

目 的

特発性間質性肺炎 (IIPs) の国際合同コンセンサスが発表され、本邦でもそれに準じた形で第 4 次改訂が発表されている。国際合同コンセンサスでは新しい基準が示されると共に IIPs の診断には臨床、病理、画像、を総合した診断が重要とされている。我々は厚生労働省政策医療呼吸器ネットワーク関連施設 (呼吸器疾患専門施設) で外科的肺生検の行われた IIPs について、新しい基準による総合的な臨床画像病理的な再評価を行っている (進行中)。この中で、初期診断名との比較、また病理所見だけ、あるいは画像所見 (高分解能 CT: HRCT) だけからどこまで診断可能かどうか検討した。今回、そのうちの一部症例について、H15 年 2 月にワークショップを行い詳細に検討を行った。

対象と方法

各施設で外科的肺生検で IIPs と診断され 2 年以上経過した 165 例を対象とし、経過を含めた臨床データ、画像データ (胸部レントゲン、HRCT)、病理スライドを収集した。そのうち 25 例について以下の手順で検討を行った。25 例の内訳を表 1 に示す。

画像データの解析は臨床データ、病理データ通知せずに独立して、びまん性肺疾患の診断に優れた放射線科医が担当した。読影医には各施設で IIPs と診断されたらだけ通知した。また病理医 7 名により画像データ、臨床データを伝えずに IIPs の亜分類パターンを診断した。最後に病理、画像、経過を含む臨床データから総合的な臨床画像病理診断を行い正診とした。

診断、用語は ATS/ERS の基準に従った。

結 果

(1) 胸部レントゲン、HRCT による画像診断:

画像の解析で 22 例が IIPs とされた。3 例は IIPs 以外と診断された。IIPs の内訳は IPF 6 例、NSIP 9 例、COP 2 例、DIP 2 例、LIP 2 例、分類不能型 1 例であ

国立療養所近畿中央病院、政策医療呼吸器ネットワーク関連および協力施設

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

表 1 特発性間質性肺炎 25 名の内訳

各施設初期診断名	n
IPF	7
NSIP	10
COP	1
DIP	1
LIP	3
UIP+DIP	1
Unclassifiable	1
Other	1
計	25

た (図 1)。

(2) 臨床画像病理診断:

総合診断では 19 例 (76%) が IIPs、6 例 (24%) が IIPs 以外と診断された。IIPs の 19 例の内訳は IPF 6 例、NSIP 9 例、DIP 1 例、LIP 2 例、AIP 1 例であった。IIPs 以外では膠原病肺 (CVD-IP)、慢性過敏性肺炎 (CHP)、基質化肺炎と肉芽腫の合併、リンパ球過形成 (LH)、“網谷病”と診断された (図 2)。

(3) 画像診断の正診率:

HRCT で IPF と診断された中で 66% が IPF、HRCT で NSIP と診断された中で 66% が NSIP であった。25 例全体では正診率は 48% であった (図 1)。

(4) 胸部疾患専門施設での初期診断の正診率:

25 例中 14 例 (56%) が臨床画像病理診断と一致していた。その中で初期診断で IPF とされていた中の 57% が臨床画像病理診断でも IPF であった。初期診断名で NSIP とされていた中で 70% が臨床画像病理診断でも NSIP であった (図 2)。

(5) 病理医間の診断のばらつきについて:

臨床情報抜きで 7 人の病理医に診断して頂いた正診率は平均 72±8 (SD) % であった。UIP では 88±15% と最も高く、NSIP では 74±9%、その他では 46±22% であった (表 2)。

今回症例を収集した施設は地区の胸部疾患の中心

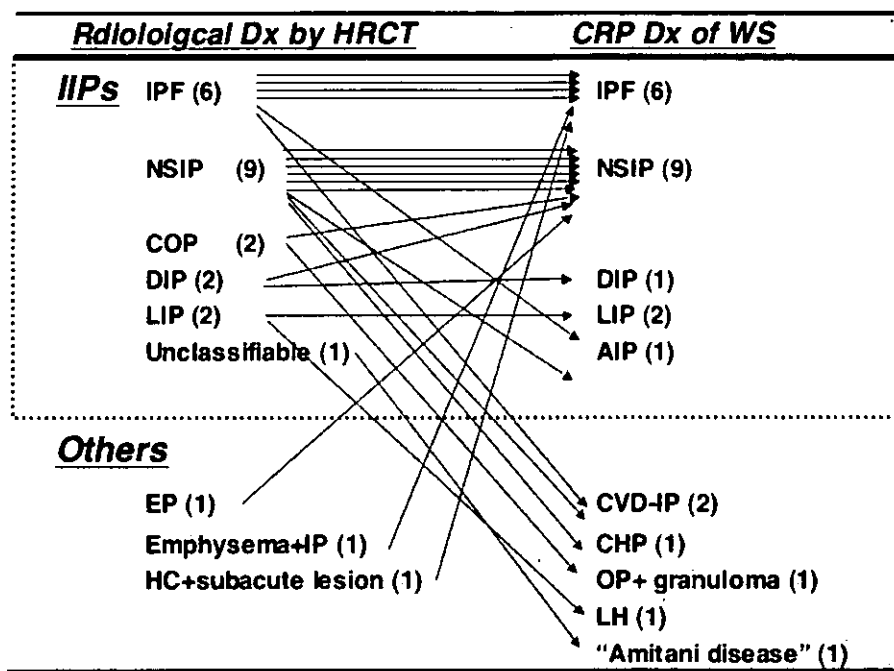


図1 画像診断と臨床画像病理診断

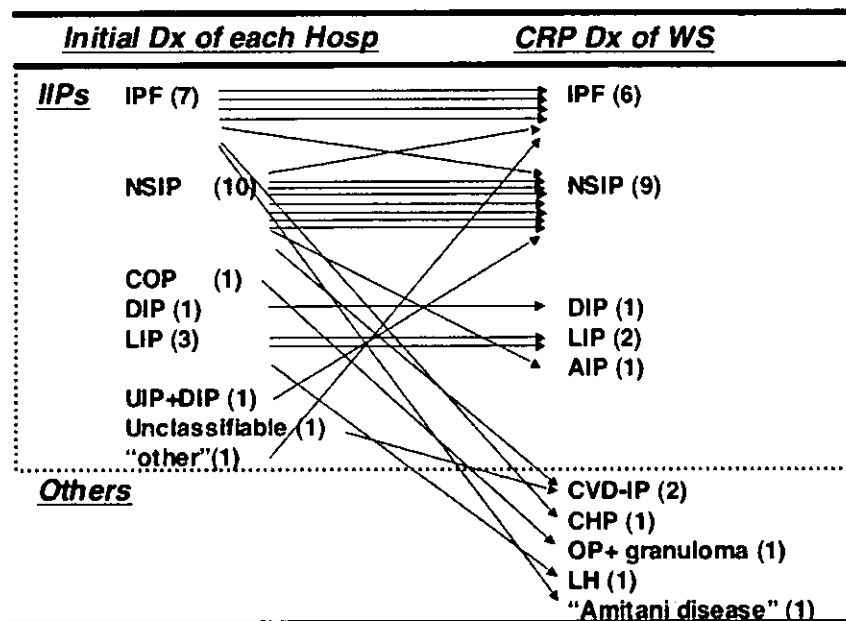


図2 呼吸器専門各施設での初期診断と臨床画像病理診断

的役割を担っている呼吸器施設である。各施設での診断名は国際コンセンサスあるいは第4次改訂の発表前に診断された症例が多かったが、25例のうち新しい臨床画像病理診断と一致していたのは56%であった。IIPsは診断により予後、治療反応性が異なり、患者の指導も異なる。ATS/ERSの国際合同コンセンサスではIIPsは臨床画像病理的に総合的に検討することが有用とされ、経過観察中も病理、画像の再評価が役に

立つと言われている。今回、過去の症例の再評価をすることで40%以上の患者の診断名が更新された。これはIIPsの分類や診断基準が新しくなったためである。過去症例の再評価をすることは診療および研究上重要と考えられる。

新しい基準ではHRCTの重要性が強調されている。また典型的なIPFはHRCTで診断可能とされているが、画像診断が臨床画像病理診断と完全に一致し

表2 病理医による臨床画像病理診断との一致率

病理パターン	n	病理医 (7人) の一致率 (%)
UIP	6	88±15
NSIP	9	74±9
LIP/DIP/AIP	4	46±22
合計	19	72±8

mean±SD

たのは25例中48%であった。しかしながらIPFの一致率は66%でありNSIPの一致率は66%と比較的良好であった。今回読影した放射線科医はびまん性肺疾患の読影に精通していたが一般の放射線科医による診断ではもっと悪い値になると思われる。これは画像診断の限界を示すと同時に、卓越した放射線科医ならばIPF、NSIPは66%程度は外科的肺生検がなくとも診断可能とも考えられる。

今回7名のびまん性肺疾患の診断に卓越した病理医に診断して頂いたが、正診率は72%であり病理医間のばらつきも認められた。病理診断基準の標準化の難しさを反映しているものと思われた。

結 論

(1) 新しい診断基準に従って、過去症例の再評価をすることは臨床上、研究上必須である。

(2) 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。

謝 辞

多大なるご協力をいただいた Armed Forces Institute of Pathology, USA の William D. Travis 先生、埼玉県立循環器呼吸器センター河端美則先生、長崎大学病院林徳真吉先生、岡山赤十字病院林英博先生に深謝いたします。また病理組織の準備にご協力頂いた寺本友昭様、名嘉正勝様、山田佳子様にも深謝いたします。

参考文献

- 1) Masanori Akira, Satoru Yamamoto, Yoshikazu Inoue, Mitsunori Sakatani. High resolution computed tomographic findings in asbestosis and idiopathic pulmonary fibrosis; a comparative study. *AJR*. 181: 163-169, 2003.
- 2) 井上義一. 特発性間質性肺炎と紛らわしい周辺疾患. *呼吸器科*. 1: 461-469, 2002.
- 3) 井上義一. びまん性肺疾患の診断, 臨床検査. in びまん性肺疾患の臨床. 泉孝英監修, 坂谷光則, 長井苑子, 北市正則, 井上義一編 p. 29-35 第3版. 金芳堂 2003.
- 4) 井上義一. NSIP. in びまん性肺疾患の臨床. 泉孝英監修, 坂谷光則, 長井苑子, 北市正則, 井上義一編 p. 82-90 第3版. 金芳堂 2003.
- 5) 新井 徹, 井上義一. LIP. in びまん性肺疾患の臨床. 泉孝英監修, 坂谷光則, 長井苑子, 北市正則, 井上義一編 p. 111-118 第3版. 金芳堂 2003.
- 6) 井上義一. 間質性肺疾患. In *Nursing selection 呼吸器疾患*. 木村謙太郎, 松尾ミヨ子監修. p. 134-142 学研 2003.
- 7) 井上義一. 間質性肺炎の診断をどのように進めるか. *MEDICO*, 34: 240-243, 2003.
- 8) 井上義一. 特発性間質性肺炎の臨床経過・予後. *日胸*, 増刊号 p. 91-100, 2003.

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

中山 智子 福田 悠*

肺の間質細胞に存在する転写因子 Fox f1, 増殖因子 FGF-10 は, マウス胎児肺において肺葉の形成, 肺胞の成熟, 上皮増殖に重要な役割を持つことが示されている。間質性肺炎における上皮, 肺胞の再生とこれらの因子についての関連を, 予後不良な UIP と, 良好な COP を対象として, 抗 FGF-10 抗体, 抗 FGF-R 抗体を用いた免疫組織化学, および micro dissection で採取した早期線維化巣での各因子の mRNA の発現を real time PCR で測定し, 疾患特異性を検討した。免疫組織化学では, FGF-10 は UIP の早期線維化巣の間質細胞に強く, COP では弱く染色された。両疾患で FGF-R は線維化巣の被覆再生上皮に強い陽性像を示した。Real time PCR では, 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。UIP では, 上皮再生, 増殖が不良であり, より多くの FGF-10 を必要としている可能性が考えられる。Fox f1 の低発現は, UIP における肺胞再生不良の反映であり, その下流には MMP-1, 3 などがあることから, UIP の線維化巣における細胞外基質吸収が阻害されている可能性が考えられる。

Expression of fibroblast growth factor-10 (FGF-10), FGF-receptor and Fox f1 in early fibroblastic lesions of interstitial pneumonia

Tomoko Nakayama, and Yuh Fukuda

Department of Analytic Human Pathology, Nippon Medical School

FGF-10 (Fibroblast growth factor-10) and transcription factor, Fox f1 exist in the interstitial cells in lung tissue and have very important role for lung morphogenesis and development. FGF-10 plays a key role in epithelial proliferation and alveolar bud formation. Fox f1 has many transcriptional target genes, such as MMP-1, stromelysin, HGF, which are closely related to the pathogenesis of interstitial pneumonia. We investigated immunohistochemical analysis and real time PCR in micro dissected early fibroblastic lesions of UIP and COP lung tissues to confirm the relation between the alveolar regeneration and these factors. In immunohistochemistry, FGF-10 was positive in interstitial cells in fibroblastic focus, but COP showed weakly positive in bud type early fibrotic lesion. FGF-R was strong positive at regenerative epithelial cells covering the fibroblastic focus in UIP. In real time PCR assay, FGF-10 showed high tendency in UIP. It was remarkable in an early fibrotic lesion. Fox f1 showed a low tendency in UIP. It was remarkable in an early fibrotic lesion. It is supposed that a lot of FGF-10 is more required for epithelial proliferation and alveolar regeneration in UIP than COP. It is also supposed that low expression of Fox f1 is reflection of alveolar regenerative insufficiency and inhibition of extracellular matrix absorption in UIP.

はじめに

特発性間質性肺炎は原因不明の間質性肺炎 (IP) であり、現在は病理組織学的に 7 型に分類されている¹⁾。病理形態と臨床経過、予後は非常に関連している。IP の線維化は、疾患の差異に関係なく、肺腔内に形成されるが、予後不良の通常型間質性肺炎 (UIP) では、高度な上皮傷害が広範囲に起こった結果、壁在・閉塞型の腔内線維化を形成する²⁾³⁾。侵入した線維芽細胞は筋線維芽細胞の性格が強く、盛んな細胞外基質産生を示す⁴⁾。基質を吸収するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) とその阻害物質である TIMP のバランスでは TIMP が優位の吸収されにくい線維化を形成し、線維化巣における上皮の再生、修復も不十分であるため、結果として肺腔構造の不可逆的な破壊、改築が進行する⁵⁾。一方、予後が良好な COP では、傷害は局所的であり、UIP とは対照的な吸収される線維化を示す。

転写因子 Fox f1 は、マウスでは肺の間質細胞、血管内皮細胞で産生され、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事が報告されている⁶⁾⁻⁸⁾。binding affinity が高い gene としては成長因子である HGF や、MMP-1, 3 などが確認されている⁶⁾。上皮増殖因子である 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⁹⁾⁻¹⁵⁾。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 Fox f1 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。

対象と方法

1. 肺組織

外科的肺生検検体 8 例 (UIP 4 例, COP 4 例) を対象とした。検体処理は、顕像と免疫組織化学のため

に、4% paraformaldehyde/0.1 M PBS pH 7.4 に固定後、パラフィン包埋を行なった。Micro dissection に用いる検体は、切除後直ちに OCT compound 内に包埋後、 -80°C で急速凍結した新鮮凍結標本を用いた。

2. 顕像および免疫組織化学

薄切標本は、Hematoxylin-eosine (HE), Alcian blue-PAS (Al-PAS), Elastica-Masson-Goldner (EMG) 染色を行なった。免疫組織化学は、avidin-biotin peroxidase 法により、抗 FGF-10 抗体、抗 FGF-R 抗体を用いて行なった。

3. Laser capture micro dissection と RNA の抽出

凍結組織をクライオスタット -20°C 下で、 $10\ \mu\text{m}$ で薄切し、70% エタノールで 30 秒固定後、DEPC 水で水洗し、同様に DEPC 処理したトルイジンブルーによる染色を 10 秒行なった。水洗後風乾し、Leica 社製 Laser capture micro dissection 機器 (Leica AS LMD[®]) にて、早期線維化巣を切り出した (Fig. 1)。サンプルは RNA 抽出キット (QIAGEN 社 RNeasy mini[®]) の抽出溶液中に回収し、同キットにより RNA の抽出を行なった。

4. Real time PCR

抽出 RNA を逆転写反応キット (Takara 社 RNA PCR kit (AMV) Ver. 2.1 (r)) で cDNA に変換し、FGF-10, FGF-R, Fox f1 の TaqMan probe を用いて 40 サイクルの Real time PCR を ABI PRISM 7900 (Applied Biosystem 社製) にて行なった。サンプルは、上記の方法で micro dissection した早期線維化巣と、凍結検体の薄切一枚切片 (以後全切片と称する) の両方で FGF-10, Fox f1 を測定した。FGF-R は全切片のみ検討した。各結果は、同条件下に内部標準として測定した β -actin との比を算出し、相対値とした。

5. 統計解析

算出された相対値を Fisher 法にて検定、解析を行なった。

結 果

1. 顕像および免疫組織化学 (Fig. 2)

FGF-10 は、UIP 早期線維化巣の線維芽細胞に陽性像を示した (Fig. 2A)。COP の早期線維化巣の線維芽細胞はわずかに陽性細胞を認めるのみである (Fig. 2B)。UIP では COP に比較して強い染色性を示した。FGF-R は UIP, COP において、再生上皮に強い陽性

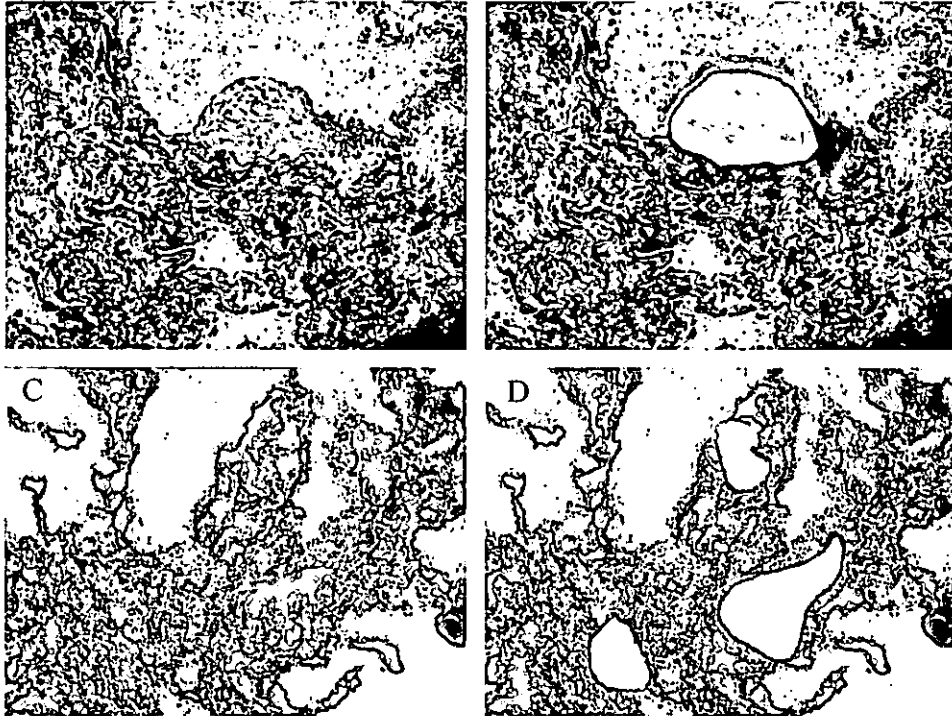


Fig. 1 Cutting by laser capture micro dissection method of early fibrotic lesions from tissue sample of patients with UIP (A and B) and COP (C and D).
 A. Fibroblastic focus was located at intra-alveolar area. It is incorporated into alveolar wall.
 B. Post cutting image.
 C. Early fibrotic lesions showing bud-type are formed in intra-alveolar spaces.
 D. Post cutting image.

像を示した (Fig. 2C).

2. Real time PCR (Table 1, Fig. 3)

症例数と、算出値のばらつきにより、有意差は示されなかったが、FGF-10はCOPに比べUIPにおいて、高い傾向を示し、その傾向は早期線維化巣において顕著な傾向を示した。また Foxf1はUIPに比べCOPにおいて、高い傾向を示し、その傾向は早期線維化巣において顕著な傾向を示した。全切片におけるFGF-Rの比較では、UIP, COP間に明らかな差は認められなかった。

考 察

FGF-10は、肺間質細胞に存在する上皮増殖因子で、上皮細胞上の膜貫通型受容体であるFGF-Rと結合する。その結果MAP kinase系を介したシグナル伝達が行われ、核内転写因子に作用することで、細胞増殖に関与することが示されている¹⁴⁾。胎生肺の形成過程では、FGF-10の欠損マウスは四肢と肺葉の欠損を引き起こし、出生直後に死に至ることから、肺の形成には必須の因子であり、肺形成の最も上流に位置する

制御因子として認識されている¹⁵⁾。主として上皮増殖作用とともに、肺芽形成を誘導し、肺胞の分葉、成熟に関与する⁹⁾⁻¹⁵⁾。間質性肺炎において、予後不良のUIPでは、線維化巣における上皮の再生が不良であることが、線維化の吸収不良の一因と考えられていることから、当初は強力な上皮増殖因子であるFGF-10が、UIPでは低く、COPでは高いことを予想した。しかし、結果は免疫組織化学、Real time PCRともに、UIPの早期線維化巣において高発現の傾向を示した。また、再生上皮には免疫組織化学でFGF-Rが強い陽性像を示していることからみても、UIPでは、病変部における上皮の再生、増殖が不良であるために、より多くのFGF-10を必要としている可能性が考えられる。一方、転写因子であるFox f1は、同様に肺形成に重要な因子であることが示されている⁶⁾。Fox f1欠損マウスは、胎生中に胚外中胚葉の欠損により死に至り、ヘテロマウスにおいても肺芽形成不全、肺胞の成熟不全が認められる⁶⁾。今回のReal time PCRにおけるUIPでのFox f1の低発現の傾向は、肺胞再生不良を反映している可能性が考えられる。Fox f1が転写因子としてtargetにする遺伝子としては、細胞増殖に関

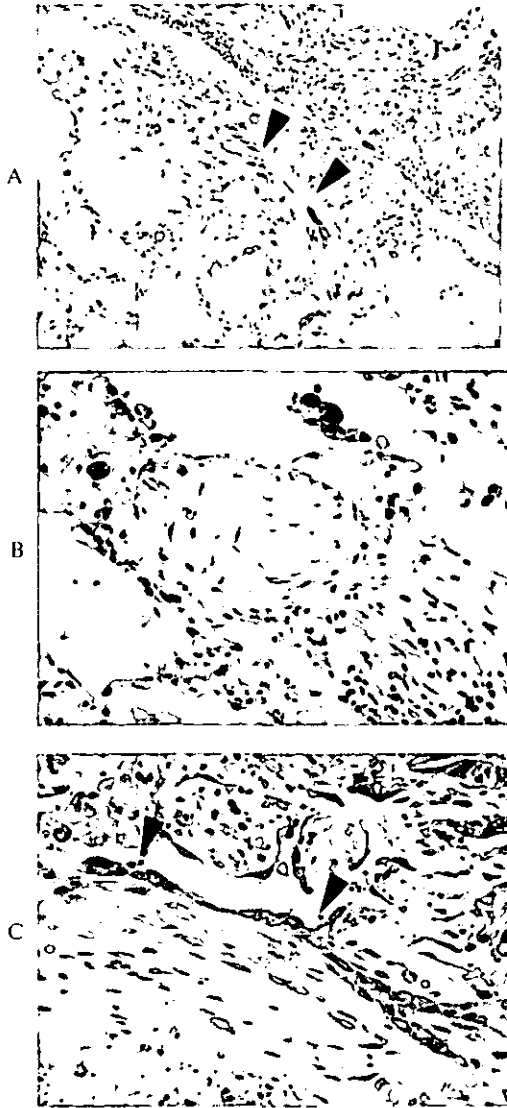


Fig. 2 Immunohistochemical findings of FGF-10 and FGF-R
 A. Interstitial cells located in the area of fibroblastic focus are positive for FGF-10 in UIP (arrow heads).
 B. Interstitial cells in an intra-alveolar bud are slightly or negative for FGF-10 in COP.
 C. FGF-R is strongly positive at regenerative epithelial cells covering the fibroblastic focus in UIP (arrow heads).

Table 1 Relativity value of real time PCR assay. Each values was divided by a calibrator normalized β -actin gene value.

	Whole section		Early fibroblastic lesion		
	FGF-10/ β	FGF-10/ β	FGF-R/ β	Foxf1/ β	
UIP1	0.36	28.3	3.99	0.1	6.95
UIP2	1.02	1.29	5.74	0.16	3.3
UIP3	0.79	6.31	19.3	2.39	4.42
UIP4	1.46			1.88	
COP1	0.1	0	29.64	1.7	4.5
COP2	0.6	1.10	8.17	0.3	7238
COP3	0.2	0.22	2.98	1.7	39.6
COP4	0.1			1.55	

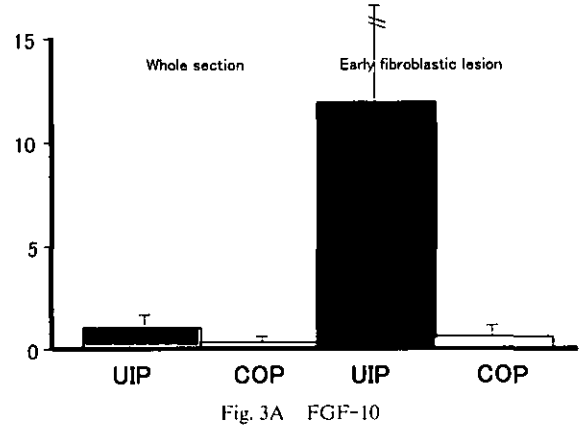


Fig. 3A FGF-10

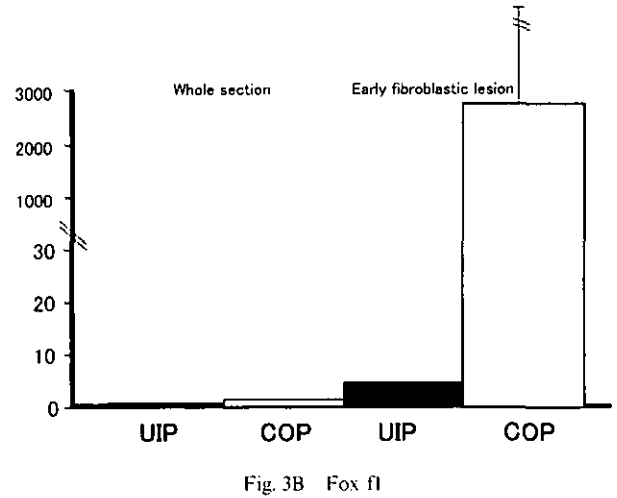


Fig. 3B Fox f1

Fig. 3 Real time PCR assay for FGF-10 and Fox f1 compared with UIP and COP.

A. FGF-10 shows a high tendency in UIP. It is remarkable in an early fibrotic lesion.
 B. Fox f1 shows a low tendency in UIP. It is remarkable in an early fibrotic lesion.

連する HGF, 細胞外基質吸収に関係する MMP-1, 3 (stromelysin) といった間質性肺炎の形成機序に関連する因子が含まれている。線維化を吸収する MMP を制御する Fox f1 の UIP における低発現の傾向は、線維化巣における細胞外基質の吸収が阻害され、線維化の吸収不全に関連することが予想される。これらの結果は特に病変部である早期線維化巣において顕著な傾向を示しており、線維化における FGF-10, Fox f1 の関与が強く予想された。現時点での FGF-10 と Fox f1 の直接的な関連は明らかではないが、いずれの因子も肺形成、上皮再生、増殖に深く関与する重要な因子であり、今後、検討症例数を増やして検討する予定である。

References

- 1) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 165(2): 277-304, 2002.
- 2) Basset F, Ferrans VJ, Soler P, Takemura T, Fukuda Y and R.G. Crystal: Intraluminal fibrosis in interstitial lung disorders. *Am J Pathol* 122(3): 443-461, 1986.
- 3) Fukuda Y, Ferrans VJ, Schoenber CI, Rennard SI, and Crystal RG. Patterns of pulmonary structural remodeling after experimental paraquat toxicity. The morphogenesis of intraalveolar fibrosis. *Am J Pathol* 118(3): 452-475, 1985.
- 4) 福田悠. 呼吸器疾患の病理: 慢性間質性肺炎の病理. *呼吸*, 17(2): 183-187, 1998.
- 5) Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, and Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinase-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung disease. *Lab Invest* 78(6): 687-698, 1998.
- 6) Mahlapu M, Enerback S and Carlsson P. Haploinsufficiency of the forkhead gene Foxf1, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations. *Development* 128, 2397-2406, 2001.
- 7) Lim L, Kalinichenko VV, Whitsett JA, Costa RH. Fusion of lung lobes and vessels in mouse embryos heterozygous for the forkhead box f1 targeted allele. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 282(5): L1012-22, 2002.
- 8) Kalinichenko VV, Zhou Y, Shin B, Stolz DB, Watkins SC, Whitsett JA, Costa RH. Wild-type levels of the mouse Forkhead Box f1 gene are essential for lung repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 282(6): L1253-65, 2002.
- 9) Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet*. 21(1): 138-41, 1999.
- 10) Chelly N, Mouhieddine-Gueddiche OB, Barlier-Mur AM, Chailley-Heu B, Bourbon JR. Keratinocyte growth factor enhances maturation of fetal rat lung type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 20(3): 423-32, 1999.
- 11) Lebeche D, Malpel S, Cardoso WV. Fibroblast growth factor interactions in the developing lung. *Mech Dev*. 86(1-2): 125-36, 1999.
- 12) Weaver M, Dunn NR, Hogan BL. Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development*. 127(12): 2695-704, 2000.
- 13) Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2; 277(3): 643-9, 2000.
- 14) Yano T, Mason RJ, Pan T, Deterding RR, Nielsen LD, Shannon JM. KGF regulates pulmonary epithelial proliferation and surfactant protein gene expression in adult rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279(6): L1146-58, 2000.
- 15) Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nature Genetics*. 1999, 138-41.

UIP ならびに NSIP における血管構築改変と VEGF の発現

武村 民子^{1*} 日向 奈恵¹ 生島壮一郎² 安藤 常浩²
折津 愈² 金 恩京³ 川並 汪一³

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ために UIP 25 例と NSIP 9 例の von Willbrand factor (vWf), thrombomodulin (TM) の発現を免疫組織化学的に、また VEGF, KDR mRNA の発現を凍結標本の microdissection による RT-PCR 法で検討した。UIP 蜂巢肺では血管の絶対数は減少し、vWf 陽性血管が主体であり、NSIP では TM 陽性血管が主体であった。肺胞腔内線維化では vWf, TM 両者に陽性の血管がみられ、共焦点レーザー顕微鏡では UIP 蜂巢肺の血管内腔の狭小化、NSIP では vWf, TM 両者に陽性血管のモザイクパターンがみられた。そして線維化の進行とともに vWf 陽性血管の相対的増加と TM 陽性血管の著明な減少がみられた。VEGF_{165,189}, KDR の mRNA の発現は UIP, NSIP において正常肺よりも有意に低値を示した ($p < 0.01$)。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形質に変化すること、ならびに病変部において VEGF, KDR 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。

Microvascular alterations and expression of vascular endothelial growth factor in idiopathic interstitial pneumonias

Tamiko Takemura¹, Nae Hinata¹, Souichiro Ikushima², Tsunehiro Ando²
Masaru Oritsu², Enjing Jin³, and Oichi Kawanami³

¹Department of Pathology, Japanese Red Cross Medical Center

²Department of Respiratory Medicine, Japanese Red Cross Medical Center

³Department of Molecular Pathology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School

To evaluate the alterations of microvasculature and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) of idiopathic interstitial pneumonias, we examined the expression of thrombomodulin (TM) and von Willbrand factor (vWf) of the endothelium of the microvessels in 25 cases of usual interstitial pneumonia (UIP) and 9 cases of nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) by the use of immunohistochemistry, and expression of mRNA of VEGF and its receptors by RT-PCR. In the honeycomb lesion of UIP, the number of blood vessels reduced with predominant vWf-positive ones, whereas TM-positive blood vessels were predominantly observed in the alveolar walls and mural incorporation in NSIP. Both vWf and TM-positive capillaries were observed in intraalveolar fibrosis. Confocal laser microscopy revealed narrow and tortuous blood vessels in the honeycomb lesion, while dilated blood vessels revealed mosaic-like pattern positive to vWf and TM in NSIP. In proportion as increasing fibrosis score, vWf-positive blood vessels relatively increased and TM-positive ones prominently decreased.

The expression of mRNA of VEGF_{165,189}, and KDR was significantly reduced compared with those of normal lung ($p < 0.01$).

These results suggest that the phenotype of endothelium of microvasculature in the remodeled area in UIP and NSIP changed to that of bronchiolar level, and bronchial arterial system may extend and replace the pulmonary vasculature. These alterations of phenotype of vasculature and decreased expression of VEGF proposed an important information for microenvironment in the remodeling of the lung, considering therapy for UIP/IPF.

はじめに

特発性間質性肺炎における血管の変化に関しては、線維化に伴う血管の減少¹⁾、特発性肺線維症 (IPF) における血管のリモデリング²⁾や、BALF 中の VEGF の低下が報告されている^{3,4)}。間質性肺炎における線維化の進行と肺胞構築の改変に伴って、病変局所の血管の形質がどのように変化しているのか、また、血管の維持、新生に関与する VEGF とそのレセプターの発現に関しては、いまだ十分に検討されていない。今回、通常型間質性肺炎 (UIP) ならびに非特異的間質性肺炎 (NSIP) における血管変化を明かにし、特発性間質性肺炎の治療に際しての病変部の血管の病態を明らかにすることを目的として検討した。

対象と方法

対象症例は病理学的に診断された UIP 25 例 (男性 22 例, 女性 3 例, 平均年齢 63±9 歳, 喫煙指数 1,254±963), NSIP 9 例 (group 2 が 7 例, group 3 が 2 例), 男女比 6:3, 平均年齢は 64±10 歳, 喫煙指数 1,486±953), 対照肺は 10 例で男性 6 例, 女性 4 例, 平均年齢 65±10 歳, 喫煙指数 1,000±910 である。

免疫組織化学的にはパラフィン切片を用いて vonWillbrand factor (vWf) (1:100, DAKO), thrombomodulin (TM) (1:100, DAKO), vascular endothelial growth factor (VEGF) (A-20, 1:100) (Santa Cruz), VEGF-2 receptor (KDR) (A-3, 1:100) (Santa Cruz) の発現を検討した。

また UIP 6 例と NSIP 5 例の凍結切片を用いて、vWF, TM の二重染色を、標識二次抗体として Texas Red antimouse IgG (1:100), Fluorescein anti-rabbit IgG (1:100) を用いて、各発現血管を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

病変部細血管の微細構造変化については UIP 蜂巢肺 5 例, 線維芽細胞巣 5 例, NSIP 5 例について電子顕微鏡的に観察した。

正常肺ならびに病変部の単位面積あたりの vWf,

TM 陽性血管数と Aschcroft による線維化スコア⁵⁾を用いて、病変部における各陽性血管数と線維化との関連性を検討した。

VEGF ならびに VEGF receptor-1/Flt-1, VEGF receptor-2/KDR の mRNA の発現について、UIP 6 例と NSIP 5 例の凍結切片から microdissection 法によ

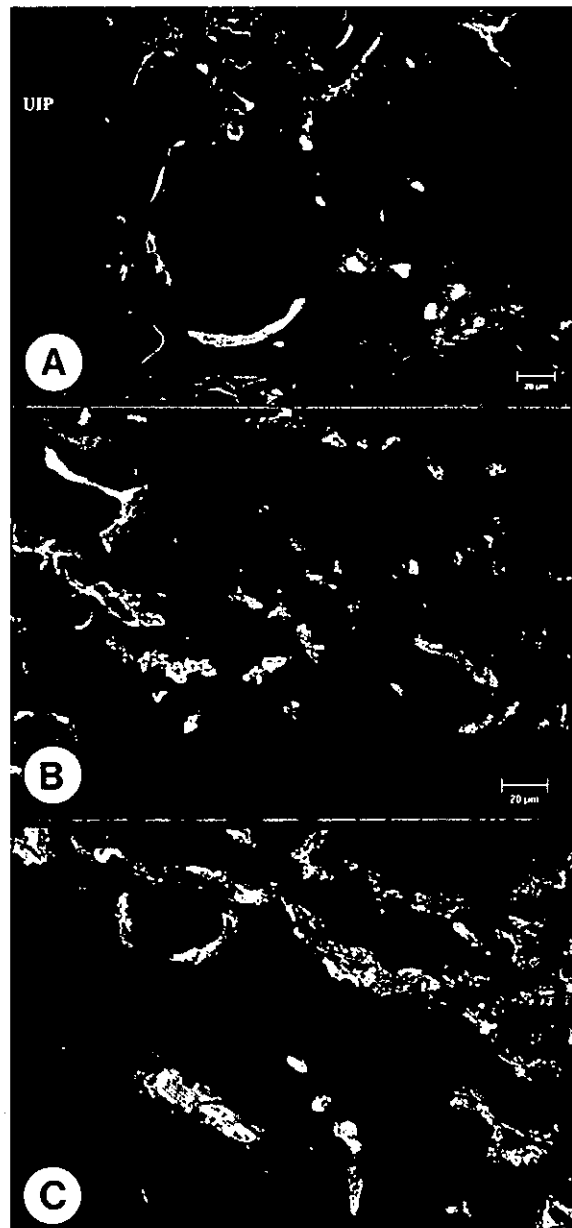


Fig. 1 Double staining for von Willbrand factor and thrombomodulin in UIP and NSIP under the confocal laser microscopy. A. Clubbed, distorted blood vessels expressing vWf in the area of honeycomb lesion of UIP. B. Dilated blood vessels in the alveolar walls expressing vWf and TM in mosaic pattern in NSIP group 2. C. Predominant vWf-positive capillaries with sparse TM-positive ones in intraluminal fibrosis in NSIP. von Willbrand factor (vWf) was demonstrated by fluorescein isothianate and thrombomodulin (TM) by Texas Red.

1 日本赤十字社医療センター病理部

2 同呼吸器内科

3 日本医大老人病研究所 病理部門

* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

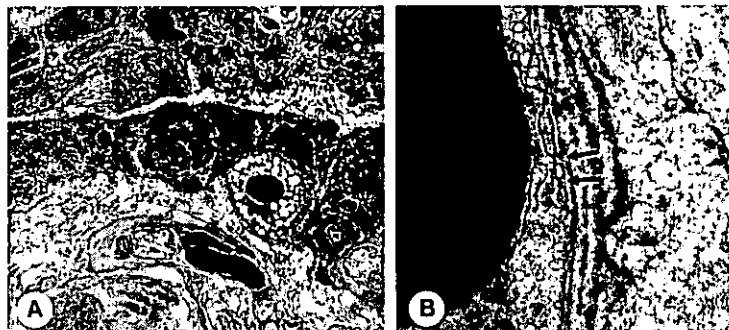


Fig. 2 Electron microscopic features in the honeycomb lesion
 A. A honeycomb lesion showing bronchiolar epithelial lining.
 B. Fenestration (arrows) of endothelium of small blood vessel in the subepithelial region.



Fig. 3 Mural incorporation of NSIP showing proliferation of fibroblasts and myofibroblasts paralleling the alveolar wall.

て、再生上皮を含む肺胞壁を採取し、正常肺胞壁 5 例を対照として RT-PCR 法で測定した。内部コントロールとして glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた⁶⁾。

結 果

1) UIP, NSIP における 血管内皮細胞の形質変化

正常肺では vWf は肺胞毛細血管内皮に発現せず、肺動脈、気管支動脈、小葉間静脈内皮に発現し、TM は選択的に肺胞壁毛細血管内皮に陽性になる。UIP の蜂巢肺間質では大部分の細血管内皮は vWf 陽性であり、TM 陽性内皮はきわめて少いか、弱い陽性像を示すのみであった。線維芽細胞巣では内腔に面しては血管は存在しないが、周囲から vWf 陽性血管が伸びていた。いっぽう、NSIP group 2 では大部分の肺胞壁や mural incorporation の部分では TM 陽性血管が主体であるが、肺胞腔内線維化にみられる毛細血管は vWf, TM いずれにも陽性であるか、あるいは vWf 陽性であった。

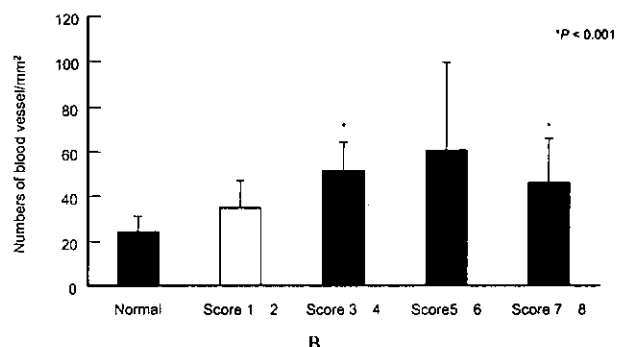
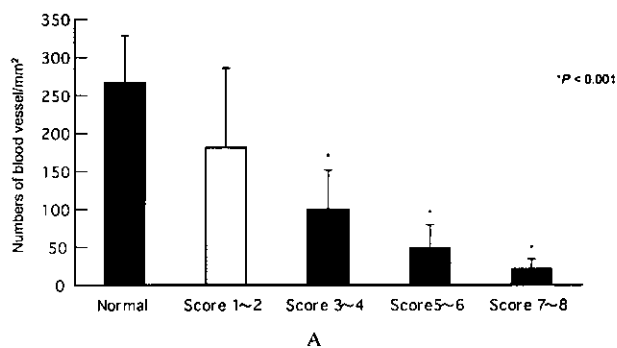


Fig. 4. Thrombomodulin and von Willbrand factor-expressing blood vessels in correlation with fibrosis score
 A. TM-expressing blood vessels reduced in numbers associated with fibrosis.
 B. vWf-positive blood vessels relatively increased associated with fibrosis.

2) 共焦点レーザー顕微鏡による vWf, TM の発現血管

UIP の蜂巢肺部では著明な血管の減少があり、ほとんどが vWf 陽性血管で占められ、その形態は棍棒状で内腔の狭小化、蛇行が目立つ。しかし、NSIP group 2 では拡張した TM 陽性血管と vWf 陽性血管がしばしばモザイクパターンを呈し、肺胞腔内線維化では vWf と TM 両者に陽性の血管が伸びていた (図 1)。

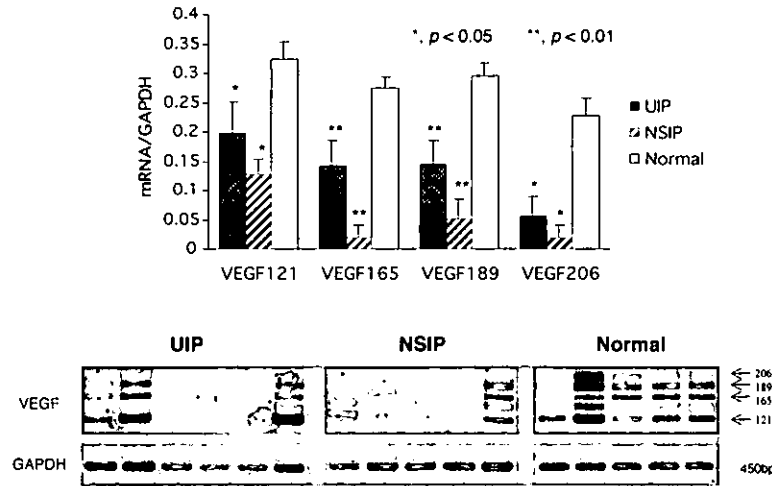


Fig. 5 Expression of VEGF isoforms mRNA in microdissected normal, UIP and NSIP lung tissue.

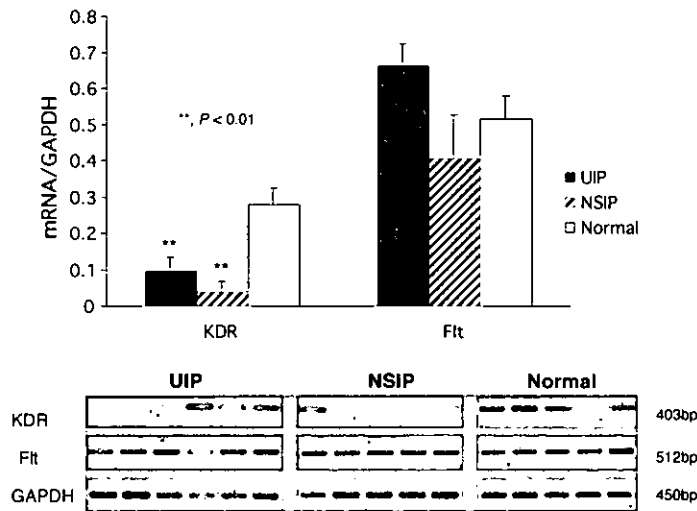


Fig. 6 Expression of mRNA for VEGF receptors (KDR and Flt-1) in microdissected normal, UIP and NSIP lung tissue.

3) 病変部血管の電子顕微鏡像

蜂巣肺の部分では UIP 5 例中 1 例に内皮細胞の fenestration が観察され (図 2), また, 全例に病変部毛細血管には基底膜の多層化や疎開像が認められた。

UIP の線維芽細胞巣では最表層に一層の扁平な再生上皮が被覆し, それに平行に線維芽細胞, 筋線維芽細胞が層状に配列し, このなかには血管は認められなかった。NSIP の壁取り込み型線維化 mural incorporation では既存の毛細血管の基底膜は肥厚し, 本来の肺胞上皮の基底膜の断裂が認められた。また増殖する線維層は線維芽細胞や筋線維芽細胞の増殖からなり, その中に血管の進展は認められなかった (図 3)。

4) TM, vWf 発現血管の数と線維化の相関

線維化の進行とともに血管の絶対数は減少し, とくに TM 陽性血管は線維化スコア 3 以上では正常肺に

比較して明らかな有意差をもって減少し ($p < 0.001$), いっぽう, vWf 陽性血管は線維化の進行とともに相対的な増加がみられた (図 4A, B)。

5) VEGF, KDR, Flt-1 mRNA の発現

正常肺では免疫組織学的に気管支・細気管支上皮, 肺胞上皮, 肺胞マクロファージに VEGF が発現し, 血管内皮細胞に KDR が発現する。UIP ならびに NSIP では VEGF, KDR は UIP の立方状や扁平な再生上皮, 平滑筋, 筋線維芽細胞に陽性であった。

microdissection 法による上皮ならびに間質を含めた病変部組織からの VEGF 各 isoform の mRNA の発現は, 正常肺に比較して, UIP, NSIP においてはすべて低下し, とくに VEGF_{165,189} mRNA は著明な低下を示した ($p < 0.01$)。さらに NSIP においては UIP よりも VEGF mRNA の発現は低かった。Flt-1 の発現

は正常肺とのあいだに有意差はなかったが、KDRのmRNAの発現はNSIP, UIPともに正常肺よりも著明な低下を示した ($p < 0.01$) (図5, 6).

考察・結論

正常肺においては血管内皮細胞の形質には heterogeneity があることがわかっている⁷⁾。すなわち、正常肺胞毛細血管内皮はTMを発現するが、肺静脈や気管支動脈内皮はvWfを発現する。今回UIPとNSIPの検討から、肺胞構築改変と線維化に伴って、TM陽性血管の減少とvWf陽性血管の相対的増加があり、線維化の進行過程においてはTMとvWfが混在して出現する部位がみられることがわかった。蜂巢肺の上皮下血管内皮細胞のfenestrationは細気管支粘膜の血管でみられるものであり、UIPにおける再生上皮が細気管支上皮の形質発現を示すとともに⁸⁾、血管内皮の形質もまた、細気管支領域の血管形質に変化することが考えられる。そして、この血管構築の改変には気管支動脈系、肺静脈系が肺動脈系と吻合しながら、置換していく可能性が示唆された。

正常肺ではVEGFは気管支上皮、II型肺胞上皮、肺胞マクロファージに発現し、KDRは血管内皮細胞に発現する⁹⁾。今回の検討では再生上皮、扁平上皮化生細胞、平滑筋細胞などにVEGFの発現をみたが、microdissectionによるRT-PCR法ではUIP, NSIP病変部におけるVEGF各isoformならびにKDR mRNAの発現の低下が顕著であった。このことは間質性肺炎の線維化の進行に伴う血管数の減少とも関連する。肺の線維化によるVEGF、およびそのレセプターの低下には上皮のアポトーシスの関与が考えられている¹⁰⁾。なお、NSIPにおけるVEGF mRNAの発現がUIPよりも低かったことについては、VEGFが炎症の活動期に種々のプロテアーゼによって分解される可能性が考えられる¹¹⁾。

肺におけるVEGFの役割には血管新生のみならず、肺胞構築を維持する働きがあるとされる。今回の検討から、肺の線維化と構築改変に伴って血管内皮細胞の形質が細気管支領域の血管の形質に変化すること、ならびに病変部における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している。

文 献

- 1) Renzoni EA, Walsh DA, Salmon M, Wells AU, Sestini P, Nicholson AG, Veeraraghavan S, Bishop AE, Romanska HM, Pantelidis P, Black CM, du Bois RM. Interstitial vascularity in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 438-443.
- 2) Ebina M, Shimizukawa M, Shibata N, Kimura Y, Suzuki T, Endo M, Sasano H, Kondo T, Nukiwa T. Heterogeneous increase of CD 34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 (on line).
- 3) Meyer KC, Cardoni A, Xiang Z-Z. Vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage from normal subjects and patients with diffuse parenchymal lung disease. *J Lab Clin Med* 2000; 135: 332-338.
- 4) Koyama S, Sato E, Haniuda M, Numanami H, Nagai S, Izumi T. Decreased level of vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage fluid of normal smokers and patients with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 382-385.
- 5) Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988; 41: 467-470.
- 6) Jin E, Ghazidadeh M, Fujiwara M, Nagashima M, Shimizu H, Ohaki Y, Arai S, Gomibuchi M, Takemura T, Kawanami O. Angiogenesis and phenotypic alteration of alveolar capillary and endothelium in areas of neoplastic cell spread in primary lung adenocarcinoma. *Pathol Intern* 2001; 51: 691-700.
- 7) Kawanami O, Jin E, Ghazidadeh M, Fujiwara M, Jiang Li, Ohaki Y, Gomibuchi M, Takemura T. Mosaic-like distribution of endothelial cell antigens in capillaries and juxta-alveolar microvessels in the normal human lung. *Pathol Intern* 2000; 50: 136-141.
- 8) Hinata N, Takemura T, Ikushima S, Yanagawa T, Ando T, Okada J, Oritsu M, Koike M. Phenotype of regenerative epithelium in idiopathic interstitial

- pneumonias. *J Med Dent Sciences* 2003; 50: 213-224.
- 9) Lappi-Blanco E, Soini Y, Kinnula V, Paakko P. VEGF and bFGF are highly expressed in intraluminal fibromyxoid lesions in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *J Pathol* 2002; 196: 220-227.
- 10) Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106: 1311-1319.
- 11) Lauer G, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Sturzebecher J, Mann K, Krieg T, Eming SA. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 12-18.

D P B

D

P

B

Propionibacterium acnes 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

江石 義信^{1*} 南 順子¹ 石下 由紀¹ 小林 寅吉²
石下 郁夫¹ 小林 大輔¹ 安藤 登¹ 内田 圭介¹
池田 聡¹ 反町 典子³ 烏山 一³ 武村 民子^{4**}
滝澤登一郎¹ 小池 盛雄¹

サルコイドーシスの原因は不明である。*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。C57BL/6 雌マウスに *P. acnes* trigger factor 蛋白の断片であるリコンビナント蛋白 (RP35) を完全 Freund adjuvant とともに反復皮下免疫した。この感作免疫処置に先行して、*P. acnes* を経静脈的に前投与する群と前投与しない群とで実験を行った。対照群としては、*P. acnes* (加熱死菌) および 2 種類の蛋白抗原 (OVA と GST) を RP35 の代わりに感作抗原として用いた。*P. acnes* の前投与の有無にかかわらず、RP35 または *P. acnes* を感作免疫したマウス群の一部で肺肉芽腫が認められた。対照として用いた 2 種類の蛋白抗原の同様な感作免疫で肉芽腫性病変は認められなかった。*P. acnes* の前投与の有無にかかわらず、RP35 および *P. acnes* いずれの感作抗原を用いた場合でも肺肉芽腫の検出頻度 (25~57%) には有意差を認めなかった。これらの感作抗原に対する膝下リンパ節細胞の免疫反応性や血中抗体価は、肺肉芽腫を認めたマウス群と認めなかったマウス群、いずれにおいても上昇しており両群に差は認めなかった。24 匹の無処置マウスで *P. acnes* の定量培養を試みたところ 8 匹 (33%) の肺組織から本菌が培養可能であった。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の肉芽腫性病変を誘導しうる事が判明した。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 (平成 14 年度班研究報告内容) 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。宿主の本菌に対する過敏性免疫反応が素因となりサルコイドーシスが発症しているのであれば、本実験系をサルコイドーシスの実験モデルとみなすことができる。細胞内細菌に有効な抗生剤による除菌処置が、本実験モデルにおける肺肉芽腫の形成を防止できる可能性がある。

**Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a
recombinant trigger-factor protein of
*Propionibacterium acnes***

Yoshinobu Eishi¹, Junko Minami¹, Yuki Ishige¹, Intetsu Kobayashi², Ikuo Ishige¹
Daisuke Kobayashi¹, Noboru Ando¹, Keisuke Uchida¹, Satoshi Ikeda¹
Noriko Sorimachi³, Hajime Karasuyama³, Tamiko Takemura⁴
Touichiro Takizawa¹, and Morio Koike¹

¹Department of Human Pathology, Tokyo Medical and Dental University

²Division of Chemotherapy, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratory

³Department of Immune Regulation, Tokyo Medical and Dental University

⁴Department of Pathology, Japanese Red Cross Medical Center

Etiology of sarcoidosis remains unknown. A trigger factor from *Propionibacterium acnes* causes a cellular immune response in some sarcoid patients but not in nonsarcoid subjects. We examined whether experimentally induced hypersensitivity to the trigger factor gives rise to granulomas. Female C57BL/6 mice primed intravenously with *P. acnes* or not were sensitized with recombinant-protein RP35, a fragment of *P. acnes* trigger factor, and complete Freund's adjuvant. In controls, RP35 was replaced with *P. acnes* or one of two control proteins. In primed and unprimed mice, pulmonary granulomas were found in some of the mice sensitized with RP35 or *P. acnes* but in no control-protein-sensitized mice. Detection of pulmonary granulomas (25-57%) did not differ significantly between mice sensitized with RP35 or *P. acnes*, primed or not. No difference in popliteal lymph-node-cell reactivity and serum antibodies to these two antigens was found between mice with and without pulmonary granulomas. *P. acnes* was cultured from the lungs of 8 (33%) of 24 untreated mice. The recombinant trigger-factor protein of *P. acnes* caused pulmonary granulomas in primed and unprimed mice sensitized with the protein and adjuvant. The mechanism of granuloma formation with only sensitization with RP35 or *P. acnes* without challenge is not known, but this experimental protocol may give a useful model of sarcoidosis, because sarcoid granulomas seem to form during hypersensitivity to antigens of *P. acnes* indigenous to the affected organ. Eradication of *P. acnes* by antibiotics might protect mice from granuloma formation caused by this experimental procedure.

¹ 東京医科歯科大学大学院病因・病理学分野

² 三菱化学 BCL 臨床微生物

³ 東京医科歯科大学大学院感染分子制御学分野

⁴ 日赤医療センター病理

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

** びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

はじめに

サルコイドーシス (サ症) は原因不明の全身性肉芽腫疾患であり、疾患感受性のある宿主が環境中の何らかの抗原物質に暴露されて誘導される過敏性免疫反応に起因すると推測されている¹⁾。これまで培養および定量的 PCR 法により病変部リンパ節から高率かつ多量の *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) が検出され^{2,3,4)}、In situ hybridization 法においても本菌 DNA がサ症病変部の肉芽腫内に集積している⁵⁾ことが解っており *P. acnes* とサ症との関係が強く示唆されている。

また、本疾患は Kveim テストが示すように宿主側の疾患感受性も非常に重要である⁶⁾。宿主側の反応として、*P. acnes* ゲノムライブラリースクリーニングをサ症患者血清にて免疫スクリーニング^{*} することにより得られた蛋白 (RP35) に対して一部のサ症患者が免疫反応性を示し他疾患では示さないという特異的な反応を示すことも確認されている。RP35 蛋白はその後の遺伝子解析の結果から *P. acnes* trigger factor である事が明らかにされている⁷⁾。

そこで、我々はこの trigger factor 蛋白をもちいて、実験的にマウスに過敏性反応を引き起こすことにより、肉芽腫性病変が誘導しうるか否かを検討することにより、サ症肉芽腫形成における *P. acnes* の病因的関与や、*P. acnes* trigger factor 蛋白の責任抗原物質としての可能性につき検証した。

材料と方法

RP35 リコンビナント蛋白の調製

サ症患者血清を用いた *P. acnes* ゲノムライブラリースクリーニング^{*} にて陽性となったプラークから抽出した挿入遺伝子断片を蛋白発現ベクターである pGEX-6P-1 プラスミドベクターにサブクローニングし、*Escherichia coli* JM109 cells をトランスフォームした後、培養し GST 融合蛋白として発現させ、GST アフェニティーカラムを用いて精製した。その後 PreScission Protease を使用して GST を切断し RP35 リコンビナント蛋白を作製した。

P. acnes 抗原の調製

使用した *P. acnes* はサ症患者の皮膚病変部より本研究室にて分離培養された患者分離株を使用した。(本

株は 16S rRNA の PCR と細菌同定法により type strain と違いがないことが確認されている。) 菌は GAM ブイオンにて 37°C で培養し十分培養した後 60°C で 30 分加熱し死菌とした。その後破砕機にて 25 分間破碎し PBS に溶解しマウスの免疫に使用した。また、可溶性抗原は 550,000 g にて超遠心して上清を回収し、単核球幼弱化反応と抗体価測定に使用した。

P. acnes 誘導による肺肉芽腫の形成

実験には C57BL/6 雌 5~6 週齢 SPF マウスを使用した。実験群 1 として *P. acnes* 死菌を 1 匹あたり 1 mg 静脈内投与し、1 週間後に RP35 (50 μg/head) 抗原を CFA とともに足裏に感作免疫しその後感作免疫に使用した抗原のみを 1 週間間隔で同様に免疫した。静脈内投与後 2, 3, 4 週の時点で最終免疫の 3 日後に屠殺した。実験群 2 では静脈内投与を行わず RP35 (50 μg/head) を CFA とともに免疫後 1, 2, 3, 4 週の時点で最終免疫の 3 日後に屠殺した (Figure 1)。

両群ともコントロール実験として RP35 の代わりに *P. acnes* (1 mg/head), ovalbumin (OVA) (50 μg/head), glutathion S-transferase (GST) (50 μg/head) を使用したものを設けた。

組織学的検討

麻酔し眼球採血を行い頸椎脱臼により屠殺した。全身臓器を摘出し、24 時間 10% 緩衝ホルマリン固定後包埋、薄切し、HE 染色を行った。薄切は 50 μm 間隔で 4 μm の切片を 3 枚薄切し染色した。これら 3 枚ともに肉芽腫が認められたとき肉芽腫形成ありと判定した。

血清中の抗体価アッセイ

各実験群マウス 3 週群において血清中の *P. acnes* および RP35 に対する IgG, IgM, IgA 抗体価を蛍光イムノアッセイにより測定した。

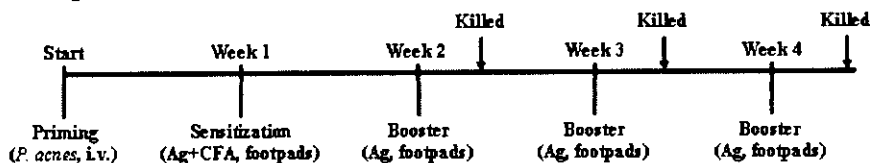
単核球幼弱化反応の検討

解剖時に膝下部リンパ節よりリンパ球を採取し、*P. acnes* と RP35 蛋白を抗原として加えて培養した。培養 3 日目にサイミジントリチウムを添加し 24 時間後細胞の放射性活性を測定することにより細胞増殖を調べた。抗原添加群の平均値を抗原未添加群の平均値で除した値を stimulation index (SI) として求めた。

組織よりの *P. acnes* 分離

正常 C57BL/6 雌マウス 6 週齢マウスと 12 週齢マウスから無菌的操作にて肺、肝臓、リンパ節を摘出し、臓器重量の 4 倍量 GAM ブイオン中ですりつぶし、

A. First experiment



B. Second experiment

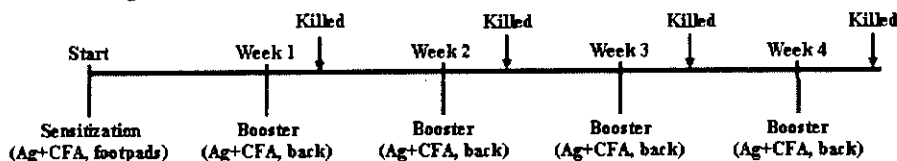


Figure 1 Immunization protocols. Priming was done by a single intravenous injection of heat-killed *P. acnes*. Sensitization was done by subcutaneous injections of one of the antigens (Ag): RP35, *P. acnes*, ovalbumin, or GST, emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA), into the hind footpads. Boosters were subcutaneous injections of the same antigen in PBS into the hind footpads in the first experiment (A), and subcutaneous injections of the antigen emulsified with CFA into the animal's back in the second experiment (B). Mice were killed three days after the last booster as shown by the arrows.

GAM ブイヨンにて 5 日間培養後、コロニーの数を算定した。コロニーよりグラム染色後 VITEK system により菌を同定した。

結 果

抗原誘導による肺肉芽腫の形成

肺において、静注による priming をした群では *P. acnes*, RP35 を感作免疫した群においてそれぞれ 25% ~30% また 33% ~57% に肉芽腫形成が認められた。また、priming を行わない群においても *P. acnes*, RP35 を感作免疫した群はそれぞれ 25% ~38% また 25%

~50% に肉芽腫形成が認められた。これら両群間において肉芽腫形成率に有意な差はなかった。また priming の有無に関わらず、OVA や GST を感作した群においては肉芽腫の形成は認められなかった (Table 1)。

組織学的検討

肉芽腫の形態における各群の差は認められなかった。肉芽腫の分布は肺の実質および胸膜下に散在性に認められ、特に胸膜下には多くの肉芽腫が認められた (Figure 2A)。拡大像では好酸性の豊かな細胞質を有する類上皮細胞とリンパ球が混在した肉芽腫性炎症が認められた (Figure 2B)。未熟な肉芽腫巣が時

Table 1 Detection frequency of pulmonary granulomas in primed and unprimed mice sensitized with various antigens

Priming	Sensitization		Numbers (%) with pulmonary granulomas of mice/total at:			
	Sensitizer	Booster	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Done	None	None	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Done	RP35 + CFA	RP35	N.E.*	4/12 (33) ^a	13/23 (57) ^b	6/12 (50) ^c
Done	<i>P. acnes</i> + CFA	<i>P. acnes</i>	N.E.	3/12 (25) ^a	4/15 (27) ^b	3/10 (33) ^c
Done	OVA + CFA	OVA	N.E.	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Done	GST + CFA	GST	N.E.	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Not done	RP35 + CFA	RP35 + CAF	0/8 (0)	2/8 (25)	8/16 (50) ^d	10/20 (50) ^e
Not done	<i>P. acnes</i> + CFA	<i>P. acnes</i> + CFA	0/8 (0)	2/8 (25)	6/16 (38) ^d	3/12 (25) ^e
Not done	OVA + CFA	OVA + CFA	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Not done	GST + CFA	GST +CFA	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)

Priming was by a single intravenous injection of *P. acnes*. Sensitizing and booster doses were injected at weekly intervals.

* Not examined.

^ap = 0.65, ^bp = 0.070, ^cp = 0.34, ^dp = 0.48, ^ep = 0.16, chi-square test of proportions with Yates' correction, pairwise.

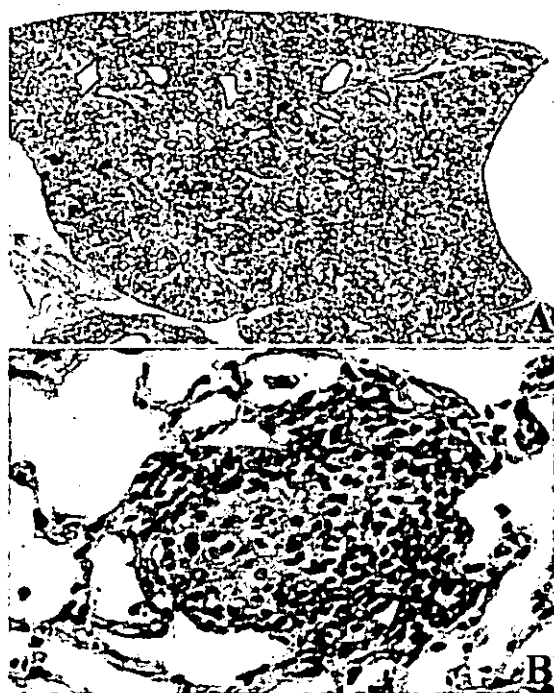


Figure 2 Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a recombinant trigger-factor protein, RP35, of *P. acnes*. Female C57BL/6 mice were sensitized by subcutaneous injections of 50 µg of RP35 emulsified with complete Freund's adjuvant weekly for 3 weeks, and examined 3 days after the last sensitization. Note the many granulomas scattered throughout the lung (A, original magnification, (22)) and a granuloma with many lymphocytes around a core of epithelioid cells with rich eosinophilic cytoplasm (B, (600)).

に胞隔炎を伴って認められ、リンパ球浸潤の少ない成熟した肉芽腫も認められた。血管壁の肉芽腫もときに認められ、血管周囲の肉芽腫はしばしば認められた。組織からの *P. acnes* 菌体培養

24匹中8匹(33%)で肺から組織1gあたり100~800 cfuの菌が培養された。このうち、肝、肺、リンパ節の3臓器より検出される例が1例、肺、肝の2臓器より検出される例が1例あった (Table 2)。

単核球幼若化反応と抗体価測定

同一の免疫プロトコールで感作されたマウス群に

において肺肉芽腫の形成があったものとなかったもの2群にわけて単核球幼若化反応と抗体価を比較した。その結果 RP35, *P. acnes* 感作群では priming の有無に関係なくその有意差を認めなかった (Table 3)。

考 察

今回の研究により *P. acnes* trigger factor (RP35) の免疫感作のみにより実験的肺肉芽腫の形成と維持が可能であることが実証できた。

現在までにラットやウサギにおいて本菌によるいくつかのサ症肉芽腫モデルが提唱されてきたが、いずれも、菌の感作を行った後に菌を静注し、肉芽腫の形成に至っている⁸⁾⁹⁾。今回の実験モデルはサ症の病態を考慮するとそれに代わる新たなサ症実験モデルと考えられる。その理由として、第一にサ症患者において既に *P. acnes* trigger factor に対する過敏性免疫反応が認められていること、第二に、発症時においてさえ無症候状態で過ごすこともあるサ症患者において、*P. acnes* が末梢血中で増菌するような敗血症状態が発症をトリガーしているとは考えづらいこと、第三に今回の方法では免疫感作のみでも肉芽腫形成を誘導することが可能であったという点である。

蛋白抗原を CFA アジュバントとともに感作免疫することにより誘導される疾患モデルは、通称 experimental organ-specific allergic disease と呼ばれ、有名なものでは、多発性硬化症の実験モデルとして知られる実験的アレルギー性脳炎 (EAE)¹⁰⁾、橋本病の実験モデルとして知られる実験的アレルギー性甲状腺炎 (EAT)¹¹⁾、リウマチ関節炎の実験モデルとして知られるアジュバント誘発性関節炎 (AIA)¹²⁾ などがある。同様に、*P. acnes* trigger factor を CFA アジュバントとともに免疫することにより引き起こされる肺肉芽腫症は、サルコイドーシスの実験モデルとして同様な観

Table 2 Results of *P. acnes* culture from lungs, livers, and mesenteric lymph nodes of normal untreated mice

Organ	Number(%) of successes in culture [cfu/g] with normal mice		
	6 weeks old (n = 12)	12 weeks old (n = 12)	Total (n = 24)
Lung	4 (33) [500 ^a , 300, 800, 100 ^b]	4 (33) [100, 100, 100, 100]	8 (33) ^{*†}
Liver	2 (17) [100 ^a , 100 ^b]	0 (0)	2 (8) [*]
Lymph node	1 (8) [100 ^a]	0 (0)	1 (4) [†]

^{a,b} Organs with the same superscripts were taken from the same mice. ^{*}p = 0.033 and [†]p = 0.0096, chi-square test of proportions with Yates' correction, pairwise.