

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(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, ⑤ BAL 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 項目以上をみと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

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/

【平成25年度】

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 phosphatase, 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Ebera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 μg/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 μg/ml 濃度の固相化抗体 (IFN-γ, IL-2; Mabtech) を 100 μl/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 × 10⁵/well, ヒト 1.0 × 10⁵/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 フラクショ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 のフラクションに分画したものについても同じ血漿で western blot を行ない, ア

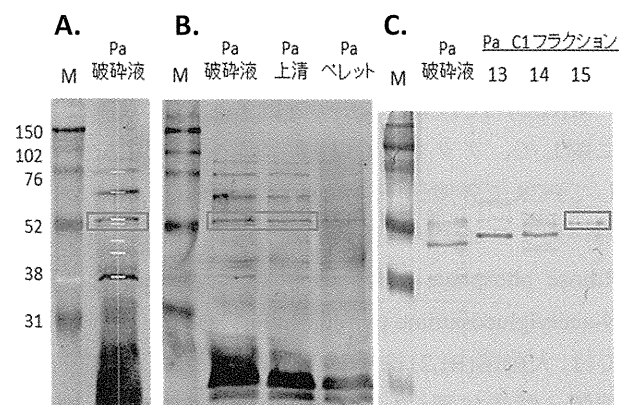


図 1. アクネ菌可溶性成分に対する western blot
 A. アクネ菌破砕液に対する western blot
 B. 可溶性成分 (上清)、不溶性成分 (ペレット) に対する western blot
 C. アクネ菌可溶性成分フラクションの CBB 染色
 Pa; アクネ菌 C1 株

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が起こらなかつたため、蛋白の発現をすることが出来なかつた。

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10 μ g/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つたのに対し、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つたため、ヒトでは10 μ g/mlでの検討を行った。サルコイドーシス患

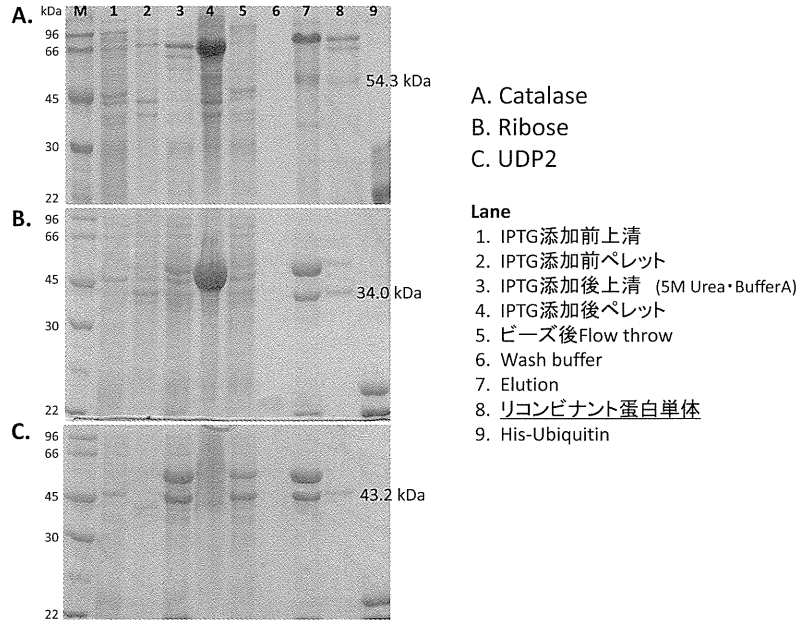


図2. pHUEベクターによるリコンビナント蛋白作製および精製

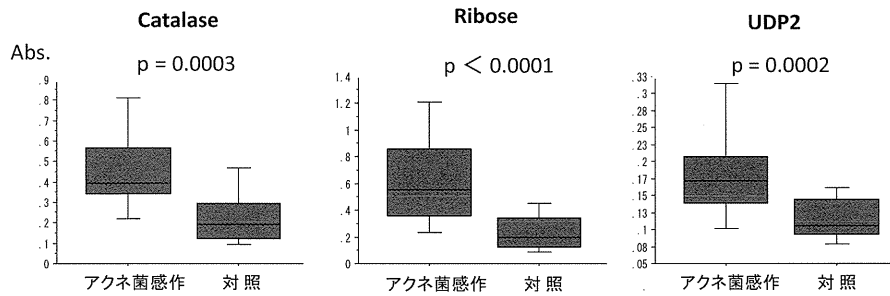


図3. アクネ菌感作・対照マウスにおける液性免疫反応

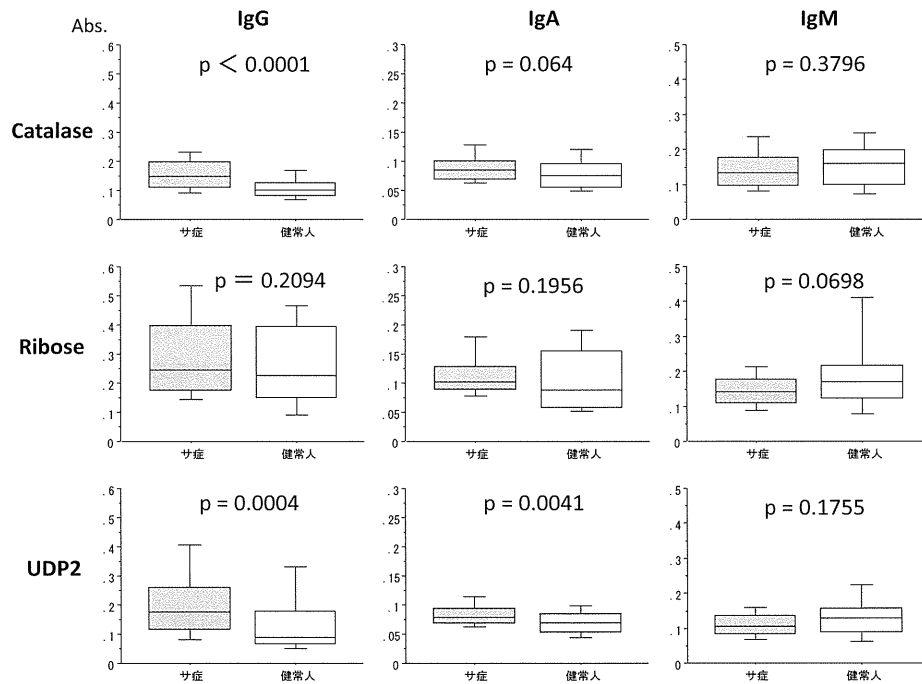


図4. サルコイドーシス患者・健常人における液性免疫反応

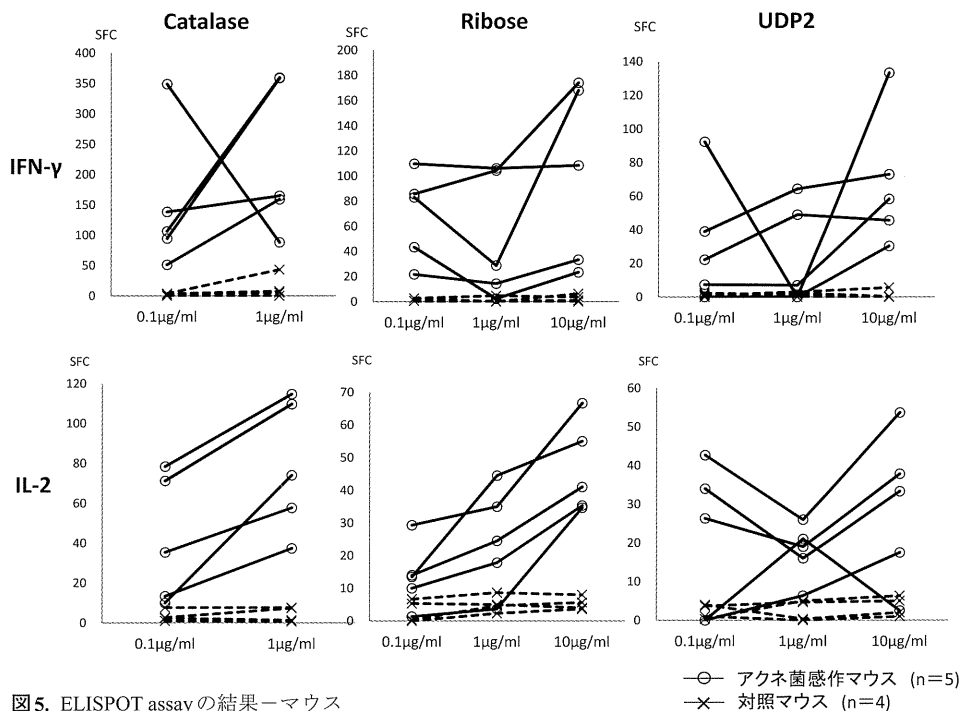


図5. ELISPOT assayの結果—マウス

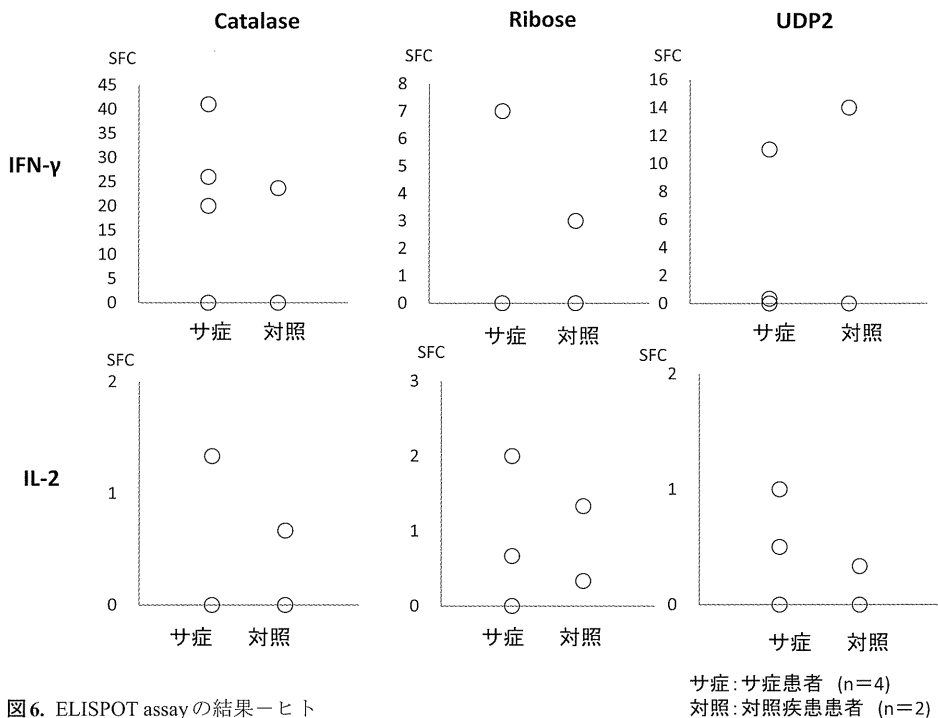


図6. ELISPOT assayの結果—ヒト

者では3/4例でCatalaseに対しIFN- γ のシグナルが確認されたが、対照疾患(過敏性肺炎)患者でも1/2例で同程度の反応が見られた。IL-2の反応は見られなかった。

【考 察】

アクネ菌は健常人皮膚にも常在する菌であるため本来重篤な病原性は持たず、ヒトはアクネ菌由来の複数の蛋白抗原に感作されていると考えられる。そのため、western blot法での解析において健常人血漿

でもサルコイドーシス患者と同様に高頻度の陽性バンドが認められたのは当然のことである。しかしながら、サルコイドーシス患者では同感作抗原に対しても健常人では働くはずの免疫寛容が起こらないために、アクネ菌に対する過剰な細胞性免疫反応が引き起こされると推察される。そこで患者・健常人ともに高頻度に検出されたバンドについて解析し、感作抗原を同定することにした。

本研究で同定されたサルコイドーシス患者および健常人の大半において感作抗原となっているアクネ菌由来の蛋白は、Catalaseを始め、いずれもLPXTG motifは存在しないが分泌シグナルを有する蛋白であった。

Western blotでの定量解析でサルコイドーシス患者において有意に高値であったIgAクラスの50 kDaのバンドはTOF-MS解析によりアクネ菌のCatalaseであると同定された。菌のCatalaseは殺菌のため産生される過酸化水素を水と酸素に分解する⁸⁾。他に同定されたArginine deiminase, Ornithine carbamoyl transferaseはアクネ菌の増殖サイクル中の酵素であるとの報告がある⁹⁾。

今回同定した蛋白は、現段階ではまだ責任抗原蛋白の候補である。現在作製し得ている3種類のリコンビナント蛋白ならびに作製途中である4種類もベクターや宿主を変更するなどして完成させ、ELISA法やwestern blot法などでその反応性や特異性を解析する必要がある。今後さらに患者末梢血単核球・BAL細胞を用いて細胞性免疫における反応性を検討していく予定であり、最終的には本症の責任抗原の同定を目指す。

【研究発表】

論文発表

- ・ Eishi Y. BioMed Res Int. 2013. 2013:935289.
- ・ Eishi Y. Res Invest. 2013. Jun;51(2):56-68.
- ・ Minegishi K, et al. Genome Announc. 2013. Jan;1(1).

学会発表

- ・ 松風綾香他. 第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
- ・ 掛川智也他. 第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会

- ・ 千葉明子他. 第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
- ・ 伊藤智里他. 第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
- ・ 中村輝子他. 第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
- ・ 峰岸佳菜他. 第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
- ・ 萬巴里子他. 第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
- ・ 鈴木好美他. 第33回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
- ・ 江石 義信. 第53回 日本呼吸器学会学術講演会
- ・ 江石 義信. 第17回 日本適応医学会学術集会

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

【参考文献】

- 1) GW Hunninghake, U Costabel, M Ando, et al. ATS/ ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Diseases. 1999. 16:149.
- 2) M Negi, T Takemura, J Guzman, et al. Localization of *Propionibacterium acnes* in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. Modern Pathology. 2012. 25(9):1284.
- 3) KA Oswald-Richter, DC Beachboard, X Zhan, et al. Multiple mycobacterial antigens are targets of the adaptive immune response in pulmonary sarcoidosis. Respiratory Research. 2010. Nov23;11:161.
- 4) J Carlisle, W Evans, R Hajizadeh, et al. Multiple mycobacterium antigens induce interferon- γ production from sarcoidosis peripheral blood mononuclear cells. Clinical and Experimental Immunology. 2007. 150:460.
- 5) KA Oswald-Richter, DC Beachboard, EH Seeley, et al. Dual Analysis for Mycobacteria and Propionibacteria in Sarcoidosis BAL. Journal of Clinical Immunology. 2012. Oct;32(5):1129.

- 6) H Furusawa, Y Suzuki, Y Miyazaki, et al. Th1 and Th17 immune responses to viable *Propionibacterium acnes* in patients with sarcoidosis. *Respiratory Investigation*. 2012. Sep;50(3):104.
- 7) Y Ebe, S Ikushima, T Yamaguchi et al. Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from *Propionibacterium acnes* DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2000. Oct;17(3):256.
- 8) PS Srinivasa Rao, Y Yamada, KY Leung. A major catalase (KatB) that is required for resistance to H₂O₂ and phagocyte-mediated killing in *Edwardsiella tarda*. *Microbiology*. 2003. 149:2635.
- 9) E Brzuszkiewicz, J Weiner, A Wollherr, et al. Comparative Genomics and Transcriptomics of *Propionibacterium acnes*. *Plos One*. 2011. 6(6):e21581.

C. 閉塞性細気管支炎・
びまん性汎細気管支炎

【平成23年度】

BO・DPB部門(長谷川好規)

びまん性汎細気管支炎・閉塞性細気管支炎 部門報告

第2回閉塞性細気管支炎全国調査研究

—一次アンケート調査—

長谷川 好規, 橋本 直純, 今泉 和良

これまで世界的に見ても閉塞性細気管支炎症例を集積した研究は限られており、診断の手引きも存在しない。我が国においては、いち早くびまん性肺疾患調査研究班において、2004年に我が国初の全国調査を実施した。しかし、診断が困難であること、疾患概念が呼吸器内科専門医においてさえも普及していないことから、前回調査では、病態・診断基準を示すに足りる情報解析が出来なかった。本年度における部門の活動として、2004年以降に診断された閉塞性細気管支炎症例の第2回全国調査(一次アンケート)を実施した。本研究は、患者数の把握など今後の閉塞性細気管支炎に関する疾患疫学調査の基礎となる情報となることが考えられる。

Study group of diffuse panbronchiolitis and Bronchiolitis Obliterans The second nation-wide case search for constrictive bronchiolitis obliterans - primary case survey-

Yoshinori Hasegawa, Naozumi Hashimoto, Kazuyoshi Imaizumi

Department of Respiratory Medicine,

Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan

There have been few reports for the nation-wide survey of Bronchiolitis Obliterans (BO) cases, and neither the guidance booklet for the diagnosis of BO. This study group conducted the first nation-wide survey for constrictive type of BO in 2003. The report in 2004 showed that only 23 cases were collected in detail review, which were pathologically diagnosed by surgical lung biopsy. The report indicated that this rare condition causes diagnostic difficulty by simulating other airway obstructive diseases. As 7 years passed from the first survey, we have planed to conduct the second-nation wide survey for constrictive type of BO in 2011. Cases were surveyed from April 2011 through May 2011 at 1815 hospitals. 477 patients were reported, in which 19% of patients were diagnosed pathologically. We will start to collect detail information as a secondary case reviewing.

研究の背景

閉塞性細気管支炎は、特発性もしくは様々な原因により、細気管支領域における包囲性狭窄や細気管支内腔の閉塞をきたす疾患である。最終的に細気管支の不可逆的閉塞をきたし呼吸不全となり、著しく日常生活を損なう疾患である。稀な疾患と考えられていたが、骨髄移植や心肺移植などの移植医療に伴う閉塞性細気管支炎の合併が報告され、新たに注目を集めている疾患である。病因は不明であり、診断は困難である。確立された治療法はなく、予後不良の疾患である。以上の背景から、これまで世界的に見ても閉塞性細気管支炎症例を集積した研究は限られており、診断の手引きも存在しない。我が国においては、いち早く厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業：びまん性肺疾患調査研究班)において、2003年～2004年に我が国初のアンケート全国調査を実施した。また、厚生科学研究費補助金により原因探索のため動物モデルや細胞を用いた研究を推進してきた。しかし、病理組織においても診断が困難であること、疾患概念が呼吸器内科専門医においても普及していないことから、アンケート調査では、病態・診断基準を示すに足りる情報解析が出来なかった。本研究課題では、閉塞性細気管支炎の診断の手引きとなる情報収集を目的として全国から症例を集積し、専門家による複数の臨床医・画像診断医・病理医からなるチームによる詳細な症例解析を実施する。最終的に症例解析集を作成し、診断の手引きとすることを目的とする。

研究の目的

本研究は閉塞性細気管支炎の全国調査研究を実施することにより、我が国における本疾患の病態ならびにその実態を明らかにし、今後の閉塞性細気管支炎の病態・治療研究構築のための基礎データとすることを目的とする。その際に、画像診断、肺機能検査を含めた検査所見を詳細に集積、解析するために、可能な症例については検査の追加を計画する。さらに、専門家チームによる詳細な症例解析を実施し、最終的に症例解析集を作成し、診断の手引きとすることを目的とする。また各症例の治療状況などもあわせて解析し現在の治療成績、予後、新たな治療の

可能性を探ることも行う。本年度は、症例スクリーニングを目的とした一次アンケートを計画した。

対象と方法

一次アンケート(スクリーニング)

目的：全国の医療機関に対してアンケートを送付し閉塞性細気管支炎またはその疑いがある症例(主治医診断、基礎疾患は問わない)について、データ収集の研究協力の可否を問う。

方法

(1) 研究の種類

後ろ向き症例集積疫学研究

(2) 調査方法

アンケート調査による症例スクリーニング

(3) 調査のアウトライン

1. 準備：疫学研究に関する倫理指針(文部科学省・厚生労働省平成14年6月17日)に従って、倫理審査委員会の承認を得た(名古屋大学倫理委員会承認2010年11月15日 承認番号1095)。
2. 閉塞性細気管支炎全国調査データ解析センター本部の設置：名古屋大学医学部内にデータセンターを置き、以後のアンケート結果あるいは症例データの集積をここで行う。
3. 1次アンケートの作成と発送：全国医療機関への手紙による1次アンケートを実施し、症例のスクリーニング調査を行い、調査協力を依頼する。ここでは閉塞性細気管支炎症例を広くスクリーニングすることを目的とし担当医が閉塞性細気管支炎を疑う症例を広く集積し調査協力を依頼する。症例は2004年以後に該当する症例とし、前回調査時の2003年以後の症例を対象とする。2003年に集積した症例については再調査を行わない。

結 果

- 1) 全国1815病院にアンケートを送付した。
- 2) 595部門から回答があり、症例なしが445部門、症例有りが150部門であった。
- 3) 病理学的に確定診断された症例が93例、臨床診

(一次アンケート調査票)

貴施設名・診療科名：

御担当者：

御住所：(〒)

TEL: FAX:

E-mail:

記入年月日： 201 年 月 日

貴施設／貴診療科で経験された閉塞性細気管支炎の患者数についてお答えください
(概略で結構です)。

- 1 病理学的に確定診断された閉塞性細気管支炎症例がございますか？
現在通院中または入院中 人
過去に通院または入院していた 人
- 2 臨床的に閉塞性細気管支炎（疑い含む）と診断されたが病理診断はついていない症例がございますか？
現在通院中または入院中 人
過去に通院または入院していた 人
- 3 上記で閉塞性細気管支炎の症例の経験ありと答えられた施設の先生にお尋ねします。
各症例についての血液、病理、画像データなどの詳細な調査にご協力いただけますでしょうか？（患者あるいは親族の方の同意が必要です。ご協力いただける場合には研究協力者として貴施設の倫理委員会に承諾をいただく必要がありますが、準備書類や同意書等は当方にて準備いたします。）
協力できる 協力できない
条件つきなら協力できる（具体的に下にお書きください）

表1

	第1回全国調査（2003年）	第2回全国調査（2011年）
送付先	1118 施設	1815 施設
症例発生期間	2003年以前	2004年～2011年
回答機関数	505	595
BO 症例あり	133 部門 (287 症例)	150 部門 (477 症例)
病理診断例	105 例	93 例
臨床診断例	182 例	384 例
協力可能施設		69/150 部門
協力施設における病理診断例	23 例	60 例
協力施設における臨床診断例	21 例	186 例

断例が384例であった。

- 4) 150部門の中で詳細な2次症例調査研究に協力可能と回答が69部門から得られた。
- 5) 協力可能と回答した69部門における症例の内訳は、病理による確定診断60例、臨床診断例186例であった。

考察・結論

表1に第1回全国調査(2003年)と今回の調査結果を比較した結果を示す。前回は症例発生期間を定めなかったが、今回は2004年からの7年間という期間に限定して調査を実施したが、BO症例の合計は287例から477例と大幅に増加した。このことは、

BOに対する疾患認識が2003年の時点から比較すると明らかに向上していることを推測させる。内訳を見ると、臨床診断例が182例から384例と増加しているが、病理診断例は105例から93例へ減少してみえる。臨床診断例の増加は、BOに対する疾患認識の向上という側面と、反面で以前より指摘されている病理的確定診断の困難さを示している。しかし、7年間の限定された期間に93例が病理的確定診断されていることから、やはり疾患に対する理解は向上

してきていると考えられる。

次年度は、2次調査に協力の承諾を得られた69部門(246例)の中で、病理診断が得られている60症例について、症例を集積し、複数の臨床医・画像診断医・病理医からなるチームによる症例解析を予定する。最終的な症例解析集の作成は、国内・国外でも例が無く、我が国における今後の疾患疫学調査の基準となり、患者数の把握など今後の疫学研究に必要であるとする。

【平成24年度】

BO・DPB部門(長谷川好規)

びまん性汎細気管支炎・閉塞性細気管支炎 部門報告

第2回閉塞性細気管支炎全国調査研究 —個別症例検討会—

長谷川 好規, 橋本 直純

これまで世界的に見ても閉塞性細気管支炎症例を集積した研究は限られており、診断の手引きも存在しない。我が国においては、いち早くびまん性肺疾患調査研究班において、2004年に我が国初の全国調査を実施した。しかし、診断が困難であること、疾患概念が呼吸器内科専門医においてさえも普及していないことから、前回調査では、病態・診断基準を示すに足りる情報解析が出来なかった。昨年度における部門の活動として、2004年以降に診断された閉塞性細気管支炎症例の第2回全国調査(一次アンケート)を実施した。これを受けて本年度は、一次アンケートに対する2次調査として病理診断が得られたと回答された症例を中心に、個別症例検討会を開始した。本研究は、閉塞性細気管支炎症例の我が国の病態を明らかにする基礎となる情報となることが考えられる。

Study group of diffuse panbronchiolitis and bronchiolitis obliterans The second nation-wide case search for constrictive bronchiolitis obliterans - secondary case survey-

Yoshinori Hasegawa, Naozumi Hashimoto
Department of Respiratory Medicine,
Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan

There have been few reports for the nation-wide survey of bronchiolitis obliterans (BO) cases, and neither the guidance booklet for the diagnosis of BO. This study group conducted the first nation-wide survey for constrictive type of BO in 2003. The report in 2004 showed that only 23 cases were collected in detail review, which were pathologically diagnosed by surgical lung biopsy. The report indicated that this rare condition causes diagnostic difficulty by simulating other airway obstructive diseases. We conducted the second-nation wide survey for constrictive type of BO in 2011. Cases were surveyed from April 2011 through May 2011 at 1815 hospitals, and 93 cases were diagnosed pathologically. Sixty institutes were reported for accepting to collect further information. Therefore, we started to collect detail information as a secondary case reviewing. Case reviewing was held two times this year, and eight cases were reviewed by chest radiologists, chest pathologists, and chest clinicians. We will continue the case reviewing and summarize the definitive cases of BO as a guidance booklet for the diagnosis of BO.

研究の背景

閉塞性細気管支炎は、特発性もしくは様々な原因により、細気管支領域における包囲性狭窄や細気管支内腔の閉塞をきたす疾患である。最終的に細気管支の不可逆的閉塞をきたし呼吸不全となり、著しく日常生活を損なう疾患である。稀な疾患と考えられていたが、骨髄移植や心肺移植などの移植医療に伴う閉塞性細気管支炎の合併が報告され、新たに注目を集めている疾患である。病因は不明であり、診断は困難である。確立された治療法はなく、予後不良の疾患である。以上の背景から、これまで世界的に見ても閉塞性細気管支炎症例を集積した研究は限られており、診断の手引きも存在しない。我が国においては、いち早く厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業：びまん性肺疾患調査研究班)において、2003年～2004年に我が国初のアンケート全国調査を実施した。また、厚生科学研究費補助金により原因探索のため動物モデルや細胞を用いた研究を推進してきた。しかし、病理組織においても診断が困難であること、疾患概念が呼吸器内科専門医においても普及していないことから、アンケート調査では、病態・診断基準を示すに足りる情報解析が出来なかった。本研究課題では、閉塞性細気管支炎の診断の手引きとなる情報収集を目的として全国から症例を集積し、専門家による複数の臨床医・画像診断医・病理医からなるチームによる詳細な症例解析を実施する。最終的に症例解析集を作成し、診断の手引きとすることを目的とする。

研究の目的

本研究は閉塞性細気管支炎の全国調査研究を実施することにより、我が国における本疾患の病態ならびにその実態を明らかにし、今後の閉塞性細気管支炎の病態・治療研究構築のための基礎データとすることを目的とする。本年度は、昨年度実施した一次アンケートに基づき、病理学的に確定診断されたと

判断された症例を集積し、それぞれ複数の胸部レントゲン診断医、胸部を専門とする病理医、呼吸器内科医が一堂に会して個別症例検討会を実施する。

対象と方法

個別症例検討会

一次アンケートで回収したデータをもとに2次症例調査に協力が得られると回答された施設から症例を集積し、各症例の診断の妥当性、病理所見、画像所見について、専門家による合議検討会を開催する。

考察・結論

第1回個別症例検討会が平成24年6月16日日本医科大学にて開催され、第2回個別症例検討会が平成24年12月22日名古屋大学にて開催された。症例の内訳は、シェーグレン症候群に発症したBOの一例、特発性BOの症例に2回肺移植を行った一例、関節リウマチにおけるD-ペニシラミン内服によるBOの一例、骨髄移植後のBOとPAPが合併した一例、アマメシバ摂取による家族発症BO、関節リウマチ治療中に発症したBO、リンパ腫治療中に発症したBO、骨髄移植後に発症したBO疑いの一例が報告された。それぞれ、複数の胸部放射線診断医、病理医、呼吸器内科医が報告された情報に基づいて*Clinical-radiologic-pathologic (C-R-P) diagnosis*を実施した。その中で課題となったことは、自施設の病理にてBOと診断された症例とCPR診断が一致しないこと、また、自施設の病理にてBOと診断できなかった症例が、CPR診断で確定診断されることが経験され、本疾患の診断の難しさがわずかな症例検討においても明らかとなってきた。今後は、背景、発症時期、肺機能検査、VATS時期・部位などの臨床情報収集のためチェックリストを作成すること、および収集したCT画像および肺血流シンチなど画像集積システム、病理スライドのヴァーチャルスライド化による収集の枠組みを作り、症例集積を予定していきたい。

びまん性汎細気管支炎に関連する *PBMUCL1* の ヒト気道上皮細胞における発現の検討

慶長 直人^{1*} 土方美奈子¹ 松下 育美¹ 伊藤 秀幸²
本間 栄^{3**} 田口 善夫^{4*} 吾妻安良太^{5**} 工藤 翔二⁶

びまん性汎細気管支炎 (DPB, diffuse panbronchiolitis) は、東アジア系集団にみられる HLA class I 関連疾患である。6番染色体 HLA 領域の DPB 疾患感受性候補領域の中には、我々がクローニングした2つの新規ムチン様遺伝子 *PBMUCL1* (*MUC22*), *PBMUCL2* (Hijikata *et al.* Hum Genet 2011) と、*DPCRI*, *MUC21* のあわせて4つのムチン(様)遺伝子がクラスターを形成している。*PBMUCL1* には、DPB と関連する遺伝的多型が複数存在している。*PBMUCL1* の非同義置換を伴う単塩基多型および、ムチン特有のセリン・スレオニンを多く含むリピート配列部分をコードする中央の第3エクソンの VNTR (variable number of tandem repeat) を、ヨーロッパ系集団検体を用いてタイピングして日本人と比較したところ、多型のアレル頻度、推定ハプロタイプ構造及びその頻度ともに、日本人とヨーロッパ系集団では大きく異なることがわかった。また、*PBMUCL1* の遺伝子発現は、poly(I:C) 刺激で強く誘導されるため、日本人の手術検体由来の初代培養ヒト気道上皮細胞30検体を用い、非刺激時および poly(I:C) 刺激時の *PBMUCL1* mRNA 発現量をリアルタイム RT/PCR によって検討した。その結果、日本人に特有な遺伝的多型ないしハプロタイプを有するもので、特に発現量が多いという結果は得られなかった。アジア人の DPB 疾患感受性、抵抗性に関わる遺伝的多型は、アジア人固有のものである可能性が示唆されたが、遺伝的多型と蛋白機能の関連については、発現量の違いより、VNTR あるいはアミノ酸の置換、あるいはスプライシングの違い等の質的な違いを今後さらに検討する必要があると考えられた。

¹ 独立行政法人国立国際医療研究センター 研究所
呼吸器疾患研究部

² 独立行政法人国立国際医療研究センター病院 呼吸器外科

³ 東邦大学 呼吸器内科

⁴ 天理よろづ相談所病院 呼吸器内科

⁵ 日本医科大学 内科学(呼吸器・感染・腫瘍部門)

⁶ 複十字病院

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

** びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

A. 研究目的

びまん性汎細気管支炎 (DPB, diffuse panbronchiolitis) は、東アジア系集団にみられる HLA class I 関連疾患である。日本人では HLA-B54 との関連が非常に強いことはいくつかの報告で確認されているのに対し (Sugiyama *et al.* ARRD 1990, Keicho *et al.* AJRCCM 1998), 韓国人では HLA-B54 との関連はなく、かわりに HLA-A11 との関連が強いとされた (Park *et al.* AJRCCM 1999)。このことから、HLA そのものが DPB に関連しているのではなく、HLA-B 遺伝子座と HLA-A 遺伝子座の間に DPB の疾患感受性遺伝子が存在するという仮説がたてられ、マイクロサテライトマーカなどの遺伝マーカーを用い、候補領域はおよそ S 遺伝子から *TFIIH* 遺伝子までの 200kb までせばめられた (Keicho *et al.* Am J Hum Genet 2000)。我々は候補領域内で新規遺伝子のクローニングを試み、2つのムチン遺伝子 (*PBMUCL1*, *PBMUCL2*) をクローニングして報告した (Hijikata *et al.* Hum Genet 2011)。*PBMUCL1* は HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) により mucin22 (*MUC22*) という遺伝子名も与えられた。既に報告されている *DPSCR1* 遺伝子と *MUC21* 遺伝子をあわせると、候補領域内は4つのムチン(様)遺伝子がクラスターを形成していた。*PBMUCL1* (*MUC22*) には、DPB と関連する遺伝的多型が複数存在した他、polyinosinic-polycytidylic acid, poly(I:C) で遺伝子発現が強く誘導される性質を有していた。

DPB はヨーロッパ系集団では非常に稀であり、西欧諸国から報告された数少ない DPB 症例のほとんどはアジア系移民の症例である。昨年度、我々は 11 番染色体のムチン遺伝子クラスター内の気道の主要な分泌型ムチンのひとつである *MUC5B* の遺伝的多型が、アジア人とヨーロッパ人で頻度が大きく異なることを報告したが、今年度、我々は *PBMUCL1* の遺伝的多型をヨーロッパ系集団健常検体を用いてタイピングし、日本人 DPB 患者と健常コントロールとの比較を行いつつ、ハプロタイプ構造の解析を行った。また、日本人手術検体から単離培養した初代培養気道上皮細胞 30 検体を用い、非刺激時、poly(I:C) 刺激時の *PBMUCL1* の mRNA 発現量を遺伝的多型とあわせて検討した。

B. 研究方法

(1) 日本人 DPB 患者 92 例、日本人健常コントロール 98 例のゲノム DNA を用いた。ヨーロッパ系集団の健常検体として、NIGMS Human Variation Panel (HD50CAU of Caucasian individuals - Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ) 50 例を用いた。*PBMUCL1* の VNTR (variable number of tandem repeat) を有する exon 3 (約 4.6kb) を含むゲノム領域の PCR 増幅は、Tks Gflex DNA Polymerase (TaKaRa Bio) とプライマー 5'- GAA TAC CAC AGC CTT CAC AAA AGG -3', 5'- CAG GGA AAT GAG GAT GAT AGC CCA -3' を用い (レファレンス配列にて増幅産物は 7,022 bp), PCR 産物を 0.5% アガロースゲルで電気泳動し、VNTR サイズを分けた。その他、exon3 の 5' 端側の非同義置換を伴う単塩基多型 (SNP), exon4, 5 の SNP を PCR 増幅とシーケンス解析を行ってタイピングした。ハプロタイプ解析は Haploview4.2 を用いて行った。

(2) 手術検体由来の初代培養ヒト気道上皮細胞 30 検体を培養し、poly(I:C) 100mg/ml で刺激を行い、24 時間後に細胞を回収した。全 RNA を抽出し、*PBMUCL1* mRNA 発現量を exon 4 内に設計した sense primer 5'- TAC AGC CCT GGG CTA TCA TCC TCA -3', exon 5 内に設計した antisense primer 5'- TCA GTC CAT GGC CCA CTC CAT ATC -3' と SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa Bio) を用いたリアルタイム PCR にて検討した。発現量の補正には GAPDH 遺伝子を用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法を使用した。初代培養細胞は、WakFlow HLA タイピング試薬 HLA-B にて HLA-B 遺伝子のタイピングを行った。

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

C. 研究結果

(1) *PBMUCL1* VNTR 多型のヨーロッパ系集団でのタイピング

図 1 に示すように、*PBMUCL1* VNTR 各アレル頻度は、ヨーロッパ系集団と日本人コントロール集団で異なっていた。特に、DPB 抵抗性に関連してい