

図10: Bafilomycin添加におけるアクネ菌の細胞内動態変化

細胞内侵入後LC3陽性の隔離膜によって囲まれるが、隔離膜に囲まれた菌体は細胞内に停留することが可能となると報告されている<sup>9)</sup>。

本研究においても*S. pyogenes*と*P. gingivalis*の観察では文献どおりの結果が得られた。これらに対し、アクネ菌は通常の細胞内感染時にはオートファジーを誘導しないもののリソソーム融合阻害剤であるBafilomycin添加時にはオートファジーを誘導することが明らかとなった[図10]。

これらの結果から、Bafilomycinを用いたことで消化機構を逃れたアクネ菌がエンドソームから細胞質へと脱出し、その結果オートファジーが亢進したものと考えられる。オートファジーの亢進はTh1型免疫反応を誘導することから、生体内でもアクネ菌が細胞内増殖し細胞質への脱出する際オートファジーが亢進することでTh1型過敏性免疫反応が誘導され、サ症肉芽腫が形成されるものと推察される。

本研究ではリソソーム阻害剤であるBafilomycinを使用したことでその状況を再現したが、結核菌の内因性活性化で言われているように<sup>10)</sup>、生体内でも何らかのきっかけで同様な細胞内冬眠型アクネ菌の再活性化・細胞内増殖が起こりえると考えられる。

現在サ症発症の機序は、細胞内に不顕性感染しているアクネ菌の細胞内増殖を契機としてNOD familyなどによる細胞内の菌体認識、免疫応答が引き起こされた結果肉芽腫が形成されると想定されている。オートファジーは細胞内抗原に対しTh1型免疫反応を誘導することが報告されており<sup>11)</sup>、この免疫応答に関与している可能性がある[図11]。本研究ではBafilomycin添加によるオートファジーの亢進

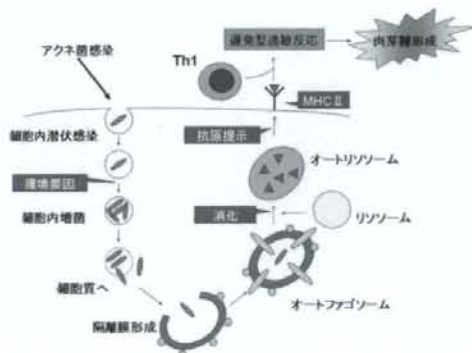


図11: アクネ菌の潜伏感染が肉芽腫形成を引き起こす機構

が実際に免疫反応を誘導することの証明にまでは至らなかった。今後上皮系細胞だけでなく血球系細胞株を用いた実験を進め、アクネ菌感染によるオートファジー亢進とTh1型免疫反応の誘導についての研究を進めていく必要がある。

また、本研究でアクネ菌と同じ皮膚常在菌である*S. epidermidis*には細胞侵入能がないことが判明した。このことからアクネ菌は細胞内外と問わずヒトへの共生が強く、細胞侵入能を有する特異な菌種であるために種々の疾患に関与していることが示唆された。

## 【参考文献】

- 1) Ishige I. et al: Quantitative PCR of micobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes with Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet*. 1999; 354: 120-123.
- 2) Eishi Y. et al: Quantitative analysis of micobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes with Japanese and European patients with sarcoidosis. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 198-204.
- 3) Ishige I. et al: *Propionibacterium acnes* is the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2005; 22(1): 33-42.
- 4) 中川 一路, 吉森 保: 蛋白質 核酸 酵素. 2006; 51(10): 1507-1514.
- 5) Paludan C. et al: Endogenous MHC Class II

- Processing of a Viral Nuclear antigen After Autophagy. Science. 2005; 307: 593-596.
- 6) Yamamoto A. et al: Bafilomycin A1 Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line, H-4-II-E Cells. Cell Structure and Function. 1998; 23: 33-42.
- 7) Nakagawa I. et al: Autophagy Defends Cells Against Invading Group A *Streptococcus*. Science. 2004; 306: 1037-1040.
- 8) Dorn B. et al: *Porphyromonas gingivalis* Traffics to Autophagosomes in Human Coronary Artery Endothelial Cells. Infect. and Immun. 2001; 69(9): 5698-5708.
- 9) Timo U. et al: New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. J Pathol 2006; 208:261-269.

# サルコイドーシスにおける 血清 Cathepsin S 濃度の臨床的意義

山口 悦郎\*

これまで我々は transcriptome scan の結果からいくつかの遺伝子の多型について、サルコイドーシスの疾患感受性ないし病像修飾因子としての意義を検討して来た。昨年検討したカテプシン S (CTSS) の遺伝子多型の意義は限定的であった。今年度はその血清濃度の診断的意義について検討した。

対象は健常者 29 名 (年齢範囲 20-31 歳), サルコイドーシス患者 52 名 (23-84 歳)。疾患対照は、特発性間質性肺炎患者 19 名 (UIP, NSIP, OP を含む) (56-86 歳), 肺癌患者 11 名 (41-79 歳), 慢性閉塞性肺疾患患者 12 名 (64-78 歳), 喘息患者 22 名 (23-87 歳) である。

血清 CTSS 濃度は Human Cathepsin S Duo Set® (R & D) を用いて、300 倍に希釈後測定した。血清 ACE 活性は ACE ColorR (Fuji Rebio) を用いて測定した。

サルコイドーシスでは、健常者および全ての疾患対照より血清 CTSS 値は有意に高値であった。サルコイドーシスと各疾患対照群の値の重なりは比較的少なかったが、間質性肺炎群と喘息群に一部高値を示す患者がみられた。活動性サルコイドーシス患者に対して間質性肺炎患者を鑑別対象とした場合、ROC 解析では CTSS 濃度 76 ng/ml で最も高い正確度 0.661 を示し、その際の感度は 74%、特異度は 89% であった。血清 CTSS 濃度と血清 ACE 活性は、健常者と全患者を含めて有意な相関を示した。血清 ACE 活性も当然良好な鑑別能を示し、活動性サルコイドーシス患者の診断に関して間質性肺炎患者を対照とした場合、ACE 活性 11.8 IU/l で最大の正確度 0.785 を示し、感度は 83%、特異度は 95% であった。そこで両者を組み合わせ、健常対照者を全く含まない数値として ACE 12.5 IU/l 以上、CTSS 72.9 ng/ml 以上とすると、間質性肺炎を対照疾患とした活動性サルコイドーシスの診断能は、感度 92%、特異度 83% となり、感度の改善が図られた。

以上の結果よりサルコイドーシスの診断に関して血清 ACE 活性は特異性を担保するものとして、CTSS 濃度は感度を向上させるために、両者を補完的に利用することが有用であろう。

## The clinical significance of serum cathepsin S levels in sarcoidosis

Etsuro Yamaguchi

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

We have assessed the significance of gene polymorphisms as susceptibility or disease-modifying factors for a several genes chosen from the results of a transcriptome scan. In the last year's study, we found that the roles of gene polymorphisms for cathepsin S (CTSS) was limited. We investigated the significance of serum levels of CTSS for the diagnosis of sarcoidosis in this year.

The study subjects included 29 healthy volunteers and 52 patients with sarcoidosis. Other disease controls were 19 patients with idiopathic interstitial pneumonia (IPs) (including UIP, NSIP, and OP), 11 patients with lung cancer, 12 patients with chronic obstructive lung disease, and 22 patients with bronchial asthma. Serum levels of CTSS were measured using an ELISA kit (Human Cathepsin S Duo Set®, R & D Systems) after diluting sera 300 fold. Serum levels of CTSS in sarcoidosis were significantly increased compared with those in controls or in all other disease control groups. The levels generally did not overlap between sarcoidosis and other respiratory diseases; however, some patients with IPs or asthma had a high CTSS level. The sensitivity and specificity of serum CTSS levels for discriminating active sarcoidosis patients from patients with IPs were 74% and 89% at a CTSS level of 76 ng/ml, respectively, and yielded the highest accuracy of 0.661. Serum CTSS levels and ACE activities significantly correlated in controls and patients with all the respiratory diseases studied. Serum ACE activities also had good discriminating capability of active sarcoidosis patients from patients with IPs with sensitivity, specificity, and the highest accuracy being 83%, 95%, and 0.785, respectively at ACE activity of 11.8 IU/l 37°C. If we set the cut off values of CTSS levels and ACE activity at 72.9 ng/ml and 11.8 IU/l 37°C, respectively, as values that exclude all the controls, sensitivity and specificity for discriminating active sarcoidosis patients from patients with IPs were 92% and 83%, respectively, thus the sensitivity was increased compared with that calculated from a CTSS level alone as a cut off value.

These results indicate that serum ACE activities assure high specificity, whereas serum CTSS levels increase sensitivity for diagnosing sarcoidosis. Thus, complementary use of both markers might be useful.

## はじめに

疾患特異的なマーカーを検索する際に重要な点は、その疾患の特異的効果細胞は何かということである。なぜならその細胞が発現する遺伝子や蛋白が、疾患特異的マーカーの候補となる可能性が高いからである。サルコイドーシスで病巣に集積する炎症細胞の主体は、T細胞とマクロファージ系細胞である。疾患特異性が高いのは類上皮細胞であるが、臨床的に入手することは必ずしも容易ではない。したがって気管支肺胞洗浄によって得られる肺胞マクロファージを代替細胞として、適当なマーカーを検索することが実際的である。

昨年まで我々はサルコイドーシス患者肺胞マクロファージの発現遺伝子レベルで、疾患感受性遺伝子のスクリーニングを行う言わばtranscriptome scanを試みて来た。その結果3番目に強い遺伝子発現を示したものとして、cathepsin S (CTSS)を見出した。その遺伝子多型のサルコイドーシスの発症や病態に及ぼす影響は限定的であったが、診断や活動性のマーカーとしての意義については未確認であった。しかしながら臨床的にすべて患者について繰り返しBALを施行し、その遺伝子発現を検討することはできない。そこで今年度の研究においては、その血

清濃度について検討した。

## 対象・方法

対象は健常者29名(年齢範囲20-31歳)、サルコイドーシス患者52名(23-84歳)。疾患対照として、特発性間質性肺炎患者19名(UIP, NSIP, OPを含む)(56-86歳)、肺癌患者11名(41-79歳)、慢性閉塞性肺疾患患者12名(64-78歳)、喘息患者22名(23-87歳)である。

血清CTSS濃度はHuman Cathepsin S Duo SetR (R & D)を用いて、300倍に希釈後測定した。血清ACE活性はACE ColorR (Fuji Rebio)を用いて測定した。

各群の血清CTSS濃度の比較は、全体でKruskal-Wallis検定後、2群間の個別の比較はMann-Whitney検定で評価した。CTSSとACEの相関は、Spearman's rank correlation coefficientを用いて検定した。サルコイドーシスと他疾患を鑑別する上での感度、特異度はReceiver Operating Characteristics Analysisにより求めた。

本研究は「アレルギー性呼吸器疾患の遺伝素因に関する研究」として、本学の倫理委員会により許可されている。

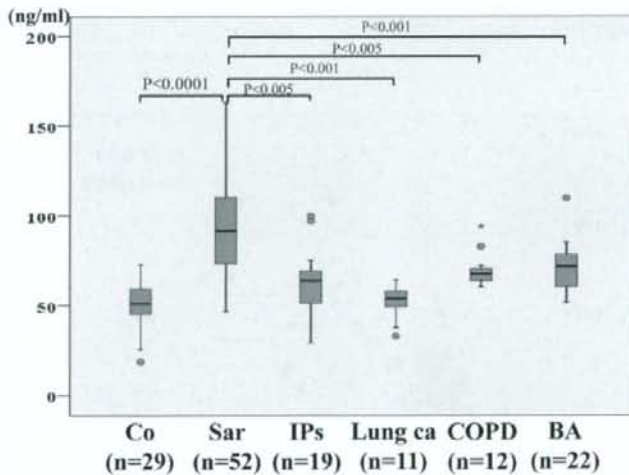


Figure 1. Serum levels of cathepsin S

Co, control; Sar, sarcoidosis; IPs, interstitial pneumonia; Lung ca, lung cancer; COPD, chronic obstructive lung disease; BA, bronchial asthma

愛知医科大学呼吸器・アレルギー内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

## 結 果

健常群を含めた全6群の血清CTSS濃度は(Figure 1), 全体として高度な有意差を認めた( $p=4.4 \times 10^{-7}$ ). 特に健常群では中央値が52 ng/mlであるのに対して, サルコイドーシスでは92 ng/mlであり, 両群間に高度な有意差を認め, また両群の値の重なりは少なかった. またサルコイドーシスでは, 全ての疾患対照より血清CTSS値は有意に高値であった. サルコイドーシスと各疾患対照群の値の重なりも比較的少なかったが, 間質性肺炎群と喘息群に一部高値を示す患者がみられた(Figure 1).

サルコイドーシスの診断に関して, ROCカーブから他の全ての呼吸器疾患を対照とするとCTSS濃度 71ng/mlで最も高い正確度0.579を示し, その際の感度は79%, 特異度は73%であった(結果非提示). 次に活動性サルコイドーシス患者と実際に鑑別が問題となることがあり得る間質性肺炎患者を鑑別対象とした場合, CTSS濃度 76ng/mlで最も高い正確度0.661を示し, その際の感度は74%, 特異度は89%であった(Figure 2).

血清CTSS濃度と血清ACE活性は, 健常者と全患者を含め, 全体として有意な相関を示した(Figure 3). サルコイドーシス患者群単独でも同様であった( $\rho=0.34$ ,  $p<0.05$ , データ非提示). したがって血清ACE活性も当然良好な鑑別能を示し, 活動性サ

ルコイドーシス患者の診断に関して間質性肺炎患者を対照とした場合, ACE活性11.8 IU/lで最大の正確度0.785を示し, 感度は83%, 特異度は95%であった(データ非提示). そこで両者を組み合わせ, 健常対照者を全く含まない数値としてACE 12.5 IU/l以上, CTSS 72.9 ng/ml以上とすると, 間質性肺炎を対照疾患とした活動性サルコイドーシスの診断能は, 感度92%, 特異度83%となり, 感度の改善が図られた(Figure 4). サルコイドーシス患者における血清CTSS濃度と疾患活動性との関連は, 今回の検

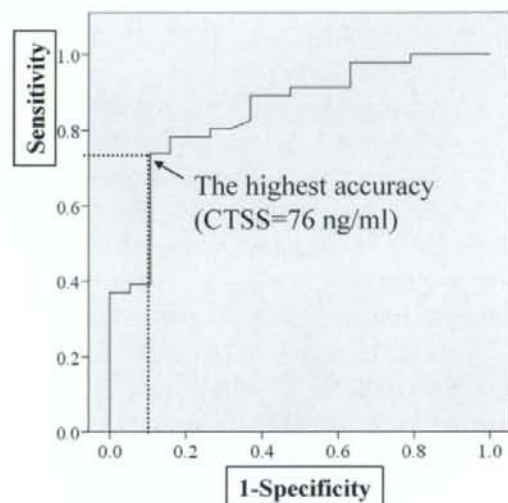


Figure 2. The ROC curve of serum cathepsin S levels for discriminating active sarcoidosis from interstitial pneumonia

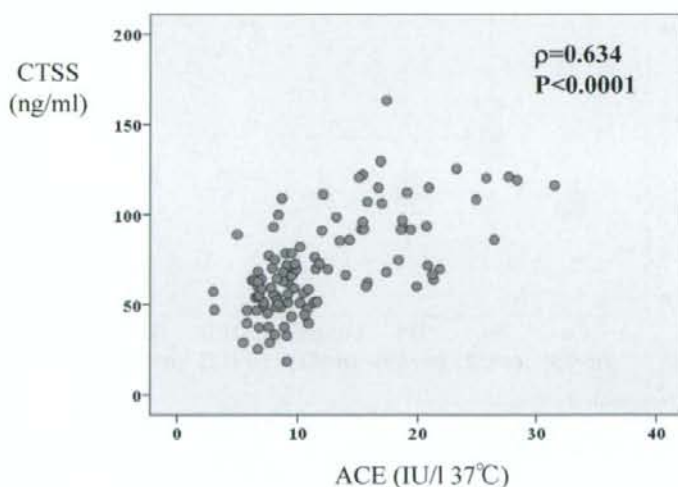


Figure 3. Correlation between serum cathepsin S levels and serum ACE activities in control, sarcoidosis, interstitial pneumonia, lung cancer, chronic obstructive pneumonia, and bronchial asthma.

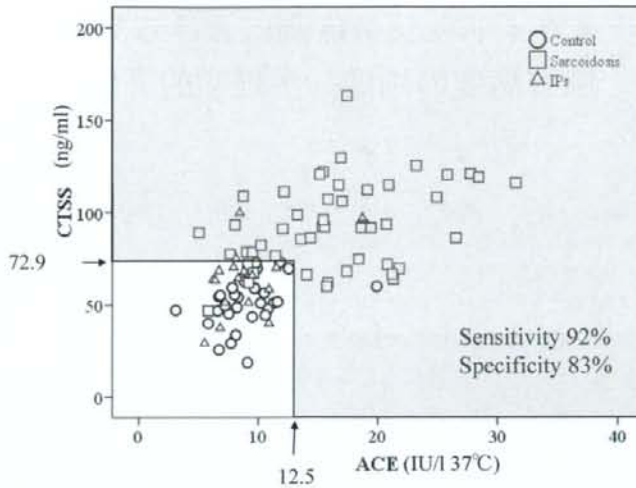


Figure 4. Combined cut off values of serum cathepsin S level and ACE activity improves sensitivity for active sarcoidosis.

討では非活動性患者が少なかった ( $n=6$ ) ためか、有意な関連は認められなかった (データ非提示)。

## 考 案

CTSSはシステイン蛋白分解酵素の一つで、他のカテプシンと同じ基質特異性を持つ。主としてマクロファージ系細胞で当初前駆体として産生され、早期活性化が防止されると共にその立体構造が保持される。小胞体からゴルジ体を経てエンドゾームに移行してからN端の一部が酵素的に切断されて活性化し、クラスII分子と結合している不変鎖(Ii)を分解し、CLIP (class-II-associated invariant chain peptide)を残す<sup>21</sup>。その後CLIPも分解されクラスII分子は抗原ペプチドと結合することができるようになり、抗原はT細胞に提示される。CTSSはIFN- $\gamma$ によりその発現が誘導される<sup>22</sup>。サルコイドーシスにおいてIFN- $\gamma$ の産生亢進はゆるぎのない事実であり、その結果としてサルコイドーシス肺胞マクロファージでの遺伝子発現亢進が確認されたのは、矛盾のない現象であった。

本年度の研究では、CTSSの蛋白発現について、もっとも簡便に入手できる血清濃度の意義を検討した。その結果サルコイドーシス患者群のCTSSは、健常者のもとよりほとんどの代表的な呼吸器疾患よりも高値を示し、その疾患特異性はかなり高いことが判明した。しかし臨床 upstairs 呼吸器疾患がサ

ルコイドーシスの鑑別対象となる訳ではない。またサルコイドーシスも活動性を失うと、血清マーカーの上昇は期待できない。そこで時に肺野の陰影で鑑別対象となり得る間質性肺炎と活動性サルコイドーシス患者間での最良カットオフ値を決定すると、感度は74%、特異度は89%であった。一般的にはかなり良好な数値であるが、古典的なマーカーである血清ACE活性はそれよりも勝れた数値を示し、なお臨床的有用性が高いことがうかがえた。しかし、その際のカットオフ値は一般的に用いられている標準値の上限ではなく11.8 IU/l 37°Cであり、通常の値である21.3 IU/l 37°Cを用いると感度は大幅に低下する。そこで今回の解析で用いた健常者データをもとにしたカットオフ値を用いると、感度をやや改善させることができた。今後ACEはサルコイドーシス診断の上で特異性の担保に、CTSSは感度の向上のために補完的に用いることが有用と考えられる。

## 文 献

- 1) Hsing L, Rudensky A. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 207: 229-241, 2005.
- 2) Cao H, Wolff RG, Meltzer MS, Crawford RM. Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by IFN- $\gamma$  and IL-4. *J Immunol* 143: 3524-3531, 1989.

# サルコイドーシス症例における気道、 肺野病変の画像、生理学的評価

半田 知宏<sup>1</sup> 谷澤 公伸<sup>1</sup> 長井 苑子<sup>2</sup> 平井 豊博<sup>1</sup>  
小熊 毅<sup>1</sup> 渡辺 創<sup>1</sup> 相原 顕作<sup>1</sup> 陳 和夫<sup>3</sup>  
三嶋 理晃<sup>1\*</sup>

サルコイドーシス症例においては、肺病変に加えて気道病変が認められる事が認識されているが、肺、気道の解剖学的指標と肺機能の関連については明らかとなっていない。本研究では、サルコイドーシス症例においてCTで評価した気道断面積や肺野濃度が肺機能と相関するかどうかについて検討した。

## Radiological and physiological assessment of airway and parenchymal lesions in patients with sarcoidosis

Tomohiro Handa<sup>1</sup>, Kiminobu Tanizawa<sup>1</sup>, Sonoko Nagai<sup>2</sup>, Toyohiro Hirai<sup>1</sup>, Takeshi Oguma<sup>1</sup>,  
Kizuku Watanabe<sup>1</sup>, Kensaku Aihara<sup>1</sup>, Kazuo Chin<sup>3</sup>, and Michiaki Mishima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

<sup>2</sup>Central Clinic/ Research Center, Kyoto, Japan

<sup>3</sup>Department of Respiratory Care and Sleep Control Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University

The aim of this study is to investigate whether airway dimensions and lung densities assessed by computed tomography associate with pulmonary function in patients with sarcoidosis. CT scanning was performed in forty-three sarcoidosis patients, and lung densities were measured using in-house software. Mean and standard deviation of lung density, kurtosis and skewness of lung density histograms were calculated. Tracheal area and airway wall area / total airway area (WA%) of the right apical bronchus was also measured. Pulmonary function tests were performed on the same day. Increased standard deviation of lung density and decreased kurtosis and skewness of lung density histograms were all associated with decreased total lung capacity, vital capacity and diffusion capacity. Increased standard deviation of lung density was also associated with decreased %FEV<sub>1</sub> and %PEF. There was a positive correlation between tracheal area corrected by body surface area and %PEF, and negative correlation between WA% and %PEF. Thus, in sarcoidosis, densitometry is a useful novel method for assessing the severity of pulmonary sarcoidosis, by quantifying parameters reflecting functional impairment.

## はじめに

サルコイドーシスは原因不明の全身性肉芽腫性疾患であり、90%以上の症例で肺病変を認める。Hansellらは、ビジュアルスコアを用いてサルコイドーシス症例の胸部CT所見を評価し、4つのパターン(8mmまでの結節、浸潤影、スリガラス陰影、網状陰影)の広がりや肺機能の関連について検討している<sup>1)</sup>。その結果、網状陰影の程度は、他のパターンの陰影と比較して、拘束性障害、閉塞性障害の指標とより強い関連を認めたと報告している。近年、特発性肺線維症<sup>2,3)</sup>や強皮症に合併した間質性肺炎<sup>4)</sup>において、肺野のdensitometryが試みられている。平均肺野濃度(mean lung density:MLD)、尖度、歪度といった肺野濃度のヒストグラムの指標をコンピューターによって算出することが可能である。尖度はヒストグラムのピークの鋭さを反映する指標である。正規分布と比較してピークがより鋭いヒストグラムは正の値を示し、正規分布では尖度はゼロとなる。歪度はヒストグラムの非対称性を反映する指標である。右に長い尾を引くヒストグラムでは歪度は正の値となり、完全に対称なヒストグラムでは歪度はゼロとなる<sup>5)</sup>。間質性肺疾患において、平均肺野濃度の上昇や尖度、歪度の低下が肺活量や肺拡散能の減少と関連する事が既報で報告されている<sup>6-8)</sup>。これらの報告に基づき、サルコイドーシス症例においてdensitometryの指標が肺機能と関連するという仮説を立てた。サルコイドーシス症例では、間質に加えて気道の病変も認められ、閉塞性障害をきたすことが認識されている<sup>9-10)</sup>。したがって、中樞気道の病理学的変化も肺機能に影響する可能性がある。既報において、慢性閉塞性肺疾患や気管支喘息といった閉塞性肺疾患では右B'基部の気道断面積の測定が気道の病理学的変化を評価する上で有用である事が報告されている<sup>11-14)</sup>。これらの背景を基に、本研究ではサルコイドーシス症例を対象に、肺野のdensitometryと気管面積、右B'基部の気道断面積を測定し、肺機能との関連について検討した。また、

Table 1. 対象患者背景

Number of subjects	43
Sex (male/female)	9/34
Age (years)	56.6±15.1
Disease duration (months)	96±74
Stage (0/ I / II / III / IV)	17/12/8/4/2
Number of extrathoracic lesions	1.4±0.9
sACE (IU/L)	15.2±5.8
Corticosteroids or immunosuppressants (+/-)*	19/24

WA = wall area. sACE = serum angiotensin-converting enzyme (Reference range: 8.3 - 21.4 IU/L). Data are expressed as mean (SD). \*Previous or current treatment with oral corticosteroids, immunosuppressants, or inhaled corticosteroids.

肺野陰影のビジュアルスコアも同時に評価した。

## 対象と方法

京都中央診療所の専門外来に通院する連続した43例のサルコイドーシス症例を対象に前向き検討を行った。喫煙歴を有する症例や、併存肺疾患を有する症例は除外した(Table 1)。CT撮影は造影剤を用いず仰臥位で撮影し、撮影にはPronto CT scanner (Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan)を用いた。撮影の間、対象者には最大吸気での息止めを指示した。肺野濃度の解析には2mm厚のCT画像を用い、撮影は大動脈弓の上縁から横隔膜の頂点までで行った。肺野の認識はオリジナル解析ソフトを用いて行い、主要な気管支や血管を除外し、平均肺野濃度、肺野濃度の標準偏差、肺野濃度のヒストグラムの尖度、歪度を計算した。気管面積の測定は、2mm厚の画像を用いて大動脈弓の上縁で行った。気管内腔面積(Tracheal luminal area :Atr)は既報<sup>10)</sup>と同様にオリジナル解析ソフトを用いて行った。右B'基部気道断面積の測定は既報と同様に行った<sup>11,16)</sup>。内腔面積(Areas of the inner lumen:Ai)と気道壁の厚さ(thickness of the bronchial wall:T)を測定し、気道径(diameters of the bronchus:D)と気道断面積(airway wall area :WA)をそれぞれ下記のように計算した: $D = 2\sqrt{(Ai/\pi) + 2T}$ ,  $WA = Ao - Ai$  (気管支外径面積: $Ao = \pi(D/2)^2$ )。気道断面積の割合(The percentage of airway wall area :WA%)は $WA/Ao \times 100$ として計算

<sup>1)</sup> 京都大学医学部付属病院呼吸器内科

<sup>2)</sup> 京都健康管理研究会中央診療所

<sup>3)</sup> 京都大学大学院医学研究科呼吸管理睡眠制御学

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者



した。ファントムを用いた測定精度検討結果<sup>10)</sup>に基づき、 $A_i < 12 \text{ mm}$  または  $T < 1 \text{ mm}$  の症例は除外した。また、気管支周囲の陰影のため気道の同定が困難なスライスや、気道が斜めに切れているスライス、枝分かれを含む気道やアーチファクトを含むスライスも解析から除外した。肺野陰影のビジュアルスコアは既報に基づいて計算した<sup>1)</sup>。ウィンドーレベル-600HU、ウィンドー幅1500HUのCT画像を2人の評価者が独立して順不同に評価した。4つのパターン(8mmまでの結節、浸潤影、スリガラス陰影、網状陰影)の広がりを半定量的に下記のようにスコア化した: grade 0, 陰影を認めない; grade 1, 肺葉の25%以下の陰影; grade 2, 肺葉の26%-50%の陰影; grade 3, 肺葉の51-75%の陰影, grade 4, 肺葉の76-100%の陰影。各パターンの肺全体での広がりは6肺葉のスコアを加算して評価した(最大値24)。解析には2人の評価者の平均スコアを用いた。総ビジュアルスコアは、各パターンのスコアの加算により算出した。肺機能検査はCT撮影と同日に施行し、Chestac-8800 (Chest M.I., Inc., Tokyo, Japan)を用いた。スパイロメトリーはアメリカ胸部疾患学会の勧告<sup>17)</sup>に基づいて施行した。予測値の計算には既報の成人標準値計算式<sup>18-20)</sup>を用いた。統計解析にはStatview software (SAS Institute, Inc., Cary, NC)を用いた。2変数の相関の検定にはスピアマンの順位相関係数を用いた。CTスコアの測定者間での変動は $\kappa$ 値で評価した。Densitometryの指標と気道の指標それぞれが独立して肺機能に及ぼす影響の検討にはステップワイズ回帰分析を用いた。P値0.05未満を統計学的に有意と判断した。

## 結 果

### Densitometryの指標と肺機能の相関

対象症例の肺機能とCT指標の結果をTable 2, Table 3に示し、Densitometryの4つの指標と肺機能の相関をTable 4に示した。明らかな肺野陰影を認めない症例(Figure 1A)とびまん性の蜂巣肺を認める症例(Figure 1B)のCT画像とヒストグラム(Figure 1C)を図1に示す。肺野濃度の標準偏差、尖度(Figure 2), 歪度はいずれも%TLC, %VC, %FVC, %DLcoと有意な相関を認めた。平均肺野濃度と肺活量の相関は比較的弱く、%DLcoとは有意な相関を認めな

Table 2. 肺機能検査結果

Number of subjects	43
%VC, %	103±22
%FVC, %	106±24
FEV1, L	2.5±0.9
%FEV1, %	104±28
FEV1/FVC, %	80±8
%PEF, %	97±19
%FEF25-75, %	74±24
%TLC, %	111±22
RV/TLC, %	34±5
%DLco, %	84±19

Data are expressed as mean ±SD.

Table 3. 胸部CT解析結果

Number of subjects	43
Atr/BSA, mm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup>	130±30
Ai/BSA*, mm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup>	8.6±2.0
WA%, %	59.9±4.5
Mean lung density (HU)	-833±29
Standard deviation of lung density (HU)	155±20
Kurtosis	8.2±2.3
Skewness	2.7±0.4

Atr = tracheal size; Ai = area of the inner lumen of right apical bronchus; BSA = body surface area; WA% = percentage of the wall area of right apical bronchus; HU = Hounsfield Unit. Data are expressed as mean ±SD. \*Measured in 25 subjects.

かった。

### 気道のCT指標と肺機能の相関

体表面積で補正した気管面積 (Atr/BSA)と%PEFの間には弱い有意な正の相関が認められた( $r = 0.327, p < 0.05$ )が、Atr/BSAと他の肺機能指標には相関を認めなかった。除外基準に基づき、18例が右B<sup>1</sup>基部気道の測定から除外された(Table 3)。検討の結果、WA%と%PEFは負の相関を示した( $r = -0.391, p < 0.05$ )。

### ビジュアルスコアと肺機能の相関

43症例にて各CTパターンを認めた頻度は、結節影25例、すりガラス影9例、浸潤影5例、網状影3例であった。各陰影パターンのスコア平均値(標準偏差)は以下であった:結節影2.7(3.6);スリガラス陰影0.4(0.9);浸潤影0.4(1.1);網状陰影0.5(2.3)。

Table 4. 肺野濃度の指標と肺機能の相関係数

	MLD	SD of lung density	Kurtosis	Skewness
%VC	-0.387*	-0.504**	0.485**	0.431**
%FVC	-0.364*	-0.523***	0.491**	0.433**
%FEV <sub>1</sub>	NS	-0.572***	0.450**	0.399**
FEV <sub>1</sub> /FVC	NS	NS	NS	NS
%PEF	NS	-0.446**	0.328*	NS
%TLC	-0.441**	-0.485**	0.495**	0.443**
%DLCO	NS	-0.387*	0.470**	0.422**

MLD = mean lung density; SD = standard deviation. NS means no significant correlations between parameters. In parentheses: data after one outlier was excluded from the analysis. Spearman rank correlation coefficients: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

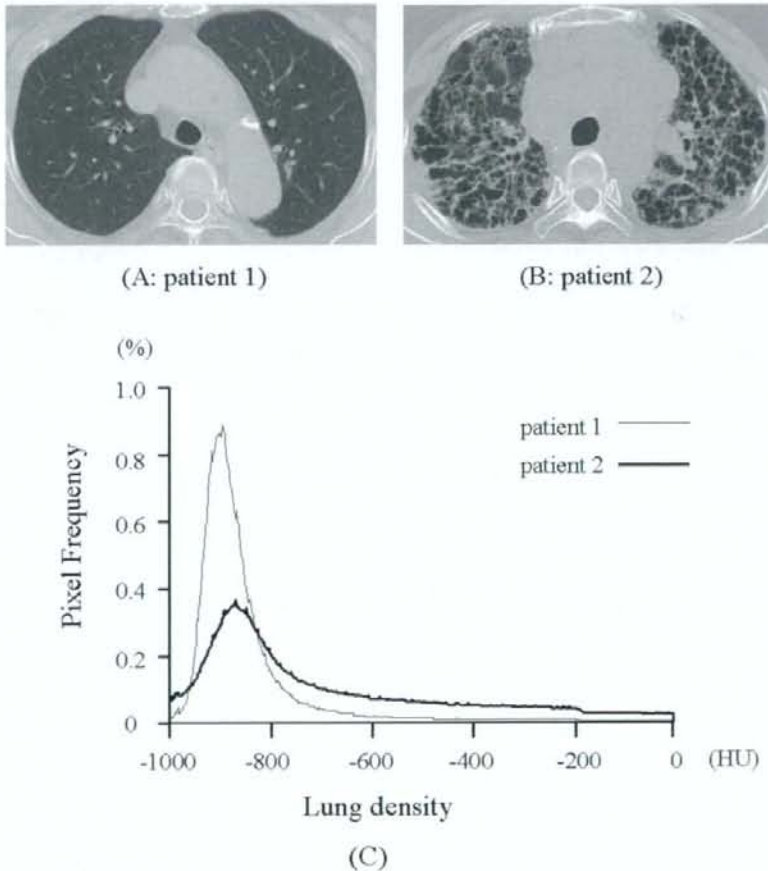


Figure 1. Representative CT images and density histograms of patients with normal lung field (patient 1: %FEV<sub>1</sub> 120%, %PEF 121%) and severe lung fibrosis (patient 2: %FEV<sub>1</sub> 45%, %PEF 79%). (A) A CT image of patient 1. No apparent parenchymal lesion is detectable visually. (B) A CT image of patient 2. Diffuse honeycomb was seen on bilateral lung fields. (C) Density histograms represented by the percentage of total lung area in patient 1 (normal line, MLD = -849 HU, SD of lung densities = 140 HU) and patient 2 (bold line, MLD = -698 HU, SD of lung densities = 260.).

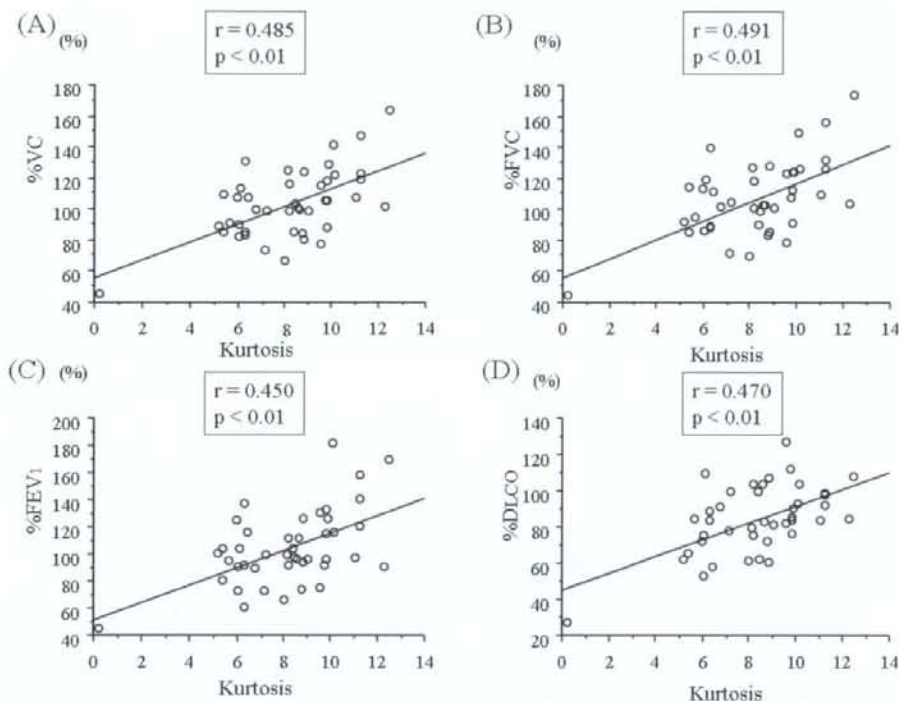


Figure 2. Correlation between kurtosis of lung density histogram and pulmonary function indices (n=43). Kurtosis is negatively correlated with %VC ( $r = 0.485$ ,  $p < 0.01$ ), %FEV<sub>1</sub> ( $r = 0.450$ ,  $p < 0.01$ ), %PEF ( $r = 0.328$ ,  $p < 0.05$ ), and %DLCO ( $r = 0.470$ ,  $p < 0.01$ ).

各パターンとのスコアの測定者間の一致率は良好であった ( $\kappa = 0.85$  to  $1.0$ )。

総ビジュアルスコアと%PEFには弱い相関が認められたが ( $r = -0.305$ ,  $p < 0.05$ )、各パターンとのスコアと肺機能の間には有意な相関を認めなかった。気道のCT指標とdensitometryの指標が独立して肺機能に及ぼす影響

単変量解析の結果に基づき、%PEFを従属変数、Atr/BSAと肺野濃度の標準偏差を独立変数としてステップワイズ回帰分析を行った。Atr/BSAの減少(相関係数0.19)と肺野濃度の標準偏差の増加は、いずれも独立して%PEFの低下と関連した( $R$ 二乗 0.19,  $p < 0.05$ )。

### 考察・結論

本研究によって、サルコイドーシス症例では肺野濃度の標準偏差の増加と、肺野濃度のヒストグラムの尖度、歪度の低下はいずれも肺容積、肺活量、拡散能の減少と関連する事が示された。一方、肺野陰

影のビジュアルスコアは肺機能との有意相関を認めなかった。気管面積の減少と右B<sup>1</sup>基部気道の肥厚はピークフローの低下に独立して影響することが確認された。

平均肺野濃度と肺機能の相関は他の指標と比較して弱かった。間質性肺疾患では濃度が上昇している領域(スリガラス影など)と低下している領域(蜂巢肺)が混在していることがあり、そのため平均肺野濃度は病変の重症度や広がりを反映しにくい可能性がある<sup>4)</sup>。この点を考慮し、既報では肺野濃度のヒストグラムから算出した尖度、歪度を用いて検討し、これらの指標が間質性肺炎において肺活量や拡散能と関連することを報告している<sup>2,4)</sup>。本研究の結果、サルコイドーシスでも同様の関連が認められる事が示された。加えて、肺野濃度の標準偏差が肺機能と相関する新たな指標として確認された。蜂巢肺を認める症例のヒストグラムは、Figure 1Cに示すように高濃度、低濃度領域ともに増えており、結果として肺野濃度の標準偏差が高値となっている。総ビジュアルスコアはピークフローと弱い相関を

- Endobronchial biopsy for sarcoidosis: a prospective study. *Chest* 2001; 120: 109-114.
- 11) Nakano Y, Muro S, Sakai H, et al: Computed tomographic measurements of airway dimensions and emphysema in smokers. Correlation with lung function. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1102-1108.
- 12) Nakano Y, Müller NL, King GG, et al: Quantitative assessment of airway remodeling using high-resolution CT. *Chest* 2002; 122: 271S-275S.
- 13) Niimi A, Matsumoto H, Amitani R, et al: Airway wall thickness in asthma assessed by computed tomography. Relation to clinical indices. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1518-1523.
- 14) Gono H, Fujimoto K, Kawakami S, et al: Evaluation of airway wall thickness and air trapping by HRCT in asymptomatic asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 965-971.
- 15) Muro S, Nakano Y, Sakai H, et al: Distorted trachea in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2000; 67: 638-644.
- 16) Ohara T, Hirai T, Sato S, et al: Comparison of airway dimensions in different anatomic locations in patients with COPD. *Respirology* 2006; 11: 579-585.
- 17) American Thoracic Society. Standardization of Spirometry, 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107-1136.
- 18) 日本呼吸器学会肺生理専門委員会:呼吸機能検査ガイドライン-スパイロメトリー, フローボリューム曲線, 肺拡散能力. 日本呼吸器学会, 東京, 2004; 20.
- 19) Cherniack RM, Raber MB: Normal standards for ventilatory function using an automated wedge spirometer. *Am Rev Respir Dis* 1972; 106: 38-46.
- 20) Schmidt CD, Dickman ML, Gardner RM, et al: Spirometric standards for healthy elderly men and women. 532 subjects, ages 55 through 94 years. *Am Rev Respir Dis* 1973; 108: 933-939.
- 21) Burrows B, Kasik JE, Niden AH, et al: Clinical usefulness of the single-breath pulmonary diffusing capacity test. *Am Rev Respir Dis* 1961; 84:789-806
- 22) Handa T, Nagai S, Fushimi Y, et al: Clinical and radiographic indices associated with airflow limitation in patients with sarcoidosis. *Chest* 2006; 130: 1851-1856.

認めたと、各パターンスコアと肺機能は相関を認めなかった。これは既報<sup>1)</sup>と異なる結果であったが、その原因としては本検討の対象症例(中央値0, 範囲0-14)では既報(中央値2, 範囲0-18)と比較して網状影の程度が軽かったことが可能性として挙げられる<sup>1)</sup>。ビジュアルスコア法では、陰影の広がり25%の単位でしか区別されないため、同じ程度の陰影であっても分布の仕方によって異なるスコアとなる場合がある。Densitometryは、この欠点を補う可能性を持つ肺野陰影の評価法である。Densitometryのいずれの指標が有用であるかは結論できないが、各指標ともCT画像、肺機能の異常を反映する事が確認された。

間質性肺炎において、肺野濃度の自動解析がビジュアルスコアと比較して再現性が高い<sup>1)</sup>ことや、densitometryの指標が肺機能、呼吸困難スコア、気管支肺胞洗浄液、健康関連QOL、運動能力等様々な臨床指標を反映する事<sup>3,4)</sup>が報告されている。この事は、densitometryの指標が他の検査では得られない情報を与える可能性を示唆している。サルコイドーシス症例におけるdensitometryの指標の臨床的有用性や予後との関連について、更なる検討が必要である。

気道のCT指標に関しては、気管面積の減少やWA%の増加が%PEFの減少と相関した。%PEFはいくつかのdensitometryの指標とも相関を認め、なかでも肺野濃度の標準偏差と最も強い相関を認めた(Table 4)。この結果に基づき、気管面積と肺野濃度の標準偏差それぞれが独立してピークフローに影響するかどうかについての検討を行った。その結果、いずれの指標も独立してピークフローに影響した。

Atr/BSA and Ai/BSAの間には有意な正の相関( $r = 0.714, p < 0.001$ )があり、WA%とAi/BSAには負の相関が認められた( $r = -0.773, p < 0.001$ )。これらの関係からは、気管面積が減少している症例では右B'の内腔面積も減少しており、相対的に気道壁が肥厚していると解釈できる。健康者において、ピークフローはばらつきがあり、個々の気道径に依存するためではないかとする報告もある<sup>10)</sup>。したがって、本研究で確認された気道の指標とピークフローの相関はサルコイドーシスに特有のものではない可能性も否定できない。いずれにしても、本研究によって、サルコイドーシス症例では気道内腔面積の減少と肺

野濃度の標準偏差の増加が独立してピークフローに影響することが示された。サルコイドーシス症例において、Densitometryの指標は肺機能を反映しており、サルコイドーシスの肺野病変の重症度を評価する新たな指標と考えられた。

## 参考文献

- 1) Hansell DM, Milne DG, Wilsher ML, et al: Pulmonary sarcoidosis: morphologic associations of airflow obstruction at thin-section CT. *Radiology* 1998; 209: 697-704.
- 2) Best AC, Lynch AM, Bozic CM, et al: Quantitative CT indexes in idiopathic pulmonary fibrosis: relationship with physiologic impairment. *Radiology* 2003; 228: 407-414.
- 3) Hartley PG, Galvin JR, Hunninghake GW, et al: High-resolution CT-derived measures of lung density are valid indexes of interstitial lung disease. *J Appl Physiol* 1994; 76: 271-277.
- 4) Camiciottoli G, Orlandi I, Bartolucci M, et al: Lung CT densitometry in systemic sclerosis: correlation with lung function, exercise testing, and quality of life. *Chest* 2007; 131: 672-681.
- 5) Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG). *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 736-755.
- 6) Carrington CB: Structure and function in sarcoidosis. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 278: 265-283.
- 7) Kitaichi M: Pathology of pulmonary sarcoidosis. *Clin Dermatol* 1986; 4: 108-115.
- 8) Nishimura K, Itoh H, Kitaichi M, et al: Pulmonary sarcoidosis: correlation of CT and histopathologic findings. *Radiology* 1993; 189: 105-109. Erratum in: *Radiology* 1994; 190: 907.
- 9) Shorr AF, Torrington KG, Hnatiuk OW: Endobronchial involvement and airway hyperreactivity in patients with sarcoidosis. *Chest* 2001; 120: 881-886.
- 10) Shorr AF, Torrington KG, Hnatiuk OW:

# 活動性サルコイドーシス肺病変に対する フルチカゾン吸入による効果の検討

田中 健介 山口 哲生\* 漆山 博和 成田 裕介  
在間 未佳 河野千代子 山田 嘉仁

サルコイドーシス肺病変(肺サ症)の治療では早期からのステロイド内服治療が推奨されているが、内服を拒否する患者は少なくない。吸入ステロイド剤は副作用が少なく受け入れられやすい治療法であるが、現在まで吸入療法のみでの治療の報告は少なく、今回サ症に対するフルチカゾン(FP)吸入療法の有用性を検討した。我々は2003年以降に当科を受診し活動性の肺病変を有するサ症患者28例(男/女;9/19人,年齢29-70歳)を対象としFP800 $\mu$ g/日の吸入を継続し自覚症状、胸部レントゲン画像、呼吸機能検査を3~6ヶ月で比較し評価した。自覚症状は質問表への回答、胸部レントゲン画像は放射線科医師2名の読影で評価し、呼吸機能検査は肺活量10%以上の増加を改善とした。その結果、自覚症状改善11/26(42%)、胸部レントゲン画像改善6/29(21%)、呼吸機能改善3/21(17%)であった。過去の報告では、自覚症状においてFP投与群は10人のうち8人に改善を認める(Baughmanら2002)、胸部レントゲン画像において69%の効果を認める(Albertsら1995)などいずれも高率であるが二重盲検で有意差は認められていない。しかし経口ステロイドを躊躇する症例における初回導入治療として、有害事象の少ない吸入ステロイドは有効である可能性が示唆された。

## Efficacy of inhaled fluticasone propionate for active pulmonary sarcoidosis

We sometimes encounter patients with active pulmonary sarcoidosis who hesitate to take oral corticosteroid because of its adverse effects such as moon face and osteoporosis. Inhaled corticosteroid therapy is not recommended in the guidelines of sarcoidosis treatment, but results of efficacy of the treatment are equivocal in previous reports. We conducted a prospective non-comparative study on the efficacy of monotherapy of inhaled corticosteroid fluticasone propionate (FP). Twenty patients with active pulmonary sarcoidosis (male/female: 6/14, age: 31-68) were enrolled, and FP 800  $\mu$ g/day was administered to all of them at least 3 months. Their respiratory symptoms, chest radiographic findings, and respiratory function test results (%VC) were evaluated before and after of the period of administration. As a result, 11 of 26 cases, it was 42%, showed an improvement in their respiratory symptoms. As for pulmonary function, 3 of 21 cases, it is 17%, showed improvement. As for radiographic findings, 6 of 29 cases, it was 21% of them, showed improvement. In the prior studies, higher improvement was shown, such as 80% improvement in their respiratory symptom (Baughman et al 2002), and 47% improvement in their chest radiographic findings (Alberts et al, 1995). Though the improvement rates in our study are lower than those in prior studies, inhaled corticosteroid therapy is one of the available choice, especially for the patients who hesitate to take oral corticosteroid.

## 【背景】

サルコイドーシス肺病変(肺サ症)に対して吸入ステロイド薬は治療効果が期待される治療であるものの、依然確立した治療選択肢ではない。しかし骨粗鬆症、満月様顔貌等の副作用の為に経口ステロイド剤の使用を躊躇する患者にとって、吸入療法は治療の選択肢として有用である可能性がある。

我々は、Ⅱ～Ⅲ期の活動性肺サ症の症例28例(男/女=9/19人,年齢:29-70歳)に対して前向き無比較試験で吸入フルチカゾン(フルタイドディスクス®,以下FP)による治療効果を検討した。

## 【対象】

1997年から2008年に当科を受診した肺サ症のうち①Ⅱ、Ⅲ期症例、②画像上広範対称性肺野病変を有する症例、③過去6ヶ月間の経過で改善傾向が見られない症例、④FPによる吸入治療導入症例であり、FP投与中の経過を3ヶ月以上に渡り確認することのできる28例を対象とした。経過の長い散在性斑状陰影症例、FP以外の吸入ステロイド治療導入症例は除外した(表1)。

表-1 患者背景

年齢(才)	31-68 (平均:47.7)
性別(人)	男性/女性:9/19
FP吸入までの罹患年数(人)	
0-4年	15
5-9年	9
10-14年	4 (平均:6.7年)
既治療(人)	
なし	18
吸入ステロイド	2 (BDP等)
経口ステロイド	7
免疫抑制薬	1
自覚症状(人)	あり/なし:26/2
FP吸入前の病勢悪化(人)	あり/なし:20/8
FP投与期間(ヶ月間)	3-95(平均:14.8)

JR 東京総合病院呼吸器内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

## 【方法】

対象症例全例にFP800 $\mu$ g/dayを3ヶ月以上投与し経過を追い、その有効性を臨床的に検討した。

## 【評価】

対象症例に対して、FP吸入前後での自覚症状、胸部レントゲン画像、呼吸機能の変化を評価した。

自覚症状は咳嗽、胸痛、倦怠感等を点数化し、5:著明に改善、4:やや改善、3:不変、2:やや悪化、1:著明に悪化、の5段階に分類した。胸部レントゲン画像は当院放射線科医2名に読影を依頼し、改善を認めるものを効果のある群とした。呼吸機能については呼吸機能検査を施行し、VCが10%以上改善した症例を効果のある群とした。

## 【結果】

自覚症状は吸入以前から無症状であった2例を除外し、やや改善以上の効果を認めた例が26例中12例(46%)と約半数に自覚症状の改善を認めた。呼吸機能はFP吸入前後ともに検査を施行できた21例中3例(17%)にのみ効果を認めた。また、胸部レントゲン画像では28例中6例(21%)に効果を認めた(表2,3)。

表-2 結果

## 自覚症状(26症例)

5/4/3/2/1 : 3/9/12/2/0 (人)

※FP吸入前から無症状の2症例は除外

※5:著明に改善~1:著明に悪化

## 呼吸機能(%VC)(21症例)

改善/改善なし : 3/18 (人)

※呼吸機能検査の非施行7症例は除外

## 胸部レントゲン画像(28症例)

改善/改善なし : 6/22 (人)

表-3 結果

FP800 $\mu$ g/日吸入療法の有効率

呼吸器症状 : 46%

胸部レントゲン画像 : 21%

呼吸機能検査 : 17%

※:5(著効)4(やや効果あり)を有効に分類

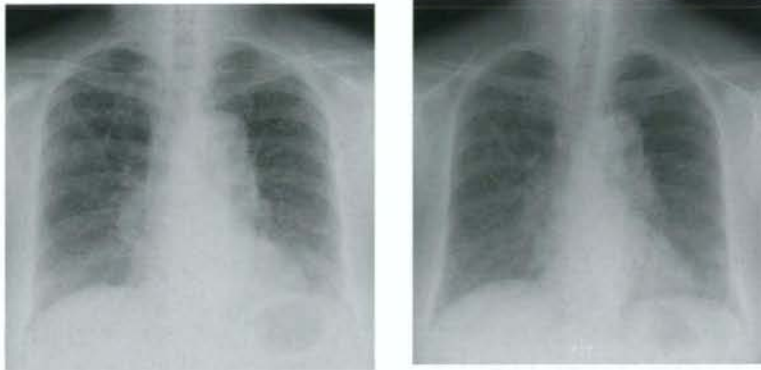


図-1  
症例1 68歳 女性  
左：吸入前 右：6ヶ月間FP800µg/day吸入後

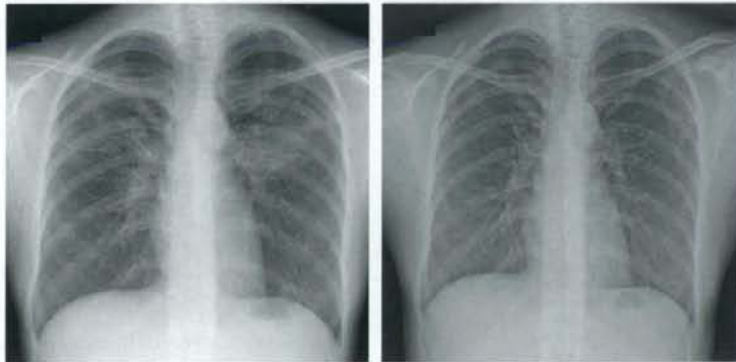


図-2  
症例2 32歳 女性  
左：吸入前 右：1年間FP800µg/day吸入後

症例1は、54歳発症の眼、肺サルコイドーシスの一例であり、呼吸機能検査上は効果を認めなかったものの自覚症状として約1ヶ月で咳嗽の改善を認め、胸部レントゲン画像も両肺のスリガラス影の改善が認められた(図1)。

症例2は検診発見の胸部異常陰影から肺サ症の診断にいたった32歳女性である(図2)。明らかな自覚症状はなかったものの胸部レントゲン画像上悪化傾向にありFP吸入を開始し、約1年の経過で両側中肺野のスリガラス影に改善傾向を認めた。

#### 【考 案】

今回我々は前向き無比較試験でⅡ～Ⅲ期の活動性肺サ症28症例に対してFP吸入の有用性を検討した。

肺サ症に対するFP吸入治療の効果についての報告は2報告あり、前治療として経口ステロイドを全例に用いている、もしくは経口ステロイド使用中症例を対象に含んでいる[1,2]。全例に経口ステロイドを投与した上での吸入ステロイドの追加投与の効果を確認した報告ではSF-36、PFT、6METいずれの項目においても有意差は認められなかった[2]。ただし、自覚症状として咳嗽の軽減を経口ステロイドと有意差なく認め、また副作用については経口ステロイドに比較して少なく、経口ステロイドの代替治療として意義がある可能性が唆されている。もう一方の報告においてはPEFR、SF-36、呼吸機能検査を項目として検討しているが、SF-36のみ有意にplaceboとの差を認めた[1]。しかしその他の項目において有意差はなく、安定した肺サ症に対するFP



吸入の有用性については否定的とされている。

またFPと同様の吸入ステロイドであるBudesonide (BDP)を用いた肺サ症に対する有効性の検討は1994年以降数報告確認される。自覚症状、PFT、CXR等をendpointとして検討しているが、最終的にBDPの効果を認めた報告はない。自覚症状については、SF36、GCI(Global clinical index)などを用いて評価されている。placeboに対して有意に効果を認めた報告において、BDP投与群の有効率は5-point GCI scaleにおいて36%(control群: 6%)であり[3]、本検討における7%(5段階評価中5を5-point GCIの5とした場合)に比較してかなり高率である。BDP吸入とplacebo間で有意差の出なかった報告においてもBDP投与群において8/10症例に咳嗽の軽減を認められている。自覚症状の改善においては気道の過敏性の関与が示唆されるが本検討においては過敏性の検討は行っておらず、今後の課題であると思われる。過去においては、methacholine challengeを行って気道過敏性と咳嗽の改善には相関はないとする報告は見られる[2]。

胸部レントゲン画像の改善については、本報告では改善率は21%であった。CXRの変化を同様に評価している過去の報告では、47%[3]など高率なものがある。

以上過去における吸入ステロイドの効果については依然明確ではなく、治療法として確立していない。しかし、吸入ステロイドの有用性が傾向としてみられた報告は多い。また経口ステロイドとの比較において有害事象が有意に少ないとする報告もある[2]。

本報告では、それぞれの評価項目での有効率は過去の報告に比較して低い結果となった。しかし、経口ステロイドを躊躇する症例に対して初期治療として投与することは有害事象の少なさからも意義はあ

ると思われる。今後、症例を増やした上で効果を検討する価値はあろう。

また、過去にはFP、BDPと同様の他の吸入ステロイドでも粒子径、肺内沈着率の異なる薬剤を用いて検討されており、今後薬剤間での比較検討も可能であると思われる。

## 【参考文献】

- 1) DuBois RM, Greenhalgh PM, Southcott AM, et al. Randomized trial of inhaled fluticasone propionate in chronic stable pulmonary sarcoidosis: a pilot study. *Eur Respir J.* 1999;13:1345-1350.
- 2) Baughman RP, Iannuzzi MC, Lower EE. Et al. Use of fluticasone IN acute symptomatic pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Duffse Lung Dis* 19: 198-204, 2002.
- 3) Alberts C, Van der Mark TW, Jansen HM. Inhaled budesonide in pulmonary sarcoidosis: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur Respir J.* 1995;8:682-688.
- 4) Pietinalho A, Tukiainen P, Haahtela T, et al. Oral prednisolone followed by inhaled budesonide in newly diagnosed pulmonary sarcoidosis. *Chest.* 1999;116:424-431
- 5) Milman N, Graudal N, Grode G, Munch E. No effect of high-dose inhaled corticosteroids in pulmonary sarcoidosis: a double-blind, placebo-controlled study. *J Intern Med.* 1994;236:285-290
- 6) Erkkila S, Froseth B, Hellstrom PE, et al. Inhaled budesonide influences cellular and biochemical abnormalities in pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis.* 1988;5:106-110

### Ⅲ．びまん性汎細気管支炎, BO

# びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子研究

土方美奈子<sup>1</sup> 松下 育美<sup>1</sup> 伊藤 秀幸<sup>2</sup> 森田 敬知<sup>2\*</sup>  
大橋 順<sup>3</sup> 徳永 勝士<sup>3</sup> 本間 栄<sup>4</sup> 田口 善夫<sup>5</sup>  
吾妻安良太<sup>6</sup> 工藤 翔二<sup>7</sup> 慶長 直人<sup>1\*\*</sup>

びまん性汎細気管支炎(DPB)の疾患感受性候補領域の中には、我々がクローニングした新規ムチン様遺伝子などいくつかの遺伝子が存在しているが、これらの遺伝子のヒト気道上皮細胞での役割については不明の点が多い。ヒト気道上皮細胞を用いてムチン様遺伝子の発現をRT/real time PCRで検討したところ、mRNA発現がいくつかの刺激により誘導されることがわかった。候補領域の遺伝的多型により発現量や刺激時の発現パターンに違いがみられるか、今後さらに検討する必要があると思われた。

## Expression of candidate genes in the susceptibility region of diffuse panbronchiolitis

Minako Hijikata<sup>1</sup>, Ikumi Matsushita<sup>1</sup>, Hideyuki Ito<sup>2</sup>, Takatomo Morita<sup>2</sup>, Jun Ohashi<sup>3</sup>, Katsushi Tokunaga<sup>3</sup>,  
Sakae Homma<sup>4</sup>, Yoshio Taguchi<sup>5</sup>, Arata Azuma<sup>6</sup>, Shoji Kudoh<sup>7</sup>, and Naoto Keicho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan

<sup>2</sup>Department of Thoracic Surgery, International Medical Center of Japan

<sup>3</sup>Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

<sup>4</sup>Department of Respiratory Diseases, Toho University School of Medicine

<sup>5</sup>Department of Respiratory Medicine, Tenri Hospital

<sup>6</sup>Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

<sup>7</sup>Fukujiji Hospital

Diffuse panbronchiolitis (DPB) is a complex genetic disease affecting East Asians and is strongly associated with the class I human leukocyte antigens (HLA) -B54 in Japan and HLA-A11 in Korea. We recently showed that an HLA-associated major susceptibility gene for DPB is probably located within the 200kb in the class I region 300 kb telomeric of the HLA-B locus on the chromosome 6p21.3. We cloned two novel mucin-like genes *G2* and *G4* in the candidate region. We investigated the expression of *G4* mRNA in human bronchial epithelial cells and found that *G4* mRNA expression was upregulated by some inflammatory stimuli.

## はじめに

びまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis, 以下DPBと略す) は、アジア系集団にみられるHLA class I関連疾患である。日本人ではHLA-B54との関連が非常に強いことはいくつかの報告で確認されているのに対し<sup>1)2)</sup>、韓国人ではHLA-B54との関連はなく、かわりにHLA-A11との関連が強いとされた<sup>3)</sup>。このことから、HLAそのものがDPBに関連しているのではなく、HLA-B遺伝子座とHLA-A遺伝子座の間にDPBの疾患感受性遺伝子が存在するという仮説がたてられ、マイクロサテライトマーカーなどの遺伝マーカーを用い、候補領域はおよそS遺伝子からTFIIH遺伝子までの200kbまでせばめられた<sup>4)</sup>。この200kbの領域をさらに一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) を用いて検討したところ、候補領域は80kbまでせばめられたが、この80kbの領域は非常に連鎖不平衡の強い領域であるために、複数の遺伝子多型が同程度に疾患に関連しており、関連解析によるそれ以上の絞り込みは困難と思われた。一方で我々は候補領域内で新規遺伝子のクローニングを試み、2つのムチン様遺伝子(G2, G4)をクローニングした。既に報告されたDPCR1遺伝子<sup>5)</sup>とMUC2I遺伝子<sup>6)</sup>をあわせると、候補領域内には4つのムチン様遺伝子がクラスターとなっている。

ムチンには繰り返し構造があり、そのユニット数が可変であるVNTR (variable number of tandem repeat) 領域が存在する場合があるため、上述のSNPを用いた関連解析のみならず、ムチン様遺伝子のエクソン内のVNTRも用いてDPBとの関連を検討したが、日本人集団ではHLA-B\*5401との関連が非常に強く、HLA-B\*5401を超える強い関連を有する遺

伝的多型はムチン様遺伝子のエクソン領域に現在のところ同定されていない。今年度我々は、気道における新規ムチン様遺伝子の役割を検討するため、まず候補領域に存在するムチン様遺伝子のヒト気道上皮細胞での発現をRT/real time PCRにて解析した。

## 対象と方法

細胞株としては、NCI-H292, A549, BET-1A, BEAS-2B, NCI-H441, Calu-3を用いた。また、human lung total RNA (Stratagene), human trachea total RNA (Stratagene)をヒト肺組織・気管組織由来total RNAとして用いた。

国立国際医療センターの呼吸器外科において、文書同意のもとで提供をうけた切除肺・気管支の一部より、気道上皮細胞を得て、初代培養を行った。

Trizol (Invitrogen)にてtotal RNAを抽出した後、total RNA 5 $\mu$ g・SuperScriptIII reverse transcriptase (Invitrogen)・pd (N)<sup>®</sup> (TaKaRa)を用いて逆転写反応を行った。

200kbの候補領域にあるムチン様遺伝子について、増幅産物が約200~300bpの範囲になるようなRT/PCR用のプライマーを作成した。イントロンを間にはさむように設計したので、ゲノムDNAの増幅とcDNAの増幅の区別は可能である。Real time PCR系は、同上プライマーを用いて、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)により構築した。RT/PCRのコントロールとしてはGAPDHを使用した。

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

## 結 果

## (1) G4遺伝子のmRNA発現

図1に示すように、今回検討したcell lineおよび肺・気管支のtotal RNAの中では、NCI-H441細胞と肺組織がG4遺伝子を比較的多く発現していることがわかった。また、切除気管支から単離培養したヒト気道上皮細胞については、発現がみられたものの、その量はNCI-H441細胞や肺組織と比べて低かった。我々が保有するヒト気道上皮初代培養細胞のパネル

<sup>1</sup> 国立国際医療センター 研究所呼吸器疾患研究部

<sup>2</sup> 同・呼吸器外科

<sup>\*</sup> 現 災害医療センター

<sup>3</sup> 東京大学 大学院医学系研究科 人類遺伝学教室

<sup>4</sup> 東邦大学 呼吸器内科

<sup>5</sup> 天理よろづ相談所病院 呼吸器内科

<sup>6</sup> 日本医科大学 第四内科

<sup>7</sup> 結核予防会複十字病院

<sup>\*\*</sup> びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者