

図 10

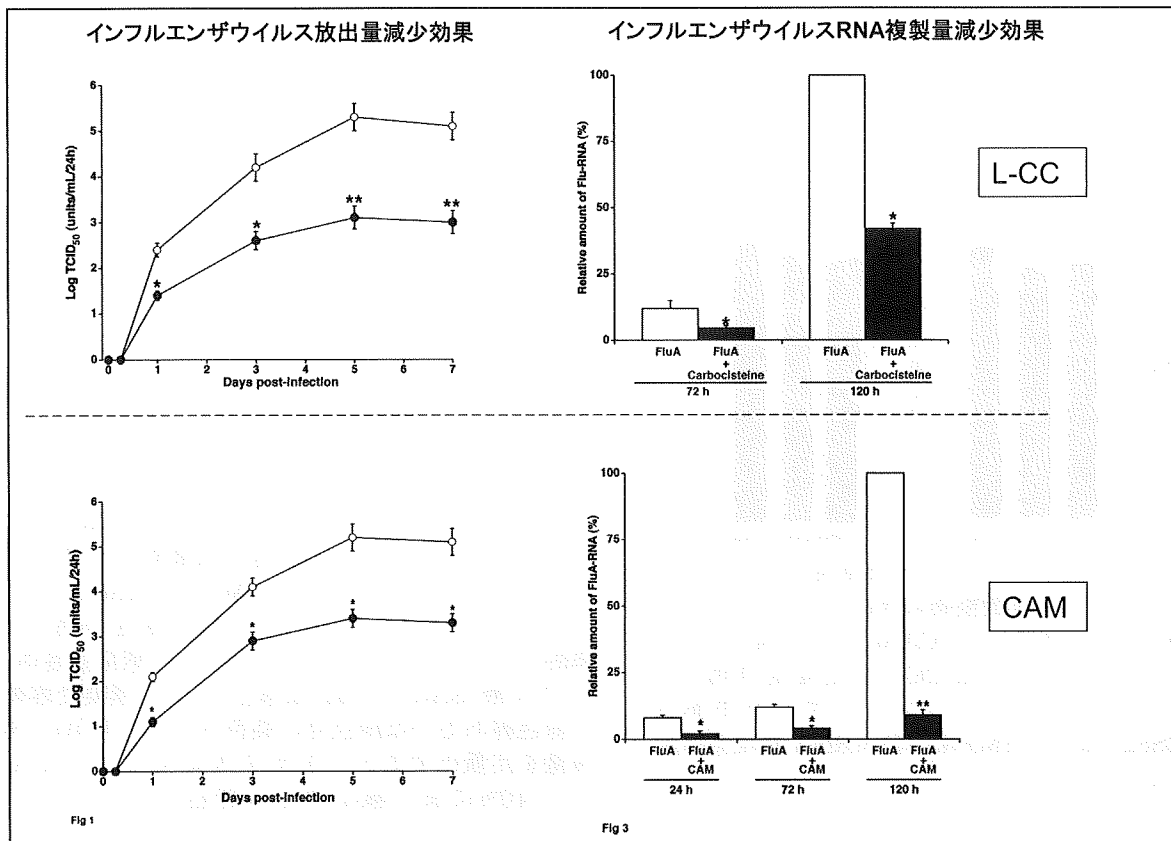


図 10. マクロライドおよび喀痰調整薬のインフルエンザウイルス感染抑制作用。クラリスロマイシン (CAM、10 μ M) および L-カルボシステイン (L-CC、10 μ M) を作用した細胞ではインフルエンザウイルスの培養液放出量 (図左) およびウイルス RNA 複製量 (図右) が減少した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ウイルスのみ (○、左図; あるいは Flu、右図) に対する有意差。

μ M) を 3 日間作用させた。その後 A 香港型季節性インフルエンザウイルスを感染させ、培養液インフルエンザウイルス放出量と細胞内インフルエンザウイルス RNA 量を測定した。

培養液インフルエンザウイルス放出量、細胞内インフルエンザウイルス RNA 量ともに、感染後の時間経過で増加し、5 日後に最大値を示した。クラリスロマイシン (10 μ M) あるいは L-カルボシステイン (10 μ M) で処理した場合、培養液インフルエンザ放出量、細胞内インフルエンザウイルス RNA 量ともに減少

した (図 10)。

インフルエンザ感染抑制効果の機序を検討するため、本年度はヘマグルチニン活性化に関与するセリン・プロテアーゼに対する作用を測定した。インフルエンザウイルスのヘマグルチニンはセリン・プロテアーゼで開離し、この過程がウイルス粒子の構造の脆弱性をもたらし、結果としてインフルエンザウイルス粒子構造の崩壊とウイルス RNA の細胞質内放出を促す。本研究において、ヒト気管上皮細胞をクラリスロマイシン (10 μ M) あるいは L-カルボシステイン (10 μ M) で 3 日間処理し、細胞の RNA を抽出した。結果は、ヒト気管上皮細胞がセリン・プロテアーゼである TMPRSS2 (transmembrane protease, serine 2) および TMPRSS11 (transmembrane protease, serine 11= HAT, human airway trypsin-like protease)

の mRNA を発現した。しかし、クラリスロマイシン(10 μ M)あるいは L-カルボシステイン(10 μ M)のいずれも、セリン・プロテアーゼ

図 11

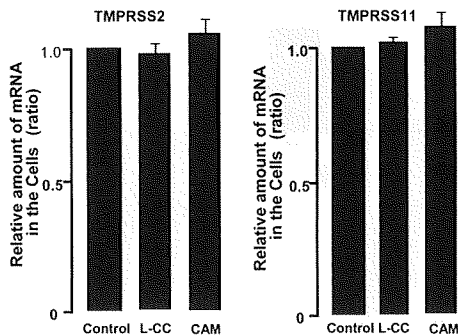


図 11. セリン・プロテアーゼ発現に対するマクロライドおよび喀痰調整薬の作用。

クラリスロマイシン(CAM、10 μ M)および L-カルボシステイン(L-CC、10 μ M)を作用した細胞において、セリン・プロテアーゼである TMPRSS2、および TMPRSS11 mRNA 発現量は変化しなかった。

mRNA 発現量を変化させなかった (図 11)。

これに対して、昨年度に一部報告したように、ヒト型インフルエンザ感染受容体、シアル酸(SA α 2,6Gal)はヒト気管上皮粘膜上皮に発現し、クラリスロマイシン L-カルボシステインのいずれも発現を減少した (図 12)。

また、クラリスロマイシン、L-カルボシステインのいずれも酸性エンドゾームを減少した (図 13)。

図 12. ヒト型インフルエンザ感染受容体発現に対するマクロライドおよび喀痰調整薬の作用。

クラリスロマイシン(CAM、10 μ M)および L-カルボシステイン(L-CC、10 μ M)を作用した細胞において、ヒト型インフルエンザ感染受容体、シアル酸(SA α 2,6Gal)は減少した。感染受容体は緑色線あるいは緑色点に染色される (矢印)。発現量を定量化すると、クラリスロマイシンにおいて 40%にまで減少する (図右下)。

図 12

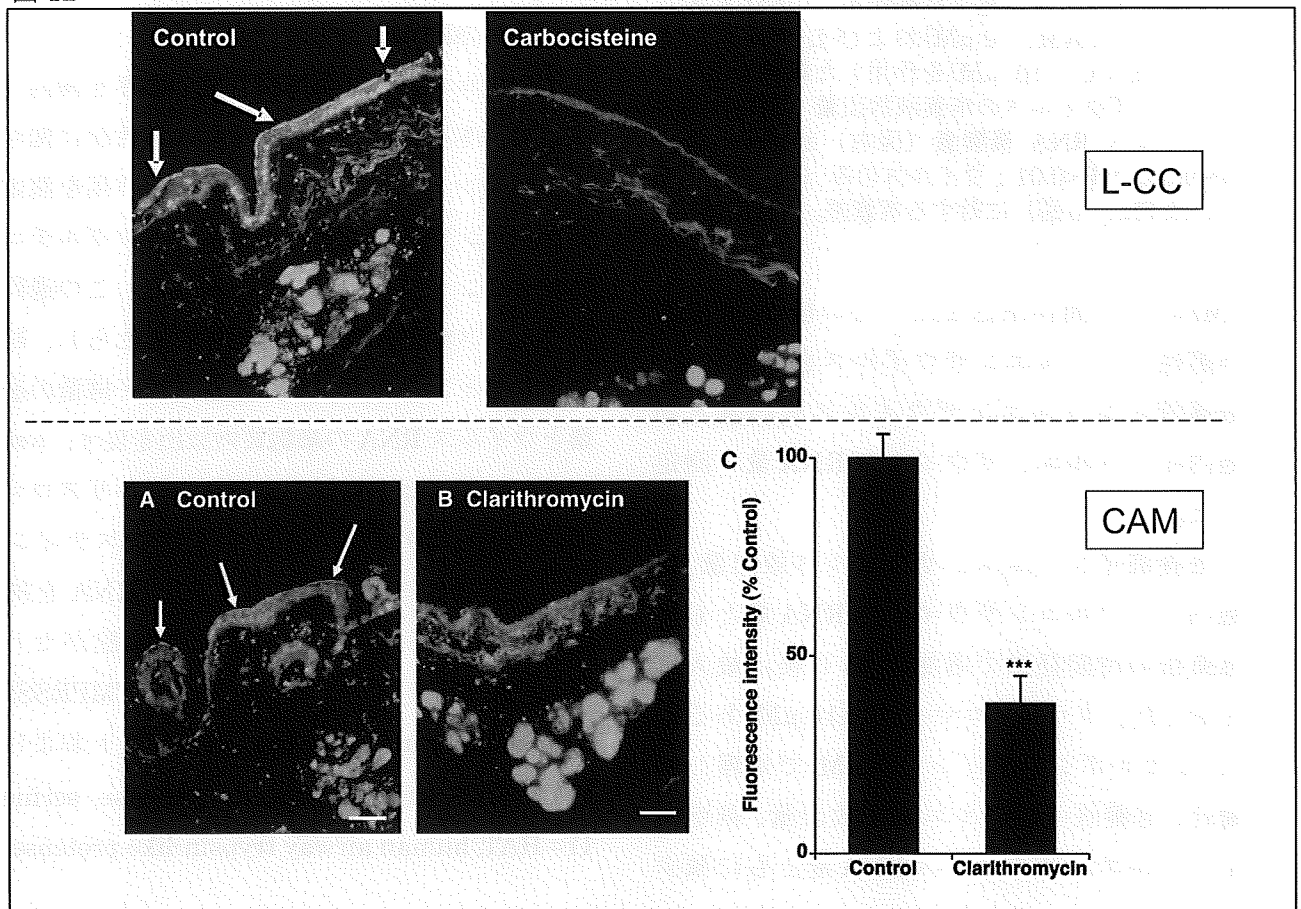


図 13 上

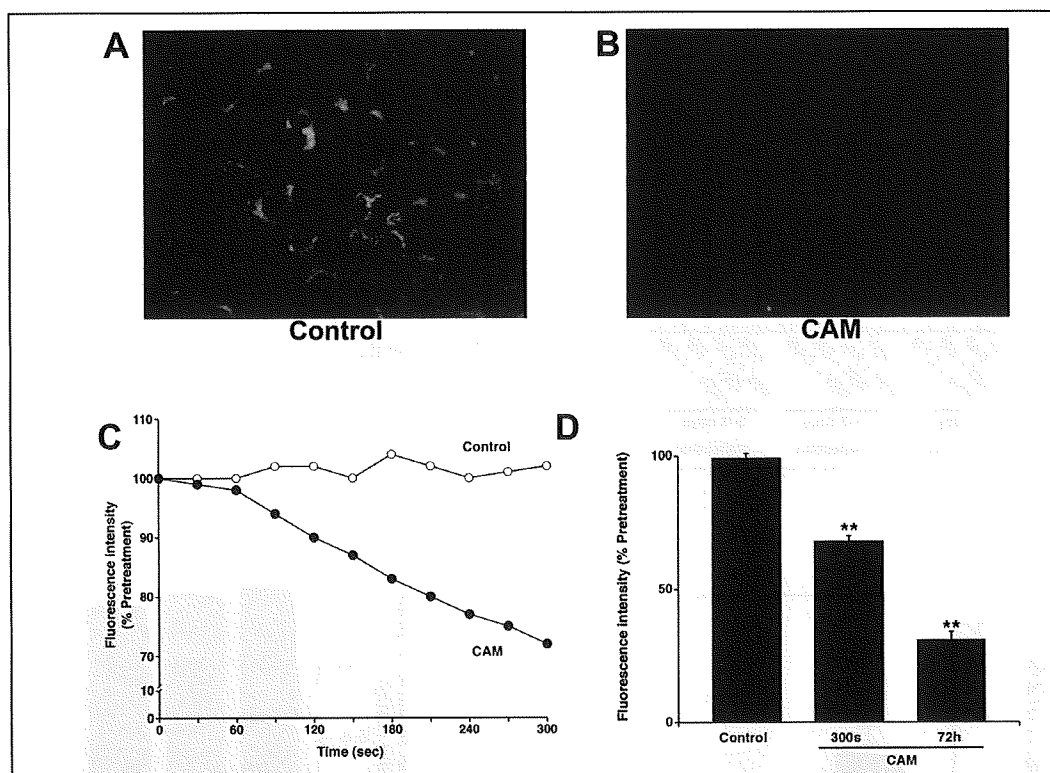


図 13 下

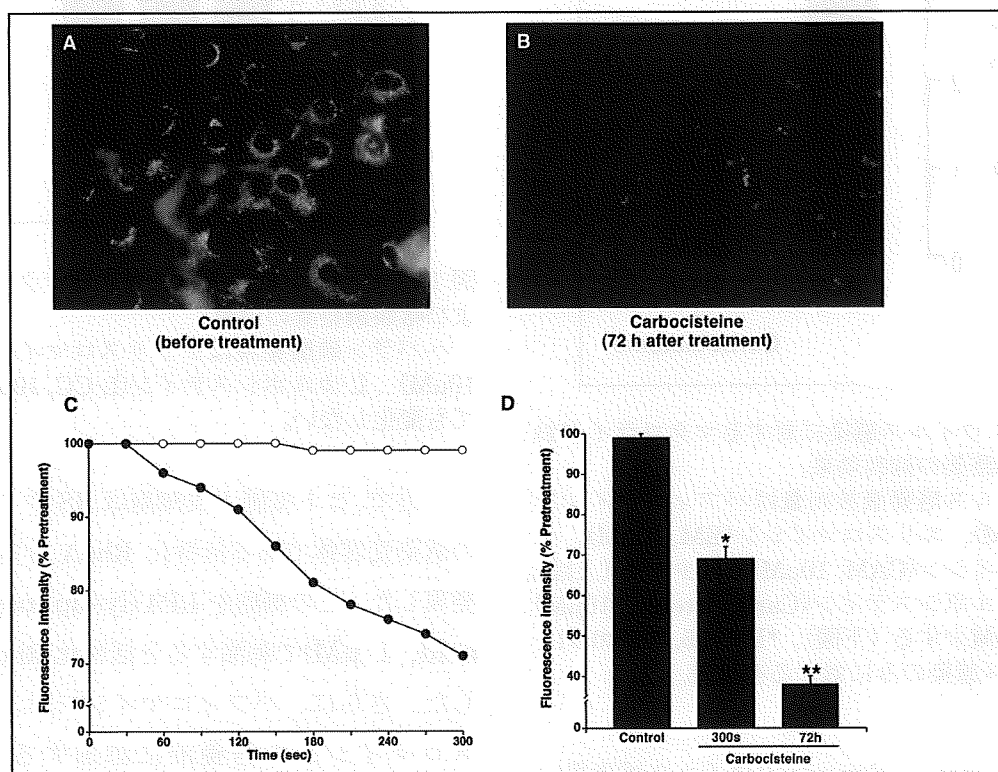


図 13. 酸性エンドゾームに対するマクロライドおよび喀痰調整薬の作用. 酸性エンドゾームは緑色顆粒状に染色される (図 A)。クラリスロマイシン(CAM、10 μ M、図 13 上)および L-カルボシステイン(Carbocisteine、10 μ M、図 13

下)は短時間 (5分) の作用においても蛍光強度が低下する (図 C)。3 日間作用させると蛍光強度は 30%前後まで低下する (D)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 処理前のコントロールに対する有意差。

図 14 上

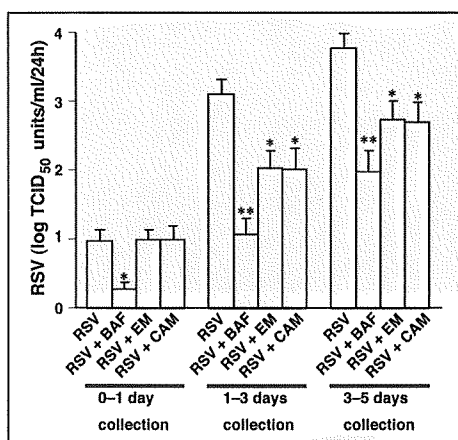


図 14 下

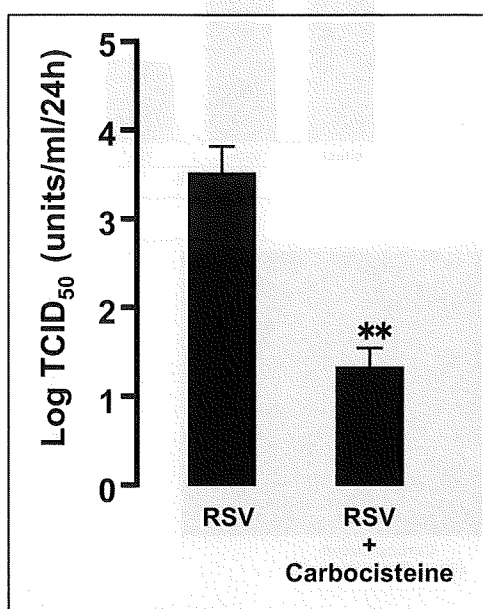


図 14. RS ウイルス感染に対するマクロライドおよび喀痰調整薬の抑制効果。

RS ウイルス培養液放出量はバフィロマイシン (BAF, 10nM)、エリスロマイシン (EM, 10 μ M)、クラリスロマイシン (CAM, 10 μ M) で減少する (上図)。また、L-カルボシステイン (Carbocisteine, 10 μ M) によっても減少する (下図)。*P<0.05, **P<0.01; RS ウイルス感染のみに対する有意差。

RS (Respiratory Syncytial) ウイルス感染後、ヒト気管上皮細胞から時間経過にしたがって RS ウイルスは培養液に放出される。バフィロマイシン (10 nM)、エリスロマイシン (10 μ M)、クラリスロマイシン (10 μ M) (図 14 上)、

および L-カルボシステイン (10 μ M) は RS ウイルス放出量を減少させる (図 14 下)。

RS ウイルスの感染受容体の一つであるヘパラン硫酸をフロー・サイトメトリー法で測定した。ヒト気管上皮細胞はヘパラン硫酸を発現した。しかし、クラリスロマイシン (10 μ M) および L-カルボシステイン (10 μ M) は、ヒト気管上皮細胞におけるヘパラン硫酸の発現を変化させなかった (図 15)。

図 15

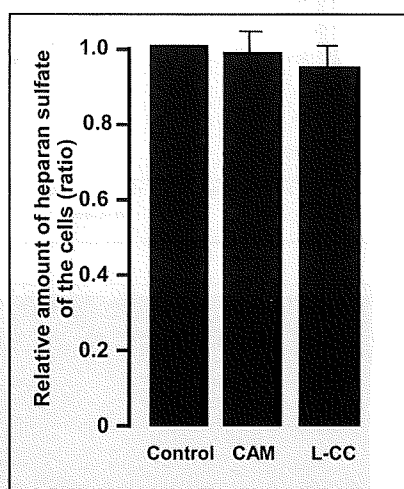


図 15. ヘパラン硫酸発現に対するマクロライドおよび喀痰調整薬の効果。

ヘパラン硫酸発現はクラリスロマイシン (CAM, 10 μ M)、L-カルボシステイン (L-CC, 10 μ M) によっても変化しない。

一方で、ヒト気管上皮細胞は RS ウイルスの別の感染受容体である活性化 RhoA を定常状態で発現した。この細胞を LPA (lysophosphatidic acid, 1 μ M) で刺激すると活性化 RhoA は増加した。さらに、バフィロマイシンおよびクラリスロマイシンを培養液に添加すると活性化 RhoA の発現は減少した (図 16)。

RS ウイルスの感染受容体として、CX3CR1 や Annexin II なども報告されている。本年度、ヒト気管上皮細胞から RNA を抽出してこれら

図 16

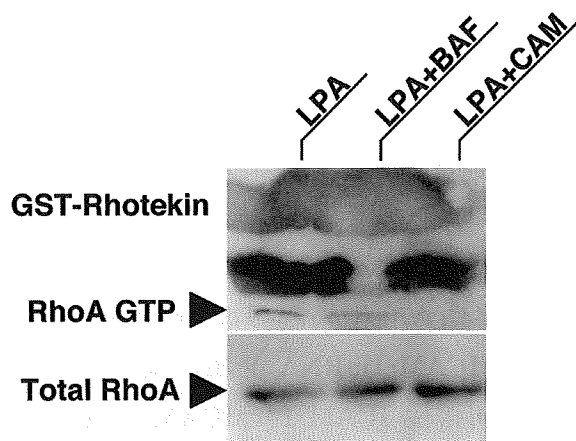


図 16. バフィロマイシンおよびクラリスロマイシンによる RhoA 抑制効果. LPA 刺激で増加した活性化 RhoA (RhoA GTP) はバフィロマイシン (BAF) およびクラリスロマイシン (CAM) で減少する。

の受容体の mRNA も測定した。しかし、ヒト気管培養上皮細胞は CX3CR1 や Annexin II の mRNA を発現しなかった (結果省略)。他方で、ICAM-1 も RS ウイルスの感染受容体として報告されている。本研究班ですでに報告しているように、マクロライドおよびカルボシステインは、いずれも ICAM-1 発現抑制作用を有する。

D. 考察

1) RS ウイルス感染は従来から乳幼児感染が多く、高齢者で発症する肺気腫の増悪としては重要視されてこなかった。しかし、今世紀になって、高齢者のインフルエンザ様発熱や、肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患増悪の原因ウイルスと報告されてきた。本邦ではこれまで肺気腫増悪における RS ウイルス感染の研究はなされてこなかった。私たちは本研究班で以前に鼻咽頭ぬぐい液を用いてライノウイルスやインフルエンザウイルスの

感染を証明したが、細胞接種法による RS ウイルス分離では RS ウイルス感染を確認できなかった。そのため、昨年度から風邪症状による肺気腫増悪時および治療 2 週間後の回復時に血清抗体価を測定して RS ウイルス感染を調査している。昨年度の 18 例に 5 例を加えて 23 例が風邪症状による肺気腫増悪を生じた。増悪時の抗体価は抗体価 4 倍あるいは 32 倍等、症例によって様々であった。これは増悪を発症する風邪の以前にすでに何回か RS ウイルスに感染していた可能性がある。さらに、4 症例では回復時に 4 倍以上の抗体価上昇を認めた。すなわち、この 4 症例において RS ウイルスの感染を示唆した。本研究結果は、RS ウイルス感染が日本人の肺気腫増悪を惹起に関係していることを示した。この 4 症例において、血中 IL-6 や可溶性 ICAM-1 が上昇した。しかも、以前に報告したライノウイルス感染症例と比較しても同等の上昇を認めた。増悪時の動脈血酸素分圧低下もライノウイルス感染症例と同様であった。RS ウイルス感染によるヒト気管上皮細胞からの炎症性物質放出を以前に本研究班で報告したように、RS ウイルス感染が気道炎症を惹起して肺気腫増悪と呼吸不全をもたらしたと示唆された。

2) 長時間作用型抗コリン薬であるチオトロピウム (スピリーバ®) は気管支拡張作用が 24 時間継続し、肺気腫患者の症状軽快や肺機能改善作用を有するため、欧米および本邦の治療ガイドラインでは第一選択の治療薬となっている。さらに、チオトロピウムは最近の大規模試験において増悪回数を 20% ~ 30% 減少し、予後の改善効果も報告されている。他方で、肺気腫の増悪は気道ウイルス感染および細菌感染が主たる原因とされ

ている。気道感染ウイルスのうち、ライノウイルス感染が半数を占めている。感染受容体発現抑制を介したチオトロピウムのRSウイルス感染の抑制作用は報告されている。しかし、チオトロピウムがライノウイルス感染や感染に伴う気道炎症を抑制するかどうか不明であった。この課題を解決するため、ヒト気管上皮細胞にチオトロピウムを作用させ、ライノウイルス感染を抑制するかどうかを検討した。

本年度の研究において、チオトロピウムの、ヒト気管上皮細胞における培養液ライノウイルス放出および細胞内ライノウイルスRNA複製に対する抑制効果が明らかになった。チオトロピウムは感染受容体ICAM-1のmRNA発現および培養液可溶性ICAM-1放出量を減少させた。すなわち、チオトロピウムはヒト気管上皮細胞におけるライノウイルス感染受容体発現を抑制した。さらに、ライノウイルスRNAの放出部位である酸性エンドゾームの減少効果を認めた。これらの結果から、感染受容体発現抑制とRNA侵入抑制を介してチオトロピウムがライノウイルス感染を抑制すると示唆された。

さらに、チオトロピウムは炎症性サイトカインの放出を抑制した。このことより、チオトロピウムがライノウイルス感染に伴う気道炎症を抑制する可能性が示唆された。チオトロピウムによる肺気腫増悪抑制効果に関与しているのかも知れない。

3) HMG-CoA還元酵素阻害薬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。昨年度から、本邦で臨床使用されているピタバスタチン（リバロ®）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ている。昨年度は、培養液ライノウイルス放出量の減少、炎症性サイトカイン放出量の減少、感染受容体ICAM-1 mRNA発現の減少、および培養液可溶性ICAM-1（sICAM-1量）の減少を報告した。すなわち、HMG-CoA還元酵素阻害薬（スタチン）に風邪ウイルスであるライノ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。本年度は、ライノウイルスRNAの細胞質放出経路である酸性エンドゾームに対する作用を検討した。結果、マクロライド等とは異なり、5分間の短時間作用によっては酸性エンドゾーム数に変化がないことが明らかになった。しかし、ライノウイルス感染実験では3日間作用しているため、今後、長時間作用の効果の検討を予定している。また、今後、インフルエンザウイルス感染やRSウイルス感染に対する作用も検討課題として注目される。

4) 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、バ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季節性 A 型インフルエンザウイルス培養液放出量を 10%以下に低下した。さらに、昨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 の複製を減少した。また、マクロライドおよび喀痰調整薬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も併せて検討してきた。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、およびインフルエンザ感染受容体発現抑制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。

セリン・プロテアーゼは、ヘマグルチニンを開離してインフルエンザ粒子の構造を脆弱化し、ウイルス RNA が細胞質に放出されやすくする機能を有する。本年度の研究において、2 種類のセリン・プロテアーゼ (TMPRSS2、および TMPRSS11) の mRNA 発現を調査した。これまで、白血球の放出するエラスターゼや末梢気管支粘膜上皮のクララ細胞から放出されるトリプターゼによるヘマグルチニンの開離が報告されてきたが、本研究によって、ヒト気管上皮細胞がセリン・プロテアーゼを放出してヘマグルチニンを開離する能力を有することが明らかになった。一方で、マクロライドやカルボシステインはセリン・プロテアーゼ活性に影響しないことが認められた。すなわち、クラリスロマイシンおよび L-カルボシステインの季

節性インフルエンザウイルス感染抑制効果の機序には含まれないことが明らかとなった。

マクロライドであるバフィロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシンによるヒト気管上皮細胞における RS ウイルス感染抑制作用を本研究班で以前に報告した。感染抑制の機序に関して、本年度も昨年度に続いて検討した。その結果、バフィロマイシンおよびクラリスロマイシンが LPA 刺激によるヒト気管上皮細胞の RhoA 活性化を抑制した。すなわち、RS ウイルス F 蛋白の細胞側感染受容体発現をバフィロマイシンおよびクラリスロマイシンが抑制することが示唆された。さらに、昨年度、RhoA 阻害剤 AGGC による RS ウイルス培養液放出量減少を報告した。また、RhoA 活性化の下流にある Rho kinase の阻害薬ファスジル (Fasudil) による RS ウイルス培養液放出量減少も報告した。この結果は RhoA を構成するペプチドを阻害させて RS ウイルス感染を抑制したこれまでの報告と一致する。この結果、RhoA はこれまでの報告の通り、RS ウイルスの感染受容体として作用することが再確認された。また、Rho kinase がヒト気道上皮において RS ウイルス感染・増殖に関与することが示唆された。本研究において臨床的に使用されているマクロライドであるクラリスロマイシンが RS ウイルス感染を抑制することが明らかにされた。

本年度、RS ウイルスの活性化 RhoA 以外の感染受容体発現を測定した。RS ウイルスの G 蛋白に対する受容体であるヘパラン硫酸の発現を蛋白レベルで測定した。結果は、ヒト気管上皮細胞はヘパラン硫酸を発現するが、マクロライドやカルボシステインはへ

パラン硫酸の発現を変化させないことを示唆した。

RS ウイルスの感染受容体として、CX3CR1 や Annexin II など報告されている。本年度、ヒト気管上皮細胞から RNA を抽出してこれらの受容体の mRNA を測定した。しかし、ヒト気管培養上皮細胞は CX3CR1 や Annexin II の mRNA を発現しなかった。他方で、ICAM-1 も RS ウイルスの感染受容体として報告されている。本研究班ですでに報告しているように、マクロライドおよびカルボシステインは、いずれも ICAM-1 発現抑制作用を有する。

まとめると、マクロライドは RS ウイルス感染受容体である活性化 RhoA と ICAM-1 の抑制を介して RS ウイルス感染を抑制していると示唆される。カルボシステインの RS ウイルス感染抑制の機序について、活性化 RhoA に関して今後検討する予定である。

これまでの検討結果から、マクロライドおよびカルボシステインは、RS ウイルス感染で悪化する乳幼児喘息様細気管支炎、気管支喘息および高齢者肺気腫増悪の治療・予防にとって画期的な医薬品になると考えられる。

E. 結論

RS ウイルス感染が、本邦において、肺気腫増悪による呼吸不全の原因ウイルスになる可能性が示唆された。長時間作用型抗コリン薬のチオトロピウムがライノウイルス感染抑制効果と気道炎症抑制効果を有することが示唆された。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には感染受容体発現抑制が関与し、ウイルス侵入経路には関与しないことが示唆された。マクロライドおよび喀痰調整薬のカルボシステインの季節性 A 型インフル

エンザ感染抑制効果には受容体発現抑制とウイルス侵入抑制が関与し、ヘマグルチニンを開離するセリン・プロテアーゼ活性は関与しないことが示唆された。マクロライドおよび喀痰調整薬のカルボシステインの RS ウイルス感染抑制効果には受容体の一つであるヘパラン硫酸の発現は関与しないことが示唆された。マクロライドによる RS ウイルス感染抑制効果には別の受容体である活性化 RhoA と ICAM-1 の発現抑制の関与が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asada M, Yoshida M, Suzuki T, Hatachi Y, Sasaki T, Yasuda H, Nakayama K, Nagatomi R, Kubo H, Yamaya M. Macrolide antibiotics inhibit respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. *Antiviral Res* 83: 191-200, 2009.
- 2) Sasaki T, Nakayama K, Yasuda H, Yoshida M, Asamura T, Ohru T, Arai H, Araya J, Kuwano K, Yamaya M. A randomized, single-blind study of lansoprazole for the prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease in older patients. *J Am Geriatr Soc* 57: 1453-1457, 2009.
- 3) Yoshida M, Nakayama K, Yasuda H, Kubo H, Kuwano K, Arai H, Yamaya M. Carbocysteine inhibits oxidant-induced apoptosis in cultured human airway epithelial cells. *Respirology* 14: 1027-1034, 2009.
- 4) Yamaya M, Fujino N, Kubo H, Arai H. Effects of pneumococcal vaccination on hospitalization and exacerbations in elderly Japanese COPD patients.

Geriatr Gerontol Int 9: 206-209, 2009.

- 5) Yasuo M, Fujimoto K, Imamura H, Ushiki A, Kanda S, Tsushima K, Kubo H, Yamaya M, Kubo K. L-carbocisteine reduces neutrophil elastase-induced mucin production. *Respir Physiol Neurobiol* 167: 214-216, 2009.
- 6) Yamaya M, Shinya K, Hatachi Y, Kubo H, Asada M, Yasuda H, Nishimura H, Nagatomi R. Clarithromycin inhibits type A seasonal influenza

virus infection in human airway epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*.
DOI:10.1124 Jpet 109 162149 ,2010 .

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：山谷睦雄、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

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)

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開発部)

山田耕二、三浦英靖 (エムバイオテック株式会社・研究開発部)

研究要旨 悪性関節リウマチの母疾患である関節リウマチについては、関節液からのマイコプラズマ遺伝子検出陽性という疫学調査結果が多数報告されている。中でも *Mycoplasma fermentans* という鶏や齧歯類の関節炎起因菌種の近縁種は、ヒト咽頭に感染しており、健常人の約 1 割で末梢リンパ球から遺伝子が検出される。本研究では、*M. fermentans* の関節炎惹起能について動物モデルを用いて解析するとともに、臨床診断系が存在しない *M. fermentans* について、開発中の脂質抗原を用いた新規診断法の評価を行なうことを主な目的として、生菌投与ウサギによる所見の解析を行なった。膝蓋関節腔内への生菌投与群においては、滑膜細胞の多層化、リンパ濾胞形成が顕著であり、そのスコアは、培地のみ比べ高値を示した。今年度新たに行なった *M. fermentans* 脂質の前投与群後の生菌投与群においては、所見スコアは減少し、観察された所見と *M. fermentans* との関連が示唆された。また、リウマチにおける関節外病変としての間質性肺炎へのマイコプラズマの関与の可能性についての基礎的検討の一環として、気道への生菌投与ウサギにおける肺所見を観察した。予備的実験において、気管支周囲リンパ装置の活性化ならびに肺胞野における限局した細胞浸潤領域が多数認められた。これらのことから、*M. fermentans* には、これまでも主要膜成分であるリポタンパク質に強いリンパ球活性化能、マイトゲン活性があることが知られていたが、生体においては、関節におけるリンパ濾胞形成や、気管支周囲リンパ装置活性化を惹起することが示唆された。関節リウマチにおける宿主遺伝子要因に加え、マイトゲン活性を有する細胞障害性の弱いマイコプラズマの感染という環境因子が加わることによる発症機構という一つの作業仮説を検討するためにも、臨床診断法開発の必要性が考えられた。

A. 研究の背景と目的

特定疾患としての悪性関節リウマチは、母疾患である関節リウマチに加えて、関節外症状を認め、全身性血管炎型では間質性肺炎、胸膜炎、消化管出血などが急速に出現する。悪性関節リウマチでの受療者数は、母疾患となる関節リウマチ患者約 66 万人の 0.6%で、約 4000 人/年と推定される。関節リウマチ患者の疾患関連遺伝子については、近年、ゲノムワイドの single-nucleotide polymorphism (SNP) 解析 (genome-wide association study: GWAS)が行われつつあり、tumor necrosis factor (TNF)レセプター関連因子遺伝子など、免疫・炎症メディエーターに関連する遺伝子多型が報告されている。我々は、宿主の遺伝要因の上に、環境要因としての微生物感染が加わり発症するという作業仮説のもと、関節リウマチ患者関節からの検出に関する疫学報告が多数なされているヒト由来マイコプラズマの 1 種、*Mycoplasma fermentans* に着目した。本研究の目的としては、*M. fermentans* の関節炎惹起能の動物における解析ならびにリウマチ所見との比較によるスコア化、動物モデルを用いた *M. fermentans* 脂質抗原による新規血清診断法の評価、また、今年度は、*M. fermentans* 脂質抗原の前投与の影響を調べることにより観察所見と *M. fermentans* との関連についての考察を試みた。関節炎に加え、リウマチの関節外病変において、間質性肺炎の併発は、予後に影響をあたえかねない重要な症状である。リ

ウマチにおける間質性肺炎に微生物の関与があるという証拠はあげられていない。マイコプラズマの中には、ヒトの間質性肺炎起因菌、肺炎マイコプラズマ (*M. pneumoniae*) がある。今回、我々が関節炎惹起能を解析している *M. fermentans* については、診断法が無く臨床的情報が乏しい。今回、*M. fermentans* のウサギにおける肺炎惹起能についても検討を加えた。

B. 研究方法

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。関節炎モデルについては、生理食塩水、または、合成 *M. fermentans* 脂質抗原 1mg/body の前投与を皮下注射にて 4 回行なった後、42 日目に麻酔下で *M. fermentans* 生菌約 10^9 CFU (0.5ml) 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同量 (0.5ml) 投与した。また、経気道内でも同菌量の投与を行なった。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。得られた所見について、着目した病変の有無をもとにスコア化を試みた。着目項目の有りを 1 点、弱いを 0.5 点、無しを 0 点と

した。関節における病変については、ヒトの関節リウマチに見られる所見項目のスコアを2倍にする重みづけを加えた。肺の所見については、弱拡大の観察時に認められる肺胞野の細胞浸潤領域の個数をもとにスコア化を試みた。11ヶ所以上を2点、5-10ヶ所を1点、4ヶ所以下を0点とした。さらに、気管支周囲のリンパ装置活性化の有無によって、有りを1点、無しを0点として加算した。

C. 研究結果

1) 関節所見のスコア化

生菌投与後 35 日目のウサギ関節において顕著に認められた所見項目を表 1 に示す。滑膜細胞の多層化、リンパ球浸潤、リンパ濾胞形成、浸出液の有無、脂肪組織の浮腫、癒着の有無、壊死の有無の 7 項目に着目した。中でも、滑膜細胞の多層化、リンパ濾胞形成、癒着の 3 項目については、関節リウマチの発症初期から慢性期への移行の際にも見られることから、スコアに重みづけを行なったところ、特に前 2 項目については、5 羽中 4 羽で観察された。

2) *Mycoplasma fermentans* 脂質抗原の前投与の関節所見への影響

生菌投与に先立ち、合成 *M. fermentans* 脂質抗原の皮下接種を行なった群における関節所見のスコアを表 1 に示した。所見のスコアは、リンパ濾胞形成を含め全般に低下が認められた。脂質抗原による免疫学的作用などの詳細については解析を行なっておらず未解決な点が多いものの、今回の試みは過去に報告のないものであり、*M.*

fermentans の存在が関節所見を惹起する可能性を示唆するとともに、脂質抗原の応用についても、これまでに報告してきている血清抗体価測定による新規診断法開発に加えて、別の切り口を検討する糸口になる可能性がある。

3) 肺所見のスコア化

表 2 に、肺所見のまとめとスコア化結果を示す。予備的実験結果として、*M. fermentans* 生菌を経気道にて 3 回投与したウサギの肺においては、関節同様、リンパ球の活性化が、気管支周囲リンパ装置の活性化として認められた (図 1, A)。リンパ装置の活性化は、実験に用いた 5 羽全てで認められた。また、肺胞野には、x100 倍観察にて認められる限局した細胞浸潤領域が多数認められた (図 1, B)。細胞浸潤領域の 1 視野における数は、個体差があるものの、多い個体では 30-50 個を数えた。

D. 考察

関節リウマチ疾患関連遺伝子については、GWAS の結果、以下の遺伝子候補があがってきている。クロモソーム 9q33 の TRAF-C5 領域の *TRAF1* (TNF receptor associated factor 1) や *C5* (complement component 5)、クロモソーム 6q23 の *TNFAIP3* (TNF alpha-induced protein 3)。TNF や補体 C5 が炎症メディエーターとして、また外界からの微生物侵入に対する免疫に関与することは改めて言うまでもないが、加えて、*TNFAIP3* の産物である A20 は、TNF 刺激ならびに Toll-like receptor (TLR) 誘導後の NF- κ B 活性化を抑制する抗炎症物質である。これらの遺伝子

について関節リウマチ患者に有意に多い型があり、また、その遺伝子型となんらかの機能的関連性があることが将来的に解明されれば、感染免疫における反応性の違いが関節リウマチの病態に関わる可能性も考えられる。他の細菌同様、マイコプラズマ感染においても、宿主からの認識には、TLRを介する系が存在し、マイコプラズマ側の被認識成分は主要膜成分、かつ、抗原でもあるリポタンパク質である。マイコプラズマのリポタンパク質は、アシル基が2個しか付加されないという特徴があり（3個目のアシル基付加酵素の遺伝子を欠くため）、宿主のTLR2と補助的にTLR6により認識され細胞内シグナル伝達経路を通じてNF- κ Bの活性化をもたらす。マイコプラズマ以外の細菌由来のリポ成分はアシル基が3個あり、TLR1を介して認識されることから被認識経路が異なる。マイコプラズマのリポタンパク質は、宿主単球を活性化させTNF産生を誘導する。また、他のサイトカインを介したリンパ球活性化能、マイトゲン活性を有する。今回のウサギへの生菌投与モデルでは、リンパ濾胞形成を伴うリンパ球活性化が顕著であった。ヒトのリウマチ発症早期に観察されるリンパ球を中心とした炎症性細胞浸潤との関連性に興味を持たれる。*Mycoplasma fermentans* のリポタンパク質M161のN末側にはmcarophag activating lipopeptide (MALP)-2と呼ばれるリポペプチドが存在し、宿主への多才な生物活性を有している。また、近縁種で齧歯類に関節炎を惹起する*M. arthritidis*において関節

炎惹起能に必須なリポタンパク質のオーソログが*M. fermentans*には存在する。分子系統的に*M. fermentans*は、家畜伝染病予防法の届出伝染病である鶏マイコプラズマ病の起因菌2種のうち、*M. synoviae*に近縁である。*Mycoplasma synoviae*は、野外で鶏に主として関節炎（滑膜の絨毛形成、滑膜下織の細胞浸潤ならびにリンパ濾胞の過形成）を惹起するのみならず、実験感染において心炎（心臓炎、心内膜炎および心外膜炎）、全身性血管炎（心臓、脾臓、腎臓で見られる）および腎炎を惹起し、血管病変部ならびに腎糸球体基底膜にIgG沈着を認めた報告もある。ヒトのリウマチ疾患において糖鎖付加不全IgGの出現が認められる例があることから、鶏における*M. synoviae*感染病変とヒトRAの類似性について興味を持たれる。一方、ヒトにおいて、関節炎起因菌となるマイコプラズマ種は同定されておらず、診断法も予防法もない。我々は、微生物、とくにマイコプラズマの関与という作業仮説のもとに動物での解析を行なうと同時に、ヒトにおける*M. fermentans*新規診断法の開発にむけて、*M. fermentans*脂質抗原による診断法評価に本研究で開発したウサギモデルを用いている。滑膜細胞の多層化に加え、リンパ球活性化を惹起し、また、一般細菌感染のような強い組織破壊性を有しないマイコプラズマの持続感染と関節炎さらには関節リウマチとの関連の可能性については、ヒトでの診断法開発、血清疫学調査も交えて検討する必要があると考えている。

E. 結論

Mycoplasma fermentans 生菌の膝蓋関節腔内投与ウサギの関節において、滑膜細胞の多層化、リンパ濾胞形成を顕著に認めた。関節炎所見は、*M. fermentans* 脂質抗原の前投与により軽減し、観察所見と *M. fermentans* の関連が示唆された。予備的実験結果において、*M. fermentans* 生菌の気道投与ウサギの肺において、気管支周囲リンパ装置活性化ならびに肺胞野における限

局された細胞浸潤領域を多数認めた。

F. 健康危険情報

とくに無し

G. 研究発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特許出願：荒川宜親、佐々木裕子、松田和洋、他（発明人）、マイコプラズマ感染症ワクチン、特願 2009-135592、出願日 2009年6月4日

表1 *Mycoplasma fermentans* 生菌の膝蓋関節腔内投与ウサギの感染 35 日目の所見
-前処理として生理食塩水または、合成 *M. fermentans* 脂質皮下投与群の比較

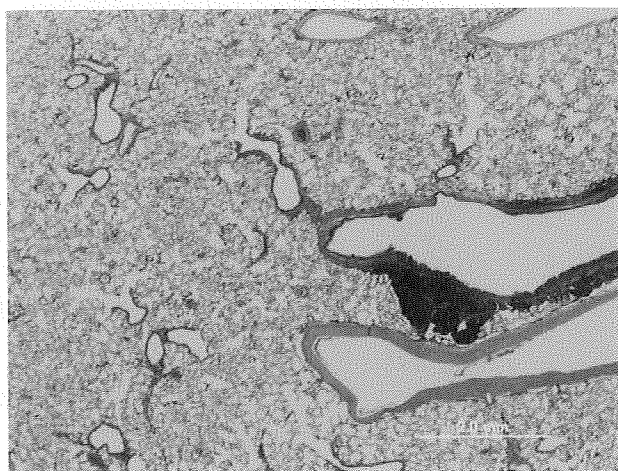
Mycoplasma fermentans接種 (右)											
Rabbit No.	前投与	生菌投与	滑膜細胞の多層化	リンパ球浸潤	リンパ濾胞形成	浸出液	脂肪組織の浮腫	癒着	壊死	合計	平均
16	saline	<i>M. fermentans</i>	2	1	2	1	1	0	0	7	5.7
17	saline	<i>M. fermentans</i>	2	1	2	0.5	1	2	0	8.5	
18	saline	<i>M. fermentans</i>	2	1	2	0.5	0.5	2	1	9	
19	saline	<i>M. fermentans</i>	0.5	1	2	0	0	0	0	3.5	
20	saline	<i>M. fermentans</i>	0	0.5	0	0	0	0	0	0.5	
21	<i>M. fermentans</i> 脂質	<i>M. fermentans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2.6
22	<i>M. fermentans</i> 脂質	<i>M. fermentans</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	
23	<i>M. fermentans</i> 脂質	<i>M. fermentans</i>	0	1	0	0	0.5	0	0	1.5	
24	<i>M. fermentans</i> 脂質	<i>M. fermentans</i>	0	1	2	0	0.5	0	0	3.5	
25	<i>M. fermentans</i> 脂質	<i>M. fermentans</i>	2	1	2	1	1	0	0	7	

表 2 *Mycoplasma fermentans* 生菌の気道内投与ウサギの感染 35 日目の所見スコア

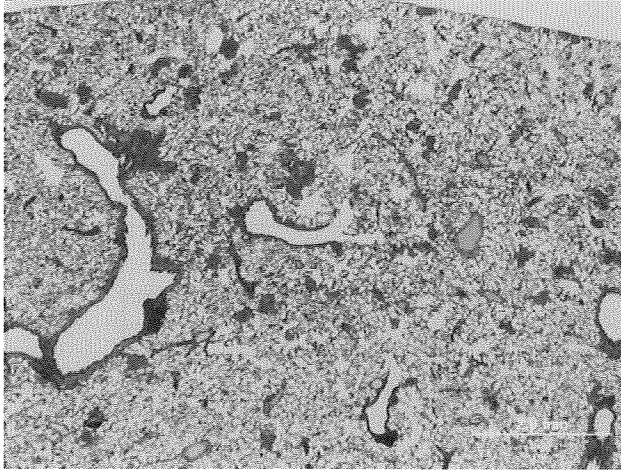
Rabbit No.	前投与	生菌投与	肺野の細胞浸潤領域の数	スコア1	気管支周囲リンパ装置の活性化	スコア合計	平均/ウサギ
6	saline	<i>M. fermentans</i>	1	-	X	0	
6	saline	<i>M. fermentans</i>	24	2+	○	3	
7	saline	<i>M. fermentans</i>	5	1+	○	2	
7	saline	<i>M. fermentans</i>	4	-	○	1	
8	saline	<i>M. fermentans</i>	7	1+	○	2	4
8	saline	<i>M. fermentans</i>	5	1+	○	2	
9	saline	<i>M. fermentans</i>	10	1+	X	1	
9	saline	<i>M. fermentans</i>	11	2+	○	3	
10	saline	<i>M. fermentans</i>	50	2+	○	3	
10	saline	<i>M. fermentans</i>	30	2+	○	3	

図 1 *Mycoplasma fermentans* 生菌の気道内投与ウサギの感染 35 日目の所見 (x100 倍)

A 気管支周囲リンパ装置の活性化



B 肺胞野における細胞浸潤領域



7. 硫化水素産生菌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)

研究協力者 大毛宏喜 (広島大学病院消化器外科)

研究要旨 炎症性腸炎、回腸囊肛門吻合術後の回腸囊炎に見られる炎症の程度と硫化水素産生菌数の関連を調べるため、サイバークリーンをもちいたリアルタイム PCR 検出系を開発した。今後、症例の蓄積と解析が必要である。

A. 研究目的

炎症性腸炎(潰瘍性大腸炎、クローン病)は、H20年度の厚生労働省の特定疾患医療受給者所持数統計によると、人口10万人あたり、82.0(潰瘍性大腸炎)、22.9(クローン病)と特定疾患の中でも罹患率の高い疾患であり(http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/eisei/08/dl/data_007.pdf)、また、患者数は上昇をつづけている。これらの疾患の原因として、免疫異常、遺伝的背景、食生活の変化、腸管内細菌の変化が挙げられているが、詳細は不明のままである。潰瘍性大腸炎の治療として行われる大腸全摘回腸囊肛門吻合術後の回腸囊炎では、腸管内の硫化水素が経時的に上昇していること(Ohge H et al. *Dis Colon Rectum* 48:469-75,2005.)、また、硫化水素吸着活性のあるビスマス製剤が治療効果を示すことから、腸管内の硫化水産生菌が、炎症に関連していることが考えられている。

Desulfovibrio は、偏性嫌気性菌で腸管常在菌叢の一部をなし、通常は強い病原性を持たない菌であるが、硫化水素を産生するため、菌量の増減と炎症性腸炎との関連が予想される。本研究では、炎症性腸炎患者か

ら採取した便中の *Desulfovibrio* を、リアルタイム PCR で定量し、炎症と菌量の関係を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

便および菌体からの DNA 抽出では、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche 社)をもちい、グアニジンによる精製を行った。硫化水素産生に係る遺伝子 *dsrA* をテンプレートとしたリアルタイム PCR を行うために、既出文献(Spence C et al. *J Appl Microbiol* 2008, 105:2143-52)よりプライマー Dsr1F+ 5'-ACSCACTGGAAGC ACGGCGG-3'、Dsr-R 5'-GTGGMRCCGT GCAKRTTGG-3'を作成し、サイバークリーン存在下で、テンプレートの増幅を行った。蛍光は ABi 社 7000 Sequence Detection System にて検出し、附属ソフトウェアで解析を行った。

倫理面への配慮

今回は基礎条件の検討を行ったため、患者検体は用いていない。患者検体を用いる試験は全てトレース不可能な匿名化のもと行う。

C. 研究結果

Desulfovibrio だけを選択的に培養することは困難であり、また、培養で得られた嫌気性菌数は必ずしも腸管内の菌数を反映しないため、定量は培養によらない方法で行うこととした。硫化水素産生に係る遺伝子 *dsrA* をテンプレートとしたサイバークリーンによるリアルタイム PCR により、*Desulfovibrio* 属の多くの種をまとめて検出することができる。用いたプライマーの特異性を図 1 に示す。

図 1

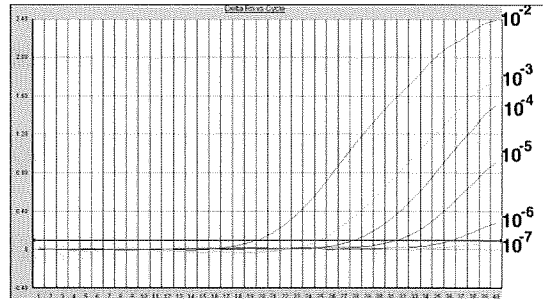
```

Dsr1F+  ACSCACTGGAAGCACGCGG
D. desulfuricans
      --G-----
D. vulgaris
      --C-----
D. termitidis
      --C-----
D. simlex
      --C-----
D. cuneatus
      --C-----
D. aerotorelans
      --G-----
D. alkalitorelans
      GGC-----

Dsr-R   GTGGMRCCGTGCAKRTTG
D. desulfuricans
      ---AG-----TG---
D. vulgaris
      ---AG-----TG---
D. termitidis
      ---AG-----TG---
D. simlex
      ---AG-----TG---
D. cuneatus
      ---AG-----TG---
D. aerotorelans
      ---AG-----TG---
D. alkalitorelans
      ---AA-----TG---
    
```

Desulfovibrio desulfuricans から DNA を精製し、これを 10 倍段階希釈したものをテンプレートとし、PCR の定量性を検証した。結果を図 2 に示す。

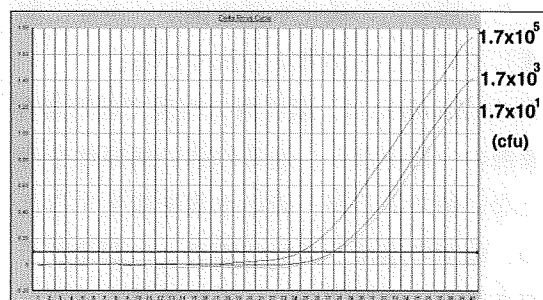
図 2



10000 倍の範囲(10^{-2} 希釈から 10^{-6} 希釈)にわたり定量可能であることが確認された。

同じ条件で、腸管内の常在細菌 (*Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella bivia*, *Veillonella atypica*, *Escherichia coli*, *Enterococcus casseliflavus*) から抽出した DNA に対する反応性を調べたが、非特異的増幅は見られなかった (data not shown)。正常便 0.1 g に *D. desulfuricans* を様々な濃度で添加し、ここから抽出した DNA をテンプレートとした PCR を行った。 1.7×10^5 cfu 添加検体と、 1.7×10^3 cfu 添加検体では、検出回数に差が見られたが、 1.7×10^3 cfu 添加検体と 1.7×10^1 cfu 添加検体では差が見られなかった (図 3)。これは、正常便中に存在する硫化水素産生菌からの増幅によるものであると考えられた。

図 3



D. 考察

本年度の研究でリアルタイム PCR により、*Desulfovibrio* の便からの定量検出が可能であることが確認された。今後、①回腸囊炎症例/非回腸囊炎、②回腸囊炎の活動期/寛解期（治療後）、③潰瘍性大腸炎活動期/寛解期、④クローン病活動期/寛解期の症例から得られた検体を比較し、得られた結果に統計的有意差が見られるかどうかの検討を行う。もし、有意差が確認された場合は、新たに種特異的リアルタイム PCR 検出系を開発し、どのような菌がどのような病態に関連しているかの観察を行う。このような研究を通じ、硫化水素産生菌が、炎症性腸炎の発症、増悪に対してどの程度かかわっているかを明らかにしたい。

E. 結論

培養によらない硫化水素産生菌の定量が可能になり、今後、症例の蓄積と解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

8. 特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究

真菌感染と特定疾患

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 感染病理部第1室)
	下平 佳代子	(東邦大学医学部 病院病理学講座)
	大久保 陽一郎	(東邦大学医学部 病院病理学講座)
	篠崎 稔	(東邦大学医学部 病院病理部)
	中山 晴雄	(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)
	永吉 優	(千葉大学 真菌医学研究センター)

研究要旨 *Stachybotrys chartarum* の吸入によってマウスで肺高血圧が惹起されるという知見に基づいて検討を行ってきた。本年度は*S. chartarum* と比べて屋内環境での曝露機会が高い*Cladosporium* 属真菌、*Aspergillus fumigatus* および*Penicillium* 属真菌の経気管的反復投与を行い、前二者では多くの菌株で*S. chartarum* と同様の肺動脈病変が形成されるものの、*Penicillium* 属菌ではこの病変が形成されないことをマウスで確認した。これらの菌株の孢子抽出液に含まれる二次代謝産物を解析したが、特定の二次代謝産物と本病変形成のしやすさとの直接的相関関係は見いだせなかった。更に*S. chartarum* の経気管的反復投与モデルにおけるRhoキナーゼインヒビターの効果について検討を行ったところ本病変形成が抑制され、病変形成におけるRhoA/ROCK経路の関与が示唆された。また、本モデルにおける肺胞洗浄液中の好酸球の増加およびIL-4、IL-5の増加からTh2免疫応答の関与が示唆された。

A. 研究目的

原発性肺高血圧症 (Pulmonary arterial hypertension, PAH) は原因不明で根本的な治療法が存在しない難病である。病理学的には肺動脈中膜、内膜の肥厚を認めるが、その病態形成の機序及びトリガーは未だに明らかでない。一方、我々はわが国の居住環境内から分離された真菌である*Stachybotrys chartarum* の気管内反復投与によってマウスで肺動脈壁の中膜および内

膜の肥厚を特徴とするヒトの肺高血圧に類似した病変が形成されることを明らかにした。そこで我々は、本疾患の原因解明の一助として、このモデルを用いて生活環境内における真菌曝露と肺動脈病変の形成について検討を進めてきた。

これまでの検討では、屋内環境中からの検出頻度が高い*Cladosporium* 属や*Penicillium* 属真菌を1株ずつ用い、本病変が形成されないことを確認したが、*S. chartarum*