

Labeling index (%)

$$= \text{陽性細胞数} / \text{総カウント細胞数} \times 100$$

結 果

プレオマイシンによる線維化とその抑制

EGF-RTKIである gefitinib は 200 mg/kg 単独投与では、有意な変化を来たさなかった。プレオマイシン投与によって著明な炎症細胞浸潤を伴う線維化形成を認めた。これに対して gefitinib は十分な有効血中濃度が得られると考えられる 20 mg/kg から subtoxic dose である 200 mg/kg, 中間量の 90 mg/kg のいずれの濃度でも線維化スコアの改善を認めた。AG1478 も

同様に線維化を抑制した (Fig. 1)。PDGF-RTKI である AG1296 もプレオマイシンによる線維化を抑制した (Fig. 2)。また、プレオマイシン投与による肺組織中のコラーゲン含量の増加もこれらの薬剤によって有意に抑制された (Fig. 3, 4)。

プレオマイシンによる EGFR 発現とそのリン酸化

プレオマイシン投与による肺線維化過程における肺組織での EGFR およびリン酸化 EGFR の発現変化と gefitinib 投与によって EGFR のリン酸化が抑制されていることを確認する目的で免疫組織学検討を行った。EGFR の発現は、コントロール群の肺組織では上皮細胞を中心に約 15% の細胞に陽性であった。プレオマイシン投与によってこの発現の増加は見ら

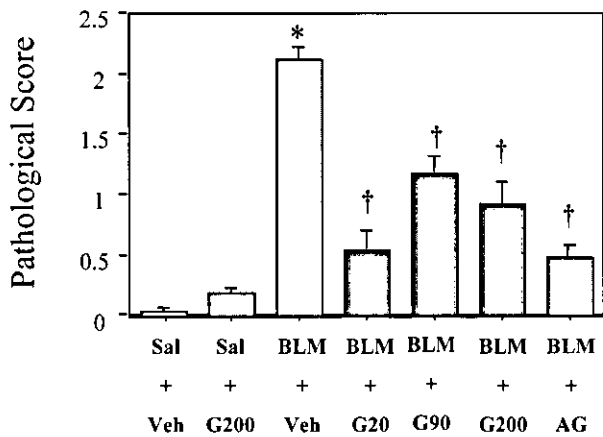


Fig. 1 Pathological fibrosis score. The fibrosis score of gefitinib 200 mg/kg without bleomycin showed no significant change. Gefitinib at any dose of 20, 90 or 200 mg/kg significantly prevented the bleomycin-induced lung fibrosis. AG1478 also prevented the fibrosis. \*p<0.001 vs Saline+Vehicle, †p<0.001 vs BLM+Vehicle.

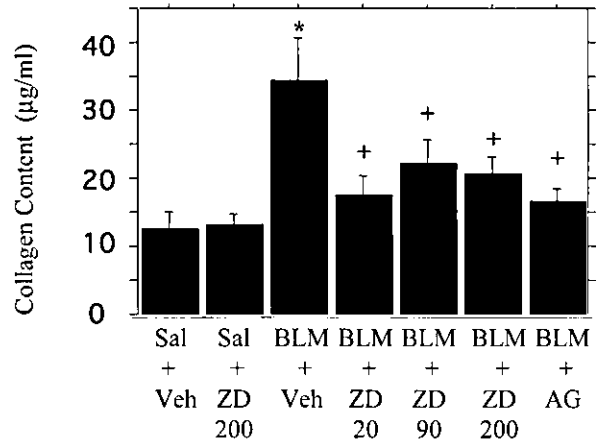


Fig. 3 Gefitinib at any dose of 20, 90 or 200 mg/kg significantly prevented the increased collagen content. AG1478 also prevented the content. \*p<0.001 vs Saline+Vehicle, †p<0.001 vs BLM+Vehicle.

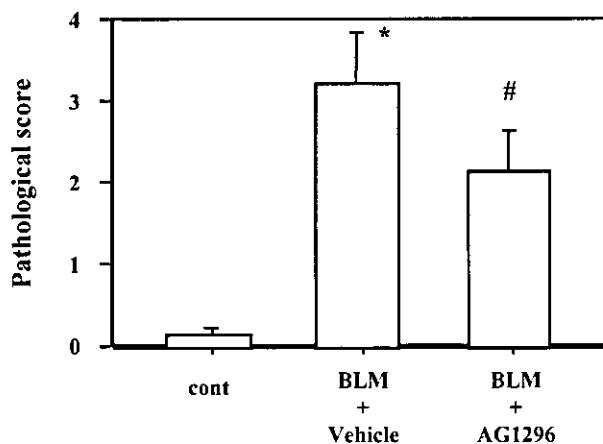


Fig. 2 Effects of AG1296 on BLM-induced lung fibrosis evaluated using a pathological fibrosis score. \*p<0.001, #p<0.01.

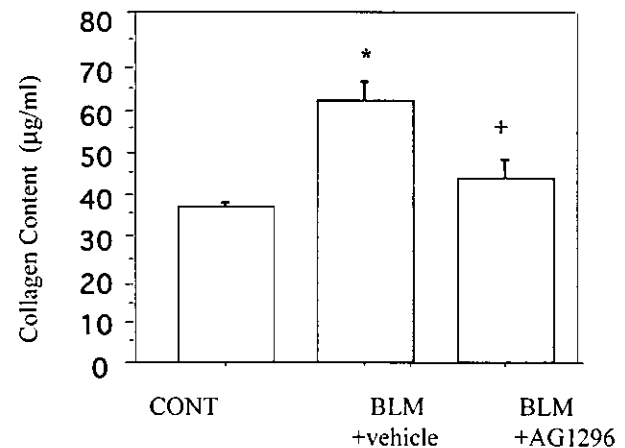
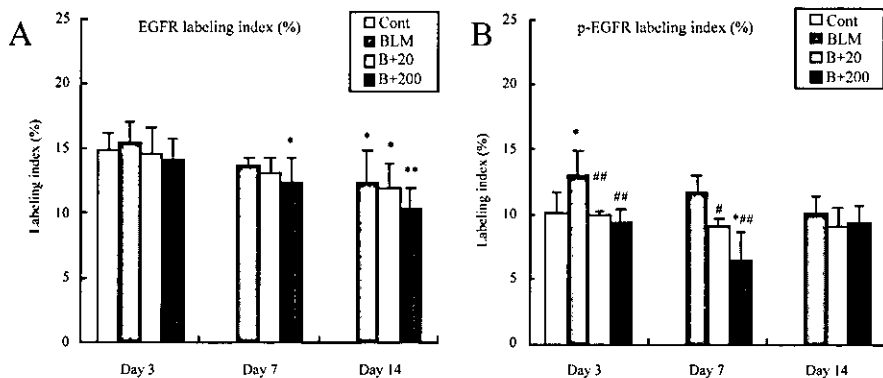


Fig. 4 AG 1296 significantly attenuated bleomycin-induced increase in collagen content. (p<0.01 vs control, +p<0.01 vs BLM+vehicle)



Values are expressed by mean ± S.D.  
 \*\*/: Significant difference from Cont by LSD test (p<0.05/0.01, respectively).  
 ##/: Significant difference from corresponding BLM by LSD test (p<0.05/0.02, respectively).

Fig. 5 Labelling index of EGFR (A) and p-EGFR (B).

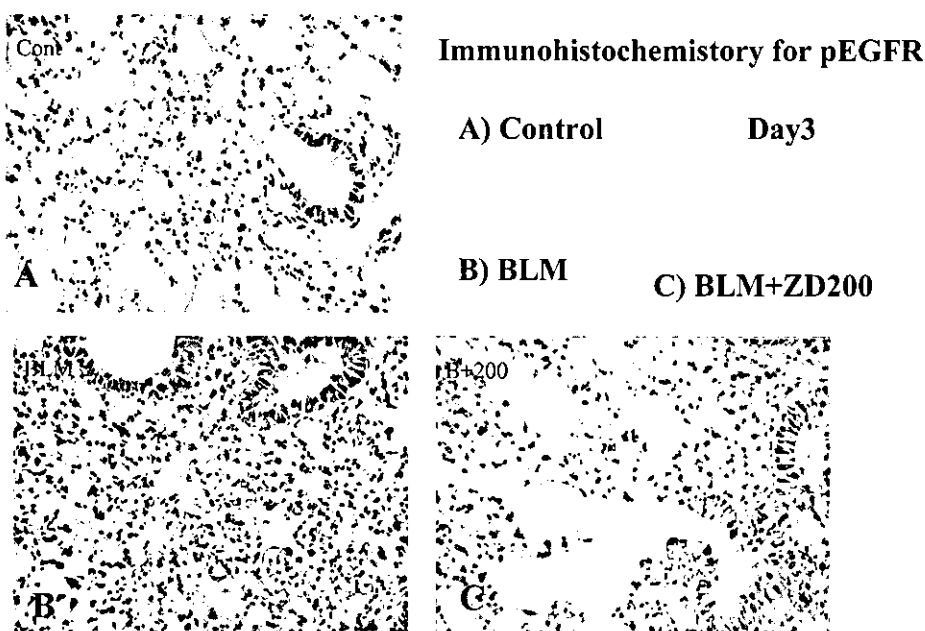
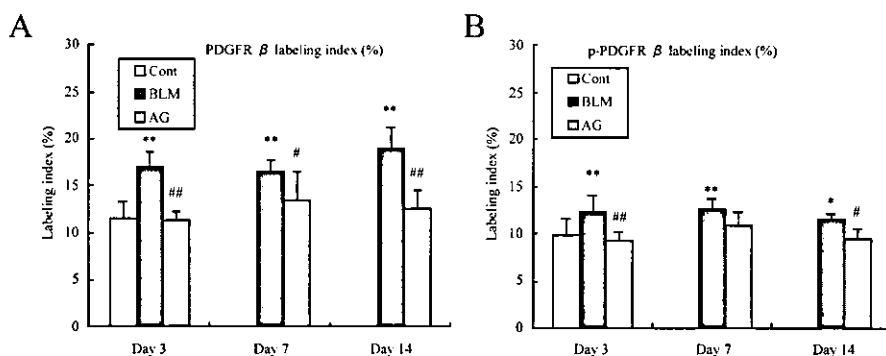


Fig. 6 Immunohistochemical stain for p-EGFR in bleomycin-induced fibrotic lung tissue at Day 3. A : control, B : bleomycin, C : bleomycin + gefitinib 200 mg/kg.



Values are expressed by mean ± S.D.  
 \*\*/: Significant difference from Cont by LSD test (p<0.05/0.01, respectively).  
 ##/: Significant difference from corresponding BLM by LSD test (p<0.05/0.02, respectively).

Fig. 7 Labelling index of PDGFR (A) and p-PDGFR (B).

Immunohistochemical stain for p-PDGFR in bleomycin-induced fibrotic lung tissue at Day 3. A : control, B : bleomycin, C : bleomycin + gefitinib 200 mg/kg.

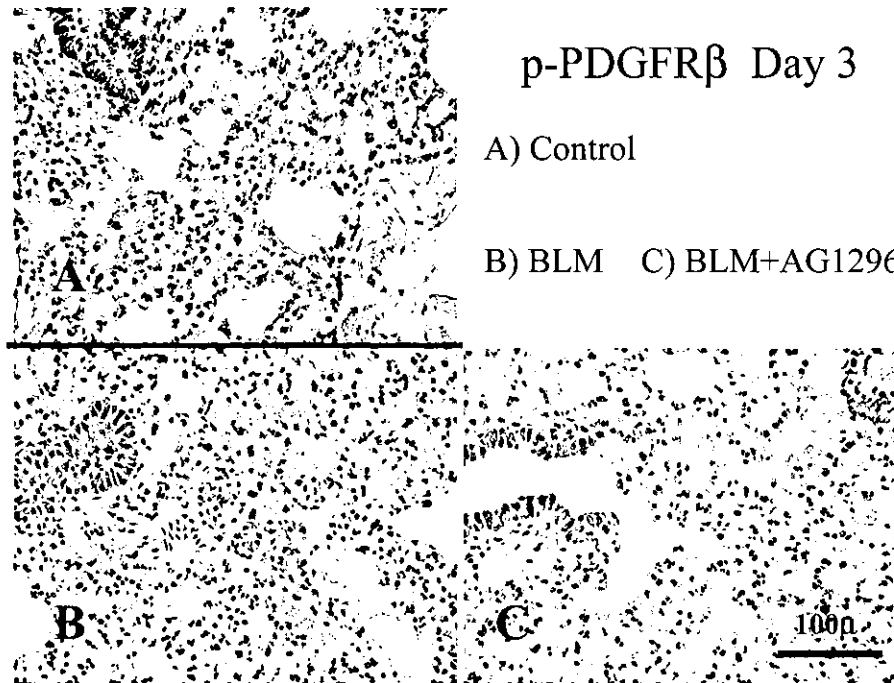


Fig. 8

れず, labelling index は 14 日後には, むしろわずかに減少した (Fig. 5A). 一方, リン酸化した EGFR (p-EGFR) の発現は, プレオマイシン投与 3 日後にコントロール (Fig. 6A) と比較して有意に増加し, 線維化肺組織の上皮細胞のほか間質に存在する線維芽細胞と考えられる細胞にも発現が認められた (Fig. 6B). gefitinib は, これを有意に抑制した (Fig. 6C). リン酸化 EGFR 発現は経時的に減少する傾向にあったが, day 7 においてもプレオマイシン群に比較し gefitinib は有意にリン酸化を抑制した (Fig. 5B).

#### プレオマイシンによる PDGFR 発現とそのリン酸化

プレオマイシン投与 3 日後より肺組織における PDGFR 発現はコントロールと比較し有意に増加し, 7 日目, 14 日目においても増加は持続した. これに対して AG1278 は, いずれの時点においても PDGFR 発現を有意に抑制した (Fig. 7A). リン酸化 PDGFR の発現も同様にプレオマイシンによって増加し, 3 日目, 14 日目では AG1278 による有意な抑制が認められた (Fig. 7B) (Fig. 8).

#### 考 察

EGFR-TKI および PDGFR-TKI は, ともプレオマイシンによる肺線維化形成を有意に抑制した. EGF-

RTKI については, 線維化の病態においては, EGFR が肺組織に高発現するとともに, EGFR リガンドである EGF や TGF $\alpha$  の産生が亢進しておりこれらの経路を遮断することが線維化形成を抑制したものと考えられる. 今回の検討で, 線維化組織における EGFR の発現増強はみとめなかったが, EGFR のリン酸化を認め, これが gefitinib によって有意に抑制されたことが示された. したがって, gefitinib は, 線維芽細胞における EGFR のリン酸化を抑制することによってその増殖を阻止し, 肺線維化を抑制したものと考えられる. 一方で, EGFR-TKI である gefitinib が副作用として急性肺傷害や間質性肺炎を併発すること<sup>6)</sup>やマウスにおいても gefitinib がプレオマイシンによる線維化を増強したという報告もなされているが, 今回の結果では, EGFR-TKI による負の作用は認められなかった. レセプターシグナルの抑制によって普遍的に肺傷害や線維化が発症するものでないことと基本的には EGFR の阻害は線維化抑制に働くことが示された. EGF シグナルを阻害することで上皮の再生など組織傷害からの修復の過程が阻害される可能性も考えられるが, これよりもむしろ, 線維芽細胞遊走や増殖の阻止作用が大きく働き線維化病態を抑制したものと考えられる. これらの分子標的治療薬の作用は, 種の違いや固体の感受性によって異なる反応を示す可能性があり, さらに慎重な検討が必要であると考え

られた。

PDGF-RTKIについてもプレオマイシンによる線維化の抑制効果とPDGFRの発現増強およびPDGFRリン酸化の増強が有意に抑制されることが示された。線維芽細胞増殖抑制を主たるターゲットとして使用できる薬剤であり、PDGF-RTKI作用を有するimatinibはすでに白血病治療薬として臨床使用されており、肺線維症治療への応用が期待されるが、こちらも間質性肺炎の副作用が報告されており、メカニズムの解明が必要である。

分子標的治療薬は、増殖因子による肺線維化を抑制し、IPFの治療薬として有用である可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) de Larco JE, Todaro GJ: Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4001-5, 1978.
- 2) Madtes DK, Busby HK, Strandjord TP, Clark JG: Expression of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor is increased following bleomycin-induced lung injury in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 540-51, 1994.
- 3) Hardie WD, Le Cras TD, Jiang K, Tichelaar JW, Azhar M, Korfhagen TR: Conditional expression of transforming growth factor- $\alpha$  in adult mouse lung causes pulmonary fibrosis *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L741-L749, 2004.
- 4) Madtes DK, Elston AL, Hackman RC, Dunn AR, and Clark JG. Transforming growth factor-deficiency reduces pulmonary fibrosis in transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 924-934, 1999.
- 5) Walsh J, Absher M, Kelley J: Variable expression of platelet-derived growth factor family proteins in acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 637-44, 1993.
- 6) *Biochem Biophys Res Commun.* 265: 503-8, 1999.
- 7) Brass DM, Tsai SY, Brody AR: Primary lung fibroblasts from the 129 mouse strain exhibit reduced growth factor responsiveness in vitro. *Exp Lung Res* 27: 639-53, 2001.
- 8) Rice AB, Moomaw CR, Morgan DL, Bonner JC: Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. *Am J Pathol* 155: 213-21, 1999.
- 9) Inoue A, Saijo Y, Maemondo M, Gomi K, Tokue Y, Kimura Y, Ebina M, Kikuchi T, Moriya T, Nukiwa T. Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib. *Lancet* 361 (9352): 137-9, 2003.
- 10) Suzuki H, Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A., Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition augments a murine model of pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 63: 5054-9, 2003.

# マウスの肺線維症モデルを用いた肺線維化の メカニズムの研究

中野 純一 中島 幹夫 足立 哲也  
長瀬 洋之 大田 健\*

今回、マウスの肺線維症モデルを用いて、照射による線維化および、その線維化に対する、ストレインによる感受性の相違、さらに HCV のトランスジェニック [HCV-Tg (+)] の及ぼす影響について検討した。15 Gy の照射後による強い肺の線維化は 12 週以降に生じ、また遺伝的には Balb/C が B57BL/6 より高感受性であることが示された。さらに HCV-Tg (+) マウスを用いた検討により、照射による肺線維化は HCV-Tg (+) において、早期に、かつ高度に生じることが示された。すなわち、従来我々がシリカモデルで示してきた結果と同様に、照射後の肺線維化においても HCV が関与し得ることが示された。さらにその線維化を促進する因子としてサイトカインの中では、線維芽細胞も活性化作用を有する IL-4 の関与が示唆された。

## Mechanisms of pulmonary fibrosis with irradiation in murine models

Junichi Nakano, Mikio Nakajima, Tutsuya Adachi,  
Hiroyuki Nagase, and Ken Ohta

*Teikyo University school of Medicine, Department of Medicine*

We have been reported that period of more than 12 weeks might be necessary for lung fibrosis in mice by the irradiation in our previous studies. We have been also reported that in HCV-transgenic system, significant pulmonary fibrosis was demonstrated by measuring lung dry weight and hydroxyproline content in HCV-transgenic mouse with treatment of 8 mg silica, which is the half dose being used conventionally in murine model of lung fibrosis. Here, we studied the process of lung fibrosis in response to irradiation in two strains of mice (Balb/C and C57BL/6) firstly. Secondly, we investigated if the HCV transgenic may influence the processes of these inflammatory changes and lung fibrosis induced by irradiation. As results, Balb/C was significantly sensitive to irradiation as compared to C57BL/6. These fibrous changes were demonstrated significantly after 12 weeks from irradiation with decreasing body weight of mice. Moreover, significant pulmonary fibrosis was produced by irradiation, in early time point and with higher magnitude in HCV transgenic mouse in response to irradiation. Furthermore, participation of IL-4 was shown as an important factor promoting the lung fibrosis in HCV transgenic system, which is agree with the results of pulmonary fibrosis of mouse in response to silica particulate. We concluded that Balb/C is sensitive to irradiation compared to B57BL6 and HCV is one of important and promoting factors in the process of these pulmonary fibrosis.

研究目的

特発性肺線維症は、その原因が未だに不明である。肺線維化の原因については、ウイルスをはじめ種々の因子が考えられている。我々は従来からシリカあるいは放射線を用いた線維症マウスモデルで検討している<sup>1)</sup>。また疫学的な研究でHCVが線維化に関与していることを報告している。今回、放射線による肺線維症と、その過程におけるHCVの関与について検討した。

研究方法

(1) まずマウスモデルとして放射線による肺線維化の成立について検討した。平成14年度の検討では15 Gy照射後3ヶ月の観察でも十分な線維化は惹起されないことを報告した。今回さらに長期の経過を追い、その線維化の過程を検討した。さらにその線維化に対して遺伝的な素因が関与しているかを、2種のマウスストレインを用いて検討した。

具体的には従来よりシリカの肺線維症モデルで使用したBalb/CとC57BL/6マウス6週齢の雄を用いて照射を行い、マウスが生存しているのか、また肺での急性期およびその後の線維化変化について検討した。照射部位を胸部に限定するために放医研の器具に鉛によるスリットも加え照射した。文献的にはマウス一匹あたりの照射量が10-15 Gyであること、また本研究班プロジェクトで報告したが、15 Gyの設定で12週までに炎症性変化と生化学的な線維化指標の変化が認められるため、今回の実験は15 Gy照射で施行した。

Balb/CまたはC57BL/6の6週齢(雄)を使用する。  
15 Gyを250 kVp (15 mA), 全肺野に照射する。  
照射後に病理, BALF, ハイドロキシプロリンについて検討する。

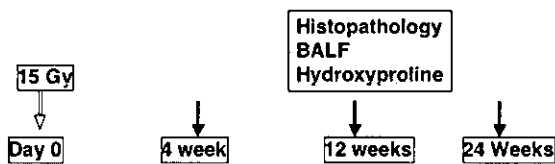


図1 方法

帝京大学医学部内科

\* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

長期の観察では個々のマウスの体重変化を検討し、さらに組織の線維化を評価する目的で、肺組織の病理(Ashcroft score)について検討した。また、炎症を評価する目的で気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid; BALF)の評価を行い、さらに肺の線維化の生化学的な指標として用いられるハイドロキシプロリン(Hydroxyproline: HOP)について検討した。サイトカインについては肺組織およびBALFについて検討した(図1)。

(2) さらに、HCVが肺の線維化を促進するか否かを解明する目的で、引き続きHCV-トランスジェニック(Tg(+))を用いてさらに照射後の線維化について検討を行った。この実験系においても、長期の観察では個々のマウスの体重変化を検討し、組織の線維化を評価するために肺組織の病理(Ashcroft score)を、また炎症を評価するためにBALFの評価を、さらに肺の線維化の生化学的な指標としてHOPについて検討した。サイトカインについては肺組織およびBALFについて検討した。実験に際し、総細胞数および細胞分画については各群をn=5、肺組織およびBALFのmRNAの発現についてはn=3、ハイドロキシプロリンについてはn=5で行った。

研究結果

(1) まず照射後12週までの経過をみると、BALでの炎症反応はすでに照射後2-4週でみとめ(図2)、さらに線維化の生化学的な指標であるHOPはすでに照射後6-12週で上昇を示したが(図3)、ただしここには表示をしていないが、病理学的には対照群と有意差を認めなかった。

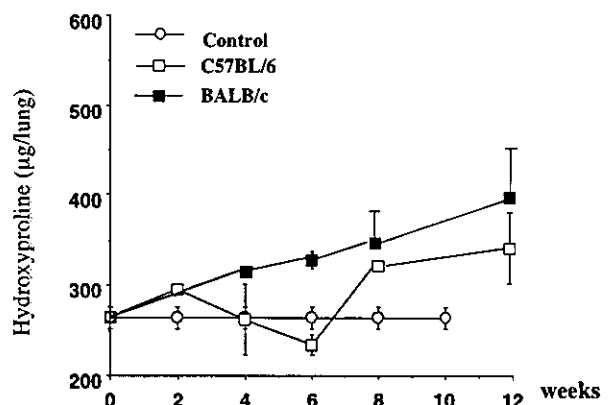


図2 Hydroxyproline value after irradiation with 15 Gy

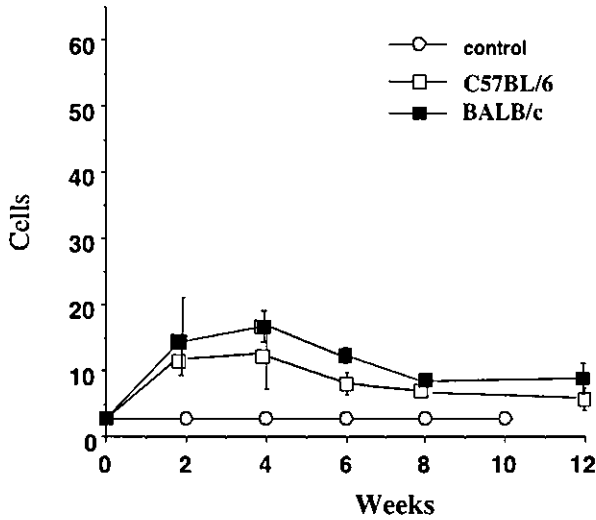


図3 BALF after irradiation with 15 Gy

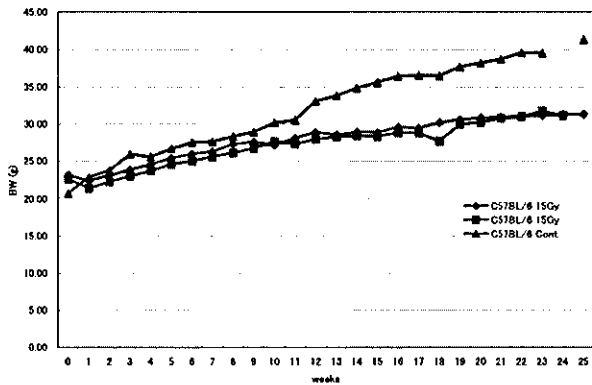


図4 C57BL/6 BW

照射後の体重の変化も観察した。その結果、まず C57BL/6 では 12 週間を超えた時点から明らかに体重の増加率が低下した (図 4)。さらに今回、さらに検討を加えたマウス種である Balb/C では、C57BL/6 と比較して、その変化が著明であり、後者では 20-22 週には死亡することが観察された (図 5)。すなわち、すでに我々はマウスの放射線による肺線維化には 12 週以上の経過観察が必要であることを報告していたが、今回の体重変化をみても、その結果を裏付けることができた。

また線維化の経過としては、HOP はすでに照射後 6-12 週で上昇を示したが (図 6)、病理学的には対照群と有意差を認めなかった。しかし、18 週の時点では病理スコアも有意に高値を示し、照射後 12 週以後に強い線維化を呈することが示された、また放射線感受性は Balb/C のほうが高いことも示された (図 7)。すな

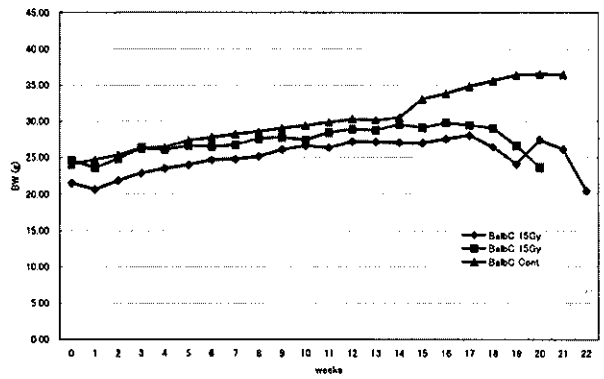


図5 Balb/C BW

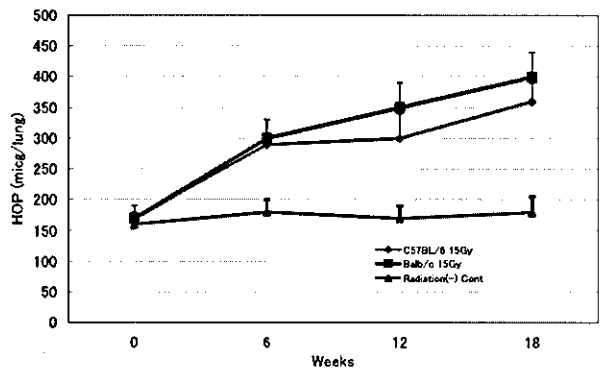


図6 Hydroxyproline in response to Radiation

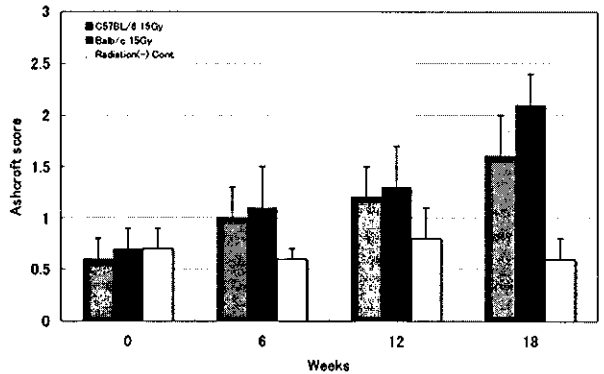


図7 Pathological Score in response to Radiation

わち、体重の変化にも見られた、照射による線維化の変化は、特にその 12 週以降に強く表れることが示された。しかも、遺伝的には Balb/C を背景とすると、その変化がより強く惹起されることが示された。

(2) さらに放射線に高感受性と判明した Balb/C を背景とするトラスジェニック HCV-Tg (+) で検討することとした。まず、この背景として、従来より我々が肺線維症のモデルとして使用しているシリカ

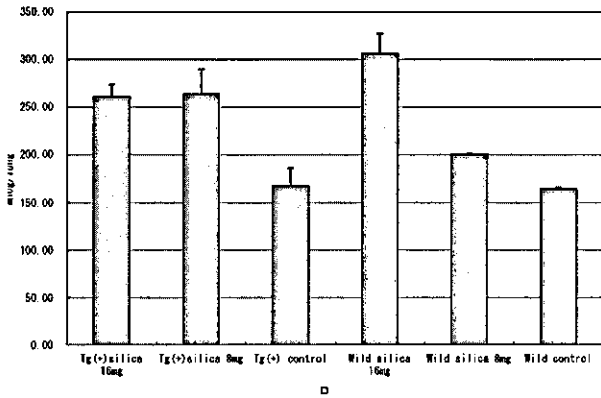


図 8-A Hydroxyproline

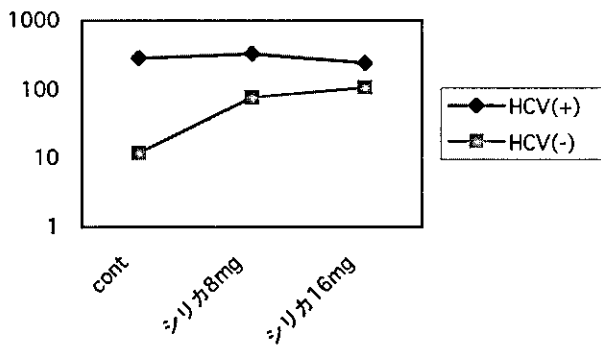


図 8-B IFN-g LC BAL

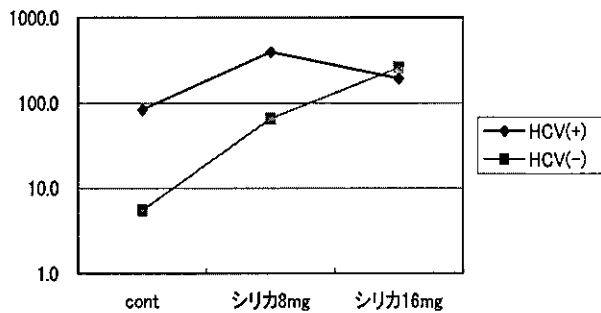


図 8-C IL-4

により、その少量投与で HCV-Tg (+) ではワイルドタイプ (Tg (-)) と比較して、有意に線維化を起こし (図 8-A), しかもその過程でサイトカインとして interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) や interleukin-4 (IL-4) が関与しうることを、すでに検討している (図 8-B) (図 8-C).

今回の放射線による肺の線維化をみると、すでに 12 週の時点で病理スコア (図 9) および HOP ともに (図 10), HCV-Tg (+) では有意な増加を示すことが確認された。すなわち、通常では、まだ十分に線維化が惹起されない、照射後 12 週の時点で、HCV を背景に有する場合には線維化が明らかとなっており、HCV が肺における線維化促進の要因となりうることが示された。

さらにサイトカインの測定では IGF-1, TGF- $\beta$  に関しては Tg (+) と Tg (-) 間に有意差を認めなかったが、IL-4 に関しては HCV-Tg (+) で有意に mRNA が強発現していることが判明した (図 11)。これは図 8-C で示した、シリカモデルと同様に HCV における線維化促進の過程でサイトカインでは IL-4 が

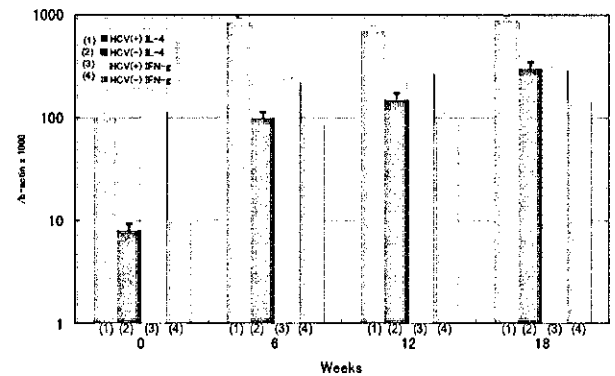


図 10 Hydroxyproline in response to Radiation

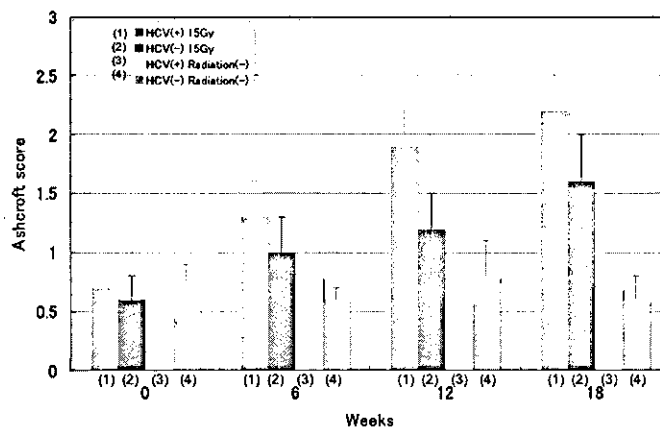


図 9 Pathological score in response to Radiation



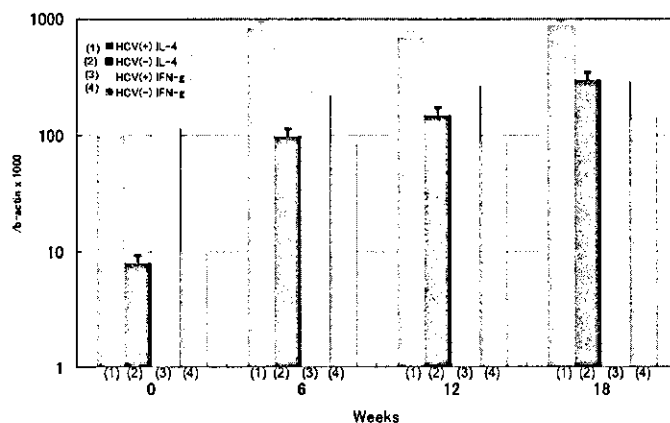


図 11 IL-4 IFN-g in response to Radiation

関与する可能性を、肺照射モデルでも示している結果であると考えられる。

## 考 察

マウスの照射モデルでは 12 週以降に強い線維化を生じ、照射に対しては BalbC が高感受性であることより、遺伝的な背景により線維化の程度がことなることが示された。この遺伝的な検討に関して放射線に対する感受性については、古くは Franko AJ ら<sup>2)</sup>で C57L/J vs CBA/J を比較して少なくとも 2 つの遺伝子の関与を示唆し、さらに Haston CK, Travis EL ら<sup>3)</sup>は放射線やプレオマシンに付いても同様に 2 つ以上の遺伝子の関与が考えられ、特に染色体 11 と 17 に注目した報告をしている。最近ではプレオマイシンに関連する遺伝的背景に IL-2 領域の可能性を示す報告や<sup>4)</sup>、H2-Ea の欠損を示唆する報告もある<sup>5)</sup>。一方で我々がシリカで線維化の促進があり、今回の照射による肺の線維化についても促進していたストレインである Balb/C に関して、線維化を抑制する可能性について検討している報告もある<sup>6)</sup>。すなわち線維化の形成における遺伝的な背景については、遺伝的な要因と、線維化の惹起する原因 (後天的要因) との相互の要因で、その線維化の過程が修飾される可能性があり、さらなる検討が必要であろう。さらに HCV-Tg (+) マウスを用いた検討により、照射後早期に線維化がおこることより、この線維化過程において HCV が促進的な要因となることが示され、従来の疫学調査やシリカモデルでの結果と合致すると考えられた<sup>7)</sup>。さらにその線維化の過程で IL-4 の関与が示された。HCV におけるサイトカインパターンでは、Th1 サイトカインが優位な状

態であるとの報告がある<sup>7)</sup>。また Th2 サイトカインである IL-4 については、HCV エンベロープの受容体である CD81 を介してリンパ球が活性化され、IL-4 の産生が亢進するとの報告がある<sup>8)</sup>。今回の検討により、IL-4 が HCV の線維化の過程において重要な役割を果たしていることが示された。この結果は HCV エンベロープが CD81 の活性化を介して IL-4 の産生が亢進するとの in vitro の実験結果とも合致する結果と考えられる。

## 結 論

遺伝的には Balb/C が B57BL/6 より高感受性であることが示された。さらに HCV-Tg (+) マウスを用いた検討により、照射による肺線維化は HCV-Tg (+) において、早期に、かつ高度に生じることが示された。すなわち、照射後の肺線維化において HCV が関与し得ることが示された。さらにその線維化を促進する因子としてサイトカインの中では、線維芽細胞も活性化作用を有する IL-4 の関与が示唆された。

## 参考文献

- 1) Ueda T, Ohta K, Suzuki N, Yamaguchi M, Hirai K, Horiuchi T, Watanabe J, Miyamoto T, Ito K. Idiopathic pulmonary fibrosis and high prevalence of serum antibodies to hepatitis C virus. *Am Rev Respir Dis.* 1992 Jul; 146(1): 266-8.
- 2) Franko AJ, Sharplin J, Ward WF, Taylor JM. Evidence for two patterns of inheritance of sensitivity to induction of lung fibrosis in mice by radiation, one

- of which involves two genes. *Radiat Res.* 1996 Jul ; 146(1) : 68-74.
- 3) Haston CK, Travis EL. Murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis is influenced by a genetic factor implicated in susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res.* 1997 ; 57(23) : 5286-91.
- 4) Beller TC, Maekawa A, Friend DS, Austen KF, Kanaoka Y. Targeted gene disruption reveals the role of the cysteinyl leukotriene 2 receptor in increased vascular permeability and in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Biol Chem.* 2004 ; 279(44) : 46129-34.
- 5) Du M, Irani RA, Stivers DN, Lee SJ, Travis EL. H2-Ea deficiency is a risk factor for bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Cancer Res.* 2004 ; 64(19) : 6835-9.
- 6) Bonniaud P, Martin G, Margetts PJ, Ask K, Robertson J, Gauldie J, Kolb M. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in "fibrosis-resistant" BALB/c mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 ; 31(5) : 510-6.
- 7) Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology.* 1996 ; 24(4) : 759-65.
- 8) Maecker HT, Do MS, Levy S. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998 ; 95(5) : 2458-62.

# サルコイドーシス

# サルコイドーシス病変部における抗酸性で細胞壁欠失型の *P. acnes* 菌体の同定とその内因性活性化現象に関する研究

江石 義信<sup>1\*</sup> 武村 民子<sup>2\*\*</sup>

サルコイドーシス病変部リンパ節に認められる抗酸性を呈する細胞内封入体 Hamazaki-Wesenberg (HW) 小体は、その形態学的な特徴から Cell wall deficient (CWD) 型マイコバクテリアであると考えられてきた。他方、病変部からは *Propionibacterium acnes* DNA のみが多量に検出されマイコバクテリア DNA はほとんど検出されていない。本研究では2種類の *P. acnes* 特異抗体を用いて HW 小体の実体に関する検討を行った。本症病変部リンパ節 30 症例、対照群として結核性リンパ節炎 15 症例、反応性リンパ節炎 23 症例、壊死性リンパ節炎 14 症例、肺癌所屬リンパ節 22 症例、大腸癌所屬リンパ節 16 症例を用いた。ギムザ染色により HW 小体の有無を確認した。*P. acnes* 細胞膜抗原であるリポテイコ酸に対する抗体 (PAB 抗体) と、*P. acnes* 細胞内抗原であるトリガーファクター蛋白に対する抗体 (TIG 抗体) を用いて免疫染色した。また、免疫電顕を行いその抗原の局在を電顕レベルで検討した。その結果、サルコイドーシス病変部に特徴的な HW 小体が CWD 型の *P. acnes* 菌体そのものであることを、菌体細胞膜から細胞壁を貫いて分布するリポテイコ酸に対する抗体 (PAB 抗体) と、細胞質内に多量に存在するリボゾーム結合性のシャペロン蛋白であるトリガーファクター蛋白に対する抗体 (TIG 抗体) を用いた免疫電顕解析にて明らかにした。PAB 抗体、TIG 抗体はいずれも *P. acnes* と特異的に反応する抗体であり、これを用いてサルコイドーシスリンパ節を免疫染色すると、ギムザ染色で同定しうる HW 小体はすべて両抗体で陽性となり、サルコイドーシスの成因と細胞欠失型の *P. acnes* との密接な関連が示唆された。また、PAB 抗体は症例の約 80% において HW 小体だけでなく肉芽腫内にも陽性像を呈することから、サルコイドーシス肉芽腫形成の原因細菌が *P. acnes* であることはほぼ確実と考えられた。病変部免疫染色所見の詳細な観察から、リンパ洞内に出現する HW 小体は本菌が体内で不顕性感染している状態 (dormant phase) を示しており、肉芽腫が形成されるリンパ節傍皮質領域に集簇する腫大マクロファージの細胞質内に多数認められる円形小型の PAB 抗体陽性像は、*P. acnes* L 型菌が内因性活性化され細胞内増殖した状態 (infective phase) を示すものと考えられた。本研究により、細胞内に不顕性感染した細胞壁欠失型の *P. acnes* が、内因性活性化を契機にマクロファージ細胞内で異常増殖することが発症の契機となることを病理形態学的な観点から明らかにすることができた。従って、細胞内細菌に感受性のある抗生物質の投与は、新たな細胞内増殖を防止する観点から肉芽腫形成の予防に有効である可能性が高い。また、本症からの完全緩解を目指すためには、active phase にある菌を抑制するだけでなく、代謝活性を低下させて生き残りを図る dormant phase の菌も含めて除菌する必要がある。

## Acid-fast and cell-wall-deficient *Propionibacterium acnes* in lymph nodes from Japanese patients with sarcoidosis

Yoshinobu Eishi<sup>1</sup>, and Tamiko Takemura<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Human Pathology, Tokyo Medical and Dental University and

<sup>2</sup>Department of Pathology, Japanese Red Cross Medical Center

The causes of sarcoidosis are not known. Recently reported effectiveness of tetracycline may suggest bacterial causes of this disease. *Propionibacterium acnes* is so far the only microorganism found in sarcoid lesions by bacterial culture, quantitative PCR, and *in situ* hybridization studies. To estimate pathogenic roles of this indigenous bacterium, histologic examination was done for sarcoid lesions with *P. acnes*-specific antibodies. We examined formalin-fixed and paraffin-embedded sections of biopsy and surgical samples from lymph nodes of 30 patients with sarcoidosis, 15 patients with tuberculosis, and 75 patients with other diseases. Immunohistochemical detection was done with *P. acnes*-specific antibodies (PAB and TIG antibodies) that react with cell-membrane-bound lipoteichoic acid and

ribosome-bound trigger factor protein, respectively. The two antibodies reacted with acid-fast spindle-shaped corpuscles, so-called Hamazaki-Wesenberg bodies, that appeared in 16 (53%) of 30 sarcoid lymph nodes and 2 (2%) of 90 control lymph nodes. Lipoteichoic acid was found confined to outer areas of the bodies without cell-wall structures and trigger factor was found scattered in their inner areas. PAB antibody also reacted with small round-shaped and acid-fast bodies in swollen macrophages at granuloma-free paracortical areas and their degraded forms were found in granulomas in 24 (80%) of sarcoid lymph nodes. We concluded that Hamazaki-Wesenberg bodies that appear frequently in sarcoid lymph nodes are acid-fast and cell-wall-deficient forms of *P. acnes*. They are dormant in lymphatic sinuses and granulomatous inflammation may be triggered by intracellular proliferation of their activated-forms that resulted in degradation by developing granulomas.

## はじめに

サルコイドーシス (サ症) リンパ節の顕微鏡標本では、その過形成リンパ洞内に HE 染色で黄褐色調を呈する小体を多数認めることが多い。病理診断の現場では肉芽腫の存在に気を取られ見過ごされることも多く、また鉄色素や消耗色素などとして無視される場合もある。文献的には、acid-fast spindle-shaped corpuscles, yeast-like acid-fast structures, unidentified yellow bodies などこれまで種々の呼び名があり、ギムザ染色で深緑色、カルボールフクシン染色で抗酸性を呈する。外科病理学書には Hamazaki-Wesenberg (HW) 小体として記載されている<sup>1)</sup>。

HW 小体は、1938 年に日本の浜崎により初めて報告され、1966 年ドイツの Wesenberg<sup>2)</sup> がサ症リンパ節に高率・多量に認められることを指摘して以来、サ症の病因との関連性が現在に至るまで議論されている。電顕像で見えるような独特の形態像から、藻類プロトプラスト、結核菌の溶原性変異体、巨大ライソゾーム、セロイド様物質、特殊なリポフスチン、マイコバクテリア L 型菌など、これまで数多くの可能性が提唱されてきた。

本研究では、*P. acnes* 菌体の細胞膜抗原および細胞質抗原に対する 2 種類のモノクローナル抗体を用いて HW 小体が *P. acnes* に由来している可能性を検証するとともに、これが CWD 型菌そのものである可能性についても電顕レベルでの観察から追求した。

## 材料と方法

### サ症リンパ節検体について

リンパ節生検にてサルコイドーシスと確定診断された 30 症例を用いた。部位別には、頸部リンパ節 15 例、鎖骨上リンパ節 6 例、鼠径部リンパ節 3 例、縦隔リンパ節 6 例であった。

### 対照リンパ節検体について

リンパ節生検にて結核性リンパ節炎と診断された 15 症例、反応性リンパ節炎と診断された 23 症例、壊死性リンパ節炎と診断された 14 症例を用いた。部位別には頸部リンパ節 28 例、鎖骨上リンパ節 14 例、鼠径部リンパ節 10 例、縦隔リンパ節 6 例、後腹膜リンパ節 4 例であった。また、手術時に採取された転移のない肺癌所属リンパ節 (縦隔リンパ節) 22 症例、大腸癌所属リンパ節 (腹腔内リンパ節) 16 症例も用いた。

### HW 小体の検出法について

HW 小体はギムザ染色にて深緑色、あるいはカルボールフクシン染色にて抗酸性に染まる紡錘形あるいは酵母様の形をしたもので、リンパ洞内マクロファージの細胞質内に認められるものと定義してその検出頻度を求めた (図 1)。

### 2 種類の *P. acnes* 特異抗体について

PAB 抗体は *P. acnes* 菌体浮遊液を超音波破碎したものをマウスに免疫して作製したもので、*P. acnes* 菌体のリポテイコ酸と特異的に反応することが知られている (表 1)。TIG 抗体は *P. acnes* の Trigger factor 遺伝子から作製したリコンビナント蛋白をマウスに免疫して作製したもので、*P. acnes* 特異的な反応を示し、結核菌および他菌とは反応しないことが判明している。

<sup>1)</sup> 東京医科歯科大学医学部 人体病理学

<sup>2)</sup> 日本赤十字社医療センター 病理部

\* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

\*\* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

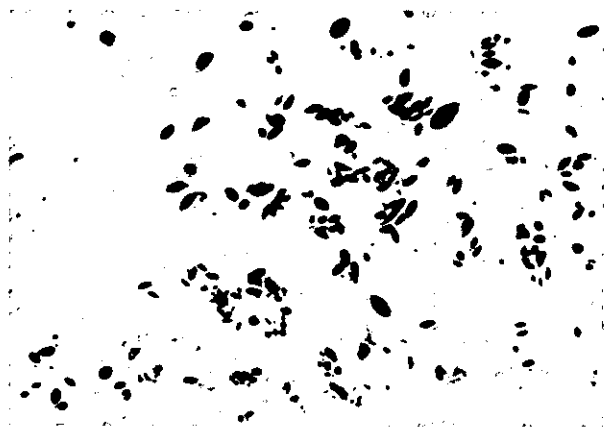


図1 サ症リンパ節のHW小体 (抗酸菌染色)

表1 PAB抗体の菌種特異性に関する検討結果

Propionibactera	Western blot	ELISA	Other bacteria	Western blot	ELISA
Cutaneous			<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	-	-
<i>P. acnes</i>	+	+	<i>Cryobacterium pyogenes</i>	-	-
<i>P. granulorum</i>	-	-	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	-
<i>P. avidum</i>	-	-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-
<i>P. lymphophilum</i>	-	-	<i>Actinomyces israelii</i>	-	-
<i>P. propionicum</i>	-	-	<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-
Classical or daily			<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-	-
<i>P. freudenreichii</i>	-	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-
<i>P. jensenii</i>	-	-	<i>Nocardia asteroides</i>	-	-
<i>P. thoenii</i>	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>P. acidipropionici</i>	-	-	<i>Escherichia coli</i>	-	-
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-

表2 各種リンパ節検体における抗体の陽性率

Disease	n	Intra granulomas		H-W bodies		
		PAB	TIG	Giemsa	PAB	TIG
サルコイドーシス	30	24 (80%)	0	16 (53%)	16 (53%)	16 (53%)
結核性リンパ節炎	15	0	0	0	0	0
反応性リンパ節炎	23	-	-	0	0	0
壊死性リンパ節炎	14	-	-	0	0	0
肺癌リンパ節	22	-	-	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)
大腸癌リンパ節	16	-	-	1 (6%)	0	0

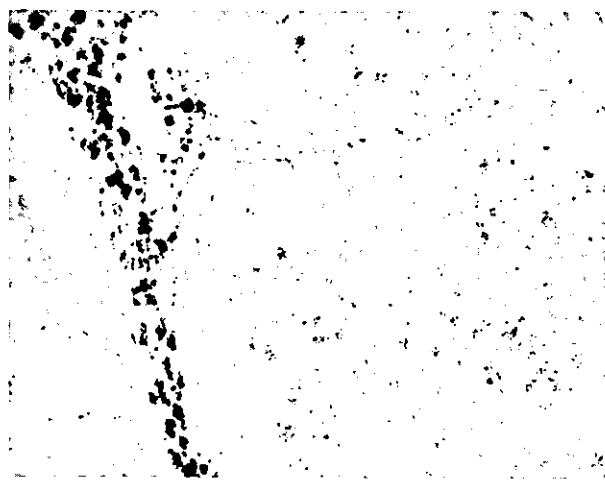


図2 PAB抗体で陽性を呈するHW小体(左)と肉芽腫内(右)でのPAB抗体陽性像

### 免疫染色法 (光顕・電顕) について

ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いて、共通のプロトコールにて免疫染色を施行後、光顕および電顕標本を作製した。

## 結 果

### 1) HW小体の頻度および抗体反応性

ギムザ染色によるHW小体の出現頻度はサルコイドーシスにて30例中16例(53%)に認められたが、対照として用いたリンパ節生検症例52症例では、結核症例を含めて陽性所見は認められなかったが、肺癌所属リンパ節1例(5%)および大腸癌所属リンパ節1例(6%)に少数のHW小体の出現をみた。HW小体はとくに辺縁洞に高率に認められた。その量はサ症例でまちまちなるも、多いものでは、肉芽腫間に存在する過形成リンパ洞に無数のHW小体を認めた。

PAB抗体は、ギムザ染色にてHW小体が認められた16例すべてにおいて、HW小体に陽性となった(図3)。また、PAB抗体はHW小体だけでなく、肉芽腫を構成する類上皮細胞やラングハンス巨細胞内に

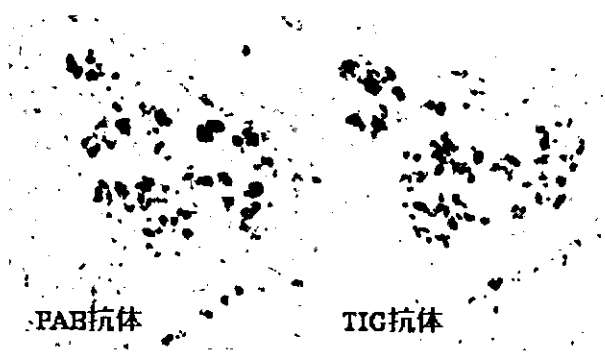


図3 PAB抗体とTIG抗体で陽性を呈するHW小体

も細顆粒状の陽性所見を呈し(図2)、その頻度は30例中24例(80%)であった。PAB抗体はとくにHW小体の辺縁に強く染まる傾向が見られた。

TIG抗体も、ギムザ染色にてHW小体が認められた16例すべてにおいてHW小体に陽性となった(図3)。すべてのサ症例において肉芽腫内にTIG抗体の陽性所見は認められなかった。TIG抗体はとくにHW小体全体に陽性で小体辺縁に強い傾向は認められなかった。

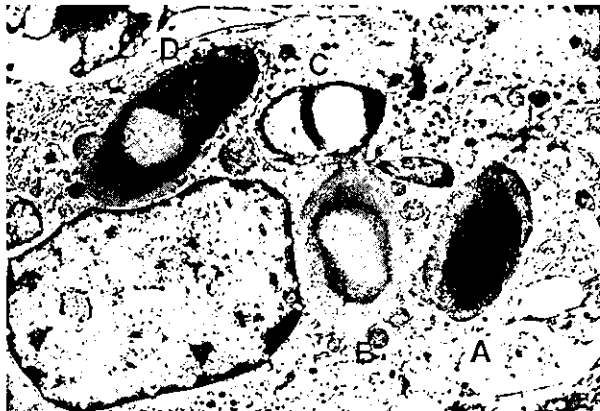


図4 電顕写真における HW 小体の種々の形態像

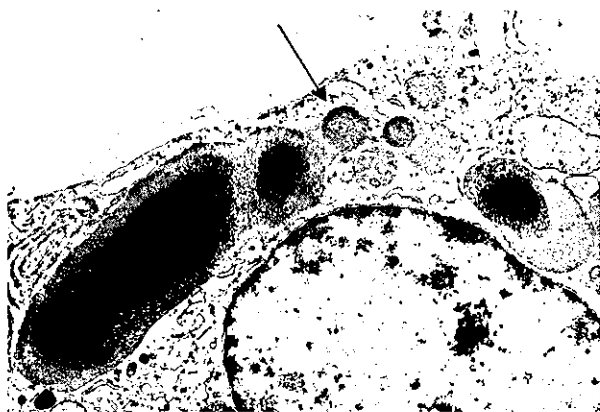


図5 HW 小体に観察される出芽様分裂像 (矢印)

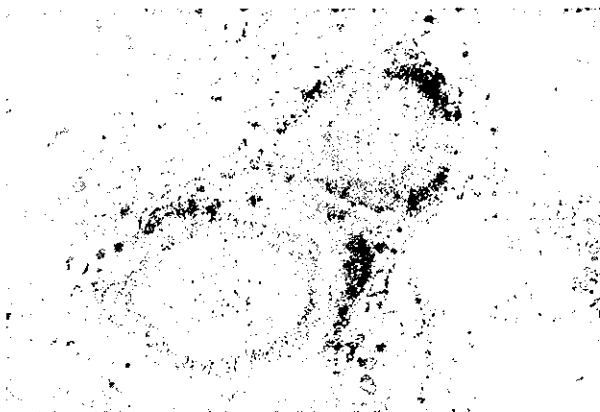


図6 HW 小体における PAB 抗体陽性像の局在

2) HW 小体の電顕・免疫電顕所見

HW 小体が多数認められた 1 症例のホルマリン固定組織から通常電顕用標本を作製し HW 小体を観察した。HW 小体の基本像は、大きさ 1-5 マイクロン大の紡錘形あるいは楕円形の単体構造にて、その周囲には比較的厚みの一定した低電子密度領域があり、その内側中心部領域は高電子密度となっていた (図



図7 HW 小体における TIG 抗体陽性像の局在

4A), HW 小体内部の高電子密度領域では、ときにその中心部が低電子密度化 (図 4B) あるいは空胞化 (図 4C) しているものがあった。HW 小体の中には、通常の細菌類のような 2 分裂パターンとは異なり出芽様分裂像を呈しているものが観察された (図 4D と図 5)。

PAB 抗体による陽性産物は HW 小体外周の低電子密度領域に局在していた (図 6)。概して外周を取り囲むように陽性となるが、完全な全周性に陽性を呈するものはほとんど認められなかった。

TIG 抗体は、内部の高電子密度領域を主体に内部全体に散在してスポット状の陽性所見を呈した (図 7)。PAB 抗体で陽性となる小体外周の低電子密度領域に TIG 抗体陽性は認められなかった。

考 察

サ症は一般的には原因不明疾患と考えられている。しかし、サ症が CWD 型 (L 型) 菌と関係した微生物感染症であることを示唆する多数の文献報告<sup>3,4,5,6)</sup>が存在する。サ症リンパ節の過形成リンパ洞に高率・多量に出現する HW 小体に関して、1978 年 Moscovic はこれがマイコバクテリアの L forms であり、サ症の病因と密接に関係した細胞内封入体であると指摘した<sup>3)</sup>。その後 1996 年になって彼らのグループは結核菌に対する抗体を使用した免疫染色によりこれが結核菌の cell-wall-deficient forms すなわち細胞壁を欠如した菌体そのものであると報告した<sup>4,5)</sup>。同年, Almenoff ら<sup>6)</sup> はサ症患者 20 名の末梢血からその 19 例において L forms 様の微生物を検出し、これが結核菌のモノクローナル抗体と反応したことから、サ症病因における CWD 型結核菌の重要性を強調した。彼らの

研究では対照として用いた 20 名の健常人ではこれらの微生物は検出されなかったと報告されたが、2003 年に発表された米国サ症病因追求研究グループ (ACCESS: A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis) の報告<sup>7)</sup>では、サ症および対照群における検出率はいずれも 4 割程度であり両者に有意な検出率の差は見出せないとしてその重要性は否定されてきたままとされている。

我々の研究室では、サ症病変部から培養される唯一の微生物が *P. acnes* であることや、病変部に多量の本菌 DNA を検出したこと<sup>8,9,10)</sup>などから、HW 小体が *P. acnes* 由来である可能性を疑ってきた。PAB 抗体は *P. acnes* 特異的であり、菌体細胞膜から細胞壁を貫いて多量に分布するリポテイコ酸と反応する。また、TIG 抗体も *P. acnes* 特異的で、細胞質内に多量に存在するリボゾーム結合性のシャペロン蛋白である trigger factor 蛋白と反応する。サ症リンパ節に認められた HW 小体のすべてがこの 2 種類の *P. acnes* 特異的抗体に反応したことから、HW 小体がこれまで言われてきたような結核菌由来ではなく *P. acnes* に由来する構造体であるという結論に達した。また電顕レベルで得られた細胞膜抗原と細胞質抗原の HW 小体における局在様式は、これが巨大化した CWD 型の *P. acnes* 菌そのものである可能性を強く示唆するものである。

我々の研究室では、1990 年初頭、WHO から供与された結核菌に対するモノクローナル抗体 (IT27) を使用して HW 小体に強い陽性反応を認めたが、その後の免疫反応性に関する詳細な解析からは、これが *P. acnes* と 100% の交差反応性を有していることが判明した。従って、Moscovic らが用いた結核菌に対する抗体も *P. acnes* との交差反応性を検定する必要がある。本研究に用いた 2 種類の抗体が結核菌 (BCG) と反応しないことは既に確認しているが、今後結核菌 Trigger factor 蛋白に対する抗体を TIG 抗体と同様な方法で作製し、これが HW 小体には陰性であることを同時に証明する必要がある。

これまで、サ症病変部から多量に *P. acnes* が培養されるにもかかわらず、病変部に通常のグラム陽性細菌を同定することができなかった理由を今回明らかにすることができた。病変部における本菌の局在はずべて細胞内でありこれらはすべて L 型菌として存在しているものと考えられる (図 8)。従って、その形態や大きさは通常細菌とはまったく異なっており、しかも

### Bacterial and cell-wall-deficient (CWD) forms of gram-positive bacteria

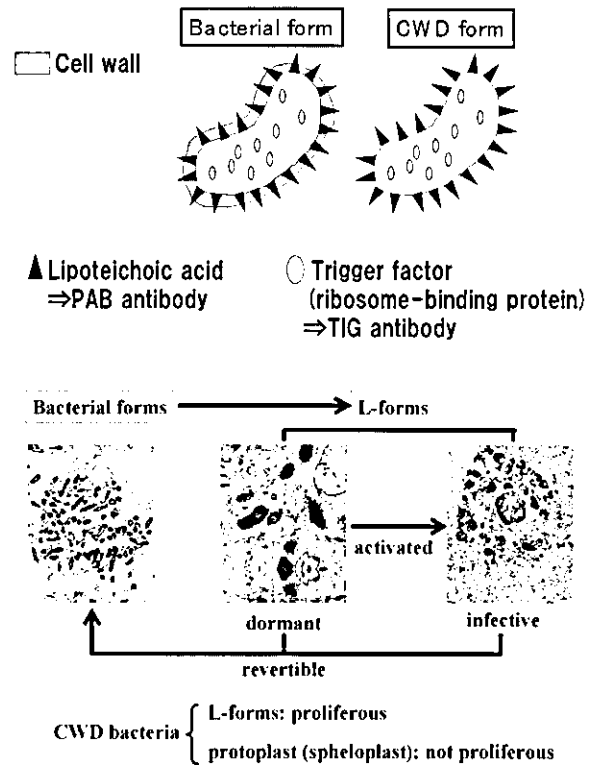


図 8 *P. acnes* L 型菌の通常細菌型への形質転換

細菌であると同定するための重要な指標となる細菌細胞壁を欠如していることから、形態学的にこれを菌と同定することは困難であった。

病変部から培養系に移された菌体は、培地における豊富な栄養を与えられ、培養直後から通常の細胞壁を有する細菌型に形質転換するものを考えられる。実際、L 型菌に適した高浸透圧培地にて病変部組織を細菌培養することにより、高率かつ多量に *P. acnes* が培養しうることが経験的に知られている。このような改良型培地を用いることで、最盛期にあるサ症リンパ節症例からはほぼ 100% に本菌が培養可能であると言われている。

今回の研究では、サルコイドーシス病変部に特徴的な Hamazaki-Wesenberg (HW) 小体が cell-wall deficient 型の *P. acnes* 菌体そのものであることを、菌体細胞膜から細胞壁を貫いて分布するリポテイコ酸に対する抗体 (PAB 抗体) と、細胞質内に多量に存在するリボゾーム結合性のシャペロン蛋白であるトリガーファクター蛋白に対する抗体 (TIG 抗体) を用いた免疫電顕解析にて明らかにした。PAB 抗体、TIG 抗体はいずれも *P. acnes* と特異的に反応する抗体であ



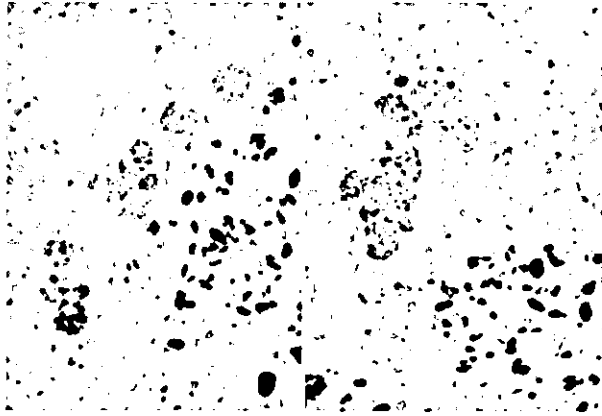


図9 マクロファージ細胞内の菌増殖 (PAB免疫染色)

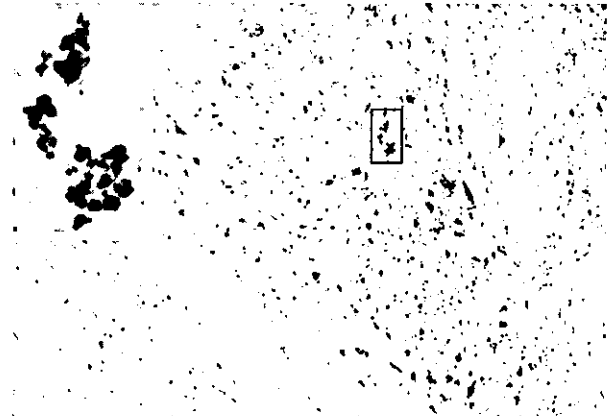


図11 心臓サルコイドーシスのPAB免疫染色

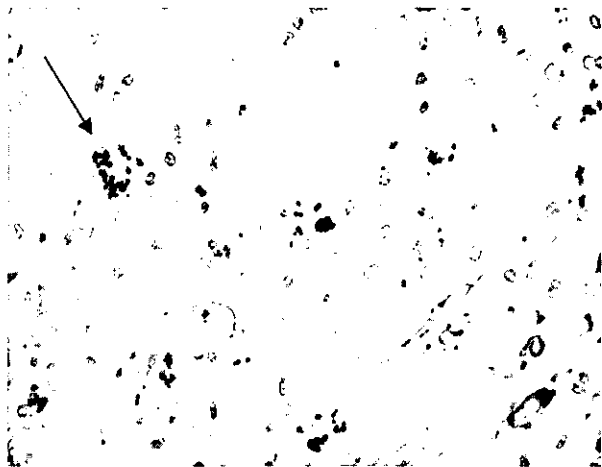


図10 脾臓サルコイドーシスのPAB抗体免疫染色

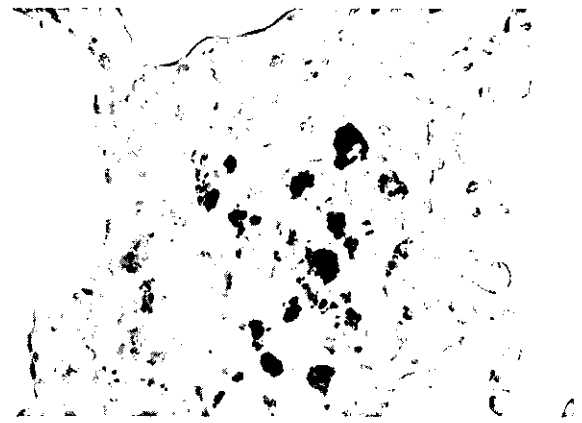


図12 肺サルコイドーシスのPAB免疫染色

り、これを用いてサルコイドーシスリンパ節を免疫染色すると、ギムザ染色で同定しうる HW 小体はすべて両抗体で陽性となり、サルコイドーシスの成因と細胞欠失型の *P. acnes* との密接な関連が示唆された。また、PAB 抗体は症例の約 80% において HW 小体だけでなく肉芽腫内にも陽性像を呈することから、サルコイドーシス肉芽腫形成の原因細菌が *P. acnes* であることはほぼ確実と考えられた。

病変部免疫染色所見 (図9) において、リンパ洞内に出現する HW 小体は本菌が体内で不顕性感染している状態 (dormant phase) を示すもので、肉芽腫が形成されるリンパ節傍皮質領域に集簇する腫大したマクロファージの細胞質内に多数認められる円形小型の PAB 抗体陽性像は、宿主へのストレス等環境要因を背景に、*P. acnes* の L 型菌が内因性活性化され細胞内増菌をはじめた所見 (infective phase) と考えられる。細胞内における本菌の細胞内増殖所見はリンパ節に限らず、他臓器のサ症肉芽腫性炎症病変においても

高頻度に認められる (図 10, 11, 12)。

このような活性化の状態にあっても健常人では Th1 反応においてなんらかの免疫寛容が誘導されており肉芽腫形成反応は起こらないか、かりに起こったとしても一過性の反応 (いわゆるサルコイド反応) に終わり早晩消褪する。ところが本菌との共生関係がうまくいかず本菌に対してなんらかの過敏性免疫反応の素因を有する患者では、細胞内で増菌した L 型菌に対して激しい Th1 免疫反応が起こり慢性的な肉芽腫性炎症反応が誘導されるものと考えられる (図 13)。

サ症の原因についてはこれまで、経気道的にせよ血行性にせよ何らかのルートで原因微生物が外界から侵入し疾患を引き起こすものと推測されていたが、これからは全く違った考え方をする必要がでてきた。健常人の肺やリンパ節に既にアクネ菌が常在性に不顕性感染している<sup>11)</sup> となると、サ症という病気は菌が外から侵入して発病するのではなく、「宿主のアレルギー反応がある閾値を超えて始動すると、菌がもともと存在する局所を中心にあたかも花が咲くようににぼ

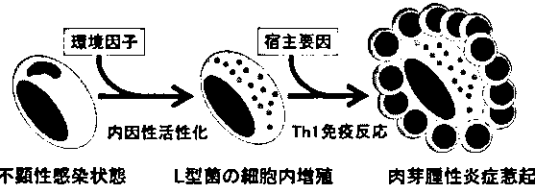


図13 細胞内L型アクネ菌の内因性活性化と肉芽腫形成との関連性：細胞内に不顕性感染したアクネ菌は、細胞壁を欠失したL型菌として細胞内に潜在感染することで宿主との共生関係が維持されているものと考えられる。潜在感染したアクネ菌がなんらかの環境要因を契機に活性化され、感染局所で増殖しはじめることが発症をトリガーしている可能性がある。

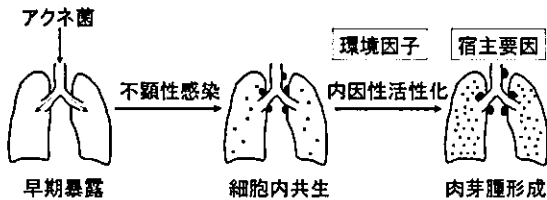


図14 サルコイドーシスにおける肺野・肺門部リンパ節病変の成り立ち：我々の皮膚表面を主体に常在菌として環境中に多量に存在するアクネ菌は、思春期前後のほや時期に経気道的に肺に不顕性感染し、末梢肺組織やその所属リンパ節である肺門部(縦隔)リンパ節に潜在性に細胞内感染している。宿主要因としてアクネ菌に対してTh1タイプの過敏性免疫反応を有する人では、なんらかの環境要因を契機に局所で異常増殖する菌を標的として肉芽腫形成が引き起こされるとする新しい考え方を仮説として示した。

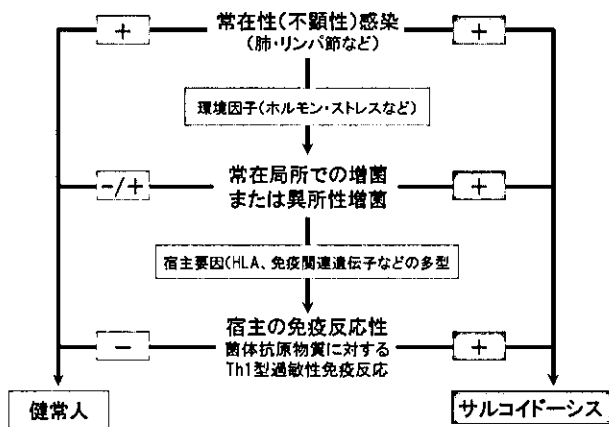


図15 アクネ菌を原因とするサルコイドーシスの病因論まとめ：多くのヒトでは、肺やリンパ節などの深部組織にアクネ菌が共生状態を保ちながら常在性に不顕性感染している。宿主にストレスやホルモン環境・生活習慣の変調など環境要因が加わることで、組織の細胞内に潜在性感染していたアクネ菌が、常在局所あるいは異所性に異常増殖するような状態が起こる。このような状態はサ症患者以外でも起こりうる可能性を現段階では否定できないが、HLAやNod蛋白<sup>14)</sup>/TLRsなど免疫関連遺伝子の遺伝子多型に起因する宿主要因を有するヒトでは、アクネ菌の保有するなんらかの菌体抗原物質に対して強いTh1型過敏性免疫反応が持続することからサ症肉芽腫が形成されてくると考えられる。

つぼつと肉芽腫ができてくる」と考えたほうが自然なのかもしれない。このような考え方<sup>12)</sup>は、サ症患者で肺や肺門部リンパ節の病変が高頻度である理由や、びまん性粒状影を呈する肺野病変の成り立ちなどを説明するには好都合かもしれない(図14)。

アクネ菌に関しては「共生」という言葉がよく使われる<sup>13)</sup>。常在菌はヒトの身体のなかに共存している必要があり、種々の手段を用いて波風立てないように静かにしており、時には我々にとってメリットのあることをしているのかも知れない。アクネ菌との共生がうまくいく宿主環境を有する健康人が多い中で、一部には共生がうまくいかず、本菌が保有するなんらかの抗原物質に対する遅延型アレルギー体質を有する人が存在する。このような疾病素因を有する人では、ストレス等の環境要因を契機にアクネ菌の異常増殖が起こり、サ症が発症してくるものと考えられる(図15)。

今回の研究により、病変部における細胞壁欠失型の *P. acnes* (L型菌)の存在が明らかとなり、これが内因性活性化することが発症の契機となることが示唆されたことから、臨床研究班(貫和班)における抗生剤治療計画を基礎研究面からサポートしうる成果を挙げることができた。また、本研究による知見から、将来使用すべき抗生剤の種類や投与期間に関する重要な情報が得られた。

細胞内細菌に感受性のある抗生物質の投与は、新たな細胞内増殖を防止する観点から肉芽腫形成の予防に有効である可能性が高い。また、本症からの完全緩解を目指すためには、active phaseにある菌を抑制するだけでなく、代謝活性を低下させて生き残りを図るdormant phaseの菌も含めて除菌する必要がある。その観点からは、最終的な本症の抗生剤治療のレジメは、結核症に対する治療と同様な多剤併用による長期投与を理想とするべきであろう。ただし、単剤(ミノマイシン)による1年投与により本症患者の9割以上が症状の改善あるいは完全寛解をみたとするフランス<sup>15)</sup>やアメリカ<sup>16)</sup>からの報告は、標的とする原因菌を特定しない段階での試みではあるが、今後日本にて治療開発に取り組む上では、十分に考慮しておくべきである。

びまん性肺疾患研究班(貫和班)において、サルコイドーシスの抗生物質投与による治療効果判定のプロジェクトが進行中である。アンケート調査による解析結果では、現在までに約80人ほどが抗生剤(多く

はミノマイシン単剤投与)による治療が行われており、その約半数で効果が認められている。効果が認められた症例では、その投与が6ヶ月以上のものが多く、単剤でも長期投与が本症治療に必要であることが示唆されている。

本研究内容を基盤に、サルコイドーシスにおける抗生剤治療が計画されている。しかしながら、治験レベルでの研究計画は、製薬会社の協力が得られずいまだスタートできておらず、今年度は上記アンケート調査の解析が主体となった。現在、諸外国でも抗生剤投与による研究が計画されつつあると聞く。日本主導型でサルコイドーシスの病因および治療までをリードするためには、「サルコイドーシス患者の抗生剤治療による効果判定」を目的とした独立した研究チームを編成し、十分な予算(特に治験用抗生剤の購入費)を背景にこの問題に早急なる結論をだす必要がある。

## 結 論

細胞内に不顕性感染した細胞壁欠失型の *P. acnes* が、内因性活性化を契機にマクロファージ細胞内で異常増殖することが発症の契機となることを病理形態学的な観点から明らかにすることができた。従って、細胞内細菌に感受性のある抗生物質の投与は、新たな細胞内増菌を防止する観点から肉芽腫形成の予防に有効である可能性が高い。また、本症からの完全緩解を目指すためには、active phaseにある菌を抑制するだけでなく、代謝活性を低下させて生き残りを図る dormant phaseの菌も含めて除菌する必要がある。

## 参考文献

- 1) Rosen Y. Atlas of granulomatous diseases. Available from URL <http://www.granuloma.homestead.com/index.html>
- 2) Wesenberg W. Saurefeste, Spindlenkörper Hamazaki bei Sarkoidose. Arch Klin Exp Med 227: 101-112, 1966.
- 3) Moscovic EA. Sarcoidosis and mycobacterial L-forms. A critical reappraisal of pleomorphic chromogenic bodies (Hamazaki corpuscles) in lymph nodes. Pathol Annu 13: 69-164, 1978.
- 4) Ang SC, Moscovic EA. Cross-reactive and species specific *Mycobacterium tuberculosis* antigens in the immunoprofiles of Schaumann bodies: a major clue to the etiology of sarcoidosis. Histol Histopathol 11: 125-134, 1996.
- 5) Alavi HA, Moscovic EA. Immunolocalization of cell-wall-deficient forms of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sarcoidosis and in sinus histiocytosis of lymph nodes draining carcinoma. Histol Histopathol 11: 683-694, 1996.
- 6) Almenoff PL, Johnson A, Lesser M, Mattman LH. Growth of acid fast L forms from the blood of patients with sarcoidosis. Thorax 51: 530-533, 1996.
- 7) Brown ST, Brett I, Almenoff PL, Lesser M, Terrin M, Teirstein AS. Recovery of cell wall-deficient organisms from blood does not distinguish between patients with sarcoidosis and control subjects. Chest 123: 413-417, 2003.
- 8) 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.
- 9) Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takizawa T, Koike M, Takemura T, Kudoh S, Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma Om P, Ando M. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes from Japanese and European patients with sarcoidosis. J Clin Microbiol 40: 198-204, 2002.
- 10) Yamada T, Eishi Y, Ikeda S, Ishige I, Suzuki T, Takemura T, Takizawa T, Koike M. 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.
- 11) Ishige I, Eishi Y, Takemura T, Kobayashi I, Nakata K, Tanaka I, Nagaoka S, Iwai K, Watanabe K, Takizawa T, Koike M. *Propionibacterium acnes* as the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 22 (in press), 2005.

- 12) Eishi Y, Ishige I, Ishige Y, Yamada T, Minami J, Ikeda S, Koike M. Etiology of sarcoidosis: the role of *Propionibacterium acnes*. *Acta Histochem Cytochem* 36: 15-26, 2003.
- 13) Casadevall A, Pirofski L-A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 67: 3703-3713, 1999.
- 14) Kanazawa N, Okafuji I, Kambe N, et al. Early-onset sarcoidosis and *CARD15* mutations with constitutive nuclear factor- $\kappa$ B activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood* 105: 1195-1197, 2005.
- 15) Bachelez H, Senet P, Cadranet J, Kaoukhov A, Dubertret L. The use of tetracyclines for the treatment of sarcoidosis. *Arch Dermatol* 137(1): 69-73, 2001.
- 16) Marshall TG, Marshall FE. Antibiotics in sarcoidosis-reflections on the first year. *JOIMR* 1(3): 2, 2003. Available from URL <http://www.joimr.org/phorum/read.php?f=2&i=38&t=38>