

## はじめに

特発性間質性肺炎 (IIP) は、原因不明の間質性肺炎であり、膠原病、薬物や過敏性肺炎などによる間質性肺炎である可能性を除外することが必要である<sup>1,2)</sup>。過敏性肺炎は有機物ないし無機物の吸入によって起こるアレルギー性肺疾患であり、その経過から急性型・慢性型に分類される<sup>3,4)</sup>。鳥飼病は、代表的な過敏性肺炎であり、鳥類の排泄物や羽毛を抗原とする<sup>5,6)</sup>。本邦で過敏性肺炎の70%以上を占める夏型過敏性肺炎は急性例が多いが<sup>7)</sup>、鳥飼病は慢性例が多く、咳、呼吸困難、発熱などの急性症状があっても経時的に軽快するので、症状の軽いことが多く、急性症状のない慢性鳥飼病も存在するため、正確に診断することが難しく、特発性肺線維症 (IPF) と誤診されることもある<sup>8)</sup>。そのため、末期の肺線維症まで進行してから専門施設に紹介されることも多い。過敏性肺炎の治療は抗原回避とステロイド療法が中心であるが、徹底した抗原回避とステロイド療法を施行しても、病勢の進行していく慢性鳥飼病を経験する<sup>9)</sup>。慢性鳥飼病の治療方法確立のため、慢性鳥飼病症例の臨床像とステロイド反応性との関連性を検討した。

## 方 法

対象は、1993年から2000年にかけて当院にて診断された慢性鳥飼病37例中ステロイド治療を受けた29例であり、ステロイド治療後の病像を改善群、不変群、進行群と3群に分類し、臨床症状、血液免疫学的検査、肺機能、画像、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、組織所見等の各項目において各群間で差がないか、retrospective に比較検討した。ステロイド投与量はプレドニゾン約0.5mg/kg/日、現実には30-40mg/日で開始し、2-4週で、2.5-5mg、1日投与量が20mg以下では1.25mgづつ漸減していた。慢性鳥飼病の診断基準は以下のように定めた。

1. 鳥関連抗原との接触歴があること
2. 環境曝露または抗原吸入誘発試験による臨床

## 像の再現

3. 鳥関連抗原に対する特異抗体かあるいはリンパ球増殖試験が陽性か、両者が陽性
4. 組織学的に線維化を認めること
5. CTでのhoneycombingの存在
6. 1年以上にわたる拘束性換気障害の進行
7. 6ヵ月以上わたる過敏性肺炎による呼吸器症状の存在

このうち、1, 2, 3, と、4または5, 6または7を認めるものを確実例として対象とした<sup>8,10)</sup>。ステロイドの治療効果の判定は、idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): diagnosis and treatment の international consensus statement を参考にして、改善群、不変群、進行群を定義した<sup>1)</sup>。つまり、3-6ヶ月の期間中、引き続き2回の来診時に以下の2項目をみたまつ場合に改善と定義した。

- ・咳、呼吸困難の軽快
- ・胸部X線写真またはHRCTにおける異常所見の減少
- ・生理学的改善 以下の3項目中2項目
- ・全肺気量または肺活量の10%以上の変化または200ml以上の変化
- ・Dlcoの15%以上の変化または3ml/分/Torr以上の変化
- ・SpO<sub>2</sub>の4%の変化、またはPaO<sub>2</sub>の4Torr以上の変化

同程度の悪化を3項目中2項目で認めた場合に進行と定義し、どちらでもない時、不変とした。

## 特異抗体の測定

気管支肺胞洗浄液中と血清中の部分精製鳩排泄物抗原に対するIgGおよびIgA抗体価をELISA法にて測定した。鳩とインコの排泄物は交叉抗原性があり<sup>11)</sup>、鳩排泄物を抗原として用いた。鳩糞をPBSで抽出し、蒸留水に対して透析、凍結乾燥後、50%硫酸アンモニウムで塩析して精製した後カーボネイトバッファー (pH9.6) に対し透析しコーティングに使用した (以下50%PDEとする)<sup>12)</sup>。各ウエルを50%PDEでコーティング、0.5%BSA (Tween20を含む) でブロックを行った。サンプル100μl (血清は400倍希釈、BAL液は8倍希釈) にて反応させ、さらにペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgGおよび

1. 東京医科歯科大学呼吸器科  
 2. 聖路加国際病院病理診断科  
 \* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

IgA ヤギ抗体にて反応させ、発色させ、490nm または 620nm で O.D を測定した。

鳩血清添加末梢血単核球増殖試験

ヘパリン採血した末梢血から比重遠心法にて単核球を分離し、 $2 \times 10^6/ml$  の濃度で RPMI 1640/10%FCS に浮遊させた。鳩血清を 1% 加え 5 日間培養し、 $2 \times 10^5$  の細胞につき  $^3H$ -thymidine  $1\mu Ci$  を加え、さらに 16 時間培養し、細胞の放射能活性を調べることにより、 $^3H$ -thymidine の取り込み能を調べた。コントロールとして鳩血清無添加の細胞を用い、放射能活性の比を stimulation index とし、2.0 以上を陽性とした。

統計

データは平均±標準誤差 (SEM) で表した。3 群間の比較には Fisher の直接確立検定、 $\chi^2$  乗検定あるいは Kruskal-Wallis 検定を使用し、Post-hoc test は Scheffe 法で行なった。これらの検定について、有意水準は危険度 5% 未満を有意差ありとした。

結果

性別、年齢、抗原暴露期間、喫煙率は 3 群間で有意差を認めなかった (Table 1)。進行群は改善群に比べて、症状出現から受診までの期間が長く、潜在性発症だった。

検査所見では、白血球数、RA 及び抗核抗体陽性率、KL-6、SP-D は 3 群間で有意差を認めなかった (Table 2)。特異抗体陽性率は進行群で有意に陰性

Table1 Clinical Characteristics

	改善群 n=14	不変群 n=7	進行群 n=8
性別 (男性; 女性)	(6; 8)	(3; 4)	(6; 2)
年齢 (歳)	58.6±2.5	66.7±2.6	61.5±2.5
症状出現から受診までの期間 (月)	9.5±3.9 #	20.6±9.0	37.0±11.8 #
抗原暴露期間 (年)	12.3±2.0	13.0±2.7	10.3±2.1
喫煙率 (%) (current; ex; never)	50.0(4; 3; 7)	42.9(0; 3; 4)	75.0(3; 3; 2)
潜在性発症型 (%)	21.4 * @	85.7 @	100.0 *
咳嗽 (%)	64.3	71.4	37.5
喀痰 (%)	14.3 @	71.4 @	25.0
微熱 (%)	28.6	0.0	0.0
労作時呼吸困難 (%)	92.9	71.4	100.0

# p < 0.05 (改善群 vs 進行群)  
\* P < 0.01 (改善群 vs 進行群)  
@ p < 0.05 (改善群 vs 不変群)

Table2 Laboratory and Immunological Findings, and Pulmonary Function Tests

	改善群 n=14	不変群 n=7	進行群 n=8
WBC ( $\mu L$ )	7191±535	6833±760	7225±761
CRP (mg/dl)	1.1±0.4	0.3±0.1	0.2±0.1
KL-6	2613±671	1704±417	1731±494
SP-D	389±78	373±140	288±19
RA (%)	21.4	28.6	37.5
ANA (%)	42.9	28.6	50.0
特異抗体 (%)	71.4 #	42.9	12.5 #
抗原添加単核球増殖試験 (%)	92.9	85.7	100.0
PaO <sub>2</sub> (Torr)	68.7±2.8	81.8±4.8	73.6±5.0
PaCO <sub>2</sub> (Torr)	38.0±0.9 * @	42.7±1.0 @	44.0±1.5 *
VC (%)	81.1±5.2 #	65.2±8.0	57.1±6.1 #
FEV1.0% (%)	77.3±1.3	89.3±6.9	88.8±2.6
%DLco (%)	56.1±4.0 *	58.0±8.6 &	33.4±2.2 * &

# p < 0.05 (改善群 vs 進行群)  
\* P < 0.01 (改善群 vs 進行群)  
@ p < 0.05 (改善群 vs 不変群)  
\$ p < 0.01 (改善群 vs 不変群)  
& p < 0.05 (不変群 vs 進行群)

例が多かった。PaCO<sub>2</sub> は、改善群では不変群、進行群より有意に低値だった。VC は、進行群では改善群より低値であり、%DLco は、進行群は改善群、不変群より低値だった。

胸部 X 線写真にて線状影は、進行群、不変群で改善群より高率に認められたが、上中下肺野優位、または全肺野びまん性という病変分布は治療反応性に差を認めなかった。HRCT では、honeycombing は、進行群では改善群より高率に認められた。外側優位の分布は、進行群では改善群より高率に認められた。

BALF のリンパ球分画は、進行群は不変群、改善群より低値だった。

外科的肺生検を施行した 23 例の組織所見を usual interstitial pneumonia (UIP) パターン、nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) パターン、desquamative interstitial pneumonia (DIP) パターン、bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) パターン、diffuse alveolar damage (DAD) パターンと分類したところ、DIP パターン、BOOP パターン、DAD パターンは 1 例も認められず、進行群では UIP パターンを高率に認めた。

考案・結論

KL-6 や SP-D は種々の間質性肺炎の活動性のマーカーとして注目され、IPF や種々の過敏性肺炎で活動性と相関したと報告されている<sup>13,14)</sup>。今回の 29 例の慢性鳥飼病の検討では、KL-6 と SP-D がス

Table3 Imaging Findings

		改善群 n=14	不変群 n=7	進行群 n=8
線状影 (%)	Chest X-ray	14.3 *\$	85.7 \$	100.0 *
肺野の縮小 (%)	Chest X-ray	21.4	42.9	50.0
上肺野優位 (%)	Chest X-ray	0.0	0.0	25.0
中肺野優位 (%)	Chest X-ray	0.0	14.3	0.0
下肺野優位 (%)	Chest X-ray	21.4	0.0	37.5
びまん性 (全肺野) (%)	Chest X-ray	78.6	85.7	37.5
小葉中心粒状影 (%)	HRCT	42.9	14.3	12.5
スリガラス影 (%)	HRCT	100.0	100.0	100.0
Consolidation (浸潤影) (%)	HRCT	42.9	28.6	37.5
Honeycombing (%)	HRCT	21.4 *	71.4	87.5 *
不規則線状影 (%)	HRCT	57.1	100.0	100.0
Bronchovascular Distribution (%)	HRCT	35.7	85.7	62.5
外側優位 (%)	HRCT	0.0 #	0.0	37.5 #

# p < 0.05 (改善群 vs 進行群)  
\* P < 0.01 (改善群 vs 進行群)  
\$ p < 0.01 (改善群 vs 不変群)

Table4 Bronchoalveolar Lavage Fluid Findings

	改善群 n=14	不変群 n=7	進行群 n=8
TCC/ml (×10 <sup>5</sup> )	6.5±1.1	4.0±0.7	3.7±1.0
Alveolar Macrophages (%)	24.8±4.7 *@	55.6±7.8 @&	83.2±2.9 *&
Lymphocytes (%)	71.2±4.7 *\$	31.9±6.0 \$&	10.7±1.0 *&
Neutrophils (%)	2.4±1.2	8.2±3.8	3.4±1.9
Eosinophils (%)	1.6±0.6	4.4±1.9	1.1±0.5
CD4/8	3.0±1.7	3.0±1.1	2.2±0.6

\* P < 0.01 (改善群 vs 進行群)  
@ p < 0.05 (改善群 vs 不変群)  
\$ p < 0.01 (改善群 vs 不変群)  
& p < 0.05 (不変群 vs 進行群)

ステロイド反応性を予測できるという結果は得られなかった。

Cormier 等<sup>15)</sup>は26例の農夫肺の検討で、BAL中のリンパ球数と予後は相関しなかったと報告している。しかし、彼等の症例はステロイド治療を受けずに、抗原回避のみで経過観察したものである。また Monkare 等<sup>16,17)</sup>は93例の農夫肺症例の検討で、ステロイド治療は、長期観察での肺機能改善をもたらさなかったとしている。今回の検討では、改善群は、潜在性発症例が少なく、急性症状を有する症例が多かったためか、慢性鳥飼病の診断は比較的容易であり、ステロイド開始前の肺機能も、進行群よりは保たれていた。これに対し、進行群は潜在性発症が多く、当科受診前はIPFと診断されている例も多かった。また、進行群8例中4例はステロイド治療の他に、cyclosporin A (CyA) や cyclophosphamide (CPA) を併用しても死亡した。しかし、末期の肺線維症となつてからの併用であるため、今回の症例のみから結論を導くことはできない。

進行群は、改善群に比べて、症状出現から受診

までの期間が長く、潜在性発症であり、特異抗体陽性率が低く、PaCO<sub>2</sub>高値、VC、Dlcoの低値、HRCTではhoneycomb、外側優位の分布は高率で、BAL中リンパ球分画低値であり、組織所見もUIPパターンを認める頻度が高かった。進行群は、不変群に比べて、Dlco低値、BAL中リンパ球分画低値だった。よって、潜在性発症の進行群では、ステロイドと免疫抑制剤の併用や肺移植など、ステロイド以外の治療を考慮する必要がある、prospectiveな検討が必要であると思われた。

### 参考文献

- 1) American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. Am J Respir Crit Care Med 161: 646-664, 2000.
- 2) Raghu G, Mageto YN, Lockhart D *et al.* The accuracy of the clinical diagnosis of new-onset idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung disease. Chest 116: 1168-1174, 1999.
- 3) Fink JN. Hypersensitivity pneumonitis. J Allergy Clin Immunol 74: 1-10, 1984.
- 4) 吉澤靖之. 過敏性肺炎. 泉 孝英編, ガイドライン外来診療. 日経メディカル開発. 66-72, 2001.
- 5) Todd A, Coan RM, Allen A. Pigeon breeder's lung: pigeon intestinal mucin, an antigen distinct from pigeon IgA. Clin Exp Immunol 85: 453-458, 1991.
- 6) Kaltreider HB. Hypersensitivity pneumonitis. West J Med 159: 570-578, 1993.
- 7) Ando M, Konishi K, Yoneda R, *et al.* Difference in the phenotypes of bronchoalveolar lavage lymphocytes in patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis, farmer's lung, ventilation pneumonitis, and bird fancier's lung: report of a nationwide epidemiological study in Japan. J Allergy Clin Immunol 87: 1002-1009, 1991.
- 8) Yoshizawa Y, Ohtani Y, Hayakawa H, *et al.* Chronic hypersensitivity pneumonitis in Japan: a nationwide epidemiologic survey. J Allergy Clin

- Immunol 103: 315-320, 1999.
- 9) Perez-Padilla R, Salas J, Chapela R, *et al.* Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 148: 49-53, 1993.
- 10) Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, *et al.* Inhalation provocation tests in chronic bird fancier's lung. *Chest* 118: 1382-1389, 2000.
- 11) Berrens L, Verschuren M, Van Dijk AG, *et al.* Antibodies against hen's egg proteins in pigeon breeder's disease. *Clin Allergy* 16: 355-363, 1986.
- 12) Tebo TH, Moore VL, Noh JJ. Antigens in pigeon breeder's disease: Isolation of a homogeneous antigen from pigeon dropping extract and its relationship to pigeon serum antigens. *J Reticuloendoth Soc* 18: 196-203, 1975.
- 13) Takahashi T, Munakata M, Ohtsuka Y, *et al.* Serum KL-6 concentrations in dairy farmers. *Chest* 118: 445-450, 2000.
- 14) Tanaka H, Sugawara H, Saikai T, *et al.* Mushroom worker's lung caused by spores of *hypsizigus marmoreus* (Bunashimeji). Elevated serum surfactant protein D levels. *Chest* 118: 1506-1509, 2000.
- 15) Cormier Y, Belanger J, Laviolette M. Prognostic significance of bronchoalveolar lymphocytosis in farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 135: 692-695, 1987.
- 16) Monkare S. Influence of corticosteroid treatment on the course of farmer's lung. *Eur J Respir Dis* 64: 283-293, 1983.
- 17) Monkare S, Ikonen M, Haahtela T. Radiologic findings in farmer's lung. Prognosis and correlation to lung function. *Chest* 87: 460-466, 1985.

# 鳥飼病動物実験モデルを用いた慢性化病態の サイトカインネットワークに関する研究

三宅 修司 大谷 義夫 角 勇樹 海野 剛  
稲瀬 直彦 吉澤 靖之\*

鳥飼病は鳥関連抗原の吸入による過敏性肺炎であるが、慢性型が多く、多彩な臨床症状を呈するなど診断が困難な症例も多い。鳥飼病の病態解明、特に慢性化病態の解明の一助とすべく、マウスを用いた動物実験モデルを作製した。鳩糞抽出物(PDE)を用いた反復経鼻感作により4週間の反復感作でPDE抗体の産生、気管支血管束周囲へのリンパ球集簇を認め、17週間の反復感作により肺/体重比の更なる増加と肺胞腔内へのマクロファージ集簇、胞隔炎の出現も認めた。また17週感作群でヒドロキシプロリン産生増加を認め、線維化巣の出現を示唆していた。肺全体のRNAで検討したサイトカイン mRNA の発現量は IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 の増加を認め、4週、17週に大きな変化は見られなかった。肺全体のサイトカイン mRNA の検討から PDE 感作肺病変の形成において上記 pro-inflammatory cytokine と anti-inflammatory cytokine の重要な関わりが示唆された。

## **Experimental murine hypersensitivity pneumonitis with pigeon dropping extracts (PDE): expression of murine lung cytokines and hydroxyproline by the repeated intranasal sensitization**

Shuji Miyake, Yoshio Ohtani, Yuki Sumi, Takeshi Umino  
Naohiko Inase, Yasuyuki Yoshizawa

*The Pulmonary Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo Japan*

An animal model of hypersensitivity pneumonitis was developed in mice by immunization with pigeon dropping extracts (PDE) on repeated intranasal sensitizations. Intranasal sensitization to C57BL/6J mice for 4 weeks caused intense diffuse lymphocyte accumulation in peribronchovascular regions with loose granulomatous changes. Extended intranasal sensitization for 17 weeks caused alveolar fillings with macrophages as well as the histological changes in peribronchovascular regions, and an increase of hydroxyproline-concentrations as compared with controls. Cytokine mRNA expression of both pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ ) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) in whole-lungs was enhanced. Other cytokine mRNA expressions including IL-2, IL-5, IL-6, and IL-12 in whole-lungs were unchanged by the sensitization with PDE suggesting that the balance between the pro-inflammatory cytokines and the anti-inflammatory cytokine is important in the pathogenesis of this hypersensitivity pneumonitis model. We believe this animal models can be used for investigating the pathogenesis of pigeon breeder's lung.

## はじめに

過敏性肺炎は様々な有機物あるいは無機物の吸入により感作され生じる肺疾患である。急性型はBAL液中のリンパ球増多を特徴とし、リンパ球性胞隔炎、疎な肉芽腫形成などが特徴である。過敏性肺炎のなかで鳥関連抗原の吸入により生じる過敏性肺炎が鳥飼病である。鳩飼病はハト飼育者の約5-15%で認められ<sup>1)</sup>、本邦では過敏性肺炎の中の約5%を占めるとされている。ハト糞中の抗原として免疫グロブリン由来の物質、羽毛をコーティングしている蛋白、あるいはムチンが関与しているとされている<sup>2)</sup>。

臨床像の多彩さの原因について現在検討中であり、その検討の一助とすべく、動物を用いた鳥飼病モデル作製を行った<sup>3)</sup>。

## 対象と方法

生後8週令以上、体重18-22gのC57BL/6J雌マウスを用いた。鳩糞抽出物(Pigeon dropping extracts, 以下PDE)はこれまでの方法<sup>4)</sup>で精製抽出した。ハト糞をPBSで抽出し、50%硫酸アンモニウムで塩析、凍結乾燥した。このPDEを生理食塩水で溶解し、各濃度に希釈調整した(PDE液)。このPDE液40 $\mu$ lをエーテルによる軽麻酔下のマウスに経鼻的に注入し、吸気とともに吸入させた。この方法を週3日、隔日で繰り返し、4週もしくは17週間施行した。

屠殺はエーテル麻酔後頸椎脱臼させ、その後心腔採血にて脱血死させた。右心室から生理食塩水2mlで肺を還流した後、心肺を一塊として摘出。さらに心臓を除去し、様々な組織を除去した後両肺の重量を測定した。

### 気管支肺胞洗浄(BAL)

プラスチックカニューラを気管内に挿入し、左肺を主気管支で結紮。右肺に対して生理食塩水0.5mlで計5回気管支肺胞洗浄を施行した。BAL液中の細胞を回収し、総細胞数と細胞分画を確認した。

## Lung Index

Lung indexはWilsonら<sup>5)</sup>の方法で計算した。Lung indexは肺重量/体重比を対照群の肺重量/体重比と比較するものである。

抗PDE IgG抗体は酵素抗体法にて測定した。

組織学的検討は肺組織を2%パラホルムアルデヒドを左主気管支より注入し、パラフィン包埋後5 $\mu$ m厚で切片を作製し、HE染色で染めた。

右肺はBAL施行後ハイドロキシブリンを定量した。

## RNA分離及びmRNA定量

左肺は主気管支から分離し、TRIzol2.5ml中にてhomogenizeした。左肺からのRNAを用いてサイトカインmRNA発現量を定量した。mRNAの定量はABI prism7700を用いたreal time PCR法を用いた<sup>6)</sup>。これは従来のPCRの半定量法と異なり、PCRで作製されるproductsをreal timeで測定するものでIL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ のreal time PCR用probeを購入し定量した。

## 結 果

予備実験にて、8 $\mu$ g/body以上のPDEによる4週間の反復経鼻感作により、lung indexが有意な増加を示すことを確認した。また8 $\mu$ g/body以上の濃度であっても肺病変の程度に同様であることを確認した。Lung index, BAL細胞数の経時的变化を図1に示す。4週間PDE反復経鼻感作後のLung indexはday0で有意に増加しday9でも有意な増加を示していたが、その程度はday0, day3と比べ低下していた。BAL細胞数や細胞分画の経時的变化ではday3で著明な細胞数増多を認めた。好中球はday0で約半数を占めていたが、day3では減少していた。そこで我々は感作後3日目を実験の時期に用いた。

## PDE長期反復経鼻感作のlung indexとBAL中細胞への影響

4週間の反復経鼻感作と比べ、17週間の経鼻感作ではlung indexがより増加していた(図2)。またBAL中のリンパ球や好中球が多い傾向を認めたが、有意な差を認めなかった(図3)。

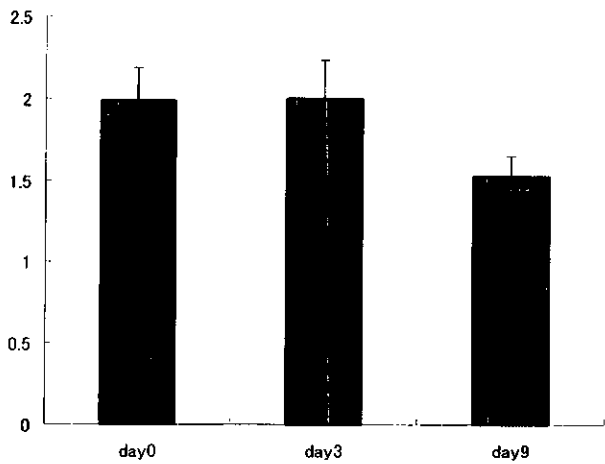


図 1A comparison of lung index on the indicated day after the last sensitization following the 4 weeks exposure.

Vertical line indicates lung index and a number 1 means lung index of controls. Horizontal axis indicates days after the last sensitization with PDE. Solid bars indicate means of each lung index and vertical lines indicate standard deviations of the means. (n=5)

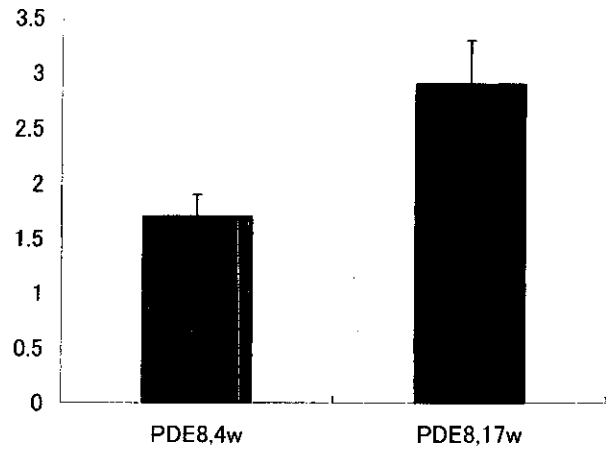


図 2 comparison of lung indexes between the 4-week exposure and the 17-week exposure. The dosage of PDE exposed at each time was 8 $\mu$ g.

Solid bars indicate means of lung indexes in each group and vertical lines indicate standard deviations of means. Statistically significant increase was observed in both group ( $p < 0.001$ ) as compared with controls. (n=5)

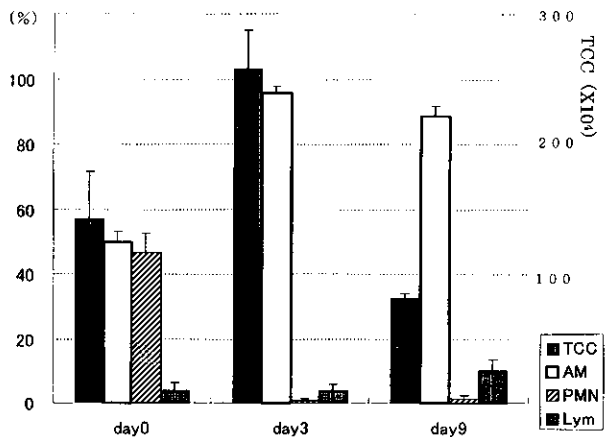


図 1B comparison of BAL cells on the indicated day after the last sensitization with PDE.

Left vertical line indicates percentage of BAL cells and right vertical line indicates cell number of BAL cells (total cell counts). Horizontal axis indicates days after the last sensitization following the 4 weeks exposure.

Solid bars represent means of total cell numbers of BAL cells. Open bars, dashed bars, and dotted bars represent means of percentage of alveolar macrophages, polymorphonuclear cells and lymphocytes in BAL cells respectively. Vertical lines indicate standard deviations of means. (n=4)

Abbreviations: TCC: total cell counts, AM: alveolar macrophages, PMN: polymorphonuclear cells, Lym: lymphocytes.

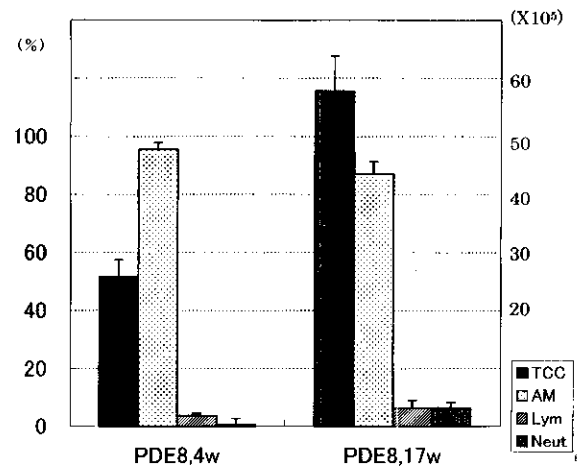


図 3 comparison of BAL cells between the 4-week exposed group and the 17-week exposed group.

Left vertical line indicates percentage of BAL cells and right vertical line indicates cell number of BAL cells (total cell counts).

Solid bars represent means of total cell numbers of BAL cells. White dotted bars, dashed bars, and dark dotted bars represent means of percentage of alveolar macrophages, polymorphonuclear cells and lymphocytes in BAL cells respectively. Vertical lines indicate standard deviations of means. (n=6)

Abbreviations: TCC: total cell counts, AM: alveolar macrophages, PMN: polymorphonuclear cells, Lym: lymphocytes.

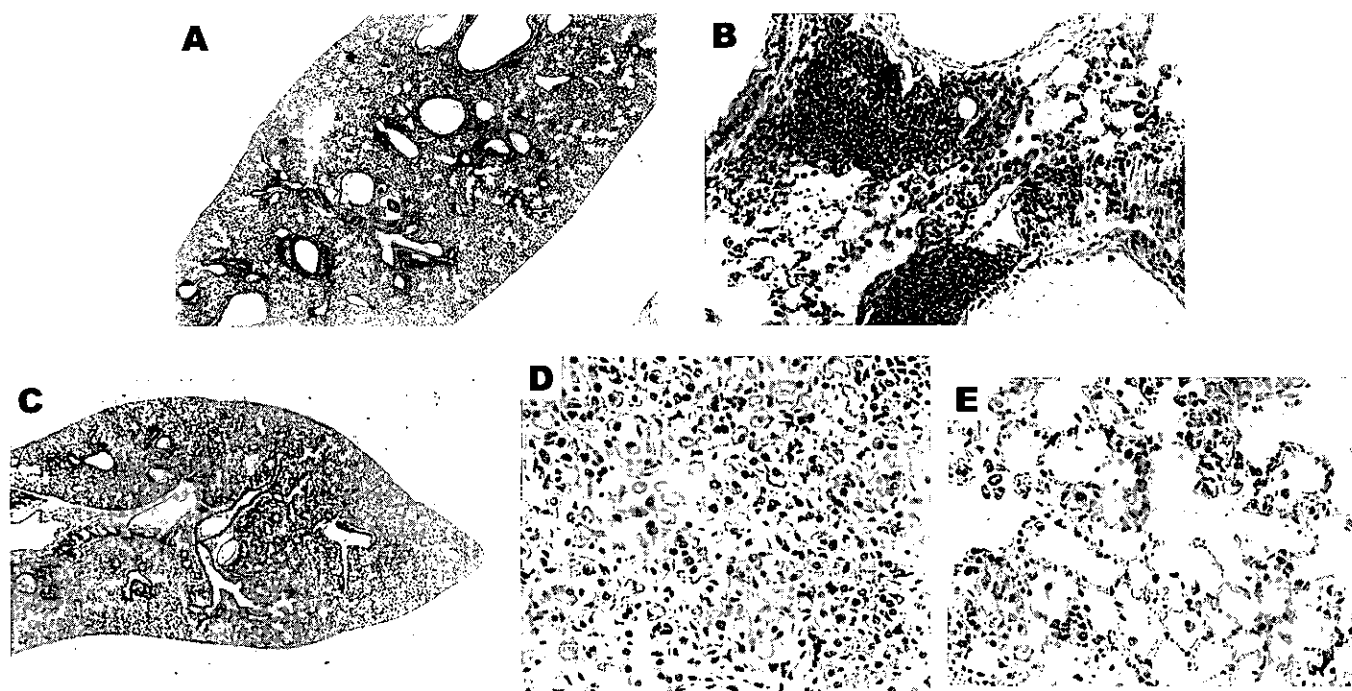


図4 Intranasal sensitization with PDE 8 $\mu$ g for the consecutive 4 weeks produced intense cell infiltrations at peribronchovascular regions with sparse alveolar lesions (4A). At high magnification, accumulation of lymphocytes and loose granulomatous lesion was observed (4B). Extended intranasal sensitization with PDE 8 $\mu$ g for 17 weeks (4C). Alveolar filling with mainly macrophages was observed (4D) and mild interstitial thickening with lymphocytes was also observed (4E).

#### 病理組織学的検討

PDE 反復感作3日後では局在する肺炎像は認めなかった。4週間の反復感作では細気管支周囲と血管周囲にリンパ球を中心とする細胞浸潤を認め、肺胞領域での病変は軽微であった(図4A, B)。一方、17週間の反復感作では上記病変に加え、肺胞腔内に主にマクロファージの集積を認めた。また胞隔に軽度なリンパ球集積を伴う炎症像を認めた(図4C, D, E)。

#### ハイドロキシプロリン定量

右肺含有ハイドロキシプロリン量は生食吸引の対照群と比べ、4週間の経鼻感作群では有意な増加を認めなかったが、17週間の感作群では増加していた(図5)。

#### mRNA 発現量の検討

左肺全体から抽出したRNAを用いたmRNAの検討では、IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ がPDE感作により、4週間群、17週間群とも有意に増加していた。IL-2, IL5, IL-6, IL-12のmRNA発現量は今回の検討ではPDE感作による有意な変動を認めなかった(図6)。

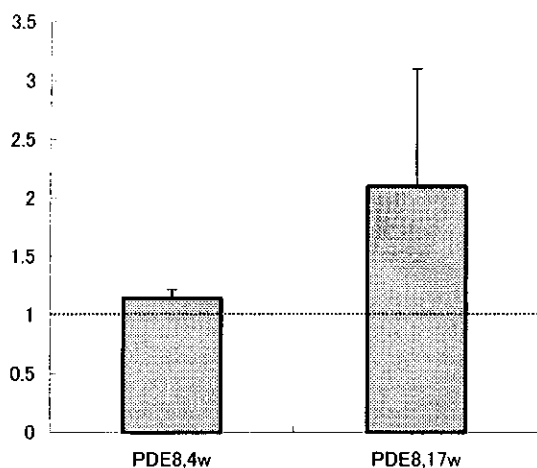


図5 comparison of contents of hydroxyproline in right lungs between the 4-week exposure and the 17-week exposure.

Vertical line indicates the ratio of hydroxyproline-contents to those of controls. A number 1 means the contents of hydroxyproline in sham treated right lungs. The dosage of PDE exposed at each procedure was 8 $\mu$ g.

Dotted bars represent the means of hydroxyproline in right lungs and vertical lines indicate the standard deviation of means. (n=5)

A significant increase of hydroxyproline contents was observed in the 17-week exposed group as compared with controls (p<0.05).



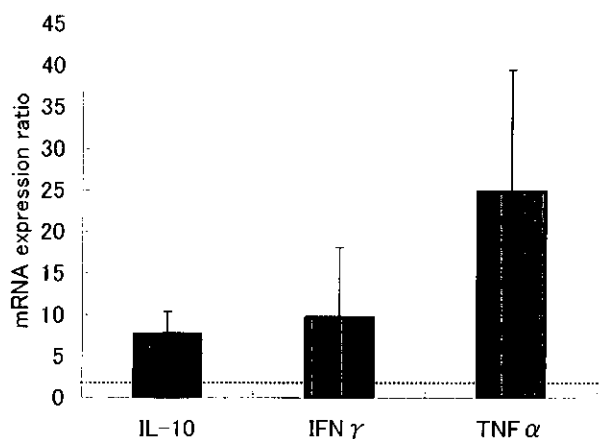


図6 The ratio of mRNA expression of cytokines. Vertical line represents the ratio of mRNA expression of cytokines to that of controls. A dotted line means the level of mRNA expression of controls. Quantitative analyses of mRNA expression demonstrate that mRNA expression of TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , and IL-10 was significantly enhanced by the repeated intranasal sensitization with PDE. Real time PCR for quantification of mRNA expression was carried out on separate three occasions and the mean of the three results was employed.

## 考案・結論

鳥飼病は、抗原曝露後数時間で呼吸器症状が出現する急性型は診断が比較的容易であるが、慢性型鳥飼病の症状は多様である。再燃症状軽減型と潜在性発症型に大きく分けられる。この臨床像の違いを決定する因子はいまだ明らかではない。吸入抗原の曝露期間や曝露抗原量が関わっている可能性が考えられているが<sup>3)</sup>、retrospectiveな臨床例の検討のみでは十分ではなく、急性型と慢性型の病態の違いも明らかではない。そこで、経鼻気道感作を繰り返すことで鳥飼病に類似した肺病変モデルを作製した。以前に Wilson ら<sup>5)</sup>は C3H/He マウスを用いた実験では2週間の気道吸入のみでは明らかな肺病変は作製できなかったとしているが、今回 C57BL/6J マウスを用いた4週間の反復経気道感作で変化を認めた。マウスによる種差もしくは反復感作期間の差が肺病変の差となった可能性が考えられた。

動物実験モデルでは反復抗原曝露により肺病変の減衰を認めるという報告もあるが、PDEを用いたこのモデルでは17週間という比較的長期にわたる感作でも lung index は増加しており、気管支血管周囲のリンパ球集積に加えて肺胞レベルの病変も出現していた。この変化は DIP 様のマクロファージの肺胞内集積がみられている。また胞隔のリンパ

球浸潤も認めており、ハイドロキシプロリンの増加が17週間の感作でみられるようになった。肺病変は我々が臨床で経験する慢性型鳥飼病の肺病理所見とは異なるものの、4週間感作でみられない胞隔炎の出現やハイドロキシプロリン増加は慢性刺激による新たな病態の出現を示唆している。

肺全体でのサイトカイン mRNA 発現量を検討したところ、IL-2, IL-5, IL-6, IL-12 は PDE による気道感作では有意な変動を認めなかった。臨床例では BAL 液中リンパ球の増加と BAL 細胞での Th1 優位のサイトカイン発現が報告されている<sup>7)</sup>が、本研究でそれを示唆する結果が得られなかった。この違いは最終感作3日後に肺を取り出した、その时期的な問題、あるいは肺全体で検討したために肺内の様々な細胞からの RNA が含まれ、明らかな差を認めなかった可能性などが考えられる。この実験モデルでは BAL 中のリンパ球数は多くないために検討しなかったが、今後は BAL 中細胞を用いたサイトカインの検討も必要と考える。

今回の検討で明らかな変化を認めたのは TNF $\alpha$  と IFN $\gamma$ , IL-10 の mRNA であり、肺全体の RNA で検討した場合、鳥飼病におけるこれらサイトカイン発現の重要性が示された。TNF $\alpha$  は炎症反応の中心的役割をはたすほか、過敏性肺炎においても高値を示すことが報告されている<sup>8,9)</sup>。IFN $\gamma$  は過敏性肺炎において肉芽腫形成に重要なサイトカインである<sup>10)</sup>。一方 IL-10 は Th2 の CD4<sup>+</sup>T リンパ球、マクロファージ、B リンパ球から産生される抗炎症性サイトカインとして知られている。内因性 IL-10 は様々な機序で肺の炎症において増加することが知られており<sup>11)</sup>、TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  の産生を抑制すると考えられている<sup>12,13)</sup>。PDE による抗原曝露による免疫反応においては、炎症性サイトカイン (pro-inflammatory cytokine) と抗炎症性サイトカインとが同時に刺激されるものと考えられる。今回肺全体の RNA による検討では TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10 が重要なサイトカインであることが示唆された。

今回の検討では4週間の経鼻気道感作により抗体産生と気管支血管周辺へのリンパ球集積を認めたほか、17週の長期感作ではさらに肺胞領域の変化も加わり、肺の線維化の指標であるハイドロキシプロリンの増加も認めた。これらの結果は PDE の長期感作により肺病変が進行し、線維化をきた

す可能性を示唆しており、本実験モデルは鳥飼病のモデルとして有用であると考ええる。

#### 参考文献

- 1) Roberts, RC, Moore VL: Immunopathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116: 1075-1090.
- 2) Baldwin CI, Stevens B, Connors S, Todd A, Bourke SJ, Calvert JE, Allen A: Pigeon fanciers' lung: the mucin antigen is present in pigeon droppings and pigeon bloom. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117: 187-193.
- 3) Yoshizawa Y, Ohtani Y, Hayakawa H, Sato A, Suga M, Ando M: Chronic hypersensitivity pneumonitis in Japan: a nationwide epidemiologic survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 315-320.
- 4) Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, Sawada M, Inase N, Miyake S, Yoshizawa Y: Inhalation Provocation Tests in Chronic Bird Fancier's Lung. *Chest* 2000; 118: 1382-1389.
- 5) Wilson BD, Sternick JL, Yoshizawa Y, Katzenstein AL, Moore VL: Experimental murine hypersensitivity pneumonitis: multigenic control and influence by genes within the I-B subregion of the H-2 complex. *J Immunol* 1982; 129: 2160-2163.
- 6) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996; 6: 986-994.
- 7) Yamasaki H, Ando M, Brazer W, Center DM, Cruikshank WW: Polarized Type 1 Cytokine Profile in Bronchoalveolar Lavage T Cells of Patients with Hypersensitivity Pneumonitis. *J Immunol* 1999; 163: 3516-3523.
- 8) Ohtani Y, Hisauchi K, Sumi Y, Miyashita Y, Sawada M, Miyake S, Yoshizawa Y: Sequential changes in bronchoalveolar lavage cells and cytokines in a patient progressing from acute to chronic bird fancier's lung disease. *Intern Med* 1999; 38: 896-899.
- 9) Dai H, Guzman J, Bauer PC, Costabel U: Elevated levels of soluble TNF receptors in bronchoalveolar lavage fluid in extrinsic allergic alveolitis. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1209-1213.
- 10) Gudmundsson G, Hunninghake GW: Interferon- $\gamma$  is necessary for the expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest* 1997; 99: 2386-2390.
- 11) Shanley TP, Schmal H, Friedl HP, Jones ML, Ward PA: Regulatory effects of intrinsic IL-10 in IgG immune complex-induced lung injury. *J Immunol* 1995; 154: 3454-3460.
- 12) Gudmundsson G, Bosch A, Davidson BL, Berg DJ, Hunninghake GW: Interleukin-10 modulates the severity of hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 812-818.
- 13) Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Ducarme M, Gerard C, Delvaux A, De Groote D, Abramowicz D, Velu T, Goldman M: Interleukin-10 controls interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1167-1171.

# 慢性経過を呈する間質性肺炎における、 鳥飼病精査の必要性について

井上 哲郎<sup>1</sup> 小橋陽一郎<sup>2\*</sup> 田口 善夫<sup>1\*</sup> 種田 和清<sup>1</sup>  
田中 栄作<sup>1</sup> 加藤 晃史<sup>1</sup> 櫻本 稔<sup>1</sup> 水口 正義<sup>1</sup>  
前田 勇司<sup>1</sup> 馬庭 厚<sup>1</sup> 寺田 邦彦<sup>1</sup> 弓場 吉哲<sup>2</sup>  
野間 恵之<sup>3</sup> 吉澤 靖之<sup>4\*\*</sup> 大谷 義夫<sup>4</sup>

天理よろづ相談所病院呼吸器内科に通院または入院中の、慢性経過を呈する間質性肺炎(計61例)を対象として、鳥との接触に関するアンケート(47例)と鳩血清添加末梢血リンパ球増殖試験(鳩血清LST)(37例)を行った。アンケートで鳥との接触歴が確認され、かつLSTで比較的高いSI(140%以上)を呈したものは6例あり、この中で胸腔鏡下肺生検(VATS)を行った3例に血清とBALFに対するPigeon Dropping Extracts(PDE)に対する抗体検査を行ったところ、2例が陽性であり慢性鳥飼病と診断した。慢性経過を呈する間質性肺炎症例の中に慢性鳥飼病が存在することが証明された。また、慢性経過を呈する間質性肺炎症例における鳥飼病精査のスクリーニングとして、鳥との接触に関するアンケートおよび鳩血清LSTが有用であると考えられた。

## Screening out chronic bird breeder's disease from chronic interstitial pneumonia using detailed questionnaires and serological studies.

Tetsuro Inoue<sup>1</sup>, Yoichiro Kobashi<sup>2</sup>, Yoshio Taguchi<sup>1</sup>, Kazukiyo Oida<sup>1</sup>  
Eisaku Tanaka<sup>1</sup>, Terufumi Kato<sup>1</sup>, Minoru Sakuramoto<sup>1</sup>, Masayoshi Minakuchi<sup>1</sup>  
Yuji Maeda<sup>1</sup>, Ko Maniwa<sup>1</sup>, Kunihiko Terada<sup>1</sup>, Yoshiaki Yuba<sup>2</sup>  
Satoshi Noma<sup>3</sup>, Yasuyuki Yoshizawa<sup>4</sup>, Yoshio Ohtani<sup>4</sup>

*1 Department of Respiratory Medicine, Tenri Hospital*

*2 Department of Pathology, Tenri Hospital*

*3 Department of Radiology, Tenri Hospital*

*4 Department of Pulmonary Medicine, Tokyo Medical and Dental University*

Among 61 cases of chronic interstitial pneumonia, screening for bird breeder's disease was performed using detailed questionnaires about history of contacting to birds (47 cases) and serological studies with lymphocyte blastogenic response to pigeon serum (37 cases). Six patients had both history of contacting to birds and positive serological tests against pigeon serum. In three patients, VATS was performed and two patients were pathologically diagnosed as chronic bird breeder's disease, who had positive antibody in serum and BALF to the pigeon dropping extracts. Therefore we conclude that screening for bird breeder's disease should be performed in patients with chronic progressive interstitial pneumonia using detailed questionnaires about history of contacting to birds and serological studies with lymphocyte blastogenic response to pigeon serum.

表1 鳥との接触に関するアンケート

はじめに

慢性経過を呈する間質性肺炎の中に、慢性鳥飼病が存在する可能性が指摘されている。今回我々は2例の慢性鳥飼病を経験し、鳥飼病精査のスクリーニングとして、鳥との接触に関するアンケートおよび鳩血清 LST が有用であると考えられたので報告する。

対象と方法

当科に通院または入院中の慢性経過を呈する間質性肺炎症例(計 61 例)に鳥との接触に関するアンケート(47 例)と

鳩血清 LST(37 例)を行った。61 例のなかで VATS を行ったものは 18 例であった。対象の 61 例の臨床診断は、IPF/UIP(組織のあるもの)が 3 例、組織は UIP の pattern だが典型的な UIP とは異なるもので膠原病のないもの(分類不能型)11 例、膠原病肺 7 例、IPF(組織なし、明らかな蜂窩肺のあるもの)18 例、その他の IP(組織なし、蜂窩肺のないもの)19 例、その他 3 例、であった。

鳥との接触に関するアンケート(表 1)は入院症例については主治医が聞き取り法で行い、外来症例については患者にアンケートを渡し、記載してもらってから回収する方法を主に行った。

鳩血清 LST は、比重遠心法にて分離した末梢血単核球分画細胞  $4 \times 10^6/\text{ml}$ 、150 $\mu\text{l}/\text{well}$  を用い鳩血清を添加して 2 日間培養、 $^3\text{H-TdR}$  取り込みを 1 日間行った。

1. 鳥の飼育歴(以前および現在)	現在飼っている 幼少の頃飼っていた 成人してから飼っていた 全く飼ったことなし
2. 自宅や周囲に鳥がくるか	多数くる ときどきくる 全くこない
3. 鳥の集まる場所へ行く機会があるか	行く 行かない
4. 鶏糞など鳥の糞を扱うことがあるか	扱う 扱わない
5. 自宅に鳥の剥製があるか	ある ない
6. 羽毛製品を使用しているか	羽毛布団 羽毛の服 その他( ) 使用していない

結 果

鳥との接触に関するアンケート(表 1)の結果:

- 1) 鳥の飼育歴(以前, 現在):
  - 現在飼っている: 0
  - 幼少の頃飼っていた: 6
  - 成人してから飼っていた: 16
  - 全く飼ったことなし: 23
- 2) 自宅や周囲に鳥がくるか:
  - 多数くる: 11
  - ときどきくる: 31
  - 全くこない: 4
- 3) 鳥の集まる場所へ行く機会があるか:
  - 行く: 3
  - 行かない: 26
- 4) 鶏糞など鳥の糞を扱うことがあるか:
  - 扱う: 4
  - 扱わない: 19
- 5) 自宅に鳥の剥製があるか:
  - ある: 2
  - ない: 45
- 6) 羽毛製品を使用しているか:
  - 羽毛布団: 20
  - 羽毛の服: 4
  - 使用していない: 23

1. 天理よろづ相談所病院呼吸器内科
2. 同 病理
3. 同 放射線部
4. 東京医科歯科大学呼吸器科
- \* びまん性肺疾患研究班 研究協力者
- \*\* 同 分担研究者

鳩血清 LST の結果 (図 1)

さきほどの鳥との接触に関するアンケートでの陽性項目数 (少しでも接触があれば陽性とした) を横軸にとり、LST の SI 値を縦軸にとった。陽性項目数が 3 項目以上で、SI 値が比較的高値 (140% 以上) をとった症例が 6 例あり (太字の囲み内に示した)、この中で VATS を行った 3 例に PDE に対する抗体検査を行ったところ、2 例 (楕円囲みで示した) が陽性であり慢性鳥飼病と診断した。その 2 例のうち 1 例を以下に呈示する。

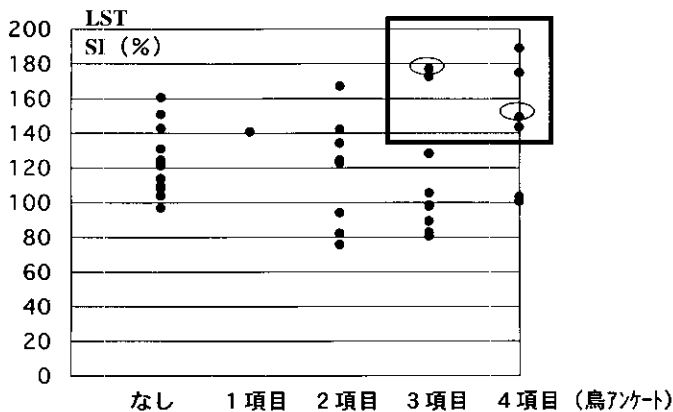


図 1 鳩血清添加末梢血リンパ球増殖試験 (LST)

症例呈示

62 歳女性

主 訴：発熱，湿性咳嗽，労作時呼吸困難

現病歴：生来健康。2, 3 年前頃から H-J II 度程度の労作時呼吸困難あり，2000 年 3 月中旬から 38℃ 台の発熱，湿性咳嗽が出現するため 2000 年 4 月 11 日当院初診，両側下肺野優位の間質影の増強を認め入院となった。なお，1998 年 9 月検診時の胸部 X 線では両側下肺野および左上肺野に軽度の間質影を認めた。

鳥との接触歴：30 歳から 60 歳頃まで室内でインコを飼っていた。現在，自宅および自宅の周囲にハト，スズメ，ヒヨドリなど多数の鳥がくる。羽毛布団を使っている。(鳥との接触に関するアンケート：3/6 項目陽性)

入院時身体所見：ばち指なし，両下肺野に fine crackle あり。

入院時検査所見：WBC 5000 / $\mu$ l, CRP 13.1 mg/dl, ESR 139 mm /hr, LDH 183 IU/l,

RF (-), 抗核抗体 (-), PR3 および MPO-ANCA (-), KL-6 364 U/ml

血液ガス：pH 7.45, PaCO<sub>2</sub> 36.8 torr, PaO<sub>2</sub> 56.1 torr  
鳩血清 LST：SI 174%

呼吸機能 (2000. 4. 21)：VC 1.61 L, %VC 67.9%, FEV<sub>1.0</sub> 1.37 L, %FEV<sub>1.0</sub> 73.2%, %DLco 36.2%

BAL (2000. 4. 17)：右 B<sup>3</sup>, 回収 78/150 ml, 総細胞数 3.0 × 10<sup>5</sup>/ml

(N 8%, Eo 3%, Ly 24%, M 65%), CD4/8：1.0

胸部 X 線：

1998 年 9 月 (入院 18 ヶ月前, 図 2-a)：両側下肺野および左上肺野に間質影を認めた

2000 年 4 月 (入院時, 図 2-b)：両側下肺野および左上肺野の間質影の増強を認めた

2000 年 5 月 (入院 1 ヶ月後, 図 2-c)：自然経過で間質影は改善傾向を認めたが，容量減少の進行を認めた

胸部 CT：

2000 年 4 月 (入院時, 図 3-a)：両側下肺野背側優位の濃い浸潤影を認めた。明らかな蜂窩肺は認めなかった

2000 年 5 月 (入院 1 ヶ月後, 図 3-b)：いずれの陰影も改善傾向を認めた

入院後経過：2000 年 4 月 11 日入院後，安静，酸素投与で経過をみたところ，自覚症状・胸部 X 線 (入院 1 ヶ月後を図 2-c に示した)・胸部 CT (入院 1 ヶ月後を図 3-b に示した)ともに改善を認めた。入院約 1 ヶ月後の 2000 年 5 月 9 日に VATS を施行したが (右 S<sup>4</sup>, S<sup>10</sup>)。その病理像は (図 4)，いずれの小葉にもすでに構造改変のすすんだ線維化がみられ，また小嚢胞腔形成もみられ組織学的には UIP に近い像であるが，気腔内器質化病変がそのまま線維化し肺の構造が比較的保たれた線維化のパターンが目立つ点が，通常の UIP とはやや異なる所見であった。

鳥との接触歴，鳩血清 LST が比較的高値であること，画像が自然に改善傾向にあったことなどから鳥飼病の可能性が考えられたため，血清と BALF の PDE に対する抗体検査を行ったところ，BALF で陽性となりこの症例を慢性鳥飼病と診断した。

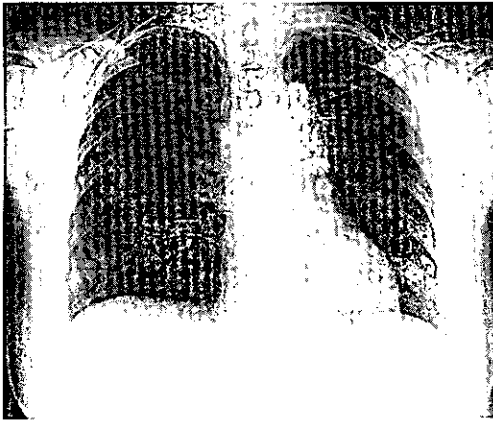


図 2-a 胸部 X 線 1998 年 9 月 (入院 18 ヶ月前)  
両側下肺野および左上肺野に間質影を認めた

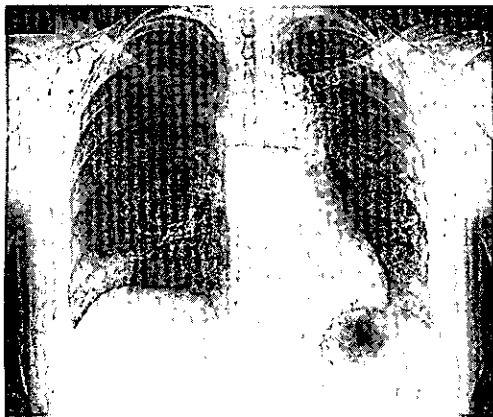


図 2-b 胸部 X 線 2000 年 4 月 (入院時)  
両側下肺野および左上肺野の間質影の増強を認めた



図 2-c 胸部 X 線 2000 年 5 月 (入院 1 ヶ月後)  
自然経過で間質影は改善傾向を認めたが、容量減少の進行を認めた

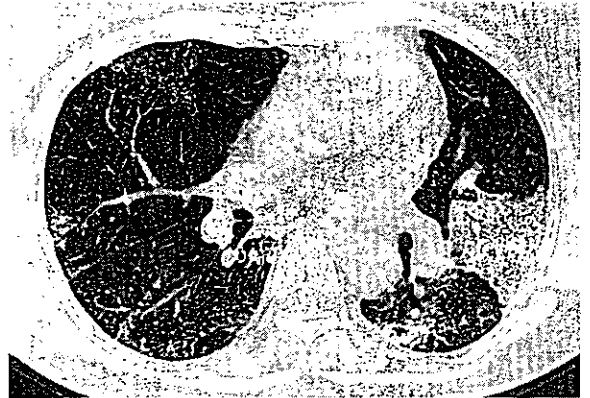


図 3-a 胸部 CT 2000 年 4 月 (入院時)  
両側下肺野背側優位の濃い浸潤影を認めた。明らかな蜂窩肺は認めなかった



図 3-b 胸部 CT 2000 年 5 月 (入院 1 ヶ月後)  
いずれの陰影も改善傾向を認めた

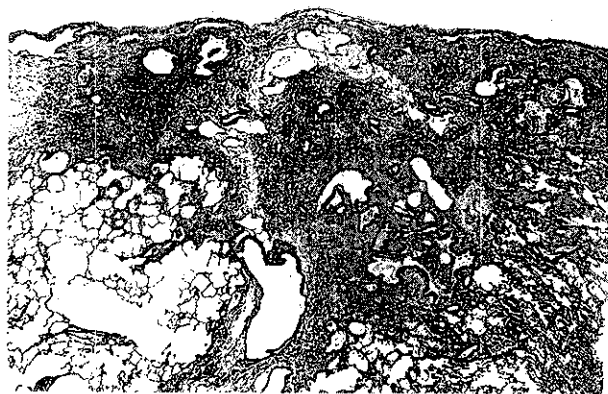


図4 VATS (2000年5月9日) 右S4, S10

いずれの小葉にもすでに構造改変のすすんだ線維化がみられ、また小嚢胞腔形成もみられ組織学的にはUIPに近い像であるが、気腔内器質化病変がそのまま線維化し肺の構造が比較的保たれた線維化のパターンが目立つ点が、通常のUIPとはやや異なる所見であった

## 考案・結論

鳥飼病は鳥類の排泄物を抗原とする過敏性肺臓炎である<sup>1)</sup>。鳥類の排泄物に含まれる成分が吸入され、抗原として作用してアレルギー性肺炎(過敏性肺臓炎)をひきおこすが、種々の鳥類の排泄物の抗原成分には交差反応性があるとされている<sup>2)</sup>。本邦における過敏性肺臓炎の原因は夏型過敏性肺臓炎が70%以上を占め<sup>3,4)</sup>、鳥飼病の報告は散見される程度である<sup>5-12)</sup>。しかし慢性例に限れば鳥飼病は19%を占めると報告され、夏型過敏性肺臓炎に比べ慢性化しやすいと推測されている<sup>3)</sup>。また、慢性鳥飼病の場合、急性の症状を呈さないことも多く特発性間質性肺炎との鑑別に苦慮する症例が報告されている<sup>8,10-12)</sup>。鳥飼病の診断には鳥との接触歴の聴取が重要であるが、とくに慢性に経過する症例では鳥との接触が少なく見過ごされる可能性がある<sup>11,12)</sup>。当院でも、従来ならば特発性間質性肺炎と診断されてきた症例の中に、慢性鳥飼病が存在するのではないかと考え、鳥との接触に関するアンケートおよび鳩血清LST検査を試みた。

鳥との接触に関するアンケートでは、鳥を現在飼っている、と答えた患者さんは全くなかった。従来ならここで病歴聴取が終了していた可能性があり、とくにこの点でアンケートの有用性が示唆された。実際に、過去に飼っていた(47%)、自宅や周囲に鳥がくる(89%)、鳥の集まる場所へ行く機会がある(6%)、鶏糞など鳥の糞を扱うことが

ある(8%)、自宅に鳥の剥製がある(4%)、羽毛製品を使用している(50%)、とアンケートではかなりの患者さんが鳥との接触ありと答えた。今回は便宜上、接触歴ありが3項目以上ある症例を取り上げたが、1項目でも接触歴があれば鳥飼病の可能性があり、今後も検討を続ける予定である。また、とくに外来症例の場合、時間の制約から十分なアンケートになっていない可能性があり、今後、外来症例においてもできるだけ十分な時間をかけて、アンケートを行いたいと考えている。

鳩血清LSTに関しては今回便宜上、SI 140%以上を比較的高値として取り上げた。さきほどのアンケートでの接触歴が3項目以上あり、かつ鳩血清LSTでSI 140%以上の症例が計6例あり、この中でVATSを行った3例にPDEに対する抗体検査<sup>13)</sup>を行ったところ2例で陽性となりこれらの症例を慢性鳥飼病と診断した。

今回の検討により、慢性経過を呈する間質性肺炎症例の中に慢性鳥飼病が存在することが証明された。ただ今回の検討はpreliminaryなものであり、慢性経過を呈する間質性肺炎全例にアンケートおよび鳩血清LSTが施行できたわけではない。よって今後も検討を続ければ、慢性鳥飼病と診断できる症例が増える可能性があると考えている。

鳥飼病の確定診断には抗原吸入誘発あるいは環境誘発試験で陽性となることが望ましい<sup>4,14)</sup>が、抗原吸入誘発試験は専門施設でなければ実施が困難であり、慢性型の場合においては環境誘発試験は陰性例が多いため、今回当院で行った、鳥との接触に関するアンケートおよび鳩血清LSTが有用なスクリーニングである可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) kaltreider HB. Hypersensitivity pneumonitis. West J Med 1993; 159: 570-578
- 2) 吉澤靖之, 三宅修司, 稲瀬直彦, 他. 呼吸器疾患の分子病態と臨床: アレルギー性肺疾患. 日内会誌 2000; 89: 108-111
- 3) Yoshizawa Y, Ohtani Y, Hayakawa H, et al. Chronic hypersensitivity pneumonitis in Japan: A nationwide epidemiologic survey. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 315-320

- 4) 吉澤靖之, 澤田めぐみ. 過敏性肺炎. 日本医事新報 2000; 3982: 33-36
- 5) 日高利昭, 杉山幸比古, 石井芳樹, 他. 鳩飼いの病の 1 例. 日胸 1995; 54: 666-670
- 6) 中村公彦, 桑原正雄, 小泊好幸, 他. Pigeon breeder's lung の 1 例. 日胸 1995; 47: 1047-1052
- 7) 伊藤伸介, 島 浩一郎, 佐藤浩一, 他. Pigeon breeder's disease の 1 例. 日胸疾会誌 1990; 28: 379-385
- 8) 吉村信行, 野寺博志, 大河内 稔, 他. 鳩による慢性過敏性肺臓炎の 1 例. 日胸疾会誌 1997 ; 35: 1067-1073
- 9) 深堀 隆, 横村一郎, 溝渕一哉, 他. 健康診断にて発見された亜急性型鳩飼病と考えられた 1 例. 日胸 1997; 56: 47-51
- 10) 塚越正章, 大野彰二, 杉山幸比古, 他. 慢性化した鳩飼病の 1 例. 日胸疾会誌 1997; 35: 1119-1123
- 11) 今野和典, 大谷義夫, 古家 正, 他. 隣家の鳩飼育により発症した鳩飼病の 1 例. 日胸 2001 ; 60: 78-83
- 12) 床島眞紀, 伊井敏彦, 京楽由佳, 他. 診断に苦慮した一羽のインコによる鳥飼病の 1 例. 日呼吸会誌 2001; 39: 739-743
- 13) Hisauchi-Kojima K, Sumi Y, Miyashita Yoshihiro, *et al.* Purification of the antigenic components of pigeon dropping extract, the responsible agent for cellular immunity in pigeon breeder's disease. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 1158-1165
- 14) Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, *et al.* Inhalation provocation tests in chronic bird fancier's lung. Chest 2000; 118: 1382-1389



## 4. 発症の背景因子に関する研究

# 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 C 型肝炎の検討を行った. 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. さらに追加で長期の観察および他臓器についての検討も施行した. その結果従来このトランスジェニックのみでは肝臓に炎症性の変化が見られないことが報告されていたが, 今回の検討では単球を中心に炎症を認めることが判明した. これは HCVenv のトランスジェニックのみでは線維化が生じない場合でもシリカによるトリガーがかかることによりシステミックに線維化が促進される可能性が示唆された点でも興味ある結果を認めた.

## Investigation of IIP with HCV transgenic mouse in long term

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, 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 series we investigated the role of this virus in IIP with HCV transgenic mouse by our murine model for IIP with silicea. HCV transgenic mouse has significantly more lymphocytes in BALF (bronchoalveolar lavage fluid) as compared to wild type mouse in natural course. Furthermore, with long term study after with or without silica particulate instillation, HCV transgenic mouse had much more doses of hydroxyproline and higher pathological scores for fibrosis as compared to those of wild type. Moreover, HCV transgenic mouse demonstrated much fibrosis not only in lung but liver than wild type without. These findings proposed that HCV might promote the progression of fibrous changes in lung in response to silica.

## 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、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。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。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。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。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)- $\beta$ , insulin like growth factor (IGF)-I 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 の定量化 (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。

帝京大学医学部内科

\* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

## 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.

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.

## 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. さらに Ashcroft 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.

また今回追加として, 他臓器にも炎症性変化あるいは, 線維化を生じているかを検討した. その結果従来このトランスジェニックのみでは肝臓に炎症性の変化が見られないことが報告されていたが, 今回の検討では単球を中心に炎症を認めることが判明した. ただし肝硬変にみられるような線維化を認めることはできなかった.

## 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/b16 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. また従来炎症のない, 肝臓でもシリカの肺への投与により炎症が生じたことは重要と考えられる. すなわちこれは HCVenv のトランスジェニックのみでは線維化が生じない場合でもシリカによるトリガーがかかることによりシステム的に線維化が促進される可能性が示唆された点でも興味ある結果である. さらにその機序に関してはサイトカインレベルも含め追求する必要がある.

## 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. また HCV の存在は他の線維化促進要因と重なることで, より強い炎症・線維化を生じうる可能性も示唆された.