

3. 原因不明の間質性肺炎の分類・名称についてお尋ねします

原因不明の間質性肺炎の分類・名称が欧米と異なっていますが、この点についてお尋ねします。

日本の分類	欧米の分類
原因不明の間質性肺炎	原因不明の間質性肺炎 idiopathic interstitial pneumonia (IIP)
<ul style="list-style-type: none"> ・特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia (IIP)) <ul style="list-style-type: none"> ・急性型 ・慢性型 <ul style="list-style-type: none"> ・A型 ・B型 ・nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) ・bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) 	<ul style="list-style-type: none"> ・急性間質性肺炎 (acute interstitial pneumonia (AIP)) ・特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)) ・nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) ・bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP)

- 特に問題はない
問題はあるが、今変える必要はない
問題があり、今変える必要がある
 欧米と同じ分類・名称にすべき
 日本独自の分類・名称を考えるべき
 その他

（ご意見：

4. その他、特発性間質性肺炎の診断に関するご意見があればお書きください。

ご協力ありがとうございました。

特発性および膠原病性間質性肺炎の組織パターンと 肺癌合併について

千田 金吾^{1*} 朝田 和博¹ 須田 隆文¹ 中村祐太郎¹
佐藤 篤彦²

特発性間質性肺炎 (IIP) には肺癌が高率に合併することが知られている。しかし、IIP の病理組織パターンにおける肺癌の合併率は明らかでなく、膠原病性間質性肺炎 (CVD-IP) の肺癌合併率などを IIP と比較検討した報告は少ない。今回われわれは IIP 443 例と CVD-IP 122 例における肺癌合併頻度とその臨床像を比較検討した。IIP 群において CVD-IP 群に比べ有意に肺癌合併が高率であった (16.7% vs. 3.3%)。患者背景では、重喫煙歴をもつ高齢男性が IIP 群に多くみられた。組織学的診断が可能であった IIP 120 例と CVD-IP 47 例では、それぞれ 15 例と 1 例に肺癌が合併しており、全例 UIP であった。IIP に合併した肺癌の多くは末梢に発生し、線維化病巣内または近接して存在していた。IIP 群と CVD-IP 群における肺癌合併率の差は線維化の成因などが異なるためと推察された。さらに、IIP 群において肺癌の発生部位が線維化病巣に関連し、UIP のみに肺癌が合併していることから慢性炎症や線維化の過程が発癌に関与している可能性が示唆された。

Association of interstitial pneumonia with lung cancer risk: comparison between idiopathic interstitial pneumonia and interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases, special reference to their histologic patterns

Kingo Chida¹, Kazuhiro Asada¹, Takafumi Suda¹, Yutaro Nakamura¹
Atsuhiko Sato²

1. Second Division, Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine,
2. Kyoto Preventive Medical Center

Idiopathic interstitial pneumonia (IIP) has been reported to be associated with an elevated risk of lung cancer. However, it is unclear whether the incidence of lung cancer is also increased in interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases (IP-CVD) and whether the risk of lung cancer is associated with distinct histologic patterns of interstitial pneumonia. In this study, we investigated the incidence of lung cancer in 443 IIP and 122 IP-CVD patients. The incidence of lung cancer was significantly higher in IIP than in IP-CVD (16.7% vs. 3.3%). Among histologically proven cases (120 IIP, 47 IP-CVD), all with lung cancer (15 IIP, 1 IP-CVD) revealed usual interstitial pneumonia (UIP) pattern. In assessing the sites of lung cancers, most of them were found in the peripheral lung just adjacent to fibrotic lesions. These data indicate that the risk of lung cancer were quite different between IIP and IP-CVD, suggesting that the distinct mechanism may be involved in fibrotic inflammation among them. Moreover, as evidenced by the findings that lung cancers were developed exclusively in patients having UIP pattern and that the location of lung cancers were closely associated with fibrotic lesions, it is suggested that the chronic inflammation and fibrotic processes in UIP may be attributable to carcinogenesis.

はじめに

特発性間質性肺炎 (IIP) には肺癌が高率に合併することが知られている。しかし、IIP に合併した肺癌と線維化病巣との関連は明らかでなく、また間質性肺炎の病理組織パターンにおける肺癌の合併率は不明である。一方、間質性肺炎をきたす疾患として膠原病性間質性肺炎 (CVD-IP) が挙げられるが、肺癌の合併率などを IIP と比較検討した報告は少ない。そこで、今回われわれは IIP と CVD-IP の肺癌合併頻度とその臨床像を比較検討した。さらに、IIP の肺癌合併例において、間質性肺炎の病理組織パターンと肺癌との関連を明らかにし、肺癌合併例と非合併例について臨床的検討をおこなった。

対象と方法

1981 年から 1999 年の間に当科及び関連施設において、臨床的または組織学的に診断された IIP 443 例、CVD-IP 122 例 (RA 50 例、SSc 23 例、PM/DM 21 例、SjS 13 例、その他 15 例) を対象とした (表 1)。

上記のうち開胸肺生検または胸腔鏡下肺生検にて組織学的診断がなされた IIP 120 例と CVD-IP 47 例 (RA 15 例、PM/DM 11 例、SjS 8 例、SSc 7 例、その他 6 例) についてさらに検討を加えた (表 1)。

検討項目は年齢、性別、喫煙指数、肺癌合併率、肺癌組織型、さらに間質性肺炎の組織パターンにおける肺癌合併率である。統計学的解析には、Student t 検定もしくは χ^2 検定を使用した。

	症例	組織診断例
IIP	443	120
CVD-IP	122	47
RA	50	15
SSc	23	7
PM/DM	21	11
SjS	13	8
SLE	8	3
MCTD	3	2
その他	4	1

表 1 対象症例の内訳

1. 浜松医科大学第二内科
 2. 京都予防医学センター
- * びまん性肺疾患研究班 研究協力者

結 果

1) IIP と CVD-IP の肺癌合併頻度とその臨床像 (表 2)

	IIP (n=443)	CVD-IP (n=122)	P
年齢 (歳)	65.2±8.6	59.2±12.2	<0.001
性 (M/F)	342 : 101	63 : 59	<0.001
喫煙 (B.I.)	661±662	285±412	<0.001
肺癌合併 (M/F)	74 (16.7%) (69/5)	4 (3.3%) (4/0)	<0.001

表 2 IIP と CVD-IP の臨床像と肺癌合併率

IIP 443 例のうち 74 例 (16.7%) に肺癌が合併し、69 例が男性であった。CVD-IP 122 例では、4 例 (3.3%) に肺癌が合併し、4 例とも男性であった。IIP 群において肺癌の合併が有意に高率であった。対象患者の背景としては、IIP 群で年齢が高く、男性が多く、また喫煙指数も高く、いずれも有意差がみられた。CVD-IP 群の肺癌合併例の内訳は、RA 3 例、SSc 1 例であった。

肺癌の組織型は、IIP 群で扁平上皮癌 35 例、腺癌 16 例、小細胞癌 15 例、重複癌 2 例、その他 6 例であり、CVD-IP 群では扁平上皮癌 1 例、腺癌 3 例であった (表 3)。

組織型	IIP	CVD-IP
扁平上皮癌	35 (47.3%)	1 (25.0%)
腺癌	16 (21.6%)	3 (75.0%)
小細胞癌	15 (20.3%)	0 (0%)
重複癌	2 (2.7%)	0 (0%)
その他	6 (8.1%)	0 (0%)
計	74 (100%)	4 (100%)

表 3 合併肺癌の組織型

2) 間質性肺炎の病理組織パターンと肺癌との関連

間質性肺炎の病理組織パターンは IIP 群では UIP 73 例、NSIP 30 例、BOOP 12 例、DIP 3 例、RB-ILD 2 例で、CVD-IP 群では UIP 16 例、NSIP 27 例、BOOP 4 例であった (表 4)。IIP 群で有意に年齢が高く、男性が多く、喫煙指数も高かったが、観察期間に有意差はみられなかった (表 5)。

	IIP	CVD-IP
UIP	73	16
NSIP	30	27
BOOP	12	4
DIP	3	0
RB-ILD	2	0

表 4 間質性肺炎の病理組織パターン

	IIP (n=120)	CVD-IP (n=47)	P
年齢(歳)	60.2±8.4	55.6±9.6	0.003
性(M/F)	86/34	19/28	<0.001
喫煙(B.I.)	756±623	282±367	<0.001
観察期間(月)	50.2±43.9	52.4±40.8	0.77
肺癌合併 (M/F)	15 (12.5%) (15/0)	1 (2.1%) (1/0)	0.03

表5 組織診断例のIIPとCVD-IPの臨床像と肺癌合併率

肺癌の合併はIIP 120例のうち15例(12.5%)、CVD-IP 47例では1例(2.1%)にみられ、IIP群で合併率が有意に高かった(表5)。IIP群、CVD-IP群ともに肺癌合併例は全例UIPであった。UIPにおける肺癌の合併率はIIP群では20.5%、CVD-IP群では6.3%で有意差はなかった。

IIPにおける肺癌は扁平上皮癌が8例(53.3%)で(表6)、末梢に発生したものが7例であった。このうち6例が手術標本またはCT所見にて線維化病巣内または線維化病巣に近接して肺癌が存在していた。

組織型	IIP	CVD-IP
扁平上皮癌	8 (53.3%)	0 (0%)
腺癌	1 (6.7%)	1 (100%)
小細胞癌	1 (6.7%)	0 (0%)
重複癌	2 (13.3%)	0 (0%)
その他	3 (20.0%)	0 (0%)
計	15 (100%)	1 (100%)

表6 組織診断例における合併肺癌の組織型

3) IIPのUIP群における肺癌合併例と非合併例の比較(表7)

肺癌合併例のうち間質性肺炎と肺癌が同時に診断されたものが7例であった。肺癌合併例は男性が有意に多く、重喫煙歴を有する傾向がみられた。年齢、観察期間には有意差はなかった。

	合併例 (n=15)	非合併例 (n=58)	P
性(M/F)	15/0	44/14	0.04
同時診断例	7		
喫煙(B.I.)	1162±941	658±455	0.06
診断年齢(歳)	64.9±7.8	62.3±7.3	0.23
肺癌年齢(歳)	66.5±8.4		
観察期間(月)	35.4±31.8	42.5±35.7	0.60

表7 IIP (UIP)の肺癌合併例・非合併例の臨床像

考察・結論

IIPと肺癌の合併率は本邦では10～30%程度と報告されており¹⁻⁸⁾、今回の検討でも16.7%であった。患者背景では、IIP群で高齢男性が多く、喫煙指数が高かった。

CVD-IPと肺癌合併の報告例は少なく、大野ら⁷⁾は肺癌

合併率はIIP 25%に対しCVD-IP 12%、貫和⁸⁾はIIP 32%に対しCVD-IP 2%とCVD-IP群に比べIIP群において肺癌合併率が高いと報告している。また、大野ら⁷⁾によると肺癌を合併したCVD-IPで肺組織の検討が可能であった7例すべてがUIPであった。我々の結果もこれらの報告に合致するものであった。

組織診断例では末梢発生扁平上皮癌が多く、本邦の報告例でも70～90%が末梢に肺癌が発生している^{2-5,7,9,10)}。清水⁹⁾はIIP合併肺癌では65%に蜂窩構造との関連があると述べており、今回UIPのみに肺癌の合併がみられたことから、間質性肺炎の組織パターンの中でUIPに固有の病変が肺癌発生に関与している可能性が推察された。

肺癌を合併したUIP全例が重喫煙者であり、喫煙が肺癌発生リスクをさらに高めている可能性がある。南部ら¹⁰⁾は肺癌合併UIP群は非合併UIP群に比べ重喫煙者が有意に多いと報告している。

CVD-IP群に比べIIP群に肺癌合併が高率である一つの理由として、UIPの割合が多いためと考えられた。実際に、UIPのみを比較すると肺癌合併率に有意差はみられなかった。しかし、患者背景(年齢、性別、喫煙指数)にいずれも有意差があり、これらを一致させた検討が必要と考えられた。また、同じUIPでもIIPとCVD-IPでは病因が異なると考えられ、これらを明らかにすることが肺癌発生のメカニズムを解明する手がかりになるであろう。

参考文献

- 1) 近藤有好, 本間行彦, 阿部庄作, 他: 特発性間質性肺炎(IIP)の疫学調査(II). 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成4年度研究報告書, 11-18, 1992.
- 2) 小倉剛, 近藤有好, 佐藤篤彦, 他: 特発性間質性肺炎における肺癌の合併とその臨床的特徴. 日胸疾会誌, 35: 294-299, 1997.
- 3) 竹内栄治, 山口俊彦, 森雅秀, 他: 肺癌を合併した特発性間質性肺炎症例の臨床的検討. 日胸疾会誌, 34: 653-658, 1996.
- 4) 木下明敏, 広瀬清人, 谷口哲夫, 他: 特発性間質性肺炎合併肺癌の検討. 日胸疾会誌, 28: 852-858, 1990.
- 5) 大塚義紀, 浮田英明, 正木芳孝, 他: 特発性間質性肺炎(IIP)からの肺癌発症—prospective study—. 日胸疾会誌, 29: 560-565, 1991.
- 6) 谷村一則, 清水透, 本間行彦, 他: 特発性間質性肺炎と肺癌合併例の特徴—とくに頻度, 組織型, 発生部位, 病期, 年齢, 肺機能について—. 日胸疾会誌, 25: 216-221, 1987.
- 7) 大野彰二, 押川克久, 北村論, 他: 肺癌を合併した

- 膠原病肺の臨床病理学的検討, 日胸疾会誌, 35: 1324-1329, 1997.
- 8) 貫和敏博:特発性間質性肺炎(肺線維症)の診断と治療の進歩 特発性間質性肺炎の病態および肺癌の合併. 日内会誌, 83: 739-744, 1994.
- 9) 清水英男:特発性間質性肺炎に合併した肺癌の病理学的研究—特に蜂窩構造との関連について—. 日胸疾会誌, 23: 873-881, 1985.
- 10) 南部静洋, 岩田猛邦, 種田和清, 他:剖検症例からみた特発性間質性肺炎と肺癌発症との関連について—環境因子からの検討—. 日胸疾会誌, 29: 1275-1281, 1991.

特発性間質性肺炎における FHIT 遺伝子異常の解析

植松 和嗣¹ 吉村 明修¹ 持丸 博² 細谷 曜子¹
逸見しのぶ² 清家 正博¹ 弦間 昭彦¹ 栗本 太嗣¹
竹中 圭¹ 福田 悠² 工藤 翔二^{1*}

特発性間質性肺炎 (IIP) の前癌病変としての性質を検討するため、その遺伝子異常を検討した。肺癌合併 IIP (腺癌 4 例、扁平上皮癌 3 例、小細胞癌 1 例) の肺癌病変、正常組織、IIP の化生上皮 (metaplasia)、細気管支上皮および肺癌非合併例 IIP 3 例の正常組織、化生上皮、細気管支上皮を顕微鏡下に採取し DNA を抽出した。これらの FHIT 遺伝子領域を含む第 3 染色体短腕のマイクロサテライト 4 カ所の検討では、肺癌病変では 8 例中 5 例にヘテロ接合性の消失 (LOH) を認め、IIP では 8 例から採取した 100 カ所中 54 カ所で LOH を認めた。FHIT 遺伝子プローブを用いた fluorescent in situ hybridization (FISH) 解析により、IIP 病変中の化生組織で FHIT 遺伝子の LOH が確認された。免疫染色では、IIP 病変の一部に Fhit タンパクの発現低下が認められた。以上より、IIP 病変中に癌化に向かう遺伝子異常が存在し、IIP 病変が前癌病変である可能性が示唆された。

FHIT aberrations in idiopathic pulmonary fibrosis

Kazutsugu Uematsu¹, Akinobu Yoshimura¹, Hiroshi Mochimaru², Yoko Hosoya¹
Shinobu Henmi², Masahiro Seike¹, Akihiko Gemma², Futoshi Kurimoto¹
Kiyoshi Takenaka¹, Yu Fukuda², Shoji Kudoh¹

1. Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

2. Department of Pathology, Nippon Medical School

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is thought to be closely associated with lung carcinogenesis. To identify genetic characteristics of IPF as precancerous lesions in peripheral lung, we conducted PCR-based microsatellite analysis with DNA derived from tissues by microdissection, fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of the FHIT gene and Fhit protein expression by immunohistochemistry for metaplasias and bronchiolar epitheliums in IPF. We used 4 microsatellite markers of FHIT gene at chromosome 3p for Loss of heterozygosities (LOH) analysis. Fifty-four of 100 lesions of metaplasias and bronchiolar epitheliums in IPF with lung carcinoma and 8 of 46 lesions of metaplasias and bronchiolar epitheliums in IPF without lung carcinoma showed LOH at FHIT gene. We ascertained the allelic loss in metaplasias in IPF by FISH analysis of the FHIT gene. Additionally Fhit protein expression frequently decreased in metaplastic cells in IPF. Our findings suggest that metaplastic lesions in IPF have genetic abnormalities that might be involved in the pathogenesis of lung carcinoma, and that allelic losses of the FHIT gene might be associated with carcinogenesis in peripheral lung with IPF.

はじめに

特発性間質性肺炎慢性型 (IIP) の患者は、高率に肺癌を合併する¹⁻⁵⁾。また、肺癌発症には、複数の遺伝子異常の蓄積が関与する。IIP は、慢性炎症性疾患であり、その病変内では、修復機転が繰り返されると考えられる。IIP の一部の細胞で、遺伝子異常が出現し、修復機転を繰り返すうちに、癌化に関与する遺伝子異常を持った細胞が増殖し、肺癌へ移行する可能性がある。遺伝子異常を、IIP で確認することにより、IIP の前癌病変としての性格が示唆される。本研究は、IIP の前癌病変としての性格をより明確にするために、IIP 病変中の組織の遺伝子異常を検討することを目的とした。

肺癌における第3染色体短腕のヘテロ接合性の消失 (Loss of heterozygosity ; LOH) は、肺癌発生の初期に認められる⁶⁾。この領域に存在する FHIT 遺伝子は、癌抑制遺伝子としての可能性が示唆されている⁷⁻¹⁰⁾。FHIT 遺伝子領域を含む第3番短腕染色体領域を中心としたマイクロサテライト解析を用い IIP 合併肺癌例の肺癌組織、IIP 組織の LOH について判定した。

対象と方法

IIP に肺癌を合併した症例で、手術 6 例、死後剖検 2 例の計 8 例 (腺癌 4 例、扁平上皮癌 3 例、小細胞癌 1 例) を用い、肺癌組織、肺線維症の組織、正常肺組織を採取し、各病変の DNA を抽出した。IIP 単独 3 例で、肺線維症組織、正常肺組織を採取し、DNA を抽出した。肺線維症組織からは、化生組織 (metaplasia)、細気管支組織を顕微鏡下に選択的に採取し、DNA を抽出した。FHIT 領域のマイクロサテライトマーカー D3S1295, D3S1234, D3S1300, D3S1312 で PCR 反応を行い、メタファーゲルで電気泳動を行い、正常組織との比較で LOH を判定した。

LOH の確認のため FHIT 遺伝子プローブを用い fluorescent in situ hybridization (FISH) 解析を行った。

IIP 病変内での Fhit タンパクの発現を抗 Fhit 抗体 (zymed) を用い検討した。

結 果

FHIT 遺伝子領域のマイクロサテライトマーカー D3S1295, D3S1234, D3S1300, D3S1312 の検討では、8 例の腫瘍組織中 5 例に LOH を認めた。マイクロサテライト不安定性は認められなかった。

8 例の IIP 合併肺癌症例の IIP 病変中の化生 (metaplasia) 組織、細気管支組織から顕微鏡下に採取した 100 検体から得た DNA を用い検討したところ、54 ケ所で FHIT 領域のマーカーでヘテロ接合性の消失を認めた。3 例の IIP 単独例で 46 検体に同様の検討を行ったところ、8 ケ所で LOH を認めた (Fig.1, 2)。

IIP 病変中での FHIT 遺伝子領域の LOH の確認のため、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用い IIP 病変の形態が保持された状態で FHIT 遺伝子プローブを用い FISH 法解析を行い、蜂窩肺中の化生組織で FHIT 遺伝子の LOH を認めた (Fig.3)。

抗 Fhit 抗体を用いた免疫染色により、正常気管支、細気管支上皮は、強い染色性を呈した。IIP 病変中では、強い染色性を呈する領域と立方形あるいは平低化した細胞など染色性の低下した領域を認めた (Fig.4)。

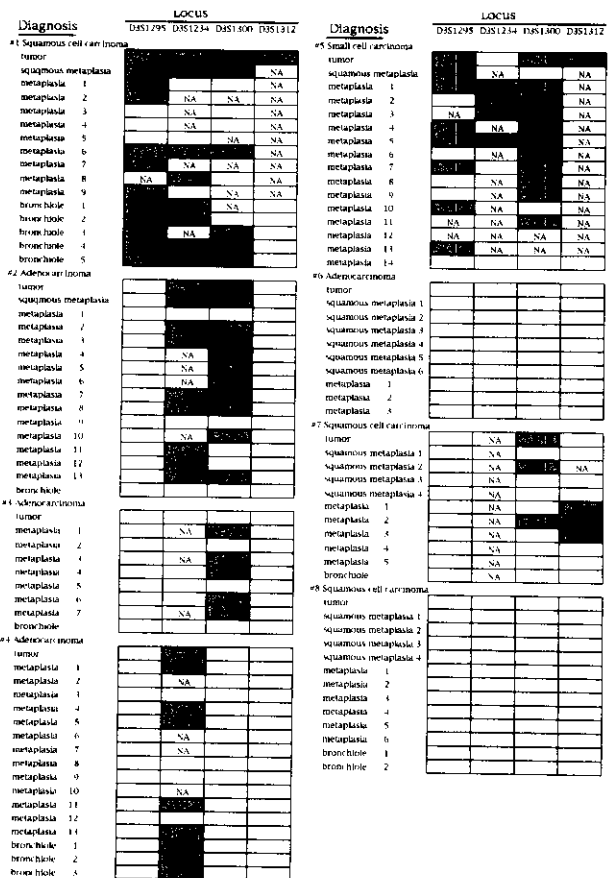


Fig.1 Results of microsatellite analysis of the FHIT locus using 4 polymorphic markers in IPF patients with lung carcinoma. When 87 metaplasias and squamous metaplasias, and 13 bronchioles with 8 lung carcinomas were analyzed, 54 lesions had allelic deletion at one or more loci. Black boxes, deletion; white boxes, no deletion; gray boxes, noninformative sites; NA, not analyzed; *, different pattern of allelic loss from that of lung carcinoma; n/L, upper allelic deletion; U/n, lower allelic deletion.

1. 日本医科大学 第四内科
 2. 第一病理
- * びまん性肺疾患研究班 主任研究者

Diagnosis	Locus			
	D3S1295	D3S1244	D3S1300	D3S1312
#9 IPF				
squamous metaplasia	NA	NA	■	
metaplasia 1	NA	NA		
metaplasia 2	NA			
metaplasia 3		NA		
metaplasia 4		NA		
metaplasia 5		NA		
metaplasia 6	NA	NA		
metaplasia 7	NA	NA		
metaplasia 8		NA		
metaplasia 9		NA		
metaplasia 10		NA		
bronchiole 1	NA	NA		
bronchiole 2	NA	NA		
bronchiole 3	NA	NA	■	
bronchiole 4	NA	NA		
bronchiole 5	NA	NA		
bronchiole 6	NA	NA		
bronchiole 7		NA		
bronchiole 8		NA		
#10 IPF				
metaplasia 1		NA		
metaplasia 2		NA		
metaplasia 3		NA	■	
metaplasia 4		NA		
metaplasia 5		NA	■	
bronchiole 1		NA		
bronchiole 2		NA		
bronchiole 3				
#11 IPF				
squamous metaplasia 1				
squamous metaplasia 2	■	NA		
metaplasia 1		NA		
metaplasia 2				
metaplasia 3				
metaplasia 4				
metaplasia 5				
metaplasia 6				
metaplasia 7				
metaplasia 8	■	■		
metaplasia 9				
metaplasia 10				
metaplasia 11				
metaplasia 12				
metaplasia 13				
metaplasia 14				
bronchiole 1				
bronchiole 2				
bronchiole 3			■	
bronchiole 4				

Fig.2 Results of microsatellite analysis of the FHIT locus in patients with IPF alone. When 32 metaplasias and squamous metaplasias, and 14 bronchioles were analyzed, 8 lesions had allelic deletion. Black boxes, deletion; white boxes, no deletion; gray boxes, noninformative sites; NA, not analyzed.

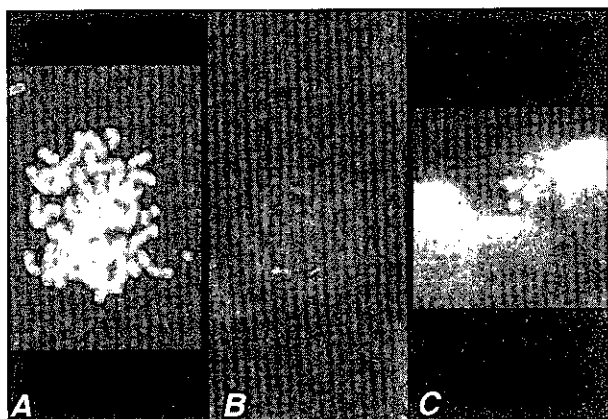


Fig.3 Results of FISH using the FHIT gene probe. Metaphase spread probed with probe of the FHIT (yellow signals) (A). Squamous cell carcinoma from formalin-fixed paraffin-embedded samples demonstrating allelic deletion of the FHIT gene (a green signal) in nucleus, while telomeric signals of chromosome 3p had intact number (B). Metaplasia around honeycombing, showing allelic deletion of the FHIT gene (a green signal), while centromeric signals of chromosome 3 showed intact number of signals (red signals), which analyzed preserving the figure of IPF using formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (C).

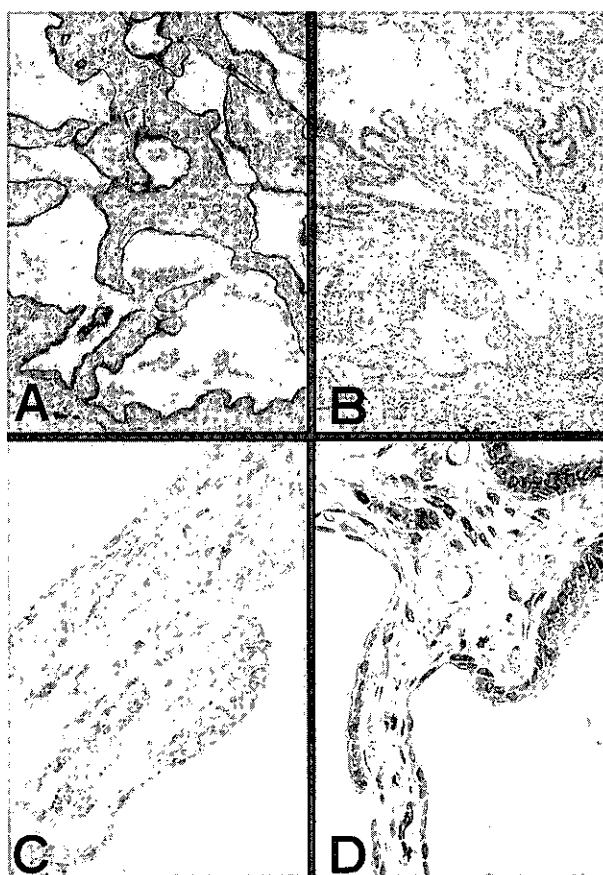


Fig.4 Fhit immunoreactivity of IPF lesion. Fhit staining in metaplasia around honeycombing is exhibiting strong (A) and weak (B). Squamous metaplastic epithelial cells showed strong staining of Fhit protein (C), but some of cuboidal, flattened or squamous metaplastic epithelial cells showed reduced staining of Fhit protein (D).

考 察

第3染色体短腕は、肺癌で高率に LOH が認められ、前癌病変においても同領域の LOH を認めたとの報告もあり最も早期の変化とされる⁶⁾。同領域には、癌抑制遺伝子が複数存在すると考えられているが、FHIT 遺伝子もその候補の一つであり、この遺伝子領域の LOH は肺癌で高率に出現する¹¹⁾。IIP 病変内に前癌病変が存在するならば、その病変の最も早期の遺伝子変化として第3染色体短腕の LOH が出現すると予想される。今回の検討で、IIP 病変中の化生 (metaplasia) 組織および細気管支領域から LOH が認められ、この領域での Fhit タンパクの発現が低下していたことから、IIP 病変内の一部に癌化へ向かう遺伝子異常が存在すると考えられた。

引用文献

- 1) 河合 健 編：特発性間質性肺炎とその周辺疾患，第1版，東京医学社，東京，1995。

- 2) Stack Bh, Choo-Kang Yf And Heard Be. The Prognosis Of Cryptogenic Fibrosing Alveolitis. *Thorax* 1972; 27: 535-542.
- 3) Turner-Warwick M, Lebowitz M, Burrows B And Johnson A. Cryptogenic Fibrosing Alveolitis And Lung Cancer. *Thorax* 1980; 35: 496-499.
- 4) Panos Rj, Mortenson Rl, Niccoli Sa And King Jr Te. Clinical Deterioration In Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Causes And Assessment. *Am J Med* 1990; 88: 396-404.
- 5) Hubbard R, Venn A, Lewis S And Britton J. Lung Cancer And Cryptogenic Fibrosing Alveolitis. A Population-Based Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 61: 5-8.
- 6) Sekido Y, Fong Km And Minna Jd. Progress In Understanding The Molecular Pathogenesis Of Human Lung Cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1998; 1378: F21-59.
- 7) Siprashvili Z, Sozzi G, Barnes LD, McCue P, Robinson AK, Eryomin V, Sard L, Tagliabue E, Greco A, Fusetti L, Schwartz G, Pierotti MA, Croce CM and Huebner K. Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13771-13776.
- 8) Ji L, Fang B, Yen N, Fong K, Minna JD and Roth JA. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res* 1999; 59: 3333-3339.
- 9) Sard L, Accornero P, Tornielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM, Pierotti MA and Sozzi G. The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8489-8492.
- 10) Chaudhuri AR, Khan IA, Prasad V, Robinson AK, Luduena RF and Barnes LD. The tumor suppressor protein Fhit. A novel interaction with tubulin. *J Biol Chem* 1999; 274: 24378-24382.
- 11) Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, Wistuba I, Sekido Y, Bader SA, Ahmadian M, Ong ST, Rassool FV, Zimmerman PV, Giaccone G, Gazdar AF and Minna JD. FHIT and FRA3B 3p14. 2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res* 1997; 57: 2256-2267.

各種間質性肺疾患に対する肺移植治療について

吉澤 靖之^{1*} 海野 剛¹ 大谷 義夫¹ 澤田めぐみ¹
稲瀬 直彦¹ 三宅 修司¹ 清水 信義^{2*}

我が国の潜在的肺移植適応 123 例の原疾患は、原発性肺高血圧症 34 例、特発性間質性肺炎 (IIP) 等 22 例、リンパ脈管筋腫症 (LAM) 20 例、Eisenmenger 症候群 12 例、びまん性汎細気管支炎 (DPB) 9 例、肺気腫 8 例、気管支拡張症 4 例、その他 14 例であった。原疾患毎の閉塞性細気管支炎の合併頻度に関して、文献上は一定の傾向は見出せなかった。原疾患のグラフトへの再発は、DIP, GIP, LAM, サルコイドーシス、ランゲルハンス細胞肉芽腫 (LCG), DPB で報告がある。DIP と GIP は全例片肺移植後であり、両肺移植が望ましい可能性が示された。LAM は両肺移植でも再発がみられ、全身への十分な免疫抑制療法や内分泌的治療が必要と考えられた。LCG では肺外病変と喫煙継続が再発のリスクファクターと考えられた。IIP と膠原病肺ではグラフト再発の判定は難しいと思われるが、明らかな報告は無かった。

Lung transplantation therapy for interstitial lung diseases in Japan.

Yasuyuki Yoshizawa¹, Takeshi Umino¹, Yoshio Ohtani¹, Megumi Sawada¹
Naohiko Inase¹, Shuji Miyake¹ and Nobuyoshi Shimizu²

1. Department of Pulmonary Medicine, Tokyo Medical and Dental University.
2. Department of Surgery 2, Okayama University School of Medicine

The first case of lung transplantation from a brain-death donor in Japan has just been done. However, the lack of donor lungs may keep being the largest problem of the project. It is important for successful use of the limited donor lungs to make a guideline which is suitable for Japanese patient population. We reviewed the literatures from Japan to estimate the candidates for the recipients of lung transplantation in Japan. One hundred and twenty three cases were reported as candidates for recipients. The largest part in the primary diseases was primary pulmonary hypertension (PPH: 34 cases). The second largest part was pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM: 20 cases). The third was idiopathic pulmonary fibrosis (IPF: 17 cases), followed by Eisenmenger syndrome (14 cases), diffuse panbronchiolitis (DPB: 9 cases), pulmonary emphysema (8 cases), other pulmonary fibroses (5 cases), bronchiectasis (4 cases) and miscellaneous (14 cases). There was no cystic fibrosis or alpha-1 antitrypsin deficiency which are major causes for lung transplantation in the world. IPF and other pulmonary fibroses might be the difficult cases among these diseases because of the unpredictable clinical course. And, these diseases may influence the whole outcome of lung transplantation in Japan. We reviewed the literatures to study the risk of bronchiolitis obliterans (BOS) and recurrence in the lung graft of the primary diseases. There was no literature reporting the correlation between the risk of BOS and the primary disease except one, although the study populations were rather small in those studies. Recurrence of the primary disease in the lung graft was reported in desquamative interstitial pneumonia (DIP: 2 cases), giant cell interstitial pneumonia (GIP: 3 cases), LAM (3 cases), sarcoidosis (5 cases), Langerhans cell granulomatosis (LCG: 4 cases) and DPB (2 cases).

はじめに

欧米での肺移植は既に 8000 例を数え、びまん性肺疾患重症例の治療法として定着した感がある。我が国では 5 例の渡航肺移植と 2 例の生体肺移植に続いて、ついに先頃初の脳死ドナーからの肺移植が行われた(表 1)。とはいえ、脳死ドナーが出現しても肺は使用不能であることが多く、移植の機会は限られたものであり続けると推測される。また、欧米と日本では人種間の疾患頻度の違いから移植の対象疾患が異なることが予測される。貴重な肺移植のチャンスを最大限に生かすためには、我が国の実状を考慮した指針とその運用が肝要であると考えられる。そこで、今後我が国で行われる肺移植治療の対象となる疾患の内訳を推測するとともに移植の成績を左右しうる特殊な病態について原疾患毎のリスクを検討する。

渡航肺移植

原発性肺高血圧症	18歳	男性	脳死	両肺
	11歳	女性	生体	両側肺葉
	12歳	女性	生体	両側肺葉
	15歳	女性	生体	両側肺葉
気管支拡張症	38歳	男性	脳死	両肺

国内での生体肺移植

気管支拡張症(岡山大)	24歳	女性	生体	両側肺葉
気管支拡張症(大阪大)	30代	男性	生体	両側肺葉

国内初の脳死ドナーからの肺移植

リンパ脈管筋腫症(東北大)	39歳	女性	脳死	右片肺
肺線維症(大阪大)	40代	女性	脳死	左片肺

表 1 日本人の渡航肺移植と国内での肺移植

対象と方法

1. 我が国の主要な肺移植関連研究グループの報告を集計して潜在的肺移植適応症例数とその基礎疾患の内訳を算出する。
2. 我が国で移植適応症例の多数を占め、移植の成績を左右すると推測される疾患に関して閉塞性細気管支炎(BOS)およびグラフト肺での再発のリスクを文献により調査する。

結 果

東北大および東日本 64 施設¹⁾、近畿肺移植検討会 21 施設²⁾、関東肺移植検討会³⁾、東京女子医大⁴⁾の調査から算出した我が国における潜在的肺移植適応 123 症例に

1. 東京医科歯科大学呼吸器科
 2. 岡山大学第二外科
- * びまん性肺疾患研究班 分担研究者

において、その原疾患の内訳は、原発性肺高血圧症 34 例、特発性間質性肺炎(慢性型)およびその他の間質性肺炎 22 例、リンパ脈管筋腫症 20 例、Eisenmenger 症候群 12 例、びまん性汎細気管支炎 9 例、肺気腫 8 例、気管支拡張症 4 例、不明・その他 14 例であった。

90 年 1 月から 99 年 6 月までの UNOS (United Network for Organ Sharing) 登録症例⁵⁾における基礎疾患の内訳とともに示すと、我が国と欧米との肺移植対象疾患の相違が明らかになる(図 1)。

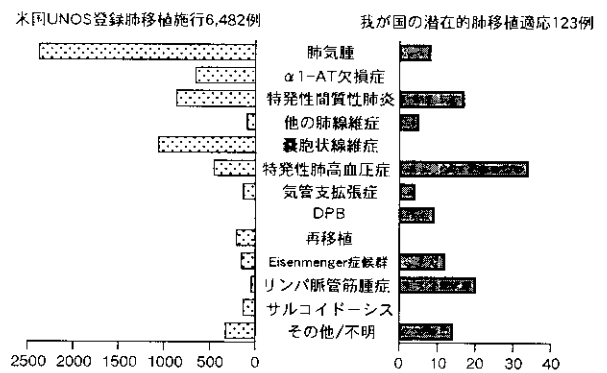


図 1 欧米と我が国での肺移植対象疾患

欧米で主要な肺移植の対象である α1 アンチトリプシン欠損症、嚢胞性線維症は本邦では見られなかった。また、肺気腫も我が国では移植対象となる若年の重症者が少ないため欧米と比べ著しく少ない。肺高血圧症(この調査には反復血栓性も含む)は相対的に多く、リンパ脈管筋腫症、特発性間質性肺炎などがこれに続く。

原疾患毎の BOS の合併頻度に関しては海外でいくつかの検討が試みられているが、特発性肺高血圧症で合併頻度が高いという報告が一件あるのみであった⁶⁾。また、原疾患毎に差はないとする報告もあるが⁷⁾、いずれも母集団の中の各疾患の症例数が少なく、十分な検出力を持った検討とはいえない。一方、レシピエントの原疾患以外の BOS のリスクファクターとしては、急性拒絶反応、サイトメガロウイルス感染症、気道過敏性、好中球機能亢進などが挙げられていた。

原疾患のグラフト肺への再発に関しては、剝離性間質性肺炎(DIP)、巨細胞性間質性肺炎(GIP)、リンパ脈管筋腫症、サルコイドーシス、ランゲルハンス細胞肉芽腫、びまん性汎細気管支炎で報告がみられた。

DIP は、2 例のほぼ確実な再発例^{8,9)}と 1 例の疑い症例¹⁰⁾、GIP は 1 例のほぼ確実な再発例¹¹⁾が報告されている。全例片肺移植後の再発であり、残した肺からのリモートエフェクトが疑われているため、両肺移植が望ましい可能性が示されていた。肺リンパ脈管筋腫症は、妊娠可能年齢の女性のみを生じる疾患であるが、男性ドナーから片肺移植を行いグラフトへの再発が生じた報告が 3 件

^{12,13,14)} あることから、全身への十分な内分泌的治療や免

疫抑制療法が必要と考えられた。ランゲルハンス細胞肉芽腫では、グラフト肺への再発が3編4例報告されている^{15,16,17)}。肺外病変の存在と喫煙の継続あるいは再開が再発のリスクファクターと考えられた。サルコイドーシスは心・腎の移植でもグラフトへの再発が報告されているが、片肺移植後のグラフト肺に再発したため、対側に再度片肺移植を行ったところ、再々発がみられたという報告がある¹⁸⁾。また、12例中3例という高い再発頻度の報告があるが、全体の治療成績は他の疾患に比べて悪くないとしている¹⁹⁾。一方、特発性間質性肺炎と膠原病肺では、グラフト肺に再発が生じたという報告はみられなかった。しかし、これらの疾患は、発病初期や急性増悪期にはこれらに特徴的な組織像を形成しないので、移植後の肺に生じた病変が原疾患の一部であるのかの評価は容易でない。

考案・結論

我が国の肺移植の主要な対象になると予想される疾患のうち、特発性肺高血圧症やリンパ脈管筋腫症は、若年発症で進行が緩徐かつ一定であることから、発症時から移植を念頭においた経過観察を行ってれば概ね周到な準備のもとに移植が可能であると考えられる。これに対して、しばしば急性増悪を生じて病勢予測が困難である特性を考慮すると、特発性間質性肺炎を中心とする各種間質性肺疾患が我が国における肺移植の成績を左右すると推測された。即ち、ドナー不足のため移植リストに載ってからの待機時間が長くなり、いざ移植という時点で容態がきわめて重篤であったり、待機中に死亡するケースが多くなると予想される。また、比較的高年齢で発病するため、移植適応年齢のうちに移植以外に救命手段がない状況に陥るか否かの判断が難しいと思われる。

各種肺疾患のうちグラフト肺への再発が報告されているDIP, GIP, リンパ脈管筋腫症, サルコイドーシス, ランゲルハンス細胞肉芽腫では上述のような術式上, 内科的補助療法上の注意が必要であることが示唆された。また, サルコイドーシスなど高率に再発を見ながらも移植後の予後が良好な疾患の場合, 移植を行わない例と比較しても生存期間に差が無い可能性がある。この場合, 肺気腫がそう考えられているように移植の目的が救命よりもQOL改善と解釈され, 現時点での我が国の指針に沿わない可能性がある。

以上の検討を通じて, 海外からの報告では原疾患の術前診断や各症例の術後の病態の評価に疑問の余地があるものが見られた。また, explantの病理所見の検討に十分な関心が払われていないこともあると感じられ, 文献だけからでなく, 国内外の実際の症例や病理標本に基づいたアプローチが必要であると考えられた。

参考文献

- 1) 島田和佳, 松村輔二, 近藤 丘, 他: 東日本における肺移植適応患者の実態についての検討: 日呼吸会誌 2000; 投稿中.
- 2) 南 正人, 三好新一郎, 松田 暉, 他: 肺移植適応評価に関して—近畿肺移植検討会の6年間の活動の総括—: 日呼吸会誌 1998; 36: S188.
- 3) 関東肺移植検討会: 討議録(未発表).
- 4) 小山邦宏, 大貫恭正, 小原徹也, 他: 肺移植適応症例の検討: 移植 1998; 33: 408.
- 5) UNOS Research Department: Total number of lung transplants by diagnosis January 1, 1990 to June 30, 1999: Transplant patient datasource; http://www.unos.org/frame_Dcdefault.asp
- 6) Kshetry VR, Kroshus TJ, Savik K, et al: Primary pulmonary hypertension as a risk factor for the development of obliterative bronchiolitis in lung allograft recipients: Chest 1996; 110: 704-709.
- 7) Boehler A, Kesten S, Weder W, et al: Bronchiolitis obliterans after lung transplantation: Chest 1998; 114: 1411-1426.
- 8) King MB, Jessurun J, Hertz MI: Recurrence of desquamative interstitial pneumonia after lung transplantation: Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1997; 156: 2003-2005.
- 9) Verleden GM, Sels F, Van Raemdonck D, et al: Possible recurrence of desquamative interstitial pneumonia in a single lung transplant recipient: Eur Respir J 1998; 11: 971-974.
- 10) Barberis M, Harari S, Tironi A, et al: Recurrence of primary disease in a lung transplant recipient: Transplant. Proc. 1992; 24: 2660-2662.
- 11) Frost AE, Keller CA, Brown RW, et al: Giant cell interstitial pneumonitis - disease recurrence in the transplanted lung: Am. Rev. Respir. Dis. 1993; 148: 1401-1404.
- 12) Nine JS, Yousem SA, Paradis IL, et al: Lymphangiomyomatosis - recurrence after lung transplantation: J. Heart Lung Transplant. 1994; 13: 714-719.
- 13) O'Brien JD, Lium JH, Parosa JF, et al: Lymphangiomyomatosis - recurrence in the allograft after single-lung transplantation: Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1995; 151: 2033-2036.
- 14) Bittmann I, Dose TB, Muller C, et al: Lymphangiomyomatosis - recurrence after single lung transplantation: Human Pathology 1997; 28: 1420-1423.

- 15) Etienne B, Bertocchi M, Gamondes JP, et al: Relapsing pulmonary Langerhans cell histiocytosis after lung transplantation: Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1998; 157: 288-291.
- 16) Gabbay E, Dark JH, Ashcroft T: Recurrence of Langerhans' cell granulomatosis following lung transplantation: Thorax 1998; 53: 326-327.
- 17) Habib SB, Congleton J, Carr D, et al: Recurrence of recipient Langerhans' cell histiocytosis following bilateral lung transplantation: Thorax 1998; 53: 323-325.
- 18) Bjortutt O, Foerster A, Boe J, et al: Single lung transplantation as treatment for end stage pulmonary sarcoidosis: recurrence of sarcoidosis in two different lung allografts in one patient: J. Heart Lung Transplant. 1994; 13: 24-29.
- 19) Walker S, Mikhail G, Banner N, et al: Medium term results of lung transplantation for end stage pulmonary sarcoidosis: Thorax 1998; 53: 281-284.

Interleukin (IL)-10 による肺線維症の制御～ IL-10 の多彩な作用～

林 清二* 新井 徹 松岡 洋人 森下 裕

Interleukin (IL)-10 の *in vivo* 遺伝子導入によりブレオマイシン (BLM) 肺傷害モデルの肺の炎症と線維化が抑制されること, *in vitro* においても肺線維芽細胞株 WI-38 を用いた検討で transforming growth factor- β によって誘導される type I collagen mRNA 転写を IL-10 が抑制することを報告してきた。さらに今回は WI-38 の増殖とマクロファージの機能に対する作用を検討した。IL-10 は WI-38 の増殖に影響を与えず, platelet derived growth factor による増殖促進に対しても作用しなかった。BLM 刺激によって誘導される肺胞マクロファージからの tumor necrosis factor (TNF)- α の産生, ヒト単球系細胞株 THP-1 の細胞内活性酸素の発生は IL-10 によって抑制された。したがって, IL-10 は肺の炎症, 線維化の両者に抑制的に働く重要な因子と考えられた。

Interleukin (IL)-10 suppresses pulmonary fibrosis: analysis of anti-fibrotic effects of IL-10

Sciji Hayashi, Toru Arai, Hiroto Matsuoka, Hiroshi Morishita

Department of Molecular Medicine, Osaka University Medical School

We have reported that introduction of the interleukin (IL)-10 gene into mice inhibited bleomycin (BLM)-induced pulmonary inflammation and fibrosis and that IL-10 significantly reduced transforming growth factor- β -stimulated type I collagen mRNA expression of a human lung fibroblast cell line, WI-38. In this report we examined the effects of IL-10 on proliferation of WI-38 and the functions of macrophages. IL-10 did not affect the proliferation of WI-38 induced by platelet-derived growth factor. The BLM-induced production of tumor necrosis factor (TNF)- α from murine alveolar macrophages and intracellular superoxide of a human monocyte cell line (THP-1) was both suppressed by IL-10. Hence IL-10 was shown to be an important factor suppressing both inflammation and fibrosis of the lung.

はじめに

Interleukin (IL)-10は、従来から抗炎症性サイトカインとして *in vitro*, *in vivo* において種々の炎症反応を抑制することが報告されてきた。しかし、肺の線維化との関連についての検討は十分とは言えないのが現状である。そこで、まず我々は、Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ)-liposome 法を用いた IL-10 の *in vivo* 遺伝子導入によりブレオマイシン (BLM) 肺傷害モデルにおける肺の炎症および線維化を抑制できることを示した。IL-10 導入マウスにおいては、BLM 投与後7日目の tumor necrosis factor (TNF)- α の発現は有意に抑制されており、炎症、線維化の両者に関わると考えられる TNF- α の制御が重要な作用機序の一つと考えられた。さらに、IL-10 が *in vitro* においても、transforming growth factor (TGF)- β によって誘導される線維芽細胞の type I collagen mRNA の転写を抑制することを明らかにした。したがって、IL-10 は直接的に線維化を抑制する可能性があると考えられた。

今回我々は、その線維化抑制の機序となる分子病態をさらに解明するため、線維芽細胞の増殖に対する作用、肺胞マクロファージからの TNF- α 、活性酸素産生に対する *in vitro* での作用を検討した。

対象と方法

1) 細胞培養

肺線維芽細胞株、WI-38 (RIKEN GENE BANK, Saitama, Japan) を 10% fetal bovine serum (FBS), 100U/ml penicillin G, 10 μ g/ml streptomycin を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用い、5% CO₂, 95% air の incubator 内で培養した。

ヒト単球系の細胞株である THP-1 (ATCC, Virginia, USA) を 10% FBS, 2-mercapthanol (2-ME) (Sigma, St. Louis, USA) 加 RPMI で継代し、実験には 2-ME を含まない 10% FBS 加 RPMI で洗浄、2-ME (-) の条件で使用した。

2) 肺線維芽細胞の cell proliferation assay

96 穴 dish に 2.25×10^4 cells/well で細胞を加え、24 時間後、confluence に到達する前に、0.4% FBS 加 DMEM に入れ替えて 24 時間培養した。その後 human PDGF-BB (R&D, Minneapolis, USA), human IL-10 (Pharmingen, California, USA) 存在下にて、さらに 24 時間培養した。

Carmichael ら²⁾の方法に準じて MTT (Sigma, St. Louis, USA) を用いて cell proliferation を測定した。Human

platelet derived growth factor (PDGF) または human IL-10 刺激 24 時間後、MTT を 50 μ g/well 加えて 6 時間培養した。上清 150 μ l を除去後 DMSO (Wako, Osaka, Japan) 150 μ l を加えて formazan crystal を溶解し、分光光度計にて 490nm の吸光度を測定した。

3) BLM 肺傷害モデルの作製

7 週令オス C57/BL6 マウスに 29G インシュリン注射用シリンジ (テルモ, Tokyo, Japan) を用いて塩酸ブレオマイシン (日本化薬, Tokyo, Japan) 100mg/kg または phosphate buffered saline (PBS) を 125 μ l の容量で尾静脈に注入した。気管支肺胞洗浄 (BAL; bronchoalveolar lavage) は PBS 1ml で 4 回行った。

4) 肺胞マクロファージの回収と培養

BLM を静注後 2 時間、8 時間後に BAL を行った。その回収液を 4～5 匹分集め、1000g, 5 分の遠心、上清吸引後 10% RPMI にて再浮遊、細胞数のカウントを行って、 1×10^6 /ml に細胞濃度を調整した。この細胞浮遊液を 96 穴プレートに 50 μ l/穴で加え、さらに human IL-10 を含む 10% RPMI を 50 μ l/穴で加えて最終濃度 0～20ng/ml で共存させた。24 時間培養後、上清を回収、-20℃ で保存した。

5) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

培養上清中の mouse TNF- α は mouse TNF- α ELISA Kit (R&D, Minneapolis, USA) を用いて測定した。

6) FACS を用いた intracellular peroxides の測定

Bass ら³⁾の方法に準じて細胞内 peroxides の測定を行った。ヒト単球細胞株 THP-1 を、6 穴プレートに 5×10^5 /ml \times 3ml/穴で加え、最終濃度 10 μ g/ml の BLM または PBS 追加後 24 時間培養した。発色基質である 2',7'-dichlorofluoresin diacetate (DCFH-DA) (Sigma, St. Louis, USA), 5 μ M を含む 10% FBS 加 RPMI に交換して 15 分培養した後、最終濃度 100ng/ml の Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) (Sigma, St. Louis, USA) にて 45 分間刺激した。PMA 刺激により発生した細胞内 peroxides の量を peroxides と反応した発色基質による FL1 の蛍光強度として、FACSort (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いて定性的に測定した。Peroxides 産生の IL-10 による制御を検討する際には、BLM 刺激時、PMA 刺激時ともに 20ng/ml の human IL-10 を添加した。

7) 統計

すべての数値は mean ± SEM で示した。統計学的解析には、対応の無い Student's *t*-test を用い危険率 5% 以下を有意差ありとした。

結果

1) 肺線維芽細胞株 WI-38 に対する効果 (Fig.1)

PDGF は 5 及び 20ng/ml の濃度で WI-38 の増殖を有意に促進した (Fig.1A) が、IL-10 はその増殖に有意な影響を与えなかった (Fig.1B)。さらに PDGF (20ng/ml) によって誘導される増殖促進に対して、抑制的にも促進的にも働かなかった (Fig.1C)。

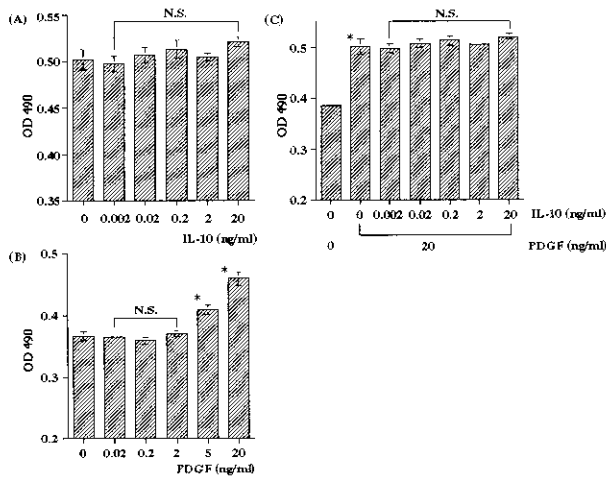


Fig.1 Effects of IL-10 on lung fibroblast proliferation. The human lung fibroblast cell line WI-38 was cultured in the presence of IL-10 and/or PDGF, and proliferation of the cells was assessed by MTT assay. Proliferation was not affected by IL-10 at concentrations of 2pg/ml to 20ng/ml (A). PDGF significantly augmented cell proliferation (*: $p < 0.01$) at concentrations of 5 and 20ng/ml (B). IL-10 at concentrations of 2pg/ml to 20ng/ml had no effect on proliferation induced by PDGF (20ng/ml) (C). Values are presented as means ± SEM (n=4). N.S.: Not significant.

2) *In vivo* BLM 刺激後マウス肺胞マクロファージにおける TNF- α 産生誘導と IL-10 による誘導抑制効果 (Fig.2)

BLM 静注マウス、コントロールマウスともに 2 時間後、8 時間後の BAL 液中の細胞は 95% 以上マクロファージであった。BLM 静注マウスの肺胞マクロファージは、コントロールマウスの肺胞マクロファージに比較し、2 時間後、8 時間後ともに有意に mouse TNF- α の産生が亢進していた。また、いずれの時間においても IL-10 により有意に TNF- α の産生は抑制された。

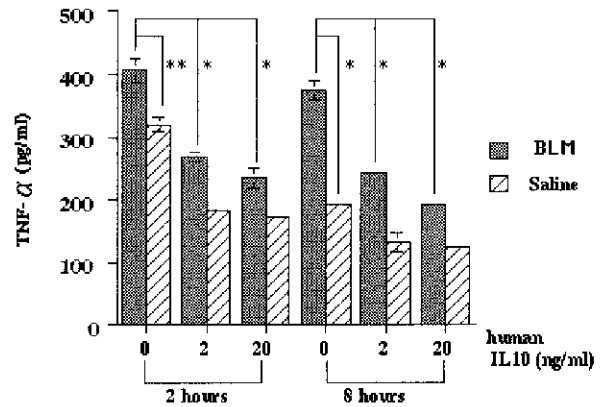


Fig.2 TNF- α production by murine alveolar macrophages (AMs) from mice 2 or 8 hours after *in vivo* exposure of BLM or saline as control. TNF- α of culture supernatant of the AMs was measured by ELISA. The release of TNF- α from AMs of BLM-treated mice was significantly high as compared with control mice after both 2 hours and 8 hours. The BLM-induced production of TNF- α was significantly inhibited by IL-10. Values are presented as means ± SEM. *: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$

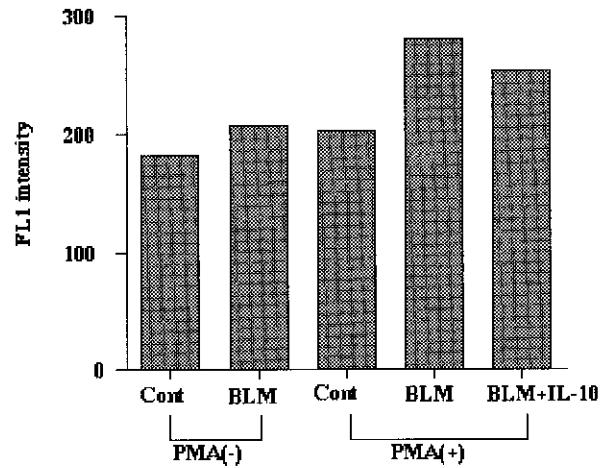


Fig.3 Intracellular peroxides induced by BLM stimulation

3) プレオマイシン刺激による THP-1 細胞内 peroxide 増加と IL-10 によるその制御 (Fig.3)

PMA 未刺激下では BLM10 μ g/ml 前処置にても著明な蛍光強度の増強を認めなかった。しかし、BLM 前処置後に PMA 刺激を行った場合、40% 程度の蛍光強度の増強が検出された。さらに、BLM 前処置時、PMA 刺激時に IL-10 (20ng/ml) を共存させた場合には、蛍光強度の低下傾向を認めた。

考案

IL-10 の肺線維化に対する効果については、現在のところ、コンセンサスを得るには至っていない。Huax らは、IL-10 knockout mouse (KO) に対し経気道的にシリカを投与すると、24 時間後の炎症所見は正常マウスに比べ

て増強するが、30日後の線維化は軽減するため、IL-10は線維化に促進的に働く可能性があると報告している。この結果は、HVJ-liposome法を用いたIL-10の遺伝子導入によりBLM肺傷害における肺の炎症と線維化の抑制が可能であり、IL-10は線維化抑制作用を有するとする我々の主張とは矛盾するものである。しかし、この相違はモデルの違いでも説明可能であり、IL-10 KOを用いたBLM肺傷害モデルでの検討を待たなければならない。しかし、今回を含めて我々が提示した*in vitro*でのIL-10の作用はいずれも、肺線維症において中心的な役割を果たす肺胞マクロファージと線維芽細胞の機能を制御し、IL-10の*in vivo*での肺の炎症、線維化抑制効果を肯定するものであり、特発性肺線維症への応用を念頭に今後もIL-10の作用について検討を進めていく予定である。

参考文献

- 1) Arai T, Abe K, Matsuoka H, Yoshida M, Mori M, Goya S, Kida H, Kaneda Y, Hayashi S. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury *in vivo*. *Am J Physiol* 278: L914-L922, 2000.
- 2) Carmichael J, Degraff EG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay; assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942, 1987.
- 3) Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130: 1910-1917, 1983.
- 4) Huaux F, Louahed J, Hudspeth B, Meredith C, Delos M, Renauld JC, Lison D. Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 51-59, 1998.

高濃度酸素曝露によるブタのびまん性肺胞傷害モデルにおける

matrix metalloproteinase の役割についての検討

具嶋 泰弘 菅 守隆* 一門 和哉 彌永 和宏
岡本 竜哉 佐藤 圭創 安藤 正幸

急性間質性肺炎 (AIP) の病態において肺胞上皮および血管内皮基底膜傷害が重要であり、その組織学的特徴はびまん性肺胞傷害 (DAD) である。マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、DAD の病変形成における肺胞構築の破壊と過剰な細胞外基質 (ECM) の分解を担う主要因子で、特に MMP-2 と MMP-9 は基底膜の主要構成成分である IV 型コラーゲンを基質とし、基底膜傷害における重要な役割が想定される。本研究では、ヨークシャー系ブタに高濃度酸素を曝露 (24-120 時間) することにより DAD/AIP モデルを作製し、このモデルにおける MMP の活性測定と組織での局在をゼラチンザイモグラフィ法および免疫組織染色法を用いて検討した。ブタに高濃度酸素を曝露すると、低酸素血症を伴う肺傷害が出現し、組織学的には DAD の浸出期早期から増殖期早期に至る所見を認めた。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の MMP-2、-9 活性は、ともに 72 時間以上の曝露群で増加していた。MMP-2 は主に肺胞マクロファージ、肺胞上皮に発現し、一方、MMP-9 は好中球、肺胞マクロファージに局在を認めた。MMP-9 は肺傷害の重症度および BAL 好中球数と強く相関しており、DAD の病変形成において MMP-9 とその主要産生細胞と考えられる好中球の重要性が示唆された。本モデルは、AIP/DAD の治療実験モデルとして重要であり、かつ MMP-9 は急性肺傷害のマーカーになりえると考えられる。

Expression of Matrix Metalloproteinases in an Diffuse Alveolar Damage Model Induced by Hyperoxic Exposure in Pigs

Y. Gushima, M. Suga*, K. Ichikado, K. Iyonaga
T. Okamoto, K. Sato, M. Ando

First Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, Japan

Acute interstitial pneumonia (AIP) is a disease of unknown etiology, acute progression, and poor prognosis that is pathologically characterized by diffuse alveolar damage (DAD). In the pathogenesis of DAD, the basement membrane destruction is thought to be an important factor in determining the severity and prognosis of DAD. The matrix metalloproteinases (MMPs), a group of zinc neutral endopeptidases produced by a variety of cells, have crucial roles in the degradation of extracellular matrix (ECM) and the irreversible pulmonary structural remodeling. MMP-2 and MMP-9 are the members of MMPs and have the capacity to degrade type IV collagen, which is one of the major structural components of the basement membrane, and that these MMPs are thought to contribute to the basement membrane destruction in DAD. In this study, we established an experimental DAD/AIP model in pigs exposed to hyperoxia and evaluated the precise roles of MMPs in this condition using gelatin zymography and immunohistochemical analysis. The progression of acute lung injury in this model histologically ranged from the features of the early exudative to the early proliferative phase of diffuse alveolar damage (DAD), and MMP-2 and MMP-9 expressions in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) increased in these lungs with prolonged hyperoxic exposure. In immunohistochemical analysis, MMP-2 localized mainly in alveolar macrophages and alveolar lining epithelium and MMP-9 was detected in neutrophils and alveolar macrophages. MMP-9 activities correlated more closely with pathologic findings of DAD than MMP-2 activities. In addition, MMP-9 correlated with lung severity and the number of neutrophils in BALF, but MMP-2 did not. These results suggest that the pig is particularly useful as an animal model of DAD mimicking in human AIP, and that MMP-9, which is mainly produced by neutrophils in this model and is useful to assess the disease severity, plays important roles in the pathogenesis of DAD from the early exudative to the early proliferative phase.

はじめに

急性間質性肺炎 (AIP) は、厚生省びまん性肺疾患調査研究班の特発性間質性肺炎 (IIP) 急性型に対応する概念で、原因不明の急性呼吸促進症候群 (ARDS) を呈する病態である¹⁾。急速進行性、治療抵抗性の予後不良な疾患であり、その病態についてはまだ十分に解明されていない。AIP の組織学的特徴はびまん性肺胞傷害 (DAD) と呼ばれ、肺胞上皮基底膜傷害がその病態に深く関わっていることが報告されている。

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、種々の細胞外基質 (ECM) を分解する蛋白分解酵素で、大きく 4 つのサブグループに分類され、一般に、不活性型前駆体 (pro MMP) として産生され、細胞外で活性化される。MMP-2, MMP-9 は、ゼラチナーゼ群に属し、基底膜の主要構成成分のひとつである IV 型コラーゲンを基質として分解する²⁾。

ヒトにおいて、DAD は種々の原因で惹起される。その中のひとつに高濃度酸素があり³⁾、臨床的に呼吸不全の治療手段として広く使用されているにもかかわらず、むしろ肺の障害を増悪させる可能性があるため重要な原因である。本研究では、肺の構造⁴⁾や免疫学的性質⁵⁾がヒトに類似しているブタに高濃度酸素を曝露することにより実験的 DAD モデルを作製し、DAD の病変形成機序の一端を MMP の立場から検討、解析した。

対象と方法

実験動物としてヨークシャー種ブタ (メス、10-15kg) を用い、酸素濃度 80 ~ 90% にて 24 ~ 120 時間にわたり曝露し、24 時間ごとに動脈血液ガス測定、末梢血白血球測定、気管支肺胞洗浄 (BAL)、組織のサンプリング、肺湿乾重量比の測定を行った。病理学的所見の評価は、次に示すような DAD で認められる 13 の所見につき 4 段階にスコア化し組織学的スコアとして個別に評価した (0=所見なし、1=軽度、2=中等度、3=重度)：肺胞上皮の破壊、肺毛細血管のうっ血、肺胞間質の浮腫、肺胞内浮腫、肺胞内出血、単核細胞浸潤、多核細胞浸潤、小葉間隔壁の肥厚、硝子膜形成、微少無気肺、II 型肺胞上皮細胞の過形成、線維芽細胞の増生、間質のコラーゲン沈着。

MMP-2, -9 の活性は、BALF 中のゼラチン溶解活性としてゼラチンゼイモグラム法により測定した。即ち、あらかじめゼラチンを包埋したアクリルアミドゲルにて非還元下で SDS-PAGE を行った後、バッファー中にて 48 時間インキュベートし、タンパク染色を行った。ゼラチナー

ゼ酵素活性があるとゲル中に含まれる基質ゼラチンが分解され、酵素の分子量に応じた部位に白く抜けたバンドが得られる。その濃度を NIH Image にて定量化し、MMP 活性とした。また、抗 MMP-2 抗体、抗 MMP-9 抗体を用いて免疫組織染色を行い、組織における発現と局在を解析した。

結 果

高濃度酸素曝露による末梢血白血球数、PaO₂/FiO₂ 比 (P/F 比)、BAL 細胞分画、肺湿乾重量比の変化を Fig.1 に示す。末梢血白血球数は酸素曝露による有意な変化は認めなかったが、P/F 比は 72 時間以上の曝露群で対照群に比較し有意に低下し、BAL 細胞分画では、72 時間以上の曝露群で白血球数の有意な増加を認めた。肺浮腫の指標である肺湿乾重量比は曝露 72 時間で有意な増加を認めた。

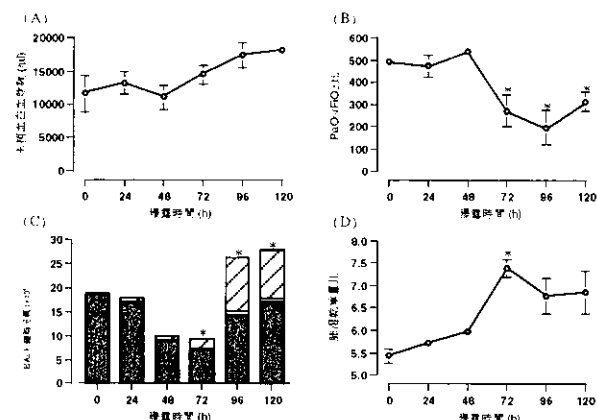


Fig.1 高濃度酸素曝露に伴う各種パラメーターの推移

高濃度酸素曝露による組織学的変化を Fig.2 に示す。48 時間以内の曝露群では、対照群と比較し、ごく軽度の間質の浮腫と間質への単核球浸潤を認めるのみであった。72 時間曝露では、好中球浸潤、硝子膜形成、小葉間隔壁の肥厚、II 型肺胞上皮の過形成が観察され、96 時間以上

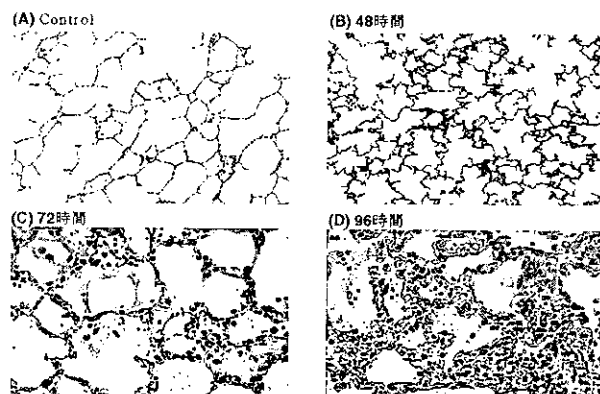


Fig.2 高濃度酸素曝露に伴う組織の経時的変化

熊本大学医学部第一内科

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

の曝露群になると、これらの所見が顕著化し、線維芽細胞の増生が認められた。高濃度酸素曝露に伴う病理学的変化は、DADの特徴を有し、本モデルでは、DADの浸出期早期から増殖期早期に至る所見を認めた。曝露時間と組織学的スコアは次の通りであった;24時間;6.9±3.1, 48時間;8.9±2.3, 72時間;19.2±3.0, 96時間;23.5±1.9, 120時間;19.1±1.6(平均±SEM)。一方、コントロール群の病理学的スコアは、1.0±0.0であった。曝露時間と組織学的スコアの間には強い相関を認めた($r_s=0.86$, $p<0.0001$)。

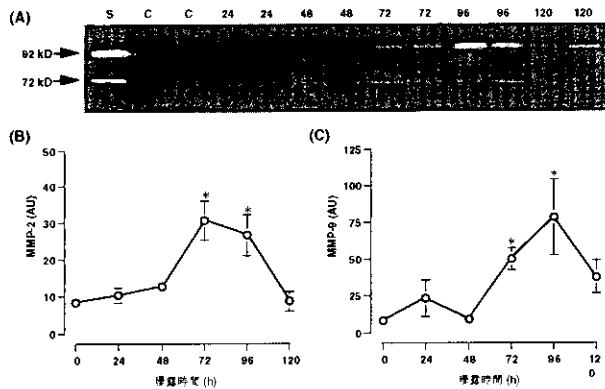


Fig.3 BALFを用いたゼラチンザイモグラムとMMP-2, MMP-9活性の推移

BALFを用いたゼラチンザイモグラムの結果とゼラチン溶解活性を定量化したグラフをFig.3に示す。ザイモグラムでは、92 kDと72 kD付近にそれぞれMMP-9, MMP-2の前駆体と活性体の計4本のバンドを認めた。それぞれ、前駆体を定量化したところ、MMP-2は、曝露48時間より増加傾向を認め、曝露72, 96時間で対照群と比較し有意に増加し、120時間でコントロールレベルまで低下した。一方、MMP-9は曝露72時間以上で有意に増加し、96時間でピークをとった。免疫組織染色をFig.4に示す。MMP-2は、コントロールの肺で、肺胞マクロファージ、肺胞上皮などに弱い発現を認め、高濃度酸素に曝露することにより特に肺胞マクロファージにおいて発現の増強を認めた。一方、MMP-9の発現は、コントロール肺で、肺胞マクロファージ、肺胞II型上皮細胞および気道

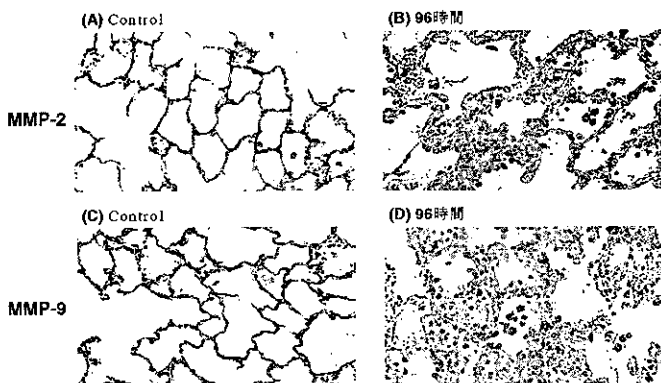


Fig.4 高濃度酸素曝露に伴うMMP-2, -9の発現変化

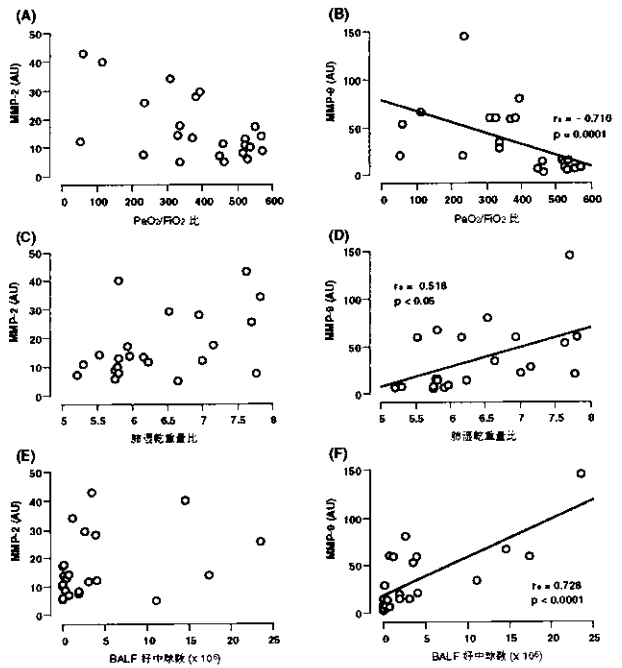


Fig.5 BALF中MMP活性と各種パラメーターとの相関

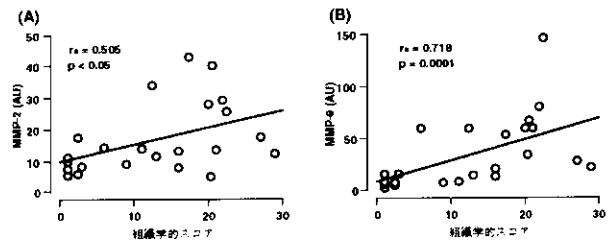


Fig.6 BALF中MMP活性と組織学的スコアとの相関

上皮細胞に局在し、高濃度酸素曝露群では、それに加え肺胞マクロファージ、好中球に強い発現を認めた。

BALF中MMP活性と各種肺傷害の指標との相関をFig.5に、BALF中MMP活性と組織学的スコアとの相関をFig.6に示す。MMP-9は肺傷害の程度を表すP/F比、BAL好中球数、および肺湿乾重量比との間に有意な相関を認めたが、MMP-2はいずれとも相関がなかった。MMP-2, -9活性ともに、組織学的スコアとの間に有意な正の相関を認めたが、MMP-9でより強く相関していた。

考察・結論

ブタに高濃度酸素を曝露することにより、特に72時間以上の曝露において低酸素血症を伴う肺傷害が出現し、組織学的にはDADの浸出期早期から増殖期早期に至る実験モデルを確立した。高濃度酸素はDADの原因として重要であり、高濃度酸素曝露動物モデルはDADの病因を解明する手段として有用である。大動物であるブタは肺の構造や免疫システムがヒトのそれと非常によく似ており、ヒトの病態をよく反映する。我々は最近、本モデル