

特発性間質性肺炎患者における糖尿病合併頻度の検討

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

特発性間質性肺炎 (IIP) 患者の糖尿病 (DM) 合併頻度を調査した。IIP 患者の 33.8% に DM の合併が認められた。健常コントロールでは、12.9% に DM を認め、IIP では有意に高率に DM の合併を認めた。胸腔鏡下肺生検を施行した 8 例の Advanced glycation end products の免疫染色では、肺胞マクロファージ、線維化巣の細胞外基質に陽性を示した。IIP の病態に高血糖、特に糖化蛋白の関与が示唆された。

Increased prevalence of diabetes mellitus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis

Tatsuji Enomoto, Shoji Kudoh, Arata Azuma, Jiro Usuki,
Kuniko Matsuda, Akinori Aoyama, Haruko Miyamoto

From the 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). 84 patients with IIP in our hospital were studied retrospectively. The glucose tolerance could be reviewed in 71 cases. We compared these patients with 184 peoples who took medical health check in Omiya City clinic. 24 patients (33.8%) of IIP met the criteria for DM while 21 patients (12.9%) of control. It was appeared that IIP patients tended to be accompanying DM. However, the association between IIP and DM is still unclear. There was no differences in background of the IIP patients with or without DM.

We focused on advanced glycation end products (AGEs), the late stage products of Maillard reaction, because AGEs have been shown to play an important role in fibrotic changes in many organs including kidneys and arteries with DM. Immunoreactivity for AGEs has been demonstrated in lung tissues from patients with pulmonary fibrosis. To investigate the role of AGEs in the pathogenesis of pulmonary fibrosis, we also did immunohistochemical analysis with an anti-AGEs antibody (6D12) for the biopsy specimens from patients with IIP. AGE expression on alveolar macrophages and extracellular matrix in the fibrotic area.

In conclusion, the present study suggests that hyperglycemia and AGE may be contributing factors in the pathogenesis of IIP.

はじめに

間質性肺炎患者において、糖尿病 (DM) の合併はしばしば経験される。その合併頻度は 9 ~ 24%^{1,2)} と様々であり一定の見解がない。また、合併の機序については、高血糖状態が引き起こす、様々なサイトカインやスーパーオキシドの産生が間質性肺炎発症のトリガーとなる可能性や、間質性肺炎と糖尿病が共通の要因に起因する可能性などが推測されているが定説はない。一方、間質性肺炎やびまん性肺障害患者の necropsy 標本では、線維化巣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り、様々な生物活性を有することが知られている、advanced glycation end products (AGEs) の発現がみられることが報告されている³⁾。そこで、今回我々は、間質性肺炎発症の一つの機序として、高血糖状態に代表される糖尿病病態の関与を検索することを目的として、特発性間質性肺炎患者における糖尿病合併頻度の再検討と、生検肺を用いて AGEs の免疫染色を施行した。

対象と方法

対象は 95 年 1 月から 2000 年 12 月までに日本医科大学付属病院呼吸器内科を受診した特発性間質性肺炎 (IIP) 患者 84 例と、対照として 1999 年 8 月から 2000 年 9 月までに大宮シテークリニックに人間ドック目的に受診した胸部レントゲン上異常が認められなかった 15798 例から年齢、性別をマッチさせ無作為に抽出した 184 例とした。

調査項目は、年齢、性別、身長、体重、%VC、FEV_{1.0}%、末梢血白血球、血清 CRP、血清 LDH、空腹時血糖、HbA1c とし、さらに、IIP 患者に対しては喫煙歴、動脈血液ガス分析、RV/TLC、DLco/VA、血清 KL-6、血清 Sp-D についても調査を行った。

advanced glycation end products (AGEs) 染色を、上記のうち胸腔鏡下肺生検が施行され、IIP と診断された 6 例と、1999 年 1 月から 2000 年 12 月までに日本医科大学付属病院にて、肺癌の診断のもと肺葉切除以上が施行され、耐糖能評価が可能な 6 例の正常肺部分について行った。

糖尿病の診断は空腹時血糖 126mg/dl 以上とした。

統計学的解析には、StatView Ver. 4.5 を使い、マンホイットニー U 検定ないし χ^2 乗検定を行った。

結 果

耐糖能評価が可能なのは、IIP 群で 84 例中 71 例であった。13 例は、初診時既に、ステロイドが投与されていた、ないし管理中一度も空腹時血糖が測定されていなかった。対照群 184 例は全例耐糖能評価可能であった。

患者背景では (Table1)、年齢、性別には有意差を認めず、身長は平均 159.8 ± 10.9cm、IIP 群 156.4 ± 15.5cm、対照群 161.0 ± 8.4cm、体重は平均 59.5 ± 1.0kg、IIP 群 57.0 ± 10.2kg、対照群 60.3 ± 10.0kg で、いずれも IIP 群で低値を示したが、Body mass index (BMI) は平均 23.7 ± 9.5、IIP 群 25.0 ± 17.7、対照群 23.2 ± 2.8 で有意差を認めなかった。%VC は平均 89.3 ± 19.3%、IIP 群 74.6 ± 23.2%、対照群 94.5 ± 14.4% で IIP 群で有意に低値を示した。1 秒率に有意差は見られなかった。白血球は IIP 群 8310 ± 3294/μl、対照群 5756 ± 1617、血清 CRP は IIP 群 2.2 ± 5.3mg/dl、対照群 0.12 ± 0.18、血清 LDH は IIP 群 460 ± 163IU/l、対照群 342 ± 53 で IIP 群に有意に高値を示した。空腹時血糖は両群間に差を認めなかったが、HbA1c は平均 5.5 ± 0.8%、IIP 群 6.0 ± 1.2、対照群 5.4 ± 0.7 で IIP 群で高値を示した。

Table1 患者背景

	Total	IIP	Control
n	254	71	184
age	66±9	66±10	65.6±8.62
F/M	68/187	19/52	49/135
BH	159.8±10.9	156.4±15.5	161.0±8.4*
BW	59.5±1.0	57.0±10.2	60.3±10.0*
BMI	23.7±9.5	25.0±17.7	23.2±2.8
%VC	89.3±19.3	74.6±23.2	94.5±14.4**
FEV _{1.0} %	82.9±8.52	84.4±9.2	82.3±8.2
WBC	6440±2471	8310±3294	5756±1617**
CRP	0.6±2.7	2.2±5.3	0.12±0.18
LDH	374±109	460±163	342±53**
FBS	107±23	111±38	106±17
HbA1c	5.5±0.8	6.0±1.2	5.4±0.7**

*P<0.05 **P<0.01

糖尿病の診断は (Table2)、IIP 群で 71 例中 24 例、33.8%、対照群で 184 例中 21 例、12.9% になされ、IIP 群では有意に糖尿病の合併頻度が高かった。

IIP 患者を DM の有無に分けて、背景を比較すると (Table3)、年齢、性別、肥満度、喫煙歴、臨床病理学的にわけた組織型に差は認められなかった。呼吸機能では、FEV_{1.0}% は IIP 全体で平均 74.8 ± 23.1%、糖尿病合併群で 82.9 ± 9.33、糖尿病非合併群で 76.2 ± 19.1 であり、糖尿病非合併群で低値を示した。AaDo₂、%VC、RV/TLC、DLco/VA は有意差を認めなかった。

Table2 糖尿病合併頻度

	DM(+)	DM(-)	Total
IIP	24 (33.8%)	47	71
Control	21 (12.9%)	163	184

P<0.01

Table3 DM 合併 IIP の特徴

	IIP全体	IIP、DM (+)	IIP、DM(-)
age	66±9	66±10	66±8
F/M	19/52	6/18	13/34
BMI	25.0±17.7	23.8±3.5	25.6±21.5
Brinkman index	709±653	880±749	623±591
UIP/NSIP/DIP	52/18/1	17/6/1	35/12/1
AaDO2	28.8±16.9	32.4±17.9	27.3±16.4
%VC	74.8±23.1	76.2±19.1	74.1±25.2
FEV1.0%	84.4±9.2	87.1±8.4	82.9±9.33*
RV/TLC	40.0±9.2	37.3±12.7	41.2±17.6
DLco/VA	3.56±1.19	4.04±0.77	3.31±1.31
WBC	8310±3294	9069±4837	7922±2088
CRP	2.2±5.3	2.2±3.3	2.5±6.2
LDH	460±163	497±180	440±151
KL-6	1256±935	1309±745	1214±1080
SP-D	301±232	338±295	258±125
FBS	111±38	145±49	94.1±9.9**
HbA1c	6.0±1.2	6.5±1.4	5.4±0.5**

*:P<0.05 **:P<0.01

糖尿病合併の有無では LDH, KL-6, Sp-D, AaDo2 を含め各種血液データにも差は認められず, FBS は IIP 全体で 111 ± 38mg/dl, 糖尿病合併群で 145 ± 49, 糖尿病非合併群で 94.1 ± 9.9, HbA1c は IIP 全体で 6.0 ± 1.2% 糖尿病合併群で 6.5 ± 1.4, 糖尿病非合併群で 5.4 ± 0.5 であり, 糖尿病合併群でいずれも高値を示した。

胸腔鏡下肺生検が施行された IIP 群の AGE の免疫組織染色では, 蜂巢肺部分の dense な線維化に一致して, AGE の陽性所見を認めた (fig. 1a). 古い線維化巣に接した幼若な線維化巣では, luminal face を覆う type II cell や fibroblast に強い陽性所見を認めた. 細胞外基質は陰性であった (fig. 1b). 線維化部分に近接した非線維化部分では, 一部の肺胞上皮細胞やマクロファージに軽度の染色性を認めた (fig. 1c). 一方, 肺癌患者の正常肺部分では, 肺胞壁及び肺胞マクロファージの染色性はほとんど認められなかった (fig. 1d).

免疫染色の結果をまとめると (Table 4), UIP 症例においては, 線維化巣のマクロファージや幼若な線維化巣内の線維芽細胞, hyperplastic type II cell に強い陽性を認めた. 蜂巢肺部分では, 線維化に一致して AGE の局在を認めた. 非線維化部分では, 特に肺胞マクロファージにおいて, コントロールに比べ染色性が強い傾向が見られた. DM の有無で差は認められなかった。

考案・結論

IIP 患者における DM の合併頻度は, 今回の検討では 33.8% と考えられ, コントロール群の 12.9% に比べ, 有意に高値を示した. これまでに Sol Abramowitz らは idiopathic の言及はないものの, 2832 例の pulmonary fibrosis の患者中, 255 例 9.0% に DM の合併を認めたとしている²⁾. この報告は, 1964 年の 169 Veterans Administration Hospitals の discharge records を解析したもので, 積極的に DM のスクリーニングを行ったものではなく, 潜在的 DM 患者が残されている可能性がある. 我が国の報告では, Ohnishi らは, IIP 患者の呼吸器以外の背景に注目し, 高脂血症を伴った肥満喫煙者に IIP が多いとし, この中で IIP 患者の 21.4% に DM の合併を認めたとしている. 今回の検討では, IIP 群はコントロール群に比べ, 身長, 体重ともに低値を示したが, BMI には有意差なく,

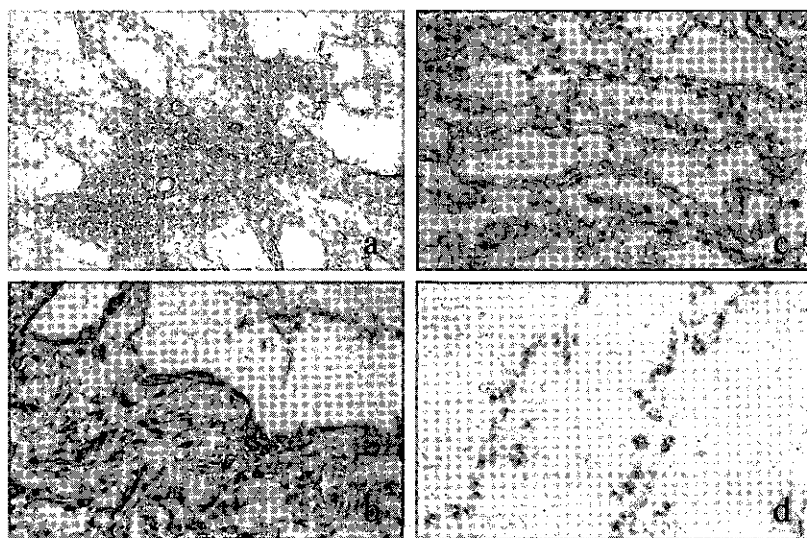


fig1 AGE の免疫組織染色

Table4 AGE immunoreactivity

age	fibroblastic foci			remodeled area		non fibrotic area			
	AM	Fb	ECM	type II	Fb	ECM	type I	type II	AM
47y	+~++	-~+	-	+~++	-~+	+~++			
49y	-~+/-	-~+/-	-	-~+/-	-	-	-	-	-
55y	+~++	-~++	-	+/-~++	-~+	+~++	-~+	-~+	+
64y	+/-~++	+~++	-	++	+~++	+~++	-	-~+	+/-~++
69y	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70y	+~++	-~+/-	-	-~+	-~+	+~++	-~+/-	+/-	+~++
47y							-	-	-
56y							-	-	-~+
61y							-	-	-~+/-
65y							-	-	-~+/-
69y							-	-	-~+
70y							-	-	-~+

斜字体はDM合併例

肥満が多いという結論には至らなかった。また、須賀らは、我々の報告と同様に健常成人を対照とし、IIP患者の24.0%にDMの合併を認めたとしている¹⁾。しかし、その機序についての言及はされていない。

DMないし高血糖状態が、肺に与える影響として、肺気量および拡散能の低下、呼気CO濃度の上昇、剖検組織における、肺胞上皮および毛細血管の基底膜の変化が、報告されている。また、糖尿病動物モデルでは、胞隔の肥厚、collagenの増生、肺胞上皮、毛細血管の基底膜の肥厚、細胞外基質の過形成が報告されている。

IIPとDMの関与には、遺伝的因子、環境因子、高血糖状態がもたらす生化学的因子など多くの検討が必要である。今回の検討では、IIP群とコントロール群、またDMを伴ったIIP群とDMを伴わないIIP群で、背景因子に差を見いだすことができなかった。また、DM合併IIP群のHbA1cの平均は6.5で、コントロールは比較的良好と考えられた。

一方、Advanced glycation and products (AGE)は、タンパク質の非酵素的糖化、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、糖尿病性腎症、網膜症や老化に伴う組織障害の発症に関与するとされている。これまでに、肺とAGEに関する報告では、Matsuseらが、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AGEsの発現が見られること²⁾、Fehrenbachらが、AGEsのレセプター(RAGE)は肺内に多く、特にI型肺胞上皮細胞に認められるとされている。AGE化蛋白はRAGEを介して様々な細胞反応を引

き起こすが、マクロファージにおいては、TNF、IL-1、IL-6、IGT-1、GM-CSFなどのサイトカイン分泌、細胞増殖・遊走を起こすとされている。また、アマドリ転位産物からAGEの産生には酸化反応が必要であるが、一方、アマドリ転位産物は活性酸素の発生源でもあり、pro-oxidantとしても作用することが報告されている。

今回の、生検材料を用いた我々の検討では、UIP患者の線維化巣内にAGEは陽性であり、幼若な線維化巣では、II型肺胞上皮細胞や線維芽細胞に、蜂窩肺部分では細胞外基質にもAGEに対する染色性を認めた。正常肺部分では、UIP症例の肺胞マクロファージはコントロール症例に比べ、AGEに対する染色性が強く認められた。

今回の結果は、IIP患者にはDMを合併する頻度が高いこと、その機序の一つとして、AGEによって、活性化された肺胞マクロファージが様々なサイトカインの分泌ないし活性酸素を産生し、肺線維化を促進している可能性を示唆するものと考えられた。

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

HCV トランスジェニックマウスを用いた特発性間質性肺炎の研究

大田 健* 中野 純一 山下 直美

特発性間質性肺炎 (IIP) の原因は未だ不明であり、治療法も確立されたものがなく予後不良の疾患であり、その成因の解明が急がれる。我々は C 型肝炎ウイルス (HCV) が IIP において関係する可能性が高いと考え検討を加えた。その結果抗体陽性率、RT-PCR による血清 HCV の検討でも IIP で有意に高率であり、IIP の原因の一つとして HCV が重要であることが示された。そこで HCV の envelope protein を強発現するトランスジェニックマウス (HCV マウス) による肺線維症の検討を行った。まず HCV マウスはワイルドタイプと比較して自然経過で BAL 中の炎症細胞の増加を認めた。さらにシリカ投与後 2 週目に気管支肺胞洗浄液 (BAL)、病理学的スコアとヒドロキシプロリン (HyP) について検討した。BAL で炎症細胞の肺の集積は HCV マウスとワイルドタイプ両方に認めたが、病理および HyP は HCV マウスが有意に上昇していた。以上より HCV トランスジェニックによりシリカによる肺の線維化が促進されることが示された。

A study of pathogenesis of IIP with HCV transgenic mouse

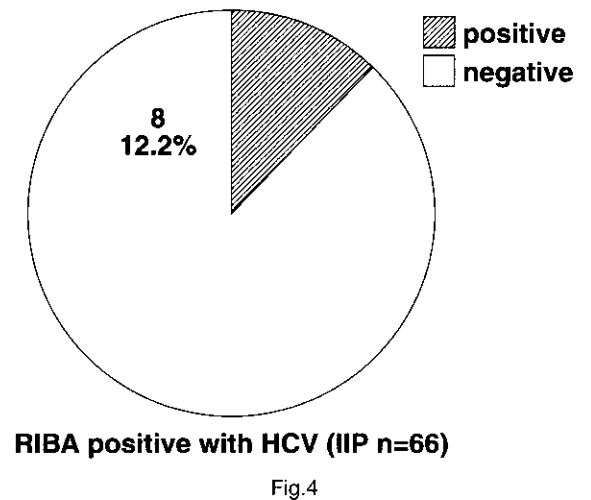
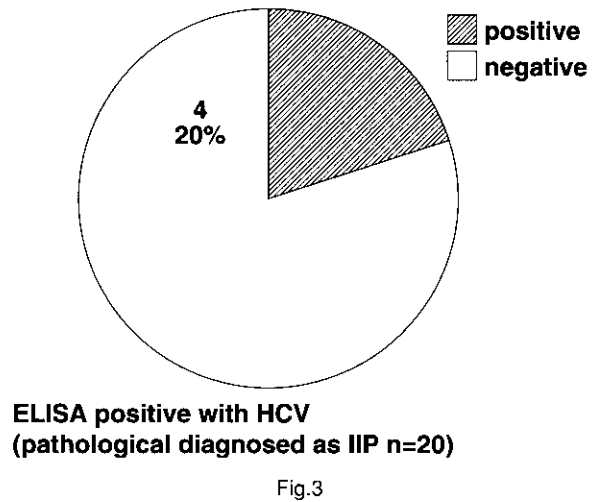
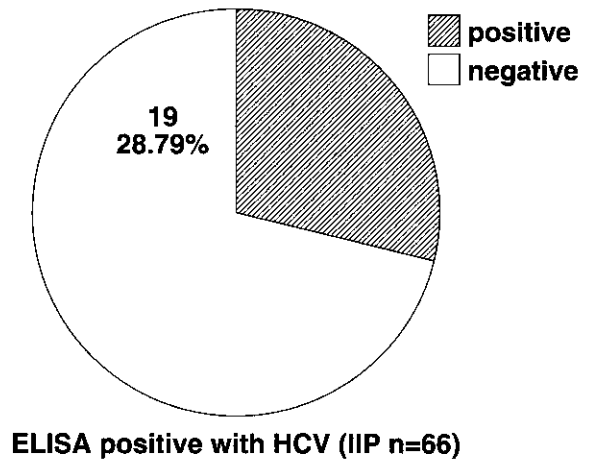
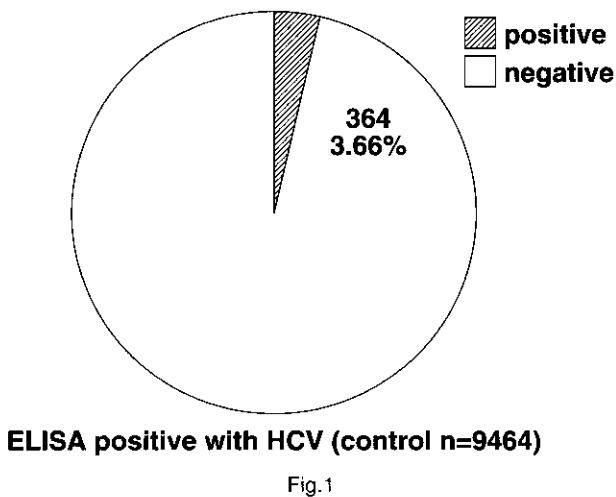
Ken Ohta, Junichi Nakano, Naomi Yamashita

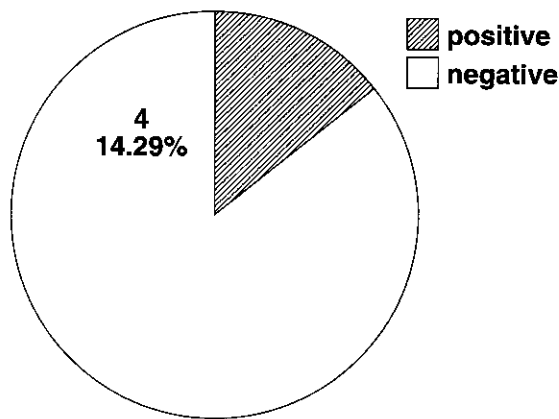
Teikyo university school of medicine, Department of Medicine

Pathogenesis of IIP (idiopathic interstitial pneumonia) is still unclear despite of its poor prognosis. We hypothesized that HCV (hepatitis C virus), which has been recognized as one of major pathogen of fibrous change in liver, may play a role in IIP. First, in epidemiologic study we confirmed significantly high population of patients with IIP have antibody against HCV and patients with IIP are more frequently positive in RT-PCR to HCV as compared to controls. In this study we investigated the role of this virus in IIP with HCV transgenic mouse by our murine model for IIP with silica. HCV transgenic mouse has significantly more lymphocytes in BALF (bronchoalveolar lavage fluid) as compared to wild type mouse in natural course. Furthermore, at the point of 2 weeks after silica particulate instillation, HCV transgenic mouse had much more doses of hydroxyproline and higher pathological scores for IIP as compared to those of wild type mouse with same treatment. These findings proposed that HCV might promote the progression of fibrous changes in lung in response to silica.

A 研究目的

特発性間質性肺炎 (IIP) の原因は未だ不明であり, 治療法も確立されたものがなく予後不良の疾患であり, その成因の解明が急がれる. 現在までその原因として様々な因子が推測されているが, その一つとして我々はウイルスが関与しているのではないかと考え, 検討している. まず, 全国 24 施設の協力のもと IIP 98 症例に対し測定可能なウイルス 32 種類の血清抗体価を測定し, EBV-VCA IgG の抗体価が健常者と比較し有意に高いことを確認した. その後, C 型肝炎ウイルス (HCV) が発見されその抗体の測定が可能となり, HCV は肝臓に線維化を惹起することに注目し, 肺の線維化を基本病態とする IIP においても HCV が関係する可能性が高いと我々は考え, さらに検討を加えた. まず第 1 世代の ELISA により測定した結果, IIP 66 例中 19 例 (28.8%) が陽性を示し (Fig2), 病理学的診断のついた 20 例に限っても 4 例 (20%) が陽性を示した (Fig3). これは健常対象群 (日赤血液センターの健常献血者) 9464 例の陽性率 3.66% に比べ著しく高い陽性率であった (Fig1). ELISA で陽性を示した 19 例の血清について, 偽陽性の影響を除くために, さらに施行した第 2 世代の recombinant immunoblotting assay (RIBA) においても 8 例 (12.2%) であり, やはり健常対象群より有意に陽性率が高いことが確認された (Fig4). さらに分子生物学的な検討として reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) による血清中の HCV の検出を行ったところ IIP の 28 例中 4 例 (14.3%) が陽性であった (Fig5). これは RIBA の陽性率 12.2% と近似している. 以上のごとく HCV に対する抗体の陽性率が IIP 患者群で有意に高





RT-PCR positive with HCV (IIP n=28)

Fig.5

く、HCV の陽性率も抗体陽性率と近いレベルにあることから、IIP の原因の一つとして HCV が重要であることが示された。

さらに、近年 HCV の core protein および envelope protein 各々を強発現するトランスジェニックマウスが作成され C 型肝炎の検討が可能となってきた。core protein の強発現では肝炎から肝癌の発生を認め、envelope protein の強発現ではシェーグレン症候群類似の唾液腺の炎症を惹起することが認められている。シェーグレン症候群において間質性肺炎の 1 群である lymphoid interstitial pneumonia

(LIP) が合併することが臨床的に知られている点でも HCV と間質性肺炎の成因との関連性を検討する必要がある。我々は現在このマウスを用いた間質性肺炎・肺線維症の研究を行うことが可能となっているが、呼吸器分野でのこのモデルによる研究は未だなく、この検討は以上で述べたようにリンパ球を含めた炎症性細胞浸潤とその後の線維化といった本疾患の成立過程を解明する大きな手がかりとなる。またさらに我々はすでにシリカを用いたマウスの肺線維症モデルを確立し、肺線維症の成立機序をサイトカインの側面より検討し報告している。その線維化に関与するサイトカインとしては platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF)- β , insulin like growth factor (IGF)-1 などが注目されている。この中で線維芽細胞の competence factor である PDGF がシリカによる肺線維症モデルでは極めて重要な線維化促進の要因であることを抗 PDGF 抗体や PDGF 拮抗薬を用いて我々は確認し報告している。しかも従来困難であったマウスの PDGF の定量 (ELISA 法) が我々の研究室では可能となった。従って、本研究では HCV の肺線維症への関与を PDGF を含めたサイトカインの mRNA のみならず蛋白レベルでも検討し、肺線維症の分子生物学的な解明が可能となる。またこの研究で HCV による PDGF などサイトカインの産生亢進を伴う肺の線維化の過程を *in vivo* で検討するとともに、IIP 患者の BALF

細胞を用いて、HCV の感染により実際に PDGF などのサイトカイン産生が促進しうるかも *in vitro* で検討する。

肺線維症の病態には多因子が関与している可能性が考えられる。本研究はその重要な一因子として HCV の関わりを明らかにするとともに、その成立過程での炎症細胞、炎症性サイトカインについても検討する。従ってこの研究によりヒトの間質性肺炎の新たな側面での解明がなされ、有効な治療が展開できると考えられる。

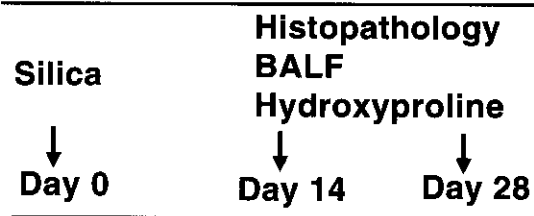
そこで HCV の envelope protein を強発現するトランスジェニックマウス (HCVenv) を用いて肺線維症の成因について検討することが重要と考え本研究を施行した。

B 研究方法

我々は従来よりシリカを用いたマウス肺線維症モデルを確立している (Table1)。そのモデルではシリカ投与から 2 週目までに強い炎症性変化と線維化が起こり、その後 4 週目までさらに線維化が進行することを確認している (Fig6)。

Table1

METHODS



Silica particulate 16 mg was instilled to mice intratracheally and lung fibrosis was examined by methods as above.

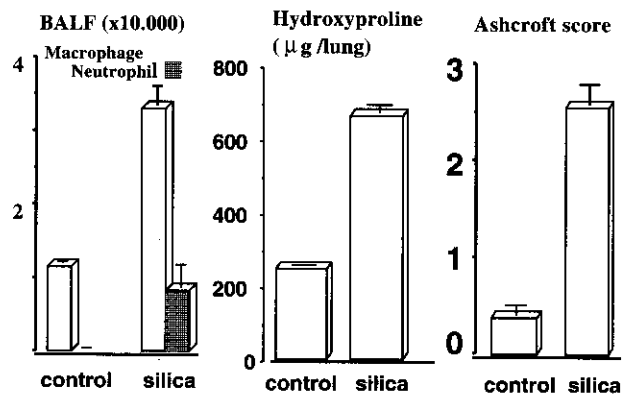


Fig.6

HCVenv における肺の炎症・線維化について、BALF、肺組織の病理とヒドロキシプロリン量を用いて検討することとした。まずこのモデルにおける HCV トランスジェニックの関与を検討するためにシリカ 16mg 投与後 2 週目に気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) で炎症性反応を検討し、さらに線維化に関しては病理学的スコア (Ashcroft score) と生化学的な指標であるヒドロキシプロリンについて検討した。対照群としてワイルドタイプ (wild) で生食のみ投与、ワイルドタイプでシリカ投与のみ、あるいは HCV マウスでシリカを投与しない群と 3 つの control 群を作成した。

C 結果

まず BAL の検討では wild vs HCVenv では後者において好中球数の増加傾向を認めた (Fig7)。さらに Ascroft score でも wild vs HCVenv で 1.0 vs 1.5 と後者でやや炎症性変化を認めた。シリカの投与 2 週後では BALF では wild+silica で好中球の増加を認めた。さらにヒドロキシプロリンを検討したところ病理学的な検討と同様に wild : HCVenv : HCVenv+silica = 150+45 : 295+40 : 438+48 とトランスジェニックにより線維化の促進傾向があり、さらにシリカ投与によりその線維化が亢進する事が示された (Fig8)。

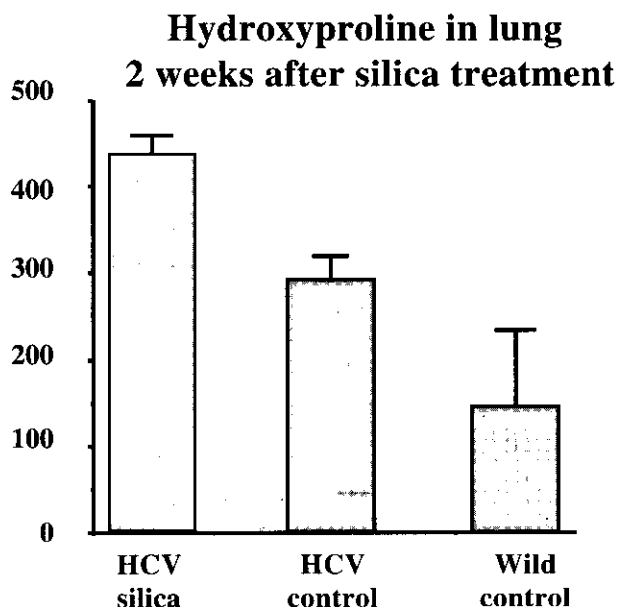


Fig.7

Pro-inflammatory cells in BALF 2 weeks after silica treatment

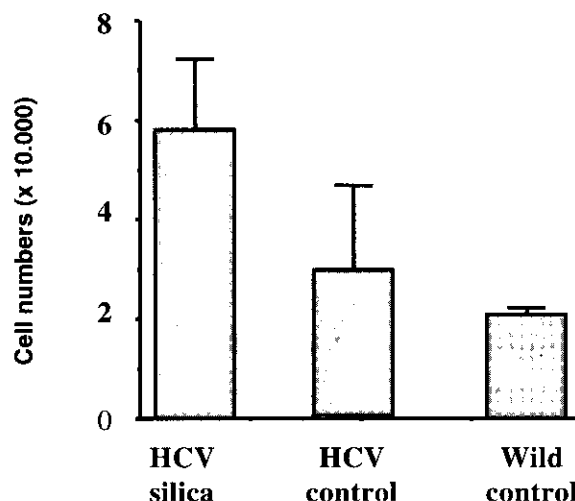


Fig.8

D 考案

今回の検討ではシリカ投与から 2 週目での線維化が wild で従来の我々の実験系と比較するとやや弱い傾向が認められた。この一つの可能性として、従来我々の使用している C57/bl6 と比較すると今回用いた balc/C がシリカへの反応性が低いことが考えられた。しかしそのストレインにおいて、HCV トランスジェニックにより自然経過でまず肺の炎症傾向が認められること、さらにシリカに対しては明らかに強い線維化を惹起したことは注目される結果である。少なくともこのマウスのモデルでは HCV が線維化に強く関与していることが示された。

E 結論

今回の検討により、HCV は肺線維症の成立の一部に関与していることが示唆された。

特発性間質性肺炎における TT ウイルスの関与に関する研究

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 TT ウイルス (TTV) は非 A-G 型肝炎以外にも慢性関節リウマチや後天性免疫不全症候群における病態や予後への関与が示唆されている。今回、特発性間質性肺炎 (IIP) における TTV の関与について、当科で経験した IIP 35 例の血清を用い、PCR 法により TTV DNA を測定し、13 例 (37.1%) で陽性を示した。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 61.5% で陰性例 (95.5%) と比べ予後不良であった。また、血清 TTV DNA 陽性例の胸腔鏡下肺生検組織中に増殖型 2 本鎖 TTV DNA を検出した。追跡可能であった 14 例の経時的な検討では、陽性 5 例全例で DNA タイターの変動を認め、陰性 9 例はその後も全例陰性であった。以上より、TTV は肺局所で増殖し、IIP の活動性や予後に影響を及ぼす可能性が示唆された。

UNENVELOPED DNA VIRUS (TTV) ASSOCIATED WITH NON-A TO G HEPATITIS IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS

Masashi Bando, Shoji Ohno, Yukihiko Sugiyama

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

The precipitating factor of IPF has not been elucidated. Recently, an unenveloped, single-stranded DNA virus (TTV) was reported in Japan in association with post-transfusion hepatitis of non-A to G etiology and the involvement of TTV in chronic rheumatoid arthritis and human immunodeficiency virus infection has been suggested in recent reports. This study sought to confirm the presence of newly discovered TTV DNA, which was determined by a semi-nested polymerase chain reaction in patients with IPF. Thirty-five patients with IPF were studied for TTV DNA. TTV DNA in serum was detected in 13 (37.1%) patients with IPF and double-stranded replicative forms of TTV DNA was detected in lung specimen from one IPF patient with TTV in serum. The serum levels of LDH in IPF patients with TTV (772 ± 115 IU/L) were significantly higher than those without TTV (537 ± 47 IU/L). Seven (53.8%) of 13 patients in the TTV DNA-positive group died during the observation period, while 7 (31.8%) of 22 patients in the TTV DNA-negative group died. The three- and four-year-survival rates were significantly lower in the TTV DNA-positive group than in the TTV DNA-negative group. The TTV DNA titer was followed prospectively in 14 patients and was negative in the all 9 TTV-negative patients continuously during the observation period, but was elevated in 2 of 5 TTV-positive patients. From the results in this study, we suggest that TTV infection influences the disease activity and prognosis of IPF in some cases.

はじめに

特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia; IIP) は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¹⁾。IIPの病因については、その一部にウイルス感染が考えられているが、依然その関与についての一定の見解は得られていない。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TTウイルス (TTV)²⁾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 (RA) や後天性免疫不全症候群 (AIDS) における病態や予後への関与を示唆する報告もみられる^{3,4)}。昨年度の本研究報告書において著者らは、IIP症例におけるTTV DNAの陽性率を測定し、その活動性、急性増悪および予後への関与について報告した⁵⁾。本年度はIIPの症例数を追加し、健常者および肺癌や膠原病肺などの他の呼吸器疾患症例における陽性率もあわせて検討するとともに、IIP症例の追跡調査を行い、経時的なTTV DNAタイターの変動についても検討した。また、TTV陽性IIP症例の肺組織を用いて、増殖型TTV DNAが存在するか否かについても検討を行った。

対象と方法

1994年から2000年までに当科に入院した慢性型IIP (特発性肺線維症: IPF) 症例のうち血清を保存していた35例 (男性22例, 女性13例, 平均年齢65.1歳) を対象とした。IIPの診断は厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班の特発性間質性肺炎の診断基準 (第3次改訂案)⁶⁾を用い、確実例22例 (胸腔鏡下肺生検18例, 経気管支肺生検4例), 疑い13例であった。また、初回TTV DNA測定後6ヶ月以上の間隔で複数回血清TTV DNAを測定できた14例については経時的なDNAタイターの変動についても検討した。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⁷⁾により行った。また、胸腔鏡下に採取した検体を凍結保存していたTTV陽性IIPの1例で組織中DNAを抽出し、同一症例の保存血清から抽出したDNAとともにアガロースゲルにて電気泳動を行い、20スライスに分割した各DNAをPCR法により増幅した。2本鎖DNAの確認には、各DNAを制限酵素NdeIで処理後、PCR法を行った。本研究は当大学倫理委員会の承認および患者の同意のもとに行われた。

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) 健常者および各種呼吸器疾患における血清TTV DNAの陽性率

IIP35例中13例 (37.1%) でTTV DNAは陽性であった。また、IIP症例と年齢をマッチさせた健常者148例における陽性率は47%で、原発性肺癌、膠原病肺およびカリニ肺炎患者における陽性率はそれぞれ36%、33%、80%であった。

(2) TTV陽性IIP症例とTTV陰性IIP症例における臨床像の比較

昨年度の報告書と同様の結果であり、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61.5%で陰性例 (95.5%) と比べ予後不良であった。また、陽性例13例中8例 (66.7%) および陰性例22例中8例 (36.4%) で急性増悪を認めた。

(3) TTV陽性および陰性IIP症例の追跡調査

追跡可能であった14例の経時的な検討では、陽性5例全例でDNAタイターの変動を認め (表1)、既死亡3例中2例で経過中にタイターの上昇を認めた。陰性9例はその後も全例陰性であり (表2)、死亡例は1例のみであった。

表1

Case 1	H.K	44 M	96.5.27	97.2.12	98.6.6		
			1+ (2)	2+ (2)		死亡	
Case 2	N.F	73 F	98.11.20	99.10.10	00.3.21	00.3.27	
			1+ (1b)	2+ (1b)	3+ (1b)		死亡
Case 3	Y.K	49 M	99.11.18	00.3.8	00.4.4		
			2+ (1a+2)	1+ (1a+2)			死亡
Case 4	N.M	63 M	97.3.7	99.10.2	00.1.14	01.3.31	
			4+ (1a+2+3)	3+ (1a+3)	1+ (1a+2+3)		生存
Case 5	K.T	70 M	00.2.24	01.1.29		01.3.31	
			2+ (1a)	3+ (1a)			生存

() : genotype

表2

Case 1	M.I	72M	95.6.18	96.12.10	97.9.10	
			(-)	(-)		死亡
Case 2	T.K	58M	94.10.5	97.7.4	00.8.23	
			(-)	(-)		(-)
Case 3	F.T	64M	97.7.9	00.7.12		
			(-)	(-)		
Case 4	S.T	47F	98.2.4	00.9.13		
			(-)	(-)		
Case 5	S.K	58M	94.8.26	00.8.30		
			(-)	(-)		
Case 6	A.E	69M	98.6.25	00.8.22	01.2.5	
			(-)	(-)		(-)
Case 7	T.T	59F	98.11.24	00.6.28		
			(-)	(-)		
Case 8	K.N	70M	98.1.23	99.10.3		
			(-)	(-)		
Case 9	T.F	77F	98.2.16	00.12.7		
			(-)	(-)		

(4) 肺組織中の増殖型 TTV DNA の検出

血清中 TTV DNA 陽性例の胸腔鏡下肺生検組織から抽出した DNA において 2.0-2.5 kb と 3.5-5.5 kb の 2 つの領域にバンドを認め、増殖型 2 本鎖 TTV DNA の存在を確認した (図 1)。

Separation of DNAs extracted from serum or lung tissues into 20 gel slices and detection of TTV DNA in each gel slice by PCR

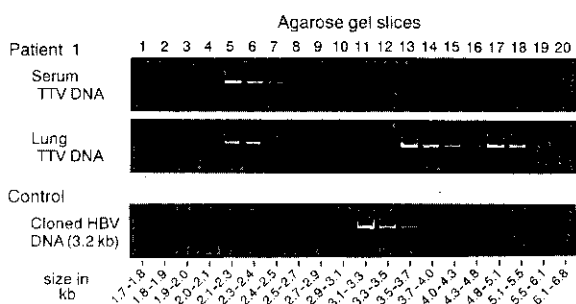


図 1

考察・結論

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、最近では肝疾患のみならずリウマチ因子陰性の RA や AIDS における病態や予後への関与を示唆する報告もみられる^{2,4)}。今回、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肺組織から DNA を抽出し、増殖型 2 本鎖 TTV DNA の存在について検討を行い、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。

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¹⁾。本研究では、IIP における TTV の陽性率を検討するとともに、TTV 陽性 IIP 群 13 例と陰性 IIP 群 22 例について、その臨床像の違いについても検討した。まず、IIP における TTV DNA 陽性率は 37.1% であった。これまでの報告では、N22 プライマーを用いた本邦の健常者における陽性率は 12% で¹⁰⁾、加齢とともに陽性率は上昇すると考えられている。また、TTV の陽性率は人種

差や地域差を認め、アメリカで 1%、ヨーロッパで 4-22%、東南アジアで 7-36% であったとの報告もみられる¹¹⁻¹³⁾。今回の検討では、同一地域の年齢をマッチさせた健常者での陽性率が 47% であったことから、TTV 感染が IIP の発症に直接的に関与している可能性は少ないものと考えられた。しかし、昨年度の報告⁵⁾と同様に TTV 陽性 IIP 群と陰性 IIP 群における臨床像には差異がみられ、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、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、臨床経過の違いとして、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 13 例中 8 例 (66.7%) で急性増悪を認め、その中の 7 例 (53.8%) が診断後平均 28.5 ヶ月と早期に死亡していた。また、経過中に 7 例 (53.8%) 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 7 例 (31.8%) 認めたが、平均 66.7 ヶ月後に死亡しており、また在宅酸素療法も 27.3% に施行されたのみであった。IIP は時として急性増悪を来す場合があり、予後不良の一因と考えられている。急性増悪は種々の原因により起こり、気道感染、ステロイド薬の減量、肺癌およびその治療、開胸術、肺生検などが挙げられる。ウイルス感染を含めた気道感染の関与については、これまでに市中感染としての呼吸器感染を引き起こすインフルエンザ、パラインフルエンザなどのほか、免疫状態が低下している時に罹患しやすい単純ヘルペスやサイトメガロウイルスなどの病態への関与の可能性が示唆されている¹⁴⁾。急性増悪への直接的なウイルスの関与については抗体価の推移や組織での封入体の存在などの指標がこれまで用いられており、長井ら¹⁵⁾は急性増悪時にパラインフルエンザウイルス抗体価の上昇を認めることから、その重要性を指摘している。現時点でこれらの指標が活性化の指標になりうるかについては不明な点も多いが、少なくとも個体の免疫状態の変化に関与しているものと推測される。本検討では、TTV 陽性群が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、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が考えられる。Christensen ら⁴⁾はカリニ肺炎合併 AIDS 症例において TTV DNA タイターが高値を示す症例が多いことに注目し、185 例の HIV 感染者を TTV DNA 高タイター群、低タイター群、陰性群に分け、その予後を検討し、高タイター群の予後が有意に不良であったと報告している。また、TTV DNA タイターは CD4 陽性 T 細胞数と負の相関を認めるものの、従来より予後の指標と考えられていた HIV のウイルス量や年齢などは独立した予後因子になる可能性を示唆して

いる。今回の検討において、TTV DNA 陽性 IIP 5 例全例で経過中にタイターは変動し、死亡例 3 例中 2 例で上昇していることから、今後、IIP 症例においても TTV DNA 陽性例でのタイターの変動に着目し、その予後因子としての有用性について検討する必要があるものと考えられた。

以上より、TTV は肺局所で増殖し、IIP の活動性や予後に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、TTV の感染経路の解明や肺組織中のどの細胞において感染、増殖し、肺胞マクロファージやリンパ球をはじめとする種々の炎症細胞にどのような影響を与えるか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) The ATS board of directors and the ERS executive committee. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med.* 161: 646-664, 2000.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Christensen JK, Eugen-Olsen J, Srensen M, Ullum H, Gjedde SB, Pedersen BK, Nielsen JO, Krogsgaard K: Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 181: 1796-1799, 2000.
- 5) 坂東政司, 大野彰二, 杉山幸比古: 特発性間質性肺炎における TT ウイルス (TTV) の関与. 厚生省特定疾患対策研究事業 びまん性肺疾患研究班平成 11 年度研究報告書 64-68, 2000.
- 6) 本間行彦, 斎木茂樹, 土井 修: 特発性間質性肺炎 (IIP) 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.
- 7) Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M: Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology* 10: 1-16, 1998.
- 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) Charlton M, Adjei P, Poterucha J: TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 28: 839-842, 1998.
- 12) Simmonds P, Davidson F, Jarvis LM: Transfusion transmitted virus. *Lancet* 352: 1310-1311, 1998.
- 13) Poovotawan Y, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Kaew-in N, Hirsch P, Tangkitvanich P: Hepatitis TT virus infection in high-risk groups. *Infection* 26: 355-358, 1998.
- 14) 高橋 亮, 棟方 充, 大塚義紀, 佐藤敦子, 本間行彦, 川上義和: 特発性間質性肺炎の急性増悪におけるウイルス感染の役割. *日胸疾会誌* 33: 723-727, 1995.
- 15) 長井苑子, 竹内 実, 楠目 馨, 泉 孝英: 特発性肺線維症の病態とウイルス感染. *呼吸* 11: 234, 1992.

5. 病態に関する基礎的研究

肺線維化機序に関する血管新生の意義の解明

海老名雅仁 渡辺 正樹 鯉沼 代造 清水川 稔
三木 誠 貫和 敏博*

これまでの研究で私達は、(1)人特発性肺線維症肺の初期病変では肺胞毛細血管が増殖しているが線維化が亢進した病変部位では毛細血管密度がむしろ正常より低いこと、(2)増殖した血管内皮細胞にはアンジオテンシン変換酵素が高産生されること、(3)さらにマウス肺線維症モデルにおいてアンジオテンシン II 受容体阻害薬が線維化抑制効果を示すことから、肺線維化早期にみられる肺毛細血管の血管新生が線維化を亢進する可能性を示してきた。ところが(4)血管新生抑制剤として知られる TNP-470 はマウス肺線維症モデルの傷害早期においてはむしろ死亡率を高め、線維化がはじまる時期における投与では線維化を亢進させることが示されたことから、線維化早期に出現する血管新生は病態への複雑な関与があるをうかがわせる結果を得た。本研究では TNP-470 の血管新生抑制効果とは異なり血流阻害効果をもつ AC-7700 の線維化機序への影響を解析した。その結果、AC-7700 の単独投与では体重減少も線維化の程度も対照群と差はみられなかったが、プレオマイシン投与に加えて AC-7700 を 20 mg/kg/日 6 回隔日皮下投与した群 (BLM/AC20) は体重減少が著明で、第 21 日の時点で 60% のマウスが死亡した。AC-7700 を 5 mg/kg/日 6 回隔日皮下投与した群 (BLM/AC5) も体重減少は著しいものの死亡率はプレオマイシン単独投与群 (BLM) 同様に 20% であった。第 21 日目の乾燥肺重量あたりのハイドロキシプロリンは BLM/AC5 群が BLM 群よりも線維化が亢進している傾向を示した。線維化病変は BLM 群が胸膜直下に分布するのに対し、BLM/AC5 群では肺静脈中心性の分布をしていた。これらの結果は血管新生阻害剤 TNP-470 の傾向と極めて類似しており、線維化早期における肺胞毛細血管血流がむしろ肺傷害から線維化に進む過程で生体防御的な機能があることを示すと考えられた。

The role of alveolar capillary in bleomycin-induced fibrosis of mouse lung

Masahito Ebina, Masaki Watanabe, Daizo Koinuma, Minoru Shimizugawa,
Makoto Miki, Toshihiro Nukiwa

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

We previously showed that (1) proliferation of alveolar capillaries occurs in the early lesions of the lungs of IPF/UIP despite decrease of capillaries in the fibrous lesions, (2) production of angiotensin converting enzyme is augmented in these increased capillary endothelial cells in the alveolar walls with minimal fibrosis, and (3) protective effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist on bleomycin-induced fibroproliferation. These results suggest the pathogenic role of capillary-endothelial cells in pulmonary fibrosis. Nevertheless, we revealed also that TNP-470, a well-known anti-angiogenic agent, increases fibroproliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. The purpose of this study is to examine the effect of AC7700, a novel combretastatin A-4 derivative which reduces blood flow without anti-angiogenic effect, on bleomycin-induced fibrosis of the mouse lung. Subcutaneous injection of AC7700, 5mg/kg/day and 20mg/kg/day for 6 times (Days 1, 3, 5, 7, 9, 11), was added to the bleomycin-administered mouse, Group BLM-AC5 and Group BLM-AC20 respectively. Both groups lost their body weight more excessively than the group of administration of bleomycin only (Group BLM). By Day 21, 60% of the mice of the Group BLM-AC20 died, while 20% died in the group BLM-AC5 and Group BLM. The content ratio of hydroxyproline per dry lung weight was higher in the lungs of Group BLM-AC5 than those of Group BLM. The fibrotic lesions in the lungs of group BLM-AC5 distributed around pulmonary veins, while those were distributed in the subpleural regions in Group BLM. The progressive effects of AC7700 on fibroproliferation in bleomycin-induced lung coincided with the effects of TNP-470. These results suggested the importance of sustaining blood flow in alveolar capillaries to protect against fibroproliferation of the lung.

はじめに

私達はこれまでに①特発性肺線維症の初期病変において血管新生が認められるが線維化が進むにつれて肺胞毛細血管が消失していくこと¹⁾, ②初期病変巣に増殖している肺胞毛細血管には ACE が高発現していること²⁾, ③ ACE によって変換されるアンジオテンシン II の 1 型受容体の拮抗薬によって線維化が抑制されること³⁾, を示すことによって, 肺線維化早期にみられる肺毛細血管の血管新生が線維化を亢進する可能性を示してきた。ところが④線維化早期の肺胞毛細血管の増殖を抑制する為に血管新生抑制剤である TNP-470 をマウス・プレオマイシン肺に投与したところ線維化はむしろ増加したことから肺線維化病態における血管新生の病態へ関与が複雑な要素に成り立っている可能性が示唆された⁴⁾。

本研究の目的は肺線維症の疾患モデルであるマウスプレオマイシン肺に対して, 血管新生抑制剤 TNP-470 とは異なる作用で血流を遮断する AC-7700 の抗線維化効果を検証することにある。

AC7700 は南アフリカの灌木である *Combretum caffrum* から抽出された強力な tubulin polymerization inhibitor であるコンプレタスタチン (CSA-4) の誘導体である⁵⁾。CSA-4 は *in vitro* にて細胞毒性を示すことが知られたものの, 水に溶けにくい欠陥をもつことから生体における実験は困難と考えられた為, 様々な可溶性の誘導体の作成が試みられた。それらの誘導体は腫瘍内に著しい壊死をもたらし, 腫瘍の増殖を抑制することが見出された⁶⁾。その腫瘍増殖抑制の機序に関しては, CSA-4 を予め還流した腫瘍組織に蛍光染色剤を血中に環流すると, 蛍光染色剤の腫瘍内への取り込みが低下することから血流の阻害作用が示された⁷⁾。さらに CSA-4 の誘導体である AC7700 に関しては, 10mg/kg をラットの尾静脈から投与すると肝臓, 骨髄では 50% の血流阻害があり回復に 8 時間以上を要した⁸⁾。また, AC7700 の抗腫瘍効果については, Colon 26 adenocarcinoma を CD2F1 マウスに 4 日毎に 3 回経皮下投与 (5, 10, 20, 40 mg/day) 投与した場合, 経皮下投与でも 40 mg/day 以上で効果がみられた。BD2F1 マウスでは同じ投与方法で 10mg/day 以上で効果が認められた⁹⁾。AC7700 の最大投与量は皮下投与の場合 3 日間隔 3 回または 2 日間隔 6 回で 40 mg/kg/day であることが確かめられている。

本実験においてはこれらの報告を基にして AC7700 の投与量を 2 日間隔 6 回で 5 および 20 mg/kg/day の皮下投与とし, プレオマイシン肺への効果を検証した。

対象と方法

プレオマイシン肺線維症モデルの作成

生後 8 週の C57BL/6 マウス (雌) 5 匹 (群 BLM) に対しプレオマイシン (BLM) を 1 回 0.75mg (3.75mg/ml の生理的食塩水溶液として) を腹腔内に 1 日おきに 4 回投与 (第 0, 2, 4, 6 日) した。マウスは各群で個別化し, 体重を測定した。

AC-7700 の投与

BLM 肺に対する AC-7700 の効果を見るために, 同じ週齢 (生後 8 週) の C57BL/6 マウス (雌) 10 匹を, AC-7700 を 5mg/kg/日 を一日おきに 6 回 (第 1, 3, 5, 7, 9, 11 日) 投与する群 5 匹 (群 BLM/AC5) と AC-7700 を 20 mg/kg/日 6 回隔日皮下投与する群 5 匹 (群 BLM/AC20) に分けた。また BLM を投与せずに AC-7700 を 20 mg/kg/日 を投与した C57BL/6 マウス (雌) 5 匹と AC-7700 を 5 mg/kg/日 を投与した 2 匹 (群 BLM/AC5), また BLM も AC-7700 もどちらも投与しなかった群 3 匹をコントロール群とした。さらに AC-7700 単独による影響を見るために, AC-7700 を 20 mg/kg/日 を一日おきに 6 回 (第 1, 3, 5, 7, 9, 11 日) 皮下投与した群 3 匹を第 12 日目に解剖し肺組織を観察した。実験動物に対しては動物愛護上の配慮を十分に行った。

肺の固定

マウスをエーテル麻酔後脱血死させ, 頸部の気道を露出させ, 両側肺を胸腔内にいれたまま気道内にカテーテルを挿入し, 10% 緩衝ホルマリン溶液を肺内に注入した。注入後はカテーテルを抜去してから気道を結索して, 肺を 48 時間伸展固定を行った。

ハイドロキシプロリンの定量

ホルマリン固定した右肺をアセトンに 6 時間浸した後, エーテルにて脱脂を行い, 乾燥させた。十分に乾燥した肺をすりつぶしてその重量を計測したあと 6N の塩酸を用いて 115°C で 16 時間の加水分解を行った。得られた溶液を, 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ハイドロキシプロリン量を求めた。これらの値は対照群の平均値に対する比としてもとめ, 統計学的有意差の検定に用いた。

病理組織作成

10% 緩衝ホルマリンにて伸展固定したマウス肺の左肺をパラフィン包埋し, 3 μ m の厚さの組織切片を薄切したあと, ヘマトキシリン・エオジンおよびエラスチカ・マッソン染色を施し観察した。

結 果

体重変化および死亡率の比較

第 0 日の体重を 1 とし, その後の体重率の変化を図

1に示す。AC7700の単独投与群は5mg/kg/日(PBS-AC5)、20mg/kg/日(PBS-AC20)とも対照群と比して体重減少は見られない。またいずれの群も対照群と同様21日目までに死亡は見られなかった。しかし、BLM投与に加えAC7700を投与した群では21日までにBLM単独群とBLM-AC5群がそれぞれ5匹中1匹死亡(20%)したのに対し、BLM-AC20群では5匹中3匹(60%)の死亡をみた。体重減少をみたBLM投与群のいずれもが第10日を境に体重を増加させたが、AC単独群はいずれもBLM単独投与群より体重は低下したままであった。

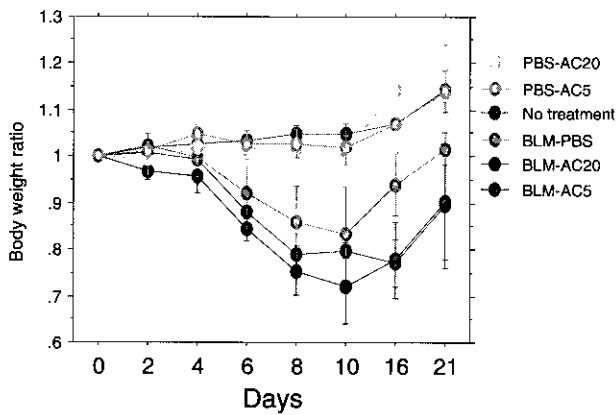


図1 各群の体重比変化。
対照群、プレオマイシン単独投与群(BLM)、AC7700単独投与群(PBS-AC5、PBS-AC20)およびプレオマイシンとAC7700の複合投与群(BLM-AC5、BLM-AC20)の第0日の体重を1とした場合の各群の体重比変化を示す。AC7700の単独投与群は対照群と比し体重差はない。プレオマイシン投与群は、いずれも対照群に比し統計的有意差をもって第10日に最も体重減少をみるがその後は次第に回復する。AC7700を加えられたBLM-AC5群とBLM-AC20群はいずれもBLM群よりも体重が著しく減少しているが、個々のばらつきが大きいために統計的有意差はない。

肺線維化の定量による比較

プレオマイシン単独投与群(BLM-PBS)の乾燥肺重量あたりハイドロキシプロリン量は対照群(n=3, 1.00 ± 0.04, mean ± SEM)に比較し14%程度増加していたのみであった(n=4, 1.14 ± 0.10, p=0.320)。AC7700の投与群はいずれも対照群よりもハイドロキシプロリンの量としては若干増加していたが、有意差はなかった(PBS-AC5; n=2, 1.17 ± 0.10, PBS-AC20; n=4, 1.07 ± 0.07)。AC7700の投与群のうち20mg/kg/日隔日に6回投与した群(BLM-AC20)では5匹中2匹のみ残存したが、生き延びたマウス内の線維化は比較的軽度であった(n=2, 1.05 ± 0.09)。しかし、同じ投与方法で5mg/kg/日投与した群(BLM-AC5)ではむしろBLM単独よりも線維化が強まっている傾向がみられた(n=4, 1.27 ± 0.10, 対照群との比較ではp=0.076)。これらの結果を図2に示す。

Hydroxyproline content ratio per dry lung weight

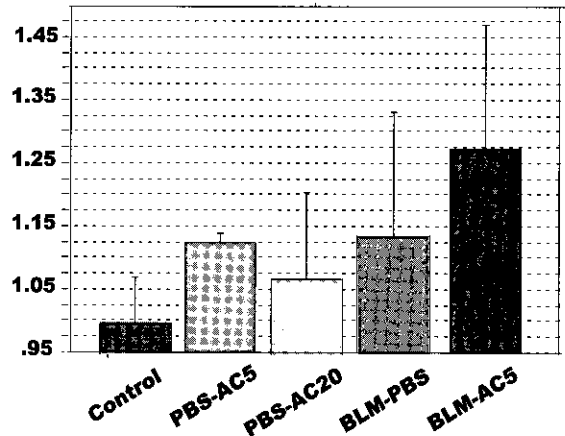


図2 乾燥肺重量あたりのハイドロキシプロリン量の比較
第21日の各群の乾燥肺重量あたりハイドロキシプロリン量を対照肺の平均値に対する比で比較した。AC7700単独投与でも僅かながらハイドロキシプロリンの含有量は増加している傾向がある。プレオマイシン投与群ではいずれもハイドロキシプロリン量は増加しているが、AC7700を投与した群(BLM-AC5)ではさらに増加する傾向が見られた(p=0.076)。

肺組織の病理学的比較

第21日目における肺の線維化の分布を比較すると、BLM単独投与群(BLM-PBS)では線維化病変は少ないながらも胸膜直下に強く分布しているのが観察される(図3a)。これに対してBLMに加えAC7700を5mg/kg/日投与した群(BLM-AC5)では線維化は胸膜直下よりもむしろ肺静脈周囲にみられる傾向が明確であった(図3b)。BLM-AC20群のなかで第10日に死亡したマウスの肺には局所的に肺胞内への出血巣が認められた(図4)。

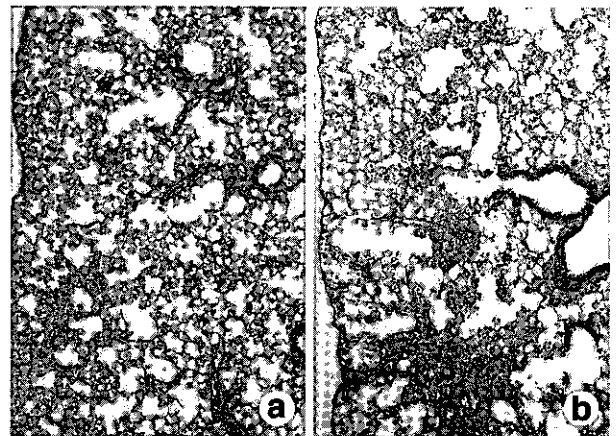


図3 肺病変の病理像
(a)プレオマイシン単独投与を受けたマウスの第21日の肺病変(エラスチカ・マッソン染色, 12.5X)。胸膜直下に強く線維化病変が広がっている。
(b)プレオマイシンとAC7700を投与されたマウス(BLM-AC5)の第21日の肺病変(エラスチカ・マッソン染色, 10X)。線維化病変は胸膜直下にはむしろ少なく、肺内部の肺静脈周囲に多く分布している。

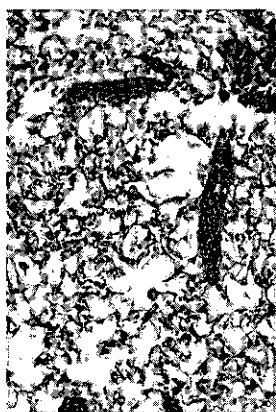


図4 肺病変の病理像
BLM-AC20 群の第 10 日に死亡したマウスの肺を示す(エラスチカ・マッソン染色, 20X). 肺胞壁の線維化は全体に目立たないが, 肺胞腔内に出血病変を認める.

考案・結論

肺線維症の病態の進展は, 肺傷害をもたらす原因によって差はあるものの, 肺胞上皮傷害が顕著になって上皮再生が不可能な状態になったとき, サーファクタントの生成低下によることが考えられている. すなわち肺胞壁表面のサーファクタント量が低下する結果, 肺胞壁にかかる表面張力が相対的に上昇し, 球体表面にかかる表面張力と半径が反比例するというラプラスの式から理解されるように, 末梢の小さな肺胞から虚脱 (collapse) していく⁷⁾. また, 肺胞上皮が剥げ落ちていく過程で毛細血管からの滲出液が肺胞内に線維化層を形成することが線維芽細胞の増殖によることも示されている. これらの炎症反応と修復の慢性化によって, 肺傷害は特発性肺線維症の UIP パターンとよく似た線維化構造を示す⁷⁾. マウス・プレオマイシン肺では確かに蜂巣化まで形成するのは稀で, 著しい線維化が進んだ肺では抗原線維の増殖が肺胞内を埋め尽くすことが観察されるのみである. その点で穏やかに炎症と修復が慢性的に進むと考えられる特発性肺線維症の正確なモデルとは言えないが, 肺における線維性増殖機構の解明には役立つものと考えられている.

私達が人特発性肺線維症肺で示したように, マウス・プレオマイシン肺における肺胞毛細血管変化を確認するためにも免疫染色による病理的検討は不可欠ではあるが, マウスの肺胞毛細血管を十分に表出する抗体が得られていない. マウス・プレオマイシン肺における血管増殖を示す論文はあるが, 血管内皮細胞に対する抗体として vWF を用いている⁸⁾. しかしながら, 私達の人肺を用いた検討からは, vWF 抗体陽性の血管内皮細胞は, 肺内では毛細血管よりも太い血管に分布しており, 肺胞毛細血管にはほとんど染まらない²⁾. マウス肺においても肺胞毛細血管内皮細胞のほとんどは vWF 抗体陽陰性である.

確かに炎症肺において肺胞毛細血管内皮細胞の抗原性に変化すると報告もあるが, vWF 抗体陽性の血管内皮細胞の増加はむしろ線維化が亢進した病変部のシャントを形成する体循環系の血管をしめしている可能性も否定できない. マウス肺胞毛細血管の描出は今後検討されるべき問題である.

本研究で用いた血流阻害剤 AC-7700 による反応は, 血管新生阻害薬 TNP-470 による反応と極めてよく類似している²⁾. すなわち, 共に単独投与のみでは生体にはほとんど変化をしめさないものの, プレオマイシン投与に重ねることでプレオマイシン単独投与よりも顕著な体重減少と, 肺の線維化亢進をもたらす. とくにその線維化分布が, プレオマイシン単独投与が胸膜直下に強いのに比べ, プレオマイシンと AC-7700 あるいは TNP-470 の併用では胸膜直下よりはむしろ毛細血管より太い脈管周辺の線維化が亢進しているのは特徴的な共通所見である.

チュブリン結合物は TNF- α の誘導とは無関係に環流を阻害することが知られている⁹⁾. AC-7700 は高濃度の投与では有糸分裂阻害の効果を示すが, 本研究で使用した濃度では有糸分裂阻害活性は低く, むしろ同じくチュブリン重合阻害でもたらされる血流阻害活性が優位であることが知られている. 肺胞毛細血管内の血流が阻害されることで, 線維化をもたらす機序はどう考えるべきか.

先述したような肺胞の虚脱が生じたあとは換気血流の調節もあり, また物理的な機序によって虚脱した肺胞の毛細血管内の血流は減少するであろう. 肺線維症の病変は慢性的なものほど不均一な分布をとることによって呼吸機能を保存した領域を保っていることは, パラコート肺の剖検例を用いた検討から示されている⁷⁾. 虚脱していない肺胞を循環する毛細血管内には, 血流が増加することは十分予想される. 線維化が亢進した後にみられる線維化巣中心部を走行する太い脈管がこの意味でシャントの役目をなしていることは十分予想されるが, 人特発性肺線維症で私達が指摘した早期肺病変における血管新生は肺胞壁表面にそって走行していることから, 合目的にみれば呼吸の場を増やすための生体のいわば防御とも考えられよう. 血管新生阻害薬 TNP-470 と血流阻害剤 AC-7700 による病態の悪化はこうした意味では理解 x できる. 血管新生阻害薬 TNP-470 による変化として前毛細血管領域の血管拡張を指摘したが²⁾, マウス・プレオマイシンにおいても同様の変化が起きていたことも示唆される.

今回の血流阻害剤 AC-7700 による変化では第 10 日における肺胞腔内への出血をみたが, 血流阻害による血管内皮細胞への傷害が生じ, プレオマイシンによる病変を加えた可能性も考えられよう. このような変化は, これらの血管新生抑制剤や血流阻害剤が抗腫瘍効果を期待されて臨床応用化された場合に, 将来的に抗癌剤との併用

の問題が生じる可能性を示している点で非常に重要なことであると考えられる。

以上の結果から、人特発性肺線維症の肺線維化早期に出現する新生血管は、マウス・ブレオマイシン肺によるモデルの検討から、生体防御機構である可能性が考えられ、血管新生抑制作用や血流障害作用をもつ薬剤はむしろ禁忌であることが示された。

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) 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. 早期肺病変における血管新生の病態への影響. 1999年度びまん性肺疾患調査研究 69-73, 2000.
- 3) Pettit GR, Singh SB, Hamel E, Lin CM, Alberts DS, and Garcia-Kendall D. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. *Experientia*, 45: 209-211, 1989.
- 4) Dark GG, Hill SA, Prise VE, Tozer GM, Pettit GR, and Chaplin DJ. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res.*, 57, 1829-1834, 1997.
- 5) Hori K, Saito S, Nihei Y, Suzuki M, and Sato Y. Antitumor effects due to irreversible stoppage of tumor tissue blood flow: Evaluation of a novel combretastatin A-4 derivatives, AC7700. *Jpn J Cancer Res* 90: 1026-1038, 1999.
- 6) Nihei Y, Suga Y, Morinaga Y, Ohishi M, Okano A, Ohsumi K, Hatanaka T, Nakagawa R, Tsuji T, Akiyama Y, Saito S, Hori K, Sato Y, and Tsuruo T. A novel combretastatin A-4 derivatives, AC-7700, shows marked antitumor activity against advanced solid tumors and orthotopically transplanted tumors. *Jpn J Cancer Res*, 90: 1016-1025, 1999.
- 7) Takahashi T. The pathology of pulmonary fibrosis revealed by the study of paraquat lungs. In: Takishima T ed. *Basic and Clinical Aspects of Pulmonary Fibrosis*. CRC Press, Boca Raton, pp 3-13, 1994.
- 8) Keane MP, Belperio JA, Moore TA, Moore BB, Arenberg DA, Smith RE, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM: Neutralization of the CXC chemokine, macrophage inflammatory protein-2, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol* 1999, 162: 5511-5518.
- 9) Chaplin DJ, Pettit GR, Parkins CS, and Hill SA. Antivascular approaches to solid tumor therapy: evaluation of tubulin binding agents. *Br. J. Cancer*, 74, S86-88, 1996.

末梢血由来の線維芽細胞様樹状細胞の単離と 肺線維化における役割の検討

石井 芳樹 知花 和行 福田 健

循環血液中に存在する CD34 陽性 progenitor cell に由来する樹状細胞 (DC) の亜群の 1 つに、組織傷害部位に集積して組織修復に働く細胞があり、組織の線維化に関与している可能性が考えられている。本細胞の末梢血からの分離法を確立し、性状を検討した。ヒト末梢血から得た PBMC を 2 週間培養し、線維芽細胞様形態を示す細胞が得られ CD14 ビーズにて単球系細胞を除去し単離した。単離すると細胞表面に樹状突起を持ち、樹状細胞様形態を示した。CD45RO (+), HLA-DR (+), CD11c (+), CD86 (+), CD14 (-) であり、血球由来の抗原提示細胞で DC の亜群と考えられた。さらに本細胞は、type I collagen, fibronectin, prolyl 4-hydroxylase 陽性であり、fibroblast としての性格も有していた。線維芽細胞の性格を有する DC が末梢血から単離された。本細胞の機能と肺線維化における役割を解明することが肺線維化病態解明と治療に有用である可能性がある。

Characterization of fibroblast-like dendritic cells derived from human peripheral blood

Yoshiki Ishii, Kazuyuki Chibana, Takeshi Fukuda

Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi, Japan

We isolated fibroblast-like dendritic cells (FDC) from human peripheral blood and examined their characteristics. Although adherent FDC showed fibroblast-like appearance on a culture plate, they demonstrated dendritic cell-like villi on the cell surface when removed from the plate. We found by flow cytometry that FDC expressed fibrogenic markers such as collagen type I, fibronectin, and prolyl 4-hydroxylase. mRNA expressions of these three molecules were detected on FDC but not on peripheral blood mononuclear cells (PBMC). FDC also displayed cell surface antigens such as CD34, CD45RO, CD11c, CD86, and HLA-DR. These findings indicated that FDC have both fibroblast-like and DC-like characteristics. To clarify the role of FDC in the pathophysiology of pulmonary fibrosis might be very useful to develop a new therapy.