

THE CHEMICAL TIMES

KANTO CHEMICAL CO., INC.



2014 No.2 (通巻232号)

ISSN 0285-2446

独自の無機／有機ナノハイブリッド膜(iO-brane)を用いた新しいPdナノ粒子触媒膜	澤 春夫	2
免疫工学による免疫システム分子機構の解析 I. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いたアレルギー発症機構の解析	熊谷 善博	8
宿主に有益な働きをもたらす生きた微生物—プロバイオティクス	高橋 志達	15
感染症四方山話(8):感染症医のあり方	菊池 賢	19
最近のトピックス		24



独自の無機／有機ナノハイブリッド膜(iO-brane)を用いた新しいPdナノ粒子触媒膜

New Palladium Nano-Particle Catalyst Membranes Based on Original Inorganic/Organic Nano-Hybrid Membrane (iO-brane)

ニッポン高度紙工業株式会社 新材料開発室 室長 澤 春夫
Haruo Sawa (General Manager)

Nippon Kodoshi Corporation New Materials Development Department

1. はじめに

触媒を利用した化学反応プロセスにおいて、金属微粒子触媒や分子触媒を固体基材に固定化して使用する固定化触媒(不均一系触媒)の有用性は言うに及ばない。これまでも、例えば金属微粒子を活性炭粉末やアルミナなどのセラミック材に担持させたような触媒が使用されている。これら固定化触媒は、反応液からの触媒の分離・回収を容易にすることを主な目的とするものだが、工夫によっては反応を制御し、所望の生成物のみを得る反応選択性を発現させるなど、より高度な機能も期待できる。既存の固定化触媒をさらに一段階高性能化、高機能化させようとするには、単に固定化される側の金属微粒子触媒や分子触媒そのものの機能や、その固定化方法(結合方法)を追及するだけでは限界があり、それらを固定化する基材や、あるいはそれを含む固定化触媒全体の構成を見直すことが有効である。しかし、従来の固定化触媒はカーボンやセラミックなど既存のありふれた固体物質をそのまま基材に用いる場合が多く、使用される反応系で安定であるという以上の条件を要求されることは少なかった。

ところで、筆者らは新たな素材として無機／有機ナノハイブリッド膜(登録商標 iO-brane)を開発した。このものは元々燃料電池用電解質膜として開発されたものであり、燃料電池の中の過酷な環境に耐え得る化学的に安定な新たな素材を追及する中から生まれたものである^{1)~4)}。この物質はナノレベルの超微細な無機酸化物ナノ粒子を有機ポリマー分子に化学結合させることによって生じるもので、それによって有機ポリマーの化学的

安定性は劇的に改善されるという発見に基礎を置いている。一方、見方を変えてこの物質のナノ構造に着目すると、内部に1~数nmの多量の金属ナノ粒子を生成させることができ、この物質を触媒として機能させられることがわかってきた⁵⁾。このタイプの固定化触媒は、材料の成り立ちそのものが従来のものとは異なるため、さまざまな特性上の特徴を有する。さらにまた、このiO-braneには、例えば金属錯体触媒など分子触媒を簡単かつ安定的に固定化することもでき、立体選択性を持つ新たな固定化触媒も開発されている⁶⁾。本稿では、高活性を示すとともに、反応液への金属の脱離・溶出が少なく、リサイクル性に優れるとともに、良好な反応選択性が得られるなど、機能面で極めて特徴的なこの新しい固体触媒について概説する。

2. 固定化触媒基材に望まれる条件

固定化触媒の基材として最低限要求される条件は以下のものである。

- ① 所望の微粒子触媒や分子触媒を安定的に固定化(結合)する手段がある。
- ② 反応に使用する溶媒(主には有機溶媒)に耐える。
- ③ その他反応系に存在する酸、アルカリ、酸化剤、還元剤、ラジカルに対して安定である。
- ④ 反応温度に耐えられる。
- ⑤ 触媒(基材)の一つ一つが十分大きく、回収が容易であり、フィルターが目詰まりがない。

これらの条件についてはカーボンやセラミックなど従

来の基材でも概ね満足するが、⑤のフィルターの目詰まりについては問題のあるケースもあるようである。

しかし、それだけではなく以下の条件も本来要求されるが、これらに関してはカーボンやセラミックなど従来の基材では必ずしも満足なものではない。

- ⑥ 触媒が反応物に対して十分な接触面積を持ち、反応活性が高い。
- ⑦ 固定化した微粒子触媒、分子触媒が簡単に脱離（リーチング）しない。
- ⑧ 攪拌しても碎けない。
- ⑨ 攪拌しても反応容器を傷つけない。
- ⑩ 反応選択性がある。

従来の固定化触媒は基材の表面に触媒を固定化したものであるが、反応溶液中に三次元的に均一に広がっている均一系触媒に比べて、基材表面という極めて限られた二次元エリアのみに触媒が局在する固定化触媒では、反応物との接触頻度が低いため反応活性が低くなるのは当然である。反応物との接触面積を増大させようとする、基材を細かい粒子にしていくことが考えられるが、その場合には結局分離・回収が困難になり、⑤の問題を生じる。また、触媒の脱離（リーチング）の問題は担体の外面に触媒を結合させる限り避け難い。すなわち、現状の固定化触媒の概念を変えない限り⑥、⑦の条件は満たされないままとなる。

条件⑧、⑨は材質として柔軟性のある有機ポリマー

を採用することによって解決できそうだが、有機ポリマーは一般に耐有機溶媒性（条件②）に問題があり、耐酸化性、ラジカル耐性（条件③）が低く、耐熱性（条件④）も高くない。従って既存の有機ポリマーをそのまま適用することによって問題を解決するのは難しい。

3. 新しい無機／有機ナノハイブリッド材料(iO-brane)

iO-braneは、無機酸化物ナノ粒子をポリビニルアルコール(PVA)を主体とする有機ポリマー分子に化学結合させた新しい材料である(図1)。無機酸化物としては用途によって酸化ジルコニウム、シリカ、酸化タングステンなどが使い分けられる。無機酸化物ナノ粒子と結合することによってPVAの性質は著しく変化し、フッ素系以外の多くの有機ポリマーよりも、ラジカル耐性、耐酸化性などの化学的安定性や耐熱性に優れる^{1)~5)}。また、無機酸化物の性質を反映してあらゆる有機溶媒に溶解せず、有機ポリマーの性質である柔軟性も兼ね備えている。すなわち、iO-braneは燃料電池用電解質膜のための新しい素材として開発されたにもかかわらず、触媒固定化基材としての上記必要条件②~⑤を満たすとともに、従来のカーボンやセラミック基材では満足できなかった⑧⑨の条件も満たす。

ところで、iO-braneを生成する過程で無機酸化物の成分としてパラジウムを導入することは難しくなく、そのパ

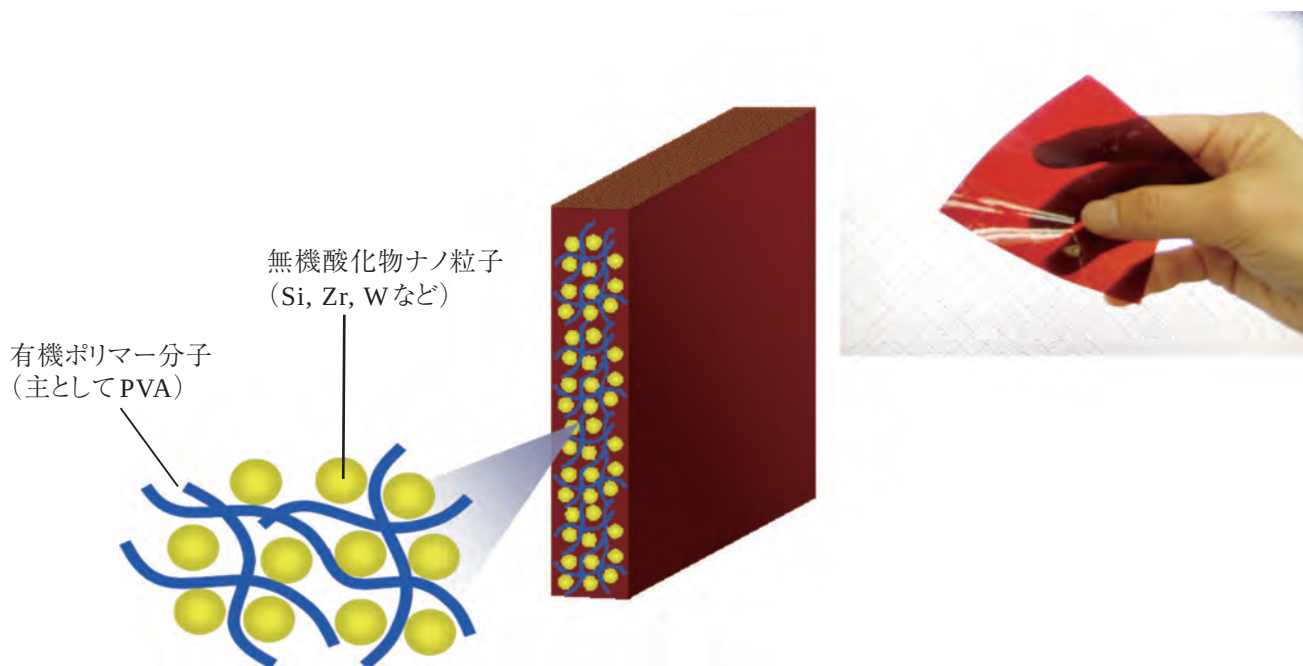
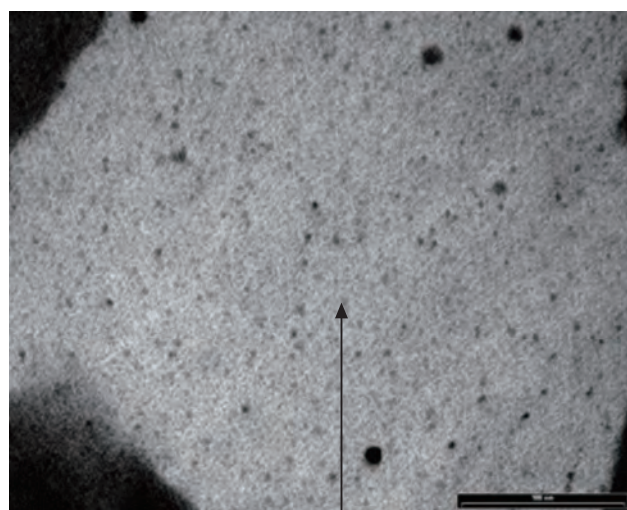


図1 無機／有機ナノハイブリッド膜 (iO-brane)

ラジウム成分を還元して金属状態とすることも可能である。この金属Pd粒子は元々ナノハイブリッド材料内部で生成したものであるから、1～数nmのナノ粒子であって、かつそれ以上成長せず、安定的にナノ粒子のままである(図2)。また、燃料電池用電解質膜の用途では膜は水分を吸収する必要があるため、iO-braneも元々水分を吸収する性質を持っている。この性質を利用すると、多くの有機溶媒を多量に吸収するように改良することもできる。この場合iO-braneは有機溶媒を多量に吸収して大きく膨潤し、かなり大きな反応物分子も膜内に吸収することができるようになる。すなわち、Pdナノ粒子を導入したiO-braneでは反応物は内部に取り込まれ、内部のPdナノ粒子上で所望の化学反応が起こる、これまでとはまったく異なるタイプの固定化触媒として機能する。このようなタイプでは、Pdナノ粒子は生成した時点で極めて微細であるために反応活性が高く、かつ基材内部に固定されているため、使用しているうちに粒子が成長し、活性が低下することが少ない。また、Pdナノ粒子は基材表面だけに二次元的に局在しているのではなく、基材全体に三次元的に存在しているので、反応有効面積(体積)を大幅に拡げ、半ば均一系触媒のように使用することも可能である。さらに、Pd粒子が内部に固定化されていることで、パラジウムが脱離(リーチング)することも防止される。すなわち、iO-braneは①～⑨の条件を満たす。さらに、後述するように、特異な触媒形態のために反応によっては従来の触媒にはない選択性(条件⑩)も示す。



iO-brane中のPdナノ粒子(平均粒子径1nm)

図2 Pdナノ粒子触媒膜のTEM像

4. iO-braneを用いた新しいPd触媒膜の実際の反応

iO-braneを用いた新しいPd触媒膜は大きくは二つの使用形態がある。一つはバッチリアクター内の反応溶液に何らかの形で接触させるもので、そのまま放り込む(図3)、攪拌羽に固定する(図4)、反応容器壁に固定するなどの方法がある。また、もう一つの使用形態はフローリアクターで使用するもので、カラム中に膜を充填してそこへ反応液を流す方法、膜に反応液を透過させて反応させる方法などがある。本Pd触媒膜は膜状であり、特にカラムに孔径の小さなフィルターを装備する必要がなく、従ってフィルターの目詰まりの問題も起こらない。

適用できる反応の種類は基本的には従来のパラジウム触媒と同じであり、各種水素化反応、酸化反応、クロスカップリング反応などに使用できる(ただし、反応選択性は従来のものと異なる例もある)。

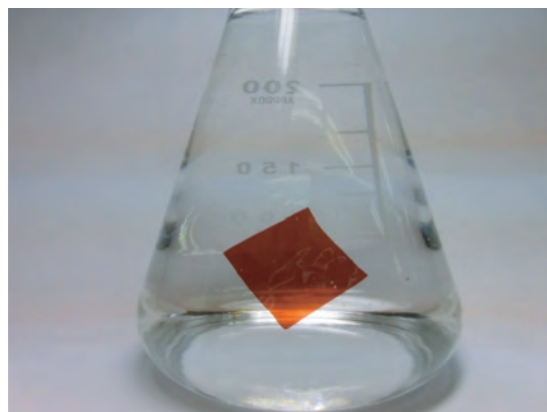
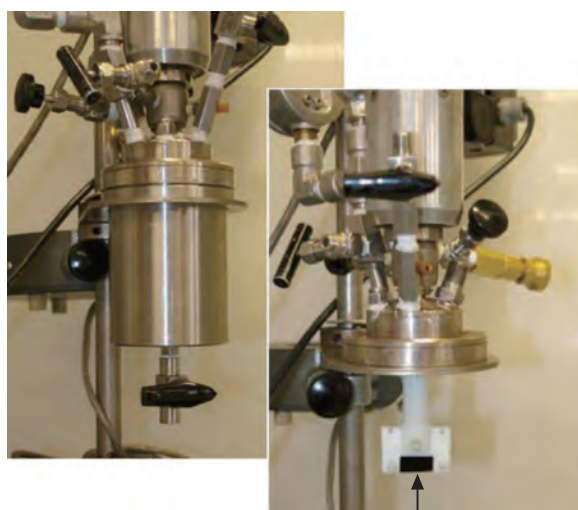


図3 Pdナノ粒子触媒膜



Pdナノ粒子触媒膜

図4 攪拌羽にセットしたPdナノ粒子触媒膜

表1にPd触媒膜(Pd担持量0.3wt%)を攪拌羽に固定したリアクターにおける3-hexyn-1-olの水素化反応(図5)の例を示した。この反応では(Z)-3-hexen-1-ol

(leaf alcohol)が香料の成分として有用なものであるが、所望の反応選択性を示すとともに、特に再生処理等を行わなくても反応回数(反応時間)に対して反応活

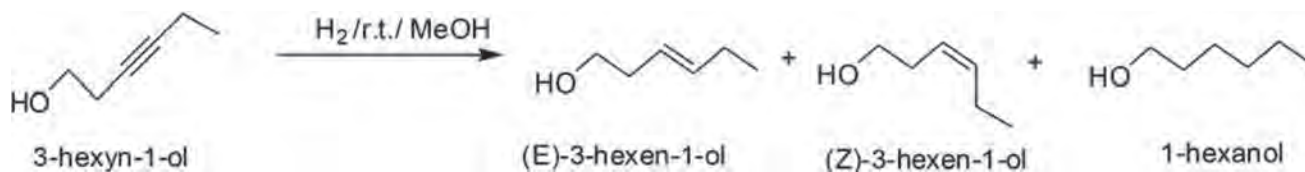


図5 3-hexyn-1-olの水素化反応

表1 3-hexyn-1-olの水素化反応

Cycle (n)	Time (h)	Yield (%)	TOF (h ⁻¹)	Selectivity 3-hexen-1-ol (%)	E/Z (%)	Leaching (ppm)
1	2	49.50	434	65.2	72 (Z)	<0.006
2	2	55.30	485	73.3	75 (Z)	<0.006
3	2	62.39	547	78.7	76 (Z)	<0.006
4	2	78.90	692	83.4	77 (Z)	<0.006
5	15	99.30	116	81.9	74 (Z)	<0.006
6	2	58.18	510	90.25	84 (Z)	<0.006

Pd content:0.3% w/w for ICP-analysis; P=5 bar, r.t., MeOH, Conc. Substrate=0.019M

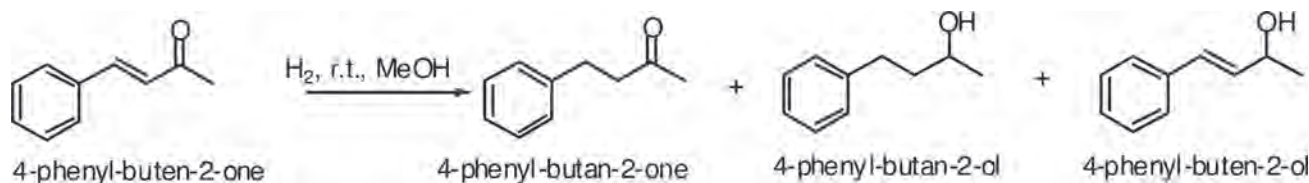


図6 4-phenyl-buten-2-oneの水素化反応

表2 4-phenyl-buten-2-oneの水素化反応

Cycle (n)	Time (h)	Yield (%)	TOF (h ⁻¹)	Selectivity 4-phenyl-butan-2-one	Leaching (ppm)
1	2	54.40	122	100	0.06
2	2	45.22	102	100	0.06
3	2	41.18	93	100	0.07
4	2	31.46	71	100	0.06
5	16	96.41	29	100	0.05
6	2	17.39	39	100	0.05

Pd content:0.3% w/w for ICP-analysis; P=5 bar, r.t., MeOH, Conc. Substrate=0.0099M

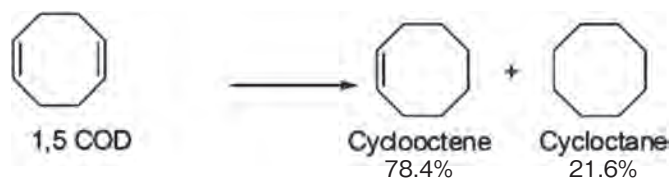


図7 1,5-cyclooctadieneの水素化反応

性、反応選択性の顕著な低下も見られない。この反応では、より低温で反応を行なうことにより、さらに選択性が向上することが確認されている。表2には4-phenyl-buten-2-oneの水素化反応(図6)の例を示した。この反応ではC=C結合の水素化反応のみが選択的に起こり、99%以上の選択性で4-phenyl-butan-2-oneが生成した。また、同様の反応条件で1,5-cyclooctadieneの水素化(図7)を行なった結果でも高収率、高選択性でcycloocteneが生成し、繰り返し使用しても安定した性能

を示した。

これらの反応において、反応終了後の溶液中のパラジウム濃度をICP-OESで測定すると図5の反応では0.006ppm以下(検出限界以下、表1)、図6の反応でも0.07ppm以下(表2)であり、Pd流出は極めて少ない(市販されているPd担持量7wt%の製品でも多くの反応例において反応液のPd濃度はICP-OESの測定で検出限界以下であることが確認されている)。また、カーボン粉末にパラジウム微粒子を担持させた従来のPd/C

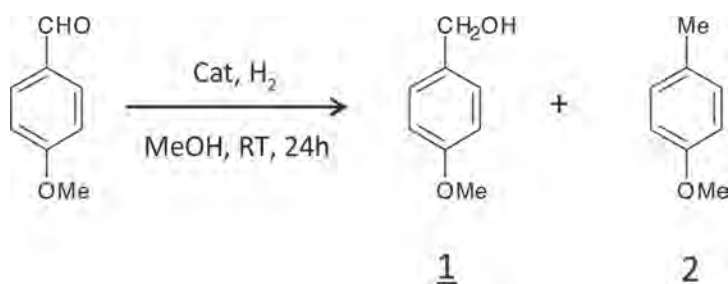


図8 anisaldehydeの水素化反応

表3 anisaldehydeの水素化反応

Cat	Yield(%)	Products	
		1	2
5% Pd/C	69	38%	62%
6% Pd/ iO-brane	67	97%	3%

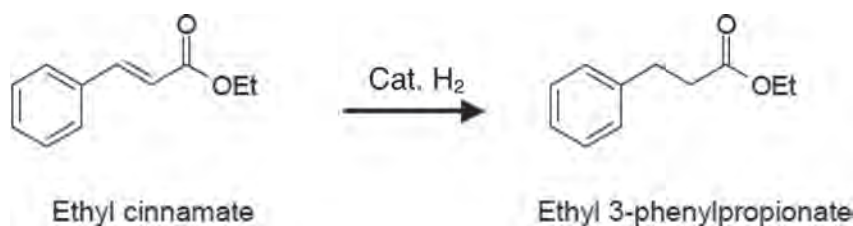


図9 ethyl cinnamateの水素化反応

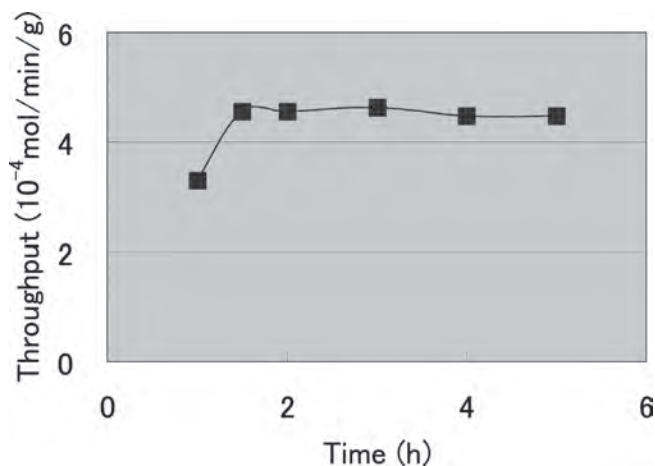


図10 ethyl cinnamateの水素化反応

触媒を使用した際によく見られる反応容器壁に付着する黒ずみ(パラジウムの付着)も見られない。Pd触媒膜は膜状であるため、当然分離・回収の手間はほとんどかからない。さらに、使用後に空気中に放置しておいても燃焼しにくいというのも一つの特長である。

表3にはPd触媒膜をanisaldehydeの水素還元(図8)に適用した場合の結果について、従来のPd/C触媒と比較したものを示した(この場合Pd触媒膜のPd担持量は6wt%であり、反応はPd触媒膜片を反応溶液に放り込むだけで行なっている)。Pd触媒膜は従来のPd/C触媒と同程度の反応率を示すとともに、Pd/C触媒を用いた場合には反応物のアルデヒド基の多くがメチル基まで変換してしまうのに対し、Pd触媒膜を使用した場合には部分水素化が可能となり、ヒドロキシメチル基で反応を止めることができた。すなわち、Pd触媒膜は従来のPd/C触媒に匹敵する触媒活性を示すとともに、より明確な反応制御を可能とすることがわかる。

図10にはPd触媒膜をethyl cinnamateの水素化反応(図9)をフローリアクター(株式会社ワイエムシー製KeyChem-H)で行なった場合の結果を示した。この時Pd触媒膜は専用のカラムに充填されたものを使用しており、流通後の反応液を定期的にサンプリングして生成物量の測定を行なっている。図10から、フローしている間、反応速度が安定的に維持されることがわかる(フロー開始直後の収量が少し低いのは、反応物が触媒膜に到達するまでの少しの間、反応が起こらないため)。

このようにPd触媒膜は、従来の触媒では発現しない反応選択性を可能としたり、容易にフローリアクターに適用できるなど、機能面での付加価値も高い。

5. その他の触媒への応用

iO-braneを利用した金属ナノ粒子触媒膜として現在商品化されているものはPd系のみであるが、Ru、Rh、Pt、Ni、Cu、Feなど他の金属種についても同様に作製することが可能である。

また、iO-braneを利用した触媒膜として、金属錯体分子を固定化したタイプも開発されている⁶⁾。例えばBINAP、Monophosなどの不斉配位子を持つ金属錯体触媒を使用すると、医薬品や香料などの合成で必要

な不斉合成が可能となるが、これら立体選択性の金属錯体触媒は一般に極めて高価であるにもかかわらず、反応溶液に分散させて使用するため回収が困難であるという問題がある。iO-braneにはこれら金属錯体分子触媒を多量に固定化させることができ、そのような固定化触媒では反応の立体選択性も維持される。すなわち、回収の手間がかからない立体選択性触媒膜として使用することができる。この場合にも前述の金属ナノ粒子触媒膜の場合と同様、反応は膜内部でも進行し、高い反応活性が得られると同時に金属錯体分子は膜内部に固着されているため、膜からの脱離が抑えられ、高いリサイクル性を示す。

6. おわりに

本Pd触媒膜は一見ただのポリマーフィルムのように(図1、図3)、従来の固定化触媒とは大きく異なるように見えるが、それはこの固定化触媒膜がiO-braneというまったく新しい材料を基にしており、高機能化のために従来の固定化触媒とはまったく異なる思想で構成されているからである。本稿に出ている以外にも、さまざまな化学反応において十分な反応活性を示し、かつ多くの反応に対して良好な反応選択性を示すことが既に確認されている。今後も金属種の拡充や、新たな適用反応の開拓が進み、幅広い合成プロセスに利用され、プロセスの簡略化やコストダウンなどの大きな効果をもたらすことが期待される。

参考文献

- 1) 澤 春夫, “無機／有機ナノハイブリッド電解質膜”. 燃料電池要素技術 触媒・電解質膜・MEAとその低コスト・高信頼・高機能化. 株式会社情報機構, 2011, 203-212.
- 2) Sawa, H.; Shimada, Y. *Electrochemistry*. 2004, 72(2), 111-116.
- 3) 澤 春夫. 燃料電池. 2012, 12(1), 82-86.
- 4) 澤 春夫. コンバーテック. 2012, 471, 74-78.
- 5) Liguori, F.; Barbaro, P.; Giordano, C.; Sawa, H. *Appl. Catal. A: Gen.* 2013, 459, 81-88.
- 6) Barbaro, P.; Bianchini, C.; Liguori, F.; Pirovano, C.; Sawa, H. *Catal. Sci. Technol.* 2011, 1, 226-229.

免疫工学による免疫システム分子機構の解析

Analysis of molecular mechanisms in the immune system by immunoengineering

I. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いたアレルギー発症機構の解析

— Mechanism of allergy induction analyzed by using T cell antigen receptor gene transgenic mice —

日本医科大学 医学部 医学科 微生物学・免疫学 准教授 熊谷 善博

Yoshihiro Kumagai (Associate Professor)

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School and Graduate School of Medicine

1. はじめに

免疫工学とは、免疫系の機能分子、担当細胞、個体に対し、遺伝子工学、細胞工学、タンパク質工学、発生工学などの、いわゆる生命に手を加える手法により、免疫機構の解析や解明を試みたり、疾病の治療アイデアを提供する学問である。

ここでは、4回のシリーズに分けて、筆者らが過去20年程継続してきた研究の中から、免疫工学を有効に免疫機構の解明や調節に利用した、以下の4トピックスについて紹介する。

- I. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いたアレルギー発症機構の解析
- II. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いた免疫調節機構の解析
- III. タンパク質工学と細胞工学を有効に利用した抗体の作製
- IV. エピトープ移植抗体 —タンパク質工学によるワクチンの創製—

2. 免疫のパラダイム

免疫系は、自然免疫系 (innate immunity) と獲得免疫系 (acquired immunity) により構成されるが、免疫記憶や異物排除におけるエフェクター機構においては、T細胞が中枢的な役割を担っている。T細胞は、抗体の産生の調節 (増幅と抑制)、炎症細胞の局所への動員、効果細胞としての機能等、獲得免疫の大局的な反応のほとんどに関わっている。

免疫のパラダイムを図1に示したが、異物に対する反応の強弱、反応対象の異物の属性によって免疫応答の内容が大きく異なっている。免疫は、スーパーシステムともいえる精緻な細胞相互作用と介在分子によるネットワークを形成しているが、システム自体のパラダイム (ここでは「大きな枠組み」という意味で用いる) は、動的なバランスによって維持されている。

免疫のパラダイム
Paradigm of Immune System

	抗自己	抗非自己
高	自己免疫病	アレルギー
低	ガン	感染症

移植片拒否反応

図1 免疫のパラダイムと疾病

本来、免疫応答は、個体に侵入するあらゆる異物 (非自己) に対して反応し、その際異物を、自分の体内の成分 (自己) との対比により識別し見分けるように仕組みられている (組織適合性抗原複合体拘束)。免疫細胞を過度に活性化し続けると、アレルギー反応や自己成分を標的とした自己免疫病による過度な炎症が惹起され、

対照的に、免疫応答が不十分だと、様々な感染症やガンが高頻度に発生することになる。免疫系細胞が必要な時に必要な程度反応するという状態、つまり適度な免疫応答が異物に対して適度に反応するバランスを保っていることが生体の免疫学的恒常性の維持には必要なのである。

ヒトをはじめとする動物は従属栄養生物で、動植物の成分(肉や野菜)を食物として摂取して、消化器系および消化酵素の働きをかりて吸収されやすい形に分解する。そして、生命維持のために必要な栄養源やビタミンを体内に吸収し、代謝系を駆動することによって生命活動を営んでいる。一方では、なんらかの理由でもともと体の中に存在しなかった物質が侵入したり、もともと体の構成成分と似ていてもその構造の違いが明確な場合には、その排除のためのシステムが作動する。

この生体異物に対する防御反応を総称して免疫反応と呼ばれているが、アレルギーという反応はもともと免疫反応そのものであるが、アレルギーは「過度に」、あるいは「不適切に」進行した免疫反応と理解できる。

3. 免疫反応の本質=自己と非自己の識別

そもそも免疫反応は他の生体反応と異なった特徴を有している。感染性微生物が体に侵入した場合を考えると、外敵である感染性微生物も当然生物であるため、これらが生体物質でできているのは、私たちヒト科の生物と共通である。したがって、微生物が体内に侵入するというを具体的な言葉で表現すると、「彼ら微生物の体を作っている生体物質と微生物の生命システムが体内に入ってくる」ということになるわけである。免疫反応とは「微生物を構成する生体物質のように、本来人間(個体)がもっていない物質が体に入ってきたとき、これを排除しようとする反応」である。アレルギー反応の相手も外来の生体物質や環境物質である。我々の体も生体物質でできているが、自分自身の生体物質を排除してしまうと不都合なため、自己の生体物質に対しては、免疫反応は起こらないように仕組みられている。このことはヒトと微生物の関係にとどまらない。ヒトの個体同士にもあてはまる。ヒト個体の中に存在しない非自己の物質を異物と呼ぶが、全く構造の異なる成分も、構造は異なっているが明確な構造の違いが1つでも存在す

れば、免疫系はそれをヒトの成分ではあるが、同種の異物(同種抗原、alloantigen)として識別する。その結果、ヒトはヒトでも、他人はもちろん、親や兄弟の違いも同様に厳密に見分けることができる。これが免疫システムの不可思議ながら、最も重要な機能である。生体にとって、自己の物質と非自己の物質(異物)を区別する「免疫系」は、神経系や内分泌系とは役割は異なるが生存に必須な仕組みなのである。その重要性は、エイズという免疫系の働きの破綻を原因とする後天性免疫不全に罹ると生存できないことから分かる。非自己物質を自己物質と区別し、これを異物と認識して排除するための反応が免疫反応なのである¹⁾。

アレルギーを、免疫反応が「過度に」、あるいは「不適切に」進行した反応と表現したが、さらに、標的を明らかにして表現すると、「自己あるいは非自己に対する過度で不適切な反応」ということになる。標的抗原が自己抗原である場合、自己への反応それ自体が不適切であるのは自明であるため、自己免疫病の病態の多くがアレルギー反応として位置づけられている。よって反応の内容を知ることが、アレルギーの制御や治療に重要であることは言うまでもない。

4. アレルギー反応の特徴=自己あるいは非自己に対する過度で不適切な免疫反応

自己・非自己を厳密に識別する免疫反応は、大別して体液性免疫や細胞性免疫といわれる2種類の反応に分類できる。体液性免疫は、抗体がその抗体のできる原因を作った抗原と結合することにより異物排除に導く反応であり、異物を処理する反応に細胞が直接関与するのが細胞性免疫である。例えば、ウイルスに感染した細胞を排除する場合には、感染細胞の表面にあるウイルス蛋白質を感染細胞の組織適合性抗原とともに認識することができるT細胞が、感染細胞に直接反応して標的細胞を傷害する。この体液性免疫や細胞性免疫が自己あるいは非自己物質に対して過度あるいは不適切に進行した反応がアレルギーである。

体液性免疫や細胞性免疫は、厳密に言えば多様な反応様式から成り立っている。したがって、「自己あるいは非自己に対する、過度で不適切な免疫反応」であるアレルギー反応も必然的に多様な様式を呈することにな

るが、アレルギー反応の結果起こる炎症や組織障害の様式に着目して分類すると4つのタイプに分類できる。それは、クームスとゲル(Coombs & Gell)の分類と呼ばれるものである(図2)^{2), 3)}。

5. 先天的に遅延型(IV)アレルギー反応を有するトランスジェニックマウスの創製⁴⁾

我々は、卵白アルブミンのアミノ酸配列(OVA323-339=ISQAVHAAHAEINEAGR)をマウスクラスII組織適合性抗原複合体をI-A^dとともに認識するIL-2依存性T細胞クローン7-3-7からpoly(A)⁺mRNAを抽出精製し、λg t10cDNAライブラリーを作製した。そのライブラリーからT細胞抗原レセプターβ鎖遺伝子(TCR-β)

とT細胞抗原レセプターα鎖遺伝子(TCR-α)のcDNAクローンを単離した。それぞれの配列を決定し、V領域の発現遺伝子、Vβ5.5-Dβ1-Jβ2.2、VaJa遺伝子、Jβ2ゲノム遺伝子をプローブとして、発現型に遺伝子再構成したTCRゲノム遺伝子を単離した。T細胞抗原レセプター遺伝子の再構成パターンは、図3に示した。

発現型ゲノム遺伝子DNAを3-7-T細胞ゲノムDNAライブラリーから単離し、図4に示した発現型TCRβゲノム遺伝子と発現型TCRαゲノム遺伝子の33.8kbと22.1kbのCosmidコンストラクトを作製し、(BALB/cXDBA)F1受精卵にマイクロインジェクションし、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスは、BALB/cマウスと退交配(バッククロス)を繰り返し、BALB/cをバックグラウンドとするトランスジェニックマウスラインを確立した。

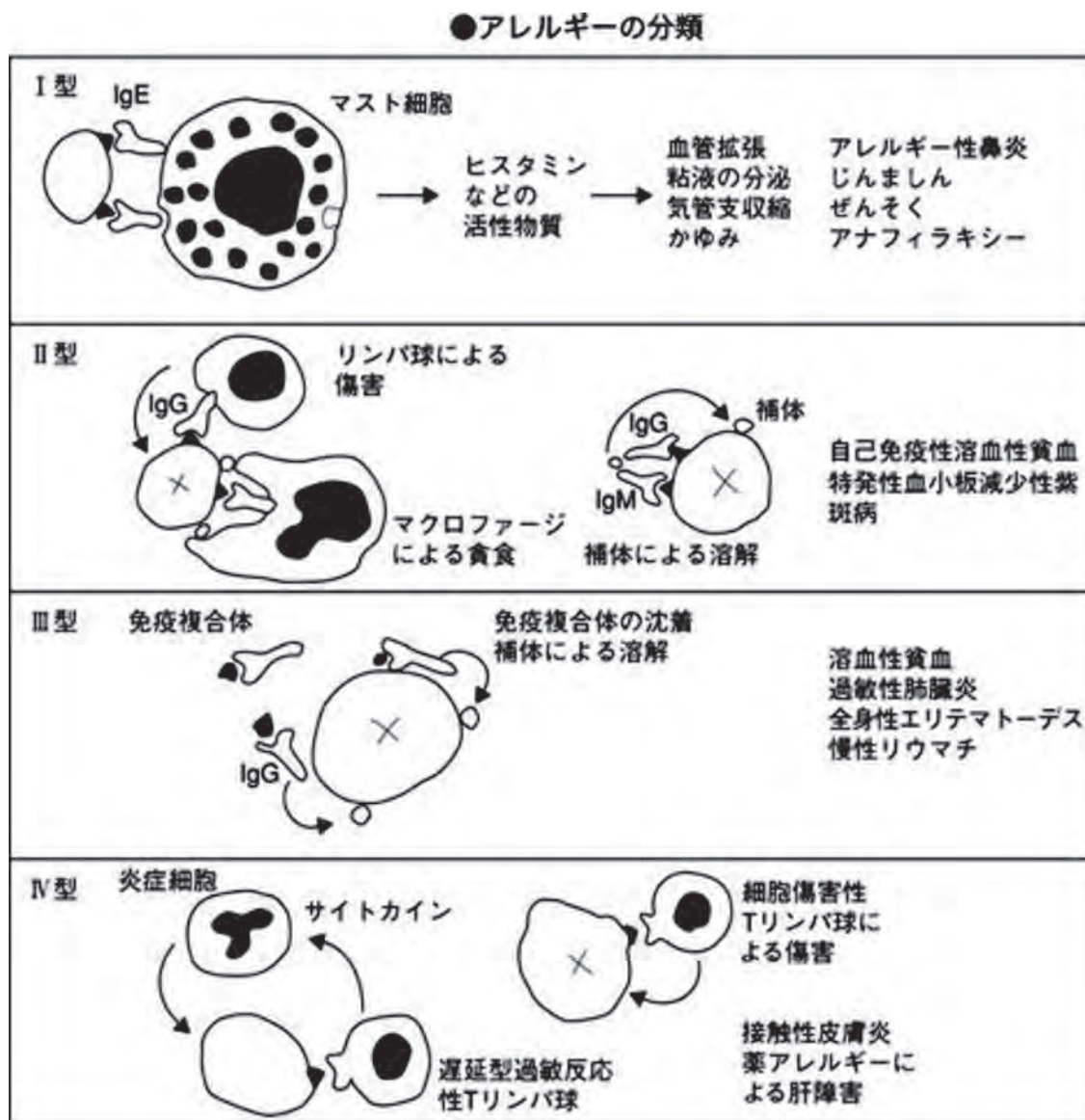


図2 Coombs & Gellの古典的アレルギーの分類

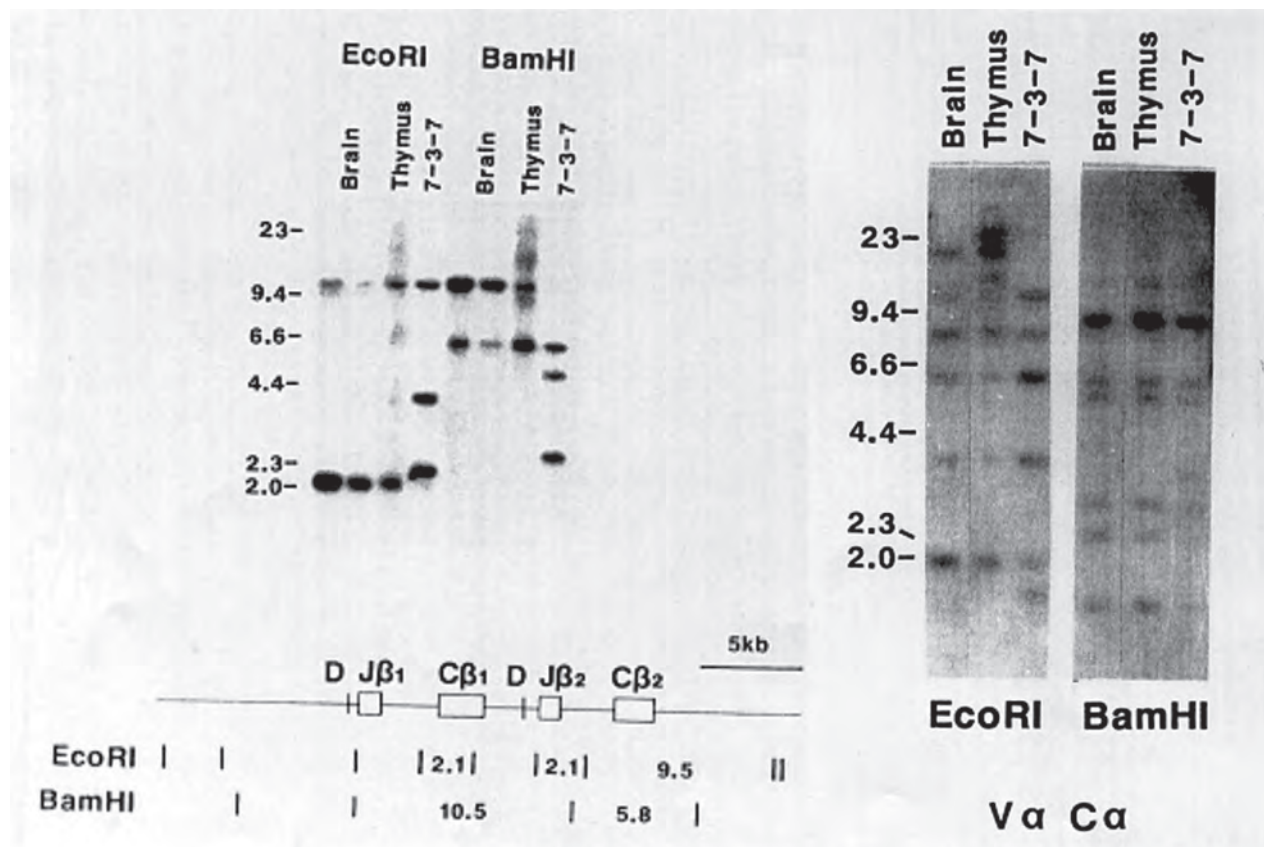


図3 T細胞クローン3-7-3のT細胞抗原レセプター遺伝子再構成パターン
β鎖遺伝子は、対立遺伝子座両方が遺伝子再構成していたが、Vβ15-Dβ1-Jβ2.2の再構成をしている対立遺伝子座が発現型で、他方のVβ5.2-Dβ2-Jβ2.4は非発現型の遺伝子再構成をしていた。Va遺伝子に関しては、遺伝子再構成ゲノム遺伝子フラグメントをそれぞれクローニングし、発現遺伝子再構成地図を作製した。

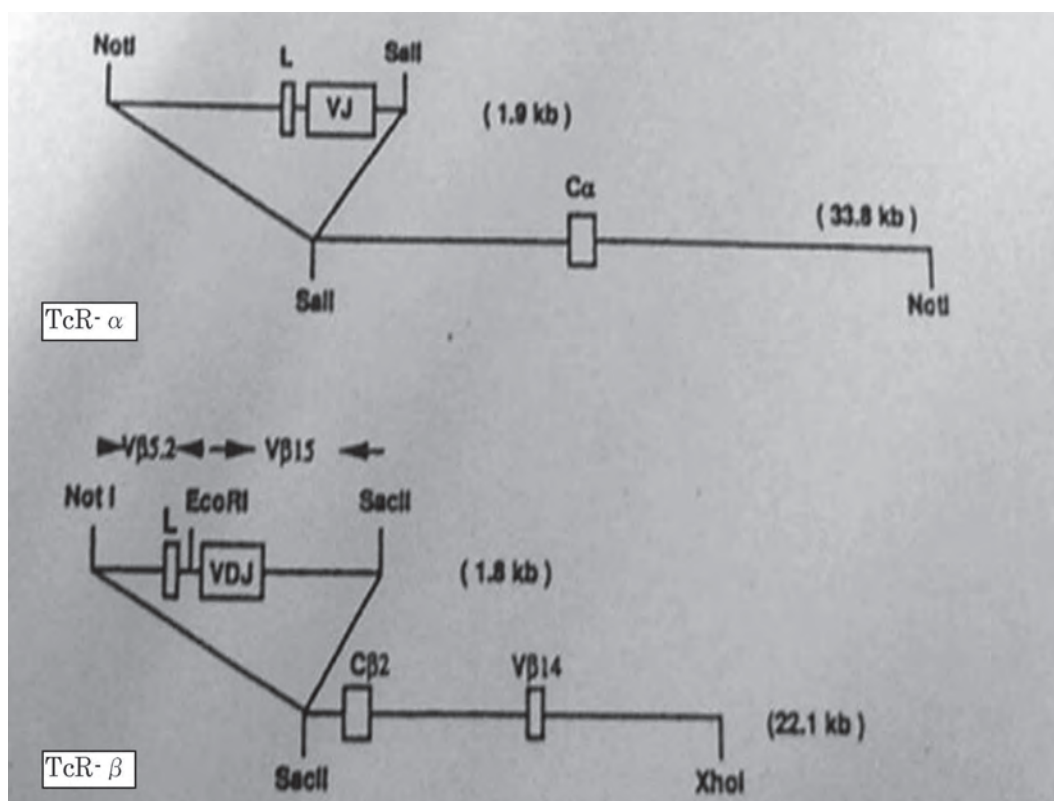


図4 トランスジェンの構築
発現型ゲノム遺伝子 DNA を 3-7-T 細胞ゲノム DNA ライブラリーから単離し、図4に示した発現型 TCRβ ゲノム遺伝子と発現型 TCRα ゲノム遺伝子の 33.8kb と 22.1kb の Cosmid コンストラクトを作製した。

トランスジェニックマウスDNAの挿入スクリーニングとフローサイトメトリーによるT細胞表面マーカースクリーニングにより、TCRトランスジーンを発現するCD4陽性T細胞だけが胸腺内選択分化成熟したTCR遺伝子トランスジェニックマウスを確立できた。図5に代表的な系統のリンパ節CD3陽性T細胞のフローサイトメトリーパターンを示した。ほとんどの成熟T細胞がトランスジーンを発現しており、遺伝子再構成装置を欠くRAG2ノックアウトマウスをバックグラウンド遺伝子とした交配ラインでも同様の結果が得られた。

このTCRトランスジェニックマウスの下肢フットパッドで遅延型アレルギー反応試験(図6参照)を行うと、驚いたことに、TCRトランスジェニックマウス自身は、一度も卵白アルブミンに暴露されたことはないにもかかわらず、

強い遅延型アレルギー反応を示した。このことは、未感作のCD4陽性T細胞、つまり、ナイーブヘルパーT細胞が1次細胞免疫応答の過程で遅延型アレルギー反応(DTH: Delayed Type Hypersensitivity)を惹起できることが明らかとなった(図7)。特殊なサイトカインを産生する特殊なT細胞がDTHの惹起効果細胞であるという推定は誤りであることが判明した。

THの過程で産生される炎症性サイトカインをRT-PCRとウェスタンブロットにより解析すると、IL-2、IL-3、Interferon- γ (IFN γ)、GM-CSF、MIP-1 α 、MIP-1 β などの産生は検出されたが、IL-4、IL-5の産生は誘導されなかった。ナイーブT細胞は、炎症性サイトカインやケモカインを産生し、DTHを直接誘導できることが初めて証明された。

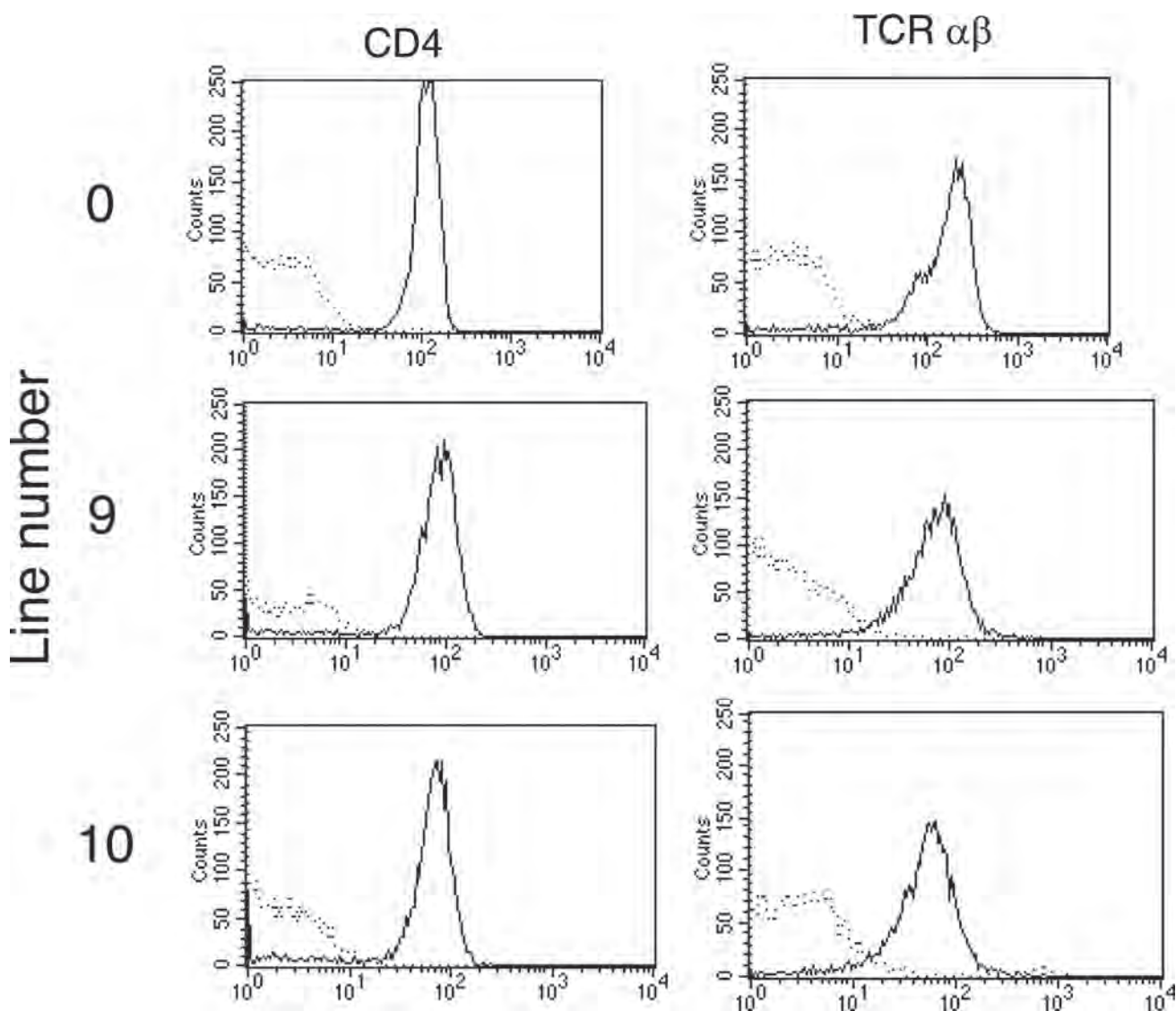


図5 腸間リンパ節CD3陽性Tリンパ球のTCRトランスジェニックマウスにおけるフローサイトメトリーパターン
成熟T細胞ほとんどがTCRトランスジーンを発現し、CD4陽性細胞として成熟しており、遺伝子再構成装置を欠くRAG2ノックアウトマウスをバックグラウンド遺伝子とした交配ラインでも同様であった。

6. TCRトランスジェニックマウスを用いた即時型アレルギーの解析^{5)~9)}

図2に示した4つの型の非自己に対するアレルギーの中で最も症例が多く重要なのはI型アレルギー(気管支喘息、花粉症、枯草熱、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、蕁麻疹など)である。卵白アルブミンに

特異性を有するTCRのトランスジェニックマウスのCD4陽性T細胞は、I型のアレルギー反応の惹起にどのような関係性を持つのだろうか。

I型アレルギーを起こす卵白アルブミン特異的IgE抗体の産生を、卵白アルブミンの経口投与で試みると、我々のTCRトランスジェニックマウスでは、図8に示した抗体産生パターンを示した。

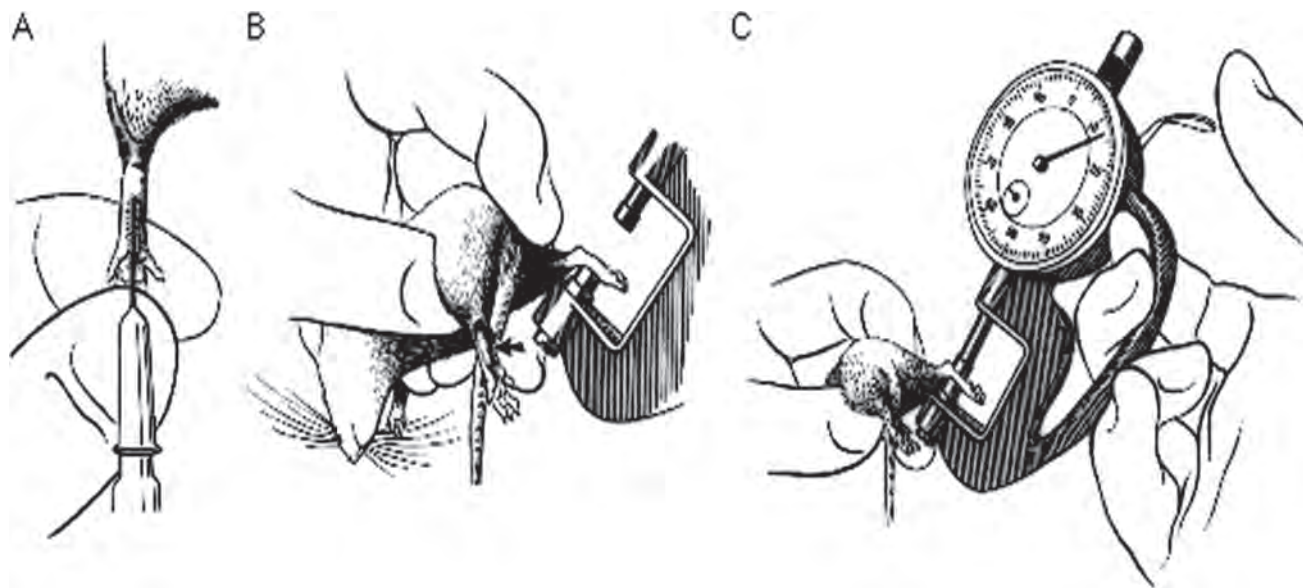


図6 遅延型アレルギー反応試験
マウス下肢フットパッドに一定量の抗原を注入し、48時間後にノギスで注入部フットパッドの腫脹をノギスで測定する。

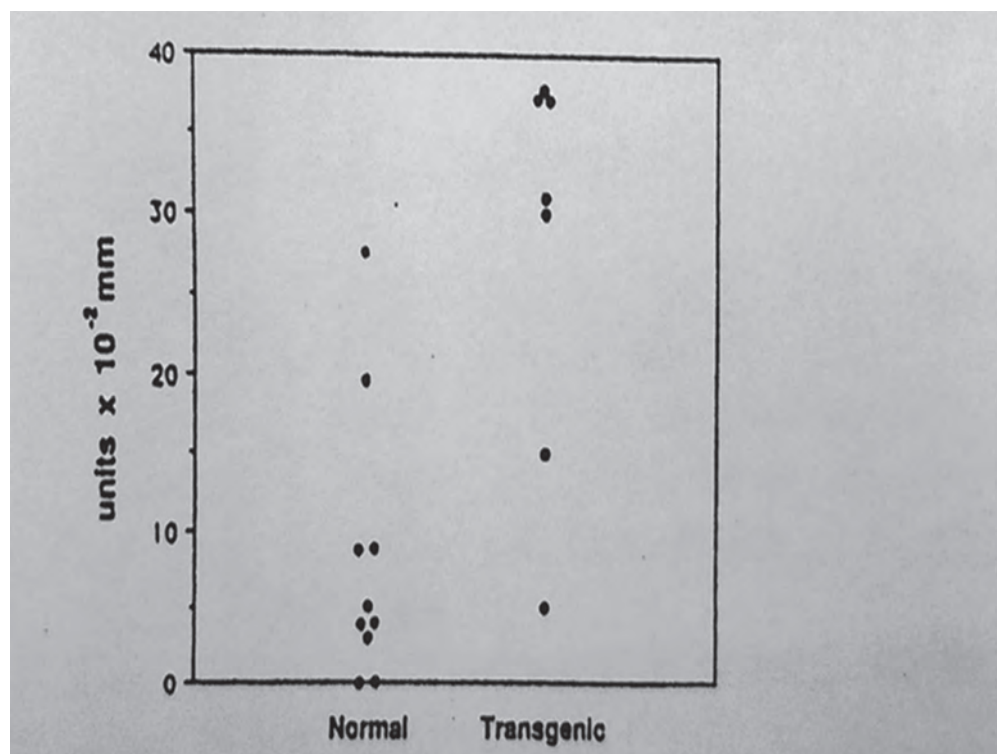


図7 ナイーブT細胞によって惹起される遅延型アレルギー反応(DTH)
正常マウスは、フットパッドに卵白アルブミンを注入しても、DTH反応は強く惹起されない(左)が、TCRトランスジェニックマウスでは、ばらつきこそあれ、強いDTHが誘導される。

ヒトI型アレルギーでは、気管支喘息、花粉症、枯草熱、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシーショック、蕁麻疹などが誘導されるが、このトランスジェニックマウスを用いて全身性のアナフィラキシーショックが誘導されるか否かを検討した。図9に示されるように、経口抗原投与による卵白アルブミン特異的IgE抗体産生量とアナフィラキシーショックの重篤度は正の相関を持つことが判明した。

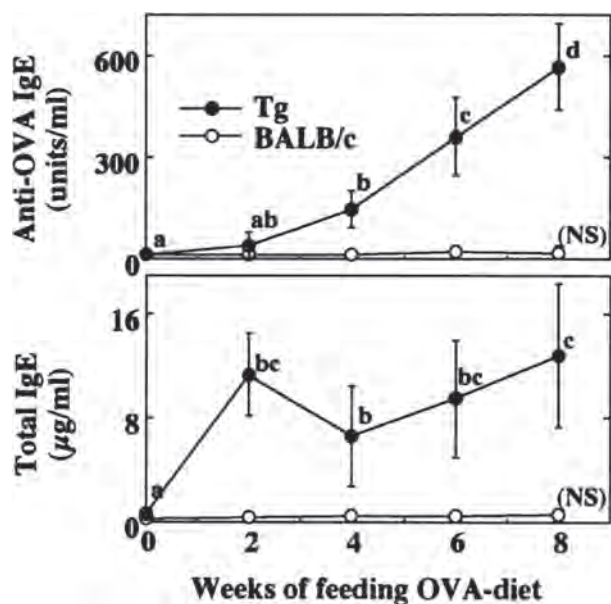


図8 卵白アルブミン(OVA)特異的IgE抗体の経口投与による誘導
OVAを20%含む固形飼料を餌に与え、2週おきに血中IgE抗体価を酵素抗体法で測定した。アラムとともに腹腔過免疫したマウス血清を1000unitとした相対unitで抗体価を示したトランスジェニックマウスで有意にOVA特異抗体の産生が誘導された。

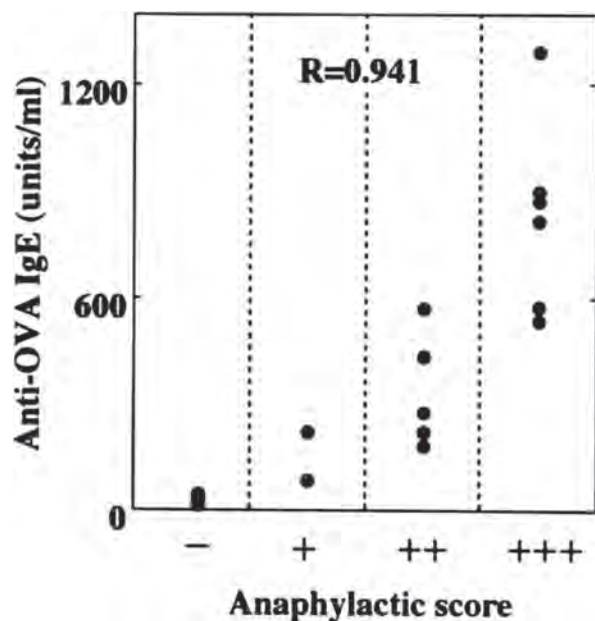


図9 血中卵白アルブミン特異的IgE抗体の産生量とアナフィラキシスコアの相関
1mg/0.1mlの卵白アルブミンを尾静脈から注入後、30分間観察した。
-:無反応、+:動けるが動作が緩慢、++:動けず、うずくまる、+++ :昏倒し痙攣する。

7. おわりに

我々のTCRトランスジェニックを用いた研究により、I型アレルギー(即時型アレルギー)とIV型アレルギー(遅延型アレルギー)は、アレルギー反応として複合的に惹起されることが推定された。最近、アレルギーの反応連鎖が、アレルギー症例の多くで報告されているようになってきた¹⁰⁾が、我々のTCRトランスジェニックマウスを用いた研究が先駆けになっていたら幸いである。

次回は、抗原の侵入量と免疫応答の関係、ワクチンの投与量は何によって規定されるのかといった、免疫学の基本的な問題をTCRトランスジェニックマウスで解析した結果を紹介したい。

参考文献

- 1) 熊谷善博. 蛋白質核酸酵素. 1986. 31. 813-830.
- 2) Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. Cellular and Molecular Immunology. 2nd ed., W.B. Saunders, 1994, 457p.
- 3) 富岡玖雄, 羅智晴 編著. マスト細胞とアレルギー. 医科学出版社, 1993, 224p.
- 4) Sato, T.; Sasahara, T.; Nakamura, Y.; Osaki, T.; Hasegawa, T.; Tadakuma, T.; Arata, Y.; Kumagai, Y.; Katsuki, H.; Habu, S. Eur. J. Immunol. 24, 1994, 1512-1516.
- 5) Shida, K.; Makino, K.; Morishita, A.; Takamizawa, K.; Hachimura, S.; Ametani, A.; Sato, T.; Kumagai, Y.; Habu, S.; Kaminogawa, S. Int. Archive. Allergy and Immunol. 1998, 115, 278-287.
- 6) Ise, W.; Totsuka, M.; Takato, R.; Hachimura, S.; Sato, T.; Ametani, A.; Kumagai, Y.; Habu, S.; Kaminogawa, S. FEBS Letters. 2000, 465, 28-33.
- 7) Shida, K.; Hachimura, S.; Ametani, A.; Ishimori, M.; Ling, M.; Hashiguchi, M.; Ueda, Y.; Sato, T.; Kumagai, Y.; Takamizawa, K.; Habu, S.; Kaminogawa, S. J Allergy Clin.Immunol. 2000, 105, 788-795.
- 8) Ise, W.; Totsuka, M.; Sogawa, Y.; Ametani, A.; Hachimura, S.; Sato, T.; Kumagai, Y.; Habu, S.; Kaminogawa, S. J. Immunol. 2002, 168, 3242-3250.
- 9) Goto, M.; Hachimura, S.; Ametani, A.; Sato, T.; Kumagai, Y.; Habu, S.; Ishikawa, H.; Kaminogawa, S. Biosci Biotechnol Biochem. 2003, 67, 1223-1229.
- 10) Murphy, K. "IgE-mediated allergic reaction have a rapid onset and can lead to chronic responses." Janeway's Immunobiology. 8th ed., Garland Science Press, 2011, 587-589.
- 11) 熊谷善博. Dear Pharmasist. 2013, 16, p3.

宿主に有益な働きをもたらす 生きた微生物—プロバイオティクス

Probiotics, as a friendly bacteria that stimulate host health

ミヤリサン製薬株式会社 東京研究部部長 高橋 志達
Motomichi Takahashi (Director)

Tokyo R&D center, Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd.

1. はじめに

「プロバイオティクス (probiotics)」とは、Fuller¹⁾により提唱された「宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物」を示す言葉であり、その語源は、生物に拮抗的に働く antibiotics に対し、「生命の為」よりなる。現在では、スーパーマーケットやコンビニエンスストアのヨーグルトや乳酸菌飲料コーナーにおいて良く目にするものであり、健康増進や医療分野において、多くの有用性が期待されている。本稿では、プロバイオティクスの働きについて概説する。

2. プロバイオティクスの使用菌種

プロバイオティクスは前述の定義の通り、生きた微生物を用いた生菌製品であり、これらには発酵乳を含む飲料、食品および医薬品としての生菌製剤などが挙げられる。

プロバイオティクスには *Lactobacillus* spp.、*Bifidobacterium* spp.、*Enterococcus* spp.、*Bacillus* spp.、および *Clostridium* spp. 等の幅広い細菌が用いられる²⁾。尚、本邦では、これまでである一定の菌種であれば、同等の有効性や安全性が期待されてきたが、近年では、欧米を中心に、プロバイオティクスの有効性は菌種レベルではなく、菌株に依存しているとの観点から、菌株レベルでの有効性および安全性を調査する必要があると報告されている³⁾。

表1 プロバイオティクスの特徴

定義	腸内細菌叢を正常化させることにより宿主に有益な作用をもたらす生きた微生物
使用菌属	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Torulopsis</i> spp.
必要条件	宿主に対し無害であり、胃酸や胆汁酸により殺菌されず腸管内において増殖性を有する
作用機序	・菌体成分による宿主免疫応答の修飾 ・菌体または産生される酵素による腸管内の物質代謝や栄養素の補完および吸収改善 ・産生されるバクテリオシンや有機酸による腸管感染症の抑制 ・免疫応答および短鎖脂肪酸の産生による腸管内の炎症や潰瘍の抑制 ・発癌関連酵素の活性低下による大腸癌等の抑制
臨床的有用性	・消化管感染症の予防および治療 ・抗生物質起因下痢症 (<i>Clostridium difficile</i> 腸炎) の予防および治療 ・炎症性腸疾患の緩解導入および維持 ・過敏性腸症候群の緩和 ・旅行者下痢症の予防 ・尿路感染症および細菌性膣炎の改善

3. プロバイオティクスの有用性

プロバイオティクスの有用性には多様な報告があり、その代表的な効果には①宿主腸内細菌叢の改善による各種疾病の予防または治療、②腸管病原性細菌に対する増殖抑制または毒素産生抑制による、その感染防御効果、③宿主免疫応答の調節による自己免疫疾患の改善、④発癌関連酵素の活性低下による大腸癌の予防または治療効果等が良く知られている。いずれの効果も表1に示すとおりプロバイオティクスによる直接または間接的な作用の相互の連携により発揮される⁴⁾。

4. プロバイオティクスによる腸管感染症対策

腸管病原性細菌の感染防御に与えるプロバイオティクスの有用性は、世界中で検討されており、そのメカニズムとして、①プロバイオティクスにより産生されるバクテリオシンや有機酸による直接的な殺菌作用、②病原性細菌の腸管内の付着部位での競合による定着阻害作用および③栄養素の競合による病原菌の増殖抑制作

用が考えられている。

腸管出血性大腸菌 O157 に対する効果

著者ら⁵⁾は、プロバイオティクスの有する感染制御作用のメカニズムを腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) O157: H7を用いて検討し、*in vitro*および*in vivo*において、プロバイオティクスとして用いた *Clostridium butyricum* MIYAIRI588 株が EHEC O157: H7 の増殖および産生される2種類の毒素 stx1 および stx2 の産生抑制、上皮細胞への付着抑制および致死抑制効果を報告している。

Fukuda⁶⁾らは、前述のようなプロバイオティクスによる腸管出血性大腸菌 O157 の感染制御を、プロバイオティクスが産生する各種有機酸に注目し、種々の検討を加えている。本研究では、プロバイオティクスとして代表的な菌種である *Bifidobacterium* spp. が、無菌マウスを用いた EHEC O157 モデルにおいて、顕著な感染防御効果を発揮するのに対し、同じ菌でありながら、それらが産生すべき有機酸である酢酸の産生能を knock out した菌株では、その感染防御効果が失われることを示

表2 Experimental infection with *Clostridium difficile* in gnotobiotic and specific pathogen-free (SPF) mice pre-infected with *C. butyricum*. (文献6より)

Mice	<i>C. butyricum</i> pre-infection	No. dead mice/total mice (%)	
		1 day after challenge	2 days after challenge
Germ-free	-	5/7 (71.4)	6/7 (85.7)
	+	1/10 (10.0)	2/10 (20.0)
SPF	-	0/10 (0.0)	0/10 (0.0)
	+	0/10 (0.0)	0/10 (0.0)

C. butyricum M588 strain was infected 5 days before the challenge with *C. difficile*.

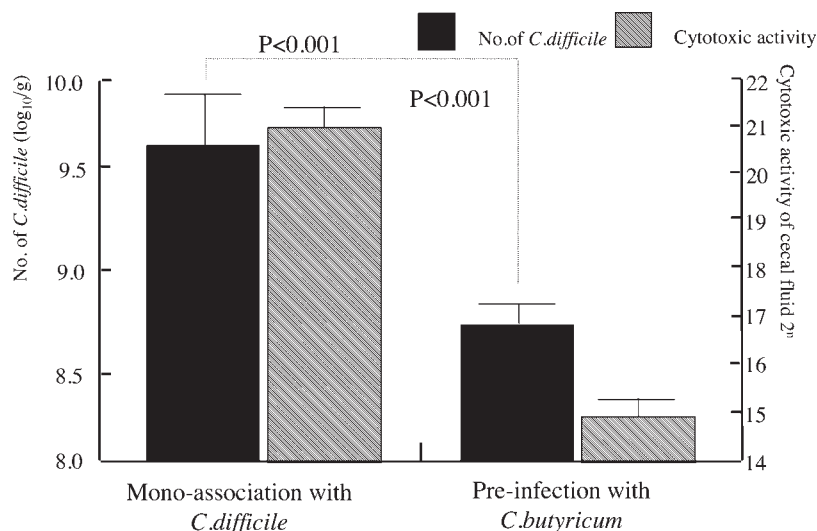


図1 Population levels of *C. difficile* in the cecal contents of gnotobiotic mice. (文献6より)

し、本菌種による腸管出血性大腸菌 O157 の感染防御作用は、有機酸に依存することを報告している。

Clostridium difficile 感染症に対する効果

Clostridium difficile は抗菌薬誘導下痢症や偽膜性大腸炎の原因菌として知られ、近年では院内感染の原因菌としても注目されている⁷⁾。

Kamiya⁸⁾らは、*C. butyricum* MIYAIRI 588 株の *C. difficile* に対する感染防御作用を無菌および SPF マウスを用いて検討した。すなわち、強毒株である *C. difficile* VPI10463 株 (1.9×10^5 CFU/mouse) を無菌マウスに経口感染させたところ、感染 2 日目までに約 86% のマウスが激しい出血性腸炎を発症し致死したが、*C. difficile* の感染前に *C. butyricum* MIYAIRI 588 株 (4.0×10^8 CFU/mouse) を投与していたマウスでは致死率が 20% まで抑制された。一方、腸内細菌叢を保有する SPF マウス (ICR, 8 week, female) は、*C. difficile* を経口感染させても *C. butyricum* MIYAIRI 588 株の投与の有無に関わらず全てのマウスが正常であった (表 2)。

本結果を細菌学的に解析した結果では、*C. butyricum* MIYAIRI 588 株の投与マウスの盲腸内容物中における *C. difficile* の菌数およびウサギ腎細胞 (RK13) に対する細胞障害活性が *C. difficile* 単独感染マウスに対し顕著に抑制されていた (図 1)。

以上の結果から、*C. butyricum* MIYAIRI 588 株は

C. difficile の増殖抑制および毒素産生抑制効果を有し、感染防御効果を発揮し得ることが示唆されている。

5. プロバイオティクスの臨床応用

抗生物質起因下痢症 (Antibiotic associated diarrhea; AAD) に対する効果

何らかの感染症に罹患し、抗菌剤が投与される患者のうち、20% 以上が抗生物質起因下痢症 (Antibiotic associated diarrhea; AAD) を発症するリスクがあると考えられており、これらは患者の治療および入院期間の延長につながる。本疾患には、*C. difficile* やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 等も関与している。AAD に対するプロバイオティクスの有用性も、多くの報告があり、その一部を表 3 に示した。この分野でもプロバイオティクスの臨床応用が期待されるとともに、*C. difficile* や MRSA の院内感染対策にも期待される⁹⁾。

Seki¹⁰⁾らは、110 例 (生後 1 ヶ月から 15 歳) の小児を対象に、抗菌薬療法中の腸内細菌叢の変動と、ミヤBM (*MIYAIRI* 588 株を使用した宮入菌製剤) の抗菌薬誘導下痢症の抑制効果を報告している。対象患者のうち 27 例 (生後 1 ヶ月から 8 歳; 平均年齢 1.9 歳) は抗生物質を単独で投与され、38 例 (平均年齢 3.1 歳) は抗生物質投与 3 日目よりミヤBM の併用を開始した。また、45 例 (平均年齢 2.0 歳) は抗生物質療法の開始と同時に

表 3 プロバイオティクスによる抗生物質起因下痢症の防御作用

抗生物質	プロバイオティクス	有効性 ^{a)}
Ampicillin	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i>	8.3% vs 21% (n=98)
Neomycin	<i>L. acidophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i>	20% vs 42% (n=39)
Amoxicillin-clavulanate	<i>L. acidophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i>	有効 ^{b)} (n=27)
Antituberculous	<i>Enterococcus faecium</i> SF68	5% vs 18% (n=200)
種々	<i>E. faecium</i> SF68	8.7% vs 27.2% (n=45)
Erythromycin	<i>Bifidobacterium longum</i>	有効 (n=10)
Erythromycin	<i>L. rhamnosus</i> GG	有効 (n=16)
種々	<i>L. rhamnosus</i> GG	17% vs 48% (n=188)
Clindamycin	<i>B. longum</i> + <i>Lactobacillus</i>	有効 (n=10)
β-lactams	<i>Saccharomyces boulardii</i>	4.5% vs 17.5% (n=388)
種々	<i>S. boulardii</i>	9.5% vs 21.8% (n=180)
β-lactams	<i>S. boulardii</i>	7.2% vs 14.6% (n=193)
種々	<i>Clostridium butyricum</i>	5-9% vs 59% (n=110)

a) 抗生物質服用後の腹部症状発症率 (プロバイオティクス投与群 vs 対照群), b) 著者らにより有効性は報告されているが、2 群間の発症率の比較はされていない。文献 9) を一部追加、改変

ミヤBMの投与を開始した。

試験では抗生物質投与前の便性状および腸内細菌叢と、抗生物質投与3日目および6日目の各項目を比較検討している。その結果、抗生物質を単独で投与された患者の腸内細菌叢では、ミヤBM投与患者に比し、偏性嫌気性菌の顕著な減少および*Bifidobacterium*の検出率の顕著な減少が確認された。また、抗生物質投与による抗生物質誘導下痢症は、抗生物質単独群で59%の患者に認められたが、ミヤBMを併用した群では5%まで低下した(図2)。

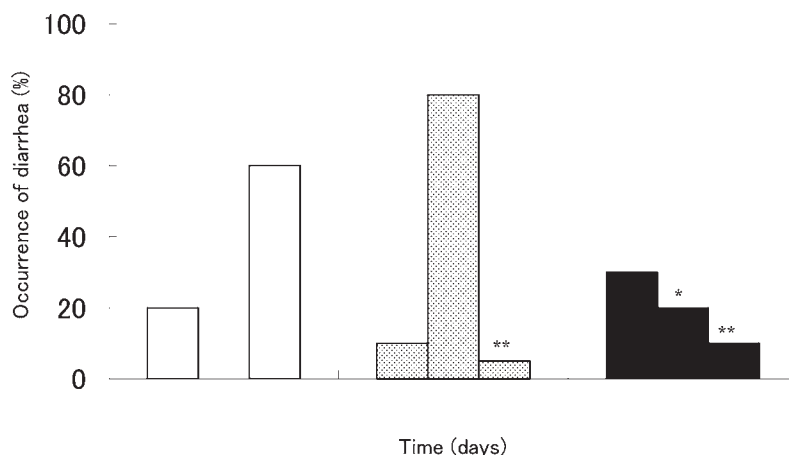


図2 The occurrence of diarrhea in children who received (□) only antibiotics, (▨) *Clostridium butyricum* MIYAIRI (CBM) from the mid point, and (■) CBM from the beginning of therapy. * $P<0.05$, significant difference compared with (▨). ** $P<0.05$, significant difference compared with (□). (文献10より)

過敏性腸疾患に対する効果

過敏性腸症候群(Irritable Bowel Syndrome; IBS)は消化器系疾患のなかでも、一般的な疾病であり、下痢や便秘を繰り返すものの、明確な原因が不明であり、且つ、治療に難渋するケースが多いことが知られている。本疾患へのプロバイオティクス投与も、各種薬物治療の代替療法として良く用いられる。Hoveydaら¹¹⁾は、本疾患に対するプロバイオティクスの効果について、MEDLINE (1950-2007)、EMBASE (1980-2007)、CINAHL (1982-2007)、AMED (1985-2007)の各種データベース上に報告されている14のプラセボ対照臨床研究成績をメタ解析することで臨床的意義を検討した。その結果、プロバイオティクスによるIBSの各種症状の緩和作用は認められるものの、対象となった臨床研究は4-26週と限られており、長期間にわたるIBSの疾患の特性を考慮した、より長い期間の検討の必要性を指摘している。

6. おわりに

プロバイオティクスの有用性について、基礎および臨床の観点から概説した。本分野は、様々な疾患を対象として数多くの研究が報告されているが、これまでは、腸管感染症や過敏性腸症候群等、主に消化器系疾患に対する有効性がその中心であった。一方、近年ではアトピー性皮膚炎や喘息、さらには肥満に至るまで、全身性の疾患や症状に対する効果も期待されつつある。今後の、プロバイオティクスの更なる研究に期待したい。

参考文献

- 1) Fuller, R. J. Appl. Bacteriol. 1986, 61, 1S-7S.
- 2) 神谷 茂. 日本臨床腸内微生物学会誌. 2000, 2, 3-7.
- 3) Rowland, I.; Capurso, L.; Collins, K.; Cummings, J.; Delzenne, N.; Goulet, O.; Guarner, F.; Marteau, P.; Meier, R. Gut Microbes. 2010, 1, 436-439, doi: 10.4161/gmic.1.6.13610.
- 4) Sanders, M.E.; Guarner, F.; Guerrant, R.; Holt, P.R.; Quigley, E.M.M.; Sartor, R.B.; Sherman, P.M.; Mayer, E.A. Gut. 2013, 62, 787-96, doi: 10.1136/gutjnl-2012-302504.
- 5) Takahashi, M.; Taguchi, H.; Yamaguchi, H.; Osaki, T.; Komatsu, A.; Kamiya S. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2004, 41, 219-226.
- 6) Fukuda, S.; Toh, H.; Hase, K.; Oshima, K.; Nakanishi, Y.; Yoshimura, K.; Tobe, T.; Clarke, J.M.; Topping, D.L.; Suzuki, T.; Taylor, T.D.; Itoh, K.; Kikuchi, J.; Morita, H.; Hattori, M.; Ohno, H. Nature., 2011, 469(7331), 543-547, doi: 10.1038/nature09646.
- 7) Cohen, S.H.; Gerding, D.N.; Johnson, S.; Kelly, C.P.; Loo, V.G.; McDonald, L.C.; Pepin, J.; Wilcox, M.H. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2010, 31, 431-455, doi: 10.1086/651706.
- 8) Kamiya, S.; Taguchi, H.; Yamaguchi, H.; Osaki, T.; Takahashi, M.; Nakamura, S. Rev. Med. Microbiol. 1997, 8, s57-59.
- 9) Marteau, P.R.; de Vrese, M.; Cellier, C.J.; Schrezenmeir, J. Am. J. Clin. Nutr. 2001, 73(suppl.), 430S-436S.
- 10) Seki, H.; Shiohara, M.; Matsumura, T.; Miyagawa, N.; Tanaka, M.; Komiyama, A.; Kurata, S. Pediatr. Int. 2003, 45, 86-90.
- 11) Hoveyda, N.; Heneghan, C.; Mahtani, K.R.; Perera, R.; Roberts, N.; Glasziou, P. BMC Gastroenterol. 2009, 9: 15. doi: 10.1186/1471-230X-9-15.

感染症四方山話(8): 感染症医のあり方

Various Topics concerning Infectious Disease (8)

Proposal of education for infectious disease physicians

順天堂大学医学部 感染制御科学／細菌学／総合診療科学 准教授 菊池 賢

Ken Kikuchi, MD, PhD.(Associate Professor)

*Department of Infection Control Science, Department of Bacteriology, Department of General Medicine,
Faculty of Medicine, Juntendo University*

1. はじめに

先日(2014年2月1-2日)に名古屋で開催された第25回日本臨床微生物学会にて、「臨床微生物・感染症学における人材育成」なるシンポジウムの企画があった。不肖、私には「十分な臨床微生物学的知識背景を有する臨床感染症学のspecialistを今後、どのように育成するのか」というテーマが与えられ、何か喋らなければならなかった。抄録提出の期限が迫り、お題目を決めなければいけない。「私が、感染症を目指す医師に望むこと」を考えていて、改めて自分の事で気がついたことがある。私は人に強要するのも、強要されるのも大嫌いだということだ。これでは「人をどう育成するか」などという大層なことはとても喋ることができないと頭を抱えた。しかし、自分のスタンスを見直してみて、私の提言が感染症医の一つのあり方として「あり」と感じてくれるならば、それはそれで若手の感染症医諸氏の参考にはなるかもしれないと思った。シンポジウムの時間は25分程度で、うまく伝えられなかつ

た点多々ある。そこで、今回の四方山話は自分なりの「感染症医のあり方」について雑感を書き連ねてみたいと思う。あくまでも個人の意見(個人的見解という言葉は、最近、やたらと政治の分野で連発され、あまり良い意味で使われていないが)なので、これには「正解」も「間違い」もないと思う。ただ、「こういう感染症医の形があっても良い」と何らかの参考にして頂ければ幸いである。

2. 私が捉えている感染症学

近年、感染症医を目指す若手医師が増えてきた。感染症学は「終わった学問」とされ、研究者は「抗菌薬メーカーの太鼓持ち」などと揶揄され、感染症を専攻する講座もほとんどなかった時代を知る人間にとっては、若手の台頭は何よりも嬉しい。

私は感染症学を「内科の王道」と考えている(図1)。感染症の専門家は、内視鏡や超音波検査などの特殊技能を持っている訳ではない。主訴、病歴、身体所見か

感染症学は臨床の中核を成す

- 内科の王道である
 - 病歴、全身所見、検査所見などを総合的に判断する能力を要求される
- 様々な全身疾患に関与
 - 悪性腫瘍、自己免疫疾患、神経疾患、変性疾患、内分泌・代謝疾患など
- 診断が治療に直結
- 伝播・蔓延する疾患である
 - 制御・安全管理・危機管理が重要

らおおよその鑑別診断の見当をつけ、一般検査、画像診断、そして微生物検査を実施する。得られた膨大な情報を総合的に判断することが要求されるが、これはまさしく「内科診断学」の原点である。感染症の診断・治療のプロセスを、腫瘍、代謝疾患、変性疾患のような他の疾患への対応と比較すると、両者の違いは際立っている。例えば、腹部にしこりがあるて病院を受診し、主治医が胃癌を疑ったとする。医師は内視鏡を予約するだろう。もちろん、貧血がひどいとか、悪液質で全身状態が不良で、栄養管理が必要だとか、理由があればその場で緊急検査を実施する場合もあるが、一般的には「それでは、1週間後に検査の予約をしましたので、いらして下さい。」との指示になることだろう。内視鏡を施行して、胃癌らしき病態が見つければ、生検を行い、病理診断にまわす。その結果が得られるのも1週間先などになる。手術適応があると判断され、外科に転科して入院予約をすると、また、1-2週間待たされる。結局、最初に受診してから治療にかかるまでに1ヶ月くらいを要することになる。一方、肺炎の患者を考えてみよう。患者は40歳男性、生来健康。発熱、悪寒戦慄が2日前からあって、咳嗽、黄色痰を訴えて受診した。主治医は主訴、病歴、身体所見から肺炎、特に肺炎球菌の肺炎を疑い、喀痰のグラム染色を実施する。多数の白血球と莢膜を有するグラム陽性双球菌が観察され、ほぼ肺炎球菌で間違いないと判断する。喀痰培養と血液培養を提出し、セフトリアキソン 1gの静注を行い、入院させた。そう、一部の亜急性～慢性感染症、例えば感染性心内膜炎などでなければ、診断と同時に必ず治療を実施する。培養検査の結果が判明して、確定診断がつくまで治療を待つことは稀である。即ち、培養検査はあくまでも初期診断と初期治療が正しかったかどうかを確

認するためのものであり、そこで診断・治療方針を再評価、転換するために行うのである(図2)。このため迅速診断、とりわけグラム染色は、多くの貴重な情報を教えてくれ、鑑別診断を絞る上で非常に重要である。診断が治療に直結し、セットで実施されるという臨床は他ではあまり経験できない。また、培養検査の結果が判明する2-3日後には自分への審判が下されることと合わせて、感染症医は常に自分の臨床技能・嗅覚を研ぎすます必要性にかられ、良い緊張感を持って臨床の醍醐味を満喫しているのではないかと思う。

また、他の疾患と感染症の根本的な違いは、病気の原因が自分以外の生命体(ウイルス、プリオンなども含まれるから、必ずしも「生き物」であるとは言えないが)であることだ。この生命体は自然発生する訳ではない。どこからか入り込んで「感染」するのである。即ち、伝播・蔓延する疾患なので、個々の患者を扱う場合は、患者個人の診断・治療の一般的な臨床のプロセスに加えて、マスとしての管理、他に感染を広げない為の予防対策、言い換えれば、疾患自体の危機管理・安全管理が必要になるということである。今では感染制御部門の重要性は大分、認識されるようになってきたが、感染症は医療機関の組織を横断して認識を共有する必要がある疾患なのである。

また、*Helicobacter pylori*と胃癌の関係のように、近年は感染症による慢性炎症が、悪性腫瘍、自己免疫疾患、変性疾患などの感染症以外の疾患発症に密接に関わっていることが明らかになってきた。常在菌叢、保菌、持続感染、内因性感染といったこれまでにあまり注目されてこなかった感染症や感染病態が様々な疾患の予防、診断、治療に直結する可能性が出てきている。今や感染症医は新たな活躍の場を得て、力を求められていくことになるだろう。

感染症診断・治療の流れ

初期診断→初期治療

↓ 2-3日 2-3日後
再評価 ← 繰り返し

診断の評価・治療変更

3. 感染症の面白さ

感染症学の臨床の醍醐味に加え、life scienceとしての感染症学もまた魅力に溢れている(図3)。感染症で戦うべき相手を深く知る学問、それが感染症学の根本、土台となる臨床微生物学である。感染症学は臨床微生物学の上に築かれていると換言して良い。

感染症で戦う相手は人間に比べて、極めて増殖、世代交代が早く、我々が有史以来、築いてきたことを1日で再現してしまえる。即ち、進化の過程を目の当た

図2

りにすることが可能なのだ。大腸菌や酵母が様々な生命現象のモデル生物として科学の発展に大きく寄与してきたように、高度な生命現象に対して簡略化した解決の道筋を示してくれる。更に、相手は自分たちとは異なる存在であるから、臨床微生物の研究は、そのまま診断・治療に直結できるものが多い。敵は自分たちと異なる相手であるから、撲滅、制御できる可能性もある。臨床微生物学的アプローチを経た感染症学は研究自体のモチベーションを上げやすい学問と言える。

しかし、その魅力を満喫できるかどうかは臨床微生物学的視点と素養をどの程度持つかに深く関わっている。患者体内で起こっていることは、自分以外の生命体と自己との戦いである。敵を知らねば、攻撃態勢を取ることはできない。植物の種だけ見ても成長した草木を想像することはできない。机上で学んだ知識と、実際に自分で扱った経験では、病態をイメージする上でも大きく違ってくるだろう。

私は感染症の診断・治療という臨床のプロセスを考えると、患者に起こっている病態生理と同時にそこにいると思われる微生物の状態(想定される微生物が今、どのような状態にあるのか、biofilmの陰でじっと身を潜めて嵐が過ぎ去るのを待っているのか、それともcompetenceを発動し、毒素をまき散らし、爆発して全身に飛び出そうとしているのか)をイメージする。いじけて死んだふりをしている微生物にはどのように戦えば良いのか? 活発に増殖する菌をコントロールするにはどうすべきか? 戦略はその時の宿主と起因微生物の戦場のイメージで変わる。微生物を深く知れば知る程、イメージは膨らむ。イメージが膨らめば、臨床の醍醐味も倍増する。見える風景が違ってくるのである。

感染症学は面白い

- Life Scienceの対象
- 進化の過程を試験管内で再現できる
- あらゆる生命現象のモデルになりうる
- 様々な全身疾患との関連性
- 基礎研究が臨床に比較的直結する
- 撲滅、制御できる可能性がある
- 自然界の摂理、本質を体現する

図3

4. 感染症学・臨床微生物学をどこで学ぶか

ここで、現在の医師育成過程を考えてみよう。感染症学を独立した臨床科として教えている医学部はまだ数少ない。多くは臓器別診療科でそれぞれ関与する感染症を学んでいることと思われる。感染症科として教えているところでも、臨床微生物学をセットで教えているカリキュラムはほとんどないではなかろうか。一方、「微生物を手にする経験」は医学部基礎医学(3年生か4年生)の微生物学実習以外にはないであろう。だが、どの程度の医学生が臨床を学んだ時に、この体験を自分の骨肉としているだろうか。自分の目指す医師や臨床現場のイメージがまだ臆げな時分に、微生物学実習のモチベーションを上げることは容易ではない。また、最近の微生物学実習は、取り扱う微生物の種類も少なく、ほとんど生の微生物を扱わず、PCRなどの分析法を導入している。益々、臨床微生物を体験する場は医学教育の中で少なくなっている。

ではどうすべきか。医学教育の中で感染症学のカリキュラムに臨床微生物学実習を組み込むのが一番の早道だろうが、1~2日の実習で感染症の骨肉になる臨床微生物学の素養を身につけるのは無理である。やはり、臨床研修の中で1ヶ月でも良いから、微生物検査室で修行させることが一番の近道かと思う。培養検体をグラム染色、培養、分離、同定、感受性試験まで検査技師と同じ体験をさせる。グラム染色のみならず、培養検査で相手が生き物であることを体験してもらおう訳である。培養検査の流れがわかれば、無駄なオーダーが出さなくなる。また、自分が提出する培養検査でどんな微生物が生えるか、イメージすることができる。生き物を扱えば、教科書通りにいかないことなど日常茶飯事であることがよくわかる。そうすれば必ず、疑問を持つことになる。その疑問を自分で解決できれば、違った風景が見えてくる筈だ。先入観を持たずに感染症に対峙することが如何に重要か、学ぶことになるだろう。そこで見えてきた昨日までは別の感染症の風景に興味を抱けば、自ら新たな探求の道をこじ開けて、感染症医を目指す人材が必ず出て来るだろう。

以前の感染症四方山話(3)(4)に書いたが、私は感染性心内膜炎と出会って、新しい風景を数多く見てきた。壁にぶつかる度に、あれこれ悩み、あがき、答えを見つけてきた。ブレイクスルー後には新たな風景の広がりを感じ

ることができる。これは至福の時であり、また、新たな試練の始まりでもある。それが感染症研究・臨床に執着している理由だと思う。

研修医や感染症医に微生物を扱わせるには検査室の負担、指導システムの整備など、解決せねばならない課題もあるが、決して世迷い言ではない。数年前、ある500床ほどの総合病院で講演を頼まれ、訪れた折に、その検査室で実施していたことなのだ。できれば指導する感染症医がこの一連の操作指導できれば一番良いのだが、自分で微生物を扱っている感染症医は残念ながらほとんどいない。指導者育成も今後の大きな課題になるだろう。

5. 微生物自然史に眼を向ける医師に

さて、話を臨床微生物学会シンポジウムに戻す。お題目の設定には頭を悩ませた。天の邪鬼の私は、通り一遍のタイトルでは面白くない。一見、聴衆を煙に巻きながら、何かを期待させるタイトルはないか。思いついたのは「自然史」という言葉である。タイトルは「微生物自然史に眼を向けられる医師像」と決まった。

私は1994年から3年間、アメリカ ニューヨーク市で留学生生活を送った。時折、足を運んだのが、マンハッタン島セントラルパーク西側にあった American Museum of Natural History だった。当時、私はセントラルパークを挟んで反対側の 72nd St. 3rd Ave. に住んでいたもので、よく散

歩がてら、また、博物館近くにある大きな八百屋 (Fairway Market)、魚屋 (Citarella)、ベーグル屋 (H&H Bagels)、リビング用品屋 (Zaybar's) への買い物ついでに、セントラルパークを横断して出かけた。日本で言えば国立科学博物館に相当する。ワシントンDCにあるスミソニアン科学分野の博物館は National Museum of Natural History、イギリス最大の科学博物館、ロンドン自然史博物館も Natural History Museum だ。皆、「科学博物館」ではなくて、正式名称は「自然史博物館」なのである。今でこそ、「自然史」なる名称は群馬県立自然史博物館、埼玉県立自然史博物館、大阪市立自然史博物館、豊橋市自然史博物館など、国内の博物館にも冠するところが増えてきたが、我が国ではまだまだ「自然史」はなじみがないかも知れない。「自然史」は直訳で、本来は「博物学」のことである。明治以降、museum に「博物館」の訳語が当てられたため、「Natural History Museum」をそのまま訳せば「博物学博物館」となって都合が悪いこともあったのだろう。我が国に元々ある言葉で言えば「本草学」となるが、残念ながら「本草学館」のような名前は耳にしたことがない。

話が横道に逸れたが、プリニウスの博物誌に代表されるように、古来、自然界に存在するあらゆる物を体系化する試み、即ち、博物学が行われてきた。科学の原点に「博物学」がある訳で、その哲学的経緯も踏まえて、博物学は広く自然科学を指すと捉えても良いだろう。古典的博物学の本質は分類学であるが、これは今なお、現在の

Tokyo Infection Conference (TIC)

- 設立 : 2003年7月9日(2014年1月現在、64回実施)
- 設立目的 : 感染症領域における基礎、臨床医学の専門知識の増進・普及と技術に貢献すること。
- 対象 : 医師、検査技師、薬剤師、看護師など。
- 形式 : 感染症症例検討会(CPC)
- 運営方法 : 登録制(参加希望者は事務局へ連絡し登録)
- 運営費 : 会費徴収(500円/回)
- 開催場所 : 東京女子医科大学病院、社会保険中央病院
順天堂大学病院の各当番(臨床講堂など)を持ち回り
- 開催時期 : 年6回—1, 3, 5, 7, 9, 11月
- 参加人数 : 毎回50-80名 登録一約200名
- 世話人 : 約20名(代表:順天堂大学 菊池 賢)

図4

臨床微生物学では「菌種同定」に絡んで重要な位置を占める。臨床微生物学を「感染症由来の微生物自然史の学問」と定義しても良いのではないだろうか。

「自然史」にはもう一つのメッセージを込めた。博物学は本来、「自ら蒐集」した自然界の万物を「自分の手で」分類、研究する学問であった。現代の博物学者といえば、南方熊楠のような存在であろうか。大事なことは「自分で」調べてみることである。

さて、今の感染症医の多くの興味は、「感染症の臨床」であって、患者の病態から感染症を捉えることに偏りすぎている気がしてならない。「自分で培養検査に手を下す」感染症医に是非会いたいと思う。

私は2003年7月から隔月で(年6回、12症例を検討) Tokyo Infection Conferenceという感染症症例検討会を主催している(図4。興味のある方は、是非、ご連絡賜りたい。セミクローズドな会なので、事前登録が必要)。元々は検査技師と感染症医の連携をはかる目的で始めた会だが、こんなに長く、一度も休まず継続するとは、当初は思っていなかった。これも次々に感染症を目指す若手の優秀な医師が増えたお蔭である。毎回、大体50-80名の参加があり、感染症医と検査技師がほぼ半々、薬剤師などの他の職種の方がこれに少し加わる。いわゆる clinical pathological conference (CPC) 形式で、司会者も会場の誰もが答え(診断名、起因微生物名)を知らない。主訴、現病歴、既往歴、家族歴、身体所見、一般検査、画像診断、と別々にスライドを作成し、その項目毎に、質疑応答を行って、会場の皆で最終診断を考えるというスタイルである(図5、6)。感染症医は鑑別診断までは積極的に参加し、非常に白熱した展開になることが多いの

だが、検出された菌種の同定の話になると急に静かになってしまうことが少なくない。グラム染色像から、コロニーの性状から、生化学的性状から、菌種の同定にも「鑑別診断」があり、「確定診断」するためには何をすれば良いのか、そこで病態から臨床医が総合的に判断して鑑別診断を挙げるのと同じような議論が生じる筈である。しかし、この議論に参戦する感染症医はほとんどなく、検査技師の人々の討論と相成るが、技師の方々は引っ込み思案な人が多いのか、中々、盛り上がった議論になることは少ない。「16S rRNA gene sequenceで〇〇に決まりました」というと、そこで議論は終結して、誰も疑問を挟まない。私は一人でも多くの感染症医に、新しい風景を感じ取ってもらい、ここに積極的に参戦して欲しいと願っている。そう、「微生物自然史に眼を向けられる感染症医」をめざし、「自分で微生物を扱う体験の果てに得られた臨床微生物学的素養を身につけた医師」になってほしいと切願しているのである。

6. おわりに

今回の四方山話は柄にもなく、説教めいたことを書いた。これには様々な異論、反論、ご意見もあることだろう。感染症医の育成、特に、微生物学への造詣の深い感染症医の育成は今後、益々必要とされるだろうが、その具体策は全く講じられていない。今回の話はあくまでも私見であるが、何か皆様のヒントになることもあるかと思う。これをお読みになられた方からご意見を頂戴できれば、こんな嬉しいことはない。最後に若い感染症医を目指す諸君! まだ見ぬ風景を見てみませんか?

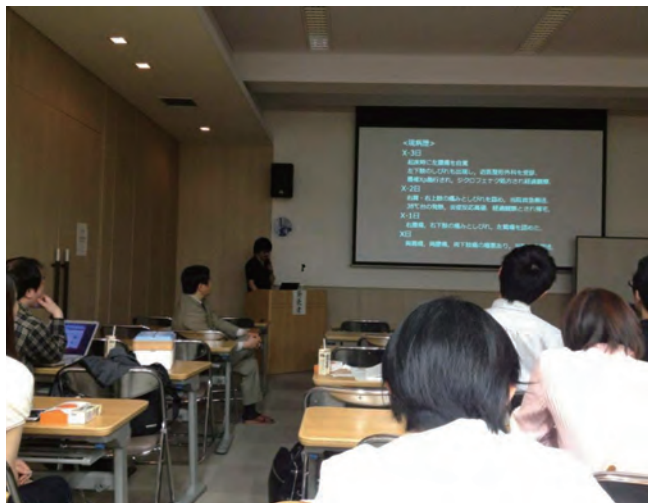


図5



図6

最近のトピックス



貝毒検査と貝毒標準品

貝毒とは、魚介類が生成する毒物(マリントキシン)の一種で貝類の毒を指す。貝毒は自然毒に分類され、ふぐ毒と同等の神経毒であり、貝毒検査は食品衛生上重要である。日本国内の貝毒検査は、公定法としてマウス毒性試験法が採用されている。マウス毒性試験法はマウスに対して致死毒性のある成分を一括して検出可能であるが、毒性物質の同定が困難であることや検出感度・精度の悪さが指摘されている。それに対し、機器分析は検出感度・精度が高いこと、成分毎に検出可能なことが利点として挙げられる。機器分析では未知毒物の同定はできないが、検査感度・精度が技術の習熟度に大きく依存しないことが一番の利点と考えられ、実際にEUの公定法では機器分析が採用されている。貝毒には、下痢性貝毒(DSP: Diarrhetic Shellfish Poison)(表1)、麻痺性貝毒(PSP: Paralytic Shellfish Poison)(表2)、記憶喪失性貝毒(表3)、神経性貝毒などがあり、機器分析による毒の同定は今後重要な分野になると考えられ、(独)水産総合研究センター中央水産研究所では、LC/MSによる貝毒分析手法に関する研修会が行われている。LC/MSによる分析を行うためには貝毒の標準品が必要となるが、合成による製造はできないため自然物からの抽出となり、国内にて製造を行っているメーカーはない。また、不確かさなどの値付けも必要となるため、検査技法などの習熟も必要となる。これらのことから関東化学では、カナダのNRC(National Research Council)より販売されている標準品の取次販売を開始し、現在はサキシトキシン以外の商品について、各種輸入販売を行える体制が整っている。さらに、これらの標準品の他にも、以前より販売しているマイティシルシリーズ(HPLCカラム)、新製品であるボーダレス(モノリスカラム)(図1)、イージーオーダープレミックス溶媒サービスなどにより、総合的に本検査の発展に貢献していきたい。

表1 下痢性貝毒

製品名	成分	CAS.No	濃度	溶媒	容量	製品番号
CRM-AZA1	Azaspicidin-1	214299-21-5	1.47 μM	ME	0.5mL	49915-00
CRM-AZA2	Azaspicidin-2	209799-92-7	1.5 μM	ME	0.5mL	49915-01
CRM-AZA3	Azaspicidin-3	209799-93-8	1.25 μM	ME	0.5mL	49915-02
CRM-DTX1	Dinophysistoxin-1	81720-10-7	18.5 μM	ME	0.5mL	49915-03
CRM-DTX2	Dinophysistoxin-2	130933-46-3	9.7 μM	ME	0.5mL	49915-07
CRM-OA-c	Oksalic acid	78111-37-6	1.7 μM	ME	0.5mL	49915-09
CRM-YTX-b	Yessotoxin	112514-64-2	4.9 μM	ME	0.5mL	49915-10
CRM-NYTX	homo-yessotoxin	198201-04-1	5.0 μM	ME	0.5mL	49915-14
CRM-PTX2	pectenotoxin-2	97564-91-5	10.0 μM	ME	0.5mL	49915-15

表2 麻痺性貝毒

製品名	成分	CAS.No	濃度	溶媒	容量	製品番号
CRM-C1&2-b	N-Sulfocarbonyl gonyutoxin-1 N-Sulfocarbonyl gonyutoxin-2	80173-95-4 80226-62-6	11.9 μM 33.9 μM	17 μM AA	0.5mL	49915-03
CRM-doGT&3-b	Decarbonyl gonyutoxin-2 Decarbonyl gonyutoxin-3	86936-67-4 87008-53-7	11.8 μM 26.1 μM	0.003M HCl and 0.01M AA	0.5mL	49915-04
CRM-doSTX-b	Decarbonyl gonyutoxin	58911-04-9	65 μM	0.003M HCl	0.5mL	49915-05
CRM-NEO-c	Neosaxitoxin	54296-20-4	65.8 μM	0.003M HCl	0.5mL	49915-08
CRM-GYM	gymnodimine	173792-58-0	9.8 μM	ME	0.5mL	49915-13
CRM-SPXI	13-Desmethyl spirolide C	334974-07-1	10.2 μM	ME	0.5mL	49915-16
CRM-doNEO-c	decarbonyl-neosaxitoxin	68683-58-9	29.4 μM	0.003M HCl	0.5mL	49915-17
CRM-GTX1&4-c	gonyutoxin-1 gonyutoxin-4	50148-99-2 54296-26-0	60.4 μM 19.7 μM	0.003M HCl and 0.01M AA	0.5mL	49915-18
CRM-GTX2&3-c	gonyutoxin-2 gonyutoxin-3	60506-99-6 80597-65-7	11.42 μM 43.4 μM	0.003M HCl and 0.01M AA	0.5mL	49915-19
CRM-GTX5-b	gonyutoxin-5	54296-25-9	65 μM	17 μM AA (pH5)	0.5mL	49915-20
CRM-ATX	anatoxins	54285-08-9	30 μM	ME/W:9/1 and 0.1% AA	0.5mL	49915-21
CRM-CYN	cylindrospermopsin	143545-90-9	30 μM	DMA	0.5mL	49915-22

表3 記憶喪失性貝毒

製品名	成分	CAS.No	濃度	溶媒	容量	製品番号
CRM-ASP-Mu-d	muscle tissue (domoic acid and some its isomers)		49 μg/g	-	2 × 4g	49915-11
CRM-DA-f	domoic acid	14277-97-5	327 μM	ALWA:1:19	0.5mL	49915-12



図1 ボーダレス



関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
室町東三井ビルディング
電話 (03)6214-1056 FAX (03)3241-1029
インターネットホームページ <http://www.kanto.co.jp>
編集責任者 金田 尚 平成26年4月1日 発行