

はじめに

サルコイドーシスの重症度分類については、平成 10 年に厚生省特定疾患呼吸器系調査班—びまん性肺疾患分科会から表 1 のように提案されている。この重症度分類案は、視覚障害、心臓機能障害、呼吸機能障害を中心に分類されており、各々を 1 級から 5 級までに分けて指数を設け、2 臓器以上の場合には重複する障害の合計指数によって分類されている。この重症度分類は大変貴重な提案であるが、残念ながら案のまま経過している。そこで今回我々は、試案ではあるが新しい重症度分類を提案することにしたい。

サルコイドーシス重症度分類の問題点

サルコイドーシスの重症度分類を検討するとき、機能障害を中心に身体障害認定基準に基づき分類される傾向にあるが、日本のサルコイドーシスは、身障者認定基準を満たす、いわゆる重症サルコイドーシスの症例は少数であることを考慮する必要がある。またサルコイドーシスは、治療の第一選択薬であるステロイド剤が比較的有効なことが多く、ステロイド剤長期投与により機能障害が重症化することなく持続している症例もあり、このような症例を重症度分類としてどのように扱うかが問題となる。また手術やペースメーカー装着で症状がまったく安定した場合もその扱いが課題となる。すなわち従来の機能障害中心の重症度分類に、治療効果を含めて重症度分類を考慮する必要がある。

遷延性、難治性、重症サ症

従来サルコイドーシスの重症度の表現として遷延性、難治性、重症サルコイドーシスが使用されてきた。しかしこれらの呼称については共通の定義はなく、各施設によって若干のニュアンスが異なるのが実態である。そこでサルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会評議員の先生方を中心にアンケート調査を実施し、これ

らの呼称がどのような見解で使用されているかについて厚生労働科学研究—難治性疾患克服研究事業びまん性肺疾患調査研究班の一環として調査した。結果を表 2 に示す。その結果 30% 前後に共通の認識があったが、その他種々な回答を得た。一方このアンケートを依頼したサルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会評議員の大部分は専門として呼吸器内科を中心とした内科であり、全身臓器疾患であるサルコイドーシスにおいて他科すなわち眼科、循環器内科、神経内科などの意見が十分反映されていないことに配慮しなければならない。表 3 に西山らが発表した神経内科医とサルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会員との「遷延性の期間」についてのアンケートの結果を示す。これによると呼吸器内科が中心のサルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会員の遷延性とする病変持続期間は約 1 年～3 年であり、神経学会員のそれは 6 ヶ月～1 年が多く認められる。その他難治性や重症の内容についても日本語の持つイメージが各々異なり、種々の回答が得られている。

以上のことから、サルコイドーシスにおける遷延性、難治性、重症性の定義を各臓器別に共通のものにすることは極めて困難であることが考えられた。

重症度分類を考慮した治療効果

上述したような見解から遷延性、難治性、重症性に変えてサルコイドーシスの治療を中心とした経過において次のように呼称することを提案したい。

治療反応性サルコイドーシス

病変に対してステロイドホルモン剤全身投与やその他の治療（注）が有効なサルコイドーシス
 （注）ステロイド剤以外の免疫抑制剤、抗菌剤、ペースメーカー、手術など……

治療抵抗性サルコイドーシス

いずれの治療も無効で、病変が改善しないサルコイドーシス

新サルコイドーシス重症度分類の提案

従来のサルコイドーシス重症度分類は、身障者認定基準を念頭に機能障害により分類されてきている。し

¹ 日赤医療センター

² 浜松医科大学

³ 国立病院機構西別府病院

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

表1 サルコイドーシスの重症度分類案

3:36

呼吸器科 第3巻 第1号

表1 サルコイドーシスの重症度分類案

	視覚障害	心臓機能障害				呼吸器機能障害	その他・臓器の機能障害 (臓器別身障者分類による)
		心室性期外収縮 (Lown分類)	房室ブロック	左室駆出率	NYHA		
一級	両眼の視力(万国式視力表によって測ったものをいい、屈折異常のある者については、矯正視力について測ったものをいう。以下同じ。)の和が0.01以下のもの	4b あるいは 5	25%未満	IV	呼吸器の機能の障害により自己の身の日常生活活動が極度に制限されるもの PaO ₂ 59以下 指数 20以下	
二級	1. 両眼の視力の和が0.02以上0.04以下のもの 2. 両眼の視野がそれぞれ10度以内でかつ両眼による視野について視能率による損失率が95%以上のもの	4a	Ⅱ度(Mobitz型) あるいはⅢ度 (上記でペースメーカーを植え込んだ例を含む)	25%以上 35%未満	Ⅲ	呼吸器の機能の障害により自己の身の日常生活活動が著しく制限されるもの PaO ₂ 60~69 指数 20~30	
三級	1. 両眼の視力の和が0.05以上0.08以下のもの 2. 両眼の視野がそれぞれ10度以内でかつ両眼による視野について視能率による損失率が90%以上のもの	2 あるいは 3	Ⅱ度 (Wenkebach型)	35%以上 45%未満	Ⅱ	呼吸器の機能の障害により家庭内での日常生活活動が著しく制限されるもの PaO ₂ 70~79 指数 30~40	
四級	1. 両眼の視力の和が0.09以上0.12以下のもの 2. 両眼の視野がそれぞれ10度以内のもの	1	I度	45%以上 55%未満	I	呼吸器の機能の障害により社会での日常生活活動が著しく制限されるもの PaO ₂ 80以上 指数 40~50	
五級	1. 両眼の視力の和が0.13以上0.20以下のもの 2. 両眼による視野の2分の1以上が欠けているもの	0	55%以上	I	BHLと肺野に病巣があるが、呼吸器機能障害の少ないもの	

(1)障害等級の認定法 2つ以上の障害が重複する場合の障害等級は、重複する障害の合計指数に応じて、次のように認定する。		(2)合計指数の算定方法 合計指数は、次の等級別指数表により各々の障害臓器の該当する等級の指数を合計したものとす。	
合計指数	認定等級	認定等級	合計指数
18以上	1級	1級	18
11 ~ 17	2級	2級	11
7 ~ 10	3級	3級	7
4 ~ 6	4級	4級	4
2 ~ 3	5級	5級	2

(文献¹⁾より引用)

表2 アンケート実施 平成19年9月 126通送付, 47通回答 (回答率37.3%)

① 遷延性サ症の定義について

症状ならびに所見は認めるが、これらが3年以上増悪することなく継続するサ症	17(人)
若年者を除外すれば3年以上はかなり多い	1
5年以上	1
特に意見なし	3
遷延性肺サ症など臓器名を入れる	1
症状ならびに所見は認めるが、これらがステロイドホルモンの全身投与を行うことなく、3年以上増悪せずに継続するサ症	1
症状、所見が3年以上継続するサ症	2
学問的には5年以上必要と考えます。	1
少しずつ肺野病変等が進行する症例もある(ステロイド治療は要しないが)	1
治療介入の有無とは関係なく、ということですね。次の②は単に遷延性と考えると良い	1
サ症の所見は80%が2年以内に改善することから2年以上でも良いかもしれませんが	1
3年以上増悪せずに継続するサ症増悪でなく、改善	1
治療の有無に関わらずか?、無治療ででしょうか?	1
①、②、③は一方が他方を含むことがあっても良いとする 定義の仕方が変わってきますが、それでよいと思います。	1
3年以上増悪→改善	1
期間は2年?	1
再燃もあり	1
増悪するものは②以下に入れるのか?	1
②との差別のポイントは無治療でということか?	1
4~5年程度が良いのでは	1
良いと思うが、または遷延性	1
4年以上としています	1
無治療下で3年以上	1
遷延性という症状が悪いイメージを持つが、眼科で消炎剤のみの点眼(ステロイドなし)を受けている患者も遷延性となるのか? またBHLのみ(BHLが3年以上続く患者は多くないと思います)で変化のない患者も遷延性という症状が重いイメージを抱く	1

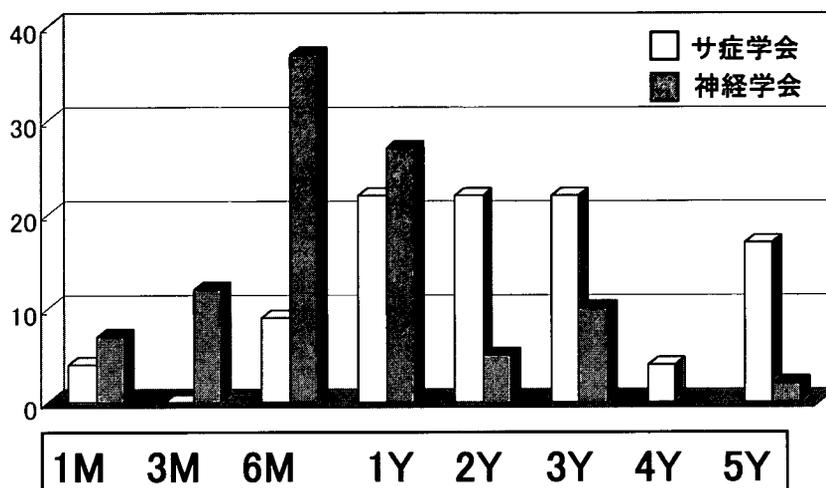
② 難治性サ症の定義

ステロイドホルモンまたはその他の免疫抑制剤および抗生剤が必要な症状、検査所見が持続し、進行は抑えられているが薬剤の減量が困難なサ症	12(人)
特になし	2
期間の記入は不要か?	1
心筋サ症は3~5年かかる	1
治療に関わらず進行する場合も加える	1
原因菌が判明したので検討を要する	1
抗生剤は世界的に容認されているサ症治療薬ではないので、免疫抑制剤など	1
その他の...とした方がよいのでは?	1
難治性肺サ症など臓器名を入れる	1
これを重症サ症にした方がよい	1
ステロイドホルモンの内服投与を含め、あらゆる治療を行っても自覚症状、検査所見が持続し、薬剤の減量中止が困難なサ症	1
ステロイドホルモン、免疫抑制剤と同等に「抗生剤」を位置づけているのはいかかとおもいます。「免疫抑制剤等」として抗生剤ははずした方がよいのでは	1
治療薬剤の減量が困難なサ症	1
※点眼のみ必要なサ症をいれるか? 付記した方がよい	1
治療はステロイド内服が必ずあり、その他を加えた場合になると考えます。	1
ある程度までは減量できても中止出来ない症例もある(中止すると増悪)	1
進行が抑えられるのなら、難治性ではないと思う。むしろ③の内容が難治性であり	1
その中でも特に重度の臓器障害をきたしている症例と「重症」とするのが分かりやすい	1
薬剤の減量のみではなく、全身性のステロイドホルモンまたは免疫抑制剤の投与を中止することが不可能な症例も含めては?	1
薬剤投与によって進行は抑えられているが...	1
抗生剤のみで治療していても「難治性」となるのでしょうか?	1
免疫抗生剤→免疫抗生薬	1
進行は抑えられているが、寛解に至らない、あるいは減量により増悪をみる	1
②、③は一緒にしてもよいのでは?	1
追加で 薬剤を減量すると症状等の悪化をみるサ症	1
薬剤の減量が困難とあるが、もう少し具体的な文が必要	1
病変が3年以上持続し、改善、悪化を繰り返す、治療継続が必要なサ症	1
治療依存性を付記	1
「抗生剤が必要な」というところの説明が少し必要	1

③ 重症サ症

ステロイドホルモンその他の免疫抑制剤、抗生剤の投与にも関わらず、症状、検査所見が増悪し、視力障害、肺機能低下など生活不自由な重い臓器障害を呈するサ症	13(人)
検査所見が像悪し...に「改善せず」を追える方がよい	1
心不全を加える	1
心臓機能低下を加える	1
全身性疾患とした他臓器疾患の合併があること	1
このグループを作って医療費の補助を手厚くする必要がある	1
特に意見なし	2
臓器の機能障害を元とする重症肺サ症ならO2吸入を持続的に要するなど	1
これを難治性サ症にした方がよい	1
ステロイドホルモンその他の治療が必要で、かつ高度の視力障害、肺機能低下などADL低下をきたす臓器障害を有するサ症	1
ペースメーカーが入って普通の生活が出来ているサ症、顔面にひどい皮膚のあるサ症などどうするかは付記した方がよい	1
検査所見が増悪するのは「難治性」で機能低下が重症なのではないでしょうか。すると重症とする判断が必要となるでしょうか	1
臓器不全が固定し、治療しない場合もあるのでは?	1
神経、筋障害、心臓機能低下を加える	1
障害の程度の評価が必要。身体障害者の評価が相応可能か、現在のサ症の活動性とは一致しない場合がある。障害が残っているだけの状態	1
症状、検査所見が増悪し...を外した方がよい	1
治療継続にも関わらず、病変が持続し、介助が必要な生活不自由を示すサ症	1
重症サ症についてはステロイド投与前に判断すべき	1
「抗生剤が必要な」というところの説明が少し必要	1

表3 神経・筋病変：遷延性の定義



かし今回サルコイドーシスの治療効果を治療反応性と治療抵抗性に分け、これに機能障害を加えた新しい重症度分類を提案したい。すなわち

重症度 I

無治療または局所治療で機能障害がないもの

重症度 II

治療反応性サ症で、機能障害のないもの

重症度 III

治療反応性サ症で、機能障害を認めるが、その程度が身障者認定基準を満たさないもの

重症度 IV

治療と関係なく、身障者認定基準を満たすもの

いものはないか

- ④ 前述した重症度分類ごとの日本における症例数を把握すること
- ⑤ 共通の重症度分類にするために各臓器ごとの学会およびサルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会で検討する必要がある

おわりに

この重症度分類案は、治療効果と機能障害を組み合わせたものである。治療を要するが軽い機能障害が持続する症例を公費負担の対象とすることが重要であり、この考えを念頭に各方面からのさらなる検討が必要と考える。

新サルコイドーシス重症度分類の今後の課題

以下の点を検討する必要がある。

- ① 治療反応性の判断をいつの時期にするか。3ヶ月かまたは6ヶ月が妥当か
- ② 各臓器ごとの、身障者認定基準を満たさない軽い機能障害の内容はどのようなものであるか。また病初期の段階で将来重篤な機能障害につながる所見があるかの検討
- ③ 多臓器疾患で、多彩な経過を示すサルコイドーシスにおいてこの重症度分類にあてはまらない

付 記

この重症度分類に関する研究は、以下の先生方との共同研究である。

- 石原麻美 (眼科・横浜市立大学)
 森本紳一郎 (心臓・藤田保健衛生大学)
 西山和利 (神経・杏林大学)
 千田金吾 (浜松医科大学)
 杉崎勝教 (国立病院機構西別府病院)
 折津愈 (日赤医療センター)

難治性サルコイドーシスの実態調査にむけてのパイロット研究

杉崎 勝教^{1*} 折津 愈^{2*} 千田 金吾^{3*} 宮崎 英士⁴

難治性サルコイドーシスあるいは重症サルコイドーシスといった用語についてはこれまで統一的な見解が得られていないが、実態はステロイド治療抵抗性の症例と考えられる。今回こうした症例の頻度や具体的な臨床像について2つの臨床データを使用して検討してみた。ひとつは1995年から2000年にステロイド剤治療が行われた全国集計症例197症例のデータであり、もう一つは現在大分大学第3内科とその関連病院で診療されているサルコイドーシス患者162例についてのデータである。その結果サルコイドーシス症例のうち約2.5%がこうした症例に該当した。また中高年女性で肺外病変を持つ症例が多く含まれていた。今後さらにこうした症例を集積してその臨床像を明らかにしていきたい。

Preliminary epidemiologic research for the refractory sarcoidosis patients in Japan

Katsunori Sugisaki¹, Masaru Oritu², Kingo Tida³, and Eishi Miyazaki⁴

¹*Department of Internal Medicine, National Nishibeppu Hospital*

²*Department of Respiratory Disease, Japanese Red Cross National Center*

³*Second Division of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine*

⁴*Third Department of Internal Medicine, Oita University School of Medicine*

In Japan, the term such as refractory sarcoidosis or severe sarcoidosis has not been clearly defined till now, but this term is thought about with a case who is resistant to steroid therapy. This time, I examined the frequency and the clinical data of such a case using two clinical data. The one is the data of 197 cases who were treated with oral corticosteroid in national survey performed in 1995–2000, and the other one is about 162 sarcoidosis patients who are now treated at the third department of internal medicine of Oita University and its related hospitals. As a result, about 2.5% of cases are equivalent to such a case among Japanese sarcoidosis patients. In addition, a lot of old to middle aged woman and the patients with extra-thoracic disease were included in this group.

Furthermore, we accumulate such a case and clarify the clinical data in future.

背景

従来我が国で使用されてきた難治性サルコイドーシスあるいは重症サルコイドーシスといった用語についてこれまではっきりした定義が与えられておらず、種々の解釈がなされ臨床の現場で使用されてきた。今回サルコイドーシスの診断基準と診断の手引き¹⁾として診断基準が改訂されたのを機会にこれらの用語についても統一した解釈を与え、その実態について明らかにする必要がある。

方法

折津らにより暫定的に与えられた用語の解釈²⁾に基づき、実際にどのような患者がその解釈に相当するのか、あるいは実数がどの程度のものなのかについてアンケートによる集計データを利用して調査した。利用した集計データは2つである。ひとつはこの研究班の仕事として2001年に報告したステロイド剤(ス剤)治療が行われた全国集計症例197症例のデータである³⁾。もう一つは現在大分大学医学部第3内科とその関連病院で診療しているサルコイドーシス患者162例についてのデータである。難治性サルコイドーシスとはス剤治療に抵抗性のサルコイドーシスと一応定義し上記2つのデータからその実態調査を行った。

結果

1. まずこうしたス剤治療抵抗性サルコイドーシス患者がどの程度の数存在するかについて検討した。

データ1: 対象は1995年から2000年までの5年間にス剤内服治療をうけて1年間以上経過観察を行った197症例である。この間のサ症全症例のうちのス剤治療症例の割合は10.3%であった。また197例のうち治療経過が不変または増悪した症例は全体の24%であった。その結果サ症症例全体に占めるス剤治療抵抗性患者の割合は2.5%となった。アンケートの対象と

なった施設は日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会の評議員を中心に行っているのでおおよそ専門施設での数値と考えられる。

データ2: 大分大学医学部第3内科およびその関連病院4病院において現在診療しているサルコイドーシス患者136例のうちス剤治療に抵抗性の患者数は31名で全体の患者数に対する割合は22.8%であった。このうち大分大学症例では25.9%であり、その他の施設では4%であった。

以上から、こうしたス剤治療抵抗性の患者の比率は施設間でバラツキが大きく特にサルコイドーシスを専門に見ている施設にはこうした患者が集積している可能性が示唆された。一般の病院ではおおむね2.5%くらいと考えられた。またス剤治療対象患者は約10%程度と考えられた。

2. ス剤治療抵抗性サルコイドーシス患者の臨床的な特徴

次に大分大学関連症例31例についてその臨床像を検討してみた。その結果を図1に示した。図1の結果は以下のようにまとめられた。

- 1) 中高年女性が非常に多かった。
- 2) 肺外サ症の割合が71%と非常に多く、一般的に肺サ症の難治例が多い欧米での集計結果⁴⁾と大きく異なっていた。特に眼病変の難治化症例が多かった。
- 3) ス剤治療抵抗症例について他の薬剤が使用されているケースはあまり多くなかったが、メソトリキセートに加えてミノサイクリンが使用されている点が注目された。

3. ス剤治療抵抗性のパターンによる分類

この31名についてさらに詳しく見てみるとス剤治療抵抗性と判断された経緯にはいくつかのパターンが存在することがわかった。主なものは次の4つである。

- 1) 臓器病変の活動性が高くス剤を使用した効果がなく自他覚所見が持続・進行する例
- 2) ス剤投与で一旦自他覚所見が改善したが、減量とともに再増悪(他臓器の増悪含め)する例
- 3) ス剤投与である程度目的臓器症状は改善したが日常生活に大きな障害を残した症例(高度視力低下、運動障害など)
- 4) すでに進行してしまっておりス剤を投与しても全く反応しなかった例(肺の線維化症例など)

¹ 国立病院機構西別府病院内科

² 日本赤十字社東京医療センター呼吸器内科

³ 浜松医科大学第2内科

⁴ 大分大学医学部第3内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

- 対象患者数 31 名
- 性別 男 8 名、女 23 名
- 年齢 20-29 歳 3 名、30-39 歳 2 名、40-49 歳 3 名、50-59 歳 4 名、60-69 歳 12 名、70 歳以上 4 名 平均 58.2 歳
- 治療対象臓器 眼 12 名、肺 9 名、心臓 4 名、神経筋 4 名、その他 5 名 (高 Ca 血症、骨関節など)
- 治療内容 ほぼ全員内服ステロイド使用 (すでに効果がないため中止した者 2 名) メソトリキセート 2 名、ミノマイシン 3 名
- 経過観察期間 6 月から 23 年まで 平均 5.5 年

図 1 ステロイド治療抵抗性サルコイドーシス患者の臨床的特徴

ど)

このうち 2) や 3) は臨床的には難治性というイメージの症例だが必ずしも薬剤治療抵抗性とはいえない。

考 案

欧米の文献では本邦での難治性サ症に相当する症例に対して refractory sarcoidosis あるいは steroid resistant sarcoidosis という呼称を使用していることが多い。したがって本邦でも難治性とはステロイド治療抵抗性サ症であると考えて差し支えないであろう。しかしステロイド治療抵抗性かそうでないかの判断については議論があると思われる。すなわち一旦ステロイド剤が奏功しても減量の過程で目的臓器あるいは他の臓器で再発し結局ステロイドの長期使用が必要となった症例をどう考えるかである。こうした症例は臨床的には難治性と考えてもおかしくはない。またステロイド不応だったが他の薬剤の使用または併用で寛解した症例がミノサイクリン使用症例等で認められる。このようないくつかのケースを考慮して適切な判断基準を提示する予定である。全国集計の検討では純粹にステロイド不応性症例は 2.5% 程度とそう多くなかったが、今回のアンケート調査が呼吸器科の施設に偏っていることを考慮する必要がある。眼科系や循環器系の施設ではもっとこの比率が上昇することが予

想される。ステロイド不応例の実態調査ではこうした施設を十分に取り込んで行う必要がある。

ま と め

難治性サ症の実態調査を行うにあたって、事前に予備調査を行った。およそ全体の 2.5% の症例がステロイド不応性の難治例と考えられたが、さらに眼科、循環器科の症例を増やす必要がある。

文 献

- 1) サルコイドーシスの診断基準と診断の手引き-2006. 日サ学会誌 27: 89-102, 2007.
- 2) 折津 愈, 杉崎勝教, 千田金吾; サルコイドーシスの重症度分類について. 厚生労働省びまん性肺疾患調査研究班平成 19 年度報告書 (in press)
- 3) Sugisaki K, Yamaguchi T, Nagai S, et al; Clinical characteristics of 197 Japanese sarcoidosis patients treated with corticosteroid. Sarcoidosis Vasc Other Granulomatous Dis. 20: 222-226, 2003.
- 4) Rizatto G, Montemurro L, Colombo P; The late follow-up of chronic sarcoid patients previously treated with corticosteroids. Sarcoidosis Vasc Other Granulomatous Dis. 15: 52-58, 1998.

サルコイドーシスの組織診断における気管支内超音波 ガイド下 transbronchial needle aspiration biopsy (EBUS-TBNA) の有用性

石井 芳樹* 武政 聡浩

【目的】サルコイドーシスの組織診断は、ほとんどの場合、TBLBによって行なわれている。しかし、TBLBの陽性率は必ずしも満足のものではなく、特に画像上肺野病変が明らかでないI期症例では、陽性率は低いと報告されている。サルコイドーシスの多くの症例では、肺門縦隔リンパ節の腫大を伴っており、経気管支的なアプローチは診断率の向上に有用と考えられたが、これまでブラインドでのTBNAは手技の熟練も要し、必ずしも普及していない。我々は、リアルタイムに超音波画像を観察しながら穿刺が可能なEBUS-TBNAを用いてサルコイドーシス診断におけるTBNAの有用性をTBLBと比較検討した。【対象】臨床的にサルコイドーシスと診断された53例(I期25例、II期28例)。気管支鏡検査時にTBLB、BALとともにEBUS-TBNAを行なった。【結果】全体ではTBNAにて非乾酪性類上皮肉芽腫を認めた陽性率は53例中44例(83.0%)であり、TBLBの陽性率は71.7%であった。I期症例では、TBNA 80%、TBLB 60%、II期症例ではTBNA 85.7%、TBLB 89.3%であり、I期症例ではTBLBの陽性率はII期症例に比較し有意に低かったが、TBNAの陽性率は有意差がなかった。TBNAとTBLBを併用することによってI期症例でも96.2%、II期症例では100%の組織診断が可能であった。【結論】EBUS-TBNAによるリンパ節生検は、手技も簡便容易で、TBLBと併用することでI期症例でも高い診断効率を得ることが可能であり、サルコイドーシスの組織診断に極めて有用な検査法と考えられた。

Utility of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration biopsy (EBUS-TBNA) in the diagnosis of sarcoidosis

Yoshiki Ishii, and Akihiro Takemasa

*Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Respiratory Endoscopy Center,
Dokkyo Medical University School of Medicine, Mibu*

【Rationale】 Although pathological diagnosis of sarcoidosis is usually made by transbronchial lung biopsy (TBLB), positive rate of TBLB is not satisfactory, especially in stage I patients. Since almost of patients with sarcoidosis have hilar and mediastinal lymphadenopathy, an approach to lymph nodes is expected to have good diagnostic yields. Transbronchial needle aspiration biopsy (TBNA) ultrasound guide needs skillfulness of the operator. On the other hand, TBNA under the real-time endobronchial ultrasound (EBUS-TBNA) is easy to perform. In the present study, we examined the utility of EBUS-TBNA and TBLB in the pathological diagnosis of sarcoidosis.

【Subjects and Methods】 Both TBLB and EBUS-TBNA were performed in 53 patients with suspected sarcoidosis (stage I: 25 cases, stage II: 28 cases).

【Results】 TBNA and TBLB demonstrated noncaseating epithelioid cell granulomas in 44 (83.0%) and 38 (71.7%) of total patients, respectively. In stage I patients, positive rates of TBNA and TBLB were 80.0% and 60.0%, respectively. In stage II patients, positive rates of TBNA and TBLB were 85.7% and 89.3%, respectively. The combination of TBNA and TBLB increased the diagnostic yield to 96.2% in total patients, 92.0% in stage I patients, and 100% in stage II patients.

【Conclusion】 Approach to hilar and mediastinal lymph nodes by EBUS-TBNA is easy and useful for pathological diagnosis of sarcoidosis, especially in stage I patients.

はじめに

サルコイドーシスの組織診断は、ほとんどの場合、TBLB によって行なわれている。しかし、TBLB の陽性率は必ずしも満足のいくものではなく^{1,2)}、特に画像上肺野病変が明らかでない I 期症例では、陽性率は低く 40-60% 程度と報告されている³⁻⁷⁾。サルコイドーシスの多くの症例では、肺門縦隔リンパ節の腫大を伴っており、経気管支的なアプローチは診断率の向上に有用と考えられた。そして、transbronchial needle aspiration biopsy (TBNA) を併用することによって診断率が向上することが報告されてきた。しかし、これまでの TBNA は CT 画像を頼りに、ブラインドで行うものであり、陽性率もそれほど高いものではなかった (46-65.6%)⁸⁻¹¹⁾。TBLB と TBNA を併用すれば診断効率は、80-90% 程度と良好であったが⁸⁻¹¹⁾、手技に熟練を要することもあり、必ずしも普及していなかった¹²⁾。最近、リアルタイムに超音波画像を観察しながら穿刺が可能なコンベックス型超音波内視鏡 (Figure 1) が開発され、その有用性が報告されてきている¹³⁻¹⁵⁾。本装置によって穿刺に適したターゲットとなる病変を的確に選択することが可能で、さらに穿刺針の先端もリアルタイムに鮮明に認識することが可能であり安全で確実な検査が可能である (Figure 2)。今回、EBUS-TBNA を用いてサルコイドーシス診断における TBNA の有用性を TBLB と比較検討した。

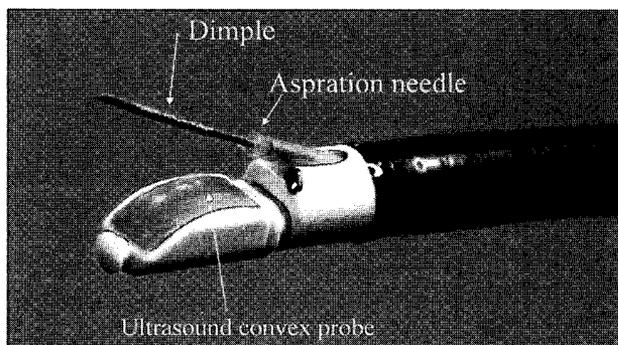


Figure 1 Convex probe endobronchial ultrasonography (BF-UC260F-OL8, Olympus)

獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科、呼吸器内視鏡センター

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

対 象

臨床的にサルコイドーシスと診断された 53 例 (stage I 25 例, II 28 例)、気管支鏡検査時に TBLB, BAL とともに EBUS-TBNA を行なった。咽頭麻酔後、ミダゾラムおよびプロポフォール静注で鎮静をかけた。全例通常型の気管支鏡で内腔観察を行なったのち、BAL, TBLB を行なった。TBLB は、B8, B9, B6, B3, B2 を中心に最低 6 個から 10 個の検体を採取した。続いて気管支鏡を convex 型超音波気管支鏡オリンパス社製 BF-UC 260F へ変更し、#3 や #7 を中心に CT 上腫大の見られるリンパ節を 1-3 個生検した。穿刺針は、外径 22G の専用穿刺針 NA-201SX-4022 を用いた。

結 果

TBLB と TBNA の両者が施行され検体の得られた 53 例を対象に解析した。TBLB では、肺組織内に非乾酪性肉芽腫を、TBNA では索状のリンパ節組織内部に非乾酪性肉芽腫が認められた場合組織診陽性とした (Figure 3)。

TBLB 検体は、1 症例より平均 7.53 個採取された。のべ 399 検体のうち 181 検体 (45.4%) が陽性であった。採取部位別の陽性率は 22.2% から 57.8% であり、上葉 (中葉も含む) での陽性率は 51.8% であり下葉での陽性率 37.1% と比較し有意に高かった ($p < 0.001$) (Table 1)。全症例における陽性率は 71.7% であった。Stage 別にみると、stage I 症例における TBLB の陽性率は 60% であり、stage II 症例における 89.3% と比較し有意に低値であった ($p < 0.05$) (Table 2)。

TBNA は 1 症例あたり平均 1.57 個検体が採取された。採取部位は #7 および #3 が多かったが肺門リンパ節からも採取された。のべ 83 検体が採取され陽性率は 80.7% と高率であった (Table 3)。症例ごとの陽性率は、全体では 53 例中 44 例 (83.0%) であり、stage I 症例では、TBNA 80%、stage II 症例で TBNA 85.7% であり、stage I, II では有意差は認めなかった。

TBLB と TBNA を比較すると、検体ごとでは 45.4%、80.7%、症例ごとでは 71.7%、83.0% であり、TBNA のほうが陽性率は高かった。Stage I 症例では TBLB の陽性率は stage II 症例に比較し有意に低かったが、TBNA の陽性率は有意差がなかった。TBNA と

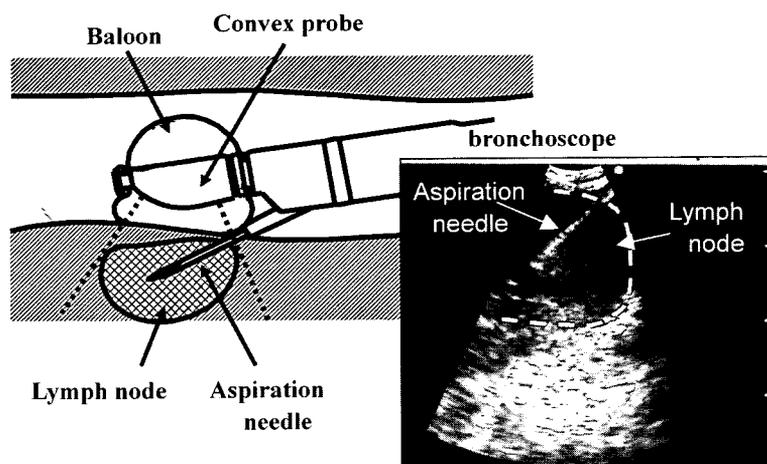


Figure 2 Convex probe endobronchial ultrasonography (BF-UC260F-OL8, Olympus)

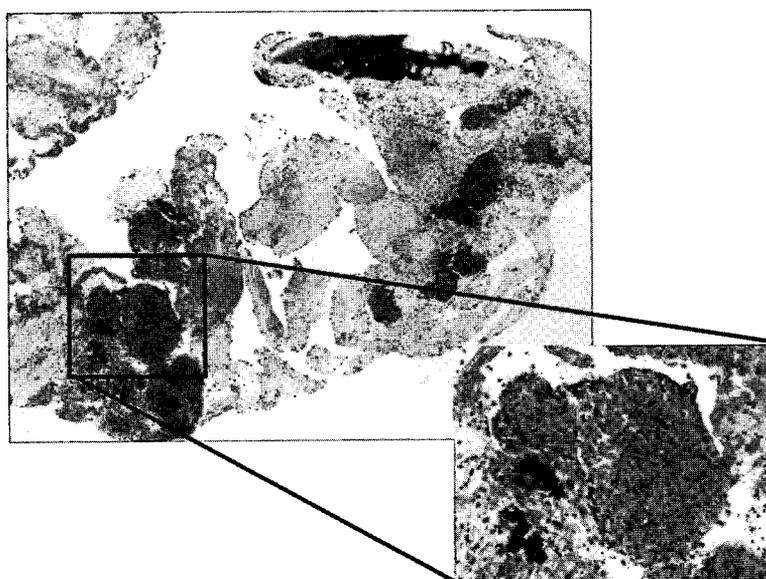


Figure 3 Non-caseating granuloma in lymph node tissue obtained by EBUS-TBNA

Table 1 Diagnostic Efficacy of TBLB for Sarcoidosis. *significant difference between upper and lower lobes ($p < 0.01$).

Biopsy Site	Number of Sample	Positive Number	Positive Rate (%)
S2	78	41	52.6
S3	92	47	51.1
S4	45	26	57.8
S5	9	2	22.2
Upper (+Middle)	224	116	51.8
S6	28	12	42.9
S8	83	32	38.6
S9	64	21	32.8
Lower	175	65	37.1
Total	399	181	45.4

Table 2 Diagnostic Efficacy of TBNA and TBLB for Stage I and II Patients with Sarcoidosis. *Significant difference between Stage I and II ($p < 0.05$).

	Total	Stage I	Stage II
n	53	25	28
Positive TBLB	38 (71.7%)	15 (60.0%)*	25 (89.3%)*
Positive TBNA	44 (83.0%)	20 (80.0%)	24 (85.7%)
Positive Histology	51 (96.2%)	23 (92.0%)	28 (100%)

Table 3 Diagnostic Efficacy of TBNA for Sarcoidosis

Lymph Node Location	Total Number of Sample	Positive Number	Positive Rate (%)
#2	2	2	100
#3	23	20	87.0
#4	3	1	33.3
#6	1	0	0
#7	42	35	83.3
#10	6	4	66.7
#11	6	5	83.3
Total	83	67	80.7

TBLBを併用することによって全体では96.2%, stage I症例でも92.0%, stage II症例では100%の組織診断が可能であった (Table 2).

TBLB, TBNAとも検査に伴う軽度の出血を認めた以外特記すべき合併症は認めなかった。

考 察

サルコイドーシス症例に対する組織診断として従来からのTBLBに加えて気管支超音波ガイド下のTBNA (EBUS-TBNA)を加えることで非常に高い組織診断陽性率を得ることができた。サルコイドーシスの組織診断において超音波を用いない場合のTBNAの有用性はすでに報告されてきた⁸⁻¹¹⁾。しかし、CT画像を参考にした従来TBNAは#7リンパ節では比較的容易であるものの他の部位では、確実性が少なく、安全性にも不安があった。そのため術者は、十分な修練が必要とされ、術者の技術向上によって陽性率は向上した¹²⁾。これに対してEBUS-TBNAでは、リアルタイムにリンパ節や周囲の血管も明瞭に観察でき、穿刺針ははっきりと観察できる。小さなリンパ節や血管に接した病変であっても最大限のストロークを用いて穿刺針の前進後退を繰り返し行えるため確実な検体採取が可能である。実際、これまでのサルコイドーシスリンパ節に対するTBNAの陽性率は、46-65.6%程度であったが⁸⁻¹¹⁾、EBUS-TBNAによってWongらは93.8%¹⁵⁾、今回の成績でも83%と良好な結果であった。

今回、Stage別にTBLBとTBNAの陽性率を比較したが、従来から報告されているとおり、肺野病変が画像上明らかでないStage I症例では、肺野病変を認めるstage II症例に比較してTBLBの陽性率は有意に低

値であった。これに対して、TBNAではstage I, IIともに良好な陽性率を示し、両群に差は認めなかった。TBLBには、気胸や出血などの合併症がしばしば見られることを考慮すると、EBUS-TBNAがサルコイドーシスの組織診断において最も効率的で安全な手段といえる。しかし、Stage Iおよびstage IIのいずれにおいてもTBLBとTBNAを併用することによって診断率は向上しており、気管支鏡を2本使用する必要や所要時間がかかるという問題もあるが、現状ではTBLBとTBNAの併用が確実と考えられる。

結 論

EBUS-TBNAによるリンパ節生検は、手技も簡便容易で、TBLBと併用することでI期症例でも高い診断効率を得ることが可能であり、サルコイドーシスの組織診断に極めて有用な検査法と考えられた。

参考文献

- 1) Koonitz CH, Joyner LR, Nelson RA. Transbronchial lung biopsy via the fiberoptic bronchoscope in sarcoidosis. *Ann Intern Med* 1976; 85: 64-66.
- 2) Gilman MJ, Wang KP. Transbronchial lung biopsy in sarcoidosis. An approach to determine the optimal number of biopsies. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 721-724.
- 3) American Thoracic Society. Statement on sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 736-755.
- 4) De Remeé RA. Sarcoidosis. *Mayo Clin Proc* 1995; 10: 177-181.
- 5) Gilman, MJ, Wang, KP. Transbronchial lung biopsy in sarcoidosis: an approach to determine the optimal number of biopsies. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 721-724.
- 6) Poe RH, Israel RH, Utel MJ, et al. Probability of a positive transbronchial lung biopsy result in sarcoidosis. *Arch Intern Med* 1979; 139: 761-763.
- 7) Mitchell DM, Mitchell DN, Collins JV, et al. Transbronchial lung biopsy through the fiberoptic fiberscope in diagnosis of sarcoidosis. *BMJ* 1980; 80: 679-681.

- 8) Morales CF, Patefield AJ, Strollo PJ Jr, Schenk DA. Flexible transbronchial needle aspiration in the diagnosis of sarcoidosis. *Chest* 1994; 106(3): 709-711.
- 9) Leonard C, Tormey VJ, O'Keane C, Burke CM. Bronchoscopic diagnosis of sarcoidosis. *Eur Respir J* 1997; 10(12): 2722-4.
- 10) Bilaçeroğlu S, Perim K, Günel O, Cağırıcı U, Büyüksirin M. Combining transbronchial aspiration with endobronchial and transbronchial biopsy in sarcoidosis. *Monaldi Arch Chest Dis* 1999; 54(3): 217-223.
- 11) Trisolini R, Lazzari Agli L, Cancellieri A, Poletti V, Candoli P, Paioli D, Alifano M, Tinelli C, Patelli M. Transbronchial needle aspiration improves the diagnostic yield of bronchoscopy in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004; 21(2): 147-151.
- 12) Hsu LH, Liu CC, Ko JS. Education and experience improve the performance of transbronchial needle aspiration: a learning curve at a cancer center. *Chest* 2004; 125(2): 532-540.
- 13) Yasufuku K, Chiyo M, Sekine Y, Chhajed PN, Shibuya K, Iizasa T, Fujisawa T. Real-time endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration of mediastinal and hilar lymph nodes. *Chest* 2004; 126(1): 122-128.
- 14) Yasufuku K, Chiyo M, Koh E, Moriya Y, Iyoda A, Sekine Y, Shibuya K, Iizasa T, Fujisawa T. Endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration for staging of lung cancer. *Lung Cancer* 2005; 50(3): 347-354.
- 15) Wong M, Yasufuku K, Nakajima T, Herth FJ, Sekine Y, Shibuya K, Iizasa T, Hiroshima K, Lam WK, Fujisawa T. Endobronchial ultrasound: new insight for the diagnosis of sarcoidosis. *Eur Respir J* 2007; 29(6): 1182-1186.

2004年サルコイドーシス臨床調査個人票における 組織診断群と臨床診断群ならびに疑診群の比較

森本 泰介¹ 吾妻安良太^{1**} 阿部 信二¹ 臼杵 二郎¹
工藤 翔二¹ 杉崎 勝教^{2***} 折津 愈^{3****} 貫和 敏博^{4**}

我々は昨年度の班会議にて2004年のサルコイドーシス(サ症)難病認定患者の臨床調査個人票を解析し、新規認定患者のうち組織診断群(1027名)の解析結果を報告した。今回はわが国固有に繁用されてきた「臨床診断群」(358名)ならびに「疑診群」(294名)の妥当性を評価する目的で、昨年解析対象から除外した非組織診断群を解析し、組織診断群との比較を行った。

非組織診断群では、組織診断群と発症年齢分布は相似形を呈したが、中高年女性の比率が若干増加していた。組織診断群対非組織診断群では、女性の比率は64.6%:68.2%、有自覚症状率は73.8%:77.6%、健診発見例の比率は28.0%:26.5%であった。自覚症状に関しては視力障害28.8%:46.2%、皮膚症状9.6%:1.4%と差が認められた。眼所見はあるがその他の所見が乏しく診断基準を満たすことができない症例が多く認められたと考えられる。また皮膚は生検がしやすいため組織診断がついた症例が多かったと考えられる。

Epidemiology of sarcoidosis in Japan (pathologically-confirmed vs not pathologically-confirmed cases)

Taisuke Morimoto¹, Arata Azuma, Shinji Abe, Jiro Usuki, Shoji Kudoh, Katsunori Sugisaki², Masaru Oritsu³, and Toshihiro Nukiwa⁴

¹*Department of Pulmonary Medicine (divisions of pulmonary medicine, infectious diseases, and oncology), Nippon Medical School*

²*Department of internal medicine, Nisibeppu National Hospital*

³*Department of Respiratory Medicine, Japanese Red Cross Medical Center*

⁴*Department of Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Institute of Development, Aging, and Cancer, Tohoku University*

We have reported analysis of the pathologically-confirmed sarcoidosis cases newly diagnosed in 2004 last year. The number of newly registered sarcoidosis patients accepted as having this intractable disease in 2004 was 1,679, of which 652 presented with insufficient histopathological findings and were excluded from former analysis. Not pathologically-confirmed sarcoidosis cases newly diagnosed in 2004 were eligible for this study.

The age-specific incidence rates of each are shown in Figure 1, displaying a similar biphasic pattern, but second peak was slightly higher in not pathologically-confirmed group. Abnormalities detected at routine medical examination and subjective symptoms, and the female ratio were similarly frequently found in both groups.

In not pathologically-confirmed group visual disturbance was significantly higher (28.8% vs 46.2%) and skin symptom was significantly lower (9.6% vs 1.4%) than pathologically-confirmed group. Subjects who had sarcoidosis manifestations only in locations difficult to biopsy (e.g. eye) might have been excluded from pathologically-confirmed group and easy to biopsy (e.g. skin) might have been included in pathologically-confirmed group.

はじめに

日本のサルコイドーシス(サ症)は欧米各国に比べ発生率、有病率が低く、比較的軽症者が多いといわれている。サ症の日本における全国疫学調査は1991年より施行されておらず、その最近の実態は良く知られていないために臨床調査個人票を用いた全国疫学調査を行い、平成18年度研究報告書にて報告した¹⁾。昨年度の報告では海外との比較を考え組織診断群のみを対象とし、臨床診断群ならびに疑診群は除外して検討された。今回は前回調査にて除外した群と組織診断群に差異があるかどうか検討することを目的とした。

対象と方法

日本ではサ症は1974年から厚生労働省により“難病”に指定されており、診断基準を満たし所定の診断書(臨床調査個人票)を提出し認められれば、医療費を各自治体と国から一部負担してもらえるようになっている。本研究はこの臨床調査個人票を用いて行われた。

2004年1月～12月に日本においてサ症として“難病”認定された新規発症患者で、非乾酪性類上皮細胞肉芽腫が証明された患者である「組織診断群」と、2004年当時の臨床診断群²⁾と疑診群を含んだ「非組織診断群」を比較解析した。臨床調査個人票は個人情報マスクする形でデータ我々に開示され解析を行った。

結 果

我々は日本全人口12,768.7万人中、10,140.4万人分(79.4%)にあたる34都道府県の臨床調査個人票を入手することができた。2004年新規登録サ症患者は1679名で、さらにそのうち臨床症状があり、非乾酪性

類上皮細胞肉芽腫が証明され組織診断により確定診断がなされたものは1027例(61.2%)であった。生検でサ症が証明されなかったが難病認定された臨床診断群は358例、疑診群は294名で、非組織診断群は652名であった。

組織診断群：非組織診断群では、発症年齢はともに2峰性に分布し、第一ピークが25～34歳、第二ピークが60歳代に認められた。発症年齢分布はほぼ相似形を呈したが(Figure 1, 2)、非組織診断群で中高年女性の比率が若干増加していた。全体に女性の比率は64.6%:68.2%、有自覚症状率は73.8%:77.6%、健診発見例の比率は28.0%:26.5%であった。自覚症状に関しては視力障害28.8%:46.2%、皮膚症状9.6%:1.4%と差が認められ(Table 1)、罹患臓器の比較についてはTable 2、検査結果についてはTable 3のとおりであった。

考察と結論

臨床診断群ならびに疑診群は組織診断群の解析結果と類似する結果が多く、組織診断によらず難病認定された群も信頼性はあると考えられた。非組織診断群の罹患臓器については眼が多く、皮膚が少ないという偏りが認められた。

組織診断の得にくい眼サ症、心サ症などは組織診断群に入る割合が低いと考えられるため、組織診断がつかない症例のために臨床診断基準は必要であると考えられた。2007年に両側肺門部リンパ節腫脹がサルコイドーシスの診断基準に導入されたことで、今後さらに臨床診断群が増加するものと考えられる。その他、今まで主治医判断とされてきた罹患臓器判定に対して、今後は国際比較の観点から明確な基準を設けるなどの課題があると考えられた。

¹ 日本医科大学呼吸器感染腫瘍内科

² 国立病院機構西別府病院内科

³ 日本赤十字社医療センター呼吸器内科

⁴ 東北大学加齢医学研究所 呼吸器腫瘍研究分野

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 主任研究者

** びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

*** びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

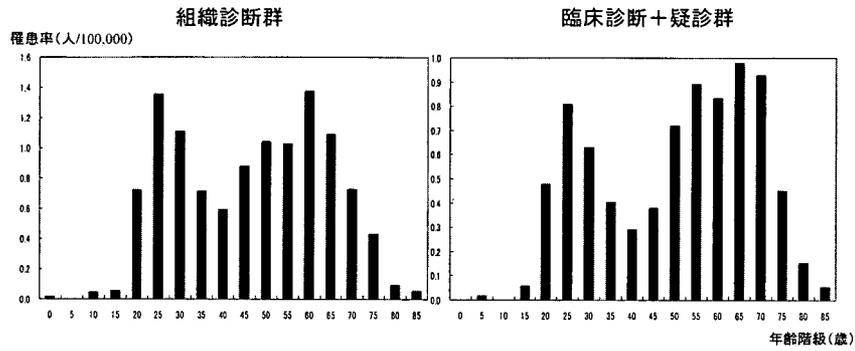


Figure 1 Distribution of patients with sarcoidosis by age at diagnosis

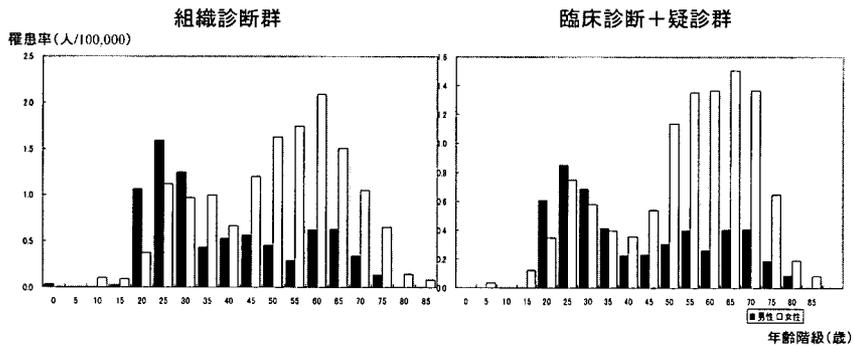


Figure 2 Distribution of patients with sarcoidosis by age at diagnosis and sex.
The percentages of male and female are shown separately.
■ : male, □ : female

Table 1 Characteristics of symptom at diagnosis

	組織診断群	臨床診断群+疑診
視力障害	28.8% (288)	46.2% (290)
咳嗽	18.3% (183)	12.4% (78)
息切れ	12.4% (124)	8.6% (54)
皮膚	9.6% (96)	1.4% (9)
倦怠感	6.6% (66)	7.3% (46)
発熱	6.1% (61)	5.1% (32)
胸痛	4.1% (41)	4.9% (31)
神経・筋	3.4% (34)	2.1% (13)
関節痛	1.5% (15)	0.8% (5)
リンパ節腫脹	1.2% (12)	0.3% (2)
体重減少	0.8% (8)	0
自覚症状なし	26.2% (262)	22.4% (141)

Table 2 Characteristics of organ involvement

	組織診断群	臨床診断群+疑診
胸郭	86.1% (853/991)	87.7% (536/611)
※BHL	75.8% (766/1,011)	83.9% (525/626)
※肺	46.9% (466/993)	34.3% (211/615)
眼	54.8% (546/996)	72.1% (457/634)
皮膚	35.4% (358/1,011)	11.9% (74/623)
心臓	23.0% (224/976)	28.1% (167/594)
リンパ節	15.2% (151/996)	9.7% (60/618)
神経	7.2% (71/993)	8.3% (51/612)
肝臓	5.6% (56/995)	3.6% (22/615)
筋肉	4.2% (42/993)	3.6% (22/613)
腎臓	3.7% (36/974)	2.8% (17/602)
耳下腺	3.1% (31/994)	2.8% (21/612)
消化管	1.6% (14/891)	1.1% (6/550)
骨	0.7% (7/961)	1.0% (6/593)

Table 3 Characteristics of laboratory findings at diagnosis

	組織診断群	臨床診断群+疑診
Gaシンチ集積	87.6% (495/565)	91.0% (344/378)
BALF異常	81.2% (433/533)	86.9% (272/313)
ツ反陰性	73.1% (449/614)	81.8% (77/461)
リゾチーム	58.4% (276/473)	58.8% (207/352)
ACE	51.9% (509/981)	54.3% (337/621)
γグロブリン	21.4% (147/686)	21.1% (103/488)
高Ca血症	7.4% (62/842)	7.1% (38/537)
高Ca尿症	6.4% (19/298)	6.0% (12/200)

参考文献

- 1) Morimoto T, Azuma A, Abe S et al. Epidemiology of sarcoidosis in Japan. *Eur Respir J* 31 (2): 372-379, 2008.
- 2) 森本 泰介, 吾妻安良太, 阿部 信二, 他. 2004

年サルコイドーシス疫学調査. 厚生労働科学研究費補助金 2006年度びまん性肺疾患に関する調査研究 平成 18 年度報告書, 55-60, 2007.

- 3) 平賀 洋明. サルコイドーシス分科会報告. 厚生省特定疾患「びまん性肺疾患」調査研究班, 昭和 63 年度研究報告書, p 13, 1989.

アクネ菌によるオートファジー誘導とサルコイドーシス病変部におけるアクネ菌蘇生促進因子の免疫組織学的証明

古川あすか¹ 内田 佳介¹ 石下 由紀¹ 石下 郁夫²
鈴木 好美¹ 鈴木 高成¹ 西川 絵理¹ 三輪 彩¹
瀧澤真奈美¹ 小林 寅喆³ 武村 民子⁴
岩井 和郎⁵ 江石 義信^{1*}

【目的】サルコイドーシス (サ症) の病因は、細胞内に潜伏感染しているアクネ菌が内因性活性化して細胞内増殖する際、疾患感受性のある宿主において Th1 型過敏性免疫反応を惹起するものと想定される。細胞内増菌現象が Th1 型過敏性免疫反応を誘導する機序としては autophagy との関連が示唆されている。また潜伏感染菌の内因性活性化にともなう細胞内増菌には Resuscitation promoting factor (RPF 蛋白) が注目されている。本研究では、アクネ菌感染による autophagy の誘導および病変組織における RPF 蛋白の関与を検討した。【材料と方法】アクネ菌は細胞内侵入能を有する臨床分離株を用いた。各実験にはそれぞれ HeLa-LC3 細胞, A549 細胞, HEK293T 細胞を用いた。病変部の検討には HW 小体が認められたサ症リンパ節 28 例および対照リンパ節群 10 例を用いた。細胞内アクネ菌の観察には細胞小器官のマーカーである EEA-1 抗体および LAMP-1 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、隔離膜のマーカーである LC3 の発現と合わせて観察した。細胞内の詳細な観察については電子顕微鏡を用いた。アクネ菌 RPF 蛋白は結核菌 RPF 蛋白のホモログから同定し、そのリコンビナント蛋白を作製した。リコンビナント蛋白はアクネ菌培養に添加しその増菌促進機能を確認するとともにアクネ菌感染細胞の細胞内外から添加し、細胞内アクネ菌への影響を検討した。また、BALB/c マウスに免疫して RPF 蛋白特異的なモノクローナル抗体を作製し、サ症病変部における RPF 蛋白の関与を免疫染色により検討した。【結果】アクネ菌は endocytosis により細胞内に侵入し、その後 lysosome との融合により細胞内消化されていた。一部の菌体は autolysosome を形成し、アクネ菌感染が autophagy を誘導していることが明らかとなった。アクネ菌 RPF 蛋白は細胞外添加においてその作用をみせた。免疫染色では RPF 蛋白はサ症リンパ節に特異的に検出され、約半数の症例において HW 小体に一致した陽性像を呈した。【考察】アクネ菌の細胞内感染により autophagy が誘導されることが判明した。今後は細胞内に潜伏感染したアクネ菌が細胞内増殖する際に誘導される急激な autophagy の誘導を *in vitro* で再現する必要がある。RPF 蛋白がサ症病変部の HW 小体に特異的に検出されたことは、サ症の病因と考えられている細胞内増菌を裏付ける根拠となった。

***Propionibacterium acnes*-induced autophagy and intracellular reactivation of latent *P. acnes* in the sarcoid lymph nodes by *P. acnes* resuscitation promoting factor**

Asuka Furukawa¹, Keisuke Uchida¹, Yuki Ishige¹, Ikuo Ishige², Yoshimi Suzuki¹, Takashige Suzuki¹, Eri Nishikawa¹, Aya Miwa¹, Manami Takizawa¹, Intetsu Kobayashi³, Tamiko Takemura⁴, Kazuro Iwai⁵, and Yoshinobu Eishi¹

¹Department of Human Pathology, Tokyo Medical and Dental University

²Laboratory of Stem Cell Therapy, The Institute of Medical Science The University of Tokyo

³Chemotherapy Division, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratory

⁴Department of Pathology, Japanese Red Cross Medical Center

⁵Division of Molecular Pathology, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

【Background】 Our previous studies have suggested that *P. acnes* can persist intracellularly as latent infection in susceptible hosts and that the reactivation and proliferation of the intracellular *P. acnes* may trigger sarcoidosis. This has led us to speculate that intracellular *P. acnes* proliferation elicits Th1 hypersensitivity in susceptible hosts. One possible explanation of such hypersensitivity is *P. acnes*-induced autophagy trigger by intracellular proliferation of the reactivated *P. acnes*. **【Materials and Methods】** We examined *P. acnes*-induced autophagy by *in vitro* assay and the reactivation status of *P. acnes* in the sarcoid lymph nodes by immunohistochemistry with the antibody to *P. acnes* resuscitation promoting factor (RPF), a protein implicated to be involved in the reactivation of intracellular latent bacteria. An cell-invasive isolate of *P. acnes* and cell lines (HeLa-LC3 cells, A549 cells and HEK293T cells) used in the *in vitro* assay. Fluorescent immunostaining of *P. acnes*-infected HeLa-LC3 cells was done using EEA1 antibody and LAMP-1 antibody, and intracellular *P. acnes* was scrutinized by electron microscopy. In the colony assay, the recombinant RPF was introduced both extracellularly and intracellularly. Immunohistochemical examination of *P. acnes* RPF in sarcoid lesions was done using anti-*P. acnes* RPF monoclonal antibody prepared in our laboratory. For the immunohistochemistry, lymph nodes from 28 sarcoid patients and from 10 non-sarcoid patients, all of which included HW bodies (dormant form of *P. acnes*), were used. **【Results】** *P. acnes* entered the cell by endocytosis and was soon degraded by endosome-lysosome fusion. Autophagy was induced for some of intracellular *P. acnes*. Extracellular *P. acnes* RPF promoted the proliferation of intracellular *P. acnes*. Immunohistochemically, *P. acnes* RPF was found in 12 (43%) of the 28 sarcoid lymph nodes and none of the 10 non-sarcoid lymph nodes. The antibody reacted only with HW bodies in the sarcoid lymph nodes. **【Discussion】** We found *P. acnes*-induced autophagy in the cells infected by cultured *P. acnes*. The result suggests that more autophagy can be induced in cells with proliferating *P. acnes* after reactivation from the latent phase. Our finding that *P. acnes* RPF was found in the HW bodies only in sarcoid lymph nodes supports the hypothesis that intracellular proliferation of the bacterium is involved in the etiology of sarcoidosis.

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る。近年、「皮膚常在菌として知られるアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の細胞内潜伏感染が原因となり Th1 型過敏性免疫反応を惹起する結果として本症が発症する」とするという病因論が提唱されている¹⁾。

細胞内増菌現象が肉芽腫形成にいたる Th1 型過敏性免疫反応を誘導する機序としては、autophagy との関連が注目されている。Autophagy (自食現象) は蛋白質を分解し細胞内蛋白質の品質管理や飢餓適応を行う機構であるとされているが²⁾、食食機構から逃れて生存を図る多くの細胞内侵入性細菌の殺菌・分解という自然免疫反応にも関与していることが近年報告されている (図 1)。

細胞による細胞内侵入性細菌の消化と細菌によるその回避機構は前述の autophagy を介するメカニズムなど様々な経路が知られている。最も一般的なものは endosome か phagosome により細胞内に取り込まれた細菌が直接 lysosome と結合し消化を受けるものである。一方、赤痢菌やリステリア菌では endosome あるいは phagosome 膜を突き破って細胞質内に脱出して、細胞質内で増殖する。また、結核菌やサルモネラ菌では、endosome と lysosome との結合を阻害したり、殺菌因子に抵抗を示すことにより生存できる (図 2)。

本研究ではアクネ菌の細胞内感染によるサ症発症のメカニズムを探るために、培養細胞株を使用しアクネ菌の細胞内感染後の動態の解明を試みた。

また、サ症発症のトリガーとなりうるアクネ菌の細胞内増菌現象に関して、潜伏感染性結核などの再燃においてその関与が示唆されている RPF (Resuscitation promoting factor) と呼ばれる分泌型蛋白に注目した³⁾。RPF は *Micrococcus luteus* の培養上清から発見された分泌型蛋白である⁴⁾。冬眠期の状態から蘇生、増

殖を促進する機能を持つことが知られており、グリシンとシトシンを多く含む G+C rich-gram 陽性菌においても相同性の高い配列が認められ⁵⁾、同様な機能を持つことが確認されている。

本研究では細胞内アクネ菌の活性化現象における RPF の関与を検討するために、アクネ菌の RPF を同定し、アクネ菌感染細胞への内外からの RPF 作用に対する増菌活性の検定を試みた。また、アクネ菌 RPF に対するモノクローナル抗体を作製し、病変部リンパ節における RPF の存在およびその局在を検索した。

材 料

アクネ菌は細胞内侵入能を有する臨床分離株を用いた。GAM プイヨン (GAM, Nissui Co., Tokyo) にて 37°C 3 日間嫌気培養した菌体を実験に使用した。

細胞内感染後のアクネ菌の観察には A549 細胞と GFP-LC3 融合蛋白を遺伝子導入した HeLa-LC3 細胞を、RPF 蛋白添加における細胞内アクネ菌の増菌を検討する colony assay には A549 細胞および HEK293T 細胞を使用した。各細胞株は 10%FBS 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Gaithersburg, MD, USA) にて継代培養した。

病変部の検討には冬眠型アクネ菌と想定される Hamazaki-Wesenberg (HW) 小体の存在が確認されているサ症例リンパ節 28 例および対照例として反応性リンパ節炎 1 例、肺癌リンパ節 4 例、胃癌リンパ節 4 例、大腸癌リンパ節 1 例 (パラフィン切片) を使用した。

方 法

研究 1: 細胞内感染後の動態の観察

1. 細胞感染

各細胞株は感染前日抗生剤 (-) DMEM にて chamber slide または 24-well plate (HeLa-LC3; 5×10^4 cells/ml, A549, HEK293T; 1×10^5 cells/ml) に播種して使用した。電子顕微鏡用試料の場合は直径 3 cm の culture dish に播種した。アクネ菌は PBS で 2 回洗浄後吸光度 (OD₆₀₀) にて一定濃度に調整した菌体浮遊液を作製し、前日播いておいた細胞株に加えた。また、長時間感染させる場合は 37°C の CO₂ インキュベーター内での感染 2 時間後に PBS にて 3 回洗浄し、

¹ 東京医科歯科大学人体病理学分野

² 東京大学医科学研究所幹細胞治療研究分野

³ 三菱化学 BCL 臨床微生物

⁴ 日本赤十字医療センター病理部

⁵ 結核予防会結核研究所病理検査科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

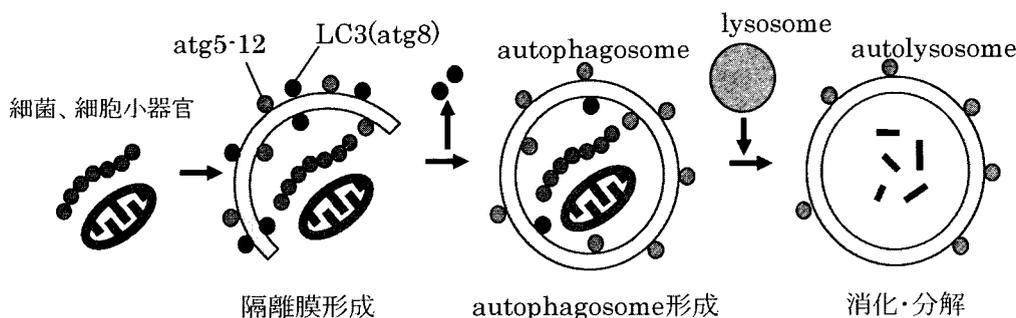


図1 autophagy 形成メカニズム

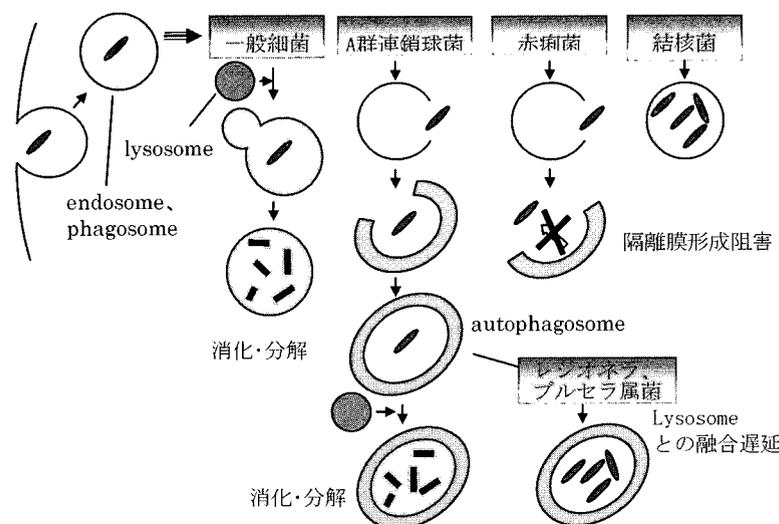


図2 病原細菌と autophagy

細胞外殺菌するために高濃度抗生剤 (400 U/ml penicillin-G, 1 mg/ml streptomycin) を添加した DMEM に替え, さらに 3 時間培養した。その後タイムコースで細胞を回収するまでは抗生剤 (-) DMEM にて培養を続けた。

2. 蛍光標識による観察

初期 endosome, phagolysosome のマーカーとして EEA-1 (early endosome antigen1) および LAMP-1 抗体を用い, 免疫染色を行った。

1) EEA-1 抗体による免疫染色

3%PFA で細胞を固定後ジギトニンにより細胞膜に穴をあける。NH₄Cl にて細胞を処理した後 3%BSA にてブロッキングする。EEA-1 抗体をかけ, 室温にて 1 時間反応させる。二次抗体として FITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins を用い, 室温にて 1 時間反応させる。DAPI 含封入剤にて封入する。

2) LAMP-1 抗体による免疫染色

4%PFA で細胞を固定後 0.1% Triton/PBS により細

胞膜に穴をあける。ブロッキング剤に RNase を加え, RNase 処理する。LAMP-1 抗体をかけ, 室温にて 1 時間反応させる。二次抗体として Cy5-conjugated anti-mouse IgG を用い, 室温にて 30 分反応させる。PI にて核染色後, 封入する。

3. 電子顕微鏡による観察

2% グルタルアルデヒドで固定後オスミウムにより後固定し, エポキシ樹脂にて包埋する。

超薄切片はウラン・鉛染色後透過型電子顕微鏡にて観察した。

研究 2: RPF 蛋白についての検討

1. アクネ菌, 結核菌リコンビナント RPF 蛋白作製
リコンビナント蛋白は, 既知である結核菌の RpfB のゲノム配列およびその配列とアクネ菌の全ゲノム配列データ・ベースにおいて相同性の高い配列を検索し, アクネ菌の Rpf とと思われる配列を PCR にて増幅した。PCR product は pT7 blue プラスミドベクターにクローニング後シーケンスを確認し, 変異のないク