

Streptococcus sanguis の抗原性の検討

I. *streptococcus sanguis* 分画の抗原性の有無について

笹本 洋一, 広瀬 茂人, 大野 重昭, 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に *Streptococcus (S.) sanguis* の関与が示唆されているため、その抗原性について検討してみた。*S. sanguis* の菌体抗原分画 Mechanical Braun Extract (MBE) と Crude Cell Wall (CCW) を作成し Lewis rat に免疫して抗血清を得、Ouchterlony 法および ELISA 法にて検討したところ MBE のみに抗原性が存在した。さらに MBE の亜分画では、Membrane Fraction (MF) と Cytoplasmic Fraction (CF) に抗原性が存在し、吸収試験より CF により強く存在することが判明した。一方、Cell Wall Fragment (CWF) や Lipoteichoic Acid (LTA) には抗原性は認められなかった。*S. sanguis* と他抗原との共通抗原性の検索では *S. pyogenes* 以外は、*Enterococcus faecalis*, S-Ag, IRBP, 網膜可溶性分画, 網膜非可溶性分画とも認められなかった。(日眼会誌 94: 377-382, 1990)

キーワード: ベーチェット病, 連鎖球菌, *Streptococcus sanguis*, 抗原性, 共通抗原性

Immunological Analysis of *Streptococcus Sanguis* Antigens

Yoichi Sasamoto, Shigeto Hirose, Shigeaki Ohno and Hidehiko Matsuda

Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine

Abstract

The exact cause of Behçet's disease is still unknown. Recently, advanced bacterial studies revealed that Behçet's disease was related to *Streptococcus (S.) sanguis*. However, the antigenicity of *S. sanguis* has not been fully studied. In this study, we clarified the antigenicity of *S. sanguis*. We made *S. sanguis* antigens: Mechanical Braun Extract (MBE) and Crude Cell Wall (CCW) from the whole cells, Membrane Fraction (MF) and Cytoplasmic Fraction (CF) from MBE, Cell Wall Fragment (CWF) and Lipoteichoic acid (LTA) from MBE. We found that the major antigenicity of *S. sanguis* was present in CF by use of the Ouchterlony method and the ELISA method. However, apart from *S. pyogenes*, we could not recognize a common antigenicity among *S. sanguis* and several other antigens, such as S-Ag, IRBP, retinal soluble fraction, retinal insoluble fraction and *Enterococcus faecalis*, by the Ouchterlony method. Since we have clarified the antigenicity of *S. sanguis* in this study, we can now perform detailed examinations with samples from patients with Behçet's disease for *S. sanguis* antigens. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 377-382, 1990)

Key words: Behçet's disease, *Streptococcus*, *Streptococcus sanguis*, Antigens, Common antigens

別刷請求先: 060 札幌市北区14条西5丁目 北海道大学医学部眼科学教室 笹本 洋一
(平成元年9月26日受付, 平成元年11月6日改訂受理)

Reprint requests to: Yoichi Sasamoto, M.D. Dept. of Ophthalmol., Hokkaido Univ. School of Med.
Nishi 5, Kita 14, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

(Received September 26, 1989 and accepted in revised form November 6, 1989)

I 緒 言

ベーチェット病の病因については、Behçet の提唱したウイルス説をはじめ、細菌感染・アレルギー説、免疫異常説、環境汚染説などが知られているが、いずれも病因として証明はされていない¹⁾。日本人やトルコ人などで HLA-B51陽性者に本症が多いことはよく知られている²⁾が、ハワイや米国西海岸に居住する日系人には本症が少ないことから、内因のみで本症の発症を説明することは難しく、外因の関与が強く推定されている。

近年、ベーチェット病の病態解明が進み、連鎖球菌など細菌との関連が注目を集めている。これは、本病患者に扁桃炎などの連鎖球菌感染の既往が多く、扁桃摘出を経験しているものが多いこと³⁾、齲歯の患者が多く⁴⁾歯科治療などで発作が誘発されることがあること⁴⁾、再発性口腔内アフタに連鎖球菌が関与しているらしいこと⁵⁾、血漿中に連鎖球菌の L 型菌と思われる構造体が観察されたこと⁶⁾などのためである。一方、本病患者で抗ストレプトリジン O (ASO) などが陰性であること⁶⁾が、連鎖球菌説に対する反論としてあげられていたが、ASO は限局した感染の場合や抗生剤の使用によって陰性となることが知られており⁷⁾連鎖球菌説を否定する根拠とはならないと思われる。

ベーチェット病患者の口腔内細菌叢に占める各種細菌の割合を検討した結果 *Streptococcus (S.) sanguis* の割合が有意に高いこと⁸⁾が判明し、連鎖球菌の中でも *S. sanguis* に対する関心が高まり、しかも、本病患者群で *S. sanguis* に対する血清抗体価が高いこと^{9)~11)}、*S. sanguis* を中心とする連鎖球菌抗原に対する遅延型過敏反応が亢進していること¹²⁾、連鎖球菌抗原による皮膚テストでベーチェット病発作が誘発されること¹²⁾など、本病における免疫学的異常に対して連鎖球菌とりわけ *S. sanguis* の関与を示唆する所見が得られるようになった。しかし、報告によっては本病患者の *S. sanguis* 血清抗体価が低いという成績もみられ^{13)~15)}、リンパ球幼若化試験などでは必ずしも陽性所見が得られているわけではない¹⁶⁾¹⁷⁾。このように、一定の結果が得られないことは、*S. sanguis* についてまだ不明の点が多く、その抗原性もよく解明されていないためと考えられる。

われわれは、*S. sanguis* の抗原性を明らかにするため各種の菌体分画を作製し、どの分画が抗原性を有するかを明かにし、さらに他の連鎖球菌や網膜抗原との

共通抗原性の有無についても検討を加え、*S. sanguis* の抗原性について詳細な検討を行ったので報告する。

II 対象・方法

1. 実験動物：8~10週齢の近交系 Lewis rat, 雄14匹を用いた。

2. 細菌及び菌体抗原の作製方法：*S. sanguis* は標準株 (ATCC10556)、川崎病患者由来株 (MCLS-1, KTH-1)、ベーチェット病患者由来株 (114-23, KTH-3) を用い、その他 *S. pyogenes* (ATCC19618)、*Enterococcus (E.) faecalis* (478) を使用した。*S. sanguis* の菌体抗原の作製は全菌体を超音波破壊し、2,000×G にて20分間遠心し、その上清を20,000×G にて40分間遠心し、上清を Mechanical Braun Extract (MBE)、沈澱物を Crude Cell Wall (CCW) とした。MBE はさらに100,000×G で超遠心され、上清 Cytoplasmic Fraction (CF) と沈澱物 Membrane Fraction (MF) に分離された。また、MBE は chloroform-methanol などで脱脂後80% phenol を加え遠心し、沈澱物を0.1% Triton X-100含有0.02M sodium acetate buffer で透析、遠心後上清に DNase I, RNase を加え、25°C にて3時間反応させ、遠心後上清を Sephalose CL-6B column, DEAE-Sephalose column に流し、Lipoteichoic Acid を含む分画を回収し、Octyl-Sephalose CL-4B column を流して、Cell Wall Fragment (CWF) と Lipoteichoic Acid (LTA) を分離した¹⁸⁾¹⁹⁾。*S. pyogenes* と *E. faecalis* は MBE を用いた。

3. その他の抗原の作製：S-Ag, IRBP は牛網膜より Dorey²⁰⁾、藤野らの方法²¹⁾にしたがって作製し、網膜可溶性分画と網膜非可溶性分画はその過程で得られたものを使用した。

4. 免疫方法：免疫抗原は *S. sanguis* ATCC 10556 および114-23の MBE と CCW, MCLS-1の MBE を用い、それぞれを等量の完全フロイドアジュバント (BCTO-ADJUVANT COMPLETE, DIFCO LABORATORIES Detroit Michigan USA) とまぜエマルジョンとし、ラットの足跡に0.25mg/0.25ml/rat の量で免疫した。3週間後、同量を追加免疫し、初回免疫より6週間後に心腔内より血清を採取した。

5. Ouchterlony 法：スライドグラスに1.2% J-agar を滴下し、固まったのちパンチにより穴を開け1mg/ml の抗原及び非希釈の血清を各々10 μ l 滴下し、沈降線形成の有無を観察した。

6. ELISA 法：抗原を10 μ l/ml に調整し、96穴のマ

表1 S. sanguis分画に対する血清抗体価 (Ouchterlony法)

抗原	免疫ラット血清				
	10556 MBE	MC-1 MBE	114 MBE	10556 CCW	114 CCW
10556 MBE	+	-	-	-	-
MCLS-1 MBE	-	+	-	-	-
114-23 MBE	-	+	+	-	-
10556 CCW	-	-	-	-	-
MCLS-1 CCW	-	-	-	-	-
114-23 CCW	-	-	-	-	-
PBS	-	-	-	-	-

+ : 沈降線形成, - : 非形成

表2 S. sanguis分画に対する吸収値 (ELISA法)

抗原	免疫ラット血清					
	PBS	10556 MBE	MC-1 MBE	114 MBE	10556 CCW	114 CCW
10556 MBE	0.035	<u>0.429</u>	0.261	0.339	0.171	0.121
MCLS-1 MBE	0.037	0.255	<u>0.615</u>	<u>0.509</u>	0.080	0.132
114-23 MBE	0.039	0.275	<u>0.540</u>	<u>0.562</u>	0.153	0.150
10556 CCW	0.071	0.061	0.221	0.287	0.189	0.208
114-23 CCW	0.039	0.183	0.114	0.146	0.103	0.138

数値は490 nmの吸収値, _____ : 0.400以上

ルチプレートに100 μ lずつコーティングし4 $^{\circ}$ Cでover nightした。ブロッキングは1%牛血清アルブミンを用いた。1次抗体の免疫ラット血清は1,000倍に希釈し室温で1時間反応させた。2次抗体はペルオキダーゼ標識抗ラットIgGやぎ血清 (Jackson Immuno Research LABORATORIES, INC) を5,000倍に希釈したものを用い、o-phenyldiamineを添加後490nmの吸光度を測定した。

さらに、吸収血清を作製するため、免疫ラット血清をCFとともに室温で1時間反応させた。対照は、S-Ag免疫ラット血清とS-Agを反応させたものを用いた。

III 結果

表1に、S. sanguis分画に対する血清抗体価を示す。Ouchterlony法では10556のMBEで免疫されたラット血清は免疫抗原のみと沈降線を形成したが、他の抗原とは沈降線を形成しなかった。MCLS-1のMBEで免疫されたラット血清は免疫抗原のみでなく114-23のMBEとも沈降線を形成した。しかし、114-23のMBEで免疫されたラット血清は免疫抗原のみとしか沈降線を形成しなかった。CCWで免疫されたラット血清は、

表3 MBEの各種分画に対する吸収値 (ELISA法)

抗原	免疫ラット血清		
	PBS	10556 MBE (Rat 1)	10556 MBE (Rat 2)
Membrane Fraction	0.227	<u>0.677</u>	<u>0.648</u>
Cytoplasmic Fraction	0.134	<u>1.081</u>	<u>1.041</u>
Cell Wall Fragment	0.056	0.127	0.092
Lipoteichoic Acid	0.226	0.286	0.276

数値は490 nmの吸収値, _____ : 0.400以上

いずれの抗原とも沈降線を形成しなかった。

一方、表2に示すELISA法ではMBEで免疫されたラットの血清は10556、MCLS-1、114-23とも免疫抗原に対して高い吸収値を示し、しかもMCLS-1、114-23で免疫された血清は互いのMBEに対しても高い吸収値を示した。しかし、CCWで免疫されたラット血清は免疫抗原を含めいづれの分画に対しても低い吸収値しか認められず抗原性は認められなかった。

表3に、MBE免疫ラット血清の各種S. sanguis分画に対する吸収値を示した。10556のMBEで免疫された2匹のラット血清は、MFに0.677、0.648と中等度の吸収値を示し、CFに対しては1.081、1.041と高い吸収

表4 Cytoplasmic Fractionによる吸収後の吸収値 (ELISA法)

抗原	10556 MBE		S-Ag	
	CF (-)	(+)	S-Ag (-)	(+)
Membrane Fraction	0.517	0.353	0.077	0.099
Cytoplasmic Fraction	0.806	0.303	0.030	0.032
S-Ag	0.095	0.126	0.491	0.251

数値は490 nmの吸収値。____ : 0.400以上。
 : 0.400未満0.200以上。

表5 *S. sanguis*と細菌及び網膜抗原との共通抗原性 (Ouchterlony法)

抗原	免疫ラット血清		
	10556 MBE	MC-1 MBE	114 MBE
<i>S. pyogenes</i>	+	+	ND
<i>E. faecalis</i>	-	-	ND
S-Ag	-	-	-
IRBP	-	-	-
網膜可溶性分画	-	-	ND
網膜非可溶性分画	-	-	ND

+: 沈降線形成, -: 非形成

値を示した。しかし、CWF、LTAには抗原性は認められなかった。

表4にCFによる吸収後の吸収値を示す。免疫ラット血清はCFで吸収後MFに対して0.517から0.353に吸収値が低下し、CFに対して0.806から0.303に低下した。Positive controlとしてS-Ag免疫ラット血清をS-Agに吸収させたところ、吸収値は0.491から0.251に低下した。

表5に*S. sanguis*と細菌及び網膜抗原との共通抗原性を示す。Ouchterlony法では10556およびMCLS-1のMBEで免疫したラット血清は、*S. pyogenes*と強い沈降線を形成したが、*E. faecalis*、S-Ag、IRBP、網膜可溶性分画、網膜非可溶性分画とは沈降線を形成しなかった。

IV 考 按

細菌抗原作製の方法はRantz-Randal法、Mechanical Braun法などが知られている。Rantz-Randal法は菌体抗原を加熱処理して作製するため、蛋白抗原などは熱変性を受けやすい可能性がある。今回用いたMechanical Braun法は超音波による菌体の機械的破壊のため抗原性の変化が比較的少ないと考えられる。

今回の実験で、*Streptococcus (S.) sanguis*のMechanical Braun Extract (MBE)はLewis ratに対して強い免疫原性を有していることが、Ouchterlony法、ELISA法で判明した。しかし、ELISA法でMCLS-1と114-23は共通抗原性が強く認められたが、Ouchterlony法では異なる結果が得られた。MCLS-1と114-23は標準株由来の10556とは異なった抗原性を有し、その両者は多くの共通抗原性を持つことが考えられるが、まったく同一ではなく異なる抗原性を有するためと考えられる。一方、Crude Cell Wall (CCW)は完全フロインドアジュバントとともに免疫する今回の方法では、Ouchterlony法、ELISA法のいずれでも抗体を証明できず、抗原性がないか非常に弱いと考えられた。

近年、細菌の新しい菌体抗原としてLipoteichoic Acid (LTA)が知られるようになった²²⁾。これを含めMBEの抗原性がどの亜分画に存在するかMembrane Fraction (MF)、Cytoplasmic Fraction (CF)、Cell Wall Fragment (CWF)、Lipoteichoic Acid (LTA)を用いてELISA法で調べた結果は、MFとCFの両者に抗原性は存在し、CFにより強く存在することがわかった。結果には示さないが、CWFとLTAは可溶性のため、ELISA法でコーティングされない可能性もありOuchterlony法でも検討したが沈降線は形成されなかった。さらに、CFと抗血清を反応させ、十分に吸収させた結果では、MFとCFは大部分が吸収され、S-Agと同程度まで吸収されていることから、MFの抗原性は大部分がCFの抗原性と同一であることが予想された。したがって、*S. sanguis*の抗原性はMBEのうち、CFに含まれることが判明した。

自己免疫疾患、特にSLEや原発性胆汁性肝硬変(PBC)などでみられる自己抗体が、外来性の抗原物質と反応することが知られ²³⁾²⁴⁾、experimental autoimmune uveitis (EAU)を発症させるS-AgはYeast菌などと共通抗原性を有することが明らかになっており²⁵⁾、*S. sanguis*と連鎖球菌、網膜抗原などの共通抗原性を検討することはたいへん重要と考えられる。

今回の検討では10556およびMCLS-1、114-23のそれぞれのMBEで免疫したラット血清は、Ouchterlony法で*S. pyogenes*と強い沈降線を形成した。これは*S. pyogenes*が*S. sanguis*と強い共通抗原性を有するためと考えられる。しかし、他の抗原とは沈降線を形成せず共通抗原性は認められなかった。特にS-Ag、IRBP、網膜可溶性分画、網膜非可溶性分画とは共通抗

原性を証明できず、ELISA法でもS-Ag、IRBPに対して高い吸収値は認められなかった(未発表)。S. sanguisがペーチェット病の眼病変発症の引金であると仮定しても、S-AgなどによるEAUとは異なる機序でペーチェット病の眼病変が生じる可能性を示唆するものと考えられる。

今回の研究により、S. sanguisの主要な抗原性がCFに存在することが判明したことで、今後より均一な抗原を作成することが可能となった。現在これらの抗原分画を使用することによりペーチェット病患者のリンパ球その他各組織との共通抗原性や反応性を検討中である。

稿を終えるにあたりご指導いただきました北海道大学理学部生物化学、嘉屋俊二先生、荒木義雄先生、札幌医科大学微生物、横田憲治先生、小熊恵二教授、北海道大学免疫科学研究所病理、小野江和則教授に深謝いたします。本論文の要旨は第93回日本眼科学会総会にて発表した。なお、本研究の一部には文部省科学研究費(奨励研究A:01771319)、厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班、および秋山記念生命科学振興財団の補助を受けた。

文 献

- 1) 松田隆秀, 水島 裕: ペーチェット病研究15年のあゆみ. 病因・病態・治療. 最新医学 43: 249-258, 1988.
- 2) Ohno S, Matsuda H: Studies of HLA Antigens in Behçet's Disease in Japan, in Lehner T and Barnes CG (eds): Recent Advances in Behçet's disease. New York, Royal Society of Medicine Services, London, 181-186, 1986.
- 3) Nakae K, Agata T, Maeda K, et al: Case control studies on Behçet's disease: Behçet's disease. Univ. of Tokyo Press, 41-49, 1982.
- 4) 水島 裕, 星 恵子, 松田隆秀, 他: ペーチェット病の病因としての連鎖球菌, 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.
- 5) Stanley H, Graykowski EA, Barile MF: The occurrence of micro-organisms in microscopic sections of aphthous and nonaphthous lesions and other oral tissues. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 18: 335-341, 1964.
- 6) 難波克彦, 沖田美智, 弘田 彰, 他: 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.
- 7) 難波克彦: ペーチェット病と溶連菌感染. 最新医学 43: 271-274, 1988.
- 8) 大野重昭, 小竹 聡, 吉川浩二, 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.
- 9) 小熊恵二, 横田憲治, 山口昌子, 他: ペーチェット病から分離された Streptococcus sanguis の諸性状について. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和62年度業績, 57-58, 1988.
- 10) 平野隆雄, 小林茂人, 橋本博史, 他: 抗連鎖球菌抗体の測定とその意義. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和63年度研究業績, 49-50, 1989.
- 11) 小熊恵二, 横田憲治, 山口昌子, 他: ペーチェット病患者の Streptococcus に対する血中抗体価の測定. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和63年度研究業績, 56-57, 1989.
- 12) Mizushima Y, Hoshi K, Matsuda T, et al: Skin hypersensitivity to streptococcal antigens and the induction of systemic symptoms by the antigens in Behçet's disease. A multicenter study. J Rheumatol 16: 506-511, 1989.
- 13) 橋本喬史, 柳田たみ子, 徳富研二, 他: ペーチェット病の連鎖球菌抗体価. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和63年度研究業績, 51-53, 1989.
- 14) 横地高志, 柳川 明, 水島 裕: ペーチェット病患者血清中の連鎖球菌に対する抗体価. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和63年度研究業績, 58-59, 1989.
- 15) 水島 裕, 星 恵子, 松田隆秀, 他: 各種連鎖球菌を用いた凝集価. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和63年度研究業績, 64-65, 1989.
- 16) 三村康男, 田内芳仁, 坂東康晴, 他: 各種連鎖球菌細胞壁に対するリンパ球幼若化試験. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和62年度研究業績, 34-35, 1988.
- 17) 市川幸延, 三島研吾, 清水宏明, 他: ペーチェット病と連鎖球菌抗原. 皮膚反応と血中抗体価, リンパ球幼若化反応, 単核球培養上清の影響. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班, 昭和63年度研究業績, 36-37, 1989.
- 18) Iwasaki H, Shimada A, Ito E: Comparative studies of lipoteichoic acids from several Bacillus strains. J Bacteriol 167: 508-516, 1986.
- 19) Amano K, Hazama S, Araki Y, et al: Isolation and characterization of structural components of Bacillus cereus AHV 1356 cell wall. Eur J Biochem 75: 513-522, 1977.
- 20) Dorey C, Cozette J, Faure JP: A simple and rapid method for isolation of retinal S antigen. Ophthalmol Res 14: 249-255, 1982.
- 21) 藤野雄次郎, 川島秀俊, 奥村敦司, 他: 実験的自己免疫性ぶどう膜炎. (その1) 網膜抗原の分離精製法と病原性について. 日眼会誌 91: 498-508,

- 1986.
- 22) **Wicken AJ, Knox KW**: Lipoteichoic acids: A new class of bacterial antigen. *Science* 187: 1161-1167, 1975.
- 23) **Schwartz RS, Stollar BD**: Origins of anti-DNA autoantibodies. *J Clin Invest* 75: 321-327, 1985.
- 24) **Baum H, Berg PA**: The complex nature of mitochondrial antibodies and their relation to primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis*, 309-313, 1982.
- 25) **Singh VK, Yamaki K, Donoso LA, et al**: Molecular mimicry. Yeast histone H3-induced experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 142: 1512-1517, 1989.
-