

また、外因性 IL-6 の添加が BLM により誘導される A549 細胞の cleaved caspase 8 の産生を、IL-6 濃度依存的に抑制した。すなわち、アポトーシスを阻害した結果は、過去、IL-6 が、過酸化水素による A549 細胞のアポトーシスを抑制するという報告⁹⁾に相関したものであった。

以上の *in vitro* の結果より、BLM 刺激下の A549 細胞において Akt は survival に働き、IL-6 はアポトーシスを抑制することが判明した。肺上皮細胞特異的に STAT3 をノックアウトしたマウスでは LPS による急性肺障害が悪化したとの報告があり⁹⁾、AEC II において STAT3 は rescue シグナルとして機能することが報告されていることから、BLM 誘導性肺線維症マウスモデルにおいて、IL-6/Akt シグナル axis を介する抗アポトーシス機能に STAT3 は協調的に作用すると推察される。

次に *in vivo* において、BLM 投与後の炎症初期に AEC II から産生される IL-6 がアポトーシスおよび線維化に及ぼす影響について検討を行った。BLM 投与後に、IL-6-NA を用いて、炎症初期 (day 3) に、主に AEC II から肺胞内へ産生される IL-6 を阻害すると、BLM 誘導性の AEC II のアポトーシスが亢進することを認めた。このことから、*in vitro* の系と同様に、*in vivo* においても、IL-6 が AEC II のアポトーシスを抑制していることが判明した。さらに、day 7 の肺の組織所見は大変興味深いものであった。通常、BLM 投与後 day 7 は炎症期であり、線維化は認めないとされている。事実、BLM の単独投与では、肺胞内への炎症細胞のおびただしい浸潤を認めたが、線維化は観察されなかった。一方、BLM+IL-6-NA 投与群では、明らかな肺線維化が認められ、BLM による線維化の病態進展が加速もしくは悪化したと考えられた。

今回の研究から、BLM 投与後に肺胞内で産生される IL-6 は、AEC II の生存を介して線維化を抑制する方向に働くことが明らかとなった。BLM を用いた実験系においては、この IL-6 による代償作用があるにも関わらず、最終的に肺線維症が誘導されることから、線維化という病態の最終的なアウトプットを変えることは出来ない。しかしながら、IL-6 の代償作用を IL-6-NA により抑制してしまうと、より線維化の病態進展が加速もしくは悪化することから、炎症反応のトリガーとしての位置付けのみに準

じた anti-IL-6 strategy は、少なくとも、間質性肺炎などの肺線維症につながる疾患では、より重篤な病態のアウトプットを導く可能性が考えられた。

過去に関節リウマチに合併した肺線維症の患者で、抗 IL-6 受容体抗体 (tocilizumab) の治療中に、肺線維症の増悪で死亡したケースが報告されており⁷⁾、人においても、肺線維症では、IL-6 は病態進展を抑制しようとする代償作用を果たしている可能性が示唆される。臨床的に、肺線維症を合併した患者に、IL-6 を阻害する治療を施行することは、合併症の肺線維症を増悪させる危険性があり、慎重な検討が必要であると思われる。

結 論

BLM 投与後の炎症初期において、AEC II から産生された IL-6 がオートクライン/パラクラインの挙動に準じて AEC II を細胞死から保護する働きを演じることを確認した。炎症初期の肺胞内の IL-6 を阻害すると、線維化の病態進展が加速もしくは悪化することを確認した。以上より、IL-6 は肺線維症の病態成立の起点となる重要因子として機能する可能性が示唆された。臨床的に、肺線維症を合併した患者に、IL-6 を阻害する治療を施行することは、合併症の肺線維症を増悪させる危険性があり、慎重な検討が必要であると思われる。

引用文献

- 1) Sisson TH, Mendez M, Choi K, et al. : Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 Feb 1, 181(3) : 254-63.
- 2) Saito F, Tasaka S, Inoue K, et al. : Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008 May, 38(5) : 566-71.
- 3) 林 清二, 望月 順子, 吉田 光宏. 気道肺胞上皮細胞への *in vivo* 遺伝子導入 間質性肺炎の病態解析. *医学のあゆみ* 1996, 176(10) : 677-681.
- 4) Chen RH, Chang MC, Su YH, et al. : Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol

- 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* 1999 Aug, 274(33) : 23013-9.
- 5) Kida H, Yoshida M, Hoshino S, et al. : Protective effect of IL-6 on alveolar epithelial cell death induced by hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 Feb, 288(2) : L342-9.
- 6) Ikegami M, Falcone A, Whitsett JA. : Stat3 regulates surfactant phospholipid homeostasis in normal lung and during endotoxin-mediated lung injury. *J Appl Physiol* 2008 Jun, 104(6) : 1753-60.
- 7) Kawashiri SY, Kawakami A, Sakamoto N, et al. : A fatal case of acute exacerbation of interstitial lung disease in a patient with rheumatoid arthritis during treatment with tocilizumab. *Rheumatol Int* 2012 Dec, 32(12) : 4023-6.

鳥関連過敏性肺炎マウスモデルにおける Th17の関与に関する研究

石塚 聖洋 宮崎 泰成 稲瀬 直彦*

【背景】急性過敏性肺炎は、農夫肺の原因抗原でもある好熱性放線菌 (*Saccharopolyspora rectivirgula*: SR) を使用したマウスモデルによる病態の解析が進んでおり、IFN- γ などのTh1系サイトカインだけでなく、IL-17などのTh17系サイトカインが病変形成に重要であることが、IL-17ノックアウトマウスや抗IL-17抗体などを使用して証明されている。今回、鳩糞抽出物(pigeon dropping extracts; PDE)を使用して鳥関連過敏性肺炎マウスモデルを作製し、Th17、Th1、Th2系サイトカインの評価及び、抗IL-17抗体を使用し、急性期におけるTh17系サイトカインの役割を検討した。

【方法】雌C57BL/6野生型マウスを用い、PDEの経気管噴霧により、鳥関連過敏性肺炎モデルを作製し、control群、PDE投与群、PDE/抗IL-17抗体投与群の3群で、肺組織の病理組織学的評価、mRNA、BALF細胞分画について検討した。また、PDE群では、day 0-10にかけての経時的推移も検討した。

【結果】HE染色では、PDE投与群で炎症細胞の浸潤、リンパ球の集簇病変がみられた。同病変内にF4/80陽性細胞がみられ、病変形成にマクロファージの関与が考えられた。抗IL-17抗体群では、リンパ球集簇病変数の有意な減少が見られた。肺組織のmRNAは、PDE群で、*Il17a*, *Il17f*, *Il6*, *Il23a*, *Il10*, IFN- γ (*Ifng*), TNF (*Tnf*), *Il13*, *Il5* で、control群より有意に発現が増加していた。FCMによるBALF評価では、PDE群でSiglec-F^{high}, Ly-6G^{low}, SSC^{high}群(好酸球)とSiglec-F^{int}, Ly-6G^{high}, F4/80^{low}群(好中球)が多くみられた。Day 10において、control群では好酸球2.5 \pm 1.0%、好中球0.4 \pm 0.2%であるのに対し、PDE群では、好酸球69.8 \pm 3.7%、好中球7.4 \pm 1.1%であった。抗IL-17抗体群では、好中球分画で3.4 \pm 0.5%と有意に低下が見られた(p=0.0424)。また、PDE群における経時的評価では、好中球分画がday 2で40.4 \pm 3.9%と最大となり、その後減少傾向が見られた。一方、好酸球分画およびBALF総細胞数では、day 10まで増加傾向が継続して見られた。

【結論】PDEを使用した鳥関連過敏性肺炎モデルを確立し、急性期初期に肺への好中球遊走が起きていること、急性期反応にIL-17が強く関与していることを確認した。

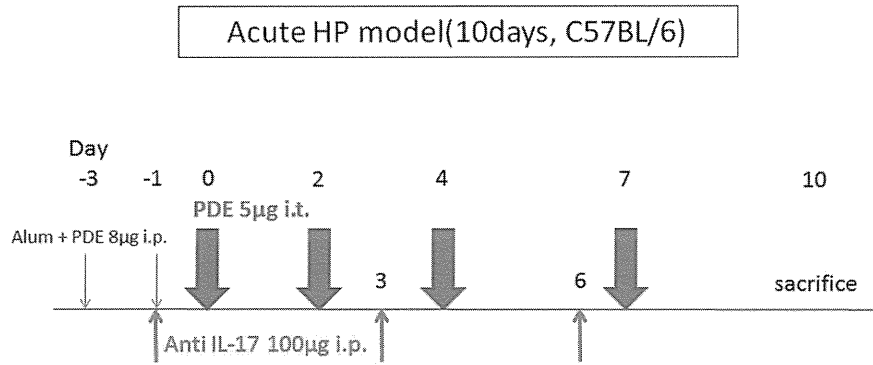


図1. 鳥関連過敏性肺炎マウスモデルのプロトコール

A. 研究目的

過敏性肺炎は、さまざまな原因抗原の吸入によって免疫学的機序により引き起こされる疾患である。その原因抗原には、真菌や鳥関連物質などの異種蛋白や、イソシアネートなどの低分子化学物質がある。過敏性肺炎はその臨床像から、急性発症と慢性発症に分けられ、慢性発症の中で再燃症状軽減型と潜在性発症型に分類されている¹⁾。慢性過敏性肺炎の主な原因である、羽毛布団や鶏糞肥料使用に起因する慢性鳥関連過敏性肺炎(chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis; chronic BRHP)では、特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)と同様、Th2系サイトカインが線維芽細胞の増殖やcollagen産生を促進し、線維化を誘導しており、臨床検体においてTh2系ケモカインやレセプターの上昇が報告されている²⁾。また、当科で作製したchronic BRHPのマウスモデルでは、Th2優位のA/Jマウスにおいて病変形成が強く、肺組織中のTh2系サイトカインのmRNA発現の上昇やBALF中のIL-13発現の上昇が確認されている³⁾。

一方、急性過敏性肺炎に関しては、農夫肺の原因抗原でもある好熱性放線菌(*Saccharopolyspora rectivirgula*; SR)を使用したマウスモデルによる病態の解析が進んでおり、IFN- γ などのTh1系サイトカインだけでなく、IL-17などのTh17系サイトカインが病変形成に重要であることが、IL-17ノックアウトマウスや、IL17レセプターノックアウトマウス、あるいは抗IL-17抗体などを使用して証明されている⁴⁾。

今回、chronic BRHPマウスモデルと同様、鳩糞抽

出物(pigeon dropping extracts; PDE)を使用して、acute BRHPマウスモデルを作製し、Th17, Th1, Th2系サイトカインの評価及び、抗IL-17抗体を使用し、急性期における過敏性肺炎の病変におけるIL-17などのTh17系サイトカインの役割を検討した。

B. 研究方法

動物は、8週から10週齢の雌C57BL/6野生型マウスを使用した。PDEは、新鮮な鳩糞を蒸留水で透析後に、20倍量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS; pH7.4)で24時間攪拌し、フィルター濾過後、凍結乾燥させたものを使用した⁵⁾。Day -3, -1に、水酸化アルミニウム(Alum)をPDE(8 μ g/100 μ l)と同量加え、30分間室温静置後に腹腔内投与した。PDE 5 μ g/25 μ lを、day 0, 2, 4, 7に、マイクロスプレーヤーを使用し、経気管的に噴霧した。コントロール群では、day -3, -1にAlumとPDEを腹腔内注射し、経気管的には生理食塩水を噴霧した。また、day -1, 3, 6に、抗IL-17抗体(R&D Systems) 100 μ gおよびisotype control(rat IgG)を腹腔内投与した。塩酸ケタミンと塩酸キシラジンの腹腔内投与による麻酔後に、day 0, 2, 4, 7, 10(同日の経気管的投与は行わず)に、それぞれ検体を採取した(図1)。検体としては、一部のマウスでは、左肺をホルマリン固定後にパラフィン包埋を行い、右肺の一部を使用し肺組織のmRNA発現を評価した。また、残りのマウスでは、全肺で生理食塩水1ml \times 3回、気管支肺胞洗浄を行い、BAL中の細胞分画をcytospinおよびflow cytometry(FCM)で評価した。FCMの抗体は、blockingとしてanti-mouse CD16/32を用い、その他に、PE-rat anti-mouse Siglec-

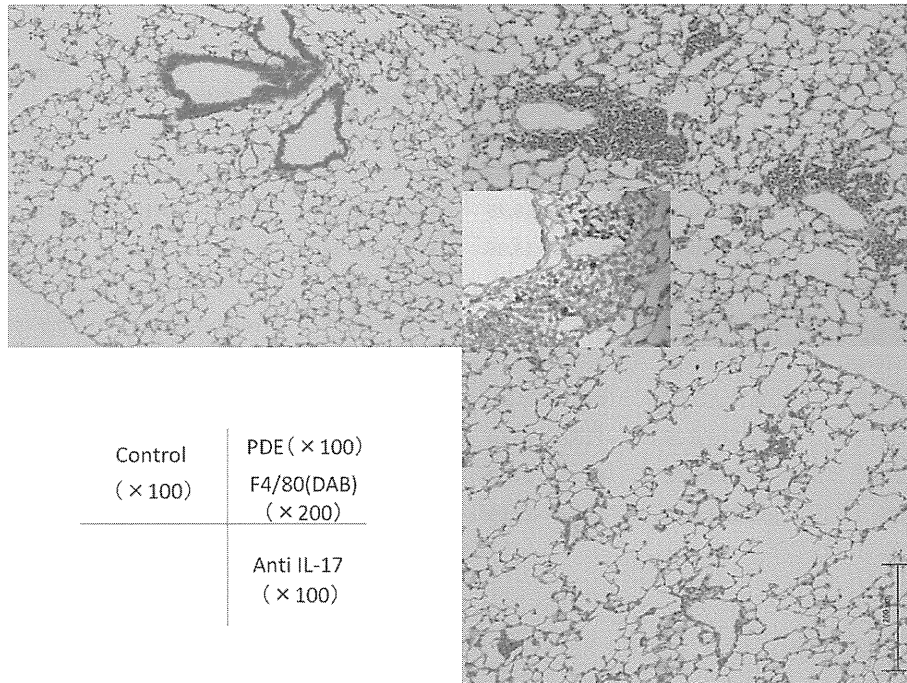


図2. Day10におけるHE染色, DAB染色(F4/80)

F(BD), FITC-rat anti-mouse Ly-6G(BD), APC-rat anti-mouse F4/80を使用した。

病理組織学的には、HE染色および免疫組織学的染色で評価した。免疫組織学的染色としては色素としてDABを用い、抗体としては肺胞マクロファージの評価目的に、rat anti-mouse F4/80(AbD serotec, Clone CI:A3-1)を用いた。肺病変の評価としては、100倍で10視野撮影し、リンパ球集簇病変の1視野あたりの個数を各群で比較した。

肺組織のmRNA発現は、RT-PCRを行い、housekeeping geneをRPS15とし、 $-\Delta\Delta Ct = -(Ct(target) - Ct(RPS15))$ で比較検討した。データは、平均±標準誤差で表示し、2群間の解析にはMann-Whitney *U*検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

当研究における動物実験においてはマウスを最低限必要な数に制限し、処置は気管内投与および腹腔内投与以外は安楽死したマウスからの臓器摘出とした。また、人道的エンドポイントとして呼吸障害、摂食・摂水の困難、気道からの持続的出血、著しい体重減少を設定した。上記内容を当大学動物実験委員会に計画書として提出し承認を受けた(動物実験計画書承認番号 0140022C)。

リンパ球集簇病変

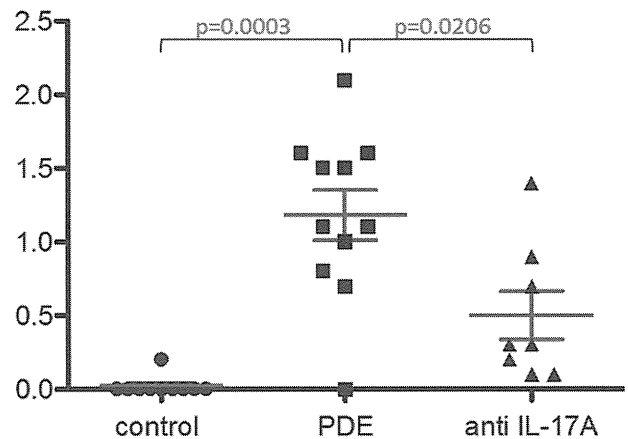


図3. 各群間でのリンパ球集簇病変(100倍10視野平均)

C. 研究結果

Day 10のHE染色では、PDE投与群で傍気道領域や傍血管領域に炎症細胞の浸潤を認め、リンパ球の集簇病変も複数みられた(図2)。免疫組織学的染色では、リンパ球集簇病変内にF4/80陽性細胞がみられ、病変形成にマクロファージが関与していると考えられた(図2右上強拡大)。抗IL-17抗体投与群では、炎症細胞浸潤が減弱しており、リンパ球の集簇病変に関しては有意に減少が見られた(図3)。

表1. 肺組織でのmRNA発現(-ΔCt)

	Control group		PDE group		P value
	mean±SE	95%CI	mean±SE	95%CI	
Il17a	-16.15±0.24	-16.70 - -15.60	-9.53±0.42	-10.45 - -8.60	0.0001
Il17f	-12.41±0.44	-13.40 - -11.41	-10.43±0.24	-10.96 - -9.90	0.0022
Il6	-13.78±0.24	-14.32 - -13.23	-12.77±0.16	-13.14 - -12.41	0.0102
Il23a	-13.72±0.16	-14.09 - -13.36	-13.16±0.13	-13.45 - -12.88	0.0242
TGF-β1(Tgfb1)	-7.48±0.15	-7.81 - -7.15	-7.11±0.21	-7.58 - -6.65	0.1697
Il10	-15.37±0.33	-16.10 - -14.63	-13.67±0.15	-14.01 - -13.34	0.0004
IFN-γ(Ifng)	-12.08±0.16	-12.44 - -11.72	-11.47±0.19	-11.90 - -11.03	0.0166
TNF(Tnf)	-9.77±0.19	-10.19 - -9.35	-9.13±0.16	-9.48 - -8.78	0.0377
Il4	-11.17±0.28	-11.80 - -10.54	-10.70±0.30	-11.37 - -10.02	0.3072
Il13	-14.69±0.25	-15.26 - -14.12	-13.01±0.18	-13.42 - -12.60	0.0004
Il5	-15.51±0.19	-15.93 - -15.09	-13.57±0.20	-14.00 - -13.13	0.0002

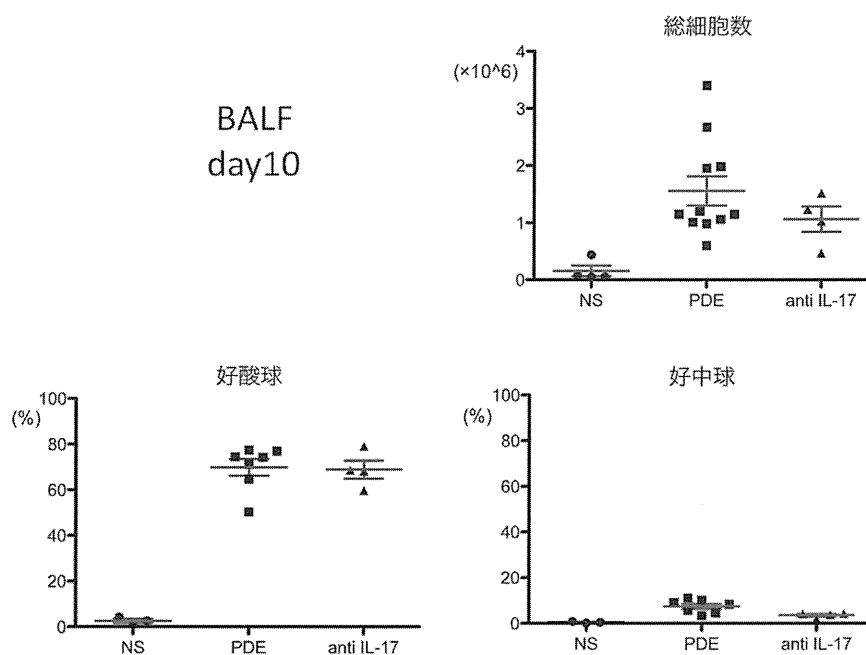


図4. Day10における3群間のBALF比較

RT-PCRを用いた肺組織のmRNA評価では、PDE投与群で、*Il17a*, *Il17f*, *Il6*, *Il23a*, *Il10*, *IFN-γ(Ifng)*, *TNF(Tnf)*, *Il13*, *Il5*で、control群より有意に発現が増加していた(表1).

CytospinによるBALF細胞分画評価では、control群ではほぼマクロファージが占めており、リンパ球、顆粒球はそれぞれ1%前後であった。一方、PDE投与群では、顆粒球約70%、マクロファージ約20%、リンパ球約10%の分画であった。

FCMによる評価では、PDE投与群で *Siglec-F^{high}*, *Ly-6G^{low}*, *SSC^{high}* の群と *Siglec-F^{int}*, *Ly-6G^{high}*, *F4/80^{low}* の

群が多くみられた。*Siglec-F^{high}*, *Ly-6G^{low}*, *SSC^{high}* の群に関しては、*SSC*, *FSC* の分布からも好酸球と考えた。また、*Siglec-F^{int}*, *Ly-6G^{high}*, *F4/80^{low}* の群に関しては、末梢血好中球と異なり肺胞好中球では *Siglec-F* 軽度陽性となることから⁶⁾、同群が肺胞好中球を表していると考えた。FCMにおける上記評価では、day 10において、control群では好酸球 $2.5 \pm 1.0\%$ 、好中球 $0.4 \pm 0.2\%$ であるのに対し、PDE投与群では、好酸球 $69.8 \pm 3.7\%$ 、好中球 $7.4 \pm 1.1\%$ であった(図4)。抗IL-17抗体投与群では、好中球分画で $3.4 \pm 0.5\%$ と有意に低下が見られた ($p=0.0424$)。

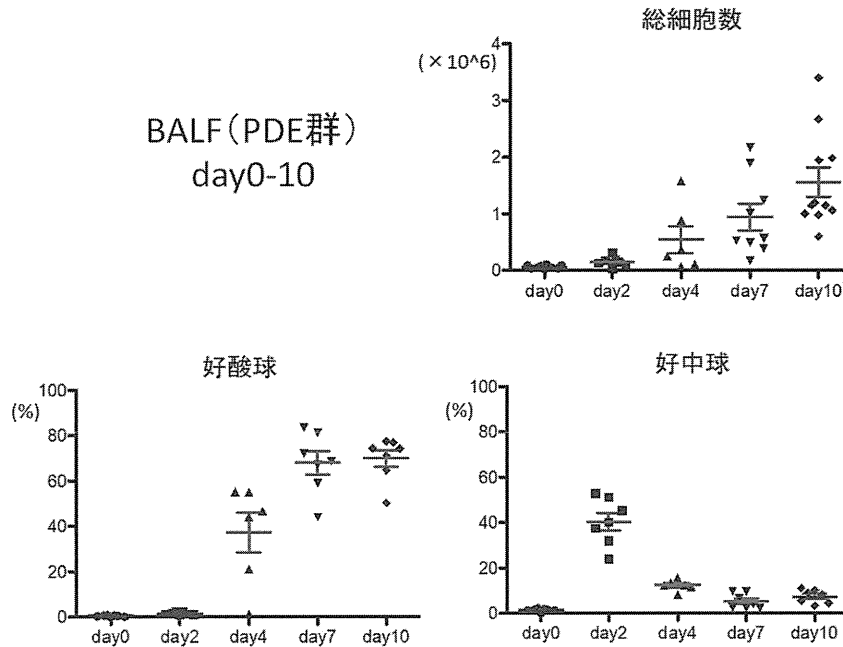


図5. PDE投与群でのday0-10の経時的BALF比較

PDE投与群におけるday 0からday 10までの経時的なBALFのFCM評価では、好中球分画がday 2で $40.4 \pm 3.9\%$ と最大となり、その後減少傾向が見られた(図5)。一方、好酸球分画およびBALF総細胞数では、day 10まで増加傾向が継続して見られた。

D. 考 察

今回、PDE吸入による10日間のBRHPマウスモデルを確立した。C57BL/6マウスでは、吸入を継続していくと病変が減弱していく傾向があり、以前当科で報告したchronic BRHPモデルのA/Jマウスと6週吸入時点で比較しても、病変が弱い傾向がある³⁾。しかし、10日目での比較では、A/Jマウスよりも反応が強いことが確認されている。Chronic BRHPに関しては、進行期の臨床肺検体、マウスモデルともにTh2優位な環境にあることが確認されており²⁾、実際にTh2-prone strain(A/J, BALB/c)での病変が強くみられた³⁾。一方、10日目ではTh1-proneとされているC57BL/6で病変が一番強くみられており、今回のモデルではBRHPの急性期反応をみていると考えた。このBRHPの急性期において、肺組織でTh17系サイトカインが上昇していることを確認し、抗IL-17抗体を用いて病変が減弱するのを確認した。これらのことから、農夫肺や他の急性過敏性肺炎と

同様^{4), 7)~10)}、BRHPの急性期でもIL-17が病変形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、ヒトでは、発症の極初期や抗原による誘発試験の直後には、BALFの好中球分画が増加するとされているが¹¹⁾¹²⁾、今回のマウスモデルでも病変が弱いday 2の段階でBALF好中球分画がピークとなっており、疾患の形成過程初期に好中球が重要な役割をしていることが推測された。当科でBRHP診断目的に施行しているPDE吸入誘発試験の吸入24時間後BALFの検討でも、陽性患者では陰性患者と比較して、リンパ球や好酸球の分画では有意差がなかったものの、好中球分画では有意に高値を示した(表2)。

本検討においては、抗体投与群においての経時的な評価がされておらず、また、IL-17抑制が抗体のみで評価されていることもあり、今後は、遺伝子改変マウスなどを使用した評価など、さらなる研究が必要と考えた。

E. 結 論

今回、PDEを使用したBRHP急性期マウスモデルを確立した。同モデルを使用して、急性期の極初期に肺への好中球遊走が起きていること、急性期反応にIL-17が強く関与していることを確認した。

表2. PDE吸入誘発試験24時間後のBALF細胞分画

細胞分画(%)	吸入陰性		吸入陽性		P value
	mean±SD	95%CI	mean±SD	95%CI	
リンパ球	20.69±22.36	13.45-27.94	24.39±24.47	16.11-32.67	0.6332
好中球	6.63±9.30	3.62-9.65	22.00±15.98	16.59-27.41	<0.0001
好酸球	3.09±6.96	0.83-5.34	2.19±5.34	0.38-4.00	0.8852

参考文献

- 1) Ohtani Y, Saiki S, Sumi Y, et al. Clinical features of recurrent and insidious chronic bird fancier’s lung. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;90:604-610.
- 2) Kishi M, Miyazaki Y, Jinta T, et al. Pathogenesis of cBFL in common with IPF? Correlation of IP-10/TARC ratio with histological patterns. *Thorax* 2008;63:810-816.
- 3) Mitaka K, Miyazaki Y, Yasui M, et al. Th2-biased immune response are important in a murine model of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;154:264-274.
- 4) Hasan SA, Eksteen B, Reid D, et al. Role of IL-17A and neutrophils in fibrosis in experimental hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1663-73.
- 5) Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, et al. Inhalation provocation tests in chronic bird fancier’s lung. *Chest* 2000;118:1382-1389.
- 6) Suzukawa M, Miller M, Rosenthal P, et al. Sialyltransferase ST3Gal-III regulates Siglec-F ligand formation and eosinophilic lung inflammation in mice. *J Immunol* 2013;190:5939-5948.
- 7) Lacasse Y, Girard M, Cormier Y. Recent advances in hypersemnsitivity pneumonitis. *Chest* 2012;142:208-217.
- 8) Selman M, Pardo A, King TE Jr. Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:314-324.
- 9) Simonian PL, Roark CL, Born WK, et al. Gammadelta T cells and Th17 cytokines in hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *Transl Res* 2009;154:222-227.
- 10) Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, et al. Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *J Immunol* 2009;182:1663-1673.
- 11) Seal RM, Hapke EJ, Thomas GO, et al. The pathology of acute and chronic stages of farmer’s lung. *Thorax* 1968;23:469-489
- 12) Fournier E, Tonnel AB, Gosset P, et al. Early neutrophil alveolitis after antigen inhalation in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1985;88:563-566.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

特発性肺線維症 (IPF) におけるオートファジー低下による 筋線維芽細胞分化誘導機序の検討

原 弘道	荒屋 潤	小林 賢司	栗田 裕輔
伊藤 三郎	高坂 直樹	和久井 大	吉井 悠
皆川 俊介	小島 淳	清水健一郎	沼田 尊功
河石 真	金子 由美	中山 勝敏	桑野 和善*

(背景)筋線維芽細胞の集簇からなる fibroblastic foci (FF)の形成は特発性肺線維症 (IPF)の病態の本質である。我々は、昨年度、FFにおいてオートファジーが不十分であることが筋線維芽細胞への分化を誘導し、IPFの病態と関連する可能性を報告した。本年度は、オートファジー、特にミトコンドリア特異的オートファジー：マイトファジーの低下による傷害ミトコンドリア蓄積が過剰な Reactive Oxygen Species (ROS) 産生を誘導し、筋線維芽細胞分化を制御するとの仮説を立て、検証した。(方法)分離培養したヒト肺線維芽細胞を使用した。オートファジーはATG5 ノックダウンで、マイトファジーはParkin 及びPINK1のノックダウンで抑制した。筋線維芽細胞分化は α -smooth muscle actin (SMA)の発現にて評価した。ROS産生はMitoSox Red染色とDCFH-DA法で評価した。(結果)オートファジー/マイトファジー抑制はミトコンドリア由来のROS産生を亢進させ、PDGF受容体、PI3K-Akt経路を活性化し、筋線維芽細胞分化を誘導した。抗酸化剤(NAC, MitoTEMPO)、PDGF阻害剤、PI3K-Akt経路阻害剤(LY294002, Akt1/2キナーゼ阻害剤)はオートファジー阻害による筋線維芽細胞分化を抑制した。(結論)ミトコンドリア由来のROS産生が亢進し、PI3K-Akt経路を活性化することが、不十分なオートファジー/マイトファジーによる筋線維芽細胞分化誘導の機序と考えられた。

(はじめに)

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis : IPF) は、慢性かつ進行性に肺実質の線維化をきたし、進行すると呼吸不全に至る、予後不良の呼吸器疾患である¹⁾。喫煙、加齢がリスクファクターであるが、原因不明で、予後を改善する根本的な治療法は開発されていない。現在までの理解では、上皮細胞の損傷とそれに引き続く修復、治癒機転の異常が病態の中心と考えられており²⁻⁵⁾、病理学的には、筋線維芽細胞の集簇からなる fibroblastic foci (FF) や、FF を覆う再生化生上皮増殖などが特徴的な所見である^{1,6)}。なかでも、FF の形成は、線維化進展の重要な機序と考えられており、IPF の予後を規定する可能性も報告されている⁷⁾。FF を形成する筋線維芽細胞は細胞外基質の過剰産生と、強い収縮能を特徴とし、線維化病態で重要な役割を果たしているが、その由来や分化誘導機序に関する詳細は未だ明らかではない^{8,9)}。上皮細胞や内皮細胞からの epithelial-mesenchymal transition (EMT) や、血中の fibrocyte, pericyte の流入など、種々の細胞の関与の可能性が報告されているが、なかでも、局所に存在する線維芽細胞が TGF β や PDGF などにより筋線維芽細胞へ分化誘導される機序が最も重要視されている⁹⁾。すなわち線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化誘導は、IPF の中心的な線維化進展機序の一つと思われ、その分子病態の解明は重要である。

オートファジーは細胞内分解機構であり、¹⁰⁾ オートファゴゾームと呼ばれるリン脂質の二重膜様構造からなる小胞を形成し、タンパク質や細胞小器官を囲い込み、リソソームと融合し内容物を分解する。生理的な状態では、新陳代謝や小器官の品質管理に関与しており、また、飢餓や様々なストレスやホルモン刺激によって誘導され、細胞内環境維持、免疫応答、感染制御、発癌抑制など、様々な病態と密接に関連している。オートファジーは、腎臓や、皮膚など全身の各種線維化病態においても、過剰な膠原線維産生を抑制する機構として、重要な役割を果たしていることが報告されており^{11,12)}、肺の線維化においてもオートファジーは重要な役割を果たしている可能性があるが、これまえ、IPF の線維化進展におけるオートファジーの役割については十分に検討されていない。さらにオートファジーは細胞分化の

制御においても重要な役割を果たしている¹³⁾ ことから、我々は、オートファジーが筋線維芽細胞への分化を制御し、IPF 病態における筋線維芽細胞の増生に関与している可能性を考え検討を行った。免疫組織学的検討や、培養系の線維芽細胞を用いた検討の結果、IPF 肺組織において、オートファジー活性が不十分であることが筋線維芽細胞への分化を誘導し、病態と関連する可能性を報告した¹⁴⁾ (昨年度報告)。本年度は、オートファジーの低下が筋線維芽細胞へ分化誘導する詳細な細胞分子機序について、特に、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) の関与に注目して検討を行った。

(対象と方法)**分離肺線維芽細胞を用いた検討**

肺癌手術患者由来の肺組織の正常部分より分離培養した肺線維芽細胞を用いて、筋線維芽細胞分化におけるオートファジーの果たす役割について検討した。

分離培養した線維芽細胞のオートファジーを抑制し、筋線維芽細胞への分化を誘導した。LC3, ATG5 のノックダウンによりオートファジーを抑制した。ミトコンドリア特異的オートファジー、マイトファジーの抑制には Parkin, PINK1 のノックダウンを用いた。筋線維芽細胞への分化は α -smooth muscle actin (SMA) と type I collagen の発現により評価した。蛍光染色によるミトコンドリアの形態は TOM20 染色にて、またミトコンドリア膜電位は MitotrackerRed (MTR) を用いて検討した。ROS 産生は MitoSox Red 染色と DCFH-DA で評価した。NAC と MitoTEMPO を抗酸化剤として用いた。PI3K-Akt 経路の阻害には LY294002 と Akt1/2 キナーゼ阻害剤を使用した。PDGF 受容体型チロシンキナーゼの阻害には AG1296 を使用した。

(結 果)**1. オートファジー抑制によるミトコンドリア傷害と ROS 産生増加**

分離培養した線維芽細胞を LC3, ATG5 に対する siRNA を用いてオートファジーを抑制すると、 α -SMA と type I collagen の発現が亢進し、筋線維芽

細胞へ分化することを確認した(昨年度報告). 以後, オートファジー抑制にはATG5のノックダウンを用いた. ATG5のノックダウンによりミトコンドリアの膜電位は低下し(MTR染色), ミトコンドリア由来のROS産生も増加した(MitoSox Red染色). また細胞全体のROS産生も増加した(DCFH-DA assay).

2. オートファジー抑制によるPDGF受容体, PI3K-Akt経路の活性化と筋線維芽細胞分化

ATG5のノックダウンによりPDGF受容体, PI3K, および, Aktのリン酸化が亢進した. LY294002とAkt1/2キナーゼ阻害剤はいずれもATG5ノックダウンによる α -SMAの発現を抑制した. 同様に, AG1296も α -SMAの発現を抑制した. 一方, ATGノックダウンによりERK, p38のリン酸化は若干増加したが, MAPK阻害剤PD98059, p38阻害剤SB203580は α -SMAの発現を抑制しなかった. さらに, TGF β の下流シグナルであるSmad2, 3のリン酸化もATG5ノックダウンの影響を受けず, ALK5阻害剤であるSB431542も α -SMAの発現亢進を抑制しなかった.

3. オートファジー抑制による筋線維芽細胞分化促進におけるROSの役割

オートファジー抑制によるROS産生亢進が, 筋線維芽細胞への分化に関与している可能性を検討した. NAC及びミトコンドリア特異的な抗酸化剤であるMitoTEMPOにより, PDGF受容体のリン酸化, PI3K, Aktのリン酸化, α -SMAの発現はいずれも抑制された.

4. マイトファジー抑制によるPI3K-Akt経路活性化, 筋線維芽細胞分化促進

ミトコンドリアは主要なROS産生源である. そこで, オートファジー抑制による筋線維芽細胞分化誘導は, ミトコンドリアのオートファジーによる処理低下によるROS蓄積が主要な病態である可能性を想定した. そこで, マイトファジー抑制による筋線維芽細胞分化への影響を検討したマイトファジーで中心的役割を果たすParkinとPINK1をノックダウンすると, ATG5ノックダウンと同様に, ROS産生が増加し, PI3K, Aktのリン酸化, α -SMAの発現が亢進した.

(考 察)

Transforming growth factor(TGF)- β やPlatelet-derived growth factor (PDGF)などの成長因子が受容体に結合し, その下流に存在する, smad2/3や, MAPK, PI3K-Akt経路などを介するシグナル伝達経路の活性化による筋線維芽細胞分化が, IPF病態で重要であることは報告されている^{15,16}. 一方我々は不十分なオートファジーが, 筋線維芽細胞分化を誘導することをこれまで報告しており¹⁴, 今回は, オートファジーによる筋線維芽細胞分化制御に関与する細胞内シグナル伝達経路を検討した. その結果PDGF受容体-PI3K-Akt経路が, オートファジー低下による筋線維芽細胞分化において重要である可能性を確認した. 臨床的にPDGFを含む受容体型チロシンキナーゼ阻害剤がIPFの治療に有用である可能性が報告されているが¹⁷, 今回の検討により, オートファジーの低下がPDGF受容体活性化の一つの機序である可能性を示した. さらに抗酸化剤を用いた検討から, オートファジー低下とPDGF受容体活性化による筋線維芽細胞分化を結びつける分子が, ROSであることを明らかにした.

過剰なROSは, 核酸や蛋白を傷害し, 老化や癌化など細胞の機能異常をもたらすが, 一方生理的な濃度では重要な細胞内シグナル伝達物質として働いている¹⁸. このため, 細胞内のROS濃度は, 豊富な抗酸化蛋白などにより厳密に管理されている. 細胞内ROSの主要な産生源はミトコンドリアであり, 傷害を受けたミトコンドリアはROS産生が増加することから, ミトコンドリアの品質管理は細胞内の恒常性維持に重要である¹⁹. オートファジー, 特に, ミトコンドリア特異的オートファジー(マイトファジー)は, 傷害ミトコンドリアを分解, 除去することによりミトコンドリアの品質管理を行っており, マイトファジーが低下すると, 傷害ミトコンドリアが蓄積し, その結果, ROS産生が増加する. 線維化病態においても, ROSは, TGF- β によるNOX4を介した筋線維芽細胞分化や, PTENの不活化によるPI3K-Akt経路活性化, さらには受容体型チロシンキナーゼの活性化を介した筋線維芽細胞分化に関与している可能性が報告されている^{15,20,21}. そこで, 我々は, オートファジーの低下による筋線維芽細胞分化誘導は, 特にマイトファジー低下による作用で

あると考えた。実際マイトファジーの中心分子である Parkin, PINK1 のノックダウンによってもオートファジー抑制と同様に, ROS 産生亢進, PI3K-Akt 経路の活性化, 筋線維芽細胞分化が誘導された。

以上の結果から, 線維芽細胞において, マイトファジーが低下すると傷害ミトコンドリアが蓄積し, 傷害ミトコンドリア由来の ROS が増加し, 結果的に PDGF 受容体-PI3K-Akt 経路の活性化を介して筋線維芽細胞分化が誘導されると考えた。今回の結果は, オートファジー, 特に, マイトファジーによる筋線維芽細胞分化制御の機序に関連する新たな知見であり, IPF 病態を理解する上で重要と思われる。マイトファジーの促進により筋線維芽細胞分化を抑制することが, IPF の新たな治療法開発につながる可能性があり, 今後さらなる検討を予定している。

(結 論)

不十分なマイトファジーにより傷害ミトコンドリアが蓄積し, ROS が増加, PDGF 受容体のリン酸化から PI3K-Akt 経路の活性化を介して筋線維芽細胞分化を誘導することが, IPF 病態に関与している可能性が示唆された。

(文 献)

- 1) Raghu G et al: An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management., *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:788-824.
- 2) Gross TJ, et al: Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 345: 517-25, 2001.
- 3) Harari S, et al: IPF: new insight on pathogenesis and treatment. *Allergy* 65: 537-53, 2010.
- 4) Selman M, et al: Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc.* 3: 364-72. 2006.
- 5) Strieter RM, et al: New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest* 136: 1364-70, 2009.
- 6) Chilosi M, et al: Abnormal re-epithelialization and lung remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis: the role of deltaN-p63. *Lab Invest.*;82:1335-45, 2002
- 7) Nicholson AG, et al: The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 166:173-7 2002
- 8) Fernandez IE, Eickelberg O: New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.* 380:680-8 2012
- 9) Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc.* 9:111-6 2012
- 10) He C et al: Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 43:67-93, 2009.
- 11) Del Principe D et al: Fibroblast autophagy in fibrotic disorders. *J Pathol.* 229:208-20 2013
- 12) Kim SI et al: Autophagy Promotes Intracellular Degradation of Type I Collagen Induced by Transforming Growth Factor (TGF)- β 1. *J Biol Chem.* 15:11677-88. 2012.
- 13) Pan H et al: Autophagic control of cell 'stemness'. *EMBO Mol Med.* 5:327-31 2013
- 14) Araya J, et al: Insufficient autophagy in Idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1:L56-69, 2013.
- 15) Liu RM et al: Oxidative stress and glutathione in TGF- β -mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 48:1-15. 2010
- 16) Sampson N et al: Therapeutic targeting of redox signaling in myofibroblast differentiation and age-related fibrotic disease. *Oxid Med Cell Longev* 2012:458276. 2012
- 17) Richeldi L et al: Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 365:1079-87 2011
- 18) Ray PD et al: Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 24:981-90 2012
- 19) Zhang J : Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox Biol.* 1:19-23. 2013
- 20) Xia H, et al: Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med.* 205(7):1659-72. , 2008.
- 21) Bocchino M et al: Reactive oxygen species are

required for maintenance and differentiation of primary lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS One. 5 :e14003. 2010

(健康危険情報)

なし

(研究発表)

Hara H et al, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2013 Nov;305(10):L737-46.

Araya J et al, Intern Med. 2013;52(20):2295-303.

(知的財産権の出願・登録)

なし

B. サルコイドーシス

サルコイドーシス部門(山口哲生)

サルコイドーシス部門のまとめ

研究協力者	山口哲生	JR 東京総合病院副院長
	四十坊典晴	JR 札幌病院副院長
	今野 哲	北海道大学大学院医学研究科呼吸器内科学分野 講師
	西村正治	北海道大学大学院医学研究科呼吸器内科学分野 教授

サルコイドーシス部門で検討したものは以下の4項目である。

1. 「サルコイドーシス診療Q&A集」の作成

主に非専門医を対象として、診療の手引きにかわりうるものを目指して、本症のQ&A集(総論13項目、各論21項目、よく質問される9項目)を作成した。サルコイドーシスの診療を十分に経験した医師が少なくなっている現状があり、診療の手引きにかわりうるものとして実地臨床での活用が期待される。

2. サルコイドーシスの診断基準の改定

診断時に血清ACE、血清リゾチーム、血清可溶性interleukin-2受容体(sIL-2R)、血清カルシウム、ツベルクリン反応(ツ反)、ガリウムシンチグラフィ、BAL検査がすべて行われて、組織学的にサルコイドーシスと診断された118例について、病期ごとの陽性率を検討した。ACEは60.2%、リゾチームは39.8%、ACEカリゾチームのどちらか一方では70.3%、sIL-2Rは82.2%、カルシウムは1.7%で陽性であった。ツ反は65.2%で陰性であり、ガリウムシンチグラフィでは90.7%で縦隔・肺門または肺野に集積を認めた。BAL検査ではリンパ球増多が74.6%、CD4/CD8比上昇は68.6%であり、91.5%でいずれか一方の陽性所見を認めた。ツ反陰性群と陽性群で特徴的な検査結果を比較検討したが、いずれも有意差がなく、ツ反陰性群において活動性が高いという結果は得られなかった。

3. サルコイドーシスの重症度分類(案)の策定

特定疾患の医療費受給対象者に重症度の考えをとり入れるべきといわれている。都道府県によって受給対象者の判定が異なる場合があるともいわれており、サルコイドーシスの重症度分類(案)を策定して適切な医療費受給対象者を選定する基準としたい。

4. 北海道におけるサルコイドーシスの疫学的検討

2000年から2008年において、北海道にて新規診断されたサルコイドーシス(サ症)患者を対象に、この期間におけるサ症の臨床像の変化を検討した。また、同患者の喫煙率を検討し一般集団との比較検討をおこなった。この期間において、サ症患者の発症年齢は、20-29歳の割合が減少し、50歳以上の年齢層の割合が増加している傾向を認めた。また、診断2年後の肺病変の消失率は14.8%であり、陰影消失群は残存群と比べ40歳未満の割合が多かった。またサ症患者の喫煙率は、一般集団と比較し必ずしも低い結果ではなかった。

1. 「サルコイドーシス診療Q&A集」の作成

A. 研究目的

サルコイドーシスの診療に関しては、現在までに、当班会議と日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会との共同で、「サルコイドーシス治療に関する見解—2003」、および「サルコイドーシスの診断基準と診断の手引き—2006」を作成してきた。しかし、サルコイドーシスは日常診療においては稀な疾患であり、多くの医師にこの内容が十分にいきわたっているとはいいがたく、本症の非専門医にもわかりやすい内容で診療の手引きになるものの作成が必要とされている。サルコイドーシスの臨床像は多彩、かつ多様であり、患者への説明、観察、治療の選択には豊富な知識と経験が必要となる。しかしながら、サルコイドーシスという全身にわたる複雑な疾患を十分に診療できる医師は少なく、適切な診療のための診療の手引きになるものが求められるようになった。本症の診療に必要な幅広い内容をQ&A方式で網羅して、サルコイドーシスの診療にあたる一般医家に対する知識の敷衍を目的として、日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会と共同でこの「サルコイドーシス診療Q&A集」を作成した。

B. 研究方法

サルコイドーシスの診療に長けた当班員および日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会の会員の共同執筆によって、本症の診療における必要な事項をQ&A形式で作成した。以下の点を考慮した。

①Q&Aは、医師・医療者が患者さんからの質問に答えるための参考になるものにする。また、サルコイドーシスという疾病を理解するために通読する著述物として適したものとする。

②コメディカルや患者自身が読む場合も想定して平易な文章で作成する。

本書の全体の構成に関しては、Ⅰ. 総論 Ⅱ. 各論 Ⅲ. よくある患者さんからの質問と回答に大別して作成した。各々の項目で非専門家の医療者でもわかるようなできるだけわかりやすい回答をこころがけた。大きな内容を含む質問事項もいくつかの小

さな質問に分けて回答するようにして読者にわかりやすくすることをこころがけた。また、執筆に関しては倫理面へ配慮した。

C. 研究結果

以下の内容で作成した。

I. 総論

1. サルコイドーシスとはどのような病気ですか？
山口哲生
2. どのような臓器に影響を与えますか？ 宮崎英士
3. どのような経過をたどりますか？ 長井苑子
4. サルコイドーシスの原因 森下宗彦
5. 体の中ではどのような免疫反応がおこっているのでしょうか？ 宮崎泰成
6. サルコイドーシスの組織像はどうなっていますか？ 武村民子
7. サルコイドーシスの疫学について教えてください 吾妻安良太
8. サルコイドーシスの診断はどのように行われますか？ 四十坊典晴
9. サルコイドーシスで行うべき検査とその意味は(循環器以外)？ 四十坊典晴
10. 心臓で行なう検査について教えてください 土田哲人
11. サルコイドーシスと鑑別が必要になるのはどのような疾患ですか？ 渡辺憲太郎
12. サルコイドーシスにはどんな治療法がありますか？ 大道光秀
13. サルコイドーシスの治療薬による副作用はどのようなものがありますか？
副作用を防止するためにどのような工夫(併用治療)が必要ですか？ 赤川しのぶ
14. 難病認定・医療費助成について教えてください。 坂東政司

Ⅱ. 各論

1. 呼吸器病変について 須田隆文, 千田金吾
2. サルコイドーシスの画像所見 酒井文和
3. サルコイドーシス診断のための気管支鏡検査 石井芳樹

4. サルコイドーシスの肺機能 新美 岳
5. サルコイドーシスの眼病変と診断 石原麻美
6. 眼病変の検査方法と治療法 後藤 浩
7. サルコイドーシスの皮膚病変について
岡本祐之, 水野可魚
8. 皮膚病変の鑑別診断について 伊崎誠一
9. 心臓サルコイドーシスはどのように診断するか
森本紳一郎, 加藤靖周
10. 心臓病変の特殊治療方法について 矢崎善一
11. 神経病変について 西山和利
12. サルコイドーシスの筋病変 熊本俊秀
13. サルコイドーシスの骨, 関節病変
玉田 勉, 奈良正之
14. サルコイドーシスの腎, 泌尿器病変
伊藤由美, 鈴木栄一, 成田一衛
15. 肝, 消化管病変, 脾病変について 立花暉夫
16. 内分泌, 高カルシウム血症 濱田邦夫
17. サルコイドーシスの上気道病変 山口哲生
18. 唾液腺, 涙腺について 森 由弘
19. サルコイドーシスにおける血球の異常について
立花暉夫
20. Heerfordt 症候群 栗野 康, 生島壮一郎
21. レフグレン症候群 佐藤滋樹
22. Blau 症候群 金澤伸雄

III. 質問

1. サルコイドーシスは遺伝しますか? 山口悦郎
2. サルコイドーシスはうつりますか? 山口悦郎
3. サルコイドーシスの全身症状について 山口哲生
4. サルコイドーシスは妊娠・出産に影響しますか?
四十坊典晴
5. サルコイドーシスは悪性腫瘍を合併しやすいですか?
片岡幹男
6. サルコイドーシスと膠原病は関係がありますか?
三浦佳代, 高橋和久
7. 喫煙はサルコイドーシスに影響を与えますか?
今野 哲
8. サルコイドーシスの合併症にはどのようなものがありますか?
山口哲生
9. サルコイドーシスの日常生活に注意する点は?
山田嘉仁

D. 考察と結論

本Q&A集は、実地臨床の場に配布され使用されている。医師・医療者が患者さんからの質問に答えるために、また、サルコイドーシスという疾病を理解するために通読する著述物として適したものとなっていると考えられる。

2. サルコイドーシスの診断基準の改定

A. 研究目的

サルコイドーシス診断基準における特徴的な検査項目の検討を組織診断群において行う。陽性率が高い検査項目の抽出を目的とする。また、本邦において成人の結核の既感染率が著しく低下している現在において、ツ反の陰性が活動性を反映しているかどうか陰性群と陽性群で検討し、ツ反の意義についても検討する。これらの結果に基づいてサルコイドーシスの診断基準の特徴的な検査項目を検討した。

B. 研究方法

診断時にACE(カットオフ値23.7U/mL), リンチー

ム(カットオフ値11.5mg/ml), sIL-2R(カットオフ値466U/mL), カルシウム(カットオフ値10.4 mg/dL), ツ反(長径10mm未満が陰性), ガリウムシンチグラフィ, BALをすべて検査しており, 組織学的にサルコイドーシスと診断された118例について, 病期ごとの陽性率を検討した。胸部X線病期は病期0が26例, 病期1が51例, 病期2が36例, 病期3が5例であった。非喫煙者が55例で喫煙者が63例であった。眼病変は118例中80例(67.8%)に認められ, 病期0は26例中22例(84.6%), 病期1は51例中34例(66.7%), 病期2は36例中20例(55.6%), 病期3は5例中2例(40.0%)に眼病変が認められた。いずれの症例も未治療である。

Table 1. Blood levels of ACE activity, lysozyme and sIL-2R and their positive rates in sarcoidosis according to radiographic stage

Stage	n	ACE (U/ml)	Lysozyme ($\mu\text{g/ml}$)	sIL-2R (U/ml)
Stage 0	26	21.9 (6.6)	10.3 (8.0)	652 (298)
Stage 1	51	26.9 (8.6)	10.8 (4.8)	898 (407)
Stage 2	36	30.5 (10.1)	11.7 (4.8)	1070 (608)
Stage 3	5	23.2 (9.9)	12.2 (6.5)	608 (199)
Total	118	26.7 (9.4)	11.0 (5.8)	884 (448)

Stage	ACE	Lysozyme	ACE and/or lysozyme	sIL-2R
Stage 0	11/26 (42.3)	9/26 (34.6)	15/26 (57.7)	19/26 (73.1)
Stage 1	30/51 (58.8)	19/51 (37.3)	35/51 (68.6)	45/51 (88.2)
Stage 2	29/36 (80.6)	16/36 (44.4)	30/36 (83.3)	29/36 (80.6)
Stage 3	1/5 (20.0)	3/5 (60.0)	3/5 (60.0)	4/5 (80.0)
Total	71/118 (60.2)	47/118 (39.8)	83/118 (70.3)	97/118 (82.2)

Values are mean (SD) or positive cases/total cases (%). ACE; angiotensin converting enzyme and sIL-2R; soluble interleukin 2 receptor. Normal ranges of ACE activity, lysozyme and sIL-2R are 14.1-23.7 U/ml, 4.2- 11.5 $\mu\text{g/ml}$ and 124-466 U/ml, respectively.

Table 2. Positive rates of tuberculin skin test, Galium scintigram and serum calcium in sarcoidosis according to radiographic staging

Stage	Tuberculin test	Galium scintigram	Calcium
Stage 0	16/26 (61.5)	21/26 (80.8)	0/26 (0)
Stage 1	33/51 (64.7)	50/51 (98.0)	1/51 (2.0)
Stage 2	24/36 (66.7)	32/36 (88.9)	0/36 (0)
Stage 3	4/5 (80.0)	4/5 (80.0)	1/5 (20.0)
Total	77/118 (65.2)	107/118 (90.7)	2/118 (1.7)

Positive results of sarcoidosis in tuberculin skin test show less than 10 mm in greater diameter. Normal range of serum Calcium is 8.5 to 10.4 mg/dL. Values are positive cases/total cases (%)

C. 研究結果

ACEは60.2% (71/118), リゾチームは39.8% (47/118), ACEまたはリゾチームのいずれかでは70.3% (83/118), sIL-2Rは82.2% (97/118)で陽性であった (Table 1). ツ反は65.2% (77/118)で陰性であり, カルシウムは1.7% (2/118)で上昇を認め, ガリウムシンチグラフィでは90.7%(83/118)で縦隔・肺門または肺野に集積を認めた (Table 2). BAL検査ではリンパ球増多が74.6% (カットオフ値: 非喫煙者30%, 喫煙者10%¹⁾; 88/118), CD4/CD8比上昇は68.6%(カットオフ値3.5; 81/118)であり, 91.5%(108/118)でい

ずれか一方の陽性所見を認めた (Table 3).

次にツ反陰性群と陽性群で特徴的な検査結果を比較検討した. ツ反陽性群と陰性群ではACEの陽性率は58.5% (24/41)と61.0%(47/77), リゾチームの陽性率は39.0% (16/41)と40.3%(31/77), sIL-2Rの陽性率は80.5% (33/41)と83.1%(64/77)であった (Table 4). また, BAL検査のリンパ球増多がツ反陽性群では75.3% (31/44)で, ツ反陰性群では74.0% (57/77)であり, CD4/CD8比上昇はツ反陽性群では61.0% (25/44)で, ツ反陰性群では72.7% (56/77)であった. ガリウムシンチグラフィにおいてはツ反陽性群で90.2%(37/44), ツ反陰性群で90.9%(70/77)で縦隔・

Table 3. Lymphocyte proportions and CD4/CD8 ratios in sarcoidosis according to radiographic staging

Stage	Lymphocyte	CD4/CD8	lymphocyte and/or CD4/CD8
Stage 0	15/26 (57.7)	17/26 (65.3)	22/26 (84.6)
Stage 1	42/51 (82.4)	40/51 (78.4)	50/51 (98.0)
Stage 2	28/36 (77.8)	22/36 (61.1)	31/36 (86.1)
Stage 3	3/5 (60.0)	2/5 (40.0)	5/5 (100.0)
Total	88/118 (74.6)	81/118 (68.6)	108/118 (91.5)

Values are mean (SD). Increased proportions of BAL fluid lymphocytes are more than 30% in sarcoidosis nonsmokers and more than 10% in sarcoidosis smokers. Increased proportions of BAL fluid CD4/CD8 are more than 3.5 in sarcoidosis.

Table 4. Blood levels of ACE activity, lysozyme and sIL-2R and their positive rates in sarcoidosis according to tuberculin skin test status

Tuberculin test	n	ACE (U/ml)	Lysozyme (μ g/ml)	sIL-2R (U/ml)
Positive	41	26.6 (9.8)	11.0 (7.2)	871 (462)
Negative	77	26.8 (9.1)	11.0 (4.8)	892 (491)
Total	118	26.7 (9.4)	11.0 (5.8)	884 (448)

Tuberculin test	ACE	Lysozyme	sIL-2R
Positive	24/41 (58.5)	16/41 (39.0)	33/41 (80.5)
Negative	47/77 (61.0)	31/77 (61.0)	64/77 (83.1)
Total	71/118 (60.2)	47/118 (39.8)	97/118 (82.2)

Values are mean (SD) or positive cases/total cases (%). ACE; angiotensin converting enzyme and sIL-2R; soluble interleukin 2 receptor. Normal ranges of ACE activity, lysozyme and sIL-2R are 14.1-23.7 U/ml, 4.2- 11.5 μ g/ml and 124-466 U/ml, respectively.

Table 5. Positive rates of BAL fluid lymphocyte proportions and CD4/CD8 ratios and Galium scintigram in sarcoidosis according to tuberculin skin test status

Tuberculin skin test	Lymphocyte	CD4/CD8	Galium scintigram
Positive	31/41 (75.6)	25/41 (61.0)	37/41 (90.2)
Negative	57/77 (74.0)	56/77 (72.7)	70/77 (90.9)
Total	88/118 (74.6)	81/118 (68.6)	107/118 (90.7)

Values are mean (SD). Increased proportions of BAL fluid lymphocytes are more than 30% in sarcoidosis nonsmokers and more than 10% in sarcoidosis smokers. Increased proportions of BAL fluid CD4/CD8 are more than 3.5 in sarcoidosis.

肺門または肺野に集積を認めた (Table 5)。いずれも有意差がなく、ツ反陰性群において活動性が高いという結果は得られなかった。

D. 考 察

「サルコイドーシスの診断基準と診断の手引き—2006」²⁾では、6項目の全身反応を示す検査所見(①

BHL, ②血清ACE値上昇, ③ツ反陰性, ④ガリウムシンチグラフィにおける著明な集積所見, ⑤BAL検査でリンパ球増加またはCD4/CD8比高値, ⑥血清あるいは尿中カルシウム高値)のうち2項目以上をみだすことで全身反応を示す検査所見が陽性とした。①BHLをサルコイドーシスの典型症例の所見として, 大きくとりあげられたことは当初の方針どおりであった。しかし, 2006年の改定時はこれらの検査結果の本邦での陽性率は示されていない。今回の検討ではそれぞれの陽性率に関してはACEが60.2%, リゾチームが39.8%, ACEカリゾチームのどちらでも70.3%, ツ反陰性が65.2%, sIL-2Rが82.2%, カルシウムが1.7%, ガリウムシンチグラフィが90.7%であり, BAL検査ではリンパ球増多が74.6%, CD4/CD8比上昇は68.6%であり, 91.5%でどちらか一方の陽性所見を認めた。尿中カルシウムに関してはカットオフ値の設定が難しいこと, 蓄尿を必要とすることもあり, 外来での検査は困難である。陽性率の高い検査としては, BAL検査, ガリウムシンチグラフィ, sIL-2R, ACEカリゾチーム, ツ反陰性となった。

結核既感染率に関しては, 本邦では広範なBCG接種の普及のため, 乳幼児の場合には偽陽性の影響のため, 正確な値を任意の年齢に対して求めるのは困難であるが, 推定として1990年の時点では, 5歳0.2%, 10歳0.4%, 15歳0.6%, 20歳1.3%, 40歳8.5%, 50歳23.1%, 60歳48.2%, 70歳65.3%とされ, 戦前生まれの世代と後の世代との格差が大きいと考えられている。このように成人の結核の既感染率が著しく低下する中, ツ反陰性を陽性所見して, サルコイドーシスの特徴的な検査所見とすることの意義を現時点で検討する必要があると考えられる。ツ反陰性群と陽性群において, 特徴的とさせる検査はいずれも有意差がなく, ツ反陰性群において活動性が高い

という結果は得られなかった。

E. 結 論

今回の検討ではそれぞれの陽性率に関してはACEが60.2%, リゾチームが39.8%, ACEカリゾチームのどちらでも70.3%, ツ反陰性が65.2%, sIL-2Rが82.2%, カルシウムが1.7%, ガリウムシンチグラフィが90.7%であり, BAL検査ではリンパ球増多が74.6%, CD4/CD8比上昇は68.6%であり, 91.5%でどちらか一方の陽性所見を認めた。ツ反陰性群において活動性が高いという結果は得られなかった。本邦におけるサルコイドーシスの特徴的な検査としてはBHLに加えて, sIL-2R, ACEまたはリゾチーム, ガリウムシンチグラフィ, BAL検査が望ましいと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

文 献

- 1) 四十坊典晴, 市村志保, 伊藤峰幸, 他. 類上皮細胞肉芽腫を証明したサルコイドーシス516例における各種検査所見の解析. 日サ会誌 2007; 27: 29.
- 2) サルコイドーシスの診断基準と診断の手引き—2006. 日サ会誌 2007; 27: 89.

3. サルコイドーシスの重症度分類(案)の策定

A. 研究目的

特定疾患の医療費受給においては, 重症度の考えをとりいれて受給を行なうべきといわれている。都

道府県によって受給対象者の判定が異なる場合があるともいわれており, 適切な医療費受給対象者を選定する基準をもうけるために, サルコイドーシスの重症度分類(案)を策定することを目的とした。