

ベーチェット病の化膿連鎖球菌L型菌および 黄色ブドウ球菌L型菌に対する血清抗体価

小川 智美*, 難波 克彦*, 西山 彌生**, 澤田 和江**

*帝京大学溝口病院眼科, **帝京大学医学部細菌学教室

要 約

ベーチェット病患者12例を対象に化膿レンサ球菌L型菌および黄色ブドウ球菌L型菌に対する血清抗体価をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。L型菌の誘導はペニシリンディスク法によった。患者の黄色ブドウ球菌L型菌に対する抗体価は健康人対照(14例)と差がなかったのに対し、化膿レンサ球菌L型菌に対する抗体価は、Studentのt検定により、対照よりも有意に低かった($p < 0.025$)。また患者では、眼発作期と寛解期の間に、各L型菌に対する抗体価に差はみられなかった。ベーチェット病では、化膿レンサ球菌に対する抗体産生が、そのL型菌も含めて、特異的に低下している可能性が考えられる。(日眼会誌 94: 408-412, 1990)

キーワード: ベーチェット病, 化膿連鎖球菌L型菌, 黄色ブドウ球菌L型菌, 抗体産生低下, ELISA法

The Antibody Titer to Streptococcal and Staphylococcal L-form in Behçet's Disease

Tomomi Ogawa*, Katsuhiko Namba*, Yayoi Nishiyama** and Kazue Sawada**

*Department of Ophthalmology, Teikyo University Mizonokuchi Hospital

**Department of Bacteriology, Teikyo University School of Medicine

Abstract

The antibody titer to streptococcal and staphylococcal L-form was determined in the serum of Behçet's disease by enzyme-linked immunosorbent assay. These L-form bacteria were induced by the penicillin disk method. In 12 patients with Behçet's disease, the antibody titer to streptococcal L-form was significantly lower than that in the 14 normal controls by Student's t-test ($p < 0.025$). The antibody titer to staphylococcal L-form, however, showed no statistical difference between the patients and the controls. In Behçet's disease, antibody formation to streptococcus pyogenes, as well as its L-form, may be specifically disturbed. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 408-412, 1990)

Key words: Streptococcal L-form, Disturbance of antibody formation, Penicillin disk method, Enzyme-linked immunosorbent assay

別刷請求先: 〒213 川崎市高津区溝ノ口74 帝京大学溝口病院眼科 小川 智美

(平成元年8月3日受付, 平成元年10月4日改訂受理)

Reprint requests to: Tomomi Ogawa, M.D. Dept. of Ophthalmol. Teikyo Univ. Mizonokuchi Hospital
74 Mizonokuchi, Takatsu-ku, Kawasaki 213, Japan

(Received August 3, 1989 and accepted in revised form October 4, 1989)

I 緒 言

パーチェット病では、扁桃炎などの既往が多いこと¹⁾、血漿中の化膿連鎖球菌抗原価が高く、血液中に本菌のL型菌と思われる構造が認められることなどから、病因として化膿連鎖球菌の関与が考えられている^{2)~4)}。一方患者では、本菌の血漿抗原価が高いにもかかわらず、種々の血清抗体価が異常に低いことが知られている^{5)~7)}。このことから、本病では化膿連鎖球菌に対する抗体産生が何らかの理由により障害されているものと思われる。細胞壁をもたないL型菌は、細胞壁抗原を欠如することにより⁸⁾⁹⁾、このような異常な免疫応答に関与している可能性が考えられる。しかしながら、本菌の化膿連鎖球菌L型菌に対する抗体価については知られていない。そこで本研究は、パーチェット病の化膿連鎖球菌L型菌に対する血清抗体価を測定することを目的とした。併せて対照として、黄色ブドウ球菌L型菌に対する血清抗体価についても測定した。

II 対象と方法

1. 対象：パーチェット病患者12例(男8例,女4例)と健康人対照14例(男6例,女8例)を対象とした。患者は完全型が11例(男8例,女3例)。陰部症状を欠く不全型が1例(女)であった。病期については、眼症状を中心に分類し、眼発作の直後1週間を発作期とし、眼の炎症がおさまり次の眼発作まで1カ月以上の間隔のあるものを寛解期とした。年齢は、患者が23~59歳(男23~59歳,女37~53歳)、平均43歳、対照は30~48歳(男30~48歳,女30~47歳)、平均39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および散瞳剤の点眼をおこなった。検体数は、患者が27、対照が14であった。

2. 方法：ペニシリンディスク法により誘導した化膿連鎖球菌L型菌と黄色ブドウ球菌L型菌に対する抗体価をELISA法により測定した。統計学的有意差の検定は、Studentのt検定による。

1) L型菌の誘導：化膿連鎖球菌L型菌は化膿連鎖球菌124株から¹⁰⁾、また黄色ブドウ球菌L型菌は黄色ブドウ球菌FDA 209P株から¹¹⁾、いずれもペニシリンディスク法により誘導した。すなわち、化膿連鎖球菌の親株は血清ブイオン(HIブイオン[®], 10%馬血清)で、黄色ブドウ球菌の親株は、brain heart infusion broth(BHI[®])(栄研化学, 東京)でそれぞれ培養(37℃、

一夜)後、L型菌寒天平板培地(3.7%BHI, 0.5%yeast extract, 5% NaCl, 1.0%Bactoagar[®], 10%馬血清)に接種し、培地上にアミノベンジルペニシリンの1濃度ディスク(20 μ g/ディスク, 昭和薬品, 東京)を置き、37℃で培養した。ディスクの周囲に形成された阻止円の内部に出現した顆粒状集落を新しいL型菌寒天平板培地に接種し、本培地上に同様にディスクを置いて継代培養した。継代培養後、L型菌特有の目玉焼状集落を得た。

2) 抗原の調整：得られた各L型菌の集落をL型菌液体培地(3.7%BHI, 0.5%yeast extract, 5%NaCl, 10%馬血清)に入れ、振盪培養(37℃, 48時間)した。培養後、遠心(10,000rpm, 15分)により集菌した菌体を5%NaCl液で3回洗滌し、蒸留水に浮遊させburstさせた。これを遠心操作(20,000rpm, 30分)により蒸留水で洗滌後、超音波処理(KUBOTA INSONATOR Model 201M 使用, 180watt, 30分)し、0.1%ラウリル硫酸ナトリウムを加えて細胞膜を可溶化させ、得られた懸濁液を抗原として用いた。Lowry法により測定した懸濁液中の蛋白量は、化膿連鎖球菌L型菌は18 μ g/ml, 黄色ブドウ球菌L型菌は83 μ g/mlであった。

3) 抗体価の測定：各抗原液をマイクロプレート(Limbro[®], Flow Labo. Conn. USA)の各穴に100 μ lずつ加えて遮光し、4℃で12時間吸着させた。吸着後、リン酸緩衝食塩水(PBS, pH 7.2)とTween 20(T, 和光純薬, 大阪)にウシ血清アルブミン(BSA)を加えて遮光し、室温で1時間静置した。次に、被検血清を0.1%PBS-T-BSAで200倍と10倍に希釈し、それぞれ化膿連鎖球菌L型菌と黄色ブドウ球菌L型菌を入れた穴に100 μ lずつ加えて遮光し、室温で1時間静置した。PBS-Tで洗滌後、0.1%PBS-T-BSAで2,000倍に希釈した抗ヒトIgG(Miles Labo. Inc. Chicago, USA)を100 μ l/穴ずつ加えて遮光し、室温で1時間反応させた。再びPBS-Tで洗滌後、3% H_2O_2 をO-フェニレンジアミン(東京化成, 東京)で1,000倍に希釈し、その100 μ lずつを全穴に加え遮光し、室温で30分反応させた。8NH₂SO₄を50 μ l/穴ずつ加えて反応を停止させた後、500nmにおける吸光度を二波長マイクロプレート光度計(MTP-12, コロナ電気, 勝田, 茨城)により測定した。抗原を加えた穴と対照の穴の吸光度の差を求め、1,000倍した値を抗体価とした。

III 結 果

パーチェット病患者と対照の化膿連鎖球菌L型菌

および黄色ブドウ球菌L型菌に対する抗体価の平均値と標準偏差をTable 1に示す。患者の化膿連鎖球菌L型菌に対する抗体価は対照よりも有意に低かったが、黄色ブドウ球菌L型菌に対する抗体価には特に差がみられなかった。また、ペーチェット病患者の発作期と寛解期の各L型菌に対する抗体価には差がなかった(Table 2)。ペーチェット病患者のL型菌に対する抗体価と病期の関係はTable 3に示す如くである。

Table 1 Antibody titer to L-form (mean±S.D.)

	No. of samples	Antibody titer to streptococcal L-form	Antibody titer to staphylococcal L-form
Control	14	25.3±34.1	37.1±19.8
Behçet	27	7.9±6.3*	26.9±13.3**

*: p<0.025, **: Not significant

Table 2 Antibody titer to L-form during ocular attack and remission in Behçet's disease (mean±S.D.)

	No. of samples	Antibody titer to streptococcal L-form	Antibody titer to staphylococcal L-form
Attack	15	6.1±5.2	26.3±12.2
Remission	12	8.2±7.8	27.7±15.1

There was no significant difference in the titer between the stages of ocular attack and remission.

Table 3 Antibody titer to L-form in each patient with Behçet's disease

Case (age, sex)	Antibody titer to L-form			Case (age, sex)	Antibody titer to L-form		
	Str	Sta	(stage)		Str	Sta	(stage)
Y. K. (59M)	4	7	(a)	O. M. (53F)	27	44	(r)
	2	11	(r)		K. K. (51M)	2	21
S. M. (36M)	5	27	(a)	T. K. (36F)		13	14
	1	26	(r)			11	28
O. M. (51M)	18	40	(a)			9	36
	12	33	(r)		N. K. (37M)	12	54
K. A. (40M)	2	21	(a)			12	2
	4	38	(r)		A. T. (23M)	5	2
S. M. (51M)	8	16	(r)	T. H. (40F)		1	15
	1	32	(a)		S. H. (36M)	11	35
	8	23	(r)			6	20
T. R. (47F)	6	39	(r)			14	37
	8	34	(a)			1	39
	1	35	(r)				

Str : streptococcal L-form, Sta : staphylococcal L-form, M : male, F : female, a : attack, r : remission

IV 考 按

ペーチェット病患者の既往歴には扁桃炎と関連の高いものが多く、発症前に重症の扁桃炎を頻発したり、扁桃摘出しているものが健康人よりも明らかに多い。また、多数の抜歯を経験しているものや、歯槽膿漏のような歯周病に侵されている頻度も明らかに高い¹⁾。扁桃炎の主な原因は化膿連鎖球菌であり、歯の疾患では完成された病巣内に化膿連鎖球菌が存在する可能性は十分考えられる。一方、再発性口腔内アフタは本病の必発病状として重要であるが¹²⁾、実験的にも化膿連鎖球菌の作用により、アフタが作られている¹³⁾。このようにペーチェット病では、病巣感染の原因となりうる口腔内病変が必ず存在し、これらの病巣に存在する化膿連鎖球菌が、病因論的に本病と密接な関連をもつ可能性が考えられる。加えて、本病の血液中の化膿連鎖球菌抗原価は特異的に高く、症状と密接に関連して変化しており^{2)~4)}、本病の病因として、本菌が重要な役割を演じていると思われる。

ところで、化膿連鎖球菌の感染の指標として広く用いられてきた anti-streptolysin O (ASO) は、本病患者では一般に陰性である⁵⁾¹⁴⁾。また我々が報告したように、患者では、ASOと同様に菌体外酵素に対する抗体である anti-streptokinase (ASK) も健康人より有意に低かった⁵⁾。さらに、化膿連鎖球菌の菌体成分そのものに対する抗体である anti-streptococcal polysac-

charide (ASP) も健常人に比べ低値を示した⁷⁾。今回、ベーチェット病の化膿連鎖球菌 L 型菌に対する抗体価についてしらべたところ、やはり患者では健常人に比べ異常に低かった。さらに本症では、通常の培養方法で化膿連鎖球菌が検出されないことから、化膿連鎖球菌が特殊な状態にあるか、本菌に対する特殊な免疫状態の存在する可能性が考えられる。すでに我々が報告したように、眼発作期の患者血漿から細菌様の構造物が認められた。これは実験的に作り出した化膿連鎖球菌の死菌と大きさ・形・内部構造などが酷似し、また死菌と異なり細胞壁を失っていることから、化膿連鎖球菌の L 型菌であると考えられた²⁴⁾。同様の構造物は眼発作期の患者血液を分離して得られた白血球層内にも観察された²⁴⁾。一方、本病の再発性口腔内アフタの潰瘍部には、化膿連鎖球菌 L 型菌と思われるものの存在が報告されている¹⁵⁾。これらのことからベーチェット病では、化膿連鎖球菌が L 型菌のような特殊な状態で関与している可能性が考えられる。L 型菌は細胞壁を欠如した細菌であり、一般に *in vitro* の培養は困難であるが、特殊な条件下での増殖は可能である。病原性は多様で、宿主側の免疫力によっても規定され、感染症の慢性化や再発などに病原的意義をもつ。細菌の L 型菌への変化は、細菌の細胞壁に作用する β -ラクタム系抗生剤の実用化と関連が深い⁹⁾¹⁶⁾。ベーチェット病における化膿連鎖球菌の関与が L 型菌によると考えると、これまで患者の血液や咽頭から、従来の培養方法では化膿連鎖球菌が検出できなかったことが理解できる。

今回ベーチェット病患者の黄色ブドウ球菌 L 型菌に対する抗体価は健常人と差がなかったにもかかわらず、化膿連鎖球菌 L 型菌に対する抗体価は異常に低いことがわかった。L 型菌は細胞壁抗原がないため、宿主のリンパ球に認識されにくい。本研究により明らかのように、本病では、黄色ブドウ球菌 L 型菌に対する抗体は健常人と同程度に産生され、一方化膿連鎖球菌 L 型菌に対しては特異的に抗体産生が抑制されている。このように本病において、化膿連鎖球菌に対する特殊な免疫状態が存在することは、本病の原因を考える上で重要な意義をもつと思われる。この特殊な免疫状態を引き起こす理由として、次のようなことが考えられる。すなわち、素因として化膿連鎖球菌に対し高い感受性をもつ個体では、化膿連鎖球菌(とくに L 型菌)による感染をくり返し、特殊な感作状態が成立する結果、本菌に対する免疫応答の異常として、これに

対する抗体産生が特異的に阻害される場合、また、抗体は健常人と同程度に産生されるが、扁桃炎などの病巣からの慢性的な抗原刺激により相対的に抗体が不足する場合である。

このようにベーチェット病では、化膿連鎖球菌に対し感受性の高い個体において、本菌による扁桃炎などの病巣感染を基礎として、抗生剤の使用などにより L 型菌として存在する化膿連鎖球菌が、病因として関与している可能性が考えられる。その結果、化膿連鎖球菌に対し特異的に抗体産生が障害される特殊な免疫状態が発現し、これが本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思われる。

文 献

- 1) Nakae K, Agata T, Maeda K, et al: Case Control Studies on Behçet's Disease. Behçet's Disease. Tokyo, University of Tokyo Press, 41-49, 1982.
- 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-溶連菌由来抗原価の測定. 日眼会誌 87: 1112-1120, 1983.
- 3) 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. 日眼会誌 89: 200-207, 1985.
- 4) Namba K, Ueno T, Okita M: Behçet's disease and streptococcal infection. Jpn J Ophthalmol 30: 385-401, 1986.
- 5) 難波克彦, 沖田美智, 山下英俊, 他: ベ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.
- 6) 難波克彦: ベーチェット病の抗溶連菌抗体価. 日眼会誌 92: 269-273, 1988.
- 7) 小川智美, 難波克彦: ベーチェット病の血清 ASP. 眼臨 82: 2449-2451, 1988.
- 8) 西山彌生, 江田 亨: 細菌 L-form の性状と微細構造. 細胞 16: 22-30, 1984.
- 9) 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. 帝京医誌 8: 199-209, 1985.
- 10) 江田 亨, 松岡俊介, 田所一郎: ブドウ球菌 L-form に関する研究. I. ブドウ球菌 L-form の誘導と固型培地上の形態について. 日細誌 27: 657-644, 1972.
- 11) 江田 亨, 田所一郎: A 群溶連菌 L-form の生成と形態. 日細誌 27: 517, 1972.
- 12) Mishima S, Masuda K, Izawa Y, et al: Behçet's disease in Japan: Ophthalmic aspects. Trans Am Ophthalmol Soc 77: 225-279, 1979.
- 13) Graykowski E, Barile M, Lee W, et al:

Recurrent aphthous stomatitis: Clinical, therapeutic, histopathologic, and hypersensitivity aspects. *J Am Med Assoc* 196: 637-644, 1966.

- 14) 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.
- 15) **Stanley H, Graykowski E, Barile M, et al:** The occurrence of microorganisms in microscopic sections of aphthous and nonaphthous lesions and other oral tissues. *Oral Surg Oral Med & Oral Pathol* 18: 335-341, 1964.
- 16) 江田 亨: 細胞壁欠損菌, とくに L 型菌の病原的

意義. *日本臨床* 39: 2343-2348, 1981.

- 17) **Kim Y, Watson D:** Streptococcal Exotoxins, Biological and Pathological Properties. Wanamaker L & Massen J *Streptococci and Streptococcal Disease* Ed. New York, Academic Press, 33-50, 1972.
- 18) **Cunningham C, Watson D:** Suppression of antibody response by group A streptococcal pyrogenic exotoxin and characterization of the cells involved. *Infect Immun* 19: 470-476, 1978.