

感染症四方山話(10): 感染症研究との出会い(2)

Various topics concerning infectious diseases (10) an encounter with infectious diseases research (2)

東京女子医科大学 感染症科 教授 菊池 賢
Ken Kikuchi, MD, PhD.(Professor)

Department of Infectious Diseases, Tokyo Women's Medical University

1. はじめに

2011年の感染症四方山話(3)で感染症研究との出会い、特に viridans group streptococci (VGS) との長い付き合いの始まりの話を書いた¹⁾。「おわりに」にあるように、これは編集部と続きを書く約束になっていたのだが、ずっと先延ばしにしていた。自慢出来るような研究成果を上げている訳でもなく、この内容を臆面もなく誌面に登場させるには、抵抗感があったのだ。しかし、感染症四方山話(9)が出てから休筆が続いていて、断れなくなった。

私とレンサ球菌との歩みで避けて通れないのが、Lancefieldレンサ球菌研究会である。この会は日本医科大学の大國教授、大阪大学歯学部の浜田教授、山梨医科大学の山田教授が世話人となり、特に若手研究者の育成を目的に「レンサ球菌談話会」として1992年に発足した。昨年からは歴史の長いレンサ球菌感染症研究会と一緒に、「レンサ球菌研究会」として発展を遂げている。この会は、当初、旅館などに泊まり込み、昼間は缶詰になって研究発表・激しいディスカッションを行う一方、夜はかなり羽目を外した宴会が延々と続き、繰り広げられた様々なエピソードは「この誌面ではとても書けない伝説」として語り継がれる、実に楽しい会であった。読者の方で、このあたりのエピソードを知りたい方は、レンサ球菌を研究テーマにしている50歳以上の研究者であれば、誰でもご存知だと思うので、お尋ねされたい。当時、滅茶苦茶をやっていた若手の研究仲間達は、ほとんどが教室を運営する責任者になっている。今、思い返してみても濃厚な凄いなメンバーであったと思う。私は1998年から参加しており、2013年には世話人と

して、研究会を主催させて頂く栄誉ある機会も得た。私のレンサ球菌の仕事はほとんどがこの会を通じて知り合った仲間と行ったものである。様々な成果を上げることができたが、私の役割は臨床と基礎のパイプ役を果たしたに過ぎない。今回、ここで取り上げる内容は、こうした数多くの共同研究者との共同作業で生み出されたことを、改めてご認識の上で、本稿を読んで頂きたいと思う。

2. *Streptococcus anginosus* groupと *Streptococcus intermedius* について

VGSは口腔内常在菌の最優位菌で、歯面に多い *Streptococcus sanguinis*, *S. gordonii* などの属する *S. mitis* group, 舌表面に多く見られる *S. salivarius* の属する *S. salivarius* group, 齲歯の原因として知られる *S. mutans* の属する *S. mutans* group, 嫌気環境を好み、歯周ポケットや扁桃腺窩などに見られる *S. anginosus* group (SAG) の4クレードから構成される¹⁾。SAGは *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius* の3菌種5亜種から成り、以前、“*Streptococcus milleri*”, “*Streptococcus MG*”, “minute colony streptococci” などと呼ばれていたグループに相当する¹⁾。SAGはいずれもCO₂指向性(capnophilic)があり、嫌気要求性、栄養要求性も比較的高く、血液寒天培地上で観察されるコロニーが他のVGSに比べて小さい(minute colonyの由来)。このため、口腔-気道領域の検体だと、他の発育の良い菌のコロニーに隠れ、特に好気培養では検出するのが難しい。レンサ球菌の重要な鑑別点の溶血性も α , β , γ のいずれのタイプがあり、Lancefield血清型もA, C, Fかnon-typeを示すため、*S.*

pyogenes, *S. dysgalactiae*と間違えられることもある。普段、溶血性レンサ球菌以外のレンサ球菌同定に慣れていないと、SAGを臨床検体から適切に分離・同定するのはかなり経験を要する。私も最初は無菌部位以外からSAGを集めようとして、その難しさに辟易した。菌の分離は平板でのコロニーの顔つきを覚える事から始めるのだが、SAGの場合、兎に角、目がいく溶血性、コロニー性状がバラバラであり、他のVGSや溶血性レンサ球菌との区別も難しい。 γ レンサ球菌であれば*S. mutans*と、 β レンサ球菌であれば*S. agalactiae*, *S. pyogenes*などと区別しにくい。 α レンサ球菌のSAGは、はっきり言ってお手上げである。昔、VGSの同定方法の論文を投稿したとき、reviewerからのコメントで一番答えに窮したのが「SAGを検討しないのは何故か」であった²⁾。何のことはない、当時、検討に十分な数の分離株を集められなかったからである。唯一、役に立つのは平板を開けた時の臭いである。SAGはピルビン酸からジアセチルを産生し、特有のカaramel臭を示すため、純培養のように菌量が多いと気がつくが、口腔領域の検体だと他の菌が多数生えているので臭いで気がつくのは難しいだろう。また、SAGではマクロライド、テトラサイクリン、クリンダマイシン耐性を持つ菌株が存在することが知られているが、まだペニシリン耐性の報告はない。このような非常に多様な性質を示す一方、他のレンサ球菌と鑑別する適当な抗菌薬耐性も持たないので、選択培地の開発が極めて難しく、実際のSAGの分布、特に、健常部位での分布はまだよくわかっていないことが多く、検査室・研究者泣かせの菌である。しかし、これまでの我々の検討では、口腔領域だと*S. anginosus*は比較的口腔全域に広く分布し、*S. constellatus*は扁桃、*S. intermedius*は歯周ポケットのような嫌気度の高い環境に限定されることがわかってきた(投稿中)。我々はSAG3菌種の標準株の全ゲノム解析を行い、いくつか、他のレンサ球菌とは異なる代謝経路を見いだしたので、今後はこれを応用した選択培地の開発を考えている。

一方、SAGが引き起こす感染症としては化膿性病変を形成するのが特徴であり、脳膿瘍、肝膿瘍、膿胸などの深部膿瘍の原因となる¹⁾。VGSは感染性心内膜炎の起原因菌としてポピュラーであるが、SAGの頻度はそれほど高くない。しかし、SAGによる感染性心内膜炎は通常*S. mitis* group菌種によるものとは臨床像が際立って異なっている³⁾。弁上の疣贅形成よりは、弁輪部膿瘍、心

外膜炎など、やはり化膿性病変を作る傾向が強い。一部の膿瘍から分離されたSAGは図1に示すようにムコイド型を示す場合があり、膿瘍形成の際の白血球の貪食から免れる一因になっているのであろう。これは多発性肝膿瘍の患者から分離された株で、あらゆる抗菌薬に感受性を示していた。しかし、ムコイド基質が抗菌薬の透過性に影響したかどうかは定かではないが、行った全ての抗菌化学療法が無効だった。この症例では肝臓内に無数の蜂の巣状の膿瘍を形成していたため、ドレナージも出来ず、抗菌薬治療の限界を痛感させられた。

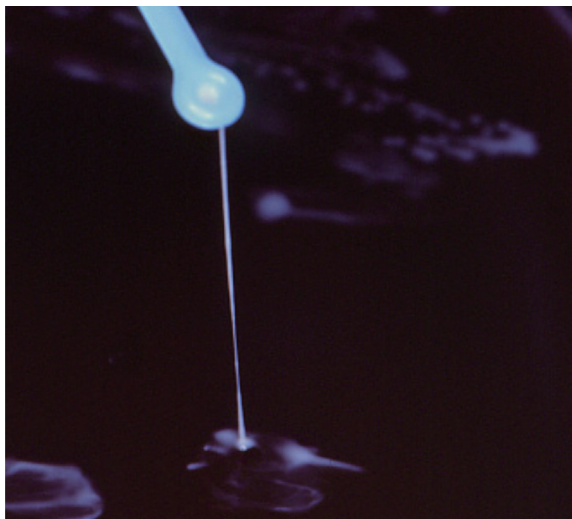
SAGは口腔が起源のことが多いため、膿瘍では*Prevotella*属、*Fusobacterium*属、*Peptostreptococcus*属などの口腔領域の嫌気性菌などの混合感染が多いが、*S. intermedius*はSAGの中では、深部膿瘍などから単独で分離される頻度が高く、病原性が最も高いと考えられている⁴⁾。その理由として挙げられるのが本菌を特徴づける毒素、intermedilysin(ILY)である。ILYは*Clostridium perfringens*のperfringosin O、*S. pneumoniae*のpneumolysin、*S. pyogenes*のstreptolysin O、*Listeria monocytogenes*のlisteriolysin O、*S. suis*のsuilysinなどに類似した膜孔形成性細胞溶解毒素であり、*S. anginosus* groupの残り2菌種を含む他の菌種からの検出は知られていない⁴⁾。ILYのターゲットはヒト型CD59(huCD59)で、霊長類以外の動物細胞にはほとんど毒性を発揮しないため、*S. intermedius*のほとんどは通常検査室で使用されるヒツジやウマ血液寒天培地上では溶血を示さない(γ 溶血性)⁵⁾。CD59は活性化補体から自己細胞を守るタンパクで、CD59への自己免疫により、活性化補体が容易に溶血するCD59欠損赤血球ができると発作性夜間血尿症(PNH)が起こる⁶⁾。全身性ループスエリテマトーデス(SLE)やシェーグレン症候群(SS)ではCD8+T細胞でCD59発現が減少し、これらの細胞は通常のCD59発現細胞に比してアポトーシスを起こし易く、病態と関与することが報告されている⁷⁾。

3. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)との出会い

前述したLancefieldレンサ球菌研究会で徳島大学歯学部 弘田先生とSAGの雑談をしていたとき、「*S. intermedius*でマウスに歯周病を起こさせると、何故か肝臓の胆管周囲に炎症が起きるんですよ」という一言

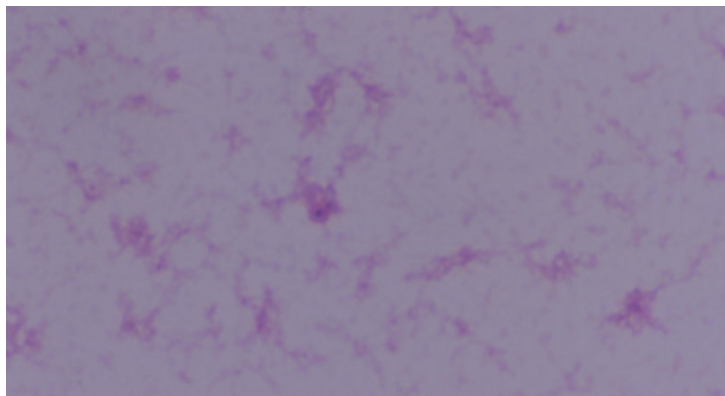
が、引っかけた。研究会から戻って、「動物実験してみたら面白いのだろうか。胆管周囲の炎症というと、原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis: PBC)だなあ。誰か消化器内科で興味を持っている人はいないかな?」と思い、研修の同期だった消化器内科の春田先生に電話してみた。PBCとは閉経後の中年女性に好発する肝内小胆管周囲の非化膿性炎症(慢性非化膿性破壊性胆管炎: chronic nonsuppurative destructive cholangitis CNSDC)を主病態とする原因不明の進行性疾患である⁸⁾。進行すると肝硬変から肝不全となり、肝移植しか治療の手だてのない難病だが、ほとんど進行のみられない患者(無症候性PBC)も存在する。1990年に特定疾患に指定され、医療費公費負担患者は15,000人程登録されており、毎年500~1,000名程の新規患者

が発症している⁸⁾。無症候性PBCは登録患者の4~5倍はいるものと想定されている。全くの偶然だったが、彼女はPBCの研究をしていて、PBCの肝組織を抗リボタイコ酸(LTA)抗体で染めると、胆管周囲の炎症部位が染色されることに気がついて、「LTAの起源を調べる方法はないか?」と私に連絡しようとしていたところだったのだ。図2にPBC患者と対照の慢性C型肝炎の抗LTA抗体による免疫染色像を示す⁹⁾。PBCでは小葉間胆管周囲に浸潤している細胞とその周囲の間質にLTAが染め出されているのがわかる。そこで「こういう話があるんだけど」と話すと、トントン拍子に事は進んだ。PBC患者の血清中のIgG, IgM, IgA classの抗LTA抗体の値を慢性C型肝炎(Chronic hepatitis C: CHC)、健常者血清と比較してみたところ、PBC患者ではIgM, IgA class

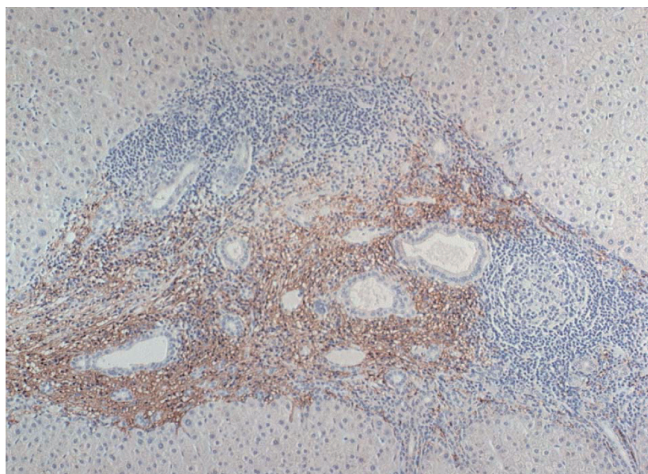


コロニー外観

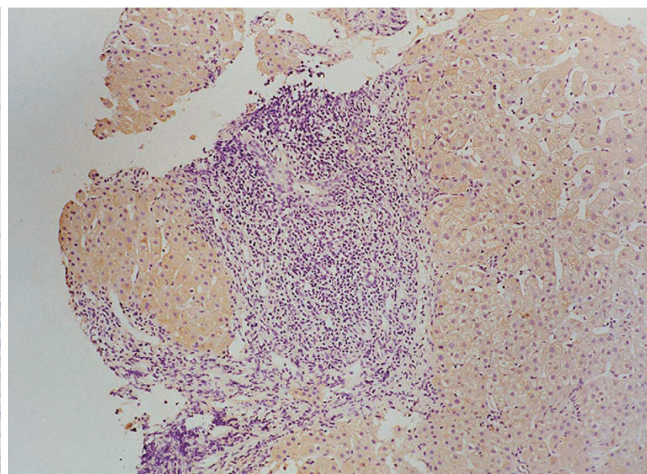
図1 ムコイド型 *S. anginosus* 株



莢膜染色(Hiss染色)像



PBC



慢性C型肝炎(CH-C)

図2 PBC患者と慢性C型肝炎(CH-C)患者肝臓組織の抗LTA抗体による免疫染色所見

の抗LTA抗体が有意に高値を示すことが確認できた⁹⁾。次にこのLTA酸が何のグラム陽性菌由来なのか調べるため、PBC患者血清の様々なグラム陽性菌に対する抗体価を測定することになった。図3に結果の一部を示す¹⁰⁾。様々なグラム陽性菌の中では、レンサ球菌との反応性が高く、特に*S. intermedius*の抗体価が他のレンサ球菌に対する抗体価よりも高いことが明らかとなった。

4. PBCの自己抗体の起源

PBC検査所見では肝胆道系酵素の上昇、IgM高値に加え、抗ミトコンドリア抗体が高率に(>90%)陽性になることから、自己免疫疾患と考えられている。抗ミトコンドリア抗体のエピトープは pyruvate dehydrogenase complex

(PDC)のE2, E3 binding protein, E1 α , E1 β , 2-oxoglutarate dehydrogenase complex(OGDC)E2, branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex(BCOADC)E2などで、PBCではPDC-E2抗体が最も高率に陽性となる。PBC患者ではこの他にも、抗gp210抗体、抗p62抗体、抗lamin B receptor抗体、抗sp100抗体、抗セントロメア抗体など、多種類の自己抗体が陽性になる^{4,8)}。これらのエピトープはPDC E2, gp210などで明らかになっているが、その分子相同性(molecular mimic)の対象となる微生物については今なお、特定に至っていない。これまでに、大腸菌、*Novosphingobium aromaticivorans*, *Propionibacterium acnes*, レトロウイルスなどの様々な微生物が候補にあげられたが、PBCの動物実験モデルなどによる直接的な証明はされていなかった⁴⁾。

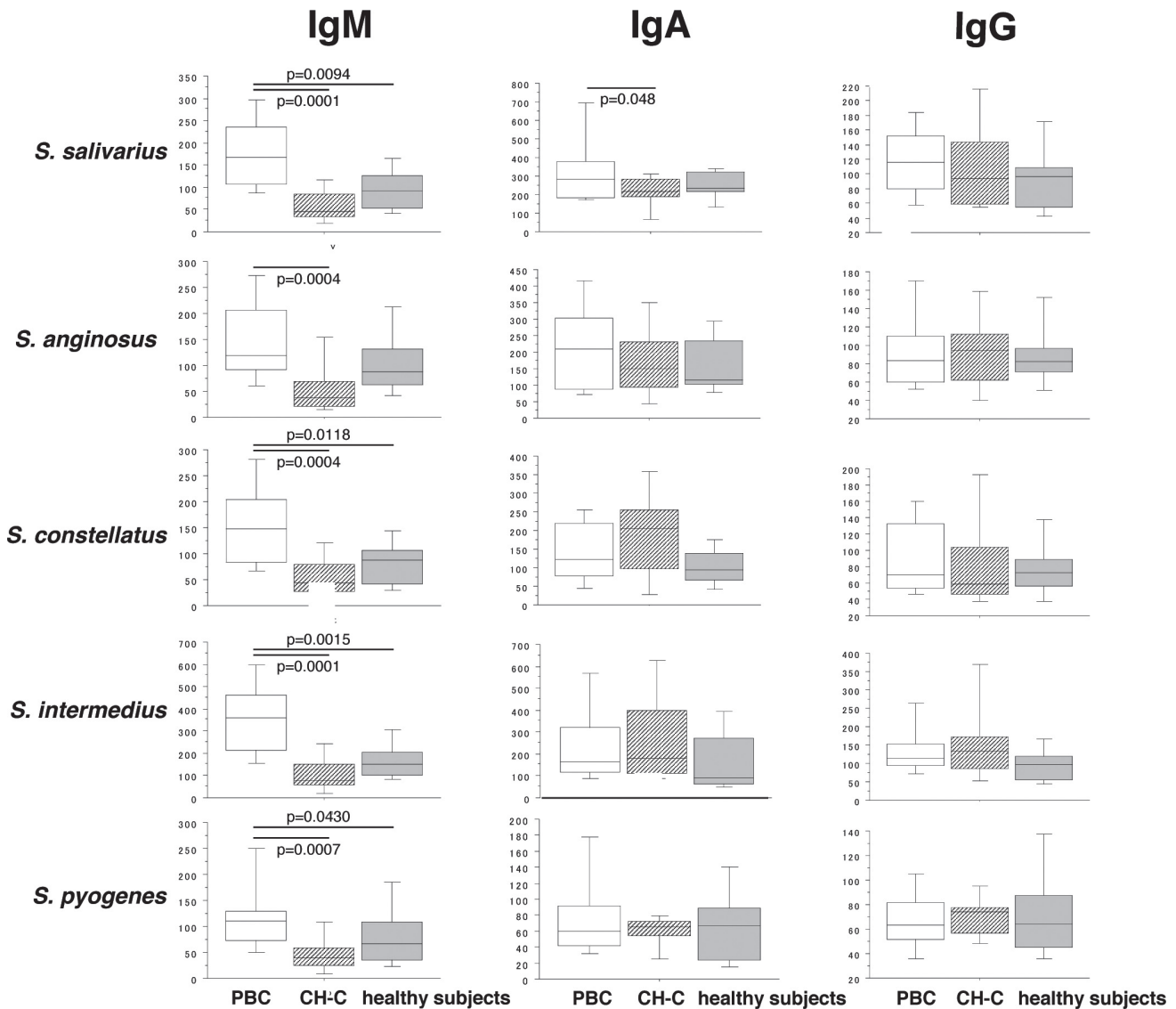


図3 PBC患者、慢性C型肝炎(CH-C)患者、健常者血清の各種レンサ球菌全菌体に対する抗体価

今回、PBC患者血清のレンサ球菌、特に*S. intermedius*の抗体価が高いことを見いだしたが、更にPBC患者血清では*S. intermedius* histone-like protein (Hlp)に対する抗体が高いこと、患者肝組織の免疫染色でPBC病変部位にHlpが検出されることから、*S. intermedius*の菌体成分、とりわけ、LTA、Hlpが⁸ molecular mimicとしてPBCの発症に関与していることが示唆された⁹⁾。

Hlpは菌種毎の保存性が極めて高い(種特異性が高い)RNA, 1本鎖、2本鎖DNA結合性タンパクであり、菌の生育には必須である。レンサ球菌では91アミノ酸から構成され、2量体を形成している¹¹⁾。細胞内でDNAの複製、転写調整、翻訳調整、ストレス応答などにかかわる一方、Hlpは細胞外にも放出され、細胞外放出DNAと共にバイオフィーム形成に寄与し、免疫細胞からの炎症性サイトカイン(IL-8, IL-1 β , TNF- α)の分泌を引き起こし、糸球体腎炎、リウマチ熱の病原因子としても知られている¹¹⁾。ところが、Hlpには抗ミトコンドリア抗体の抗原エピトープであるPDC-E2のEIETDK配列は含まれない。それではHlpは何と反応しているのであろうか。

5. PBC動物実験モデルの確立

先に*S. intermedius*はSAGの中でもかなり嫌気度の高いニッチな環境からしか分離されないことを説明した。その部位として、最も疑われるのが歯周病ポケットである。そこで、マウス歯肉に*S. intermedius*を週2回、8週間投与して歯周病モデルを作成し、肝臓にどのような変化が生じるのか調べてみた¹²⁾。驚くべきことに、*S. intermedius*は生菌でも加熱死菌でも典型的な肝臓小胆管周囲の非化膿性炎症像が観察され、投与終了20ヶ月後でもPBC様の病変は安定して検出された。肝組織では小胆管周囲の非化膿性炎症部位に一致して、免疫染色でHlpが検出された(図5)。まさにヒトPBCとそっくりの病態が再現された訳である。ここで更に大変興味深い事実が明らかになった。PBC患者にみられる抗gp210抗体は近年、PBCの予後予測因子として注目されている⁴⁾。PBC患者全体での陽性率は抗ミトコンドリア抗体に比べて低いが、抗gp210抗体陽性患者では陰性患者に比べ、肝硬変へ進展する症例の割合が高い⁴⁾。このマウスモデルで抗gp210抗体値の上昇がみられ、かつ、抗Hlp抗体はマウスのgp210と交差

反応することが明らかになった¹²⁾。ヒトgp210のエピトープと*S. intermedius*-Hlpの配列を比較すると、エピトープの共有が確認できたのである(図4)。しかし、何故、核膜孔を構成するタンパク核膜孔を構成するタンパクであるgp210に対する抗体がPBCで認められるのか。Susilowatiらは*S. intermedius*の産生するILYが胆管上皮細胞に作用すると、核内にカルシウム流入が起こり、nuclear factor of activated T cells 1(NFAT1)を活性化することで、細胞傷害をきたすことを報告した¹³⁾。胆管上皮細胞はCD59を高発現していることが知られており、ILYは細胞膜傷害のみならず、核膜傷害により核内タンパクの漏出を引き起こしたことにより、自己抗体獲得につながると想定された。また、このPBCモデルマウスの脾臓細胞をT細胞の欠如したRAG2^{-/-}マウスに移植すると、同じPBC様病変が移植マウスに再現された¹⁴⁾。これらの結果から、本モデルは優れたPBC動物実験モデルとして用いられるのではないかと考えている。おそらく、PBC発症に当たっては、閉経等で引き起こされるエストロゲン低下による免疫変化が前段階として存在し、発症の引き金となるイベントと炎症を継続させ、進行させる別々の複雑な経路が必要と推察される。

6. おわりに

PBCの molecular mimicに関して、候補になった微生物はレトロウイルスから、マイコプラズマ、グラム陰性菌、グラム陽性菌など、非常に多岐に渡る。PBC患者側の因子として、HLA-DQB1などのHLA領域、IL12/IL12Rシグナル伝達、TLR/TNA α -NH κ Bシグナル伝達、B細胞成熟分化、上皮細胞分化、アポトーシス、小胞体ストレス応答などの種々の遺伝子多型の影響が明らかにされている¹¹⁾。これらの点から考えても、PBCの発症要因は非常に複雑であり、疾患としての多様性を感じさせる。現在、我々はPBC患者、PBC以外の自己免疫疾患患者、コントロールで歯周病部位から検出されるSAGの比較解析を行っている。仮に、PBCの一部が*S. intermedius*の菌周の慢性炎症が原因で起きているとすれば、歯周病治療がPBCの予防・治療に直結する可能性が出てくる。今後はマイクロバイオーム解析を加えて、本研究を更に進めれば、新しい風景が見えてくるのではないかと期待している。

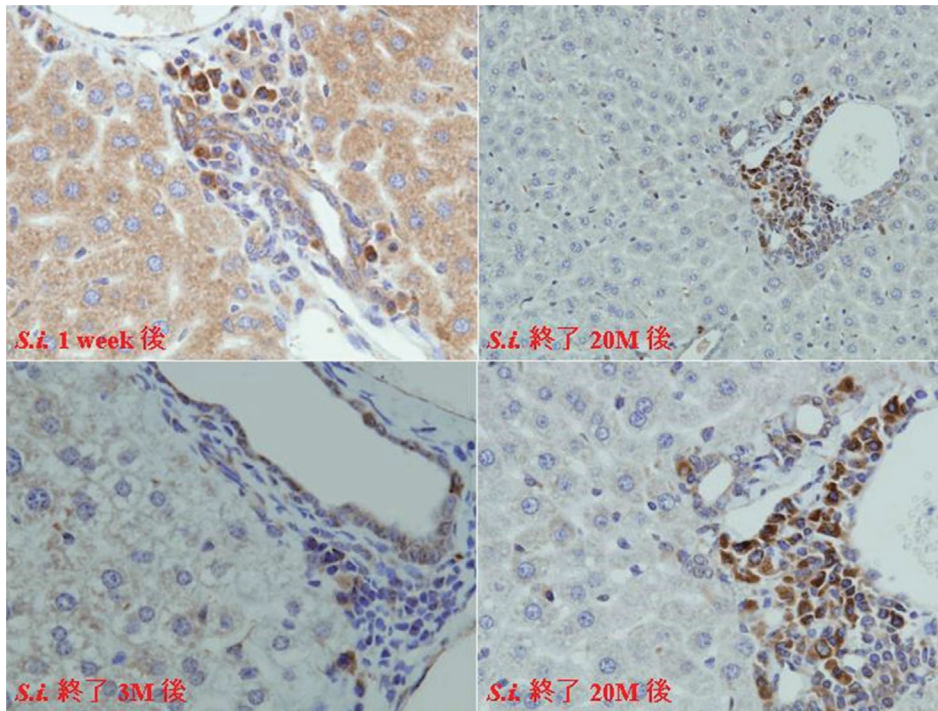


図4 マウスPBCモデルの非化膿性破壊性胆管炎病変の抗Hsp抗体による免疫染色所見

Hsp of *S. intermedium*
ARKGRNPQTGKEITI
ARKASPPSGLWSPAY
human gp210 epitope (1870-1884)

図5 *S. intermedium*-Hspとヒトgp210エピトープの比較

参考文献

- 1) 菊池賢. THE CHEMICAL TIMES. 2012, 224, 8-14.
- 2) Kikuchi, K.; Enari, T.; Totsuka, K.; Shimizu, K. J. Clin. Microbiol. 1995, 33 (5), 1215-1222.
- 3) Ko, T.; Mahara, K.; Ota, M.; Kato, Y.; Tobaru, T.; Takanashi, S.; Kikuchi, K.; Umemura, J.; Sumiyoshi, T.; Tomoike, H. Heart Lung. 2013, 42(5), 379-381.
- 4) 菊池賢. 化学療法の領域. 2011, 27(1), 71-78.
- 5) 長宗秀明. 日本細菌学雑誌. 2008, 63(3), 425-435.
- 6) Kim, D.D.; Song, W-C. Clin. Immunol. 2006, 118(2-3), 127-136.
- 7) Song, W-C. Autoimmunity. 2006, 39(5), 403-410.
- 8) 中村稔, 相葉佳洋, 小森敦正, 石橋大海. 医療. 2009, 63(6), 357-362.
- 9) Haruta, I, Hashimoto E, Kato Y, Kikuchi K, Kato H, Yagi J, Uchiyama T, Kobayashi M, Shiratori K. Autoimmunity. 2006, 39(2), 129-135.
- 10) Haruta, I.; Kikuchi, K.; Hashimoto, E.; Kato, H.; Hirota, K.; Kobayashi, M.; Miyake, Y.; Uchiyama, T.; Yagi, J.; Shiratori, K. Clin. Immunol. 2008, 127(2), 245-251.
- 11) 菊池賢. Bio Industry, 2015, 32(4), 20-24.
- 12) Haruta, I.; Kikuchi, K.; Hashimoto, E.; Nakamura, M.; Miyakawa, H.; Hirota, K.; Shibata, N.; Kato, H.; Arimura, Y.; Kato, Y.; Uchiyama, T.; Nagamune, H.; Kobayashi, M.; Miyake, Y.; Shiratori, K.; Yagi, J. Lab. Invest. 2010, 90, 577-588.
- 13) Susilowati, H.; Okamura, H.; Hirota, K.; Shono, M.; Yoshida, K.; Murakami, K.; Tabata, A.; Nagamune, H.; Haneji, T.; Miyake, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011, 404(1), 57-61.
- 14) Haruta, I.; Kikuchi, K.; Nakamura, M.; Hirota, K.; Kato, H.; Miyakawa, H.; Shibata, N.; Miyake, Y.; Hashimoto, E.; Shiratori, K.; Yagi, J. J. Clin. Immunol. 2012, 32(5), 1026-1037.