

ベーチェット病の抗溶連菌抗体価 (表2)

難波 克彦 (帝京大学溝口病院眼科)

Titer of Anti-streptococcal Antibody in Behçet's Disease

Katsuhiko Namba

Department of Ophthalmology, Teikyo University Mizonokuchi Hospital

要 約

ベーチェット病患者の抗溶連菌抗体について検討した。Rantz & Randall のオートクレーヴ法で抽出した溶連菌抗原に対する血清抗体価は、患者が健常人対照に比べ、Student の t 検定により有意に低く ($p < 0.05$)、松村らの方法に準じて測定した細胞 ASO 価は、患者と対照の間に有意差を認めなかった。またいずれも患者の症状とは無関係であった。ベーチェット病では、血中溶連菌抗原の増加に対し、抗体産生の障害されている可能性があり、その原因として、個体の溶連菌感染に罹り易い素因、溶連菌発熱外毒素の作用、溶連菌の L 型菌の関与などが考えられる。(日眼 92:269—273, 1988)

キーワード：ベーチェット病，溶連菌感染，抗溶連菌抗体，溶連菌抗原，溶連菌 L 型菌

Abstract

The titers of anti-streptococcal antibodies were studied in Behçet's disease. The serum antibody titer to streptococcal autoclaved extracts was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The titer in 26 patients was significantly lower than that in 36 normal controls ($p < 0.05$, Student's t-test). The cell anti-streptolysin O titer was determined by the method of Matsumura et al. The titer showed no significant difference between 70 patients and 43 controls. There was no significant difference in the titers between the active and inactive stages of the disease. These data suggest that anti-streptococcal antibodies cannot be produced sufficiently in Behçet's disease. The roles played by susceptibility to streptococci, streptococcal pyrogenic exotoxin, streptococcal L-form were discussed. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:269—273, 1988)

Key words: Behçet's disease, Streptococcal infection, Anti-streptococcal antibody, Streptococcal antigen, Streptococcal L-form

I 緒 言

ベーチェット病では、血漿中の A 群 β 溶血性化膿連鎖球菌 (streptococcus pyogenes. 溶連菌と略す) に由来する抗原価が、健常人や他のブドウ膜炎に比べ特異的に高く、症状の変化と一致して変動する^{1)~4)}。これらのことから本病の病因として溶連菌の関与が考えられるが、本病では、代表的な抗溶連菌抗体である血清抗

ストレプトリジン O (血清 ASO と略す) が陰性である⁵⁾⁶⁾。しかしながら血清 ASO には、溶連菌感染の指標として種々の限界があり^{7)~9)}、一方溶連菌は多種類の抗原をもつことから、対応する抗体の種類も多い。また疾患によっては、血清 ASO が陰性でも健常人より高いものもある¹⁰⁾。そこで本病における溶連菌感染の役割について抗体の立場から論じるため、本研究は、血清 ASO と異なる抗溶連菌抗体について、健常人と

別刷請求先：213 川崎市高津区溝口74 帝京大学溝口病院眼科 難波 克彦 (昭和62年9月2日受付)

Reprint requests to: Katsuhiko Namba, M.D. Dept. of Ophthalmol., Teikyo Univ.

Mizonokuchi Hospital, 74 Mizonokuchi, Takatsu-ku, Kawasaki 213, Japan

(Accepted September 2, 1987)

比較することを目的とする。

II 実験方法

抗溶連菌抗体として、溶連菌のオートクレーヴ抽出抗原に対する血清抗体と細胞抗ストレプトリジンO(細胞ASOと略す)について測定した。

1. オートクレーヴ抽出溶連菌抗原に対する血清抗体価の測定

対象は、眼症状を有するベーチェット病患者26例(男15例, 女11例)と健常人対照36例(男27例, 女9例)で、患者は完全型が7例(男5例, 女2例), 陰部症状を欠く不全型が19例(男10例, 女9例)である。年齢は、患者が15~58歳(男25~58歳, 女15~58歳), 平均39.8歳(男38.5歳, 女41.6歳)で、対照は20~50歳(男20~50歳, 女20~48歳), 平均34.2歳(男35.0歳, 女31.9歳)であった。患者の治療は、主にコルヒチン(0.5~1.5mg/日)を投与し、眼症状増悪時にステロイド剤や散瞳剤を点眼した。患者で明らかな眼症状の増悪(発作)がみられた場合、1週以内を発作期とし、発作後3週以上経過し、次の発作まで3週以上あるものを寛解期とした。検体数は、患者が140(発作期38, 寛解期101, その他1), 対照が36であった。

方法は、Rantz & Randallのオートクレーヴ法¹⁾で抽出した溶連菌抗原を用い、これに対する血清抗体価をEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で求めた。

抗原の調整: Todd Hewitt Broth (Difco, Detroit, Michigan, USA) 50mlに溶連菌(T-9株)を37°Cで16時間接種し、遠心して上清を捨てる。0.85%NaClで洗滌し、遠心して上清を捨てたのち、0.5mlの0.85%NaClに浮遊させ、121°Cで20分オートクレーヴにかける。遠心後得られた上清を蒸留水で160倍に希釈し、抗原として用いた。

抗体価の測定: 抗原(160倍希釈)をマイクロプレート(EIAフラットプレートII®, 三光純薬, 東京)の穴に100 μ lずつ加え、マイクロプレートをアルミホイルで包み、4°Cで12時間吸着させる。対照として蒸留水(100 μ l/穴)を用いた。検体(血清)は、リン酸緩衝食塩水(pH 7.2, PBSと略す)-Tween 20®(和光純薬, 大阪, Tと略す)の0.05%溶液(PBS-Tと略す)にウシ血清アルブミン(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. BSAと略す)を加えた0.1%PBS-T-BSA溶液により800倍に希釈し、抗原を吸引したのち100 μ l/穴を全穴に加え、アルミホイルで包み室温で1時間

静置する。全穴を吸引後PBS-Tで洗滌し、0.1%PBS-T-BSAで2,000倍に希釈した抗ヒトIgG(Miles Labo. Inc., Cicago, USA)を100 μ l/穴ずつ全穴に加え、アルミホイルで包み室温で1時間反応させる。全穴を吸引し、PBS-Tで洗滌後、3% H_2O_2 溶液をo-フェニレンジアミン(東京化成, 東京. OPDと略す)溶液で1,000倍に希釈した溶液100 μ lを全穴に加え、アルミホイルで包み室温で30分反応させる。OPD溶液は、OPDをメタノール溶液中に10mg/ml含む溶液を蒸留水で100倍希釈したものをを用いた。OPD溶液、 H_2O_2 溶液の調整と H_2O_2 溶液をOPD溶液で希釈する操作は、すべて遮光した状態で行った。8N H_2SO_4 溶液を50 μ l/穴ずつ全穴に加えて反応を停止させたのち、MTP-12®(二波長マイクロプレート光度計, コロナ電気, 勝田, 茨城)により500nmにおける吸光度を測定する。抗原を加えた穴と対照の穴の吸光度の差を1,000倍し、抗体価とした。

2. 細胞ASO価の測定

対象は、眼症状を有するベーチェット病患者15例(男9例, 女6例)と健常人対照43例(男26例, 女17例)で、患者は完全型が6例(男4例, 女2例), 陰部症状を欠く不全型が9例(男5例, 女4例)である。年齢は、患者が19~59歳(男26~55歳, 女19~59歳), 平均38.5歳(男36.4歳, 女40.8歳)で、対照は19~60歳(男25~60歳, 女19~57歳)平均36.2歳(男36.8歳, 女35.4歳)であった。患者の治療方法ならびに病期の定義は、前項と同様である。検体数は、患者が70(発作期22, 寛解期31, その他17), 対照が43であった。

細胞ASOは松村らの方法²⁾に準じて測定した。ヘパリン加肘静脈血5mlに0.8%Dextran T250(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を0.5ml混和し、37°Cのふ卵器内に30分静置する。上清をHanks液(pH 7.4, 日水製薬, 東京)で3回洗い、ASO緩衝液(pH 6.5, 日水製薬)を加えて 80×10^4 cells/mlの白血球浮遊液を作成する。これをASO緩衝液により、1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:12, 1:16, 1:24, 1:32, 1:48に希釈し、各々の白血球浮遊液0.5mlに3倍希釈のストレプトリジンO液(日水製薬)を0.25ml加え、37°Cで15分反応させる。5%ヒトO型赤血球を0.25ml加えて37°Cで45分反応させ、完全不溶血となる最高希釈倍数を細胞ASO価とした。

III 結果

1. オートクレーヴ抽出溶連菌抗原に対する血清抗

表1 オートクレーヴ抽出溶連菌抗原に対する血清抗体価

	検体数	平均値±標準偏差
対 照	36	112.2±72.9
ペーチェット病	140	68.9±63.9*
発作期	38	57.0±47.2
寛解期	101	73.6±68.9

*p<0.05

表2 細胞 ASO 価

	検体数	平均値±標準偏差
対 照	43	1.72±0.85
ペーチェット病	70	2.06±0.95
発作期	22	2.23±1.02
寛解期	31	2.06±1.00

(単位:倍)

体価

ペーチェット病患者と対照の抗体価の平均値と標準偏差を表1に示す。患者の抗体価は、対照に比べ、Studentのt検定により、5%の危険率で有意に低かった。患者の発作期と寛解期の間には、有意差は認められなかった。

2. 細胞 ASO 価

患者と対照の細胞 ASO 価の平均値と標準偏差を表2に示す。患者と対照、患者の各病期の間には、有意差を認めなかった。

IV 考 按

ペーチェット病の原因は不明であるが、我々は溶連菌感染の関与を考え、これまでに次のようなことを明らかにした^{1)~4)}。

- 1) 患者の血漿溶連菌抗原価は、健常人や他のブドウ膜炎に比べ特異的に高い。また患者の抗原価は症状とともに変化し、発作期にもっとも高く、寛解期にもっとも低い傾向があり、発作直前にすでに上昇している。
- 2) 発作期の患者の血漿と白血球層には、電顕的に溶連菌のL型菌と思われる菌体が存在する。

これらのことから溶連菌感染は、ペーチェット病の病因として重要で、その発症と症状の増悪に密接に関与していると考えられる。

ところで本病の血清 ASO が一般に陰性であることは、病因としての溶連菌感染の役割に対し否定的とも考えられる。しかしながら血清 ASO は典型的な溶連

菌感染症でもしばしば陰性となり⁷⁾⁸⁾、抗生物質の投与によっても産生が抑制され、陰性になり易い¹²⁾、またとくに本病と関係の深い³⁾¹³⁾¹⁴⁾扁桃炎、歯科疾患などが原因となりうる病巣感染での意義は低い⁹⁾。このように血清 ASO には、溶連菌感染の関与の有無を知る指標として種々の限界がある。従ってとくにペーチェット病のように、溶連菌感染が病因として関与しているとしても、一般的な溶連菌感染症とはかなり異なると考えられる疾患の場合、血清 ASO により溶連菌感染の意義を論じることは危険である。

一方本病でも、発症前に血清 ASO が陰性であるのに対し、血清抗streptokinase (血清 ASK と略す)は強陽性のこともある³⁾¹⁵⁾。また病因として溶連菌感染の関与が考えられる疾患で、小児の川崎病のように血清 ASO は陰性でも健常人より高く有意差のあるものや¹⁰⁾、白血球に由来する細胞 ASO は上昇しているものもある⁹⁾¹⁶⁾。従って本病では、血清 ASO とともに他の抗溶連菌抗体についても調べ、しかも健常人と比較することが必要であると思われる。すでに血清 ASO と血清 ASK については、本病患者の値が対照より有意に低く、症状の変化とは無関係であることを報告した¹⁷⁾。そこで本研究では、これらとは別の血清抗溶連菌抗体価と、溶連菌感染症などで血清 ASO とは異なる動態を示す細胞 ASO について調べた。

今回 ELISA 法で測定した血清抗体価は、オートクレーヴで抽出した streptolysin O と異なる溶連菌抗原に対するもので、抗原物質である rhamnose-N-acetylglucosamine polysaccharide は、溶連菌以外の菌の抗体とほとんど交叉反応を示さない。従ってこの抗原に対する抗体が証明された場合、他の群に属する連鎖球菌や、肺炎球菌等の他の菌による感染の可能性は除外される。本研究の結果、ペーチェット病では、正常人に比べ溶連菌に対する抗体価が有意に低く、症状とも無関係であることが判った。この事は、本病で溶連菌に由来する抗原が過剰に存在するとともに、これを処理する抗体の不足した状態が同時に存在している事を示す。

次に細胞 ASO は、松村らにより Rantz-Randall の血清 ASO 測定法を応用して測定方法が確立された白血球のもつ ASO 活性である。細胞 ASO と血清 ASO の間に相関はなく、血清 ASO は溶連菌感染症で発病初期に低く、約2週で上昇する傾向のあるのに対し、細胞 ASO は初期からすでに高い傾向がある。また病巣感染では、血清 ASO が陰性でも細胞 ASO は高値を

示し、症状とともに変化することが多い⁹⁾今回本病の細胞 ASO は健常人と同様の値を示し、症状によって変化しないことが明らかとなった。これらの結果は、本病で溶連菌抗原に対する抗体産生の障害されている可能性を示すとともに、血清 ASO が異常に低いにもかかわらず細胞 ASO が低くないことから、溶連菌が病巣感染を基礎として本病に関与している可能性のあることを示している。

本病で、溶連菌抗原の侵入に対し、これを処理する抗体が十分産生されない理由として、溶連菌感染を起こし易い素因、溶連菌発熱外毒素の作用、溶連菌の L 型菌の関与などが考えられる。

溶連菌に感受性の高い個体が、溶連菌による扁桃炎や上気道炎を繰返すと、病巣を形成し、病巣感染として慢性遷延化することが考えられる⁹⁾。本病の既往歴には、病巣となる扁桃炎や齲歯、歯周病などが必ずみられ、本病発症後も重症のこれらの病変が放置されていることが多い³⁾。また口腔内アフタは、本病に必発し初発症状であることが多く、ほぼ間断なく存在するが、原因としては溶連菌あるいはその L 型菌の関与している可能性が考えられる¹⁸⁾¹⁹⁾。従ってこれらの病巣から、溶連菌の毒素、すなわち抗原が絶えず放出されて抗原過剰となり、抗体産生が相対的に不足することが考えられる。またこれらの毒素による反復感作の結果、正常な免疫応答が障害され、抗原処理が十分に行われない可能性もある。溶連菌の代表的毒素である溶連菌発熱外毒素は、リンパ球を介し、血清 ASO などの抗体の合成を阻害することが知られ²⁰⁾²¹⁾、本病でもその作用により、抗溶連菌抗体の形成が障害されている可能性がある。これらのことは、猩紅熱のような溶連菌感染症に比べ、本病の溶連菌抗原価が明らかに高く、しかも症状の回復にともなう抗原価の低下が遅いことから推察される²⁾¹⁶⁾。

一方ペニシリンをはじめとする β -ラクタム系抗生物質の使用量増加に伴い、L 型菌の増加したことが知られているが²²⁾、眼科領域でも原因不明の疾患で、病因としての L 型菌の役割が注目されている^{23)~25)}。我々も本病患者の血液中に、溶連菌 L 型菌と考えられる菌体の存在を確認しているが^{1)~4)}、溶連菌が L 型菌の状態では本病に関与しているとするれば、患者から溶連菌が培養されない理由が説明できる²⁶⁾。一方我国で、L 型菌を誘導する薬剤の使用が普及した時期からベーチェット病が異常に増加したことは²⁷⁾、本病と溶連菌 L 型菌との関係を考える上で極めて示唆的である。

ところで L 型菌の状態では、細胞壁抗原がないため、リンパ球による菌の認識はかなり低下するはずで²²⁾、その結果溶連菌に対する抗体産生は抗原の増加に対応できず、一部の抗原処理に消費された残りの抗体量は健常人より少なくなり、結局溶連菌に対する抗体価が異常に低くなる可能性が考えられる。

このように溶連菌は、溶連菌に感受性の高い個体の病巣感染など基礎に、L 型菌のような特殊な状態で、ベーチェット病の発症や症状の再発に重要な役割を果たしているものと考えられる。

本稿の要旨は、第91回日本眼科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) 難波克彦, 沖田美智, 弓田 彰他: ベ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 87: 1112—1120, 1983.
- 2) 難波克彦, 沖田美智, 弓田 彰他: ベーチェット病と溶連菌感染—溶連菌抗原価の経時的変化および他のブドウ膜炎との比較. 日眼 89: 200—207, 1985.
- 3) 難波克彦: ベーチェット病と溶連菌感染. 日本の眼科 57: 683—688, 1986.
- 4) Namba K, Ueno T, Okita M: Behçet's disease and streptococcal infection. Jpn J Ophthalmol 30: 385—401, 1987.
- 5) 金子史男, 金田孝道, 大西 修他: Behçet 病における細菌アレルギー. アレルギー 27: 440—451, 1978.
- 6) 梁瀬恵子: Behçet 病の病因に関する免疫学的考察. 皮膚 20: 23—48, 1978.
- 7) 大國真彦, 飯島昌夫, 吉原昭次: リウマチ熱と扁桃. 治療 46: 1160—1164, 1964.
- 8) Burrows W: Textbook of microbiology, 420—442, Saunders, Philadelphia, 1973.
- 9) 松村龍雄: 病巣感染の臨床. アレルギー 23: 501—529, 1974.
- 10) 宮本博子, 荻原 博, 中村 健他: 川崎病患者血清における ASO 価の検討. 第 3 回川崎病研究会, 名古屋, 1983.
- 11) Rantz L, Randall E: Use of autolaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping. Stanford Medical Bulletin 13: 290—291, 1955.
- 12) 牧 淳, 下辻常介, 厚味勇二他: 小児科領域における溶連菌感染症の展望. 小児科臨床 20: 2—11, 1967.
- 13) 関梯四郎, 小川定男: 大阪におけるベーチェット病の疫学的研究. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和49年度研究業績, 20—26, 1975.
- 14) Nakae K, Agata T, Maeda K, et al: Case control studies on Behçet's disease. Behçet's

- Disease, 41-49, University of Tokyo Press, Tokyo, 1982.
- 15) 村田嘉彦, 小泉博史, 佐藤信英他: 溶連菌感染症として発症し, 多彩な全身症状を呈した重篤なペーチェット病の1例. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和59年度研究業績, 41-45, 1985.
 - 16) Ueno T, Matsumi F: Kawasaki syndrome and streptococcal infection. *Acta Paediatr Jpn Overseas* Ed 25: 130-146, 1983.
 - 17) 難波克彦, 沖田美智, 山下英俊他: 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.
 - 18) Barile M, Graykowski E, Driscell E, et al: L form of bacteria isolated from recurrent aphthous stomatitis lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 16: 1395-1402, 1963.
 - 19) Graykowski E, Barile M, Lee W, et al: Recurrent aphthous stomatitis: Clinical, therapeutic, histopathologic, and hypersensitivity aspects. *J Am Med Ass* 196: 637-644, 1966.
 - 20) Kim Y, Watson D: Streptococcal exotoxins, biological and pathological properties. Wanamaker L, Massen J: *Streptococci and Streptococcal Disease*, 33-50, Academic Press, New York, 1972.
 - 21) Cunningham C, Watson D: Suppression of antibody response by group A streptococcal pyrogenic exotoxin and characterization of the cells involved. *Infection & Immunity* 19: 470-476, 1978.
 - 22) 江田 亨, 西山彌生: 細菌 L-form の形態学. I. 一般構造と細胞内膜様構造. *帝京医学雑誌* 8: 199-209, 1985.
 - 23) Hessburg P, Mattman L, Barth C, et al: Aqueous microbiology: The possible role of cell wall deficient bacteria in uveitis. *Henry Ford Hosp Med J* 17: 177-194, 1969.
 - 24) Hessburg P: Studies on uveitis. Part II: Hypotheses with case reports. *Henry Ford Hosp Med J* 26: 17-38, 1978.
 - 25) Barth C, Judge M, Mattman L, et al: Isolation of an acid-fast organism from the aqueous humor in a case of sarcoidosis. *Henry Ford Hosp Med J* 27: 127-133, 1979.
 - 26) 難波克彦, 沖田美智, 山下英俊他: Culturette Brand 10-Minute Group A Strep ID (Strep ID) によるペーチェット病の溶連菌の検索. *眼紀* 37: 1355-1358, 1986.
 - 27) Mishima S, Masuda K, Izawa Y, et al: Behçet's disease in Japan: Ophthalmologic aspects. *Trans Am Ophthalmol Soc* 77: 225-279, 1979.

(第91回日眼総会原著)