

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業  
びまん性肺疾患調査研究班  
平成 15 年度研究報告書

平成 16 年 3 月

主任研究者 貫和敏博

**厚生労働科学研究費補助金**

**難治性疾患克服研究事業**

**びまん性肺疾患調査研究班**

**平成 15 年度研究報告書**

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業  
びまん性肺疾患調査研究班  
平成 15 年度研究報告

# 目 次

班員名簿

## 総括研究報告

総括研究報告—平成 15 年度研究—	1
	主任研究者 貫和 敏博

研究班平成 15 年度経過報告	11
-----------------	----

## 研 究 報 告

<b>全国調査研究</b>	(班員, 班協力者名)
閉塞性細気管支炎の全国調査研究	31
	長谷川好規 他
<b>特発性間質性肺炎</b>	(班員, 班協力者名)
家族集積性特発性間質性肺炎の臨床像と SP-C 遺伝子変異についての検討	37
	瀬戸口靖弘 他
剥離性間質性肺炎の気管支肺胞洗浄液のプロテオーム解析	44
	中田 光 他
画像の評価に関する研究	54
	上甲 剛 他
IIPs 早期発見のシステム開発に向けて	
—— 肺 CT 被検診者を対象とした間質性肺炎の実態調査 ——	59
	高橋 弘毅 他
間質性肺炎における肺内無機沈着物の定量と元素分析	63
	土屋 公威 他
マウス LPS 急性肺傷害モデルにおける一酸化窒素の炎症調節作用・オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いた包括的遺伝子発現解析	71
	岡本 竜哉 他
プレオマイシン誘発肺線維症モデルにおける分子標的治療薬 Imatinib (Gleevec) の抗線維化効果	77
	西岡 安彦 他
EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬 gefitinib のマウスプレオマイシン誘発肺線維症に及ぼす効果	81
	石井 芳樹 他
マウスの肺線維症モデルを用いた肺線維化のメカニズムの研究	
—— シリカによる肺線維化に対する, 分子病態的な側面からの検討 ——	85
	大田 健 他
肺細胞による骨髄再建能の検討	91
	阿部 信二 他

HGF による線維化肺組織修復における骨髄由来幹細胞の役割 .....	96	海老名雅仁 他
肺線維芽細胞における Fas 感受性の制御に関する検討 .....	101	萩本 直樹 他
アロ免疫反応に伴う閉塞性気道病変形成に対するレシピエントマクロファージ除去の効果 —— ラット異所性気管移植モデルを用いて —— .....	106	小柳津 毅 他
特発性肺線維症の急性増悪の新しい診断基準について .....	114	谷口 博之 他
2施設における特発性間質性肺炎外科的生検例に関する検討 .....	120	井上 哲郎 他
特発性肺線維症に合併した原発性肺癌の胸部 CT 所見に関する研究 .....	124	岸 一馬 他
SF-36 による特発性肺線維症の重症度分類の再評価 .....	129	大野 彰二 他
特発性肺線維症における血清 KL-6 を含めた予後因子の検討 .....	133	河野 修興 他
新しい基準による特発性間質性肺炎の再評価：臨床画像病理診断の意義 .....	137	井上 義一 他
間質性肺炎早期線維化巣における FGF-10, FGF-R, Fox f1 の発現についての検討 .....	141	中山 智子 他
UIP ならびに NSIP における血管構築改変と VEGF の発現 .....	146	武村 民子 他
<b>サルコイドーシス</b> .....		(班員, 班協力者名)
<i>Propionibacterium acnes</i> トリガーファクター蛋白による実験的マウス肺肉芽腫症の誘導 .....	155	江石 義信 他
抗酸菌感染症における Th1 サイトカインの血清中濃度 .....	162	杉崎 勝教
サルコイドーシスにおける IL-18 遺伝子多型の意義 .....	165	山口 悦郎
サルコイドーシスの肉芽腫形成機序における CD1 分子の検討 .....	172	千田 金吾 他
実験的マウス肺サルコイド様病変における肺常在 <i>P. acnes</i> の意義 .....	178	西脇 徹 他
<b>DPB</b> .....		(班員, 班協力者名)
びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子研究 —— 強い連鎖不平衡の見られる 80 kb の領域に関する遺伝子と変異の検討 —— .....	189	土方美奈子 他
エリスロマイシンの抗炎症作用：包括的遺伝子発現解析から (第二報) .....	193	月舘 利治 他
<b>追加</b> .....		(班員, 班協力者名)
「アアメシバ」摂取と関連したと思われる閉塞性細気管支炎の本邦での発生 —— 緊急報告 —— .....	199	松山 航 他

サ症患者におけるプロピオニバクテリアの細菌学的検討 —— 糞便の凍結がプロピオニバクテリアの分離に及ぼす影響 ——	202
	渡邊 邦友 他

研究成果の刊行に関する一覧表	207
----------------	-----

行政書類	223
------	-----

サルコイドーシス

・ 診断基準	225
・ 臨床調査個人票	
1. 新規	228
2. 更新	230

特発性間質性肺炎

・ 診断基準	231
・ 臨床調査個人票	
1. 新規	234
2. 更新	237

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業  
びまん性肺疾患調査研究班 住所録

## 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

役 職	氏 名	所属施設名	郵便番号
主任研究者	貫 和 敏 博	東北大学加齢医学研究所 呼吸器腫瘍研究分野	980-8575
分担研究者	近 藤 丘	東北大学加齢医学研究所 呼吸器再建研究分野	980-8575
〃	杉 山 幸 比 古	自治医科大学呼吸器内科	329-0498
〃	江 石 義 信	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 病因・病理学	113-0034
〃	吉 澤 靖 之	東京医科歯科大学大学院 呼吸器内科	113-8519
〃	松 島 綱 治	東京大学大学院医学系研究科 分子予防医学教室	113-0033
〃	滝 澤 始	東京大学医学部附属病院呼吸器内科	113-8655
〃	吾 妻 安 良 太	日本医科大学第四内科	113-8603
〃	福 田 悠	日本医科大学第一病理	113-8603
〃	慶 長 直 人	国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部	162-8655
〃	井 上 義 一	独立行政法人国立病院機構 近畿中央胸部疾患 センター 臨床研究センター呼吸不全	591-8555
〃	上 甲 剛	大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学講座	565-0871
〃	河 野 修 興	広島大学大学院分子内科 (第二内科)	734-8551
〃	曾 根 三 郎	徳島大学医学部分子制御内科学	770-8503
〃	菅 守 隆	熊本大学大学院医学薬学研究部 呼吸器病態学分野	860-0811
研究協力者	高 橋 弘 毅	札幌医科大学医学部第三内科	060-8543
〃	石 井 芳 樹	獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科	321-0293
〃	大 田 健	帝京大学医学部 内科	173-8605
〃	瀬 戸 口 靖 弘	順天堂大学医学部呼吸器内科	113-8421
〃	武 村 民 子	日本赤十字社医療センター病理部	150-8935
〃	折 津 愈	日本赤十字社医療センター 呼吸器内科	150-8935
〃	中 田 光	国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部	162-8655
〃	吉 村 邦 彦	虎の門病院 呼吸器科	105-8470
〃	渡 邊 邦 友	岐阜大学 生命科学総合実験センター 嫌気性菌実験分野	501-1194

## びまん性肺疾患調査研究班 住所録 [平成 15 年度]

所属住所	電話番号	FAX 番号	e-mail
宮城県仙台市青葉区星陵町 4-1	022-717-8534	022-717-8549	toshinkw@idac.tohoku.ac.jp
宮城県仙台市青葉区星陵町 4-1	022-717-8521	022-717-8527	t-kondo@idac.tohoku.ac.jp
栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1	0285-58-7349	0285-44-3586	sugiyuki@jichi.ac.jp
東京都文京区湯島 1-5-45	03-5803-5964	03-5803-0123	eishi.path@tmd.ac.jp
東京都文京区湯島 1-5-45	03-5803-5950	03-5803-0167	yoshizawa.pulm@tmd.ac.jp
東京都文京区本郷 7-3-1	03-5841-3431	03-5684-2297	koujim@m.u-tokyo.ac.jp
東京都文京区本郷 7-3-1	03-5800-8826	03-5800-8826	TAKIZAWA-PHY@h.u-tokyo.ac.jp
東京都文京区千駄木 1-1-5	03-3822-2131 (7309)	03-5802-8134	a-azuma@nms.ac.jp
東京都文京区千駄木 1-1-5	03-3822-2131 (5255)	03-5685-3067	fukuda@nms.ac.jp
東京都新宿区戸山 1-21-1	03-3202-7181 (2876)	03-3207-1038	nkeicho-ky@umin.ac.jp
大阪府堺市長曾根町 1180	072-252-3021	072-251-1372	giichi@kch.hosp.go.jp
大阪府吹田市山田丘 1-7	06-6879-2560	06-6879-2560	johkoh@sahs.med.osaka-u.ac.jp
広島県広島市南区霞 1-2-3	082-257-5196	082-255-7360	nokohno@hiroshima-u.ac.jp
徳島県徳島市蔵本町 3-18	088-633-7127	088-633-2134	ssone@clin.med.tokushima-u.ac.jp
熊本県熊本市本荘 1-1-1	096-373-5012	096-373-5012	suga@gpo.kumamoto-u.ac.jp
北海道札幌市中央区南一条西 16 丁目	011-611-2111 (3241)	011-613-7407	htaka@sapmed.ac.jp
栃木県下都賀郡壬生町北小林 880 番地	0282-87-2151	0282-86-7780	ishiiysk@dokkyomed.ac.jp
東京都板橋区加賀 2-11-1	03-3964-1211 (1583)	03-3964-5436	kenohta@med.teikyo-u.ac.jp
東京都文京区本郷 2-1-1	03-5802-1063	03-5802-1617	ystgc@med.juntendo.ac.jp
東京都渋谷区広尾 4-1-22	03-3400-1311 (2852)	03-3409-1604	tamiko-7540@pop06.odn.ne.jp
東京都渋谷区広尾 4-1-22	03-3400-1311 (2304)	03-3409-1604	m_oritsu.jrme@nifty.com
東京都新宿区戸山 1-21-1	03-3202-7181	03-3202-7364	knak@ri.imcj.go.jp
東京都港区虎ノ門 2-2-2	03-3588-1111	03-3582-7068	kuniyosh@toranomom.gr.jp
岐阜県岐阜市柳町 1-1	058-230-6555	058-230-6551	kuni@cc.gifu-u.ac.jp

役職	氏名	所属施設名	郵便番号
〃	千田金吾	浜松医科大学第二内科	430-3192
〃	下方薫	名古屋大学大学院医学系研究科 機能調節内科学	466-8550
〃	山口悦郎	愛知医科大学医学部 呼吸器・アレルギー内科	480-1195
〃	谷口博之	公立陶生病院 呼吸器・アレルギー内科	489-8642
〃	田口善夫	天理よろづ相談所病院呼吸器内科	632-8552
〃	杉崎勝教	独立行政法人国立病院機構 西別府病院内科	874-0838
〃	中西洋一	九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設	812-8582
〃	納光弘	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年内科	890-8520

所 属 住 所	電話番号	FAX 番号	e-mail
静岡県浜松市半田山 1 丁目 20-1	053-435-2263/2264	053-435-2354	chidak11@hama-med.ac.jp
名古屋市昭和区鶴舞町 65	052-744-1918	052-744-2176	kshimo@med.nagoya-u.ac.jp
愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又 21	0561-62-3311 (3050)	0561-62-1804	etsuro@aichi-med-u.ac.jp
瀬戸市西追分町 160	0561-82-5101	0561-82-9139	tosei-lung@deluxe.ocn.ne.jp
奈良県天理市三島町 200	0743-63-5611	0743-62-5576	ytaguchi@tenriyorozu-hp.or.jp
大分県別府市大字鶴見 4548 番地	0977-24-1221	0977-26-1163	sugisakk@wbeppu.hosp.go.jp
福岡市東区馬出 3-1-1	092-642-5376	092-642-5389	yoichi@kokyu.med.kyushu-u.ac.jp
鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1	099-275-5332	099-265-7164	osame@med6.kufm.kagoshima-u.ac.jp

総括研究報告  
——平成15年度研究——

# 総括研究報告

主任研究者 貫 和 敏 博  
(東北大学加齢医学研究所 教授)

## I. 緒 言

「びまん性肺疾患調査研究班」は過去 25 年以上にわたりサルコイドーシス、特発性間質性肺炎、びまん性汎気管支炎の 3 疾患を研究対象とし、全国の多数研究者を班員として研究が推進されてきた。本貫和班は 2 年目に入り、初年度に準備を開始した計画が実行され始めた。そのいくつかは、今後のびまん性肺疾患の病因解析、治療法開発に重要なものである。

第一点は実態調査としての方法論の展開である。びまん性肺疾患研究において HRCT 像による病的肺把握は重要な意義を持つが、研究班として多数例の解析はなされてこなかった。今回、当班に加え、日本呼吸器学会、呼吸不全調査研究班、協力検診施設、および読影担当放射線科医協会の協力で最終的には約 2,000 例に及ぶ HRCT 画像の読影が可能となり、データ集積が始まった。本データは呼吸器疫学上重要な基礎指標となるものである。一方、かかる調査研究班においては 10 年以上の長期にわたる症例追跡と、そのデータの共有データベース化が重要である。今回 informed consent 取得患者の prospective registry が計画されフォーマットが固まりつつある。これらデータは散逸することなく継承される必要があり、今回の取り組みは長期的視野から期待される。実態調査としての狭窄性細気管支炎は、健康食品アマメシバによる同病態の健康被害調査も加わり、今後増加する骨髄移植に伴う免疫病態としての本病態の理解、予防法の開発が期待される。

第二点は、病態そのものの基礎的な情報集積が進んでいる事実である。特発性間質性肺炎においては、最近になり II 型肺胞上皮細胞の重要な機能である surfactant 蛋白やその細胞内移送に関与するタンパクの異常が報告されている。日本の家族性肺線維症に関してもかかる解析が始まった。一方サルコイドーシスでは日本の独創的な研究である P. acnes に関しそのトリガー因子による細胞性免疫刺激と肉芽腫形成という、より病因論的な研究展開がなされている。またびまん

性汎気管支炎 (DPB) における疾患感受性遺伝子の narrow down は続いているが、今回候補遺伝子のいくつかの検討が始まっている。

こうした基礎研究をもとに新たな治療法への手がかりが見いだされることが期待される。一方 2 年前約 100 例を対象として施行された pirfenidone による臨床試験は厚生労働省による承認のため、さらに多数例で第 III 相として double blinded, placebo-controlled, prospective な試験が総症例 250 例という大規模試験として近日開始される。これは「特発性間質性肺炎の画期的治療法に関する臨床研究」の一翼も担って、難治性である本疾患の治療法開発の推進が第 3 年度への班研究の中心的課題となる。

## II. 研究要旨

### 全国調査研究

#### 1. 特発性間質性肺炎に関する全国調査

新しい診断基準 (第 4 次改定) にもとづいた特発性間質性肺炎の疫学調査を開始する準備段階を公表した。その具体的な課題としては (1) 発症率とその予後を調査する全症例登録による前向き調査、(2) 特発性肺線維症の死因に大きく関与する急性増悪の発症、(3) 背景遺伝子異常が関与すると考えられる家族性間質性肺炎の疫学調査、の 3 項目である。各施設でのアンケート調査から集計を行う。

#### 2. 閉塞性細気管支炎の全国調査研究

閉塞性細気管支炎 (BO) は、肺移植患者の長期予後を左右する重要な合併症として知られているが、造血幹細胞移植においても以前より長期生存移植患者の QOL を著しく悪化させる合併症として注目されている。今後日本において移植医療の増加が予測されるが、BO の診断と治療が重要な課題となる。しかし、我が国における BO に対する認識は高いとはいえない。これまでに我が国における閉塞性細気管支炎の実態調査研究がないことから、閉塞性細気管支炎の全国調査研究を実施した。2003 年 9 月から 2003 年 12 月の期

間に全国 1,118 施設への一次アンケート調査を実施した結果、287 例の症例が報告された。37% の症例は、病理診断に基づく確定診断例であったが、67% の症例は臨床診断であった。今回の結果に基づき、集積症例の個別調査を目的とした二次アンケート調査を企画する。確定診断例の臨床的特徴と臨床診断例の診断基準の評価を明らかにすることにより、我が国における BO の実態を明らかにできるものと考えている。

## 特発性間質性肺炎

### I. 臨床研究の新しい試みに関する研究

#### 1. 家族性間質性肺炎の臨床像と SP-C 遺伝子異常の研究

最近、米国に於いて家族性間質性肺炎症例の中に sp-C 遺伝子異常が存在することが明らかになった。このような点を踏まえ、家族性間質性肺炎の調査とまた sp-C 遺伝子変異について解析をおこなった。家族性間質性肺炎症例は 9 家系 19 症例で、診断時年齢は、47.2 (14.4 歳、病理診断名は UIP 9 例、IIPs 9 例、COP 1 例 (病理診断 11 例) であった。男女比は 1.5:1.0、死亡時年齢は 51.4 (15 歳で平均生存期間は、6.9 (4.0 年であった。8 家系が兄弟姉妹発症、内 1 家系が異母兄妹発症、1 家系が親子発症であった。画像的特徴は、上葉優位の間質影を認める症例が 49%、上肺優位に胸膜直下に嚢胞をみとめる症例が 37%、全肺野に蜂巣状所見を示した症例が 1 例存在した。Sp-C 遺伝子解析は、5 症例について両親兄弟について Exon 2 から Intron 5 の間について行い、これまで報告されているような変異は認められなかったが、複数の遺伝子多型が存在し、コドン 186 については健常者 16 名についても調べ、S186N が家族性間質性肺炎では 11% の頻度であったが健常者では 88% の頻度であった。

#### 2. 剥離性間質性肺炎の BALF のプロテオーム解析

我々は、BALF 中の磷脂質を効率よく除去し、分離よく二次元展開する方法を検討してきた。また、疾患と健常の BALF の differential 二次元電気泳動を試みるため、異なる吸収波長をもつ蛍光色素により BALF 蛋白を染色し、同一ゲル上で疾患と健常の差を検出する 2D DIGE 法を導入した。疾患として剥離性間質性肺炎 (DIP) 7 例、コントロールとして 27 例の健常非喫煙者 BALF をプールしたものを用いた。BALF の総蛋白、総磷脂質濃度は両者に差がなかったが、

Differential 二次元電気泳動により、DIP で健常者よりも著明に増加していた蛋白は  $\alpha 1$  アンチトリプシン、 $\alpha 1$  アンチキモトリプシン、イムノグロブリン H 鎖、L 鎖など炎症に関連した蛋白であり、逆に DIP で著減していた蛋白は、サーファクタント蛋白 A 及び D (SP-A, -D) であった。サーファクタント蛋白の減少は BALF を ELISA 法により定量することによって確認された。免疫組織化学染色により、DIP においては、SP-A, B, D の産生は肺 II 型上皮において過剰に産生されていることが示されたことから、サーファクタント蛋白は過形成により増生した II 型上皮により産生が増加するものの、異常増殖した肺胞マクロファージにより分解が進み、結果的に BALF 中のサーファクタント濃度が低下すると考えられる。

#### 3. 画像評価に関する研究

本研究の目的は、微細な陰影の検出が可能である近年臨床の場に導入された multi-detector row CT (マルチスライス CT) を用いた CT 検診の data から原因不明の間質性肺炎と COPD の有病率を明らかにすることと、原因不明の間質性肺炎の早期病変の候補を抽出することである。CT 検診を用いた肺気腫・間質性肺炎の疫学調査；マルチスライス CT では 2 mm 以下の thin-slice で 1 回息止め下に撮影が可能で、これを用いた肺癌検診のデータより肺気腫、慢性間質性肺炎の早期病変の検出及び有病率の同定を目的とした検討を行った。UIP, NSIP の CT 画像から volume histogram 法を用い Contrast, Entropy, Variance の 3 種の特徴量を算出、比較することで、UIP, NSIP 間での傾向に差が見られた。

#### 4. 肺 CT 被検診者を対象とした間質性肺炎の実態調査

検診目的で施行される肺 CT 検査が間質性肺炎の検出に有用であるか、その検出頻度の実態調査を行うことである。不可逆的線維化病巣を特徴とする特発性間質性肺炎 (IIPs) の治療は、できるかぎり早期に開始されるべきとの理念に基づき、我々は肺 HRCT と特異的血清マーカーを早期発見のツールとすべく検討中である。本年度は早期 IP 患者を効率よく発見するための集団として、肺 CT ドックの有用性を検討した。1,019 名の CT 所見の後向き検討の結果、潜在的 IP 患者が総受診者の 8.83% を占め、IP 発見のための効果的集団であることが示唆された。

## 5. 間質性肺炎における肺内無機沈着物の定量と元素分析

間質性肺炎における無機粉塵の沈着について検討し疾患による比較を行った。症例は19例、男性10例、女性9例、年齢64.9歳。疾患別では慢性鳥飼病9例、膠原病肺4例、特発性肺線維症 (IPF) 4例、職業曝露歴 (鉄, チタン, ステンレス, 銅など) を有する間質性肺炎2例。外科的肺生検又は剖検肺組織で10視野を選択し偏光顕微鏡で複屈折性を示す粒子数を測定した。うち8例と対照群3例 (肺癌切除肺非癌部2例, 肺気腫1例) ではエネルギー分散型X線分光法 (EDS) で沈着物の元素分析も行った。慢性鳥飼病群 (44.6±23.0個), IPF群 (364.5±547.5個) は膠原病肺群 (20.5±6.4個) と比較して粒子数が多い傾向にあった。IPF群の中に非常に粒子数の多い症例があった。元素分析では大部分がAl, Si主体の粒子であったが、IPFや職業曝露例ではFe, Ti, Crなども検出された。IPFでは自覚しない曝露歴がある可能性があり、間質性肺炎患者の確定診断と病態解明において偏光顕微鏡, 走査電顕等の精査も考慮すべきと考えられた。

## II. 実験モデルを用いた基礎的研究

### 6. マウス LPS 急性肺傷害モデルにおける一酸化窒素の炎症調節作用に関する研究

肺の感染・炎症病態において、肺局所で過剰に産生される一酸化窒素 (NO) は、生体防御において重要な役割を演じている。今回、NO合成酵素欠損 (NOS2<sup>-/-</sup>) マウスでLPS急性炎症モデルを作成し、肺の急性炎症病態におけるNOの役割について検討した。マウスLPS急性肺傷害モデルにおいて、一酸化窒素 (NO) の作用を明らかにするため、マイクロアレイを用い検討した。その結果、NOS2由来のNOは、急性炎症を促進的に調節する炎症メディエーターであることが明らかになった。

### 7. LM 肺線維症モデルにおける分子標的治療薬 Imatinib (Gleevec) の抗線維化効果

分子標的治療薬 imatinib の抗線維化作用について検討した。PDGF 刺激マウス肺線維芽細胞を用い imatinib の増殖抑制効果を 3H-TdR 取り込み試験を用いて測定し、さらに PDGFR のリン酸化阻害を immunoblot により検討した。またプレオマイシン (BLM) 誘発肺線維症マウスモデルを用いて in vivo の抗線維化作用を検討した。imatinib は PDGF による

肺線維芽細胞の増殖反応及び PDGFR のリン酸化を濃度依存性に抑制した。組織学的検討から imatinib 投与は BLM 投与により誘発される肺線維化を有意に抑制した。以上より肺線維症に対する抗線維化薬として imatinib の臨床応用の可能性が示唆された。

### 8. EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬 gefitinib のマウスプレオマイシン誘発肺線維症に及ぼす効果

EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) のプレオマイシン誘発肺線維化に対する影響を明らかにするため gefitinib の用量を 20, 90, 200 mg/kg の3用量で比較するとともに、同じ実験系において AG1478 の作用と比較した。Gefitinib はいずれの用量においてもプレオマイシンによる肺線維化を抑制し、同様に AG1478 も有効であった。少なくともマウスプレオマイシン誘発肺線維症モデルにおいて gefitinib は EGFR-TKI のリン酸化を抑制しうる 20 mg/mg の濃度で線維化を抑制し、subtoxic dose においても肺傷害を悪化させることはなく同等の抑制効果を示した。このことは、基本的に、EGFR の抑制は、線維化抑制に働くこと、また、臨床例で認められた gefitinib による間質性肺炎が EGFR の抑制に起因するものでない可能性を示唆するものと考えられる。しかし、これらの分子標的治療薬の作用は、種の違いや固体の感受性によって異なる反応を示す可能性もあり、さらに慎重な検討が必要であると考えられた。

### 9. マウスの肺線維症モデルを用いた肺線維化のメカニズムの研究—シリカによる肺線維化の過程に対する、分子病態的な側面からの検討—

HCV が肺の線維化を促進する機序を解明する目的で、HCV-トランス下ニックマウス (Tg (+)) を用いて検討を行うこととした。今回の HCV-Tg (+) マウスを用いた検討により、従来使用していた量の半分の 8 mg のシリカにより HCV-Tg (+) では HCV-Tg (-) と比較して、肺乾燥重量およびハイドロキシプロリンを指標として、有意な線維化を認めた。このことは HCV の強発現を背景とする環境で、少量のシリカによる線維化の促進因子が加わることで、実際に肺に線維化病変が生じることを示している。さらにその線維化を促進する因子として IL-4, INF- $\gamma$  の関与が示された。

### 10. 肺 (幹) 細胞による骨髄再建能

近年、骨髄の side population (SP) 細胞が幹細胞の性質を有していることが報告されている。肺細胞の多

分化能を検討する目的でマウスの肺細胞並びに肺 SP 細胞を用い、これらの細胞を放射線照射したマウスに投与して骨髄再建能を調べた。C57Bl/6 マウス (6-8 週令, 雌) と Green Fluorescent Protein (GFP) マウス (6-8 週令) を用いた。骨髄および骨髄 SP 細胞, 肺細胞および肺 SP 細胞を全身照射 (7 Gy) したマウスに経静脈的に投与し、末梢血中の GFP 陽性細胞を経時的に観察した。電子顕微鏡にて形態学的観察を行い、さらに CD45+/- 肺細胞を放射線照射マウスに投与して生存曲線による解析を行い、

マウス肺には骨髄と同様に SP 細胞が存在し、CD45+ 肺細胞に骨髄を再建させる細胞、すなわち造血幹/前駆細胞が含まれていることを示した。

#### 11. HGF による線維化肺組織修復における骨髄由来幹細胞の役割

特発性肺線維症患者肺に特徴的な病変分布にともなう肺胞毛細血管の構築変化を、さらに連続切片と 3 次元画像解析装置を用いて観察した。CD34 陽性血管内皮細胞は、線維化病変においては消失するが、その周囲の線維化が進行していない領域ではむしろ肺胞壁内の血管密度は増加する。その増加が内皮細胞の増殖によることを、Ki-67 にて確認した。これらの結果から、肺線維症患者の治療として肺胞毛細血管を薬剤の投与ルートとして用いる場合は、線維化が亢進していない肺胞壁に対する予防効果が期待できることを示している。プレオマイシン肺傷害に対してこの方法による HGF 遺伝子導入をすると、傷害後に生ずる線維化が効果的に抑制された。プレオマイシン傷害後の肺組織再生に関わる骨髄由来幹細胞は、HGF 遺伝子導入によってむしろ減少することが観察された。これは、HGF の主効果がアポトーシス抑制であり、その結果として炎症そして線維化を抑制するため、骨髄由来幹細胞による肺組織修復に至らないためであると考えられた。

#### 12. 肺線維芽細胞における Fas 感受性の制御に関する研究

肺傷害に続く肺線維化の過程において、肺線維芽細胞の肺腔内、間質での増殖は必要不可欠である。また、肺傷害後の正常な修復過程においては、肺腔内に滲出した肺線維芽細胞や炎症細胞の制御された細胞死とその吸収が必要と考えられる。従って、肺線維症の進展過程において、肺線維芽細胞の増殖と細胞死の機構を解明し、制御することは重要だと考えられ

る。肺線維症の病態における肺線維芽細胞の Fas 抵抗性の獲得機構と Fas による異所性コラーゲン産生機構が明らかになった。

#### 13. アロ免疫反応に伴う閉塞性気道病変形成に対するレシピエントマクロファージ除去の効果 —ラット異所性気管移植モデルを用いて—

ラット異所性気管移植モデルを用いて、肺移植後に発生する閉塞性細気管支炎 (BO) におけるマクロファージの関与について、レシピエントのマクロファージを除去することで、BO の発生が抑制されるか否かを検討した。本研究の結果から、レシピエントへの GdCl<sub>3</sub> 投与によるマクロファージ除去によって、アロ免疫反応に関連して発生する線維性肉芽組織による閉塞性気道病変の形成が著しく抑制されることが明らかとなった

### III. 診断・予後・QOL に関する研究報告

#### 14. 特発性肺線維症の急性増悪の新しい診断基準について

特発性肺線維症の急性増悪とは、わが国で提唱された概念であり、病理学的には UIP 所見に加え、DAD 所見が認められる。IPF の急性増悪は、予後不良のため外科的肺生検の施行が困難な場合が多く、精度の高い臨床診断基準が必要である。自験例の検討および種々の知見より、新しい臨床診断基準を提案した。IPF の経過中に、1 カ月以内の経過で、① 呼吸困難の増強、② HRCT 所見で蜂巣肺所見+新たに生じたすりガラス陰影・浸潤影、③ 動脈血酸素分圧の低下有意な低下 (同一条件下で PaO<sub>2</sub> 10 mmHg 以上) のすべてがみられる場合を「急性増悪」とする。ただし、明らかな肺感染症、気胸、悪性腫瘍、肺塞栓や心不全を除外する。参考所見としては、(1) CRP, LDH の上昇、(2) KL-6, SP-A, SP-D などの上昇、がある。

#### 15. 2施設における間質性肺炎外科的生検例に関する検討

2施設 (天理よろづ相談所病院, 国立姫路病院) の特発性間質性肺炎 (IIPs) 外科的生検例は、同一病理医が病理所見をみていることから、均一の症例を検討することが可能である。本研究は、両施設の外科的生検症例の治療と予後を検討することを目的とした。1992 年~2001 年までの 10 年間に両施設で外科的肺生検を行った IIPs 症例で、病理診断が fibrosing NSIP (F-NSIP) または分類不能 (others) であり、2 年以上

経過観察が可能であった症例を対象に、①施設別に2群に分けて、②組織型別に2群(F-NSIPおよびothers)に分けてretrospectiveに検討した。分類不能とは病変の時相が均一ではなくUIPパターンを呈するが、病変の分布がUIPとは異なる疾患群と定義した。その結果、施設別の検討では、CyAは天理で有意に多く使用されていた。しかし2施設の予後に有意差はなかった。また、組織型別の検討では、F-NSIPとothersの2群に分けて検討したが、2群の予後に有意差を認めなかった。

#### 16. 特発性肺線維症に合併した原発性肺がんの胸部CT所見に関する研究

特発性肺線維症(IPF)には高率に肺癌が合併するが、その高分解能CT(HRCT)所見に関する報告はない。本研究ではIPF合併肺癌のHRCT像の特徴を明らかにすることを目的とした。1993年より2002までに当科に入院したIPFに合併した肺癌30例を対象として、病歴、HRCT画像、病理組織を解析した。その結果、HRCTでは30例中28例(93%)が軟部組織濃度からなる結節を呈していた。結節の辺縁は明瞭が82%、分葉状が86%、棘状が50%であった。エアブロンコグラムは57%に認められた。肺癌は全例が肺野末梢に存在した。組織型は扁平上皮癌と腺癌が最も多かった。IPF合併肺癌に典型的なHRCT所見は、胸膜下領域の境界明瞭で分葉状の結節であることが判明した。

#### 17. SF-36による特発性肺線維症の重症度分類の再評価

平成15年秋に改訂された特発性間質性肺炎の新重症度分類が、SF-36質問表による健康関連QOLをどの程度反映しているのかを旧重症度分類と比較し検討した。対象は当院外来通院中の特発性間質性肺炎のなかの特発性肺線維症患者40例である。SF-36の結果は8つのサブスケールのうち7項目で国民標準値より低値を示し、身体・精神面のQOL低下が示唆された。これらと臨床検査値との相関を検討したところ、%VCと%DLcoは多くの項目で相関を認めたが、LDHやKL-6はいずれの項目とも相関を認めなかった。安静時のPaO<sub>2</sub>により規定される旧重症度分類、およびこれに6分間歩行負荷時のSpO<sub>2</sub>低下を加味した新重症度分類では、新重症度分類のほうがSF-36と若干相関が良好である傾向であった。結論として、新重症度分類はQOLの面からは満足できるものではないことが示唆された。

#### 18. 特発性肺線維症における血清KL-6を含めた予後因子の検討

特発性肺線維症(IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis)の発症推定時期は過去の症状、胸部画像から決め、発症から3年以内に初めて測定したKL-6を初期値とし、その後3年間の経過観察が可能であった症例を対象として予後との関連を検討した。年齢、KL-6、CRP、LDH、ESR、%VC、%DLCO、SPO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>における生存群と死亡群との比較ではKL-6のみが死亡群で、有意差をもって高値を示した。ROC曲線から得られたcut off値は、年齢が60歳、KL-6が1,000 U/ml、CRPは0.65 mg/dl、LDHは550 IU/L、ESRは35 mm(1時間値)であった。それぞれの決定したcut off値以上、未満における生存率の比較では、KL-6とLDHのみがcut off値以上で、有意差をもって低い生存率を示した。ロジスティック単回帰分析を行った年齢、KL-6、CRP、LDH、ESRのなかで、KL-6とLDHのみが1以上のOdds比を示し、さらに有意差を示した。次に、最も相関があったKL-6とLDHにおいて、ロジスティック重回帰分析を行った結果、KL-6のみが1以上のOdds比を示して、さらに有意差を認めた。

### IV. 臨床病理学的研究

#### 19. 新しい基準による特発性間質性肺炎の再評価: 臨床画像病理診断の意義

呼吸器専門施設で外科的肺生検を施行され特発性間質性肺炎(IIPs)と診断された25例について新しい基準(ATS/ERS)による臨床画像病理総合診断を行い再検討を行った。新基準に従って、過去症例の再評価をすることは临床上、研究上必須である事が確認された。また、画像のみで66%のIPF、NSIPが診断可能であったが、IIPsの診断には病理、画像だけでは限界があり、総合的な臨床画像病理診断を行うことは有用である。

#### 20. 間質性肺炎早期線維化巣におけるFGF-10、FGF-R、Fox f1の発現についての検討

転写因子fox F1は、肺の間質細胞で産生され、その欠損マウスは発生段階において肺形成が阻害される。Target geneには成長因子HGFや、MMP-1,3などが確認されている。上皮増殖因子FGF-10は、肺葉形成において、最も上流に位置する制御分子として認識されており、上皮形成、増殖に深く関与する。UIPでは、

線維化が吸収されないことのみならず、修復する上での上皮再生が不良であることが、UIP の病理形態学的な特徴である事が示されている。本研究では肺の形成に不可欠であり、間質性肺炎の発生機序に関連した多くの gene を転写の target とする foxF1 と上皮増殖因子である FGF-10 の局在と発現を、UIP と COP 肺組織において確認し、疾患特異性と病態の関連について検討した。肺の形成に不可欠であり、間質性肺炎の発生機序に関連した多くの gene を転写の target とする foxF1 と上皮増殖因子である FGF-10 の局在と発現を、酵素抗体法 realtime PCR 法を用いて UIP と COP 肺組織において確認、検討した。FGF-10 は UIP で高く、COP で低い発現傾向を示した。Fox f1 は、UIP で低く、COP で高い発現傾向を示した。

## 21. UIP ならびに NSIP における血管構築改変と VEGF の発現

間質性肺炎における血管形質の変化と vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を明らかにすることを目的として UIP と NSIP の病変部血管について、UIP 25 例と NSIP 9 例のパラフィン切片による von Willbrand 因子 (vWf) と thrombomodulin (TM) の発現を免疫組織化学的に、また VEGF, KDR mRNA の発現を RT-PCR 法で検討した。線維化と肺胞構築改変に伴って vWf 陽性血管の相対的増加、TM 陽性血管の著減がみられ、NSIP では両者の陽性血管がモザイク状にみられた。また病変部では VEGF165, 189 と KDR mRNA の発現は正常肺と比較して有意に低下していた。肺の線維化と構築改変に伴って血管内皮の形質が細気管支領域の血管の形質に変化すること、病変部における VEGF の発現の低下は UIP/IPF の治療を考える上で重要な病態を示す。

## サルコイドーシス

### 1. Propionibacterium acnes トリガーファクター蛋白による実験的マウス肉芽腫症の誘導

Propionibacterium acnes (P. acnes) 由来の trigger factor 蛋白は、慢性安定期にあるサルコイドーシス患者の約 2 割で患者特異的な細胞性免疫反応を引き起こすことが知られている。今回我々は P. acnes trigger factor 蛋白に対して実験的に誘導された過敏性免疫反応によりマウスに肉芽腫性病変を引き起こしうるか否かを検索した。今回の実験により、P. acnes trigger factor のリコンビナント蛋白は、マウスを前もって抗

原暴露する必要なく、これをアジュバントとともに感作免疫するだけで、肺にサルコイドーシス類似的肉芽腫性病変を誘導しうることが判明した。蛋白抗原のかわりに菌体そのものを用いても結果は同様であった。また正常マウスの約 1/3 で肺から P. acnes が培養可能であることから、感作免疫のみにて肺肉芽腫を形成するマウスでは、肺に P. acnes が常在性に感染している可能性がある。ヒトの末梢肺組織や肺門部リンパ節からも約半数の症例で本菌が培養可能であり他の細菌類はほとんど検出されないことから、P. acnes はこれらの組織に常在感染している可能性が高い。

### 2. 抗酸菌感染症患者血清における Th1 サイトカインの検討—サルコイドーシス患者との比較—

前回サルコイドーシス (サ症) 患者における血清中 Th1 サイトカイン、IL-12p40 と IL-18 について測定しこれらが正常人コントロールに比べいずれも有意に増加していること、また血清 ACE も含め相互に正の相関関係があることを報告した。今回肺結核の患者 8 名、非結核性抗酸菌症の患者 5 名の計 13 名について血清中 IL-12p40 と IL-18 を測定しサ症患者及び正常人の値と比較した。その結果、抗酸菌感染症と正常コントロールを比較した場合血清中 IL-12p40 が有意に抗酸菌感染症群で高値であった。一方血清中 IL-18 については一部で非常に高くなったがばらつきが大きく有意差がでなかった。次に IL-12p40 についてサルコイドーシス患者と抗酸菌感染症を比較したところサ症群でやや高値となる傾向があった。抗酸菌感染症についてさらに非結核性抗酸菌症と結核の血清中 IL-12p40 の濃度を比較したが有意差を認めなかった。

### 3. サルコイドーシスにおける IL-18 遺伝子多型の意義

IL-18 は IL-12 とともに IFN- $\gamma$  を誘導することにより、サルコイドーシスにおいて重要な役割を果たしているため、疾患感受性ないし疾患修飾遺伝子の有力な候補である。IL-18 遺伝子プロモーター領域の 3 つの一塩基多型 (SNP)、-137 (G/C)、-607 (C/A)、-656 (G/T) の役割を検討した。176 名の対照者と 161 名の患者間で、-137 と -656 の二つの SNP の遺伝子型や対立遺伝子の頻度に有意差を認めなかった。しかし、-607 と -656 多型は有意にサルコイドーシス患者血清 IL-18 濃度と相関していた。サルコイドーシスでは 3 つの SNP を同定したが、それらの間には強い連鎖不平衡が成立しており、そのハプロタイプの推定値

をサルコイドーシス患者について求めた。その中で2つの主要なハプロタイプを含むプロモーター領域配列を、ルシフェラーゼレポーターベクターに挿入し、細胞株 THP-1 を用いてプロモーター活性を測定した。その結果、主要ハプロタイプ-137G/-607C/-656Gは酪酸ナトリウム刺激下において、もう一つの主要ハプロタイプである-137G/-607A/-656Tに比して、プロモーター活性が高かった。これは血清のIL-18濃度が高い遺伝子型と符合していた。-607と-656の遺伝子型のうちヘテロ個体は、他の二つのホモ個体に比して有意に臨床経過が遅延していた。一方、喫煙者は非喫煙者および過去喫煙者に比して有意に臨床経過が短縮していた。二つの因子で患者群を4群に分けると、より明瞭に臨床経過の差異を示すことができた。以上のように、今回の検討はSNPのハプロタイプによるIL-18遺伝子プロモーター活性の相違に基づく蛋白発現の違いにより、サルコイドーシスの臨床像が異なり、それがまた喫煙など外因の影響をも受けることを示した。

#### 4. サルコイドーシスの肉芽腫形成機序におけるCD1分子の検討

サルコイドーシスの肉芽腫形成機序において、脂質抗原の関与を検討するため、肉芽腫におけるCD1分子の発現を検討する。CD1分子による脂質抗原提示のメカニズムが報告されているが、サルコイドーシスにおいて樹状細胞上のCD1分子の関与を検討した報告はわずかである。今回我々は、サルコイドーシス確定9例および対照7例において抗CD1a, CD1b, CD1c抗体を用いて免疫組織学的に検討を行った。サルコイドーシス群5例において肉芽腫を中心としてCD1陽性細胞が確認されたが対照群は全例陰性であった。またCD1陽性症例と陰性症例に検査成績の相違はみられず、病勢との関連も認められなかった。サルコイドーシスの肉芽腫形成には、樹状細胞を介したCD1/脂質抗原による免疫応答が関与している可能性が示唆された。

#### 5. 実験的マウス肺サルコイド様病変における肺常在P.acnesの意義

肺肉芽腫症の発症機構を解明するべく、正常マウス肺での常在P. acnesの存在を示し、これがP. acnesの肺外反復感染が誘導する肺肉芽腫病変の形成に大きな影響を与えることを示唆した。また、人工的な肺常在P. acnesの量の増減に肉芽腫形成が呼応することを

示し、このモデルにおいて、肺常在P. acnesの除菌が肉芽腫病変の軽減に有効であることが分かった。このマウス肺肉芽腫モデルの解析により、原因不明間質性肺疾患の病態解明に向けた新たな糸口が見出されることが期待される。

### DPB

#### 1. びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子研究

びまん性汎細気管支炎の疾患感受性候補領域の中に特に連鎖不平衡の強い80 kbの領域が存在し、複数のSNPが疾患と有意な関連を示したことから、昨年より、遺伝子クローニングと、領域内の遺伝子変異の網羅的検索を行っている。候補領域内の全域を詳細に検討し、新規遺伝子内の変異についてもさらに検討を重ね、関連する遺伝子変異を複数同定している。本年度は、連鎖不平衡の強い80 kbの領域内は、直接シーケンシング法により、塩基配列を決定し、SNP, I/D多型等を同定した。また、新規遺伝子に関しても、long PCRを利用して、VNTRを含む多型の存在を確認した。新規遺伝子内にあり、疾患と関連する変異は、機能解析を加えることにより、今後、疾患との関連が解明されるものと期待される。

#### 2. エリスロマイシンの抗炎症作用：包括的遺伝子発現解析から (第二報)

エリスロマイシン (EM) など14員環マクロライド抗生物質の慢性気道炎症性疾患における有効性の機序について、今年度は正常ヒト気道上皮細胞により長時間エリスロマイシンを作用させ、その遺伝子発現への作用をジーンチップを用いて包括的に評価した。ヒト気道上皮細胞BET-1Aを標的細胞として、エリスロマイシンの遺伝子発現への作用を、ジーンチップを用いて包括的に評価することを試みた。EMの処理により発現が増強あるいは減弱する遺伝子が存在した。明らかに減弱した遺伝子として気道炎症において役割が推定されるIgE-dependent histamine-releasing factorがあった。今後、この方法の利点と、限界を考慮しつつマクロライドの作用に関与するする遺伝子群の検索を推進する。

### 追加発表

#### 1. 「アマメシバ」摂取に関連した肺疾患患者は日本にも存在する。

5症例の「アマメシバ」摂取に関連した肺疾患患者

の症例報告を行った。全例閉塞性肺機能障害を呈しステロイドや気管支拡張薬を投与しても症状は改善されなかった。内1例は閉塞性細気管支炎と診断された。今後は全国の呼吸器関連施設に対して、これまでに「アマメシバ」の摂取と関連あると考えられた肺疾患症例の症例調査研究をアンケート方式により実施し、全国調査により日本の現状とその臨床的特長を明らかにする中で、早期診断と発病予防に向けた情報発信を行うことが急務である。

## 2. サ症患者におけるプロピオニバクテリアの細菌学的検討—糞便の凍結がプロピオニバクテリアの分離に及ぼす影響—

検体採取や採取後の検体の保存環境等の培養成績

に与える負の因子の影響を最小限にする目的で、新規に愛知県を研究の場として、サルコイドーシス患者の糞便を収集し、それらを対象に、プロピオニバクテリア選択培地によるプロピオニバクテリアの分離培養を実施した。サルコイドーシス患者44名の糞便中から10 cfu/g以上に本菌が検出された検体数は30検体で、培養陽性率は68.2%であった。凍結操作が成績に及ぼす影響を明らかにする目的で、無作為に凍結前にも培養を行った24検体中の培養陽性検体数は16検体で、陽性率は66.7%であった。糞便の凍結前後の培養結果の比較、すなわち、培養陽性率、個々の検体における菌量、平均菌量の比較では、凍結による顕著な菌数の変化は認めなかった。

# 調査研究班平成15年度経過報告