

## 背景

多様な臨床経過をもつ本疾患について統一的な重症度分類の必要性が求められている。国際的な重症度分類については規範とするべきものがなく通常はステロイド治療に反応性のサ症と反応しないで進行するサ症(治療抵抗性サ症)といった分類がなされている<sup>1)</sup>。今回サルコイドーシスの診断基準が新しく改訂されたことに伴い重症度分類についても本研究班を中心に新たに作成し本邦における重症度の基準としたい。

## 新重症度分類とその検証

### 1) 新重症度分類

重症度分類は図1のごとくにする。

図1 サルコイドーシスの新重症度分類(案)

重症度 I	無治療または局所治療で対応可能なもの。
重症度 II	QOLを障害する自覚症状や機能障害を認めステロイド等の全身的な治療が必要なもの。
重症度 III	治療と関係なく身障者認定基準を満たす機能障害を認めるもの。 複数の臓器に障害がある場合は重症度の最も高い臓器障害の重症度をもってその患者の重症度とする。

### 2) サルコイドーシス新重症度分類の適用についての検討

大分大学医学部第3内科におけるサルコイドーシス症例169例について新重症度分類を適用した。その結果を図2に示す。

図2 新重症度分類の適応結果

重症度 I	109例 (64.4%)
重症度 II	56例 (33.1%)
重症度 III	4例 (2.5%) (ペースメーカー植え込み3例, 慢性呼吸不全1例)

### 3) 本重症度分類の問題点

- (1) 多くの症例が重症度 I に入ってしまう、重症度 III がきわめて少なくなってしまう。

- (2) 眼科を中心に局所注射、手術など専門的な治療を加えても局所治療として重症度は I となり無治療で経過観察する群と同じになってしまう。

## 考案

従来からサルコイドーシス(以下サ症)の臨床経過においては自然軽快する患者が多いことが知られておりこうした患者では経過観察を行うことが重要であるとされている<sup>2)</sup>。一方眼病変や心病変をもつ患者を中心に重大な機能障害を残し、場合によっては致死的な経過をたどる症例が存在する<sup>3)</sup>。こうした多様な臨床経過をもつ本疾患について統一的な重症度の分類の必要性が求められており、従来からいくつかの試みがなされたが正式な分類には至らなかった。今回サルコイドーシスの診断基準が新しく改訂されたことに伴い重症度分類についても本研究班を中心に新たに作成し本邦における重症度の基準としていきたい。国際的な重症度分類については規範とするべきものがなく通常はステロイド治療に反応性のサ症と反応しないで進行するサ症(治療抵抗性サ症)といった分類がなされており治療抵抗性サ症が重症サ症とほぼ同義に解釈されている<sup>1,4,5)</sup>。しかし本邦では眼病変や心病変が多く<sup>6)</sup>、単にステロイドの全身的な投与のみで重症度が考慮されるべきではない。以上の状況を考慮して本邦におけるサルコイドーシスの新しい重症度分類を提案しそれに対する全国的な検証を行っていきたい。

## 結語

サルコイドーシスの新重症度分類案を提示した。今後この案を中心に検討を進め最終的な重症度分類を策定する予定である。

## 参考文献

- 1) Baughman RP, Low EE. Alternative to corticosteroids in the treatment of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1997; 14:853-864.
- 2) 泉 高英: サルコイドーシス. 日内会誌. 1992; 81: 1481-1495.

- 3) 杉崎 勝教, 山口 哲生, 千田 金吾. 治療抵抗性サルコイドーシスに関する実態調査. 厚生労働省科学研究—難治性疾患克服研究事業—びまん性肺疾患に関する調査研究班 平成20年度研究報告書. 2009; p85-88.
- 4) Muller-Quernheim J, Kienast K, Pfeifer S, et al. Treatment of chronic sarcoidosis with an azathiopurine/ prednisolone regimen. *Eur Respir J* 1999; 14: 1117-1122.
- 5) Wyser CP, van Schalkwyk EM, Alheit B. Treatment of progressive pulmonary sarcoidosis with Cyclosporin A. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1371-1376.
- 6) Morimoto T, Azuma A, Abe S, Usuki J, Kudoh S, Sugisaki K, Oritu M, Nukiwa T. Epidemiology of sarcoidosis in Japan. *Eur Respir J* 2007; 31:372-379.

# サルコイドーシスに対するメソトレキサートと アザチオプリンの有用性

一色 琢磨 山口 哲生\* 山口 陽子 若林 義賢 細木 敬祐  
鈴木 智史 在間 未佳 河野千代子 山田 嘉仁

2000年から2009年の間に当科を初診となったサルコイドーシス症例のうち、経過中にメソトレキサート(MTX)を使用した55例及びアザチオプリン(AZP)を使用した15例を対象とし安全性および有効性について検討した。有効性に関しては3ヶ月以上内服できた症例で評価した。両薬剤はステロイド治療に上乘せしたか、あるいは単剤で投与した。MTXで20/55例(36.3%)、AZPでは3/15例(20%)において何らかの副作用の発現を認めた。MTXでは肝機能障害が最も多かったが全て減量あるいは中止で軽快し、重篤な副作用を認めた症例はなかった。AZPを使用した1例において骨髄抑制による発熱性好中球減少症を来したが200mg/日という高用量に起因したものと考えられた。有効性に関してはMTXで10/52例(19.2%)、AZPで3/9例(33.3%)において何れかの臓器病変の改善を認めた。両薬剤ともにサ症に対して一定の有効性を示し、用量に留意して使用すれば比較的安全に使用できる。

## **Efficacy of methotrexate and azathioprine in patients with sarcoidosis**

Takuma Isshiki, Tetsuo Yamaguchi, Yoko Yamaguchi, Yoshitake Wakabayasi, Keisuke Hosoki,  
Satoshi Suzuki, Mika Zaima, Chiyoko Kono, Yoshihito Yamada

*Department of Respiratory Medicine, Japan Railway Tokyo General Hospital*

The purpose of this study was to evaluate the efficacy and safety of methotrexate(MTX) and azathioprine(AZP) in patients with sarcoidosis. Between January 2000 and December 2009, 55 sarcoidosis patients were treated with MTX and 15 were treated with AZP. Patients were administered each of them only or with corticosteroid. Effectiveness was assessed in 52 MTX cases and 9 AZP cases who were treated for more than 3 months, and 10 MTX cases (19.2%) and 3 AZP cases(33.3%) showed improvement in some lesions. Adverse effects were observed in 20 out of 55 MTX cases (36.3%) and in 3 out of 15 AZP cases (20%). The most frequent adverse effect of MTX was liver dysfunction, but none of the patients were severe. Afebrile neutropenia was occurred in one patient treated with AZP probably because of high dose usage (200mg/day). MTX and AZP were effective in some sarcoidosis patients and safe with appropriate dosage.

## 【背景】

サルコイドーシスに対する治療薬の中心は副腎皮質ステロイド薬(ステロイド)<sup>1)</sup>であるが、中にはステロイド難治例や合併症によりステロイドの投与が困難な症例があり、ステロイド忌避例も多い。免疫抑制剤であるメソトレキサート(MTX)及びアザチオプリン(AZP)はステロイド代替療法の一つとして欧米ではサルコイドーシス症例に対して使用されているが、本邦では保険診療の問題もあり適応や投与量などに関して明確な指針はない。

## 【目的】

MTX及びAZPの有効性および安全性について検討することを目的とした。

## 【方法】

2000年1月1日から2009年12月31日までに当院を初診となったサルコイドーシス症例のうちMTXを投与された55例及びAZPを投与された15例を対象とし、有効性および安全性について検討した。心臓病変のみ有している症例に関しては心臓病変の有効性の評価が難しいことより今回は除外した。また、有効性については3ヶ月以上内服できた症例で評価し、副作用の出現など何らかの理由で3ヶ月以上内服できなかった症例に関しては安全性のみを評価した。

MTXおよびAZPの両薬剤は単剤であるいはステロイドを使用している症例に上乗せして使用した。MTXの投与量は原則5～7.5mg/週とし、AZPの投与量は原則50～100mg/日としたが200mg/日が投与された症例もあった。有効性については臨床症状あるいは画像所見が明らかに改善した症例を有効例とし、不変例などそれ以外の症例は全て無効とした。

## 【患者背景】

### ① MTX患者背景

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

男性26例、女性29例で治療開始年齢は27～75歳(中央値47歳)であった。MTXを単剤で投与された症例は28例、ステロイドに上乗せして投与した症例は27例であった。

### ② AZP患者背景

男性7例、女性8例で治療開始年齢は20～64歳(中央値40歳)であった。AZPを単剤で投与された症例は1例、ステロイドに上乗せして投与した症例は14例であった。また、15例の内14例は過去にMTXを投与された既往を有していた。

## 【結果】

### ① MTX

55例中何らかの副作用の発現を認めた症例は20例(36.3%)で男性7例、女性13例であった。副作用の内訳としては肝機能障害13例(23.6%)、消化器症状3例(5.5%)、脱毛3例(5.5%)、白血球減少1例(1.8%)、浮腫1例(1.8%)であった。消化器症状の発現は比較的早く数日から2ヶ月程度で出現しており、肝機能障害の出現には平均して約2年の経過が認められた。肝機能障害の程度、白血球減少の程度はともに軽微でありいずれもMTXの減量あるいは中止ですみやかに改善を認めた。肝生検を必要とする症例はなく施行していない。臨床的に問題となるような重篤な副作用を認めた症例は1例もなかった。

有効性に関しては副作用あるいは自己中断により3ヶ月以内に内服が中止された3例を除いた52例で評価した。10例(19.2%)でいずれかの臓器病変に改善を認めた(表1)。臓器別にみると肺(BHLも含

表1 MTX有効例一覧

年齢	性別	MTX投与方法	MTX用量	罹患臓器	有効臓器
39	女	単剤	7.5mg	眼、BHL、表在リンパ節	BHL、表在リンパ節
79	女	単剤	7.5mg	眼、肺、皮膚	肺、皮膚
75	男	単剤	7.5mg	BHL、心、腎、皮膚	腎
37	女	単剤	7.5mg	眼、BHL、皮膚	皮膚
59	女	単剤	7.5mg	眼、BHL、肺、皮膚、筋肉	皮膚、筋肉
66	女	単剤	7.5mg	眼、BHL、心、皮膚	眼、皮膚
51	男	単剤	7.5mg	眼、肺、皮膚	肺
64	男	ステロイドに上乗せ	7.5mg	眼、BHL、筋肉	筋肉
63	女	ステロイドに上乗せ	7.5mg	眼、BHL、肺、皮膚	眼、BHL
37	女	ステロイドに上乗せ	7.5mg	喉頭蓋	喉頭蓋

む)4/46例(8.7%), 眼 2/28例(7.1%), 皮膚 4/22例(18.2%), 関節 0/12例(0%), 表在リンパ節 1/8例(12.5%), 筋肉 2/6例(33.3%), 腎 1/1(100%), 喉頭蓋 1/1(100%)で有効性を確認した(複数臓器の場合は重複して算定). MTXが有効であった症例のうちMTXを単剤で投与した症例が7例, ステロイドに上乗せして使用した症例は3例であった. また有効性を確認するまでの期間は内服開始後2ヶ月から12ヶ月程度で有効例におけるMTXの全使用期間は16ヶ月から80ヶ月(継続中)であった.

② AZP

15例中何らかの副作用の発現を認めた症例は3例(20%)で男性1例, 女性2例であった. 副作用の内訳としては骨髄抑制1例, 消化器症状 1例, 頭痛1例であった. 骨髄抑制は唯一 200mg/日の高用量を投与された症例であったが, 投与開始後3週間後に発熱性好中球減少症を来し, G-CSF及び広域スペクトラムの抗菌薬治療を要した. 他の症例はAZPの減量あるいは中止ですみやかに副作用の改善を認めた.

有効性に関しては副作用あるいは自己中断により3ヶ月以内に内服が中止された6例を除いた9例で評価した. 何れかの臓器病変に改善を示した症例は3例(33.3%)で有効臓器は眼, 肺, 皮膚であった(表2). AZP投与開始から有効性を確認するまでの期間は平均して2ヶ月程度であった.

【症例提示】

① MTX有効例

《症例1》

39歳の女性. 6年前に眼病変で発症しその際に既にBHLを指摘されていた. その後頸部リンパ節の生検で類上皮細胞肉芽腫が検出されサルコイドーシスの診断に至ったがその後も改善なく当院紹介となった. ステロイド忌避のためMTX単剤 7.5mg/週

で治療を開始したところ3ヶ月後から表在リンパ節の縮小及びBHLの縮小(図1)を認めた. 12ヶ月で一旦MTXを中止して経過をみているが現在のところ落ち着いている<sup>9)</sup>.

《症例2》

59歳女性. 5年前にBHL指摘され紹介. 皮下結節の生検で類上皮細胞肉芽腫が検出されサルコイドーシスの診断に至った. 抗菌薬治療など試されたが改善なく糖尿病を合併しているためステロイドの使用が困難であった. そのためMTX単剤 7.5mg/週を開始したところ4ヶ月経過ころから指の結節の縮小及び顔面の局面形成性の皮疹は改善を示してきた. 図2はMTX投与前と投与開始9ヶ月後の手背及び顔面の写真である. 23ヶ月で一旦MTXを中止して経過をみている.

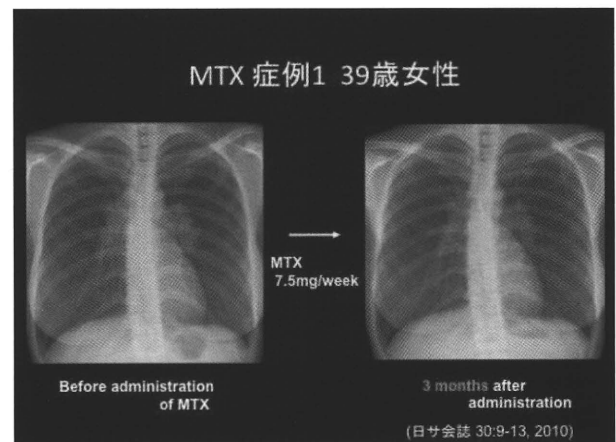


図1

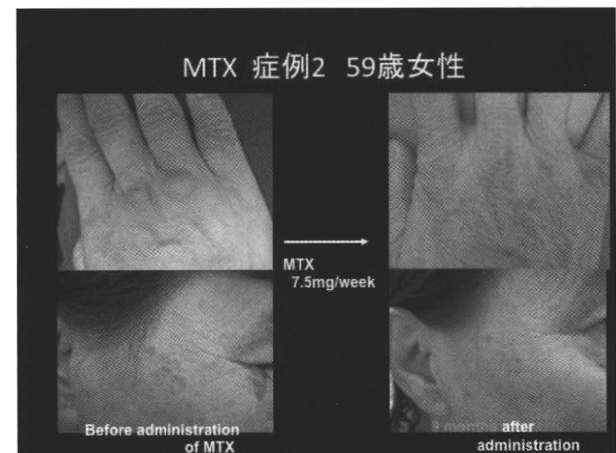


図2

表2 AZP有効例一覧

年齢	性別	AZP 投与方法	AZP 用量	罹患臓器	有効臓器
46	女	ステロイドに上乗せ	50mg	眼、肺、皮膚	皮膚
37	男	ステロイドに上乗せ	50mg	眼、肺、皮膚、腎	眼、皮膚
32	女	ステロイドに上乗せ	50mg	肺	肺

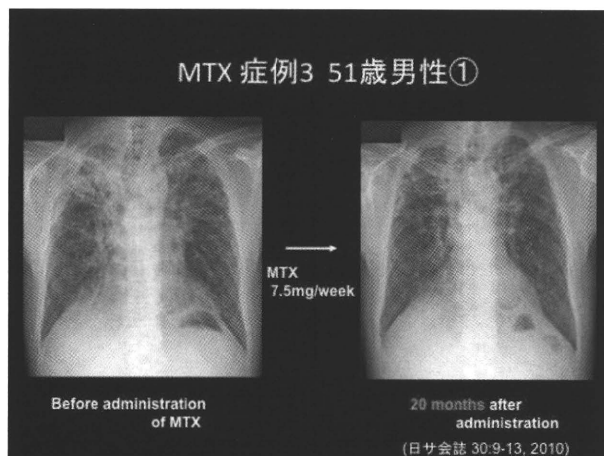


図3

《症例3》

51歳男性。20年前に飛蚊症で発症し肘の皮下結節の生検でサルコイドーシスの確定診断が得られた。眼病変に対して10数年前に半年ほどステロイドの内服をしていた期間がある。その後肺野の病変の増悪を認め当科紹介となった。画像上アスペルギルス感染が疑われたためMTX単剤 7.5mg/週を開始したところ4ヶ月経過より咳などの自覚症状の改善、レントゲン上も肺野の陰影の改善を認めた。図3は投与前と投与20ヶ月経過時点でのレントゲンである。MTXは33ヶ月内服して一旦中止して経過をみている<sup>5)</sup>。

③ AZP有効例

《症例1》

32歳女性。3年前に健診で肺野の陰影を指摘され他院で経過を診られていたが増悪傾向にあったため2年前に当院紹介となった。少量ステロイドを開始して肺野の陰影は改善を認めたが、ステロイド減量中に再度増悪を認めたためステロイドの用量は変更せずAZP 50mg/日をステロイドに上乗せした。1ヶ月後のレントゲンでは既に肺野の陰影は改善傾向を認めた。図4はAZP投与開始5ヶ月後のCTで両側肺野の小粒状影は改善を認めている。現在もAZPは継続しており、安定しているためステロイドを減量している。

《症例2》

46歳女性。20年前に眼病変で発症しTBLBでサルコイドーシスと診断された。その後5年前に一度ステロイド内服を開始したが、発汗、不眠、満月様

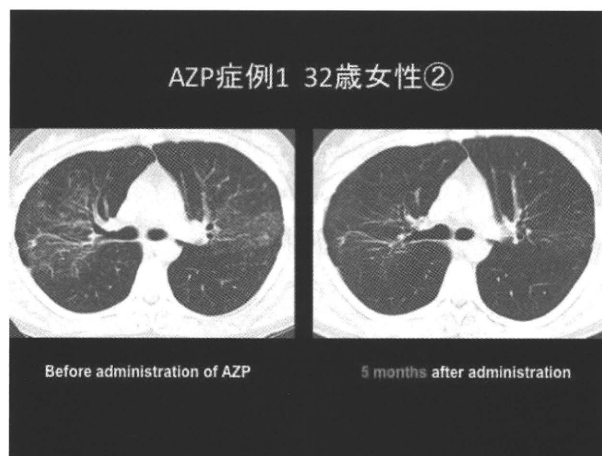


図4

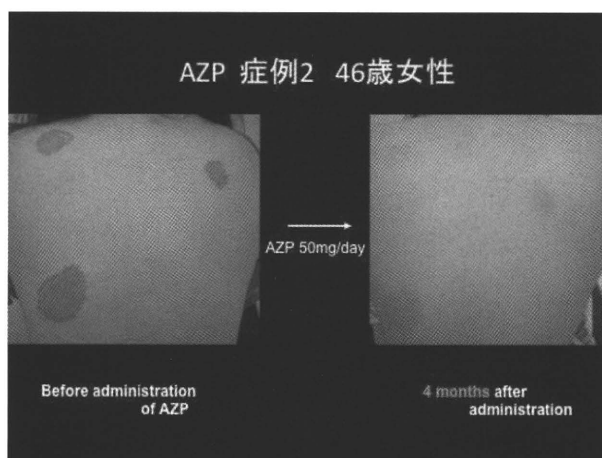


図5

顔貌などの副作用が強く内服を中止した。以後は肺野病変に対して1年に数回ステロイドミニパルス療法(125mg/day)を施行している。AZP50mg/dayを開始したところ肺野病変には変わらないものの内服開始後より皮膚の赤色隆起性の皮疹が改善。図5はAZP投与前と投与4ヶ月後の写真で背部の皮疹の改善がわかる。現在もAZPの内服は継続しており皮疹はほぼ消退している。

《症例3》

34歳男性。6年前に健診でBHLを指摘された。その後肺野病変や皮疹の増悪ありステロイド治療を2年前に開始された。ステロイド減量中に顔面や背中の皮疹の増悪あり、MTXを一時ステロイドに上乗せしたが肝機能障害が出現したため中止した。AZP 50mg/dayに免疫抑制剤を変更したところ2ヶ月後には皮疹の改善を認め始めた。図6はAZP投与前と投

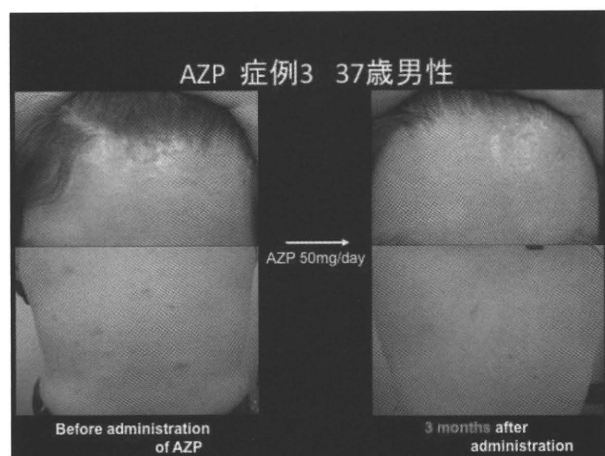


図6

与3ヶ月後の前額部および背部の写真でいずれも皮疹が改善している。現在もAZPは継続中でステロイドの減量を試みている。

## 【考 察】

安全性に関しては両薬剤ともに高いと言える。特にMTXは使用した55例において臨床的に重篤な副作用を認めた症例はなかった。肝機能障害が頻度として多かったが全て減量、中止で軽快しており定期的に血液検査で経過をみていけば安全に使用できると考えられた。AZPに関しては唯一200mg/日の高用量を投与した症例において骨髄抑制による発熱性好中球減少症をきたしG-CSF及び抗菌薬治療を要した。それ以外の症例は50mg/日あるいは100mg/日を投与されており頭痛や消化器症状を認めた症例はあったが、減量あるいは中止で軽快している。有効例は50mg/日で有効性を確認できており、低用量から開始し効果をみながら漸増して用量に留意しながら使用すれば比較的安全に使用できるものと思われる。

サルコイドーシスに対するMTXの有効性についてはR P Baughmanらから報告されており全体で66%の有効性を示し、臓器別にみても肺病変で47%、皮膚病変で97%など高い有効性を示したとされている<sup>2)</sup>。AZPに関しては慢性のサルコイドーシス症例11例に対してステロイドにAZPを併用したところ全例に臨床症状、胸部レントゲン、呼吸機能検査、血液生化学所見に改善を認めステロイド減量

に有効だったとの報告<sup>3)</sup>や、高用量ステロイドが奏効しなかったサルコイドーシス10例に対して少量ステロイドにAZPを併用したところ2例に胸部レントゲン所見及び呼吸機能に著明な改善を認め2例に短期的な改善とステロイド減量効果を認めたとの報告<sup>4)</sup>がある。

今回我々の研究ではMTXで19.2%、AZPで33.3%の症例に有効性がありサルコイドーシスに両薬剤が奏効する症例があることを示された。今回どのような症例において有効性が高いのかは不明であり、今後もその点に関しては検討が必要であろう。MTXにおいては従来からの報告ほどの有効性は示されなかったがこれは有効性の評価が困難なことも一因かもしれない。サルコイドーシスという疾患の性質上自然寛解がありうるということが有効性の評価を難しくしている。今回我々は各臓器病変に対して両薬剤を開始して明らかに改善した症例のみを有効例としたが、例えば各臓器病変が改善しないまでも安定しステロイドを減量できた症例を有効例とすれば有効率はもっと上がったであろう。またMTXでは有効例10例のうちMTXを単剤で投与した症例が7例であり、症例によってはステロイド併用でない単剤での使用が選択肢として考えられた。AZPに関しては有効例3例全てが50mg/日の比較的低用量での使用であり、低用量から開始して改善がなければ漸増していく投与方法が副作用の面からみても適していると思われる。また、AZP有効例3例のうち2例は過去にMTX投与歴がありMTXが奏効しない症例においてもAZPが奏効する可能性がある。

## 【結 論】

サルコイドーシスに対する免疫抑制剤の投与でMTXは10/52例、AZPは3/9例で有効性を示し両薬剤がサルコイドーシスに対して奏効する症例があることを示した。両薬剤は用量に留意しながら使用すれば日常臨床において比較的安全に使用できると思われる。どのような症例に有用性が高いのかは今後検討が必要であろう。

## 【参考文献】

- 1) 山口哲生：サルコイドーシスの診療ガイドラ

- イン呼吸 27:459-471,2008
- 2) R P Baughman, Lower EE: A clinical approach to the use of methotrexate for sarcoidosis. Thorax 54:742-746,1999
  - 3) J Muller-Querhneim, et al Treatment of chronic sarcoidosis with an azathioprine/prednisolone regimen Eur Respir J 14:1117-1122,1999
  - 4) Stephen J Lewis, et al Efficacy of Azathioprine as Second-line Treatment in Pulmonary Sarcoidosis SARCOIDOSIS VASCULITS AND DIFFUSE LUNG DISEASE 16:87-92,1999
  - 5) 田中健介, 山口哲生: メソトレキサート単剤治療が有効であったサルコイドーシスの2症例. 日サ会誌 30:9-13,2010

# プール試料を用いたサルコイドーシスのGWAS

山口 悦郎\*

近年アレイ技術によるゲノム関連解析(genome-wide association study, GWAS)が、疾患感受性遺伝子検索の新たな切り札として注目されている。サルコイドーシスに関しては、Hofmannらによって2008年にその第一報が発表されているが、日本人についても確認することが必要とされる。しかしそのためには多額の費用を要することが難点である。そこで今回日本人サルコイドーシスのプールしたDNA試料について、GWASを試みた。

対象は健常対照者128名、サルコイドーシス患者163名。それぞれの個体由来DNAを各群の中で等量用い、プール試料を作製した。対照プール試料は4検体、患者試料は3検体用意した。用いたアレイは、Illumina社のHuman610-Quad v1.0 DNA Analysis BeadChipである。

疑似アリル頻度を用いた $\chi^2$ 検定でp値が0.05未満を示したSNPを8289個見出した。GWASレベルで有意とされる $10^{-7}$ 未満( $10^{-8}$ レベル)のp値を呈したものは、全体で503個あった。その数を、それぞれの染色体での被検SNP数で割った比率をみると、やや変動があるが多くの染色体である程度の割合を有しており、サルコイドーシスの疾患感受性遺伝子はゲノム全域で広く分布している可能性が示唆された。しかし本法の真の有効性は、個別タイピングの結果を踏まえて評価する必要がある。

## GWAS in sarcoidosis by the use of pooled samples

Etsuro Yamaguchi

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

Genome-wide association study (GWAS) has been receiving attention as a new master card for a searching method of disease susceptibility genes. The first GWAS report for sarcoidosis was published by Hofman and colleagues in 2008. Though replication study is needed for Japanese patients, high economic burden is a great concern. To circumvent this problem, we conducted GWAS using pooled samples.

The study subjects were 128 control subjects and 163 patients with sarcoidosis. Pooled DNA samples for each group were prepared by adding equal amount of DNA from individual subjects. Quadruplicated and triplicate samples were prepared for controls and patients, respectively. We used Human610-Quad v1.0 DNA Analysis BeadChip (Illumina) as a SNP array.

We found 8289 SNPs which had a p value less than 0.05 by  $\chi^2$  test for simulated allele frequency. A total of 503 SNPs had a p value less than  $10^{-7}$  which corresponded to the significant value for GWAS. The percentages of such SNPs among SNPs examined for each chromosome were relatively constant for all the chromosomes, indicating broad distribution of susceptibility genes through the genome. Verification of the validity of current method awaits results of individual typing for each SNP.

## はじめに

サルコイドーシスの疾患感受性遺伝子探索の努力は、今日に至るまで長く続けられている。もっとも古くはHLAとの相関に始まり<sup>1,2)</sup>、候補遺伝子のSNPマーカーによる関連研究<sup>3-5)</sup>に次いで、ゲノムスキャンが行われた<sup>6,7)</sup>。ゲノムスキャン結果の追認は必ずしも成功していないところで、さらに多くのマーカーによる検索手法が求められていた。それに対応するのが、急速な進歩を遂げたアレイ技術によるゲノム関連解析(genome-wide association study, GWAS)である。サルコイドー시스に関しては、Hofmannらによって2008年にその第一報が報告された<sup>8)</sup>。これまで疾患感受性遺伝子には、人種差があることが広く認められており、日本人についても確認することが求められる。しかしそのためには多額の費用を要することが難点である。

一方で、疾患感受性遺伝子探索には多数検体が必要であり、その遺伝子タイピングは手間と費用がかかる欠点に鑑み、多数検体を対照あるいは疾患群でひとまとめとするプール試料として解析する方法が有用であることが古くから報告されている<sup>9,10)</sup>。そこで今回日本人サルコイドーシスのDNA試料について、そのような解析を試みた。

## 対象・方法

対象は健常者128名、サルコイドー시스患者163名。それぞれの個体由来DNAを各群の中で等量用い、かつ各群合わせて3.5 μgとなるようにDNA量を調整して分注し、プール試料を作製した。対照プール試料は4検体、患者試料は3検体用意した。用いたアレイは、Illumina社のHuman610-Quad v1.0 DNA Analysis BeadChipである。アレイとハイブリダイズ後、得られた蛍光データのうち、健常者、サルコイドー시스患者ともに一定以上の蛍光強度がある一塩基多型(SNP)を約59万選択した。次いでゲノム全域ではSNPの2つのアレル頻度はほぼ同じと仮定し、それぞれの蛍光強度を補正した。その蛍光強度は、それぞれのアレル頻度の代替情報になると見なし、

対照群、患者群それぞれの疑似アレル頻度を各SNPについて計算した。それから $\chi^2$ 値を求めて $\chi^2$ 検定によるp値を各SNPについて計算した。

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、本学医学部の倫理委員会により承認されている。すべての試料は被験者に対して文書による説明の上、同意を得て採取した。

## 結 果

$\chi^2$ 検定でp値が0.05未満を示したSNPを8289個見出した。-log p値の分布を、染色体別に表示するManhattan plotを図1に示す。また-log p値を範囲、あるいは特定の値に分けて、染色体別に表示したものを図2に示す。GWASレベルで有意とされる $10^{-7}$ 未満( $10^{-8}$ レベル)のp値を呈したものは、全体で503個あった。染色体別では、第6、第2、第9、第4、第5、第1染色体の順であった。しかしその数を、それぞれの染色体での被検SNP数で割った比率をみると(図3)、やや変動があるが多くの染色体である程度の割合を示しており、サルコイドーシスの疾患感受性遺伝子はゲノム全域で広く分布している可能性が示唆された。

## 考 案

今回日本人サルコイドーシスの疾患感受性遺伝子スクリーニングするために、プール試料を用いたGWASを試行した。プール試料であるため、遺伝子型を求めることは原理的に不可能であり、本法の妥当性は、各アレルに対応する反応シグナルすなわち蛍光強度が、集団としてのアレル頻度を大筋において反映するであろうとの仮定に依存している。予備的な検討では、単純にアレル蛍光強度比の患者群と対照群との比が大きいSNPを選択し、個別タイピングを行ったが、必ずしも低いp値が得られなかった。それは一方のアレル頻度が相当低いと他方のアレルとの比が大きくなるが、それは必ずしも正確ではなかったり、 $\chi^2$ 検定で低いp値につながらない場合があるためである。そこで今回は疑似アレル頻度を算出し、疑似 $\chi^2$ 値を求めてp値を計算した。それがどの程度実際を反映しているかは、今後個別にタイピングを行って確かめる必要がある。

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

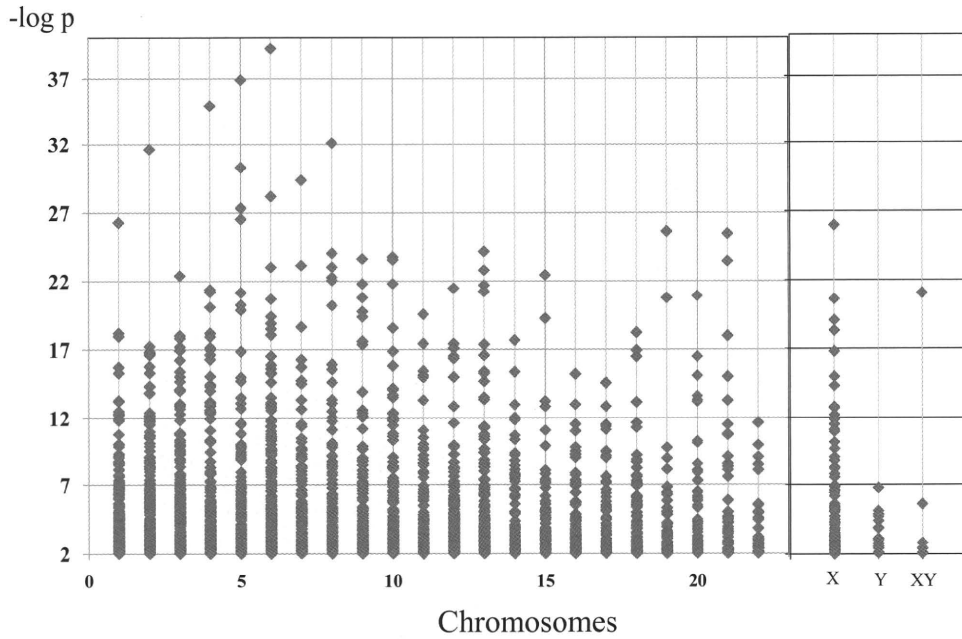


図1：サルコイドーシス患者GWASのManhattan plot

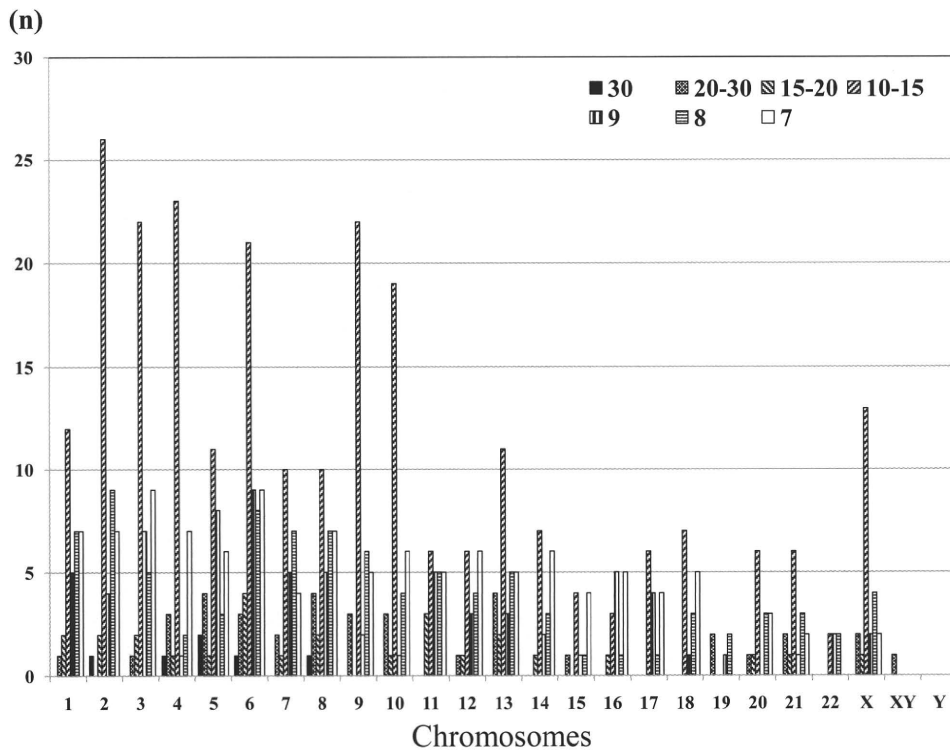


図2：染色体別の -log p 分布  
 30,  $-\log p \geq 30$ ; 20-30,  $30 > -\log p \geq 20$ ; 15-20,  $20 > -\log p \geq 15$ ; 10-15,  $15 > -\log p \geq 10$ ; 9,  $10 > -\log p \geq 9$ ;  
 8,  $9 > -\log p \geq 8$ ; 7,  $8 > -\log p \geq 7$

GWASで有意とされるp値は一般に $5 \times 10^{-8}$ 未満とされている。今回の検討は候補SNPのスクリーニングが目的であり、このp値を採用する必然性はないと思われる。しかし仮にそれを採用したところ、

この危険率におよそ該当する $-\log p$ 値が7以上を示すSNPは503個も存在した。しかもそのようなSNPは多くの染色体に分散しており、疾患感受性遺伝子は多様でゲノムに広く分布していることを示唆す

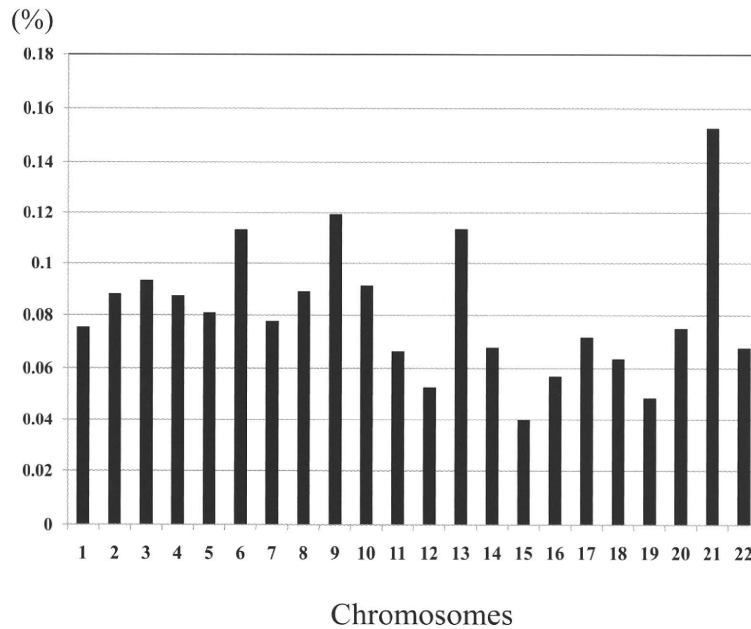


図3：各染色体の被検SNPに占める -log p が7を越えるSNPの割合  
(X染色体, Y染色体については該当SNPの数が少ないので非提示)

る。しかしこれも個別タイピングでの確認が必要である。今回の試行の有効性が示されたなら、GWASの第一段階スクリーニング法として、今後広い応用可能性がある。

## 文 献

- 1) Kunikane, H. Abe, S. Tsuneta, et al. Role of HLA-DR antigens in Japanese patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 135: 688-91, 1987.
- 2) Ishihara M, Ohno S, Ishida T, et al. Molecular genetic studies of HLA class II alleles in sarcoidosis. *Tissue Antigens* 43:238-41, 1988.
- 3) Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, et al. The role of the C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism V64I (CCR2-64I) in sarcoidosis in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* 159:2021-3, 1999.
- 4) Yamaguchi E, Itoh A, Hizawa N, et al. The gene polymorphism of tumor necrosis factor-beta, but not that of tumor necrosis factor-alpha, is associated with the prognosis of sarcoidosis. *Chest* 119:753-61, 1999.
- 5) Zhou Y, Yamaguchi E, Hizawa N, et al. Roles of functional polymorphisms in the interleukin-18 genepromoter in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 22:105-113, 2001.
- 6) Valentonyte R, Hampe J, Huse K, et al. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet* 37:357-64, 2005.
- 7) Nguyen T, Liu XK, Zhang Y, et al. BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J Immunol* 176:7354-60, 2006.
- 8) Hofmann S, Franke A, Fischer A, et al. Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. *Nat Genet* 40:1103-6, 2008.
- 9) Arnheim N, Strange C, Erlich H. Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: studies of the HLA class II loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6970-4, 1982.
- 10) Macgregor S, Zhao Z, Henders A, et al. Highly cost-efficient genome-wide association studies using DNA pools and dense SNP arrays. *Nucleic Acids Res* 36: e35, 2008.

# サルコイドーシス病変部における *Propionibacterium acnes* の検出と局在の検討

根木真理子<sup>1</sup> 内田 佳介<sup>1</sup> 古川あすか<sup>1</sup> 鈴木 好美<sup>1</sup> 峰岸 佳菜<sup>1</sup>  
萬 巴里子<sup>1</sup> 田村 友樹<sup>1</sup> 中村 輝子<sup>1</sup> 中野 翼<sup>1</sup> 飯田 忠恒<sup>1</sup>  
天野 与稔<sup>1</sup> 武村 民子<sup>2</sup> 江石 義信<sup>1\*</sup>

**【目的】** サルコイドーシス(サ症)は原因不明の全身性肉芽腫性疾患である。一方、*Propionibacterium acnes*はこれまで、培養や定量的PCR、ISHなどでサ症病変部から菌体成分が確認できた唯一の細菌である。我々は*P. acnes*特異的モノクローナル抗体(PAB抗体)を用い、肺を主体としたサルコイドーシス罹患臓器における本菌の検出頻度と局在について検討し、PAB抗体免疫染色法の病因的・診断的価値に関して評価を行った。

**【方法】** サ症と診断された肺(23例)、縦隔リンパ節(40例)など胸郭内病変に加え、胸郭外サ症として表在リンパ節(33例)・皮膚(23例)・脾(6例)・神経(6例)・心(6例)・筋(7例)の計144検体を用い、対照検体(計188例)と共に、ホルマリン固定パラフィン切片において免疫染色法で解析した。

**【結果】** サ症肉芽腫内にPAB抗体陽性像が認められた症例は、肺17例(74%)、縦隔リンパ節35例(88%)、表在リンパ節29例(88%)、皮膚19例(83%)、脾5例(83%)、神経6例(100%)、心5例(83%)、筋7例(100%)であった。また肉芽腫以外に、肺では、サ症検体の肺胞内マクロファージに陽性像が12例(52%)、対照検体では散在性に12例(24%)に認められた。気道上皮内にもサ症検体の7例(30%)、対照検体では5例(16%)で陽性が認められた。リンパ節では、サ症検体の傍皮質領域に18例(25%)、対照疾患では4例(5%)に陽性を認めた。リンパ洞内のHW小体にサ症検体の39例(53%)に、対照検体の5例(7%)の陽性を認めた。しかしながら肺やリンパ節以外の臓器では、対照検体における陽性像はまったく認められなかった。

**【考察】** PAB抗体はサ症肉芽腫内に高い陽性率を示し診断的価値が高いと考える。外界から直接*P. acnes*に暴露される肺およびリンパ節で対照においても低率ながら陽性となることから、同部位での*P. acnes*の潜伏感染が示唆された。

<sup>1</sup> 東京医科歯科大学人体病理学分野

<sup>2</sup> 日赤医療センター病理部放射線科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

## Frequency and localization of *Propionibacterium acnes* in sarcoid granulomas

Mariko Negi<sup>1</sup>, Keisuke Uchida<sup>1</sup>, Asuka Furukawa<sup>1</sup>, Yoshimi Suzuki<sup>1</sup>, Kana Minegishi<sup>1</sup>,  
Pariko Yorozu<sup>1</sup>, Tomoki Tamura<sup>1</sup>, Teruko Nakamura<sup>1</sup>, Tsubasa Nakano<sup>1</sup>, Tadatsune Iida<sup>1</sup>,  
Tomonari Amano<sup>1</sup>, Tamiko Takemura<sup>2</sup>, and Yoshinobu Eishi<sup>1</sup>

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

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

**[Background]** The causes of sarcoidosis are not known. *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 novel *P. acnes*-specific antibody (PAB antibody) that react with cell-membrane-bound lipoteichoic acid, respectively.

**[Material and methods]** We examined formalin-fixed and paraffin-embedded biopsy and surgical samples from affected organs (23 samples of lung, 73 of lymph node, 24 of skin, 6 of spleen, 7 of central nervous tissue, 6 of heart, and 7 of skeletal muscle) of 144 patients with sarcoidosis, together with corresponding control samples from 188 patients with diseases other than sarcoidosis.

**[Results]** By immunohistochemistry, small round bodies were found in sarcoid granulomas by PAB antibody in 17(74%) samples from lung, 64(88%) from lymph nodes, 19(83%) from skin, 5(83%) from spleen, 6(100%) from central nervous tissue, 5(83%) from heart, and 7(100%) from skeletal muscle. Alveolar macrophage with many PAB-positive small-round bodies was abundant in 12 (53%) of sarcoid lung samples and scattered in 12 (24%) of control lung samples. Respiratory epithelium with a few large round bodies detected by PAB antibody was scattered in 7 (30%) of sarcoid lung samples and in 5 (16%) of control lung samples. In 18 (25%) of sarcoid lymph nodes, macrophages with many PAB-positive small-round bodies were clustered in lymphatic parenchyma coexisting with sarcoid granulomas although such macrophages were also detected in 4 (5%) of control lymph nodes. Macrophages with variable-sized bodies detected by both PAB antibody were found in 39 (53%) of sarcoid lymph nodes and 5 (7%) of control lymph nodes. None of reactivity was found by PAB antibody in all control samples from skin, spleen, central nervous tissue, heart, and skeletal muscle.

**[Discussion]** These results suggest that sarcoid granulomas may be formed by immune response against this indigenous bacterium. Detection of *P. acnes* in some control samples may suggest latent infection in the lungs and lymph nodes.

表1 検体の属性

サルコイドーシス		対照疾患			
縦隔内臓器	肺	23例	肺結核	12例	全51例
			過敏性肺炎	8例	
			膠原病関連肺炎	7例	
			特発性間質性肺炎	6例	
			肺癌正常部	18例	
縦隔リンパ節	40例	肺癌非転移所属リンパ節	18例		
		リンパ節結核	3例		
縦隔外臓器	表在リンパ節	33例	リンパ節結核	17例	
			壊死性リンパ節炎	11例	
			反応性リンパ節腫大	26例	
	皮膚	23例	酒さ	7例	全22例
			結節性紅斑	6例	
			Bazin硬結性紅斑	2例	
			ハンセン病	2例	
			顔面播種状粟粒性狼瘡(LMDF)他	5例	
	脾	6例	胃癌手術時に摘出された脾臓	10例	
	脳・神経	6例	てんかん	10例	
心臓	6例	拡張型心筋症	10例		
筋肉	7例	正常横紋筋	10例		

## 【はじめに】

サルコイドーシス(サ症)は肺や眼, 心臓, 皮膚, リンパ節などに非乾酪壊死性の類上皮細胞肉芽腫を形成する全身性肉芽腫疾患である. 肉芽腫は何らかの抗原により惹起されたTh1型過敏性免疫応答であるが<sup>1,2)</sup>, サ症は何らかの疾病素因を有する宿主におけるサ症起因体に対する過敏性免疫反応として発症するものと考えられている. この抗原としては, 培養<sup>3)</sup>や定量的PCR<sup>4)</sup>, ISH<sup>5)</sup>などでサ症病変部から菌体成分が確認できた唯一の細菌である *Propionibacterium acnes*(*P. acnes*)が想定されている<sup>6)</sup>. *P. acnes*感染とサ症の関連について検討するため, 本研究室で作成した *P. acnes* 特異的モノクローナル抗体(PAB抗体)を用い諸臓器のサ症病変部組織における本菌の検出頻度と局在について検討を行った.

## 【材 料】

本研究には東京医科歯科大学附属病院において診断されたサ症と表1に示すような他疾患群から採取された検体のホルマリン固定パラフィン切片を用いた.

## 【方 法】

1. *P. acnes*特異的モノクローナル抗体(PAB抗体)作製

超音波破碎させた *P. acnes* の菌体を免疫原とし,

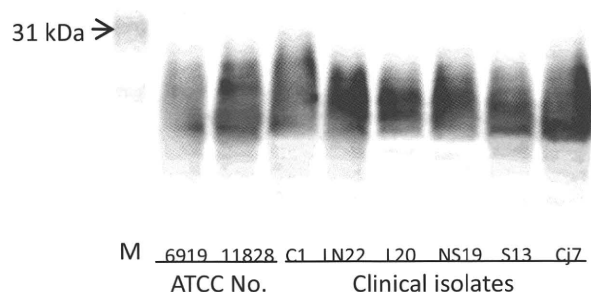


図1 PAB抗体を用いた Western blotting

感作免疫させたマウスの脾細胞を採取し, 骨髄腫細胞とのハイブリドーマを作製した. スクリーニングは抗 *P. acnes* 抗体産生のハイブリドーマに, 免疫原に使用した抗原でELISA法を行った. さらに陽性を示したハイブリドーマを, *P. acnes*を感染させたラットの肝臓のホルマリン固定パラフィン切片上での免疫染色で染色強度の高い抗体を選別した. 最終的にヒト組織切片に対し最も特異的に反応した抗体を産生するハイブリドーマを選別し, 限界希釈法で2度クローニングを行い, SCIDマウスの腹腔内に単一のハイブリドーマクローンを移植し, 1-2週間後に採取した腹水を未精製のモノクローナル抗体原液とした. 得られたモノクローナル抗体は, Western blotting法にて *P. acnes* の細胞壁を貫通する脂質の一種であるリポテイコ酸に特異的であることを確認した(図1).

## 2. 免疫染色

3μmに薄切した組織標本をマイクロウェーブ処理(99℃, 60分), 内因性ペルオキシダーゼ処理(室温10分)後, R.T.U. NORMAL HORSE SERUM (Vectastain Universal Elite ABC Kit; Vector Laboratories社)でブロッキングし(室温30分), 1次抗体:PAB抗体(15,000倍希釈)をかけ室温一晚反応させた。二次抗体反応としてR.T.U. BIOTINYLATED UNIVERSAL ANTI RABBIT/ Mouse IgGを用い, 室温にて30分反応させた。VECTASTAIN R.T.U. Elite ABC REAGENTをかけ室温にて30分反応後, ヒストファイン シンプルステインDAB溶液(ニチレイバイオサイエンス社)を用いて発色させた。マイヤー・ヘマトキシリンにて核染色後, 水洗, 脱水, 透徹し, 封入した。光学顕微鏡下(倍率400倍)にて観察し, 全視野中に陽性細胞が1つでも認められる場合をPAB陽性群, 1つも陽性細胞がない場合をPAB陰性群とした。

## 3. 免疫二重染色

リンパ節を用い, *P. acnes* 陽性細胞の貪食細胞内同定を行った。同定に用いた抗体はマクロファージに対する抗ヒトCD68抗体(KP-1;DAKO), 樹状細胞に対する抗ヒトFascin抗体(55K-2;DAKO)を用いた。2μmの組織切片を脱パラフィンし, マイクロウェーブ処理(99℃, 60分)を行った。正常ウマ血清でブロッキングを行った後, PAB抗体(15,000倍希釈)を室温で30分反応させた。二次抗体反応は前述と同様に行った。次にfluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated streptavidin (DAKO)と室温で30分後, 遮光して反応させた。再びマイクロウェーブで20分処理したあと, 適切な希釈倍率の抗体(CD 68抗体;1:8000, fascin抗体;1:100)を室温, 一晚反応させた。次に, tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)標識二次抗体(DAKO)を室温で30分間, 遮光して反応させた。最後に蛍光抗体用の封入剤(DAKO)で封入し, 蛍光顕微鏡BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan)にて観察, 撮影を行った。

## 【結果】

### 1. 免疫染色

肺における免疫染色ではサ症の74%の症例で肉芽腫に, その周囲の炎症巣の83%にPAB抗体が陽

表1-1 肺における免疫染色の結果

疾患名	N	各部位にPAB抗体で陽性を認めた症例数(%)			
		肉芽腫内	炎症巣	肺胞内マクロファージ	気道上皮
サルコイドーシス	23	17 (74%)	19 (83%)	12 (53%)	7 (30%)
結核	12	0	0	3 (25%)	1 (8%)
間質性肺炎	21	—	0	2 (11%)	0
肺癌	18	—	—	7 (39%)	4 (17%)

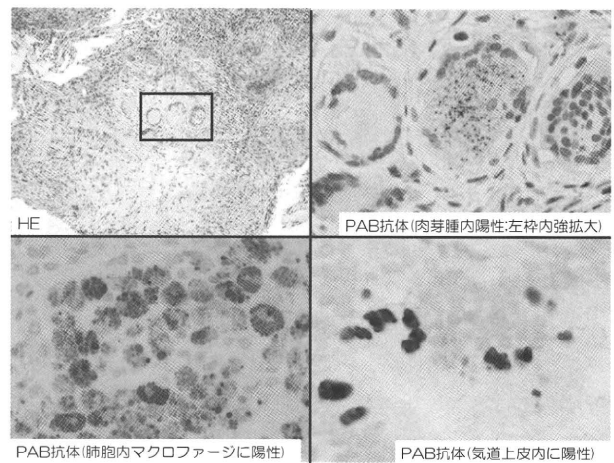


図1-1 サ症(肺)における免疫染色像

表1-2 リンパ節における免疫染色の結果

疾患名	N	各部位にPAB抗体で陽性を認めた症例数(%)		
		肉芽腫内	リンパ洞内(HW小体)	傍皮質領域
縦隔リンパ節	サルコイドーシス	35 (88%)	25 (63%)	13 (33%)
	リンパ節結核	0	0	0
	肺癌所属リンパ節	—	1 (6%)	0
末梢リンパ節	サルコイドーシス	29 (88%)	14 (42%)	5 (15%)
	リンパ節結核	0	2 (12%)	2 (12%)
	反応性腫大	—	2 (8%)	2 (8%)
	壊死性リンパ節炎	11	—	0

性となった。結核の肉芽腫には染まらなかった。またサ症では半数の症例で肺胞内マクロファージに陽性となり, 30%の症例で一部の気道上皮内に陽性となった。次に, 対照群においては, 気道上皮内やマクロファージ内にもサ症患者よりは低率ながらも一部で陽性となった。(表1-1, 図1-1)

次に, リンパ節の結果を示す(表1-2, 図1-2)。サ

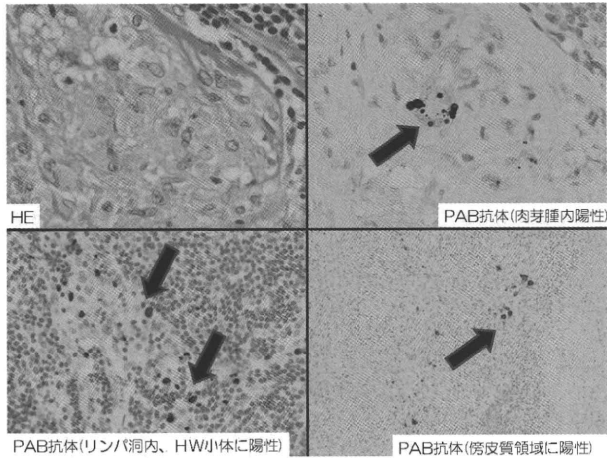


図1-2 サ症(リンパ節)における免疫染色像

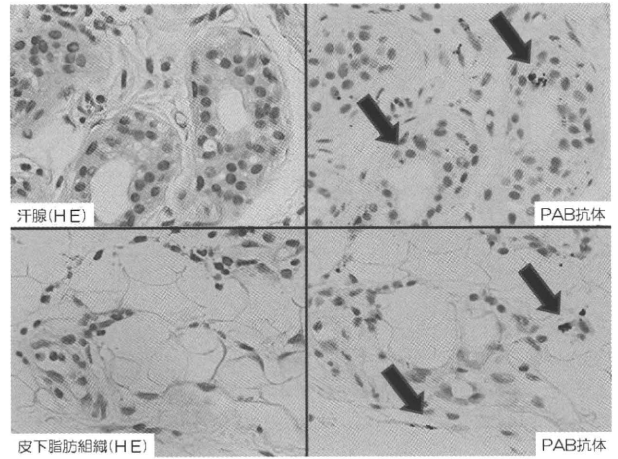


図1-4 サ症(皮膚)の肉芽腫以外の陽性像

表1-3 皮膚における免疫染色の結果

疾患名	N	各部位にPAB抗体で陽性を認めた症例数(%)			
		肉芽腫内	炎症巣	汗腺・脂肪	全体
サルコイドーシス	23	19 (83%)	16 (70%)	2 (9%)	20 (87%)
その他の肉芽腫を有する疾患					
酒さ	7	0	0	0	0
結節性紅斑	3	0	0	0	0
Bazin 硬結性紅斑	2	0	0	0	0
ハンセン病	2	0	0	0	0
LMDF その他	5	0	0	0	0

表1-4 その他の臓器における免疫染色の結果

臓器名	N	サルコイドーシス		対照疾患	
		肉芽腫内の陽性検体数(%)	血管・脂肪組織の陽性数(%)	N	陽性数(%)
脾臓	6	5 (83%)	3 (50%)	10	0
脳・神経	6	6 (100%)	1 (17%)	10	0
心臓	6	5 (83%)	0	10	0
筋肉	7	7 (100%)	1 (14%)	10	0

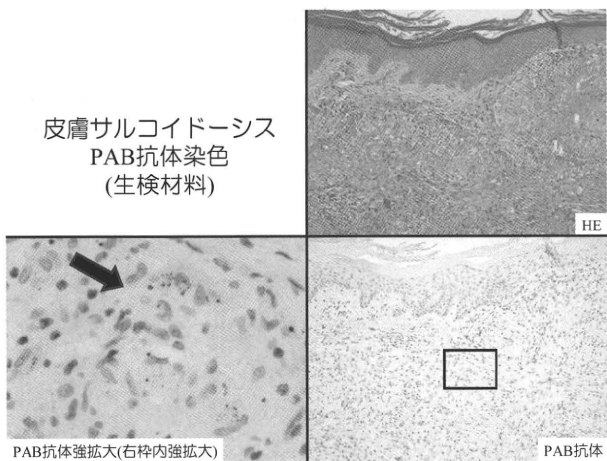


図1-3 サ症(皮膚)の免疫染色像

症リンパ節では、縦隔、末梢いずれにおいても、肉芽腫内に約90%の症例で陽性となる。結核の肉芽腫にはPABは染まらない。肉芽腫以外の部位で、リンパ洞内のHW小体や傍皮質領域に陽性細胞が散見され、なかでもサ症の縦隔内リンパ節では他と比

べて陽性率が高い傾向が見られた。

皮膚においては、サ症では83%の症例の肉芽腫内に、周囲の炎症巣にも70%の症例で陽性となった他(表1-3, 図1-3), 汗腺や脂肪組織にも一部で陽性となった(図1-4)。それに対し、その他の肉芽腫を有する皮膚疾患では、肉芽腫を含むすべての部位に陰性であった。

最後に、症例数は少ないがサ症発症頻度が比較的まれな臓器である、脾臓、脳神経、心臓、筋肉についても示す(表1-4)。サ症の肉芽腫内には80%以上の症例で陽性となり、肉芽腫以外にも、血管や脂肪にも陽性となる部分を認めた(図1-5)。対照群においては、すべて陰性であった。

以上の免疫染色の結果のまとめを表1-5に示す。

まず、いずれの臓器においても PAB 抗体はサ症肉芽腫に高い陽性率を示した。サ症患者検体においては、肉芽腫以外にも、肺における気道上皮や肺胞内マクロファージ、リンパ節、とりわけ縦隔リンパ節におけるHW小体や傍皮質領域のマクロファージ

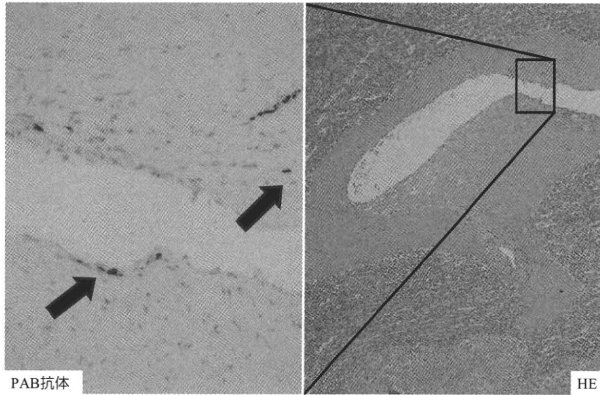


図1-5 脾動脈の血管平滑筋・内皮細胞に陽性

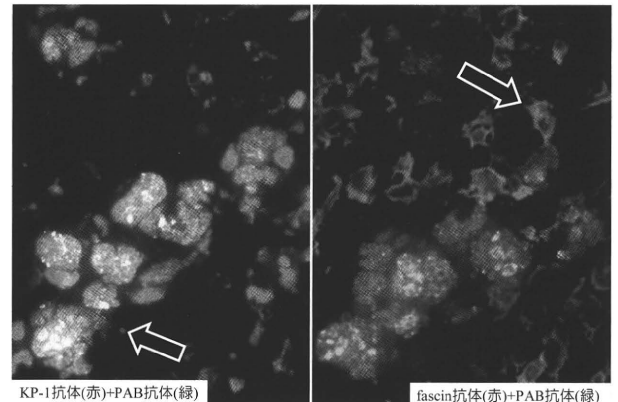


図2-1 PAB抗体のリンパ節傍皮質領域内マクロファージ内陽性像(蛍光二重染色)

表1-5 免疫染色の結果のまとめ

臓器別	N	サ症患者の検体中で PAB抗体の肉芽腫内陽性数(%)	N	非サ症患者の PAB抗体の陽性数(%)
肺	23	17 (74%)	44	13 (30%)
リンパ節	73	64 (88%)	75	7 (9%)
皮膚	23	19 (83%)	22	0
脾	6	5 (83%)	10	0
脳・神経	6	6 (100%)	10	0
心臓	6	5 (83%)	10	0
筋肉	7	7 (100%)	10	0

には、陽性となる頻度が高いことがわかった。それに対し、非サ症患者においては、肉芽腫以外の部位において、肺やリンパ節に低率ながら陽性を示す部位を認めた。それ以外の臓器においては、非サ症患者では陰性となった。

## 2. 免疫二重染色

図2-1の左の写真では、サ症リンパ節の傍皮質内において、KP-1抗体で染色されるマクロファージ内にPAB陽性像が顆粒状に存在することが分かる。右の写真では、fascin抗体で染色される樹状細胞のなかには、PAB陽性の顆粒は存在しないことが分かる。

同様に、図2-2では、リンパ洞内においては、HW小体内に充満するPAB陽性像がマクロファージ内に取り囲まれるようにして存在することが左の写真から分かる。右の写真が示すように、樹状細胞のなかにPAB陽性のHW小体は存在しない。

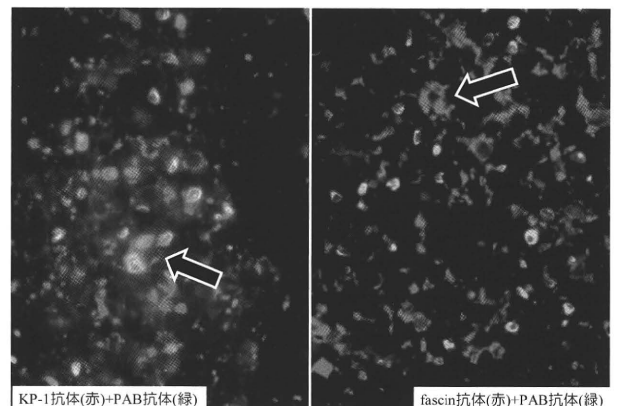


図2-2 PAB抗体のリンパ節のリンパ洞内マクロファージ内陽性像(蛍光二重染色)

## 【考 察】

本抗体はサ症肉芽腫で7-8割以上という高い陽性率を示した。肺やリンパ節だけでなく、全身の諸臓器のサ症肉芽腫においても、同様の頻度で検出された。本抗体は結核をはじめとした他の肉芽腫性疾患には陰性であり、サ症の診断的価値が高いと考える。

肺サ症肉芽腫内に2割程度検出されなかったことについては、以下の可能性があると考えられる。第一に、肉芽腫形成の原因菌が異なっている可能性がある。以前我々は、サ症のリンパ節に定量的PCRを施行し、15例中12例から*P. acnes*を多量に検出したが、*P. acnes*が検出できなかった3例いずれからも*P. granulosum*(*P. acnes*同様に皮膚に常在する近縁種)由来のDNAを検出したと報告しており<sup>4)</sup>、頻度は少ないながらも*P. acnes*以外の菌による発症の経路も考えうる。欧米では結核が根強く支持されているが、サ症に伝染性はなく、また結核菌がサ症病変部から

培養されることもない。第二には、採取された検体の肉芽腫は、病理学的に幼若なものから線維化の目立つものまで新旧混在していたため、肉芽腫内に捉えられた菌体成分が処理されてしまったものが含まれており、一部は検出されなかった可能性がある。

また、肺やリンパ節については、肉芽腫以外の部位、例えば、肉芽腫周囲の炎症巣や、気道上皮内、肺胞/リンパ洞内/傍皮質領域マクロファージにPABが少量陽性となった。これらの部位には対照疾患の検体にもサ症検体よりは低率ながら陽性となる像がみられた。これらのことから、外界から直接*P. acnes*に暴露される部位である肺およびリンパ節には、*P. acnes*の潜伏感染が示唆された。

さらに、サ症の患者検体では、肺・リンパ節以外の臓器においても、病変部以外の末梢の血管や間質組織内に*P. acnes*が陽性となった。古川らは、*P. acnes*の2種類のserotypeのうち、type I分離株の約7割が細胞侵入能を有すると報告しており<sup>7)</sup>、今回免疫組織化学的にもその現象が確認できた。血管壁に*P. acnes*陽性細胞が見られることは、肉芽腫病変がしばしば血管壁に観察されることとも関連し、血管壁から組織内に侵入した*P. acnes*のうちの一部は過剰な免疫応答の結果、侵入部位で肉芽腫を形成している可能性が示唆される。

PAB抗体とマクロファージとの蛍光二重染色において、リンパ節傍皮質領域およびリンパ洞内のマクロファージ内にPABは陽性となることが確認できた。樹状細胞内には陰性であった。これらの結果から、体内に侵入した*P. acnes*はマクロファージに捕捉され、一部はリンパ洞内に潜伏感染の状態として観察され(HW小体と考えられる)、一部は活発な免疫応答が起こるリンパ節の傍皮質領域へと移動することが予測される。つまり、*P. acnes*の潜伏感染には、マクロファージや血管内皮細胞などに受動的に捕捉される場合と、気道上皮などに能動的に侵入する場合のいずれかあるいは両方が関わっていることが推測される。

肺・リンパ節以外の臓器では、潜伏感染の像は非サ症患者では全く見られない。肺・リンパ節において潜伏感染した微量の*P. acnes*は、血行性に全身に散布されることが予測されるが、サ症においては末梢の組織に侵入したあとマクロファージに処理されることなく、そこで再度潜伏感染の状態となると推

測される。非サ症においてはすぐにマクロファージに処理されてしまい、肺・リンパ節以外の部位での潜伏感染は成立しないことが予測される。

肉芽腫病変が起こりやすい臓器・部位と、潜伏感染が確認できる臓器・部位とは一致しており、「潜伏感染していた*P. acnes*が内因性活性化により細胞内増殖し、肉芽腫の形成を引き起こす」という我々の仮説を支持するものである。なにより、生体が体内から異物を隔離しようと形成した肉芽腫内に*P. acnes*の菌体を確認できうることは、本菌が肉芽腫形成に積極的に関与しているということの強い証拠となりうる。

#### 【参考文献】

- 1) C. Agostini et al. Alveolar Macrophage – T Cell Interactions During Th1-type Sarcoid Inflammation. *Microscopy research and technique*. 2001; 53:278-287.
- 2) 杉山幸比古ら. サルコイド肉芽腫の成因機序 サイトカイン・ケモカインの関与. *日本臨床* 2002; 9:1728-1733.
- 3) Abe C et al. Frequent isolation of *Propionibacterium acnes* from sarcoidosis lymph nodes. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]* 1984; 256:541-547.
- 4) Ishige I et al. Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet*. 1999; 354:120-123.
- 5) Yamada T et al. In situ localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalyzed reporter deposition. *Journal of Pathology* 2003; 198:541-547.
- 6) 江石義信. サルコイドーシスの成因論 成因にかかわる候補起因为体研究の最新動向. *日本臨床* 2002; 9:1688-1696.
- 7) Furukawa A et al. Characterization of *Propionibacterium acnes* isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues with special reference to cell invasiveness, serotype, and trigger factor gene polymorphism. *Microbial Pathogenesis*. 2009; 46:80-87.

# サルコイドーシス症例における 末梢血樹状細胞サブセットの解析

林 ゆめ子 端 みつ美 石井 芳樹\*

【背景】末梢血中の樹状細胞(dendritic cell:DC)は、主に myeloid DC(mDC)と plasmacytoid DC(pDC)に分けられる、近年、mDCの中にTh1を誘導するmDC1と、Th2を誘導するmDC2の2つのサブセットが存在することが分かってきたが、疾患におけるmDC1、mDC2の動態については明らかでない。【目的】Th1優位な病態とされるサルコイドーシスにおいて、末梢血中のDCサブセット; mDC(mDC1, mDC2)とpDCを解析した。比較のため、Th2優位と考えられるアトピー症例および健常者についても同様に検討した。【方法】未治療のサルコイドーシス症例、アトピー症例、健常者から末梢血を採取し、全血を各種表面抗原に対する抗体で処理した後溶血しFACSで解析した。mDC1, mDC2, pDCのマーカールにはそれぞれCD1a, BDCA3, CD123を用いた。【結果】サルコイドーシス症例ではmDC, pDCともに細胞数が有意に低下していた。また、健常者と比較し、mDC1が優位な傾向を認めた。一方アトピー症例では、有意にmDC2が増加していた。【結論】サルコイドーシス症例の末梢血のDC数は低下していた。mDC1/mDC2バランスがTh1/Th2バランスを反映していると考えられた。

## Analysis of circulating blood dendritic cell subsets in sarcoidosis

Yumeko Hayashi, Mitsumi Hata, Yoshiki Ishii

*Dokkyo Medical University  
Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology*

### 【Background】

Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cell and play a crucial role in initiation and modulation of specific immune response. Circulating DCs are divided in two subsets; myeloid DC (mDC) and plasmacytoid DC (pDC). Recent studies showed that there are another two subsets in mDC, mDC1 which induce Th1, and mDC2 which induce Th2. It is not well known the distribution and role of them in morbidity.

### 【Objective】

To analyze the subsets of circulating blood DC in patients with non-treated sarcoidosis compared with normal controls and patients with non-treated atopic disease.

### 【Methods】

Circulating DC subsets were identified by staining with cocktail of mAbs against CD1a (mDC1), blood dendritic cell antigen 3(BDCA3), CD123(pDC) and isotype-matched control antibodies. Cell count of mDC, pDC, mDC1, and mDC2 were analyzed by using a FACSCalibur™ flow cytometer.

### 【Result】

In sarcoidosis, the number of mDC was significantly decreased. mDC1/mDC2 balance tended to shift to mDC1 dominant in sarcoidosis while mDC2 was significantly increased in atopic patients.

### 【Conclusion】

Circulating DCs count was decreased in sarcoidosis. It is suggested that mDC1/mDC2 balance in peripheral blood may reflect the Th1-/Th2 immunity.