

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860648

研究課題名(和文)真菌関連過敏性肺炎の早期診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of early diagnostic methods for mycosis associated hypersensitivity pneumonia

研究代表者

原 信太郎 (HARA, Shintaro)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：60597087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：今回、真菌を原因抗原とする過敏性肺炎に対して早期診断法を確立するべく、1)HP13例の居住環境調査を行い、環境真菌相を明らかにした。2)HP患者の肺胞洗浄液の真菌培養を行った。3)真菌に対する特異抗体の存在の有無を免疫沈降法を用いて検討した。4)標準株を用いて真菌抗原を抽出する事に成功した。5)真菌抗原を用いて、健常者コントロール9例、HP患者3例の血液検体を用いたリンパ球刺激試験(LST)を行った。抽出した真菌抗原を用いたLSTは、HPの早期診断に繋がる可能性が高いと考えられる。また真菌抗原を用いて患者血清との免疫沈降法を行い、LSTとの相関を検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Many cases of mycosis associated hypersensitivity pneumonia (HP) have reported recently, and environmental fungi except Trichosporon have attracted additional attention, however early diagnostic methods have not been available. The main objective was the establishment of early diagnostic procedures for mycosis associated HP. First, we demonstrated major environmental fungi by environmental surveillance and fungal culture of thirteen HP cases. Second, we revealed fungal culture of bronchoalveolar lavage from HP patients. Third, we elucidated specific antibody against fungi by immunoprecipitation methods in 84 cases. Fourth, we succeeded fungal antigen extraction of several fungi found out from environmental surveillance. Fifth, we demonstrated negative results of lymphocyte stimulating test (LST) by four fungal antigen extracted standard strain in healthy volunteer. Then we demonstrated positive results of LST in three HP patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：真菌関連過敏性肺炎 住居関連過敏性肺炎 環境調査 肺胞洗浄 免疫沈降法 真菌抗原抽出 リンパ球刺激試験

1. 研究開始当初の背景

過敏性肺炎 (HP) の診断は 1990 年作成の診断基準が現在も利用されているが、原因抗原を特定するに至っては限られた施設での特異抗体検査や抗原によるリンパ球幼若化試験を行う必要があるなど困難な、推定できないことも多い。また、住居関連など真菌と関連がある HP の報告は増加しており、*Trichosporon* 以外の環境真菌の重要性も注目されているが、早期診断の手法は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究は真菌を原因抗原とする HP に対して早期診断法を確立するべく、環境真菌相や肺内に吸入された真菌など発症環境を把握し、また、原因として推定される真菌の標準株を用いて患者末血単核球/リンパ球の反応を理解することで HP 早期診断に繋がることを目的とする。

3. 研究の方法

住居関連性の慢性過敏性肺炎 (HP) などの真菌が関与する HP の早期診断法を確立すべく、【 】真菌関与 HP 患者の肺内に吸入された真菌 DNA を検出解析し、また、居住環境調査で環境真菌相を解析し、真菌関与 HP 患者において発症環境を解析する。【 】すでに HP の原因と報告されている真菌や環境調査で検出された真菌の標準株を用いて、患者単核球・リンパ球を刺激し、培養上清中のサイトカインプロファイルの解析 (AHP では Th1 サイトカイン優位に、また、CHP では Th2 サイトカイン優位になることが予想される) やリンパ球刺激 (幼若化) 試験を行い、真菌が HP 患者単核球/リンパ球に対する作用を解明する。

4. 研究成果

まず HP13 例の居住環境調査を行い、環境から採取した検体で真菌培養を施行し、よく検出される環境真菌相を明らかにした。また HP 患者の肺胞洗浄液の真菌培養を行い真菌の検出を試みた。次いで真菌に対する特異抗体の存在の有無を相模原病院の協力を得て、84 例で免疫沈降法を用いて検討した。続いて環境調査よりよく検出される真菌の 4 種類 (*Aspergillus flavus*, *Cladosporium*, *Acremonium* Sp, *Trichosporon* Sp) の標準株を用いて真菌抗原を抽出する事に成功した。この真菌抗原を用いて、健常者コントロール 9 例の血液検体を用いたリンパ球刺激試験 (LST) を行い、比較的陰性が多い結果を確認した。続いて HP 患者 3 例の血液検体を用いて同様の LST を施行したところ、有意に高値で陽性となることが判った (現在進行中)。この標準真菌株から抽出した真菌抗原を用いた LST は、HP の早期診断に繋がる可能性が高いと考えられ、さらに検討数を増やしていく予定である。また真菌抗原を用いて患者血清との免疫沈降法を行い、LST との相関を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Nakashima S, Kakugawa T, Yura H, Tomonaga M, Harada T, Hara A, Hara S, Nakano M, Yamasaki E, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Isomoto H, Gochuico BR, Suffredini AF, Mukae H, Kurazono H, Hirayama T, Moss J, Kohno S: Identification of *Helicobacter pylori* VacA in human lung and its effects on lung cells. *Biochemical and biophysical research communications* 460: 721-726,

2015 (査読有)

2. Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kakugawa T, Yura H, Tomonaga M, Harada T, Nakashima S, Hara S, Hara A, Ishimoto H, Yatera K, Mukae H, Kohno S: Elevated plasma alpha-defensins in patients with acute exacerbation of fibrotic interstitial pneumonia. *Respiratory medicine* 109: 265-271, 2015 (査読有)
3. Tomonaga M, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kakugawa T, Harada T, Nakashima S, Hara A, Hara S, Horai Y, Kawakami A, Mukae H, Kohno S: Comparison of Pulmonary Involvement Between Patients Expressing Anti-PL-7 and Anti-Jo-1 Antibodies. *Lung* 193: 79-83, 2015 (査読有)
4. Harada T, Ishimatsu Y, Nakashima S, Miura S, Tomonaga M, Kakugawa T, Hara S, Sakamoto N, Yoshii C, Mukae H, Kawabata Y, Kohno S: An autopsy case of hermansky-pudlak syndrome: a case report and review of the literature on treatment. *Intern Med* 53: 2705-2709, 2014 (査読有)
5. Ishimatsu Y, Koyama H, Tomonaga M, Harada T, Nakashima S, Hara A, Hara S, Kakugawa T, Sakamoto N, Hayashi T, Kohno S: A Japanese patient with Lofgren's syndrome with an HLA-DR12 allele and review of literature on Japanese patients. *Tohoku J Exp Med* 234: 137-141, 2014 (査読有)
6. Kakugawa T, Tabata K, Ogawara D, Tsuchiya T, Hara S, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Ashizawa K, Nagayasu T, Fukuoka J, Kohno S: Acute exacerbation of airspace enlargement with fibrosis. *Respiratory Medicine Case Reports* 13:

19-23, 2014 (査読有)

7. Kakugawa T, Yokota SI, Ishimatsu Y, Hayashi T, Nakashima S, Hara S, Sakamoto N, Kubota H, Mine M, Matsuoka Y, Mukae H, Nagata K, Kohno S: Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute interstitial pneumonia. *BMC pulmonary medicine* 14: 48, 2014
8. Sakamoto N, Ishimatsu Y, Koyama H, Kakugawa T, Hara S, Tomonaga M, Harada T, Nakashima S, Mukae H, Kohno S: Bronchiolitis in a patient with ulcerative colitis treated with erythromycin. *Intern Med* 53: 875-877, 2014 (査読有)
9. 石松祐二, 中島章大, 朝長正臣, 原田達彦, 原敦子, 原信太郎, 角川智之, 坂本憲穂, 福岡順也, 河野茂: BAL 液が白濁を呈さなかった骨髄異形成症候群に伴う続発性肺胞蛋白症の1例. *長崎医学会雑誌* 89: 130-135, 2014 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

1. Miyamura, T, Hara S, Ishimatsu Y, Sakamoto N, Kakugawa T, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor level could differentiate between pneumocystis jirovecii pneumonia and methotrexate-induced pneumonitis in patients with rheumatoid arthritis under methotrexate therapy. *Asian Pacific Society of Respiriology*. 2014. Bali Nusa Dua Convention Center (BNDCC), Bali, Indonesia

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：なし

6．研究組織

(1)研究代表者

原 信太郎（HARA, Shintaro）

長崎大学・病院（医学系）・助教

研究者番号：60597087