

を複数株用いた検討では病変形成の有無に菌株差があったことから、*Cladosporium* 属、*Penicillium* 属真菌でも菌株差のあることが推測された。そこで本研究では *Cladosporium* 属、*Penicillium* 属真菌について菌株数、菌種数を増やして検討を試みた。環境内に常在し、病原性が知られている *Aspergillus fumigatus* についても本病変を形成するかどうか検討した。

また、本病変形成に関わる因子を検討するために、各菌種の孢子抽出液中に含まれる二次代謝産物を分析し、本病変との関連性について検討した。

さらに、*S. chartarum* の気管内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を検討するとともに、気管支肺胞洗浄液中におけるサイトカインおよび細胞の変化を検討した。

PAH モデルの病態解析の一環として、明瞭な肺動脈中・内膜肥厚を来した肺組織および対象とした RPMI 気管内投与マウスの肺より RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて本モデルにおける遺伝子発現パターンの変動を検索した。

## B. 研究方法

### 1. *Stachybotrys chartarum* 以外の環境内真菌による肺動脈病変の惹起について

*C. cladosporioides* (IFM57246、57247、57248)、*C. herbarum* (IFM57768、57769、57770)、*P. citrinum* (IFM57241、57242)、*P. chrysogenum* (IFM57243、47244、57245)、*A. fumigatus* (IFM47450、49896、53842、54229、55195) を potato dextrose agar (PDA) にて 25°C で 3 週間培養し、RPMI1640 にて孢子懸濁液を作製した。

ddY マウス (6 週齢、オス) に全身麻酔下でマウスの気管内に 1 回あたり  $1 \times 10^4$  spores/mouse (25  $\mu$ l/mouse) の孢子懸濁液を 4

週間にわたって合計 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病理組織学的変化を検討した。

### 2. 肺動脈病変形成に関与する真菌の産生物質の検索

*C. cladosporioides* (IFM57246、57247、57248)、*C. herbarum* (IFM57768、57769、57770)、*P. citrinum* (IFM57241、57242)、*P. chrysogenum* (IFM57243、47244、57245)、*A. fumigatus* (IFM47450、49896、53842) を PDA にて 25°C で 3 週間培養し、採取した孢子を 80% メタノールに一晩浸漬した。その後、遠心分離およびフィルターろ過によって孢子を除去した。このメタノール抽出液をエヴァポレーターにて乾固させた。これらの試料は 4°C で保存した後、100% メタノール 1ml で溶解して LC/MS/MS にて分析した。分析対象は Isocladosporin/cladosporin、Cladosporol、Cladospolide A/B/C、Claphostin A、Claphostin B、Claphostin C、Claphostin D、Claphostin I、Pernitrin、Questionomycin A、Questionomycin C、Sorbicillin、Fumigaclavine A、Fumigaclavine B、Fumigaclavine C、Gliotoxin、Pyripyropenes A、Pyripyropenes O、Pyripyropenes S、Fumagillin、Fumiquinazoline A/B、Fumiquinazoline D、Fumiquinazoline D isomer、Fumiquinazoline F/G、Fumitremorgin B、Fumitremorgin C、Trypacidin、Methyl-sulochrin、Helvolic acid とした。

### 3. *S. chartarum* による肺動脈病変の形成機序について (Rho キナーゼインヒビターの効果についての追加検討)

*S. chartarum* (IFM53637) を PDA にて 25°C で 3 週間培養し、RPMI1640 にて孢子懸濁液を作製した。全身麻酔下で ddY マウス (6 週齢、オス) に 1 回あたり  $1 \times 10^4$  spores/mouse (25  $\mu$ l/mouse) の孢子懸濁液を経気管的に 3 ヶ月にわたって計 18 回反復投与した。マ

ウスは2群に分け、一方には実験期間中 Rhoキナーゼインヒビターである fasudil (100mg/kg/day) を経口的に投与し続け (fasudil 投与群、n=6)、もう一方は fasudil を投与しない対照群とした (fasudil 非投与群、n=6)。反復投与終了後 7 日目に体重、肝、腎、脾の重量を測定し、病理組織学的変化を検討した。外径 50~100  $\mu$ m の肺動脈を各マウス 50 本、各群合計 300 本ずつ測定し、内腔狭窄の程度を stenotic index (1-血管内腔の面積/血管全体の面積)  $\times$  100) を用いて評価した。

#### 4. *S. chartarum*-induced PA remodeling における気管支肺胞洗浄液中中の細胞分画およびサイトカインの変動

*S. chartarum* (IFM53637) を PDA にて 25°C で 3 週間培養し、RPMI1640 にて孢子懸濁液を作製した。ddY マウス (6 週齢、オス) に全身麻酔下で 1 回あたり  $1 \times 10^4$  spores/mouse (25  $\mu$ l/mouse) の孢子懸濁液を経気管的に 4 週間にわたって合計 6 回反復投与し、1 回目および 6 回目の投与からそれぞれ 24 時間後に気管支肺胞洗浄液を採取して、細胞分画を調べるとともに、ELISA を用いてサイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$ ) を測定した。

#### 5. モデルを用いた PAH 関連遺伝子の検索

動物は 6 週齢の ddY 雄マウス (実験群 3 匹、コントロール群 3 匹) を用いた。*S. chartarum* (IFM53637) を PDA にて 25°C で 3 週間培養し、RPMI1640 にて孢子懸濁液を作製した。マウスに麻酔下で 1 回あたり  $1 \times 10^4$  spores/mouse (25  $\mu$ l/mouse) の孢子懸濁液を経気管的に反復投与し、実験群とした。コントロール群には孢子懸濁液と同様の方法で RPMI1640 液体培地のみを気管内に投与した。8 週間、計 12 回の反復投与を行い、反復投与終了 7 日目に、肺組織を採取し RNA を抽出し

た。

#### < 遺伝子解析 >

Agilent 2100 Bioanalyzer 及び NanoDrop ND-1000 を用いて、抽出した RNA の濃度及び純度が解析に十分であることを確認した後、Affymetrix® 推奨プロトコールに準じて 3' IVT Express kit を用い aRNA の合成を行った。GeneChip® を用いてハイブリダイゼーションを行い、AGCC (Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software) にて画像解析し、Affymetrix® Expression Console™ を用いてデータを数値化した。全probe数は 45101 であった。各データは解析ソフト GeneSpring® GX 10.0 を用いて比較解析を行った。Shift to 50 percentile、Baseline to Median of Control samples を行い Normalized し、実験群群とコントロール群の全てのデータにおいて Perfect Much と Miss Much 間の値に有意に差が (p-value  $\leq$  0.05) あったものを解析対象とした。また、実験群とコントロール群の値の比が 2 倍以上離れており、その差が有意 (p-value  $\leq$  0.05) であった遺伝子を発現変動している可能性のある遺伝子とした。

#### C. 研究結果

##### 1. *Stachybotrys chartarum* 以外の環境内真菌による肺動脈病変の惹起について (表 1)

*Cladosporium* 属真菌、*A. fumigatus* の経気管的反復投与では、これまでと同様にマウスで肺高血圧症に合致する肺動脈病変が形成された。病変形成の有無や割合は菌株により著明な差が見られた。*C. cladosporioides* では 4 株のうち 1 株のみで肺動脈壁中膜と内膜の肥厚が形成された。本病変は病

理組織学的に、*S. chartarum* によって惹起される病変と非常に類似していた。*Penicillium* 属真菌はいずれの株でも本病変を惹起しなかった。いずれの実験群においても肺内で孢子の生育は認められず、感染は成立しなかった。

表1. 菌種と肺動脈病変の形成

菌種名	菌株番号	肺動脈病変の形成	
		(匹)	(%)
<i>C. cladosporioides</i>	If-Mo2134*	0/10	0
	If-M57245	4/1*	36
	If-Mo /24 /	0/1*	0
	If-M57243	0/1*	0
<i>C. herbarum</i>	If-M57758	7/1*	64
	If-M57759	7/1*	64
	If-M57772	5/1*	45
<i>P. citrinum</i>	If-M54813*	0/10	0
	If-M57241	0/10	0
	If-Mo /242	0/10	0
<i>P. chrysogenum</i>	If-M57243	0/10	0
	If-M57245	0/10	0
	If-M57244	0/10	0
<i>A. fumigatus</i>	If-M47450	0/10	0
	If-M49835	4/1*	36
	If-M53842	7/1*	64
	If-M54229	6/1*	55
	If-Mo2135	1/1*	9

\* 以前報告したデータ

## 2. 肺動脈病変形成に関与する真菌の産生物質の検索 (表2)

*Cladosporium* 属、*Penicillium* 属、*Aspergillus* 属の孢子の抽出物から、各菌種に特有の物質をはじめとする多くの二次代謝産物が検出された。*A. fumigatus* ではこれまでに知られていなかった *S. chartarum* との共通物質が検出された。しかし、特定の二次代謝産物が肺動脈病変形成に関与しているという直接的な関係を示唆するデータは得られなかった。

表2. 孢子抽出液中の二次代謝産物

Secondary metabolites	<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. herbarum</i>		<i>P. citrinum</i>		<i>P. chrysogenum</i>		<i>A. fumigatus</i>	
	FM	FM	FM	FM	FM	FM	FM	FM	FM	FM
Beclomethasone/Clodolone	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cladocoral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cladocoral A/B/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cladocoral E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Claphostin D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Claphostin B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Claphostin A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Claphostin C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Claphostin I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quetiapine C	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Sorlicidin	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Furazolidinone B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Furazolidinone A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Glotatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Furazolidinone C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pyriproxyfen S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Furazolidinone A/B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Furazolidinone D isomer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Furazolidinone D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Furazolidinone F/G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Funtronolone D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Trigecatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Methylsulfolin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pyriproxyfen A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pyriproxyfen G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Funtronolone B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Furazolidinone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Methylacid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

## 3. *S. chartarum* による肺動脈病変の形成機序について (Rhoキナーゼインヒビターの効果についての追加検討) (図1、2)

Stenotic indexは *S. chartarum* の反復投与によって上昇した。一方、fasudilを投与することによって強い狭窄を示す血管数が減少し、stenotic indexが有意に低下した。内膜肥厚を検討したところ、fasudil投与群では内膜の増生と血管狭窄が抑制されることが示された。

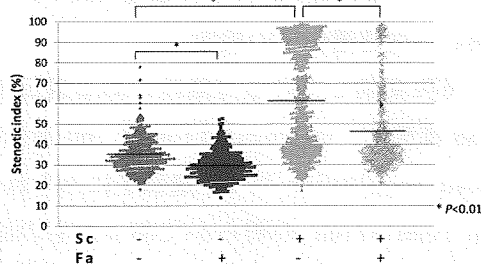


図1. 肺動脈の内腔狭窄率の変化

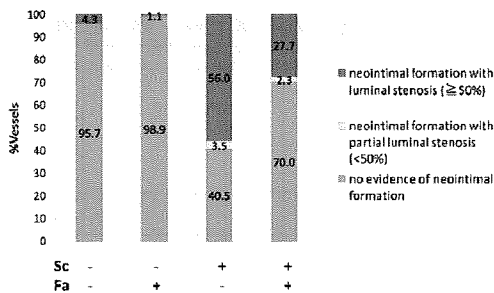


図2. 肺動脈の内腔狭窄程度の比較

#### 4. *S. chartarum*-induced PA remodeling における気管支肺胞洗浄液中の細胞分画およびサイトカインの変動

*S. chartarum*を計6回反復投与したマウスでは肺胞洗浄液中の好酸球と好中球の数が増加した。特に、測定した全細胞数に占める好酸球数の割合は約45%となり、著しい増加が認められた。

肺胞洗浄液中のサイトカインは、Th2サイトカインであるIL-4、IL-5が有意に増加していた。Th1サイトカインであるIFN- $\gamma$ は変化がみられなかった。

#### 5. *S. chartarum* 投与によるPAHモデルを用いた関連遺伝子の検索

発現変動している可能性のある遺伝子は188種類で、up regulationは160遺伝子、down regulationは28遺伝子にみられた。up regulationの明らかであったものは免疫グロブリンやCXCサイトカインに係る遺伝子が多かった。現在、PAH関連遺伝子として注目されている血管平滑筋のリモデリングに係るMmp1とその内因性抑制因子であるTimp1は、今回の検討でも有意にup regulationがみられた。また、アポトーシスに係るFabp1のdown regulation、Gas・Igf1・Bcl2のup regulationもみられたが、これはヒトのPAH症例を用いた遺伝子検索

の既存の報告と同様の結果であった。(Mark W. Geraci et al. Gene Expression Patterns in the Lungs of Patients With Primary Pulmonary Hypertension: A Gene Microarray Analysis Circ. Res. 2001)

#### D. 考察

*C. cladosporioides*では肺動脈病変が形成されたのは供試した4株中1株のみであり、*C. herbarum*では3株全てで形成されたのに対して比較的肺動脈病変を形成しにくい傾向がみられた。*A. fumigatus*では菌株により肺動脈病変の形成頻度に差がみられたものの5株中4株で肺動脈病変を形成しており、病変形成を惹起しやすい傾向がみられた。一方、*Penicillium* sp.ではまったく病変形成が認められず、菌種により明瞭な相違が確認された。

胞子のメタノール抽出物中からは多様な物質が検出されたが肺動脈病変形成への関与は不明であった。*A. fumigatus*で検出された*S. chartarum*との共通物質については詳細を検討中である。

Fasudilの投与によって肺動脈リモデリングが抑制されたことから、*S. chartarum*による肺動脈病変の形成におけるRhoA/ROCK pathwayの関与が示唆された。

一方、*S. chartarum*を投与したマウスの肺胞洗浄液中の好酸球の増加およびTh2サイトカインの増加から、本病変形成におけるTh2免疫応答の関与が示唆された。

PAHモデルマウスを用いた関連遺伝子の検索より、PAHの病態形成には免疫応答やアポトーシスの関連因子の不均衡に惹起される血管リモデリングの関与が示唆された。

## E. 結論

本研究から、環境内に常在する *Cladosporium* 属や *Aspergillus* 属真菌の吸入によっても *S. chartarum* と同様の肺動脈病変がマウスで形成されることを確認した。肺動脈病変の形成頻度は菌株による差があり、真菌胞子の構造的特徴の他に、産生される二次代謝産物が本病変形成に関与している可能性が考えられた。しかしながら、これらの真菌胞子からは種々の二次代謝産物が検出されたものの、肺動脈病変形成への関与は明らかではなかった。本病変形成に関わる因子については、今後さらに検討を進める必要があると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. 磯部和順, 秦 美暢, 杉野圭史, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 本間 栄. 間質性肺炎合併癌診断における FDG-PET の有用性の検討. 日呼吸会誌. 47(4): 278-85, 2009
2. 大久保陽一郎, 羽鳥 努, 密田亜希, 長谷川千花子, 谷川佳世子, 中山晴雄, 篠崎 稔, 渋谷和俊. 真菌症が発生したらどう対応すればよいでしょうか? 腎と透析, 66(4) : 693-95, 2009
3. Sugino K, Kobayashi M, Iwata M, Gocho K, Kaburaki K, Muramatsu Y, Ishida F, Miyazaki T, Sato D, Sakaguchi S, Sano G, Kusano E, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Takagi K, Homma S. Successful Treatment with Pneumonectomy for Pulmonary

*Mycobacterium Abscessus* Infection. Inter Med, 48: 459-63, 2009

4. Shinozaki M, Okubo Y, Nakayama H, Mitsuda A, Ide T, Murayama S, Shibuya K. Application of *In situ* Hybridization to Tissue Sections for Identification of Molds Causing Invasive Fungal Infection. Jpn J Med Mycol, 50:75-83, 2009
5. 渋谷和俊, 下平佳代子. 深在性真菌症の病態と診断. 今日の移植, 22:368-75, 2009
6. 磯部和順, 秦 美暢, 岩田基秀, 石田文昭, 鍋木教平, 後町杏子, 小林美奈穂, 阪口真之, 佐藤大輔, 佐野 剛, 杉野圭史, 草野 英美子, 坂本 晋, 高井雄二郎, 渋谷和俊, 高木啓吾, 本間 栄. 多発薄壁空洞を形成した細気管支肺胞上皮癌の1剖検例. 日呼吸会誌, 47:512-17, 2009
7. Sugino K, Gocho K, Ota H, Kobayashi M, Sano G, Isobe K, Takai Y, Izumi H, Kuraishi Y, Shibuya K, Homma S. Miliary Tuberculosis Associated with Chronic Neutrophilic Leukemia. Inter Med, 48:1283-7, 2009
8. Takahashi H, Wada A, Yokoyama Y, Fukushi S, Sakurai T, Shibuya K, Suguro T. Ligamentum flavum haematoma: a report of two cases. J Orthop Surg, 17:212-5, 2009
9. 石原 晋, 中山晴雄, 和泉春香, 長瀬大輔, 藤本吉紀, 名取一彦, 安藤常浩, 渋谷和俊, 榎村浩一, 酒井文和, 倉石安庸. 抜き打ち感染 (Breakthrough infection) として発症した侵襲性ムーコル症の1剖検例. THE JAPANESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, 62:53-68, 2009

10. 鈴木 琢, 渋谷和俊. —これだけは知っておきたい皮膚真菌症の知識—真菌症と病理. Monthly Book Derma, 148:7-11, 2009
11. Saito T, Shime N, Itoh K, Fujita N, Saito Y, Shinozaki M, Shibuya K, Makimura K, Hashimoto S. Disseminated Aspergillosis Following Resolution of *Pneumocystis* Pneumonia With Sustained Elevation of Beta-Glucan in an Intensive Care Unit: a Case Report. Infection 2009, e-Publish 2009 (Infection 2009 DOI 10.1007/s15010-009-8108-5)
12. 塩澤一恵, 渡邊 学, 高山竜司, 池原 孝, 住野泰清, 谷川佳世子, 渋谷和俊, 山崎康朗. IgG4関連病変が疑われた肝炎症性偽腫瘍の1例. Liver Cancer, 15(2):175-84, 2009
13. Isobe K, Hata Y, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Homma S. Clinical characteristics of acute respiratory deterioration in pulmonary fibrosis associated with lung cancer following anti-cancer therapy. Respirology, e-Publish 2009 (DOI 10.1111/j.1440-1843. 2009 01666.x)
14. Isobe K, Hata Y, Takai Y, Shibuya K, Takagi K, Homma S. Usefulness of fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography for investigating unexplained rising carcinoembryonic antigen levels that occur during the postoperative surveillance of lung cancer patients. Int J Clin Oncol 14:497-501, 2009 (DOI 10.1007/s10147-009-0905-4)
15. 大久保陽一郎, 渋谷和俊. 合併症・免疫抑制薬の副作用とその対応、感染症：真菌. 腎移植のすべて(高橋公太編)、pp323-324 メジカルビュー社、東京、2009
16. Nakayama H, Shibuya K, Kimura M, Ueda M, Iwabuchi S. Histopathological Study of Candidal Infection in the Central Nervous System. Jpn J Med Mycol 51: in press, 2010

#### 学会発表

1. Shibuya K. Pathophysiological implication of diagnosis in invasive aspergillosis. ISHAM 2009 Satellite Symposia Beijing, May29-31, 2009 China
2. Shinozaki M, Shibuya K. Application of *in site* hybridization procedure on tissue sections to identification of molds causing invasive fungal infections.
3. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May 25-29, 2009 Tokyo, Japan
4. Nagayoshi M, Ochiai E, Watanabe A, Sato A, Tada Y, Tatsumi K, Shibuya K, Kamei K. Rho-Kinase inhibitor suppresses pulmonary artery remodeling induced in mice by repeated inhalation of *Stachybotrys chartarum*. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May 25-29, 2009 Tokyo, Japan
5. Ochiai E, Nagayoshi M, Sato A, Watanabe A, Toyotome T, Shibuya K, Kamei K. The effect of fungal species and murine strains on the

- development of pulmonary arterial hypertension. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May 25-29, 2009 Tokyo, Japan
6. Shimamura T, Kubota N, Nagasaka S, Suzuki T, Mukai H, Shibuya K. Establishment of novel model of onychomycosis in rabbits for evaluation of antifungal agents. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May 25-29, 2009 Tokyo, Japan
  7. Suzuki T, Kubota N, Shimamura T, Nagasaka S, Mukai H, Shibuya K. Histopathological study on the experimental onychomycosis in rabbit. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May 25-29, 2009 Tokyo, Japan
  8. Shinozaki M, Nakayama H, Okubo Y, Ide T, Miyake Y, Sasaki K, Maruyama S, Shibuya K. Development and application of *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes in tissue sections for histological diagnosis of invasive fungal infections. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May 25-29, 2009 Tokyo, Japan
  9. Sugino K, Hasegawa C, Sano G, Sato D, Kusano E, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Takagi K, Homma S. Pathophysiological study of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis associated with sequelae of tuberculosis. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May 25-29, 2009 Tokyo, Japan
  10. Nakayama H, Shinozaki M, Iwabuchi S, Shibuya K. Histopathological study of central nervous system candidiasis. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May 25-29, 2009 Tokyo, Japan
  11. Miyake Y, Shimizu M, Shinozaki M, Nakayama H, Abe F, Iwamoto K, Nagase D, Shibuya K. A case of cryptococcal meningitis of which morphological examination on yeasts in cytological specimen was useful for accurate assessment for antifungal chemotherapy. The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM2009), May 25-29, 2009 Tokyo, Japan 永吉 優、落合恵理、渡辺 哲、佐藤綾香、多田祐司、笠原靖紀、田辺信宏、巽浩一郎、渋谷和俊、亀井克彦：真菌胞子の反復気管内投与により惹起される肺血管病変の検討。第49回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2009. 6.

12. Ochiai E and Kamei K. Pulmonary hypertension caused by inhalation of fungal spores –a new mycotoxic disease?-. The 17<sup>th</sup> Congress of the international society for human and animal mycology. 2009. 5. Tokyo, Japan.
  13. Nagayoshi M, Ochiai E, Watanabe A, Sato A, Tada Y, Tatsumi K, Shibuya K, Kamei K. Rho-kinase inhibitor suppresses pulmonary artery remodeling induced in mice by repeated inhalation of *Stachybotrys chartarum*. The 17<sup>th</sup> Congress of the international society for human and animal mycology. 2009. 5. Tokyo, Japan.
  14. 滝埜昌彦、落合恵理、矢口貴志、亀井克彦：LC/TOF-MS 及び LC/MS/MS を用いた *Aspergillus* 属中のマイコトキシンの分析. 日本マイコトキシ学会第 67 回学術講演会、東京、2010. 1.
  15. 渋谷和俊. Threat of Aspergillosis: Early diagnosis and treatment. 第 5 回ファンガス・クラブ, 8/4, 2009 東京
  16. 下平佳代子, 中山晴雄, 篠崎 稔, 大久保陽一郎, 職 玉珠, 若山 恵, 井手 忠, 渋谷和俊. 病理からみた東邦大学における侵襲性糸状菌症の変遷. 共同利用研究第 3 回アスペルギルス研究会, 9/26, 2009 東京
  17. 清水雅子, 緒方美和子, 田邊なおみ, 井手 忠, 大久保陽一郎, 密田亜希, 羽鳥 務, 若山 恵, 渋谷和俊. セルブロックにおける悪性中皮種と反応性中皮細胞の免疫染色の検討. 第 48 回日本臨床細胞学会秋期大会, 10/30, 31, 2009 福岡市
  18. Shimodaira K, Nakayama H, Saji T, Shibuya K. A road of invasive fungal infection in Toho University. The 6<sup>th</sup> Joint Seminar on Biomedical Sciences among PSU, CMU, KMU and TU, Oct 12-14, 2009 Tokyo, Japan
  19. 中山晴雄, 篠崎 稔, 佐藤健一郎, 原科純一, 平田容子, 斉藤紀彦, 伊藤圭介, 青木和哉, 岩渕 聡, 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. 第 22 回日本外科感染症学会総会, 12/9・11, 2009 山口県
  20. Ochiai E, Takino M, Sugita-Konishi Y, Ito J, Kikuchi K, Sato A, Watanabe A, Toyotome T, Yaguchi T, Kamei K. Antifungal susceptibility and mycotoxin production of *Aspergillus fumigatus* and its relative fungi. 4<sup>th</sup> Advances Against Aspergillosis. 2010. 2. Roma, Italy.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
- 特許取得 なし  
実用新案登録 なし  
その他 なし



## 9. 潰瘍性大腸炎(UC)手術における術前1日経口抗菌薬投与による腸管処置に関する研究

研究分担者 竹末 芳生 (兵庫医科大学感染制御学)

研究要旨 pouchを作成するUC手術における術前1日経口抗菌薬投与による腸管処置によるSSI予防効果について、大腸癌手術と比較し、各々無作為化比較試験を行った。潰瘍性大腸炎手術では有意に低率(経口抗菌薬あり4.2% vs なし28.6%)となり、その有用性が示唆されたが、大腸癌手術では術前経口抗菌薬投与の有用性は示されなかった。術中汚染が高率に起きる手術において経口抗菌薬による術前腸管処置の有用性が証明された。

### A. 研究目的

UC手術ではpouch作成のため、一般大腸手術より術中汚染が高率となる。そこで術前1日経口抗菌薬による手術部位感染(SSI)予防効果をProspectiveに検討した。

### B. 研究方法

UC患者と、対照として大腸癌患者を各々、経口抗菌薬投与A群と非投与B群に無作為に割り付けた。腸閉塞などによる機械的腸管処置の施行不可例、術前2週間以内の抗菌薬投与例は除外した。A群にはkanamycinとmetronidazole各々500mgを術前日の14時・15時・21時に投与した。両群で機械的腸管処置を行い、第2世代セフェム系薬を手術前、開始3時間後、術後8時間毎2回の計4回投与した。なお、pouch作成はLinear staplerにて施行後、粘膜面を反転し止血操作を行った。SSIはNNISの診断基準を用いた。

### C. 研究結果

UC 142例(A群72例、B群70例)、大腸癌203例(A群99例、B群104例)の

それぞれのA,B両群間で、年齢、Body mass index、術前総蛋白・アルブミン値、手術時間、出血量、輸血の有無、人工肛門造設の有無、免疫抑制剤使用の有無、術前ステロイドの総投与量に差はなかった。UC患者におけるSSI発症は、A群例3/72例(4.2%)、B群例20/70例(28.6%)であり、有意にA群で低率であった( $P=0.0016$ ) (縫合不全によるSSIはA群1例、B群1例)。大腸癌患者におけるSSI発症はA群例4/99例(4.0%)、B群例7/104例中(6.7%)で有意差を認めなかった( $P=0.62$ ) (縫合不全によるSSIはA群2例、B群5例)。抗菌薬関連性腸炎である *C.difficile* 腸炎の発症は両群で認めず、CD toxin 陽性率も有意の差を認めなかった。

### D. 考察

大腸手術における経口抗菌薬による術前腸管処置は、欧米においては推奨されているものの、最近の報告では、その効果は一定でない。日本では、実施率は15%程度であり、経口抗菌薬を使用しない方針が主流

である。今回の結果では、通常の大腸癌手術ではそのSSI予防効果は認められなかったが、pouch作成など術中汚染が高率なUCにおいては有意にSSI発生が低率であった。また常在細菌叢を乱すことによる抗菌薬関連性腸炎の発症もなく安全に使用可能であった。

#### E. 結論

pouchを作成するUC手術では、術前1日経口抗菌薬投与による腸管処置によりSSI発症が有意に低率となり、その有用性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Risk factors associated with surgical site infection after ileal pouch-anal anastomosis in ulcerative colitis. Uchino M, Ikeuchi H, Matsuoka H, Tsuchida T, Tomita N, Takesue Y. *Dis Colon Rectum*. 2010;53:143-9.

2. Takesue Y, Nakajima K, Ichiki K, Ishihara M, Wada Y, Takahashi Y, Tsuchida T, Ikeuchi H: Impact of a hospital-wide programme of heterogeneous antibiotic use on the development of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *J Hosp Infect* accepted in press

3. Kohyama M, Takesue Y, Ohge H, Murakami Y, Shimamoto F, Sueda T Pouchitis disease activity index (PDAI) does not predict patients

with symptoms of pouchitis who will respond to antibiotics. *Surg Today*. 2009;39(11):962-8.

4. Sugiyama Y, Okii K, Murakami Y, Yokoyama T, Takesue Y, Ohge H, Sueda T, Hiyama E. Changes in the agr locus affect enteritis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2009 May;47:1528-35.

5. Uchino M, Ikeuchi H, Tsuchida T, Nakajima K, Tomita N, Takesue Y. Surgical site infection following surgery for inflammatory bowel disease in patients with clean-contaminated wounds. *World J Surg*. 2009;33:1042-8.

##### 学会発表

1. Uchino M, Ikeuchi H, Bandou H, Matsuo ka T, Tsuchida T, Ichiki K, Nakajima K, Tomita N, Takesue Y: Risk factors associated with surgical site infection after ilealpouch-anal anastomosis in ulcerative colitis. ICAAC K-962 2009 SanFrancisco

2. Takesue Y, Nakajima K, Wada Y, Ichiki K, Takahashi Y, Tsuchida T. Does MIC crep in vancomycin still have significant influence on the mortality in MRSA bacteremia after the introduction of linezolid in clinical use in Japan? ICAAC K-1618 2009 SanFrancisco

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

## 10. IgA 腎症と感染症

研究分担者	河野 茂	(長崎大学大学院感染免疫学講座 教授)
研究協力者	古巢 朗	(長崎大学大学院感染免疫学講座 准教授)
	掛屋 弘	(長崎大学病院第二内科 講師)
	西野友哉	(長崎大学病院血液浄化療法部 助教)
	小畑陽子	(長崎大学病院医師育成キャリア支援室 助教)
	高橋晴雄	(長崎大学病院耳鼻咽喉科 教授)
	川田晃弘	(長崎大学病院耳鼻咽喉科 助教)
	宮崎義継	(国立感染症研究所 生物活性物質部 部長)
	金子幸弘	(国立感染症研究所 生物活性物質部 研究員)
	瀬藤光利	(浜松医科大学 分子解剖学研究部門 教授)
	早坂孝宏	(浜松医科大学 分子解剖学研究部門 特任助教)
	荒川宜親	(国立感染症研究所 細菌第二部 部長)
	佐々木裕子	(国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官)
	黒田 誠	(国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センター室長)

研究要旨 ①質量顕微鏡を用いた IgA 腎症の腎糸球体内沈着物質の解明  
IgA 腎症の腎組織に沈着している物質とその分布を質量顕微鏡を用いて明らかにし、IgA 腎症の病態と病原微生物との関連を検討する。まず、IgA 腎症モデルマウスの腎組織を採取し、質量顕微鏡による検討を行った。コントロールマウスと比較し、モデルマウスにおいて腎組織内に分布が異なる物質の存在が数種類明らかとなった。そのうち、尿細管部分に IgA 腎症モデルマウスに特異的な沈着物質を認め、今後はその沈着物質の詳細を検討する予定である。

### ②IgA 腎症患者検体を用いた網羅的解析

IgA 腎症患者扁桃と非 IgA 腎症患者扁桃からゲノム DNA を抽出し、大規模シーケンスを用いた既知微生物ゲノムとの比較による微生物の網羅的解析を行う。また、IgA 腎症群扁桃に特異的な菌が同定された場合は、尿や腎組織における抗原検出や血清中の抗微生物抗体測定などを行う予定である。現在、シーケンスへ向けて試料を収集中である。

### A. 研究目的

慢性腎臓病の国内における患者数は 1,000 万人以上と推定される中、日本の維持透析患者数は 27 万人を超え、毎年約 1 万人ずつ増加している現状にある。近年、慢性腎臓病が糖尿病・高血圧・高脂血症と並

ぶ心血管疾患の危険因子であることが明らかとなり、慢性腎臓病への対策を講じることが透析導入患者数の増加に歯止めをかけると共に心血管疾患の発症を防止することにも繋がり、大変意義深いものと考えられる。この慢性腎臓病の代表的な原疾患のひ

とつに、慢性糸球体腎炎があげられる。IgA腎症に代表される慢性糸球体腎炎において、その発症・進展機序の多くはいまだ明らかとなっていないのが現状である。慢性糸球体腎炎のうちわが国でもっとも頻度が高いIgA腎症については、慢性扁桃炎合併例が多いこと、感染を契機に症状の悪化が見られるといった背景から、病原微生物の病態への関与が示唆されている。実際これまでの報告では、関与する抗原として各種細菌、ウイルス、食物、自己抗原など様々なものが報告されているが、特異的な抗原は未だ同定されていない。

また、IgA腎症は、メサングウム領域に deposit と呼ばれる免疫複合体が沈着することを特徴とするが、その免疫複合体を形成する物質についても、その詳細な検討はなされていない。これを明らかにすることはIgA腎症の病因解明に結びつくものと思われ、今後の発症・進展予防対策を講じる上で大変重要であると考えられる。

今回我々は、①従来の光学顕微鏡による形態観察と同時に生体分子の分布をみることが可能な質量顕微鏡を使用し、IgA腎症の腎組織に沈着している物質を明らかにし、病態および病原微生物との関連を検討した。②IgA腎症患者扁桃において、非IgA腎症患者扁桃と比較し、特異的な細菌叢の存在を検討するために網羅的に解析を行った。

## B. 研究方法

### ① 1. IgA腎症モデルマウスでの検討

a. 自然発症のIgA腎症様病態を呈するヒトIgA腎症モデルマウスである若年好発性高IgA血症マウス(HIGAマウス)において腎組織障害をPAS染色にて検討した。

b. HIGAマウスとコントロールマウスの腎組織における生体分子の分布を質量顕微鏡を用いて比較検討した。

### ① 2. ヒト腎生検組織での検討

長崎大学大学院倫理委員会にて2008年12月承認後、腎疾患の診断・治療のため腎生検が必要と主治医が判断した患者で、腎生検および本研究への同意を得たものを対象とし、承諾書を取得した。腎生検時に採取された腎組織の一部を液体窒素で凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し、解析に備えている。凍結保存された腎組織より、質量顕微鏡用の切片を作成し、質量顕微鏡を設置している浜松医大 瀬藤研究室へ郵送し、解析を行う予定である。

### ② 1. IgA腎症患者と非IgA腎症患者における扁桃組織の形態学的検討

扁桃疾患の治療のため、扁桃摘出術が必要と主治医が判断した患者で、手術及び本研究への同意が得られた方から、扁桃組織を収集し、HE染色にて形態学的検討を行った。

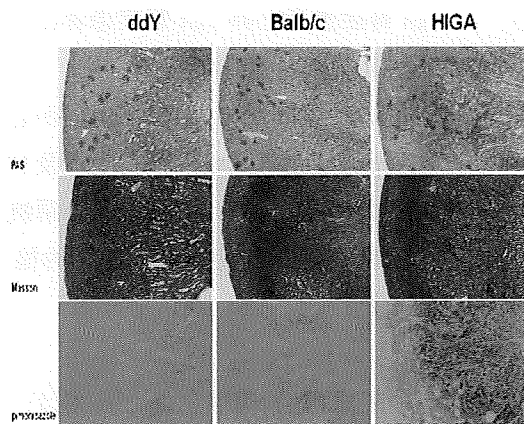
(倫理面への配慮)動物実験にあたっては、長崎大学実験動物計画委員会の承認を得て、動物愛護の指針にもとづいて行った。本研究に同意が得られた症例はコード番号を情報管理者が割り当て、以後はその番号にて扱っており、患者同意書および腎生検申込書は、カルテと同じセキュリティレベルとして長崎大学第二内科に保管している。コード番号と患者名との連結は、情報管理者のみが可能とすることとした。

C. 研究成果

1. IgA 腎症モデルマウスでの検討

- a. 28 週令 HIGA マウスでは、コントロールマウスや ddY マウスと比較し、尿蛋白の増加傾向と腎組織における糸球体メサンギウム細胞の増殖と基質の増加、尿細管の萎縮を認めた。また、尿細管障害の原因として、虚血の関与を検討するため、虚血の検出マーカーであるピモニダゾールの免疫染色を行ったところ、HIGA マウスではコントロールのマウスに比べてピモニダゾール陽性領域が有意に増加していた。(図 1)

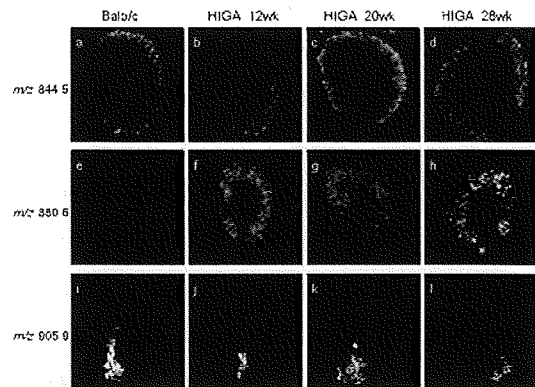
図 1 PAS、マッソントリクローム染色  
ピモニダゾール染色



b. 質量顕微鏡での検討結果

コントロールマウスと HIGA マウスの腎組織を質量顕微鏡で検討した結果、図 2 に示す質量電荷比 844.5, 880.6, 905.9 など 20 ほどのピークが見られ、分布に差があることが確認された。(図 2)

図 2 質量顕微鏡での結果



質量分析の結果、コントロールマウス、HIGA マウスともに腎門部血管周囲に分布のみられた分子量 905.9 の物質については、triacylglycerol と判明した。コントロールマウスと HIGA マウスにおいて質量顕微鏡にて分布に差を認めたいくつかの物質について質量分析を行ったところ、皮質周囲に分布のみられた分子量 844.6 の物質については、phosphatidylcholine と判明した。

(図 3)

また、PAS 染色にてマウス間に差を認めた尿細管障害に一致して分布に差のある物質を認めたが、こちらに関しては、現在解析中である。(図 4)

図 3 質量分析の結果 1

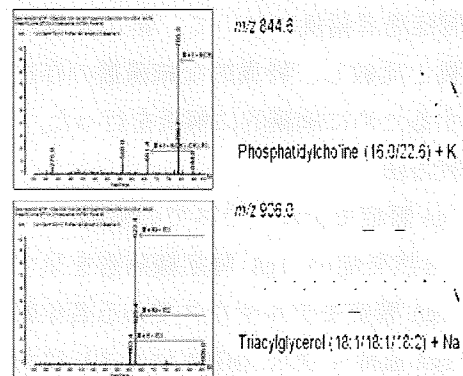
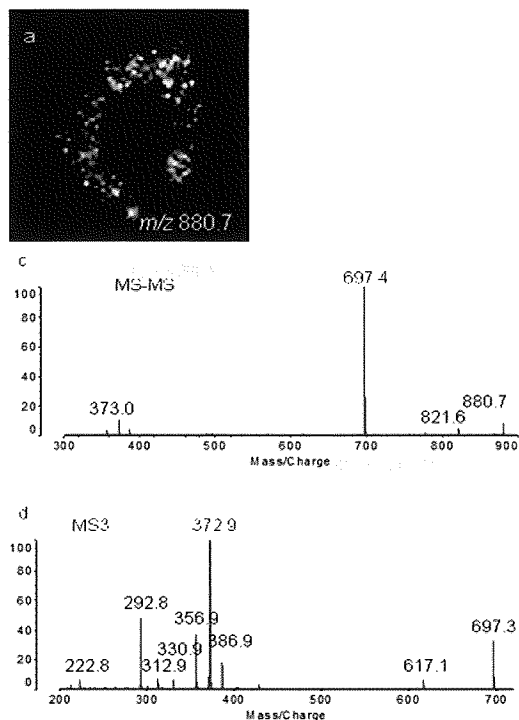
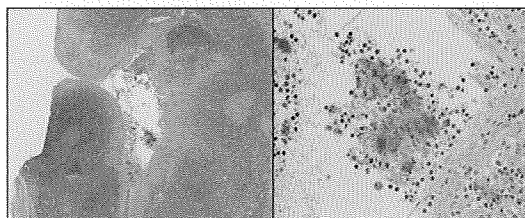


図4 質量分析の結果2



2. IgA 腎症患者と非 IgA 腎症患者における扁桃組織の形態学的検討  
 IgA 腎症ならびに非 IgA 腎症患者両者の扁桃においては、HE 染色にて陰窩部分に菌体と思われる部分を認めた。(図4)

図4 IgA 腎症患者扁桃組織における HE 染色



#### D. 考察

ヒト IgA 腎症腎組織における沈着物質と病原微生物との関連を明らかにすることが目的であるが、その前実験として IgA 腎症モデルマウスを使用し、質量顕微鏡による検討を行った。モデルマウス腎組織において、コントロールマウスと比較し性質の異なる

物質が沈着し、その分布にも差を認めることが明らかとなった。このことより、分布に差のある物質が何らかの IgA 腎症の病態に関与している可能性が示唆された。

#### E. 今後の予定

① 今後は質量顕微鏡を用いて、正常の腎組織ではどのような生体分子分布のパターンが得られるか、IgA 腎症もしくはそのモデルマウスで異なるパターンがみられるか、その中で、IgA 腎症のみに見られるピークがあれば、微生物由来である可能性など沈着物質の詳細を検討する。更に、本来の目的であるヒト IgA 腎症腎組織における検討については、2008 年 12 月の長崎大学大学院倫理審査委員会において本研究の承認が得られ、同意が得られた患者より腎生検組織の採取を開始したところである。引き続き症例数を増やししながら、ヒト腎生検組織での解析を開始する予定である。

③ IgA 腎症扁桃組織における網羅的解析に関しては、2009 年長崎大学病院倫理審査委員会承認後より検体収集中であり、2010 年 2 月末現在、IgA 腎症検体：7 例、非 IgA 腎症検体：4 例を採取した。今後は、IgA 腎症患者扁桃と非 IgA 腎症患者扁桃から、microdissection 法にて菌体部分を中心にゲノム DNA を抽出し、大規模シーケンスを用いた既知微生物ゲノムとの比較による微生物の網羅的解析を行う。また、IgA 腎症群扁桃に特異的な菌が同定された場合は、尿や腎組織における抗原検出や血清中の抗微生物抗体測定などを行う予定である。

#### F. 健康危機情報：特になし。

G. 研究発表  
論文.

1. Kurashige T, Abe K, Furuu A, Miyazaki M, Obata Y, Xia Z, Nakazawa M, Nakazawa Y, Funakoshi S, Harada T, Koji T, Kohno S: Renoprotective effect of azelnidipine in rats. *Biol Pharm Bull.* 31: 2237-44, 2008
2. Shinzato T, Abe K, Furuu A, Harada T, Shinzato K, Miyazaki M, Kohno S: Serum pro-hepcidin level and iron homeostasis in Japanese dialysis patients with erythropoietin (EPO)- resistant anemia. *Med Sci Monit.* 14: CR431-7, 2008
3. Abe-Yoshio Y, Abe K, Miyazaki M, Furuu A, Nishino T, Harada T, Koji T, Kohno S: Involvement of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in glomerular capillary repair in habu snake venom- induced glomerulonephritis. *Virchows Arch.* 453: 97- 106, 2008
4. Shinzato T, Furuu A, Nishino T, Abe K, Kanda T, Maeda T, Kohno S: Cowfish (Umisuzume, *Lactoria diaphana*) poisoning with rhabdomyolysis. *Intern. Med.* 47: 853-6, 2008
5. Nishioka Y, Miyazaki M, Abe K, Furuu A, Harada T, Ozono Y, Taguchi T, Koji T, Kohno S: Regeneration of peritoneal mesothelium in a rat model of peritoneal fibrosis. *Ren Fail.* 30: 97- 105, 2008
6. Xia Z, Abe K, Furuu A, Miyazaki M, Obata Y, Tabata Y, Koji T, Kohno S: Suppression of renal tubulointerstitial fibrosis by small interfering RNA

targeting heat shock protein 47. *Am J Nephrol.* 28: 34- 46, 2008

学会発表.  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



### III. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	巻	ページ	出版年
Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S	Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of <i>Candida glabrata</i>	Antimicrob Agents Chemother		DOI:10.1128 AAC 01364-09	2010
Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y	Anti- <i>Candida</i> -biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90 related stress responses.	Medical Mycology		DOI:10.3109 13693780903426721	2010
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
Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM and Tomonaga K.	Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes.	Nature	463	84-87	2010
Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y.	The effects of an hsp90 inhibitor on the paradoxical effect.	Jpn J Infect Dis	62(5)	392-393	2009
Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K.	HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes.	J Biol Chem	284	35060-72	2009

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	巻	ページ	出版年
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
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
Yoshida M, Nakayama K, Yasuda H, Kubo H, Kuwano K, Arai H, Yamaya M.	Carbocisteine inhibits oxidant-induced apoptosis in cultured human airway epithelial cells.	Respirology	14	1027-1034	2009
Yamaya M, Fujino N, Kubo H, Arai H.	Effects of pneumococcal vaccination on hospitalization and exacerbations in elderly Japanese chronic obstructive pulmonary disease patients.	Geriatr Gerontol Int	9	206-209	2009
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

