

ことにした。

評価項目としたのは精神症状、知能検査 (WAIS-R)、神経内科学的診察、血液一般検査、血清 IL-6、髄液一般検査、髄液 IL-6、頭部 MRI・CT・SPECT、脳波であり、MTX による治療前と治療開始1年および2年後においてこれらを比較・評価した。

【結果】 MTX は開始投与量 $7.5 \pm 2.8 \text{mg/週}$ [mean \pm SD] (5~12.5mg/週)、維持投与量 $8.9 \pm 3.8 \text{mg/週}$ (5~12.5mg/週)、2年後投与量 $8.5 \pm 3.5 \text{mg/週}$ (5~12.5mg/週) であった。知能検査 (WAIS-R) は MTX 投与前、1年後、2年後で有意差は認めず (図1A) 言語性、動作性に分けても有意差は認めなかった (図1B, C)。1年間の MTX 投与後、髄液中の IL-6 は全例で有意に低下した (図2)、2年後の時点においても、投与開始前に比べて有意に低下しており、1年後と比べ低値を持続していた (図2)。

1年後の主治医、家族、患者自身、精神科医の評価において9例中3例に症状の若干の進行がみられ、2年後にも MTX 投与継続が可能であった症例のうち2例で髄液 IL-6 が上昇し神経症状も進行した。MRI・CT・SPECT などの画像診断、脳波においては投与前後で有意差は認めなかった。

MTX 投与中に9例中4例に肝障害が認められが、MTX の減量ないし葉酸の併用により軽快し、投与継続が可能であった。

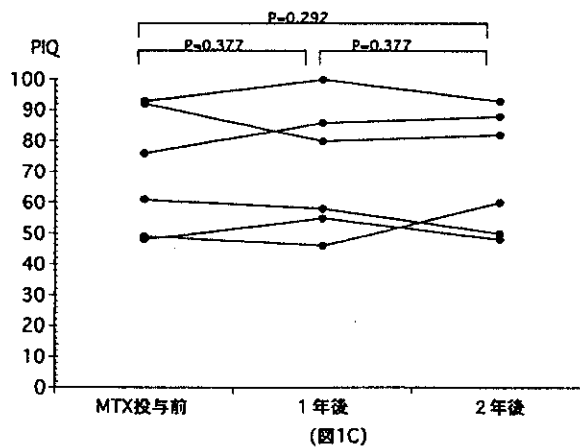
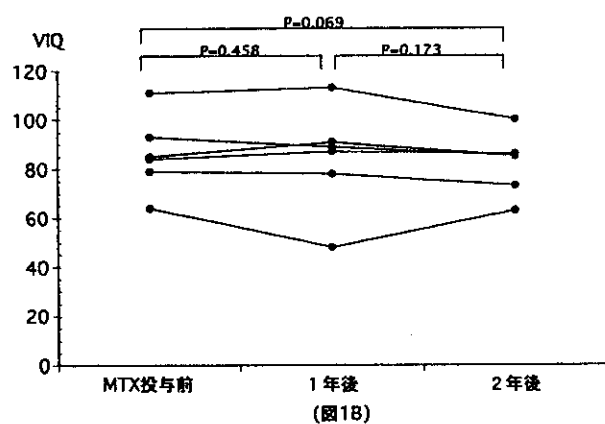
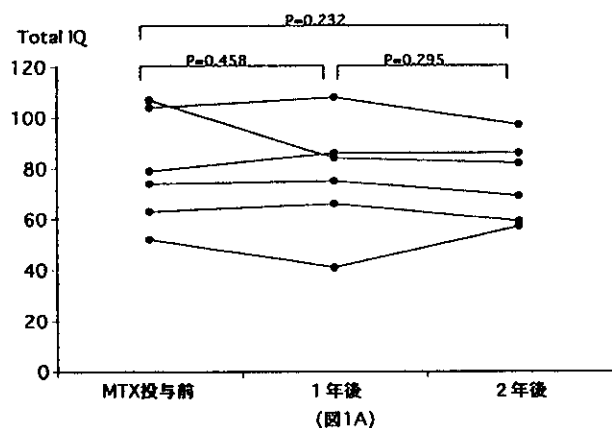


図1 : MTX投与前と投与1年後、2年後のIQ(WAIS-R)の比較。統計学的処理は paired T testにて検討した。(A: 総合IQ B: 言語性IQ C: 動作性IQ)

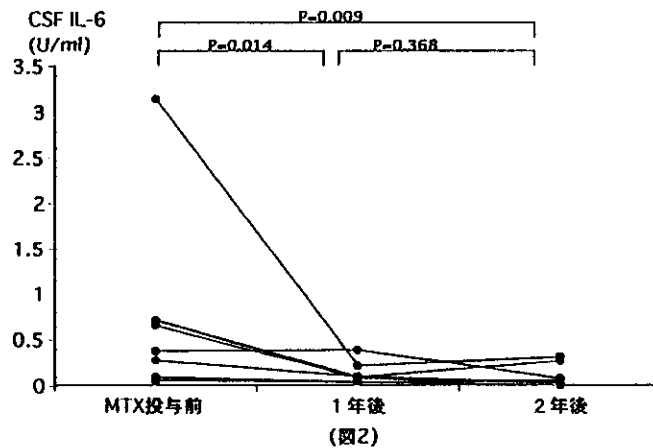


図 2 : MTX投与前と投与1年後、2年後の髄液中IL-6の比較。
統計学的処理はWilcoxon signed rank testにて検討した。

症状が安定していた1例ではMTX投与量の減量が可能であった。また、2例でMTXの投与を中止したが、1例は他薬剤による血小板減少を発症し、もう1例では痴呆悪化のため内服困難となったため、両症例ともMTXの副作用のために中止したものではなかった。

【考案・結論】ベーチェット病患者の約5~7%の患者においては進行性の痴呆を主体とする精神神経症状が出現するが、これらの患者ではADLが著しく障害され、ついには社会生活から脱落する症例が多い。副腎皮質ステロイドをはじめとする各種薬剤に抵抗し、現在のところ有効性の確認された薬剤はない。一方、MTXは少量投与により慢性関節リウマチに有効であり、欧米でも広く治療薬として用いられている。また、MTX少量パルス療法がベーチェット病の皮膚血管病変などの神経外症状に有効であるとの報告があり、本症においてもその有効性が期待される。

MTX投与中の2年間に症状が若干進行した例はみられたが、髄液中のIL-6は投与1年後および2年後において投与前に比べて有意に低下していた。近年の研究によれば髄液IL-6の持続高値により反映される中枢神経内の炎症が進行性の神経ベーチェット病の病態形成に重要な働きをするとの報告があり、MTXは髄液IL-6を低下させ病態の進行・悪化を阻止する可能性があると思われる。9例中3例に症状の進行がみられたが、全体としては知能検査・MRI・CT・SPECT・脳波等に悪化所見はみられずその有効性に十分期待がもたれる。副作用として9例中4例に肝障害がみられたが減量または葉酸投与により軽快しており、その他の副作用は認めなかったことより、安全性に重大な問題はないと考えられる。また、MTXの減量が可能であった例もあるので、減量のしかたについての工夫も大切となる。MTX治療に抵抗して症状の悪化した症例も一部にある

ことから、他の治療法を考慮しなくてはならない例もあり今後の重要な課題になってくると思われる。

【参考文献】

1. Hirohata S, Suda H, Hashimoto T. Low dose weekly methotrexate for progressive neuropsychiatric manifestations in Behcet's disease. *J Neurol Sci* 159: 181~185, 1998.
2. Inaba G. Behcet's disease. In "Handbook of Clinical Neurology" McKendall RR, Ed. Vol. 12, pp. 539~610, Elsevier, Amsterdam, 1989.
3. Jorizzo JL, White WL, Wise CM, et al. Low dose weekly methotrexate for unusual neutrophilic vascular reactions: Cutaneous polyarteritis nodosa and Behcet's disease. *J Am Acad Dermatol* 24: 973~978, 1991.
4. Hirohata S, Isshi K, Oguchi H, Ohse T, Haraoka H, Takeuchi A, Hashimoto T. Cerebrospinal fluid interleukin-6 in progressive neuro-Behcet's syndrome. *Clinical Immunol Immunopathol* 82: 12~17, 1997.

ベーチェット病患者血液水銀濃度と好中球のX線マイクロアナリシス

宮田幹夫 1)

小川泰典 1)

宮澤七郎 2)

1) 北里大学医学部眼科

2) 北里大学医学部電子顕微鏡室

著者よみ みやた みきお、おがわ やすのり、みやざわ しちろう

KEY WORDS Behcet's disease, Heavy metals, mercury, lead,

X-ray microanalysis

抄録 ベーチェット病（以下BDと略）の環境因子の原因物質またはその病態を反映するものとして、血液中重金属の関連性が検討されてきている。本研究では前回に引き続き、BD患者および健常対照者各12名の血液中水銀の測定を行い、BD患者では $2.408 \pm 2.142 \mu\text{g/dl}$ と健常対照者の $1.317 \pm 0.524 \mu\text{g/dl}$ に比べて有意ではないが高値を示す傾向が認められた。この傾向は前回の鉛、クローム、コバルトの結果と類似するものであった。さらに患者好中球中の高電子密度のdepositのX線マイクロ分析を行い、Cl、Hg、Pb、Siを検出した。なお健常対照者ではこの様な異常析出物は認められなかった。

Mercury in blood and X-ray microanalysis of deposit in neutrophils of Behcet's disease

Miyata Mikio*, Ogawa Yasunori*, Miyazawa Shichirou**

*Department of Ophthalmology, **Electron Microscope Laboratory,
School of Medicine, Kitasato University

Heavy metals in blood have been considered for the possible cause or the possible affecting factor of Behcet's disease. In this study, the content of mercury in the blood of Behcet's disease were compared to that of the healthy adult control. The average value of mercury was $2.408 \pm 2.142 \mu\text{g/dl}$ (mean \pm standard deviation) in blood of 12 patients with Behcet's disease and $1.317 \pm 0.524 \mu\text{g/dl}$ (mean \pm standard deviation) of 12 normal controls. Though the difference was not significant, but tended to increase as Cr, Co and Pb as previously reported. Furthermore, electric high density deposit in the neutrophil leucocyte of Behcet's disease was applied to X-ray microanalysis. The deposit contained Cl, Hg, Pb and Si. On the otherhands, there is no such abnormal deposit in that of healthy adults.

1. はじめに

疾病はすべて体質、老化、環境の3因子により規制される。ベーチェット病に関しても、その発症を体質から分析を加える手法と、環境因子から分析を加える手法がとられている。今回われわれは前回に引き続き、環境因子、すなわちベーチェット病患者の血液中の水銀の測定を行うとともに、好中球中の高電子密度の沈着物のX線マイクロアナライザーによる分析を試みたので報告する。

2. 対象と方法

1) 血中水銀分析

平成8年から9年にかけて北里大学病院眼科外来を受診したいまだ薬物療法を受けていない眼発作を有するベーチェット病新鮮例12例(男性8例、女性4例、完全型6例、不完全型例)である。対照として患者と血縁関係のない健常者12名(男性6名、女性名)であった。年齢は患者群では 35.5 ± 15.5 歳、対照群では 28.5 ± 18.5 歳であった。発作時臨床症状は前房蓄膿を伴う虹彩毛様体炎4例、前房蓄膿の伴わない虹彩毛様体炎3例、網膜出血と白斑を示すもの5例であった。

ヘパリン加で採血し、住友金属パイロケミカルスへ移送し、水銀濃度の測定を行った。

2) 白血球中析出物のX線マイクロアナライザーによる重金属分析

平成10年に北里大学病院眼科を訪れたベーチェット病患者の新鮮発症例の患者2名からヘパリン採血を行なった。両者の病歴を簡略に記す。

症例 1: 23歳男性、症状は前房蓄膿、眼底には滲出斑、今回が初発、HLA B51、職業は学生。

症例 2: 37歳男性、数回目の発作、網膜はやや変性、HLA B51、職業は事務職。

血液は直ちに1%グルタルアルデヒド・カコジレート緩衝液で固定を行い、好中球の高電子密度のdepositのX線マイクロアナリシスを行った。その分析法の詳細

細は表 1 に示した。なお健常対照者の好中球からはこの様な異常な deposit は検出されなかった。なお同時に両患者血液は金属定量分析を行った。

3. 結果

1) 血中水銀分析結果

図 1 に示すように、ベーチェット病患者の血中水銀濃度 ($2.408 \pm 2.142 \mu\text{g/dl}$) は健常対照者 ($1.317 \pm 0.524 \mu\text{g/dl}$) に比べると高値を示したが、その差は有意ではなかった。

今回の結果を前回の結果¹⁰⁾と合わせて表 2 に記載した。

2) 血液分析と X 線マイクロアナライザーによる分析結果

症例 1 : 血液分析結果は表 3 の通りである。Cr にやや高い価が認められている。

好中球に electron density の高い異常な deposit が認められている。これらの deposit の X 線マイクロアナリシスでは Cl が高く検出されたが、その他の金属はノイズと重なり充分分析出来なかった。

症例 2 : 血液分析結果は表 4 に示す。Hg、Pb、Cr にやや高い値を認めた。

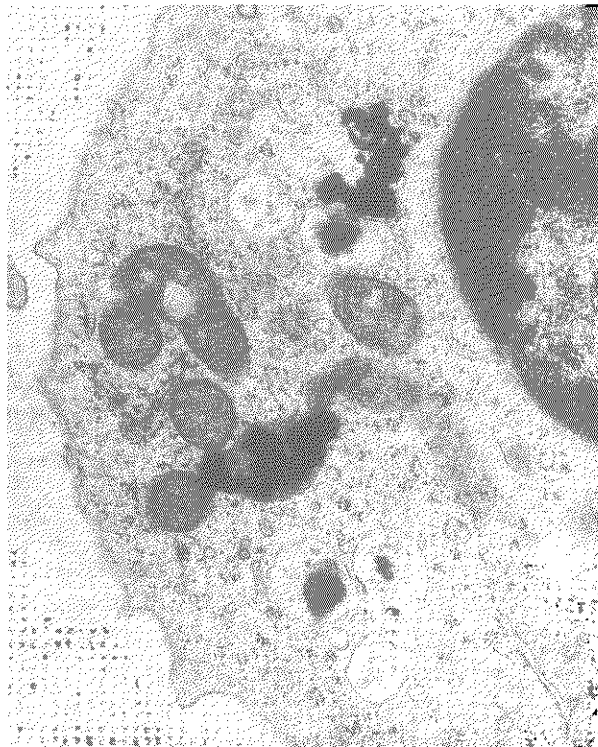
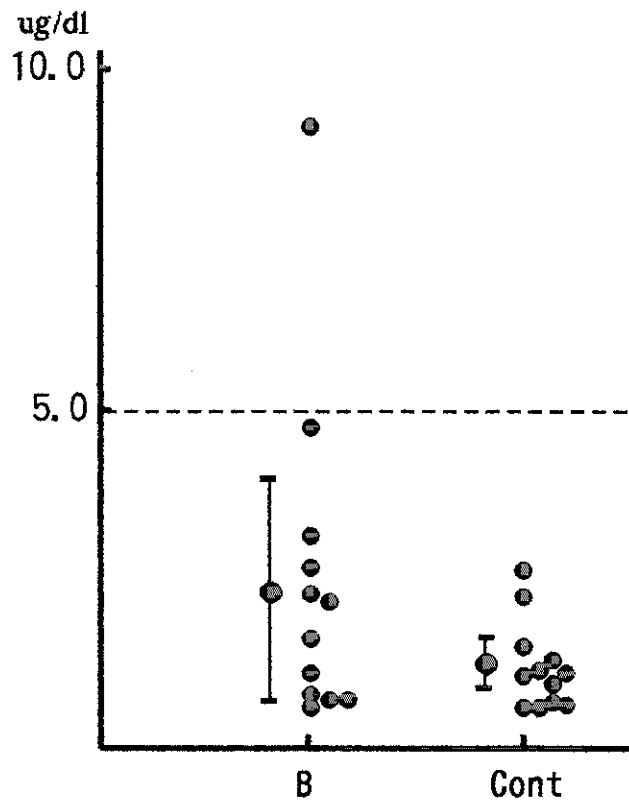
好中球にはライソゾームから density の高い deposit までの種々な段階の状態が観察された。その中の図 2 の deposit の部位の測定結果を図 3 に示す。L α 線領域ではし、Hg、Pb、Cl、Si が検出されており、L β 線領域でもさらに Hg、Pb が確認された。

4. 考察

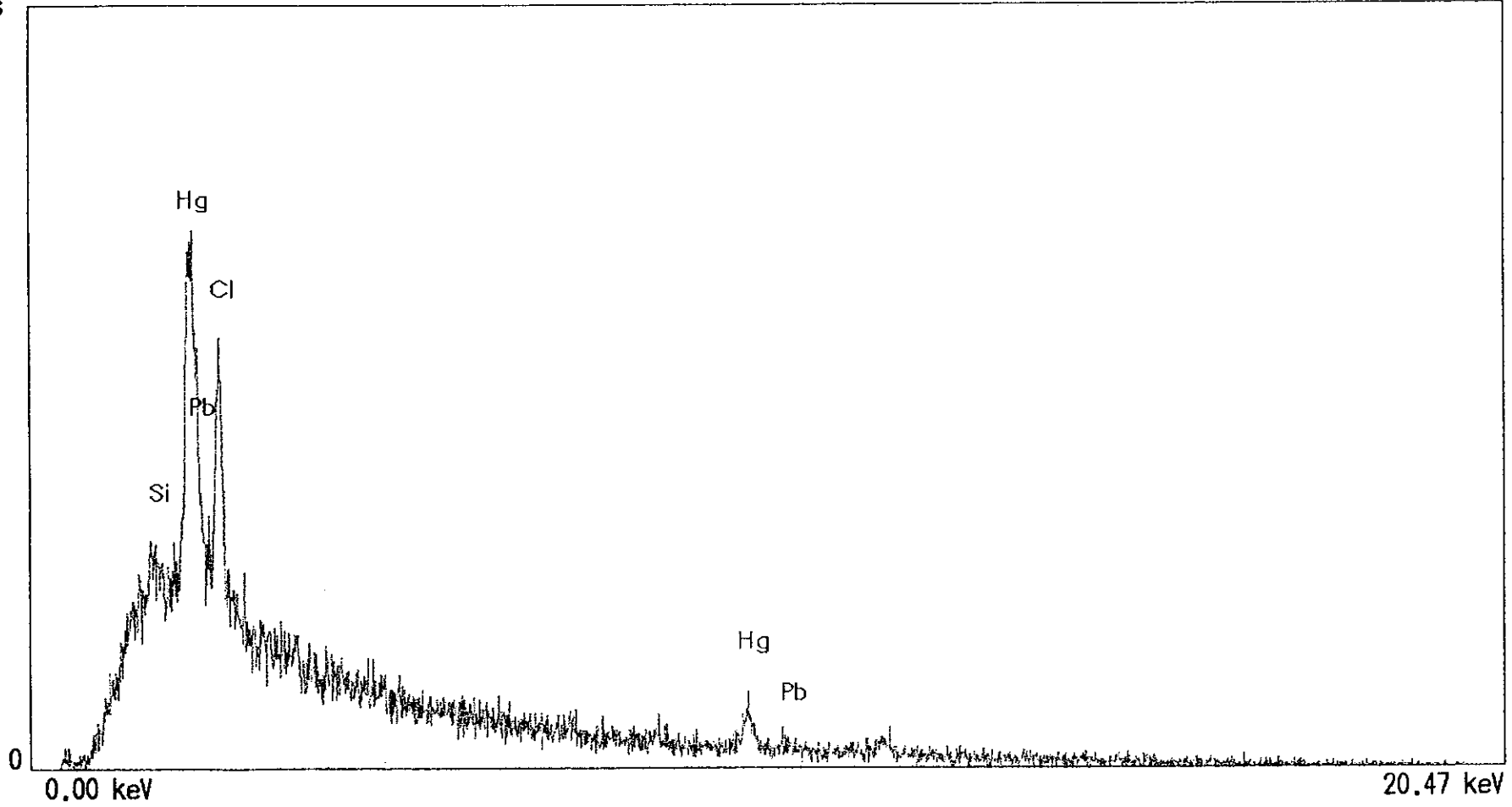
ベーチェット病と環境因子との関連に関しては多くの報告がある。トルエンと曝露との関連の可能性の報告¹⁾、有機リン殺虫剤、有機塩素剤との関連の可能性の報告がある²⁾。また有機リンにより発作の誘発された報告³⁾もあり、環境因子の発症への関わりを示唆している。また職業的には電子機器製造業従事者に患者が多かった報告²⁾もある。また職種によっては発症の HLA 抗原占有率にも差が認められており^{4, 5)}、環境因子が大いにベーチェット病の発症に関与している可能性を示唆していると言える。一方ベーチェット病と金属との関係についての研

究も行われてきている。ベーチェット病患者血液の銅については、セルロプラスミンの上昇に伴った銅の高値の報告⁶⁾、またベーチェット病発作毎に上昇を繰り返す患者例の報告⁷⁾、銅の高値⁸⁾などがある。鉛の高値は杉浦の報告がある⁹⁾。これまでわれわれのS eの低値、C r、C o、P bの高値に加えて¹⁰⁾、今回水銀の有意ではないが高値を認めた。一般にS eは有害元素H gの摂取にともなって変動することが知られており¹⁴⁾、その点を反映しているとも言えた。

今回さらに細胞内の重金属を知る目的で好中球の高電子密度の析出物のX線マイクロアナリシスを行った。これまでもベーチェット病患者の細胞内の金属などをX線マイクロアナライザーで分析した結果が報告されている。すなわち西山らはX線マイクロアナリシスによりベーチェット病患者の白血球中にC u、C l、P、A tを検出している¹²⁾。藤原らは同様にベーチェット病患者腓腹神経にC l、P、C uを検出している¹³⁾。さらに杉らはベーチェット病患者白血球中にZ n、P b、C r、H g、P、C lを検出している。Miyazawaらは末梢白血球、末梢神経、皮膚、血管内皮、毛球にC u、C l、P、Sを証明している¹⁵⁾。X線マイクロアナライザーの改良とともにピンポイントの測定精度も上昇してきており、再度の分析を試みた。その結果、症例2において好中球の電子密度の高いlisozome由来と考えられるdepositにはP b、H g、S i、C lの高い値を得た。これは過去の報告とよく一致していると言え、さらに血液中の金属濃度の上昇とこれらのdepositの分析結果が一致していると言えた。なお症例1ではC lのみが明瞭に証明されたが、他の金属類は検出出来なかった。いずれにしろ、これらの症例では職業的な汚染歴は認められず、これらの汚染物質は一般生活環境に由来していると考えられた。生活環境からの重金属は、口腔内金属のみでなく、陶磁器の上絵付け、ビニール類の安定剤、C C Aと言われる防腐剤なども広く一般に使用されている。C lの汚染も以前から言われており、今回も検出された。症例1と症例2では汚染物質に差があり、これらのどれかの汚染物質が直接発症に関与していると考えより、総負荷量としての汚染物質が発症に関与していると考えた方がよいのかも知れない。もしくは直接発症には関係なく、発症の結果として汚染物質の排除機構に障害が起きているのかも知れない。このようにその関係は不明であるが、これまでの結果がさらに再確認された。



4.000cps



付図説明

図1：血液中水銀濃度。対照にくらべて、やや高値を示す傾向があったが、有意差は認められなかった。

図2：患者好中球の電子顕微鏡写真。異常なdepositが認められる。健常者にはこのようなdepositは認められない。

図3：図2のdepositの部位のX線マイクロアナライザーによる分析結果。L α 線領域では、Hg、Pb、Cl、Siが検出されており、L β 線領域でもさらにHg、Pbが確認された。

表1 X線分析法

固定 : 2% glutaraldehyde(0.1M cacodylate buffer) (単固定)
洗浄 : 0.1M cacodylate buffer pH7.4
脱水 : エタノール濃度上昇系列
置換 : QY-1
包埋 : Luft法 Quetol 812
超薄切 : Ultracut N にて約100nmの超薄切片を作成し、ナイロングリッドに付着、
カーボン蒸着を施す。
電顕観察 : 日立 H-8100 付属 HoribaEMAX-5770Wにて分析、加速電圧100kV

表2 ベーチェット病患者血液重金属

Hg↑ Cr↑ Co↑ Pb↑ Se↓**

↑ : 増加、 ↓ : 低下、 ** : 1%危険率で有意

表3 症例1の血液分析結果

		健常対照値 means±SDs
S e	58 ng/ml	(131.2±32.4ng/ml)
C r	66	(37.6±15.2)
P b	76	(67.4±24.1)
C o	28	(21.3± 8.2)
H g	12	(13.2± 0.52)

表4 症例2の血液分析結果

		健常対照値means±SDs
S e	63 ng/ml	(131.2±32.4ng/ml)
C r	103	(37.6±15.2)
P b	119	(67.4±24.1)
C o	26	(21.3± 8.2)
H g	67	(13.2±0.52)

文献

- 1) K Homma, S Ishikawa: Toluene-induced uveitis. *Environmental Medicine* 8: 9-15, 1988.
- 2) S Ishikawa, M Miyata, K Okuwaki, T namba, K Fukushima: Analysis of H LA antigens in Behcet's disease--A possible implication of environmental chemicals. *Clinical Ecology* 4: No 2.
- 3) 川崎いずみ、福島一哉: 農作業と関連して発作を繰り返すベーチェット病の一例. *臨床環境医学* 2: 88-92, 1994.
- 4) 宮田幹夫、小川泰典: ベーチェット病と環境因子. 厚生省特定疾患免疫疾患調査研究班一平成8年度研究報告書、 331-338, 1997.
- 5) 奥脇賢一、升田豊、佐藤美菜子、藤田哲、宮田幹夫、石川哲: ベーチェット病における宿主側因子と環境因子について. *臨床環境医学* 2: 106-110, 1993.
- 6) P Dogan, U Soyuer, G Tanrikulu, S Utas: Serum and polymorphonuclear leucocyte antioxidant system in Behcet's disease. *Inest Dermatol* 93: 297, 1989.
- 7) K Shimizu, S Ishikawa, M Miyata, H Yoshida, H Kubo: Relationships between the change of serum copper levels and ocular attacks in Behcet's disease (An etiological consideration). p61-65. *International Congress Series No.467 Behcet's Disease. Proceedings of an International Symposium on Behcet's disease, Istanbul, Turkey, 29-30, September 1977. Experientia Medica, Amsterdam-Oxford.*
- 8) 杉浦清治、斉藤一字、金島弘恭: Behcet病患者における2、3の環境汚染物質の検索. *日眼会誌* 82: 255-259, 1978.
- 9) 杉浦清治、大口正樹、樋口真琴、大野重昭、金島弘恭、伊藤和徳、都築俊文: ベーチェット病患者血清中の銅および脂質含量. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和53年度研究業績 p12.
- 10) 宮田幹夫、小川泰典: ベーチェット病と重金属. 厚生省特定疾患調査研究グループ、免疫疾患調査研究班、ベーチェット病分科会 平成9年度報告書 p76-88.
- 11) 杉晴夫、鈴木季直、市川千代子、稲葉午朗: ベーチェット病患者好中球の

X線マイクロアナリシス. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班、昭和56年度研究業績 p. 196.

12) 西山茂夫、堀嘉昭、村上通敏、宮沢七郎、太田美津子、前島和樹：ベーチェット病の微量金属. 西日本皮膚 37:7、1975.

13) 藤原紀男、石川哲：Behcet病の腓腹神経に関する研究. 日眼会誌 81:1733、1977.

14) 森田昌敏、柴田康行、橋本喬史：ベーチェット病患者の微量元素および有機汚染物質について. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班、昭和58年度研究業績 p. 68.

15) S Miyazawa, N Fujiwara, Y Hori, S Ishikawa: Determination of heavy metals from tissue in Behcet's disease--X-ray microanalysis-- J Clin Electron Microscopy 8: 5-6, 1975.

ペーチェット病患者由来 *Streptococcus sanguis* 感染ノトバイオート マウスを用いた口腔粘膜障害機序の解析

磯貝恵美子

磯貝 浩

横田憲治、小熊恵二

木村浩一 久保田 徹 藤井暢弘

小竹 聡 吉川浩二

大野重昭

北海道医療大学歯学部口腔衛生

札幌医科大学実験動物

岡山大学医学部細菌

札幌医科大学微生物

北海道大学医学部眼科

横浜市立大学医学部眼科

KEYWORD=ペーチェット病、 *Streptococcus sanguis*、外因、実験動物モデル

目的: ペーチェット病 (BD) は再発性の口腔および外囲陰部の潰瘍、ぶどう膜炎を伴う全身の炎症性疾患である。その病因と発病病理機構はいまだ不明とされている。我々は *Streptococcus sanguis* が外因の候補であることを示してきた。すなわち、口腔細菌叢に占める *S. sanguis* の割合は対照に比較して有意に増加していた。さらに、患者からの分離株は遺伝的、抗原的、生物学的性状をこれまで報告された標準株と異にしていた。患者病状の活動性のめやすとなる好中球の活性化のレベルは口腔内の *S. sanguis* の増加に相関していた。臨床分離株から得た抗原に対する患者の免疫応答は皮膚反応などで証明されただけでなく、場合によっては症状の誘発も起こしえた。本研究の目的はこれらの事象がBDに付随した結果の反映ではなく、発病病理に直接関連することを調べるための実験動物モデルを作製することにある。方法: マウスとしては無菌 I Q I マウスをもちい、患者由来菌株として BD113-20 を選択した。マウスの口腔に $10^{3.5-7}$ の菌を接種した。粘膜熱障害の影響をあわせて調べた。。結果: *S. sanguis* はマウスの口腔によく定着した。熱障害群では接種菌数に関係なく唾液 1ml あたりの菌数は 10^{7-8} であった。糞便中の菌数は唾液中より少ないものの同様のレベルで推移した。熱障害対照マウスと比較したとき、粘膜障害は重度で治癒の遅延を示した。5 匹中 1 例、消化管潰瘍での死亡を認めた。単独感染群では唾液中の菌数は $1/10-1/100$ と有意にすくなかったが、糞便中の菌数は熱障害群と差がなかった。熱障害群では *S. sanguis* 細胞壁に対する D T H 応答を示したが、単独感染群では応答を示さなかった。口腔局所における内在性サイトカインの定量を行った。熱障害感染群では感染 2 週間目においても I L-2, I L-6, I F N- γ , T N F- α が高いレベルで検出された。一方、感染あるいは熱損傷のどちらか一方のみの群ではいずれのサイトカインも検出限界以下であった。考察および結論: ペーチェット病の主症状のひとつである口腔粘膜病変の形成をマウスモデルにおいて再現できた。内因が表現されていないマウスでは菌の単独感染では不十分であり、あらかじめ用意された粘膜障害および高い局所でのサイトカインのレベルが必要条件になると考えられた。また、このモデルにおいて局所だけでなく全身への免疫応

答誘導の証明ができた。

Infection of gnotobiotic mice with an *Streptococcus sanguis* strain associated with Behcet's disease - Pathogenesis of oral mucosal damages

Emiko Isogai (Health Sciences University of Hokkaido, Dept. of Preventive Dentistry), Hiroshi Isogai (Sapporo Medical University, Division of Experimental Animals), Kennji Yokota (Okayama University, Dept. of Microbiology), Keiji Oguma (Okayama University, Dept. of Microbiology), Koichi Kimura (Sapporo Medical University, Dept. of Microbiology), Toru Kubota (Sapporo Medical University, Dept. of Microbiology), Nobuhiro Fujii (Sapporo Medical University, Dept. of Microbiology), Satoshi Kotake (Hokkaido University School of Medicine, Dept. of Ophthalmology), Koji Yoshikawa (Hokkaido University School of Medicine, Dept. of Ophthalmology), Shigeaki Ohno (Yokohama City University School of Medicine, Dept. of Ophthalmology)

[Purpose] Behcet's disease (BD) is multisystemic disorder presenting with recurrent oral and genital ulceration as well as uveitis often leading blindness. The etiology and pathogenesis of this syndrome remain obscure. We found that the proportion of *Streptococcus sanguis* in the oral flora of patients with BD significantly increased as compared with the controls. The clinical isolates have different characters genetically, antigenically and biologically from those of ATCC strains. The activation of neutrophils correlated with an increase in the proportion of *S. sanguis*. The patients show hypersensitivity in skin tests with the streptococcal antigens, and sometimes symptoms typical of BD are provoked by an injection of the antigen. The aims of this study were to produce experimental mouse model with infection of *S. sanguis*, which is thought to be candidate for BD, and to examine the mechanism of pathogenesis for oral ulceration. After heat shock, the effect was examined in this mouse model. [Methods] *S. sanguis* strain BD 113-20 was inoculated to oral cavity of germ-free IQI mice. After bacterial inoculation, saliva samples were collected from each mouse and colonization ability was assessed by determining the level at which a strain persisted in the saliva. Total ATP in the saliva was also monitored by HY-LITE system. Cytokine assay (IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ) was done by ELISA. [Results] In heat shock group of gnotobiotic mice inoculated with a *S. sanguis* strain BD-113-20, the bacteria colonized oral cavity at 10^{7-8} /ml saliva. Colonization was persistent even if the inoculum size was small (10^3 /mouse). Inflammatory cytokines were detected in oral inflammatory sites of these mice. However, the mice without heat shock showed no cytokine responses, similar

to what was found for controls. Systematic immune response was observed in heat shock group of the gnotobiotic mice, but not in others. [Conclusion] *S. sanguis* can infect in oral cavity persistently, via powerful activity of colonization. Pretreatment of heat shock enhanced the inflammatory response of oral mucosa in the gnotobiotic mice. Systemic immune response such as T cell activation occurred in these mice. Lymphoepithelial communication may be important in the progress of the disease.

はじめに

我々は *Streptococcus sanguis* が外因の候補であることを示してきた。しかし、本菌は口腔常在菌のひとつであることから、菌数の増加、それともなう免疫あるいは炎症応答は単に本病に付随した結果の反映にすぎないとの指摘もある。Koch の 4 原則のうち、基準 3 および 4 に次のようなことが記載されている。分離された菌は、あらためて別の個体に問題の疾患を発生させることができる。そして実験的に起こされた疾患個体に対象となる菌が、再び発見されなければならない。*S. sanguis* 感染説の最大の弱点はまさにこの点がクリアされていないことである。そこで、患者由来 *S. sanguis* 感染ノトバイオームモデルを作製し、特に口腔粘膜障害への関連を調べた。

方法

マウスとしては無菌 I Q I マウスをもちい、患者由来菌株として BD113-20 を選択した。マウスの口腔に $10^{3.5-7}$ の菌を接種した。粘膜熱障害の影響をあわせて調べた。口腔および腸内での Colonization monitoring 方法として唾液および糞便中の菌数を調べた。唾液中の菌数については化学発光を利用した ATP 測定をあわせて行った。また、他の常在菌や病原細菌と定着状況を比較するため、*Clostridium perferingens*, *C. ramosum*, *Bacteroides vulgatus*, *B. fragilis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* O157, non-pathogenic *E. coli* 感染ノトバイオームモデルを作った。口腔局所における内在性サイトカインの定量 (IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α) を感染 2 週間目において ELISA で行った。剖検時に口腔、胃、十二指腸、空回腸、盲腸、大腸、その他基本臓器の培養を行った。

結果

Clostridium perferingens, *C. ramosum*, *Bacteroides vulgatus*, *B. fragilis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* O157, non-pathogenic *E. coli* 感染ノトバイオームモデルでの唾液中の菌数は *S. sanguis* 感染ノトバイオームモデルに比べていずれも 1/1000 以下と有意に低かった。菌によっては口腔から検出できないものもあった。*S. sanguis* はマウスの口腔によく定着した。熱障害群では接種菌数に関係なく唾液 1ml あたりの菌数は 10^{7-8} であった。糞便

中の菌数は唾液中より少ないものの同様のレベルで推移した。熱障害対照マウスと比較したとき、粘膜障害は重度で治癒の遅延を示した。5匹中1例、消化管潰瘍での死亡を認めた。単独感染群では唾液中の菌数は1/10-1/100と有意にすくなかったが、糞便中の菌数は熱障害群と差がなかった。熱障害群では*S. sanguis* 細胞壁に対するDTH応答を示したが、単独感染群では応答を示さなかった。口腔局所における内在性サイトカインの定量を行った。熱障害感染群では感染2週間目においてもIL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α が高いレベルで検出された。一方、感染あるいは熱損傷のどちらか一方のみの群ではいずれのサイトカインも検出限界以下であった。

考察および結論

ペーチェット病の主症状のひとつである口腔粘膜病変の形成をマウスモデルにおいて再現できた。内因が表現されていないマウスでは菌の単独感染では不十分であり、あらかじめ用意された粘膜障害および高い局所でのサイトカインのレベルが必要条件になると考えられた。また、このモデルにおいて局所だけでなく全身への免疫応答誘導の証明ができた。しかし、本病のもっとも重要な症状である眼病変については病理組織学的検索がまにあわなかったことや、実験期間の検討をおこなっていないなどの不備がみられる。さらに、自己抗体やリンパ球の活性化の機所など仔細な点については今後の研究の進展によらねばならない。

リンパ球が刺激に対して応答するプロセスは外来抗原に対する正常な免疫応答から自己免疫に至るまできわめて広範囲かつ多様性に富んでいる。ペーチェット病の発病病理は内因に基礎を置く抑制制御システムの異常に特定外因の刺激が加わった場合起こりうるのではないだろうか。近年、B細胞やT細胞において正常な免疫反応、トレランスの誘導、そして自己免疫の間のバランスはシグナルの閾値によって決定されるというシグナル閾値仮説が提唱された。現在のところ、BDにおいてシグナル閾値が正常との差をもっているかどうかは不明であり、また、どのような分子によって制御されているかも把握されていない。しかし、シグナル伝達機構の異常やアポトーシスの異常はこの仮説を支持するものと思われる。さらに、細胞をとりまく外部環境—とくに高サイトカインレベルはシグナル閾値を変化させるかもしれない。

ひとの皮膚の表面積は約18平方メートルであるのにたいして、粘膜の表面積は約400平方メートルと広い。いわゆる、内なる外を人は外来の異物との接触面として広範囲に有していることになる。粘膜上皮はそれ自身サイトカインなどを積極的に産生し、粘膜下リンパ球とのコンタクトをもつ。したがって、粘膜での病変を主体とするBDにおいてはその相互作用が重要な鍵となりうる。本研究において、あらかじめ与えられた粘膜の障害は*S. sanguis* 感染に伴い有意に局所におけるサイトカイン産生の増強をもたらした。また、この感染が局所にとどまらず、全身応答へ拡大することにも関連していた。

S. sanguis は障害を受けた粘膜に働き、アフタ形成に関与するだけでなく、全身応答も誘導することがわかった。さらに、このモデル系において lymphoepithelial communication

の重要性が示唆された。

参考文献

1. Chidgey, A. and Boyd, R. 1997. Agonist peptide modulates T cell selection thresholds through qualitative and quantitative shifts in CD8 co-receptor expression. *Int. Immunol.* 9: 1527-1536.
2. Isogai, E., Isogai, H., Kimura, K., Hayashi, S., Kubota, K., Fujii, N., and Takeshi, K. 1998. Role of tumor necrosis factor alpha in gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain. *Infect. Immun.* 66: 197-202.
3. Isogai, E., Isogai, H., Yokota, K., Hayashi, S., Fujii, N., Oguma, K., Yoshikawa, K., Sasamoto, Y., Kotake, S., and Ohno, S. 1991. Platelet aggregation induced by uncommon serotypes of *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behcet's disease. *Arch. Oral Biol.* 36: 425-429.
4. Isogai, E., Ohno, S., Kotake, S., Isogai, H., Tsurumizu, T., Fujii, N., Yokota, K., Yamaguchi, M., Matsuda, H., and Oguma, K. 1990. Chemiluminescence of neutrophils from patients with Behcet's disease and its correlation with an increased proportion of uncommon serotypes of *Streptococcus sanguis* in the oral flora. *Arch. Oral Biol.* 35: 43-48.
5. Isogai, E., Ohno, S., Takeshi, K., Yoshikawa, K., Tsurumizu, T., Isogai, H., Yokota, K., Kotake, S., Matsuda, H., and Oguma, K. 1990. Close association of *Streptococcus sanguis* uncommon serotypes with Behcet's disease. *Bifidobacteria Microflora* 9: 27-41.
6. Goodnow, C. C. 1996. Balancing immunity and tolerance: deleting and turning lymphocyte repartories. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93: 2264-2271.
7. The Behcet's Disease Research Committee of Japan. 1989. Skin hypersensitivity to *Streptococcus sanguis* and the induction of symptoms by the antigens in behcet's disease- A multicenter study. *J. Rheumatol.* 16:506-511
8. Yokota, K., Hayashi, S., Araki, Y., Isogai, E., Kotake, S., Yoshikawa, K., Fujii, N., Hirai, Y., and Oguma, K. 1995. Characterization of *Streptococcus sanguis* isolated from patients with Behcet's disease. *Microbiol. Immunol.* 39: 729-732.
9. Yokota, K., Hayashi, S., Fujii, N., Yoshikawa, K., Kotake, S., Isogai, E., Ohno, S., Araki, Y., and oguma, K. 1992. Antibody response to oral streptococci in Behcet's disease. *Microbiol. Immunol.* 36: 815-822.