

を用いてブタ肺の高分解能CTを撮影し、その所見がヒトのDAD/ARDSと同様の所見を呈し、組織学的変化とも良い相関をすることを報告した⁷⁾。

ほ乳類の肺においては、ECMはコラーゲンやエラスチン、ラミニンといった非コラーゲン性のタンパクで構成され、構造と機能の両面を維持していくために重要な役割を果たしている⁸⁾。正常肺では、基底膜にIV型コラーゲンが存在する。Fukudaらは、ARDSや特発性肺線維症(IPF)などの疾患で基底膜が破壊されていることを報告している⁹⁾。基底膜の破壊にはMMP-2、-9が関与しており、ラットの高濃度酸素曝露やモルモットのLPS気管内投与急性肺傷害モデルでこれらMMPが増加しているとする報告がある。しかしながら、組織学的変化や疾患の重症度との関連について詳細に検討したものはなく、しかもこれらは齧歯類を用いたモデルである。本研究において、72時間以上の曝露でBALF中MMP-2、-9活性の増加を認めた。MMP-2は、48時間から増加傾向を認め、72、96時間で有意に増加し、一方、MMP-9は曝露72時間以上有意に増加し、96時間でピークとなった。MMP-2は、肺傷害の重症度との間に相関を認めなかったが、MMP-9はすべてのパラメーターと有意な相関を認めた。また、組織学的スコアとの間には、MMP-2、-9ともに有意な相関を認めたが、MMP-9の方がより強い相関があった。MMP-9は、本モデルにおいて重症度を反映するとともに病変形成に重要な役割を果たしており、BAL好中球数と強い相関があったこと、免疫組織染色で好中球に局在していたことから、その主要な産生細胞は好中球であることが示唆された。MMPは、前駆体として産生され、細胞外で活性化される。たとえば、好中球エラスターゼがMMP-9を活性化するという報告があり¹⁰⁾、我々も以前、二酸化窒素やパーオキシナイトライトがMMP-8を活性化することを報告している¹¹⁾。本モデルにおけるMMPの活性化の機序は不明であるが、高濃度酸素曝露により様々なラジカル種が産生され、さらに本モデルで好中球エラスターゼが曝露時間に比例して増加していることを確認しており、これらラジカル種や好中球エラスターゼがMMPの活性化に関与していると考えられる。

MMP-2は、肺傷害とのパラメーターとは相関を認めなかったが、MMP-9に比較し、早期に増加する傾向を認めた。免疫染色では、肺胞マクロファージや肺胞上皮に局在を認め、これらが高濃度酸素曝露時に最初に酸素に曝される細胞であることから、MMP-2は、曝露開始後、明らかな肺傷害が出現する前のごく早期に産生され、初期病態に関与している可能性が考えられた。

DADの浸出期後期から増殖期早期にかけてMMP-2、-9が増加し、特に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、本モデルにおいて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

参考文献

- 1) Katzenstein ALA, Myers JL, and Mazur MT. Acute interstitial pneumonia: a clinicopathologic, ultrastructural, and cell kinetic study. *Am J Surg Pathol.* 10: 256-267 (1986).
- 2) 山村昌士. 厚生省特定疾患「びまん性肺疾患調査研究班」平成3年度研究報告書(1992).
- 3) Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5: 2145-2154 (1991).
- 4) Katzenstein ALA, Bloor CM, and Liebow AA. Diffuse alveolar damage - the role of oxygen, shock, and related factors. *Am J Pathol.* 85: 210-228 (1976).
- 5) Todo G, and Herman PG. High-resolution computed tomography of the pig lung. *Invest Radiol.* 21: 689-696 (1986).
- 6) Gehrke I, and Pabst R. Cell composition and lymphocyte subsets in the bronchoalveolar lavage of normal pigs of different ages in comparison with germfree and pneumonic pigs. *Lung.* 168: 79-92 (1990).
- 7) Ichikado K, Suga M, Gushima Y, Johkoh T, Iyonaga K, Yokoyama T, Honda O, Shigeto Y, Tomiguchi S, Takahashi M, Itoh H, Ikezoe J, Müller N, and Ando M. Hyperoxia-induced diffuse alveolar damage in pigs: correlation between thin-section computed tomographic and pathologic findings. *Radiology.* (1999) (In press).
- 8) Madri JA, and Furthmayr H. Collagen polymorphism in the lung. An immunohistochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum Pathol.* 11: 353-366 (1980).
- 9) Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, and Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest.* 78: 687-698 (1998).
- 10) Ferry G, Lonchampt M, Pennel L, de Nanteuil G, Canet E, and Tucker GC. Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury. *FEBS Lett.* 402: 111-115 (1997).
- 11) Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, Ichimori K, and Maeda H. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 342: 261-274 (1997).

放射線肺臓炎—肺線維芽細胞の PDGF- β レセプター発現

曾根 三郎* 大串 文隆 多田 浩也 谷 憲治
西岡 安彦

【目的】線維化の機序解明を目的に放射線肺臓炎の病変局所から線維芽細胞を採取し、細胞表面の PDGF- β レセプター (PDGF-R β) 発現について検討した。【方法】ラット肺線維芽細胞採取；6 週齢ウィスター系雄性ラット (約 200g) に Ward らの方法に準じて全肺に 15Gy の単回照射を行い放射線肺臓炎モデルを作成した。対照及び放射線照射後第 4 週目のラット肺より Phan らの方法で線維芽細胞を採取した。線維芽細胞遊走能；PDGF-AA, PDGF-BB に対する線維芽細胞遊走は 48well マイクロケモタクティックチャンバーを用いて行い、遊走細胞を Diff-Quick で染色し顕微鏡下にその細胞数を算定した。線維芽細胞表面の PDGF-R 発現； ^{125}I 標識 PDGF を用いてレセプターアッセイを行った。肺線維芽細胞表面のレセプター数、親和性はマックライガンドソフトウェアにて解析した。また、ヤギ抗ラット PDGF-R β 抗体を一次抗体に、ウサギ抗ヤギ IgG 抗体を二次抗体として細胞表面のレセプターをフローサイトメトリー法にて解析した。【結果】PDGF-BB に対する肺線維芽細胞の遊走能は、放射線照射肺線維芽細胞 (照射肺線維芽細胞) が対照肺線維芽細胞に対して有意に亢進していた。一方、PDGF-AA に対する遊走能には両群で差は見られなかった。非標識 PDGF と、 ^{125}I 標識 PDGF-BB を用いて線維芽細胞のレセプターに対する競合的結合反応を検討した。非標識 PDGF-BB で、 ^{125}I 標識 PDGF-BB の結合抑制がみられたが、PDGF-AA では変化がみられなかった。肺線維芽細胞表面の PDGF-R β 発現をフローサイトメトリー法で検討すると、照射肺線維芽細胞で対照に比較し軽度増強していた。肺線維芽細胞表面上の PDGF-R 解析を行うと、照射肺線維芽細胞で単位細胞あたり対照肺線維芽細胞の約 2 倍存在し、同時にその親和性も亢進していた。【考案】PDGF は細胞表面のレセプターを介して作用するため、PDGF の病態での役割を考える上で、そのレセプター発現の変化は重要である。本研究により放射線肺臓炎から得た肺線維芽細胞では PDGF-R β の発現増強していることを示した。このことが、放射線肺臓炎の発症の一因となる可能性が示唆された。

【来年度の予定】本研究の延長として、炎症から線維化への病態をサイトカイン及びアラキドン酸代謝物産生の面より解析し標的分子を確認する。これらの結果に基づいて治療実験を開始する。

UPREGULATION OF PDGF β RECEPTOR IN FIBROBLASTS FROM RAT RADIATION PNEUMONITIS

Saburo Sonc, Fumitaka Ogushi, Hiroya Tada, Kenji Tani
Yasuhiko Nishioka

The Third Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tokushima University, Kuramoto-cho 3, Tokushima, 770-8503, Japan

Radiotherapy is commonly employed in the treatment of the thoracic malignancies. The dosage of radiation is limited because clinically significant radiation pneumonitis and subsequent pulmonary fibrosis often occurred during or after treatment. On the other hand, platelet-derived growth factor (PDGF) isoforms are mesenchymal cells mitogens and chemoattractants for wound healing and tissue remodeling. To clarify the mechanism of radiation pneumonitis, we established a rat model and prepared its lung fibroblast line. Moreover, we investigate the reaction to PDGF and the expression of PDGF receptors compared with normal fibroblast line. Histologically pneumonitis and fibrosis are showed at 4th and 18th week after irradiation and fibroblasts from radiation lung (radiation fibroblast line) were prepared from rat at 4th week after radiation. Chemotaxis of fibroblasts was measured using a 48-well microchemotactic chamber and PDGF receptor assay was performed using ^{125}I -PDGF-BB. The fibroblasts chemotaxis to PDGF-BB is up-regulated twice by radiation fibroblasts. Furthermore, the number of fibroblasts PDGF β receptor is also increased twice by radiation. These data suggest that the fibroblasts of radiation pneumonitis increased expression of PDGF- β receptor may play an important role in the pathogenesis of radiation pneumonitis.

はじめに

胸郭の悪性腫瘍の放射線治療による肺障害-線維化は、臨床上しばしば遭遇する重要な問題であり、治療を制限し、予後、QOL に大きな影響を与える。その頻度は放射線を 30Gy 以上の肺へ照射を行った患者の 5-15% に発症すると報告されている¹⁾。これらのことより、悪性腫瘍に対する放射線治療成績向上のためには放射線肺臓炎の病態解析及び治療法の開発は重要な研究課題である。

肺の構成細胞のうち、血管内皮細胞、II 型肺胞上皮細胞、気道上皮細胞などは放射線感受性が高く、照射により直接これらの細胞が傷害をうける。また、照射時に発生するヒドロキシオキサイド、ラジカルなどで肺細胞傷害が引き起こされる。このように放射性肺障害は、肺胞、間質の炎症の時期を経て、治癒過程である肺線維化に至ると考えられている²⁾。この過程においては、種々の肺細胞から産生される TNF- α 、IL-1、TGF- β や PDGF など様々なサイトカインが関与することが想定されているが、その役割は十分解明されていない。

PDGF は血小板のほかマクロファージなど種々の細胞からも産生される成長因子で、そのターゲットは間葉系の細胞で線維芽細胞もその一つである。PDGF の肺におけるソースはおもにマクロファージであり³⁾。一方、PDGF 刺激を受けた肺線維芽細胞は 1) コラーゲン産生、2) 細胞増殖、3) 走化、遊走、メディエーター産生などを引き起こす^{3,4)}。この意味から PDGF は傷害に引き続く創傷治癒、組織修復に重要な役割を演じていると考えられる。PDGF は A 鎖、B 鎖の組み合わせからなる二量体であり細胞膜上のレセプターを介して作用する。PDGF のレセプターには α 、 β 二種類のレセプター (R α 、R β) があり、A 鎖は R α にのみ結合し、B 鎖は R α 、R β 両方に結合できる特性がある⁵⁾。さらに、病変部での間質の肺線維芽細胞は機能、形態上で多様性があると考えられている⁶⁾。これらの知見を基に、本研究では放射線肺臓炎発症の機序解明を目的として放射線肺臓炎モデルを作成し病変部における肺線維芽細胞の PDGF レセプター発現について検討した。

対象と方法

放射線肺臓炎モデルの作成：6 週齢ウイスター系雄性ラット (約 200g) に Ward らの方法に準じて全肺に 15Gy の単回照射を行った⁷⁾。

肺線維芽細胞採取：放射線照射後第 4 週目のラット肺より Phan らの方法に準じて線維芽細胞を採取した⁸⁾。採

取した肺をハサミで細片した後、トリプシンで処理し、肺組織から細胞を採取し線維芽細胞株を作成した。確立した細胞株はビメンチン、サイトケラチン、CD68 による免疫染色で線維芽細胞であることを確認した。実験には第 3-10 世代の細胞株を使用した。

線維芽細胞遊走能：線維芽細胞遊走は 48well マイクロケモタクティックチャンバーを用いて行った。フィルターは 1% コラーゲンで前処理したポアサイズが 8 μ m のポリカーボネイトメンブレンフィルターを用いた。上段に採取した線維芽細胞、下段に各濃度の PDGF-AA、-BB を加え 3 時間 37°C で静置後、遊走細胞を Diff-Quick で染色し顕微鏡下にその細胞数を算定した。Chemotaxis index は PDGF に対する遊走細胞数/培養液に対する遊走細胞数で表現した。

線維芽細胞表面の PDGF-R 発現：[¹²⁵I] 標識 PDGF を用いてレセプターアッセイを行った。肺線維芽細胞表面のレセプター数、親和性はマックライグッドソフトウェアにて解析した。また、ヤギ抗ラット PDGF-R β 抗体を一次抗体に、ウサギ抗ヤギ IgG 抗体を二次抗体として細胞表面のレセプターをフロサイトメトリー法にて解析した。

結 果

照射肺組織所見では照射 4 週目から間質への細胞浸潤、隔壁の肥厚がみられた。8 週目には隔壁の肥厚は増強し、18 週目には線維性変化の出現をみた。気管支肺胞洗浄所見では 4 週目にはマクロファージを主とする総細胞数の増加、リンパ球、好中球比率の増加をみるが、その前後では対照に比べて著変を見なかった。

PDGF-BB に対する肺線維芽細胞の遊走能は濃度依存性に増強することが認められた。放射線照射肺線維芽細胞 (照射肺線維芽細胞) と対照肺線維芽細胞の PDGF に対する遊走能を比較すると、低濃度から有意差をもって照

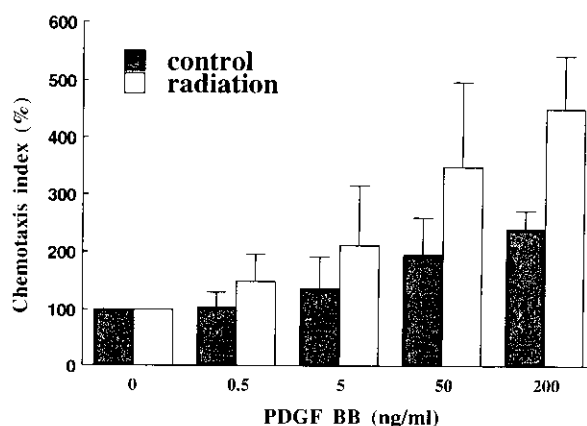


図 1 肺線維芽細胞の PDGF に対する遊走能
radiation: 放射線照射肺線維芽細胞, control: 対照肺線維芽細胞

射肺線維芽細胞において強い走化性がみられた[図1]。一方、PDGF-AA に対する遊走能には両群で差は見られなかった。

非標識 PDGF と、 $[^{125}\text{I}]$ 標識 PDGF を用いて線維芽細胞のレセプターに対する競合的結合反応を検討した。非結合 PDGF の割合が増加すると、PDGF-BB の場合は $[^{125}\text{I}]$ 標識 PDGF-BB の結合抑制がみられたが、PDGF-AA では結合に関して変化がみられなかった[図2]。この結果は

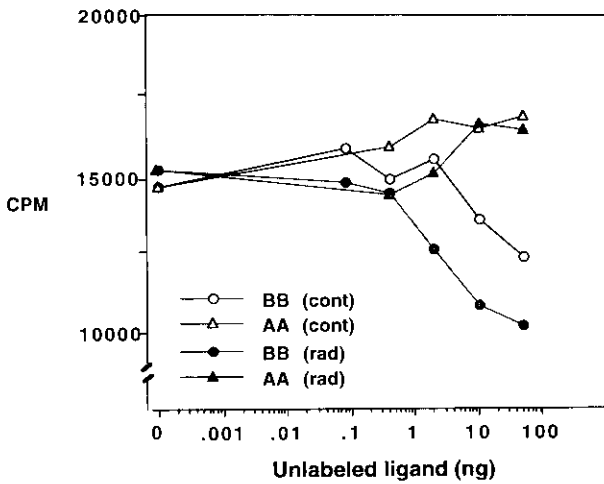
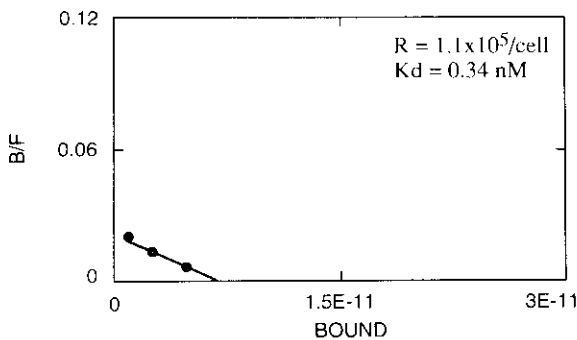


図2 $[^{125}\text{I}]$ 標識 PDGF-BB と非標識 PDGF との競合反応
cont: 対照肺線維芽細胞, rad: 放射線照射肺線維芽細胞

A. control



B. radiation

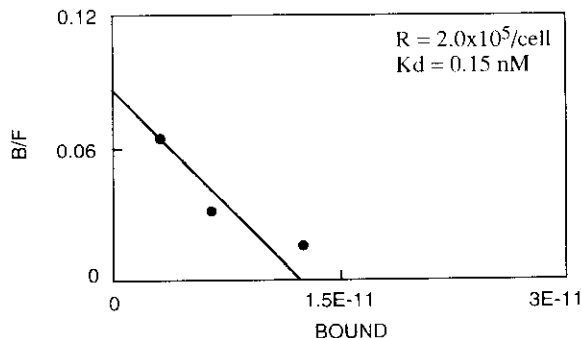


図3 PDGF レセプターアッセイ
control: 対照肺線維芽細胞, radiation: 放射線照射肺線維芽細胞

対照群と照射群の両群で同じような傾向を示した。肺線維芽細胞表面の PDGF-R β 発現をフローサイトメトリー法で検討すると、有意ではなかったが照射肺線維芽細胞で対照に比較し軽度増強していた。

肺線維芽細胞表面上の PDGF レセプターの解析を $[^{125}\text{I}]$ 標識 PDGF-BB を用いたレセプターアッセイで検討すると、照射肺線維芽細胞で単位細胞あたり対照肺線維芽細胞の約2倍存在していることが判明した(対照群: $R=1.1 \times 10^5/\text{cell}$, 照射群: $R=2.0 \times 10^5/\text{cell}$)。また、同時にその親和性も照射肺線維芽細胞で亢進していた[図3]。

考察・結論

線維化の病態と PDGF の関連については多くの研究がなされている。長岡らは肺線維症患者の肺胞マクロファージは PDGF 産生能が増強していることを示している⁸⁾。また、PDGF の遺伝子導入により動物肺に間質性肺炎/肺線維症を発症することが証明されている⁹⁾。これらの報告は PDGF が肺線維化の過程においては重要な役割を演じていることを示唆している。PDGF は細胞表面のレセプターを介して作用するため、PDGF の役割を考える上では、そのレセプター発現の変化についての検討も重要である。実際、ある病態下で PDGF-R 発現が増強されることが知られており、アスベスト肺では、PDGF-R α の発現が増強することが報告されている¹¹⁾。また、*in vitro* の実験においても、ある種の刺激により線維芽細胞表面の PDGF-R 発現の増強が引き起こされるとの報告もある¹²⁾。この点に着目し、本研究では放射線肺臓炎の病変局所から肺線維芽細胞を採取し細胞表面の PDGF レセプター発現について対照肺線維芽細胞と比較検討した。一般にラット肺線維芽細胞は主に PDGF-R β を有することが知られている¹¹⁾。PDGF に対する遊走は照射肺線維芽細胞で対照に比し増強していた。さらに、レセプターアッセイによる検討から放射線肺臓炎の線維芽細胞は対照に比較し表面の PDGF-R 数の増加、及びその親和性の増強が認められた。また、標識及び非標識 PDGF の競合反応から PDGF-R β の発現増強が示唆された。以上のことより、線維芽細胞表面の PDGF-R β 発現の変化が放射線肺臓炎の発症の一因となる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) E. Cameron and R. Crystal, Radiation-induced lung injury. In Crystal RG, West JB, Weibel ER, Barnes PJ, eds, The Lung 2nd ed. Lippincot-Raven Publishers, New York. 1997: 2647-2651.
- 2) Bonner JC, Osornio-Vargas AR, Badgett A, Brody AR. Differential proliferation of rat lung fibroblasts induced by

- the platelet-derived growth factor-AA, -AB, and -BB isoforms secreted by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 539-547, 1991.
- 3) Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46: 155-69, 1990.
 - 4) Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Badgett A, Brody AR. Rat alveolar macrophage-derived platelet-derived growth factor is chemotactic for rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3: 595-602, 1990.
 - 5) Hart CE, Forstrom JW, Kelly JD, Scifert RA, Smith RA, Ross R, Murray MJ, Bowen-Pope DF. Two classes of PDGF receptor recognized different isoforms of PDGF. *Science* 240: 1529-31, 1988.
 - 6) Phan H, Varani J, Smith D. Rat lung fibroblast collagen metabolism in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 76: 241-247, 1985.
 - 7) Ward HE, Kemsley L, Davis L, Holecek M, Berend N. The pulmonary response to sublethal thoracic irradiation in the rat. *Radiat Res* 136: 15-21, 1993.
 - 8) Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG. Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 85: 2023-27, 1990.
 - 9) Yoshida M, Sakuma J, Hayashi S, Abe K, Saito I, Harada S, Sakatani M, Yamamoto S, Matsumoto N, Kaneda Y, Kishimoto T. A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor beta 1, or platelet-derived growth factor B gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 10: 9570-4, 1995.
 - 10) Lasky JA, Tonthat B, Liu J-Y, Fredman M, Brody AR. Upregulation of the PDGF-alpha receptor precedes asbestos-induced lung fibrosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1652-57, 1998.
 - 11) Bonner JC, Goodell AL, Coin GP, Brody R. Chrysotile asbestos upregulates gene expression and production of α receptors for platelet-derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts. *J Clin Invest* 92: 425-430, 1993.

特発性間質性肺炎における TT ウイルス (TTV) の関与

坂東 政司 大野 彰二 杉山幸比古*

近年本邦において、原因不明の輸血後肝炎患者から分離・同定された TTV は非 A-G 型肝炎以外にもリウマチ (RA) 因子陰性の RA における病態関与が示唆されている。また、特発性間質性肺炎 (IIP) はその病因として粉塵吸入や自己免疫とともにウイルス感染の関与が考えられているが、詳細は依然不明である。

今回、IIP の病態における TTV の関与について、当科で経験した IIP33 例の血清を用い、PCR 法により TTV DNA を測定し、12 例 (36.4%) で陽性であった。TTV 陽性 IIP 例の血清 LDH 値は陰性例と比べ有意に高値を示し、陽性例の 3 年生存率は 58.3% で陰性例 (95.2%) と比べ予後不良であった。

以上より、TTV 感染は IIP の活動性や予後に関与している可能性が示唆された。

THE DETECTION OF AN UNENVELOPED DNA VIRUS (TTV) ASSOCIATED WITH NON-A TO G HEPATITIS IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC INTERSTITIAL PNEUMONIA.

Masashi Bando, Shoji Ohno, Yukihiko Sugiyama

Department of Pulmonary Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

Idiopathic interstitial pneumonia (IIP) is a clinical syndrome in which the precipitating factors are unclear. An association between the Epstein-Barr virus (EBV) or the hepatitis C virus (HCV) and IIP had previously been suggested using serology and immunohistochemistry. Recently, an unenveloped, single-stranded DNA virus (TTV) was discovered in Japan in association with post-transfusion hepatitis of non-A to G etiology. This study sought to confirm the presence of TTV DNA that was determined by a semi-nested polymerase chain reaction in patients with IIP. Thirty-three patients with IIP were studied for TTV DNA. TTV DNA in serum was detected in 12 (36.4%) patients with IIP and double-stranded TTV DNA was detected in lung specimen from one IIP patient with TTV in serum. We compared various features between the IIP patients with TTV DNA and the remaining patients who were without detectable TTV DNA in serum. The serum levels of LDH in IIP patients with TTV (802 ± 121 IU/L) were significantly higher than those without TTV (530 ± 49.3 IU/L). In addition, survival status was ascertained for 33 patients in each group. In the TTV DNA positive group, six patients (50%) died during the study period compared with 6 (28.5%) in the TTV DNA negative group. Three- and four-year-survival rates were also significantly greater in the TTV negative group compared with those diagnosed as having TTV DNA positive. Those results indicate that TTV might play an important role in the activity or prognosis of IIP.

はじめに

特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia :IIP) は肺の間質を病変の主座とし、胞隔炎から肺構築の改変と線維化をきたし蜂巣肺にいたる原因不明のびまん性間質性肺炎・肺線維症である。IIP の病因については粉塵吸入、自己免疫、ウイルス感染などが考えられており、ウイルス感染ではこれまでに C 型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、EB ウイルスなどが注目されているが¹⁾、依然その発症への関与についての一定の見解は得られていない。また、IIP の予後は 5 年生存率が 40-50% 程度と不良であり、その死因は急性増悪を含む慢性呼吸不全の悪化や肺癌、呼吸器感染症などの合併症などが主たるものであるが、急性増悪時にはウイルス感染症に類似した感冒様症状が先行し、急速に呼吸不全が進行することが多い。

一方、1997 年本邦において輸血後肝炎患者から新たに TTV ウイルス (TTV) が分離・同定された²⁾。TTV は環状一本鎖 DNA を有し、核酸配列の差異により多くの遺伝子型が発見されており、遺伝子型の違いにより宿主に対する感染に大きな違いがみられることがわかってきている³⁾。最近では、肝疾患のみならずリウマチ因子陰性の慢性関節リウマチにおける病態関与を示唆する報告もみられる⁴⁾。

そこで今回著者らは、IIP 症例における TTV DNA の陽性率を測定し、その発症、活動性、急性増悪および予後への関与について検討した。

対象と方法

1994 年から 1999 年に当科に入院した IIP 症例のうち血清を保存していた 33 例 (男性 20 例、女性 13 例、平均年齢 65.3 歳) を対象とした。対象 33 例は、胸腔鏡下肺生検などにより組織学的診断が得られた 20 例および厚生省特定疾患「間質性肺疾患」調査研究班による診断基準で臨床的に IIP と診断でき、CT 画像上蜂窩肺を認めた 13 例である。TTV DNA の測定は岡本らが作製した N22 プライマーを用いた semi-nested PCR 法⁵⁾ により行った。また、血清 TTV DNA が陽性で、同時期の胸腔鏡下に採取した検体を凍結保存していた 1 例については、組織中 DNA を抽出し、増殖型の 2 本鎖 DNA の検出も試みた。さらに TTV 陽性 IIP 群と陰性 IIP 群の 2 群に分けてその活動性や臨床経過、予後などの臨床的特徴の差異についても比較検討を行った。

自治医科大学呼吸器内科

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

結 果

(1) IIP における血清 TTV DNA および肺組織中増殖型 2 本鎖 TTV DNA の検出 (表 1)

HP33 例のうち、TTV DNA が陽性であったのは 12 例 (36.4%) であった。この 12 例のうち 4 例で複数の遺伝子型の TTV 感染を認め、遺伝子型では 1 型 (1a, 1b) が最も多く、12 例中 9 例 (75%) でその感染を認めた。その他に 2 ~ 4 型 TTV の感染も認められた。検出された TTV DNA タイターは $10 \sim 10^4$ /ml のタイターを示した。また、胸腔鏡下肺生検凍結検体の組織中に増殖型 2 本鎖 TTV DNA の存在を認めた。

遺伝子型	n	titer	n
1 1a	5	1+	5
1 1b	4	2+	4
2	3	3+	2
3	2	4+	1
4	3		
5	0		
total	17	total	12 (n+ : 10^n /mL)

表 1 検出 TTV DNA の遺伝子型およびタイター

(2) TTV 陽性 IIP 症例と TTV 陰性 IIP 症例における臨床像の比較

1) 患者背景 (表 2) : 両群間において平均年齢に差を認めなかったが、性差がみられ、TTV 陽性 IIP 12 例中 2 例を除き全例が男性であり、一方、TTV 陰性 IIP 21 例で

	TTV (+)	TTV (-)
Patients n	12	21
Age yrs	64.3 ± 12.2	65.8 ± 8.7
Sex F/M	2/10	11/10
Smoking history n	8	11
Duration months	54.3 ± 19.0	33.9 ± 5.5
粉塵吸入歴	4	5
輸血歴	1	1
HBs-Ag	0	1
HCV-Ab	0	4
RA	2	4
ANF	6	12
診断方法		
TSO	4	12
TBLB	2	2
画像	6	7

表 2 TTV 陽性 IIP 群と陰性 IIP 群における患者背景

は男性10例、女性11例であった。その他、患者背景として喫煙歴、粉塵吸入歴、輸血歴、自己抗体の発現などには両群間で差を認めなかった。また、IIP発症からの罹病期間はTTV陽性群(54.3 ± 19.0ヶ月)がTTV陰性群(33.9 ± 5.5ヶ月)より長い傾向にあった。

2) 検査所見(表3): TTV陽性群では血清LDHが有意に上昇しており、また肺機能検査における肺活量の有意な低下を認めた。またTTV陽性群でCRPの上昇および肺機能検査における拡散能、動脈血ガス分析におけるPaO₂の低下傾向を認めた。

	TTV(+)	TTV(-)
n	12	21
KL-6	2777 ± 818	1746 ± 215
LDH**	802 ± 121	530 ± 49.3
CRP*	6.4 ± 2.5	2.7 ± 1.1
GOT	64.4 ± 34.3	32.9 ± 4.5
GPT	42.8 ± 17.4	22.6 ± 3.7
γ-GTP	45.6 ± 7.8	40.3 ± 7.1
ALP	207.8 ± 15.3	216.8 ± 16.9
<PFT>		
VC	1.85 ± 0.16	2.26 ± 0.21
%VC**	60.7 ± 5.6	79.3 ± 4.6
%DLco/VA*	62.4 ± 8.9	84.0 ± 10.8
<BGA>		
PaO ₂ (Torr)*	63.5 ± 2.8	71.4 ± 3.0

* p < 0.1, ** p < 0.05

表3 TTV陽性IIP群と陰性IIP群における検査所見

3) 予後(表4, 5): Kaplan-Mier生存曲線では両群間に有意差は認めなかったが、TTV陽性群では12例中6例(50%)が観察期間中に死亡した。またTTV陰性群(確定診断後平均66.7ヶ月)と比べ、早期(平均28.5ヶ月)に死亡する症例が目立ち、3年および4年生存率はTTV陽性群で有意に低かった(3年生存率TTV陽性群58.3%、TTV陰性群95.2%)。

考案・結論

IIPは原因不明の間質性肺炎の総称であり、診断のみならず治療面においても多くの未解決の問題を残している疾患群である。これまでにその病因として自己免疫、粉塵吸入、加齢、遺伝的素因などとともにウイルス感染の関与が考えられている。IIPとウイルスとの関連性については、1944年Hammanらにより初めて指摘され⁷⁾、その

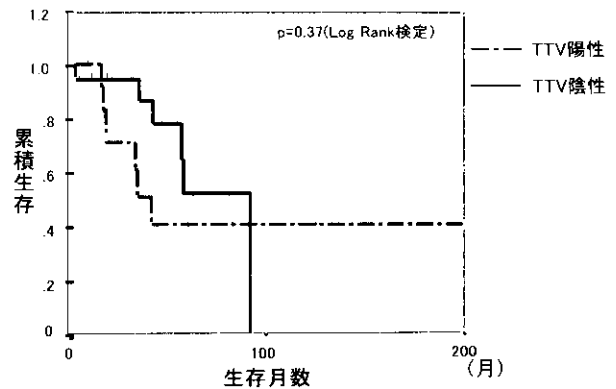


表4 TTV陽性IIP群と陰性IIP群における生存曲線

	TTV(+)	TTV(-)
HOT施行	7 (58.3%)	6 (28.5%)
予後		
死亡	6 (50%)	6 (28.5%)
急性増悪	8 (66.7%)	7 (33.3%)
生存率(%)		
3年*	58.3	95.2
4年**	50	85.7
5年***	50	76.2
生存期間中央値(月)	42.0	92.0

*p < 0.02, ** p < 0.05, *** N.S.

表5 TTV陽性IIP群と陰性IIP群における臨床経過・予後

後も病理組織学検討により封入体の存在が認められたことなどからその可能性を示唆する報告がいくつか発表された¹⁾。近年ではpolymerase chain reaction (PCR)やin situ hybridizationなどの解析方法を用い、EBウイルス、サイトメガロウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルスI型などが肺胞上皮細胞やリンパ球などに局在し、間質性肺炎の発症、進展(線維化)に何らかの役割を担っている可能性を示唆する報告が散見される¹⁻³⁾。

TTVは1997年本邦において、輸血後肝炎患者から新たに分離・同定された環状1本鎖DNAウイルスで、最近では肝炎患のみならずリウマチ因子陰性の慢性関節リウマチにおける病態関与を示唆する報告もみられる⁴⁾。

そこで今回著者らは、このTTVがIIPの発症や進展に関与する可能性を知る目的で、当科に入院した慢性型IIP 33例のTTV DNAを測定し、その陽性率は36.4% (12/33例)で、男性に多く認められた。さらに血清中のTTV DNA

が陽性であった 1 例で胸腔鏡下に採取された凍結組織から DNA を抽出し、増殖型 2 本鎖 TTV DNA の存在についても検討を行い、2 本鎖 DNA が検出された。これまでの検討では TTV は肝臓において増殖型の 2 本鎖 TTV DNA が検出され、また胆汁中において血清の 10-100 倍のタイターが検出されることから、肝臓で増殖し、循環血液中及び胆道系に流出し、腸管へ排出されるものと考えられている^{8,9)}。また、糞便や唾液中からの TTV DNA が検出されることより、A 型や E 型肝炎と同様に糞口感染や経気道感染の可能性も想定されている¹⁰⁾。本検討は増殖型 2 本鎖 TTV DNA が気管支・肺胞領域の組織中においても存在することを初めて証明したものであり、IIP をはじめとする呼吸器疾患への関与の可能性を示唆するものである。

本研究では、IIP における TTV の陽性率および局在を検討するとともに、TTV 陽性 IIP 群 12 例と陰性 IIP 群 21 例について、その臨床像の違いについても検討した。その中で注目すべき点として、まず第一に TTV 陽性 IIP 群と陰性 IIP 群における活動性に差異がみられ、TTV 陽性群で LDH の有意な上昇、CRP の上昇傾向、肺機能検査での %VC や %DLco の低下、動脈血ガス分析での PaO₂ の低下を認めた。IIP はその臨床経過により急性型および今回対象とした慢性型の 2 つの病型に分類されるが、いずれの病型においてもその活動性を客観的かつ迅速に評価することが重要であり、今日では⁹⁹Ga シンチグラフィや気管支肺胞洗浄、呼吸機能検査および CRP、LDH、KL-6、SP-A、D などの血清マーカーなどを用い総合的に評価しているのが現状である^{11,12)}。本研究では、TTV 陽性 IIP 群で疾患活動性が高いものと考えられ、TTV 感染が IIP における胞隔炎および線維化に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

また、注目すべき第 2 点として臨床経過の違いが挙げられる。生存曲線では両群間に有意差は認めなかったが、TTV 陽性 IIP 症例の 3 年、4 年生存率は有意に低く、また 12 例中 8 例で急性増悪を認め、その中の 6 例 (50%) が診断後平均 28.5 ケ月と早期に死亡していた。また、経過中に 7 例 (58.3%) で呼吸不全の進行による在宅酸素療法が導入されていた。一方、TTV 陰性 IIP 群でも死亡例を 6 例 (28.6%) 認めたが、平均 66.7 ケ月後に死亡しており、また在宅酸素療法も 28% に施行されたのみであった。IIP の死因としては、呼吸不全の増悪、心不全の進行、肺癌の合併などが挙げられるが、中でも急性増悪による呼吸不全はステロイド・パルス療法などの治療に抵抗性であり、致死率が高い。これまでにステロイド薬の減量や気道感染が急性増悪の誘因に挙げられているが¹³⁾、急性増悪前後の気管支肺胞洗浄液や胸腔鏡下あるいは開胸肺生検組織を用いた多方面からの検討がなされているものの、その病態はいまだ不明である。本検討では、TTV 陽

性 IIP 群で早期に急性増悪をきたし、死亡に至る症例が多かったことより、TTV 感染が IIP の活動性に影響を与えるとともに、急性増悪による予後の悪化にも何らかの関与をしている可能性を示唆するものと考えられる。

今回の検討では、IIP 症例において検出された TTV の遺伝子型は 1～4 型に分布しており、中でも 1 型が 9 例 (75%) で検出された。また、4 例で複数の遺伝子型が検出され、タイターでは 10～10²/ml の低いタイターを示すものが多かった。これまでの検討により^{5,10)}、TTV には数多くの遺伝子型が認められ、N22 領域の 222-231 塩基長の配列の比較解析により分類されており、現時点ではこの N22 領域の塩基配列が互いに 30% 以上異なることを基準として 16 種類の遺伝子型に分類されている¹⁴⁾。今回の検討では、N22 領域の特に 1 型と 2 型の保存性の高いプライマー (N22) を用いて PCR を行っており、1 型や 2 型を主体として 1～6 型までの遺伝子型に属する TTV を特異的に検出することが可能であった。肝障害においては 1 型を主体とした特定の遺伝子型の TTV 感染との関連性が示唆されているが¹¹⁾、本検討では IIP の活動性や予後と TTV DNA の遺伝子型やタイターとの明らかな関連は認められなかった。

今後、検討すべき課題としては IIP と特定の遺伝子型との関連性について、症例数を増やし検討するとともに、TTV の感染経路の解明、肺組織での局在についても検討を進める必要があるものと思われる。

参考文献

- 1) Egan JJ, Woodcock AA, Stewart JP: Viruses and idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 10: 1433-1437, 1997.
- 2) Ueda T, Ohta K, Suzuki N: Idiopathic pulmonary fibrosis and high prevalence of serum antibodies to hepatitis C virus. *Am Rev Respir Dis* 146: 266-268, 1992.
- 3) 山田和人: 特発性間質性肺炎と Epstein-Barr virus の関連性についての検討. *炎症* 20:51-55, 2000.
- 4) Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa Y, Miyakawa Y, Mayumi M: A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 92-97, 1997.
- 5) Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikada H, Iizuka H, Miyakawa Y, ayumi M: Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepato Res* 10: 1-16, 1998.
- 6) Hirata D, Kaneko N, Iwamoto M, Yoshio T, Okazaki H, Mimori A, Masuyama J, Minota S: Infection with an

- unenveloped DNA virus (TTV) associated with non-A to G hepatitis in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheum* 37: 1361-1362, 1998.
- 7) Hamman L, Rich AR: Acute diffuse interstitial fibrosis of the lung. *Bull Johns Hopkins Hosp* 74: 177-212, 1944.
- 8) Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M: Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 56: 128-132, 1998.
- 9) Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y, Mayumi M: Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis* 179: 1245-1248, 1999.
- 10) 岡本宏明, 真弓 忠: 肝炎ウイルス研究の展開. *内科* 84: 204-212, 1999.
- 11) 本間行彦, 斎木茂樹, 土井 修: 特発性間質性肺炎 (HPP) の臨床診断基準—第3次改訂案. 厚生省特定疾患「びまん性肺疾患」調査研究班平成3年度研究報告書 20-22, 1992.
- 12) 北村 諭, 坂東政司, 小林 淳, 石井芳樹: 特発性間質性肺炎急性増悪例に対するステロイドパルス療法施行前後における血清 KL-6 値の経時的変動について. 厚生省特定疾患「びまん性肺疾患」調査研究班平成10年度研究報告書 46-49, 1998.
- 13) 中田絃一郎: 特発性間質性肺炎の経過・予後. 間質性肺炎研究会編, 特発性間質性肺炎とその周辺. 東京医学社, 東京, 153, 1995.
- 14) Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M: Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 259: 428-436, 1999.

早期肺線維化病変における血管新生の病態への影響

海老名雅仁 清水川 稔 木村雄一郎 秋山 健一
中村 晃 三木 誠 貫和 敏博*

我々は先に特発性間質性肺炎患者の胸腔鏡下生検肺を用いて、肺胞壁内の血管密度が線維化早期には著しく増大するものの高度な線維化病変では正常肺よりも減少するという二相性の再構築を示すことを報告した(1998年びまん性肺疾患研究報告書, pp.84-88, 2000)。本研究はさらに、初期病変において増加する肺胞毛細血管内皮細胞が肺線維症の病態へどのような影響をおよぼしているかを、(1)初期病変の肺胞毛細血管内皮細胞が高産生するアンジオテンシン変換酵素(ACE)の影響、および(2)血管新生抑制剤 TNP-470 の肺線維症に与える影響の2点から、ブレオマイシン(BLM)障害マウス肺を用いて検証した。ACEによって変換される angiotensin II(AII)は AII 型受容体を介して細胞外基質を増殖させたり bFGF, TGF- β , PDGF 等の増殖因子を増加させる作用が報告されているが、AII 型受容体拮抗薬(losartan, 20mg/kg/day)を持続皮下注入した BLM 投与後 28 日目の肺内 hydroxyproline (HOP) 含有率は、losartan 非投与群に比し、有意に低下した ($p=0.014$)。この結果から肺線維化早期に出現する新生血管が産生する ACE が AII を介して肺の線維化を促進する可能性が考えられた。一方 TNP-470 (30mg/kg) を 1 日おきに 4 回皮下投与し、投与時期を BLM 投与後第 5-11 日、第 11-17 日、第 19-25 日の 3 群に分けて TNP-470 非投与群との肺内 HOP 含有量を比較してみると、血管新生が最も生じる第 11-17 日に TNP-470 を投与した群 ($n=7$) で TNP-470 非投与群より HOP 産生が有意に増加した ($p=0.0092$)。また、BLM 投与後 9 日目の肺胞壁内毛細血管が拡張・増殖しつつ胸膜直下の線維化が増強しているのに対し、TNP-470 投与群では肺胞毛細血管の拡張・増殖はみられず、肺動脈末梢 precapillary 領域の血管内径が拡張し、かつ肺内線維化が進行していることから、肺胞毛細血管の早期病変での増加は線維化を胸膜直下に局限させている可能性も考えられた。これらの結果は早期肺線維化病変における血管新生の病態への影響が一元的なものではないことを示唆する。

Pathogenic effects of angiogenesis on fibroproliferation of pulmonary fibrosis

Masahito Ebina, Minoru Shimizukawa, Yuichiro Kimura, Ken-ichi Akiyama
Akira Nakamura, Makoto Miki, Toshihiro Nukiwa

Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

We previously reported biphasic remodeling of alveolar capillaries in the biopsied lungs of the patients with idiopathic pulmonary fibrosis. That is, vascular density in the alveolar septae was significantly higher at low grades of fibrosis than that of control lungs, though alveolar capillaries were rarely distributed in the extensively fibrous lesions. We evaluated in this study (1) the effect of angiotensin II (AII), produced by angiotensin converting enzyme augmentedly expressed in the increased capillary endothelial cells, and (2) the effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on fibroproliferation of bleomycin-treated mouse lung with extended fibrous lesions localized in the subpleural area. The continuous subcutaneous injection of AII type 1 receptor antagonist (losartan, 20 mg/kg/day) reduced the hydroxyproline content ($p=0.0140$) in the lungs. The subcutaneous administration of TNP-470 (30 mg/kg), on the contrary, increased the contents of hydroxyproline ($p=0.0092$) with diffuse distribution of fibrous lesions in the lung. These results suggested the tortuous involvement of angiogenesis in the early pathogenesis of pulmonary fibrosis.

はじめに

肺線維症における血管病態は長い間不明確に残されていたが、私達は特発性肺線維症の胸腔鏡下生検肺を対象として、肺線維症における肺胞毛細血管が二相性に再構築されることを我々は示したり、すなわち、肺胞壁の線維化がほとんどないような早期病変周囲には、血管増殖因子である VEGF, IL-8 が再生した肺胞上皮細胞、細気管支上皮細胞、および肺胞マクロファージなどの炎症細胞に著しく増加し、肺胞壁中にしめる毛細血管は2重3重になって走行し、その血管密度(面積比)は正常肺と比べても有意に増加していることから血管新生が生じていることが示されている。一方、これらの増加した毛細血管床も肺の線維化が進むにつれて次第に減少し、線維化が高度に進んだ病変部においてはむしろ正常肺におけるよりも低い血管密度で分布する¹⁾。

本研究は、この線維化早期に増殖する肺胞毛細血管床が肺の線維化にどのような影響を来しているのか、実験動物をもちいた疾患モデルを用いて検証することを目的としている。

まず最初に、特発性肺線維症患者の生検肺の早期病変において増殖している血管内皮細胞に ACE 産生がたかまっていることに注目し、ACE を介して変換された angiotensin II (AII) の、肺線維症の線維化病変の進行に関与している可能性を予測した。AII はよく知られているの血圧調節作用の他に、やはり angiotensin II type 1 receptor (ATRI) を介して、細胞外基質を増殖させたり bFGF, TGF- β , PDGF 等の増殖因子を増加させる作用が報告されている²⁾。われわれは、肺線維症の疾患モデルであるマウス BLM 肺に対して、ATRI 拮抗剤である losartan を投与することによって肺線維化抑制効果を検討した。次に、血管新生を抑制する TNP-470³⁾ を投与することでどのような病態変化が肺に生じるのかを、おなじ肺線維症モデルを用いて病理形態と線維化の程度を評価し、血管新生の線維化病態に与える影響を考察した。

対象と方法

対象：肺線維症実験モデルとしては C57BL/6 マウス (雌、10-12 週齢) の腹腔内に 0.75mg/body の BLM を 4 回隔日投与し (第 0, 2, 4, 6 日)、その第 28 日目の肺内の線維化を評価した。線維化の評価法としてはヒドロキシプロリンの定量と病理学的変化を用いた。

ロサルタン投与：10mg/kg/day, および 20mg/kg/day のロサルタンを、背側の皮下に埋め込んだ浸透圧ミニボ

ンプ (alza Corp., Palo Alto, CA) を通して、BLM を投与開始する 3 日前から 28 日間の持続皮下投与を行った。ロサルタンを溶解していない生食のみ含んだ浸透圧ミニポンプも BLM 投与群、非投与群に埋め込み、それぞれロサルタンの線維化抑制効果の判定の為にコントロールとして用いた。

TNP-470 の投与：TNP-470 (30mg/kg) 投与は、BLM 投与後のマウスにたいして隔日に 4 回皮下投与した。投与時期は第 5-11 日 (早期, n=10), 第 11-17 日 (中期, n=10), 第 19-25 日 (後期, n=5) の 3 期に分け、それぞれ TNP-470 を含まない溶液 (5% arabic gum, 3% エタノール) を同様に皮下に投与したコントロール群 (各 n=5) と第 28 日目の肺の線維化病変の程度を比較した。また、TNP-470 の投与からの経時的な変化をみるために、新たに BLM (0.6mg/body) の腹腔内投与 (第 0, 2, 4, 6 日) した C57BL/6 マウス (雌, 10-12 週齢) に TNP-470 (30mg/kg) を第 1, 3, 5, 7 に投与した群 (n=3) の第 9 日目の肺、第 5, 7, 9, 11 日に投与した第 17 日、第 21 日のマウス (各 n=3) の肺の病理的变化をそれぞれ TNP-470 の代わりに BS を投与した群 (各 n=3) と比較した。

Hydroxyproline：第 28 日目のマウス肺は 6N の塩酸で 110℃ で 16 時間加水分解した後、液体クロマトグラフィーを用いて、乾燥肺単位重量当たりのヒドロキシプロリン量を求めた。

病理形態的評価：10%緩衝ホルマリンにて固定してパラフィン包埋した標本から 3 μ m の厚さの組織切片を薄切し、エラステイカ・マッソン染色および Elastica-Masson 染色を施し、病理的な変化を観察した。

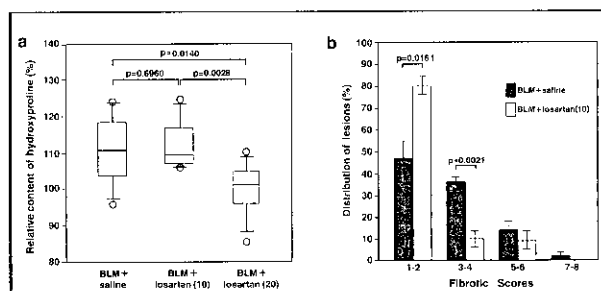


図1 マウス BLM 肺に対するロサルタンの影響：
(a) 正常コントロールに対する乾燥肺重量当たりの hydroxyproline 含有量を BLM+saline, BLM+losartan (10mg/kg/day) および BLM+losartan (20mg/kg/day) の 3 群での比較。
(b) BLM+saline 群と BLM+losartan (10) 群での病理形態的な線維化病変の分布の比較。

結果と考察

ロサルタン投与による線維化病態への影響

BLM を投与しない negative control 群 (n=6) の乾燥肺重

量あたりの HOP の平均値に対する各群の相対的な HOP 含有率を換算した。BLM 単独投与群 (BLM/saline) は $110.4 \pm 3.2\%$ であるのに対し、ロサルタン 10mg/kg/day 投与した群 (BLM/L10) では $112.2 \pm 2.7\%$ と有為差を認めなかったが ($p=0.696$)、ロサルタン 20mg/kg/day 投与した群 (BLM/L20) では $99.8 \pm 2.6\%$ と統計学的な有意差をもって減少をした ($p=0.0244$)、ロサルタン 10mg/kg/day 投与した群 (BLM/L10) と 20mg/kg/day 投与した群 (BLM/L20) との間でも有為な差がみられた ($p=0.0061$) (図 1a)。

BLM 単独投与群 (BLM/saline) とロサルタン 10mg/kg/day 投与した群 (BLM/L10) との間の病理的な線維化変化を評価する為に、Ashcroft score に準じて線維化の程度を 4 段階で評価し、その度数を比較した。その結果、軽度の線維化 (score 1&2) はむしろロサルタン 10mg/kg/day 投与した群で多くみられるものの、中等度の線維化 (score 3&4) は BLM 単独投与群で多く、ロサルタンは 10mg/kg/day でも線維化を軽度に行っていることが示された (図 1b)。

以上より ATRI 拮抗剤のロサルタンが BLM による肺の線維化を抑制した結果が得られたことから、AH が線維化病変の進行に関わっていることが示された。肺胞壁中の新生血管内皮細胞における ACE 産生が亢進していることから、増加する肺胞毛細血管が AH を介して線維化病変の拡がりに関与することが推察された。

TNP-460 投与による線維化病態への影響

Fumagillin analogue である TNP-470 は血管内皮細胞の増殖と遊走を選択的に阻害し、腫瘍血管形成をも強力に抑制することが知られている。TNP-470 の前期投与群 ($n=10$) は TNP-470 を第 5, 7, 9, 11 日に皮下投与された。しかし、10 匹中 4 匹は第 9 日目に死亡、第 28 日目までさらに 3 匹死亡し、残った 3 匹の肺のみ検討した。第 11, 13, 15, 17 日に TNP-470 を皮下投与された中期投与群では第 28 日目までに 10 匹中 2 匹 (20%)、第 19, 21, 23, 25 日に TNP-470 を皮下投与された後期投与群では 5 匹中 2 匹 (40%) 死亡した。TNP-470 のかわりに TNP-470 を含まない溶液を注入されたコントロール群の内、前期は 5 匹中 3 匹が (60%)、中期では 0、後期では注入前に 2 匹 (40%) 死亡し、コントロール全体としては 15 匹中 5 匹 (33.3%) 死亡した。正常肺 5 匹の乾燥肺重量あたりの HOP 含有量の平均値を 1 とし、各群の相対的な HOP 含有量を求めた。これら TNP-470 非投与群の肺乾燥重量あたりの HOP 含有量をあわせて、BLM 肺の positive control とした。

結果は BLM のみ投与した TNP-470 非投与群 ($n=9$) で $150.0 \pm 3.3\%$ であったのに対し、TNP-470 前期投与群 ($n=3$) は $143.8 \pm 6.9\%$ と差がなかった。TNP-470 中期投与群 ($n=7$) は $169.2 \pm 5.8\%$ と有意に増加した ($p=0.024$)。

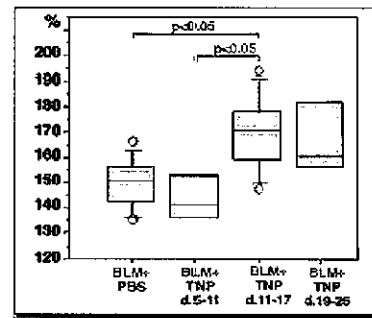


図 2 マウス BLM 肺に対する TNP-470 の影響：正常コントロールに対する乾燥肺重量あたりの hydroxyproline 含有量を BLM 投与後に TNP-470 を前期 (第 5-11 日)、中期 (第 11-17 日)、後期 (第 19-25 日) に投与した 3 群での比較。



図 3 マウス BLM 肺の第 28 日目の全体像。線維化病変が胸膜直下を中心に分布している (EM 染色)。

TNP-470 中期投与群 ($n=3$) も $167.8 \pm 10.5\%$ と増加傾向を示したが大きくばらつき、統計学的有意差はなかった ($p=0.0526$) (図 2)。その病理形態的比較をしてみると BLM 単独投与群では胸膜直下に著しい線維化病変を認めるのに対し、中期投与群では胸膜直下に加え、肺の内側の病変が目立つ (図 3)。TNP-470 の単独投与では肺内の変化は見当たらないことから、この変化は単なる TNP-470 の肺障害とは考えにくい。

TNP-470 前期投与群が 10 匹中 7 匹が死んだ原因、特に BLM と TNP-470 を投与直後に死亡していることから、BLM の投与を 0.6mg/body に減量し、その経時的な病理形態学的な変化を比較した (図 4)。第 9 日目の BLM 単独

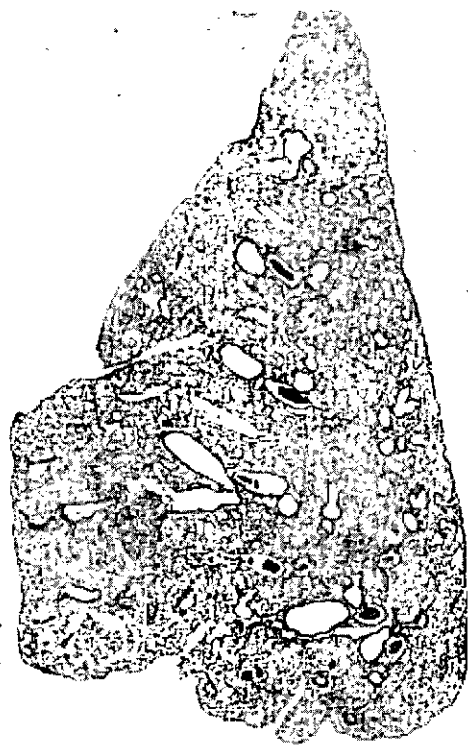


図4 TNP-470 投与を中期に投与した第28日目のマウス BLM 肺。線維化病変が胸膜直下だけではなく肺の中心領域にも拡がって分布している (EM 染色)。

投与肺は胸膜直下に細胞浸潤と線維化の早期病変がはじまっており (図5 a), 肺内の肺胞毛細血管の著しい拡張と血管床の増加傾向を認めた (図5 b)。一方 BLM と TNP-470 の投与群では、胸膜直下病変はおだやかで、肺胞毛細血管の拡張もほとんどみられない。顕著な変化としては肺動脈末梢領域の、肺毛細血管血管に到る前の precapillary region の拡張像がみられた。

以上の結果から TNP-470 が肺障害性であるというよりはむしろ、BLM による肺障害に生じる血管の拡張・増殖を angiopoietin-1 と同様に⁹⁾ TNP-470 が抑制することによって、肺動脈と肺胞毛細血管とをつなぐ前毛細管内圧が高まり、拡張し、その血管内圧の亢進が炎症反応を惹起し⁸⁾、内部の線維化を促進したことが考えられた。このメカニズムに関してはさらに詳細な検討が必要である。

結 論

- (1) マウス BLM 肺における線維化病変の進行過程には、アンジオテンシン II がその I 型受容体を介して作用していることが示された。これは、人特発性肺線維症患者の生検肺における早期病変領域に増加している肺胞毛細血管床が高産生する ACE が、線維化を促進していることを推察させる。
- (2) 新生血管抑制剤の TNP-470 は、マウス BLM 肺における線維化病変の早期過程において生じる肺胞毛細血

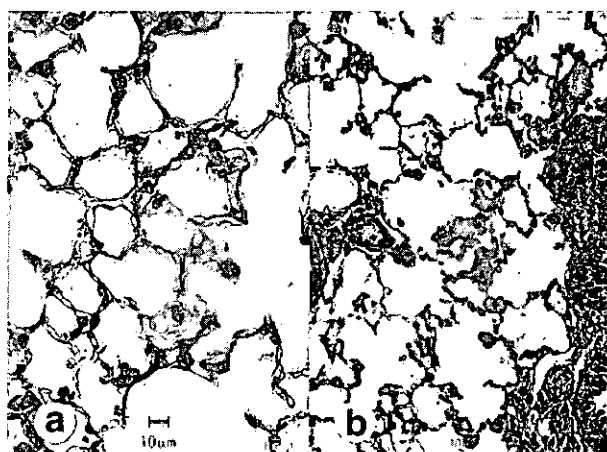


図5 第9日目のマウス BLM 肺における、TNP-470 非投与群 (a) と投与群 (b) の病理形態の変化。

- (a) TNP-470 投与を投与していない第9日目のマウス BLM 肺。肺胞毛細血管の拡張と増殖がみられる (EM 染色, X60)。
- (b) TNP-470 投与を前期に投与した第9日目のマウス BLM 肺。肺胞毛細血管の変化はほとんどみられないが、肺動脈末梢の前毛細管の著明な拡張が認められる (EM 染色, X40)。

管の拡張と増殖をさまたげる。しかし、これによって胸膜直下中心だった線維化病変の分布が肺内部を中心に拡がり、結果として線維化病変はむしろ拡大した。

- (3) 本研究の結果から、肺障害から炎症反応が生じ線維化にいたってその炎症を収斂させる過程において、肺胞毛細血管床の増加は、Ang II を介しての線維化促進作用と、線維化病変を末梢肺野領域に局在させて呼吸領域を確保する作用の両面がある可能性が推察された。
- (4) 肺線維症における肺胞毛細血管のリモデリングは線維化病態に複雑に影響しており、今後さらに詳細に検討を要する。

参考文献

- 1) 海老名雅仁, 清水川稔, 猪岡望, 阿部達也, 貫和敏博. 肺線維症における新生血管に関する研究. 1998 年度びまん性肺疾患調査研究. 84-88, 1999.
- 2) Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 68: 450-456, 1991.
- 3) Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 348: 555-557, 1990.
- 4) Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult

vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6: 460-463, 2000.
5) Kuebler WM, Ying X, Singh B, Issekutz AC,

Bhattacharya J. Pressure is proinflammatory in lung venular capillaries. *J Clin Invest* 104: 495-502, 1999.

肺線維症に与える高血糖の影響

榎本 達治 白杵 二郎 松田久仁子 青山 昭徳
高橋 卓夫 宮本 晴子 阿部 信二 吾妻安良太
工藤 翔二*

特発性間質性肺炎 (IIP) と糖尿病 (DM) の合併については、いくつかの報告がある。当院を受診した IIP 患者 104 例についてレトロスペクティブに検討した。37 例について耐糖能の評価が可能で、12 例 (32.4%) が DM と診断された。日本人 40 歳以上の健常人における DM の罹患率は 9.4% であり、IIP 患者における DM の合併率は高いものと考えられる。しかしながら、IIP と DM の因果関係は明かでない。そこで、今回我々は、Advanced glycation end products (AGEs) に注目した。IIP 患者における血清 AGE 値は高値を示した。

ブレオマイシン (BLM) 肺傷害モデルを用い、ストレプトゾトシン (STZ) 投与により DM 状態とし、組織学的変化を観察した。

方法：7 週齢の雄 ICR マウスをコントロール群 (NC)、STZ 単独投与群 (ST)、BLM 単独投与群 (BL)、BLM 投与後 STZ 投与群 (BS) の 4 群を作製した。すべて、初回処置から 8 週後に解剖し、組織所見及びハイドロキシプロリン (HOP) を用いて、線維化の程度を評価した。

結果：ST、BS 群では高血糖を示した。線維化の程度は、BS>BL>ST=NC であった。

結論：高血糖状態は肺線維化の程度に影響を与えることが示唆された。

Influence of Hyperglycemia to the Severity of Pulmonary Fibrosis

Tatsuji Enomoto, Jiro Usuki, Kuniko Matsuda, Akinori Aoyama
Takuo Takahashi, Haruko Miyamoto, Shinji Abe, Arata Azuma
Shoji Kudoh

Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

Several investigators have reported the frequent association of diabetes mellitus (DM) and idiopathic interstitial pneumonia (IIP). 104 cases with IIP in our hospital were studied retrospectively. The glucose tolerance could be reviewed in 37 cases. 12 cases (32.4%) of IIP patients met the criteria for DM. As the incidence of DM is reported to be approximately 9.4% in Japan, it is suggested that IIP patients have a high prevalence of associated DM. However the correlation between IIP and DM is unclear. We focused on advanced glycation end products (AGEs). Serum AGEs level (*creatinin*) of patients with IIP was higher than that of normal volunteers.

We compared the morphological changes of bleomycin (BLM)-induced lung fibrosis in mice with or without streptozotocin (STZ)-induced DM.

Material and Methods: 7 week-old ICR mice were divided into 4 groups. NC group: control, ST group: STZ injected alone, BL group: BLM injected alone, BS group: STZ injected prior to BLM injection. These animals were sacrificed 8 weeks after the initial treatment. To evaluate the extent of lung fibrosis, we measured hydroxyproline content in the lung and graded these pathological features.

Results: Animals in both ST and BS groups showed hyperglycemia. The grade of fibrosis revealed BS>BL>ST=NC.

Conclusion: Glucose level might influence the severity of lung fibrosis.

はじめに

間質性肺炎症例において、糖尿病の合併はしばしば経験される。これまでは、本邦では NIDDM の合併は未治療の慢性型 IIP の 24%¹⁾ と海外では 9%²⁾ と報告されている。一方、松瀬らは necropsy の標本を用いて IPF や DAD 患者の線維化巣内のマクロファージに蛋白糖化反応の後期段階生成物である Advanced glycation end products (AGEs) の発現が強く見られること³⁾、糖尿病の実験モデルでは、肺における組織学的変化として、胞隔の肥厚、collagen の増生および肺胞上皮と毛細血管の基底膜の肥厚⁴⁾ が報告されている。今回臨床的に膠原病が否定された間質性肺炎における糖尿病の合併頻度を調査すると共に、高血糖の間質性肺炎への影響を AGEs に注目し、動物モデルを用いて実験的に検討を行った。

〈臨床的検討〉

対象と方法

日本医科大学第4内科に通院中ないし通院歴のある間質性肺炎患者 104 例中、ステロイド投与中でない、ないし投与歴がなくかつ耐糖能の評価が retrospective に可能なものは、37 例であった。この 37 例を対象に、日本糖尿病学会診断基準委員会の勧告をもとに朝食前空腹時血糖 126 以上、随時血糖 200 以上、OGTT にて糖尿病型と判定できるもの、および HbA1c 6.0 以上を糖尿病と診断し、調査を行った。また、保存血清のあるものに対し血清 AGEs を測定した。

結 果

37 例の内訳は男性 27 例、女性 10 例であり、このうち計 12 例、32.4% が糖尿病と診断された。このうち、すでに糖尿病の診断を受けていたものは 7 例で、残り 5 例は今回診断された。男女比は 8/4 であった。年齢、BMI には有意差は認められなかった。糖尿病合併群の HbA1c は平均 5.95 でコントロールは良好と考えられた (表 1)。

健常成人 7 例、間質性肺炎糖尿病合併群 10 例、非合併群 8 例を対象として測定した血清 AGEs の値は、血清クレアチニンとの比で、2.12, 2.44, 2.85 であり、統計学的に有意差はみなかったが、間質性肺炎群で高い傾向がみられた (図 1)。

日本医科大学第四内科

* びまん性肺疾患研究班 主任研究者

Glucose tolerance could be reviewed in 37 cases.
diabetes mellitus 12cases (32.4%)
8:UIP, 4:NSIP

	DM	Normal
M/F	8/4	19/6
Age(Ave.)	65.4	67.4
BMI(Ave.)	21.9	21.8
HbA1c	5.95	

表 1 The prevalence of diabetes mellitus in patients with idiopathic interstitial pneumonia

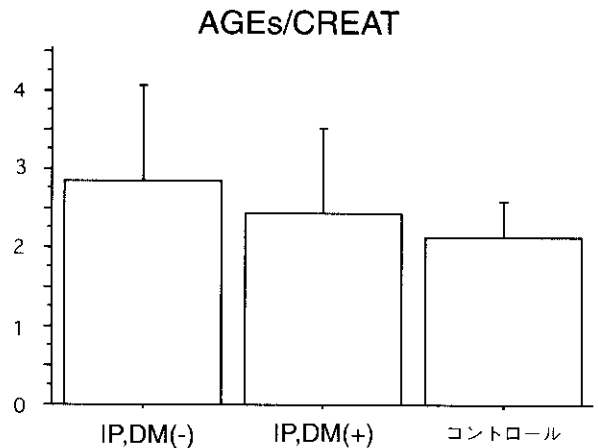


図 1 Serum AGEs level in patients with IIP
Serum AGEs level/creatinine in patients with IIP is higher than that in normal volunteers.

〈基礎的検討〉

対象と方法

6 週令の雄 ICR マウスを用い、以下の 4 群に分けた (図 2)。すなわち、day1 と 28 に生食のみを尾静脈より iv した NC 群、day1 にストレプトゾシン 150mg/kg を iv し day28 に生食を iv した ST 群、day1 に生食を iv し day28 にプレ

材料と方法

6 週令 ICR マウス (雄)

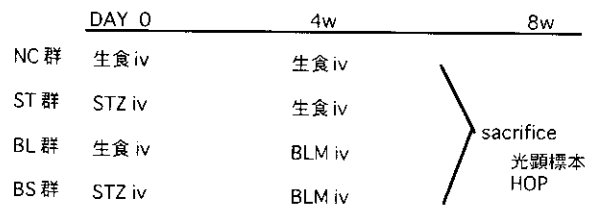


図 2 Materials and Methods
7 week-old ICR mice were divided into four groups: group ST, injected i.v. with streptozotocin (STZ) (150mg/kg) at day 1, group BL, injected i.v. with bleomycin (BLM) (100mg/kg) at day 28, group BS, injected i.v. with STZ at day 1 and BLM at day 28 group NC, injected i.v. with vehicle only at day 1 and 28. Eight weeks after the initial treatment, the animals were sacrificed.

オマイシシ 100mg/kg を iv した BL 群, day1 にストレプトゾシン 150mg/kg iv し day28 にプレオマイシシ 100mg/kg を iv した BS 群であり, すべて初回処置から 8 週後に解剖した. 右肺でハイドロキシプロリンの測定, 左肺で組織学的検索を行った.

結 果

解剖直前の血糖値は, NC 群平均 165, ST 群 461, BL 群 145, BS 群 547 でストレプトゾシン投与群で有意に高値を示した (図 3). HE 染色像では, NC 群, ST 群は, 正常所見を呈した. BL 群では, 胸膜直下を中心とする比較的小さな線維化巣が patchy にみられ, 線維化巣内には

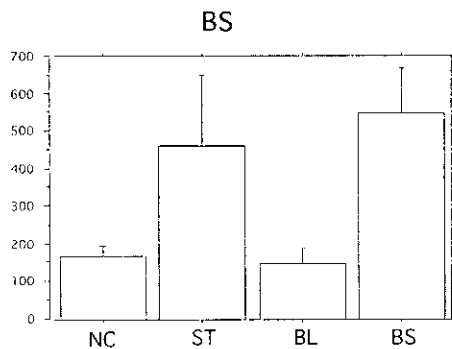


図 3 Blood sugar concentration
Blood sugar concentration was determined just prior to sacrifice. In animals treated with streptozotocin (ST and BS) blood sugar levels were significantly higher than those in animals without streptozotocin treatment (NC and BL) * P<0.05.

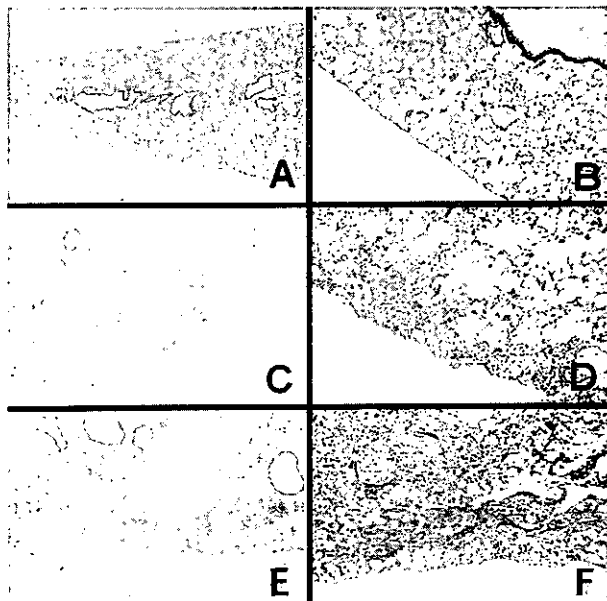


図 4 Histopathological findings
Hematoxylin and eosin (HE) staining (figure A) and Masson trichrome (MT) staining (figure B) obtained from group ST showing normal appearance. HE staining (figure C) and MT staining (figure D) obtained from group BL showing patchy fibrous change especially in subpleural areas. The fibrous lesions include mature collagen fibers and lymphocyte infiltrates. HE staining (figure E) and MT staining (figure F) obtained from group BS showing extended fibrous changes in subpleural areas. Increase of collagen fibers is obvious. The fibrous lesions also include fibroblasts, type II pneumocyte hyperplasia and lymphocyte infiltrates.

マッソン染色で青く濃染する mature な collagen fiber も含まれた. 同部にはリンパ球の浸潤も目立った. BS 群では, 胸膜直下を中心に patchy な fibrotic change がより広範にみられ, 線維化巣内の mature な collagen fiber の増生もより明らかであった. 線維化巣内には fibroblast とともに Type II cell hyperplasia, リンパ球浸潤など比較的多くの細胞がみられた (図 4).

組織学的に線維化の程度を半定量的に表す Ashcroft の Score を用い, 各群について評価を行った. ST 群では NC 群と差はなく, BL 群では有意に高く, BS 群すなわち, ストレプトゾシン投与後にプレオマイシシを投与した群では更に高い結果を得られた. ハイドロキシプロリン量においても, ST 群では NC 群と差はなく BL 群では有意に高値を示し, BS 群ではさらに高い傾向はみられた. しかし, BL 群, BS 群間に有意差は認められなかった (図 5).

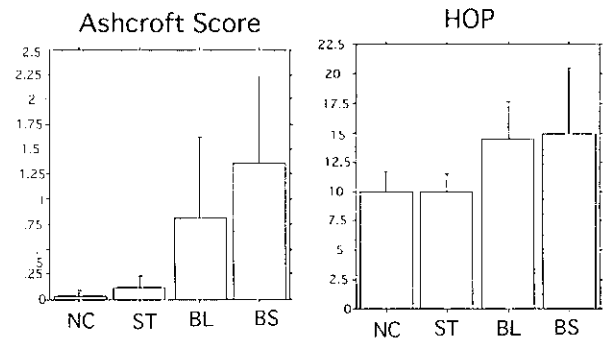


図 5 Grade of lung fibrosis
The grade of fibrosis according to the method of Ashcroft and co-workers is presented in left figure. Bleomycin-treated groups (BL and BS) demonstrate significantly higher scores. The score in group ST exhibits no significant differences compared with that in group NC. The score in group BS is significantly higher than that in group BL. Hydroxyproline content in lung is presented in right figure. The content of bleomycin-treated groups (BL and BS) is significantly higher than that of group NC and ST. The value in group BS is somewhat higher compared with that in group BL, but there is no significant difference between these two groups.

Advanced glycation endproducts (AGE) のモノクローナル抗体を用いた免疫染色では, NC 群および ST 群における AGE の分布は同様で, 肺胞マクロファージ, II 型肺胞上皮及び非線毛気道上皮細胞に強く AGE の発現が認められた. I 型肺胞上皮や血管内皮細胞はほとんど陰性であった (図 6). BL 群では AGE は, 線維化巣に陽性であり, 特にマクロファージや増生した II 型肺胞上皮細胞に強く発現し, 細胞外基質や線維芽細胞にも見られた. また, プレオマイシシ投与群では泡沫状マクロファージを線維化巣周囲に多数認め, これらの細胞も AGE 陽性であった. I 型肺胞上皮も軽度陽性を呈した. BS 群では, AGE の局在は BL 群とほぼ同様で線維化巣に陽性を示した (図 7).

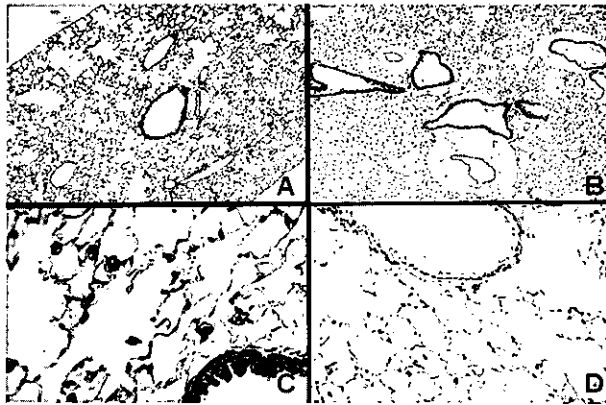


図6 AGE immunoreactivity in lung
AGE immunoperoxidase staining in lung tissues from group NC (figure A) and group ST (figure B and C) showing the similar pattern of immunoreactivity on alveolar macrophages, type II pneumocytes and non-ciliated airway epitheliums. Replacement of primary antibody with non-specific IgG1 gives no background staining (figure D). Negative control for immunoperoxidase staining the serial section (figure D) as in (figure A), in which primary antibody was replaced with non specific mouse IgG1.

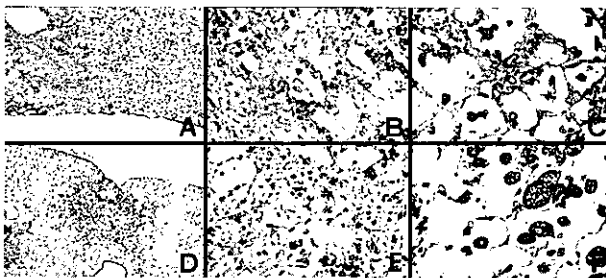


図7 AGE immunoreactivity in pulmonary fibrosis
AGE immunoperoxidase staining in lung tissues obtained from group BL (figure A, B, C) and group BS (figure D, E, F). AGE is localized in the fibrous lesions. Alveolar macrophages, type II pneumocytes, fibroblasts and extracellular matrix show positive staining for AGE. Note that foamy macrophages around fibrous lesions, which are not seen in the lung tissue from mice without bleomycin treatment are also positive.
No significant difference is observed between groups BL and BS.

考案・結論

一般に成人 NIDDM の有病率は 40 才以上の 9.4% とされている。今回の調査による間質性肺炎における合併率は 32.4% と高値であった。また、ストレプトゾシンを投与により作製した高血糖マウスでは、それだけでは肺に組織学的変化を示さなかったが、プレオマイシン投与による肺線維化は高血糖下においてより高度になる傾向を示した。

糖尿病と間質性肺炎の関係は遺伝的な要因、環境的背景さらに糖尿病に伴う生化学的な要因など様々な要因の考慮が必要である。そのうちのひとつとして、高血糖とそれに伴う生化学的变化が挙げられる。さらにそのメカニズムの一つとして糖化蛋白の影響に注目した。AGEs は、蛋白質の非酵素的糖化、メイラード反応の後期生成物の総称であり、様々な生物活性をもち、腎症、網膜症などの糖尿病性合併症や老化に伴う組織障害の発症に関与していることが知られている。

臨床的には、間質性肺炎患者において、血清 AGE が高い傾向がみられた。DM (-) 群でも AGEs は高値を示しており、今後年齢分布を一致させた、より数の多いコントロールとの比較が必要と考えられる。

高血糖モデルマウス肺における、AGE の免疫染色では、正常肺において、肺胞マクロファージ、2 型肺胞上皮細胞、非線毛上皮細胞に AGE の発現を認め、プレオマイシン肺傷害組織においては、線維化巣内および線維化巣周囲の肺胞壁、泡沫状マクロファージに AGE の発現を認めた。これまでの報告より、肺以外においても AGE を貪食したマクロファージにはサイトカインの産生をはじめ様々な生物学的活性が知られている。常にマクロファージを豊富に含む肺においては、この細胞が線維化において重要な役割を果たしていることが予測される。

今回の結果よりプレオマイシン肺傷害に対し、高血糖状態がより促進的に働き、そのメカニズムとして、AGE が関与する可能性が示唆された。AGE は加齢など高血糖以外の因子によっても修飾を受けると考えられ、今後 AGE の定量や *in vitro* における AGE 陽性のマクロファージの機能の解析、あるいは肺内での AGE のレセプターの分布について更に検討を要すると思われる。

また、前述したように糖尿病の肺線維症に対する影響は、今回提示した、高血糖に伴う AGEs の増加のみでなくインスリン抵抗状態における細胞増殖促進など様々な因子が考えられ、今後より幅広い検討が必要と考えられる。

参考文献

- 1) 須賀達夫, 杉山幸比古, 北村論: 糖尿病に合併した特発性間質性肺炎の症例検討. 日胸疾会誌 1994; 32: 1131-1135.
- 2) Sol Abramowitz, George C. Leiner, Maurice J. Small: Chronic Respiratory Diseases and Diabetes. Review of Allergy 1969; 23: 972-977
- 3) Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, Fukayama M, Nagai R, Horiuchi S, Ouchi Y: Immunohistochemical localization of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. Journal of Clinical Pathology 1998; 51: 515-519
- 4) Kida K, Utsuyama M, Takizawa T, Thurlbeck W M: Changes in Lung Morphologic Features and Elasticity Caused by Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus in Growing Rats. A rev Respir Dis 1983; 128: 125-131

びまん性肺疾患における治療研究及び遺伝子発現解析

石岡 伸一* 玉川孝太郎 渡部 哲也 前田 晃宏
檜山 桂子 山木戸道郎

本研究は、特発性間質性肺炎・肺線維症およびサルコイドーシスに代表される肉芽腫性肺疾患の病態解明および治療開発を目的とする。平成11年度は、ブレオマイシン (BLM) の腹腔内投与によるマウス肺線維症モデルを用いて、新たに開発されたレシチン化 Superoxide dismutase (PC-SOD) がその病態に及ぼす影響について検討した。その結果、治療効果を認めた PC-SOD 1 mg/kg/日投与群において、気管支肺胞洗浄 (BAL) 細胞における IL-1 β 及び PDGF-A mRNA の発現抑制が認められた。一方、治療効果が認められなかったメチルプレドニゾロン (mPSL) 投与群では、BAL 細胞における IL-1 β 及び PDGF-A mRNA の発現抑制が認められたものの PC-SOD 投与群に比べて PDGF-A mRNA レベルは有意に高かった。また、サルコイドーシスについては、発症素因としてインターフェロン γ 受容体の遺伝子変異について検討中である。

A Study on Treatment and Gene Expression in Diffuse Lung Disease

Shinichi Ishioka, Kotaro Tamagawa, Tetsuya Watanabe, Akihiro Maeda
Keiko Hiyama, Michio Yamakido

Second Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine

We investigated the effects of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) and methylprednisolone (mPSL) on bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis in mice. We previously reported that the treatments of PC-SOD but mPSL ameliorate pulmonary fibrosis induced by intraperitoneal administration of BLM. In bronchoalveolar lavage (BAL) findings, total cell number and the proportions of lymphocytes or neutrophils in PC-SOD group were significantly decreased compared with those in BLM group. The levels of Interleukin-1 beta mRNA in BAL cells on the next day after 10 days of BLM treatment were significantly decreased in both PC-SOD and mPSL groups. On the other hand, a more significant decrease of the level of platelet-derived growth factor-A in BAL cells was observed in PC-SOD group compared with that in mPSL group. Taken together, a suppression of various cytokine expression in BAL cells (mainly alveolar macrophages) may be important in the inhibitory effects of PC-SOD on BLM-induced pulmonary fibrosis in mice.