
 総 説

ベーチェット病と連鎖球菌抗原

吉川 浩二, 小竹 聡, 松田 英彦

北海道大学医学部眼科学教室

要 約

ベーチェット病の病因としての微生物感染は古くから研究がなされている。本病患者は連鎖球菌抗原に対する抗体価の上昇および遅延型過敏反応の亢進がみられることから、発症との関連が調べられてきた。中でも *Streptococcus sanguis* は患者の口腔内から高率に分離され、その血清型は健常人とは大きく異なっており、この菌に対する患者の免疫反応が強いことから、特に注目されている。一方、自己免疫疾患の発症因子として熱ショック蛋白質と $\gamma\delta$ T 細胞が重要な役割を果たしていることが示唆され、ベーチェット病においてもこれらの因子と連

鎖球菌との関係が研究されている。さらに、連鎖球菌の具体的な抗原部位の検索が行われており、これらの外来抗原とヒト組織との分子相同性および抗原特異的免疫反応の解明により、本病の発症における自己免疫機序の意義が明らかにされると思われる。(日眼会誌 100:173-180, 1996)

キーワード：ベーチェット病, 連鎖球菌抗原, *Streptococcus sanguis*, 熱ショック蛋白質, $\gamma\delta$ T 細胞

 A Review

Behçet's Disease and Streptococcal Antigens

Koji Yoshikawa, Satoshi Kotake and Hidehiko Matsuda

Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine

Abstract

Many studies have been carried out concerning microbial infections and the occurrence of Behçet's disease. Recently, attention has been focused on the streptococci. The serum antibody titer and delayed type hypersensitivity of patients with Behçet's disease against streptococcal antigens were significantly higher than those of controls. We also found that the oral flora of patients with Behçet's disease was dominated by *Streptococcus sanguis*, whose serotypes were different from controls. Recent studies have revealed that some streptococcal antigens are associated with heat shock protein

and that human $\gamma\delta$ T cell lines recognize streptococcal antigens. These results suggest that an autoimmune response might be implicated in the etiology of Behçet's disease. To make clear autoimmune mechanisms of Behçet's disease, we have analysed immunogenic antigens of *S. sanguis*. (J Jpn Ophthalmol Soc 100:173-180, 1996)

Key words: Behçet's disease, Streptococcal antigen, *Streptococcus sanguis*, Heat shock protein, $\gamma\delta$ T cell

I 緒 言

ベーチェット病の原因は未だに不明であり、そのため決定的な治療法もない。現在、本病は内因としての病因遺伝子が存在し、ある特定の外因が作用したときに発症す

る多因子性疾患であり、病態として種々の免疫異常を示すことが知られている。病因遺伝子としては HLA が調べられている。HLA は遺伝的多型性を示す白血球抗原を支配し、様々な疾患に対する感受性を規定しているという特徴をもっており、HLA-B 51 がベーチェット病の

別刷請求先：060 北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目 北海道大学医学部眼科学教室 吉川 浩二
(平成 7 年 9 月 19 日受付, 平成 7 年 11 月 14 日改訂受理)

Reprint requests to: Koji Yoshikawa, M.D. Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine, Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060, Japan

(Received September 19, 1995 and accepted in revised form November 14, 1995)

代表的な遺伝子マーカーとして知られている¹⁾。これは、健常人でも本邦においては10~20%の陽性者がみられ、逆に本病患者の40~50%で陰性である。それ故、HLA-B 51がペーチェット病を規定する内因遺伝子かどうかは不明である。HLA自身ではなく、HLA-B遺伝子座近傍に本病を規定する因子があるとの仮説もあり、TNF- β 遺伝子などの検索が行われている²⁾。本病の病態としての免疫異常については、好中球機能、リンパ球の活性化、サイトカイン産生能などの研究が行われているが、病因と結びつくものは見出されていない。しかし、これは非特異的免疫療法として、現在行われている主な治療に直接結びついている。すなわち、本病患者では好中球の機能亢進があるため、その遊走抑制作用のあるコルヒチンが使われている³⁾。最近では活性化T細胞がより本質的な役割を果たしていることが明らかとなり、ヘルパーT細胞を選択的に抑制するシクロスポリン⁴⁾、FK 506⁵⁾などの免疫抑制剤が使われている。しかし、ともに根治的治療ではなく、眼発作を完全に抑制するには至っていない。一方、外因についてはこれまで微量金属や有機塩素系農薬などの環境汚染物質、細菌・ウイルスなどの微生物などが調べられてきたが、現在までに確定したものはない。もし、これが明らかになれば発症機序の解明から治療へと進展することが期待できる。近年、外因の一つとして連鎖球菌が注目されており、様々な側面から検証が行われている。本稿では、これまでのペーチェット病における微生物感染の関与の研究を紹介し、特に連鎖球菌に関しては、我々の研究成果を含め、将来の展望についても述べる。

II 歴史的背景

ペーチェット病と微生物感染の関係は以前から調べられてきた。1920年、Gilbert⁶⁾のブドウ球菌感染説に始まり、1937年にはBehçet⁷⁾が本病の一つの疾患概念としてまとめ、原因としてウイルス説を提唱した。ウイルスについては前房水、アフタ抽出液からのウイルス分離⁸⁾、神経ペーチェット病患者の髄液からのウイルス分離⁹⁾の報告があるが、いずれも再現性の乏しいものであった。日本では、1958年に氏原¹⁰⁾はブドウ球菌に対して本病患者の感受性が亢進し、抗体が増加していることを報告し、1959年に萩原¹¹⁾は眼症状はブドウ球菌や連鎖球菌による抗原抗体反応によるものであると述べ、1960年に浦山¹²⁾は皮膚テストにより連鎖球菌に対する過敏性を示した。その後、再発性口腔内アフタの分野で連鎖球菌、特に*Streptococcus* (*S.*) *sanguis*が注目されるようになった。1963年Barileら¹³⁾、Graykowskiら¹⁴⁾は口腔内アフタ患者の病変部から α -*streptococcus* (*S. sanguis* prototype 2 A)のtransitional L-formを分離し、それに対して患者が皮内反応で遅延型過敏反応を呈することを示した。1974年にDonatskiら¹⁵⁾は再発性口腔内アフタ患者で*S. sanguis*に対する遅延型アレルギー反応の亢進および血

清抗体価が上昇していたことを報告し、再発性口腔内アフタに自己免疫のメカニズムが関与しているのではないかという仮説を提示した。原因不明の再発性口腔内アフタとペーチェット病によるアフタとは臨床的に鑑別不可能であり、再発性口腔内アフタがペーチェット病の初発症状であり、両疾患が同一の範疇に入る疾患であるのか、あるいは*S. sanguis*が両疾患のtriggerとなっているのかについてはわかっていない。

こうした中、1972年には日本で厚生省特定疾患研究班が始まり、ペーチェット病がまず第一に取り上げられるようになった。発足した当初は電子顕微鏡や蛍光抗体法などを駆使してウイルスの検索が行われたが、いずれも陰性であった¹⁶⁾。その後は細菌、特に連鎖球菌を中心に研究が行われるようになった。1977年に杉浦ら¹⁷⁾は連鎖球菌(A群、D群)から抽出した抗原を用い、白血球遊走阻止試験と皮内反応を行い、ともに患者で反応が亢進していることを示した。1978年に金子ら¹⁸⁾は病変部から*S. viridans*群を分離し、患者がこの菌に対して異常に強い遅延型皮膚反応を示すことを報告した。1983年に難波ら¹⁹⁾は溶連菌由来抗原価を測定し、患者で有意に高く、患者血漿中に多数のL型菌を発見した。以上から、少なくとも本病患者が連鎖球菌により感作された状態にあることは間違いないと考えられる。しかし、anti-streptolysin O (ASO)、anti-streptokinase (ASK)は低値を示し¹⁸⁾²⁰⁾、抗生物質による治療も皮膚病変に対してある程度の効果がみられるのみで²¹⁾、本病を単純な感染症としては説明できない。

III 口腔内細菌叢の検索

ペーチェット病患者では口腔内アフタがほぼ全例に認められる上、他の主症状にさきがけて出現することが多く、また、扁桃炎や歯周疾患などの既往が高率にみられることから²²⁾、口腔内細菌が本病の病因に何らかの役割を果たしていることが推測される。そこで、1986年に我々はペーチェット病患者の口腔内細菌叢の検索を行った。表1に歯垢での検査結果を示したが、患者では対照と比較して*S. sanguis*の比率が著明に増加していた。この他、検査した舌表面、頬粘膜、唾液でも同じように*S. sanguis*が有意に増加していた^{23)~25)}。これまでペーチェット病患者での口腔内細菌に関する報告はみられなかったが、再発性口腔内アフタの分野で注目されている*S. sanguis*が多く分離されたということは、少なくとも*S. sanguis*と口腔内アフタとの間には何らかの関係があることは確実と考えられる。

*S. sanguis*は、これまで血清学的に標準株のserotype I~IVと川崎病由来のMCLS-1、MCLS-2が知られていた。MCLS-1、MCLS-2は1984年に川崎病患者の歯垢から分離された新しい血清型で、川崎病の病因との関連性が注目されている²⁶⁾。我々がペーチェット病患者から分

表1 ペーチェット病患者および対照における口腔内細菌の比率(文献25から引用)

| 細菌 | ペーチェット病患者(22例) | 対照(8例) |
|------------------------------|----------------|-----------|
| Gram-positive bacteria | 66.7±3.6* | 69.0±6.2 |
| <i>Streptococcus</i> | 53.3±4.1 | 48.1±4.6 |
| <i>S. sanguis</i> | 26.7±3.7† | 9.4±0.6 |
| <i>S. salivarius</i> | 7.4±1.4 | 6.6±2.4 |
| <i>S. mitis</i> | 14.9±2.1◇◇ | 25.9±4.5 |
| <i>S. mutans</i> | 4.1±1.1† | 0.2±0.1 |
| Other streptococci | 0.2±0.1◇ | 6.0±2.5 |
| <i>Enterococcus</i> | 0.25±0.11 | 0.01±0.01 |
| <i>Staphylococcus</i> | 0.26±0.19 | 0.02±0.01 |
| <i>Lactobacillus</i> | 1.6±0.6 | 0.38±0.02 |
| <i>Enbacterium</i> | 0.36±0.17 | 0.23±0.28 |
| Gram-positive rods | 11.0±1.9◇ | 22.3±2.4 |
| Gram-negative bacteria | 33.2±3.5 | 29.2±7.1 |
| <i>Bacteroides</i> | 16.5±2.2† | 6.4±1.9 |
| Black pig. <i>Bacteroids</i> | 3.1±0.7‡ | 0.9±0.2 |
| <i>Fusobacterium</i> | 2.6±0.6 | 1.9±0.7 |
| <i>Veillonella</i> | 3.3±1.1 | 7.8±3.1 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | <0.001 | ND** |
| Others | 7.5±1.1 | 6.8±2.8 |
| Molds | 0.15±0.08 | ND |

*: 総菌数に占める割合(%、平均値±標準誤差)
 **: not detected †: >, p<0.01 ‡: >, p<0.05
 ◇: <, p<0.01 ◇◇: <, p<0.05

表2 *Streptococcus sanguis* の分類

| | 血清型 | 一般的名称 |
|------|----------------|--------------|
| 標準株 | ATCC 10556 | serotype I |
| | ATCC 10557 | serotype II |
| | ATCC 10558 | serotype III |
| | ST-7 | serotype IV |
| 非標準株 | MCLS-1* | KTH-1 |
| | MCLS-2* | KTH-2 |
| | BD-1 (114-23)† | KTH-3 |
| | BD-2 (118-1)† | KTH-4 |

*: 川崎病患者由来株
 †: ペーチェット病患者由来株

離した *S. sanguis* の血清学的性状を調べたところ、標準株ではなく、MCLS-1と同じ血清型のもの、これまで知られていない全く新しい血清型の2種類が検出された。その後、厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班により標準株以外の *S. sanguis* はKTH-1~4に分類された(表2)。KTH-1,2はそれぞれMCLS-1,2と同じで、KTH-3,4はペーチェット病患者由来の新しい血清型である²⁷⁾。なお、KTH株は *S. sanguis* よりも *S. oralis* に分類されるという報告²⁸⁾もあるが、結論はでない。

IV 連鎖球菌に対する免疫反応

ペーチェット病患者が連鎖球菌に対して感作された状態にあることは以前から報告されていたが、最近ではよりのを絞って *S. sanguis*, 特にKTH株に対する患者の

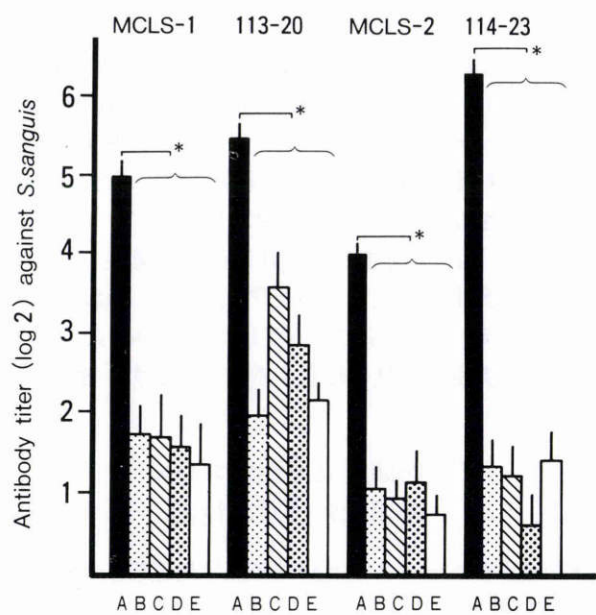


図1 *Streptococcus sanguis*(KTH株)に対する血清抗体価。

A: ペーチェット病, B: 原田病, C: サルコイドーシス, D: その他のぶどう膜炎, E: 健康人. *: p<0.01 (文献25から引用)

免疫反応が検討されている。我々は *S. sanguis* に対する血清抗体価を生菌による凝集反応により調べた。その結果、患者ではすべての血清型で健康人およびサルコイドーシス・原田病などの他のぶどう膜炎患者に比べ高い抗体価を示した。特にKTH-1~4に対しては、患者の抗体価は対照に比較して危険率1%以下で有意の上昇を示した(図1)²⁴⁾²⁵⁾²⁹⁾。

次に、細胞性免疫能を連鎖球菌抗原に対する皮膚反応によって調べた。抗原として、*S. pyogenes*, *Enterococcus (E.) faecalis*, *S. sanguis*, *S. salivarius* 由来のものを用いた。はじめに *S. pyogenes*, *E. faecalis* 抗原を各0.1 ml 皮内注射した。注射した3例とも注射部位に大きな紅斑を作り、2例では膿疱を形成した。また、1例では皮内反応の翌日に7か月ぶりに左眼前眼部発作を起こし、もう1例では2日後に3か月ぶりに右眼眼底発作を起こした。幸い発作は後遺症を残すことなく治まったが、このことは因らずも連鎖球菌抗原が症状増悪因子の一つであることを証明することになった³⁰⁾。同じ抗原は全国の数か所の施設で使用されたが、他にも症状の増悪が報告されており、1例は両眼眼底発作を起こし、1例では結節性紅斑が多発し、2例で口腔内アフタが多数出現した³¹⁾。次に、抗原量を0.02 ml に減らして皮内注射を行ったところ、*S. pyogenes* では患者と対照の間に差はなかったが、*E. faecalis* においては患者で対照に比し著明に反応が亢進していた。

S. sanguis, *S. salivarius*, *E. faecalis* を用いてプリックテストを行った結果では、患者ではすべての抗原で反応

が亢進していた。*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus subspecies anitratus*, *Propionibacterium acnes* でもブリックテストを行ったが、患者と対照の間で反応には差がなかった。また、*S. sanguis* の各血清型に分けて抗原を作製しブリックテストを行ったところ、標準株もそれ以外の血清型も同じように患者で反応が亢進していた³⁰⁾³²⁾。このことは、細胞性免疫を引き起こす抗原については *S. sanguis* のすべての血清型に共通抗原性が存在することを示すと考えられた。

V 病態成立過程における連鎖球菌抗原の役割

連鎖球菌がペーチェット病の発症に具体的にどのような役割を果たしているのかについてはわかっていないが、最近の免疫学の進歩に伴い断片的にはあるが、徐々にその病態が解明されつつある。近年その中で、熱ショック蛋白質(heat shock protein, HSP)が自己免疫疾患と細菌感染を結びつける蛋白として注目されている。HSPは熱刺激などのストレスにより生じる細胞内蛋白であり、生体の防御や機能維持に重要な働きを持ち、原核細胞から哺乳類細胞に至るまでアミノ酸配列の相同性がよく保存されている。それにも関わらず、HSPは非常に免疫原性が強く、微生物の感染に対する免疫反応が細菌のHSPとヒトのHSPの間で交叉反応を起こし、自己免疫反応を引き起こしているのではないかと推測されている。このことは、すでに動物モデルにおいては証明されている。結核菌を含むアジュバントを投与すると関節炎の起こるアジュバント関節炎ラットにおいて、抗原と反応するT細胞クローンを分離したところ、このT細胞クローンは結核菌抗原のみならず、関節軟骨のプロテオグリカンと交叉反応を示し、プロテオグリカンとアミノ酸構造においてホモロジーを持つことが明らかとなった³³⁾。後に、この蛋白の遺伝子をクローニングし塩基配列を調べたところ、65 kDaのHSPであることがわかった³⁴⁾。さらに、この65 kDa HSPを前投与しておく、溶連菌などの別の物質を用いた実験的関節炎をも予防できることが示された³⁵⁾。

同様に、ペーチェット病においてもHSPに対する反応性が調べられている。まず1991年、ペーチェット病患者の血清に連鎖球菌や抗酸菌のHSPに反応する抗体が存在することが示された³⁶⁾。1993年には *Mycobacterium (M.) tuberculosis* の65 kD HSPとヒト60 kD HSP由来の特定の合成ペプチドにペーチェット病患者T細胞が高反応を示すことが報告³⁷⁾された。さらに、このHSP由来のペプチドをルイスラットに投与すると、ぶどう膜炎を誘発することができた³⁸⁾。また最近、結核などの種々の感染症において $\gamma\delta$ T細胞が増加することが報告³⁹⁾さ

れており、ヒト $\gamma\delta$ T細胞の中には *Mycobacterium bovis* 由来の65 kD HSPに反応するものも見出されている⁴⁰⁾。ペーチェット病患者でも $\gamma\delta$ T細胞が浸潤リンパ球の主流を占め、末梢血中でも増加していることが明らかとなり⁴¹⁾、本病の病態成立過程においてHSPとともに $\gamma\delta$ T細胞が重要な鍵を握っている可能性がある。一方、慢性関節リウマチ患者の関節液中から確立された65 kD HSPに反応する $\gamma\delta$ T細胞クローンがMHC拘束性を受けないことが示され⁴¹⁾、同様に *S. sanguis* KTH-1に特異的なヒト $\gamma\delta$ T細胞が樹立され、その反応性にHLAによる拘束が認められないことが報告⁴³⁾された。よって、連鎖球菌抗原が通常の抗原刺激の経路を通さず、 $\gamma\delta$ T細胞を介してそれ自体が直接免疫異常を起こさせる可能性、すなわち、スーパー抗原として働いている可能性も考えられる。

VI 連鎖球菌抗原の遺伝子クローニング

ペーチェット病患者が連鎖球菌に対して免疫亢進状態にあることは明らかとなったが、具体的な抗原の同定は行われていない。この抗原同定へのアプローチとして、我々は連鎖球菌の発現する抗原蛋白のうち、ペーチェット病患者血清と強く反応する蛋白の遺伝子クローニングを行った。方法はイムノスクリーニング、DNAクローニ

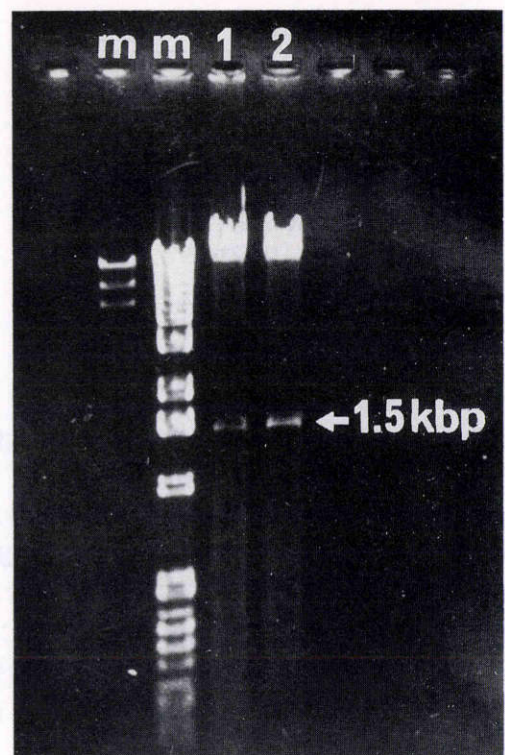


図2 患者血清に反応した連鎖球菌抗原 DNA。1%アガロースゲルによる電気泳動写真。m: 分子量マーカー、1, 2: 連鎖球菌抗原 DNA。イムノスクリーニングにより得られた陽性ブランクのなかから特に反応の強い2つのブランクを選択したところ、ともに約1.5 kbpのDNAが得られた。

ング, DNA シークエンシングの順に行った。まず, ペーチェット病患者由来の *S. sanguis* (KTH-1) から菌体 DNA を抽出し, 制限酵素 Eco RI でランダムに切断し, λ gt 11 ベクターに挿入し DNA ライブラリーを作製した。この λ gt 11 を大腸菌に感染させ, プレート上で IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) で飽和したニトロセルロースフィルターを被せ, フィルター上に β -ガラクトシダーゼ融合蛋白質を発現させた。非特異的

蛋白質結合部位をブロックした後, 患者血清を一次抗体, アルカリフォスファターゼ結合抗ヒト IgG 抗体を二次抗体とするイムノスクリーニングを行った。1 回目のスクリーニングでいくつかの陽性プラークが得られた。そのうち, 特に反応の強いプラークを取り出し, 再度スクリーニングを行い, プラークが単一になるまで同じ操作を繰り返した。その結果, この抗原を発現している菌体由来 DNA は約 1.5 kbp の大きさであった(図 2)。また,

Eco RI site

| | | |
|---|---|-----|
| GAATTC | CAAGTTCAAGTCTTGAGGCTTCCCAGGGTATGAAGCTGGATCGAGTCGCTGGCTTGGAAAGATGTCCAAGCGGGAGAGGGAGTGGAT | 94 |
| | AsnSerLysValGlnValLeuGluAlaSerGlnGlyMetLysLeuAspArgValAlaGlyLeuGluAspValGlnAlaGlyGluGlyValAsp | 31 |
| GAGAAGACGCTCTATCACCCCATACCTGGTGGATCCTCAGAAGGCTGCGGAGGAAGCCAAATTATCGCTGACAGACTGTCGGATCTGGAT | 187 | |
| | GluLysThrLeuTyrHisProHisThrTrpLeuAspProGlnLysAlaAlaGluGluAlaGlnIleIleAlaAspArgLeuSerAspLeuAsp | 62 |
| AGCGACCATCGGAAATTTATCAAGCCAATGCTCGAAAATTTCAAGAAGAGGCCAAGGAGCTGAACGAGCGTTACCAGAAGATTTTCGACAAA | 280 | |
| | SerAspHisArgGluIleTyrGlnAlaAsnAlaArgLysPheGlnGluGluAlaLysGluLeuAsnGluArgTyrGlnLysIlePheAspLys | 93 |
| GTGCCAACAAAGACCTTTGTCACTCAGCATAAGCCTTTTCTTATCTAGCTAAGCGCTTCGGGCTGACCCAGCTGGGTATTGCTGGTATTTC | 373 | |
| | ValProAsnLysThrPheValThrGlnHisThrAlaPheSerTyrLeuAlaLysArgPheGlyLeuThrGlnLeuGlyIleAlaGlyIleSer | 124 |
| CCGAGCAGGAGCCTAGTCCGCGTCAACTGACAGAGATAGAAGACTTTGTCAAGGAGCATCAGGTGCAGACCATTTTGTGAAAGCAATGCT | 466 | |
| | ProGluProSerProArgGlnLeuThrGluIleGluAspPheValLysGluHisGlnValGlnThrIlePheValGluSerAsnAlaSerSer | 155 |
| TCTTCCAAAGTGGCTCAAACCTTGGTCAAGCGACTGGTGTACAAATCAAGAAGCTGAATCCTCTGGAAGCAGATCCAGCTAACCAACTATCT | 559 | |
| | LysValAlaGlnGlnGluThrLeuValLysAlaThrGlyValGlnIleLysGluLeuAsnProLeuGluAlaAspProAlaAsnGlnLeuSer | 186 |
| TATTTAGAAAAATTTAGAAAAAATCTAGCAGTTTTAGCTAAAGATTGAAAGGATAAAAGACAATCATGAAAAAGAAATATTTCTTGTGTTCA | 652 | |
| | TyrLeuGluAsnLeuGluLysAsnLeuAlaValLeuAlaLysAspLeuLysGly***LysThrIleMetLysLysLysTyrPheLeuValSer | 217 |
| GCAGCTGTATTAGCTCTTGGCGTCGGAACCTTATGGGCTTATCCAATGGCAAGCTCAGCCCCAGACCAAAAAATAACAAAGTAGCCTATATTGAG | 745 | |
| | AlaAlaValLeuAlaLeuGlyValGlyThrTyrGlyLeuIleGlnTrpGlnAlaGlnProGlnThrLysAsnAsnLysValAlaTyrIleGlu | 248 |
| GACAAGACTTCGGGTGACAAGACGGATAAAAAATTTGACACTGACCAAAATCAATGATGAGGAAGGTATTGAAGCAGAGCAGATTGTCGTGAAA | 838 | |
| | AspLysThrSerGlyAspLysThrAspLysAsnLeuThrSerAspGlnIleAsnAspGluGluGlyIleGluAlaGluGlnIleValValLys | 279 |
| ATCACAGATCAGGGCTATGTCACTTCTCATGGAGACCATTATCACTTACTTTGATGGAAAGGTGCCTTTTGTATGCTATTATCAGCGAAGAGCTG | 931 | |
| | IleThrAspGlnGlyTyrValThrSerHisGlyAspHisTyrHisTyrPheAspGlyLysValProPheAspAlaIleIleSerGluGluLeu | 310 |
| ATTATCCGAGATTCTAACTACACGCTGCAGGAAGCAGATATTGTCAATGAGGTCAAGGATGGTTACATCATCAAGGTGGAGGGGAAGTATTAT | 1024 | |
| | IleIleArgAspSerAsnTyrThrLeuGlnGluAlaAspIleValAsnGluValLysAspGlyTyrIleIleLysValGluGlyLysTyrTyr | 341 |
| CTCTACCTCAAGGATGCCAAACATACCAGCAATGTCCGCTCGGTGGATGAGATTGCGCGGCAGAGAAGCTGCATAAGACCAAAGAAGAAGGC | 1117 | |
| | LeuTyrLeuLysAspAlaLysHisThrSerAsnValArgSerValAspGluIleAlaArgGlnLysLysLeuHisLysThrLysGluGluGly | 372 |
| GATAGTGGCAAATCTTCCACTGCAAAATCAAGCAGGACTCGCGATTTCAGCCAGCTAGTAAGTCCCTAGCTGCGGAAAGACAGCCGCGAGAC | 1210 | |
| | AspSerGlyLysSerSerThrAlaLysSerSerArgThrArgAspPheSerGlnProSerLysSerLeuAlaAlaGlyLysThrAlaAlaAsp | 403 |
| CTTGCAGGAGTTTCATACCAAGGCCAAGGGGGATATAGGACGGATGATGGTTATACGTTTAGTCCGTCTGACGTCATCGAGGATACTGGCGAT | 1303 | |
| | LeuAlaGlyValSerTyrGlnGlyGlnGlyGlyTyrArgThrAspAspGlyTyrThrPheSerProSerAspValIleGluAspThrGlyAsp | 434 |
| GCTTTTATCGTACCGCATGGCGGGCATTTCCTACTATATTCTAAGACGACCTGTCACCAGCAGAATTGGCTGCGGCTCAGAGCTACTGGAAT | 1396 | |
| | AlaPheIleValProHisGlyGlyHisPheHisTyrIleProLysSerAspLeuSerProAlaGluLeuAlaAlaAlaGlnSerTyrTrpAsn | 465 |
| AGCAGCGGACCGCGGAAGTGTGAATCCGCTAACTACGGTAGGACAATAGCTTCTTCCAACACATGGAATCAGAATAGTGCTATCAATCAG | 1489 | |
| | SerArgArgThrGlyGlySerValAsnProProAsnTyrGlyArgThrIleAlaSerSerAsnThrTrpAsnGlnAsnSerAlaIleAsnGln | 496 |
| | Eco RI site | |
| GGTGGACTCGTCTCAAATCCGCTCCACAGCTGCCAAATCATTCAAAGATTGAGCAGCCAAAGTCTGGCTTAGCGGTTACTCAGCCGAATTC | 1582 | |
| | GlyGlyLeuValSerAsnProSerProGlnLeuProAsnHisSerLysIleGluGlnProSerProGlyLeuAlaValThrGlnProAsn?? | 526 |

図3 クローニングした 1582 bp の塩基配列。

患者血清に反応した連鎖球菌抗原の全塩基配列および予想されるアミノ酸配列を示した。四角で囲んだ ATG (methionine) で始まる 2 つの open reading frame と考えられる部分が見られた。二重下線で示した部分が Shine-Dalgarno 配列と考えられた。

western blotting からこの DNA の発現する蛋白は分子量 33~35 kDa であった⁴⁴⁾.

ここから得られた DNA の塩基配列を決めるために、DNA を pUC 118 plasmid にサブクローニングした。ジデオキシ法を用い、オートラジオグラフィで塩基配列を解析した。明らかとなった塩基配列を基にしていくつかのプライマーを設定し、シークエンシングを繰り返した。また、最後にすべてのプライマーを用いて、自動 DNA シークエンサー (373 A, Applied Biosystems) により塩基配列を確認した。塩基配列から予想されるアミノ酸配列をみたところ、ATG (methionine) で始まる 2 つの open reading frame (ORF) と考えられる部分が存在していた (図 3)。大きさは 590 bp と 950 bp であり、それぞれ蛋白の分子量に換算すると約 21 kDa と 34 kDa であった。Western blotting から患者血清と反応した抗原蛋白は分子量 33~35 kDa であり、後者の ORF に相当する大きさであった。さらに、その 16 b 上流にはリボゾーム RNA の結合部位である Shine-Dalgarno 配列 (図 3 二重下線) と思われる部分を有していることから、後者の ORF が抗原蛋白を発現している可能性が高いと考えられた⁴⁵⁾。

VII 抗原特異的免疫反応の解析

連鎖球菌の具体的な抗原部位が明らかとなれば、今後ベーチェット病の発症機序の解明に向けて、新たなステップが期待できる。一つは自己免疫機序の解明で、もう一つは抗原特異的 T 細胞を標的とした治療への応用である。自己免疫疾患を説明するうえで molecular mimicry が想定されており⁴⁶⁾、先にも述べたように、最近では HSP が共通抗原として注目されている。今回、我々が分離した連鎖球菌抗原について、データベース BLAST によりホモロジーサーチを試みた。最初の ORF では *S. sanguis* (adhesin B presursor), *S. gordonii* (adhesin), *S. parasanguis* (fim A), *Enterococcus faecalis* (endocarditis specific antigen), *S. pneumoniae* (adhesion protein), *Mitochondrion Marchantia polymorpha* (atpA intron I protein), 後の ORF では pig (bone sialoprotein II) と相同性がみられた。これまでのところ、ヒト組織とのホモロジーは確認できなかったが、今後 *EcoRI* site 以降を調べ、whole の抗原を解析する予定である。現在ヒトゲノムの解析が世界的に進められており、これがデータベース化されれば近い将来、すべてのヒト組織とのホモロジーが検索可能になるであろう。

免疫疾患の病因・病態を解明するためには、抗原特異的免疫反応を理解することが重要である。抗原認識の中心になるのは T 細胞と B 細胞であり、T 細胞は T 細胞レセプター (T cell receptor, TCR) を介し、B 細胞は免疫グロブリンを介して特異抗原を認識する。B 細胞に関しては抗原抗体反応としてよく理解されており、それに基

づいてワクチン療法が開発された。しかし、T 細胞に関しては病原抗原の同定が難しく、治療としては非特異的な副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤が使われているのが現状である。これらは特異性の面から十分とはいえず、正常に存在する免疫機能にも影響を及ぼしているため副作用の点が問題となっている。動物実験レベルでは、自己抗原特異的 T 細胞の活性化を起こす外来抗原がわかっており、抗原特異的 T 細胞抑制療法として、抗 TCR 抗体、抗 MHC 抗体、抗 CD 3・CD 4 抗体、抗接着分子抗体などの様々な治療が考えられている⁴⁷⁾。ベーチェット病においても病因としての外来抗原が明らかとなれば、TCR の V β 鎖の解析、 $\gamma\delta$ T 細胞の反応、活性化 T 細胞の産生するサイトカインなどについて検討することにより、病態の解明が可能となり、さらにはより特異性の高い治療法の開発が期待できる。

本研究は、文部省科学研究費 (課題番号 06671746) の補助を受けた。

文 献

- 1) 大野重昭, 広瀬茂人, 吉田 篤, 一林泰彦, 市石 昭, 小熊淑記, 他: ベーチェット病における疾患感受性および疾患抵抗性因子の検討. 日眼会誌 90: 767-770, 1986.
- 2) Mizuki N, Inoko H, Sugimura K, Nishimura K, Nakamura S, Tanaka H, et al: RFLP analysis in the TNF- β gene and the susceptibility to alloreactive NK cells in Behçet's disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 3084-3090, 1992.
- 3) Matsumura N, Mizushima Y: Leucocyte movement and colchicine treatment in Behçet's disease. Lancet 2: 813, 1975.
- 4) Nussenblatt RB, Palestine AG, Rook AH, Scher I, Wacker WB, Gery I: Treatment of intraocular inflammatory disease with cyclosporin A. Lancet 2: 235-238, 1983.
- 5) Mochizuki M, Masuda K, Sakane T, Inaba G, Ito K, Kogure M, et al: A multicenter clinical open trial of FK 506 in refractory uveitis, including Behçet's disease. Transpl Proc 23: 3343-3346, 1991.
- 6) Gilbert W: Über die rezidivierende eitrige Iridozyklitis und ihre Beziehungen zur septischen Allgemeinerkrankung. Arch f Augenh 86: 29-49, 1920.
- 7) Behçet H: Über rezidivierende, Aphthöse, durch ein Virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an den Genitalien. Dermatol Wochensh 105: 1152-1157, 1937.
- 8) Sezer N: Further investigations on the virus of Behçet's disease. Am J Ophthalmol 41: 41-60, 1956.
- 9) Evans AD, Pallis CA, Spillane JD: Involvement of the nervous system in Behçet's syndrome. Lancet 2: 349-353, 1957.
- 10) 氏原 弘: Behçet 氏症候群の細菌学的研究. 東京医学雑誌 66: 414-424, 1958.

- 11) 萩原 朗：ペーチェット症候群の就て。日眼会誌 63：1504—1517, 1959.
- 12) 浦山 晃, 涌沢章郎, 朝岡 力, 福士 克, 山田西之, 阿部信博, 他：葡萄膜炎の病院と病理—主として病因について。日眼会誌 64：2263—2301, 1960.
- 13) Barile MF, Graykowski EA, Driscoll EJ, Riggs DB：L form of bacteria isolated from recurrent aphthous stomatitis lesions. Oral Surg 16：1395—1402, 1963.
- 14) Graykowski EA, Barile MF, Stanley HR：Periadenitis aphthae：Clinical and histopathologic aspects of lesions in a patient and of lesions produced in rabbit skin. J Am Dent Assoc 69：118—126, 1964.
- 15) Donatsky O, Dabelsteen E：An immunofluorescence study on the humoral immunity to *Strep.* 2A in recurrent aphthous stomatitis. Acta Pathol Microbiol Scand (B) 82：107—112, 1974.
- 16) 穴戸 亮, 山内一也, 福田朗子, 小船富美夫, 加藤茂孝, 吉川泰弘：ウイルス感染とペーチェット病との関連性についての研究。厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和48年度研究業績：23—25, 1974.
- 17) 杉浦清治, 大口正樹, 大野重昭：ペーチェット病と連鎖球菌アレルギー, 白血球遊走阻止試験による検討。厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和52年度研究業績, 58—60, 1978.
- 18) 金子史男, 金田孝道, 大西 修, 岸山和敬, 高島 巖, 福田 博, 他：Behçet 病における細菌アレルギー。アレルギー 27：440—451, 1978.
- 19) 難波克彦, 沖田美智, 弓田 彰, 林 清文, 上野忠彦, 松見富士夫：ペーチェット病と溶連菌感染—溶連菌由来抗原価の測定。日眼会誌 87：1112—1120, 1983.
- 20) 難波克彦, 沖田美智, 山下英俊, 村尾元成：ペーチェット病の抗ストレプトリジンOと抗ストレプトキナーゼ。眼紀 38：565—568, 1987.
- 21) 金子史男：Behçet 病の治療—Minomycin capsule を中心とした抗生物質療法による治療成績について—。西日皮膚 43：850—856, 1981.
- 22) 青木功喜, 大野重昭：ペーチェット病患者の体質と既往歴。日眼会誌 76：1608—1612, 1972.
- 23) 大野重昭, 小竹 聡, 吉川浩二, 磯貝恵美子, 藤井暢弘, 小熊恵二, 他：ペーチェット病における口腔内細菌叢の検索。厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和61年度研究業績：139—141, 1987.
- 24) Isogai E, Ohno S, Takeshi K, Yoshikawa K, Tsurumizu T, Isogai H, et al：Close association of *Streptococcus sanguis* uncommon serotypes with Behçet's disease. Bifidobact Microflora 9：27—41, 1990.
- 25) 吉川浩二, 小竹 聡, 笹本洋一, 大野重昭, 松田英彦：ペーチェット病における口腔内連鎖球菌の意義。日眼会誌 95：1261—1267, 1991.
- 26) 橋本 喬, 鶴水 隆, 佐藤 誠, 中村 亮, 坂上正道, 八代公夫, 他：MCLS 患者および母親などの歯垢(プラーク)から分離される *Streptococcus sanguis* の性状と同菌に対する血中抗体。小児科 25：221—225, 1984.
- 27) 鶴水 隆, 清水晴美, 小此木博, 橋本 喬, 星 恵子, 水島 裕：ペーチェット病患者から分離された *Streptococcus sanguis* の諸性状。厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和63年度業績：20—21, 1989.
- 28) 成川新一, 鈴木康夫, 長内麻子, 坂根 剛, 水島 裕：ペーチェット病患者由来 *Streptococcus oralis* (*Streptococcus sanguis*) の heat shock protein (HSP) の精製。厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 平成3年度研究業績：80—82, 1992.
- 29) Yokota K, Hayashi S, Fujii N, Yoshikawa K, Kotake S, Isogai E, et al：Antibody response to oral streptococci in Behçet's disease. Microbiol Immunol 36：815—822, 1992.
- 30) 吉川浩二, 大野重昭, 笹本洋一, 松田英彦：ペーチェット病患者の連鎖球菌皮膚テストの検討。日眼会誌 94：181—185, 1990.
- 31) 水島 裕, 星 恵子, 松田隆秀, 大野重昭, 小暮美津子, 櫻木章三：抜歯および連鎖球菌皮膚テストによる症状誘発。最新医学 43：279—283, 1988.
- 32) 星 恵子, 松田隆秀, 柳川 明, 水島 裕：菌体抽出成分による皮膚反応。最新医学 43：275—278, 1988.
- 33) van Eden W, Holoshitz J, Nevo Z, Frenkel A, Klajman A, Cohen IR：Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to cartilage proteoglycans. Proc Natl Acad Sci USA 82：5117—5120, 1985.
- 34) Young D, Lathigra R, Hendrix R, Sweetser D, Young RA：Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. Proc Natl Acad Sci USA 85：4267—4270, 1988.
- 35) van den Broek MF, Hogervorst EJ, van Bruggen MC, van Eden W, van der Zee R, van den Berg WB：Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein. J Exp Med 170：449—466, 1989.
- 36) Lehner T, Lavery E, Smith R, van der Zee R, Mizushima Y, Shinnick T：Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behçet's syndrome. Infect Immun 59：1434—1441, 1991.
- 37) Pervin K, Childerstone A, Shinnick T, Mizushima Y, van der Zee R, Hasan A, et al：T cell epitope expression of Mycobacterial and homologous human 65-kilodalton heat shock protein peptides in short term cell lines from patients with Behçet's disease. J Immunol 151：2273—2282, 1993.
- 38) Stanford MR, Kasp E, Whiston R, Hasan A, Todryk S, Shinnick T, et al：Heat shock protein peptides reactive in patients with Behçet's disease are uveitogenic in Lewis rats. Clin Exp Immunol 97：226—231, 1994.
- 39) Janis EM, Kaufmann SHE, Schwartz RH, Pardoll DM：Activation of $\gamma\delta$ T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*.

- Science 244: 713—716, 1989.
- 40) **Haregewoin A, Soman G, Hom RC, Finberg RW**: Human $\gamma\delta^+$ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature* 340: 309—312, 1989.
- 41) **Fortune F, Walker J, Lehner T**: The expression of $\gamma\delta$ T cell receptor and the prevalence of primed, activated and IgA-bound T cells in Behçet's syndrome. *Clin Exp Immunol* 82: 326—332, 1990.
- 42) **Holoshitz J, Koning F, Coligan JE, Bruyn JD, Strober S**: Isolation of CD4⁻CD8⁻ mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* 339: 226—229, 1989.
- 43) **Mochizuki M, Suzuki N, Takeno M, Nagafuchi H, Harada T, Kaneoka H, et al**: Fine antigen specificity of human $\gamma\delta$ T cell lines (V γ 9⁺) established by repetitive stimulation with a serotype (KTH-1) of a gram-positive bacterium, *Streptococcus sanguis*. *Eur J Immunol* 24: 1536—1543, 1994.
- 44) 小竹 聡, 吉川浩二, 藤井暢弘, 木村浩一: ベーチェット病患者血清に反応する連鎖球菌抗原の遺伝子クローニング. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 平成5年度研究業績: 70—71, 1994.
- 45) 小竹 聡, 吉川浩二, 笹本洋一, 木村浩一, 藤井暢弘: ベーチェット病患者血清に反応する連鎖球菌抗原の遺伝子解析. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 平成6年度研究業績: 74—76, 1995.
- 46) **Oldstone MBA**: Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50: 819—820, 1987.
- 47) 小竹 聡, 松田英彦: 自己免疫疾患に対する新たな治療の可能性. *日眼会誌* 98: 121—129, 1994.