

した条件で居住環境における大気中に最も多く検出される *C. cladosporium*、*P. citrinum* を反復投与したが、同病変は形成されなかった。これには、これらの真菌の胞子が有する活性物質や胞子の大きさの相違などの影響が推測されるが、さらに肺動脈病変の形成に必要な胞子数や実験期間が *S. chartarum* とは異なっている可能性も考えられる。今後、これらの条件を変更するとともに、被検菌の種や株を増やして慎重に検討を進める必要があると思われる。一方、今回行ったヒト剖検例のパラフィンブロックを用いた真菌関連遺伝子の検討では、600bp 以上の PCR 産物に陽性であったり検出されていることや遺伝子レベルでの異物混入に関する検討等、検体固有の問題点を解決し、panfungal primer の評価、PCR 産物に対するシーケンスの解析やコントロールの設定等の基本的な条件を詳細に検討して、信頼性の確立に勤める必要があろう。

E. 結論

本研究により、*S. chartarum* による肺動脈病変の形成は、本菌の単回のみの曝露でも成立することを確認した。菌の曝露によって病変が形成されるマウスの割合は胞子の生死による影響を受けることが確認され、病変の形成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示された。環境内に多く存在する *Cladosporium* 属、*Penicillium* 属については、今回の実験条件下では肺動脈病変は惹起しなかった。しかしながら、環境内で真菌に曝露されることによって肺高血圧症が惹起されることを考えるにあたっては、今後、慎重に検討を進める必要があるものとする。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 杉野圭史, 長谷川千花子, 木村一博, 佐野剛, 磯部和順, 渋谷和俊, 本間 栄. 白血病に合併した侵襲性肺アスペルギルス症の臨床病理学的検討. 感染症学雑誌 81: 261-7, 2007
 - 2) 磯部和順, 村岡 成, 杉野圭史, 山崎陽子, 菊池 直, 濱中伸介, 高井雄二郎, 清水邦彦, 木村一博, 廣井直樹, 渋谷和俊, 本間 栄. ポリコゾナルによる抗利尿ホルモン分泌異常症候群を認めた肺アスペルギルス症の一例. 日本呼吸器学会雑誌 45: 489-93, 2007
 - 3) Omuta J, Uchida K, Yamaguchi H, Shibuya K. Histopathological Study On Experimental Endophthalmitis Induced by Bloodstream Infection with *Candida albicans*. Jpn J Infect Dis 60: 33-9, 2007
 - 4) Taguchi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Kawabata T, Wakayama M, Ogoshi T, Iwabuchi S, Shibuya K, Nishimura K, Takahashi K. Allergic fungal sinusitis caused by *Bipolaris spicifera* and *Schizophyllum commune*. Med Mycol 45: 559-64, 2007
- ##### 2. 学会発表
- 1) 落合恵理, 亀井克彦, 永吉 優, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* 単回投与によるマウス肺高血圧症の形成に関する検討. 第 81 回日本感染症学会(京都) 2007 年 4 月
 - 2) 永吉 優, 渡辺 哲, 多田裕司, 長岡鉄太郎, 佐藤弘一, 笠原靖紀, 田辺信宏, 栗山喬之, 渋谷和俊, 亀井克彦: *Stachybotrys chartarum* の反復気管内投与によって誘導されるマウス肺高血圧症に関する検討. 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会(東京) 2007 年 5 月
 - 3) 永吉 優, 落合恵理, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 多田裕司, 長岡鉄太郎, 佐藤弘一, 笠原靖紀, 田邊信宏, 栗山喬之, 渋谷和俊, 亀井克彦: *Stachybotrys chartarum* の反復気管内投与により惹起されるマウス肺高血圧に関する検討. 第 1 回 iPUC-II (Integrated pulmonary circulation research) (東京) 2007 年 6 月
 - 4) 亀井克彦, 落合恵理: 住宅環境に生息する病原性カビ、特にマイコトキシン産生カビによる真菌症について (シンポジウム). 第 62 回マイコトキシン学会(神戸) 2007 年 9 月

- 5) 落合恵理、亀井克彦、渡辺 哲、永吉 優、豊留孝仁、渋谷和俊：Cladosporium 属、Penicillium 属菌の気管内反復投与がマウスの肺動脈に与える影響について。第 56 回日本感染症学会東日本地方会総会（東京）2007 年 10 月
- 6) 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：Stachybotrys chartarum 胞子のメタノール処理とマウス肺動脈病変の形成について。第 51 回日本医真菌学会総会（岐阜）2007 年 11
- 7) 渋谷和俊。肺真菌症 UPDATE：病態から治療まで。第 47 回日本呼吸器学会学術講演会(シンポジウム)。東京, 2007. 5
- 8) 中山晴雄， 渋谷 和俊， 倉石安庸． Breakthrough zygomycosis - 2 case reports. 第 12 回神経感染症学会総会. 福岡, 2007. 10
- 9) 中山晴雄，大久保陽一郎，上田守三，渋谷和俊. 中枢神経カンジダ症に関する病理学的検討. 第 12 回神経感染症学会総会. 福岡, 2007. 10
- 10) 久住英二，上昌広，渋谷和俊. 白血病、悪性リンパ腫および固形癌における真菌症の頻度:日本病理学会剖検輯法データベースを用いた解析. 第 69 回日本血液学会第 49 回日本臨床血液学会合同総会. 横浜, 2007. 10
- 11) 中山晴雄，上田守三，篠崎稔，大久保陽一郎，渋谷和俊. 中枢神経カンジダ症に関する病理学的検討. 真菌症フォーラム第 9 回学術集会. 東京, 2008. 2
- 12) 菅又美穂，渋谷和俊，槇村浩一，内田勝久，山口英世，安部茂． 7.Cryptococcus neoformans var.gattii の実験的気道感染マウスにおける病態の病理組織学的検索. 第 28 回関東医真菌懇話会. 東京, 2007. 6
- 13) 渋谷和俊. 深在性真菌症:動物モデルによる病態解析と遺伝子組織学的診断の試み. 第 51 回日本医真菌学会総会モーニングセミナー. 高山, 2007.11
- による真菌症について. Mycotoxins 58 (1): 47 - 51, 2008
- 2) 渋谷和俊. 深在性真菌症の病理. 上尾市医師会報 108: 6-10,2007
- 3) 篠崎 稔、井手 忠、中山晴雄、渋谷和俊. 病理細胞診断材料を用いた真菌 DNA 抽出法について. ビオメリュー・ニュースレター 7: 8-9,2007
- 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

3.総説 他

- 1) 亀井克彦、落合恵理. 住宅環境に生息する病原性カビ、特にマイコトキシン産生カビ

1 1. 肺炎クラミジアと多発性硬化症に関する研究

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 (国立感染症研究所 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 室長)

池島秀明、星 恵子 (昭和薬科大学 薬物治療学 講師)

加茂 力 (聖マリアンナ医科大学 神経内科 准教授)

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) 研究員)

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、MS と肺炎クラミジアの関連について患者血清と髄液を用いて検討した。MS 症例、5 例の血清と髄液での肺炎クラミジアの PCR ではすべて検出限界以下であった。2 例で IgG と IgM 陽性例があり、ウェスタンブロット(WB)でも肺炎クラミジアに対する特異抗体が確認された。このことから、この 2 例はいずれも肺炎クラミジアの初感染、あるいは急性感染が示唆された。しかし、MS の経過からは、肺炎クラミジアの感染が MS の発症に関与したものではなく、MS にたまたま肺炎クラミジア感染が起こった可能性が高いと推察された。前年度の成績とあわせて考えると、肺炎クラミジア感染は一部の MS の急性増悪の要因となる可能性はあるが、MS 発症への直接的な関与を積極的に疑う証拠は認められなかった。

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。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、否定的な報告もある。不明な点が多く、特に本邦での詳細な検討は不足している。昨年度の検討では、MS 患者の血清抗体価を検討し、健常人と比較すると抗体保有率は高率ではあったが、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すると低く、関与については不明であった。今年度は MS 患者の血清に加えて髄液の提供が得られたため、MS と、肺炎クラミジア感染症との因果関係に

ついて 髄液と血清からの PCR と抗体価測定を行い検討した。

B. 研究方法

1) 材料と方法

対象の MS 症例の背景を(表 1)(表 2)に示す。

5 例の性別は男:女=4:1 で年齢は 17~41 歳(平均 29.2 歳)であった。炎症を示すデータは表 2 に示すように CRP が測定された 4 例ではすべて <0.3mg/dl であった。

試料

・ MS 患者 5 名の血清 4 検体・髄液 5 検体
方法

①肺炎クラミジアの PCR

MS サンプルからの *C. pneumoniae* DNA 検出は、血清ならびに髄液からの DNA 抽出を常法に従って行い、PCR 法は Takara *ExTaq* を使用し、プライマーは 1stPCR に Kubota の 53-1、53-2 を、secondPCR に semi nested として 53-3、

53-4 を設定して表 3 の条件で施行した。

②クラミジア抗体測定法と判定

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、ヒタザイム C.ニューモニエ(日立化成)で、髄液と血清の抗肺炎クラミジア IgG, IgA, 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。

判定は以下のように設定した。シングル血清のみのため、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、急性抗体保有: IgG-ID 3.0 以上、あるいは IgM 陽性 ID 2.0 以上。

③IgM 陽性の場合 WB を行い確認することとした。

(倫理面への配慮)

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。(受付番号 83 および 138)。

C. 研究結果

1) MS 症例の PCR

図 1 に示すように MS 症例、5 例の血清と髄液での肺炎クラミジアの PCR ではすべて検出限界以下であった。

2) 肺炎クラミジア抗体 IgG, IgA, IgM の測定(表 4)

髄液の抗肺炎クラミジア抗体はすべて陰性であった。血清では、IgG 抗体保有(感染既往) ID \geq 1.10 は 2 例認め、IgG 高値 ID \geq 3.0 はなかった。IgG 抗体保有 2 例ではいずれも IgM がそれぞれ 2.81、3.46 と高値を示していた。

3) WB の成績

2 例で IgM 陽性例があり、すべてで WB を行なった。この 2 例では図 2 に示すように、肺炎クラミジアに対する特異抗体(53kd, 46kd, 43kd のバンドのいずれか)が確認された。

D. 考察

MS と肺炎クラミジアの関連について、国内の MS 患者 5 例の血清と髄液を用いて検討した。5 例の血清と髄液での肺炎クラミジアの PCR

ではすべて検出限界以下であった。

髄液の抗肺炎クラミジア抗体はすべて陰性であった。血清抗体の測定では、2 例で IgG と IgM 陽性例があり、WB でも肺炎クラミジアに対する特異抗体が確認された。このことから、この 2 例はいずれも肺炎クラミジアの初感染、あるいは急性感染が伺われた。

ただし、炎症所見としては CRP は陰性で、感染による炎症や MS の増悪も認められていない。これらのことから、この 2 例では今回の炎症所見、MS の経過から推察すると肺炎クラミジア感染は MS そのものの発症に関与したものではなく、MS にたまたま肺炎クラミジア感染が起こった可能性が高いと推察された。前年度の成績とあわせて考えると、肺炎クラミジア感染は一部の MS の急性増悪の要因となる可能性はあるが、MS 発症への直接的な関与を積極的に疑う証拠は認められなかった。

E. 結論

MS と肺炎クラミジアの関連について、前年度の成績とあわせて考えると、肺炎クラミジア感染は一部の MS の急性増悪の要因となる可能性はあるかも知れないが、MS 発症への直接的な関与を積極的に疑う証拠は見出せなかった。しかし、関連についての結論に至るには、さらなる症例の積み重ねが必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岸本寿男, 安藤秀二:肺炎クラミジア, 日本臨床, Sp.3 : 428-432, 2007 年 3 月
- 2) 岸本寿男, 安藤秀二:クラミジアの病原因子, 日本臨床, Sp.3 : 458-463, 2007 年 3 月
- 3) 岸本寿男, 安藤秀二, 沼崎 啓, 尾内一信, 山崎 勉, 中浜 力:肺炎クラミジア感染症の血清診断における「ヒタザイム C.ニューモニエ Ab-IgM」の診断基準の見直し. 第 55 回日本化学療法学会総会, 2007 年 6 月
- 4) 岸本寿男, 安藤秀二, 沼崎 啓, 尾内一信, 山崎 勉, 中浜 力:肺炎クラミジア感染症の血清診断における「ヒタザイム C.ニュー

モニエ Ab-IgM」の診断基準の見直しと評価.第56回日本感染症学会東日本地方会総会,2007年10月

- 5) 河合泰宏,岡崎旭美,織田慶子,尾内一信,宮下修行,山崎 勉,岸本寿男: PCR 法を用いた *Chlamydia pneumoniae* に関する検討. 第25回日本クラミジア研究会・第14回リケッチア研究会合同研究会, 2007年10月
- 6) 岸本寿男,安藤秀二,沼崎 啓,尾内一信,山崎 勉,中浜 力ほか、:肺炎クラミジア感染症の血清診断における「ヒタザイム C.

ニューモニエ Ab-IgM」の新たな判定基準の提唱. 第25回日本クラミジア研究会・第14回リケッチア研究会合同研究会, 2007年10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

Clinical profile				
Number	Patients	Sex	Age	Diagnosis
1	A.T	F	40	Multiple Sclerosis
2	H.S	M	17	Multiple Sclerosis
3	K.M	M	23	Multiple Sclerosis
4	S.M	M	41	Multiple Sclerosis
5	S.M	M	25	Multiple Sclerosis

表2

Number	days collection	CSF analysis			blood analysis		
		IgG index	myelinbasic protein	cell/ul	Protein mg/dl	WBC/ul	CRPmg/dl
1	2000/2/18	-	-	-	-	-	-
	1999/10/13	-	-	-	-	9800	<0.3
2	2000/2/14	566	-	16	32	-	-
3	1999/9/10	0.49	-	6	58	5800	<0.3
	1999/9/22	-	-	-	-	-	-
4	1999/10/22	0.01	0.3	0	27	7800	<0.3
5	2000/1/31	0.04	0.4	25	41	7000	<0.3

表3

MSサンプルからの *C. pneumoniae* DNA検出(PCR法: *Takara ExTaq*使用)

	1st	2nd	95°C	9:30	
DW	37.75ul	41.25ul	94°C	0:30	
10 x Buffer	5ul	5ul	55°C	0:30	x 40
dNTPs	1ul	1ul	72°C	1:00	
primer-1	0.5ul	0.5ul	72°C	5:00	
primer-2	0.5ul	0.5ul	4°C	hold	
ExTaq	0.25ul	0.25ul			
template *	5ul	1.5ul			
total	50ul	50ul			
				1st	2nd
			primer-1	53-1	53-3
			primer-2	53-2	53-4
			(50uM)		

表4

肺炎クラミジアに対する抗体価

No.	名前	検体	日付	<i>C.pneumoniae</i>					
				IgA		IgG		IgM	
				INDEX	判定	INDEX	判定	INDEX	判定
1	AT	CSF	2000/2/18	0.01	-	0.01	-	0.00	-
2	AT	serum	1999/10/13	1.33	+	2.80	+	2.81	+
3	HS	CSF	2000/2/14	0.00	-	-0.02	-	0.00	-
4	HS	serum	2000/2/14	1.33	+	0.65	-	0.98	-
5	KM	CSF	1999/9/10	0.01	-	0.00	-	0.01	-
6	SM	CSF	1999/10/22	-0.01	-	0.00	-	0.00	-
7	SM	serum	1999/10/22	0.38	-	0.03	-	0.94	-
8	SM	CSF	2000/1/31	0.00	-	-0.02	-	0.00	-
9	SM	serum	2000/1/31	2.00	+	1.25	+	3.46	+

図1

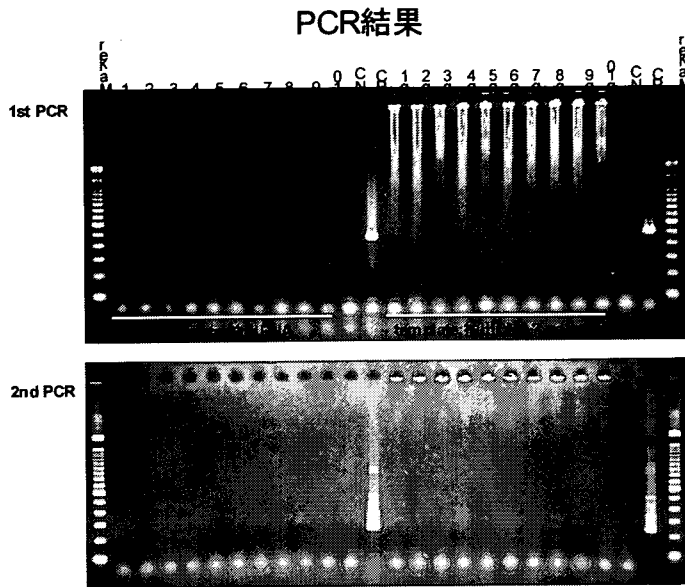
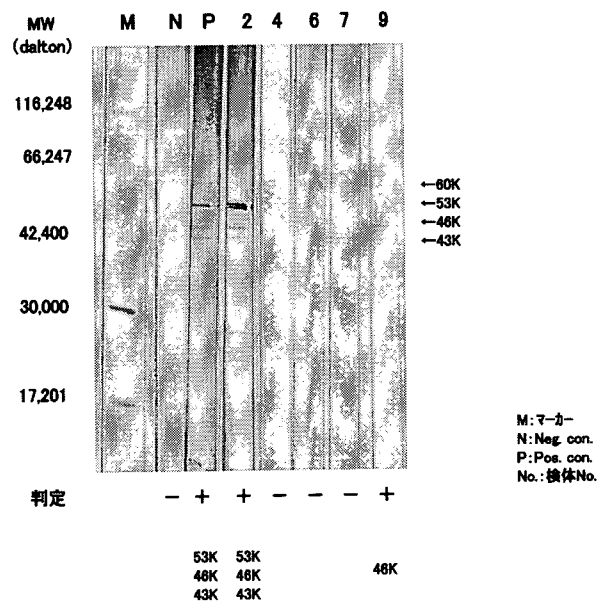


図2

MS血清のWB法 (C.pn IgM) 結果



III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Ohtaki N, Kamitani W, Watanabe Y, Hayashi Y, Yanai H, Ikuta K and Tomonaga K	Downregulation of an astrocyte-derived inflammatory protein, S100B, reduces vascular inflammatory responses in brains persistently infected with Borna disease virus.	J Virol	81	5940-5948	2007
Yamaya M, Sasaki T, Yasuda H, Inoue D, Suzuki T, Asada M, Yoshida M, Seki T, Iwasaki K, Nishimura H, Nakayama K	Hochu-ekki-to inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells.	BrJ Pharmacol	150	702-710	2007
Nakajima A, Wada K	Life style-related diseases of the digestive system: from molecular mechanisms to therapeutic strategies: preface.	J Pharmacol Sci	105	127-128	2007
Yoneda M, Saito S, Ikeda T, Fujita K, Mawatari H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Akiyama T, Takahashi H, Abe Y, Kubota K, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Nakajima A	Hepatitis C virus directly associates with insulin resistance independent of the visceral fat area in nonobese and nondiabetic patients.	J Viral Hepat	14	600-607	2007
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	211	63-74	2007
Saito K, Ito T, 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.	Am J Trop Med Hyg	77	1124-1127	2007
Kaji C, Watanabe K, Apicella MA, Watanabe H	Antimicrobial Effect of Fluoroquinolones for the Eradication of Nontypeable Haemophilus Influenzae Isolates within Biofilms.	Tohoku J Exp Med	214	121-128	2008