

# A 群溶血レンサ球菌感染における特異的 *In Vitro* リンパ球幼若化反応

滝 沢 慶 彦

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨 教授)

## Studies on Tests of *In Vitro* Lymphocyte Transformation to Group A Streptococcal Antigens in Patients with Streptococcal Infection

Yoshihiko TAKIZAWA

Department of Pediatrics, Sapporo Medical Collage

(Chief : Prof. T. Nakao)

Using techniques of the whole blood microculture assay, the activity of lymphocyte transformation (LTF) to antigens of group A streptococci was studied in normal subjects and in various illnesses caused by this agent. The antigens included C-polysaccharide, T1, T4, T6, T8, T12, T22, and B3264.

The results are summarized as follows.

1. An age-related difference was observed in the LTF response to T antigens; that is, the highest mean activity was obtained from adults (SI, 40.3) followed by children (SI, 17.2) and cord blood (SI, 9.7) showed the lowest response.

2. Regardless of the epidemic types of streptococci, particular T antigens stimulated lymphocytes to proliferate more efficiently than others.

3. The detection of the LTF response in some specimens of cord blood and the presence of the activity in the B lymphocyte fraction after stimulation either by C-polysaccharide or T antigens suggest contribution of a nonspecific component in the reaction.

4. The LTF activity to T antigens in the group of patients with acute glomerulonephritis or with acute rheumatic fever (SI, 7.9) was significantly ( $p < 0.05$ ) suppressed compared to that of normal children (SI, 17.2) while the response of patients with scarlet fever (SI, 38.1) was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of normal subjects.

5. A type specific cellular immune response to T12 antigen was demonstrated in patients with scarlet fever due to streptococcal infection with T12 antigen.

6. No correlation existed between the magnitude of the LTF response to T4 and the antibody activity to the antigen in the serum.

7. A significant association was found between the existence of HLA-DR6J or MT2 and low responsiveness to C-polysaccharide. (Received August 20, 1983 and accepted September 26, 1983)

**Key words:** *In vitro* lymphocyte transformation test, Streptococcal antigens, Streptococcal infection, Type T12 specific cellular immune response, HLA-DR6J.

### 1 結 言

A 群溶血レンサ球菌(以下 A 群溶レン菌と略す)は、化膿性疾患の病原菌として、あるいは急性糸球体腎炎やリウマチ熱の誘因として、抗生物質が発達した現在

でも依然として重要な地位を占めている。また、本症の感染防御には血中型特異抗体が重要な役割を演じていることが、その抗体価と発症との関連から明らかにされている<sup>1)</sup>。一方、最近、種々の溶レン菌抗原を用いた皮内反応や、*in vitro* におけるリンパ球反応から、溶

レン菌感染症においても細胞性免疫の成立が示唆されている<sup>2)</sup>。しかしながら現在のところ、このような細胞性免疫が本症の種々の病像へのかかわりについては必ずしも明確ではない。

急性糸球体腎炎およびリウマチ熱がA群溶レン菌感染を基盤として発症することは古くから指摘されており、Kaplan and Meyeseran<sup>3)</sup>が溶レン菌M蛋白とヒト筋線維および血管平滑筋とが共通抗原を有することを始めて報告して以来、共通抗原による発症のメカニズムが追求されている。したがって、心筋、弁膜あるいは腎糸球体基底膜と共通抗原を有するとされる溶レン菌抗原<sup>4,5)</sup>に対して、ヒト末梢リンパ球が強い幼若化反応を示す<sup>6,7)</sup>ということは、この免疫機構もまた、これらの疾患発生に関係する免疫異常の一要因となりうる可能性を示唆するものと考えられる<sup>8-10)</sup>。また、最近、溶レン菌感染症からこれらの疾患への進展には、その遺伝的背景としてhuman leukocyte antigen (HLA)と免疫応答遺伝子の連鎖不平衡が関与する可能性も示唆されている<sup>9)</sup>。このような観点から、著者はA群溶レン菌細胞壁成分であるC多糖体抗原とT抗原を用い、正常人、あるいは本症罹患者の末梢リンパ球について*in vitro*幼若化反応を試み、同時にHLA typingを行なって、そのような反応に関係する遺伝的な背景について若干の検討をおこなった。

## 2 研究対象

### 2.1 正常成人

医学生73例およびその他13例、計86例の正常成人(22~50歳、平均年齢25.0歳)から採血した。そのうち76例についてはHLAのtypingも行なった。

### 2.2 正常小児

溶レン菌感染または二次症のない小児21例(3~14歳、平均年齢6.9歳)から採血した。

### 2.3 新生児

市立札幌病院産婦人科および札幌第一病院産婦人科、同小児科の御好意により、12例の新生児から臍帯血を得た。

### 2.4 猩紅熱患者

市立札幌病院伝染病科に入院した猩紅熱患者50例(2~14歳、平均年齢7.0歳)について発病早期(2~6病日、平均3.4病日)に採血した。いずれも合併症はなく、予後良好に経過した症例である。これらの患者のうち26例から菌が分離され、その内訳はT12型9例、T4型4例、T6型4例、T22型1例、および型別不能株8例であった。そのうち14例については、1週間ご

とに4回採血し検討した。

### 2.5 急性糸球体腎炎(AGN)患者および急性リウマチ熱(ARF)患者

市立札幌病院小児科に入院したAGN患者8例およびARF患者2例(5~11歳、平均年齢7.5歳)について、いずれも入院時またはその後3日以内に採血した。なお、ARF患者では採血時アスピリンやステロイドホルモンは投与されていない。AGN患者ではいずれも、浮腫および血圧上昇を伴った蛋白尿ないし血尿があり、また、2例のARF患者では、心炎と関節痛、発熱、急性期反応陽性等の諸症状が認められ、改訂Jonesの診断基準を満たしていた。

## 3 研究方法

### 3.1 溶レン菌抗原の作製

#### 3.1.1 溶レン菌標準株

使用した溶レン菌標準株は、いずれも、WHOのNational Streptococcus Reference Laboratoryである神奈川県衛生研究所の保存株で、当研究所の宮本泰博士、および札幌医科大学微生物学教室の前川静枝助教授の御好意により分与を受けたものである。使用したのは、group A T1(T1 glossy)、T4(4990)、T6(T6)、T8(SF4)、T12(SF42)、T22(63T)、およびB3264(C637)の7種である。

#### 3.1.2 A群C多糖体(A-C)の抽出

Fullerの方法<sup>11)</sup>に準拠し抽出した。すなわち、A群T12型菌標準株(SF42)を2 litersのTodd Hewitt brothにて37°C、48時間培養した。その菌体を60°C、30分間、恒温槽にて殺菌後、生理食塩液で3回洗浄し、さらに40 mlのホルムアルデヒドを加えて160°C、15分間恒温油槽に保った。冷却後、遠心上清に塩酸アルコール(無水エタノール95容+2N塩酸5容)100 mlを混和し、沈降物を遠心により取り除いた。この上清にアセトン200 mlを加え、500 rpm、30分間遠心して得られた沈澱物をC多糖体として採取し、蒸留水で24時間透析後、凍結乾燥し保存した。

#### 3.1.3 T抗原の抽出

Erwaのトリプシン法<sup>12)</sup>に準拠し、まず、4 lのTodd Hewitt brothにより37°C、48時間培養した菌体を60°C、30分間加熱殺菌後、生理食塩液で3回洗浄し、菌体をリン酸緩衝食塩液(PBS, pH 8.2)の54 mlに浮遊させた。ついで、5%トリプシン(Difco 1:250)(Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)液6 mlを加え、50°Cの恒温槽にて2時間作用させた後、5000 rpm、30分間の遠心により沈降物を取り除き、上清を1 N塩

酸で pH 2.5 に調整した。これをさらに 4°C で一夜静置し、生じた沈澱物を 5000 rpm, 10 分間遠心して集め、PBS (pH 7.2) 20 ml に溶解後、蒸留水で 24 時間透析し、凍結乾燥した。C 多糖体, T 抗原とともに、使用にあたっては RPMI 1640 medium (10 mM Hepes buffer, kanamycin sulfate 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加) で溶解して、至適濃度の抗原液を作製した。

### 3.2 *In vitro* Lymphocyte transformation (LTF) 反応

全血微量培養法<sup>13,14)</sup>によりおこなった。すなわち、1~2 ml のヘパリン添加 (heparin Na 20 単位/ml) 末稍血を RPMI 1640 medium で 10 倍希釈し、U 型マイクロプレート (A/S NUNC, Denmark) に分注 (0.2 ml/well) して、抗原 (0.02 ml/well) を加えた後、37°C の炭酸ガス培養器 (CO<sub>2</sub> 5%) で 7 日間培養した。なお同一抗原につき 4 ケの well を使用し、対照培養として、常に、抗原非添加のものを実験に含め、また、アイソトープラベルのため、培養終了の 24 時間前に <sup>3</sup>H-thymidine (specific activity 5.0 Ci/mmol) (Radiochemical Centre, Amersham, England) 0.2  $\mu\text{Ci}/0.02 \text{ ml}$  を加えた。培養血液の処理は semiautomatic cell harvester (LM 101, ラボマッシュ, ラボサイエンス, 東京) を用い、得られたリンパ球を glass fiber filter 上に採取した。リンパ球にとり込まれた <sup>3</sup>H-thymidine の radioactivity は、Packard model LS 6024 liquid scintillation spectrometer (Packard, Inst. Co., Downers Grove, Ill.) を用いて測定した。結果は count per minute (cpm), および stimulation index (SI) で示した。SI は抗原添加培養血の cpm を対照培養血の cpm で除した値である。

### 3.3 LTF 反応細胞の同定

LTF 反応によって検出される活性リンパ球の subpopulation を明らかにする目的で、以下の実験を行なった。すなわち、10 倍希釈血液を 5 ml ずつ試験管に分注し、それぞれ、A-C 抗原, T4 抗原, および T6 抗原を 0.5 ml 添加して 7 日間培養した。培養終了の 24 時間に <sup>3</sup>H-Thymidine 5  $\mu\text{Ci}/0.5 \text{ ml}$  を加え、この培養血液から Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) を用いた比重遠心法<sup>15)</sup>によりリンパ球を分離し、羊血球による E-rosette 形成<sup>16)</sup>後、再度の比重遠心法によって T cell 分画と non T cell 分画とに分離し、各々の radioactivity を測定した。

### 3.4 分離溶レン菌の群別と T 凝集反応による型別 (T 型別)

宮本の報告<sup>17)</sup>に基づき作製した家兔免疫抗血清を用

いて、スライド凝集反応により群別と T 型別を行なった。一部は市販の抗血清 (東芝科学, 東京) を使用した。

### 3.5 T4 抗体価の測定

著者ら<sup>18)</sup>が行なった感作血球凝集反応により測定した。すなわち、Erwa のトリプシン法により抽出した T4 抗原 (T4 標準株使用) とヒト O 型血球を用いて以下のごとく行なった。

#### 3.5.1 T4 感作血球の作製

5%ホルマリン処理血球浮遊液 1 容に、1:2000 タンニン酸加 PBS (pH 7.2) 1 容を加え、37°C, 10 分間恒温槽に保ち、PBS で 1 回洗浄後、再度 PBS で 5% 血球浮遊液とした。この 1 容に対し、1 mg/ml 濃度の T4 抗原液 1 容と pH 6.2 の PBS4 容を加え、37°C, 20 分間恒温槽に保った後、1200 rpm, 3 分間、1:200 正常ウサギ血清加生理食塩液 (1:200 NRS) で 3 回洗浄し、最終的に 1:200 NRS で 5% に調整した。

#### 3.5.2 T4 抗体価測定

非働化した被検血清を 1:200 NRS を用いて倍数希釈した。次いでこの 0.2 ml を U 型マイクロプレートにとり、5% 感作血球を 0.025 ml 加え、軽く攪拌後、3 時間室温に静置し、血球凝集像より抗体価を判定した。陰性対照として血清の代りに 1:200 NRS のみものを用いた。

### 3.6 HLA の typing

LTF 反応について検討のなされた正常成人の HLA 型は、北海道大学医学部第一病理学教室に依頼し、A, B, C, DR, MB 系, MT 系の各 locus の typing を行なった。

### 3.7 統計解析

LTF 反応の結果を SI 値で示し、統計処理をおこなった。解析には  $\chi^2$  検定 (Yates 補正) および Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を用いた。

## 4 成 績

### 4.1 溶レン菌 T 抗原の確認

作製した T 抗原の特異性について若干の検討を試みた。これらのうち、他の T 抗原と交叉反応がないとされている T1 抗原と T1, T4, および T12 家兔免疫抗血清との間でゲル内沈降反応をおこなったところ、T1 抗原は対応する抗血清とのみ反応し、この抽出方法が T 抗原の精製に適当であることを確認した (Fig. 1)。

4.2 リンパ球幼若化 (LTF) 反応

4.2.1 至適抗原濃度

猩紅熱患者 5 例の末梢血について、抗原濃度の変化に伴う LTF 反応の変化を検討し、その結果を Fig. 2 に示した。抗原は、T4, T6, B3264, A-C を使用したが、7 日間培養ではいずれの抗原においても、その最終濃度が 50~100  $\mu\text{g/ml}$  において最も高い SI 値を示す傾向にあった。したがって、以下の実験については 100  $\mu\text{g/ml}$  濃度の抗原を常時使用した。

4.2.2 新生児および正常人の LTF 反応

まず、新生児 (臍帯血) 12 例における各種抗原に対する LTF 反応を SI 値で Table 1 に示した。各抗原に対する反応は、検出されないか、あるいは概して低いものが大部分であったが、症例 9, 11 のようになかなか強い反応を示す例も認められた。平均 SI 値は、T1. 1.6, T4. 16.7, T6. 25.6, T8. 2.3, T12. 1.2, T22. 2.6, B3264. 17.5 であり、傾向として T4, T6, B3264 抗原

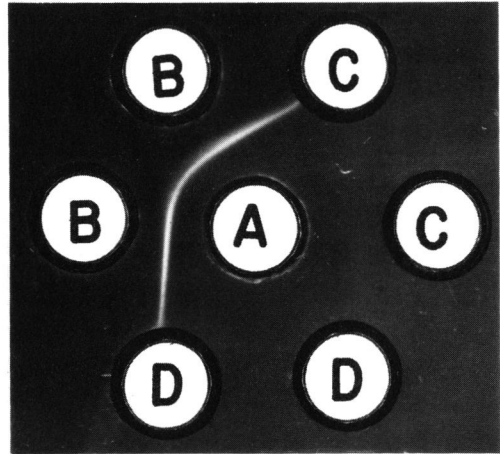


Fig. 1 Identification of trypsin-extracted T1 antigen by immunodiffusion.  
A; T1 antigen prepared, C; T4 antiserum,  
B; T1 antiserum, D; T12 antiserum.

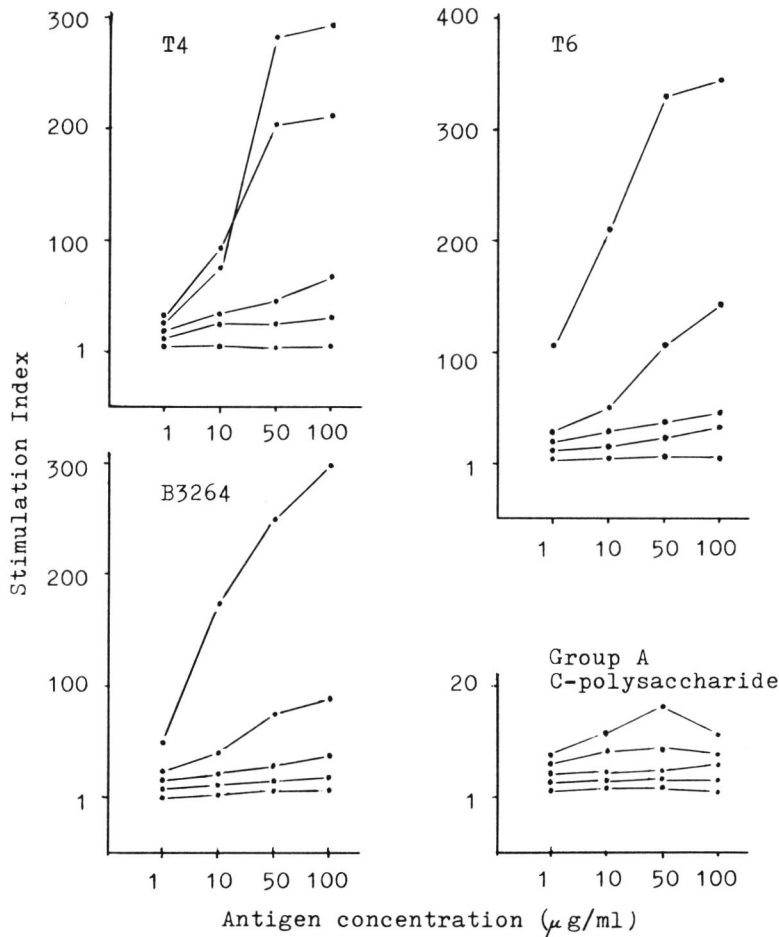


Fig. 2 Dose response of lymphocyte transformation to streptococcal antigens.

**Table 1** *Lymphocyte transformation activity to streptococcal T antigens in cord blood.*

No.	Stimulation Index to streptococcal antigen of						
	T1	T4	T6	T8	T12	T22	B3264
1.	1.1	0.9	1.6	0.8	1.2	1.0	1.2
2.	1.4	0.9	8.0	1.7	0.9	0.9	0.6
3.	0.6	1.5	8.7	0.7	0.6	0.6	4.0
4.	2.5	1.7	17.6	8.2	1.0	10.0	7.2
5.	2.5	4.7	6.3	3.0	1.0	4.0	3.0
6.	1.3	0.9	1.2	0.9	1.1	1.2	0.9
7.	3.6	3.0	3.6	3.3	2.5	3.2	2.1
8.	1.6	1.2	1.6	1.8	1.1	1.8	1.1
9.	0.9	133.6	212.5	3.8	1.8	5.0	168.1
10.	1.0	1.1	0.6	0.8	0.9	0.8	0.9
11.	1.5	45.9	42.9	1.7	1.2	1.7	20.2
12.	1.4	1.0	2.7	1.4	1.1	1.4	1.0
Mean SI	1.6	16.7	25.6	2.3	1.2	2.6	17.5

に対して比較的強い反応がみられた。なお、全体的にみた場合、これらの反応は後述する正常小児に比し低値であったが、これら2群の間に有意差は認められなかった ( $Z=0.29$ ,  $p<0.4$ )。

正常小児21例についてのLTF反応の結果をFig. 3に示した。平均SI値は、T1. 13.0, T4. 73.7, T6. 21.3, T8. 1.2, T12. 4.5, T22. 1.6, B3264. 5.3であり、T1, T4抗原に対しては新生児より高い反応を示したが、他の抗原に対するそれには大差は認めなかった。

一方、正常成人86例におけるLTF反応(Fig. 4)の平均SI値は、T抗原の場合、T1. 9.4, T4. 105.5,

T6. 65.8, T8. 1.7, T12. 16.7, T22. 7.4, B3264. 21.8であり、正常小児に比し明らかに高く( $p<0.05$ )、特にT4, T6に対してその傾向が著明であった。また、A-C抗原に対する反応も検討したが、48例(55.8%)が陽性反応を示し、平均SI値は13.2であった。

#### 4・2・3 疾患別LTF反応

猩紅熱患者50例の発病早期のT抗原に対するLTF反応の成績をFig. 5に示した。平均SI値は、T1. 1.2, T4. 60.8, T6. 112.4, T8. 11.2, T22. 2.0, B3264. 76.9であり、正常小児に比し有意に高く( $Z=2.23$ ,  $p<0.05$ )、また、T4, T6, T12, B3264においてその傾向が著明であった。

Table 2に、AGN患者8例およびARF患者2例についての各抗原に対するLTF反応をSI値で示した。平均SI値は、T1. 1.1, T4. 1.2, T6. 25.0, T8. 1.2, T12. 1.4, T22. 1.3, B3264. 24.2であった。B3264以外の抗原に対しては正常小児に比し明らかに低値であり、全体として統計学的にも有意に低い値を示していた( $Z=1.71$ ,  $p<0.05$ )。このように溶レン菌感染が先行する患者群において、溶レン菌T抗原に対して、LTF活性が明らかに低下していることは、何らかの原因によって反応が抑制されている可能性も考えられた。

#### 4・2・4 LTF反応陽性率

以上の新生児、正常小児、正常成人、猩紅熱患者、およびAGN・ARF患者群における各抗原に対するLTF反応陽性(SI $\geq 3.0$ )率をFig. 6に示した。正常人における陽性率の場合、新生児では0%(T12)~58.3%(T6)、小児では0%(T8)~57.1%(T4)、成人の場合は8.1%(T8)~80.2%(T4)であり、成人のT4に対

**Table 2** *Lymphocyte transformation activity to streptococcal T antigens in patients with acute glomerulonephritis (AGN) or acute rheumatic fever (ARF).*

No. Disease	Age (Years)	Stimulation Index to streptococcal antigen of						
		T1	T4	T6	T8	T12	T22	B3264
1. AGN	6	0.8	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	—
2. ARF	10	1.0	1.0	1.9	1.0	1.1	1.1	—
3. ARF	10	0.9	0.9	1.3	0.9	1.0	1.2	—
4. AGN	7	2.6	1.4	0.9	1.8	3.2	1.2	1.3
5. AGN	5	1.0	1.2	227.6	2.5	3.9	2.0	46.0
6. AGN	6	1.1	1.9	3.4	1.1	0.9	3.1	89.1
7. AGN	11	0.6	0.9	1.3	0.8	1.2	1.4	1.4
8. AGN	7	2.1	2.7	10.5	1.5	0.6	0.4	15.3
9. AGN	7	0.6	0.8	2.4	0.8	0.7	1.7	12.9
10. AGN	6	0.9	0.4	0.6	0.8	0.7	0.6	3.8
Mean SI		1.1	1.2	25.0	1.2	1.4	1.3	24.2

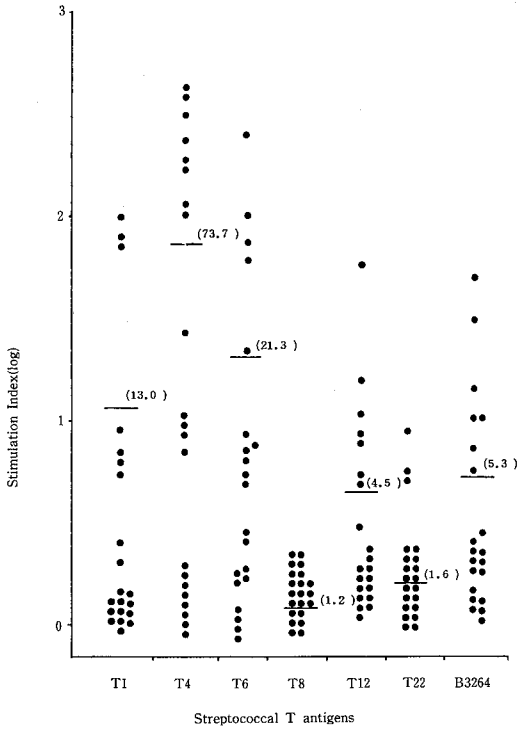


Fig. 3 Lymphocyte transformation activity to streptococcal T antigens in 21 cases of healthy children. The mean stimulation indices to each antigen are also indicated in the figure.

する反応においていく分他の群より高い陽性率が見られた。疾患別にみると、猩紅熱患者では4.4% (T1) ~80.9% (T6) であり、AGN・ARF 患者群では0% (T1, T4, T8) ~71.4% (B3264) であった。このように、LTF 反応陽性率には、用いた抗原や疾患によって大きな差がみられたが、全体的にみると急性期猩紅熱患者では T6, B3264 に対して高陽性率を示す傾向があり、AGN・ARF 患者群では B 3264 に対する高陽性率にもかかわらず、全体的に見ると、正常小児に比し陽性率が低い ( $\chi^2=3.72, p<0.05$ ) ことなどが特徴のように思われた。

4・2・5 猩紅熱患者における LTF 反応の推移

猩紅熱患者 14 例について入院時より 1 週間ごとに採血し、4 週間にわたり LTF 反応の推移を検討した。Fig. 7 に A-C 抗原に対する LTF 反応の推移を示したが、入院時から 4 週目までの平均 SI 値をみると、2.4, 25.8, 4.5, 3.9, 2.1 と、第 1 週目に最も高い値を示

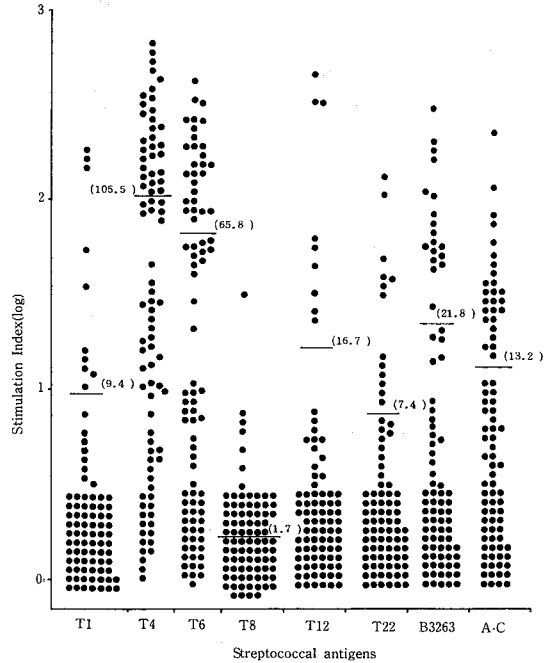


Fig. 4 Lymphocyte transformation activity to streptococcal antigens in 86 cases of healthy adults.

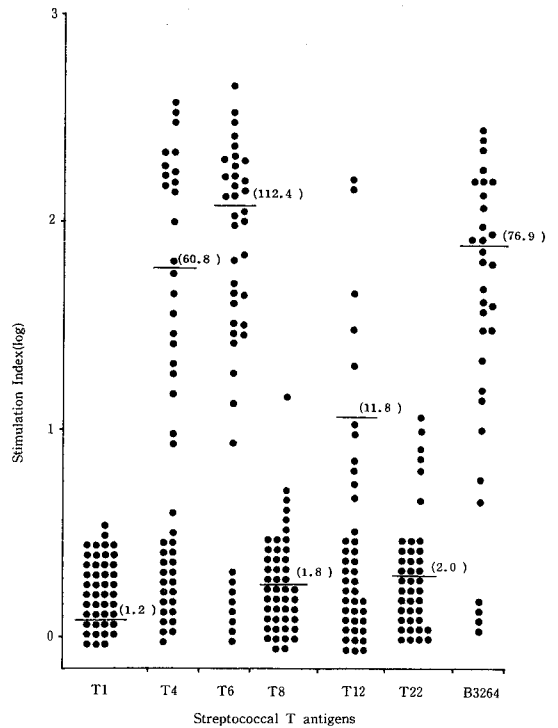


Fig. 5 Lymphocyte transformation activity to streptococcal T antigens in 50 patients with scarlet fever.

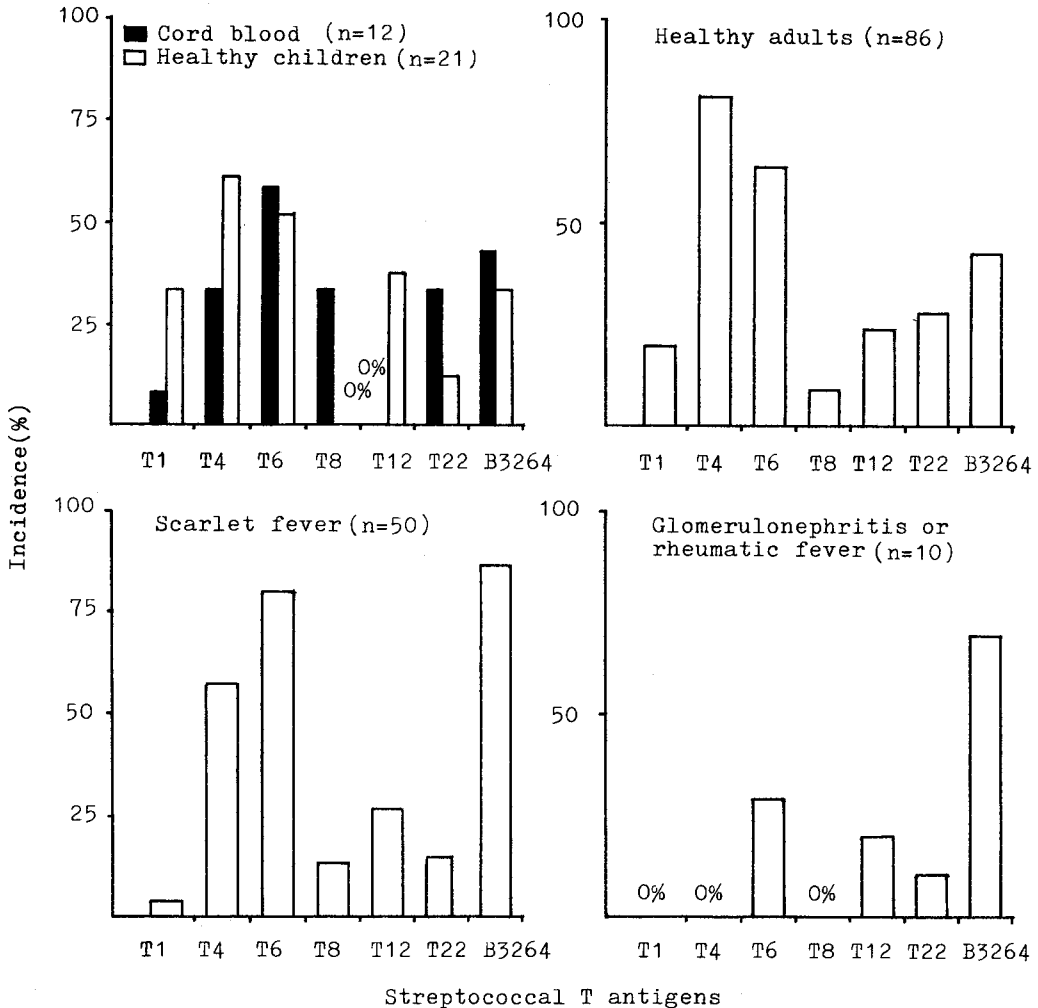


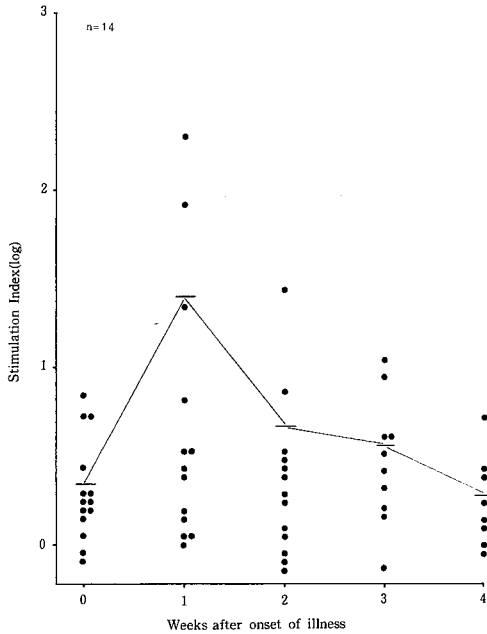
Fig. 6 Incidence of cases with positive lymphocyte transformation activity ( $SI \geq 3.0$ ) to streptococcal T antigens in healthy controls and in patients with scarlet fever, glomerulonephritis or rheumatic fever.

していた。しかし、個々の反応には大きな差があり、統計学的に有意な変化とは認められなかった ( $U=66$ ,  $p < 0.20$ )。次に、これら14例の猩紅熱患者で、T12型が分離された4例と、その他の型が分離された5例 (T4. 2例, T6. 2例, T22. 1例) について、T12抗原に対するLTF反応の推移を観察した (Fig. 8)。T12型猩紅熱患者4例について入院時から4週目までの平均SI値をみると、1.8, 3.9, 5.5, 14.6, 11.7であり、第3週目と4週目に高い値を示していた。また、これは統計学的に有意な上昇であると考えられた ( $U=3.5$ ,  $p < 0.05$ )。一方、T12型以外の猩紅熱患者においては、各々、1.3, 2.0, 0.9, 1.0, 1.1であり、反

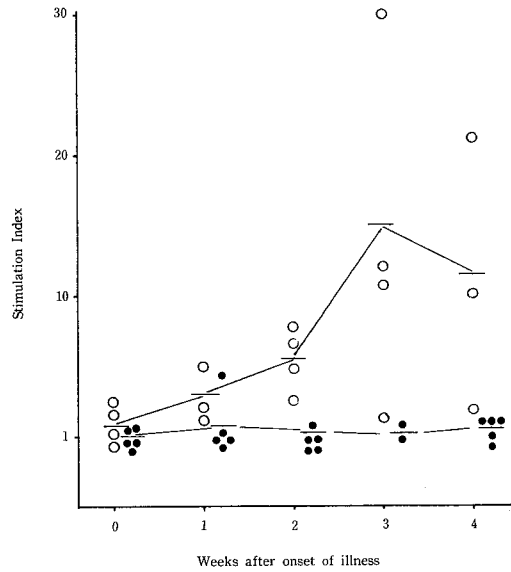
応は全く認められなかった。さらに、これらの反応とT12型同士での反応との間には統計学的な有意差が認められ ( $U=1$ ,  $p < 0.004$ )、T12抗原に対して型特異的細胞性免疫の成立することが証明された。

#### 4.2.6 LTF反応細胞の同定

以上述べたLTF反応にはいかなるリンパ球 subpopulation が関係するなかを検討するために、抗原添加、あるいは非添加のもとで培養後、分離したE-rosetteおよびnon E-rosette分画について $^3H$ -thymidineの取り込みを測定した。正常成人5例、猩紅熱患者5例についての結果をTable 3に示したが、E-rosetteないしnon E-rosette形成リンパ球分画における活性を対照培



**Fig. 7** Development of lymphocyte transformation activity to the C-polysaccharide of group A streptococci in patients with scarlet fever. The solid line indicates the mean stimulation index.

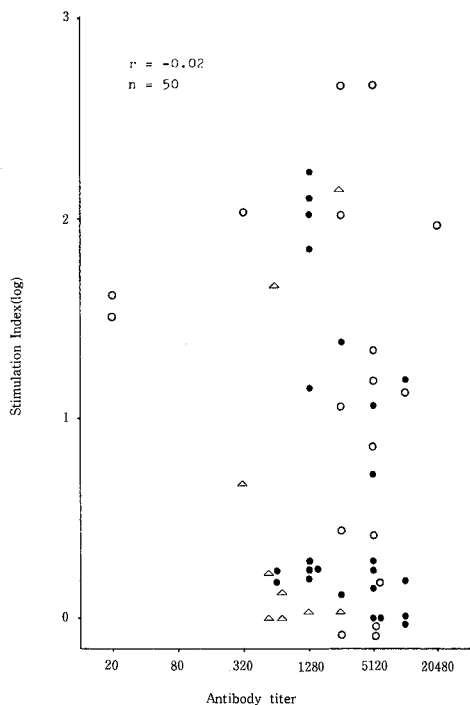


**Fig. 8** Development of lymphocyte transformation activity to streptococcal T12 antigen in patients with scarlet fever due to infection with type T12 strains (○) or due to other types (●).

**Table 3** Lymphocyte transformation activity to streptococcal antigens in the E-rosetting T-lymphocyte or in non E-rosetting lymphocyte fractions after in vitro culture of whole blood.

No.	Lymphocyte fraction	Medium alone cpm	Response to the streptococcal antigen of					
			A-C		T4		T6	
			cpm	SI	cpm	SI	cpm	SI
1.	E	56	1197	21.4				
	non E	31	372	12.0				
2.	E	137	526	3.8				
	non E	80	274	3.4				
3.	E	45	226	5.0				
	non E	30	215	7.2				
4.	E	52	145	2.8				
	non E	44	79	1.8				
5.	E	42	231	5.5				
	non E	22	148	6.7				
6.	E	47			163	3.5	163	3.5
	non E	26			97	3.7	90	2.7
7.	E	83			2081	25.1	494	6.0
	non E	56			733	13.1	253	4.5
8.	E	61			3942	64.6	10134	166.1
	non E	27			428	15.9	693	25.7
9.	E	281			38755	138.0	25339	90.2
	non E	131			17984	137.3	5553	42.4
10.	E	581			22070	38.0	2592	4.5
	non E	218			9413	43.2	816	3.7





**Fig. 9** Relationship between lymphocyte transformation activity to streptococcal T4-antigen and serum T4-antibody titer.

○; Normal adults, ●; Patients, △; Cord blood.

養のそれぞれの cpm で除した値(SI)で比較すると, A-C 抗原, T 抗原に対する反応は共に, 必ずしも E-rosette 分画にのみ存在するとは限らず, non E-rosette 分画にも存在することがわかった.

#### 4.3 LTF 反応と血中型特異抗体

LTF 反応と血中型特異抗体価との関連についていくらかの知見を得ることを目的として, T4 抗原に対する血中抗体価を測定した. 対象は T4 抗原により LTF 反応を検討した者の中で新生児 9 例, 正常成人 17 例, その他各種疾患 24 例の計 50 例である. Fig. 9 に示すごとく, 正常人, 罹患者とも, LTF 反応の有無にかかわらず, ほとんどの症例で比較的高い抗体価が検出され, LTF 反応との間には明瞭な関係は認められなかった(相関係数,  $r = -0.02$ ). また, 正常成人についてのみ観察しても  $r = -0.03$  であり, 関連性は認められなかった.

#### 4.4 LTF 反応と HLA 型との関係

**Table 4** Frequency of HLA antigens in high responders ( $SI \geq 3.0$ ) and low responders ( $SI < 3.0$ ) to C-polysaccharide of group A streptococci.

Stimulation Index (SI)	SI $\geq 3.0$	SI $< 3.0$
Number of cases (%)	40 ( 53)	36 ( 47)
HLA-A		
	2 13 ( 43)	17 (57)
	11 7 ( 58)	5 (42)
	26 12 ( 67)	6 (33)
w24	26 ( 58)	19 (42)
w31	7 ( 54)	6 (46)
w33	4 ( 31)	9 (69)
HLA-B		
	7 1 ( 25)	3 (75)
	40 17 ( 63)	10 (37)
w22	3 (100)	0 ( 0)
w35	9 ( 56)	7 (44)
w44	2 ( 20)	8 (80)
w51	4 ( 33)	8 (67)
w52	10 ( 63)	6 (37)
w54	5 ( 63)	3 (37)
w59	3 (100)	0 ( 0)
w62	9 ( 53)	8 (47)
SN 2	1 ( 33)	2 (67)
HLA-C		
w1	13 ( 72)	5 (28)
w3	22 ( 50)	22 (50)
w4	3 ( 50)	3 (50)
Number of cases (%)	34 ( 50)	34 (50)
HLA-DR		
	1 2 ( 40)	3 (60)
	2 15 ( 68)	7 (32)
	4 15 ( 56)	12 (44)
	5 1 ( 20)	4 (80)
5J	9 ( 53)	8 (47)
6J	6 ( 27)	16 (73)*
w 9	14 ( 64)	6 (36)
MB 1	20 ( 47)	23 (53)
	3 30 ( 51)	29 (49)
MT 2	15 ( 37)	26 (63)**
	3 26 ( 59)	18 (41)

\*  $\chi^2 = 5.44$   $p < 0.05$ , \*\*  $\chi^2 = 6.14$   $p < 0.05$

さらに, このような溶レン菌抗原に対するリンパ球の応答性が HLA 抗原と何らかの関連を有するか否かについて検討するため, 正常成人 76 例の A-C 抗原および 7 種類の T 抗原に対する反応とそれらの HLA 型との関係を調べた. これらのうち, 有意な所見の得られた A-C 抗原に対する反応のみを Table 4 に示したが,

これはSI値3.0以上の高応答群とそれ以下の低応答群とに別け、HLAの各抗原別に $\chi^2$ 検定(Yates補正)をおこなったものである。それによると、まず、A-C抗原に対するLTF反応とHLA-A, B, C領域の関係では、高応答群、低応答群ともに、統計学的に有意な関連を示す特定の抗原はみられなかった。次に、DR領域との関係では、低応答群において、HLA-DR6JおよびMT2保有者の割合(各々73%, 63%)が全体としてみた低応答群の割合(50%)より高く、統計学的にもこれら2つのHLA抗原と低応答群とは有意な関連のあることが示された(各々 $\chi^2=5.44$ ,  $p<0.05$ および $\chi^2=6.14$ ,  $p<0.05$ )。なお、HLA-DR6J保有者の平均SI値は6.9(22例)で、非保有者の16.4(46例)に比べ明らかに低値であった。また同じくDR領域と高応答群との関係では、DRw9やMT3保有者の割合(各々64%, 59%)が高応答群全体の割合(50%)より高い傾向にあったが、いずれも統計学的有意差は認められなかった(各々 $\chi^2=3.47$ ,  $\chi^2=3.51$ )。一方、前述のごとくT抗原に対するリンパ球反応と各HLA抗原との間には何の関連も見出すことはできなかった。

## 5 考 察

本研究の目的は、ヒトA群溶レン菌感染における特異的細胞性免疫の成立について検討し、疾患発生におけるその役割を明らかにすることと共に、このような免疫応答性に何らかの遺伝子支配が存在するか否かを、HLA抗原との関連において検討することであった。

今回、種々の角度からおこなった実験により、A-C抗原、T抗原に対する末梢リンパ球反応の相違と特異性、また、溶レン菌感染症および二次症におけるその反応の特徴、あるいはLTF反応と血中抗体、さらにはHLA抗原との関連などについていくらかの知見を得ることができたと考えるが、以下、いくつかの項目に分け考察を加える。

### 5.1 A群C多糖体(A-C)抗原とT抗原

リンパ球刺激抗原として用いたこれら両者の溶レン菌細胞壁成分は、M抗原と共にこの菌の群別および型別の基礎を成す重要な抗原物質である。溶レン菌は現在C多糖体によって、A, B, C, ……T(I, Jは除く)の18の群に分類されているが、病原株の大部分はA群に属している<sup>19)</sup>。一方、T抗原は病原性のない蛋白とされているが、病原性蛋白であるM抗原<sup>9)</sup>とは、両者の型は同じホモNo.として高率に一致することが知られている<sup>19)</sup>。著者らが以前に行なった経験では、猩紅熱患者由来の157株中136株が完全に一致(86.6%)

し、残りのわずか21株がM型別不能株(未発表)であったが、M型抗原の自然脱落<sup>19)</sup>を考慮すると、一致率はさらに高いものと思われる。したがって、このことはあるtypeのT抗原に対する生体の免疫反応は同時に病原性蛋白であるM抗原の特定なtypeに対する生体の反応と相関している可能性が考えられる。また、T抗原はM抗原に比べ比較的少量に存在し、抽出も容易であり、さらにT型別がより一般化して広く普及していることを考慮すると、T抗原に対する細胞性免疫の検討はM抗原に対すると同様にその意義は大きいものがある。

T抗原の抽出法に関してはこれまでいくつかの方法が試みられてきたが<sup>20-22)</sup>、現在、トリプシン法がよりこの物質を純粋に抽出しようという結果が示されている<sup>12)</sup>。この方法で抽出したT1抗原についてゲル内沈降反応をおこなったところ、同種家兎免疫血清との間に明らかな単一の沈降線が形成されることが確認され、型特異性の高い抗原として充分使用できることが確かめられた。しかし、宮本<sup>17)</sup>や前川・滝沢<sup>23)</sup>らの抗血清作製時における交叉凝集パターンから明らかにされているごとく、T抗原の中には他の型抗血清との間に交叉反応性を認めるものがあり、今回使用した7種類では、T4, T8, B3264抗原が2~3の抗血清との間に交叉反応を示すことが知らされている。しかしながら、T1, T6, T12, T22抗原については交叉反応はないとされている。

このような菌型の存在を、札幌市の過去5年間の菌分離状況<sup>24)</sup>にあてはめて考えると、T12型とT4型は広く我国において蔓延している菌型であり、T1, T22, T6型はたまたま流行をおこし、T8, B3264型はほとんど見られない菌型であると言えることができる。したがって、これら検出頻度が異なる7種のT抗原に対するリンパ球の免疫反応を検討することは極めて興味深いことであると考えられた。

### 5.2 A-C抗原、T抗原に対するLTF反応

これまで、溶レン菌抗原に対する細胞性免疫の研究は、古くは培養濾液を用いた皮内反応から始まり<sup>25)</sup>、その後、粗M蛋白<sup>26,27)</sup>、菌体<sup>27)</sup>streptokinase/streptodornase(SK/SD)<sup>27)</sup>等について調べられ、さらに、より純化されたM蛋白を用いた皮内反応によっても検討されるに至った<sup>28,29)</sup>。これらは組織学的にも典型的な遅延型過敏反応の像を呈することが示されている<sup>30)</sup>。また、Lawrence<sup>27)</sup>によって、溶レン菌抗原においても遅延型過敏反応の受身伝達の成立することが既に実証されている。このような溶レン菌抗原に対する細胞性免疫の成立は、ヒトおよび動物の皮内反応によってその可能

性が示唆されたが、1970年代より皮内反応に替って *in vitro* における検討が主体となり、また、これにより、溶レン菌菌体成分や菌体外毒素には多数のリンパ球刺激物質の含まれていることが明らかにされた<sup>31-33</sup>。現在、比較的多く検討されている物質としては、A-C, M 抗原があり<sup>34-39</sup>、T 抗原に対するリンパ球反応は最近になって Ludwicka *et al.*<sup>40,41</sup> によって初めて試みられた。彼らは T 抗原がリンパ球幼若化活性を有することを見出すと共に、モルモット細胞性免疫を成立させることに成功した。しかし型抗原として T1 と T12 の 2 種類しか検討されておらず、また、型特異性に関しても言及されていない。

今回の検索では、A-C 抗原と 7 種類の T 抗原について LTF 反応を試みたが、その結果、型抗原や疾患の相違によってリンパ球の反応性が異なっていることが見出された。すなわち、T 抗原の場合、正常人成人についてみると、T4, T6 抗原に対しては高い反応性が示されたのに対し、T1, T8, T12 抗原に対しては反応を示さない例が多くみられた。正常小児でも、反応は成人よりも全体的に低い傾向にあったが、基本的には同様のパターンであった。しかし、流行菌型 (T4, T12) と非流行菌型 (T1, T6, T8, T22, B3264) に対する反応を比較した場合、流行菌型である T12 抗原に対しては、平均 SI 値、反応陽性率とも相対的に低い値が得られ、逆に希少株である T6, B3264 抗原に対しては明らかに高い反応が示されるなど、このような反応の流行株との関係を裏付けることはできなかった。

疾患別に SI 値をみると、猩紅熱患者では正常小児に比べ全体的に高い反応が得られた。このことは、これら猩紅熱患者の過去における溶レン菌感染の存在を示唆している可能性もあり、この場合、猩紅熱発疹の原因には発赤毒素による遅延型過敏反応が関与しているという説<sup>42</sup>を支持するようにも思われた。一方、AGN および ARF 患者群における LTF 活性は全般的に明らかに低値を示し、急性期における免疫応答性の低下を疑わせた。実際、Francis and Oppenheim<sup>43</sup> はリウマチ性心炎の患者で、溶レン菌細胞壁抽出物に対するリンパ球反応は有意に抑制されていることを報告している。なお、同様な報告が他に数編みられるので項目別にして言及する。

A-C 抗原の LTF 反応は、まず 86 例の正常成人について検討したが、その平均 SI 値は 13.2 であり、T 抗原に対する場合と同様、各個体により大きな差がみられた。一方、猩紅熱患者において、統計的有意差は得られなかったが、第 1 週目に比較的高い反応が示され

た。しかし、現在のところこれらの反応は純粋な A-C 抗原に対する反応ではなく、mucopptide との複合体 (C-polysaccharide-mucopptide complexes) に対する反応であるという可能性が考えられている<sup>30</sup>。すなわち、純化された A-C 抗原はそれ自体ヘプテンであり、毒性はなく、ヒトや動物のリンパ球に何の活性も持たないことが示されており<sup>35,44</sup>、mucopptide との複合体となって始めて病変活性が生じるとの報告が多い。A-C 抗原に対する LTF 反応については、今後さらに検討する必要があると思われる。

### 5.3 猩紅熱罹患後の T 型特異的細胞性免疫の推移

すでに、Reid *et al.*<sup>45</sup> の急性糸球体腎炎に関する研究や、Hayama *et al.*<sup>36</sup> の M 抗原を用いた動物実験により型特異的細胞性免疫の成立が示唆されているが、溶レン菌自然感染時にどのような経過で型特異的細胞性免疫が成立するかについてはこれまで報告されておらず、その詳細は明らかでない。今回、T12 型猩紅熱患者 4 名と、他の菌型による患者 5 名について、T12 抗原に対する LTF 反応を 4 週間にわたって追跡した結果、前者では反応の上昇が認められたが、後者では反応は全く認められなかった。また、前者の反応は統計学的に有意な変化であることも明らかとなった。即ち、T12 型に対する特異的細胞性免疫を示すものと思われた。前述のごとく、T 抗原はこの菌の病原性とは直接関係はないとされている。しかしながら、溶レン菌感染症の成立と T 型特異性の間にはある程度の関連があるとされ、例えば、T4 型猩紅熱患者では入院時 T4 抗体価が有意に低いこと<sup>1)</sup>、流行菌型に対して高年齢児では高い抗体価を保有し<sup>46</sup>、それらの菌型による猩紅熱の発生は非常に少ないこと<sup>47</sup>、保菌者で保有菌型による発病はみられないこと<sup>23</sup>、などの事実が知られている。したがって、これらのことは T 抗原に対する反応が同じホモ No. としてはほぼ平行して存在し、病原性蛋白である M 抗原<sup>48</sup> に対する反応と極めて密接な関係にあることを示唆しているかも知れない。今回の結果は、細胞性免疫の立場から T 型特異性の存在を実証したものと考えられるが、M 抗原や A-C 抗原とヒト組織との共通抗原性<sup>5,49</sup>、あるいは、これによる二次症発症に言及した報告<sup>9-10,50</sup> の存在に反し、T 抗原についての報告はみあたらず、現在のところその意義の詳細は明らかではない。なお、このような型特異的細胞性免疫がすべての T 抗原について成立するか否かについてもさらに検討を要するが、型抗原のもつ抗原性の相違や交叉反応性<sup>17,23</sup>、さらに後述のごとく非特異的反応が加味されることも考えられることから、その反応は必ずしも単純ではないものと推

測される。

#### 5・4 急性期 ARF, AGN 患者における細胞性免疫の低下

Hirschhorn *et al.*<sup>51)</sup>, Rassokhina *et al.*<sup>52)</sup> および Mericz and Berkel<sup>53)</sup> は急性期 ARF 患者で、また、Krzymanski *et al.*<sup>39)</sup> は急性期 AGN 患者においては各種溶レン菌抗原に対するリンパ球反応は低下していると報告し、Francis and Oppenheim<sup>43)</sup> は非活動性 RF 患者においても心炎のある者では反応が抑制されていることを示した。Mortensen *et al.*<sup>54,55)</sup> は、C-reactive protein (CRP) と T cell との関連について報告し、CRP が T cell と選択的に結合することにより、T cell の機能が抑制され、その結果、特異的刺激に対する反応が低下するとの見解を示している。この見解は、Francis and Oppenheim<sup>43)</sup> が溶レン菌抗原に対する反応は抑制されたが PHA に対する反応は抑制されなかったとの報告や、RF 患者で溶レン菌抗原に対するリンパ球反応は CRP の濃度に比例して抑制されたとする Rossokhina *et al.*<sup>52)</sup> の報告と一致するものである。しかし、Mericz and Berkel<sup>53)</sup> の PHA に対する反応も抑制されたとの報告とは一致しない。Lueker and Williams<sup>56)</sup> は、ARF 患者のリンパ球と正常者のリンパ球との混合培養実験で、前者のリンパ球は幼若化反応と刺激活性の両者において明らかに低下していることを示し、ARF 患者における何らかの細胞性免疫機能異常を指摘している。今回の実験においても急性期 ARF, AGN 患者では LTF 反応の抑制がみられ、これらの報告とはほぼ一致したが、前述した可能性に加え、感作リンパ球の病巣部位への集積とそれによる末梢血中における反応の低下なども一つの可能性として考慮されるべきものと思われ、このような免疫反応の低下にはかなり複雑な機序が関与しているのかもしれない。

なお、これらの結果とは逆に、ARF や AGN 患者では溶レン菌抗原に対して強いリンパ球反応を示すという報告<sup>37,38,57)</sup>、対照に比し有意差はないとの報告<sup>44)</sup> もある。使用した抗原の種類や、採血時期の違いがこれら結果の相違に関係しているものと思われた。

#### 5・5 T 抗原に対する LTF 反応の特異性

溶レン菌の自然感染において特異的細胞性免疫が成立することは、T12 型菌による猩紅患者の反応において明らかである。しかしながら流行菌型にかかわらず、ある種の T 抗原、特に 4, 6, B3264 に対しては強い LTF 反応がみられ、実際、臍帯血の一部においても同様な傾向が認められた。また、個々の正常対照について長期に LTF 反応を観察してみたが、その基本的反

応様式に大きな変化はなかった(未発表)。したがって、これらの結果は溶レン菌 T 抗原に対する *in vitro* LTF 反応には一部非特異的な反応も関係していることを示唆していると思われる。

臍帯血の反応 (Table I) において明らかのように、LTF 活性は一部の症例において特に強く認められ、また、それらの症例は同じ抗原に対して共に強く反応することが観察された。したがって、これら非特異的反応には個体側の要因と、抗原の性格という 2 つの因子が関係しているように思われる。前者としては、個体の感作状態とは別な何らかの遺伝的素因が存在しているのかも知れない。一方、抗原側の問題としては、溶レン菌のある種の抗原が有する非特異的 mitogen としての働きをあげることができる<sup>58,59)</sup>。例えば、Banck and Forsgren<sup>58)</sup> は A 群 M 55 型菌菌体を抗原とする LTF 反応において、B cell に中等度の mitogen としての作用があることを報告し、また、Ludwicka *et al.*<sup>41)</sup> は、溶レン菌 T 蛋白で数回感作したマウスのリンパ球は lipopolysaccharide に対し強い LTF 反応を示したことから、T 蛋白の LTF 活性は T cell よりも B cell に強いであろうと推測している。今回の成績でも、LTF 活性は T cell 分画のみならず、non T cell 分画にも検出されており、これらのこともこの LTF 反応の全体としての特異性に大きな影響を与えていることが考えられる。

#### 5・6 溶レン菌抗原 LTF 反応と HLA との関係

A 群溶レン菌菌体成分とヒト臓器との間に共通抗原の存在することが報告され<sup>3-5)</sup>、また、溶レン菌抗原に対する細胞性免疫は臓器移植時における拒絶反応を増強させることが、臨床的観察<sup>60)</sup>と実験的研究<sup>61,62)</sup>から明らかにされている。それがどのようなメカニズムで生体に関与しているのかは明らかではないが、これは溶レン菌抗原に対する生体の免疫反応もまた免疫応答遺伝子<sup>63)</sup>の影響を強く受けている可能性を示唆しているのかも知れない。溶レン菌抗原に対する免疫応答性と HLA との関係について Hirata and Terasaki(1970)<sup>64)</sup> が初めて報告して以来、ARF や AGN 患者と HLA との関連などについていくつかの報告がみられるようになった<sup>65)</sup>。今回、著者は数種類の A 群溶レン菌抗原に対する LTF 反応と HLA との関連について検討してみたが、A-C 抗原に対する低応答性が HLA-DR6J および MT2 保有者と比較的強い関係にあることが明らかとなった。

HLA-DR 抗原は、B リンパ球特有の HLA-D 領域アロ抗原として公認されており、今回注目される DR-6J

は Dw6 あるいは DRw6 と相関し<sup>66)</sup>、すべて MT2 に含まれるとされている<sup>67)</sup>。HLA-DR 座を含む D 領域には免疫応答遺伝子 (immune response gene: Ir gene) と免疫抑制遺伝子 (immune suppression gene: Is gene) の存在が考えられており<sup>68)</sup>、これらによって個体の免疫応答性が厳密に制御されている可能性が示唆されている<sup>69)</sup>。実際、発症に免疫学的機序のからむ疾患群では、HLA-D との相関が多数報告され<sup>69)</sup>、その原因として、Ir, Is gene が関与する HLA-D 抗原との連鎖不平衡によるものと推測されている<sup>69)</sup>。一方、ある抗原に対する低応答性と特定の HLA-D 抗原との間に強い相関があることが報告され<sup>69-71)</sup>、また、このような低応答性が HLA に連鎖して遺伝することも Sasazuki *et al.*<sup>72)</sup> によって証明されている。したがって、HLA-DR6J 保有者の A-C 抗原に対する低応答性は、DR6J と強い連鎖不平衡にある Is gene によって遺伝的に支配されていると考えることも可能である。

ARF や AGN 罹患と HLA との関連についての報告は少ないが、Sasazuki *et al.*<sup>73)</sup> は 46 名の AGN 患者について検討し、HLA-D<sub>En</sub> 保有率が Control に比べ有意に高いことを報告した。今回 HLA-D locus の typing は行なっていないが、HLA-D<sub>En</sub> は日本人に特有な抗原であると共に、HLA-DR6J とは強い関連性を有することが知られており<sup>63,74)</sup>、今回の実験結果と照し合せると、A-C 抗原に対する低応答性と腎炎発症との関連性がさらに強く示唆されるように思われた。RF 患者と HLA との関連では、フィンランド人<sup>75)</sup>、日本人<sup>76)</sup> では HLA-Bw35、アメリカ人<sup>77)</sup> では HLA-B5 との関連が報告されている。しかし、HLA-D、-DR 抗原との関連性についての報告は今のところみられない。溶レン菌抗原に対する細胞性免疫反応を含めて、これらの疾患と HLA-D、-DR 抗原との関連につき検討することは、今後、病因の究明にさらに役立つものと思われる。

## 6 結 語

A 群溶レン菌 C 多糖体と 7 種類の T 抗原に対するヒトリンパ球の反応を、微量全血培養法によるリンパ球幼若化 (LTF) 反応で検討し、以下の結果を得た。

1. 一般的に T 抗原に対する LTF 活性は、年齢が進むにつれて上昇し、新生児の SI 値は 9.6 であったが、小児では 17.2 であり、成人の場合 40.3 に達した。

2. 正常人の場合、LTF 反応は流行菌型に関係なく、ある特定の T 抗原に対して高い SI 値を示す傾向にあった。

3. 臍帯血リンパ球の反応、T、B 両細胞分画における活性の存在などから、溶レン菌 T 抗原に対する LTF 反応には、特異的の反応のみならず非特異的な部分もあることが推測された。

4. 疾患によって LTF 反応にその特徴が認められ、猩紅熱患者 (平均 SI, 38.1) では比較的高い SI 値が得られたのに対し、急性期のリウマチ熱および急性糸球体腎炎患者 (同, 7.9) では明らかに低値であった。

5. 猩紅熱患者において、T12 抗原に対する型特異的細胞性免疫の成立が示唆された。

6. T4 抗原に限ってみた場合、LTF 反応の SI 値と血清抗体価との間に関連性は認められなかった。

7. A 群 C 多糖体に対する低応答性と HLA-DR 6 J および MT2 保有者との間に有意な関連が認められた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、実験の遂行、論文の作成に際し直接御指導頂きました千葉靖男講師に深謝致します。また、溶レン菌に関して御指導承りました微生物学教室、前川静枝助教授、臍帯血を提供していただきました市立札幌病院産婦人科、後藤史郎主任医長、全面的に御支援を受けました同南ヶ丘分院、富沢功主任医長、高瀬愛子医長、伊藤勝美薬剤師、小西和美検査技師、および本教室、千葉峻三助教授はじめ諸先生に深謝いたします。

最後に、HLA の typing を行なって頂きました北海道大学医学部第一病理学教室 (主任: 相沢幹教授) の諸兄に感謝いたします。

本研究の一部は、第 56 回日本感染症学会総会 (1982 年 4 月、東京) で発表した。

## 文 献

1. 滝沢慶彦, 高瀬愛子, 富沢 功, 小西和美: 溶レン菌 T 抗体に関する研究. II. 感作血球凝集反応を用いた溶レン菌 T4 抗体価測定に関する臨床的, 疫学的研究. 感染症学雑誌 56, 47-55 (1982).
2. 大国寿士, 野呂瀬嘉彦, 小野田拓男, 留目優子, 木村義民: レンサ球菌感染と細胞性免疫. 臨床免疫 8, 20-21 (1976).
3. Kaplan, M. H. and Meyeseran, M.: An immunological crossreaction between group A streptococcal cells and human heart tissue. Lancet 1, 706-710 (1962).
4. Ginsburg, I.: Mechanisms of cell and tissue injury induced by group A streptococci: Relation

- to poststreptococcal sequelae. *J. Infect. Dis.* **126**, 419-456 (1972).
5. Christensen, P., Schalen, C. and Holm, S. E.: Reevaluation of experiments intended to demonstrate immunological cross-reactions between mammalian tissues and streptococci. *Prog. Allergy* **26**, 1-41 (1979).
  6. Plate, J. M. and Amos, B.: Lymphocyte stimulation by a glycopeptide isolated from streptococcus pyogenes C203S. II. Kinetics of the response. *Cell. Immunol.* **1**, 488-499 (1971).
  7. Keiser, H., Kushner, I. and Kaplan, M. H.: "Nonspecific" stimulation of lymphocyte transformation by cellular fractions and acid extracts of group A streptococci. *J. Immunol.* **106**, 1593-1601 (1971).
  8. Read, S. E., Poon-King, T., Reid, H. F. M. and Zabriskie, J. B.: HLA and group A streptococcal sequelae. In: Read, S. E. and Zabriskie, J. B.: *Streptococcal Diseases and the Immune Response*. 347-353, Academic Press, London (1978).
  9. Rocklin, R. E.: Role of lymphocyte mediators (Lymphokines) in health and disease. In: Read, S. E. and Zabriskie, J. B.: *Streptococcal Diseases and Immune Response*. 253-270, Academic Press, London (1980).
  10. Friedman, I., Laufer, A., Ron, N. and Davies, A. M.: Experimental myocarditis: *In vitro* and *in vivo* studies of lymphocytes sensitized to heart extracts and group A streptococci. *Immunology* **20**, 225-232 (1971).
  11. Fuller, A. T.: The formamide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci. *Brit. J. Exp. Pathol.* **19**, 130-139 (1938).
  12. Erwa, H. H.: Studies on two methods for extraction of streptococcal T antigens. *J. Hyg. Camb.* **71**, 131-138 (1973).
  13. Park, B. H. and Good, R. A.: A new micro-method for evaluating lymphocyte responses to phytohemagglutinin: Quantitative analysis of the function of thymus-dependent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 371-373 (1972).
  14. Pauly, J. L. and Han, T.: whole blood micro-culture assay of human lymphocyte function. *J. Lab. Clin. Med.* **88**, 864-872 (1976).
  15. Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocyte from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21(Suppl.)**, 77-89 (1968).
  16. Aiuti, F., Cerottini, J. C., Coombs, R. R. A., Cooper, M., Dickler, H. B., Frøland, S. S., Funderberg, H. H., Greaves, M. F., Grey, H. M., Kunkel, H. G., Natvig, J. B., Preud'homme, J. L., Rabellino, E., Ritts, R. E., Rowe, D. S., Seligmann, M., Siegal, F. P., Stjernswärd, J., Terry, W. D. and Wybran, J.: Identification, enumeration, and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. *Scand. J. Immunol.* **3**, 521-532 (1974).
  17. 宮本 泰: レンサ球菌: A群レンサ球菌の凝集反応による型別法. *臨床検査* **13**, 89-95 (1969).
  18. 滝沢慶彦, 高瀬愛子, 富沢 功, 小西和美: 溶レン菌 T 抗体に関する研究. I. 感作血球凝集反応を用いた T 抗体価測定に関する基礎的研究. *感染症学雑誌* **56**, 37-46 (1982).
  19. 宮本 泰: 溶レン菌感染症最近の病像. 菌型のもつ意義とその変遷ならびに疫学について. *診療と保険* **14**, 1230-1240 (1972).
  20. Lancefield, R. C. and Dole, V. P.: The properties of T antigens extracted from group A hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **84**, 449-470 (1946).
  21. Pakula, R.: Extraction of the T antigen of streptococcus pyogenes. *J. Gen. Microbiol.* **5**, 640-647 (1951).
  22. Ludwicka, A.: T antigen of streptococcus pyogenes: Isolation and purification. *Infect. Immun.* **13**, 993-994 (1976).
  23. 前川静枝, 滝沢慶彦: 北海道根室市学童の咽頭溶血レンサ球菌の保有状況と血清中の AGG-, ASO-, ASK-値について. *札幌医学雑誌* **46**, 1-8 (1977).
  24. 滝沢慶彦, 高瀬愛子, 富沢 功, 小西和美: 札幌市における猩紅熱患者分離溶レン菌—菌型分布 (1975-1979年) と猩紅熱の再発についての考察—*臨床小児医学* **28**, 297-302 (1980).
  25. Swift, H. F., Wilson, M. G. and Todd, E. W.: Skin reactions of patients with rheumatic fever to toxic filtrates of streptococcus. *Am. J. Dis. Child.* **37**, 98-111 (1929).
  26. Taran, L. M., Jahlon, J. M. and Weyer, H. N.: Immunological studies in rheumatic fever. I. Cutaneous response to type-specific proteins of the hemolytic streptococci. A. Response to combinations of M proteins from selected types of hemolytic streptococci. *J. Immunol.* **49**, 209-222 (1944).
  27. Lawrence, H. S.: The cellular transfer in humans of delayed cutaneous reactivity to hemolytic streptococci. *J. Immunol.* **68**, 159-178 (1952).
  28. Beachey, E. H., Alberti, H. and Stollerman, G.

- H.: Delayed hypersensitivity to purified streptococcal M protein in guinea pigs and in man. *J. Immunol.* **102**, 42-52 (1969).
29. Hayama, M., Kato, T., Ohkuni, H. and Kimura, Y.: Delayed type hypersensitivity induced by group A streptococcal infection in mice. In: Parker, M. T.: Pathogenic Streptococci. 97-98, Reedbooks Chertsey, Surrey (1979).
  30. Dekaris, D., Alouf, J. E. and Raynaud, M.: Hypersensitivity reactions in guinea pigs to group A hemolytic streptococci. *Int. Arch. Allergy* **37**, 14-25 (1970).
  31. Wannamaker, L. W.: The extracellular products of group A streptococci. In: Read, S. E. and Zabriskie, J. B.: Streptococcal Diseases and the Immune Response. 177-184, Academic Press, London (1980).
  32. Gray, E. D.: Purification and properties an extracellular blastogen produced by group A streptococci. *J. Exp. Med.* **150**, 1438-1449 (1979).
  33. Barsumian, E. L., Schlievert, P. M. and watson, D. W.: Nonspecific and specific immunological mitogenicity by group A streptococcal pyogenic exotoxins. *Infect. Immun.* **22**, 681-688 (1978).
  34. Knöll, H., Knöll, G. und Köhler, W.: Nachweis zellulärer Antikörper gegen Streptokokkenantigene bei Kindern. *Z. Immunitätsforsch.* **151**, 143-152 (1976).
  35. 西山裕子: 溶レン菌菌体成分とリンパ球幼若化に関する基礎的臨床的研究. *横浜医学* **29**, 433-453 (1978).
  36. Hayama, M., Kato, T., Ohkuni, H. and Kimura, Y.: Delayed type hypersensitivity induced by group-A streptococcal infection in mice. In: Parker, M. T.: Pathogenic Streptococci. 97-98, Reedbooks Chartsey, Surrey (1979).
  37. Zabriskie, J. B., Lewshenia, R., Möller, G., Wehle, B. and Falk, R. E.: Lymphocytic response to streptococcal antigen in glomerulonephritic patients. *Science* **168**, 1105-1108 (1970).
  38. Read, S. E., Fischetti, V. A., Utermohlen, V., Falk, R. E. and Zabriskie, J. B.: Cellular reactivity studies to streptococcal antigens. Migration inhibition studies in patients with streptococcal infections and rheumatic fever. *J. Clin. Invest.* **54**, 439-450 (1974).
  39. Krzymanski, M., Möller, E. and Bergström, J.: Cell-mediated and humoral immunity to streptococcal cell wall antigenic extract in patients with glomerulonephritis and healthy controls. *Scand. J. Immunol.* **4**, 295-302 (1975).
  40. Ludwicka, A. and Ziemia-Zoltowska, B.: Streptococcal protein T induced hyperdelayed sensitivity and lymphocyte stimulation. *Zentralbl. Bakteriol. [Orig. A]* **241**, 286-293 (1978).
  41. Ludwicka, A., Szmigielski, S., Roszkowski, W. and Janiak, M.: Effect of streptococcal T protein on lymphocyte function *in vitro* and *in vivo*. In: Parker, M. T.: Pathogenic Streptococci. 42-44, Reedbooks Chertsey, Surrey (1979).
  42. Kim, Y. B. and watsoson, D. W.: Streptococcal exotoxins. Biological and pathological properties. In: Wannamaker, L. N. and Mtsen' J. M.: Streptococci and Streptococcal Disease. 33-50, Academic Press, New York (1972).
  43. Francis, T. C. and Oppenheim, J. J.: Impaired lymphocyte stimulation by some streptococcal antigens in patients with recurrent apthous stomatitis and rheumatic heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* **6**, 573-586 (1970).
  44. Sodomann, C. P., Heymer, B., Havemann, K., Schmidt, M., Schumacher, B. und Haferkamp, O.: Die Reaktion von Lymphozyten auf Streptokokken-Antigene bei Patienten mit normalem und erhöhtem Antistreptolysintiter. *Pes. Exp. Med.* **160**, 58-68 (1973).
  45. Reid, H. F. M., Read, S. E. and Zabriskie, J. B.: Specific blastogenic response to group A streptococcal cell-wall and cell-membrane antigens in acute glomerulonephritis patients in Trinidad. In: Parker, M. T.: Pathogenic Streptococci. 99-100, Reedbooks Chartsey, Surrey (1979).
  46. 山脇徳美, 庄司キク, 斎藤志保子, 森田盛大, 石田名香雄: 本荘市住民のA群溶連菌に対するT凝集素保有状況について. *秋田県衛生研究所報* **25**, 51-55 (1981).
  47. 滝沢慶彦, 高瀬愛子, 富沢 功, 小西和美: 札幌市における過去5年間の溶レン菌菌型分布および年齢による菌型分布の相違について. *市立札幌病院医誌* **41**, 49-55 (1980).
  48. Lancefield, R. C.: Current knowledge of type specific M antigens of group A streptococci. *J. Immunol.* **89**, 307-313 (1962).
  49. Goldstein, I. Halpern, B. and Robert, L.: Immunological relationship between streptococcus A polysaccharide and the structural glycoproteins of heart valve. *Nature* **213**, 44-47 (1967).
  50. Yang, L. C., Soperay, P. R., Wittner, M. K. and Fox, E. N.: Streptococcal-induced cell-mediated-immune destruction of cardiac myofibers *in vitro*. *J. Exp. Med.* **146**, 344-360 (1977).
  51. Hirschhorn, K., Schreihman, R. R., Verbo, S.

- and Grushin, R. H.: The action of streptolysin S on peripheral lymphocytes of normal subjects and patients with acute rheumatic fever. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 1151-1157 (1964).
52. Rassokhina, I., Ananyeva, L., Bulanova, T. and Speransky, A.: Cell-mediated immunity to membrane and cytoplasmic components of group A streptococci. In: Parker, M. T.: *Pathogenic Streptococci*. 103-104, Reedbooks Chartsey, Surrey (1979).
53. Meriçz, N. and Berkel, A. I.: Cellular immunity in children with acute rheumatic fever and rheumatic carditis. *Pediatr. Res.* **13**, 16-20 (1979).
54. Mortensen, R. F., Osmand, A. P. and Gewurz, H.: Effects of C-reactive protein on the lymphoid system. I. Binding to thymus-dependent lymphocytes and alteration of their functions. *J. Exp. Med.* **141**, 821-839 (1975).
55. Mortensen, R. F., Braun, D. and Gewurz, H.: Effects of C-reactive protein on the lymphoid system. III. Inhibition of antigen-induced lymphocyte stimulation and lymphokine production. *Cell. Immunol.* **28**, 59-69 (1977).
56. Lueker, R. D. and Williams, R. C.: Decreased reactivity of lymphocytes in mixed-leukocyte culture from patients with rheumatic fever. *Circulation* **46**, 655-660 (1972).
57. Gross, W. L., Auerbach, G., Hahn, G., Schuler, M. and Schlaak, M.: The effect of group-A streptococcal cell components on peripheral lymphocytes *in vitro*. In: Parker, M. T.: *Pathogenic Streptococci* 102-103, Reedbooks Chartsey, Surrey (1979).
58. Banck, G. and Forsgren, A.: Many bacterial species are mitogenic for human blood B lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **8**, 347-354 (1978).
59. Toffaletti, D. L. and Schwab, J. H.: Modulation of lymphocyte functions by group A streptococcal membrane. *Cell. Immunol.* **42**, 3-17 (1979).
60. Roses, D. F., Zabriskie, J. B. and Rapaport, F. T.: White graft reaction after streptococcal and staphylococcal infection in man. *Transplant. Proc.* **5**, 487-489 (1973).
61. Zabriskie, J. B., Read, S. E., Ellis, R. J., Markowitz, A. S. and Rapaport, F. T.: Cellular reactivity studies in human and experimental renal transplantation. *Transplant. Proc.* **4**, 259-264 (1972).
62. Rapaport, F. T., Chase, R. M., Markowitz, A. S., McCluskey, R. T., Shimada, T. and Watanabe, K.: Cross-reactions in mammalian transplantation—with particular reference to streptococcal antigens and antibodies. *Transplant. Proc.* **3**, 89-94 (1971).
63. 兼岡秀俊, 笹月健彦: HLA 領域遺伝子の生物学的機能—疾患感受注の基礎として— *日本臨床* **36**, 3096-3101 (1978).
64. Hirata, A. A. and Terasaki, P. I.: Cross-reactions between streptococcal M proteins and human transplantation antigens. *Science* **168**, 1095-1096 (1970).
65. Read, S. E., Reid, H., Poon-King, T., Fischetti, V. A., Zabriskie, J. B. and Rapaport, F. T.: HLA and predisposition to the nonsuppurative sequelae of group A streptococcal infections. *Transplant. Proc.* **9**, 543-546 (1977).
66. 草場亮輔: HLA-D 抗原と HLA-DR 抗原の相関に関する研究. *移植* **16**, 500-507 (1981).
67. 前田平生, 平田蘭子, 宮本光子, 金子信子, 十字猛夫: DRw 6 関連抗原. *移植* **16**, 437-439 (1981).
68. 太田伸生, 笹月健彦: 疾患と HLA の相関—その機序. *臨床免疫* **14**, 25-33 (1981).
69. Nose, Y., Komori, K., Inoue, H., Nomura, M., Yamamura, M. and Tsuji, S.: Relationship between HLA-D and *in vitro* and *in vivo* responsiveness to candida allergen. *Clin. Exp. Immunol.* **40**, 345-350 (1980).
70. Sasazuki, T., Kohno, Y., Iwamoto, I., Tanimura, M. and Naito, S.: Association between an HLA halotype and low responsiveness to tetanus toxoid in man. *Nature* **272**, 359-361 (1978).
71. Sasazuki, T., Ohta, N., Kaneoka, R. and Kojima, S.: Association between an HLA halotype and low responsiveness to schistosomal worm antigen in man. *J. Exp. Med.* **152**, 314-318 (1980).
72. Sasazuki, T., Kaneoka, H., Nishimura, Y., Kaneoka, R., Hayama, M. and Ohkuni, H.: An HLA-linked immune suppression gene in man. *J. Exp. Med.* **152**, 297-313 (1980).
73. Sasazuki, T., Hayase, R., Iwamoto, I. and Tsuchida, H.: HLA and acute poststreptococcal glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* **22**, 1181-1185 (1979).
74. 吉田考人: HLA-D 領域とヒト細胞アロ抗原. *日本臨床* **36**, 3102-3106 (1978).
75. Leirisalo, M., Laitinen, O. and Tiilianinen, A.: HLA phenotypes in patients with rheumatic fever, rheumatic heart disease and Yersinia arthritis. *J. Rheumat.* **3**, 78-83 (1977).
76. 寺脇 保: 感染と生体反応. *日本医師会雑誌* **83**, 21-43 (1980).



77. Yoshinoya, S. and Pope, R. M.: Detection of immune comple complexes in acute rheumatic fever and their relationship to HLA-B5. *J. Clin. Invest.* **65**, 136-145 (1980).

---

別刷請求先:

(〒062) 札幌市豊平区平岸5条15丁目

市立札幌病院南ヶ丘分院 滝沢慶彦