

肺アスペルギルス症克服への新しい試み —感染とアレルギー反応および病原因子対策—

小川 賢二

IRYO Vol. 63 No. 11 (695-701) 2009

要旨

アスペルギルス属真菌は感染症の起因菌としての側面とアレルギー疾患のアレルゲンとしての側面を持っている。肺アスペルギルス症の場合、空洞などの組織破壊病変を形成することが多い。またアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の場合は気管支拡張性病変を形成しやすい。このような肺既存構造の破壊因子として菌産生エラスターゼに注目した。アスペルギルス属から分離精製したエラスターゼはエラスターゼ活性のほか、コラゲナーゼ活性やフィブリノゲナーゼ活性を示し、モルモット肺に出血性肺炎をおこすことが確認された。一方菌自身がエラスターゼ阻害物質を産生することを発見し、その作用を検討したところエラスターゼ活性、コラゲナーゼ活性、フィブリノゲナーゼ活性を強力に阻害することがわかった。免疫不全マウスにアスペルギルス感染をおこし、アムホテリシン B: Amphotericin B (AMPH-B) にエラスターゼ阻害物質を併用して治療したところ、未治療群や AMPH-B 単独治療群に比べ、有意に生存率が高くなることが示された。以上のことからアスペルギルス産生エラスターゼは肺既存構造破壊因子として重要であり、その阻害物質の発見は新しい治療法の開発につながるのではないかと考えられた。

キーワード 肺アスペルギルス症, アレルギー, 肺既存構造破壊, エラスターゼ, エラスターゼ阻害物質

はじめに

肺アスペルギルス症は深在性真菌症の中で最も頻度が高く、また難治性の疾患として知られている。肺アスペルギルス症は宿主の状態により異なる病態を示し、全身性の免疫低下時に発症する侵襲性肺アスペルギルス症: Invasive pulmonary aspergillosis (IPA), 肺既存構造破壊を基礎疾患に持つ場合に発症する慢性型肺アスペルギルス: Chronic pulmo-

nary aspergillosis (CPA) 症, そして菌に対するアレルギー反応が主体となるアレルギー性気管支肺アスペルギルス症: Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA→739Pを参照) の3種類に分類される。この中で CPA におけるアレルギー的側面および ABPA における感染症的側面が注目されている。さらにアスペルギルス属の産生するエラスターゼは生体における菌の侵襲性に関与していることに加えアレルゲンとしても認知されており, 病原因

国立病院機構東名古屋病院 臨床研究部・呼吸器科
別刷請求先: 小川賢二 国立病院機構東名古屋病院 臨床研究部・呼吸器科 〒465-8620名古屋市長東区梅森坂5-101
(平成21年3月19日受付, 平成21年9月11日受理)

Emerging Therapeutic Approach for Pulmonary Aspergillosis: Infection, Allergic Reaction and Anti Pathogenic Factor
Kenji Ogawa, NHO Higashi Nagoya National Hospital

Key Words: pulmonary aspergillosis, allergy, destruction of pulmonary structure, elastase, elastase inhibitor.

表1 ABPAの診断基準⁷⁾

A：従来の診断基準（Rosenbergらの提唱した基準）

一次基準

1. 喘息
2. 末梢血好酸球増多
3. アスペルギルス抗原に対する即時型皮内反応陽性
4. アスペルギルス抗原に対する血清沈降抗体陽性
5. 血清総IgE値の上昇
6. 中枢性気管支拡張（胸部単純X線または気管支造影）
7. 肺浸潤影の既往（一過性または固定性）

二次基準

1. 喀痰中にアスペルギルス菌糸を検出
2. 茶褐色の粘液栓子を喀出
3. アスペルギルス抗原に対するアルサス型皮内反応陽性

診断

1. 確実：一次基準をすべて満たすもの
2. ほぼ確実：一次基準の6項目を満たすもの、二次基準のいくつかを満たせば確実性が増す

B：筆者らの提唱する診断基準

一次項目

1. 血清アスペルギルス特異的IgE抗体陽性、またはアスペルギルス抗原に対する即時型皮内反応陽性
2. 血清総IgE高値

二次項目

1. 気管支喘息（咳喘息を含む）の合併
2. 血清アスペルギルス沈降抗体陽性
3. 末梢血好酸球増多
4. 肺浸潤影の既往
5. 中枢性気管支拡張
6. アスペルギルス抗原に対するアルサス型皮内反応陽性
7. 喀痰中のアスペルギルス菌糸検出または培養陽性
8. 茶褐色粘液栓子の喀出

診断

確実：一次項目2項目を満たしかつ二次項目5項目以上を満たす

注意：7または8が認められる場合には感染症的側面に留意する

子として重要な物質であると考えられている。筆者らは肺アスペルギルス症における感染とアレルギー反応について、ABPA側からみた感染症的側面、CPA側からみたアレルギー的側面、両者に関連する病原因子としてのエラスターゼの関与および抗真菌菌治療におけるエラスターゼ対策の意義について、現在までに報告されている発表論文と自験例を基に考察した。

肺アスペルギルス症における感染とアレルギー反応

1. ABPAは臨床的にアレルギー反応が強く関与した気管支肺アスペルギルス症

Rosenberg & Patterson（以下、R&P）のABPAの診断基準¹⁾は、わが国においても長年広く用いられている。しかしながら、初発、急性期の基準であるため、病期が進展すると診断基準に合わなくなる。また国内外から喘息をともなわないABPAが報

告²⁻⁴⁾されているなど、逆に早期の場合も満たさない項目がある。これらの理由から、ABPA 診断基準の見直しが必要と考えられる。

比較的最近の欧米の臨床試験報告 2 報⁵⁾⁶⁾における ABPA 診断クライテリアはともに喘息、I 型アレルギー反応の存在を重視しているものの、血中好酸球増多や肺浸潤影の既往および中枢性気管支拡張の存在は問わないなど、R&P の診断基準を踏襲していない。また両報告ともに、ランダム化二重盲検試験にて、ステロイド治療中の ABPA 患者を対象にイトラコナゾール (ITCZ) 400mg/日×16週間投与群とプラセボ16週間投与群を比較し、ITCZ 投与群で有意な改善効果が認められている。この理由としては、気道上のアスペルギルスに対する除菌効果、すなわち抗真菌薬としての効果であろうと考察している。

以上のことを踏まえ、われわれは ABPA の診断基準の見直し案を考案した (表 1)⁷⁾。

一次項目は必須項目であり、アスペルギルス関連の I 型アレルギー反応を客観的に示すものである。また参考項目である二次項目の 7, 8 は菌の存在を示すものであり、ABPA の感染症的側面を考慮したものである。一次項目 2 項目を満たし、かつ二次項目 5 項目以上を満たしたものを、ABPA と診断する。

ABPA の診断においては R&P の提唱した診断基準にはこだわらず、臨床的にアレルギー反応が強く関与している気管支肺アスペルギルス症として捉えるのが妥当ではないかと考えている。

2. ABPA の感染症的側面が中枢性気管支拡張発症において重要

われわれが考案した ABPA 診断基準の二次項目の 1 つ、中枢性気管支拡張は予後に関連する重要な項目である。しかし重症の気管支喘息患者であっても、I 型アレルギー反応だけでは粘膜障害に留まり、構造破壊病変である気管支拡張にまでは至らないことがわかっている。一方、ABPA 患者喀痰から増殖可能なアスペルギルス生菌が検出されることがしばしばある。これは ABPA の感染症的側面を示唆するものであり、中枢性気管支拡張の発症にも関わる可能性が考えられる。そこでわれわれはアスペルギルス属が産生する菌体外タンパク質分解酵素エラスターゼに着目し、その肺組織障害性を調べた。

臨床分離 *A. fumigatus* 培養上澄液から精製した

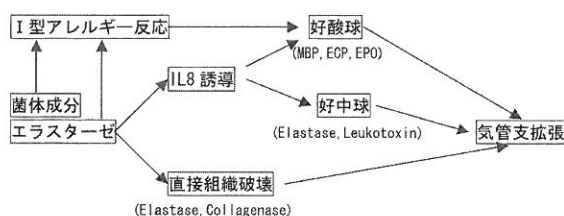


図 1 ABPA における中枢性気管支拡張病変形成の機序⁷⁾

エラスターゼは分子量32,000、至適温度37℃のセリンプロテアーゼであった。これはエラスターゼ基質、カゼイン、コラーゲン (I-IV) を分解する酵素活性を有し、毛細血管透過亢進作用、肺胞マクロファージ貧食抑制作用も示した。

モルモットの気管を切開し、細いカテーテルで肺内に精製エラスターゼを直接注入した。24時間後に肺を摘出し、肉眼で観察したところ、強い炎症がみられた。炎症部分の病理組織像でも、白血球の強い浸潤、赤血球やタンパクの漏出といった強い炎症所見を呈し、出血性肺炎の発症が確認できた⁸⁾。

ABPA における中枢性気管支拡張の発症機序をシェーマにて示す (図 1)⁷⁾。

エラスターゼや菌体成分により I 型アレルギー反応が誘起され気管支粘膜の破壊がおこる。しかし粘膜下層はこのアレルギー反応だけでは破壊されない。エラスターゼにはコラゲナーゼ作用もあり、とくに臓器の基底膜を構成するタイプ IV コラーゲンを分解するため、修復不可能な気管支拡張病変形成へ進展すると考えられる。なお中枢気道が特異的に破壊される機序は ABPA の場合、中枢気管支に Mucoid impaction of bronchi という粘液栓子病変を形成するためとされている。そしてこの粘液栓子からアスペルギルスが分離培養されることが多い。この病変形成がなぜ末梢でなく中枢であるのか明らかになっていないわけではないが、気管支喘息の場合主に中枢気管支に強いアレルギー反応をおこすためと考えられている。

ABPA の治療においては、菌を検出する症例では感染症的側面を考慮すべきである。従来のステロイド治療に加え、抗真菌薬を使用することにより、抗原除去や炎症起因菌の除去による気管支拡張症予防が期待でき、より効果的な治療を行える可能性がある。

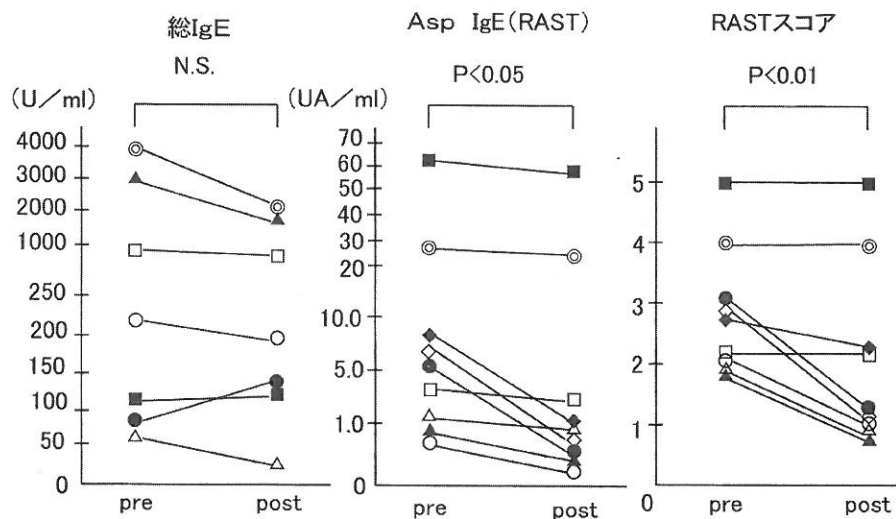


図2 抗真菌剤治療前後におけるIgE値の変化⁹⁾

3. 肺既存構造破壊性病変を持つ肺疾患患者はアスペルギルスに易感染性

慢性型肺アスペルギルス症であるアスペルギローマ: aspergilloma (AG) および慢性壊死性肺アスペルギルス症: chronic necrotizing pulmonary aspergillosis (CNPA) については、感染症病態でありながらアスペルギルス特異的IgE抗体陽性例を経験することがある。そこでわれわれは慢性型肺アスペルギルス症患者のIgE抗体産生性を調査した。

対象は、明らかなアレルギー性疾患を持たない慢性型肺アスペルギルス症 (AG および CNPA) 50例とした。調査項目は、年齢、性別、症状、画像所見、菌種、血清沈降抗体、血清抗原、血清総IgE抗体、血清アスペルギルス特異的IgE抗体 (RAST)、RASTスコアとした。RASTスコア0, 1, および2以上の3群に対象患者を分類し、それぞれR0, R1, R2群とした。調査項目の比較にあたっては、疑陽性にあたるR1群を除外した。

対象患者50例のうちR0群は19例、R1群は4例、R2群は27例であった。対象が感染症型であるにもかかわらず、半数以上にアスペルギルスに対するI型アレルギー反応が認められた。R0群とR2群との比較で、性別、年齢、症状、画像所見、菌種に有意な差は認められなかった。しかしR2群において、血清沈降抗体陽性率および血清総IgE値 (平均) が有意に高かった。また血清総IgE抗体に関しては、R0群はすべて正常範囲であったが、R2群では異常高値 (>200U/ml) が56%と有意に多かった。このことから、アスペルギルスは菌保者に対して特

異的なI型アレルギー反応を誘起しやすいことが推察された⁹⁾。またLuisらは、76例のcystic fibrosis患者のアスペルギルス特異的IgE抗体陽性率が64.5%と高率であったものの、ABPAの診断基準を満たしたのは10例のみであったことを報告¹⁰⁾している。

以上のことから、慢性破壊性病変をもつ肺疾患患者はアスペルギルスに感作されやすい可能性が考えられる。

4. 慢性型肺アスペルギルス症に対する抗真菌剤治療でアレルギー反応も改善

われわれは、抗真菌剤治療前後のデータ比較ができるCNPA9症例について、血清総IgE抗体、RAST、RASTスコアの治療後変化を検討した。

患者背景としては、性別は男8例、女1例、年齢 (歳) は60±14であった。治療薬剤はポリコナゾール (VRCZ) 単独4例、VRCZ+ミカファンギン (MCFG) 1例、MCFG+ITCZ 2例、ITCZ 1例、アムホテリシンB: Amphotericin B (AMPH-B) 単独1例であった。治療期間 (日) は62±22で、治療効果については全例有効であった。総IgE値は治療後低下する症例が多くみられたが、有意差は認めなかった。RAST、RASTスコアについては、治療後、有意な低下が認められた (図2)⁹⁾。

この変化に対する解釈としては、抗真菌薬による除菌効果、すなわちアレルギー反応的には抗原除去効果と考えられる。この結果より、感染症である慢性型肺アスペルギルス症であっても、アレルギー反

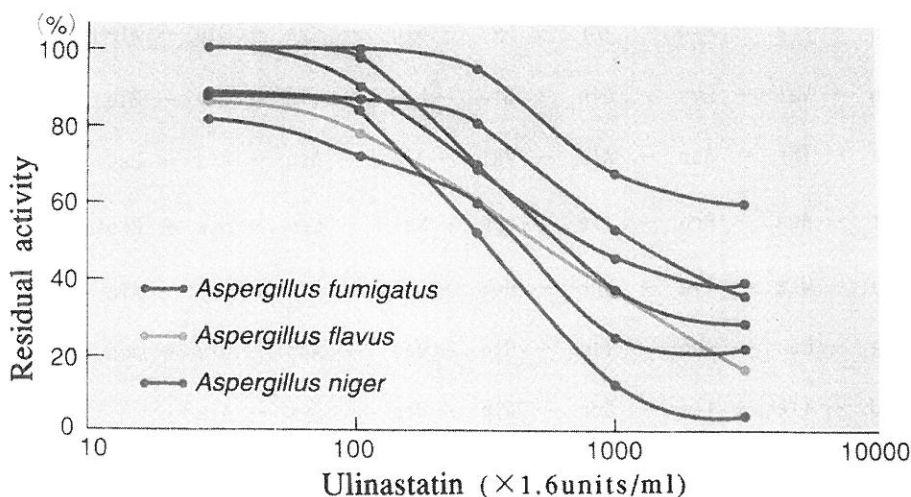


図3 各種アスペルギルス属産生エラスターゼに対するウリナスタチンの阻害効果¹²⁾

応の存在が明らかで、病態に悪影響を与えている場合には、ステロイド剤の併用も考慮すべきであろう。

肺アスペルギルス症の病原因子： エラスターゼとその対策

1. 強力なエラスターゼ阻害物質の発見は肺アスペルギルス症治療の新たな道を開く

アスペルギルス産生の菌体外タンパク質分解酵素エラスターゼは感染、炎症、アレルギーすべての面において病原因子として重要であり、その阻害物質の発見は肺アスペルギルス症の新しい治療法の開発につながる可能性を秘めている。われわれは強力なエラスターゼ阻害物質をみいだすべく、研究に鋭意取り組んでいた。

ウリナスタチンは、ヒト尿中から分離精製された分子量約67,000の糖タンパク質で、種々の膵臓酵素やヒト好中球の産生するエラスターゼを強力に阻害する。*A. flavus* をエラスチン含有の寒天平板培地で培養すると、菌の発育にともないエラスチン顆粒が分解するが、ウリナスタチン含有培地ではエラスチン顆粒が分解せず残存することをわれわれは確認している¹¹⁾。

各種アスペルギルス菌から精製したエラスターゼにウリナスタチンを直接作用させたところ、ウリナスタチンは濃度依存的にエラスターゼ活性を阻害した(図3)¹²⁾。

二木らは第35回日本胸部疾患学会総会において、免疫不全マウスに対するアスペルギルス感染実験で、ウリナスタチン前投与により、一定時間ではあるが、

菌が気道内に留まり、肺胞への侵襲性が低下すると報告した。その他にもウリナスタチンの有効性を示す報告¹³⁾¹⁴⁾がいくつかなされているが、治療至適濃度や保険適応の問題などがあり、現在ではその研究を中断している。

われわれのグループは、アスペルギルス自身が産生するエラスターゼ阻害物質：*Aspergillus flavus* elastase inhibitor (AFLEI) を発見し、2004年 Journal of Medical Mycology (JMM) に発表した¹⁵⁾。

AFLEIは分子量約7,500で、その一次構造(図4)¹⁶⁾は、*A. fumigatus* Af293が産生する構造既知の機能未知タンパク質としてNatureに2005年に発表されたAfu3g14940のアミノ酸配列と一部一致することが判明した¹⁷⁾。

AFLEIのエラスターゼ阻害活性を調べたところ、*A. flavus* および *A. fumigatus* 産生のエラスターゼおよびヒト好中球産生エラスターゼ活性に対し強い阻害効果を示し、コラゲナーゼ活性などにも阻害効果があることがわかった。また、*A. flavus* 産生エラスターゼおよびヒト好中球エラスターゼに対する阻害効果を、他のエラスターゼ阻害物質(ウリナスタチン、メシル酸ナファモスタット、シベレスタットナトリウム水和物、メシル酸ガベキサート、エラストチナール、エラフィン)と比較検討した。AFLEIは他阻害物質に比し、きわめて低濃度で50%阻害作用を示すことがわかった¹⁸⁾。

A. flavus 産生エラスターゼのみを直接投与したラット肺では強い炎症所見がみられたが、エラスターゼとAFLEIの混合液を投与したラット肺にはほとんど炎症がみられなかった。またそれらの組織を

Asp — Pro — Ala — Thr — Cys — Glu — Lys — Glu — Ala — Gln
 Phe — Val — Lys — Gln — Glu — Leu — Ile — Gly — Gln — Pro
 Tyr — Thr — Asp — Ala — Val — Ala — Asn — Ala — Leu — Gln
 Ser — Asn — Pro — Ile — Arg — Val — Leu — His — Pro — Gly
 Asp — Met — Ile — Thr — Met — Glu — Tyr — Ile — Ala — Ser
 Arg — Leu — Asn — Ile — Gln — Val — Asn — Glu — Asn — Asn
 Glu — Ile — Ile — Ser — Ala — His — Cys — Ala

Molecular weight : 7525.8 (TOF-MASS)
 Heat stability : 80°C, 10min...50%(residual activity)
 pH stability : Stable (pH 6~10)
 Sugar : non

図4 エラスターゼ阻害物質：AFLEIの一次構造¹⁶⁾

病理学的に観察したところ、エラスターゼと AFLEI の混合液を投与した組織では非常に軽微な炎症に留まっていることも判明した¹⁹⁾。

2. 抗真菌薬とエラスターゼ阻害物質との併用でより高い治療効果

A. *flavus* 感染の免疫抑制マウスを用い、薬剤未投与群、AMPH-B 低用量群、AMPH-B 高用量群、AFLEI と AMPH-B 併用群のそれぞれの治療効果を、マウス生存率にて評価した。AFLEI と AMPH-B 併用群では、薬剤未投与群、AMPH-B 単独投与群に比し、生存率が高くなる傾向が認められた (図5)¹⁹⁾。

さらにわれわれは、ヒトへの感染が多い A. *fumigatus* が産生するエラスターゼ阻害物質 (AFUEI) と AFLEI の一次構造が完全に一致することを確認した²⁰⁾。このことから、これら阻害物質はアスペルギルス属が普遍的に持つ物質ではないかと考えられる。

以上の結果より、アスペルギルス属が産生するエラスターゼには病原性があると考えられ、肺アスペルギルス症の治療において抗真菌薬にエラスターゼ阻害物質を追加することは、非常に有意義であると思われる。強力なエラスターゼ阻害物質の発見は、肺アスペルギルス症治療に新たな道を開く可能性がある。

アスペルギルス産生エラスターゼは感染、炎症、

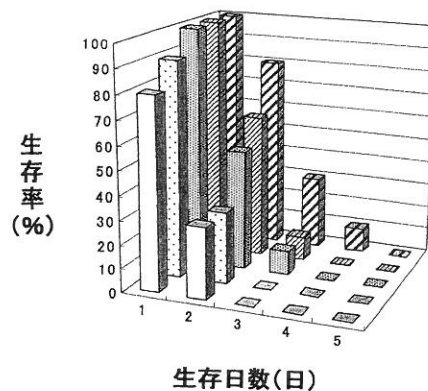


図5 *Aspergillus flavus* 感染免疫抑制マウスにおける生存率¹⁹⁾

アレルギーのすべての面において病原因子として重要であり、その阻害物質発見は新しい治療法の開発につながるのではないかと考えられた。

[文献]

- 1) Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R et al. Clinical and immunological criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. Am Intern Med 1977 ; 86 : 405-14.

- 2) 北 英夫, 小林良樹, 山下健三ほか. 気管支粘膜生検所見を検討した喘息症状を伴わないアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の1例. 日呼吸会誌 2003; 41: 411-5.
- 3) 吉田ナガミ, 勝呂 元, 小原富士夫ほか. 気管支喘息を伴わないアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の1例. 気管支肺アスペルギルス症の1例. 日胸疾患会誌 1992; 30: 2127-33.
- 4) 久保雅子, 工藤宏一郎, 越野 健ほか. 慢性気道感染を合併した喘息症状のないアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の1例. 日胸疾患会誌 1997; 35: 698-704.
- 5) Stevens DA, Schwarts HJ, Lee JY et al. A randomized trial of itraconazole in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *N Engl J Med* 2000; 342: 756-62.
- 6) Wark PAB, Hensley MJ, Saltos N et al. Anti-inflammatory effect of itraconazole in stable allergic bronchopulmonary aspergillosis: A randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 952-7.
- 7) 小川賢二, 中川 拓. アレルギー性気管支肺アスペルギルス症. 呼吸器症候群II. 第2版. 大阪: 日本臨牀社; 2009: p30-3.
- 8) 小川賢二, 長谷川洋一, 二改俊章ほか. *Aspergillus fumigatus* から産生されるエラスターゼ-病原因子としての意義と対策-. 日医真菌会誌 1997; 38: 149-53.
- 9) 小川賢二, 垂水 修. 病原体-宿主応答の視点から見た真菌感染症: 肺アスペルギルス症とアレルギー反応. *臨と微生物* 2007; 34: 691-6.
- 10) Luis M, Manuela C, Santiago Q et al. Serologic IgE immune response against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in patient with cystic fibrosis. *Chest* 2002; 121: 782-8.
- 11) 小川賢二, 滝 文男, 高木健三ほか. アスペルギルス属のエラスターゼ産生能と薬剤によるエラスターゼ活性阻害の検討. *呼吸* 1992; 11: 880-6.
- 12) 長谷川洋一, 二改俊章, 吉川幸江ほか. アスペルギルス属由来のエラスターゼ活性とウリナスタチンによる阻害. 日医真菌会誌 1994; 35: 293-8.
- 13) 前崎繁文, 河野 茂, 田中研一ほか. AMPHの空洞内注入とウリナスタチンの併用が有効であったアスペルギローマの1例. 日胸疾患会誌 1993; 31: 1327-31.
- 14) 杉村 悟, 吉田耕一郎, 大場秀夫ほか. Non-immunocompromised hosts に発症したアスペルギルス肺炎の2症例. 日胸疾患会誌 1994; 32: 1032-7.
- 15) Okumura Y, Ogawa K, Nikai T. Elastase and elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *J Med Microbiol* 2004; 53: 351-4.
- 16) Okumura Y, Ogawa K, Uchiya K et al. Characterization and primary structure of elastase inhibitor, AFLEI from *Aspergillus flavus*. *Jpn J Med Mycol* 2007; 48: 13-8.
- 17) Nierman WC, Pain A, Anderson MJ et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2005; 438: 1151-6.
- 18) Okumura Y, Ogawa K, Uchiya K et al. Isolation and characterization of a novel elastase inhibitor, AFLEI from *Aspergillus flavus*. *Jpn J Med Mycol* 2006; 47: 219-24.
- 19) Okumura Y, Ogawa K, Uchiya K et al. Biological properties of elastase inhibitor, AFLEI from *Aspergillus flavus*. *Jpn J Med Mycol* 2008; 49: 87-93.
- 20) Okumura Y, Matui T, Ogawa K et al. Biochemical properties and primary structure of elastase inhibitor AFUEI from *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 2008; 57: 803-8.