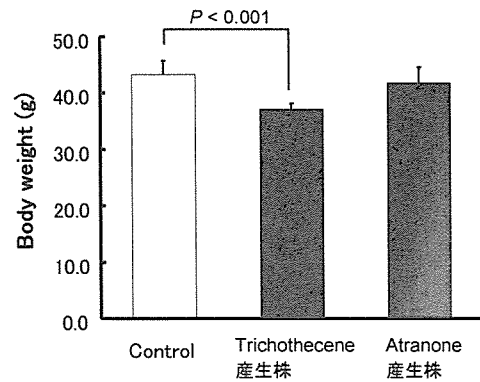
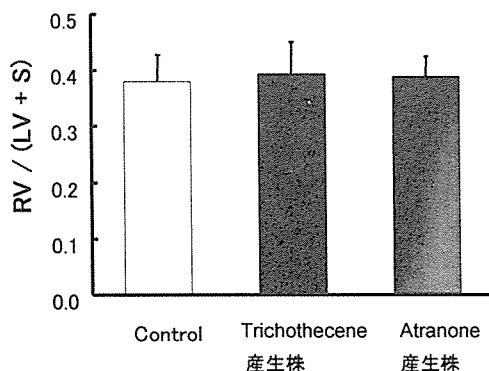


図 4. マイコトキシン産生能の異なる株の分生子懸濁液を経気管的に計 6 回 (4 週間) 反復投与したマウスの RV/(LV + S) 重量比、体重の比較: 両投与群とも RV/(LV + S) 重量比による右室肥大は認められなかった。体重は Trichothecene 産生株を投与した場合に減少した。

#### D. 考 察

本実験で *S. chartarum* の反復投与によって肺動脈壁の肥厚が形成されたマウスで、右室収縮期圧の上昇が確認されたことから、病理組織像および血行動態においても本菌による PAH の発生が確認された。PAH に特徴的な病変である肺動脈壁中膜の肥厚は、本モデルでは分生子を計 6 回 (4 週間) 反復投与した場合にも認められるが、計 12 回 (8 週間) 以上反復投与した場合には有意差をもって確認されることが示された。また、*S. chartarum* は種々のトキシンを産生するが、肺動脈病変の形成には trichothecene 産生株が産生する物質が関与している可能性が示された。

*S. chartarum* はわが国の居住環境内にも生育している真菌であり、ヒトが本菌に実際に曝露される可能性が考えられる。PAH の中に原発性肺高血圧症のように原因が明らかでない場合もあり、本菌との関連がある可能性もある。また、汚染された環境から検出される *S. chartarum* のうち約 40% の株は trichothecene を産生するという報告 (Andersen *et al.*, *Mycologia* 94(3): 392-403, 2002) もあることから、本菌がどのように PAH の惹起に関わっているのか更に詳細な検討を行っていく必要があると考えられる。

#### E. 結 論

本研究により、*S. chartarum* の反復投与によ

り肺動脈壁の肥厚、右室収縮期圧の上昇が確認され、病変がヒトの IPAH に類似していることが明らかとなった。この病変形成には *S. chartarum* の trichothecene 産生株が産生する物質が関与している可能性が示唆された。本菌の曝露によってヒトでも同様の疾患が惹起され得ることが考えられるため、本菌による病変形成のメカニズムの詳細について検討を進める必要があるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

- 1) Ochiai E, Kamei K, Watanabe A, Sato A, Hiroshima K, Shibuya K: Inhalation of *Stachybotrys chartarum* causes pulmonary hypertension in mice – relation to human PPH, The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, June 2006, Paris, France.
- 2) 落合恵理、亀井克彦、佐藤綾香、渡辺 哲、永吉優、豊留孝仁、渋谷和俊: Trichothecene 産生能の異なる *Stachybotrys chartarum* 2 株を用いたマウス肺高血圧症モデルの検討. 第 50 回日本医真菌学会総会（東京）2006 年 10 月
- 3) 落合恵理、永吉 優、佐藤綾香、渡辺 哲、豊留孝仁、矢口貴志、亀井克彦、渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* の株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 8 回学術集会（神戸）2007 年 2 月

#### 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 ー肺炎クラミジアと多発性硬化症についての研究ー

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、坂田明子（感染研・ウイルス第一部）  
川端寛樹（国立感染症研究所・細菌第一部第四室）  
楠 進、宮本勝一（近畿大学医学部・神経内科）  
川越清隆、守川俊英、増田周子（日立化成工業(株)  
機能性材料事業部ライフサイエンス部門）

研究要旨 特定疾患の微生物学的原因として、近年、多発性硬化症（以下 MS）と、肺炎クラミジアとの関連の可能性が指摘されているが、不明な点が多い。本年度の研究では、本邦の MS 症例血清 26 検体を用いて、肺炎クラミジア抗体価測定を行い、MS との関連を検討した。IgG 抗体保有は MS 症例対健常者ではそれぞれ、65.4%:49.5%、IgG 高値は 4.7%:0.8%、IgM 抗体陽性 15.4%:4.8%であり、MS 症例の方がいずれも高率であった。しかし、呼吸器感染症例、ならびに肺炎クラミジア急性呼吸器感染症例の IgG 抗体保有はそれぞれ 51.6%:87.2%、IgG 高値は 7.7%:57.4%、IgM 抗体陽性 18.5%: 27.2%であり、MS 症例よりもさらに高率であった。現時点では MS と肺炎クラミジアの関連の有無について判断することは困難であり、今後、検体数の追加と髄液での PCR などの検討をさらに進める予定である。

### A. 研究目的

特定疾患の微生物学的原因として、近年、肺炎クラミジアと中枢神経系疾患との関連の可能性が指摘されている。疾患としてはギラン・バレー症候群、多発性硬化症（MS）、アルツハイマー病などの難治性の神経、脳脊髄疾患との関連であるが、因果関係の根拠は疫学、メカニズムも含めていずれも不十分であり、結論にいたっていない。その中で、特に MS と肺炎クラミジア感染症との関連の可能性が最も注目されているが、強く関与を示唆する報告がある一方で、否定的な報告もあり、不明な点が多い。特に本邦での詳細な検討はほとんどなされていない。本年度の研究では、本邦の MS 患者血清、ならびに、健常者、その他の呼吸器疾患例の血清を用いて、肺炎クラミジア抗体価測定を行い、MS との関連について血清疫学的に検討することとした。

### B. 研究方法

#### 1) 材料と方法

試料として以下の各血清を使用した。

- ① MS 症例血清 26 検体（近畿大学医学部神経内科由来）
- ② 健常者血清 592 検体（人間ドック受診者血清）
- ③ 呼吸器感染症例血清 124 検体
- ④ 肺炎クラミジア急性呼吸器感染症例血清 242 検体

なお、本研究計画は国立感染症研究所のヒトを対象とした医学研究倫理審査委員会で審査され、国立感染症研究所長により承認されている。

#### 2) クラミジア抗体測定法

以下の2つの抗体測定法を使用し IgG, IgM 抗体の測定を行い、比較した。IgM についてはリウマチ因子（RF）による非特異反応を除去するため、測定時に RF 除去剤による前処理を施行した。

#### ①ヒタザイム C.ニューモニエ（日立化成）

肺炎クラミジアの精製外膜タンパク複合体（COMC）を抗原に用いた ELISA 法で、判定は以下のように設定した。陰性: IgG-ID（インデックス値）1.10 未満。抗体保有（感染既往）: IgG-ID 1.10 以上、急性感染確定: ペア血清で IgG-ID 1.35

以上上昇、あるいはシングル血清で IgM 陽性 ID 1.60 以上。急性感染の疑い: IgG 高値 ID3.0 以上。

### ②micro-immunofluorescence (micro-IF)法

精製基本小体 3 抗原を用いた間接蛍光抗体法で、使用抗原は *C. pneumoniae* AR39 株、*C. psittaci* Budgerigar No.1 株、*C. trachomatis* D 株。判定は、陰性: IgG 16 倍未満、抗体保有(感染既往): IgG 16~256 倍、急性感染: 単独血清で IgM 16 倍以上あるいはペア血清で IgG 4 倍以上の上昇とした。

### 3) MS 症例の背景

21 例(26 検体: 5 例がペア血清)

男:女=4:17

年齢:16~67 歳(平均 38.6 歳)

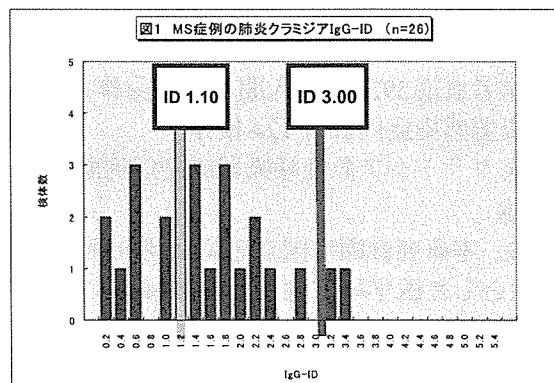
病変部位: 検体採取時

脊髄 22 例、視神経 2 例、大脳 2 例

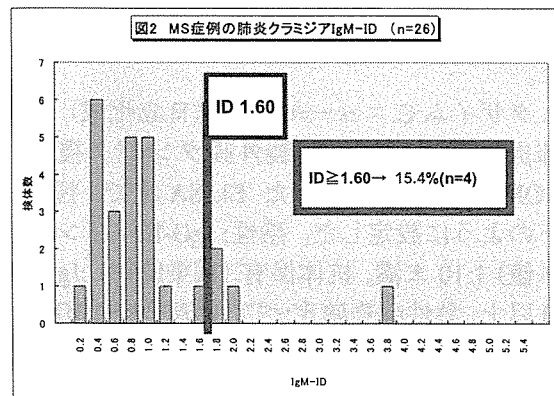
## C. 研究結果

### 1) MS 症例 26 血清の肺炎クラミジア抗体

ヒタザイム C.ニューモニエでは、IgG 抗体保有(感染既往) ID $\geq$ 1.10 は 65.4%(n=17)、IgG 高値 ID $\geq$ 3.0 は 7.7%(n=2) (図 1) であった。



また IgM 抗体陽性 ID $\geq$ 1.60 は 15.4%(n=4) であった (図 2)。



一方 micro-IF 法では IgG 抗体保有(感染既往)69.2% (n=18)、IgG 高値は 3.8% (n=1)、IgM 抗体陽性 15.4% (n=4) であった。

IgG についてはヒタザイム C.ニューモニエ ID と micro-IF 法の抗体価に相関がみられた(図 3)。なお micro-IF 法では 3 抗原に対する抗体価も測定したが、肺炎クラミジア以外のクラミジアに対しては有意な上昇は認められなかった。また ペア血清が採取されていた 5 例では 2 つの測定法でいずれも有意な抗体価の推移は認められなかった。

### 2) 健常者血清 (人間ドック受診者血清) での検討

ヒタザイム C.ニューモニエで測定した 592 検体の IgG は、ID $\geq$ 1.10 は 49.5%(n=293)、ID $\geq$ 3.00 は 4.7%(n=28) であった。IgM については 417 検体で測定し、ID $\geq$ 1.60 は 4.8%(n=20) であった。

### 3) 呼吸器感染症例血清 124 検体

ヒタザイム C.ニューモニエで測定した 124 検体の IgG については ID $\geq$ 1.10 は 51.6%(n=65)、ID $\geq$ 3.00 は 0.8%(n=1) であった。また IgM については ID $\geq$ 1.60 は 18.5%(n=23) であった。

### 4) 肺炎クラミジア急性呼吸器感染症例血清 242 検体

ヒタザイム C.ニューモニエで測定した ID $\geq$ 1.10 は 87.2%(n=211) ID $\geq$ 3.00 は 57.4% (n=129) であった。一方 IgM は 136 検体で測定し、ID $\geq$ 1.60 は 27.2%(n=37) であった。

## D. 考察

今回すべての検体で抗体価が得られた測定法はヒタザイム C.ニューモニエであったので、その測定値を用いて比較をすることにした。MS 症例の血清では、健常者と比較すると MS:健常者はそれぞれ、IgG 抗体保有は 65.4%:49.5%、IgG 高値は 4.7%:0.8%、IgM 抗体陽性 15.4%:4.8% であった。症例数が少ないため、有意差を求めることはしなかったが、MS 症例の方がいずれも高率であった。ただし、今回、疾患としての比較対照のため測定した呼吸器感染症例、ならびに肺炎クラミジア急性呼吸器感染症例の IgG 抗体保有は 51.6%:87.2%、IgG 高値は 7.7%:57.4%、IgM 抗体陽性 18.5%:27.2% であり、MS 症例よりもいずれもさらに高率であった。

またペアで測定された 5 例でも有意な抗体変動は認められなかったが、病態の詳細が不明なため関連について考察することは困難であった。

#### E. 結 論

MS と肺炎クラミジアの関連について、今回の検討では、健常人と比較すると高率ではあったが、呼吸器感染症例血清や特に確定肺炎クラミジア感染症例との比較では差が大きくあり、症例を追加して検討する必要があると考えられた。また MS 症例の血清追加とあわせて、今後は髄液の抗体測定や可能であれば PCR を施行して病原体の存在を検討することも考慮する必要がある。さらに他の難治性神経疾患症例の血清、髄液の検体収集を検討している。

一方、肺炎クラミジアの血清抗体測定については、現在ヒタザイム C、ニューモニエによる IgM のカットオフ値の検討や、IgM での非特異反応除去剤の改良が進められており、現在の成人での ID $\geq$ 1.60 を見直す可能性もある。次年度はその結果も踏まえた抗体価の再評価をすることも考慮したい。

#### F. 健康危険情報

健康被害の情報はない。

#### G. 研究発表

- 1) 岸本寿男、安藤秀二：新しい臨床検査・未来の臨床検査；各論 感染症検査 抗クラミジア・ニューモニエ IgM 抗体、検査と技術 34: 1261-1262, 2006.
- 2) 岸本寿男、佐藤 梢、井上美由紀、山口徹也、山崎 勉：肺炎クラミジア；図説呼吸器系細菌感染症 疫学・診断・治療（佐々木次雄編）じほう, pp79-104, 2006.

#### 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。

### III. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果に関する刊行一覧表

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Yanagisawa Y, Sato Y, Asahi-Ozaki Y, Ito E, Honma R, Imai J, Kanno T, Kano M, Akiyama H, Sata T, Shinkai-Ouchi F, Yamakawa Y, Watanabe S, Katano H	Effusion and solid lymphomas have distinctive gene and protein expression profiles in an animal model of primary effusion lymphoma.	J Pathol	209	464-473	2006
2	Kanno T, Sato Y, Sata T, Katano H	Expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded K10/10.1 protein in tissues and its interaction with poly(A)-binding protein.	Virology	352	100-109	2006
3	Abe Y, Matsubara D, Gatanaga H, Oka S, Kimura S, Sasao Y, Saitoh K, Fujii T, Sato Y, Sata T, Katano H	Distinct expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded proteins in Kaposi's sarcoma and multicentric Castleman's disease.	Pathol Int	56	617-624	2006
4	Yanai H, Kobayashi T, Hayashi Y, Watanabe Y, Ohtaki N, Zhang G, de la Torre JC, Ikuta K, Tomonaga K	A methionine-rich domain mediates CRM1-dependent nuclear export activity of Borna disease virus phosphoprotein.	J Virol	80	1121-1129	2006
5	Watanabe Y, Yanai H, Ohtaki N, Ikuta K, Tomonaga K	Prevalence of Borna disease virus antibodies in healthy Japanese black cattle in Kyushu.	J. Vet. Med. Sci.	68	171-174	2006
6	Yanai H, Hayashi Y, Watanabe Y, Ohtaki N, Kobayashi T, Nozaki Y, Ikuta K, Tomonaga K	Development of a novel Borna disease virus reverse genetics system using RNA polymerase II promoter and SV40 nuclear import signal.	Microbes Infect	8	1522-1529	2006
7	Chase G, Mayer D, Hildebrand A, Frank R, Hayashi Y, Tomonaga K, Schwemmle M	Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity.	J Virol	81	743-749	2007

8	朝長 啓造, 生田 和良	ボルナ病ウイルス.	Virus Report	3	97-107	2006
9	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
10	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
11	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
12	Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, Inoue D, Nakayama K, Yamada M, Suzuki T, Sasaki H	Carbocisteine inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells.	Eur Respir J	28	51-58	2006
13	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
14	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	Nov;209(Pt22)	4574-4579	2006
15	Nagaishi T, Iijima H, Nakajima A, Chen D, Blumberg RS	Role of CEACAM1 as a regulator of T cells.	Ann N Y Acad Sci	Aug	1072-1075	2006

16	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 b-lactamase-negative ampicillin-resistant strains.	Epidemiol Infect	6	1-4	2006
17	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
18	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
19	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
20	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
21	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
22	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.	Infec Immun	74	6690-6699	2006
23	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

24	Shinohara H, Nagai-Miura N, Ishibashi K, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, Ohno N	Beta-mannosyl linkages negatively regulate anaphylaxis and vasculitis in mice, induced by CAWS, fungal PAMPs composed of mannoprotein-beta-glucan complex secreted by <i>Candida albicans</i> .	Biol Pharm Bull	29	1854-1861	2006
25	Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Ishida-Okawara A, Suzuki K, Maeda N, Koyama H	Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defense against <i>Cryptococcus neoformans</i> .	J Med Microbiol	55	1291-1299	2006
26	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, <i>Candida albicans</i> water-soluble fraction.	Atherosclerosis	186	310-320	2006
27	Watanabe Y, Ibrahim MS, Hagiwara K, Okamoto M, Kamitani W, Yanai H, Ohtaki N, Hayashi Y, Taniyama H, Ikuta K and Tomonaga K	Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility.	Microbes Infect		in press	
28	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 <i>Haemophilus influenzae</i> in a mouse model.	Tohoku J Exp Med		in press	
29	Ishida-Okawara A, Nagi-Miura, N, Oharaseki T, Takahashi K, Okumura A, Tachikawa H, Kashiwamura S, Okamura H, Ohno N, Okada H, Ward PA, Suzuki K	Neutrophil activation and induced by <i>C. albicans</i> water-soluble mannoprotein- $\beta$ -glucan complex (CAWS).	Exp Mol Pathol		in press	