血小板活性化因子とライム病

磯貝恵美子¹・木村 浩²・磯貝 浩³

¹北海道医療大学歯学部口腔衛生学教室 〒061-02 北海道石狩市当別1757
²札幌医科大学²微生物学教室, ³動物実験施設 〒060 北海道札幌市中央区南1西17

〔受理: 1996年4月21日〕

血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) は炎症や血栓などの病態に関与するメディエーターである。ライム病のマウス疾患モデルで PAF 拮抗剤は皮膚病変の形成を抑制した。PAF によって媒介される産生細胞と標的細胞間の反応機構を解析する目的で、好中球と血小板ならびに血管内皮細胞と好中球の細胞間反応を調べた。この結果から、ライム病と PAF との関係について述べてみたい。

1. はじめに

ライム病は世界各地に見られるマダニ媒介性の *Borrelia* 感染症である (2, 3)。病原体の発見当時は *Borrelia burgdorferi* の一菌種のみとされていた。現在では遺伝的、抗原的に多様性に富むことが知られており、新しい菌種が追加されている。このうち、人における疾病との関連が明らかな主要菌種は *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* および *B. afzelii* である。世界のライム病分布を見ると、北米、ヨーロッパ、アジアではそれぞれライム病病原体の菌種や菌株の性状が異なり、それを媒介するマダニの種類も異なってい

る。菌種や菌のもつ性状の違いは遊走性紅斑 (erythema migrans, EM) の出現率や後期ライム病の主要症状が異なることに関連していると考えられてきた (表1)。

2. 紅 斑

紅斑は、乳頭下静脈網や乳頭部の毛細血管の可逆的な拡張による血流量の増大によって起こる。紅斑を起こす疾患には極めて多くのものがあり、皮膚疾患の大部分を占める炎症性皮膚病変は多少とも紅斑を伴う。風疹や伝染性紅斑などのウイルス性疾患や猩紅熱や肺炎マイコプラズマなどの細菌性疾患の皮疹は鑑別診断の重要な鍵性状となっている。また、ペーチェット病、スウィート病などでも特徴的な皮疹が現れる。しかし、その発生病序はほとんどわかっていない。環状紅斑はライム病にかぎらず、リウマチ熱、シェーグレン症候群、亜急性皮膚エリテマトーデスなどの自己免疫様疾患でも観察される。様々な説はあるものの環状紅斑の機序は不明であり、多様性に富む理由も明らかにされていない。

環状紅斑のひとつである EM はマダニ刺傷によって皮膚内に侵入したライム病ボレリアによって引き起こされる紅斑である。出現時期はマダニ刺傷後、3日から4ヶ月後であり、通常は1週間目前後とされる。出現頻度は北米で50-80%と高く、ヨーロッパやアジアでは50%以下 (地域によっては10%前後) である。臨床所見としてははじめ均一な小紅斑であるが、次第に遠心性に

Emiko ISOGAI¹, Koichi KIMURA² and Hiroshi ISOGAI³
Platelet Activating Factor (PAF) and Lyme Disease

¹ Dept. of Preventive Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Ishikari-Tobetsu 1757, Hokkaido 061-02

² Dept. of Microbiology, Sapporo Medical University, Minami-1 Nishi-17, Chuo-ku, Sapporo 060

³ Animal Experimentation Center, Sapporo Medical University, Minami-1 Nishi-17, Chuo-ku, Sapporo 060

表 1. ライム病ボレリアの主要菌種と関連症状

菌種／菌株	分離地域	EM との 関連性	注目される 後期症状	C3H/HeN 形成率	マウスでの 形成度	皮膚病 変形態
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto B31	北米	＋（高）	関節炎	10/10	3.3±1.2	大円形
<i>B. afzelii</i> ACA-1	ヨーロッパ	＋	慢性肢端性 皮膚炎	10/10	0.9±0.2	不整形 散在性
<i>B. afzelii</i> BFOX	日本	＋	神経症状	10/10	0.6±0.3	不整形 散在性
<i>B. garinii</i> TN	ヨーロッパ	＋	神経症状	10/10	2.3±0.7	不整形
<i>B. garinii</i> SIKa2	日本	＋	神経症状	10/10	1.6±1.0	不整形
<i>B. japonica</i> O612	日本	－		10/10	0.1±0.1	微小円形

ライム病ボレリアは継代10代以下のものを使用し、病原性に関連する OspA/OspB および OspC の発現があることを確認している。皮膚病変の形成度は最大直径×最小直径（cm）で表した。

拡大する環状紅斑として数十 cm におよぶこともある。この環状紅斑はライム病の EM の約80%をしめる。そのほか、均一型の EM や出血性 EM など存在する。さらに、後期ライム病では多発性 EM が北米で25-50%の患者に、ヨーロッパで4-8%の患者にそれぞれ認められる。組織学的所見としては血管周囲性に様々の炎症性細胞が出現する。それらは主にリンパ球、組織球、抗酸球、形質細胞であり、好中球の浸潤はあまりないと言われている。

日本において、ライムボレリアの暴露を受けた野生動物の皮膚病変を調べてみると、これまで報告されている人の病変といくつかの点で違いがでてくる（11, 13）。ひとつは出血性の病変がほとんどであること、好中球の浸潤が頻繁に見られることである。リザーバーであるエゾアカネズミのみならず、エゾシカやキタキツネでも互いに共通の病理組織像を呈している。ここで推定できることは第一に菌種の違いが EM の出現率や病変形成のしかたに影響を与えているのではないかと、第二に凝固線溶系をその病因論の中で考えるべきだろうということである。

3. 実験動物における皮膚病変

1) 初期病変

皮膚病変はライム病ボレリアを接種されたすべてのマウスで感染7日目に観察した（12）。初期

病変は野生動物で見られる病変とよく似ていたが、皮膚病変形成度や形態は接種された菌種／菌株の違いを反映していた（表1）。すなわち、*B. burgdorferi* sensu stricto は接種部位を中心とした円形の大きな出血性の皮膚病変を形成するのに対して、*B. garinii* や *B. afzelii* は不整形ないし散在性の皮膚病変を形成した。*B. japonica* 接種マウスでは皮膚病変は微小であった。

C3H/HeN マウスは BALB/c マウスに比べてライム病ボレリアによく感染する。この2系統のマウスの皮膚病変を比較してみると、有意に皮膚病変の形成度は C3H/HeN マウスのほうが重度であった。たとえば、*B. burgdorferi* sensu stricto B31 を接種された C3H/HeN マウスの皮膚病変形成度は3.3±1.2であったが、同菌を接種された BALB/c マウスでは0.88±0.03であった。これらの結果は EM の出現率が世界の国々で異なる理由に菌種／菌株の違いが関連していること、および宿主側の感受性が問題となることを示している。

病理組織像から初期の皮膚病変に凝固線溶系の活性化が疑われた。そこで、病変形成に PAF が関与するかどうかを PAF 拮抗剤である CV3988 を用いて調べた（12）。

PAF 拮抗剤投与マウスでは非投与マウスと比較した時、皮膚病変の形成度は 1/10 以下となった。どちらのマウスからも接種菌は回収できた。

2) 後期病変

後期病変の観察は菌接種後45日目に行った。ここでの特徴は2つに大別される。ひとつは接種部位およびその近傍に小肉芽腫が形成されることであり、他ひとつは末端部（とくに耳介）に二次性紅斑が出現することである。前者は遅発型過敏反応（DTHR）が経日的に増加し、接種した菌が分離されることから、持続感染に伴う細胞性免疫応答が病変形成に関与していると考えた（10）。同様のDTHRはライム病ボレリアの菌体抗原でも誘導された。同抗原で感作されたマウスのリンパ節由来のリンパ球を移入すると、そのマウスでもDTHRが再現された。さらに、あらかじめ移入リンパ球をThy-1.2, CD4, I-Aに対する単クローン抗体で処理するとDTHRは認められなかった。したがって、マウスでのDTHRにはCD4陽性のT cellが重要であることがわかった。後期皮膚病変の肉芽腫形成にもこのタイプのT cellが関与していると思われる。

二次性紅斑は*B. afzelii*接種マウスの50%に出現した。一方、*B. garinii*や*B. burgdorferi sensu stricto*接種マウスではほとんど認められなかった。このことは、*B. afzelii*が慢性肢端性皮膚炎の患者からよく分離されることに関係するのかもしれない。いいかえれば、菌種／菌株によって組織親和性が異なり、それが慢性持続感染時の標的

臓器を決定するのだろう。さらに、各々菌種の温度感受性を調べてみると*B. afzelii*は最も感受性が高く、四肢末端の低温部で生存しやすいと言える。

後期病変形成におけるPAFの関与は不明である。肺炎ではPAFが検出されるのに対し、肺結核などではPAFは検出されないことを考えると慢性期の病変形成への関与はうすいのかかもしれない。

4. PAF

PAFは炎症、エンドトキシンショック、アレルギー、血栓症などの病態に関与するケミカルメディエーターとして知られている（9）。化学構造は1-アルキル-2-アセチル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリンと同定されており、エーテル型リン脂質に分類される。その生理活性は血小板活性化だけでなく、好中球活性化、血管透過性亢進など多彩な作用を有している。PAFの産生細胞は好中球、血管内皮細胞、単球、マクロファージ、肥満細胞、好塩基球などであり、標的細胞としては血小板、好中球、平滑筋細胞、血管内皮細胞、単球、マクロファージ、神経細胞などがある。PAFのもつ生理活性は様々な産生細胞-標的細胞間の組合わせで初期炎症病変の形成に深く関与すると考えられる。

図1. ライム病ボレリアによる好中球由来 PAF を介した血小板凝集

5. ライム病ボレリアによる PAF を介した血小板活性化

レンサ球菌やブドウ球菌のようなある種の細菌は血小板に結合し、この相互作用が感染成立を助長させると考えられている。ライム病ボレリアはヒトやネズミの血小板に結合し、菌の全身拡散に関与することが示唆されてきた (5, 8) ヒト血小板への結合は活性化した血小板においてのみ観察される。血小板上の結合部位は α IIb β 3 であることは、(A) この分子が活性化した血小板においてはじめて発現すること、(B) anti- α IIb β 3 抗体で結合阻止が見られること、(C) 精製した α IIb β 3 に結合することから明らかである。ライム病ボレリアが活性化した血小板に結合することは他の臓器組織への拡散に寄与すると考えられている。それでは、ライム病ボレリア自身は血小板活性化にどの様に関与するのだろうか。

ライム病ボレリアは *in vitro* においてヒトの血小板に結合せず、直接的な活性化はしない。すなわち、血小板の活性化は宿主の炎症反応に依存したものと考えられる。初期皮膚病変が PAF 拮抗剤で抑制されることから、血小板活性化の第一候補に PAF を考えた。そこで、PAF 産生が最も強いと言われる好中球の活性化がライム病ボレリアで誘導されるかどうかを調べた (12)。好中球と血小板を共培養した系にライム病ボレリアを加えると血小板は凝集した (図 1)。この凝集は PAF 拮抗剤で阻止された。また、菌体で刺激を受けた好中球の遠心上清を加えても凝集が起こらないことから、細胞結合性 PAF として初期反応をスタートさせたものと考えた (図 2)。PAF の作用は極微量 10^{-10} M もしくはそれ以下で認められる。それゆえ、その制御系は厳密にコントロールされている。PAF アセチルヒドラーゼは血清中に存在する酵素であり、活性型 PAF を不活性型 lyso-PAF にすみやかに変換する (15)。PAF 産生は活性酸素の産生と密接に結びついているだけでなく、活性酸素は PAF アセチルヒドラーゼを不活化する (1)。ライム病における EM では PAF や活性酸素が初期の炎症病変を作ることが示唆される。

図 2. ライム病ボレリアによって刺激を受けた好中球による血小板活性化と活性化血小板へのライム病ボレリアの付着

6. 血管内皮細胞と好中球との相互作用における PAF の役割

流血中の白血球は正常状態では血管内皮に接着することはないが、感染や組織障害時にはその炎症部位で血管内皮に接着する。この反応の過程には様々の炎症性メディエーターやサイトカインの関与が明らかになっている。白血球および血管内皮細胞それぞれに発現する接着分子は絶妙にコントロールされていることが解明されてきた。たとえば、IL-1 β や TNF- α で刺激された血管内皮細胞は PAF を産生し、これによって好中球は活性化し、数分以内にその表面に CD11b/CD18 を発現する。さらに、CD11a/CD18 は好中球の活性化により質的変化を受け、機能が增強するとされている。これらの白血球インテグリンのリガンドである ICAM-1 は静止期の内皮にはほとんど発現していないが種々の刺激によって発現増強をき

図3. 炎症部位における PAF 産生と細胞間相互作用

たす。ICAM-2 は静止期の内皮にも ICAM-1 の 10倍以上が発現している。

ライム病ボレリアが血管内皮に付着し、内皮細胞層を貫通して全身に広がることが示唆されてきた (6, 14)。内皮への付着は特異的であり、菌体表層物質に付着分子が含まれている (14)。我々は血管内皮がライム病ボレリアの付着、侵入のターゲット細胞であるだけでなく、PAF 産生を含めた炎症細胞として機能することに興味をもった。血管内皮細胞をライム病ボレリアで刺激すると、PAF が産生され好中球の血管内皮への接着は増強した。このことは PAF 拮抗剤を加えると接着抑制がかかることから明らかである。内皮への接着は好中球だけでなく血小板でも同様に認められた。図3にライム病ボレリア感染に伴う細胞間相互作用を示した。

7. PAF カスケード

図4にライム病ボレリア感染時の PAF カスケードの仮説を示した。PAF はライム病における炎症性メディエーターのひとつとして重要な役割を担っている。ライム病ボレリアには内毒素様活性をもつ分子として OspA, OspB, OspC などが報告されており、これらは好中球や血管内皮細胞に作用し PAF の産生をうながすと考えられる。PAF 産生に前後して起こるサイトカイン、活性酸素、エイコサノイドなども PAF カスケードにおいて重要である。たとえば、PAF は IL-1 や TNF の産生を増強するし、IL-1 や TNF は PAF 産生を誘導する。実際、ライム病ボレリア感染時

には炎症性サイトカインが産生される (4, 7)。我々のマウスモデルでも炎症性サイトカインは高レベルで検出されている。さらに、PAF は凝固線容系を活性化する。この際、組織型のプラスミノゲン活性化因子の放出が増大する。ライム病ボレリアはこのプラスミノゲン活性化因子に付着し、これらと複合体を作る。この過程でプラスミン (フィブリン溶解プロテアーゼ) が生成される。組織侵入性をもつ一般的な病原細菌がトリプシン様プロテアーゼやコラゲナーゼを介して組織侵入を果たすのに対して、ライム病ボレリアは宿主の酵素を利用している。以上のように、感染初期の炎症反応はそれに引き続く、ライム病ボレリアの全身拡散にも影響を与える可能性がある。

8. マダニの唾液による血小板凝集の抑制

マダニは吸血に伴い、様々な生理活性物質を唾液腺から分泌する。産生される物質の質的量的変化はめまぐるしく変わるだけでなく、未同定の物質もあると考えられる。マダニ唾液は血小板凝集抑制作用を有する。我々は日本産シュルツェマダニの唾液がコラーゲンあるいは ADP で誘導されるヒト血小板の凝集を抑制することを示してきた。このことはマダニ刺傷の中心部は炎症性紅斑を示していないことに関係するのかもしれない。この反応抑制物質のひとつにマダニ由来のプロスタサイクリンが知られている。しかし、EM は多様性を示し、遠心性に拡大すること、出現が同一地域でも個人で異なることなどから別の物質も存在する可能性があった。我々は反応抑制物質が他

図4. PAF を中心とした初期炎症病変成立の可能性

に存在しないかどうかを調べた。なぜなら、しばしば、生物の毒化に細菌が関与するからである。マダニ中腸内細菌にはある種の *Pseudomonas* 類縁菌(この細菌は属レベルで大幅に変更している)が存在し、これはサイトトキシン活性をもっていた。菌体もしくは培養上清はマダニの唾液と似た挙動で血小板凝集を抑制した。ライム病ボレリアと宿主の炎症応答以外にこうした第3、第4の因子が存在することも忘れてはならない。

9. お わ り に

以上のようにライム病ボレリア感染において、その病因論には種々の要素が複雑にからみあっていると見える。PAF は特に初期皮膚病変の形成に重要であろう。野生動物における皮膚病変が出血を主体にするのに対し、ヒトでは紅斑であることも凝固線溶系—もしくはプラスミノーゲンの活

性化が速く進めば前者、遅ければ後者ということもできる。EM だけでなく皮膚症状は多くの病気の臨床診断にいかされているが、そのメカニズムを知ることは貴重な情報を与えてくれるものと思われる。

文 献

- 1) Ambrosio, G., Oriente, A., Napoli, C., Palumbo, G., Chiariello, P., Marone, G., Condorelli, M., Chiariello, M., Triggiani, M. (1994): Oxygen radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolizes platelet activating factor. *J. Clin. Invest.* **93**, 2408-2416.
- 2) Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assous, M., Grimont, P.A. (1992): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 378-383.

- 3) Barbour, A.G. (1984): Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* **57**, 521-525.
- 4) Beck, G.L., Benach, J., Habicht, G.S. (1989): Isolation of interleukin 1 from joint fluids of patients with Lyme disease. *J. Rheumatol.* **16**, 800-806.
- 5) Coburn, J., Barthold, S.W., Erban, J.M. (1993): Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ mediates binding of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* to human platelets. *Proc. Soc. Acad. Sci. USA* **90**, 7059-7063.
- 6) Comstock, L.E., Thomas, D.D. (1989): Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **57**, 1626-1628.
- 7) Defosse, D.L., Johnson, R.C. (1992): In vitro and in vivo induction of tumor necrosis factor alpha by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **60**, 1109-1113.
- 8) Galbe, J.L., Guy, E., Zapatero, J.M., Peerschke, E.I., Benach, J.L. (1993): Vascular clearance of *Borrelia burgdorferi* in rats. *Microbe. Pathogen.* **14**, 187-201.
- 9) Hanahan, D.J. (1986): Platelet activating factor : a biologically active phosphoglyceride. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 483-509.
- 10) Ishii, N., Isogai, E., Isogai, H., Kimura, K., Nishikawa, T., Fujii, N., Nakajima, H. (1995): T cell response to *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia japonica* in various congenic mouse strains. *Microbiol. Immunol.* **39**, 929-935.
- 11) Isogai, E., Isogai, H., Kawabata, H., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., Kimura, K., Sakai, T., Azuma, Y., Fujii, N., Ohno, S. (1994): Lyme disease spirochetes in a wild fox (*Vulpes vulpes schrencki*) and ticks. *J. Wildl. Dis.* **30**, 439-444.
- 12) Isogai, E., Kimura, K., Fujii, N., Nishikawa, T., Ishii, N., Postic, D., Baranton, G., Isogai, H. (1996): Platelet-activating-factor-mediated pathogenesis in Lyme disease. *Infect. Immun.* **64**, 1026-1029.
- 13) Kimura, K., Isogai, E., Isogai, H., Kamewaka, Y., Nishikawa, T., Ishii, N., Fujii, N. (1995): Detection of Lyme disease spirochetes in the skin of naturally infected wild sika deer (*Cervus nippon yezoensis*) by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1641-1642.
- 14) Shoberg, R.J., Thomas, D.D. (1993): Specific adherence of *Borrelia burgdorferi* extracellular vesicles to human endothelial cells in culture. *Infect. Immun.* **61**, 3892-3900.
- 15) Wardlow, M.L., Cox, C.P., Meng, K.E., Green, D.E., Farr, R.S. (1986): Substrate specificity and partial characterization of the PAF-acetylhydrolase in human serum that rapidly inactivates platelet-activating factor. *J. Immunol.* **136**, 3441-3446.