

5. *Campylobacter jejuni* リポ多糖感作による ギラン・バレー症候群疾患モデル

分担研究者 結城 伸泰（獨協医科大学内科学（神経）助教授）

研究要旨

目的：ギラン・バレー症候群における分子相同性仮説を立証する。

対象と方法：*Campylobacter jejuni* (CF 90-26) からリポ多糖を精製した。ウサギ 23羽に *C. jejuni* リポ多糖を 2.5 mg (n=15) もしくは 10 mg (n=8) とアジュバントを 3週毎に皮下注射した。

結果：IgG 抗 GM1 抗体産生が誘導された。リポ多糖を 2.5 mg ずつ感作した群では 3羽 (20%) に、10 mg ずつ感作した群では全例に運動麻痺が生じた。脊髓前根の軸索に IgG が沈着していた。坐骨神経に Waller 様の変性像がみられた。脱髄像やリンパ球の浸潤はみられなかった。これに対して、アジュバント対照群や *E. coli* K12、*Salmonella minnesota* R595 のリポ多糖を感作したウサギでは、抗 GM1 抗体の誘導や運動麻痺はみられず、病理組織学的にも異常なかった。

結論：*C. jejuni* のリポ多糖を感作して、軸索型ギラン・バレー症候群の疾患モデルを樹立できた。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群は、先進国における、急速に四肢の筋力低下をきたす疾患の中で最も頻度が高い。ギラン・バレー症候群患者の 3分の2 に種々の感染が先行する。なかでも、急性下痢症の主要な原因であるグラム陰性桿菌 *Campylobacter jejuni* 感染が、ギラン・バレー症候群発症に先行することが多い。ギラン・バレー症候群の治療として血漿交換が有効であることから、末梢神経に対する自己抗体がギラン・バレー症候群発症に関与すると考えられてきた。われわれは、*C. jejuni* 感染後軸索型ギラン・バレー症候群患者の急性期の血清中に IgG 抗 GM1 抗体が上昇していることを見出した (Yuki et al., 1990)。

ウシ脳から抽出されたガングリオシドが、種々の神経疾患の治療薬として西欧、南米で広く使用されていた。ガングリオシド治療後に発症した筋萎縮性側索硬化症様の患者をわれわれが報告して以降 (Yuki et al., 1991)、ウシ脳ガングリオシド注射後に発症したギラン・バレー症候群患者の報告が相次いだ。こうした副作用症例の存在から逆に、ギラン・バレー症候群の先行感染の病原体がガングリオシド様構造を有することが示唆された。軸索型ギラン・バレー症候群患者から分離された *C. jejuni* リポ多糖の末端の構造 (Gal β 1-3 GalNAc β 1-4 [NeuAc α 2-3] Gal β) が GM1 の末端の 4 糖の構造と完全に一致していることを明らかにした (図 1; Yuki et al., 1993)。この研究により、ギラン・バレー症候群

患者から分離された病原体と神経とが糖鎖相同性を有することが明らかにされた。

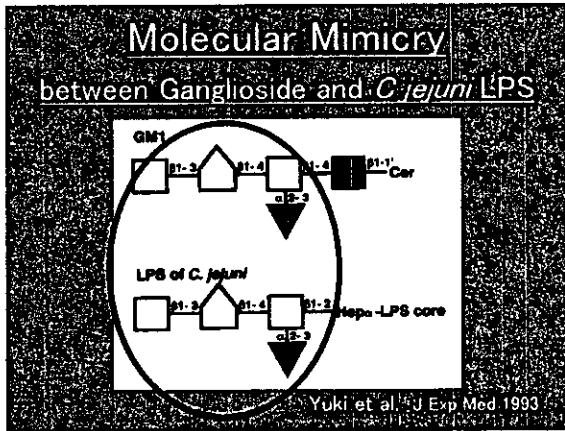


図 1

われわれは最近、GM1 をウサギに感作することにより、軸索型ギラン・バレー症候群のモデル動物を樹立した (Yuki et al., 2001)。

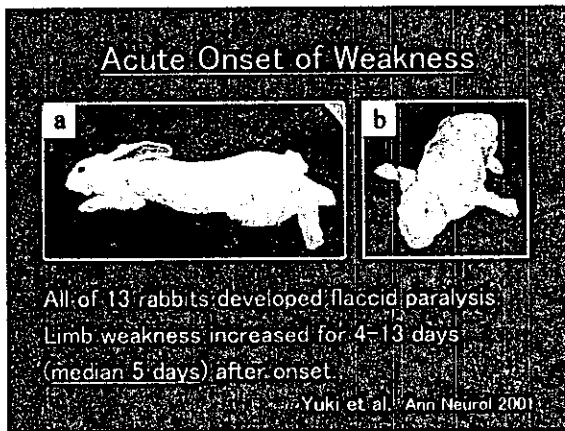


図 2

本研究では、ギラン・バレー症候群発症における分子相同性仮説を立証するために、*C. jejuni* のリポ多糖を感作してギラン・バレー症候群のモデル動物の作成を試みた。

B. 研究方法 と C. 研究結果

ギラン・バレー症候群患者から分離された *C. jejuni* (CF 90-26) からリポ多糖を精製した。
Japanese white rabbit 23 羽に *keyhole limpet*

hemocyanin 1 mg、完全 Freund アジュバントと *C. jejuni* リポ多糖 を 2.5 mg (n=15) もしくは 10 mg (n=8) を 3 週に 1 回皮下に感作を繰り返した。IgM 抗 GM1 抗体産生が誘導されたばかりでなく、IgG ヘクラススイッチした。リポ多糖 を 2.5 mg ずつ感作した群では 3 羽 (20%) に、10 mg ずつ感作した群では全例に運動麻痺が生じた (図 3)。

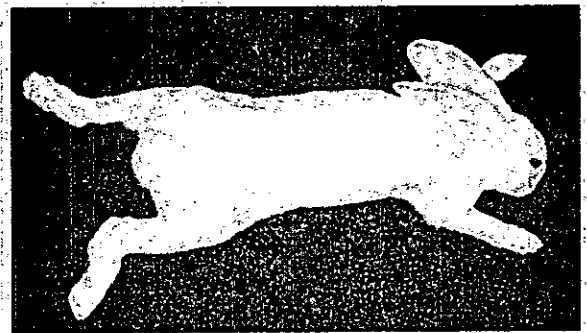


図 3

脊髄前根の軸索周囲に IgG が沈着していた (図 4)。

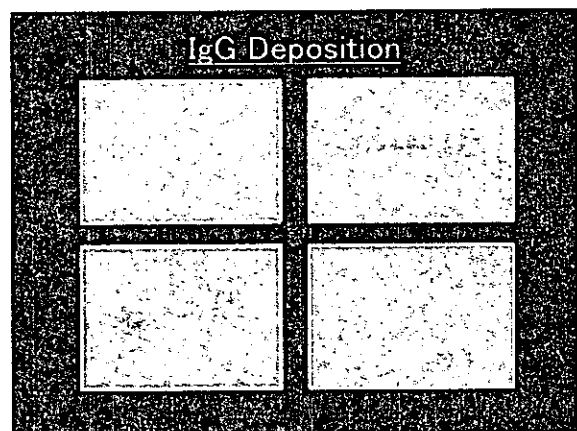


図 4

坐骨神経に Waller 様の変性像がみられた (図 5)。脱髄像やリンパ球の浸潤はみられなかった。

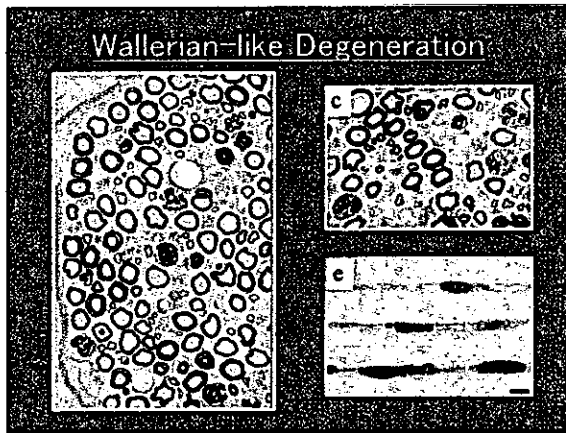


図 5

これに対して、アジュバント対照群 10 羽では、抗 GM1 抗体も誘導されず、1 羽も発症しなかった。病理組織学的にも明らかな変化はみられなかった。*E. coli* K12、*Salmonella minnesota* R595 のリボ多糖を感作したウサギでも抗 GM1 抗体は誘導されず、運動麻痺を呈さず、病理組織学的にも異常はみられなかった。

(倫理面への配慮)

ペントバルビタール 60-230 mg/kg を腹腔内投与し、十分に麻酔をかけて解剖した。

D. 考察

自己免疫疾患の発症機構は未だ明らかにされていない。多くの仮説が呈示されているが、その中でも「微生物と宿主との分子相同性が存在し、それが引き金となり自己免疫応答が誘導され、発症に至る」分子相同性仮説は魅力的である。たしかに、数多くの研究により微生物と宿主との間に分子相同性が存在することが示されている。しかしながら、ほとんどの自己免疫疾患では微生物感染との疫学的な関係は明らかにされていない。例えば、多発性硬化症では *Chlamydia pneumoniae* を含めた多くの感染因子との関係が取り沙汰されてきたが、疫学的には確立されていない。また、実際の患者で相同性を有する分子に反応する自己抗体や自己反応性 T 細胞が誘導

されている証拠も、ほとんどの疾患では見つからない。こうしたことから、分子相同性仮説に疑問をもつ免疫学者も少なくない。

しかしながら、ギラン・バレー症候群では *C. jejuni* との疫学的な関係が確立している(表 1)。

表 1

<i>C. jejuni</i> & GBS			
CRITERION	PATIENTS (N = 103)*	HOUSEHOLD CONTROLS (N = 94)†	P VALUE
	number (percent)		
Positive stool culture	8 (8)	1 (1)	0.04
Elevated immunoglobulin levels, negative stool culture	14 (14)	0	<0.001
History of diarrhea, elevated IgA or IgG levels, negative stool culture	5 (5)	1 (1)	0.21
Total	27 (26)	2 (2)	<0.001

Rees et al. N Engl J Med 1995

また、われわれの一連の研究により、*C. jejuni* 菌体成分がヒト末梢神経の構成成分である GM1 と相同性を有することが明らかにされているばかりでなく、GM1 に反応する IgG クラスの自己抗体が急性期の患者血中に見出されている。さらに、本研究において、患者から実際に分離された *C. jejuni* から精製した GM1 様リボ多糖を動物に感作して、ヒト軸索型ギラン・バレー症候群の疾患モデルを作成することができた。自己免疫疾患発症における分子相同性仮説が正しいことを示す確証が得られた。

C. jejuni 腸炎後ギラン・バレー症候群の発症機序として、GM1 様リボ多糖を有する *C. jejuni* に感染し、IgG 抗 GM1 抗体が誘導され、血液神経関門の脆弱な脊髄前根の GM1 に抗 GM1 抗体が結合し、軸索の機能が障害されて、筋力が低下すると考えられる。さらに、沈着した IgG に引き寄せられたマクロファージが軸索を傷害し、軸索型ギラン・バレー症候群に至るのであろう(図 6)。

E. 結論

本疾患モデルは、分子相同性仮説を支持する直接的な証拠のひとつとなるであろう。

2. 実用新案登録:なし

3. その他:なし

参考文献

- Yuki N, et al. Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following *Campylobacter* enteritis. *Neurology* 1990;40:1900-2.
- Yuki N, et al. Motoneuron-disease-like disorder after ganglioside therapy. *Lancet* 1991;337:1109-10.
- Yuki N, et al. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med* 1993;178:1771-5.
- Yuki N, et al. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 2001;49:712-20.
- Yuki N. Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barré and Fisher syndromes. *Lancet Infect Dis* 2001;1:29-37.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (論文準備中)

2. 学会発表

結城伸泰、古賀道明、薄敬一郎、西本幸弘、平田幸一。

Campylobacter jejuni リポ多糖感作による軸索型 Guillain-Barré 症候群モデル動物の樹立。

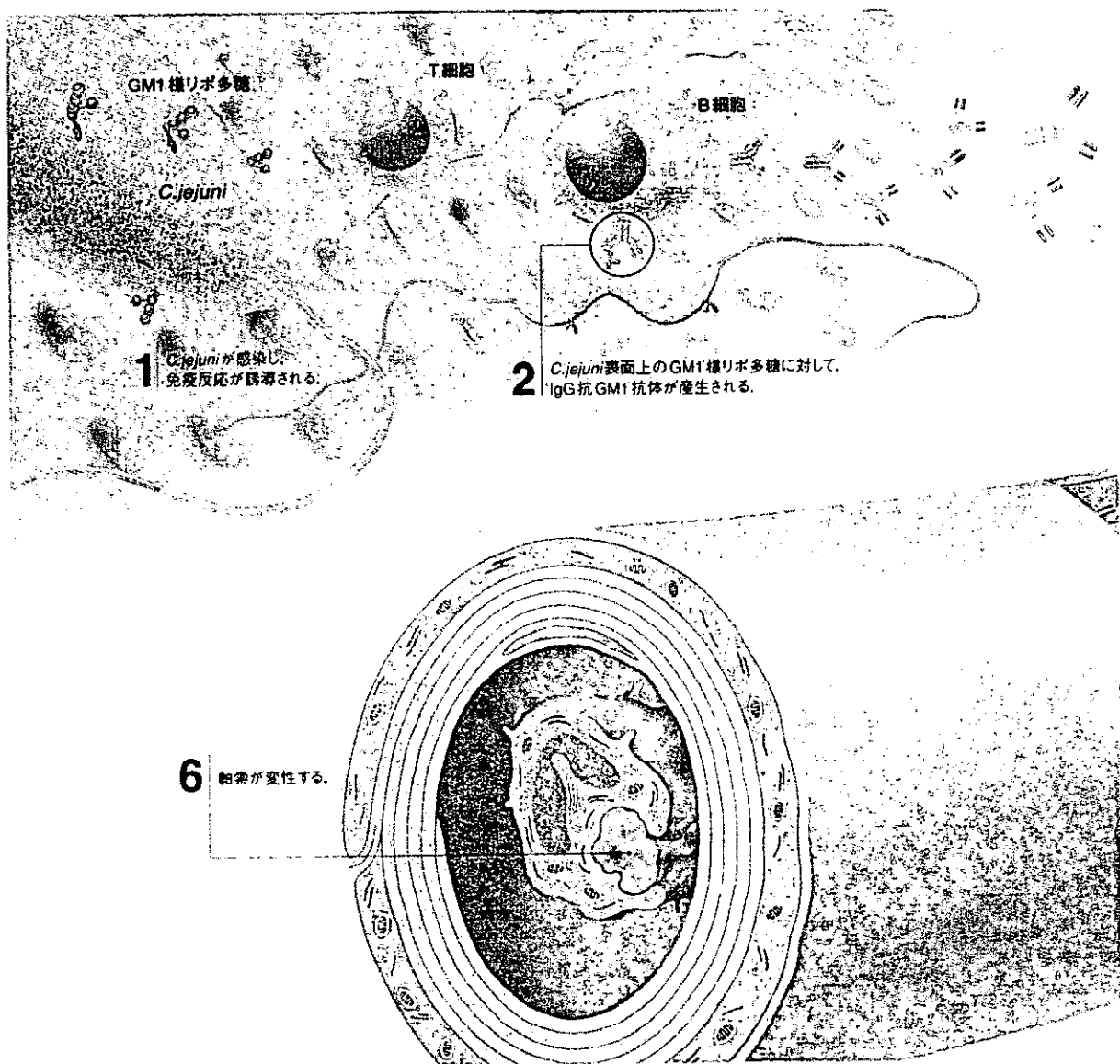
2002年5月31日、札幌で開かれる日本神経学会で発表予定。

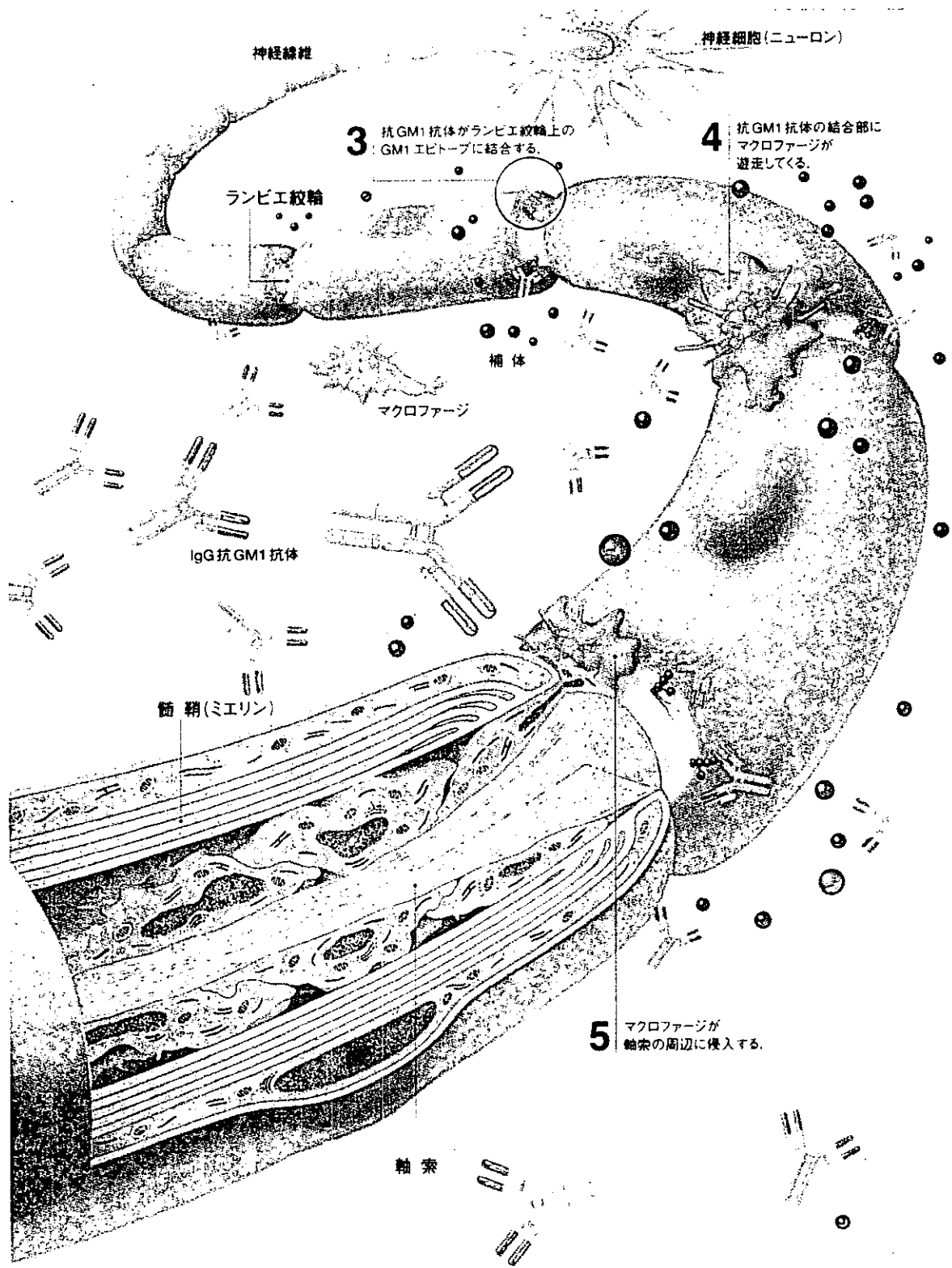
H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得:なし

図6 C. jejuni 先行感染により誘導されたIgG抗GM1抗体がギラン・バレー症候群を引き起こす

免疫遺伝学的に特定の背景をもつ患者がGM1様リポ多糖を有する *C. jejuni* に感染すると、IgG抗GM1抗体が産生される。大量に産生された抗GM1抗体は、血液神経関門の脆弱な運動神経のランビエ絞輪部や、神経・筋接合部前シナプス側にあるGM1に結合する。そこに、補体が結合し、マクロファージが遊走してきて、運動神経の軸索の周囲に侵入し、軸索を変性させる。





神経線維

神経細胞(ニューロン)

3 抗GM1抗体がランビエ紋輪上のGM1エпитープに結合する。

4 抗GM1抗体の結合部にマクロファージが遊走してくる。

ランビエ紋輪

補体

マクロファージ

IgG抗GM1抗体

筋鞘(ミエリン)

5 マクロファージが軸索の周辺に侵入する。

軸索

6. ギラン・バレー症候群の病因因子の解明と その予防に関する研究

分担研究者 高 昌星（信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科教授）
研究協力者 小穴 こず枝、川上 由行

研究要旨 ギラン・バレー症候群（Guillain-Barré syndrome: GBS）は先行感染の後 1～2 週間後に免疫学的機序により発症する炎症性末梢神経炎であるが、その詳細な発症機序は不明である。GBS は現在、上気道感染を先行感染とする急性炎症性脱髄性 polyneuropathy (AIDP) と下痢等の下部消化管症状を先行感染とする急性運動軸索型神経炎 (AMAN) などいくつかに分類されるようになってきているが、AMAN の発症に *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) 感染との関連が注目されている。AMAN の発症に抗ガングリオシド抗体が関与しているとの報告が最近多いが、抗ガングリオシド抗体病因説については 1) 先行感染から発症までの期間が GBS では通常 2 週間であり、抗体で発症するには短期間過ぎる、2) ガングリオシドは生体の構成成分として中枢神経系を始めとして多くの臓器に分布するが、なぜ末梢神経のみが選択的に障害されるのかなどいくつかの疑問点があり、これまでの研究からは細胞性免疫が GBS の発症に重要であるとの証拠が蓄積されている。GBS に関わる *C. jejuni* の血清型別では Penner の 19 が多いとするもの、26 が多いとするものの他、他の型も GBS 患者から分離されている。本研究では季節における *C. jejuni* の分離菌株の血清型を鑑別し、異なる血清型における共通抗原の GBS 惹起性 T-cell epitope を決定し、GBS の発症機序の解明とその予防に役立てようとした。その結果、A 群 (1, 44 型) を除くその他の菌株に関しては、2000 年(8-11 月) と 2001-2002 年では、分離菌株の型別された血清型に違いがみられた。今回の結果は、既報 (Penner ら、Karmali ら、Sjögren ら) とは必ずしも一致していない。O 群 (19 型) に関しては、まれに存在する血清型ではなく、2001-2002 年では 10.2% の分離率であり、2 年間を通して 2 番目に多い分離菌株であった。今後、GBS を惹起する可能性のある菌株を培養し、異なる血清型における共通抗原の GBS 惹起性 T-cell epitope を決定し、GBS の発症機序の解明とその予防に役立てる。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群 (Guillain-Barré syndrome: GBS) は先行感染の後 1～2 週間後に免疫学的機序により発症する炎症性末梢神経炎であるが、その詳細な発症機序は不明である。GBS は現在、上気道感染を先行感染とする急性炎症性脱髄性 polyneuropathy (AIDP) と下痢等の下部消化管症状を先行感染とする急性軸索型運動ニューロパチー (AMAN)、急性軸索型運動

感覚ニューロパチー (AMSAN) などいくつかに分類されるようになってきているが、AMAN の発症に *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) 感染との関連が注目されている。GBS の先行感染の 10～30% に *C. jejuni* 感染がみられるとの報告もある。*Campylobacter* 属菌は、15 菌種、9 亜種に分類されている。ヒトの下痢症から分離される菌種は、*Campylobacter jejuni* が 95～99% を占め、*C. coli* は数%に過ぎない。*C. jejuni* はグラム陰性のらせん状桿菌で単極または両極に 1 本

の鞭毛を有している。*C. jejuni* および *C. coli* は、家畜・家禽、野生動物の腸管に保菌されており、保菌動物の排泄物で汚染された食肉、牛乳、飲料水がヒトへの主要な感染源となる。ヒトに感染すると3~5日の潜伏期を経て、下痢、腹痛、発熱、嘔吐、悪寒、倦怠感などをの症状をもたらす。散発下痢症における *C. jejuni* の検出率は、小児では15-25%と高く起因菌の第1位を占め、成人でも5-10%の頻度で糞便から検出される。*C. jejuni* 感染症は、一般的に予後は良好であるが、近年、*C. jejuni* 腸炎とGBS、特にAMANとの関連が注目されるようになってきた。

AMANの発症に抗ガングリオシド抗体が関与しているとの報告が最近多いが、抗ガングリオシド抗体病因説については1) 先行感染から発症までの期間がGBSでは通常2週間であり、抗体で発症するには短期間過ぎる、2) ガングリオシドは生体の構成成分として中枢神経系を始めとして多くの臓器に分布するが、なぜ末梢神経のみが選択的に障害されるのかなどいくつかの疑問点があり、これまでの研究からは細胞性免疫がGBSの発症に重要であるとの証拠が蓄積されている。GBSの発症に *C. jejuni* 感染との関連が注目されているが、*C. jejuni* の血清型別ではPennerの19が多いとするもの、26が多いとするものの他、他の型もGBS患者から分離されている。これまで報告されているものでは、Pennerの血清型で、1、2、4、5、7、10、16、19、23、37、44、64が報告されている。本研究では季節における *C. jejuni* の分離菌株の血清型を鑑別し、異なる血清型における共通抗原のGBS惹起性T-cell epitopeを決定し、GBSの発症機序の解明とその予防に役立てる。

B. 研究方法

ミロクメディカルラボラトリーから分与された *C. jejuni* 54株を用いた。内訳は、2000年8-11月分離菌株17株、2001年11月-2002年2月分離菌株37株である。マイクロバンク (Pro-Lab Diagnostics) を使用して-80℃にて凍結保存してあった供試菌株を5%羊血液寒天平板培地に接種し、微好氣的条件(10% CO₂)下で35℃、48時間培養した。発育菌苔の独立集落を釣菌し、5%羊血液寒天平板培地により前述と同様な方法で純培養を行った。これらの菌株について、Pennerが提唱した耐熱性抗原によ

る血清型別法を基本とする受身赤血球凝集反応(PHA)を用い、血清型別を行った。亜硝酸抽出法で抽出された *Campylobacter* の耐熱性血清型特異抗原はヒヨコ血球に吸着され、さらに、この抗原感作固定血球と抗血清を混合すると特異的に反応して凝集が観察される。使用した免疫血清はA~G、I~L、N、O、P、R、S、U、V、Y、Z、Z₂~Z₇群の25種類である。固定ヒヨコ赤血球は一日齢新鮮ヒヨコ赤血球をアルデヒドで固定処理した後、生理食塩液で1.5%に浮遊したものをを用いた。

C. 研究結果

2000年(8-11月)分離菌株の血清型は *C. jejuni* 17株のうち11株は判定可能であった。血清型分布は、A群(1、44型)、G群(8型)、L群(15型)、およびY群(37型)が各2株(11.8%)であり、D群(4、13、16、43、50型)、N群(18型)、およびO群(19型)が各1株(5.9%)であった(Table)。2001年11月-2002年2月分離菌株の血清型では37株のうち30株が判定可能であった。血清型分布は、A群(1、44型)が8株(21.6%)、B群(2型)およびO群(19型)が各4株(10.8%)、D群(4、13、16、43、50型)が3株(8.1%)、L群(15型)およびR群(23、36、53型)が各2株(5.4%)であった。C群(3型)、G群(8型)、I群(10型)、N群(18型)およびZ5群(52型)が各1株(2.7%)であった。J群(11型)およびL群(15型)の複合型が2株(5.4%)存在していた(Table)。A群(1、44型)を除くその他の菌株に関しては、2000年(8-11月)と2001-2002年では、分離菌株の型別された血清型に違いがみられた(Table)。

本邦のGBSでよくみられると言われていたO群(19型)に関しては、まれに存在する血清型ではなく、2001-2002年では10.2%の分離率であり、2年間を通して2番目に多い分離菌株(10.2%)であった(Table)。

D. 考察

Karmaliらは、1978-1980年の3年間に、小児病院(Toronto, Canada)の胃腸炎患者から検出された285株の *C. jejuni* および *C. coli* を対象と

Prevalence of serotypes of *Campylobacter jejuni* isolates on the basis of soluble heat-stable antigens

Serotype	2000		2001-2002		Total	
	No. of strains	Frequency (%)	No. of strains	Frequency (%)	No. of strains	Frequency (%)
A (1, 44)	2	11.8	8	21.6	10	18.5
B (2)	0	0	4	10.8	4	7.4
C (3)	0	0	1	2.7	1	1.9
D (4, 13, 16, 43, 50)	1	5.9	3	8.1	4	7.4
E (5)	0	0	0	0	0	0
F (6, 7)	0	0	0	0	0	0
G (8)	2	11.8	1	2.7	3	5.6
I (10)	0	0	1	2.7	1	1.9
J (11)+L (15)	0	0	2	5.4	2	3.7
K (12)	0	0	0	0	0	0
L (15)	2	11.8	2	5.4	4	7.4
N (18)	1	5.9	1	2.7	2	3.7
O (19)	1	5.9	4	10.8	5	10.2
P (21)	0	0	0	0	0	0
R (23, 36, 53)	0	0	2	5.4	2	3.7
S (27)	0	0	0	0	0	0
U (31)	0	0	0	0	0	0
V (32)	0	0	0	0	0	0
Y (37)	2	11.8	0	0	2	3.7
Z (38)	0	0	0	0	0	0
Z2 (41)	0	0	0	0	0	0
Z4 (45)	0	0	0	0	0	0
Z5 (52)	0	0	1	2.7	1	1.9
Z6 (55)	0	0	0	0	0	0
Z7 (57)	0	0	0	0	0	0
Total typable	11	64.7	30	81.1	41	75.9
Not typable	6	35.3	7	18.9	13	24.1
Total	17	100	37	100	54	100

して、Penner らによる耐熱性(HS)抗原の血清型別を行っている。97%の分離菌株は55種類の抗血清により型別された。約半数の分離菌株は、2型(18.6%)、4型(11.2%)、3型(9.8%)および1型(8.8%)を占め、約3/4の分離菌株は、10種類の血清型別により型別されていた。また、血清型2型は、調査した3年間、毎年いずれも全分離菌株の15-20%と最も多くを占めていた。19型に関しては記載がない。

また、Sjögren らは、下痢症状を示した3ヶ月~60歳までの51名の患者(Kuwait, Sweden)から検出された *C. jejuni* および *C. coli* を対象として、耐熱性(HS)抗原および易熱性(HI)抗原の血清型別を行った。HS 抗原の血清型別の結果、78.4%の分離菌株は13種類の抗血清により型別された。主な血清型は4型(19.6%)、8型(13.7%)、13型(9.8%)、5型(5.9%)、25型(5.9%)であり、これらの血清型が全体の54.9%を占めていたと報告している。19型は51株中1株(2%)のみであった。

今回の我々のHS抗原血清型別の結果、主な血清型は、2000年(8-11月)分離菌株において菌株数が17株と少なかったが、A群(1、44型)、G群(8型)、L群(15型)、およびY群(37型)、2001-2002年分離菌株においてA群(1、44型)、B群(2型)、O群(19型)、D群(4、13、16、43、50型)であり、これらの血清型がそれぞれ全体の約50%を占めていた(Table)。特にA群(1、44型)が常に多く分布していたが、今回使用した血清型別用試薬では1型と44型との区別はできないため、Penner ら、Karmali らの報告と同様に1型が多く分離されるのかは確認できなかった。A群(1、44型)を除くその他の菌株に関しては、2000年(8-11月)と2001-2002年では、分離菌株の型別された血清型に違いがみられた(Table)。今回の結果は、既報(Penner ら、Karmali ら、Sjögren ら)とは必ずしも一致していない。本邦のGBSでよくみられると言われていたO群(19型)に関しては、まれに存在する血清型ではなく、2001-2002年では10.2%の分離率であり、2年間を通して2番目に多い分離菌株であった(Table)。

今後、GBSを惹起する可能性のある菌株を培養し、異なる血清型における共通抗原のGBS惹起性T-cell epitopeを決定して行く必要がある。そのため *C. jejuni* 感染動物および *C. jejuni* 感作動物における実験的自己免疫性神経炎におけるT-cell epitopeとB-cell epitopeを決定し、さらにGBS患者における *C. jejuni* 抗原反応性リンバ

球を検索し、GBS患者血中のT細胞プロファイルを検索する。以上から未だ不明である、ペプチドであろうと推定されるGBS惹起性ヒト末梢神経特異抗原の決定が期待され、GBSの発症機序の解明に飛躍的な進歩がみられ、GBSの治療のみならず、発症予防に飛躍的な発展が期待される。

E. 結論

GBS患者から分離された *C. jejuni* はPennerの耐熱性抗原による分類では1、2、4、5、7、10、16、19、23、37、44、64であるが、今回の結果は、既報(Penner ら、Karmali ら、Sjögren ら)とは必ずしも一致していない。O群(19型)に関しては、まれに存在する血清型ではなく、2001-2002年では10.2%の分離率であり、2年間を通して2番目に多い分離菌株(10.2%)であった。今後、GBSを惹起する可能性のある菌株を培養し、異なる血清型における共通抗原のGBS惹起性T-cell epitopeを決定し、GBSの発症機序の解明とその予防に役立つ。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekiguchi Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, Koh C-S: Brain derived gangliosides suppress the chronic relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. J Neuroimmunol, 116: 196-205, 2001
2. Inaba Y, Ichikawa M, Inoue A, Itoh M, Kyogashima M, Sekiguchi Y, Nakamura S, Komiyama A, *Koh C-S: Plasma thrombin-antithrombin III complex associated with the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurol Sci, 185: 89-93, 2001

3. Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koh C-S, Ohshima H, Yagita H, Mizuno Y, Okumura K: Amelioration of experimental auto-immune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: A critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. *J Immunol* 166: 2108-2115, 2001
4. Yahikozawa H, Palma JP, Dalcanto M, Kang H-K, Koh C-S, Kim BS: Increased susceptibility of C57L/J male mice after castration and restoration of resistance by treatment with estrogen to Theiler's virus induced demyelinating disease. *J Neuroimmunol*, (submitted)

H. 知的所有権の取得状況

なし

7. サルコイドーシスリンパ節における *P.acnes* DNA の組織内分布

分担研究者 江石 義信（東京医科歯科大学大学院病因・病理学助教授）

研究要旨 *P.acnes* とサ症肉芽腫形成との病因的関連を検証するために、本菌 DNA の組織内分布を ISH 法を用いて解析した。サ症 9 例、結核症 9 例、正常対照 9 例のリンパ節・パラフィン切片を用いた。ISH 法では、Digoxigenin を 3'-tailing 標識した 26 mer のオリゴプローブ(16S rRNA 由来)を用い、CSA 増感法を併用して DAB 発色系および FITC 蛍光系にて検出した。サ症肉芽腫内のシグナル密度は、サ症肉芽腫外のシグナル密度よりも有意($p < 0.001$)に高かった。サ症におけるシグナル密度は、肉芽腫内($p < 0.001$)および肉芽腫外($p < 0.007$)、いずれにおいても結核症および正常対照リンパ節に比べて有意に高かった。また、ISH 陽性シグナル密度は、同一検体における定量系 PCR 法による *P.acnes* ゲノム数と高い相関($r = 0.86, p < 0.001$)を示した。*P.acnes* DNA は肉芽腫内に集積しており本菌がサ症の原因である可能性が高い。

A. 研究目的

サルコイドーシス（以下サ症）は原因不明の全身性肉芽腫性疾患である。サ症は遺伝的に疾患感受性のある個体が、環境中のなんらかの原因物質（起因体）に曝露されて惹き起こされるものと考えられている。その起因体としていくつかの感染微生物が想定されてきたが未だ確定されたものはない。日本においては、*Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) が既にサ症病変部より培養されており、*P.acnes* あるいは *P. granulosum* の細菌ゲノムが日本人サ症患者のリンパ節から多量に検出されている。しかしながら、*P.acnes* は皮膚に常在性の細菌であり、サ症以外の疾患リンパ節からも少量ではあるが検出されることから、本菌のサ症起因体としての可能性に関しては未だ確定されるに至っていない。

一般に、肉芽腫反応とは細胞内停滞性抗原に対する宿主の防衛反応であり、病理学的には、炎症細胞を混じた類上皮細胞や巨細胞からなるマクロファージ由来の細胞集塊からなる。このような肉芽腫形成における基本原則に従えば、サ症の原因

として想定される原因物質（サ症起因体）は、サ症病変部において肉芽腫性炎症局所に集積して存在している必要がある。

本研究では、catalysed reporter deposition (CARD) という新しいシグナル増幅法を用いた高感度の *in situ* hybridization (ISH) 法を応用して組織切片中の *P.acnes* DNA の検出を行った。サ症病変部で肉芽腫性炎症部と非肉芽腫部それぞれの CARD シグナル数を光学顕微鏡下に測定しその組織内分布を検討するとともに、結核性肉芽腫病変や反応性リンパ節炎における測定結果とも比較した。また、CARD 法によるシグナル測定結果を quantitative real-time PCR (QPCR) 法によるゲノム定量結果と比較して、今回用いた組織学的な細菌 DNA 検出法の精度についても検討した。これらの組織学的解析から、サ症における常在菌 *P.acnes* の病因的因果関係を明らかにすることが本研究の目的である。

B. 研究方法

材料：材料としては、サ症患者 9 名からの前斜

角筋リンパ節生検、9名の頸部リンパ節結核症例、および対照として9名の反応性リンパ節炎症例を用いた。いずれもホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いた。CARD法とQPCR法にはそれぞれ隣接切片を用いた。

CARD法によるISH: Dako社製のGenPointキットをジゴキシゲニン(DIG)標識プローブ用に改変して用いた。*P.acnes*の16S rRNAから26merのオリゴヌクレオチドプローブを設計した。対照用プローブとして*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)および*Escherichia coli* (*E. coli*)に特異的なプローブを文献より引用して用いた。菌種特異性を検討するために、種々の菌50mgを静注して1時間後に屠殺したラット肝臓のパラフィン切片を用いた。導入されたビオチンにペルオキシダーゼ(HRP)標識アビジンを反応させ、DAB発色した後、ヘマトキシリンにて後染色した。

ISHと免疫染色による蛍光二重染色: HRP標識アビジンの代わりにFITC標識アビジンを用いてISHを完遂した後、抗CD68単クローン抗体(Kp-1, Dako社)による免疫染色をローダミン標識二次抗体を用いて二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

光学顕微鏡によるシグナル計数法: 高倍率(400倍)の光学顕微鏡下にCARDシグナル数を計測した。肉芽腫部および非肉芽腫部にわけてそれぞれ3箇所を設定し、1箇所につき5視野(250 μm^2 /視野)計15視野の平均値をその検体の測定値として解析した。

QPCR法: 既に報告されている江石らの方法に準じて、組織DNA500ngあたりの*P.acnes*ゲノム数を測定した。

統計学的解析: QPCRゲノム数およびCARDシグナル数の疾患群および肉芽種内外における比較のためにはMann-Whitney U testを用いた。また同一検体における両計測数の相関についてはSpearmanの相関係数を計算して解析した。

C. 研究結果

CARD法により、*P.acnes*を投与されたラット肝臓のクッパー細胞内に、黒褐色のドット状あるいは凝集塊状の陽性シグナルを検出した(Figure 1)。これらの陽性シグナルは

*granulosum*や*P. avidum*をはじめ、*P.acnes*以外に菌種を投与されたラット肝臓には認められず、また*H. pylori*や*E. coli*に対する対照プローブとは反応しないことから、本法が*P.acnes* DNAを特異的に検出していることが確認された(Table 1)。

サ症リンパ節においては、肉芽腫内の類上皮細胞および肉芽腫周囲の単核細胞(単球およびマクロファージ)の細胞質内に1個~数個の陽性シグナルが観察された(Figure 2a)。結核性リンパ節炎および反応性リンパ節炎の検体では、陽性シグナルは少数ながらもリンパ洞や傍濾胞領域に散見された。

サ症リンパ節の蛍光二重染色法においては、多くのCARDシグナルがCD68陽性細胞の局在と一致して観察された(Figure 2b)。シグナルは、CD68陽性細胞の集塊からなる肉芽腫性炎症局所にほぼ限局して集積しており、特に肉芽腫辺縁部において著明であった。

QPCR法によって、*P.acnes* DNAは、サ症において9例中8例(89%)と高率に検出されたが、結核症9例中1例(11%)および反応性リンパ節炎9例中2例(22%)にも検出された(Figure 3)。しかしサ症で検出された*P.acnes*ゲノム数は、結核症($p = 0.0017$)、反応性リンパ節炎($p = 0.0071$)のいずれとの比較においてもはるかに多量に認められた。

組織250 μm^2 あたりの平均CARDシグナル数を比較すると(Figure 4)、サ症リンパ節について肉芽腫内が肉芽腫外よりも有意に高く($p < 0.001$)、さらに後者のサ症リンパ節肉芽腫外シグナル数に限っても、結核肉芽腫内($p < 0.0023$)・肉芽腫外($p < 0.001$)、反応性リンパ節炎($p < 0.0071$)のすべてに対して高値を示した。結核性リンパ節については、肉芽腫内と肉芽腫外の間有意差を認めなかった。QPCR法にて*P.acnes* DNA陽性とされた結核性リンパ節炎1例および反応性リンパ節炎2例は、同一症例群内QPCR法陰性例と比較して、平均CARDシグナル数については差を認めなかった。全リンパ節材料について、QPCR法による*P.acnes*ゲノム数と、CARD法*P.acnes*シグナル数とは、有意な相関を示した($n = 27$, $r = 0.86$, $p < 0.001$; Figure 5)。

D. 考察

ISH 法は組織の形態を保ちつつ病原体を検出することから、組織中の病変部と病原体との分布を併せて把握することが可能である。しかし通常行われている ISH 法は特異性が高い一方で検出感度に限界があり、特にゲノムコピー数の少ない細菌を検出する際には、増感法の試みがいくつ報告されている。本研究では、パラフィン包埋組織切片中の *P.acnes* DNA を特異的かつ高感度に検出するために、ビオチン化タイラマイド沈着により ISH のシグナルを増幅する CARD 法を用いた。

サ症の起因体としては、生検リンパ節からの細菌培養に基づき *P.acnes* の可能性が提示されたものの、混入が疑われていた。しかし近年、QPCR 法による研究にて *P.acnes* ゲノム数は、他疾患と比較してサ症リンパ節に圧倒的に多量に検出されることが示されている。本研究に用いたリンパ節においても同様の結果が追試され、混入は否定的となり、QPCR 法の精度が再確認された。

P.acnes 由来抗原に対するクームス IV 型アレルギー反応により、サ症肉芽腫が形成される可能性を示唆する知見も報告されている。肉芽腫内にその起因抗原物質が存在する、という病理学総論を踏まえれば、サ症肉芽腫についてリンパ節病変内の *P.acnes* の局在を同定することは、サ症の病因を明らかにする上で重要である。

CARD 法を用いた本研究では、サ症リンパ節各病変について *P.acnes* DNA が肉芽種内に強く集積していることを証明した。

サ症肉芽腫辺縁部で *P.acnes* DNA を含む多数の単核細胞は、抗原提示マクロファージと考えられる。肉芽腫中心部で、*P.acnes* DNA 陽性の少数の類上皮細胞は、*P.acnes* を貪食したマクロファージから分化したもの、他方 *P.acnes* DNA 陰性の多くの類上皮細胞および巨細胞は、*P.acnes* 抗原刺激により Th1 細胞が局所産生したサイトカインに導かれ単球から分化したもの、にそれぞれ相当すると解釈できる。検出した *P.acnes* DNA が、食細胞内で消化抵抗性の生菌由来か、消化後の遺残物由来かは明らかでない。

QPCR 法で *P.acnes* DNA が検出されなかったサ症リンパ節 1 例は、CARD 法でも肉芽種内平均 *P.acnes* シグナル数がサ症全例中最低値を示し、*P. granulorum* DNA 陽性かつ *P.acnes* DNA 陰性の検体の可能性がある。

CARD 法 *P.acnes* シグナル数が QPCR 法による *P.acnes* ゲノム数と相関したことから、CARD 法の結果は信頼に足るものと言える。

本研究が明らかにしたサ症肉芽腫内への *P.acnes* DNA 集積の事実は、常在菌である本菌がサ症の病因に関与していることを、一層積極的に示すものである。

E. 結論

プローブ標識にビオチンポリマーを使用するとともに、タイラマイドを利用した高感度 CSA 法を用いることにより、*P.acnes* DNA の組織内局在を明瞭に検出することに成功した。類上皮細胞やマクロファージのマーカーである kp-1(CD68)抗体による蛍光抗体法と蛍光発色系 ISH 法との二重染色によって、*P.acnes* DNA が肉芽種内に集積していることが共焦点レーザー顕微鏡下に観察された。また、DAB 発色系によって、*P.acnes* DNA の局在を光学顕微鏡下に観察して、その陽性シグナルを計数した結果からも、*P.acnes* DNA が肉芽腫内に集積していることが証明された。今回の *P.acnes* DNA に関する組織内局在の解析結果は、サ症病変部において *P.acnes* が単に常在性細菌として無意味に存在しているのではなく、これが肉芽腫の形成に積極的に関与していることを示唆している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takizawa T, Koike M, Takemura T, Kudoh S, Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma Om P, Ando M. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes from Japanese and European patients with sarcoidosis. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 198-204.

2. Kobayashi D, Eishi Y, Ohkusa T, Ishige I, Suzuki T, Minami J, Yamada T, Takizawa T, Koike M. Gastric mucosal density of *Helicobacter pylori* estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading. *J Med Microbiol* 2002; 51: 1-7.
3. Yamada T, Eishi Y, Ikeda S, Ishige I, Suzuki T, Takemura T, Takizawa T, Koike M. In situ localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. *J Pathol* 2002; (in submission).
4. Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, Koike M. Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 2002; (in press).
5. Kawachi H, Takizawa T, Eishi Y, Shimizu S, Kumagai J, Funata N, Koike M. Absence of either gastric or intestinal phenotype in microscopic differentiated gastric carcinomas. *J Pathol* 2002; (in submission)
6. Ohkusa T, Fujiki K, Takashimizu I, Kumagai J, Tanizawa T, Eishi Y, Yokoyama T, Watanabe M. Improvement in atrophic gastritis and intestinal metaplasia in patients in whom *Helicobacter pylori* was eradicated. *Ann Intern Med* 2001; 134(5): 380-6.
7. Akashi T, Ito E, Eishi Y, Koike M, Nakamura K, Burgeson RE. Reduced Expression of Laminin alpha 3 and alpha 5 Chains in Non-small Cell Lung Cancers. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92(3): 293-301.
8. Ikeda S, Shibata T, Kimura H, Eishi Y. The expression of telomerase reverse transcriptase protein is associated with p53 expression or high Ki-67 labeling index or both in advanced colorectal cancer. *Jpn J Cancer Clin* 2001; 47(1):

117-121.

H. 知的所有権の取得状況

なし

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CARD with HRP-conjugated streptavidin for *P. acnes* in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue section of the liver from a rat given an intravenous injection of *P. acnes* (ATCC 6919). Dark brown dots and large brown aggregates are seen in the cytoplasm of swollen Kupffer cells, but neighboring hepatocytes lack signals.

Figure 2: Accumulation of *P. acnes* genomes in and around sarcoid granuloma. (a) CARD with HRP-conjugated streptavidin. (b) Double fluorescence staining of CARD with FITC-conjugated streptavidin and CD68 immunostaining with rhodamine-labeled anti-mouse immunoglobulin.

Figure 3: Numbers of *P. acnes* genomes in lymph nodes from patients with sarcoidosis (Sar) or tuberculosis (Tbc) and in control lymph nodes (Cont) by QPCR. Closed circles, samples with positive results by QPCR, and open circles, samples with negative results by QPCR. The horizontal bars show, from bottom to top, the 25th percentile, median, and 75th percentile.

Figure 4: Numbers of signals by CARD for *P. acnes* in lymph nodes from patients with sarcoidosis (Sar) or tuberculosis (Tbc), and in control lymph nodes (Cont). Signals were counted in both granulomatous areas ('inside Gr') and nongranulomatous areas ('outside Gr'). Closed circles, samples with positive results by QPCR, and open circles, samples with negative results by QPCR. The horizontal bars show, from bottom to top, the 25th percentile, median, and 75th percentile.

Figure 5: Correlation between results of CARD and QPCR. Closed circles, sarcoid samples.

Table 1: Specificity of ISH probes for bacteria phagocytosed by Kupffer cells of rats

Species	Origin	Results ^a with an ISH probe or without a probe			
		<i>P. acnes</i>	<i>H. pylori</i>	<i>E. coli</i>	Without probe
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 6919	+	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	Clinical isolate ^b	+	-	-	-
<i>Propionibacterium granulosum</i>	ATCC 25564	-	-	-	-
<i>Propionibacterium avidum</i>	ATCC 25577	-	-	-	-
<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC 43504D	-	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	-	-	+	-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 8482	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC 6538P	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	-	-	-	-
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	ATCC 35734	-	-	-	-

^aThe symbols + and - indicate that hybridization occurred or did not occur, respectively.

^bThis strain was isolated from a sarcoid lesion in the skin of a patient with sarcoidosis.

Figure 1

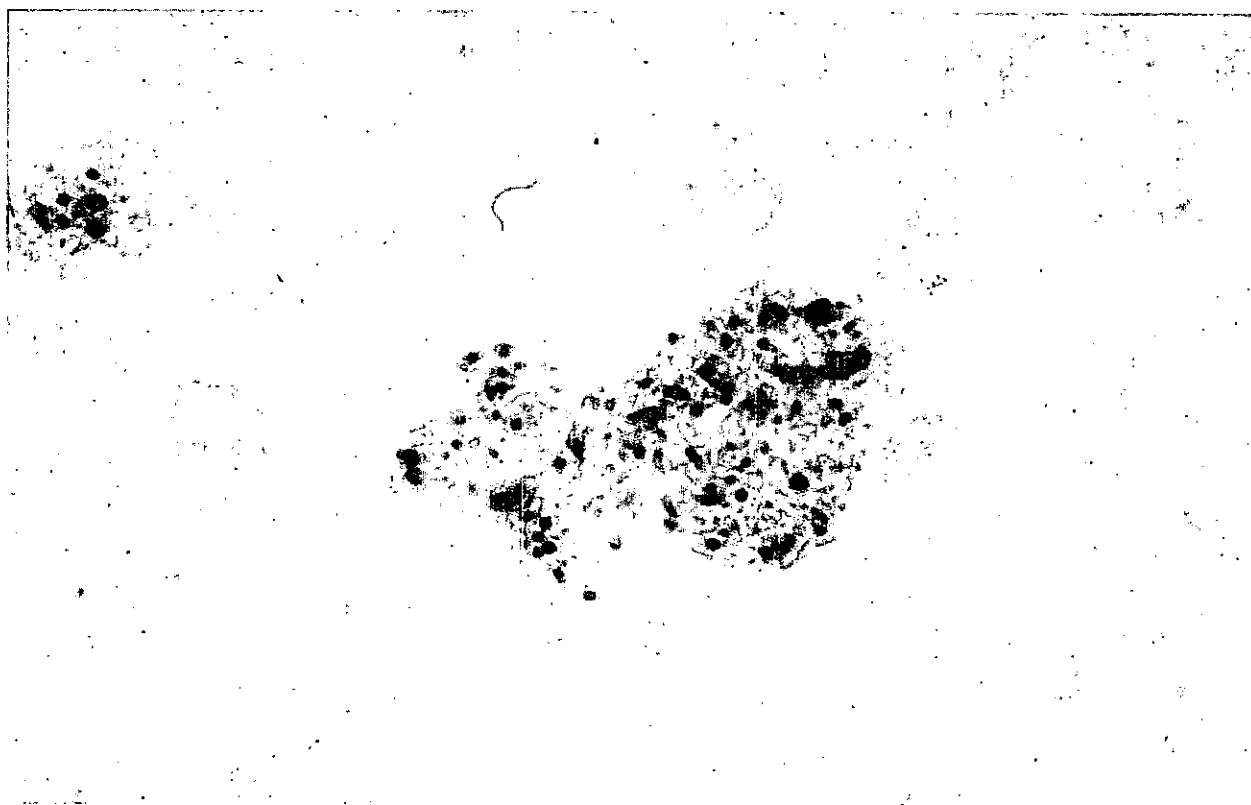


Figure 2

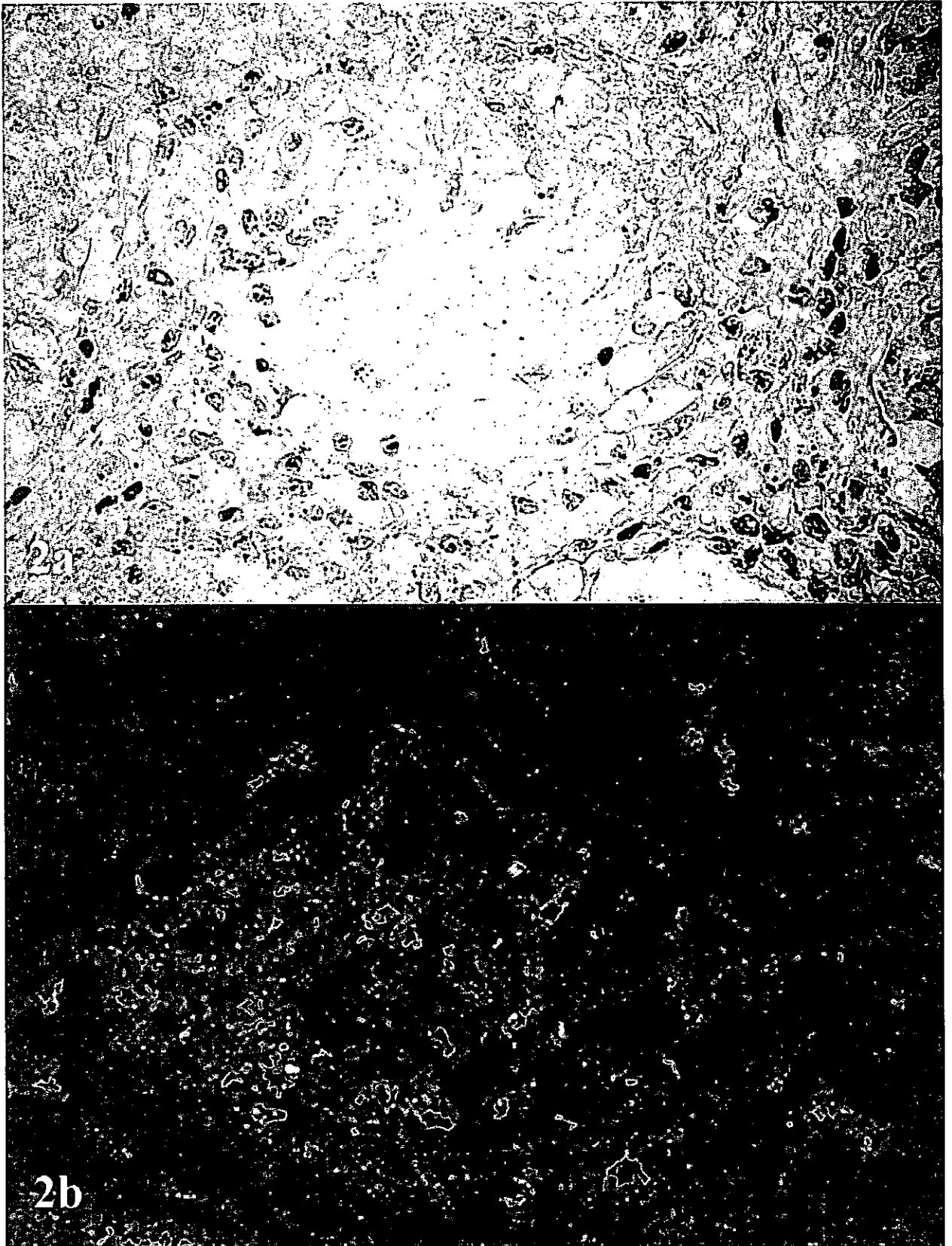


Figure 3

