

B. 研究方法

重症度の策定においては、治療の必要な重症者が適切な医療費助成をうけられるように、また軽症者において無駄な医療費助成が行われないように策定すべきである。当班の班員と協力者、ならびにコイドーシス/肉芽腫性疾患学会の有識者らの意見をまとめて重症度の策定を行った。策定においては倫理面にも配慮した。

C. 研究結果

以下のように、3項目によるスコアで判定する。

1. 臓器病変数

- 1 または2臓器病変 1
3臓器病変以上 2

2. 治療の必要性の有無(全身ステロイド治療, 全身免疫抑制剤治療)

- 治療なし 0
治療あり 2

3. サルコイドーシスに関連した各種臓器の身体障害の認定の程度

- 身体障害なし 0
身体障害3または4 1
身体障害1または2 2

合計スコアによる判定

- グレード 1 1
グレード 2 2
グレード 3 3または4
グレード 4 5または6

グレード3と4を助成対象とする。

D. 考察と結論

サルコイドーシスは全身性疾患であり、①臓器病変数、②全身治療(副腎皮質ステロイドホルモンまたは免疫抑制剤の全身投与による治療)の必要性、③本症の臓器障害による身体障害の認定の程度など種々の要素をとりいれて重症度分類案を策定した。今後の日常臨床でこれを検証して来年度までに確定する予定である。

4. 北海道におけるサルコイドーシスの疫学的検討

A. 研究目的

近年の一般人口の高齢化は、多くの疾患の病態に影響を及ぼしている。本邦のサ症においては、性差により特徴的な発症年齢の分布を示すことが知られている。また、発症年齢は、肺サ症の臨床経過に影響することも知られている。また、欧米では、喫煙はサ症の発症に抑制的にはたらく可能性を示す疫学調査結果があるが、本邦においては明らかではない。本研究では、北海道におけるサルコイドーシス患者において、近年の発症年齢及び臨床像の変化を把握することを目的とする。また、北海道のサ症患者の喫煙歴を一般集団と比較し、また、喫煙がサ症の臨床経過に及ぼす影響を検討する。

B. 研究方法

2000年1月から2008年12月までの間に、北海道大学病院、札幌鉄道病院(現JR札幌病院)、大道内科・呼吸器科クリニックを受診し、新規診断されたサ症患者605人を対象に喫煙歴を調査し、各種臨床所見との関連について検討した。また、2000年4月から2009年3月までの間に申請された臨床調査個人票を用いて、北海道地区における新規サ症患者の臨床像を調査し、また各年度の臨床像の推移について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、特定疾患治療研究事業における臨床調査個人票の研究目的利用に関する要綱(平成16年10月29日)に基づき、北海道大学大学院医学研究科呼吸器内科学分野教授西村正治による申請、自治医科

表1 患者背景(論文1より引用)

	Total (n = 388)	Male (n = 151)	Female (n = 237)	P [†]
Male/female [‡]	151 / 237	151 / 0	0 / 237	
Age (median, range) [§]	49, 13–79	32, 15–78	53, 13–79	<0.001
Smoking status (never/former/current) [‡]	178/54/156	31/30/90	147/24/60	<0.001
Stage (0/I/II/III/IV) [‡]	81/190/95/22/0	24/72/47/8/0	57/118/48/14/0	0.057
Stage 0, n (%) [‡]	81 (20.9)	24 (15.9)	57 (24.1)	0.072
Stage I, n (%) [‡]	190 (49.0)	72 (47.7)	118 (49.8)	0.764
Stage II, n (%) [‡]	95 (24.5)	47 (31.1)	48 (20.3)	0.021
Stage III, n (%) [‡]	22 (5.7)	8 (5.3)	14 (5.9)	0.978
Pulmonary involvement (stage I–III), n (%) [‡]	307 (79.1)	127 (84.1)	180 (75.9)	0.072
Lung parenchymal involvement (stage II–III), n (%) [‡]	117 (30.2)	55 (36.4)	62 (26.2)	0.042
Extra pulmonary involvement, n (%) [‡]	315 (81.2)	112 (74.2)	203 (85.7)	0.004
Ocular involvement, n (%) [‡]	249 (64.2)	83 (55.0)	166 (70.0)	0.004
Cutaneous involvement, n (%) [‡]	87 (22.4)	21 (13.9)	66 (27.8)	0.002
Cardiac involvement, n (%) [‡]	23 (5.9)	11 (7.3)	12 (5.1)	0.495
Serum ACE activity (median, range) [§]	24.3, 0.9–66.9	23.9, 4.1–66.9	23.9, 0.9–57.8	0.434
Reason to visit hospital (symptom/health check) [‡]	265/123	84/67	181/56	<0.001

[†] P: male versus female.

[‡] χ^2 test.

[§] Mann–Whitney U test.

ACE, angiotensin converting enzyme.

表2 サ症患者の年齢別喫煙率(論文1より引用)

Smoking status	Age								Total
	0–19 [†]	20–29	30–39	40–49	50–59	60–69	≥70		
Male	Current n (%)	1 (33.3)	53 (81.5)	9 (39.1)	8 (66.6)	9 (60.0)	10 (41.7)	0 (0)	90 (59.6)
	Former, n (%)	0 (0)	4 (6.2)	6 (26.1)	2 (16.7)	5 (33.3)	8 (33.3)	5 (55.6)	30 (19.9)
	Never, n (%)	2 (66.7)	8 (12.3)	8 (34.8)	2 (16.7)	1 (6.7)	6 (25.0)	4 (44.4)	31 (20.5)
	Total, n (%)	3 (100)	65 (100)	23 (100)	12 (100)	15 (100)	24 (100)	9 (100)	151 (100)
Female	Current n (%)	1 (25.0)	23 (62.2)	14 (45.2)	7 (30.4)	15 (19.5)	4 (10.0)	2 (8.0)	66 (27.9)
	Former, n (%)	0 (0)	5 (13.5)	5 (16.1)	1 (4.4)	8 (10.4)	3 (7.5)	2 (8.0)	24 (10.1)
	Never, n (%)	3 (75.0)	9 (24.3)	12 (38.7)	15 (65.2)	54 (70.1)	33 (82.5)	21 (84.0)	147 (62.0)
	Total, n (%)	4 (100)	37 (100)	31 (100)	23 (100)	77 (100)	40 (100)	25 (100)	237 (100)

[†] Smoking is prohibited for those under 20 in Japan.

大学呼吸器内科教授杉山幸比古の承諾を経て厚生労働省健康局疾病対策課長からの使用許可(平成23年9月29日)を得た上での検討である。また、北海道大学病院「自主臨床研究審査委員会」に「サルコイドーシスの臨床背景に関する検討」として審査を申請し、平成23年11月9日付けで承認されている。

C. 研究結果

1. サルコイドーシス患者の喫煙率の検討

検討したサ症患者の背景を表1に、実際のサ症患者の喫煙率を表2に示す。厚生労働省による本邦の喫煙率、及び2006年に、厚生労働省班研究にて、北海道土幌町で調査された結果(Shimizu K, *et al.* 清水薫子ら アレルギー 2008)と比較しても、本邦では、サ

症患者の喫煙率は必ずしも低いという結果ではなかった。むしろ、特に若年者においては、サ症患者の喫煙率は一般集団と比べ高かった。

2. 個人調査票に基づくサ症患者の疫学研究

対象の特徴を表3に示す。男女比は0.55(表1: 男性637例, 女性1159例)で、年齢中央値は52歳(男性38歳, 女性54歳)であった。罹患臓器では87.0%で胸部異常影を認め、そのうち臨床病期0期は13.0%, I期は45.3%, II期は34.5%, III期は7.2%であった。眼病変の罹患割合は61.7%で、皮膚病変は20.7%であった。いずれの罹患臓器割合も男女差を認め、肺病変の割合は男性で高く、眼病変と皮膚病変は女性で高かった。年度ごとの推移については、男女比の変化は明らかではなかったが、20-29歳の

表3 対象の特徴

	計	女性	男性	P 値
^a 数	1796	1159	637	<0.001
^b 年齢 (中央値, 範囲)	52,12-93	54,12-87	38,14-93	<0.001
^a Stage 0, n (%)	232(13.0)	176(15.2)	56(8.8)	<0.001
^a Stage I, n (%)	811(45.3)	560(48.4)	251(39.7)	<0.001
^a Stage II, n (%)	617(34.5)	346(29.9)	271/633(42.8)	<0.001
^a Stage III, n (%)	129(7.2)	74(6.4)	55(8.7)	0.118
^a 肺病変(Stage I-III), n (%)	1557(87.0)	980(84.8)	577(91.1)	<0.001
^a 眼病変, n (%)	1090 (61.7)	785 (68.6)	305 (49.1)	<0.001
^a 皮膚病変, n (%)	370(20.7)	275(23.8)	95(15.0)	<0.001
^a 組織診断, n (%)	1085(61.7)	676(59.9)	409(67.0)	0.004

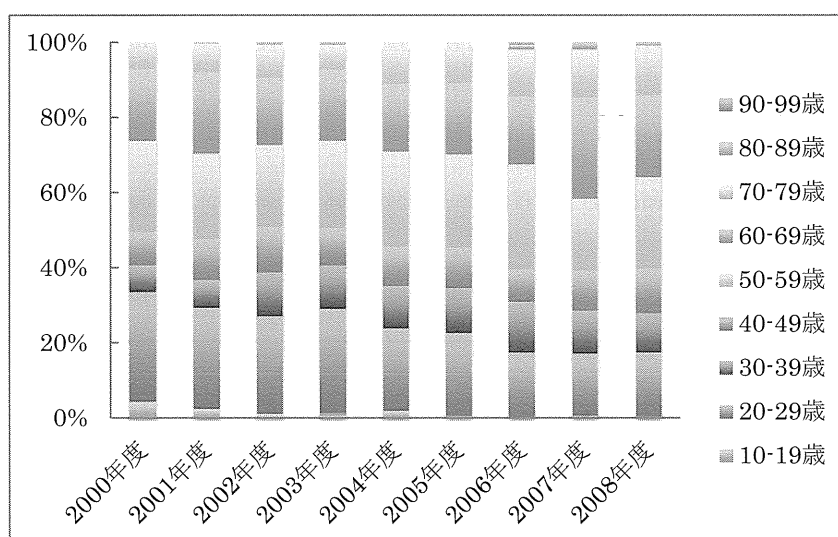


図1 2000-2008年度におけるサルコイドーシス患者の年齢分布

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があった(図1)。罹患臓器については、眼病変の罹患割合が増加している印象であった傾向を示した(表4)。

3. 肺サルコイドーシスの自然経過に関する検討

605例のサ症患者においてStage0を除外し、診断2年後の病期分類を行い、陰影消失の有無を評価した(全身ステロイド投与による陰影消失例除く)。また、陰影消失に関連する因子の検討をおこなった。2年間の経過を追えた肺サルコイドーシス患者337名のうち(表5)陰影消失を認めたのは50名(14.8%)であった。陰影消失群は残存群と比べ、40歳未満が多く、性別、喫煙の有無によらず有意な関連を認めた(多変量解析 $P<0.05$)。いっぽう、肺病変の臨床

病期、肺外病変の有無は陰影消失と有意な関連を認めなかった。

D. 結 論

札幌市3病院において診断され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。むしろ特に若年者においては、サ症患者の喫煙率は、一般集団と比べ高かった。2000年から2008年の検討において、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歳未満が多かった。

表4 サルコイドーシス患者の年度別特徴

	2000 年度	2001 年度	2002 年度	2003 年度	2004 年度	2005 年度	2006 年度	2007 年度	2008 年度
数	214	285	273	202	145	141	161	157	218
男女比	75/139 (0.54)	100/185 (0.54)	118/155 (0.76)	60/142 (0.42)	51/94 (0.54)	50/91 (0.55)	58/103 (0.56)	50/107 (0.47)	75/143 (0.52)
Stage 0, n (%)	23 (10.8)	30 (10.6)	33 (12.1)	30 (14.9)	17 (11.7)	24 (17.1)	25 (15.6)	18 (11.5)	32 (14.8)
Stage I, n (%)	105 (49.5)	131 (46.1)	118 (43.2)	96 (47.5)	63 (43.4)	60 (42.9)	69 (43.1)	79 (50.3)	90 (41.7)
Stage II, n (%)	73 (34.4)	107 (37.7)	99 (36.3)	60 (29.7)	52 (35.9)	39 (27.9)	56 (35.0)	50 (31.8)	81 (37.5)
Stage III, n (%)	11 (5.2)	16 (5.6)	23 (8.4)	16 (7.9)	13 (9.0)	17 (12.1)	10 (6.3)	10 (6.4)	13 (6.0)
肺病変 (Stage I-III), n (%)	189 (89.2)	254 (89.4)	240 (87.9)	172 (85.1)	128 (88.3)	116 (82.9)	135 (84.4)	139 (88.5)	184 (85.2)
眼病変, n (%)	109 (51.9)	154 (55.4)	138 (52.5)	135 (67.5)	107 (73.8)	88 (63.3)	110 (68.3)	113 (73.4)	136 (63.0)
皮膚病変, n (%)	41 (19.5)	50 (17.7)	60 (22.1)	43 (21.3)	29 (20.0)	37 (26.2)	39 (24.2)	25 (15.9)	46 (21.2)
組織診断, n (%)	132 (64.1)	160 (57.6)	145 (54.1)	110 (55.8)	94 (68.1)	85 (65.4)	102 (65.8)	104 (68.0)	153 (71.5)

表5 対象の背景

	消失群 (n=50)	残存群 (n=283)	P 値
女性, n (%)	36 (72.0)	178 (62.9)	0.281
年齢 (40 歳以上), n (%)	19 (38.0)	184 (65.0)	<0.001
現喫煙者, n (%)	17 (34.0)	109 (38.5)	0.654
血清 ACE 活性 (IU/ml) (中央値, 範囲)	25.7, 13.2-66.9	25.1, 0.9-57.8	0.131
Stage (I/II/III/IV)	36/16/2/0	178/87/18/0	
Stage I, n (%)	32 (64.0)	178 (62.9)	0.992
Stage II, n (%)	16 (32.0)	87 (30.7)	0.991
Stage III, n (%)	2 (4.0)	18 (6.4)	0.261
Stage II-III, n (%)	18 (36.0)	105 (37.1)	0.991
肺外病変, n (%)	38 (76.0)	220 (77.7)	0.93
眼病変, n (%)	31 (62.0)	190 (67.1)	0.585
皮膚病変, n (%)	6 (12.0)	48 (17.0)	0.503
心病変, n (%)	1 (2.0)	18 (6.4)	0.371
組織診断, n (%)	36 (72.0)	195 (68.9)	0.786

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 四十坊典晴, 山口哲生. 特集 注目される呼吸器疾患の病態・診断・治療 難治性サルコイドーシスの治療 呼吸器内科 23: 90-95, 2013.
- 2) 四十坊典晴. 特集 職業性肺疾患の最新動向 アスベスト関連呼吸器疾患 呼吸器内科 23: 443-448, 2013.
- 3) 四十坊典晴, 山口哲生. 特集 サルコイドーシス診断と治療の進歩 診断基準の改定に向けて 呼吸器内科 24: 199-205, 2013.
- 4) 四十坊典晴, 山口哲生. 特集② 知っておきたい呼吸器疾患—専門医の診方・治し方 肺サルコイドーシス 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 85: 618-623, 2013.
- 5) 四十坊典晴, 伊藤峰幸, 市村志保, 中島一貴, 西野雅彦, 平賀洋明. 気管支血管束病変, 空洞を伴いステロイド少量治療で改善した肺サルコイドーシスの1例 日サ会誌33: 123-126, 2013
- 6) 四十坊典晴, 山口哲生. 特集 びまん性肺疾患の画像—多彩なプロファイル— サルコイドーシス—難治例とその画像所見— 日呼吸誌 2: 521-526, 2013.
- 7) 四十坊典晴, 山口哲生. 特集 サルコイドーシスのすべて サルコイドーシスの難治例への取り組み 成人病と生活習慣病 43: 1261-1266, 2013.
- 8) 山口哲生, 杉山幸比古, 工藤翔二 特集 サルコイドーシスのすべて 座談会「サルコイドーシスの過去・現在・未来」成人病と生活習慣病 43:, 2013.
- 9) Hattori T, Konno S, Shijubo N, Ohmichi M, Nishimura M. An increased prevalence of cigarette smoking in Japanese patients with sarcoidosis. *Respirology*. 2013 Jul 2. doi: 10.1111/resp.12153. [Epub ahead of print]
- 10) Isshiki T, Yamaguchi T, Yamada Y, Maemura K, Makita K, Takeshima H, Hirasawa Y, Yamaguchi Y,

- Hosoki K, Suzuki M, Kono C, Terada J, Tatsumi K. Usefulness of low-dose methotrexate monotherapy for treating sarcoidosis. *Intern Med*. 2013;52(24):2727-32.
- 11) Yamada Y, Terada J, Tatsumi K, Kono C, Tanno M, Takemura T, Yamaguchi T. Respiratory bronchiolitis and lung carcinoma. *Respir Investig*. 2013 51:184-90.
 - 12) Ryogo Minamimoto, Yoko Miyata, Momoko Okasaki, Osamu Okazaki, Yoshihito Yamada, Tetsuo Yamaguchi and, Michiaki Hiroe. Long fasting is effective in inhibiting physiological myocardial 18F-FDG uptake and for evaluating active lesions of cardiac sarcoidosis *EJNMMI Research*. 2013 in press.
 - 13) 服部健史, 今野 哲. 特集 サルコイドーシス診断と治療の進歩 本邦サルコイドーシスの疫学研究 呼吸器内科 24: 193-198, 2013.
 - 14) 服部健史, 今野 哲. サルコイドーシスの疫学 成人病と生活習慣病 43: 1175-1180, 2013

2. 学会発表

- 1) 四十坊典晴, 山口哲生. 委員会報告「サルコイドーシス診断基準改定(案)」第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会 2013年10月 東京
- 2) 山口哲生 シンポジウム「サルコイドーシスの抗菌薬治療—現状と今後の展望—」ドキシサイクリンによるサルコイドーシスの治療 第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
- 3) 山口哲生 会長講演「症例から学ぶサルコイドーシスの治療」第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
- 4) 宮下直也, 鈴木未佳, 河野千代子, 山田嘉仁, 山口哲生「サルコイドーシス経過観察中に心不全を発症した高齢者女性の一例」第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
- 5) 宮下直也, 鈴木未佳, 河野千代子, 山田嘉仁, 山口哲生「高度の肺高血圧症を合併しPVOD様所見を呈したサルコイドーシスの一例」第33回東京サルコイドーシス/肉芽腫性疾患研究会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

サルコイドーシス患者における 血清カテプシンSの臨床的意義 —罹患臓器数やステロイド治療との関連について—

山口 悦郎*

以前我々が見出したサルコイドーシスの新規血清マーカーであるカテプシンS (CTSS)の、詳細な臨床的意義を検討した。対象は34名のサルコイドーシス患者で、経過観察中央値2.7年の間に採取した115試料のCTSSを測定した。その結果、CTSS濃度は罹患臓器数が増えると高くなり、特に罹患臓器数3以上では、2以下に比して有意に高値であった。疾患が緩解に至ると、CTSSは全例低下した。CTSSは血清ACE活性と高度に相関していたが、全身ステロイドが投与されACEが低下した時点でもCTSSが高い場合があり、残存病変量を反映するなど独自の臨床的意義が示唆された。

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

初めに

疾患の診断や経過予測において、簡便であり臨床的有用性の高いマーカーの開発は、常に求められているところである。特に血液は容易に採取できることから、日本では医学各領域において種々の血清マーカーの開発が続けられている。

カテプシンS (CTSS)は我々がサルコイドーシス患者肺泡マクロファージの網羅的遺伝子発現研究から見出した血清マーカーである。これまでサルコイドーシスと間質性肺炎の鑑別診断に関して、その感度、特異度から求めたROC解析による曲線下面積は、ACEより優れていることを報告している¹⁾。しかし疾患の重症度やステロイド治療における特性など、詳細な意義については未報告である。今回、多数例において複数の観察点を含めてCTSSを測定し、その意義について検討を加えた。

対象・方法

対象は34名のサルコイドーシス患者(男12名, 女22名)で、合計115回の異なった時期における血清CTSS濃度とACE活性、およびそれぞれの時点における胸郭内病変病期、罹患臓器数(BHL, 肺野病変, その他の臓器をそれぞれ別々に算定した)、それらを踏まえた疾患活動性などを調査した。観察期間中央値は2.7年(範囲0.1-7.5年)。統計値は特に断らなければ、単一患者について複数の時点の測定値を含んだものである。

CTSSはHuman Cathepsin S Duo Set[®] (R & D)を用いて、100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。多重比較になる際には、Bonferroniの補正を行った。CTSSとACEの相関は、Spearman's rank correlation coefficientを用いて検定した。

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。

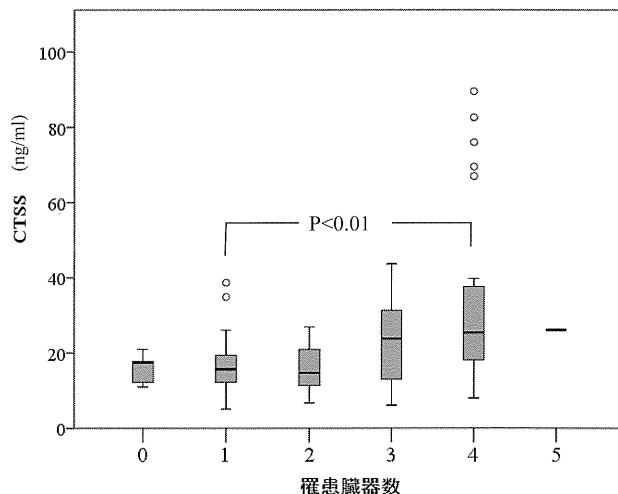


図1A. 罹患臓器数と血清CTSS濃度
全体として各群の値は有意に異なっている (p<0.0001)

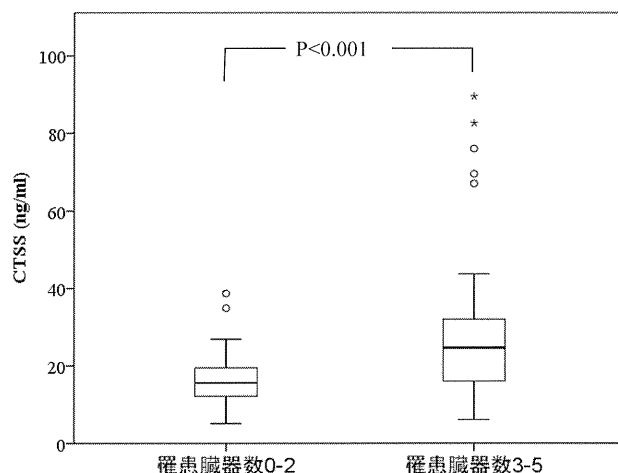


図1B. 罹患臓器数により2群に分けた場合の血清CTSS濃度

結果

血清CTSSは全測定時点で中央値18 ng/ml (5-90)であり、健常者の約2倍の値を呈していた。また罹患臓器数と有意な相関を示し、臓器数が増えると増加した(図1A)。個別群の比較では、罹患臓器1個と4個間に有意差を認めた。CTSS濃度は臓器数2つまではあまり上昇をみないのでそれまでの群と、さらに罹患臓器数が多い群(3-5臓器)の2群に分けて比較すると、有意に後者で上昇していた(図1B)。罹患臓器数0となって初めて緩解と判断すると、今回の対象患者では4名しか該当者がいなかった。それらについてCTSSの変動をみると、全員低下し全体として24.0 ng/mlから17.6 ng/mlに変化した(図2)。

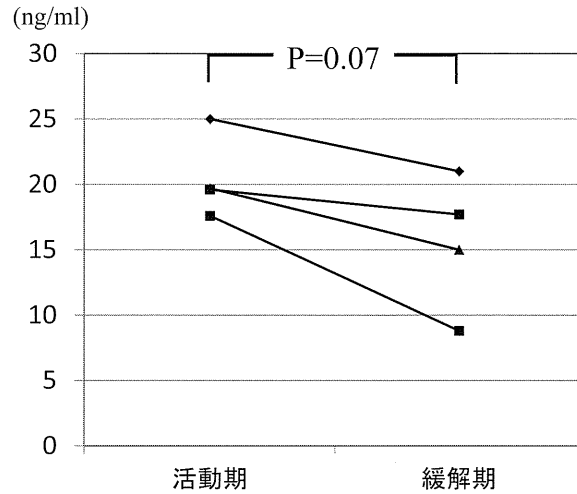


図2. 血清CTSS濃度と臨床的活動性

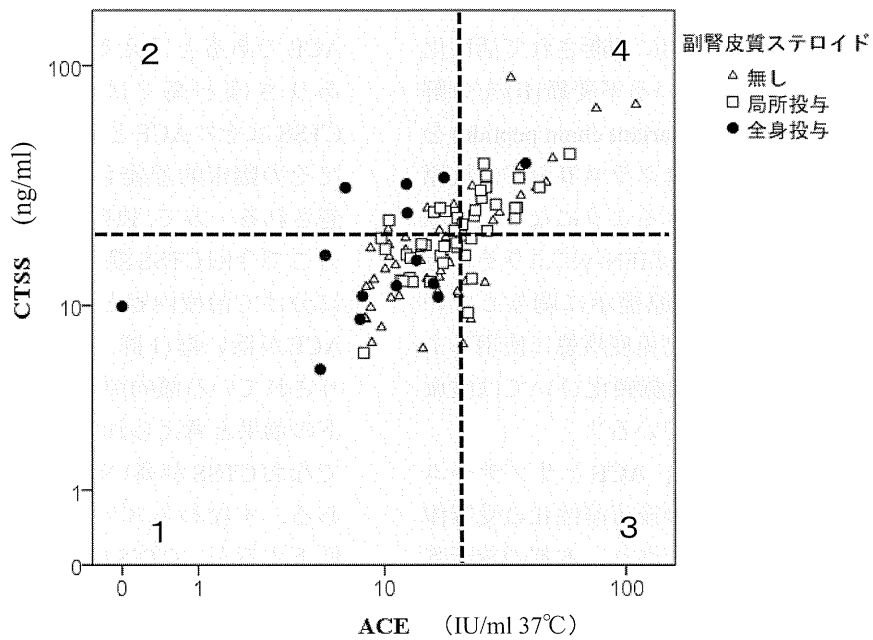


図3. 血清ACE活性とCTSS濃度の相関
 $\rho=0.657, p=2.6 \times 10^{-15}$

CTSS と ACE は有意な相関を示した (図3. $\rho=0.657, p=2.6 \times 10^{-15}$). その分布図において, CTSS は全体の中央値 18 ng/ml, ACE も同様に中央値 18 IU/ml 37°C で分割し, 4 群を構成した. それぞれについて, ステロイド治療の有無, それがある場合には点眼や塗布などの局所投与であるか, 全身投与であるかで分類し, その分布を検定すると, 1 群, 2 群, すなわち ACE は高くはない群では, ステロイドの全身投与が多い傾向にあり ($p=0.07$), その中には

CTSS がなお高い群 (2 群) が含まれていた (図4).

考 案

CTSS はシステイン蛋白分解酵素の一つで, 他のカテプシンと同じ基質特異性を持つ. 主としてマクロファージ系細胞で当初前駆体として産生され, 早期活性化が防止されると共にその立体構造が保持される. 小胞体からゴルジ体を経てエンドゾームに移

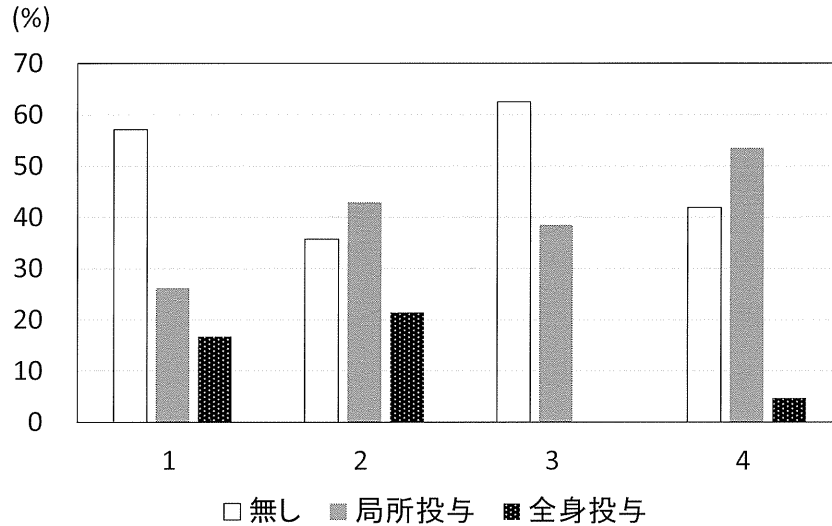


図4. ACEとCTSS値により分類された各群におけるステロイド治療の比率

行してからN端の一部が酵素的に切断されて活性化し、クラスII分子と結合している不変鎖(Ii)を分解し、CLIP (class-II-associated invariant chain peptide)を残す¹⁾。その後CLIPも分解されクラスII分子は抗原ペプチドと結合することができるようになり、抗原はT細胞に提示される。CTSSはIFN- γ によりその発現が誘導される²⁾。CTSSが抗原提示に関与していることから、その阻害薬を自己免疫疾患に使用しようとする試みがある³⁾。また動脈硬化ひいては虚血性心疾患との関連も議論されている⁴⁾。

従来サルコイドーシスでは、ACEとリゾチームが古典的マーカーであり、その後可溶性IL-2受容体が有用性のあるマーカーと見なされ、本邦の診断基準の中にも組み入れられている。また近年急性期蛋白として血清アミロイドAとLDLコレステロールの意義に関する報告も散見される⁵⁾。

今回独自に見出した新規マーカーであるCTSSの意義について、詳細に検討した。その結果同一患者において、疾患活動性が軽減し緩解に至ると全例その値は低下した。緩解の定義はすべての臓器病変が臨床上認められなくなることであり、その意味で罹患臓器数と相関することが予想された。実際罹患臓器数が増えるに伴ってCTSSは漸増の傾向を呈し、特に罹患臓器数3以上でそれが明確に表れた。したがってCTSS濃度は、全身の病変体積を反映していることが推測される。

サルコイドーシス血清マーカーの標準は未だに

ACEであると言える。感度は遺伝子多型の影響もありさほど高くはないが、特異度は十分高い。CTSSはそのACEと高度な相関を示した。したがってその臨床的意義もACEと同程度であることが予想される一方で、独自の意義が問われることになる。そこで今回CTSS濃度とACE活性の分布から、4群に分けて治療内容との関連を検討した。その結果、ACEが低い群(1群, 2群)では全身ステロイドが投与されている傾向が強く、そのこと自体はステロイドの効果と考えられた。しかし着目すべきは其中でなおCTSSが高い群(2群)が含まれていたことである。すなわちステロイドによりACEは速やかに低下するが、CTSSはその応答性が悪い、あるいは病変の残存を反映し容易に低下しない可能性を示唆している。そこにCTSSの特異的な意義が存在する可能性があり、今後十分な症例について検討を重ねる必要があると考えられる。

文 献

- 1) Yamaguchi E, et al., The role of serum cathepsin S levels in sarcoidosis. European Respiratory Society Barcelona 2010, Annual Congress.
- 2) Hsing L, Rudensky A. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. Immunol Rev. 2005; 207: 229-41.
- 3) Lee-Dutra A, Wiener DK, Sun S. Cathepsin S

inhibitors: 2004-2010. *Expert Opin Ther Pat.* 2011; 21:311-37.

4) Taleb S, Clément K. Emerging role of cathepsin S in obesity and its associated diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45:328-32.

5) Salazar A, Pintó X, Mañá J. Serum amyloid A and high-density lipoprotein cholesterol: serum markers of inflammation in sarcoidosis and other systemic disorders. *Eur J Clin Invest.* 2001; 31:1070-7.

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

四十坊典晴^{1*} 山口 哲生^{2*}

今回、我々は診断時に血清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ー、BAL検査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。ACEは60.2%、リゾチームは39.8%、ACEカリゾチームのどちらでも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ーでは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%でどちらか一方の所見を認めた。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。

¹ JR札幌病院呼吸科内科

² 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

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 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 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 (%)

A. 研究目的

サルコイドーシス診断基準における陽性率が高い検査項目の抽出を目的として、特徴的な検査項目の検討を組織診断群において行う。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再検討したい。

B. 研究方法

今回、我々は診断時にACE (カットオフ値23.7U/mL), リゾチーム(カットオフ値11.5 $\mu\text{g/ml}$), 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が26例中22例(84.6%), 病期1が51例中34例(66.7%), 病期2が36例中20例(55.6%), 病期3が5例中2例(40.0%)に眼病変を認められた。いずれの症例も未治療である。

C. 研究結果

ACEは60.2%, リゾチームは39.8%, ACEカリゾチームのどちらでも70.3%, sIL-2Rは82.2%で陽性であった(Table 1)。ツ反は65.2%で陰性であり、カルシウムは1.7%で上昇を認め、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(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

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 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 test status

Tuberculin 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.

10%¹⁾), CD4/CD8比上昇は68.6%(カットオフ値3.5)であり, 91.5%でどちら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%と61.0%, リゾチームの陽性率は39.0%と40.3%, sIL-2Rの陽性率は80.5%と83.1%であった (Table 4). また, BAL検査のリンパ球増多はツ反陽性群では75.3%で, ツ反陰性群では74.0%であり, CD4/CD8比上昇はツ反陽性群では61.0%で, ツ反陰性群では72.7%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%, ツ反陰性群で90.9%で縦隔, 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(①BHL, 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項目以上をみたすことで全身反応を示す検査所見が陽性とされた. BHL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年の改正時はこ

これらの検査結果の本邦での陽性率は示させていなかった。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，ツ反となり，血清カルシウムは極めて陽性率が低かった。

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，推定として年齢階層別結核既感染率は2010年の時点では，5歳0.2%，10歳0.5%，15歳0.8%，20歳1.6%，40歳5.4%，50歳10.4%，60歳23.7%，70歳48.7%とされ，結核の既感染率が1980年で37.0%，1990年で31.0%，2000年で25.7%，2010年で20.4%と低下傾向が推定されている³⁾。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確認するためにツ反がサルコイドーシスの活動性を反映しているかどうかを検討した。ツ反陰性群と陽性群において，特徴的な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。ツ反陰性をサルコイドーシスの特徴的な検査所見とすることは問題があると考えられる。

FDG-PETに関して検討していないが，心臓サルコイドーシスに保険収載が認められており，FDG-PETもガリウムシンチグラフィに併記して特徴的な検査項目として取り上げたい。

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が70.3%，ツ反が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

フィーが90.7%であった。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%でどちらか一方の陽性所見を認めた。ツ反陰性群においてツ反陽性群に比較し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

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 四十坊典晴，山口哲生．特集 注目される呼吸器疾患の病態・診断・治療 難治性サルコイドーシスの治療 呼吸器内科 23: 90-95, 2013.
- 2) 四十坊典晴．特集 職業性肺疾患の最新動向 アスベスト関連呼吸器疾患 呼吸器内科 23: 443-448, 2013.
- 3) 四十坊典晴，山口哲生．特集 サルコイドーシス診断と治療の進歩 診断基準の改定に向けて 呼吸器内科 24: 199-205, 2013.
- 4) 四十坊典晴，山口哲生．特集② 知っておきたい呼吸器疾患—専門医の診方・治し方 肺サルコイドーシス 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 85: 618-623, 2013.
- 5) 四十坊典晴，伊藤峰幸，市村志保，中島一貴，西野雅彦，平賀洋明．気管支血管束病変，空洞を伴いステロイド少量治療で改善した肺サルコイドーシスの1例 日サ会誌33: 123-126, 2013
- 6) 四十坊典晴，山口哲生．特集 びまん性肺疾患の画像—多彩なプロファイル— サルコイドーシス—難治例とその画像所見— 日呼吸誌 2: 521-526, 2013.
- 7) 四十坊典晴，山口哲生．特集 サルコイドーシスのすべて—サルコイドーシスの難治例への取り組み— 成人病と生活習慣病 43: 1261-1266, 2013.
- 8) Hattori T, Konno S, Shijubo N, Ohmichi M, Nishimura M. An increased prevalence of cigarette

smoking in Japanese patients with sarcoidosis. *Respirology*. 2013 Jul 2. doi: 10.1111/resp.12153. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 委員会報告 サルコイドーシス診断基準改定(案) 四十坊典晴, 山口哲生. 第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会 2013年10月 東京

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) 大森正子. 結核感染者数の推計 (pdf file) (2009.5.7) - 結核予防会結核研究所 www.jata.or.jp/rit/ekigaku/index.php/download.../961/

サルコイドーシス患者血漿を用いた Western blot 解析による アクネ菌感作抗原の同定とその病因的役割

古川あすか 萬 巴里子 掛川 智也 小川 智永
竹村 公佑 内田 佳介 江石 義信*

【背景】 サルコイドーシス患者及び健常人血漿を用いて、液性免疫の解析からアクネ菌由来の感作抗原およびサルコイドーシスにおける責任抗原の同定を目指している。これまでに western blot 法により患者・健常人が高頻度に感作しているアクネ菌由来の蛋白の分子量が判明している。本研究ではこれらの蛋白を同定するために質量分析を実施し、さらに同定された蛋白についてリコンビナント蛋白を作製して実際に免疫反応を検証した。

【方法】 質量分析を実施するにあたり、まずアクネ菌の可溶性・不溶性成分に対する western blot を行った。可溶性成分中に目的の分子量のバンドが検出された場合には、さらに可溶性成分を陰イオンクロマトグラフィーにて分離した24分画の中からのどの分画中にバンドが検出されるかを確かめた。目的蛋白が単一バンドとして切り出せたものをTOF-MS解析により同定した。同定されたアクネ菌由来の7種類の蛋白のうち完成した3種類のリコンビナント蛋白に対して、アクネ菌感作マウス血清ならびにサルコイドーシス患者・健常人血漿を用いてELISAによる抗体価測定を行うとともに、アクネ菌感作マウス・サルコイドーシス患者細胞を用いてELISPOT assayによる細胞性免疫反応の検討を行った。

【結果】 アクネ菌感作マウスにおいては、Catalase, Ribose phosphate pyrophosphokinase, UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, に対して液性免疫・細胞性免疫ともに高い反応を見せた。サルコイドーシス患者においては健常人に対し有意な抗体価上昇は認められず、細胞性免疫では4例中2例でCatalaseに対する反応が確認された。

【考察】 質量分析で同定された7種類の蛋白と他菌種の同一蛋白に対する相同性は低く、本菌特異的な蛋白抗原である可能性が高い。今後患者検体を用いた細胞性免疫反応に関する解析を追加検討し、本法の有用性を検証したい。

【研究背景】

サルコイドーシスの病因に関しては、「疾病素因を有する患者が何らかの環境要因を契機に特定の原因物質に暴露されて発症する」という説に対して、すでに国際的に合意が得られている¹⁾。欧米においてはこの特定の原因物質について長年結核菌が疑われているが、昨年Negiらの研究が認められ、欧米でもアクネ菌説が受け入れられることとなった²⁾。

近年本症における責任抗原の検索は盛んに行われている。Drakeらのグループは結核菌原因説の立場からではあるが、結核菌由来の蛋白(ESAT-6, katG, Ag85A, sodA,)がサルコイドーシス患者のBAL細胞において強いTh1免疫応答を誘導するとの報告^{3, 4)}に加え、アクネ菌由来の可溶性蛋白も一部のサルコイドーシス患者においては同様にTh1免疫応答を誘導することも報告している⁵⁾。日本人サルコイドーシス患者では、Furusawaらの報告によればESAT-6ではなくアクネ菌由来成分に対するTh1免疫応答が確認されている⁶⁾。

アクネ菌由来の具体的な責任抗原についてはEbeらによってTrigger factorが報告されているが、患者の2割にのみ強い免疫反応を誘導するに留まっている⁷⁾。Drakeらも提唱しているように、複数の抗原が責任抗原となっている可能性も考慮し、本研究室ではサルコイドーシスにおける責任抗原の探索を継続している。昨年度はサルコイドーシス患者・健常人血漿を用いたwestern blot法による解析を行い、患者・健常人ともに高頻度に感作されているアクネ菌由来の蛋白が複数存在することを報告した。本研究ではこれらの蛋白を同定するためにTOF/MS解析を実施し、さらに同定された蛋白についてリコンビナント蛋白を作製して実際に細胞性免疫反応を検証した。

【材料と方法】

臨床検体

東京医科歯科大学医学部附属病院にてサルコイドーシスと組織診断された患者(53例)の末梢血から血漿および単核球を分離し、本研究に使用した。また健常人ボランティア(36例)の末梢血から分離した血漿も対照として使用した。

これらの臨床検体を用いた解析を行うにあたっては、東京医科歯科大学医学部研究倫理審査委員会の承認を受けた。

アクネ菌感作マウス

C57BL/6Jマウス(Crea Japn inc.)にアクネ菌破砕液とComplete Freund's Adjuvant (BD)を混合させたエマルジョンを両後足底から100 μ Lずつ免疫した。その後1週間おきに尾起始部の皮下に200 μ L、計3-4回免疫を行った。最終免疫から1-2週間の個体を実験に使用した。対照マウスにはアクネ菌破砕液の代わりに生理食塩水を使用した。

Western blot法

Western blot法にはアクネ菌C1株(サルコイドーシス患者分離株)の菌体破砕液を250 μ g/laneで使用した。12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE)により分離を行い、その後Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad)でpolyvinylidene difluoride membraneに転写した。Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd)で室温30分ブロッキングを行った後、患者血漿(100倍希釈)を室温で90分反応させた。2次抗体はBiotin標識されているAnti-human IgG, A, M (500倍希釈, invitrogen)を、3次反応としてCy3標識Streptavidin (3000倍希釈, GE Healthcare)を各々室温で30分反応させた。各反応の前後でT-PBSで洗浄を行った。最後にPBSで洗浄を行い、メンブレンを乾燥させ、MOLECULAR IMAGER FX (Bio-Rad)でCy3の蛍光を読み取り解析を行った。

アクネ菌可溶性フラクションにおける陽性バンドの同定

アクネ菌破砕液を11,000 rpm, 20分, 4 $^{\circ}$ Cで遠心し、可溶性成分(上清)と不溶性成分(ペレット)に分離し、分離した試料を用いてwestern blot法を施行した。可溶性成分にアクネ菌破砕液と同様に陽性バンドを検出したバンドについて、今度はC1株の可溶性フラクション1-24を用いてwestern blotを行い、陽性バンドがどのfractionに属するかを確かめた。陽性バンドを検出したフラクションについて、SDS-PAGEを施行し、ゲルをCBBで染色後、ゲルから目的バンドを切り出した。切り出したゲルを細かく刻

み, MALDI TOF/MS 試料とした.

MALDI TOF-MS 解析

目的バンドを含む蛋白分画を SDS-PAGE で分離し CBB で染色後バンドを切り出し, 蛋白をトリプシンでペプチド断片化させた後, 飛行時間型質量分析計 (UltrafleXtreme, Bruker) を用いて質量分析を行った.

得られたスペクトルと, Mascot データベース上でアクネ菌 C1 株のゲノムデータベースとの照合を行い, スコアが高く, かつ分子量が一致するものをゲル中に含有されている蛋白と同定した.

pHUE ベクターによるリコンビナント蛋白の精製

アクネ菌のゲノム DNA を template として目的遺伝子を PCR にて増幅した. PCR product は MagExtractor PCR & Gel Clean up kit (TOYOBO) にて精製後, pT7 Blue プラスミドベクター (TaKaRa) にサブクローニングした. シークエンスを確認し, 変異のないクローンのプラスミドから挿入遺伝子領域を制限酵素処理により切り出し, pHUE プラスミド発現ベクターにクローニングした. 発現ベクターでトランスフォームした大腸菌 (BL21 株) を 37°C で 3 時間培養後, 37°C で 4 時間発現誘導させ, NiNTA ビーズを用いて精製した.

LPS 除去

Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel (Thermo) に各リコンビナント蛋白液を加え, 1 時間反応させ LPS を吸着除去した. SDS-PAGE を行い銀染色にて除去の確認をした.

ELISA

各リコンビナント蛋白を 1 $\mu\text{g/ml}$ になるように固相化 buffer で希釈し, 固相化用プレート (Thermo) にて 37°C 90 分固相化を行った.

マウス血清, サルコイドーシス患者および健康人血漿を 200 倍希釈して加え, 4°C にて一晩反応させた. 二次抗体はビオチン標識 anti-human IgG, IgA, IgM 抗体 (Biosource International Inc.) を 5000 倍希釈して使用し, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Dako) を標識させ Plate reader で 490 nm の吸光度を測定した. 各個体につき 3 well の平均を求め,

抗体価とした.

ELISPOT assay

Multiscreen (Millipore) 96 穴プレートに 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の固相化抗体 (IFN- γ , IL-2; Mabtech) を 100 $\mu\text{l/well}$ まき, 4°C にて一晩固相化した. プレートを PBS で 5 回洗い, RPMI 培地で室温にて 30 分ブロッキングした. RPMI 培地で濃度調整した細胞をまき (マウス $5.0 \times 10^5/\text{well}$, ヒト $1.0 \times 10^5/\text{well}$), 各リコンビナント蛋白を添加した. 37°C, CO₂ インキュベーターにて 18 時間反応させた後プレートを PBS で 5 回洗い, ビオチン化抗体 (IFN- γ , IL-2; Mabtech) を加え室温で 2 時間反応させた. その後 SAPX (DAKO) を室温 1 時間, 発色液 (AEC kit; VECTOR) を室温 30 分反応させた後 MQ で洗い, 37°C インキュベーターで乾燥させた後実態顕微鏡下で陽性のスポット数をカウントした.

【結 果】

C1 フラクシオンからの陽性バンドの同定

患者・健康人で高頻度に陽性となったバンドを同定するために, 目的のバンドの単離を行った. まず, アクネ菌破砕液を可溶性成分と不溶性成分とに分けて陽性の強かった血漿を用いて再度 western blot を施行した (図 1-B). 可溶性成分側にアクネ菌破砕液と同様の陽性バンドを確認した後, 更に可溶性成分を HPLC にて No. 1-24 のフラクシオンに分画したもののについても同じ血漿で western blot を行ない, ア

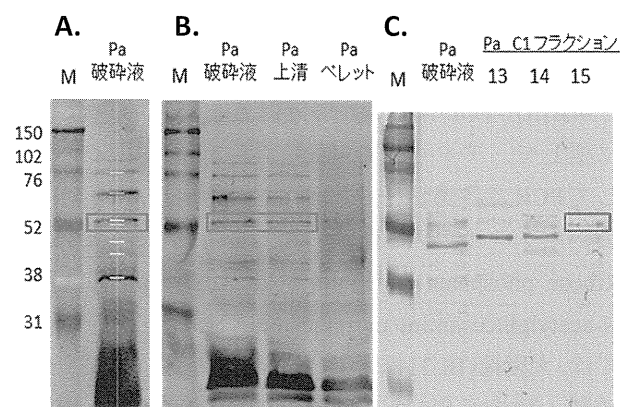


図 1. アクネ菌可溶性成分に対する western blot
 A. アクネ菌破砕液に対する western blot
 B. 可溶性成分 (上清)、不溶性成分 (ペレット) に対する western blot
 C. アクネ菌可溶性成分フラクシオンの CBB 染色
 Pa; アクネ菌 C1 株

表1. MALDI TOF/MSにより同定された western blot 陽性バンドの蛋白名

蛋白名	検出抗体サブクラス	陽性率 (%)	陽性検出フラクションno.	WBにおける分子量 (kDa)	DB上の分子量 (kDa)	Score	Expect
Catalase	IgA	Sar 31/53 (58) Nor 17/36 (47)	15	50	54.3	270	1.6e-021
Arginine deiminase	IgA	Sar 20/53 (38) Nor13/36 (36)	13	45	45.7	349	5.9e-032
Ornithine carbamoyl transferase	IgA	Sar 12/53 (23) Nor 9/36 (25)	12	43	36.6	29	6.1
Ribose phosphate pyrophosphokinase	IgM	Sar 10/53 (19) Nor 10/36 (27)	12	34	34.0	90	0.0017
propionyl-CoA carboxylase subunit beta	IgG	Sar 30/53 (57) Nor 24/36 (65)	17	50	57.2	113	9.1e-006
UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	IgM	Sar 20/53 (38) Nor 14/36 (38)	9	39	43.2	80	4.5e-005
Serine hydroxymethyltransferase	IgM	Sar 9/53 (17) Nor 8/36 (22)	11	45	52.9	130	4.7e-010

WB; western blot DB; NCBI database (Accession no. CP003877.1)
Sar; サルコイドーシス患者 Nor; 健常人

クネ菌破砕液と同様の陽性バンドが確認できたフラクションから目的のバンドを切り出した。一例を図1に示す。

MALDI TOF/MS 解析

7本のバンドを解析し、いずれも高いスコアでアクネ菌の蛋白が同定された(表1)。患者と健常人で有意差のあった IgA クラスの 50 kDa のバンドは Catalase であった。

pHUE ベクターを用いたリコンビナント蛋白精製

MALDI-TOF/MSにより蛋白名を同定できたものに関して、アクネ菌C1株ゲノムをテンプレートとしてPCRで各遺伝子を増幅して、pHUEベクターを用いたリコンビナント蛋白の精製を行った。Catalase, Ribose phosphate pyrophosphokinase (Ribose), UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UDP2)に関しては、大腸菌(BL21株)へのtransformが成功して発現・精製・酵素処理(ユビキチン切断)まで行い、それぞれの蛋白単体を得た(図2)。その他の蛋白質, Arginine deiminase, Ornithine carbamoyl transferase, Serine hydroxymethyltransferase, propionyl-CoA

carboxylase subunit beta に関しては、transformationが起こらなかったため、蛋白の発現をすることが出来なかった。

ELISA

アクネ菌感作マウスにおいては3種類のリコンビナント蛋白すべてにおいて有意に高い抗体価を示した(図3)。

Catalaseはwestern blotにおける定量解析で有意差を認めたバンドであったが、本結果ではIgAではなくIgGクラスでサルコイドーシス患者・健常人間で有意差を認めた(図4)。

ELISPOT assay

マウスでは各リコンビナント蛋白の至適濃度検討を行った。Catalaseは蛋白の回収量が少なく10µg/mlでの結果が欠けているが、アクネ菌感作マウスにおいては対照マウスでまったく反応が生じなかったのに対し、3抗原ともいずれかの濃度でIFN-γ, IL-2ともにシグナルが確認された。特にIL-2は濃度依存的に反応が高くなる傾向にあったため、ヒトでは10µg/mlでの検討を行った。サルコイドーシス患

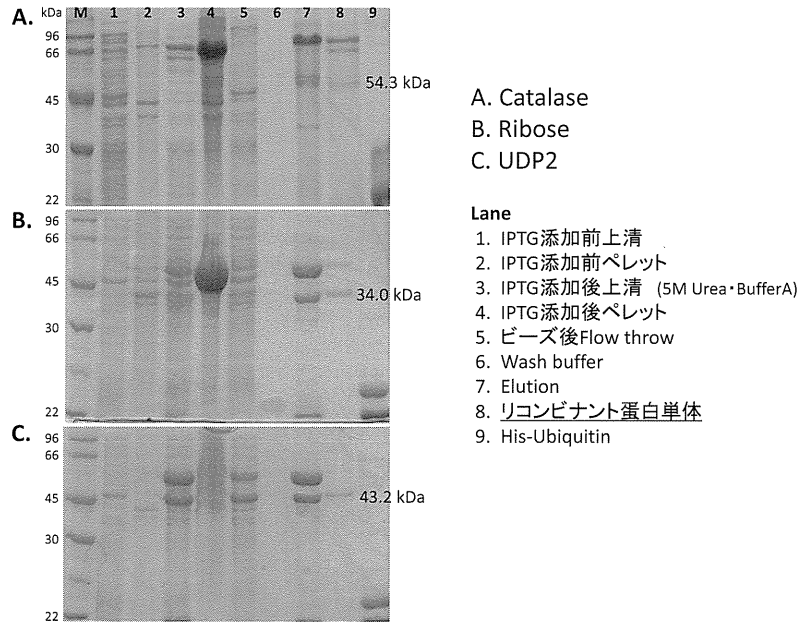


図2. pHUE ベクターによるリコンビナント蛋白作製および精製

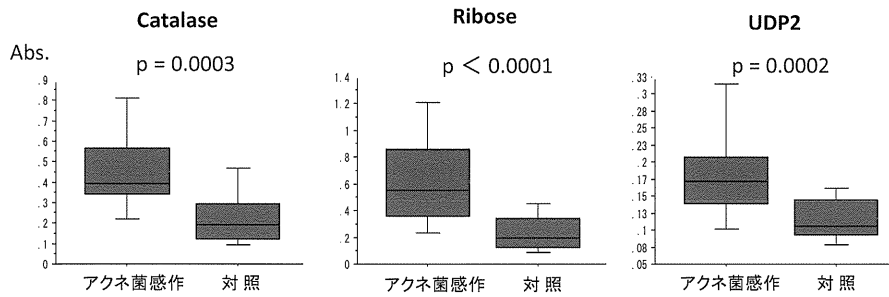


図3. アクネ菌感作・対照マウスにおける液性免疫反応

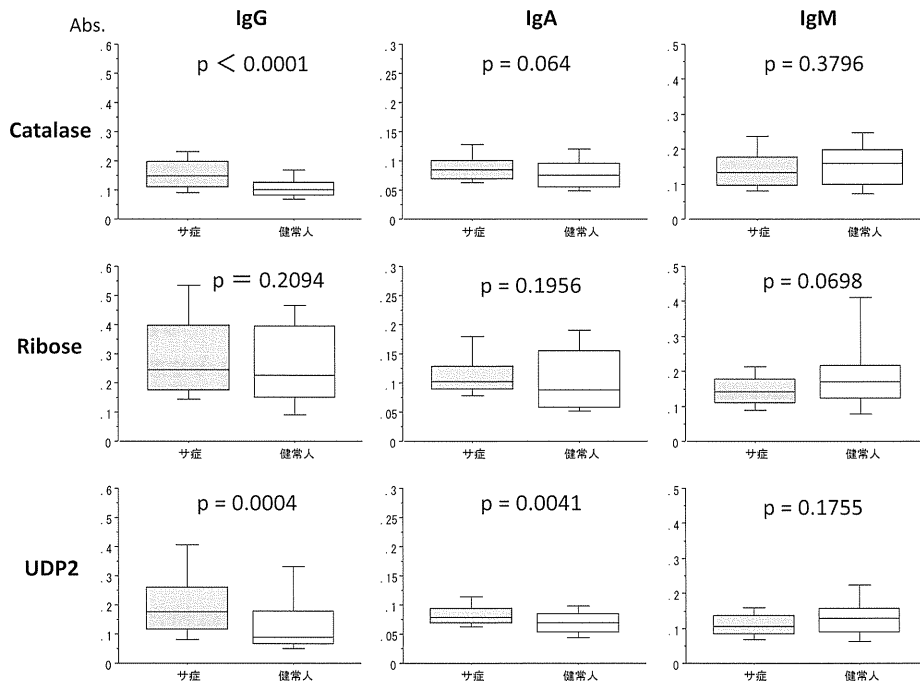


図4. サルコイドーシス患者・健常人における液性免疫反応