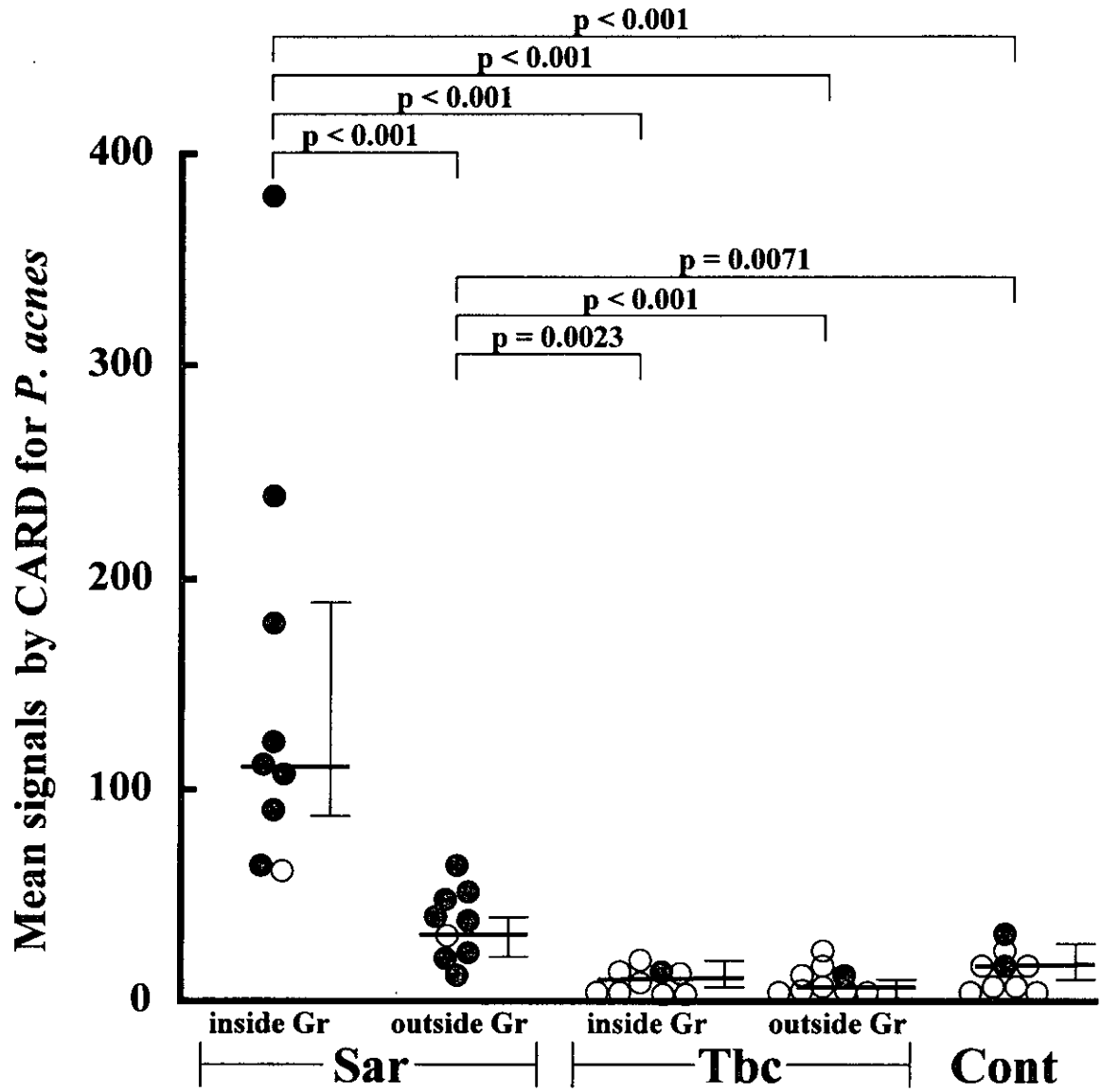
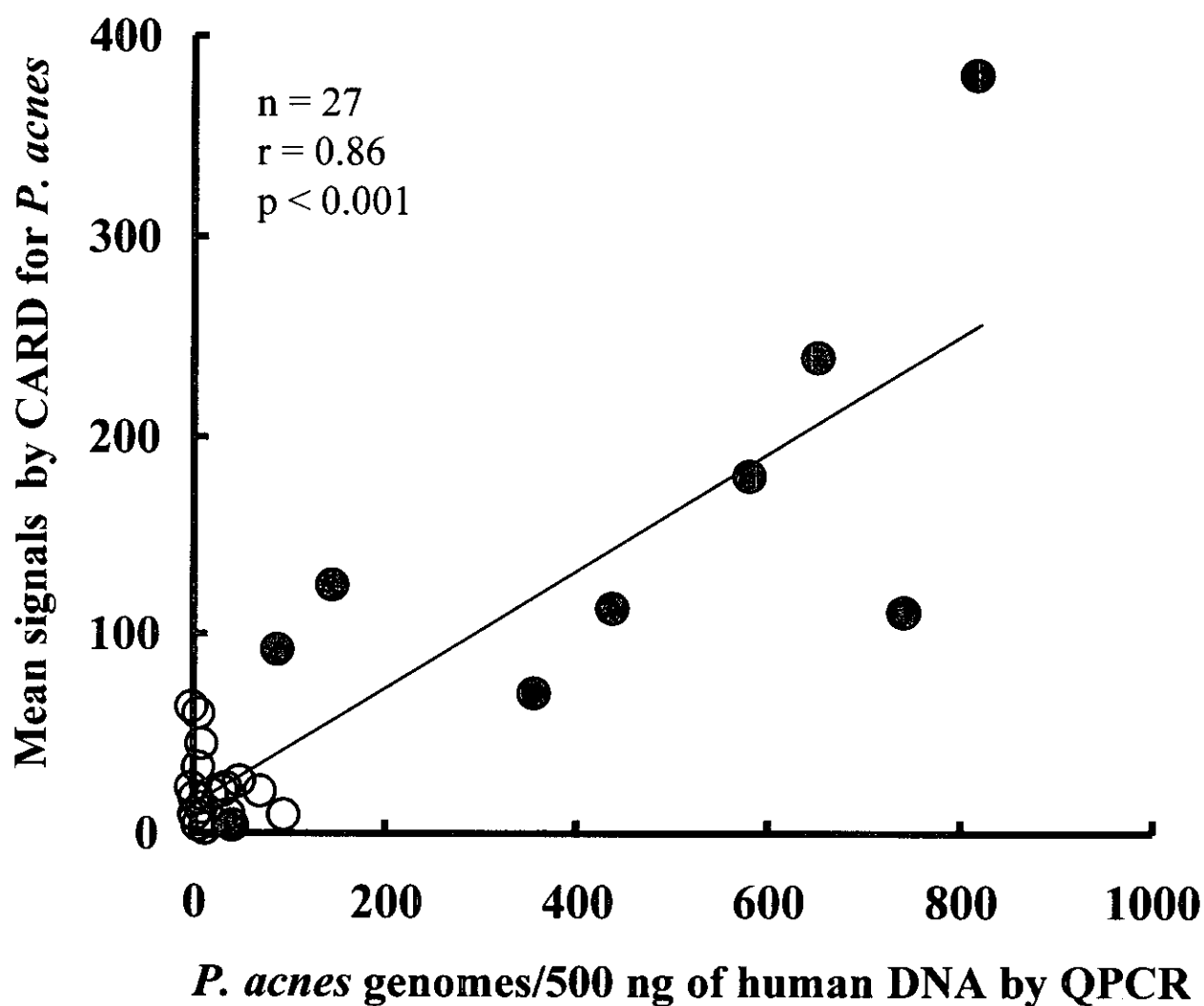


Figure 4



**Figure 5**



## 8. サ症患者におけるプロピオニバクテリアの細菌学的検討 ～サルコイドーシス患者糞便での検討～

分担研究者 渡邊 邦友（岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設教授）

研究協力者 田中 香お里（同施設助手）、びまん性肺疾患研究班\*

\* 石井芳樹（獨協医科大学呼吸器アレルギー内科）、井上義一（国立療養所近畿中央病院）、海老名雅仁（東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍分野）、大田健、中野純一（帝京大学医学部内科）、菅守隆（熊本大学医学部第1内科）、河野修興、檜山桂子（広島大学医学部第2内科）、杉崎勝教（大分医科大学第3内科）、千田金吾（浜松医科大学第二内科）、曾根三郎、西岡安彦（徳島大学第3内科）、高橋卓夫吾妻安良太（日本医科大学第4内科）、林清二（大阪大学医学部第3内科）吉沢靖之（東京医科歯科大学呼吸器科）、江石義信（東京医科歯科大学大学院病因病理学）

**研究要旨** サルコイドーシス患者の腸管における *Propionibacterium* spp.を検索するため、これまでの検討から考案した選択分離培地を用いてサルコイドーシス患者の糞便内における *Propionibacterium* spp.の検索を行った。協力施設\*で収集された由来の明らかな患者糞便 65 検体における *Propionibacterium* spp.の保有率は、38.5%であった。これは、先の検討で行った健康成人の糞便 70 検体における *Propionibacterium* spp.の保有率（41.4%）と同等であった。菌量の平均も  $4.26 \times 10^2$  cfu/g と健康成人の結果（ $2 \times 10^2$  cfu/g）と同等のレベルであった。また、20歳代～70歳代の各年代における保有率は33.3%～50%であった。男女別では、男性47.1%、女性35.4%であった。その他、罹患年数、疾患部位についても、*Propionibacterium* spp.の保有率に特徴的な差は認められなかった。今回の検討では、少なくとも糞便中の *Propionibacterium* spp.の保有率、保有菌量に関しては、健康成人との違いは認められなかった。

### A. 研究目的

近年、サルコイドーシス（以下サ症）への *Propionibacterium* spp.の病因的関与がより強く疑われ、病変形成との関連性の解明は興味ある問題である。一方、病巣にみられるこれらの *Propionibacterium* spp.の由来については、肺病変が主であることから吸引や主要な常在部位である皮膚のほか、腸管からの由来も疑われているものの、それらを証明出来るような情報は得られていない。本研究の最終的な目的は、サ症の病変部にみつかると *Propionibacterium* spp.の由来を

検索することであるが、ここでは特に腸管由来の可能性について検索する。

### B. 研究方法

#### I. 対象および材料

研究協力者から提供されたサ症患者の糞便 65 検体を検討対象とした。糞便は、採便カップに採取後、嫌気パウチに入れた状態で各協力施設に提出され、フリーザーで凍結保存されていたものを、凍結状態のまま回

収した。

## II. 方法

提供された糞便を解凍し、一部を秤量して予め嫌気状態にしてあった嫌気性希釈液に均一に分散し 1g/mL の溶液とした。この 0.1 mL を先の検討で考案した *Propionibacterium* 選択分離培地に均一に塗り広げ、4 日間嫌気培養した。選択培地上に発育した菌を観察後分離し同定に供した。分離された菌の同定は、コロニーの外観、グラム染色所見、カタラーゼ試験、簡易同定キット、LBS 培地・EF 培地・BBE 培地での発育、終末代謝産物分析などにより行った。

## C. 研究結果

提供された 65 検体の背景は男性 17 名(年齢 20～75 才、罹患期間 1 年～9 年)、女性 48 名(23～76 才、罹患期間 1 ヶ月～20 年)と女性が多かった。男性は、20 歳代から 70 歳代の各年代で 1～4 人であった。女性では 50 歳代が 15 人と最も多く、次いで 60 歳代が 13 人、後の年代は 3～7 人であった。罹患期間は 1 ヶ月から 20 年間に渡っていたが、6 割は罹患 1 年～3 年目までの患者であった。

培養の結果、カタラーゼ陽性で主要代謝産物としてプロピオン酸を産生し、形態その他からカタラーゼ陽性 *Propionibacterium* spp. と同定された株は、65 検体中 25 検体 (38.5%) から検出された。各年代の検出率は 33.3%～42.8% と年代による差は見られなかった。男女別では、男性 47.1%、女性 35.4% であった。検出されなかった *Propionibacterium* spp. の検出菌量の平均は、 $4.26 \times 10^2$  cfu/g であったが、検出された 25 検体の 68% にあたる 17 検体では、検出菌量は 100 cfu/g 未満であった。罹患期間との関係では、患者が多い罹患 1 年～2 年で検出率が高い傾向がみられた。また、菌量が 100 cfu/g 以上のものは罹患 1 年～3 年の検体にみられた。疾患部位と検出率、検出菌量には特徴的な傾向は認められなかった。

## D. 考察

腸管からの由来の有無を明確にするためには、患者の腸管及び健康人の腸管における本菌種の分布の差異、患者の腸管由来菌株と病巣部由来菌株との同一性、患者分離株における健康人由来株と異なる何らかの特性の有無などを検討していく必要がある。

今回のサ症患者の糞便 65 検体を対象とした検討では、*Propionibacterium* の検出率は、38.4% であった。これは、先の検討で行った健康成人の糞便 70 検体における *Propionibacterium* の保有率 (41.4%) と同等であった。菌量の平均は  $4.26 \times 10^2$  cfu/g で健康成人の  $2.08 \times 10^2$  cfu/g と同等のレベルであった。検出される菌量の範囲やばらつきの点でも特に差は見いだせなかった。

年代別では、健康成人では、30 歳代で 20% とその他の年代の 45%～60% と検出率が低い傾向がみられたが、患者検体ではこの傾向はみられなかった。罹患期間については、罹患 1 年～2 年で *Propionibacterium* spp. の検出率が高い傾向がみられたが、これらのグループでも 4 割から 5 割の検体では *Propionibacterium* spp. が検出されておらず、疾患との関係の有意性については不明である。

今回の検討では、糞便 1g あたりの目的菌の検出限界は 10 cfu 未満であるが、患者検体の半数以上からは目的菌が検出されておらず、少なくとも糞便中に存在する *Propionibacterium* spp. の検出率や検出菌量の点では健康成人由来の糞便との差を認めることは出来なかった。サ症の病因としての腸管 *Propionibacterium* の可能性の有無を決定するには、今後、腸管分離株と病巣分離株、およびその他の部位由来の菌株との同一性を検討する必要があると考えられた。

## E. 結論

少なくとも糞便中に存在する *Propionibacterium* spp. の検出率や検出菌量の点ではサルコイドーシス患者と健康成人の差は認められなかった。すなわち、腸管由来菌と疾患の因果関係を示す結果は得られなかった。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

なし

**H. 知的所有権の取得状況**

なし

附表 サルコイドーシス臨床検体培養成績のまとめ

検体No	性別	年齢	疾患	罹患期間	菌数 (cfu/g)			疾患部位					
					P.acnes	P.granulo-	Propioni. sp.	肺	リンパ腺 (肺門)	眼	皮膚	臓器	
A1	F	45	サ症	2y5m	100			肺	リンパ腺 (肺門)	眼			
A2	F	53	サ症	4y8m	10			肺			皮膚		
A3	F	39	サ症	5y				肺		眼			
A4	F	59	サ症	3y4m				肺					
A5	F	56	サ症	6y3m				肺		眼	皮膚		
A6	M	28	肝サ症	1y	10							肝臓	
A7	F	57	サ症	1y						眼	皮膚		筋肉
A8	F	64	サ症	1y									
A10	F	31	サ症	1y	10				リンパ腺 (肺門)	眼			
A11	F	51	サ症	1y				肺	リンパ腺 (肺門)				
A12	F	38	サ症	1y			3090	肺	リンパ腺 (肺門)	眼	皮膚		
A13	F	47	サ症	5y				肺	リンパ腺 (肺門)				
A14	F	76	サ症	4y				肺	リンパ腺 (肺門)		皮膚		
A15	F	67	サ症	2y			480		リンパ腺 (肺門)				
A16	F	57	サ症	5y					リンパ腺 (肺門)	眼			
A17	F	62	サ症	4y						眼		腎臓	
A18	F	62	サ症	2y						眼			
A19	F	39	サ症	1y					リンパ腺 (肺門)	眼			神経
A20	F	56	サ症	3y									
A21	F	43	サ症	5y				肺		眼			
A22	F	60	サ症	6y				肺				心臓	
A23	F	70	サ症	3y			110	肺		眼			
A24	M	54	サ症	4y				肺		眼			
A25	F	75	サ症	1y6m				肺		眼	皮膚		
A26	M	53	サ症	2y			30	肺			眼瞼		
A27	F	70	サ症	4y				肺		眼			
A28	F	63	サ症	9y				肺		眼			
A29	F	63	サ症	1y			5300	肺			皮膚		
A30	F	66	サ症	2y	30			肺		眼			
A31	M	42	サ症	1y6m			200	肺		眼			
A32	M	65	サ症	3y				肺					
A33	F	59	サ症 /軟骨肉腫	2y			20	肺					
B1	M	32	サ症	10y	70			肺		眼		心臓	
B2	M	48	サ症	5y				肺		眼		腎臓	
B3	F	29	サ症	1y				肺		眼			
B4	F	56	サ症	5y				肺		眼		心臓	
B5	F	23	サ症	3m				肺	リンパ腺 (BHのみ)				
B6	F	70	サ症	8m	120			肺	リンパ腺 (縦隔・肺門)				
B7	F	52	サ症	2y6m			10	肺	リンパ腺 (縦隔・肺門)	眼			
B8	F	28	サ症	4y				肺	リンパ腺 (縦隔・肺門)	眼			
B9	F	66	サ症	1y			810	肺	リンパ腺 (縦隔・肺門)	眼			
B10	F	71	サ症	1y				肺	リンパ腺 (縦隔・肺門)			心臓	
B11	M	27	サ症	1y		10		肺					
B12	F	29	サ症	1y		30		肺		眼			
B13	M	75	サ症	2y		20		肺		眼			
B14	F	69	サ症	1y				肺		眼			
B16	F	71	サ症	1y				肺					
B17	M	20	サ症	2y				肺	リンパ腺 (縦隔)	眼			
B18	M	54	サ症	1y6m	110			肺	リンパ腺 (縦隔)				
B19	M	45	サ症	2y6m				肺	リンパ腺 (縦隔)	眼			
B20	F	54	サ症(皮膚)	5y				肺	リンパ腺 (縦隔)	眼	皮膚		
B21	F	54	皮膚サ症	3y				肺	リンパ腺 (縦隔)				

附表 サルコイドーシス臨床検体培養成績のまとめ

検体No	性別	年齢	疾患	罹患期間	菌数 (cfu/g)			疾患部位					
					P.acnes	P.granulo-	Propioni. sp.	肺	眼	皮膚	肝腎	筋肉	
B22	F	65	サ症	11y				肺		眼	皮膚	肝腎	筋肉
B23	M	61	サ症	2y	50			肺					
B24	M	63	サ症	3u				肺				脾臓	
B25	F	38	サ症	2y	10.0			肺				脾臓	
B26	F	64	サ症	2y			60	肺	リンパ腺 (BHL)	眼		心臓	
B27	M	40	サ症	9y			50	肺		眼			
B28	F	54	サ症	3y				肺	リンパ腺 (BHL)				
B29	F	53	サ症	3m				肺			皮膚		
B30	F	38	サ症	1m				肺		眼			
B31	M	30	サ症	4y				肺		眼			
B32	F	66	サ症	20y				肺					
B33	M	64	サ症	3y				肺		眼			
B36	F	54	サ症	1y			10	肺					

## 9. 微生物の感染とIgA腎症の関連に関する研究

分担研究者	荒川 宜親（国立感染症研究所細菌・血液製剤部長）
共同研究者	佐々木裕子、永田典代、原島綾子（国立感染症研究所・安全）
	網 康至、須崎百合子（国立感染症研究所・動物管理室）
	堀田 修、宮崎真理子（仙台社会保険病院・内科・腎臓）
	松谷幸子（仙台日赤病院・耳鼻咽喉科）
	松尾清一、湯沢由紀夫（名古屋大医・第三内科腎臓研究室）

**研究要旨** IgA腎症の病態に粘膜免疫の関与を考え、粘膜免疫刺激受容体の一つである扁桃への感染微生物、特にマイコプラズマに着目して、IgA腎症の病態成立への関与について検討を行った。IgA腎症患者の扁桃付近の咽頭スワブ42%からマイコプラズマが培養にて分離され、PCRでは、扁桃の9/11(81%)、アデノイド2/3(66%)で*M. fermentans*と*M. salivarium*共通ftsZプライマーで陽性であり、*M. fermentans*特異的プライマーでの陽性率は、扁桃3/11(27%)、アデノイド1/3(33%)であった。血清中の抗マイコプラズマ抗体価陽性者は約10%であった。高い抗*M. fermentans*抗体価を有する例で、リンパ球活性化マーカーの発現が昂進しており、マイトゲンとしてのマイコプラズマの関与を疑わせた。腎臓へのマイコプラズマ抗原沈着は陰性であった。

カニクイザルへの*M. fermentans*感染実験では、感染7日目をピークに、末梢血単核細胞(PBMC)の80%が1日培養後にアポトーシスによる細胞死を起こし、感染29日目の剖検時に、プラズマ細胞浸潤を伴う脾臓の静脈炎ならびに腎臓、糸球体のメサンギウム領域の増生というIgA腎症類似の病変を軽度ながら形成し、病変部位に*M. fermentans*抗原が沈着していた。腎臓にIgAの沈着が無いことから完全なモデルとは成らなかったが、リンパ球異常と腎臓病変の関連をつなぎ、IgA腎症成因の一端を再現できたと考えられる。

### A. 研究目的

IgA腎症は、蛋白尿並び血尿を主症状とし、我が国では、慢性糸球体炎の60%を占める。好発年齢が20歳台に多い慢性腎疾患であるが、繰り返される炎症の結果、約40%の患者、年間約5,000人が腎透析治療を必要とする。IgA腎症患者には呼吸器感染症の症状が先行する患者がいる事、扁桃摘出により症状の改善を見る事、末梢リンパ球の異常活性化がある事などから、我々は、扁桃或いは粘膜系のリンパ組織に対する常在性あるいは弱毒性微生物、例えばマイコプラズマ等による

慢性的、断続的な刺激がIgA腎症の発症と関連するかどうかについて検討を進めてきた。マイコプラズマ属菌は、一般的にリンパ球に対するマイトゲン活性を有することから、IgA腎症患者で見られるリンパ球の非特異的活性化への関与も疑った。そこで、IgA腎症患者扁桃、腎臓組織におけるマイコプラズマの検出、抗マイコプラズマ抗体価とリンパ球活性化の関連ならびに、カニクイザルへの投与実験を行い、マイコプラズマがIgA腎症あるいはそれに類似した病態を誘発しうるかについて検討した。



## B. 研究方法

### 1) マイコプラズマの分離、同定、検出

扁桃付近の咽頭スワブ、末梢血、摘出扁桃、腎生検検体は、協力医療機関より分与された。マイコプラズマの分離には 10%馬血清ならびに 10%新鮮酵母エキス添加 PPLO 培地を用い、液体ならびに寒天培地にて培養を行った。マイコプラズマは、他の細菌と異なり、-60℃以上では死滅するため、患者咽頭ぬぐい綿棒を液体 PPLO 培地にひたし、即時、マイナス-80℃にて保存し、ドライアイスと共に輸送した。融解した咽頭ぬぐい液を PPLO 寒天培地に接種して、37℃にて 1 週間培養し、コロニーの単離を行った。DNA 検出には PCR 法を用いた。PCR には、ftsZ 遺伝子ならびに 16S rRNA 遺伝子の配列より設計したプライマーを用いた。

### 2) 抗体価測定

血清中抗体価は、菌体超音波破碎液あるいは *M. penetrans* については、菌体の tritonX-114 抽出成分を抗原に用いた ELISA を用いた。

### 3) 免疫染色

患者組織標本の免疫染色には、抗 IgA 抗体ならびに抗 *M. fermentans*、抗 *M. penetrans*、抗 *M. orale*、抗 *M. salivarium* 抗体のいずれかを用いた。

### 4) リンパ球表面分子の解析

末梢単核細胞(PBMCs)の分離は、フィコールを用いた遠心分離法を用いた。フローサイトメトリーによる細胞の解析は、以下の二通りの方法を行った。PBMCs の一部を細胞表面マーカーの解析用に、蛍光標識抗 CD4、抗 CD8、抗 CD69 (T, B リンパ球の活性化初期に発現される分子)、抗 HLA-DR (T リンパ球における慢性活性化を示す分子)ならびに抗 CD25 (IL-2 を介したリンパ球活性化を示す分子)モノクローナル抗体にて染色後、Paraformaldehyde にて固定し、FACScalibur™ により、CellQuest™ 解析ソフトを用いて解析した。細胞障害特にアポトーシスによる細胞死の解析には、

分離した PBMCs を RPMI 培地にて一晩培養後(刺激物は無添加)、回収し、triton-X 処理後に Propidium Iodide にて核を染色した。アポトーシスの変化により核凝集を起こしている細胞画分の割合をフローサイトメトリー法にて解析した。

### 5) 感染実験

国立感染症研究所、筑波霊長類センターにて繁殖、飼育したカニクイザル 2 頭を用い、*M. fermentans* の感染実験としては、新鮮培養菌  $2 \times 10^8$  個 (CFU) を静脈内投与し、その後 29 日間観察し、経時的に尿ならびに末梢血を採取した。リンパ球表面マーカーの発現は、モノクローナル抗体で染色後、また、PBMCs におけるアポトーシスは、1 日培養後の PBMC を前述した方法で解析した。病理組織標本は、HE 染色後、観察し、特に腎糸球体については、メサングウム領域の増生を観察する為マッソントリクローム染色を行った。*M. fermentans* の組織における分布を見る為、抗 *M. fermentans* 抗体を用いた免疫染色を行った。

## C. 研究結果

### I. 患者材料を用いた検討

#### 1) 扁桃からの分離

IgA 腎症患者の摘出扁桃は、リンパ組織の活性化に伴い、陰窩に IgA 陽性のプラズマ細胞が多数浸潤していた。患者の扁桃付近の咽頭スワブ 47 検体中、20 例 (42%) から、マイコプラズマが培養にてコロニーとして分離され、*M. orale*、*M. salivarium* は分離されたが、増殖速度が遅い *M. fermentans* は分離できなかった。扁桃組織から抽出した DNA と *M. fermentans* と *M. salivarium* 共通 ftsZ プライマーを用いた PCR 解析では、扁桃の 9/11 (81%)、アデノイド 2/3 (66%) において陽性結果が得られた。*M. fermentans* 特異的プライマーを用いた場合の陽性率は、扁桃 3/11 (27%)、アデノイド 1/3 (33%)であった。

## 2) 抗体価測定

IgA 腎症患者血清 40 人の血清中の抗体価を *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. orale*, *M. pneumoniae* ならびに *M. penetrans* について測定した結果、患者の数%で *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. penetrans* IgG 抗体価が上昇していた。*M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. penetrans* について IgM ならびに IgA 抗体価を測定したところ、抗 *M. fermentans* IgM 抗体、*M. penetrans* IgM 抗体価が、それぞれ 4 人 (10%) で OD 0.3 以上と高かった。IgA 抗体価の上昇は、弱いながら 3 人 (7.5%) において抗 *M. fermentans* IgA 抗体ならびに抗 *M. pneumoniae* IgA 抗体が OD 0.1 以上であった (図 1、上図)。

## 3) IgA 腎症におけるリンパ球活性化へのマイコプラズマ感染の影響

マイコプラズマ感染が患者リンパ球へおよぼすマイトゲン活性について調べる為に患者のリンパ球活性化の程度と抗マイコプラズマ抗体価との関連について検討した。IgA 腎症患者の T ならびに B リンパ球における CD69、HLA-DR あるいは IL-2 レセプターである CD25 発現増強から、患者の病態が免疫系の異常に関与していることを再確認した。さらに、IgA 腎症患者血清 40 人中、抗 *M. fermentans*-IgG 抗体価が OD1.0 以上を示した患者において、慢性的な T リンパ球活性化を示す HLA-DR 発現細胞の割合が 50%と高値を示し、個々の患者に注目すると、マイコプラズマ感染と末梢リンパ球活性化に関連がある可能性が示唆された (図 1、下図)。この点に関しては、患者材料を用いた解析から得られるデータから結論を出すのは不十分なので、カニクイザルを用いた感染実験を行った。

## 4) リンパ球におけるアポトーシスによる細胞障害の昂進

患者数人の PBMCs について解析した結果、1 日培養後の PBMCs は、アポトーシスを介した細胞死で、PBMCs の

30%が死滅した。健常人においては、アポトーシスによる PBMCs の細胞死は 10%以下の割合に留まることから、IgA 腎症患者における昂進が確認された。

## 5) 腎臓における免疫染色

IgA 腎症患者 7 人の腎糸球体に対して行った免疫染色の結果は、*M. fermentans* 抗原ならびに *M. penetrans* 抗原が陰性であることを示した。

## II. カニクイザルにおける実験感染

### 1) カニクイザルにおける症状

感染サルは、観察した 29 日間、蛋白尿、血尿等の尿所見ならびに血液の生化学的異常は正常値の範囲に留まった。

### 2) リンパ球活性化と細胞障害

異常が見られたのは、末梢リンパ球についてで、感染 7 日目をピークに 1 日培養後の PMBC の 80%がアポトーシスにより細胞死を起こした (図 2)。このことは、IgA 腎症患者のリンパ球で見られるアポトーシス昂進との関連が疑われた。細胞活性化の初期に発現される CD69 発現も 1 頭で観察され、*M. fermentans* 感染によるリンパ球活性化ならびにリンパ球障害が誘導されることが、動物実験において明らかになった。

### 3) *M. fermentans* の体内分布

*M. fermentans* 由来の DNA は、サルの尿、末梢血の他、脾臓、リンパ節 (1 頭のみ) のリンパ組織から回収された。

### 4) 病理所見

感染後 29 日の解剖時の所見は、1: 脾臓における静脈炎 (リンパ球、プラズマ細胞の内皮細胞下への浸潤) が見られ、*M. fermentans* 抗原が内皮細胞で陽性であった。2: 腎臓の糸球体におけるメサンギウム領域の増生が軽度であるが観察され (IgA 腎症の病変と類似している。しかし IgA 腎症特異的病変ではない)、*M. fermentans* 抗原が病変部位に沈着していた (図 3)。実験施設の都

合で、観察期間が短かったせいもあり、腎糸球体への IgA の沈着は陰性で、完全な IgA 腎症の動物モデルとはならなかった。

#### D. 考察

IgA 腎症患者では、糸球体に IgA のみならず IgG や IgM 抗体と抗原、補体などの複合体が沈着する特徴的所見を有し、扁桃においても IgA 産生プラズマ細胞が増加している。末梢リンパ球の活性が亢進しており、1 日培養後にアポトーシスによる細胞死を引き起こすことから、全身性のリンパ球の異常活性化が IgA 腎症の病態に深く関与していることは明らかである。また、ポリクローナルな IgA が産生されること、また、発症間際、或いは軽症例では、扁桃という粘膜系免疫器官を摘出することで症状の改善が見られる例があることから、粘膜免疫の過刺激が成因に関与することが予想される。しかしながら、既知の粘膜免疫に関する知見では、腎臓における病態成立を説明しきれず、さらに IgA 腎症類似動物モデルも少ない。今回のマイコプラズマによるサル感染実験で明らかになった点は、マイコプラズマの静脈投与後の末梢リンパ球におけるアポトーシス増加、その後の静脈炎、糸球体メサンギウム領域の増生という病的所見が観察され、マイコプラズマの感染あるいは敗血症が IgA 腎症の病変の出現と関連している可能性が示唆される。しかしながら、今回の観察期間は 29 日間と短く、慢性的に病変が経過する IgA 腎症とは食い違う点もあり、その因果関係を証明するには至っていない。また、粘膜感染モデルでは無い事から、今後機会があれば粘膜系投与後のマイコプラズマの血流への移行性の検討や粘膜系よりの感染による腎病変の出現の有無などについて検討したい。一方、IgA 腎症患者において、マイコプラズマの血流への侵入に関しては抗体価、腎臓への沈着の大半が陰性の結果となり、現段階で IgA 腎症患者における *M. fermentans* 感染の関与が示唆される例は、10% 未満と考えられる。しかし、*M. fermentans* は *M. pneumoniae* と異なり菌血症を引き起こす可能性が示唆されており、本菌が扁桃等の粘膜系リンパ組織で増殖し、扁桃の炎症などにより血流中に微量の菌体が断続的に放出される事により、慢性的なリンパ球系の活性化を誘発し、IgA

腎症の発症に寄与している可能性は依然として否定できない。事実、少数ながら、個別に患者を見ていくと、マイコプラズマ感染が末梢リンパ球活性化に影響を及ぼしていると推察される症例もある。扁桃同様、粘膜免疫刺激受容器官である泌尿器粘膜に対して慢性感染する *M. penetrans* についても、IgA 腎症患者の約 10% で、抗体価上昇を見たことは、興味深い。文献的に *M. penetrans* は、感染者の腎尿細管上皮に侵入して感染している電顕像が確認されている種である。これまでに腎臓病との関連については報告は無いものの、呼吸器ならびに泌尿器の両方に感染し、腎臓にも分布する種として、今後、IgA 患者の尿等からの分離を試みる必要があると考えられる。

#### E. 結論

IgA 腎症患者の 42% で扁桃周囲の咽頭からマイコプラズマが分離、単離された。血中抗体価は、約 10% で IgG 抗体価が、約 7.5% で IgM あるいは IgA 抗体価が、陽性であった。マイコプラズマが、血流に侵入した場合に、リンパ球へのアポトーシスを伴う細胞障害を誘発すること、脾臓などのリンパ系組織の静脈炎を誘発すること、ひいては、腎糸球体のメサンギウム領域の増生を主体とする糸球体病変を誘発することが動物実験から明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 2. 口頭発表

Y.SASAKI, N.NAGATA, Y.AMI, Y.SUZAKI, T.IWASAKI, I.HATANO, A.HARASHIMA, O.HOTTA, M.MIYAZAKI, T.SASAKI and Y.ARAKAWA, Cytopathic effects on lymphocytes and hyperplasia of mesangial cells in kidney in cynomolgus monkey-infected with *Mycoplasma fermentans*. The fifth chinese congress on mycoplasmaology,

October 2001, Xiamen, China

## H. 知的所有権の取得状況

なし

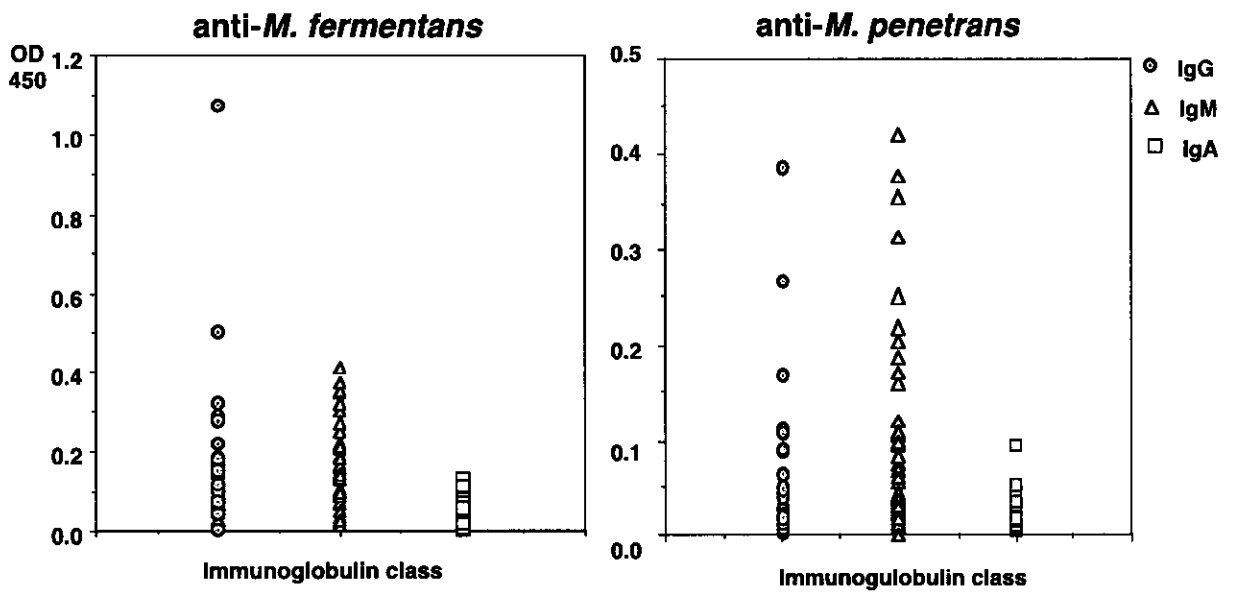
## 謝辞

患者検体を供戴きました協力病院の方々に深謝いたします。

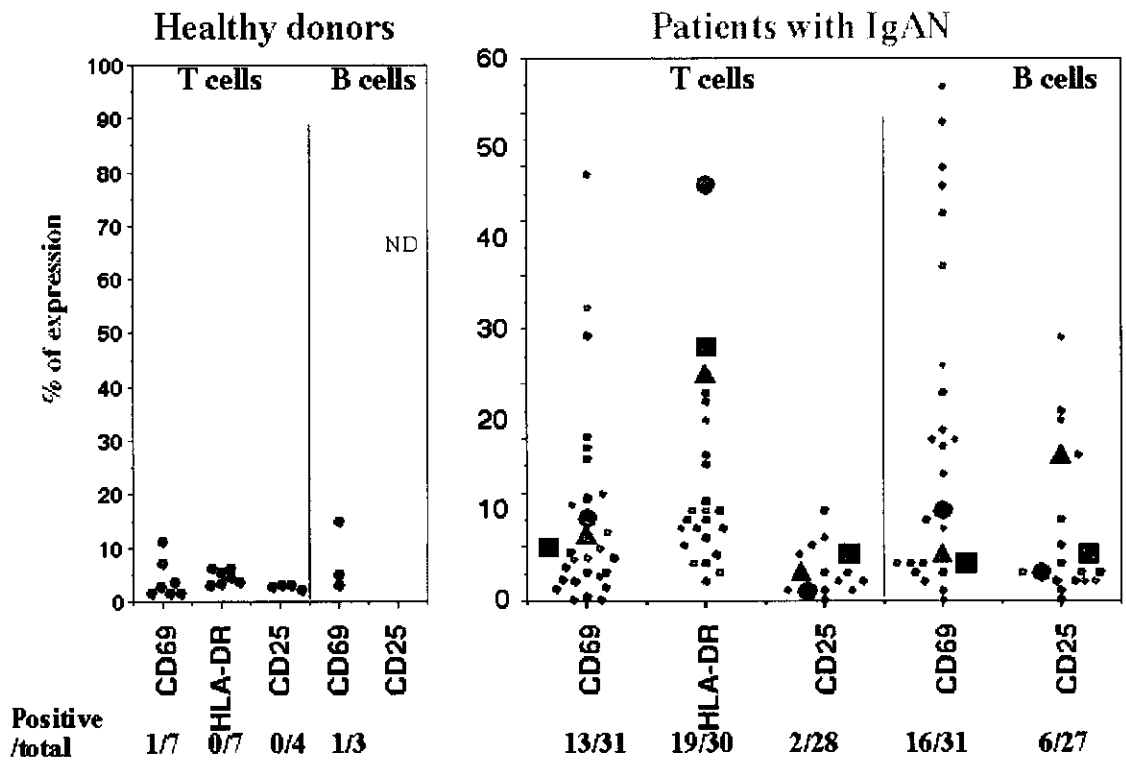
大沢 弘(弘前大学医・第二内科)、今井 祐一(秋田大学医・第三内科)、政金 生人(山形大学医・第一内科)、佐藤 博(東北大学医・第二内科)、加藤 哲夫(福島県立医科大学・第三内科)、中林 巖(防衛医科大学校・第二内科)、中林 滋(名古屋大学大幸医療センター・内科)、安永 親雄(済生会八幡総合病院・内科)、原田 孝司(長崎大学医・腎疾患治療部)

## 図の注釈

- 図 1 : IgA 腎症患者における抗 *M. fermentans* 抗体価 (上図) ならびに、リンパ球中の活性化マーカー発現頻度 (下図)、上図 ;  
○ : IgG、△ : IgM、□ : IgA、下図 ; ○ : 抗 *M. fermentans* 抗体価高値ならびに強いリンパ球活性化を示す患者
- 図 2 : IgA 腎症患者 (上図) ならびに *M. fermentans* 感染カニクイザル (下図) における 1 日培養後の PBMC におけるアポトーシスによる細胞死
- 図 3 : *M. fermentans* 感染カニクイザルにおける糸球体病変部への *M. fermentans* 抗原の沈着



**Cell activation markers on peripheral lymphocytes from healthy donors and patients with IgAN**



1

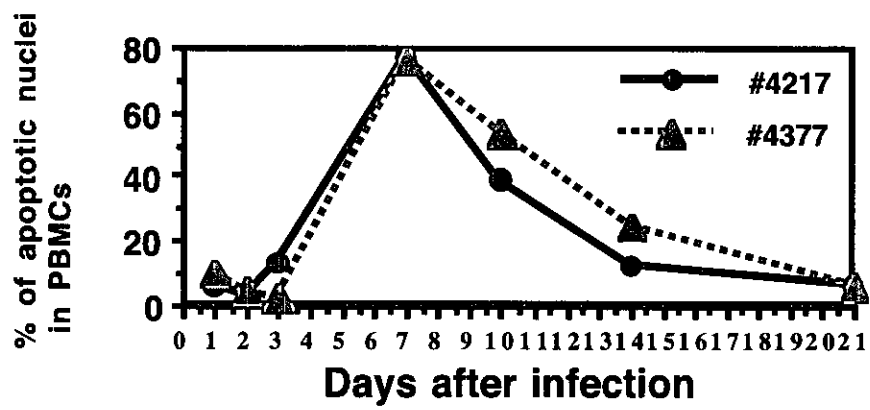
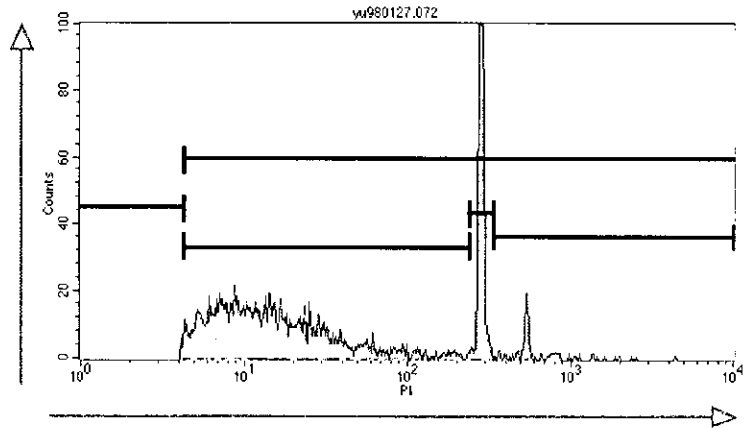
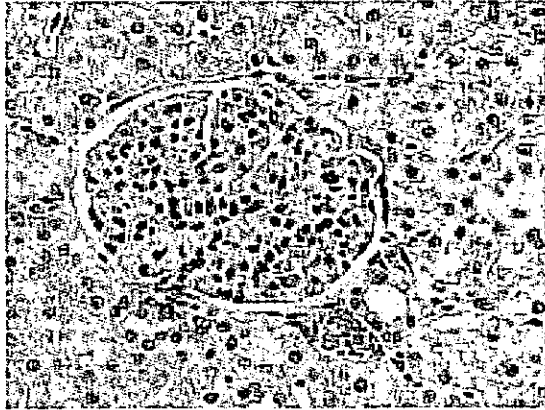


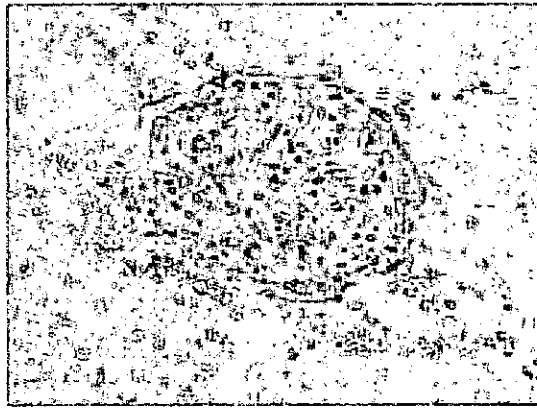
图2



HE 染色



PAS 染色



抗*M. fermentans*抗体を用いた  
ABC 法による免疫染色

図 3

## 10. IgA 腎症の発症における *Haemophilus parainfluenzae* 菌の関与に関する研究

分担研究者 鈴木 亨（福井医科大学医学部臨床検査医学講座助教授）

**研究要旨** IgA 腎症は免疫複合体病型糸球体腎炎と考えられているが、病因抗原は依然として不明のままである。分担研究者は、IgA 腎症患者の咽頭・扁桃粘膜からの *Haemophilus parainfluenzae* (*H.parainfluenzae*) の分離頻度が高率であることに注目し、IgA 腎症患者の糸球体内および血清中に、*H.parainfluenzae* の菌体外膜成分と IgA 型抗 *H.parainfluenzae* 抗体の存在を世界に先駆けて証明してきた（Lancet 1994）。本研究では、以上の研究成果を踏まえて、IgA 腎症患者の扁桃組織リンパ球の *H.parainfluenzae* 外膜抗原に対する特異的免疫応答を検討した。その結果、IgA 腎症患者の扁桃組織リンパ球は *H.parainfluenzae* 菌体外膜抗原刺激により T 細胞系および B 細胞系が活性化されており、*H.parainfluenzae* 外膜抗原に対して polyclonal activation を伴う IgA class switch による抗体産生系が活性化され、特異的 IgA (IgA1) 型抗 *H.parainfluenzae* 抗体の産生亢進およびサイトカインの IL-10、TGF- $\beta$  と IFN- $\gamma$  の産生亢進が明らかとなった。今回の検討から、IgA 腎症の発症機序において、*H.parainfluenzae* 菌体外膜抗原が扁桃組織リンパ球を中心とした局所免疫機構と共に、重要な役割を果たしていることが示唆された。

### A. 研究目的

わが国における原発性糸球体腎炎患者の約半数を占め、20 年間の経過で約 40% の患者が腎死に至る IgA 腎症の有効な治療法が確立されていない最大の理由は、IgA 腎症を惹起する免疫複合体の原因抗原が不明であることによる。現在までに、国内外の研究者により、IgA 腎症の原因抗原として種々の食餌抗原、数種のウィルス抗原および細菌抗原が報告されているが、追試験による確認の報告はなく、さらに否定される報告もあり、まだ一定の見解が得られていない。また、最近では抗原の検索に関する報告がほとんどないのが現状である。

分担研究者は、IgA 腎症患者の咽頭・扁桃粘膜からの *Haemophilus parainfluenzae* (*H.parainfluenzae*) の分離頻度が高率であることに注目し、IgA 腎症患者の糸球体内および血清中に、*H.parainfluenzae* の菌体外膜成分と IgA 型

抗 *H.parainfluenzae* 抗体の存在を世界に先駆けて証明してきた（Lancet 1994）。本研究では、以上の研究成果を踏まえて、IgA 腎症患者の扁桃組織リンパ球の *H.parainfluenzae* 外膜抗原に対する特異的 IgA 型抗体の産生およびサイトカインの産生を検討した。

### B. 研究方法

扁桃摘出術（扁桃摘）の適応により、摘出手術が行われた IgA 腎症 16 例および対照群（慢性扁桃炎に罹患しているが腎機能正常例）24 例から得られた摘出扁桃組織から分離したリンパ球に、*H.parainfluenzae* 菌体外膜抗原を 1 週間添加培養して、培養上清を得た。同様に、3H-サイミジンの取り込み実験を行った。さらに、IgA 腎症の発症における原因抗原の 1 つと報告されている緑膿菌（Endo et al. Kidney Int. 1986）菌体抗原を対照抗原として用いて、上記と同様の



方法により、緑膿菌抗原添加による免疫応答を検討した。解析は、ELISA による培養上清中のサイトカイン (IL-4、IL-6、IL-10、TGF- $\beta$  と IFN- $\gamma$ )、total IgA、*H.parainfluenzae* 菌体抗原および緑膿菌菌体抗原特異的 IgA、IgA1、IgA2、IgG と IgM の測定と 3H-サイミジンの取り込みの測定により行った。

(なお、摘出した扁桃組織の実験使用に関するインフォームドコンセントは、扁桃摘手術前に実施された。)

### C. 研究結果

- ① *H.parainfluenzae* 菌体外膜抗原刺激により 3 H-サイミジンの取り込みは、IgA 腎症群において有意な上昇を示した。一方、緑膿菌菌体抗原刺激による 3H-サイミジンの取り込みの有意な上昇は、両群において認められなかった。
- ② *H.parainfluenzae* 菌体外膜抗原刺激による培養上清中 IgA 型抗 *H.parainfluenzae* 抗体価の変動を検討した結果、IgA 腎症群における刺激指数 [Stimulation Index (SI): 刺激後のリンパ球による IgA 型抗 *H.parainfluenzae* 抗体価 (OD) / 刺激前の同抗体価 (OD)] は、対照群における S I に比して、有意に高値を示した。
- ③ *H.parainfluenzae* 菌体外膜抗原刺激による培養上清中 IgA 1 型抗 *H.parainfluenzae* 抗体価の変動を検討した結果、IgA 腎症群における S I は、対照群に比して、有意に高値を示した。
- ④ *H.parainfluenzae* 菌体外膜抗原刺激による培養上清中 IgA 2、IgG および IgM 型抗 *H.parainfluenzae* 抗体価の S I は、両群間において有意な差は認められなかった。
- ⑤ グラム陰性菌との対比のために、上記検討内容を緑膿菌菌体抗原を用いて行った結果、IgA、IgA 1、IgA 2、IgG および IgM 型抗 *H.parainfluenzae* 抗体価の S I は、IgA 腎症群および対照群の間において、有意な差は認められなかった。
- ⑥ *H.parainfluenzae* 菌体外膜抗原刺激後のリンパ球培養上清中の *H.parainfluenzae* 菌体外膜抗原に対する IgA 型と IgG 型、IgA 型と IgM 型、および IgG 型と IgM 型抗体価の間に、IgA 腎症群においては、それぞれ正の相関が認められた。一方、対照群においては、*H.parainfluenzae* 菌体抗原に対する IgG 型と IgM 型抗体価の関係においてのみ正の相関が認められた。
- ⑦ 両群とも、*H.parainfluenzae* 菌体抗原刺激により、IL-10 および TGF- $\beta$  の有意な産生の亢進を示した。一方、緑膿菌抗原刺激では、両群ともに変化が認められなかった。
- ⑧ IL-4 および IL-6 の産生は、いずれの刺激においても、両群間に差は認められなかった。
- ⑨ IgA 腎症群は、対照群に比して、*H.parainfluenzae* 菌体抗原刺激時と無刺激時において、IFN- $\gamma$  および total IgA の有意な産生亢進を示した。
- ⑩ 両群ともに、無刺激時、*H.parainfluenzae* 菌体抗原および緑膿菌抗原刺激時における IFN- $\gamma$  と total IgA 産生の間に、有意な正の相関を示した。
- ⑪ IgA 腎症群においては、*H.parainfluenzae* 菌体抗原刺激により *H.parainfluenzae* 菌体抗原特異的 IgA の有意な産生亢進を認めたが、対照群においては産生亢進は認められなかった。

### D. 考察

IgA 腎症の発症機序が、抗原抗体反応により惹起されると想定した場合、循環性免疫複合体によるものか、あるいは糸球体のメサンジウムに対する特異的抗体によるものか、を明らかにすることが重要であるが、現時点では、IgA 腎症は免疫複合体によるものと考えることが一般的であり、免疫複合体の原因抗原の解明がなされている。しかし、最近では抗原の検索に関する報告がほとんどないのが現状であるが、分担研究者が、IgA 腎症患者の咽頭・扁桃粘膜からの *H.parainfluenzae* 菌の分離頻度が高率であることに注目し、IgA 腎症患者の糸球体内および血清中に、*H.parainfluenzae* の菌体外膜成分と IgA 型抗 *H.parainfluenzae* 抗体の存在を世界に先駆けて証明するに至って、*H.parainfluenzae* 菌が IgA 腎症の原因抗原として注目されるようになっていく。

近年、helper T 細胞は IL-2、IFN- $\gamma$  などのサイトカインを分泌する Th 1 細胞と、IL-4、IL-6、IL-10 などのサイトカインを分泌する Th 2 細胞に分類されるようになり、これら T 細胞は分泌するサイトカインによって、相互に機能制

御を行っていることが明らかとなっており、T細胞からのサイトカインはB細胞系の分化・増殖に深く関与しており、IgAの産生に、これらのサイトカインが大きな影響を与えている、と考えられている。本研究の成果においても、IgA腎症患者の扁桃組織リンパ球が*H.parainfluenzae*菌体外膜抗原刺激を受けることにより、特異的IgA (IgA1)型抗*H.parainfluenzae*抗体の産生亢進およびサイトカインのIL-10、TGF- $\beta$ とIFN- $\gamma$ の産生亢進を示すことが明らかとなった。このことは、IgA腎症において、扁桃組織Tリンパ球は*H.parainfluenzae*菌体外膜抗原により活性化されて、サイトカインを特異的に産生し、産生されたサイトカインにより、*H.parainfluenzae*外膜抗原に対して polyclonal activation を伴うIgA class switch による抗体産生系が活性化され、特異的IgA (IgA1)型抗*H.parainfluenzae*抗体の産生亢進が惹起されることを示唆しており、IgA腎症の発症機序において、*H.parainfluenzae*菌体外膜抗原が扁桃組織リンパ球を中心とした局所免疫機構と共に、重要な役割を果たしていることが、今回の検討でも確認された。

## E. 結論

IgA腎症の発症は、*H.parainfluenzae*菌体外膜抗原が扁桃組織リンパ球を刺激して、特異的IgA (IgA1)型抗*H.parainfluenzae*抗体の産生亢進およびサイトカインのIL-10、TGF- $\beta$ とIFN- $\gamma$ の産生亢進を導くことにより、惹起されることが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamamoto C, Suzuki S, Kimura H, Yoshida H, Gejyo F: Experimentary nephropathy induced by *Haemophilus parainfluenzae* antigens. *Nephron* 2002 (in press)
2. Suzuki S, Fujieda S, Sunaga H, Yamamoto C, Kimura H, Yoshida: Production of IgA, TGF- $\beta$ , and IL-10 by tonsillar lymphocytes from patients with IgA nephropathy induced by stimulation with *Haemophilus parainfluenzae* antigens. *Nephrology* (in press)
3. Yamamoto C, Suzuki S, Kimura H, Yoshida H: Comparison of immunological and histopathological changes between oral and intraperitoneal immunization of outer membrane of *Haemophilus parainfluenzae* antigens in mice. *Nephrology* (in press)
4. Suzuki S, Fujieda S, Sunaga H, Sugimoto H, Yamamoto C, Kimura H, Abo T, Gejyo F: Immune response of tonsillar lymphocytes to *Haemophilus parainfluenzae* in patients with IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol.* 2000; 119: 328-332
5. Suzuki S, Fujieda S, Sunaga H, Yamamoto C, Kimura H, Gejyo F: Synthesis of immunoglobulins against *Haemophilus parainfluenzae* by tonsillar lymphocytes from patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: 619-624
6. Fujieda S, Suzuki S, Sunaga H, Yamamoto H, Seki M, Sugimoto H, Saito H: Induction of IgA against *Haemophilus parainfluenzae* antigens in tonsillar mononuclear cells from patients with IgA nephropathy. *Clin Immunol.* 2000; 95: 235-243
7. Fujieda S, Suzuki S, Sunaga H, Yamamoto H, Seki M, Sugimoto H, Saito H: Production of interferon- $\gamma$  by tonsillar mononuclear cells in IgA nephropathy patients. *Acta Otolaryngol.* 2000; 120: 649-654
8. Ogura Y, Suzuki S, Shirakawa T, Masuda M, Nakamura H, Iijima K, Yoshikawa N: *Haemophilus parainfluenzae* antigen and antibody in children with IgA nephropathy and

Henoch-Schaenlein nephritis. Am J  
Kidney Dis. 2000; 36: 47-52

**H 知的所有権の取得状況**

なし

## 11. びまん性肺疾患または呼吸不全における細菌感染に関する研究

分担研究者 永武 毅（長崎大学熱帯医学研究所教授）

**研究要旨** びまん性肺疾患または呼吸不全の原因となる慢性疾患の中で難治性要因としての細菌感染が如何に関与するかについて検討した。まず、下気道感染の発症に細菌の上気道への付着が重要なステップであり、さらにこの菌付着メカニズムに上皮細胞の糖鎖が重要であることを明らかにした。さらに、原子間力顕微鏡(AFM)を用いることで、陰性荷電の菌と細胞表面の陰性荷電部分が付着することを明らかにした。また、胃酸の吸引性肺炎における細菌感染の増悪にも細菌付着の増強が関与することを明らかにした。今後びまん性肺疾患または呼吸不全における細菌感染の関与について精細な検討を行うと共にこれらの細菌感染の治療・予防にも新しい展望が開けるものと考ええる。

### A. 研究目的

びまん性肺疾患あるいは呼吸不全の原因となる慢性疾患の中で難治化要因として病原細菌や非病原性の常在細菌がいかに関与しているかの研究を行う。特に感染症の成立過程での最初のステップとなる上皮細胞への細菌付着のメカニズムを解明することで、びまん性肺疾患の微生物学的原因究明を行なうと共に将来の感染予防に役立つ薬剤の発見やワクチンの開発をも目指すものである。

### B. 研究方法

びまん性肺疾患または呼吸不全の原因となる細菌感染の代表的起炎菌の上皮細胞側の付着因子については、各菌種毎にヒト咽頭上皮細胞表面に発現している各種糖鎖にそれぞれ特異的に付着するものであることを *in vitro* 付着実験を通して明らかにする。呼吸器親和性病原細菌としてはいずれも呼吸器感染症患者から分離同定されたインフルエンザ菌（nontypable）、プランハメラ（モラクセラ・カタラーリス）、肺炎球菌の中から菌株を選び、菌数を調整した。

一方、ヒト咽頭上皮細胞については健常者群と慢性呼吸器疾患群について十分な informed consent を得た後で咽頭皮細胞を綿棒にて採取後、遠心洗浄後一定量に調整した。付着実験では各種糖鎖のいかなるものが細菌の上皮細胞表面上の付着に関与しているかを明らかにし、これまで慢性下気道感染症の感染エピソードの減少に貢献していることが臨床的に推察されていた一部の去痰薬について細菌の上皮細胞への付着に影響がみられるか否かについても検討した。また、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて、細菌と細胞間での表面荷電の調査研究を加えることにより基礎研究の進展を計った。マウス塩酸吸引後の緑膿菌性肺炎モデルは ICR マウスに塩酸 0.1N を気管内接種後に、非致死量の緑膿菌を気管内接種した。接種後のマウス生存率、肺内菌数および気管内の菌付着は走査型電子顕微鏡（SEM）を使用した。

### C. 研究結果

これまでの長年の臨床的研究から、上気道とりわけ口腔咽頭付着病原細菌の付着性と下気道