— 原 著 —

レンサ球菌感染症の血清学的診断法と その意義に関する研究

小湊 秀久

日本医科大学微生物学免疫学教室 (主任: 木村義民教授)

Serological assessments of streptococcal infectious diseases and its significance

Hidehisa Kominato

Department of Microbiology and Immunology (Chief: Prof. Yoshitami Kimura),
Nippon Medical School

The antibody titers were measured against extracellular products of group A streptococci, deoxyribonuclease-B (DNase-B), nicotine-amide adenine dinucleotidase (NADase), streptolysin-O (SLO), cellular components of group A streptococci, partially purified extracts (PPE), C-polysaccharide (C-poly) and peptidoglycan (PG), in the sera of patients infected with streptococci or its sequelae.

The results obtained were as follows.

1) Antibody titers against DNase-B and NADase were high in the sera of patients with acute glomerulonephritis or with acute rheumatic fever.

2) There were no significant differences in antibody titers against PPE between healthy group and patient group of children. In each group of patient high antibody titers against PG occurred at high frequency. Antibody titers against C-poly were high in the sera of acute glomerulonephritis, acute rheumatic fever and anaphylactoid purpura.

3) No correlation was observed between ASO titers and anti DNase-B titers, as well as between ASO titers and anti NADase titers. In the patients with acute glomerulonephritis antibody titers against DNase-B and NADase were high at early stage, but had a tendency to become lower as time went on.

There were almost no changes in the antibody titers of the sera of the patients with mucocutaneous lymphoid syndrome (MCLS).

Key words : serological assessments, streptococcal infectious disease, anti DNase-B・NADase・SLO titers, anti-streptococcal cellular components titers

緒 言

A群レンサ球菌の産生する菌体外代謝物質ないしは菌体成分の多くは抗原性を有し、したがってこの菌の感染に基づき生体は各々の抗原に対応する抗体を産生する。

今日、レンサ球菌感染症の血清学的診断法としては Antistreptolysin-O Antibody (ASO) の測定がルーチン化されているが、しかし本抗体の測定だけでは十分とは思われない。なぜなら菌体外代謝物質自体において菌型、菌株によりその産生能に差があり¹⁾、また宿主側における抗体応答も抗原により相違があると思われるからである。

Present address: Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

本論文では、A群レンサ球菌代謝物質である Deoxyribonuclease-B (DNase-B), Nicotineamideadenine

dinucleotidase (NADase), および Streptolysin-O (SL-O), 菌体成分である細胞壁蛋白物質, C-多糖体, ならびに Peptidoglycan に対する抗体価を, レンサ球菌感染症ないしはその続発症患者血清を用いて測定し, それらの血清学的診断法を再検討するとともにその測定意義につき検討を試み, 興味ある知見を得たので報告する.

実験材料および方法

(1) 使用菌株

A群レンサ球菌 12 型, SS 95/12 株を使用した.

(2) 細胞壁の分離

Todd-Hewitt broth (Difco 社製) に前記菌株を型のごとく培養し, 菌体を集め Bleiweis らの方法²⁾ に準拠し, Brown の Cell homogenizer (Model, MSK)

Table 1 Streptococcal partially purified extracts (PPE)

Table 2 Extraction of peptidoglycan and C-polysaccharide from cell wall

を用いて細胞壁画分を得た.

(3) 細胞壁蛋白抗原の抽出

細胞壁画分を RNase (100 $\mu\text{g/ml}$, Miles lab. 製) および DNase (100 $\mu\text{g/ml}$, Miles lab. 製) で処理後, Lancefield の方法³⁾ に準じ加熱塩酸抽出を実施し, この抽出物を 33~60% の飽和硫酸で沈降する画分を細胞壁蛋白粗抗原 (partial purified extracts, 以下 PPE と略す) とした (Table 1).

(4) 細胞壁 C-多糖体ならびに Peptidoglycan の抽出

前記の方法で得られた細胞壁画分を DNase, RNase で処理後, さらに Pronase (100 $\mu\text{g/ml}$, 科研製) で 37°C, 4 時間処理後 Fuller⁴⁾ および Krause らの方法⁵⁾ に従い C-多糖体 (C-polysaccharide, 以下 C-poly. と略す) と Peptidoglycan (以下 PG と略す) を得た (Table 2).

PG は不溶性物質として得られるため, 実験での使用に際してはリン酸緩衝食塩水 (phosphate buffer salines, PBS, pH 7.4) 中で超音波 (Model, UR-200 P, トミー精工) 処理し, 可及的に可溶化した.

(5) Antideoxyribonuclease-B (ADNase-B) 抗体の測定⁶⁾

DNase は DNA を depolymerize するので, ADNase 抗体が存在すれば, この depolymerization が阻害される. この原理を応用して ADNase 抗体の測定がなされた. すなわちマイクロプレートを用い, 非働化血清の各希釈系列 0.025 ml に抗原である

DNase-B 0.025 ml を加え, 室温で 15 分間反応させた後, toluidine blue O に結合した DNA 0.05 ml を添加し, さらに 37°C で 1 時間 incubate し, 血清中に抗体が存在すれば DNase-B と結合することにより DNA-toluidine blue O complex はそのまま残存し, 溶液全体が青色を呈すが, 抗体が存在しなければ DNase-B は基質である DNA を分解し溶液全体が薄青色を呈し, 管底に沈殿物が生ずる. したがって, この沈殿物を生じない血清の最大希釈倍数をもって抗体価とした. なお, これら DNase-B ならびに DNA-toluidine blue O complex は Behringwerke-Hoechst 社製のキットを用いた (Table 3).

(6) Antinicotineamide adenine dinucleotidase (ANADase) 抗体の測定⁷⁾

Nicotine amide adenine dinucleotidase

Table 3 Working schedule for ADNase B determination(micromethod)

Tube No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		1:50	1:75	1:100	1:150	1:200	1:300	1:400	1:600	1:800	1:1200	1:1600	1:2400
Serum dilution	ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Streptodornase B	ml	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
		Mix, leave to stand at room temperature for 15'											
DNA toluidine blue O substrate	ml	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
		Mix : Incubate taped about 60 minutes at 37°C											
		Read highest dilutions which still contain a blue, homogeneous solution											
ADNase B titer		50	75	100	150	200	300	400	600	800	1200	1600	2400

(NADase) は Nicotine amide adenine dinucleotide (NAD) の nicotinic acid ribose bonds を切断するので、この反応は ANADase 抗体により阻止されるので、これを応用することにより抗体価の測定が行われた。その概要は、非働化血清の各希釈系列 0.1 ml に一定単位の NADase(500 u/ml) 0.1 ml を加え、37°C で 30 分間反応させた後、NAD 溶液 0.1 ml を加え 37°C で 7 分 30 秒間正確に反応させ、直ちに 60~70°C の water bath に 3 分間入れることにより反応を停止し、さらに alcohol dehydrogenase (ADH) 0.01 ml を加え室温 10 分間放置後、残存する NAD を NADH に還元し、これを 366 nm で比色定量することにより反応に関与した NADase の総量を求め、これにより抗体価を決定した。なお、これら NADase, NAD は Behringwerke-Hoechst 社製のキットを用いた (Table 4)。

(7) Antistreptolysin-O (ASO) 抗体の測定

本抗体の測定は streptolysin-O (SL-O) の持つ溶

血活性を阻止するかどうかをもって測定する Rantz-Randall 法⁹⁾に準じた。被検血清はマイクロプレートを用いて血清は 1:2, および 1:3 に希釈し、これらをそれぞれ倍々希釈して抗体価の測定が行われた⁹⁾。測定のためには栄研製のキットを用いた。

(8) 菌体成分に対する抗体の測定

1) Anti PPE 抗体の測定

Boyden らの方法¹⁰⁾に準じ感作血球凝集反応を用いて測定した。すなわち市販の綿羊血球 (日本生物材料センター) を pH 7.2 の PBS を用いて 1.5% の血球浮遊液とし、これに 20,000 倍のタンニン酸溶液を等量加え、37°C で 10 分間 incubate 後に血球を洗浄し、再び 1.5% 血球浮遊液とした後、PPE 抗原 (蛋白濃度 200 µg/ml) 溶液を加え 37°C, 40 分間感作し感作血球浮遊液を作製した。被検血清はマイクロプレート中で 200 倍正常非働化ウサギ血清を用いて希釈して、希釈系列を作製した。各 well に対して 0.025 ml に 1.5% 感作血球浮遊液 0.025 ml を加え攪拌

Table 4 Procedure for anti-NADase estimation

Tube No.		1	2	3	4	5	6	7	8
Dilution		1:20	1:30	1:40	1:60	1:80	1:120	1:160	1:240
Serum dilution	ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Buffer solution I	ml	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
NADase	ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
		30 min in water bath at 37°C							
NAD	ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
		at 30 sec. Intervals							
		7.5 min in a water bath at 37°C (each tube must be incubated for exactly 7.5 minutes, Stopwatch !)							
		appr. 3 minutes in a water bath at 60~70°C (to halt reaction)							
ADH	ml	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Buffer solution II		2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
		after 10 min at room temperature measure extinction in the photometer at 366 nm using 1 cm glass cuvettes.							
Anti-NADase-units per ml at an extinction of 0.25		50	75	100	150	200	300	400	600

し、37°C で3時間、さらに 4°C で一晩放置した後、凝集の有無を判定し、凝集を起こす最大の血清希釈倍数をもって抗体価とした。

2) Anti C-polysaccharide (Anti C-poly) 抗体の測定^{11,12)}

dimethyl formamide に pyridine 存在下で stearoyl chloride で C-poly をエステル化し、これをホルマリン固定血球に感作することにより感作血球凝集反応で測定された (Table 5)。

Table 5 Esterification procedure of C-polysaccharide extraction from *Streptococcus pyogenes*

3) Anti Peptidoglycan (Anti PG) 抗体の測定
超音波処理して可溶化した PG (100 µg/ml) を抗原として、ホルマリン固定血球を用いたタンニン酸処理感作血球凝集反応により測定した。方法は Anti PPE 抗体の測定と同様である。

(9) 対象検体

昭和 53 年 10 月～54 年 5 月までに本学付属病院小児科神経外来を受診した痙攣性疾患以外には異常を認めない患児血清 20 例、ならびに本学衛生学・公衆衛生学教室より恵与された予防接種時に採取した 40 例の血清を健常血清 (年齢 6～12 才) として使用した。

患者血清としては急性リウマチ熱 (発症後 1 ヶ月以内、年齢 8～12 才)、急性糸球体腎炎 (年齢 5～13

才)、アレルギー性紫斑病 (年齢 5～12 才)、Mucocutaneous lymphnode syndrome (MCLS, 川崎病, 年齢 1～5 才)、A 群レンサ球菌感染の確認された上気道炎 (年齢 3～10 才) の各疾患のものが使用され、一部の血清は経時的にも採取された。なお MCLS の診断は川崎病の診断基準に準拠した¹¹⁾。これらは昭和 53 年 8 月～55 年 5 月までに本学付属病院小児科ならびに川口市民病院小児科を受診ないしは入院した患児より採取された。

結 果

1. ASO 抗体価に関する検討

Fig. 1 に示すごとく、対照群の健常者血清 60 検体の ASO の平均値は 151 単位であったが、正常上限値を諸家の報告¹⁸⁻¹⁹⁾ に従い 333 単位 (マイクロタイター法では 320 単位) とすると、それ以上の値を示したのは対照群で 3 例 (5%) に対し、急性糸球体腎炎では 40 例中 12 例 (30%) が 333 単位以上であり、急性リウマチ熱では例数は少ないが 9 例中 9 例 (100%)、アレルギー性紫斑病では 9 例中 2 例 (22%)、レンサ球菌感染による上気道炎では 25 例中 3 例 (12%)、MCLS では 68 例中 0 であった。それぞれレンサ球菌感染例において 333 単位以上の異常値を示す者が存在したが、急性糸球体腎炎やレンサ球菌感染による上気道炎において低値を示す血清もかなり存在した。

2. ADNase-B 抗体価に関する検討 (Fig. 2)

54 例の健常者血清を用いて ADNase-B 抗体を検討したところ、その価は ≤50～300 単位の間に分布し、正常限界をその集団の上位 15～20% を限界^{16,17)} とすれば 150 単位が正常値の上限となり、また有意水準 5%¹⁸⁾ における正常範囲は 160 単位までであり、ここでは 160 単位以上を異常値として採用した。急性糸球体腎炎ではその 50%、リウマチ熱では全例に高値が認められ、レンサ球菌感染性上気道炎では 13 例中 1 例に高値を認めたが、アレルギー性紫斑病では全例が正常範囲にあった。

3. ANADase 抗体価に関する検討 (Fig. 3)

対照群において 100 単位以上の価を示すものは 13% 存在したが、有意水準 5% における正常範囲は 99 単位までであり、したがって 100 単位までを正常範囲とすると、急性糸球体腎炎では 60.7%、リウマチ熱

Fig. 1 Distribution of ASO titers in the sera of healthy children and patients
 control : healthy children (6~12 ages)
 AGN : acute glomerulonephritis (5~13 ages)
 SI : streptococcal infection (3~10 ages) (upper respiratory infection)
 RF : acute rheumatic fever
 AP : anaphylactoid purpura (5~12 ages)
 MCLS : mucocutaneous lymphnode syndrome (1~5 ages)
 Dotted line shows mean value.

では 57% がこれよりも高い値を示し、またアレルギー性紫斑病で 12 例中 3 例に高値を示したのが注目された。

4. Anti PPE 抗体価に関する検討 (Fig. 4)

A 群レンサ球菌細胞壁由来の蛋白抗原 (PPE) に対する抗体価は、対照群で平均値 107 であり、有意水準 5% の正常上限は 1 : 292 であった。急性糸球体腎炎、レンサ球菌感染性上気道炎、アレルギー性紫斑病の血清でそれぞれ高値を示したものが認められたが、ほとんどの血清が正常範囲の値を示し、各疾患群間においてその価に著明な相違を認めることができなかった。

5. Anti C-poly 抗体価に関する検討 (Fig. 5)

群特異性を示す C-poly に対する抗体価については、対照群の有意水準 5% の正常範囲は 1 : 16 までであり、したがって急性糸球体腎炎の 70%、リウマチ熱では 43% が異常値を示したにすぎず、またアレルギー性紫斑病では 82% に高い抗体価が認められた。また MCLS では 47 例中 8 例に高い価を示す血

清が存在した。

6. Anti PG 抗体価に関する検討 (Fig. 6)

細菌細胞壁 PG はレンサ球菌にのみ存在する特異抗原物質でなく、多くの細菌に共通して存在する物質であるだけに、これに対する抗体の測定は必ずしもレンサ球菌の感染を反映するものではないが、この PG に対する抗体を測定することは、細菌感染を受けたか否かの一つの指標になろう。対照健全群の血清における有意水準 5% の正常上限は 1 : 156 であり、これと比較すると急性糸球体腎炎をはじめ各疾患群できわめて高い価が認められた。

7. 各種抗体価の相関に関する検討

急性糸球体腎炎とリウマチ熱患者血清につき ASO 抗体価と ADNase-B 抗体価の相関性を検討した。Fig. 7 に示すごとく、対照群 (50 例) では $|r|=0.021$ 、急性糸球体腎炎 (26 例) では $|r|=0.279$ 、リウマチ熱 (5 例) では $|r|=0.512$ を示し両抗体価の間でそれぞれ相関を認めることはできなかった。また ASO 価と ANADase 抗体価の相関を検討すると

Fig. 2 Distribution of anti DNase-B titers in the sera of healthy children and patients
control : healthy children
AGN : acute glomerulonephritis
SI : streptococcal infection (upper respiratory infection)
RF : acute rheumatic fever
AP : anaphylactoid purpura
MCLS : mucocutaneous lymphnode syndrome
Anti DNase-B titers were measured by Toluidine blue O method using microplate.
Dotted line shows mean value.

Fig. 3 Distribution of anti NADase titers in the sera of healthy children and patients
control : healthy children
AGN : acute glomerulonephritis
SI : streptococcal infection (upper respiratory infection)
RF : acute rheumatic fever
AP : anaphylactoid purpura
MCLS : mucocutaneous lymphnode syndrome
Anti NADase titers were measured by modified Peterson's method (See details in material and methods)
Dotted line shows mean value.

Fig. 4 Distribution of anti PPE titers in the sera of healthy children and patients
 control : healthy children
 AGN : acute glomerulonephritis
 SI : streptococcal infection (upper respiratory infection)
 RF : acute rheumatic fever
 AP : anaphylactoid purpura
 MCLS : mucocutaneous lymphnode syndrome
 Anti PPE titers were measured by passive hemagglutination test using microplate.
 Dotted line shows mean value.

(Fig. 8), 対照群 (50 例) では $|r|=0.087$, 急性糸球体腎炎 (28 例) で $|r|=0.35$, リウマチ熱 (7 例) で $|r|=0.229$ を示し, 両抗体価の間に有意の相関を認めることができなかった. さらに ADNase-B 抗体価と ANADase 抗体価の相関を検討すると (Fig. 9), 対照群 (50 例) では $|r|=0.024$, 急性糸球体腎炎 (26 例) では $|r|=0.189$, リウマチ熱 (5 例) では $|r|=0.427$ を示し, 両抗体価の間の相関はなかった. なお図には示していないが, 菌体外代謝物質に対する抗体価と各菌体成分に対する抗体価の間でも相関は特に認められなかった.

8. 抗体価の経時的変動

(1) 急性糸球体腎炎について

比較的長期にわたり follow しえた急性糸球体腎炎 2 症例における各種抗体価の経時的変動につき検討した. Fig. 10 に示したように症例 1 (A) では入院時 (0 日) ADNase-B 抗体価は正常範囲にあったが, 経過とともにその価は低下していく傾向にあり, ANADase 抗体価は一旦上昇した後, 以後経過とともに

に下降していった. 両抗体ともに入院前にいかなる価を示していたかは不明である. また Anti C-poly 抗体は入院時多少高い価を示したが, 経過とともに大きな変動を示さず Anti PPE, Anti PG 抗体も経過中大きな変動を認めることはできなかった. 一方, 症例 2 (B) では ADNase-B 抗体価は入院時より低く, 12 週間にわたる経時的測定の間にもほとんど変動を認めなかったが, ANADase 抗体価は入院時 1 : 2,048 と異常に高い価を示し, 2 週間後には 1 : 256 に低下し, さらに 8 週で正常範囲に復した. 一方, Anti C-poly 抗体価は当初 1 : 64 を示したが, 以後漸減する傾向にあり, また Anti PG 抗体も入院時高値を示したが経過とともに大きな変動を認めることはできなかった.

(2) MCLS について (Fig. 11)

一部にレンサ球菌感染が疑われている¹⁰⁾ MCLS につき同様に各種レンサ球菌抗体を経時的に検討した. 菌体外代謝物質である DNase-B, NADase に対する抗体は, 4 症例とも ASO と同様に低値を示し, 菌体成分である PPE, C-poly に対する抗体もともに経過を通じて変動することなく, わずかに PG に対する抗

Fig. 5 Distribution of anti C-poly titers in the sera of healthy children and patients
control : healthy children

AGN : acute glomerulonephritis

SI : streptococcal infection (upper respiratory infection)

RF : acute rheumatic fever

AP : anaphylactoid purpura

MCLS : mucocutaneous lymphnode syndrome

Anti C-poly titers were measured by passive hemagglutination test using microplate.

Dotted line shows mean value.

体が高い価で持続して存在するのが認められたにすぎない。

考 察

レンサ球菌感染症ないしはその続発症の血清学的診断法としては、今日菌体代謝物質の一つである SLO に対する抗体 (ASO) の測定が最も広く行われている。しかし SLO の産生能は各菌株により相違があり、また宿主のこの抗原に対する免疫応答能にも差異があると思われ、したがって本抗体の測定だけでレンサ球菌感染を診断することは必ずしも満足なものと思われず、多くのレンサ球菌抗原に対する抗体を測定することにより判定して行くことが、少なくとも血清学的診断法としては必要なことのように思える。

そこで従来の ASO の測定とともに、菌体代謝物質である DNase-B ならびに NADase に対する抗体を測定し、その血清学的診断における意義を比較検討するとともに、従来わが国ではほとんどなされていない菌体成分に対する抗体をも測定することにより、上記の抗体と併せ若干の検討を試みた。

A 群レンサ球菌には、4 種類の DNase (A, B, C, D) が isoenzyme として同定されており^{20,21)}, Wannamaker ら²²⁾によりその抗原性が検討され、これら 4 種の酵素間に交叉反応性のないことが観察された。特に DNase-B はほとんどすべての A 群レンサ球菌により産生されることが知られており、これに対する抗体を測定することはレンサ球菌感染の診断の上からきわめて重要であるにもかかわらず、その測定の複雑さゆえにルチン化することが困難であった。著者はこの抗体が比較的簡単に測定できる Tiesler ら²³⁾により開発された microplate を使用しての Toluidine-blue O 法によりこの DNase-B に対する抗体を測定した。ADNase-B の正常値に関しては、研究者による測定法の相違ないしは人種差などの問題もあって、必ずしも確定していると思われないが、Ayoub ら²⁴⁾は正常上限を 250 単位としており、Kaplan ら¹⁷⁾は年齢、季節的変動を考慮して 400 単位以上を異常値とした。一方、Klein ら¹⁶⁾は正常学童 (9~15 才) で 170 単位を正常上限値とし、1~4 才で 60 単位、成人で 85 単位をそれぞれ正常上限とした。これらの正

Fig. 6 Distribution of anti PG titers in the sera of healthy children and patients
control : healthy children

AGN : acute glomerulonephritis

SI : streptococcal infection (upper respiratory infection)

RF : acute rheumatic fever

AP : anaphylactoid purpura

MCLS : mucocutaneous lymphnode syndrome

Anti PG titers were measured by passive hemagglutination test using microplate.

Dotted line shows mean value.

Fig. 7 Correlation between ASO titers and anti DNase-B titers in the sera of healthy

children (●), AGN (▲), and RF (□)

In 50 cases healthy children, coefficient correlation shows 0.021.

In 26 cases acute glomerulonephritis (AGN), coefficient correlation shows 0.279.

In 5 cases acute rheumatic fever (RF), coefficient correlation shows 0.512.

常限界は、その集団の上位 20% を限界として採用している。著者の今回の測定では正常上限は 160 単位であり、したがって 200 単位以上を異常値とみなすと健康対照群 54 例中 2 例のみ高値をみたのに対し、急性糸球体腎炎では 26 例中 13 例で 50%, リウマチ熱では 5 例中全例 100% に高値を認め、これらの結果は先の Ayoub ら²⁴⁾の報告と同様の傾向を示している。

ASO と ADNase-B 抗体の相関をみると、健康対照群では ADNase-B 抗体はほとんど低値を示しているにもかかわらず、ASO 値に高いものが認められ、急性糸球体腎炎では両抗体が高いものが 23%, ASO 値が高く ADNase-B 抗体値の低いもの 7.7%, 逆に ADNase-B 抗体値が高く ASO 値の低いもの 27% などの事実が示すように、どちらか一方の抗体の測定だけではレンサ球菌感染の血清学的診断としては不十分であることを示唆していよう。また、リウマチ熱では症例数がきわめて少なく、臨床的に診断された患者血清を無作為に採取しているので詳細な時期や病勢などの経過は不明であるが、全体的な傾向として両抗体がともに高いものが多い。いずれにせよ ADNase-B

Fig. 8 Correlation between ASO titers and anti NADase titers in the sera of healthy children (●), AGN (▲), and RF (□)

In 50 cases healthy children, coefficient correlation shows 0.087.

In 28 cases acute glomerulonephritis (AGN) coefficient correlation shows 0.35.

In 7 cases acute rheumatic fever (RF), coefficient correlation shows 0.23.

抗体は Ayoub らの報告と正常上限設定に若干の相違はあっても、急性糸球体腎炎、リウマチ熱で高い価を示す傾向にあり、Ayoub らの成績と同様であった。

NADase は NAD の nicotineamide-ribose bridge を切断する酵素としてレンサ球菌培養上清から Carlson ら²⁵⁾により同定され、そしてその酵素活性は動物に実験的に作製された抗体により特異的に中和されることが報告²⁶⁾された。さらに同様な抗体がレンサ球菌感染咽頭炎、リウマチ熱患者血清中に存在することが指摘^{26, 27)}された。一般に ANADase 抗体価と ASO 価とは相関すると報告され^{26, 27)}、特に患者の 90% に両抗体の上昇がみられるといわれている。一方、本抗体の正常範囲は 10~100 単位とかなり幅広く存在し、健康者にも 200 単位を超えるものもあることが報告されている。Kellner ら²⁶⁾、Bernhard ら²⁷⁾は正常上限を 100~150 単位とし、また Ayoub および Wannamaker らは 275 単位とした。わが国においてはこれまで本抗体の測定は全然なされておらず、したがって日本人の正常値ないしは正常上限値は明らかでなかった。今回測定した健康血清の正常上限は 100 単

位であり、この基準を踏まえて 150 単位以上を異常値とみなすと、健康 60 例中 1 例のみが 150 単位を示したにすぎず、急性糸球体腎炎では 60% 以上、リウマチ熱では 57% 以上が高い価を示し、またアレルギー性紫斑病でも高い価を示したものが認められた。

本抗体価と ASO 価を比較すると、ADNase-B 抗体の場合と同様に、健康者血清で ASO 価の高い者が認められるが、ANADase 抗体はほとんど正常範囲にあり、この事実は ASO を測定するよりはむしろ ANADase 抗体を測定したほうが、より正確に最近のレンサ球菌感染のあったことを反映し意義がある可能性であろう。急性糸球体腎炎では ASO 価が低くとも ANADase 抗体価の高いものも多く (36%)、また両者ともに高い価を示すものも 25% に認められた。リウマチ熱では 7 例中 4 例が本抗体価が高く、いずれも ASO 価も同時に高い価を示した。アレルギー性紫斑病でも 12 例中 3 例に高値を認め、図には示していないがこれらはいずれも ASO 価が低く、したがってアレルギー性紫斑病が以前からレンサ球菌感染の疑いがいわれている疾患だけに ASO のみの測定だけでは不十分であり、他のレンサ球菌抗原に対する抗体を測定することにより本疾患とレンサ球菌との関連はより深くなるようにも思われる。なお MCLS で 56 例中 3 例に高い価の ANADase 抗体が検出されたが、他の ASO 価、ADNase-B 抗体価はいずれも低く、この抗体の検出のみで MCLS をレンサ球菌感染に基づくものとはしがたい。

以上の結果に示されたように、菌体外代謝物質に対する抗体の測定においては、ASO のみの測定では十分でなく、ADNase-B ないしは ANADase 抗体の測定のみでも不十分であり、これら抗体の少なくとも二つ以上を同時に測定することにより、レンサ球菌の最近の感染を正確に把握しなければならない。また本来、抗体の測定方法としては健康者で低い価を示すもののほうが少なくとも血清学的診断上はより良い。ASO は健康者の中にも高い価を示すものが比較的多いだけに ANADase 抗体や ADNase-B 抗体の測定を同時に実施する必要があると思われる。

菌体成分に対する抗体の測定は今日ルチンな検査法としてはほとんどなされていない。A 群レンサ球菌にあっては、その細胞壁 M 蛋白が型特異性を有し、この抗体を測定すること自体は興味があるが、その菌型は 70 種近くもあり、また M 蛋白抗原の精製の困難さとともにレンサ球菌感染症の血清学的診断用抗原とし

Fig. 9 Correlation between anti NADase titers and anti DNase-B titers in the sera of healthy children (●), AGN (▲), and RF (□)
 In 50 cases healthy children, coefficient correlation shows 0.024.
 In 26 cases acute glomerulonephritis (AGN), coefficient correlation shows 0.189.
 In 5 cases acute rheumatic fever (RF), coefficient correlation shows 0.427.

Fig. 10 Changing patterns in clinical course of anti DNase-B (○), anti NADase (△), anti C-poly (▲), anti PPE (■), and anti PG titers (●), in the sera of acute glomerulonephritis

Fig. 11 Changing patterns in clinical course of anti DNase-B (○), anti NADase (△), anti C-poly (▲), anti PPE (■), and anti PG titers (●), in the sera of MCLS

て、これを用いても患者の起因菌の相違により使用する意味も減少しよう。著者の用いた細胞壁蛋白抗原は、このM蛋白のほかに多くの菌型に共通して存在する M-protein associated protein²⁸⁾を含む。すなわち、12 型菌特異的M蛋白を含む粗標品であるのでこれを抗原としてその抗体を測定してみた。しかし、レンサ球菌の自然感染を受けていることを反映してか、急性糸球体腎炎、レンサ球菌感染上気道炎、アレルギー性紫斑病の数例に高値を示すものを認めた以外は、健常者群と疾患群とでほとんど変わりなく、この粗標品を用いた血清学的反応のみではレンサ球菌感染の診断は難しいように思われる。むしろ群特異性を示す C-poly に対する抗体の測定のほうが、A群レンサ球菌感染を診断する上でその意義は高いと思われる。この抗 C-poly 抗体の正常値に関しては、同じ感作血球凝集反応を用いた諸富の報告¹²⁾があり、学童 (7~12 才) で 1:25~1:37, また Slade ら²⁹⁾は平均値 1:32, Goldstein ら³⁰⁾は 1:64 と報告した。一方、今回の測定では健常対照群での平均値は 1:8 であり、1:32 以上を異常値とすると急性糸球体腎炎、リウマチ熱、上気道炎、アレルギー性紫斑病でそれぞれ異常値を示すものが認められた。一般に菌体代謝物質に対する抗体は感染早期に産生され、経過とともに低下していき、菌体成分に対する抗体はこれよりも遅れて上昇し比較的長く持続するといわれており、抗 C-poly 抗体が各疾患で比較的高い価を示しているのは、恐らく感

染を基盤とした既往反応としての価を反映しているものと思われる。

抗PG 抗体は健常対照群に比し、各疾患群ともに高い価を示し、なかでも MCLS に高い価が示された。しかし PG は多くの細菌に共通して存在している物質だけに、本抗体の測定のみではレンサ球菌感染の指標とはならず、むしろ MCLS が高値を示したことは本疾患がなんらかの細菌感染に基づく可能性を示唆しているのかもしれない。また PG は血清をはじめ組織成分と共通抗原を保持している可能性も否定できず、その意味ではなんらかの自己抗体が産生されている可能性もあろう。

以上の実験で使用した各疾患の血清は、臨床的に診断されたものであっても無作為に抽出した血清を用いており、したがって病期に関係なく分離された血清のために各疾患群ともその価はかなり広い分布を示しているものと思われる。そこで糸球体腎炎患者の一部の血清を用いて、各抗体価の変動を経時的に観察した。

Fig. 10 に示されたごとく、ADNase-B, ANADase の各抗体は比較的病初期に上昇し経過とともに低下していくことが観察された。これらの症例は ASO 価が低い例であり、それゆえレンサ球菌感染の血清学的診断の指標としては ASO 価だけでは不十分であり、ASO 価測定に加えて少なくとも DNase-B ないしは NADase に対する抗体の測定、あるいは両抗体価の同時測定を経時的に実施することが重要であるように思

われる。一方、菌体成分である抗 C-poly 抗体も変動は少ないが、漸減していく傾向にあり、これらの抗体はいずれも病初期にすでに上昇しており、感染後菌体代謝物質に対する抗体よりも遅れて産生されてくるような傾向は認められず諸富の報告¹²⁾と同様な結果を示した。

MCLS の病因に関してはなお不明であり、一部にレンサ球菌感染を基礎とするという考え¹³⁾もある。まず病期に関係なく無作為に抽出した MCLS 患者血清を用い、各レンサ球菌抗原に対する抗体を測定したが、高い価を示すものが認められなかった。そこで本疾患につき各抗体の変動を経時的に追究したが、ASO と同様 ADNase-B, ANADase の各抗体の上昇を認めることができず、わずかに PG に対する抗体価が高い価を示し、本疾患について少なくとも血清学的にはレンサ球菌感染の証拠をつかむことはできなかった。

結 論

1) レンサ球菌菌体外代謝物質である DNase-B および NADase に対する抗体価は、急性糸球体腎炎、リウマチ熱で高値を示した。

2) レンサ球菌菌体成分に対する抗体を検討すると、PPE に対する抗体価は各疾患群と健常対照群との間に有意の差を認めなかった。PG に対する抗体価は MCLS を含む全疾患群で高率に高値を認めた。C-poly に対する抗体価は急性糸球体腎炎、リウマチ熱およびアレルギー性紫斑病で高値を認めた。

3) 各疾患において、ASO と ADNase-B 抗体、ASO と ANADase 抗体の間に相関は認められなかった。

4) 急性糸球体腎炎と MCLS の患児血清で経時的に各種抗体価の変動を検討したが、急性糸球体腎炎では特に ADNase-B, ANADase 抗体が病初期より上昇し、経過とともに低下していく傾向にあった。MCLS ではほとんど変動を認めなかった。

以上の結果はレンサ球菌感染における血清学的診断法としては、ASO, ADNase-B ないしは ANADase 抗体の測定をそれぞれ単独で測定するだけでは不十分であり、これらのうち二つ以上を同時に測定することにより、レンサ球菌の感染を正確に把握することができることを示唆している。

稿を終るに臨み、ADNase-B, ANADase 抗体の測定にあたり各試薬を恵与された Behringwerke-Hoechst 社に感謝

いたします。

本研究にあたり、終始御指導をいただいた 大國寿助教授に深謝するとともに血清採取に御協力いただいた 日本医科大学付属病院小児科学教室員ならびに 川口市民病院小児科各位に感謝します。

なお、本論文の要旨は日本アレルギー学会(昭和 54 年 10 月)、日本小児科学会(昭和 55 年 5 月)において発表した。

文 献

- 1) 山田俊彦：溶血性連鎖球菌の臨床細菌学的研究。防衛医大誌, **3**, 161~171, 1978.
- 2) Bleiweis, A.S., Karakawa, W.W., and Kraus, R.M.: Improve technique for the preparation of streptococcal cell walls. J. Bacteriol., **88**, 1198~1200, 1964.
- 3) Lancefield, R.C., and Perlmann, G.E.: Preparation and properties of type-specific M antigen isolated from group A, type 1 hemolytic streptococcus. J. Exp. Med., **96**, 71~82, 1952.
- 4) Fuller, A.T.: The formamide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci. Br. J. Exp. Pathol., **19**, 130~139, 1938.
- 5) Krause, R.M., and McCarty, M.: Studies on the chemical structure of the streptococcal cell wall. I. The identification of a mucopolysaccharide in the cell walls of group A and A-variant streptococci. J. Exp. Med., **114**, 127~140, 1961.
- 6) Störko, K., and Uhlemann, G.: Laboratory notes for Medical diagnostics. (Nedde, D. ed.), p. 52~64, Behringwerke AG, Marburg, 1976.
- 7) Störko, K., and Uhlemann, G.: Laboratory notes for medical diagnostics. (Nedde, D. ed.), p. 45~52, Behringwerke AG, Marburg, 1976.
- 8) Rantz, L.A., and Randall, E.: A modification of the technique for determination of the antistreptolysin titer. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **59**, 22~25, 1945.
- 9) 松浦美喜雄, 白石聡：マイクロタイター法による ASLO 値測定と定量ラテックス結合反応。臨検, **13**, 33~35, 1969.
- 10) Boyden, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J. Exp. Med., **93**, 107~120, 1951.
- 11) 大國寿士, 中田敷, 木村義民：レンサ球菌 C-多糖体の精製とエステル化多糖体による感作血球凝集反応について。日細菌誌, **24**, 290~295, 1969.
- 12) 諸富武彦：A群レンサ球菌 C-多糖体の抗体測定法の簡易化に関する基礎的検討。リウマチ, **17**, 188~194, 1977.
- 13) Stollerman, G.H., Markowitz, M., Taranta, A., Wannamaker, L.W., and Whittemore, R.: Jones criteria (revised) for guidance in the diagnosis of rheumatic fever. Circulation, **32**, 664~666, 1965.
- 14) 熊谷直秀：溶連菌感染の診断(2)血清学的方法。診療と保険, **14**, 1242~1254, 1972.
- 15) 大國真彦：ASO 値。“正常値と異常値の間”(日野原重明, 河合忠編), p. 255~260, 中外医学社, 東京, 1980.

- 16) Klein, G.C., Baker, C.N., and Jones, W.L. : "Upper limits of normal" antistreptolysin O and antideoxyribonuclease B titers. *Appl. Microbiol.*, **21**, 999~1001, 1971.
- 17) Kaplan, E.L., and Franklin, H.R. : Diagnosis of streptococcal pharyngitis, differentiation of active infection from the carrier state in the symptomatic child. *J. Infect. Dis.*, **123**, 490~501, 1971.
- 18) 杉田暉道, 津田忠美 : 統計学入門. p. 25~55, 医学書院, 東京, 1977.
- 19) 上野忠彦, 松見富士夫 : 川崎病と猩紅熱の本態について. *小児臨*, **31**, 747~759, 1978.
- 20) Wannamaker, L.W. : The differentiation of three distinct desoxyribonucleases of group A streptococci. *J. Exp. Med.*, **107**, 797~812, 1958.
- 21) Wannamaker, L.W., Hayes, B., and Yasmineh, W. : Streptococcal nucleases. II. Characterization of DNase D. *J. Exp. Med.*, **126**, 497~508, 1967.
- 22) Wannamaker, L.W., and Yasmineh, W. : Streptococcal nucleases. I. Further studies on the A, B, and C enzymes. *J. Exp. Med.*, **126**, 475~496, 1967.
- 23) Tiesler, E., and Merklen, K. : Die initialen phasen einer Infektion mit β -hämolisierenden Streptokokken der Gruppe A beim Kaninchen unter besonderer Berücksichtigung der Streptodornase und Anti streptodornase. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 1, Abt. Orig. **A 226**, 48~54, 1974.
- 24) Ayoub, E.M., and Wannamaker, L.W. : Evaluation of the streptococcal desoxyribonuclease B and diphosphopyridine nucleotidase antibody test in acute rheumatic fever and acute glomerulonephritis. *Pediatrics*, **29**, 527~538, 1962.
- 25) Carlson, A.S., Kellner, A., Bernheimer, A.W., and Freekman, E.B. : A streptococcal enzyme that acts specifically upon diphosphopyridine nucleotide; Characterization of the enzyme and its separation from streptolysin O. *J. Exp. Med.*, **106**, 15~26, 1957.
- 26) Kellner, A., Freekman, E.B., and Carlson, A.S. : Neutralizing antibodies to streptococcal diphosphopyridine nucleotidase in the serum of experimental animals and human beings. *J. Exp. Med.*, **108**, 299~309, 1958.
- 27) Bernhard, G.C., and Stollerman, G.H. : Serum inhibition of streptococcal diphosphopyridine nucleotidase in uncomplicated streptococcal pharyngitis and in rheumatic fever. *J. Clin. Invest.*, **38**, 1942~1949, 1959.
- 28) Widdowson, J.P., and Pinney, A.M. : An m-associated protein antigen (MAP) of group A streptococci. *J. Hyg. (Lond.)*, **69**, 553~564, 1971.
- 29) Slade, H.D., and Hammerling, U. : Detection by hemagglutination of antibodies to Group A and Group E streptococci by the use of O-stearoyl derivatives of their cell wall carbohydrate-grouping antigens. *J. Bacteriol.*, **95**, 1572~1579, 1968.
- 30) Goldstein, I., and Caravno, R. : Determination of anti group A streptococcal polysaccharide antibodies in human sera by an hemagglutination technique. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **124**, 1209~1212, 1967.
- 31) 四宮敬介 : 「診断のてびき」について. *小児内科*, **13**, 323~327, 1981.

(受付 1982 年 1 月 13 日)