

FIP 7-2
(32 years old, male)

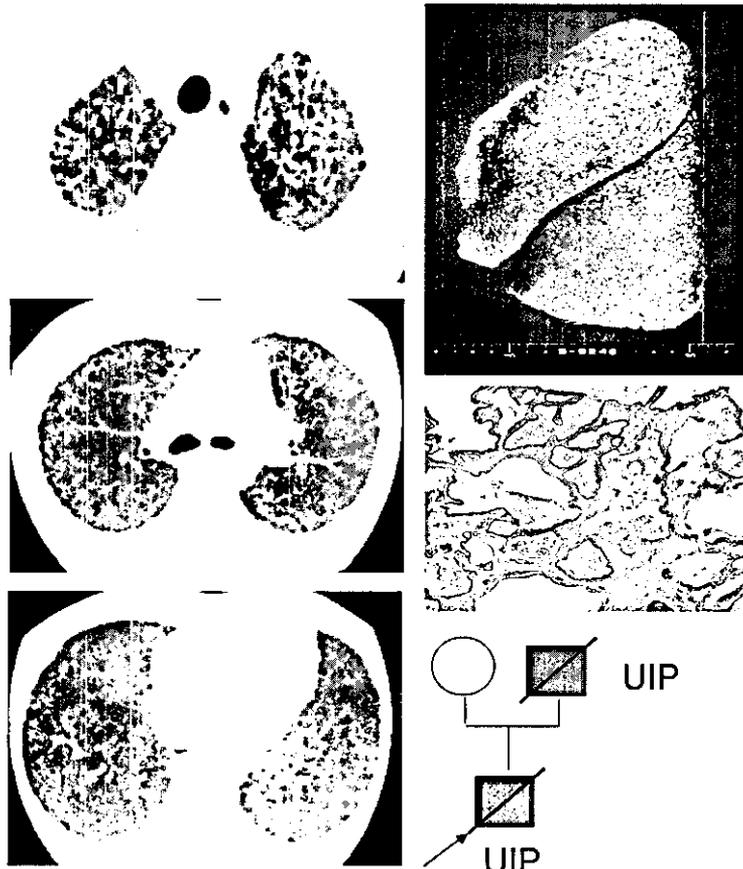


図3 Chest CT image and pathological image of parent-child pair case

表1 pulmonary function test of all members of FIP-1 family case

	VC (L)	FEV1 (L)	DLco	DLco/VA	TLC (L)	RV (L)
FIP-1-1	1.76 (38%)	1.67 (43.1%)	4.1 (13.2%)	1.88 (33.9%)	2.43 (38.5%)	0.67 (39.9%)
FIP-1-2	2.97 (65%)	2.46 (85.7%)	8.2 (26.8%)	2.50 (44.9%)	3.63 (58.5%)	0.67 (40.6%)
Youngest Brother	3.73 (78.9%)	3.14 (84.1%)	16.0 (50.8%)	3.86 (67.4%)	4.47 (70.4%)	0.74 (45.7%)
Mother	2.57 (93.4%)	1.94 (77.3)	13.1 (63.3%)	4.65 (72.1%)	3.61 (96%)	1.04 (103%)
Father	3.69 (95.9%)	2.84 (81.1%)	16.3 (61.6%)	3.30 (71.3%)	5.37 (93.2%)	1.68 (87.8%)

胞構造が保たれているとされている。一方、本症例では、上葉についてはIPUFと類似の病像をとるものの下葉においてもUIPパターンを呈していた。文献的には、上葉優位或いは上葉限局型肺線維症症例の中には20から30歳代の若者も存在し、発症背景に家族例も存在することから何らかの遺伝素因も考慮されてい

る⁷⁾⁸⁾。本研究の家族症例で認められる間質性肺炎の分布の特異性は、IPUF家族症例同様、遺伝素因に由来する可能性が強く示唆される。SFTPC遺伝子異常を呈した家族性間質性肺炎では、IPUFのような病理的、放射線診断学的報告はない。本研究の症例に於いてSFTPC遺伝子異常は同定されなかったことを考える

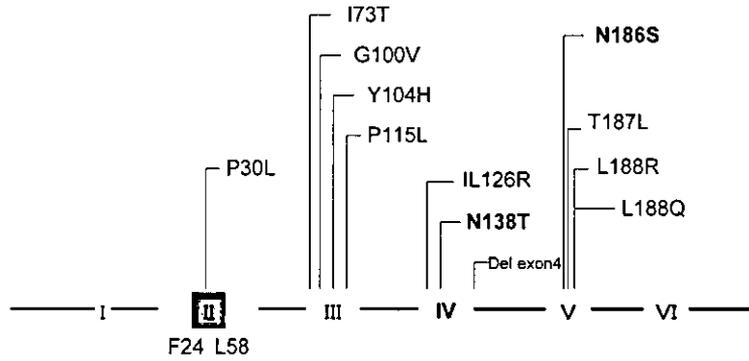


図4 Sequence analysis of SFTPC gene in patients with familial interstitial pneumonia

表2 Genotype and allele frequencies in exon4 of SFTPC gene

(Exon4 ACT/AAT : T138N)

	Genotype			Frequency			(P=0.48)
	AAT/AAT	ACT/AAT	ACT/ACT	AAT/AAT	ACT/AAT	ACT/ACT	
FIP	0/11 (0)	2/11 (0.18)	9/11 (0.81)				
Sporadic IIP	0/30 (0)	10/30 (0.33)	20/30 (0.67)				
Control	1/43 (0.02)	18/43 (0.42)	24/43 (0.80)				

	Allele		Frequency		(p=0.33)
	AAT	ACT	AAT	ACT	
FIP	2/22 (0.09)	20/22 (0.91)			
Sporadic IIP	10/60 (0.17)	50/60 (0.83)			
Control	19/86 (0.22)	67/86 (0.78)			

表3 Genotype and allele frequencies in exon5 of SFTPC gene

(Exon5 AGC/AAC : S186N)

	Genotype			Frequency			(P=0.05)
	AAC/AAC	AAC/AGC	AGC/AGC	AAC/AAC	AAC/AGC	AGC/AGC	
FIP	0/11 (0)	2/11 (0.18)	9/11 (0.81)				
Sporadic IIP	0/30 (0)	13/30 (0.43)	17/30 (0.57)				
Control	4/43 (0.09)	22/43 (0.51)	17/43 (0.40)				

	Allele		Frequency		(p<0.05)
	AAC	AGC	AAC	AGC	
FIP	2/22 (0.09)	20/22 (0.91)			
Sporadic IIP	15/60 (0.25)	45/60 (0.75)			
Control	30/86 (0.35)	56/86 (0.65)			

と他の候補遺伝子の検索が必要である。3) 1家系について家族全員の呼吸機能検査を行った。間質性肺炎症例、間質性肺炎非発症症例ともに拡散能の低下が認められた。Crystalらは、家族性肺線維症におけるBAL液解析で間質性肺炎非発症症例に於いても線維芽細胞増殖因子の発現が高いことを明らかにし、遺伝的要因が関与している可能性をのべている⁹⁾。本研究の家族症例における間質性肺炎非発症例の拡散能低下も遺伝的要因の関与が示唆される。

SFTPC 遺伝子解析では exon1 から intron5 間の塩基配列を決定した。missense mutation を exon4, exon5 に認めたが、欧米の SNP (一塩基多型) の data base で比較検討した結果いずれも多型であった。しかし、codon186 については欧米で報告されている遺伝子多型頻度とは異なっていた。これは、民族差によるものなのか、病的な意味合いをもつものなのか検討するために孤発の特発性間質性肺炎症例と健常者について SFTPC 遺伝子解析を行った。codon186 の 186S (セリン) が家族性間質性肺炎症例や特発性間質性肺炎に、健常者では 186N (アスパラギン) が統計学的に高頻度に認められ、186S が間質性肺炎発症に感受性をしめすことが推測された。codon187, codon188 の missense mutation が、欧米で報告されている家族性間質性肺炎症例で認められていることを考え合わせると興味深い。codon187 や codon188 の 1 アミノ酸置換が SFTPC 前駆蛋白の細胞内プロセッシング異常を招くことから近傍の codon186 の 1 アミノ酸置換も SFTPC 前駆蛋白のプロセッシングに異常を招く可能性の否定はできない。

今回の検討から明らかな SFTPC 遺伝子異常は同定されなかったが、最近米国において ABC transporter A3 の遺伝子異常が家族性間質性肺炎の中に高頻度に見つかる¹⁰⁾ こと、また遺伝子連鎖解析から第 10 染色体短腕の 5～10 cM に間質性肺炎の感受性領域が存在するのではないかと報告もあり、今後症例の蓄積と欧米との共同研究を進めていく必要があると考えられた。

文 献

- 1) Nogee LM, et al. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *New Engl J Med* 344: 573-579, 2001.
- 2) Thomas AQ, et al. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J respire Crit Care Med* 165: 1322-1328, 2002.
- 3) Bridges JP, Wert SE, Nogee LM, Weaver TE. Expression of a human surfactant protein C mutation associated with interstitial lung disease disrupts lung development in transgenic mice. *J Biol Chem* 278: 52739-52746, 2003.
- 4) Glasser SW, Detmert EA, Ikegami M, Na C-L, Stahlman MT, Whitsett JA. Pneumonitis and emphysema in sp-C gene targeted mice. *J Biol Chem* 278: 14291-14298, 2003.
- 5) 瀬戸口靖弘, 福地義之助 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 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服調査研究班 平成 15 年度研究報告書 (主任研究者 貫和敏博) 37-43, 平成 16 年 3 月。
- 6) Repo UK, Kentala E, Koistinen J, Lehtipuu AL, Miettinen A, Pyrhonen S, Tiilikainen A, Vuornos T. Pulmonary apical fibrocystic disease. A serologic study. *Eur J Respir Dis* 62: 46-55, 1981.
- 7) 網谷良一, 新美彰男, 久世文幸, 他 特発性上葉限局型肺線維症 呼吸 11: 693-699, 1992.
- 8) 塩田智美, 清水孝一, 鈴木道明, 他 上葉優位な肺線維症の臨床病理学的検討 日呼吸会誌 37: 87-96, 1999.
- 9) Bitterman PB, Renard SI, Keogh B, Wewers MD, Adelberg S, Crystal RG. Familial idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 314: 1343-1347, 1986.
- 10) Shulenin S, Nogee LM, Annilo T, Wert S, Whitsett J, Dean M. ABCA3 gene mutation in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med* 350: 1296-1303, 2004.

【平成 16 年度】

間質性肺炎における血中 KL-6/MUC1 ムチンと 血栓形成について

河野 修興* 横山 彰仁 中島 拓 稲田 順也
大西 広志 宮崎 満 中島 正光

MUC1 ムチンには血管内皮細胞や血小板と結合する能力があり、血栓形成に関与しうる。そこで、血中に KL-6/MUC1 が増加する間質性肺炎において血栓形成に KL-6/MUC1 が関与するか否かを検討した。対象は間質性肺炎 (n=47) あるいは ARDS 患者 (n=34) で、診断時血清 KL-6 と線溶系マーカー (フィブリン分解生成物 FDP と D ダイマー) の関係を検討した。また、KL-6 上のセレクトチンのリガンドを検出する ELISA を構築した。間質性肺炎あるいは ARDS 患者の診断時血清 KL-6 と線溶系マーカーに有意の相関は認めなかった。しかし、ARDS 患者における KL-6 増加率と線溶系マーカー増加率の間には有意の相関を認め、ARDS 患者の DIC 合併群では KL-6 増加率は有意に高かった。呼吸器疾患において血中 KL-6/MUC1 の絶対量は血栓形成に関与しないが、急性増加は血栓形成と関連する可能性が推察された。また、セレクトチンリガンドを有する KL-6/MUC1 は間質性肺炎においても出現しており、血栓形成傾向のマーカーとなりうることを示唆された。

Relationship between serum KL-6/MUC1 level and intravascular coagulation in patients with interstitial pneumonia

Nobuoki Kohno, Akihito Yokoyama, Taku Nakajima, Junya Inada,
Hiroshi Ohnishi, Mituru Miyazaki, and Masamitsu Nakajima

*Department of Molecular and Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi,
Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan*

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) and exacerbation of IPF are often associated with thrombosis and disseminated intravascular coagulation (DIC). We hypothesized that MUC1 mucin is involved in the pathogenesis of thrombosis in such condition. We found that an increase in circulating KL-6/MUC1 during the 2 weeks following diagnosis of ARDS was significantly correlated with an increase of the fibrinolysis markers (fibrin degradation products and D dimer), but had no significant correlation with the absolute amount of KL-6/MUC1 in newly diagnosed ARDS patients. KL-6/MUC1 was also significantly higher in ARDS patients with DIC. These results strongly suggest a novel role of KL-6/MUC1 which may have a causal relationship with intravascular coagulation in interstitial pneumonia. In addition, we constructed an ELISA system for detection of selectin-ligands on KL-6/MUC1. We succeeded to detect serum KL-6/MUC1 with the epitope of sialyl Lewis A (designated as sLa-KL) in patients with interstitial pneumonia including ARDS. The amount of serum sLa-KL before treatment with high-dose corticosteroid "pulse" was significantly higher in patients who developed DIC than those without DIC, suggesting that this marker may reflect possibility for future thrombosis in patients with interstitial pneumonia.

はじめに

急性呼吸窮迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS) は急性肺障害の最も重篤な状態であり、死亡率は 50-70% と高率で極めて予後不良である。血液凝固異常の最重症型である播種性血管内凝固 (DIC) は ARDS 患者にしばしば合併し、予後の悪化に関与していると考えられる。ARDS 患者においては肺胞内あるいは血管内にフィブリン沈着が高頻度に認められ、凝固カスケードの活性化が認められる¹⁾。

我々は MUC1 ムチン上に発現した特異なエピトープである KL-6 を発見し、報告した。KL-6 は ARDS を含む間質性肺疾患の感度、特異度ともに優れたマーカーであり、病勢や予後を反映する^{2,3)}。ARDS においても、循環血液中の KL-6/MUC1 が高値を示す例ではその肺疾患がより重篤であり、予後はより不良であることが報告されている^{4,5)}。

最近、肺癌由来のムチンと P-及び L-セレクトインの相互作用が血管内血栓形成をもたらすことが報告された⁶⁾。大腸癌や乳癌の MUC1 上にはセレクトインと結合可能なルイス血液型物質が存在することが明らかになっている^{7,8)}。すなわち、ARDS などにみられる凝固カスケードの活性化は、内皮障害のみならず、MUC1 上のルイス抗原が関連する可能性がある。

以上の知見から、我々は循環血液中のムチンの増加が ARDS 患者における血管内凝固促進に働いているとの仮説をたてた。本仮説を検証するために、ARDS 患者における循環中の MUC1 ムチン/KL-6 と血管内凝固の指標として線溶系マーカー (フィブリン分解生成物 FDP と D ダイマー) を測定し、その関係を検討した。

対象・方法

1. 血清 KL-6 値と線溶系マーカーの相関について

対象は間質性肺炎 47 例および ARDS 34 例。間質性肺炎は当科で診断されたもので、内訳は、IPF 16 例、膠原病肺 16 例、その他 15 例 (NSIP 3 例、COP 3 例、薬剤性肺炎 2 例、詳細不明 7 例) である。また、ARDS は広島大学病院及び関連病院において、新規に診断さ

広島大学大学院 分子内科学

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

表 1. 各疾患群の背景

	IP (n=47)	ARDS (n=34)
Sex (M/F)	21/26	19/15
Age (years)	62.5±11.2	64.8±16.7
KL-6 (U/ml)	1285.3±1040.7	877.1±829.7
FDP (µg/ml)	5.3±6.6	19.8±33.8
D-Dimer (µg/ml)	2.6±4.4	15.7±16.7
LDH (IU/ml)	330.3±124.9	581.7±430.2
CRP (mg/dl)	3.2±5.5	15.3±10.9

Results are shown as the mean±SD.

れた例であり、いずれも診断時に静脈血を採取した。ARDS 症例で、少なくとも 2 週間以上生存しかつ離院しなかった 21 症例については、診断から 1 週後及び 2 週後にも継続して検体を採取した。得られた検体より、血清 KL-6、LDH 及び CRP と血漿 FDP 及び D-ダイマーを測定した。症例の背景は表 1 に示す。

ARDS の診断は 1994 年の American-European Consensus Conference Committee のクライテリアに、DIC の診断は 18th Congress of the International Society of Thrombosis and Hemostasis での診断基準に従った。

データは平均値±標準偏差で示した。また統計学的解析は、異なる 2 群間の検定には Mann-Whitney U-test を用い、データの相関には Spearman's rank correlation coefficient analysis を用いた。

2. セレクトイン・リガンドをもつ KL-6/MUC1 の検出について

血清中のセレクトイン・リガンドをもつ MUC1 分子を検出するために、サンドイッチ ELISA 法を用いた。すなわち、固相物質として、リコンビナントの E-, L-, および P-セレクトイン、各セレクトインと免疫グロブリンの Fc 部分とのキメラ、さらにセレクトインのリガンドである、シアリル・ルイス a を認識する CA19-9 抗体、シアリル・ルイス a および c を認識する ST272 抗体を用い、検出抗体として HRP 標識 KL-6 抗体を使用した。

スクリーニングのために、肺腺癌細胞株 ABC-1、PC-3、RERF-LCK、乳癌細胞株 YMB5 の各培養上清と、2 名の肺癌患者血清を用いた。各検体中の KL-6 濃度は市販のキット (ピコルミ KL-6; 三光純薬) にて測定した。

また、パルス療法を施行した間質性肺炎患者 [n=

34: IIPs 16例 (IPF 7, NSIP 1, COP 3, 未確定 5), CVD-IP 6例, ARDS 10例, AEP 1例, Radiation Pneumonitis 1例] のパルス前血清を用いてセレクチン・リガンドをもつ KL-6/MUC1 分子を測定した。

結 果

図 1 に示すように、間質性肺炎患者の診断時 KL-6 と線溶系マーカー (FDP 及び D-ダイマー) の間に有

意な相関は認められなかった。図 2 に ARDS の診断時および 2 週間後の血清 KL-6 と線溶系マーカーの関係を示すが、これらの間にも有意な相関を認めなかった。また図には示さないが、1 週間後の時点においてもそれらの間に有意な相関は認められなかった。さらにいずれの時点でも LDH 及び CRP と線溶系マーカーの間にも相関は認めなかった。

しかし、図 3 に示すように、診断日から 2 週間の KL-6 の増加率と線溶系マーカーの増加率との間には

図 1

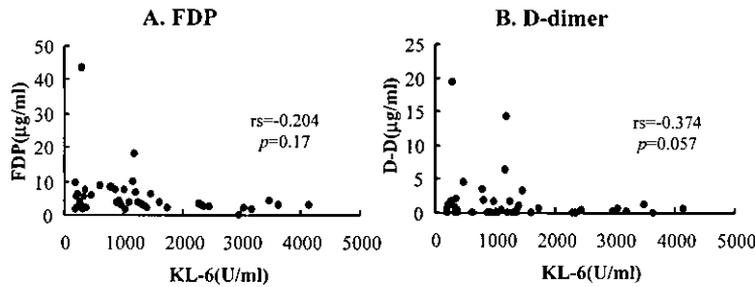


図 2

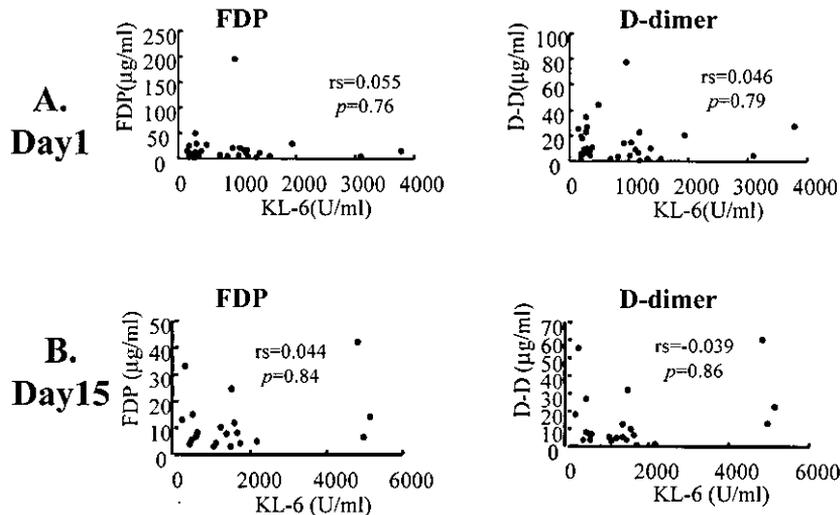
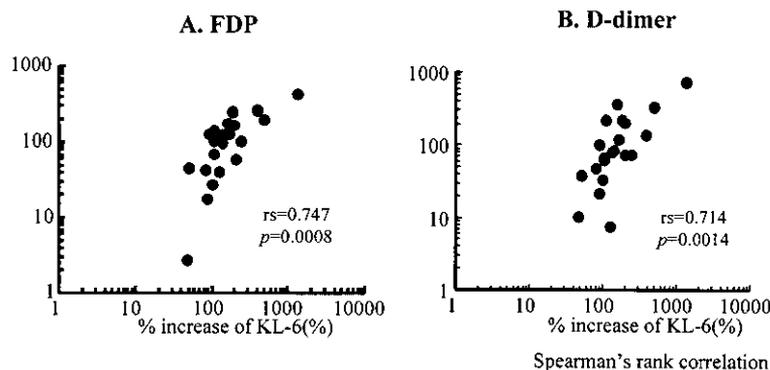


図 3



Spearman's rank correlation

図 4

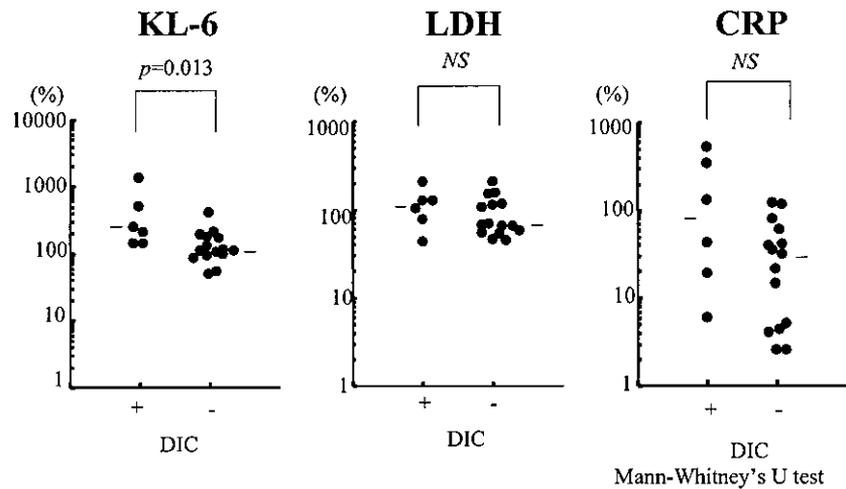


図 5

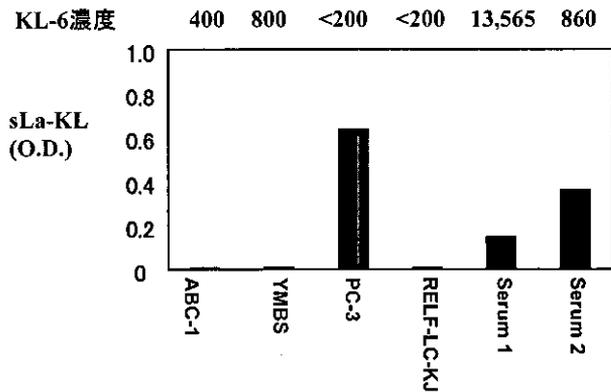
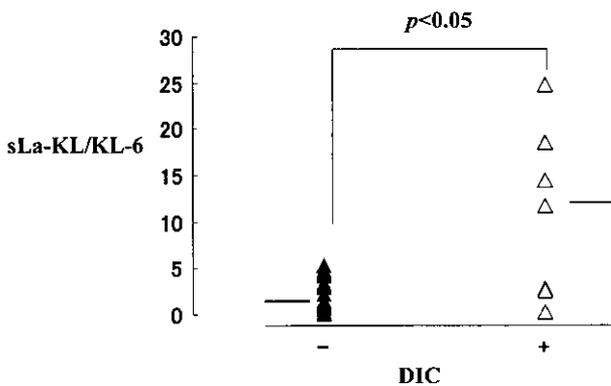


図 6



有意な相関が認められた。また増加量で検討しても同様であった。線溶系マーカー増加量・増加率との相関は LDH または CRP との間には認められなかった。さらに ARDS 患者において DIC 合併群では、非合併群に比較して KL-6 増加率は有意に高かったが、LDH

及び CRP の増加率には有意差を認めなかった (図 4)。

各種がん細胞培養上清と臨床検体 (血清) を用いて、セレクチン・リガンドをもつ KL-6/MUC1 の検出を試みた。各検体中の KL-6 濃度は図 5 に示した。固相にリコンビナントのセレクチン、Fc とのキメラを用いた場合は検出不能または極めて低い感度であった。そこで、セレクチン・リガンドであるシアリル・ルイス a に対する CA-19-9 抗体を用いて検出を試みた (検出物は sLa-KL と名づけた)。その結果 (図 5)、KL-6 の濃度に関係なく一部の培養上清、患者血清において検出可能であった。PC-3 の培養上清は KL-6 濃度が低いものの sLa-KL 濃度が高く、これを用いて標準曲線を作成し、多数例の血清で測定した。

図には示していないが、肺癌患者あるいは間質性肺炎患者において sLa-KL 濃度と KL-6、CA19-9 濃度との間に相関は認めなかった。また、シアリル・ルイス a とシアリル・ルイス c を認識する ST-272 抗体を用いて (ST-KL と命名) も同様に検出できたが、少なくとも肺癌患者において sLa-KL と ST-KL は極めて高い相関を示し、ほぼ同一のものを検出しているものと考えられた。図 6 には間質性肺炎増悪例での測定結果を示すが、KL-6 のなかでどの程度 sLa-KL が存在するかという指標として sLa-KL/KL-6 を比較すると、DIC を併発した 7 例では併発しなかったものに比較して有意に高値であった。

考 察

今回の検討から、MUC1 ムチンに属する KL-6 の増加は ARDS 患者における血管内凝固と非常によく相関し、DIC との因果関係があるものと考えられた。線溶系マーカーとの有意な相関は KL-6 においてのみ認められ、他の炎症や組織障害のマーカーである LDH 及び CRP においては認められなかったことも、KL-6 と血管内凝固の因果関係を示唆するものであった。しかしながら、KL-6/MUC1 の絶対量と線溶系マーカーとの相関は認めず、この事実から血管内凝固には KL-6/MUC1 の急激な増加が必要であると考えられた。

各種がん細胞培養上清と臨床検体 (血清) を用いて、セレクトイン・リガンドをもつ KL-6/MUC1 の検出を試みた。これまでに少数例でウエスタンブロットや ELISA で MUC1 上のルイス抗原の存在を明らかにした報告があるが、良性疾患で、あるいは多数例での検討は行われていない。過去に我々は間質性肺炎における血清 KL-6、CA19-9、SLX の比較検討を行っている⁹⁾。間質性肺炎における診断能は KL-6 が最も優れていたが、IPF や膠原病肺の 30-60% において CA19-9 や SLX が上昇し、KL-6 との間に有意の相関が認められた。健康人ではこれらの間に相関は認めないことから、病的な KL-6 上には CA19-9 や SLX のエピトープが出現している可能性が考えられた。

固相にリコンビナントのセレクトインを用いた場合は検出不能であり、1) 固相できていない、2) セレクトインとの affinity が弱い、3) 検体中に存在しない、という3つが考えられた。そこで、免疫グロブリンの Fc とのキメラ蛋白を固相化し検討したところ、Fc に対する抗体を用いることで、固相化が可能であることを確認でき、非常にわずかではあるが、図5と同様の結果が得られた。ある程度2次抗体の量を増加させても検出はむづかしく、そもそもセレクトイン・セレクトイン・リガンドの結合はゆるいのが特徴でもあり、affinity に問題があるものと考えられた。そこで、セレクトイン・リガンドに対する抗体を用いることとした。その結果、ARDS や間質性肺炎の増悪時など、良性疾患においても sLa-KL の検出が可能であることをはじめに明らかにすることができた。また、DIC を合併した例ではその濃度が有意に高く、DIC 合併の予測因子としても有用である可能性が示唆された。

ARDS において、KL-6/MUC1 の絶対量は関連がないが、急性の増加が血管内凝固と相関する可能性が示唆されたが、その理由は以下のように説明することが可能である。安定した状態において KL-6/MUC1 分子上のセレクトイン結合部位は、循環血液中に大量に存在する可溶性セレクトイン ($\mu\text{g/ml}$ のオーダーで存在) により飽和状態にあると思われる¹⁰⁾。KL-6/MUC1 が急性に増加することにより、細胞のセレクトインとの相互作用が可能になり、血管内凝固の最初のステップをもたらすと考えられる。ARDS のリスクのある患者群において、可溶性 L-セレクトインの減少が実際の ARDS 発症に相関し、さらには呼吸不全の重症度にまでも相関があったという報告があり¹¹⁾、この仮説と矛盾しない。しかし、可溶性セレクトインと KL-6/MUC1 との結合能や実際の臨床検体におけるこれらの関係を今後明らかにする必要がある。

結論として、KL-6/MUC1 は間質性肺炎患者における血液凝固異常に関与するという可能性が考えられ、急性の増加時にはセレクトイン・リガンドを持った KL-6/MUC1 が増加し、血管内凝固に関与している可能性がある。これまでに MUC1/KL-6 は血清マーカーとしての意義だけでなく、線維芽細胞の強い遊走因子であるなど間質性肺炎の病態にも関与する機能的側面が報告されているが¹²⁾、今回新たな機能面が明らかになったわけである。

参考文献

- 1) Welty-Wolf KE, Carraway MS, Ortel TL, Piantadosi CA. Coagulation and inflammation in acute lung injury. *Thromb Haemost* 2002; 88: 17-25.
- 2) Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Hamada H, Abe M, Nishimura K, Hiwada K, Kohno N. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 378-81.
- 3) Yokoyama A, Kohno N, Hamada H, Sakatani M, Ueda E, Kondo K, Hirasawa Y, Hiwada K. Circulating KL-6 predicts the outcome of rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit*

- Care Med 1998 ; 158 : 1680-4.
- 4) Sato H, Callister ME, Mumby S, Quinlan GJ, Welsh KI, duBois RM, Evans TW. KL-6 levels are elevated in plasma from patients with acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 2004 ; 23 : 142-5.
 - 5) Ishizaka A, Matsuda T, Albertine KH, Koh H, Tasaka S, Hasegawa N, Kohno N, Kotani T, Morisaki H, Takeda J, Nakamura M, Fang X, Martin TR, Matthay MA, Hashimoto S. Elevation of KL-6, a lung epithelial cell marker, in plasma and epithelial lining fluid in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004 ; 286 : L1088-94.
 - 6) Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J Clin Invest* 2003 ; 112 : 853-62.
 - 7) Fernandez-Rodriguez J, Dwir O, Alon R, Hansson GC. Tumor cell MUC1 and CD43 are glycosylated differently with sialyl-Lewis a and x epitopes and show variable interactions with E-selectin under physiological flow conditions. *Glycoconj J* 2001 ; 18 : 925-30.
 - 8) Sikut R, Zhang K, Baeckstrom D, Hansson GC. Distinct sub-populations of carcinoma-associated MUC1 mucins as detected by the monoclonal antibody 9H8 and antibodies against the sialyl-Lewis a and sialyl-Lewis x epitopes in the circulation of breast-cancer patients. *Int J Cancer*. 1996 ; 66 : 617-23.
 - 9) Yokoyama A, Kohno N, Kondo K, Ueda S, Hirasawa Y, Watanabe K, Takada Y, Hiwada K. Comparative evaluation of sialylated carbohydrate antigens, KL-6, CA19-9 and SLX as serum markers for interstitial pneumonia. *Respirology* 1998 ; 3 : 199-202.
 - 10) Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Bio* 119 (1992), p. 229.
 - 11) Donnelly SC, Haslett C, Dransfield I, Robertson CE, Carter DC, Ross JA, Grant IS, Tedder TF. Role of selectins in development of adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1994 ; 344 : 215-9.
 - 12) Hirasawa Y, Kohno N, Yokoyama A, Inoue Y, Abe M, Hiwada K. KL-6, a human MUC1 mucin, is chemotactic for human fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997 ; 17 : 501-7.

【平成 16 年度】

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 に関しても検討を行った。

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。

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、

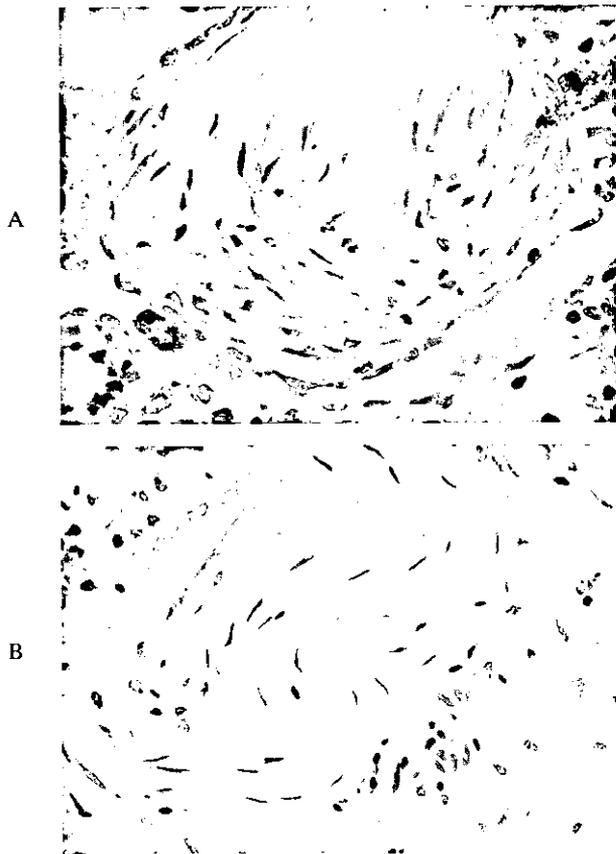


Fig. 1. Immunohistochemical findings of Foxfl in UIP and COP
 A. Interstitial cells in an intra-alveolar bud are positive for Foxfl in COP.
 B. Interstitial cells located in the area of fibroblastic focus are slightly positive for Foxfl in UIP.

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 Foxfl 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⁾。Foxfl 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 Foxfl 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 Foxfl 発現量をみ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

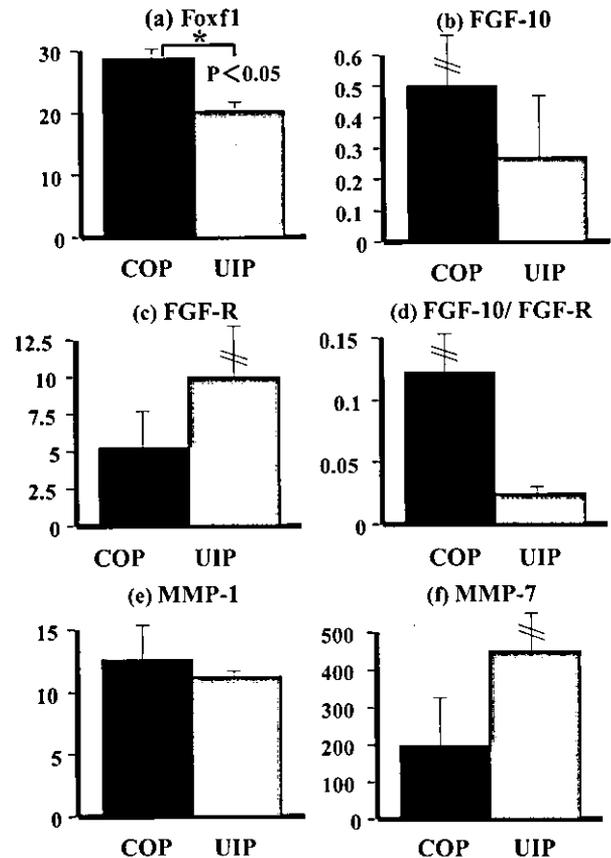


Fig. 2. Real time PCR assay for Foxfl, FGF-10, FGF-R, MMP-1, and MMP-7 in UIP and COP.
 (a) Foxfl shows significantly higher expression in COP than UIP. ($p < 0.05$)
 (b) FGF-10 shows high tendency in COP and low tendency in UIP.
 (c) FGF-R shows high tendency in UIP and low tendency in COP.
 (d) The 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、Foxfl 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 Foxfl の DNA binding site との結合親和性が確認されており、Foxfl 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 Foxfl 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 Foxfl 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⁸⁾⁻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.

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 臼井 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、微小なものは肺泡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 μm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、肺泡に粉塵が過剰沈着し線維増殖性変化が起きる。主に職業性のものが塵肺と呼ばれ、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¹⁾⁸⁾。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 μm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

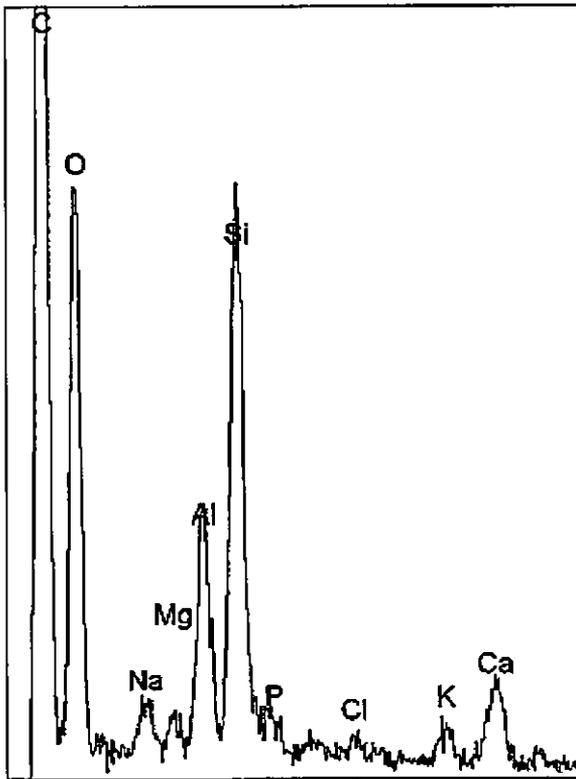


図1 EDS分析例
(energy dispersive X-ray spectroscopy)

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。この補正值を用いて疾患別, 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

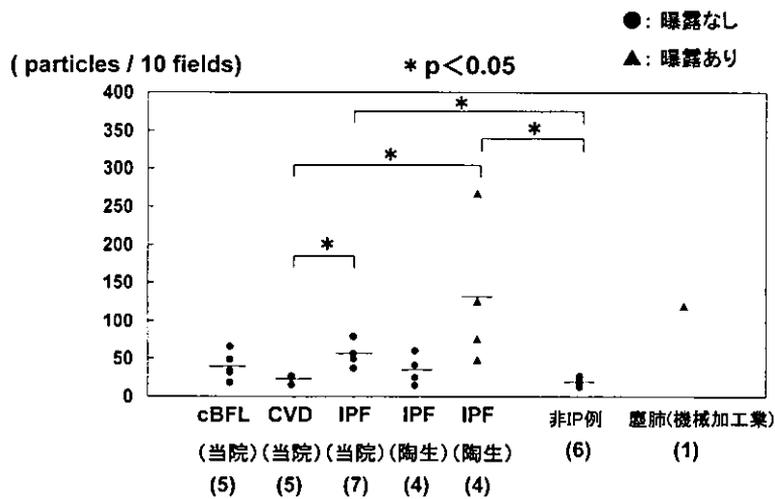


図2 偏光顕微鏡での粒子数測定 (疾患別)

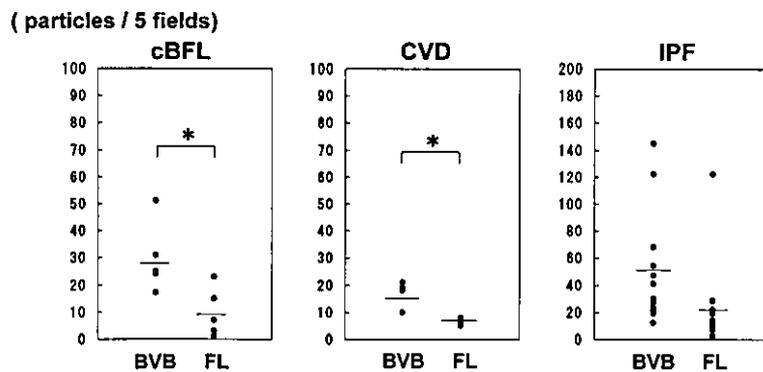


図3 偏光顕微鏡での粒子数測定 (部位別)

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

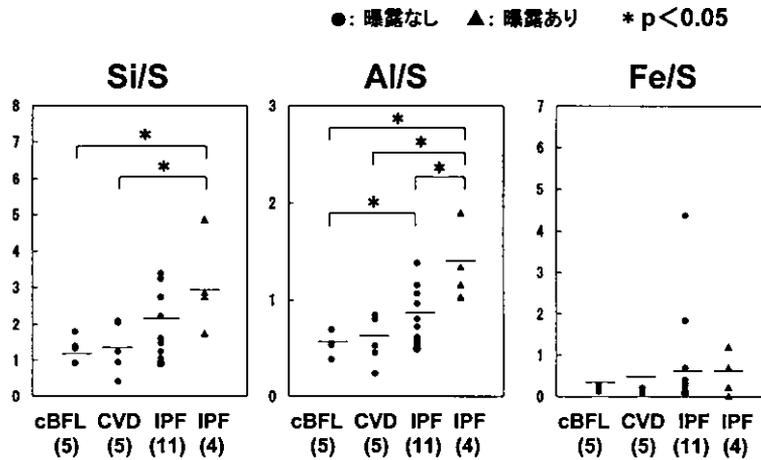


図4 疾患別比較 (1)

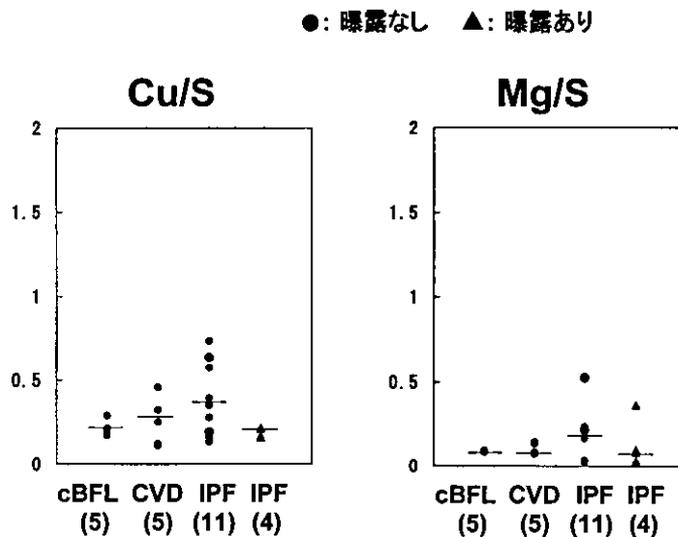


図5 疾患別比較 (2)

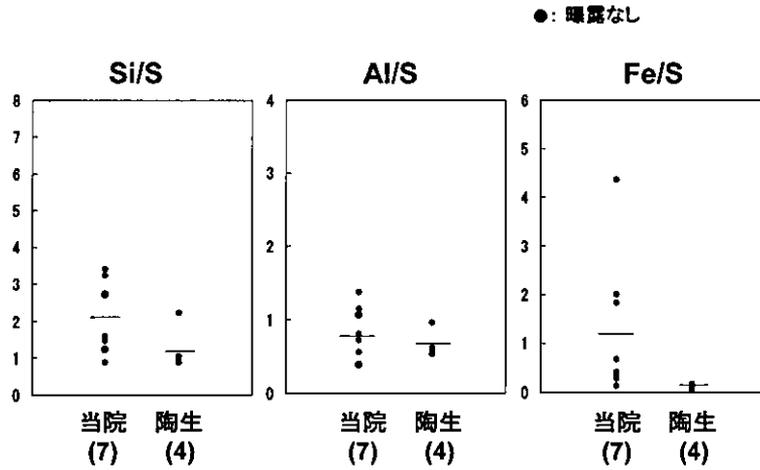


図6 IPFにおける地域間の比較

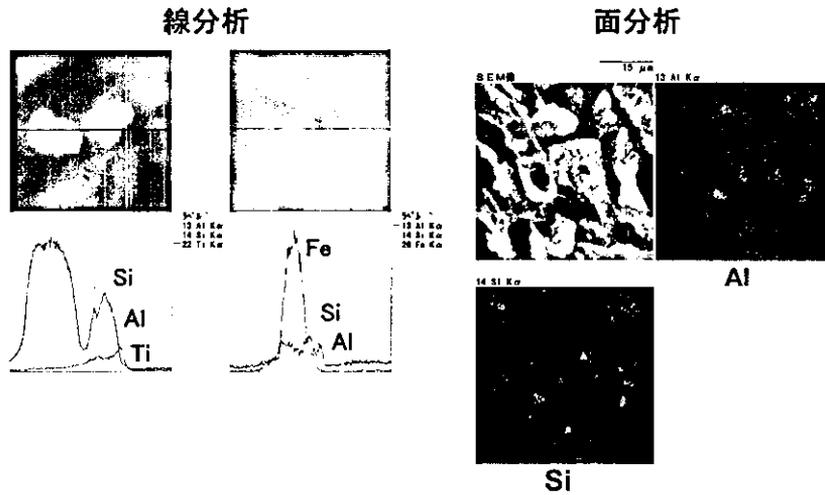


図7

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

ウム、珪素を含む粒子は認められたが、IPF ではさらに鉄、チタン、クロム、コバルトなども含む粒子を認める症例が多かった。また間質性肺疾患を持たない肺癌症例の正常肺部分や肺気腫症例の分析でもアルミニウム、珪素は同様に検出された。

考案・結論

偏光顕微鏡による肺組織観察については、塵肺症例において偏光顕微鏡、電顕両者での検討を行った報告があるが⁹⁾¹⁰⁾、偏光顕微鏡での観察は silica (遊離珪酸) 及び silicate (珪酸塩) の存在を微小なものまで確認でき、通常の病理標本で観察できることからスクリーニング検査として有効と思われる。一方、塵肺以外の肺疾患で偏光顕微鏡での観察を検討した報告は少なく、今回我々は慢性鳥飼病、吸入因子の関与が少ない膠原病肺、明らかな原因が不明である IPF について検討した。職業性曝露のある IPF で粒子数が特に多い傾向があり塵肺症と同程度のものも含んでいることは職業歴の関与で説明可能だが、職業性曝露のない IPF でも他疾患と比べて多くの粒子を認めたことは IPF における吸入因子の関与を示唆するものである。また逆に膠原病肺では非 IPF 例と同程度であったことから吸入因子の関与は少ないと考えられた。

電顕での元素分析は、職業歴は明確でないが塵肺症が疑われる場合、光顕で同定困難なタイプの石綿線維の同定などにおいて有効であるとされる¹¹⁾。間質性肺疾患においては患者の生活環境、職業、住居、趣味等を詳細に聴取することが重要であるが、短期間の経歴、かなり以前の生活歴などは不明な場合も多いため、このような電顕を用いた精査を積極的に行うことも重要と思われる。

今回測定した肺組織中の元素沈着量に関しては当然高齢であるほど蓄積は多いと思われ、また喫煙者では非喫煙者より肺組織中のアルミニウム、珪素の沈着が多く喫煙指数が高いほどこれらの元素沈着量も多いとの報告¹²⁾もあるが、今回比較した4群間では患者背景に差はなくこれらの影響は強くないと考えた。

元素分析において職業性曝露のある IPF で多く見られたアルミニウム、珪素については職業性吸入によるものと考えられ、珪素の線維化能と疾患との関連は考えやすいが、職業性曝露のない IPF においてもアルミニウム沈着が多かったことは、IPF と潜在的吸入の

関連、アルミニウムの肺線維化への関与を考える必要がある。もちろん個体側の感受性の要素はあるとしても、IPF においては職業歴以外の環境曝露の関与が考えられるため、認識困難な潜在的な吸入が肺局所における免疫反応を修飾したり直接病態に関与している可能性を考慮して IPF という疾患を認識していく必要がある。また、アルミニウム吸入による肺線維化に関しては、金属アルミニウム、アルミナなどの吸入により生じるとされるアルミニウム肺の報告がある¹³⁾。同じアルミニウムが肺線維化に関与しているという点では類似しているが、今回の検討ではアルミニウムのほとんどが珪素と共に存在し珪酸塩 (aluminum silicates) の形で検出されていること、アルミニウム肺に特徴的とされる上肺野優位、気腫性変化、胸膜肥厚などは目立たないことなどから異なった病態と考えられる。しかしアルミニウム肺の病態自体も詳細には理解されておらず¹⁴⁾、動物モデルでは単純な aluminum oxide 吸入のみでは軽度の炎症性変化しか起こさないと報告¹⁵⁾ やアルミニウムによる肺障害に否定的な意見¹⁶⁾ があること、症例報告ではアルミニウムと同時に吸入した珪酸などの関与も否定できないもの¹⁷⁾ があることを考慮すると、今回認めたような珪酸塩 (aluminum silicates) として存在し沈着量が多いアルミニウムが肺線維化を進行させるような作用を及ぼしている可能性は十分考えられる。

粒子自体の分析をある一定の範囲で行った検討では過去の報告¹⁸⁾ と同様に疾患に関係なく共通してアルミニウム、珪素を含む粒子を多く認めた。アルミニウム、珪素は鉄とともに土壤に多く含まれる元素として知られており¹⁹⁾²⁰⁾、主体は土壤由来の粉塵と考えた。また IPF において鉄、チタン、クロム、コバルトを含む粒子を認める症例が多かったことから、やはり IPF の一部の症例ではある特定の元素を多く吸入し肺に沈着していることが病態に関与している可能性が示唆された。

以上より 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るがこれらは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る。

参考文献

- 1) American Thoracic Society. Idiopathic pulmo-