

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

呼吸器合併症を呈した全身性強皮症のリハビリテーションの確立に関する研究
—日常生活動作が改善した2例を通じて—

研究協力者	麦井直樹	金沢大学医学部附属病院作業療法部
分担研究者	佐藤伸一	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
協力者	塩谷真美	金沢大学医学部附属病院作業療法部
協力者	西悦子	金沢大学医学部附属病院作業療法部
協力者	染矢富士子	金沢大学医学部保健学科作業療法学専攻教授
主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

強皮症の肺合併症に対してはこれまで運動を制限することが一般的であり、リハビリテーションは確立されたものがない。今回、在宅酸素療法を受け入院加療中の全身性強皮症（抗DNAトポイソメラーゼI抗体陽性）2例に対し、リハビリテーションを行った。2例とも約50回の経過を経て日常生活動作に改善がみられた。その治療法、経過に考察を加え報告する。

A. はじめに

全身性強皮症（以下、強皮症）において肺合併症は頻度が多く¹、その合併により日常生活は制限され、重篤な場合は生命を脅かす。これまで強皮症の肺合併症に対して、リハビリテーションを積極的に行った報告はほとんどなく、拘束性障害に対する肺理学療法としての総論的報告であり^{2, 3}、その拘束性障害に対する呼吸理学療法も閉塞性障害ほど確立されたものはない。ところが肺合併症により在宅酸素療法となっていた2症例に対し、今回入院中作業療法、理学療法を行ったところ日常生活活動（以下、ADL）の改善および機能向上を認めた。そこでその治療プログラム、症例の治療経

過に考察を加え報告する。

B. 症例

1) 症例1：58歳，女性，診断名：全身性強皮症（抗DNAトポイソメラーゼI抗体陽性），間質性肺炎，2次性肺高血圧症。

現病歴：1995年4月より手指の浮腫性硬化を認めた。同年11月皮膚硬化が上肢に拡大し、近医で全身性強皮症と診断された。1996年より間質性肺炎を指摘され、1998年労作時呼吸困難が出現し、1999年在宅酸素療法を1L/分で開始した。また下肢の皮膚硬化も再びみられたため、治療目的に2000年1月16日当院入院、皮膚硬化に対

して P S L 20 mg 内服開始した。5月8日リハビリテーション紹介された。作業療法では手指拘縮の評価、治療に対して、理学療法で呼吸器リハビリテーションを開始した。

リハビリテーション開始時所見：

呼吸機能は V C 0.89 l (33.7%)， F E V_{1.0%} 70.3%， D L C O は測定不可，血液ガス，動脈血酸素分圧 60.4 mmHg，動脈血二酸化炭素分圧 49.7 mmHg，酸素飽和度 91.2%，推定右心室圧 51 mmHg，鼻チューブによる酸素投与量は安静時 1 l / 分，運動時 3 l / 分であった。また Hugh-Jones の分類では IV の休まなければ 50 m 以上歩けないに相当していた。ADL ではバーサルインデックス (以下，B I) の評価では 80 点であった。皮膚硬化の程度は modified-Rodnan T S S にて 21 点，皮膚硬化に対して P S L 15 mg 内服となっていた。

初期リハビリテーション経過：

作業療法では拘縮予防の手指のストレッチングを開始した。入院中 (リハビリテーション開始 3 週) に縦隔気腫となり，理学療法 1 ヶ月中断，ベッドサイドにて作業療法のみ継続となった。

縦隔気腫後 1 ヶ月間は息切れの自覚症状が強く，訓練困難な日も多く，症例は日中の臥床時間が多くなった。ADL では食事が側臥位にて介助下摂取，排泄が病棟トイレより，ポータブルトイレへと身辺動作の介助量が増大した。B I では 40 点に低下した。Hugh-Jones の分類では V の会話または着物の着脱，その他身のまわりのことをするにも息切れがするに相当していた。

2) 症例 2：67 歳，女性。診断名：全身性強皮症 (抗 DNA トポイソメラーゼ I 抗体

陽性)，間質性肺炎，2 次性肺高血圧症。

現病歴：1992 年春より全身倦怠感，労作時呼吸困難を認めた。その後レイノー症状，手指腫脹，皮膚硬化が出現した。1994 年に強皮症に伴う間質性肺炎と診断された。

2001 年 5 月より症状の増悪認められ，酸素療法を開始した。以後症状軽快していたが同年 11 月頃より呼吸困難等改善しないため 2002 年 2 月 19 日当院入院となった。翌週 リハビリテーション紹介された。作業療法，理学療法ともに廃用性の筋力低下および全身状態改善の目的でプログラムを開始した。

リハビリテーション開始時所見：

呼吸機能は V C 1.07 l (46.7%)， F E V_{1.0%} 86.0%， D L C O は測定不可，血液ガス，動脈血酸素分圧 114.8 mmHg，動脈血二酸化炭素分圧 40.8 mmHg，酸素飽和度 98.5% (21 酸素下)，推定右心室圧 55 mmHg，鼻チューブによる酸素投与量は安静時 2 l / 分，運動時 3 l / 分であった。また Hugh-Jones の分類では IV の休まなければ 50 m 以上歩けないに相当していた。ADL では B I の評価では 85 点であった。皮膚硬化の程度は modified-Rodnan T S S にて 7 点，P S L は 5 mg 内服となっていた。

C. 経過

1) 症例 1：機能低下後に作業療法では身辺動作自立に目標変更，廃用性の筋力低下および全身状態改善の目的にプログラム変更し行った。以前行っていた手指拘縮に対する訓練は十分な関節可動域が維持されているため自主訓練として対処した。

変更後作業療法プログラム：(リハビリテーション開始 13 週)

ベッド上訓練として① S L R 各 10 回②

ブリッジ 20 回③起立 5～10 回のプログラムを運動時の酸素量を 21/分に設定し、症例の末梢酸素飽和度（以下、%SpO₂）を携帯型のパルスオキシメーター（NONIN 社製オニックス モデル 9500）でモニターしながら行った。測定は左示指にて行った。プログラム開始 1 週後より、息切れの自覚症状の緩和およびリハビリテーションを休む日がなくなったことなどより、ベッド上訓練を自主訓練とした。また、能力低下に対し、歩行をベッド上訓練と同様、客観的指標となる%SpO₂ をモニターし、下限を 90%と設定して低酸素血症とならないように負荷をかけた⁴（リハビリテーション開始 14 週）。歩行中は 2～3l/分の酸素を供給し、酸素ボンベは症例に牽かせた。開始時は 1 回の歩行量を%SpO₂ と息切れの自覚症状から 60 秒間（45m）に設定し、十分な休憩（酸素飽和度や脈拍が安静時の状態になる程度）をはさみ 3～4 セット行った。歩行終了直後およびその後 30 秒毎の休憩時の%SpO₂ と脈拍を表に示す評価用紙にて記録した。歩行開始 2 日目では訓練直後より 30 秒経過時点まで%SpO₂ の低下がみられ、その後上昇した。歩行 3 週（リハビリテーション開始 17 週）後より 1 セット歩行量を 90 秒そして 120, 180, 360 秒と%SpO₂ が歩行中および歩行後にある程度 90 をきらなくなった時点で徐々に増やした（図 1）。歩行訓練開始後 7 週目（リハビリテーション開始 21 週）頃には%SpO₂ が安定し、その後は順調に歩行時間、距離の延長がみられた。2 ヶ月後には洗濯や酸素吸入なしでの自動車への乗車（助手席）も可能となり、これまで行われなかった入浴も介助ながら許可され、院内 ADL は向上した。BI の

得点も 85 点に改善した。最終的には連続して 1000m の歩行が酸素 21/分下、%SpO₂ が 90 をきらずに可能となった（Hugh-Jones の分類ではⅢに相当する）。このように%SpO₂ をモニターしながらの歩行訓練は 2 ヶ月半でのべ 42 回行った。歩行訓練 38 回目には、表に示すように%SpO₂ においても機能向上が示された。ベッドサイドのプログラムを加えると、全身状態改善の目的のプログラムは 58 回（廃用プログラム 15 週）であった。ところでリハビリテーションの経過中、4 回スパイロメトリーによる呼吸機能検査を行っているが、%VC に大きな変化はなかった。またリハビリテーション開始 8 週時、下肢皮膚硬化軽減により、PSL は 10mg へと減量された。

2) 症例 2：リハビリテーション紹介時より作業療法では廃用性の筋力低下および全身状態改善の目的にプログラムを開始した。具体的には体幹筋の筋力強化目的でサンディング 50 回を 3 セット、起立 5～10 回を 3 セット、歩行の 3 種目とした。歩行中の酸素ボンベは症例に牽かせた。プログラム中は運動時の酸素量を 31/分に設定し、症例の%SpO₂ を携帯型のパルスオキシメーターでモニターし、症例 1 と同様に低酸素血症とならないようにした⁴。測定は左母指にて行った。各々のプログラムでは各セット毎に%SpO₂ と息切れの自覚症状から、十分な休憩（酸素飽和度や脈拍が安静時の状態になる程度）をはさみ行った。各々のプログラム終了直後およびその休憩中最低時の%SpO₂ と脈拍を記録した。リハビリテーション開始時は全体の歩行量を 100m と間に十分な休憩をはさみ行った。%SpO₂ が歩行中および歩行後にある程度 90 をき

らなくなった時点で徐々に増やした(図2)。リハビリテーション開始 11 週頃には%SpO₂が安定し、その後は順調に歩行時間、距離の延長がみられた。B Iの得点は85点と変化はなかったが、息切れは明らかに減少した。最終的には連続して1800mの歩行が酸素3l/分下で可能となった(Hugh-Jonesの分類ではⅢに相当する)。このように%SpO₂をモニターしながらの訓練は約3ヶ月(12週)でのべ55回行った。症例2でもリハビリテーションの経過中、3回スパイロメトリーによる呼吸機能検査を行っているが、%VCはわずかに増大しているものの大きな変化はなかった。

D. 考察

強皮症に伴う肺合併症には間質性肺炎、肺高血圧症などがみられる。一般的に肺機能検査では、自覚症状を認めない初期から拡散障害(DLCOの低下)が認められ、つづいて拘束性障害(%VCの低下)を呈する⁵。2症例とも間質性肺炎、2次性の肺高血圧症の症状により常時酸素吸入を余儀なくされ、肺機能検査ではDLCOが測定不能、%VCが低下しており、息切れの自覚症状も強く、臥床しがちとなっていた。

これまで強皮症の肺機能障害に対してリハビリテーションを積極的に行ったという報告はみられず、どちらかといえば生活指導により運動制限されるのが一般的である^{6,7}。ところが2症例は臥床による機能低下が明らかであり、能力低下を引き起こした原因は廃用と考えられた。訓練にあたって設定した%SpO₂が90という数値は動脈血酸素分圧の60Torrに相当し、この値より低下すると低酸素血症となる危険性がある⁴。しかも運動時%SpO₂が90をきる場合

は酸素吸入量を安静時の約2~3倍程度に設定して行う必要がある⁸⁾。また、症例自身も%SpO₂が90という数値以内なら息切れの自覚症状なくリハビリテーション可能であった。

2症例とも、経過の中で%SpO₂の値も安定し、酸素吸入下ではあるが、連続した歩行も1000m以上可能となった。一方、リハビリテーション経過中に測定した肺機能検査結果では%VCの大きな変動はなかったことから、今回の症例の改善は廃用となっていた循環器機能、また酸素の取り込みの能力などの改善がADLに反映されたものと考えられた。また2症例ともリハビリテーションの受け入れは良好であり、休みの日も無理のない自主トレを継続してくれたことが良い結果につながった。

このように疾患の根源的問題に対するリハビリテーションではなく、あくまでも廃用など2次的要因による機能低下を訓練目標とした場合、十分なリスク管理下で機能向上を目指した積極的リハビリテーションが有効といえる。訓練手段も、症例1では定量化しやすい歩行を用いたが、%SpO₂をモニターする方法を利用すれば、症例2で積極的に取り入れた起立やサンディング、さらにはベッド上の訓練種目であっても問題は無いと思われる。今後はリハビリテーションの適応となる肺合併症の障害の程度を見極めていきたい。

E. まとめ

間質性肺病変を呈した58歳と67歳の女性の強皮症患者に対しリハビリテーション

を行った。訓練中は呼吸器症状のモニターとして%SpO₂を携帯型のパルスオキシメーターにて経時的に測定し、リスク管理下で主に歩行訓練を行った。2症例とも約50回の訓練後、歩行能力、ADL能力共に改善し、主に廃用と考えられた機能障害が改善した。

F. 文献

- 1) 竹原和彦：強皮症 膠原病 正しい知識と治療のポイント，第3章 症状，診療新社，1996
- 2) 篠原 豊：拘束性換気障害のトレーニング，理学療法5：207-210，1988
- 3) 高橋精一郎：拘束性呼吸器疾患に対する理学療法の効果とその限界，理学療法18，95-100，2001
- 4) 日本作業療法士協会学術部編：OTが知っておきたいリスク管理(Ⅱ)6 呼吸器疾患のリスク管理，日本作業療法士協会，2000
- 5) 近藤啓文，上村明子：特集／強皮症—その基礎と臨床—，全身性強皮症(4) 内臓病変の評価とその治療，Derma，No12，1998

- 6) 竹原和彦：皮膚疾患と生活指導—強皮症—，皮膚病診療：19，569-572，1997
- 7) 長谷川稔：特集／強皮症—その基礎と臨床—，全身性強皮症(6)生活指導，Derma，No12，1998
- 8) 石原傳幸：在宅酸素療法患者のケア，J. Clinical Rehabil10：509-516，2001

G. 研究成果

1. 論文発表

麦井直樹，塩谷真美，島崎悦子，染矢富士子，佐藤伸一他：間質性肺炎を伴った全身性強皮症に対するリハビリテーション—呼吸管理下リハビリテーションが有効であった1例—，総合リハビリテーション，30，563-566，2002.

2. 学会発表

麦井直樹，塩谷真美，島崎悦子，染矢富士子，佐藤伸一他：間質性肺炎を伴った全身性強皮症に対するリハビリテーション，第36回日本作業療法学会.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表 症例1の歩行訓練前半と後半でのSpO₂と脈拍の値

酸素量(/分)	2リットル	2リットル	2リットル	2リットル
歩行訓練2日目	1セット(SpO ₂ -脈拍)	2セット	3セット	4セット
安静時	95-94	/	/	/
歩行終了直後	90-104	91-123	93-83	92-83
30秒後	89-126	92-108	90-130	88-131
60秒後	92-117	95-107	92-118	93-120
90秒後	93-107	96-104	94-108	94-112
120秒後	95-101	97-105	96-107	95-107
150秒後	97-93	/	98-102	96-110
最低SpO ₂ 値	89	91	90	88
歩行時間(秒)	60	60	60	60
酸素量(/分)	3リットル	2リットル	1.5リットル	1.5リットル
歩行訓練38日目	1セット(SpO ₂ -脈拍)	2セット	3セット	4セット
安静時	99-80	/	/	/
歩行終了直後	96-112	96-109	97-110	95-113
30秒後	96-91	95-87	95-96	95-96
60秒後	100-82	99-83	98-83	97-88
90秒後	100-78	99-76	99-81	98-83
120秒後	100-76	99-74	99-75	98-77
150秒後	100-74	99-77	99-77	99-79
最低SpO ₂ 値	95	95	95	93
歩行時間(秒)	180	120	90	120

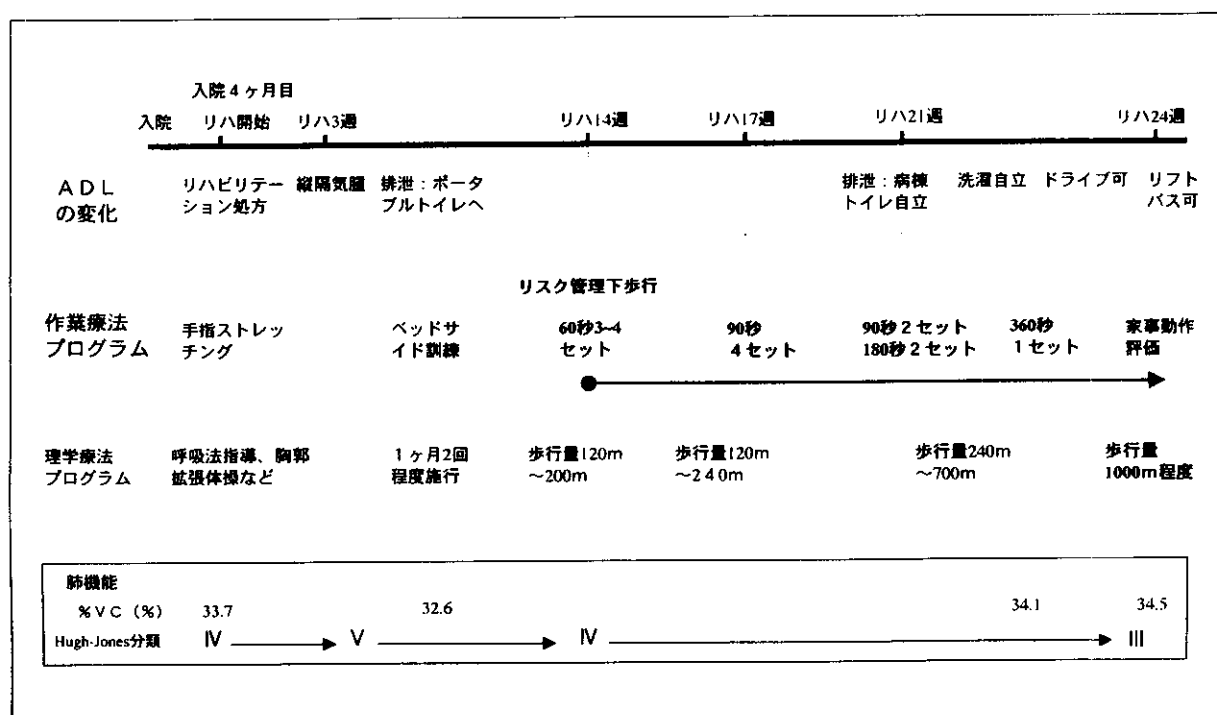


図1：症例1の治療経過，作業療法および理学療法の具体的プログラムとその経過を示す。さらに症例の肺機能評価として%VCとHugh-Jones分類を示す。

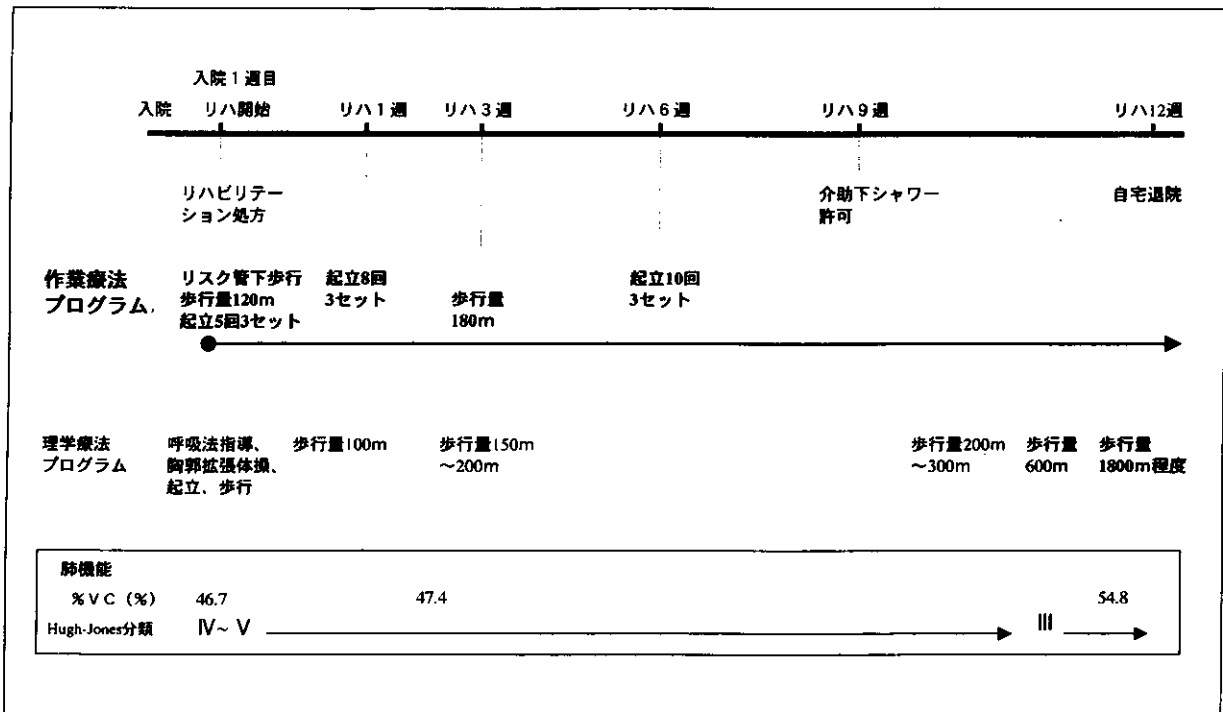


図2：症例2の治療経過，作業療法および理学療法の具体的プログラムとその経過を示す。さらに症例の肺機能評価として%VCとHugh-Jones分類を示す。

全身性強皮症では fractalkine/CX₃CL1 とそのレセプターCX₃CR1 の発現が上昇している

分担研究者 佐藤 伸一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
協力者 長谷川 稔 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助手
協力者 安井 正英 金沢大学大学院医学系研究科第三内科学講師
主任研究者 竹原 和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

細胞障害活性を有する細胞の遊走、血管内皮細胞への接着に関与するケモカインである fractalkine/CX₃CL1 (FKN)の全身性強皮症 (SSc) の病態における関与について検討した。SSc の皮膚や肺病変部の血管内皮細胞では、FKN の発現が正常コントロールよりも亢進していた。血清と気管支肺胞洗浄液中の soluble FKN (sFKN)は、SSc では上昇していた。血清中の sFKN は SSc の発症早期に上昇し、皮膚や肺病変の重症度と相関した。FKN のレセプターである CX₃CR1 は、SSc の末梢血中の単球や T 細胞で発現が上昇していた。SSc では FKN と CX₃CR1 の発現上昇が病変部への細胞浸潤を促し、炎症や血管・組織障害などの病態に関与していると考えられた。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis:SSc) は皮膚や肺などの内臓における線維化、血管障害を特徴とする自己免疫疾患である。その病態は不明であるが、皮膚や肺の病変部には単核球の浸潤がみられ、これらの細胞が産生するサイトカインや成長因子の病態への関与が指摘されている^{1,2}。Fractalkine/CX₃CL1 (FKN)は interleukin (IL)-1、interferon- γ (IFN- γ)、tumor necrosis factor (TNF) などにより活性化された血管内皮細胞に発現するケモカインのひとつである³。FKN はそのレセプターである CX₃CR1 を発現する単核球の血管内皮への接着のカスケードの個々のステップに関与するユニークな作用を有している。また、soluble FKN (sFKN)は CX₃CR1 発現細胞の遊走を促進する。CX₃CR1 はパーフォリンなどを含有して細胞障害活性を有する CD14⁺単球、CD16⁺NK 細胞、及び一部の T 細胞に発現するため、FKN はこれらの細胞障害活性を有する細胞を選択的に組織へ移行させる働きを有する⁴。このため、FKN と CX₃CR1 を介した作用は、

組織での炎症や血管障害に関与する可能性がある。

我々は SSc 患者において FKN と CX₃CR1 の発現を検討し、その病態への関与を検証した。

B. 研究方法

1) 血清中の sFKN 濃度

対象患者は SSc 67 例 (女性 58 例、男性 9 例) であり、年齢は 51 \pm 15 歳であった。病型別では limited cutaneous SSc (lSSc)が 35 例、diffuse cutaneous SSc (dSSc)が 32 例であった。これらの患者の初診時の血清、および年齢および性別のほぼ一致した 20 人の健常人コントロールの血清中の sFKN の濃度を ELISA にて測定した。また、SSc 患者ではその後の経過中の血清における sFKN の濃度を経時的に測定した。

2) BALF 中の sFKN

10 例の肺線維症を伴う SSc 患者と 10 例の正常コントロールより採取した気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の sFKN の濃度を ELISA にて測定した。

3) 免疫組織染色

SSc 患者より採取した病変部皮膚 (10 例) および肺組織 (5 例) と正常コントロールより採取した皮膚 (5 例) および肺組織 (2 例) において、血管内皮細胞における FKN の発現をヤギ抗ヒト FKN 抗体を用いて検討した。

4) フローサイトメトリーによる染色

10 例の SSc 患者と 10 例の正常コントロールより末梢血を採取し、CD14⁺単球、CD16⁺NK 細胞、CD4⁺T 細胞、及び CD8⁺T 細胞における CX₃CR1 の発現をフローサイトメトリーによる 2 重染色により検討した。

C. 研究成果

1) 血清中の sFKN は SSc で上昇している

血清中の sFKN は SSc では正常コントロール (CTL) に比べて有意に上昇していた (図 1)。また、dSSc では ISSc よりも sFKN が有意に高値を示した。臨床症状との相関では、sFKN の上昇している患者では正常な患者よりも肺線維症 (64% vs. 28%) や赤沈の亢進 (62% vs. 26%) が有意に高率にみられた。また、sFKN の濃度は肺機能の指標である肺活量 ($r=-0.5$, $p<0.0001$) や肺拡散能 ($r=-0.4$, $p<0.0001$) と有意な負の相関、炎症の指標である赤沈 ($r=0.64$, $p<0.0001$) や CRP ($r=0.62$, $p<0.0001$) と正の相関がみられた。

2) 血清中の sFKN は発症早期に上昇がみられる

SSc 患者において、経時的な sFKN の変動を検討したところ、初診時に sFKN の上昇していた患者もその後の経過中に正常範囲内に低下がみられた (図 2)。また、初診時に正常であった患者では経過中に上昇がみられなかった。

3) 肺線維症を伴う SSc では BALF 中の sFKN が上昇している

BALF 中の sFKN は肺線維症を有する SSc ではコントロールよりも有意に高値を示した (図 3)。また、sFKN の濃度と BALF 中での細胞数との間には有意な相関 ($r=0.61$, $p<0.05$) が認められた。

4) FKN は SSc 患者の皮膚や肺組織の血管内皮細胞において発現が増強している

SSc の線維化を伴う皮膚や肺の血管内皮細胞では、正常コントロールに比べて FKN の発現が増強していた (図 4)。

5) SSc では末梢血単核球の CX₃CR1 の発現が上昇

している

末梢血の CD14⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞、および CD8⁺T 細胞における CX₃CR1 の発現は SSc ではコントロールよりも有意に上昇していた (図 5)。しかしながら、CD16⁺T 細胞における CX₃CR1 の発現はコントロールと差がみられなかった。

D. 考案

今回の検討で、血清中の sFKN が SSc では正常コントロールよりも有意に上昇していた。SSc では一般に発症から 5 年以内の早期に皮膚硬化や肺線維症が進行するが、経時的な検討で sFKN は発症早期にのみ上昇がみられた。また、SSc の皮膚病変部では血管内皮細胞での FKN の発現が上昇していた。SSc の皮膚病変部では発症早期にマクロファージをはじめとする単核球浸潤のみられることが指摘されている。発症早期の末梢血での sFKN の上昇はマクロファージなどの CX₃CR1 を発現する細胞の遊走を促進し、皮膚や肺での血管内皮細胞の FKN の発現上昇はこれらの細胞の組織中への浸潤を促進している可能性が考えられる。そして、これらの浸潤細胞が産生するサイトカインが線維芽細胞からのコラーゲン産生を促進し、皮膚や肺の線維化へと進展するものと思われる。また、CX₃CR1 を発現する細胞はパーフォリンなどの細胞障害活性を有する物質を細胞内に有しているために、SSc における血管障害や組織障害を引き起こし、その後の修復過程において線維化が生じる可能性も考えられる。

血清中や BALF 中の sFKN は SSc の肺線維症の重症度とよく相関した。SSc の肺の病変部の血管内皮細胞では FKN の発現が増強していた。肺線維症は SSc の大半にみられ、主要な死因のひとつである。SSc の肺病変はひとつには BALF にて評価されるが、BALF における単核球、好中球、好酸球など全細胞数の増加が認められる。これまでに、SSc の BALF において IL-8, RANTES, MIP-1 α などの高値が報告されており、それぞれ好中球、好酸球、T 細胞の肺への遊走に関与している可能性が指摘されている。しかし、単球の肺への異常な集積を説明する因子はよくわかっていない。CX₃CR1 は単球のほとんどの発現し、血管内皮への接着と遊走に働くため、SSc の肺病変部への単球の集積の主要な

役割を果たしているかもしれない。また、SScの肺病変部では、CD4⁺T細胞よりもCD8⁺T細胞が有意の細胞浸潤がみられる。CX₃CR1はCD4⁺T細胞よりもCD8⁺T細胞に有意に強く発現するので、SScにおけるCD8⁺T細胞の肺への浸潤にはFKNとCX₃CR1の相互作用が深く関わっているものと思われる。

今回の検討では、FKNの発現ばかりでなく、そのレセプターの発現もSScでは上昇していた。一般に、sFKNが血中で増加するとそのレセプターであるCX₃CR1の単核球での発現は低下することが推定される。それにも関わらず、CX₃CR1の発現がSScの単球やT細胞で上昇しているということは、SScにおけるCX₃CR1の異常な高発現を示唆しているのかもしれない。あるいは、次のような機序も推定される。SScにおける病変部での血管内皮細胞におけるFKNの発現亢進はCX₃CR1を発現する細胞を浸潤させるが、一方でCX₃CR1⁺T細胞はIFN- γ やTNF- α を産生することが最近報告された⁵。これらのサイトカインは血管内皮細胞からのFKNの産生を更に促進するので、SScの病変部でFKNとCX₃CR1が相互に発現を促進するループが形成されている可能性も考えられる。いずれにしても、SScではFKNとCX₃CR1を介した作用が増強しているものといえる。

E. 結論

以上のように、FKNとCX₃CR1を介した接着・遊走作用は細胞障害活性を有する細胞を罹患臓器に浸潤させ、SScにおける炎症・組織障害やその後の修復過程による線維化などの病態に関与している可能性が示唆された。また、sFKNはSScの病勢や肺病変の血清学的なマーカーとなる可能性が示唆された。

F. 文献

1. Sato S. Abnormalities of adhesion molecules and chemokines in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11:503-7.
2. Takehara K. Pathogenesis of systemic sclerosis: two step fibrosis hypothesis, induction of fibrosis by TGF- β and maintenance by CTGF. *J Rheumatol*, *in press*.
3. Umehara H, Bloom E, Okazaki T, Domae N, Imai T. Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunol* 2001;22:602-7.
4. Nishimura M, Umehara H, Nakayama T *et al*. Dual functions of fractalkine/CX₃C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX₃CR1 expression. *J Immunol* 2002;168:6173-80.
5. Nanki T, Imai T, Nagasaka K *et al*. Migration of CX₃CR1-positive T cells producing type 1 cytokines and cytotoxic molecules into the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2878-83.

G. 研究発表

1. 学会発表

Hasegawa M, Sato S, Takehara K: Up-regulated expression of fractalkine and CX₃CR1 in systemic sclerosis. American College of Rheumatology 66th Annual Scientific Meeting, Oct.2002, New Orleans.

H. 知的所有権の出願・登録状況 なし

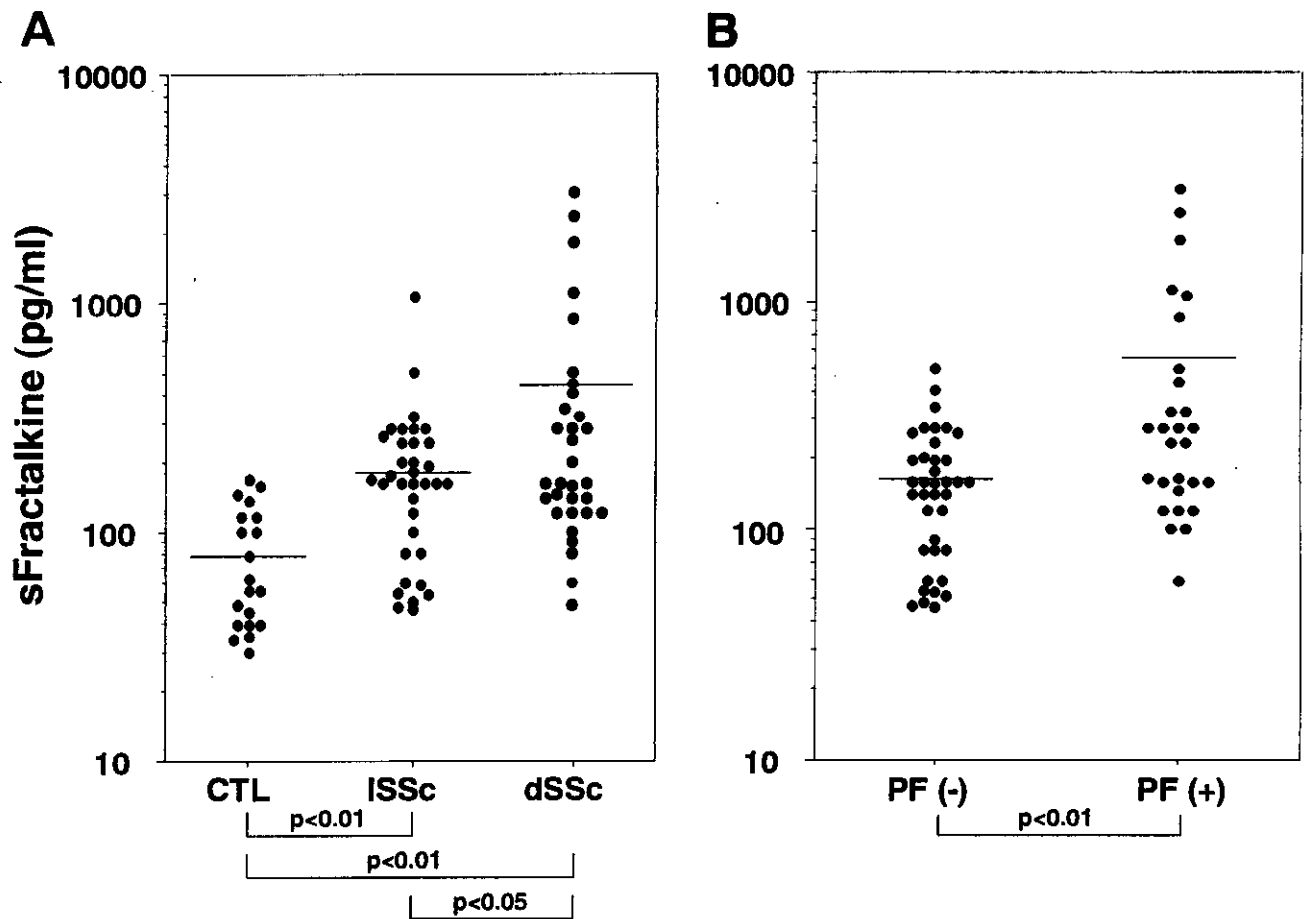


図1 SSc 患者血清中の soluble fractalkine(sFKN)の濃度 (ELISA による)

(A) Diffuse cutaneous SSc (dSSc), limited cutaneous SSc (ISSc)、正常コントロール(CTL)において血清中の sFKN を ELISA にて測定した。

(B) 肺線維症 (PF) を有する SSc と有さない患者群で血清中の sFKN を測定、比較した。

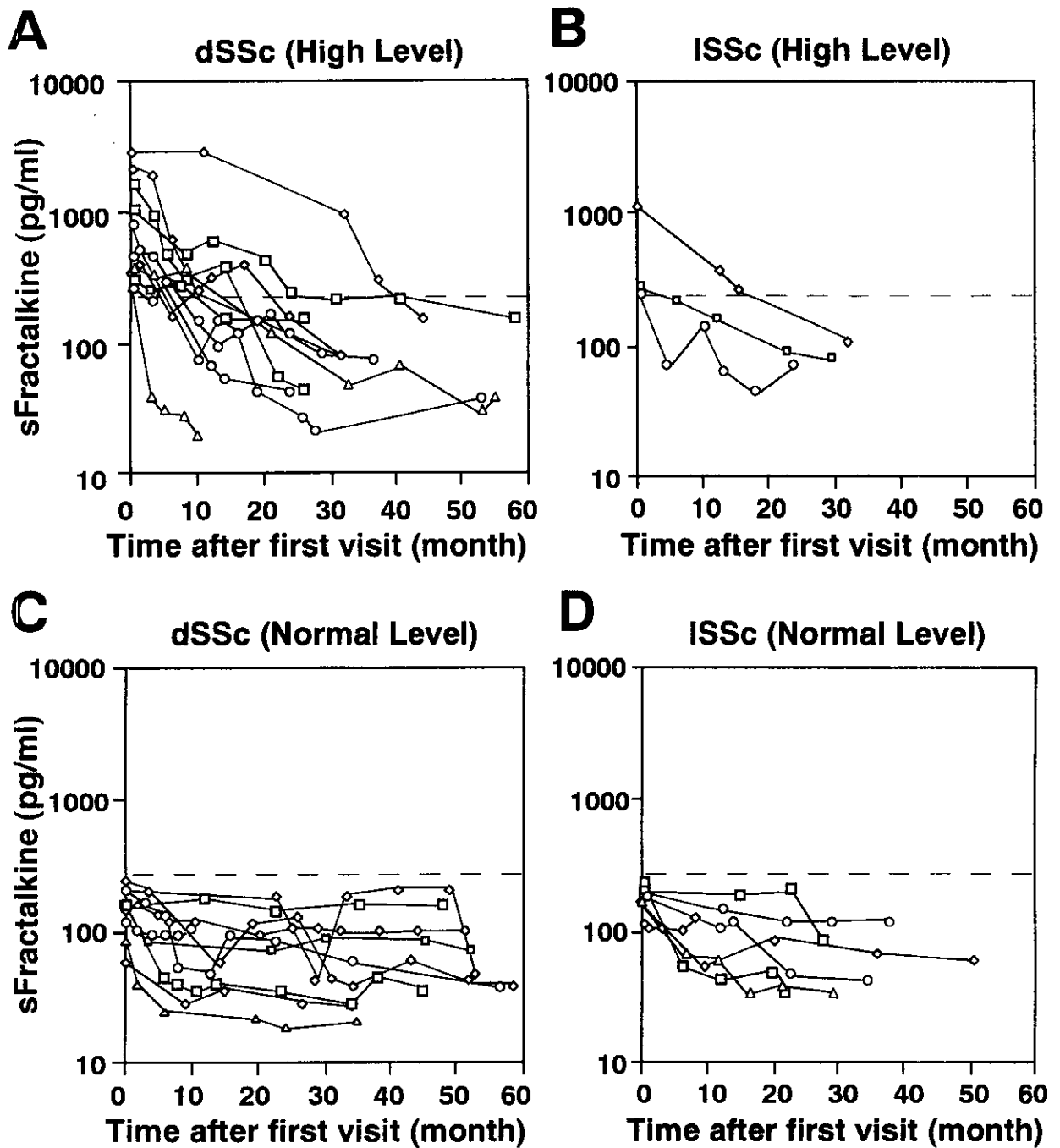


図2 SSc患者における血清中のsoluble fractalkine (sFKN)の経時的変動
SSc患者において初診後の経時的な血清中のsFKNの変動をELISAにて測定した。

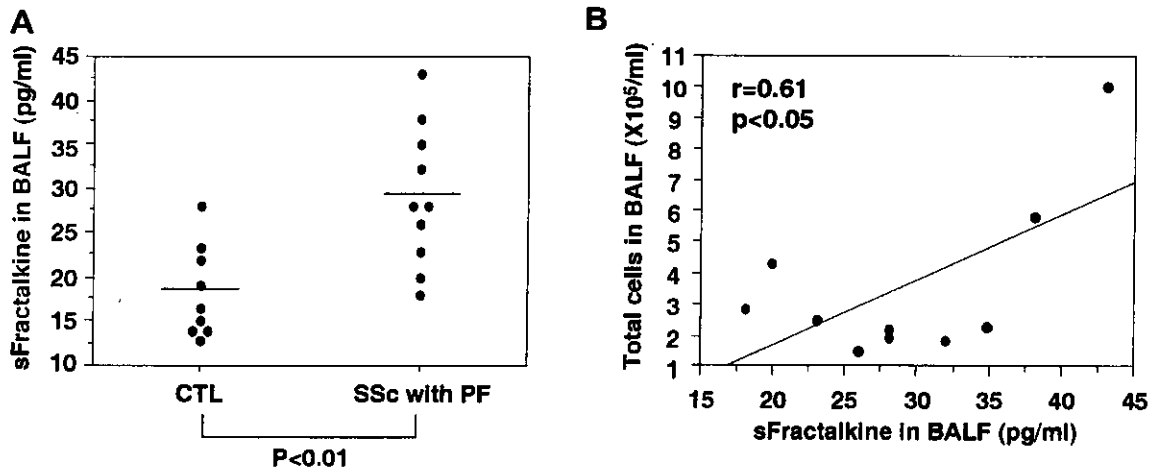


図3 気管支肺胞洗浄液中 (BALF)中の soluble fractalkine (sFKN)の濃度
 (A) 肺線維症を有するSSc患者におけるBALF中のsFKN濃度をELISAにて測定した
 (B) BALF中のsFKNの濃度と総細胞数との相関を検討した。

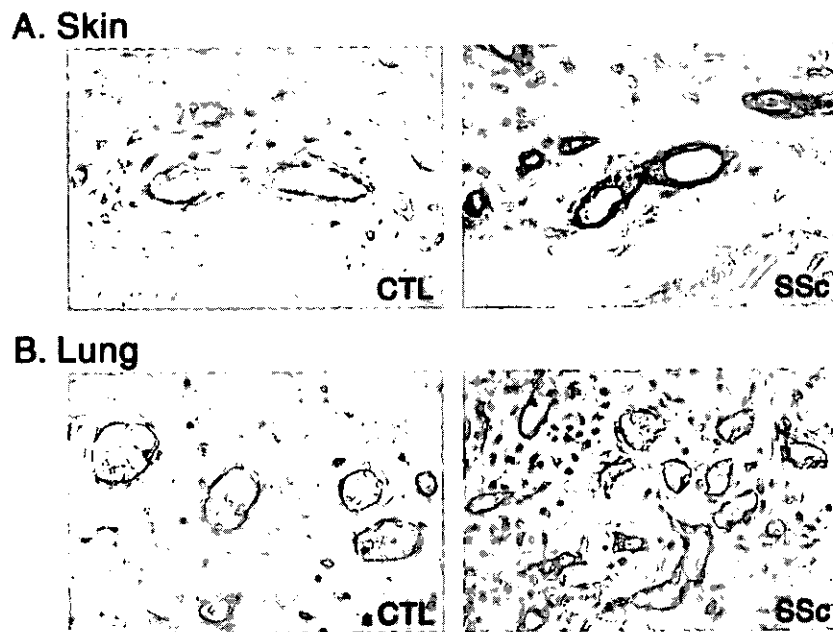


図4 SSc患者の皮膚と肺の病変部におけるfractalkine (FKN)の発現
 SSc患者の皮膚と肺の血管内皮細胞におけるFKNの発現を免疫組織学的に検討した。

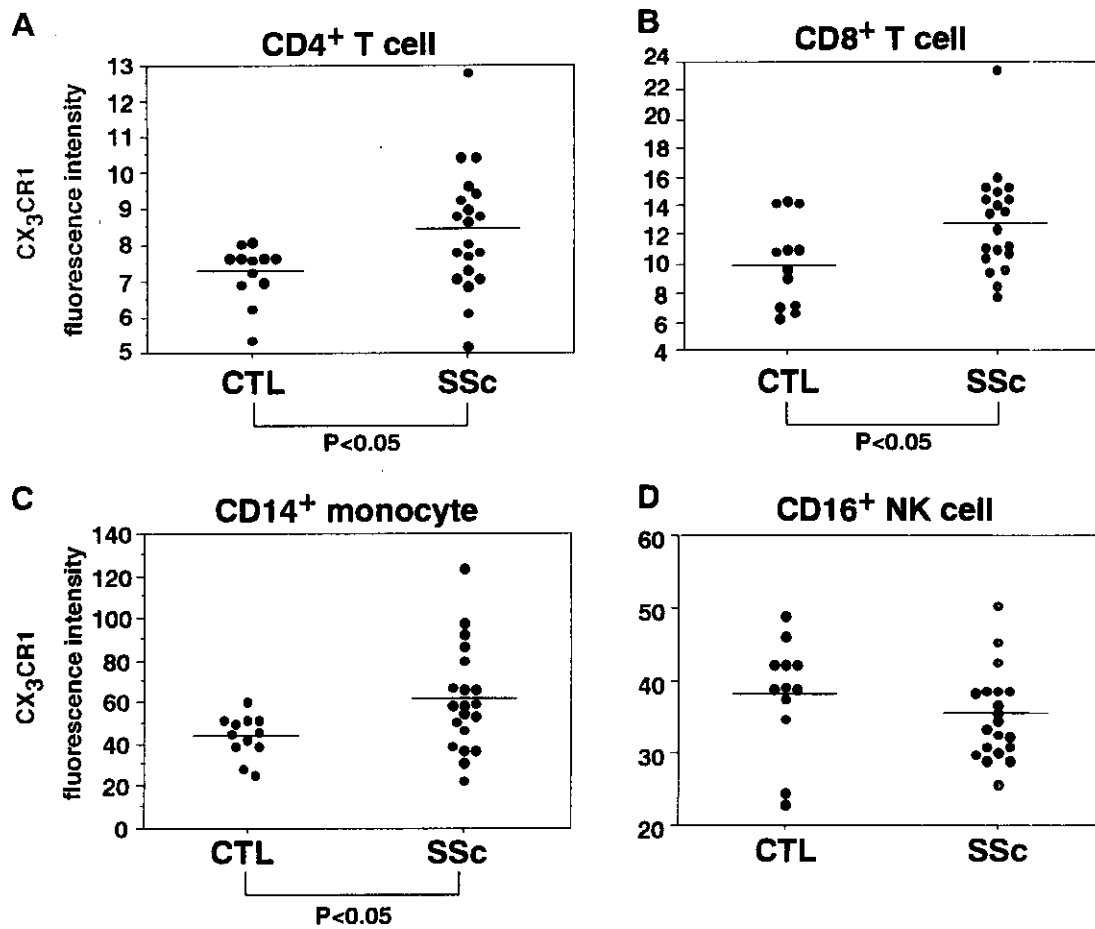


図5 末梢血単核球におけるCX₃CR1の発現
SSc患者の末梢血単核球におけるCX₃CR1の発現をフローサイトメトリーにより検討した。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

プレオマイシン誘発肺臓炎モデルにおいて、細胞接着分子は白血球の浸潤を
制御することで線維化に関与する

分担研究者 佐藤伸一 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
協力者 濱口儒人 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

細胞接着分子である L-selectin、ICAM-1 およびその両者を欠損したマウスを用いてプレオマイシン誘発肺臓炎モデルを作成し、肺の線維化における接着分子の役割を検討した。各接着分子欠損マウスでは肺への炎症細胞浸潤、線維化ともに野生型マウスに比べ有意に抑制されており、これらの細胞接着分子は肺への炎症細胞浸潤を制御することにより線維化に対し重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

間質性肺炎は肺胞壁を病変の主体とする一群の線維化形成性肺炎を指す病名であり、慢性に経過し予後良好な場合もあるが、急速に線維化が進行して呼吸不全を呈し予後不良な経過をとる症例も少なくない。間質性肺炎を呈する疾患は主に特発性間質性肺炎、膠原病性間質性肺炎、薬剤性間質性肺炎の3つがあり、原因の如何に関わらず病理組織学的に肺の線維化を認める。皮膚科領域においては、全身性強皮症や皮膚筋炎に合併した膠原病性間質性肺炎、抗腫瘍剤であるプレオマイシンによる薬剤性間質性肺炎をしばしば経験する。間質性肺炎の病因に関する研究では、扁平上皮癌の治療に使用されるプレオマイシンを経気管的にマウスに投与し、肺の線維化を誘発する動物モデルが確立されている¹。この動物モデルでは、病変は inflammatory stage と fibrosis stage の2つから構成される²。つまり、プレオマイシン投与後まず1週後をピークに炎症細胞浸潤が生じ、次いで2週後に線維化が形成される。このモデルで主に解析されてきたことは、どの白血球サブセットが線維化に最も関与しているかということと、どのようなサイトカンあるいは細胞成長因子が最も線維化の誘導に重要であるのか、という2点である。前者に関しては、好酸球、マクロファージ、T細胞が重要な役割を果たしていると考えられているが、その中でどれが最も重要かということに関しては未

だ一定の見解はない。後者に関しては、いくつかのサイトカンや細胞成長因子が候補に挙げられているが、TNF- α 、TGF- β の重要性に関しては多くの報告でほぼ一致している。一方、L-selectin はほぼ全ての白血球に発現し、白血球が血管外へ浸潤する際の attachment および rolling の段階に関与する細胞接着分子である。また、ICAM-1 は血管内皮細胞に発現して白血球が血管外へ浸潤する際の firm adhesion に関与することが知られているが、最近 rolling にも関与していることが報告された。これらの接着分子は白血球の血管外浸潤の際に非常に重要であると考えられる。そこで、L-selectin、ICAM-1 を欠損したマウスを用いてプレオマイシン誘発肺臓炎モデルを作成し、肺の線維化におけるこれら接着分子の役割について検討した。

B. 研究方法

1) プレオマイシンの投与

実験動物として、生後12-16週のL-selectin欠損マウス、ICAM-1欠損マウス、およびその両者を欠損したマウスと野生型マウスを用いた。プレオマイシン8 mg/kgを生理的食塩水（生食）0.2 mlに溶解し経気管的に1回のみ投与した。生食0.2 ml投与群を対象とした。各マウス群間で体重差、肺重量差は認めなかった。

2) 組織学的検討

プレオマシシ投与 8、16 日後に肺を摘出し、肺への細胞浸潤および線維化の程度について組織学的に検討した。肺肺炎と細胞浸潤の評価のために hematoxylin and eosin(HE)染色を、コラーゲンの沈着の評価のために Azan-Mallory 染色を行った。細胞浸潤の評価は、高倍率で任意に 30 視野を選定して細胞数を算定し、平均値を求めた。

3) 肺組織中ヒドロキシプロリン測定

ヒドロキシプロリンはコラーゲン中に特異的に高率に含まれるアミノ酸で、その量はコラーゲン量を反映する。従って、肺における線維化を評価するため、Schrier ら³の方法に準じ肺組織中のヒドロキシプロリン量を測定した。

4) 気管支肺泡洗浄液(BAL)の採取

プレオマシシ投与 2、4、8、12、16 日後に、生食 1 回 1ml で肺を軽くマッサージしながら洗浄して洗浄液を回収した。同様の操作を 3 回繰り返した。BAL の回収量は 1 検体当たり約 2.5ml だった。回収した BAL は細胞数の測定と細胞分画の評価に用いた。細胞数は Burger-Turk 算定板を用い算定した。細胞分画の評価はまず細胞沈殿法により細胞標本を作成し、May-Giemsa 染色を施行後検討した。細胞分画は任意に選定した視野で、計 200 個の細胞を算定して検討した。好中球の同定は形態学的に行った。

5) RT-PCR

線維化におけるサイトカインと細胞成長因子の役割を解明するために、プレオマシシ投与 8 日後の肺におけるサイトカインと細胞成長因子の発現を RT-PCR 法により検討した。サイトカインと細胞成長因子は TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、TGF- β 1 の 5 種類について検討した。

C. 研究結果

1) 細胞接着分子欠損マウスにおける肺の線維化

肺における線維化を評価するため、プレオマシシ投与 16 日後に肺を摘出して HE 染色と Azan-Mallory 染色を行った(図 1)。Azan-Mallory 染色では、コラーゲンは青色に染色された。野生型マウスでは、密な細胞浸潤を伴う肺胞壁の破壊とコラーゲンの沈着を認めた。L-selectin、ICAM-1 を欠損したマウスでは、これらの変化は野生型マウスに比べ著明に減少した。減少の程度は、L-selectin 単独欠損マウス、ICAM-1 単独欠損マウスとも同程度だ

った。さらに両者の欠損マウスでは単独欠損マウスに比べて線維化は著明に減少しており、ほとんど線維化を認めなかった。コントロールとして生食を投与したマウスでは線維化は認めなかった。

線維化の程度を定量的に検討するため、プレオマシシ投与 16 日後における肺組織中ヒドロキシプロリン量を測定した(図 2)。野生型マウスでは、コントロールに比べヒドロキシプロリン量は 2.5 倍に増加していた。野生型マウスに比べ、ヒドロキシプロリン量は L-selectin 欠損マウスでは 20%、ICAM-1 欠損マウスでは 28%、両者の欠損マウスでは 50%減少していた。両者の欠損マウスでは単独欠損マウスに比べてヒドロキシプロリン量は有意に低下しており、コントロールと同程度だった。従って、L-selectin と ICAM-1 の単独欠損マウスでは線維化は抑制されており、さらに両者を欠損すると線維化はほぼ完全に抑制されることが示された。

2) BAL 中の炎症細胞浸潤の検討

肺への炎症細胞浸潤における細胞接着分子の役割を解明するため、プレオマシシ投与 2、4、8、12、16 日後に BAL を採取し、総細胞数と細胞分画について検討した。野生型マウスにおいて、肺への総炎症細胞浸潤数はプレオマシシ投与 8 日後にピークとなった(図 3A)。これに比べ、投与 8 日後において総細胞数は L-selectin 欠損マウスでは 20%、ICAM-1 マウスでは 22%、両者の欠損マウスでは 66%減少していた。L-selectin 欠損マウスと ICAM-1 欠損マウスでは同程度に減少していたが、両者の欠損マウスでは単独欠損マウスに比較してさらに減少していた。両者の欠損マウスでは投与 8 日後以降も浸潤細胞数は徐々に増加したが、これは野生型マウスや単独欠損マウスと比べて炎症過程における動態が異なっているためと考えられた。

また、プレオマシシ投与 8 日後に肺を摘出して病理組織標本を作製し、肺の間質における細胞浸潤の程度を評価した(図 4)。間質における細胞浸潤数は、野生型マウスに比較して L-selectin 欠損マウスでは 20%、ICAM-1 欠損マウスでは 28%、両者の欠損マウスでは 90%減少していた。両者の欠損マウスでは単独欠損マウスに比較しても有意に細胞浸潤数は減少していた。両者の欠損マウスではコントロールに比較して細胞数は増加していた。これらの結果は BAL で得られた結果と相関していた。つまり、野

生型マウスではブレオマイシン投与により肺への炎症細胞浸潤が誘導され、これらの反応は接着分子欠損マウスでは減少していた。

3) BAL 中の細胞分画の検討

次に、浸潤細胞の分画について検討した。好中球数に関しては投与 16 日後に野生型マウスに比べ両者の欠損マウスでは増加していたことを除けばほぼ総細胞数と同じ動態を示した(図 3B)。つまり、野生型マウスでは好中球数は投与 8 日後にピークとなり、各接着分子欠損マウスでは減少していた。リンパ球浸潤に関しては、野生型マウスでは投与 8 日後にピークとなったが、L-selectin 欠損マウスと両者の欠損マウスではピークが 8 日後から 12 日後へとシフトしていた。ICAM-1 欠損マウスではリンパ球浸潤は投与 8 日後にピークとなり 12 日後まで持続した。マクロファージについては一定の傾向を認めなかった。従って、ブレオマイシン誘発肺臓炎モデルにおいて線維化の程度は好中球の浸潤の程度と最も相関しており、線維化を生じる機序において好中球が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

4) サイトカインと細胞成長因子の産生

線維化における細胞接着分子とサイトカインおよび細胞成長因子の関係を解明するため、ブレオマイシン投与 8 日後に肺を摘出し TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、TGF- β 1 の発現を RT-PCR 法により検討した(図 5)。投与 8 日後の肺において、野生型マウスと単独欠損マウスではサイトカインの発現は増加していた。一方、両者の欠損マウスでは野生型マウスに比べ TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、TGF- β 1 の発現は減少していたが、IFN- γ の発現に差はなかった。L-selectin 欠損マウスでは野生型マウスに比べ TNF- α と TGF- β 1 の発現は減少していたが IL-1 β 、IL-6、IFN- γ の発現量は同程度だった。ICAM-1 欠損マウスでは野生型マウスに比べ IL-6 と TGF- β 1 の発現は減少していたが TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ の発現は同程度だった。TGF- β 1 の発現は単独欠損マウスに比べ両者の欠損マウスでは低下しており、これは肺の線維化と相関していた。従って、接着分子欠損マウスでは線維化の程度と同程度に TGF- β 1 の発現が減少しており、炎症性サイトカインもその発現は野生型マウスに比べて減少あるいはほぼ同程度だったことから、L-selectin と ICAM-1 は時に協調して、時には個別に

サイトカインの産生を調整することにより線維化に関与していることが考えられた。

D. 考 察

本研究では、ブレオマイシン誘発肺臓炎において生体内で L-selectin と ICAM-1 がどのように関与しているのかをノックアウトマウスを用いて検討した。今回の検討では、L-selectin 欠損マウスと ICAM-1 欠損マウスでは野生型マウスに比べ線維化は同程度に抑制されていた。このことは、L-selectin と ICAM-1 は炎症領域への白血球の遊走とリクルートに対して協調して働いているとする過去の報告と一致する^{4, 5, 6}。さらに興味深いのは、L-selectin と ICAM-1 の両者の欠損マウスでは線維化はほぼ完全に抑制されていた。従って、L-selectin と ICAM-1 はこのモデルにおいて極めて重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

線維化が生じる病態に関してはまだ不明な点があるが、まず初めに白血球が局所へ浸潤し、次いで白血球そのものによる組織障害あるいは白血球の浸潤により線維化をもたらすサイトカインが産生された結果、線維化を生じるのではないかと考えられている。このことを裏付けるように、各接着分子欠損マウスでは BAL および間質における細胞浸潤、特に好中球の浸潤は減少していた。このことは白血球分画の中でも好中球が特に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。マクロファージの浸潤に一定の傾向はなく、リンパ球浸潤に関しては L-selectin 欠損マウスと両者の欠損マウスでは低下していた。以上の結果をまとめると、好中球を含む細胞浸潤が、今回のモデルでは線維化において重要であると考えられた。

エンドトキシンを用いた炎症モデルにおいて抗 ICAM-1 抗体を投与すると好中球の浸潤は約 60%低下したとする報告がある⁷。このことは、炎症の過程で ICAM-1 が重要な働きをしていることを示しているが、それとは別に ICAM-1 を介さない別の系があることも示唆している。ICAM-1 に加え L-selectin が欠損するとブレオマイシン投与 8 日後の好中球浸潤がほぼ完全に抑制されることから、好中球の浸潤において ICAM-1 を介さない系の大部分は、L-selectin が関与していることが伺われた。しかし、両者を欠損したマウスでは投与 16 日後に好中球の浸潤が増

加していたことから、好中球の浸潤過程において ICAM-1 と L-selectin のどちらも介さない系が存在していることが考えられた。

ブレオマイシン誘発肺臓炎におけるサイトカインと細胞成長因子の役割に関しても今までに多数の報告がある。その中で TNF- α の重要性に関しては多くの報告で一致しており⁸、IL-1 β と IL-6 についても関与が疑われている。L-selectin と ICAM-1 の両者の欠損マウスでは、野生型マウスに比べ TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の発現は減少していた。ICAM-1 欠損マウスで IL-6 の発現は減少していたが TNF- α と IL-1 β の発現は同程度だった一方、L-selectin 欠損マウスでは TNF- α の発現は減少していたが IL-1 β と IL-6 の発現は同程度だった。IFN- γ については、ブレオマイシン誘発肺臓炎において発現が増強しているとする報告がいくつかあるが、一方で IFN- γ は線維化に対して抑制的に働くとする報告もある。今回の検討では、L-selectin と ICAM-1 の発現が欠損しても IFN- γ の発現に影響はなかった。ブレオマイシン誘発肺臓炎において TGF- β を抗体により中和すると線維化が抑制されることが報告されている。今回の検討でも各接着分子欠損マウスでは TGF- β 1 の発現は野生型マウスに比べ減少しており、その程度は線維化の抑制の程度と相関していた。従って TGF- β 1 の産生において L-selectin と ICAM-1 を介する系は主要な系の 1 つであることが考えられた。従って L-selectin と ICAM-1 は時には個別に、時には協調してこれら炎症性サイトカインの産生を制御していると考えられた。

E. 結論

L-selectin と ICAM-1 はブレオマイシン誘発肺臓炎モデルにおいて、白血球の浸潤とサイトカインや TGF- β の産生を調節することにより肺の線維化に対して重要な役割を果たしていることが示唆された。このことは、L-セレクチンと ICAM-1 が間質性肺炎の治療のターゲットとなり得る可能性があることを示唆している。

F. 文献

1. Paine R, 3rd, Ward PA: Cell adhesion molecules and pulmonary fibrosis. *Am J Med* 1999, 107:268-279

2. Smith RE, Strieter RM, Zhang K, Phan SH, Standiford TJ, Lukacs NW, Kunkel SL: A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J Leukoc Biol* 1995, 57:782-787
3. Schrier DJ, Phan SH, McGarry BM: The effects of the nude (nu/nu) mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A biochemical evaluation. *Am Rev Respir Dis* 1983, 127:614-617
4. Steeber DA, Tang MLK, Green NE, Zhang X-Q, Sloane JE, Tedder TF: Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interaction between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J Immunol* 1999, 163:2176-2186
5. Steeber DA, Campbell MA, Basit A, Ley K, Tedder TF: Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:7562-7567
6. Nagaoka T, Kaburagi Y, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Steeber DA, Tedder TF, Sato S: Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *Am J Pathol* 2000, 157:237-247
7. Qin L, Quinlan WM, Doyle NA, Graham L, Sligh JE, Takei F, Beaudet AL, Doerschuk CM: The roles of CD11/CD18 and ICAM-1 in acute *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in mice. *J Immunol* 1996, 157:5016-5021
8. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Kapanci Y, Vassalli P: Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med* 1989, 170:655-663

G. 研究発表

1. 論文発表

Yasuhito Hamaguchi, Yoriko Nishizawa, Masahide Yasui, Minoru Hasegawa, Yuko Kaburagi, Kazuhiro Komura, Tetsuya Nagaoka, Eriko Saito, Yuka Shimada, Kazuhiko Takehara, Takafumi Kadono, Douglas A. Steeber, Thomas F. Tedder, Shinichi Sato: Intercellular Adhesion Molecule-1 and L-Selectin Regulate Bleomycin-Induced Lung Fibrosis. *Am. J. Pathol* 2002, 161: 1607-1618

2. 学会発表

- ・ The 89th Meeting of American Association of Immunologists (April 20-24, 2002, New Orleans, USA)

- ・ 第 32 回日本免疫学会総会、2002 年 12 月、東京

H. 知的所有権の出願・登録状況 なし

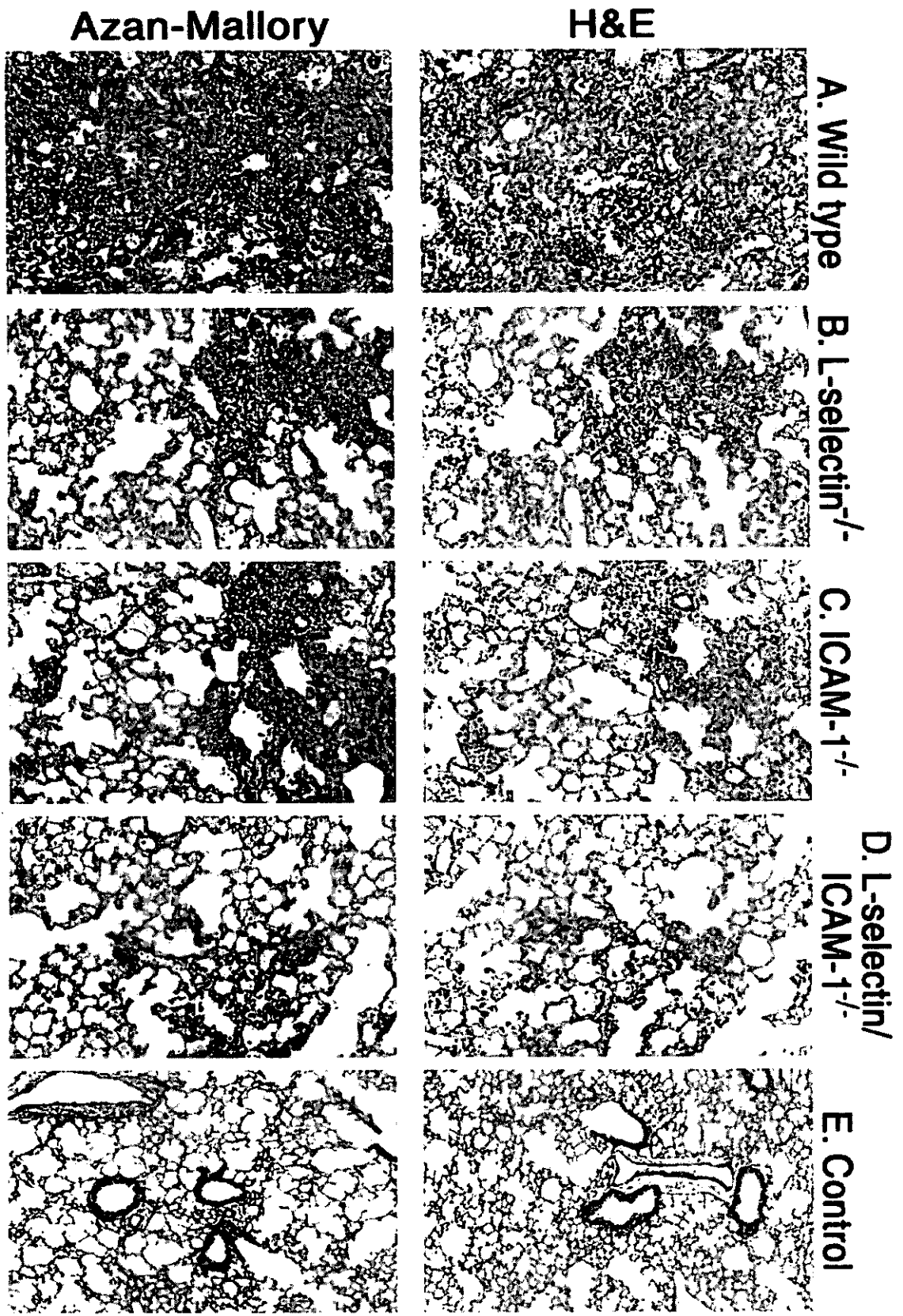


図 1：ブレオマイシン投与 16 日後における肺の組織像。上段に HE 染色、下段に Azan-Mallory 染色を示す。肺胞炎と細胞浸潤の評価のために HE 染色を、コラーゲンの沈着の評価のために Azan-Mallory 染色を行った。Azan-Mallory 染色ではコラーゲンは青色に染色された。