

M. fermentans GGPL-III に対する IgG 抗体価も IgA 腎症患者の中には、高値を示す患者が存在した。*M. fermentans* の感染部位は、咽頭に限らず、関節リュウマチ患者の関節腔や健康人の末梢単核細胞 PBMCs からの DNA 分離報告もあり、また、我々がカニクイザルの静脈内に注射した実験例では、脾臓の血管内皮細胞や糸球体の上皮細胞にも抗原陽性細胞が見られた。GGPL-III は、*M. fermentans* の主要な菌体成分であるが、コリン基を含み、さらに、それ自体に免疫細胞への作用を有していることから、興味深い糖脂質であり、抗 GGPL-III 抗体価の上昇患者における詳細な感染解析が必要であると考えられた。

扁桃からの *M. pneumoniae*/ *M. fermentans*/ *M. salivarium* いずれかの DNA 陽性例が存在した。佐藤らも、IgA 腎症患者の扁桃における陰窩上皮の異常すなわち、陰窩上皮の非網状化領域 (area of nonreticulated crypt epithelium) の割合が、糸球体における病変の重度さ (index of glomerular lesions) と関連することを報告しており、扁桃への何らかの刺激 (感染を含む) が腎病変と関連する可能性が考えられる。今回、扁桃から遺伝子を抽出したマイコプラズマ 3 種のうち、*M. fermentans* については、我々が以前に行った免疫染色においては、海綿状態の病変を示す陰窩上皮に抗原陽性部を認めたことから、陰窩上皮への感染が疑われる。*M. fermentans* の MALP-2 あるいは、*M. salivarium* の FSL-1 は、そのリポ蛋白 N 末端のリポペプチド構造が、強い免疫細胞活性化能を有することが知られている。マイコプラズマのゲノム中には、いずれの種であれ、一般細菌では三本目の脂肪酸を附加する為に使われる酵素アポリポプロテイン トランスアシレーズの遺伝子が欠落している為に二本鎖の脂肪酸しか有さない。この二本の脂肪鎖を有するリポ蛋白は主として Toll-like receptor 2 に認識された後、免疫細胞を強く活性化させる。マイコプラズマの有するリポ蛋白のリンパ球活性化作用と IgA 腎症患者における非特異的 B リンパ球活性化との関連については、まだ検討の余地があるものの興味深い。

これまでの知見をまとめると、IgA 腎症患者においては、末梢リンパ球における活性化や扁桃における陰窩上皮の異常が見られ、扁桃上皮への何らかの刺激により全身の粘膜免疫への刺

激が持続的に加わっている可能性が考えられる。さらに、血管周囲に炎症の跡である結合織増生が見られることから血管炎が疑われる。原因微生物があるとすれば、このような病変を引き起こせる微生物であることが推察される。IgA 腎症患者群の血清中抗体価測定の結果は、*M. pneumoniae*/ *M. genitalium* 特異的 IgA 抗体の高値、*M. fermentans* 特異的 IgG 抗体価が高い例が見られた。また、扁桃からのマイコプラズマ DNA 分離例が存在した。マイコプラズマは、リンパ球活性化や障害性を有すること、カニクイザルへの *M. fermentans* 感染例の解析では、PBMCs でリンパ球活性化やアポトーシス昂進を誘導し、リンパ組織に血管炎を、腎臓の糸球体にメサンギウム領域の軽度な増生をもたらすことから、患者組織で観察される病変の幾つかに類似する病変を惹起すると考えられる。

IgA 腎症と微生物感染との関連を考えるにあたり残されている主要な検討課題としては、腎における糸球体のメサンギウム領域の増生や、グロブリンの沈着という腎炎形成時に、微生物感染の場が、腎にあるのか、腎以外の臓器 (扁桃も含めて) にあるのかという点である。IgA 腎症は、血管炎であり、免疫異常でもあることから、免疫刺激が持続的に加えられる微生物感染の場が理解される必要がある。

E. 結論

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*-IgG 抗体陽性者 1 例、抗 *M. pneumoniae*/ *M. genitalium*-IgA 抗体価は、患者群で健康人群よりも有意に高く、抗 *M. fermentans*-IgG 抗体価は、健康人よりも高い患者例が認められた。抗原によっては、全検体で抗体価が低いことから、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、抗原特異的抗体の増加であると考えられる。扁桃におけるマイコプラズマ DNA を抽出した。扁桃所見として、陰窩上皮層の浮腫、海綿状態、血管周囲の結合織増生等を観察した。アポトーシスの解析においては、若干の TUNEL 陽性細胞が観察されたのみであった。今回の結果は、IgA 腎症患者中には、マイコプ

ラズマに対する高い抗体価を有する患者がいること、扁桃に感染している可能性があることを示した。これまでに行ってきたカニクイザルにおけるマイコプラズマ感染モデルの結果と合わせて考えると、マイコプラズマに対する抗体価の高いIgA腎症患者における、血管炎、腎炎との関連についての検討を行う必要があると考えられた。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

参考文献

1. Y. Sasaki, J. Ishikawa, A. Yamashita, K. Oshima, T. Kenri, K. Furuya, C. Yoshino, A. Horino, T. Shiba, T. Sasaki and M. Hattori. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Research* 30(23): 5293-5300, 2002
2. A. Horino, Y. Sasaki, T. Sasaki and T. Kenri. Multiple promoter inversions generate surface antigenic variation in *Mycoplasma penetrans*. *Journal of Bacteriology*, 185: 231-242, 2003
3. Y. Sasaki, A. Blanchard, H. L. Watson, S. Garcia, L. Montagnier and M.-L. Gougeon. In vitro influence of *Mycoplasma penetrans* on activation of peripheral T lymphocytes from healthy donors or human immunodeficiency virus-infected individuals. *Infection & Immunity* 63(11): 4277-4283, 1995
4. K. Matsuda, JL Li, R. Harasawa, N. Yamamoto. Phosphocholine-containing glycolipids (GGPL-I and GGPL-III) are species-specific major immunodeterminants of *Mycoplasma fermentans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Apr 28;233 (3):644-649.
5. Y. Sato, O. Hotta, Y. Taguma, T. Takasaka, M. Nose. IgA nephropathy with poorly developed lymphoepithelial symbiosis of the palatine tonsils. *Nephron.* 1996; 74: 301-308

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

図1、抗 *M. penetrans* 菌体抗体ならびに抗リコンビナント PHD-E2 抗体に対する *M. penetrans* 抗原のイムノブロッティングの結果



1. anti-*M. penetrans* cell surface antibody

2~4. anti rPDH-E2 antibody in three mice

図2、*M. penetrans* rPDH-E2 抗体に対する ELISA 抗体価

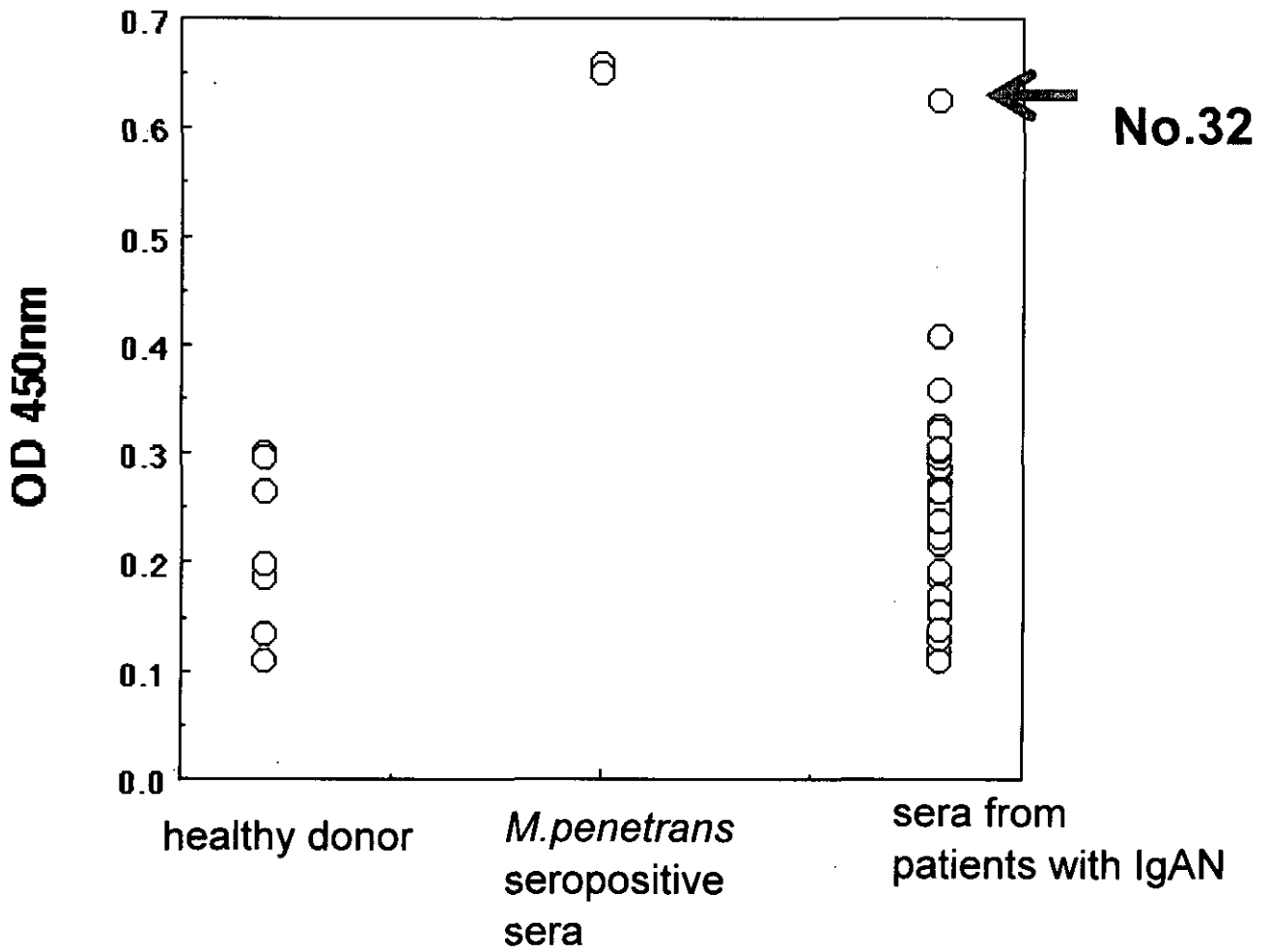


図3、*M. pneumoniae*/*M. genitalium*特異抗原 rP1-8 に対する ELISA 抗体価

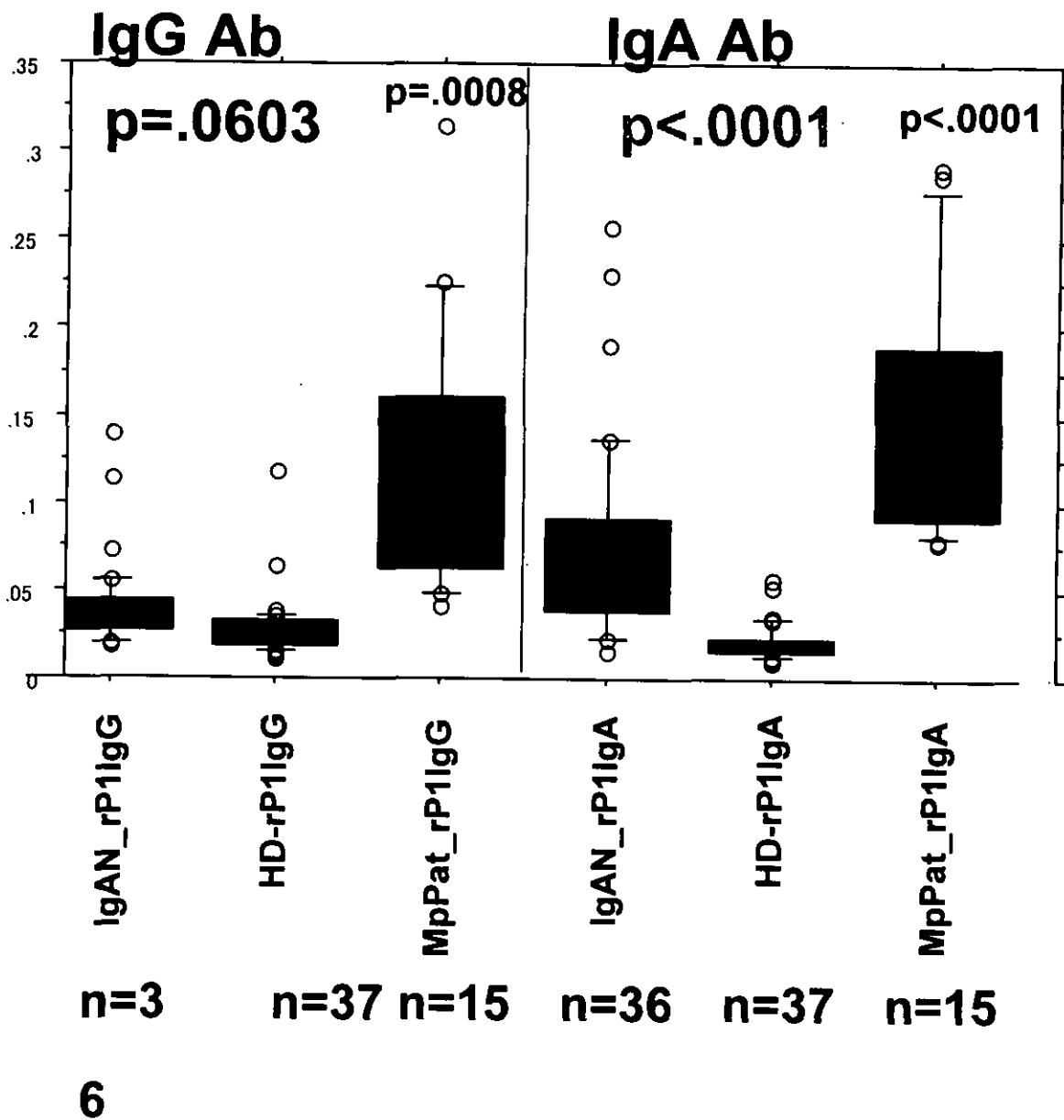


図4、*M. fermentans* 特異抗原 GGPL-III に対する ELISA 抗体価

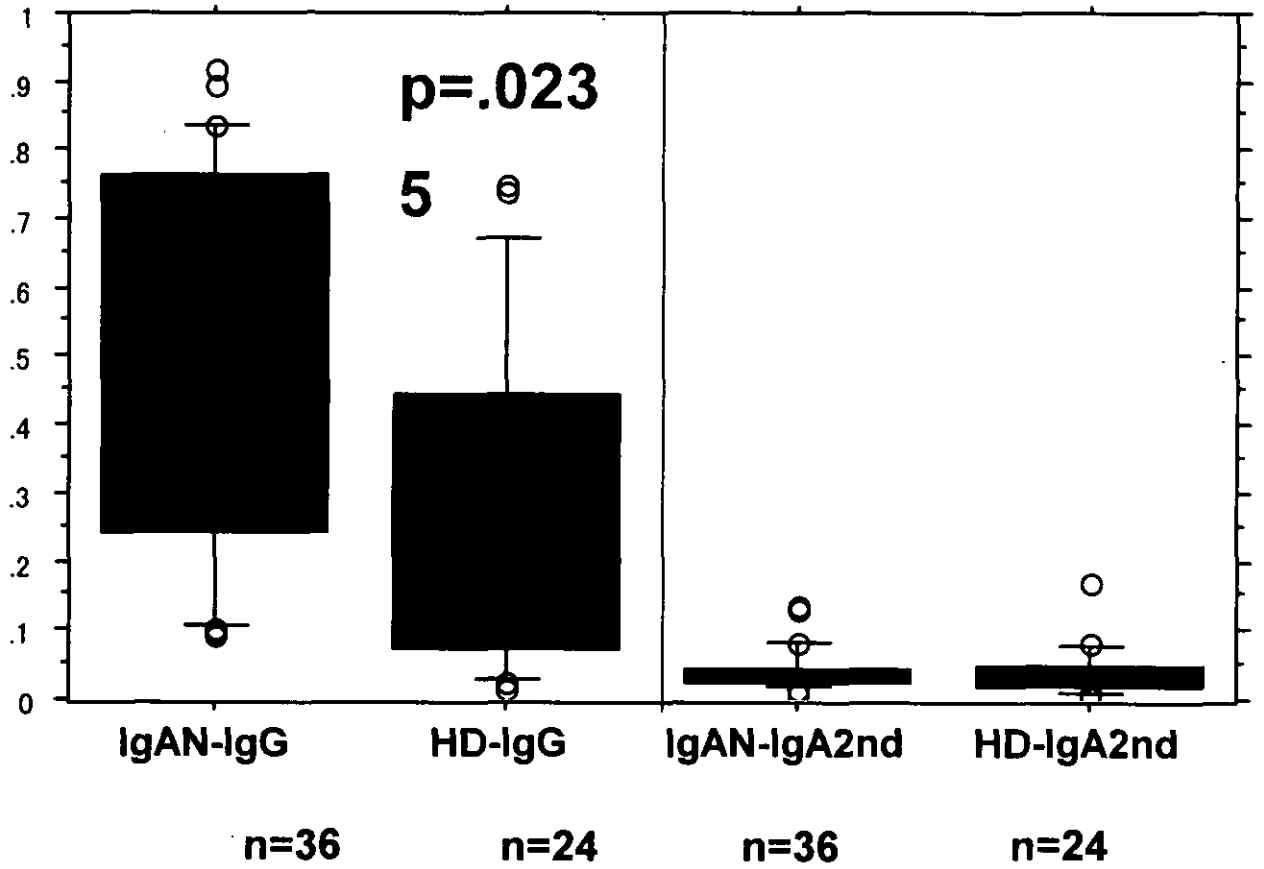
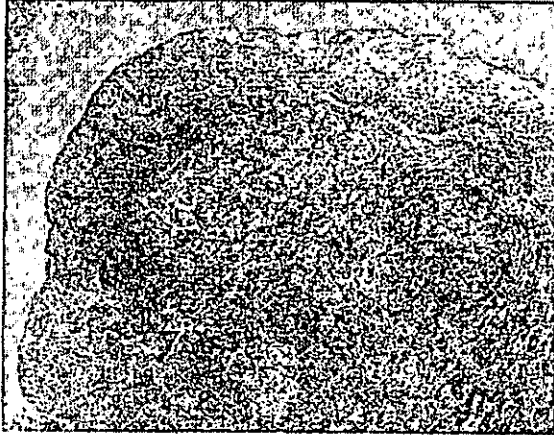


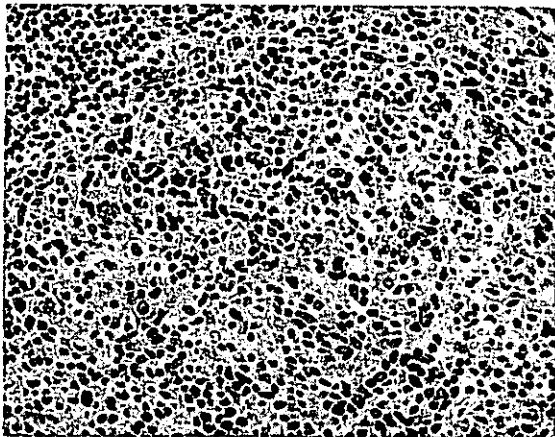
図5、扁桃組織の所見

HE 染色

x 100

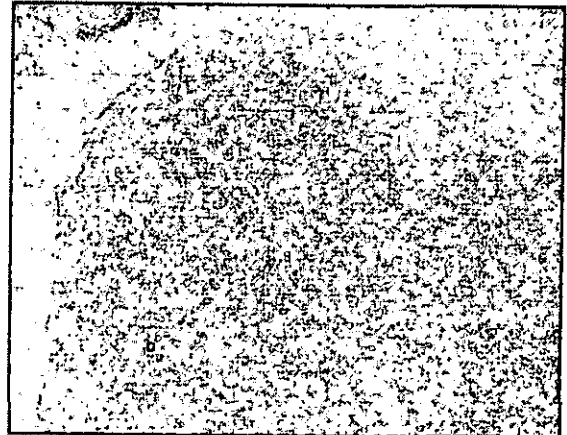


x 400

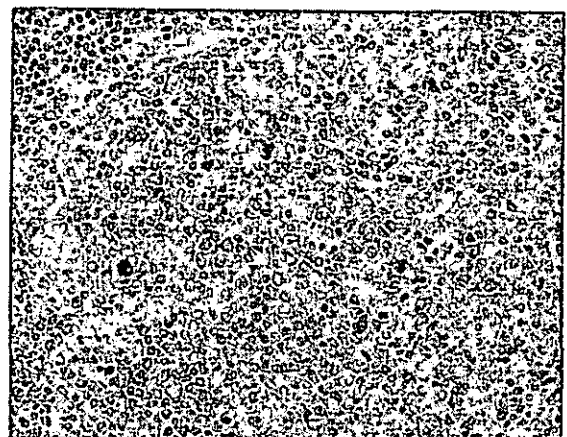


TUNEL-Apoptotic cell

x 100



x 400



IgA 陽性細胞

x100



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

分担研究者 生田 和良 (大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野教授)

研究要旨 ボルナ病ウイルス(BDV)は、向神経性のマイナス鎖、一本鎖のRNAを持つウイルスである。BDVは、ウマやヒツジに脳炎を引き起こす原因ウイルスとして分離された。ヒトにおいても、特に精神疾患との関連性が疫学的研究から示唆されている。私達は、BDV持続感染と神経変性疾患との関連性について検討している。これまでに、パーキンソン病やアルツハイマー病患者の剖検脳内にBDV RNAがRT-PCR法およびin situ hybridization法により検出できる例があること、対照剖検脳よりもその陽性率が高いことを報告してきた。本年度は、BDVの持続感染が引き起こす脳内病態機序を明らかにするために、各種モデル系を用いて、BDV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、非感染状態に比べ、有意に低下していることが明らかとなった。

A. 研究目的

ボルナ病は、ウマに脳脊髄炎をもたらす疾患で、ボルナ病ウイルス (Borna Disease virus; BDV) の中枢神経系への感染が原因で引き起こされる。BDVは、ウマの他にヒツジ、ウシ、ネコ、イヌ、ダチョウなどの動物にも自然感染する。しかし、その多くは不顕性感染である。ウマやヒツジにおける脳炎の発症の原因は、急激な炎症による神経細胞の破壊であると考えられている。一方、自然感染例(ウマの運動器障害など)や実験感染例(ラットやスナネズミ)では、BDVの脳内持続感染により、神経機能の障害が認められる。

ヒトにおいても、BDVに対する血清疫学的研究から精神疾患との関連性が初めて1985年にドイツのグループから報告され、それ以降、多くの国の複数のグループによりこれを指示する結果が報告されたが、一部ではそのような関連性を認めないとする報告も見られる。

私たちは、「神経変性疾患」であるパーキンソン病、アルツハイマー病とBDVとの関連性について検討してきた。パーキンソン病患者およ

びアルツハイマー病患者由来剖検脳において、BDV RNAの検出をRT-PCRおよびin situ hybridization法により行い、対照群に比べ、高率に検出できることを確認した。

一方、このBDV感染が引き起こす脳内の分子病態機序について理解するため、モデル系を用いた解析を行って来た。これまでに、BDVの1つの遺伝子産物であるp24リン酸化蛋白質が、神経突起伸長因子であるAmphoterin (HMGB1)との強い結合性を示すことを明らかにしてきた。実際、BDV持続感染細胞は非感染細胞に比べ、突起伸長能が明らかな低下を引き起こしていることを報告した。また、BDVリン酸化蛋白質を脳内で発現するトランスジェニックマウス(P-Tg)を作成し、この解析から、BDVリン酸化蛋白質発現(GFAPプロモーター下流にp24遺伝子を挿入したことから、アストロサイトでの発現)は、攻撃性亢進、記憶・学習能力の低下が観察されることを報告してきた。

今回、神経系細胞にHeat shockストレス負荷を処理し、BDV持続感染が原因と考えられる宿主細胞脆弱性の検討と、P-Tgにおける中枢神経機能阻害の検討、とくに中枢神経系で重要な

伝達物質の一つであるグルタミン酸に関する動態の解析を試みた。

B. 研究方法

1) BDV 感染によるストレス応答能の低下

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 (持続感染の期間の異なる各細胞) に、各種ストレス (heat stress、 H_2O_2 など) を負荷した。その後、復帰培養を行い経時的に各細胞を回収し、ストレス蛋白質 (HSP70、HSP90、HSP27 など) 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。また、ストレスに伴う細胞の形態変化と生存率の定量についても検討した。

2) P-Tg 脳内におけるグルタミン酸に関する動態の解析

P-Tg 脳サンプルを小脳・海馬・大脳領域に分け、グルタミン酸トランスポーターのうちアストロサイトに特異的に発現している 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。

C & D. 研究結果及び考察

1) BDV 感染によるストレス応答能の低下

通常の培養条件下において、BDV 持続感染細胞の増殖率、生存率、形態ならびにストレス蛋白質の発現に非感染細胞との違いは認められなかった。しかしながら、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。一方、ストレス蛋白質の誘導能が低下している細胞では、ストレスによる細胞の円形化と培養プレートからの剥離が観察された。

BDV は一般的に容易に持続感染を成立する、いわゆる細胞障害性を伴わない感染複製が起こることが特徴で、したがって容易に持続感染を成立させる。しかし、今回の結果により、BDV 持続感染細胞では、ストレス誘導性の細胞障害が観察され、この障害性はストレス蛋白質の発現の低下と関連して

いると考えられた。

2) P-Tg 脳内におけるグルタミン酸に関する動態の解析

P-Tg 脳内でのグルタミン酸トランスポーター GLAST 蛋白質の発現は、コントロール群に比べて 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。GLAST 蛋白質は、小脳の Bergmann グリア細胞で発現が高いことが知られている。また、P-Tg 小脳では、特に Bergmann グリア細胞での P 蛋白質の発現が顕著であった。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。

E. 結論

疫学的に神経変性疾患との関連性が認められた BDV について、その病態機序への関与の可能性を検討するため、モデル系を用いた解析を行った。その結果、BDV 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。これらの結果は、神経変性疾患を含めた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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Lee BJ, Watanabe M, Kamitani W, Baba S, Yamashita M, Kobayashi T, Tomonaga K, Ikuta K: Age- and host-dependent control of Borna disease virus spread in the developing brains of gerbils and rats. *Microbes Infect.* 5: 1195-1204, 2003.
2. Zhang G, Kobayashi T, Kamitani W, Komoto S, Yamashita M, Baba S, Yanai H, Tomonaga

- K, Ikuta K: Borna disease virus phosphoprotein represses p53-mediated transcriptional activity by interference with HMGB1. *J. Virol.* 77: 12243-12251, 2003.
3. Terayama H, Nishino Y, Kishi M, Ikuta K, Itoh M, Iwahashi K: Detection of anti-Borna Disease Virus (BDV) antibodies from patients with schizophrenia and mood disorders in Japan. *Psychiatry Res.* 120: 201-206, 2003.
 4. Okamoto M, Hagiwara K, Kamitani W, Sako T, Hirayama K, Kirisawa R, Tsuji M, Ishihara C, Iwai H, Kobayashi T, Tomonaga K, Ikuta K, Taniyama H: Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse. *Arch. Virol.* 148: 1557-1568, 2003.
 5. Yang AY, Zhang FM, Li JH, Li GM, Ma PL, Gu HX, Ikuta K: Detection of Borna disease virus-p24 specific antibody in the sera of schizophrenic patients of China by means of Western-blot. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 17: 85-87, 2003. (In Chinese)
 6. Kamitani W, Ono E, Yoshino S, Kobayashi T, Taharaguchi S, Lee BJ, Yamashita M, Kobayashi T, Okamoto M, Taniyama H, Tomonaga K, Ikuta K: Glial expression of Borna disease virus phosphoprotein induces behavioral and neurological abnormalities in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 8969-8974, 2003.
 7. Kobayashi T, Zhang G, Lee BJ, Baba S, Yamashita M, Kamitani W, Yanai H, Tomonaga K, Ikuta K: Modulation of Borna disease virus phosphoprotein nuclear localization by the viral protein X encoded in the overlapping open reading frame. *J. Virol.* 77: 8099-8107, 2003.
 8. Watanabe M, Lee BJ, Yamashita M, Kamitani W, Kobayashi T, Tomonaga K, Ikuta K: Borna disease virus induces acute fatal neurological disorders in neonatal gerbils without virus- and immune-mediated cell destructions. *Virology* 310: 245-253, 2003.
- ボルナ病ウイルス感染新生仔ラット脳内における糖化最終産物レセプター(RAGE)の発現動態とその意義. 第 51 回 日本ウイルス学会学術集会. 2003.
3. 渡邊洋平, Madiha S. Ibrahim, 大滝尚広, 矢内英之, 山下真紀子, 李丙載, 神谷亘, 笹尾芙蓉子, 岡本実, 谷山弘行, 萩原克郎, 朝長啓造, 生田和良: 我が国における BDV の疫学的調査とウシ由来野外分離株の病原性解析. 第 51 回 日本ウイルス学会学術集会. 2003.
 4. 笹尾芙蓉子, 倉恒弘彦, 松永秀典, 朝長啓造, 生田和良: ボルナ病ウイルス疫学的研究のための検出法の改良. 第 51 回 日本ウイルス学会学術集会. 2003.
 5. 神谷亘, 小野悦郎, 田原口智士, 李丙載, 山下真紀子, 矢内英之, 渡邊洋平, 大滝尚広, 朝長啓造, 生田和良: ボルナ病ウイルス P 遺伝子トランスジェニックマウスにおけるグルタミン酸トランスポーターの発現異常. 第 51 回 日本ウイルス学会学術集会. 2003.
 6. 山下真紀子, 神谷亘, 矢内英之, 李丙載, 大滝尚広, 渡邊洋平, 朝長啓造, 生田和良: ボルナ病ウイルス持続感染による細胞のストレス応答能の阻害. 第 51 回 日本ウイルス学会学術集会. 2003.
 7. 李丙載, 松永秀典, 神谷亘, 矢内英之, 山下真紀子, 大滝尚広, 渡邊洋平, 朝長啓造, 生田和良: リバビリン投与による BDV 感染スナネズミの神経症状の回避とその機序の解析. 第 51 回 日本ウイルス学会学術集会. 2003.
 8. 矢内英之, 神谷亘, 張国旗, 李丙載, 山下真紀子, 渡邊洋平, 大滝尚広, 笹尾芙蓉子, 朝長啓造, 生田和良: 持続感染期におけるボルナ病ウイルスの細胞内局在とゲノム複製機構の解析. 第 51 回 日本ウイルス学会学術集会. 2003.

2. 学会発表

1. 朝長啓造, 矢内英之, 神谷亘, 李丙載, 張国旗, 山下真紀子, 渡邊洋平, 大滝尚広, 生田和良: BDV 持続感染細胞におけるウイルス特異的核内ドット状構造物の解析. 第 51 回 日本ウイルス学会学術集会. 2003.
2. 大滝尚広, 神谷亘, 張国旗, 山下真紀子, 渡邊洋平, 李丙載, 矢内英之, Madiha S. Ibrahim, 笹尾芙蓉子, 朝長啓造, 生田和良:

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

4. *Propionibacterium acnes* 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

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)

研究協力者 南 順子、石下 由紀、石下 郁夫、小林 大輔、安藤 登、内田 圭介、
池田 聡 (東京医科歯科大学大学院病因・病理学)
反町 典子、烏山 一 (東京医科歯科大学大学院免疫制御学)
武村 民子 (日赤医療センター病理)
小林 寅詰 (三菱化学研究所)

研究要旨 サルコイドーシスの原因は不明である。*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。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。この感作免疫処置に先行して、*P. acnes* を経静脈的に前投与する群と前投与しない群とで実験を行った。対照群としては、*P. acnes* (加熱死菌) および 2 種類の蛋白抗原 (OVA と GST) を RP35 の代わりに感作抗原として用いた。*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。対照として用いた 2 種類の蛋白抗原の同様な感作免疫で肉芽腫性病変は認められなかった。*P. acnes* の前投与の有無にかかわらず、RP35 および *P. acnes* いずれの感作抗原を用いた場合でも肺肉芽腫の検出頻度 (25~57%) には有意差を認めなかった。これらの感作抗原に対する膝下リンパ節細胞の免疫反応性や血中抗体価は、肺肉芽腫を認めたマウス群と認めなかったマウス群、いずれにおいても上昇しており両群に差は認めなかった。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。今回の実験により、*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事が判明した。蛋白抗原のかわりに菌体そのものを用いても結果は同様であった。また正常マウスの約 1/3 で肺から *P. acnes* が培養可能であることから、感作免疫のみにて肺肉芽腫を形成するマウスでは、肺に *P. acnes* が常在性に感染している可能性がある。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(平成 14 年度班研究報告内容)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。宿主の本菌に対する過敏性免疫反応が素因となりサルコイドーシスが発症しているのであれば、本実験系をサルコイドーシスの実験モデルとみなすことができる。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。

A. 研究目的

サルコイドーシス (サ症) は原因不明の全身性肉芽腫疾患であり、疾患感受性のある宿主が環境中の何らかの抗原物質に暴露されて誘導される過敏性免疫反応に起因すると推測されている。これまで培養および定量的 PCR 法により病変部リンパ節から高率かつ多量の *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) が検出され、In situ hybridization 法においても本菌 DNA がサ症病変部の肉芽腫内に集積していることが解っており *P. acnes* とサ症との関係が強く示唆されている。

また、本疾患は Kveim テストが示すように宿主側の疾患感受性も非常に重要である。宿主側の反応として、*P. acnes* ゲノムライブラリースクリーニングをサ症患者血清にて免疫スクリーニングすることにより得られた蛋白 (RP35) に対して一部のサ症患者が免疫反応性を示し他疾患では示さないという特異的な反応を示すことも確認されている。RP35 蛋白はその後の遺伝子解析の結果から *P. acnes* trigger factor である事が明らかにされている。

そこで、我々はこの trigger factor 蛋白をもちいて、実験的にマウスに過敏性反応を引き起こすことにより、肉芽腫性病変が誘導しうるか否かを検討することにより、サ症肉芽腫形成における *P. acnes* の病因的関与や、*P. acnes* trigger

factor 蛋白の責任抗原物質としての可能性につき検証した。

B. 研究方法

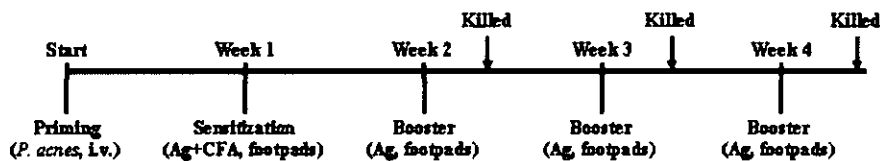
RP35 リコンビナント蛋白の調製

サ症患者血清を用いた *P. acnes* ゲノムライブラリースクリーニングにて陽性となったプラークから抽出した挿入遺伝子断片を蛋白発現ベクターである pGEX-6P-1 プラスミドベクターにサブクローニングし、*Escherichia coli* JM109 cells をトランスフォームした後、培養し GST 融合蛋白として発現させ、GST アフェニティーカラムを用いて精製した。その後 PreScission Protease を使用して GST を切断し RP35 リコンビナント蛋白を作製した。

P. acnes 抗原の調製

使用した *P. acnes* はサ症患者の皮膚病変部より本研究室にて分離培養された患者分離株を使用した。(本株は 16S rRNA の PCR と細菌同定法により type strain と違いがないことが確認されている。) 菌は GAM ブイヨンにて 37°C で培養し十分培養した後 60°C で 30 分加熱し死菌とした。その後破砕機にて 25 分間破砕し PBS に溶解しマウスの免疫に使用した。また、可溶性抗原は 55000g にて超遠心して上清を回収し、単核球幼弱化反応と抗体価測定に使用した。

A. First experiment



B. Second experiment

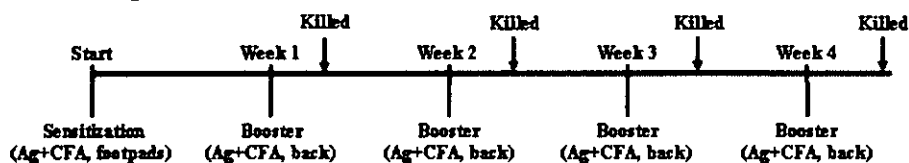


Figure 1 Immunization protocols. Priming was done by a single intravenous injection of heat-killed *P. acnes*. Sensitization was done by subcutaneous injections of one of the antigens (Ag): RP35, *P. acnes*, ovalbumin, or GST, emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA), into the hind footpads. Boosters were subcutaneous injections of the same antigen in PBS into the hind footpads in the first experiment (A), and subcutaneous injections of the antigen emulsified with CFA into the animal's back in the second experiment (B). Mice were killed three days after the last booster as shown by the arrows.

P. acnes 誘導による肺肉芽腫の形成

実験には C57BL/6 雌 5~6 週齢 SPF マウスを使用した。実験群 1 として *P. acnes* 死菌を 1 匹あたり 1mg 静脈内投与し、1 週間後に RP35 (50 μ g/head) 抗原を CFA とともに足裏に感作免疫しその後感作免疫に使用した抗原のみを 1 週間間隔で同様に免疫した。静脈内投与後 2、3、4 週の時点で最終免疫の 3 日後に屠殺した。実験群 2 では静脈内投与を行わず RP35(50 μ g/head)を CFA とともに免疫後 1、2、3、4 週の時点で最終免疫の 3 日後に屠殺した (Figure 1)。両群ともコントロール実験として RP35 の代わりに *P. acnes* (1mg/head)、ovalbumin (OVA) (50 μ g/head)、glutathion S-transferase (GST) (50 μ g/head)を使用したものを設けた。

(倫理面への配慮)

東京医科歯科大学動物実験センターの動物取り扱いガイドラインに従って上記マウス実験は行われた。

組織学的検討

麻酔し眼球採血を行い頸椎脱臼により屠殺した。全身臓器を摘出し、24 時間 10%緩衝ホルマリン固定後包埋、薄切し、HE 染色を行った。薄切は 50 μ m 間隔で 4 μ m の切片を 3 枚薄切し染色した。これら 3 枚ともに肉芽腫が認められたとき肉芽腫形成ありと判定した。

血清中の抗体価アッセイ

各実験群マウス 3 週群において血清中の *P. acnes* および RP35 に対する IgG、IgM、IgA 抗体価を蛍光イムノアッセイにより測定した。

単核球幼若化反応の検討

解剖時に膝下部リンパ節よりリンパ球を採取し、*P. acnes* と RP35 蛋白を抗原として加えて培養した。培養 3 日目にサイミジントリチウムを添加し 24 時間後細胞の放射性活性を測定することにより細胞増殖を調べた。抗原添加群の平均値を抗原未添加群の平均値で除した値を stimulation index (SI)として求めた。

組織よりの *P. acnes* 分離

正常 C57BL/6 雌マウス 6 週齢マウスと 12 週齢マウスから無菌的操作にて肺、肝臓、リンパ節を摘出し、臓器重量の 4 倍量 GAM ブイヨン中ですりつぶし、GAM ブイヨンにて 5 日間培養

後、コロニーの数を算定した。コロニーよりグラム染色後 VITEK system により菌を同定した。

C. 研究結果

抗原誘導による肺肉芽腫の形成

肺において、静注による priming をした群では *P. acnes*、RP35 を感作免疫した群においてそれぞれ 25%~30%また 33%~57%に肉芽腫形成が認められた。また、priming を行わない群においても *P. acnes*、RP35 を感作免疫した群はそれぞれ 25%~38%また 25%~50%に肉芽腫形成が認められた。これら両群間において肉芽腫形成率に有意な差はなかった。また priming の有無に関わらず、OVA や GST を感作した群においては肉芽腫の形成は認められなかった。(Table 1)

組織学的検討

肉芽腫の形態においての各群の差は認められなかった。肉芽腫の分布は肺の実質および胸膜下に散在性に認められ、特に胸膜下には多くの肉芽腫が認められた(Figure 2A)。拡大像では好酸性の豊かな細胞質を有する類上皮細胞とリンパ球が混在した肉芽腫性炎症が認められた(Figure 2B)。未熟な肉芽腫巣が時に胞隔炎を伴って認められ、リンパ球浸潤の少ない成熟した肉芽腫も認められた。血管壁の肉芽腫もときに認められ、血管周囲の肉芽腫はしばしば認められた。

組織からの *P. acnes* 菌体培養

24 匹中 8 匹(33%)で肺から組織 1g あたり 100~800cfu の菌が培養された。このうち、肝、肺、リンパ節の 3 臓器より検出される例が 1 例、肺、肝の 2 臓器より検出される例が 1 例あった。(Table 2)

単核球幼若化反応と抗体価測定

同一の免疫プロトコールで感作されたマウス群において肺肉芽腫の形成があったものとなかったもの 2 群にわけて単核球幼若化反応と抗体価を比較した。その結果 RP35、*P. acnes* 感作群では priming の有無に関係なくその有意差を認めなかった。(Table 3)

Table 1 Detection frequency of pulmonary granulomas in primed and unprimed mice sensitized with various antigens

Priming	Sensitization		Numbers (%) with pulmonary granulomas of mice/total at:			
	Sensitizer	Booster	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Done	None	None	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Done	RP35 + CFA	RP35	N.E.*	4/12 (33) ^a	13/23 (57) ^b	6/12 (50) ^c
Done	<i>P. acnes</i> + CFA	<i>P. acnes</i>	N.E.	3/12 (25) ^a	4/15 (27) ^b	3/10 (33) ^c
Done	OVA + CFA	OVA	N.E.	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Done	GST + CFA	GST	N.E.	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Not done	RP35 + CFA	RP35 + CAF	0/8 (0)	2/8 (25)	8/16 (50) ^d	10/20 (50) ^e
Not done	<i>P. acnes</i> + CFA	<i>P. acnes</i> + CFA	0/8 (0)	2/8 (25)	6/16 (38) ^d	3/12 (25) ^e
Not done	OVA + CFA	OVA + CFA	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Not done	GST + CFA	GST + CFA	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)

Priming was by a single intravenous injection of *P. acnes*. Sensitizing and booster doses were injected at weekly intervals.

* Not examined.

^ap = 0.65, ^bp = 0.070, ^cp = 0.34, ^dp = 0.48, ^ep = 0.16, chi-square test of proportions with Yates' correction, pairwise.

Table 2 Results of *P. acnes* culture from lungs, livers, and mesenteric lymph nodes of normal untreated mice

Organ	Number(%) of successes in culture [cfu/g] with normal mice		
	6 weeks old (n = 12)	12 weeks old (n = 12)	Total (n = 24)
Lung	4 (33) [500 ^a , 300, 800, 100 ^b]	4 (33) [100, 100, 100, 100]	8 (33) ^{*†}
Liver	2 (17) [100 ^a , 100 ^b]	0 (0)	2 (8) [*]
Lymph node	1 (8) [100 ^a]	0 (0)	1 (4) [†]

^{a, b} Organs with the same superscripts were taken from the same mice. ^{*}p = 0.033 and [†]p = 0.0096, chi-square test of proportions with Yates' correction, pairwise.

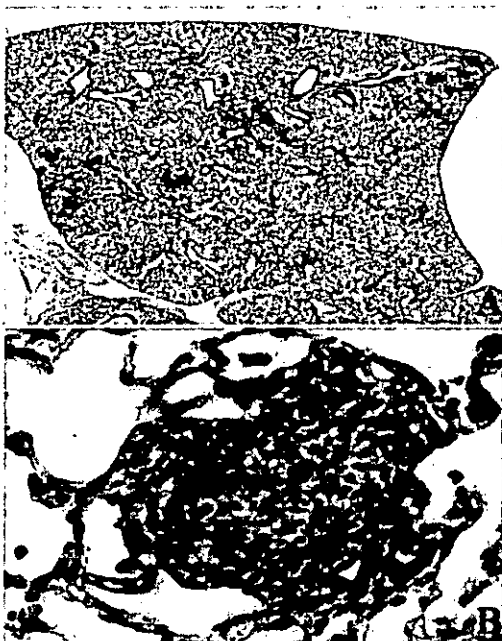


Figure 2 Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a recombinant trigger-factor protein, RP35, of *P. acnes*. Female C57BL/6 mice were sensitized by subcutaneous injections of 50 µg of RP35 emulsified with complete Freund's adjuvant weekly for 3 weeks, and examined 3 days after the last sensitization. Note the many granulomas scattered throughout the lung (A, original magnification, ×22) and a granuloma with many lymphocytes around a core of epithelioid cells with rich eosinophilic cytoplasm (B, ×600).

Table 3 Lymphoproliferative response and serum levels of IgG, IgA, and IgM to RP35 and *P. acnes* in primed and unprimed mice sensitized with RP35 and *P. acnes*, examined 3 weeks after the first treatment

Priming	Antigen	Gra.*	n	Response (SI) to:		IgG antibodies to:		IgA antibodies to:		IgM antibodies to:	
				RP35	<i>P. acnes</i>	RP35	<i>P. acnes</i>	RP35	<i>P. acnes</i>	RP35	<i>P. acnes</i>
Done	RP35	+	1	48.4 ^a	7.5 ^a	177 ^r	145	1	11	26 ^b	132 ^b
			3	(41.8, 74.5)	(4.0, 9.0)	(123, 466)	(119, 173)	(0, 2)	(11, 14)	(15, 39)	(118, 151)
Done	RP35	-	1	44.6 ^c	7.3 ^c	418 ^s	103	< 1	9	29 ^d	137 ^d
			0	(34.3, 48.4)	(5.7, 9.4)	(233, 514)	(97, 159)		(9, 16)	(14, 41)	(102, 157)
Done	<i>P. acnes</i>	+	4	5.3	9.4	3 ^{e,r}	259 ^e	< 1	12	4 ^f	165 ^f
			4	(3.4, 6.0)	(8.8, 10.1)	(1, 4)	(250, 288)		(9, 15)	(1, 11)	(117, 174)
Done	<i>P. acnes</i>	-	1	8.3	10.7	< 1 ^q	246 ^q	< 1	9	5 ^h	115 ^h
			1	(6.0, 9.7)	(9.8, 11.5)		(241, 354)		(9, 12)	(2, 6)	(95, 153)
Not done	RP35	+	8	86.1 ⁱ	9.6 ⁱ	312 ^{i,t}	17 ⁱ	2	8	20	21
			8	(76.5, 97.2)	(6.0, 11.6)	(276, 388)	(10, 37)	(2, 2)	(7, 8)	(12, 30)	(19, 32)
Not done	RP35	-	8	74.6 ^t	9.0 ^t	337 ^u	13 ⁱ	2	6	7	19
			8	(38.6, 92.1)	(4.3, 21.2)	(313, 382)	(9, 18)	(1, 4)	(4, 8)	(5, 11)	(12, 34)
Not done	<i>P. acnes</i>	+	6	3.5	6.0	< 1 ^{m,t}	123 ^m	< 1	9	< 1 ^o	88 ^o
			6	(2.8, 4.9)	(3.9, 7.2)		(97, 152)		(8, 9)		(51, 121)
Not done	<i>P. acnes</i>	-	1	9.0	11.1	< 1 ^{p,u}	168 ^p	< 1	10	2 ^a	86 ^a
			0	(8.2, 9.8)	(8.3, 13.1)		(118, 193)		(7, 11)	(0, 4)	(66, 104)

* Granuloma formation detected in the lungs. The stimulation index (SI) and levels of antibodies (counts per second) are expressed as medians, with 25th and 75th percentiles in parentheses. Values for the levels of antibodies are to be multiplied by 10³. The p-values of a to u were less than 0.001. Kruskal-Wallis test for overall differences; Mann-Whitney U-test with Bonferroni's correction used to evaluate any significant differences found (here, p < 0.0018 was taken to be significant).

D. 考察

今回の研究により *P. acnes* trigger factor (RP35) の免疫感作のみにより実験的肺肉芽腫の形成と維持が可能であることが実証できた。

現在までにラットやウサギにおいて本菌によるいくつかのサ症肉芽腫モデルが提唱されてきたが、いずれも、菌の感作を行った後に菌を静注し、肉芽腫の形成に至っている。今回の実験モデルはサ症の病態を考慮するとそれに代わる新たなサ症実験モデルと考えられる。その理由として、第一にサ症患者において既に *P. acnes* trigger factor に対する過敏性免疫反応が認められていること。第二に、発症時においてさえ無症候状態で過ごすこともあるサ症患者において、*P. acnes* が末梢血中で増菌するような敗血症状態が発症をトリガーしているとは考えづらいこと、第三に今回の方法では免疫感作のみでも肉芽腫形成を誘導することが可能であったという点である。

蛋白抗原を CFA アジュバントとともに感作免疫することにより誘導される疾患モデルは、通称 experimental organ-specific allergic disease と呼ばれ、有名なものでは、多発性硬化症の実験モデルとして知られる実験的アレルギー性脳炎 (EAE)、橋本病の実験モデルとして知られる実験的アレルギー性甲状腺炎 (EAT)、リウ

マチ関節炎の実験モデルとして知られるアジュバント誘発性関節炎 (AIA) などがある。同様に、*P. acnes* trigger factor を CFA アジュバントとともに免疫することにより引き起こされる肺肉芽腫症は、サルコイドーシスの実験モデルとして同様な観点から取り扱われるものと考えられる。感作免疫に用いられる抗原蛋白は、EAE の場合は myelin basic protein、EAT の場合は thyroglobulin といずれも自己抗原が用いられているが、アジュバント関節炎では結核菌の heat shock protein (hsp60) が用いられており、今回の肺肉芽腫モデルにおける *P. acnes* trigger factor とは極めて近い関係にある疾患モデルと考えられる。これらの実験モデルにおいては、感作免疫に用いた抗原と交差反応性を有する自己抗原を有する臓器に特異的にリンパ球浸潤やときに肉芽腫形成が認められるが、今回の *P. acnes* trigger factor を CFA とともに免疫して誘導される肺肉芽腫症においては、肺に普遍的に存在する自己抗原を標的としているというよりむしろ、肺に常在感染している *P. acnes* を標的として肉芽腫性免疫反応が生じている可能性が高い。そのひとつの理由として、今回の実験系では感作抗原に対する細胞性免疫も液性免疫が十分に上昇しているにもかかわらず肉芽腫形成がまったく認められないマウスが半数以上存在したからである。また、今回行った菌の培養はコンタミネーションをさけるため

に実験群ではない正常マウスで行なっているが、正常マウスの菌培養検出率と免疫したマウスでの肉芽腫形成率がほぼ一致することより、RP35 や *P. acnes* を免疫して肺に肉芽腫が形成されたマウスでは、感作免疫開始以前においてすでに肺に *P. acnes* が常在感染していた可能性が高い。

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(平成14年度班研究報告内容)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。宿主の本菌に対する過敏性免疫反応が素因となりサルコイドーシスが発症しているのであれば、本実験系をサルコイドーシスの実験モデルとみなすことができる。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もあり、現在その解析が進行中である。

細菌の trigger factor の機能に関しては徐々にわかりつつある。リボソーム内で mRNA の遺伝子情報をもとに合成される蛋白質は、リボソーム内の L29 や L23 蛋白部分と結合した trigger factor 蛋白の folding 機能により、それぞれのアミノ酸配列に特有の立体構造を獲得する。trigger factor が発見される以前では、大腸菌の hsp60 family である GroEL や、DnaK, DnaJ などのシャペロン蛋白の機能が重要と考えられてきたが、これらのシャペロン蛋白の働きは、いずれにおいても trigger factor による spontaneous folding のあとに機能する二次的な働きであり、細胞内で合成される蛋白質の多くは、trigger factor の機能だけで立体構造を獲得しうると考えられるようになってきた。hsp60 ファミリーは、マイコプラズマ感染症などの肉芽腫性疾患において主要な免疫原となったり、また先ほど紹介したアジュバント関節炎における責任抗原であることも分かっている。これらのシャペロン蛋白と同様な機能を有し、しかもその機能においては hsp60 よりも重要かつ普遍的な役割を有する trigger factor が、肉芽腫性疾患であるサルコイドーシスにおいてなんらかの病因的役割を果たしている可能性は高いと考えられる。

今回の研究により、*P. acnes* による肉芽腫形成の責任抗原の1つが *P. acnes* trigger factor

(RP35) であることが判明した。サ症患者のなかに *P. acnes* trigger factor に対して過敏性免疫反応性がある人が存在すること⁷⁾までは判明しているがそのメカニズムについては未だ不明のままである。今後、本抗原蛋白に対する反応性を規定している宿主側の要因 (HLA や免疫関連遺伝子における多型) や菌側の要因 (trigger factor 蛋白翻訳領域における遺伝子多型) などを明らかにしていく必要がある。

E. 結論

宿主の *P. acnes* に対する過敏性免疫反応が素因となりサルコイドーシスが発症しているのであれば、本実験系をサルコイドーシスの実験モデルとみなすことができる。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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Eishi Y, Ishige I, Ishige Y, Yamada T, Minami J, Ikeda S, Koike M. Etiology of sarcoidosis: the role of *Propionibacterium acnes*. Acta Histochem Cytochem 2003; 36: 15-26.
2. Eishi Y. *Propionibacterium acnes* and sarcoidosis. JJSOG 2003; 23: 11-21.
3. Hiramatsu J, Kataoka M, Nakata Y, Okazaki K, Tada S, Tanimoto M, Eishi Y. *Propionibacterium acnes* DNA detected in bronchoalveolar lavage cells from patients with sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2003; 20: 197-203.
4. Minami J, Eishi Y, Ishige Y, Kobayashi I, Ishige I, Kobayashi D, Ando N, Uchida K, Ikeda S, Sorimachi N, Karasuyama H, Takemura T, Takizawa T, Koike M. Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a recombinant trigger-factor protein of *Propionibacterium acnes*. J Med Dent Sci 2003; 50: 265-274.
5. 江石義信、呼吸器疾患の新たな展開：病態

- 局面から分子標的制御へ I.呼吸器疾患の分子疫学 1.サルコイドーシスとアクネ菌、日本内科学会雑誌 92(7):1182-1189, 2003.
6. 江石義信、肉芽腫形成の分子病態、別冊・医学のあゆみ 呼吸器疾患-state of arts 2003-2005 (編集、北村・福地・石井) (医歯薬出版) 76-79 頁、2003 年
 7. 江石義信、サルコイドーシスと *P. acnes*、Annual Review 2003 呼吸器(中外医学社 2003 年 1 月 30 日発行) 115-121 頁
 8. 江石義信、サルコイドーシスの病因としてのプロピオニバクテリア：国際比較、現代医療(現代医療社)35 巻(第 1 号)：98-104 頁、2003 年
 9. 江石義信、サルコイドーシスの素因・病因・病態、病因としてのアクネ菌-最近の話題-、分子呼吸器病(先端医学社) Respiratory Molecular Medicine 7(4): 297-305, 2003.
 10. 江石義信、サルコイドーシスとアクネ菌(*P. acnes*)、臨床医(中外医学社) vol.29:1848-1849, 2003.
 11. 江石義信、候補病因としての *P. acnes* と *P.granulosum* をめぐって、呼吸器科(科学評論社) vol.3 No.1(Jan.2003): 56-64, 2003.
 12. 江石義信、サルコイドーシスと *Propionibacterium acnes* (内因性細菌による新たな疾病発生機構の提唱)、シンポジウム微生物感染が疑われている原因不明疾患、日本化学療法学会日本感染症学会日本細菌学会 2003 年東日本・関東支部合同学術集会(講演抄録集 49 頁)
 13. 江石義信、サルコイドーシスとプロピオニバクテリア(病因論にもとづく治療戦略について)、第 23 回日本サルコイドーシス学会総会特別講演(抄録集 19 頁)
 14. 江石義信、サルコイドーシスの治療、ラジオたんぱ『ドクターサロン』平成 15 年 8 月 7 日放送
 15. 江石義信、山田哲夫、池田聡、関根正喜、安藤登、石下郁夫、武村民子、滝澤登一郎、小池盛雄、サルコイドーシスリンパ節における *Propionibacterium acnes* DNA の組織内分布、日本病理学会会誌第 92 巻第 1 号(2003 年)248 頁
 16. 新井徹、井上義一、林清二、武村民子、江石義信、坂谷光則、*Propionibacterium acnes* が肉芽腫内に検出された Necrotizing sarcoid granulomatosis の一例、第 23 回日本サルコイドーシス学会総会(抄録集 39 頁)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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 —

分担研究者 高 昌星 (信州大学医学部保健学科教授)

研究協力者 松本 陽(東京都神経科学研究所)
市川 元基(信州大学医学部保健学科)
Meejung Ahn, Taekyun Shin(Department of Veterinary Medicine,
Cheju National University, South Korea)

研究要旨 ギラン・バレー症候群(GBS)の10~30%に *Campylobacter jejuni* (*C. j*) の先行感染があり、発症との関連が注目されているが、その機序は未だ不明である。GBSの発症機序の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAN)は上行性の進行性麻痺を来とし、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。EANの発症機序の解明はGBSの発症機序の解明に大きく役立つとともに、GBSの治療とその予防にも貢献できることが期待される。EANの発症にはT細胞と炎症性メディエーターが関与していることが推測されており、とりわけ炎症系細胞内シグナルの関与が示唆されているが、詳細な研究がなされて来なかった。最近、mitogen-activated protein (MAP) kinase ファミリーのリン酸化が細胞の生存、増殖、分化、細胞死に関与していることが次第に明らかにされつつある。今回、我々はEANの発症機序をこうした細胞内シグナルの側面から詳細に検討した。GBSの動物モデルであるEANの経過中にERK、SAPK/JNKおよびp-38の3つのMAP kinaseがリン酸化されることを明らかにした。Western blotではリン酸化ERK(p-ERK)、リン酸化JNK(p-JNK)およびリン酸化p38(p-p38)の3つのMAP kinaseのいずれも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、EANの極期で発現が亢進し、回復期に低下した。EANラット坐骨神経における炎症系細胞およびSchwann細胞におけるMAP kinase活性の一過性の亢進は細胞シグナルに影響を及ぼし、末梢神経系における炎症を修飾する上で決定的な役割を担っていることが示唆される。MAP kinaseファミリーがEANの発症と防御のどちらに関与しているかを明らかにすることにより、GBSの治療と予防法の開発に大きく役立つことが期待される。

A. 研究目的

ギラン・バレー症候群(GBS)の10~30%に *Campylobacter jejuni* (*C. j*) の先行感染があり、発症との関連が注目されているが、その機序は未だ不明である。GBSの発症機序の解明に動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAN)は大きく貢献してきた。EANは上行

性の進行性麻痺を来とし、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。EANの発症機序の解明はGBSの発症機序の解明に大きく役立つとともに、GBSの治療とその予防にも貢献できることが期待される。EANの発症にはT細胞と炎症性メディエーターが関与していることが推測されており、とりわけ炎症系細胞内シグナ

ルの関与が示唆されているが、詳細な研究がなされて来なかった。最近、mitogen-activated protein (MAP) kinase ファミリーのリン酸化が細胞の生存、増殖、分化、細胞死に関与していることが次第に明らかにされつつある。今回、我々は EAN の発症機序をこうした細胞内シグナルの側面から詳細に検討した。

B. 研究方法

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) は mitogen-activated protein (MAP) kinase ファミリーのサブグループの 1 つであり、MAP kinase シグナルカスケードは ERK、stress-activated protein kinase/c-Jun NH(2)-terminal protein kinase (SAPK/JNK) および p38 から成っている。これら 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 EAN において検討した。Lewis ラットを馬坐骨神経を用いて Freund の完全アジュバントとともに感作し、EAN を作成した。感作後、毎日臨床症状を観察するとともにスコア化した。感作後 14 日 (極期) および 21 日目 (回復期) に坐骨神経を採取し、一部は -70°C に凍結保存もしくは 4% パラホルムアルデヒドで固定した。坐骨神経はホモジナイズ後、イムノブロットを用いて ERK、JNK および p38 を測定した。またこれら細胞内シグナルの発現および局在を免疫組織化学的に検討した。

C. 研究結果

ラットは感作後 11 日~12 日目に尾の麻痺で発症し、上行性に進行し 14 日~16 日目に後肢の麻痺を来し、その後回復した (図 1)。

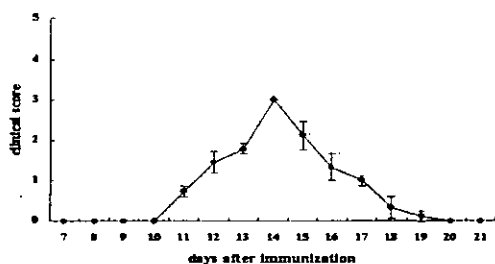


図 1. Clinical course. Floppy tails (G1) by days 11-12 PI. Progressive hindlimb paralysis (G2 or G3) by days 14 - 16 PI. All rats recovered subsequently.

ウェスタンブロットではリン酸化 ERK (p-ERK)、リン酸化 JNK (p-JNK) およびリン酸化 p38 (p-p38) の 3 つの MAP kinase のいずれも EAN の極期で発現が亢進し、回復期には低下した (図 2、4、6)。免疫組織化学的検討では p-ERK は Schwann 細胞に発現がみられ、EAN の極期で発現が亢進していた (図 3)。EAN の極期では T 細胞やマクロファージを含む炎症系細胞にも p-ERK の発現がみられ、p-JNK および p-p38 の発現パターンは p-ERK と同様であった (図 3、5、7)。

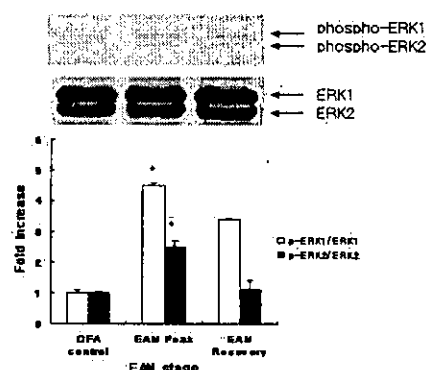


図 2



図 3. Immunohistochemical staining of p-ERK in the sciatic nerves. (A): In the sciatic nerves of controls. (B-D): experimental autoimmune neuritis (EAN). p-ERK immunostaining was observed in some Schwann cells (A, arrows). In animals with EAN, p-ERK was localized to Schwann cells (B, arrows) and some inflammatory cells (C). Colocalization of ED1 (D) and p-ERK (C) immunostaining showed that ED1-immunopositive macrophages (D) were positive for p-ERK (C). C and D are from the same section. Arrowheads indicate the same cells in C and D. In A-D, scale bar=30 μm .

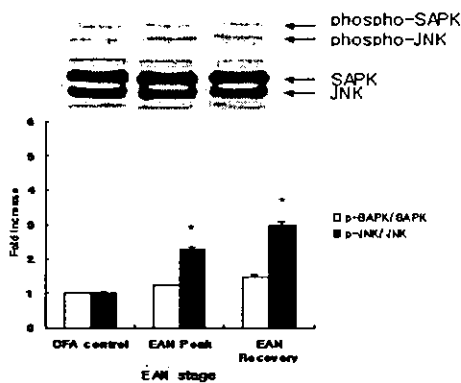


図 4



図 5. (A) sciatic nerves of control animals: vascular endothelial cells showed p-JNK immunoreactivity. (B-C) EAN (G.3, 14 days after induction): p-SAPK/JNK immunostaining was localized to some inflammatory cells (B). Colocalization of ED1 (C) and p-SAPK/JNK (B) showed that ED1-positive macrophages (C) were immunopositive for p-ERK (B). Arrowheads indicate the same cells in B and C. In A-C, scale bar = 30 μm.

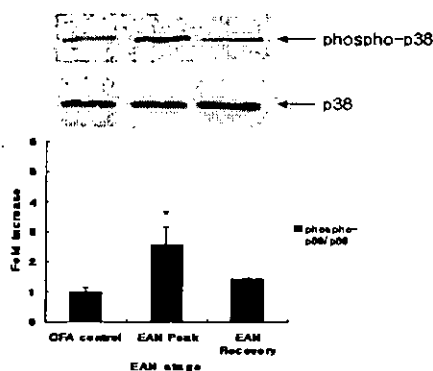


図 6



図 7. (A) sciatic nerves of control animals: Immunostaining in some Schwann and vascular endothelial cells (B-C) EAN (G.3, 14 days after induction): p-p38 immunostaining was localized to some inflammatory cells (B). Colocalization of ED1 (C) and p-p38 (B) showed that ED1-positive macrophages (C) were immunopositive for p-p38 (B). Arrowheads indicate the same cells in B and C. In A-C, scale bar = 30 μm.

D. 考察

今回、我々は初めて EAN の経過中に ERK、SAPK/JNK および p-38 の 3 つの MAP kinase がリン酸化されることを明らかにした。とりわけ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。EAN ラット坐骨神経における炎症系細胞および Schwann 細胞における MAP kinase 活性の一過性の亢進は細胞シグナルに影響を及ぼし、末梢神経系における炎症を修飾する上で決定的な役割を担っていることが示唆される。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。本研究により EAN の詳細な発症機序が明らかになれば GBS の発症機序が明らかとなり GBS の治療と予防に大きく役立つことが期待される。

E. 結論

ERK、SAPK/JNK および p-38 の 3 つの 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る。これら MAP kinase ファミリーが EAN の発症に関与しているか、防御に関与しているかをさらに研究することにより、GBS の治療と予防法の開発に大きく役立つことが期待される。