

抗生剤投与実験では、1 グループ 5 匹のマウスに、それぞれ PBS, 塩酸ミノサイクリン 133 $\mu\text{g}/\text{dose}$ (MINO: Wyeth Lederle 製), クリンダマイシン 1.6 mg/dose (CLDM: Pharmacia 製) を *P. acnes* の足床反復感作一週間前から終了時まで、腹腔内および経口投与した。(投与初日のみ経気道投与も実施。)

結 果

P. acnes による肺肉芽腫症発症メカニズムの仮説の前提として、正常下気道肺における *P. acnes* の常在を明らかにするために、抗 *P. acnes* 抗体を使用して免疫染色を行った。図 1 に定常状態のマウス肺における *P. acnes* 染色像を示す。弱拡大像では肺胞腔内に表出した細胞内に陽性像がみられ、強拡大像では比較的辺縁明瞭な複数の顆粒の集合として *P. acnes* が染色された。また、図には示していないが、この *P. acnes* 貪食細胞を同定するために F4/80, CD11c, DEC205 の抗体を用いて *P. acnes* との二重免疫染色を行ったところ、*P. acnes* は F4/80 発現細胞に貪食されており、CD11c・DEC205 発現細胞には貪食されていなかった。

肺における *P. acnes* の常在を多角的に証明するために、SPF 正常マウス肺、及び肺・肝臓・皮膚・脾臓

の各所属リンパ節における *P. acnes* の存在を遺伝子学的に解析した。正常マウス下気道肺では個体により程度の差はあるものの、いずれにも *P. acnes* の存在が認められた (図 2)。さらに、本来 *P. acnes* の常在が示唆されている臓器と同様、肺の正常所属リンパ節にも、遺伝子学的に *P. acnes* が証明された (図 3)。

次に、定常状態のマウス肺における *P. acnes* に対する免疫応答の存在を確認するために、未感作マウスより肺所属リンパ節と、比較のために他の器官における所属リンパ節も摘出し、リンパ節細胞増殖アッセイを行った (図 4)。肺、鼠径、肝臓の各リンパ節では、いずれにおいても *P. acnes* に対する免疫応答が認められたが、脾臓では反応が弱かった。これらにより、正常マウス肺における *P. acnes* の常在と、定常時よりすでに *P. acnes* に対する免疫応答の成立していることが示唆された。

そこで、肺外で増殖した *P. acnes* 感作リンパ球が循環血流を経て、未感作肺に肉芽腫を誘導し得るか否かを確認するために、*P. acnes* 感作 CD4 陽性細胞の移入実験を行った。 2×10^6 個の *P. acnes* 感作 CD4 陽性細胞を経尾静注された正常マウスでは、2 週間後から肺肉芽腫の形成が観察された。一方、未感作マウスから単離した CD4 陽性細胞の移入では肉芽腫は誘導さ

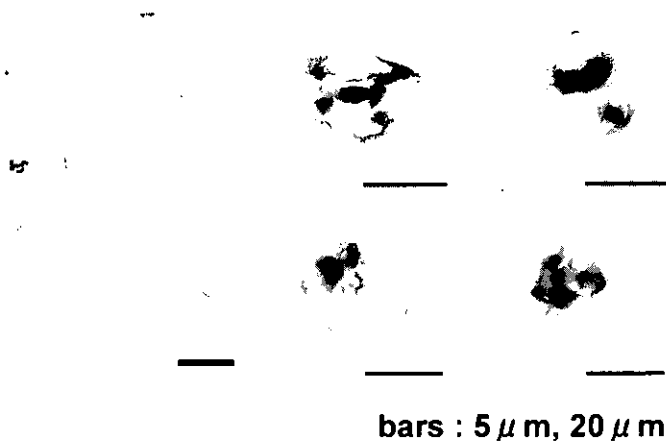


図 1 正常 SPF マウス肺における *P. acnes* 陽性染色像

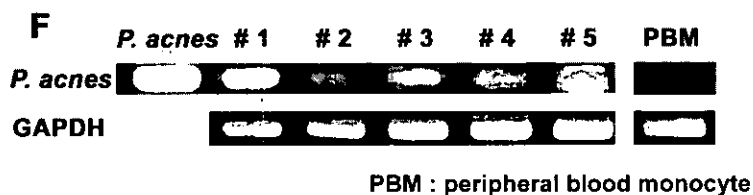


図 2 正常 SPF マウス肺における *P. acnes* 遺伝子の検出

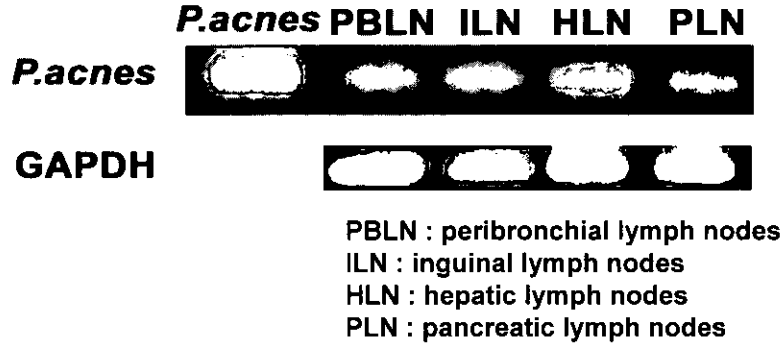


図3 正常 SPF マウス各所属リンパ節における *P. acnes* 遺伝子の検出

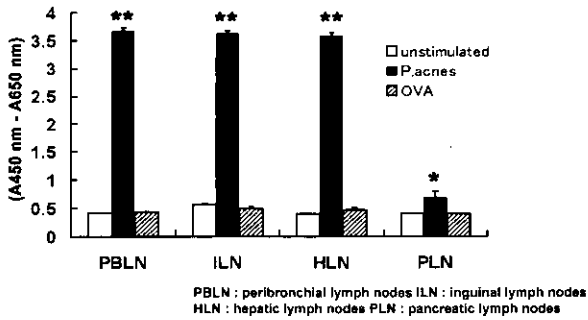


図4 正常 SPF マウス各所属リンパ節における *P. acnes* に対するリンパ球増殖試験

れなかった (図5).

以上より、肺に直接 *P. acnes* が感作されなくても *P. acnes* 感作ヘルパーT細胞が経循環的に肺に流入することで肉芽腫病変を誘導しうることが示唆された

め、恒常的に循環血流中の *P. acnes* 感作ヘルパーT細胞数を増加させ、より慢性肺肉芽腫症に近い病像を誘導する目的で、定期的にあジュバントを用いた *P. acnes* の肺外 (足床) 感作を行った。400 μ g の *P. acnes* を完全フロイントアジュバント (DIFCO 製) と共に2週間間隔で下肢足底に皮下注射すると、2回以上の免疫から2週後のマウス肺では、胸膜直下・肺血管・リンパ管周囲有意に、類上皮細胞・多核巨細胞の集簇を核とした単核球の集積が認められた (図6)。また、図には示していないが、これらの病変内細胞構成は、抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞の代表的表面マーカーとして知られる F4/80・CD11c と CD4 との二重免疫染色により、従来の典型的肺肉芽腫⁸⁾ と同様の細胞構成であった。更に、インターフェロンガンマ (IFN γ)・インターロイキン4 (IL4) と

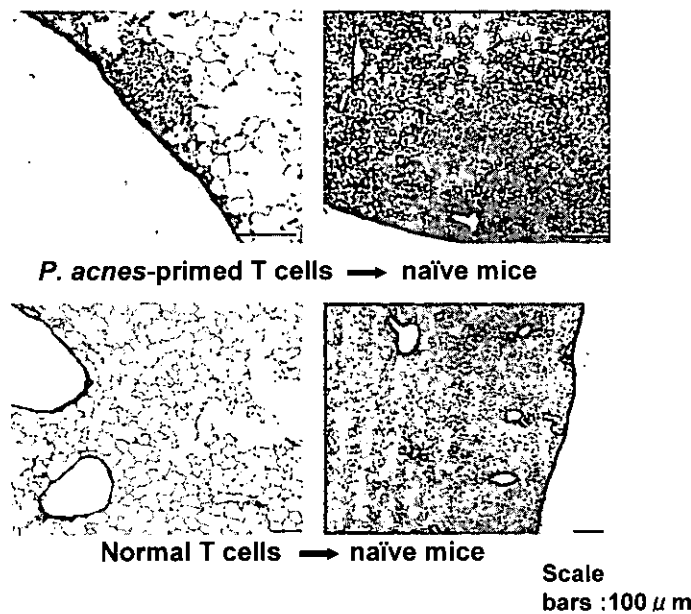


図5 *P. acnes* 感作ヘルパーT細胞の移入により正常マウスに誘導される肺肉芽腫

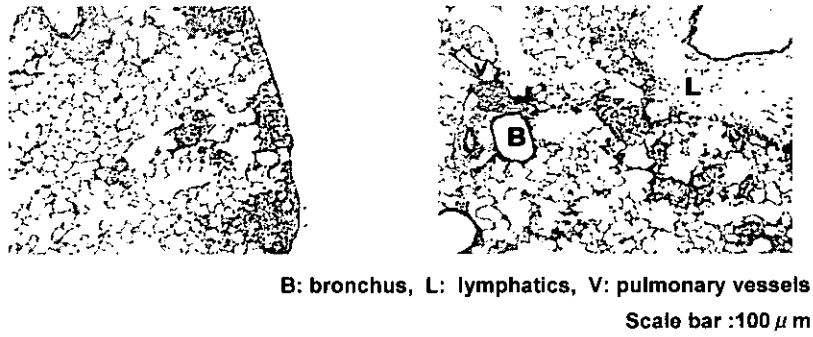


図6 *P. acnes* の肺外反復免疫により誘導される肺肉芽腫

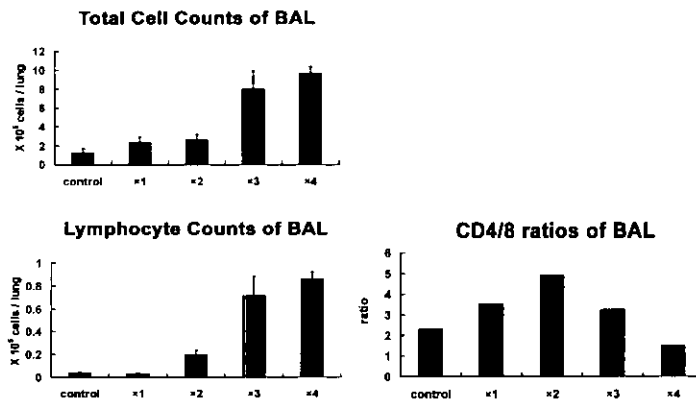


図7 *P. acnes* 反復免疫マウスにおける BAL 総細胞数およびリンパ球分画

CD4 との二重免疫染色を行うと、これらは IFN γ 産生性、すなわち Th1 型肉芽腫であった。さらに、このモデルにおいては感作回数依存的に肺胞洗浄液 (BAL) 中のリンパ球優位の増加が認められ (図 7)、血清の ACE 活性も上昇した (図 8) が、BAL 中リンパ球の CD4/CD8 比と血清カルシウム値は、肉芽腫形成が認められ始める感作 2 回のグループで最も高値を示した (図 7, 8)。

つぎに、この *P. acnes* の肺外反復免疫モデルにおける肺肉芽腫病変が、健常時より肺に常在する *P. acnes* に依存して誘導されていることを確認する為に、*P. acnes* の免疫開始前に人工的に肺内 *P. acnes* を増加・及び減少させることで、肉芽腫病変の程度が呼応するか否かを検討した。

肺常在 *P. acnes* が増加している状態を想定するために行った図 9 の実験では、免疫開始前に気道内投与された *P. acnes* の量依存的に BAL 総細胞数は増加し、組織学的にも肉芽腫形成の増加をみた。

また、肺常在 *P. acnes* を減ずる目的で行った抗生剤投与実験では、すでに皮膚科診療の領域において、*P. acnes* による尋常性痤瘡に効果があり、頻用されてい

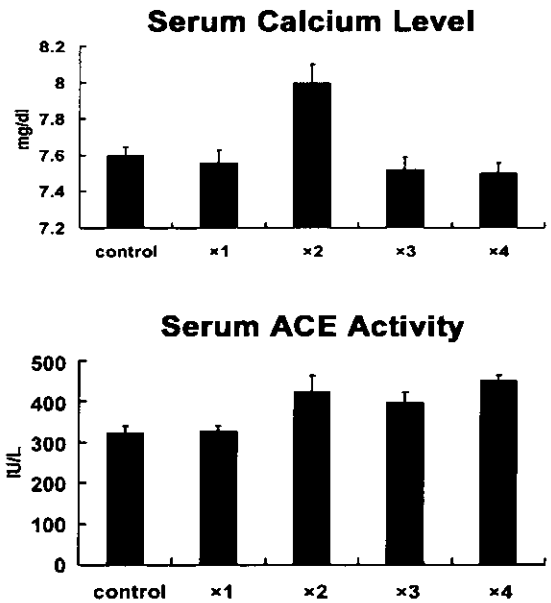


図8 *P. acnes* 反復免疫マウスにおける血清学的特徴

る塩酸ミノサイクリンとクリンダマイシンを使用した。抗生剤投与群においては、*P. acnes* 反復免疫による BAL 総細胞数・CD4 陽性細胞数の増加は抑えられ、また、組織学的にも肉芽腫形成の減少を認めた (図 10)。

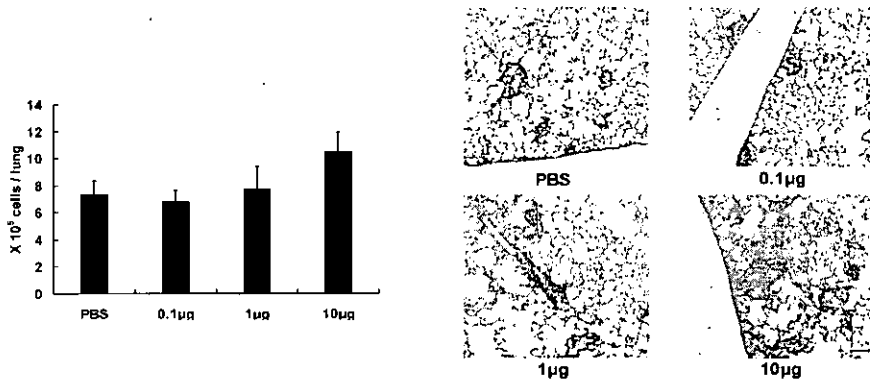


図9 *P. acnes* 生菌前投与による肺肉芽腫形成の変化

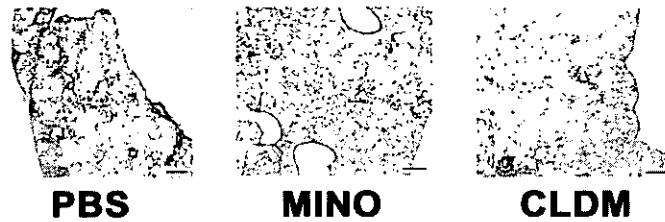
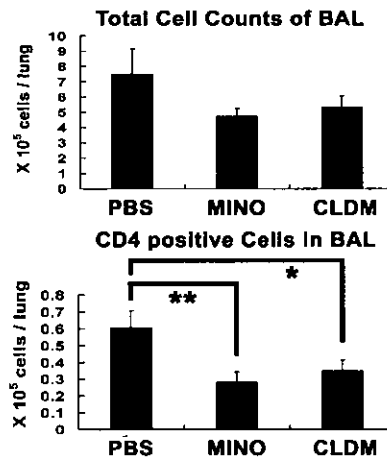


図10 抗生剤投与による *P. acnes* 反復免疫マウス肺肉芽腫形成の変化

考案・結論

「SPF 管理された健常動物の下気道肺に特定の細菌が常在している」という、本研究の前提は、それ自体、今日までの呼吸器学の常識を覆すものであり、その提唱には殊更に慎重になる必要がある。*P. acnes* は結核菌と同様、Th1 型肉芽腫や局所炎症を誘導する能力に長けており、尋常性痤瘡により、今もなお苦しんでいる患者が多いことは言うまでも無い。この *P. acnes* が肺内に常在しているとなれば、他の炎症性・感染性疾病や遺伝的素因等により、宿主側の基礎免疫状態に変化が生じた場合、この肺常在 *P. acnes* が新たな肺炎患者発症の起点となりうる可能性は、決して低くはない。

従って、本報告では、まず *P. acnes* が健常マウスの下気道肺に存在していることを立証するために、免疫組織化学的・遺伝子学的側面からの多角的な検証を行った。また、実際に免疫応答が成立する場である肺所属リンパ節においても、*P. acnes* が存在することを確認し (図 1, 2, 3), 同時に、肺所属リンパ節においては定常時より *P. acnes* に対する免疫応答が成立していることを確認した (図 4)。

肺肉芽腫症の病態形成機序に対する従来の考え方は、肺結核・粟粒結核症や過敏性肺臓炎に代表されるような、外来性抗原の経気道・経血管的肺内侵入後の長期停滞に対する免疫応答を基本とするものが主流であった⁹⁾。従って、サルコイドーシスをはじめとする

原因不明の肺肉芽腫性疾患も、各種抗酸菌・真菌・ウィルス肺感染の続発症という観点から研究されることが多かった⁹⁾。しかし、上述のように、健常時より、下気道肺に抗原となる *P. acnes* が存在しているのであれば、肺に直接抗原が投与されなくても、十分量の *P. acnes* 感作リンパ球が肺内、さらには正常リンパ循環に流入するだけでも、肺病変を形成する可能性がある。*P. acnes* 感作ヘルパーT細胞の正常マウスに対する移入実験の結果(図5)は、この考えを支持するものである。米山らの一連の仕事で詳細に解明された、樹状細胞を中心とした局所免疫応答における免疫担当細胞動態によれば⁷⁾¹⁰⁾、生体では局所で抗原に感作されると、樹状細胞をはじめとした抗原提示細胞が所属リンパ節に抗原情報を伝播し、そこで抗原特異的リンパ球が増殖し、輸出リンパ管を経て血流中に再循環した後、抗原曝露部位に帰還する。この細胞動態を基に考えると、異所性に *P. acnes* 感作リンパ球が増殖した場合であっても、それらの細胞が肺循環に流入した際、肺病変を形成する現象は、免疫細胞生物学的にも矛盾しない。

上記の理由により、図6以降の実験で使用している *P. acnes* 反復免疫による肺肉芽腫誘導モデルは、図5の移入実験の応用型として捉えうるものであり、より慢性型の病像を呈しているものと考えられる。事実、図7, 8のように、BALの細胞数、リンパ球分画や血清ACE活性・カルシウム値も肉芽腫病変を反映している結果が得られ、肺サルコイドーシスと類似する点が散見される。

この慢性肺肉芽腫モデルにおける肺病変が、本当に肺常在 *P. acnes* に依存して形成されていることを検証することは、今後このモデルを用いた研究結果を解釈するうえで重要であり、本報告の目的でもある。図9, 10の実験は、常在 *P. acnes* を人工的に増した状態と減じた状態を設定しているものであり、これらの結果により、少なくともこの *P. acnes* 反復免疫によるマウス肺肉芽腫モデルにおいては、病変形成に肺常在 *P. acnes* の存在が重要であることが示唆された。また、さらには、「肺の常在菌をターゲットとした治療」という新規の概念が、ひとつの肺肉芽腫形成病態に適用し得る可能性が見出される結果となった。

サルコイドーシスとは、ヒトにおける極めて限定された疾患であり、本報告における肺肉芽腫モデルマウスが、それと全く同一の病態機序を有していると言う

ことはできない。しかし、*P. acnes* の肺外感作を用いた系において、少なくともサルコイドーシスといくつかの共通点をもつ病態がマウスで再現でき、それが肺常在 *P. acnes* をターゲットとした抗菌治療により改善したことは注目すべきであり、今後、サルコイドーシスに留まらず、広い視野で間質性肺疾患の病態形成機序を解明する際に一助となることを期待して、ここに報告する。

参考文献

- 1) Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarcoidosis. N Engl J Med 336: 1224-1234, 1997.
- 2) Baughman RP, Lower EE, du Bois RM. Sarcoidosis. Lancet 361: 1111-1118, 2003.
- 3) 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.
- 4) Eishi Y, Suga M, et al. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. J Clin Microbiol 40: 198-204, 2002.
- 5) Yamada T, Eishi Y, et al. In situ localization of Propionibacterium acnes DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. J Pathol 198: 541-547, 2002.
- 6) Matsuno K, Ezaki T, et al. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. J Exp Med 183: 1865-1878, 1996.
- 7) Yoneyama H, Matsuno K, 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 193 (1): 35-49, 2001.
- 8) Robinson DS, et al. Granulomatous Processes. In: Crystal RG, Weibel ER, et al. The lung: scientific foundations. 2nd ed, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.: 2395-2409, 1997.
- 9) Wangoo A, Sparer T, et al. Contribution of Th1

and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. *J Immunol* 166 : 3432-3439, 2001.

10) Yoneyama H, Narumi S, et al. Pivotal role of

dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. *J Exp Med* 195 : 1257-1266, 2002.

D P B

D
P
B

びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子研究 ——強い連鎖不平衡の見られる 80 kb の領域に 関する遺伝子と変異の検討——

土方美奈子¹ 松下 育美¹ 徳永 勝士² 本間 栄³
中田紘一郎⁴ 田口 善夫⁴ 吾妻安良太⁵
工藤 翔二⁵ 慶長 直人¹

びまん性汎細気管支炎の疾患感受性候補領域の中に特に連鎖不平衡の強い 80 kb の領域が存在し、複数の SNP が疾患と有意な関連を示したことから、昨年より、遺伝子クローニングと、領域内の遺伝子変異の網羅的検索を行っている。候補領域内の全域を詳細に検討し、新規遺伝子内の変異についてもさらに検討を重ね、関連する遺伝子変異を複数同定した。

Candidate genes and nucleotide substitutions observed in the susceptibility region of diffuse panbronchiolitis

Minako Hijikata¹, Ikumi Matsushita¹, Katsushi Tokunaga², Sakae Homma³
Koichiro Nakata⁴, Yoshio Taguchi⁵, Arata Azuma⁶, Shoji Kudoh⁶
and Naoto Keicho¹

¹*Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan*

²*Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo*

³*Division of Respiratory Diseases, Toranomon Hospital*

⁴*Department of Respiratory Diseases, Toho University School of Medicine*

⁵*Department of Respiratory Medicine, Tenri Hospital*

⁶*Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School*

One of the major susceptibility genes for diffuse panbronchiolitis may be located within 80 kb in the HLA class I region, showing strong linkage disequilibrium. Since a novel gene was cloned in the critical region, we have searched for genetic variations which are associated with the disease.

はじめに

びまん性汎細気管支炎 (DPB) はアジア系集団に多く見られる、HLA class I 関連疾患である。関連する対立遺伝子型は韓国人と日本人の患者で異なり、HLA-A, B 遺伝子座間に疾患感受性候補領域が推定されている¹⁻⁴⁾。本年度は、昨年度から引き続き、候補領域の遺伝子変異を同定するとともに、候補領域内の新規遺伝子についても、変異検索をあわせて進めた。

すなわち、昨年までの検討により、遺伝子予測プログラムで予測したエクソン部位を中心に検討した結果、200 kb の候補領域の中で特に連鎖不平衡の強い 80 kb の領域が存在し、その領域内の複数の一塩基多型 (SNPs) が疾患との有意な関連を明らかにした。さらに同一領域内に、新規遺伝子を同定した。しかし、疾患と有意な関連を示す遺伝子多型は複数個あり、強い連鎖不平衡の結果であることが予想されたため、いずれの変異が最も強く疾患と関連するか否かを明らかにする目的で、本年度は、この 80 kb の領域の遺伝子多型の網羅的探索および 80 kb の領域内に予測されたすべての遺伝子のクローニングを試みた。

対象と方法

材料としては、疾患に関連するマイクロサテライトのアレル (C2_2_2 が 251 かつ C2_4_4 が 231) をホモ接合で持つ DPB 患者 12 例と健常コントロール 12 例、計 24 例を対象とし、この 80 kb を約 20 領域に分割して平均約 4 kb を増幅する PCR を行った。得られた PCR 産物については、シーケンス用プライマーを約 600 塩基程度ごとに設定して、直接シーケンス法により塩基配列の決定を行い、SNP を同定した。得られた SNPs を用いて、この連鎖不平衡構造の詳細な解析を行った。

同時に、この 80 kb の領域内で GENSCAN により

予測された 4 つの遺伝子のクローニングを試みた。ヒト気道上皮細胞株の NCI-H292 細胞・A549 細胞・BET1A 細胞、EBV 不死化ヒト B 細胞株を材料にし、total RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて cDNA 化した。予測された遺伝子エクソン部のうち、上流エクソンにセンスプライマーを設定し、下流エクソンにアンチセンスプライマーを設定し、cDNA を PCR で増幅した。増幅産物は直接シーケンス法で塩基配列を決定した。この 4 つの材料からは増幅産物が得られなかった予測遺伝子については、Human MTC パネル I および II (CLONTECH) を用いて、16 種類のヒト組織由来の cDNA を材料にして PCR 増幅を試みた。

(倫理面への配慮)「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に準拠した当センターの遺伝子解析に係わる倫理委員会の承認を受けている。

結 果

(1) 特に連鎖不平衡の強い 80 kb の領域は、疾患に関連するマイクロサテライトのアレルをホモ接合で持つ 24 例を対象に、疾患との関連性が強く、さらに主要ハプロタイプを分ける変異検索を網羅的に行った結果、反復配列構造を持つ約 10 kb の領域を除き、全塩基配列を解析することが可能であった (図 1)。解析した約 70 kb の領域からはさらに 100 個以上の SNPs が同定された。また、新たに疾患と強く関連するマイクロサテライトマーカーもこの領域内に同定された (図 2)。これらの SNPs 間の連鎖不平衡構造は、D' を指標とした場合は、ほとんど 1 を示し、この 80 kb の領域内で組換えが乏しいことを示していたが、r2 を指標にした場合に、さらにいくつかのセグメントに分かれ、これらセグメントの成り立ちが様でないことを示していた。すなわち、これらの変異を用いることによって、主要ハプロタイプをさらにいくつかのハプロタイプに分けることが可能であった。すなわち、ハプロタイプ予測プログラム (PHASE ver 2) を用いることによって、HLA-B54 とほぼ 1:1 対応の関係にあるハプロタイプなどを見いだすことができた。

(2) 候補領域内の 4 つの予測遺伝子のうち、2 つの遺伝子の発現が確認され、VNTR を含む多型が認められた。

遺伝子クローニングの試みについては、4 つの予測

¹ 国立国際医療センター 研究所・呼吸器疾患研究部

² 東京大学人類遺伝学教室

³ 虎の門病院呼吸器科

⁴ 東邦大学呼吸器内科

⁵ 天理よろづ相談所病院呼吸器内科

⁶ 日本医科大学第四内科

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

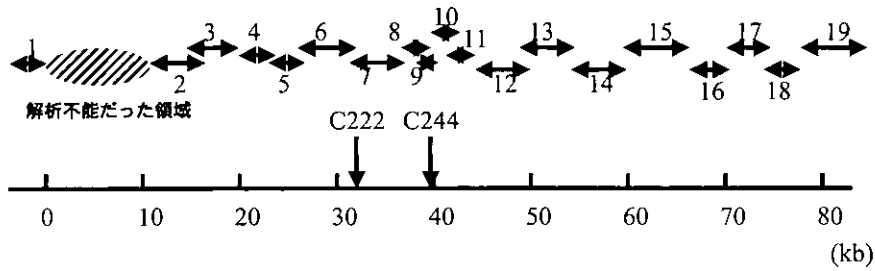


図1 塩基配列を決定し、遺伝子変異の有無を検索した80 kbの候補領域。候補領域を分割して、PCR法によって、 \leftrightarrow で示すように増幅した。リピート配列のため解析不能であった領域を斜線を示す。

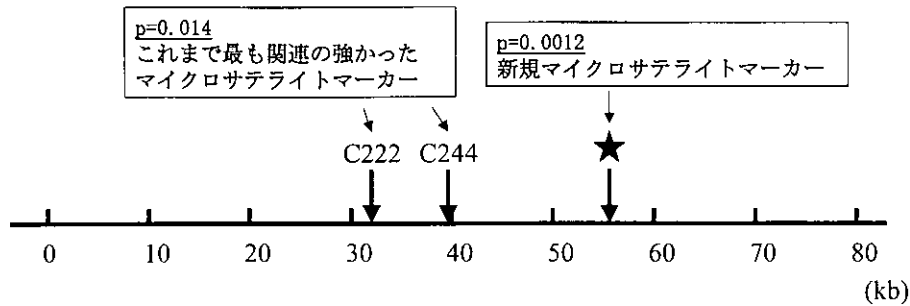


図2 疾患と強く関連する新規マイクロサテライトマーカー

C222とC244は既報(文献4)のマイクロサテライトマーカーであるが、今回の80 kbの網羅的探索で新たに見出されたマイクロサテライトマーカーの位置を★で示す。

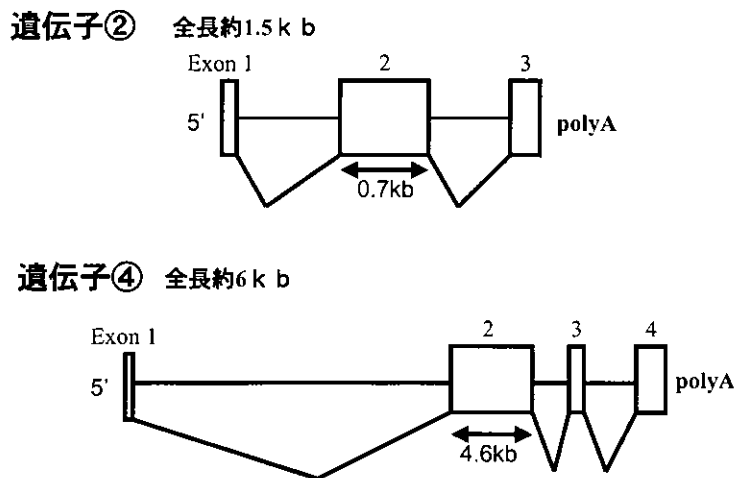


図3 候補領域からクローニングされた新規遺伝子

遺伝子予測プログラムにより、推定された①から④のうち、2つの遺伝子が実際にクローニングされた。②と④) 得られた遺伝子のエクソン、イントロン構造を模式的に示す。

のうち2つの遺伝子がRT/PCRで増幅された(図3)。80 kbのうちHLA-B側の領域に予測された遺伝子は、cDNAパネルを用いた検討まで行ったが、いずれの臓器からも増幅されなかった。HLA-A側の領域に予測された遺伝子については、2つの遺伝子がRT/PCRで陽性であり、ともにcDNAパネルでの検討では肺組織で陽性であった。最もHLA-B遺伝子座側に

クローニングされた遺伝子には、疾患と強く関連する変異は見出されなかった。

一方、膜型ムチン遺伝子は、80 kbの連鎖不平衡領域のA遺伝子座側の辺縁部に位置し、これまで十分な検索が行われていなかったため、本年度、全遺伝子領域について遺伝子変異を網羅的に探索した。その結果、疾患と関連する遺伝子変異がこの遺伝子のコーディ

ング領域に新たに見出された。

考案・結論

マイクロサテライトマーカーを用いた検討により、HLA-A座より300 kbほどHLA-A座よりの200 kbの領域が疾患感受性遺伝子の候補領域として推定されていたが、予測されたエクソン部位を中心に検討して得られたSNPsを用いた昨年度までの結果により、更に80 kbまで候補領域が限定されてきた。この80 kbの領域は非常に連鎖不平衡の強い領域であり、疾患と関連する遺伝子多型の中でいずれのものが真に意味のある多型かの判断は困難であったため、網羅的解析を行った。新規遺伝子について遺伝子変異を網羅的に探索した結果、疾患と関連する遺伝子変異がコーディング領域に新たに見出された。80 kbの領域のうち、解析不能であったリピート配列構造を持つ約10 kbの領域を除いて残りの領域はすべて検索を完了しており、ほかに、疾患と強く関連するDNA多型がある可能性はほぼ排除されている。また、昨年度の検討で、膜型ムチン遺伝子のVNTRについて、最も短いアレルが症例・対照集団において出現頻度に偏りが認められ、症例での頻度が有意に低いことも判明しており、このVNTRが短いものは疾患抵抗性の性質を有すると考えられた。以上の状況より、この膜型ムチン遺伝子がDPBの発症に関与する可能性が高いと判断

された。

今後、疾患に関連するハプロタイプを推定し、解析を加えていくことにより、さらにこの問題に解答を与えたい。また新規遺伝子内にあり、疾患と関連する変異は、機能解析を加えることにより、今後、疾患との関連が解明されるものと期待される。

参考文献

- 1) Kudoh S, Keicho N. Diffuse panbronchiolitis. *Semin Respir Crit Care Med* 24: 607-617, 2003.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

エリスロマイシンの抗炎症作用：包括的遺伝子 発現解析から（第二報）

月館 利治¹ 中島 敏治¹ 斉藤 博久¹ 滝澤 始^{2*}

びまん性汎細気管支炎に対する特効的効果から、その抗炎症作用が注目された 14 員環マクロライド系抗生物質（以下マクロライド）は、現在では慢性副鼻腔炎、副鼻腔気管支症候群をはじめさまざまな疾患領域での治療応用が行われている。私達はこれまでに、気道炎症に重要な役割を演じるサイトカイン、ケモカイン、接着分子の発現への抑制効果に注目し、これらに共通して重要な転写調節因子（NF κ B, AP-1）への抑制性作用を報告してきた。しかし、マクロライドの薬効の機構をすべて説明することはできない。そこで、ヒト気道上皮細胞を標的細胞として、エリスロマイシンの遺伝子発現への作用を、ジーンチップを用いて包括的に評価することを試みた。ヒト正常気管支上皮細胞においてエリスロマイシン 10^{-5} M を 72 時間作用させて包括的遺伝子発現への影響を検討した。エリスロマイシンの処理により発現が増強する遺伝子と減弱する遺伝子が存在した。明らかな発現減弱を示したもののなかには気道炎症において役割が推測される IgE-dependent histamine-releasing factor が含まれていた。今後、マクロライドの処理時間などを変えてさらに検討する予定である。

Studies on the array analysis of mRNA transcripts in human bronchial epithelial cells: An approach to the anti-inflammatory actions of macrolide antibiotics

Toshiharu Tsukidate¹, Toshiharu Nakajima¹, Hirohisa Saito¹, and Hajime Takizawa²

¹National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan.

²The 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.

To investigate the molecular mechanisms of their actions, we explored to utilize the array analysis of mRNA transcripts in human bronchial epithelial cells. The normal human bronchial epithelial cells were treated with therapeutic dosage of erythromycin (EM) for 72 hrs. Total cellular RNA were extracted and subjected to gene transcription analysis by Gene-Chip. EM showed increasing as well as suppressing effects on transcription of several genes. This approach seemed to help elucidating the important genes involved in the therapeutic effectiveness of the macrolides.

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^{1)~3)}。これらの多くに共通して重要な転写調節因子 (NF κ B, 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⁴⁾、治療域濃度のエリスロマイシン (EM, 10⁻⁶ 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 NF κ B, AP-1 の活性化抑制作用を見出した⁵⁾。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 (NF κ B, AP-1) の活性化を抑制しうること、I κ B のリン酸化には直接作用しないこと、を示した⁶⁾。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する結果も得られた⁷⁾。

昨年我々は、びまん性汎細気管支炎などに対するマクロライドの有効性を解明するため、エリスロマイシンを作用させた気道上皮細胞株 (BET-1A) における遺伝子発現をマイクロアレー (GeneChip) を用いて網羅的に検討した。

今回、さらに正常ヒト細気管支上皮細胞における遺伝子発現を網羅的に検討した。

対象と方法

1) 既報のごとく⁵⁾、正常ヒト細気管支上皮細胞 (SAEC, CloneticsTM) 1×10⁵ cells を用い、ホルモン・成長因子を添加した Small Airway Epithelial Cell Medium without hydrocortisone and BPE にて培養した。

2) コントロール (溶媒のみ)、および Erythromycin (EM) 10⁻⁵ M で、37°C 72 時間インキュベートしたのち、total RNA を精製し (RNeasy キット)、引き続き、

Human Genome U133A (Affymetrix 社) を用いて包括的な遺伝子発現解析を行った。手順は昨年示したとおりである。

3) 発現強度の平均値の差が 100 を超えており、かつ 2 倍を超えて変化した場合を有意な変化とした。

結 果

(1) 気道炎症に関連の深いサイトカイン・ケモカインについての結果を図 1 に示す。EM の処理により、72 時間後の IL-8 遺伝子発現レベルは減弱傾向を示した。

(2) CFTR を含むイオンチャンネル遺伝子についても注目したが、有意に変動したものはなかった。

(3) 有意に増強した遺伝子が 11 個認められたが、病態での意義は不明であった。EM の処理により、発現が有意に減弱した遺伝子が 12 個認められ、そのうち、tumor protein, translationally-controlled 1 (IgE-dependent histamine-releasing factor) はコントロールを 1 とすると、0.23 へと大きく減弱していた。

考 案

これまでの研究により、14 員環マクロライド抗生物質が、炎症性サイトカインなどの発現に重要な転写調節因子 (NF κ B, AP-1) の活性化を抑制することが明らかになり、びまん性汎細気管支炎の気道炎症を改善する 1 機序として推定されるに到っている。この作用は、気道上皮細胞のみならずマクロファージ、リンパ球、線維芽細胞においても認められ^{1)~5)}、生体に対するかなり普遍的な作用である可能性がある。一方、マクロライドには、気道分泌抑制作用、細胞のアポトーシスへの作用、リンパ球の増殖抑制作用など、きわめて多面的な作用も示されており、以上述べた機構だけで薬効を説明しきることはできない。昨年度は、ヒト気管支上皮細胞株である BET-1A 細胞を用いて、Affymetrix 社のジーンチップを用いて、約 2 万以上の遺伝子についてその発現への影響を検討できた。このうち、ヒト気道上皮細胞において今回検出可能であったのは、約半分の 1 万個であった。

今年度は、正常ヒト気管支上皮細胞を用いて、EM の処理をより長時間とした。予備的な実験により、細胞の生存率に影響を与えない最長時間として 72 時間

¹ 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部

² 東京大学医学部呼吸器内科

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

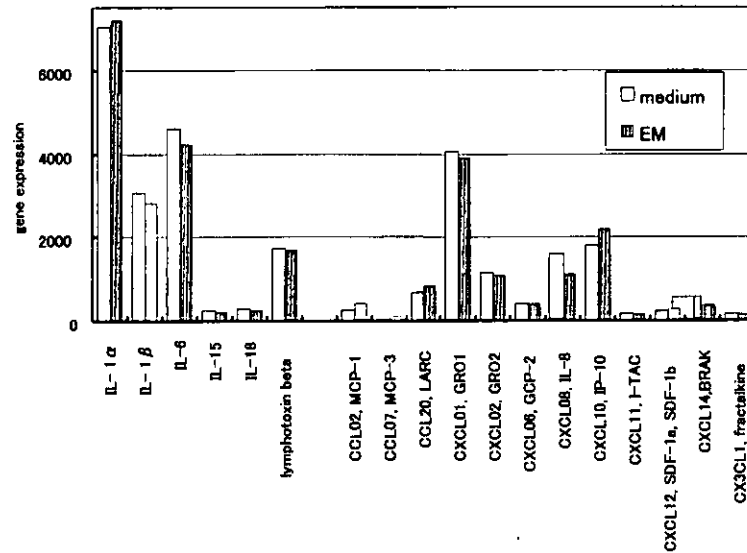


図1 ジーンチップを用いた包括的遺伝子発現の検討

のインキュベートを行った。この処理により、72時間後のIL-8遺伝子発現レベルは減弱傾向を示した。他の炎症性サイトカイン・ケモカインでははっきりしたものは認めなかった(図1)。この結果は、既報の我々を含む諸家の報告に矛盾ないものであった^{2,3)}。また、EMの処理により、発現が増強する遺伝子が11個みられ、一方減弱する遺伝子が12個存在した。どちらもBET-1Aで行った昨年度の結果よりも大幅に少ない数であった。この原因は不明であるが、細胞株よりも正常細胞での結果が臨床的な意義が大きいと考えられ、さらに検討する予定である。有意に変動したもののうち、病態的な意義付けが考えられたのは、tumor protein, translationally-controlled 1 (IgE-dependent histamine-releasing factor) であり、従来の報告からは、好塩基球からヒスタミン、IL-4、IL-13をリリースさせる、好酸球へのchemotaxis活性、また気管上皮に作用し、IL-8、GM-CSFを産生させるなどの作用が知られており、マクロライドの活性として可能性をもつものと思われた。

今回は、TNFα 1 ng/mlのような炎症刺激下での検討は行い得なかったが、昨年度の検討により炎症性分子を含む多数の遺伝子の発現が強く増強することがわかっており、これらの増強した遺伝子群においてエリスロマイシンの効果が注目される。今後の課題としたい。

マクロライドの作用機構を解明する上で、今回のアプローチは、同時にほぼ全部の遺伝子発現への影響を網羅的に検出できる点が最大の利点と思われる。しか

し、一方で、細胞内でリン酸化されるシグナル分子の動きなどはとらえられないことなど、限界もまた存在する。さらに、マクロライドの効果発現には少量で長期の投与が必要であることを考慮するとマクロライドの試験管内での作用時間にも工夫が必要である。我々は、以上の点にも留意しながら、マクロライドの作用する遺伝子群の検索を推進する予定である。

結 論

マクロライドの抗炎症作用解明のために、ヒト正常気道上皮細胞を用いてジーンチップによる包括的遺伝子発現の検討を行い、その変化を検出することができた。

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, et al. 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 et al. Eryth-

romycin 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, et al. 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 伸他. 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, et al. 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) Masashi Desaki, Hitoshi Okazaki, Toshiaki Sunazuka, Satoshi Omura, Kazuhiko Yamamoto, Hajime Takizawa. Molecular mechanisms of an anti-inflammatory action of erythromycin in human bronchial epithelial cells: a possible role in the signaling pathway that regulates nuclear factor-kappa B activation. *Antimicrob. Agents Chemother.* In press (2004)
- 7) Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, et al. Clarithromycin inhibits NF- κ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 44-47, 2001.
- 8) Miyano-hara T, Ushikai M, Matsune S, et al. 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-kappaB, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2678-2684, 1999.
- 10) Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y. et al. Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappa B transcription factors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 49(5): 745-55, 2002.

追 加

追

加

「アマメシバ」摂取と関連したと思われる閉塞性 細気管支炎の本邦での発生 —— 緊急報告 ——

松山 航¹ 大中原研一¹ 東元 一晃¹ 納 光弘^{1*}
林 美保² 小倉 高志² 長谷川好規³ 下方 薫^{3**}

閉塞性細気管支炎は病理学的には細気管支の狭窄及び閉塞の認められる予後不良の稀な疾患である。閉塞性細気管支炎は膠原病、感染症、薬剤、粉塵吸入、骨髄を含めた臓器移植など多くの原因で発症するがその病態は未だ解明されていない。1995年に台湾での「アマメシバ」摂取に関連した閉塞性細気管支炎の大量発生がLaiらにより報告された。「アマメシバ」は植物の一種で体重コントロール目的に使用される。我々はここに日本での「アマメシバ」摂取に関連した閉塞性細気管支炎5例を報告する。全症例、閉塞性呼吸機能障害を認めステロイド治療に抵抗性であった。日本での年間「アマメシバ」生産量は3,000トンにのぼり、まださらに多くの「アマメシバ」摂取に関連した呼吸器疾患についての全国調査の必要性を提案する。

Outbreak of bronchiolitis obliterans associated with consumption of *Sauropus androgynus* in Japan

Wataru Matsuyama¹, Ken-ichi Oonakahara¹, Ikkou Higashimoto¹, Mitsuhiro Osame¹
Miho Hayashi², Takashi Ogura², Yoshinori Hasegawa³, Kaoru Shimokata³

¹Department of Neurology and Geriatrics, Kagoshima University Graduate School of
Medical and Dental Science, Kagoshima Japan.

²Department of Respiratory Medicine, Kanagawa Cardiovascular and Respiratory Center, Kanagawa Japan

³Department of Medicine, Division of Respiratory Diseases, Nagoya University Graduate School of Medicine

Bronchiolitis obliterans (BO) is a rare disease with poor prognosis characterized by stenosis and obstruction of bronchioles, pathologically. It has been reported that BO is caused by many factors such as collagen diseases, infections, drugs, toxic fumes and bone marrow or lung transplantation, however detailed pathogenesis of BO has not been elucidated. In 1995, Lai et al reported an outbreak of BO, which were associated with the consumption of uncooked *Sauropus androgynus* (SA). SA is a vegetable that is used for weight control. Here, we report new five cases of BO associated with consumption of SA in Japan. All cases showed obstructive pulmonary dysfunction and steroid therapy was not effective. Total production amount of SA is 3000t per year in Japan, therefore it is possible that there are more patients with pulmonary disorder associated with SA consumption. We propose the necessity to investigate the nation-wide case search of SA-associated pulmonary disorders.

はじめに

1995 年, 台湾において健康食品として販売されていた「アマメシバ (Sauropus androgynus)」が原因と見られる重篤な閉塞性細気管支炎で 200~300 例の犠牲者の報告がなされた。これらはいずれもステロイドなどの免疫抑制剤や気管支拡張薬の治療に反応せず, その中には死亡例や肺移植を要する例など予後不良症例も少なくなかった¹⁾。2003 年, 我々は本邦で初めて「アマメシバ」が原因と考えられる閉塞性細気管支炎の緊急症例報告²⁾を行った。その後, 相次いで 4 例の「アマメシバ」摂取が原因と考えられる肺疾患の症例が見つかった³⁾。以下に本邦での「アマメシバ」摂取が原因と考えられる肺疾患患者について報告する。

症 例 (表 1)

症例 1. 47 歳女性, 生来健康, 平成 14 年 4 月より 4 ヶ月間「アマメシバ」(総量 1 kg) 摂取していたところ呼吸困難, 咳が出現。呼吸困難は Hugh-Jones IV 度まで進行, 呼吸機能検査で閉塞性肺機能障害, 胸部 CT にてモザイクパターン (図 1a), 肺換気シンチにてびまん性に欠損を認め (図 1b) 臨床的に閉塞性細気管支炎と診断された。「アマメシバ」摂取中止し, ステロイド治療開始されたが呼吸困難進行し, 平成 16 年現在生体肺移植待ちの状態である。

症例 2. 55 歳女性, 生来健康, 平成 14 年 8 月から約 3 ヶ月間「アマメシバ」(総量 1.44 kg) 摂取したところ呼吸困難, 咳, 喘鳴が出現。近医受診し呼吸機能検査



図 1a. 胸部 CT (呼吸時)

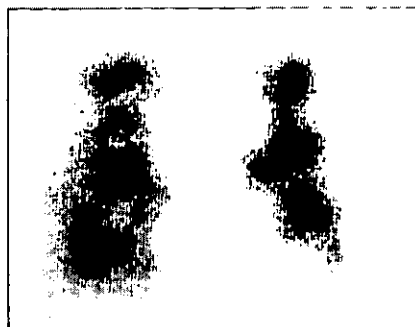


図 1b. 肺換気シンチ

で閉塞性肺機能障害を認めた。「アマメシバ」摂取中止し, 気管支拡張薬, ステロイド治療をされたが症状の改善は認めていない。

症例 3. 29 歳女性, 生来健康, 平成 14 年 8 月より約 9 ヶ月「アマメシバ」(総量 1.2 kg) 摂取したところ咳, 喘鳴, 呼吸困難出現。近医受診し呼吸機能検査で閉塞性肺機能障害を認めた。「アマメシバ」摂取中止し, 気管支拡張薬, ステロイド治療をされたが症状の改善は認めていない。

症例 4. 73 歳女性, 生来健康, 平成 13 年 6 月より約 6 ヶ月間「アマメシバ」(総量 0.3 kg) 摂取したところ口腔内腫脹, 味覚異常が出現したため摂取中止したが約 3 ヶ月後から労さじ呼吸困難出現。近医受診し呼吸機能検査で閉塞性肺機能障害を認め, 気管支拡張薬, ステロイド治療をされたが症状の改善は認めていない。

症例 5. 50 歳女性 (症例 4 の娘), 生来健康, 平成 13 年 9 月より約 3 ヶ月間「アマメシバ」(総量 0.36 kg) 摂取したところ舌の違和感出現し摂取中止した。しかし, その 3 ヶ月後労さじ呼吸困難出現。近医受診し呼吸機能検査で閉塞性肺機能障害を認め, 気管支拡張薬, ステロイド治療をされたが症状の改善は認めていない。

表 1

症例	1	2	3	4	5
年齢(歳)・性	47・女	55・女	29・女	73・女	50・女
			(2の娘)		(4の娘)
アマメシバ					
総摂取量(g)	1000	1440	2190	300	400
摂取期間(日)	130	360	360	180	120
1秒量(l)	0.64	0.62	1.00	0.45	0.53
1秒率(%)	36.4	40.3	54.3	29.0	24.0
治療反応性	無	無	無	無	無

¹⁾ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学講座 神経内科・老年病学分野

²⁾ 神奈川県立循環器呼吸器病センター呼吸器科

³⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科機能調節内科学

* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

考 察

上記5症例はいずれも、生来健康であったにもかかわらず「アマメシバ」摂取後呼吸器疾患が出現しました他に原因が見当たらず、ステロイド治療に反応しないことより「アマメシバ」摂取に関与した肺疾患と考えられた。

「アマメシバ」はトウダイグサ科の多年生通年性の低木で、マレーシアが原産である。葉は栄養価（カロチン、ビタミンB1/B2/C、カルシウム、リン、鉄など）が高い。アルカロイドのパパベリンを含有するとの報告⁴⁾もあるが、本邦で肺疾患との関連性が疑われた「アマメシバ」の分析結果ではパパベリンは含まれていないことが確認された（厚生労働省報告 un-published data）。台湾では1989年ごろより栽培され始めたが1995年ごろより営利的に栽培されるようになり特に若い女性を中心に体重コントロールの目的で服用されるようになった⁵⁾。

台湾での報告によると「アマメシバ」に関連した呼吸器疾患のうち、多くは本報告の症例1と同じ閉塞性細気管支炎である。閉塞性細気管支炎は慢性閉塞性肺疾患の範疇に属する稀な疾患であり、細気管支に局限した狭窄及び閉塞を特徴とする。その原因として膠原病、感染症、薬物などがあるが⁶⁾いまだに詳細な病態は解明されていない。「アマメシバ」関連の閉塞性細気管支炎の病態は不明であるがその組織所見では細気管支内腔粘膜内、粘膜下へのリンパ球浸潤及びマクロファージと線維芽細胞を主体とした線維化を伴う気管支内腔の狭窄が認められ、「アマメシバ」摂取に伴う何らかの肺での免疫異常の存在が示唆されている⁷⁾。臨床的には、いずれの症例もステロイドや気管支拡張薬などの治療効果はなく重症化するものも少なくなく、台湾では肺移植なども試みられている。

「アマメシバ」は本邦では1996年に沖縄で栽培されるようになり現在年間約3000トンが生産され複数の業者が製造・販売を行っており日本国内でも相当数の使用者がいると考えられる。しかし、上記のように「アマメシバ」は重篤な肺障害を起こす可能性が極めて高いにもかかわらず、本邦における「アマメシバ」の実態調査研究がない。今後は全国の呼吸器関連施設に対して、これまでに「アマメシバ」の摂取と関連あると考えられた肺疾患症例の症例調査研究をアンケート

方式により実施し、全国調査により日本の現状とその臨床的特長を明らかにする中で、早期診断と発病予防に向けた情報発信を行うことが急務である。

参考文献

- 1) Lai RS, Chiang AA, Wu MT, Wang JS, Lai NS, Lu JY, Ger LP, Roggli V. Outbreak of bronchiolitis obliterans associated with consumption of *Sauropus androgynus* in Taiwan. *Lancet*. 1996; 348: 83-5.
- 2) 大中原研一, 堂地ゆかり, 町田健太郎, 東元一晃, 川畑政治, 有村公良, 納 光弘. 「アマメシバ」摂取によると思われる閉塞性細気管支炎の本邦での発生. *日本医事新報* 2003; 4141: 27-30.
- 3) Ken-ichi Oonakahara, Kentarou Machida, Wataru Matsuyama, Ikkou Higashimoto, Masaharu Kawabata, Kimiyoshi Arimura, Mitsuhiro Osame. Outbreak of bronchiolitis obliterans associated with consumption of *Sauropus androgynus* in Japan. In submission.
- 4) Padmavathi P, Rao P. Nutritive value of *Sauropus androgynus* leaves. *Plant Foods for Human Nutrition* 1990; 40: 107-113.
- 5) Hsiue TR, Guo YL, Chen KW, Chen CW, Lee CH, Chang HY. Dose-response relationship and irreversible obstructive ventilatory defect in patients with consumption of *Sauropus androgynus*. *Chest* 1998; 113: 71-6.
- 6) St. John RC, Dorrinsky PM. Cryptogenic bronchiolitis. *Clinical Chest Medicine* 1993; 14: 667-675.
- 7) Chang H, Wang JS, Tseng HH, Lai RS, Su JM. Histopathological study of *Sauropus androgynus*-associated constrictive bronchiolitis obliterans. *American Journal of Surgical Pathology* 1997; 21: 35-42.
- 8) Chen CW, Hsiue TR, Chen KW, Chang HY, Chen CR, Yang BC. Increased IL-5 and IL-10 transplanted in bronchial cells after *Sauropus androgynus* injection. *Journal of Formosan Medical Association* 1996; 95: 699-702.

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 —— 糞便の凍結がプロピオニバクテリアの 分離に及ぼす影響 ——

渡邊 邦友^{1*} 田中香お里¹ 森下 宗彦²

検体採取や採取後の検体の保存環境等の培養成績に与える負の因子の影響を最小限にする目的で、新規に愛知県を研究の場として、サルコイドーシス患者の糞便を収集し、それらを対象に、プロピオニバクテリア選択培地によるプロピオニバクテリアの分離培養を実施した。サルコイドーシス患者 44 名の糞便中から 10 cfu/g 以上に本菌が検出された検体数は 30 検体で、培養陽性率は 68.2% であった。凍結操作が成績に及ぼす影響を明らかにする目的で、無作為に凍結前にも培養を行った 24 検体中の培養陽性検体数は 16 検体で、陽性率は 66.7% であった。糞便の凍結前後の培養結果の比較、すなわち、培養陽性率、個々の検体における菌量、平均菌量の比較では、凍結による顕著な菌数の変化は認めなかった。以上のことから、サルコイドーシス患者の 68.2% で、糞便からプロピオニバクテリアが 10 cfu/g 以上、10,000 cfu/g 以下の菌量で分離されることが明らかとなった。サルコイドーシス患者の病巣内に見られるプロピオニバクテリアの侵入門戸として消化管を考慮に入れる必要がある。

Propionibacteria in feces from patients suffered from Sarcoidosis

Kunitomo Watanabe, Kaori Tanaka, and Munehiko Morishita

*Div. of Anaerobe Research, Life Science Research Center, Gifu University,
Division of Internal Medicine, Aichi Medical College*

To minimize the effect of some factors on the culture results, we set a new group of patients suffered from sarcoidosis in Aich Medical College. A total of 44 fecal specimens were transported under anaerobic conditions as soon as possible after defecation, were frozen at -70°C within 1~2 days and were thawed out just before microbiological examination. Among them, a total of 24 specimens, randomly selected, were submitted to the microbial examination just before freezing to ensure the effect of the freezing on the viability of propionibacteria in the feces. As a result, thirty of 44 specimens (68.2%) were culture-positive for propionibacteria. Freezing the specimens did not change the viability of Propionibacteria in the specimens in this series of experiment. This study showed that Propionibacteria reside in the feces of 68.2% of the sarcoidosis patients with a range of 10 cfu/g to 10,000 cfu/g. These results might permit us to consider the intestinal tract as one of the possible site of infection of propionibacteria.