

2004-00835A

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐多 徹太郎

平成 17(2005)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 16 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人体病理学	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
	大石 和徳	長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野	助教授
	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年・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 16 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……………	7
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： IgA 腎症における扁桃感染細菌の検索と血中抗体、尿中蛋白の解析……………	12
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……………	24
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. サルコイドーシス病変部における抗酸性で細胞壁欠失型の <i>P. acnes</i> 菌体の 同定とその内因性活性化現象に関する研究……………	27
江石 義信（東京医科歯科大学大学院人体病理学）	
5. ギラン・バレー症候群の病因因子の解明とその制御に関する研究 — <i>Campylobacter jejuni</i> 菌体抗原感作による実験的神経炎の作成—……………	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……………	39
近藤 一博（東京慈恵会医科大学微生物学講座第 1）	
7. 難治性血管と真菌の関与の研究……………	43
鈴木 和男（国立感染症研究所生物活性物質部）	
8. 自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与……………	48
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 <i>Nontypeable Haemophilus influenzae</i> と <i>H. influenzae</i> type b のバイオフィルム産生に関する比較研究……………	51
大石 和徳（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……………	53
11. 村田 幸作（京都大学大学院農学研究科）	
12. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全におけるウイルス感染……………	58
山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院老年・呼吸器内科）	
13. カンピロバクター・リポオリゴ糖合成酵素の遺伝子多型と ギラン・バレー症候群……………	62
結城 伸泰（独協医科大学神経内科）	
14. 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 渡辺 邦友（岐阜大学生命科学総合実験センター）……………	65
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	69

# 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** 特定疾患を引き起こす病原体および発症機序を明らかにすることにより、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して研究を行った。ボルナ病ウイルスと神経変性疾患、ギラン・バレー症候群と *C. jejuni*、サルコイドーシスとプロピオニバクテリア、慢性難治性気道性感染症疾患とインフルエンザ菌のバイオフィーム形成およびライノウイルス、緑膿菌のバイオフィーム形成機序、難治性血管炎とカンジダ、IgA 腎症とマイコプラズマ、クローン病と HHV-6、原発性肺高血圧症と HHV-8 について、難治性疾患と微生物の関連について検討した。それぞれの特定疾患との関連性あるいは非関連性について明らかにされ、さらに一部では治療に係わる知見が明らかにされた。

### 分担研究者

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

### A. 研究目的

特定疾患（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、それ故原因療法ができない。特定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、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。当研究班では特定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：

ストレス状態におけるボルナ病ウイルス持続感染細胞に現れる脆弱性について検討した（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：

GBS やその関連疾患患者の糞便から分離・培養された *C. jejuni* と各症例の臨床データを収集した。ガングリオシドエpiteopeの分布、*cst-II* 多型（Thr/Asn 51）、Penner 血清型別、抗ガングリオシド血中 IgG 抗体を測定した（結城）。GM1 の局在を二重染色および免疫電顕法で観察した。MAPkinase ファミリーに属する 3 つの細胞内酵素蛋白の発現、細胞内シグナルの発現および局在を検討した（高）。

3) サルコイドーシスの病因説明:

サルコイドーシス病変部リンパ節に認められる細胞内封入体 Hamazaki-Wesenberg (HW)小体についてその実体に関する検討を行った(江石)。糞便中および口腔のプロピオニバクテリアの生態についての検討を行った(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:

インフルエンザ菌と感受性菌間でのバイオフィーム形成の違いについて検討する(大石)。慢性肺気腫患者および慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者の風邪による急性増悪時の際に、咽頭ぬぐい液と喀痰を採取し喀痰の細菌や気道ウイルスを同定した。ヒト気管上皮細胞および粘膜下腺細胞にライノウイルス 14 型を感染させ、マクロライド、ランソプラゾールおよび L-カルボシステインを培養液に添加して影響を調べた。慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者における風邪および急性増悪回数を調べた(山谷)。BF分解に関わる AlgL と PA1167、並びに PPK の各欠損株の性状を解析し、また、各酵素の構造・機能相関を X線結晶構造解析により明らかにする(村田)。

5) 難治性血管炎を誘発する心筋を主とした感染症:

血管炎誘発モデルマウスを用い、真菌分子 CADS、CAWS を投与し、心、脾、腎の血管の障害程度を観察し、血流に関する定量解析、シグナル伝達機構の解析を行う。さらにサイトカインチップを用いた遺伝子の網羅的解析を行う(鈴木)。

6) 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検索:

IgA 腎症患者の症状悪化との相関等について病態と関連させて、患者血清中の抗マイコプラズマ抗体の測定ならびに組織におけるマイコプラズマ抗原の検出を行う(荒川)。

7) 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明:

β-ヘルペスウイルスが潜伏感染時に特異的に発現している遺伝子および蛋白を同定し、これらの蛋白に対する抗体価を患者と健常

人において検討した。また、これらのウイルスの遺伝子組み換え体を作成する(近藤)。クローン病および自己免疫性肝炎の発症に関する微生物の関与を近年急速に進歩してきた遺伝子発現の網羅的解析により同定する(中島)。

8) 造血器疾患等の特定疾患とウイルスの関与:

原発性肺高血圧症とヒトヘルペスウイルス 8 感染の関連、および小児劇症肝炎について未知あるいは既知のウイルスを検索した(佐多)。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いる際は、患者のインフォームドコンセントを得ること、実験については必要により各機関の研究倫理審査委員会の承認を得るものとする。また得られた成績から患者個人の特定はしえないように扱うものとする。動物実験においては各施設の動物実験委員会、また組換え DNA 実験は同様に各施設の組換え DNA 委員会の承認を得てから行う。

C. 研究結果

1) 神経変性疾患における起因ウイルスの解析:

BDV 持続感染細胞では、ストレス負荷による HSP70 の mRNA および蛋白質の発現量に顕著な低下が認められ、さらに、HSP70 mRNA の安定化に必要とされる PKR の発現量について検討を行ったところ、BDV 持続感染細胞において恒常的な PKR の活性化が認められた(生田)。

2) ギラン・バレー-症候群(GBS)の発症に関わる病原因子、宿主因子の解明:

GBS 分離株の *cst-II* 遺伝子保有頻度は腸炎株に比べ高頻度であった。Thr 51 型の株は GM1 (92%) や GD1a (91%) 様 LOS を有し、患者血中に GM1 (88%) や GD1a (52%) に対する IgG 抗体を誘導し四肢脱力を来たす傾向があった(98%)。一方、Asn51 型の株は GQ1b/GT1a 様 LOS を有し(83%)、患者血中に IgG 抗 GQ1b 抗体を誘導し(56%)脳神経麻痺来たしやすかった。さ

らに、Asn 51 型の株において、53 番目のアミノ酸残基が Ile である場合は、 $\alpha$ -2,8 シアル酸転移酵素活性が比較的低い結果、GQ1b/GT1a 様 LOS と GM1 様 LOS とを併せ持つ傾向にあることが新しく分かった（結城）。共焦点レーザー顕微鏡で末梢神経における GM1 の局在は髄鞘にあった。Cj の免疫電顕による観察で GM1 局在は確認できなかった。EAN ラットを用いた検討では、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。さらに Cj を抗原として Cj 誘導による EAN の作成では Lewis ラットでは尾の麻痺がみられた（高）。

### 3) サルコイドーシスの病因説明：

サルコイドーシス病変部に特徴的な Hamazaki-Wesenberg (HW) 小体が cell-wall deficient 型の *P. acnes* 菌体そのものであることを、免疫電顕解析にて明らかにした（江石）。

サルコイドーシス患者 44 名の凍結糞便の解凍検体中から 10 cfu/g 以上に菌が検出された検体数は 33 検体で、培養陽性率は 68.2%であった。44 検体中凍結前に培養を行うことができた 24 例中の培養陽性検体数は 16 例で、培養陽性率は 66.7%であった。また、給食部に勤める健康人由来の検体 70 検体中 10 cfu/g 以上に菌が検出された検体数は 29 検体（培養陽性率 41.4%）であった。健康成人の唾液 38 検体で 10 cfu/g 以上にプロピオニバクテリアが検出された検体数は 34 検体（培養陽性率 92.1%）であった（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：

非莢膜保有インフルエンザ菌株は *in vitro* でバイオフィーム形成をするのに対し、type b インフルエンザ菌株ではバイオフィーム形成は認められなかった。走査型電子顕微鏡による観察でも、多くの type b インフルエンザ菌ではバイオフィーム形成は観察されなかった（大石）。COPD 急性増悪時においても、インフルエンザやライノウイルスなどの気道ウイルス感染と共に肺炎球菌やインフルエンザ菌が混合感染すること、分泌型ムチンである MUC5AC の合成・分泌を促進すること、また細胞内シグ

ナルについては転写因子の関与および Src-related p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway の関与等が明らかとなった。培養ヒト気管上皮細胞および気管粘膜下腺細胞は風邪の主因であるライノウイルスがムチン合成・分泌促進効果を有することが明らかとなり、マクロライド抗生物質エリスロマイシン、クラリスロマイシン、プロトンポンプ阻害薬ランソプラゾール、L-カルボシステインのムチン合成抑制効果が明らかとなった。12 ヶ月間の観察期間で認められた風邪の累積回数は、明らかに L-カルボシステイン内服群で減少した。さらに、COPD 急性増悪の累積回数も明らかに L-カルボシステイン内服群で減少した（山谷）。大腸菌を用いて PPK, AlgL 及び PA1167 の大量発現系を構築し精製した。精製した PPK は可溶性であり、ポリリン酸合成活性も保持していた。AlgL は、アルギン酸の MM ブロックを良好に分解した。ホモロジーモデリングにより、AlgL は、A1-III と同等の高次構造を示すことが分かった。そして、His202 及び Tyr256 が AlgL の活性残基と同定された。重原子同型置換法により、PA1167 の X 線結晶構造を決定した。PA1167 の分子表面における保存残基は、シート A (SA3,4,5) に集中していた。また、緑膿菌におけるアルギン酸の分解経路並びに分解に関わる酵素 (AlgL, PA1167) とその遺伝子を決定した（村田）。

### 5) 難治性血管炎を誘発する心筋を主とした感染症：

真菌膜成分により誘導される血管炎に関与する自己抗体 MPO-ANCA の抗原が好中球 MPO であることを MPO-KO マウスにより証明した。真菌由来分子 Mannose-Protein-1, 3- beta- glucan (CAWS) が、血管炎誘発することを明らかにし、CAWS が IL-6, TNF-alpha の炎症性サイトカインの誘導に関与することを明らかにした。Candida 由来分子 (CAWS) が好中球抗体 (ANCA) の産生を伴う難治性血管炎の誘発モデルマウスを開発した。活性化好中球が、血管炎誘導の初期過程に関与することを SCG/Kj マウスにより明らかにした（鈴木）。

### 6) 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検索：

マイコプラズマ特異的プライマーを用いた

解析においては、IgA 腎症患者の扁桃の 81%から *M. fermentans*/*M. salivarium* (ftsZ 遺伝子共通配列)が検出された。5/8 例で陰窩上皮下に IgA 陽性細胞を認めた。今回改良した血中抗体価測定系により、IgA 腎症患者群における抗 *M. pneumoniae*/*M. genitalium*-IgA 抗体価が、健常人群に比べ有意に ( $p < 0.0001$ ) 高いことが明らかになった (荒川)。

#### 7) 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明:

HHV-6 の潜伏感染特異的遺伝子蛋白に対する患者の血清抗体の反応を検討したところ、クローン病患者の約 5 割で陽性となることが判明した。また HHV-6 と HHV-7 の組み換えウイルスを世界に先駆けて作成することに成功した (近藤)。クローン病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 Virus 特異的な遺伝子発現は認められなかった (中島)。

#### 8) 造血管疾患等の特定疾患とウイルスの関与:

日本人原発性肺高血圧症 (PPH) 症例 10 例から採取した剖検肺組織につき HHV-8 の検索を行った。潜伏感染タンパク LANA を検出する免疫組織化学染色および PCR ではいずれの症例にも陽性シグナルを認めなかった。生体肝移植の適応となった小児劇症肝炎患者 3 例につき摘出肝を材料にウイルスの検索を行った。mRNA を抽出し、cDNA library を構築し、患者血清を用いて免疫スクリーニング法にて血清抗体と反応する抗原の同定を試みたが、微生物抗原は検出されなかった (佐多)。

### D. 考察

ボルナ病ウイルス (BDV) の培養細胞での実験により、BDV 持続感染による HSP70 の誘導発現の低下や PKR の恒常的活性化が、ストレス負荷時における神経細胞死へとつながることが考えられた。ギラン・バレー症候群においては、先行感染病原体 *C. jejuni* の遺伝子多型により、菌体上のガングリオシド様 LOS の構造が決まり、GBS の臨床像の多様性を規定していることが示された。また、軸索型 GBS であるとされる AMAN における抗 GM1 抗体の

病因説は否定的なデータが得られた。サルコイドーシスにおいてリンパ節病変にみられる Hamazaki-Wesenberg (HW) 小体が cell-wall deficient 型の *P. acnes* 菌体そのものであることがわかった。また、患者の便から、プロピオニバクテリアの分離率を明らかにした。全国的レベルで過去に実施し報告したサルコイドーシス患者由来の凍結糞便 65 検体で、10 cfu/g 以上に菌が検出された検体数は 25 検体 (陽性率 38.5%) であったが、今回の培養陽性率はそれよりも優位に高い結果であった。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して、ライノウイルス感染抑制効果が COPD の風邪および急性増悪予防効果に関連していると示唆された。バイオフィームに関して、緑膿菌は菌体外のアルギン酸を AlgL 次いで PA1167 を作用させて完全に分解することが示唆された。緑膿菌 BF 形成に関わる PPK に関して、その阻害剤の探索と設計を可能とする基盤が確立できた。βヘルペスウイルスに対する抗潜伏感染蛋白抗体の存在はクローン病患者において、潜伏感染蛋白を活発に発現する中間状態の潜伏感染細胞が多く、細胞機能が修飾されクローン病の生じる可能性が高くなるのではないかと考えられる。原発性肺高血圧症においては、日本人症例では HHV-8 の関与はまれであることが推察された。

### 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で神経変性疾患を含めたさまざまな疾患の病態に関与している可能性が示唆された。先行感染病原体 *C. jejuni* の遺伝子多型 (*cst-II* [Thr/Asn 51]) により、菌体上のガングリオシド様 LOS の構造が決まり、GBS の臨床像の多様性を規定していることがわかった。*C.j* 誘導による EAN が世界ではじめて作成された。細胞内に不顕性感染した細胞壁欠失型の *P. acnes* が、マクロファージ細胞内で異常増殖することがサルコイドーシス発症の契機となると考えられた。サルコイドーシス患者の約 70% で下部消化管 (糞便) からプロピオニバクテリアが分離された。type b インフルエンザ菌株はバイオフィーム形成が乏しく、バイオフィーム産生の多い株と少ない株が認められた。ライノウイルスを含めたウイルス感染の病態と予防法・治療法の解明がさらに深まった。緑膿菌 BF 形成に関わる PPK の可溶性発現と酵素学的性質の解明、及



び緑膿菌におけるアルギン酸の完全分解経路の確定とそれに関わる酵素の高次構造の決定を行った。真菌関与の血管炎誘発機構の解明についてMPOが抗原であり、真菌分子による炎症初期像、発現遺伝子の網羅的解析ができ、さらにモデルマウスを開発できた。また真菌成分による血管炎にはマウス系統差があり、それを利用して感受性遺伝子のマッピングができた。IgA腎症患者群は、健常人群より有意に肺炎マイコプラズマ (*M. pneumoniae*) / 泌尿器マイコプラズマ (*M. genitalium*) に対するIgA抗体、*M. fermentans*-IgG抗体が高値を示した。患者の扁桃からはマイコプラズマ遺伝子が検出された。扁桃におけるIgA過剰産生が、糸球体へ沈着する免疫グロブリンの産生源の一つになっていると予想された。ヒトヘルペスウイルス6の潜伏感染特異的な遺伝子・蛋白を同定し、これがクローン病の患者で異常産生されていることを見出した。クローン病と自己免疫性肝炎におけるvirus由来の遺伝子発現について網羅的手法を用いて解析したが陰性の結果をえた。原発性肺高血圧症の検体ではHHV-8感染との関係が否定された。劇症肝炎については既知のウイルスに対する多くのPCR法、さらに未知の微生物が検索可能と期待される方法で検討したが陰性であった。

## 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

### 1. 特許出願

「HIV等のウイルス感染の有無、又はブリーオン感染の有無を近赤外線分光法により検査・判定する方法、及び同方法に使用する装置」(生田和良)

「酵母の形質転換方法」、特願2002-54965、平成14年(村田幸作)

「*Sphingomonas* sp. A1の全ゲノム配列」、出願予定(村田幸作)

「*Pseudomonas aeruginosa* アルギン酸リアーゼ PA1167の高次構造」、出願予定(村田幸作)

「*Bacillus* sp. GL1の不飽和グルクロニルヒドロラーゼの高次構造」、出願予定(村田幸作)

「慢性肺気腫の発症リスクを予測する方法」特許第3491034号(山谷睦雄)

「気管支喘息の検査方法(ムチン合成関連遺伝子の解明)」特願2002-229312号(山谷睦雄)

「ライノウイルス感染予防剤」特願2004-98995号(山谷睦雄)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

1  
2  
3  
4  
5

## II. 分担研究報告

## 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、尾崎泰子、菅野隆行、阿部賢治、中島典子  
(国立感染症研究所感染病理部)

木村 宏 (名古屋大学医学部小児科)

**研究要旨** 劇症肝炎は肝性脳症を伴う急性肝不全に陥る肝炎であり、小児から成人まで幅広い年齢層で発症する。特に小児では重篤な症例が多く、予後不良で生体肝移植の適応となる。劇症肝炎の原因としては肝炎ウイルスなどのウイルス感染の他に薬剤が原因になるものもあるが、小児に発症する劇症肝炎では既知のウイルスが検出されず、また、他の原因も同定されないケースが多い。本研究では小児の劇症肝炎の原因微生物を同定する目的で生体肝移植の適応となった患者3名につき、摘出肝と血清を用いて、原因ウイルスの検索を行った。肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、エンテロウイルス、パルボウイルス等について検出を試みたが、サイトメガロウイルス、TTVが各1例で陽性だったほかは全て陰性の結果であった。未知のウイルスを検出する方法として劇症肝炎病変部の cDNA ライブラリーを作成し、患者血清を用いた免疫スクリーニング法を行った。結果、患者血清中の抗体と特異的に反応するクローンは得られず、今回検索した3症例については劇症肝炎の病因と関係する微生物の検出には至らなかった。しかし、方法論が確立したことで今後症例を積み重ねることにより、小児劇症肝炎の病原微生物が明らかになる可能性がある。また、ここで構築された劇症肝炎病変部の cDNA ライブラリーは今後の劇症肝炎の研究に有用と思われる。

### A. 研究目的

劇症肝炎は急激に起こる肝細胞の広範な壊死に基づいて肝の萎縮、進行性の黄疸、出血傾向及び精神神経症状(肝性脳症)などの種々の肝不全症状が出現する肝炎である。診断基準としては「肝炎のうち症状発現後8週以内に高度の肝機能異常に基づいて昏睡Ⅱ度以上の肝性脳症をきたし、プロトロンビン時間が40%以下を示すもの」とされ、症状出現後10日以内に脳症が発現する急性型と11日以降に発現する亜急性型に分類される。小児から成人まで幅広い年齢層で発症し、近年では毎年100例ほどの症例があると考えられる。小児の劇症肝炎は亜急性型が多く、救命率は約10%と予後は悪い。病因として肝炎ウイルスやヘルペスウイルスにより起こるウイルス性、ハロセン、サルファ剤、パラアミノサリチル酸などが原因で起こる

薬剤性などがあるが、小児の場合、既知のウイルスが検出されずに他の原因も考えられないことから原因不明とする症例が多い。小児劇症肝炎の治療は困難で生体部分肝移植の適応となる。本研究では生体肝移植の適応となる小児劇症肝炎の摘出肝の一部と患者血清を材料に、病原微生物の検出を目的とする。

これまでの報告から小児劇症肝炎の原因として未知のウイルスが関与している可能性が示唆されている。すなわち、(1)小児劇症肝炎症例の半数以上がHAV-HGVのいずれの肝炎ウイルスも検出されず、他のウイルスも検出されない症例であること、(2)劇症肝炎の肝移植後、約3割に再生不良性貧血が起こること(他の肝移植後ではほとんどない)、(3)肝移植後の再生不良性貧血はアジアで多く国内では中西部に多いなど、疫学的な特徴があること、(4)

再生不良性貧血患者で肝炎を既往に持つものが多いことなどから、骨髄にも感染する未知の肝炎ウイルスが小児劇症肝炎の病原ウイルスである可能性が示唆されている。

未知のウイルスの検索法としては過去には培養細胞を使ったウイルス分離が唯一の手段であったが近年の分子生物学的技術の進歩により様々な方法が開発されてきており、近年発見されたウイルスの例では PCR をベースとしたサブトラクション法などが主流となっている。しかし、サブトラクション法は比較する対象症例の選択が容易でないことや多くの非特異的なクローンがクローニングされてしまい成功率が低いなどの問題がある。そこで、今回われわれは感染者血清中にはウイルスに対する抗体が産生されることを利用し、患者検体から構築した cDNA ライブラリーから患者血清を一次抗体に用いた免疫スクリーニング法で未知のウイルスの検出を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 検体

生後 1 年未満の生体肝移植の適応となった患者 3 名からインフォームドコンセントを得た上で (1) 生体肝移植時の摘出肝 (2) 患者血清検体の採取を行った。患者は男児 1 名、女児 2 名で、入院時の GOT/GPT, TB ともに高値を示し、経過中に一度は II 度以上の肝性昏睡を示していた。生体肝移植のドナーは父親または母親で、うち一例は血液型不適合の母親からの移植であった。生体肝移植後、1 例は死亡し、他の 2 例は回復後、退院した。生体肝移植手術により摘出した患児の肝組織を摘出後すぐに -80°C にて凍結保存した。血清は術前のもので -80°C にて凍結保存した。

### 2. 既知のウイルスの検査(PCR)

摘出肝組織から mRNA を抽出し逆転写酵素を用い cDNA とし、各ウイルスの検出を PCR 法あるいは real-time PCR 法で行った。まず QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN) にて DNA を、SV total RNA isolation kit (Promega) にて RNA を抽出した。RNA は、特異的プライマーと OmniScript RT Kit (QIAGEN) を

用いて逆転写反応を行った。cDNA あるいは DNA を鋳型として RNA/DNA ウイルス特異的プライマーと PreMix Taq (Takara) により PCR を行った。RT-PCR 反応条件は 37°C, 60min, 93°C, 5 min で、DNA-PCR および nested PCR の反応条件は 94°C, 2 min, 30 ~ 40 × (94°C, 30s, アニーリング, 30s, 72°C, 30s) 、72°C, 7 min で行った。さらに PCR の内部標準として GAPDH または  $\beta$ -globin 遺伝子の増幅を同時に行った。増幅した DNA 断片は 2%アガロースゲルに電気泳動し、エチレンブロマイド染色をおこなった。Real-time PCR は Taqman PCR (Applied Biosystems)を用いた。

### 3. cDNA ライブラリーの構築と患者血清を用いた免疫スクリーニング

摘出肝組織から Invitrogen FastTrack 2.0 を用いて mRNA を抽出した。cDNA の合成は Superscript Choice System (Invitrogen) で行い、得られた cDNA に EcoRI アダプターを付加後、 $\lambda$  ZAP express vector (Stratagene) にライゲーションし、その産物をパッケージングした。ファージのタイターは通法により希釈ファージウイルス液を大腸菌に感染させ、プレート培養後のプラークの数から算定した。免疫スクリーニングのため大腸菌プレート上に  $5 \times 10^5$  プラークとなるようプレーティングした。IPTG 含有メンブレンを載せてタンパク発現を誘導した後に、メンブレンを剥がし乾燥した。このメンブレンに対し希釈患者血清を 1 次抗体に、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体を二次抗体として染色した。陽性プラークは 3 次までスクリーニングを行い、最終的に患者血清と反応するプラークを確定した。分離された陽性プラークは in vivo excision の後、plasmid に変換し、DNA シークエンスを行った。

#### (倫理面への配慮)

インフォームドコンセントを取るに当たり、厚生労働省のガイドラインに準拠した同意書を作成し、これに患者またはこれに代わる親権者の同意を得た。全ての研究の過程は国立感染症研究所研究倫理委員会の承認 (平成 16 年 10 月 21 日 承認番号 41) を得たプロトコールにしたがって行われた。

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. 既知のウイルスの検査 (PCR)

RT-PCR では A 型肝炎ウイルス(HAV)、C 型肝炎ウイルス(HCV)、エンテロウイルス (図 1) を DNA-PCR では B 型肝炎ウイルス (HBV)、単純ヘルペスウイルス(HSV) I 型、II 型、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、ヒトヘルペスウイルス (HHV)6, 7, 8, パルボウイルス B19, TTV について検出を試みた (図 2)。1 例において CMV が、他の 1 例で TTV が検出されたがほかはすべて陰性の結果であった。CMV 陽性例につきウイルス量を real-time PCR で測定したところ、その量は微量であり、病変との関連は否定的であった。

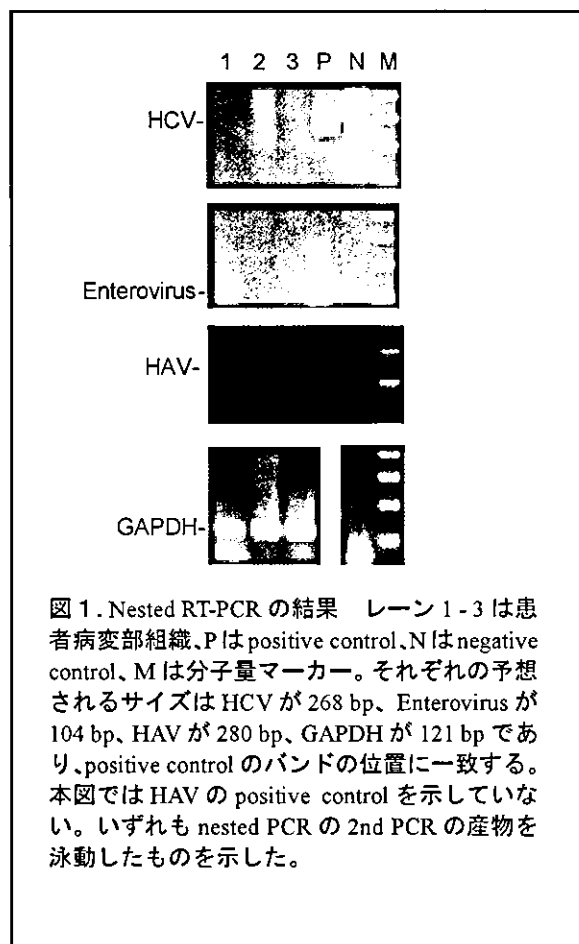


図 1. Nested RT-PCR の結果 レーン 1-3 は患者病変部組織、P は positive control、N は negative control、M は分子量マーカー。それぞれの予想されるサイズは HCV が 268 bp、Enterovirus が 104 bp、HAV が 280 bp、GAPDH が 121 bp であり、positive control のバンドの位置に一致する。本図では HAV の positive control を示していない。いずれも nested PCR の 2nd PCR の産物を泳動したものを示した。

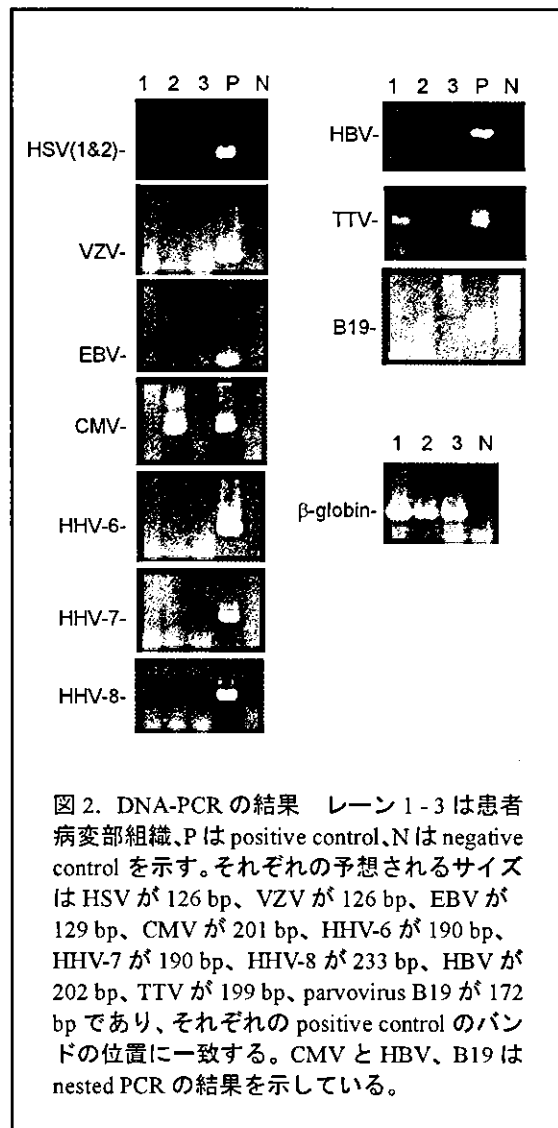


図 2. DNA-PCR の結果 レーン 1-3 は患者病変部組織、P は positive control、N は negative control を示す。それぞれの予想されるサイズは HSV が 126 bp、VZV が 126 bp、EBV が 129 bp、CMV が 201 bp、HHV-6 が 190 bp、HHV-7 が 190 bp、HHV-8 が 233 bp、HBV が 202 bp、TTV が 199 bp、parvovirus B19 が 172 bp であり、それぞれの positive control のバンドの位置に一致する。CMV と HBV、B19 は nested PCR の結果を示している。

#### 2. cDNA ライブラリーの構築と患者血清を用いた免疫スクリーニング

劇症肝炎病変部から採取した mRNA 量は 0.2 - 4.0  $\mu\text{g}$  であり、cDNA ライブラリーを作成するには最低 2  $\mu\text{g}$  が必要であるため、1 例では cDNA ライブラリーの作成は不可であった。2 例について構築された cDNA ライブラリーは  $0.8-1.2 \times 10^6$  の独立したクローンを含んでおり、スクリーニングには十分な数と考えられた。この cDNA ライブラリーを用いて、患者血清により免疫スクリーニングを行った。その結果、1 例の患者は 8 クローンを、他の患者では 3 クローンを 3 次スクリーニングまで陽性であった。得られたクローンをシーケンスで確認し

たところ 1 例で human heparan sulfate proteoglycan が 1 クローンあったのみで他はすべてヒトイムノグロブリン遺伝子であった。これらは二次抗体とクロスしたものと恐れ、非特異的な結合と判定された。したがって、得られたクローンは病原微生物のタンパクを含まず、この方法でこれらの検体から未知の病原微生物を同定するには至らなかった。

#### D. 考察

小児劇症肝炎の原因としてウイルス感染はもっとも頻度の高いものと考えられている。薬剤性や代謝性の原因が否定され、自己免疫疾患などの肝炎を引き起こす背景がない限り、ほとんどの症例はウイルス性の原因が疑われている。事実、小児の劇症肝炎全体のうち 25-75% の症例には HBV が検出され、現在分かっている劇症肝炎の原因の中では最も重要な要因であるといえる。HBV のほかに小児の劇症肝炎に検出されるウイルスとしては本研究で検索した HAV, HCV やヘルペスウイルス、パルボウイルスなどが挙げられるが、その他に HDV や HEV, GBV/HGV などその関連が指摘されている。HAV は発展途上国では小児劇症肝炎の 3 割程度に検出され、HBV とともに原因ウイルスとして重要である。しかし、アメリカ等の先進国ではわずか 5% 以下にしか認められず、劇症肝炎の原因としてはそれほど大きな割合を占めるものではない。他のウイルスでは EBV が頻度としては比較的高いものの、他のウイルスはいずれも頻度としてはきわめて低い。小児の劇症肝炎でこれらのウイルスのうちどれかが検出される症例は全体の半分程度で、約 50% の症例ではどのウイルスも検出されずにしかも、薬剤性など他の原因も考えられないことから「nonA-G ウイルス性劇症肝炎」という診断がなされることが多い。すなわち、「nonA-G ウイルス性劇症肝炎」という診断自体が waste basket 的な診断名であり、ウイルスが同定されていない以上、本来はウイルス性とは言えず、ウイルス性以外の原因も考えなければならない。こうした経緯を勘案すると小児の劇症肝炎において未知の原因ウイルスを同定することは「nonA-G ウイルス性劇症肝炎」が本当にウイルス性であるかという議論に終止符を打ち、その原因と病態の解明にとってきわめて意義

深いことと言える。

PCR 法はウイルスの検出法としては感度の高い、また汎用性の高い方法として定着している。今回検索した 3 症例については劇症肝炎の病因と考えられている既知のウイルスに対して網羅的に検索したが、病因といえるものは検出できなかった。これは検索対象となった既知のウイルスしか検出できないという PCR 法の限界であり、PCR の感度の問題ではない。もしこれらのウイルスのうちどれかが病因に関わっているとしたら、病変部には多くのコピー数が存在するはずであるし、PCR 法で検出できるはずである。1 例で CMV が検出されたが、real-time PCR の結果では低いコピー数が検出され、病因に関連するものとは考えられない量であった。また、TTV は近年その肝炎ウイルスとしての病原性が否定されつつあり、劇症肝炎の病因とは考えにくい。しかし、各ウイルスに対する検出法が確立したことで今後症例を積み重ねることにより、臨床的に「nonA-G ウイルス性劇症肝炎」に分類されていた症例の中で既知のウイルスが関与していた症例に関しては原因ウイルスが明らかになる可能性がある。

本研究において未知のウイルスの検索法として採用した cDNA ライブラリーを用いた免疫スクリーニング法は、元来、抗体を用いて遺伝子をクローニングする方法の一つである。これまでウイルス学の分野ではウイルスがコードする抗原タンパクの同定などに応用されている。患者血清中にウイルスに対する抗体価が上昇していて、病変部にウイルスが多量に存在していれば未知のウイルスの抗原タンパクがクローニングされてくる可能性は十分あるが、いくつかの問題点もはらんでいる。一つは血清抗体の質と量の問題で、小児の場合、感染から発症までが間もないことが考えられ、IgG が上がりきらず、IgM しか出ていない可能性もある。その場合は 2 次抗体に抗ヒト IgM 抗体を使用する必要がある。2 番目の問題はフェージの発現するタンパク側の問題で、タンパクを大腸菌で発現させることになるので、糖タンパクなどでは抗原性が減弱し、陽性シグナルが弱くなることが考えられる。3 番目の問題は特異性の問題で、今回の場合、2 次抗体と反応してしまった、ヒトイムノグロブリン遺伝子が非特異的に検出された。この問題はブロッキングを完全に

行うことでこれは容易に防ぐことができる。これらの問題を改良しつつ、今後症例を増やしていくことで未知のウイルスの同定は可能と期待される。なお、本研究で2例の小児劇症肝炎患者の肝病変部から約  $1 \times 10^6$  個の独立したクローンを含む cDNA ライブラリーを構築することができた。これまで、小児劇症肝炎患者の肝病変部から cDNA ライブラリーを構築したとする報告はなく、今後の劇症肝炎の研究に有用と思われる。

## E. 結論

今回検索した3症例については劇症肝炎の病因と関係する微生物の検出には至らなかった。しかし、各ウイルスに対する検出法が確立したことで今後症例を積み重ねることにより、これらのウイルスと劇症肝炎との関わりが明らかになるものと思われる。また、未知のウイルスの検索法として、cDNA ライブラリーを用いた免疫スクリーニング法を応用したが、今回の結果には非特異反応によるクローンが含まれ、今後の検討が必要である。なお、ここで構築された劇症肝炎病変部の cDNA library は今後の劇症肝炎の研究に有用と思われる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Katano H, Ito K, Shibuya K, Saji T, Sato Y, Sata T. Lack of Human Herpesvirus 8 Infection in Lungs of Japanese Patients with Primary Pulmonary Hypertension. *J Infect Dis.* 2005;191:743-745
2. Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T. BCL-6-positive Human Herpesvirus 8-associated Solid Lymphoma arising from Liver and Spleen as Multiple Nodular Lesions. *Leuk Lymphoma.* 2004;45:2169-2172

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



## 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: IgA 腎症における扁桃感染 細菌の検索と血中抗体、尿中蛋白の解析

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 (エム バイオ テック(株))  
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)  
富岡・松谷幸子 (仙台赤十字病院耳鼻咽喉科)

**研究要旨** IgA 腎症における過剰 IgA 産生の機構を細菌感染との関連から解析する為、治療用摘出扁桃への細菌感染を細菌に共通な 16S rRNA 遺伝子、マイコプラズマ属に共通な 16-23S rRNA 遺伝子スペーサー領域ならびに肺炎マイコプラズマ(*M. pneumoniae*)特異的遺伝子の増幅ならびに配列解析、データベース検索により予測し、予測された細菌(マイコプラズマを含む)に対する血中 IgA 抗体価を測定した。扁桃から抽出した DNA から主に増幅された菌種として *Chryseobacterium meningosepticum*, *C. indologenes*, *C. joostei* が上げられた。*C. meningosepticum* ならびに *C. indologenes* に対する血中 IgA 抗体価は、抗 *C. indologenes*-IgA 抗体価が、IgA 腎症患者群で、健常人群より有意 ( $p < 0.0001$ ) に高かった。マイコプラズマに対する解析では、扁桃から *M. fermentans*, *M. salivarium* ならびに *M. pneumoniae* の遺伝子が低率ながら検出された。*M. fermentans* ならびに *M. pneumoniae* に対する血中抗体価は、抗 *M. pneumoniae*-IgA 抗体価が、IgA 腎症患者群で、健常人群より有意 ( $p < 0.0001$ ) に高かった。IgA 腎症患者のうち 2 例は、クリセオバクテリウム 2 種ならびに肺炎マイコプラズマの 3 種のいずれについても高い IgA 抗体価を示したが、このうち 1 名は、急性期の患者であった。扁桃にいたことが予想される細菌の幾つかに対する血中の特異的 IgA 抗体価の高値は、細菌の抗原刺激が IgA 腎症患者において過剰 IgA 産生の一原因になっていることを示唆するものと考えられた。また、IgA 腎症患者の尿中主要蛋白の同定を行った。血清成分が検出されたが、微量抗原の解析には、改良が必要であると思われた。

### A. 研究の背景ならびに目的

IgA 腎症は、我が国の慢性糸球体腎炎の約 60% を占め、20 歳台を好発年齢とし、蛋白尿、血尿を主症状とし、10 年以上の慢性経過を経て、約 40% の患者で腎透析治療を必要とする。糸球体のメサンギウム領域への IgA1 を主体とする免疫グロブリンの沈着ならびにメサンギウム細胞の増生を特徴とする。IgA 腎症の病態に

は、糸球体障害が重要であることに違いないが、糸球体病変の形成には、腎そのものよりも、むしろ全身の免疫グロブリンの異常による免疫複合体形成が役割を果たしていると考えられる。特に、IgA1 の糖鎖異常や、IgA 過剰産生といった現象の理解が、病態解明に役立つと考えられる。このことは、現在、我が国において行われている IgA 腎症の扁桃摘出治療+パルス療法による高成績(尿症状の消失率、初発

症状より3年以内の患者において84%、3年以上経過した患者では36%)を見ることから予想されるように、粘膜免疫刺激の受容体の一つである扁桃が、IgA産生をもたらす持続的抗原刺激を供給していることを示唆すると考えられる。我々はこれまでにIgA腎症患者の治療用摘出扁桃の陰窩上皮下にIgA陽性細胞の浸潤を認めており、文献的にも扁桃におけるIgA産生を担うB-1細胞が、IgA腎症患者では細胞数が多く、かつFasを介するアポトーシスに抵抗であるとの報告があり[1]、扁桃におけるIgA過剰産生が疑われる。我々は、今回、扁桃における抗原刺激を解析する目的で、IgA腎症患者において治療用に摘出された扁桃に感染している細菌(マイコプラズマを含む)の遺伝子を増幅、遺伝子配列から種を予測し、その細菌に対する特異的抗体、特にIgA抗体価を測定し、IgA産生の抗原刺激についての解析を行ったので報告する。さらに、尿中蛋白の解析法の開発を試み、今回は、主要蛋白の同定を行ったので、あわせて報告する。

## B. 材料と方法

末梢血、尿ならびに、治療用摘出扁桃とい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ける研究倫理委員会の指示に従い、研究に供した。

### 1) 扁桃からの細菌遺伝子の増幅と配列解析からの種の予測

細菌に共通に存在する16S rRNA遺伝子をターゲットとして用い、遺伝子増幅用プライマーを設定した。Nested-PCRの一回目には、グラム陰性から陽性までの幅広い菌種ならびにマイコプラズマの16S rRNA遺伝子を増幅可能なプライマーセット(10F, 800R)[2]を用いた。二回目には、160F-529Rを用いた[3]。扁桃から抽出したDNAを鋳型に用いた。増幅されたDNAのバンドをアガロースゲルから切りだし精製後、増幅に用いたプライマーの片方をシークエンスプライマーとして、dye-terminationによるシークエンス反応を行った。遺伝子配列データは、全遺伝子配列データベースに対してNCBI-BLASTを用いて検索を行い、高スコアでベストヒットした候補を選択

した。

### 2) 扁桃からのマイコプラズマ遺伝子増幅と種の予測

二つのnested-PCR系を行った。一つは、ヒトから分離される複数のマイコプラズマ6種(*M. fermentans*, *M. hominis*, *M. orale*, *M. salivarium*ならびに*U. urealyticum*)を含む属特異的な16-23S rRNA spacer region配列を基にしたプライマーセット(Takara, Co, Ltd.)ならびに、二つ目は、*M. pneumoniae*特異的プライマーとして16S rRNA遺伝子をターゲットとしたプライマーセットを用いた。扁桃から抽出したDNAを鋳型に用いた。属特異的PCRでは、増幅された遺伝子産物の分子量サイズを、陽性対象に用いた種に対する増幅産物と比較して、種を予測した。

### 3) 特異抗体測定法の開発

A: *M. pneumoniae*/ *M. genitalium*に対する特異抗原: *M. pneumoniae*の宿主細胞への主要付着蛋白であるP1蛋白は、強い抗原性を有していることがわかっている。P1遺伝子の膜外領域を含む領域をクローニングしたrP1-8(共同研究者の見理が作成)を用い、大腸菌で蛋白の大量発現を行い、His-tagとの融合蛋白として発現し、ニッケルカラムにて精製し、抗原を作成した。

B: *M. fermentans*に対する特異抗原: phosphocholine含有glycoglycerophospholipid(GGPL-III)は、膜の主要蛋白で抗原性が強く、種特異性があることから、抗原に使用した。GGPL-IIIは、エムバイオテック(株)の松田和洋博士より分与された。

C: *M. penetrans*に対する特異抗原:我々が解析した*M. penetrans*全ゲノム情報[4]をもとに、主要抗原蛋白をプロテオミクス法を用いて同定した(平成15年度の報告書参照)。同定されたpyruvate dehydrogenase(PDH)-E2をコードする遺伝子の一部をクローニングし、大腸菌にて発現させ、ニッケルカラムで精製したリコンビナント蛋白を抗原とした。

D: クリセオバクテリウムに対する抗原：*Chryseobacterium meningosepticum* ならびに *C. indologenes* の培養全菌体を超音波破砕した cell lysates を抗原として用いた。

#### 4) 血中抗体価の測定

それぞれの抗原をコーティングした ELISA プレートを、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。

#### 5) 尿中蛋白のプロテオミクス法による解析

IgA 腎症患者ならびに健常人の尿を二次元泳動にて展開し、銀染色ならびにクマシーブリリアントブルー(CBB)染色により可視化した。CBB 染色用には、尿 1.5ml 中の蛋白をトリクロロ酢酸にて沈殿させて資料とした。タンパクスポットは、トリプシンによるゲル内消化を行った後、ペプチドの解析を LC-MS/MS を用いたペプチドフィンガープリンティング法で解析し、ヒトゲノムデータベースならびに細菌のデータベースに対して検索し、シークエンスタグ法を用いて、蛋白を同定した。

### C. 研究結果

#### 1) 扁桃からの細菌遺伝子の増幅と配列解析からの種の子測

1 回の PCR では、菌から DNA を精製した陽性対象では、約 800bp のバンドが増幅されたものの、扁桃組織中の微量の細菌遺伝子を増幅することはできず、nested 化の必要性が示された。Nested-PCR の結果、2 本の DNA バンドが増幅された (図 1)。分子量約 900bp のバンドは、配列解析の結果、ヒトのミトコンドリア遺伝子と予測された。もう一本の分子量約 350bp のバンドは、配列解析の結果、表 1 に示すように、13 例中、8 例で *C. meningosepticum*、1 例で *C. indologenes*、1 例で *C. joostei* と予測された。高スコアでヒットした全ての菌種は、

クリセオバクテリウムであった。16S rRNA 遺伝子中の細菌毎の可変領域が存在することから、全細菌を網羅して増幅可能なプライマーの設計は難しい。今回使用したプライマーは、口腔内細菌ならびにマイコプラズマの数種 (*Staphylococcus aureus*, *Actinomyces viscosus*, *Veillonera atypical*, *Treponema denticola*, *Mycoplasma salivarium*, *M. orale*, *M. fermentans*, *M. penetrans*) を増幅することを確認したが、増幅できない種の存在も想定される。また、増幅遺伝子は、異なる細菌の混合産物であることから、配列データの読み取りは、量的にメジャーな配列を読んでいることになる。従って、クリセオバクテリウムが今回解析した扁桃に大量に存在する種の一つであることが示唆されたことになる。

#### 2) 扁桃からのマイコプラズマ遺伝子増幅と種の子測

扁桃に存在するマイナーな菌種の予測には、特異的プライマーを用いる必要がある。マイコプラズマの属特異的ならびに、*M. pneumoniae* 特異的 Nested-PCR プライマーによる解析の結果は、以下の通りである。*M. fermentans* 陽性は、3/14 例ならびに *M. salivarium* 陽性は、2/14 例、*M. pneumoniae* 陽性は、1/14 例。低率ながら、扁桃にマイコプラズマの (少なくとも) 遺伝子の存在が示唆された。

#### 3) 血中抗体価の測定

次ぎに、扁桃から遺伝子の存在が予測されたクリセオバクテリウムならびにマイコプラズマに対する血中抗体価を測定した。患者血清は、1 点希釈のみのスクリーニングであるが、得られた ELISA 抗体価の統計処理から、以下の事が導き出された (図 2A-C)。

1. 抗 *C. indologenes*-IgA 抗体価は、IgA 腎症患者群で健常人群より高い値を示す。(p<0.0001)
2. 抗 *M. pneumoniae*-IgA 抗体価は、IgA 腎症患者群で健常人群より高い値を示す。(P<0.0001)
3. 2 名の患者においては、クリセオバクテリウム 2 種ならびに *M. pneumoniae* いずれの抗原に対しても、非常に高値

- の IgA 抗体価を示した方がいた。
4. この 2 名の値を省いた統計計算においても、抗 *C. indologenes*-IgA 抗体価 ( $P=0.001$ ) ならびに抗 *M. pneumoniae*-IgA 抗体価 ( $p<0.0001$ ) の IgA 腎症患者群における高値は、有意であった。
  5. 抗 *C. meningosepticum*-IgA 抗体価ならびに抗 *M. fermentans*-IgA 抗体価は、IgA 腎症患者群と健常人群で統計的に有意な差は無かった。
  6. 抗 *M. fermentans*-IgG 抗体価は、IgA 腎症患者群で、 $P=0.02$  で高かった。抗 *M. penetrans*-IgG 抗体価も IgA 腎症患者 1 名でのみ高かった。

これらの結果は、扁桃にいることが予測される菌種に対する特異的抗体価の上昇をうかがわせる一方、菌種による IgA 抗体価の違いも存在した。

#### 4) 尿中蛋白のプロテオミクス法による解析

二次元泳動にて展開した尿中蛋白は、健常人においては、銀染色でアルブミンが観察されただけであったが、IgA 腎症患者では、蛋白尿が出ていることの当然の結果として、銀ならびに CBB 染色において、顕著なスポットが検出された。メジャーなスポットは、血清由来と考えられる蛋白で、以下のものが同定された (図 3)。アルブミン、セルロプラスミン、アルファ-1B-糖蛋白、トランスフェリン、プロスタグランジン-H2D-イソメラーゼ。このうち、アルファ-1B-糖蛋白は、クロモゾーム 19 にコードされる機能不明な血清中の主要蛋白 (22mg/dl) であり、人種等による遺伝子多形が存在し[5]、細胞外マトリックスの CRISP-3 に結合する。このアルファ-1B-糖蛋白には、二両体 IgA(pIgA)を含むポリマーな免疫グロブリンのレセプターである poly-IgR と相同性の高いドメインが存在している[6]。

#### D. 考察

*M. pneumoniae* によるマイコプラズマ肺炎後の IgA 腎症を含む免疫グロブリン沈着による糸球体腎炎の症例がこれまでに数例報告されている[7-9]。18歳で罹患した 1 症例については、

抗ヒト IgA 抗体と患者血清を反応させて IgA を除いてしまうと、その血清の抗 *M. pneumoniae* 抗体価が激減したと記載があり、抗 *M. pneumoniae*-IgA 抗体の病態への関与が疑われている。小児科領域においては、マイコプラズマ肺炎後の蛋白尿発現は、熱性蛋白尿として知られているが、一過性のもので、治療せずに回復する。*M. pneumoniae* はヒトにのみ感染する細菌で、ヒトは、機会があれば人生に何度でも感染しうる。軽い症状で終わる場合も多いが、宿主の免疫応答が病変部形成に関与し、乳幼児や小児では、症状は軽く肺炎にまで至らないが、若年層で感染すると病状が重く、場合によっては肺炎に至るとされている。IgA 腎症の好発年齢が 20 歳代であることも、マイコプラズマ感染との関連は不明だが、マイコプラズマ肺炎同様、強い免疫応答が病態に関与している現れであると考えられる。*M. pneumoniae* の付着蛋白を抗原に用いた今回の解析では、IgA 腎症患者群における抗 *M. pneumoniae*-IgA 抗体価が有意に高値を示した。解析を行った患者は、肺炎を疑うケースは無く、皆、臨床においては、マイコプラズマ抗体価測定を行っていない。今回、*M. pneumoniae* ならびに、2 種のクリセオバクテリウムに対する抗体価が非常に高かった患者のうち一名は、咳と発熱の 10 日後に血尿で受診され 1 ヶ月以内の急性期の方である。抗 *M. pneumoniae*-IgG 抗体価は低値であり、咳が何に由来していたかは、不明である。

扁桃に大量に存在していることが予測されたクリセオバクテリウムは、以前の分類では、フラボバクテリウム属に分類されていた自然環境に常在する菌であり、院内感染菌としても知られている。特に、*C. meningosepticum* は、未熟児や免疫力の低下した大人に肺炎、敗血症、髄膜炎を起こす[10]。血液や髄液からの分離報告はあるものの、健常人を含め、ヒトの扁桃に常在しているかについては、文献を見つけれなかった。今回行った扁桃遺伝子を鋳型にした細菌の 16S rRNA 遺伝子の増幅ならびに配列決定の手法は、扁桃に存在する大量の菌種を予測するものであることから、クリセオバクテリウムが、大量に存在した可能性は高い。同じ実験系で解析した他のサンプルならびに陰性対象からはクリセオバクテリウムが増幅されてこなかったこと、また、扁桃によって、予測された種が異なったことから、実験に用いた水やプライマー等が、本菌に汚染していたことは考え