

な *M. hominis* 感染症患者において抗 PS 抗体価ならびに抗 PS/PT 抗体価陽性を見たことから、今後、産科領域における抗 PS/PT 抗体陽性者における *M. hominis* 抗体価の調査が必要なのではないかと考えている。ただし、用いた 2 社のキットにおける抗 PS/PT 抗体価測定で差が見られた。この 2 社のキットでは固相化の過程に相違があり、B 社の γ 線照射により陰性荷電したプレート上に固相化されたプロトンピンでは、構造変化により新たなエピトープが出現することが予想され、このような抗プロトンピン抗体が高頻度に検出される強皮症患者においては、A-B 社キットによる測定結果が相関しないことが報告されている（文献 7）。今回の調査では、逆に A 社キットでの測定値において抗 PS 抗体価ならびに抗 PS/PT 抗体価が高値を示し、結果報告には、抗 PS 抗体価のみの成績も同時に示しているが、抗 PS 抗体価上昇による高値なのではないかと予想される。今後の課題としては、今回用いた ELISA 系のみでは不十分であり、抗プロトンピン依存性に関する実験的アプローチが必要だと考えられる。さらに、リン脂質について言及すれば、フォスファチジルセリンは、細菌よりは、むしろ宿主であるヒトで主要なリン脂質であることから、マイコプラズマ感染により、抗体産生が起きる機序については、宿主-菌相互作用が関連していると予想される。マイコプラズマは、宿主体内でしか生存、増殖できない寄生生活に適応した小型細菌であり、退行進化の過程で脂質合成経路の遺伝子を欠落させている。したがって、脂質を宿主に依存するため、コレステロールの取り込み能などを有していると考えられている。さらに、齧歯類由来マイコプラズマ種に修飾されたコレステロールの一つ APO-AI が本来持たない抗原性を獲得することが報告されている（文献 8）。APS における標的蛋白である β 2-GPI に対する話ではないものの、単なるアミノ酸配列の相同性に由来する自己抗体産生機構のみならず、微生物による宿主リポ蛋白の修飾による新たな自己抗体産生機構として分子レベルでの解析が望まれる。

新規発見種 *M. amphoriforme* の抗原蛋白としてモリキューテス特異的リポ蛋白が候補の一つに考えられたが、一般細菌と異なり細胞壁を

欠くマイコプラズマにおいては、リポ蛋白は菌体表面の細胞膜を形成する重要かつ、主要な蛋白である。リポ蛋白は、一方で、Toll-like receptor (TLR)により認識される自然免疫ならびに抗体による免疫の標的物質であることから、さまざまなマイコプラズマ種において、パラログ遺伝子群を形成した抗原変異機構を発達させていることが知られている（文献 4-5）。これらモリキューテス特異的リポ蛋白のパラログ群には、種間で相同性を持つオソログもあるが、種特異的な遺伝子群の存在も *M. pneumoniae*, *M. penetrans* などにおいてはゲノム情報からわかっている。本研究においては、*M. amphoriforme* を含め、*M. hominis* や *M. fermentans* のゲノム情報の公開により抗原蛋白の同定作業が進むことが予想される。これら、臨床診断系が存在しない種の診断系開発も、原因不明特定疾患とマイコプラズマ感染症の関連を明瞭にするツールとして重要だと考えている。

最後に *M. fermentans* 生菌投与ウサギにおける関節炎形成については、個体差があるものの、滑膜上皮細胞の多層化や、リンパ球集ぞくなどの関節リウマチで見られる所見が得られたのは複数回投与によるメリットであった。逆に、マイコプラズマ生菌投与において液体培地ごと投与する必要があることから、培地だけの投与関節においても上皮直下への細胞浸潤が見られたことはマイナス要素であった。今後、滑膜細胞の多層化を指標として、本モデルを利用した治療薬の評価などに用いる可能性を探りたいと考えている。さらに、本ウサギモデルにおけるリウマチ疾患の早期診断に有用な抗ガラクトース欠損 IgG 抗体の一過性上昇は、複数投与群においても単回投与群と変りないことから、最初の生菌投与から約 1 週間程度にピークを迎え、その後、2-3 週間かけて低減していく生体反応と関連していることが考えられる。ガラクトース欠損 IgG 生成機構がガラクトースの付加異常なのか、ガラクトース活性による切り取りなのか不明なことから、*M. fermentans* 感染による生成機序については言及できないが、少なくとも、ガラクトース欠損 IgG においては、Gal-Nac がむき出しになった IgG ヒンジ部分の糖鎖に対し、抗

Gal-Nac 抗体が結合し、免疫複合体形成のきっかけになる可能性が示唆されている。免疫複合体の沈着による炎症が滑膜細胞の増生などの原因になる可能性も指摘されている。今後、滑膜細胞における免疫複合体や、*M. fermentans* 免疫染色による菌の存在の証明を行う必要がある。

E. 結論

マイコプラズマ感染者における抗リン脂質抗体価を測定したところ、健康人との比較において、*M. pneumoniae* 感染者においては抗カルジオリピン抗体価の上昇ならびに抗フォスファチジルセリン抗体価の上昇が、また *M. hominis* 感染者群においては抗フォスファチジルセリン抗体価の上昇が認められた。

経後脚膝蓋関節腔内 *M. fermentans* 生菌投与ウサギ 13 羽中 1 羽において、滑膜上皮細胞の多層化、上皮直下への形質細胞浸潤、リンパ球集ぞくが病的に認められた。抗ガラクトース欠損 IgG 抗体の一過性上昇も認められた。

(謝辞)

M. amphoriforme 抗原蛋白の解析において、ご協力、ご助言をいただきました新開・大内史子氏（国立感染症研究所、細胞化学部）に感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu XW, Espinola RG, Harris EN. GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activate endothelial cells in vivo and in vitro. *J Immunol.* 163: 2922-2927, 1999
- 2) Gharavi EE, Chaimovich H, Cucurull E, Celli CM, Tang H, Wilson WA, Gharavi AE. Induction of antiphospholipid antibodies by immunization with synthetic viral and bacterial peptides. *Lupus.* 8: 449-455, 1999
- 3) Gharavi AE, Pierangeli SS. Origin of antiphospholipid antibodies: induction of aPL by viral peptides. *Lupus* 7: suppl 2: S52-S54, 1998
- 4) Sasaki, Y., J. Ishikawa, A. Yamashita, K. Oshima, T. Kenri, K. Furuya, C. Yoshino, A. Horino, T. Shiba, T. Sasaki and M. Hattori. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids*

Research 30: 5293-5300, 2002

- 5) Sasaki Y. Chapter 10 "*Mycoplasma*", p. 175-190, *In V.* L. Chan, P. M. Sherman and B. Bourke (eds.) "*Bacterial Genomes and infectious Diseases*", Humana Press, Totowa, NJ, 2006
- 6) Yáñez A, Cedillo L, Neyrolles O, Alonso E, Prévost MC, Rojas J, Watson HL, Blanchard A, Cassell GH. *Mycoplasma penetrans* bacteremia and primary antiphospholipid syndrome. *Emerg Infect Dis.* 5: 164-167, 1999
- 7) 河嶋洋平、山崎雅英、森下英理子、朝倉英策、長谷川稔、大竹茂樹、異なる疾患群における IgG 型プロトロンビン抗体測定キット 2 社の測定値の乖離、*血栓止血誌* 16 : 378-385、2005
- 8) Hasebe A, Pennock ND, Mu HH, Chan FV, Taylor ML, Cole BC. A microbial TLR2 agonist imparts macrophage-activating ability to apolipoprotein A-1. *J Immunol.* 177: 4826-4832, 2006

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 佐々木裕子、堀野敦子、見理 剛、荒川宜親、佐々木次雄、*Mycoplasma pneumoniae* 株間の主要発現蛋白の比較解析、*日本マイコプラズマ学会誌*、34 (印刷中)
- 2) 佐々木裕子、新開・大内 史子、川上隆雄、見理 剛、堀野敦子、山河芳夫、荒川宜親、佐々木次雄、*Mycoplasma penetrans* のプロテオミクス、*日本マイコプラズマ学会雑誌* 32:47-49、2005

2. 学会発表

- 1) 佐々木裕子、堀野敦子、見理 剛、荒川宜親、佐々木次雄、*Mycoplasma pneumoniae* 株間の主要発現蛋白の比較解析、第 33 会日本マイコプラズマ学会、和歌山、2007 年 5 月
- 2) Yuko SASAKI, Takao KAWAKAMI, Fumiko OUCHI-SHINKAI, Yoshio YAMAKAWA, Yoshichika ARAKAWA and Tsuguo SASAKI, Proteomics of *Mycoplasma penetrans* by two-dimensional liquid

chromatography/tandem mass spectrometry.
16th Congress of International Organization
for Mycopasmology, July, 2006, Cambridge,
UK,

- 3) 佐々木裕子、見理 剛、堀野敦子、荒川宜
親、佐々木次雄、2D-HPLC LC-MS による
Mycoplasma penetrans のリポ蛋白発現なら
びに pyruvate 代謝の解析、第 79 回日本細

菌学会、金沢、2006 年 3 月

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

表1

検査対象	臨床での検査 抗CL-b2GP1 IgG(U/ml)	臨床での検査 抗PS IgG	抗体		
			抗 <i>M. fermentans</i> (OD値)	抗 <i>M. hominis</i> (OD値)	抗 <i>M. pneumoniae</i> (倍)
基準値(陰性)	3.5未満	1.0未満			
プール血清/ 健常 者			0.29	~0.2-0.3	
APS患者1	CL 陰性 1.4	PS陽性 1.4	0.32	0.39	>20
APS患者2 流産・妊娠中毒	CL 陰性 >1.2	PS陰性 0.5	0.47	0.61	320
APS患者3 SLEの続発	CL 陰性 >1.2	PS陰性 0.8	0.34	0.30	>20
検査項目高値例、 血栓傾向なしの為 APSではない	CL 陽性 2回測定値8.8/5.2	ND	1.59	0.31	>20

表2

マイコプラズマ感染者等血清中の抗リン脂質抗体測定結果

供試血清の由来	主症状など	例数	抗マイコプラズマ抗 体価	抗リン脂質抗体測定(健常人群との有意差)				
				抗カルジオ リピン抗体	抗カルジオ リピン-b2- GP1抗体	抗フォスファ チルセリン抗 体(A社キット)	抗フォスファ チルセリン ・プロトン ピン抗体 (A社キット)	抗フォスファ チルセリン ・プロトン ピン抗体 (B 社キット)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (肺炎マイコプラズマ)感染者	呼吸器疾患	45例	陽性	陽性 (p<0.001)	なし	陽性 (p<0.05)	陽性 (p<0.05)	なし
<i>Mycoplasma hominis</i> 感染者	産褥熱など産科疾 患	9例、 15検体	陽性	なし	なし	陽性 (p<0.001)	陽性 (p<0.001)	陽性 9例中 7例12unit/ml 以上、(有意差 なし)
<i>Mycoplasma penetrans</i> 抗体陽 性者	抗体陽性のみ、ただ し、2例はHIV抗体陽 性者	3例	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
APS患者(血栓、流産等あり)		3例	<i>M. hominis</i> 陽性1例、 <i>M. pneumoniae</i> 陽性1 例	なし	なし	なし	1例陽性	1例陽性
APSではないが抗リン脂質抗 体陽性で経過観察例		1例	<i>M. fermentans</i> 陽性	陽性	陽性	なし	なし	なし

図1

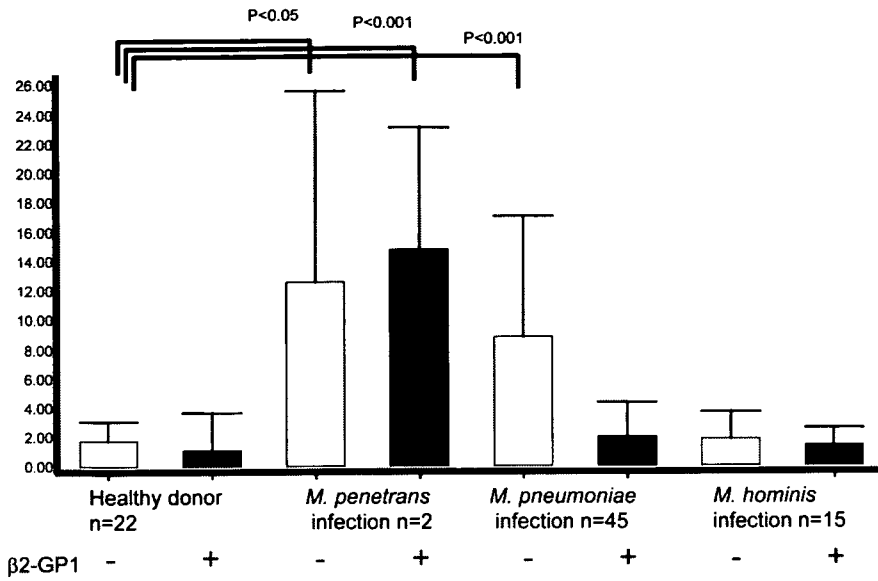
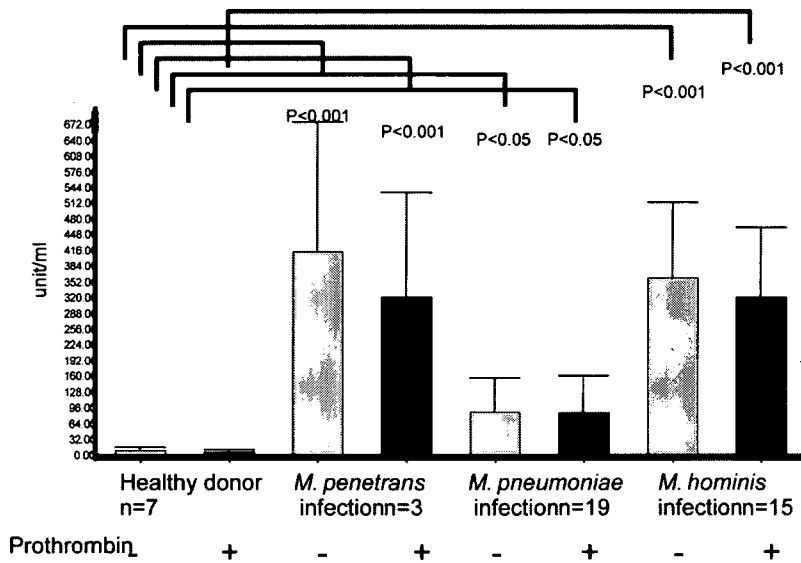


図1 マイコプラズマ感染者等血清中の抗カルジオリピン IgG 抗体価ならびに抗カルジオリピン・β2-GP1 複合体 IgG 抗体価

図2

A



B

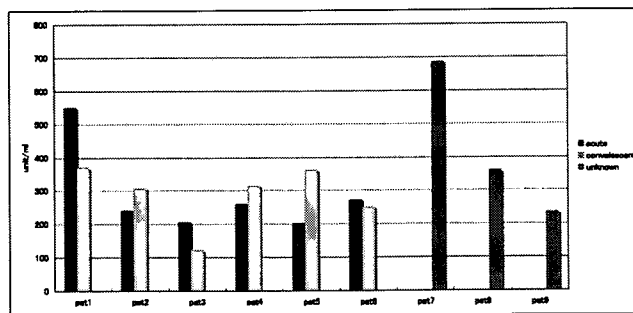


図2 マイコプラズマ感染者等血清中の抗フォスファチジルセリン IgG 抗体価ならびに抗フォスファチジルセリン・プロトロンビン複合体 IgG 抗体価:市販キット A によるもの (A-B)、ならびに市販キット B によるもの (C-D)

図 2-A、健康人群ならびにマイコプラズマ 3 種の感染者等血清中の抗体価 (kitA にて測定)

図 2-B、Mycoplasma hominis 感染者における急性期ならびに回復期における血清中の抗フォスファチジルセリン・プロトロンビン複合体 IgG 抗体価 (kitA にて測定)

C

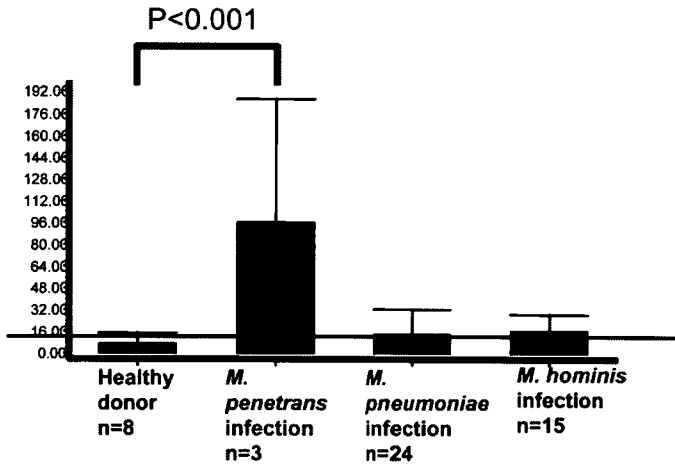


図 2-C、健康人群ならびにマイコプラズマ 3 種の感染者等血清中の抗体価 (kitB にて測定)

D

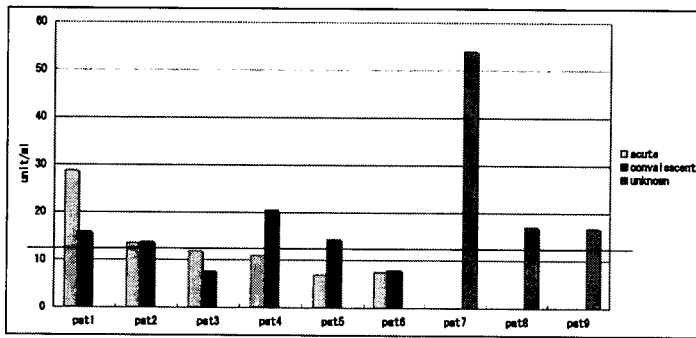


図 2-D、*Mycoplasma hominis* 感染者における急性期ならびに回復期における血清中の抗フォスファチジルセリン・プロトロンビン複合体 IgG 抗体価 (kitB にて測定)、図中の横棒は基準値 12unit/ml を示す

E

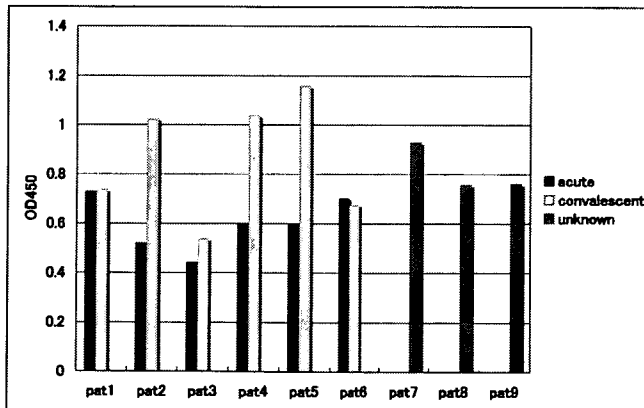


図 2-E、*Mycoplasma hominis* 感染者における急性期ならびに回復期における血清中の抗 *Mycoplasma hominis* 抗体価

図3

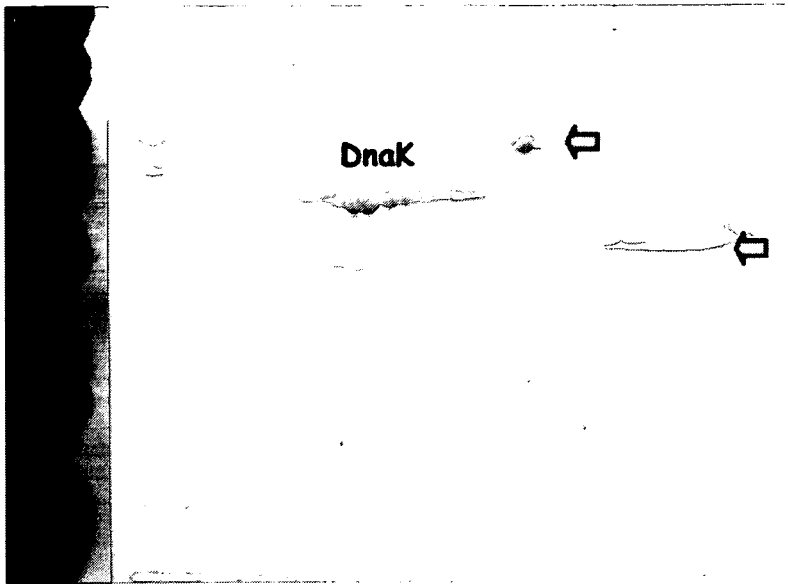


図3、*Mycoplasma amphoriforme* 抗原蛋白の解析：免疫マウス血清により認識される *M. amphoriforme* 抗原蛋白の1例

図4

経気道内投与个体(陰性対象) 培地 3回関節内腔投与(対象2) *M. fermentans* 3回関節内腔投与

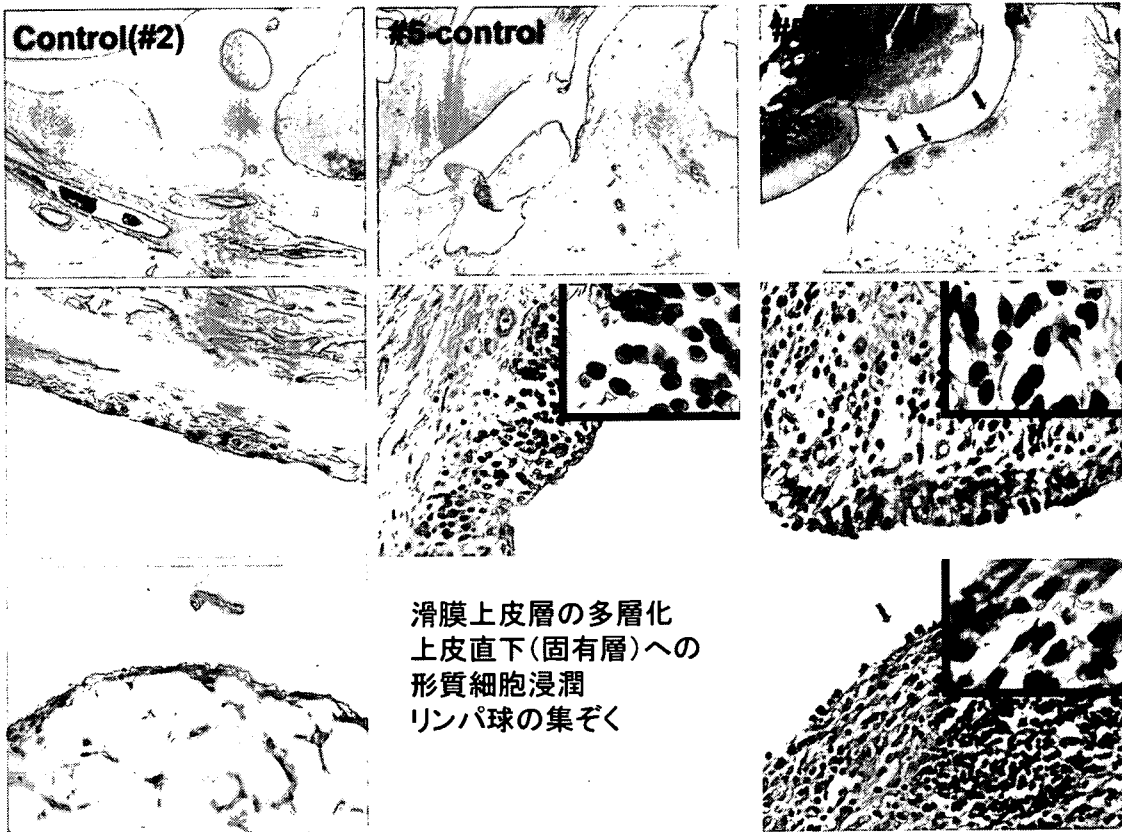


図4、*Mycoplasma fermentans* 経膝関節内投与ウサギにおける膝関節の病理像

7. 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 (長崎大学熱帯医学研究所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検討した。β-lactamase-negative ampicillin (ABPC)-susceptible (BLNAS)株及びβ-lactamase-negative ABPC-resistant (BLNAR) 株を 48 時間培養後、ABPC, cefotaxime (CTX), erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), levofloxacin (LVFX), gatifloxacin (GFLX)を加え、バイオフィルムに対する効果を比較検討した。Microtiter biofilm assay では BLNAR 株に対し、ABPC, CTX, EM, CAM では 10 MIC でもバイオフィルムの抑制効果はみられなかったが、LVFX は 1 MIC 以上、G FLX は 0.1 MIC 以上で抑制効果がみられた。continuous flow cell chamber を用いた検討ではバイオフィルムの性状には抗生物質間の違いはみられなかったが、GFLX は 1 MIC で優位な菌量の減少がみられ、10 MIC では菌の生育は認めなかった。LVFX, GFLX は NTHi が産生するバイオフィルムの中に浸透し、バイオフィルム内の菌を殺菌する効果が高いことが示唆された。

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与することがある 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。現在、本邦ではβ-lactamase-negative ampicillin (ABPC)-resistant (BLNAR)株の増加が臨床上的の問題となっているが、薬剤耐性菌のバイオフィルムに対する抗生物質の効果は明らかではない。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て 48 時間培養し、in vitro でバイオフィルムを産生させ、その後各種抗生物質 (ABPC, cefaclor (CCL), erythromycin (EM), clarithromycin (CAM), levofloxacin (LVFX),

gatifloxacin(GFLX))をそれぞれ 0.1, 1, 10 MIC の濃度で 12 時間おきに計 4 回添加し、Microtiter biofilm assay を行った。また continuous flow cell chamber 内に BLNAR 株を 48 時間培養し、ABPC, CTX, EM, GFLX を 0.1, 1, 10 MIC の濃度で加え、生育菌数および confocal laser scanning microscopy によるバイオフィルムの観察を行った。

C. 研究結果

Microtiter biofilm assay では BLNAR 株に対し、ABPC, CTX, EM, CAM では 10 MIC でもバイオフィルムの抑制効果はみられなかったが、LVFX は 1 MIC 以上、G FLX は 0.1 MIC 以上で抑制効果がみられた。continuous flow cell chamber を用いた検討ではバイオフィルムの性状には抗生物質間の違いはみられなかったが、GFLX は 1 MIC で優位な菌量の減少がみられ、10 MIC では菌の生育は認めなかった。

D. 結論および考察

本研究ではペニシリン剤、セフェム剤およびマクロライド剤には 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、LVFX, GFLX などのキノロン剤は NTHi が産生するバイオフィルムの中に浸透し、バイオフィルム内の菌を殺菌する効果が高いことが示唆された。今後、in vivo における検討を加え、キノロン剤の NTHi が産生するバイオフィルムに対する効果を明らかにしていきたい。

E. 結論

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaji C, Watanabe K, Apicella MA, and Watanabe H. Antimicrobial effect of fluoroquinolones for the eradication of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates within biofilms. *Tohoku J Exp Med* (in press).
- 2) Hamada N, Gotoh K, Hara K, Iwahashi J, Imamura Y, Nakamura S, Taguchi C, Sugita M, Yamakawa R, Etoh Y, Sera N, Ishibashi T, Chijiwa K, and Watanabe H. A nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis accompanying environmental contamination with adenoviruses. *J Hosp Infect* (in press).
- 3) Watanabe H, Asoh N, Kobayashi S, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, and Nagatake T. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired pneumonia among HIV-infected patients in northern Thailand. *J Infect Chemother* (in press).
- 4) Qin L, Masaki H, Watanabe K, Furumoto A, Watanabe H. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates indicating possible nosocomial transmission routes in a community hospital in Japan. *J Clin Microbiol*, 45: 3701-3706, 2007.
- 5) Watanabe K, Anh DD, Huong PLT, Nguyet NT, Anh NTH, Thi NT, Dung NT, Phong DM, Rusizoka OS, Nagatake T, Watanabe H, and Oishi K. Drug-resistant pneumococci in children with acute lower respiratory infections in Vietnam. *Pediatric Int* (in press).
- 6) Watanabe H, Batuwanthudawe R, Thevanesam V, Kaji C, Qin L, Nishikiori N, Saito W, Saito M, Watanabe K, Oishi K, Abeyasinghe N, Kunii O. Possible prevalence and transmission of acute respiratory tract infections caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among the internally displaced persons in tsunami disaster evacuation camps of Sri Lanka. *Intern Med*, 46: 1395-1402, 2007.
- 7) Anh DD, Huong PLT, Watanabe K, Nguyet NT, Anh NTH, Thi NT, Dung NT, Phong, DM, Tanimura S, Ohkusa Y, Nagatake T, Watanabe H, and Oishi K. Increased rates of intense nasopharyngeal bacterial colonization of Vietnamese children with radiological pneumonia. *Tohoku J Exp Med*, 213, 2007.
- 8) Iwahashi J, Hamada N, and Watanabe H. Two hydrophobic segments of the RTN1 family determine the ER localization and retention. *Biochem Biophys Res Commun*, 335: 508-512, 2007.
- 9) Koyama J, Ahmed K, Zhao J, Saito M, Onizuka S, Oma K, Watanabe K, Watanabe H, and Oishi K. Strain-specific pulmonary defense achieved after repeated airway immunizations with non-typeable *Haemophilus influenzae* in a mouse model. *Tohoku J Exp Med*, 211: 63-74, 2007.
- 10) Qin L, Watanabe H, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Mizota T, and 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*, 135 : 665-668, 2007.

- 11) 渡邊 浩。旅行医学とトラベルクリニック。久留米医学会雑誌、70: 179-184, 2007.

2. 学会発表

- 1) 渡邊 浩。教育セミナー3, デング熱。第77回日本感染症学会西日本地方会学術集会。佐賀、2007.11.16.
- 2) 秦 亮、真崎宏則、渡辺貴和雄、古本朗嗣、渡邊 浩。Clinical study of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from a community hospital in Japan. 第55回日本化学療法学会西日本支部総会、第50回日本感染症学会中日本地方会学術集会。神戸、2007.10.31.
- 3) 後藤憲志、渡邊 浩、渡辺貴和雄、大石和徳。ベトナム、ナチャンにおける小児急性下気道感染症患者由来の薬剤耐性遺伝子を有するインフルエンザ菌に関する分子疫学的検討。第48回日本熱帯医学会大会。大分、2007.10.12.
- 4) 渡邊 浩。シンポジウム2、トラベルクリニックネットワークの設立—トラベルクリニックの設立方法。第11回日本渡航医学会学術集会。東京、2007.7.21.
- 5) 渡邊 浩、渡辺貴和雄、川上健司。院内発症の菌血症症例より分離されたバイオフィルム産生 *Bacillus spp.*に関する分子疫学的検討。第55回日本化学療法学会総会。仙台、2007.6.1.
- 6) Watanabe H. Organisms of nosocomial infection and the prevention. Shanghai International Forum on Infection Control. Shanghai, China, 2007.4.21.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

8. 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)
研究協力者	楠 進、宮本勝一 (近畿大学 医学部 神経内科) 池島秀明、星 恵子 (昭和薬科大学・薬物治療学) 加茂 力 (聖マリアンナ医科大学・神経内科) 岸本壽男、倉根一郎、渡邊治雄 (国立感染症研究所)

研究要旨 多発性硬化症 (MS) 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抗原を用いた Western blotting 法による MS 患者における抗ライム病抗体検索、および髄液中の病原体 DNA 検索をおこなった。試験法の精度向上を目的として、血清診断においては偽陽性を低減させる新たな判定基準を導入した。また髄液中の微量の病原体 DNA を検出するために、genome-wide な DNA 増幅を前処理として行い、高感度な特異的 PCR を実施した。MS 患者検体は、近畿大学、昭和薬科大学、および聖マリアンナ医科大学より分与頂いた。評価のために供与を受けた MS 患者 27 例中、抗ライム病 IgG 抗体陽性例は 3 例(11.1%)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。ペア血清が得られた 5 例において抗体調査では顕著な抗体変動は見られなかった。さらに、血清診断では反応抗原の特異性に応じた判定のための point 制を導入し、健常者、ライム病患者、および MS 患者における、各群間での point 数を比較した場合、MS-健常者間における point 数での有意差は見出されなかった。以上の結果から、我が国の MS 患者において、ライム病ボレリアの慢性感染を疑わせる積極的な知見は得られなかった。

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の標準化と新たな判定基準の設定

1) 標準化のためのパネル血清

ライム病患者由来血清 (分離例、もしくはペア血清での抗体陽転) 19 検体、健常者血清 17 検体をパネル血清として用いた。

2) 抗体検査法

2-1) Western blotting 法 (常法)

I 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。

2-2) 非組換え型抗原を用いた kit による検出

Trinity 社の MarDX Lyme を用いた。方法は添付プロトコールに従って行った。

2-3) 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。

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

1) 被検血清

近畿大学、聖マリアンナ医科大学、昭和薬科大学にて保存されていた MS 患者血清を用いた。患者数 27 名 (被検血清: 31 検体。5 ペア血清を含む。男: 女=8: 18。年齢 16-67 歳、平均 38.6 歳、但し不明 5 例を除く。髄液: 5 検体、男: 女=4: 1。年齢分布不明。) の血清を用いた。病変部位は脊髄 22、視神経 2、大脳 2、不明である。

2) 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} IgG を用いた。方法は添付プロトコールに従って行った。国内例では OspC による偽陽性が報告されていることから、OspC は判定基準より除外した。

Genome-wide な DNA 増幅と病原体検出 PCR

1) 髄液からの全 DNA の抽出

髄液 0.1ml を 15,000rpm、15 分遠心し得た沈渣を材料とし、DNeasy tissue kit (Qiagen) を用いて DNA 抽出を行った。抽出 DNA は genomphi V.2 (GE Healthcare) を用いて genome-wide で前増幅を行った後、ボレリア特異的 PCR に供した。DNA 抽出、前増幅は添付プロトコールに従って行った。

2) ボレリア特異的 DNA の検出

Sato らによって報告されたボレリア属特異的な *flaB*-PCR を行った。

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 および 138)。

C. 結果と考察

1) 組換え抗原型ライム病血清診断キットの標準化と新たな判定基準の設定

分担研究者は、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、これら症例では原因は不明であるが、高率で抗ボレリア抗体、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。そこで、OspC に対する何らかの交叉抗体産生による偽陽性を除外する目的で、ライム病患者由来血清 (分離例、もしくはペア血清での抗体陽

	Lyme case n=19	Healthy n=16
recomBlot IgG(+)	16	1
recomBlot IgG(-)	3	15
Sensitivity(+)		84.2
Specificity		93.8
Accuracy(+)		88.6
MarDX IgG(+)	13	0
MarDX IgG(-)	6	16
Sensitivity(+)		68.4
Specificity		100.0
Accuracy(+)		83.3
Conventional-IgG(+)	14	0
Conventional-IgG(-)	5	16
Sensitivity(+)		73.7
Specificity		100.0
Accuracy(+)		86.1

表 1. 各試験法の Sensitivity, Specificity および Accuracy

転) 19 検体、健常者血清 17 検体をパネル血清

として用い、OspC に対する反応性を考慮に入れない判定基準にて、各試験法での感度特異性を比較した（表 1）。

本結果から、OspC を判定から除外した判定基準では、組換え抗原型ライム病血清診断キットにより、非組換え型抗原を用いた kit、常法より Sensitivity, Accuracy はいずれも良い成績が得られた。

抗ボレリア IgG 抗体

組換え抗原型ライム病血清診断キットを用い MS 患者 27 例中、抗ライム病 IgG 抗体陽性例は 3 例(11.1%)であった。

各抗原に対する反応性を表 2 にまとめた。MS 患者血清が反応した抗原は P100 (3.2%), VlsE (12.9%), P41 (87.1%), p39 (6.5%), OspA (9.7%), P41 抗原の *Borrelia* 種特異的領域である P41/i では、P41/*B. garinii* (3.2%), P41/*B. afzelii* (6.5%)であった。

表 2.各群由来血清の組換えボレリア抗原に対する反応性

Antigens Isolated from: Point	p100 <i>B. afzelii</i> 8	VlsE Fusion protein 4	p41 <i>B. burgdorferi</i> 1	p39 <i>B. afzelii</i> 8	OspA <i>B. afzelii</i> 4	p41/l <i>B.garinii</i> 1	p41/l <i>B. afzelii</i> 1	p18 <i>B. afzelii</i> 8
MS	3.23	12.90	87.10	6.45	9.68	3.23	6.45	0.00
Lyme	21.1	73.7	100.0	47.4	15.8	21.1	0.0	0.0
Healthy	0.0	0.0	93.8	0.0	6.3	0.0	0.0	0.0

統計処理

各群血清の抗原反応性から、個々の血清について判定 point を算出し、結果を図 1 にまとめた。また、各群の正規性について検討した結果を表 3 にまとめた

図 1.各群由来血清の point 判定(IgG)

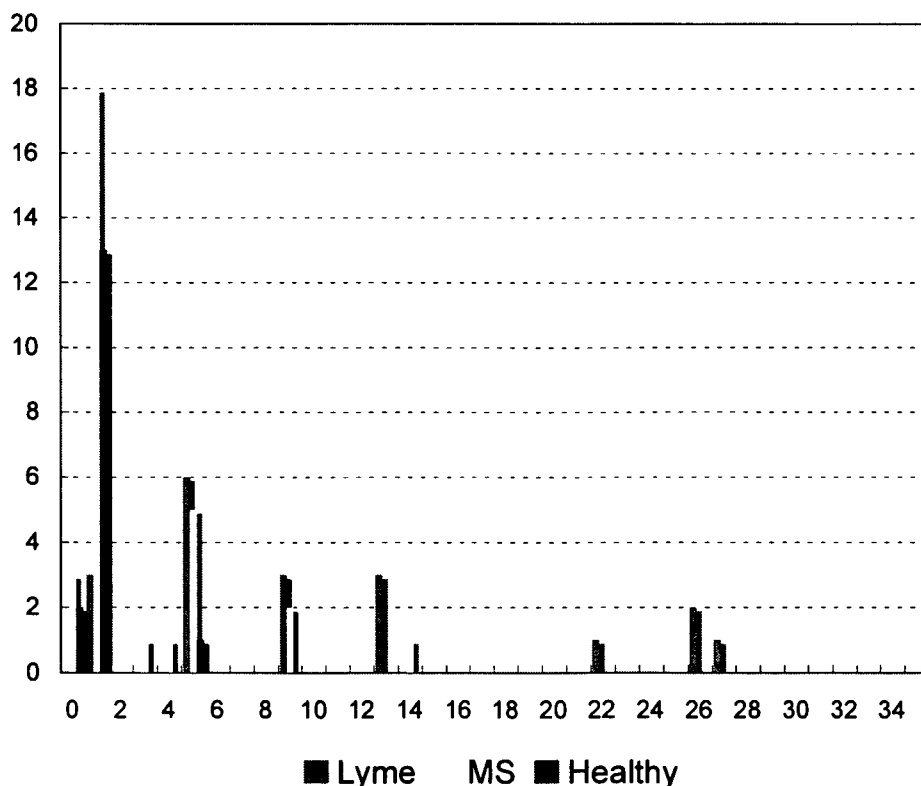


表3. 各群の正規性の検定

	Lyme	Healthy	MS
データ数	19	16	31
平均値	10.526	1.125	2.645
標準偏差	8.701	1.088	3.210
自由度	1	1	2
χ^2 値	3.170	16.913	38.670
P値 (上側確率)	0.075	0.000	0.000
$\chi^2(0.975)$	5.024	5.024	7.378

健常者群と MS 群は等分散であることから、両群の比較にはスチューデント t 検定を用い、一方、Lyme 群は 5%の危険率で等分散仮定が棄却されたため MS 群または健常者群との比較には、ウェルチ t 検定を適用した。

Lyme 群と健常者群または MS 群では、ウェルチ t 検定により、各々 $P=0.00017$ および $P=0.0011$ で有意の差が見出された。一方、MS 群と健常者群間では、 $P=0.074$ であり、両群の間に有意差は見出されなかった。

Borrelia 特異的 DNA の検出

Genomiphi V.2 による genome 増幅後 *flaB*-PCR(nested)を行ったが、特異的な増幅産物は見出されなかった(data not shown)。

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、積極的関与を主張する報告も散見される。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)。今回の我々の結果からは、MS 症例におけるボレリア感染症の関与は見出されなかった。しかしながら、他の病原体が MS 発症の‘トリガー’を引いている可能性は否定出来ておらず、今後さらなる検索が必要と考えられる。

D. 考 察

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、および髄液中の病原体 DNA 検出を試みた。抗体調査を行った、MS 群では、ライム病患者群、健常人群と比較し、1)ライム病ボレリアに対する特異的抗体の検出頻度はライム病患者群と比較して低いこと、一方、健常者群と比較して、特異的抗体の検出に有意差は無いこと、2)ペア血清による IgG 抗体の変動は見られないこと、3)病原体 DNA は患者髄液から見出されなかったことから、本疾患とライム病の相関を支持する結果は得られなかった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito K, Ito A, Asashima N, Ohno M, Nagai R, Fujita H, Koizumi N, Takano A, Watanabe H, Kawabata H: Case report: *Borrelia valaisiana* infection in a Japanese man associated with traveling to foreign countries. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2007. 77:1124-1127.
- 2) Fujita H, Takada N, Kawabata H, Ishiguro F, Yamamoto S, Oikawa Y, Yano Y, Ma XH, Oh HS. Some suggestive records of rickettsiae isolated from ticks in Korea and central China. Annual report of Ohara General Hospital. 2007. 47: 21-24.
- 3) 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. Microbiology and Immunology. 2007. 51(1):15-24.

- 4) 矢野泰弘、田原研司、保科健、板垣朝夫、藤田博己、角坂照貴、川端寛樹、高田伸弘、島根県におけるツツガムシの分布調査-ツツガムシ病発生相と関連して-、大原総合病院年報、2007. 47、7-10.
- 5) 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、2007. pp201-203.
- 6) 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、2007. pp229-232.
- 7) 川端寛樹、高野愛、渡邊治雄:ライム病。「新感染症学(下)」-新時代の基礎・臨床研究-。日本臨床. 2007. 62(3) 196-199.

2. 学会発表

- 1) 川端寛樹、高野愛、渡邊治雄、. ライム病ボレリア形質転換技術の確立とその応用. 第81回日本細菌学会総会、2007年3月、京都.
- 2) 高野愛、川端寛樹、藤田博己、渡邊治雄、爬虫類から見出された新規ボレリア:ボレリア-媒介節足動物間のco-cladogenesisに関する新見解. 第81回日本細菌学会総会、2007年3月.京都.
- 3) 鶴見みや古、尾崎清明、藤田博己、川端寛樹、安藤秀二、高橋守、鳥類標識調査における外部寄生虫採取調査、-2006年度調査結果および本年度経過報告-.日本鳥類標識協会全国大会、2007年12月.東京
- 4) 藤田博己、角坂照貴、高野愛、川端寛樹、本田俊郎、御供田睦代、及川陽三郎、山本正悟、高田伸弘、トカラ列島のマダニ類とツツガムシ. 日本衛生動物学会西日本支部会、2007年10月.大津
- 5) 花岡希、安藤秀二、坂田明子、川端寛樹、高野愛、岸本寿男、倉根一郎、PCR法を用いたリケッチア症病原体検出法の改良—コンタミネーション防止のためのポジティブコントロール作製—、リケッチア・

クラミジア研究会、2007年10月.東京

- 6) 藤田博己、安藤秀二、川端寛樹、福島市の山林におけるタネガタマダニの紅斑熱リケッチア保有状況調査、日本衛生動物学会北日本支部会、2007年9月.仙台
- 7) 藤田博己、高田伸弘、川端寛樹、田原研司、高野愛、山内健生、川森文彦、東北地方中部のマダニ相とマダニ保有リケッチア検査、日本衛生動物学会北日本支部会、2007年9月.仙台
- 8) 安藤秀二、坂田明子、高野愛、川端寛樹、藤田博己、宇根有美、五箇公一、岸本寿男、爬虫類寄生ダニ類からのリケッチアの検出、日本衛生動物学会北日本支部会. 2007年9月.仙台
- 9) 川端寛樹、齋藤幹、新田芳樹、角坂照貴、藤田博己、御供田睦代、本田俊郎、河村好章、江崎孝行、高田伸弘、高野愛、渡邊治雄、マダニ媒介性の *Borrelia valaisiana* 近縁種 (*Candidatus* ' *Borrelia orientalis* ') 感染が疑われたライム病の1症例と、*B. valaisiana* 近縁種の国内分布、病原性に関する解析、日本衛生動物学会北日本支部会、2007年9月.仙台
- 10) 高野愛、安藤秀二、坂田明子、鶴見みや古、仲村昇、佐藤文男、高橋守、岸本寿男、倉根一郎、渡邊治雄、藤田博己、川端寛樹、*Carios* 属ダニの病原体ベクターとしてのリスク評価、日本衛生動物学会北日本支部会、2007年9月.仙台

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

9. 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子

分担研究者 宮崎 義継 (国立感染症研究所 生物活性物質部)

研究協力者 鈴木 和男 (千葉大学大学院医学研究院免疫発生学 炎症制御学)
大川原明子、山越智 (国立感染症研究所 生物活性物質部)

研究要旨 難治性血管炎の真菌関与の菌側因子ならびに生体との相互関係を明らかにすることを目的とし、*Candida albicans* 由来 CAWS (*C. albicans* water-soluble mannan complex) が誘発する血管炎が、活性化好中球や好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) と関連すること、サイトカインの動態について前年度までに報告した。更に、血管炎を惹起する特異的なマンナン構造を特定することを目的として、*C. albicans* の mannosyl-transferase をコードすると予測される遺伝子を破壊した *C. albicans* 変異株を作成し、それぞれの変異株由来 CAWS によるサイトカイン誘導能を検討した。*C. albicans* 親株と 14 の候補遺伝子破壊 *C. albicans* 株由来の CAWS による刺激で、TNF- α と IL-6 産生能に差は認められなかった。

A. 研究目的

Candida albicans 由来 CAWS (*C. albicans* water-soluble mannan complex) がマウスモデルにおいて病理組織学的に血管炎を惹起する (CAWS 血管炎) ことが報告されており、このモデルが血管炎と感染症の関連について解析可能か否かを検証し、最終的に血管炎の原因となる真菌由来分子を明らかにすることを目的とした。

血管炎の発症要因として、活性化した好中球の関与が推定されている (Arimura et al. Clin Nephrol 40:256-264,1993, L.Harper et al, Arthritis Rheumatism 44:921-930,2001)。そこで、血管炎症候群患者において臨床病勢の指標として使用される好中球自己抗体 (ANCA) や活性化好中球が、CAWS 血管炎モデルにおいて血管炎の病態と関連するか否かを検討した。また、CAWS は mannose-protein-1,3- β -glucan であることを示したが、主成分であるマンノースの構造を解析し、組成として複数の異性体が混在していることが示唆された。異なるマンノースが混在する状態では原因を特定できないため、CAWS 血管炎の誘因となる特定のマンノース構造を見いだすことを目的として、マン

ノース転移酵素の破壊株を作成し検討した。

B. 研究方法

1) *C. albicans* の mannosyl-transferase 候補遺伝子

Saccharomyces cerevisiae において mannosyl-transferase 活性が確認されている遺伝子に相同性を有する *C. albicans* 遺伝子をデータベースから検索した。

2) *C. albicans* 遺伝子の破壊

C. albicans (Δ ura3, Δ arg4) を用いて、それぞれの標的遺伝子 ORF の 5' 末端と 3' 末端を増幅し URA3 遺伝子に ligation した遺伝子片により形質転換に使用した。URA3 マーカーを用いて一方の locus を破壊した後に、同様な手順で ARG4 マーカーにより他の locus を破壊し欠損株を得た。

3) CAWS の抽出とマンナン精製

C. albicans IFO 1385 を完全合成培地 (1L あたり sucrose 10g, (NH₄)₂SO₄ 2g, KH₂PO₄ 2g, CaCl₂ · 2H₂O 50 mg, MgSO₄ · 7H₂O 50 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 1 mg, CuSO₄ · 5H₂O 1mg,

FeSO₄·7H₂O 10 mg, biotin 25 mg) で 27°C、48h 培養した。その培養液に等量のエタノールを加えて静置した。生成した沈殿に蒸留水を加え得られた可溶性画分に 4 倍量のエタノールを加え生成した沈殿を CAWS とした。アセトンで洗浄し、アセトンを完全に除去し室温にて乾燥した。マンノースの精製は (Methods Enzymology, 1990, 185, 440-70) に準じた。培養液を遠心して菌体を集めて洗った後、20 mM の citrate buffer を加え、125°C で 90 分オートクレーブしマンノプロテインを抽出した。抽出物に 3 倍量のメタノールを加えて overnight 攪拌したものゝを遠心し、その沈殿に水を加えて溶解した。水溶液を透析した後、遠心エバポレーターで乾燥した。

4) in vitro におけるサイトカイン誘導

J774 細胞を各々の変異株由来マンナンにより刺激し、培養液中のサイトカイン量を 8 時間後と 24 時間後に測定した。また、マウス投与初期免疫応答との相関を確認するため、PBS に懸濁したマンナンを、C57BL/6N マウス (♂, 6w) 腹腔内に投与後、8 時間後と 24 時間後に屠殺して、腹腔マクロファージのサイトカイン産生能を測定した。

(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 putative mannosyl-transferase 遺伝子破壊株の確認

破壊した native gene を増幅するプライマーにより増幅されない株をスクリーニングした。更に、異所性に遺伝子片が導入されていないことを確認し、一候補遺伝子あたり 4 株以上の破壊株をえた。破壊した遺伝子破壊株を CA1995, CA3803, CA4394, CA5572, CA6692 と親株を対照として使用した。

② 菌糸の形成能

CA4394 を破壊した 6 株ではすべて、他の破

壊株や親株と比較して菌糸の形成能が低下していた。

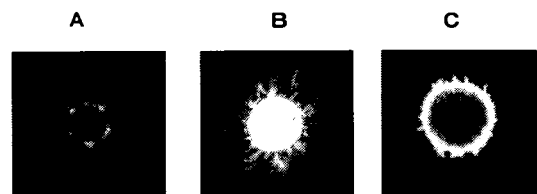


図1. 菌糸の形成能

A. 親株、B; CA1995 C; CA4394。CA4394 では、親株や他の破壊株と比較して菌糸形成能が低下していた。

③ サイトカイン誘導能

J774 細胞における TNF- α 、IL-6 の産生は、8 時間後ならびに 24 時間後において、CA1995, CA3803, CA4394, CA5572, CA6692 と親株の間で有意な差は認められなかった。マウス腹腔マクロファージにおいても同様の結果であった。

D. 結論および考察

マウス血管炎を誘導する CAWS の主たるマンノース構造を決定することを目的として、*C. albicans* の putative mannosyl-transferase 遺伝子を破壊し、破壊株から生成したマンノースのサイトカイン誘導能を検討した。培養条件を変更しマンノースの主成分が異なる CAWS を生成し、血管炎誘導能を検討すると、特定の培養条件からえられた CAWS では β -1,2-マンノースが主成分となり、この場合は血管炎が誘発されなかった。通常の培養では、 β -1,2-マンノースが細胞壁表面の外層に位置しており、内層に位置する α -1,2-マンノースなどが血管炎を誘発することを、作業仮説とした。今回検討した CA1995, CA3803, CA4394, CA5572, CA6692 株は現在までに報告のない putative mannosyl-transferase 遺伝子の破壊株であり、このほかにも 11 の遺伝子を破壊した株を作成しており検討中である。合計 41 程度の遺伝子が関与する可能性があり、順次検討する。

今回の検討では、マンノース構造を変化させることにより、菌糸の発育が抑制される場合があることが明らかになった。*C. albicans* において菌糸発育はヒト組織での病原因子の一つで

あり、マンノースが *C.albicans* の病原性にも影響することが示唆された。

検討した6つの遺伝子の破壊株では、初期免疫応答への影響はみられなかったが、他の遺伝子が関与しないか検討を続ける。また、慢性炎症に関連するサイトカインについても検討予定である。

E. 健康危険情報
特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagi-Miura, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Akinori Okumura, Hitoshi Tachikawa, Shin-ichiro Kashiwamura^e, Haruki Okamura, Naohito Ohno, Hidechika Okada, Peter A. Ward and Kazuo Suzuki. Neutrophil activation and arteritis induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein-beta-glucan complex (CAWS). *Exp Mol Pathol* 2007 Apr;82(2):220-6
- 2) Norihide Higuchi, Naoko Tahara, Katsunori Yanagihara, Kiyoyasu Fukushima, Naofumi Suyama, Yuichi Inoue, Yoshitsugu Miyazaki, Tsutomu Kobayashi, Koh-ichiro Yoshiura, Norio Niikawa, Chun-Yang Wen, Hajime Isomoto, Saburou Shikuwa, Katsuhisa Omagari, Yohei Mizuta, Shigeru Kohno, Kazuhiro Tsukamoto. NAT2 6A, a haplotype of the N-acetyltransferase 2 gene, is an important biomarker for risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Japanese patients with tuberculosis. *World J Gastroenterol.* 2007 Dec 7;13(45):6003-8.
- 3) Yoshihisa Kohno, Hideaki Ohno, Yoshitsugu Miyazaki, Yasuhito Higashiyama, Katsunori Yanagihara, Yoichi Hirakata, Kiyoyasu Fukushima, and Shigeru Kohno. In vitro and in vivo activities of novel fluoroquinolones alone and in combination with clarithromycin against clinically isolated *Mycobacterium avium* complex strains in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(11):4071-6.
- 4) Yuichi Inoue, Yoshitsugu Miyazaki, Kohichi

Izumikawa, Katsunori Yanagihara, Hiroshi Kakeya, Toyomitsu Sawai, Yoichi Hirakata and Shigeru Kohno. Pulmonary cryptococcosis presenting as endobronchial lesions in a patient under corticosteroid treatment. *Intern Med.* 2007;46(8):519-23.

2. 学会発表

- 1) 宮崎義継、河野 茂. 中枢神経系における真菌症治療の進歩. 第25回日本神経治療学会総会. 2008.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

10. 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 *Stachybotrys chartarum* をマウスに経気管的に投与することによって肺高血圧症が惹起されることを示してきたが、今回さらに本症の発生に関わる要因について検討した。1) 肺動脈病変の形成における投与回数の影響では、単回投与でもマウスに頻度は低いながら肺動脈病変が形成された。2) 投与した胞子の生死に関しては、病変形成に影響が認められなかった。一方、3) 胞子をメタノールで処理すると肺動脈病変の形成は認められなくなり、本病変の形成にはメタノールにより除去または不活性化などの影響を受ける物質が関与している可能性が示唆された。4) 環境内に多く存在する *Cladosporium* 属および *Penicillium* 属の真菌をマウスに反復投与したところ、同様の実験条件では、両菌種ともマウスに肺動脈病変形成を惹起しなかった。

さらに原発性肺高血圧症の発症に真菌が関与する可能性を探索する端緒として、剖検肺からの真菌関連遺伝子の検索を行ったところ、高い頻度で目標とする PCR 産物を得た。

A. 研究目的

肺高血圧症の発症には遺伝的要因、環境因子の関与などが指摘されているが、その原因は未だ明らかになっていない部分が多い。我々はこれまでに、環境内から分離された *Stachybotrys chartarum* を経気管的に反復投与したマウスで肺高血圧症が惹起されることを見出した。肺高血圧症と真菌との関連はこれまでに指摘されたことはない知見であり、肺高血圧症の発症原因の探索において新たな視点でアプローチするための足がかりになるものと考えられる。

これまでは経気管的投与を反復して行ってきたが、本年度は空気中に浮遊する高濃度の本菌胞子に一度だけ曝露された場合を考慮し、胞子を単回投与した場合の肺動脈病変形成についての検討を行った。また、投与する胞子をメタノール処理した場合の影響、胞子の生死がこの病変形成に及ぼす影響についても検討した。さらに *S. chartarum* 以外の真菌と肺高血圧症との関連についても検討するために、環境内から多く検出される真菌である *Cladosporium* 属、*Penicillium* 属をマウスに反復投与し、肺に与

える影響を検討した。これまでの検討より強く疑われる原発性肺高血圧症と生活環境内での真菌暴露との関係を検討する端緒として、原発性肺高血圧症剖検肺からの真菌に関連する遺伝子について検出を試みた。

B. 研究方法

1) *S. chartarum* 単回投与による肺動脈病変の形成

S. chartarum (IFM53637) を Potato dextrose agar (PDA) にて 25°C で 3 週間培養後、RPMI1640 で菌を洗浄して胞子を採取し、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、麻酔下で気管内にカテーテルを挿管して胞子懸濁液を 25 μ l / mouse (1 \times 10⁶ spores / mouse または 5 \times 10⁶ spores / mouse) 単回投与した。投与終了後 4 週、8 週、12 週目に体重、肝、腎、脾の湿重量を量った。これらの臓器および肺をホルマリンで固定した後、パラフィン切片を作製した。これらを hematoxylin-eosin (HE) 染色、

elastica van Giesson (EVG) 染色し、病理組織学的変化を検討するとともに、右室/（左室+中隔）（RV/(LV+S)）重量比を算出した。

2) S. chartarum 胞子のメタノール処理、凍結融解処理と肺動脈病変の形成

1と同様に *S. chartarum* (IFM53637) を培養して胞子を採取し、メタノール処理または凍結融解処理を行った。即ち、メタノール処理はメタノールに 60 分間浸漬した胞子を用い、凍結融解処理は液体窒素を用いて胞子の凍結融解を繰り返した後に使用した。それぞれの胞子は CFU を測定して生存率を確認した。いずれの胞子も RPMI1640 に懸濁して胞子懸濁液を作製して実験に用いた。

麻酔下で ddY マウス (6 週齢、オス) に胞子懸濁液 25 μ l / mouse、 1×10^4 conidia / mouse を経気管的に 4 週間にわたって計 6 回投与した。反復投与終了後 7 日目に体重、肝、腎、脾の湿重量を測定した。これらの臓器および肺を HE 染色、EVG 染色し、病理組織学的変化を検討した。また、RV/(LV+S)重量比を算出した。

3) Cladosporium 属、Penicillium 属真菌の反復投与による肺動脈病変形成への影響

屋内環境中から多く検出される真菌として *Cladosporium cladosporioides* (IFM52184)、*Penicillium citrinum* (IFM54313) を用い、*S. chartarum* (IFM53637) と比較検討した。

1と同様に胞子懸濁液を作製し、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。投与は 1 回あたり 25 μ l / mouse、 1×10^4 spores / mouse とし、終了後 7 日目に体重、肝、腎、脾の湿重量を測定するとともに病理組織学的検討を行い、RV/(LV+S)重量比を算出した。

4) 原発性肺高血圧症等の剖検肺を用いた真菌関連遺伝子の探索

4-1) 剖検例からの検体の収集：

東邦大学医療センター大森病院で施行された 3,650 例の剖検例中、臨床的並びに病理組織学的に原発性肺高血圧症と診断され、パラフィンブロックの保存状態が良好であった 9 例(平均年齢 25.7 歳、男女比 2:7)を対象とした。な

お、この 9 例においては、全例において肺動脈の拡張病変に加え *Stachybotrys chartarum* 経気道感染モデルに認められたものと同様の閉塞性病変が確認されている。

4-2) PCR 法による真菌関連遺伝子の検出：

剖検例から作成した 10%ホルマリン固定パラフィン切片を用い、DNA を抽出した後に真菌特異性のある primer を使用し、常法に従って PCR 法にて真菌関連遺伝子の検出を行った。なお、定量的 PCR 法に関しては Taq Polymerase (iTaq™ DNA Polymerase, BIO RAD 社) を用いて行い、primer の選定は、これまでになされている報告を参考に panfungal として認知されているものの中から実績のある 3 種類を選定した。また、検体からの DNA の抽出はニュークリセンス miniMAG (BIOMERIEUX 社)にて抽出した。

C. 研究結果

1. *S. chartarum* 単回投与による肺動脈病変の形成

S. chartarum を 1×10^6 spores/mouse 1 回のみ投与した群では、投与後 4 週目に 20% (2/10 匹) のマウスで肺動脈壁の肥厚が見られたものの、8、12 週目のマウスではこの病変形成は確認されなかった (各 n = 10)。一方、 5×10^6 spores/mouse を投与した群では、4 週目には本病変は形成されず、8 および 12 週目にそれぞれ 20% (2/10 匹) のマウスで肺動脈病変を形成した。反復投与した場合に比べて病変が形成されたマウスの割合は低く、肥厚の程度は弱かった。内腔の閉塞した血管は認められなかった。また、肝、腎、脾には動脈病変は認められなかった。胞子は主として肺胞内に認められたが、その数は経時的に減少した。一部のマウスでは体重が減少したものの、各臓器湿重量および RV/(LV+S)重量比に有意な変化はなかった。

2. *S. chartarum* 胞子のメタノール処理、凍結融解処理と肺動脈病変の形成

メタノール処理を行った胞子と凍結融解処理した胞子の CFU は 0/100 であり、どちらも生存率は 0%であった。しかし肺動脈病変を形成したマウスの割合は胞子の処理によって異なり、凍結融解処理した胞子を投与した場合に

は18% (2/11匹) に認められたのに対し、メタノール処理した胞子を投与したマウスには全く認められなかった (0/10匹)。凍結融解によって病変が形成されたマウスの割合は、無処理の胞子を投与した場合の45% (5/11匹) と比べて低かった。いずれの投与群においても肺内で胞子は生育せず、感染は成立しなかった。体重、RV/(LV + S)重量比、肝、腎、脾の湿重量は処理の違いによる差はなかった。

3. Cladosporium 属、Penicillium 属真菌の反復投与による肺動脈病変形成への影響 (図1)

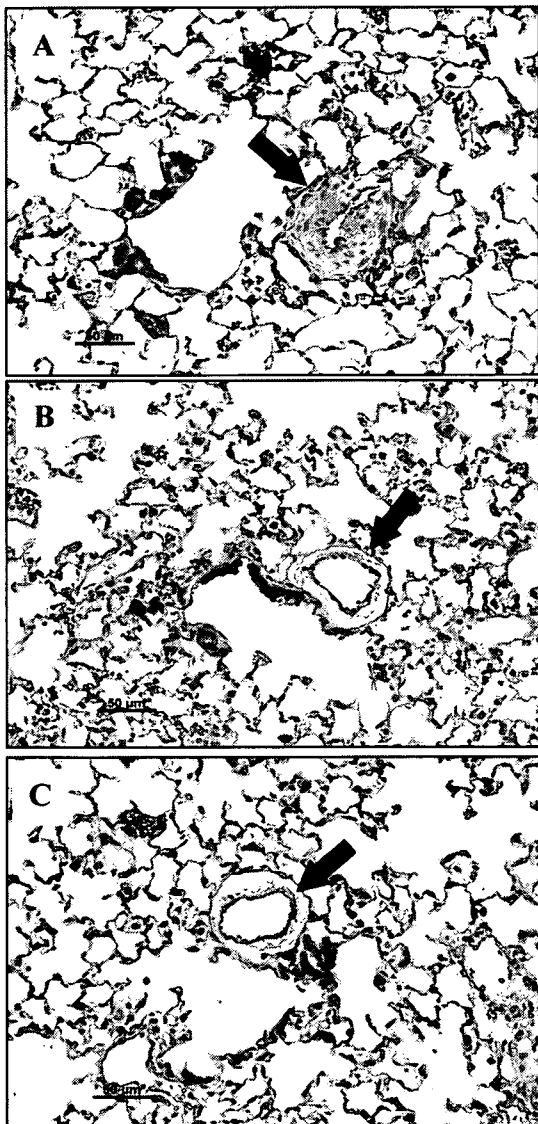


図1. 各菌株を計6回(4週間)反復投与したマウスの肺(HE染色)
A: *S. chartarum*, B: *C. cladosporioides*, C: *P. citrinum* (矢印は肺動脈を示す。)肺動脈病変の形成は *S. chartarum* 投与群のみで認められた。

S. chartarum 投与群ではこれまでの実験と

同様に肺動脈病変が形成されたが、*C. cladosporioides* 投与群および *P. citrinum* 投与群においては肺動脈の病変は形成されなかった。その他の臓器については、いずれの投与群においても動脈病変は認められなかった。RV/(LV + S)重量比は *P. citrinum* 投与群で軽度増加した ($P < 0.05$)。体重および各臓器の湿重量は菌種による差は認められなかった。

4. 原発性肺高血圧症等の剖検肺を用いた真菌関連遺伝子の探索

プライマーとして B2F/B4R, U1/U2 ならびに PF1/PF2 を使用した場合の陽性率はそれぞれ100%、78%及び0%であった。

D. 考察

今回の実験より *S. chartarum* の胞子を単回投与した場合でもマウスに肺動脈病変が形成されることが確認された。これらにおける病変の性質は反復投与した場合と同様であったが、病変形成の割合や程度は弱かったことから、本病変の程度は持続的な曝露や曝露される胞子数による影響を受けることが推測された。さらに、ヒトにおいても本菌の多量の吸入は単回の曝露でも健康に影響を及ぼす可能性が示唆された。

メタノール処理によって作製した死菌を反復投与した場合には肺動脈病変は形成されなかったことから、本病変の形成にはメタノールによって除去または不活化される物質が関与している可能性が推測された。一方、凍結融解して作製した死菌を投与した場合は病変が形成されたことから、本病変の形成には吸入される胞子は生菌である必要がないことが明らかとなった。同時にこの病変が惹起されたマウスの割合は無処理の胞子を投与した場合に比べて低く、凍結融解処理が本病変の惹起に関わる物質に何らかの影響を与えた可能性が示唆された。この点を含め、*S. chartarum* の投与によって惹起される肺高血圧症の発症メカニズムについては更なる検討が必要と考えられた。

環境内には多種類の真菌が存在しており、*S. chartarum* 以外にも肺高血圧症の原因となり得る真菌が存在する可能性が考えられる。今回の検討では、*S. chartarum* が肺動脈病変を惹起