

Figure3 The correlation between Serum ACE and IL-18

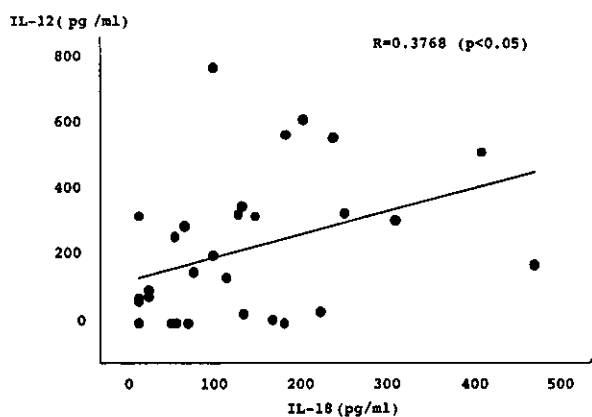


Figure4 The correlatino between Serum IL-12p40 and IL-18

参考文献

- 1) Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, *et al*: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170: 827-845.
- 2) Scott P : IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 1993; 260: 496-497.
- 3) Moller D, Forman JD, Liu MC, *et al*: Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profile in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996; 156: 4952-4960.

Propionibacterium acnes トリガーファクター蛋白による 実験的マウス肺肉芽腫症の誘導

江石 義信^{1*} 南 順子¹ 石下 由紀¹ 小林 寅喆²
石下 郁夫¹ 小林 大輔¹ 安藤 登¹ 内田 圭介¹
池田 聡¹ 反町 典子³ 烏山 一³ 武村 民子^{4**}
滝澤登一郎¹ 小池 盛雄¹

サルコイドーシスの原因は不明である。*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 由来の trigger factor 蛋白は、慢性安定期にあるサルコイドーシス患者の約 2 割で患者特異的な細胞性免疫反応を引き起こすことが知られている。今回我々は *P. acnes* trigger factor 蛋白に対して実験的に誘導された過敏性免疫反応によりマウスに肉芽腫性病変を引き起こしうるか否かを検索した。C57BL/6 雌マウスに *P. acnes* trigger factor 蛋白の断片であるリコンビナント蛋白 (RP35) を完全 Freund adjuvant とともに反復皮下免疫した。この感作免疫処置に先行して、*P. acnes* を経静脈的に前投与する群と前投与しない群とで実験を行った。対照群としては、*P. acnes* (加熱死菌) および 2 種類の蛋白抗原 (OVA と GST) を RP35 の代わりに感作抗原として用いた。*P. acnes* の前投与の有無にかかわらず、RP35 または *P. acnes* を感作免疫したマウス群の一部で肺肉芽腫が認められた。対照として用いた 2 種類の蛋白抗原の同様な感作免疫で肉芽腫性病変は認められなかった。*P. acnes* の前投与の有無にかかわらず、RP35 および *P. acnes* いずれの感作抗原を用いた場合でも肺肉芽腫の検出頻度 (25~57%) には有意差を認めなかった。これらの感作抗原に対する膝下リンパ節細胞の免疫反応性や血中抗体価は、肺肉芽腫を認めたマウス群と認めなかったマウス群、いずれにおいても上昇しており両群に差は認めなかった。24 匹の無処置マウスで *P. acnes* の定量培養を試みたところ 8 匹 (33%) の肺組織から本菌が培養可能であった。今回の実験により、*P. acnes* trigger factor のリコンビナント蛋白は、マウスを前もって抗原暴露する必要なく、これをアジュバントとともに感作免疫するだけで、肺にサルコイドーシス類似の肉芽腫性病変を誘導しうる事が判明した。蛋白抗原のかわりに菌体そのものを用いても結果は同様であった。また正常マウスの約 1/3 で肺から *P. acnes* が培養可能であることから、感作免疫のみにて肺肉芽腫を形成するマウスでは、肺に *P. acnes* が常在性に感染している可能性がある。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がある。

**Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a
recombinant trigger-factor protein of
*Propionibacterium acnes***

Yoshinobu Eishi¹, Junko Minami¹, Yuki Ishige¹, Intetsu Kobayashi², Ikuo Ishige¹
Daisuke Kobayashi¹, Noboru Ando¹, Keisuke Uchida¹, Satoshi Ikeda¹
Noriko Sorimachi³, Hajime Karasuyama³, Tamiko Takemura⁴
Touichiro Takizawa¹, and Morio Koike¹

¹Department of Human Pathology, Tokyo Medical and Dental University

²Division of Chemotherapy, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratory

³Department of Immune Regulation, Tokyo Medical and Dental University

⁴Department of Pathology, Japanese Red Cross Medical Center

Etiology of sarcoidosis remains unknown. A trigger factor from *Propionibacterium acnes* causes a cellular immune response in some sarcoid patients but not in nonsarcoid subjects. We examined whether experimentally induced hypersensitivity to the trigger factor gives rise to granulomas. Female C57BL/6 mice primed intravenously with *P. acnes* or not were sensitized with recombinant-protein RP35, a fragment of *P. acnes* trigger factor, and complete Freund's adjuvant. In controls, RP35 was replaced with *P. acnes* or one of two control proteins. In primed and unprimed mice, pulmonary granulomas were found in some of the mice sensitized with RP35 or *P. acnes* but in no control-protein-sensitized mice. Detection of pulmonary granulomas (25-57%) did not differ significantly between mice sensitized with RP35 or *P. acnes*, primed or not. No difference in popliteal lymph-node-cell reactivity and serum antibodies to these two antigens was found between mice with and without pulmonary granulomas. *P. acnes* was cultured from the lungs of 8 (33%) of 24 untreated mice. The recombinant trigger-factor protein of *P. acnes* caused pulmonary granulomas in primed and unprimed mice sensitized with the protein and adjuvant. The mechanism of granuloma formation with only sensitization with RP35 or *P. acnes* without challenge is not known, but this experimental protocol may give a useful model of sarcoidosis, because sarcoid granulomas seem to form during hypersensitivity to antigens of *P. acnes* indigenous to the affected organ. Eradication of *P. acnes* by antibiotics might protect mice from granuloma formation caused by this experimental procedure.

¹ 東京医科歯科大学大学院病因・病理学分野

² 三菱化学 BCL 臨床微生物

³ 東京医科歯科大学大学院感染分子制御学分野

⁴ 日赤医療センター病理

* 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

はじめに

サルコイドーシス (サ症) は原因不明の全身性肉芽腫疾患であり、疾患感受性のある宿主が環境中の何らかの抗原物質に暴露されて誘導される過敏性免疫反応に起因すると推測されている¹⁾。これまで培養および定量的 PCR 法により病変部リンパ節から高率かつ多量の Propionibacterium acnes (*P. acnes*) が検出され²⁾³⁾⁴⁾、In situ hybridization 法においても本菌 DNA がサ症病変部の肉芽腫内に集積している⁵⁾ことが解っており *P. acnes* とサ症との関係が強く示唆されている。

また、本疾患は Kveim テストが示すように宿主側の疾患感受性も非常に重要である⁶⁾。宿主側の反応として、*P. acnes* ゲノムライブラリースクリーニングをサ症患者血清にて免疫スクリーニング⁷⁾することにより得られた蛋白 (RP35) に対して一部のサ症患者が免疫反応性を示し他疾患では示さないという特異的な反応を示すことも確認されている。RP35 蛋白はその後の遺伝子解析の結果から *P. acnes* trigger factor である事が明らかにされている⁷⁾。

そこで、我々はこの trigger factor 蛋白をもちいて、実験的にマウスに過敏性反応を引き起こすことにより、肉芽腫性病変が誘導しうるか否かを検討することにより、サ症肉芽腫形成における *P. acnes* の病因的関与や、*P. acnes* trigger factor 蛋白の責任抗原物質としての可能性につき検証した。

材料と方法

RP35 リコンビナント蛋白の調製

サ症患者血清を用いた *P. acnes* ゲノムライブラリースクリーニング⁷⁾にて陽性となったプラークから抽出した挿入遺伝子断片を蛋白発現ベクターである pGEX-6P-1 プラスミドベクターにサブクローニングし、*Escherichia coli* JM109 cells をトランスフォームした後、培養し GST 融合蛋白として発現させ、GST アフェニティーカラムを用いて精製した。その後 PreScission Protease を使用して GST を切断し RP35 リコンビナント蛋白を作製した。

P. acnes 抗原の調製

使用した *P. acnes* はサ症患者の皮膚病変部より本研究室にて分離培養された患者分離株を使用した。(本

株は 16S rRNA の PCR と細菌同定法により type strain と違いがないことが確認されている。) 菌は GAM ブイヨンにて 37°C で培養し十分培養した後 60°C で 30 分加熱し死菌とした。その後破砕機にて 25 分間破砕し PBS に溶解しマウスの免疫に使用した。また、可溶性抗原は 550,000 g にて超遠心して上清を回収し、単核球幼弱化反応と抗体価測定に使用した。

P. acnes 誘導による肺肉芽腫の形成

実験には C57BL/6 雌 5~6 週齢 SPF マウスを使用した。実験群 1 として *P. acnes* 死菌を 1 匹あたり 1 mg 静脈内投与し、1 週間後に RP35 (50 µg/head) 抗原を CFA とともに足裏に感作免疫しその後感作免疫に使用した抗原のみを 1 週間間隔で同様に免疫した。静脈内投与後 2, 3, 4 週の時点で最終免疫の 3 日後に屠殺した。実験群 2 では静脈内投与を行わず RP35 (50 µg/head) を CFA とともに免疫後 1, 2, 3, 4 週の時点で最終免疫の 3 日後に屠殺した (Figure 1)。

両群ともコントロール実験として RP35 の代わりに *P. acnes* (1 mg/head), ovalbumin (OVA) (50 µg/head), glutathion S-transferase (GST) (50 µg/head) を使用したものを設けた。

組織学的検討

麻酔し眼球採血を行い頸椎脱臼により屠殺した。全身臓器を摘出し、24 時間 10% 緩衝ホルマリン固定後包埋、薄切し、HE 染色を行った。薄切は 50 µm 間隔で 4 µm の切片を 3 枚薄切し染色した。これら 3 枚ともに肉芽腫が認められたとき肉芽腫形成ありと判定した。

血清中の抗体価アッセイ

各実験群マウス 3 週群において血清中の *P. acnes* および RP35 に対する IgG, IgM, IgA 抗体価を蛍光イムノアッセイにより測定した。

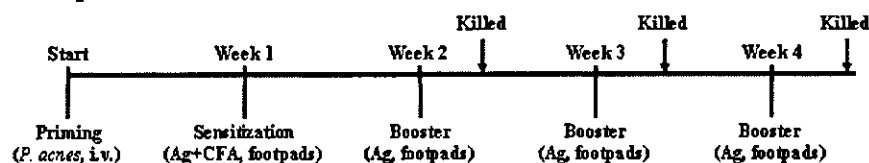
単核球幼若化反応の検討

解剖時に膝下部リンパ節よりリンパ球を採取し、*P. acnes* と RP35 蛋白を抗原として加えて培養した。培養 3 日目にサイミジントリチウムを添加し 24 時間後細胞の放射性活性を測定することにより細胞増殖を調べた。抗原添加群の平均値を抗原未添加群の平均値で除した値を stimulation index (SI) として求めた。

組織よりの *P. acnes* 分離

正常 C57BL/6 雌マウス 6 週齢マウスと 12 週齢マウスから無菌的操作にて肺、肝臓、リンパ節を摘出し、臓器重量の 4 倍量 GAM ブイヨン中ですりつぶし、

A. First experiment



B. Second experiment

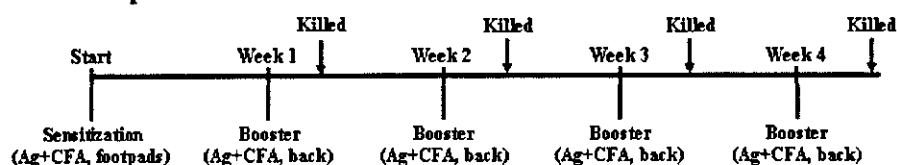


Figure 1 Immunization protocols. Priming was done by a single intravenous injection of heat-killed *P. acnes*. Sensitization was done by subcutaneous injections of one of the antigens (Ag): RP35, *P. acnes*, ovalbumin, or GST, emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA), into the hind footpads. Boosters were subcutaneous injections of the same antigen in PBS into the hind footpads in the first experiment (A), and subcutaneous injections of the antigen emulsified with CFA into the animal's back in the second experiment (B). Mice were killed three days after the last booster as shown by the arrows.

GAM プイオンにて 5 日間培養後, コロニーの数を算定した。コロニーよりグラム染色後 VITEK system により菌を同定した。

結 果

抗原誘導による肺肉芽腫の形成

肺において, 静注による priming をした群では *P. acnes*, RP35 を感作免疫した群においてそれぞれ 25%~30% また 33%~57% に肉芽腫形成が認められた。また, priming を行わない群においても *P. acnes*, RP35 を感作免疫した群はそれぞれ 25%~38% また 25%

~50% に肉芽腫形成が認められた。これら両群間において肉芽腫形成率に有意な差はなかった。また priming の有無に関わらず, OVA や GST を感作した群においては肉芽腫の形成は認められなかった (Table 1)。

組織学的検討

肉芽腫の形態においての各群の差は認められなかった。肉芽腫の分布は肺の実質および胸膜下に散在性に認められ, 特に胸膜下には多くの肉芽腫が認められた (Figure 2A)。拡大像では好酸性の豊かな細胞質を有する類上皮細胞とリンパ球が混在した肉芽腫性炎症が認められた (Figure 2B)。未熟な肉芽腫巣が時

Table 1 Detection frequency of pulmonary granulomas in primed and unprimed mice sensitized with various antigens

Priming	Sensitization		Numbers (%) with pulmonary granulomas of mice/total at:			
	Sensitizer	Booster	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Done	None	None	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Done	RP35 + CFA	RP35	N.E.*	4/12 (33) ^a	13/23 (57) ^b	6/12 (50) ^c
Done	<i>P. acnes</i> + CFA	<i>P. acnes</i>	N.E.	3/12 (25) ^a	4/15 (27) ^b	3/10 (33) ^c
Done	OVA + CFA	OVA	N.E.	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Done	GST + CFA	GST	N.E.	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Not done	RP35 + CFA	RP35 + CAF	0/8 (0)	2/8 (25)	8/16 (50) ^d	10/20 (50) ^e
Not done	<i>P. acnes</i> + CFA	<i>P. acnes</i> + CFA	0/8 (0)	2/8 (25)	6/16 (38) ^d	3/12 (25) ^e
Not done	OVA + CFA	OVA + CFA	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Not done	GST + CFA	GST + CFA	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)

Priming was by a single intravenous injection of *P. acnes*. Sensitizing and booster doses were injected at weekly intervals.

* Not examined.

^ap = 0.65, ^bp = 0.070, ^cp = 0.34, ^dp = 0.48, ^ep = 0.16, chi-square test of proportions with Yates' correction, pairwise.

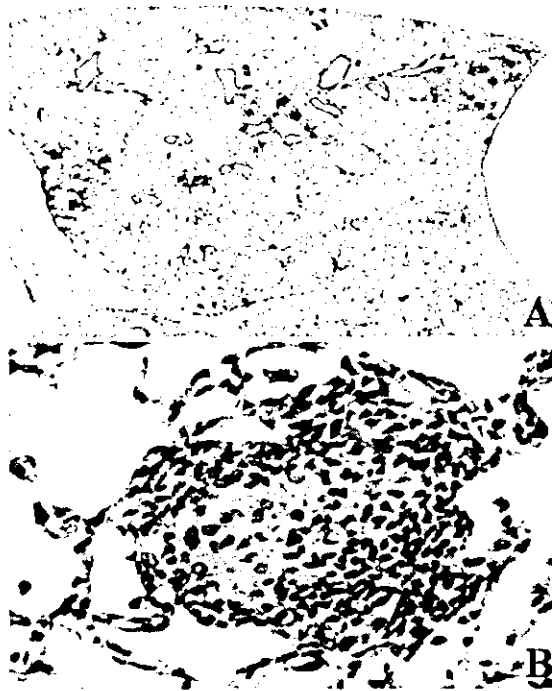


Figure 2 Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a recombinant trigger-factor protein, RP35, of *P. acnes*. Female C57BL/6 mice were sensitized by subcutaneous injections of 50 µg of RP35 emulsified with complete Freund's adjuvant weekly for 3 weeks, and examined 3 days after the last sensitization. Note the many granulomas scattered throughout the lung (A, original magnification, (22) and a granuloma with many lymphocytes around a core of epithelioid cells with rich eosinophilic cytoplasm (B, (600).

に胞隔炎を伴って認められ、リンパ球浸潤の少ない成熟した肉芽腫も認められた。血管壁の肉芽腫もときに認められ、血管周囲の肉芽腫はしばしば認められた。組織からの *P. acnes* 菌体培養

24匹中8匹(33%)で肺から組織1gあたり100~800 cfuの菌が培養された。このうち、肝、肺、リンパ節の3臓器より検出される例が1例、肺、肝の2臓器より検出される例が1例あった (Table 2)。

単核球幼若化反応と抗体価測定

同一の免疫プロトコールで感作されたマウス群に

において肺肉芽腫の形成があったものとなかったもの2群にわけて単核球幼若化反応と抗体価を比較した。その結果 RP35, *P. acnes* 感作群では priming の有無に関係なくその有意差を認めなかった (Table 3)。

考 察

今回の研究により *P. acnes* trigger factor (RP35) の免疫感作のみにより実験的肺肉芽腫の形成と維持が可能であることが実証できた。

現在までにラットやウサギにおいて本菌によるいくつかのサ症肉芽腫モデルが提唱されてきたが、いずれも、菌の感作を行った後に菌を静注し、肉芽腫の形成に至っている⁸⁾⁹⁾。今回の実験モデルはサ症の病態を考慮するとそれに代わる新たなサ症実験モデルと考えられる。その理由として、第一にサ症患者において既に *P. acnes* trigger factor に対する過敏性免疫反応が認められていること。第二に、発症時においてさえ無症候状態で過ごすこともあるサ症患者において、*P. acnes* が末梢血中で増菌するような敗血症状態が発症をトリガーしているとは考えづらいこと、第三に今回の方法では免疫感作のみでも肉芽腫形成を誘導することが可能であったという点である。

蛋白抗原を CFA アジュバントとともに感作免疫することにより誘導される疾患モデルは、通称 experimental organ-specific allergic disease と呼ばれ、有名なものでは、多発性硬化症の実験モデルとして知られる実験的アレルギー性脳炎 (EAE)¹⁰⁾、橋本病の実験モデルとして知られる実験的アレルギー性甲状腺炎 (EAT)¹¹⁾、リウマチ関節炎の実験モデルとして知られるアジュバント誘発性関節炎 (AIA)¹²⁾ などがある。同様に、*P. acnes* trigger factor を CFA アジュバントとともに免疫することにより引き起こされる肺肉芽腫症は、サルコイドーシスの実験モデルとして同様な観

Table 2 Results of *P. acnes* culture from lungs, livers, and mesenteric lymph nodes of normal untreated mice

Organ	Number (%) of successes in culture [cfu/g] with normal mice		
	6 weeks old (n = 12)	12 weeks old (n = 12)	Total (n = 24)
Lung	4 (33) [500 ^a , 300, 800, 100 ^b]	4 (33) [100, 100, 100, 100]	8 (33) [†]
Liver	2 (17) [100 ^a , 100 ^b]	0 (0)	2 (8) [*]
Lymph node	1 (8) [100 ^a]	0 (0)	1 (4) [†]

^{a,b} Organs with the same superscripts were taken from the same mice. ^{*}p = 0.033 and [†]p = 0.0096, chi-square test of proportions with Yates' correction, pairwise.

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 ^t	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,r}	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 ^{s,t}	246 ^s	< 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,t}	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 ^k	9.0 ^k	337 ^{l,u}	13 ^k	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,v}	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 ^{u,v}	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).

点から取り扱おうものと考えられる。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⁾。リボソーム内で mRNA の遺伝子情報をもとに合成される蛋白質は、リボソーム内の 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⁷⁾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 Bakteriol 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.

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^{1*} 武村 民子^{2**}

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、肺癌所属リンパ節 22 症例、大腸癌所属リンパ節 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 Eishi¹, and Tamiko Takemura²

¹Department of Human Pathology, Tokyo Medical and Dental University and

²Department 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¹⁾。

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 Wesenberg²⁾ 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、特殊なりポフスチン、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。

¹ 東京医科歯科大学医学部 人体病理学

² 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

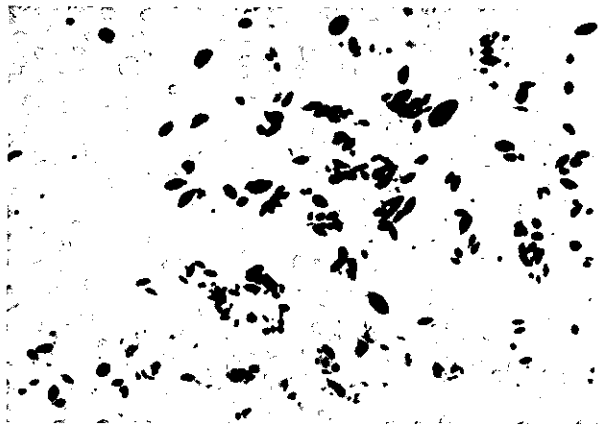


図1 サ症リンパ節のHW小体 (抗酸菌染色)

表1 PAB抗体の菌種特異性に関する検討結果

Propionibacteria	Western blot	ELISA	Other bacteria	Western blot	ELISA
Cutaneous			<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	-	-
<i>P. acnes</i>	+	+	<i>Corynebacterium pyogenes</i>	-	-
<i>P. granulosum</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 dairy			<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>	-	-

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

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

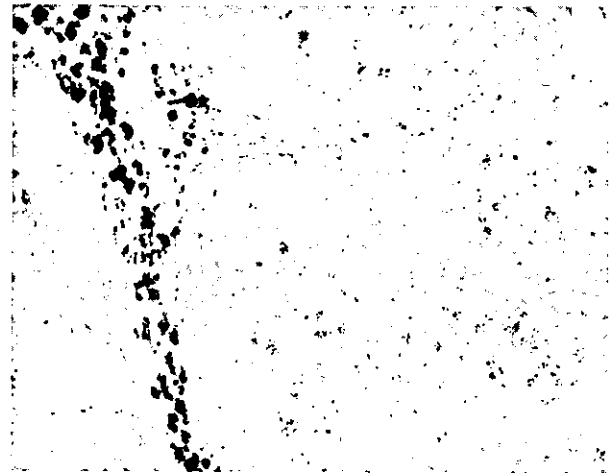


図2 PAB抗体で陽性を呈するHW小体(左)と肉芽腫内(右)でのPAB抗体陽性像



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。

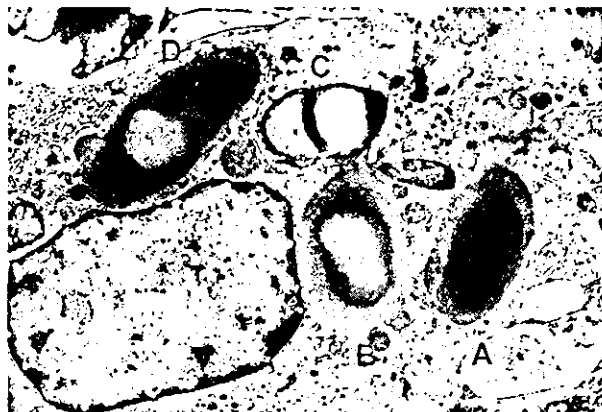


図4 電顕写真における HW 小体の種々の形態像

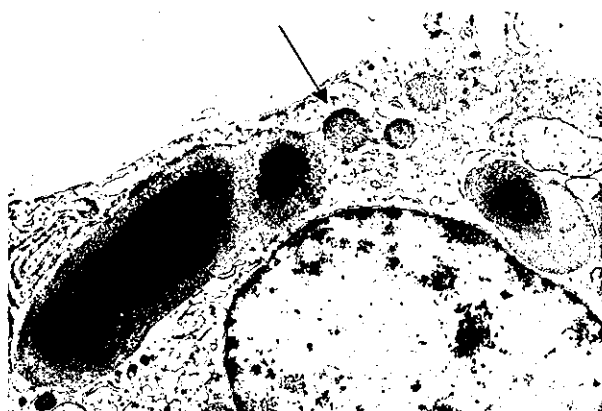


図5 HW 小体に観察される出芽様分裂像 (矢印)

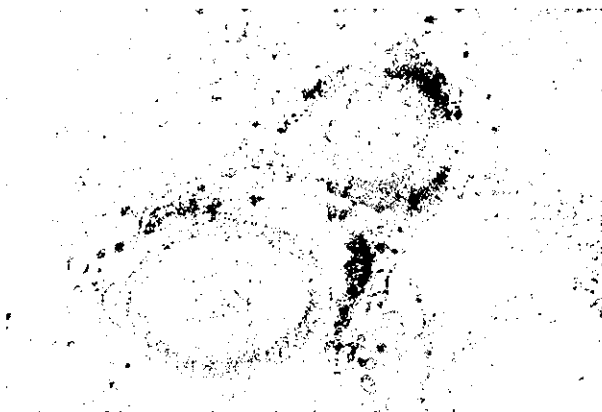


図6 HW 小体における PAB 抗体陽性像の局在

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の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^{3,4,5,6)}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³⁾。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^{4,5)}。同年、Almenoff ら⁶⁾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⁷⁾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^{8,9,10)}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ナール抗体 (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す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

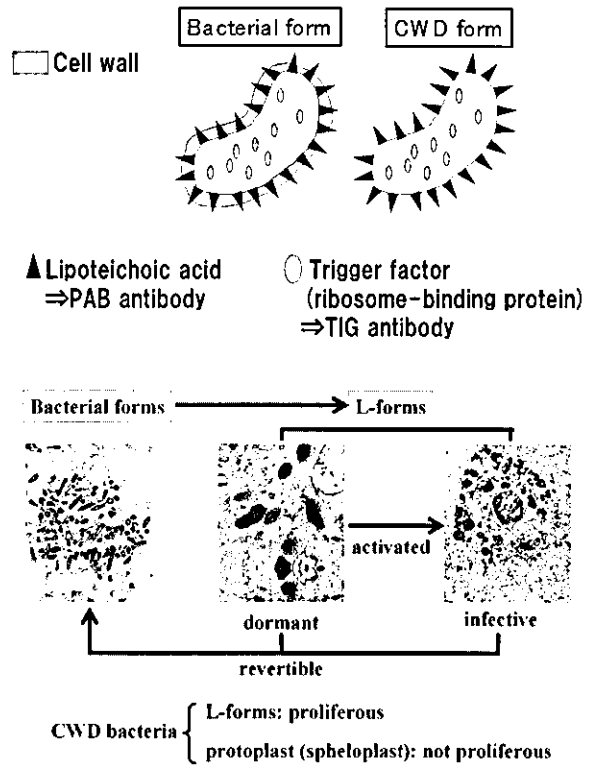


図 8 *P. acnes* L 型菌の通常細菌型への形質転換

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

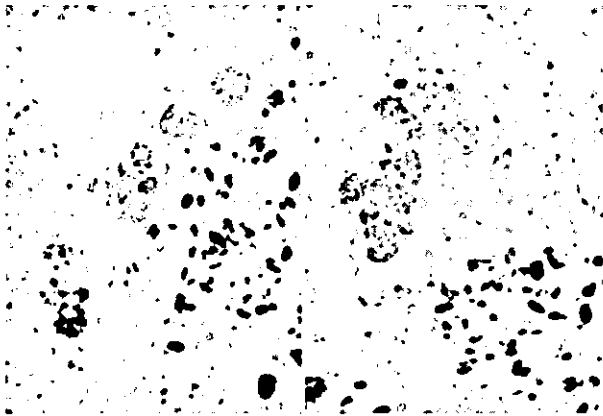


図9 マクロファージ細胞内の菌増殖 (PAB 免疫)

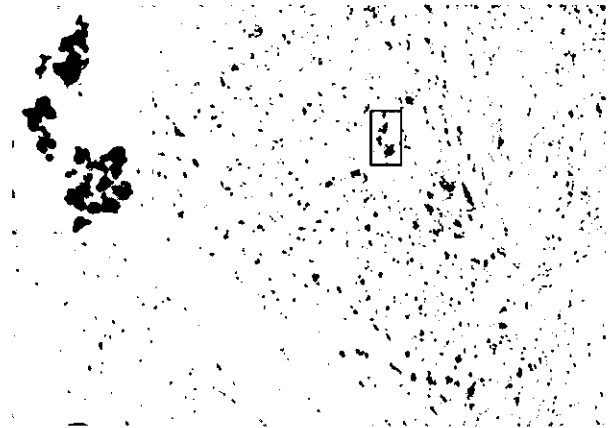


図11 心臓サルコイドーシスの PAB 免疫染色

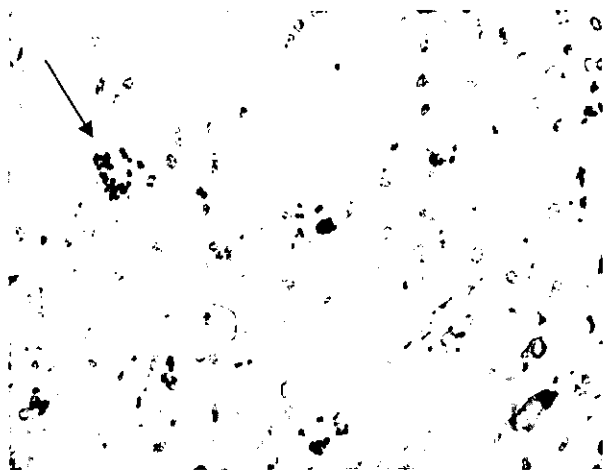


図10 脾臓サルコイドーシスの PAB 抗体免疫染色



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) に終わり早晚消褪する。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¹¹⁾ 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

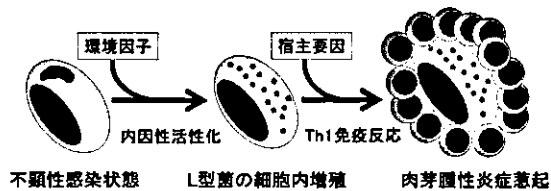


図13 細胞内L型アクネ菌の内因性活性化と肉芽腫形成との関連性：細胞内に不顕性感染したアクネ菌は、細胞壁を欠失したL型菌として細胞内に潜在感染することで宿主との共生関係が維持されているものと考えられる。潜在感染したアクネ菌がなんらかの環境要因を契機に活性化され、感染局所で増殖しはじめることが発症をトリガーしている可能性がある。

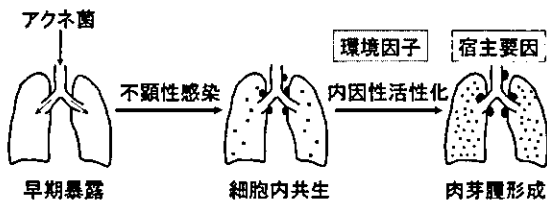


図14 サルコイドーシスにおける肺野・肺門部リンパ節病変の成り立ち：我々の皮膚表面を主体に常在菌として環境中に多量に存在するアクネ菌は、思春期前後のはやい時期に経気道的に肺に不顕性感染し、末梢肺組織やその所属リンパ節である肺門部(縦隔)リンパ節に潜在性に細胞内感染している。宿主要因としてアクネ菌に対してTh1タイプの過敏性免疫反応を有する人では、なんらかの環境要因を契機に局所で異常増殖する菌を標的として肉芽腫形成が引き起こされるとする新しい考え方を仮説として示した。

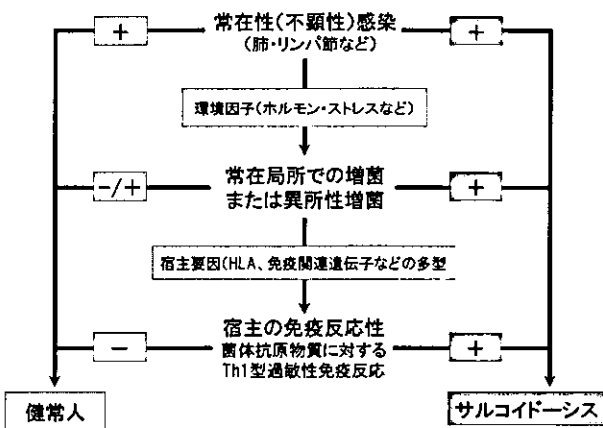


図15 アクネ菌を原因とするサルコイドーシスの病因論まとめ：多くのヒトでは、肺やリンパ節などの深部組織にアクネ菌が共生状態を保ちながら常在性に不顕性感染している。宿主にストレスやホルモン環境・生活習慣の変調など環境要因が加わることで、組織の細胞内に潜在性感染していたアクネ菌が、常在局所あるいは異所性に異常増殖するような状態が起こる。このような状態はサ症患者以外でも起こりうる可能性を现阶段では否定できないが、HLAやNod蛋白¹⁴⁾/TLRsなど免疫関連遺伝子の遺伝子多型に起因する宿主要因を有するヒトでは、アクネ菌の保有するなんらかの菌体抗原物質に対して強いTh1型過敏性免疫反応が持続することか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¹²⁾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¹³⁾。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¹⁵⁾やアメリカ¹⁶⁾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, Spindlekörper 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- κ 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>

MDC 遺伝子多型とサルコイドーシスの病態

山口 悦郎* 周 艶秋

macrophage-derived chemokine (MDC) は、IL-4, IL-13 など刺激により、マクロファージや樹状細胞、ナイーブ T 細胞、気道上皮細胞などから産生されるケモカインで、単球や NK 細胞、T 細胞、特に Th2 細胞に対する遊走活性を示す。サルコイドーシスは、Th1 免疫応答が優位であると考えられているが、特定の病期や、特定の患者亜集団において、Th2 細胞が関与している可能性は否定できない。そこで MDC 遺伝子プロモーター領域の 3 つの一塩基多型 (SNP) についてサルコイドーシスの発症や病態との関連を検討した。その結果 -942 (G/A) のみがサルコイドーシスの発症と相関しており、特に発症年齢が 40 歳未満の患者でその傾向が強かった。その他の臨床指標や臨床経過とはいずれの SNP も有意な関連を示さなかった。-942 (G/A) は健常対照者、サルコイドーシス患者において、血清 MDC 濃度と相関しており、患者ではやはり発症年齢 40 歳未満で関連が強かった。-942 (G/A) の遺伝子型を揃えた比較において、サルコイドーシス患者の血清 MDC 濃度は健常者より高かった。対立遺伝子 -942 G のプロモーター活性は -942 A より高く、血清の蛋白濃度の結果と一致していた。サルコイドーシスにおける MDC 発現の亢進から、その発症病態における Th2 細胞の関与が示唆されるが、MDC 高発現群におけるサイトカインプロファイルなど、今後より詳細な検討を踏まえた解析が必要であろう。一方で MDC はサルコイドーシスにおいて、他のひとつの重要な効果細胞である単球・マクロファージ系細胞の集積に関与している可能性もある。また、-942 (G/A) と 40 歳未満での発症や、同年齢層の患者血清 MDC 濃度との相関などは、MDC と内分泌系の間に相互作用が存在することを示唆する。

Gene polymorphisms of MDC and the pathogenesis of sarcoidosis

Etsuro Yamaguchi, and Yanqiu Zhou

*Division of Respiratory Medicine and Allergology, Department of Medicine,
Aichi Medical University School of Medicine*

Macrophage-derived chemokine (MDC) is a chemokine produced by macrophages, dendritic cells, naïve T cells, and airway epithelial cells stimulated with IL-4 or IL-13. It is a chemoattractant for monocytes, NK cells, and T cells; especially for Th2 cells. Sarcoidosis is believed to have TH1-dominant immune phenomena, however, it is possible that Th2 cells are also involved in a certain clinical stage of the disease or in a subpopulation of patients. We thus investigated the relationship between three single nucleotide polymorphisms in the promoter of MDC gene and the occurrence or the pathogenesis of sarcoidosis. A SNP -942 (G/A) was solely associated with the development of sarcoidosis, specifically in those patients whose age at onset was less than 40 years. No SNP was associated with other clinical parameters and clinical course of sarcoidosis. Meanwhile, -942 (G/A) was associated with serum levels of MDC in both patients and controls. The association was stronger for patients whose age at onset was less than 40 years. Patients with sarcoidosis had higher serum levels of MDC than control subjects having the same genotype for -942 (G/A). The promoter activity of allele -942 G was higher than that of -942 A, which was consistent with the association between the SNP genotype and serum MDC levels. These observations suggest possible involvement of Th2 cells in sarcoidosis, however, more precise analysis on, for example, the cytokine profile in patients with high MDC expression will be needed. Meanwhile, it is likely that MDC has a role in the accumulation of monocyte/macrophage lineage cells which are the other important effector cells in sarcoidosis. Also, significant association between -942 (G/A) and the occurrence of sarcoidosis before 40 years of age at onset or serum MDC levels in such patients suggests the presence of a crosstalk between MDC and the endocrine system.

初めに

macrophage-derived chemokine (MDC) はヒト単球由来マクロファージの cDNA の無作為シーケンスにより発見されたケモカインである¹⁾。IL-4, IL-13, IL-1 β , TNF- α , LPS などの刺激により、マクロファージや樹状細胞, ナイーブ T 細胞, 気道上皮細胞などから産生される^{2,3)}。受容体は CCR-4 で⁴⁾、それを発現した単球や NK 細胞, T 細胞のうち特に Th2 細胞に対する遊走活性を示す^{5,6)}。これらの特徴から容易に推測されるように、これまでに Th2 免疫応答が主体であると考えられているアトピー性皮膚炎患者血清, 症状が持続している気管支喘息患者血漿や呼気濃縮液で MDC 濃度の上昇が観察されており^{7,8)}、それらの疾患における役割が強く示唆されている。

一方サルコイドーシスは、病理学的に類上皮細胞肉芽腫がその病変の主体であること、気管支肺胞洗浄液中のマクロファージや T 細胞が IFN- γ を産生すること^{9,10)}、血清や気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の IFN- γ や IL-12 濃度が上昇していることより^{11,12)}、Th1 免疫応答が優位であると考えられている。しかし、サルコイドーシスの肺胞 T 細胞由来クローンは、末梢血 T 細胞由来クローンと同様に IL-4 を産生し¹³⁾、サルコイドーシス患者由来の II 型肺胞上皮細胞は、IL-4 と IFN- γ 双方の産生が亢進しているとの報告がある¹⁴⁾。また実験的肉芽腫形成モデルでは、肉芽腫の退縮期に IL-4 が産生される¹⁵⁾。以上よりサルコイドーシスにおいても特定の病期や、特定の患者亜集団において、Th2 細胞が関与している可能性は否定できない。

MDC 遺伝子は他のひとつの Th2 細胞遊走ケモカインである thymus and activation-regulated chemokine (TARC) と共に、染色体 16q13 に位置する¹⁶⁾。そのプロモーター領域には、-942 (G/A), -721 (G/A), -469 (T/C) の 3 つの一塩基多型 (SNP) が存在する (図

1)。前述のような背景から、MDC が関与する亜集団の検索のためのひとつの手法として、遺伝子多型の役割に興味もたれる。そこで今回の研究においては、これら 3 つの多型についてサルコイドーシスの発症や病態との関連を検討した。

対 象

対象は 393 人の健常者と 204 名のサルコイドーシス患者である。健常者は健診受診者の中から、呼吸器疾患の既往歴や現病を有しておらず、何らかの治療を受けていない者を選別した。サルコイドーシスの診断は、厚生労働省の特定疾患診断基準に基づいた。本研究は、北海道大学医学研究科「医の倫理委員会」の承認を受けて実施した。

方 法

遺伝子多型は ARMS (amplification refractory mutation system) 法により同定した。サルコイドーシスと健常者間の多型頻度の差は χ^2 検定とロジスティック回帰分析にて、サルコイドーシスの臨床経過との関連は Cox 比例ハザードモデルにより検定した。サルコイドーシス患者血清の MDC 濃度は ELISA 法 (R & D 社) により測定し、MDC 濃度と多型との関係は Kruskal-Wallis 検定にて、2 群間の差は Mann-Whitney *U* 検定によって検討した。MDC 遺伝子プロモーター活性は、プロモーター配列を PCR 増幅後、ホタルルシフェラーゼレポーターベクターである pGL3 basic vector (Promega) の複数クローニング部位に挿入し、ヒトの単球性白血病細胞株である THP-1 に移入した。同時に移入効率の対照として、ウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクターである pRLTK vector も移入した。無刺激で 24 時間培養後に細胞内のルシ

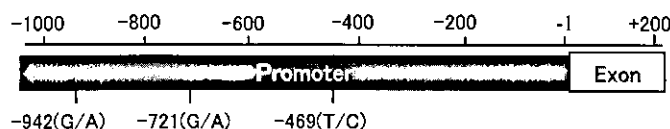


図1 MDC 遺伝子の一塩基多型

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

表1 サルコイドーシス全員について年齢, 性で補正したロジスティック回帰分析

多型	オッズ比	p 値
-469 (T/C)	0.96 (0.76-1.21)	0.74
-721 (G/A)	0.72 (0.56-1.28)	0.58
-942 (G/A)	0.72 (0.56-0.93)	0.01*

* G に対する A の発症オッズ比

表2 発症年齢 40 歳未満のサルコイドーシス患者について年齢, 性で補正したロジスティック回帰分析

多型	オッズ比	p 値
-469 (T/C)	0.95 (0.69-1.29)	0.73
-721 (G/A)	0.58 (0.58-1.33)	0.67
-942 (G/A)	0.58 (0.40-0.83)	0.003*

* G に対する A の発症オッズ比

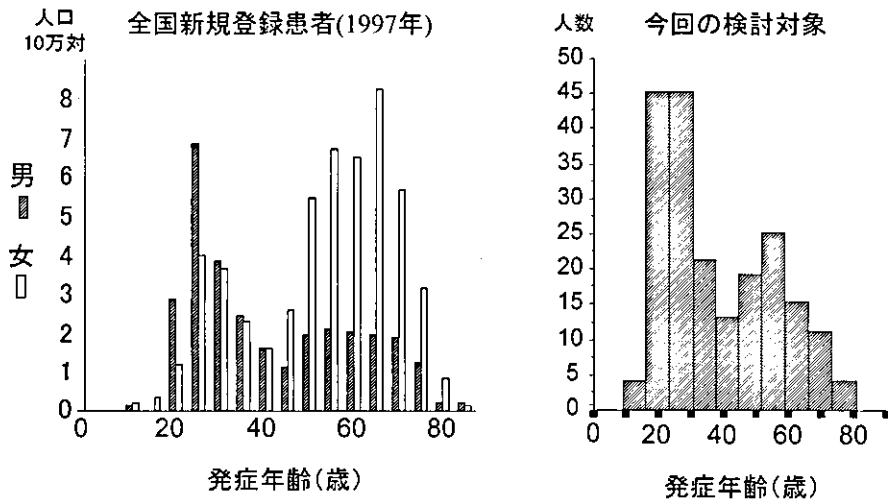


図2 サルコイドーシス患者発症年齢分布

フェラーゼ活性比を求め, プロモーター活性とした。

結 果

サルコイドーシスの発症に関して, χ^2 検定ではいずれの多型の遺伝子型もサルコイドーシスと健常者間に有意な分布差を認めなかった (結果非提示)。しかし, 性別と, サルコイドーシスにおいてはその臨床象を調査した時点, 健常者では遺伝子試料を入手した時点での年齢で補正したロジスティック回帰分析で, -942 (G/A) 多型のみがサルコイドーシスの発症と有意な関連を示した (表 1)。

ここで今回の患者集団の発症年齢分布をみると, 図 2 に示すように明らかに 40 歳付近が最も少なく, そこを境に比較的若年発症群と中・壮年発症群に分かれている。この分布は, 我国の 1997 年の特定疾患新規登録患者の年齢分布とよく類似しており (図 2), 全国的な傾向と考えられる。そこで発症年齢が 40 歳未満の患者について同様なロジスティック回帰分析を行った

ところ, より危険率の低い結果が得られ, -942 (G/A) 多型のサルコイドーシス発症に及ぼす影響は, 比較的若年発症群で大きいことが判明した (表 2)。

-942 (G/A) 多型によるサルコイドーシス患者の背景分析では, 発症年齢が遺伝子型 AA で高く, 非喫煙者率が GA ないし AA で高かったが, その他に胸部 X 線写真による病期や罹患臓器数, 血清 ACE 活性, 呼吸機能とは有意な関連を認めなかった (データ非提示)。また臨床経過と各多型との関連も検討したが, 有意な相関は認められなかった (データ非提示)。

次に患者と健常対照者のうち, 血清が得られた一部の被験者において, 血清 MDC 濃度と多型との相関を検討した。その結果, 両群とも全体として -942 (G/A) と有意な相関を示した。特にサルコイドーシス患者では, 上記の年齢層で群分けすると, 発症年齢 40 歳未満の群でのみ全体として有意な相関が認められた (図 3)。他の多型と血清 MDC 濃度との間には有意な相関を認めなかった。またサルコイドーシス患者では, 全ての遺伝子型において同じ遺伝子型の健常者より血