

刺激薬の気道炎症抑制作用が報告されてきたが、NF- κ B 抑制が機序の1つであることが、今回の検討で確認された。

4) HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) には血中コレステロール低下作用以外の生理活性が報告されている。ライノウイルス感染受容体 ICAM-1 の血管内皮細胞における発現抑制やマスト細胞における炎症性サイトカイン合成・放出抑制など、気道関連の知見がある。さらに、インフルエンザや肺炎による慢性閉塞性肺疾患 (肺気腫を含む) の死亡を減少するとの報告が2007年になされた。本年度研究において、本邦で臨床使用されているピタバスタチン (リパロ®) および海外で臨床使用されているロバスタチンのライノウイルス感染抑制作用をヒト気管上皮細胞で検討した。結果、培養液ライノウイルス放出量、炎症性サイトカイン放出量の減少および感染受容体 ICAM-1 mRNA 発現および培養液 sICAM-1 量の減少を認めた。すなわち、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) に風邪ウイルス感染抑制効果および気道炎症抑制効果のあることが示唆された。肺気腫患者のインフルエンザ・肺炎死亡減少効果に関係している可能性が示唆された。

5) インフルエンザ治療薬としてノイラミニダーゼ阻害薬やアマンタジンが臨床で用いられているが、耐性ウイルスの出現やインフルエンザ脳症の克服など、あらたな治療法が望まれている。私たちは本研究班において、これまでマクロライドや喀痰調整薬のインフルエンザ感染抑制作用を報告してきた。すなわち、ヒト気管上皮細胞において、パフィロマイシンやエリスロマイシン、クラリスロマイシンなどのマクロライド、喀痰調整薬の L-カルボシステインが培養液 A 型インフルエンザウイルス放出量を 10% 以下に低下した。さらに、本年度の研究におい

て、クラリスロマイシンおよび L-カルボシステインが細胞内インフルエンザウイルス RNA 合成を抑制した。さらに、これらの医薬品を処理した細胞では感染成立に必要なインフルエンザウイルス量が増加し、感染抵抗性の増加が示唆された。このように、現在インフルエンザ治療に用いられている医薬品以外にもインフルエンザ感染抑制作用を有する医薬品があることが明らかとなった。私たちはインフルエンザ感染抑制の機序を検討してきた。昨年までの報告で、インフルエンザの細胞内移動の役割を持っている酸性エンドゾームの機能抑制作用をこれらの医薬品が有していることを明らかにしてきた。本年度はさらに、クラリスロマイシンおよび L-カルボシステインによるインフルエンザ感染受容体発現抑制が明らかになった。今後、細胞表面におけるインフルエンザ活性化に対する作用などを検討する予定である。

E. 結論

RS ウイルス感染が肺気腫増悪による呼吸不全の原因ウイルスである可能性が示唆された。マクロライドが感染受容体 RhoA を抑制して RS ウイルス感染を抑制することが示唆された。 β 2 刺激薬のライノウイルス感染受容体発現抑制における転写因子 NF- κ B 活性抑制作用の関与が示唆された。HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) のライノウイルス感染抑制効果が示唆された。マクロライドおよび喀痰調整薬の、感染受容体発現抑制を介したインフルエンザ感染抑制効果が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaya M, Azuma A, Tanaka H, Takizawa H, Chida K, Taguchi Y, Mikasa K, Kadota J, Kudoh S. Inhibitory effects of macrolide antibiotics on exacerbations and hospitalization in COPD in Japan: a retrospective multicenter analysis. *J Am Geriatr Soc* 56: 1358-1360, 2008.
- 2) Inoue D, Kubo H, Sasaki T, Yasuda H, Numasaki M, Sasaki H, Yamaya M. Erythromycin attenuates MUC5AC synthesis and secretion in cultured human tracheal cells with RV14 infection. *Respirology* 13: 215-220, 2008.
- 3) Inoue D, Kubo H, Watanabe M, Sasaki T, Yasuda H, Numasaki M, Sasaki H, Yamaya M. Submucosal gland cells in human lower airways produce MUC5AC protein. *Respirology* 13: 285-287, 2008.
- 4) Nakao I, Kanaji S, Ohta S, Matsushita H, Arima K, Yuyama N, Yamaya M, Nakayama K, Kubo H, Watanabe M, Sagara H, Sugiyama K, Tanaka H, Toda S, Hayashi H, Inoue H, Hoshino T, Nakajima A, Inoue M, Suzuki K, Aizawa H, Okinami S, Nagai H, Hasegawa M, Fukuda T, Green ED, Izuhara K. Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 180: 6262-6269, 2008.

H. 知的所有権の取得状況

特許申請中

発明の名称：ライノウイルス感染予防剤

出願者：山谷陸雄、安田浩康、佐々木英忠

出願番号：特願 2004-98995 号

6. マイコプラズマ感染と特定疾患の関連性についての研究

Mycoplasma fermentans 生菌投与ウサギを用いたリウマチ性疾患モデル開発の検討
ならびに

抗リン脂質抗体症候群における自己抗体産生へのマイコプラズマの関与についての検討

研究分担者：荒川宜親（国立感染症研究所・細菌第二部）

研究協力者：佐々木裕子（国立感染症研究所・細菌第二部）

永田典代、原嶋綾子（国立感染症研究所・感染病理部）

網 康至、須崎百合子（国立感染症研究所・動物管理室）

山田耕二、三浦英靖、松田和洋（エム・バイオテック株式会社）

松田和洋（産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報解析研究センター、
エム・バイオテック株式会社）

研究要旨：関節リウマチ患者の関節から高頻度に DNA が分離されるマイコプラズマ種 *Mycoplasma fermentans* の関節病変形成への関与を明らかにし、かつ、新規の *M. fermentans* 血清診断系や予防・治療法の評価系とする目的で、生菌投与ウサギによる動物モデルを作製した。関節所見をヒト関節リウマチにおける慢性期所見と比較し、所見の有無によるスコア化を試みた。*M. fermentans* 生菌投与群のスコアは、培地投与群の3倍以上の高値を示し、評価系に有用である可能性が示唆された。抗リン脂質症候群の病態への関連が考えられる二つのリン脂質の特異結合蛋白であるアポリポ蛋白 H (APO-H、別名 $\beta 2$ -GP1) とプロトロンビン (PT) に対するポリクロナール抗体に反応するマイコプラズマ菌体成分について検討した。PVDF 膜上の抗体が反応するバンドを含む蛋白候補は推定されたが、 $\beta 2$ -GP1 や PT と相同性の高い領域を有する蛋白にはヒットせず、マイコプラズマ感染者で見られる抗カルジオリピンやフォスファチジルセリン抗体の産生には、蛋白の相同性による抗体産生以外の機序が想定された。

A. 研究目的

特定疾患に指定されている悪性関節リウマチは、既存の関節リウマチ(RA)に関節外症状を認める重篤な臨床病態を伴う疾患で、一年間の受療者数は数千人と推定される。関節外病変としては、血管炎と間質性肺炎が重要とされる。その理由として、血管炎の中でも内臓を系統的に侵す全身性動脈炎型を呈した場合と、血管炎以外でも間質性肺炎を呈すると生命予後不良であることがあげられる。悪性関節リウマチ患者の家族における関節リウマチ家族内発症率は 12%で、遺伝性疾患といえるほどの強い遺伝性は無い。悪性関節リウマチの原因は、母疾

患の関節リウマチと同様に不明である。また、悪性関節リウマチでは、関節リウマチで認められる免疫異常が強く現れ、抗リンパ球抗体陽性、細胞障害性T細胞機能低下を示す例もある(難病情報センター)。我々は、悪性関節リウマチの病態に微生物感染が関与していると考えれば、母疾患である関節リウマチの病態に関与する微生物と関連があるのではないかと考え、関節リウマチ患者の関節からの検出報告が多数報告されているマイコプラズマ感染に着目した。マイコプラズマは、細胞壁を欠き細胞膜で被われた小型の細菌の一群で、自然宿主の種特異性が狭い。家畜においては、それぞれの宿主に感

染するマイコプラズマ種が、鶏、山羊、羊、牛、齧歯類等に関節炎を引き起こし、呼吸器疾患を伴う場合も多い。ヒトから分離されるマイコプラズマの中でも、特に、関節リウマチ患者の関節部からの菌分離あるいはDNA検出率について報告が多数あるのが *Mycoplasma fermentans* である。関節液からの *M. fermentans* DNA 検出率は、関節リウマチ 17%、診断未確定関節炎 25%、反応性関節炎 10%、変形性関節炎 0%、結晶性関節炎 0% (Gilroy CB ら, *Rheumatology* 40: 1355-1358, 2001)と、リウマチや、早期の関節リウマチが疑われる診断未確定関節炎で高い。そもそも、*M. fermentans* は、健康人の末梢リンパ球の約 8%から DNA が検出されるとの報告がある (Kovacic ら, *J Clin Microbiol* 34:1808-1180, 1996)。Harier らは、*M. fermentans* は、関節リウマチ患者由来末梢リンパ球からの DNA 検出率が 54%とマイコプラズマ中で最も高頻度に検出される種であると報告している (Harier J ら, *Rheumatology* 38: 504-509, 1999)。一方、他のマイコプラズマ種である *M. pneumoniae* (肺炎マイコプラズマ) の関節からの DNA 検出は、関節リウマチのみならず、変形性や外傷性関節炎にも認められる。口腔内にいる *M. salivarium* の検出率は低い (関節リウマチで、*M. fermentans* 92%、*M. pneumoniae* 79%、*M. salivarium* 4%。変形性関節炎で *M. fermentans* 0%、*M. pneumoniae* 80%、*M. salivarium* 20%。対照の外傷性関節炎では *M. fermentans* 0%、*M. pneumoniae*、*M. salivarium* は検体により約 50%、Johnson SM et al. *J. Clin Microbiol* 45: 953-957, 2007)。

こうした背景の中、我々は以下のことを本研究の目的としている。1) 関節リウマチ患者の関節から検出されるマイコプラズマ、特に *M. fermentans* の関節リウマチ病変形成への関与を明らかにすること、2) 臨床で *M. fermentans* の診断が不可能なことから、リウマチ性疾患における *M. fermentans* 感染の診断技術法を確立すること、3) *M. fermentans* による関節炎モデルを作製し、新規の診断・予防・治療法(抗菌物質以外)の評価を行なうこと。我々は、これまでに試験的に行なった実験の中で、ウサギの関節への *M. fermentans* 生菌投与により関節炎

等を惹起できることを明らかにしてきたが、今年度は、その系を用いて、報告されている関節リウマチ患者における病理所見との比較ならびに、治療法等評価のペースとなる関節所見のスコア化を中心に検討を行なったので報告する。

二番目の研究対象疾患として、抗リン脂質抗体症候群(APS)についてもマイコプラズマとの関連を検討している。APS は、臓器を問わず、動脈、静脈、小血管の血栓症であるが、臨床においては、深部静脈血栓症や胎盤血栓による流産などといった血栓症状を引き起こす疾患群である。不妊症の一因として診断されることも多い。疾患名の示すとおり、リン脂質に対する自己抗体産生が関与し、約半数が全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患に合併するが、基礎疾患をもたない原発性APSも約40%前後を占めると推察されている。遺伝性は認められていない。APS では、リン脂質カルジオリピンに特異的に結合するアポリポ蛋白 H (APO-H、別名 β 2-GPI) やループスアンチコアグラント(後天性に血中出现する自己抗体で、凝固因子または凝固反応を阻害する循環抗凝集素の一つ、一般名)の抗原として有力候補であるフォスファチジルセリンに特異的に結合するプロトロンビン(PT)に対するリン脂質・特異結合蛋白複合体抗体が産生された結果、血液凝固系カスケードに異常をもたらすことが一病因と考えられている。*M. pneumoniae* 肺炎患者において、抗カルジオリピン抗体産生例が報告されており、また *M. penetrans* 感染による原発性 APS 症例報告 (Yáñez Aane et al. *Emerg Infect Dis.* 5: 164-167, 1999)がある。そこで、本研究では、マイコプラズマ感染がリン脂質・特異結合蛋白に対する自己抗体産生に関与するかの検討、ならびに、関与するとすればその機序を解明することを目的とした。我々は、先にマイコプラズマ感染者血清中の抗リン脂質・特異結合蛋白抗体測定において陽性例を得ている。今年度は、マイコプラズマ菌体中の抗 APO-H (β 2-GPI)ならびに PT 抗体に反応する成分について検討した。

B. 研究方法

テーマ1. *Mycoplasma fermentans* 生菌投与ウサギを用いたリウマチ性疾患モデル開発の検討

国立感染症研究所実験動物委員会の承認に基づき、以下の実験を行なった。NZ/W 系統のウサギ、体重約 2kg を用いた。今後の予防・治療法の効果判定を想定し、生理食塩水の注射を数回行なった後、麻酔下で *M. fermentans* 生菌約 10^9 CFU を右後脚膝蓋関節腔内に投与した。反対側の左後脚膝蓋関節腔内には、マイコプラズマの培養に用いた培地のみを投与した。また、経気道内にも投与を行なった。これまでに試験的に行なった複数回投与の方法に従い、最初の感染から 7 日後、ならびに 21 日後の合計 3 回投与した。経時的に末梢血を採取し血清分離を行なうとともに、感染 35 日後に剖検し、脳を除く主要臓器を採取し病理学的解析を行なった。関節については、脱灰後、前後十字靭帯の交叉する部分を解析した。得られた所見をもとに、ヒトの関節リウマチで見られる所見との比較を行い、着目した病変の有無をもとにスコア化を試みた。また、後脚膝蓋関節腔内への生菌投与群のウサギ血清において、抗 *M. fermentans* 抗体の有無を SDS-PAGE ならびにウエスタン・ブロッティング法を用いて解析した。さらに、抗原蛋白候補を解析するため、プロテオミクス解析を行なった。PVDF 膜上で抗体と反応した蛋白を含むバンドを切り出してトリプシン消化後、LC-MS/MS(LCQ-DECA, Thermo electron)による質量解析ならびに予想ペプチド配列の検索には BLAST に登録されているマイコプラズマ数種の遺伝子情報をもとにしたペプチドマス・フィンガープリンティング法での解析を行なった。同時に、同ウサギ血清中の抗 *M. fermentans* 代謝阻止(MI)抗体価を測定した。

テーマ2. 抗リン脂質抗体症候群における自己抗体産生へのマイコプラズマの関与についての検討

ヒト β 2-GPI ならびに PT 抗体に反応するマイコプラズマ数種の菌体成分について解析を行なった。SDS-PAGE にてマイコプラズマ菌体成分を展開後、PVDF 膜に転写し、非蛋白性のブロッキング剤にてブロッキングを行なった。

膜を抗ヒト β 2-GPI ならびに PT ポリクロナール抗体と反応させた後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体と反応させ、基質反応にて発色させた。抗体に反応した蛋白を含むバンドを切り出し、プロテオミクスを用いた解析を行なった。BioWorks ならびに Mascot を用いた予想ペプチド配列の検索データベースとして、公表されている *M. pneumoniae* ゲノム、我々がゲノム解析を行なった *M. penetrans* の情報に加えて、培地中馬血清成分を考慮し、ウマゲノムに近く、より情報量が多いウシゲノムデータベースも用いた。

C. 研究結果

テーマ1. *Mycoplasma fermentans* 生菌投与ウサギを用いたリウマチ性疾患モデル開発の検討

1) 経後脚膝蓋関節腔内投与群における関節所見

M. fermentans 生菌投与群 5 羽中 4 羽で、リンパ球浸潤、リンパ濾胞形成を認めた。滑膜細胞の多層化は、3 羽で顕著に認められた。浸出液、脂肪組織の浮腫、癒着、壊死が数羽で認められた。一方、培地投与群 5 羽においては、リンパ球浸潤は程度の差はあれ 4 羽に認められたものの、リンパ濾胞形成が顕著な例は認めなかった。滑膜細胞の多層化、浸出液、脂肪組織の浮腫、壊死も顕著ではなかった。これらの所見から言えることは、今回の実験において、*M. fermentans* 生菌投与群においては、リンパ濾胞形成が顕著な例が多く、また、滑膜細胞の多層化やフィブリンの沈着を示す傾向が見られた。

2) 関節リウマチにおける所見との比較と関節所見のスコア化

報告されているヒトの関節リウマチの病理所見では、初期病変においては、滑膜の充血・浮腫、軽度の炎症細胞浸潤といった非特異的な所見が見られる。慢性病変においては、滑膜の顕著な増殖、多核巨細胞を混える多層化した滑膜細胞の増生、リンパ濾胞を形成する慢性炎症細胞浸潤、滑膜表面や間質へのフィブリンの沈着が見られる。今回のウサギモデルにおける感染 35

日後の病理像においては、ヒトの関節リウマチの慢性病変に類似した、慢性期への移行を疑わせる所見が観察された。そこで、関節リウマチ慢性期との類似を疑う所見については、スコア化において重みづけを行なった。具体的には、ウサギモデルにおける以下の7所見、滑膜細胞の多層化、リンパ球浸潤、リンパ濾胞形成、浸出液、脂肪組織の浮腫、癒着、壊死について、有=1点、弱い=0.5、無=0点とし、そのうち、滑膜細胞の多層化、リンパ濾胞形成ならびに癒着の3所見については重みづけをし、スコアを2倍とした。5羽における平均スコアは、*M. fermentans* 生菌投与群で5.7点、培地投与群で1.5点と算出され、3倍以上のスコア差が見られた。

3) 血清解析の結果

M. fermentans 生菌投与群5羽全ての血清中に、*M. fermentans* 菌体成分と反応する抗体が検出された。プロテオミクス解析の結果、PVDF膜上の微量な蛋白についても候補を得ることができ、データベース上の *M. fermentans* 蛋白1個にもヒットが得られた。*M. fermentans* ゲノム情報が公開されていないことから公開を待って候補の決定を行なう必要があるものの、少なくとも6個の主要抗原が存在することが推測された。また、抗 *M. fermentans* 代謝阻止抗体価の上昇が、5羽すべてにおいて感染32日後の血清中に認められた。

4) 経気道投与群における肺所見

M. fermentans 経気道投与群5羽の肺病理組織においてはリンパ装置活性化、肺胞野におけるリンパ球・偽好酸球・類上皮細胞の浸潤が観察された。

テーマ2. 抗リン脂質抗体症候群における自己抗体産生へのマイコプラズマの関与についての検討

抗β2-GP1ならびにPT抗体に反応するマイコプラズマ菌体成分の分子量は、*M. pneumoniae*, *M. penetrans*, *M. fermentans*, *M. hominis* においてそれぞれ異なった。抗体と反応している菌体成分の分子量が、β2-GP1の分子量である50kDa付近でない

ものが多いことから、培地中馬血清からのβ2-GP1混入だけで説明できる可能性は低いと考えられた。昨年度は、SDS-PAGEで展開したマイコプラズマ菌体成分を膜に転写し、抗体と反応させる際、ニトロセルロース膜上での発色により明瞭なバンドが可視化できるものの、PVDF膜上では発色結果が得られなかった。LC-MS/MS解析を行なうには、PVDF膜上に蛋白が存在することが必須となるため、今年度、発色基質の感度を上げたところ、可視化が可能となったためLC-MS/MSでの解析を行なった。ゲノム情報が得られる *M. pneumoniae*, *M. penetrans* については、抗体に反応したバンドを含む領域に存在する特定の蛋白候補が推定された。候補蛋白のアミノ酸配列中に、β2-GP1やPTと高い相同性を有する領域は見いだされなかった。このことから、マイコプラズマ感染者で見られる抗リン抗体の産生には、蛋白の相同性による抗体産生以外の機序が想定された。

D. 考察

今回行なった関節所見のスコア化によって生菌投与群と培地投与群との間に数値の開きが生じたことは、今後の予防・治療薬評価に向けて、本モデルが活用できる可能性を示唆できたと考えている。病態形成におけるマイコプラズマの役割や、機序の詳細については、今後の課題として残っているが、*M. fermentans* の血清診断法開発については、すでにELISA系が立ち上がっており、これまでに本ウサギモデルにおける血中抗体価上昇を確認してきている。加えて、今回の所見スコア化の試みは、新規予防・治療薬評価系作製の第一歩である。問題点としては、今回は、着目所見の有無により点数を加算していく方式で、病変の強さを反映することにはなっていない。生菌投与群では、リンパ濾胞形成が顕著ではあったものの、リンパ濾胞のサイズや視野内の個数など、複雑な所見に対処可能な判定方法も加味するべきかもしれない。

一方、目的の一つにあげた、関節リウマチ等患者の関節から検出される *M. fermentans* の関

節リウマチ病態への関与については、本モデルにおいてヒト関節リウマチにおける慢性病変に類似した所見が観察された。このことは、一般的に他の化膿性関節炎を惹起する細菌とマイコプラズマの病態の違いに基づくと考えられる。もともと、関節腔は無菌的な空間であり、そこに菌が存在すれば、すなわち、侵襲性疾患の定義にあてはまる。例えば、黄色ブドウ球菌のような細菌による化膿性関節炎では、急性炎症所見や、関節の破壊といったより激しい病変を伴うとされる。関節リウマチ患者においても、急性炎症期においては、関節に疼痛や熱感はあるとはいえ、化膿性関節炎の重症例に比べると軽微で、しかし、慢性化の傾向がある。今回のマイコプラズマモデルにおいて一つ明確なのは、リンパ濾胞形成に見られるようにリンパ球活性化が顕著なことである。マイコプラズマは、種によって程度の差はあれ、リンパ球に対してマイトゲン活性を有している。その責任物質の一つとしては、マイコプラズマの主要な膜成分であるリポ蛋白が上げられる。マイコプラズマは一般細菌と異なり、細胞膜のみに被われており、脂質二重膜にリポ蛋白がはまりこむ膜構造をとっている。また、一般の細菌のリポ蛋白は、アシル基が3本存在するのに対し、マイコプラズマでは、3本目のアシル基を結合するためのアポリポ蛋白アシル転移酵素 (apolipoprotein transacylase) 遺伝子が欠落しており、*M. fermentans* のリポ蛋白N末端部分のリポペプチド macrophage-activating lipopeptide (MALP)-2 を用いて研究がなされたように、2本鎖アシル基を持つマイコプラズマのリポ蛋白は、強力な宿主免疫活性物質である。宿主自然免疫における Toll-like receptor (TLR) による認識もアシル基が2本のリポペプチドは、他の細菌のリポポリサッカロイドとは異なり、TLR-2 と6で認識されるという違いがある。また、リポ蛋白以外にも膜の主成分である脂質も抗原として宿主に認識される。関節にマイコプラズマが存在する場合、関節リウマチ類似の病変を惹起するか？という問いが、今回の生菌投与モデル作製の目的の一つである。宿主特異性の障壁があることから、投与菌数は実験手技上可能な最大数

となっているとはいえ、少なくとも、局所での病変について言及すれば、類似病変を惹起する可能性を否定する結果ではないと考えている。

抗リン脂質自己抗体産生にマイコプラズマが関わる機序として、現在、以下の可能性を想定している。1) 宿主のアポリポ蛋白とマイコプラズマのリポ蛋白等との抗原交叉性、2) 宿主の APO-H(β 2-GPI)などへのマイコプラズマ脂質結合による構造変化を伴う抗原性の付加、3) マイコプラズマ膜脂質成分と宿主脂質の共通性、4) マイコプラズマが生存に必須な脂質を宿主脂質に依存していることから、宿主コレステロールなどを取り込みやすい形にする際の働きに由来するもの。このうち、今回の実験においては、1の可能性について検討した。これまでのところ、抗体に反応する蛋白と APO-H(β 2-GPI)や PT とのアミノ酸配列における高い相同性は見いだされておらず、蛋白間の相同性によらない他の機序が関与している可能性も推定される。過去の報告において、APS に直接関わらないものの、マイコプラズマが、アポリポ蛋白に抗原性を付加する可能性が示唆されている。すなわち、齧歯類に感染するマイコプラズマ種 *M. arthritis* では、培地に添加する馬血清由来アポリポ蛋白の一つ APO-AI がマイコプラズマに修飾されて本来なら持たない抗原性を獲得することが報告されている (Hasebe A et al. J Immunol. 177: 4826-4832, 2006)。その修飾が何であるかは未特定であるが、微生物による宿主成分の修飾による新たな自己抗体産生機構であれば興味深い。我々は、*M. pneumoniae* ならびに *M. penetrans* の無血清培地での順化を行い、*M. penetrans* については、コレステロールを添加することで無血清培地での培養が可能となり、脂質供給源の異なる培地で培養した菌体における宿主アポリポ蛋白抗体との反応性についても検討している。また、*M. penetrans* には、 β 2-GPI のカルジオリピン結合領域と相同性の高い8アミノ酸を有する約18kDa蛋白があるが、抗 β 2-GPI抗体に反応する20kDa付近のバンド中の候補蛋白は、その18kDa蛋白にはヒットしなかった。

E. 結論

関節リウマチ患者の関節から高率に DNA が検出される *M. fermentans* を用いて、生菌投与動物モデルを作製した。本モデルにおける関節リウマチ所見との比較を行い、関節所見の有無に基づくスコア化を試みた。マイコプラズマ投与群のスコアは、培地投与群のスコアの 3 倍以上の高値を示し、今後、本モデルにおける関節病変の予防・治療法評価の際に有用であることが示唆された。

F. 健康危機情報

とくに無し

G. 研究発表

学会発表

佐々木裕子、永田典代、網 康至、須崎百合子、松田和洋、荒川宜親、*Mycoplasma fermentans* 生菌投与ウサギを用いた関節炎モデル開発と抗糖脂質抗体の解析、第 82 回日本細菌学会総会、平成 21 年 3 月、名古屋

H. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）

特許出願準備中

表 1 関節所見のスコア化の試み

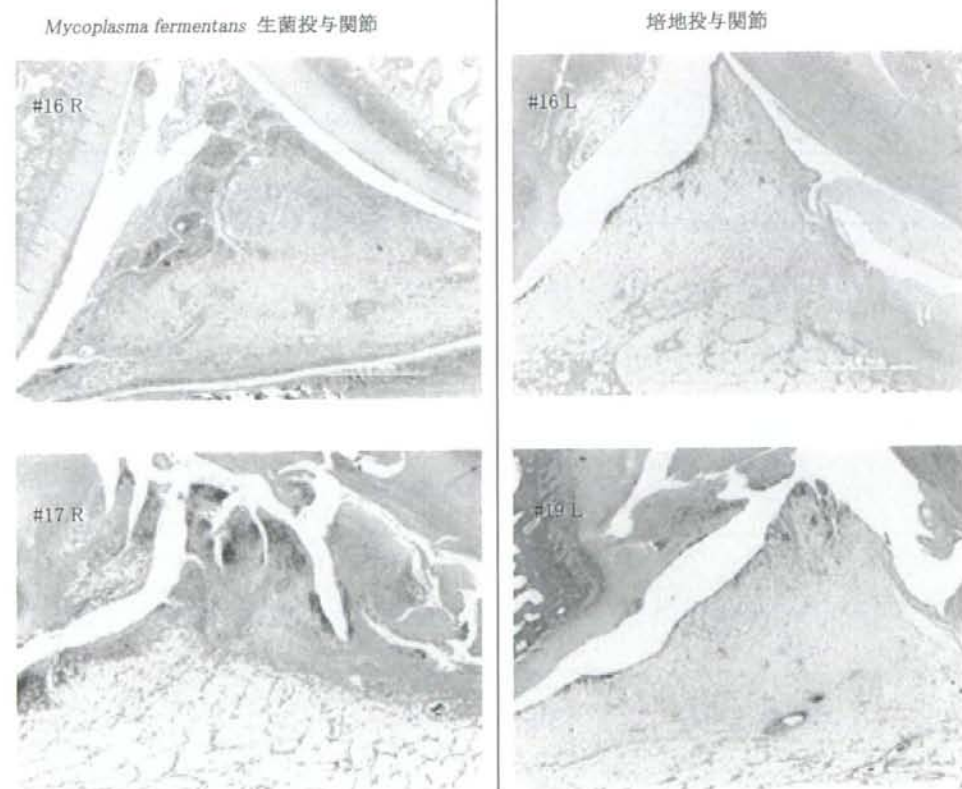
Mycoplasma fermentans 接種 (右)

Rabbit No.	Immunization	Injection	滑膜細胞の多層化	リンパ球浸潤	リンパ濾胞形成	浸出液	脂肪組織の浮腫	癒着	壊死	合計	平均
16	saline	<i>M. fermentans</i>	2	1	2	1	1	0	0	7	5.7
17	saline	<i>M. fermentans</i>	2	1	2	0.5	1	2	0	8.5	
18	saline	<i>M. fermentans</i>	2	1	2	0.5	0.5	2	1	9	
19	saline	<i>M. fermentans</i>	0.5	1	2	0	0	0	0	3.5	
20	saline	<i>M. fermentans</i>	0	0.5	0	0	0	0	0	0.5	

培地

Rabbit No.	Immunization	Injection	滑膜細胞の多層化	リンパ球浸潤	リンパ濾胞形成	浸出液	脂肪組織の浮腫	癒着	壊死	合計	平均
16	saline	medium	0	1	0	0	0	0	0	1	1.5
17	saline	medium	0	1	1	0	0.5	0	0	2.5	
18	saline	medium	0	1	1	0	0	0	0	2	
19	saline	medium	0	1	1	0	0	0	0	2	
20	saline	medium	0	0	0	0	0	0	0	0	

図 1 ウサギモデルにおける関節の所見



7. 腸管スピロヘータが炎症性腸炎に及ぼす影響に関する研究

研究分担者：和田 昭仁（国立感染症研究所細菌第一部）

研究要旨：腸管スピロヘータ症の起炎菌として国内症例より分離され同定された *Brachyspira pilosicoli* ならびに *B. aalborgi* の臨床背景を、検査依頼例および学会発表等の文献より検索し、炎症性腸炎との関連性を調べた。*B. pilosicoli* に関しては、12 例中男性が 11 例であり、アメーバ症をはじめとする原虫腸管感染症との合併例が多く見られた。臨床的に潰瘍性大腸炎と診断されていた例は、2 例みられた。*B. aalborgi* に関しては、病理検索による結果が、他施設より発表され (Mod Pathol. 2008, 21:71-84)、2556 例中、大腸炎/直腸炎からの検出が 4 例、ポリープからの検出が 13 例との内容であった。

A. 研究目的

腸管スピロヘータ症の起炎菌である *Brachyspira* は、発展途上国においては、食品、水系を原因として腸管感染を起こす一方、衛生状態がよい地域でも、赤痢アメーバなどの原虫感染症との混合感染として分離されることがあり、また、臨床的に潰瘍性大腸炎と診断された症例から分離されることもある。本研究では、便、腸液、腸管病理組織から菌を分離、あるいは PCR により菌特異的 DNA を検出し、腸管スピロヘータ症の合併率を明らかにし、炎症性腸炎と *Brachyspira* の関連を知ることを目的とする。

B. 研究方法

培養は、ヒツジ血液寒天でも可能であるが、成長を促進するため、Tryptone Soya Agar (Oxoid) に 5-10% のウシ血清を加えた平板を用いた。臨床検体からの培養には選択剤として 400 µg/mL spectinomycin, 12.5 µg/mL rifampicin を上記の平板培地に加えたものを用いた。分離された菌の同定のため、生化学的性状測定、16S rDNA 配列決定、必要に応じ走査電子顕微鏡による形態の観察を行った。

倫理面への配慮

依頼された検査は全てトレース不可能な匿名化のもと行った。

C. 研究結果

人から分離される *Brachyspira* として、*B. pilosicoli* ならびに *B. aalborgi* が知られている。

a) *B. pilosicoli* に関して

検査依頼例および、文献や学会発表に見られた *B. pilosicoli* 分離症例を表 1 に示す。

12 症例中 11 例が男性であり、そのうち 3 例がアメーバやジアルジアとの混合感染であった。また、1 例 HIV 陽性例が見られた。症例 12 は腸管からではなく、敗血症の起炎菌として分離された症例である。炎症性腸炎(潰瘍性大腸炎)と診断されていた例は症例 8, 11 の 2 例だけであった。

b) *B. aalborgi* に関して

B. aalborgi は分離培養に 3 週間以上を必要とするため、鏡検ではスピロヘータが見られるものの、分離培養されないことがある。したがって、HE 染色、Warthin-Starry 染色による病理的な検索が有効である。今回

の研究期間中にこの検索を行うことはできなかったが、他施設より 2556 例の生検材料、手術材料からの検索結果の報告がなされた (1)。これによると、*B. aalborgi* 陽性例は 20 例見られ、4 例が大腸炎、13 例がポリープ、1 例が癌、1 例がアメーバ症、1 例が記載なしであった。

D. 考察

a) *B. pilosicoli* に関して

表 1 に示したように、炎症性腸炎の診断がなされていた例は 16.6% (2/12) にみられた。他の例で見られた原虫腸管感染症は、食品、飲料水の衛生状態がよい日本においては STD として捉えられている疾患である。日本における *B. pilosicoli* 感染の危険因子として、STD 感染、ペット飼育歴、東南アジアなどへの旅行歴が考えられる。危険因子に関する結論を得るには、ケースコントロールスタディが必要であり、この中で炎症性腸炎との関連を調査する必要があると考えられる。

b) *B. aalborgi* に関して

文献 1 には調査対象となった材料 2556 例

のうち、ポリープは "most" であるとの記載があるだけで、炎症性病変検体とポリープ検体の具体数は示されていない。90% がポリープであったと仮定し、 χ^2 検定を行ってみると、ポリープに対して、*B. aalborgi* が炎症性病変から検出されるオッズ比は 2.76 (95% 信頼区間 0.89-8.54) $p=0.065$ となり、統計的有意差は見られない。本研究では、病理組織に加え臨床材料からの検出を行う計画を立てていたため、この数字とは異なる結論が得られる可能性はあるが、病理組織の検査数 (2556 例) を考えると、培養に当たっても相当量の検査が必要になると予想される。

E. 結論

病理検査や培養で *B. pilosicoli* ならびに *B. aalborgi* 感染症診断をおこない、統計的な処理に耐える症例を蓄積するには相当の時間と費用が予想される。これを解決するためには、特異的な血清診断系の開発が有効であると考えられる。

参考文献

1. Tanahashi J et al., Mod. Pathol. 2008, 21:76-84.

表 1

症例	性	年齢	症状	診断	推定感染原因
1	M	38	下血	Amoebiasis	ペット (ミニブタ)
2	M	61	下血	Amoebiasis Giardiasis	海外の果物・ペット (猫)
4	M	55	下血	DM C.diverticula	ペット (犬)
5	M	32	下痢・下血		ハワイ渡航?
6	M	45	下痢	Amoebiasis Giardiasis	風俗店・ペット (犬)
7	M	36	水溶性下痢		
8	M	35	下痢・下血	UC, HIV positive	
9	M	41	下血	Tubular adenoma	
10	M	47	下腹部痛	Polyp	
11	F	40's	下痢・下血	UC	ペット (ミニブタ)
12	M	58	ショック	敗血症	頻回の東南アジア渡航

症例 1-7 この研究による症例;

症例 8-10 文献 1

症例 11 第 18 回日本臨床微生物学会総会

症例 12 第 20 回日本臨床微生物学会総会

8. 糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序に関する解析

研究分担者：渋谷 和俊（東邦大学医学部病院病理学講座）

研究協力者：亀井 克彦（千葉大学真菌医学研究センター）
片野 晴隆（国立感染症研究所感染病理部）
中山 晴雄（東邦大学医学部病院病理学講座）
篠崎 稔（東邦大学医学部病院病理学講座）
落合 恵理（千葉大学真菌医学研究センター）

研究要旨 *Stachybotrys chartarum* の気管内反復投与によってマウスで惹起される肺高血圧症について検討を進めた。*S. chartarum* による肺動脈病変の形成頻度はマウスの系統や菌株の相違によって異なった。既知の mycotoxin を中心とする二次代謝産物について分析したところ、本菌は trichothecene など多様な物質を産生していることが確認された。今回対象とした二次代謝産物と *S. chartarum* による肺高血圧との関連は明確ではなかったが、菌株によって肺動脈病変形成に相違があることから、その相違を明らかにするために、今回検討しなかった物質を対象として更に検討を重ねる必要があると考えられた。また、本病変形成において Rho kinase の関与が示され、本モデルがヒトの肺高血圧症と同様の機序によって惹起されている可能性が示唆された。さらに、原発性肺高血圧症と生活環境内での真菌曝露との関係を検索する端緒として、原発性肺高血圧症剖検肺からの真菌に関連する遺伝子 (*S. chartarum* 特異遺伝子) について、nested PCR 法を用いて検出を試みたところ、*S. chartarum* 特異遺伝子が抽出されたが、その抽出率はコントロール群と同等であった。これにより、*S. chartarum* が広く我々の生活環境に分布し、曝露されている可能性が推察された。

A. 研究目的

原発性肺高血圧症は肺高血圧症の中でも原因が不明で根本的な治療法が未確定であり、かつ、経過が慢性にわたり、単に経済的な問題のみならず介護等に著しく人手を要するために家族の負担が重く、また精神的にも負担の大きい疾病として、難治性疾患克服研究事業調査研究対象疾患とされている。一方、*Stachybotrys chartarum* は、わが国の居住環境内に生育している真菌であることから、ヒトが日常的に本菌に曝露されている可能性が指摘されている。

我々はこれまでにヒト居住環境内から分離された *S. chartarum* をマウスの気管内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てきた。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あり、本疾患の病態の解明にとって重要な知見であると考えられる。しかし、これまでに原発性肺高血圧症と生活環境内での真菌曝露との関係や本菌による病変形成の仕組みについて詳細に検討された報告は皆無である。

本研究では、1) *S. chartarum* 曝露による肺動脈病変形成におけるマウスの系統および菌株の相違、2) 本病変形成に関わる因子の解明を目的として、真菌胞子に含まれる trichothecene 等の mycotoxin の分析、3) ヒトの肺高血圧症で関与が考えられている Rho kinase の本モデルにおける関与、を検討した。さらに、原発性肺高血圧症と生活環境内での真菌曝露との関係を検索する端緒として、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。本研究では原発性肺高血圧症剖検例と、年齢、性別、剖検年数を可能な限り一致させた症例9例をコントロールとして設定し、検討を行った。

B. 研究方法

1. マウス系統の相違と肺動脈病変の形成について

S. chartarum (IFM53637) を potato dextrose agar (PDA) にて 25°C で 3 週間培養後に胞子を採取し、RPMI1640 にて懸濁液を作製した。

ddY、ICR、C57BL/6J、BALB/c マウス (6 週齢、オス) の腹腔内に ketamine および xylazine の混合液を注射し、麻酔下でマウスの気管内にカテーテルを挿管し、1 回あたり 1×10^4 spores/mouse (25 μ l/mouse) の胞子懸濁液を 4 週間にわたって計 6 回反復投与した。反復投与終了後 7 日目に体重、肝、腎、脾の重量を測定し、肺およびこれらの臓器についてパラフィン切片を作製し、hematoxylin-eosin (HE) 染色、elastica van Gieson (EVG) 染色し、病理組織学的変化を検討した。また、右室/(左室+中隔) ((RV/(LV+S)) 重量比を算出した。

2. 菌株による肺動脈病変形成の相違について

S. chartarum 12 株を PDA にて培養したのちに胞子を採取し、それぞれの胞子懸濁液を作製した。麻酔下の ddY マウス (6 週齢、オス) に 1 回あたり胞子懸濁液 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 回反復投与した。反復投与終了後 7 日目に体重、肝、腎、脾の重量を測定し、肺およびこれらの臓器を 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. *S. chartarum* 菌体成分の抽出と二次代謝産物の分析

S. chartarum 37 株を PDA で 3 週間培養したのちにそれぞれの胞子を採取し、これら各菌株の胞子を室温にてメタノールに一晩浸漬した。このメタノール抽出液を濃縮乾固させた後、再度メタノールに希釈して LC-MS および LC/TOF-MS にて分析をおこなった。検出対象

は、trichothecene 類 (Satratoxin G、H、Iso-satratoxin F、Roridin L2、E、Epiroridin E、H、Verrucaric acid、B、Trichoverrol A、Trichoverrin A)、Atranone、Dollabellane、Stachybotrylactone、Stachybotrylactam、Stachybotrycin、Trichodermin、Trichodermaol とした。

4. Rho kinase 阻害薬投与による本病変形成への影響

S. chartarum (IFM53637) を PDA で 3 週間培養したのちに胞子を採取し、RPMI1640 にて胞子懸濁液を作製した。麻酔下で ddY マウス (6 週齢、オス、12 匹) に 1 回あたり胞子懸濁液 25 μ l/mouse (1×10^4 conidia/mouse) を経気管的に 3 ヶ月にわたって計 18 回反復投与した。この実験期間中、半数のマウスには併せて Rho kinase 阻害薬である fasudil (100mg/kg/day) を経口的に投与し続けた (fasudil 投与群)。反復投与終了後 7 日目に体重、肝、腎、脾の重量を測定し、これらの臓器と肺を 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。さらに、外径 50 ~ 100 μ m の肺動脈について、内腔狭窄の程度を調べ、stenotic index (1-血管内腔の面積/血管全体の面積)) を用いて評価した。

5. 原発性肺高血圧症剖検肺からの真菌に関連する遺伝子の検出

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。

また、これら原発性肺高血圧症剖検例と、年齢、性別、剖検年数を可能な限り一致させた剖検例を 9 例選択し対照群として設定した。なお、本研究計画を東邦大学医学部倫理委員会に申請し承認を得た (承認番号: #20029)。

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、感度と特異性を高めることを考慮して、nested 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 (iTaQTM DNA Polymerase, BIO RAD 社) を用いて行い 1st step PCR および 2nd step PCR に用いる primer pair の選定は、これまでになされている報告を参考に、*S. chartarum* 特異性のある primer としてそれぞれ PCR 産物が 138 塩基対および 96 塩基対となるように 2 種類を選定した (表 1)。

1st step PCR では 2 分の 94°C 処理の後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒を 35 サイクル行った。この PCR 産物の 2.5 μL を 2nd step PCR の template とし、94°C 2 分間処理の後、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒を 35 サイクル行った。PCR 産物についてはアガロース電気泳動を行い、目的の塩基対のバンドが得られたものについて陽性と判定した。

なお、検体からの DNA の抽出はフェノール法にて抽出した。

C. 研究結果

1. マウス系統の相違と肺動脈病変の形成について (図 1)

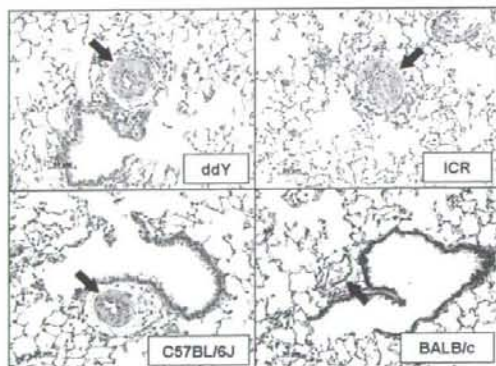


図 1. マウス系統の相違と肺動脈病変
S. chartarum を 4 週間にわたって計 6 回反復投与したところ、ddY、ICR、C57BL/6J マウスで肺動脈壁の肥厚が見られた。BALB/c マウスでは肺動脈の変化は見られなかった。

S. chartarum を反復投与によって肺動脈壁の肥厚が形成されたマウスは、ddY では 10 匹中 2 匹 (20%)、ICR では 11 匹中 8 匹 (73%)、C57BL/6J では 10 匹中 9 匹 (90%) であった。いずれのマウスにおいても肺動脈病変の程度は同程度であり、マウス系統の相違による病変の程度には差が見られなかった。一方、BALB/c マウスではこのような肺動脈病変の形成は 1 匹も認められなかった (11 匹中 0 匹)。いずれのマウスにおいても肺内で胞子の生育は見られず、また、肝、腎、脾に動脈病変は認められなかった。各臓器湿重量、RV/(LV+S)重量比に有意な変化はなかった。

2. 菌株による肺動脈病変形成の相違について

今回検討した菌株において肺動脈病変が形成される割合は 10-60% であり、本病変形成には菌株の相違による差が見られた。どの菌株の投与群においても、肺動脈壁の中膜・内膜の肥厚により内腔が狭窄した血管がそれぞれの肺葉でびまん性に認められた。いずれの菌株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、脾の湿重量にも有意差は見られなかった。

3. *S. chartarum* 菌体成分の抽出と二次代謝産物の分析

分析した *S. chartarum* 37 株のうち 9 株で trichothecene 類が検出された。残りの株からは atranone や dollabellane が検出された。これらの物質は trichothecene 産生株からは検出されなかった。Stachybotrylactone、stachybotrylactam が全ての株から検出された。Stachybotrycin は trichothecene 産生性とは無関係に約半数の菌株から検出された。Trichodermin および trichodermol はどの株からも検出されなかった。

4. Rho kinaes 阻害薬投与による本病変形成への影響

S. chartarum を反復投与したマウスにおいて、fasudil を投与しなかった群では 6 匹中 5 匹 (83%) で肺動脈壁の肥厚が見られたのに対して、fasudil を投与した群では 6 匹中 3 匹 (50%) であり、fasudil 投与群の方が肺動脈病変の形成割合が低かった。さらに stenotic index は fasudil

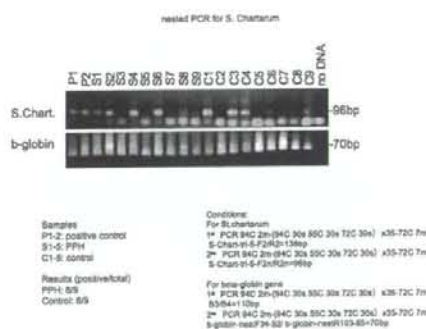
非投与群と比べて fasudil 投与群で有意に小さかった ($P < 0.001$)。体重および RV/(LV+S)重量比は両群間で有意差は認められなかった。

5. 原発性肺高血圧症剖検肺からの真菌に関連する遺伝子の検出 (図 2)

tri5F2/tri5R2, tri5F2n/tri5R2n

1st PCR の Primer として tri5F2/tri5R2 を使用し、2nd PCR の Primer として tri5F2n/tri5R2n を使用した場合、原発性肺高血圧症例 9 例中 6 例 (66.6%) に *S. chartarum* に特異的な 96bp の明瞭なバンドが検出された。一方、対象群でも 9 例中 6 例 (66.6%) に同様に 96bp の明瞭なバンドが検出された (図 2)。

図 2



D. 考察

マウスの系統により肺動脈病変の形成に相違が認められた。この原因は明らかではないが、BALB/c が免疫系に異常を有していることが知られていることなどから、系統による免疫反応の相違などが関与している可能性が考えられた。また、肺動脈病変の形成頻度は菌株による相違が認められ、同一菌株内でも菌株によって病変形成に関与する能力に相違がある可能性が示された。

一方、供試した *S. chartarum* 株はいずれも trichothecene など種々の二次代謝産物を産生することが確認された。しかし、これらの物質の産生性は菌株によりかなりの相違がみられた。肺動脈病変の形成が菌株によって相違がある

ことを考えると、このような二次代謝産物が本病変形成に直接または間接的に関与している可能性も否定できない。今回測定した二次代謝産物と肺動脈病変形成との関連については明らかな傾向はみられなかったが、対象としなかった二次代謝産物の中に病変形成に関与する物質が含まれている可能性も考えられる。今後は対象となる二次代謝産物の幅を広げ、本病変形成に関わる二次代謝産物を検討する必要があると思われる。

また、今回の検討によって *S. chartarum* による肺動脈病変の形成に Rho kinase が関与している可能性を示す結果が得られた。Rho kinase は血管平滑筋の収縮に関与していることが知られており、ヒトの肺高血圧症における関与が考えられている。我々のモデルにおける肺動脈病変形成にも同様の機序が関わっている可能性が考えられる。このことについては今後、更に詳細な検討を進める必要がある。

原発性肺高血圧症と生活環境内での真菌曝露との関係を探索する端緒として、原発性肺高血圧症剖検肺からの真菌に関連する遺伝子 (*S. chartarum* 特異遺伝子) について検出を試みた。また、原発性肺高血圧症剖検例と、年齢、性別、引検年数を可能な限り一致させた症例 9 例を対照群として設定した。その結果、両群間に *S. chartarum* 特異遺伝子の抽出率に優位差は認められなかった。これにより、*S. chartarum* が広く我々の生活環境に分布し、暴露されている可能性が推察された。特異的 DNA を高感度かつ特異的に検出する nested PCR 法は原発性肺高血圧症と生活環境内での真菌曝露、特に *S. chartarum* との関係や本菌による病変形成の仕組みの解析に有用であり、原発性肺高血圧症と生活環境内での真菌曝露との関係を明らかにするには nested PCR 法を含む新規遺伝子診断法による高感度検出法による検討が必要である。今後、*S. chartarum* 特異遺伝子に加え真菌に関連する遺伝子の検出を重ね、原発性肺高血圧症と生活環境内での真菌曝露との関係や本菌による病変形成の仕組みについて更なる検討を進める必要があると考えられた。

E. 結論

本研究により、*S. chartarum* による肺動脈病変の形成頻度はマウス系統や菌株によって相違があることを確認した。*S. chartarum* は多様な二次代謝産物を産生し、その中には trichothecene 類のような細胞傷害性を持つトキシシンなどが含まれていた。しかし、このような二次代謝産物と肺動脈病変形成との関連については現時点では明らかでなく、更に検討を進める必要があると思われる。また、肺動脈病変の形成には Rho kinase の関与も示され、本モデルがヒトの肺高血圧と同様の機序によって成立している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizuiri S, Henmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, Sakai K, Ishikawa Y, **Shibuya K**, Hase H, Aikawa A. Expression of ACE and ACE2 in individuals With Diabetic Kidney Disease and Healthy Controls. *Am J Kidney Dis*, 51(4) (April): 613-23, 2008
- 2) 谷島 聡、土屋 勝、大塚 由一郎、山崎 有浩、田村 晃、久保田 喜久、鷲沢 尚宏、渡辺 正志、佐藤 真司、渋谷 和俊、金子 弘真. 腹腔鏡補助下に切除した小腸 GIST の一例. *臨床と研究*, 85 巻 5 号、87-90、2008
- 3) 中山晴雄、篠崎 稔、三宅洋子、井手 忠、大久保陽一郎、渋谷和俊. 病理組織検査. *Medical Technology*, 36(7): 707-12、2008
- 4) 谷川佳世子、大久保陽一郎、中山晴雄、長谷川千花子、密田亜希、羽鳥 努、和久井紀貴、土屋 勝、相川 厚、渋谷和俊. 胆管炎と間質性腎炎で発症した IgG4 関連硬化性疾患の 1 例. *診断病理*, 25(3)、222-5、2008
- 5) Hanaoka N, Takano Y, **Shibuya K**, Fugo H, Uehara Y, Niimi M. Identification of the Putative Protein Phosphatase Gene PTC1 as a Virulence-Related Gene Using a Silkworm Model of Canadian albicans Infection. *Eukaryot Cell*. 7(10): 1640-8, 2008
- 6) 渋谷和俊. 非アスペルギルス性糸状菌感染症の動向と対策～接合菌症を中心として～. *深在性真菌症～SFI Forum～* 4 (2)、2008
- 7) Sugino K, Hasegawa C, Sano G, **Shibuya K**, Homma S. Pathophysiological Study of Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 61(6), 450-3, 2008
- 8) 篠崎 稔、中山晴雄、渋谷和俊. 7. 肺真菌症の新しい病理診断手法. *日胸*, 67 巻 11 号増刊、250-54、2008
- 9) 磯部和順、岩田基秀、石田文昭、鏡木教平、後町杏子、村松洋子、阪口真之、佐藤大輔、佐野 剛、草野英美子、坂本 晋、高井雄二郎、渋谷和俊、本間 栄. マレイン酸メチルエルゴメトリンによる肺出血の 1 例. *日呼吸会誌*, 46 (12)、1007-12、2008
- 10) 大久保陽一郎、中山晴男、長谷川千花子、密田亜希、羽鳥 努、谷川佳世子、篠崎 稔、渋谷和俊. 深在性真菌症の病態と病理組織学的特徴. *日本臨床*, 66(12)、2327-33、2008(Okubo Y, Nakayama H, Hasegawa C, Mitsuda A, Hatori T, Tanikawa K, Shinozuka M, **Shibuya K**. Pathophysiology of invasive fungal infection in diabetic patients. *Nippon Rinsho*, 66(12), 2327-33, 2008)
- 11) Ando T, Moriya A, **Shibuya K**. Aspergillosis. *Nippon Rinsho*, 66 (12), 2345-9, Japan
- 12) Haugen AC, Goel A, Yamada K, Marra G, Nguyen TP, Nagasaka T, Kanazawa S, Koike J, Kikuchi Y, Zhong X, Arita M, **Shibuya K**, Oshimura M, Henmi H, Boland CR, Koi M.
- 13) Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 68(20), 8465-72, 2008
- 14) Saito N, Hatori T, Aoki K, Hayashi M, Hirata Y, Sato K, Nakayama H, Harashina J, Murata N, Zhang Z, Nonaka H, **Shibuya K**, Iwabuchi S. Dynamics of global gene expression changes during brain metastasis

- formation. Wiley InterScience JOURNALS Neuropathology, 1440-789, 2008
- 15) 尾野大洋, 大橋則夫, 関東裕美, 土屋一晃, 森田あや子, 渋谷和俊, 伊藤正俊. 手背に生じた皮膚型平滑筋肉腫の1例. 臨床皮, 62(8), 576-8, 2008
 - 16) 菊池由宜, 松崎淳人, 藤田泰子, 渡邊慶太, 中野 茂, 渡辺 学, 五十嵐良典, 住野泰清, 中野弘一, 渋谷和俊. 腓小細胞癌の1例. 癌の臨床, 54(11), 935-40, 2008
 - 17) Hata Y, Takagi S, Sasamoto S, Tamaki K, Fukumori K, Otsuka H, Kusano E, Isobe K, Hasegawa C, Mitsuda A, Shibuya K. An Endobronchial Emergency Core-out Procedure and Subsequent Elective Surgery for a Central Airway Obstruction Caused by Lung Cancer with Polypoid Growth. 15th World Congress for Bronchology (WCB) and 15th World Congress for Bronchoesophagology(WCBE) MEDIMOND S.r.l, April:221-24, 2008
 - 18) Ochiai E, Kamei K, Watanabe A, Nagayoshi M, Tada Y, Nagaoka T, Sato K, Sato A, Shibuya K. Inhalation of *Stachybotrys chartarum* causes pulmonary arterial hypertension in mice. *International Journal of Experimental Pathology* 2008; 89(3): 201-208.
- ## 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* による肺動脈病変形成におけるマウス系統差について. 第82回日本感染症学会総会, 感染症誌 82 (臨増): 241, 松江, 2008. 4.
 - 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* による肺血管病変の形成に関する因子の検討. 第48回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 2008. 6.
 - 3) 滝埜昌彦, 落合恵理, 亀井克彦, 小西良子: LC/TOF-MS 及び LC-MS/MS を用いた真菌中の大環状トリコテセン類及びグリオトキシンの分析. 日本マイコトキシン学会第64回学術講演会, 名古屋, 2008. 8.
 - 4) 落合恵理, 亀井克彦, 佐藤綾香, 永吉 優, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊: 真菌胞子の吸入と肺動脈壁肥厚の形成について. 第52回日本医真菌学会総会, 長崎, 2008. 9.
 - 5) 落合恵理, 永吉 優, 佐藤綾香, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊, 亀井克彦: 環境内真菌の吸入と難治性肺疾患の発症に関する検討. 平成20年度室内環境学会総会, 2008. 12.
 - 6) 滝埜昌彦, 落合恵理, 亀井克彦, 小西良子: LC/TOF-MS を用いた *Stachybotrys chartarum* 及び *Aspergillus fumigatus* のキャラクタリゼーション. 日本マイコトキシン学会第65回学術講演会, 東京, 2009. 1.
 - 7) 落合恵理, 亀井克彦, 滝埜昌彦, 小西良子, 矢口貴志, 松澤哲宏, 佐藤綾香, 永吉優, 渡辺哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊: *Stachybotrys chartarum* によるマイコトキシン産生性についての検討. 真菌症フォーラム第10回学術集会, 名古屋, 2009. 2.
 - 8) 渋谷和俊. Mini Lecture, 第237回臨床病理検討会, 4,10,2008 東京
 - 9) 羽鳥 努, 密田亜希, 長谷川千花子, 大久保陽一郎, 渋谷和俊, 斎藤紀彦, 佐野弘子, 板橋正幸, 田島康夫, 北山康彦, 鎌田信悦, 三浦弘規, 竹内賢吾, 森 茂郎. 5重癌の1つとして認められた精巣悪性リンパ腫の1例. 第97回日本病理学会総会, 5,15・16・17,2008 金沢市
 - 10) 中山晴雄, 岩淵 聡, 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. 第97回日本病理学会総会, 5,15,2008 金沢市
 - 11) 磯部和順, 阪口真之, 鍋木教平, 佐野 剛, 杉野圭史, 草野英美子, 坂本 晋, 高井雄二郎, 本間 栄, 秦 美暢, 笹本修一, 高木啓吾, 長谷川千花子, 渋谷和俊. 間質性肺炎(IP) 合併肺癌における治療後急性増悪の検討. 第48回日本呼吸器学会学術講演会, 6,15・16・17,2008 神戸市

- 12) 秦 美暢, 笹本修一, 田巻一義, 福森和彦, 大塚 創, 牧野 崇, 高木啓吾, 磯部和順, 草野英美子, 本間 栄, 長谷川千花子, 密田亜希, 渋谷和俊. 重症・最重症 COPD 合併肺癌の7切除例. 第48回日本呼吸器学会学術講演会, 6,15・16・17, 2008 神戸市
- 13) 永吉 優, 多田裕司, 笠原靖紀, 田邊信宏, 栗山喬之, 長岡鉄太郎, 佐藤弘一, 渋谷和俊, 渡邊 哲, 亀井克彦. *Stachybotrys chartarum* による肺血管病変の形成に関与する因子の検討. 第48回日本呼吸器学会学術講演会, 6,15・16・17, 2008 神戸市
- 14) 磯部和順, 阪口真之, 鏑木教平, 杉野圭史, 坂本 晋, 高井雄二郎, 本間 栄, 秦 美暢, 高木啓吾, 長谷川千花子, 渋谷和俊. 間質性肺炎 (IP) および合併肺癌組織における SUV 値と Glut-1 の対比. 第48回日本呼吸器学会学術講演会, 6,15・16・17, 2008 神戸市
- 15) 落合理恵, 亀井克彦, 豊留孝仁, 永吉 優, 渡邊 哲, 渋谷和俊. *Stachybotrys chartarum* による肺動脈病変の形成におけるマウス系統差について. 第82回日本感染症学会総会, 4,17・18, 2008 島根県
- 16) 杉野圭史, 宮崎泰斗, 佐野 剛, 後町杏子, 鏑木教平, 岩田基秀, 山崎陽子, 石田文昭, 佐藤大輔, 阪口真之, 草野英美子, 磯部和順, 坂本 晋, 高井雄二郎, 本間 栄, 長谷川千花子, 渋谷和俊. 慢性壊死性肺アスペルギルス症の臨床病理学的検討. 第82回日本感染症学会総会, 4,17・18, 2008 島根県
- 17) 中山晴雄, 篠崎稔, 大久保陽一郎, 渋谷和俊. 病原性糸状菌の鑑別を目的とした新規 PNA プローブの検討. 第2回アスペルギルス研究会, 7,19,2008 千葉県
- 18) 渋谷和俊. 侵襲性糸状菌症. 第4回岐阜 SFI 研究会, 9,5,2008 岐阜県
- 19) 篠崎 稔, 中山晴雄, 大久保陽一郎, 渋谷和俊. *in situ hybridization* 法による糸状菌感染起因菌の病理同定. 第52回日本医真菌学会総会, 9,10・11,2008 長崎県
- 20) 安藤常浩, 守屋敦子, 折津 愈, 鈴木憲史, 鈴木利哉, 武村民子, 渋谷和俊. 剖検にて接合菌とアスペルギルスの重複感染が確認された急性骨髄性白血病の1例. 第52回日本医真菌学会総会, 9,10・11,2008 長崎県
- 21) 鈴木 琢, 向井秀樹, 久保田信雄, 島村 剛, 長坂沙織, 渋谷和俊. 爪白癬動物モデルにおける病理組織学的検討. 第52回日本医真菌学会総会, 9,10・11,2008 長崎県
- 22) 島村 剛, 久保田信雄, 長坂沙織, 鈴木 琢, 向井秀樹, 渋谷和俊. 爪白癬動物モデル作製に関する検討. 第52回日本医真菌学会総会, 9,10・11,2008 長崎県
- 23) 落合恵理, 亀井克彦, 佐藤綾香, 豊留孝仁, 永吉 優, 渡邊 哲, 渋谷和俊. 真菌胞子の吸入と肺動脈壁肥厚の形成について. 第52回日本医真菌学会総会, 9,10・11,2008 長崎県
- 24) Nakayama H, Shinozaki M, Sugamata M, Uchida K, Yamaguchi H, **Shibuya K**, Aoyama T, Murayama S. Histopathological Features of Two Strains of *Cryptococcus neoformans* Var. *gattii* with Different Virulence, and Analysis of Differentially Expressed Genes. The 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis. September 11 to 14, 2008 Nagasaki
- 25) **Shibuya K**. Set up an equation of granuloma. 7th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis Luncheon Seminar 1, 9,11,2008 長崎県
- 26) **Shibuya K**. Dynamics in Pathophysiology of Onychomycosis. The 4 Asia Pacific for Medical Mycology Meeting, 10,4・5, 2008 KOREA
- 27) 中山晴雄, 篠崎稔, 大久保陽一郎, 上田守三, 岩淵聡, 渋谷和俊. 中枢神経カンジダ症の分子生物学的診断を加えた病理学的検討. 第13回日本神経感染症学会総会, 10,10・11, 2008 東京
- 28) 渋谷和俊. 深在性真菌症の病態と診断. 第20回腎移植免疫研究会 (旧ミノリピン移植検討会) プログラム, 10,18, 2008 大

- 阪
- 29) 中山晴雄, 渋谷和俊, 篠崎稔, 青木和哉, 林盛人, 斎藤紀彦, 平田容子, 佐藤健一郎, 上田守三, 岩淵聡. 中枢神経カンジダ症の病理学的検討 形態計測と分子生物学的診断. 第21回日本外科感染症学会総会、11,7,2008 北海道
- 30) 三宅洋子, 清水雅子, 篠崎 稔, 渋谷和俊, 安井久美子, 永田梨耶, 岩本康之介, 長瀬大輔. 治療効果判定に形態評価が有用であったクリプトコッカス髄膜炎の1例. 第47回日本臨床細胞学会秋期大会、11,14・15,2008 東京
- 31) 石井真由美, 緒方美和子, 大久保陽一郎, 密田亜希, 羽鳥 努, 渋谷和俊, 馬越俊輔, 緒方秀昭, 横瀬智之. 乳腺腺筋上皮腫の2例. 第47回日本臨床細胞学会秋期大会、11,14・15,2008 東京
- 32) 渋谷和俊. 侵襲性糸状菌症. 第16回山口件呼吸器セミナー、11,6,2008 山口県
- 33) 渋谷和俊. 侵襲性肺糸状菌症. 第14回山形呼吸器感染症研究会、11,7,2008 山形県
- 34) 渋谷和俊. 「クリプトコックス症の病理、肉芽腫の方程式を解く?」. 第1回西新宿呼吸器セミナー、11,27,2008 東京
- 35) 中山晴雄, 篠崎 稔, 大久保陽一郎, 渋谷和俊. 病理診断で常用されるホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いた病原糸状菌の遺伝子学的同定に関する基礎的検討. 真菌症フォーラム第10回学術集会、2,21,2009 愛知県
- 36) 篠崎 稔, 中山晴雄, 大久保陽一郎, 渋谷和俊. 病理診断材料における病原真菌の検出を目的とした Peptide Nucleic Acid プローブを用いた *In site hybridization* 法の検討. 真菌症フォーラム第10回学術集会、2,21,2009 愛知県
- 37) 落合恵理, 亀井克彦, 滝杵昌彦, 小西良子, 矢口貴志, 松澤哲宏, 佐藤綾香, 永吉 優, 渡辺 哲, 豊留孝仁, 渋谷和俊. *Stachybotrys chartarum* によるマイコトキシン産生製についての検討. 真菌症フォーラム第10回学術集会、2,21,2009 愛知県

その他

渋谷和俊. 医療訴訟. 医学教育懇話会 第4回招請学術講演、2,19,2009 東京

3. 総説 他

H. 知的財産権の出願・登録情報なし。