

Propionibacterium acnes 感作肺肉芽腫 モルモットの特異抗体の測定

中田安成 森 由弘¹⁾ 江尻東伍²⁾ 片岡幹男³⁾ 平松順一³⁾

要 約

P. acnes を皮内前感作した後, P. acnes 菌体壁成分を incomplete Freund's adjuvant と共に気管内に投与して作製した実験的肺肉芽腫症モルモットにおける抗 P. acnes 抗体について検討した。気管支肺胞洗浄液中抗 P. acnes 抗体価は気管内投与後 1 週目にピークを示し 2 週目までは上昇が認められ, 4 週目では気管内投与前の値に復した。この経過は肺胞内リンパ球数の変動と軌を一にしており, 抗体価とリンパ球数の間には正の強い相関が認められた。血清中の抗 P. acnes 抗体価は 1 週目に低下が認められ, 2 週以後に徐々に回復して 4 週以後は元に戻った。P. acnes の気管内投与により血清中の抗体は肺へと移行し, リンパ球浸潤による胞隔炎, 更には類上皮細胞肉芽腫の形成に P. acnes の関与を示すものであった。

キーワード: サルコイドーシス, プロピオニバクテリウム, 肺肉芽腫症, 動物実験モデル, 気管支肺胞洗浄液

はじめに

サルコイドーシス(サ症)は全身臓器に類上皮細胞肉芽腫を来す疾患であるがその原因は今日に至るまで明らかにされていない。しかしサ症病変からは高頻度, 高濃度に Propionibacterium acnes (P. acnes) が分離培養され¹⁾, 更に PCR 法によっても P. acnes の DNA が高頻度に検出されている²⁾。更に著者らはサ症肺胞内 T-cell は P. acnes の刺激により, 特異的に interleukin-2 (IL-2) 産生を亢進すると共に, 同じく IL-2 receptor (IL-2R) の発現をも亢進し, 増殖することを認め³⁾⁴⁾。一方, サ症肺病巣内における抗 P. acnes 抗体産生の亢進も認められ⁵⁾, 病態形成に液性抗体の関与も示唆された。そこでモルモットに P. acnes を経気道的に感作して作製された実験的肺肉芽腫症において, P. acnes 抗体の動態を検討した。

方 法

1) 実験的肺肉芽腫モルモットの作製: 体重約 400g の Hartley 系, 雌モルモットを用い, 無処置モルモットを I 群とし, 2.0 mg/ml の P. acnes (Merieux 社, IM1585株) 浮遊液と incomplete Freund's adjuvant (IFA) の等量混合液 0.2ml を週 1 回, 合計 3 回の皮内注射を行った後, II 群と III 群に分けた。即ち II 群は生理食塩水 0.2ml を, III 群は P. acnes の菌体壁成分である pyridine extract residue (P. acnes PER) (Strain 4182, RIBI Immuno Chem Re-search INC) 浮遊液 1.0 mg/ml と IFA 等量混合液 0.2ml を気管内に 3 日間連続注入した。I 群と II 群は気管内注入より 2 週後に, III 群は気管内注入当日(0 週), 1 週, 2 週, 4 週, 6 週後にネプタール麻酔にて解剖し肺を取り出し, ポリエチレンチューブを主気管支に挿入し, 1 回に 7-8 ml, 合計 50ml の生理食塩水

岡山大学医療技術短期大学部衛生技術学科

1) 高松病院

2) 市立吉備病院

3) 岡山大学医学部第二内科

にて肺胞洗浄を行った。気管支肺胞洗浄液は遠沈にて上清を採取し、抗 P.acnes 抗体価の測定を行い、有核細胞は塗抹標本を作製し細胞分類を行った。反対側肺の組織標本を作製して病理学的検討に供した。又心臓穿刺にて採血を行い、血清を分離し抗体価の測定を行った。

2) 抗 P.acnes 抗体価の測定：測定は whole bacterial cell ELISA 法を用いた。マイクロタイタープレート (Coaster 社) に poly-L-lysine を一夜被覆し、P.acnes 菌体浮遊液を添加し 2,000 rpm, 1 時間遠沈にて菌体を固着し、0.05% Tween 20 加 PBS で洗浄した。更に 3% 牛血清アルブミンを 1 時間反応させ PBS にて洗浄した。希釈した検体を加え、室温にて 2 時間反応後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗モルモット IgG 抗体を加え 2 時間反応させた。洗浄した後、基質液 (o-phenylenediamine 0.4mg/ml と H₂O₂ 液 0.2 μl/ml を含むクエン酸—リン酸緩衝液、pH5.0) 100 μl を加え、室温 30 分間反応後、EIA Reader (BIO-RAD 社) にて 492nm の吸光度を測定した。抗体活性は Optical density (O.D.) をもって抗体価とした。

結 果

1) Checker-board titration: 抗原とした P.acnes 菌体量と二次抗体濃度は 10,000 倍と 20,000 倍による checker-board titration を行ったところ、濃度依存性が認められた (図 1) ので、以後の測定は P.acnes 菌体量を 0.25 μg/ml とし、二次抗体は 10,000 倍希釈にて行った。

2) 検体の希釈による影響：気管支肺胞洗浄液を 250 倍から 8,000 倍まで希釈して抗体価を測定した (図 2)。III 群では 250 倍から 2,000 倍まではほぼ直線的に低下することが明らかになったので、以後は気管支肺胞洗浄液中の抗体価の測定は 500 倍希釈にて測定を行った。II 群では 500 倍希釈まで抗体価の測定可能であったが、I 群では全ての濃度で測定限界以下で測定は出来なかった。血清中の抗体価についても同様に希釈条件の検討を行い、80 万倍希釈を最適条件と設定した。

3) 気管支肺胞洗浄液及び血清中抗体価と有核細胞の経時的変動 (図 3)：

III 群の気管内感作後の気管支肺胞洗浄液中抗体価、総細胞数、リンパ球数の経過を検討した。各群 4 匹のモルモットで実験を開始したが、0 週群

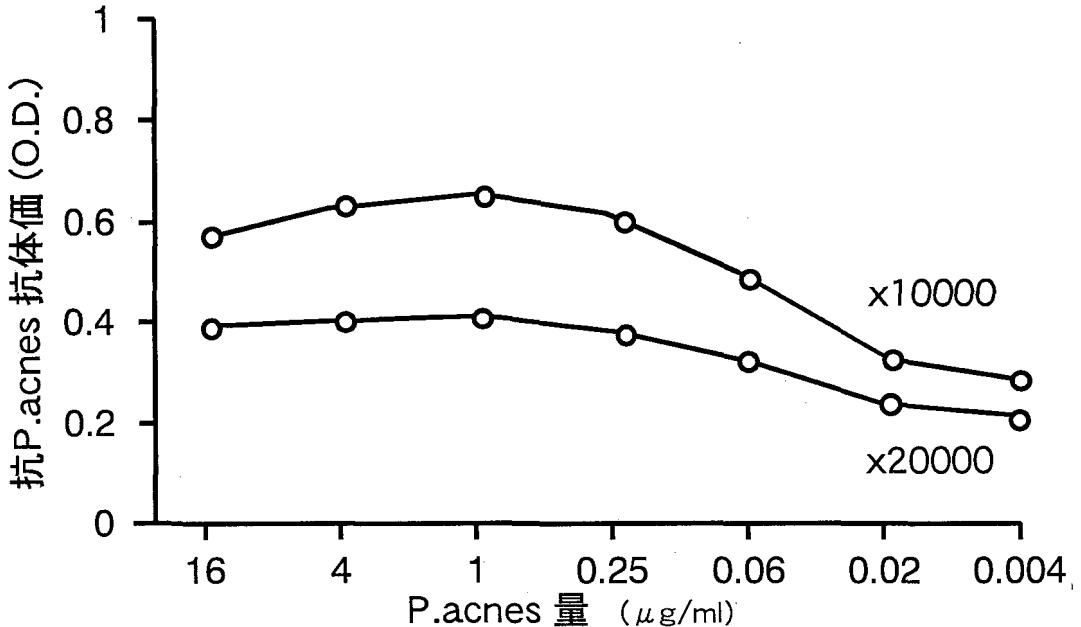


図 1 気管支肺胞洗浄液中抗 P.acnes 抗体価：P.acnes 抗原量と二次抗体濃度による変動

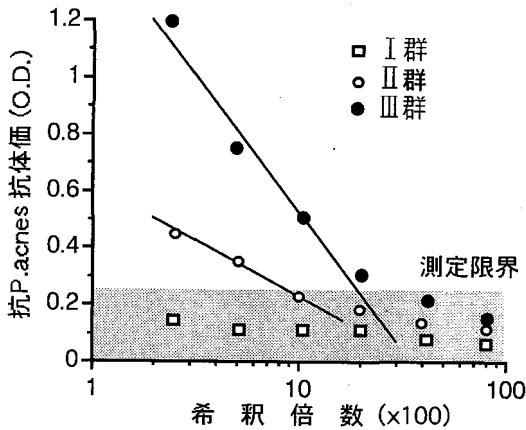


図2 気管支肺胞洗浄液中抗 P. acnes 抗体価：気管支肺胞洗浄液の希釈による変動

と2週群に各々1匹が途中死亡した。総細胞数は1週から増加して2週で平均 15.7×10^6 と最高値を示し、以後徐々に減少し4週以降は0週と同じ値まで低下した。リンパ球数も総細胞数と全く同様な変動を示し、2週で平均 3.8×10^6 と最高値を示した後は減少し、4週以降は元に戻った。

気管支肺胞洗浄液中の抗体価は0週に 0.329 ± 0.042 (平均値 \pm 標準偏差), 1週 0.505 ± 0.183 , 2週で 0.496 ± 0.090 とピークを示し、4週で 0.383 ± 0.090 , 6週で 0.271 ± 0.51 と次第に低下した。

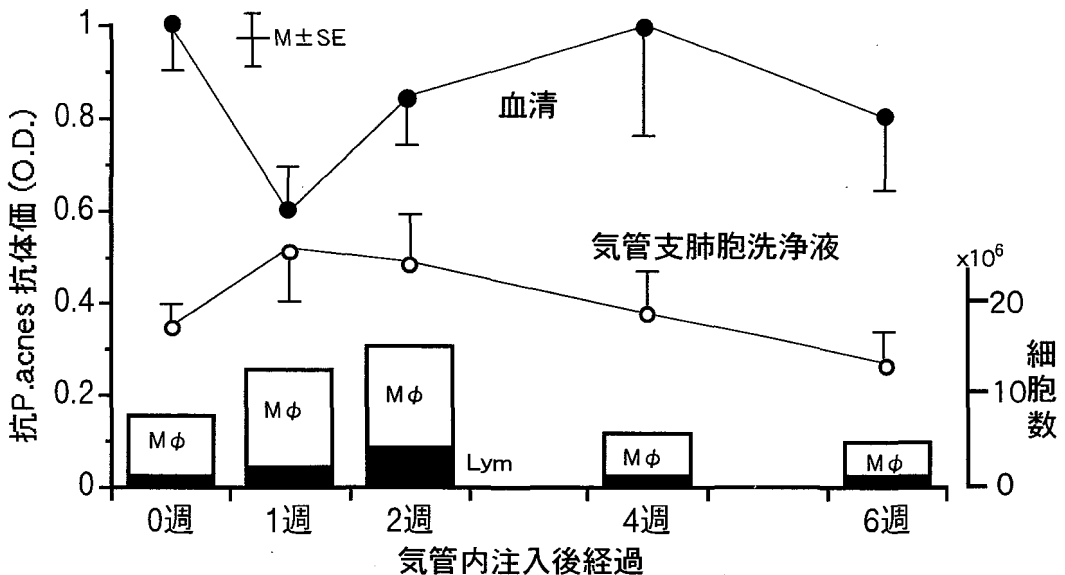


図3 気管支肺胞洗浄液および血清中抗 P. acnes 抗体価の経時的変動

血清中の抗体価は0週 1.083 ± 0.128 , 1週 0.603 ± 0.139 , 2週 0.851 ± 0.091 , 4週 0.987 ± 0.411 , 6週 0.786 ± 0.219 と1週目に有意に低下が認められたが、4週以後は元の値に戻っている。

4) 気管支肺胞洗浄液中抗体価と有核細胞数の相関：

これら18匹のIII群の気管支肺胞洗浄液中の総細胞数と抗体価の間には相関係数 0.636 (危険率 < 0.01)と有意な正の相関が見られた(図4)。更に気管支肺胞洗浄液中リンパ球数と抗体価の間にも相関係数 0.784 (危険率 < 0.001)と良好な正の相関が認められた(図5)。

5) 肺病理所見：

写真1はIII群のP. acnes気管内注入2週後に認められた肺肉芽腫像である。胞隔炎を伴い巨細胞を有する類上皮細胞から成る類上皮細胞肉芽腫が認められた。しかしI群, II群では異常所見は認められなかった。

考 察

サルコイドーシスの病態の研究はCrystal, R. G.ら⁹⁾の気管支肺胞洗浄液所見より肺病巣でのT-cellの活性化の研究以来、主にリンパ球を中心とした細胞性免疫異常に向けられてきた。本症にお

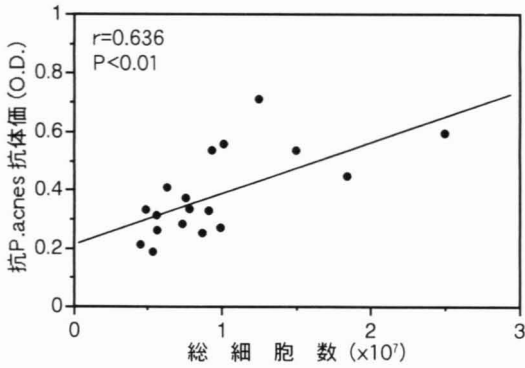


図4 気管支肺胞洗浄液中の抗 P.acnes 抗体価と総細胞数との相関

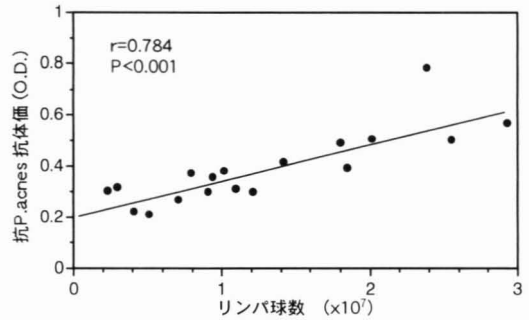


図5 気管支肺胞洗浄液中の抗 P.acnes 抗体価とリンパ球数との相関

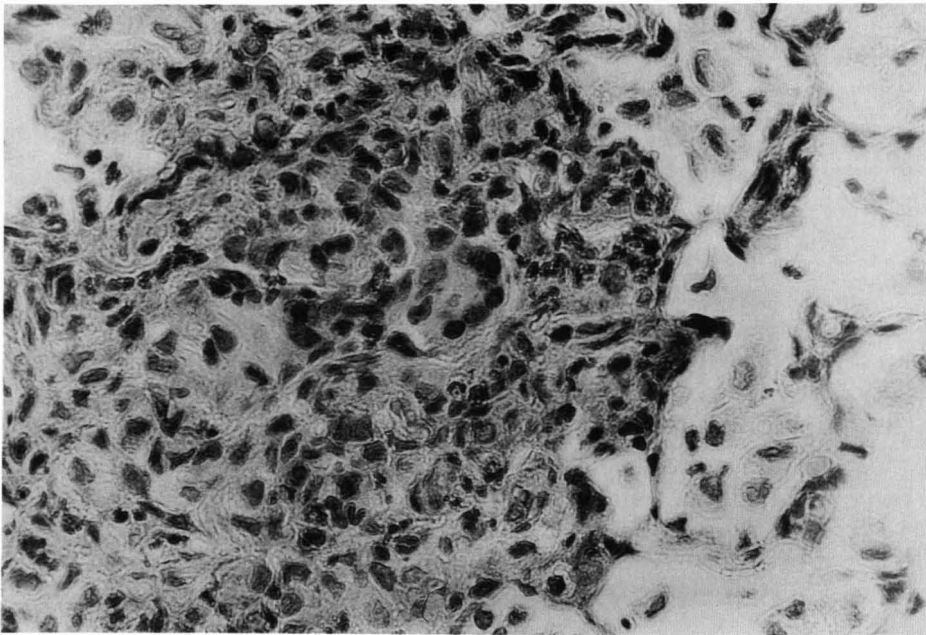


写真1 III群 (P.acnes 気管内感作群) の肺に見られた類上皮細胞肉芽腫像

ける液性免疫異常については polyclonal な抗体産生の亢進は認められるものの、特異的異常所見はないとされている。しかし著者らはサ症肺病巣における抗 P.acnes 抗体、特に IgA 抗体の産生亢進を認めた⁵⁾。一方、江石⁷⁾はサ症リンパ節内に IgA, IgM を結合した顆粒状物質をリンパ洞内マクロファージの胞体内に多数認め、本物質はマクロファージによる不溶性免疫複合体の貪食像として捕らえている。これら貪食物質の一部はマイコバクテリアの L-form としての可能性が指摘され

ている Hamazaki-Wesenberg 小体に一致することから、抗原である細菌と免疫グロブリンの結合した免疫複合体が、ライソゾーム内で消化・吸収されている可能性が示唆されている。

Ito, Y.⁸⁾はモルモットに P.acnes 生食浮遊を経気道的に吸入させ、肺門リンパ節腫大を伴う肺肉芽腫形成を報告しているが、その組織所見は sinus and follicular hyperplasia であり、ヒトにみられるサルコイド肉芽腫とは異なっていた。小林⁹⁾はモルモットに Propionibacterium avium を

皮内感作した後、muramyl depeptide (MDP) を w/o emulsion にて経気道的に投与し、肺及び肺門リンパ節の肉芽腫形成に成功している。しかしリンパ節に認められた肉芽腫はよく分化したものであったが、肺における肉芽腫は境界不明瞭で細胞成分も乏しく、類上皮細胞の分化も十分とは言えなかった。江尻¹⁰⁾は更に改良して、P. acnes にて皮内感作した後、P. acnes 及び P. acnes-PER を w/o にて経気道的に投与して、リンパ球浸潤による胞隔炎を伴い、巨細胞を有する類上皮細胞肉芽腫の作製に成功した。今回は江尻の方法により作製した肺肉芽腫症モルモットにおける肺病巣における抗 P. acnes 抗体の変動を検討した。

本実験のⅢ群、即ち肺肉芽腫症モルモットにおいては P. acnes 気管内注入後に胞隔炎像と類上皮細胞の集簇を来し、2週後には巨細胞を有する類上皮細胞肉芽腫像が認められた。しかし4週では胞隔炎、肉芽腫は共に減少し、6週後にほとんど消退し、従来の報告⁹⁾¹⁰⁾と同様の結果が得られた。この経過中の気管支肺胞洗浄液中総細胞数は1週目から増加し2週目で最も高値となり、4、6週では元に復した。リンパ球数も総細胞数の変動と全く同一の経過を示した。即ち肺胞内有核細胞、特にリンパ球数の変動は類上皮細胞肉芽腫の出現、消退と軌を一にした。抗 P. acnes 抗体は気管支肺胞洗浄液中では1週から2週にかけて最高値を示し、4週以後には元に復した。抗体価はリンパ球の増加より1週間早く増加し、以後はリンパ球数の変動と同一の経過を示した。更に肺内の抗体価の上昇はリンパ球数増加と強く相関しており、リンパ球性胞隔炎の程度を良く反映している。そして、抗 P. acnes 抗体のリンパ球性胞隔炎を含む肉芽腫の病態への関与を示すものである。血清中の抗体価は1週目に減少を示し2週以後に徐々に回復を示し、これは肺内に吸入された菌体に対して、抗体の血清中からの肺への移行を示すものであり、気管内感作による、ごく初期の変化を示している。血中より移行した抗体は菌体に結合し、マクロファージに貪食され、貪食マクロファージは interleukin 1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF) 産生・分泌を行い、これらサイトカイン

はリンパ球の集簇、増殖を招来して胞隔炎の形成するであろう。更にはマクロファージによる貪食・消化の過程で、菌体抗原に対する拒絶反応が肉芽腫を形成していくのではないかと考えられた¹¹⁾。

文 献

- 1) 本間日臣, 豊倉康夫(編): サルコイドーシスの発生機構に関する研究—感染論的立場からの基礎的研究—。難病の発生機構。東京大学出版会, 東京, 245-303, 1981.
- 2) 江石義信: サルコイドーシスにおける肉芽腫形成の機序。Modern Physician 14: 127-131, 1994.
- 3) 中田安成, 江尻東伍, 岸俊行, 小林洋三, 藤田道雄, 大塚泰亮, 木村郁郎: サルコイドーシス肺胞リンパ球の Propionibacterium acnes に対する反応性の検討。日胸疾会誌 23: 413-419, 1985.
- 4) 森由弘, 中田安成, 片岡幹男, 江尻東伍, 飛岡徹, 前田剛, 細谷茂衛, 大塚泰亮, 木村郁郎: サルコイドーシス肺胞リンパ球の Propionibacterium acnes 刺激による Interleukin-2 産生及び Interleukin-2 receptor 発現の検討。日胸疾会誌 26: 42-50, 1989.
- 5) 森由弘, 中田安成, 片岡幹男, 江尻東伍, 飛岡徹, 前田剛, 細谷茂衛, 大塚泰亮, 木村郁郎: サルコイドーシスにおける気管支肺胞洗浄液および血清中の抗 Propionibacterium acnes 抗体の検討。日胸疾会誌 27: 35-41, 1989.
- 6) Hunninghake G.W., Gadek J.E., Young R.C. Kawana, O., Ferrans V.J., Crystal, R.G.: Maintenance of granuloma formation in pulmonary sarcoidosis by T lymphocytes within the lung. N.Engl.J.Med. 302: 594-598, 1980.
- 7) 江石義信: サルコイドーシスにおける肉芽腫の成因。呼吸 11: 1059-1056, 1992.
- 8) Ito Y., Toyama J., Morikawa S., Hirano T., Hirasawa K., Kinoshita Y., Kanasawa Y.: The production of granulomas in animals and men by a Propionibacterium suspension and Yersinia. In Eighth International Conference on Sarcoidosis and Other Granulomatous Diseases. Williams, W.J. and Davies, B.H. (ed.). Alpha Omega Publishing Limited. New York, 142-149, 1986.
- 9) 小林洋三: サルコイドーシスの成因に関する研究。第2編 Propionibacterium acnes と muramyl depeptide による実験的肺肉芽腫症作製の試み。岡山医学会雑誌 96: 1136-1174, 1984.
- 10) 江尻東伍: サルコイドーシス肺病態への Propionibacterium acnes の関与に関する研究 第2編 Propionibacterium acnes による実験的肺肉芽腫症作製の試み。岡山医学会雑誌 100: 811-819, 1988.
- 11) 中田安成, 片岡幹男, 木村郁郎: サルコイドーシス病態への Propionibacterium acnes の関与。岡大医短紀要 3: 19-36, 1992.

Antibody to *Propionibacterium acnes* (P.acnes) in guinea pigs with pulmonary granulomatosis

Yasunari NAKATA, Yoshihiro MORI¹⁾, Tohgo EJIRI²⁾,
Mikio KATAOKA³⁾, Jun-ichi HIRAMATSU³⁾

Abstract

In guinea pig models of *P.acnes* induced pulmonary granulomatosis, anti-*P.acnes* antibody activity in bronchoalveolar lavage fluid peaked at 1 week after the endotracheally injection and decreased progressively, attaining control animal value by 4 weeks. The change of lymphocyte counts paralleled the change of anti-*P.acnes* antibody activity levels in bronchoalveolar fluids. Furthermore, the degree of granuloma formation in the lung paralleled the rise of anti-*P.acnes* antibody activity level. This data suggests that the anti-*P.acnes* antibody play a central role in the induction of lymphocyte alveolitis in experimental pulmonary granulomatosis.

Key words : sarcoidosis, *propionibacterium acnes*, pulmonary granulomatosis,
experimental model, bronchoalveolar lavage

School of Health Sciences Okayama University

1) Takamatsu Hospital,

2) Kibi Hospital,

3) Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School.