

Bes-1 抗原を発現する大腸菌の作製

分担研究者	木村 浩一	北海道工業大学工学部福祉生体工学科
	磯貝恵美子	北海道医療大学歯学部口腔衛生学
	磯貝 浩	札幌医科大学医学部動物実験施設部
	西川 武志	北海道教育大学養護科
	小熊 恵二	岡山大学医学部細菌学
	小竹 聡	北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻感覚器病学
	大野 重昭	北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻感覚器病学

研究要旨

Behçet 病患者の血清中には、連鎖球菌の一種である *Streptococcus sanguis* DD113-20 に対する抗体価の上昇が見られる。我々は以前、この患者血清抗体の標的蛋白の一つをクローニングし (BES-1)、そのアミノ酸配列の一部が、ヒトの転写因子である POU4F3 とホモロジーを持つことを報告した。その後、*S. sanguis* DD113-20 を使用したマウスの感染実験によって、実験的なブドウ膜炎を作成することに成功した。この実験によるブドウ膜炎発症機序の仮説として、BES-1 蛋白と POU4F3 の共通抗原性による自己免疫性機序が考えられた。今年度の研究では、この仮説の真偽を明らかにする目的で、BES-1 蛋白を発現する大腸菌を作製した。この組換え大腸菌が、*S. sanguis* DD113-20 と同様にマウスにブドウ膜炎を発症させることが可能であれば、少なくとも BES-1 蛋白の存在が、ブドウ膜炎を発症させる原因となること、またその機序が共通抗原性に基づくものであることが強く示唆されることとなる。また、この大腸菌の発現する BES-1 蛋白は、N 末端側にヒスチジン 6 個からなる His-tag 配列を保有しており、Ni 結合カラムによって容易に精製が可能である。したがって、BES-1 蛋白を使用した ELISA システムの構築も容易である。

現在、感染実験に必要な無菌マウス (germ-free mice) の供給が停止しており、感染実験を行うことが不可能な状態である。無菌マウスの供給が開始され次第、感染実験を行う予定である。

A. 研究目的

Behçet 病は、再発性の口腔および外囲陰部の潰瘍、ブドウ膜炎を伴う原因不明の全身性炎症性疾患である。我々のこれまでの研究では、口腔内細菌叢に占める *Streptococcus sanguis* の割合が、Behçet 病患者において優位に増加していること、また、

Behçet 病患者から分離された *S. sanguis* の遺伝的、抗原的、生物学的性状が標準株と異なること、さらに Behçet 病の活動性の目安となる好中球の活性レベルが、患者口腔内の *S. sanguis* の菌数と相関していることが明らかになっている。また、Behçet 病患者から分離された *S. sanguis* DD113-20 を

マウスに感染させることにより、実験的なブドウ膜炎を作成することにも成功している。以上の結果から、Behçet病患者から特異的に分離される *S. sanguis* が、本疾患の外因として重要な役割を果たしている可能性が考えられた。その病理的機序として、患者特異的な *S. sanguis* と患者の病変部位に共通抗原が存在することによるⅢ型アレルギーの存在を仮定した。この仮説に基づき、Behçet病患者から分離した *S. sanguis* DD113-20 の DNA から発現ベクターライブラリーを構築したところ、Behçet病患者血清中の抗体と強く反応する蛋白をコードする遺伝子の存在が明らかになった。BES-1 と命名されたこの蛋白は、そのアミノ酸配列の一部が、ヒトの転写因子である POU4F3 とホモロジーを持っており、Behçet病の病因因子としての可能性を持っていた。本研究では、BES-1 蛋白の病原因子としての可能性を検討するため、大腸菌を使用し

た BES-1 蛋白の大量合成システムを構築した。

B. 研究方法

札幌医大微生物学講座藤井教授らの構築した *S. sanguis* DD113-20 の発現ベクターライブラリーより、PCR 法により BES-1 遺伝子を増幅した。PCR に使用したプライマーは、BES-1 遺伝子の全長を増幅し、増幅された DNA 断片の両端に *Bam* HI サイトが作成されるよう設計した (図 1)。

PCR で増幅された DNA 断片を精製後、制限酵素 *Bam* HI によって両端の *Bam* HI サイトを切断した。さらに電気泳動を行い、目的の DNA バンドを切り出し精製した。この DNA を、大腸菌発現ベクター pQE-32 (Quiagen) の *Bam* HI サイトにクローニングした。

PCR に用いたプライマーを使用し、Behçet 病由来以外の *S. sanguis* についても PCR を行い、BES-1 遺伝子が、Behçet 病株

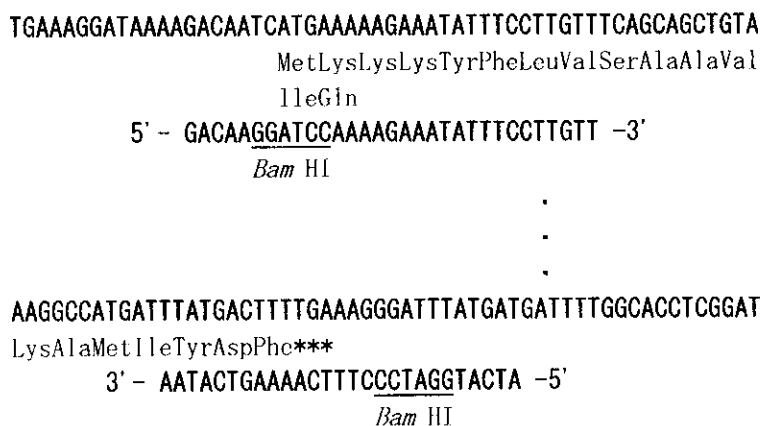


図1. PCRに使用したプライマーの配列とBES-1遺伝子上の位置

BES-1遺伝子のスタートコドンとストップコドン周辺を示してある。アミノ酸配列は、BES-1遺伝子にコードされているアミノ酸配列である。プライマー配列上の *Bam* HI サイトは下線で示してある。5'側のプライマーは、*Bam* HI サイトを導入したため、元のアミノ酸配列が、変化している (Met Lys → Ile Gln)。右の電気泳動の写真は、PCRによって増幅したDNA断片である (左端は分子量マーカー、左から2番目のレーンが増幅断片)。

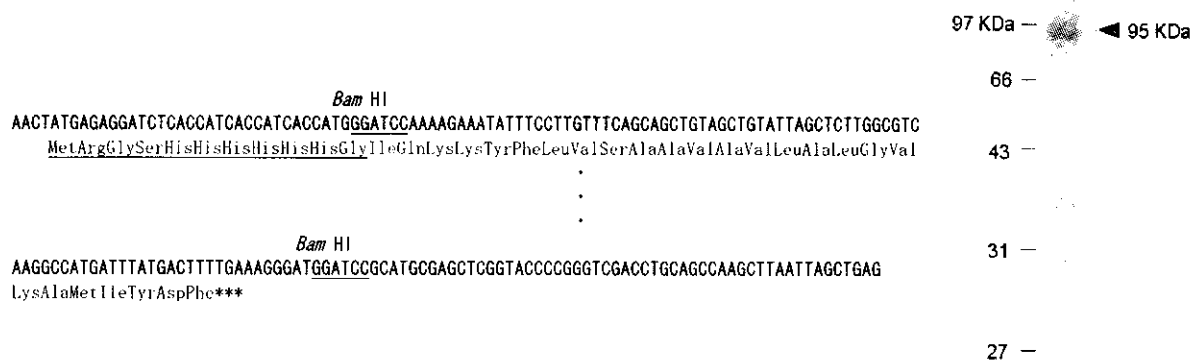


図2 大腸菌から発現される BES-1 蛋白

発現される BES-1 蛋白の遺伝子のスタートコドンとストップコドンの周辺を示した。プラスミド由来のアミノ酸配列には下線を付けてある。下線部のアミノ酸に配列に 6 個の His サイトが存在している。

右の写真は、大腸菌から発現している BES-1 蛋白の SDS 電気泳動像である。

特異的であるかどうかを調査した。

以上の研究で使用した患者由来の菌株については、患者個人が特定出来ないよう番号で分類されてあるため、倫理上の問題点は発生しなかった。

C. 研究結果

一連の操作により、BES-1 蛋白のほぼ全長を発現する大腸菌を作製することが出来た (図2)。プラスミド pQE-32 の *Bam* HI サイトに組み込んだため、産生される BES-1 蛋白は、N 末端側にヒスチジン 6 個からなる His-tag 配列を保有したものとなった。

また、Behçet 病由来以外の *S. sanguis* について行った PCR の結果、心内膜炎由来の ATCC10557 株についても BES-1 蛋白をコードする遺伝子を保有していることが明らかになった。

D. 考察

本研究で作製した大腸菌から産生される BES-1 蛋白は、N 末端側にヒスチジン 6 個からなる His-tag 配列を保有しており、Ni 結合カラムによって容易に精製が可能である。したがって、BES-1 蛋白を使用した ELISA システムの構築も容易である。

BES-1 蛋白を産生する大腸菌をマウスに感染させることによって、*S. sanguis* DD113-20 を感染させた場合と同様な、実験的ブドウ膜炎を作成することが可能であれば、BES-1 蛋白が Behçet 病の原因となっていることを示す強い証拠となる。

しかしながら、Behçet 病由来以外の *S. sanguis* についても BES-1 蛋白をコードする遺伝子を保有していることが明らかになり、BES-1 蛋白が Behçet 病由来 *S. sanguis* に特異的なものではないことが判明した。これは、BES-1 が Behçet 病の原因ではない

という可能性を排除出来ないことを示唆するものである。

G. 研究発表

1. 論文発表

Isogai E, Isogai H, Hirose K, Kubota T, Kimura K, Fujii N, Hayashi S, Takeshi K, Oguma K. : Therapeutic effect of anti-TNF-alpha antibody and levofloxacin (LVFX) in a mouse model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection. *Comp.Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 24(4), 217-231(2001).

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

Streptococcus sanguis 感染ノトバイオートマウスにおける
口腔粘膜障害の重症度と全身応答との関連性

分担研究者	磯貝恵美子	北海道医療大学歯学部口腔衛生学教室
	磯貝 浩	札幌医科大学医学部実験動物施設
	木村浩一	北海道工業大学工学部福祉工学講座
	小竹 聡	北海道大学大学院医学研究科感覚器病学講座
	大野重昭	北海道大学大学院医学研究科感覚器病学講座
	横田憲治	岡山大学医学部細菌学教室
	小熊恵二	岡山大学医学部細菌学教室

研究要旨

ペーチェット病（BD）に微生物感染が関与するかどうかを知る目的で、無菌マウスに外因の候補である *Streptococcus sanguis* を感染させた。このマウスモデルでは眼病変が誘導された。本年度は口腔粘膜病変がすでに存在する場合、症状の重症度や全身応答に関与するかどうかを検討した。

A. 研究目的

ペーチェット病（BD）は再発性の口腔および外陰部の潰瘍、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。*Streptococcus sanguis* が外因の候補となりうるかを調べるためノトバイオート実験動物モデルを作製した。本菌が他の常在細菌と比較して、有意に定着し、BD関連病変を誘導することを報告した。ここでは、口腔粘膜病変の違いが他のBD関連症状誘発に関与するかどうかを調べた。

B. 研究方法

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（HS/bac）と機械的障害（SCR/bac）の2群を作り、その影響を調べた。重症度の判定は感染14日目の病理組織標本による観察のほか、経時的にマウスを観察し、口腔および皮膚の炎症領域の広さから判定した。定量的な基準を設けるため、炎症性サイトカインであるIL-2、IL-6、IFN- γ 、TNF- α について、血清および口腔局所中の定量を行

った。免疫応答としては本菌細胞壁に対する D T H , Hsp336-351, Bes-1, Brn-3b に対する抗体応答を E L I S A にて調べた。

実験動物は眼研究に関して実験動物の取り扱いを記載した A R V O 文書にしたがって、飼育された。また、すべての実験は H e l s i n k i 宣言に基づく生命倫理を踏まえた上で、行った。

C. 研究結果

S. sanguis はマウスの口腔によく定着した。粘膜に障害を与えられた群ではどちらも有意に感染単独群に比べて、高い定着を示した (Table 1)。熱障害群と機械的障害群では常に熱障害群のほうが高い定着 (約 10 倍) を示した。粘膜障害群は重度で治癒の遅延を示したが、機械的障害群では粘膜障害は一過性であった。感染 14 日目のサイトカイン応答は熱障害群で IL-2、IL-6、IFN- γ 、TNF- α すべてに認められたが、機械的障害群では感染単独群と同じ低いレベルで IL-6 および IFN- γ が認められたにすぎなかった (Table 2)。D T H 応答では粘膜障害群で細胞壁に対する応答が誘導されるのに対して、感染単独での誘導はできなかった。Hsp336-351, Bes-1, Brn-3b 抗体応答は感染を受けた群すべてに認められた。Hsp336-351 の応答はもっともよく接種菌数に依存し、重症度とも関連していた。眼病変 (虹彩毛様体部) は感染群に共通して見られた。熱障害群では

BD の皮膚病変とは異なる広範囲にわたる遊走性紅斑が特徴的に見られた。

D. 考察

S. sanguis を無菌マウスに定着させ粘膜障害を与えることによって、BD と類似の病変および応答を誘導できた。粘膜障害の重症度と持続性が細菌持続感染を助長し、全身への応答を惹起しやすくと考えられた。

感染後の菌の定着はその後の病変形成に深く関与すると考えられる。このことは菌側の付着能力に依存するだけのものでなく、粘膜損傷などによって宿主側の状況が変化したとき助長される。口腔組織の破壊はその後の全身免疫応答に大きく影響した。粘膜のバリア機能が不全となることで、免疫惹起能力のある菌体成分が流入した結果といえる。

本モデルにおいては B D に近い病変は誘導されるものの完全な一致はみしていない。すなわち、B D に特有の後部ぶどう膜炎は誘導されず、軽度の前部ぶどう膜炎にとどまった。また、皮膚病変はマウスでは広域な紅斑であった。消化管および外陰部潰瘍は H S / b a c 群で 1 例にのみ認められたに過ぎない。このマウスモデルでは B D に強く相関する H L A - B 5 1 などが発現していない。疾患感受性遺伝子群の存在はこうしたモデルにおける最終ステージで要求されるだろう。

E. 結論

- 1) 口腔粘膜障害の重症度と持続性は *S. sanguis* への定着を増強させ、その菌に対する全身応答を強く惹起させる。
- 2) 口腔粘膜障害の持続は炎症性サイトカイン応答を持続させ

る。

- 3) 口腔粘膜障害が強いと他の部位にも炎症が誘発され、継続する。

F.健康危険情報

特記事項なし

Table 1. Colonization of *S.sanguis* to germ-free mice

Group	Inoculum Size	Number (Log ₁₀ CFU/ml) ^a of <i>S.sanguis</i> in the saliva after infection			
		1 day	3 days	7 days	14 days
HS/bac	10 ⁷	7.76±0.30 ^b	7.86±0.56 ^b	7.84±0.12 ^b	6.12 ±0.77 ^b
SCR/bac	10 ⁷	7.22±0.20 ^b	7.02±0.21 ^b	6.67±0.15 ^b	5.74±0.37 ^b
bac	10 ⁷	5.95±0.45	6.51±0.12	6.36 ±0.67	5.06±0.37
HS/bac	10 ⁵	7.40±0.43 ^b	8.01±0.02 ^b	7.82±0.41 ^b	6.01±0.64 ^b
bac	10 ⁵	5.25±0.48	6.22 ± 0.20	5.47±0.47	5.96±0.22
HS/bac	10 ³	6.86±0.46 ^b	8.03±0.12 ^b	7.48±0.07 ^b	5.90±0.46 ^b
bac	10 ³	5.48±0.72	5.81±0.08	6.28±0.25	5.59±0.32
HS	0	0	0	0	0
SCR	0	0	0	0	0
Control	0	0	0	0	0

a. Data were expressed as mean ± SD

b. Significantly higher than the level of each bac group.

Table 2. Detection of cytokines in oral soft tissue of germ-free mice infected with *S. sanguis* BD113-20

Group	Inoculum Size	Cytokine level ^a (pg/0.1 g)			
		IL-2	IL-6	IFN- γ	TNF- α
HS/bac	10 ⁷	43.6 ±19.1 ^b	60.5 ±40.5 ^b	62.0 ±30.4 ^b	56.3 ±33.0 ^b
SCR/bac	10 ⁷	<15.0	17.0±6.7	22.7±8.0	<10.0
bac	10 ⁷	<15.0	13.5±8.8	17.2 ± 6.8	16.3±10.8
HS/bac	10 ⁵	45.2 ± 21.8 ^b	74.2 ± 43.4 ^b	51.0 ± 30.3 ^b	65.0 ± 44.3 ^b
bac	10 ⁵	<15.0	7.9 ± 1.2	8.2 ± 4.7	12.0 ± 4.6
HS/bac	10 ³	75.1 ± 49.3 ^b	96.0 ± 72.0 ^b	117.6 ± 41.2 ^b	101.4 ± 72.8 ^b
bac	10 ³	<15.0	11.6 ± 8.3	13.1 ± 7.2	21.7 ± 13.5
HS	0	<15.0	16.1 ± 3.6	15.1 ± 8.4	23.3 ± 24.2
SCR	0	<15.0	<5.0	<5.0	<10.0
Control	0	<15.0	<5.0	<5.0	<10.0

c. Data were expressed as mean ± SD

d. Significantly higher than the level of each bac, HS, SCR and control (P<0.05).

合成抗菌ペプチド CAP18 活性ドメインおよびその誘導体の 粘膜感染症への応用

分担研究者	磯貝恵美子	北海道医療大学歯学部口腔衛生学教室
	平田陸正	パロアルト分子医学研究所
	磯貝 浩	札幌医科大学医学部実験動物施設
	渡来 仁	大阪府立大、農学部、獣医免疫
	大野重昭	北海道大学大学院医学研究科感覚器病学講座
	小竹 聡	北海道大学大学院医学研究科感覚器病学講座
	横田憲治	岡山大学医学部細菌学教室
	小熊恵二	岡山大学医学部細菌学教室

研究要旨

好中球はその抗菌活性を介して、強い感染防御能を示すことが知られている。ヒト好中球から単離された18kDaの塩基性抗菌蛋白(CAP18)は様々な細菌に対して強い抗菌活性を示す。そこで、大腸菌O157感染モデルを用いて、粘膜感染をおこし、かつその菌体成分が体内へ流入した場合、中和できるかどうか。臨床症状発現を抑制できるかどうかを検討した。CAP18は大腸菌O157のLPSに結合し、生体内において症状の発現や死亡率を減少させた。この作用に加えて、ペロ毒素の中和をその毒素受容体によって行い、ニューキノロン剤による除菌を行うと死亡率、症状発現は完全に抑制することができた。以上のことから、CAP18は粘膜感染症が全身疾患へ波及するのを防ぐのに有効であると考えられた。

A.研究目的

生体は種々の感染防御機構をもっており、特に好中球は抗菌活性を示す多くの蛋白を保有している。近年、ヒトおよびウサギ好中球から単離された18kDaの塩基性抗菌蛋白(CAP18)は様々な細菌に対して強い抗菌活性を示すことが*In vitro*で示された。CAP18は感染における生体防御因子として、感染治療への新しい戦略のひとつとなりうるユニークな物質である。遺伝子の4番目のエクソンがコードしている43残基のうち27残基がすべての活性発現のドメインである。本研究では、大腸菌O157のコントロールにCAP18が効果を示すかどうかをCAP18活性ドメインの合成ペプチドおよびその誘導体について

検討した。

B.研究方法

ペプチドの合成はペプチド研究所(大阪市)に委託した。固相法で合成し、最終標品は高速液体クロマトグラフィー(逆相液体クロマトグラフィー)で精製し、溶出パターンで単一のピークが得られ、純度は97%以上であった。用いた合成ペプチドはF12-V38(FRK SKEKIGKEFK RIVQRIKDFL RNLV:V38)および2種類の置換体を用いた。置換体としては2個所をロイシンで置換したもの(L22L31:LL)および2個所をフェニルアラニンで置換したもの(F22F31:FF)を用いた。ペロ毒素の中和にはその受容体であるグロボトリアオシルセラミド(Gb3)

を、EHECの除菌にはニューキノロン剤であるレボフロキサシン（LVFX）を使用した。

マウスモデルとしては大腸菌O157を無菌マウスに経口感染させたノトバイオートマウスを用いた。実験マウスは実験動物の取り扱いを記載した国内および学内指針にしたがって飼育された。また、すべての実験はHelsinki宣言に基づく生命倫理を踏まえた上で行った。

C. 研究結果

マウスに 2.5×10^9 の大腸菌O157 #7株を感染させたところ、すべてが四肢麻痺あるいは痙攣を起こして死亡した。LVFXによる治療を受けた#7感染マウスで死亡率は60%まで減少したものの全例に組織障害を認めた。

それぞれの合成ペプチドを投与された感染動物では未処置感染マウスの糞便中の菌数に有意差を認めなかった。CAP18合成ペプチドの投与によって、死亡率が低下した。この効果はペプチドの種類によって異なっていた（図1）。合成ペプチドF12-V38投与マウスは未処置感染マウスと同様、生残率は0%であった。LLおよびFF投与マウスの生残率はそれぞれ40および60%であった。

合成ペプチドと抗生物質の併用効果を調べた。合成ペプチドおよびLVFXを投与された感染動物ではLVFX投与感染マウスの糞便中の菌数に有意差を認めなかった。しかし、

抗生物質による除菌の際も、合成ペプチドの投与は臨床症状の発現を抑制した。生残率は、特に、活性の高い誘導体を用いたときに有意差が高かった。

Gb3リポゾームの単独投与は発症の遅延をもたらしたが、最終的な生残率は0%となった。一方、感染1日目にGb3とともにLVFX投与されたマウスは1匹が死亡したに過ぎなかった。カクテル療法としてGb3リポゾーム、FF、およびLVFXの3剤投与マウスではすべてが生残した。これらのマウスで臓器障害は見られず、除菌も完璧に行われた。

D. 考察

本研究ではニューキノロン剤のもつ強い殺菌活性をサポートしつつ、血中の2つ流入した2つの毒素である内毒素とペロ毒素をそれぞれ中和し、発症を抑制することができた。また、除菌に成功しても臓器障害がおこるというトラブルを未然に回避することも可能であることが証明された。このことは感染症治療における新しい戦略となりうるだろう。

E. 結論

CAP18は内毒素を中和することによって、粘膜感染症が全身疾患へ波及するのを防ぐのに有効である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

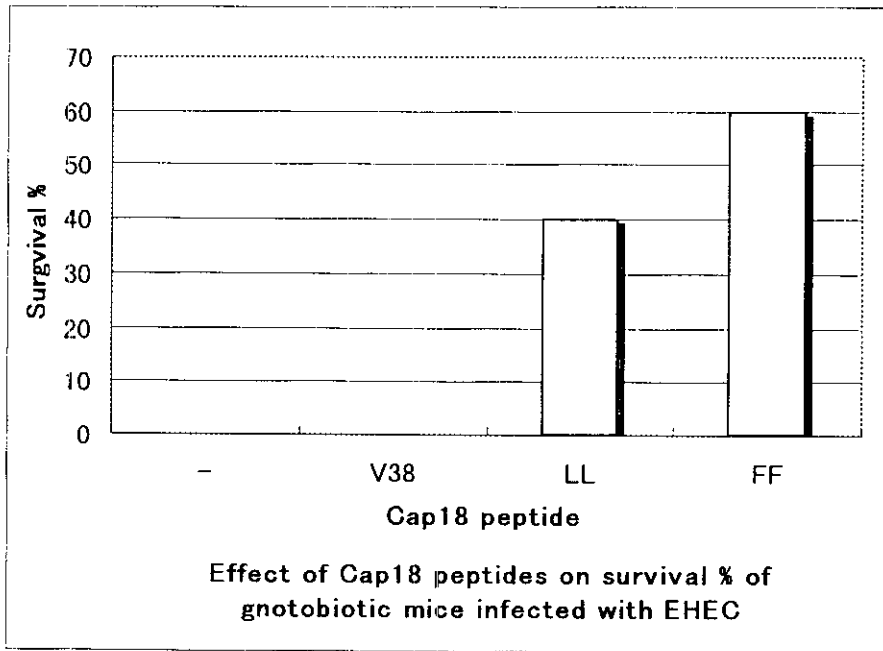


図1. CAP18合成ペプチドによるEHEC感染マウスの死亡率の抑制

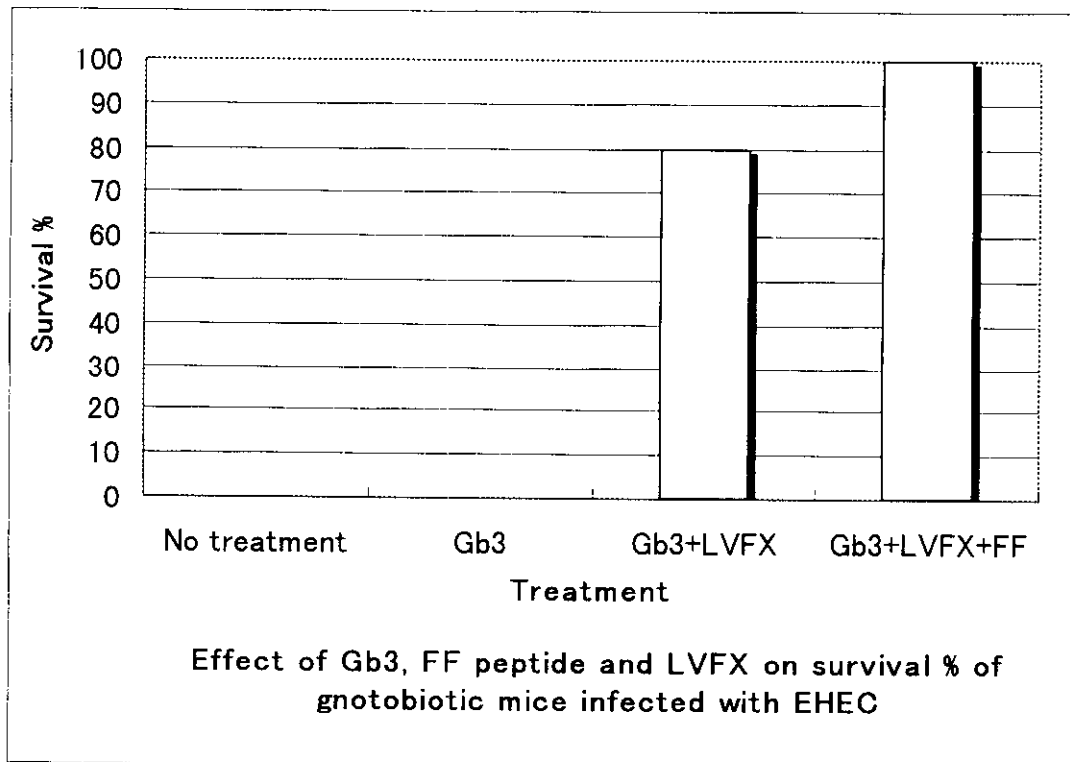


図2. 3剤カクテル療法によるEHEC感染マウスの死亡率の抑制

ペーチェット病患者口腔由来 *Streptococcus sanguis* に対する CAP 18 活性ドメインおよびその誘導体の殺菌活性

分担研究者	磯貝恵美子	北海道医療大学歯学部口腔衛生学教室
	平田陸正	パロアルト分子医学研究所
	磯貝 浩	札幌医科大学医学部実験動物施設
	大野重昭	北海道大学大学院医学研究科感覚器病学講座
	小竹 聡	北海道大学大学院医学研究科感覚器病学講座
	小熊恵二	岡山大学医学部細菌学教室
	西川武志	北海道教育大学養護教員養成課程免疫微生物学教室
	金子史男	福島県立医大医学部皮膚科学教室

研究要旨

A. 研究目的

好中球には低分子の殺菌ペプチドが存在し、感染防御に重要な役割を果たしている。これまでに、低分子殺菌ペプチドのファミリーとして、defensin と cathelicidin が知られている。Cathelicidin の仲間である 18 kDa の塩基性抗菌蛋白 (CAP 18) は様々な細菌に対して強い抗菌活性を示すことが知られている。そこで、活性ドメインおよびアミノ酸置換体によるペーチェット病患者口腔由来 *Streptococcus sanguis* に対する殺菌活性を調べた。

B. 研究方法

用いた合成ペプチドは F12-V38 (FRK SKEKIGKEFK RIVQRIKDFL RNLV) および 2 種類の置換体を用いた。置換体としては 2 個所をロイシンで置換したもの (L22L31) および 2 個所をフェニルアラニンで置換したもの (F22F31) を用いた。殺菌活性は MIC および IC50 で示した。

C. 研究結果

用いた合成ペプチドはペーチェット病患者口腔由来 *Streptococcus*

sanguis に対して、濃度依存性に殺菌活性を示した。F12-V38 の活性は菌株によって異なっていた。最小発育阻止濃度 (MIC) は *S. sanguis* BD113-20、BD114-23 で $20 \mu\text{g/ml}$ 以上、BD118-1 で $20 \mu\text{g/ml}$ であった (Table 1)。50% 発育阻止濃度 (IC50) は $1.0 - 4.8 \mu\text{g/ml}$ であった (Table 2)。MIC および IC50 は標準株で $5 - 20 \mu\text{g/ml}$ 以上および $0.5 - 7.0 \mu\text{g/ml}$ であった。アミノ酸置換体である L22L31 および F22F31 は F12-V38 に比べてきわめて強い殺菌活性を示した。また、標準株に比べて、ペーチェット病患者由来株のほうが感受性は高い傾向にあった。これはどのような患者から分離されたかというより、菌株による差を示しているものと考えられた。殺菌活性は時間依存性であった。殺菌にかかる時間は短時間であり、長く接触させても MIC や IC50 にはほとんど影響がなかった。

D. 考察

殺菌ペプチドは、プラスに荷電した塩基性の領域と疎水性の領域を持つ両親媒性の分子である。塩基性領域

がマイナス荷電した細菌膜表面分子と結合した後に、疎水性領域を細菌細胞膜に挿入して、細胞膜の透過性を変化させ、細菌の代謝を傷害し、殺菌作用を発揮すると考えられる。このペプチドは菌体から遊離したLPSに結合して、結果的にサイトカインの産生を抑制することが報告されている。グラム陽性菌については、十分な解析が行われていないが、殺菌とサイトカイン抑制が同時に期待でき、かつ耐性菌の出現を認めないことことから、治療への応用が期待できるかもしれない。

CAP18 合成ペプチドはLPSに

対する結合するのと同様に、患者由来株から抽出、精製された細胞壁、リポタイコ酸、グリセロ糖脂質にも結合した。

E. 結論

CAP18 合成ペプチドおよびその置換体はペーチェット病患者口腔由来 *Streptococcus sanguis* に対して殺菌活性を示すことがわかった。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

Table 1. Anti-microbial activity of synthetic human CAP18 peptides ---MIC

Bacterial strain	MIC($\mu\text{g/ml}$)		
	HCAP18 ₁₀₉₋₁₃₅	L22L31	F22F31
<i>S.sanguis</i> BD113-20	>20.0	0.6	1.2
<i>S.sanguis</i> BD114-23	>20.0	1.2	1.2
<i>S.sanguis</i> BD118-1	>20.0	5.0	5.0
<i>S.sanguis</i> SSH-83	>20.0	20.0	20.0
<i>S.sanguis</i> KTH-T	>20.0	5.0	10.0
<i>S.sanguis</i> ATCC10556	>20.0	2.5	10.0
<i>S.oralis</i> ATCC10557	>20.0	10.0	10.0
<i>S.gordonii</i> ATCC10558	5.0	0.3	1.2
<i>S.gordonii</i> ST-7	>20.0	0.6	0.6

Table 2. Anti-microbial activity of synthetic human CAP18 peptides ---IC50

Bacterial strain	IC50($\mu\text{g/ml}$)		
	hCAP18 ₁₀₉₋₁₃₅	L22L31	F22F31
<i>S.sanguis</i> BD113-20	1.0	0.15	<0.15
<i>S.sanguis</i> BD114-23	3.3	2.5	<0.15
<i>S.sanguis</i> BD118-1	4.8	2.1	0.24
<i>S.sanguis</i> SSH-83	4.2	0.65	0.95
<i>S.sanguis</i> KTH-T	8.4	2.2	<0.15
<i>S.sanguis</i> ATCC10556	7.0	0.18	0.46
<i>S.oralis</i> ATCC10557	4.8	2.5	1.12
<i>S.gordonii</i> ATCC10558	0.53	0.21	0.52
<i>S.gordonii</i> ST-7	3.7	0.11	<0.15

G. 研究発表

論文発表

著書

1. 磯貝恵美子、磯貝 浩：茶抽出エキスの歯周病予防効果。 ペットフードの開発と市場。 株ジーエムシー, 2001
2. Isogai, E., Isogai, H., Yokota, K., Oguma, K., Kimura, K., Kubota, T., Fujii, N., Kotake, S., Yoshikwa, K., and Ohno, S. Experimental Model for Behcet's disease in gnotobiotic mice infected with *Streptococcus sanguis*. pp133-138, Behcet's disease. Design mecca Publishing Co., Korea, 2001
3. Isogai, E., Kokai, Y., Isogai, H., Yokota, K., Oguma, K., Ishihara, M., and Ohno, S. Mucosal infection of *Streptococcus sanguis* in granulocyte Colony-stimulating factor transgenic mice---microbiologic model for Behcet's disease. pp139-142, Behcet's disease. Design mecca Publishing Co., Korea, 2001
4. 磯貝恵美子：犬のライム病。 動物の感染症 (分担執筆)、P. 326 - 327, 近代出版、2002

原著

1. Watarai, S., Tana, Inoue, K., Kushi, Y., Isogai, E., Yokota, K., Naka, K., Oguma, K., and Kodama, H. Inhibition of Vero cell cytotoxic activity in *Escherichia coli* O157:H7 lysates by globotriaosylceramide, Gb3, from bovine milk. Biosci. Biotechnol. Biochem., 65 (2), 414-419, 2001.
2. Isogai, E., Isogai, H., Hirose, K., Hayashi S., and Oguma, K. In Vivo Synergy between Green Tea Extract and Levofloxacin against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Infection. Current Microbiology. 42, 248-251, 2001.
3. Isogai, E., Isogai, H., Hirose, K., Kubota, T., Kimura, K., Fujii, N., Hayashi, S., Takeshi, K., and Oguma, K. Therapeutic effect of anti TNF- α and levofloxacin (LVFX) in a mouse model of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection. Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis. 24, 217 - 231, 2001
4. Matsuo, K., Isogai, E., and Araki, Y. Structural characterization of the O-antigenic polysaccharide chain of *Porphyromonas circumdentaria* NCTC12469. Microbiol. Immunol. 45(4), 299-306, 2001
5. 広瀬公治、磯貝恵美子、水谷博幸、小林美智代 *Porphyromonas*

*gingivalis*線毛はヒト血管内皮細胞に付着する 東日本歯学雑誌 20(1), 1-6,
2001

2. 国際学会発表

1. Kawahara, M, Isogai E., Suto, C., Shibata, S., Fujita, H., Nishioka, Y., Tsuji, Y., Rikihisa, Y. Detection of 16S rRNA genes of several Ehrlichia spp. In ticks in Japan and USA, and serosurvey for human exposure to *Ehrlichia muris* and the HE agent in area where Lyme disease is endemic. 101th General Meeting of American Society for Microbiology, Orland, Florida, USA, May 20-24, 2001.
2. Miura, H., Isogai, E., Kotake, S., Fujino, Y., and Kawashima, H. Perceived oral health status, oral function and related behavior among the patients of Behcet's disease. IADR (International Association for Dental Research), 79th General Session & Exhibition, Chiba, Japan, 2001.
3. Kobayashi S. M., Isogai, E., Mizugai, H., Hirose, K. *Porphyromonas gingivalis* proteases degradate IL-8 and MCP-1 secreted by human endothelial cells. IADR, 80th General Session & Exhibition, San Diego, USA, 2002.

H. 知的財産権の出願、登録状況
特記事項なし。

ベーチェット病に対するネオーラル療法

分担研究者 小竹 聡 北海道大学眼科講師

共同研究者 吉沢 史子、東 こずえ、合田 千穂、南場 研一 北海道大学眼科

研究要旨 従来のシクロスポリンであるサンディミュンは、脂溶性のため胆汁酸分泌量や食事の影響による吸収の変動が指摘されていた。それに代わるネオーラルはマイクロエマルジョン前濃縮製剤であり安定した吸収が期待されている。北大眼科通院中のベーチェット病患者で、最近1年間、サンディミュンからネオーラルに切替えた15例及びネオーラル新規投与3例について、眼症状、眼外症状、シクロスポリン血中濃度、腎機能、肝機能、血圧について診療録より調査した。

ネオーラル投与後6か月間で、眼発作回数が減少した症例は切替え例で2例、新規投与例では全例であった。眼外症状は切替え例では変化がなく、新規投与例では2症例の症状が改善した。

シクロスポリン血中濃度は14例で変化なく、1例で上昇がみられたが全身症状に変化はなかった。

全身症状では、切替え例では消化器症状3例(20%)、頭痛2例(13%)、耳鳴、関節痛、肝機能障害、が各1例(7%)みられたが、全て軽症にて1週間以内に軽快した。新規投与例では、消化器症状1例(33%)、頭痛1例(33%)、発汗1例(33%)がみられた。

以上の結果より、ネオーラルはサンディミュンとほぼ同様の投与方法でベーチェット病に使用できると考えられた。

A. 目的

従来のシクロスポリンであるサンディミュンは、脂溶性のため胆汁酸分泌量や食事の影響による吸収の変動が指摘されていたが、それに代わるネオーラルはマイクロエマルジョン前濃縮製剤であり安定した吸収が期待されている。今回我々は、ベーチェット病患者において、ネオーラル療法を行いその効果を検討した。

B. 研究方法

北大眼科通院中の眼症状を有するベーチェット病患者で2000年9月から2001年9月の期間サンディミュンからネオーラルに切替えた15例及びネオーラル新規投与3例を対象とした。切替え例では切替え前後でシクロスポリンは同量投与とした。いずれの症例も、眼症状、眼外症状、シクロスポリン血中濃度、腎機能、肝機能、血圧について診療録より調査した。

C. 結果

- 1) 切替え前後1か月のシクロスポリントラフ値を比較すると、14例で変化はなかったが1例のみ極端にトラフ値が上昇した。しかし全身症状に変化はなかった。(図1)
- 2) 新規投与3例の血中シクロスポリン濃度日内変動を測定すると、いずれも4時間以内にピーク

がみられ、ネオーラルの腸管吸収性の良さが反映された。(図2)

- 3) 眼発作回数を切替え前後6か月で比較してみると13例が症状が安定しており、変化はなかった。2例が発作回数が減少していた。新規投与例では、いずれも発作回数は減少した。
- 4) 切替え前後6か月での眼外症状を比較すると、明らかに増加、減少した症状はなく、切替え前から認められ切替え後も不変だったのが、口腔内アフタ4例、毛嚢炎様皮疹7例、結節性紅斑1例であった。新規投与後6か月の眼外症状は、口腔内アフタ不変1例、減少1例。毛嚢炎様皮疹不変1例、減少1例。外陰部潰瘍不変1例であった。
- 5) 切替え後に認められた全身症状で、最も多かったのが胃痛、もやもや感といった消化器症状が3例(20%)。次に、頭痛2例(13%)、耳鳴、関節痛肝機能障害、動悸が各1例(7%)であった。しかし全て軽症にて1週間以内に軽快した。新規投与例では、消化器症状1例(33%)、頭痛1例(33%)、発汗1例(33%)であった。

D. 考察

切替え例で、眼発作回数が減少した2例は、観察期間6か月を過ぎるとは再び発作回数が増加しており、長期的にみるとサンディミュンとネオーラル

の効果は同等と考えられた。しかし、今回の調査では、ほとんどが発作のない落ち着いた症例であったため、効果の判断は困難であり、今後も多くの症例の観察が必要と考えられた。

全身症状では神経ベーチェットなど、重篤な副作用はなかったが調査対象数が少なかったため、今後も慎重な投与が必要であると考えられた。

E. 結論

ネオーラルはサンデイミュンと同様の投与方法でベーチェット病に使用できると考えられた。

トラフ値の推移

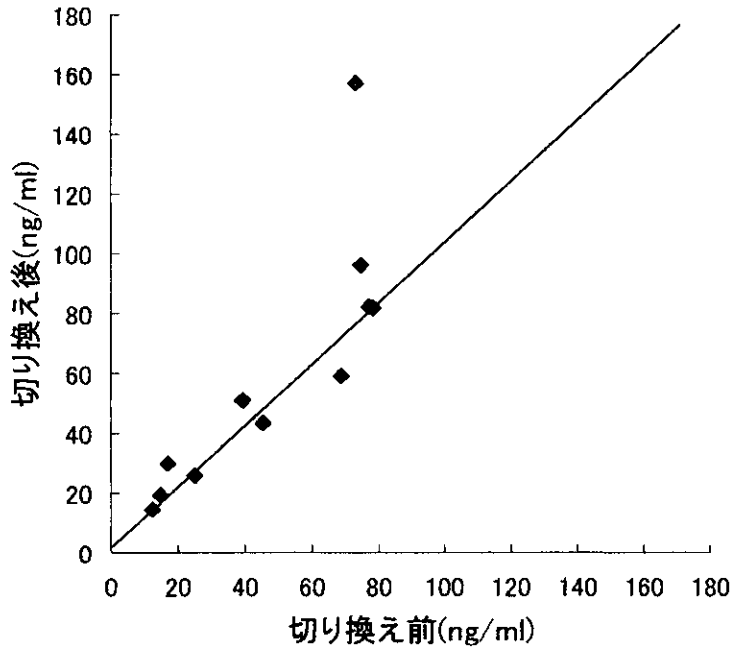


図1 切換え前後1か月のシクロスポリントラフ値の推移

血中シクロスポリン濃度日内変動

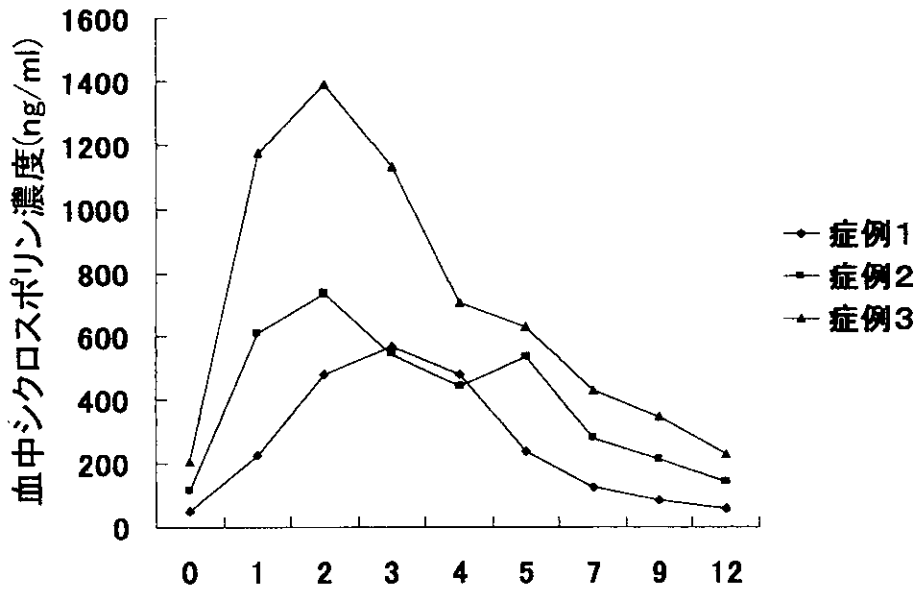


図2 新規投与3例のシクロスポリン血中濃度日内変動

ベーチェット病に対するシクロスポリンMEPC製剤の臨床成績

分担研究者	藤野雄次郎	東京厚生年金病院眼科
	佐藤伸平	東京大学医学部眼科
	蕪城俊克	東京大学医学部眼科
	渋井洋文	東京大学医学部眼科
	本山祐大	東京大学医学部眼科
	秋山和英	東京大学医学部眼科
	吉田 淳	東京大学医学部眼科
	沼賀二郎	東京大学医学部眼科
	川島秀俊	東京大学医学部眼科

研究要旨 シクロスポリンマイクロエマルジョン(MEPC)は、脂溶性のため吸収の不安定であった従来型シクロスポリン製剤に比べ、安定した血中濃度と治療効果を示すことが期待されている製剤である。眼症状を有するベーチェット病患者のうち、従来型シクロスポリンから同量のMEPC製剤に切替えた症例18例(男性14例、女性4例)の経過をretrospectiveに調査した。切替え前後で他の併用内服薬の投薬が同一であった期間における全血濃度(トラフ値)、発作頻度を比較した。平均観察期間は従来型シクロスポリンで 15.6 ± 15.5 ヶ月、MEPC製剤で 4.4 ± 3.2 ヶ月であった。従来型製剤使用中及びMEPC製剤使用中の全血濃度(投薬量mg/kgあたりのトラフ値ng/ml)は、平均 30.1 ± 15.4 、 30.0 ± 15.1 ng.kg/mg.mlであった。また血中濃度の測定時毎のばらつき(変動係数)は従来型で平均40%、MEPC製剤で平均27%であった(Student's t-test: $p=0.26$)。変動係数の減少した症例は10例(56%)、増加した症例は3例(17%)であった。また、眼発作頻度は従来型製剤使用中で平均 0.50 ± 0.46 回/月、MEPC製剤使用中で平均 0.37 ± 0.50 回/月であった(Student's t-test: $p=0.39$)。発作回数が減少した症例は11例(61%)、増加した症例は5例(28%)であった。一方、MEPC製剤切替え後に認められた副作用として、歯肉炎(1例)が認められた。MEPC製剤への切替え症例では、従来型製剤と同等の血中濃度が得られており、かつ測定時毎のばらつきは減少した。眼発作回数も減少する症例が多かったことから、眼発作の頻度が高く活動性の高い症例では、副作用に注意しながら切替えを試みて良いものと考えられる。

A. 研究目的

現在、ベーチェット病眼症に対する内服治療薬としてはコルヒチン、シクロスポリン、ステロイド、その他の免疫抑制剤が用いられている。シクロスポリンはベーチェット病に

対する二重盲検法を用いた臨床試験において、その有効性が確立されて以来¹⁾、一般的に使用されるようになっている。しかし、従来型のシクロスポリン製剤は脂溶性であった為、腸管からの吸収に際して胆汁分泌などの影響

を受けやすく、不安定となりやすい問題があった。Mullerらは脂肪を多く含む食事の後では血中濃度がpeakに達するまでの時間が延長し、AUC(area under the concentration time curve)が37%上昇することを報告している²⁾。

このような問題点を改善するため開発されたシクロスポリンマイクロエマルジョン前濃縮製剤(MEPC)は水に触れると機械的攪拌なしにマイクロエマルジョンを形成し、水溶性のような挙動を示す新しいシクロスポリン製剤である。本製剤により従来型製剤に比べて用量調節の精度が向上し、より安定した効果と安全性が得られることが期待されている³⁾。

今回我々はシクロスポリン従来型製剤を使用中のベッチェット病患者に対し、同用量のMEPC製剤への切り替えを行い、その経過をretrospectiveに調査した。

B. 研究方法

対象は東大病院、東京厚生年金病院、自治医大病院の眼科に通院中の眼症状を有するベッチェット病患者18例(男性14例、女性4例。平均年齢 42.0 ± 10.9 歳)で、病型は完全型7例、不全型11例であった。

シクロスポリン従来型製剤を使用中のベッチェット病患者に対し、他の内服薬(コルヒチン、ステロイド)は変更せず、同用量のMEPC製剤への切り替えを行い、その前後の臨床経過をretrospectiveに調査した。平均観察期間は従来型製剤の使用期間が 15.6 ± 15.5 ヶ月、MEPCの使用期間は 4.4 ± 3.2 ヶ月であった。検討項目は服用期間中の眼発作回数、血中トラフ濃度($\text{ng} \cdot \text{kg}/\text{ml} \cdot \text{mg}$)、副作用の三点である。さらに各症例について、変薬前後の血中トラフ濃度の変動を見るため、変動係数(CV値)を計算した。CV値は各症例のトラフ濃度について、その標準偏差を平均値で割ったもので、トラフ濃度の平均に対して、測定回毎のばらつきが相対的にどれだけ

大きいかを示す。

C. 研究結果

従来型製剤使用時とMEPC変薬後の発作頻度を比較すると、一ヶ月あたりの発作回数で、従来型製剤 0.50 ± 0.46 回、MEPC 0.37 ± 0.50 回であり、全18症例中、発作頻度の増加した症例は5例、減少した症例が11例、経過観察期間中に一度も発作を起こしていない症例が2例であった(図1)。統計的には有意な差を認めなかった(n.s.; Student's t-test)。

従来型製剤、MEPCのそれぞれについて服用期間中のシクロスポリントラフ濃度の平均値を比較した。全18症例中、従来型製剤使用中に薬物血中濃度が測定されていなかった1例を除外した残り17例での比較を行った。結果は従来型製剤で 30.1 ± 15.4 ($\text{ng} \cdot \text{kg}/\text{mg} \cdot \text{ml}$)、MEPCで 30.0 ± 15.1 ($\text{ng} \cdot \text{kg}/\text{mg} \cdot \text{ml}$)であった。平均トラフ濃度の増加した症例は7例、減少した症例は10例であった(図2)。従来型製剤使用時とMEPC使用時との間に統計的な有意差は認められなかった(n.s.; Student's t-test)。

従来型製剤使用期間、MEPC使用期間共にそれぞれ複数回の血中濃度測定が行われていた症例13例について、変薬前後の血中トラフ濃度の変動を見るため、変動係数(CV値)を計算した。従来型製剤使用中のCV値は 0.40 ± 0.31 、MEPC使用中では 0.27 ± 0.15 であった。変薬前後でCV値が増加した症例は3例、減少した症例は10例であった(図3)。CV値が減少した症例が多かったが、やはり統計的には有意差は認められなかった(n.s.; Student's t-test)。

今回調査した症例の中でシクロスポリンによる副作用と思われる症状が出現していたのは歯肉炎を生じた1例のみであった。症例は50歳男性、不全型。従来型製剤 $3\text{mg}/\text{kg}$ から同量のMEPC製剤に切り替えたところ、2ヵ月後に副作用と思われる歯肉炎が出現した。