

病巣感染症における扁桃細菌叢の検討

野澤 はやぶさ 高原 幹 原 淵 保 明

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

Investigation of The Bacterial Flora in Tonsil from Patients with Focal Tonsillar Infection

Hayabusa NOZAWA, Miki TAKAHARA, Yasuaki HARABUCHI

Asahikawa Medical College, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery

There were only few studies on the bacteriology of tonsils in patients with focal tonsillar infection. The purpose of this study was to clear the bacteriology of tonsils in patients with pustulosis palmaris et plantaris (PPP), and IgA nephropathy. To clear the relation between immunological profiles and tonsillar bacteriology, we also examined the subsets of tonsillar lymphocytes with flow-cytometry. The surface culture swab and culture of tonsillar core of 82 patients undergoing tonsillectomy were studied.

The results of surface and core culture revealed that there were not differences in bacteriology between patients with PPP and without PPP. In patients with IgA nephropathy, the tonsil core culture showed a high incidence of *Haemophilus (H. parainfluenzae)* and *Neisseria spp.* In tonsillar lymphocytes from patients with PPP, significantly increased proportions of CD4⁺CD45RO⁺ cells, CD4⁺CD25⁺ cells and CD4⁺CD29⁺ cells were found compared to those in control samples (p<0.05, each). Otherwise, in patients with IgA nephropathy, only the proportion of CD4⁺CD29⁺ cells was significantly higher than that in the control samples (p<0.05). Moreover, in IgA nephropathy, the rate of CD4⁺CD45RO⁺ cells was lower in tonsils from which *H. parainfluenzae* was isolated than those from which *H. parainfluenzae* was not isolated. There are differences in tonsillar bacteriology and immunological profiles between patients with PPP and IgA nephropathy, and which may associate with differences in pathogenesis of these two focal tonsillar infections.

はじめに

扁桃病巣感染症は口蓋扁桃にある慢性炎症が原因となり遠隔の諸臓器に障害をもたらす病態として知られているが、その免疫学的な詳細は

未だに明らかではない。近年本疾患の発症に口腔常在菌に対する扁桃での過剰免疫反応が示唆されており、掌蹠膿疱症では α 溶連菌が、IgA腎症においてはパラインフルエンザ菌がそれぞれ

れ注目されている。一方、病巣感染症扁桃の組織学的特徴として、掌蹠膿疱症ではB細胞領域の萎縮を伴うT細胞領域の拡大が、IgA腎症ではB細胞領域の萎縮を伴わないT細胞領域の拡大が報告されており^{1,2)}、各疾患において免疫担当細胞の役割や活性化の違いが存在するものと思われる。しかしながらこれまでに扁桃病巣感染症に特異的に検出されるとされる細菌の有無や、外来抗原によりもたらされる宿主側の免疫応答に関しては未だに十分な解明がなされていないのが現状である。

今回我々はこれらの病巣扁桃における術前の扁桃表面、および摘出された扁桃深部から細菌検査を施行するとともに、摘出扁桃より分離した扁桃リンパ球を用いフローサイトメトリーにて

よりその免疫学的プロフィールを検討した。

対象と方法

対象は1999年から2001年7月までに、当科にて口蓋扁桃摘出術を行った症例であり、扁桃表面における細菌検査が施行できた症例が82名、深部では75名である。その疾患の内訳として、掌蹠膿疱症、IgA腎症、乾癬、アレルギー性紫斑病などの扁桃病巣感染症と対照疾患群として習慣性扁桃炎、睡眠時無呼吸症がもちいられた (Table 1)。方法としてはシードスワブ2号 (高研) を用いて、術前の非炎症時に扁桃表面陰窩から、術後に摘出扁桃を切開し深部実質から細菌検査を施行した。その後、当院の細菌検査室にて培養、同定を行った。さらに各種免疫担当細胞の検討では術後得られた扁桃組織から比重遠心法により扁桃単核球を分離した後、抗ヒトCD4抗体、CD45RO抗体、CD45RA抗体、CD29抗体、CD25抗体、CD20抗体をもちいた2カラーフローサイトメトリーを施行した。

Table 1 Subjects in this study

部 位	表面陰窩	扁桃実質
症例数	82	75
掌蹠膿疱症	34	28
IgA腎症	11	18
尋常性乾癬	1	12
アレルギー性紫斑病	4	1
その他の病巣感染	5	2
習慣性扁桃炎	23	23
睡眠時無呼吸症候群	4	10
男性：女性	32：50	34：41
年齢(中央値)	16~74 (38)	16~74 (39.5)

結 果

口蓋扁桃表面からの検出菌の結果を示した (Fig. 1)。全体として289菌株、22菌種が検出

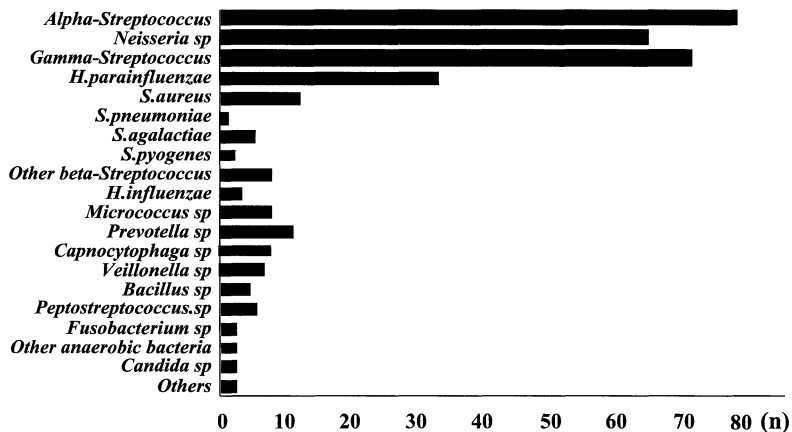


Fig. 1 Bacteriology of the tonsil surface culture in 82 patients undergoing tonsillectomy. In many cases, *α-streptococcus*, *Neisseria sp* and *γ-streptococcus* were commonly isolated in the tonsil surface. Tonsil surface culture revealed only normal respiratory flora.

された。常在菌として知られる α 溶連菌, ナイセリア菌, γ 溶連菌, パラインフルエンザ菌はそれぞれ高率に検出され, 次に黄色ブドウ球菌, γ 溶連菌, インフルエンザ菌などが検出された。またプレボテラ属を始めとする嫌気性菌は全体の 21% に検出された。次に, 口蓋扁桃実質深部からの検出菌の結果を示した (Fig. 2)。全体として 254 菌株, 21 菌種が検出された。検出菌の頻度は口蓋扁桃表面と同様に常在菌とし

て知られる α 溶連菌, ナイセリア菌, γ 溶連菌はそれぞれ高率に検出される結果であった。また嫌気性菌の検出率は扁桃表面よりその頻度は高く全体の 30% に検出された。さらに症例を掌蹠膿疱症, 習慣性扁桃炎, 睡眠時無呼吸症候群の 3 群に分け, それぞれの細菌の検出率を比較したところ, 各疾患群間にて有為に検出率が高い細菌は認められなかった (Fig. 3)。IgA 腎症に関しても習慣性扁桃炎, 睡眠時無呼吸症

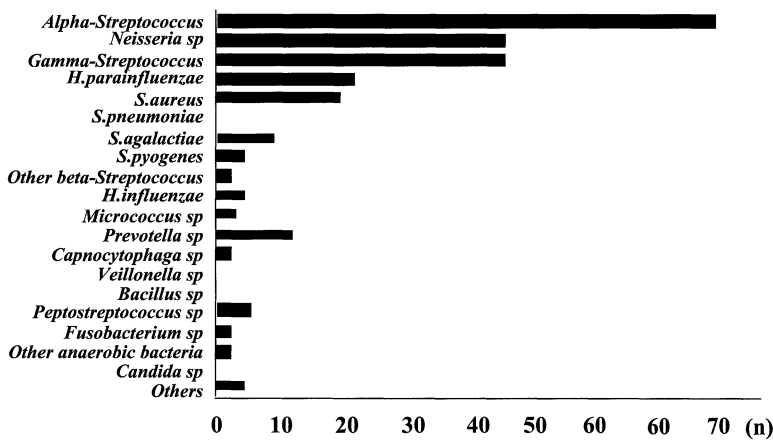


Fig. 2 Bacteriology of the tonsil core culture in 75 patients undergoing tonsillectomy. In many cases, α -streptococcus, *Neisseria sp* and γ -streptococcus were found in the tonsil core, which was similar to the results of tonsil surface culture. Comparing tonsil surface and core culture, we found anaerobic bacteria, such as *prevotella sp*, more frequently in tonsil core.

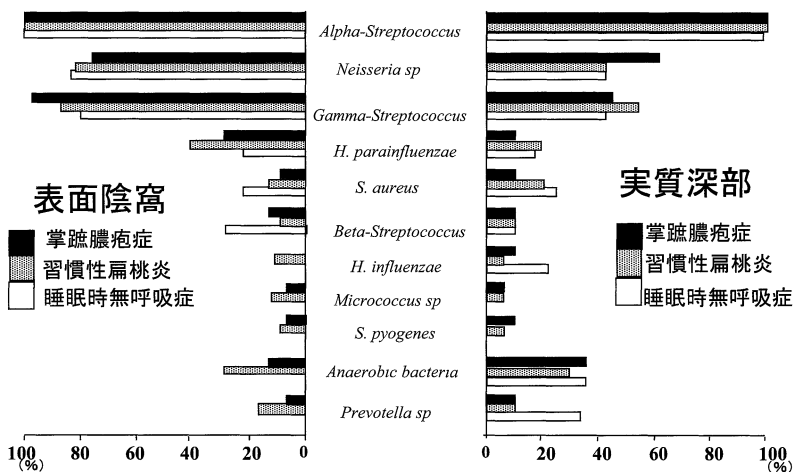


Fig. 3 Bacteriology of the tonsil surface and core culture in patients with pustulosis palmaris et plantaris (PPP), recurrent tonsillitis (RT) and sleep apnea syndrome (SAS). No specific bacteria were detected in tonsil patients with PPP.

候群を対照としてその細菌の検出率を比較した (Fig. 4). IgA腎症ではナイセリア菌, パラインフルエンザ菌の検出率が他の2疾患に比べ有意に高かった (いずれも $p < 0.05$).

各免疫担当細胞の発現率を掌蹠膿疱症と睡眠時無呼吸症候群で比較検討したものを示した (Fig. 5). 掌蹠膿疱症では CD4 陽性 CD45RO

陽性細胞, CD4 陽性 CD25 陽性細胞, CD4 陽性 CD29 陽性細胞の割合は睡眠時無呼吸症候群に比べて有意に高かった (いずれも $p < 0.05$). IgA腎症においても各免疫担当細胞の発現率を睡眠時無呼吸症候群と比較検討したものを示した (Fig. 6). その結果として IgA腎症では CD4 陽性 CD29 陽性リンパ球の発現が有意に

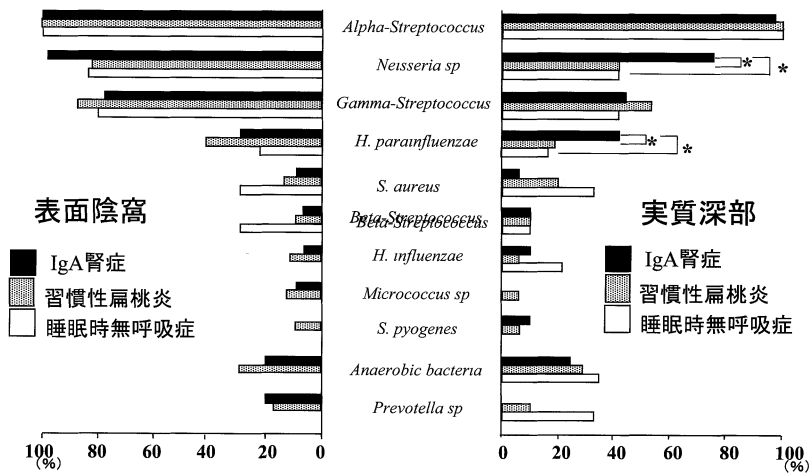


Fig. 4 Bacteriology of the tonsil surface and core culture in patients with IgA nephropathy, recurrent tonsillitis (RT) and sleep apnea syndrome (SAS). In tonsil core culture, *H. parainfluenzae* and *Neisseria sp* were more frequently isolated in patients with IgA nephropathy than those with RT and SAS (*: $p < 0.05$).

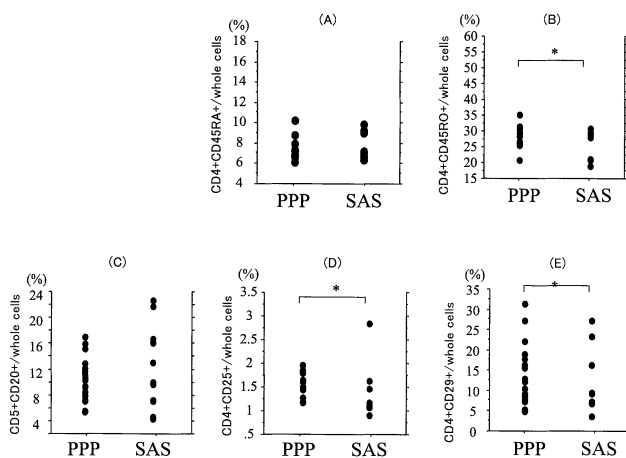


Fig. 5 Flow-cytometric analysis of tonsillar lymphocytes in patients with pustulosis palmaris et plantaris (PPP). Percentage of CD4⁺CD45RO⁺ cells (A), CD4⁺CD45RA⁺ cells (B), CD5⁺CD20⁺ cells (C), CD4⁺CD25⁺ cells (D), and CD4⁺CD29⁺ cells (E) for whole tonsillar lymphocytes were shown. The percentage of CD4⁺CD45RO⁺ cells, CD4⁺CD29⁺ cells and CD4⁺CD25⁺ cells in patients with PPP were higher than those in patients with sleep apnea syndrome (SAS) (*: $p < 0.05$).

高かった ($p < 0.05$). さらに IgA 腎症の細菌叢の検討においてパラインフルエンザ菌の検出率が高かったことに注目して, IgA 腎症群で本菌が検出された群と検出されなかった群とで免疫担当細胞の発現を比較した (Fig. 7). IgA 腎症と睡眠時無呼吸症候群を比較した結果と同

様に CD4 陽性 CD29 陽性細胞の発現はパラインフルエンザ菌が検出された群にて有意に高い結果であった ($p < 0.05$). また CD4 陽性 CD45RO 陽性細胞であるメモリー T 細胞はパラインフルエンザ菌検出群で有意に低い結果であった ($p < 0.05$).

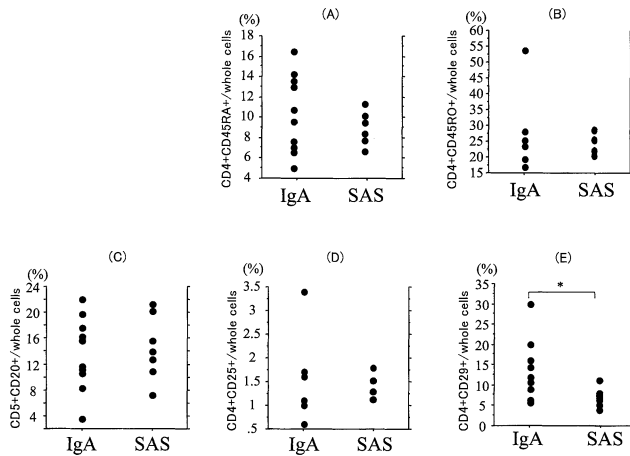


Fig. 6 Flow-cytometric analysis of tonsillar lymphocytes in patients with IgA nephropathy (IgA). Percentage of CD4⁺CD45RO⁺ cells (A), CD4⁺CD45RA⁺ cells (B), CD5⁺CD20⁺ cells (C), CD4⁺CD25⁺ cells (D), and CD4⁺CD29⁺ cells (E) for whole tonsillar lymphocytes were shown. The percentage of CD4⁺CD29⁺ cells in patients with IgA nephropathy was higher than those in patients with sleep apnea syndrome (SAS) (*: $p < 0.05$).

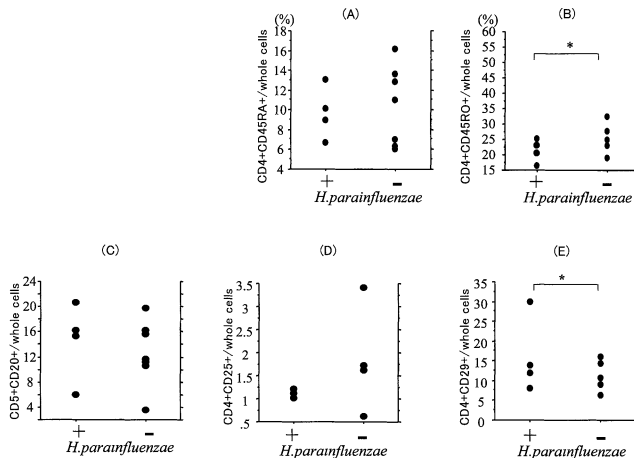


Fig. 7 Flow-cytometric analysis of tonsillar lymphocytes from IgA nephropathy patients with and without isolation of *Haemophilus (H). parainfluenzae*. Percentage of CD4⁺CD45RO⁺ cells (A), CD4⁺CD45RA⁺ cells (B), CD5⁺CD20⁺ cells (C), CD4⁺CD25⁺ cells (D), and CD4⁺CD29⁺ cells (E) for whole tonsillar lymphocytes were shown. The percentage of CD4⁺CD45RO⁺ cells in patients with isolation of *H. parainfluenzae* was lower than those without isolation of *H. parainfluenzae* (*: $p < 0.05$). The percentage of CD4⁺CD29⁺ cells in patients with isolation of *H. parainfluenzae* was higher than those without isolation of *H. parainfluenzae* (*: $p < 0.05$).

考 察

掌蹠膿疱症の扁桃における検出菌を検討した報告はいくつかあるが、本症に特異的な病原菌の存在は今のところ否定されている。しかしながら掌蹠膿疱症患者における扁桃摘出後皮疹改善群では α 溶連菌群、とくに *Streptococcus* (*S.*) *sanguis*, *S. salivarius* および *S. mitis* の検出率が、習慣性扁桃炎患者に比較して有意に高かったとの報告もありこれらの口腔内常在細菌の関与が示唆されている³⁾。今回の検討においても掌蹠膿疱症に特異的に検出される細菌は扁桃表面および深部のどちらにおいても見いだされなかった。また α 溶連菌は掌蹠膿疱症、対照疾患群ともに高率に検出されており、これらの結果から本疾患の発症機序として特定の病原性をもつ細菌による感染症というよりもむしろ、宿主側の免疫反応に起因した自己免疫疾患としての側面をつよく持ち合わせていることが予想される。実際に口腔常在菌である前述の α 溶連菌抗原存在下で扁桃リンパ球を培養すると掌蹠膿疱症患者由来扁桃リンパ球では活性化反応がみられ、TNF- α 、IFN- γ および IL-6 の産生が亢進するのに対し、習慣性扁桃炎患者由来扁桃リンパ球では活性化反応が認められなかったとの報告があり⁴⁾、本疾患の発症機序として扁桃リンパ球における α 溶連菌に対する過剰免疫反応の存在が有力視されている。

一方 IgA 腎症においてはパラインフルエンザ菌が注目されている。Suzuki ら⁵⁾によると咽頭からのパラインフルエンザ菌の検出頻度を検討したところ、対照群では1724例中442例(26%)に検出されたのに対し、IgA腎症では44例中40例(91%)と高い頻度で検出されたとしている。今回の我々の検討においてもIgA腎症では習慣性扁桃炎および睡眠時無呼吸症候群と比べて有意にパラインフルエンザ菌の検出頻度が高くSuzuki らの報告と同様であった。一方ナイセリア菌の検出頻度が本疾患で高いとの報告はこれまでになく、今後より多数の症例

を用い検討する必要があるものと思われた。パラインフルエンザ菌、ナイセリア菌ともに口腔内常在菌としての側面が強いとされ、掌蹠膿疱症と同様にIgA腎症においてもその発症に宿主側の免疫応答の異常が強く関連している可能性が示唆される結果であった。

さらに我々は検出される細菌により宿主側どのような免疫応答の変化がもたらされているかを知る目的で、扁桃リンパ球の免疫学的プロフィールをフローサイトメトリーにて検討した。今回検討した免疫担当細胞は主にTリンパ球のサブセットに属するものであり、いずれも宿主側の免疫応答に重要な役割を担うものとされる。抗原提示細胞により外来抗原の情報を受取ったナイーブT細胞(CD4陽性CD45RA陽性細胞)はそのサイトカイン環境により様々な細胞に分化、あるいは活性化を促す。メモリーT細胞(CD4陽性CD45RO陽性細胞)は暴露された抗原情報を記憶しさらなる暴露に備えるという獲得免疫における中心的役割を担う。CD29陽性T細胞(CD4陽性CD29陽性細胞)はインテグリンファミリーの細胞接着因子を有し、血管外遊走などホーミングに関与するとされる。一方で自己攻撃性を有する免疫細胞の活動を低下させる抑制性T細胞(CD4陽性CD25陽性細胞)の存在や、初期の自然免疫に特化したB細胞として知られるB1細胞(CD5陽性CD20陽性細胞)などが報告されており、これら様々な細胞の障害が自己免疫疾患などの発症に関与しているものと考えられている。

今回の検討において掌蹠膿疱症ではメモリーT細胞、抑制性T細胞およびCD4陽性CD29陽性細胞の割合は睡眠時無呼吸症候群に比べて有意に高い結果であった。一方IgA腎症ではCD4陽性CD29陽性細胞の発現は睡眠時無呼吸症候群に比べ有意に高かったが、他のサブセットでは明らかな違いは認められなかった。さらにIgA腎症においてパラインフルエンザ菌の検出された群では本菌が検出されなかった群に

比べて有意に CD4 陽性 CD45RO 陽性細胞の割合が低い結果であった。このような各免疫担当細胞の発現の違いは疾患発症のメカニズムの違いを示唆する可能性があるものと思われ、今後疾患単位ごとの各免疫担当細胞の役割や検出細菌との関連についてさらなる検討が必要と思われた。

ま と め

(1)扁桃細菌叢の検討において掌蹠膿疱症では疾患特異的な細菌の検出は認められなかったが、IgA 腎症では扁桃実質のナイセリア菌、パラインフルエンザ菌の検出率が高かった。(2)扁桃リンパ球のフローサイトメトリー解析において掌蹠膿疱症では睡眠時無呼吸症候群に比べて CD4 陽性 CD29 陽性細胞、メモリー T 細胞、抑制性 T 細胞の割合が有意に高かった。また IgA 腎症では睡眠時無呼吸症候群に比べて CD4 陽性 CD29 陽性細胞の割合が有意に高かった。(3)IgA 腎症においてパラインフルエンザ菌が検出された群では非検出群に比べてメモリー T 細胞の割合が有意に低かった。(4)IgA 腎症と掌蹠膿疱症における免疫担当細胞の発現の差は疾患発症のメカニズムの違いを示唆する可能性があった。

参 考 文 献

- 1) Koizumi F, Kurashige Y: Multinucleated giant cells in palatine tonsil of three patients with pustulosis palmaris et plantaris, *Acta Otolaryngol Suppl*, 401: 75-8, 1983
- 2) 高原幹, 岸部幹, 野澤はやぶさ, 石田芳也, 柳内充, 他: 掌蹠膿疱症でのホーミングケモカインの検討, *口咽科*, 14 (3): 299-304, 2002
- 3) 久々湊靖, 志藤文明: 掌蹠膿疱症患者における扁桃陰窩内細菌叢と血清中抗レンサ球菌抗体に関する研究, *日耳鼻*, 93 (5): 786-95, 1990
- 4) Murakata H, Harabuchi Y, Kataura A: Increased interleukin-6, interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha production by tonsillar mononuclear cells stimulated with alpha-streptococci in patients with pustulosis palmaris et plantaris, *Acta Otolaryngol*, 119 (3): 384-91, 1999
- 5) Suzuki S, Nakatomi Y, Sato H, Tsukada H, Arakawa M, Haemophilus parainfluenzae antigen and antibody in renal biopsy samples and serum of patients with IgA nephropathy, *Lancet*, 343 (8888): 12-6, 1994

質 疑 応 答

質問 黒野祐一 (鹿児島大)

病巣扁桃で起炎菌が検出された群で抑制性の免疫応答が亢進するその機序について教えて下さい。

応答 野澤はやぶさ (旭川医大)

今回検討した免疫担当細胞が、特定の細菌にばく露した結果として、その割合に変化を生じたかどうかは、実際のところわからない。抑制性 T 細胞の割合が掌蹠膿疱症では上昇するなど、当初の予想と異なる結果もあり、細菌ばく露がダイレクトに免疫担当細胞に変化をきた

すのではなく、その過程として様々な細胞や細胞間ネットワークを介しておきていると考えられ、今回検討した免疫細胞のプロフィールは、その結果をみているだけかもしれない。

質問

演題の中で示されたサブセットの違いが細菌によりもたらされているといえるか。

応答 野澤はやぶさ (旭川医大)

常在細菌に対する宿主側の免疫応答については現在盛んに研究が行われているが、今回取り上げたサブセットに関して細菌特異的な免疫応

答が証明された報告はいまのところ少ない，従って本研究から直接的にそれを証明することは現段階では難しいと思われ，今後の研究課題としたい。

連絡先：野澤 はやぶさ

〒078-8510

北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1番1号

旭川医科大学

耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

TEL 0166-68-2554 FAX 0166-68-2559

E-mail hayabusa@asahikawa-med.ac.jp