

テュートリアル

事例1 (9月2日・月曜日に提示)

Sさんは近畿大学医学部の学生です。今日はお母さんと一緒に近くのコンビニエンスストアで買い物をし、空腹だったのでトリの唐揚げを買いました。現金で支払いをしてお店を出、すぐ外のベンチで唐揚げを食べようとする、「お札を触った手は汚いから、そのまま食べ物に触っちゃダメよ」とお母さんに注意されました。お母さんはスマホの画面を操作し、東京にある衛生微生物研究センターが行ったという、お札の表面の微生物検出実験の結果を見せてくれました:

<https://www.atpress.ne.jp/news/36512>

既に免疫学の講義を聴いていたSさんは、人間の皮膚の表面には元々たくさんの微生物が常在しているのだから、お母さんが触っているスマホの表面にだって、無数の微生物がくっついているに違いないと思いました。

皮膚の表面に多数の常在微生物が居るからこそ、表皮のバリアが破綻した時、マクロファージや白血球のToll様受容体による認識や補体の活性化を介して炎症反応が起こるのだった筈です。Sさんは、講義で聴いた皮膚常在細菌と炎症の話を復習し、お母さんにも教えて上げなければと思いました。



キーワード

- ☐ 近畿大学医学部
- ☐ コンビニエンスストア
- ☐ トリの唐揚げ
- ☐ 現金
- ☐ 紙幣(お札)
- ☐ 手指の汚染
- ☐ スマートフォン
- ☐ 画面
- ☐ 衛生微生物研究センター
- ☐ 微生物の検出
- ☐ 免疫学
- ☐ 皮膚の微生物
- ☐ 微生物の常在
- ☐ 表面への付着
- ☐ 表皮のバリア
- ☐ 表皮バリアの破綻
- ☐ Toll様受容体(TLR)
- ☐ 補体
- ☐ マクロファージ
- ☐ 補体
- ☐ 白血球

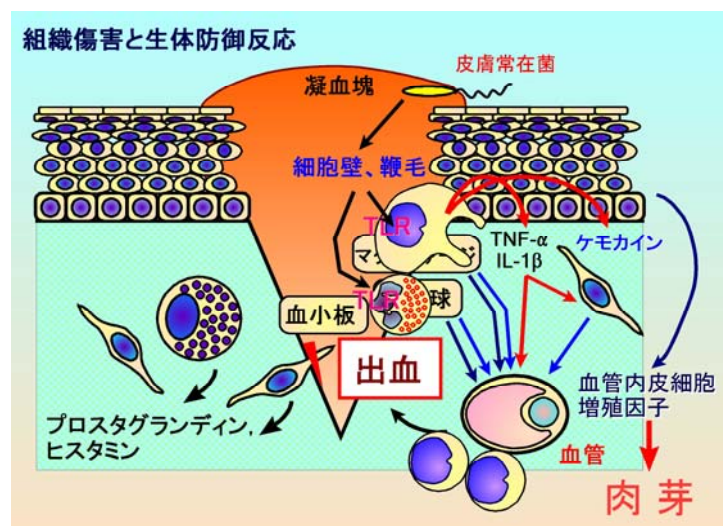
こんなことを考えてみよう

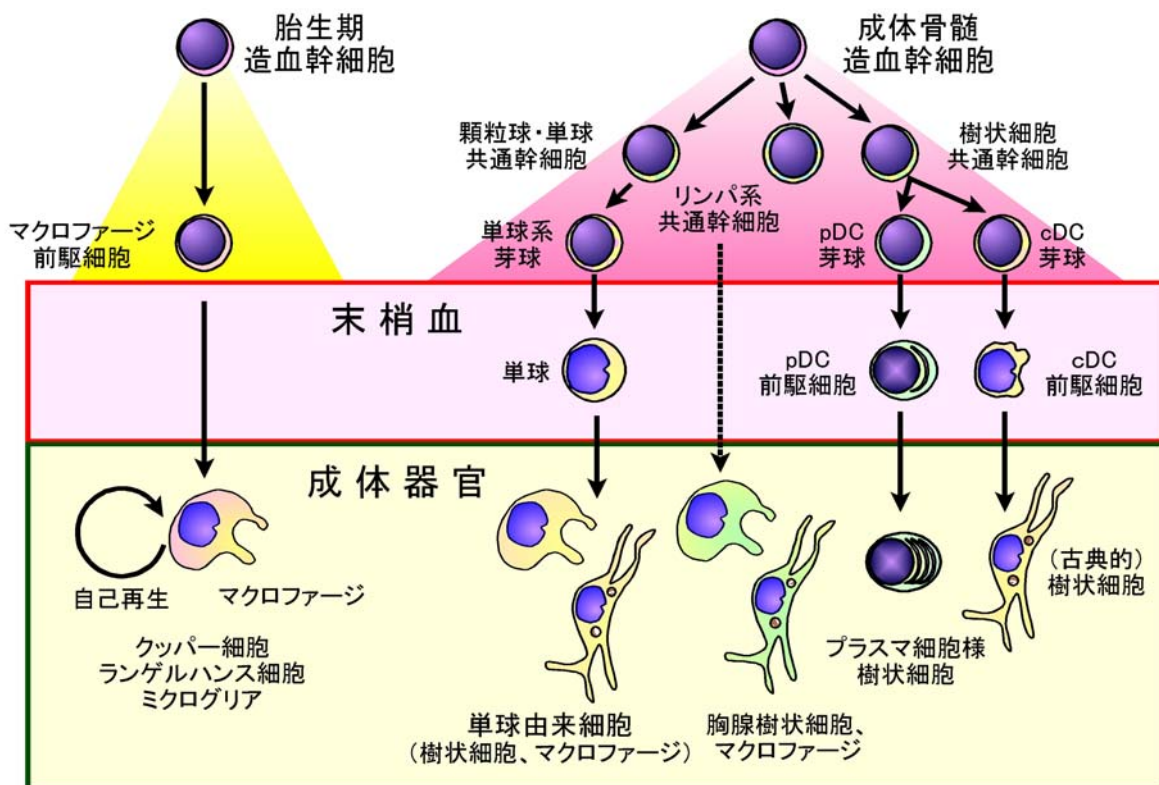
- ☐ 紙幣の表面は本当に「汚い」のだろうか
- ☐ 紙幣の表面に付着している微生物は、そこで増殖しているのだろうか？
- ☐ 紙幣の表面にある微生物は、どのようにして検出したのだろうか？
- ☐ 紙幣の表面にある微生物は、病原性を持つのだろうか？
- ☐ スマートフォンの表面にはどのような微生物がいるのだろうか？
- ☐ スマートフォンの表面の微生物は、どのようにして検出できるだろうか？
- ☐ スマートフォンの表面にある微生物は、紙幣の表面に較べて多いのだろうか？
- ☐ そもそも、皮膚の表面にはどのくらいの数の微生物が居るのだろうか？
- ☐ 元々皮膚にいる微生物が、お札やスマートフォンに付着するのではないのか？
- ☐ 元々皮膚に微生物がいるなら、手洗いは必要なのだろうか？
- ☐ 皮膚の組織構造は？
- ☐ 表皮のバリア機能はどのように保たれているのか？
- ☐ 表皮のバリア機能が破綻して皮膚の常在微生物が真皮に侵入すると、何が起こるのか？
- ☐ TLRとは何か？TLRは何を認識するのか？
- ☐ 補体とは何か？補体はどのようにして活性化するのか？
- ☐ マクロファージとはどのような細胞か？
- ☐ マクロファージと血液中の単球との関係は？

解説

今年度から、病因・病態ユニットでは微生物学教室と免疫学教室の担当期間を入れ替え、先に免疫学のテュートリアル・講義・実習を行って、その後微生物学の講義・実習を実施することとしました。これは、免疫反応が自己同一性を維持するという生理機能を担うこと(実際、有名なガイトンの生理学教科書<John E. Hall. **ガイトン生理学** 原著第13版. 石川 義弘, 岡村 康司, 尾仲 達史, 河野 憲二 訳. エルゼビア・ジャパン株式会社, 2018>でも、免疫系は「**生体の感染に対する抵抗性**」を担う生理機能を持つとして、章立てされています)、また微生物の病原性と感染による病態発生のしくみとを理解するためには、予め免疫応答のしくみを知っておく必要があることから、合理的な順序であると言えます。但し、体外からの異種細胞や異種遺伝子の侵入から自己同一性を護る免疫系の機能を学ぶためには、そもそも生物学的侵襲の担い手としての微生物について基本的な知識を持っていることが必要です。また、Toll様受容体(TLRs)や補体が生体防御反応の誘導や獲得免疫反応の調節に果たす役割を理解するためには、微生物の構造とその分子構成に関する最低限の理解もなければいけません。

そこで今回は、テュートリアルを通じて学生さんたちが自ら微生物の存在様式と宿主との相互作用について学んでくれるよう考えました。導入として、事例1では、学生さんたちが自分たちの身の回りに遍在している微生物の存在に気付いてくれるよう仕向けています。





このユニットの第1週の講義では、既に皮膚を題材として組織傷害が炎症反応に結びつくしくみを学んでいます(前頁の図)。従って、学生さんたちは皮膚の常在菌が表皮バリアを越えて真皮層に侵入したとき、代替経路やレクチン経路を介して補体系が活性化したり、マクロファージや白血球がTLRを介して活性化し、サイトカインやケモカインを産生したりする過程を理解している筈です。

第1回のテュートリアルではまだ事前の自己学習はありませんから、事例後半の記述を素材にして、学生さんたちに前週の講義内容を振り返らせるよう意図しています。その際、表皮バリアの組織構造を模式図に描かせたり、真皮に存在しているマスト細胞やマクロファージが、TLRやアナフィラトキシン受容体を介して侵襲を感知するしくみを想起させたりすることが目的です。また、マクロファージと血液中の単球の関係、マスト細胞と好塩基球の関係など、侵害刺激のセンサーとなる細胞が全身組織に元々分布していることの意義についても考えて貰いたいと思います(上の図)。その上で、事例の前半の記述に戻り、皮膚の常在微生物にはどのような種類ものがどのくらいの数あるのか、またそれらの存在はどのようにして検出されたのかを考えさせ、水曜日に向けて自己学習すべき課題を抽出させるよう意図しています。

さて、お札(紙幣)が不潔であると言う「常識」は多くの人たちが持っていると思いますが、その科学的根拠はどこに示されているのでしょうか？一方、紙幣に較べてスマートフォンが「より清潔である」という証拠はあるのでしょうか？お札の表面に微生物が付着しているのなら、ヒトが手指で触るスマートフォンの画面にも同じように微生物が付着しておかしくない筈です。しかし、肉眼で見ることの出来ない微生物の存在は、どのようにして検出するのでしょうか？

事例では、Sさんのお母さんが(株)衛生微生物研究センター(東京都葛飾区青戸7丁目21-14；因みに大阪支所もあります：大阪市淀川区宮原1丁目1-1 新大阪阪急ビル3F)の行った実験結果をスマートフォンの画面で示しています(学生には、QRコードで実際のWeb siteを参照させて下さい)。

この実験では、東京都内の店舗でお釣りとして収集した紙幣と硬貨を検体に、寒天培地へのスタンプ法によってコロニーを形成する細菌や真菌を検出し、さらに病原性細菌として黄色ブドウ球菌とセレウス菌の検出を試みています。一部の紙幣から食中毒菌であるセレウス菌が検出されたとしていますが、そもそもセレウス菌 (*Bacillus cereus*) は土壌、空気及び河川水等の自然環境、及び農水産物や家畜などの飼料等に広く分布しているもの(環境微生物)ですから、紙幣の表面に付着していても何の不思議もありません。セレウス菌は90℃・60分の加熱に耐える耐熱性の芽胞を形成し、一般に10℃～50℃と広範囲の温度域で増殖できる上、7℃以下の低温域でも増殖する株があり、増殖すると嘔吐毒を産生します。嘔吐毒は126℃・90分の加熱処理でも失活しません¹⁾。セレウス菌による食中毒の原因食品としては焼き飯や麺類などが多く、大量調理された食品を室温で放置することにより芽胞からの増殖を招くことが食中毒の原因と考えられています。一般食品に通常見られる程度の菌数(10～10³/g程度)では経口摂取しても発症しないとされており、紙幣の表面に付着したセレウス菌がそのまま感染・発症の原因になるとは考えられません(勿論、紙幣を直接口に入れば感染・発症の可能性はあるでしょう)。

なお、硬貨は紙幣に較べて細菌コロニー形成数が少なかったとされていますが、これは紙幣が植物繊維を織った構造であって、細菌が吸着・保持され易く、皮脂や汗などの栄養物と水分を含み易いため、その表面や内部で細菌が増殖する可能性があるからでしょう。一方、硬貨の表面は栄養物や水分が乏しく、特に銅の合金である10円硬貨は、銅イオンによる殺菌効果を示すと考えられます。

ところで、この実験では紙幣や硬貨を寒天培地にスタンプし、35℃で48時間培養することによりコロニーを形成する微生物を検出、コロニー数を数えています。しかし、実際には寒天培地で増殖できない微生物も多くある筈ですし、特殊な培養条件下(例えば嫌気性培養)でないとコロニーを形成しない微生物もいると考えられます。つまり、このような「培養法」は、既知の培養条件で増殖できる微生物以外は検出できないという、技術上の(著しい)制約を伴ったものです。そこで最近では、ある場所に存在する微生物全体を、より網羅的に検出しようとする「非培養法」(culture-independent methods)が主流になっています。これにより、その場に存在するあらゆる微生物種の解析(whole community analyses)が可能となって来ました。

非培養法でよく用いられるのが、細菌の16S rRNAを増幅し、その塩基配列を解析して菌種を網羅的に同定する方法(細菌叢解析)です。また、検体中の全DNAからショットガンライブラリーを構築し、次世代シーケンサーで塩基配列を決定して系統解析をするメタゲノム解析も、頻繁に行われるようになっていきます。メタゲノム解析では、16S rRNAを持たない原虫やウイルスの存在も検出できます。こうしてゲノムの塩基配列情報から構築された微生物叢(microbiota)の全体像を、マイクロバイオーム(microbiome)と呼びます。

非培養法で明らかになったヒトの皮膚のマイクロバイオームは、細菌が80%以上、それに次いでウイルスが多く、真菌(カビ)は5%未満でした²⁾。ヒトの皮膚には、平均して1平方センチメートル当たり10⁷個の細菌細胞が存在しています(従来培養法で報告されていた数<10³～10⁵/cm²>よりも遥かに膨大です)。系統別で4つの主要な門は、数の多い順に

Firmicutes(フィルミクテス門)：グラム陽性で、多くは芽胞形成性であり、代表菌属として偏性嫌気性菌であるクロストリジウム属(*Clostridium*)や、好気～通性嫌気性菌であるバチルス属(*Bacillus*)が含まれます。芽胞形成能を失ったスタフィロкокカス属(*Staphylococcus*)、エンテロкокカス属(*Enterococcus*)、ペプチドグリカン層を持たず細胞壁を欠くマイコプラズマ属(*Mycoplasma*)もこの門に含まれます³⁾；

Actinobacteria(アクチノバクテリア門)：グラム陽性で、通常の桿菌、不規則な形状の桿菌、球菌および菌糸状の形態をもつ「放線菌」と呼ばれる菌群が含まれます。結核

菌を含むマイコバクテリウム属 (*Mycobacterium*)、ジフテリア菌を含むコリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*) などがこの門に属します³⁾;

Proteobacteria (プロテオバクテリア門): 細菌の門の中で最も記載種が多い分類群であり、元々は光合成能を有していたとするという仮説があります。エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、ビブリオ属 (*Vibrio*)、カンピロバクター属 (*Campylobacter*)、リケッチア属 (*Rickettsia*) など、医学的に重要な多くの病原菌や腐敗菌が、この門に含まれます³⁾;

Bacteroidetes (バクテロイデス門): 偏性嫌気性であり、動物の口腔・腸管、反芻動物の第一胃などの主要構成菌であるバクテロイデス属 (*Bacteroides*) などが含まれます³⁾ となっています²⁾。

但し、皮膚マイクロバイオームの構成は、個人間で、また同一個体でも皮膚の部位により、時期により変動し、特に手指のマイクロバイオームは身体の他の部位に較べて時間的変動が大きいと言います²⁾。しかし、それに関わらず手指(同一部位)における個人間の変化は同一個体における時間的変動よりも大きく、それが個人所有の携帯電話機に付着しているため、携帯電話機のマイクロバイオームはその所有者のマイクロバイオームを特定するに十分な個別性を示すとされます⁴⁾。即ち、携帯電話機表面の細菌叢は、所有者間で有意な系統構成の差を持っているということになります。Sさんのお母さんが操作しているスマートフォンの画面には、お母さんの手指に常在している微生物が多数付着している訳です。

このように、携帯電話機はその所有者の手指の微生物叢を反映した微生物によって覆われている訳ですが、勿論だからと言って携帯電話が病原体の感染源になると結論できる訳ではありません。培養法で病原細菌を検出したデータでは、病院内で用いられているタッチパッドのような携帯電子端末の表面から、高い頻度でブドウ球菌やバチルス菌が検出されています⁵⁾。ある整形外科の手術室に持ち込まれた携帯電話機からゲル密着法で検出された細菌のコロニー数は、電話機1台当たり平均して258個であったという報告もあります⁶⁾。手術室の滅菌後にはその数は減少したが、それでも平均して127のコロニーが検出されたといえます。NICU(新生児集中治療室)に持ち込まれている携帯電話機の40~100%から病原性の微生物が検出され、その多くは院内感染の原因になり得るという報告もあります⁷⁾。一方で、三次救急施設のICUにおいて、患者臨床検体から検出された多剤耐性菌(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)と、バンコマイシン耐性腸球菌)と、医療従事者の携帯電話2台から検出されたMRSAの全ゲノム解析を行ったところ、お互いの遺伝的距離が大きく、携帯電話に付着していたMRSAが院内感染の原因菌となっていると言う証拠は得られなかった(即ち、感染源は別にある)という報告もあります⁸⁾。

ウイルス学的な解析では、医療従事者の携帯電話機から流行性のウイルスが検出されると言う報告があり、調べた109台のうち38.5%からRNAウイルスが検出され、陽性だった携帯電話機の大半からロタウイルスが検出されたとのこと⁹⁾。

興味深いことに、頻繁に手洗いをする医療従事者では、手指の細菌叢の多様性が低下し、その分病原性微生物の検出率が高まるという報告があるそうです(一種の菌交代現象です)²⁾。予想されることですが、リフィルタイプの液状石鹸ディスペンサーを用いていると、手指皮膚での日和見菌の検出率が高まります²⁾。一方、モデルウイルスを用いた実験で、石鹸を用いた手洗いが手指表面のノロウイルス感染価の低下につながることを示されており¹⁰⁾、コクランレビューでも手洗い教育が下痢症の頻度低下に有効であることが結論づけられています¹¹⁾。これらの報告から、適切な手洗いは感染防止に有用と考えられますが、一方で手指の常在微生物叢を維持することも、病原菌の伝播防止に役立ちそうです。

- 1) 食品安全委員会ファクトシート セレウス菌食中毒．平成23年11月24日．
(http://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/06bacillus_cereus.pdf)
- 2) Edmonds-Wilson, S. L., N. I. Nurinova, C. A. Zapka, N. Fierer, and M. Wilson. Review of human hand microbiome research. *J. Dermatol. Sci.* 80:3–12, 2015.
- 3) 横田 明．微生物分類同定講座 第4回 細菌の分類体系．
<https://www.mitsui-norin.co.jp/mmids/knowledge/yokota/index4.html>
- 4) Meadow, J. F., A. E. Altrichter, and J. L. Green. Mobile phones carry the personal microbiome of their owners. *PeerJ* 2:e447, 2015.
- 5) Khan, A., A. Rao, C. Reyes-Sacin, K. Hayakawa, S. Szpunar, et al. Use of portable electronic devices in a hospital setting and their potential for bacterial colonization. *Am. J. Infect. Control* 43:286-288, 2015.
- 6) Murgier, J., J.-F. Coste, E. Cavaignac, X. Bayle-Iniguez, P. Chiron, et al. Microbial flora on cell-phones in an orthopedic surgery room before and after decontamination. *Surgery & Research* 102 (2016) 1093–1096
- 7) Curtisa, A., Z. Mooreb, D. Pattonb, T. O'Connorb, L. Nugent. Does using a cellular mobile phone increase the risk of nosocomial infections in the Neonatal Intensive Care Unit: A systematic review. *J. Neonatal Nursing* 24:247–252, 2018.
- 8) Smibert, O. C., A. K. Aung, E. Woolnough, G. P. Carter, M. B. Schultz, et al. Mobile phones and computer keyboards: unlikely reservoirs of multidrug-resistant organisms in the tertiary intensive care unit. *J. Hospital Infection* 99:295-298, 2018.
- 9) Pillet, S., P. Berthelot, A. Gagneux-Brunon, O. Mory, C. Gay, et al. Contamination of healthcare workers' mobile phones by epidemic viruses. *Clin. Microbiol. Infect.* 22:456.e1–456.e6, 2016.
- 10) 森 功次, 林 志直, 野口 やよい, 甲斐 明美, 大江 香子 et al. Norovirusの代替指標としてFeline Calicivirusを用いた手洗いによるウイルス除去効果の検討. *感染症学雑誌* 80:496-500, 2006.
- 11) Ejemot-Nwadiaro, R. I., J. E. Ehiri, D. Arikpo, M. M. Meremikwu, Julia, A. Critchley. Hand washing promotion (education activities, sometimes with provision of soap) at child day-care facilities or schools prevents around one-third of diarrhoea episodes in high income countries. *Cochrane Database of Systematic Reviews* Issue 9, Art. No. CD004265, 2015.

事例2（9月4日・水曜日に提示）

Sさんの予想通り、人間の指には多数の微生物が常在しており、それはそのままスマホ画面やコンピュータキーボードの微生物叢に反映されているようです。お札よりスマホの方がきれいということではなさそうです。

Sさんは、免疫学の講義で、肉眼的に1個体に見えるヒトの身体は、実は約37兆個のヒト細胞と、それよりも多くの微生物細胞とから成る共生体だと習いました。当然、皮膚よりも消化管により多くの微生物が共存している筈です。ヒトの消化管にはどのくらいの数と種類の微生物が共存しているのでしょうか？また、それはどうやって調べたのでしょうか？消化管の常在微生物はどこから入ってきたものなのでしょうか？肺は空気で満たされているから、食物と消化液で満たされた消化管より常在微生物は少なそうに思いますが、肺にも常在微生物叢があるのでしょうか？そういえば、講義では空気中にもたくさんの微生物が浮遊しており、ヒトはそれらを呼吸の過程で吸入していると聴きました。

キーワード

- ☐ 常在微生物
- ☐ 微生物(細菌)叢
- ☐ スマホ画面
- ☐ キーボード
- ☐ 皮膚
- ☐ ヒトを構成する細胞数
- ☐ 60兆個？37兆個？
- ☐ ヒトに共生する微生物の数
- ☐ 消化管の共生微生物
- ☐ 消化管の常在微生物の由来
- ☐ 常在微生物叢
- ☐ 常在微生物叢の調べ方
- ☐ 食物と消化液
- ☐ 肺の常在微生物
- ☐ 空気中の微生物
- ☐ 呼吸

こんなことを考えてみよう

- ☐ ヒト個体は何個ぐらいの細胞できているのだろうか？それは、どうやって数えられるのだろうか？
- ☐ ヒトの個体を構成するヒトの細胞の数と、常在する微生物の数はどちらが多いのだろうか？
- ☐ ヒトの一個体は約60兆個の細胞から成ると良く言われるが、本当だろうか？
- ☐ ヒト個体を構成する細胞の中で、一番数が多いのはどの細胞だろうか？
- ☐ 消化管にはどのくらいの数と種類の微生物が共生しているのだろうか？
- ☐ 消化管の常在微生物はどこから体内に入ったのだろうか？
- ☐ 消化管に常在する微生物は、ヒトの身体機能に何か役に立っているのだろうか？
- ☐ 消化管内にある微生物の代謝産物は、宿主であるヒトの体内に吸収されるのだろうか？

- ☐ 空気中にはどのくらいの数の微生物が浮遊しているのだろうか？
- ☐ 肺は無菌なのか？
- ☐ 肺の中には、何らかの微生物が共生しているのだろうか？

解説

成人の一個体を構成する細胞の数については、これまで「およそ60兆個」という数値が一人歩きしてきました(宮澤も、講義でこの数値を述べて来ました)。ところが、この数値には根拠となる文献がなく、成人の体重を60kgとして、ヒト個体の体積をおよそ60リットルと推定、ヒト細胞の平均的な大きさを一辺10 μ mの立方体とすると、割り算の結果は60兆になると言うことだったようです。

2013年にヒトの各組織を構成する細胞数について、文献検索と数学的解析によるより精密な推計が行われ、それを総計した結果、成人の一個体を形成する細胞数として 3.72×10^{13} 、即ち37.2兆個という数値が報告されました¹²⁾。現在はこの値が「科学的に推計されたヒト個体の細胞数」として多くの文献に引用されています。その後さらに精密な推計が行われた結果、造血系細胞及び血球の果たす役割が大きいとされ、2016年の論文では、成人の一個体を構成する細胞数が合計30兆個とされていますが¹³⁾、実はそのうちの84%は赤血球、4.9%は血小板ですから、遺伝情報を持った有核細胞の数は 3.3×10^{12} 、即ち3.3兆個となります。同じ論文では口腔、胃、十二指腸・空腸・回腸、結腸及び皮膚に存在する細菌細胞数をその密度と体積から推計しており、総数を 38×10^{12} としています¹³⁾。この数値は、これまで一般に流布されてきた「ヒトの一個体は60兆個のヒト細胞と、その10倍以上の微生物細胞とから成る共生体である」という数値がやや大袈裟であることを示していますが、上記の通り、推計されたヒト細胞数のおよそ9割は赤血球と血小板ですから、遺伝情報を持つ有核細胞の比率にすれば、矢張り細菌細胞数はヒト細胞数の10倍以上となります。

ヒトの消化管に常在する細菌の細胞数は、以前からおおよそ100兆個と推計されてきました¹⁴⁾。ヒトの下部消化管には内容物1 mlあたりに 10^{12} 個を超える細菌が含まれているという記述もあります¹⁶⁾。これら微生物の大多数は培養不可能な培養法の知られていないものと考えられますから、その構成を把握する方法としては、上記のメタゲノム解析が有効です。その結果、ヒトの消化管には1000を超える種の細菌が検出され、その中で最も遺伝的検出量の多い二つの系統は、上記の皮膚のマイクロバイオームにも含まれていたFirmicutes門とBacteroidetes門であると報告されています¹⁴⁾。意外なことに、大腸菌(*E. coli*)を含むProteobacteria門の検出頻度は上記2門に較べると遥かに低いそうです。ヒト消化管マイクロバイオームの99%は細菌ゲノム由来ですが、その他の大半は古細菌(Archaea)であり、古細菌の大半は*Methanobrevibacter smithii*と言う唯一つの種で占められています。この古細菌は食物中の多糖類を原料とする細菌発酵の最終産物をエネルギー源としており、ヒトの消化管における主要なメタン産生菌であると言われます¹⁷⁾。西欧人では、その他の常在微生物として0.1%の真核生物(大半は真菌)が検出され、ウイルスゲノム(viromeとして)も検出されますが、その大半は細菌を宿主とするファージ類であるということです¹⁴⁾。

これらの常在微生物は、どこからヒトの体内に入り定着するようになったのでしょうか？ 健常な胎児の消化管は無菌であると考えられますが、分娩の際に産道を介して母体の常在細菌叢と最初の接触が起こります^{14, 15)}。その後、授乳を介する母体の皮膚常在細菌叢との接触や、食物に付着した環境微生物との接触が繰り返されると考えられます。従来、経膣分娩の新生児と帝王切開により出産した新生児では消化管の常在細菌叢が異なり、それは産道の常在細菌叢(例えば*Lactobacillus*種)に曝されるかどうか、その後長期にわたり消化管や皮膚の細菌叢構成に影響を与えるからだという説がありました¹⁸⁾。また、このことが疫学的に

知られていた帝王切開が小児喘息やアトピー性皮膚炎のリスク因子となることの原因であるとの考え方も広く流布し、経膣分娩により産道の細菌叢の「洗礼を受ける (the "bacterial baptism" of vaginal birth)」ことが生後の生理機能に重要であるとして、帝王切開出産児に人工的に膣の細菌叢を移植する "**vaginal seeding**" も行われるようになりました¹⁸⁾。しかし、出生直後から数日間の新生児の常在細菌叢を調べた結果は、大多数の報告で出産経路との関連を否定しており¹⁸⁾、産道での最初の接触が出生初期に定着する微生物叢を決定付けるという証拠は乏しいようです。

一方で、分娩様式(経膣か帝王切開か)が生後数週間から数ヶ月における乳児常在微生物叢の構成に影響を与えるとの報告は多く、帝王切開出産児では母体由来の常在細菌叢の定着が遅れること、*Bacteroides*種の定着率が低く、代わって*Clostridium difficile*が頻繁に検出されることなどが報告されています¹⁸⁾。しかし、分娩経路によるこのような常在細菌叢構成の差は、成長と共に解消されて行くとの報告もあります。これは、固形食の摂取開始に伴い、食物中の多糖類が消化管常在細菌叢の構成に主要な影響を与えるようになるためと考えられます¹⁴⁾。

一般には、初乳や母乳中に含まれる生きた細菌、代謝産物、分泌型IgA、免疫系細胞、サイトカインなどが新生児の消化管細菌叢に影響を与え¹⁵⁾、経膣分娩例と帝王切開例とで母乳育児の割合が異なること、これに加え分娩時の抗生物質の使用の有無や、母体のタンパク質や炭水化物摂取比率などが、経膣分娩の場合と帝王切開の場合とで異なることなどが、新生児期の微生物叢に影響を与えているのではないかと考えられています¹⁸⁾。

宿主の食物構成が消化管微生物叢の構成に影響を与えることはよく知られています。例えば、タンパク質と動物性脂肪の多い食事は*Bacteroides*種を増加させ、炭水化物の多い食事は*Prevotella*種を増加させます¹⁴⁾。一方、常在微生物による代謝の産物は、消化管の吸収上皮を介して直接宿主であるヒトの血液中に取り込まれます。特に重要なのが、ヒトの消化酵素で分解できない多糖類や食物繊維から細菌発酵によって形成される短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids: SCFAs) であり、腸内細菌叢の産生するSCFAsの量や分子種構成が、宿主であるヒトのエネルギー代謝に大きな影響を与え、肥満にも影響すると言われています¹⁹⁾。

さて、それでは肺はどうでしょうか？

吸気中には1立方mm当たり $10^4 \sim 10^6$ の細菌が含まれていると言われます²⁰⁾。地下鉄の車内のような閉鎖空間では、空気中に検出される細菌の系統はヒトの皮膚の常在菌叢に見られるもの (*Proteobacteria*門や*Actinobacteria*門) が最も多く、その多様性の時間的変動が車内のCO₂濃度と相関するという報告もあります²¹⁾。しかしながら、気管支上皮には線毛運動があり、肺の中の空気は消化管内容物に較べて酸素濃度が高く、また肺胞病面を覆うサーファクタントは殺菌性があるため、健常人においては吸入された空気中の微生物が肺の中で増殖することは殆ど無く、気道中の細菌の密度は十二指腸と同程度で、結腸に較べて10の数乗のオーダーで低いと考えられています²⁰⁾。

健常人では、肺のマイクロバイオームは殆どが口腔由来で、それらは臨床的に気付かれない微小な誤飲 (microaspiration) に由来すると考えられています。これは、鼻腔内のマイクロバイオームが皮膚のそれとほぼ同じであることとは対照的です。また、健常人の肺マイクロバイオームが口腔と同じく*Bacteroidetes*門主体であるのに対し、慢性肺疾患の患者ではこれが*Proteobacteria*門主体に変化すると言われます²⁰⁾。このように、「肺は無菌」という従来の考えは誤りであり、特に慢性肺疾患の条件下では、肺のマイクロバイオームはその数も菌種の多様性も大きく変動することが明らかとなっています。

12) Bianconi, E., A. Piovesan, F. Facchin, A. Beraudi, R. Casadei, et al. An estimation of the

number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, 40:463-471, 2013.

13) Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* 14: e1002533, 2016.

14) Jacobs, J. and J. Braun. The mucosal microbiome: Imprinting the immune system of the intestinal tract. In *Mucosal Immunology*, 4th Ed. (J. Mestecky, W. Strober, M. Russell, H. Cheroutre, B. N. Lambrecht, et al., eds.) Academic Press, 2015: pp63-77.

15) Belkaid, Y. and T. Hand. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 157:121–141, 2014.

16) Hooper, L. V., D. R. Littman, and A. J. Macpherson. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336:1268-1273, 2012.

17) Gottlieb, K., V. Wachter, J. Sliman, and M. Pimentel. Inhibition of methanogenic archaea by statins as a targeted management strategy for constipation and related disorders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 43:197–212, 2016.

18) Stinson, L. F., M. S. Payne, and J. A. Keelan. A critical review of the bacterial baptism hypothesis and the impact of cesarean delivery on the infant microbiome. *Front. Med. (Lausanne)* 5:135, 2018.

19) Cani, P. G., M. Van Hul, C. Lefort, C. Depommier, M. Rastelli et al. Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nature Metabolism* 1:34–46, 2019.

20) Dickson R. P. and G. B. Huffnagle GB. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathog* 11:e1004923, 2015.

21) Leung, M. H. Y., D. Wilkins, E. K. T. Li, F. K. F. Kong, and P. K. H. Lee. Indoor-air microbiome in an urban subway network: Diversity and dynamics. *Applied Environmental Microbiol.* 80:6760-6770, 2014.

事例3 (9月6日・金曜日に提示)

消化管には非常に多くの種類の微生物が常在しているようです。それらの微生物に対して免疫反応は起こらないのでしょうか？もしも免疫反応が起こったら、微生物は排除されてしまって常在できないような気がします。と言うことは、ヒトは消化管の常在微生物に対して免疫反応を起こさないのでしょうか？講義で習った分泌型IgAは、消化管に常在する微生物に対して防御機能を果たしているのでしょうか？

免疫学の授業では、消化管の粘膜下層には特有のリンパ組織があり、粘膜固有層や上皮細胞の間には、生理的に多数のリンパ球が存在していると習いました。もしも常在微生物が全くいなかったら、消化管の免疫組織はどうなるのでしょうか？

キーワード

- ☐ 常在微生物叢に対する宿主応答
- ☐ 免疫反応による排除
- ☐ 消化管免疫
- ☐ 分泌型IgA
- ☐ IgAによる感染防御
- ☐ 粘膜固有層
- ☐ 粘膜下層
- ☐ 上皮内リンパ球
- ☐ リンパ組織
- ☐ 無菌状態
- ☐ 免疫組織の形成

こんなことを考えてみよう

- ☐ 免疫系を構成する組織にはどのようなものがあるか？
- ☐ 一次リンパ組織、二次リンパ組織とは何だったか？
- ☐ 粘膜に特有のリンパ組織には、どのようなものがあるか？
- ☐ パイエル板の組織構造は？
- ☐ 孤立リンパ小節(孤立リンパ濾胞)とは何か？
- ☐ 分泌型IgAはどこで作られるの？
- ☐ 分泌型IgAと血清中のIgAの構造の違いは？
- ☐ 分泌型IgAはどのようにして粘液中に運ばれるの？
- ☐ 粘膜の免疫系組織と全身の免疫系組織の間は、細胞の行き来があるのだろうか？
- ☐ 無菌状態のヒトはいるだろうか？
- ☐ 無菌環境下でも免疫系組織は正常に形成されるのだろうか？
- ☐ 消化管の常在微生物に対して、ヒトは免疫応答を起こしているのだろうか？
- ☐ 消化管内腔の常在微生物が、上皮のバリアを越えたらどうなるのか？

解説

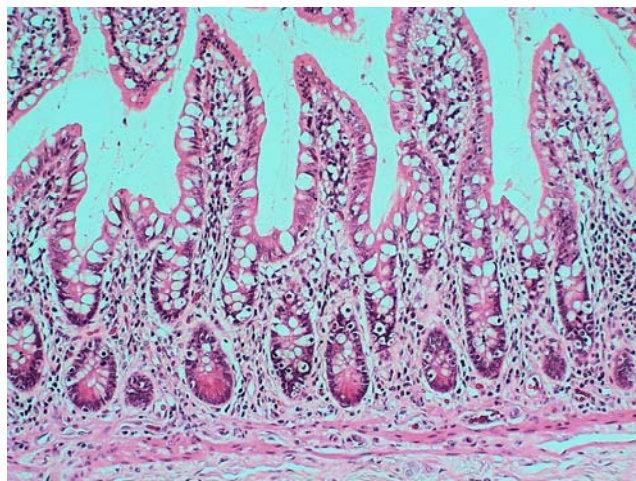
体内に取り込まれた外界である消化管の内腔に、その壁を構成しているヒト細胞の数をはるかに上回る微生物細胞が存在していると言っても、それら常在細菌叢は粘膜上皮細胞に直接接触している訳でも、上皮のバリアを越えて自由に体内に侵入している訳でもありません。ヒトの消化管粘膜はおよそ200m²の面積を持ち、上皮層の厚さは僅かに10μmしかありません。

せんが、粘膜上皮細胞と内腔の常在細菌叢の間には、ムチンを主成分とする粘液層があり、これが両者の直接接触を妨げています²²⁾。ムチンとは、コアタンパク質にO-結合(セリン、スレオニン結合)型糖鎖が高密度に付加した高分子の粘性糖タンパク質で、膜結合型(細胞膜表面のグリコカリックス)と、分泌型とがあります。代表的な分泌型ムチン分子であるMUC2は難分解性で、生合成過程でN-末端側に近いD3ドメインのシステイン残基を介して3量体を形成する一方、C-末端側のシステイン残基を介して2量体を形成し、全体として六角形が連なった二次元のシート状構造を形成すると考えられています²³⁾。さらにD3ドメインよりもN-末端側に近いD2ドメインのリジン残基とグルタミン残基の間でトランスグルタミナーゼ反応による架橋が形成され、網目構造が重なり合った籠状構造が形成されます。粘膜ゴブレット細胞の分泌小胞内では高密度に折りたたまれた状態にあるムチンが、細胞外に分泌されると1,000倍以上の体積に膨張し、三次元の網目構造から成る強固なゲル状となって、上皮細胞の表面に物理的なバリアを形成すると言われます²³⁾。ムチンのゲル層は胃では厚く全面を覆っていますが、小腸では薄く断続的となり、大腸では再び厚く全面を覆うようになっています^{22, 23)}。大腸のムチンゲル層は2層に分かれ、上皮細胞に近い下層は厚さ100~150 μ mの強固なゲル層を成し、その上に厚さ数100 μ m~1mm近くの緩やかなゲル層が重なっていると考えられます^{22, 23)}。下層の強固なゲル層は、その三次元の編み目のメッシュサイズから、腸内細菌の粘膜への侵入を物理的に防ぎ得ると考えられます²³⁾。これに対して、小腸のムチン層は内層と外層の区別が大腸ほど明確ではありません²²⁾。

小腸粘膜のムチン層は大腸のそれに較べて薄く、層形成が不十分であるにも関わらず、内腔の常在菌数は大腸の方が1,000倍も多いことが知られています¹³⁾。これは、胃液や胆汁の影響もさることながら、小腸の粘膜に複数の抗菌活性物質が存在するためと考えられます。

小腸粘膜の陰窩に存在するパネート細胞(Paneth cells: 下の組織像で陰窩の底にある好酸性の顆粒を持つ細胞)は、TLR・MyD88依存性に抗菌レクチンであるRegIII γ (Regenerating islet-derived protein 3 gamma)を産生します²²⁾。マウスのRegIII γ はREG3遺伝子ファミリーの産物の一つで、REG3G遺伝子の他に重要なパラログ(遺伝子重複の産物)として、ヒトでHIP/PAP(Hepatocarcinoma-Intestine-Pancreas/ Pancreatitis-Associated Protein)をコードするREG3A(RegIII α)遺伝子があります。RegIII γ とHIP/PAPは、グラム陽性菌の細胞壁ペプチドグリカンに結合するC-型レクチンで、マンノース結合レクチンやDC-SIGNなど、他のC-型レクチンとは異なった糖鎖結合部位構造を持ち、補体非依存性に直接殺菌効果を示します^{24, 25)}。TLRシグナルを伝達するMyD88を小腸絨毛上皮特異的に欠損したマウス、及びRegIII γ をノックアウトしたマウスでは、小腸内腔のムチン内層に細菌叢が侵入し、代償性に粘膜固有層のIgA産生細胞が増加します²⁶⁾。このことから、ムチン内層に含まれるRegIII γ が、内腔の細菌叢と粘膜上皮層との直接接触(penetration)の阻止に重要な役割を果たしていると考えられます^{22, 26)}。一方で、RegIII γ 欠損状況下で消化管内腔の細菌叢と上皮層の接触が起こると、粘膜固有層でのIgA産生が誘導されることもわかります。

一方、パネート細胞は抗菌ペプチドである α -デフェンシンも産生します。RegIII γ の産生がTLRシグナルに依存するのに対し、上皮細胞による α -デフェンシンの産生は構成的です¹⁵⁾。パネート細胞はその顆



粒中に α -デフェンシンの一種であるCryptidinを豊富に持ち、コリン作動性刺激やTLR刺激により顆粒を放出します。顆粒から放出されたCryptidinの活性化にはマトリクスメタロプロテイナーゼの一種であるMatrilysinが必要ですが、これを欠損するマウスでは*Salmonella typhimurium*の経口感染による致死率が有意に上昇します²⁷⁾。 α -デフェンシンのノックアウトマウスでは、常在細菌叢の数に変化はありませんが、その菌種構成が有意に変化するとされます²²⁾。また、ヒトのパネート細胞 α -デフェンシンであるHD5を発現させたトランスジェニックマウスでは、小腸の常在細菌叢に変化が生じ、Firmicutes門が増加してBacteroidetes門が減少したとされます。このことから、パネート細胞の産生する α -デフェンシンは、宿主の種特異的な消化管常在細菌叢の維持にも重要な役割を果たしているものと考えられています²⁷⁾。また、これらのことから、 α -デフェンシンは緩やかなムチン外層に存在し、内腔の常在細菌叢に働きかけていると考えられています²²⁾。

消化管の常在細菌叢は、宿主粘膜組織及び全身の免疫系の発生に重大な影響を及ぼします。常在微生物と宿主免疫系の相互作用は、無菌(Germ-free: GF)動物と、GF動物に特定の微生物叢だけを持たせたノバイオート(gnotobiot: 純粋隔離群)動物を、一般のSPF(specific pathogen-free: 調べた特定の病原性微生物がない状態)またはconventional(微生物管理を行っていない状態)飼育の同一系統動物と比較することで明らかにされてきました。このような研究は、フィルターを通した空気を供給するビニールアイソレーター内で、滅菌したケージと床敷きを用い、滅菌飼料と水を与えて、子宮から無菌的に取り出した胎子を人工飼育する技術により可能となったものです。因みに、gnotobiotとは、gno(= know)とbiota(生物相)を合わせた造語で、その動物が生存する環境に存在する全ての生物が明らかである状態を言います。

GFマウスでは消化管粘膜のCD4及びCD8陽性Tリンパ球数が減少し、上皮内CD8陽性Tリンパ球(intraepithelial CD8⁺ T cells)数も減少します^{15, 22)}。最も顕著な変化はパイエル板が小型化し、消化管粘膜の孤立リンパ小節(孤立リンパ濾胞)が消失、分泌型IgAの産生が減少することです^{15, 22, 28)}。消化管粘膜のTリンパ球サブセットはGFマウスで大きく変化し、小腸粘膜ではTh17細胞が減少、逆に大腸粘膜ではTh17細胞が増加します²⁸⁾。全身のTh17細胞及びTh1細胞の大半は消化管粘膜に存在し、常在細菌叢からの刺激に依存しているものと考えられます¹⁵⁾。このため、GFマウスでは全身のTh17細胞が減少します。GFマウスにおける全身のTh17細胞数低下は全身性の免疫・炎症反応に影響を与え、例えばGFマウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)が著しく軽症化します。

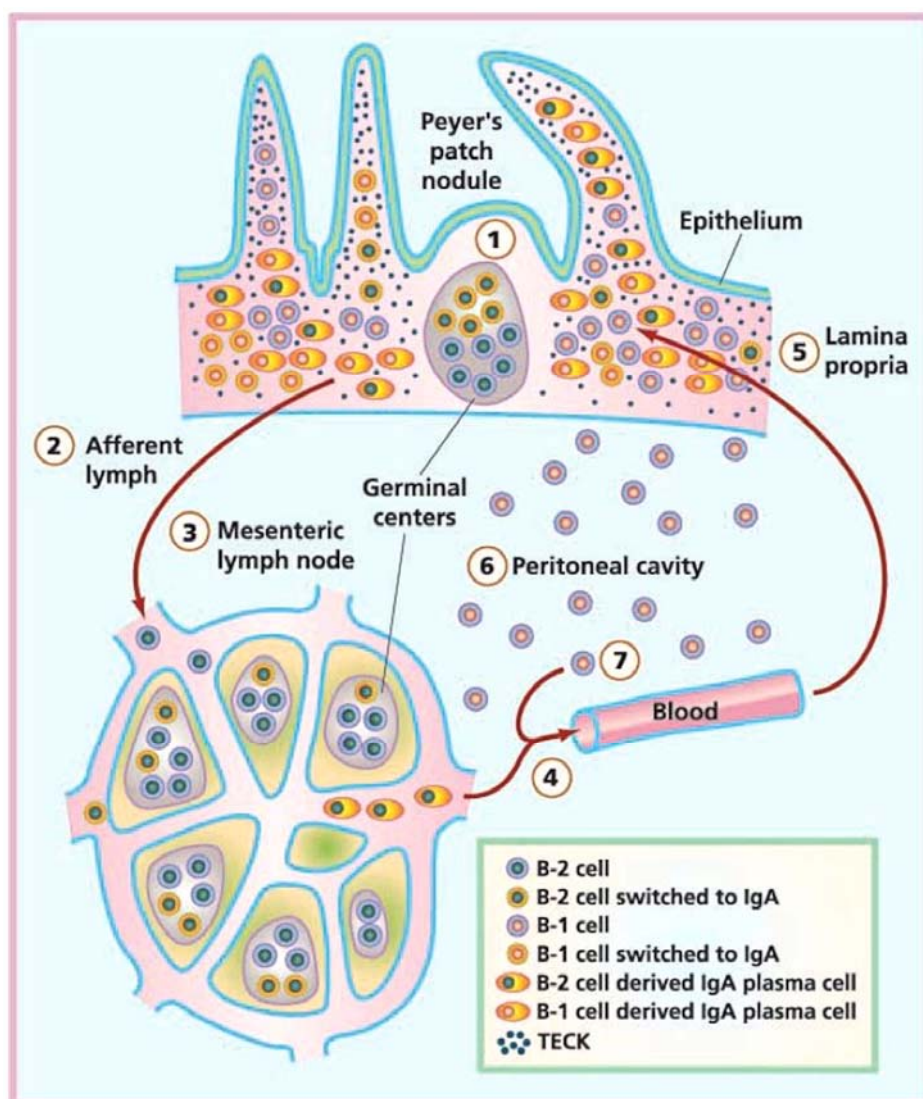
興味深いことに、マウスでTh17細胞の活性化と増殖に関与しているのはセグメント細菌(segmented filamentous bacteria: SFB)と呼ばれるクロストリジウム科の細菌(*Candidatus Savagella*)で、これはげっ歯類や魚類、鳥類の消化管常在菌ですが、ヒトには存在しません。GFマウスをSFBのみでノバイオートにすると、Th17細胞数が増加します^{14, 22)}。ところが、GFマウスにヒトの腸内細菌叢を移植してもTh17細胞は増えないことがわかっています¹⁴⁾。GFマウスで軽症化したEAEは、SFB単独でノバイオート化することにより重症化します²²⁾。

消化管常在微生物叢の存在は、全身の生理的な炎症及び組織修復反応にも重大な影響を及ぼしています。消化管の常在菌を失ったマウスでは、実験的に誘導した心筋梗塞からの回復が遅れ、これに消化管常在菌の産生する短鎖脂肪酸(SFCA)を投与すると、組織修復が回復し生存率が高まるという実験があります²⁹⁾。

消化管の内腔に宿主細胞数を上回る常在細菌叢が存在しながら、それが通常強い炎症反応を誘発しないのは、常在細菌叢が免疫抑制機能を有する細胞の機能を支えているからだと考えられます。実際、GFマウスでは消化管粘膜固有層や腸間膜リンパ節、及び全身の誘導性制御性Tリンパ球(iTreg)細胞数が減少していますが^{22, 28)}、複数のクロストリジウム属

によってノトバイオートとすると、その数が回復します²²⁾。これには消化管粘膜に存在するCD103陽性CD11b陽性樹状細胞の役割が重要と考えられており、これが常在細菌叢の刺激の下で産生するTGF- β が、iTregの誘導に関与すると解釈されています¹⁵⁾。

もう一つの重要な概念として、免疫系の区画化 (compartmentalization) があります³⁰⁾。消化管粘膜で抗原を取り込んだ樹状細胞は、リンパ管を介して腸間膜リンパ節に移動し抗原提示を行います。この際レチノイン酸を産生する消化管粘膜由来



Lamm, M. E. and J. M. Phillips-Quagliata. Origin and homing of intestinal IgA antibody-secreting cells. **J. Exp. Med.** 195:F5-F8, 2002.

樹状細胞により活性化されたTリンパ球は、インプリンティングを受け、消化管粘膜の後毛細血管細静脈が発現するアドレシンMadCAM1と結合する $\alpha 4:\beta 7$ インテグリンを細胞表面に出します。その結果、消化管粘膜由来の樹状細胞により活性化されたエフェクターTリンパ球は、消化管粘膜に集積します(15頁の図を参照)。同様に、パイエル板のリンパ装置で活性化したBリンパ球はリンパ管を介して腸間膜リンパ節に移動しますが、このような細胞も、リンパ管から腸間膜リンパ節に流入した抗原により活性化したBリンパ球も、血流を介して消化管粘膜にホーミングします(上の図)。そして、一部は消化管粘膜上皮細胞が発現する膜結合型サイトカインAPRILなどにより、直接IgAへのクラススイッチを起こします。このため、消化管粘膜から取り込まれた抗原は、そのままでは全身の免疫応答を引き起こしません。

分泌型IgAを欠損するマウスでは全身のIgG産生が亢進することが知られており²²⁾、このことから分泌型IgAは消化管内腔に存在する微生物叢の粘膜への吸着・侵入を阻止することで、全身免疫系が消化管内腔の抗原に曝露されることを防いでいると考えられます。

これらを総合すると、

- 1) 消化管の粘膜では、内腔の微生物が粘膜上皮に直接接触することをムチンが物理的

に阻害している(特に強固な内層のある大腸で著明)

2) また、特に小腸の粘膜では、ムチンの中にRegIII γ や α -デフェンシンなどの抗菌タンパク質や抗菌ペプチドが分泌され、細菌の侵入を制御している

3) 分泌型IgAも、上皮細胞への接着阻害を介して、常在微生物叢の粘膜への侵襲(及び全身免疫系への曝露)を防ぐことに役立っている

4) 消化管の常在微生物に対する(過剰な)免疫・炎症反応は、樹状細胞やiTreg細胞の機能により抑制されている

5) 消化管粘膜に侵入した微生物抗原に対する免疫応答は、免疫系の区画化により、粘膜組織内に留まり、全身の免疫反応を誘導しないようになっている

6) 無菌動物では、粘膜の免疫系は未発達になる

7) 従って、常在微生物叢に対しては「生理的に」免疫応答が起こっていると考えられる

とまとめることができるでしょう。

22) Hooper, L. V., D. R. Littman, and A. J. Macpherson. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336:1268-1273, 2012.

23) 芦田 久. 消化管ムチンを介した微生物と宿主の相互作用. *化学と生物* 54:901-908, 2016.

24) Cash, H. L., C. V. Whitham, C. L. Behrendt, and L. V. Hooper. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313:1126-1130, 2006.

25) Lehotzky, R. E., C. L. Partch, S. Mukherjee, H. L. Cash, W. E. Goldman, et al. Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:7722-7727, 2010.

26) Vaishnava, S., M. Yamamoto, K. M. Severson, K. A. Ruhn, X. Yu, et al. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*. 334:255-258, 2011.

27) 綾部 時芳. 腸上皮のPaneth細胞が担う自然免疫・粘膜免疫. *医学のあゆみ* 253:349-353, 2015.

28) Round, J. L. and S. K. Mazmanian. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Rev. Immunol.* 9:313-323, 2009.

29) Tang, T. W. H., H.-C. Chen, C.-Y. Chen, C. Y. T. Yen, C.-J. Lin, et al. Loss of gut microbiota alters immune system composition and cripples postinfarction cardiac repair. *Circulation* 139:647-659, 2019.

30) 宮澤 正顯. 総論 第5章 免疫. 解明病理学 第3版(青笹 克之 総編集), 医歯薬出版 2017; pp89-136.

事例4 (9月9日・月曜日に提示)

血液型に関する講義を聞いた時、今まで一度も輸血や移植を受けたことがなくても、血液型がA型の人はB型抗原に対する自然抗体を、B型の人はA型抗原に対する自然抗体を、またO型の人はA型抗原とB型抗原の両方に対する自然抗体を持つと説明されました。規則抗体という概念も教わりました。自分自身の持たない血液型抗原に対して自然抗体ができるしくみは一体どのようなものなのでしょうか？消化管に常在する微生物が関係すると聞いたことがあります、そうだという証拠があるのでしょうか？また、もしもそうだとすると、どうして分泌型のIgA抗体ではなく、血清中のIgM抗体ができるのでしょうか？

キーワード

- ☐ 血液型
- ☐ 輸血
- ☐ 移植
- ☐ A型抗原、B型抗原
- ☐ 自然抗体
- ☐ 非自己抗原
- ☐ 規則抗体
- ☐ O型の人
- ☐ 消化管常在微生物
- ☐ 微生物叢と血液型抗原
- ☐ 分泌型IgA
- ☐ 血清IgM
- ☐ 抗体のクラス(アイソタイプ)

こんなことを考えてみよう

- ☐ 規則抗体と不規則抗体の違いは？
- ☐ ABO式血液型抗原の実体は何か？
- ☐ 細胞表面の糖鎖はヒト細胞に特有のものか？
- ☐ そもそも「自然抗体」とは何だろうか？
- ☐ 抗原刺激無しに抗体産生が起こることがあるの？
- ☐ Bリンパ球が抗体産生細胞に分化するしくみは？
- ☐ T細胞非依存性抗原とはどのようなものか？
- ☐ 抗体のアイソタイプとは何か？
- ☐ IgMとIgAの構造上の違いと共通点は？
- ☐ クラススイッチのしくみはどのようなものか？

解説

血液型は、歴史的に血球を用いてその抗原の存在と多型性が研究されてきたことからこう呼ばれますが、実際には「血液型」抗原の分布は血球系に限られるものではなく、血球以外の組織にも分布しているものが多いため、「組織血液型抗原」(Histo-blood group antigens)と呼ばれることもあります。例えばABO式血液型抗原は赤血球だけでなく、血小板、血管内皮細胞、各種の上皮組織や神経組織に発現しています^{31, 32)}。

ヒトのABO式血液型抗原の分子実体についてはここでは詳しく述べませんが、それが糖タ

ンパク質や糖脂質に結合した糖鎖の末端構造の違いであることは講義でも詳しく触れています。N-アセチルグルコサミンにガラクトースが β 1-4結合した2型糖鎖のガラクトースに、FUT1酵素活性によりフコースが α 1-2結合したものがH型糖鎖であり、その末端にA型酵素の働きによりN-アセチルガラクトサミンが α 1-3結合で転位したものがA型糖鎖、B型酵素の働きによりガラクトースが α 1-3結合で転位したものがB型糖鎖です^{31, 32)}。成人赤血球の表面には、細胞1つ当たり800,000~10⁶分子のABO抗原糖鎖が存在すると言われます³²⁾。赤血球に発現するABO式血液型糖鎖は、その大半が糖タンパク質として存在しているのに対し、消化管粘膜の上皮細胞などに発現するABO式血液型糖鎖は、その多くが糖脂質に結合していると言われています³²⁾。

ヒトのABO式血液型抗原に対しては、「規則抗体」の存在が知られています。血球細胞表面のABO式血液型抗原の存在によって決まる血液型がA型の人、血清中に自分の持たないB型抗原に対する抗体を持ち、血液型がB型の人、自分の持たないA型抗原に対する抗体を血清中に持ちます。当然、A型抗原もB型抗原も持たないO型の人、血清中に抗A型抗体と抗B型抗体の両方を持ちます。これが「ランドシュタイナー (Landsteiner) の法則」であり、この法則に従う抗血液型抗体を規則抗体と呼びます。稀なBombay型の人、FUT1酵素活性を欠くためH型糖鎖を合成できず、血球細胞表面にA型抗原・B型抗原だけでなく、O型抗原も持ちません。このような人では血清中にA型、B型、及びO型抗原に対する抗体が検出されます。規則抗体の存在が、ABO式血液型の検査に表試験と裏試験 (forward and reverse typings) が行われる理由です。

これに対して、自分自身の持たない(組織)血液型抗原であっても、血清中にそれに対する抗体を持つとは限らない場合、その抗体を「不規則抗体」と呼びます。不規則抗体の多くは、当該の抗原による感作を受けることにより産生されることのあるものですが、感作を受けていなくても、一部の個体で自然抗体として検出される不規則抗体もあり得ます。ヒトの血液型抗原はおよそ34種類が知られていますが、そのうち規則抗体が産生されるのはABO式抗原に対してのみです。不規則抗体産生の原因となる血液型抗原のうち、最も免疫原性が高いのは赤血球細胞膜のアンモニウムイオン輸送体であるRh(D)抗原で、Rh(D)陰性の者はRh(D)抗原による一回の感作で、約80%が抗体陽性となると言われます³³⁾。次いで免疫原性が高いのは、極めて多型性の高い膜貫通型糖タンパク質であるKell抗原で、アミノ酸配列の違いにより25種類以上の表現型が報告されています。Kell抗原の多型に対しては、一回の感作でおよそ10%の人が抗体陽性となり得ると言われます³⁴⁾。

「規則抗体」と言っても、自身の持たないABO式血液型抗原に対する抗体が、生まれつき「自動的に産生される」訳ではありません。新生児はABO式血液型抗原に対する抗体を欠いており、生後4~6ヶ月で自己の持たないABO式抗原に対する抗体が検出させるようになります。成人の抗体価に達するのは5歳から10歳になってからと言われます^{32, 35)}。従って、ABO式血液型抗原に対する「規則抗体」は、生後何らかの抗原刺激を受けることにより産生されて来るのだと理解されます。

ABO血液型抗原に対して生後「規則抗体」が産生される時、その抗原刺激となるのは身体の常在微生物叢が持つ糖鎖抗原であると考えられます³²⁾。実際、消化管微生物叢のグラム陰性菌は、ヒトの血液型糖鎖抗原と同じ糖鎖構造を発現していることがわかっており、調べられた282種のグラム陰性菌のうち、137種がA型、B型、またはO型抗原活性を示したという報告があります³²⁾。

古典的な実験としては、Springerらがニワトリで行った実験がよく引用されます³⁶⁾。通常飼育のレグホン種のニワトリは生後次第にヒトのB型抗原に対する血清抗体を持つようになりますが、Germ-freeで飼育したレグホン種のニワトリは抗B型抗体を持つことがありません(エサに含まれる微量の抗原性物質により、ごく低い抗体価の抗B型抗体が検出されることはあり

ます)。GF飼育のニワトリに、ヒトのB型抗原活性を持つ胎便を経口投与すると、抗B型抗体が産生されるようになります。また、GF飼育のニワトリに、大腸菌O86を混入した餌を与えると、僅か一回の投与だけでも抗B型抗体の産生が起こるようになりました。

糖鎖抗原に対する抗体産生は、当然のことながらヒトの血液型糖鎖抗原に対してのみ起こる訳ではありません。実際、ヒトの血清中に異種の赤血球に対する抗体（異好性凝集素：**heterophile agglutinin**）が存在することは以前から知られています^{37, 38}）。このうち、細胞表面のセラミド糖脂質に結合したGal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-Rエピトープに対する、所謂「anti-Gal」抗体は、非霊長類動物や原猿類の細胞に反応する血清抗体として霊長類が多量に持つもので、「ヒト抗ウサギ赤血球抗体」としても知られ³⁸）、ヒトでは血清中の全免疫グロブリンの1%にも達すると言われます³⁷）。この糖鎖抗原に対するIgE抗体の産生が、一部の人では肉類に対するアレルギー反応の原因になっているとも言われます³⁷）。数百人のボランティアで血清を調べた結果では、**全員がこの糖鎖抗原に対するIgMまたはIgG抗体を持っていた**ということです³⁸）（その意味では「規則抗体」）。

最近、350種類もの糖鎖抗原を載せたマイクロアレイを用いて、GFマウス及びノトバイオートのマウスにおける抗糖鎖抗体産生を網羅的に解析した論文が発表されましたが³⁹）、GFマウスは抗糖鎖抗体の産生がなく、これに無菌でないマウスの消化管内容物を一度経口投与しただけで、抗糖鎖抗体の産生が誘導されました。また、GFマウスに大腸菌W3110株を単独で経口投与したノトバイオートでは、全ての個体でGal α 1-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc糖鎖に対する抗体産生が見られ、うち一匹ではヒトのH型糖鎖に対する抗体産生も認められました。また、*Lactobacillus reuteri* SD2112株を単独投与した群でも、ヒトのABO式血液型糖鎖に対する抗体産生が見られたそうです。

ヒトそのものの確認例もあります。血液型がA型またはO型のボランティアに大腸菌O86を経口摂取させると抗B型抗体価が特異的に上昇し、消化管手術後の患者では、恐らく手術手技に伴って抗原曝露が増加したためと考えられますが、抗A/B抗体価が一時的に平均32倍も上昇したと言う報告もあります³²）。一方で、長期間にわたり高カロリー輸液など非経腸栄養法下にあった乳幼児では、抗ABO血液型抗体は検出されないか、低値であったと言います³²）。これらのことから、ABO式を含む血液型糖鎖抗原に対する抗体産生が、少なくとも消化管の微生物叢が持つ糖鎖抗原を抗原刺激として起こっていることは疑いの余地がないと考えられます。

なお、食生活の欧米化に伴う「レトルト食品」や殺菌牛乳摂取の増加が、過去に記載された抗ABO抗体価に較べて、最近報告される血液型抗体価の著しい低下に関連していると言う考察も行われています³²）。

31) Ewald, D. R. and S. C. J. Sumner. Human microbiota, blood group antigens, and disease. Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med. 10:e1413, 2018.

32) Cooling, L. Blood groups in infection and host susceptibility. Clin. Microbiol. Rev. 28:801-870, 2015.

33) Urbaniak, S. J. Alloimmunity to human red blood cell antigens. VoxSanguinis 83:293-297, 2002.

34) Stackl, G. and C. A. Tormey. Estimating the immunogenicity of blood group antigens: a modified calculation that corrects for transfusion exposures. British J. Haematol. 175:154-160, 2016.

35) Wuttke, N. J., P. J. MacArdle, and H. Zola. Blood group antibodies are made by CD5+ and by CD5- B cells. Immunol. Cell Biol. 75:478-483, 1997.

36) Springer, G. F., R. E. Horton, and M. Forbes. Origin of anti-human blood group B agglutinins in white Leghorn chicks. J. Exp. Med. 110:221-244, 1959.

37) Galili, U. Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogenesis and clinical benefits. Immunology. 140:1-11, 2013.

- 38) Cairns, T. D. H., J. Lee, L. C. Goldberg, B. E. Samuelsson, and D. H. Taube. Natural antibody polymorphism and anti-Gal α 1-3Gal antibodies. In *Xenotransplantation* (D. K. C. Cooper, et al. eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1997; pp33-37.
- 39) Khasbiullina, N. R., N. V. Shilova, M. E. Navakouski, A. Y. Nokel, Y. A. Knirel, et al. Repertoire of Abs primed by bacteria in gnotobiotic mice. *Innate Immunity* 24:180–187, 2018.

事例5（9月11日・水曜日に提示）

どうやら、ABO式血液型糖鎖に対する自然抗体は、消化管の微生物叢が持つ多糖類抗原に対して出生後に作られるようになるようです。しかし、抗原刺激があつて作られるのなら、「自然抗体」と呼ぶのはおかしい話です。ABO式糖鎖抗原に対する抗体産生は、通常の獲得免疫反応における抗体産生と何か違った特徴を持っているのでしょうか？講義のどこかで、B-1 Bリンパ球が関係するという話を聞いたような気がします。B-1 Bリンパ球というのはどのような細胞でしょうか？

キーワード

- ☐ 自然抗体
- ☐ 微生物叢
- ☐ 多糖類抗原
- ☐ 出生後
- ☐ 抗原刺激
- ☐ ABO式抗原
- ☐ 糖鎖
- ☐ 獲得免疫反応
- ☐ B-1 Bリンパ球
- ☐ 通常のBリンパ球

こんなことを考えてみよう

- ☐ 自然抗体とはどのような抗体だろうか？
- ☐ 自然抗体は、どのくらい多く存在するのだろうか？
- ☐ 自然抗体はどこで作られるのだろうか？
- ☐ 自然抗体の特徴は何だろうか？
- ☐ 自然抗体の産生を引き起こす抗原刺激は何だろうか？
- ☐ 自然抗体のアイソタイプは？
- ☐ Bリンパ球はどこで分化するのか？
- ☐ B-1 Bリンパ球とはどのような細胞か？
- ☐ B-1 Bリンパ球はどこで分化するのか？
- ☐ B-1 Bリンパ球と脾臓の辺縁帯 (marginal zone) Bリンパ球は異なるのか？

解説

自身の発現していないABO式血液型抗原に対して出生後にヒト個体が持つようになる抗体は、「自然抗体」と言われます。「自然抗体」とは、それが反応する抗原による明確な「感作」が行われる以前から存在している抗体という意味です。ABO式血液型抗原に対する血清抗体の場合、輸血や移植などを介して同種異系の血液型抗原に曝される機会がなくとも、血清中に「自然に」産生されるようになることから、「自然抗体」と言われるようになっています。しかしながら、既に事例4で議論した通り、ABO式血液型に対する抗体産生には、消化管の常在微生物叢が持つ糖鎖抗原による刺激が必要であり、GF動物では血液型糖鎖抗原に対する抗体産生は見られない訳ですから、「抗原刺激無しに」抗体産生が起こっている訳ではありません。Bリンパ球の活性化と抗体産生細胞への分化には、抗原受容体である膜型免疫グロブリンの架橋とこれに続く細胞内シグナル伝達が必要ですから、

「自然抗体」の産生に際しても抗原受容体の架橋は起こっている筈です。

一方で、既に事例3で述べた粘膜系の免疫応答と全身免疫応答の区画化から考えると、消化管内腔の微生物抗原に対して抗体産生が起こる場合、全身の免疫応答を伴わずに粘膜での分泌型IgA産生だけが起こって良い筈です。血液型糖鎖抗原に対しては、何故血清抗体の産生が起こるのでしょうか？これに対する正確な答えは難しいのですが、事例4で述べたGF動物の実験で、生きた腸内細菌の移入をしなくても、エサの中に微生物由来糖鎖抗原が微量に含まれていると、血液型糖鎖抗原に対する抗体産生が僅かに起こる場合があると報告されていること³⁶⁾が、一つのヒントになりそうです。つまり、消化管の常在微生物叢が産生する血液型糖鎖抗原を含む多糖類抗原は、必ずしもその抗原を持った微生物そのものの上皮を越えた侵入(=感染)を伴わなくても、全身の免疫系に対して提示される機会があるということです。

これに関連して、細菌は細胞壁の多糖類に加え、意外にも糖タンパク質を産生する能力を持つこと、線毛や鞭毛などの細菌タンパク質に糖鎖の結合が起こっていることがわかっています⁴⁰⁾。GFマウスでは全身免疫系のCD4陽性Tリンパ球サブセットに、通常飼育のマウスと較べて変化があることを既に事例3の解説で述べましたが、GFマウスに*Bacteroides fragiris*を単独で経口接種しただけで、通常飼育のマウスと同じようにIFN- γ 産生性のCD4陽性Tリンパ球数が回復します。その際、莢膜のpolysaccharide A (PSA)を欠損する遺伝子改変菌の感染ではIFN- γ 産生細胞数は回復しないことから、PSAが単独で全身免疫応答の制御に関わることがわかります。*Bacteroides fragiris*のPSAはC-型レクチン受容体であるDC-SIGNを介して樹状細胞に結合し、陽イオン基と陰イオン基の両方を持つ Zwitterionic polysaccharidesの一種であるPSAは、小さな断片に分解されて、まるでペプチドのようにMHC class II分子により提示され、CD4陽性Tリンパ球を活性化すると言われています^{40, 41)}。このように、樹状細胞はPSAなどの細菌由来糖鎖を結合して全身の免疫系に提示できると考えられ(右上の図)⁴⁰⁾、一方でTLRのリガンドである線毛や鞭毛のタンパク質が糖タンパク質として細菌糖鎖を含むことがある訳ですから、上記の樹状細胞を介する経路で細菌糖鎖に対する血清抗体の産生が誘導されることは不思議ではありません。

ABO式血液型抗原に対する自然抗体を産生するのは、B-1 Bリンパ球であることを示す多くの証拠があります^{35, 42, 43)}。例えば、B細胞を除去したマウスに腹腔由来のB-1 B細胞を移入することにより、血清中のIgM自然抗体価が回復します⁴²⁾。B-1 B細胞の分化については、講義では殆ど全く触れませんが、今回の事例を機会に、学生さんたちに自己学習を深めて貰いたいと思います。

濾胞型Bリンパ球と脾臓の辺縁帯Bリンパ球を含む通常の(B-2)Bリンパ球が、成体の骨髓造血幹細胞から分化し、骨髓で未熟Bリンパ球となって脾臓に移動し成熟する(この過程は、講義で詳しく述べます)のに対し、B-1 Bリンパ球は胎児肝で分化し、全身のリンパ組織に分布して、そこで自己複製を行うことにより維持されています⁴⁵⁾。このB-1 Bリンパ球とB-2 Bリンパ球の関係は、胎児造血系に由来して全身組織で自己複製により維持されているマクロファージと、成体の骨髓で造血幹細胞から分化する単球及び単球由来細胞(マクロファージの形態を示しうる)との関係(19頁の図)によく似ています。

マウスでは腹腔にB-1 Bリンパ球があり、これが消化管粘膜のIgA産生細胞に分化することが知られていますが、ヒトでは腹腔のB-1 Bリンパ球はなく、そこからのIgA産生細胞分化は否定的です。マウスの腹腔B-1 B細胞は、脾臓にあるB-1 B細胞が活性化し、メモリー細胞に分化したものではないかと考えられています。ヒトのB-1 B細胞については、その実体が長いこと議論の対象でしたが、最近ヒトにもB-1 B細胞が存在することが明確に認められています。但し、マウスのようにCD5陽性Bリンパ球として定義されるものではなく、むしろCD5の発現は無い場合も多く、ヒトでは臍帯血や成人末梢血のCD20陽性、CD27陽性、CD43陽性、

CD70陰性の分画として定義されます⁴⁴⁾。このように定義されたヒトのB-1 B細胞はCD11b陽性、CD86陽性の形質を持つものを多く含み、抗原提示能が高いと考えられます。ヒトでは臍帯血B細胞の75%、成人末梢血B細胞の15~30%がこうして定義されたB-1 B細胞で、定常状態のヒト血清IgMの80~90%、及び恐らく血清IgAの半分近くがB-1 Bリンパ球由来の自然抗体であると考えられています⁴⁴⁾。

B-1 B細胞はTLRを発現しており、抗原刺激から1~3日という早期に、T細胞非依存性にIgMを産生できます⁴⁵⁾。このことから、B-1 B細胞はB-2 B細胞によるT細胞依存性の抗体産生が起こる(抗原刺激から1週間以上を要する)までの「繋ぎ」として、感染防御に重要な役割を果たすものと予想されます。一方、既に述べた通り、TLRリガンドでもある細菌の線毛タンパク質や鞭毛タンパク質は糖タンパク質であり、血液型糖鎖抗原とも交差反応性のある細菌由来糖鎖を含んでいます。また、細菌細胞壁や莢膜の糖鎖は、DC-SIGNを介して樹状細胞に結合し、全身免疫系に対する抗原提示が行われます。抗原受容体とTLRとを介するB細胞活性化や、繰り返し構造を持つ多糖類による抗原受容体の架橋は、T細胞非依存性のIgM産生に結び付きますから、これが血液型糖鎖抗原に対する自然抗体産生のしくみであると考えられます。一方で、糖タンパク質である線毛或いは鞭毛タンパク質が抗原になっている場合、或いはZwitterionic polysaccharideであるPSAのようなものが抗原となっている場合は、CD4陽性エフェクターT細胞の活性化を介してT-B細胞間相互作用が起こり、IgGやIgAへのクラススイッチが進行することも十分考えられます。一般に、ABO式血液型抗原に対する自然抗体はIgMだけであるかのように理解されがちですが、実はヒトが持つABO式血液型糖鎖に対する自然抗体には、しばしばIgG(特にIgG3)やIgAも含まれることが知られています。それどころか、血液型がO型の人が持つ抗A型・抗B型抗体は、実際にはIgGが主体であると言われます⁴⁶⁾。これら、クラススイッチした抗血液型抗体、特にIgGは、B-1 B細胞だけでなく、成人後に通常のB-2 B細胞からも産生されるようになると考えられています⁴⁶⁾。学生さんたちには、その生理的及び病的な意味を考えて貰いたいと思います。

40) Comstock, L. E. and D. L. Kasper. Bacterial glycans: Key mediators of diverse host immune responses. Cell 126:847-850, 2006.

41) Bloem, K., J. J. García-Vallejo, I. M. Vuist, B. A. Cobb, S. J. van Vliet, et al. Interaction of the capsular polysaccharide a from *Bacteroides fragilis* with DC-SIGN on human dendritic cells is necessary for its processing and presentation to T cells. Front. Immunol. 4:103, 2013.

42) Holodick, N. E., N. Rodríguez-Zhurbenko, and A. M. Hernández. Defining natural antibodies. Front. Immunol. 8:872, 2017.

43) Panda, S and J. L. Ding. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. J. Immunol. 194:13-20, 2015.

44) Rothstein, T. L., D. O. Griffin, N. E. Holodick, T. D. Quach, and H. Kaku. Human B-1 cells take the stage. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1285:97-114, 2013.

45) Hoffman, W., F. G. Lakkis, and G. Chalasani. B cells, antibodies, and more. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 11:137-154, 2016.

46) Branch, D. R. Anti-A and anti-B: what are they and where do they come from? Transplantation 55:S74-S79, 2015.