

はじめに

急性呼吸促迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) は, 急性発症, 著明な低酸素血症 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200 \text{ mmHg}$), 胸部 X 線写真にてびまん性の浸潤影の出現があり, 心原性の要因が否定される非水圧性肺水腫と定義され, 急性肺傷害として類別される病態のスペクトラムの中で最も重篤な病態である。その原因は様々であるが, 肺炎などの肺内病変から続発して起こる場合 (direct injury) と, 他の臓器を炎症巣とする敗血症などの肺外病変からの炎症が波及する場合 (indirect injury) と, 大きく2つに分類され, その致死率は未だ 40-60% に及ぶ^{1,2)}。

ARDS の予後不良を規定する背景因子としては, 近年の多変量解析の結果では, 70 歳以上の年齢, 原因としての direct lung injury, 基礎疾患としての肝硬変, また基礎疾患の予後スコアである McCabe スコアの高値, 全身の重症度を示す Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II スコアもしくは SAPS スコアの高値, さらに高率に多臓器不全を合併することが多いことから, その多臓器不全の程度を示す Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) スコアが報告されている³⁻⁵⁾。一方肺傷害に関する因子としては, 発症後 day 3 における PaO_2 と FiO_2 の比 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) が唯一挙げられているに過ぎない³⁾。

我々は, ARDS の病理組織像であるびまん性肺胞傷害 (diffuse alveolar damage, DAD) の病理学的病期 (急性浸出期, 亜急性増殖期, 慢性線維化期) と高分解能 CT (HRCT) 所見との対比の検討から, HRCT 所見が DAD の病理学的病期を反映することを報告してきた^{6,7)}。さらにこの知見と, HRCT が肺野全体の病理学的病期を表わすことを応用し, 基礎疾患のない比較的健康人に発症する原因不明の ARDS/DAD である急性間質性肺炎 (acute interstitial pneumonia, AIP) 症例において, HRCT による評価が AIP の予後因子になりうることを報告した⁸⁾。

今回の検討の目的は, AIP 症例に有用と考えられた HRCT による評価の方法が様々な原因や基礎疾患を有する一般の ARDS 症例においても適応できるかについて評価することである。その評価の第一のエンドポイントは, AIP 症例と同様に予後因子となりうるかどうかという点であり, 第二のエンドポイントは, 発症 28 日までの人工呼吸器離脱率および圧外傷発生率の予測に有用かどうかを検討した。

対象と方法

1) 症例

症例の内訳は男性 23 例, 女性 7 例, 平均年齢は, 64.0 ± 15.8 歳 (14-80 歳) であり, 診断は, 1994 年に発表された診断基準によって行った⁹⁾。CT 施行時の急性肺傷害スコア (Lung Injury Score) は, 中央値 3.0 ± 0.7 と ARDS (> 2.5) の範疇に入るものであった⁹⁾。全身性の重症度を示す APACHE II スコアは, 中央値 16.5 ± 3.8 であった。ARDS の発症時にて, 他の臓器不全の合併は 15 例 (50%) に認められた。薬剤の治療内容については, メチルプレドニゾロンパルス療法 (1-2g/日, 3日間, 1-3クール) 施行例が 22 例であり, このうち 8 例ではシクロフォスファミドパルス療法 (500mg) が併用されていた。他の 6 例の治療は, 2mg/kg の低用量のメチルプレドニゾロンが用いられていた。残りの 2 例については, ステロイドや免疫抑制剤の使用はなく, 人工呼吸管理のみにて治療された。

ARDS 生存例 18 例と非生存例 12 例の背景因子の比較を Table 1 に示す。ARDS 発症時の年齢では, 非生存例でやや高齢の傾向が認められたが, 統計学的に有意な差は見られなかった。また, 多臓器不

Table 1 Clinical Characteristics of Patients on the Day of High-Resolution CT Scans

Scans	Total (n=30)	Survivors (n=18)	Non-survivors (n=12)	p Value
Age	64.0 ± 15.8	58.0 ± 13.6	71.0 ± 19.6	0.1, NS
Sex, M/F	23/7	14/4	9/3	>0.99, NS
Liver cirrhosis, %	27	16	11	>0.99, NS
Direct/Indirect injury	12/18	6/12	6/6	0.46, NS
Day from the onset	1.4 ± 3.0	1.8 ± 3.6	1.7 ± 1.6	0.24, NS
Lung Injury Score*	3.0 ± 0.7	3.3 ± 0.7	3.0 ± 0.9	0.33, NS
APACHE II Score*	16.5 ± 3.8	16.0 ± 3.6	17.0 ± 4.1	0.37, NS
SOFA Score*	5.0 ± 3.1	5.0 ± 3.0	6.5 ± 3.3	0.20, NS

Definition of Abbreviations. APACHE= Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; SOFA= Sequential Organ Failure Assessment.

*Data are expressed as median ± standard deviation.

1 熊本大学第一内科

2 大阪大学保健学科医用物理学講座

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

全の程度を示す SOFA スコアも非生存例で高値であったものの、有意差は認めなかった。HRCT 施行時の ARDS 発症からの期間（罹病期間）や、急性肺傷害スコアおよび APACHE II スコアについても明らかな有意差はみられなかった。

2) CT 撮影

高分解能 CT (HRCT) の撮影は、ARDS の発症から平均 1.4 ± 3.0 日に施行された。スライス厚は 1mm を用い、撮像間隔は 10mm で、肺尖から横隔膜上まで撮影後、片肺ごとに high-spatial frequency algorithm にて画像再構成を行った。

3) CT 所見の広がりへの評価

HRCT 所見は、症例の予後を知らせることなく 2 名の観察者によって別個に評価された。各所見の有無と広がりについて検討した。DAD の病理学的病期と HRCT 所見との関係^{6,7)}から、浸出期、増殖期そして線維化期に対応する CT 所見を以下のように 6 段階に分類し、それぞれの所見の広がりを視覚的に 10% きざみでスコア化した。肺野を左右上肺野（肺尖から気管分岐部まで）、中肺野（気管分岐部から下肺静脈レベルまで）および下肺野（下肺静脈レベルから横隔膜上まで）と 6 領域に分け、各領域について各所見の広がりを評価した後、6 領域の広がり（%）の平均値（%）を算出した。6 段階の所見は、(1) 一見正常に見える領域、(2) スリガラス状陰影、(3) 浸潤影、(4) 牽引性細気管支・気管支拡張像を伴うスリガラス状陰影、(5) 牽引性細気管支・気管支拡張像を伴う浸潤影、そして (6) 蜂巣肺である。

4) CT による肺野全体のスコアの算出 (CT による病理学的進展度の定量的評価)

上記の病理学的病期に対応した 6 つの CT 所見について、段階的に 1-6 点のスコアを設定した。すなわち、一見正常に見える領域を 1 点、スリガラス状陰影を 2 点とし、最も病期の進んだ蜂巣肺を 6 点とした。このスコアに各所見の広がり（%）の平均値（%）を乗じ、その総和をもって算出した。

5) 統計学的評価

HRCT 所見の読影者間の一致率は、Kappa 検定を用いて評価し、所見の広がりについての一致率は Spearman 順位相関係数を用いて検定した。生存例および非生存例のそれぞれの臨床的な背景因子の頻度の比較には、 χ^2 検定 (Fisher の直接確率計算法)

を用い、量的因子の比較には、Mann-Whitney U 検定にて評価した。2 変量の相関性の検定には、Spearman 順位相関係数を用いた。CT スコアの予後因子としての独立性の検定には、ロジスティック多変量解析を用いて行った。また、CT スコアのカットオフ値の設定には、生存例の平均 CT スコアの 95% 信頼区間上限の値を参考とし、感度、特異度、陽性適中率および陰性適中率を算出した。有意水準は 5% 未満をもって有意と判定した。

結 果

1. ARDS の発症からの罹病期間は病理学的進展度を必ずしも示さない

図 1 に ARDS の罹病期間と CT スコアと相関性の検討では、相関係数 $R_s = 0.24$ ($p = 0.20$) と、有意な相関関係を示さないことがわかった。さらに、ARDS 発症から平均 1.4 ± 3.0 日で CT が撮影されたにも関わらず、増殖期以降を示唆する牽引性細気管支・気管支拡張像を伴う濃度上昇域は、21 症例 (70%) に確認された。この結果は、ARDS 発症からの罹病期間は必ずしも病理学的進展度を示さないことを示唆している。

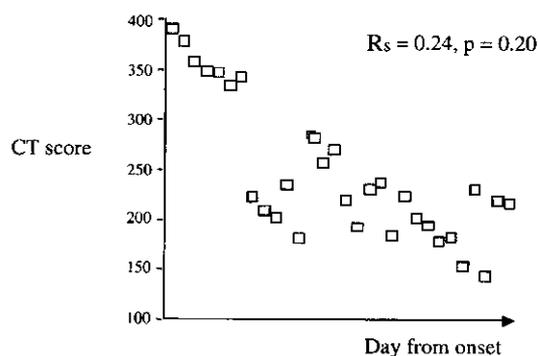


図 1 ARDS 発症からの日数と CT スコアの関連

2. 生存例・非生存例の各 HRCT 所見の広がりへの違い

Table 2 に、生存例と非生存例の各 HRCT 所見の広がりへの違いを示す。

非生存例に比較して生存例において、有意に牽引性細気管支・気管支拡張像を伴う濃度上昇域が広範に認められる傾向がみられた。読影者間の所見の一致率は、0.70 - 0.82 と良好であった。また、所見の広がりへの評価の一致率についても、0.72 と良好であった。

Table 2 Extent of Each CT Finding in Survivors and Non-survivors of Acute Respiratory Distress Syndrome

CT Findings	Survivors (n=18)	Non-survivors (n=12)	p value*
Spared area	29.8 ± 15.6	24.4 ± 17.6	NS
Ground-glass attenuation	42.1 ± 21.0	15.1 ± 16.4	0.0008
Air-space consolidation	20.1 ± 17.5	11.7 ± 17.2	0.07
Ground-glass attenuation + Traction bronchiolectasis or bronchiectasis	6.9 ± 11.3	37.1 ± 34.3	0.01
Air-space consolidation + Traction bronchiolectasis or bronchiectasis	2.4 ± 4.2	11.5 ± 18.0	0.11
Honeycombing	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NS

Values are mean ± SD percentages of lung involvement.

*For between group comparisons; NS = not significant

3. 生存例・非生存例のCTスコアの比較

図2に生存例と非生存例のCTスコアの比較を示す。非生存例に比較して生存例において、有意にCTスコアは低値を示した。しかしながら、非生存例においては、CTスコアが高値の群が多いものの低値の症例も含まれることがわかった。生存例の平均CTスコアの95%信頼区間の上限にあたる232をカットオフ値と設定し、CTスコアによる予後の予測が可能かどうか検討した結果をTable 3に示す。この場合には、感度および陽性適中率がそれぞれ78%、特異度67%、陰性適中率73%の確率で予後予測が可能であることが判明した。

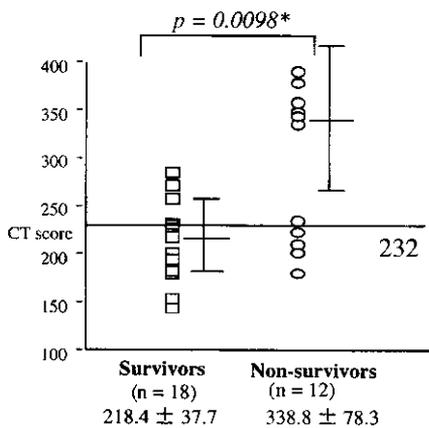


図2 生存例・非生存例のCTスコアの比較

Table 3 Predictive Value of CT score in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome

Outcome*	CT Score	
	< 232†	≥ 232
Lived	14	4
Died	4	8

*Sensitivity = 78%, Specificity = 67%

Positive predictive value for survival = 78%.

Negative predictive value for survival = 73%

† p=0.01, Fisher's exact test

4. CTスコアによる人工呼吸器離脱率および圧外傷発生率の予測

同様にCTスコアのカットオフ値232を用いて、発症28日までの人工呼吸器離脱率および圧外傷発生率について検討を行った。結果を図3および4に示す。カットオフ値未満の症例群では、有意に人工呼吸器離脱率が高く、圧外傷発生率が低いことがわかった。

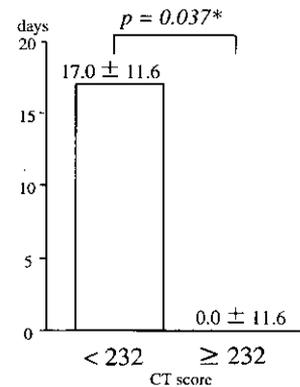


図3 Day28までの人工呼吸器離脱率

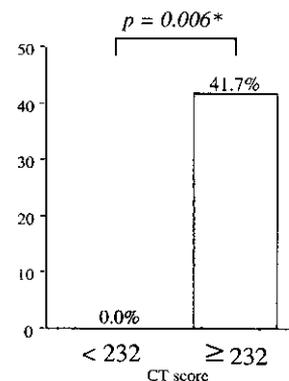


図4 Day28までの圧外傷発生率

5. CTスコアの予後因子としての独立性の検討

CTスコアの予後因子としての独立性の検討結果をTable 4に示す。これまで報告された予後因子を多変量解析にて一致させた上での検討において、CTスコアは有意なp値を示し、予後因子として独立したものであることがわかった。さらに、牽引性気管支拡張像を伴う濃度上昇域が10%の増加を示した場合の致死率の相対危険度(オッズ比)は、3.85倍増加することが判明した。

Table 4 Multiple logistic regression of variables associated mortality in patients with acute respiratory distress syndrome

Variable	p Value	Odds Ratio	95% Confidence Interval
CT score	0.010	3.85*	0.942-0.992
SOFA score	0.094		
PaO ₂ /F _i O ₂	0.166		
Direct injury	0.220		
Age >70	0.363		
APACHE II score	0.703		

Definition of Abbreviations. SOFA= Sequential Organ Failure Assessment; APACHE= Acute Physiology and Chronic Health Evaluation.

* Expressed as mortality change per change of 10% increased area of attenuation with traction bronchiectasis on high-resolution CT scan.

考察・結論

我々は、ARDS の病理組織像であるびまん性肺胞傷害 (diffuse alveolar damage, DAD) の病理学的病期 (急性浸出期, 亜急性増殖期, 慢性線維化期) と高分解能 CT (HRCT) 所見との対比の検討から、HRCT 所見が DAD の病理学的病期を反映することを報告してきた。すなわち、浸出期に対応する HRCT 所見は、牽引性気管支拡張像を伴わない濃度上昇域 (スリガラス状陰影, 浸潤影) であり、増殖期には、濃度上昇域の内部に牽引性細気管支・気管支拡張像の出現を認め、さらに線維化期には、これらの所見に加え小嚢胞性変化が明らかとなってくるのがわかった^{6,7)}。CT 所見を病理学的な進展度に応じてスコア化し、各所見の広がりと合わせることによって、肺野全体の病変の進展度を CT により定量化することが可能であると考え、原因不明の ARDS/DAD である急性間質性肺炎 (AIP) 症例において、CT スコアが予後因子となることを報告した⁹⁾。

しかしながら、この AIP における結果を一般の ARDS にも当てはめられるかについては、それぞれの背景因子に大きな相違が認められる。基礎疾患のない比較的健康人に発症し、明らかな原因が同定できず、しかも呼吸不全のみの一臓器不全である AIP に対し、一般の ARDS では、発症時に既に様々な基礎疾患を有し、これに伴って他の臓器不全を高率に合併する特徴が認められる¹⁰⁾。実際に、これまでの ARDS の予後を規定する背景因子として、基礎疾患としての肝硬変や、基礎疾患そのもの予後を示す McCabe スコアが重要と報告されている^{4,5)}。さらに、多臓器不全の程度を示す SOFA スコアの高値も同様に予後不良な因子である⁵⁾。

本研究では、ARDS 症例においても、HRCT 所見上、DAD の増殖期以降を示唆する牽引性気管支拡張像を伴う濃度上昇域を非生存例において、より広範に認める傾向があり、CT スコアも生存例に比較して、非生存例に有意に高値であることが確認された。しかしながら、非生存例の CT スコアには低値の症例も認められ、生存例の CT スコアのカットオフ値 232 にて、生存に対する特異度 67% と、感度や陽性適中率に比較して低い傾向であった。他の予後因子を含めた検討の必要性が考えられたことから、今回の検討では、多変量解析を用いて、これまでの ARDS の予後を規定する因子を一致させた上で、CT スコアが有意に独立した ARDS 予後因子となりうることを明らかにした。

ARDS において、近年 Meduri ら¹¹⁻¹³⁾ によって、亜急性期からの少量長期のステロイド投与の有効性が報告されている。この有効性についての理論的背景は、亜急性増殖期にみられる II 型肺胞上皮の過形成像などの所見が、傷害に対する修復反応であり、この組織の修復反応をステロイドが助長するというものである。一方増殖後期や線維化期などの完成した線維増殖性病変には、却ってステロイドが膠原線維の沈着を増強するという報告に基づく。今回 2 例を除く全症例にメチルプレドニゾロンのパルス療法または、Meduri らの報告に準じて、低用量 (2mg/kg) のメチルプレドニゾロンが治療として用いられており、増殖後期や線維化期を示唆する所見があった場合でも限局した症例においては治療が有効であった。この結果から、ステロイドの投与時期については、一般の ARDS においても、AIP の場合と同様に浸出期を示す濃度上昇域の時期から牽引性気管支拡張像を伴う増殖期が比較的限局した時期までがもっとも効果的である可能性が考えられた。

ARDS 後期におけるステロイドの有効性の検証のため、米国における ARDS Network では、現在大規模無作為試験進行中であるが、ARDS 発症からの罹病期間のみ (発症 7 日以上 28 日以内) で ARDS の進展度を定め、ステロイド投与のタイミングを規定している¹⁴⁾。本研究では、CT スコアによる肺野の病変の進展度と罹病期間との間には有意な相関関係を認めなかった。このことは、ARDS 発症からの罹病期間が必ずしも病理学的進展度を示さな

いことを表わしている。今回の検討の結果、罹病期間のみを参考としたステロイドの投与時期の決定は、病理学的には進行度が様々な症例を対象としている可能性があり、ステロイドの効果の正確な評価を困難にすることが考えられる。今後、ARDSに対するステロイドの投与時期の最適化をはかる上で、HRCT所見に基づく評価の有用性が期待される。

今回の検討では、CTスコアの第二のエンドポイントとして、発症28日までの人工呼吸器離脱率および圧外傷発生率に着目した。人工呼吸器離脱率は近年エンドポイントとして有用な使用であることが報告されている¹⁵⁾。CTスコアのカットオフ値232未満の症例群では、232以上の症例群に比較して、有意に発症28日までの人工呼吸器離脱率が高く、圧外傷発生率が低いことが認められた。現在ARDSに対する人工呼吸器管理法として、low tidal volumeおよびhigh PEEPを用いたopen-lung approachによる肺の保護戦略が提唱されている¹⁶⁾。しかしながら、一方でhigh PEEPと圧外傷発生率との関連の高さも報告されている¹⁷⁾。今回の結果から、CTスコアが高値の症例については、圧外傷の発生についての注意が必要であると思われる。

本研究によって、一般のARDSにおいて、HRCTを用いた病理学的病期の推定は、予後因子となるだけでなく、人工呼吸器離脱率や圧外傷発生率を予測する上で、重要であることがわかった。しかしながら今回の検討では症例数が少ないために、今後の症例の積み重ねによって、今回の結果について、さらに検証しなければならない。

参考文献

- 1) Bernard GR, Artigas A, Brigham L, Carlet J, Falke L, Hudson M, Lamy M, LeGall JR, Moris A, Spragg R and the Consensus Committee. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes: and clinical trial coordination. *Intensive Care Med* 20: 225-232, 1994.
- 2) Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342; 18: 1334-1349.
- 3) Ely EW, Wheeler AP, Thompson BT, Ancukiewicz M, Steinberg KP, and Bernard GR. Recovery rate and prognosis in older persons who developed acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 136: 25-36, 2002.
- 4) Monchi M, Bellenfant F, Cariou A, Joly LM, Therbert D, Laurent I, Dhainaut JF, and Brunet F. Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A Multivariate analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1076-1081, 1998.
- 5) Estenssoro E, Dubin A, Laffaire E, Canales H, Saenz G, Moseinco M, Pozo M, Gomez A, Baredes N, Jannello G, and Osatnik J. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 30: 2450-2456, 2002.
- 6) Ichikado K, Johkoh T, Ikezoe J, Kohno N, Takeuchi N, Arisawa J, Nakamura H, Nagareda T, Itoh H, Ando M. Acute interstitial pneumonia: high-resolution CT findings correlated with pathology. *Chest* 111: 333-338, 1997.
- 7) Ichikado K, Suga M, Gushima Y, Johkoh T, Iyonaga K, Yokoyama T, Honda O, Shigeto Y, Tomiguchi S, Takahashi M, Itoh H, Ikezoe J, Muller NL, Ando M.
- 8) Ichikado K, Suga M, Muller NL, Taniguchi H, Kondoh Y, Akira M, Johkoh T, Mihara N, Takahashi M, Ando M. Acute interstitial pneumonia: comparison of high-resolution computed tomography findings between survivors and non-survivors. *Am J Respir Crit Care Med* Jun 1; 165 (11) : 1551-1556
- 9) Murray JF, Matthay MA, Luce JM and Flick MR. An expanded definition of the acute respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 138: 720-723, 1988.
- 10) Hansell DM. Acute interstitial pneumonia: clues from the white stuff. *Am J Respir Crit Care Med* Jun 1; 165 (11) : 1465-1466, 2002.
- 11) Meduri GU, Belenchia JM, Koeniger E, et al. Fibroproliferative phase of ARDS clinical findings and effect of corticosteroids. *Chest* 100; 943-952, 1991.

- 12) Meduri GU, Chinn AJ, Leeper KV, *et al.* Corticosteroid rescue treatment of progressive fibroproliferation in late ARDS. Pattern of response and predictors of outcome. Chest 105; 1516-1527, 1994.
- 13) Meduri GU, Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome. JAMA 280: 159-165, 1998.
- 14) ARDS Clinical Network RESERCH PROTOCOL. LATE STEROID RESCUE STUDY, June 2, 2000.
- 15) Shoenfeld DA, Bernard GR, and the ARDS Network. Statistical evaluation of ventilator-free days as an efficacy measure in clinical trials of treatments for acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med 30: 1772-1777, 2002.
- 16) Brower RG, Ware LB, Berthiaume Y, Matthay MA. Treatment of ARDS. Chest 120: 1347-1367, 2001.
- 17) Eisner MD, Thompson BT, Schoenfeld D, Anzueto A, Matthay MA, and the Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Am J Respir Crit Care Med 165: 978- 982, 2002.

特発性間質性肺炎に対する慢性鳥飼病の位置づけ —慢性鳥飼病の組織学的パターンと臨床像の対比—

大谷 義夫 角 勇樹 海野 剛 白井 裕
稲瀬 直彦 三宅 修司 吉澤 靖之*

慢性鳥飼病は特発性肺線維症（UIP/IPF）と誤診されることが多いため、慢性鳥飼病の臨床病理学的特徴を明らかにする研究を行った。外科的肺生検を施行した慢性鳥飼病 26 例の組織像を特発性間質性肺炎群（IIPs）の組織学的分類に準じて分類し、臨床像を比較検討した。26 例中 7 例は Cellular NSIP パターン、8 例は Fibrosing NSIP パターン、11 例は UIP パターンに分類された。Cellular NSIP パターンの多くは再燃症状軽減型であり、UIP パターンは全例潜在性発症型であった。UIP パターンに分類された 11 例中 8 例は、当科受診前は UIP/IPF と診断されていた。特異抗体は Cellular NSIP パターンの 85.7% が陽性であったが、UIP パターンでは 18.2% にのみ陽性であった。ステロイド治療への反応は、Cellular NSIP パターンでは良好だったが、UIP パターンでは不良であった。UIP パターンを示す慢性鳥飼病は、UIP/IPF と誤診されることが多いので、詳細な問診聴取と抗原添加リンパ球増殖試験、吸入誘発試験などで正しく診断すべきである。

Chronic Bird Fancier's Lung: Histopathological and Clinical Correlation

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

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

Chronic bird fancier's lung (BFL) may be misdiagnosed as idiopathic interstitial pneumonias (IIPs), if a careful history is not taken. This study was conducted to define the clinicopathologic characteristics of chronic bird fancier's lung (BFL) and provide clues to its diagnosis and prognosis in relation to the surgical lung biopsy histopathologic findings.

In addition to the pathologic details by surgical lung biopsy, the correlation between histopathology and the clinical characteristics and prognosis was analyzed in 26 patients with chronic BFL underwent a surgical lung biopsy between October 1992 and April 2001. The pattern of chronic inflammatory and fibrotic changes was expressed by the description of the 2002 ATS/ERS consensus classification of idiopathic interstitial pneumonias.

Fifteen of the 26 patients showed a nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) pattern (7 cellular NSIP pattern and 8 fibrotic NSIP pattern), whereas the remaining 11 patients showed a usual interstitial pneumonia (UIP) pattern with temporal heterogeneous appearance. However, fibrosis in these patients had developed in centrilobular, as well as perilobular areas, suggestive of hypersensitivity pneumonitis as the etiology. The 19 patients (73.1%) showed multinucleated giant cells often with cholesterol clefts while only 5 patients (19.2%) showed granulomas. Patients with cellular NSIP pattern tended to have recurrent acute episodes, whereas patients with UIP pattern had an insidious onset. Patients with cellular NSIP pattern had a more favorable outcome than those with fibrosing NSIP and UIP pattern.

Pathologists can suggest the diagnosis of chronic BFL on the basis of these histological findings. The patterns of chronic inflammatory and fibrotic lesions are diverse but correlate with clinical features and prognosis.

はじめに

特発性間質性肺炎群 (IIPs) 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^{1,2)}。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^{3,4)}。鳥飼病は、代表的な過敏性肺炎であり、鳥類の排泄物に含まれる免疫グロブリンの分解産物、消化管由来のムチンあるいは羽毛をコーティングする蛋白などを抗原とする^{3,4)}。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⁵⁾、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。一方、急性症状のない慢性鳥飼病も存在するため、診断が難しく、特発性肺線維症 (IPF) と誤診されることもある^{6,7)}。そのため、広範囲に肺線維化をきた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⁸⁾。慢性鳥飼病の診断および治療方法確立のため、慢性鳥飼病症例の組織像を特発性間質性肺炎群 (IIPs) の組織学的分類に準じて分類し、臨床像と比較検討した。

方 法

対象は、1993年から2001年にかけて当院にて診断され、外科的肺生検を施行された慢性鳥飼病26例で、このうち、当科受診前には10例が idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)、1例が nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) と診断されていた。IIPs の組織学的分類^{1,2,9-11)} に準じて、cellular NSIP パターン、fibrosing NSIP パターン、usual interstitial pneumonia (UIP) パターン、bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) パターン、diffuse alveolar damage (DAD) パターン、desquamative interstitial pneumonia (DIP) パターンに分類し、臨床像を比較

検討した。

ステロイド投与量は約0.5mg/kg/日、実際には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ずつ漸減していた。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での蜂巣肺の存在
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^{6,7,12)}。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¹⁾。

特異抗体の測定

気管支肺胞洗浄液中と血清中の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¹³⁾、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、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 (PDE)。各ウエルを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100 μ l (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。

鳩血清添加末梢血リンパ球増殖試験

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、 2×10^6 /mlの濃度でRPMI1640/10% FCSに浮遊させた。鳩血清を1%加え5日間培養し、 2×10^5 の細胞につき³H-thymidine 1 μ Ciを加え、さらに16時間培養し、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, χ^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

慢性鳥飼病 26 症例の内訳は, cellular NSIP パターン 7 例, fibrosing NSIP パターン 8 例, UIP パターン 11 例であり, BOOP パターン, DAD パターン, DIP パターンは認められなかった。Cellular NSIP パターン, fibrosing NSIP パターン, UIP パターンの 3 群間で, 年齢, 性別, 喫煙歴, 労作時呼吸困難の頻度, 外科的生検までの有病期間, 抗原曝露期間, 肺活量, 拡散能には有意差を認めなかった (Table 1)。Cellular NSIP パターンでは, 再燃症状軽減型が多く, 特異抗体陽性率が高いのに対し, UIP パターンでは, 全例潜在性発症型で, 特異抗体は有意に低い陽性率だった。これに対し, 抗原添加リンパ球増殖試験は 3 群ともに高率に陽性だった。BAL 中リンパ球は, cellular NSIP パターンで高値であり, fibrosing NSIP パターン, UIP パターンの順に低下していた。

Cellular bronchiolitis は cellular NSIP パターンで高率に認められたのに対し, 蜂巣肺と fibroblastic foci

は UIP パターンで高率に認められた (Table 2)。コレステリン結晶や多核巨細胞は 3 群とも比較的高頻度に認められたが, 肉芽腫は cellular NSIP パターン 3 例, fibrosing NSIP パターン 2 例にのみ認められた。

ステロイド治療への反応性は, cellular NSIP パターンでは良好だったが, fibrosing NSIP パターン, 更には UIP パターンでは不良だった (Table 3)。Fibrosing NSIP パターン 3 例, UIP パターン 6 例は, 外科的肺生検からそれぞれ 41.3 ± 13.1 , 30.5 ± 8.8 月で, 抗原回避とステロイド治療にもかかわらず死亡した。

Table2 組織パターンと組織所見

	Cellular NSIP パターン N=7	Fibrosing NSIP パターン N=8	UIP パターン N=11
Cellular bronchiolitis, %	100.0 #	50.0	27.3 #
Honeycombing, %	0.0 &#	75.0 &	90.9 #
Fibroblastic foci, %	0.0 &#	75.0 &	100.0 #
Lymphoid follicle, %	100.0	62.5	63.6
Interstitial infiltrates of chronic inflammatory cells, %	100.0	87.5	100.0
Intraalveolar foamy histiocytes, %	28.6	25.0	36.4
Cholesterol clefts, %	57.1	37.5	45.5
Giant cell, %	71.4	75.0	72.7
Granuloma, %	42.9	25.0	0.0

p < 0.01 (Cellular NSIP パターン versus UIP パターン)

& p < 0.01 (Cellular NSIP パターン versus Fibrosing NSIP パターン)

Table3 組織パターンと予後

	Cellular NSIP パターン N=7	Fibrosing NSIP パターン N=8	UIP パターン N=11
ステロイド治療に良好な反応, %†	7/7 (100.0%) &#	1/7 (14.3%) &	1/9 (11.1%) †
ステロイド治療に不良な反応, %‡	0/7 (0.0%) *	4/7 (57.1%) *	6/9 (66.7%) *
生存/死亡	7/0	5/1	5/6

† ステロイド治療がなされた cellular NSIP パターン 7 例, Fibrosing NSIP パターン 7 例, UIP パターン 9 例での検討

p < 0.01 (Cellular NSIP パターン versus UIP パターン)

* p < 0.05 (Cellular NSIP パターン versus UIP パターン)

† p < 0.01 (Fibrosing NSIP パターン versus UIP パターン)

& p < 0.01 (Cellular NSIP パターン versus Fibrosing NSIP パターン)

Table1 組織パターンと臨床像

	Cellular NSIP パターン N=7	Fibrosing NSIP パターン N=8	UIP パターン N=11
年齢	56.9 ± 4.3	58.4 ± 1.8	64.7 ± 2.1
性別 (男性: 女性)	3:4	5:3	8:3
喫煙率, % (Current-Ex:Never)	57.1 (2:2:3)	50.0 (1:3:4)	72.7 (5:3:3)
再燃症状軽減型, %	85.7 #	50.0 @	0.0 @#
初診時無症状例 (健診発見), %	0.0	12.5	18.2
労作時呼吸困難, %	85.7	100.0	90.9
外科的肺生検までの有病期間, 月	19.3 ± 7.5	46.3 ± 14.2	24.2 ± 5.3
抗原曝露期間, 年	11.6 ± 2.8	18.0 ± 2.8	11.0 ± 2.5
特異抗体, %	85.7 *	62.5	18.2 *
抗原添加リンパ球増殖試験, %	100.0	87.5	90.9
VC, %pred	80.2 ± 9.1	60.6 ± 5.3	74.8 ± 7.2
Dlco, %pred	58.7 ± 5.8	49.1 ± 6.0	52.3 ± 5.7
BAL リンパ球, %	77.0 ± 2.6 &#	40.8 ± 8.6 &#	19.1 ± 2.9 &#

p < 0.01 (Cellular NSIP パターン versus UIP パターン)

* p < 0.05 (Cellular NSIP パターン versus UIP パターン)

@ p < 0.05 (Fibrosing NSIP パターン versus UIP パターン)

† p < 0.01 (Fibrosing NSIP パターン versus UIP パターン)

& p < 0.01 (Cellular NSIP パターン versus Fibrosing NSIP パターン)

考案・結論

ATS/ERS の consensus statement により, IIPs は 7 型の組織学的パターンに分類される^{1,2)}。我々は, 慢性鳥飼病症例を IIPs の組織学的分類に準じて分類し, 臨床像を比較検討した。対象 26 症例中 10 例は IPF, 1 例は NSIP と診断されていた。

過敏性肺炎の診断に, 肉芽腫の存在が強調されているが¹⁴⁾, 慢性例に限っては肉芽腫を認める症例は少ない。Seal 等¹⁵⁾ は, 6 例の慢性農夫肺症例を検討した結果, 肉芽腫を認めた例はなく, 間質

の線維化が主たる病理所見であると報告している。慢性鳥飼病の末期肺の外科的生検や剖検例の報告¹⁶⁻¹⁹⁾でも、広範な蜂巢肺やびまん性肺胞障害を認めるものの、肉芽腫は認められていない。鳥接触歴のあるびまん性肺疾患症例では、肉芽腫を認めなくても、慢性鳥飼病を考えて諸検査を施行する必要がある。

IPFの組織像はUIPであるが、慢性過敏性肺炎や膠原病でも同様な組織パターンを呈することがあり、本研究では26例中11例がUIPパターンを呈していた。これらの症例は潜在性に発症し、特異抗体陽性率は低く、BAL中のリンパ球分画も低値であった。今回の検討でも、UIPパターンを呈した慢性鳥飼病11例中8例が当科受診前はIPFと診断されていた。しかし、UIP/IPFと違い、線維化病変は、小葉辺縁だけでなく、小葉中心にも認められ、コレステリン結晶を含んだ多核巨細胞やリンパ濾胞の形成も認められた。しかし、病勢が進展すると、小葉中心性のパターンが消失し¹⁹⁾、UIP/IPFと誤診される可能性がある。従って確診の為の外科的肺生検は、病理所見で鑑別可能な比較的早い時期に施行すべきであると考え²⁰⁾。

Katzensteinら⁹⁾による当初のNSIPの報告では、特発性や膠原病だけでなく、過敏性肺炎も含まれていた。Vourlekisら²¹⁾は、6例の肉芽腫を認めないNSIPパターンの病理像を呈する過敏性肺炎を報告している。最近では、NSIPはcellular NSIPとfibrosing NSIPに亜分類されるようになったが^{2,10,11)}、特発性NSIPでは、fibrosingパターンがcellularパターンよりも、更にUIPパターンはfibrosing NSIPパターンより予後が悪かったと報告している¹⁰⁾。慢性鳥飼病の組織パターンをIIPsの組織パターンに当てはめて検討した本研究でも、組織パターンと予後は同様の関係であった。

Jacobs等²²⁾は、原因不明のUIP、NSIP、BOOPと他院で診断されていた症例を再度検討したところ、過敏性肺炎であったと報告し、IIPsが疑われる症例では全例過敏性肺炎を疑うべきであると強調している^{20,22)}。慢性鳥飼病では、特発性NSIPやUIP/IPFと誤診されることが多いので、詳細な問診聴取と病理所見の検討、抗原添加リンパ球増殖試験、吸入誘発試験などで慎重に診断すべきであると思われた。

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) Travis WD, King TE Jr. (Co-Chairs): American Thoracic Society/European Respiratory Society international consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277-304
- 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) 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.
- 6) Ohtani Y, Saiki S, Sumi Y, *et al.* Clinical features of recurrent and insidious chronic bird fancier's lung. *Ann Allergy Asthma Immunol* 90: 604-610, 2003.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Katzenstein AL, Fiorelli RF. Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance. *Am J Surg Pathol* 18: 136-147, 1994.
- 10) Nagai S, Kitaichi M, Itoh H, *et al.* Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis and BOOP. *Eur Respir J* 12: 1010-1019, 1998.

- 11) Travis WD, Matsui K, Moss J, *et al.* Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns. *Am J Surg Pathol* 24: 19-33, 2000.
- 12) Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, *et al.* Inhalation provocation tests in chronic bird fancier's lung. *Chest* 118: 1382-1389, 2000.
- 13) 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.
- 14) Coleman A, Colby TV. Histologic diagnosis of extrinsic allergic alveolitis. *Am J Surg Pathol* 12: 514-518, 1988.
- 15) Seal RME, Hapke EJ, Thomas GO, *et al.* The pathology of the acute and chronic stages of farmer's lung. *Thorax* 23: 469-489, 1968.
- 16) Greenberger PA, Pien LC, Patterson R, *et al.* End-stage lung and ultimately fatal disease in a bird fancier. *Am J Med* 86: 119-122, 1989.
- 17) Tasaka S, Kanazawa M, Kawai C, *et al.* Fatal diffuse alveolar damage from bird fancier's lung. *Respiration* 64: 307-309, 1997.
- 18) Ohtani Y, Saiki S, Inase N, *et al.* Fatal outcome in chronic bird fancier's lung. *Am J Med* 112: 588-590, 2002.
- 19) Hayakawa H, Shirai M, Sato A, *et al.* Clinicopathological features of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respirology* 7: 359-364, 2002.
- 20) Jacobs RL. Hypersensitivity pneumonia: UIP/IPF histopathologic presentation. *J Allergy Clin Immunol* 110: 532-533, 2002.
- 21) Vourlekis JS, Schwarz MI, Cool CD, *et al.* Nonspecific interstitial pneumonitis as the sole histologic expression of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Med* 112: 490-493, 2002.
- 22) Jacobs RL, Andrews CP, Coalson J. Organic antigen-induced interstitial lung disease: diagnosis and management. *Ann Allergy Asthma Immunol* 88: 30-41, 2002.

Hermansky-Pudlak 症候群 (HPS) の *HPS1* 遺伝子解析

河野 修興* 池上 靖彦 中島 正光 檜山 桂子

Hermansky-Pudlak 症候群 (HPS) は全身性白皮症, 出血傾向, 細胞質内のセロイド様顆粒の蓄積を 3 徴とする常染色体劣性遺伝性疾患で, 成人において肺線維症を高率に発症する. 現在のところ, 原因遺伝子の一つとして染色体 10 番長腕の *HPS1* 遺伝子等の異常が報告されている. 【目的】 HPS の確定診断のために胸腔鏡下肺生検, *HPS1* 遺伝子の解析を行った. 【対象と方法】 患者胸腔鏡下肺生検組織より mRNA を抽出し, *HPS1* 遺伝子全コード領域をカバーする 7 組のプライマーセットを用いて RT-PCR を行い, 塩基配列を決定した. また, 患者および両親の末梢血 DNA を抽出し, ゲノム解析も行った. 【結果】 患者 *HPS1* 遺伝子のスプライス供与部位の変異と, それに由来するスプライス異常と考えられる新たな mRNA の配列異常を認め, この異常が本症の発症に関与していると考えられた.

Novel aberrations of *HPS1* mRNA detected in a case of Hermansky-Pudlak syndrome

Nobuoki Kohno, Yasuhiko Ikegami, Masamitsu Nakajima, Keiko Hiyama

Department of Molecular and Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) consists of oculocutaneous albinism, platelet storage-pool deficiency, and ceroid lipofuscinosis. Until now, nucleotide substitutions, deletions, and insertions in the *HPS1* gene have been reported to be responsible for the phenotype of HPS. OBJECTIVE: Molecular diagnosis of HPS. SUBJECTS AND METHODS: A lung tissue sample was taken from an HPS patient for definite diagnosis, under informed consent. RNA was extracted from the lung tissue sample, reverse-transcribed into cDNA, amplified by use of seven primer sets, which cover the entire 2.1-kb coding region of the *HPS1* cDNA, then sequenced. Genomic DNA extracted from the patient and her parents was also analyzed. RESULTS: Novel aberrations of *HPS1* mRNA, possibly due to alternative splicing caused by a mutation at the splice-donor site, were observed in the patient's lung tissue.

はじめに

Hermansky-Pudlak 症候群 (HPS) は 1959 年に Hermansky らによって初めて報告¹⁾された, 全身性白皮症, 出血傾向, 細胞質内のセロイド様顆粒の蓄積を 3 徴とする稀な常染色体劣性遺伝性疾患で, 肺線維症を 60%程度と, 高率に発症することが本邦で報告されている. 本疾患の原因遺伝子として, 現在まで HPS1²⁾, AP3B1³⁾, HPS3⁴⁾, HPS4⁵⁾が報告されており, それぞれの原因遺伝子が引き起こしている HPS を, HPS1, HPS2, HPS3, HPS4 と区別する試みもされるようになってきている. このなかで HPS1 がもっとも頻度が高く, 現在までのところ日本人症例では, HPS1 遺伝子の異常が報告⁶⁻⁸⁾されている.

HPS1 遺伝子は, 第 10 染色体に遺伝子座を持ち, 全長約 30.5 kb, 20 のエクソンより構成されている. HPS1 遺伝子は 700 のアミノ酸からなる膜貫通性蛋白をコードし, 細胞内蛋白輸送に関与していると考えられている⁹⁾.

我が国の症例とプエルトリコの症例は高率に重症の肺線維症を発症し, 40 歳代までに死亡することが多い. 一方で, 同じく HPS1 遺伝子の異常によるスイス症例では肺線維症を合併せず天寿を全うすることが多いといわれている. このように, 肺線維症の発症の差は HPS1 遺伝子の異常部位の違いに関連する可能性が推測される¹⁰⁾.

本研究では当科で経験した症例の肺組織から抽出した mRNA, 末梢血から抽出した DNA で, 上記 HPS1 遺伝子の解析を行い, 現在までに遺伝子解析が行われている日本人症例と比較検討した.

対象と方法

症 例

症 例: 37 歳, 女性.

主 訴: 咳, 労作時の息切れ.

既往歴: 特記事項なし.

家族歴: 近親婚なし.

現病歴: 出生時から, 白皮症, 斜視を認めた. 特

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 分子内科学

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

に, 出血異常の既往はない.

1998 年頃より乾性咳と労作時の息切れを自覚したが, 放置していた. 1999 年 1 月頃, 胸部単純レントゲン写真上, 異常陰影を認め, 肺線維症と診断された.

2000 年 2 月, 手指のこわばり, 膝関節痛が出現するようになり, 他医を受診し, 関節リウマチの診断を受け, ステロイド投与を開始された. その後, 手指の症状改善は認められたが, 息切れ, 咳が徐々に増悪した. このため, 2000 年 6 月, 精査加療のため当科に入院した.

入院時現症: 体温 36°C, 脈拍 70/分, 呼吸数 20 回/分, 血圧 110/70 mmHg.

身体所見: 頭頸部, 髪の毛は栗毛色, 口唇の周囲に橙色の色素沈着を認めた. 両睫毛, 両虹彩に色素低下, 眼底所見で網膜の色素低下と黄斑部の発達不良を認めた. 結膜には黄疸, 貧血は見られず. 表在リンパは触知しなかった. 胸部両側全肺野で fine crackles を聴取し, 心音は整で, 腹部に異常所見を認めなかった. 両手指に腫脹を認めた.

検査所見: 白血球は 15,080/μl と高値を示したが, その他, 末梢血検査に異常は認めなかった. 凝固系では, Ivy 法で 15 分と延長しているが, PT, aPTT に異常を認めなかった. KL-6 は 1050 U/ml と上昇していた. 呼吸機能検査では, vital capacity が 1.22 L (%VC, 36.8%) と低下, 動脈血液ガスは, PaO₂ 71.7 torr であった. 胸部単純レントゲン写真および, 胸部 CT 写真は, 胸膜直下の淡い濃度上昇を認めた.

本症例では, 臨床的に血小板機能異常を認めず. また, リウマチ肺との鑑別が必要であったため, 右 S⁸ 胸腔鏡下肺生検を行った. 生検肺組織は, 胸膜および肺胞隔壁にリンパ球を中心とした, 強い炎症細胞の浸潤, 肺胞腔内には多数のマクロファージをみとめ, UIP 様の像を示していた. 肺胞腔内のマクロファージに, セロイド様顆粒を認め, 臨床所見と合わせて HPS と診断した.

方 法

Hazelwood らの報告¹¹⁾を参考に HPS1 遺伝子全コード領域をカバーする 7 組のプライマーセット (表 1) を作成し, 診断目的で行った. HPS 患者の胸腔鏡下肺生検組織より抽出した mRNA を用いて,

RT-PCRを行った。また、ABI310 シークエンサーを用いて、塩基配列も決定した。さらに、患者および、患者両親の末梢血より抽出したDNAを用いて、ゲノム塩基配列を比較検討した。このDNAの解析に対して、上記とは別に、二つのプライマー（表1）を設定した。患者および、両親より遺伝子解析の同意を得た。

表1 プライマーのシーケンス

HP-1	5-GCTTGCCAAGATGAAGTGCGTC-3
	5-TCGGTGTGGTCACCATTGATG-3
HP-2	5-GGAGAATGCCTGTTTCATTGC-3
	5-TGGCTAGAGTAGAATGCCAG-3
HP-3	5-TCCTGCTCGTGCACTCCAACGT-3
	5-GCTTTCCTCCACGTTGGCATC-3
HP-4	5-ACACCCTCCAAACACTGGTTCC-3
	5-TAAACTCCAGCCAGGTGCTCTG-3
HP-5	5-TTGTCAGAATCGAGGGGCAC-3
	5-CCAACTCCGACGAGGTCTTTTG-3
HP-6	5-CGGCTGAACTTTCTGACCACAG-3
	5-ACCCCATGTCATTCTCGAACC-3
HP-7	5-GGATTCTACTGCTCCTACTTC-3
	5-GAACAGTGGCAAGCAAGGGTG-3
HP-8	5-ACGGCATCTTATCAAACCCG-3
	5-AAAATGGCAGCTTCACAGGG-3

プライマーセット HP-1 から HP-7 は cDNA 解析用であり

HP-8 は DNA 解析用である

結 果

患者肺組織から抽出した患者RNAの解析で① exon 5 の 3' 側 72 塩基の欠失を homogenous に認めた。② exon 4 の 3' 末端に intron 4 の挿入を heterogenous に認めた。③ exon 5, 297 番目の塩基に C から T への silent mutation を homozygous に認めた。両親の末梢血から抽出したDNAでは、この変異を heterozygous に認めた。

また、DNA の intron 5 の 5' 末端から 5 塩基目即ち、intervening sequence (IVS) 5+5 の G から A の変異を、本人で homozygous に、両親で heterozygous に認めた。

考案・結論

2000年にMargaglioneらはフィブリノーゲン欠損症で、フィブリノーゲン遺伝子のIVS 3+5のGからAへの変異がスプライシング異常を招いたと報告¹²⁾している。我々の今回の検討では、患者末梢血におけるIVS 5+5のGからAへの変異が、患者肺組織から抽出したmRNAレベルでのexon 5の3'側72塩基のhomogenousな欠失という、スプライス異常を起こしている可能性が示唆された。患者両親の末梢血から抽出したDNAの解析ではIVS 5+5のGからAへの変異をheterozygousに認め、これが本症例で、homozygousに認めた同様の変異の原因となったと考えられた。

HPSI遺伝子解析が行われている過去の日本人報告例は6例^{6,8)}あり、その報告例の中には、我々が報告した、IVS 5+5のGからAへの変異を、homozygousに認めるものが1例、heterozygousに認めるものが1例あった。現在までの解析は少数であるため判断は困難であるが、日本人以外で、この変異の報告がないことを考えると、非常に興味深い。この変異と日本人における本症例発症の関連について、症例の積み重ねが必要と考えられた¹³⁾。また、本症でみられる遺伝子異常を究明することによって、同様な肺線維症を認める特発性肺線維症や膠原病関連間質性肺炎の発症機序解明にも、多大な貢献をなすものと考えている。

参考文献

- 1) Hermansky F, Pudlak P. Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies. *Blood* 1959; 14: 162-9.
- 2) Oh J, Bailin T, Fukai K, *et al.* Positional cloning of a gene for Hermansky-Pudlak syndrome, a disorder of cytoplasmic organelles. *Nat Genet* 1996; 14 (3) : 300-6.
- 3) Shotelersuk V, Dell'Angelica EC, Hartnell L, *et al.* A new variant of Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in a gene responsible for vesicle formation. *Am J Med* 2000; 108 (5) : 423-7.

- 4) Anikster Y, Huizing M, White J, *et al.* Mutation of a new gene causes a unique form of Hermansky-Pudlak syndrome in a genetic isolate of central Puerto Rico. *Nat Genet* 2001; 28 (4) : 376-80.
- 5) Suzuki T, Li W, Zhang Q, *et al.* Hermansky-Pudlak syndrome is caused by mutations in HPS4, the human homolog of the mouse light-ear gene. *Nat Genet* 2002; 30 (3) : 321-4.
- 6) Oh J, Ho L, Ala-Mello S, *et al.* Mutation analysis of patients with Hermansky-Pudlak syndrome: A frameshift hot spot in the HPS gene and apparent locus heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1998; 62 (3) : 593-8.
- 7) Horikawa T, Araki K, Fukai K, *et al.* Heterozygous HPS1 mutations in a case of Hermansky-Pudlak syndrome with giant melanosomes. *Br J Dermatol* 2000; 143 (3) : 635-40.
- 8) Mitsui H, Komine M, Watanabe T, *et al.* Does Hermansky-Pudlak syndrome predispose to systemic lupus erythematosus? *Br J Dermatol* 2002; 146 (5) : 908-11.
- 9) Spritz RA. Hermansky-Pudlak syndrome and pale ear: melanosome-making for the millennium. *Pigment Cell Res* 2000; 13 (1) : 15-20.
- 10) 木戸健治, 田村尚亮, 福地義之助: Hermansky-Pudlak 症候群: 責任遺伝子と線維化肺. *現代医療* 2001; 31: 151-4.
- 11) Hazelwood S, Shotelersuk V, Wilkenberg SC, *et al.* Evidence for locus heterogeneity in Puerto Ricans with Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Hum Genet* 1997; 61 (5) : 1088-94.
- 12) Margaglione M, Santacroce R, Colaizzo D, *et al.* A G-to-A mutation in IVS-3 of the human gamma fibrinogen gene causing afibrinogenemia due to abnormal RNA splicing. *Blood* 2000; 96 (7) : 2501-5.
- 13) Ikegami Y, Hiyama K, Haruta Y, *et al.* Novel aberrations of HPS1 mRNA detected in a case of Hermansky-Pudlak syndrome with pulmonary fibrosis. (Submitted)

間質性肺炎肺組織における KL-6 の局在と産生の同定

中山 智子¹ 河野 修興^{2*} 福田 悠^{1*}

KL-6 は間質性肺炎 (IP) の診断, 病勢に有用な血清マーカーとして, 本邦で広く用いられている. IP における上皮傷害, 肺胞-毛細血管バリアーの破綻により, 肺胞被覆液から血中に移行・上昇すると予測されるが, これまでに肺組織内での詳細な検討はされていない. そこで我々は IP と健常肺において, 免疫組織化学 (IHC), 免疫電顕 (IEM), in situ hybridization (ISH), western blot (WB), ELISA 法により肺組織内での KL-6 の局在と産生を検討した. IHC では健常肺で II 型上皮と気管支上皮の内腔側表層に弱陽性であったが, IP では I 型, II 型上皮の内腔側表層と細胞質に強い陽性像を示し, 再生気管支上皮内腔側表層にも連続性に陽性像を認めた. ISH では IP の再生上皮に KL-6 mRNA の発現を認め, IEM では II 型上皮の粗面小胞体に陽性を認めた. WB では健常肺に比し, IP で有意な蛋白産生の増加を確認した. 血清 KL-6 値と蛋白量は同様の傾向を示した. これらより, IP では KL-6 が主として II 型上皮で産生されることが確認され, 健常例と比較して局在が変化するのみでなく, 局所での蛋白産生も増加することが確認された.

Detection of KL-6 production and localization in interstitial pneumonia

Tomoko Nakayama¹, Nobuoki Kohno², Yuh Fukuda¹

¹ Department of Pathology, Nippon Medical School

² Second Department of Internal Medicine, Hiroshima University, School of Medicine

KL-6 is recognized as an useful serum marker for diagnosis and monitoring the activity of interstitial pneumonia (IP). Serum KL-6 increases in the condition of alveolar-blood barrier damage in IP. But the production and localization of KL-6 in lung tissues were not studied in detail. In this study, we confirm the producing cells, localization and productive quantity of KL-6 in lung tissues and review the difference between IP and controls.

Immunohistochemistry shows hyperplastic type II cells are strongly positive for KL-6 at apical area and diffusely in cytoplasm in IP. Type I cells, basal cells and regenerative bronchial epithelial cells are also positive but less than type II cells. In control, only slightly positive reactions are observed at apical area of bronchial epithelial cells and type II cells. In situ hybridization shows the positive reaction for KL-6 in hyperplastic type II cells in IP. Immunoelecton microscopy shows the positive staining for reaction KL-6 in rough endoplasmic reticulum of type II cells in IP. Western blotting analysis (WB) shows strong bands for KL-6 in IP but less in controls. Serum KL-6 measured by ELISA is almost correlated with the result of WB. Our study emphasizes type II cells mainly produce KL-6 in IP and the localization and productive quantity shows clearly difference from control.

はじめに

間質性肺炎 (IP) は、肺胞間質に炎症を引き起こす肺疾患の総称である。IP の病態形成には以下の過程が認められる¹²⁻¹⁷⁾。まず初めに、肺胞間質の炎症により肺胞上皮傷害が生じ、I型上皮細胞の壊死・アポトーシスが起る。続いて傷害を受けた部位の基底膜の断裂が起り、間葉細胞が肺胞腔内に侵入し、肺胞腔内線維化に進行する。これらの過程は、病理組織分類の差異に関係なく、IP の病態において等しく認められる事象である。Usual interstitial pneumonia (UIP) は、Nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) や Cryptogenic organizing pneumonia (COP) といった予後良好な IP に比較して、通常ステロイドや免疫抑制療法に対する反応性が非常に限られており、慢性進行性に、確実に悪化する。加えてその経過中にしばしば致命的な急性増悪を引き起こす予後不良な IP である¹⁾。

これら IP の診断に、病理学的検索は必須であるが、繰り返し施行することの困難な肺生検にかわる IP の診断、病勢判定のための客観的で正確な血清マーカーが望まれていた。KL-6 は、河野らによって間質性肺炎の新しい血清マーカーとして報告され²⁾、現在は IP の鑑別と、疾患活動性の指標のための非常に役立つ血清マーカーとして、広く認識されている^{3-11,19)}。KL-6 は、約 1000KD の高分子量糖蛋白で、ヒト肺上皮細胞の発現抗原の Cluster 9 に分類される、非分泌性の膜貫通型ムチン蛋白である MUC1 の sialyl 化糖鎖の一分子種である²⁾。通常では、血清中に比較して、肺胞被覆液中 (Epithelial lining fluid: ELF) に高濃度に存在する¹⁰⁾。血清 KL-6 の上昇は、IP の病因における肺胞上皮傷害による肺胞-毛細血管バリアの破綻により、ELF から逆行性に血中に移行し、増加すると考えられているが²⁾、これまでに肺組織中の KL-6 の生産と局在に関しての詳細な検討は行われていない。そこで我々は、ヒト肺組織中の KL-6 の局在、生産細胞と蛋白産生量を検討し、健常肺との相違、IP のマーカーとしての KL-6 の有用性を検討した。

対象と方法:

1. ヒト肺組織: 外科肺生検検体 IP 6 例 (UIP n=4, NSIP n=2) と 2 例の健常肺を対象とした。検体処理は、光顕像と免疫組織化学のために、4% paraformaldehyde/0.1M PBS pH7.4 に固定後、パラフィン包埋を行った。蛋白アッセイには、切除後直ちに-80℃で凍結保存した新鮮肺組織を用いた。In situ hybridization と免疫電顕のために、4% paraformaldehyde/0.1M PBS pH7.4 で固定後、10, 20, 30% の sucrose に段階的に置換し、OCT compound に包埋後、急速凍結した凍結標本を用いた。
2. 光顕および免疫組織化学: 薄切標本は H. E, Alcian blue-PAS (ABP), Elastic-Masson-Goldner (EMG) 染色を行った。免疫組織化学は avidin-biotin peroxidase 法により抗 KL-6 抗体を用いて行った。
3. In situ hybridization 大腸菌プラスミド pBluescript II に挿入された KL-6 cDNA を用い、Promega 社によるキットを用いて RNA プローブを作成し、凍結標本で hybridization を行った。
4. 免疫電顕 凍結標本に対し、抗 KL-6 抗体を用い horseradish peroxidase 法による酵素抗体法を施行後、1% OsO₄ で固定、Epok 812 包埋後に超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察した。
5. Western blotting 凍結肺組織 30mg の蛋白抽出液を 1 レーンにつき 18μg の蛋白濃度に調整し、3-10% gradient polyacrylamide gel で電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。Blocking 処理後抗 KL-6 抗体と反応させ、化学発光キットにより発色を行った。
6. 血清 KL-6 ELISA エーザイ社により開発された electrochemiluminescence イムノアッセイ法に基づくキット (ピコルミ® KL-6) により測定を行った。
7. 統計解析 Western blot で検出したバンドを NIH イメージ・ソフトウェアにより読み込み、相対量を算出後、フィッシャー検定法を行った。p<0.05 を有意差とした。

1 日本医科大学病理

2 広島大学第二内科

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

結 果

1. 光顕および免疫組織化学：

(1) 健常肺

KL-6 は、II 型上皮細胞と気管支上皮細胞の細胞質内腔側に、わずかで弱い陽性像を示した (Fig. 1A, B)。また、気管支腺の漿液細胞にも弱陽性を示した。

(2) UIP

早期線維化巣周囲の、過形成性 II 型上皮細胞には、細胞質内腔側および細胞質にびまん性に陽性像を示した。健常例では陰性であった I 型上皮細胞、基底細胞にも細胞質内腔側に陽性像を認めた (Fig. 2A)。蜂巢肺を裏打ちする再生気道上皮においても、細胞質内腔側に連続性に強い陽性像を認めた。気胞腔内への滲出物にも陽性であった (Fig. 2B)。

(3) NSIP

UIP と同様に過形成性 II 型上皮細胞には、細胞質内腔側および細胞質にびまん性に陽性像を示した。I 型上皮細胞にも細胞質内腔側に強い陽性像を認めた (Fig. 3A)。

免疫組織化学染色結果より、IP では KL-6 の染色パターン、局在が明らかに健常例と異なることが明らかになった。

2. In situ hybridization

KL-6 mRNA の発現は anti sense プローブにおいて、肺胞領域に出現する再生性気道上皮、II 型上皮 (Fig. 4A) で陽性像を示した。一方、sense プローブは、無反応であった (Fig. 4B)。

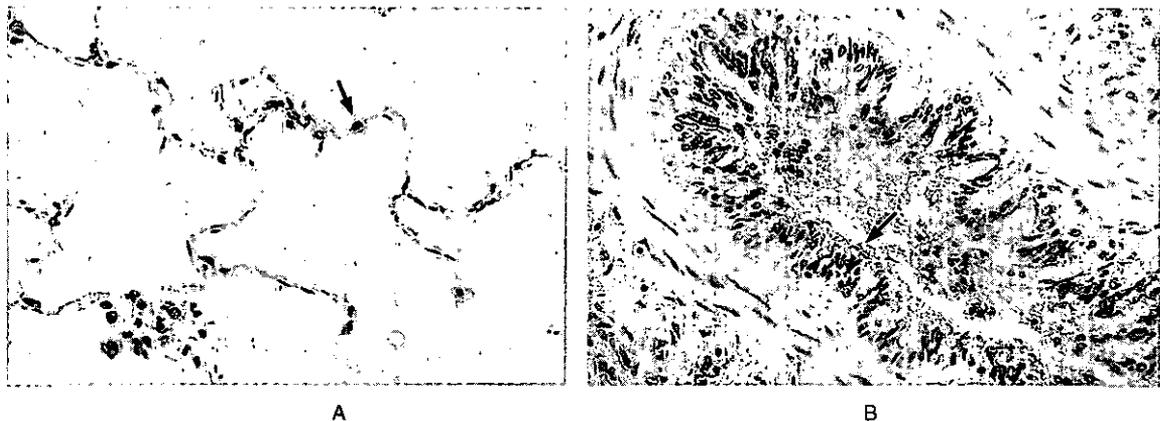


Fig. 1 KL-6 localization in control lung tissue with immunohistochemistry.
(A) KL-6 is slightly and weakly positive in type II cells (arrow) ($\times 100$).
(B) Bronchiolar epithelial cells are only weakly and intermittently positive for KL-6 (arrow) ($\times 50$).

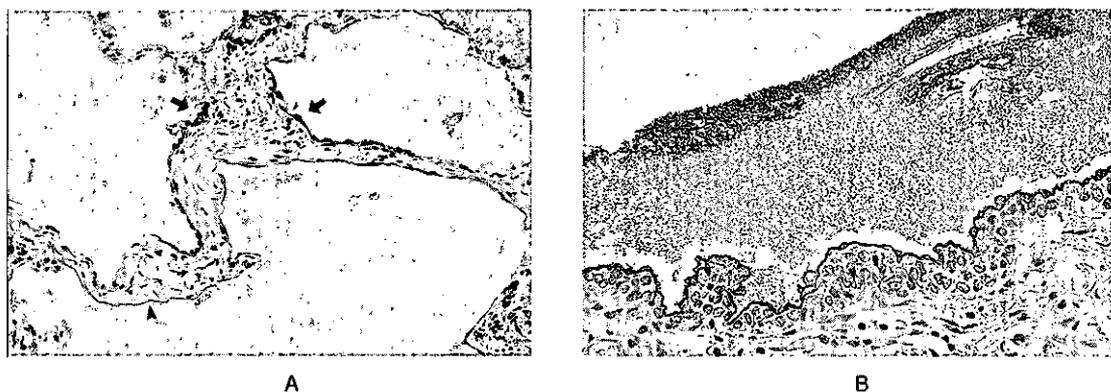


Fig. 2 KL-6 localization in UIP with immunohistochemistry.
(A) Around the fibroblastic focus, hyperplastic type II cells are strong positive at apical area and some in cytoplasm (arrows). Type I cells are also positive at apical area (arrow head) ($\times 50$).
(B) Apical area of the regenerative bronchiolar epithelial lining on honeycombing shows strong and successive staining. Exudates in the airspace is also positive ($\times 100$).

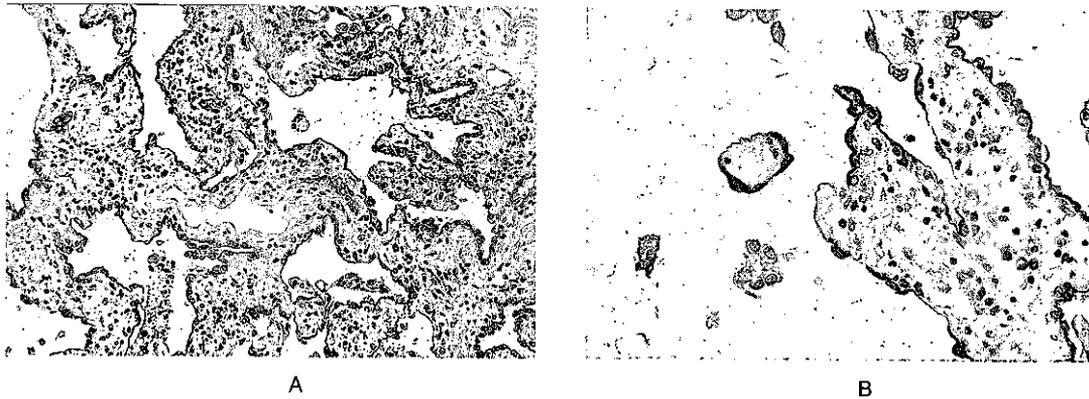


Fig. 3 KL-6 localization in NSIP with immunohistochemistry.

(A) KL-6 is strong positive at apical area and diffusely in cytoplasm of hyperplastic type II cells. Type I cells show also positive staining ($\times 50$).

(B) This particle is called as collagen globule, which is the late lesion of absorbable bud type intraalveolar fibrosis. It is observed frequently in COP and occasionally in NSIP. Positive for KL-6 is also recognized in epithelium surrounding this globule ($\times 200$).



Fig. 4 Production of KL-6 in UIP with in situ hybridization.

(A) Anti sense probe shows positive reaction in hyperplastic type II cells and regenerative bronchiolar epithelial cells (arrows) ($\times 100$).

(B) Sense probe shows no reaction ($\times 100$)

この結果より、再生性気道上皮と II 型上皮細胞に KL-6 の mRNA が確認され、これらの細胞が間接的に KL-6 蛋白を生産することが証明された。

3. 免疫電顕

II 型上皮細胞の粗面小胞体内に KL-6 の陽性像が確認された (Fig. 5)。この所見は II 型上皮細胞が KL-6 を生産することを明らかにした。

光顕的免疫組織化学と同様に、細胞表面上に発現していると思われる部位である細胞質内腔側に強い陽性像を認めた。

4. Western blotting

1000kDa 近傍に検出される KL-6 蛋白のバンドは、健常例に比較して、IP 例で明らかに増強していた (Fig. 6A)。NIH イメージによる分析では、UIP と



Fig. 5 KL-6 production and localization with immunoelectron microscopy.

KL-6 is positive staining in rough endoplasmic reticulum of type II cell (arrow). Positive staining also observed at apical area ($\times 3000$).

健常例 ($p < 0.01$), NSIP と健常例 ($p < 0.05$) において IP に有意に KL-6 蛋白の産生量の増加が認められた。UIP と NSIP 間には有意差は認められなかった ($p = 0.80$)。

5. 血清 KL-6 ELISA

IP 例では全例に KL-6 の cut off 値 500U/ml を超えた上昇が認められ、この結果はほぼ western blot 結果と同様の傾向を示した。健常例での上昇は認められなかった (Fig. 6B)。

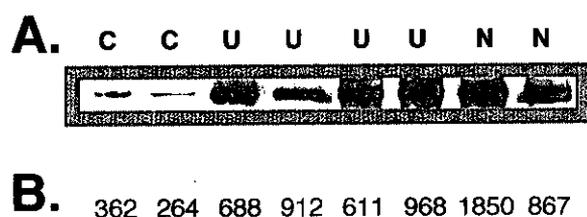


Fig. 6 KL-6 production in controls and IP with Western blotting analysis and ELISA of serum of these patients. (C: control, U: UIP, N: NSIP)

- (A) Western blotting analysis of tissue homogenized extract shows strong band for KL-6 at high molecular weight (near by 1000kD) in IP, but less in normal controls.
 (B) Serum KL-6 levels are clearly increased above the cut off value in IP (cut off value is 500U/ml).

考 察

KL-6 は、1989 年に河野らによって報告された IP の新しい血清マーカーであり²⁾、現在までに IP の診断・疾患活動性の有用な指標として種々の報告がされている^{3-11,19)}。しかし、肺組織中の KL-6 局在、産生細胞、および蛋白産生レベルは詳細に検討されていなかった。本研究は、形態学的・分子生物学的分析によりこれらの問題を確認した最初の報告である。

免疫組織化学および免疫電顕の検索により、通常の状態では、II 型上皮細胞、気管支上皮細胞の細胞質内腔側に弱い陽性像を認めた。この染色パターンは、細胞膜貫通型蛋白としての KL-6 の局在を反映する。しかし、健常例と比較して IP ではこれらの部位のみならず、II 型上皮細胞の細胞質内や気道上皮基底細胞、再生性気道上皮、健常例では認められなかった I 型上皮細胞の細胞質内腔側に強い陽性像を示した。これらの結果より、IP においては KL-6 産生の局在が健常例に比較し変化・拡

大することが判明した。また、産生細胞に関する検討では、免疫組織化学、免疫電顕、In situ hybridization 法により、主として II 型上皮細胞が KL-6 を産生することを確認し、再生性気道上皮にも mRNA の発現、免疫電顕でも気道上皮基底細胞に陽性像を認め、産生細胞であることを確認した。さらに、Western blotting により、KL-6 の産生蛋白レベルが IP の肺組織において有意に増加することを確認した。以上の結果より、血清 KL-6 値が IP で増加する理由は、単に IP における上皮傷害から引き続き肺泡-毛細血管透過性の亢進による血中への移行のみならず⁷⁾、IP においては、健常では KL-6 を産生しない細胞が産生細胞となり、局在が拡大する事に加え、局所での蛋白合成も亢進しているためであることが確認された。

また、この結果は血清 KL-6 値とほぼ同様の傾向を示すものであった。以上の結果から、我々の研究を通して、KL-6 が IP での診断と疾患活動性にとって有用な血清マーカーであることを傍証するものと考えられた。

参考文献

- 1) Travis WD, Matsui K, Moss J and Ferrans VJ. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns: survival comparison with usual interstitial pneumonia. *Am J Surg Pathol.* 24: 19-33 2000.
- 2) Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fnkuhara H, Yamakido M, Akiyama M. New serum indicator of interstitial pneumonitis activity: Sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest.* 96: 68-73 1989.
- 3) Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, Hiwada K, Kohno N. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 165: 378-81 2002.
- 4) Bando S, Fujita J, Ohtsuki Y, Ueda Y, Hojo S, Tokuda M, Dobashi H, Kurata N, Yoshinouchi T, Kohno N, Takahara J. Sequential changes of KL-6 in sera of patients with interstitial pneumonia