

4) *Propionibacterium acnes* のサイトカイン誘発能と
サルコイドーシスへの関与

新潟大学医学部細菌学教室 望月 博史
同 第二内科学教室
京都大学医学部微生物感染症 光山 正雄

Bacteriological Approach to Sarcoidosis:
Difference of Cytokine-inducing Ability in
Various Strain of *Propionibacterium Acnes*

Hirofumi MOCHIZUKI and Masao MITSUYAMA

Department of Bacteriology, Department of Medicine (II),
Niigata University School of Medicine,
Department of Microbacteriology Graduate
School of Medicine, Kyoto University³

Propionibacterium acnes has been implicated as the etiologic agent of sarcoidosis since the isolation of this bacterium at a high incidence from sarcoidosis specimens in 1978. However, this possibility has not been established or accepted widely yet. We have obtained the *P. acnes* strains isolated in that study. Based on the idea that inflammatory cytokines are involved in granuloma formation characteristic for pathology of sarcoidosis, we have compared the cytokine-inducing ability among various strains.

【Method】 Peripheral blood mononuclear cells were obtained from sarcoidosis patients and healthy controls. Cells were stimulated with *P. acnes* strains in vitro, and inflammatory cytokines were determined by using cytokine-specific EIA. The effect of T-cell depletion was examined. 【Result】 Th1-type of antigen-specific response was not observed when patient cells were stimulated with *P. acnes*. Strains from sarcoidosis specimen showed a significantly higher activity for induction of IL-12 and IFN- γ for whole mononuclear cells and also for T cell-depleted population. 【Conclusion】 The results suggested that particular *P. acnes* strains capable of inducing a high level of inflammatory cytokine are involved in the pathogenesis of sarcoidosis. It was postulated that *P. acnes* first stimulate macrophages to produce IL-12 then in turn stimulate NK cells to produce IFN- γ which may contribute to granuloma formation.

Key words: *Propionibacterium acnes*, sarcoidosis, cytokine, macrophage,
Interleukin 12, *Propionibacterium acnes*,
サルコイドーシス, サイトカイン, マクロファージ, インターロイキン12

Reprint requests to: Hirofumi MOCHIZUKI, 別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1番町757
Department of Bacteriology, 新潟大学医学部細菌学教室, 第二内科学教室
Department of Medicine (II), 望月 博史
Niigata University School of Medicine
Niigata City, 951-8510 JAPAN

はじめに

サルコイドーシス（以下サ症）は全身性の非乾酪性肉芽腫を特徴とした疾患である。その病態として病理学上の類上皮肉芽腫の存在が重要であり、その形成が何らかの物質に対する宿主側の特殊な免疫応答によるものというところでは諸研究者の意見は一致している。しかし原因については種々の微生物の関与のほか化学物質、金属、花粉、粘土などあらゆるものが想定されてきたものの、いずれの症例でもサ症との関係を実証できておらず、今日でも原因は不明のままである¹⁾。日本では1970年代に本間らがサ症患者検体より高頻度に *Propionibacterium acnes*（以下 *P. acnes*）が分離されることを報告²⁾して以来、サ症と *P. acnes* の関与について、*P. acnes* の実験的肉芽腫形成能、*P. acnes* 特異抗原のサ症肉芽腫内での証明、PCR による病巣での *P. acnes* DNA の証明、抗原添加時のリンパ球幼若化などを通じて間接的に証明が試みられてきた。しかし国際的には、*P. acnes* がサ症の原因であるというための Koch's postulates を満たしうる結果がないこと、*P. acnes* は皮膚常在菌であり、コンタミネーションの可能性を否定しきれないこと、宿主側の要因の関与が強く考えられること、などの理由から支持するものは少なく、むしろ抗酸菌群を候補とする意見の方が強い³⁾。

我々は本菌のサ症への関与の可能性について、従来用いられた患者からの菌の検出や免疫応答の観察とは異なる方法でアプローチを試みた。感染性肉芽腫は宿主のサイトカインに依存することが知られており、*P. acnes* が肉芽腫形成に関与するのであれば、当然本菌は肉芽腫形成に必須のサイトカイン誘導を示すであろうと考えられる。また皮膚、腸管常在菌である *P. acnes* がサ症患者にのみ起因菌としての役割を果たすとすれば、患者が特異的に *P. acnes* に反応するか、あるいは特殊な *P. acnes* の存在によりサ症患者にのみ肉芽腫病変を作るといふ仮説をたてることができる。そこでサ症分離株と非サ症由来株の、肉芽腫形成に関わるサイトカイン誘導能の比較に注目し、宿主サイトカイン誘発能とサイトカインメッセージによるサ症病因論の解析を試みた。

対象と方法

1. *P. acnes* 菌株

Homma らによって1978年に分離報告されたサ症病変部由来及び非サ症由来の *P. acnes* 各2菌株を結

核研究所阿部千代治博士より分譲された。便宜的にサ症由来株を S-11, S-12, 非サ症由来株を N-01, N-02 と名付けて以下の実験に用いた。各菌株は嫌氣的に ABCM broth（栄研）で培養しアニデント嫌気性菌同定システム（api bio merieux s.a, France）で菌種の同定再確認を行った。

2. ELISA

サ症患者4名及び健康成人3名より各40mlの採血を行い、Ficoll-Paque PLUS（Pharmacia Biotec, Sweden）にて単核球を分離し 1×10^7 /ml になるよう 10% FCS+GM20 μ g/ml 加 RPMI 1640 培地 1 ml に suspend した。この単核球浮遊液を各菌株加熱死菌（75°C 30min）で刺激し、その培養上清中の IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ をそれぞれ EIA で定量した。また健康成人対照群では NK 細胞や T 細胞に着目し、MACS CD3 microbeads（Mitenyi Biotec, Germany）を使用して T 細胞（CD3⁺）を除去し、主に NK 細胞と単球系のサイトカインプロフィールを EIA で定量した。

3. RT-PCR

ヒト M ϕ への分化能を持つ monocyte cell line である U937-DE4（理化学研究所） 4×10^6 を各菌株生菌 MOI 10 で48時間刺激し、回収した細胞より cDNA を作成し、 β アクチン、IL-1 α , IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ について抽出した RNA から PCR をを行い、各 mRNA の発現を観察した。positive control には PMA を MOI 10^{-4} にあたる濃度で刺激し、negative control には無刺激細胞を使用した。

結 果

サ症患者末梢血単核球のサイトカイン応答

我々は厚生省特定疾患呼吸器系調査研究班びまん性肺疾患「平成8年度研究報告書」において、*P. acnes* 一般臨床分離株が Th1 型のサイトカイン発現を示す傾向を認めた⁴⁾。サ症の肉芽腫が抗原特異的な Th1 細胞に依存するとすれば、サ症患者末梢血単核球（以下 PBMC）は健常者に比し強い Th1 サイトカインを産生すると考えられる。そこでサ症由来株と非サ症由来株を用いて健常者1名とサ症患者4名の PBMC を *P. acnes* で刺激し、培養上清中の各種サイトカインを定量測定した。ここで用いたサ症患者は外来通院中ではあるが積極的加療を必要としない安定期のものである。その結果 IL-2, IL-4 についてはサ症患者1例のみがやや低い IL-2 産生を示したのみで、*P. acnes* のい

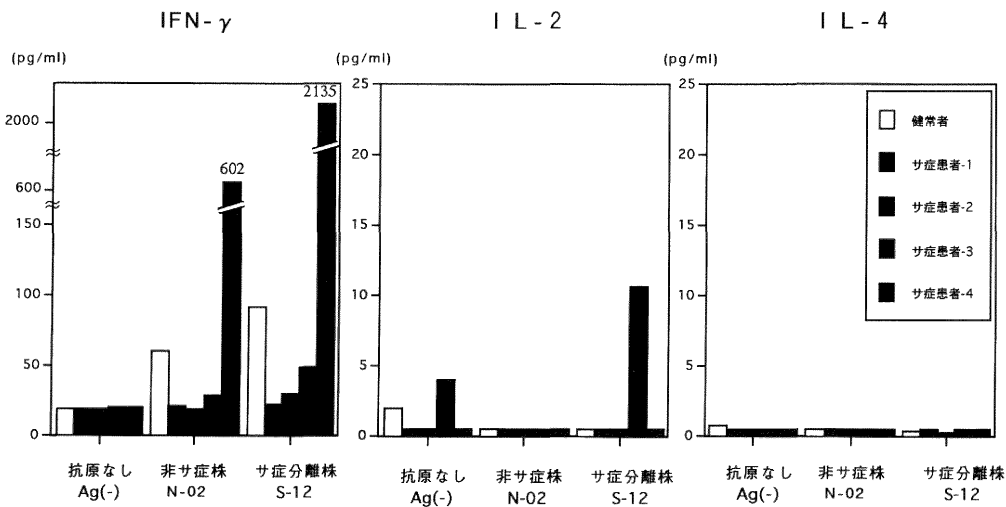


図1 サ症患者及び健常者末梢単核球の *P. acnes* 刺激による IL-2, IL-4, IFN- γ 産生能

ずれの株も患者群に対し明らかな Th1 サイトカイン産生を示す結果は得られなかった(図1)。一方 IFN- γ は患者及び健常者いずれの PBMC もサ症分離株に対して非サ症分離株の方がより強い産生能を認めた。サ症患者のうち1人は特に高い IFN- γ を産生したが、臨床の病勢とは必ずしも一致してはいなかった。以上の結果から、特にサ症分離 *P. acnes* 株は非特異的に IFN- γ 産生を誘導し、しかもその産生細胞としては Th1 よりも T 細胞以外の(NK 細胞などの)関与が考えられた。

健常者 PBMC のサイトカイン応答

3名の健常者 PBMC を *P. acnes* 生菌で刺激したところ高い IFN- γ 産生応答が認められ、さらに CD3⁺陽性細胞(T 細胞)を除去すると非サ症株に比しサ症株に強い誘導活性が認められた(図2)。このことからサ症由来株は肉芽腫形成に必須の IFN- γ 産生を非特異的に誘導する活性が高いことが確認された。さらに M ϕ 系細胞レベルでこの違いが規定されている可能性を考え、モノカインとして IL-1 α と IL-12産生を調べた。IL-1 α については菌株による差異ははっきりとはしなかったが、IL-12に関してはサ症株が非サ症株より明らかに強い産生誘導を示した。CD3⁺陽性細胞を除去した状態においてもその傾向に変わりはなかった(図3)。

M ϕ 系細胞の刺激実験

末梢血から単球, M ϕ 系細胞のみを採取することが容

易ではないことから、培養系細胞として U937 を用い、*P. acnes* 生菌刺激に対する IL-1 α , IL-12発現を RT-PCR 法で比較した。IL-1 α は *P. acnes* 生菌に対し発現されたが死菌には反応が弱く、*P. acnes* は生菌に強い活性があることが考えられ、活性成分には菌の代謝産物や分泌性蛋白を考える必要性を示唆した。しかし直接 NK 細胞を刺激し IL-12の産生を促す物質である IL-12の発現は認められず、しかも PMA 刺激でも発現しなかったため、我々の使用している U937 細胞をこの実験目的でヒト M ϕ の代用とすることには問題があると考えられた。

考 察

今回の実験に関する限りサ症患者が *P. acnes* に対し特異的な免疫応答により Th-1タイプの応答をしているとはいえなかった。むしろ *P. acnes* は非特異的に単核球からの IFN- γ 産生を誘導し、その活性はサ症分離株が非サ症分離株より強い傾向を認めた。その機序として M ϕ の IL-12産生亢進を介して非特異的に非 T 細胞、恐らく NK 細胞の IFN- γ 産生を刺激することが考えられた。非特異的な NK 細胞からの IFN- γ 産生誘導には M ϕ からの IL-12や IL-18が必須であることは我々が抗酸菌やリステリアの実験系で明らかにしているところである^{5) 6)}。肉芽腫形成には多くの炎症性サイトカインが関与するが、抗原特異的な Th1由来サイトカイン以外にも、NK細胞由来の IFN-

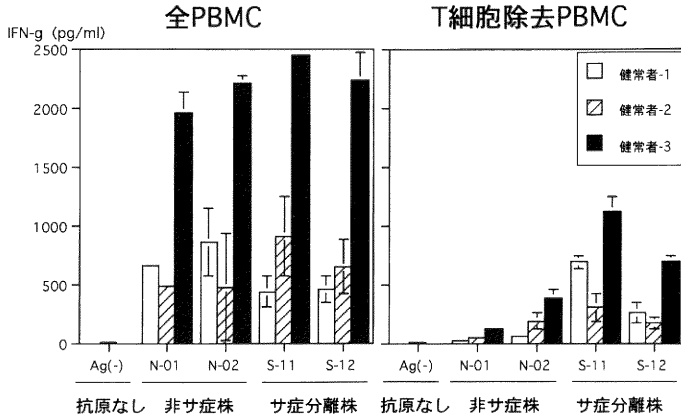


図2 健康者末梢単核球の *P. acnes* 刺激による IFN- γ 産生と菌株による違い

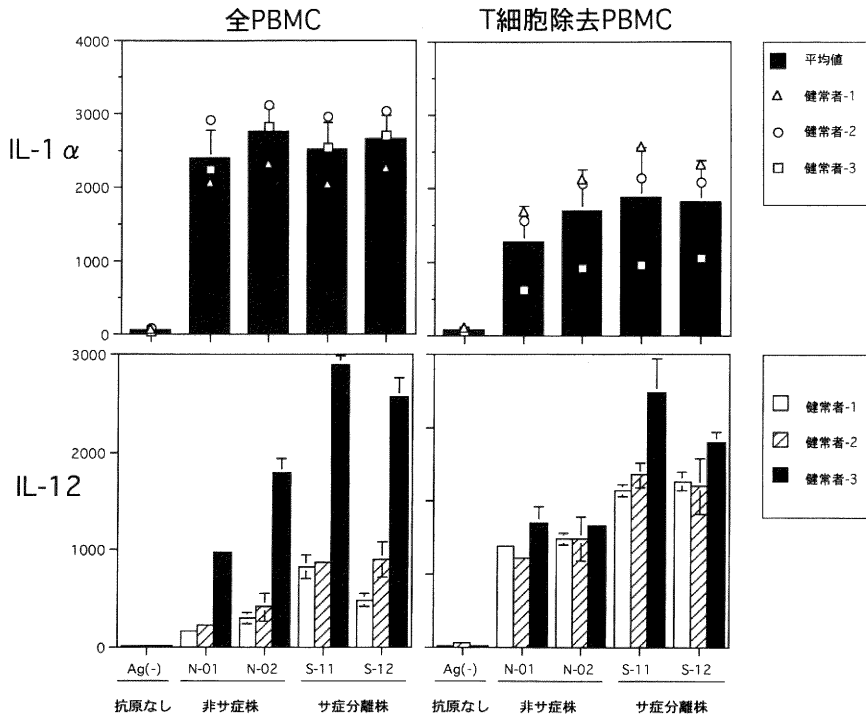


図3 健康者末梢血単核球の *P. acnes* 刺激に対する IL-1 α , IL-12 産生と菌株による違い

γ の重要性が着目されている⁷⁾。従って *P. acnes* にもそのような肉芽腫形成性サイトカイン誘導能に異なる活性を示す株があり、そのような株がサ症の肉芽腫形成により関与する可能性を今後さらに検討していきたい。

また、生菌により強い活性を認めることから、菌体成分よりも分泌性蛋白などに着目していく予定である。一方でこのような非特異的炎症性サイトカインのみでサ症特有の類上皮肉芽腫形成を説明するには無理もあり、従来

報告があるように特異的な抗原応答による肉芽腫形成や、サ症患者自身の免疫学的異常に対するアプローチについても否定せずに進めていく必要がある。

参 考 文 献

- 1) Newman, L.S., Rose, C.S. and Maier, L.A.: Sarcoidosis (Medical Progress). New Engl J Med 336: 1224~1234, 1997.
- 2) Homma, J.Y., Abe, C., Chosa, H., Ueda, K., Saegusa, J., Nakayama, M., Homma, H., Washizaki, M. and Okano, H.: Bacterial investigation on biopsy specimens from patients with sarcoidosis. Jpn J Exp Med 48: 251~255, 1978.
- 3) Mangiapan, G., and Hance, A.J.: Mycobacteria and sarcoidosis: an overview and summary of recent molecular biological data. Sarcoidosis 12: 20~37, 1995.
- 4) 光山正雄: サルコイドーシスへの細菌学的アプローチ - *P. acnes* によるサイトカイン誘導 - : 厚生省特定疾患 呼吸器系疾患調査研究班びまん性肺疾患分科会平成8年度報告書: 90~92, 1997.
- 5) Yang, J., Kawamura, I., Zhu, H., and Mitsuyama, M.: Involvement of natural killer cells in nitric oxide production by spleen cells after stimulation with *Mycobacterium bovis* BCG. J Immunol 155: 5278~5735, 1995.
- 6) Xiong, H., Nishibori, T., Ohya, S., Tanabe, Y. and Mitsuyama, M.: Involvement of various combination of endogenous inflammatory cytokines in *Listeria monocytogenes*-induced expression of inducible nitric oxide synthase in mice. FEMS Immunol Med Microbiol 16: 257~266, 1996.
- 7) Smith, D., Hansh, H., Bancroft, G. and Ehlers, S.: T cell independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumor necrosis factor- α and interferon- γ . Immunology 92: 413~421, 1997.

司会 ありがとうございます。ではこの演題に、御質問はございますでしょうか。どうぞ。

渡部 マウスにおいてもNK細胞はインターフェロン γ を強く産生することが知られております。また、ヒトリンパ球でも、NKT細胞がIL-4を産生するという報告が出ております。この疾患でも、胸腺外分化T

細胞の機能も合わせてみていただければ、マウスとの整合性を確かめることができるのではないかと思っております。

司会 サルコイドーシスのガンマデルタが増えているという報告は、アルファベータのこともありますね。CD-4とCD-8はどうでしたか。

望月 末梢血ではCD-4、CD-8のどちらも減少していました。

司会 リンパ節はどうでしたか。

望月 リンパ節ではCD-4が優位でした。

司会 わかりました。どうぞ。

内藤 *P. acnes* というと、*P. acnes* を静注して肝に肉芽腫を作ってその後、LPS誘発、劇症肝炎ということで使うのがポピュラーなモデルですが、サルコイドーシスですと、肺のほうから病変が拡大していくので、モデルはまったく違うと思います。たとえば吸入させるなど感染経路を変えてみるという実験は行われているのでしょうか。

望月 マウスにサルコイドーシスを再現させることは困難です。吸入モデルも考えられるのですが、手技的な困難さと、データを集めるときのイージーさを考えますと、肺に病変が多いというのは確実にいえるものの侵入経路が肺に確定されたわけではなく、また起因为質が何であるかも分からない状態で吸入モデルを優先してやるというのは今のところ考えていません。ですが、侵入経路としてはそれも選択枝の一つだと思います。

司会 はいどうぞ。

P. acnes によるサイトカインの誘導を見られたわけですが、そのプロファイルがgranulomaを作るようなサイトカインが出やすいということなのですが、これを、*P. acnes* ではなく他の菌でやった場合と比較して*P. acnes* のときにこういうことが特異的に起こったということなのでしょう。

望月 いいえ。*P. acnes* にはimmunomodulation作用があり、先ほどのLPSによるendotoxinのショックモデルを作る際に、*P. acnes* が良く使われる理由です。おそらく殆どの細菌を使えば、末梢単核球にせよM ϕ にせよ炎症性サイトカインを誘導することは可能かと思えます。それがdoseによるものなのか、性質によるものなのか、他の菌株との比較を行っていないので何とも言えませんが、*P. acnes* にだけ特異的であると私たちが決して考えているわけではありません。

司会 他にございませんか。ありがとうございました。では次の山本先生お願いします。