

総 説

慢性型肺アスペルギルス症の臨床的検討および エラスターゼ阻害物質の検討

小川 賢二¹ 奥村 欣由² 二改 俊章²
垂水 修¹ 中川 拓¹ 齊藤 裕子¹

¹独立行政法人国立病院機構東名古屋病院臨床研究部/呼吸器科

²名城大学薬学部微生物学研究室

要 旨

当院で経験した慢性型肺アスペルギルス症（アスペルギローマ，慢性壊死性肺アスペルギルス症）59症例の臨床的検討を行なった。本症の診断には，レントゲン画像，喀痰検査，血清学的検査が主に行なわれていた。画像所見は，菌球型が47%，空洞壁肥厚型が32%を占めた。喀痰培養で検出した菌は，*A. fumigatus*が78%，*A. niger*が13%，*A. flavus*が2%であった。血清学的検査では沈降抗体陽性率が81%，抗原陽性率が11%，β-Dグルカンが基準値を上回った症例が39%であった。また，臨床症状として，血痰，喀血が高頻度に認められた。治療法は，抗真菌剤の全身投与，局所投与が行われていた。薬剤としては主にアムホテリシンB，イトラコナゾール，ミカファンギンが使用されていた。この他補助療法として，エラスターゼ阻害剤であるミラクリッドの併用やアレルギーの要素が関与していると考えられる症例にはステロイドの併用も行なわれていた。ミカファンギンを使用した慢性壊死性肺アスペルギルス症の6例は，全例に画像改善が認められた。

病原因子としてアスペルギルス属の産生するエラスターゼに注目していたが，菌自身が産生するエラスターゼ阻害物質を発見した。各種アスペルギルス属の臨床分離株の培養上清についてスクリーニングを行ったところ，*A. fumigatus*は12株中5株，*A. flavus*は2株中1株の培養上清に強い阻害活性が認められた。*A. niger*では弱い阻害活性を認めた。*A. fumigatus* 5株と*A. flavus* 1株の培養上清（粗阻害物質）は熱に安定で，ヒト白血球エラスターゼにも阻害作用をみとめたが，ブタ膵エラスターゼには阻害作用をほとんど認めなかった。今後，臨床応用を目指してさらなる研究を継続して行く予定である。

Key words: アスペルギローマ (aspergilloma), 慢性壊死性肺アスペルギルス症 (chronic necrotizing pulmonary aspergillosis), 病原因子 (pathogenic factor), エラスターゼ阻害物質 (elastase inhibitor)

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，中でも慢性型であるアスペルギローマと慢性壊死性肺アスペルギルス症が多数を占めている。慢性型肺アスペルギルス症は肺に既存構造破壊がある患者に発生しやすく，当院は特に遺残空洞を伴う肺結核後遺症患者の診療機会が多いため，本症と診断し治療する症例が多い。そこで，当院における診断治療の実態を検討した。また，本学会にアスペルギルス属の病原因子として報告してきたエラスターゼに対する菌自身が産生する阻害物質を発見したので合わせて報告する。

慢性型肺アスペルギルス症の臨床的検討

対象および方法

当院にて，下記の診断基準に従って慢性型肺アスペルギルス症と診断した59症例（1996年度29例，2004年度30例）を対象とした。これらの症例に対し年齢層，性別，合併症，画像所見，菌種，血清アスペルギルス沈降抗体，血清アスペルギルス抗原，血清β-Dグルカン，血清アスペルギルス特異的IgE抗体（RAST），治療法，予後を調査した。また，ミカファンギン治療を行った16例に対し，病型，使用量，治療期間，併用薬，有効性，後治療の有無について検討した。なお，両年度で検討事項に差がなかったため59症例にまとめた。

診断基準

臨床症状（発熱，血痰，喀血など），経過，画像所見などにより真菌感染が強く疑われ，かつ1～4のいずれか

別刷請求先：小川 賢二

〒465-8620 名古屋市名東区梅森坂5-101
独立行政法人国立病院機構東名古屋病院

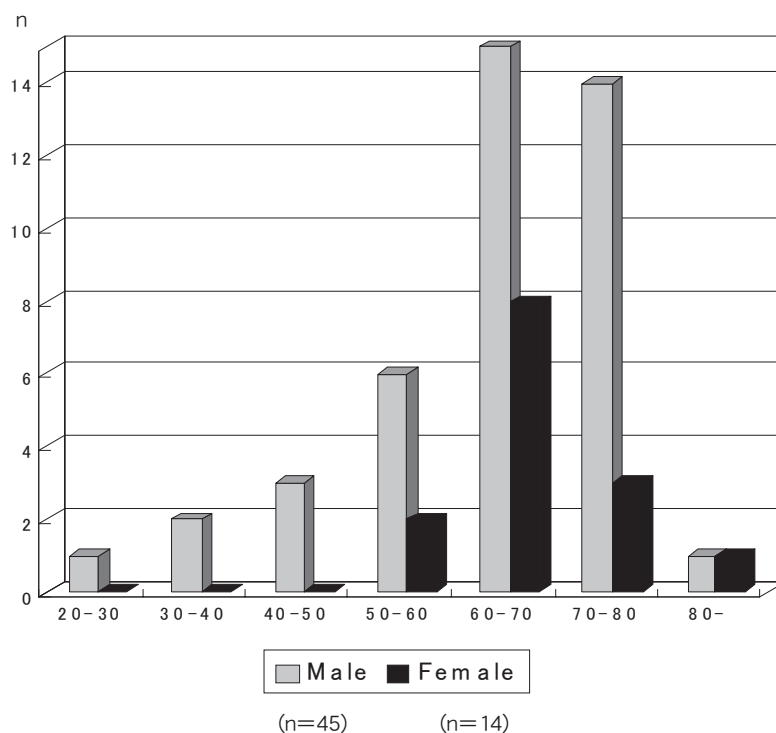


Fig. 1. Age and sex of patients with chronic pulmonary aspergillosis.

Age: 24-81 (mean 65) (y.o.)

を満たすものとした。1. 喀痰, BALF, 肺組織, 気管内採痰などの培養検査でアスペルギルスを分離。2. TBLB, 経皮肺生検などの病理学的検査, または直接鏡検で糸状菌を確認。3. 血清アスペルギルス沈降抗体陽性または血清アスペルギルス抗原陽性。4. 血液, BALF, 気管内採痰, 経皮肺吸引液などから PCR によりアスペルギルス遺伝子を検出。

結果と考察

年齢幅は24~81歳で平均は65歳, 男性45名, 女性14名, 男女共に60歳代にピークを認めた (Fig. 1)。合併症で最も多かったのは糖尿病で14%, ついでC型肝炎, 非結核性抗酸菌症が共に10%を占めた。主な臨床症状は, 咳, 痰, 発熱, 血痰, 咯血であった。特に血痰, 咯血は68%に認めた。胸部レントゲン所見は菌球型が48%と最も多く, 空洞壁肥厚型が32%であり, 20%の症例は浸潤影や斑状影など特徴的な陰影は示さなかった。慢性壊死性肺アスペルギルス症はアスペルギローマからの進展と考えられる症例が多かった。喀痰培養により菌を検出した症例は45例でそのうち35例78%が *A. fumigatus* であった。ついで *A. niger* が13%, *A. flavus* が2%, 13%は菌種を同定出来なかった。血清検査データは, 沈降抗体陽性率が57例中46例で80%, 抗原陽性率は45例中5例で11%と少なかった。β-Dグルカンは基準値を上回ったのが46例中18例で39%, アスペルギルス特異的IgE抗体が基準値を上回ったのが40例中24例で60%と多かった (Table 1)。

真菌の中でもアスペルギルスはアレルギーとの関連が

Table 1. Serological examination

Positive rate of serum <i>Aspergillus</i> precipitating antibody	(n=57) 80% (46/57)
Positive rate of serum <i>Aspergillus</i> antigen	(n=45) 11% (5/45)
Rate of serum β-D glucan exceeding reference value 20 (pg/ml)	(n=46) 39% (18/46)
Rate of serum specific IgE antibody exceeding reference value 0.34 (μg/ml)	(n=40) 60% (24/40)

深く, 慢性型感染症の場合, 長期に渡って抗原が生体に存在することにより, 特異的IgE抗体を産生し易くなっている可能性がある。当院では空洞内の菌球が治療により消失すると共に特異的IgE抗体値が低下する症例を経験している。治療法は抗真菌剤の全身投与, 局所投与が行われていた。アムホテリシンBは吸入, 局注, 静注, イトラコナゾールは経口, ミカファンギンおよびアンビゾームは静注で投与されていた。アスペルギローマの場合, 可能な症例には切除術が施行されていた。この他, 血痰, 咯血を呈する症例にはエラスターゼ阻害剤であるウリナスタチンが, 喘鳴などの症状を伴いアスペルギルスの RAST 値が高い症例には内服のステロイド剤が併用されていた。また, コントロール不能な咯血症例には気管支動脈塞栓術が行われていた。

今回新規抗真菌剤として2002年末より使用されているミカファンギンについて当院での治療16症例について検討した。病型はアスペルギローマが10例, 慢性壊死

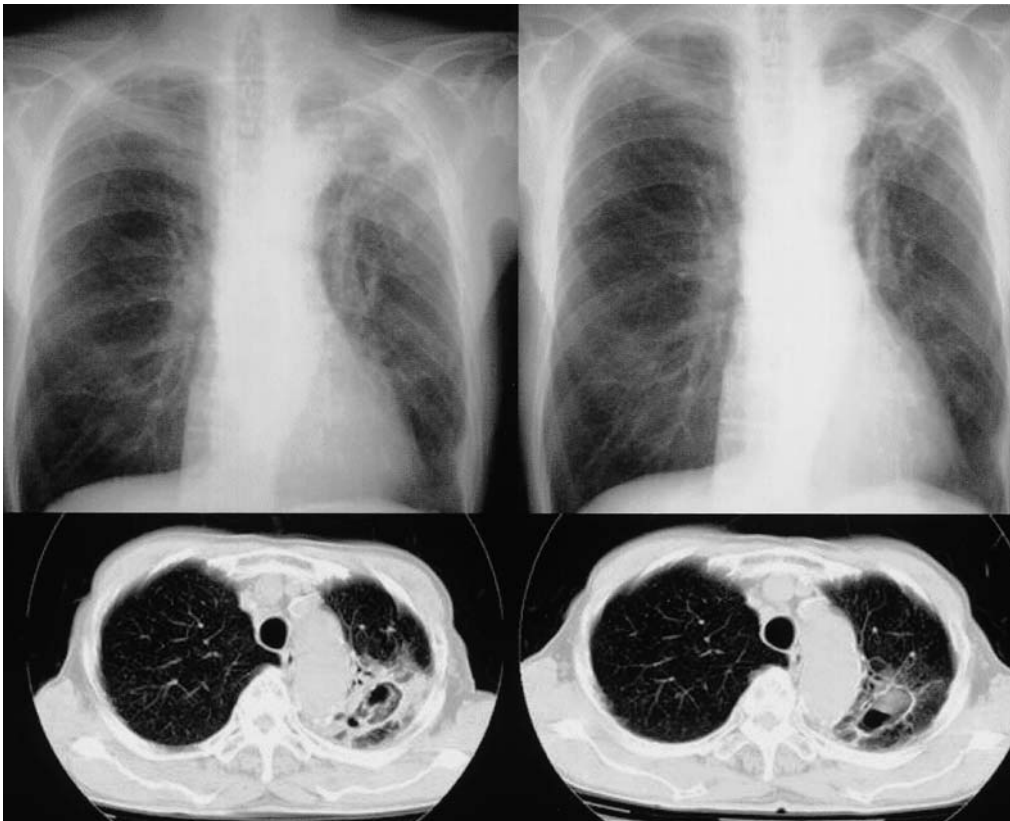


Fig. 2. Chest X-rays, CT findings before and after treatment with micafungin. Cavity ambient infiltrating shadow in the left upper lung field are remarkably improved.

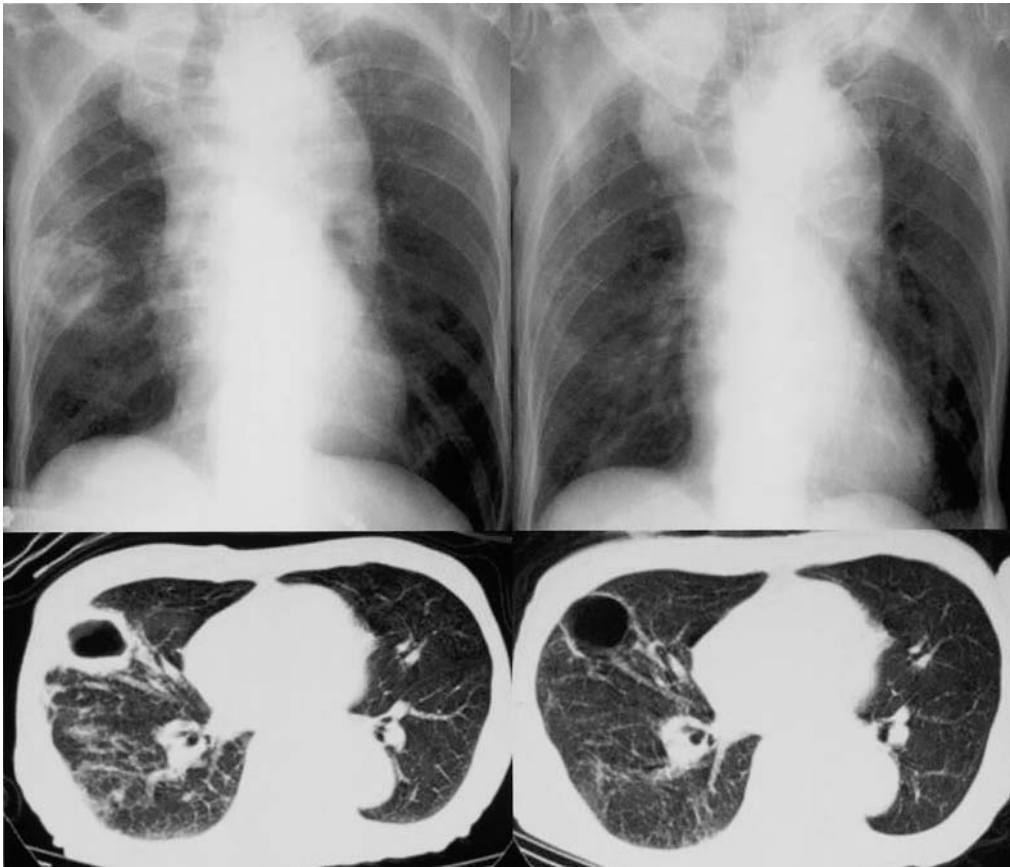


Fig. 3. Chest X-rays, CT findings before and after treatment with micafungin. Cavity and infiltrating shadow in the right middle lung field are improved

性肺アスペルギルス症が6例で、使用量は体重の少ない2例を除き14例が150 mg/日であった。平均使用期間は45日、抗真菌剤の併用は5例で、すべてイトラコナゾールであった。有効性についてみると、症状改善が12例(80%)、画像改善が7例(47%)、この7例中6例は慢性壊死性肺アスペルギルス症であり、結果慢性壊死性肺アスペルギルス症は全例画像改善が得られた。また、治療前に菌を検出した8例は全例陰性化した。ミカファンギン治療後にイトラコナゾールによる後治療が全例になされていた。慢性型肺アスペルギルス症の治療期間は長期化しており、今後は適正治療期間の検討が重要であると考えられた。ミカファンギン治療により約3週間の経過で画像が著明に改善した2症例を提示する (Fig. 2, Fig. 3)。

ま と め

1. 本症の罹患者は男性(76%)が多かった。
2. 合併症は糖尿病(14%)が多かった。
3. 症状としては血痰、咯血が頻発していた。
4. 画像所見は菌球形(48%)が多かった。
5. 分離培養した菌種は *A. fumigatus* が78%を占めた。
6. 血清アスペルギルス沈降抗体は陽性率が80%と高かった。
7. 血清アスペルギルス抗原は陽性率が11%と低かった。
8. 血清 β -Dグルカンの基準値を上回ったのは39%だった。
9. アスペルギルス特異的IgEが基準値を上回ったのは60%にのぼった。
10. 6ヵ月以内の治癒率は15%と低かった。

エラスターゼ阻害物質の検討

病原因子としてのエラスターゼ

我々は、アスペルギルス属の産生するエラスターゼが菌の病原因子に関与していることを報告してきた。その内容は要約すると下記の6項目になる。

1. *A. fumigatus* および *A. flavus* からエラスターゼを精製した^{1, 2)}。
2. 本酵素はエラスターゼ活性のみならず強いコラゲナーゼやフィブリノゲナーゼ活性も示し、臓器の基底膜を構成する type IV collagen を分解することが分かった³⁾。
3. 本酵素は健常モルモット肺に強い出血性肺炎を誘起した³⁾。
4. 本酵素はマウス肺胞マクロファージの活性を抑制した³⁾。
5. 肺アスペルギルス症患者から分離した菌株の本酵素産生性は90%を上回った。
6. 肺アスペルギルス症患者に対し、抗真菌剤に加えウリナスタチンを併用することにより、咯血・血痰などの臨床症状が早期に改善した⁴⁾。

エラスターゼ阻害物質の発見と阻害活性

ウリナスタチンのエラスターゼ阻害活性には限界があり、高濃度でも50%阻害程度であったため、新たな阻害物質の存在を探索していた。*A. flavus* の臨床分離株のエラスターゼ産生性をスクリーニングしている時にエラスターゼ活性の急に低下する時期があることに気付いた。Fig. 4はエラスチンを窒素源にして菌を培養しそのエラスターゼ活性を折れ線グラフに示している。2日前後でエラスターゼ活性が認められ、6日前後でその活性は下

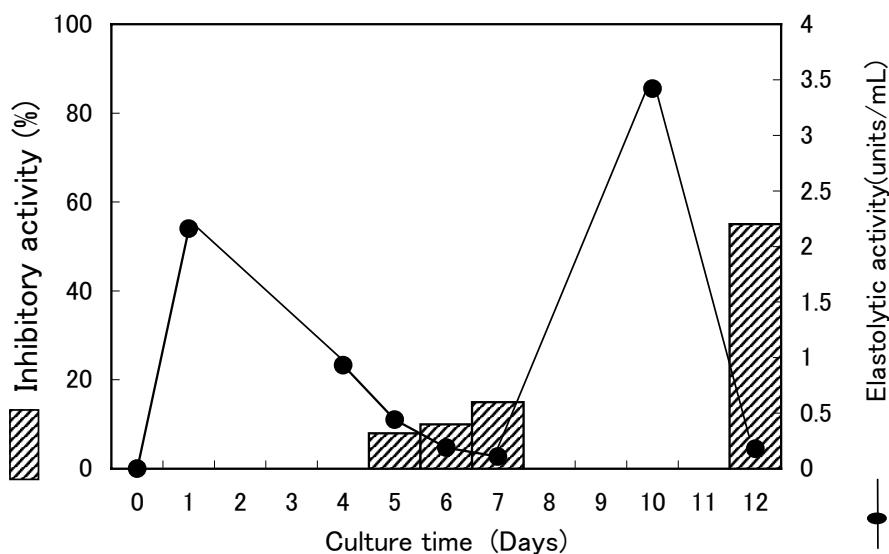


Fig. 4. Elastolytic and inhibitory activity of culture filtrate from *Aspergillus flavus* elastase activity (line graph) is recognized around the 2nd, and the activity falls around the 6th.

This revealed inhibitory activity (bar graph) when equivalently mixed culture supernatants and suggested the presence of an elastase inhibitor.

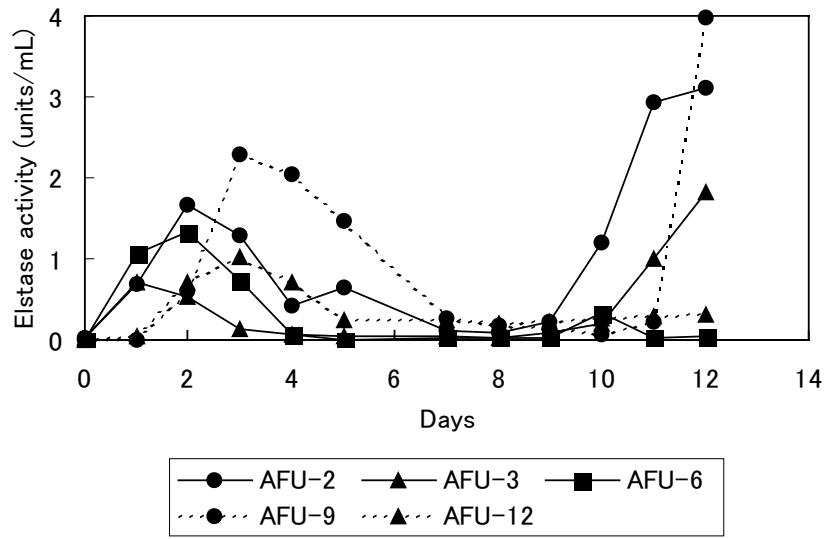


Fig. 5. Elastase activity of *Aspergillus fumigatus*. (AFU)

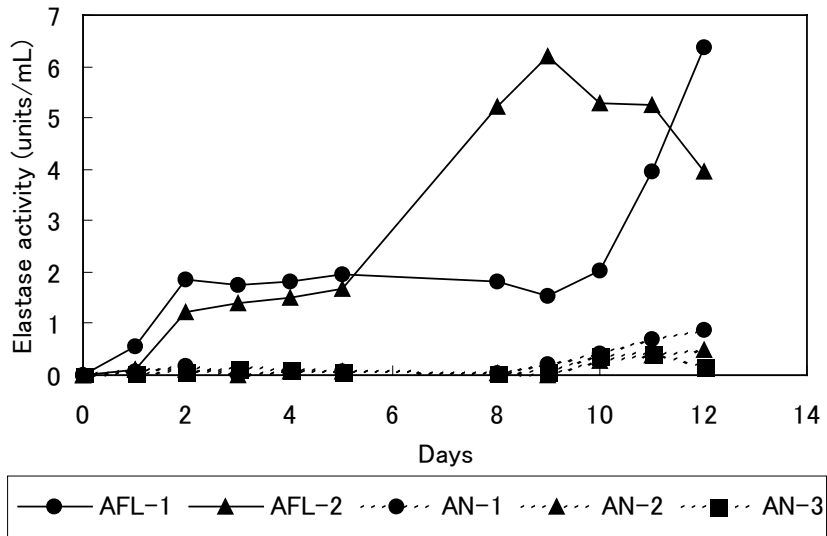


Fig. 6. Elastase activity of *Aspergillus flavus* (AFL) and *Aspergillus niger* (AN)

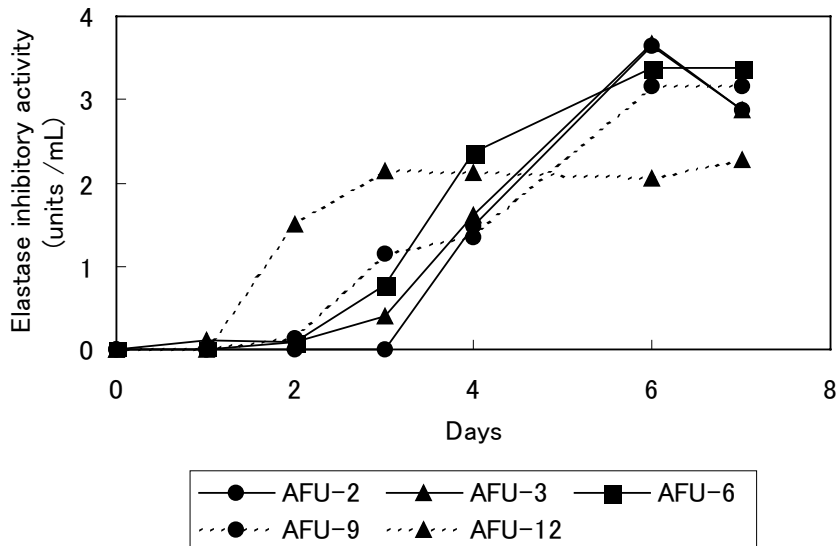


Fig. 7. Elastase inhibitory activity of *Aspergillus fumigatus* (AFU)

がっている。そこで、試みに5, 6, 7, 12日の培養ろ液と精製したエラスターゼを等量混合してエラスターゼ活性を調べたところ阻害活性(棒グラフ)が見られ、エラスターゼ阻害物質の存在が示唆された。窒素源をカザアミノ酸にしたときが最も阻害活性があったので、カザアミノ酸を用いてエラスターゼ阻害物質を産生させ、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過により精製した。このようなエラスターゼ活性の変化、エラスターゼ阻害物質の産生は *A. fumigatus* や *A. niger* の臨床分離株でも認められた⁵⁾。

エラスターゼ阻害物質のスクリーニング

A. fumigatus 12株, *A. flavus* 2株, *A. niger* 3株の臨床分離株を用い、エラスチンを窒素源とした培地でエラスターゼを産生させ (Fig. 5, Fig. 6) またカザアミノ酸を窒素源とした培地でエラスターゼ阻害物質を産生させた (Fig. 7, Fig. 8). *A. fumigatus* は AFU, *A. flavus* は AFL, *A. niger* は AN として表した。それぞれの培養上清にエラスターゼとエラスターゼ阻害活性を認め、特に AFU の5株, AFL の1株の培養上清(粗阻害物質)には強いエラスターゼ阻害活性が認められた。なお、今回のデータからはエラスターゼ産生および阻害物質産生の時間的関連について一定の傾向を認めなかった。これらの粗阻害物質は100°C 10分の加熱処理に対し安定であった (Fig. 9)。アスペルギルス由来のエラスターゼ、ヒト白血球エラスターゼに阻害作用を認めたが、ブタ膵エラスターゼに対しては阻害作用をほとんど認めなかった (Table 2)。

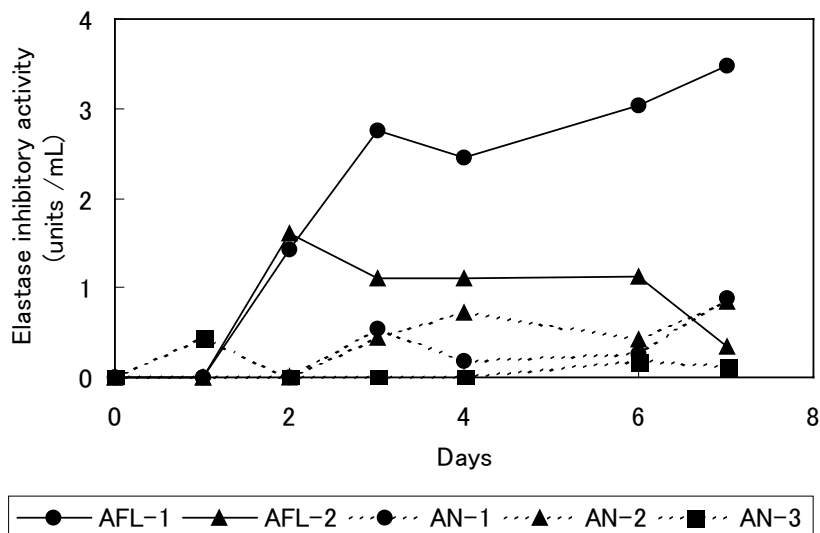


Fig. 8. Elastase inhibitory activity of *Aspergillus flavus* (AFU) and *Aspergillus niger* (AN)

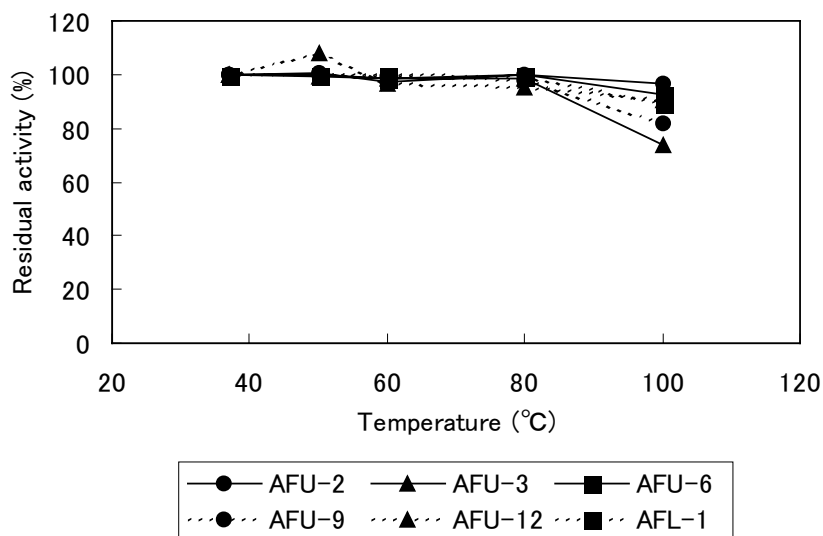


Fig. 9. Heat stability of culture supernatant from *Aspergillus* spp.

AFU: *Aspergillus fumigatus*

AFL: *Aspergillus flavus*

Table 2. Inhibitory effect of culture supernatant from *Aspergillus* on pancreas and leukocyte elastase

Culture supernatant from <i>Aspergillus</i>	Inhibitory activity (%)	
	Elastase from pancreas	Elastase from leukocytes
AFU-2	0	52.2
AFU-3	0	36.8
AFU-6	12.1	23.9
AFU-9	11.1	33.6
AFU-12	6.5	54.6
AFL-1	0	27.4

AFU: *Aspergillus fumigatus*AFL: *Aspergillus flavus*

ま と め

1. *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*の臨床分離株がエラスターゼ阻害物質産生能を有することを発見した。*A. niger*による阻害活性は弱かった。
2. 本粗阻害物質は、熱に安定であった。
3. 本粗阻害物質は、アスペルギルス属由来のエラスターゼ、およびヒト白血球エラスターゼの活性を阻害した。

文 献

- 1) Hasegawa Y, Nikai T, Yamasita R, Yoshikawa Y, Sugihara H, Ogawa K, Mizuno M: Isolation and characterization of elastolytic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. Jpn J Med Mycol **36**: 235-243, 1995.
- 2) Hasegawa Y, Nikai T, Okumura Y, Ogawa K, Sugihara H: Characterization of elastolytic proteinase from *Aspergillus flavus*. Comparison of biochemical properties to the elastolytic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. Jpn J Med Mycol **38**: 53-59, 1997.
- 3) 小川賢二, 長谷川洋一, 二改俊章, 杉原久義, 高木健三: *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-. 真菌誌 **38**: 149-153, 1997.
- 4) 小川賢二: 肺アスペルギルス症の診断と治療 - 肺アスペルギルス症の内科的治療-. 結核 **72**: 59-64, 1997.
- 5) Okumura Y, Ogawa K, Nikai T: Elastase and elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. J Med Microbiol **53**: 351-354, 2004.

Clinical Analysis of Chronic Pulmonary Aspergillosis and Discovery of a Elastase Inhibitor

Kenji Ogawa¹, Yoshiyuki Okumura², Toshiaki Nikai²,
Osamu Tarumi¹, Taku Nakagawa¹, Yuko Saitou¹

¹Department of Pulmonary Medicine, National Higashinagoya Hospital
5-101 Umemorizaka, Meito-ku, Nagoya, Aichi 465-8620, Japan

²Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University
150 Yagotoyama, Tenpaku-ku, Nagoya, Aichi 468-8503, Japan

We studied the clinical features of 59 chronic pulmonary aspergillosis cases (aspergilloma, chronic necrotizing pulmonary aspergillosis) which we experienced in our hospital. To diagnose this disease, X-rays, sputum culture and serologic tests were mainly examined, X-ray findings were a fungus ball type in 47% of cases and thickened wall of a cavity type in 32%. Positive sputum culture found was *A. fumigatus* 78%, *A. niger* 13% and *A. flavus* 2%. Positive rates of serologic tests showed precipitating antibody 81% and antigen 11%; 39% of β -D glucan exceeded the reference value. As clinical symptoms, bloody sputum and hemoptysis were found at high frequency. Antifungal agents were administered intravenously or topically for treatment, primarily AMPH-B, ITCZ and MCFG. As adjuvant therapy, we administered Ulinastatin which is an elastase inhibitor for use against hemoptysis, and we performed steroid combination for cases considered to be associated with allergy. In all of 6 cases of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis which were administered MCFG, X-ray findings improved.

A pathogenic factor, elastase was isolated from *Aspergillus* spp., and we also found the elastase inhibitor from this series. Five of 12 strains of *A. fumigatus*, and one of 2 strains of *A. flavus* expressed elastase inhibitory activity when we screened for the culture supernatant of various *Aspergillus* spp. of a clinical isolate. Elastase inhibitory activity from *A. niger* was very weak. Culture supernatants from 5 strains of *A. fumigatus* and one strain of *A. flavus* were stable for a fever, and human leucocyte elastase was inhibited, but these did not inhibit porcine pancreas elastase. We are aiming at clinical application and plan to continue further study.

この論文は、第49回日本医真菌学会総会の“シンポジウム1：難治性の深在性真菌症に対する最近のアプローチ－糸状菌感染を中心に”において発表されたものです。