

膠原病治療法に関する研究：皮膚型結節性多発動脈炎（PN）に対する ガンマグロブリン大量療法治療について

分担研究者 小林茂人 順天堂大学順天堂越谷病院内科准教授
研究協力者 松本俊治 順天堂大学医学部病理第一 准教授
橋本博史 順天堂大学医学部膠原病内科 名誉教授
高崎芳成 順天堂大学医学部膠原病内科 教授

研究要旨：皮膚型 PN に対して人工ガンマグロブリン大量治療を考えた。まず、皮膚型 PN の病態を検討した。皮膚型 PN は、MPA, WG, CSS 症例と比べ、女性が多く（男女比 2:7）、年齢が若い傾向（中央値 45 歳）にあった。発症から長期間（中央値 7.5 年）観察しても全身型 PN や他の疾患に移行しないことが理解された。皮膚に限局する限局型 PN の 1 型であることが考えられた。皮膚型 PN では難治性下腿潰瘍・足壊疽が起こる。切断手術を回避する目的にて、人工ガンマグロブリン大量治療が必要・有用であると考えられた。

A. 研究目的

人工ガンマグロブリン治療は川崎病、顕微鏡的多発血管炎に対して考慮・検討されている。他の血管炎の治療の可能性について検討した。皮膚型結節性多発動脈炎（皮膚 PN）は下腿の難治性潰瘍や壊疽を起こすことが知られている。しかし、皮膚型 PN の概念や難治性病態の頻度など不明確である。今回、皮膚型 PN の臨床病態について、検討し、治療の可能性について検討した。

一病、全身型 PN（MPA と鑑別できないことがあるため）は除外した。診断は厚生省難治性血管炎分科会（1998 年）の診断基準を使用した。皮膚型 PN の診断は臨床・検査・病理所見などから expert によって行われた。

（倫理面への配慮）

入院病歴の検索と過去の文献の検索のため、倫理委員会の承認は必要とせず、個人情報公開はない。

B. 研究方法

2007 年 5 月以前に順天堂医院にて診断・入院治療を受けた 150 症例の血管炎症例を連続的に抽出して病歴を解析した。このなかから、MPA 31 例、WG 20 例、CSS 24 例、皮膚型 PN 18 例、合計 91 例を検討した。高安動脈炎、側頭動脈炎、バージャ

C. 研究結果

MPA 31 例、WG 20 例、CSS 24 例、皮膚型 PN 18 例の男女比、年齢、皮疹の割合、生検の頻度、生検によって診断された割合、生検部位を表 1 に示した。興味あることは、皮膚型 PN は他の血管炎と比べ、女性が多く、年齢も 42.2 ± 19 歳と低いことが示された。

皮疹は100%存在し、皮膚生検によって、92%診断が確定した。皮膚型PNの皮疹の特徴は、結節性紅斑、皮下結節、下腿潰瘍（7症例、1例が壊疽のため切断に至った）（表2）。経過中全身型PNへの移行、他の疾患の合併などを考え、臨床経過、検査所見などを検討した（表3）。観察期間は平均（±SD）7.1±6.2年で、中央値7.5年、0～21年であった。CRPは平均（±SD）4.2±4.3 mg/dl、中央値4.1 mg/dl、0～13.1 mg/dl。Digital subtraction angiography (DGA)が2症例に施行され、いずれも他の血管炎が否定されていた。ANCAは、MPO-ANCAが17例に施行され、いずれも陰性、PR-3 ANCAは16症例に施行され、前例陰性であった。併発症は2症例が関節リウマチ(RA)の診断名が記載され、RAに伴う血管病変である可能性も存在した。ただし、悪性関節リウマチとは診断されていない。1例にループス抗凝固因子陽性が報告された。

D. 考案

皮膚型PNの臨床概念を当科の入院症例にて再検討した。最大の関心は、長期間の経過観察中に、全身型PNや他疾患への移行の有無について、retrospectiveに検討した。最近の入院経過サマリーをもとに、発症時から入院時までの臨床経過を検討した結果、0～21年、中央値7.5年であった。このため、多くの皮膚PNは全身型PN、他疾患に移行していないことが推定された。

診断は入院中に精査を行っているため、多くの検査を行い、他疾患との鑑別を行い、診断は当科のexpertが行った。MPA、leukocytoclastic angiitis、バージャー病など、結節性紅斑、下腿潰瘍、壊疽をきた

す疾患の鑑別が重要であると考え。

2症例にRAの診断が併記されていたが、RAに伴う下腿潰瘍か、関節痛を伴う皮膚型PNであるか、再検討する必要があった。

当科の皮膚型PN18例は、これまでの報告のように、MPA、CSS、WGと比べ、女性に多く、平均年齢が若い徴を有した。

厚生労働省の難治性血管炎研究班では全国の皮膚科医にアンケート調査を行った。その結果、今回の結果と同様な結果が得られた。報告された症例は22名であるが、その27%に皮膚潰瘍を認めたと報告された(古川福実、難治性血管炎に関する調査研究、平成18年度総括・分担研究、p86-88)。

最近、皮膚型PNにて、抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体(IgG)や血小板除去血漿におけるループス抗凝固因子の存在が報告された。下腿の網状紅斑の所見でまず念頭に考えることは、血管炎と抗リン脂質抗体症候群の存在である。この観点からも、今後の皮膚型PNに関する新しい知見が期待される。

多くの皮膚型PNはANCA陰性であるが、MPAの病理組織の概念を考慮して、皮膚型PNの組織所見で血管炎が毛細血管・細静脈の領域に存在しないか考えた。病理の先生の意見は否定的であり、皮膚型PNは、虫垂、胆嚢、子宮、精巣に認められる限局型(limited forms of polyarteritis)と考えられた。成書から皮膚型PNの概念と重症度分類を表4、5に記載した。

現在行われている下腿潰瘍・壊死に対する再生医療は既存の阻血病変に対する血流再開治療である。皮膚型PNに対する人工ガンマグロブリン大量治療の意義は、1)皮膚型PNが川崎病と同じ口径の血管炎をもつ

ため有効と考えられること。2) 血管の阻血変化、damage 形成に対する予防・治療である。3) 下腿の難治性潰瘍・壊疽～切断手術を回避できる可能性があること。以上が推定される。

E. 結論

皮膚型 PN の概念や臨床所見を再確認する目的にて、当科の皮膚型 PN の臨床所見を検討した。皮膚型 PN は皮膚に限局する限局型 PN の一型と推定された。難治性皮膚潰瘍・壊疽を呈する症例には、切断手術を回避する目的に、人工ガンマグロブリン大量療法の治療が考慮された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki K, Kobayashi S, Yamazaki K, Gondo M, Tomizawa K, Arimura Y, Nakabayashi K, Ozaki S, Yashida M, Yoshida T, Tsusaka N, Muso E, Okazaki T, Hashimoto H. Analysis of risk epitopes of anti-neutrophil antibody MPO-ANCA in vasculitis in Japanese population. *Micro Immunol* 2007;51:1215-20
2. Yoshidome Y, Morimoto S, Tamura N, Kobayashi S, Tsuda H, Hashimoto H, Takasaki Y. A case of primary antiphospholipid antibody syndrome presenting with dysfunctional uterine bleeding and cerebral infarction. *Mod Rheumatol* 2007;17:251-2
3. Tamura N, Matsudaira R, Hirashima M, Ikeda M, Tajima M, Nawata M, Morimoto S, Kaneda K, Kobayashi S, Hashimoto H, Takasaki Y. Two cases of refractory Wegener's granulomatosis successfully treated with rituximab.

Intern Med 2007;46:409-14

4. Matsumoto T, Kobayashi S, Ogishima D, Aoki Y, Sonoue H, Abe H, Fukumura Y, Nobukawa B, Kumasaka T, Mori S, Suda K. Isolated necrotizing arteritis (localized polyarteritis nodosa): examination of the histological process and disease entity based on the histological classification of stage and histological differences from polyarteritis nodosa. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:1569-70.

2. 学会発表

1. S Kobayashi, T Ito-Ihara, K Suzuki, S Fujimoto, RA Watts, DG Scott, DJ Jayne, H Hashimoto and the Japan-UK AAV Study Group. Incidence of ANCA-associated vasculitis in Japan. A preliminary report from Japan-UK collaboration study.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1. 皮膚型PNと他の血管炎の男女比、年齢、皮疹、生検の比較

	MPA	CSS	WG	CPN
n	31	24	20	18
男女比	9:22	1:3	1:1	4:14
年齢				
中央値	67	52.5	56.5	45.5
範囲	28~77	17~89	12~73	17~76
平均±SD	60.1±14.8	50.8±16.2	49.9±19.0	42.2±19.0
皮疹	7 (23%)	12 (50%)	3 (15%)	18 (100%)
生検	11 (35%)	15 (63%)	16 (80%)	12 (67%)
確定された症例	10 (32%)	12 (50%)	10 (50%)	11(61%)
確定数/生検症例	91%	80%	63%	92%
部位				
腎	5	1	2	0
神経・筋	3	7	0	0
皮膚	1	5	1(腫瘤)、1(皮疹)	12
胃粘膜	0	1	0	0
鼻粘膜	0	0	12	0
肺(TBLB)、開胸	0	0	TBLB 2、開胸 1	0

表2. 各種血管炎の皮膚所見(記載頻度の多かった順に示した。)

MPA	CSS	WG	CPAN
1. 紫斑 顔面 両下腿	1. 紫斑 下腿(3症例) 腹部から大腿部 前腕と下腿	1. 紫斑 下腿紫斑 色素沈着、紫斑	1. 結節性紅斑 3症例
2. 結節 大腿 両下腿、上肢	2. 網状紅斑 右上肢水泡を伴う	参考所見 歯肉の腫脹	2. 皮下結節 3. 下腿潰瘍 7症例 1例壊疽…切断
3. 網状紅斑 両下腿 両上下肢	3. 紅斑 全身の紅斑 前腕と下肢に5- 10mmの紅斑	3. 紅斑 眼球突出 2症例 鞍鼻	
	4. 皮膚潰瘍 多発性皮膚潰瘍		
	5. 蕁麻疹		
	6. 好酸球性毛包炎		

表3. 皮膚型PNの観察期間、検査所見など

- 発症から観察年数 0~21年
 中央値: 7.5年
 平均: 7.1±6.2年
- CRP 0~13.1 mg/dl
 中央値: 4.1 mg/dl
 平均: 4.2±4.3 mg/dl
- DSA 2症例のみ施行: いずれも陰性
- ANCA 陰性 MPO: 17例陰性、PR-3: 16例陰性
- 併発症 2例 RA, 1例 LAC陽性

表 4 . 皮膚型 PN の概念

- A chronic relapsing arteritis of subcutaneous, and deep dermal, small and medium-sized vessels.
- It spares visceral organs, and only rarely evolves into a systemic disease. (David J : Arch Dis Child 69:685-8,1993)
- Necrotizing Inflammation , in various stage of healing, which involves small and medium-sized arteries.
- A neutrophilic infiltrate with leukocytoclasia.
- Support for hypersensitivity as a possible cause for CPAN.
 Drugs, streptococcal infection, chronic inflammatory bowel disease
- A diagnosis of CPAN only when systemic disease has been excluded.
- The most common sites of involvements are the lower legs, ankles, and feet.
- Lower Limb ulcerations have been seen in as many as 50% of patients with CPAN.

図 5 . 皮膚型 PN の重症度分類

Cutaneous PAN: Classes of severity

Class	Cutaneous manifestations	Extracutaneous manifestations
I- Mild cutaneous	Nodular skin Lesions, Livedo reticularis	Mild polyneuropathy may be present
II- Severe cutaneous	Livedo more prominent, Ulceration	Mild polyneuropathy frequent present, Fever malaise, arthralgias (acute phase)
III-Progressive systemic	Necrotizing livedo, Acral gangrene	Progressive musculoskeletal involvement, Foot drop, Visceral involvement (eventually), Autoimmune tests positive

J Dermatol,16:429-42,1989, Br J Dermatol 136: 706-13,1997,
 Ball GV, Louis Bridges S Jr.ed.s. Vasculitis. "Cutaneous Vasculitis" Oxford 2002, 321-328,

血管炎・腎炎の免疫グロブリンの治療に関する研究 免疫グロブリン大量療法の臨床的試み

分担研究者 今井圓裕 大阪大学医学系研究科老年・腎臓内科 助教授

研究要旨： ANCA 関連腎炎に対する免疫グロブリン大量療法の効果と安全性の検討を臨床的に行った。ANCA 関連腎炎による急速進行性糸球体腎炎を呈している患者 2 名に対して γ グロブリン大量療法を行い、その治療効果について検討し、感染予防・治療効果の点において、いずれも良好な治療成績を得た。

A. 研究目的

ANCA 関連腎炎に対する免疫グロブリン大量療法の効果と安全性を検討する

B. 研究方法

ANCA 関連腎炎による急速進行性糸球体腎炎を呈している患者に対して γ グロブリン大量療法を行い、その治療効果について検討した。また、本治療の治療効果に対する多施設共同研究のプロトコール作成・症例登録に参加し、その結果の解析に協力した。

C. 研究結果

本院で 2 症例の ANCA 関連腎炎に対して γ グロブリン大量療法を行い、いずれも良好な治療成績を得た。また、本症例中 1 例が B 型肝炎の感染症の合併があったが、いずれも経過中顕在化することなく本治療法の安全性が示された。

D. 考案

ANCA 関連腎炎による急速進行性糸球体腎炎は 6 ヶ月後生命予後が 70% 程度であり、極めて予後の悪い疾患である。 γ グロブリン大量療法を行った 2 症例ではいずれ

も生命予後、腎予後とも良好であり有効な治療法と考えられた。今後、人工 γ グロブリンの開発により本治療法の安全性が向上し、より一般的な治療法となることが期待される。

E. 結論

ANCA 関連腎炎に対して γ グロブリン大量療法を行い、良好な治療成績を得た。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 1. 大量 γ グロブリン (IVIG) 療法が著効した、B 型慢性肝炎合併、MPO-ANCA 関連腎炎の一例 日本腎臓学会西部学術大会 10 月 19-20, 2007 福井
 2. A Case of ANCA associated nephropathy along with chronic B hepatitis treated by IVIG, International conference on Regulation of inflammatory Diseases Vasculaitis and asthma 2008 in chiba 1 月 18-19, 2008 千葉

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

急速に進行する MPO-ANCA 関連腎炎における γグロブリン治療介入時期の検討

分担研究者 湯村和子 自治医科大学 腎臓内科 教授
(研究協力者 板橋美津世 東京女子医科大学 助教)

研究要旨： 急速進行性腎炎の経過をとり多彩な病態を持つ MPO-ANCA 関連腎炎は、早期の診断が重要であるが、そのために BVAS を普及させる。末期腎不全に至る腎障害の腎病変の特徴を明らかにし、血清クレアチニンとの関連も解析する。γグロブリン大量療法など、いかなる治療を試みても、組織学的にすでに可逆性の病変であれば、治療に不応性であることを明らかにしたい。このことにより、腎機能が改善するポイントを明らかにすることは、適切な治療の介入時期を腎生検施行出来ない症例でも予測することが出来る。

A. 研究目的

腎生検を行った MPO-ANCA 腎炎の患者で透析導入あるいは非透析導入にわけ、血清クレアチニン値とその組織病変、治療について検討する。

B. 研究方法

血管炎としての活動性を Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS)で評価した。腎生検所見を糸球体、間質および小血管病変をスコアリングして評価した。腎予後は、1年後に維持透析に至った群と透析離脱例も含めた腎機能保存群に分けて検討した。

C. 研究結果

平均年齢は 58.6±13.9 歳で、男女比はやや女性に多く、60代が 44%と最も多かった。血管炎の活動性は BVAS で平均 14.8±3.2 であった。CRP は腎限局では 1.2±1.4、多臓器型では 12.6±10.5 と有意に腎限局型は低

値であった ($p=0.0079$)。一方、MPO-ANCA は腎限局型では 393 ± 320 EU、多臓器型では 355 ± 280 EU であり、両群の間に有意差はなかった ($p=0.793$)。1年後に維持透析に至らなかった腎生存群では腎生検時の血清クレアチニンが 3.57 ± 2.31 mg/dl であり、維持透析になった透析移行群の血清クレアチニン 9.10 ± 2.6 mg/dl に比し有意に低値であった。 ($p=0.000259$) 腎病理所見では、全糸球体における球状硬化糸球体率は、腎生存群が $24.7\pm 19.9\%$ 、透析移行群が $68.5\pm 19.7\%$ と透析移行群は有意に高値であった ($p=0.0004$)。ステロイドパルス療法が 5 例、ステロイドセミパルス療法が 6 例であり、免疫抑制薬の併用は 4 例であった。初期治療後 1 ヶ月目には全例において、BVAS における新しい項目は 0 となった。初期治療後 1 ヶ月間における透析移行例は 6 例と 33%であったが、そのうち 2 例は初期治療により透析から離脱した。しかし、2 例は 1

年以内に新たに透析導入となり、1年後の時点で維持透析となった症例は6例(33%)であった。

D. 考案

発症時の血清クレアチニン、腎生検所見における硬化糸球体の割合は腎予後の有意な規定因子であった。クレアチニン上昇速度や半月体は腎予後と有意な相関が見られなかった。BVASの総点や腎外病変の有無は腎予後との相関はなかったが、BVASの腎の項目の合計点数が高いほど維持透析に至っている傾向がみられた。

E. 結論

腎単独型に比し、多臓器型では有意にCRPが高い傾向があった。腎生検による球状硬化糸球体の割合は腎予後と強い相関を示し、腎生検時の血清クレアチニン値は腎予後に関係する因子であった。半月体形成率と腎予後とは有意な相関がなかった。すでに球状硬化への進展した糸球体の頻度が高いほど、治療を行っても腎機能の改善には寄与しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamazaki M, Takei T, Otsubo S, Iwasa S, Yabukui Y, Suzuki K, Koike M, Uchida K, Tsuchiya K, **Yumura W**, Horita S, Honda K, Akiba T, Nitta K
Wegener's granulomatosis complicated by intestinal ulcer due to cytomegalovirus infection and by thrombotic thrombocytopenic purpura.. Intern Med. 46 (17) : 1435-1440, 2007
2. Takahashi M, Otsubo S, Takei T, Sugiura H, Yoshida K, Tamei N, Koike M, Uchida K, **Yumura W**, Kawamura S, Horita S, Akiba T, Nitta k
Anti-glomerular basement membrane

antibody disease with granulomatous lesions on renal biopsy.. Inten Med. 46 (6) : 295-301, 2007

3. 湯村和子:BVAS(Birmingham vasculitis activity score)とVDI(vasculitis damage index). リウマチ科 (37(3) : 268-278, 2007
2. 学会発表
 1. 湯村和子:ANCA 関連腎炎・血管炎の将来への展望に向けて. 第6回自治医科大学シンポジウム 2007.9, 栃木
 2. 湯村和子, 小池美菜子, 鈴木啓子, 板橋美津世, 塚田三佐緒, 代田さつき, 武井 卓, 内田啓子, 新田孝作
尿異常を指摘される時期と至適治療の時期. 日本腎臓学会誌 49 (3) : 300, 2007 : 第50回日本腎臓学会学術総会, 浜松
 3. 湯村和子, 鈴木和男, 中山俊憲
Bovine serum albumin(BSA)誘導腎炎におけるCD69の関与. 炎症制御治療フォーラム : 2007, 千葉
 4. **Yumura Wako**:Contribution of CD69 in MPO-associated glomerulonephritis in mice. 13th International vasculitis & ANCA workshop : 2007, Mexico
 5. 湯村和子, 代田さつき, 杉浦秀和, 武井卓, 内田啓子, 新田孝作
抗好中球細胞体抗体(ANCA)関連腎炎における臨床病態と治療. 日本内科学会誌 96 (臨時増刊) : 208, 2007 : 第104回日本内科学会 2007.4, 大阪
 6. **Yumura Wako** : Treatment of Lupus Nephritis. 第5回日韓腎臓フォーラム : 2007, 釜山

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

大量 γ グロブリン療法が有効であったPR3-ANCA陽性、 全身性エリテマトーデスの1例

分担研究者：山縣 邦弘 筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系腎臓内科 教授

研究協力者

萩原 正大	筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系腎臓内科	講師
臼井 丈一	筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系腎臓内科	講師
森戸 直記	筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系腎臓内科	講師
斎藤 知栄	筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系腎臓内科	講師
楊 景堯	筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系腎臓内科	准教授

研究要旨： 全身性エリテマトーデス(SLE)では、様々な自己抗体を伴うことが知られている。SLEの加療中にCNSループスによるけいれん発作を併発し、血清にPR3-ANCA高度陽性を認め、大量 γ グロブリン療法が奏功した一例を経験したので報告する。

症例は 24 歳女性。1年前より顔面紅斑、口腔内潰瘍、脱毛傾向を自覚するようになり、その後両下肢の浮腫が出現、近医受診し、SLE、ループス腎炎（WHO IV-G(A)；半月体形成性糸球体腎炎）と診断された。2ヵ月にわたるプレドニン(PSL) 60mg/day の治療に加え、エンドキサンパルス療法、ステロイドパルス療法を施行されたが、ネフローゼ、貧血、炎症所見の改善が認められず、腎機能障害が進行したため当院転院となった。転院後1ヵ月間は PSL 60mg/day を継続し、CMV 陽性、呼吸器感染症合併のため γ グロブリン製剤（5g 6日間）の投与など感染症に対して加療を行った。腎機能障害は次第に改善し、補体も正常化した。CNSループスを疑わせる痙攣発作を発症し、貧血の進行、CRP 高値を認め、PR3-ANCA 142 EU/l と高値を確認したため、病状に ANCA の関与を否定できず、IVIg（20g 5日間）を施行した。その後、貧血、炎症所見は改善し、PR3-ANCA も 40-50 EU/l まで低下し、PSL の減量後退院となった。

大量のステロイド薬、免疫抑制薬の使用にもかかわらず、治療抵抗性であった PR3-ANCA 陽性の全身性エリテマトーデスの1例に対して、IVIg を施行し良好な結果を得た。

A. 研究目的

これまでに、全身性エリテマトーデス(SLE)に対する大量 γ グロブリン療法(IVIg)の有効性は、いくつかの論文にて報告されている。IVIgの効果発現の機序としては、自己抗体の抗原との結合を阻害することや、免疫複合体を凝集させることで食食を促進させることなどが推測されている。また、大量のステロイド薬を使用され免疫能低下状態にあるようなSLE症例に対しては、その易感染性の改善という観点からもIVIgの効果が期待さ

れている。

B. 研究方法

我々はSLEの加療中にCNSループスによるけいれん発作を併発し、血清にPR3-ANCA高度陽性を認め、大量 γ グロブリン療法が奏功した一例を経験したので報告する。

C. 研究結果

[症例] 24歳女性。
既往歴：特記事項なし

家族歴：特記事項なし

現病歴：1年前より顔面紅斑、口腔内潰瘍、脱毛傾向を自覚するようになり、その後両下肢の浮腫が出現、近医受診し、SLE、ループス腎炎（半月体形成性糸球体腎炎）と診断された。近医に入院し、2ヵ月にわたるプレドニン(PSL) 60 mg/day治療に加え、エンドキサンプルス療法、ステロイドパルス療法を施行されたが、ネフローゼ、貧血、炎症所見の改善が認められず、腎機能障害が進行したため当院転院となった。

[入院時現症]

体重 54.6 kg、体温 38.2 °C、血圧 148/100 mmHg、脈拍 120 bpm、心雑音なし、肺雑音なし、腹部所見異常なし、表在リンパ節は触知しない、神経学的所見に異常はない。

[入院時検査所見]

尿一般：SG 1.016, PH 5.5, pro (3+), Glu (-), Ket (-), Bld (3+)

尿沈査：RBC 5-9 /HPF, WBC 1-4 /HPF, 硝子円柱 >100 /HPF, 顆粒円柱 20-99 /HPF, 脂肪円柱(+)

尿蛋白 6.3 g/day, 尿化学：Ccr 12.2 ml/min

血算：WBC 118200, Hb 6.8 g/dl, Plt 7.8万
凝固系：PT-INR 1.20, APTT 35.7秒, FDP 22.4 μg/ml

生化学：TP 3.9 g/dl, Alb 1.9 g/dl, AST 43 U/l, ALT 68 U/l, LDH 860 U/l, ALP 182 U/l, γ-GTP 89 U/l, CHE 80 U/l, BUN 135.7 mg/dl, Cre 3.90 mg/dl, UA 10.9 mg/dl, Na 133 mEq/l, K 3.7 mEq/l, Ca 5.5 mg/dl, P 6.6 mg/dl, CK 1385 U/l, T-Chol 371 mg/dl, TG 1131 mg/dl, CRP 0.26 mg/dl,

免疫系：IgG 454 mg/dl, IgA 55 mg/dl, IgM 66 mg/dl, C3 49 mg/dl, C4 11 mg/dl, CH50 31.2 U/ml, ANA speckled x 320, 抗ds-DNA抗体 (-), LAC (-), MPO-ANCA <10 EU, PR3-ANCA 39 EU, ハプトグロビン 154 mg/dl

感染症：HBs-Ag (-), HCV-Ab (-), HIV-Ab (-)

[入院後の経過]

患者の全経過を図1に示す。

当院入院後、PSL 60mg/dayを継続し、CMV陽性、呼吸器感染症合併のためγグロブリン製剤（5g 6日間）の投与など感染症に対して加療を行った。

腎機能障害、補体は改善傾向であったが、発熱、CRPの改善は認めず、転院1週間後にはCNSループスを疑わせるような痙攣発作を発症し、PR3-ANCA 142 EU/lまで上昇した。感染兆候もあり、これ以上のステロイド薬の追加投与や、免疫抑制薬の追加投与は危険が高いと判断し、IVIg (20g 5日間)を施行した。

その後、発熱、炎症所見は改善し、PR3-ANCA も40-50 EU/lまで低下し、PSLの減量後退院となった。

D. 考案

SLEの症例において、MPO-ANCA陽性例はよく知られているが、PR3-ANCA陽性例はそれほど多くない。表1はこれまでの報告をまとめたものである。PR3-ANCAもしくはC-ANCA陽性例は3%程度であった。陽性例の報告の多くがヨーロッパからのものであり、これまでのPR3-ANCA陽性血管炎の報告と同様で、SLE症例の中で自己抗体としてのANCAが合併した場合、PR3-ANCAが陽性となるのは、圧倒的にヨーロッパの症例が多いことが明らかであった。

SLEに対するIVIgの有効性は、いくつかの論文にて報告されているが、本症例のようにPR3-ANCAが陽性であった症例に関する報告はない。本症例は、大量のステロイド薬と免疫抑制薬が投与されているにもかかわらず、PR3-ANCAが強陽性であり、発熱などの症状の改善を得られなかった症例であった。このような症例に対して、IVIgを施行したところ、PR3-ANCA値を含め、SLEのコントロールは良好となった。

PR3-ANCAに対するIVIgの効果ならびに、PR3-ANCA陽性SLEに対する治療を考えていく上で貴重な症例であると考えられた。

E. 結論

大量のステロイド薬、免疫抑制薬の使用にもかかわらず、治療抵抗性であったPR3-ANCA陽性の全身性エリテマトーデスの1例に対して、IVIgを施行し良好な結果を得た。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 山縣邦弘、平山浩一、高橋秀人、小山哲夫 わが国の急速進行性糸球体腎炎の治療におけるアフェレーシス療法の位置づけ 日本アフェレーシス学会雑誌、25(1)、12-20,2006
2. 平山浩一、山縣邦弘、中村日出子、小林正貴、小山哲夫 急速進行性糸球体腎炎 総合臨床 55(4) 1281-1287,2006
3. 山縣邦弘、小山哲夫 ANCA関連血管炎腎と透析、60(2) : 252-256, 2006
4. 田中宏明、山縣邦弘【腎・尿路疾患 一般診療から専門診療へ】 腎・尿路疾患の診断と治療 疾患各論 急性腎炎症候群・急速進行性腎炎症候群 Medicina 43巻3号 428-430,2006
5. 清水芳男 山縣邦弘、小山哲夫【分子腎臓病学 分子生物学的アプローチと分子病態生理学】 臨床編 各種腎疾患別の分子病態生理学 成因,病態,治療 原発性糸球体疾患 急速進行性糸球体腎炎 (RPGN) 日本臨床 64巻増刊2 403-407 2006
6. 山縣邦弘 成人のA群β溶連菌による急性糸球体腎炎 日本医事新報 4294,90-91, 2006
7. 山縣邦弘 急速進行性糸球体腎炎 腎と透析、61(1)、105-109,2006
8. 金子修三、山縣邦弘 遷延する管内増殖性糸球体腎炎の診断と治療 腎と透析 61(3): 321-325, 2006
9. Kai H, Shimizu Y, Hagiwara M, Yoh K, Hirayama K, Yamagata K, Ohba S, Nagata M, Koyama A Post-MRSA infection glomerulonephritis with marked Staphylococcus aureus cell envelope antigen deposition in glomeruli. J Nephrol. 19(2):215-219.2006
10. Yamagata K, Ishida K, Sairenchi T, Takahashi H, Ohba S, Shiigai T, Narita M, Koyama A. Risk factors for chronic kidney disease in a community-based population: a 10-year follow-up study. Kidney Int. 71(2):159-66.2007
11. 山縣邦弘 ANCA関連血管炎 炎症と免

疫 15(1):128-133, 2007

12. 金子修三、山縣邦弘 急性糸球体腎炎の治療ガイド 腎と透析62(3): 465-469, 2007
13. 山縣邦弘 ANCA関連血管炎における腎障害 リウマチ科 38(1), 78-85, 2007
14. 山縣邦弘急速進行性糸球体腎炎 総合臨床 56, 1361-1368, 2007
15. 荒川洋、山縣邦弘 感染症関連糸球体腎炎 MRSA関連腎症 日本医師会雑誌 136巻(2), S170-S171, 2007
16. Yamagata K, Iseki K, Nitta K, Imai H, Iino Y, Matsuo S, Makino H, Hishida A. Chronic kidney disease perspectives in Japan and the importance of urinalysis screening. Clin Exp Nephrol. 12(1):1-8, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

図1

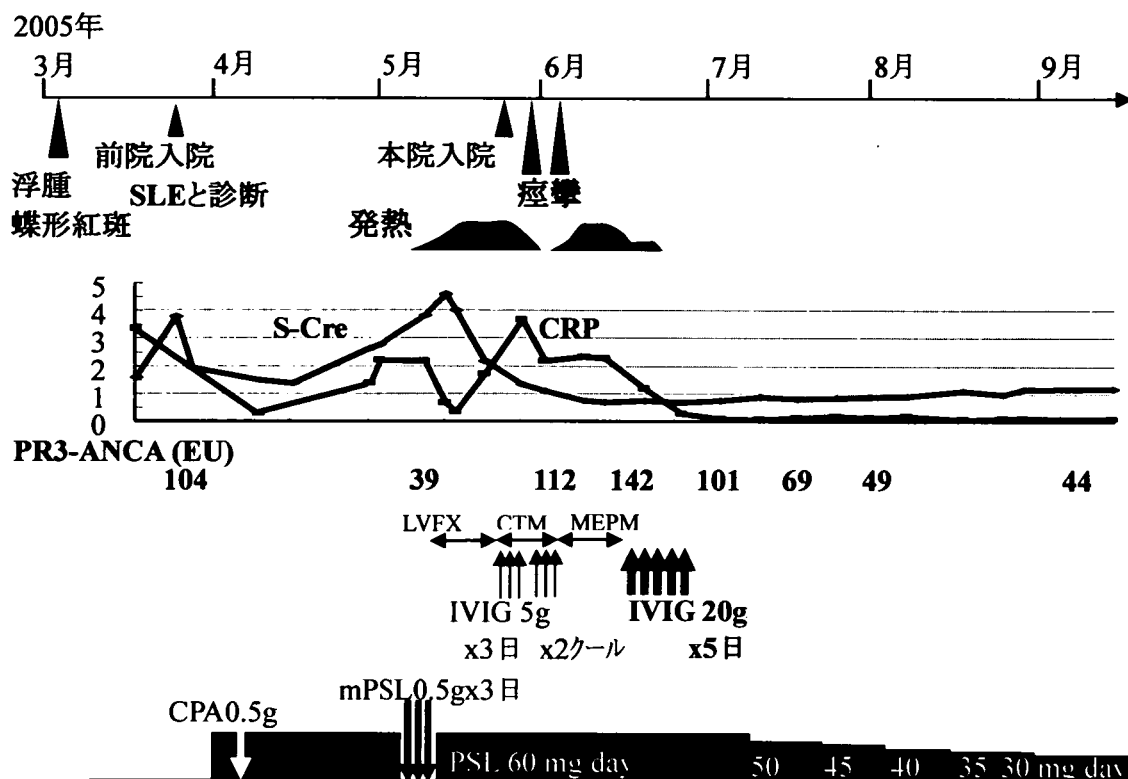


表 1

報告者	報告年	国	SLE (n)	MPO(p)-ANCA	PR3(c)-ANCA	ANCA (others)
Pradhan VD, et al.	2004	India	59	12	0	10
Manolova I, et al.	2002	Bulgaria	20	5	6	
Molnar K, et al.	2002	Hungary	41	10	3	
Manolova I, et al.	2001	Bulgaria	55	6	7	24
Chin HJ, et al.	2000	Korea	51	16	3	
Faure-Fontenla MA, et al.	1999	Mexico	50	8	0	
Galeazzi M, et al.	1998	Italy	566	53	10	107
Nishiya K, et al.	1997	Japan	31	5	0	11
Spronk PE, et al.	1996	Netherlands	84	7	0	23
			957	122 (13%)	29 (3%)	175

宮崎地区における ANCA 関連腎血管炎の疫学

分担研究者 布井博幸 宮崎大学医学部小児科 教授
研究協力者 藤元昭一 宮崎大学医学部循環体液制御学 准教授

研究要旨： 宮崎県下での ANCA 関連腎血管炎（ANCA-associated primary renal vasculitis ; ANCA-PRV）の 2005～2007 年の 3 年間の疫学調査を行い、先の 5 年間（2000～2004 年）の後方視的調査結果と比較検討した。この 3 年間の ANCA-PRV の発生頻度は先の 5 年間と同等であったが{19.6 (CI.17.1-22.2) vs. 14.8 (CI. 10.8-18.9) /100 万人・年}、今回の調査では以前には確認されなかった Wegener 肉芽腫、Churg-Strauss 症候群に伴う ANCA-PRV を各々 2 例、3 例認めた。また、PR3-ANCA 陽性の 3 症例も今回は確認された。しかし、今回の検討においても宮崎地区における PRV のほとんどは MPA/RLV であり、しかも多くは MPO-ANCA 陽性であることが再確認された。

A. 研究目的

特発性腎血管炎(Primary Renal Vasculitis; PRV)は、腎臓の小動脈から細静脈にかけて血管炎を起こす疾患で、これまで欧米では年間 100 万人当たり 20 名の全身性血管炎 (primary systemic vasculitis : PSV)患者が発生し、その内訳は 5-10 名の Wegener 肉芽腫(WG)患者、6-8 名の顕微鏡的多発血管炎患者(Microscopic polyangiitis; MPA)、1-3 名の Churg-Strauss 症候群(CSS)患者となっている¹⁾。また、PR-3 陽性の MPA の血管炎は欧州で多く (38.3%)、続いて米国 (27%)、日本 (2.5%) と報告されている。一方、MPO-ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody) 陽性の MPA 患者は欧州では少ないことが知られている。日本での病院単位の有病率調査では、MPA 患者は年間 100 万人当たり 15 名が MPA および腎限局型血管炎(Renal

limited vasculitis; RLV) (MPO-ANCA 陰性の患者も含む) で、2 名が Wegener 肉芽腫患者の有病率 (prevalence) と報告されている^{2,3)}。しかし、これまで欧米と比較できる患者発生率 (incidence) に関するデータがない状態であった。我々は、一昨年 2000-2004 年の 5 年間の ANCA-associated PRV 症例の発生頻度を後方視的に明らかにした⁴⁾。今回は PRV について、前回調査後の 2005 年 1 月から 2007 年 12 月までの前方視的調査を行い、過去 5 年間と比較することにより、① PRV の発生頻度はほぼ欧米と同等、② Wegener 肉芽腫症は日本ではまれ、③ MPO-/PR3-ANCA 比は欧米に比べて明らかに日本で高いことを再確認したので報告する。

B. 研究方法

特発性腎血管炎(PRV)の調査対象はEuropean Systemic Vasculitis Study Group (EUVAS)の診断

基準に従った。症例は腎臓内科があり腎生検を施行している宮崎大学附属病院、宮崎県立宮崎病院、古賀総合病院、社保宮崎病院の4病院（宮崎県下で腎生検を施行している全て）の他、腎臓内科専門外来を持つ宮崎県下の全ての病院（宮崎県立延岡病院、宮崎県立日南病院、都城藤元早鈴病院、日向市千代田病院、延岡医師会病院）で調査を行った。さらに今回の調査では、膠原病病棟・外来を持つ宮崎大学附属病院、宮崎県立宮崎病院、市民の森病院の原発性血管炎（Primary Systemic Vasculitis; PSV）症例（腎症の有無を問わず）の収集も行なった。

今回の調査でも倫理面では患者名が特定できないよう配慮した。

C. 研究結果

ANCA-associated PRVとして登録された数は前回の5年間調査での総数56例に対し、今回の調査では2005年、2006年、2007年にそれぞれ14例、17例、14例で、男女比は25:20であった（図1, 2）。2004年までの5年間調査での平均年齢は70.4±10.9歳、今回の3年間の調査では70.1±11.7歳と同等であり、65歳以上が76%、発症のピークは70～74歳であった（図3）。PRVの内訳ではMPA/RLV 40例、WG 2例、CSS 3例であり、ANCAはMPO陽性36例、PR3陽性3例であった（表1a）。WG症例は2症例ともPR3-ANCA陽性、CSS症例は3症例ともMPO-ANCA陽性であった。宮崎県の平成19年度(2007年)における患者発生状況から対象となった患者の分布する地域（宮崎県北部地区を除く）での15歳以上の成人人口および65歳以上の老人人口は各々76.4万人、21.5万人である（宮崎県資料による）。2005年から2007年の3年間の調査でPRVを発症された患者さんは対象地区では45名で、平成17年度の人口から計算すると、その発症頻度は成人人口100万人当たり19.6 (95% C.I 17.1-22.2)

名、老人人口100万人当たり、52.8 (95% C.I 41.8-63.8) 名であった。同様に成人人口100万人当たりの発症頻度は MPA/RLV 17.5 (95% CI 14.4-20.5)、WG 0.9 (95% CI 0.02-1.73)、CSS 1.5 (95% CI -.02-2.79)と計算された。以上の結果をまとめて表2に示す。さらに前回の調査と合わせて計算すると、成人人口100万人当たりのPRV発症頻度は16.5 (95% CI 13.5-19.4)であり、人口3万人以上の都市部と以下の地域での発症率に差はなく (16.0, 95% CI 12.1-19.9 vs. 17.4, 95% CI 10.3-24.5)、発症時期にも一定の傾向は認めなかった(表3)。

図1 Distribution of the patients with new-onset of PRV

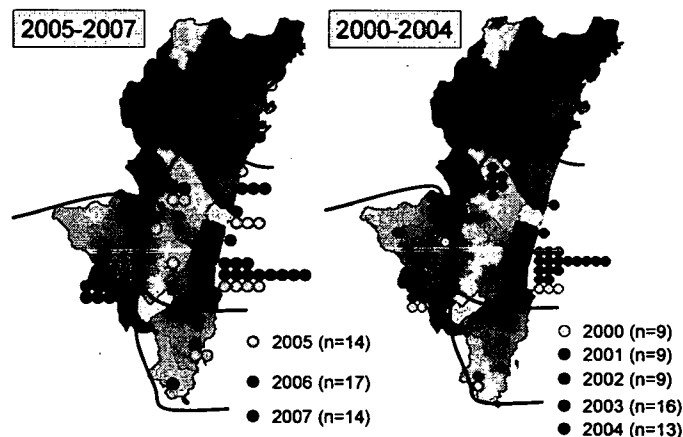
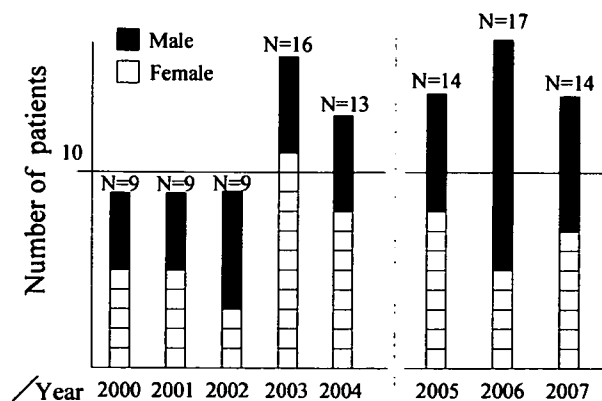


図2 Annual number of the patients with PRV



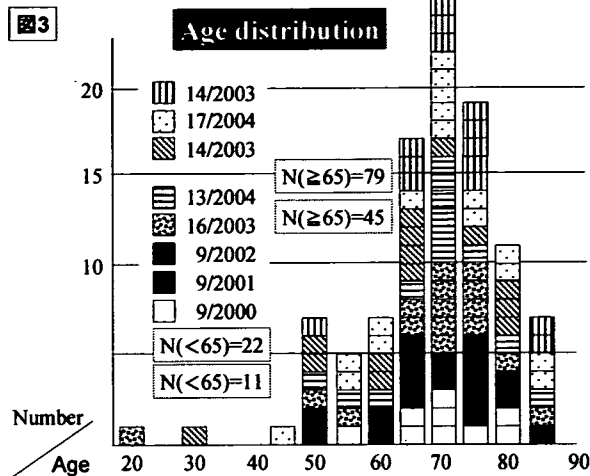


表3 Seasonal difference of the disease onset in urban and rural areas (2000-2007)

season	number of patients (%)	annual incidence *	
		urban area	rural area
Feb. - April	21 (21.2%)	11.6	7.4
May - July	27 (27.3%)	13.8	11.9
Aug. - Oct.	30 (30.3%)	12.4	19.4
Nov. - Jan.	21 (21.2%)	8.7	13.4

* per million adults

表1 Classification and ANCA serology

(a) ANCA-associated Primary Renal Vasculitis (PRV)

	Number	MPO(+)/ PR3 (+)
MPA/RLV	40	33 / 1
WG	2	0 / 2
CSS	3	3 / 0
Total	45	36 / 3

(b) Primary systemic vasculitis (PSV) without renal involvement

	Number	MPO(+)/ PR3 (+)
MPA/RLV	2	2 / 0
WG	5	3 / 2
CSS	4	3 / 0
Total	11	8 / 2

今回行なった新たな調査で腎症を伴わないPSV例が3年間で11症例登録され、WG 6例、CSS 3例、MPA/RLV 2例であり、ANCAはMPO陽性8例、PR3陽性2例であった(表1b)。上記のPRV症例と合わせた56症例で検討すると、臓器障害としての腎症はMPA例では17/19(MPA&RLVでは40/42)、WG例では2/7、CSSでは3/6であった(表4)。なお、WG7例の中でPR3-ANCA陽性は4例のみで、他の3例はMPO-ANCA陽性であった(表5)。

表2 Incidence of PRV: Comparison between 2000-2004 and 2005-2007

	2000-2004	2005-2007
male : female	24 : 32	25 : 20
mean age (yr)	70.4 ± 10.9	70.1 ± 11.7
MPO/PR3-ANCA	51 / 0	36 / 3
Incidence (/million)		
total	14.8 (10.8-18.9)	19.6 (17.1-22.2)
MPA/RLV	14.8 (10.8-18.9)	17.5 (14.4-20.5)
WG	0	0.9 (0.02-1.73)
CSS	0	1.5 (-0.2-2.79)

(95% C.I.)

表4 Organ involvements in 56 patients with primary systemic vasculitis (PSV)

	MPA	RLV	WG	CSS
Number	19	23	7	6
ENT	1	0	7	0
Respiratory	16	0	3	6
Nervous	3	0	0	4
Kidney	17	23	2	3

表5

ANCA serology in 56 patients
with primary systemic vasculitis (PSV)

	MPA	RLV	WG	CSS
Number	19	23	7	6
pANCA/MPO (%)	18 (95%)	19 (83%)	3 (43%)	5 (83%)
cANCA/PR3	1	0	4	0
Negative ANCA	1	4	0	1

D. 考案

宮崎県は人口 100 万人の県であり、人口の変動も少なく (5% 以下)、特に 65 歳以上の老人人口で考えると 0.8% とほとんど人口移動は認められず、疫学調査には適切な地区だと考えられる。宮崎県北での患者発生が少なく、他県への紹介などが考えられたので、患者分布から前回の調査と同様に県央、県南、県西地区に限った統計を行った。調査した患者は 3/4 以上の患者が 65 歳以上の高齢者で前回同様に発症のピークは 70~74 歳であった (図 3)。

今回の調査では宮崎地区での PRV の発症頻度は年間成人人口 100 万人当たり 19.6 名、65 歳以上の老人人口 100 万人当たり 52.8 名であった。この数値は、英国など欧州の年間成人人口 100 万人当たり 12-18 名^{5, 6)} とほぼ同率の発症頻度であった。しかし、宮崎地区では PRV の多くは MPO-ANCA 陽性の MPA/RLV 患者であるのに対し、米国の同じ診断基準で検討した Watts RA らの報告 (personal information) では PR3-ANCA 陽性の WG 患者が多い (表 6)。すなわち、今回の前方視的 PRV 患者の発生頻度調査でも前回の後方視的調査と同じくわが国の PRV 患者の多くは MPO-ANCA 陽性の MPA/RLV であることが確認された。なお、検査法については本研究班で欧米との比較研

究を行い、感度や操作上に違いが無いことを確認している。

表6

Incidence of vasculitis with renal involvement:
Comparison between Japan and UK

	Japan (Miyazaki)	UK
male : female	25 : 20	16 : 14
mean age (yr)	70.1	64.8
MPO/PR3-ANCA	36 / 3	15 / 11
Incidence (/million)		
total	19.6 (17.1-22.2)	13.9 (9.48-19.8)
MPA/RLV	17.5 (14.4-20.5)	5.8 (3.1-10.0)
WG	0.9 (0.0-1.7)	6.3 (3.4-10.6)
CSS	1.5 (-0.2-2.8)	1.4 (0.3-3.9)

(By RA Watts)

今回は新たに腎症を伴わない PSV 症例も登録した。これらの症例と腎症を伴う PRV 症例と合わせて欧州の報告と比較検討すると、わが国の WG 症例は腎症を伴わない軽症例が多く、PR3-ANCA 陽性の頻度も低い可能性が考えられた (表 4, 5)。

E. 結論

宮崎地区での PRV (MPA/RLV, WG, CSS による) の発生頻度は欧米とほぼ同率であるが、欧米と比べると MPO-ANCA 陽性の MPA/PRV 患者が日本では極めて高率であることが、この 3 年間 (2005~2007 年) の前方視的な調査でも確認された。今回の検討では新たに、わが国の WG 症例は腎症を伴わない軽症例が多く、PR3-ANCA 陽性の頻度も低い可能性も考えられた。

参考文献

- 1) Watts RA, Lane SE, Bentham G, et al.: Epidemiology of systemic vasculitis (SV) - a 10 year study. *Arthritis Rheum* 43: 422-427, 2000
- 2) Matsumoto M, Kobayashi S, Hashimoto H, et al: Nationwide epidemiological survey of refractory vasculitis (anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated

vasculitis, anti-phospholipid syndrome and temporal arteritis) in Japan. Annual report of the Research Committee on Intractable Vasculitides, the Ministry of Health and Welfare of Japan 15-23, 1998 (Japanese)

- 3) Sakai K, Kurokawa K, Koyama A, et al.: Clinical guideline of the rapidly progressive glomerulonephritis in Japan. Jpn J Nephrol 44: 55-82, 2002 (in Japanese)
- 4) Fujimoto S, Uezono S, Hisanaga S, et al.: Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture: The first population-based, retrospective epidemiological survey in Japan. Clin J Am Soc Nephrol 1: 1016-1022, 2006
- 5) Rainer Nowack, Ilona Grab, Luis-Felipe Flores-Suaréz, et al. ANCA titers, even of IgG subclasses, and soluble CD14 fail to predict relapses in patients with ANCA-associated vasculitis Nephrol Dial Transplant 2001, 16: 1631-1637
- 6) Lane SE, Watts RA, Shepstone L, et al. Primary systemic vasculitis: clinical features and mortality. QJM. 2005, 98:97-111.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uezono S, Sato Y, Hara S, Hisanaga S, Fukudome K, Fujimoto S, Nakao H, Kitamura K, Kobayashi S, Suzuki K, Hashimoto H, Nunoi H: Outcome of ANCA-associated primary renal vasculitis in Miyazaki Prefecture. Intern Med 46: 815-822, 2007
- 2) 藤元昭一：治癒可能な可逆性の腎不全-ANCA 関連腎血管炎-. 日州医事 No.689 : 97-98, 2007
- 3) 此元隆雄、高橋真悠子、布井博幸：小児ネフローゼ症候群に対するミゾリピン一日一回投与の再発抑制効果. 日本小児科学会雑誌 111: 568-572, 2007

2. 学会発表

- 1) Fujimoto S, Nunoi H: Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis (PRV) in Miyazaki during 2005-2007. International conference on regulation of inflammatory diseases: Vasculitis and asthma-2008 in Chiba. 2008.1 (Chiba, Japan)
- 2) Fujimoto S, Hara S, Uezono S, et al: Renal histology as a predictor for renal outcome in ANCA-associated primary renal vasculitis. ASN 40th Annual Meeting & Scientific Exposition. 2007.11 (San Francisco, USA)
- 3) Kobayashi S, Ito-Ihara T, Suzuki K, Fujimoto S, Watts RA, Scott DG, Jayne DJ, Hashimoto H: Incidence of ANCA-associated vasculitis

in JAPAN: A preliminary report from JAPAN-UK collaboration study. 14th International vasculitis and ANCA workshop. 2007.4 (Mexico)

- 4) 彦坂ともみ, 西浦亮介, 山田和弘, 原誠一郎, 藤元昭一, 北村和雄: Native MPO-ANCA が臨床経過を反映していた ANCA 関連腎血管炎 (PRV) の 1 例. 第 276 回内科学会九州地方会 2007.1 (博多)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Candida albicans 細胞壁多糖の構造と活性の培養環境による変化

分担研究者 大野尚仁 東京薬科大学 教授

研究要旨：我々は、*Candida albicans* IFO 1385 を完全合成培地で培養し、その培養上清中から得られる可溶性多糖画分（CAWS）は、川崎病類似の血管炎誘発活性のあることを報告してきた。本研究により、*Candida* 菌体周辺の環境変化は、細胞壁多糖、特に mannan の構造変化を誘起することを明らかにした。また、完全合成培地で培養した *Candida* の細胞壁抽出物は、CAWS と同様にマウスに対して急性のアナフィラキシー様ショックおよび血管炎を惹起した。興味深いことに、YPD 培地、27 °C で培養した菌体から得られた細胞壁抽出物のみが、これらの生理活性を有していなかった。YPD 培地、27 °C の細胞壁抽出物には他の細胞壁抽出物にはない、 β -mannan が特異的に発現されていたことから、 β -mannan が血管炎やアナフィラキシー様ショック誘発に対して負に作用していることが考えられた。

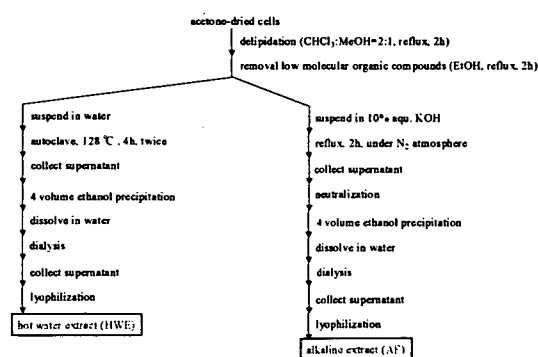
A. 研究目的

Candida の mannan は主たる細胞壁構成成分であり、菌の持つ病原性や抗原性を担っていることが知られている⁷⁰⁻⁷²。一方、*Candida* 細胞壁 mannan は、培養環境に鋭敏であり、その構造をダイナミックに変化させることが報告されている^{44, 45}。しかしながら、このような細胞壁 mannan の構造変化と、mannan の持つ病原性との関係に関する研究は行われていない。そこで、培養環境による細胞壁 mannan の構造変化を解析し、さらに、アナフィラキシー様ショック活性や血管炎誘発活性に対してどう影響するかを明らかにした。

B. 研究方法

培地成分(YPD medium または C-limiting medium)ならびに培養温度(27 °Cまたは

37 °C)を変えて *C. albicans* を培養し、得られた乾燥菌体を用いて scheme 1 に従って熱水抽出およびアルカリ抽出して細胞壁多糖を得た。



Scheme 1 Scheme of extractions of cell wall extract from *C. albicans* cultured by various culture conditions

これらの細胞壁多糖の糖質の組成を GLC で解析し、免疫化学的な性質は *Candida* 因子血清を用いて、さらに mannan 部分の構造

は NMR で解析した。

また、これらの細胞壁多糖をマウスに静脈内投与し、アナフィラキシー様ショック誘発活性を観察した。血管炎誘発活性は、これらの細胞壁多糖を 1 週目にマウスに 5 日間腹腔内投与し、5 週目に心臓を摘出、大動脈起始部の組織切片を作成し、HE 染色で観察した。

C. 研究結果

1. 培養温度や培地成分の変化により得た *Candida albicans* 細胞壁多糖の組成分析

培地成分(YPD medium または C-limiting medium)ならびに培養温度(27 °C または 37 °C)を変えて *C. albicans* を培養し, scheme 1 に従い, 得られた細胞壁抽出物の化学成分を Table 1 に示した。全ての抽出物は主に糖(41.7~56.9 %)と蛋白質(16.7~33.6 %)より構成されていた。主構成成分である糖質の組成を GLC を用いて解析したところ, mannose と glucose であった。Mannose/Glucose 比は, YPD medium で培養した菌体から得た抽出物(hot water extract derived from YPD medium at 27 °C (HWE-Y27); 22.0 : 1.00, HWE derived from YPD medium at 37 °C (HWE-Y37); 11.2 : 1.00)は, 完全合成培地である C-limiting medium で培養した菌体から得た抽出物よりも mannann が豊富であった(HWE derived from C-limiting medium at 27 °C (HWE-C27); 0.556 : 1.00, HWE derived from C-limiting medium at 37 °C (HWE-C37); 0.828 : 1.00)。

Table 1 Chemical composition of cell wall extracts from *C. albicans* cultured by various culture conditions

Culture media	Culture temperature (°C)	Extraction method	Yield (%)	Total carbohydrate (%)	Total protein (%)	Elemental analysis (C:H:N)	Sugar composition (Man:Glc)	Endotoxin content (ng/mg)
C-limiting medium	27	Hot water	21.0	50.3	20.7	40.8:7.09:4.20	0.556:1.00	N.D.
		Alkaline	14.6	45.9	16.7	41.0:7.04:5.41	2.52:1.00	N.D.
	37	Hot water	24.2	54.4	30.7	43.1:6.96:4.91	0.828:1.00	5.20
		Alkaline	14.2	41.7	17.1	42.9:6.76:4.90	2.17:1.00	3.00
YPD medium	27	Hot water	19.6	53.6	28.2	42.7:6.99:5.72	22.0:1.00	N.D.
		Alkaline	24.0	48.7	20.1	43.8:7.08:5.55	8.94:1.00	N.D.
	37	Hot water	26.9	43.3	33.6	43.9:6.90:8.39	11.2:1.00	12.4
		Alkaline	19.2	56.9	22.3	42.8:6.86:4.58	8.03:1.00	N.D.

2. 抗血清を用いた免疫化学的解析

得られた抽出物の mannann 構造を, *Candida* cell wall mannann に対する抗血清である *Candida* 因子血清を用いて検討した (Table 2)。C-limiting 培地で培養した菌体由来の細胞壁抽出物は, Fab の nos. 11, 13b および 13 と反応性が高かった。一方, YPD 培地で培養した菌体由来の細胞壁抽出物は, Fab の nos. 4, 5 および 6 との反応性が高かった。さらに, 37 °C 培養では, Fab の nos. 5 および 6 との反応性が低下した。

Table 2 The reactivity of cell wall extract to *Candida* serum factors

Culture media	Culture temperature	Extraction method	Serum factor											
			1	4	5	6	8	9	11	13b	13	34		
C-limiting medium	27	Hot water	+++	++	-	+	-	-	-	++	+	+	-	
		Alkaline	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	37	Hot water	+++	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	
		Alkaline	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
YPD medium	27	Hot water	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	+	-	
		Alkaline	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	
	37	Hot water	+++	+++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	
		Alkaline	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+++ , O.D.>2.0; ++, 2.0>O.D.>1.5; +, 1.5>O.D.>0.5; -, 0.5>O.D.

3. NMR を用いた詳細な構造解析

mannann 部分の違いをより詳細に明確にするために, ¹H,¹³C-HSQC スペクトルを測定した。その結果, C-limiting medium 中 27 °C にて培養した菌体より得た mannann

(M-C27), C-limiting medium 中 37 °Cにて培養した菌体より得た mannan (M-C37), YPD medium 中, 27 °Cにて培養した菌体より得た mannan (M-Y27)および YPD medium 中, 37 °Cにて培養した菌体より得た mannan (M-Y37)は各々, 同じシグナルも存在しており, 全てを合計すると 34 個のシグナルが観測された(Fig. 1). 各々のシグナルはその³J_{H1, H2} (Hz)より, no 1~30 については mannose 残基, no 31~34 については glucose 残基であることが明らかとなった. さらに, 各々のシグナルについて, 糖残基のコンフォメーションを決定するために, 取り込み中にデカップルしない¹H,¹³C-HSQC スペクトルより¹J_{H1, C1}を求めたところ, Table 3 に示す結果が得られた. すなわち, 31 個中 19 個のシグナルはα-mannose 残基, 残りの 12 個のシグナルはβ-mannose 残基であった.

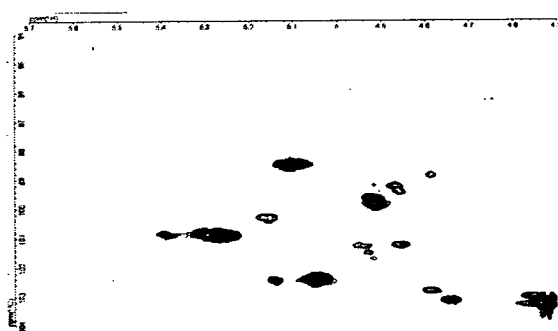


Fig. 1 Overlaid ¹H, ¹³C-HSQC spectra of hot water cell wall extracts

The overlaid ¹H, ¹³C-HSQC spectra from (black) HWE-C27, (green) HWE-C37, (red) HWE-Y27, and (blue) HWE-Y37 derived from *C. albicans* NBRC 1385. All spectra were recorded in D₂O at 310K using a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a TXI xyz-three gradient probe for ¹H detection. Chemical shifts are reported in ppm relative to acetone-*d*₆ as an internal standard (δ_H=2.189 ppm, δ_C=31.45 ppm).

Table 3 Anomeric conformation analyses of hot water cell wall extracts of *Candida*

***albicans* cultured in various culture conditions**

	¹ H (ppm)	¹³ C (ppm)	¹ J _{H1,C1} (Hz)	Conformation	Contain			
					C27	C37	Y27	Y37
1	5.56	94.5	172	α-Mannose			●	
2	5.54	94.5	174	α-Mannose			●	
3	5.39	100.9	173	α-Mannose	●	●		●
4	5.39	100.9	176	α-Mannose			●	●
5	5.30	101.8	172	α-Mannose	●	●		●
6	5.28	100.9	172	α-Mannose	●	●		●
7	5.25	100.9	172	α-Mannose			●	●
8	5.17	100.3	172	α-Mannose			●	
9	5.15	100.3	172	α-Mannose			●	
10	5.15	102.5	171	α-Mannose				●
11	5.14	102.5	172	α-Mannose			●	●
12	5.13	98.4	175	α-Mannose	●	●		
13	5.11	98.5	172	α-Mannose	●	●	●	●
14	5.09	98.5	170	α-Mannose	●	●	●	●
15	5.05	102.5	172	α-Mannose	●	●	●	●
16	5.04	102.4	171	α-Mannose	●	●	●	●
17	4.95	101.5	162	β-Mannose			●	
18	4.93	101.3	162	β-Mannose			●	
19	4.93	101.5	162	β-Mannose			●	
20	4.92	101.7	160	β-Mannose			●	
21	4.93	99.6	160	β-Mannose			●	
22	4.93	99.7	171	α-Mannose				●
23	4.92	99.9	172	α-Mannose	●	●	●	●
24	4.90	99.8	170	α-Mannose	●	●	●	●
25	4.92	99.2	160	β-Mannose			●	
26	4.87	99.2	159	β-Mannose			●	
27	4.86	99.4	160	β-Mannose			●	
28	4.86	101.2	162	β-Mannose			●	
29	4.84	101.2	160	β-Mannose			●	
30	4.79	98.9	159	β-Mannose			●	
31	4.78	102.8	163	β-Glucose	●	●		
32	4.74	103.2	162	β-Glucose	●	●		
33	4.56	103.1	163	β-Glucose	●	●		
34	4.53	103.3	162	β-Glucose	●	●	●	●

Candida の mannan は Fig.2 に示すような α-1,6-mannose 主鎖に様々な結合様式を持つ mannan 側鎖が連なる構造を一般的にしている. さらに, phosphodiester bond を介した acid-labile region および主鎖と側鎖から成る acid-stable region に分かれている事が知られている. そこで次に筆者は, 各々のシグナルの結合様式をより詳細に決定するために, Shibata らの方法を用いて検討した. すなわち, Shibata らは 2D-TOCSY スペクトルを測定することにより, 各々の残基の linkage type を同定可能であることを示している⁷³⁾. そこで, 各々の培養条件より得た菌体から調整した mannan の 2D-TOCSY スペクトルを測定した. その結果を, Table 4 に示した. 注目すべき事に, M-Y27 にのみ特徴的に現れるシグナルが数多く見られ, それはβ-mannosyl 残基であった.