

ではないかと推測された。また、*in situ* hybridization により解析した3名の患者黒質切片のうち、1名においてBDV p40 遺伝子の陽性シグナルが得られた。

さらに、これらの患者黒質の乳剤を、BDV 感受性動物であるスナネズミに脳内接種し、ウイルスの伝播を検討した。その結果、RNA 陽性であった P2、P4、P6、P8 の黒質を接種したスナネズミの脳内で、RT-PCR によりBDV RNA が検出された。また、このうち P2、P4 の黒質を接種したスナネズミでは、*in situ* hybridization によってもBDV RNA が検出された。

2. スナネズミ感染実験

20 および 200 FFU を接種したスナネズミ群においてそれぞれ接種後30日ならびに25日目頃より、コントロール群と比較して顕著な体重減少が認められた。また、それに伴いほとんどのスナネズミにおいて後駆麻痺、盲目、食欲減退、知覚過敏および自発運動の低下などの神経症状が確認された。また、神経症状の発症に伴い、抗 p24 抗体の上昇がその血漿中に確認された。一方、そのほとんどのスナネズミにおいて、p40 抗原に対する抗体の上昇は観察されなかった。病理学的検索において、神経症状を呈したスナネズミ群においては、その大脳皮質および小脳に軽度の囲管性細胞浸潤が認められた。次に、神経症状と脳内におけるBDVの広がりとの相関を検索するために、BDVのp40 および p24 遺伝子の mRNA をターゲットとした *in situ* hybridization を行った。その結果、神経症状の発症時期と前後して、黒質を含む中脳、ならびに橋、延髄などの脳幹付近に、BDV mRNA の発現が認められた。さらに、脳の各領域において、p24 遺伝子の発現が p40 遺伝子の発現に比べ明らかに多く観察された。また、Antigen-capture ELISA を用いた解析においても、感染脳内における p24 タンパク質の優位な発現が確認された。

3. BDV p24 遺伝子 Tg マウス

BDV p24 遺伝子を発現している Tg マウス数系統の確立に成功した。GFAP をプロモーターとする Tg マウスで2系統、ならびにオーエスキー病ウイルス IE 遺伝子をプロモーターとする Tg マウスで1系統において歩行不全、激しい首振りなどの神経症状の発症が認められた。その他の系統は成長、活動とも正常で、現在までのところコントロールとの間に顕著な差は認められていない。病理学的解析の結果、p24 タンパク質の発

現が大脳顆粒層に、また激しい症状を示した系統で大脳皮質ならびに線条体の神経網に多く認められた。また、Tg マウスは脳内におけるニューロン成長因子の1つであるBDNFの有為な低下が観察された。

D. 考察

今回の検索より、パーキンソン病患者の黒質に高率にBDVが感染していることが明らかとなった。また、患者黒質よりスナネズミへのBDVの伝播が見られたことより、パーキンソン病患者の黒質においてBDVがその感染性を保持したまま持続感染している可能性が示唆された。さらに、スナネズミへの感染実験および p24 遺伝子 Tg マウスの解析により、黒質を含む中脳、線条体、ならびに脳幹付近でのBDVの増殖、特に p24 遺伝子産物の発現がBDVの神経症状と関与している可能性が示唆された。

E. 結論

実験動物を用いた解析で、黒質付近における局所的なBDVの発現、特に p24 遺伝子の発現がBDVによる神経症状と関与していることが示唆された。私達は p24 遺伝子産物が脳内の神経突起伸長因子と特異的に結合していることも突き止めている。また、パーキンソン病患者におけるBDVの検出率の高さ、ならびにBDV感染ラットにおいてドーパミン、ドーパミンレセプターあるいは代謝酵素の異常が報告されていることを考慮に入れると、BDVの感染とパーキンソン病の病態との間に強い関連性が疑われる。今後、パーキンソン病の病態であるドーパミン作用経路の異常にBDVがどのように関与しているかを探る必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura, Y., Takahashi, H., Shoya, Y., Nakaya, T., Watanabe, M., Tomonaga, K., Iwahashi, K., Ameno, K., Momiyama, N., Taniyama, H., Sata, T., Kurata, T., de la Torres, J. C., and Ikuta, K.: Isolation of Borna disease virus from human brain. *J. Virol.*, in press.
2. Hagiwara, K., Kamitani, W., Takamura, S., Taniyama, H., Nakaya, T., Tanaka, H., Kirisawa, R., Iwai, H., and Ikuta, K.: Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Vet. Microbiol.*, in press.
3. Nakamura, Y., Watanabe, M., Kamitani, W., Taniyama, H., Nakaya, T., Nishimura,

- Y., Tsujimoto, H., Machida, S., and Ikuta, K.: High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan. *Vet. Microbiol.* 70, 153-169, 1999.
4. Nakamura, Y., Nakaya, T., Hagiwara, K., Momiyama, N., Kagawa, Y., Taniyama, H., Ishihara, C., Sata, T., Kurata, T., and Ikuta, K.: High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine* 17, 480-489, 1999.
 5. Nakaya, T., Takahashi, H., Nakamura, Y., Kuratsune, H., Kitani, T., Machii, T., Yamanishi, K., and Ikuta, K.: Borna disease virus infection in two family clusters of patients with chronic fatigue syndrome. *Microbiol. Immunol.* 43, 679-689, 1999.
 6. Kohno, T., Goto, T., Takasaki, T., Morita, C., Nakaya, T., Ikuta, K., Sano, K., Kurane, I., Nakai, M.: Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus (BDV). *J. Virol.* 73, 760-766, 1999.
2. 学会発表
1. 小林剛、渡辺真紀子、朝長啓造、生田和良
ボルナ病ウイルス 0.8kb(X/P)mRNA の翻訳様式
第 47 回日本ウイルス学会学術集会
10 月 横浜
 2. 朝長啓造、小林剛、渡辺真紀子、生田和良
ボルナ病ウイルスの選択的スプライシングとその発現調節
第 47 回日本ウイルス学会学術集会
10 月 横浜
 3. 渡辺真紀子、小林剛、神谷亘、谷山弘行、朝長啓造、生田和良
新生仔スナネズミにおけるボルナ病ウイルスの病態解析
第 47 回日本ウイルス学会学術集会
10 月 横浜
 4. 朝長啓造、小林剛、渡辺真紀子、生田和良
ボルナ病ウイルスの選択的スプライシング機構の解明
第 128 回日本獣医学会学術集会
10 月 熊本
 5. 小林剛、渡辺真紀子、朝長啓造、岸雅彦、生田和良
ボルナ病ウイルスの翻訳様式および相互作用
第 128 回日本獣医学会学術集会
10 月 熊本
 6. 渡辺真紀子、小林剛、朝長啓造、生田和良
抗原検出 ELISA を用いた培養細胞およびスナネズミ脳における BDV 抗原の定量
第 128 回日本獣医学会学術集会
10 月 熊本

4. 多発性硬化症の微生物学的原因究明に関する研究

分担研究者 高橋 和郎 (福島県立医大微生物学講座)

研究要旨 多発性硬化症 (MS) の発症に微生物の感染が関与すると考え、その起因微生物の遺伝子をサブトラクション法により同定することを試みた。患者胸髄および髄液 RNA より PCR で増幅され、サブトラクション法により cDNA が得られたが、現在までに MS の病原と考えられる微生物の遺伝子は検出されていない。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) の発症に微生物の感染が関与すると考え、その起因微生物を同定することを目的とする。

B. 研究方法

MS 患者の死後の病変部位および生存患者の髄液に起因微生物の遺伝子が存在すると想定し、正常脊髄組織を対照としてサブトラクション法を用いて同定する。

1. 検体

MS 患者 2 例の死後の凍結胸髄病変部組織 (新潟大学脳研究所、高橋均教授より分与) 非 MS 患者 2 例の死後の同部位 (拡張型心筋症、心筋梗塞、北大病理 長嶋和郎教授より分与) 生存 MS 患者の髄液および血液 (福島医大神経内科、山本悌二教授より分与)

2. 方法

- (1) 患者検体からの DNA, RNA の精製
MS 患者および非 MS 患者それぞれ 2 名の死後の胸髄と生存する MS 患者 1 名の髄液より RNA と DNA を定法に従い精製した。
- (2) サブトラクション法
random primer を用いて RNA より cDNA を合成し、その両端にアダプターを結合させ PCR で増幅した。非 MS 患者の胸髄由来のコントロールの cDNA に結合させたアダプターはビオチンでラベルされている。MS 患者胸髄由来の cDNA (Tester) とコントロール患者由来の cDNA (Driver) を 1:30 でハイブリダイズさせ、アビディン結合の鉄粒子に結合させた。この操作でビオチン結合の

cDNA と、Driver と相同なシークエンスを持つ tester が除去される。除去したのちの tester を PCR で増幅させ、さらにもう一度 Driver と 1:30 でハイブリダイズさせる。このサブトラクションを 3 回繰り返した。PCR 産物を電気泳動し、主たるバンド 1 つを含む 3 つの部分に分け、それぞれをプラスミッド pGEM-T ベクターに挿入し、大腸菌をトランスフォームさせコロニーからプラスミッドを精製しシークエンスを行った。

(倫理面への配慮)

患者より髄液および血液を採取するにあたっては研究に供する旨を主治医より十分に説明し同意を得た。尚、採取は入院中の必要な検査時に伴って行い、患者に対する不利益、危険性を最小限にした。

C. 研究結果

1. MS 患者および非 MS 患者の胸髄の各検体 RNA より random primer を用いて cDNA を合成し、PCR で増幅したところ、200-1500bp にかけてスメア状に cDNA のバンドが得られた。このことは RNA の構造がある程度は保存されていることを示唆する。
2. 患者胸髄由来 cDNA を Tester にしてサブトラクション法を 3 回繰り返し PCR で増幅させたところ主たるバンド 1 つを含むスメア状 (200-1000bp) のバンドとして認められた。
3. 上記のバンドを精製し pGEM-T ベクターにクローニングし、49 クローンをシークエンスした結果を以下に示す。

検出された遺伝子	個数
Human mitochondrial DNA	8
Homo sapiens genomic DNA	22
Homo sapiens mRNA (特定されない)	12
Homo sapiens chromosome (17)	7

このように genomic DNA や house-keeping 遺伝子と思われる遺伝子断片がクローニングされ、病因に関与すると思われる既知の微生物の遺伝子は検出できなかった。

D. 考察

1. サブトラクション法で得られたクローンのシーケンス結果ではヒトの genomic, chromosome DNA や House-keeping 遺伝子と考えられる mRNA 由来 cDNA が多数クローニングされた。この事実は十分にサブトラクションがなされていないことを示唆する。サブトラクションの効率を上げる解決策として、1) 検体から RNA を精製する際、DNAase を十分反応させ、genomic DNA や chromosome DNA を完全に分解する。2) サブトラクションのハイブリダイゼーションにおいて、Tester : Driver の比を 1 : 100 にし、サブトラクションの効率を上げる。などの方法を用いる必要がある。
2. Genomic DNA や chromosome DNA, House-keeping 遺伝子を排除する他の方策として、サブトラクション後の PCR 産物をラムダファージにクローニングし、蛋白を発現させ、患者血清でスクリーニングすることが可能であると考えられる。
3. 今回は患者胸髄由来の RNA を対象としたが、検体由来 DNA や髄液由来の DNA, RNA についても同様にサブトラクション法を行い、病原微生物の遺伝子の検索を行う。

E. 結論

患者胸髄および髄液 RNA より PCR で増幅され、サブトラクション法により cDNA が得られたが、現在までに MS の病原と考えられる微生物の遺伝子は検出されていない。

F. 研究発表

1. Shigeta, S., S. Mori, T. Kira, K. Takahashi, E. Kodama, et. al. Anti-herpesvirus activities and cytotoxicities of 2-thiopyrimidine nucleoside analogues in vitro. Antiviral Chemistry & Chemother. 10: 195-209, 1999
2. Yamaguchi, K., T. Sawada, T. Naraki, Y. Igata, K. Takahashi, et. al. Detection of Borna disease virus-reactive antibodies from patients with psychiatric disorders and from horses by electrochemiluminescence immunoassay. Clin. Diag. Lab. Immunol. 6: 696-700, 1999

G. 知的所有権の取得状況

なし

5. パーキンソン病とインフルエンザ感染

分担研究者 田代 真人 (国立感染研・ウイルス製剤部)

研究要旨 1918-1919年のスペイン風邪の大流行後、およそ10年の期間にわたり post-encephalitic parkinsonism の有意な増加が認められたことから、インフルエンザ感染とパーキンソン病の発症に何らかの因果関係がある可能性が指摘されている。本研究は、インフルエンザの臨床分離株を用いた脳炎・脳症ならびにパーキンソン病発症の機序を解明するための実験動物モデルを確立することを目的とする。

A. 研究目的

1918-1919年のスペイン風邪の大流行後、およそ10年に渡る期間において、Post-encephalitic parkinsonism の増加が有意に認められたとして、パーキンソン病とインフルエンザ感染の関与が提唱されてから久しい。また、最近国内において若年児童におけるインフルエンザ感染に関連した脳症・脳炎発症例の多発が報告されている。実験室継代株であるWSN/31株を用いたマウス感染実験によって神経向性インフルエンザウイルスの中枢での標的が黒質ニューロンである可能性が示唆されているが、インフルエンザウイルスの中枢神経系に対する病原性発現の機序はいまだ不明な点が多い。

一方、人の中枢神経に対する病原性を調べるために最も重要であると考えられる、A型インフルエンザの臨床分離株を用いた感染実験動物モデル系は未だ確立されていない。そこで本研究では、ハムスターを用いてA型インフルエンザの臨床分離株による感染実験系の可能性を検討し、インフルエンザ感染と脳症・脳炎、およびPost-encephalitic parkinsonism との関連を検討することを目的とした。

B. 研究方法

ウイルスは急性脳症により死亡した3歳の女児からMDCK細胞を用いて分離されたH3N2型インフルエンザウイルス(A/Hiratsuka/1/99)を用いた。

感染実験には、7週齢のオスシリアンハムスターを用いた。ネブタール麻酔下で鼻腔から105.3TCID₅₀のウイルスを感染させ、経時的に体温を測定すると共に、肺内でのウ

イルス量を測定した。また、マウスTNF- α (1.5ug/body)、マウスINF- γ (6ug/body)、マウスIL-1 β (0.6ug/body)を、それぞれ単独で腹腔内投与した後、経時的に体温を測定し、各種サイトカイン単独での生体への影響を検討した。

C. 研究結果

A/Hiratsuka/1/99株の経鼻接種後2日から5日までの間の肺内でのウイルス増殖を測定したところ、接種3日目の約 3×10^4 TCID₅₀/mlを最高に5日目まで全てのサンプルにおいて肺でのウイルス増殖が確認された。一方、接種後2週間までの観察期間の間で、著明な臨床症状を示す動物もなく、全ての動物が観察期間終了まで生存した。また感染4日後の脳内でのウイルスの増殖は確認されなかった。

ウイルス接種後の動物の直腸温の変動を感染1日後から4日後まで測定したところ、感染1日後に約1度の上昇を認める、体温は感染4日後まで有意に上昇していた。

マウス・サイトカインの単独投与による体温上昇を測定したところ、IL-1 β の腹腔内投与によって投与1日後から2日後にかけて1度以上の体温の上昇を認めた。

D. 考察

インフルエンザ脳症で死亡した患者から分離されたH3N2型インフルエンザウイルス(A/Hiratsuka/1/99)を、経鼻接種によってハムスターに感染させることによって、肺内で効率よくウイルスが増殖することが明

らかになった。一方で、このウイルスが脳内で増殖することは確認されなかったことから、ハムスターに関してはこのウイルスが直接向神経性がある可能性は低いと考えられた。

インフルエンザ感染にともなう脳症の発現に、サイトカインの異常産生が関与している可能性が指摘されている。今回の実験においてハムスターがマウス・サイトカインの腹腔内投与に対し、体温変化を認めたことより、この実験系がある種のマウス・サイトカインの投与に感受性のある系であることが示された。

E 結論

インフルエンザ A 型ウイルスの臨床分離株を用いたハムスターの実験感染系によって、従来報告されているようにウイルスが肺内で効率よく増殖することが確認された。今後サイトカインの投与とウイルス感染の相互作用を検討することによって、インフルエンザ感染、脳症、および生体のサイトカイン反応の相互作用を解明する一つのきっかけが得られ、また post-encephalitic parkinsonism 発現との関連が検討可能となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

G 知的所有権の取得状況

なし

6. ギラン・バレー症候群の亜型フィッシャー症候群と *Haemophilus influenzae* 感染

分担研究者 結城 伸泰（獨協医科大学神経内科）

研究要旨 フィッシャー症候群との関連が証明されている先行感染は *Campylobacter jejuni* 腸炎のみである。しかし、大部分のフィッシャー症候群症例では上気道炎症状の先行を認め、さらに *Haemophilus influenzae* 肺炎後フィッシャー症候群の一例が報告されていることから、*H. influenzae* と本症候群との関連をフィッシャー症候群 70 例の血清を用いて検討した。抗 *H. influenzae* 抗体は対照群と比較しフィッシャー症候群で有意に高活性を示した。本菌感染が陽性と判定されたのはフィッシャー症候群 5 例(7%)、ギラン・バレー症候群 2%、神経疾患対照 0%、健常対照 1%であり、フィッシャー症候群では他群と比べ高頻度であった。抗体陽性の 7 例全例で咽頭痛などの呼吸器感染症状の先行を認め、6 例で外眼筋麻痺を伴い血清 IgG 抗 GQ1b 抗体、抗 GT1a 抗体が陽性であった。これらの結果から、*H. influenzae* がフィッシャー症候群における先行感染の主要な病原体であることが示唆された。さらに、*H. influenzae* 菌体上に抗 GT1a モノクローナル抗体と結合するリポ多糖が検出された。この結果から、われわれが *C. jejuni* 腸炎後ギラン・バレー症候群の発症機序として提唱している、先行感染病原体と宿主組織における分子相同性仮説が *H. influenzae* 感染後フィッシャー症候群の発症機序にも当てはまることが示唆された。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群では約 30%の症例で *Campylobacter jejuni* 感染の先行が確認され、*C. jejuni* 腸炎後ギラン・バレー症候群の発症機序が次第に解明されつつある。一方、フィッシャー症候群はギラン・バレー症候群亜型の中で最も高頻度であるにも関わらず、先行感染因子に関する研究は少ない¹⁾²⁾。われわれはすでに、フィッシャー症候群での *C. jejuni* 感染先行頻度は 18%であることを報告した¹⁾。しかし、大部分のフィッシャー症候群症例では咽頭痛をはじめとする上気道炎症状が先行することから、上気道感染を起こす病原体が本症候群例の大部分を惹起している可能性が示唆されている³⁾。

Fisher の原著⁴⁾では、フィッシャー症候群 3 例中 1 例の喀痰より呼吸器感染症の起炎菌である *Haemophilus influenzae* が分離されている。さらに、本菌ワクチンの接種後や、本菌感

染後に発症したギラン・バレー症候群症例が報告されていることか

ら⁵⁾⁶⁾、フィッシャー症候群およびギラン・バレー症候群における *H. influenzae* の先行感染頻度について血清学的検討を行った。

B. 研究方法

- 1) フィッシャー症候群 70 例、ギラン・バレー症候群 110 例、神経疾患対照 62 例、健常対照 82 例の血清を対象とした。
- 2) b 型 *H. influenzae* 基準株（デンカ生研より供与）より抽出した外膜蛋白を抗原に用いた ELISA にて抗 *H. influenzae* 抗体 (IgG / IgM / IgA) の吸光度を測定した。健常対照における平均値 + 2SD 以上を陽性とした。
- 3) *H. influenzae* のリポ多糖上にガングリオシド様構造が存在するか否かにつき、抗 GT1a モノクローナル抗体を用いた TLC 免疫染色で検討した。

- 4) 4 群間の比較にはクラスカル・ワーリス検定または χ^2 独立性の検定を、各群間の比較には多重比較検定 (Scheffe's F 法) を用いた。p 値 0.05 以下を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

- 1) IgG クラス、IgM クラスの抗 *H. influenzae* 抗体は、疾患対照群や健常対照群と比べフィッシャー症候群で有意に高力価を示した。IgA クラスも、疾患対照群と比べフィッシャー症候群で有意に高力価を示し、健常対照と比較してもフィッシャー症候群で高力価の傾向を示した ($p=0.08$)。ギラン・バレー症候群では、疾患対照群や健常対照群と比べ、抗体力価に有意差を認めなかった。年齢、性別は 4 群間で有意差を認めなかった。
- 2) 2 ないし 3 クラスの抗体が陽性であったのは、フィッシャー症候群 5 例 (7%)、ギラン・バレー症候群 3 例 (3%)、健常対照 1 例 (1%) であった。ギラン・バレー症候群 3 例中 1 例は経時的な抗体価の変動を認めず、偽陽性ないし不顕性感染と考えられた。
- 3) *H. influenzae* 感染ありと判定されたフィッシャー症候群・ギラン・バレー症候群 7 例中全例で咽頭痛や咳などの上気道炎の先行を認めた。さらに全例で *C. jejuni* やサイトメガロウイルス、EB ウイルス、*Mycoplasma pneumoniae* の感染は血清学的に否定された。さらに、7 例中 6 例で外眼筋麻痺を認め、血清 IgG 抗 GQ1b 抗体、抗 GT1a 抗体が検出された。
- 4) TLC 免疫染色において、*H. influenzae* のリボ多糖上に抗 GT1a モノクローナル抗体で染色されるバンドが検出された。

D. 考察

フィッシャー症候群の先行感染病原体としてギラン・バレー症候群と同様に *C. jejuni* やサイトメガロウイルス、EB ウイルスなどが知られているが、*C. jejuni* 以外は 1-2 例の症例報告があるのみである。今回初めて *H. influenzae* 感染に関して検討を行い、フィッシャー症候群における *H. influenzae* の先行感染頻度は 7% であった。これは、フィッシャー症候群におけるサイトメガロウイルス、EB ウイルス、*M. pneumoniae* 感染の先行頻度 (0-3% ; 古賀ら、未発表データ) よりも高く、*H. influenzae* が

C. jejuni に次ぐ、フィッシャー症候群の主要な先行感染病原体であることが示唆された。

H. influenzae 感染後フィッシャー症候群・ギラン・バレー症候群 7 例中 6 例で IgG 抗 GT1a 抗体が陽性であり、さらに *H. influenzae* のリボ多糖上における GT1a エピトープの存在が確認された。この結果により、われわれが *C. jejuni* 腸炎後ギラン・バレー症候群の発症機序として提唱している、先行感染病原体と宿主組織における分子相同性仮説が *H. influenzae* 感染後フィッシャー症候群の発症機序にも当てはまることが示唆された。

ギラン・バレー症候群における *H. influenzae* 感染の先行頻度は、Jacobs ら³⁾の検討では 1% と対照群と比較して有意差を認めていないのに対し、森ら⁴⁾の検討では 13% と健常対照 0% に比し有意に高頻度であった。今回の検討ではギラン・バレー症候群における *H. influenzae* 感染の先行頻度は 2% であり、対照群との間に有意差を認めず Jacobs ら³⁾の報告を支持する結果が得られた。しかし、使用している抗 *H. influenzae* 抗体測定系がそれぞれの報告で異なることから、今後さらなる検討が必要と考えられる。

E. 文献

- 1) Koga M et al: Close association of IgA anti-ganglioside antibodies *Campylobacter jejuni* infection in Guillain-Barré and Fisher's syndromes. *J Neuroimmunol* 81: 138-143, 1998
- 2) Yuki N et al: Fisher's syndrome and group A streptococcal infection. *J Neurol Sci* 160: 64-66, 1998
- 3) 古賀 道明 他: Fisher 症候群、Guillain-Barré 症候群における先行感染症状. *神経内科* 49: 75-77, 1998
- 4) Fisher M: An unusual variant of acute idiopathic polyneuritis (syndrome of ophthalmoplegia, ataxia and areflexia). *N Engl J Med* 255: 57-65, 1956
- 5) D'Cruz et al: Acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (Guillain-Barré syndrome) after immunization with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *J Pediatr* 115: 743-746, 1989
- 6) Mori M et al: *Haemophilus influenzae*

- has a GM1 ganglioside-like structure and elicits Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 52: 1282-1284, 1999
- 7) Takano H et al: Fisher's syndrome associated with chickenpox and anti-GQ1b antibody. *J Neurol* 242: 255-256, 1995
 - 8) Jacobs et al: The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: A case-control study. *Neurology* 51: 1110-1115, 1998
 - 9) 森 雅裕 他: *Haemophilus influenzae* 感染と軸索型 Guillain-Barré 症候群. *神経免疫学* 7: 90-91, 1999

F. 研究発表

刊行書籍又は雑誌名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
J Neurol Neurosurg Psychiatry 66:254-255. Oropharyngeal palsy in Guillain-Barré and Fisher's syndromes is associated with muscle weakness in the neck and arm.	1999年		Koga M, Yuki N, Hirata K.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 66:513-516. Antiganglioside antibody in patients with Guillain-Barré syndrome who show bulbar palsy as an initial symptom.	1999年		Koga M, Yuki N, Hirata K.
Ann Neurol 45:533-536. Special sensory ataxia in Miller Fisher syndrome detected by postural body sway analysis.	1999年		Kuwabara S, Asahina M, Nakajima M, Mori M, Fukutake T, Hattori T, Yuki N.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 66:688. Facial diplegia with paraesthesias: Facial nerve enhancement in three dimensional MRI.	1999年		Hozumi A, Yuki N, Yamazaki K, Hirata K.
J Neurol Sci 163:44-46. The 301 to 314 amino acid residue of β -tubulin is not a target epitope for serum IgM antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.	1999年		Tagawa Y, Yuki N, Hirata K.
J Neurol Sci 163:53-57. Are Campylobacter curvus and Campylobacter upsaliensis antecedent infectious agents in Guillain-Barré and Fisher's syndromes?	1999年		Koga M, Yuki N, Takahashi M, Saito K, Hirata K.
J Neuroimmunol 96:245-250. Subclass distribution and the secretory component of serum IgA anti-ganglioside antibodies in Guillain-Barré syndrome after Campylobacter jejuni enteritis.	1999年		Koga M, Yuki N, Hirata K.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 67:128-129. Relation between critical illness polyneuropathy and axonal Guillain-Barré syndrome.	1999年		Yuki N, Hirata K.
J Neurol Sci 164:50-55. Antibodies to GD3, GT3, and O-acetylated species in Guillain-Barré and Fisher's syndromes: Their association with cranial nerve dysfunction.	1999年		Koga M, Yuki N, Ariga T, Hirata K.
J Neurol Sci 164:134-138. Autoantibodies to GM1b and GalNAc-GD1a: Relationship to Campylobacter jejuni infection and acute motor axonal neuropathy in China.	1999年		Yuki N, Ho TW, Tagawa Y, Koga M, Li CY, Hirata K, Griffin JW.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 67:206-208. Bilateral ballism in a patient with overlapping Fisher's and Guillain-Barré syndromes.	1999年		Odaka M, Yuki N, Hirata K.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 67:180-184. Hyperreflexia in Guillain-Barré syndrome: Relation with acute motor axonal neuropathy and anti-GM1 antibody.	1999年		Kuwabara S, Ogawara K, Koga M, Mori M, Hattori T, Yuki N.
Muscle Nerve 22:840-845. Axonal involvement at the common entrapment sites in Guillain-Barré syndrome with IgG anti-GM1 antibody.	1999年		Kuwabara S, Mori M, Ogawara K, Mizobuchi K, Hattori T, Koga M, Yuki N.
J Neurol Sci 165:126-132. Antibodies to GD1? and GQ1? in Guillain-Barré syndrome and the related disorders.	1999年		Odaka M, Yuki N, Yoshino H, Kiso M, Ishida S, Hirata K.
Jpn J Infect Dis 1999;52:99-105. Pathogenesis of Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes subsequent to Campylobacter jejuni enteritis.	1999年		Yuki N.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 67:668-670. IgG anti-GQ1b positive acute ataxia without ophthalmoplegia.	1999年		Mori M, Kuwabara S, Koga M, Asahina M, Ogawara K, Hattori T, Yuki N.
J Neurol Sci 168:121-126. Acute motor axonal neuropathy and acute motor-sensory axonal neuropathy share a common immunological profile.	1999年		Yuki N, Kuwabara S, Koga M, Hirata K.
Neurology 53:2122-2227. Rapidly progressive, predominantly motor Guillain-Barré syndrome with anti-GalNAc-GD1a antibodies.	1999年		Ang CW, Yuki N, Jacobs BC, Koga M, van Doorn PA, Schmitz PIM, van der Meché FGA.
Trends in Glycoscience and Glycotechnology 11:345-353. Glycotope mimicry between human ganglioside and bacterial lipopolysaccharide induces autoimmune neuropathy.	1999年		Yuki N.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 68:191-195. Isolated absence of F wave and proximal axonal dysfunction in Guillain-Barré syndrome with antiganglioside antibodies.	2000年		Kuwabara S, Ogawara K, Mizobuchi K, Koga M, Mori M, Hattori T, Yuki N.
Cell Mol Life Sci Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease: Guillain-Barré syndrome.	in press		Yuki N.
Ann Neurol No cytomegalovirus DNA in sera from patients with anti-MAG/SGPG antibody-associated neuropathy: reply.	in press		Yamamoto T, Yuki N.
J Neurol Bickerstaff's encephalitis associated with shingles	in press		Tagawa Y, Yuki N.
Ann Neurol Clinical Features and Response to Treatment in Guillain-Barré Syndrome Associated with Antibodies to GM1b Ganglioside	in press		Yuki N, Ang CW, Koga M, Jacobs BC, van Doorn PA, Hirata K, van der Meché FGA.
J Neurol Neurosurg Psychiatry Bickerstaff's Brainstem Encephalitis Subsequent to Campylobacter jejuni Enteritis.	in press		Yuki N, Odaka M, Hirata K.
Muscle Nerve Anti-SGPG antibody in CIDP: nosological position of IgM anti-MAG/SGPG-associated neuropathy.	in press		Tagawa Y, Yuki N, Hirata K.
内科 83:384-386. Bickerstaff型脳幹脳炎の2例: IgG抗GQ1b抗体と免疫吸着の有用性。	1999年		吉田未央, 田川由美, 結城伸泰, 細川寿和, 中村泰浩, 今井浩三。
神経内科 50:377-383. 免疫グロブリン静注療法が奏効したBickerstaff型脳幹脳炎の2例。	1999年		国吉和昌, 田川由美, 古賀道明, 結城伸泰。
末梢神経 9:127-132 IgG抗GM1抗体を伴うGuillain-Barré症候群の治療: 免疫グロブリン静注療法と血液浄化法の比較	1999年		桑原 聡, 森 雅裕, 小河原一恵, 溝淵敬子, 服部孝道, 古賀道明, 結城伸泰。
日小誌 103:939-942. Campylobacter腸炎後小児Guillain-Barré症候群の臨床所見と転帰の検討	1999年		西本幸弘, 下山田洋三, 古賀道明, 柳川敏彦, 宮代英吉, 紀平省悟, 小池通夫, 結城伸泰。
臨床神経 39:967-970. GD1bを含むb系列ガングリオシドに対するIgM抗体をともなう慢性感覚性運動失調型ニューロパチー。	1999年		薄敬一郎, 古賀道明, 結城伸泰, 城倉健, 黒岩義之。

臨床神経 39:1045-1048. 妊娠中に発症したBickerstaff型脳幹脳炎。	1999年		舟川 格、生越まち子、芝崎謙作、古賀道明、結城伸泰。
臨床神経 39:1169-1170. エビデンスに基づいたGuillain-Barré症候群の治療。	1999年		田川由美、結城伸泰、平田幸一。
小児科 多彩な臨床像を示した骨髄移植後Guillain-Barré症候群の一例。	印刷中		今井雅子、田川由美、大川洋一、矢田純一、神田隆、結城伸泰。
治療 81:259-263 Guillain-Barré症候群、Fisher症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)。	1999年		結城伸泰。
神経進歩 43:114-127 Bickerstaff型脳幹脳炎の診断と病因。	1999年		小鷹昌明、結城伸泰。
検査技術 27:400-403 カンピロバクターとギラン・バレー症候群。	1999年		古賀道明、結城伸泰。
最新医学 54:84-91 Campylobacter jejuni腸炎と自己免疫性神経疾患。	1999年		古賀道明、結城伸泰。
日本臨床別冊 領域別症候群シリーズ No.25 感染症症候群:症候群から感染性単一疾患までを含めてIII pp407-411 細菌感染が誘発する自己免疫疾患。	1999年		小鷹昌明、結城伸泰。
新内科治療ガイド:治療戦略の立て方と病態に応じた治療の実際, pp295-298 ギラン・バレー症候群。	1999年	Medical Practice 編集委員会編, 文光堂	結城伸泰。
新内科治療ガイド:治療戦略の立て方と病態に応じた治療の実際, pp299-301 慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー。	1999年	Medical Practice 編集委員会編, 文光堂	結城伸泰。
臨床神経 39:17-18 Campylobacter jejuni腸炎とGuillain-Barré症候群。	1999年		結城伸泰。
脊椎脊髄ジャーナル 12:612-617 Guillain-Barré症候群:最新の疾患概念と治療。	1999年		結城伸泰、田川由美。
日本臨床別冊 領域別症候群シリーズ No.26 神経症候群I, pp 783-787 Bickerstaff型脳幹脳炎。	1999年		小鷹昌明、結城伸泰。
日本臨床別冊 領域別症候群シリーズ No.27 神経症候群II, pp464-469 Guillain-Barré症候群。	1999年		古賀道明、結城伸泰。
日本臨床別冊 領域別症候群シリーズ No.27 神経症候群II, pp470-474 Miller Fisher症候群。	1999年		小鷹昌明、結城伸泰。
メディカル・テクノロジー 27:702 カンピロバクター腸炎とギラン・バレー症候群。	1999年		古賀道明、結城伸泰。
臨床病理 47:713-718 カンピロバクター腸炎とギラン・バレー症候群。	1999年		結城伸泰。
日本医事新報 3931:8-16 ギラン・バレー症候群。	1999年		古賀道明、結城伸泰。
Medicina 36:1348-1350 Guillain-Barré症候群と慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー。	1999年		小鷹昌明、結城伸泰。
免疫学からみた神経系と神経疾患, pp241-245 ギラン・バレー症候群。	1999年	吉田孝人、糸山泰人 錫村明生 編, 日本医学館	結城伸泰。

BioScan 1(2):8 ギラン・バレー症候群とキャンピロバクター感染症.	1999年		古賀道明, 結城伸泰.
Medical Technology 27:702 カンピロバクター腸炎とギラン・バレー症候群.	1999年		古賀道明, 結城伸泰.
臨床免疫 32:507-512 慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)の病因論.	1999年		田川由美, 結城伸泰.
組織培養工学 25:20-24 自己免疫性神経疾患と抗ガングリオンド抗体.	1999年		田川由美, 結城伸泰.
別冊・医学のあゆみ 神経疾患-state of arts (Ver. 1) 628-632 Guillain-Barré症候群.	1999年		古賀道明, 結城伸泰.
モダンフィジシャン 19:1401-1406 脳幹脳炎のトピックス(Bickerstaff型脳幹脳炎を中心に).	1999年		小鷹昌明, 結城伸泰.
Medical Briefs in Brain & Nerve 10:11 Miller Fisher症候群における抗GQ1b抗体:運動神経終板での?-ラトキシン様作用.	1999年		田川由美, 結城伸泰.
Medical Briefs in Brain & Nerve 10:12 抗GD1a抗体上昇は, 軸索型Guillain-Barré症候群と相関し, 脱髄型とは相関しない.	1999年		田川由美, 結城伸泰.
Medical Briefs in Brain & Nerve 10:12 GBS研究の目覚しい進歩.	1999年		田川由美, 結城伸泰.
難病の最新情報:疫学から臨床・ケアまで ギラン・バレー症候群	印刷中	南山堂	結城伸泰.
臨床神経 Treatment of anti-glycolipid antibody-associated neuropathy	印刷中		結城伸泰.
免疫学辞典 フィッシャー症候群	印刷中	東京化学同人	結城伸泰.

7. ギラン・バレー症候群の発症機序からみた血液浄化療法（アフェレシス）の有用性と病因因子の解明に関する研究

分担研究者 高 昌星（信州大学医学部第三内科）
研究協力者 井上 敦・山崎 正志（信州大学医学部第三内科）
篠田 俊雄（社会保険中央病院内科）

研究要旨

ギラン・バレー症候群（GBS）のアフェレシス治療前後における T 細胞サイトカインおよび両治療法との比較，先行感染との関係を検討した．血漿交換療法と血漿吸着療法のいずれも GBS に対し有効であった．血漿交換療法と血漿吸着療法との間に有効性に関しては有意差はなかった．先行感染に関しては上気道感染が最も多く，下部消化管感染は少なかった．アフェレシス治療の有効性に関しては，先行感染との違いによる差異はみられなかった．GBS 急性期では Th1 系が優位であったが，アフェレシス治療後は Th2 系が優位であった．置換液を必要としない血漿吸着療法がより推奨される治療法と考えられた．

A. 目的

ギラン・バレー症候群（GBS）は先行感染の後 1～2 週間後に発症する末梢性炎症性神経炎であり，その発症機序に免疫学的機序が深く関与していることは，その動物モデルである実験的自己免疫性神経炎の研究から明らかにされつつある．GBS の治療の第一選択は血液浄化療法（アフェレシス）であるとされており，その有用性が立証されている．アフェレシスには現在，血漿交換療法と吸着療法があり，吸着療法は置換液を必要としない点で交換療法に比べ利点がある．本研究では GBS のアフェレシス治療前後における T 細胞サイトカインおよび両治療法との比較，先行感染との関係を検討した．

B. 方法

GBS 急性期患者 11 名に対し，同意を得た後に血漿交換療法または吸着療法を 1～4 回施行した（Table 1）．両群間における治療成績を比較検討した．アフェレシス前後の末梢血リンパ球をフィコール比重遠心分離法で採取し，tumor necrosis factor- α （TNF- α ），Th1 細胞由来の interferon- γ （IFN- γ ），

Th2 細胞由来の interleukin-4（IL-4），IL-10 について ELISPOT 法を用いて検討した．リンパ球はサイトカインモノクローナル抗体を結合させたニトロセルロース膜上で，短期培養を行い，それぞれの 2 次抗体を反応させ，さらに phosphatase 標識の 3 次抗体を加えて発色させ，実体顕微鏡下で spot 数を算定した．さらに先行感染との関係についても比較検討した．

C. 結果

血漿交換療法と血漿吸着療法のいずれも GBS に対し有効であった．血漿交換療法と血漿吸着療法との間に有効性に関しては短期効果も長期効果も有意差はなかった（Table 1，Figure 1）．先行感染に関しては上気道感染が最も多く，下部消化管感染は少なかった．アフェレシス治療の有効性に関しては，先行感染との違いによる差異はみられなかった．ELISPOT 法では GBS 急性期の血漿吸着療法施行前では Th1 系サイトカインである IFN- γ 産生細胞が Th2 系の IL-4，IL-10 産生細胞よりも有意に多かった（ $p < 0.05$ ）．血漿吸着施行後は，これとは逆に IL-4，IL-10 産生細

Table 1.
Immediate effect

Case no.	Age (years)	Sex	Grade	Onset (days)	Phase	Immediate effect	Sessions by the effect
IAPP Group							
1	34	F	4	-12	progress	++	1
2	76	M	4	-10	progress	++	1
3	54	F	4	-14	plateau	±	2
4	39	M	4-5	-3	progress	++	2
5	75	M	4	-14	progress	++	2
6	68	M	4-5	-8	progress	++	1
PE Group							
7	47	M	4	-6	plateau	±	2
8	20	M	4-5	-6	progress	+	3
9	12	M	4	-10	progress	++	1
10	17	F	4	-5	progress	++	2
11	12	M	5	-3	progress	++	1

M male; F female.

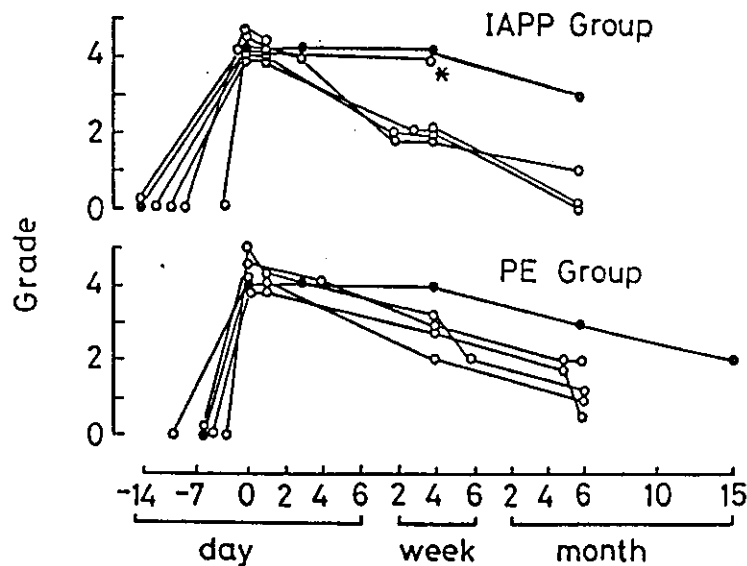


Figure 1. Clinical course. IAPP or PE were started on day 0. Open and closed circles shows patients in progressive and plateau phases, respectively.

胞が IFN- γ 産生細胞が有意に増加していた ($p < 0.01$) .

D. 考察

GBS では先行感染の如何に関わらず、アフェレシス治療が有効であり、血漿交換療法と血漿吸着療法との間に有意差はなかった。血漿吸着療法は新鮮凍結血漿や、アルブミンを

必要とせず、従って置換液による感染の心配がなく、より有用な治療法と考えられた。血漿吸着療法により、サイトカイン産生細胞は Th1 系優位から Th2 系優位へと変換しており、この変換により改善したと考えられた。

E. 結論

血漿吸着療法は GBS に対し、血漿交換療法

と同等以上の効果があり、新鮮凍結血漿や、アルブミンを必要とせず、従って置換液による感染の心配がなく、より有用な治療法と考えられた。血漿吸着療法により、Th1系優位からTh2系優位へと変換することにより改善したと考えられた。

F. 研究発表

- 1) Ichikawa M, *Koh C-S, Hata Yukiko, Inaba Y, Inoue A, Itoh M, Ishihara Y, Bernard CCA, Komiyama A: IgG2b antibody is associated with the severity of multiple sclerosis like demyelinating disease in NOD mice injected with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55. Cell Immunol, 191: 97-104, 1999
- 2) Iwahashi T, Inoue A, *Koh C-S, Shin T-K, Kim BS: Expression and potential role of inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. Cell Immunol, 194: 186-193, 1999
- 3) Takahashi K, Arai M, Yamamoto M, Koh C-S, Fukutake K: Interaction of coagulation factors V and VIII on membranes containing phospholipids: Studies with confocal laser-scanning fluorescence microscopy. Bioimages 7: 36, 1999
- 4) Sakai T, Inoue A, *Koh C-S, and Osame M: Serum levels of apoptosis related molecules in patients with multiple sclerosis and human T-lymphotropic virus type-I associated myelopathy. J Interferon Cytokine Res, 19: 999-1004, 1999
- 5) Inoue A, *Koh C-S, Iwahashi T, : Detection of serum anti-cerebellar antibodies in patients with Miller Fisher syndrome (MFS). Eur Neurol, 42: 230-234, 1999
- 6) Inoue A, *Koh C-S, Yamazaki M, Yagita H: Effect of anti-B7-1, B7-2 mAb on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. J Immunol 163: 6180-6186, 1999
- 7) Inaba Y, Ichikawa M, *Koh C-S, Inoue A, Itoh M, Kyogashima M, Komiyama A: Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Dermatan Sulfate. Cell Immunol, 198: 96-102, 1999
- 8) Ichikawa M, *Koh C-S, Inoue A, Tsuyusaki J, Yamazaki M, Inaba Y, Sekiguchi Y, Itoh M, Yagita H, Komiyama A: Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of multiple sclerosis like demyelinating disease in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. J Neuroimmunol 102: 56-66, 2000
- 9) Inoue A, *Koh C-S, Yamazaki M, Kim BS: High-dose mouse immunoglobulin G administration suppresses Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. J Neuroimmunol (in press)
- 10) Kim BS, Palma JP, Inoue A, Koh C-S : Pathogenetic immunity in Theiler's virus-induced demyelinating disease: a viral model for multiple sclerosis. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (in press)

8. *P. acnes* 由来trigger factor抗原に対するサ症患者の免疫反応性について

分担研究者 江石 義信 (東京医科歯科大学医学部付属病院病理部)

研究要旨 *P. acnes* DNA expression library を患者血清にてスクリーニングして得られたrecombinant protein (RP35)抗原は、分子量 79 KDaの*P. acnes* trigger factor に由来しており、本年度はその全塩基配列を決定した。さらに、RP35抗原を用いて、末梢血リンパ球の刺激試験を行ったところ、サ症50症例中、9例(18%)においてサ症患者に特異的な高い反応性が認められた。対照として用いたPPD (ツ反抗原) に対しては、結核患者21例中、8例(38%)において結核患者に特異的な高い反応性が認められた。PPD抗原によるツ反が全例で強陽性である結核症においても、PPD抗原に対する末梢血リンパ球の刺激試験にて、疾患特異的な高い反応性を示し得た症例は38%のみであった事から、サ症におけるRP35抗原による刺激試験・陽性率18%は、決して低い陽性率であるとは限らず、今後、RP35抗原による皮内反応試験を検討してみる必要がある。

A. 研究目的

サルコイドーシス(サ症)は原因不明の全身性肉芽腫性疾患で、その病因は何らかの起因体に対する宿主側の過敏性免疫反応(Coomb's IV型アレルギー反応)によるものと推測されている。日本国内では、サ症患者の病変部から分離培養された微生物が*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) であること、病変部組織内に*P. acnes* および*P. granulosum* 由来の菌体DNAが多量に検出されたことなどから、サ症の病因に関与し得る微生物としてpropioni-bacteriaが注目を集めている。しかし、*P. acnes*は健常人の皮膚や腸内細菌叢からも分離可能な常在性細菌であるため、本菌がサ症の原因菌であることを証明するには、従来の病原微生物学的な考えからすると大変難しい。サ症病態の形成(肉芽腫形成)には、多数の活性化されたマクロファージやヘルパーT細胞が関与することから、もし、*P. acnes*がサ症を引き起こす原因菌ならば本菌由来の抗原に対する患者特異的な細胞性免疫応答が存在するはずである^{6,7)}。細胞性免疫応答の上昇に伴い、体液性免疫応答の上昇も十分起こりうるという仮定のもとに、本研究では*P. acnes*ゲノムDNAライブラリーから、サ症患者血清と強い免疫反応性

を有する菌体蛋白の遺伝子クローニングを行い、その菌体蛋白に対するサ症群および対照群における免疫反応性を比較検討した。

B. 研究方法

*P. acnes*ゲノムDNAライブラリースクリーニングおよびリコンビナント蛋白の調製

*P. acnes*からゲノムDNAを抽出し、 λ gt11ファージベクターを用いて*P. acnes*ゲノムDNAライブラリーを作製した。これを大腸菌に感染させ、各プラークにライブラリーの挿入遺伝子を発現させ、ニトロセルロースメンブレンに転写した。これを、肺胞洗浄液(BALF)中CD4/CD8比が12以上の高値を呈した3人のサ症患者の血清を用いて免疫染色し、陽性プラークを選別した。陽性プラークから抽出した挿入遺伝子断片をpGEXプラスミドベクターにサブクローニングしてGST融合リコンビナント蛋白(GST-RP35)を発現させ、GSTアフィニティーカラムを用いて精製した。western blottingにより、スクリーニングに用いた患者血清は、GST-RP35に対して反応し、GST単体には反応しないことを確認した(図1)。

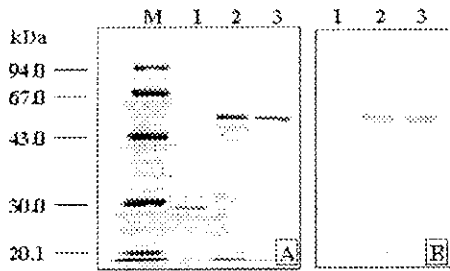


図1. (A) SDS-PAGE(10%ポリアクリルアミドゲル、クマシール染色)の結果。GST(Ross 1)、GST-RP35(*low 33*)のみまたは、*low 33*は別クローンから得られた蛋白、M、分子重量マーカー(B)同蛋白を転写し、兔血清を用いたwestern blottingの結果。SDS-PAGEおよびwestern blottingにおいてsingle bandが得られた*low 33*のクローンを後のアッセイで使用した。

RP35上流遺伝子配列の検索

RP35遺伝子断片が挿入されたpGEXプラスミドベクターを用いてRP35のDNA配列をシーケンシングした。得られた配列から作製した3'プライマーとλgt11配列から設計した5'プライマーを用いて*P. acnes*ゲノムDNAライブラリーをPCRにより増幅し、得られたDNA産物をシーケンシングすることにより、挿入遺伝子よりさらに上流の遺伝子配列を決定した。

RP35と同エピトープを持つ*P. acnes*菌体蛋白の検索

GST-RP35を免疫して得られたウサギ抗血清中の抗GST抗体をGST結合ピーズにより吸収し、吸収後の抗血清の*P. acnes*破砕液に対する反応をwestern blottingで検討した。反応した蛋白バンドを精製するために、*P. acnes*破砕液をイオン交換クロマトグラフィーにて分画化し、反応蛋白を含む分画をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動でさらに分別しメンブレンに転写後、CBBで染色して反応蛋白バンドを切り出した。精製した蛋白のN末端アミノ酸配列を解析した。

BALFおよび血清中の抗体価測定

GST-RP35およびGSTを抗原として、サ症患者(38人)、間質性肺炎(IP)患者(32人)、過敏性肺臓炎(HF)患者(13人)、好酸球性肺炎(PIE)患者(13人)、結核患者(5人)および健常人(4人)のBALFおよび上記検体に加えて慢性関節リウマチ(22人)、結核患者(21人)および健常人(18人)の血清中のIgG、IgA、IgM抗体価を蛍光免疫アッセイにより測定した。GST-RP35抗体価からGST抗体価を引いた値をRP35特異的抗体価として求めた。

末梢血単核球幼若化反応の検討

サ症患者(50人)、結核患者(21人)、慢性関節リウマチ患者(32人)および健常人(32人)の末梢血から単核球を分離し、GST、GST-RP35、および結核菌由来ツベルクリン反応用蛋白分画(PPD)を抗原として加え、培養した。培養5日目に³H-thymidineを添加し24時間後に細胞の放射活性を測定することにより細胞増殖を調べた。GST-RP35およびPPD添加群の平均値をGST添加群および抗原未添加群の平均値で除した値をstimulation index(SI)として求めた。

C. 研究結果

RP35および同エピトープを持つ*P. acnes*菌体蛋白の検索

western blottingの結果、抗RP35抗血清は*P. acnes*破砕液中の約79 kDa蛋白と反応した(図2)。反応した蛋白のN末端アミノ酸配列を解析し、既知蛋白との相同性検索を行った結果、*Mycobacterium tuberculosis*由来 trigger factor蛋白のN末端配列と最も高い相同性を示した(Identities=47%)。また、RP35の遺伝子配列よりさらに上流の遺伝子配列中に、79 kDa蛋白のN末端アミノ酸配列をコードする配列が存在することを確認した。N末端配列からstop codonまでの全アミノ酸配列と既知蛋白との相同性検索を行った結果、同様に*M. tuberculosis*由来 trigger factor蛋白と最も高い相同性を示した(Identities=40%)(図3)。

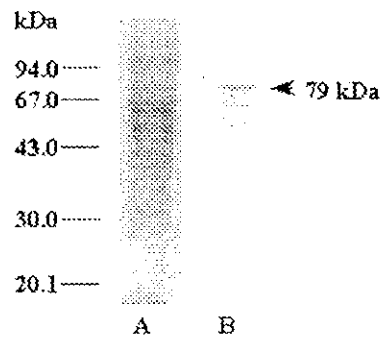


図2. (A) SDS-PAGE(10%ポリアクリルアミドゲル、クマシール染色)の結果。*P. acnes*破砕液(80 μg)を泳動。(B)同蛋白を転写し、RP35に対するウサギ抗血清を用いたwestern blottingの結果。抗血清に反応する約79 kDaのbandが検出された。

```

A 1  PPSLEEMLNITNPKKRLTIRKPPDELKPSLDKAYKDIANDVYVNGFNRKQKVP 49
B 1  NKSTVEQLSPTRVRIINNEVFAELFPDFORATYKELAKOVRLPGRFPGKAP 50
A 50 APYIDORFGRGYVLOEAINDALPAAYGKAIEENTWPLGPEIEVTKLED 99
B 51 AHLLEARIIGREANLDQIVNDALPSRYGDAVAESDVQPLGRPNIEVTKKEY 100
A 100 GEVYEF TAEYDVRFDLFDVSAISVNEVAVENPDEVDVDERVETLRRFA 149
B 101 GQDLQF TAEYD IRFK ISPPULSAL TYSVDPIE IGEDDYDAELOSIRTRFG 150
A 190 TNEVERAAAKKODLYTIDLAGTROGEALEDATASGYTYKVGSEGLLEGLD 199
B 151 TLTAVDRPVAVGQVYSIDLSATVQGEDIPNAAAEGLSHEVSSGRLIAGLD 200
A 200 EAVTQLKAGESAEFHSILVGFPLRQDADIKVYTKVGEDELPANDQDA 249
B 201 DAYVGLSADES RVFTAKLAAEGHAGQEAQVTVTVRSVKRELPEPDEDEFA 250
A 290 OLVSQFOTVQENRADRLTALENMARLDDAADARDKVLVEEYISKIDIELPT 299
B 251 QLASEFDS IDELRASLSDVQYRQAKRQDQABDIRNATIDALLEQVDVPLPE 300
A 300 SLIDSELEARRQVWQQLAQAGNTVCEYLEDSEEVYDMDQDFWAEIEK 347
B 301 S'WQAGPDSYLHS-----ALSGLNHDEARFRIELLVEGSSRAAFDAEART 345
A 348 RSLDALKAQIYLDWVADDEIGVEONELTELLFRKAQDNGTSPEEAAQHN 397
B 346 ASEKQVKKRLLDLALADELQVNGQDDLTERLVYTSROYGIPEQOLFGL 395
A 398 NQNHHLPOVNOEIRKQKALASHVGAATVYDSKQHALELDRIQPDGTIAQK 447
B 396 QERRQLPTNFADVPRELAIRAAVEAATVYDSQNTIDTSEFF-GKRVSAQ 444
A 448 QAEEDAPAEDSAEKADGKATEEPKAEKAPAKKTTTKKISAKKSAGAKAT 497
B 445 EAEEAEPADEGAARAASDEATT----- 486
A 498 THKYVDKSDHPAAKPKAPKPKTAAKKDKSK 529
B -----

```

図3. RP35の上流を含む遺伝子配列から変換されたアミノ酸配列(A)と*M. tuberculosis*由来 trigger factor 蛋白(B)との相同性解析の結果。図中のboldは同一アミノ酸、+は保守的变化を表す。→はRP35の5'および3'末端を示す。N末端側の網掛け部分は、western blottingによりRP35ウサギ抗血清と反応した*P. acnes*由来 79 kDa蛋白のN末端アミノ酸配列と等しかった。

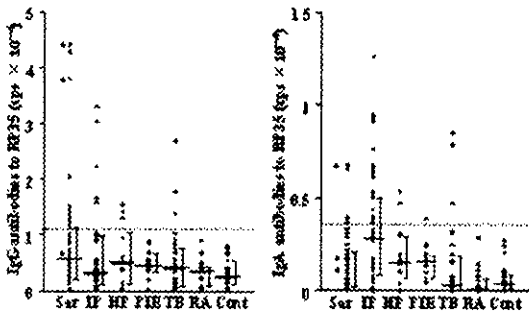


図4. RP35に対する血清中のIgGおよびIgA抗体価。図中点線は健康人群の抗体価の平均値+3SDを表す。水平の実線は、下から25パーセント、中央値、75パーセントを示す。健康人群の値と比較してIgGに関してはサ症群で有意に高く($p < 0.007$)、IgAに関してはサ症、IP、PIE群において有意に高かった(サ症($p = 0.007$)、IP($p < 0.001$)、PIE($p = 0.010$)。図中*印の検体は、*図A. *P. acnes* ゲノムDNAライブラリースクリーニングに用いられた検体である。

血清中およびBALF中の抗体価測定

RP35に対する血清中のIgM抗体価はすべての検体において、ほとんど検出されなかった。サ症群および他の疾患対照群と健康人群間のRP35に対する血清中IgG,IgA抗体価の有意差をMann-WhitneyのU検定により検定した結果、IgGに関してはサ症のみで、IgAに関してはサ症、IPおよびPIE群において健康人群に対する有意差が見られた(図4)。BALF中抗体価においてもIgM抗体価はすべての検体においてほとんど検出されなかった。サ症群と全対照群間のIgG,IgA抗体価の有意差を同様に検定した結果、IgGではサ症群においてIP,HP,PIE群に対する有意差が見られた。IgAに関しては、サ症群においてIP,HP,PIEおよび健康人群間に対する有意差が見られた(図5)。

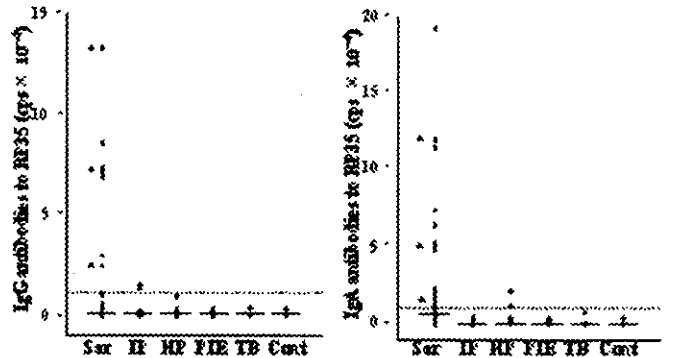


図5. RP35に対するBALF中のIgGおよびIgA抗体価。図中点線は 1×10^4 cpaを表す。水平の実線は中央値を示す。IgGに関してはサ症群においてIP、HP、PIE群に対する有意差が見られた(IP($p = 0.000$), HP($p = 0.042$), PIE($p = 0.045$))。IgAに関してはサ症群においてIP、HP、PIEおよび健康人群に対する有意差が見られた(IP($p < 0.001$), HP($p = 0.004$), PIE($p < 0.001$), 健康人($p = 0.008$))。図中*印の検体は、今回*P. acnes* ゲノムDNAライブラリースクリーニングに用いられた検体である。

末梢血単核球幼若化反応の検討

サ症群と、他の対照群間のRP35に対する末梢血単核球幼若化反応性(SI)の有意差をMann-WhitneyのU検定により検定した結果、全対照群(結核、慢性関節リウマチ、健康)に対する有意差が見られた。同様に結核群と他群間のPPDに対する末梢血単核球幼若化反応性の有意差を検定した結果、結核群においてサ症、慢性関節リウマチおよび健康人群に対する有意差が見られた。各抗原に関して、健康人群のSI値の平均値に標準偏差の3倍を足した値をしきい値として、しきい値以上の陽性率を求めた結果、RP35に対する反応のサ症群陽性率は18%、PPDに対する反応の結核群陽性率は38%であった(図6)。

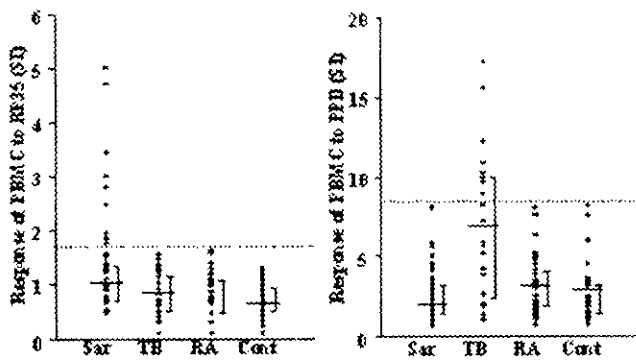


図6. RP35およびPPDに対する末梢血単核球幼若化反応の結果。図中点線は健康人群のSIの平均値+3SDを表す。水平の線は、下から25パーセントイル、中央値、75パーセントイルを示す。RP35に対する反応性は、サ症群において他対照群に対して有意に高かった (Tb($p=0.024$), RA($p=0.008$), 健康人($p<0.001$))。PPDに対する反応性は、結核群において他対照群に対して有意に高かった (サ症($p<0.001$), RA($p=0.003$), 健康人($p<0.001$))。

D. 考察

Siltzbachの原著²⁶によれば、サ症患者病変部組織の懸濁液を皮下注射したところ、生検によって確認された165症例のサ症患者のうち139例(84%)において、皮下注射部位に一致して、注射後4~6週に最大サイズとなる肉芽腫が引き起こされた。対照群303例中においては、2例(1%未満)のみがそのような肉芽腫形成反応を示したにすぎなかった。このKveim現象には、サ症の病因に関して重要な情報が含まれている。第一に、サ症の原因物質が肉芽腫組織中に存在すること。第二に、サ症患者以外のほとんどがその原因物質に対し肉芽腫反応を示さなかったことである。

病変部リンパ節中にある原因物質を探し出す目的で、定量PCRを行った結果、2種のpropionibacterium由来のDNAを高率かつ多量に検出した。そこで今回我々は、propionibacteriaを標的として、サ症患者においてのみ細胞免疫応答が認められるような1つないし複数の菌体抗原を得ようと試みた。

日本人サ症患者の肺に集積するT細胞はオリゴクロ・ナルであったという報告があることから、責任抗原物質の種類は決して多くはないものと予想される。結果的に、今回のサ症患者血清を用いたスクリーニングにより*P.acnes*ゲノムDNAライブラリーから得られた唯一のリコンビナント蛋白(RP35)は*P.acnes*由来trigger factor蛋白の一部である事が判明しているが、他の患者血清を用いた場合に、これとは異なる蛋白抗原が検出される可能性は否定できない。

ヒトにとって*P.acnes*由来trigger factor蛋白がどれだけ高い抗原性を示しうるかは明らかではないが、一部のサ症患者においては、体液性免疫応答のみならず細胞性免疫応答も誘導されていた。現時点では、このtrigger factor蛋白についてあまり知られていないが、*Escherichia coli*由来trigger factor蛋白はある種のheat shock proteinと同様に分子シャペロン群に属していることが分かっている。heat shock proteinは異なる細菌間において配列保存性が高いことが知られており、時に菌種間で強い交叉免疫反応が認められる。それとは対照的に、1996年以前に確認された細菌由来のtrigger factorは、比較した4菌種中の3種が類似しておらず、trigger factor蛋白においてはheat shock proteinのような交叉免疫反応は生じにくいと思われる。我々がSwiss-Protデータベースを用いて、trigger factorに関して*M.tuberculosis*と他の10種の細菌間で相同性検索を行ったところ、いずれの相同性も30%以下であり、配列保存性はあまり高くないと思われる。今回同定された*P.acnes*由来のtrigger factor蛋白のアミノ酸配列は、結核菌trigger factor蛋白に対して40%の相同性が認められ、両者が最も類似していることが分かった。このことより、GP35が*P.acnes*由来trigger factorであることが示唆された。

*P.acnes*がアレルギー機序を介してサルコイドシスを引き起こす原因となっているとすれば、その責任抗原は、*P.acnes*菌種に特異的な抗原である必要がある。*P.acnes*由来trigger factorのC末端のアミノ酸配列(Asp-463からLys-529まで)は、Swiss-Protデータベースで検索した結果では、他の細菌蛋白アミノ酸配列と相同性がなかった。しかし、C末端のSer-491からLys-529までの範囲は、アミノ酸配列からの構造予測解析において、抗原性が高いということが分かった(データ未表示)。このことから、この領域が*P.acnes*に特異的な抗原決定基である可能性が示唆された。ただし、本来の細菌蛋白(SDS-PAGEの結果では79kDa)とGP35(アミノ酸配列からの計算値では58kDa)との大きさの不一致に対する理由はまだ明らかではない。

RP35に対する血清抗体価の上昇は、サ症群のみならず他対照群においても見られたが、BALF中抗体価の上昇はサ症群に特異的に見られた。これは肺野部の病変局所におけるRP35抗体産生の特異的な亢進を反映していると考えられる。RP35に対する末梢血単核球幼若化反応の特異的な上昇はサ症群の18%で見られたが、ツベルクリン反応で強陽性を示す結核患者においてPPDに対する末梢血単核球幼若化反応の特異的な上