

negative cell からの出現は認めなかった. 表面マーカーの解析により, FDCは CD34 (+), CD45RO (+)より末梢血由来であること, type I collagen (+), α SMA (+), P4H (+)より線維芽細胞の性状を有すること, HLA-DR (+)より抗原提示細胞である可能性が示された (Fig. 6). FDCの CD83, CD86の発現は MoDCに比較して弱く抗原提示能は保持していた (Table 1). 同一個体から得られた PBMC,

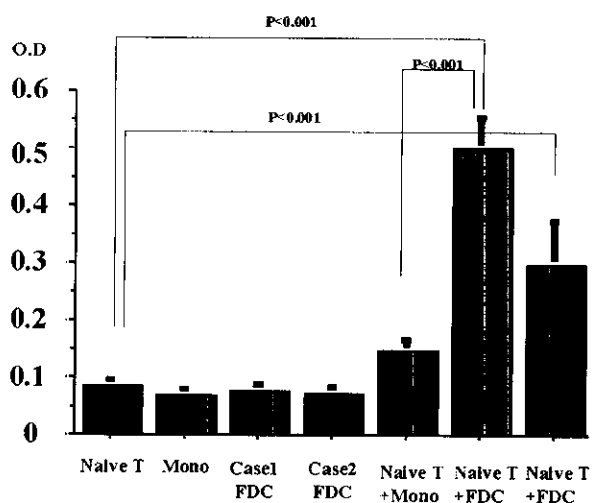
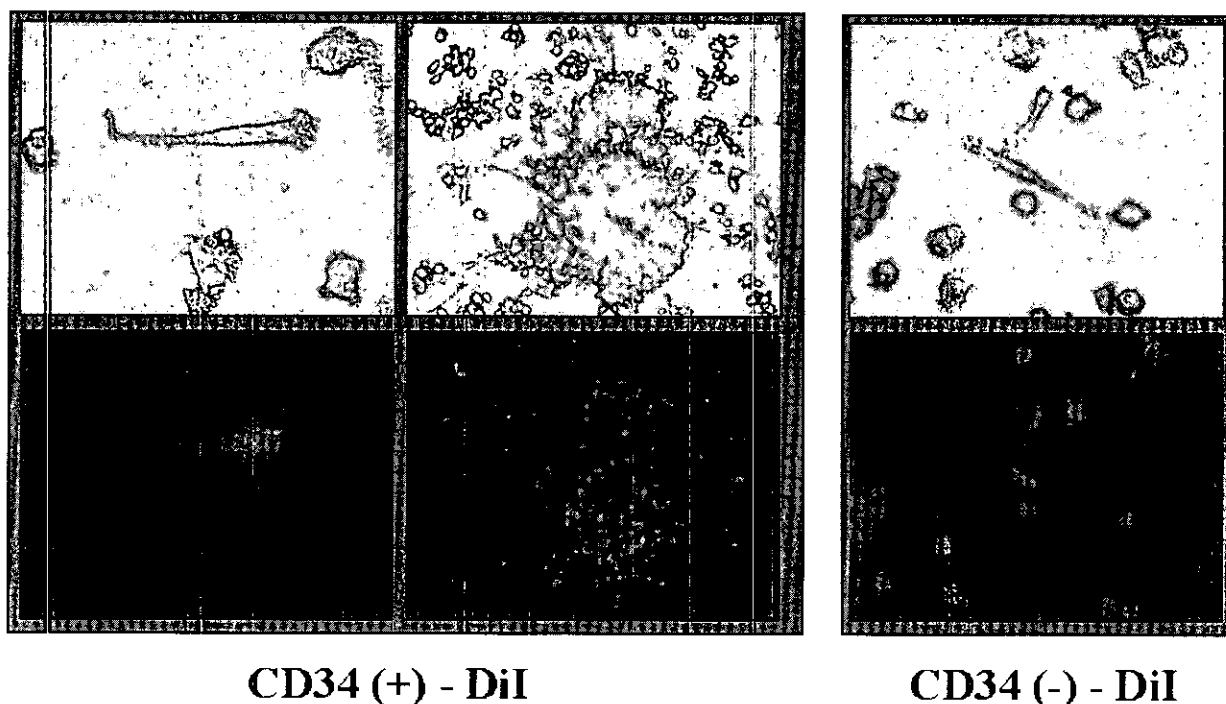


Figure 3 リンパ球混合試験. 線維芽細胞様樹状細胞 (FDC) との混合培養によってリンパ球の有意な増殖の増加が見られた.

MoDC, FDCの type I collagen, Fibronectin を RT-PCR で検討したところ PBMC, MoDC, AMと比較し, FDCは最も強く発現が認められた (Fig. 7, ヒト肺線維芽細胞 HFL-1 は positive control). 同様に 1×10^6 個あたりの Fibronectin の産生量を比較したところ, FDCは, MoDC, AMと比較して有意差に産生していた (Fig. 8). TGF- β 1による筋線維芽細胞への分化誘導が可能かどうかFDCを分化誘導する day4より培養上清中に TGF- β 1を 1~10 ng/mlを添加し day14まで培養した. 細胞内の α -smooth muscleを FACSで確認したところ濃度依存的に α -smooth muscleが増加した (Fig. 9).

考 察

PBMCを培養し, 線維芽細胞様の付着細胞を得た. この細胞は非付着時には樹状細胞様の形態を示した. しかし, MoDCが浮遊細胞であり, 分化に GM-CSF, IL-4等の特定のサイトカインを必要なのに対して本細胞は付着細胞であり, 20%のFBSのみで特別な因子を添加することく増殖したことから通常の DCとは異なる細胞であると考えられた. また, HLA-DR陽性であり, naive T cellを活性化増殖させ



CD34 (+) - DiI

CD34 (-) - DiI

Figure 4 線維芽細胞様樹状細胞 (FDC) の由来の検討. 健康成人末梢血より得た PBMC から CD34 ピーズを用いて CD34 陽性 progenitor cell を得た後に, DiI で染色し CD34 negative cell と再び共培養し, day14 に蛍光顕微鏡で検討した. 線維芽細胞様形態を示す細胞は DiI 陽性であった. しかし, 右側に示した CD34 陰性細胞からも線維芽細胞様形態を示す細胞が得られた.

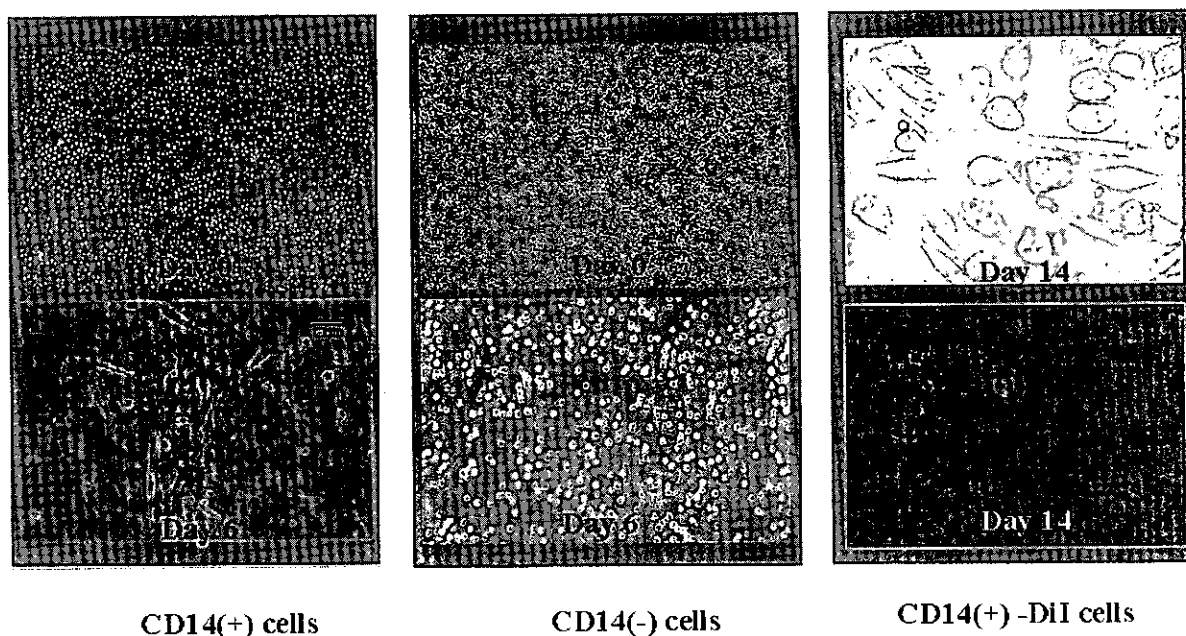


Figure 5 線維芽細胞様樹状細胞 (FDC) の由来の検討. CD14 陽性単球を positive selection し, DiI で標識し day14 まで培養した. 付着し, 紡錘形の細胞はすべて CD14 positive 由来であった.

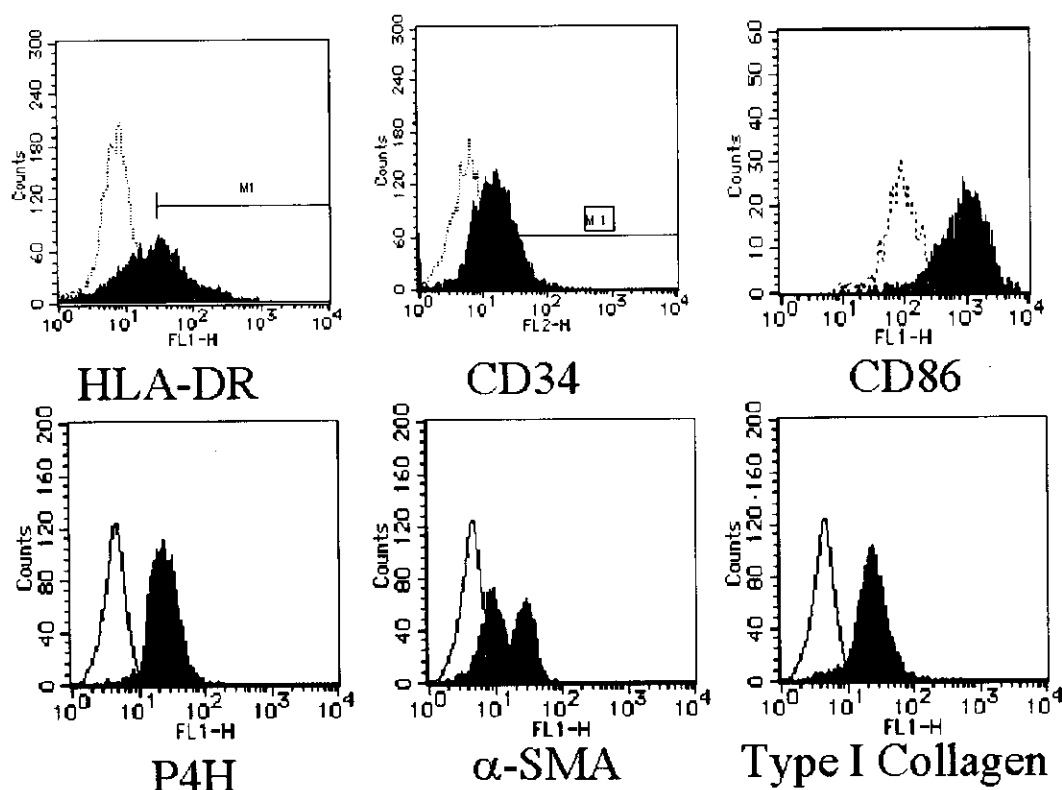


Figure 6 線維芽細胞様樹状細胞 (FDC) の表面マーカーの解析. FDC は CD34 (+), CD45RO (+) より末梢血由来であること, type I collagen (+), α SMA (+), P4H (+) より線維芽細胞の性状を有すること, HLA-DR (+) より抗原提示細胞である可能性が示された.

Table 1 線維芽細胞様樹状細胞 (FDC) の表面マーカーのFACSによる解析

	MoDC	AM	FDC
CD1a	+	-	--
CD14	-	+	-
CD34	-	-	--~+
CD45RO	+	+	+
CD68	-	++	+
CD83	++	-	--~+
CD86	+++	+	+~++

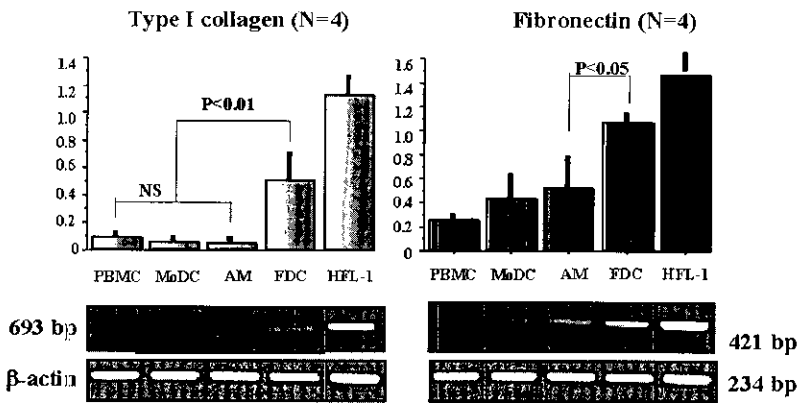


Figure 7 線維芽細胞様樹状細胞 (FDC), 単球由来樹状細胞 (MoDC), 肺胞マクロファージ (AM), 末梢血単核球 (PBMC) における type I collagen, Fibronectin mRNA 発現. 同一個体から得られたそれぞれの細胞を RT-PCR で検討した. ヒト肺線維芽細胞 HFL-1 は positive control として用いた.

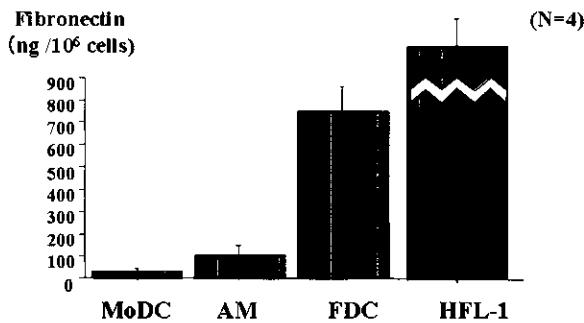
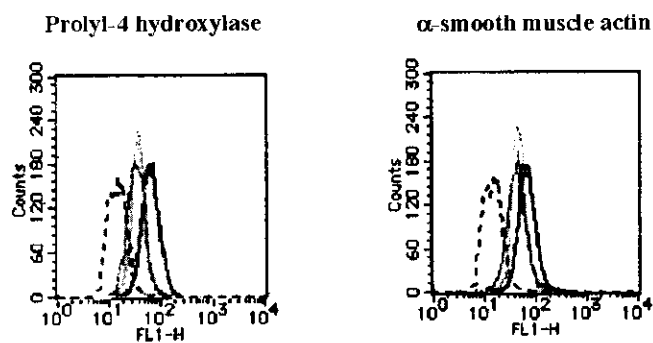


Figure 8 線維芽細胞様樹状細胞 (FDC), 単球由来樹状細胞 (MoDC), 肺胞マクロファージ (AM), ヒト肺線維芽細胞 (HFL-1) からのファイブロネクチンの産生.

ることから professional な抗原提示細胞であり樹状細胞亜群と考えられた. 本細胞は CD34 陽性細胞からも由来するが, それよりも分化した単球からも発現しうることが示された. PBMC には認めない type I collagen や P4H, Fibronectin の mRNA や蛋白を発現を認めており, 形態学的のみならず, 機能的にも線維芽細胞様に分化したものと考えられた. 同一個体から得た MoDC, AM と比較して表面マーカーでは CD14 (-), CD83 (±), CD86 (+ ~ ++), HLA-DR (+) と MoDC と同様の phenotype を持ち, さらに type I collagen, Fibronectin mRNA はより強く発現しており, より線維芽細胞の性格を強く示す DC であるということがいえる. さらに TGF-β1 で濃度依存的に P4H, αSMA の蛋白が増加しており, 筋線維芽細胞様の phenotype をより強く示した.

これまで本細胞と類似の性格を持つ細胞についていくつかの報告があるが同一のものであるかは明らかではない^{1,5)}. Bucala らは, 本細胞と類似の細胞を fibrocyte と呼び, 末梢血に存在する progenitor cell が wound 病巣に集積し, fibroblast-like に分化し, extracellular matrix を産生し wound repair に働くとともに, 抗原提示細胞としても機能することを報告している^{1,2,3)}. このような細胞が肺の線維化においても重要な役割を演じている可能性は十分に考えられるため, 今後, 間質性肺炎肺組織の免疫学的解析を行い, 本細胞の生体内における動態を知るとともに, マウスブレオマイシン肺臓炎モデルにおける本細胞の動態解析を行い本細胞の肺線維化における役割を明らかにしたい. この結果, 線維化病巣に集積しう末梢血由来細胞が同定されれば, 本細胞に HGF など線維化抑制因子を gene targeting することによってより有効性の高い肺線維化の治療が可能となることも期待される.



- **Black ; Isotype control,**
- **Yellow ; TGF-β1 (1ng/ml),**
- **Red ; TGF-β1 (10ng/ml)**
- **Blue ; Medium alone**

Figure 9 TGF-β1 による線維芽細胞様樹状細胞(FDC)の筋線維芽細胞への分化誘導. day4 より FDC の培養上清中に TGF-β1 を 1 ~ 10 ng/ml を添加し day14 まで培養した. 細胞内の α-smooth muscle を FACS で確認したところ濃度依存的に α-smooth muscle が増加した

参考文献

- 1) Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Ceranmi A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.* 1994 ; 1: 7-81.
- 2) Chesney J, Bache M, Bender A, Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 ; 94 : 6307-12.
- 3) Chesney J, Metz C, Stavisky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol.* 1998 ; 160: 419-25.
- 4) 石井芳樹, 知花和行, 福田 健: 末梢血由来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. 厚生科学研究補助金(特定疾患対策研究事業)びまん性肺疾患研究班平成 12 年度研究報告書. 186-189, 2001.
- 5) Labat ML, Bringiuer AF, Arys-Philippart C, Arys A, Wellens F. Monocytic origin of fibrosis. In vitro transformation of HLA-DR monocytes into neo-fibroblasts : inhibitory effect of all-trans retinoic acid on this process. *Biomed Pharmacother* 1994 ; 48 : 103-111.

びまん性間質性肺疾患の気管支肺胞洗淨液中 リンパ球表面 Th1/Th2 マーカーの比較検討

石井 芳樹* 朝倉 琢磨 知花 和行 阿部喜世子
福田 健

Th1 あるいは Th2 タイプのサイトカインを産生するリンパ球を鑑別するマーカーとしていくつかの表面抗原が報告されている。これまで、Th1 のマーカーとして CD26, CXCR3, CCR5 などが、Th2 のマーカーとして CD30, CCR4 などが知られている。今回、種々のびまん性肺疾患において肺胞内に集積したリンパ球が Th1 のマーカーを有するのか Th2 のマーカーを有するのか、また、それが病態とどのような関連を持つのか知るために、気管支肺胞洗淨液 (BALF) 中リンパ球についてこれらの表面マーカーの発現を比較検討した。Th1 マーカーである CD26 は、サルコイドーシスにおいてコントロール群と比較して高値を示した。また、CXCR3 は、IP 群で低値を示した。Th1 マーカーは、CD4 陽性細胞では、CD26, CXCR3, CCR5 の 3 者間に相関を認めた。Th2 マーカーとされる CD30, CCR4 の発現はいずれの疾患においても低値で、リンパ球全体および CD4 陽性細胞において CD30 と CCR4 には相関を認めなかった。IP 群では Th2 のわずかな増加と Th1 の減少が見られたが、絶対的には Th1 が優位な状況はかわらず、Th1 細胞も病態に大きく関与していると考えられた。

ANALYSIS OF TH1/TH2 EXPRESSION ON LYMPHOCYTES IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID FROM PATIENTS WITH DIFFUSE INTERSTITIAL LUNG DISEASES

Yoshiki Ishii, Takuma Asakura, Kazuyuki Chibana, Kiyoko Abe
Takeshi Fukuda

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

Some cell surface antigens are reported as a marker indicating Th1 or Th2 type cells. CD26, CXCR3, and CCR5 are known as a marker of Th1 type lymphocytes, meanwhile, CD30 and CCR4 are known as a marker of Th2 type lymphocytes. To know which type of lymphocytes is dominant in the lung, we obtained bronchoalveolar lavage fluids from patients with various diffuse interstitial lung diseases and analyzed the expression of various markers related to Th1 and Th2 on BAL lymphocytes using a flow cytometry.

Expression of CD26, Th1 markers, in sarcoidosis was higher than that in healthy controls. Expression of CXCR3 was decreased in the interstitial pneumonia group. There were significant correlations among expression of three Th1 markers, CD26, CXCR3, CCR5, on CD4 positive cells. Expression of the Th2 marker, CD30 and CCR4 on BAL lymphocytes was substantially low in all patients groups. Although the ratio of Th2 marker positive cells were increased slightly in the group of interstitial pneumonia, Th1 positive cells were absolutely dominant. These findings suggest that in the patients with interstitial pneumonia not only slightly increased Th2 cells but also constitutively rich Th1 cells play an important role in the pathogenesis of lung fibrosis

はじめに

ヘルパー T 細胞は、産生するサイトカインによって Th1 細胞と Th2 細胞に分けられる。IL-2 や IFN- γ などの Th1 サイトカインは炎症反応促進や線維化抑制に¹⁾、IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインは炎症反応抑制や線維化促進に働くことが示されており²⁾、種々の疾患において Th1 / Th2 バランスの変化が病態形成に重要な役割を演じていることが報告されている。間質性肺炎の病態においては、線維化亢進という点から Th2 サイトカインが優位であるという意見が強いが^{3,4)}、明確にはなっていない^{5,7)}。ヒトの線維化肺における浸潤リンパ球や II 型肺胞上皮細胞では Th1 サイトカイン産生細胞より Th2 サイトカイン産生細胞が優位であるという報告がある一方、Th2 産生リンパ球が圧倒的に優位であるとする報告もある。Th1/Th2 の優位性を明確にすることはサイトカインを用いた治療という面からも重要である。

Th1 あるいは Th2 タイプのサイトカインを産生するリンパ球を鑑別するマーカーとしていくつかの表面抗原が報告されている。これまで、Th1 のマーカーとして CD26, CXCR3, CCR5 など、Th2 のマーカーとして CD30, CCR4 などが知られている。CD26 は、dipeptidyl peptidase IV 酵素活性をもつ costimulatory molecule であり、RANTES や SDF-1 α を基質とし、その作用を調節する役割を持つが、Th1 サイトカイン産生 T 細胞上に発現しており、Th1 細胞のマーカーと考えられている。一方、CD30 は、TNF receptor superfamily の一員であり、Hodgkin's cell や Reed-Stenberg cell のマーカーである K1-I 抗原として知られているが、Th2 リンパ球のマーカーとされている。ケモカインレセプターについては、Th1 に選択的なものとして interferon- γ inducible protein 10 (IP-10), monokine induced by IFN- γ (MIG), Interferon Inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC) をリガンドとする CXCR3 と macrophage Inflammatory protein (MIP-1 β), MIP-1 β , RANTES をリガンドとする CCR5 があり、Th2 に選択的なものとして macrophage-derived

chemokine (MDC), thymus and activation-regulated chemokine (TARC) をリガンドとする CCR4 がある。これらレセプターの発現は、リンパ球の分化度や活性化の程度によって異なるので、同じ Th1 あるいは Th2 のマーカーであっても病態によって異なることが予想される。

今回、種々のびまん性肺疾患において肺胞内に集積したリンパ球が Th1 のマーカーを有するのか Th2 のマーカーを有するのか、また、それが病態とどのような関連を持つのか知るために、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中リンパ球についてこれらの表面マーカーの発現を比較検討した。

対象と方法

対象は特発性肺線維症 (IPF/UIP) 8 例 (平均年齢 61 \pm 12 歳, 男性 4 名女性 4 名) と Th1 優位な疾患と考えられるサルコイドーシス 9 例 (平均年齢 54 \pm 14 歳, 男性 1 名女性 8 名), Th2 優位な疾患と考えられる気管支喘息アトピー型 9 例 (平均年齢 31 \pm 10 歳, 男性 5 名女性 4 名) およびコントロールとして健常者 4 名 (平均年齢 56 \pm 8 歳, 男性 0 名女性 4 名) であった (Table 1)。通常の方法で気管支肺胞洗浄を施行、各種モノクローナル抗体で染色した後 FACS でリンパ球領域における陽性率を測定した。

Table1 Subjects

	n	Age	Sex (M/F)
Interstitial Pneumonia (UIP)	8	61 \pm 12	4/4
Bronchial Asthma (atopic)	9	31 \pm 10	5/4
Sarcoidosis	9	54 \pm 14	1/8
Control	4	56 \pm 8	0/4

獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科

* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

結 果

BAL 液中のリンパ球比率は、コントロール群 $8.48 \pm 3.78\%$ 、IPF 群 $19.0 \pm 17.1\%$ 、サルコイドーシス群 $35.9 \pm 25.6\%$ 、気管支喘息群 $16.8 \pm 11.0\%$ でありサルコイドーシス群でコントロール群と比較し有意に増加していた ($p < 0.05$) (Fig. 1)。BAL 液中の好酸球比率は、コントロール群 $0.35 \pm 0.47\%$ 、IPF 群 $3.40 \pm 3.97\%$ 、サルコイドーシス群 $0.91 \pm 0.30\%$ 、気管支喘息群 $4.83 \pm 9.99\%$ であり気管支喘息群で増加を認めたが有意差は認めなかった (Fig. 1)。

リンパ球の CD26 陽性率は、サルコイドーシス群で高い傾向を認めたが有意差はなかった (Fig. 2)。2-color 解析で CD4 + CD26 + 陽性細胞比率を比較するとサルコイドーシス群で他群に比較し有意に高値であった (Fig. 2)。CXCR3 は IPF 群において他群と比較し低下が見られた (Fig. 3)。CCR5 は、いずれの群においても有意な差は無かった (Fig. 4)。

Th1 マーカーは、リンパ球全体では、CD26 が CXCR3 と相関を示したが、CCR5 とは相関せず、CD4 陽性細胞では、CD26、CXCR3、CCR5 の 3 者間に相関を認めた (Fig. 5)。

Th2 マーカーとされる CD30、CCR4 の発現はいずれの疾患においても低値であったが、IP 群において増加傾向がみられた (Fig. 6)。CCR4 については例数が少なく解析は困難であるがやはり、IP 群では高い傾向がみられた (Fig. 7)。リンパ球全体および CD4 陽性細胞において CD30 と CCR4 には相関を認めなかった。

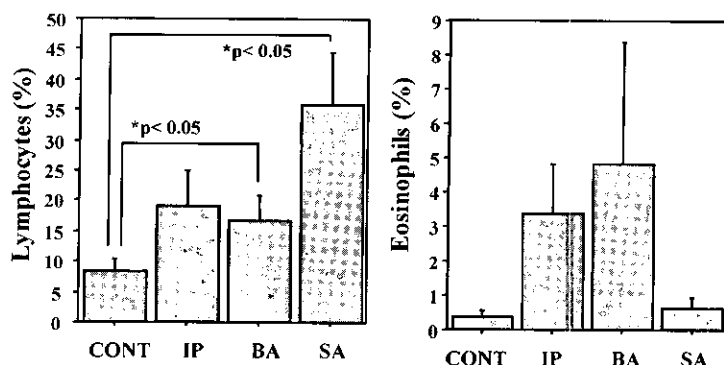


Fig.1 Percentages of Lymphocytes and Eosinophils in BALF IP: interstitial pneumonia, BA: bronchial asthma, SA: sarcoidosis

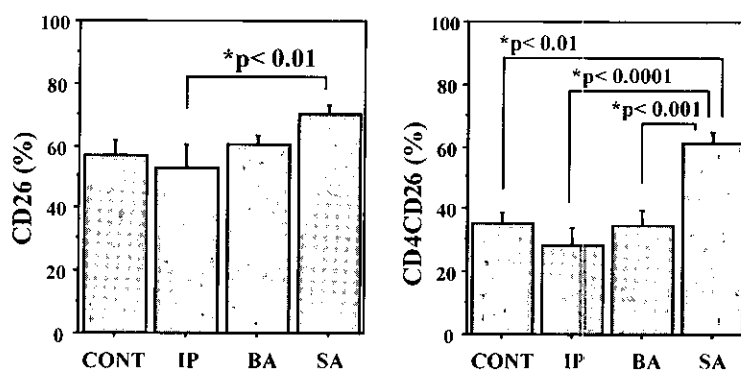


Fig.2 Expression of CD26 on Lymphocytes and CD4+ Lymphocytes in BALF

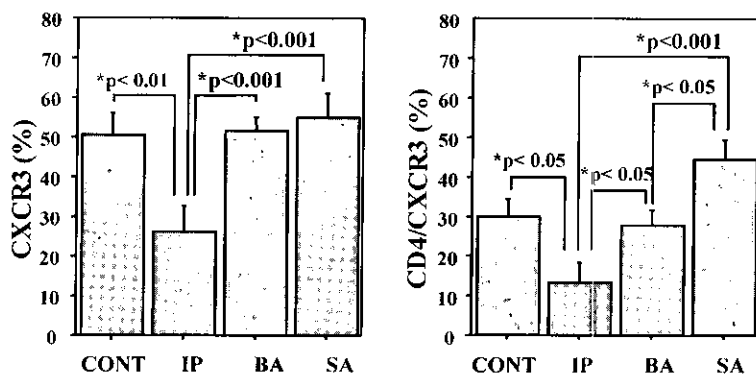


Fig.3 Expression of CXCR3 on Lymphocytes and CD4+ Lymphocytes in BALF

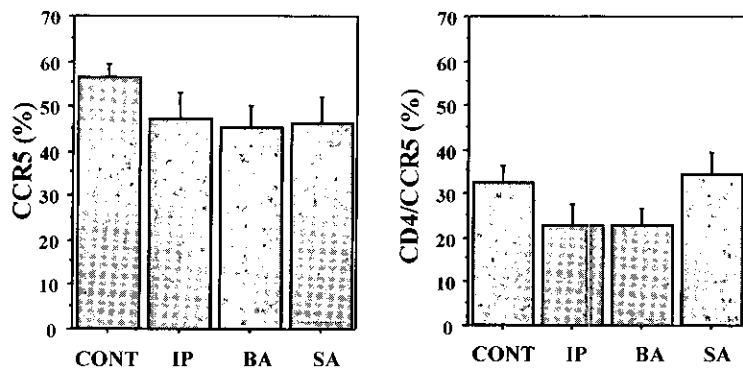


Fig.4 Expression of CCR5 on Lymphocytes and CD4+ Lymphocytes in BALF

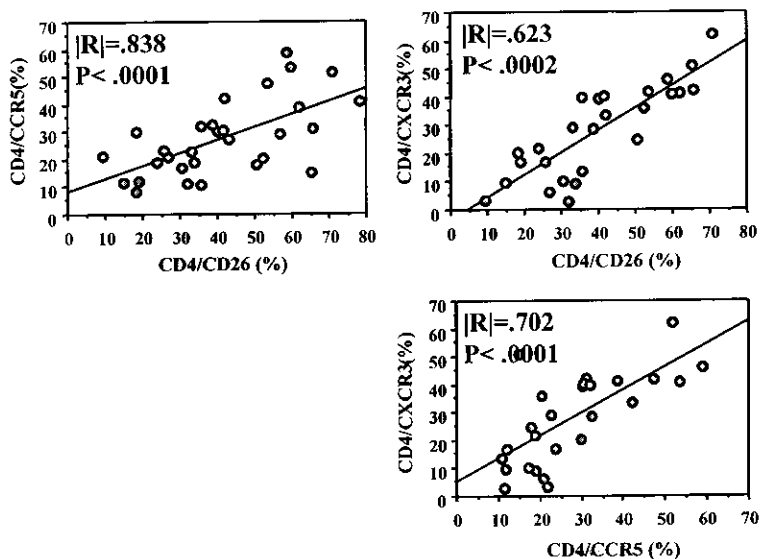


Fig.5 Correlations among CD26, CXCR3 and CCR5 expression on CD4+ Lymphocytes in BALF

考 察

Th1 マーカーである CD26, CXCR3 の発現は,サルコイドーシスにおいて健常者と比較し有意に高値を示した。これは,サルコイドーシス症例のみを対象とし CD26 陽性率を検討した前回の報告とほぼ一致する結果であった。一方,間質性肺炎では,Th1 マーカーのうち CXCR3 の有意な低下と CCR5,CD26 の低下傾向を認めた。逆に,Th2 マーカーの CD30, CCR4 は高い傾向を認めた。このように BALF リンパ球においてこれらの表面マーカーで見ると,健常者のみならずいずれの疾患においても Th1 が絶対的に優位であったが,サルコイドーシスでは,健常者と比較し Th1 の増強が,間質性肺炎においては,Th1 の減弱と Th2 の増強傾向が認められた。今回,Th2 マーカーのうち CCR4 については測定した症例数が少なく十分な比較ができなかったためさらに症例数を重ねて検討する必要がある。

Th1 マーカーとされる 3 つの表面抗原 CD26, CXCR3, CCR5 は, CD4 陽性リンパ球において有意な正の相関を示し,ほぼ類似の動態を示すものと考えられた。

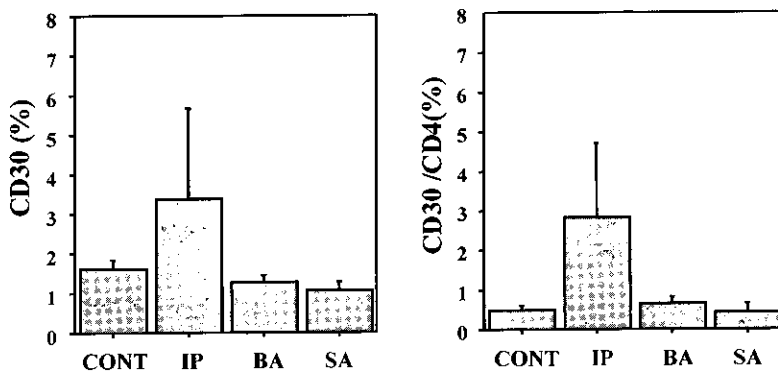


Fig.6 Expression of CD30 on Lymphocytes and CD4+ Lymphocytes in BALF

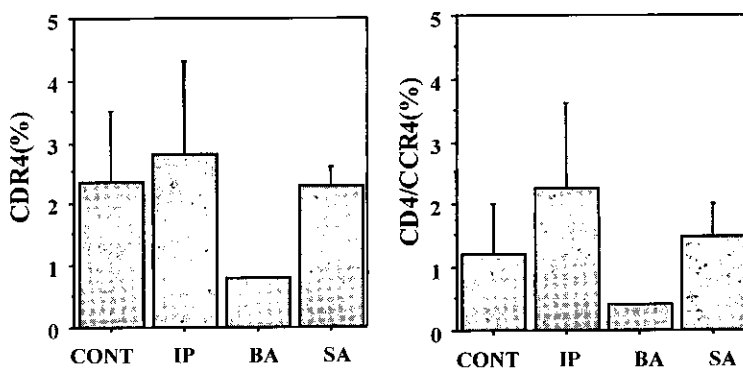


Fig.7 Expression of CCR4 on Lymphocytes and CD4+ Lymphocytes in BALF

Th1 サイトカインである IFN- γ は、線維芽細胞の増殖やコラーゲンの産生を抑制し、逆に、Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 は、線維芽細胞を活性化し、細胞外マトリックスの産生を増加させる。このような個々のサイトカインの作用をみると、線維化肺においては Th2 優位であろうと予想され、今回、間質性肺炎症例では Th2 方向へのシフトが見られた点は合致しているといえる。しかし、絶対的には Th1 が優位な状況はかわらず、Th1 細胞も病態に大きく関与していると考えられる。生体において Th1/Th2 の相互作用は単純ではなく、炎症とそれに続く線維化の時相によって Th1/Th2 の優位性は変化している可能性がある⁸⁾。また、BAL から得られた細胞が組織中のリンパ球の状態を正しく反映しているか否かは明らかでない。しかしながら、BAL 細胞の解析は比較的簡単に施行でき、肺局所の免疫の状態を知るよい方法であり、今後組織における所見と対比していけば、有用性は高いと思われる。

参考文献

- 1) Narayanan AS, Whitney J, Souza A, Raghu G. Effect of gamma-interferon on collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Chest*. 1992 ;101:1326-31.
- 2) Gillery P, Fertin C, Nicolas JF, Chastang F, Kalis B, Banchereau J, Maquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen gene expression in human fibroblast monolayer cultures. Potential role in fibrosis. *FEBS Lett* 1992 ;302:231-4.
- 3) Wallace WA, Ramage EA, Lamb D, Howie SE. A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA). *Clin Exp Immunol*. 1995;101:436-41.
- 4) Wallace WA, Howie SE. Immunoreactive interleukin 4 and interferon-gamma expression by type II alveolar epithelial cells in interstitial lung disease. *J Pathol*. 1999 ;187:475-80.
- 5) Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM. IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 ;281:L92-7
- 6) Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, Kunitake R, Hagimoto N, Hara N. Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by monoclonal antibody to interleukin-12. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:L1128-37.
- 7) Chen ES, Greenlee BM, Wills-Karp M, Moller DR. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon-gamma-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24:545-55.
- 8) Lukacs NW, Hogaboam C, Chensue SW, Blease K, Kunkel SL. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. *Chest*. 2001;120 (Suppl) :5S-8S.

肺線維症合併肺癌の発癌メカニズムに関する研究

工藤 翔二 吉村 明修 弦間 昭彦 植松 和嗣
竹中 圭 細谷 曜子

肺癌は、肺線維症に高頻度に合併し、この疾患の大きな死亡原因となっている。この発癌メカニズムを検討するため、病変内の上皮過形成、Bronciolization、化生等、上皮病変と、腫瘍における fragile histidine triad (FHIT) 遺伝子領域の欠失を polymerase chain reaction (PCR)-based microsatellite analysis と、Fluorescent in situ hybridization (FISH) 解析で、同遺伝子産物発現を免疫染色で検討した。その結果、これらの病変において、遺伝子欠失が高頻度に認められ (62/119, 52%)、特に、肺癌合併症例 (54/74, 73%) における遺伝子欠失は、非合併例に比し (8/46, 17%)、有意に高頻度であった。その欠失の範囲は病変形態より個人に左右され、変異原への暴露が示唆された。これらの欠失は、FISH 解析でも確認された。また、免疫染色により、染色性の低下した上皮病変を認めた。これらの結果より、FHIT 遺伝子の欠失は、肺線維症における肺癌発癌に関係し、これら上皮病変が前癌病変である事が示唆された。

Human lung carcinogenesis in idiopathic pulmonary fibrosis

Shoji Kudoh, Akinobu Yoshimura, Akihiko Gemma, Kazutsugu Uematsu
Kiyoshi Takenaka, Yoko Hosoya

The fourth department of Internal Medicine, Nippon Medical School

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) seems to be closely associated with lung carcinogenesis. To identify the genetic characteristics of precancerous IPF lesions in the peripheral lung, we performed polymerase chain reaction (PCR)-based microsatellite analysis with DNA extracted from microdissected tissues; fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis of the fragile histidine triad (FHIT) gene; and immunohistochemical analysis of Fhit protein expression in samples of metaplasias and bronchiolar epithelia obtained from patients with IPF. We used four microsatellite markers of the FHIT gene within or flanking the FHIT gene on chromosome 3p for loss of heterozygosity (LOH) analysis. LOH of the FHIT locus was frequently found among the lesions of metaplasias and bronchiolar epithelia in the patients with IPF (62/119 informative lesions, 52%). Fifty-four (73%) of the 74 lesions of metaplasias and bronchiolar epithelia obtained from the IPF patients with lung carcinoma and 8 (17%) of the 46 samples obtained from the IPF patients without lung carcinoma showed LOH at the FHIT gene ($p < 0.0001$). We confirmed allelic loss in the metaplasias and bronchiolar epithelia of IPF by FISH analysis of the FHIT gene. Additionally, the level of Fhit protein expression in the metaplastic cells of IPF was frequently reduced. Our findings suggest that allelic loss of the FHIT gene may be involved in carcinogenesis in the peripheral lung of patients with IPF.

はじめに

特発性肺線維症は難治の疾患であり、診断時からの平均余命は約5年とされている。また肺癌の合併率が高く相対リスクは7-14倍で大きな死亡原因となっている。我々は、この特発性肺線維症における発癌メカニズムを解明しその制御を図ることは、この疾患の存在による肺癌治療の制限をふまえ、この疾患の診療に大きな意義を持つと考えている。

肺線維症肺癌の慢性炎症は、上皮細胞の損傷と再生を繰り返し、化生などの多数の上皮病変を生み出している。これらの上皮病変が前癌病変であると考え、以下の研究を行った。

肺癌は、腫瘍抑制遺伝子の遺伝子異常が蓄積し生じる病変である¹⁻⁵⁾。p53²⁾、p16⁶⁾、FHIT⁷⁻¹⁰⁾等の癌抑制遺伝子について、変異、欠失、過メチレーションなどの異常が肺癌や化生を含む前癌病変において報告されている。肺癌発生過程の早期にどのような遺伝子異常が起こっているかを解析するため、前癌病変において多くの研究がなされてきたが、これらの研究を通じ、第三染色体短腕の欠失が最も早期に起こる事象と考えられている。fragile histidine triad (FHIT) 遺伝子は3p14.2より単離された遺伝子であり、肺癌⁷⁻¹⁰⁾、乳癌¹¹⁾、頭頸部癌¹²⁾、食道癌¹³⁾、胃癌¹⁴⁾等多くの癌に異常が認められている。

我々は、肺線維症末梢肺における上皮病変が前癌病変としての性格を有することを遺伝子レベルで明らかにするために、マイクロダイセクションによって得た試料を用い、fragile histidine triad (FHIT) 遺伝子についてPCR-base マイクロサテライト解析と fluorescent in situ hybridization (FISH) 解析を、Fhit 蛋白について免疫染色を行った。

対象と方法

1) 特発性肺線維症病変部位の FHIT 遺伝子の変異解析

我々は、特発性肺線維症病変部位について、4つのマイクロサテライトマーカーを用いた FHIT 遺伝子領域の LOH 解析を行った¹⁵⁾。8- μ m-thick の切片よりマイクロダイセクションにより病変部サンプルを採取し、後に DNA 抽出し解析した¹⁵⁾。FISH analysis は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い以下のように行った。BAC, 1-O 12 probe (Dr. Kay Huebner 供与) を digoxigenin-11-dUTP で標識し、FITC-anti-digoxigenin を用いて発色させた。コントロールとして、chromosome 3 centromere probe (Dr. Joe W. Gray 供与) を fluorolink Cy3-dUTP で標識したものをを用いた。免疫染色は、rabbit polyclonal anti-GST-Fhit antiserum (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA) を用いて行った¹⁵⁾。

結 果

肺線維症内上皮病変における FHIT 遺伝子の LOH

肺線維症内上皮病変における FHIT 遺伝子の遺伝子異常を把握するために、我々は、肺線維症 11 症例から得られた 146 の化生領域や蜂巢肺周囲の気管支上皮を解析した。4つのマイクロサテライトマーカーを用いた PCR による LOH 解析の結果、FHIT 遺伝子領域の LOH が、高頻度に認められた (Fig. 1) (Table 1, 2)。肺癌を合併した肺線維症の 74 上皮病変のうち 54 病変、肺癌を合併していない肺線維症の 46 上皮病変のうち 8 病変に FHIT 遺伝子の LOH を認め、両者の頻度に有意差を認めた ($p < 0.0001$)。同一患者の上皮病変のアレルの欠失パターンは、類似しており、ANOVA model (SAS system) を用いて、個人と形態のアレル欠失パターンに対する影響を解析した結果、個人の影響がより強いという結果であった (Table 3)。また、腫瘍合併肺線維症のアレル欠失のパターンは、腫瘍部分のパターンと類似していた。

肺線維症内上皮病変における FHIT 遺伝子の LOH の結果を確認するために、肺癌を合併した肺線維症の肺線維症内上皮病変の FHIT 遺伝子の FISH 解析を行った。ホルマリン固定パラフィン

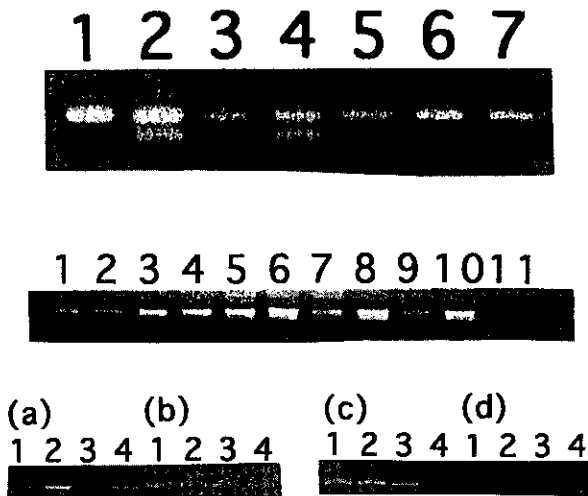


Figure 1 (A) Examples of allelic deletion analysis using the D3S1295 microsatellite marker on the samples obtained from Patient 5. The D3S1295 microsatellite sequence was analyzed in the following tissue samples: small cell lung cancer (1), normal bronchus (2), and metaplasias (3-7). Samples 1, 5-7 had lost one allele, while the remaining tissue samples were intact. (B) Examples of allelic deletion analysis using the D3S1300 microsatellite marker on the samples obtained from Patient 9. The D3S1300 microsatellite sequence was analyzed in the following tissue samples obtained from Patient 9: bronchiolar epithelium adjacent to metaplasia (1, 2), metaplasias (3-8), squamous metaplasia (9), lymphocytes (10), and normal bronchus (11). Samples 1-4, 7, and 9 had lost one allele, while the remaining tissue samples were intact. (C) Examples of allelic deletion analysis using the D3S1300 (a), D3S1312 (b), D3S1295 (c), and D3S1234 (d) microsatellite markers on the samples obtained from Patient 6: normal lymphocytes (1), adenocarcinoma (2), and metaplasias (3-4). All microsatellite markers were not informative in this case.

包埋切片を用いたハイブリダイゼーションは難しく、限られた7例の解析が行われたが、全ての症例で認められた (Fig. 2) (Table 4).

免疫組織化学解析

免疫組織化学を用いて、肺癌を合併した肺線維症の上皮病変における Fhit 蛋白の検討を行った。正常気管支上皮と細気管支上皮は強陽性であり、内部コントロールとした。肺線維症の気管支化生細胞は強陽性であったが、円柱、平坦な化生上皮は染色性が弱かった。扁平上皮化生細胞は種々の染色性であり、化生細胞の6例中5例では、染色性が低下していた (Fig. 3A, 3B) (Table 4).

考察・結論

肺線維症において、FHIT 遺伝子の遺伝子異常が高頻度に認められる事を示した。われわれは、肺線維症における上皮病変が肺線維症合併肺癌の前癌病変であるという仮説をたてたが、今回のこの結果は、この仮説を支持していると考えている。Sozzi 等は、気管支の化生に遺伝子異常あるいは蛋白の機能異常を示し、Fhit 蛋白が、気管支発生肺癌の発癌に関係している可能性を報告している¹⁹⁾。今回、肺線維症における上皮病変においても、Fhit 蛋白の減少を認めた。

フォルマリン固定パラフィン包埋切片からマイクロダイセクションにより得られた試料を用いた場合、PCR による LOH 解析は、しばしば判定が困難であり、連続切片を用いて再現性を確認した。また、FISH 解析や免疫組織化学解析での確認を行った。FHIT 遺伝子のアレルの欠失は、同一個人の病変では類似していた。アレルの欠失を示す病変は同一クローンから生じているのか、肺線維症患者が変異原に暴露し発生しているのか、という疑問が湧く。環境や職業性暴露は、肺線維症や肺癌のリスクを増強しており、金属粉塵、喫煙、アスベスト等は肺線維症のリスクファクターである¹⁶⁻¹⁹⁾。喫煙やアスベストは、また FHIT 遺伝子異常や Fhit 蛋白発現に影響を及ぼしているという報告もある^{19,20)}。今回の結果は、個人の特殊な変異原への暴露、あるいは変異原への特別な反応の可能性が示唆される。

以上のように、肺線維症の上皮病変に FHIT 遺伝子の異常や Fhit 蛋白の減少を認めた。この事は、肺線維症合併肺癌の発癌にこれらの異常が関与していることを示唆している。FHIT 遺伝子の異常を防ぐことは、肺線維症における発癌を予防することにつながり、肺線維症患者の予後の延長をもたらすかもしれない。

Table 1

		Locus						Locus			
		D3S1295	D3S1234	D3S1300	D3S1312			D3S1295	D3S1234	D3S1300	D3S1312
Diagnosis						Diagnosis					
#1 Squamous cell carcinoma tumor						#5 Small cell carcinoma tumor					
squamous metaplasia 1					NA			NA			NA
metaplasia 1					NA						NA
metaplasia 2			NA	NA	NA						NA
metaplasia 3			NA		NA						NA
metaplasia 4			NA		NA						NA
metaplasia 5				NA	NA						NA
metaplasia 6					NA						NA
metaplasia 7			NA	NA	NA					*	NA
metaplasia 8		NA			NA			NA			NA
metaplasia 9					NA			NA			NA
bronchiole 1					NA						NA
bronchiole 2											
bronchiole 3			NA								
bronchiole 4											
bronchiole 5											
#2 Adenocarcinoma tumor						#6 Adenocarcinoma tumor					
squamous metaplasia 1			*								
metaplasia 2											
metaplasia 3				*							
metaplasia 4			NA	*							
metaplasia 5			NA	*							
metaplasia 6			NA	*							
metaplasia 7				*							
metaplasia 8			*	*							
metaplasia 9				*							
metaplasia 10			NA								
metaplasia 11											
metaplasia 12											
metaplasia 13				*							
bronchiole											
#3 Adenocarcinoma tumor						#7 Squamous cell carcinoma tumor					
metaplasia 1			NA				NA				
metaplasia 2							NA				NA
metaplasia 3			NA				NA				
metaplasia 4							NA				
metaplasia 5							NA				
metaplasia 6							NA				
metaplasia 7			NA				NA				
bronchiole							NA				
#4 Adenocarcinoma tumor						#8 Squamous cell carcinoma tumor					
metaplasia 1											
metaplasia 2			NA								
metaplasia 3											
metaplasia 4											
metaplasia 5											
metaplasia 6			NA								
metaplasia 7			NA								
metaplasia 8											
metaplasia 9											
metaplasia 10			NA								
metaplasia 11											
metaplasia 12											
metaplasia 13											
bronchiole 1											
bronchiole 2											
bronchiole 3											

Table 2

Diagnosis	Locus			
	D3S1295	D3S1234	D3S1300	D3S1312
#9 IPF				
squamous metaplasia	NA	NA		
metaplasia 1	NA	NA		
metaplasia 2		NA		
metaplasia 3		NA		
metaplasia 4		NA		
metaplasia 5		NA		
metaplasia 6	NA	NA		
metaplasia 7	NA	NA		
metaplasia 8		NA		
metaplasia 9		NA		
metaplasia 10		NA		
bronchiole 1		NA		
bronchiole 2	NA	NA		
bronchiole 3	NA	NA		
bronchiole 4	NA	NA		
bronchiole 5	NA	NA		
bronchiole 6				
bronchiole 7		NA		
bronchiole 8		NA		
#10 IPF				
metaplasia 1				
metaplasia 2		NA		
metaplasia 3		NA		
metaplasia 4		NA		
metaplasia 5				
bronchiole 1		NA		
bronchiole 2		NA		
bronchiole 3				
#11 IPF				
squamous metaplasia 1				
squamous metaplasia 2				
metaplasia 1		NA		
metaplasia 2				
metaplasia 3				
metaplasia 4				
metaplasia 5				
metaplasia 6				
metaplasia 7				
metaplasia 8				
metaplasia 9				
metaplasia 10				
metaplasia 11				
metaplasia 12				
metaplasia 13				
metaplasia 14				
bronchiole 1				
bronchiole 2				
bronchiole 3				

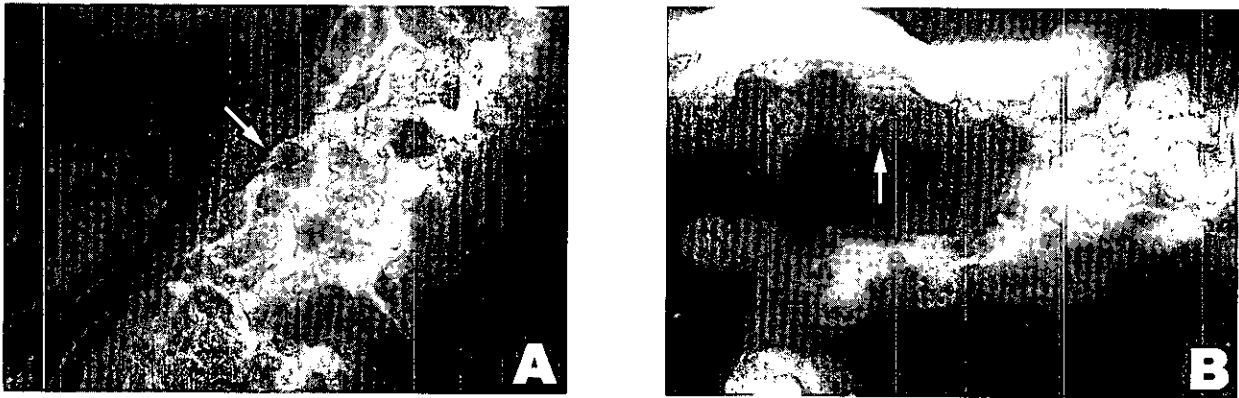


Figure 2 Results of FISH of the FHIT gene in IPF lesions using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Green signals: FHIT-specific probe spanning exon 5; red signals: chromosome 3 centromere probe. LOH of the FHIT gene is seen in ciliated metaplasias (A: Case 1) and non-ciliated metaplasias (B: Case 6) of IPF.

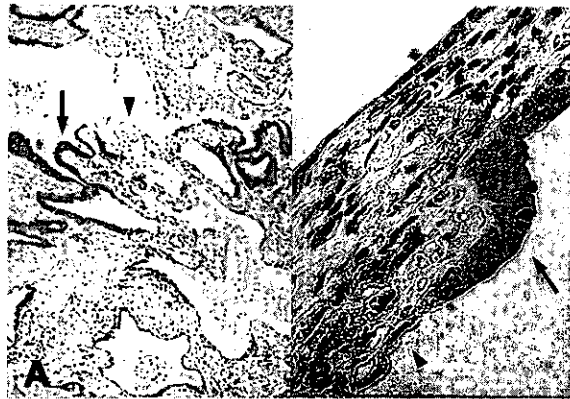


Figure 3 Fhit immunoreactivity of IPF lesions. Strong (A) and moderate (B) Fhit staining in the metaplasias surrounding honeycomb formations are seen. However, some cuboidal, flattened and squamous metaplastic epithelial cells show reduced Fhit protein staining.

Table 3 ANOVA model analysis of allelic losses in IPF

Source of variation	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
diagnosis	4.451	3	1.484	3.48	0.0177
person	55.182	10	5.518	12.94	0.0001
	59.724	140	0.427		
total	119.357	153			

Table 4 Summary of FISH analysis and Immunohistochemistry of IPF tissue with allelic losses by PCR-based LOH analysis

Case	FISH analysis				Immunohistochemistry
	Green<Red	Green=Red	Green>Red	Total	
#1	21	78	1	100	+/-
#2	58	41	1	100	+/-
#3	24	18	1	43	+/-
#4	66	34	0	100	NT
#5	NT	NT	NT	NT	NT
#6	41	57	2	100	+
#7	43	56	1	100	-
#8	59	36	5	100	+/-
Normal cells	3	92	5	100	

Green: FHIT specific signals spanning exon 5, Red: chromosome 3 centromere signals, Number: count of signals, NT: not tested, +: positive staining equal to normal bronchial epithelium, +/-: reduced staining, -: negative staining

参考文献

- 1) Sozzi, G., Miozzo, M., Tagliabue, E., Calderone, C., Lombardi, L., Pilotti, S., Pastorino, U., Pierotti, M. A., and Della Porta, G. Cytogenetic abnormalities and overexpression of receptors for growth factors in normal bronchial epithelium and tumor samples of lung cancer patients. *Cancer Res.* 51: 400-404, 1991.
- 2) Sundaresan, V., Ganly, P., Hasleton, P., Rudd, R., Sinha, G., Bleehe, N. M., Rabbitts, P. p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene*, 7: 1989-1997, 1992.
- 3) Thiberville, L., Payne, P., Vielkinds, J., LeRiche, J., Horsman, D., Nouvet, G., Palcic, B., and Lam, S. Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res.*, 55: 5133-5139, 1995.
- 4) Wistuba, I. I., Behrens, C., Milchgrub, S., Bryant, D., Hung, J., Minna, J. D., and Gazdar, A. F. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene*, 18: 643-650, 1999.
- 5) Park, I. W., Wistuba, I. I., Maitra, A., Milchgrub, S., Virmani, A. K., Minna, J. D., and Gazdar, A. F. Multiple clonal abnormalities in the bronchial epithelium of patients with lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91: 1863-1868, 1999.
- 6) Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Palmisano, W. A., Michels, R., Saccomanno, G., Gabrielson, E., Baylin, S. B., and Herman, J. G. Aberrant methylation of p16 (INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11891-11896, 1998.
- 7) Sozzi, G., Veronese, M. L., Negrini, M., Baffa, R., Cotticelli, M. G., Inoue, H., Tornielli, S., Pilotti, S., De Gregorio, L., Pastorino, U., Pierotti, M. A., Ohta, M., Huebner, K., and Croce, C. M. The FHIT gene 3p14. 2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, 85: 17-26, 1996.
- 8) Fong, K. M., Biesterveld, E. J., Virmani, A., Wistuba, I., Sekido, Y., Bader, S. A., Ahmadian, M., Ong, S. T., Rassool, F. V., Zimmerman, P. V., Giaccone, G., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. FHIT and FRA3B 3p14. 2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res.*, 57: 2256-2267, 1997.
- 9) Sozzi, G., Pastorino, U., Moiraghi, L., Tagliabue, E., Pezzella, F., Ghirelli, C., Tornielli, S., Sard, L., Huebner, K., Pierotti, M. A., Croce, C. M., and Pilotti, S. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res.*, 58: 5032-5037, 1998.
- 10) Burke, L., Khan, M. A., Freedman, A. N., Gemma, A., Rusin, M., Guinee, D. G., Bennett, W. P., Caporaso, N. E., Fleming, M. V., Travis, W. D., Colby, T. V., Trastek, V., Pairolero, P. C., Tazelaar, H. D., Midthun, D. E., Liotta, L. A., and Harris, C. C. Allelic deletion analysis of the FHIT gene predicts poor survival in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 58: 2533-2536, 1998.
- 11) Campiglio, M., Pekarsky, Y., Menard, S., Tagliabue, E., Pilotti, S., and Croce, C. M. FHIT loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the disease. *Cancer Res.*, 59: 3866-3869, 1999.
- 12) Kisielewski, A. E., Xiao, G. H., Liu, S. C., Klein-Szanto, A. J., Novara, M., Sina, J., Bleicher, K., Yeung, R. S., and Goodrow, T. L. Analysis of the FHIT gene and its product in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncogene*, 17: 83-91, 1998.
- 13) Michael, D., Beer, D. G., Wilke, C. W., Miller, D. E., and Glover, T. W. Frequent deletions of FHIT and FRA3B in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas. *Oncogene*, 15: 1653-1659, 1997.
- 14) Gemma, A., Hagiwara, K., Ke, Y., Burke, L. M., Khan, M. A., Nagashima, M., Bennett, W. P., and Harris, C. C. FHIT mutations in human

- primary gastric cancer. *Cancer Res.*, 57: 1435-1437, 1997.
- 15) Uematsu, K., Yoshimura, A., Kudoh, S. et al. : Aberrations in the fragile histidine triad (FHIT) gene in idiopathic pulmonary fibrosis. *Cancer Research*, 61 (23) : 8527-8533, 2001.
- 16) Iwai, K., Mori, T., Yamada, N., Yamaguchi, M., and Hosoda, Y. Idiopathic pulmonary fibrosis. Epidemiologic approaches to occupational exposure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 150: 670-675, 1994.
- 17) Hubbard, R., Lewis, S., Richards, K., Johnston, I., and Britton, J. Occupational exposure to metal or wood dust and aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet*, 347: 284-289, 1996.
- 18) Baumgartner, K. B., Samet, J. M., Stidley, C. A., Colby, T. V., and Waldron, J. A. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155: 242-248, 1997.
- 19) Sozzi, G., Sard, L., De Gregorio, L., Marchetti, A., Musso, K., Buttitta, F., Tornielli, S., Pellegrini, S., Veronese, M. L., Manenti, G., Incarbone, M., Chella, A., Angeletti, C. A., Pastorino, U., Huebner, K., Bevilaqua, G., Pilotti, S., Croce, C. M., and Pierotti, M. A. Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res.*, 57: 2121-2123, 1997.
- 20) Nelson, H. H., Wiencke, J. K., Gunn, L., Wain, J. C., Christiani, D. C., and Kelsey, K. T. Chromosome 3p14 alterations in lung cancer: evidence that FHIT exon deletion is a target of tobacco carcinogens and asbestos. *Cancer Res.*, 58: 1804-1807, 1998.

6. 特発性間質性肺炎の治療に関する報告

Pirfenidone (S-7701) 無作為化臨床比較第 II 相試験成績の報告 (班共同研究, 国内大規模臨床試験)

吾妻安良太¹ 工藤 翔二^{1*} 菅 守隆^{2**} 阿部 庄作^{3**}
貫和 敏博^{4**} 中田紘一郎^{5**} 坪井 永保⁵ 長井 苑子⁶
田口 善夫^{7***} 大井 元春⁸ 伊藤 春海^{9**} 佐藤 篤彦¹⁰
共同研究者: 別紙 参加施設一覧(表 3)

Pirfenidone (開発番号 S-7701) は米国マルナック社で開発された, 分子量 185.23 の化合物である (図 1)¹⁾. 前臨床試験においては TGF- β をはじめとする線維化因子産生抑制作用を有し, さらに線維芽細胞のコラーゲン産生を抑制することから抗線維化剤として注目されている (図 2)²⁾. 米国において 54 例の特発性肺線維症を対象とした臨床試験が進められ, 肺機能の改善を指標として慢性の悪化が阻止される成績が示された³⁾. 日本においては塩野義製薬が第 I 相単回投与試験での安全性確認を終了し, 医薬品機構との相談の結果, 特発性間質性肺炎 (慢性型) を対象に希少疾病用医薬品開発として班研究と連動しての第 II 相試験を計画し, 平成 12 年 11 月から平成 13 年 1 月まで 111 例の症例がエントリーされ, 6 ヶ月にわたる臨床試験が遂行された. その間, 急性増悪症例が有意に placebo 群に偏る結果が得られ, 6 ヶ月の時点で試験結果解析を行った. その結果, 主要評価項目とした 6 分間トレッドミル運動負荷試験による酸素飽和度の低下面積は, 歩行試験完結例において, Pirfenidone 群 (n = 55) は placebo 群 (n = 25) に比べて有意に改善した. また, VC, TLC の有意な改善が認められ, SpO₂ 面積改善と矛盾しない結果であった. 副作用も米国の試験結果とほぼ同等の内容で, 服薬量の減量にて十分対応可能であった. Pirfenidone は IPF 患者の急性増悪を減少させ, かつ歩行運動耐用能を改善し, 肺機能を改善する薬剤である可能性が示唆された.

A Placebo Controlled and Double Blind Phase II Clinical Study of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Japan

A. Azuma *, E. Tsuboi, S. Abe, T. Nukiwa
K. Nakata, S. Nagai, Y. Taguchi, M. Suga
H. Itoh, M. Ohi, A. Sato and S. Kudoh *

*Nippon Medical School, Tokyo and S-7701 Clinical Study Group, Japan

Pirfenidone (S-7701, MW: 185.23 produced in Marnac CO. LTD)¹⁾ is known to ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in animals and to inhibit TGF- β -induced collagen synthesis and fibroblast growth *in vitro*²⁾, and is recognized to be an anti-fibrotic agent. The first clinical trial with the agent was conducted in 54 patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)³⁾, and suggested the promising efficacy in these patients without serious adverse events.

To obtain more concrete evidence that the agent is effective in IPF patients, we started a placebo controlled- and double blind- phase II clinical study for 1 year in Japan. From 25 centers, one hundred and eleven patients who were diagnosed to be IPF were randomized into the study. Pirfenidone group, which consisted of 2/3 of the total randomized patients, was received active drug at the dose of 1800mg/day at maximum. Placebo group, which consisted of the rest of patients, received matching placebo tablets. Most important point of efficacy of Pirfenidone was significantly different frequency for acute exacerbation ratio of pulmonary fibrosis during 6 months. De-saturation area during exercise as a primary end point was significantly improved in IPF patients who received Pirfenidone (n=55) compared with those who received Placebo (n = 25) gradually getting worth. Vital capacity and total lung capacity improved in Pirfenidone group whereas were deteriorated in placebo group. Pirfenidone successfully decreased acute exacerbation ratio and improved de-saturation area during exercise on Treadmill in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.

研究目的

特発性間質性肺炎の慢性型（特発性肺線維症）を対象として、プラセボを対照薬とする多施設共同無作為化二重盲検比較試験により有効性および安全性を検討する。有効性評価の検出力を増強するために、6分間トレッドミル運動負荷を用いて、本剤投与前後の末梢血酸素飽和度低下 (Δ SpO₂) 面積を主要評価項目として Pirfenidone の臨床効果を検討する。また、副作用の発現頻度および重症度の調査を行い、本療法の安全性を検討する。

Pirfenidone (S-7701)

化学名 5-methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridon

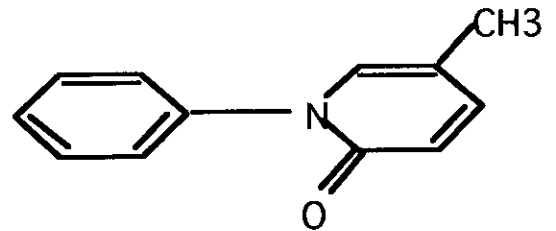


図1 Pirfenidone の化学構造

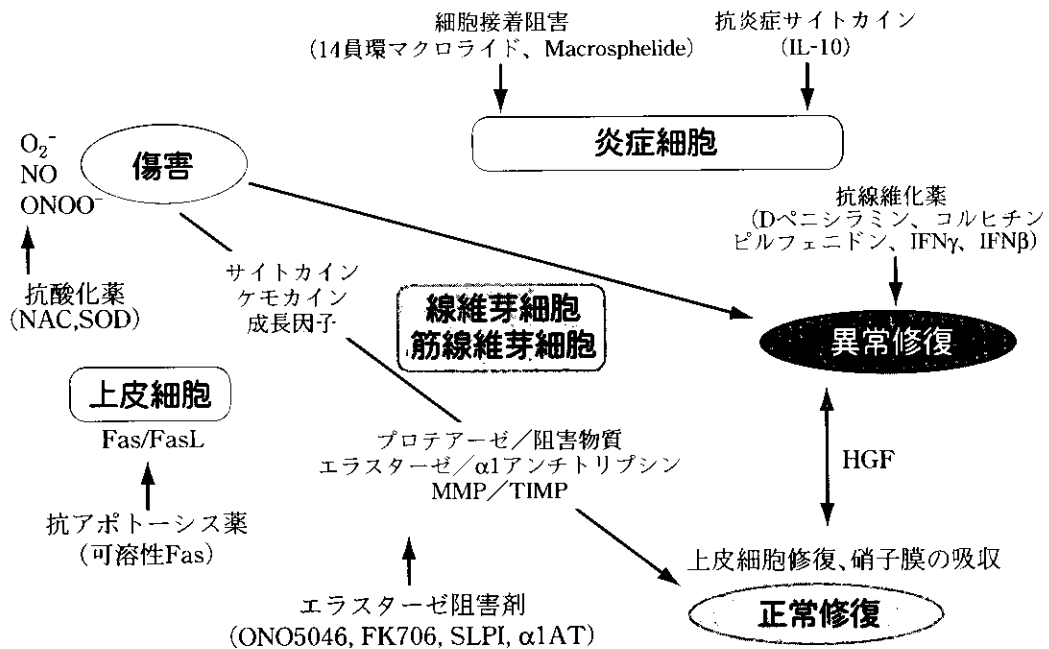


図2 Pirfenidone の作用機序

1. 日本医科大学第四内科
 2. 熊本大学医学部附属病院第一内科
 3. 札幌医科大学第三内科
 4. 東北大加齢医学研究所
 5. 虎の門病院
 6. 京都大学医学部附属病院
 7. 天理よろづ相談所病院
 8. 大阪回生病院呼吸器内科
 9. 福井医科大学放射線科
 10. 京都予防医学センター
- * びまん性肺疾患研究班 主任研究者
 ** 同 分担研究者
 *** 同 研究協力者

研究方法

選択基準：

慢性型の特発性間質性肺炎で 20 歳以上 75 歳未満であり、登録前 1 ヶ月以内の安静時 PaO₂ が 70Torr 以上かつ労作時 SpO₂ が 90% 以下に低下する患者を選択する。

除外基準：

6 ヶ月以上前に比較して病勢の改善が認められる患者、免疫抑制剤使用患者、プレドニン換算量として一日量 10mg を超過するステロイド使用患者、有効性に影響を及ぼす疾患を合併している患者を除外する。