

また定期健診などを受けていなかったなどの理由が考えられるが、これらの事実から、PCD 症例でさらに Kartagener 症候群であっても、未診断の症例が少なからず存在する可能性が示唆される。積極的な症例の発掘、集積と、全国的規模での一元的症例登録 (registry) が望まれる所以である。

PCD 確定診断に関しては、いくつかの問題点を指摘しうる。内臓逆位を有し、古典的な気管支拡張、副鼻腔炎の3徴を呈する Kartagener 症候群例は比較的診断は容易である一方、逆位がなく、臓器位置関係の正常な症例では、常に気道病態の成因として PCD を鑑別に挙げる必要があり、疑わしい症例では鼻粘膜ないし気管支上皮細胞の線毛の運動能と電顕による微細形態構造の解析が必須である。このなかで、線毛の運動能の解析には高速ビデオ画像が有用であり、線毛運動の速度と協調的な線毛活動パターンが同時に解析可能であるが、実際には各診療機関が独自に施行するのは不可能で、各々で診断精度を担保するのに無理がある。また、電子顕微鏡による微細構造の解析にも精通した病理医が関わる必要があるが、dynein arms を高精細写真として撮影し定量的解析をすることの困難さや、近年線毛構造に異常のない PCD が文献上報告されており (Boon et al. *Orphanet J Rare Dis*, 2014, 9:11; *DNAH11*, *HYDIN*, *CCDC65* 遺伝子の異常に起因)、さらに診断を困難にしている。また、PCD ではない慢性気道炎症による二次性の CD 鑑別が必須であり、これらの意味で、まさに線毛機能 and/or 微細形態のみでの診断の限界が明らかである。したがって、確定診断にはすでに報告された PCD の原因遺伝子の変異検索がさらに必須であるが、実際には原因遺伝子と判明している遺伝子の全てを解析するのは不可能であり、頻度の高い上位数種の遺伝子検索が現実的と考えられる。

以上、当施設での症例を中心に報告したが、今後多施設からの症例集積 (registry) と、一元的に線毛機能および形態の診断が可能なセンター的施設の設置が望まれる。当研究については、次年度以降は遺伝子レベルでの発症要因解明を目指したい。

## E. 結論

当施設にて診療中の男性 3 例、女性 1 例の計 4 名の PCD 症例について、病歴、内臓逆位や気管支拡張、副鼻腔炎などの臨床的特徴、胸部画像所見、微細形態所見などを解析し、その問題点を明らかにした。今後、わが国の PCD に関する研究では、全国的な症例の集積、確定診断に必要な緒検査の集約と精度管理の可能なセンター的施設の設置が必要である。

## F. 健康危険情報 該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 吉村邦彦, 石黒 洋, 成瀬 達, 下瀬川 徹. わが国の嚢胞性線維症患者の胸部画像所見に関する検討. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性肺疾患に関する調査研究. 平成 25 年度総括・分担研究報告書, p263-266, 2014.
- 2) 吉村邦彦. 慢性気道感染症. *medicina*, 51 (10): 1884-1887, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) 仁部美保, 江島美保, 辻川 雄, 小澤聡子, 中村万里, 山中澄隆, 友安 浩, 坂本穆彦, 武村民子, 吉村邦彦. 胸腔鏡下縦隔リンパ節生検にて確定診断の得られたサルコイドーシスの 2 例. 第 33 回サルコイドーシス / 肉芽腫性疾患学会総会, 東京, 2013 年 10 月 25 日.
- 2) 大橋敦希, 江島美保, 辻川 雄, 仁部美保, 小澤聡子, 中村万里, 武村民子, 吉村邦彦. 抗 scl-70 陽性 lung-dominant CTD 急性増悪の 1 例. 第 209 回日本呼吸器学会関東地方会, 幕張, 2014 年 5 月 24 日
- 3) Yoshimura K. CFTR gene mutations and pulmonary manifestations in Japanese patients with cystic fibrosis. International Symposium "Cystic Fibrosis in Asia from Basics to Clinics", Nagaya (Noyori Conference Hall, Nagoya University), September 29-30, 2014.

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

# アクネ菌病因論に基づくサルコイドーシス血清診断法の開発

江石 義信\*、内田 佳介、米山 晶子、峰岸 佳菜、古川 あすか、明石 巧

東京医科歯科大学大学院人体病理学分野 \*研究協力者

## 【研究要旨】

**【背景】**サルコイドーシスの発症機序として、深部臓器に潜伏感染するアクネ菌の内因性活性化による細胞内増殖を契機に、本菌に対する宿主側のアレルギー反応が疾病素因となり肉芽腫形成が惹起されるものと想定している。肉芽腫による封じ込めを逃れたアクネ菌の一部はリンパ行性や血行性に他臓器へ感染することが考えられるため、患者血液中においては本菌およびその菌体成分の存在が予想されるが、これまでその検出には成功していない。思春期以降のすべての成人では本菌に対して高い抗体価が検出されることから、アクネ菌あるいはその菌体成分に対する循環性免疫複合体の存在が想定される。そこで本研究ではヒト血中菌体成分を検出する新たな方法を検討し、サルコイドーシスの血清診断法の開発を目的とした。

**【方法】**捕獲抗体としてアクネ菌のリポテイコ酸に特異的なマウスモノクローナル抗体、および検出抗体としてアクネ菌の破碎液を免疫抗原としたウサギポリクローナル抗体を対する2種類の抗体を利用した sandwich ELISA 法を用いた。また、血中菌体成分の検出を可能するためにサンプル処理の検討を行い、pH を変化させ抗原から抗体を解離させたのち、煮沸によりその抗体を変性させる方法を考案した。あらたに作成した方法により、サルコイドーシス患者 58 例および健常者血漿 35 例の血漿を用いて解析を行った。

**【結果】**本方法を用いて検出を行った結果、リポテイコ酸に対する免疫複合体は患者で有意に高く検出された。今回検出した結果を用いて ROC 曲線を作成し、それにより算出したカットオフ値を用いて解析した結果、本方法の感度は 74%、特異度は 94% と極めて高いものであり、そのオッズ比は 49 倍であった。

**【考察】**今回の結果は、本症のアクネ菌病因論を支持するだけでなく新たな血清診断法として今後の利用も期待される。また、本検査法にて患者の病勢判定および抗菌剤対象者の選別や効果判定などにも広く応用できる可能性もある。賛同が得られるようであれば本検査法を用いた多施設共同研究を班会議にて企画していただきたい

## 【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<sup>1)</sup>。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、本邦においてはサルコイドーシス患者病変部組織からは唯一、アクネ菌

(*Propionibacterium acnes*) が分離培養されており<sup>2,3)</sup>、PCR 法や in situ hybridization 法にてアクネ菌 DNA が検出される<sup>4,5)</sup>。本教室にて作成したアクネ菌特異的モノクローナル抗体である PAB 抗体により解析を行うと、サルコイドーシス病変部リンパ節の肉芽腫内および HW 小体に陽性を示す<sup>6)</sup>。また、その肉芽腫の周囲ではマクロファージ内に充満して認められるアクネ菌がしばしば観

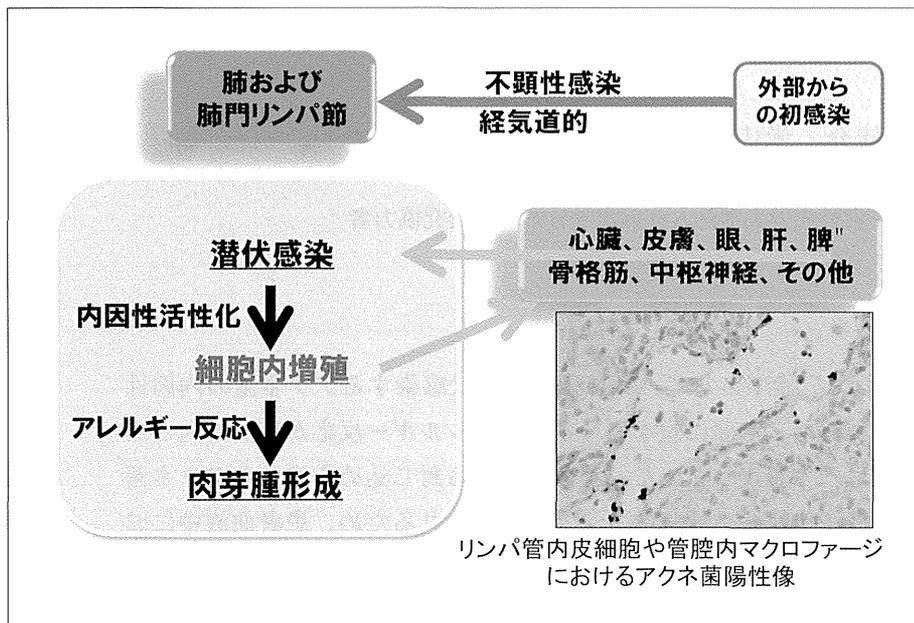


図 1 サルコイドーシスの発症機序（仮説）

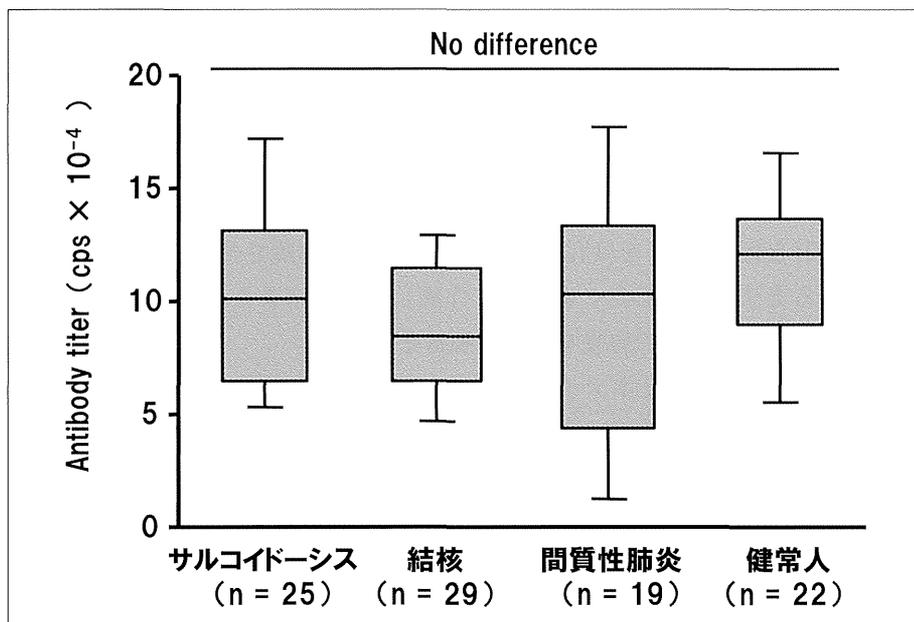


図 2 アクネ菌に対する感染抗体価は多くの人が陽性となる

察され、これは細胞内感染したアクネ菌の内因性活性化による細胞内増殖現象を捉えているものとして考えられる。これまでの研究結果よりサルコイドーシスの発症機序は、図 1 で示すように深部臓器に潜伏感染するアクネ菌の内因性活性化による細胞内増殖を契機に、本菌に対する宿主側のアレルギー反応が疾病素因となり肉芽腫形成が惹起されるものと想定している<sup>7,8)</sup>。また、肉芽腫による封じ込めを逃れたアクネ菌の一部はリンパ行性や血行性に他臓器へ感染することが考えられる

ため、患者血液中においては本菌およびその菌体成分の存在が予想される。これまでに血中に存在するアクネ菌菌体成分の検出について検討を行ってきたが、その検出には成功していない。サルコイドーシス患者に限らず、思春期以降のすべての成人では本菌に対して高い抗体価が検出されることが明らかとなっており（図 2）、患者血液中においてはアクネ菌あるいはその菌体成分は循環性免疫複合体として存在していることが想定される。そのため検出に用いるアクネ菌に対する抗体

は、免疫複合体を形成する抗体とエピトープの競合が生じていたため検出が困難であったと考えられる。そこで本研究ではアクネ菌の菌体成分であるリポテイコ酸に対する抗体を利用した sandwich ELISA を用いて、ヒト血中菌体成分を検出するためサンプル処理の方法を検討し、サルコイドーシスの病因論に基づく新たな血清診断法の開発を目的とした。

【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（58例）の末梢血から得られた血漿を本研究に使用した。また健常人ボランティア（35例）の末梢血から得られた血漿についても対照として解析に使用した。これらの臨床検体を用いた検討を行うにあたり、東京医科歯科大学医学部研究倫理審査委員会の承認を取得している。

アクネ菌リポテイコ酸の抽出及び精製

検出系を作成するためにアクネ菌よりリポテイコ酸の抽出及び精製を行い、検討に用いた。抽出に用いたアクネ菌は血清型 I 型である ATCC 6919 株及び血清型 II 型である ATCC 11828 株を用いた。これらの菌を GAM 培地で 4 日間、嫌気培養し PBS 15 ml にて 1 g/ml に調整した。Leupeptine を最終濃度で 1  $\mu$ g/ml になるように添加した後、超音波により 1 時間菌の破碎を行った。次に 3000 rpm で 20 分遠心分離し、上清部分に対して等量のフェノールを添加し 4  $^{\circ}$ C で 1 時間振盪させた。その後 5000 rpm で 10 分遠心分離し、上清部分を回収し MQ にて透析を行った。透析後、凍結乾燥を行い乾燥前と同量のクロロホルムとメタノールを 2:1 の割合に調整したものを加え 4  $^{\circ}$ C で 1 時間振盪させた。その後再び 5000 rpm で 10 分遠心分離し沈殿成分に対して 10 ml の 0.05 M Tris-HCl (pH8.0)、10 mM MgCl<sub>2</sub> にて溶解

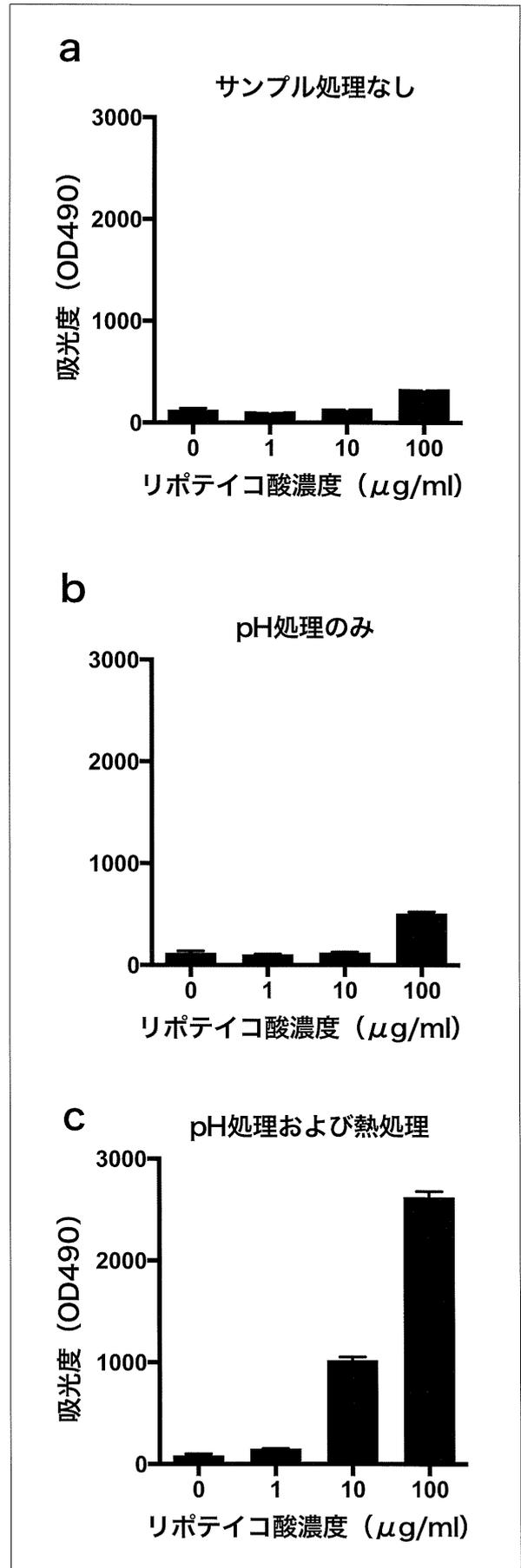


図3 サンプル処理方法の検討

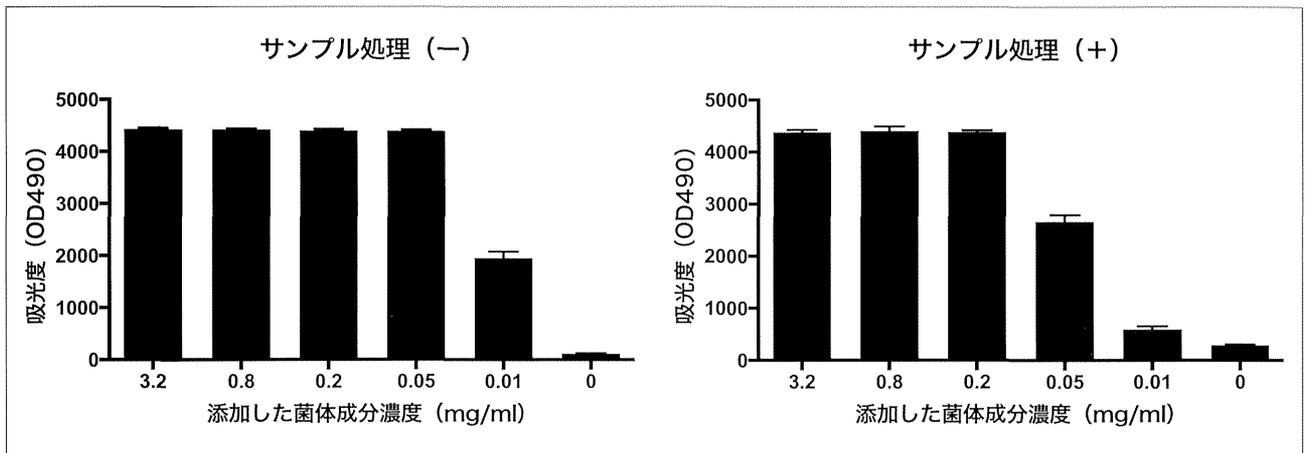


図 4 サンプル処理の有無によるリポテイコ酸検出への影響

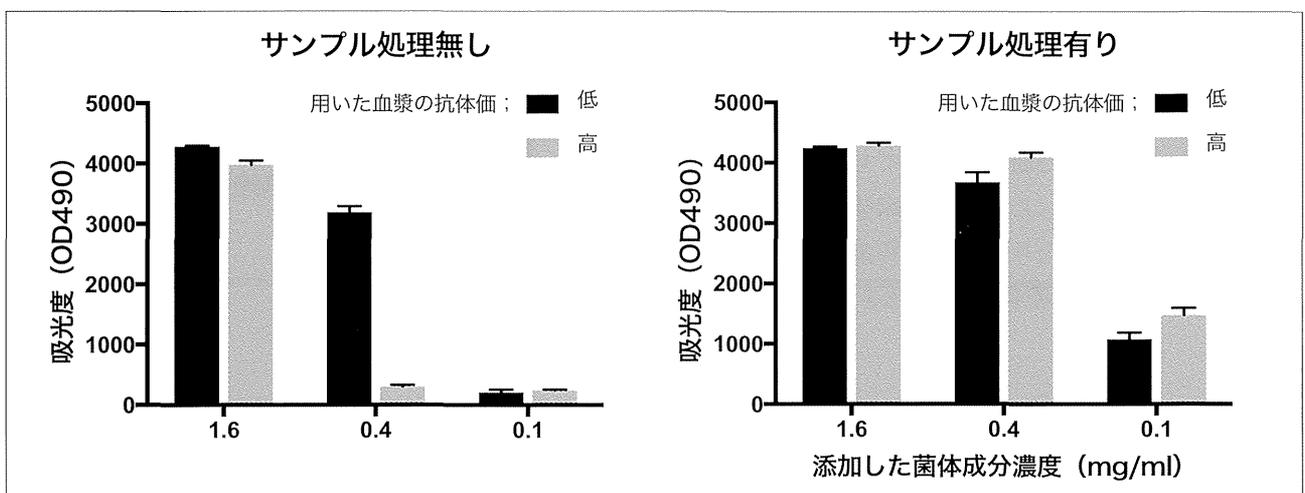


図 5 リポテイコ酸抗体価が異なるサンプルでの検討

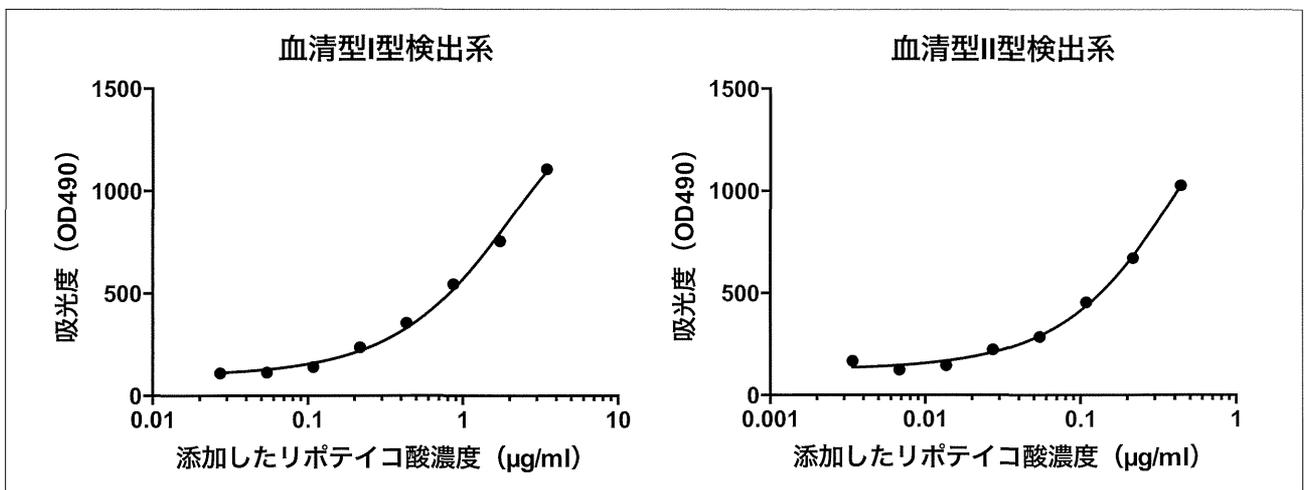


図 6 免疫複合体定量解析に用いたスタンダードカーブ

表 1 免疫複合体検出系の測定精度 (血清型 I 型の検出系)

リポテイコ酸測定範囲濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	アッセイ内精度 (%)					アッセイ間精度 (%)
	アッセイ1	アッセイ2	アッセイ3	アッセイ4	アッセイ5	
12.5	5	7	3	1	3	32
6.25	4	7	3	4	3	25
3.13	7	7	10	2	5	17
1.57	2	2	4	1	5	10
0.79	3	5	2	4	1	6
0.40	2	6	1	2	4	7
0.20	8	1	5	4	1	6
0.10	6	4	4	7	1	5

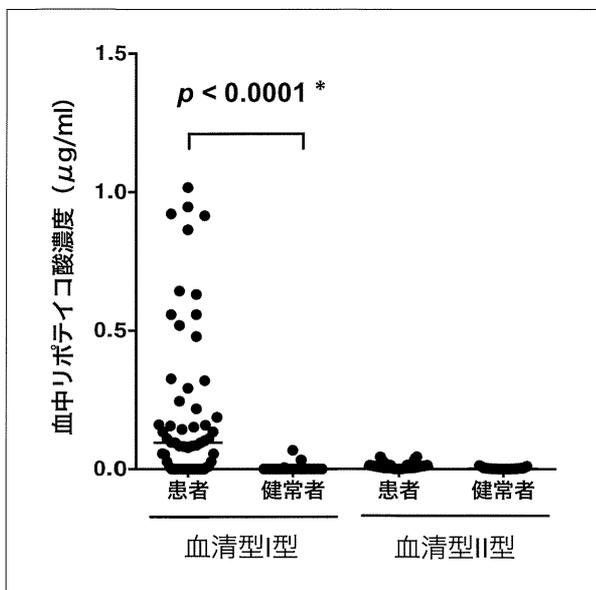


図 7 リポテイコ酸免疫複合体の検出結果  
\*Mann-Whitney test

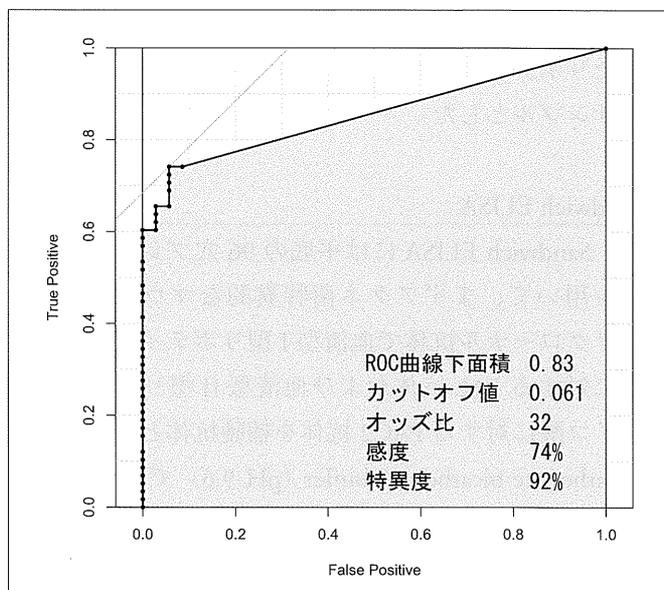


図 8 本検出系の ROC 曲線による解析

させた。さらに DNase、RNase を最終濃度で 0.02 mg/ml になるように加え、37℃で 16 時間インキュベートさせた。その後等量のフェノールを加え 4℃で 1 時間振盪させ、5000 rpm で 10 分遠心分離し沈殿成分に対し 1 ml の MQ で溶解した。さらに凍結乾燥を行い、抽出したリポテイコ酸の乾燥重量を計測し解析に用いた。

サンプル処理方法

解析に用いたサンプルは免疫複合体を形成する抗体の解離、及びその抗体を失活させるため、以下の処理を行った。PBS で 4 倍に希

釈した血漿 50  $\mu\text{l}$  に対して 0.1M グリシン塩酸塩 pH 1.0 を 25  $\mu\text{l}$  加え、4℃で一晩、インキュベートを行った。その後、解離した抗体を失活させるために 100℃で 10 分間の熱処理を行い、1M Tris-HCl pH 13 で中性に戻し解析に用いた。また定量に用いたスタンダードサンプルについても同様の処理を行い、解析に用いた。

スタンダードサンプル

定量解析を行うためにスタンダードサンプルを調整してプレート毎に用いた。予備検討にて健常人血漿を数名分測定し、血中リポテ

表 2 重回帰分析による他の因子との関連性の解析 (n=43)

	回帰係数	標準誤差	標準回帰係数	t 値	p 値
性別	0.913	0.927	0.178	0.984	N.S.
年齢	-0.012	0.03	-0.084	-0.399	N.S.
stage	-0.077	0.663	-0.021	-0.116	N.S.
ACE	-0.007	0.07	-0.03	-0.097	N.S.
lysozyme	0.034	0.074	0.129	0.453	N.S.
BAL 中リンパ球数	-0.007	0.026	-0.056	-0.264	N.S.
BAL 中 CD4/8 比	0.076	0.128	0.12	0.596	N.S.

イコ酸量が低く、リポテイコ酸に対する抗体価が高い人の血漿に対して希釈系列を作成したりリポテイコ酸を加え、これをスタンダードサンプルとした。

#### Sandwich ELISA

Sandwich ELISA には平底の 96 穴プレートを用いて、まずアクネ菌特異的なマウスモノクローナル抗体で血清型 I 型リポテイコ酸に対する PAL 抗体および血清型 II 型リポテイコ酸に対する PAC2 抗体を捕獲抗体として carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) で 1000 倍に希釈したものを 50  $\mu$ l 添加し 37  $^{\circ}$ C で 60 分固相化を行った。Tween-PBS で洗浄を行った後、上記の pH および熱による処理を行ったサンプルを 50  $\mu$ l 加え 37  $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。同様に Tween-PBS にて洗浄を行った後、検出抗体としてアクネ菌破砕液を免疫し作成したウサギポリクローナルを Tween-PBS で 500 倍に希釈し、50  $\mu$ l 添加し 37  $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。Tween-PBS による洗浄後、高感度の検出系にするために 2 次抗体として DAKO 社のマウスイムノグロブリンに対する EnVision を Tween-PBS にて 10 倍に希釈したものを 50  $\mu$ l 添加し、室温で 30 分間反応させた。再び Tween-PBS にて洗浄後、最後に 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride、0.06%  $H_2O_2$  を加えた Tris-HCl (pH7.5) を 50  $\mu$ l 加え室温、15 分発色させ、2 N HCl を 25  $\mu$ l 加え反応を停止させた。その後、プレートリーダーにて

490 nm の吸光度を測定した。

#### 【結果】

##### サンプル処理の検討

Sandwich ELISA により検出を可能にするために、サンプル処理の方法について検討を行った。サンプルにはアクネ菌リポテイコ酸に対して高い抗体価を有する健常者血漿に、抽出したりリポテイコ酸を加え、免疫複合体を形成させたものを擬似陽性サンプルとして検出系の作成に用いた。通常の方法による検出では図 3a に示すように加えたりリポテイコ酸濃度に関係なく、すべてのサンプルで検出不能であった。次にサンプル中の pH を下げ、その後再び中性に戻したサンプルに対して検出を行ったが (図 3b)、図 3a と同様に検出不能であった。そこでサンプルの pH を下げた後、熱処理を加えて抗体を失活させたのち pH を中性に戻し測定を行うと図 3c のように、加えたりリポテイコ酸の濃度依存的に検出が可能となった。

##### サンプル処理によるリポテイコ酸への影響

今回、血漿中で免疫複合体を形成するリポテイコ酸の検出を可能にしたサンプル処理によりどの程度リポテイコ酸にダメージが加わり検出に影響するかを確認した (図 4)。サンプルとして PBS にアクネ菌破砕液を加えたサンプルを用い、サンプル処理の有無によりその検出を比較した。その結果、サンプル処理を行わなかった場合と比較して、大きな差

は認められずリポテイコ酸の検出においては影響が少ないことが判った。

血清型 II 型の検出においてはサルコイドーシス患者、健常人共に殆ど検出されなかった。

#### 菌体成分添加による本検出系の検討

リポテイコ酸に対する抗体価が低い健常人血漿、及び高い健常人血漿を用いて、アクネ菌破砕液を過剰量添加し本検出系にて測定を行った (図 5)。サンプル処理を行わなかった場合、添加した菌体成分の濃度が 0.4 mg/ml のポイントにおいて、抗体価が低い血漿においてはリポテイコ酸の検出が可能であったが、抗体価の高い血漿においては検出不能であった。また、サンプル処理を行った場合では抗体価に影響されることなく、同濃度のいずれの血漿においても同程度の検出が可能であった。

#### 免疫複合体検出系におけるスタンダードカーブと検出精度

ヒト血中におけるアクネ菌リポテイコ酸に対する免疫複合体を定量解析するためにスタンダードの作成を行った (図 6)。一部のサルコイドーシス患者および健常人血漿を用いて測定した予備検討にてスタンダードに用いるリポテイコ酸濃度を決定し、得られた吸光度よりスタンダードカーブを作成した。また、本スタンダードサンプルを用いて 5 回測定を行い、アッセイ内精度及びアッセイ間精度を算出した (表 1)。アッセイ内精度においてはすべてのアッセイにおいて 10% 以下を示し、アッセイ間精度においては実際のリポテイコ酸測定範囲内において概ね 30% 以下であった。

#### リポテイコ酸免疫複合体の検出結果

サルコイドーシス患者 58 名、及び健常人 35 名の血漿を用いて血清型 I 型及び血清型 II 型のリポテイコ酸免疫複合体の検出を行った (図 7)。血清型 I 型のリポテイコ酸免疫複合体検出においてサルコイドーシス患者では健常人と比較して有意に高く検出された。

#### 本検出結果の解析

今回、血清型 I 型のリポテイコ酸免疫複合体の定量を行った結果から ROC 曲線による解析を行った (図 8)。その結果、ROC 曲線下面積は 0.83 と高いものであり有用な検査法であることが示された。また本検出法におけるカットオフ値は 6,724 ng/ml で、その場合の感度は 74%、特異度は 94% と高いものであり、オッズ比は 47 倍であった。

また、サルコイドーシス患者のリポテイコ酸免疫複合体検出結果と性別、年齢、stage、ACE 値、lysozyme 値、BAL 中リンパ球数、BAL 細胞 CD4/8 比との関連性を確認するために重回帰分析を行った (表 2)。解析にはこれらの因子と比較可能な 43 例について行った。その結果、これらの因子との有意な関連性は認められなかった。

#### 【考察】

本教室ではこれまでに、様々なアクネ菌に対する抗体を利用した血中の菌体成分検出系の作成を試みてきたが、いずれも成功までには至らなかった。その原因としてアクネ菌の菌体やその菌体成分が免疫複合体として存在していたからである。そのため、捕獲抗体や検出抗体とのエピトープの競合が生じ検出を困難にしていた。今回、我々が新たに作成したアクネ菌の循環性免疫複合体の検出系は、サンプル中の pH を酸性にすることで抗原と抗体を解離させ、熱により抗体を失活させることで成功に至った。この方法は強酸の状態や熱による処理加えているが、今回ターゲットとした糖脂質抗原であるリポテイコ酸はこれらの処理による変性を受けづらいことも成功の要因の一つとなっている。

今回、サルコイドーシス患者でアクネ菌由来リポテイコ酸の循環性免疫複合体が検出されたことは、これまで想定してきた病因論をさらに裏付ける結果となった。サルコイドーシスリンパ節組織

においては、マクロファージ細胞内に充満して認められるアクネ菌がしばしば観察される。これはアクネ菌が内因性活性化し細胞内増殖したものと考えられ、その一部はマクロファージ内から他の細胞へと感染の場を広げ、リンパ行性や血行性に他臓器へと拡散する可能性を想定してきた。よって今回検出されてきたものの一部は拡散しているアクネ菌の菌体そのものも含まれている可能性が高く、今後、この免疫複合体のコアとなっている抗原を詳細に解析する必要がある。

また、血清型 I 型のリポテイコ酸に対する免疫複合体が健常人と比較してサルコイドーシス患者で有意に高く検出され、また血清型 II 型では殆ど検出はされなかった。これまでの研究で、血清型 I 型に分類されるアクネ菌は、その多くが細胞侵入能を有し、マクロファージだけでなく上皮細胞等においても細胞内への感染を引き起こすことを明らかにしている<sup>9)</sup>。これらのことより、潜伏感染が成立し、内因性活性化による細胞内増殖したアクネ菌は、その多くが血清型 I 型である可能性が考えられる。

今回作成に成功したアクネ菌の菌体成分に対する免疫複合体の検出方法は、CD4/8 比など他のマーカーとの関連性は見出せず、サルコイドーシスにおける新たな血清診断法に利用出来る可能性が高い。アクネ菌病因論から推察される本菌の増殖及び拡散現象を捉えているならば、病勢等を判定出来るマーカーに利用出来ると考えられる。また、抗菌剤対象者の選別やその効果判定などにも広く応用できる可能性もある。今回の検討においてはサルコイドーシス患者および健常人に対して解析を行ったが、今後、他疾患（特にサルコイドーシスとの鑑別が必要とされる疾患）等を含めた多数例による解析が必要であると考えられ、他施設の先生方のご協力が必要不可欠である。そのため本法を用いた解析の多施設共同研究を是非とも班会議にて企画していただきたい。

## 【研究発表】

### 論文発表

- ・ Bae Y, et al. PLoS One. 2014. 28;9 (2) :e90324.
- ・ Takemura K, et al. Hum Pathol. 2014. 45 (2) :331-41.
- ・ Takemori N, et al. J Med Case Rep. 2014. 15;8:15.
- ・ Omori M, et al. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2014. doi: 10.1111/jdv.12594.

### 学会発表

- ・ Eishi Y, et al. 3<sup>rd</sup> Combined WASOGBAL Meeting, 11<sup>th</sup> WASOG Meeting and 13<sup>th</sup> International Conference on BAL.
- ・ 江石 義信他. 第 97 回日本細菌学会関東支部総会
- ・ 友恵 瑤子他. 第 97 回日本細菌学会関東支部総会
- ・ 米山 晶子他. 第 97 回日本細菌学会関東支部総会

### 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, et al. ATS/ ERS/WASOG statement on sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 1999. 16:149-73.
- 2) Homma JY, et al. Bacteriological investigation on biopsy specimens from patients with sarcoidosis. *Jpn J Exp Med.* 1978. 48:251-5.
- 3) Abe C, et al. Frequent isolation of *Propionibacterium acnes* from sarcoidosis lymph nodes. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1984. 256:541-7.

- 4) Ishige, I. et al. Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. *Lancet*. 1999. 354:120-3.
- 5) Yamada, T. et al. In situ localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. *J Pathol*. 2002. 198:541-7.
- 6) Negi M, et al. Localization of *Propionibacterium acnes* in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. *Mod Pathol*. 2012. 25 (9) :1284-97.
- 7) Eishi, Y. Etiologic link between sarcoidosis and *Propionibacterium acnes*. *Respir Investig*. 2013. 51:56-68.
- 8) Eishi, Y. Etiologic Aspect of Sarcoidosis as an Allergic Endogenous Infection Caused by *Propionibacterium acnes*. *BioMed Res Int*. Volume 2013, Article ID 935289, 18 pages.
- 9) Furukawa, A. et al. Characterization of *Propionibacterium acnes* isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues with special reference to cell-invasiveness, serotype, and trigger factor gene polymorphism. *Microb Pathog*. 2009. 46:80-7.

研究成果の刊行に  
関する一覧表

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版地	出版年	ページ
本間 栄	特発性肺線維症	山口 徹, 北原光夫 監修	2014 今日の治療指針	東京	2014	313-314
本間 栄 (分担)	ANCA 関連血管炎の 診療ガイドライン (2014 年改訂版)	尾崎承一, 榎野博史 編	厚生労働省 難治性疾患克服研究事業 難治性血管炎に関する調査研究班		2014	
石田文昭, 本間 栄 (分担)	呼吸器疾患 (慢性閉塞性疾患、 運動誘発性喘息)		健康運動指導士養成講習会テキスト (公益財団法人 健康・体力づくり 事業財団)	東京	2014	131-136
杉野圭史, 本間 栄 (分担)	検査手順と 診断フローチャート	久保恵嗣, 藤田次郎 編	間質性肺疾患診療マニュアル 改訂第 2 版	東京	2014	46-50
本間 栄 (分担)	Acetylcysteine 吸入療法	久保恵嗣, 藤田次郎 編	間質性肺疾患診療マニュアル 改訂第 2 版	東京	2014	184-189
坂本 晋, 本間 栄 (分担)	特発性間質性肺炎診断と 治療の手引き 改訂第 2 版	門脇 孝, 小室一成, 宮地良樹 監修	診療ガイドライン UP-TO-DATE	東京	2014	97-104
坂本 晋, 本間 栄 (分担)	特発性間質性肺炎	弦間昭彦 編	呼吸器疾患診療最新ガイドライン	東京	2014	118-124
佐藤敬太, 本間 栄 (分担)	多発性筋炎 / 皮膚筋炎	杉山幸比古 編	全身性疾患の肺病変	大阪	2014	25-33
坂本 晋, 本間 栄 (分担)	ロバの肺病変 —高齢のロバに高頻度に認めら れる肺病変は？	塩谷隆信, 千原孝司, 桑平一郎, 小林弘祐 編	呼吸のトリビア	東京	2014	119-123
高橋弘毅	間質性肺疾患の診断・検査 —画像と病理がわかる：E. 疾患 マーカー・特殊検査の手順と解 釈：1b. 疾患マーカー：サーファ クタント蛋白質 (SP-A, SP-D)	久保恵嗣, 藤田次郎	間質性肺疾患診療マニュアル 改訂第 2 版	東京	2014	146-148
高橋弘毅, 千葉弘文, 大塚満雄	総論 治療 1. 生活習慣と薬物療法	東田有智	インフォームドコンセントのための 図説シリーズ びまん性肺疾患と特発性間質性肺炎	大阪	2014	42-47
稲瀬直彦	好酸球性肺炎	山口 徹, 北原光夫	今日の治療指針 2014 年版	東京	2014	314-315
稲瀬直彦	過敏性肺炎	久保恵嗣, 藤田次郎	間質性肺疾患診療マニュアル 改訂第 2 版	東京	2014	364-369
稲瀬直彦	過敏性肺炎	弦間昭彦	呼吸器疾患 最新ガイドライン	東京	2014	205-208
古家 正, 稲瀬直彦	呼吸困難	井上智子, 稲瀬直彦	緊急度・重症度からみた 症状別看護過程 + 病態関連図 第 2 版	東京	2014	496-502

著者名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版地	出版年	ページ
宮崎泰成, 稲瀬直彦	過敏性肺炎における ステロイド療法の実践	東田有智	呼吸器疾患のステロイド療法 実践マニュアル	東京	2014	140- 145
坂東政司	特発性間質性肺炎 (IIPs) 各疾患 の診断と治療 2) 特発性肺線維 症 (IPF) の急性増悪	東田有智	インフォームドコンセントのための 図説シリーズ びまん性肺疾患と特発性間質性肺炎	大阪	2014	84- 91
坂東政司	B ステロイド療法の実践	東田有智	呼吸器疾患のステロイド療法実践 マニュアル	東京	2014	112- 121
酒井文和	IPF の ATS/ERS/JSR/ALAT statement と日本における診断	永井厚志, 巽 浩一郎, 桑野和喜, 高橋和久	呼吸器 annual review 2014	東京	2014	189- 195
酒井文和	画像診断	二木芳人, 吉田耕一郎	レジデントのために感染症の 診断と治療	東京	2014	148- 155
酒井文和	画像で見る呼吸器感染症	松島敏春, 藤田次郎	画像で見る呼吸器感染症	東京	2014	
須田隆文, 千田金吾	Ⅲ. 診断の進歩 4. IIPs と UCTD, Lung-dominant CTD, Autoimmune-featured ILD	永井厚志, 桑野和善, 高橋和久, 巽浩一郎	Annual Review 呼吸器 2014	東京	2014	151- 158
中村祐太郎, 須田隆文	特発性間質性肺炎 (IIPs) 各疾患 の診断と治療 8) リンパ球性間 質性肺炎 (LIP) と IPPFE	東田有智	インフォームドコンセントのための 図説シリーズ びまん性肺疾患と特発性間質性肺炎	大阪	2014	128- 133
穂積宏尚, 須田隆文	IV -A 特発性間質性肺炎 4 非 特異性間質性肺炎 (NSIP) の急 性増悪	久保恵嗣, 藤田次郎	間質性肺疾患 診療マニュアル 改訂第 2 版	東京	2014	241- 244
新井 徹, 井上義一	リンパ脈管筋腫症		今日の診療のために ガイドライン 外来診療		2014	
井上義一	欧米のガイドライン紹介	久保恵嗣, 藤田次郎	間質性肺疾患 診療マニュアル 改訂第 2 版	東京	2014	19- 24
佐々木由美子, 井上義一	慢性好酸球性肺炎	久保恵嗣, 藤田次郎	間質性肺疾患 診療マニュアル 改訂第 2 版	東京	2014	372- 375
井上義一	2. 診断 1) 臨床像 (問診, 身体 所見, 一般検査, 特殊検査)	東田有智	インフォームドコンセントのための 図説シリーズ びまん性肺疾患と特発性間質性肺炎	大阪	2014	18- 29
井上義一	リンパ脈管筋腫症	弦間昭彦 編	呼吸器疾患診療最新ガイドライン	東京	2014	379- 384
井上義一	ランゲルハンス細胞組織球症 up to date	永井厚志, 桑野和善, 高橋和久, 巽浩一郎	Annual Review 呼吸器 2014	東京	2014	112- 118
井上義一	Ⅲ 特発性間質性肺炎 A 作用機序, 適応と注意点	東田有智	呼吸器疾患のステロイド療法 実践マニュアル	東京	2014	85- 90
井上義一	肺胞蛋白症	山口 徹, 北原光夫	今日の治療指針 2014 年版	東京	2014	319
井上義一	肺胞蛋白症	山口 徹, 北原光夫	今日の治療指針 2014 年版ポケット版	東京	2014	319
西岡安彦	細胞・分子生物	橋本 修	呼吸器疾患文献レビュー 2014 ~ 2015	東京	2014	12- 25

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版地	出版年	ページ
岸 潤, 河野 弘, 西岡安彦	強皮症	杉山幸比古	最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC	大阪	2014	34-41
石井 寛, 渡辺憲太郎	全身性疾患の肺病変 第5章 他臓器疾患の肺病変 炎症性疾患の肺病変	杉山幸比古	最新医学・別冊 新しい診断と治療の ABC	大阪	2014	177-182
近藤康博, 長谷川隆一, 谷口博之	V. 各種の呼吸不全に対する人工呼吸と集中ケア 28 喘息患者の急性増悪時の人工呼吸と集中ケア	岡元和文	人工呼吸器と集中ケア Q&A	東京	2014	188
谷口博之	特発性間質性肺炎 (IIPs) 各疾患の診断と治療 1) 特発性肺線維症 (IPF)	東田有智	びまん性肺疾患と特発性間質性肺炎	東京	2014	68-83
谷口博之, 片岡健介	ステロイド療法の実践 IPF におけるステロイド療法の位置づけ	東田有智	呼吸器疾患のステロイド療法 実践マニュアル	東京	2014	91-102

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugino K, Ishida F, Kikuchi N, Hirota N, Sano G, Sato K, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Homma S	Comparison of clinical characteristics and prognostic factors of combined pulmonary fibrosis and emphysema versus idiopathic pulmonary fibrosis alone	Respirology	19	239-245	2014
Koyama K, Sano G, Hata Y, Shiraga N, Ota H, Sugino K, Isobe K, Sakamoto S, Takai Y, Kozuka S, Makino T, Otsuka H, Sato F, Sasamoto S, Iyoda A, Kurosaki A, Homma S	An anomalous unilateral single pulmonary vein associated with a bone morphogenetic protein receptor II gene mutation	Intern Med	53	461-466	2014
Isobe K, Hata Y, Tochigi N, Kaburaki K, Kobayashi H, Makino T, Otsuka H, Sato F, Ishida F, Kikuchi N, Hirota N, Sato K, Sano G, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Shibuya K, Iyoda A, Homma S	Clinical significance of BIM deletion polymorphism in non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutation	J Thorac Oncol	9	483-487	2014
Yamamoto A, Sugino K, Kobayashi M, Hata Y, Homma S	Efficacy of nasal continuous positive airway pressure in tracheobronchomalacia	J Med Soc Toho	61	166-171	2014
Muramatsu Y, Isobe K, Sugino K, Kinoshita A, Wada T, Sakamoto S, Takai Y, Sato F, Hata Y, Wakayama M, Sibuya K, Uekusa T, Iyoda A, Homma S	Malignant pleural mesothelioma mimicking the intrapulmonary growth pattern of epithelioid hemangioendothelioma	Pathol Intern (Letter to the Editor)	64	358-360	2014
Hirota N, Ito T, Miyazaki S, Ebina M, Homma S	Gene expression profiling of lung myofibroblasts reveals the anti-fibrotic effects of cyclosporine	Tohoku J Exp Med	233	283-293	2014
Takai Y, Yamashiro Y, Satoh D, Fukunaga S, Kobayashi M, Sugiyama K, Hatakeyama Y, Moriyama K, Komagamine M, Takasaki Y, Homma S	Association of obstructive sleep apnea syndrome with trapezius muscle hardness	J Med Soc Toho	61	224-231	2014
Hasegawa Y, Takahashi M, Ariki S, Asakawa D, Tajiri M, Wada Y, Yamaguchi Y, Nishitani C, Takamiya R, Saito A, Uehara Y, Hashimoto J, Kurimura Y, Takahashi H, Kuroki Y	Surfactant protein D suppresses lung cancer progression by downregulation of epidermal growth factor signaling	Oncogene		doi: 10.1038/onc.2014.20	2014
Natsuzaka M, Chiba H, Kuronuma K, Otsuka M, Kudo K, Mori M, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi H	Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences	Am J Respir Crit Care Med	190	773-779	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishikiori N, Chiba H, Arika S, Kuronuma K, Otsuka M, Shiratori M, Ikeda K, Watanabe A, Kuroki Y, Takahashi H	Distinct compartmentalization of SP-A and SP-D in the vasculature and lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis	BMC Pulm Med	doi: 10.1186/1471-2466-14-196		2014
Yoshida T, Nagai K, Inomata T, Ito Y, Betsuyaku T, Nishimura M	Relationship between neutrophil influx and oxidative stress in alveolar space in lipopolysaccharide-induced lung injury	Respir Physiol Neurobiol	191	75-83	2014
Konno S, Hizawa N, Makita H, Shimizu K, Sakamoto T, Kokubu F, Saito T, Endo T, Ninomiya H, Iijima H, Kaneko N, Ito YM, Nishimura M	J-Blossom Study Group: The effects of a Gly16Arg ADRB2 polymorphism on responses to salmeterol or montelukast in Japanese patients with mild persistent asthma	Pharmacogenet Genomics	24	246-255	2014
Taniguchi N, Konno S, Isada A, Hattori T, Kimura H, Shimizu K, Maeda Y, Makita H, Hizawa N, Nishimura M	Association of the CAT-262C>T polymorphism with asthma in smokers and the nonemphysematous phenotype of chronic obstructive pulmonary disease	Ann Allergy Asthma Immunol	113	31-36	2014
Furusawa H, Miyazaki Y, Sonoda S, Tsuchiya K, Yaguchi T, Kamei K, Inase N	Penicilliosis marneffei complicated with interstitial pneumonia	Intern Med	53	321-323	2014
Komazaki Y, Miyazaki Y, Fujie T, Sakashita H, Tsuchiya K, Tamaoka M, Sumi Y, Maruyama Y, Nanki T, Inase N	Serodiagnosis of Mycobacterium avium complex pulmonary disease in rheumatoid arthritis	Respiration	87	129-135	2014
Ono H, Motoi N, Nagano H, Miyauchi E, Ushijima M, Matsuura M, Okumura S, Nishio M, Hirose T, Inase N, Ishikawa Y	Long noncoding RNA HOTAIR is relevant to cellular proliferation, invasiveness, and clinical relapse in small-cell lung cancer	Cancer Med	doi: 10.1002/cam4.220		2014
Iijima Y, Furusawa H, Tateishi T, Fujie T, Tamaoka M, Sakashita H, Miyazaki Y, Sumi Y, Hosono Y, Nakashima R, Minori T, Inase N	Amyopathic dermatomyositis complicated with eosinophilic pneumonia	Intern Med	53	1539-1544	2014
Azuma A	Macrolide antibiotics: 25 years of use and the future treatment of common diseases.	Community Acquir Infect	1	6-10	2014
Judson MA, Costabel U, Drent M, Wells A, Maier L, Koth L, Shigemitsu H, Culver DA, Gelfand J, Valeyre D, Sweiss N, Crouser E, Morgenthau AS, Lower EE, Azuma A, Ishihara M, Morimoto S, Tetsuo Yamaguchi T, Shijubo N, Grutters JC, Rosenbach M, Li HP, Rottoli P, Inoue Y, Prasse A, Baughman RP, Organ Assessment Instrument Investigators TW	The WASOG Sarcoidosis Organ Assessment Instrument: An update of a previous clinical tool	Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis	31	19-27	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogura T, Taniguchi H, Azuma A, Inoue Y, Kondoh Y, Hasegawa Y, Bando M, Abe S, Mochizuki Y, Chida K, Klüglich M, Fujimoto T, Okazaki K, Tadayasu Y, Sakamoto W, Sugiyama Y	Safety and pharmacokinetics of nintedanib and pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis.	Eur Respir J	Epub ahead of print		2014
Miura Y, Saito T, Fujita K, Tsunoda Y, Tanaka T, Takoi H, Yatagai Y, Rin S, Sekine A, Hayashihara K, Nei T, Azuma A	Clinical experience with pirfenidone in five patients with scleroderma-related interstitial lung disease	Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Disease	31	235-238	2014
Inomata M, Ikushima S, Awano N, Kondoh K, Satake K, Masuo M, Kusunoki Y, Moriya A, Kamiya H, Ando T, Yanagawa N, Kumasaka T, Ogura T, Sakai F, Azuma A, Gemma A, Takemura T	An autopsy study of combined pulmonary fibrosis and emphysema: correlations among clinical, radiological, and pathological features	BMC Pulm Med	doi: 10.1186/1471-2466-14-104		2014
Kamio K, Azuma A, Ohta K, Sugiyama Y, Nukiwa T, Kudoh S, Mizushima T	Double-blind controlled trial of lecithinized superoxide dismutase in patients with idiopathic interstitial pneumonia – short term evaluation of safety and tolerability	BMC Pulm Med	doi: 10.1186/1471-2466-14-86		2014
Kurotsu S, Tanaka KI, Niino T, Asano T, Sugizaki T, Azuma A, Suzuki H, Mizushima T	Ameliorative effect of mepenzolate bromide against pulmonary fibrosis	J Pharmacol Exp Ther	350	79-88	2014
Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Flaherty KR, Hansell DM, Inoue Y, Kim DS, Kolb M, Nicholson AG, Noble PW, Selman M, Taniguchi H, Brun M, Le Maulf F, Girard M, Stowasser S, Schlenker-Herceg R, Disse B, Collard HR; INPULSIS Trial Investigators.	Efficacy of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: The INPULSIS™ Trials	New Engl J Med	370	2071-2082	2014
Inomata M, Kamio K, Azuma A, Matsuda K, Miura Y, Hayashi H, Nei T, Fujita K, Saito Y, Gemma A	Pirfenidone inhibits fibrocyte accumulation in the lungs in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis	Respir Res	doi: 10.1186/1465-9921-15-16		2014
Kurosaki F, Bando M, Nakayama M, Mato N, Nakaya T, Yamasawa H, Yoshimoto T, Fukushima N, Sugiyama Y	Clinical features of pulmonary aspergillosis associated with interstitial pneumonia	Intern Med	53	1299-1306	2014
Kurosaki F, Bando M, Nakayama M, Mato N, Yamasawa H, Higashizawa T, Tanaka A, Sugiyama Y	A patient with sarcoidosis who developed heterochronic involvements in different organs from initial organs during 7 years	Respir Investig	52	71-74	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kurosaki F, Bando M, Shinoda S, Nakayama M, Mato N, Yamasawa H, Kawai A, Shinozaki T, Yoshimoto T, Fukushima N, Tetsuka K, Endo S, Sugiyama Y.	A Case of Solitary Fibrous Tumor of the Pleura That Increased in Size After Resection of Renal Cell Carcinoma	JJSRE	36	153-157	2014
Natsuizaka M, Chiba H, Kuronuma K, Otsuka M, Kudo K, Mori M, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi H	Epidemiological survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences	Am J Respir Crit Care Med	190	773-779	2014
Sawahata M, Sugiyama Y, Nakamura Y, Nakayama M, Mato N, Yamasawa H, Bando M	Age-related differences in chest radiographic staging of sarcoidosis in Japan	Eur Respir J	43	1810-1812	2014
Takahashi H, Matsubara S, Saito K, Bando M.	Good obstetric outcome after embolisation of pulmonary arteriovenous malformation in hereditary haemorrhagic telangiectasia: planned pregnancy may also be important in this condition	Aust N Z J Obstet Gynaecol		doi: 10.1111/ajo.12154	2014
Bando M, Nakayama M, Takahashi M, Hosono T, Mato N, Yamasawa H, Okamoto H, Sugiyama Y	Serum Torque Teno Virus DNA Titer in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients with Acute Respiratory Worsening	Intern Med		in press	2014
Bando M, Sugiyama Y, Azuma A, Ebina M, Taniguchi H, Taguchi Y, Takahashi H, Homma S, Nukiwa T, Kudoh S, The Diffuse Lung Diseases Research Group by a Ministry of Health, Labour and Welfare Grant-in-Aid for Scientific Resenharh	A prospective survey of idiopathic interstitial pneumonias in a web registry in Japan	Respir Investig		in press	2014
Ogura T, Taniguchi H, Azuma A, Inoue Y, Kondoh Y, Hasegawa Y, Bando M, Abe S, Mochizuki Y, Chida K, Klüglich M, Fujimoto T, Okazaki K, Tadayasu Y, Sakamoto W, Sugiyama Y	Safety and pharmacokinetics of nintedanib and pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis.	Eur Respir J		Epub ahead of print	2014
Endo S, Bando M	Invited commentary: Videotheracoscopy-assisted surgical lung biopsy for interstitial lung diseases	Gen Thorac Cardiovasc Surg	62	331-333	2014
坂東政司	間質性肺炎に合併した肺癌の現状と治療戦略シンポジウム6 薬物療法、術後急性増悪回避で戦略検討 初回化学療法、CBDCA+PTX 療法に標準の可能性	Japan Medicine monthly 号外	3	1	2014
坂東政司, 山内浩義, 杉山幸比古	臨床調査票を用いた重症度Ⅳの特発性肺線維症に対するピルフェニドン使用例に関する臨床的検討	難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患に関する調査研究平成25年度研究報告書		47-52	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
坂東政司, 杉山幸比古	びまん性肺疾患に関するプロスペクティブ調査研究 (Web 登録)	難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患に関する調査研究平成25年度研究報告書		59-64	2014
Washino S, Ando H, Ushijima K, Hosohata K, Kumazaki M, Mato N, Sugiyama Y, Kobayashi Y, Fujimura A, Morita T	Temsirolimus induces surfactant lipid accumulation and lung inflammation in mice	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	306	L1117-L1128	2014
山内浩義, 坂東政司, 小松 有, 開 陽子, 間藤尚子, 中屋孝清, 山沢英明, 杉山幸比古	自然冷媒ヒートポンプ給湯器の貯湯タンクユニット使用中に発症した hot tub lung の 1 例	日呼吸誌	3	525-529	2014
坂東政司	眼で見る薬剤性肺障害	最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC	85		2014
坂東政司	特発性肺線維症の予後を規定するバイオマーカー	呼吸器内科	26	202-208	2014
Yoshizawa K, Mukai HY, Miyazawa M, Miyao M, Ogawa Y, Ohyashiki K, Katoh T, Kusumoto M, Gemma A, Sakai F, Sugiyama Y, Hatake K, Fukuda Y, Kudoh S	Bortezomib therapy-related lung disease in Japanese patients with multiple myeloma: Incidence, mortality, and clinical characterization	Cancer Sci	105	195-201	2014
Fujimoto K, Hara M, Tomiyama N, Kusumoto M, Sakai F, Fujii Y	Proposal for a new mediastinal compartment classification of transverse plane images according to the Japanese Association for Research on the Thymus (JART) General Rules for the Study of Mediastinal Tumors	Oncology Report	31	565-572	2014
Tanaka J, Moriyama H, Terada M, Takada T, Suzuki E, Narita I, Kawabata Y, Yamaguchi T, Hebisawa A, Sakai F, Arakawa H	An observational study of giant cell interstitial pneumonia and lung fibrosis in hard metal lung disease	BMJ Open		doi:10.1136/bmjopen-2013-004407	2014
Hasegawa M, Sakai F, Arimura K, Katsura H, Koh E, Sekine Y, Hiroshima K	EGFR mutation of adenocarcinoma in congenital cystic adenomatoid malformation/congenital pulmonary airway malformation: a case report	Jpn J Clin Oncol	44	278-281	2014
Enomoto Y, Takemura T, Hagiwara E, Iwasawa T, Okudela K, Yanagawa N, Baba T, Sakai F, Fukuda Y, Nagaoka S, Ogura T	Features of usual interstitial pneumonia in primary Sjogren syndrome from idiopathic pulmonary fibrosis	Respir Investig	52	278-281	2014
Inomata M, Ikushima S, Awano N, Kondoh K, Satake K, Masuo M, Kusunoki Y, Moriya A, Kamiya H, Ando T, Yanagawa N, Kumasaka T, Ogura T, Sakai F, Azuma A, Gemma A, Takemura T	An autopsy study of combined pulmonary fibrosis and emphysema: correlations among clinical, radiological, and pathological features	BMC Pulm Med		doi:10.1186/1471-2466-14-104	2014