

総 説

## 真菌感染と好中球ミエロペルオキシダーゼ

荒 谷 康 昭

横浜市立大学 木原生物学研究所

### 要 旨

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は好中球と単球のみに存在し、過酸化水素と塩素イオンから次亜塩素酸が産生される反応を触媒する。筆者は MPO のノックアウト (MPO-KO) マウスを作製して、このマウスの真菌易感染性を解析した。MPO-KO マウスはクリーンな環境下では何ら異常を示さない。ところが、*C. albicans* を経鼻接種すると、野生型マウスはまったく死ななかったのに対し、MPO-KO マウスは感染後 5 日目までに肺炎を起こして大半が死亡した。さらに、*A. fumigatus*, *C. tropicalis*, および *T. asahii* を接種した 2 日後の肺での殺菌能も、野生型に比べて有意に低下していた。MPO-KO マウスの *C. neoformans* に対する防御能の低下は接種後 7 日を過ぎてから現れはじめ、30 日後から顕著になった。すなわち、MPO はこれらの真菌に対する生体防御に重要であることが示された。次に、MPO-KO マウスの *C. albicans* 易感染性を NADPH-オキシダーゼ欠損マウス (CGD マウス) と比較した。CGD マウスの感染重篤度は菌の接種量依存的に増大した。一方、MPO-KO マウスは低量の接種では野生型と同程度の軽度な感染しか示さなかったが、高量を接種すると CGD マウスに匹敵する重篤な感染症状を示した。すなわち、MPO は多量の菌が感染した際の生体防御機構として、NADPH オキシダーゼと同等の重要性を有していることが判明した。

**Key words:** 好中球 (neutrophil), ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase), 活性酸素 (reactive oxygen species), 生体防御 (host defense), 真菌感染 (fungal infection)

### はじめに

病原微生物の感染などによって活性化した好中球は、血管外組織の感染局所に浸潤し、活性酸素などを産生して病原微生物の殺菌作用を営む。活性化した好中球は、NADPH オキシダーゼにより酸素からスーパーオキシド ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) を、次いで自発的あるいはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により  $\cdot\text{O}_2^-$  から過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を産生する。さらに、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) により  $\text{H}_2\text{O}_2$  と塩素イオン ( $\text{Cl}^-$ ) から次亜塩素酸 (HOCl) を産生する。

MPO は好中球のみに存在しており、単球内でもわずかに検出される他には MPO を発現している組織は同定されていない<sup>1, 2)</sup>。MPO 欠損の発生頻度は、米国やイタリアでは 2,000~4,000 人に 1 人<sup>3)</sup>、我が国では 50,000 人に 1 人<sup>4)</sup> と報告されている。MPO を欠損する単離好中球は、試験管内での殺菌能が低下していることは古くから報告されている<sup>3)</sup>。しかし、MPO の欠損が生体の真菌感染にどの程度リスクを負っているのかについては、いまだ明確な回答は得られていない。そこで、筆者は MPO のノックアウトマウスを用いて、本酵素の生体防御における役割を個体レベルで解析した。

### MPO ノックアウト (MPO-KO) マウス

筆者らが世界に先駆けて作製した MPO-KO マウスは、好中球と単球のペルオキシダーゼ活性を欠如しているが、好酸球ペルオキシダーゼ活性は正常に保持している。マウス腹腔から回収した好中球をフォルボールエステルで活性化させると、MPO-KO マウス好中球からの HOCl 産生はほとんど検出できず、ヘテロ変異マウス好中球の産生量は野生型の半分量に低下していた。一方、 $\cdot\text{O}_2^-$  産生量は、野生型と MPO-KO マウス間に差はほとんど認められなかった<sup>5)</sup> (Fig. 1)。

### MPO-KO マウスの生体防御能

MPO-KO マウスはクリーンな環境下では何ら異常を示さない。ところが、*Candida albicans* (ATCC 18804) を経鼻接種すると、野生型マウスはまったく死亡しなかったが、MPO-KO マウスは感染後わずか 5 日の間におよそ 7 割のマウスが死亡した。肺組織切片の解析結果から、重篤な肺炎が死因と考えられた。野生型マウスとヘテロ変異マウスの肺における残存菌数は経時的に速やかに減少したのに対し、MPO-KO マウスは接種時の菌数を保持していた。また、MPO-KO マウスでのみ腎臓への菌の伝播が認められた<sup>5)</sup> (Fig. 2)。

次に、その他の真菌に対する初期防御能も調べるために、経鼻接種 48 時間後の肺中の残存菌数を測定した。そ

別刷請求先：荒谷 康昭

〒244-0813 横浜市戸塚区舞岡町 641-12  
横浜市立大学 木原生物学研究所

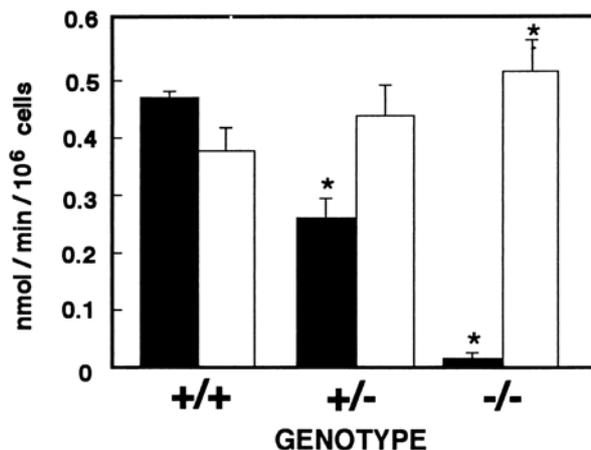


Fig. 1. HOCl and  $\cdot\text{O}_2^-$  generation from neutrophils of wild-type (+/+), heterozygous mutant (+/-), and MPO-KO (-/-) mice. The levels of HOCl (closed bars) and  $\cdot\text{O}_2^-$  (open bars) generated from phorbol myristate acetate-stimulated peritoneal exudate neutrophils were determined by the chlorination of monochlorodimedon and the SOD-inhibitable reduction of cytochrome  $c$ , respectively. Results represent means  $\pm$  S.D. The asterisk indicates a  $P$  value of  $<0.05$  for mutant versus wild-type mice, as determined by Student's  $t$  test.

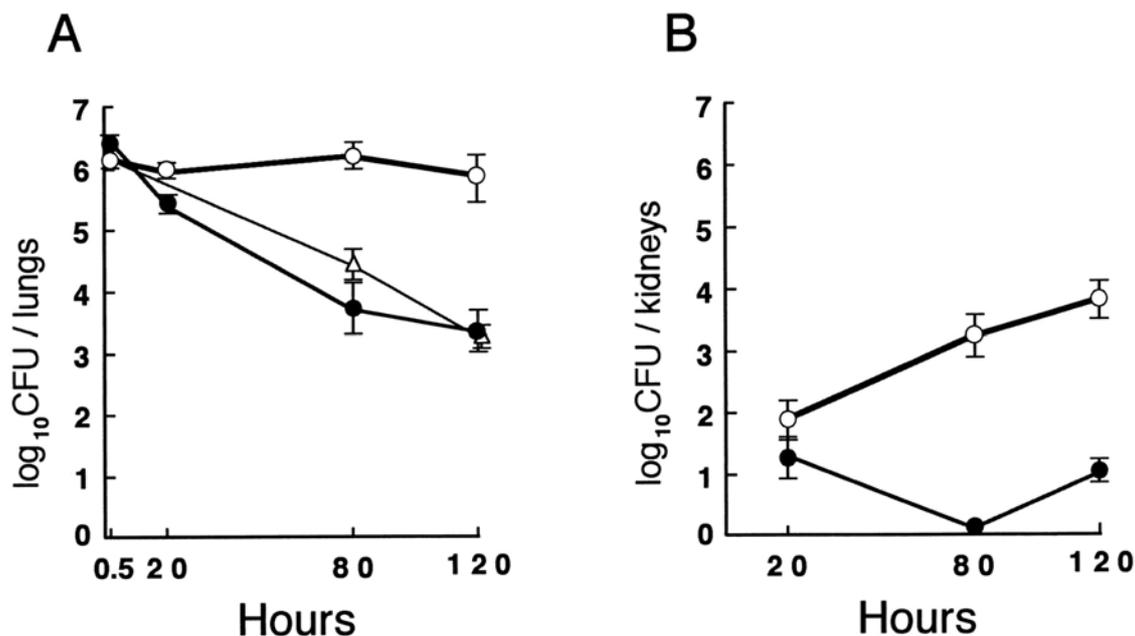


Fig. 2. Pulmonary infection with *C. albicans* in wild-type, heterozygous mutant, and MPO-KO mice. Wild-type (closed circles), heterozygous mutant (open triangles), and MPO-KO (open circles) mice were infected with  $4 \times 10^6$  CFU of *C. albicans*. At the indicated times after the challenge, whole lungs and kidneys were homogenized and aliquots of the homogenates were plated on Guanofuracin-Sabouraud agar plates. The number of viable *C. albicans* was calculated from the number of colonies grown on the plates and was expressed in CFU.

の結果, *Candida tropicalis* (IFO 1400) と *Trichosporon asahii* (IFO 10844) に対しても殺菌能の著しい低下が認められた。さらに, *Aspergillus fumigatus* (ATCC 90240) の殺菌も有意に遅延していた<sup>6, 7)</sup> (Table 1)。また, 野生型と MPO-KO マウスの殺菌能の差は, 接種菌数が多いほど顕著に現れた。すなわち, MPO は多種の真菌に対する感染初期の生体防御にきわめて重要な酵素であることが明らかとなった。ここで, *Cryptococcus neoformans* (ATCC 24067) の残存菌数は, 野生型と MPO-KO マウスとで差

は認められなかった (Table 1)。ところが, 接種 7 日目頃から徐々に差がみられ始め, 30 日目頃になると MPO-KO マウスは重篤な肺炎を誘発し, 60 日目までにほとんどすべてが死亡した。クリプトコッカスの感染防御には Th1 依存性の免疫応答が必須であるとともに, 最近では自然免疫リンパ球の重要性も指摘されている<sup>8)</sup>。これらの防御系に加えて, 好中球由来の活性酸素も *C. neoformans* に対する生体防御に重要な役割を担っていることが本研究から強く示唆された。

Table 1. Recovery of fungi from the lungs of wild-type and MPO-KO mice after intranasal inoculation

Organism	Wild type at 0.5 hr	log CFU/lung at 48 hr		CFU in MPO-KO /CFU in wild type at 48 hr
		Wild type	MPO-KO	
<i>Candida albicans</i>	6.71	4.83 ± 0.20	6.31 ± 0.16	30.2
	5.71	3.56 ± 0.16	5.38 ± 0.14	66.1
<i>Candida tropicalis</i>	6.00	4.12 ± 0.17	5.64 ± 0.13	33.1
	5.14	3.04 ± 0.24	3.51 ± 0.14	3.0
<i>Trichosporon asahii</i>	5.96	4.66 ± 0.08	6.08 ± 0.13	26.3
	5.11	3.57 ± 0.18	4.16 ± 0.07	3.9
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5.68	2.19 ± 0.18	3.55 ± 0.24	22.9
	5.22	1.75 ± 0.50	2.86 ± 0.22	12.9
<i>Cryptococcus neoformans</i>	6.80	7.70 ± 0.27	7.73 ± 0.22	1.1
	4.68	5.67 ± 0.09	5.50 ± 0.22	0.7

Data at 48 h represent mean ± SD obtained with 5 wild-type and MPO-KO mice, respectively.

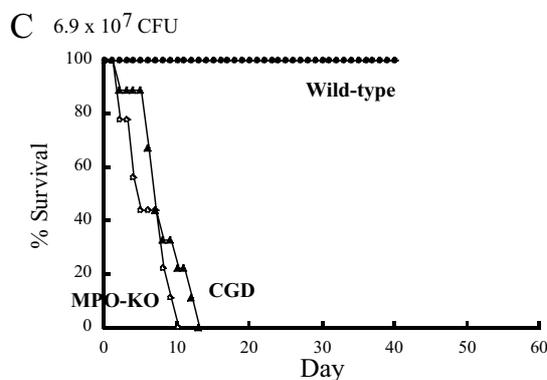
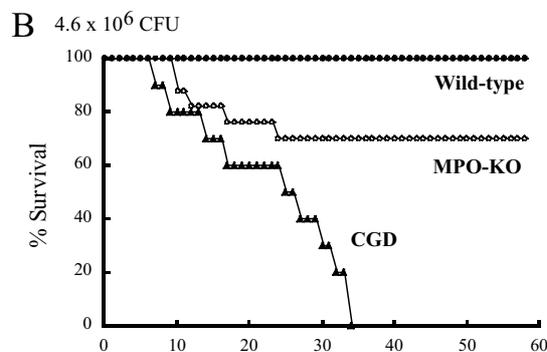
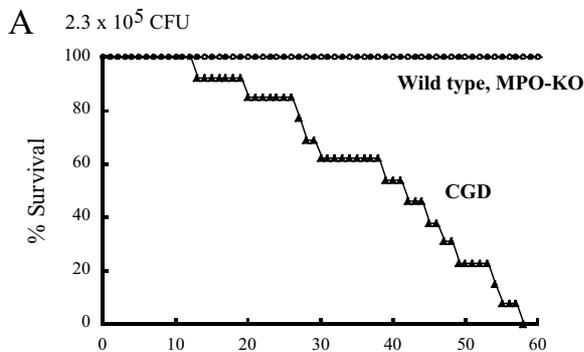


Fig. 3. Survival of mice after *C. albicans* infection. Wild-type mice (black circles), MPO-KO mice (open circles), and CGD mice (black triangles) were intraperitoneally infected with  $2.3 \times 10^5$  CFU (A),  $4.6 \times 10^6$  CFU (B), or  $6.9 \times 10^7$  CFU (C) of *Candida* per mouse.

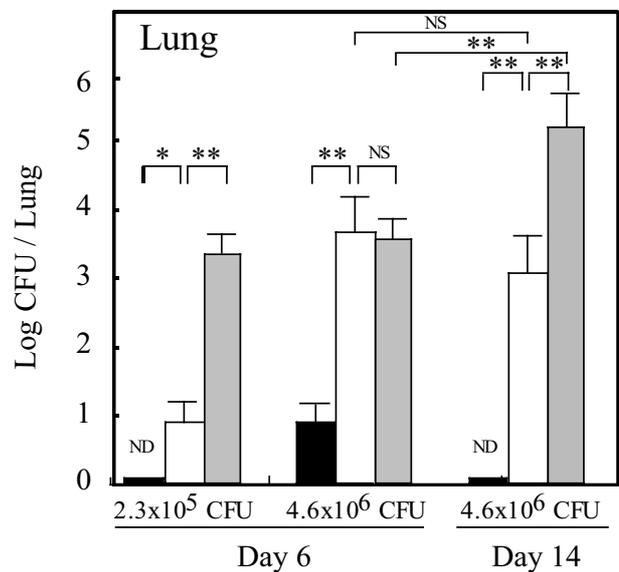


Fig. 4. Culture of *C. albicans* from lungs after intraperitoneal infection of the mice. Wild-type (black bars), MPO-KO (open bars), and CGD (gray bars) mice were inoculated intraperitoneally with  $2.3 \times 10^5$  CFU or  $4.6 \times 10^6$  CFU per mouse of *C. albicans*, and their lungs were analyzed at day 6 or day 14. Brackets indicate statistical comparisons. ND, not detectable; NS, not significant. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

NADPH オキシダーゼ<sup>9)</sup> の欠損患者は慢性肉芽腫症を発症し、幼少期から重篤な感染を繰り返す、多くの患者は成人を待たずして死を迎える。また、この酵素の欠損マウス (CGD マウス) が *A. fumigatus* などに易感染性を示すことも示されている<sup>10)</sup>。そこで、MPO 欠損の感染に対するリスクをより詳細に知るために、MPO-KO マウスと CGD マウスのカンジダ菌に対する易感染性を比較した。野生型、MPO-KO、CGD の各マウスに、低量 ( $2.3 \times 10^5$  CFU)、中量 ( $4.6 \times 10^6$  CFU)、または高量 ( $6.9 \times 10^7$  CFU) の *C. albicans* を経鼻接種し、生存率 (Fig. 3) と、接種 6 日目と 14 日目の肺の菌数 (Fig. 4) を測定した。CGD マウスの感染重篤度は接種した菌量

依存的に増大したが、野生型マウスの感染は高量の菌を接種してもごく軽度であった。興味深いことに、MPO-KO マウスでは、高量の菌を接種すると CGD マウスに匹敵する重篤な感染を示したが、低量では野生型マウスと同程度の極めて軽度な感染しか示さなかった。また、中量の菌を接種した際、6日目のMPO-KO マウス肺の菌数はCGDと同程度だったが、14日目ではCGDマウスよりも著しく減少した。以上から、MPOは、大量の菌が感染した際の初期生体防御機構として、NADPH オキシダーゼと同等の重要性を有することが判明した<sup>11)</sup>。したがって、もし *C. albicans* が高量感染すると、MPO 欠損はCGD患者と同程度に感染のリスクを負う可能性があることが示唆された。

### ま と め

MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>系の *in vitro*での殺菌能は、精製MPO蛋白や単離好中球を用いた1970~80年代の盛んな研究によって証明されたが、生体内での重要性は必ずしも明確ではなかった。今回の研究は、予後も悪く、また血管炎等<sup>12)</sup>の疾患発症の一因ともなり得る真菌感染に対する防御系としてのMPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>系の重要性を個体レベルで示し、種々の真菌感染に対する生体防御機構をさらに解明していくための一助になったと考える。

### 謝 辞

本総説の執筆ならびにシンポジウムでの発表の機会を与えて頂きました。西村和子教授(千葉大)、川上和義教授(東北大)、大野尚仁教授(東京薬大)に深くお礼申し上げます。また、本研究は、鈴木和男、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝(以上、国立感染症研究所)、Nobuyo Maeda (Univ. of North Carolina)、小山秀機(横浜市立大学)の各先生方と共同で行われました。

### 文 献

- 1) Klebanoff SJ: Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* **77**: 598-625, 2005.
- 2) Hansson M, Olsson I, Nauseef WM: Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. in press
- 3) Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ: Myeloperoxidase deficiency: preva-

lence and clinical significance. *Ann Intern Med* **95**: 293-301, 1981.

- 4) Nunoi H, Kohi F, Kajiwara H, Suzuki K: Prevalence of inherited myeloperoxidase deficiency in Japan. *Microbiol Immunol* **47**: 527-531, 2003.
- 5) Aratani Y, Koyama H, Nyui S, Suzuki K, Kura F, Maeda N: Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* **67**: 1828-1836, 1999.
- 6) Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Maeda N, Koyama H: Differential host susceptibility to pulmonary infection with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J Infect Dis* **182**: 1276-1279, 2000.
- 7) Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Dinuer MC, Maeda N, Koyama H: Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* **40**: 1557-1563, 2002.
- 8) Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo Y, Kinjo T, Ishikawa H, Saito A: Accumulation of gammadelta T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* **172**: 7629-7634, 2004.
- 9) Babior BM: Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* **109**: 33-44, 2000.
- 10) Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, Orkin SH, Doerschuk CM, Dinuer MC: Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet* **9**: 202-209, 1995.
- 11) Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Dinuer MC, Maeda N, Koyama H: Critical role of myeloperoxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J Infect Dis* **185**: 1833-1837, 2002.
- 12) Nagi-Miura N, Harada T, Shinohara H, Kurihara K, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, Ohno N: Lethal and severe coronary arteritis in DBA/2 mice induced by fungal pathogen, CAWS, *Candida albicans* water-soluble fraction. *Atherosclerosis*, in press.

## Role of Myeloperoxidase in the Host Defense against Fungal Infection

Yasuaki Aratani

Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University  
641-12 Maioka-cho, Totsuka, Yokohama, Kanagawa 244-0813, Japan

Neutrophils are believed to be the first line of defense against invading microorganisms, but *in vivo* roles of reactive oxygens produced by neutrophils are not well known. Myeloperoxidase (MPO) catalyzes reaction of hydrogen peroxide with chloride ion to produce hypochlorous acid that is used for microbial killing by phagocytic cells. To define the *in vivo* role of MPO, we generated mice having no peroxidase activity in their neutrophils or monocytes. MPO-deficient (MPO-KO) mice showed severely reduced cytotoxicity to *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, and other microorganisms, demonstrating that an MPO-dependent oxidative system is important for host defense against fungi. However, the significance of MPO compared to the NADPH-oxidase is still unclear because individuals with MPO deficiency are usually healthy in contrast to patients with chronic granulomatous disease (CGD) who present clinical symptoms early in life. To better understand the contributions of MPO and NADPH-oxidase to antifungal defense mechanisms, we compared the susceptibility of MPO-KO mice and CGD mice to infections by *C. albicans*. Interestingly, at the highest dose, the mortality of MPO-KO mice was comparable to CGD mice, but was the same as normal mice at the lowest dose. These results suggest that MPO and NADPH-oxidase are equally important for early host defense against a large inocula of *Candida*. Our present results suggest that MPO-deficient individuals could exhibit similar problems as CGD patients if exposed to a large number of microorganisms.

---

この論文は、第49回日本医真菌学会総会の“シンポジウム4：真菌感染と自然免疫”において発表されたものです。