

## Study on intestinal *Propionibacteria* as a probable pathogen of sarcoidosis

K. Watanebe<sup>1</sup>, K. Tanaka<sup>1</sup>, Y. Ihsii<sup>2</sup>, G. Inoue<sup>3</sup>,  
M. Ebina<sup>4</sup>, K. Ohta<sup>5</sup>, M. Suga<sup>6</sup>, N. Kohno<sup>7</sup>,  
K. Sugisaki<sup>8</sup>, K. Chida<sup>9</sup>, S. Sone<sup>10</sup>, T. Takahashi<sup>11</sup>,  
Y. Nishioka<sup>10</sup>, J. Nakano<sup>5</sup>, S. Hayashi<sup>12</sup>, K. Hiyama<sup>7</sup>,  
Y. Yoshizawa<sup>13</sup>, A. Azuma<sup>11</sup>, Y. Eishi<sup>14</sup>

1. Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University, School of Medicine
2. Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine
3. National Kinki Central Hospital for Chest Diseases
4. Department of Respiratory, Oncology, Molecular Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University
5. Teikyo University School of Medicine, Department of Medicine
6. First Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine
7. Second Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine
8. Third Department of Internal Medicine, Oita Medical University
9. Second Division, Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine
10. Third Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tokushima University
11. Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School
12. Third Department of Internal Medicine, Osaka University Medical School
13. The Pulmonary Medicine, Tokyo Medical and Dental University
14. Department of Human Pathology, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

*Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum* are anaerobes that were recently shown to be probable pathogens of sarcoidosis. Process of infection for sarcoidosis, however, has not been studied, yet. It is well known that natural habitat of *P. acnes* is normal skin. Besides that, the bacteria are also found in intestine but their populations are thought to be quite small. In order to investigate the possibility that intestinal catalase-positive *Propionibacterium* spp. (*P. acnes*, *P. granulosum*) are the pathogens of sarcoidosis, we have prepared a new selective medium for *Propionibacterium*. Feces samples from sixty-five sarcoidosis patients were subjected to this selective medium. Catalase-positive *Propionibacterium* spp. were isolated from 38.5% (twenty-five patients) of the patients. Average of their bacterial number was  $4.26 \times 10^3$  cfu/g feces. These results were similar to that of 70 healthy persons. On the period of sarcoidosis, rates of *Propionibacterium* spp. positive patients were slightly higher in the patients of 1-2 year (50%-69.2%). From the points of age, sex, and foci, any significant feature was recognized in distribution of intestinal *Propionibacterium* spp.

In this study on distribution of intestinal catalase-positive *Propionibacterium* spp., any evidence for the relation between intestinal *Propionibacterium* spp. and sarcoidosis. It is suggested that further studies on analysis of isolated strains, and comparison among strains isolate from feces, foci of disease, and other normal flora are required.

## はじめに

近年、培養法に加え定量 PCR 法によりサルコイドーシス（以下サ症）患者のリンパ節病変から *Propionibacterium acnes* あるいは *Propionibacterium granulosum* DNA が検出されること、また、この現象は国内外で共通する現象であることが江石らにより確認されている<sup>1,2)</sup>。このことから、サ症への *Propionibacterium* の病因的関与がより強く疑われ、病変形成との関連性の解明は興味ある問題である。一方、病巣にみられるこれらの *Propionibacterium* の由来については、肺病変が主であることから吸引や主要な常在部位である皮膚のほか、腸管からの由来も疑われているが、それらを証明出来るような情報は得られていない。本研究の最終的な目的は、サ症の病変部にみつかると *Propionibacterium* spp. の由来を検索することであり、ここでは特に腸管由来の可能性について検討を行うこととした。腸管からの由来の有無を明確にするためには、患者の腸管及び健康人の腸管における本菌種の分布の差異、患者の腸管由来菌株と病巣部由来菌株との同一性、患者分離株における健康人由来株と異なる何らかの特性の有無などを検討していく必要がある。

ところで、*Propionibacterium* spp. については、皮膚 ( $10^4$  cfu / inch<sup>2</sup>)、結膜囊における分布は詳細に

検討されているものの消化管における分布についてはあまり知られていない<sup>3)</sup>。その理由としては、腸管内のように多数の腸内細菌が優勢に常在する中で、それらの発育を抑制し、劣勢であると言われる *Propionibacterium* spp. を選択的に分離する方法が確立されていなかった事が挙げられる。そこで著者らは、糞便からの *Propionibacterium* spp. の分離を容易にする選択培地の処方を検討し、作成した培地を用いて健康成人の腸管における本菌種の分布を調べた<sup>4)</sup>。今回は、サ症患者の糞便を対象とし、*Propionibacterium* spp. の分布について検討した。

## 対象と方法

### I 対象および材料

共同研究者から提供されたサ症患者の糞便 65 検体を検討対象とした。糞便は、採便カップに採取後、嫌気パウチに入れた状態で各協力施設に提出され、フリーザーで凍結保存されていたものを、凍結状態のまま回収した。

### II 方法

提供された糞便を解凍し、一部を秤量して予め嫌気状態にした嫌気性希釈液に均一に分散し 1g/1mL の溶液とした。この 0.1 mL を先の検討<sup>4)</sup>で考案した *Propionibacterium* 選択分離培地に均一に塗り広げ、4 日間嫌気培養した。選択培地上に発育した菌を観察し、分離同定した。分離された菌の同定は、コロニーの外観、グラム染色所見、カタラーゼ試験、簡易同定キット、LBS 培地・EF 培地・BBE 培地での発育、終末代謝産物分析などにより行った。

## 結 果

提供された 65 検体の背景は男性 17 名（年齢 20～75 才、罹患期間 1 年～9 年）、女性 48 名（23～76 才、罹患期間 1 ヶ月～20 年）と女性が多かった。男性は、20 歳代から 70 歳代の各年代で 1～4 人であった。女性では 50 歳代が 15 人と最も多く、次いで 60 歳代が 13 人、後の年代は 3～7 人であつ

- 1 岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設
- 2 獨協医科大学呼吸器アレルギー内科
- 3 国立療養所近畿中央病院
- 4 東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍分野
- 5 帝京大学医学部内科
- 6 熊本大学医学部第一内科
- 7 広島大学医学部第二内科
- 8 大分医科大学第三内科
- 9 浜松医科大学第二内科
- 10 徳島大学第三内科
- 11 日本医科大学第四内科
- 12 大阪大学医学部第三内科
- 13 東京医科歯科大学呼吸器科
- 14 東京医科歯科大学大学院病因病理学
- \* びまん性肺疾患研究班 研究協力者
- \*\*                    〃                    分担研究者

た(表1)。罹患期間は1ヶ月から20年間に渡っていたが、6割は罹患1年～3年目までの患者であった。

培養の結果、カタラーゼ陽性で主要代謝産物としてプロピオン酸を産生し、形態その他からカタラーゼ陽性 *Propionibacterium* spp. と同定された株は、65検体中25検体(38.5%)から検出された(表1)。各年代の検出率は33.3%～42.8%と年代による差は見られなかった。男女別では、男性47.1%、女性35.4%であった。菌量の内訳を図1に示した。検出されなかった40検体については、菌数「0」とした。*Propionibacterium* spp. の検出菌量の平均は、 $4.26 \times 10^2$  cfu/gであったが、検出された25検体の68%にあたる17検体では、検出菌量は100 cfu/g未満であった。罹患期間との関係では、患者が多い罹患1年～2年で検出率が高い傾向がみられた(図2)。また、菌量が100 cfu/g以上のものは罹患1年～3年の検体にみられた。疾患部位と検出率、検出菌量には特徴的な傾向は認められなかった。

表1 *Propionibacterium* が検出された検体数

年代	性別	検体数	陽性検体数	陽性率(%)	
20代	男性	3	2	66.7	42.8
	女性	4	1	25.0	
30代	男性	2	1		50.0
	女性	6	3	50.0	
40代	男性	4	2	50.0	42.8
	女性	3	1	33.3	
50代	男性	3	1	33.3	33.3
	女性	15	5	33.3	
60代	男性	4	1	25.0	35.3
	女性	13	5	38.5	
70代	男性	1	1		37.5
	女性	7	2	28.6	
計		65	25		38.5

考案・結論

65検体のサルコイドーシス患者糞便を対象とした検討では、*Propionibacterium* の検出率は、38.4%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* の保有率(41.4%)と同等であった。菌量の平均は  $4.26 \times 10^2$  cfu/gで健康成人の  $2.08 \times 10^2$  cfu/gと同等のレベルであった。検出される菌量の範囲やばらつきの中でも特に差は見いだせなかった。

年代別では、健康成人では、30歳代で20%とそ

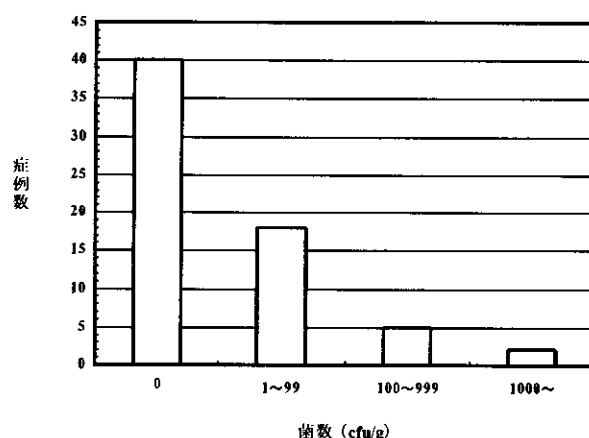


図1 サ症患者糞便中の *Propionibacterium* の菌量

他の年代の45%～60%と検出率が低い傾向がみられたが、患者検体ではこの傾向はみられなかった。罹患期間については、罹患1年～2年で *Propionibacterium* spp. の検出率が高い傾向がみられたが、これらのグループでも4割から5割の検体では *Propionibacterium* spp. が検出されておらず、疾患との関係の有意性については不明である。

今回の検討では、糞便1gあたりの目的菌の検出限界は10 cfu未満であるが、患者検体の半数以上からは目的菌が検出されておらず、少なくとも糞便中に存在する *Propionibacterium* spp. の検出率や検出菌量の点では健康成人由来の糞便との差を認めることは出来なかった。サ症の病因としての腸管 *Propionibacterium* の可能性の有無を決定するには、今後、腸管分離株と病巣分離株、およびその他の部位由来の菌株との同一性を検討する必要があると考えられた。

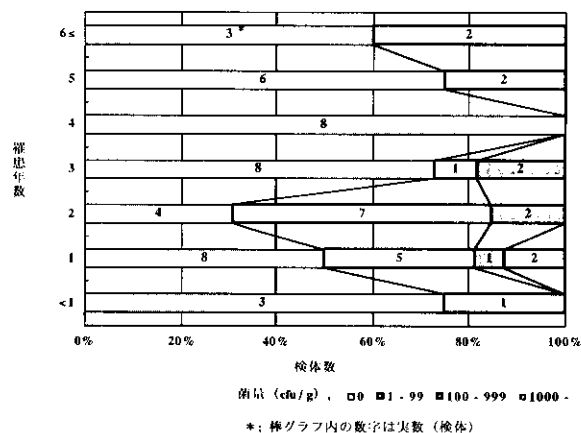


図2 罹患者数と *Propionibacterium* の糞便内保有

参考文献

- 1) Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y  
Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet* 354:120-123, 1999
- 2) 江石義信, 管 守隆, 石下郁夫, 小林大輔, 山田哲夫, 滝沢登一郎, 小池盛雄, 武村民子, 工藤翔二, Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma OP, 安藤正幸; 諸外国サルコイドーシス患者からの生検リンパ節における細菌DNAの検出と定量解析, 厚生省特定疾患対策研究事業ーびまん性肺疾患研究班, 平成12年度研究報告書2001; 45-52.
- 3) Cummins CS, Johnson JL Genus : *Propionibacterium*: Irregular, nonsporing, Gram-Positive Rods. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds, *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.2, Williams&Wilkins, Baltimore, 1986; 1346-1353.
- 4) 渡邊邦友, 田中香お里; サ症患者におけるプロピオニバクテリアの細菌学的検討～*Propionibacterium acnes*を分離するための選択培地作成の試み～, 厚生省特定疾患対策研究事業ーびまん性肺疾患研究班, 平成12年度研究報告書2001;53-5

# アクネス菌誘導 Th1 肉芽腫形成性肝障害における、 リンパ節樹状細胞産生ケモカイン CXCL10/IP-10 の役割

松島 綱治\*

免疫疾患の多くは Th1/Th2 バランスにより規定されるが、実際に生体内のどの部位でどのように Th1/Th2 分化が進行するのかは明らかにされていない。我々はマウス *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) 誘発 Th1 型肉芽腫形成性肝疾患モデルを用い、樹状細胞 (Dendritic cell; DC) の産生するケモカインが、肉芽形成 Th1 細胞の樹立過程にどのような役割を演じているか解析した。*P.acnes* 投与 2 日目の肝リンパ節 DC は CCL22/MDC 及び CXCL10/IP-10 を発現し、Th1 未分化のメモリー T 細胞に遊走活性を示したが、7 日目には IP-10 を優位に発現し、より Th1 に分化した細胞とクラスターを形成していた。抗 IP-10 中和抗体投与により、肝リンパ節の DC-Th1 細胞のクラスターが消失する一方、肝肉芽局所に増殖能・IFN- $\gamma$  産生能を有するメモリー T 細胞が著明に増加しており、肝障害自体の悪化を伴っていた。以上の結果より、炎症時肝内を遊走後肝リンパ節に移行した DC は T 細胞とクラスターを形成するが、このクラスター内で徐々に Th1 細胞が増加してくる事、ならびに、最終的な肉芽形成に関わる Th1 細胞は、肝リンパ節で活性化されたメモリー T 細胞が全身再循環により肉芽局所に選択的に遊走してきた細胞であり、しかもこれらの Th1 細胞は肉芽内でさらなる増幅を示す事が示唆され、このような T 細胞の動態は DC 由来の IP-10 により調節されていると考えられた。

## Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of Th1 lymphocytes in secondary lymph nodes

Kouji Matsushima

Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine and Core Research and Evolutional Science and Technology (CREST), The University of Tokyo.

Various immune diseases are considered to be regulated by the balance of T helper (Th) 1 and Th2 subsets. Although Th lymphocytes are believed to be generated in regional lymph nodes (LNs), *in vivo* Th cell behaviors during Th1/Th2 polarization are largely unexplored. Using a murine granulomatous liver disease model induced by *Propionibacterium acnes*, we show that retention of Th1 cells in the LNs is controlled by a chemokine, CXCL10/IP-10 produced by mature dendritic cells (DCs). DCs at day 2 after antigen challenge expressed CCL22/MDC and CXCL10 to attract proliferating nonpolarized T cells, and then preferentially produced CXCL10 to promote DC-Th1 cell cluster formation. Blockade of CXCL10 reduced the frequency of cluster formation between mature DCs and BrdU<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells resulting in a selective decrease of BrdU<sup>+</sup> Th1 cells in the hepatic LNs. This was accompanied by increased circulating memory T cells and accelerated infiltration of Th1 cells into the granuloma sites and caused liver injury. Thus, mature DC-derived CXCL10 is pivotal to retain Th1 lymphocytes within T cell areas of draining LNs and optimize the Th1-mediated immune responses.

はじめに

ナイーブ T 細胞がリンパ節で Tnp (nonpolarized T 細胞), Th1/Th2 に分化する課程で, 抗原感作 T 細胞はその分化の程度に応じてリンパ節内を有効に移動している可能性が高い<sup>1,2)</sup>, その移動は基本的には抗原提示細胞: DC との接触を目標としたものであり, より分化の進んだ抗原特異的 T 細胞ほど分化の未熟なそれと競合し, DC と優勢に接触できる事が証明されている<sup>3)</sup>. 逆に DC は T 細胞を引き寄せクラスターを形成する必要があり, DC 自身の産生するケモカインがまた重要な役割を演じている事が示唆される. しかしながら, 実際にエフェクター T 細胞が樹立するまでに T 細胞がどのように移動するのかは in situ レベルではほとんど知られていない.

私達は *P.acnes* 誘導肉芽腫形成性肝炎モデル<sup>4)</sup>において, 1) *P.acnes* 投与後数時間以内から CD11c 陽性樹状前駆細胞が血中に大量に動員され, 2)ダイレクトに肝類洞肉芽領域に遊走し肉芽形成に参画し, 3)引き続き肝門脈域に移行し T 細胞とクラスターを形成し, 4)さらには所属肝リンパ節まで移行すること, を直接的に立証した<sup>5)</sup>. これらは世界初めて組織浸潤・移行する樹状細胞前駆体を捉えた仕事であり, かつ肉芽形成に樹状細胞が重要な役割を果たす事を証明した発表になった. しかも 5)樹状前駆細胞の血中から肝類洞域への遊走が MIP-1 $\alpha$ /CCL3 で制御されている事, 6)肉芽部位で活性化・成熟した樹状細胞の門脈域への移動も SLC/CCL21 により制御されていることを確立した<sup>5)</sup>. そこで今回, 肝リンパ節まで移行した DC のさらなる追求をすすめ, *P.acnes* 誘導肉芽参画 Th1 細胞の樹立過程における DC, ケモカインの役割を詳細に検討した.

対象と方法

8 週齢の雌 C57BL/6 マウスに *P.acnes* の加熱死菌を尾静脈より 1mg 注射後, 肉芽反応がピークとなる 1 週間まで経時的に所属肝リンパ節を採取し, 分離した CD11c<sup>+</sup> DC のケモカイン発現パターンを RT-PCR 法で, CD4<sup>+</sup> T 細胞の増殖能・遊走能・サイトカイン産生能を各々 WST-1 細胞分裂キット・ケモタキシス試験・培養上清の ELISA 法で, ならびに in situ での DC-T 細胞の配置を免疫多重染色法で解析した. また, 抗 IP-10 中和抗体ならびにコントロール抗体を実験開始後 0, 2 日後に尾静脈注射し, T 細胞の動態の変化を免疫多重染色法, ELISA 法, FACS 解析で検討した.

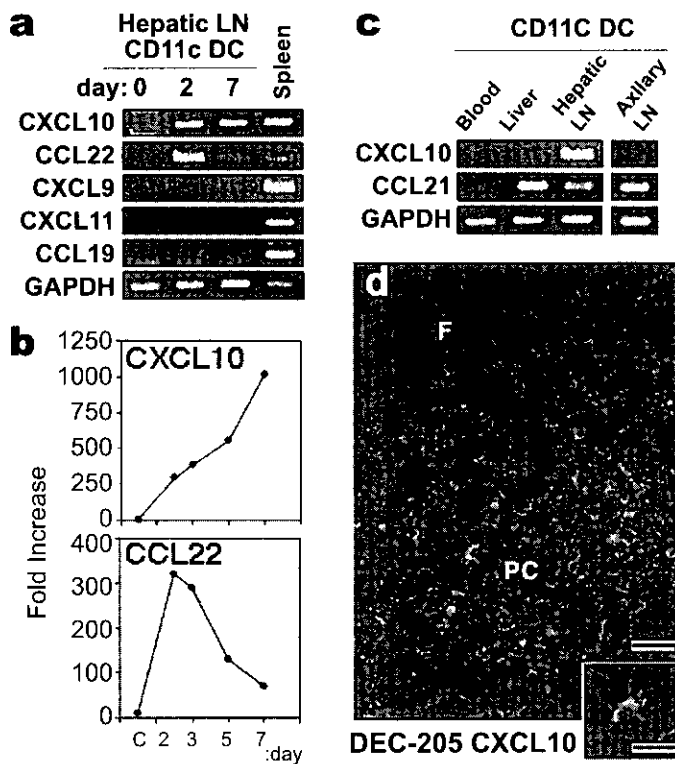


Figure1 Production of CXCL10 by maturing DCs in the hepatic LNs  
 (a) Kinetics for chemokine expression profiles of hepatic LN CD11c<sup>+</sup> DCs. Total RNA of normal spleen specimens was used as positive control. (b) Real time quantitative PCR analysis of CXCL10 and CCL22 mRNA expression by hepatic LN CD11c<sup>+</sup>DCs. Each amount was normalized to the level of GAPDH and the final relative values were expressed relative to calibrators (22, 25):normalized amount on day 0 (C;control). (c) Expression of chemokine mRNAs in CD11c<sup>+</sup>DCs isolated from the blood, liver, hepatic and axillary LNs at day 7 after *P.acnes* injection. These results represent three independent experiments. (d) Double immunostaining for CXCL10 (green) and DEC-205 (red) in the hepatic LNs on day 5. Double positive DCs (yellow) were detected selectively within the paracortex. Scale bars=40  $\mu$ m, 20  $\mu$ m (insert). F, follicle;PC, paracortex.

東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室

\* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

## 結 果

### 1. 所属肝リンパ節 DC におけるケモカイン発現パターンの推移

経時的に採取した肝リンパ節から CD11c<sup>+</sup> DC を flowcytometer により分離後即 RNA を抽出し、ケモカインの発現を定量的にも解析したところ、免疫応答初期 (*Pacnes* 投与後数時間～2日目) には CCL22/MDC, CXCL10/IP-10 を優位に発現し、後期 (4～7日目) には IP-10 を選択的にかつ数千倍のレベルで発現していた (Fig.1a, b). 特に IP-10 の産生は所属リンパ節に限定して誘導されていることから (Fig.1c), このような DC は肝臓で活性化後所属肝リンパ節まで移動した DC が主体であると考えられた. さらに、免疫蛍光 2 重染色 (DEC-205/IP-10) により、IP-10 産生 DC は所属肝リンパ節傍皮質領域に限局して存在する、DEC-205 陽性の主に成熟 DC であることが判明した (Fig.1d).

### 2. 所属肝リンパ節 CD4<sup>+</sup> T リンパ球の推移

傍皮質領域では複数の DEC-205<sup>+</sup> DC 自身のクラスター形成を認める (Fig.2a; 矢印) が、その周囲は BrdU 陽性 CD4<sup>+</sup> T 細胞 (Fig.2b; 矢印) に囲まれていた. この形態は肝肉芽腫の DC-T 細胞クラスターに極めて酷似している. このように in situ では S 期にある CD4<sup>+</sup> T 細胞が選択的に DEC-205<sup>+</sup> DC と接触していたことから、BrdU 陽性 CD4<sup>+</sup> T 細胞に着目し、その数を切片上でカウントすると、*Pacnes* 投与後 2 日目より優位に増加していた (Fig.2c). さらに、分離した肝リンパ節 CD4<sup>+</sup> T 細胞の *Pacnes* に対する増殖能を ex vivo で解析すると、2 日目にはすでに抗原特異的増殖能を有していることも確認できた (Fig.2d). また、肝リンパ節 CD4<sup>+</sup> T 細胞を CD3 刺激にて 24 時間培養後の上清を ELISA で検討すると、初期は IFN- $\gamma$ /IL-4 とも少量産生しているのに対し、後期には IFN- $\gamma$  を極めて優位に、かつ多量に産生していた (Fig.2e). 免疫蛍光多重染色でも、IFN- $\gamma$  発現 CD4<sup>+</sup> T 細胞は傍皮質領域に限局して認められた (Fig.2f, g; 矢印).

次に肝リンパ節リンパ球のケモカインに対する遊走能をケモタキシス試験で検討したところ、2 日目には MDC, IP-10 とも BrdU 陽性 CD4<sup>+</sup> T 細胞 (Fig.3a; ●) に対する遊走活性を有していたが、7

日目には IP-10 が選択的に BrdU 陽性 CD4<sup>+</sup> T 細胞に対して高い遊走活性を示した (Fig.3a). 一方、IP-10 の受容体、CXCR3 は免疫初期から肝リンパ節 CD4<sup>+</sup> T 細胞に発現し、増強し続けていた (Fig.3b).

以上より、免疫応答初期には Tnp あるいは古典的には Th0 とされるような、Th1 にまだ十分分化していない T リンパ球が、後期にはほぼ Th1 に分化したと思われる T リンパ球が主体に DC とのクラスターを形成しており、DC 側の IP-10 (初期には MDC も) により T リンパ球が引き寄せられるものと考えられた.

### 3. 抗 IP-10 抗体による肝リンパ節 CD4<sup>+</sup> T リンパ球の動態変化

そこで IP-10 の役割を明らかにするため、中和抗体による阻害実験を行った. 抗 IP-10 抗体投与により、7 日目の肝リンパ節 (すなわち、活性化 T 細胞のほとんどが IFN- $\gamma$  陽性; Fig.2e-g) の傍皮質領域における BrdU 陽性 CD4<sup>+</sup> T 細胞が選択的に激減していた (Fig.4a = コントロール抗体投与群の矢印で認められるクラスターが、Fig.4b = 抗 IP-10 抗体投与群では激減している). このような BrdU 陽性 CD4<sup>+</sup> T 細胞数の激減 (Fig.4c) は、DC の数や機能の低下を伴っていなかった (Fig.4d).

### 4. 抗 IP-10 抗体による肉芽腫形成性肝病変の増悪

一方標的臓器である肉芽腫を調べると、抗 IP-10 抗体投与で血清 ALT (GPT) の上昇 (Fig.5a), ならびに肉芽腫領域に一致した CD4<sup>+</sup> T 細胞数の著増を伴う肉芽腫の増加・増大 (Fig.5b-c) を認めた. さらに驚くべきことに、血中、肝内ともに BrdU<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 細胞が増加していた (Fig.5d) ほか、肝浸潤 CD4<sup>+</sup> T 細胞の分離培養上清中のサイトカイン産生能を ELISA で解析すると、抗 IP-10 抗体処理を受けた肝 T 細胞が IFN- $\gamma$  を極めて強く産生している事が明らかになった (Fig.5e).

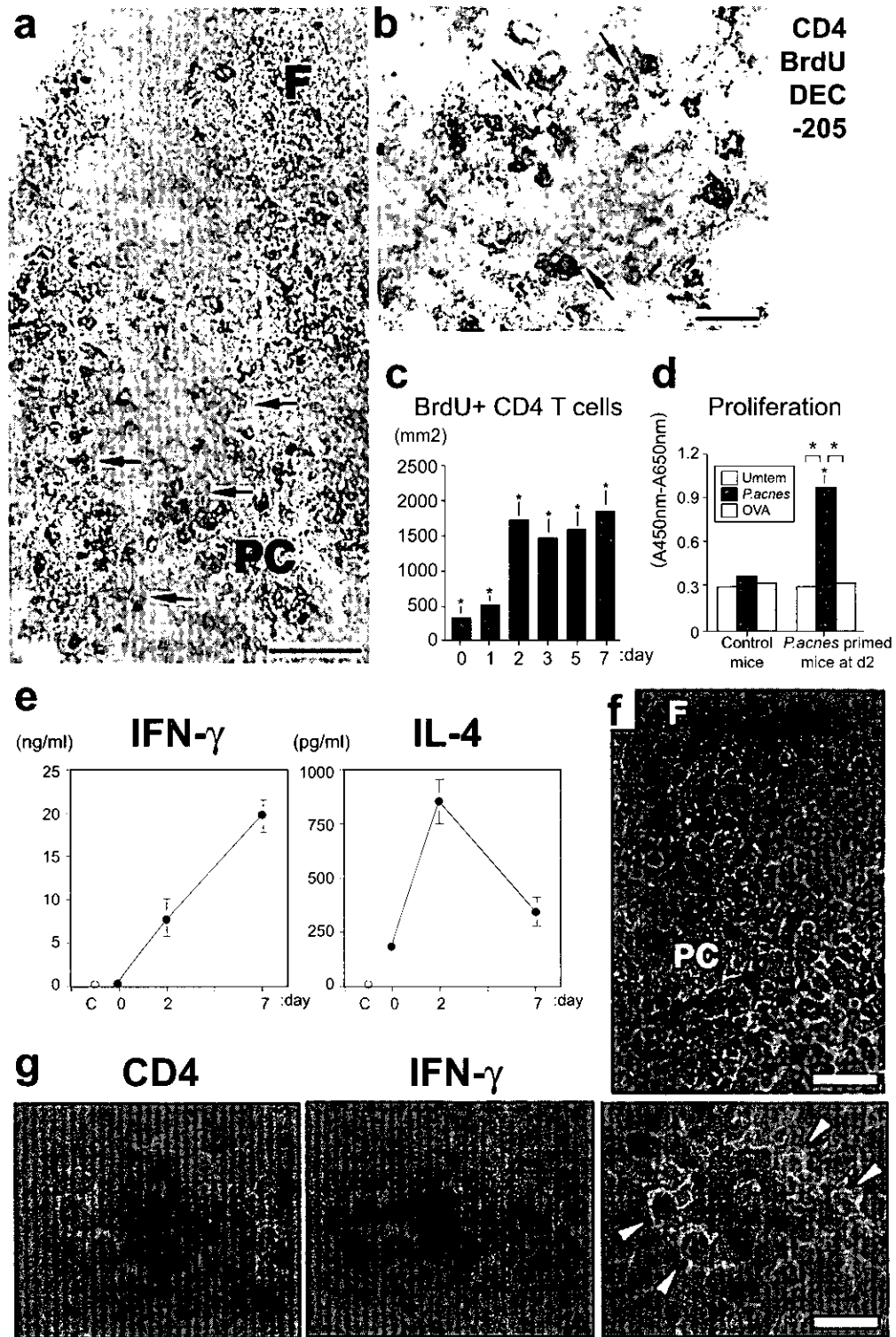


Figure2 visualization of DC-Th1 cell clusters in the hepatic LNs.

(a, b) Triple immunostaining in the hepatic LNs on day 7. (a) Numerous clusters between DEC-205<sup>+</sup> (brown) cells and BrdU<sup>+</sup> (red) CD4<sup>+</sup> (blue) cells (arrow) were seen in the paracortex. Scale bar=100 $\mu$ m. (b) Contact between BrdU<sup>+</sup> (red) CD4<sup>+</sup> (blue) cells and DEC-205<sup>+</sup> (brown) cells (arrow) at the periphery of a small granulomatous cluster. Scale bar=20 $\mu$ m. (c) The numbers of BrdU+CD4+ cells in the paracortex of hepatic LNs determined by 15mm<sup>2</sup> stained cryosections. T cell area of hepatic LNs was defined by B220 or CD3c staining (25). (d) Antigen-specific proliferation of hepatic LN T cells sorted from normal and *P.acnes* primed mice at day 2. (e) IFN- $\gamma$  and IL-4 productions by sorted LN CD4<sup>+</sup> T cells. C, Medium alone as negative control. (c-e) Representative data from five independent experiments. Mean  $\pm$  SD (n=6). Asterisk; P value<0.05, Student's T-test. (f, g) Double immunostaining for CD4 (red) and IFN- $\gamma$  (green) in the hepatic LNs on day 7. (f) IFN- $\gamma$  CD4<sup>+</sup> cells (yellow) were selectively located at the paracortex. Scale bar=40 $\mu$ m. (g) IFN- $\gamma$ CD4<sup>+</sup> cells (right; yellow, white arrowheads) were located at the periphery of a small granulomatous DC-T cell clusters. Scale bar=20 $\mu$ m. F, follicle; PC, paracortex.



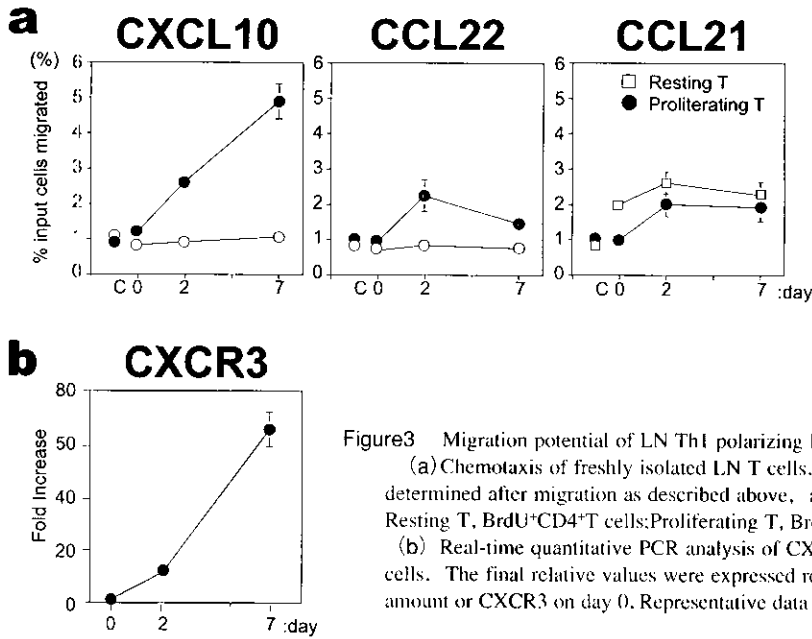


Figure3 Migration potential of LN Th1 polarizing lymphocytes.

(a) Chemotaxis of freshly isolated LN T cells. The absolute numbers of responding cell subsets were determined after migration as described above, and final results are presented as % input cells migrated. Resting T, BrdU<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells; Proliferating T, BrdU<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. C, medium alone as negative control. (b) Real-time quantitative PCR analysis of CXCR3 mRNA expression on freshly isolated LN CD4<sup>+</sup> T cells. The final relative values were expressed relative to the calibrators as described above, normalized amount of CXCR3 on day 0. Representative data from three independent experiments. Mean  $\pm$  SD (n=6).

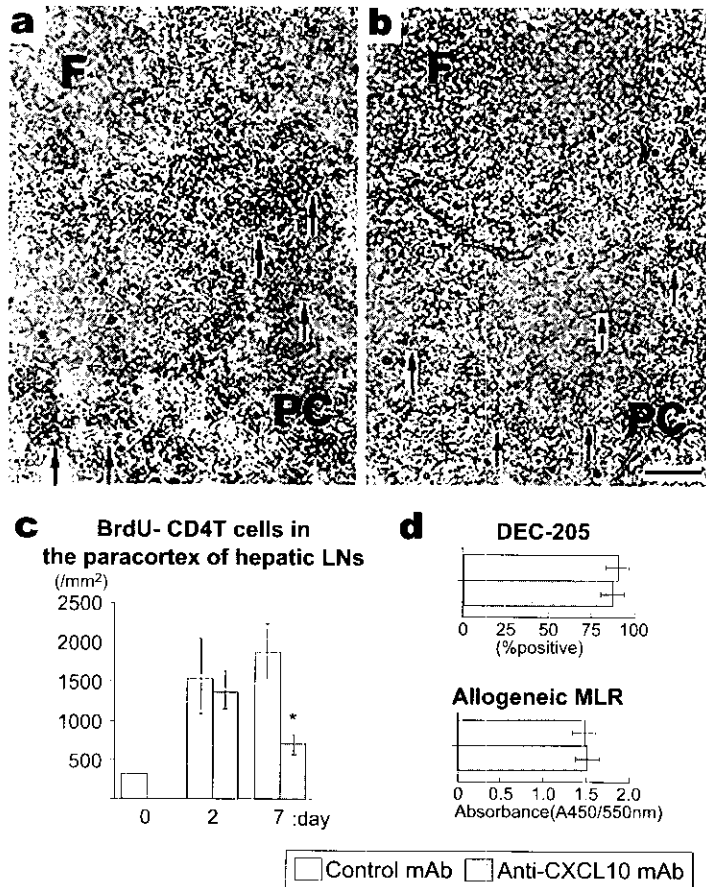


Figure4 Effect of anti-CXCL10 mAb on LN T cells.

(a, b) Triple immunostaining for ICAM-1 (brown), BrdU (red), and CD4 (blue) in the hepatic LNs on day 7. (a) The clusters between ICAM-1<sup>+</sup> cells and BrdU<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells (arrow) were seen in the paracortex. (b) Only DC accumulations (not clustered with BrdU<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells; arrow) were seen in the paracortex. Scale bar=80 $\mu$ m. F; follicle, PC; paracortex. (c) The numbers of BrdU<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells in the paracortex of hepatic LNs determined by 15mm<sup>2</sup> stained cryosections (top). Densely labeled cells were analyzed using a grid micrometer. The number of grid intersections overlying positively labeled cells was counted. Final results were presented as the proportion of the number of positive intersections to the total number of grid intersections. Primary allogeneic MLR of CD11c<sup>+</sup> DCs isolated from the hepatic LNs on day 7 (bottom). Open column, control mAb-treated mice; Closed column, anti-CXCL10 mAb-treated mice; Dotted column, untreated mice (c-d). Ten mice per group were examined. Representative data from three experiments. Mean  $\pm$  SD (n=6). Asterisk: P value < 0.05. Student's *t* test.

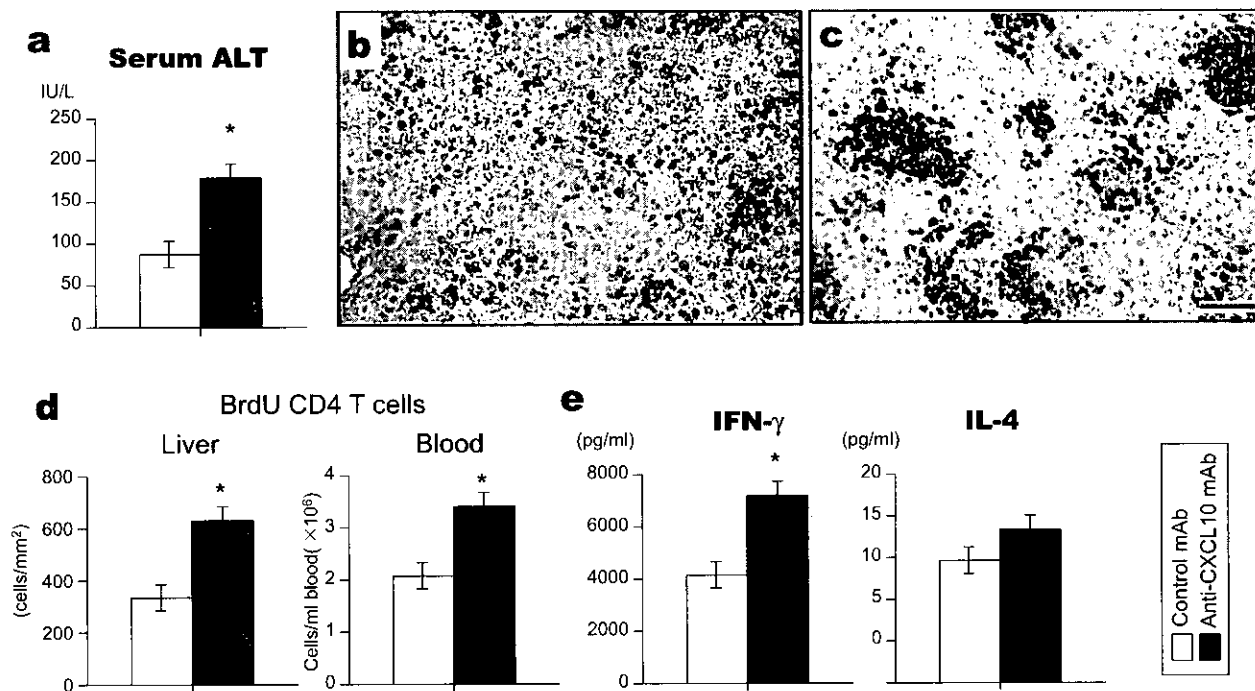


Figure5 Effect of anti-CXCL10 mAb on liver injury.

(a) Serum ALT levels on d7. (b, c) Immunostaining for CD4 (red) in the control mAb-treated liver (b) and anti-CXCL10 mAb-treated liver (c) on day 7. Scale bar=100µm. (d) The numbers of BrdU<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in the hepatic sinusoid determined by 15mm<sup>2</sup> stained cryosections (left) and in the circulation (right) on d7. (e) IFN-γ and IL-4 productions by sorted liver CD4<sup>+</sup> T cells on day 7. Open column, control mAb-treated mice; Closed column, anti-CXCL10 mAb-treated mice (a, b, e). Representative data from three independent experiments. Mean ± SD (n=10). Asterisk:P value<0.05. Student's T-test.

考案・結論

2次リンパ節傍皮質領域においてDCの産生するIP-10は、IFN-γ産生T細胞細胞がおそらく他のT細胞と競合してDCと接触できるよう誘導し、より優位にDCとTh1系の細胞とのクラスターを形成させることで、Th1分化にも関与する事が示唆された(Fig.6)。さらにIP-10のブロッキングにより、肝リンパ節のBrdU陽性Th1細胞の選択的な激減、循環血流ならびに肝類洞肉芽領域へのメモリーT細胞数の著増、そして肝細胞障害の増悪化を認めた。しかも抗IP-10抗体投与により増加した肝浸潤T細胞はBrdU陽性でかつIFN-γをより強く産生する事が判明した。これにより、1) 所属リンパ節から輸出リンパ管へのメモリーTh1細胞の移行がIP-10により調節されていること(Th1 retentionという新しい概念の提案)、そして2)最終的にはメモリーTh1細胞の肝類洞へのホーミングにより初めて肉芽部位のTh1細胞の増殖が起こり(局所における樹状細胞とのクラスター再形成によるTh1 polarizationの完了)肉芽が完成する、という慢性炎症のサルコイドーシスの原因とされるPacnesによ

る肉芽形成メカニズムの全貌が、ケモカインと樹状細胞の視点からかなり観えてきたのではないかとと思われる(投稿中)。

この仕事はまた、1)ある程度Th1に分化した細胞をリンパ節傍皮質のDCとのクラスター内に留めておく事が炎症局所の障害の程度をも軽減できる、というTリンパ球浸潤疾患の治療開発にも大きく影響し、さらには、2)エフェクターTh1/Th2樹立の場はリンパ節のみならず炎症局所であり、しかもいずれもDC群と形成されるクラスター内で巧妙に調節されていることを示唆している(Fig.6)。肉芽腫をDC-T細胞クラスターという観点で捉え直すと、これらは必ずしも慢性炎症の終末像ではなく、on-goingな免疫応答が展開されている像であると考えられる。

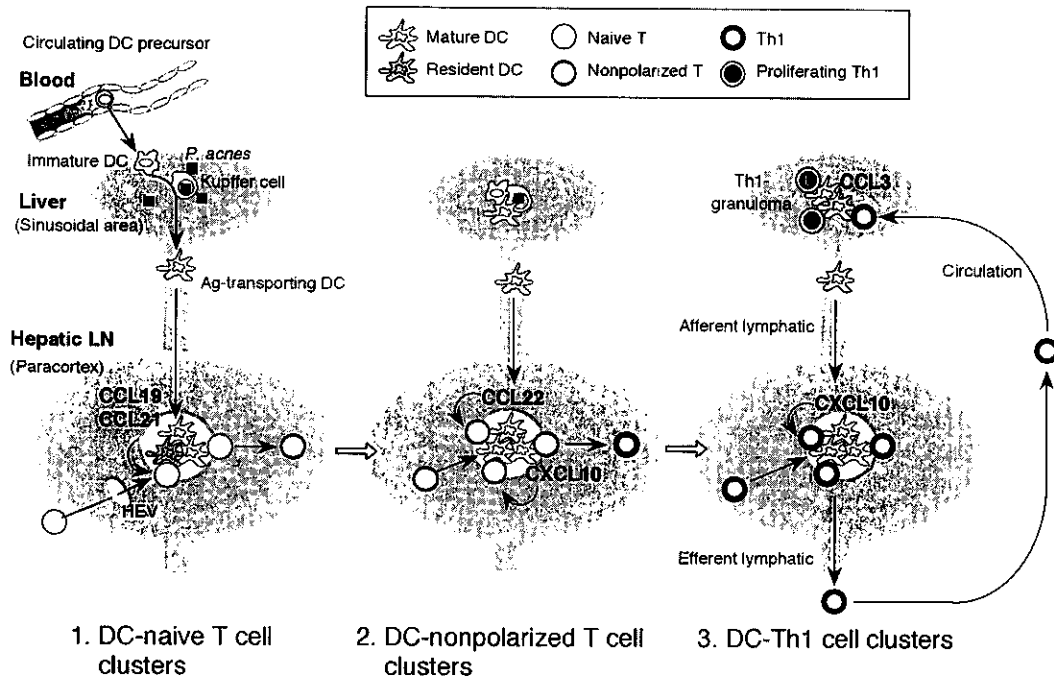


Figure6 Three phases of DC-Th cell clusters during Th1 development controlled by DC-derived chemokines.

1:Initiation and induction of DC-naive T cell clusters by CCL19 or CCL21. 2:Amplification of DC-nonpolarized T cell clusters by CCL22. 3:promotion and retention of DC-Th1 cell clusters (this study). After leaving the LNs. Th1 cells migrate into the liver and form clusters with DCs (granuloma formation) possibly by CCL3 or CXCL9. Th1 cells can further proliferate and produce higher amount of IFN- $\gamma$  at the periphery of the granulomas. HEV, high endothelial venule.

参考文献

1) Cyster, JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999; 286: 2098-2102.

2) Lanzavecchia A & Sallusto F: Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001; 106: 263-266.

3) Kedl, RM., Ress, WA., Hildemann, DA., *et al.* : T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 1105-1113.

4) Yoneyama, H., Harada, A., Imai, T., *et al.* : Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria-induced fulminant hepatic failure in mice. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 1933-1941.

5) Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, *et al.* Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J. Exp. Med.* 2001; 193: 35-49.

# サルコイドーシスの発症に関わる遺伝因子の探索

田中 剛<sup>1,2</sup> 松下 育美<sup>1</sup> 中山 光<sup>1</sup> 折津 愈<sup>3</sup>  
徳永 勝士<sup>4</sup> 慶長 直人<sup>1\*</sup>

サルコイドーシスの発症には、同じ地域で人種差を認めることや家族集積性があることから、遺伝的素因の関与が考えられている。このサルコイドーシスの発症に関わる遺伝因子を明らかにすることを目的として解析を行った。対象はサルコイドーシス患者 83 例、健常者 96 例で、候補遺伝子近傍のマイクロサテライトマーカーを用いた関連解析を行った。候補遺伝子には、Th1 系免疫に関わるサイトカインのレセプター (IFN- $\gamma$  レセプター 1, -2, IL-12 レセプター  $\beta$ 1, - $\beta$ 2) 及びそのシグナルを伝達する転写因子 (STAT1, STAT4) を選択した。まず、候補遺伝子近傍でマイクロサテライトを検索し、プライマーを設計した。次に、マイクロサテライトの多型の有無を確認し、多型を示したものを新規のマーカーとして用い、症例と対照でタイピングを行った。今回、解析したマーカーは 8 マーカーでそれぞれ 2 ~ 4 塩基いずれかの繰り返し配列を持ち、対立遺伝子の数は平均 7.1 個、ヘテロ接合度は 0.50 ~ 0.78 であった。関連解析の結果、STAT4 の最も頻度の高い対立遺伝子で有意差を認め、STAT4 遺伝子の多型がサルコイドーシス発症に関与している可能性が示唆された。(オッズ比 3.82; 95% 信頼区間 1.56 - 9.39; p 値 0.0022)

## Genetic susceptibility to sarcoidosis

Goh Tanaka<sup>1,2</sup>, Ikumi Matsushita<sup>1</sup>, Koh Nakata<sup>1</sup>, Masaru Oritsu<sup>3</sup>  
Katsushi Tokunaga<sup>4</sup>, Naoto Keicho<sup>1</sup>

1. Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan
2. Department of Respiratory Medicine, University of Tokyo
3. Department of Respiratory Diseases, Japanese Red Cross Medical Center
4. Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

Genetic factors are thought to affect susceptibility to sarcoidosis because of the two lines of evidence, racial variation in its epidemiology and familial clustering of cases. To determine whether genes participating in the Th1 immune response may contribute to the genetic predisposition to sarcoidosis, we examined polymorphisms of these genes in a case control study. In this study, IFN- $\gamma$  R1, -R2, IL-12R  $\beta$ 1, - $\beta$ 2, STAT1 and STAT4 genes were chosen as candidates. Then microsatellites close to these genes were identified and used as markers. These markers had di- or tetranucleotid repeats and the number of alleles ranged from 3 to 11, with an average of 7.1 alleles. Heterozygosity of these markers are 0.50-0.78. We analyzed polymorphisms of these markers in 83 Japanese patients with sarcoidosis and 96 Japanese control subjects. Our results showed that the most common allele in the STAT4 gene marker was significantly associated with sarcoidosis. (odds ratio 3.82; 95% CI 1.56-9.39; p=0.0022) The results suggest that a genetic variation in STAT4 may affect susceptibility to sarcoidosis.

はじめに

サルコイドーシスは、非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を特徴とする原因不明の全身性疾患であり、その発症には、同じ地域で人種差を認めることや家族集積性がある<sup>1)</sup>ことから、遺伝的素因の関与が指摘されている。

病変形成の機序としては、まず何らかの誘因により、マクロファージとT細胞が集積し、活性化され、そして類上皮細胞肉芽腫を形成していくというTh1系免疫応答の亢進によるものが考えられている。

このようなTh1系免疫に関わる遺伝子のうち、サイトカインのレセプター及びそのシグナルを伝達する分子に着目し、これらの遺伝子多型が、サルコイドーシスの発症にかかわっているか否かを明らかにすることを目的として解析を行った。

対象と方法

対象は、厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班の診断基準により診断されたサルコイドーシス患者83例、健常者96例とした。候補遺伝子には、Th1系免疫に関わるサイトカインのレセプター(IFN- $\gamma$ R1, -R2, IL-12R $\beta$ 1, - $\beta$ 2)及びそのシグナルを伝達する転写因子(STAT1, STAT4)を選択した。まず、候補遺伝子及びその近傍の配列を、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のGenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)からコンピュータ上に取り込み、RepeatMasker (<http://repeatmasker.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>)で解析し、マイクロサテライトを検索した。次に、マイクロサテライトの前後にプライマーを設計、PCRで増幅し、電気泳動でマイクロサテライトの多型の有無を確認した。多型を示したものをマーカーとし、それらのプライマーに蛍光をつけ、ABI PRISM 377 DNA Sequencer

(Applied Biosystems)を使用して、症例と対照でタイピングを行った。解析には、 $\chi^2$ 検定を用い、それぞれのマーカーにおける対立遺伝子数で補正を行った。期待値5以下となる対立遺伝子については、Fisher's exact 検定を行い、他の対立遺伝子とはp値で比較した。

結 果

解析した患者の背景を表1に示す。男性27例、女性56例で、発症年齢は平均37.1才であった。観察期間は平均15.6年で、最低でも3年以上観察されていた。5年以上の経過で最終観察時に寛解していないものを遷延としたが、今回、解析した患者では、このような症例を59例認めた。

マーカーとして解析に用いたマイクロサテライトは、それぞれ2もしくは4塩基いずれかの繰り返し配列をもち、対立遺伝子の数は3個から11個、集団での多型性を示すヘテロ接合度は0.50から0.78であった(表2)。これらのマーカーについて症例と健常者でタイピングし関連解析を行った結果のうち、それぞれのマーカーで最大となる $\chi^2$ 値とそのp値を表3に示す。健常群がHardy-Weinberg平衡からはずれていたのは、IL-12R $\beta$ 2遺伝子のマーカーのみであった。そのため、このマーカー

表1 患者背景

性別 (M/F)	27 / 56		
発症年齢	37.1才 (18才-68才)		
観察期間	15.6年 (3年5ヶ月-40年11ヶ月)		
胸部X線Stage (初診時)	0 (4)	I (49)	II (20)
	III (6)	IV (0)	不明 (4)
肺外病変	眼 (63)	皮膚 (9)	神経 (6) 心 (3)
経過*	自然寛解 (17)	治療後寛解 (1)	
	遷延 (59)	不明 (2)	

\*5年以上の観察期間があるもののみ提示

表2 解析に用いたマイクロサテライトと多型性

遺伝子座	繰り返し配列	対立遺伝子数	ヘテロ接合度
IFN- $\gamma$ R1 (6q24.1)	(CA) <sub>n</sub>	11	0.78
IFN- $\gamma$ R2 (21q22.11)	(TAAA) <sub>n</sub>	8	0.73
	(CA) <sub>n</sub>	3	0.53
IL-12R $\beta$ 1 (19p13.1)	(TGGA) <sub>n</sub>	3	0.67
IL-12R $\beta$ 2 (1p31.2)	(CA) <sub>n</sub>	10	0.66
	(TAAA) <sub>n</sub>	5	0.50
STAT1 (2q32.2)	(CA) <sub>n</sub>	8	0.66
STAT4 (2q32.2)	(CA) <sub>n</sub>	9	0.67

1. 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部
  2. 東京大学呼吸器内科
  3. 日本赤十字社医療センター呼吸器内科
  4. 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室
- \* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

に関しては、他の健常者検体で再解析したが、有意差は認めなかった。

関連解析の結果、STAT4 マーカーの対立遺伝子で、オッズ比 3.82, p 値 0.0022 と有意差を認めた。この STAT4-254 という対立遺伝子を、サルコイドーシス患者では、83 例中 76 例、健常者では 96 例中 71 例、保有しており、この遺伝子座の対立遺伝子数で補正しても p 値 0.05 以下であった (表 4)。

表 3 Th1 系遺伝子とサルコイドーシスの関連解析

遺伝子座	繰り返し配列	$\chi^2$ 値 (最大値)	P値	補正P値*
IFN- $\gamma$ R1	(CA)n	1.12	0.29	NS
IFN- $\gamma$ R2	(TAAA)n	1.95	0.16	NS
	(CA)n	2.67	0.10	NS
IL-12R $\beta$ 1	(TGGA)n	2.30	0.12	NS
IL-12R $\beta$ 2	(CA)n	—	0.098 <sup>††</sup>	—
	(TAAA)n	1.01	0.31	NS
STAT1	(CA)n	1.87	0.17	NS
STAT4	(CA)n	9.40	0.0022	0.020

\* 対立遺伝子数で補正, † Fisher's exact検定で解析, †† 健常群がHardy-Weinberg平衡からはずれているため参考値、他の健常者検体で有意差認めず

表 4 STAT4 マーカーとサルコイドーシスの関連解析

対立遺伝子	症例 (n= 83)	対照 (n= 96)
254 / 254, 254 / 254以外	76 (0.92)	71 (0.74)
254以外 / 254以外	7 (0.08)	25 (0.26)

オッズ比 (95%信頼区間) 3.82 (1.56 - 9.39),  
 $\chi^2$ 値 9.40, P値 0.0022, 補正P値 0.020

## 考 案

発症原因が不明であるサルコイドーシスのような疾患で、疾患感受性遺伝子を探索する場合、数多くの遺伝子が候補となるため、効率よく解析する必要性が生じる。ある候補遺伝子座で連鎖不平衡の及ぶ領域内を考えた場合、マイクロサテライトは、対立遺伝子を多く持つため、そのうちの一つが疾患に関連した遺伝子変異とハプロタイプを組んでいる可能性が考えられ<sup>3)</sup>、また、比較的簡便かつ大量にタイピングすることが可能である。このような利点があるため、マイクロサテライトをマーカーとして選択し、解析を行った。

サルコイドーシスでは、病変部の類上皮細胞や

BAL 液中の細胞などで、IFN- $\gamma$ 、IL-12をはじめとする Th1 系サイトカインやレセプターの mRNA の発現亢進がみられること<sup>4,7)</sup> などから、これらのサイトカインは病変形成に重要な役割を担っていると考えられている。今回の解析で有意差を認めた STAT4 は、IL-12 がレセプターに結合することにより活性化され、IFN- $\gamma$  の発現を誘導する転写因子である。これまでに、サルコイドーシスとの関連について報告されたものはないが、この分子の多型が、Th1 系免疫の活性や持続に影響を与える、あるいは、細胞内殺菌能に影響を及ぼし疾患の発病に関与している可能性が示唆された。

今後、STAT4 遺伝子の多型解析を行い、STAT4 - 254 対立遺伝子と連鎖不平衡にある多型を同定し、その多型の機能的意義を検討する方針としている。また、さらに症例を集積して解析結果の再現性を確認するとともに、病型や予後などとの関連も解析する予定である。同様の手法を用い、他の候補遺伝子群について解析することも検討している。

## 参考文献

- 1) Rybicki BA, Major M, Popovich J Jr, Maliarik MJ, Iannuzzi MC. Racial differences in sarcoidosis incidence: a 5-year study in a health maintenance organization. *Am J Epidemiol* 145: 234-41, 1997
- 2) Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, Thompson BW, Rossman MD, Bresnitz EA, Terrin ML, Moller DR, Barnard J, Baughman RP, DePalo L, Hunninghake G, Johns C, Judson MA, Knatterud GL, McLennan G, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Teirstein AS, Weinberger SE, Yeager H, Cherniack R; The ACCESS Research Group. Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med* 164: 2085-91, 2001
- 3) Nakajima T, Jorde LB, Ishigami T, Umemura S, Emi M, Lalouel JM, Inoue I. Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am J Hum Genet* 70:108-23, 2002
- 4) Moller DR, Forman JD, Liu MC, Noble PW, Greenlee BM, Vyas P, Holden DA, Forrester JM,

- Lazarus A, Wysocka M, Trinchieri G, Karp C. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 156: 4952-60, 1996
- 5) Minshall EM, Tsicopoulos A, Yasrael Z, Wallaert B, Akoum H, Vorng H, Tonnel AB, Hamid Q. Cytokine mRNA gene expression in active and nonactive pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 10: 2034-9, 1997
- 6) Taha RA, Minshall EM, Olivenstein R, Ihaku D, Wallaert B, Tsicopoulos A, Tonnel AB, Damia R, Menzies D, Hamid QA. Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active pulmonary tuberculosis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1119-23, 1999
- 7) Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Takahashi R, Kon S, Okamura H, Kurimoto M, Hiraga Y, Tatsuno T, Abe S, Sato N. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN- $\gamma$  production in sarcoid lungs. *J Immunol* 166: 642-9, 2001

# 「サルコイドーシス診断指針見直しについて」に関する研究

津田 富康<sup>1\*</sup> 杉崎 勝教<sup>1</sup> 山口 哲生<sup>2</sup> 長井 苑子<sup>3</sup>  
森本紳一郎<sup>4</sup> 竹中 耐夫<sup>5</sup> 石原 麻美<sup>6</sup> 立花 暉夫<sup>7</sup>

この研究は大分医科大学内科三を訪れたサルコイドーシス患者 170 名を使い、現在使用されている「サルコイドーシス診断基準」の中の「主要項目」と「診断の基準」の項目の妥当性を検討した。その結果検査所見の項目中、ACE 活性、 $\gamma$ グロブリンは陽性頻度が低いことが解った。また組織診断が出来ないと仮定すると、気管支肺胞洗浄液検査や<sup>67</sup>Ga シンチが使用出来ない場合は患者の多くは現在使用されている診断基準では診断できなくなることも解った。即ち、臨床診断群の診断に際し気管支肺胞洗浄液検査や<sup>67</sup>Ga シンチの出来ない、呼吸器科医師を除く医師にとっては非常に診断が困難となることが理解された。

## Reevaluation of the Validity of Japanese diagnostic criteria for sarcoidosis

Tomiyasu Tsuda<sup>1</sup>, Katsunori Sugisaki<sup>1</sup>, Tetsuo Yamaguchi<sup>2</sup>, Sonoko Nagai<sup>3</sup>,  
Sinichiro Morimoto<sup>4</sup>, Shinobu Takenaka<sup>5</sup>, Mami Ishihara<sup>6</sup>, Teruo Tachibana<sup>7</sup>

*1 Third Department of Internal Medicine, Oita Medical University*

*2 Department of Chest Medicine, Japan Railway Tokyo Central Hospital*

*3 Department of Respiratory Medicine, Kyoto University*

*4 Department of Cardiology, Department of Internal Medicine, Fujita Health University, School of Medicine.*

*5 Department of Pulmonary Division, Kumamoto City Hospital.*

*6 Department of Ophthalmology, Yokohama City University, School of Medicine.*

*7 Osaka Kampo Medical Center.*

The purpose of the present study is to reevaluate the validity of the current Japanese criteria for diagnosis of sarcoidosis and assess the necessity to revise them. We especially focused on the validity of major criteria and diagnostic definition of the current criteria. The study population consisted of 170 patients who were diagnosed as sarcoidosis in the Third Department of Internal Medicine of Oita Medical University. For each Patient, clinical manifestations, laboratory findings, and radiological features were retrospectively assessed. The results showed that the frequency of patients with high serum ACE activities and of patients with high serum gamma globulin contents is markedly low, suggesting that unless BALF analysis and <sup>67</sup>Ga scintigram as well as histopathologic examination are available, most of patients with sarcoidosis could not be diagnosed with the current criteria. In other words, for patients without histologic confirmation the diagnosis of sarcoidosis is rather difficult for most physicians other than respirologist who are not able to enjoy BALF analysis and <sup>67</sup>Ga scintigram.



## はじめに

サルコイドーシスの診断基準は1989年に厚生省特定疾患「びまん性肺疾患」調査研究班、昭和63年度研究報告によって報告されて以来広く利用されてきた。しかし、この診断基準が呼吸器科専門の医師を念頭に記載されているため、肺外の他臓器病変を主訴に眼科や循環器内科等を受診したサルコイドーシス患者の場合、病理診断の確定した組織診断群を除くと、臨床診断群の患者判定が、眼科や循環器科等の医師には診断しにくいとの批判を受ける事が多くなって来た。以上のことに注目して今回は大分医科大学を受診した患者170人を対象に、現在のサルコイドーシス診断基準(1)の妥当性を検討し、今後の改訂の問題点を示すことを目的(予備調査)とした。

## 対象と方法

大分医科大学医学部付属病院呼吸器内科に訪れたサルコイドーシス患者170人を対象にサルコイドーシスの診断基準(表1)にもとづいて、初診時の臨床症状、臨床所見・検査所見、病理診断を行い、検査所見では各項目別(a~f)に従って解析し、その陽性率を検討した。以上の結果を踏まえて組織診断群と臨床診断群の従来の項目を使用して、診断率を判定した。また当科の症例が全に例組織診断がない場合を仮定し、気管支肺胞洗浄検査(BALF)と<sup>67</sup>Gaシンチ検査が各々か両方出来ないと仮定した場合の診断不可能症例について検討した。

1. 大分医科大学医学部内科学三
  2. JR 東京総合病院内科
  3. 京都大学医学研究科呼吸器病態学
  4. 藤田保健衛生大学循環器内科
  5. 熊本市市民病院呼吸器科
  6. 横浜市立大学医学部眼科
  7. 大阪簡易保健センター
- \* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

## 結 果

### 1. 主要事項

#### (1) 臨床症状

初診時の自覚症状あり群は66.1%、症状無し群は34.9%で現在の我が国の症例の自覚症状の頻度(2)と同じであった。

#### (2) 臨床所見・検査所見

##### ①胸郭内病変

胸郭内病変ありが147:86.5%で、胸郭外病変ありが132:75%であった。胸郭内病変の内訳は胸部X線・CT所見上有所見率は87.2%で、病期分類は表2に示す。肺機能所見の異常者は0.9%であり肺機能異常者は少ない。気管支鏡所見は粘膜下血管のnetwork formationは高頻度に認められるが、結節を認める頻度は少ない。気管支肺胞洗浄所見は③検査所見の項でのべる。胸腔鏡所見は当科では行われていない。

##### ②郭外病変

胸郭外病変(他臓器病変)は当科では眼病変(59.4%)、皮膚病変(18.2%)、神経(11.2%)・筋病変(9.4%)、心病変(15.9%)、腎病変(1.2%)・高Ca血症(4.1%)、骨病変(2.9%)の順で多く認められる。その他は稀である。

##### ③検査所見

検査所見の各項目の陽性率を表3に示す。

血清ACE高値、 $\gamma$ グロブリン高値の頻度が極端に低値である。

#### (3) 病理組織学的所見

病理組織学的に非乾酪性類上皮細胞肉芽腫をいずれかの臓器にて認めた症例は87.6%であった。

### 2. 参考事項

参考事項については改訂上、特に問題とはならないので今回は解析の対象とはしなかった。

### 3. 診断の基準

①組織診断群(确实) 当科の症例170例中149例で87.6%を示した。

これらの症例群は診断の基準①の条件をみたしていた。

②臨床診断群(ほぼ确实) 当科の症例170例中15例で8.8%であった。

表1 サルコイドーシスの診断基準

## 1 主要事項

### (1) 臨床症状

呼吸器症状(咳・息切れ), 眼症状(霧視), 皮膚症状(丘疹)など.

### (2) 臨床所見・検査所見

#### ① 胸郭内病変

- (a) 胸部 X 線・CT 所見(両側肺門リンパ節腫脹 BHL, びまん性陰影, 血管・胸膜の変化など)
- (b) 肺機能所見(%VC・DLco・PaO<sub>2</sub>の低下)
- (c) 気管支鏡所見(粘膜下血管の network formation, 結節など)
- (d) 気管支肺胞洗浄液所見 ※1(総細胞数・リンパ球の増加, CD4/8 上昇)
- (e) 胸腔鏡所見(結節, 肥厚, 胸水など)

#### ② 胸郭外病変

- (a) 眼病変 ※2(前部ぶどう膜炎, 隅角結節, 網膜血管周囲炎など)
- (b) 皮膚病変(結節, 局面, びまん性浸潤, 皮下結節, 癬痕浸潤)
- (c) 表在リンパ節病変(無痛性腫脹)
- (d) 心病変 ※3(伝導障害, 期外収縮, 心筋障害など)
- (e) 唾液腺病変(耳下腺腫脹, 角結膜乾燥, 涙腺病変など)
- (f) 神経系病変(脳神経, 中枢神経障害など)
- (g) 肝病変(黄疸, 肝機能上昇, 結節など)
- (h) 骨病変(手足短骨の骨梁脱落など)
- (i) 脾病変(腫脹など)
- (j) 筋病変(腫瘍, 筋肉低下, 萎縮など)
- (k) 腎病変(持続性蛋白尿, 高カルシウム血症, 結石など)
- (l) 胃病変(胃壁肥厚, ポリープなど)

#### ③ 検査所見

- (a) ツベルクリン反応 陰性
- (b) γグロブリン 上昇
- (c) 血清 ACE 上昇
- (d) 血清リゾチーム 上昇
- (e) <sup>67</sup>Ga 集積像 陽性(リンパ節, 肺など)
- (f) 気管支肺胞洗浄液の総細胞数・リンパ球増加, CD4/8 上昇  
※1 気管支肺胞洗浄所見については喫煙歴を考慮する。  
※2・3 眼・心サルコイドーシスについては別に診断の手引き(1巻参照)を参考とする。

### (3) 病理組織学的所見

類上皮細胞からなる乾酪性壊死を伴わない肉芽種病変  
生検部位(リンパ節, 経気管支肺性検 TBLB, 気管支壁, 皮膚, 肝, 筋肉, 心筋, 結膜など).  
クベイム反応も参考になる.

## 2 参考事項

- ① 無自覚で集団検診により胸部 X 線所見から発見されることが多い.
- ② 霧視などの眼症状で発見されることが多い.
- ③ ときに家族発生がみられる.
- ④ 心病変にて突然死することがある.
- ⑤ ステロイド治療の適応には慎重を要する.
- ⑥ 結核菌培養も同時に行うことが肝要である.

## 3 診断の基準

- ① 組織診断群(確実): 1-(2)のいずれかの臨床・検査所見があり, 1-(3)が陽性.
- ② 臨床診断群(ほぼ確実): 1-(2)①, ②のいずれかの臨床所見があり, 1-(2)③の(a)(ツベルクリン反応)又は(c)(血清 ACE)を含む3項目以上陽性.

## 4 除外規定

- ① 原因既知あるいは別の病態の疾患. 例えば悪性リンパ腫, 結核, 肺癌(癌性リンパ管症), ベリリウム肺, じん肺, 過敏性肺炎など.
- ② 異物, 癌等によるサルコイド局所反応.

またこれら症例群は診断の基準②の条件をみたしていた。

③疑診断群以上の診断基準に当てはまらない症例が6例(3.5%)あった。

以上より当科の症例の判定にあたっては特に診断の基準②は仮に血清 ACE 値が低値でかつグロブリンが低値であっても、その他の項目で3項目以上が陽性で臨床診断が可能であった。しかし、組織診断が出来ない施設では臨床診断に頼る必要が起こる。その場合<sup>67</sup>Ga シンチ検査か気管支肺胞洗浄検査が出来ないかまたは両検査が出来ない施設では③検査所見(a)～(d)に頼らなければいけない場合には3項目は非常に診断の判定が困難な症例が多く出現してくることが理解された。当科の170例の症例を組織診断がないと仮定し<sup>67</sup>Ga シンチ検査が出来ないと仮定すると111症例(65.2%)は診断できなくなる。また気管支肺胞洗浄検査が出来ない場合は78症例(45.8%)が診断出来なくなる。その上、

表2 当科における初診時胸部X線所見

Wurm-Heilmeyer 分類 (期)	n	%	男/女
0	23	13.5	1/22
I	65	38.2	21/44
II	69	40.6	18/51
III	13	7.6	5/8

表3 サルコイドーシス診断基準の各検査所見

(a) ツベルクリン反応	陰性	68.8%
(b) $\gamma$ グロブリン	>1.5	10%
(c) ACE 活性	>21.5	33.5%
(d) リゾチーム	>11	67.3%
(e) <sup>67</sup> Ga 集積像	陽性	96.8%
(f) 気管支肺胞洗浄液所見		
1) 総細胞数	>2x10 <sup>5</sup>	63.6%
2) リンパ球比率	>10%	81.8%
3) CD4/8	>3.0	72.8%

上記の両検査が出来ない場合は134症例(78.8%)の診断が出来なくなる。このことは呼吸器科の医師以外の一般の医師の診断にとって重大な条件設定の歪みと考えられる。しかし、このような疾患の診断は専門医との共同作業が必須だとの立場を認めれば、また当然の結果かも知れない。

## 考 案

現在サルコイドーシス診断基準が問題となっているのは、専門家がない場合でも診断できるための基準を如何に作るかという問題である。現在あるサルコイドーシス診断基準は呼吸器専門医として考える場合は十分過ぎる項目を備えた完璧な基準と考えることができる。今回の結果が示すごとく ACE や  $\gamma$ グロブリンはその他の項目に比し陽性率は極端に低い。ACE は最近では ACE 遺伝子多型 (3) と関連しその活性が変動することが明らかとなっているので、遺伝子解析を行って、正常値の判定を各型 (II 型, ID 型, DD 型) に従い判定し直す必要があるが、しかし一般の医師レベルでは実用性が低い。一方  $\gamma$ グロブリンは欧米諸国とは異なり我が国では陽性率は極端に少なく判定基準に入れるべきではないとも考えられる。

現在のサルコイドーシス診断基準でもう一つ問題となる点は「3 診断の基準」を利用して診断を行う際に、組織診断群(確実)は問題ないが、臨床診断群(ほぼ確実)の診断は胸郭内病変か胸郭外病変のいずれかをもち「③検査所見」のツベルクリン反応または、血清 ACE を含む3項目以上が陽性であることが要求されている点である。即ち、血清 ACE と  $\gamma$ グロブリンの陽性率が低いことと、気管支肺胞洗浄 (BALF) 検査は呼吸器専門医以外の人には検査が難しく出来ないことを考えると、呼吸器科医師以外の人には検査項目から3項目を選ぶことはほぼ不可能である。即ち、呼吸器科医師以外にはサルコイドー

シスの診断，特に臨床診断群の判定は出来ないことになる。しかし実際には眼科病変を主訴に病院を受診する患者は全体の 30 - 40% を占めている。本研究の意図は一般の医師で，高度の検査をしなくても（必要であれば精密検査は必要だが）的確にサルコイドーシスの診断が出来るような「診断の基準」を作ることが必要である。

例えば以下のように改正することもできる。即ち，現在のサルコイドーシス診断基準（1989 年）の「3 診断の基準」から③検査所見より  $\gamma$  グロブリンの項目を除くことを前提として以下のように考えてみる。

### 3 診断の基準

#### (3) 組織診断群（確実）：

1 - (2) のいずれかの臨床・検査所見があり，1 - (3) が陽性。

#### (4) 臨床診断群（ほぼ確実）：

1 - (2) ①，②のいずれかの臨床所見があり，1 - (2) ③の (a)（ツベルクリン反応）又は (c)（血清 ACE）を含む 2 項目以上陽性。または 1 - (2) ②のいずれかの臨床所見があり，1 - (2) ③の (d)  $^{67}\text{Ga}$  集積）か (e)（気管支肺胞洗浄液）を含む 2 項目以上陽性。

以上の基準で判定すると当科で診断し得なかった現在の確定診断と臨床診断群からはみだした 6 例のサルコイドーシス症例は 4 例が診断できることになる。

## 結 論

以上の結果をもとに診断基準の改訂を行うことは各臓器の診断基準（眼サルコイドーシスの診断の手引き (4)，心臓サルコイドーシスの診断の手引き (5)）との整合性を考えると早急には出来ない。しかし上記の改正点を各分野の専門家に検討をお願いして，近い将来に呼吸器科専門医師以外の医師でも，サルコイドーシスの診断が出来易くすることが望ましい。

## 参考文献

- 1) 平賀洋明：サルコイドーシス分科会報告。厚生省特定疾患「びまん性肺疾患」調査研究班，昭和 63 年度研究報告書，p13，1989。
- 2) 安藤正幸：日本におけるサルコイドーシスの疫学動態。日本臨床 52:25-29，1994。
- 3) 古家 乾，川上義和：サルコイドーシスと ACE 遺伝子多型。医学のあゆみ 178:56-70，1996。
- 4) 平賀洋明：サルコイドーシス分科会報告。厚生省特定疾患「びまん性肺疾患」調査研究班，平成元年度研究報告書，p.23-24，1990。
- 5) 平賀洋明，岩井和男，広江道昭，大森文夫，関口守衛，立花輝夫，高田勝利，山本正彦，矢崎善一：心サルコイドーシス診断の手引き - 1992 - 製作の経過について。厚生省特定疾患「びまん性肺疾患」調査研究班，平成 4 年度報告書，p.23-24，1993。