

はじめに

本来、マクロライドの抗菌作用は細菌のリボソーム 50S サブユニットに選択的に結合することにより、ペプチド転移反応を阻害し、ペプチド合成を阻害する。しかし、真核生物のリボソームには作用せず、極めて安全性の高い薬剤として臨床で広く用いられてきた¹⁾。

一方、腸管蠕動亢進作用を発揮する薬剤は消化管ホルモンである「モチリン」にちなんでモチライドと名付けられ、14員環マクロライドの誘導体が開発されている。この第2の作用であるモチリン様作用は抗菌作用と独立した作用であることが明らかにされている。

一方、日本の慢性気道炎症性疾患として極めて予後不良であった、びまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis; DPB) に対し、エリスロマイシン (erythromycin; EM) 少量長期投与が著名に予後を改善した²⁾。これらは「抗炎症作用」として第3番目の作用に位置づけられるが、好中球を初め免疫炎症担当細胞や、関連するサイトカイン、接着分子、気道分泌などに対するマクロライドの作用が明らかにされてきている。今回の研究では、新たに開発された14員環マクロライドの構造と活性相関を検討し、抗炎症作用を期待できる新薬の開発の一助となるべき、Assay 法のための基礎的検討を試みた。

14員環マクロライドの構造と活性

エリスロマイシン (EM) やオレアンドマイシン (oleandomycin; OL) は抗菌作用を目的に選択された14員環マクロライドで、化学修飾の結果以下のような特徴が認められている。①EMはマクロライドの中で特に酸に不安定であるが、その主たる機構はアグリコン部にあり、9位カルボニル基と6位および12位の水酸基の関与により、6, 9-ヘミアセタールを経たエノールエーテルならびに6, 9, 9, 12-スピロケタールの形成により、抗菌活性が失われる。②アミノ糖のデソサミン上のC-3'ジメチルアミノ基は必須であり、変換すると抗菌活性を失う。③中性糖のクラジノースを除去すると、抗菌活性が著しく低下する³⁾。

これら酸分解機構を踏まえて分子設計された誘導体のうち、6位水酸基を選択的にメチル化することにより酸に対する安定性を獲得したクラリスロマイシン (clarithromycin: CAM) は *in vitro* でEMとほぼ同等から16倍の抗菌活性を示し、しかも酸に対して極めて安定で、pH2、30分の処理でEMがほぼ完全に失活する

のに対し、CAMは95%が残存する。さらに血中濃度はEMの4~5倍の濃度で推移し、かつ持続的である。また、アジスロマイシン (azithromycin: AZM) は、環内に窒素原子を含む15員環マクロライドで、グラム陽性菌に対してEMを上回る抗菌活性を発揮する。AZMの特徴は扁桃、皮膚、肺など組織移行性に優れた点で、血中濃度の100倍以上の集積が認められること、EMに比べて10倍も免疫・炎症担当細胞内に集積されること、さらに9位のカルボニル基がなくなったため、極めて酸安定性にも優れていることである³⁾。以上からAZMは従来のマクロライド系抗生物質に比べて、より少量・短期間投与で同等以上の効果が期待されており、近日発売が予定されている。

モチライド活性

マクロライドに消化管蠕動促進ホルモンである「モチリン」に類似の作用があることは1984年に報告され⁴⁾、腸管機能改善薬の開発が進められてきた。大村らは構造活性相関の観点から、抗菌活性と消化管蠕動促進活性 (gastro-intestinal motor stimulating activity; GMSA) との分離をした結果⁵⁾、14員環マクロライド共通にGMSA作用が認められ、しかし12員環、16員環マクロライドには活性が見いだせなかった。また、EM-Aが最も強いGMSAを示し、酸処理の結果得られたEM201 (8, 9-anhydroerythromycin A6, 9-hemiketal) がEM-Aの10倍のGMSAを示し、EM522はさらにGMSA活性が高く、さらにEM574はEM-Aの約300倍の活性を示した⁴⁾。EM201の3'-ジメチルアミノ基はGMSA発現に最も重要で、ジメチルアミノ基のメチル基を一つ水素に代えたEM522、エチル基に代えたEM523、さらにイソプロピル基に代えたEM574は、それぞれ2倍、18倍、248倍にGMSAが増加し、また同部位を4級アンモニウム塩とした誘導体の一つでEM536はEM-Aの2890倍のGMSAを発揮し、抗菌活性は消失した。これらEM誘導体は容量依存的にモチリンのレセプター結合を阻害し、自らモチリン様作用を発揮することから、モチリンアゴニストと考えられている。大村らはマクロライドのモチリン様作用を、併せて「モチライド (motilide)」と提唱した⁶⁾。

今回の研究では、以上のモチライド活性を有する薬剤のうち、EM201、EM522、EM574を用いて、気道分泌に対する作用、造血器系に対する作用を従来のEM-A、CAM、さらに16員環マクロライドロキタマイシン (RKM) と比較検討した (図1)。

日本医科大学第四内科

* びまん性肺疾患分科会 分科会長

文 献

- 1) 田中信男：抗生物質の作用メカニズム．東京大学出版会，東京，1977．
- 2) Kudoh, S, Azuma, A, Ando, M, *et al.*: Distinguished improvement of survival times of the patients with diffuse panbronchiolitis (DPB) treated with 14-membered ring macrolides (14-MM). *Am. J. Respir. Critic. Care Med.*, 153:a275, 1998.
- 3) Weis, R.: Thye pharmacokinetics of azithromycin. *Rev. Contemp. Pharmacother.* 5:329-340, 1994.
- 4) Itoh, Z., Suzuki, T., Nakaya, M., *et al.*: Gastrointestinal motor-stimulating activity of macrolide antibiotics and analysis of their side effects on the canine gut. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:863-869, 1984.
- 5) Omura, S., Tsuzuki, K., Sunazuka, T., *et al.*: Macrolides with gastrointestinal motor stimulating activity. *J. Med. Chem.*, 30:1941-1943, 1987.
- 6) Tsuzuki, K., Sunazuka, T., Marui, S., *et al.*: Motilides, macrolides with gastrointestinal motor stimulating activity. I. O-substituted and tertiary N-substituted derivatives of 8, 9-anhydroerythromycin A6, 9-hemiacetal. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 2687-2700, 1989.

リンパ球, マクロファージに対する作用

赤川 清子

国立感染症研究所 免疫

はじめに

エリスロマイシンがヒトリンパ球の特異抗原及びマイトジェン刺激による T 細胞増殖応答を抑制すること，またヒト末梢血単球及び THP-1 細胞のマクロファージへの分化を誘導することは，すでに報告されている^{1, 2)}．今回これら 2 つの系を用い，エリスロマイシン各種誘導体の活性を検討した．

材料および方法

ヒト末梢血単核球 (PBMC) は，パフィーコートよりリンホブレップにて分離した．単球は，MACS により CD14 陽性の細胞を PBMC より回収し，その後プレートに付着させ純度の高い (>96%) CD14 陽性単球画分を得た．マイトジェン刺激による T 細胞増殖応答へのエリスロマイシン誘導体の影響は，PBMC (2×10^5 /well) を種々の濃度の薬剤存在及び非存在下に ConA ($2 \mu\text{g/ml}$) を添加し 72 時間培養し，培養終了 16 時間前に [³H]-チミジン ($0.5 \mu\text{Ci/well}$) を添加し DNA 合成を測定し検討した．

単球のマクロファージ分化へのエリスロマイシン誘導体の影響は，単球を種々の濃度の薬剤存在下に 7 日間培養後，分化したマクロファージ細胞数をセタブロン溶液

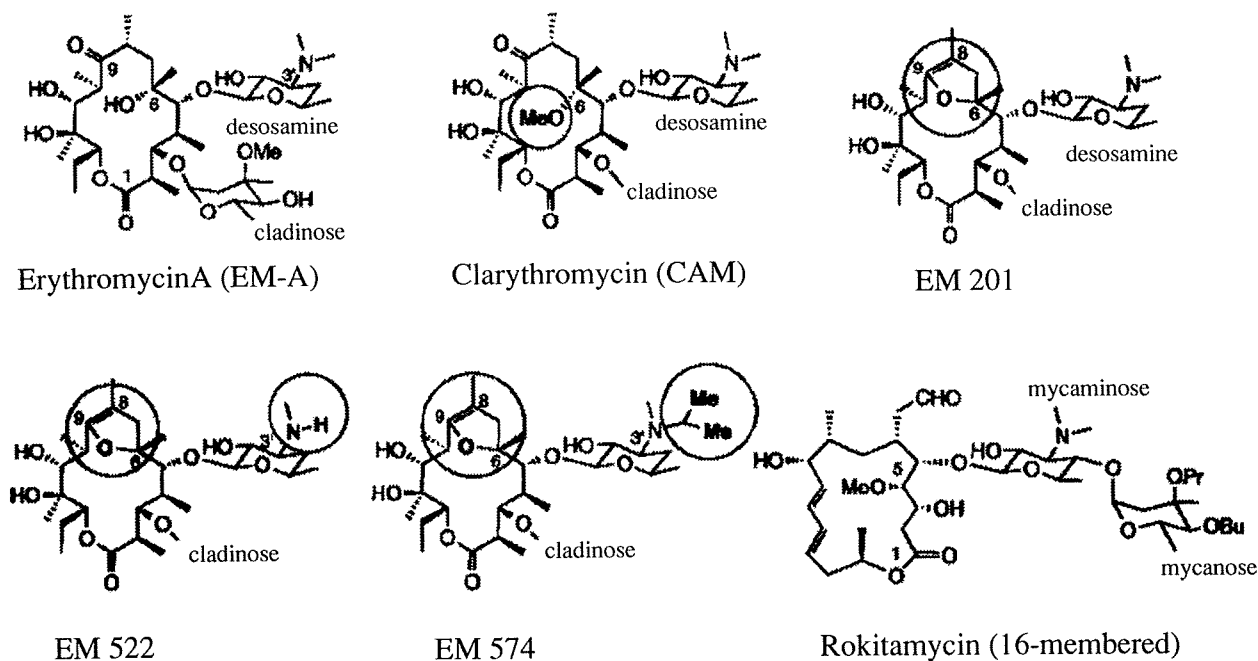


図 1

にて脱核し数えた。使用したエリスロマイシン (EM-A) 及びエリスロマイシンの誘導体 (EM201, BM522, EM574), クラリスロマイシン (CAM), ロキシスロマイシン (RXM) 及び 16 員環マクロライドのロキタマイシン (RTM) は、北里研究所より供与された。

結 果

1. ヒト T 細胞増殖応答に対するエリスロマイシン誘導体の影響

ヒト末梢血由来 PBMC の ConA 刺激による T 細胞増殖応答へのエリスロマイシン及びその誘導体の影響を検討した結果、図 2 に示すように EM では 1 及び 10 μ M の濃度ではほとんど抑制作用が認められなかったが、100 μ M の濃度で抑制が認められた。一方、エリスロマイシン誘導体の EM201, EM522, EM574 は 10 μ M でも抑制作用を認め、100 μ M では非常に強い (90% 以上) 抑制作用を示すことが知られた。また CAM は、1 及び 10 μ M では抑制作用ははっきりしないが、100 μ M の濃度では 90% 以上の強い抑制作用を認めた。

2. ヒト単球のマクロファージへの分化に対するエリスロマイシン誘導体の影響

ヒト単球を種々の濃度のエリスロマイシン各種誘導体存在下に 7 日間培養後、プラスチックプレートに粘着性のマクロファージへ分化した細胞数を測定した結果、図 3 に示すように EM の濃度に依存して単球からマクロファージへの分化が誘導されること、特に 30 μ M 以上の濃度で強いマクロファージ分化誘導を認めた。EM201, EM522, EM574 いずれの誘導体も単球からマクロファージへの分化誘導能を有すること、また、これら誘導体は EM に比べその活性が強く、1 μ M の濃度でもマクロファージへの分化を誘導する作用を有することが明らかになった。CAM 及び RXM も EM 同様単球のマクロファージへの分化誘導作用を有することが知られたが、その活性は EM より強いこと、また EM と異なりこれら両薬剤では高濃度 (100 μ M) ではむしろ単球の細胞死が誘導さ

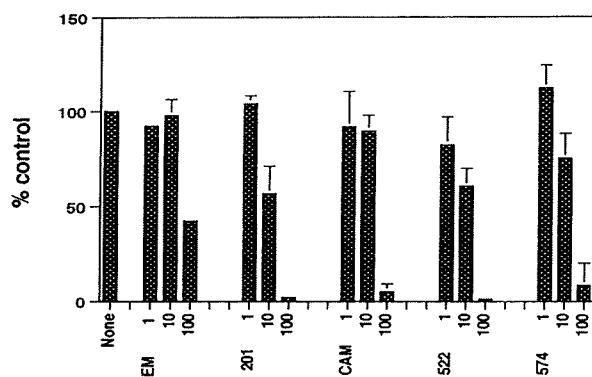


図 2 T 細胞増殖に対するマクロライドの抑制効果

れ回収されるマクロファージの数は少なくなることが知られた。尚、16 員環マクロライドであるロキタマイシンも 10 μ M では単球のマクロファージへの分化誘導作用を示すことが知られたが、1 μ M では活性は認められず、また 100 μ M では単球の細胞死を誘導した。

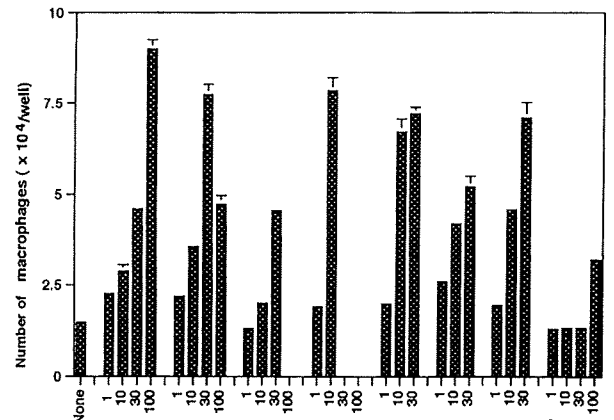


図 3 単球・マクロファージの分化誘導に対するマクロライドの効果

考 察

今回エリスロマイシン各種誘導体の ConA 刺激によるヒト T 細胞増殖応答及び単球のマクロファージへの分化に対する影響を検討した結果、いずれの誘導体も EM 同様 T 細胞増殖応答の抑制作用とマクロファージへの分化誘導作用を有すること、また EM に比べその活性は、誘導体の方が強いこと、特に EM201 が他の誘導体に比べ若干活性が強い傾向が明らかになった。さらに、各薬剤の T 細胞増殖抑制作用の活性の強さとマクロファージ分化誘導作用の活性の強さは相関していることより、これら 2 つの作用に対し、これら薬剤は共通の作用点を介して影響をおよぼしているものと考えられる。また、CAM や RXM は、EM に比べ高濃度においてむしろ単球の細胞変性や細胞死を誘導したが、これは、活性が強すぎるためか、または、EM の有する活性以外の活性をこれら薬剤が有しそのためにこのような変化が誘導されたものか現在はまだ不明であり、今後明らかにしなければいけない点である。

興味ある点は、16 員環マクロライドである RTM でも単球のマクロファージへの分化が誘導されたことである。しかし、14 員環の EM 及び EM 誘導体と比べその活性閾値は非常に狭く、薄い活性がなく濃いとすぐ細胞死が誘導された。16 員環マクロライドは、臨床応用の場では 14 員環マクロライドとことなり効果がないとされているが、それは、ここに示した単球のマクロファージへの分化誘導活性に見るように、その活性閾値が非常に狭いということと関連するかも知れない。今回 EM の誘導

体でEM以上に強い活性が認められたことより、今後これらの薬剤を使用することにより、作用機作の解明に近づくことも可能かも知れない。

文 献

- 1) Keicho N, *et al.*: Erythromycin promotes monocytes to macrophage differentiation J Antibiotics 47:80-89, 1994.
- 2) Keicho N, *et al.*: Antilymphocytic activity of erythromycin distinct from that of FK506 or cyclosporin A. J Antibiotics 46:1406-1413, 1993.

上皮細胞：ヒト気道上皮細胞のIL-8産生に対するマクロライド剤の影響

滝沢 始

東京大学医学部 検査部

はじめに

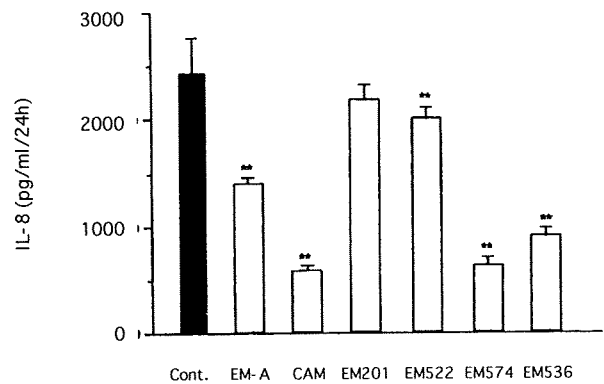
14員環マクロライドは *in vitro* である種の抗炎症作用をもつことを示している。一方、16員環マクロライドのジョサマイシン (JM) ではこのような効果がみられないことから、抗菌作用とは異なる何らかの構造特異性が想定されている。このたび、北里研究所大村智先生から供与された誘導体を用いてヒト気管支上皮細胞のIL-8産生系における活性の比較を試みた。

方 法

- (1) 米国NCI, Dr. Lechnerらから供与されたヒト気管支上皮細胞BEAS-2Bをホルモン添加ハムF12液中でコラーゲン処理培養プレート上でコンフルエントまで培養した。
- (2) エリスロマイシン (EM), およびその誘導体をエタノールを用いて溶解後それぞれ最終濃度が 10^{-6} Mになるように添加して、24時間後の培養上清中のIL-8濃度をELISAで測定した。
- (3) 細胞毒性試験としては、トリパンブルー試験のほかLDH測定、およびMTTアッセイを行い有意な影響を認めなかった。また、エタノールの最終濃度でIL-8遊離へは有意な影響を認めなかった。

結 果

EMA, CAMのほか、EM574, EM536も明らかにIL-8産生抑制を示した (図4)。



**p<0.05 (unpaired test)

図 4

水分分泌に対する作用

三輪 正人

藤田保健衛生大学医学部 耳鼻咽喉科

はじめに

繊毛上皮細胞は気道の粘膜上皮を構成する主要な細胞であり、非特異的防御機構として非常に重要な粘液繊毛輸送機能の主役を担う細胞であることは明確な事実であるが、分泌能については全く知られていなかった。気道繊毛細胞の電解質分泌能・イオントランスポートについて我々はパッチクランプ法を用いて初めて証明し、14員環マクロライドが抑制することを既に見出している¹⁾。今回、気道繊毛上皮細胞のマクロライドイオン分泌に対するその他のマクロライド剤の影響について、パッチクランプ法を用いて、チャンネル活性の記録をおこない検討した。

材料および方法

Hanley系モルモットを用い、ペントバルビタール腹腔麻酔後、気管を摘出し、既報の如く¹⁾気管繊毛上皮細胞を単離した。その後、全細胞膜を流れるイオン電流を記録するホールセルレコーディングをaxopatch200A (Axon Instrument社製)を用いて行い、pCLMP 6.0.3 (Axon Instrument社製)にて解析した。イソプロテレノール (100 μ M) 刺激後、EM-A, CAM, EM201, EM522 (50 μ M) の各溶液を灌流し、イソプロテレノールにより活性化したクロライドイオンの全細胞電流に対する各薬剤の効果を観察した。パッチ電極液の組成は、150mM CsCl, 10mM HEPES, 5mM EGTA, 2mM MgCl₂とした。EM-A, CAM, EM201, EM522は、北里研究所 大村 智所長、砂嫁敏明博士より供与されたも

のである。

結 果

イソプロテレノール刺激後の EM-A の抑制率は、 70.2 ± 8.6 (n=5) であった。その結果の代表例を I-V カーブに示した (図 5 a)。イソプロテレノール刺激後の CAM の抑制率は、 93.6 ± 10.1 (n=5) であった。その結果の代表例を I-V カーブに示した (図 5 b) が、4 薬剤のなかで最も高い抑制率を示した。イソプロテレノール刺激後の EM201 の抑制率は、 40.8 ± 30.5 (n=4) であった。イソプロテレノール刺激後の EM522 の抑制率は、 0.09 ± 0.06 (n=4) でほとんど抑制効果がみられなかった。

考 察

気道過分泌に対するマクロライド剤の有効性は、既に多くの施設において臨床的に実証されているが、その基礎的作用機序はいまだ不明の点が多い。著明な気道分泌障害や鼻茸などの上気道疾患の合併で知られる嚢胞線維症は、cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) の遺伝子異常によりおこることが発見され、気道分泌におけるサイクリック AMP 依存性クロライドチャンネルの重要性が示唆されている²⁾。イオントランスポートについては、種々の研究法がなされているが、Ussing's chamber で測定される短絡電流があらわすとされる組織全体の分泌電流と単一イオンチャンネル電流の対応が全く為されていないのが現状である。

今回、airway surface liquid の sol 層を調節している

とされるイオントランスポートのなかでもサイクリック AMP 依存性クロライドイオンチャンネルに絞りパッチクランプ法を用いて各マクロライド剤の効果を検討した。その結果、CAM > EM-A > EM201 の順で、抑制効果がみられたが、EM522 はほとんど影響をおよぼさなかった。我々は既にマクロライド剤は、気道上皮管腔側のクロライドチャンネル (outwardly rectifying chloride channel: ORCC) のブロッカーとして作用している可能性を示唆している³⁾。クロライドチャンネルブロッカーの構造活性相関については Greger⁴⁾らのグループが精力的に研究をおこなっているが、詳細は不明である。今回用いた実験方法をより詳細に適用することにより、マクロライド剤の基礎的作用機序がより明らかになると思われる。

文 献

- 1) 三輪正人, 岩田重信, 高須昭彦ほか: 気道繊毛上皮細胞の dual function - 繊毛運動と分泌能 -。日食食会報, 49:81-85, 1998.
- 2) Boucher RC: Human airway ion transport. Am. J. Respir. Crit. Care Med 150:271-281, 1994.
- 3) 三輪正人, 岩田重信, 高須昭彦ほか: 培養気道上皮細胞管腔側の Cl⁻チャンネル活性に対するロキシシロマイシン抑制効果。耳鼻展望, 39 (補1):23-27, 1996.
- 4) Tilmann M, Kunzelmann K, Frobe U, et al.: Different types of blockers of the intermediate-conductance outwardly rectifying chloride channel in epithelia. Pflügers Arch. 418:556-563, 1991.

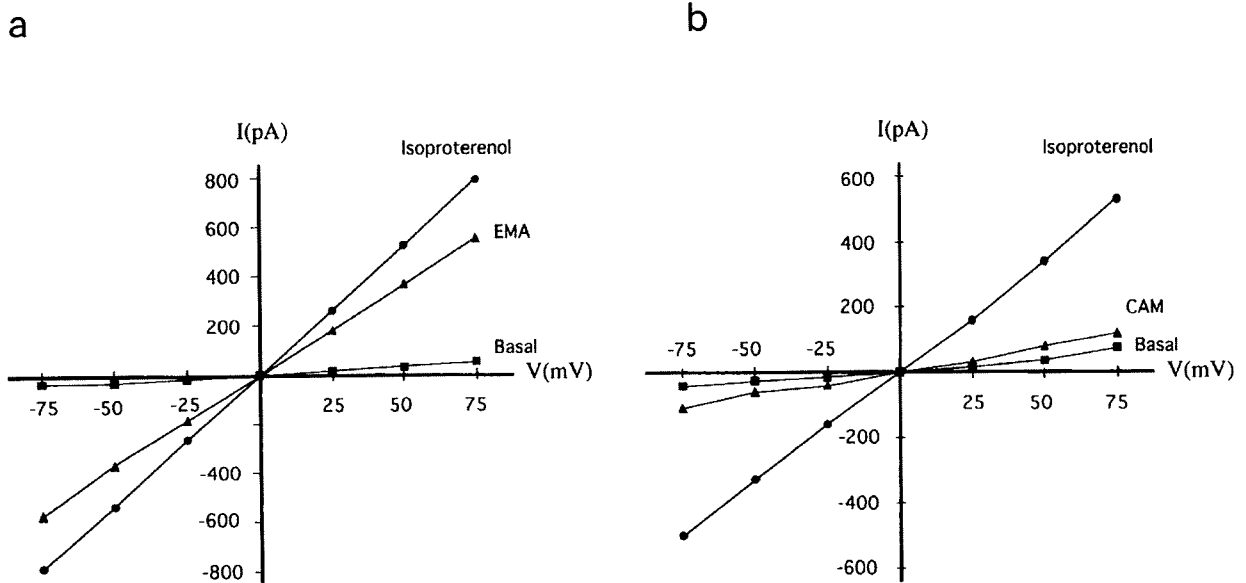


図 5 気道繊毛細胞の Cl⁻イオン電流に対するイソプロテレノール (100 μM) および EM-A (50 μM) (a) ならびに CAM (50 μM) (b) の効果

気道上皮細胞 Cl⁻ イオントランスポートに対する効果

叶 宗一郎¹, 玉置 淳², 近藤 光子², 永井 厚志²

1. 防衛医科大学 第三内科
2. 東京女子医科大学 第一内科

はじめに

びまん性汎細気管支炎など慢性気道疾患に対するマクロライド長期投与の奏効機序として、気道分泌抑制、免疫調節、抗炎症作用などが注目されている。気道上皮細胞をターゲットとした気道分泌に関する研究では、これまでにエリスロマイシン (EM) が粘膜下腺由来の粘液糖蛋白や気道上皮細胞からのクロルイオン (Cl⁻)・水分分泌を減少させることが *in vitro* の系で明らかとなっている^{1,2)}。しかし、マクロライド系薬剤の気道分泌抑制の細胞内作用点については不明である。本研究ではマクロライドの構造と生物学的活性の相関を明らかにする目的で、EM およびその誘導体が気道上皮細胞の Cl⁻ 分泌能に与える影響を検討した。

方 法

プロテアーゼ処理した牛気管上皮細胞をメンブレンフィルター上に撒き、5%牛胎児血清 DMEM/HamF12 混合培地を用いエアインターフェース法にて10~14日間培養後、実験に供した。Cl⁻ 分泌能の指標として短絡電流 (short circuit current, I_{sc}) を用い、粘膜側と漿膜側との電気的特性を評価した。I_{sc} は気道上皮細胞をフィルターごと Ussing's chamber に固定し、Na⁺ チャネルブロッカーのアミロライド (100 μM) 存在下にボルテージクランプ法により測定した。気道上皮細胞の Cl⁻ 分泌を亢進させる刺激薬としてイソプロテレノール (10 μM) を用いた。検討薬剤は、EM-A, クラリスロマイシン (CAM), EM201, EM522, EM574, ロキタマイシン (RKM) である。

結 果

図6は気道上皮細胞の I_{sc} の経時的变化を示したものである。アミロライド (AML) 処置後、10 μM イソプロテレノール (ISO) を投与すると急速な一過性の上昇とそれに続く持続的な増加からなる二相性反応が惹起された。ついで、安定した I_{sc} が得られた後、10 μM の EM を粘膜側 (M) に投与しても影響はみられなかったが、漿膜側 (S) 投与では I_{sc} の急速な低下が認められた。I_{sc} は Cl⁻ チャネルブロッカーである diphenylamine-2-carboxy-late (DPC) の投与でさらに抑制された。他のマクロライド薬でも粘膜側では効果なく、漿膜側におい

て I_{sc} を低下させた。図7に I_{sc} に対する EM522 の効果を示した。イソプロテレノールによる Cl⁻ 分泌は濃度依存的に EM522 により抑制された。同様の実験を各マクロライド薬で検討し、I_{sc} に対する減少効果の結果を図8に示した。何れの薬剤も濃度依存的に Cl⁻ 分泌を抑制した。本効果の作用強度順位は 10⁻⁸ ~ 10⁻⁶ M の濃度では、EM522 > EM = EM201 = EM574 = RKM ≥ CAM であった。

考 察

本研究により EM をはじめとする各種マクロライド薬はイソプロテレノールによる Cl⁻ 分泌を抑制することが明らかとなった。この抑制効果は濃度依存的で漿膜側においてのみ認められた。この理由は明らかでないが、作用部位が漿膜側に局在している可能性や粘膜側と漿膜側における細胞膜透過性あるいは能動輸送の相違などが推定される。

本作用は抗菌活性のない EM201, EM522, EM574 で

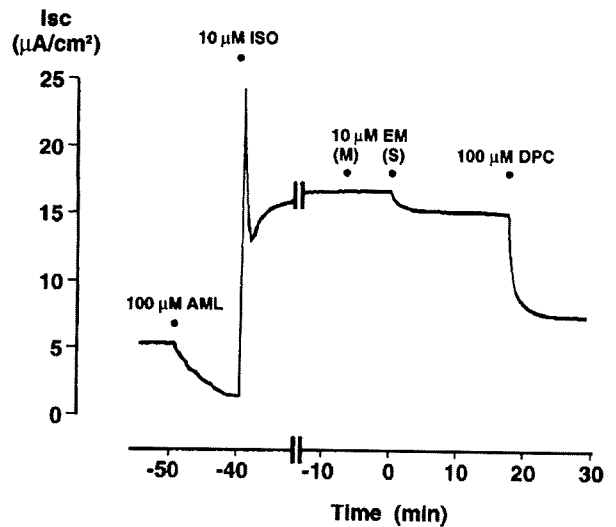


図6 気道上皮細胞の短絡電流 (I_{sc}) に対する EM (10 μM) の効果

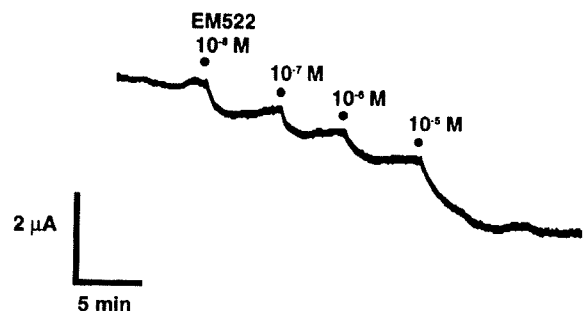


図7 イソプロテレノール (10 μM) 投与後の短絡電流 (I_{sc}) におよぼす EM522 の効果

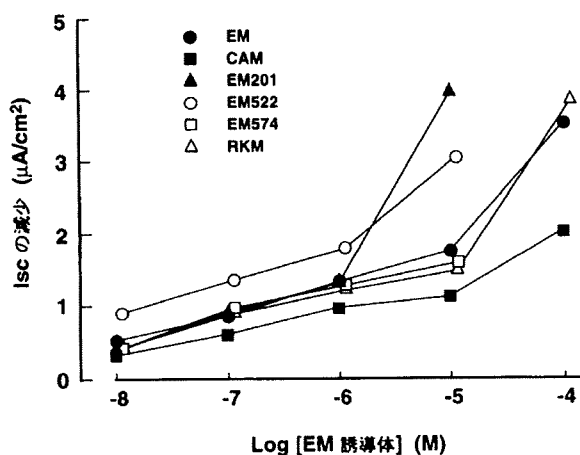


図8 短絡電流 (Isc) に対するマクロライド剤の濃度依存的効果

も同等ないし同等以上の効果が得られ、マクロライド薬の有する新作用を支持する結果と考えられる。これらの薬剤は何れも抗菌活性に必須とされる14員環の5位 desosamine 連鎖のジメチルアミノ基を変化させ、モチリン様活性を高めたものである³⁾。この修飾によるCl⁻分泌抑制作用の活性低下がみられなかったことは、逆に本作用が他の構造部位に依存している可能性も示唆される。また、14員環マクロライド薬が有するチトクローム P450 に対する誘導・阻害作用⁴⁾がない16員環のRKMでもほぼ同様の効果が得られた結果からは、本酵素に対する作用とも独立したものと考えられる。今回の成績からはマクロライド薬による気道分泌系の抑制作用と構造活性相関について明らかにできなかったが、今後その細胞内作用部位を含めた検討が必要と思われる。

文 献

- 1) Tamaoki J, Isono K, Sakai N, *et al.*: Erythromycin inhibits Cl secretion across canine tracheal epithelial cells. *Eur. Respir. J.* 5:234, 1992.
- 2) Goswami SK, Kivity S, Marom Z: Erythromycin inhibits respiratory glycoconjugate secretion from human airways *in vitro*. *Am Rev Respir Dis* 141:72, 1990.
- 3) 砂塚敏明: マクロライドの構造と作用. *Jpn J Antibiotics* 50 Suppl. A:20, 1996.
- 4) 鎌滝哲也: チトクローム P450 によるマクロライドの代謝: 14員環と16員環の違い. *Jpn J Antibiotics* 51, Suppl. A:30, 1996.

ムチン分泌に対する効果 (1)

色川 俊也

東北大学医学部 第1内科

はじめに

臨床の場で慢性閉塞性肺疾患の過分泌状態に対して erythromycin (EM) が喀痰量の減少に著しい効果を及ぼすことが知られ、広く用いられてきたが、1990年 Goswami¹⁾らが、EMがヒト気道上皮 explant からの粘液糖蛋白分泌を抑制する事を証明して以来、EMがイヌ気道上皮や、モルモット鼻腺のCl⁻分泌を抑制すること^{2,3)}、EMと clarithromycin (CAM) が lipopolysaccharide (LPS) により誘発される guinea pig 気管杯細胞からの過分泌を抑制すること⁴⁾などが次々に報告された。今回私達は、これまで気道分泌に対する影響が未だ明らかにされていなかったいくつかのマクロライド剤のネコ気道粘膜下腺細胞のムチン分泌に対する影響を検討した。

対象及び方法

ネコ気管から実体顕微鏡下に粘膜下腺を Krebs-Ringer-bicarbonate 溶液中 (bubbling of 5%CO₂-95%O₂ and pH7.4 at 20°C.) で単離した。単離粘膜下腺は、D [6-³H] glucosamine hydrochloride を 2.5 μCi/ml で含む、2 ml の medium 199 (specific activity 27~40 Ci/mmol, Amersham Japan, Tokyo) 中で48時間、5%CO₂/55%N₂/40%O₂のもとで37°Cのチャンバー内で培養する。その後洗浄して、更に、放射性物質を含まない 2 ml の medium 199 にて12時間同じ条件下に培養を2回繰り返し、それぞれ period1, period2 とする。各々の period 終了時には培養した medium を回収し、10% trichloroacetic acid (TCA) と、1% phosphotungstic acid (PTA) を含む溶液と混注し、4°Cで一晩沈殿させる。沈殿物の放射性活性を液体シンチレーションカウンター (LSC-1000, Aloka, Tokyo) を用いて測定し、各々における放射性活性 (dpm) の比 {period1 (dpm)/period2 (dpm)} をとり、これを secretory index とした。今回、period2 開始時に EM-A, CAM, EM201, EM522, EM574, RKM の 10⁻⁶M を各々加え、マクロライド剤が spontaneous (定常状態) に及ぼす効果を評価した。次に、agonist として aceyl-6-methylcholine (MCh) 1 μM を用い、period1の終了直後に各々のマクロライド剤と共に medium に加え agonist 刺激 (過分泌) に対するマクロライド剤の効果を評価した。実験で用いたマクロライド剤の効果については、コントロールサンプルとの secretory index⁵⁾の比較で検討し

た。

結 果

(1) 定常状態 (spontaneous) に対するマクロライド剤の効果 (図 9, n=4 or 5)

Control を 100% として, EM-A 91±11%, CAM 130±16%, EM201 80±7%, EM522 119±15%, EM574 101±12%, RKM 160±25% と, 何れも有意な変化をもたらさなかったが, CAM, EM522, RKM で有意ではないものの, 若干の分泌増加傾向を示した。

(2) agonis 刺激 (過分泌) 状態に対するマクロライド剤の効果 (図 10, n=4 or 5)

MCh 1μM を 100% として, EM-A 116±13%, CAM 81±9%, EM201 108±9%, EM522 147±37%, EM574 140±28%, RKM 123±21% の結果であった。定常状態と同様にやはり有意な変化は認められなかったものの, CAM では抑制傾向, EM522, EM574, RKM では増加傾向を示した。⁶⁾

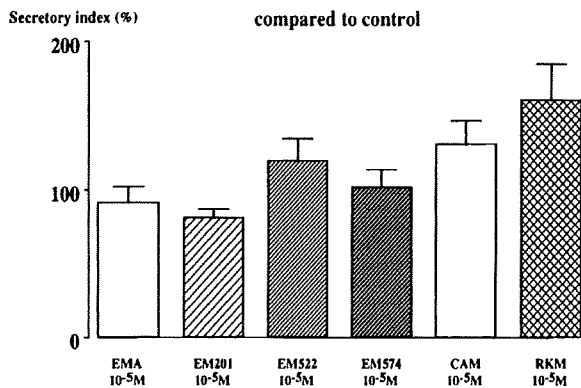


図9 定常状態 (spontaneous) に対するマクロライド剤の効果

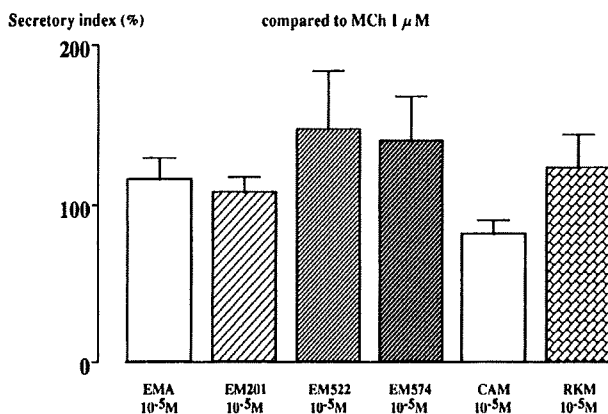


図10 agonis 刺激 (過分泌) に対するマクロライド剤の効果

考 察

今回の我々の結果からは 定常状態, 過分泌状態いずれにおいても有意な抑制効果は認められなかった。しかし, Goswami らの報告と比較して, 実験材料の種差 (ヒトとネコ), 組織の差 (explant と単離の gland, 培養細胞と fresh な分離細胞), 培養条件やマクロライド剤の濃度, 投与の方法などいくつかの実験条件の違いがあることから, 結果を単純に比較することはここでは避けたい。また, mucin 分泌に関する限り, マクロライド剤各々によってその力価には違いのある可能性がありデータにばらつきの認められたことや, agonist とマクロライド剤の投与方法としてはマクロライドを前投与した方が抑制効果が顕著に現われた可能性があったのではないかと思われる。

参考文献

- 1) Goswami, S. K., Kivirr, S., Marom, Z. *et al.*: Erythromycin inhibits respiratory glycoconjugate secretion from human airways *in vitro*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:72-78, 1990.
- 2) Tamaoki, J., Isono, K., Sakai, T.: Erythromycin inhibits Cl secretion across canine tracheal epithelial cells. *Eur. Respir. J.* 5:224-238, 1992.
- 3) Ikeda, K., Wu, D., Takasaka, T.: Inhibition of acetyl-choline-avoked Cl currents by 14-membered macrolide antibiotics in isolated acinar cells of the guinea pig nasal Gland. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13:449-454, 1995.
- 4) Tamaoki, J., Takeyama, K., Yamawaki, I. *et al.*: Lipopolysaccharide-induced goblet cell hypersecretion in guinea pig trachea: inhibition by macrolides. *Am. J. Physiol.* 272:1519, 1997.
- 5) Sasaki, T., Shimura, S., Sasaki, H. *et al.*: Effect of epithelium on mucus secretion from feline tracheal sub-mucosal glands. *J. Appl. Physiol.* 66:764-770, 1989.
- 6) Irokawa, T., Sasaki, T., Shimura, S. *et al.*: Cholinomimetic action of macrolide antibiotics on airway gland electrolyte secretion. *Am. J. Physiol.*, in press

ムチン分泌に対する効果 (2)

清水 猛史, 岸岡 睦子, 藤田健一郎, 坂倉 康夫
三重大学医学部 耳鼻咽喉科

はじめに

ヒト鼻粘膜上皮の細胞培養モデルを用いて, 上皮細胞からのムチン分泌におよぼすマクロライド剤の直接作用を検討した. 一般に, 気道上皮の細胞培養では上皮細胞がすぐ脱分化して単一の未分化細胞になるため, 生体における線毛円柱上皮の作用を反映できない欠点がある. そこで, 分泌細胞や線毛細胞などの分化形態を有するヒト鼻粘膜上皮の細胞培養モデルを作成した.

方 法

慢性副鼻腔炎患者鼻茸より得た上皮細胞を, Type I コラーゲンを coat したコラーゲン膜上で, Kaartinen ら¹⁾の方法に準じて retinoic acid を加えた serum-free の培養液で培養し, confluent になった段階で上室の培養液を除いて air-liquid-interface とした (図11). confluent の段階では 1 ~ 2 層の未分化細胞に被われるが, air liquid interface にすると徐々に線毛細胞や分泌細胞の分化が認められ, 多数の分泌顆粒が出現して 3 週間後には約半数が分泌細胞で占められる²⁾. また, この培養法では刺激と反応を管腔側と基底側の両面から別々に検討できる利点があり, ムチン分泌は管腔側にのみ認められ極性のある分泌が観察できる.

そこで, まず基底側の培養液に 10^{-4} M 濃度の各薬剤を 3 日間加え apical side から分泌される粘液を回収して, 自発的なムチン分泌におよぼす影響を検討した. 次に, 各薬剤を 4 日間投与し最後の 24 時間は $\text{TNF } \alpha$ を 20ng/ml 濃度で加え, $\text{TNF } \alpha$ 刺激時のムチン分泌におよぼす影響を検討した. 私達は慢性副鼻腔炎鼻汁に対する 18 種類のモノクローナル抗体の作成に成功し, このうち HCS18 抗体は鼻粘膜の杯細胞に特異的に反応し, 分泌顆粒中のムチン様高分子量物質を認識している³⁾. ムチン分泌量の測定は精製した HCS18 抗体を用いた ELISA 法を利用して, 薬剤添加前の粘液分泌量を 100 として分泌

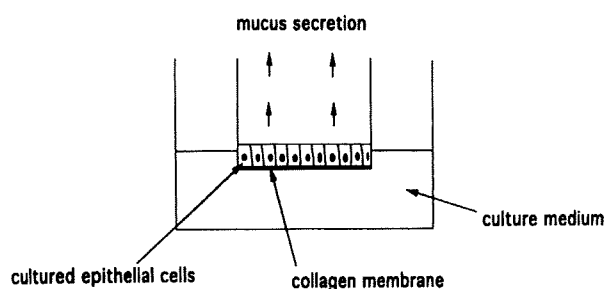


図11 Air-Liquid interface による鼻粘膜上皮の細胞培養

量の変化をパーセント表示した.

結 果

10^{-4} M 濃度のマクロライド誘導体の 3 日間投与により, CAM, EM-A, EM522 には RXM に比べて自発的な粘液分泌を抑制する傾向が認められたが, それぞれの well での粘液分泌量の差が大きく統計学的に有意差は認められなかった (図12). $\text{TNF } \alpha$ (20ng/ml) は 24 時間投与により, 鼻粘膜上皮細胞からのムチン分泌を有意に促進した. マクロライド誘導体の 4 日間投与により, $\text{TNF } \alpha$ 刺激時のムチン分泌は, CAM, EM522 などで抑制される傾向が認められたが, データのばらつきが大きく, 統計学的有意差は認められなかった (図13).

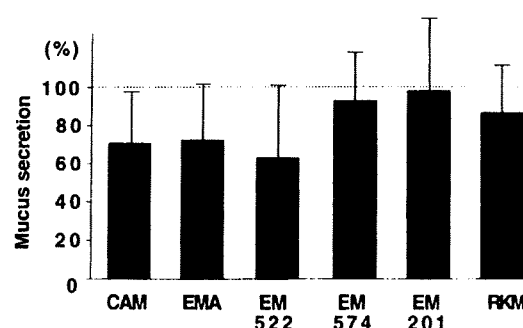


図12 培養上皮からの自発的な粘液分泌に対するマクロライド剤の影響 (3日間投与)

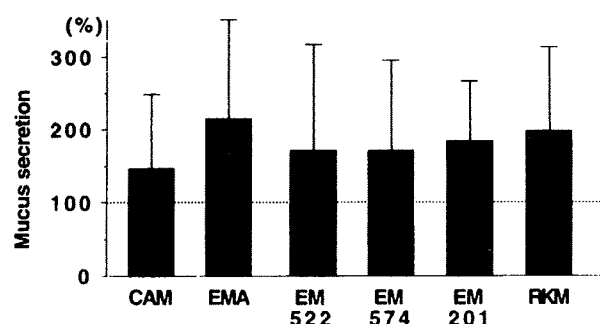


図13 $\text{TNF } \alpha$ (20ng) 刺激時の培養上皮からの粘液分泌に対するマクロライド剤の影響 (4日間投与)

考 察

培養鼻粘膜上皮細胞からのムチン分泌に対する抑制作用は, 自発的な分泌に対して CAM, EM-A, EM522 に抑制する傾向があり, $\text{TNF } \alpha$ 刺激時の分泌は CAM, EM522, EM574 に抑制する傾向が認められた. 以上の結果をしいて評価すれば, CAM, EM522 ついで EM-A, EM574 の順にムチン分泌に抑制効果が有ることが考えられるが, いずれも統計学的有意差は認められず, 生理学的濃度をはるかに超えた 10^{-4} M という高濃度での作

用であり、このことが実際の生体内でのマクロライド剤の作用機序にどれほど貢献しているかについては疑問が残る。さらに、こうしたムチン分泌の研究結果の比較には、上皮細胞と腺細胞の違い、上気道と下気道の違い、動物種や培養方法の違い、マクロライド剤の濃度や投与方法の違い、自発的な分泌と刺激時の分泌の違い、分泌刺激方法の違い、分泌ムチン量の測定方法の違い、などを考慮する必要があると考えられた。

参考文献

1) Kaartinen, L., Mettesheim, P., Adler, K. B., *et al.*: Rat tracheal epithelial cell differentiation *in vitro*. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29A:481-492, 1993.
 2) Usui, S., Shimizu, T., Fishioka, C., *et al.*: Secretory cell differentiation and mucus secretion in cultures of human nasal epithelial cells: use of a monoclonal antibody to study human nasal mucin. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, in press
 3) Kishioka, C., Shimizu, T., Fujita, K., *et al.*: Carbohydrate epitopes of human nasal secretions detected by monoclonal antibodies are differentially expressed in tissue and diseases. *Am. J. Rhinol. in*

press

総括

本研究は1) マクロライドの抗菌作用以外の生物活性と薬物構造との関係を明らかにすることが一義的な目的である。加えて2) 目的とする薬理作用を持つ薬剤の開発に向けて、有用な assay 系の確立の一助となることを目的に企画した。以下に総括を示す。

血球系として、1) ヒトのT細胞の増殖抑制作用と2) モノサイトのマクロファージへの分化誘導作用(赤川博士, 感染研), また、上皮系として、3) ヒト気管支上皮細胞のIL-8産生抑制作用(滝沢博士, 東大), 4) 牛気管上皮細胞の分泌抑制作用(玉置博士, 東京女子医大), 5) モルモット気管絨毛上皮細胞の分泌抑制作用(三輪博士, 藤田保健衛生大), 6) ヒト鼻粘膜上皮細胞のムチン分泌抑制作用(清水博士, 三重大), 7) ネコ気道粘膜下腺細胞のムチン分泌抑制作用(色川博士, 東北大)について調べた。また、薬剤としては抗菌活性とモチリン様活性の両方を有するEM-A, 抗菌活性のみを有するEM-Aの6-O-メチル体であるクラリスロマイシン(CAM), EM-Aの6位と9位で環化したモチリン様活性のみを有するEM201, EM201のジメチルアミノ基を

表1 マクロライドの構造と活性の相関

	血球系					上皮系				
	抗菌活性	モチリン様活性	T細胞増殖抑制	単球分化誘導	THP-1分化誘導	IL-8産生抑制	CLチャンネル抑制	ムチン分泌抑制		
EM-A	++	+	+	+	+	+	+	+	±	±
CAM	++	-	++	++	-	++	±	++	±	+
EM201	-	++	+++	+++	++	±	+	±	-	-
EM522	-	++	+++	+++	++	+	++	-	-	++
EM574	-	+++	+++	+++	++	++	+	nd	±	±
RKM	++	-	++	(++)	-	-	+	nd	-	-
濃度 (10 ^x M)	-7~-5	-8~-5	-6~-4	-6~-4		-6	-8~-6	-5~-4	-4	-5
	北里研究所		赤川	赤川	赤川	滝沢	玉置	三輪	色川	清水

変換した EM522 及び EM574 そして抗菌活性のみを有する 16 員環マクロライド, ロキタマイシン (RKM) の 6 種について調べ, 構造と活性の相関を検討した. その結果を薬剤の濃度も入れて表 1 に示したが, 今回調べたいずれの作用 1) ~ 7) は, 抗菌活性, モチリン様活性ともに相関性がないことが明らかになり, これらの作用は抗菌活性とは別の作用であることが確認出来た.

興味あることに血球系について, 1) T 細胞の増殖抑制作用の活性の強さと 2) マクロファージ分化誘導作用の活性の強さは相関をしており, これらの薬剤はこれらの作用に対し共通の作用点を介し影響しているものと思われる. また, EM201, EM522, EM574 に関しては EM-A よりもかなり強い活性を示しており, EM201 の骨格が活性発現に重要で, ジメチルアミノ基の変化には影響しないものと思われる. このように, これらの作用に特異的な薬剤の創製が可能と思われる. さらに, 16 員環マクロライド RKM にも同様な作用があることは興味深い.

一方, 上皮系については血球系とは全く相関性は認められなかったが, 3) ヒト気管支上皮細胞の IL-8 産生抑制作用については, 6) ヒト鼻粘膜上皮細胞のムチン分泌抑制作用と多少の相関性が認められた. 前記, 2 施設で行ったクロライドイオンの分泌抑制作用には相関性は見られなかった. それは種の違い (牛とモルモット) や薬剤の濃度の違い等によるものと考えられる. 今後薬剤の投与方法や濃度をふる等の検討が必要と思われる. また, 今回測定したムチン分泌抑制作用に関しては, 2 施設とも有意な抑制効果は認められなかった. 今後さらに種々の誘導体について種差や濃度等を統一して, それぞれの作用について検討することにより, より詳細な構造活性相関が明らかになると思われる. また, 作用の分離も可能と思われ, 高活性化化合物を見つけることにより作用機作解明のプロープの創製も可能と思われる. さらに特異的な誘導体が見い出されれば新たな薬剤へ展開出来ることが期待される.

サルコイドーシス

サ症重症化の要因の検討

— 疫学実態調査 —

佐藤 篤彦^{1*} 千田 金吾² 須田 隆文² 工藤 翔二^{3**}
横山 徹爾⁴ 田中 平三^{4***}

【目的】サルコイドーシス（サ症）は早期に改善治癒する予後良好な症例が多いが⁵、病変が遷延あるいは進行する難治例も存在する。しかし、サ症の予後を規定する因子は未だ明確に定義されていない。そこで、多施設で新規に診断されたサ症について予後調査を行い、本症の予後規定因子の解明を試みた。

【対象および方法】協力施設において1992年1月から1994年12月までの3年間に新規に診断されたサ症305例（男：女=1：1.6，平均年齢：男41.0歳，女55.0歳）を対象とし、追跡調査を行い（平均4.0年）予後を病変残存率で判定した。肺内および肺外病変の累積残存率をCulter-Ederer法によって推定し、比例ハザードモデルを用いて病変残存率に寄与する因子の検討を行った。【結果】肺内病変の残存率は、高齢、肺活量低値、IgMおよびγグロブリン高値、ACE低値例で有意に高率であった。肺外病変の残存率は、高齢、1秒率低値、%DLCO低値、BALリンパ球高値例で有意に高かった。性差による肺および肺外病変の残存率の差は認められなかった。【考察】従来より報告されてきた性差による病変残存率の差は年齢調整を行った比例ハザードモデルによる今回の検討ではみられなかったが、肺内および肺外病変に共通して高齢発症の予後が不良なことが再確認された。

Epidemiological study of clinical factors responsible for disease progression in sarcoidosis

Atsuhiko Sato¹, Kingo Chida², Takafumi Suda², Shouji Kudo³
Tetsuji Yokoyama⁴, Heizou Tanaka⁴

1. Kyoto Preventive Medical Center
2. Second Division of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine
3. Forth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School
4. Department of Epidemiology, Tokyo Medical and Dental University

To investigate clinical factors responsible for prognosis in sarcoidosis, we made prospective prognostic study in patients with sarcoidosis. Their prognoses were evaluated as a cumulative rate of remaining sarcoid lesions which was calculated by Culter-Edren method. Factors governing the rates were examined using Cox-proportional hazard model. Subjects were 305 patients (male:female=1:1.6; average age, male 41.0 yr., female 55.0 yr.) with sarcoidosis newly diagnosed between January 1992 and December 1994. Patients at older age, and with lower vital capacity, elevated levels of serum IgM, increased gamma globulin, or lower level of serum angiotensin converting enzyme had higher rates of remaining intrathoracic lesions. Contributing factors to significantly higher rates of remaining extrathoracic lesions were found older age, lower FEV1, diminished %DLco, and higher percentage of BALF lymphocytes. Inconsistent with previous studies reporting that female patients with sarcoidosis revealed poorer prognoses than did male patients, the present data analyzed using Cox-proportional hazard model did not show the difference in the rate of remaining lesions between the male and female patients.

3. 年齢別の病変残存率の比較:

年齢別の診断6年目までの肺内と肺外病変を含む残存率を比較すると、性調整ハザード比は0.23 ($p < 0.001$)と1より小さく、図1に示すように40歳以上の高齢者で、若年者に比べ有意に病変残存率が高かった。

肺病変と肺外病変に分けて病変残存率を同様に比較検討すると、それぞれの年齢別の性調整ハザード比は0.30 ($p < 0.001$), 0.33 ($p < 0.001$)となり、肺内および肺外病変ともに高齢者で残存率が有意に高値であった。

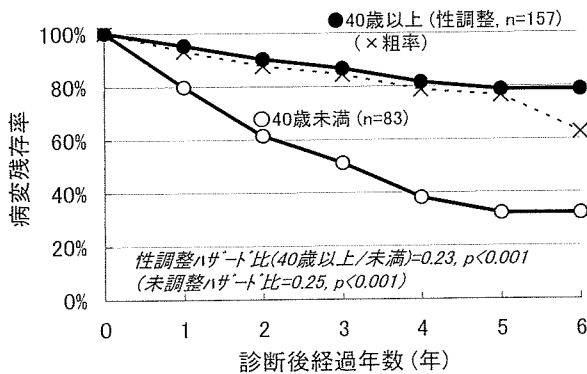


図1 診断後6年目までの病変残存率 年齢別の比較

4. 性別による病変残存率の比較:

性別による診断6年目までの肺内と肺外を含む病変残存率を比較すると、年齢調整ハザード比は0.69 ($p = 0.14$)になり、男女差はなかった(図2)。

肺病変と肺外病変に分けて病変残存率を同様に比較検討しても、それぞれの年齢別の年齢調整ハザード比は1.59 ($p = 0.12$), 0.99 ($p = 0.97$)となり、性別による差は認められなかった。

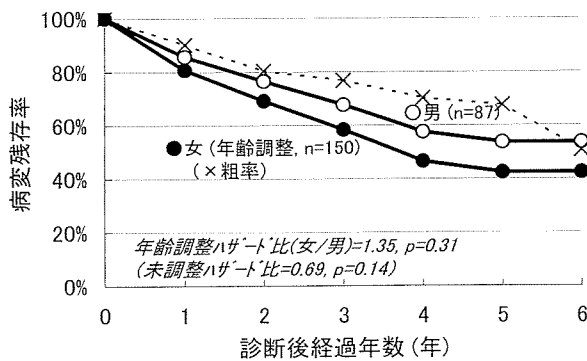


図2 診断後6年目までの病変残存率 性別の比較

5. ステロイド治療の有無による病変残存率の比較:

ステロイド治療の有無による診断6年目までの肺内と肺外を含む病変残存率を比較すると、性年齢調整ハザード比は0.46 ($p = 0.02$)になり、ステロイド治療群で有

意に病変残存率が高かった(図3)。

肺病変と肺外病変に分けて病変残存率を同様に比較検討すると、それぞれのステロイド治療の有無による性年齢調整ハザード比は1.50 ($p = 0.18$), 0.52 ($p = 0.07$)となり、肺病変の残存率にはステロイド治療の有無による差はなかったが、肺外病変はステロイド治療群で残存率が高い傾向がみられた。

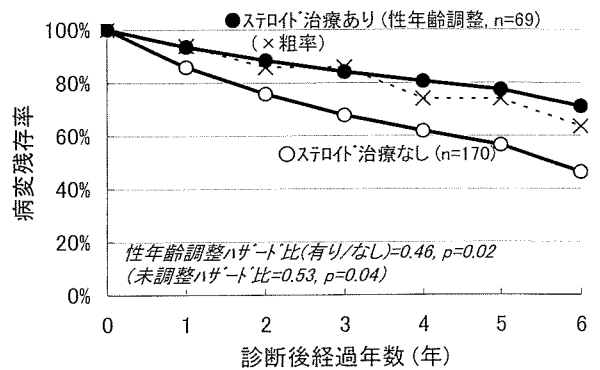


図3 診断後6年目までの病変残存率 ステロイド治療の有無による比較

6. 発見動機による病変残存率の比較:

発見動機による診断6年目までの肺内と肺外を含む病変残存率を比較すると、性年齢調整ハザード比は0.61 ($p = 0.12$)になり、自覚症状(+)群で病変残存率が高い傾向がみられた(図4)。

肺病変と肺外病変に分けて病変残存率を同様に比較検討すると、それぞれの発見動機別の性年齢調整ハザード比は0.76 ($p = 0.31$), 0.52 ($p = 0.06$)となり、肺外病変の残存率は自覚症状(+)群で残存率が高い傾向がみられた。

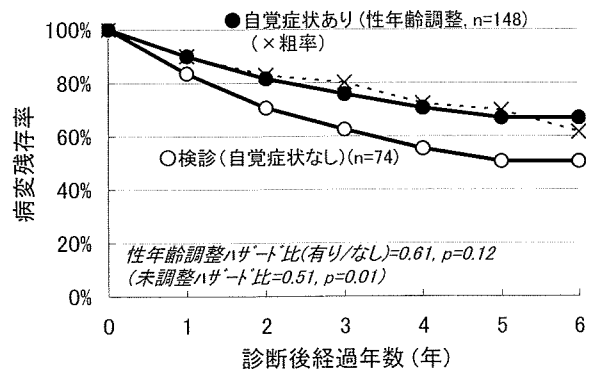


図4 診断後6年目までの病変残存率 発見動機による比較

7. 診断時の臨床検査成績と病変残存率との関連:

診断時の臨床検査値と6年間の肺または肺外病変の残存との関連を比例ハザードモデルを用いて解析したとこ

ろ、肺活量、1秒量、 γ グロブリン (%) と有意な関連を認めた (表4)。

診断時の臨床検査値と肺病変残存との関連を同様に検討すると、肺活量、IgM、 γ グロブリン (%), ACE と有意な関連がみられた。(表5)。

一方、診断時の臨床検査値と6年間の肺外病変の残存との関連を同様に検討すると、1病量、%DLco, BALリンパ球数 (%) と有意な関連がみられた (表6)。

表4 診断時検査成績と6年間の病変 (肺または肺外) 残存との関連

	ハザード比*	p値		ハザード比*	p値		ハザード比*	p値
肺機能			免疫指標			血中指標		
VC	2.22	0.017	IgG	0.88	0.51	ACE	1.07	0.72
%VC	1.17	0.37	IgA	1.06	0.79	Ca	0.86	0.52
FEV _{1.0}	2.65	0.013	IgM	1.38	0.064	BAL		
FEV _{1.0} %	1.06	0.74	γ -glob	0.72	0.30	総細胞数	0.51	0.54
%DLco	1.22	0.48	γ -glob%	0.54	0.033	AM	0.95	0.79
動脈血ガス			CD3	0.60	0.19	Lym	1.01	0.94
PH	1.30	0.30	CD4	0.36	0.039	Neut	0.83	0.68
PaCO ₂	1.35	0.23	CD8	1.48	0.47	Eos	0.63	0.16
PaO ₂	0.74	0.19	CD4/CD8	0.37	0.23	Bas	0.00	0.99
			C3	0.82	0.72	CD4/CD8	0.86	0.49
			C4	0.53	0.27			
			CH50	0.83	0.66			
			抗核抗体	0.83	0.65			
			RA	0.04	0.11			

*+1標準偏差あたりのハザード比(性年齢調整)
ハザード比が大きいほど、検査値が高い群での病変消失が早いことを意味する。

表5 診断時検査成績と6年間の肺病変残存との関連

	ハザード比*	p値		ハザード比*	p値		ハザード比*	p値
肺機能			免疫指標			血中指標		
VC	1.98	0.031	IgG	0.71	0.11	ACE	1.54	0.025
%VC	1.19	0.30	IgA	0.85	0.42	Ca	0.69	0.12
FEV _{1.0}	2.08	0.057	IgM	1.48	0.031	BAL		
FEV _{1.0} %	0.87	0.36	γ -glob	0.50	0.068	総細胞数	0.02	0.22
%DLco	1.12	0.59	γ -glob%	0.43	0.010	AM	0.95	0.78
動脈血ガス			CD3	0.81	0.59	Lym	1.03	0.89
PH	1.27	0.29	CD4	0.65	0.52	Neut	0.64	0.36
PaCO ₂	0.92	0.68	CD8	1.47	0.47	Eos	0.69	0.17
PaO ₂	0.89	0.60	CD4/CD8	0.76	0.62	Bas	-	-
			C3	0.82	0.61	CD4/CD8	0.92	0.65
			C4	0.39	0.12			
			CH50	1.24	0.50			
			抗核抗体	0.82	0.53			
			RA	0.14	0.28			

*+1標準偏差あたりのハザード比(性年齢調整)
ハザード比が大きいほど、検査値が高い群での病変消失が早いことを意味する。

表6 診断時検査成績と6年間の肺外病変残存との関連

	ハザード比*	p値		ハザード比*	p値		ハザード比*	p値
肺機能			免疫指標			血中指標		
VC	1.97	0.094	IgG	1.09	0.68	ACE	0.82	0.39
%VC	1.45	0.12	IgA	0.86	0.47	Ca	0.87	0.55
FEV _{1.0}	2.43	0.048	IgM	1.36	0.10	BAL		
FEV _{1.0} %	1.26	0.22	γ -glob	1.00	1.00	総細胞数	0.82	0.50
%DLco	3.02	0.006	γ -glob%	1.07	0.79	AM	1.43	0.10
動脈血ガス			CD3	0.62	0.40	Lym	0.85	0.048
PH	1.19	0.54	CD4	0.84	0.64	Neut	1.23	0.48
PaCO ₂	1.01	0.98	CD8	1.63	0.40	Eos	0.98	0.95
PaO ₂	0.95	0.87	CD4/CD8	0.99	0.98	Bas	-	-
			C3	2.08	0.26	CD4/CD8	0.74	0.32
			C4	1.03	0.97			
			CH50	0.89	0.83			
			抗核抗体	0.57	0.33			
			RA	1.05	0.86			

*+1標準偏差あたりのハザード比(性年齢調整)
ハザード比が大きいほど、検査値が高い群での病変消失が早いことを意味する。

考 察

今回、多施設のサ症症例の予後調査を行い、病変の遷延化を病変残存率として推定し、残存率を規定する因子を比例ハザードモデルによって検討した。サ症の予後不良群、つまり病変が長期残存する症例は、肺病変に関しては高齢、肺活量低値、血清IgM高値、 γ グロブリンの上昇、ACE低値などの特徴があることが明らかとなった。興味あることにACEについては、従来の報告とは異なり、高値を示す例よりむしろ低値例で肺病変が遷延化するという結果となった。また、ステロイド治療が予後に及ぼす影響については、以前よりステロイド治療例の予後が遷延化することが報告されていたが、今回の最近の新規症例を対象とした検討ではステロイド治療の有無で肺病変の残存率に差はなかった。一方、肺外病変の遷延化要因は、高齢、1秒量低値、%DLco低値、BALリンパ球高値などであった。また、肺外病変はステロイド治療例で残存率が高い傾向がみられた。

従来よりサ症の予後は女性で不良と報告されているが³⁾、今回の検討では対象症例の女性患者の平均年齢は男性患者よりも10歳以上も高く、この年齢因子を調整した比例ハザードモデルを用いて検討したところ性差による肺内および肺外病変の残存率の違いは認められなかった。性差に関わらず高齢が予後不良因子であることは今回の検討から明らかであり、したがって従来より女性患者で予後が不良と考えられたのは、その年齢構成が男性患者より高齢であったためとも推定される。性差による本症の予後の違いについては、今後さらに症例を蓄積して、本研究のように年齢因子を補正した上で検討を加える必要があると考えられた。

参考文献

- 1) 山口百子, 平賀洋明, 田村昌士, 細田 裕, 田中平三: サルコイドーシスの予後調査. 厚生省特定疾患難病の疫学調査研究班. 平成5年度研究業績集. 1994:127-128.
- 2) Sarcoidosis (ICD-9: 135). Recent Statistical Data Book of Intractable Diseases in Japan. Research Committee on Epidemiology of Intractable Diseases. The Ministry of Health and Welfare of Japan. 1966:22-23.
- 3) 玉腰暁子, 大野良之, 若井貞夫, 中村利恵, 橋本修二, 中村 努, 柳川 洋, 山口百子, 平賀洋明, 田村昌士: サルコイドーシスの全国疫学調査成績. 厚生省特定疾患難病の疫学調査研究班. 平成4年度研究業績集. 1992:25-28.

サルコイドーシス重症度策定

菅 守隆^{1*} 平賀 洋明² 山口 哲生³

Sarcoidosis severity grades were prepared in cooperation with the Japan Society of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders.

- (1) The degrees and ranks of functional disorders of each organ were principally prepared following those in the handbook for physically handicapped persons, and characteristic pathology and disorders of sarcoidosis were incorporated.
- (2) Sarcoidosis is a disease causing disorders in multiple organs, and the severity differs from that of disorders of a single organ. Therefore, addition of degree of each organ disorder was set to reflect the patient's QOL.
- (3) Ranks of functional disorders of the eyes, heart, and lung, which are considered most important for the frequency of organs affected by sarcoidosis and patient's QOL, were newly prepared, and are shown in Table 1. Ranks of other organ disorders are to be calculated following the physically handicapped persons classification by affected organs.
 - (i) Ophthalmopathy: Ophthalmic disorders were classified by total of visual acuity and visual field (refer to the simplified rank chart in physically handicapped persons handbook).
 - (ii) Cardiac lesions: Cardiac disorders were classified by New York Heart Association (NYHA) cardiac function classification, Lown Classification of ventricular premature beat, atrioventricular block, and left ventricular ejection fraction.
 - (iii) Lung lesions: Pulmonary function disorders were classified by either predicted vital capacity per second (index) (refer to the ranks in physically handicapped persons handbook) or arterial

blood partial gas pressure.

- (4) With regard to the severity of sarcoidosis, the ranks of affected organs are decided following the sarcoidosis severity (severity rank of each affected organ) shown in Table 1, and when more than two organs are impaired, indices based on the disorder classification shown in Table 2 are summed up and regarded as the severity.

サルコイドーシス重症度策定方針

- (1) 各臓器の機能障害の程度と等級は、基本的に身障者手帳等級における障害の程度と等級を踏襲し、それにサルコイドーシス特有の病変と障害を加味して作成した。
- (2) サルコイドーシスは多臓器に障害を起こす疾患であり、その重症度は単独臓器障害と異なる。したがって、その障害の程度を加算することにより、患者のQOLに反映させた。
- (3) サルコイドーシスによる罹患臓器の頻度と患者のQOLに最も重要と考えられる眼、心、肺の機能障害等級を新たに作成して表1に示し、その他の臓器の障害の等級は臓器別身障者分類によって算定するものとする。
 - (i) 眼病変：視力、視野の合計によって等級分類をした(身体障害者手帳等級早見表参照)。
 - (ii) 心病変：New York Heart Association (NYHA)心機能分類1(資料1)、心室性期外収縮のLown分類(資料2)、房室ブロック、左室駆出率によって等級分類をした(表3)。
 - (iii) 肺病変：肺機能障害は予測肺活量1秒率(以下「指数」という)(身体障害者等級参照)、または動脈血ガス分圧(表4)のいずれかによって等級分類をした。
- (4) サルコイドーシスの重症度は表1のサルコイドーシス重症度(臓器別等級)によって障害臓器の等級を決め、障害臓器が二臓器以上の場合には表2の障害等級による指数を合計して重症度とする。

1. 熊本大学医学部第一内科

2. 札幌鉄道病院

3. JR 鉄道病院

* びまん性肺疾患分科会 分科会員

表1 サルコイドーシス重症度分類

	視覚障害	心臓機能障害				呼吸器機能障害	その他・臓器の機能障害 (臓器別身障者分類による)
		心室性期外収縮 (Lown分類)	房室ブロック	左室駆出率	NYHA		
一級	両眼の視力(万国式試視力表によって測ったものをいい、屈折異常のある者については、矯正視力について測ったものをいう。以下同じ。)の和が0.01以下のもの	4b あるいは 5	25%未満	IV	呼吸器の機能の障害により自己の身の日常生活活動が極度に制限されるもの PaO ₂ 59以下 指数 20以下	
二級	1. 両眼の視力の和が0.02以上0.04以下のもの 2. 両眼の視野がそれぞれ10度以内でかつ両眼による視野について視能率による損失率が95%以上のもの	4a	II度(Mobitz型)あるいはIII度(上記でペースメーカーを植え込んだ例を含む)	25%以上 35%未満	III	呼吸器の機能の障害により自己の身の日常生活活動が著しく制限されるもの PaO ₂ 60~69 指数 20~30	
三級	1. 両眼の視力の和が0.05以上0.08以下のもの 2. 両眼の視野がそれぞれ10度以内でかつ両眼による視野について視能率による損失率が90%以上のもの	2 あるいは 3	II度(Wenkebach型)	35%以上 45%未満	II	呼吸器の機能の障害により家庭内での日常生活活動が著しく制限されるもの PaO ₂ 70~79 指数 30~40	
四級	1. 両眼の視力の和が0.09以上0.12以下のもの 2. 両眼の視野がそれぞれ10度以内のもの	1	I度	45%以上 55%未満	I	呼吸器の機能の障害により社会での日常生活活動が著しく制限されるもの PaO ₂ 80以上 指数 40~50	
五級	1. 両眼の視力の和が0.13以上0.20以下のもの 2. 両眼による視野の2分の1以上が欠けているもの	0	55%以上	I	BHLと肺野に病巣があるが、呼吸器機能障害の少ないもの	

表2 障害が二臓器以上に重複する場合の取り扱い

(1) 障害等級の認定法 二つ以上の障害が重複する場合の障害等級は、重複する障害の合計指数に応じて、次のように認定する。		(2) 合計指数の算定方法 合計指数は、次の等級別指数表により各々の障害臓器の該当する等級の指数を合計したものである	
合計指数	認定等級	認定等級	合計指数
18以上	1 級	1 級	18
11 ~ 17	2 級	2 級	11
7 ~ 10	3 級	3 級	7
4 ~ 6	4 級	4 級	4
2 ~ 3	5 級	5 級	2

参考資料1 New York Heart Association (NYHA) 心機能分類

機能分類 functional capacity	
クラス I	心疾患を有するが、身体活動に制限はなく、通常の身体活動では疲労、動悸、呼吸 困難、狭心痛を生じない。
クラス II	心疾患のために、身体活動に少しの制限はあるが、安静にすると楽に生活できる。通常の身体活動で疲労、動悸、呼吸困難、狭心痛を生ずる。
クラス III	身体活動に強い制限のある患者であるが、安静にすると楽に生活できる。通常以下の身体活動で疲労、動悸、呼吸困難、狭心痛を生ずる。
クラス IV	心疾患を有し、いかなる身体活動をするときにも苦痛を伴う。心不全、狭心症徴候が安静時にも認められることがある。いかなる身体活動によっても苦痛が増強する。
客観的診断 objective assessment	
A.	心血管疾患が他覚的に認められない。
B.	他覚的に軽微な心血管疾患が認められる。
C.	他覚的に中等度の心血管疾患が認められる。
D.	他覚的に高度の心血管疾患が認められる。
(Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels, 9th ed. The Criteria Committee of the New York Heart Association, 1994)	

参考資料2 心室性期外収縮の Lowm の分類

Grade	
0	心室性期外収縮なし
1	散発性、単源性
2	頻発 (>1/分または30/時間)
3	多形性
4a)	2個連発
b)	連続性 (short run)
5	R on T 型

表4 重症度分類 (動脈酸素分圧)

動脈酸素分圧は安静時に室内気を呼吸している状態で測定する。

I 度	: 安静時PaO ₂	80 Torr以上
II 度	: 安静時PaO ₂	79~70 Torr
III 度	: 安静時PaO ₂	69~60 Torr
IV 度	: 安静時PaO ₂	59 Torr以下

表3 サルコイドーシスの重症度等級 -心症状- (試案)

重症度	1級	2級	3級	4級	5級
機能分類 (NYHA)	心疾患を有し、いかなる身体活動をするときにも苦痛を伴う。心不全、狭心症徴候が安静時にも認められることがある。いかなる身体活動によっても苦痛が増強する。	身体活動に強い制限のある患者であるが、安静にすると楽に生活できる。通常以下の身体活動で疲労、動悸、呼吸困難、狭心痛を生ずる。	心疾患のために、身体活動に少しの制限はあるが、安静にすると楽に生活できる。通常の活動で疲労、動悸、呼吸困難、狭心痛を生ずる。	心疾患を有するが、身体活動に制限はなく、通常の身体活動では疲労、動悸、呼吸困難、狭心痛を生じない。	心疾患を有するが、身体活動に制限はなく、通常の身体活動では疲労、動悸、呼吸困難、狭心痛を生じない。
左室駆出率	25%未満	25%以上 35%未満	35%以上 45%未満	45%以上 55%未満	
房室ブロック		II型 (Mobitz II型) PQ時間は一定のまま (PQは正常のことも延長していることもある)。突然心室脱落をみるもの。あるいは、3度) 房室伝導が完全に途絶し、心房と心室がそれぞれ独立して興奮するもの	2度 QRSの脱落が時々ないししばしばみられるもの。II型 (Wenckebach型) PQ時間が徐々に延長し、ついに心室脱落をみるというWenckebach周期を繰り返すもの。	1度 PQ時間 (心電図で心房興奮を表すP波が初めから、心室興奮の始まりを表すQ波まで) が、0.21秒以上に延長したもの。心室 (QRS) の脱落はない。	
心室性期外収縮 (Lowm分類)	連発性 (short run) あるいは RonT型	2個連続	頻発性 (>1/分または30/時間) あるいは多形性	散発性、単源性	心室性期外収縮なし

サルコイドーシス病変部リンパ節におけるマイコバクテリアおよびプロピオニバクテリア菌体 DNA の QPCR 法による定量解析

石下 郁夫¹ 白井 裕¹ 武村 民子² 江石 義信^{1*}

【目的】サルコイドーシス（以下サ症）の病因に関しては、これまで種々の原因候補が提示されてきたが未だ不明のままである。欧州ではこれまで結核菌説が主流をなしており、サ症病変部に PCR 法にて結核菌が検出されたとする報告がある。日本においては、病変部からの細菌培養法によりプロピオニバクテリア（*P.acnes* および *P.granulosum*）が検出されたとの報告があるが、本菌が健康人皮膚にも検出される常在性細菌であることから、サ症病因との関連については白黒つけがたい現状にある。本研究では、これまで起因体としての候補になっているこれらの細菌に関して、定量系 PCR（QPCR）法を用いて病変部リンパ節内の菌体 DNA 量を測定し、サ症との病因的関連性につき検討した。【方法】材料としては、ホルマリン固定パラフィン包埋したリンパ節組織を対象として、サ症リンパ節 15 例、結核症リンパ節 15 例、対照群としては転移のない胃癌所属リンパ節 15 例を解析した。*P.acnes* および *P.granulosum* では 16S rRNA を、結核菌では insertion sequence 6110 を標的遺伝子としたビオチン標識プライマーを用いて PCR 増幅を行った。PCR 増幅後に蛍光色素を標識したプローブを液相でハイブリさせ、最終的にその蛍光強度を測定値とした。また、菌体 DNA の希釈系列から作製した標準曲線を用いて、試料中に含まれている菌体ゲノム数について概数を算定した。【結果】多量の結核菌 DNA が結核症リンパ節の全例から検出された。サ症群 3 例、対照群 1 例においても結核菌が検出されたが、その DNA はごく微量であった。他方、多量の *P.acnes* 菌 DNA がサ症 15 例中 12 例で検出された。結核群 2 例、対照群 3 例においても本菌 DNA は検出されたが、その DNA はごく微量であった。サ症群と非サ症群における *P.acnes* 菌ゲノム数の差は 1000 倍以上であり、この差は結核群と非結核群における結核菌ゲノム数の差に匹敵した。*P.acnes* が検出されなかった 3 例のサ症検体においては、かわりに多量の *P.granulosum* が検出され、その DNA 量はサ症における *P.acnes* ゲノム数や結核症における結核菌ゲノムと同様に高濃度であった。【総括】サ症リンパ節では、例外なくすべての検体において、プロピオニバクテリア（*P.acnes* または *P.granulosum*）の DNA が高濃度に検出され、その量は結核症における結核菌 DNA 量と同等であった。本菌の存在がサ症の病因と直接関係するかどうかはわからないが、病変部リンパ節内に本菌が多数存在する所見はサ症に特徴的であると言える。感染症におけるコッホの原則は別として、細菌培養や PCR 検出の結果のみから類推すれば、マイコバクテリアよりもプロピオニバクテリアの方がサ症起因体としての可能性がより高いものと考えられる。

Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis.

Ishige Ikuo¹, Usui Yutaka¹, Takemura Tamiko², Eishi Yoshinobu¹

1. School of Medicine, Department of Pathology, Tokyo Medical and Dental University

2. Department of Pathology, Japanese Red Cross Medical Center

【Purpose】 The etiology of sarcoidosis is not known, although many possibilities have been explored. Research in Europe has focused on *Mycobacterium tuberculosis*, the DNA of which has been detected in some sarcoid lesions. In Japan, *Propionibacterium acnes* has been isolated from such lesions, but it is not clear whether this indigenous bacterium is related to the disease. We used PCR to estimate the number of genomes of these bacteria in lesions in an effort to identify any etiological relationship between sarcoidosis and these two bacterial species. 【Methods】 We examined formalin-fixed and