

Table 3 Lymphoproliferative response and serum levels of IgG, IgA, and IgM to RP35 and *P. acnes* in primed and unprimed mice sensitized with RP35 and *P. acnes*, examined 3 weeks after the first treatment

Priming	Antigen	Gra.*	n	Response (SI) to:		IgG antibodies to:		IgA antibodies to:		IgM antibodies to:	
				RP35	<i>P. acnes</i>	RP35	<i>P. acnes</i>	RP35	<i>P. acnes</i>	RP35	<i>P. acnes</i>
Done	RP35	+	1	48.4 ^a	7.5 ^a	177 ^r	145	1	11	26 ^b	132 ^b
			3	(41.8, 74.5)	(4.0, 9.0)	(123, 466)	(119, 173)	(0, 2)	(11, 14)	(15, 39)	(118, 151)
Done	RP35	-	1	44.6 ^c	7.3 ^c	418 ^a	103	< 1	9	29 ^d	137 ^d
			0	(34.3, 48.4)	(5.7, 9.4)	(233, 514)	(97, 159)		(9, 16)	(14, 41)	(102, 157)
Done	<i>P. acnes</i>	+	1	5.3	9.4	3 ^e	259 ^e	< 1	12	4 ^f	165 ^f
			4	(3.4, 6.0)	(8.8, 10.1)	(1, 4)	(250, 288)		(9, 15)	(1, 11)	(117, 174)
Done	<i>P. acnes</i>	-	1	8.3	10.7	< 1 ^g	246 ^f	< 1	9	5 ^h	115 ^h
			1	(6.0, 9.7)	(9.8, 11.5)		(241, 354)		(9, 12)	(2, 6)	(95, 153)
Not done	RP35	+	1	86.1 ⁱ	9.6 ⁱ	312 ⁱ	17 ⁱ	2	8	20	21
			8	(76.5, 97.2)	(6.0, 11.6)	(276, 388)	(10, 37)	(2, 2)	(7, 8)	(12, 30)	(19, 32)
Not done	RP35	-	1	74.6 ^j	9.0 ^j	337 ^u	13 ^j	2	6	7	19
			8	(38.6, 92.1)	(4.3, 21.2)	(313, 382)	(9, 18)	(1, 4)	(4, 8)	(5, 11)	(12, 34)
Not done	<i>P. acnes</i>	+	1	3.5	6.0	< 1 ^m	123 ^m	< 1	9	< 1 ^o	88 ^o
			6	(2.8, 4.9)	(3.9, 7.2)		(97, 152)		(8, 9)		(51, 121)
Not done	<i>P. acnes</i>	-	1	9.0	11.1	< 1 ⁿ	168 ^p	< 1	10	2 ^q	86 ^q
			0	(8.2, 9.8)	(8.3, 13.1)		(118, 193)		(7, 11)	(0, 4)	(66, 104)

* Granuloma formation detected in the lungs. The stimulation index (SI) and levels of antibodies (counts per second) are expressed as medians, with 25th and 75th percentiles in parentheses. Values for the levels of antibodies are to be multiplied by 10³. The p-values of a to u were less than 0.001. Kruskal-Wallis test for overall differences; Mann-Whitney U-test with Bonferroni's correction used to evaluate any significant differences found (here, p < 0.0018 was taken to be significant).

点から取り扱えるものと考えられる。感作免疫に用いられる抗原蛋白は、EAE の場合は myelin basic protein, EAT の場合は thyroglobulin といずれも自己抗原が用いられているが、アジュバント関節炎では結核菌の heat shock protein (hsp60) が用いられており、今回の肺肉芽腫モデルにおける *P. acnes* trigger factor とは極めて近い関係にある疾患モデルと考えられる。これらの実験モデルにおいては、感作免疫に用いた抗原と交差反応性を有する自己抗原を有する臓器に特異的にリンパ球浸潤やときに肉芽腫形成が認められるが、今回の *P. acnes* trigger factor を CFA とともに免疫して誘導される肺肉芽腫症においては、肺に普遍的に存在する自己抗原を標的としているというよりむしろ、肺に常在感染している *P. acnes* を標的として肉芽腫性免疫反応が生じている可能性が高い。そのひとつの理由として、今回の実験系では感作抗原に対する細胞性免疫も液性免疫が十分に上昇しているにもかかわらず肉芽腫形成がまったく認められないマウスが半数以上存在したからである。また、今回行った菌の培養はコンタミネーションをさけるために実験群ではない正常マウスで行なっているが、正常マウスの菌培養検出率と免疫したマウスでの肉芽腫形成率がほ

ぼ一致することより、RP35 や *P. acnes* を免疫して肺に肉芽腫が形成されたマウスでは、感作免疫開始以前においてすでに肺に *P. acnes* が常在感染していた可能性が高い。

ヒトの末梢肺組織や肺門部リンパ節からも約半数の症例で本菌が培養可能であり他の細菌類はほとんど検出されないこと (平成 14 年度班研究報告内容) から、*P. acnes* はこれらの組織に常在感染している可能性が高い。宿主の本菌に対する過敏性免疫反応が素因となりサルコイドーシスが発症しているのであれば、本実験系をサルコイドーシスの実験モデルとみなすことができる。細胞内細菌に有効な抗生剤による除菌処置が、本実験モデルにおける肺肉芽腫の形成を防止できる可能性もあり、現在その解析が進行中である。

細菌の trigger factor の機能に関しては徐々にわかりつつある¹³⁾。リボゾーム内で mRNA の遺伝子情報をもとに合成される蛋白質は、リボゾーム内の L29 や L23 蛋白部分と結合した trigger factor 蛋白の folding 機能により、それぞれのアミノ酸配列に特有の立体構造を獲得する。trigger factor が発見される以前では、大腸菌の hsp60 family である GroEL や、DnaK, DnaJ な

どのシャペロン蛋白の機能が重要と考えられてきたが、これらのシャペロン蛋白の働きは、いずれにおいても trigger factor による spontaneous folding のあとに機能する二次的な働きであり、細胞内で合成される蛋白質の多くは、trigger factor の機能だけで立体構造を獲得しうるものと考えられるようになってきた。hsp60 ファミリーは、マイコバクテリア感染症などの肉芽腫性疾患において主要な免疫原となったり、また先ほど紹介したアジュバント関節炎における責任抗原であることも分かっている。これらのシャペロン蛋白と同様な機能を有し、しかもその機能においては hsp60 よりも重要かつ普遍的な役割を有する trigger factor が、肉芽腫性疾患であるサルコイドーシスにおいてなんらかの病因的役割を果たしている可能性は高いと考えらる。

今回の研究により、*P. acnes* による肉芽腫形成の責任抗原の1つが *P. acnes* trigger factor (RP35) であることが判明した。サ症患者のなかに *P. acnes* trigger factor に対して過敏性免疫反応性がある人が存在することまでは判明しているがそのメカニズムについては未だ不明のままである。今後、本抗原蛋白に対する反応性を規定している宿主側の要因 (HLA や免疫関連遺伝子における多型) や菌側の要因 (trigger factor 蛋白翻訳領域における遺伝子多型) などを明らかにしていく必要がある。

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 Bakteriologie 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) 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.
- 5) Yamada T, Eishi Y, Ikeda S, et al. In situ localization of Propionibacterium acnes DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. J Pathol 2002; 198: 541-547.
- 6) Siltzbach LE. The Kveim test in sarcoidosis. JAMA 1961; 178: 476-482.
- 7) 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.
- 8) Yi ES, Lee H, Suh YK, et al. Experimental extrinsic allergic alveolitis and pulmonary angiitis induced by intratracheal or intravenous challenge with Corynebacterium parvum in sensitized rats. Am J Pathol 1996; 149: 1303-1312.
- 9) Ichiyasu H, Suga M, Iyonaga K, Ando M. Role of monocyte chemoattractant protein-1 in Propionibacterium acnes-induced pulmonary granulomatosis. Microsc Res Tech 2001; 53: 288-297.
- 10) Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lesson in T-cell immunology and autoreactivity. Immunol Rev 2001; 184: 129-135.
- 11) Goulvestre C, Batteux F, Charreire J. Chemokines modulate experimental autoimmune thyroiditis through attraction of autoreactive or regulatory T cells. Eur J Immunol 2002; 32: 3435-3442.
- 12) Von Eden W, Waksman BH. Immune regulation in adjuvant-induced arthritis: possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis. Arthritis Rheum. 2003; 48: 1788-1796.
- 13) Craig EA, Eisenman HC, Hundley HA. Ribosome-tethered molecular chaperones: the first line of defense against protein misfolding. Curr Opin Microbiol 2003; 6: 157-162.

抗酸菌感染症における Th1 サイトカインの血清中濃度

杉崎 勝教*

抗酸菌感染症の患者の抹消血中の Th1 サイトカインの濃度を測定し、サルコイドーシス（サ症）患者や正常人と比較した。その結果抗酸菌感染症では正常人に比べ血清中 IL-12p40 の濃度が有意に高値であった。また血清中 IL-12p40 濃度が抗酸菌感染症に比べサ症患者で高くなる傾向が認められた。Th1 優位の疾患では一般的に抹消血中の IL-12p40 や IL-18 などの Th1 サイトカインが高値になることが示された。サ症では Th1 へのシフトがより強く起こっていることが示唆された。

The Serum Concentration of Th1 Cytokines in Mycobacterial Infectious Diseases

Katsunori Sugisaki

Department of Internal Medicine, Nishibeppu National Hospital

We examined the serum concentration of IL-12p40 and IL-18 in the patients with mycobacterial infection, and compared with those in sarcoidosis patients and normal controls. The results showed that the concentration of IL-12p40 increased significantly in mycobacterial infection, compared with normal controls. On the other hand, the concentration of IL-12p40 in sarcoidosis patients was higher than that in the patients with mycobacterial infections. Those results suggest that Th1 cytokines increase in several diseases with Th1 mediated diseases, but Th1 deviation is stronger in sarcoidosis patients.

研究目的

前回サルコイドーシス (サ症) 患者における血清中 Th1 サイトカイン, IL-12p40 と IL-18 について測定しこれらが正常人コントロールに比べいずれも有意に増加していること, また血清 ACE も含め相互に正の相関関係があることを報告した. こうした Th1 サイトカインは肉芽腫形成を伴う他の代表的疾患である抗酸菌感染症においても当然増加していることが予想され, また疾患の活動性や重症度との関連に興味を持たれる. 今回肺結核の患者 8 名, 非結核性抗酸菌症の患者 5 名の計 13 名について血清中 IL-12p40 と IL-18 を測定しサ症患者及び正常人の値と比較した.

対象と方法

肺結核の患者および非結核性抗酸菌症の患者について入院時の血清を採取して保存しておき一括し以下の測定を行った. すなわち血清中の IL-12p40 および IL-18 について ELISA 法を用いて測定した. IL-12p40 については R&D 社の, IL-18 については BML 社の測定キットを使用した. またサ症患者 30 名, 正常コントロール 20 名についても同様の検査を行い結果を比較した. 各症例の概要を表 1 に示した. 結核患者は全例塗抹陽性の活動性の肺結核であった. また非結核性抗酸菌症は全例 MAC 症であった. これらの MAC 症 5 例のうち 4 例はすでに他院で治療されていたが効果不良のため当院に入院した患者であった.

Table 1 Characteristics of patients

	Cases	M/F	Age
Mycobacterial infections	13	8/5	66±15
Tuberculosis (TB)	8	7/1	
Non-tuberculous (NTMI)	5	1/4	
Sarcoidosis	30	10/20	54±15
Normal controls	20	10/10	31±8

国立療養所西別府病院 内科

* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

結 果

抗酸菌感染症と正常コントロールを比較した場合血清中 IL-12p40 が有意に抗酸菌感染症群で高値であった. 一方血清中 IL-18 については一部で非常に高くなったがばらつきが大きく有意差がでなかった (図 1). 次に IL-12p40 についてサルコイドーシス患者と抗酸菌感染症を比較したところサ症群でやや高値となる傾向があった (図 2). 抗酸菌感染症についてさらに非結核性抗酸菌症と結核の血清中 IL-12p40 の濃度を比較したが有意差を認めなかった.

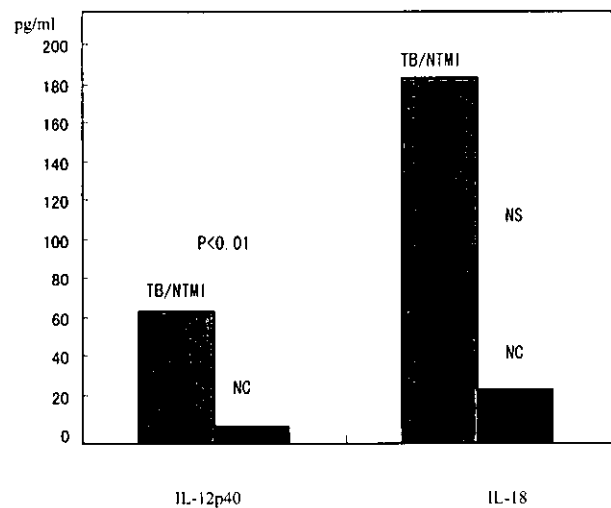


Figure 1 The serum concentration of IL-12p40 and IL-18 in the patients with mycobacterial infections and normal controls.

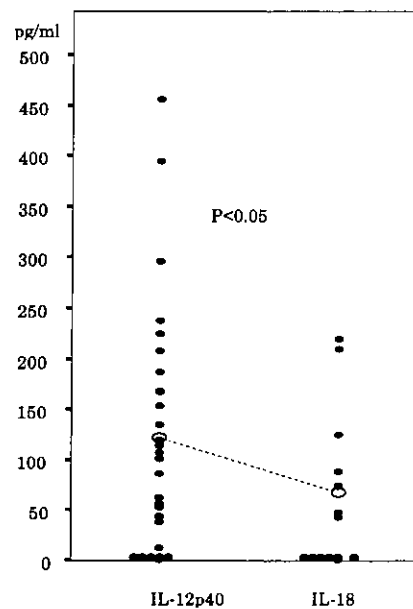


Figure 2 The serum concentration of IL-12p40 in the patients with mycobacterial infections and sarcoidosis.

考案と結論

抗酸菌感染症では病巣局所においてTh1系のサイトカインが優位に産生されていることが知られている¹⁻³⁾。しかし患者の抹消血におけるこうしたTh1サイトカインの動態や臨床的な意味づけについてはあきらかではない。今回正常コントロールとの比較においてIL-12p40が高値となったことから抗酸菌感染症では抹消血のレベルでもTh1に傾いていると考えられる。当然サ症では高値となっておりこうした疾患においては抹消血レベルでTh1優位な状態にあることが病態を反映していることが予想される。サ症においては血清中IL-12p40やIL-18の濃度が血清ACEと相関することをすでにわれわれが報告しており⁴⁾、疾患活動性の重要なマーカーのひとつと考えられる。一方今回抗酸菌感染症について検討をおこなった結果こうした血清中Th1サイトカインの増加はTh1優位と考えられる他の疾患にも一般的に認められる現象であることが確認された。またサ症ではより強いTh1へのシフトが起こっていることが示唆された。

参考文献

- 1) Giacomini E, Iona E, Marone Bianco A, et al: Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with Mycobacterium Tuberculosis Induces a Differential Cytokine Gene Expression That Modulates T Cell Response, *J Immunol*, 166: 7033-7041, 2001.
- 2) Morosini M, Meloni F, Ferroni L, et al: The assessment of IFN-gamma and its regulatory cytokine: in the plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with active pulmonary tuberculosis, *Int J Tuberc Lung Dis*, 7: 994-1000, 2003.
- 3) Hiraki A, Aoe K, Matsuo K, et al: Simultaneous measurement of T-helper 1 cytokines in tuberculous pleural effusion, *Int J Tuberc Lung Dis*, 7: 1172-1177, 2003.
- 4) 杉崎勝教, 津田富康: サルコイドーシス患者血清におけるIL-12, IL-18濃度と疾患活動性について, 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14年度研究報告書 p. 193-195, 2003.

サルコイドーシスにおける IL-18 遺伝子多型の意義

山口 悦郎*

IL-18 は IL-12 とともに IFN- γ を誘導することにより、サルコイドーシスにおいて重要な役割を果たしているため、疾患感受性ないし疾患修飾遺伝子の有力な候補である。我々は今回の検討で IL-18 遺伝子プロモーター領域の 3 つの一塩基多型 (SNP), -137 (G/C), -607 (C/A), -656 (G/T) の役割を検討した。176 名の対照者と 161 名の患者間で、-137 と -656 の二つの SNP の遺伝子型や対立遺伝子の頻度に有意差を認めなかった。しかし、-607 と -656 多型は有意にサルコイドーシス患者血清 IL-18 濃度と相関していた。サルコイドーシスでは 3 つの SNP を同定したが、それらの間には連鎖不平衡が成立しており、そのハプロタイプの推定値をサルコイドーシス患者について求めた。その中で 2 つの主要なハプロタイプを含むプロモーター領域配列を、ルシフェラーゼレポーターベクターに挿入し、細胞株 THP-1 を用いてプロモーター活性を測定した。その結果、主要ハプロタイプ -137G/-607C/-656G は酪酸ナトリウム刺激下において、もう一つの主要ハプロタイプである -137G/-607A/-656T に比して、プロモーター活性が高かった。これは血清の IL-18 濃度が高い遺伝子型と符合していた。-607 と -656 の遺伝子型のうちヘテロ個体は、他の二つのホモ個体に比して有意に臨床経過が遷延していた。一方、喫煙者は非喫煙者および過去喫煙者に比して有意に臨床経過が短縮していた。二つの因子で患者群を 4 群に分けると、より明瞭に臨床経過の差異を示すことができた。以上のように、今回の検討は SNP のハプロタイプによる IL-18 遺伝子プロモーター活性の相違に基づく蛋白発現の違いにより、サルコイドーシスの臨床像が異なり、それがまた喫煙など外因の影響をも受けることを示した。

The roles of IL-18 gene polymorphism in sarcoidosis

Etsuro Yamaguchi

Division of Respiratory Medicine and Allergology, Department of Internal Medicine, Aichi Medical University

Interleukin-18 (IL-18) plays important roles in sarcoidosis by inducing interferon- γ in synergy with IL-12, and is thus a strong candidate for disease susceptibility and/or disease-modifying gene. We investigated the roles of three single nucleotide polymorphisms (SNPs), -137 (G/C), -607 (C/A), and -656 (G/T), in the promoter region of the IL-18 gene in sarcoidosis. There was no significant difference in the genotype distribution or allele frequency of SNPs at -137 and -656 between 176 healthy controls and 161 patients with sarcoidosis. However, -607 (C/A) and -656 (G/T) was significantly associated with serum concentrations of IL-18 in sarcoidosis. A SNP at -607 was typed in patients, and a linkage disequilibrium among three SNPs was noted. The haplotype frequencies were estimated. The promoter activity of one of the most frequent haplotypes -137G/-607C/-656G measured in a sodium butyrate-stimulated THP-1 cell line was significantly higher than that of another frequent haplotype -137G/-607A/-656T. Meanwhile, heterozygous genotype at -607 and -656 was associated with the more prolonged clinical course of sarcoidosis than homozygous genotypes. Smoking status was also associated with clinical course of sarcoidosis, with current smokers having a more favorable course than the others. When patients were divided into four groups according to IL-18 gene polymorphism and smoking status, this grouping better discriminated clinical courses. Our results indicate that differences in the promoter activity of the IL-18 gene according to haplotypes underlie altered protein expression leading to the phenotypic variations of sarcoidosis. Smoking is an important confounding factor of genetic components that affect clinical manifestations of sarcoidosis.

はじめに

多くのサイトカインはいわゆるサイトカインネットワークの一部であり、その上流あるいは下流に他の多くのサイトカインが位置している。日本人によって発見された IL-18 は、その意味では IFN- γ の上流に位置する。すなわち IL-18 は IL-12 と共存下で強力な IFN- γ 産生誘導を起こす¹⁾。IFN- γ 以外にサルコイドーシスでは TNF- α や GM-CSF などの発現も上昇しており、またアポトーシスに関与している FAS リガンドの発現も亢進している。これらの現象は少なくとも部分的には IL-18 が誘導し得る。実際サルコイドーシスにおいては、血清中や気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の IL-18 濃度が上昇している (図 1)。したがって IL-18 はサルコイドーシスの病態で重要な役割を果たしていると言える。

サルコイドーシスの家族発症例は、一般にまれである。しかしサルコイドーシスは弱いながらも家族集積性があり、遺伝素因が存在する²⁾。これまでサルコイドーシスの遺伝素因研究は、HLA に関する報告が大部分を占めている³⁻⁵⁾。しかし、近年サイトカインに関する研究もいくつか存在する。実際我々は、TNF- β や

ケモカイン受容体遺伝子多型とサルコイドーシスの関連を報告している^{6,7)}。

IL-18 にはそのプロモーター領域に 3 つの一塩基多型 (SNP) が存在する (図 2)。そのひとつは IL-18mRNA と IFN- γ 産生との有意な相関と関連しているとの報告がある⁸⁾。前述のようなサルコイドーシスにおける IL-18 の役割を考えると、その SNP がサルコイドーシスの発症や病像に影響を与える可能性がある。そこで症例・対照研究によりその可能性を検証した。

対象と方法

対象は 161 人のサルコイドーシス患者と 176 名の健常対象者である。サルコイドーシス患者は全員厚生労働省の特定疾患の診断基準を満たす。健常者は健診受診者の中から異常所見の無い対象者を選んだ。本研究は北海道大学医学研究科の倫理委員会にて承認されている。

IL-18 の SNP の同定は、表 1 に示すプライマーを用いて ABI7700 (Applied Biosystems 社) によりリアルタイム PCR を行い、増幅効率の差異からアレルを同

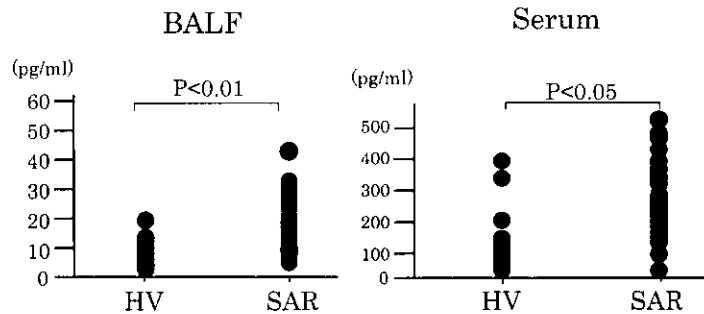


Figure 1. IL-18 levels in BALF and serum
HV, healthy volunteers; Sar, sarcoidosis

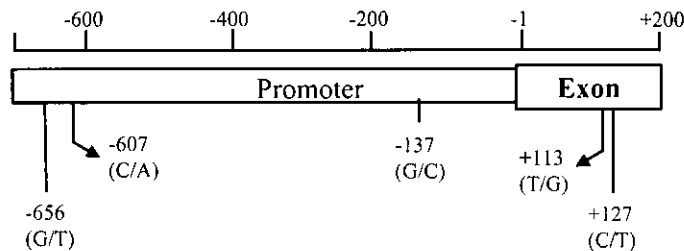


Figure 2. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IL-18 gene promoter. Those in the exon belong to silent mutations.

愛知医科大学呼吸器・アレルギー内科

* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

Table 1. Primer sequences for amplification refractory mutation system

	forward primer	reverse primer
-137 (G/C)	5'-CCCAACTTTTACGGAAGAAAAG-3' 5'-CCCAACTTTTACGGAAGAAAAC-3'	5'-GAAGTCGAAATAAAGTGGCAGAGG-3'
-607 (C/A)	5'-AGCTTACTTTCTGTTCAGAAAAGTGT-3'	5'-ACCGATACCATCATTAGAATTTTATG-3' 5'-ACCGATACCATCATTAGAATTTTATT-3'
-656 (G/T)	5'-GCCCTCTACCTGAATTTTGGAAAG-3' 5'-GCCCTCTACCTGAATTTTGGAAAT-3'	5'-CAGATGCAAGCCACACCGA-3'

定する ARMS 法 (amplification refractory mutation system) によった。IL-18 濃度は、MBL 社の ELISA キットで測定した。

IL-18 多型によるプロモーター活性の相違は、luciferase reporter vector を用いた luciferase assay 法によった。すなわち Promega 社の pGL3 basic ベクターの multiple cloning site の *Xho* I と *Kpn* I 間に、後述の 2 種類の主要ハプロタイプを持つ IL-18 プロモーター遺伝子配列を挿入し、ヒト単球性白血病細胞株である THP-1 に形質移入した。2 mM の酪酸ナトリウムの存在下あるいは非存在下で 24 時間培養後に THP-1 を回収し、Promega 社の Dual Luciferase Assay kit を用いて化学発光量を測定した。形質移入効率のコントロールとして pRL-tk ベクターの化学発光強度に対する pGL3 basic 由来の化学発光強度の比でプロモーター活性を評価した。

サルコイドーシス患者の臨床経過の評価は、少なくとも 3~6ヶ月毎に胸部 X 線写真、一般血液所見、血清 ACE 活性、眼科所見、皮膚所見を評価し、それらすべてが正常ないし無所見となった時点を臨床的寛解とした。

統計学的解析について、遺伝子型やアリル頻度の差異の検定は χ^2 分析とロジスティック解析によった。臨床経過については Cox の比例ハザードモデルで、ハプロタイプの推定は Terwilliger と Ott らの方法により⁹⁾、連鎖不平衡係数は Hill らの D_s を用いた¹⁰⁾。

結 果

-607 と -656 の SNP は位置的に近接しているので高度の連鎖不平衡があり、臨床的意義は同等と考えられたので、当初、-137 と -656 のタイピングを患者と対照について行った。その結果、両多型について、 χ^2 乗検定では両群間で遺伝子型頻度や対立遺伝子頻度に

Table 2. Genotype distribution and allele frequencies of IL-18 polymorphism*

-137 (G/C)

	Genotype			Total	p value [†]
	GG	GC	CC		
Controls	140 (79%)	31 (18%)	5 (3%)	176 (100%)	0.105
Sarcoidosis	136 (85%)	17 (11%)	7 (4%)	161 (100%)	

-656 (G/T)

	Genotype			Total	p value [†]
	GG	GT	TT		
Controls	32 (18%)	88 (50%)	56 (32%)	176 (100%)	0.847
Sarcoidosis	32 (20%)	82 (51%)	47 (29%)	161 (100%)	

Allele frequency

	-137		-656	
	G	C	G	T
Controls	311 (88)	41 (12)	152 (43)	200 (57)
Sarcoidosis	289 (90)	31 (10)	146 (45)	176 (55)
p value [†]	0.673		0.573	

*Data are numbers of subjects (percentage) or chromosomes (percentage).

[†]P values by the chi-square test.

有意差を認めなかった (表 2)。またロジスティック回帰分析にも有意な相関を認めなかった (-137 (G/C) に関してオッズ比 0.898, 95% C.I., 0.572-1.408, $p=0.639$, -656 (G/T) に関して 0.919, 95% C.I., 0.666-1.266, $p=0.604$)。したがって二つの多型がサルコイドーシスの発症に関連しているとの結果は得られなかった。

72 名の患者と 64 名の対照において血清の IL-18 濃度を測定した。その結果、サルコイドーシス患者においてのみ -656 (G/T) と血清濃度に有意な相関を認め、遺伝子型 GG, GT, TT の順に高かった (図 3)。-137 (G/C) については、両群とも有意な相関は示さなかった。

サルコイドーシス患者において、-607 (C/A) のタイピングも行い、連鎖不平衡係数 (D_s) を求めた。その結果、-137 (G/C) と -607 (C/A) 間では 0.709, -137 (G/C) と -656 (G/T) 間では 0.818, -607 (C/A) と -656 (G/T) 間では 0.986 であった。また連鎖不平衡を仮定した場合とそうではない場合で、実際の遺伝

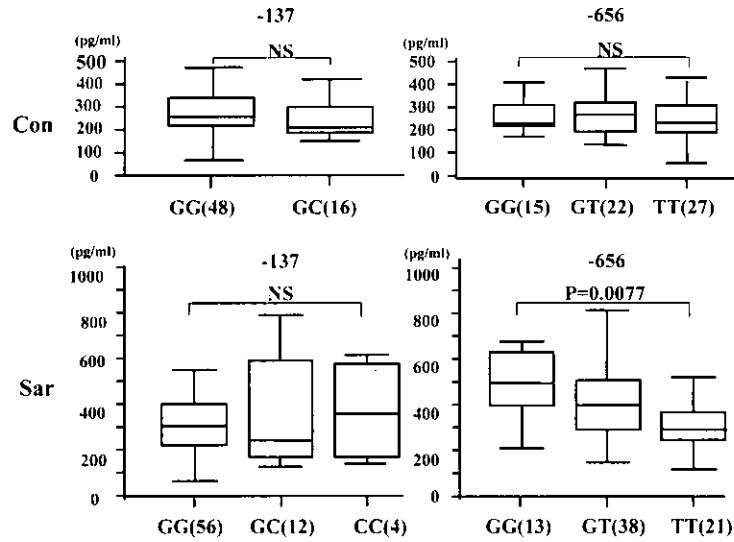


Figure 3. IL-18 genotypes and serum IL-18 levels
Figures in parentheses are the number of subjects.

Table 3. Estimated haplotype frequencies of the IL-18 gene promoter polymorphisms in sarcoidosis

Positions of SNP			assuming independence	assuming linkage
-137	-607	-656		
G	C	G	0.173722	0.417746
G	C	T	0.223754	0.014038
G	A	G	0.214438	0.003548
G	A	T	0.276197	0.452780
C	C	G	0.021886	0.015769
C	C	T	0.028190	0.000000
C	A	G	0.027016	0.000000
C	A	T	0.034796	0.096119

There were highly significant evidence for linkage disequilibrium among SNPs (chi square=259.3. df=4, p=0.0001)

子型分布への当てはまりのよさを検討したところ明らかに前者が高度に有意であった(表3)。また-137G/-607C/-656Gと-137G/-607A/-656Tが主要なハプロタイプであることが明らかとなった。そこでそれぞれのハプロタイプを別個に含み長さの異なるプ

ロモーター配列4種と、-607と-656多型を含まない-575までのプロモーター配列を含む reporter vector (pGL3 basic) を作成し、THP-1細胞株を使用してプロモーター活性を検討した。その結果、酪酸ナトリウム刺激時に、ハプロタイプ-137G/-607C/-656Gの活性が他方に比して有意に高かった(図4)。

次に遺伝子多型と臨床経過との関連を検討した。その結果、-607 (p=0.027, データ非提示) および-656と(図5)と有意な相関を認めしたが、-137とは関連がなかった (p=0.674, データ非提示)。特に-607と-656のヘテロ個体ではホモ個体に比して、有意に長い臨床経過を示した (-656についてのみ図6)。

最後に喫煙と臨床経過との関連および、IL-18 遺伝子多型との組み合わせによる影響を検討した。初診時喫煙習慣により、非喫煙者および過去喫煙者の群と、

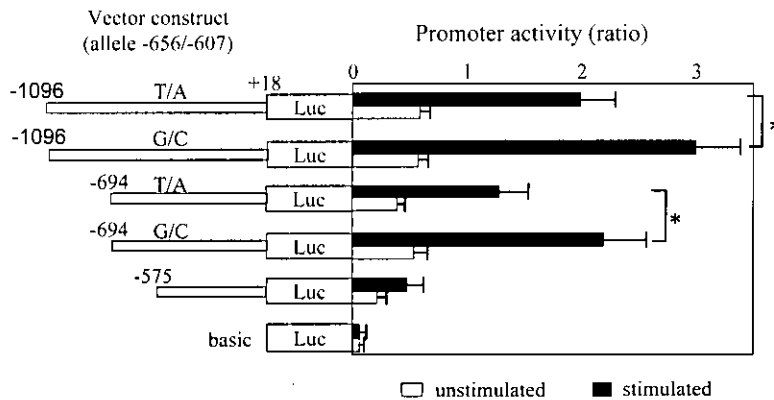


Figure 4. Promoter activities of IL-18 gene.
Luc: fire fly luciferase gene. *p=0.001

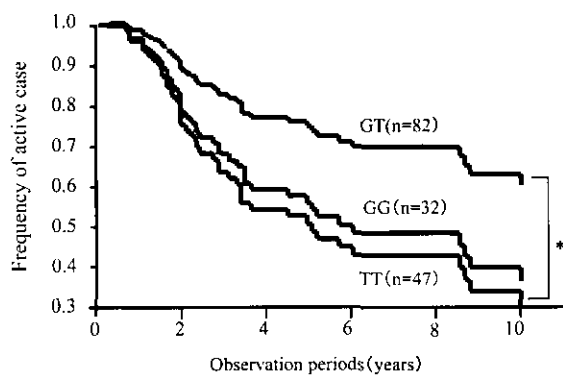


Figure 5. Clinical course of sarcoidosis according to genotypes of -656 (G/T). The association between -656 (G/T) and clinical course under the Cox proportional hazards model is significant ($p=0.037$).
* $p=0.014$ (GT vs TT)

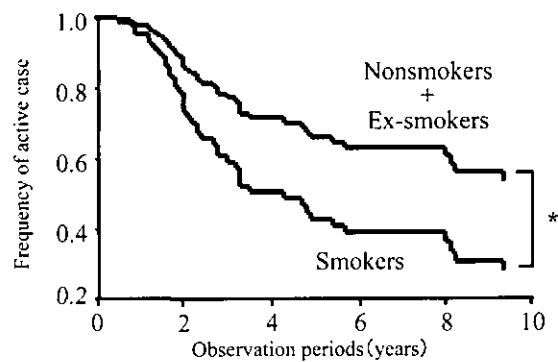


Figure 7. Clinical course of sarcoidosis according to smoking status (* $p=0.016$).

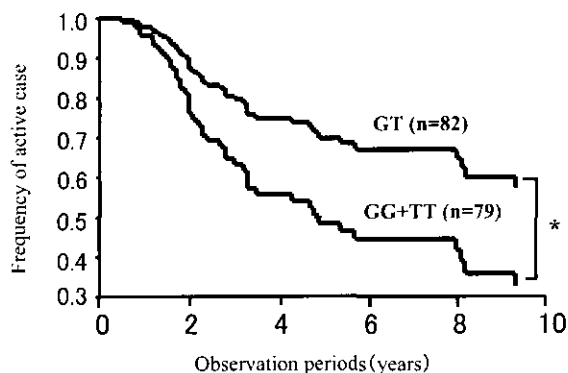


Figure 6. Clinical course of sarcoidosis according to genotypes of -656 (G/T). Heterozygous vs homozygous genotypes (* $p=0.028$).

喫煙者群に分けると前者の臨床経過が有意に延長していた (図 7)。そこでその 2 群と IL-18 遺伝子-656 多型によるホモ個体とヘテロ個体の 2 群よりなる 4 群と臨床経過の関連を検討したところ、経過の判別がより明瞭となった (図 8)。

考 察

本研究はわが国のミレニアムプロジェクトの一環として実施された、日本人ゲノムの SNP 検索事業の結果¹¹⁾、IL-18 遺伝子プロモーター領域で同定された SNP について、サルコイドーシスにおける意義を検討したものである。その結果、検討した SNP はサルコイドーシスの発症遺伝子であるとの結果は得られなかった。一般に、単一の遺伝子異常が決定的な影響を持つ先天性疾患以外の他の多くの疾患の発症には、多くの遺伝子の相互作用と環境因子が関連していると考えられる。したがって、IL-18 は確かにサルコイドーシスの病態に関与しているが、その発現の多寡が発症に決定的な影響を持つ可能性はむしろ少ない。その意味で今回の結果は首肯できる。

遺伝子発現の個体差はもっとも直接的な影響として、蛋白発現の個体差に反映されるはずである。我々の今回の検討では、-607 ないし-656 の多型とサルコイドーシス患者血清 IL-18 濃度と相関を認めた。それは蛋白濃度が高いアリルを含むハプロタイプのプロ

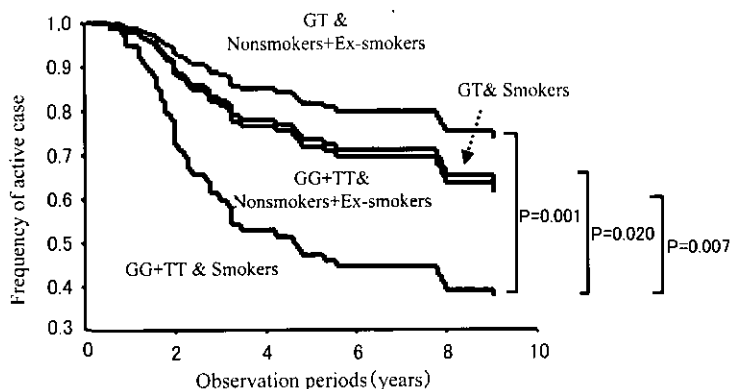


Figure 8. Clinical course of sarcoidosis according to IL-18 genotype and smoking status. The overall statistics is significant ($p=0.028$).

モーター活性が高いことと符合しており、蛋白翻訳の相違が転写活性の相違を介していることを示している。

今回の検討で興味深いことは、-656 ないし -607 のヘテロ個体の臨床経過がホモ個体のそれより延長していたことである。ヘテロ個体では IL-18 蛋白発現が中間レベルであることを考慮すると、その理由の説明は簡単ではない。しかし近年、従来よりあった雑種強勢の概念に対して、雑種劣勢 (hybrid inferiority) とも言える現象が動物学や植物学において次々と発見されている¹²⁾。これはヘテロ個体がホモ個体に比して進化論的に不利となる現象である。サルコイドーシスにおける臨床経過の遷延を、進化における劣勢形質とみなすことができるか否かという問題はあるが、ヘテロ個体の表現型が中間とはならない点で共通している。類似の報告として、近年 IL-12 β 鎖遺伝子多型のヘテロ個体では、IL-12 の発現が低く、その結果小児喘息が重症化するとの報告がある¹³⁾。今後その詳細な機序の解明に興味が持たれる。

今回の検討では IL-18 遺伝子多型に加えて、喫煙がサルコイドーシスの経過に及ぼす影響も検討した。その結果、喫煙者は非喫煙者および過去喫煙者に比して、短い経過で寛解することが明らかとなった。一般に喫煙はサルコイドーシスや過敏性肺炎の発症を抑制することが報告されている^{14,15)}。その仕組みの一部には、喫煙が IL-1 や TNF- α の産生を抑制することが含まれている^{16,17)}。今回の結果はさらに臨床経過についても、疾患を抑制する方向に作用している可能性を示唆している。疾患の病像は遺伝素因と環境要因の影響が様々に組み合わせられて確立する。実際今回検討対象としたサルコイドーシス患者群では、IL-18 遺伝子多型と喫煙習慣を組み合わせると、より識別良く臨床経過を示すことができた。今後同様な手法でより多くの因子を取り入れることにより、精度高く患者の臨床経過を推定することができるようになることが期待される。

結 論

IL-18 遺伝子多型はサルコイドーシスの疾患感受性遺伝子であるとの結果は得られなかった。しかしそれとサルコイドーシス患者血清の IL-18 濃度と相関が認められ、その背景には SNP のハプロタイプによる

IL-18 遺伝子プロモーター活性の相違があることが明らかになった。その結果、サルコイドーシスの臨床経過が異なり、それがまた喫煙など外因の影響をも受けることが示された。

参考文献

- 1) Itoh A, Yamaguchi E, Kuzumaki N, Okazaki N, Furuya K, Abe S, Kawakami Y. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA by inflammatory cells in the sarcoid lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3: 245-249.
- 2) Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, Thompson BW, Rossmann 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. Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 11: 2085-2091.
- 3) Kunikane H, Abe S, Tsuneta Y, Nakayama T, Tajima Y, Misonou J, Wakisaka A, Aizawa M, Kawakami Y. Role of HLA-DR antigens in Japanese patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1987; 3: 688-691.
- 4) Abe S, Yamaguchi E, Makimura S, Okazaki N, Kunikane H, Kawakami Y. Association of HLA-DR with sarcoidosis. Correlation with clinical course. *Chest* 1987; 3: 488-490.
- 5) Ishihara M, Ohno S, Ishida T, Ando H, Naruse T, Nose Y, Inoko H. Molecular genetic studies of HLA class II alleles in sarcoidosis. *Tissue Antigens* 1994; 238-241.
- 6) Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Jinushi E, Ito A, Kawakami Y. The role of the C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism V64I (CCR2-64I) in sarcoidosis in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 2021-2023.
- 7) Yamaguchi E, Itoh A, Hizawa N, Kawakami Y. The gene polymorphism of tumor necrosis factor- β , but not that of tumor necrosis factor- α , is associated with the prognosis of sarcoidosis. *Chest* 2001; 3:

- 753-761.
- 8) Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol* 2001; 1-2: 146-152.
 - 9) Terwilliger J, Ott J. *Handbook of Human Genetic Linkage*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1994.
 - 10) Hill WG. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity* 1974; 2: 229-239.
 - 11) Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tanaka T. Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *Journal of Human Genetics* 2002; 11: 605-610.
 - 12) Burke JM, Arnold ML. Genetics and the fitness of hybrids. *Annu Rev Genet* 2001; 31-52.
 - 13) Morahan G, Huang D, Wu M, Holt BJ, White GP, Kendall GE, Sly PD, Holt PG. Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet* 2002; 360: 455-459.
 - 14) Harf RA, Ethevenaux C, Gleize J, Perrin-Fayolle M, Guerin JC, Ollagnier C. Reduced prevalence of smokers in sarcoidosis. Results of a case-control study. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 625-631.
 - 15) McSharry C, Banham SW, Boyd G. Effect of cigarette smoking on the antibody response to inhaled antigens and the prevalence of extrinsic allergic alveolitis among pigeon breeders. *Clin Allergy* 1985; 5: 487-494.
 - 16) Yamaguchi E, Itoh A, Furuya K, Miyamoto H, Abe S, Kawakami Y. Release of tumor necrosis factor- α from human alveolar macrophages is decreased in smokers. *Chest* 1993; 2: 479-483.
 - 17) Yamaguchi E, Okazaki N, Itoh A, Abe S, Kawakami Y, Okuyama H. Interleukin 1 production by alveolar macrophages is decreased in smokers. *Am Rev Respir Dis* 1989; 2: 397-402.

サルコイドーシスの肉芽腫形成機序における CD1 分子の検討

千田 金吾^{1*} 榎本 紀之¹ 須田 隆文¹
宮嶋 裕明² 高橋 良知²

抗酸菌感染症を中心に CD1 分子による脂質抗原提示のメカニズムが報告されているが、サルコイドーシスにおいて樹状細胞上の CD1 分子の関与を検討した報告はわずかである。今回我々は、サルコイドーシス確診 9 例 (サルコイドーシス群) および対照群 7 例において抗 CD1a, CD1b, CD1c 抗体を用いて免疫組織学的に検討を行った。サルコイドーシス群のうち 5 例において肉芽腫を中心として CD1 陽性細胞が確認されたが対照群では全例陰性であった。また CD1 陽性症例と陰性症例間に検査成績の相違はみられず、病勢との関連も認められなかった。サルコイドーシスの肉芽腫形成には、樹状細胞を介した CD1/脂質抗原による免疫応答が関与している可能性が示唆された。

Analysis of CD1 molecule in the process of granuloma formation with sarcoidosis

Kingo Chida¹, Noriyuki Enomoto¹, Takafumi Suda¹, Hiroaki Miyajima²,
and Yoshitomo Takahashi²

¹Second Department of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1,
Handayama, Hamamatsu, 431-3192, Japan

²First Department of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1,
Handayama, Hamamatsu, 431-3192, Japan

There have been many reports studying the presentation for lipid antigen by CD1 molecules on dendritic cell (DC), mainly in the infection of acid-fast bacilli. But little is known about the expression of CD1 molecules in sarcoidosis. In this study, we analyzed the expression of CD1 molecules by immunohistochemical stain with monoclonal anti-CD1a, CD1b and CD1c antibody for the specimens of nine sarcoidosis patients (sarcoidosis group) and seven control cases (control group). CD1 molecules were present adjacent to granulomas in five cases of sarcoidosis group, but were absent in all cases of control group. There were no differences in the results of laboratory findings or disease activity between CD1-positive and negative cases in sarcoidosis group. These data suggest that the presentation of lipid antigens mediated by CD1 molecules on DC is involved in granuloma formation in sarcoidosis.

はじめに

主要組織適応抗原 (MHC) クラス I 分子またはクラス II 分子が蛋白由来のペプチド抗原を結合して T 細胞に提示するという細胞性免疫応答の中心的パラダイムに加え, CD1 分子が脂質抗原を T 細胞に提示するという新たなパラダイムが示されている¹⁾。CD1 分子の研究は抗酸菌感染症を中心に進められており, 抗酸菌由来の脂質抗原の提示が感染防御において重視されている^{2,3)}。しかし, 原因不明の肉芽腫性疾患であるサルコイドーシスにおいて CD1 分子の関与を検討した報告はわずかである⁴⁾。今回, 我々はサルコイドーシス症例において免疫組織学的検討を行い肉芽腫形成機序における CD1 分子の関与を検討した。

対象と方法

当院において臨床症状, 画像所見, 血液検査などからサルコイドーシスが疑われ, 組織生検により非乾酪性肉芽腫を認めたサルコイドーシス確定 9 例 (サルコイドーシス群) を対象とした。対照群として肺癌 5 例 (癌周囲の肺組織), 炎症性肺病変 1 例および特発性リンパ節炎 1 例を検討した。

サルコイドーシス群および対照群の生検組織を OCT compound により包埋し凍結検体とした後, 5 μ m スライス標本を作製した。マウス抗 CD1a, CD1b, CD1c, CD83 モノクローナル抗体 (Immunotech, Marseille Cedex, France) を用いて Streptavidin-Biotin 法 (SAB 法) により免疫染色を行い陽性細胞の局在を検討した。CD1 陽性細胞が明らかに集簇している部位のみを陽性と判定した。またサルコイドーシス群において CD1 陽性例と陰性例の検査成績, 画像所見を比較検討した。

結 果

サルコイドーシス群 9 例は男性 4 例, 女性 5 例, 平均年齢 54 歳 (23~72 歳) であった (Table 1)。生検組織は骨格筋 4 例 (腓腹筋 3 例, 大腿筋 1 例), リンパ節 3 例, 肺 1 例, 皮膚 1 例であった。対照群 7 例は男性 5 例, 女性 2 例, 平均年齢 55 歳 (29~73 歳) であり, 生検組織は肺 6 例, リンパ節 1 例であった。免疫染色は CD1a, 1b, 1c のいずれかが陽性であった症例はサルコイドーシス群において 5 例 (症例 2, 4, 5, 6, 9) 認められたが, 対照群は全例陰性であった (Table 2)。CD1 陽性例の内訳は CD1a と CD1c 陽性が 1 例 (症例 4,

Table 1 Summary of cases in our study

Case No.	Age	Sex	B.I.	Disease	Diseased organs	Biopsy organ
1	63	F	0	Sarcoidosis	uvea, lung, muscle	calf muscle
2	31	M	300	Sarcoidosis	lung, parotid gland, lymph node	lymph node
3	23	M	140	Sarcoidosis	uvea, lung, liver, lymph node	lymph node
4	59	M	0	Sarcoidosis	uvea, lung	lung
5	72	M	80	Sarcoidosis	lung, skin	skin
6	54	F	0	Sarcoidosis	uvea, muscle	calf muscle
7	57	F	0	Sarcoidosis	muscle, lung, uvea	calf muscle
8	68	F	0	Sarcoidosis	muscle	femoris muscle
9	61	F	250	Sarcoidosis	uvea, lymph node	lymph node
10	73	M	600	lung cancer	lung	lung
11	61	F	0	lung cancer	lung	lung
12	52	F	1280	lung cancer	lung	lung
13	70	M	1250	lung cancer	lung	lung
14	61	M	800	lung cancer	lung	lung
15	41	M	0	Inflammatory lung disease	lung	lung
16	29	M	200	Idiopathic lymphadenitis	lymph node	lymph node

B.I.: Brinkmann Index

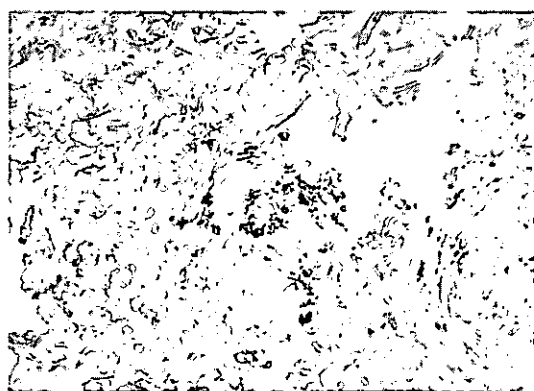
1 浜松医科大学第 2 内科

2 浜松医科大学第 1 内科

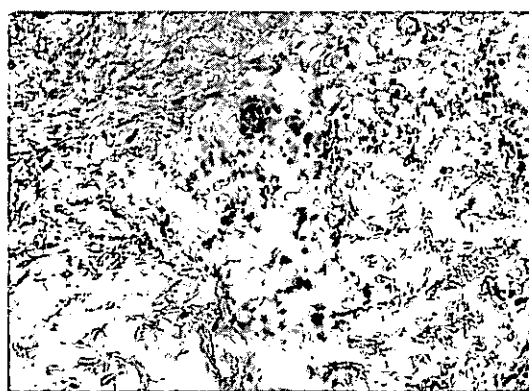
* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

Table 2 Results of immunohistochemistry staining in sarcoidosis group

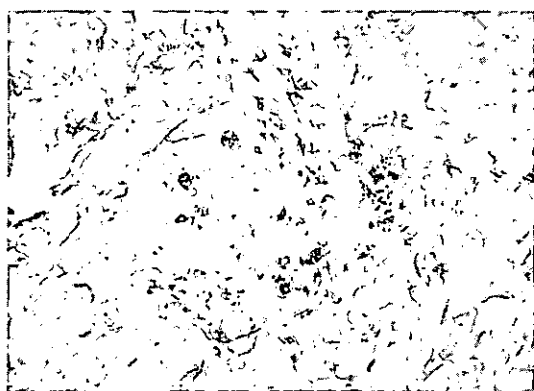
Case N.o.	CD1a	CD1b	CD1c	CD83
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	-	-	-
4	+	-	+	-
5	+	+	-	+
6	-	-	+	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	+	-	-	+



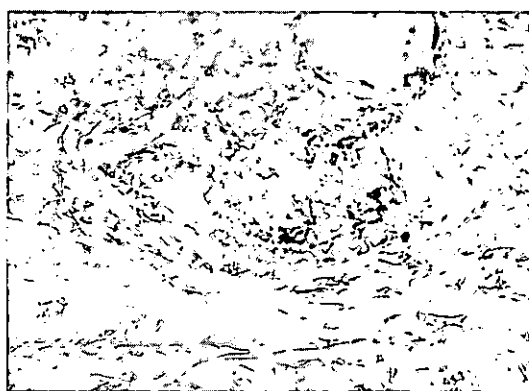
a



a



b



b

Fig. 1 Immunohistochemical stain of lung specimen in case N.o 4. (a) CD1a is positive on granuloma, (b) CD1c is positive on granuloma.

Fig. 2 Immunohistochemical stain of skin specimen in case N.o 5. (a) CD1a is positive on granuloma, (b) CD1b is positive on granuloma.

Fig. 1a, 1b), CD1a と CD1b 陽性が 1 例 (症例 5, Fig. 2a, 2b), CD1c のみ陽性が 1 例 (症例 6, Fig. 3), CD1a のみ陽性が 2 例 (症例 2, 症例 9: Fig. 4, Fig. 5) であり CD1a~c すべてが陽性となった症例は認められなかった。また CD1 陽性細胞は明らかに肉芽腫付近に強く認められたが、その局在は肉芽腫の中心部や辺縁部など様々であった。CD83 は CD1 陽性 5 例のうち 2 例が陽性であり、その他の症例はすべて陰性であっ

た。

サルコイドーシス群において CD1 陽性例と陰性例の検査成績、画像所見を比較検討したところ血清 angiotensin converting enzyme (ACE)、ツベルクリン反応、気管支肺胞洗浄液のリンパ球分画および CD4/CD8 比率、Ga シンチグラムなどは両群間に明らかな相違は認められず、病勢との関連もみられなかった (Table 3)。



Fig. 3 Immunohistochemical stain of calf muscle specimen in case N.o. 6. CD1c is positive on the center of granuloma.



Fig. 5 Immunohistochemical stain of lymph node specimen in case N.o. 9. CD1a is positive on and around granuloma.



Fig. 4 Immunohistochemical stain of lymph node specimen in case N.o. 2. CD1c is positive mainly around granuloma.

考 案

細胞性免疫において CD1 分子は脂質/糖脂質抗原を T 細胞へと提示しており, CD1 分子および提示される脂質/糖脂質抗原の研究は抗酸菌感染症を中心に報告されている²³⁾。ヒト CD1 遺伝子群は第 1 染色体上に存在し, CD1A から CD1E まで 5 つの CD1 遺伝

子が確認されている²³⁾⁵⁾。このうち 4 つの遺伝子産物 (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d) が β_2 ミクログロブリンと結合した機能性蛋白として発現している。これらの遺伝子産物は遺伝子配列の相同性からグループ 1 CD1 (CD1a, CD1b, CD1c) とグループ 2 CD1 (CD1d) に大別され, グループ 1 CD1 は未熟胸腺細胞以外では主に樹状細胞に限局して発現し抗酸菌由来の脂質抗原などを T 細胞に提示している²³⁾⁵⁾。

前述のように CD1 分子の検討は抗酸菌感染症を中心に行われているが, サルコイドーシスでの報告はごくわずかである。Tsuneyama ら⁴⁾は Primary biliary cirrhosis (PBC) 22 例と共に 4 例のサルコイドーシス症例において, 肝臓の肉芽腫での CD1d 陽性細胞を確認している。グループ 2 CD1 (CD1d) は血球系細胞に広く分布しており樹状細胞に限局している訳ではないが, やはり本症と脂質/糖脂質抗原の関与を疑わせる結果であった。本検討ではグループ 1 CD1 のみの免疫染色を行ったがサルコイドーシス群のみに陽性例が認められたため, サルコイドーシスの肉芽腫形成

Table 3 Comparison of CD1 positive and negative cases in sarcoidosis group

Case N.o.	CD1	Biopsy organ	s-ACE(IU/l)	PPD	BAL-lym(%)	CD4/8 ratio	Ga Cintigraphy
2	positive	lymph node	25	N.D	25	2.6	positive
4	positive	lung	19	negative	28	4.2	positive
5	positive	skin	15	negative	12	7.2	N.D
6	positive	calf muscle	33	negative	13	2.5	positive
9	positive	lymph node	11	positive	N.D	N.D	positive
1	negative	calf muscle	29	N.D	38	13	positive
3	negative	lymph node	39	positive	N.D	N.D	positive
7	negative	calf muscle	22	negative	3	10	positive
8	negative	femoris muscle	25	negative	N.D	N.D	positive

s-ACE : serum angiotensin converting enzyme, PPD : purified protein derivative
BAL-lym : lymphocyte in broncho alveolar lavage fluid N.D : not done

機序に樹状細胞を介したCD1/脂質抗原による免疫応答が関与している可能性が示唆された。

それぞれのCD1分子の細胞内の局在やtraffickingは異なっており、CD1c分子は早期エンドソームに、CD1b分子は後期エンドソームやリソソームに、またCD1a分子は早期エンドソームの一部であるリサイクリングエンドソームに多く分布している²³⁾²⁵⁾。外来性の脂質抗原は樹状細胞に取り込まれた後まず早期エンドソームへ運ばれ、長いアシル鎖を有する脂質は後期エンドソームからライソソームへ、また短く不飽和のアシル鎖を持つ脂質は早期エンドソームからリサイクリングエンドソームへと運ばれるため、これらすべてのエンドソームにグループ1CD1分子が発現していることは脂質抗原の効率の良いサンプリングを可能としている²³⁾²⁵⁾。本検討において、CD1陽性5例のうちCD1a~CD1cすべての同時陽性例は認められなかったが、これはグループ1CD1分子が共同して脂質抗原の提示を行っているためであると考えられた。

今回の検討ではCD1陽性例はサルコイドーシス群の過半数を占めていたものの、CD1陰性サルコイドーシス症例も少なからず認められた。Steffenら⁶⁾は結核菌感染において抗原提示細胞上のグループ1CD1分子がdown-regulationされることを報告しており、サルコイドーシスにおいても類似の反応が惹起されている可能性が残される。

CD83陽性細胞はCD1陽性5例のうち2例のみに確認された。Peterら⁷⁾は癩の皮膚病変においてグループ1CD1分子の免疫染色を行い、癩腫型と比し結核型において強い陽性所見を認めたと報告している。またこれらの細胞は同時にCD83陽性細胞であり、Langerhans細胞とは異なる強力な抗原提示細胞であるとしている。CD83は活性化した樹状細胞のマーカーであるが、肉芽腫形成過程において樹状細胞の活性化が一過性であった可能性も考えられる。

今回の検討において、CD1分子によって提示されている脂質/糖脂質抗原の特定は困難であるが、近年サルコイドーシスの病因として議論されている抗酸菌や*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)の菌体成分および内因性のリン脂質などもその候補として考えられる。

サルコイドーシスの病因は未だに不明であり、抗酸菌や*P. acnes*が注目されているものの生検組織においてpolymerase chain reaction (PCR)を用いた検討

では肯定的な結果と否定的な結果が相反しており未だに結論が出ていない^{8)~15)}。MHCクラスI、クラスII/ペプチド抗原という細胞性免疫の中心的パラダイムの他に、CD1/脂質抗原による免疫応答も広く視野に入れた病態の解析と今後の検討が望まれる。

文 献

- 1) Evan M. Beckman, Steven A. Porcelli, Craig T. Morita, et al: Recognition of a lipid antigen by GDI-restricted $\alpha\beta$ +T cells. *Nature* 1994; 372: 691-694.
- 2) 杉田昌彦: CD1を介した脂質抗原提示. *医学のあゆみ* 2000; 193: 776-780.
- 3) T. Ulrichs, S.A. Porcelli: CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. *Reviews in immunogenetics* 2000; 2: 416-432.
- 4) Koichi Tsuneyama, Mitsue Yasoshima, Kenichi Harada, et al: Increased CD1d expression on small bile duct epithelium and epithelioid granuloma in livers in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1998; 28: 620-623.
- 5) 杉田昌彦: CD1分子による脂質抗原提示経路. *Immunology frontier* 1999; 9: 223-229.
- 6) Steffen Stenger, Kayvan R. Niazi, and Robert L. Modlin: Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with mycobacterium tuberculosis. *The journal of immunology* 1998; 161: 3582-3588.
- 7) Peter A. Sieling, Denis Jullien, Monica Dahlem, et al: CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *The journal of immunology* 1999; 162: 1851-1858.
- 8) Syed A. Saboor, Norman Mci. Jhonson, and John-joe Mcfadden: Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *The lancet* 1992: 1012-1015.
- 9) Elvira Richter, ULF Greinert, Detlef Kirsten, et al: Assessment of mycobacterial DNA in cells and tissues of mycobacterial and sarcoid lesions. *American journal of respiratory critical care medicine* 1996; 153: 375-380.

- 10) Wonder Puryear Drake, Zhiheng Pei, David T. Pride, et al : Molecular analysis of sarcoidosis tissues for mycobacterium species DNA. *Emerging infectious diseases* 2002 ; 8 : 1334-1341.
- 11) Martin Vokurka, Denise Lecossier, Roland M. du Bois, et al : Absence of DNA from mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex in sarcoidosis. *American journal of respiratory critical care medicine* 1997 ; 156 : 1000-1003.
- 12) ML Wilsher, RE Menzies, MC Croxson : *Mycobacterium tuberculosis* DNA in tissues affected by sarcoidosis. *Thorax* 1998 ; 53 : 871-874.
- 13) 倉島篤行 : サルコイドーシスと肺抗酸菌症の合併例に関する研究. 2001 年度びまん性肺疾患調査研究 : 89-93.
- 14) Ikuo Ishige, Yutaka Usui, Tamiko Takemura, et al : Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. *The lancet* 1999 ; 354 : 120-123.
- 15) Yoshinobu Eishi, Moritaka Suga, Ikuo Ishige, et al : Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and european patients with sarcoidosis. *Journal of clinical microbiology* 2002 ; 40 : 198-204.

実験的マウス肺サルコイド様病変における 肺常在 *P. acnes* の意義

西脇 徹¹ 米山 博之¹ 松尾 直樹
江石 義信^{2*} 松島 綱治^{1*}

肺間質性病変は、呼吸器に限局した疾患に限らず、膠原病を始めとした様々な全身性疾患の一症状として出現することも多く、多様な病態機序の存在が想定されている。なかでも肺肉芽腫症は、その遷延により線維化が容易に誘導され、ガス交換が障害されるため、病態解明が切望されているが、その多くはいまだなお明らかにされていない。

今回我々は、皮膚・消化管粘膜常在菌である *P. acnes* が正常な SPF マウスの下気道肺においても存在することを示し、この肺常在菌に依存して誘導される肺肉芽腫モデルを作製した。また、人工的な肺常在 *P. acnes* の量の増減に肉芽腫形成が呼応することを示し、このモデルにおいて、肺常在 *P. acnes* の除菌が肉芽腫病変の軽減に有効であることを示唆した。

このマウス肺肉芽腫モデルは、肺内に抗原繫留せずに病変を誘導する点で従来動物モデルとは大きく異なり、また、その成因が正常肺内 *P. acnes* の存在に深く関わっていると考えられ、原因不明間質性肺疾患の病態解明に向けた新たな糸口となることを期待し、ここに報告する。

Importance of pulmonary indigenous *P. acnes* in the experimental lung sarcoid-like granulomatosis in mice

Tetsu Nishiwaki¹, Hiroyuki Yoneyama¹, Naoki Matsuo¹
Kouji Matsushima¹, and Yoshinobu Eishi²

¹Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

²Department of Human Pathology, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Not limited in respiratory disease, the lung interstitial lesions are often observed in the systemic disorders such as collagen vascular disease. Therefore, various pathogenesis have been considered to cause them. Although lung granulomatosis, which can easily induce fibrosis and respiratory disturbance, has been strongly desired to be elucidated, it remains to be resolved.

In this report, we have demonstrated the existence of *P. acnes* even in the lower respiratory lung, which generally exists on the skin and the mucosal surfaces, and based in this, we have developed the murine lung granulomatosis model. Furthermore, we have showed the alterations in the pulmonary granuloma formation depending on the dose of indigenous lung *P. acnes*, suggesting that the eradication of indigenous *P. acnes* can improve pulmonary granulomatosis in this model.

This novel animal model is different from previous lung granulomatosis models in point of the method without anchoring antigens in the lung. The pathogenesis of this model is strongly suggested to correlate with pulmonary indigenous *P. acnes*, and we expect that this would be helpful for resolving interstitial lung disease of unknown origin.

はじめに

肺は恒常的に外界からの異物抗原に曝露されているため、諸臓器のなかでも多彩な病像を呈し易い器官のひとつと考えられている。また、肺は生命維持に必須のガス交換を司るため、換気障害を惹起する間質性肺疾患は病態解明・新規治療戦略の発展が切望されている。

原因不明の間質性肺疾患の一つであるサルコイドーシスは、その主病変が肺肉芽腫症や肺所属リンパ節腫脹であることから、同じく肺肉芽腫性疾患である過敏性肺臓炎のように、吸入病原体に病因を求める研究が広く行われてきた¹⁾。成人の多くが自然感作している結核菌は、その高い肉芽腫誘導能などを理由に、長い間主要な病因候補のひとつであった。しかし、蓄積される報告は、それを肯定するものばかりではなく、現在に至るまで賛否両論である²⁾。近年、江石らによる一連の報告³⁾⁴⁾⁵⁾で、皮膚・消化管粘膜常在菌であるプロピオニバクテリウム・アクネス (以下 *P. acnes*) がサルコイドーシス患者の患部組織に多く認められることが示唆され、*P. acnes* が新たな病因抗原として注目されてきている⁶⁾。

しかし、本来無菌領域と考えられている下気道肺に、疾患を誘発するに十分な量の *P. acnes* が新たに侵入・感染することは臨床的に想定し難い。そこで我々は、下気道肺には *P. acnes* が定常時より存在しており、たとえ肺外での感作であっても、循環血流から十分量の *P. acnes* 感作リンパ球が肺に流入することで病変を形成しようとの仮説をたてた。本報告は、この仮説に基づき樹立した実験的マウスモデルにおける肺常在 *P. acnes* の意義を確かめることを目的としており、その検証を試みている。

対象と方法

マウスは SPF で管理された C57BL/6J (雌, 6~8 週) を使用。抗原として用いた *P. acnes* (ATCC11828) は嫌気条件下で培養し、表 1 に示す実験以外は全て 60 度で 30 分間過熱し、死菌化した。

¹ 東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室

² 東京医科歯科大学病理部

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

免疫染色は間接的免疫アルカリフォスファターゼ (以下 ALP)・ペルオキシダーゼ (以下 HRP) 法で行った⁶⁾。免疫染色に一次抗体として用いた抗マウスモノクローナル抗体は CD4 (クローン RM4-5), CD8 α (53-6.7), IL-4 (BVD6-24G2), IFN- γ (XMG1.2): BD PharMingen 製, F4/80 (Cl: A3-1), CD11c (N418): Serotec 製, DEC205 (NLDC-145): BMA Biomedicals 製, で、*P. acnes* のリポペプチドを認識する抗体⁷⁾ は研究協力者である江石氏より御提供頂いた。また二次抗体は、HRP 標識抗ラット免疫グロブリン抗体: Biosource International 製, HRP 標識抗マウス免疫グロブリン抗体: DAKO 製, ALP 標識抗ハムスター免疫グロブリン抗体: Cedarlane 製, ビオチン化 ALP: ニチレイ製, Alexa Fluor 488 抗ラット免疫グロブリン, ストレプトアビジン Alexa Fluor 594: Molecular Probes 製を使用した。

RT-PCR は SPF マウスの下気道肺, 及び肺・肝臓・皮膚・脾臓の各所属リンパ節より抽出した RNA 1 μ g を逆転写して作成した相補的 DNA を用いて施行した。プライマーは先行文献⁴⁾において *P. acnes* の 16s リボゾーム RNA の菌特異的な配列を基に、設計・使用されているものを用いている。(forward, 5'-GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA-3'; reverse, 5'-TTCCGACGCGATCAACCA-3')

リンパ球増殖アッセイは、無刺激の正常マウスから諸臓器の所属リンパ節を摘出し、1 ウェル 1 \times 10⁵ 個の調整細胞に、抗原および対照抗原 (*P. acnes*・OVA: 10 μ g/100 μ l, PBS) のみを加えたプレートを 3 日間培養した後、WST-1 細胞増殖アッセイシステム (Takara Biomedicals 製) により解析した。

細胞移入実験に使用した *P. acnes* 感作 CD4 陽性細胞は足床に *P. acnes* を感作されたマウスの腫大した鼠径リンパ節から採取したリンパ節細胞から、磁気ビーズ吸着法 (MACS system: Miltenyi Biotech 製) を用いて単離した。実験では、マウス一匹に対し 2 \times 10⁶ 個の細胞を経尾静注した。

生菌 *P. acnes* の気道内前投与の実験では、*P. acnes* の足床反復感作一週間前に *P. acnes* の生菌を 1 グループ 5 匹ずつ、それぞれ 0.1 μ g, 1 μ g, 10 μ g (1 μ g 中の *P. acnes* は 2.5 \times 10⁵ 個) で投与し、PBS 投与群と比較した。なお、*P. acnes* の気道内投与のみでは、感作開始時、および終了時に肺肉芽腫形成の無いことは確認している。