

背景

過敏性肺炎は種々の吸入抗原により引き起こされるアレルギー性肺炎である。過敏性肺炎は発症形式により急性と慢性に分けられる。さらに慢性過敏性肺炎は原因抗原の吸入によって急性症状を繰り返し、次第に症状が減弱し肺線維化をきたす再燃症状軽減型と、急性症状がなく労作時呼吸困難と咳嗽だけの症例や健診で発見される潜在性発症型に亜分類される。その病理組織像は特発性間質性肺炎 (IIPs) と同様、unusual interstitial pneumonia (UIP) パターン、fibrotic nonspecific interstitial pneumonia (fNSIP) パターン、cellular nonspecific interstitial pneumonia (cNSIP) パターン、organizing pneumonia (OP) パターンに分類される¹⁾。UIPパターンは潜在性発症型に多く、急性増悪のリスクとなることが報告されている²⁾。

体液のプロテオミクス解析はバイオマーカーの検索に有用な方法である。BALFは肺胞被覆液を正確に反映する体液であり、気管支鏡検査の一つとして日常的に広く行われている。そのBALFを用いたプロテオミクス解析により発現している蛋白の変化や違いから病態に関わる重要な情報が得られる。過去にサルコイドーシス、特発性肺線維症 (IPF)、喘息、慢性閉塞性肺疾患、強皮症肺や過敏性肺炎におけるBALF中のタンパクを解析した報告があるが、組織型別に評価した報告はない。慢性過敏性肺炎の気管支肺胞洗浄液 (BALF) を用いて、UIPパターンとfNSIPパターンについて組織型別に評価することで、病態に関わる蛋白を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

1998年から2008年の間に外科的肺生検を実施し診断された未治療の慢性過敏性肺炎11例 (UIPパターン7例、fNSIPパターン4例) について検討した。

BALF中のタンパク質をアセトン沈殿で濃縮し、2次元電気泳動にて18cm×18cmのゲルに展開した。SYPRO Rubyで染色し、FluoroPhoreStar 3000を用い

東京医科歯科大学 呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

表1 患者背景

	UIP	fNSIP	p value
Number	7	4	-
Sex (M/F)	7/0	3/1	-
Age (yr)	58.9±7.5	57.5±11.3	0.925
Smoking history (pack-year)	40.7±24.1	46.3±36.8	0.788
CRP (mg/dl)	0.22±0.19	0.70±0.80	0.774
LDH (IU/l)	265±69	262±71	0.527
KL-6 (U/ml)	2249±1147	1062±509	0.109
SP-D (ng/ml)	293.3±249.9	192.8±171.7	0.527
%VC (%)	85.2±22.8	86.8±12.0	0.927
%DLco (%)	57.7±12.5	54.8±7.1	0.788

表2 BALF

	UIP	fNSIP	p value
Number	7	4	-
Recovery rate (%)	61.2±16.8	46.5±12.0	0.155
Total cell count (x10 ⁵ /ml)	3.53±1.99	3.37±1.89	1
Macrophage (%)	80.0±10.3	68.4±20.3	0.412
Neutrophils (%)	4.2±6.9	4.5±4.6	0.788
Eosinophils (%)	0.7±0.5	5.2±4.1	0.01
Lymphocytes (%)	15.2±9.1	19.4±18.8	0.924
CD4/CD8 ratio	3.4±2.7	1.9±0.8	0.256

て撮影を行った。その画像を解析ソフトProgenesis PG220を用いて各spotを定量化、比較検討した。発現量に差を認めたspotや興味深いspotについてタンパク質同定を行った。同定は質量分析 (LC-nESI-MS/MS) およびSWISS-PROTなどのデータベース検索により行った。

また、血清 (UIP25例、fNSIP17例) およびBALF (UIP15例、fNSIP9例) 中のSP-Aをhuman SP-A ELISA kit (BioVendor-Laboratori medicina a.s., Czech Republic) を用いて定量化した。

結果

患者背景において年齢、喫煙歴、血液検査、肺機能検査に差を認めなかった (表1)。BALF所見ではBALF中の好酸球分画がfNSIPパターンにおいてUIPパターンよりも高値を示した (表2)。2次元電気泳動では、分子量10kDa～200kDa、pI4～7の間に約500個のspotを認め、41種類のタンパク質を同定

表3 同定したスポット

Protein #	Protein	AC	Identification method
1	α -2 macroglobulin	P-01023	GM
2	Ceruloplasmin	P-00450	GM, MS
3	Immunoglobulin A-S chain	P-99003	GM, MS
4	Complement factor B	P-00751	GM
5	α -1 B-glycoprotein	P-04217	GM, MS
6	Hemopexin	P-02790	GM, MS
7	Albumin	P-02768	GM, MS
8	Transferrin	P-02787	GM, MS
9	Complement C3 β	P-01024	GM
10	Immunoglobulin heavy chain α	P-99002	GM, MS
11	α -2 antiplasmin	P-08697	GM, MS
12	α -1 antichymotrypsin	P-01011	GM, MS
13	α -2-HS-glycoprotein	P-02765	GM, MS
14	Antithrombin III	P-01008	GM, MS
15	Vitamin D-binding protein	P-02774	GM, MS
16	α -1 antitrypsin	P-01009	GM, MS
17	Zinc finger protein GLIS1	P-08151	MS
18	Apolipoprotein A-IV	P-06727	GM
19	β -actin	P-60709	GM, MS
20	Fibrinogen γ , α chain	P-02679	GM
21	Immunoglobulin heavy chain	P-99009	GM, MS
22	Immunoglobulin heavy chain γ	P-99006	GM
23	Zinc α 2-glycoprotein	P-25311	GM
24	Haptoglobin	P-00737	GM, MS
25	Toll-like receptor 1	P-38593	MS
26	Orosomucoid 1	P-02763	GM
27	Pulmonary surfactant protein A	P-07714	GM, MS
28	Immunoglobulin J chain	P-01591	GM, MS
29	Complement factor I	P-05156	GM
30	C-reactive protein	P-02741	GM
31	Proapolipoprotein AI	P-39133	GM
32	Immunoglobulin light chain κ , λ	P-99007	GM
33	Apolipoprotein A-1	P-02647	GM
34	Glutathione S-transferase pi	P-09211	GM, MS
35	Translationally controlled tumor protein	P-13693	GM
36	Serum retinol binding protein	P-02753	GM
37	Haptoglobin α	P-00738	GM
38	Superoxide dismutase (Cu-Zn)	P-00441	GM
39	Transthyretin	P-02766	GM, MS
40	Immunoglobulin binding factor	P-15923	GM
41	Calgranulin B	P-31725	GM

Protein #: reference to the annotations in Figure 1. AC: accession number from the SWISS-PROT database. MS: LC-nESI-MS/MS. GM: Gel matching with two dimensional gel electrophoresis database from SWISS-PROT.

した(表3, 図1・2). UIPパターンとfNSIPパターンで発現量に差を認めたものとして, UIPにより多く発現したタンパク質は, Immunoglobulin heavy chain α , α 2 heat shock glycoprotein, Haptoglobin β ,

Surfactant protein A (SP-A), Immunoglobulin J chainの5種類であり, 一方fNSIPパターンに高発現であったタンパク質は, Vitamin D-binding protein, β -actin, Glutathione S-transferase piの3種類であっ

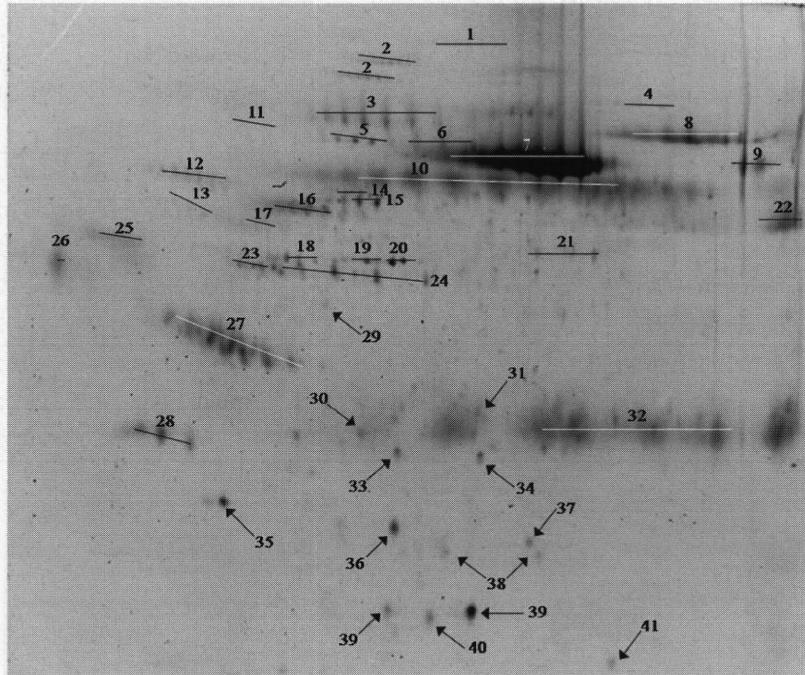
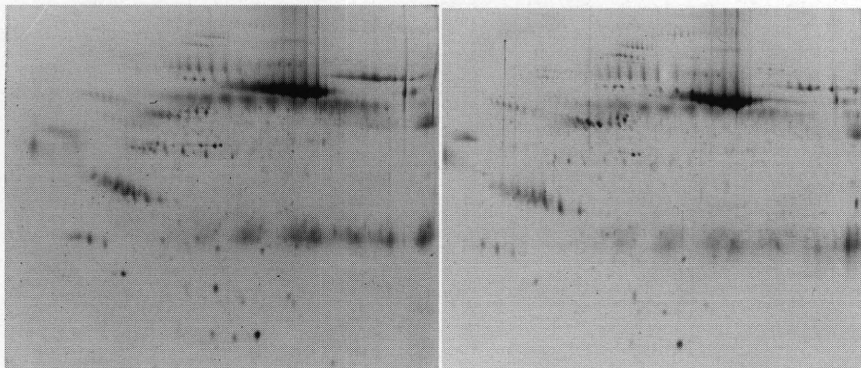


図1 BALFの2次元電気泳動



左；UIPパターン 右；fNSIPパターン
図2 UIPとfNSIPの2次元電気泳動の比較

た(表4). SP-Aについて注目すると, SP-A領域に9つのisoformを認めた(図3). SP-Aの定量では, 血清では2群に差を認めなかったが, BALFではUIPパターンにおいてfNSIPパターンよりも有意に高値を示した(UIP; $2.331 \pm 1.656 \mu\text{g/ml}$, fNSIP; $1.319 \pm 1.916 \mu\text{g/ml}$, $p=0.034$)(図4). 血清中のSP-A値とBALF中のSP-A値に相関関係を認めなかった($p=0.583$).

考 察

Proteomicsの手法を用いて, 間質性肺炎の組織型

別に評価した報告はこれまでにない. 本報告では, UIPパターンとfNSIPパターンで発現量が異なる8つのタンパクを明らかにした. またSP-Aをはじめとして多くのisoformを認めた. これら蛋白発現の差やisoformがUIPとfNSIPの臨床経過や表現型の違いと関連している可能性が示唆された.

BALF所見で, 好酸球分画がUIPパターンにおいて有意に低下していた. 慢性過敏性肺炎における急性増悪群と非急性増悪群の臨床的特徴を比較した報告²⁾では, 非急性増悪群においてBALF中の好酸球分画は高値であり, 急性増悪群においてUIPパターンを多く認めたことから, 好酸球の役割は不明だが

表4 2群間で差異を認めたスポット

Protein	Normalization volume of UIP ($\times 10^{-3}$)	Normalization volume of fNSIP ($\times 10^{-3}$)	p value
Immunoglobulin heavy chain α	946.7 \pm 502.8	126.5 \pm 99.1	0.024
$\alpha 2$ heat shock glycoprotein	79.4 \pm 60.1	17.8 \pm 14.8	0.029
Haptoglobin β	438.6 \pm 392.4	90.5 \pm 97.2	0.012
Surfactant protein A	1153.3 \pm 641.5	339.6 \pm 285.5	0.024
Immnglobulin J chain	243.6 \pm 197.9	27.1 \pm 53.9	0.029
Vitamin D-binding protein	146.9 \pm 81.8	375.3 \pm 172.0	0.029
β -actin	36.0 \pm 29.5	315.0 \pm 194.3	0.024
Glutathione S-transferase pi	65.3 \pm 29.1	189.6 \pm 73.1	0.012

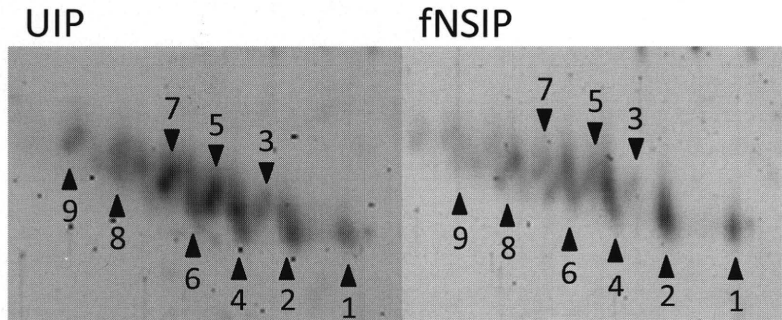


図3 SP-A isoform

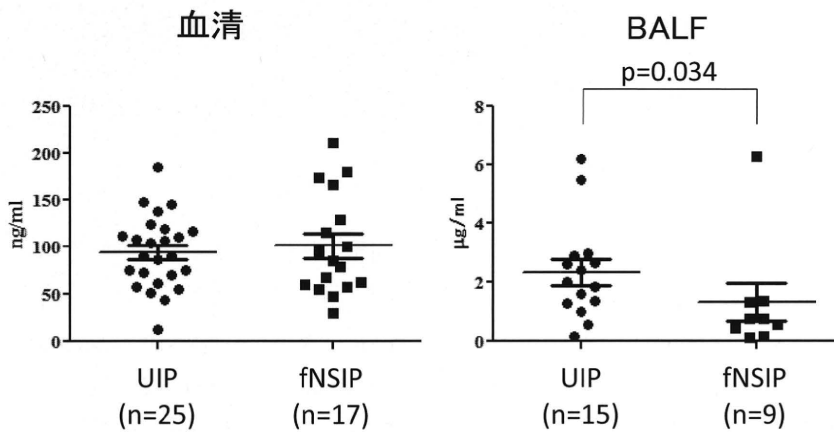


図4 SP-A (ELISA)

類似した結果と言える。

UIPパターンにおいてより多く発現していた蛋白を5つ認めた。 $\alpha 2$ heat shock glycoprotein (Heat shock protein 60)は、様々なストレスで傷害を受けて構造異常をおこした蛋白の修復、および蛋白の合成、運搬、分解に関与する生体防御蛋白である。UIPパター

ンにおけるより強い肺傷害を反映している可能性がある。SP-AはII型肺胞上皮細胞で産生される肺サーファクタントの構成成分であり、肺胞腔内のリン脂質を一定に保ち、気道の感染に対する自然免疫作用がある。特発性肺線維症(IPF)の検討では、増加あるいは低下の両方の報告があり一定の結論は出てい

ない³⁴⁾。

一方、fNSIPパターンにおいてより多く発現した蛋白を3つ認めた。Vitamin D binding proteinは肝臓で主に産生され、免疫、死細胞から誘導される細胞外G-actinの除去、癌抑制などに関与する。細胞外G-actinの除去能の低下はUIPパターンの病態と関連する可能性がある。GST-piは脂質過酸化反応の際に発生し、細胞傷害を起こすヒドロキシアルケナルなどを無毒化する抗酸化作用がある。UIPパターンにおけるGST-piの低下は、酸化ストレスに対する防御反応の低下を反映している可能性がある。

SP Aについて注目すると、SP-A領域に9つのisoformを認めた。これらは糖化、prolineの水酸化、ジスルフィド結合、シアル酸付加などの様々な翻訳後修飾による変化であると考えられている。肺胞蛋白症⁵⁾やcystic fibrosis⁶⁾においてSP-Aの翻訳後修飾が関与しているという報告もあり、本疾患も翻訳後修飾が病態を反映している可能性がある。

結 論

慢性過敏性肺炎のUIPパターンとfNSIPパターンにおいて、発現量の異なる蛋白が明らかにされた。今後有意差を認めた蛋白に注目して検討し、本疾患あるいは線維化の病態を明らかにする必要がある。

参考文献

- 1) Ohtani Y, Saiki S, Kitaichi M, et al. Chronic bird fancier's lung: Histopathological and clinical correlation. An application of the 2002 ATS/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax* 2005;60:665-71.
- 2) Miyazaki Y, Tateishi T, Akashi T, et al. Clinical predictors and histologic appearance of acute exacerbations in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2008;134:1265-70.
- 3) Phelps DS, Umstead TM, Mejia M, et al. Increased surfactant protein-A levels in patients with newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2004;125:617-25.
- 4) Schmidt AG, Yabut-Perez NM, Guth C, et al. Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999;14:565-73.
- 5) He C. Proteomic analysis of human bronchoalveolar lavage fluid: expression profiling of surfactant associated protein A isomers derived from human pulmonary alveolar proteinosis using immunoaffinity detection. *Proteomics* 2003;3:87-94.
- 6) von Bredow C, Birrer P, Griese M. Surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins are altered in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001;17:716-22.

B. サルコイドーシス

【平成20年度】

サルコイドーシス発症機構におけるアクネ菌細胞内感染とオートファジーの役割

峰岸 佳菜¹ 萬 巴里子¹ 古川あすか¹ 西川 絵理¹ 内田 佳介¹
鈴木 好美¹ 三輪 彩¹ 鈴木 高成¹ 武村 民子² 江石 義信^{1*}

【目的】サルコイドーシスの病因と深部臓器の細胞内に潜伏感染しているアクネ菌との関連が研究されている。本研究では細胞内アクネ菌が過敏性免疫反応を惹起する機序を明らかにすることを目的とし、細胞侵入性の病原細菌に対し宿主の防御機構としてはたらくオートファジーとの関与を調べた。【材料と方法】オートファジーのマーカーとなるGFP-LC3融合蛋白を遺伝子導入したHeLa細胞株に細胞侵入能を有するアクネ菌を感染させ、蛍光および電子顕微鏡によりリソソーム融合阻害剤であるBafilomycin添加・非添加での観察を行った。【結果】細胞内に感染したアクネ菌はエンドソーム・リソソーム系で消化されていたが、一部の菌体は感染後18時間をピークにLC3陽性膜に囲まれていた。Baf存在下ではファゴソームのマーカーであるLAMP-1陽性の空胞から菌体が脱出し、LC3に囲まれた菌体が増加していた。【考察】本研究ではBafilomycinを用いたことで細胞内消化が阻害され、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の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、サルコイドーシス肉芽腫が形成されるものと推察される。

Implication of autophagy induced by intracellular infection of *Propionibacterium acnes* in the etiology of sarcoidosis

Kana Minegishi¹, Pariko Yorozu¹, Asuka Furukawa¹, Eri Nishikawa¹, Keisuke Uchida¹,
Yoshimi Suzuki¹, Aya Miwa¹, Takashige Suzuki¹, Tamiko Takemura², and Yoshinobu Eishi¹

¹Department of Human Pathology, Tokyo Medical and Dental University

²Department of Pathology, Japanese Red Cross Medical Center

【Background】 Intracellular proliferation of *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) may cause Th1 hypersensitivity and subsequent granuloma formation after antigen-processing via autophagy since some bacteria proliferating in cells can escape from phagosomes where they reside latently. In the study, we examined whether intracellular infection of *P. acnes* can induce autophagy under certain environments.

【Materials and Methods】 HeLa-LC3 cells, which were transformed to express GFP-LC3 fusion proteins, were infected by an invasive isolate of *P. acnes* and the process of *P. acnes* infection and intracellular trafficking within nonphagocytic cells were examined. After immunofluorescent staining, HeLa-LC3 cells infected by *P. acnes* were observed during 24 hours by fluorescence microscopy and electron microscopy. The number of viable *P. acnes* in the cells was determined by so-called invasion assay. The same experiment was done under the culture conditions where fusion between phagosome and lysosome was blocked by using bafilomycin. 【Results】 *P. acnes* entered the cells by endocytosis. Most of them were degraded by endosomal enzymes (lysozyme and cathepsin D) in the cells. A few *P. acnes* were localized in LC3-positive autophagosome-like vacuoles that appeared most abundant 18 hours after the infection. When treated with bafilomycin, *P. acnes* escaped from LAMP-1 positive vacuoles and many of them were captured by LC3-positive autophagosomes. 【Discussion】 These results suggest that *P. acnes* can induce autophagy escaping from degradation. Increased induction of autophagy by *P. acnes* infection under bafilomycin pretreatment may simulate the intracellular proliferation of the bacterium that seems to have occurred in patients with 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病変を特徴とした疾患である。肉芽腫形成には通常マクロファージによる抗原物質の細胞内消化不全や細胞内停留に起因していることから、サ症の本体として何らかの抗原物質に対する細胞性免疫反応が考えられている。

これまでにサ症患者の病変部リンパ節から高率・多量にアクネ菌(*Propionibacterium acnes*)が検出されていることから^{1,2)}、その抗原物質としてアクネ菌が疑われている。アクネ菌は皮膚常在性細菌であるが、近年細胞侵入能を有することが判明し、ヒトの深部臓器に細胞壁を欠失した冬眠型の状態で潜伏感染していることが示唆されている³⁾。疾病素因を有する患者において、冬眠型の細胞内潜伏感染アクネ菌が何らかの内因性活性化因子により細胞内増殖することでサ症を発症すると考えられる。

一方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、「オートファジー」との関連が疑われている。オートファジー(自食現象)は従来細胞質内の蛋白質を分解することで細胞内の蛋白質の品質管理や飢餓適応を行うとされてきたが、オートファジーは貪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判明し、研究が進んでいる⁴⁾。実際細胞内抗原がオートファジーによりMHC class IIに抗原提示されうることも報告されている⁵⁾。

本研究では細胞内のアクネ菌が過敏性免疫反応を惹起する機序を明らかにすることを目的とし、リソソーム阻害剤を使用することでアクネ菌の細胞内増殖を再現し、オートファジーの亢進を引き起こさるかを検討した。

また、アクネ菌のオートファジー誘導機序について、すでに報告されている細胞内侵入性細菌の誘導機序と比較検討した。

【材料と方法】

I. 菌株

アクネ菌は細胞侵入能を有するサ症患者分離株を使用し、GAM broth (Nissui)にて37℃ 3日間嫌気培養した菌体を実験に用いた。*Porphyromonas gingivalis* (標準株)はウサギ血液寒天培地(BD)にて37℃ 4日間嫌気培養した菌体を実験に用いた。*Streptococcus pyogenes* (JRS4株)、*Staphylococcus eidermidis* (標準株)はそれぞれTHY broth [Todd Hewitt Broth (BD) + 0.2% yeast extract (BD)], GAM brothにて好気下37℃で一晩前培養を行い、翌日log phaseに達した菌液を遠心して回収した菌体を実験に用いた。

II. 細胞株

ヒト子宮頸癌細胞由来のHeLa細胞株、GFP-LC3融合蛋白質を遺伝子導入したHeLa-LC3細胞株(東京大学医科学研究所の中川先生より譲与)を用いた。

HeLa細胞株はDulbecco MEM培地 +10% FBS (以下10% FBS/DMEM)+50 µg/ml gentamycinにて継代培養した。HeLa-LC3細胞株は10% FBS/DMEM +50 µg/ml gentamycinに選択薬として500 µg/ml neomycinを加えて継代培養した。

III. 感染

各細胞株は感染前日、10%FBS/DMEM antibiotics (-)にて24-well plateに5x10⁴/wellとなるようにまきなおした。蛍光標識による観察用には10% gelatin/PBSにてコーティングした丸カバーガラスをwellに入れ、その上に細胞をまいた。

各菌株は10% FBS/DMEM antibiotics (-)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、細胞株に加えた(Multiplicity of Infection = 1000)。37℃・CO₂インキュベーターにて2時間感染後、PBSにて3回洗浄し、細胞外殺菌するために高濃度抗生剤(400 U/ml penicillin, 1 mg/ml streptomycin 添加DMEM)を添加し、さらに3時間培養した。*(P. gingivalis*は500 µg/ml gentamycinにて殺菌。)

リソソーム阻害剤として使用したBafilomycinは最終濃度が100nMとなるように感染2時間前に添加した。対照群にはDMSOを最終濃度が1%となるように添加した⁶⁾。

¹ 東京医科歯科大学人体病理学分野

² 日本赤十字医療センター病理部

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

タイムコースで細胞を回収する場合は細胞外殺菌後10% FBS/DMEM antibiotics (-)にて培養を続けた。

IV. 蛍光標識による観察

初期エンドソーム, ファゴソーム, リソソームのマーカーとしてそれぞれRab5, LAMP-1抗体, 抗リゾチーム抗体, 抗カテプシンD抗体を用いた。

1) Rab5 transfection

前日10%FBS/DMEM antibiotics (-)にて24-well plateに 4×10^4 /wellとなるようにまきなおした。

150mM NaCl 100 μ lに1 μ g/ml Rab5 plasmid DNA 0.4 μ lとポリエチレンイミン2 μ l入れてvortexし, 室温で20分置いた後, 全量をwellに添加した。6時間後10%FBS/DMEM antibiotics (-)で液替えを行った。Transfection 24時間後アクネ菌を感染させ, 1時間ごとに丸カバーガラスを4%パラホルムアルデヒド液に回収し, 固定した。

2) 免疫染色(LAMP-1抗体, 抗リゾチーム抗体, 抗カテプシンD抗体)

4%パラホルムアルデヒド液で細胞を固定後, 0.1% Triton/PBSにより細胞膜に穴をあけた。RNase(10 μ g/ml)添加ブロッキング剤にて室温15分処理をした。1次抗体としてLAMP-1抗体(Santa cruz Biotechnology, 1:100希釈)をかけ, 室温にて1時間反応させた。次に二次抗体としてCy5-conjugated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:200希釈)を用い, 室温にて30分反応させた。PI(200 ng/ml, 1:1000希釈)にて核染色後封入し, 観察を行った。

LAMP-1抗体と抗リゾチーム抗体の二重染色は, ブロッキング処理後, 1次抗体としてLAMP-1抗体と抗リゾチーム抗体(DAKO A099, 1:40希釈), 2次抗体としてCy5-conjugated anti-mouse IgGとpolyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins / Biotinylated (DAKO E0432, 1:500希釈)を反応させた後, 抗リゾチーム抗体の3次抗体としてStreptavidin/FITC (DAKO F0422, 1:50希釈)を室温で30分反応させた。PIにて核染色後封入し, 観察を行った。

LAMP-1抗体と抗カテプシンD抗体の二重染色では, 感染細胞をメタノールにて固定後ブロッキング処理し, 1次抗体としてLAMP-1抗体と抗カテプシンD抗体(SIGMA C0715, 1:200希釈), 2次抗体としてCy5-conjugated anti-mouse IgGとpolyclonal

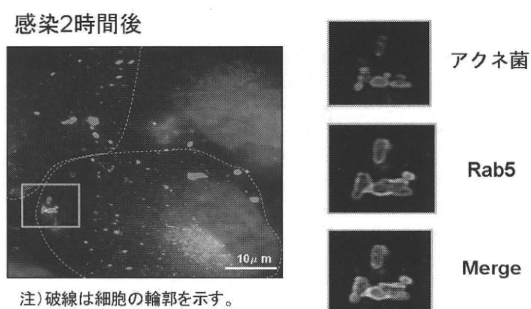


図1: エンドサイトーシスにより侵入したアクネ菌

Goat anti-Rabbit Immunoglobulins /Biotinylated (DAKO E0432, 1:500希釈)を反応させた後, 抗カテプシンD抗体の3次抗体としてStreptavidin/FITC (DAKO F0422, 1:50希釈)を室温で30分反応させた。PIにて核染色後観察を行った。

V. 電子顕微鏡用試料

直径3 cmのdishにまいた細胞を2%グルタルアルデヒドで固定。その後エポン樹脂にて包埋し, 超薄切, ウラン・鉛染色後透過型電子顕微鏡にて観察を行った。

VI. Colony assay

感染細胞は抗生剤による細胞外殺菌後経時的に細胞をトリプシン100 μ lで剥がして回収し, 滅菌水900 μ lを入れて計1 mlとした。そこから原液と10倍希釈液をそれぞれGAM寒天培地に20 μ l塗布し, 嫌気培養を行った。4日後発育したコロニー数を測定した。

【結 果】

1. 細胞内アクネ菌の局在およびオートファジーの関与

1) アクネ菌と初期エンドソーム

Rab5 plasmid DNAをtransfectionしたHeLa細胞への感染0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8時間後の観察を行った。Rab5はすべての時間帯において発現していた。その中でも感染2時間後がRab5の発現のピークであり, 菌がRab5に囲まれている像を確認できた[図1]。感染3時間以降では細胞内に菌体は存在するもRab5に囲まれている菌体は見つけられなかった。

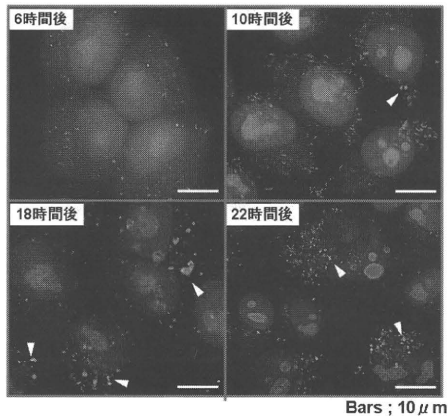


図2: アクネ菌感染によるLC3発現の経時観察

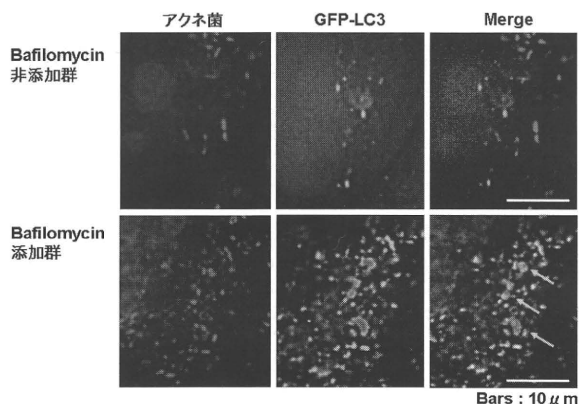


図3: LC3に捕われた細胞内アクネ菌(感染24時間後)

2) アクネ菌とLC3

HeLa-LC3細胞にアクネ菌を感染後蛍光顕微鏡により経時的に観察を行った. 細胞内に存在したほとんどの菌体はオートファジーの隔離膜のマーカであるLC3に捕獲されてはいなかったものの, 一部の菌体が感染18時間後をピークにLC3陽性膜に囲まれていた[図2, ▲印].

Bafilomycin添加群では感染後6時間ころからLC3の発現が多く観察され, LC3とアクネ菌が共局在している数が増加した. 強拡大での観察により, GFPで標識されたLC3がアクネ菌を取り囲んでいる様子が観察された[図3].

3) アクネ菌とファゴソーム・リソソーム

細胞内に感染したアクネ菌は時間経過と共にLAMP-1陽性の空胞内に含有される菌体数が増え, 感染後24時間の時点ではほぼすべての菌がLAMP-1に囲まれていた. またそれらの菌体は桿菌状から小型円形化し, 消化されていると思われた.

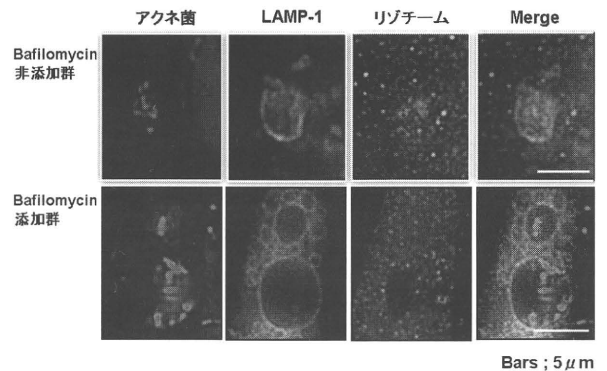


図4: アクネ菌感染細胞のLAMP-1とリゾチームの二重染色(感染24時間後)

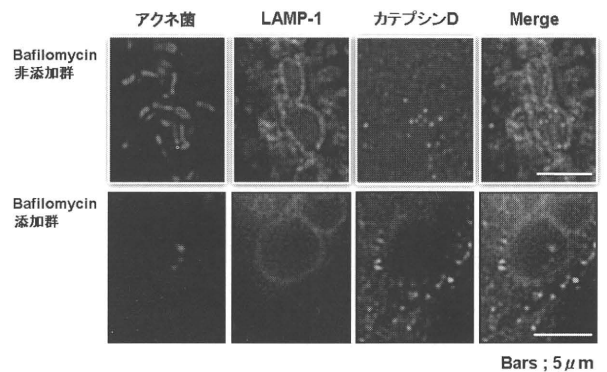


図5: アクネ菌感染細胞のLAMP-1とカテプシンD二重染色(感染24時間後)

LAMP-1抗体と抗リゾチーム抗体および抗カテプシンD抗体の二重染色を行ったところ, アクネ菌を囲んでいるLAMP-1空胞内にリゾチーム, カテプシンDを確認した[図4, 図5: 上段].

これに対し, Bafilomycin添加群ではLAMP-1陽性の空胞が小型化するとともに, 逆に菌体を含むものは巨大化して観察された. また, LAMP-1抗体と抗リゾチーム抗体および抗カテプシンD抗体の二重染色を行ったところ, LAMP-1陽性膜内に菌体とともにリゾチームおよびカテプシンDは観察されなかった[図4, 図5: 下段].

4) 電子顕微鏡による観察

Bafilomycin非添加(1% DMSO添加)群では図6の矢印で示すように複数の菌体が一重膜内に観察され, それらは消化され始めていた. これに対し, Bafilomycin添加群では蛍光標識による観察と同様に一重膜の空胞から菌体が抜け出していた(*). さらに細胞内消化を逃れた菌体が細胞外へと脱出している像が観察された(▲印).

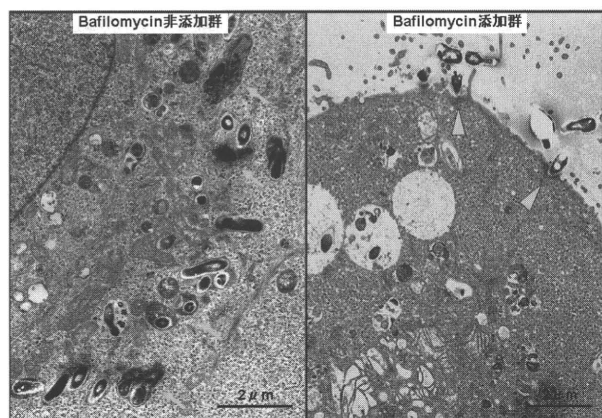


図6: 電子顕微鏡像

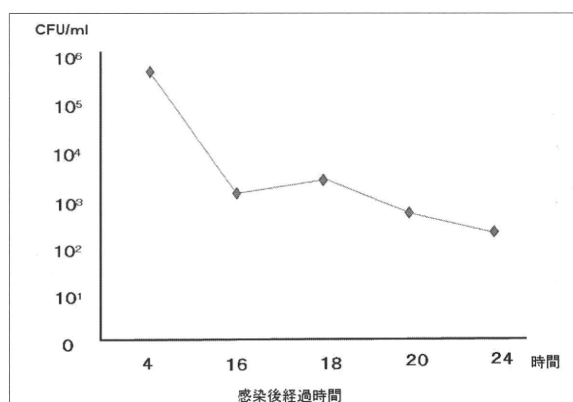


図7: 細胞内生菌数の経時的変化

2. Colony assay

細胞内生菌数は感染後4時間から16時間に急激に減少した。感染後16時間から24時間においてはさらに減少をみせたが、18時間をピークにわずかな増加もみせた[図7]。

Bafilomycin添加群では細胞内に侵入した菌数が非添加群に比べ少なかったが、感染後4時間から24時間にかけては非添加群と同様に減少していた。

3. 他の細胞侵入性細菌の観察結果

1) *P. gingivalis*

感染初期においてBafilomycin添加・非添加群どちらにおいても菌体はLC3に囲まれていた。また両者ともLC3に囲まれた菌体はLAMP-1には囲まれていなかった[図8]。感染後時間経過とともにLC3に囲まれた菌体がLAMP-1に覆われる像が確認されるようになった。Bafilomycin添加群では感染24時間後には顕微鏡下ではあるが増菌が確認された。

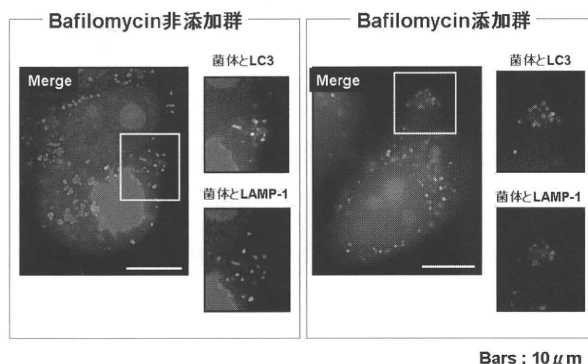


図8: *P. gingivalis* 感染細胞の観察(感染後4時間)

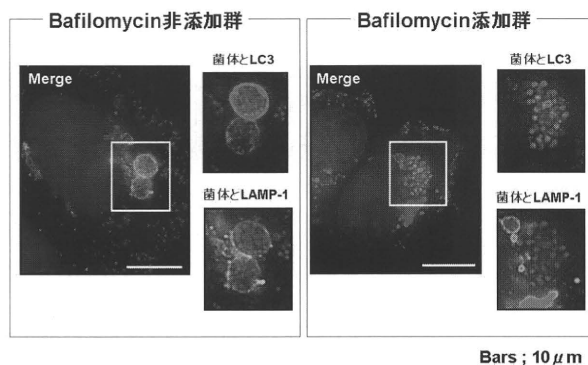


図9: *S. pyogenes* 感染細胞の観察(感染後6時間)

2) *S. pyogenes*

*S. pyogenes*は文献7で報告されているように細胞内に侵入後細胞質へ脱出しLC3陽性隔離膜により迅速に捕われ、さらにLAMP-1が囲い込みオートリソソームによって消化されているであろう像が観察された。またBafilomycin添加群では、菌がLC3に取り囲まれてはいるがリソソームの結合を阻害しているためLAMP-1には囲まれていない像を確認した[図9]。

3) *S. epidermidis*

細胞内に菌体が侵入している像は見つけれず、観察したどの時間帯においてもLC3やLAMP-1に囲まれている菌体は確認出来なかった。

【考 察】

*S. pyogenes*は細胞内侵入後SLOと呼ばれる毒素によってエンドソームから細胞質へと脱出するが、オートファジーは菌体を効率良く捕獲し、消化する⁷⁾。それに対し*P. gingivalis*は*S. pyogenes*と同様に

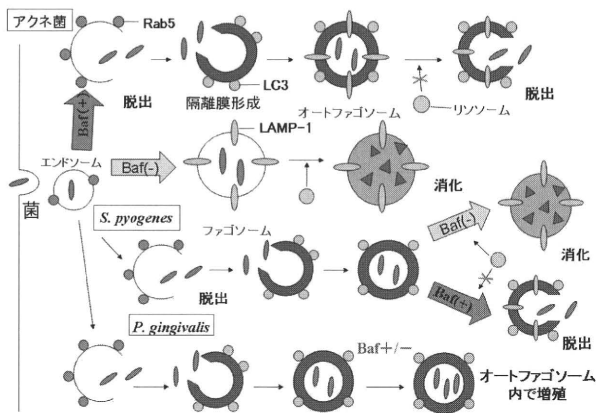


図10: Bafilomycin添加におけるアクネ菌の細胞内動態変化

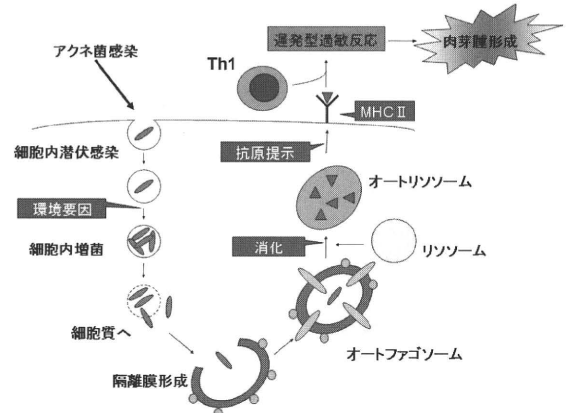


図11: アクネ菌の潜伏感染が肉芽腫形成を引き起こす機構

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⁸⁾。

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⁹⁾、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⁵⁾、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

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.

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 μ 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 μ 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FP800μg/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

FP800μg/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	

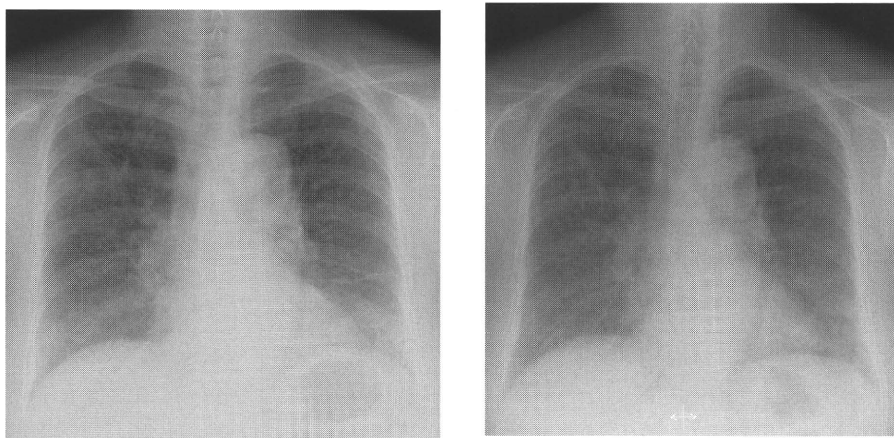


図-1
症例1 68歳 女性
左：吸入前 右：6ヶ月間FP800 μ g/day吸入後

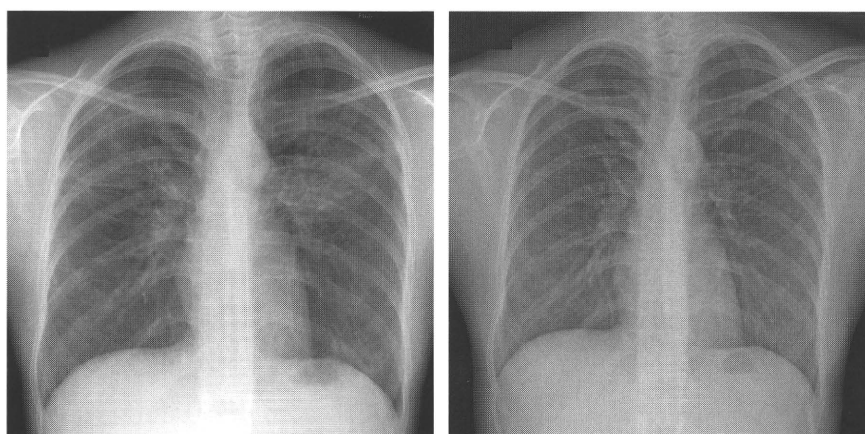


図-2
症例2 32歳 女性
左：吸入前 右：1年間FP800 μ g/day吸入後

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示唆されている。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の効果を確認した報告はない。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確認した報告において、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症例に咳嗽の軽減が認められている。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

【平成21年度】

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*

我々は昨年度から transcriptome scan により選び出した血清カタペプシン S (CTSS)濃度の、サルコイドーシスの診断における意義について検討している。今年度はさらに対照疾患を広げて検討した。

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54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),塵肺患者150名(54-93歳),肝硬変症患者20名(43-83歳),甲状腺機能亢進症患者19名(20-72歳),肺抗酸菌症患者17名(45-83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 Color® (Fuji Rebio)を用いて測定した。

血清CTSS濃度は、健常者と比較して今回新たに追加した塵肺、肝硬変症、甲状腺機能亢進症、肺抗酸菌症で上昇していた。サルコイドーシスでは、それら4疾患の内、肝硬変症を除く疾患対照より血清CTSS濃度は有意に高値であった。サルコイドーシスと塵肺の鑑別に関して、ROC解析では曲線下面積は0.869と十分に高値であり、CTSS濃度72ng/mlにおける感度は78%、特異度は79%であった。

血清ACE活性は健常者と比較して、肝硬変症と甲状腺機能亢進症で上昇していた。サルコイドーシスと塵肺の鑑別に関して、CTSS同様にROCカーブによる解析を行うと、曲線下面積は0.697で、CTSS濃度より有意に低かった($p<0.05$)。ACE活性13.9 IU/l 37°Cにおける感度は68%、特異度は69%とやや低値であった。血清CTSS濃度と血清ACE活性は、健常者と全患者を含めると全体として有意な相関を示した($\rho=0.371, p<0.0001$)。しかしその相関係数はさほど高値ではなく、両者が高い領域では分布が拡散する様相を示した。

以上より血清CTSS濃度は、疾患特異性は高くはないが疾患によってはACEより高い鑑別能を有する有用なマーカーと言える。

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

The role 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 been assessing the significance of serum levels of cathepsin-S (CTSS) selected by the transcriptome scan from the previous year. We added disease controls in this year.

The study subjects included 29 healthy volunteers and 54 patients with sarcoidosis. Other disease controls were 19 patients with idiopathic interstitial pneumonia (IPs) (including UIP, NSIP, and OP), 11 with lung cancer, 12 with chronic obstructive lung disease, 22 with bronchial asthma, 150 with pneumoconiosis, 20 with liver cirrhosis, 19 with hyperthyroidism, and 17 with pulmonary mycobacteriosis. 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 pneumoconiosis, hyperthyroidism, liver cirrhosis, and pulmonary mycobacteriosis which were added to this year's study were all significantly increased compared with those in healthy controls. The levels in sarcoidosis were significantly higher than those in newly-added disease control groups except for liver cirrhosis. Regarding the differential diagnosis of sarcoidosis and pneumoconiosis by the receiver operating characteristics (ROC) curve, the area under the curve (AUC) was enough large (0.869). The sensitivity and specificity of serum CTSS levels for discriminating sarcoidosis patients from patients with pneumoconiosis were 78% and 79% at a CTSS level of 72 ng/ml, respectively.

Serum ACE activities in liver cirrhosis and hyperthyroidism were significantly increased compared with those in healthy controls. As in the case of serum CTSS levels, ROC curve was used for the differential diagnosis of sarcoidosis and pneumoconiosis. AUC was 0.697, and was significantly lower than that for CTSS. The sensitivity and specificity of serum ACE activities for discriminating sarcoidosis from pneumoconiosis were 68% and 69%, respectively, at a ACE activity of 13.9 IU/l 37°C. Serum CTSS levels and ACE activities significantly correlated in healthy controls and patients with all the disease controls studied ($p=0.371$, $p<0.0001$), but the correlation coefficient was not large enough; the distribution of the two markers widely scattered at their high levels.

These results indicate that the serum CTSS level is a useful serum marker for differential diagnosis with a higher discriminating capability than ACE depending on diseases concerned, though its disease specificity is not very high.

はじめに

疾患の診断マーカーとして血清中の蛋白濃度が古くから用いられ、常に新規マーカーが探索されている。その際に重要な点は、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。

これ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。その結果対照との比較で3番目に強い遺伝子発現を示したのとして、cathepsin S (CTSS)を見出した。昨年は各種間質性肺炎、肺癌、COPD、気管支喘息患者を対照とすると、その血清濃度がサルコイドーシスの診断に関して良好な特異性を示すことを見出した。古典的なマーカーであるACEも同様であり、結局のところ血清ACE活性は特異性を担保するものとして、CTSS濃度はさらに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るとの結果を得た。

診断マーカーとしての有用性を突き詰める際、ACEの意義を意識せざるを得ない。血清ACE活性

はこれまでの報告で塵肺、肝硬変症、甲状腺機能亢進症でも上昇することが分かっている。また画像上サルコイドーシスと肺抗酸菌症はしばしばその鑑別が問題となる。そこで今年度はそれらの疾患における血清CTSS濃度を測定し、CTSSのサルコイドーシス特異性についてさらに詳細に検討することを目的とした。

対象・方法

対象は健常者29名、サルコイドーシス患者54名。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)、肺癌患者11名、慢性閉塞性肺疾患患者12名、喘息患者22名、塵肺患者150名、肝硬変症患者20名、甲状腺機能亢進症患者19名、肺抗酸菌症患者17名である(表1)。

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 Color[®] (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、本学医学部の倫理委員会により承認されている。

表1. 対象

	n	(男, 女)	年齢中央値 (歳)	[範囲 (歳)]
健常対照	29	(14, 15)	22	[20-31]
サルコイドーシス	54	(17, 37)	54	[23-84]
特発性間質性肺炎	19	(10, 9)	74	[56-86]
肺癌	11	(7, 4)	71	[41-79]
COPD	12	(10, 2)	63	[64-78]
気管支喘息	22	(10, 12)	57	[23-87]
塵肺	150	(150, 0)	76	[54, 93]
肝硬変症	20	(12, 8)	68	[43-83]
甲状腺機能亢進症	19	(5, 14)	36	[20-72]
肺抗酸菌症	17	(10, 7)	73	[45-83]