

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

特定疾患の微生物学的
原因究明に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐多 徹太郎

平成 16(2004)年 3 月

特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究班(平成 15 年度)

区分	氏名	所 属	職名
班 長	佐多 徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
班 員	荒川 宜親	国立感染症研究所細菌第 2 部	部長
	生田 和良	大阪大学微生物病研究所免疫生体防御研究部門	教授
	江石 義信	東京医科歯科大学医学部附属病因・病理部	助教授
	高 昌星	信州大学医学部保健学科	教授
	近藤 一博	東京慈恵会医科大学医学部微生物学講座第 1	教授
	鈴木 和男	国立感染症研究所生物活性物質部	室長
	中島 淳	横浜市立大学大学院医学部分子消化管内科学	助教授
	永武 毅	長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野	教授
	村田 幸作	京都大学大学院農学研究科	教授
	山谷 睦雄	東北大学医学部附属病院老人呼吸器内科	助教授
	結城 伸泰	独協医科大学神経内科	助教授
	渡辺 邦友	岐阜大学医学部附属生命科学総合実験センター	教授

目 次

I. 総括研究報告書（平成 15 年度）	
特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究……………	1
班長 佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部長）	
II. 分担研究報告	
1. 特定疾患とウイルスの関与……………	9
佐多 徹太郎（国立感染症研究所感染病理部）	
2. 微生物の慢性感染が関与する特定疾患におけるマイコプラズマの探索……………	15
荒川 宜親（国立感染症研究所細菌第 2 部）	
3. 神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染との関連性に関する研究……………	26
生田 和良（大阪大学微生物病研究所免疫生体防御研究部門ウイルス免疫分野）	
4. <i>Propionibacterium acnes</i> トリガーファクター蛋白による実験的マウス 肺肉芽腫症の誘導……………	29
江石 義信（東京医科歯科大学大学院病因・病理学）	
5. ギラン・バレー症候群（GBS）の病因因子の解明とその制御に関する 研究 —GBS の動物モデルである実験的自己免疫性神経炎における mitogen activated protein kinases の役割—……………	36
高 昌星（信州大学医学部保健学科）	
6. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明……………	40
近藤 一博（東京慈恵会医科大学微生物学講座第 1）	
7. 難治性血管炎を誘発する真菌を主とした感染症……………	43
鈴木 和男（国立感染症研究所生物活性物質部）	
8. クローン病の病因微生物の関与……………	50
中島 淳（横浜市立大学大学院分子消化管内科学）	
9. 難治性気道感染症における細菌感染 人氣道上皮細胞上における インフルエンザ菌のバイオフィーム産生……………	53
永武 毅（長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野）	
10. 慢性肺疾患における細菌の関与とその治療法の開発……………	55
村田 幸作（京都大学大学院農学研究科）	
11. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全におけるウイルス感染……………	60
山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院老年呼吸器内科）	
12. カンピロバクター・リポオリゴ糖における糖脂質エピトープの多様性と ギラン・バレー症候群……………	66
結城 伸泰（独協医科大学神経内科）	
13. 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 —糞便の凍結がプロピオニバクテリアの分離に及ぼす影響—……………	69
渡辺 邦友（岐阜大学生命科学総合実験センター）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	75

1. 総括研究報告書

特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究

主任研究者 佐多 徹太郎 国立感染症研究所感染病理部長

研究要旨 難治性疾患の原因は不明である。当研究班では微生物の感染の関与について原因究明を行い、発症予防あるいは効果的治療法の開発に結びつけることを目的とした。対象課題として、神経変性疾患とボルナ病ウイルス、ギランバレー症候群と細菌感染因子、サルコイドーシスと *P. acnes*、慢性難治性気道感染性疾患とライノウイルス、好中球機能や緑膿菌バイオフィーム、難治性血管炎と真菌因子、クローン病とヒトヘルペスウイルス 6 型、そして原発性肺高血圧症とヒトヘルペスウイルス 8 型との関連について研究を実施した。本年度の研究結果は下記の通りである。ボルナ病ウイルスが神経系細胞のストレス応答能を低下させること、ウイルス蛋白質である P 蛋白質のみで中枢神経内でグルタミン酸の取り込みを阻害することが示唆された。*C. jejuni* LOS の構造により、GBS 患者の自己抗体の反応特異性が決定され、神経所見が規定されると考えられた。MAP kinase は末梢神経系炎症性脱髄疾患の発症・制御に重要な役割を担っていることが示唆された。*P. acnes* trigger factor をアジュバントとともに感作免疫するだけで、肺にサルコイドーシス類似の肉芽腫性病変を誘導しうることが判明した。サルコイドーシス患者の約 70% に糞便からプロピオニバクテリアが 10 cfu / g 以上に分離され、その菌数は、10,000 cfu/g 以下であることが明らかになった。ライノウイルス感染により増加する喀痰の主成分であるムチン合成には NF-kappa B 等の細胞内機序の関与を認めた。プロトンポンプ薬はライノウイルス感染抑制効果を有することが明らかとなった。非莢膜保有インフルエンザ菌がバイオフィームを産生することが確認され、sialic acid が重要な役割をはたしていることが示唆された。緑膿菌はアルギン酸リガーゼをペリプラズムに分泌し、アルギン酸の MM ブロックを切断後に細胞質に取り込み、PA1167 の作用により、アルギン酸を完全分解することが想定された。カンジダ菌由来分子が血管炎を誘導し、好中球自己抗体 ANCA も病態と連動した。サイトカインと連動する活性化好中球が重要な役割を担っているものと考えられた。クローン病患者の血清に HHV-6 潜伏感染特異的遺伝子蛋白抗体が検出された。その初期病変においてはウイルス特異的な遺伝子発現は認められなかった。IgA 腎症の原因としてマイコプラズマが候補に上げられる可能性を示した。原発性肺高血圧症患者病理組織検体に HHV-8 は検出されなかった。

分担研究者

荒川 宜親 (国立感染症研究所部長)	永武 毅 (長崎大学熱帯医学研究所教授)
生田 和良 (大阪大学微生物病研究所教授)	村田 幸作 (京都大学大学院農学研究科教授)
江石 義信 (東京医科歯科大学助教授)	山谷 睦雄 (東北大学医学部附属病院老年呼吸器内科助教授)
高 昌星 (信州大学医学部教授)	結城 伸泰 (独協医科大学助教授)
近藤 一博 (東京慈恵会医科大学医学部教授)	渡辺 邦友 (岐阜大学生命科学総合実験センター教授)
鈴木 和男 (国立感染症研究所室長)	
中島 淳 (横浜市立大学医学部助教授)	

A. 研究目的

難治性疾患（いわゆる“難病”）と定義される疾患の大部分は原因が不明である。それ故原因療法ができないでいる。難治性疾患の原因としてウイルスや細菌あるいはそれらの産物が引き金となり自己免疫疾患が惹起されたり、微生物の潜伏・持続感染、あるいはそれらの再活性化により、さらには未知の病原体の関与が示唆される。当研究班では難治性疾患を引き起こす病原体、その発症機序を臨床研究班と密接に連携をとり、明らかにすることにより原因究明を行い、その結果として発症の予防あるいは効果的な治療法の開発に結び付けることを目的とする。

B. 研究方法

1) 神経変性疾患における起因ウイルスの解析

パーキンソン病およびアルツハイマー病患者脳検脳でのボルナ病ウイルスの検出とその普遍性について詳細に検討するとともに、このウイルスの持続感染状態における抗ストレス応答能について検討した（生田）。

2) ギラン・バレー症候群の発症に関わる病原因子、宿主因子の解明

ガングリオシド様 LOS が GBS 発症に関与するのかわかりにされていないので、菌株におけるガングリオシド様 LOS の分布を調べ、GBS 患者における血中自己抗体の反応特異性や神経所見との関連を検討することで、GBS 発症に直接関与しているかを検証した（結城）。MAP kinase ファミリーに属する 3 つの細胞内酵素蛋白の発現を、一過性の末梢神経系の炎症性脱髄疾患で臨床的・病理学的特徴が GBS と酷似している実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAN）において検討した。（高）。

3) サルコイドーシスの病因解明

Propionibacterium acnes (*P. acnes*) 由来の trigger factor 蛋白は、慢性安定期にあるサルコイドーシス患者の約 2 割で患者特異的な細胞性免疫反応を引き起こすことが知られている。今回我々は *P. acnes* trigger factor 蛋白に対して実験的に誘導された過敏性免疫反応によりマウスに肉芽腫性病変を引き起こしうるか否かを検索した（江石）。患者、感染症における *P. acnes* の宿主内動態と病原性発現を微生物学的に明らかに

する。発症後の年数とプロピオニバクテリアの分離率との間に有意な関係があることに関する仮説を確認することおよび糞便凍結保存の定量結果に及ぼす影響について検討した（渡辺）。

4) 慢性難治性気道感染症疾患における微生物感染の関与とその除去方法の開発

慢性肺気腫の呼吸不全における気道ウイルス感染（特にライノウイルス）と細菌感染の関係を明らかにする（山谷）。非莢膜保有インフルエンザ菌(NTHi)のヒト気道上皮細胞上のバイオフィーム産生について検討する（永武）。*Shingomonas* 属細菌がアルギン酸リアーゼを生産し、それが緑濃菌を分解することを明らかにしてきた。緑濃菌のバイオフィーム形成に関与するポリリン酸キナーゼ阻害剤の開発を行う（村田）。

5) 難治性血管炎と真菌の関与

難治性血管炎の原因究明を行うことを目的として、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein CADS/CAWS が血管炎を誘導するがマウスの系統差があることに注目し、CADS/CAWS 誘導に反応する遺伝子群を特定する。CADS/CAWS による誘導でのサイトカイン産生におけるマウスの系統差および好中球の機能を解析した。また誘導の際のマウスの系統差を利用して遺伝子マップ解析もあわせて検討した（鈴木）。

6) 神経疾患および消化器疾患の起因ウイルスの解明

βヘルペスウイルスの潜伏感染と再活性化を直接検査できる方法を開発し、慢性難治性疾患の発症機序を解明することを目的とする。本年度はクローン病および多発性硬化症との関係について潜伏感染特異的遺伝子蛋白に対する抗体の検索を行った（近藤）。Crohn 病の初期病変として直径 1-2 mm の Aphtoid Lesion が内視鏡的には知られ、この初期病変における遺伝子発現のプロファイリングを行い、疾患に関与の強く疑われる遺伝子およびウイルスを網羅的に検索し同定することを目的とした（中島）。

7) 既知の細菌、ウイルスを用いた難治性疾患との関連の探索

マイコプラズマは細胞壁を持たない細菌で、動物細胞と同じでリン脂質を含む細胞膜のみを持つが、この菌の肺炎マイコプラズマ以外の病原性については知られていない。IgA 腎症、特発

性間質性肺炎等の難病につき患者血液、咽頭スワブ、尿等を用い抗体解析、分離等の方法により関連を探索する(荒川)。ヒトに潜伏・持続感染するヒトヘルペスウイルスと難治性疾患との関わりをウイルス学的に探索する(佐多)。

(倫理面への配慮)

人体検体を研究に用いる際には、主治医が説明の後患者の同意を当該機関ごとに得ている。動物実験は機関ごとに担当委員会の承認のもとに実施されている。ヒト由来遺伝子の解析については必要に応じ各機関の研究倫理委員会で承認を得てから行う。

C&D. 研究結果及び考察

1) 神経変性疾患における起因ウイルスの解析

C6(ラットグリア系由来)、OL(ヒトオリゴデンドロサイト系由来)の非感染細胞およびBDV持続感染細胞に各種ストレスを負荷した。ストレス蛋白質とストレス関連細胞内シグナルの誘導をウェスタンブロット法により検討した。BDV持続感染細胞では、各種ストレス負荷によるHSP70の発現量に顕著な低下が認められた。また、P-Tg脳サンプルについて、GLAST蛋白質およびGLT-1蛋白質についてウェスタンブロット法にて解析した。グルタミン酸トランスポーターGLAST蛋白質の発現は8週齢ならびに16週齢において特に小脳で顕著に減少していた。一方、GLT-1蛋白質の発現には、顕著な差が認められなかった。これらのことより、P-TgにおけるP蛋白質の発現は、アストロサイトのグルタミン酸の取り込みを阻害して、神経生理学的な異常とそれに引き続く行動異常を誘発する可能性が考えられた。(生田)。

2) ギラン・バレー症候群の発症に関わる病原因子、宿主因子の解明

ガングリオシド様LOSとして、GM1、GD1a、GQ1b/GT1aエピトープはそれぞれ、60%、49%、21%の菌株でみられた。腸炎患者由来株と比べGBS患者株ではGM1やGD1aエピトープを有する頻度が有意に高いことが示された。血清型、神経所見、抗ガングリオシド抗体との関連では、GM1とGD1aエピトープを有する菌株は、血清型がHS:19であることが多く、四肢麻痺や血中IgG抗GM1・GD1a抗体と密接な関連がみられた。GQ1b/GT1aエピトープはHS:2やHS:4 complexと関連がみられ、外眼筋麻痺などの脳神

経麻痺や運動失調、血中IgG抗GQ1b抗体を高頻度に認めた。(結城)。初めてEANの経過中に3つのMAP kinaseがリン酸化されることを明らかにした。ウェスタンブロットによる検討で、MAP kinaseがEAN発症ラットの炎症病変部位である坐骨神経で活性化されることを明らかにした。これらMAP kinaseが末梢神経系に障害的に作用するのか、あるいは防御的役割を担っているかについてはさらなる検討が必要である(高)。

3) サルコイドーシスの病因解明

C57BL/6雌マウスに*P. acnes* trigger factor 蛋白の断片であるリコンビナント蛋白(RP35)を完全 Freund adjuvant とともに反復皮下免疫した。*P. acnes*の前投与の有無にかかわらず、RP35または*P. acnes*を感作免疫したマウス群の一部で肺肉芽腫が認められた。24匹の無処置マウスで*P. acnes*の定量培養を試みたところ8匹(33%)の肺組織から本菌が培養可能であった。ヒトの末梢肺組織や肺門部リンパ節からも約半数の症例で本菌が培養可能であり他の細菌類はほとんど検出されないことから、*P. acnes*はこれらの組織に常在感染している可能性が高い。細胞内細菌に有効な抗生剤による除菌処置が、本実験モデルにおける肺肉芽腫の形成を防止できる可能性がある(江石)。*Propionibacterium*の分離を容易にするための新規培地を作製し、糞便中の分離を行った。そのデータを解析ツールで検討したところ、罹患年数1-2年のサルコイドーシス患者糞便から有意に高率に*Propionibacterium*が分離されるという結果をえた。凍結による顕著な菌数の変化は認めなかった。したがってサルコイドーシス患者の68.2%で糞便からプロピオニバクテリアが10 cfu/g以上、10,000 cfu/g以下の菌量で分離されることが明らかとなった。サルコイドーシス患者におけるプロピオニバクテリアの侵入門戸として消化管を考慮に入れる必要がある(渡邊)。

4) 慢性難治性気道感染症疾患における微生物感染の関与とその除去方法の開発

慢性肺気腫や気管支喘息はウイルス感染により急性増悪し呼吸不全をきたす。その原因の一つとして気道の喀痰増加が考えられている。培養ヒト気道上皮および粘膜下腺細胞培養系でライノウイルス感染とムチン産生との関連を調べた。ライノウイルス感染は気管上皮細胞や気管粘膜下腺細胞におけるムチンmRNA合成を著明に亢進した。マクロライド抗生物質エリスロマイシ

ンが気管上皮細胞のムチン分泌を抑制した。NF-kappa B, tyrosine kinase, MAP kinase は細胞内機序として関与することを明らかにした。プロトンポンプ阻害薬のライノウイルス感染抑制効果を調べ、培養液ライノウイルス量、細胞内ライノウイルス RNA 量を減少させた。慢性肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患の急性増悪において喀痰増加が関与するが、増加するムチン蛋白の内容は MUC5AC および総ムチン量の著明な増加を認めた。(山谷)。非莢膜保有インフルエンザ菌(NTHi) は、biofilm growth assay および continuous flow chamber assay、またヒト気道上皮細胞上でも経時的に増加するバイオフィーム産生が確認できた。IsgG, rfe, siaA, siaB を削除した mutant は野生株に比べてバイオフィーム産生が明らかに低下していた。また、野生株で sialic acid を加えない培養液下では、バイオフィーム産生の明らかな低下が認められた(永武)。緑膿菌バイオフィーム感染症にアルギン酸リアーゼを利用する治療法を検討している。今年度は緑膿菌における BF 分解機構に焦点を当て、それに関わる分子の同定と機能解析を行った。その結果、緑膿菌がペリプラズムと細胞質に各々局在するアルギン酸リアーゼ AlgL と PA1167 の協調作用によりアルギン酸バイオフィームを完全分解していることが示唆された。阻害剤の探索や治療法の開発につながると考えられる(村田)。

5) 難治性血管炎と真菌の関与

真菌由来分子によって誘導される好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) が、難治性血管炎の病態に相関していることを明らかにした。また、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein CADS/CAWS が血管炎を誘導し、その誘導にはマウスの系統差があることを示した。CADS/CAWS 誘導に反応する遺伝子群を特定するため、系統差を利用して遺伝子マップ解析をし、CADS/CAWS での誘導にかかわるサイトカインや好中球の活性化を検討し、TNF α 、IL-6 および IL-10 の関与を認めた。また、CAWS 投与初期には、好中球が血中に一過性に動員され活性化状態にあることがわかった。(鈴木)。

6) 神経疾患および消化器疾患の起因ウイルスの解明

難治性疾患における β ヘルペスウイルスの関与について明らかにする目的で、クローン病患者の 8 例中 4 例に HHV-6 の潜伏感染特異的遺伝子

蛋白に対する抗体が検出された。多発性硬化症の患者 10 例では検出されなかった(近藤)。クローン病の初期病変における網羅的遺伝子発現解析のデータベースからウイルス特異的な遺伝子発現は認められなかったが、癌遺伝子である myc, ras の発現が認められた(中島)。

7) 既知のウイルス、細菌を用いて難治性疾患との関連の探索

ヒトに感染するマイコプラズマの血清診断系の開発を目的に、マイコプラズマ 3 種の抗体価測定系を改良し、さらに新たな抗原を用いて、36 例の IgA 腎症患者血清中の抗体価を測定した。その結果、健康人よりも高い患者例が認められた。扁桃におけるマイコプラズマ DNA 検出を行ったところ、*M. fermentans*, *M. salivarium* ならびに *M. pneumoniae* 遺伝子の陽性例を認めた。扁桃上皮の異常と腎病変との関連が報告されていることから、扁桃に持続感染し、リンパ球活性化能を有する微生物の一つとして、マイコプラズマが候補に上げられる可能性を示した。

(荒川)。原発性肺高血圧症において HHV-8 が関与するという報告が最近みられたので、本邦の剖検例について HHV-8 の潜伏感染関連蛋白が plexiform lesion で検出できるかどうか検討したが、HHV-8 の各種抗体を用いた免疫組織化学および 2 種類の HHV-8 DNA PCR 法でも陰性であった。(佐多)。

E. 結論

ボルナ病ウイルスが神経系細胞のストレス応答能を低下させること、ウイルス蛋白質である P 蛋白質のみで中枢神経内でグルタミン酸の取り込みを阻害することが示唆されたことから、さまざまな疾患の中枢神経系病態に関与している可能性が考えられた。*C. jejuni* 腸炎後ギランバレー症候群 (GBS) の発症には菌体とヒト末梢神経との間の分子相同性の存在が重要で、*C. jejuni* LOS の構造により、GBS 患者の自己抗体の反応特異性が決定され、神経所見が規定されることが考えられた。MAP kinase はいずれも EAN の発症経過中にリン酸化され、末梢神経系炎症性脱髄疾患の発症・制御に重要な役割を担っていることが示唆された。*P. acnes* trigger factor のリコンビナント蛋白は、マウスを前もって抗原暴露する必要なく、これをアジュバントとともに感作免疫するだけで、肺にサルコイドーシス類似の肉芽腫性病変を誘導しうることが判明し

た。サルコイドーシス患者の約 70%に糞便からプロピオニバクテリアが 10 cfu / g 以上に分離され、その菌数は、10,000 cfu / g 以下であることが明らかになった。感冒の主因であるライノウイルス感染により増加する気道上皮細胞および粘膜下腺細胞の喀痰の主成分であるムチン合成には NF-kappa B、tyrosine kinase、および MAP kinase を介した細胞内機序の関与を認めた。プロトンポンプ薬は受容体 ICAM-1 および酸性エンドソーム減少を介してライノウイルス感染抑制効果を有することが明らかとなった。また慢性肺気腫急性増悪時において、喀痰中の MUC5AC などのムチン合成増加が明らかとなった。非莢膜保有インフルエンザ菌はヒト気道上皮細胞上でもバイオフィルムを産生することが確認され、またそれには sialic acid が重要な役割をはたしていることが示唆された。緑膿菌は AlgL をアルギン酸分解の主要酵素として、ペリプラズムに分泌し、AlgLによりアルギン酸の MM ブロックを切断後、その反応産物(MG ブロック)を細胞質に取り込み、PA1167 の作用により、アルギン酸を完全分解することが想定された。カンジダ菌由来分子分が血管炎を誘導し、難治性血管炎の病態マーカーである好中球自己抗体 ANCA も病態と連動した。*Candida albicans* 由来糖ペプチドが不可欠で、サイトカインと連動する活性化好中球が重要な役割を担っているものと考えられた。クローン病患者の血清に HHV-6 潜伏感染特異的遺伝子蛋白抗体が検出された。またその初期病変においてウイルス特異的な遺伝子発現は認められなかった。IgA 腎症の原因としてマイコプラズマが候補に上げられる可能性を示した。原発性肺高血圧症患者病理組織検体に HHV-8 は検出されなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表や学会発表は各分担研究者の報告書に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む。)

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

1. 特定疾患とウイルスの関与

分担研究者 佐多 徹太郎 (国立感染症研究所感染病理部長)

研究協力者 片野 晴隆、佐藤 由子(国立感染症研究所感染病理部)
伊藤 金次、渋谷 和俊、佐地 勉(東邦大学医学部)

研究要旨 原発性肺高血圧症 primary pulmonary hypertension(PPH)は基礎疾患となりうる心肺疾患がなく、原因不明の肺動脈系の血管抵抗が増大し、肺動脈圧の持続的な亢進から肺性心、右心不全を来す予後不良の疾患である。発症はまれで、一部の患者には BMPR2 の遺伝子異常が発見されているが、多くの症例では原因不明である。病理では肺動脈枝の中膜肥厚、内膜の同心円状線維化による内腔の狭窄を特徴とした plexiform lesion といわれる病変部が認められる。2003 年、米国のグループがこの plexiform lesion にカポジ肉腫の原因ウイルスとして知られるヒトヘルペスウイルス 8 (human herpesvirus 8, HHV-8) を検出し、本疾患との関連が示唆された(NEJM 349:1113-1122)。われわれは日本人 PPH 症例 8 例から採取した plexiform lesion を含む剖検肺組織につき HHV-8 の検索を行った。HHV-8 の潜伏感染タンパク LANA を検出する免疫組織化学染色ではいずれの症例にも陽性シグナルを認めなかった。さらに、パラフィンブロックから DNA を抽出し、HHV-8 のコードする遺伝子 K1 と ORF26 を検出する PCR を行なったが、PPH の 8 例はすべて陰性の結果であった。これらの結果から、日本人 PPH 症例では HHV-8 の関与はまれであることが推察された。

A. 研究目的

原発性肺高血圧症 primary pulmonary hypertension (PPH) は基礎疾患となりうる心肺疾患がなく、原因不明の肺動脈系の血管抵抗が増大し、肺動脈圧の持続的な亢進から肺性心、右心不全を来す疾患である。病理組織学的には肺動脈枝の中膜肥厚、内膜の同心円状線維化による内腔の狭窄を特徴とした plexiform lesion といわれる病変が認められる。発症はまれであるが、おもに若い女性に発症し、2000 年には国内で約 200 例が報告されている。本邦では 1975 年、「厚生省特定疾患原発性肺高血圧症調査研究班」が設置され、PPH の診断基準が確立された。治療はプロスタグランジン I₂ の静脈内持続注入療法が主であるが、予後は不良で 5 年生存率は 5 割を切る。家族性に発症するケースもあり、その約半分には bone morphogenic protein receptor 2 (BMPR2) の遺伝子異常が発見されているが、多くの症例では原因不明である。

2003 年、米国のグループがこの plexiform lesion にカポジ肉腫の原因ウイルスとして知られるヒトヘルペスウイルス 8 (human herpesvirus 8, HHV-8) を plexiform lesion に検出し、本疾患との関連が示唆された (NEJM 349:1113-1122)。HHV-8 は 1994 年にエイズに合併したカポジ肉腫から発見された新規のヒトヘルペスウイルスで、これまでカポジ肉腫のほかには原発性体腔液性リンパ腫、多巣性キャスルマン病などカポジ肉腫以外では B 細胞のリンパ増殖性疾患との関連が知られている。HHV-8 はヒトヘルペスウイルスの一種でありながら他の型のヘルペスウイルスとは異なる点が多い。170kbp ほどあるウイルス遺伝子にはヒトのサイトカインや細胞周期に関わるタンパクの遺伝子ホモログがコードされており、病態の形成に深く関与すると考えられている。また、他のヒトヘルペスウイルスは健常者のほとんどが既感染であるのに対し、HHV-8 感染は日本人ではまれであり、血清抗体は日本人健常者の約 1%に

見られる。ウイルスは感染すると細胞内で潜伏感染し、細胞内で多くのウイルスが一度に複製される増殖感染（細胞溶解性感染 lytic infection）となることはまれである点も他のヒトヘルペスウイルスとは異なる。HHV-8 が起こす疾患であるカポジ肉腫、リンパ腫などではその腫瘍細胞の中で HHV-8 は潜伏感染しているにとどまり、lytic infection になっている細胞は非常に少ない。ウイルスの感染経路は唾液を介した粘膜感染と考えられているがその詳細は不明である。

HHV-8 が PPH のような明らかな増殖性疾患でない疾患との関連が示唆されたのは初めてであり、癌ウイルスとして位置づけられている HHV-8 の PPH の病因への関わりは疑問が多い。そこで、われわれは PPH 発症と HHV-8 の関与を明らかにする目的で日本人症例 8 例につき、HHV-8 の検出を試みた。

B. 研究方法

1. HHV-8 の潜伏感染タンパク LANA 特異抗体の作成

HHV-8 の open reading frame 73 (ORF73) の N 末端である 257 アミノ酸 (35 から 291) をグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク法でリコンビナントタンパクとして作成した。これらのタンパクをアジュバントとともにウサギに免疫し、2-3 ヶ月後に血清を採取した。血清は硫酸沈殿後、アフィニティーカラムを用い抗体成分を精製した。抗体の特異性は HHV-8 感染細胞株 TY-1 の蛍光免疫染色、およびウエスタンブロットにより確認した。

2. 免疫組織学的検出法

生検および剖検病理組織は 10% 緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。4 μm 厚の切片を作製し、シランコートガラススライドに貼付した。脱パラフィン後、クエン酸処理にて抗原賦活化処理を行い、リン酸バッファーで洗浄後、上記ウサギポリクローナル抗体を一次抗体として反応させた。洗浄後、ビオチン標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を二次抗体として、三次抗体にはペルオキシダーゼ標識ストレプトア

ビジンを順次反応させた。抗体の種類により、Catalyzed Signal Amplification kit (DAKO) によりシグナルを増強させた。ジアミノベンチジンで発色後、アルコール脱水、キシレン透徹、封入後、検鏡した。また、免疫染色とは別に各標本はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で全体の形態変化を観察した。

3. PCR

10 μm のホルマリン固定パラフィン包埋切片を 2 枚作製し、エッペンドルフチューブにいれ、キシレンで脱パラフィンした後、エタノールで置換し、proteinase K で一晚消化、フェノールクロロフォルムで DNA を抽出した。HHV-8 の ORF26 に含まれる KS330 領域の一部 233bp を PCR 法にて増幅した。また、同 ORF-K1 領域の一部である 162bp を nested PCR で増幅した。さらに PCR の内部標準として beta-globin 遺伝子の増幅も同時に行った。増幅した DNA 断片は 2% アガロースゲルに電気泳動し、エチジウムブロマイド染色をおこなった。

(倫理面への配慮)

実験に用いたすべての剖検組織の検討は事前の剖検承諾書を得たものに関して行われた。また、遺伝子組換え実験は当該施設 (国立感染症研究所) の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。

C. 研究結果

1. 検索対象

日本人 PPH 症例 8 例の剖検例を検索した。患者は 0 歳から 41 歳までで平均 29 歳。男性 3 人と女性 5 人である。(表) いずれも基礎疾患となりうる心肺疾患がなく、原因不明の肺動脈系の血管抵抗が増大し、肺動脈圧の持続的な亢進がみられた患者で、PPH の診断がなされている。剖検標本のうち、肺のパラフィンブロックにつき plexiform lesion の存在が確認されたものを以下の実験に用いた。

2. 免疫染色 (図 1)

日本人 PPH 症例 8 例から採取した剖検肺組

織につき HHV-8 の潜伏感染タンパク LANA を検出する免疫組織学的染色を行なった。いずれの組織標本にも明らかな plexiform lesion が含まれており、血管中膜における細胞の増生と内膜の線維性の肥厚に伴う内腔の狭窄が見られたが、免疫染色の結果、いずれの症例にも陽性シグナルを認めなかった。あきらかな plexiform lesion も詳細に観察したが、陽性シグナルは一切見られなかった。一方、陽性コントロールとして染色されたエイズ合併カポジ肉腫の組織標本では紡錘形腫瘍細胞の核内に点状の陽性シグナルが認められた。また、カポジ肉腫が肺に発症した症例を同様の方法で検索するとやはりカポジ肉腫の紡錘形の腫瘍細胞にのみ LANA の陽性シグナルを認め、肺胞上皮やマクロファージ、リンパ球などには一切陽性シグナルを認めなかった。

3. PCR (図 2)

パラフィンブロックの薄切片から DNA を抽出し、HHV-8 のコードする遺伝子 K1 と ORF26 を検出する PCR を行なった。同時に内部標準として beta-globin 遺伝子の増幅を行なった。K1 領域を増幅する PCR では nested PCR を行った。その結果、PPH の 8 例は K1 領域および ORF26 領域いずれの PCR でもすべて陰性の結果であった。標本はいずれも剖検例であるため、8 例中 3 例で内部標準である beta-globin の増幅が見られず、一部の標本では DNA の断片化が進んでいることが予想される。いずれにせよ、検索した症例すべてが HHV-8 陰性の結果であり、LANA の免疫染色の結果と合わせると日本人 PPH 症例では HHV-8 の関与はまれであることが推察された。

D. 考察

本研究では日本人 PPH 症例においては HHV-8 感染との関連は認められなかった。ドイツの研究グループが PPH の血清中の抗 HHV-8 抗体を調べた結果、PPH と HHV-8 感染の関連は認められなかったとする報告が NEJM に掲載されており、我々の研究はそれを免疫組織学的検索から裏付けるデータとなった。当初の HHV-8 との関連を指摘した論文では LANA の免疫染色において、肺胞上皮やマクロファージ、血管

内皮細胞などが LANA 陽性になっているのに対し、plexiform lesion を構成する中膜の平滑筋細胞には LANA の染色が認められないことが報告されている。こうした染色態度はこれまで報告されてきた LANA のそれとは大きく異なるものであり、彼らが特殊な状況、あるいは特殊なサンプルで HHV-8 を検出した可能性がある。さらに、血清抗体の検出は HHV-8 感染の既往を知るもっとも有力な方法であるが、ドイツの研究グループのデータはその関連を否定するデータである。これらのことと我々のデータを考え合わせると一般に PPH の病因における HHV-8 感染の関連は薄いものと思われる。しかし、研究対象である PPH 患者の人種がいずれの研究でも異なるので、人種により病因の差がある可能性は否定できない。日本人症例については、さらに症例を増やして検索するとともに、血清学的検索が必要であろう。

PPH そのものについては家族性のものも存在することからその病因には遺伝子の関与がもっとも考えられる。BMP2 の変異が検出される例は家族例の半数にとどまるが、これは遺伝子的な要因がほかにも存在することを意味する。加えて、感染性要因も捨てきれない。PPH はエイズ患者でその発症率が高いことが知られている。免疫不全者における高い発症率はウイルスや他の微生物の関与の可能性を示唆するものであり、HHV-8 もエイズ患者、とくに同性愛傾向の男性患者に高率に感染が認められることから、その有力な候補の一つであった。もともと HHV-8 との関連を指摘したグループの研究も HHV-8 関連疾患である多巣性キャスルマン病と PPH が合併した例と遭遇したことからはじまった。しかし、これまで報告されている HHV-8 が関連する疾患はカポジ肉腫やリンパ腫などのあきらかに形質転換を起こした疾患である。また、多巣性キャスルマン病では HHV-8 の増殖性感染が見られ、HHV-8 が活発に複製される。そうした HHV-8 関連疾患の特徴と PPH を比較してみると PPH でみられる plexiform lesion の細胞増生や線維化は平滑筋細胞や血管内皮細胞が形質転換しているのではなく、そのクローナリティーも証明されていない点で大きく異なる。さらに、ウイルスが活発に活動しているところは細胞溶解性感染がおき、細胞は溶解、破壊されるのが通常であるが、plexiform lesion の細胞増生部位でそのような像は見られず、ウイルスが活発に活動し

ている場であるとは考えられない。こうした状況から、HHV-8 感染が PPH の plexiform lesion に関連しているとは病因論からは考えにくい。PPH の病因は遺伝子的な要因に加え、未知あるいは HHV-8 以外の既知のウイルス、微生物の関わりを考えるべきで、今後の検索が期待される。

E. 結論

日本人 PPH 症例 8 例から採取した plexiform lesion を含む剖検肺組織につき HHV-8 の潜伏感染タンパク LANA を検出する免疫染色と ORF26, K1 を検出する PCR を行った結果、すべての症例につき HHV-8 は検出されなかった。これらの結果から、日本人 PPH 症例では HHV-8 の関与はまれであることが推察された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukushi M, Higuchi M, Oie M, Kasolo F, Ichiyama K, Yamamoto N, Katano H, Sata T, Fujii M: Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with myeloid cell nuclear differentiation antigen induced by interferon α . *Virus Gene* 2003, 27: 237-47.
2. Katano H, Sata T: Human herpesvirus 8 (HHV-8). *Antimicrobial Therapy and Vaccine*. 2nd Ed. By Yu VL, Weber R, Raoult D. 2002, pages 1243-1247, Apple Trees Productions, LLC.
3. Rosales CM, McLaughlin MD, Sata T, Katano H, Veno PA, De Las Casas LE, Miranda RN.: AIDS presenting with cutaneous Kaposi's sarcoma and bacillary angiomatosis in the bone marrow mimicking Kaposi's sarcoma. *AIDS Patient Care and STDs* 2002, 19: 573-577.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

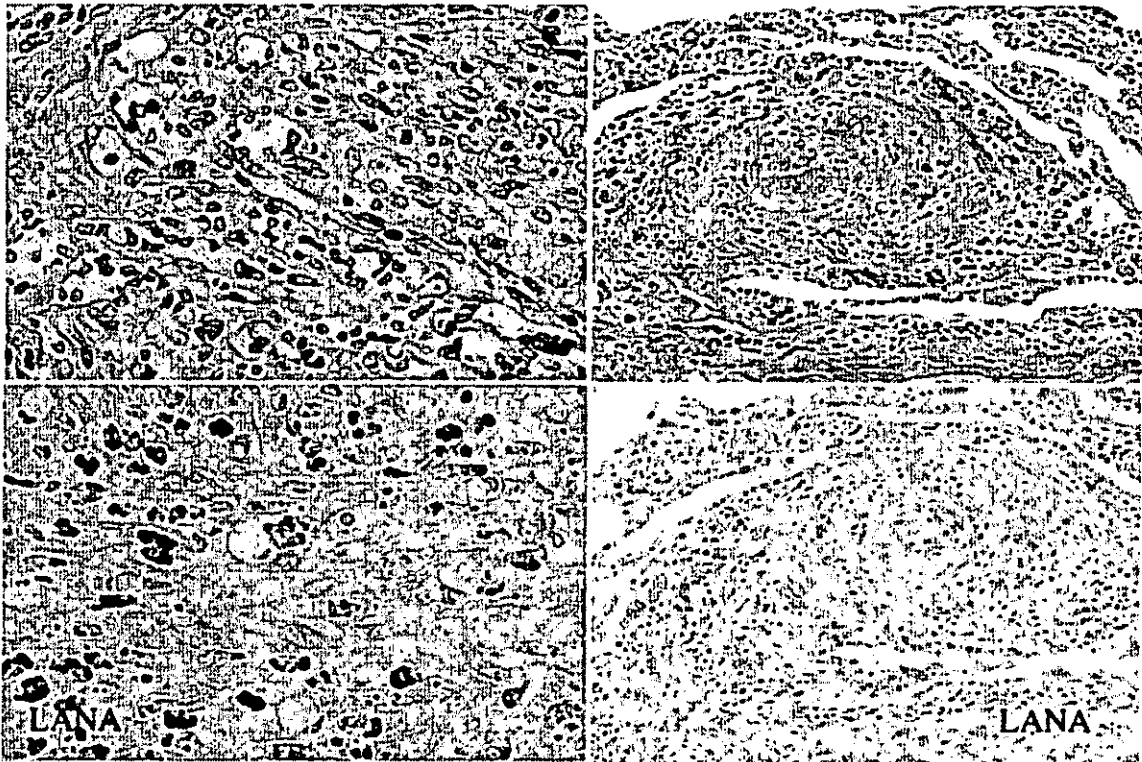


図1 カポジ肉腫と原発性肺高血圧症の plexiform lesion の免疫組織化学染色

(左上) カポジ肉腫の組織像。(ヘマトキシリン・エオジン染色) 紡錘形の腫瘍細胞が赤血球を容れた血管隙を作りながら増殖している。(左下) カポジ肉腫における LANA の染色像。抗 HHV-8 LANA 抗体を用いた免疫染色。多くの点状の陽性シグナルが紡錘形細胞の核内に認められる。(右上) 原発性肺高血圧症の plexiform lesion。中膜の肥厚と血管内皮の増生により内腔が狭窄している像が認められる。増殖している細胞に異型はない。(右下) 原発性肺高血圧症の plexiform lesion における LANA の染色像。陽性シグナルは全く認められない。

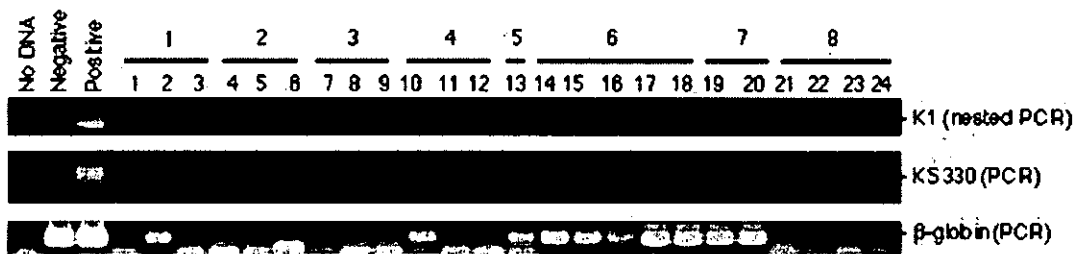


図2 HHV-8 の K1, KS330 の PCR。8 症例から得られた肺のパラフィンブロック 24 検体につき HHV-8 の検索が行われた。いずれも陰性の結果である。下は内部標準の beta-globin。剖検例なので、内部標準の DNA が増幅されていないサンプルも存在する。

Sample No.	Patient No.	Age	Sex	Nested PCR (K1)	PCR (KS330)	PCR (β -globin)	IHC (LANA)
1	1	29	M	-	-	-	-
2				-	-	+	-
3				-	-	-	-
4	2	41	M	-	-	-	-
5				-	-	-	-
6				-	-	-	-
7	3	0	F	-	-	-	-
8				-	-	-	-
9				-	-	-	-
10	4	39	F	-	-	+	-
11				-	-	-	-
12				-	-	-	-
13	5	0	F	-	-	+	-
14	6	21	F	-	-	+	-
15				-	-	+	-
16				-	-	+	-
17				-	-	+	-
18				-	-	+	-
19	7	16	F	-	-	+	-
20				-	-	+	-
21	8	24	M	-	-	-	-
22				-	-	-	-
23				-	-	-	-
24				-	-	-	-

表：8 症例から得られた肺のパラフィンブロック 24 検体における HHV-8 検索の結果

2. 微生物の慢性感染が関与する特定疾患における マイコプラズマの探索

分担研究者 荒川 宜親、佐々木 裕子 (国立感染症研究所細菌第二部)

研究協力者 松田 和洋 (国立ガンセンター研究所薬効試験部)
永田 典代、原嶋 綾子 (国立感染症研究所感染病理部)
見理 剛 (国立感染症研究所細菌第二部)
堀田 修、宮崎 真理子 (仙台社会保険病院内科・腎臓)
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 マイコプラズマ3種の抗体価測定系を改良し、新たな抗原を用いて、36例のIgA腎症患者血清中の抗体価を測定した。抗*M. penetrans* rPDH-E2-IgG抗体陽性者1例、抗*M. pneumoniae*/*M. genitalium* rP1-8-IgA抗体価は、患者群で健常人群よりも有意に高く ($p<0.0001$)、抗*M. fermentans* GGPL-III-IgG抗体価は、健常人よりも高い患者例が認められた。扁桃におけるマイコプラズマDNA検出を行った結果、*M. fermentans*、*M. salivarium*ならびに*M. pneumoniae*遺伝子の陽性例を認めた。IgA腎症患者8例の扁桃における病理所見では、6/8例で陰窩上皮層の細胞間浮腫、すなわち海綿状態がみられ、2/8例で上皮内に好中球の浸潤が観察された。IgA陽性細胞は、5/8例で陰窩に近い上皮内に浸潤していた。扁桃上皮の異常と腎病変との関連がすでに報告されていることから、扁桃に持続感染し、リンパ球活性化能を有する微生物の一つとして、マイコプラズマが候補に上げられる可能性を示した。

A. 研究の背景ならびに目的

IgA腎症は、20歳台を好発年齢とし、初期には呼吸器症状や、高熱など微生物の感染を疑わせる先行症状があり、その後、蛋白尿ならびに血尿を主体とする腎障害を呈する。炎症の回復、悪化を繰り返すうち、自然治癒例もあるものの、約10年を経て、約40%の患者で腎透析治療を必要とする経過をたどる、患者にとっても医療保険行政にとっても損失の多い疾患である。我が国の慢性糸球体腎炎の約60%を占め、年間約5000人の方が腎透析治療を開始される。病気初期に扁桃摘出を行うことで緩解する症例が知られており、最近では、扁桃摘出とステロイド治療の組み合わせで緩解率を上げる治療法についての検討が試みられている。腎疾患として、糸球体メサンギウム領域の増生ならびに糸球体へのイムノグロブリン沈着を呈する他、

全身の免疫系異常や、血管炎が病態に関与すると考えられており、腎臓局所における病態理解のみで解決できない全身疾患である。我々は、以前にカニクイザルを用いたIgA腎症モデル系の作成を試み、マイコプラズマの一種を感染させ、全身リンパ組織とくに血管内皮細胞へのマイコプラズマ抗原の局在、リンパ球異常とくにアポトーシスの昂進、糸球体メサンギウム領域の増生と糸球体病変部へのマイコプラズマ抗原の局在等を確認した。その結果から、マイコプラズマ感染の関与がIgA腎症の病態に関与しうるとの印象を得たので、実際の患者におけるマイコプラズマ感染の有無を解析する為、診断法の改良を行った。昨年度、抗原のリコンビナント化を行った*Mycoplasma pneumoniae*/*M. genitalium*に加え、今年度は、*M. penetrans*の主要抗原を同定し、リコンビナント化した。また、*M. fermentans*については、

糖脂質 GGPL-III (共同研究者、松田和洋氏より分与された) を抗原に用いた。これら3種のマイコプラズマ種について、患者血清中の抗体価測定を行った。さらに、治療目的で摘出された扁桃組織中のマイコプラズマ遺伝子の解析を *M. fermentans*, *M. salivarium* ならびに *M. pneumoniae* の3種について行った。加えて、マイコプラズマがリンパ球活性化能等を有することから、患者摘出扁桃の病理像を観察した。

B. 材料と方法

1) *M. penetrans* 主要抗原の同定ならびにリコンビナント蛋白の作成

M. penetrans に対する免疫抗体をマウスで作成した。*M. penetrans* 全菌体蛋白を SDS-PAGE ならびに二次元電気泳動で展開し、ニトロセルロース膜に転写したシートを免疫抗体と反応させ、HRP 標識抗マウス IgG 抗体と反応、発色させ、免疫抗体が認識する蛋白を解析した。蛋白スポットの解析にあたっては、東京医科大学、臨床プロテオームセンターの川上隆雄、西村俊秀両氏に御協力頂いた。抗体で認識された蛋白スポットについて、その一部アミノ酸配列をエドマン分解解析法にて決定した。得られたアミノ酸配列を、我々が決定した *M. penetrans* ゲノム情報 (<http://www.nih.go.jp/MyPET/>) と照らし合わせ、その遺伝子を同定した。マイコプラズマにおけるコドン使用は、他の生物における終始コドン UGA をトリプトファンと翻訳することから、大腸菌にクローニングされたマイコプラズマの遺伝子は、発現の際、ORF 中のトリプトファンで発現が中断してしまう。そこで遺伝子の一部、TGA コドンを含まない N 末側の配列を大腸菌に組み込み、His-tag との融合蛋白として発現させ、ニッケルカラムにて精製した。リコンビナント蛋白はマウスの腹腔内ならびに皮下に免疫し、抗血清を作成した。

2) 3種のマイコプラズマに対する ELISA 系の改良

M. pneumoniae/*M. genitalium* に対する特異抗原リコンビナント P1-8 (rP1-8) ならびに、*M. penetrans* に対するリコンビナント

PDH-E2 (rPDH-E2) は、大腸菌で作成後、精製したものを抗原とした。*M. fermentans* に対する phosphocholine 含有 glycoglycerophospholipid (GGPL-III) は、国立ガンセンター研究所の松田和洋氏より分与された。

3) IgA 腎症患者血清中の抗マイコプラズマ抗体価測定

それぞれの抗原をコーティングした ELISA プレートに、0.2%BSA 添加 PBS で 1:100 倍希釈した患者血清ならびに健常者血清と反応させた。二次抗体として HRP 標識抗ヒト IgG ならびに IgA と反応させ、洗浄後、基質 OPD で発色させ OD450nm を測定した。統計解析は、StatView を用いて行った。臨床検体の取り扱いについては、所属機関ならびに共同研究機関において研究倫理委員会の指示に従った。

4) IgA 腎症患者摘出扁桃におけるマイコプラズマ DNA の検出

治療用に摘出した扁桃の一部を病理組織用に処理し、一部を微生物 DNA 解析用として DNA を抽出し、マイコプラズマに対する PCR プライマーにて、遺伝子を増幅した。用いたプライマーは、*M. pneumoniae* 用には、16S rRNA 配列を、*M. fermentans*/*M. salivarium* 用には、以前に報告した *ftsZ* 配列を、複数のマイコプラズマ種に対するものとして 16-23Sr RNA spacer region 配列を基にしたプライマー (Takara, Co, Ltd.) を用いた。

5) IgA 腎症患者摘出扁桃のアポトーシス解析

扁桃組織のアポトーシス解析は、ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Intergen Co. Ltd.) を用いて TUNEL 法で行った。また、IgA 陽性細胞検出には、抗ヒト IgA 抗体を用いた免疫染色を行った。

C. 研究結果

1) *M. penetrans* 主要抗原の同定ならびにリコンビナント蛋白の作成

抗 *M. penetrans* 抗体は、*M. penetrans* 全菌体抗原に対して、リポ蛋白以外の主要蛋白として約 53kDa 蛋白と強く反応した。二次元電気泳動で展開した *M. penetrans* 全菌体抗原と抗体を反応させて得られた蛋白スポットのうち、分子量約 53kDa にあたるメジャースポットを切り出し、その N 末のアミノ酸配列を決定し、さらに *M. penetrans* 全ゲノム情報と照合した結果、約 53kDa の蛋白は、ピリベート、デハイドロゲネース E2 コンポーネント (PDH-E2、473 アミノ酸、推定分子量、約 52kDa、*phdC*) と同定された。大腸菌に組み込んだ 170 アミノ酸分の部分的 *phdC* 遺伝子の発現産物 (rPDH-E2 と称す) は、菌培養液 100ml から、mg オーダーで回収された。マウスで作成した抗 rPDH-E2 抗体は、*M. penetrans* 全菌体の約 53kDa 蛋白と特異的に反応したことから、目的の蛋白がリコンビナント化されたものと考えられた (図 1)。rPDH-E2 抗原は、他のヒト由来マイコプラズマ種である *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. orale* ならびに *M. salivarium* に対する抗血清とは反応しなかったことから、これらの種との交差反応性は、低いことが示唆された。

2) 3 種のマイコプラズマに対する ELISA 系の改良

M. penetrans rPDH-E2 抗原に対する ELISA 系において IgG 抗体価を測定したところ、健常人では陰性、リポ蛋白抗原 LAMP を指標として診断された *M. penetrans* 感染者は調べた 3 例全例において陽性であった (図 2)。*M. pneumoniae*/*M. genitalium* 両種に特異的な rP1-8 抗原を用いた ELISA 系において、健常人血清の殆どが IgG ならびに IgA 抗体を有しておらず、一方 *M. pneumoniae* 肺炎患者群では、有意に高値を示した (図 3)。*M. fermentans* GGPL-III 抗原に対する ELISA 系においては、健常人の殆どで IgG ならびに IgA 抗体は陰性であった。

3) IgA 腎症患者血清中の抗マイコプラズマ抗体価測定

IgA 腎症患者血清中の 3 種の抗原に対する抗体価を示す。*M. penetrans* rPDH-E2 に対

する IgG 抗体価は、36 例中 1 例で *M. penetrans* 抗体陽性者と同レベルに高値を示した (図 2)。この患者血清について、rPDH-E2 抗原に対するウエスタンブロットリング試験にて陽性を確認した。この患者は以前に行った LAMP 抗原に対する ELISA 系においても高値を示していたことから、*M. penetrans* 感染の可能性が強く疑われた。また、*M. pneumoniae*/*M. genitalium* 特異抗原 rP1-8 に対する IgA 抗体価は、図 3 に示すように、IgA 腎症患者群で有意に高かった ($p < 0.0001$)。とくに 4 例の患者における抗 rP1-8-IgA 抗体価は、*M. pneumoniae* 肺炎患者の平均値以上を示した。*M. fermentans* 特異的 GGPL-III に対する ELISA 抗体価は、図 4 に示すように、 $p = 0.0235$ ではあるが、IgA 腎症患者群で、健常人に比較して高値を示した。すなわち、IgA 腎症患者中に、抗 GGPL-III IgG 抗体価が高い患者が存在することが示された。

4) IgA 腎症患者摘出扁桃におけるマイコプラズマ DNA の検出

IgA 腎症において、腎臓病変は、免疫異常を含む全身性疾患の一部であると考えられる。我々は、免疫異常特にポリクローナルな IgA 抗体産生につながる粘膜免疫刺激の受容組織であり、かつ、呼吸器感染症状の場となりうる扁桃に注目して解析を行った。IgA 腎症患者摘出扁桃 11 例ならびにアデノイド 3 例について、マイコプラズマ DNA の有無を調べた結果、以前にも報告した通り、*M. fermentans*/*M. salivarium* に対する *ftsZ* 配列を基にした PCR プライマーでの陽性例は、扁桃で 9/11 (81%) 例、アデノイドで 2/3 例 (66%) であった。また、16-23S rRNA gene spacer 領域配列を基にしたプライマーでは、特異性が上がるものの感度は低下し *M. fermentans* 陽性は、扁桃で 3/11 例、アデノイドで 1/3 例ならびに *M. salivarium* 陽性は、扁桃 2/11 例、アデノイドで 0/3 例であった。さらに今回 *M. pneumoniae* 特異的プライマーを用いた結果、扁桃で 1/11 例、アデノイドで 0/3 例と低率ながら、陽性例が得られた。

5) IgA 腎症患者摘出扁桃の所見

摘出扁桃 8 例の HE 染色による所見、免疫染色法による IgA 陽性細胞検出ならびに TUNEL 陽性細胞の検出結果は以下の通りである。全例 8/8 例でリンパ濾胞の萎縮と壊死、濾胞中心部における細胞の欠落、血管周囲の結合織の増殖と血管の増生ならびに陰窩の扁平上皮細胞の角化が見られた。また 6/8 例で陰窩上皮層の細胞間浮腫、すなわち海綿状態が見られ、2/8 例で上皮内に好中球の浸潤が観察された。IgA 陽性細胞は、5/8 例で陰窩に近い上皮内に浸潤していた。ステロイド治療歴が不明な為、リンパ濾胞の萎縮については、治療の影響である可能性を残した。アポトーシスの解析では、細胞が欠落した濾胞に若干の TUNEL 陽性細胞を認めたが、TUNEL 陽性細胞の極度な増加は認められず、細胞がすでに欠落してしまった為と考えられた。マイコプラズマ DNA が検出された扁桃とされない扁桃における所見の差は、検討できなかった。*M. fermentans*-DNA 陽性扁桃における像を図 5 に示す。

D. 考察

抗体測定法における抗原の改良により、*M. pneumoniae* あるいは *M. fermentans* 全菌体を抗原としていた際に見られた健常人におけるバックグラウンドが軽減され、健常人群と患者群の統計解析が容易になった。*M. penetrans* だけは、既存の診断用抗原として全菌体ではなく主要抗原であるリポ蛋白群を抗原として用いていたが、今回の改良法においては、リポ蛋白抗原以外の蛋白を選んだ。その理由は、リポ蛋白群が抗原変機構を有すること、主要抗原 P35 リポ蛋白関連遺伝子が全ゲノム中に 38 個存在し、その遺伝子群の発現調節にはプライマー領域の逆位による発現の On-Off 機構が存在することが我々のこれまでの解析により明らかになったことで、抗原作成に用いる株間のみならず培養ロットによる発現抗原蛋白の安定性を欠くことが予想された為である。さらに、この主要抗原であるリポ蛋白群を使用した ELISA 系は、*M. penetrans* への種特異性が低く *M. hominis* という泌尿器由来の種と交差反応があるというこれまでの報告とを合わせ持ち、診断用抗原としてリポ蛋白以外の主要抗原を選択した。IgA 腎症患者における *M. penetrans*

rPDH-E2 抗体陽性例は 36 例中わずか 1 例のみであり、患者群の抗体価に有意な差も無かったことから、*M. penetrans* 感染は、IgA 腎症の主要な原因とは考えにくい。しかしながら、*M. penetrans* の泌尿器への感染、上皮細胞内への侵入や長期に渡る持続感染例の報告があることから、今回の抗体陽性患者の泌尿器における *M. penetrans* 感染の有無や、病変との関連に興味を持たれる。

M. pneumoniae/*M. genitalium* 特異抗原 rP1-8 に対する IgA 抗体価は、IgA 腎症患者群で有意に高かった。今回調べた 36 例の患者血清は、他の 2 種の抗原に対しては低い IgA 抗体価しか示さなかったことから、rP1-8 に対する高い抗体価は、IgA 腎症患者におけるポリクローナルな B リンパ球活性化の結果生じる非特異的なグロブリン血症の影響というよりは、むしろ、rP1-8 特異的抗体の増加であると考えられる。文献的にも *Haemophilus parainfluenzae* に対する IgA 抗体価上昇を IgA 腎症の病態と関連づける報告もあり、B リンパ球の IgA クラス抗体産生へのスイッチングと病態との関連が考察されている。今回、改良した ELISA 系は、リコンビナント化した付着蛋白 P1 に抗原を絞ることにより、健常人における抗体価のバックグラウンドを低くおさえることができた。一方、*M. pneumoniae* 肺炎患者血清中に、付着抗原 P1 に対する抗体価が上昇する率は他の報告では約 70%程度であり、従って感染者を取り逃がすことが予想される。この点については、今後、他の抗原蛋白を加えることによりさらに改良を加える予定であるが、今回のサーベイランスで明らかになった事は、IgA 腎症患者の少なくとも 1 割あるいは、それ以上で *M. pneumoniae*/*M. genitalium* の粘膜免疫を刺激する感染が起きている可能性である。文献的には、IgA 腎症患者の腎糸球体から *M. pneumoniae* 抗原を検出した報告があるが、一般に *M. pneumoniae* は呼吸器、*M. genitalium* は泌尿器に感染する種であること、両者は進化系統樹上の近縁種で、かつ抗原性が類似していることから考えると、以下の二通りの考え方ができる。一つは、腎臓に沈着していた抗原は、泌尿器以外の場所（咽頭など）に感染した *M. pneumoniae* 由来で、それに対する抗体が多量に産生されることから、抗原抗体複合体が血中に存在し、その一部が腎に沈着したもの、二つ目は、腎糸球体に *M. genitalium* が感染している可能性である。