

# 難治性副鼻腔炎における アレルギー性ムチンより検出された真菌菌種の検討

石野 岳志      竹野 幸夫      平川 勝洋

広島大学大学院 医学部 病態制御医科学講座 耳鼻咽喉科学

## Fungus species isolated from allergic mucin in intractable sinusitis.

Takashi ISHINO, Sachio TAKENO, Katsuhiko HIRAKAWA

Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

Although the diagnostic significance of eosinophilic inflammation has been studied in intractable sinusitis, including both allergic fungal rhinosinusitis and eosinophilic sinusitis, little is known about the mechanisms by which fungal species induce eosinophilic inflammation. In this study, we examined the association between the isolated fungus species and disease prevalence of another mycosis. Fourteen fungus species, including 6 *Aspergillus sp.*, were isolated from the cultures of 32 samples of allergic mucin from 9 patients. These included 12 funguses (85.7%) that contain pathogens related to other sicknesses, including 3 skin mycosis and 9 upper and/or inferior respiratory sickness pathogens. The 9 funguses that are correlated with upper and/or inferior respiratory sickness included 7 funguses which induce allergic bronchopulmonary mycosis and 6 funguses that were recognized by the antigen and *Alternaria alternate*, whose protease has been recognized as an eosinophilic activator and degranulator. These results suggested that most of the isolated funguses (85.7%) containing pathogens and the 9 funguses (64.2%) that correlated with upper and/or inferior respiratory sickness had direct and/or indirect abilities to induce eosinophilic inflammation. Researching the pathogen-inducing mechanisms by these funguses will be a key to revealing the molecular-biological mechanisms by which eosinophilic inflammation is induced in intractable sinusitis.

### はじめに

難治性副鼻腔炎として、好酸球性鼻副鼻腔炎、アレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎が鼻科学的に近年話題となっているが、これら疾患において好酸球性炎症が病態形成に深く関与していることが知ら

れている<sup>1) 2)</sup>。これら難治性副鼻腔炎ではアレルギー性ムチンを認めるのが特徴的であり、好酸球性炎症がその病態形成に関与していることが知られている。その好酸球性炎症が誘導される機序はまだ詳細には解明されていないものの、複数の

因子が関与するとされ<sup>3) 4)</sup>, 真菌もその一因であることが報告されている<sup>5) 6)</sup>. しかしながら, 健常人の鼻内にも真菌が普遍的に認められることも知られており<sup>7)</sup>, 真菌がこれら難治性副鼻腔炎の病態にどうかかわっているか, 現在までまだ詳細な機序は不明なままである. 一方, 真菌による好酸球性炎症の誘導は上気道だけではなく, 下気道においても認められており, 下気道において関連する疾患としては気管支喘息, アレルギー性気管支肺真菌症があげられ, 病態も上気道病変であるアレルギー性鼻炎, 好酸球性鼻副鼻腔炎, アレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎に類似している. このため, 今回これら難治性副鼻腔炎に認められるアレルギー性ムチンから真菌培養を行い, 培養された真菌が他の真菌症で過去に報告された起炎菌であるかどうか, さらに好酸球性疾患発症との関連性があるかどうかについて検討を行い, 真菌の難治性副鼻腔炎への病態形成の可能性について検討および考察した.

## 方 法

通常の治療に抵抗性の難治性副鼻腔炎症例9例(男性4人, 女性5人, 29-71歳)におけるアレルギー性ムチン32検体を用い, 培養方法により培養されにくい真菌が存在することも考慮し, 3種類の方法で真菌培養を行った. 培養方法: ①Ponikauらの方法<sup>8)</sup>に準じ, アレルギー性ムチンを同量の10% sputolysin 溶液(Calbiochem: dithiothreitol)で溶解し, 30分ボルテックスで攪拌した後, 1500回転5分間遠心分離を行い, 上清液を培地に播種. ②アレルギー性ムチンを直接培地に塗布. ③鼻汁を同量の0.1mM EDTA(Sigma), 0.1% Collagenase(WAKO), 0.5% Tween80(Sigma) PBS溶液に懸濁し, 1500回転5分間遠心分離し, 上清液を培地に播種. 培養はサブロー培地, ポテトアガロース培地, M40Yの3種の培地で行い, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>, 38度にて最大4週間まで培養を行った. この際単一の真菌が増殖することで病態を形成することを想定し, 偶然の

真菌の付着を否定するために, 同一形態を呈するコロニーが複数認められた場合のみ, 関与が疑われる真菌と判断することにした. 培養された真菌は千葉大学真菌医学研究センター(ファーストラボラトリーズ)に送付し, 真菌菌種の同定を行った.

## 結 果

同定できた真菌菌種は14種で, 菌種としてはアスペルギルス属が多数を占めた(6/14:42%)(Table 1). また真菌の病原性につき, 他科での報告と比較検討すると, 菌種の多く(12/14:85.7%)が多部位での感染症に関与することが認められた. これらのうち3種(21.4%)は皮膚真菌症に関連する真菌<sup>9) 10) 11)</sup>で, 9種(64.2%)は上気道あるいは下気道疾患と関連する真菌であった. さらに培養真菌のうち, アレルギー性気管支肺真菌症(ABPM)で報告された真菌<sup>12) 13)</sup>:7種, アレルゲンとして認められている真菌<sup>14-18)</sup>:6種認められ, 上気道あるいは下気道疾患と関連する真菌9種はこれら真菌と一致していた. また産生されるプロテアーゼ, フィターゼがアレルゲンとして認められている真菌<sup>14) 15) 17)</sup>は4種であった.

## 考 察

今回の真菌培養で同定できた真菌菌種は14種で, 菌種としては *Aspergillus* 属が多数を占めた(6/14:42%). この *Aspergillus* 属に属する真菌は約200種あることが知られており<sup>19) 20)</sup>, 空気中に認められる主な一般真菌であるとされる. 今回アレルギー性ムチンから培養できた *Aspergillus* 属以外の真菌も, 空気中に存在する一般真菌であり, 今回の培養で認められた真菌の多くは空気中の一般真菌が由来であると考えられた. これは健常人における鼻洗浄液で認められる真菌の由来と同様でもあり<sup>7)</sup>, この結果のみではこれら真菌が難治性副鼻腔炎に対して, 病原性を示す証拠とはなりえないと考えられる. しかしながら, *Aspergillus* 属は空気中に存在する主な一般真菌であるにも関わらず, 病原性を示すものは約200

Table 1 Fungus species cultured from allergic mucin in intractable sinusitis. No fungus were detected in two patients. 12 fungus had the pathogens to the other mycosis and sickness and 9 fungus concerning with upper and/or inferior respiratory sickness may induces allergic sickness. ABPM, allergic broncho-pulmonary mucositis; AFRS, allergic fungal rhinosinusitis; AR, allergic rhinitis.

Fungus species	No. of Patients	Associated diseases				Antigen	Eosinophilic-inflammation inducer
		ABPM	AFRS	Asthma or AR	Other mycosis		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	○				○ (protease)	
<i>Aspergillus terreus</i>	1	○					
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	1				otomycosis		
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	○				○ (protease)	
<i>Aspergillus niger</i>	1	○	○			○ (phytase)	
<i>Aspergillus sydowii</i>	2				onychomycosis		
<i>Alternaria alternata</i>	1		○	○		○	○
<i>Fusarium incarnatum</i>	1						
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	○	○			○ (protease)	
<i>Schizophyllum commune</i>	1	○					
<i>Phialophora richardsiae</i>	1				phaeohyphomycosis		
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	○					
<i>Acremonium sp</i>	1			○		○	
<i>Eutypella sp</i>	1						

種のうちの一部であることが知られ、下気道疾患で認められた *Aspergillus* の95%以上はこれら病原性を有するものであったことも報告されている<sup>21-29)</sup>。このため、今回培養できた真菌を病原性の有無の観点で検討を行なったところ、14種中12種(85.7%)が真菌症の起炎菌であることが判明し、培養された真菌の多くが病原性を有していることが認められた。この結果から、難治性副鼻腔炎のアレルギー性ムチンから培養される真菌は、必ずしも空气中に普遍的に認められる真菌であるとはいえず、むしろある種の病原性を有したものがアレルギー性ムチン内に定着したのか、あるいは、これら真菌が病原性を有するために難治性副鼻腔炎を引き起こした可能性が考えられた。さらに、これらのうち3種(21.4%)は皮膚真菌症に関連する真菌で、9種(64.2%)は上下気道疾患

と関連する真菌であった。この上下気道疾患と関連する真菌9種のうち、アレルギー性気管支肺真菌症(ABPM)で報告された真菌は7種、アレルゲンとして認められている真菌は6種認められ、これらに属さない真菌は認められなかったことから、培養された上下気道疾患と関連する真菌9種は、いずれも好酸球性炎症と関連する真菌であることが認められた。また、アレルゲンとして認識される真菌のうち4種は真菌から産生されるプロテアーゼ、フィターゼが抗原となることが報告されており、*Alternaria alternata* においてはプロテアーゼが好酸球の活性化や脱顆粒を誘導することで好酸球性炎症に影響を及ぼすことも報告されている<sup>30)</sup>。これらのことから、今回の培養真菌について検討すると、アレルギー性ムチン内に認められた真菌は、好酸球性炎症と関連する

真菌が多く、その病原性を考慮すると、これら真菌が偶然ムチン中に定着したと考えるより、これら真菌が難治性副鼻腔炎を引き起こしている可能性が高いことが想定された。この真菌による病態形成においては、真菌からのプロテアーゼなどの産生物が抗原として好酸球炎症に関与するとともに、間接的にも好酸球性炎症の増悪に関与している場合があると考えられ、難治性副鼻腔炎に認められる真菌の多くは直接的あるいは間接的に好酸球性炎症を誘導することで、病態を形成していることが想定された。また、過去には今回の培養菌種とは異なる真菌においてではあるが、真菌からの産生物によっては、スーパー抗原と類似の反応を引き起こすものがあることも報告されており<sup>31)</sup>、好酸球性炎症と関連のない真菌においても、真菌種によっては産生物がスーパー抗原と類似の反応などを引き起こして病状を増悪させている可能性も考えられた。このため、難治性副鼻腔炎における病態を解明するためには、真菌感染の側面でも、さらに検討を行う必要があると考えられる。しかしながら、プロテアーゼなどの真菌からの産生物の産生能は真菌の培養環境に左右されること<sup>32)</sup>や真菌の属種が同一であっても株により異なることが知られているため、実際に真菌が難治性副鼻腔炎の病態形成に関与するかどうかを検討するためには、検体から分離された真菌株を用いて好適環境で培養を行って検討を行う必要があると考えられる。現在までのところ、このような側面を考慮した検討が未だ行えていないため、難治性副鼻腔炎に対する真菌の関与については詳細がまだ不明なままであるが、今回の培養において、分離された真菌の85.7%が病原性を有し、さらに好酸球性炎症に関連する真菌が培養真菌の64.2%を占めていたことなどから、分離真菌の多くがなんらかの形で病態形成に関与することが想定され、これら真菌による病態形成機構をさらに検討することが難治性副鼻腔炎の病態解明の一助となると考えられた。

## 参 考 文 献

- 1) Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol Suppl* ; (20) : 1-136. 2007
- 2) Takeno S, Hirakawa K, Ishino T. Pathological mechanisms and clinical features of eosinophilic chronic rhinosinusitis in the Japanese population. *Allergol Int* ; 59(3) : 247-56. 2010
- 3) Schubert MS. A superantigen hypothesis for the pathogenesis of chronic hypertrophic rhinosinusitis, allergic fungal sinusitis, and related disorders. *Ann Allergy Asthma Immunol* ; 87(3) : 181-8. 2001
- 4) Kern RC, Conley DB, Walsh W, et al. Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol* ; 22(6) : 549-59. 2008
- 5) Inoue Y, Matsuwaki Y, Shin SH, et al. Non-pathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils. *J Immunol* ; 175(8) : 5439-47. 2005
- 6) Collins M, Nair S, Smith W, et al. Role of local immunoglobulin E production in the pathophysiology of noninvasive fungal sinusitis. *Laryngoscope* ; 114(7) : 1242-6. 2004
- 7) Braun H, Buzina W, Freudenschuss K, et al. 'Eosinophilic fungal rhinosinusitis': a common disorder in Europe? *Laryngoscope* ; 113(2) : 264-9. 2003
- 8) Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, et al. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin.Proc* ; 74 : 877-84. 1999
- 9) Harima N, Inoue T, Kubota T, et al. A case of otomycosis caused by *Aspergillus sclerotiorum*. *J Dermatol* ; 31(11) : 949-50. 2004
- 10) Takahata Y, Hiruma M, Sugita T, et al. A case of onychomycosis due to *Aspergillus*

- sydowii diagnosed using DNA sequence analysis. *Mycoses* ; 51(2) : 170-3. 2008
- 11) Tam M, Freeman S. Phaeohiphomycosis due to *Phialophora richardsiae*. *Australas J Dermatol* ; 30(1) : 37-40. 1989
  - 12) Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, et al. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. *Med Mycol* ; 49(6) : 581-7. 2011
  - 13) Akhunova AM. Infectious-allergic bronchopulmonary paecilomycosis. *Ter Arkh* ; 63(10) : 19-24. 1991
  - 14) Shen HD, Tam MF, Tang RB, et al. *Aspergillus* and *Penicillium* allergens: focus on proteases. *Curr Allergy Asthma Rep* ; 7(5) : 351-6. 2007
  - 15) Doekes G, Kamminga N, Helwegen L, et al. Occupational IgE sensitisation to phytase, a phosphatase derived from *Aspergillus niger*. *Occup Environ Med* ; 56(7) : 454-9. 1999
  - 16) Beezhold DH, Green BJ, Blachere FM, et al. Prevalence of allergic sensitization to indoor fungi in West Virginia. *Allergy Asthma Proc* ; 29(1) : 29-34. 2008
  - 17) Chou H, Tam MF, Lee LH, et al. Vacuolar serine protease is a major allergen of *Cladosporium cladosporioides*. *Int Arch Allergy Immunol* ; 146(4) : 277-86. 2008
  - 18) An P, Barron-Casella EA, Strunk RC, et al. Elevation of IgE in children with sickle cell disease is associated with doctor diagnosis of asthma and increased morbidity. *Allergy Clin Immunol* ; 127(6) : 1440-6. 2011
  - 19) Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* ; 22 : 447-465. 2009
  - 20) Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* ; 59 : 1-10. 2007
  - 21) Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* ; 26 : 781-803. 1998
  - 22) Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, et al. *Aspergillus flavus* : human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* ; 153 : 1677-1692. 2007
  - 23) Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus fumigatus* : an emerging non-*fumigatus* *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* ; 52 : 206-222. 2009
  - 24) Hachem RY, Kontoyiannis DP, Boktour MR, et al. *Aspergillus terreus* : an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies. *Cancer* ; 101 : 1594-1600. 2004
  - 25) Baddley JW, Pappas PG, Smith AC, et al. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. *J Clin Microbiol* ; 41 : 5525-5529. 2003
  - 26) Saraceno JL, Phelps DT, Ferro TJ, et al. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: approach to management. *Chest* ; 112 : 541-548. 1997
  - 27) Severo LC, Geyer GR, Porto NS, et al. Pulmonary *Aspergillus niger* intracavitary colonization. Report of 23 cases and a review of the literature. *Rev Iberoam Micol* ; 14 : 104-110. 1997
  - 28) Walsh TJ, Groll AH. Overview: non-*fumigatus* species of *Aspergillus* : perspectives on emerging pathogens in immunocompromised hosts. *Curr Opin Investig Drugs* ; 2 : 1366-1367. 2001
  - 29) Baddley JW, Marr KA, Andes DR, et al. Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveil-

- lance Network. J Clin Microbiol ; 47 : 3271-3275. 2009
- 30) Matsuwaki Y, Wada K, White TA, et al. Recognition of fungal protease activities induces cellular activation and eosinophil-derived neurotoxin release in human eosinophils. J Immunol ; 183(10) : 6708-16. 2009
- 31) Devore-Carter D, Kar S, Vellucci VJ, et al. Superantigen-like effects of a *Candida albicans* polypeptide. Infect Dis ; 197(7) : 981-9. 2008
- 32) Talabardon M, Yang ST. Production of GFP and glucoamylase by recombinant *Aspergillus niger*: effects of fermentation conditions on fungal morphology and protein secretion. Biotechnol Prog ; 21(5) : 1389-400. 2005

連絡先：石野岳志

〒734-8551

広島市南区霞1-2-3

広島大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室

TEL 082-257-5252 FAX 082-257-5254

E-mail takashiishino@hotmail.com