サルコイドーシス肺病態への Propionibacterium acnes の関与に関する研究

第 1 編

サルコイドーシス肺胞リンパ球の活性化について

岡山大学医学部第二内科学教室（主任：木村郁郎教授）

江　尻　東　伍

（昭和63年5月24日受稿）

Key words：sarcoidosis, bronchoalveolar lavage, Propionibacterium acnes, alveolar lymphocyte, lymphocyte blastgenesis,

緒　　言

サルコイドーシス（サ症）は，全身性肉芽腫性疾患であり，その病因として，細菌，真菌，ウイルス，化学物質等が検討されてきたが，依然として未だその原因は明らかにされていない．罹患臓器では，肺門および縦隔リンパ節を含めて肺が95%以上と最も高率に侵されている[1]．近年，気管支肺胞洗浄法（Bronchoalveolar lavage, BAL）は，呼吸器疾患の診断法として，肺生検とともに，肺胞炎に対して，感度，特異性の両面で，優れた診断法であることが確立されてきた[2]．サ症の肺胞リンパ球は本法により一般に増加しており，中でも活性化T-リンパ球と，helper T細胞の増加が報告されている[3)-5)]．しかし，そのリンパ球の活性化の原因については，まったく不明である．一方，本間等は[6]，サ症病巣より，Propionibacterium acnes（P. acnes）を高頻度，高濃度に分離培養し，本菌による感染論を呈示している．そこで，著者はサ症の肺胞リンパ球の活性化と P.acnes の関与について検討した．

対　　象

岡山大学医学部第二内科外来を受診したサ症患者29例で，そのうち4例については治療前後計2回，その他の症例は治療前1回のみ，計33回 BAL を施行した．このうち1例は治療前III期より治療後0期に改善した．

対象症例の BAL 施行時の胸部 X 線病期分類は，0期（肺野病変なし）2例，I期（両側肺門リンパ節腫大のみ）10例，II期（両側肺門リンパ節腫大と肺野病変）14例，III期（肺野病変のみ）7例であった．このうち寛解例は2例で，非寛解例のうち BAL を施行する以前に prednisolone を使用した症例は9例，未治療症例は22例であった．

未治療22症例中，胸部 X 線上陰影の増悪がみられ，かつ BAL 液中リンパ球百分率が27%以上，または血清 angiotensin-converting enzyme (ACE)活性が21.4u 以上であった活動期症例は7例で，それ以外の非活動期症例は15例であった．対照として健常者15例，過敏性肺臓炎7例，特発性間質性肺炎3例，塵肺2例，肺結核1例についても検討した．なお末梢血リンパ球の検討は上記の症例を含む30例のサ症について検討した．

方　　法

先ずリンパ球の調整に関しては次の方法で実施した．BAL は気管支ファイバースコープ（Olympus, BF-1T）を，右中葉気管支 B_4 あるいは B_5 のいずれかに楔入し，滅菌生理食塩水50mlづつ4回，計200ml注入して洗浄した．回収

した洗浄液はStainless steel meshで沪過後，遠沈して細胞成分と液性成分に分離した．有核細胞は3回洗浄し，塗抹標本を作製し，May-Gimsa染色にて細胞を分類し，リンパ球を1×10^6/mlに10%仔牛血清加RPMI 1640液中に調整浮遊させた．末梢血リンパ球はFicoll-Conray比重遠沈法により，ヘパリン加静脈血より分離しリンパ球1×10^6/mlに調節した．リンパ球幼若化率は96well平底マイクロプレート（Falcon社）の各wellにリンパ球浮遊液を100μl入れ，P.acnesのpyridine extract residue（P.acnes-PER）（P.acnes, strain 4182, RIBI Imuno. Chem.Research INC, MT, USA）を0.5～500μg/mlの7段階濃度に加え，6日間37℃のCO_2インキュベータにて培養後，^{3}H-thymidineを0.2μCu添加し，さらに7時間培養し，オートセルハーベスターにて細胞をラボマッシュ用フィルターに回収後，液体シンチレーションカウンターで測定した．リンパ球の幼若化率の算定はP.acnes添加培養リンパ球のdpmを無添加リンパ球のdpmで除してstimulation index (S.I.)として算定した．

血清ACE活性は，笠原氏法にて，血清リゾチーム活性はmicrococcus lysodeikicusに反応させ，比濁法にて測定した．

なお，実験の成績の統計学的解析はStudent's paired *t-test*を用い，P<0.05を有意差と判定した．また，それぞれの図表は平均値±標準偏差値にて表した．

結　　果

1．気管支肺胞洗浄液細胞（表1）

細胞数：総細胞数はサ症2.69±0.17×10^6，健常者1.91±0.75×10^6とサ症において有意な増加が認められた（P<0.05）．しかし，サ症においてprednisolone投与による差は認められなかった．

細胞分類：サ症のマクロファージの平均は69.4%，リンパ球29.0%であり，健常者のそれぞれ89.6%, 9.8%に対してマクロファージの低率（P<0.001），リンパ球の高率（P<0.001）が認められた．好酸球，好中球，好塩基球には差は認められなかった．なお，サ症活動期症例においてはリンパ球は42.8%と非活動期26.4%，prednisolone投与症例29.4%に比して高い傾向にあった．

2．BAL液中リンパ球のP.acnes-PER添加幼若化率

1）P.acnes濃度依存性曲線：抗原としてホルマリン処理P.acnes全菌体を使用した場合，サ症5例のS.I.平均はP.acnes 1.0μg/mlの濃度にて0.91±035, 5.0μg/mlで0.75±0.56, 10μg/mlで0.99±0.39, 50μg/mlで0.79±0.56とS.I.の亢進は認められなかった．

P.acnes-PERを抗原として使用した場合は未治療サ症9例の平均値は0.5μg/mlにて1.37, 1.0μg/mlで1.80, 5.0μg/mlで2.23, 10.0μg/mlで2.06, 50μg/mlで1.44, 100μg/mlで1.00, 500μg/mlで0.81と5.0μg/mlでpeakを示す濃度依存曲線が認められた（図1）．しかし，prednisolone

表1　気管支肺胞洗浄液中の細胞成分

	症例数	細胞数 (×10^6)	細胞分類(%)				
			マクロファージ	リンパ球	好中球	好酸球	好塩基球
サルコイドーシス	29	26.9±16.5	69.4±20.9	29.0±20.8	0.6±0.9	0.5 ±1.4	0
未治療	22	28.5±16.7	67.2±21.0	31.6±21.0	0.5±0.6	0.6 ±1.6	0
活動期	7	32.9±15.9	55.3±18.3	42.8±18.4	0.7±0.5	1.3 ±2.7	0
非活動期	15	26.4±17.3	72.8±20.3	26.4±20.5	0.4±0.6	0.3 ±0.4	0
Prednisolone投与	9	24.3±13.9	69.2±18.4	29.4±18.5	1.0±1.32	0.2 ±0.4	0
寛解例	2	17.4±15.9	92.5± 3.6	7.2± 4.0	0.3±0	0.15±0.2	0
健常者	15	19.1± 7.5	89.6± 9.6	9.8± 9.4	0.3±0.6	0.3 ±0.5	0

平均値±標準偏差値

投与例ではP.acnes-PER5.0μg/mlにて0.85と最高値を示したが各濃度間に有意な差は認められなかった．健常者15例においてはリンパ球の採取量の少ないことによりP.acnes-PERの1.0μg/mlから10.0μg/mlの3段階の濃度にのみしか検査できなかったが，それぞれ，0.82，0.90，0.93と，いずれの濃度間においても差は見られず，かつS.I.が1.0以下とまったく反応が認められなかった．以上の結果より以後の測定はpeak濃度である5.0μg/mlの濃度にて行った．

2）各種肺疾患における幼若化率（図2）：サ症未治療症例22例のS.I.は1.91±0.80で健常者15例の0.90±0.39に比して，有意な亢進が認められた（P<0.001）．またprednisolone投与9例においても1.22±0.46と健常者に比して有意に亢進していた（P<0.01）．また未治療症例は治療症例に比して亢進が認められた（P<0.001）．

その他の肺疾患における幼若化率は過敏性肺臓炎7例で1.28±0.31，特発性間質性肺炎3例で1.08±0.32，塵肺2例1.24，結核1例0.87と過敏性肺臓炎において健常者よりも軽度な亢進

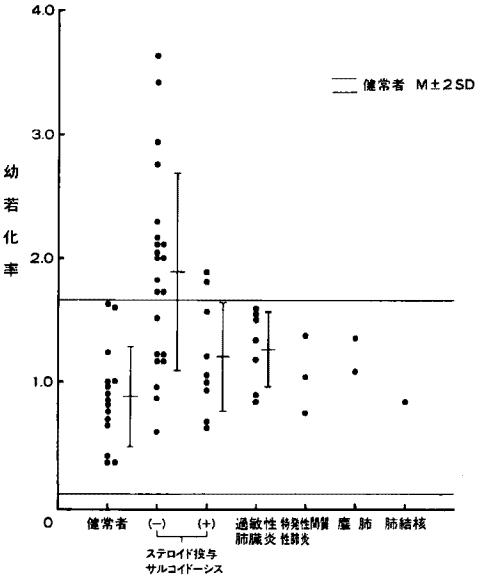

図2　各種肺疾患における肺胞洗浄液中のリンパ球のP. acses添加幼若化率（P. acses 5μg/ml）

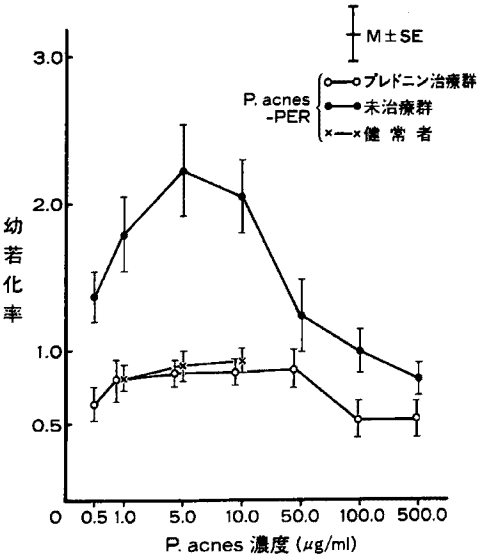

図1　サルコイドーシス肺胞洗浄液中リンパ球のP. acnes添加幼若化率
— 抗原濃度の影響 —

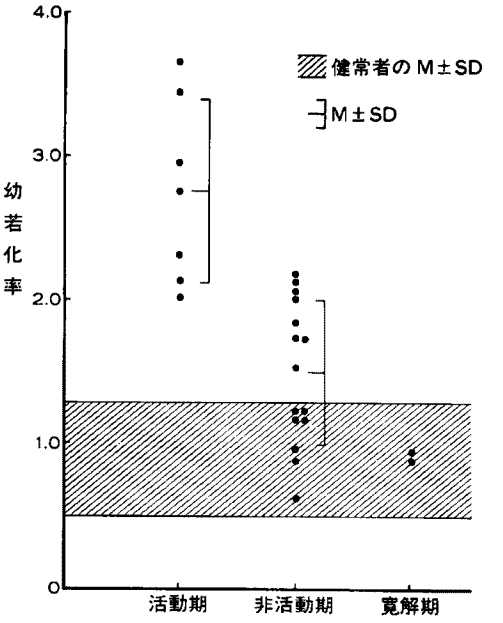

図3　サルコイドーシス肺胞リンパ球のP. acnes添加幼若化率
— 病変の活動性による —

が見られたものの有意の差はなかった.

3）サ症のP.acnes添加幼若化率と臨床所見との相関：未治療症例22例中活動期症例7例のS.I.は2.76±0.63, 非活動期症例15例1.52±0.50と，活動期，非活動期のいずれも健常者に比して著明な亢進が(P<0.001)，さらに活動期症例は非活動期症例に比して高値であった（P<0.05）．また寛解症例2例は平均0.92と健常者と同様亢進が認められなかった（図3）.

サ症肺胞リンパ球の幼若化率と，ACE活性との間には相関係数0.436（P<0.05）と，血清リゾチーム活性との間には相関係数0.523（P<0.01）と，いずれも有意な正の相関が認められた（図4）．さらにBAL液中リンパ球百分率とS.I.との間にも正の相関が認められた（相関係数0.537，P<0.01）.

4）末梢血リンパ球のP.acnes添加幼若化率（図6）：サ症治療症例18例の末梢血リンパ球の幼若率はP.acnes濃度0.5μg/mlで平均0.81, 1.0μg/mlで1.06, 50μg/mlで0.80, 100μg/mlで0.70, 500μg/mlで0.65と特異的亢進はなくprednisolone投与例12例，健常人19例においても同様にS.I.の亢進はなく，いずれの群間においても差は認められなかった.

考　　察

サ症は原因不明の肉芽腫性疾患であり，多くの細胞性免疫異常を伴うことが指摘されている[7]．末梢血リンパ球においてはリンパ球の減少特にT-リンパ球の減少がみられ，かつhelper T-cellの減少が報告され[4]，phytohemagglutinin（PHA）に対する幼若化率の低下も報告されている[8]．一方，BAL液中ではT-リンパ球[5]，なかでもhelper／inducer T-cellの増加が[9),10)]が

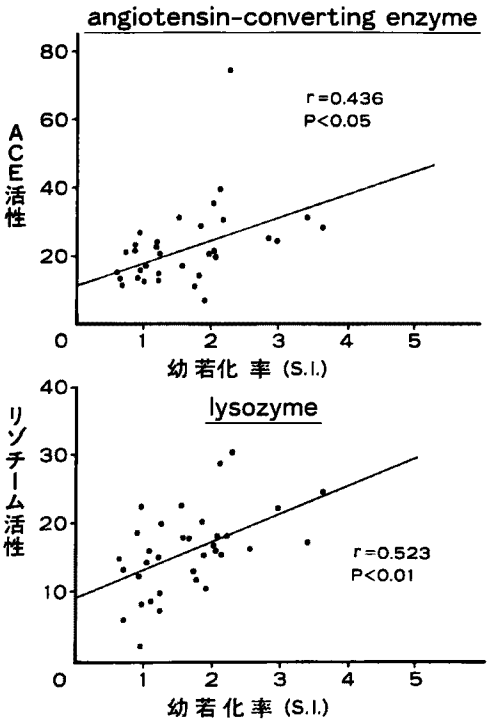

図4　サルコイドーシス肺胞リンパ球のP. acnes添加幼若化率と血清酵素活性との相関

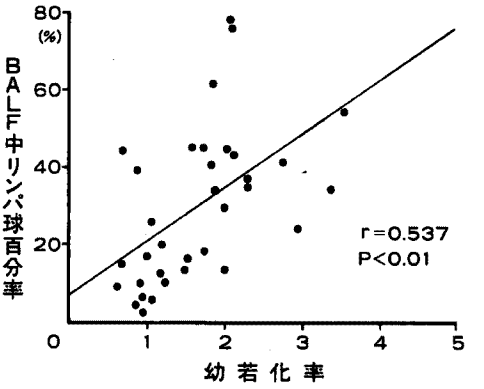

図5　サルコイドーシス肺胞リンパ球のP.acnes添加幼若化率とBAL液中リンパ球百分率との相関

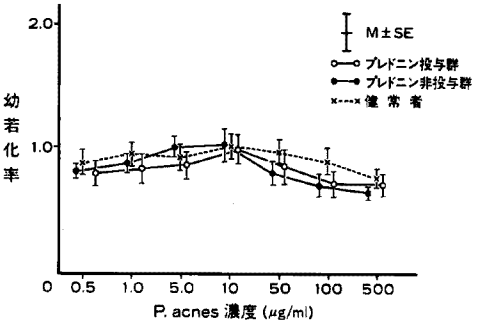

図6　末梢血リンパ球のP.acnes添加幼若化率

認められている．さらに肺胞T-リンパ球の増加が著明な症例では肺胞リンパ球によるInterleukin-2（IL-2）産生の亢進[11]thymidineの取り込み亢進[12]が認められることから，サ症の肺病巣局所に集積したT-リンパ球は，何かの刺激を受け活性化され，増殖していることを窺わせる．しかし，その原因についてはまったく不明である．一方では本間等を[6]中心として進められた文部省研究班はサ症の原因を感染論的立場に立って，類上皮細胞肉芽腫の存在するリンパ節，胸膜，肺組織を培養し，高率，高濃度にP.acnesが存在することを明らかにした．

そこで著者はサ症肺病巣におけるT-リンパ球異常を伴う病態にP.acnesの関与を想定し，サ症の肺胞リンパ球にP.acnesの細胞壁成分を添加培養したところリンパ球のDNA合成が亢進することを認めた．本反応はP.acnes-PER5.0μg/mlの濃度にピークを有する濃度依存性曲線を示したことから，サ症肺胞リンパ球はP.acnesに特異的に反応することが判明した．そして健常者および過敏性肺臓炎，特発性間質性肺炎，塵肺，肺結核等の他の肺疾患，あるいはサ症のうちでも寛解例においては亢進は認められなかった．さらにサ症においては活動期症例に最も高く，非活動期症例あるいはprednisolone投与症例では低下が認められるものの，健常者に比すればともに亢進が認められた．よって，サ症におけるP.acnes刺激による幼若化反応の亢進は本症に特異的なものと考えられた．さらにこの幼若化反応の亢進と血清ACE[13]，リゾチーム[14]の活性上昇およびBAL液中リンパ球の増加[11]との間にはいずれも正の相関がみられたことから，幼若化率の亢進はサ症における活動性をよく反映していた．そして，サ症末梢血リンパ球はP.acnes刺激にて幼若化の亢進はまったく認められず，肺胞リンパ球にのみに特異的な反応であった．なお，抗原としてP.acnes菌以外にStreptococcus pyogenes，Nocardia rubraの菌体成分を使用したが幼若化の亢進はまったく認められなかった[15]．

P.acnesはマクロファージの非特異的活性化作用を有する[16]ことから肺胞マクロファージをP.acnesが非特異的に刺激し，Interleukin-1（IL-1）などのモノカインを分泌し，リンパ球の幼若化率の亢進を来したとも考えられる．しかし健常者および過敏性肺臓炎などでの対照疾患症例においては幼若化率の亢進をまったく示さないことより非特異的刺激によるものとは考えられない．

サ症患者における類上皮細胞肉芽腫の形成機序としては，肉芽腫病変の形成に先行して胞隔炎が存在し，類上皮肉芽腫の形成，線維化へと進み，一部は自然消退するものと考えられる[4]．これら胞隔炎は肺胞に集積したT-リンパ球の浸潤によって引き起こされたものである．そしてサ症における肺内のT-リンパ球の増加の機序としては，二つの考えがある．一つは古くから認められている末梢血T-リンパ球の減少[17]，IL-1[18]，IL-2[19]にリンパ球に対する走化活性の認められることより，末梢血T-リンパ球の病巣部への流入が起こっていること，もう一つは肺局所でspontaneous IL-2 releaseがあるという成績より[20][21]，肺内におけるT-リンパ球の増殖である．IL-2はT細胞の分化，増殖因子であり，IL-2と抗原刺激による幼若化亢進は相関することから[22]，サ症肺胞リンパ球のIL-2分泌亢進の成績は肺内におけるリンパ球の幼若化率の亢進を示唆するものである．この事はP.acnes添加による肺胞リンパ球の幼若化率の亢進の成績と合致する．またSemenzato,G.[23]等はサ症病変局所においてIL-2 receptorを細胞表面に発現した活性化T-リンパ球の存在を示し，またMüller, Q.J.[24]等は，活動期サ症においては肺病巣T-リンパ球のIL-2 geneを活性化するagentの存在を指摘している．今回のサ症肺胞リンパ球のP.acnesに対する幼若化反応の亢進は，サ症肺にみられるリンパ球の異常を説明しうるものであり，P.acnesが先述のagentである可能性を示唆している．

これらの胞隔炎のagentとしては，肺サ症病変が肺胞内ではなく主として間質に形成されること[16]，さらに外因性アレルギー性肺胞炎に見られる様な細気管支病変の見られないことなどより外因性のものは考えにくく，内因的なagentの関与を考えてみる必要がある．すなわち，ある種の常在菌によって感作された個体に，なんら

かの原因によりこの菌が病巣にて異常に増殖し，感作されたT-リンパ球はIL-2産生を亢進し，T-リンパ球の増殖の亢進を来し，胞隔炎を招来しサ症病変を形成すると考えれば本間らによって検討されてきたサ症病巣におけるP.acnesの存在は興味ある成績である．

しかし，P.acnesはヒトにおいては皮脂腺，腸管等の常在嫌気性菌であり，上気道からも分離されている[25]．しかしサ症病巣より特に高頻度，高濃度に分離されるものの，なぜ病巣にて異常増殖が起こるかは不明であり今後検討を進めていくつもりである．

結　　語

サ症の肺病態へのP.acnesの関与を考えて気管支肺胞洗浄にて得た肺胞リンパ球をP.acnesと混合培養することにおいて以下の結論を得た．

1）サ症肺胞リンパ球のP.acnes添加幼若化率は健常者ならびに対照肺疾患に比して有意の亢進が認められた．しかし，末梢血リンパ球においては，反応が認められなかった．

2）肺胞リンパ球の幼若化率とBAL液中のリンパ球百分率，血清ACE活性および血清リゾチーム活性との間にはそれぞれ正の相関がみられ，本反応の亢進は，サ症の活動性を反映している．

以上の成績からサ症の肺病巣における活性化リンパ球による肺胞炎の成立と類上皮細胞肉芽腫の形成にP.acnesが深く関与していることが窺われる．

稿を終えるに臨み御指導ならびに御校閲いただきました恩師木村郁郎教授に謝意を捧げますと共に，研究に際して御指導いただきました中田安成講師に深謝致します．

なお本論文の要旨は第24回日本胸部疾患学会総会にて発表した．

文　　献

1）岩井和郎，立花輝夫，松井泰夫，重松信昭，泉孝英：サルコイドーシス剖検例の統計的，病理的観察．日胸疾会誌（1980）**11**，749—762．

2）Crystal R G, Gadek J E and Hannghake G W：Interstitial lung disease：Current concepts of pathogenesis, staging and therapy. Am J Med (1981) **70**, 542—568.

3）Hunnighake G W, Gadek J E, Young R C, Kawanami O, Ferrans V J and Crystal R G：Maintenance of granuloma formation in pulumonary sarcoidosis by T lymphocytes with in the lung. N Engl J Med (1980) **302**, 594—598.

4）Hunnighake G W and Crystal R G：Pulmonary sarcoidosis. A disoder mediated by exess helper T lymphocyte activity at sites of disease activity. N Eng J Med (1981) **305**, 429—439.

5）小林洋三：サルコイドーシス患者における気管支肺胞洗浄液の検討．岡山医誌（1984）**96**，1151—1161．

6）本間日臣：サルコイドーシス発生機構に関する研究．難病の発生機構．豊倉康夫編．東京大学出版会（1981）pp245—303．

7）Daniele R P, Dauber J H and Rossmann H D：Immunologic abnormalities in sarcoidosis. Ann Inter Med (1980) **92**, 406—416.

8）James D J, Neville E and Wolker A：Immunology of sarcoidosis. Am J Med (1975) **59**, 388—394.

9）Hunnighake G W, Fulmer J D, Young R C Jr, Cadec J E and Crystal R G：Location of the immune response in sarcoidosis. Am Rer Respir Dis (1979) **120**, 49—57.

10）Dauber J H, Rossman M and Daniele R P：Bronchoalveolar cell populations in acute sarcoidosis：Observations in smoking and nonsoking patients. J Lab Cli Med (1979) **94**, 862—871.

11）Rossmann M D, Dauder J H, Cardiollo M E and Daniel R P：Pulimonary sarcoidosis：Correlation of serum angiotensin-converting enzyme with blood and bronchoalveolar lymphocytes. Am Rev Respir Dis (1982) **125**, 366—369.

12) Hunnighake G W, Keogh B A and Line B R : Pulmonary sarcoidosis pathgenesis and therapy ; in Basic and Clinical Aspect of Granulomatous Disease, Bovos Yoshida eds (1981) pp275—290.

13) Silverstein E, Pershuk L P and Friendland J : Immunofluresent localization of angiotensin converting enzyme in epitheroid and giant cells of sarcoidosis granulomas. Proc Natl Acad Sci USA (1979) **76**, 6646—6648.

14) Pascual R S, Gee J B L and Finch S C : Usefullness of serum lysozome mesurement in diagnosis and evaluation of sarcoidosis. N Engl J Med (1973) **289**, 1074—1076.

15) 前田剛, 飛岡徹, 森由弘, 江尻東伍, 片岡幹男, 中田安成, 大熨泰亮, 守谷欣明, 木村郁郎 : サルコイドーシス肺胞リンパ球の各種細菌の壁成分刺激による幼若化反応の検討. サルコイドーシス研究会誌 (1987) **7**, 20—21.

16) Rosen Y, Anthanassiades T J, Monn S and Lyons H A : Nongranulomatous interstitial pneumonitis in sarcoidosis : Relationship to development of epitheloid granulomas. Chest (1978) **74**, 122—125.

17) Hoffbrand B I : Occurrence and significance of lymphopenia in sarcoidosis. Am Rev Res Dis (1968) **98**, 107—110.

18) Miossec P, Yu C and Ziff M : Lymphocyte chemotactic activity of interleulin 1. J Immunol (1984) **133**, 2007—2011.

19) Pinkstone P, Bittermann P B and Crystal R G : Induction of human T lymphocyte motility by interleakin 2. J Immunol (1985) **134**, 3887-3890.

20) Pinkstone P, Bittermann P B and Crystal R G : Spontaneous release of interleukin-2 by lung lymphocytes in active pulumonary sarcoidosis. N Engl J Med (1983) **308**, 793—800.

21) Hunninghake G W, Bedell G N, Zavala D C, Monick M and Brady M : Role of interleukin-2 release by lung T cells in aitive sarcoidosis. Am Rev Respir Dis (1983) **128**, 634—638.

22) 仲村恒敬, 谷本潔昭 : ヒトリンパ球のIL-2産生能およびIL-2に対する反応性の測定法. リンパ球機能検索法 (1983) pp141—151.

23) Semenzato G, Agostini C, Trenti L, Zambello R, Chilos M, Cipriani A, Ossi E, Angl M R, Moritta L and Pizzolo G : Evidence of cells hearing interleukin-2 receptor at sites of disease activity in sarcoid patients. Clin Exp Immunol (1984) **57**, 331—337.

24) Müller Q J, Saltini C, Sondermeyer P and Crystal R G : Compartmentalized activation of the interleukin-2 gene by lung T lymphocytes in active pulumonary sarcoidosis. J Immunol (1986) **137**, 3475—3483.

25) Philip A and Mackwiak M D : The normal microbial flora. New Engl J Med (1982) **307**, 83—93.

Enhanced alveolar lymphocyte proliferation in sarcoidosis patients Part 1. Pulmonary lymphocyte proliferation induced by *Propionibacterium acnes* in sarcoidosis

Togo EJIRI

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Sarcoidosis is a systemic disorder characterized by the accumulation of a large number of T-lymphocytes in pulmonary sites. Considerable evidence has been presented that alveolar lymphocytes are activated by some agent in pulmonary sarcoidosis, although the pathogenesis of this disease remains unknown.

The proliferation of lymphocytes, obtained by bronchoalveolar lavage, was determined by in vitro incorporation of ^{3}H-thymidine induced by *Propionibacterium acnes (P. acnes)*.

The mean response rate of alveolar lymphocytes was 1.91±0.80 in 22 untreated sarcoidosis patients, 1.22±0.46 in nine sarcoidosis patients given prednisolone, and 0.90±0.39 in 15 controls. The response rate was significantly enhanced in untreated patients compared to both treated patients ($P<0.01$) and controls ($P<0.001$), and a significant difference was noted in the response rates between treated patients and controls. The response rate of alveolar lymphocytes in seven patients with active sarcoidosis (2.76±0.63) was significantly higher than that in 15 patients with inactive sarcoidosis (1.15±0.50) ($P<0.05$) and in the controls ($P<0.01$). In sarcoidosis patients, the response rates showed a good correlation with the activities of serum lysozyme ($r=0.523$, $P<0.01$), with percentages of lymphocytes present in bronchoalveolar fluid ($r=0.537$, $P<0.01$), as well as angiotensin-converting enzyme activities ($r=0.436$, $P<0.05$). The alveolar lymphocyte response rates induced by *P. acnes* reflect the disease activity of sarcoidosis. Neither peripheral lymphocytes in the sarcoidosis patients nor those in the controls showed a response to *P. acnes*. Those results suggest that alveolar lymphocytes in untreated patients with active sarcoidosis are sensitized by *P. acnes*, and that activated lymphocytes play a central role in the induction of alveolitis in sarcoidosis patients through *P. acnes*.