



領域内に広く分布する遺伝マーカー、特に SNPs によるさらなる候補領域の絞り込みにより、疾患感受性遺伝子を分子遺伝学的に同定することが求められ、一連の検討を行ってきた。予測される遺伝子座を中心とした遺伝子変異の検討の結果、200 kb の領域の中には予想以上に多くの SNPs が高密度かつ高頻度に存在する。これらの SNPs はコンピュータ上、エクソンと予測される領域を中心にスクリーニングしたため、単純に位置的マーカーとして候補領域の詳細な絞り込みに用いられるのみならず、それ自体が、コーディング領域に存在し、機能的意味合いを持っている可能性がある。

実際に、DPB の HLA 関連疾患感受性遺伝子候補領域 200 kb 内に、80 個以上の SNP が同定され、その関連解析に必要な多型タイピングがほぼ完了し、今後、より詳細な解析に入る予定である。このようにまとまった長さのゲノム領域についての、SNP あるいはマイクロサテライトの対立遺伝子間の連鎖不平衡やハプロタイプ解析データは、まだ国際的にも報告が不十分であり、ヒトゲノムにおける連鎖不平衡の及ぶ範囲や高頻度組換え点に関する構造解析は、本疾患のみならず、多因子疾患の疾患感受性遺伝子を同定する際に、最も重要なポイントとなっていくものと予想される。

また本年度の検討により、新たに候補領域内に二つの遺伝子が同定されたが、それらを含めて、現在、領域内には 8 個の EST が登録されており、さらに我々および共同研究者のグループにより、新規遺伝子のクローニングが続く予定である。

#### 「謝 辞」

虎の門病院、天理よろづ相談所病院、日本医科大学第四内科の諸先生のご協力をいただきましたことに感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Keicho N, Tokunaga K, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Bannai M, Emi M, Ohishi N, Yazaki Y, Kudoh S. Contribution of HLA genes to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 846-850, 1998
- 2) Park MH, Kim YW, Yoon HI, Yoo C-G, Han SK, Shim Y-S, Kim WD. Association of HLA class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 526-529, 1999
- 3) Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park MH, Inoko H, Tokunaga K, Kudoh S. Fine localization of a major disease susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet* 66: 501-507, 2000
- 4) Matsuzaka Y, Tounai K, Denda D, Tomizawa M, Makino S, Okamoto K, Keicho N, Oka A, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H. Identification of Novel Candidate Genes in the Diffuse Panbronchiolitis (DPB) Critical Region of the class I Human Major Histocompatibility Complex (MHC). *Immunogenet* in press.

# マクロライド長期療法における緑色レンサ球菌の マクロライド耐性化に関する検討

田口 善夫<sup>1\*</sup> 井上 哲郎<sup>1</sup> 相原 雅典<sup>2</sup> 小松 方<sup>2</sup>

マクロライド長期療法下での緑色レンサ球菌におけるマクロライド耐性遺伝子について検討した。【方法】マクロライド投与、非投与群での緑色レンサ球菌にたいしてマクロライド薬の耐性遺伝子である *erm* (B), *mef* (A) 遺伝子を対象に multiplex PCR 法を用いて 93 株について検討した。【結果】マクロライド剤投与群 (57 株) では *erm* (B), *mef* (A) 陽性 20 株 (35.1%), *mef* (A) 陽性 36 株 (63.2%) で、非投与群 (36 株) では *erm* (B), *mef* (A) 陽性 7 株 (19.4%), *mef* (A) 陽性 14 株 (38.9%) であり有意差を認めた。 ( $p < 0.001$ ) また *mef* (A) 陽性株では 14 員環系薬剤にのみ中等度の耐性化を認めた。【結論】マクロライド投与下での耐性遺伝子の保有が証明された。マクロライド投与の適正使用が必要である。

## Investigation for macrolide resistance genes of viridians streptococci in the patients with long-term macrolides treatment.

Yoshio Taguchi<sup>1</sup>, Tetsuro Inoue<sup>1</sup>, Masanori Aihara<sup>2</sup>, Masaru Komatsu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Respiratory Medicine

<sup>2</sup> Division of Bacteriology, Tenri Hospital, Nara

We investigated macrolide resistance genes of the viridians streptococci, which are treated with or without macrolides treatment. Method: We examined macrolide resistance genes, which are *erm* (B) gene and *mef* (A) gene, about 93 isolates by multiplex PCR method. For the 57 clinical isolates with macrolides treatment, 20 (35.1%) were positive for double mechanisms *erm* (B) + *mef* (A), 37 (63.2%) for *erm* (B) and one (1.8%) was negative. On the other hand, for the 36 clinical isolates without it, 7 (19.4%) were positive for double mechanisms, 14 (38.9%) for *erm* (B) and 15 (41.7%) were negative. There is the high incidence of positive resistance genes with macrolides treatment than without it. ( $P < 0.001$ ) The macrolides MIC50 and MIC 80 for the isolates with double mechanisms were  $>64\mu\text{g/ml}$  and  $>64\mu\text{g/ml}$ . On the other hand, although 14 member lactone ring macrolides (EM and CAM) MIC50 and MIC80 for isolates with *mef* (A) were moderate resistance, the 16 member lactone ring macrolide (RKM) and CLDM MICs for isolates with it were as same as for isolates without double mechanisms. We concluded that as the high incidence of macrolide resistance genes on long-term macrolides treatment, the appropriate clinical use of macrolides treatment is necessary.

## はじめに

1984年DPBにたいするerythromycin(以下EM)の有用性が報告<sup>1)</sup>され、その後にEM療法の有効性が確立<sup>2)</sup>された。またDPBや副鼻腔炎にたいするマクロライド療法のガイドラインも作成<sup>3,4)</sup>された。この結果我が国においては様々な臨床の現場でマクロライド剤(MLs)が投与され、一方では抗菌剤という面から問題も生じている。すなわち抗菌剤としての薬剤が長期、しかも少量使用されることにより市中でのMLsの耐性化<sup>5)</sup>が生じている。このような観点からMLs長期療法患者における肺炎球菌のMLs耐性化の状況を調査し、同時に耐性化の特徴を検討するために、昨年MLsの投与および非投与の患者における上気道常在性緑色レンサ球菌群の各種抗菌剤感受性について検討を行った。その結果MLs療法群では有意に抗菌剤の耐性化が確認<sup>6)</sup>され、今年度この耐性化したレンサ球菌の耐性遺伝子の特徴を調べることにした。

## 目 的

MLs長期療法中におけるレンサ球菌の耐性化に関して、MLs剤耐性化機序としての耐性遺伝子を検討する。

## 対象と方法

1999年6月から9月にかけて、当院外来通院中の呼吸器疾患症例の中から、MLs少量長期療法を6ヶ月以上行った症例(MLs群)59例を無作為に抽出した。また対照として同時期に外来通院中の非MLs投与46症例を無作為に抽出し、各症例の咽頭粘液を採取し、5%ヒツジ血液寒天培地で緑色レンサ球菌110株(MLs群62株、非MLs群48株)を分離し、-80℃で冷凍保存し、後日一括して化学療法学会標準液体希釈法により各種薬剤のMIC測定した。その後110株中93株(17株死滅)を用いて、boil methodでDNA抽出を行い、Multiplex PCR

assayを用いて*erm*(B)、*mef*(A)遺伝子増幅を行った。Multiplex PCR法はFarrellらの方法<sup>7)</sup>に基づいて、表1に示すように*erm*(B)でのprimerはERMB-F2とbiotin標識のERMB-R2Bを用い、*mef*(A)ではMEF-F2とbiotin標識のMEF-R2Bを用いて94℃15秒間、52℃15秒間、72℃15秒間を1サイクルとして37サイクル行った。増幅産物の検出はPCR ELISA(DIG Detection, Roche Diagnostics GmbH, Germany)を用いたmicroplate hybridizationにより行った。Hybridization probe(digoxigenin標識)は*erm*(B)にたいしてERMB-P2D、*mef*(A)にたいしてMEF-P2Dを用い呈色反応後peroxidase標識抗digoxigenin抗体を用いABTS(roche Diagnostics GmbH, Germany)により発色反応を行った。Cut off値>0.2(405nm)として判定した。(図1)

## 結 果

第一にMLs療法の有無における*erm*(B)、*mef*(A)遺伝子の有無の検討(表2)では、MLs(+)群では*erm*(B)、*mef*(A)ともに陰性の症例は1例(1.8%)のみで、*erm*(B)、*mef*(A)ともに陽性例は20例(35.1%)、*mef*(A)のみ陽性症例は36例(63.2%)であった。一方MLs(-)群では*erm*(B)、*mef*(A)ともに陰性症例は15例(41.7%)、*erm*(B)、*mef*(A)ともに陽性症例は7例(19.4%)、*mef*(A)のみ陽性症例は14(38.9%)であり、MLs(+)群とMLs(-)群との間における耐性遺伝子保存率に有意差を認めた。(p<0.001)

また*erm*(B)、*mef*(A)の有無とMIC分布について下記薬剤について検討したところ表3に示すようにEMでは両遺伝子陰性群ではMIC50、MIC80ともに0.06μg/ml、*erm*(B)+*mef*(A)陽性群ではMIC50、MIC80ともに>64μg/ml、*mef*(A)陽性群ではMIC50、MIC80ともに4μg/mlであった。CAMでは両遺伝子陰性群ではMIC50は0.25μg/ml、MIC80は0.5μg/ml、*erm*(B)+*mef*(A)陽性群ではMIC50、MIC80ともに>64μg/ml、*mef*(A)陽性群ではMIC50は0.25μg/ml、MIC80は0.5μg/mlであった。一方RKMでは両遺伝子陰性群ではMIC50は0.25μg/ml、MIC80は0.5μg/ml、*erm*(B)+*mef*(A)陽性群ではMIC50、MIC80ともに>64μg/ml、*mef*(A)陽性群ではMIC50は0.25μg/ml、MIC80は

1. 天理よろづ相談所病院呼吸器内科
  2. 同 臨床病理部
- \* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

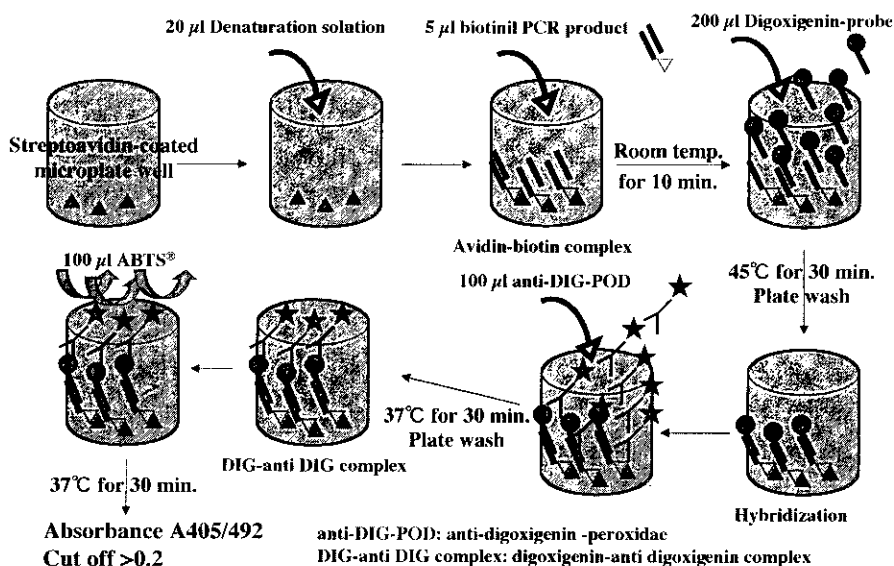


図1 Microplate hybridization

0.5µg/mlであった。また CLDM では両遺伝子陰性群では MIC50 は 0.06µg/ml, MIC80 は 0.12µg/ml, *erm* (B) +*mef* (A) 陽性群では MIC50, MIC80 ともに >64µg/ml, *mef* (A) 陽性群では MIC50, MIC80 ともに 0.06µg/ml であった。(表4)

表2-2 EM投与別マクロライド耐性遺伝子保有状況

| Gene                           | EM長期投与    |           | Total (%) |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                                | あり (%)    | なし (%)    |           |
| (-)                            | 1 (1.8)   | 15 (41.7) | 16 (17.2) |
| <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A) | 20 (35.1) | 7 (19.4)  | 27 (29.0) |
| <i>mef</i> (A)                 | 36 (63.2) | 14 (38.9) | 50 (53.8) |
|                                | 57 (100)  | 36 (100)  | 93 (100)  |

$\chi^2=24.71, p<0.001$

表1 List of primers and probes unique to this study used in the multiplex PCR assay

| Designation    | Sequence (5'-3')                     | Gene           |
|----------------|--------------------------------------|----------------|
| <i>Primers</i> |                                      |                |
| ERMB-F2        | TTTTGAAAGCCATGCGTCTGA                |                |
| ERMB-R2B       | biotin-ATCTGTGGTATGGCGGGTAAGTT       | <i>erm</i> (B) |
| MEF-F2         | TATGGGCAGGGCAAGCAGTATC               |                |
| MEF-R2B        | biotin-TCRCACCAATCATTATCTTCTFC       | <i>mef</i> (A) |
| <i>Probes</i>  |                                      |                |
| ERMB-P2D       | CTACAAGCGTACCTTGGATATTAC-digoxigenin | <i>erm</i> (B) |
| MEF-P2D        | GCGATGGTCTGTCTATGGCTTC-digoxigenin   | <i>mef</i> (A) |

(Farrell DJ et al. J Antimicrob Chemother. 2001)

表2-1 Multiplex PCR assay

| Reaction format        |            |              |          | Program    |              |
|------------------------|------------|--------------|----------|------------|--------------|
| Agent                  | Conc.      | final Conc.  | Vol.(µl) | #1         | #2           |
| Distilled water        | -          | -            | 12.3     | 95°C 2min  | } 37 cycles  |
| 10×PCR buffer          | 10×        | 1×           | 2.5      | 94°C 15sec |              |
| dNTPs                  | 2 mM       | 200 µM       | 2.5      | 52°C 15sec |              |
| MgCl <sub>2</sub>      | 25 mM      | 1.5 mM       | 1.5      | 72°C 15sec | #3 72°C 7min |
| Primer ERMB-F2         | 50 pmol/µl | 12.5 pmol/µl | 0.25     |            |              |
| Primer ERMB-R2B        | 50 pmol/µl | 12.5 pmol/µl | 0.25     |            |              |
| Primer MEF-F2          | 50 pmol/µl | 12.5 pmol/µl | 0.25     |            |              |
| Primer MEF-R2B         | 50 pmol/µl | 12.5 pmol/µl | 0.25     |            |              |
| <i>rTaq</i> polymerase | 5 U/µl     | 1 U/25 µl    | 0.2      |            |              |
| DNA solution           | -          | -            | 5        |            |              |
| Total                  |            |              | 25       |            |              |

表3 14 員環マクロライド剤での耐性遺伝子の有無と MIC

| Erythromycin                   |       |       |
|--------------------------------|-------|-------|
| Gene                           | MIC50 | MIC80 |
| (-)                            | 0.06  | 0.06  |
| <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A) | >64   | >64   |
| <i>mef</i> (A)                 | 4     | 4     |

| Clarithromycin                 |       |       |
|--------------------------------|-------|-------|
| Gene                           | MIC50 | MIC80 |
| (-)                            | ≤0.03 | 0.06  |
| <i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A) | >64   | >64   |
| <i>mef</i> (A)                 | 2     | 2     |

表4 16員環マクロライドおよびCLDMでの耐性遺伝子の有無でのMIC

| Rokitamycin          |       |       |
|----------------------|-------|-------|
| Gene                 | MIC50 | MIC80 |
| (-)                  | 0.25  | 0.5   |
| <i>erm(B)+mef(A)</i> | >64   | >64   |
| <i>mef(A)</i>        | 0.25  | 0.5   |

| Clindamycin          |       |       |
|----------------------|-------|-------|
| Gene                 | MIC50 | MIC80 |
| (-)                  | 0.06  | 0.12  |
| <i>erm(B)+mef(A)</i> | >64   | >64   |
| <i>mef(A)</i>        | 0.06  | 0.06  |

## 考 案

レンサ球菌のマクロライド耐性遺伝子としては、薬物排出促進によって耐性化を生じる *mef(A)* 遺伝子<sup>8)</sup>と、メチラーゼによる薬物代謝にかかわって耐性化する *erm(B)* または *erm(A)* subclass *erm(TR)* 遺伝子など<sup>9)</sup>が知られている。*erm(B)* 遺伝子は14員環および16員環ともに耐性化させるが、他方、*mef(A)* 遺伝子は14員環遺伝子のMLs剤のみ耐性化させる特徴があり、この遺伝子により14員環MLs剤では中等度の耐性化をきたす<sup>10)</sup>ことが知られている。

昨年度MLs療法施行中の患者とMLs療法未施行の患者群から分離した緑色レンサ球菌群について、昨年度各種薬剤に対するMICを測定したが、その結果MLs療法群ではMLs剤にたいして高度の耐性化が生じていることが証明された。今年度はその成績を踏まえたうえで検出菌群におけるMLs剤の耐性化遺伝子を検討するため、レンサ球菌群の耐性遺伝子である *erm(B)*、*mef(A)* 遺伝子を multiplex PCR により検出を試みた。結果としてMLs療法群においては *erm(B)+mef(A)* 遺伝子陽性の菌株が35.1% (20/57)、*mef(A)* 遺伝子の陽性株が63.2% (36/57)、陰性株が1.8% (1/57) であり、MLs療法未施行群では *erm(B)+mef(A)* 遺伝子陽性の菌株が19.4% (7/36)、*mef(A)* 遺伝子の陽性株が38.9% (14/36)、陰性株が41.7% (15/36) となり、両群間には明らかな有意差がみられた。また *erm(B)+mef*

(A) 遺伝子陽性群では14員環マクロライドおよび16員環マクロライドともに高度の耐性化を生じていたが、*mef(A)* 遺伝子陽性群では14員環マクロライドに対してのみ中等度の耐性化を生じていた。この結果MLs療法群では14員環MLs剤にたいして、ほぼ全株に耐性遺伝子の保有が証明され、肺炎球菌も同様の機序で耐性化をきたしていることが推測された。

近年ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) の増加が問題<sup>11,12)</sup>となっているが、とりわけPRSPはMLs剤を含め多剤耐性をきたしやすい<sup>11)</sup>ことが知られている。しかしMLs療法下での検出される肺炎球菌はMLs剤に対する耐性化は生じるが、PRSPの頻度は必ずしも高くないとの報告<sup>13,14)</sup>もある。このようなMLs療法による耐性化の問題を考慮しても、副鼻腔気管支症候群などに対するMLs療法の有用性は変えがたい程の効果があることも事実であり、マクロライド剤の非抗菌作用の面のさらなる検討、並びに新たな薬剤の開発が期待される。

## おわりに

MLs療法における緑色レンサ球菌群での耐性化遺伝子の検討を行いMLs療法時により耐性獲得が誘導されることを証明した。MLs療法は臨床上非常に有効な薬剤ではあるが、耐性化誘導の可能性は常に念頭においてガイドラインに準じて不必要な治療は避けていくことも肝要と思われる。

## 参考文献

- 1) 工藤翔二, 木村 仁, 植竹健司, 平山雅清, 久田哲哉, 寺谷啓子, 杉山幸比古, 宮沢 博: びまん性汎細気管支炎に対するマクロライド系薬剤の少量長期投与の臨床効果. 日胸疾会誌 (増) 22: 254, 1984
- 2) 山本正彦: DPB に対するエリスロマイシンの治療効果—二重盲検による検討—. 厚生省びまん性肺疾患調査研究班平成2年度報告書., 1991: p18-20
- 3) 中田紘一郎, 田口善夫, 工藤翔二: DPB の治療ガイドライン 最終報告. 厚生科学研究特定疾患対策研究事業びまん性肺疾患研究班平成11

年度報告書 p111, 2000

- 4) 羽柴基之, 洲崎春海, 古田 茂, 柳 清, 大山 勝, 馬場駿吉: 清水喜八郎, 大村 智 監修/工藤翔二 責任編集; 炎症・免疫とマクロライド UP TO DATE 2 ;慢性副鼻腔炎に対するマクロライド療法のガイドライン. 医薬ジャーナル, 東京, 1999; p48-55
- 5) 生方公子: 各種薬剤に対する感受性. 改訂 ペニシリン耐性肺炎球菌, 紺野昌俊, 生方公子編, 協和企画通信, 東京, 1999; p48-55
- 6) 田口善夫, 井上哲郎, 相原雅典, 小松 方: マクロライド療法における緑色連鎖球菌の耐性化に関する検討. 厚生省科学研究特定疾患対策事業びまん性肺疾患研究班平成12年度報告書 2001, p32-35
- 7) Farrell D J, Morrissey I, Bakker S, Felmingham: Detection of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* using a multiplex rapid cycle PCR with microwell-format probe hybridization. J Antimicrob Chemother 2001 ; 48:541-544
- 8) Clancy J, Petitpae J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath AV, Bergeron J, Retsema JA : Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mef A*, from *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiol 1996; 22: 867-879
- 9) Weisblum B: Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrobial Agents Chemother 1995; 39: 577-585
- 10) Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Vandamme P, Ieven M, Goossens H : Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 167-173
- 11) 松下久美, 白石恒明, 力丸 徹, 三森佳子, 木下正治, 大泉耕太郎, 梶村克成, 近藤重信: 成人呼吸器感染症由来の肺炎球菌の耐性化の現状. 感染症誌 1999;73:1187-1193
- 12) Harwell J I, Rrown R B: The drug-resistant pneumococcus. Clinical relevance, therapy, and prevention. Chest 2000; 117: 530-541
- 13) 沖本二郎, 大崎幸七, 本田宣裕, 砂川尚子, 浅岡直子, 大場秀夫, 米山浩英: 慢性街道感染症におけるマクロライド長期療法の呼吸器感染症起炎菌に及ぼす影響. 感染症誌 2000; 74: 846-848
- 14) 前田光一, 三笠圭一, 古西 満, 高橋 賢, 眞島利匡, 村川幸一, 善本英一郎, 坂本正洋, 成田亘啓, 佐野麗子, 増谷喬之, 中村 忍: マクロライド長期療法中に肺炎球菌により急性増悪をきたした慢性化気道感染症例の検討. 感染症誌 2001; 75: 846-850

# マクロライド抗生物質が示す抗炎症作用の 細胞内分子機構に関する検討

滝沢 始\* 出崎 真志 岡崎 仁

びまん性汎細気管支炎に著効を示す 14 員環マクロライド系抗生物質の抗炎症作用機構の解明のため、ヒト気管支上皮細胞株 BET-1A において NFκB、AP-1 の核内での結合過程への影響を検討した。エリスロマイシンとクラリスロマイシンは、PMA 刺激下で抽出した核タンパクと標識した NFκB 特異的 DNA 配列との結合を抑制する傾向を示した。この作用は、核タンパクを還元状態においた場合に明らかであった。また、mitogen-activated kinase (MAPK) 経路のうち、c-Jun のリン酸化や p38MAPK の活性化に対して、マクロライドは明らかな作用を示さなかった。14 員環マクロライド抗生物質の転写調節因子 (NFκB、AP-1) の活性化抑制作用の少なくとも一部には、転写調節因子とその特異的 DNA 配列との結合を核内において抑制することが関与していると推定された。

## Studies on the molecular mechanisms of anti-inflammatory actions of macrolide antibiotics

Hajime Takizawa, Masashi Desaki, and Hitoshi Okazaki

*Department of Respiratory Medicine, University of Tokyo, Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan*

Macrolide antibiotics have an anti-inflammatory activity, which is believed to be one of the important mechanisms of therapeutic efficacy for the treatment of diffuse panbronchiolitis. Erythromycin (EM) showed an inhibitory effect on IL-8 mRNA transcription in human bronchial epithelial cells, and also on activation of transcription factors NFκB and AP-1. Since EM had no effect on the phosphorylation processes of inhibitor of NFκB (IκB), we attempted to evaluate the effect of EM on DNA-binding activity of NFκB *in vitro*. EM and aminobenzyl penicillin (ABPC) showed no effect on PMA-induced NFκB binding, but an antioxidant NAC significantly increased its binding. When EM was pretreated after NAC-stimulation, this macrolide suppressed the binding of NFκB to its specific DNA motif. We further studied the effect of EM on the phosphorylation processes of p38 MAPK and c-Jun, but EM failed to show any effect.

In conclusion, EM seemed to affect the stages later than IκB phosphorylation in the cytosol, especially at the redox stage of nuclear factors such as NFκB in the nucleus.



はじめに

エリスロマイシン (EM) をはじめとする 14 員環マクロライド抗生物質の慢性気道炎症性疾患における有効性の機序について、これまでに気道上皮細胞のサイトカイン/ケモカイン、接着分子の発現ないし産生、遊離を抑制することを報告してきた<sup>1,2,3)</sup>。これらの多くに共通して重要な転写調節因子 (NFκB, AP-1) の活性化についてもゲルシフトアッセイにより検討し、薬剤と刺激の同時処置では明らかな抑制作用はないが<sup>4)</sup>、治療域濃度のエリスロマイシン (EM, 10<sup>-6</sup>M) およびクラリスロマイシン (CAM) を種々の条件で前添加した系においては 24 時間の前処置により、明らかな NFκB, AP-1 の活性化抑制作用を見出した<sup>5)</sup>。さらに、前年度には、マクロライドの抗菌作用を有しない各種誘導体が転写調節因子 (NFκB, AP-1) の活性化を抑制しうること、IκB のリン酸化には直接作用しないこと、を示した<sup>6)</sup>。そこで今年、1) NFκB, AP-1 の核内での結合過程への影響を検討すること、2) 上流域に存在する可能性のある mitogen-activated kinase (MAPK) のうち、c-jun N-terminal kinase (JNK) 経路では c-Jun のリン酸化を、また p38MAPK の活性化を検討した。

対象と方法

- 1) ヒト気管支上皮細胞株 BET-1A を用い、ホルモン・成長因子を添加した Ham's F12 液にて培養した。
- 2) PMA (10<sup>-7</sup>M) や TNFα 刺激を行い核タンパクを抽出した。各種マクロライドの存在下に、<sup>32</sup>P で標識した NFκB, AP-1 各々に特異的な DNA 配列と結合させ、electrophoretic mobility shift assay (EMSA, ゲルシフトアッセイ) にて、その結合への作用を検討した。
- 3) MAPK のリン酸化過程へのマクロライドの影響をウエスタンブロット法にて検討した。

東京大学医学部附属病院呼吸器内科

\* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

結 果

- (1) 試験管内における核タンパクと NFκB, AP-1 に特異的な DNA 配列との結合：EM, CAM は、PMA 刺激下で抽出した核タンパクと <sup>32</sup>P 標識した NFκB に特異的な DNA 配列との結合を抑制する傾向を示した。核タンパクに N-acetyl cysteine (NAC) を添加して還元状態にすると、明らかに結合能が増強したが (図 1)、この場合に EM を添加すると、明らかに結合抑制を示した (図 2)。AP-1 については明らかでなかった。
- (2) c-Jun, p38MAPK のリン酸化のウエスタンブロット法による検討：TNFα 刺激により、c-Jun, p38MAPK のリン酸化がウエスタンブロット法にて明らかに認められた。EM の前処理によってこの過程には明らかな変化は観察されなかった (図 3)。

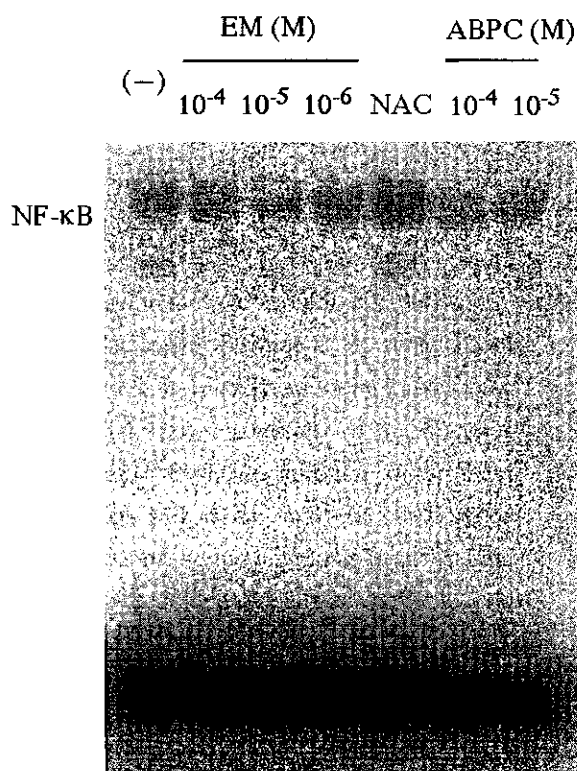


図1 ヒト気管支上皮細胞株 BET-1A の PMA 刺激下での核タンパクと NFκB 特異的 DNA との結合。

EM, aminobenzyl penicillin (ABPC), 及び NAC の影響。PMA 刺激した場合の NFκB 活性化をゲルシフトアッセイで検討した。EM, ABPC では明らかな影響はみられなかったが、NAC により結合能の増強が認められた。

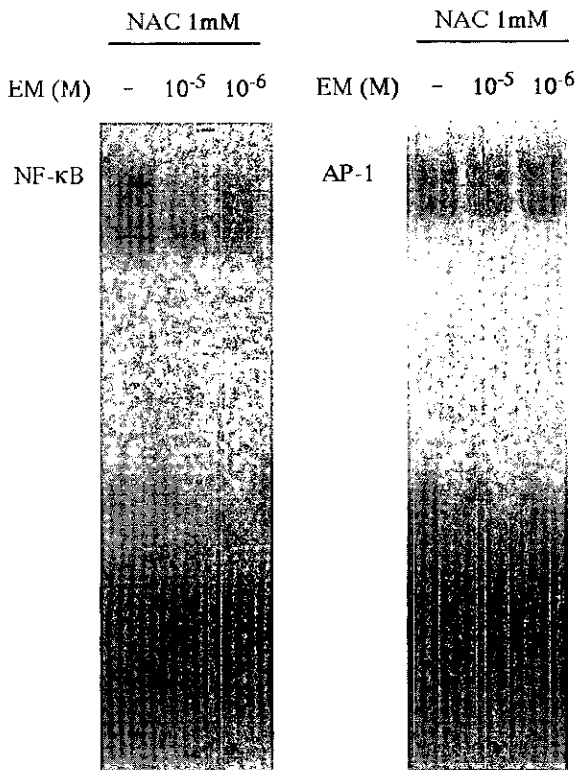


図2 ヒト気管支上皮細胞株 BET-1A の PMA 刺激、NAC 処理下における核タンパクと NFκB 特異的 DNA との結合。EM 処置により明らかな結合能の抑制が認められた。AP-1 では変化はなかった。

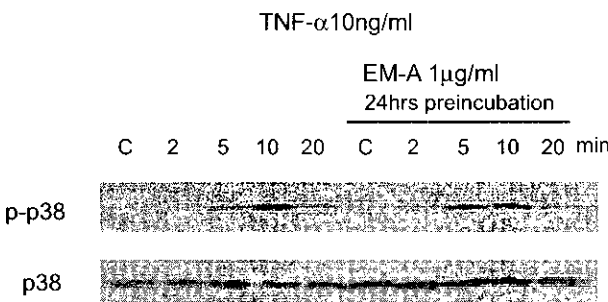


図3 ヒト気管支上皮細胞株 BET-1A の p38MAPK のリン酸化と EM 前処置の影響。TNFα 刺激による p38MAPK のリン酸化は明らかに認められた。しかし、EM の処置は TNFα 刺激による p38MAPK のリン酸化には、明らかな作用を示さなかった。

### 考察・結論

これまでの研究により、14 員環マクロライド抗生物質の前投与が、転写調節因子 (NFκB, AP-1) の活性化を抑制することが示された。この結果は諸家の報告<sup>7,9)</sup> によってもほぼ裏付けられたと思われる。その機構として、IκB のリン酸化には直接作用しないことが分かったので、よりあとの段階での作用を検討した。すなわち、核内での転写因子の DNA 結合過程でのマクロライドの作用を検討し

た。その結果、マクロライドは核内での NFκB とその特異的な DNA 配列との結合を試験管内で抑制する傾向を示した。一般に、転写因子と DNA 結合の過程では、酸化還元状態が重要であることが報告されている。内因性の thioredoxin, Ref-1 などの還元物質が、その結合能を増強することが報告されている<sup>10)</sup>。マクロライドはこのプロセスに作用して結合を抑制していることが示唆された。

一方、これら転写因子の上流のシグナル機構には不明な点が多いが、JNK, p38MAPK などのストレス応答性キナーゼの存在が示唆されている。マクロライドのこれらキナーゼ活性化の影響を検討するために、TNFα 刺激での活性化への作用を検討したが明らかな作用がみられなかった。以上の結果は、マクロライドの作用点のひとつに核内結合過程が存在することを示唆しており、今後内因性還元物質である thioredoxin 存在下でも検討する予定である。

### 結 論

マクロライドの抗炎症作用の一機構として、転写調節因子 (NFκB) とその特異的 DNA 配列との結合を核内において抑制することが示唆された。

### 謝 辞

共同研究者として本研究の遂行にご協力いただいた昭和大学医学部第一内科 笠間 毅先生、大阪市立医科大学細菌学小林和夫先生、北里研究所大村 智先生、砂塚敏明先生に深謝いたします。

### 参考文献

- 1) H. Takizawa, M. Desaki, T. Ohtoshi, T. Kikutani, H. Okazaki, M Sato, N. Akiyama, S. Shoji, K. Hiramatsu, K. Ito: Erythromycin suppresses interleukin 6 expression by human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210:781-786, 1995
- 2) H. Takizawa, M. Desaki, T. Ohtoshi, S. Kawasaki, T. Kohyama, M. Sato, M. Tanaka, T. Kasama, K. Kobayashi, J. Nakajima, K. Ito: Erythromycin

- modulates IL-8 expression in human bronchial epithelial cells : Studies with normal and inflamed airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 156 : 266-271, 1997.
- 3) Kawasaki S, Takizawa H, Ohtoshi T, Takeuchi N, Kohyama T, Nakamura H, Kasama T, Kobayashi K, Nakahara K, Morita Y, Yamamoto K: Roxithromycin inhibits cytokine production and neutrophil attachment with human bronchial epithelial cells *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1499-1502, 1998
- 4) 滝沢 始, 出崎真志, 河崎 伸, 幸山 正, 山本一彦, 伊藤幸治: エリスロマイシン療法の機序解明: ヒト気道上皮細胞の転写調節に対するマクロライド抗生物質の作用. 厚生省特定疾患呼吸器系疾患調査研究班びまん性肺疾患分科会平成 10 年度研究報告書, 124-127.
- 5) Desaki M, Takizawa H, Ohtoshi T, Kasama T, Kobayashi K, Sunazuka T, Ohmura S, Yamamoto K, Ito K. Erythromycin suppresses nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:124-128, 2000.
- 6) 滝沢 始, 出崎真志, 岡崎 仁: マクロライド抗生物質のサイトカイン発現抑制作用: その細胞内機構へのアプローチ. 平成 12 年度厚生省特定疾患呼吸器系研究班研究報告 (01 年 1 月 27 日) 同報告書 pp. 28-31.
- 7) Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, Hasegawa S, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Clarithromycin inhibits NF- $\kappa$ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:44-47, 2001.
- 8) Miyanohara T, Ushikai M, Matsune S, Ueno K, Katahira S, Kurono Y. Effects of clarithromycin on cultured human nasal epithelial cells and fibroblasts. *Laryngoscope* 110:126-131, 2000.
- 9) Aoki Y, Kao PN: Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF- $\kappa$ B, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2678-2684, 1999.
- 10) Hayashi T, Ueno Y, Okamoto T: Oxydoreductive regulation of nuclear factor  $\kappa$ B: Involvement of a cellular catalyst thioredoxin. *J Biol Chem* 268:11380-11388, 1993.

# サルコイドーシス

## サルコイドーシスリンパ節における *Pacnes* DNA の組織内分布

江石 義信\* 山田 哲夫 池田 聡 関根 正喜  
郡司 冴佳 石下 郁夫 南 順子 小林 大輔  
安藤 登 鈴木 好美 鈴木 高成

【目的】 サ症リンパ節内に検出される *Pacnes* DNA とサ症肉芽腫形成との病因的関連を検証するために、定量的 PCR 法にて検出される多量の *Pacnes* DNA の組織内分布を In situ hybridization (ISH) 法を用いて解析した。【材料と方法】 検体としてサ症リンパ節 9 例、結核症リンパ節 9 例、および正常対照として反応性リンパ節炎 9 例のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いた。HE 染色標本において、サ症では非乾酪性類上皮細胞性肉芽腫を、結核では乾酪壊死を伴った類上皮細胞性肉芽腫の存在を確認した。定量系 PCR 法には Real-time quantitative PCR 法を用いた。ISH 法では、ジコキシゲニン (DIG) を 3'-tailing 標識した 26 mer のオリゴプローブ (16SrRNA 由来) を用い、CSA 増感法を併用して DAB 発色系および FITC 蛍光系にて検出した。シグナルカウント法は、接眼マイクロメーターを用いて、その一枠 (250 $\mu$ m 四方) を 1 視野として計測し、これを 5 視野数えた後、その平均を検体の陽性シグナル数とした。【結果】 *Pacnes* 特異的プローブを用いた ISH 法によってリンパ節組織切片中に明瞭な小顆粒状を呈する陽性シグナルを検出した。サ症において陽性シグナルは、肉芽腫内の類上皮細胞や肉芽腫周囲のマクロファージの細胞質内に認められた。肉芽腫のないリンパ組織実質内では、単球あるいはマクロファージの細胞質内に少数散在性に認められた。結核症あるいは正常対照リンパ節では、肉芽腫の有無に関係なく、リンパ組織実質内の単球・マクロファージの細胞質内に極少数の陽性シグナルを散在性に認めた。サ症肉芽腫内のシグナル密度は、サ症肉芽腫外のシグナル密度よりも有意 ( $p < 0.001$ ) に高かった。サ症におけるシグナル密度は、肉芽腫内 ( $p < 0.001$ ) および肉芽腫外 ( $p < 0.0072$ )、いずれにおいても結核症および正常対照リンパ節に比べて有意に高かった。また、サ症肉芽腫内、結核症肉芽腫内、正常対照リンパ節内における ISH 陽性シグナル密度は、同一検体における定量系 PCR 法による *Pacnes* ゲノム数と高い相関 ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.001$ ) を示した。【考察】 DIG 標識オリゴプローブを使用するとともに、タイラマイドを利用した高感度 CSA 法を用いることにより、*Pacnes* DNA の組織内局在を明瞭に検出することに成功した。類上皮細胞やマクロファージのマーカーである kp-1 (CD68) 抗体による蛍光抗体法と蛍光発色系 ISH 法との二重染色によって、*Pacnes* DNA が肉芽腫内に集積していることが共焦点レーザー顕微鏡下に観察された。また、DAB 発色系によって、*Pacnes* DNA の局在を光学顕微鏡下に観察して、その陽性シグナルを計数した結果からも、*Pacnes* DNA が肉芽腫内に集積していることが証明された。今回の *Pacnes* DNA に関する組織内局在の解析結果は、サ症病変部において *Pacnes* が単に常在性細菌として無意味に存在しているのではなく、これが肉芽腫の形成に積極的に関与していることを示唆している。

# **In situ localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition**

Yoshinobu Eishi, Tetsuo Yamada, Satoshi Ikeda, Masashi Sekine  
Saeka Gunji, Ikuo Ishige, Junko Minami, Daisuke Kabayashi  
Noboru Ando, Yoshimi Suzuki, Takashige Suzuki

*Department of Human Pathology, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan*

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown etiology. Many genomes of *Propionibacterium acnes* and *P.granulosum* have been detected in lymph nodes from patients with sarcoidosis. *In situ* localization of propionibacterial genomes in sarcoid lymph nodes may help to elucidate an etiological link between sarcoidosis and these indigenous bacteria. Formalin-fixed and paraffin-embedded biopsy samples of lymph nodes from nine patients with sarcoidosis, nine patients with tuberculosis, and nine patients with nonspecific lymphadenitis as controls were examined by quantitative real-time PCR (QPCR) for *P.acnes* and by *in situ* hybridization (ISH) that used catalysed reporter deposition (CARD) for signal amplification with digoxigenin-labeled oligonucleotide probes that complemented 16S rRNA of *P.acnes*. The signals per 250 $\mu\text{m}^2$  of tissue sections from inside and outside granulomas of sarcoidosis and tuberculosis and from control lymph nodes were counted. The number of genomes by QPCR was examined for correlation with the mean signal count by ISH with CARD. In sarcoid samples, one or several signals were detected in the cytoplasm of some epithelioid cells in granulomas and of many mononuclear cells around granulomas. The mean signal counts were higher ( $p < 0.001$ ) in granulomatous areas than in other areas of sarcoid lymph nodes. Even in their nongranulomatous areas, counts were higher than in granulomatous areas ( $p=0.0023$ ) and nongranulomatous areas ( $p < 0.001$ ) of tuberculous lymph nodes and control lymph nodes ( $p = 0.0071$ ). Correlation between the results by QPCR and ISH with CARD was significant ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.001$ ). The accumulation of *P.acnes* genomes in and around sarcoid granulomas suggests that this indigenous bacterium may be related to the cause of granulomatous inflammation in sarcoidosis.

## はじめに

サルコイドーシス（以下サ症）は原因不明の全身性肉芽腫性疾患である。サ症は遺伝的に疾患感受性のある個体が、環境中のなんらかの原因物質（起因体）に曝露されて惹き起こされるものと考えられている<sup>1)</sup>。その起因体としていくつかの感染微生物が想定されてきたが未だ確定されたものはない。日本においては、*Propionibacterium acnes* (*Pacnes*) が既にサ症病変部より培養されており<sup>2)</sup>、*Pacnes* あるいは *P.granulosum* の細菌ゲノムが日本人サ症患者のリンパ節から多量に検出されている<sup>3)</sup>。しかしながら、*Pacnes* は皮膚に常在性の細菌であり、サ症以外の疾患リンパ節からも少量ではあるが検出されることから、本菌のサ症起因体としての可能性に関しては未だ確定されるに至っていない。

一般に、肉芽腫反応とは細胞内停滞性抗原に対する宿主の防衛反応であり、病理学的には、炎症細胞を混じた類上皮細胞や巨細胞からなるマクロファージ由来の細胞集塊からなる<sup>4)</sup>。このような肉芽腫形成における基本原則に従えば、サ症の原因として想定される原因物質（サ症起因体）は、サ症病変部において肉芽腫性炎症局所に集積して存在している必要がある。

本研究では、catalysed reporter deposition (CARD) という新しいシグナル増幅法を用いた高感度の *in situ* hybridization (ISH) 法を応用して組織切片中の *Pacnes* DNA の検出を行った。サ症病変部で肉芽腫性炎症部と非肉芽腫部それぞれの CARD シグナル数を光学顕微鏡下に測定しその組織内分布を検討するとともに、結核性肉芽腫病変や反応性リンパ節炎における測定結果とも比較した。また、CARD 法によるシグナル測定結果を quantitative real-time PCR (QPCR) 法によるゲノム定量結果と比較して、今回用いた組織学的な細菌 DNA 検出法の精度についても検討した。これらの組織学的解析から、サ症における常在菌 *Pacnes* の病因的因果関係を明らかにすることが本研究の目的である。

## 材料と方法

**材料：**材料としては、サ症患者 9 名からの前斜角筋リンパ節生検、9 名の頸部リンパ節結核症例、および対照として 9 名の反応性リンパ節炎症例を用いた。いずれもホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いた。CARD 法と QPCR 法にはそれぞれ隣接切片を用いた。

**CARD 法による ISH：**Dako 社製の GenPoint キットをジゴキシゲニン (DIG) 標識プローブ用に改変して用いた。*Pacnes* の 16S rRNA から 26 mer のオリゴヌクレオチドプローブを設計した。対照用プローブとして *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) および *Escherichia coli* (*E.coli*) に特異的なプローブを文献<sup>5,6)</sup>より引用して用いた。菌種特異性を検討するために、種々の菌 50 mg を静注して 1 時間後に屠殺したラット肝臓のパラフィン切片を用いた。導入されたビオチンにペルオキシダーゼ (HRP) 標識アビジンを反応させ、DAB 発色した後、ヘマトキシリンにて後染色した。

**ISH と免疫染色による蛍光二重染色：**HRP 標識アビジンの代わりに FITC 標識アビジンを用いて ISH を完遂した後、抗 CD68 単クローン抗体 (Kp-1, Dako 社) による免疫染色をローダミン標識二次抗体を用いて二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

**光学顕微鏡によるシグナル計数法：**高倍率 (400 倍) の光学顕微鏡下に CARD シグナル数を計測した。肉芽腫部および非肉芽腫部にわけてそれぞれ 3 箇所を設定し、1 箇所につき 5 視野 (250 $\mu$ m<sup>2</sup>/視野) 計 15 視野の平均値をその検体の測定値として解析した。

**QPCR 法：**既に報告されている江石ら<sup>7)</sup>の方法に準じて、組織 DNA 500 ng あたりの *Pacnes* ゲノム数を測定した。

**統計学的解析：**QPCR ゲノム数および CARD シグナル数の疾患群および肉芽腫内外における比較のためには Mann-Whitney U test を用いた。また同一検体における両計測数の相関については Spearman の相関係数を計算して解析した。

東京医科歯科大学

\* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

結 果

CARD 法により、*P.acnes* を投与されたラット肝臓のクッパー細胞内に、黒褐色のドット状あるいは凝集塊状の陽性シグナルを検出した (Figure 1)。これらの陽性シグナルは *P.granulosum* や *P.avidum* をはじめ、*P.acnes* 以外に菌種を投与されたラット肝臓には認められず、また *H.pylori* や *E.coli* に対する対照プローブとは反応しないことから、本法が *P.acnes* DNA を特異的に検出していることが確認された (Table 1)。

サ症リンパ節においては、肉芽腫内の類上皮細胞および肉芽腫周囲の単核細胞 (単球およびマクロファージ) の細胞質内に 1 個～数個の陽性シグナルが観察された (Figure 2a)。結核性リンパ節炎および反応性リンパ節炎の検体では、陽性シグナルは少数ながらもリンパ洞や傍濾胞領域に散見された。

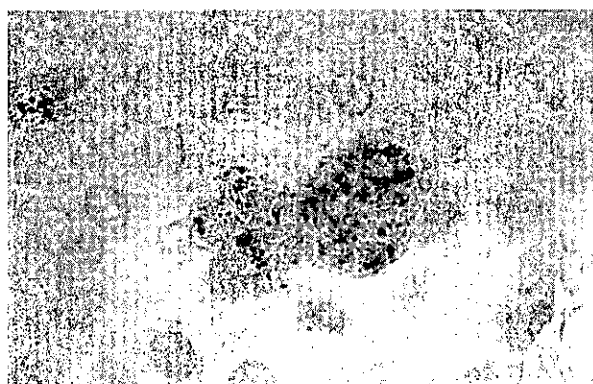


Figure 1 CARD with HRP-conjugated streptavidin for *P.acnes* in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue section of the liver from a rat given an intravenous injection of *P.acnes* (ATCC 6919). Dark brown dots and large brown aggregates are seen in the cytoplasm of swollen Kupffer cells, but neighboring hepatocytes lack signals.

サ症リンパ節の蛍光二重染色法においては、多くの CARD シグナルが CD68 陽性細胞の局在と一致して観察された (Figure 2b)。シグナルは、CD68 陽性細胞の集塊からなる肉芽腫性炎症局所にほぼ限局して集積しており、特に肉芽腫辺縁部において著明であった。

QPCR 法によって、*P.acnes* DNA は、サ症において 9 例中 8 例 (89%) と高率に検出されたが、結核症 9 例中 1 例 (11%) および反応性リンパ節炎 9 例

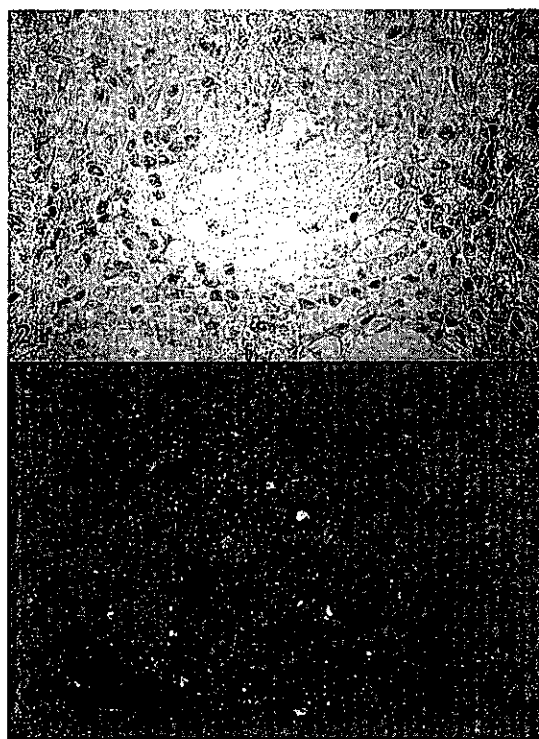


Figure 2 Accumulation of *P.acnes* genomes in and around sarcoid granuloma.

(a) CARD with HRP-conjugated streptavidin. (b) Double fluorescence staining of CARD with FITC-conjugated streptavidin and CD68 immunostaining with rhodamine-labeled anti-mouse immunoglobulin.

Table1 Specificity of ISH probes for bacteria phagocytosed by Kupffer cells of rats

| Species   | Origin                        | Results <sup>a</sup> with an ISH probe or without a probe |                  |                |               |
|---|-------------------------------|---|------------------|----------------|---------------|
|   |                               | <i>P. acnes</i>   | <i>H. pylori</i> | <i>E. coli</i> | Without probe |
| <i>Propionibacterium acnes</i>                    | ATCC 6919                     | +   | -                | -              | -             |
| <i>Propionibacterium acnes</i>                    | Clinical isolate <sup>b</sup> | +   | -                | -              | -             |
| <i>Propionibacterium granulosum</i>               | ATCC 25564                    | -   | -                | -              | -             |
| <i>Propionibacterium avidum</i>                   | ATCC 25577                    | -   | -                | -              | -             |
| <i>Helicobacter pylori</i>                        | ATCC 43504D                   | -   | +                | -              | -             |
| <i>Escherichia coli</i>                           | ATCC 11775                    | -   | -                | +              | -             |
| <i>Bacteroides vulgatus</i>                       | ATCC 8482                     | -   | -                | -              | -             |
| <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | ATCC 6538P                    | -   | -                | -              | -             |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                 | ATCC 14990                    | -   | -                | -              | -             |
| <i>Mycobacterium bovis</i> BCG                    | ATCC 35734                    | -   | -                | -              | -             |

<sup>a</sup>The symbols + and - indicate that hybridization occurred or did not occur, respectively.

<sup>b</sup>This strain was isolated from a sarcoid lesion in the skin of a patient with sarcoidosis.



中 2 例 (22%) にも検出された (Figure 3). しかしサ症で検出された *Pacnes* ゲノム数は, 結核症 ( $p = 0.0017$ ), 反応性リンパ節炎 ( $p = 0.0071$ ) のいずれとの比較においてもはるかに多量に認められた.

組織 250 $\mu\text{m}^2$  あたりの平均 CARD シグナル数を比較すると (Figure 4), サ症リンパ節について肉芽腫内が肉芽腫外よりも有意に高く ( $p < 0.001$ ), さらに後者のサ症リンパ節肉芽腫外シグナル数に限っても, 結核肉芽腫内 ( $p < 0.0023$ )・肉芽腫外 ( $p < 0.001$ ), 反応性リンパ節炎 ( $p < 0.0071$ ) のすべてに対して高値を示した. 結核性リンパ節については, 肉芽腫内と肉芽腫外の間有意差を認めなかった. QPCR 法にて *Pacnes* DNA 陽性とされた結核性リンパ節炎 1 例および反応性リンパ節炎 2 例は, 同一症例群内 QPCR 法陰性例と比較して, 平均 CARD シグナル数については差を認めなかった.

全リンパ節材料について, QPCR 法による *Pacnes* ゲノム数と, CARD 法 *Pacnes* シグナル数とは, 有意な相関を示した ( $n = 27, r = 0.86, p < 0.001$ ; Figure 5).

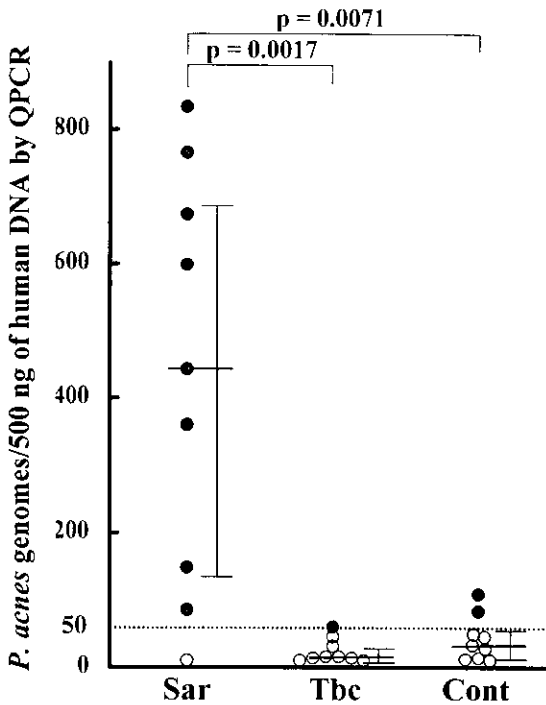


Figure 3 Numbers of *Pacnes* genomes in lymph nodes from patients with sarcoidosis (Sar) or tuberculosis (Tbc) and in control lymph nodes (Cont) by QPCR. Closed circles, samples with positive results by QPCR, and open circles, samples with negative results by QPCR. The horizontal bars show, from bottom to top, the 25<sup>th</sup> percentile, median, and 75<sup>th</sup> percentile.

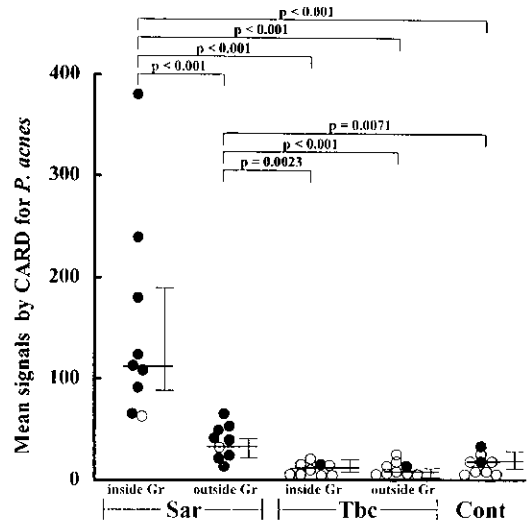


Figure 4 Numbers of signals by CARD for *Pacnes* in lymph nodes from patients with sarcoidosis (Sar) or tuberculosis (Tbc), and in control lymph nodes (Cont). Signals were counted in both granulomatous areas ('inside Gr') and nongranulomatous areas ('outside Gr'). Closed circles, samples with positive results by QPCR, and open circles, samples with negative results by QPCR. The horizontal bars show, from bottom to top, the 25<sup>th</sup> percentile, median, and 75<sup>th</sup> percentile.

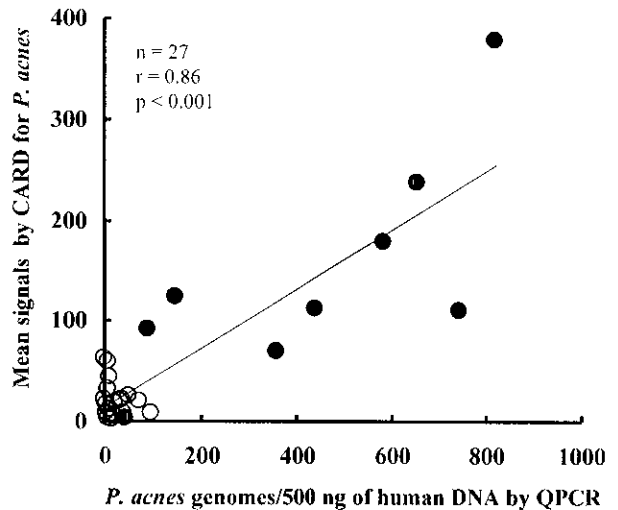


Figure 5 Correlation between results of CARD and QPCR. Closed circles, sarcoid samples.

### 考 察

ISH 法は組織の形態を保ちつつ病原体を検出することから, 組織中の病変部と病原体との分布を併せて把握することが可能である. しかし通常行われている ISH 法は特異性が高い一方で検出感度に限界があり, 特にゲノムコピー数の少ない細菌を検出する際には, 増感法の試み<sup>8)</sup>がいくつか報告されている. 本研究では, パラフィン包埋組織切

片中の *P. acnes* DNA を特異的かつ高感度に検出するために、ビオチン化タイラマイド沈着により ISH のシグナルを増幅する CARD 法を用いた。

サ症の起因体としては、生検リンパ節からの細菌培養に基づき *P. acnes* の可能性が提示されたものの、混入が疑われていた。しかし近年、QPCR 法による研究にて *P. acnes* ゲノム数は、他疾患と比較してサ症リンパ節に圧倒的に多量に検出されることが示されている。本研究に用いたリンパ節においても同様の結果が追試され、混入は否定的となり、QPCR 法の精度が再確認された。

*P. acnes* 由来抗原に対するクームスⅣ型アレルギー反応により、サ症肉芽腫が形成される可能性を示唆する知見も報告されている<sup>9)</sup>。肉芽腫内にその起因抗原物質が存在する、という病理学総論を踏まえれば、サ症肉芽腫についてリンパ節病変内の *P. acnes* の局在を同定することは、サ症の病因を明らかにする上で重要である。

CARD 法を用いた本研究では、サ症リンパ節各病変について *P. acnes* DNA が肉芽種内に強く集積していることを証明した。

サ症肉芽腫辺縁部で *P. acnes* DNA を含む多数の単核細胞は、抗原提示マクロファージと考えられる。肉芽腫中心部で、*P. acnes* DNA 陽性の少数の類上皮細胞は、*P. acnes* を貪食したマクロファージから分化したもの、他方 *P. acnes* DNA 陰性の多くの類上皮細胞および巨細胞は、*P. acnes* 抗原刺激により Th1 細胞が局所産生したサイトカインに導かれ単球から分化したもの、にそれぞれ相当すると解釈できる。検出した *P. acnes* DNA が、食細胞内で消化抵抗性の生菌由来か、消化後の遺残物由来かは明らかでない。

QPCR 法で *P. acnes* DNA が検出されなかったサ症リンパ節 1 例は、CARD 法でも肉芽種内平均 *P. acnes* シグナル数がサ症全例中最低値を示し、*P. granulosum* DNA 陽性かつ *P. acnes* DNA 陰性の検体の可能性がある。

CARD 法 *P. acnes* シグナル数が QPCR 法による *P. acnes* ゲノム数と相関したことから、CARD 法の結果は信頼に足るものと言える。

本研究が明らかにしたサ症肉芽腫内への *P. acnes* DNA 集積の事実は、常在菌である本菌がサ症の病因に関与していることを、一層積極的に示すもの

である。

#### 参考文献

- 1) Hunninghake GW, Costabel U, Ando M, *et al.* ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999; 16: 149-173.
- 2) Abe C, Iwai K, Mikami R, Hosoda Y. Frequent isolation of *Propionibacterium acnes* from sarcoid lymph nodes. *Zentralbl Bakteriolog Hyg A* 1984; 256: 541-547.
- 3) Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y. Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes with Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet* 1999; 354: 120-123.
- 4) Zulma A, James DG. Granulomatous infections: etiology and classification. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 146-158.
- 5) Barrett DM, Faigel DO, Metz DC, Montone K, Furth EE. In situ hybridization for *Helicobacter pylori* in gastric mucosal biopsy specimens: quantitative evaluation of test performance in comparison with the CLOtest and thiazine stain. *J Clin Lab Anal* 1997; 11: 374-379.
- 6) Regnault B, Martin-Delautre S, Lejay-Collin M, Lefevre M, Grimont PAD. Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli/Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization: specificity and potential applications. *Res Microbiol* 2000; 151: 521-533.
- 7) Eishi Y, Suga M, Ishige I, *et al.* Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 198-204.
- 8) Odinet PT, Meis JFGM, Hoogkamp-Korstanje JAA, Melchers WJG. In situ localization of *Yersinia enterocolitica* by catalysed reporter deposition signal amplification. *J Clin Pathol* 1998; 51: 444-449.
- 9) Ebe Y, Ikushima S, Yamaguchi T, *et al.* Proliferative response of peripheral blood

mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from *Propionibacterium acnes* DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2000; 17: 256-265.

# 消化管内における *Propionibacterium* の生態に関する研究

## 新規に開発した選択分離培地を用いたサルコイドーシス患者糞便での検討

渡邊 邦友<sup>1\*</sup> 田中香お里<sup>1</sup> 石井 芳樹<sup>2\*</sup> 井上 義一<sup>3\*\*</sup>  
海老名雅仁<sup>4</sup> 大田 健<sup>5\*</sup> 菅 守隆<sup>6\*</sup> 河野 修興<sup>7\*</sup>  
杉崎 勝教<sup>8</sup> 千田 金吾<sup>9\*</sup> 曾根 三郎<sup>10\*\*</sup> 高橋 卓夫<sup>11</sup>  
西岡 安彦<sup>10</sup> 中野 純一<sup>5</sup> 林 清二<sup>12\*\*</sup> 檜山 桂子<sup>7</sup>  
吉澤 靖之<sup>13\*\*</sup> 吾妻安良太<sup>11</sup> 江石 義信<sup>14\*</sup>

サルコイドーシス患者の腸管における *Propionibacterium* spp. 検索のため、本来腸管には劣勢で現有の選択培地では検出が不可能に近いと考えられる本菌を糞便から効果的に検出できるよう考案した培地を用い、サルコイドーシス患者の糞便内における *Propionibacterium* spp. の検索を行った。協力施設から提供された由来の明らかな患者糞便 65 検体における *Propionibacterium* spp. の保有率は、38.5%であった。これは、先の検討で行った健康成人の糞便 70 検体における *Propionibacterium* spp. の保有率(41.4%)と同等であった。菌量の平均も  $4.26 \times 10^2$  cfu/g と健康成人の結果 ( $2 \times 10^2$  cfu/g) と同等のレベルであった。また、20 歳代～70 歳代の各年代における保有率は 33.3%～50%であった。男女別では、男性 47.1%、女性 35.4%であった。疾患部位については、*Propionibacterium* spp. の保有率に特徴的な差は認められなかった。今回の検討では、少なくとも糞便中の *Propionibacterium* spp. の保有率、保有菌量に関しては、健康成人との違いは認められなかった。今後は、分離された *Propionibacterium* spp. の性状や病巣および他の部位からの分離菌との同一性についての比較を行っていく必要があると考えられた。