

Microdissection と real time PCR 法を用いた間質性肺炎肺組織における Foxf1, FGF-10, FGF-R, MMP-1, 7 の発現についての検討

中山 智子 福田 悠*

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因子を転写の target とする Foxf1, 上皮増殖因子である FGF-10 とその受容体, 更に線維化の吸収に関与する MMP1,7 の線維化病変における発現を, Real time PCR により, UIP と COP 肺組織において検討した。また, Foxf1 のペプチド抗体を作成し, 組織での局在を確認した。

Real time PCR で Foxf1 は, 有意差をもって UIP で低く, COP で高い発現を示した。他の解析因子に有意差はみられなかったが, FGF-10 は UIP で低発現の傾向であり, FGF-R は, UIP で高発現の傾向であった。MMP-1 はほぼ差異が見られなかったが, MMP-7 は UIP で高発現の傾向であった。

免疫組織化学では早期線維化巣の線維芽細胞に陽性であり, UIP に比較し, COP での陽性像を強く認めた。これらの結果より, 間質性肺炎の線維化の吸収, 修復機序に Foxf1 が関与していることが示唆された。

Expression of Foxf1, FGF-10, FGF-receptor, MMP-1 and MMP-7 in early fibroblastic lesions of interstitial pneumonia

Tomoko Nakayama, and Yuh Fukuda

Department of Analytic Human Pathology, Nippon Medical School

Foxf1 exists in the interstitial cells in lung tissue and has very important role for lung morphogenesis and development. Foxf1 has many transcriptional target genes, such as MMP-1, stromelysin, HGF, which are closely related to the pathogenesis of interstitial pneumonia. FGF-10 plays a key role in epithelial proliferation and alveolar bud formation of mouse embryo. MMP-1 is related to extracellular matrix absorption in fibrotic lesions. We investigated immunohistochemical analysis and real time PCR for Foxf1, FGF-10, FGF-receptor (FGF-R), MMP-1 and MMP-7 in microdissected early fibrotic lesions of UIP and COP lung tissues to confirm the relation between the alveolar regeneration and these factors.

Immunohistochemical analysis shows interstitial cells in the early intra-alveolar bud are positive for Foxf1 in COP, but are weakly positive in the fibroblastic foci of UIP. In real time PCR assay, Foxf1 shows significantly higher expression in COP than UIP ($p < 0.05$). There is no significant difference in other analysis factors. FGF-10 shows high tendency in COP and low tendency in UIP. FGF-R shows high tendency in UIP and low tendency in COP. MMP-7 shows high tendency in UIP and low tendency in COP. MMP-1 shows no distinct difference between UIP and COP. These results indicate that Foxf1 is involved in the extracellular matrix absorption and the mechanism of alveolar regeneration in fibrotic lesions of interstitial pneumonia.

はじめに

慢性進行性で予後が不良である通常型間質性肺炎 (Usual interstitial pneumonia: UIP) は、組織像の特徴に加え、線維化巣に出現する線維芽細胞や、細胞外基質吸収に関する Matrix metalloproteinase (MMP) とその阻害物質である Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP) のバランスが、特発性器質化肺炎 (Cryptogenic organizing pneumonia: COP) をはじめとする予後が良好なタイプとは異なることが示されている¹⁾²⁾。これまでの治療への試みとして行われた、抗炎症、抗サイトカイン療法では、疾患の進行を阻止することはできず、UIP に対して有効な治療法は現在ない。そこでわれわれは、線維化を吸収し、肺胞の再生、修復に働く因子に関して検討することが、治療への一つの手がかりとなるのではないかと考え、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 とする転写因子 Foxf1、および肺葉形成において、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上皮増殖因子 FGF-10 に着目して検討した。更に、関連した因子である MMP-1,7 についても検討を行った。

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、光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。Microdissection 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. 光顕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 Foxf1 ペプチド抗体を用いて行なった。

日本医科大学解析人体病理学

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

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。サンプルは RNA 抽出キット (QIAGEN 社 RNA easy 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 cDNA に変換し、Foxf1, FGF-10, FGF-R, MMP-1, MMP-7 の TaqMan probe を用いて 40 サイクルの Real time PCR を ABI RPM 7900 (Applied Biosystem 社製) にて行なった。サンプルは、上記の方法で micro dissection した早期線維化巣で Foxf1, FGF-10, MMP-1 を測定した。FGF-R, MMP-7 は線維化部周囲の上皮を検討した。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. 光顕および免疫組織化学 (Fig. 1)

Foxf1 は、早期線維化巣の線維芽細胞に陽性像を示した。COP では UIP に比較して強い染色性を示した。

FGF-10 は、早期線維化巣の線維芽細胞に陽性像を示したが、両者の染色性にはほとんど差異はなく、また全体的な陽性細胞も少数であった。FGF-R は UIP, COP において、再生上皮に強い陽性像を示した。(FGF-10, FGF-R に関しては昨年度の報告書に提示してあるため、割愛する。)

2. Real time PCR (Fig. 2)

Foxf1 の発現は UIP に比べ、COP において、有意に高値であった。

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 において、高発現の傾向を示し、

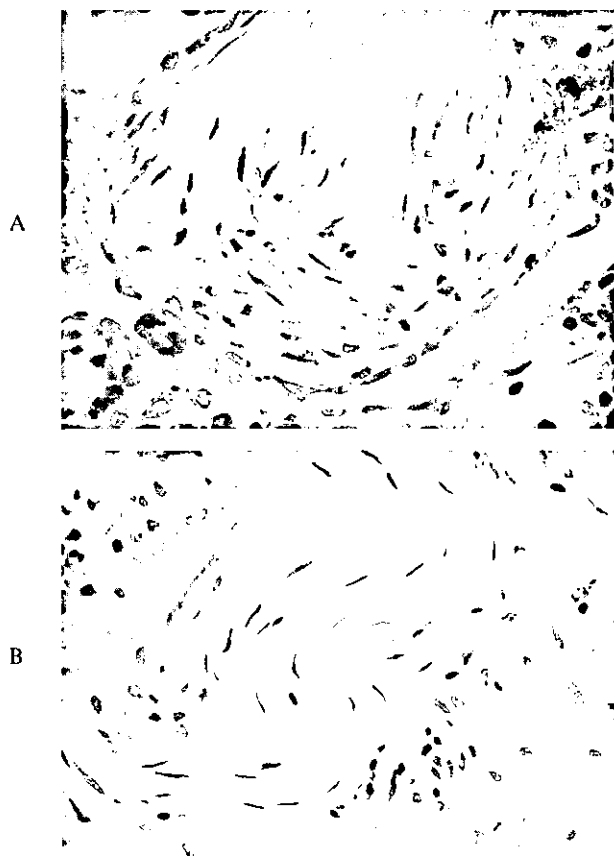


Fig. 1. Immunohistochemical findings of Foxf1 in UIP and COP
 A. Interstitial cells in an intra-alveolar bud are positive for Foxf1 in COP.
 B. Interstitial cells located in the area of fibroblastic focus are slightly positive for Foxf1 in UIP.

FGF-R では、UIP において、高発現の傾向を示した。FGF-10/FGF-R では、UIP で低発現の傾向を示し、UIP ではレセプターに対して、FGF-10 の発現が少ない傾向がみられた。

MMP-7 は UIP において、高発現の傾向を示した。MMP-1 にはほぼ差が認められなかった。

考 察

転写因子である Foxf1 は、マウス胎児肺における検討により、肺形成に重要な因子であることが示されている³⁾⁻⁵⁾。Foxf1 欠損マウスは、胎生中に肺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出生時の Foxf1 の発現が少ないものでは、肺葉形成不全、肺胞の成熟不全が認められ、6 週目までに肺出血を来し死亡する⁶⁾。また、出生時に WT と同様の Foxf1 発現量を見るヘテロマウスにおいても、BHT による肺障害実験では⁷⁾、WT が全例大きな障害を受けることなく

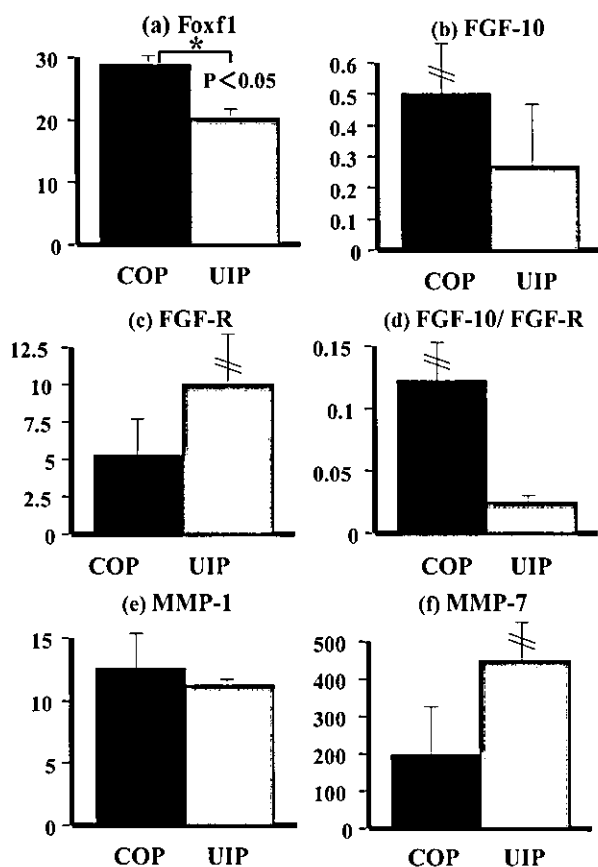


Fig. 2. Real time PCR assay for Foxf1, FGF-10, FGF-R, MMP-1, and MMP-7 in UIP and COP.
 (a) Foxf1 shows significantly higher expression in COP than UIP. ($p < 0.05$)
 (b) FGF-10 shows high tendency in COP and low tendency in UIP.
 (c) FGF-R shows high tendency in UIP and low tendency in COP.
 (d) The ratio of FGF-10 for FGF-R shows high tendency in COP and low tendency in UIP.
 (e) MMP-1 shows no distinct difference between UIP and COP.
 (f) MMP-7 shows high tendency in UIP and low tendency in COP.

生存するのに比較し、Foxf1 の経時的な減少を来し、day7 までに全例が死亡する。これらの実験系では、主として血管新生に関する、pecam-1, VE-cadherin, Flk-1 といった因子および上皮形成に関与する BMP-4 の m-RNA の発現量の減少を来すことが確認されている。

これらの因子はその promotor 領域と Foxf1 の DNA binding site との結合親和性が確認されており、Foxf1 がこれらを直接転写活性している可能性が考えられる。これらのことより、障害からの肺の再生、という面で Foxf1 が非常に重要な役割を担っていることが示唆される。今回の Real time PCR における UIP での Foxf1 の有意な低発現は、組織像で確認できるよ

うに線維化巣における血管新生不良を反映していることが示唆される。一方、Foxf1が転写因子としてtargetにする遺伝子としては、上皮細胞増殖に関連する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。UIPにおけるFoxf1の低発現は、上皮増生を傷害し、肺胞再生不良を反映している可能性が考えられる。また、線維化を吸収するMMPを制御するFoxf1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吸収が阻害され、線維化の増悪に関連することが予想される。

今回の検討で、有意差は認められなかったが、肺の形成において必須の増殖因子であるFGF-10、およびそのレセプターの検討では、UIPがレセプターの発現に比較してFGF-10の発現が低い傾向がみられた。FGF-10は、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⁾⁻¹²⁾。UIPでの結果は、線維化肺での上皮再生が不良であることへの関連が示唆される。

今回の肺の再生、という面での検討において、予後不良のUIPでは、再生に関与する因子の低発現が認められた。Target geneとの転写活性も含め検討することにより、線維化の吸収、肺胞の再生といった治療への応用への可能性が示唆される。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Mahlapuu M, Enerbäck 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.
- 4) Lim L, Kalinichenko VV, Whitsett JA, Costa RH. Fusion of lung lobes and vessels in mouse embryos heterozygous for the forkhead box fl targeted allele. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 282(5): 1012-1022, 2002.
- 5) Costa, RH, Kalinichenko VV, and Lim L. Transcription factors in mouse lung development and function. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 280: 823-838, 2001.
- 6) Kalinichenko, VV, Lim L, Beer-Stoltz D, Shin B, Rausa FM, Clark J, Whitsett JA, Watkins SC and Costa RH. Defects in pulmonary vasculature and perinatal lung hemorrhage in mice heterozygous null for the forkhead box fl transcription factor. Dev Biol. 235: 489-506, 2001.
- 7) Kalinichenko VV, Zhou Y, Shin B, Stolz DB, Watkins SC, Whitsett JA, Costa RH. Wild-type levels of the mouse Forkhead Box fl gene are essential for lung repair. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 282(6): 1253-1265, 2002.
- 8) 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): 138-141, 1999.
- 9) Lebeche D, Malpel S, Cardoso WV. Fibroblast growth factor interactions in the developing lung. Mech Dev. 86(1-2): 125-136, 1999.
- 10) Weaver M, Dunn NR, Hogan BL. Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. Development. 127(12): 2695-2704, 2000.
- 11) 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): 643-664, 2000.
- 12) 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): 1146-1158, 2000.

線維化肺における線維芽細胞の増殖に関わる 細胞周期制御因子の検討

千田 金吾* 水嶋 久乃 三輪 清一
榎本 紀之 須田 隆文

IPFの進展機序としては、上皮障害とそれに続く治癒過程の修復と再構築における異常から線維化を来すことが指摘されている。過去の報告では、線維化巣から採取した線維芽細胞の増殖能が高いことや、その遊走能が亢進していることが *in vitro* において示されているが、線維化肺における線維芽細胞そのものの生物学的動態に異常があるのか否かの結論は得られていない。

近年、癌抑制遺伝子である *RB* 遺伝子と *p53* 遺伝子がともに細胞周期制御に深く関与していることが判明し、細胞の癌化シグナルは最終的には *RB* 経路または *p53* 経路と呼ばれる経路に集約されると考えられている。IPFにおいても、細胞周期という点から考えると、線維芽細胞の細胞周期制御因子に異常をきたしている可能性が想定された。

1992年から2000年までに外科的肺生検を施行され、病理組織学的にIPF/UIPと診断された11症例(男性7例、女性4例、平均年齢62.8歳)を対象とし、外科的肺生検検体を用いてpRB、p27の免疫組織化学染色を行い、線維化肺の線維芽細胞における発現の程度を検討した。その結果、pRBは周辺組織(単核球や肺胞Mφ、肺胞上皮細胞)に比較して、発現量が低下している傾向を認めた。またp27では周辺組織と同程度に染色され、同部位におけるp27の発現には異常はみられなかった。これらの結果よりIPF/UIPの線維芽細胞では、pRBの異常が示唆され、線維化肺における線維芽細胞は何らかの細胞周期異常を来していることが推測された。

Immunohistochemical study of cell cycle regulators in idiopathic pulmonary fibrosis

Kingo Chida, Hisano Mizushima, Seiichi Miwa,
Noriyuki Enomoto, and Takafumi Suda

Department of Respiratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive fibrotic disorder characterized by the proliferation of fibroblasts. Fibroblast proliferation in IPF is generally observed as a process following epithelial injury and alveolitis, but details of the mechanism remain to be clarified.

Cyclin dependent kinase (CDK) and the tumor suppressor gene, CDK inhibitor regulate cell cycle and are implicated in cell proliferation. On this basis, we hypothesized that fibroblasts in IPF have an abnormality of cell cycle regulating factors. In this report, we utilized immunohistochemistry to examine the level of expression of pRB (retinoblastoma gene product) and p27, both of which play central roles in a major tumor suppressive pathway (RB pathway), in surgically resected lung tissues of patients with IPF. The expression of pRB was reduced in fibroblastic foci compared with the adjacent tissues, while the expression of p27 did not vary. That results suggest that downregulation of pRB in fibroblastic foci contribute to the pathogenesis of IPF.

はじめに

近年、癌抑制遺伝子である *RB* 遺伝子と *p53* 遺伝子がともに細胞周期制御に深く関与していることが判明し、細胞の癌化シグナルは最終的には *RB* 経路または *p53* 経路と呼ばれる経路に集約されると考えられている。また、IPF は上皮障害から肺胞上皮の脱落、過形成、線維芽細胞の増殖などの過程により線維化に至る疾患であり、細胞周期という点から考えると、線維芽細胞の細胞周期制御因子に異常をきたしている可能性が想定される。今回は細胞周期の G1/S 期を制御する *RB* 経路に注目し、線維化肺の線維芽細胞の細胞周期制御因子について検討した。

対象と方法

1992 年から 2000 年までに外科的肺生検を施行され、病理組織学的に IPF/UIP と診断された 11 症例を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋された外科的肺生検の検体を用い、連続切片において pRB, p27 の免疫組織化学染色を行い、線維化肺の線維芽細胞における発現の程度を検討した。

結 果

(I) 患者背景を Table 1 に示す。男性 7 例、女性 4 例の 11 症例で、平均年齢は 62.8 歳。10 例に喫煙歴を認めた。VATS 施行時の平均の PaO₂ は 79.6 torr, 平均の %FVC は 72.4% であった。全症例とも臨床的には安定あるいは緩徐に進行している症例であった。また感染症の合併は検討時点では認められなかった。ステロイドおよび免疫抑制剤投与中の症例はなかった。

(II) 染色結果を Table 2 に示す。pRB は、周辺組織(単核球や肺胞 Mφ, 肺胞上皮細胞)に比較して、発現量が低下している傾向を認めた。また p27 では、周辺組織と同程度に染色され、同部位における p27 の発現には異常はみられなかった。代表的な染色結果を (Fig. 1) に提示する。

Table 1 患者背景

症例	年齢(才)	性別	喫煙歴	PO2 (torr)	%FVC(%)	ステロイド使用	転帰
1	63	女	+	87.7	79.2	あり	死亡
2	58	男	+	74	60	あり	死亡
3	64	男	+	75.1	47.9	あり	死亡
4	75	男	+	75	96	なし	不変
5	67	男	+	89	50	なし	不変
6	54	男	+	94	122	なし	不変
7	59	女	+	67.3	69.1	なし	不変
8	74	男	+	54	N.D.	あり	死亡
9	65	男	+	101	86.6	なし	不変
10	47	女	+	82.9	62.1	あり	悪化
11	65	女	-	76.3	51	あり	死亡

Table 2 fibroblastic foci における pRB, p27 の発現

症例	RB	p27
1	(±)	(+)
2	(±)	(+)
3	(±)	(+)
4	(-)	(+)
5	(-)	(-)
6	(-)	(+)
7	(-)	(-)
8	(-)	(+)
9	(±)	(+)
10	(-)	(+)
11	(-)	(+)

考 察

哺乳動物の細胞周期は G1 期 (間期) - S 期 (複製期) - G2 期 (間期) - M 期 (分裂期) および G0 期 (静止期) からなる。各周期間は、サイクリン依存性キナーゼ (CDK: cyclin dependent kinase) の働きによって進行する。CDK は、細胞周期の進行に従って発現が誘導されるサイクリンに結合することにより活性化され、細胞周期の進行に重要な基質をリン酸化する役割を持つ。そして何らかの増殖シグナルを受けると G1 サイクリン-CDK が活性化し細胞周期が開始する。

細胞が正常な増殖や分化を行うためには、細胞周期は精密に制御される必要があり、各周期毎チェックポイント機構により監視されている。異常があれば修復のために細胞周期を停止したり、アポトーシスを誘導する。細胞周期の異常は細胞のがん化やがん的増殖の一因であり、細胞周期の緻密な制御は発生、増殖、分化、器官形成、生殖、老化などの生命現象の分子基盤

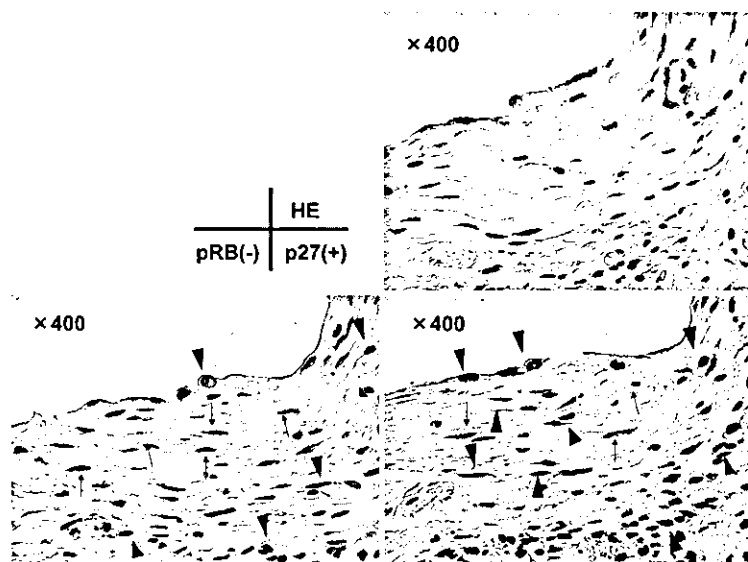


Fig. 1 Case 4. 75-year old man. Immunohistochemistry of pRB and p27 are shown in fibroblastic foci. The expression of pRB is reduced in fibroblastic foci compared with the adjacent tissues, while the expression of p27 do not vary. Arrowheads indicate positive-stained cells, and arrows indicate negative-stained cells. ($\times 400$)

といえる。

RB (retinoblastoma) 遺伝子は網膜芽細胞腫で変異を起こしているがん抑制遺伝子であり、染色体 13q14 に位置し、27 個のエクソンから成り、約 200 kb の大きな領域に広がって存在する。遺伝子産物である RB タンパク質 (以下 pRB) は、半減期が 8 時間以上の安定なタンパク質 (928 のアミノ酸からなり、分子量は約 110 kD) で、細胞内の量も多く、生体内の殆どの組織で発現されているとされる。pRB は、細胞周期において RB 経路を形成し、G1 期から S 期の進行を抑制的に制御している。その制御は通常リン酸化に依存し、G1 期において転写因子 E2F と複合体を形成し、E2F の機能を不活性化することにより、G1 期から S 期への移行を阻止する。細胞周期が進行するためには、pRB がリン酸化され E2F が解離して活性な転写因子となることが必要で、このリン酸化は、まずサイクリン D-CDK4 あるいは 6 複合体によって誘導され、続いてサイクリン E-CDK2 複合体の刺激を受け実行される¹⁾。pRB の異常は、細胞周期制御機構の破綻を意味し、網膜芽細胞株、骨肉腫を始め種々の悪性腫瘍において変異が検出されており、また悪性度や予後と関連するとも報告されている²⁾。

今回我々は、線維化肺の線維芽細胞の細胞周期において、G1 から S 期への移行期である RB 経路に注目し、pRB および p27 の免疫組織化学染色を行い、線維化肺の線維芽細胞における発現の程度を検討した。結

果は、線維化肺の線維芽細胞では pRB の発現の低下傾向を認めた。肺線維症由来の線維芽細胞の異常に注目した報告は散見されるが、肺線維症由来の線維芽細胞の増殖能やコラーゲン合成能、機能的異常の有無に関して未だ結論は出されていない。Jordana らは 4 例の臨床的に活動的な肺線維症症例肺由来の線維芽細胞と 5 例の対照群由来のそれとに関する検討を報告している。肺線維症肺由来の線維芽細胞の増殖速度は対照群に比べて速く、クローン毎に検討すると肺線維症肺由来の線維芽細胞には分裂速度の速いクローンが多かったと結論している³⁾。また Raghunath らは開胸肺生検材料から線維芽細胞株を樹立し比較検討した。組織学的に肺肺炎優位 (alveolitis predominant) な症例を early fibrosis、線維化病変優位 (fibrosis predominant) な 3 症例を late fibrosis と考え両者を分けて対照群と比較し、early fibrosis 群は分裂周期に入っている率が late fibrosis 群、対照群に比べて多く、late fibrosis 群では対照群より少なかったと報告している⁴⁾。また Ramos らは、IPF 患者の線維芽細胞は対照の正常肺に比較して増殖率が低く、またアポトーシスは高率に認められたと報告⁵⁾ しており、議論のあるところである。線維芽細胞は機能的にも増殖速度に関しても heterogeneous な細胞集団であることが知られており^{6,7)}、これらの過去の報告から細胞周期のいずれかの時点での破綻や異常が推察された。今回の結果は、線維化肺の線維芽細胞では pRB の発現の低下傾向を認めた

が、発現が低下している原因としては、遺伝子欠損やメチル化などの遺伝子レベルでの異常やタンパクレベルでの異常 (分解の亢進) などが考えられた。pRB の安定性制御に関しては、HPV の遺伝子産物 E7 の存在下で不安定化されることやカスパーゼによって限定分解を受けることなどが知られているが、最近 Mdm2 によっても pRB はユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解を受けることが報告された⁸⁾。また、p27 に関しては本検討では発現低下を認めなかった。P27^{KIP1} 蛋白質 (以下 p27) は cip/kip ファミリーの CDK インヒビターで、CDK4/6-cyclinD1 および CDK2-cyclinE による RB のリン酸化を抑制することによって細胞周期の G1-S 期間の移行を負に制御している⁹⁾。また、この蛋白質の機能の制御はユビキチン・プロテアソームによる蛋白分解によって行われる¹⁰⁾¹¹⁾。線維芽細胞での p27 の発現低下が予測されたが、結果は周囲組織と比較しての発現の低下を認めなかった。細胞周期の調節には様々な因子が関与しており、各因子における更なる検討が必要である。

結 論

IPF/UIP の線維芽細胞では、周囲組織に比較して pRB の発現量の低下を認め、線維化肺における線維芽細胞は何らかの細胞周期異常を来していることが推測された。

参考文献

- 1) Weinberg RA : The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell* 1995 ; 81 : 323-330.
- 2) Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, et al : Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. *J Natl*

Cancer Inst 1994 ; 86(9) : 695-699.

- 3) Jordana M, et al : Heterogenous proliferative characteristics of human lung fibroblast lines and clonally derived fibroblasts from control and fibrotic tissue. *Am Rev Respir Dis* 1998 ; 137 : 579-584.
- 4) Raghu G, Chen Y, Rush V & Rabinovitch PS : Differential proliferation of fibroblasts cultured from normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 1988 ; 138 : 703-708.
- 5) Carlos Ramos, et al : Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 ; 24 : 591-598.
- 6) Schneider EL, et al : Tissue-specific differences in cultured human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* 1977 ; 108 : 1-6.
- 7) Ko SD, Page RC & Narayanan AS : Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977 ; 74 : 3429-3432.
- 8) Chiharu Uchida, Seiichi Miwa, et al : Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation *The EMBO Journal* 2005 ; 24 : 160-169.
- 9) Sherr CJ : Cancer cell cycles. *Science* 1996 ; 274 : 1672-1677.
- 10) Panago M et al : Role of ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995 ; 269 : 682-685.
- 11) 秋田弘俊 : 細胞周期調節因子発現異常の予後因子としての意義。 *医学のあゆみ* 2001 ; 199(9) : 631-635.

リンパ管構築変化の間質性肺炎病態に与える影響

海老名雅仁 木村雄一郎 大河内真也 小西 一央
榊原 智博 田澤 立之 貫和 敏博*

肺のリンパ管は胸膜から小葉隔壁に分布する表在叢 (a superficial plexus) と気管支血管束周囲に分布する深部叢 (a deep plexus) の2つの系統に分けられ、互いに独立して発達することが知られている。小葉内の肺胞壁にはリンパ管が分布しリンパ還流と肺水腫の病態に関してはよく報告されているが、肺線維症を中心とする間質性肺炎の病態とリンパ管の病的変化に関してはほとんど知られていない。私たちは特発性肺線維症における血管構築変化について報告してきたが (Ebina M, et al. AJR-CCM 2004), 特発性肺線維症を中心とした特発性間質性肺炎, 膠原病による間質性肺炎, 急性肺傷害や急性増悪などの病態に対して肺リンパ管が血管構築変化と共にどのような影響を与えているのかを, 外科的肺生検および剖検肺を用いて検証した。その結果, 器質化肺炎患者および細胞性非定型間質性肺炎患者の外科的肺生検では, 小葉間隔壁や気管支血管束に分布する既存のリンパ管から進展した新生リンパ管が肺胞腔内にある肉芽組織の中に分布して行くのが観察された。一方, 特発性肺線維症および線維性非定型間質性肺炎の外科的肺生検では, これらの新生リンパ管はほとんど観察されなかった。これは剖検肺でも同様であり, 死に至るまでほとんどリンパ管の新生がなされないばかりか, 胸膜内部や小葉間隔壁内のリンパ管が消失する傾向を認めた。これらの結果はリンパ管による病巣のクリアランスが特発性肺線維症および線維性非定型間質性肺炎患者の治療効果が悪い原因となっていることを示唆していると考えられる。

The remodeling of lymph vessels in idiopathic interstitial pneumonias as a novel aspect of pathogenesis

Masahito Ebina, Yuichiro Kimura, Shinya Okouchi, Kazuhisa Konishi, Tomohiro Sakakibara
Ryu Tazawa and Toshihiro Nukiwa

Respiratory Oncology & Molecular Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai 980-8575

To date, little information has been reported on the remodeling of lymphatic vessels in interstitial pneumonias. Pulmonary lymphatics are known to develop as two plexus independent each other. A superficial plexus develops in the pleural space and interlobular space. On the other hand, a deep plexus develops in the connective tissues in the broncho-vascular bundles. We observed the distribution of both of the lymphatic plexus in the human fetal lungs by 16 week gestation. In the biopsied lungs of patients with organizing pneumonia and cellular non-specific interstitial pneumonia, lymphangiogenesis extended from the lymphatics in interlobular septum and/or peribronchovascular bundles to the granulation tissues in alveoli. In the biopsied lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and fibrous non-specific interstitial pneumonia, the lymphatics were reduced in the fibrotic lesions, mainly in subpleural or interlobular septa, and the lymphangiogenesis were hardly observed. This tendency was also observed in the autopsied lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis who died of acute exacerbation and patients with non-specific interstitial fibrosis died of progressive fibrosis with poor response to therapy. These observations indicated that inability of lymphangiogenesis in the fibrosing lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and fibrous non-specific interstitial pneumonia might cause impairment of these fatal diseases.

背 景

特発性肺線維症患者は器質化肺炎や細胞型非特異性間質性肺炎などの他の特発性間質性肺炎と比べて著しく治療効果が悪く、症状発現後の予後が短いことが知られている。先に私どもは特発性肺線維症患者肺における毛細血管構築変化を示した¹⁾。これは、線維化病変分布が特徴的な肺組織において、その分布は肺静脈が走行する小葉間隔壁、および胸膜直下に集中するとともに毛細血管密度は減少するのに対し、線維化が及んでいない肺泡領域の毛細血管は著しく増殖・新生していることを示した。これらの血管増殖性病変周囲では VEGF や IL-8 といった血管内皮増殖因子発現細胞が密に分布していることも示したり、線維化病変におけるこのような血管の病的な構築変化にくわえて、病変吸収や免疫細胞の浸出にも関わると考えられるリンパ管の変化は、肺病変においてほとんど示されていない。本研究では特発性間質性肺炎患者の生検肺を中心に間質性病変におけるリンパ管の構築変化を観察し、そのリンパ管の病態が間質性肺炎の病勢に

与える影響に関して考察を試みる。

対象と方法

外科的肺生検で得られた特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 10 例、器質化肺炎 (cryptogenic organizing pneumonia, COP) 6 例、細胞性非特異性間質性肺炎 (cellular non-specific interstitial pneumonia, c-NSIP) 3 例、線維性非特異性間質性肺炎 (fibrous non-specific interstitial pneumonia, f-NSIP) 4 例、それに慢性肺疾患のない対照患者 3 例の肺組織標本、および剖検で得られた IPF 6 例、f-NSIP 3 例、慢性肺疾患のない対照患者 3 例の肺組織をホルマリン固定後、パラフィンブロックを作成した。厚さ 2.5 μm の連続切片を 10 枚薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、エラスチカ・マッソン (EM) 染色、それに podoplanin (anti-human podoplanin monoclonal antibody, anti-human D2-40 monoclonal antibody, 500 倍) と vWF (anti-human Factor VIII monoclonal antibody, 200 倍) あるいは抗 CD34 抗体

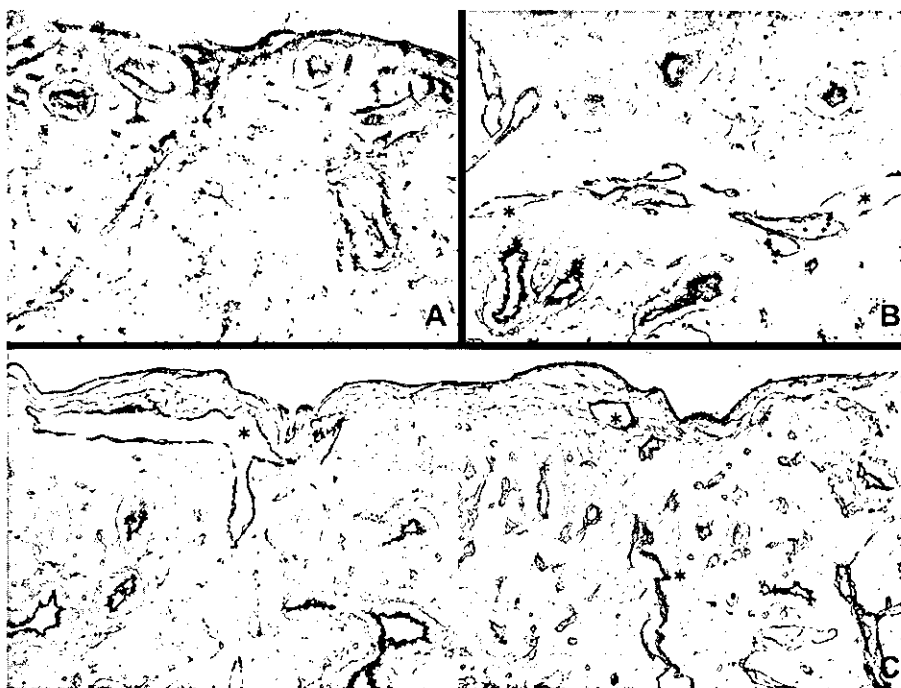


図1 胎児肺におけるリンパ管の発達 Lymphatic capillaries (red)/vWF (brown)
A&B: 16週, B: 18週. 胸膜直下およびそこに合流する小葉間隔壁内 (A&C) および静脈周囲 (B) にリンパ管 (*) の発達を認める。

東北大学病院 遺伝子・呼吸器内科, 東北大学加齢医学研究所 呼吸器腫瘍研究分野

* びまん性肺疾患調査研究班 主任研究者

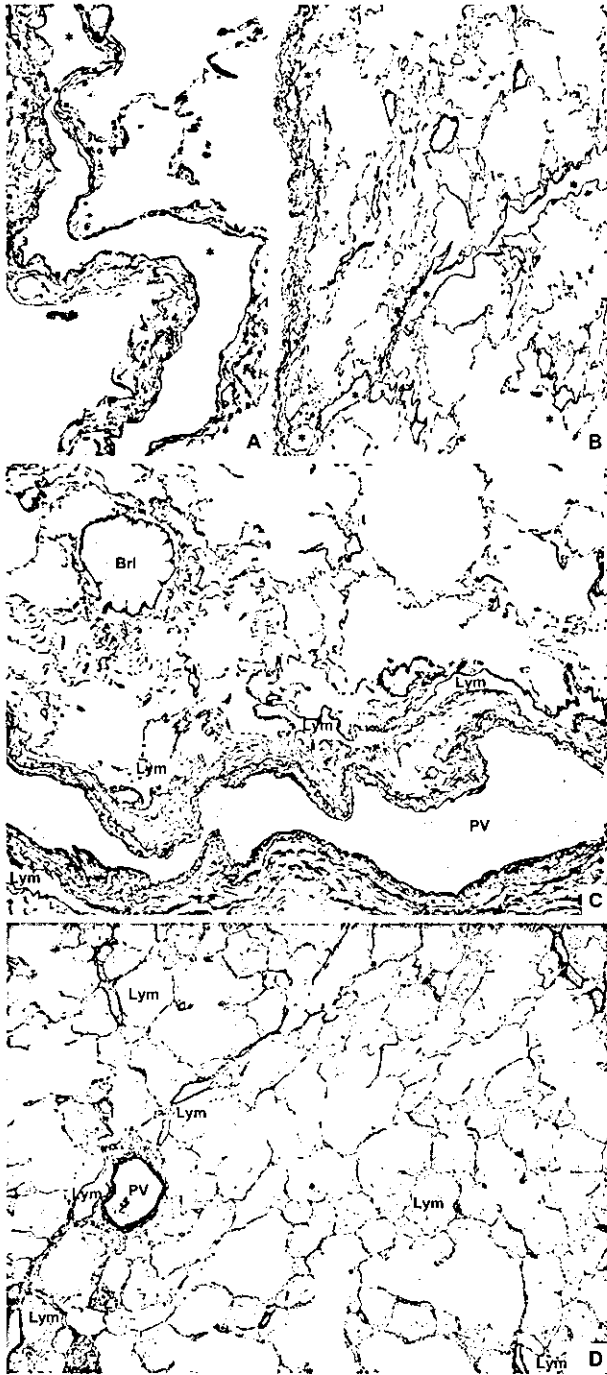


図2 正常成人肺におけるリンパ管の分布
 A: 胸膜直下におけるリンパ管(*)の分布 (100倍)
 B: 胸膜から小葉隔壁に分布するリンパ管(*)を示す (40倍)
 C: 正常成人肺におけるリンパ管の分布 (40倍), 細気管支 (Brl) および肺静脈 (PV) 周囲に分布するリンパ管 (Lym) を示す。
 D: 正常成人肺における小葉隔壁に分布するリンパ管を示す。



図3 器質性肺炎における肉芽腫
 A: 肺胞腔内にある肉芽病変中に発達するリンパ管およびvWF陽性の血管: Lymphatic capillaries (red)/vWF (brown)
 B, C: 肺胞腔内に既存の小葉隔壁から進展した新生リンパ管が多数観察される。

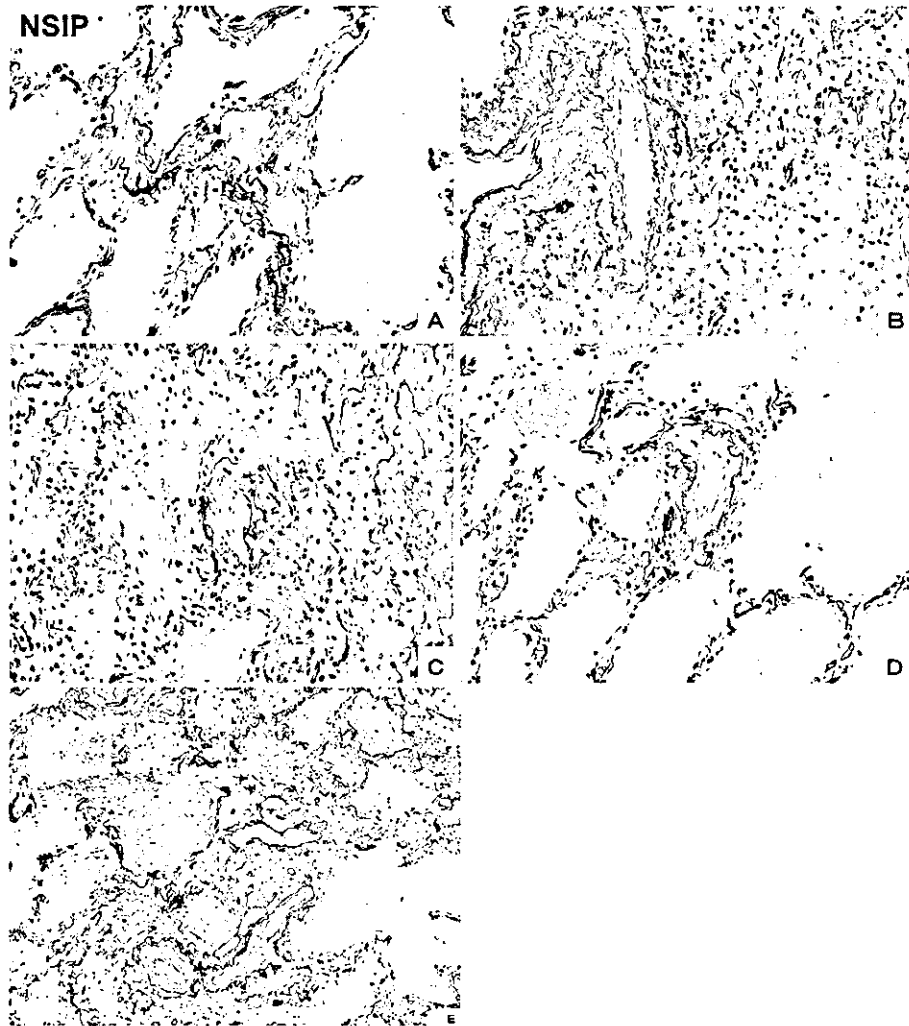


図4 c-NSIP 病変におけるリンパ管新生
 A-D: いずれも器質化肺炎病変と同様に、肺胞腔内の病変に進展する新生リンパ管が確認される。
 Lymphatic capillaries (red)/vWF (brown)(A-D), Lymphatic capillaries (red)/CD34 (brown) (E)

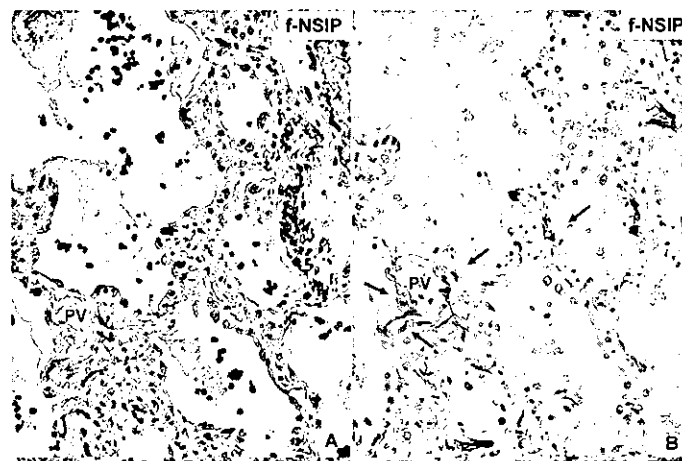


図5 f-NSIP の剖検肺
 A: 肺胞壁の肥厚を認めた f-NSIP の剖検肺 (EM 染色)
 B: 小肺静脈に近接するリンパ管は進展せずに肥厚した肺胞壁内に留まっている (矢印)

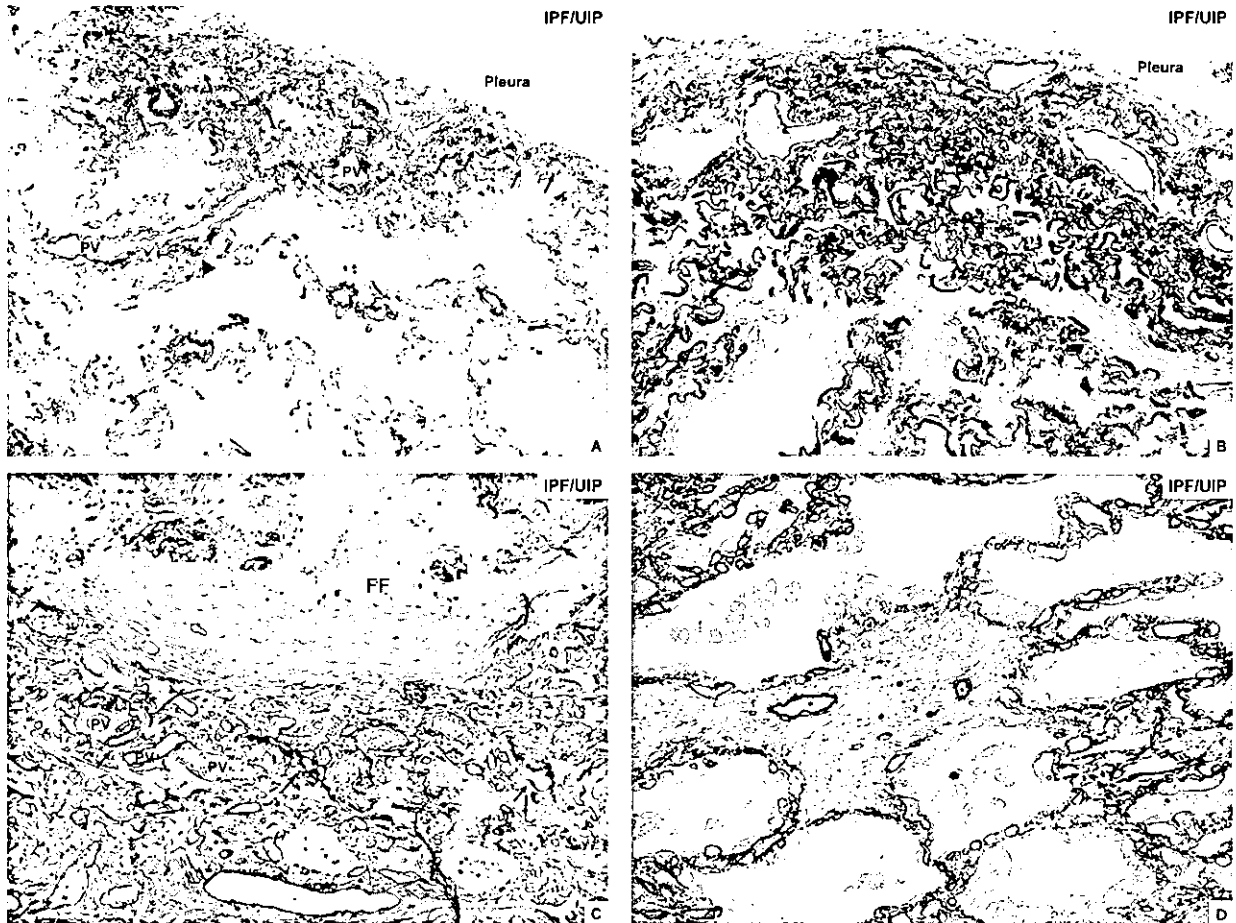


図6 特発性肺線維症の生検肺
 A, B: 特発性肺線維症生検肺: 胸膜内 (矢印) と小葉間隔壁内 (矢頭) のリンパ管が減少している。(Lymphatic capillaries (red)/vWF (brown)+EM 染色)
 C: 特発性肺線維症生検肺: 特発性肺線維症患者肺における CD34 陽性内皮細胞からなる肺胞毛細血管とリンパ管 (*) の分布を比較。Lymphatic capillaries (red)/CD34 (brown).
 D: 特発性肺線維症患者肺における CD34 陽性内皮細胞からなる肺胞毛細血管とリンパ管 (*) の分布を比較。Lymphatic capillaries (red)/CD34 (brown).

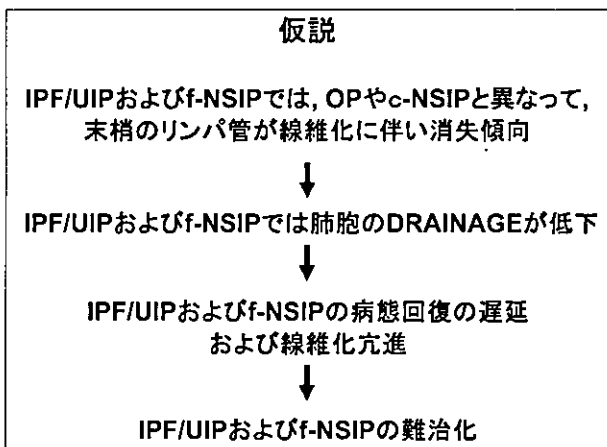


図7

(clone AE-1, 200倍) を用いての2重免疫染色を行ない、さらに重ねてEM染色を行なった。リンパ管の発達を確認するために16週および18週のヒト胎

児肺ホルマリン固定パラフィンブロックから同様に薄切・染色標本を作製した。

結果と考察

胎児肺: 16週および18週のヒト胎児肺におけるリンパ管を図1に示す。16週の肺ですでに胸膜直下にリンパ管が発達しており(図1A)、肺内ではvWF陽性血管内皮細胞を持つ肺静脈に随伴してリンパ管の走行を認めた(図1B)。18週ではさらに胸膜直下のリンパ管が発達し、小葉間隔壁を走行する肺静脈と随伴するリンパ管を認めた(図1C)。肺胞壁にはいずれもリンパ管の分布はみなかった。

正常肺: やはり胸膜直下に十分な太さを保ってリンパ管の走行を認める(図2A)。小葉間隔壁内の走行

(図 2B), 細気管支周囲, 肺静脈周囲のリンパ管の分布も胎児肺において観察された分布の特徴と一致する(図 2C, D). 肺胞壁にリンパ管が分布していないことも胎児肺の場合と同様である。

器質化肺炎: 器質化肺炎に見られる肺胞腔内の肉芽には, その中心に壁構造を伴わない vWF 陽性血管内皮細胞からなる毛細血管に沿うように, リンパ管の形成を認めた(図 3A). 肺胞内を充満している肉芽に対しては小葉間隔壁に分布する既存のリンパ管から肺胞腔内に進展している多数の新生リンパ管を観察した(図 3, B & C).

c-NSIP: 肺胞壁にはリンパ球の浸潤を認め, 肺胞壁が肥厚しているところも認めるが, 新生リンパ管は小葉間隔壁内の肺静脈周囲に分布し, やはり肺胞内の肉芽様病変や浸出病変に対して, 既存のリンパ管からのリンパ管新生を多数認められた(図 4).

f-NSIP: f-NSIP では生検肺でも剖検肺でも, その特徴である肺胞壁の線維化が著明な病巣では, 肺静脈周囲のリンパ管は線維化内に留まり, 肺胞腔内へ進展をほとんど認めない(図 5)

IPF/UIP: IPF/UIP は胸膜直下および小葉間隔壁での線維化病変が顕著である。その結果として, この胸膜直下および小葉間隔壁に分布していたと考えられるリンパ管が消失傾向にあるのが観察された(図 6A, B). 図 6C に線維化病変におけるリンパ管と肺胞毛細血管の特徴的な分布を示す。線維化病変の中には毛細血管は消失するが, その周辺の未線維化病変に毛細血管は密に分布する。線維化病変の中心にある肺静脈周囲に分布するリンパ管は, 線維化病巣に閉ざされるようになり, 肺胞腔内に進展することは OP や c-NSIP と比較して顕著に稀である。

これらの結果から推察される間質性肺炎の病態に影響する新生リンパ管の関与の仮説を掲げる(図 7).

間質性肺炎は程度の差はあれ, いずれも肺の傷害から引き起こされるものと考え。器質化肺炎や細胞型非特異性間質性肺炎は線維化が軽度であり, 肺胞腔内への病態や肺胞壁の浮腫性肥厚に対して, vWF 陽性血管細胞をもつ小静脈およびリンパ管の新生がおり, 病巣のドレナージが急速にすすみ治癒へ向う。これに対し, 線維性非特異性間質性肺炎はその肺胞壁の線維化によって, また IPF/UIP 患者肺においては本来リンパ管が分布する小葉間隔壁の線維化および胸膜直下におこる肺胞虚脱による線維化病変によって, リンパ管が閉じ込められるようになり, 病巣のドレナージが的確に行なわれなくなる。また, 治癒に必要な炎症細胞のリクルートや, 線維化病変意関わるといわれている肺胞腔内のマクロファージを回収することが困難となって肺胞腔内に滞らせる結果, 線維化病変が難治化すると同時に亢進する原因となっていることが考えられる。

結 論

間質性肺病変意おけるリンパ管の構築変化は, 特に治療が困難である線維性非特異性間質性肺炎および特発性間質性肺炎の病態を理解するうえで極めて重要であることが示唆された。

参考文献

- 1) Ebina M, Shimizukawa M, Shibata N, Kimura Y, Suzuki T, Endo M, Sasano H, Kondo T, Nukiwa T. (2004) Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.*, 169: 1203-8.

特発性肺線維症及びその他の間質性肺炎における 肺内無機沈着物の元素分析

土屋 公威¹ 稲瀬 直彦¹ 宮崎 泰成¹ 小山 信之¹
磯貝 進¹ 海野 剛¹ 白井 裕¹ 吉澤 靖之^{1*}
近藤 康博² 谷口 博之^{2***}

無機粉塵曝露は肺線維化を誘導あるいは修飾すると考えられるため、間質性肺炎の組織中における無機粉塵沈着について疾患別や職業性曝露の有無による比較検討を行った。当院症例は17例、男性7例、女性10例、年齢64.2歳。疾患別では慢性鳥飼病5例、膠原病肺5例、特発性肺線維症 (IPF) 7例。加えて愛知県瀬戸市在住 (陶生病院) の IPF 症例で製陶業などの職業性曝露のある4例とない4例についても検討を行った。偏光顕微鏡で気管支周囲と線維化肺部分の複屈折性粒子数を測定したところ、部位別の比較では気管支周囲に多く認め、疾患別では膠原病肺より IPF に多く認めた。次に粉塵沈着部の元素組成について走査電顕によるエネルギー分散型 X 線分光法 (EDS) を行った。職業性曝露のある IPF では他疾患と比べて Si, Al が多く、曝露のない IPF と比べても Al が多かった。Al については曝露のない IPF においても慢性鳥飼病より多く認めた。職業性曝露のない IPF における当院と陶生病院の比較で地域差は認めなかった。以上より IPF に対する吸入因子の関与が推測され、職業性曝露のない IPF においても Al 沈着が多かったことより、職業歴以外の環境曝露の重要性及び Al が肺線維化を誘導、修飾する因子の一つである可能性が示唆された。IPF と診断している症例の一部に環境曝露が強く関与している群があると考えられ厳密には特発性と言い難く、今後はこのような症例を正確に除外していく必要があると考えられた。

Elemental analysis of inorganic particles in the lung tissues of idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial pneumonias

Kimitake Tsuchiya¹, Naohiko Inase¹, Yasunari Miyazaki¹, Nobuyuki Koyama¹,
Susumu Isogai¹, Takeshi Umino¹, Yutaka Usui¹, Yasuyuki Yoshizawa¹,
Yasuhiro Kondoh², and Hiroyuki Taniguchi²

¹Department of Integrated Pulmonology, Tokyo Medical and Dental University

²Department of Respiratory Medicine and Allergy, Tosei General Hospital

We analysed the elemental composition of inorganic deposits in the lung tissues of 17 patients (7 men and 10 women with mean age of 64.2) with various interstitial pneumonias because exposures of inorganic dusts may induce the fibrotic changes in the lung. Five patients with chronic bird fancier's lung (cBFL), 5 with collagen vascular disease (CVD) and 7 with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) were studied. Furthermore, 8 with IPF who lived at Seto City which is well-known for the many producing companies of chinawares were also investigated. Four of them were engaged in the occupation dealing with soils and four had no occupational exposures. Birefringent particles in lung tissues were counted by polarizing light microscopy. Elemental analyses were performed by scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The number of particles in IPF was greater as compared to CVD ($p < 0.05$). In elemental analyses of IPF with occupational exposures, silicon (Si) and aluminium (Al) were detected more than other IPs and Al was detected more as compared to IPF with no exposures ($p < 0.05$). Moreover, the amounts of Al in IPF with no exposures was larger than in cBFL ($p < 0.05$). There were no significant differences in the quantity of elemental deposition between IPF in Tokyo and in Seto. In this study, we demonstrated the possibility of involvement of inhaled inorganic dusts as a causal or modulatory factor in IPF. And it was also suggested that an unrecognized exposure to dusts is notable and Al might be one of the important factors which could induce pulmonary fibrosis. Several patients diagnosed as having IPF have occupational or latent exposures to inorganic dusts which might be firmly associated with the disease process. We propose that these cases should not be diagnosed as 'idiopathic' and should be excluded from IPF for the accuracy of diagnosis in the future.

はじめに

我々は様々な環境で無自覚のうちに粉塵を吸入する機会があると考えられるが、吸入した際に比較的大きな粉塵は気道に付着し線毛運動によって口腔側へ戻され、微小なものは肺胞マクロファージに貪食されたり血管系、リンパ系を通じて血中に吸収される。その中間の1~5 μ m程度の大きさの粉塵が大量に吸入された場合、特に気道クリアランスが低下した場合には細気管支、肺胞に粉塵が過剰沈着し線維増殖性変化が起きる。主に職業性のもので塵肺と呼ばれ、原因となりうる無機粉塵としては遊離珪酸、珪酸化合物、金属(アルミニウム、鉄、ベリリウム)、炭素などがある。しかし、直接的に扱う職業性物質でなくても作業場での環境も含めて無自覚の環境曝露の無機物質を長年に亘って吸入する可能性があると考えられ、それらが肺の線維化に関与したり、他の原因による間質性肺炎に影響を与える可能性が考えられる。2000年のATS/ERS consensus statementでは、IPFの診断に際しては環境曝露が原因であるものを除外することとされているが、一方でIPFのリスクファクターに関する記述では様々な環境曝露、金属や木くずの粉塵曝露が肺線維症発症リスクの上昇と関連するとされている¹⁾。このように環境曝露を肺線維化の直接原因とする考え方が、危険因子や修飾因子としてとらえる考え方が混在しているのが実状と思われ、実際の臨床においては明らかな塵肺症は除外するとしても、ある程度の職業、環境曝露を受けていたと思われる症例も画像所見などが典型的であればIPF診断例の中に混在していると考えられる。従ってIPFを診断する際には、診断例の中に典型的塵肺を呈さない粉塵吸入肺が含まれている可能性などを考慮し周囲環境を含めた過去からの生活歴を詳細に聴取することが重要である²⁾といえる。

肺組織の元素分析に関しては1980~1990年代を中心にいくつか報告があり、IPFではケイ素、アルミニウム、マグネシウム、セレン、チタンが多いとの報告³⁾⁻⁶⁾やIPF症例のリンパ節を分析した検討ではニッ

ケルが多いとの報告があり⁷⁾、吸入物質の元素組成と肺線維化との関連が示唆されている。しかしこれらの報告はいずれもATS/ERS consensus statement以前で間質性肺炎診断のスタンダードが確立する前でありIPFの疾患認識も現在とはやや異なると推測される。特発性間質性肺炎群(IIPs)に関してはいくつかの疾患が含まれる疾患群であるとの見地から様々な変遷を経て分類が変更、追加されており、最近の高分解能CT、外科的肺生検の普及もあり現在ではIPF、NSIP、COP/BOOP、DIP、RB-ILD、LIP、AIPに分類されるに至っている¹⁸⁾。このような現在の新しい認識、分類の理解のもとで、IPF症例、原因が同定されている他の間質性肺炎症例について吸入粉塵の影響を検討することは意義あることと思われる。

今回我々は間質性肺炎における無機粉塵の沈着量およびその元素組成について調べ、様々な環境における吸入物質の病態への関与を明らかにすることを目的として検討を行った。

対象と方法

対象：当院において胸腔鏡下肺生検あるいは剖検が行われた17例で、平均年齢64.2歳、男性7例、女性10例。疾患別では慢性鳥飼病(cBFL)5例、膠原病肺(CVD)5例(関節リウマチ1例、強皮症1例、MCTD1例、シェーグレン症候群1例)、強皮症+シェーグレン症候群1例、特発性肺線維症(IPF)7例。また、これに加えて愛知県瀬戸市在住(公立陶生病院)のIPF8例に関して、製陶業などの職業性曝露のある4例(年齢61.8歳、男性3例、女性1例)と職業性曝露のない4例(平均年齢59.5歳、男性4例)についても検討を行った。

方法：各症例についてHE標本を偏光顕微鏡で観察し、気管支周囲5視野、線維化肺部分5視野の計10視野を無作為に選択し複屈折性を示す粒子数を測定した。次に吸入物質の元素組成の分析はパラフィン切片を用いて走査電顕によるエネルギー分散型X線分光法(Energy Dispersive X-ray spectroscopy, EDS)を行った。EDSは、走査電子顕微鏡(scanning electron microscopy, SEM)下に照射電子によって発生する特性X線を分析することによって元素を同定し、スペクトルの強度分布から組成分析を行うものである(図1)。パラフィン包埋した組織より4 μ mの厚さで切片

¹ 東京医科歯科大学 統合呼吸器病学

² 公立陶生病院 呼吸器・アレルギー内科

* 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

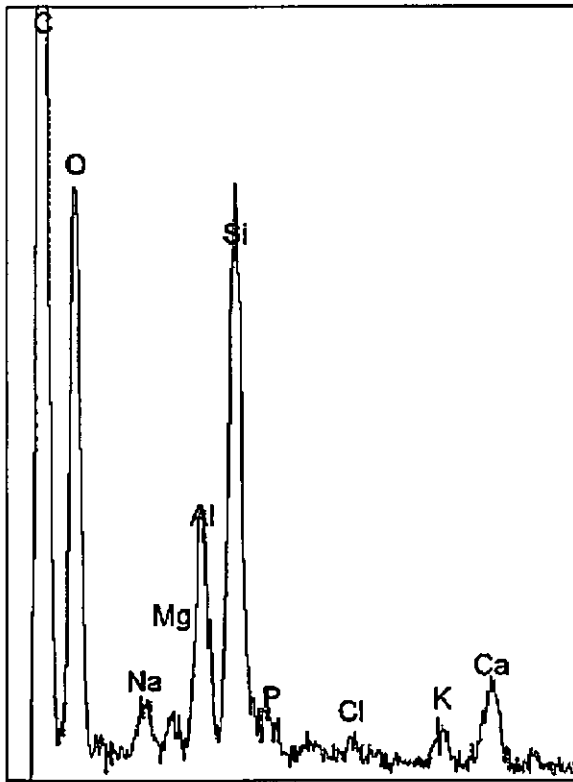


図1 EDS分析例
(energy dispersive X-ray spectroscopy)

を切り出しこれをキシレン5分×3→100%エタノール5分×2と脱パラフィン, 脱キシレンを行った後に乾燥させオスミウムガスによるコーティングを行い一晩置いたものを電顕用試料とした。元素分析に関しては, 偏光下で一般的に粒子を多く認める炭粉沈着部位に関して, SEMの観察で一定の面積(×1,000倍での観察範囲)についてのEDSを5ヵ所行い平均化した。元素の種類は, Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cuについて分析を行い, 各元素の重

量濃度は多量に含まれる炭素(C), 酸素(O)の影響を除いた上で算出し組織量を反映すると思われる硫黄(S)で補正した。この補正値を用いて疾患別, 地域別, 職業性曝露の有無別に比較検討をした。またさらに高倍率(×5,000倍)の観察で約0.5~3μm大の粒子自体の分析を無作為に20個について行い粒子の含有する元素を同定した。同時に電子プローブを一定方向に移動させて元素濃度分布を測定する線分析や, 任意の面積に電子プローブを走査し各々の点から発生するX線を1個の輝点となるように表示する面分析も行うことにより元素分布を確認した。

結 果

1. 患者背景

今回検討を行った当院の3疾患症例(慢性鳥飼病5例, 膠原病肺5例, IPF7例)と公立陶生病院のIPF症例(職業性曝露なし4例, あり4例)の5群の患者背景を(表1)に示す。職業性曝露のあるIPF4例の職業は, 珪石粉砕業, 製陶業, 陶器の型作り, 土砂運搬業であった。元素分析に関する疾患間の比較は, 慢性鳥飼病(当院5例), 膠原病肺(当院5例), 職業性曝露のないIPF(当院7例+陶生病院4例), 職業性曝露のあるIPF(陶生病院4例)の4群間で比較検討を行ったが, この4群間では鳥接触歴が慢性鳥飼病で多い以外は年齢, 性別, 喫煙歴に差を認めなかった(表2)。

2. 偏光顕微鏡下での観察

偏光顕微鏡下でHE標本を観察し肺組織中の複屈折性を示す粒子の数を気管支周囲(BVB: bronchovascular bundle)5ヵ所と線維化肺部分(FL:

表1 患者背景

	cBFL (n = 5)	CVD (n = 5)	IPF (n = 7)	IPF (n = 4)	IPF (n = 4)
施設	当院	当院	当院	陶生	陶生
年齢(歳)	59.0±4.4	54.8±5.4	74.7±2.3	59.5±0.6	61.8±2.5
性別(男:女)	2:3	1:4	4:3	4:0	3:1
喫煙歴あり	1/5	1/5	3/7	4/4	2/4
鳥接触歴あり	5/5	1/5	1/7	0/4	0/4
職業性曝露あり	0/5	0/5	0/7	0/4	4/4

cBFL: chronic bird fancier's lung CVD: collagen vascular disease
IPF: idiopathic pulmonary fibrosis

表2 患者背景 (比較4群)

	cBFL (n = 5)	CVD (n = 5)	IPF (n = 11)	IPF (n = 4)
職業性曝露	なし	なし	なし	あり
年齢(歳)	59.0±4.4	54.8±5.4	69.2±2.7	61.8±2.5
性別(男:女)	2:3	1:4	8:3	3:1
喫煙歴あり	1/5	1/5	7/11	2/4
鳥接触歴あり	5/5 *	1/5	1/11	0/4
病理組織パターン (U:UIP, N:NSIP)	U:4, N:1	U:3, N:2	U:11, N:0	U:4, N:0

UIP: usual interstitial pneumonia

NSIP: nonspecific interstitial pneumonia

* p<0.05

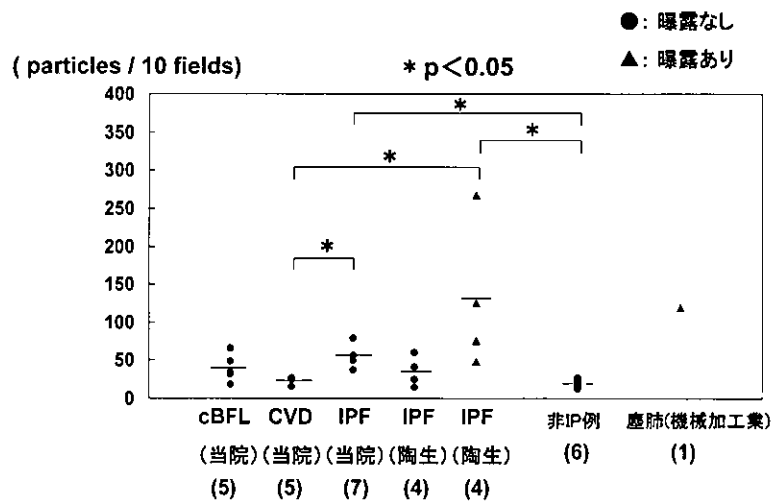


図2 偏光顕微鏡での粒子数測定 (疾患別)

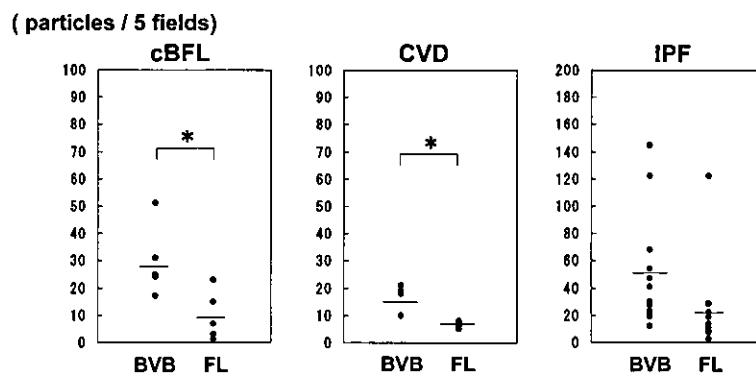


図3 偏光顕微鏡での粒子数測定 (部位別)

BVB: bronchovascular bundle (気管支周囲部分)

FL: fibrotic lung (線維化肺部分)

* p<0.05

fibrotic lung) 5ヵ所に分けて測定を行った。全視野合計の粒子数の疾患別比較では、膠原病肺 (21.8±2.8 個) と比較して当院 IPF (55.3±8.8 個) と職業性曝露のある IPF (129±48.7 個) において粒子を多く認め (p<0.05), 曝露のある IPF では曝露のない IPF よりも多

い傾向にあった。また同時に他疾患についても同様の方法で測定したところ、機械加工業 (鉄, チタン, ステンレス, 銅を扱う) に従事していた塵肺症例では 120 個と粒子数が多い傾向を認め、また間質性肺疾患を持たない 6 症例の肺組織 (肺癌切除肺の非癌部 3

例, 気胸 2 例, サルコイドーシス 1 例) の測定では 19.8 ± 2.5 個と膠原病肺とほぼ同等の値であった (図 2)。粒子を認める部位に関しては慢性鳥飼病 (BVB: 29.6 ± 5.8 , FL: 9.8 ± 4.1 個), 膠原病肺 (BVB: 15.6 ± 2.3 , FL: 6.2 ± 0.6 個) において気管支周囲に有意に多く認め, IPF (BVB: 50.8 ± 12.1 , FL: 22.3 ± 9.5 個) でも気管支周囲に多い傾向を認めた (図 3)。

3. 走査電子顕微鏡下での元素分析

次に HE 標本と連続する切片を用いて SEM 観察下で元素分析を行った。前述した偏光下での観察において無機沈着物は炭粉沈着部位に多いことを確認したため, 元素分析の測定部位は炭粉沈着部を選択した。元素分析の結果, 珪素については職業性曝露のある IPF が慢性鳥飼病, 膠原病肺より多く認めた ($p < 0.05$)。またアルミニウムにおいては職業性曝露のある

IPF が慢性鳥飼病, 膠原病肺, 曝露のない IPF より多く認め ($p < 0.05$)。加えて職業性曝露のない IPF においてもアルミニウムは慢性鳥飼病より多く ($p < 0.05$)。膠原病肺よりも多い傾向にあった (図 4)。この 2 元素以外の元素は疾患間や職業性曝露の有無で差を認めなかった (図 4, 5)。職業性曝露のない IPF について当院と陶生病院で地域による差を検討したが, どの元素についても元素沈着量に差を認めなかった (図 6)。線分析や面分析を用いて元素の分布をしらべてみるとアルミニウム, 珪素などのピークは粒子に一致していることが確認できたため (図 7), これらの元素は生体内の元素ではなく外部からの吸入物質と考えられた。このような高倍率 (SEM, $\times 5,000$ 倍) での観察で粒子自体の分析を行い粒子の内容物として同定された元素を (表 3) に示す。疾患に関係なくアルミニ

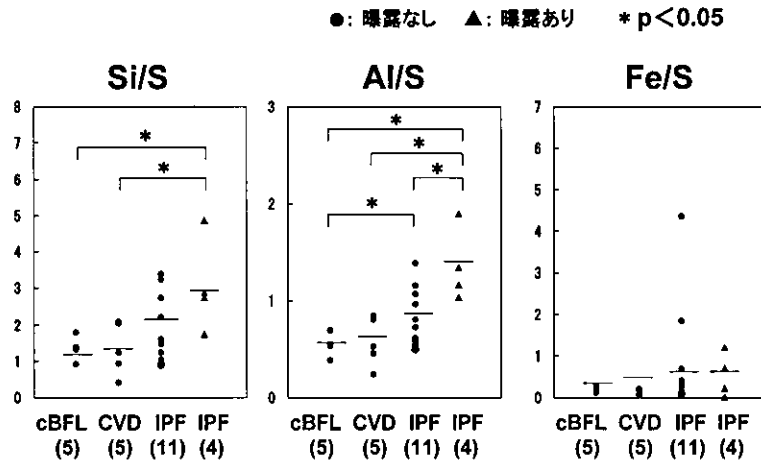


図 4 疾患別比較 (1)

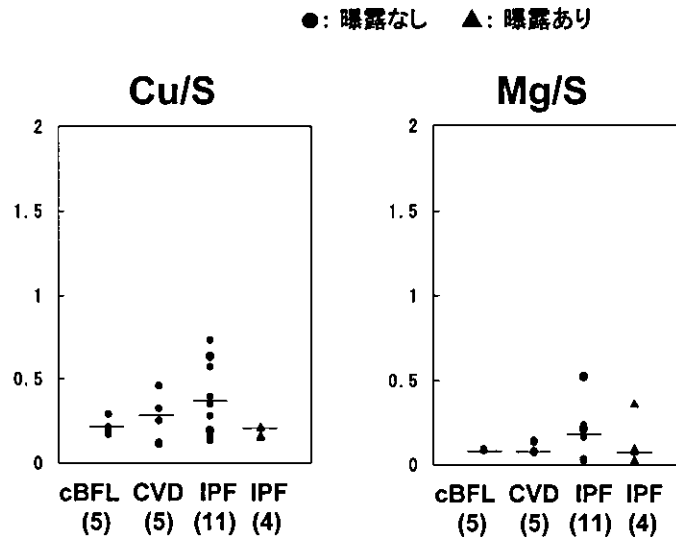


図 5 疾患別比較 (2)

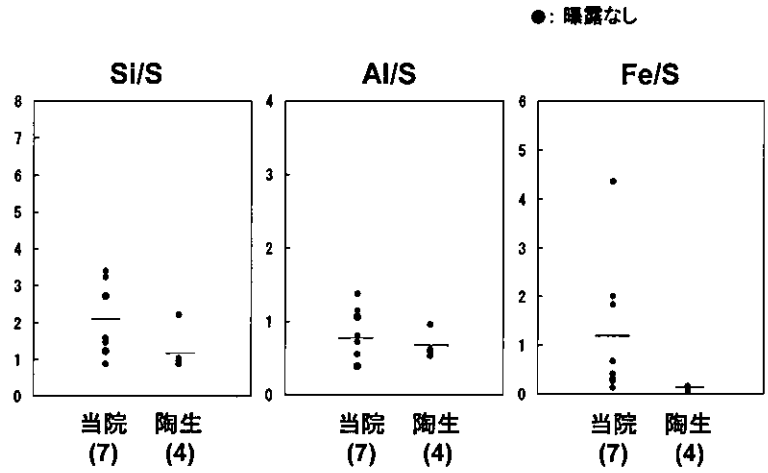


図6 IPFにおける地域間の比較

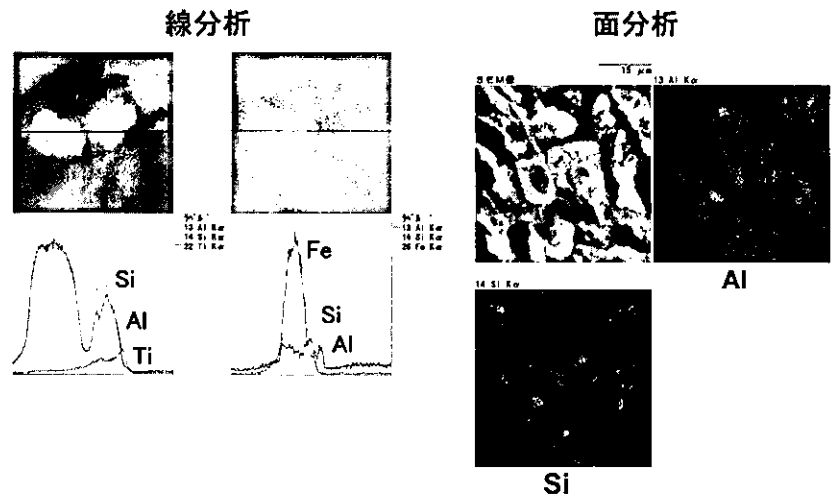


図7

表3 肺組織内粒子の元素分析

疾患	粒子の内容物として同定した元素
(1) 慢性鳥飼病 5 例	Al, Si
(2) 膠原病肺 3 例	Al, Si
1 例 (PSS)	Al, Si, Mg
1 例 (PSS + Sjögren synd.)	Al, Si, Fe, Ti
(3) IPF 5 例	Al, Si
5 例	Al, Si, Fe
3 例	Al, Si, Fe, Ti
1 例	Al, Si, Fe, Ti, Cr
1 例	Al, Si, Fe, Ti, Cr, Co
(4) 肺癌切除肺の正常肺部分, 肺気腫	Al, Si
(5) 塵肺 (機械加工業)	Al, Si, Fe, Ti, Cr