
厚生省特定疾患調査研究班
基盤研究部門

特定疾患に関する微生物研究班
平成 10 年度 研究報告書

平成 11 年 3 月

主任研究者 倉 田 毅

厚生省特定疾患調査研究班
基盤研究部門

特定疾患に関する微生物研究班
平成 10 年度 研究報告書

平成 11 年 3 月

主任研究者 倉 田 毅

特定疾患に関する微生物研究班（平成10年度）

区 分	氏 名	所 属	職 名
班 長	倉田 毅	国立感染症研究所感染病理部	部 長
班 員	光山 正雄	京都大学大学院医学系研究科微生物感染症学	教 授
	内山 竹彦	東京女子医科大学微生物学免疫学教室	主任教授
	江石 義信	東京医科歯科大学医学部附属病院病理部	助 教 授
	生田 和良	北海道大学免疫科学研究所	教 授
	田代 真人	国立感染症研究所ウイルス第1部	部 長
	中込 治	秋田大学医学部微生物学教室	教 授
	阿部 淳	国立小児病院小児医療研究センター	助 手
	山西 弘一	大阪大学医学部細菌学教室	教 授
	山谷 睦雄	東北大学医学部附属病院老人科	助 手
	荒川 宜親	国立感染症研究所細菌・血液製剤部	部 長
研 究 協 力 者	和泉 徹	北里大学医学部内科	教 授
	村田 幸作	京都大学食糧科学研究所	教 授
	野間口博子	国立感染症研ハンセン病研究センター	室 長
監 事	結城 伸泰	独協医科大学神経内科	講 師
	山西 弘一	大阪大学医学部細菌学教室	教 授
事 務 局 経理事務連絡担当責任	倉田 毅 (奥田 薫)	国立感染症研究所感染病理部 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 TEL 03-5285-1111 (内 2602) FAX 03-5285-1189	部 長

目 次

I. 総合研究報告（平成8年～10年のまとめ） （業績リストー英文のみ）	1
II. 総括研究報告（平成10年度分） 班 長 倉田 毅（国立感染症研究所）	9
III. 分担研究報告	
1. サルコイドーシスへの細菌学的アプローチ： P.acnes 菌株による宿主感作能の違いとサ症への関与の可能性について	13
光山 正雄（京都大学医微生物感染症）	
2. ベーチェット病患者の $\gamma\delta$ T細胞の解析と口腔内細菌の解析	15
内山 竹彦（東京女子医大微生物学免疫学）	
3. サルコイドーシス病変部リンパ節におけるマイコバクテリアおよび プロピオニバクテリア菌体DNAのQPCR法による定量解析	20
江石 義信（東京医歯大医学部病院病理）	
4. パーキンソン病患者脳内ボルナ病ウイルス	23
生田 和良（北大免疫科学研究所）	
5. 神経変性疾患におけるボルナ病ウイルス感染の検索	25
田代 真人（国立感染研ウイルス第1部）	
6. Crohn病発症の引き金としての麻疹ウイルス	27
中込 治（秋田大医微生物学）	
7. クローン病の発症に関する微生物研究：スーパー抗原産生細菌についての検討	30
阿部 淳（国立小児病院小児医療研究センター）	
8. 特定疾患に関するウイルスの検索システムの構築	32
山西 弘一（大阪大学医細菌学）	
9. 特発性造血障害におけるウイルス感染の関与	35
倉田 毅（国立感染研感染病理部）	
10. ウイルス感染による慢性肺気腫急性増悪の解明	38
山谷 陸雄（東北大医学部附属病院老人科）	
11. 微生物の感染とIgA腎症の関連についての研究	43
荒川 宜親（国立感染研細菌・血液製剤部）	
12. 遷延する心筋炎と特発性心筋症に関する研究	46
和泉 徹（北里大医学部内科）	
13. 細菌アルギン酸リアーゼのバイオフィルム感染症治療への応用： -高次構造と抗原性部位の除去-	49
村田 幸作（京大食糧科学研究所）	
14. 抗酸菌感染と自己免疫疾患：インシュリン依存型糖尿病	53
野間口 博子（国立感染研ハンセン病センター）	
15. ギラン・バレー症候群モデル動物の樹立	56
結城 伸泰（独協医大神経内科）	

I. 総合研究報告

(平成8年～10年のまとめ)

I. 総合研究報告（平成8～10年度）

【研究班名】 特定疾患に関する微生物研究班

【班長氏名】 倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部長）

【研究組織】

生田 和良（北海道大学免疫科学研究所教授）
山西 弘一（大阪大学医学部教授）
光山 正雄（京都大学医学部教授）
荒川 宜親（国立感染症研究所部長）
中込 治（秋田大学医学部教授）
阿部 淳（国立小児病院小児医療研究センター室長）
田代 真人（国立感染症研究所部長）
山谷 陸雄（東北大学医学部附属病院助手）
内山 竹彦（東京女子医科大学主任教授）
江石 義信（東京医科歯科大学医学部付属病院助教授）
和泉 徹（北里大学医学部教授）
野間口博子（国立感染症研ハンセン病研究センター
第1研究室長）
村田 幸作（京都大学食糧科学研究所教授）
結城 伸泰（獨協医科大学講師）

A. 【研究目的】

厚生省で特定疾患（いわゆる難病）として定義されている疾患の大部分は、原因が不明である。治療面においても対症療法的であり、原因に対する療法ができない。本研究班では近年著しく進歩した分子生物学、ウイルス学、細菌学、免疫学、感染病理学等の知識と技術を用い、種々の特定疾患の発症病理像を通して起因病原体を明らかにすることを目的とする。

B. 【研究方法】

特定疾患の原因として、ウイルスあるいは細菌等の感染が引き金となって自己免疫疾患が惹起されたり、微生物の潜伏・持続感染、あるいはまだ認知されていない病原体等が関与していることが示唆されている。そこで当班としては各臨床班と密接に連携し、患者の髄液、血液、血清、体液、生・

剖検検体を用いて

①発症時のできるだけ早い時期のあるいは再発等の病巣検体等を用いて関与病原体の分離を試みる②疾患に関与しているかもしれない微生物との関連を抗体とその動態から検索する③遺伝子レベルで検索する④ウイルス、細菌等微生物の蛋白の認識と自己免疫機構との関連を明らかにする⑤微生物による免疫担当細胞の破壊の機序とその結果としての疾患の惹起について検討する⑥疾患の発生、増悪の機序と潜伏・持続感染微生物の再活性化との関連を明らかにする⑦分子生物学的技術により特定の科のウイルス群に存在する遺伝子配列を検出する系を確立し応用する。

C&D. 【研究結果と考察】

公募により採用された下記の研究テーマについて原因究明の研究を実施して（平成8～10年度）、次の結果を得た。

1. びまん性肺疾患で重要な位置をしめる原因不明の慢性肉芽腫疾患であるサルコイドーシス（サ症）をについて検索したところ、①組織内病変部の *P. acnes* DNA 量 (QPCR) は対照群に比べ1000倍以上であった (12/15)。しかし、*P. acnes* 陰性サ症では、*P. granulorum* 菌が高濃度に検出された。血中抗体については、サ症患者と健常者の間に差はみられなかった。また、*P. acnes* 特異的 RP35 蛋白抗原の末血リンパ球の免疫反応性は、他疾患に比べサ症で有意 ($p<0.001$) に高かった (江石)。サ症と *P. acnes* との関連はかなり濃厚になった。今後さらに人体例を集積し解明する必要がある。②またサ症の肉芽

腫形成にはサイトカイン等の免疫応答も重要な役割を果たしていることから、サ症由来株と他株間で宿主応答を調べたところ、a) 細菌学的に溶血 産生、各種生化学的性状には差はみられなかった。b) 末梢リンパ球刺激 (サ症及び健常者) においても、IL-2 等のサイトカイン産生に差はみられなかった。双方の菌で感作したマウスでサ症由来株で感作した群で細菌内毒素への感受性が高まっていた (光山)。 $\gamma\delta$ T 細胞は、サ症では明確な差はないが、ベーチェット病では、25%で、10%以上の比率を示した (内山)。

2. 神経変性疾患については、近年注目されているウイルスのひとつであるボルナ病ウイルスと疾患の関連を検索した。このウイルスは、ウマやヒツジに脳炎をおこす。パーキンソン病 (黒質神経細胞の変性消失) 患者剖検脳 9 例で BDV RNA 解析を行ない (RT-PCR)、黒質および前頭葉で、p24 あるいは、p40 領域のシグナルが 5/9 に検出された。BDV の p24、p40 の検出された患者黒質を接種したスナネズミの小脳、あるいは大脳に BDV p24 遺伝子が検出された。この切片の *in situ* hybridization で、RT-PCR と一致する結果が得られた (生田)。今後さらに、新鮮な症例を多数つまかさねて、関連性を実証する必要がある。また、BDV RNA 検索アッセイ系として、新たなプライマー設計を行なった。検出感度は、1 マイクロあたり、100 コピー以下である。パーキンソン病患者抹消血からは、BDV RNA は検出できなかった (田代)。今後、さらに関連性について多数の人の例で解明する必要がある。
3. 難治性炎症性腸管障害については、クローン病 (CD) を対象とした。CD 病変部腸組織より作成された cDNA ライブラリーを抗麻疹単クローン抗体でイ

ムノスクリーニングし、陽性クローン遺伝子を解析し、CDX を得て、その単クローン抗体を作成し、CD 腸組織を検索した。CD 由来大腸組織で免疫組織学的に最も多くかつ強く染色されたが、他疾患や正常組織でもみられた。ウエスタンブロット法では、CD5 例で、CDX と反応するバンドを得た。CDX は麻疹ウイルス由来ではないヒト由来蛋白であり、共通抗原性があるものであることもわかり、病因性については麻疹ウイルスが antigen mimicry の機序を介し自己免疫反応の引き金となっている可能性も考えられるが直接証明はできなかった (中込)。Yersinia 腸炎患者の半数で抗 YPM-IgG 抗体が上昇し、この抗体が、YPM のマイトジェン作用に対する中和活性がみられた。また、CD 患者の 23.1%にこの抗体が検出された。マイトジェン作用への中和活性は 4/19 にみられたのみである。CD の直腸ぬぐい液での *S. aureus* の検出率は、PCR 法で 62.5%、直接菌分離 16.7%で陽性例のスーパー抗原遺伝子の分布パターンには変化はみられなかった。これらの結果から、CD において Yersinia との直接関与は不明である (阿部)。CD と病原体については直接あるいは間接証拠は得られなかった。- 4. 血液疾患については多数の特定疾患がある。患者末血中の未知のウイルス検索を目的として一般にヒトに最も多く潜伏・持続感染しているヘルペス群ウイルス遺伝子配列をもとに応用を試みた。感染細胞、既知ウイルス疾患患者末血単球中で増幅できるプライマーを設計し、探検したところ得られた産物の配列は、既知のヘルペス由来とヒトゲノム由来であった。これをより高感度化して非特異性を減らすとともに、急性期での検体を対象として、スクリーニングを進める必要がある (山西)、骨髓組織に感染し、造血障害を

惹起することが判明しているヒトパルボウイルス B19、ヘルペスウイルス 6 等の遺伝子、蛋白検出系を開発し、再生不良性貧血、骨髓異形成、特発性血小板減少性紫斑病等の骨髓組織と末梢血を検索した結果、B19 感染 5 例、ヒトヘルペスウイルス 6 感染が同定できた。また、ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV8) の ELISA による抗体検出系を開発した。PRCA の例と MDS の 3 例で HHV8 のゲノムが検出できている。特に、B19 については、再生不良性貧血では除外診断に加えるべきと考える(倉田)。

5. 以下はグループ研究ではないので、個別に記す。

- IgA 腎症例で、11/16 例で *Mycoplasma fermentous* の菌体抗原に反応する IgM 抗体が認められた。また、8 名の全例で咽頭スワブから *Mycoplasma* 属 DNA が検出された。また 7/10 でアルギニン分解性の *Mycoplasma* 属が分離された。IgA 腎症は、全身の免疫異常に伴う血管炎であると考え、扁桃組織における慢性的免疫刺激が疾患の本質である可能性も高く、患者の扁桃、腸管のリンパ装置での上記 *Mycoplasma* 属を疾患との関連についてさらに検討する必要がある(荒川)。
- 慢性肺気腫の急性増悪を生ずる起因ウイルス同定とその病態の研究では、アデノ、ライノ、インフルエンザ等のウイルス感染で急性増悪をきたし、呼吸不全に陥ることを明らかにした(山谷)。
- 突発性拡張型心筋症の約 30% は、活動性心筋炎が遷延化したものとされている。またいくつかのウイルスや細菌のエピトープが細胞に働き、自己免疫的機序により臓器破壊的に作用するとの考え方もあり、その機序の解明にブタ心筋ミオシンの重鎖

1070—1165 の 96 アミノ酸の後半 40 アミノ酸内に抗原感作エピトープが存在することが明らかになった。今後このペプチドを N 末端から順次アミノ酸を減らし、心筋炎惹起能を確認している(和泉)。

- ギラン・バレー症候群 (GBS) は、急性発症し四肢筋力低下をきたす疾患で人口 10 万で年間 1—2 名が発症する。GBS はグラム陰性桿菌の *C. jejuni* との関連が強く示唆されている。この菌による腸炎後 GBS の発症を規定する因子として①特定の血液型 (16/31 が PEN19 型) ②患者の免疫遺伝学的背景の重要性が示唆され IgG 抗 GMI 抗体と密接な関連が見られた PEN19 型 *C. jejuni* のリポ多糖に GMI 様の構造が存在することを明らかにした(結城)。*C. jejuni* 菌の感染と GBS 発症との関連については、菌側からと宿主側から詳細なつめを行う必要がある。
- 難治性細菌感染症における感染要因 (バイオフィルム) を解析し、効果的治療法を開発することを目的として次の様な結果を得た。水田土壤菌 *Sphingomonas* sp. A1 を分離し、それに由来するアルギン酸リアーゼクローニングし、大量生産法を確立した。この酵素はバイオフィルム感染症患者から分離された緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* が生産するアルギン酸、及び関連細菌が生産するアルギン酸を効果的に溶解し、バイオフィルム除去に最適であることが確認できた。この安全性試験で軽度のアナフィラキシー症状が認められ、この有害性除去のため酵素の X 線結晶構造解析を行ない、3 次元構造を認めた。また抗原性エピトープ部位を決め除去することを試みているが、エピトープ確認は進行中である(村田)。このような発現での治療法開

発は極めてユニークで、また普遍性があり重要テーマと考える。

- 抗酸菌感染と自己免疫疾患（I 型糖尿病 IDDM）では、らい菌の 65KD 熱ショック蛋白質（hsp65）の DNA を皮内投与（IDDM 発症系 NOD マウス）すると発症が完全に抑制あるいは遅延された。これは hsp65 による Th2 型サイトカインである IL-10 の誘導があることによると思われる（野間口）。

E. 【結論】

微生物研究班の3年間のまとめとして

1. サ症において *P. acnes* の DNA fragment が QPCR により極めて有意に検出された。
2. BDV RNA がパーキンソン病黒質に検出され、スナネズミへの接種により小脳、大脳に関連遺伝子が *in situ hybridization* により検出できた。
3. 骨髄疾患—再生不良性貧血等でヒトパルボウイルス感染が見られた。これは除外診断をする必要がある。
4. ギラン・バレー症候群の発症機序に *C.jejuni* が関与していることが示唆された。

F. 【研究発表】

1. 論文発表

（別紙の通り）

Publication list

1. Ueda, T., Miyake, Y., Imoto, K., Hattori, S., Miyake, S., Ishizaki, T., Yamada, A., Kurata, T., Nagai, T., Suga, S. & Asano, Y.: Distribution of human herpesvirus 6 and varicella-zoster virus in organs of a fatal case with exanthem subitum and varicella. *Acta Paediatrica Japonica* 38: 590-595, 1996
2. Hoshikawa, M., Sata, T., Takakuwa, T., Iwasaki, T. & Kurata, T.: Human herpesvirus 6 variant B (HHV6B) infection in Hodgkin's disease. *St. Marianna Med. J.* 24: 302-310, 1996
3. Ando, Y., Iwasaki T., Sata T., Souchi, S., Kurata, T. & Arao, Y.: Enhanced cytopathic effect of human cytomegalovirus on a retinal pigment epithelium cell line, K-1034, by serum-free medium. *Arch. Virol.* 142: 1645-1658, 1997
4. Arao, Y., Souchi, S., Sato, Y., Moriishi, E., Ando, Y., Yamada, M., Pedilla J., Uno, F., Nii, S., and Kurata, T.: Infection of a human retinal pigment epithelial cell line with human herpesvirus 6 variant A. *J. Med. Virol.* 53: 105-110, 1997
5. Ogawa-Goto, K., Arao, Y., Ito, Y., Ogawa, T., Abe, T., Kurata, T., Irie, S. and Akanuma, H.: Binding of human cytomegalovirus to sulfated glucuronyl glycosphingolipids and their inhibitory effects on the infection. *J. Gen. Virol.* 79: 2533-2541, 1998.
6. Yoshikawa, T., Suzuki, K., Ihira, M., Furukawa, H., Suga, S., Iwasaki, T., Kurata, T., Asonuma, K., Tanaka, K., Asano, Y.: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J Clin Pathol* 52: 65-67, 1999
7. Kobayashi, T. , Shoya, Y. Koda, T. , Takashima, I, Lai, P., Ikuta, K., Kakinuma, M and Kishi, M: Nuclear targetting activity associated with the amino teminal region of the Borna Disease virus nucleoprotein. *Virology*, in press
8. Iwahashi, K. , Waranabe, M. , Nakamura, K. , Suwaki, H. , Nakaya, T. , Nakamura, Y, Takahashi, H. and Ikuta, K. : Positive and negative syndromes, and Borna disease virus (BDV) infection in schizophrenia. *Neuropsychobiology.* 37, 59-64, 1998
9. Hagiwara, K., Kawamoto, S., Takahashi, H., Nakamura, Y., Nakaya, T., Hiramune, T, Ishihara, C. and Ikuta, K.: High prevalence of Borna disease vims infection in healthy sheep in Japan. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4, 339-344, 1997
10. Fujiwara, S., Takahashi, H., Nakaya, T., Nakamura, Y., Nakamura, K and Ikuta, K.: Microplate hybridization for Borna disease virus RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4: 387-391, 1997
11. Takahashi, H., Nakaya, T. , Nakamura, Y. , Asahi, S. , Onishi, Y., Ikebuchi, K. , Takahashi, T. A. , Katoh, T. and Ikuta, K. : Higher prevalence of Borna disease virus infection in blood donors living near thoroughbred horse farms. *J. Med. Virol.* 52: 330-335, 1997
12. Shoya, Y. , Kobayashi, T. , Koda, T. , Lai, P. K. Tanaka, H. , Koyama, T. , Ikuta, K., Kakinuma, M. and Kishi, M: Amplification of a full-length Borna disease virus (BDV) cDNA from total RNA of cells persistently infected with BDV. *Microbiol. Immunol.* 41: 481-486, 1997
13. Hagiwara, K. , Momiyama, N., Taniyama, H. , Nakaya, T. Tsunoda, N., Ishihara, C. and Ikuta, K. : Demonstration of Borna disease virus (BDV) in specific regions of the brain from horses positive serum antibodies to BDV but negative for BDV RNA in the blood and internal organs. *Med. Microbiol. Immunol.* 186: 19-24, 1997
14. Iwahashi, K., Watanabe, M. , Nakamura, K. , Suwaki, H., Takahashi, H. and Ikuta, K.: Chnical investigation of the relationship between Borna disease virus (BDV) infection and schizophrenia in 67 patients in Japan. *Acta Psychiatr. Scand.* 96: 412 - 415, 1997
15. Haga, S. , Yoshimura, M. , Motoi, Y. , Adma, K. , Aizawa, T., Ikuta, K., Tashiro, M. and Ikeda, K. : Detection of Borna disease virus genome in normal human brain tissue. *Brain Res.*

16. Tagawa, Y., Yuki, N. and Kirata, K.: Ability to remove immunoglobulins and anti-ganglioside antibodies by plasma exchange, double-filtration plasmapheresis, and immunoadsorption. *J. Neurol. Sci.* (in press)
17. Koga, M., Yuki, N., Kashiwase, K., Tadokoro, K., Juji, T. and Hirata, K.: Guillain-Barre and Fisher's syndrome subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis are associated with HLA-B54 and Cw1 independent of anti-ganglioside antibodies. *J. Neuroimmunol.* (in press)
18. Yuki, N.: Anti-ganglioside antibody in neuropathy: Review of our research. *J. Peripheral nervous System* 3: 3-18, 1998
19. Yuki, N. and Hirata, K.: Preserved tendon reflexes in *Campylobacter* neuropathy. *Ann. Neurol.* 43: 546-547, 1998
20. Koga, M., Yuki, N., Takahashi, M., Saito, K. and Hirata, K.: Close association of IgA anti-ganglioside antibodies with antecedent *Campylobacter jejuni* infection in Guillain-Barre and Fisher's syndromes. *J. Neuroimmunol.* 81: 138-143, 1998
21. Yuki, N.: Molecular mimicry between gangliosides and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barre syndrome and Fisher's syndrome. *J. Infect. Dis.* 176(Suppl 2):S150-S153, 1997
22. Yuki, N., Taki, T., Handa S.: Antibody to GalNAc-GD1a and GalNAc-GM1b in Guillain-Barre syndrome subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *J. Neuroimmunol.* 71: 155-161, 1996
23. Yuki, N., Takahashi M, Tagawa Y, Kashiwase K, Tadokoro K, Saito K.: Association of *Campylobacter jejuni* serotype with anti-ganglioside antibody in Guillain-Barre syndrome and Fisher's syndrome. *Ann Neurol* 42:28-33, 1997
24. Miyagi F, Horiuchi H, Nagata I, Ktshara S, Kiyoki M, Komoriya K, Yuki, N.: Fc portion of intravenous immunoglobulin suppresses the induction of experimental allergic neuritis. *J Neurol Sci* 1997;78: 127-131.
25. Uetakagaito M, Horikawa H, Yoshinaka H, Tagawa Y, Yuki, N.: Two patients with acute Guillain-Barre syndrome treated with different apheresis methods. *Therapeutic Apheresis* 1997; 1 :340-342.
26. Tagawa Y, Yuki, N., Hirata K.: Ability to remove immunoglobulins and anti-ganglioside antibodies by double-filtration plasmapheresis in Guillain-Barre syndrome: Is it equivalent to plasma exchange? *Therapeutic Apheresis* 1997; 1 :336-339.
27. Okada M, Yuki, N., Hirata K.: Comparison of the adsorption ability between tryptophan and modified tryptophan columns. *Therapeutic Apheresis* 1997;1: 353 -355.
28. Yuki, N., Miyagi F.: Possible mechanism of intravenous immunoglobulin treatment on anti-GM1 antibody-mediated neuropathies. *J Neurol Sci* 1996;139: 160-162.
29. Yuki, N.: Tryptophan-immobilized column adsorbs immunoglobulin G and-GQ1b antitoxin from Fisher's syndrome: A new approach to treatment. *Neurology* 1996;46: 1644- 1651.
30. Yuki, N., Takahashi M, Saito K, Yoshino H.: Traveler's diarrhea, *Campylobacter jejuni*, and acute motor axonal neuropathy. *Ann Neurol* 1996;39:416-417.
31. Yuki, N., Ichikawa H, Doi A.: Fisher syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis: Human leukocyte antigen and the bacterial serotype. *J Pediatr.* 1995; 126:55-57.
32. Yuki, N., Handa S, Tai T, Takahashi M, Saito K, Tsujino Y, Taki T.: Ganglioside-like epitopes of lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* (PEN 19) in three isolates from patients with Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Sci* 1995;130: 112-116.
33. Yuki, N., Ichihashi Y, Taki T.: Subclass of IgG antibody to GM1 epitope-bearing lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* in patients with Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 1995;60: 161-164.
34. Yuki, N.: Pathogenesis of axonal Guillain-Barre syndrome: Hypothesis. *Muscle Nerve* 1994; 17:680-682.

35. Yuki N, Taki T, Takahashi M, Saito K, Tai T, Miyatake T, Handa S.: Penner's serotype 4 of *Campylobacter jejuni* has a lipopolysaccharide that bears a GM1 ganglioside epitope as well as one that bears a GD1a epitope. *Infect Immun* 1994;62:2101-2103.
36. Suzuki S, Kawaguchi M, Mizuno K, Takama K, Yuki N: Immunological properties and ganglioside recognitions by *Campylobacter jejuni* enterotoxin and cholera toxin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994;8:207-212.
37. Sugita K, Ishii M, Takanashi J, Niimi H, Yuki N: Guillain-Barre syndrome associated with IgM anti-GM1 antibody following *Campylobacter jejuni* enteritis. *Eur J Pediatr* 1994;153: 181-183.
38. Yuki N, Taki T, Takahashi M, Saito K, Yoshino H, Tai T, Handa S, Miyatake T.: Molecular mimicry between GQ1b ganglioside and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Fisher's syndrome. *Ann Neurol* 1994;36:791-793.
39. Yuki N, Yamazaki M, Kondo H, Suzuki K, Tsuji S.: Treatment of multifocal motor neuropathy with a high dosage of intravenous immunoglobulin. *Muscle Nerve* 1993;16:220-221.
40. Yuki N, Miyatake T, Ohsawa T.: Beneficial effect of plasmapheresis on Fisher's syndrome. *Muscle Nerve* 1993;16: 1267-1268.
41. Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Handa S, Miyatake T.: A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med* 1993;178: 1771-1775.
42. Fujimoto S, Yuki N, Itoh T, Amako K.: Specific serotype of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis* 1992;165: 183.
43. Yuki N, Sato S, Fujimoto S, Yamada S, Tsujino Y, Knoshita A, Itoh T.: Serotype of *Campylobacter jejuni*, HLA, and the Guillain-Barre syndrome. *Muscle Nerve* 1992; 15:968-969
44. Yuki N, Handa S, Taki T, Kasahara T, Takahashi M, Saito K, Miyatake T. Cross-reactive antigen between nervous tissue and a bacterium elicits Guillain-Barre syndrome: Molecular mimicry between ganglioside GM1 and lipopolysaccharide from Penner's serotype 19 of *Campylobacter jejuni*. *Biomed Res* 1992;13:451-453.
45. Yuki N, Yoshino H, Sato S, Miyatake T.: *Campylobacter* neuropathy: Reply. *Neurology* 1991 ;41: 1327-1328.
46. Yuki N, Sato S, Itoh T, Miyatake T.: HLA-B35 and acute axonal polyneuropathy following *Campylobacter* infection. *Neurology* 1991 ;41: 1561-1563.
47. Yuki N, Yoshino H, Sato S, Miyatake T.: Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following *Campylobacter* enteritis. *Neurology* 1991;40: 1900-1902.
48. Arakawa Y, Wacharotayankun, R., Nagatsuka, T., Ito, H., Kato, N., Ohta, M. 1995. Genomic organization of the *Klebsiella pneumoniae* cps Region responsible for serotype K2 capsular polysaccharide synthesis in the virulent strain Chedid. *J. Bacteriol.* 177: 1788-1796
49. Ito, H., Arakawa Y, Ohsuka, S., Wacharotayankun, R., Kato, N., and Ohta, M. 1995. plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene blaIMP among Clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:824-829
50. Agata, N., Ohta, M., Arakawa Y, and Mori, M. 1995. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiol.* 141 : 983-988
51. Arakawa Y, Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., and Ohta, M. 1995. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1612-1615.
52. Ohsuka, S., Arakawa Y, Horii, T., Ito, H., Ohta M. 1995. Effect of pH on activities of novel β -lactamase and β -lactamase inhibitors against these β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1856-1858
53. Senda, K., Arakawa Y, Ito, H., Nakashima, K., Ichihara, S., Shimokata, K., Kato, N., and Ohta, M. 1996. Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:349-353.

54. Kato, N., Naito, S., Arakawa, Y., Sugiyama, T., Ito, H., Ohta, M., and Sasaki, K. 1996. Crystallization of synthetic Eschen'chl'a COli-type lipid A. *Microbiol. Immunol.* 40: 33-38.
55. Kimura, K., Arakawa, Y., Ohsuka S., Ito, H., Suzuki, K., Kurokawa, H., Kato, N., and Ohta, M. 1996. Molecular aspects of high-level resistance to sulbactam<efoperazone in Klebsl'eHa oxytoca clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1988-1994.
56. Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimokata, K., Kato, N., and Ohta, M. 1996. PCR detection of metallo-Pllactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum P-lactams. *J. Clinic Microbiol.* 34:2909-2913.
57. Kato, N., Ohta, M., Arakawa, Y., Naito, S., Sugiyama, T., Ito, H., Kido, N., Sasaki, K., and Asai, J. 1996. Crystallization of an R-form lipopolysaccharide from Klebsl'e11a pneumom'ae. *Microbiol. Immunol.* 40:407-41 3.
58. Matsumoto, M., Murai, T., Ichiyama, S., Saito, M., juakawa, Y., and Ohta, M. 1997. Prevalence of the speA2 and speA3 alleles in *Streptococcus pyogenes* isolated from TSLs patients in Japan. *FEMS. Microbiol. Lett.* 150:233-237.
59. Yagi, T., Kurokawa, H., Senda K., Ichiyama, S., Hideo, I., Ohsuka, S., Shibayama, K., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M., and Arakawa, Y. 1997. Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia Coli* strains carrying multiple Toho-1-like b-lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4 1 : 2606-26 1 1
60. Tanaka, T., Horii ,T., Shibayama, K., Sato, K., Ohsuka, S., I Arakawa, Y., Yamaki, K., Takagi, K., and Ohta, M. 1997. RobA-induced multiple antibiotic resistance largely depends on the activation of the AcrAB emux. *Microbiol. Immunol.* 41 :697-702.
61. Goto, M., Takahashi, T., Yamashita, I F., Koreeda, A., Mori, H., Ohta, M., and Arakawa, Y. 1997. Inhibition of the metallo-fLlactamase produced from *Serratia marcescens* by thiol compounds. *Biol. Pharm. Bull.* 20:1 136-1 140.
62. Arakawa, Y., et al. Genetic analyses of *Klebsiella cps* gene cluster involved in capsular polysaccharide synthesis. In "Molecular Approaches to Food Safety", p279-308, 1995, Ed. by M. Eklund et al., Alken. Inc., Fort Collins, Co. 80521, USA.

II. 総括研究報告

II. 総括研究報告（平成 10 年度）

【研究班名】 特定疾患に関する微生物研究班

【班長氏名】 倉田 毅（国立感染症研究所感染病理部長）

【研究組織】

生田 和良（北海道大学免疫科学研究所教授）
山西 弘一（大阪大学医学部教授）
光山 正雄（京都大学医学部教授）
荒川 宜親（国立感染症研究所部長）
中込 治（秋田大学医学部教授）
阿部 淳（国立小児病院小児医療研究センター室長）
田代 真人（国立感染症研究所部長）
山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院助手）
内山 竹彦（東京女子医科大学主任教授）
江石 義信（東京医科歯科大学医学部附属病院助教授）
和泉 徹（北里大学医学部教授）
野間口博子（国立感染症研ハンセン病研究センター
第 1 研究室長）
村田 幸作（京都大学食糧科学研究所教授）
結城 伸泰（獨協医科大学講師）

A. 【研究目的】

厚生省が特定疾患（いわゆる難病）と定義している疾患の大部分については、現在まで原因が不明である。それゆえ治療面においても必然的に対症療法的とならざるを得ず、原因療法ができないでいる。本研究班では近年著しく進歩したウイルス学、分子生物学、免疫学、細菌学、感染病理学等の知識と技術を用い、血液凝固異常、特発性造血障害、神経変性疾患、難治性炎症性腸管障害、びまん性肺疾患等につき発症病理像を通して起因病原体を明らかにすることを目的とする。

B. 【研究方法】

特定疾患の原因として、ウイルスあるいは細菌等の感染が引き金となって自己免疫機序が惹起されたり、微生物の潜伏・持続感染、あるいはまだ認知されていない病原

体等が関与していることが示唆されている。そこで当班としては各臨床班と密接に連携し、患者の髄液、血液、血清、体液、生・剖検検体を用いて

①発症時のできるだけ早い時期のあるいは再発等の病巣検体等を用いて関与病原体の分離を試みる②疾患に関与しているかもしれない微生物との関連を抗体とその動態から検索する③遺伝子レベルで検索する④ウイルス、細菌等微生物の蛋白の認識と自己免疫機序との関連を明らかにする⑤微生物による免疫担当細胞の破壊の機序とその結果としての疾患の惹起について検討する⑥疾患の発生、増悪の機序と潜伏・持続感染微生物の再活性化との関連を明らかにする⑦分子生物学的技術により特定の科のウイルス群に存在する遺伝子配列を検出する系を確立し応用する。

C&D. 【研究結果と考察】

1. びまん性肺疾患グループでは、2 名がサルコイドーシス（サ症）を対象として、常在嫌気性菌（*P. acnes*）の病因的意義について検討した。サ症組織（12/15：80%）では *P. acnes* DNA が対象群に比べ QPCR 法により 1000 倍以上高く検出された（江石）。またサ症由来株感作群マウスでは対照群に比し有意に高い感染抵抗性が見られた（光山）。PCR に加えて *in situ* hybridization 等により病因論にせまれる方法で検討する必要がある。
2. ベーチェット病（BD）30 名、20 名の健常者を比較すると、BD 患者の 25% が高 γ δ T 細胞比率（10%以上）を示したが、自己抗原あるいは細胞由来抗

- 原については不明である（内山）。
3. 神経変性グループでは 2 名が動物に自然感染しているボルナ病ウイルス (BDV) と神経疾患との関連を検討した。パーキンソン病 (PD) 患者剖検例の黒質と前頭葉で nested RT-PCR により BDV RNA を調べ、4 例 (P1—P4) 中 3 例の黒質と前頭葉 (P24 領域は、P2 の黒質、P2 と P4 の前頭葉、P40 は P1 と P4 の黒質、P4 の前頭葉) にシグナルが検出された。また他の 5 例については 2 例の黒質で P24 が陽性であった (生田)。他方 PD 外来患者 49 名の抹消血中の単球及び血清中で夫々 BDV RNA と P40 抗体の検出を試みた。RNA は認められず 1 例の血漿で他検体より高い DD 値が見られた (田代)。多数の例で臨床期の種々の段階での検討が必須である。
 4. 難治性炎症性腸管障害グループでは 2 名がクローン病 (CD) の発症病因について解析した。CD 患者腸組織 cDNA ライブラリーを抗麻疹抗体でスクリーニングし、反応する物質 (CDX) をクローニングした。これは麻疹ウイルスとは無関係のヒト由来タンパクでありこれに対するモノクローナル抗体を作成し CDX の組織分布を調べた。CD、潰瘍性大腸炎 (UC) 他の腸炎、正常等のグループでいずれも強弱の陽性が見られた (中込)。いっぽう CD Yersinia 菌由来スーパー抗原 (YPM) に対する IgG 抗体価の高い患者で YPM の mitogen 作用に対する中和活性は認められなかった (阿部)。ウイルス、細菌両面から CD の病因論にせまったが陽性といえる所見には至らなかった。
 5. 血液疾患グループについては 2 名が異なった方法でアプローチした。患者末血中の未知のウイルス検索を目的として既知ヘルペス遺伝子配列を元にした consensus primer PCR 法を開発、応用を試みた。感染細胞、既知ウイルス疾患患者末血単球中で増幅できるプライマーを往復分設計し、探索したところ得られた産物の配列は既知のヘルペス由来とヒトゲノム由来であった。これをより高感度化して非特異性をへらすと共に急性期の検体を対象としてスクリーニングを進める必要があろう (山西)。また特発性造血障害研究班の班員諸氏より提供された及び当研究部で他のルートで集めた再生不良性貧血 (11 例)、pure red cell aplasia (5 例)、myelodysplastic syndrome (MDS) (45 例)、溶血性貧血 (1 例) pancytopenia (1 例) 等の特発性骨髄障害ならびに特発性血小板減少性紫斑病 (1 例) について入手しえた材料について、PCR、in situ hybridization、免疫組織学的に検討した。現在までパルホウイルス B19 感染 5 例、ヒトヘルペスウイルス 6 感染 1 例が陽性となった。基礎疾患を認めない B19 感染例で 3 カ月以上の pancytopenia を呈した例では血液症状とウイルスゲノムの存在に相関が認められた。再生不良性貧血については今後 B19 の除外診断を行う必要がある (倉田)。
 6. 以下のグループは個々に共通項がないので個々にまとめる。IgA 腎症発症 26 例の血清等から 11/16 に *Mycoplasma fermentans* (M.f.) の菌体抗原に対する IgM 抗体を検出した。咽頭スワブ 8 例全てに M 属の DNA が検出された。また 10 例中 7 例の咽頭スワブからアルギニン分解性 M 属が分離された。しかし PCR では M.f. 特異的 DNA は検出できてはいない。今後関連性については腎組織等を含めて検討する必要がある (荒川)。慢性肺気腫 20 例を経過観察し (1998 年 1~11 月)、8 例に上気道感染に続く急性増悪を認めた。2 例はインフルエンザ A 型 (H3N2)、アデノウイルス (型不明)、単純ヘルペス各々 1 例が検出された。また急性

増悪時に動脈血酸素分圧とピークフロー値は低下し呼気一酸化炭素濃度は上昇した。これ寄子の疾患の上気道炎後の気道狭窄と低酸素血症との関連が示唆された（山谷）。特発性心筋症の発症機序については心筋ミオシンのエピトープを決定し、病原体との共有制や類似性を検索し、拡張型心筋症を惹起する病原体候補を同定するため、小ペプチド化した抗原感作実験によりエピトープは96アミノ酸の後半40個に存在することが明かとなったが、このレベルでは既知の病原体との分子学的共有制は認められてはいない。理由として小ペプチド化不十分、あるいは心筋症発症機序に他の免疫学的交差性も関与しているとも考えられる（和泉）。ギランバレー症候群については病因に関連があるとされる *C. jejuni* のリポ蛋白を免疫してモデル動物の確立する前段階として GM1 を含むウシ脳ganglioside を白ウサギに注射した。皮下、腹腔注射群いずれにおいても各 4/5 に運動マヒがみられた。対照群には見られてはいない。*C. jejuni* のリポ蛋白が同様の症状を惹起しうるかどうか関心が持たれる（結城）。難治性細菌感染症における感染要因（バイオフィルム）の解析については、緑膿菌バイオフィルム構成多糖であるアルギン酸をアルギン酸リアーゼで分解することによってバイオフィルムを破壊し、抗生物質との併用によって感染菌を除去する治療法の確立を目指して、

Sphingomonas sp. A1 由来組換え体アルギン酸リアーゼの N 末端から夫々 4 カ所、C 末端から夫々 3 カ所のアミノ酸を除去した計 7 個の変異体を作製した。これらの変異体酵素の全ては大腸菌で大量発現したが、抗原エピトープ部位の存在は確認できなかった（村田）。自己免疫疾患型を示す I 型糖尿病 (IDDM) 発症におけるらい菌 hsp65 の関与についてモデル動物の NOD マウスを用い検討したところ、発症がこの蛋白により抑制された。その原因は、hsp65 により、Th2 型サイトカインである IL-10 の誘導がみられたことと関連があらう（野間口）。

E. 【結論】

1. サルコイドーシスの組織にきわめて高率に *P. acnes* の遺伝子が検出された。
2. パーキンソン病の病変の中心である黒質に、ボルナウイルス RNA が高率に検出された。
3. 再生不良性貧血の骨髓中に、ヒトパルボウイルス B19 の感染がみつかった。今後、除外診断も考慮すべきである。
4. ギランバレー症候群の原因と考えられる *C. jejuni* のモデルとして、GMI を含むウシ脳ganglioside をウサギに注射し、高率に運動マヒを生じさせた。
5. IgA 腎症発症に、*Mycoplasma* の関与が示唆された。

以上のような重要な 5 所見につき、さらに臨床例を中心として確認も含めて、病因検索を行う必要がある。

III. 分担研究報告

1. サルコイドーシスへの細菌学的アプローチ：

P.acnes 菌株による宿主感作能の違いとサ症への関与の可能性について

分担研究者 光山 正雄 京都大学医学研究科微生物感染症学
研究協力者 望月 博史 新潟大学医学部細菌学

[はじめに]

いまなお原因不明のサルコイドーシス（以下サ症）は全身性肉芽腫を特徴とした疾患である。病理組織学的には非乾酪性類上皮肉芽腫の存在が重要であり、その形成には何らかの物質に対する宿主側の特殊な免疫応答が関与する可能性が示唆されている。しかし原因となる因子については種々の微生物の関与のほか化学物質、金属、花粉、粘土などが想定されてきたものの、いずれの症例でもサ症との関係を直接実証できてはいない¹⁾。日本では1970年代にHomma（本間）らがサ症患者検体より高頻度に *Propionibacterium acnes* が分離されることを報告²⁾して以来、*P.acnes* の実験的肉芽腫形成能、*P.acnes* 特異抗体のサ症肉芽腫内での証明、PCRによる病巣での *P.acnes* DNA の証明、抗原添加時のリンパ球幼若化などを通じてサ症と *P.acnes* の関与についての間接的証明が試みられてきた。しかし国際的には、*P.acnes* がサ症の原因であるというための Koch's postulates を満たし得る結果がないこと、*P.acnes* は皮膚常在菌でありコンタミネーションの可能性を否定しきれないこと、宿主側の要因の関与が強く考えられること、などの理由から原因菌としての *P.acnes* を支持するものは少なく、国外ではむしろ抗酸菌群を候補とする考えが強い³⁾。我々は本菌のサ症への関与の可能性について、従来用いられた患者からの菌の検出や免疫応答の観察とは異なった方法でアプローチを試みた。この病態にマクロファージ活性化やサイトカインが関与することが考えられるので、常在菌的な *P. acnes* の菌株によって宿主サイトカイン誘導能または2次刺激応答への感作能の違いがあり、その違いがサ症の発症に関与する可能性を考えた。そこで、サ症由来株と非サ症由来株を用いてマウスに対する

サイトカイン誘導能と、宿主を感作し2次刺激に対する応答を変化させる能力の違いがみられないか否かを検討した。

[対象と方法]

Homma らによって1978年に報告されたサ症病変部由来及び非サ症由来の *P.acnes* 各2菌株を結核研究所阿部千代治博士より分譲を受けた。各菌株はアニデント嫌気性菌同定システム(Api Bio Merieux, France)で菌種の同定再確認を行った上で、嫌氣的に ABCM broth(栄研)で培養し、一定の生菌浮遊保存液として分注保存した。8週令前後の雄の C3H/He マウスを用いた。正常マウスの脾細胞および腹腔マクロファージを採取し、in vitro で各種濃度の生菌で刺激し、産生される各炎症性サイトカインを測定定量した。正常マウスに各種濃度の生菌を接種して感作し、7日後に感作マウスとして、LPS(大腸菌由来) またはリスチア生菌 (*Listeria monocytogenes*)を腹腔内接種して、内毒素感受性および感染抵抗性をしらべ、*P. acnes* 菌株による宿主感作能の違いを比較した。

[結果]

サイトカイン誘導能マクロファージを刺激すると、IL-1, TNF α , IL-12 などいわゆる inflammatory cytokine の産生誘導能が認められた。脾細胞を刺激するとこれらに加えて IFN- γ の産生誘導もみられた。その活性は多の細菌種よりは高い傾向を示したが、サ症由来株と非サ症由来株の間には、当初期待されたような大きな違いを認めることはできなかった。

マウス感作能の違い一方マウスを in vivo で感作した場合、*P. acnes* 菌株による感作自身ではマウスの死亡はみられず、接種菌の臓器内増殖も

みられなかった。感作後1週目に内毒素としての *E. coli* LPS を投与すると、感作群では著明な感受性亢進がみられ、非感作マウスが全例生存する量の LPS により感作マウスはほぼ全例が死亡した。この傾向は感作菌数にある程度平行していた。一方同様の感作マウスにグラム陽性菌であるリステリアを接種すると、正常マウスにとっての致死量感染に対して大半が生存し、著明な感染抵抗性亢進が認められた。このような、*P. acnes* 感作により誘導される宿主の内毒素感受性と感染抵抗性の亢進は、サ症由来株による感作マウスでより明らかな傾向が見られた。

[考案・結論]

今回の実験結果から、サ症患者由来 *P. acnes* 菌株の1次サイトカイン誘導能が特に高く、それがサ症の発症に直接関与する可能性は否定的であった。しかし、菌株でマウスを感作して一定期間をおいた後に、LPS やリステリアをいった2次刺激を与えると、それぞれ感受性や感染抵抗性の亢進がみられ、サ症由来菌株にこの現象でみた感作能が高いことが示唆された。我々がリステリアの実験系で明らかにしているように、感染刺激に対してマクロファージは IL-12 や IL-18 を産生し、これらがさらに非特異的な NK 細胞活性化をひき起こして IFN- γ 産生を誘導する⁴⁵⁾。内毒素感受性や感染抵抗性の亢進は、一見相反する事象に見えるが、何れもサイトカインによるマクロファージ系活性化が関与するので、*P. acnes* 菌株のうち、宿主を強く感作する活性の高いものが持続的に感染(?)した個体では、同じ *P. acnes* や種々の外来性2次刺激に対するサイトカイン応答が亢進し、結果的に肉芽腫形成などサ症特有の病態を形成する可能性は考えられるであろう。予備実験では、感作マウスから7日目に採取した脾細胞を *in vitro* で培養し LPS やリステリアで2次刺激した培養上清中のサイトカイン量には、菌株による違いは認めていない。しかしながら、感作マウスの臓器では違いが存在することは否定できず、現在、感作後に LPS やリステリアを腹腔接種し、血液や臓器内のサイトカインレベルを測定している。このレベルに *P. acnes* 菌株により差異が認められれば、上記の可能性は大きいと考えられる。

[参考文献]

- 1) Newman LS, Rose CS & Maier LA : Sarcoidosis (Medical Progress). New Engl J Med 1997;336:1224-1234.
- 2) Homma JY, Abe C, Chosa H, et al : Bacteriological investigation on biopsy specimens from patients with sarcoidosis. Jpn J Exp Med 1978;48:251-255.
- 3) Manganapan G & Hance AJ : Mycobacteria and sarcoidosis:an overview and summary of recent molecular biological data. Sarcoidosis 1995;12:20-37.
- 4) Xiong,H., Ohya,S., Tanabe,Y. & Mitsuyama,M.: Administration of killed bacteria together with listeriolysin O induces protective immunity against *Listeria monocytogenes* in mice. Immunology 1998;94:14-21.
- 5) Tanabe,Y., Xiong,H., Nomura,T., Arakawa,M. & Mitsuyama,M. :Induction of protective T cells against *Listeria monocytogenes* in mice by immunization with a non-immunogenic strain of bacteria and liposome-encapsulated listeriolysin O. Infect Immun 1999; 67:568-575.