

カンジダ菌体抽出物による マウス系統的血管炎誘発モデルと川崎病

高橋 啓 大原関利章 村田 久雄 直江 史郎

要 旨：川崎病は小児に好発する系統的血管炎症候群である。われわれは川崎病剖検例の病理組織学的検討を行う一方で、カンジダ菌体抽出物によるマウス系統的血管炎誘発モデルを用いた検討を進めている。本モデルでは冠状動脈炎が高頻度に発生し、病変分布や組織像などは川崎病に類似する。川崎病動脈炎と本誘発動脈炎モデルを対比させながら、両者の類似点、相違点について整理した。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, 43: 673-678)

Key words: Kawasaki disease, Systemic vasculitis, Coronary artery aneurysm, *Candida albicans*, Animal vasculitis model

はじめに

川崎病は、1967年川崎富作博士により報告¹⁾された乳幼児に好発する原因不明の急性熱性発疹性疾患である。当初は予後良好と考えられていた本疾患であるが、全身の血管炎が惹起され、特に冠状動脈炎に基づく動脈瘤の血栓性内腔閉塞による虚血性心疾患が招来されることで社会的に注目された。現在、累積患者数は17万人を超え、新規報告患者数も年々増加している。川崎病は症候の組み合わせによりなされる臨床診断であり、治療にはアスピリンと免疫グロブリンの経静脈的大量投与(IVIG)の併用療法が広く施行されている。IVIG療法の有効性は広く認知されているが、10～20%の症例は本療法に反応不良あるいは不応で、IVIGの追加投与やステロイド、好中球エラスターゼ阻害剤などの代替、補充療法が必要となる²⁾。

われわれは、川崎病剖検例を用いた病理組織学的検索を進めている一方で、村田等³⁾が開発したカンジダ菌体抽出物(*Candida albicans*-derived substance: CADS)によるマウス系統的血管炎誘発モデルを用いた検討を進めている。本モデルにおいても冠状動脈炎が高頻度に発生し、病変分布、組織像の類似性などから川崎病動物モデルとしての評価を受けている。

本稿では、川崎病動脈炎とCADS誘発動脈炎モデルについてこれまでの検討結果を対比させながら、類似

点、相違点について整理してみたい。

1. カンジダ菌体抽出物による マウス系統的血管炎の誘発

川崎病罹患児糞便から分離培養した*Candida albicans* (*C. albicans*)を、2%グルコース添加サブロー液体培地にて37℃、72時間静置培養する。集菌後、熱水、0.1, 0.5M KOHにて菌体成分の抽出を行い、透析の後、アルコール沈殿させたものをCADSとして実験に用いる。

通常の実験プロトコルを以下に示す。4週齢、雄の近交系あるいはクローズドコロニーマウスを購入し、1週間試験飼育した後、実験第1週目と第5週目にそれぞれ連続5日間、PBSに懸濁したCADSを腹腔内に4mgずつ接種する。第9週目に麻酔下で心臓採血にて屠殺。剖検し諸臓器をホルマリン固定後、心、腎、肺、肝、脾、胸腺、睾丸など全身諸臓器のパラフィン包埋薄切片標本作製し、光学顕微鏡を用いて血管炎の有無、その性状を検討する。一方、分離した血清は-80℃にて保存する。

2. 動脈炎の病理組織像

川崎病動脈炎の病理組織学的特徴は、増殖性肉芽腫性炎症と表現しうるマクロファージをはじめとする大単核細胞の著しい集積にあり、病変形成にはこれら大単核細胞の異常な活性化が関与していると推測され

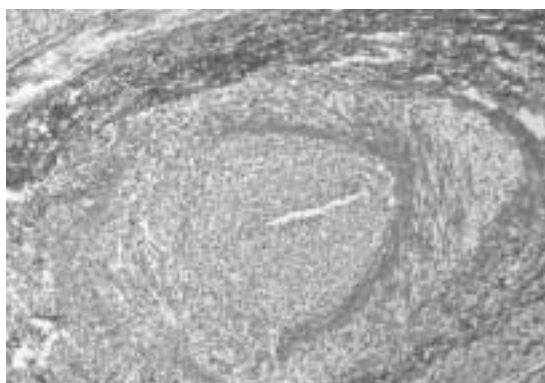


Figure 1 Granulomatous proliferative panarteritis in a patient who died 27 days after the onset of Kawasaki disease.

る^{4,5)}(Fig. 1)。フィブリノイド壊死をみることは極めてまれである。一方、分葉白血球、特に好中球の関与について、好中球エラスターゼやミエロペルオキシダーゼに対する抗体を用いて免疫組織学的に検討したところ、好中球はマクロファージやリンパ球に先行するピークを示す浸潤パターンを示した⁶⁾。好中球から産生、放出されるプロテアーゼなどの諸酵素が、動脈瘤発生に至る初期の動脈壁障害に関与している可能性がある(Fig. 2)。

一方、CADS誘発動脈炎モデルでも、動脈病変に主として出現するのはマクロファージや線維芽細胞などの大単核細胞であり、この点で増殖性肉芽腫性炎症と表現する⁷⁾(Fig. 3)。また、病変内には好中球、リンパ球、形質細胞などの炎症諸細胞を混じるが、好中球浸潤の程度は川崎病に比して高度である。動脈内膜は細胞線維性肥厚をきたし、中膜平滑筋層の消失や内・外弾性板の断裂を伴う。外膜にも広い範囲で大単核細胞をはじめとする諸細胞の集積が認められる。また、本実験系でもフィブリノイド壊死をみることは比較的稀である。

2-1 動脈炎の経時的推移

川崎病冠状動脈炎は、6～8病日例でみられる動脈中膜の水腫性疎開性変化に始まり、10病日頃に汎血管炎に至る。同時に炎症は血管全周に進展し、12病日頃には動脈瘤が形成される。強い炎症細胞浸潤は25病日頃まで持続するが、その後徐々に消退し、40病日頃にはほぼ消失する。その後、炎症瘢痕が長期間にわたって残存する⁴⁾。

一方、CADS誘発動脈炎モデルの血管炎発生から癒

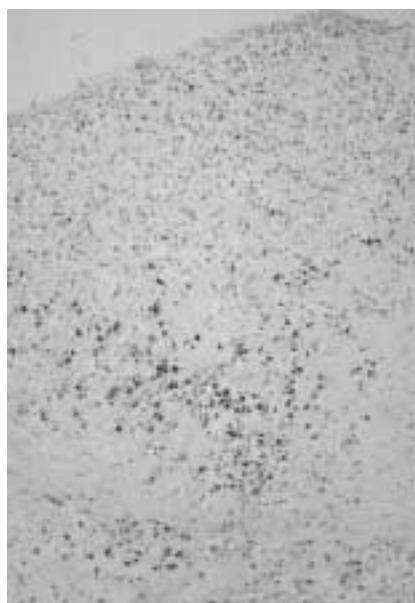


Figure 2 Immunohistochemistry for neutrophil elastase. Anti-neutrophil elastase antibody positive polymorphonuclear leukocytes were predominantly infiltrating in the media of coronary artery.

痕化に至る詳細はいまだ把握できていない点も多いが、実験第5週の第2回CADS接種終了後3日目には血管炎が発生していることを確認しており、動脈炎はこの頃に始まると推測される⁷⁾。通常の実験では第9週目に屠殺が行われ、この時期にも活発な炎症像が観察されることから、炎症は比較的長期にわたって持続していると考えられる。つまり、川崎病では動脈炎発生後極めて短期間で動脈障害が進展し、動脈瘤に至るのに対し、CADS誘発動脈炎の経過はよりゆるやかで、かつ長期にわたって炎症が継続していると推測される。しかし、実験第20週まで生存させたマウスでは冠状動脈に炎症細胞浸潤はなく、血管炎瘢痕像のみが観察された。このように川崎病、実験モデルともに炎症は一峰性の推移を示しており、結節性動脈周囲炎で観察されるような新旧病変の混在はない。

2-2 動脈拡張の有無

川崎病では冠状動脈の起始部や分岐部に、状あるいは紡錘形の瘤が単発あるいは多発して発生する(Fig. 4)。これに対し、CADS誘発動脈炎モデルで状の動脈瘤が観察されることはない。しかし、連続切片を作

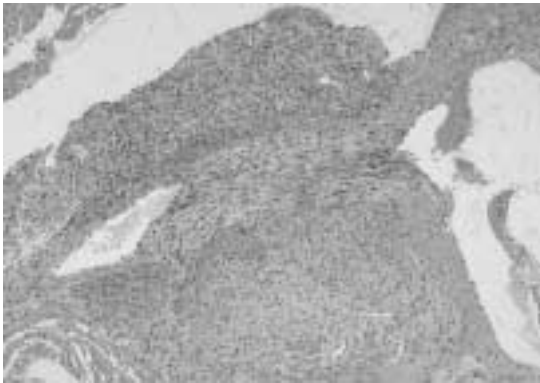


Figure 3 Coronary arteritis in a CD-1 mouse induced by the intraperitoneal injection of *C.albicans* extract.

成し動脈径を測定することにより、冠状動脈の拡張が生じることを確認している⁸⁾。本モデルにおける拡張は冠状動脈起始部から始まり、拡張部では内弾性板および中膜平滑筋層の破壊が目立つ。川崎病同様、炎症によって動脈構築が破壊されることが拡張のための重要な因子となっている。川崎病のような瘤に至らない原因として、前述したように、川崎病に比較して炎症の推移が緩徐で動脈破壊が進行する一方で、動脈を外側から補強するように線維組織の増生が起こるためと推測している。

2-3 動脈病変の分布

川崎病剖検例を検索する限り、95%以上の症例の冠状動脈には動脈炎やその癒痕が認められる。このほかに川崎病で侵襲頻度の高い臓器動脈は、腎、精巣・卵巣などである。そして、動脈病変はいずれも臓器に入る手前の実質外中型筋型動脈に局限する⁹⁾。

一方、ICR(CD-1)マウスを用いた場合のCADS誘発動脈炎発生頻度は60~80%であり、最も高頻度に侵襲されるのは冠状動脈およびその周囲の大動脈起始部である。冠状動脈の炎症は大動脈分岐直後の心筋層外動脈に局限し、心筋層内動脈は侵されない。また、心以外には腎動脈や後腹膜内動脈、精巣周囲動脈などがしばしば侵される¹⁰⁾(Table 1)。

2-4 浸潤細胞の免疫組織学的検討

川崎病動脈病変に出現する大単核細胞の大部分は、CD68陽性、HAM56陽性の単球/マクロファージ系細胞

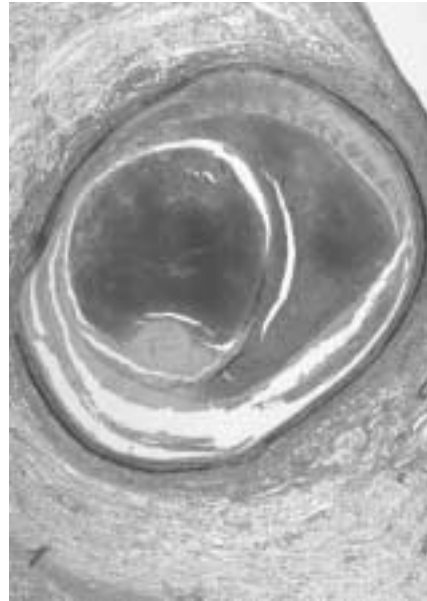


Figure 4 Thrombosed coronary artery aneurysm in a patient who died 18 days after the onset of Kawasaki disease.

である。また、混在する小円形細胞はCD3陽性、CD45RO陽性T細胞、あるいはCD20陽性、CD79α陽性のB細胞、形質細胞である⁶⁾。形質細胞はIgG、IgM、IgAなどに陽性を示し、モノクローナルな形質細胞浸潤はわれわれの観察では認められていない。また、前述したように動脈構築破綻に至る時期には好中球も相当数出現する。

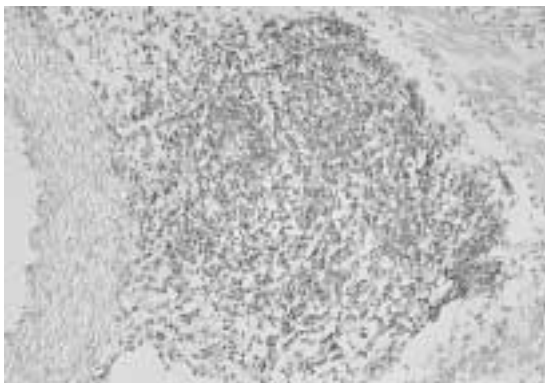
一方、CADS誘発動脈炎内に浸潤する細胞の大多数はCD11b陽性(Fig. 5)で、CD68あるいは抗マウス好中球抗体陽性を示す。また、CD5、CD45RB陽性細胞がごく少数混在する。

2-5 動脈以外の変化

心筋炎は急性期川崎病でしばしば認められる変化であるが、本マウスモデルで心筋炎を認めることはほとんどない。川崎病のリンパ節には巣状ないし広範な壊死が観察されることが多いが、マウスの縦隔、腹腔リンパ節にも皮質、傍皮質の壊死が生じる。腎動脈は川崎病、CADS誘発動脈炎マウスともに比較的高頻度に侵襲される血管であるが、両者ともに腎糸球体には目立った変化をみいだせず、免疫複合体の沈着もない。

Table 1 Comparison of the incidence of arteritis between Kawasaki disease and CADS induced vasculitis model

Kawasaki Disease		CADS induced vasculitis	
95%	Heart(Coronary artery)	60-80%	Heart(Coronary artery)
75%	Kidney	20%	Kidney
45%	Lung		Mediastinum
20-30%	Ovary, Testis		Restroperitoneum
10-20%	Mesentery		Aorta
	Iliac artery		Testis
	Pancreas		Lung
	Liver		Liver
	Spleen		Spine

**Figure 5** Immunohistochemistry for CD11b in the vascular lesion caused by CADS injection in a mouse. Large mononuclear cells and polymorphonuclear leukocytes were positive for CD68.

3. 動脈炎の病因・病態

川崎病の病因はいまだ不明であるが、疫学データは感染因子が一次的、二次的に関与していることを示唆している。疾患感受性の高い宿主が何らかの感染症を契機として発症するものと推測される。

3-1 起炎物質の同定

NMR解析の結果から、CADSの主要構成成分はマンナンであり、微量の $\beta 1$, 3-および $\beta 1$, 6-グルカン、そしてタンパクを含有している。いずれの成分が冠状動脈炎発生に関与しているのかを検討するため、CADSからタンパク、糖を除去した画分を作成し実験を行った。その結果、マンナンおよび $\beta 1$, 6-グルカンが動脈炎

発生に強くかかわっていると考えられた¹¹⁾。また、抗*C. albicans*マンナン抗体を用いた免疫組織学的検索では動脈病変内に陽性像が認められ、腹腔に接種されたCADSの少なくともある成分は、リンパ管を介して縦隔に達しているものと考えられる。同部で一次的、二次的な血管障害が生じ血管炎が発生しているのであろう。

ここで強調したいのは、マンナン、グルカンはカンジダ属に限らず、真菌、細菌の基本菌体構成要素であるという点である。微生物を構成する成分が血管炎を引き起こす生物活性を有することは、感染因子の関与が示唆される川崎病の病因、病態を考える上で極めて興味深い所見であるように思われる。

3-2 炎症性サイトカインなどの動態

急性期川崎病では、TNF- α , IL-6, INF- γ , IL-8, MCP-1など多様なサイトカインやケモカイン、VEGFやPDGFなどの成長因子が上昇しており、これらが白血球を接着、遊走、活性化させ血管壁障害をひきおこしていると考えられる¹²⁾。

CADS単回投与によるマウスの血清サイトカインの経時的変動を観察すると、CADS接種後数時間でIL-6, TNF- α は上昇を示すのに対して、IL-1 β , IL-12, INF- γ は比較的長期にわたって高値を示した。凍結切片を用いた免疫組織学的検討においても、病変局所の大単核細胞、小円形細胞にはほぼ同様のサイトカインの発現をみた。

3-3 抗好中球細胞質抗体(ANCA)の関与

一部の川崎病例では、myeloperoxidaseに対する抗好

中球細胞質抗体(MPO-ANCA)が陽性を示すことが知られている¹³⁾。CADS誘発動脈炎モデルでも動脈炎発生マウスの血清MPO-ANCA値は動脈炎非発生マウスに比較して優位に高値を示しており、動脈炎の発生とMPO-ANCA値とは密接に関連していた¹⁴⁾。しかし、本モデルではANCA関連血管炎でしばしば観察されるような壊死性糸球体腎炎や肺出血などは認められない。

3-4 遺伝的背景

川崎病は特に日本人に多く発生するが、人種別罹患率をみてもアジア系が最多で、黒人、白人の順に多く、川崎病発症には遺伝的素因が関与していることが推測される。これまで川崎病の遺伝的素因の解析は、同胞罹患例を対象とした罹患同胞対法による川崎病発症に関与する遺伝子多型や各種サイトカイン、炎症物質に対する遺伝子多型と川崎病発症および冠状動脈病変併発との関連性について行われている。しかし、結論からいえば、いまだ有力な知見は得られていないのが現状といわざるを得ない。

一方、CADS誘発動脈炎モデルにおいても、近交系マウスを用いた検討ではBALB/cやCBA/JNで動脈炎発生率が低いものに対して、C3H/HeNやC57BL/6Nでは高頻度に動脈炎が生じ、動脈炎感受性には明らかな系統差が存在する¹⁰⁾。そこで、動脈炎低発生マウスと高発生マウスを交配して得られたF1に戻し交配をしてN1を作製し、実験を実施する一方で冠状動脈炎関連遺伝子の染色体マッピングを行った。その結果、冠状動脈炎誘導に関与する遺伝子と動脈炎を抑制する遺伝子の存在が確認された¹⁵⁾。今後、候補領域を中心とした検索を行う予定であるが、これらが解明されれば川崎病発症関連遺伝子を検索する際に貴重な手がかりになり得るであろう。

4. 今後の課題

4-1 治療評価系への応用

CADS動脈炎誘発モデルに免疫グロブリン、アスピリン、ステロイドを投与し動脈炎抑制効果を検討した実験がある¹⁶⁾。有意差は得られなかったが、免疫グロブリン投与により動脈炎は抑制される傾向にあり、本実験は治療評価系としても有用と考えられた。その後、条件をさまざまに変更し検討を加えても免疫グロブリンは動脈炎抑制作用を示しており、現在さらなる検討

を加えている。また、本モデルは新薬開発の評価系としても応用可能と考えられる。

4-2 後炎症性動脈変化の長期的推移

川崎病研究のもうひとつの大きな課題は、川崎病罹患児の長期予後に関する問題である。後炎症性変化が残存する冠状動脈を有する川崎病罹患児が、成人期に達した際に粥状動脈硬化症の影響をどのように受けるのか、臨床的に心血管後遺症なく治癒したと評価された児は経過観察を終了することが可能か、これら極めて重要な問題に対する解答はまだ得られていない。CADSを接種して血管炎を誘発させた後、長期間生存させると血管はどのように変化していくのか。食餌などの環境因子や薬剤による修飾をどのように受けるのか、さまざまな角度から検討が可能である。

4-3 *Candida albicans* Water Soluble Polysaccharide Fraction (CAWS)を用いた検討

大野等¹⁷⁾が作成したCAWSは、*C. albicans*を完全合成培地で培養した際に菌体から培養上清中に溶出する菌体外可溶多糖画分である。本物質を用いて同様の実験を行ったところ、極めて高い動脈炎誘発活性を示すことが判明した。この物質を用いて従来よりも簡略化させた実験を行うことにより、血管炎に至るプロセスの解明や治療評価判定が容易となった。

おわりに

急性期死亡は減少したが、いまなお増加を続ける川崎病は、病因をはじめ動脈炎発生機序や関連遺伝子など解明すべき課題が数多く残されている。川崎病動脈炎と類似点の多いCADS動脈炎誘発モデルの解析を進めることで、これら諸問題を解くカギを得たいと努力している。

謝 辞

川崎病剖検例の検索を快くお許し下さいました全国諸機関の先生方に深謝いたします。

本研究は以下に示す諸先生方との共同で行われたものである。増田弘毅(秋田大学医学部病理学第2)、田中 昇(BML病理)、山田仁美(東邦大学医学部大橋病院病理)、大川原明子、鈴木和男(国立感染症研究所)、三浦典子、大野尚仁(東京薬科大学免疫学)、西島基弘(実践女子大学)。

文 献

- 1)川崎富作：指趾の特異的落屑を伴う小児の急性熱性皮膚粘膜淋巴腺症候群(自験例50例の臨床的観察)，アレルギー，1967，**16**：178-222.
- 2)岡崎富雄：川崎病における治療の現状，医学のあゆみ，2003，**266**：161-163.
- 3)Murata H: Experimental *Candida*-induced arteritis in mice, relation to arteritis in the mucocutaneous lymph-node syndrome. Microbiol. Immunol, 1979, **23**: 825-831.
- 4)増田弘毅，直江史郎，田中 昇：川崎病(MCLS)における冠状動脈の病理学的検討—特に冠状動脈炎と動脈瘤の形態発生の関連について—，脈管学，1981，**21**：899-912.
- 5)Naoe S, Takahashi K, Masuda H et al: Kawasaki Disease with particular emphasis on arterial lesions. Acta Pathol. Jpn, 1991, **41**: 785-797.
- 6)Takahashi K, Oharaseki T, Naoe S et al: Neutrophilic involvement in the damage of coronary arteries at acute stage of Kawasaki Disease(投稿中).
- 7)跡部俊彦，村田久雄：実験的動脈炎の発生機序に関する病理形態学的研究—特に川崎病にみられる冠状動脈炎との関連において—，脈管学，1987，**27**：625-633.
- 8)大原関利章，高橋 啓，若山 恵，他：マウス冠状動脈炎部の拡張ならびに瘤形成機序に関する検討，日小循環誌，2000，**16**：860-866.
- 9)高橋 啓，直江史郎：病理学的所見．川崎病ハンドブック(大国真彦，直江史郎，浅井利夫編)，中外医学社，東京，1988，27-40.
- 10)Takahashi K, Oharaseki T, Wakayama M et al: Histopathological features of murine systemic vasculitis caused by *Candida albicans* extract-an animal model of Kawasaki Disease. Inflamm Res(印刷中)
- 11)高橋 啓：川崎病類似マウス系統的動脈炎惹起モデルにおける動脈炎起炎物質の検討．厚生労働科学研究費補助金「難治性血管炎に伴う多臓器不全に係る病態の解明および治療法の開発に関する研究」(主任研究者鈴木和男)平成14年度研究報告書，2003，55-57.
- 12)佐地 勉：川崎病急性期における血管細胞生物学—内皮細胞機能異常の研究からのLesson—，日小児会誌，2003，**107**：23-28.
- 13)Okazaki T, Sakatani T, Sasagawa S et al: Enzyme release and O₂— production of neutrophils and vascular lesions in gamma globulin therapy of Kawasaki disease. Kawasaki Disease (ed. Shulman ST) New York, Alan R Liss, 1987, 557-558.
- 14)Ishida OA, Oharaseki T, Takahashi K et al: Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production, Inflammation, 2001, **25**: 381-387.
- 15)Oharaseki T, Suzuki K, Okawara OA et al: Chromosomal localization of coronary arteritis-susceptible genes in animal model of Kawasaki disease(投稿中).
- 16)村田久雄，高橋 啓，若山 恵，他：Candida albicans 菌体抽出物によるマウスの実験的動脈炎に及ぼすγ-グロブリンの影響—特に川崎病との関連について—，真菌誌，1994，**35**：19-23.
- 17)Uchiyama N, Ohno N, Miura NN et al: Chemical and immunochemical characterization of limulus factor G-activating substance of Candida spp. FEMS Immunol Med Microbiol, 1999, **24**: 411-420.

A Murine Systemic Vasculitis Caused by *Candida Albicans* Extract and Vasculitis in Kawasaki Disease

Kei Takahashi, Toshiaki Oharaseki, Hisao Murata, and Shiro Naoe

Department of Pathology, Ohashi Hospital, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan

Key words: Kawasaki disease, Systemic vasculitis, Coronary artery aneurysm, *Candida albicans*, Animal vasculitis model

Kawasaki disease is an acute febrile illness that affects mainly infants and young children. This disease is considered as one of the systemic vasculitis syndromes. Its most critical complication is coronary arteritis because it appears to lead to the formation of aneurysm. In addition to our ongoing histopathological study of Kawasaki disease autopsies, we established a unique systemic vasculitis mouse model in which coronary arteritis was induced by intraperitoneal injection of a *Candida albicans* extract. This is a useful animal model of Kawasaki disease because it exhibits many histological similarities to Kawasaki disease. In this paper, we described the histopathological features of the arterial lesions in this mouse model, comparing with those in Kawasaki disease.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, **43**: 673-678)