

- Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 1843-50.
- 15) Endo S, Sato N, Nakae H, Yamada Y, Makabe H, Abe H, Imai S, Wakabayashi G, Inada K, Sato S. Surfactant protein A and D (SP-A, AP-D) levels in patients with septic ARDS. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2002; 111: 245-51.
- 16) Eisner MD, Parsons P, Matthay MA. Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Thorax.* 2003; 58: 983-8.
- 17) Kohno N. Serum marker KL-6/MUC1 for the diagnosis and management of interstitial pneumonitis. *J Med Invest.* 1999; 46: 151-8.
- 18) 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.
- 19) Fukaya S, Oshima H, Kato K, Komatsu Y, Matsumura H, Ishii K, Miyama H, Nagai T, Tanaka I, Mizutani A, Katayama M, Yoshida S, Torikai K. KL-6 as a novel marker for activities of interstitial pneumonia in connective tissue diseases. *Rheumatol Int.* 2000; 19: 223-5.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) Ohnishi H, Yokoyama A, Yasuhara Y, Watanabe A, Naka T, Hamada H, Abe M, Nishimura K, Higaki J, Ikezoe J, Kohno N. Circulating KL-6 levels in patients with drug induced pneumonitis. *Thorax.* 2003; 58: 872-5.
- 23) Fujii M, Tanaka H, Kameda M, Fujii M, Tanaka S, Ohashi K, Chiba H, Takahashi H, Abe S. Elevated serum surfactant protein A and D in a case of acute eosinophilic pneumonia. *Intern Med.* 2004; 43: 423-6.
- 24) Groeneveld AB, Raijmakers PG, Teule GJ, Thijs LG. The 67gallium pulmonary leak index in assessing the severity and course of the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996; 24: 1467-72.
- 25) Uh S, Lee SM, Kim HT, Chung Y, Kim YH, Park CS. The clearance rate of alveolar epithelium using ^{99m}Tc -DTPA in patients with diffuse infiltrative lung diseases. *Chest.* 1994; 106: 161-5.
- 26) Groeneveld AB, Raijmakers PG. The 67gallium-transferrin pulmonary leak index in patients at risk for the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1998; 26: 685-91.
- 27) Ishizaka A, Hasegawa N, Nakamura K, Takagi Y, Takano M, Yamaguchi K, Kubo A. Usefulness of pulmonary vascular leakiness assessment in interstitial pneumonitis. *Chest.* 2001; 119: 1455-60.
- 28) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165: 277-304.
- 29) Gelb AF, Dreisen RB, Epstein JD, Silverthorne JD, Bickel Y, Fields M, Border WA, Taylor CR. Immune complexes, gallium lung scans, and bronchoalveolar lavage in idiopathic interstitial pneumonitis-fibrosis. *Chest.* 1983; 84: 148-53.

特発性間質性肺炎における抗血管内皮細胞抗体の検討

千田 金吾* 松井 隆 須田 隆文 乾 直輝

抗血管内皮細胞抗体 (AECA) は, SLE などの膠原病や血管炎を来す疾患で検出され, 膠原病においては間質性肺炎の合併と関連があることが示唆されている. しかしその病因的意義については明らかではない. 特発性間質性肺炎 (IIP) 症例と膠原病性間質性肺炎 (CVD-IP) 症例で AECA を測定し, 基礎疾患, 病理組織所見, 疾患活動性および既存検査値との関連を検討した. 外科的生検にて病理診断が確定した IIP 12 例 (UIP 6 例/NSIP 6 例) と CVD-IP 12 例を対象とし, 肺病変を伴わない SLE 症例を陽性コントロールとした. AECA 値はヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞を用いて cellular ELISA 法にて測定した. 結果は Rosenbaum の方法を用いて ELISA ratio (ER) として算出し, 健常人の mean+3.SD. 以上を陽性とした. 結果は, IPF/UIP は全例が陰性だったが, IIP-NSIP は 6 例中 4 例 (67%) で, CVD-IP 症例は 12 例中 7 例 (58%) が陽性だった. AECA からみると, IIP-NSIP は IPF/UIP と異なり, CVD-IP との類似性が示唆された.

Anti-endothelial cell antibodies in patients with idiopathic interstitial pneumonia

Kingo Chida, Takashi Matsui, Takafumi Suda, and Naoki Inui

Second Division, Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

Anti-endothelial cell antibodies (AECA) are frequently detected in collagen vascular disease (CVD) and systemic vasculitis. It is also reported that the presence of AECA was correlated with pulmonary fibrosis in patients with CVD. Their pathogenic role, however, remains unclear. We investigated the prevalence of AECA in the sera of patients with interstitial pneumonia including usual interstitial pneumonia (UIP) and nonspecific interstitial pneumonia (NSIP), and also studied the relation between the existence of AECA and the clinical and serological features. Twelve patients with idiopathic interstitial pneumonia (6 with IPF/UIP and 6 with idiopathic NSIP), and 12 patients with interstitial pneumonia associated with CVD (CVD-IP) were studied. The histological classification was performed based on the pathologic findings obtained by surgical lung biopsy. Serum samples collected from the patients and healthy subjects were examined for AECA by cellular enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using human umbilical vein endothelial cells. The results were expressed as an ELISA ratio (ER). Sample was judged positive when the ER is greater than the mean+3S.D. of the healthy control group. AECA were negative in sera of all 6 patients with IPF/UIP, whereas 4 of 6 patients (67%) with idiopathic NSIP as well as 7 of 12 patients (58%) with CVD-IP were found to be positive. Further, there was no significant correlation of the values of AECA with clinical or serologic findings in patients with IIP or CVD-IP.

In terms of the prevalence of AECA our data suggest that the pathogenesis of idiopathic NSIP is similar or comparable to that of CVD-IP.

初めに

抗血管内皮細胞抗体 (Antiendothelial cell antibodies; AECA) は SLE などの膠原病や血管炎を来す疾患において検出され、疾患活動性や臓器病変に関連している可能性が示唆されている。しかし、対応する抗原は明らかでなく、AECA の病態に与える意義についても不明な点が多い¹⁾。

AECA は膠原病において、間質性肺炎の発症に関連することが報告された^{2,3)}。一方、特発性間質性肺炎における AECA の検討をした報告はまだない。そこで今回、特発性間質性肺炎における、AECA の意義についての検討を行った。

対象と方法

浜松医科大学附属病院で、外科的肺生検により診断の確定した 12 名の特発性間質性肺炎患者 (IIP; IPF/UIP 6, NSIP 6) と膠原病関連間質性肺炎患者 (CVD-IP) 12 名を対象とした。対象患者の、診断確定時かつ治療前の血清を用い AECA を測定し、その結果と基礎疾患、病理組織型、既知のマーカー、間質性肺炎の活動性や呼吸機能、治療反応性や予後との関連について検討した。

AECA は Rosenbaum らにより報告された cellular ELISA 法⁴⁾ に若干の改変を加え測定した。以下にその詳細を示す。ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC, Veritas 社) の第 4 継代を用いて行った。各継代で実験を行い、継代間で結果の違いがないことを確認した。96 穴プレート (Nunc No. 167008) の各ウェルに 20,000 個ずつ細胞を播種し、2 日後にコンフルエントとなった状態で使用した。まず初めに、培養液を除き、0.5% glutaraldehyde で細胞を固定した後、phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄する。そして、非特異的結合を防ぐため 10% bovine serum albumin (BSA)/PBS で 60 分間ウェル内面をブロックする。ブロック終了後、1% BSA/PBS で 1,000 倍に希釈した被検血清を、各ウェルに 100 μ l ずつ添加し、60 分間、37°C におく。1% BSA/PBS で洗浄した後、HRP ウサギ抗ヒト F(ab)₂ を 800 倍希釈し 100 μ l ずつ加える。60

分間、37°C でおいた後、1% BSA/PBS で 5 回洗浄し、風乾で十分に乾燥させる。発色反応として TMB を各 well に 100 μ l ずつ加え 10 分間反応させた後、H₂SO₄ を反応停止液として 100 μ l ずつ加え、反応を停止させる。その後、ELISA reader を用いて 450 nm の波長で吸光度を計測する。各検体は triplicate で行い、平均値をその検体の吸光度とした。各測定結果は ELISA ratio (ER) で表した。

$$ER = \frac{S - B}{A - B}$$

- S : 被検血清の吸光度
- A : 陽性コントロールの吸光度
- B : 陰性コントロールの吸光度

cut off 値は健常人コントロールの平均 + 3S.D. とし、それ以上を陽性と判定した。

統計学的検討はノンパラメトリック検定または χ 検定で行い、有意水準は 0.05 以下とした。

結 果

対象症例の背景を示す (Table 1)。IPF/UIP は全例

Table 1. 対象症例の背景因子

| 疾患 | IIPs | | CVD-IP |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | IPF/UIP | NSIP | |
| 症例数 | 6 | 6 | 12 |
| 性別 (男性/女性) | 6/0 | 4/2 | 6/6 |
| 検査所見 | | | |
| LDH (IU/l) | 206 \pm 28 | 238 \pm 46 | 301 \pm 182 |
| KL-6 (U/ml) | 612 \pm 376 | 1670 \pm 1266 | 1066 \pm 1215 |
| PaO ₂ (Torr) | 77.4 \pm 7.3 | 79.8 \pm 10.2 | 76.2 \pm 13.0 |
| %VC (%) | 79.4 \pm 30.3 | 71.2 \pm 2.9 | 78.2 \pm 22.9 |
| BAL-Ly (%) | 2.0 \pm 1.0 | 6.4 \pm 1.7 | 8.8 \pm 6.4 |
| レイノー症状あり | 0 | 1 | 4 |
| 肺高血圧症の合併 | 0 | 0 | 0 |

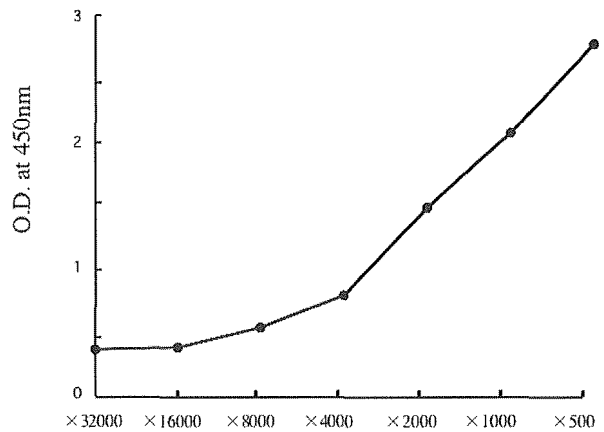


Figure 1. 陽性コントロールから作成した検量線

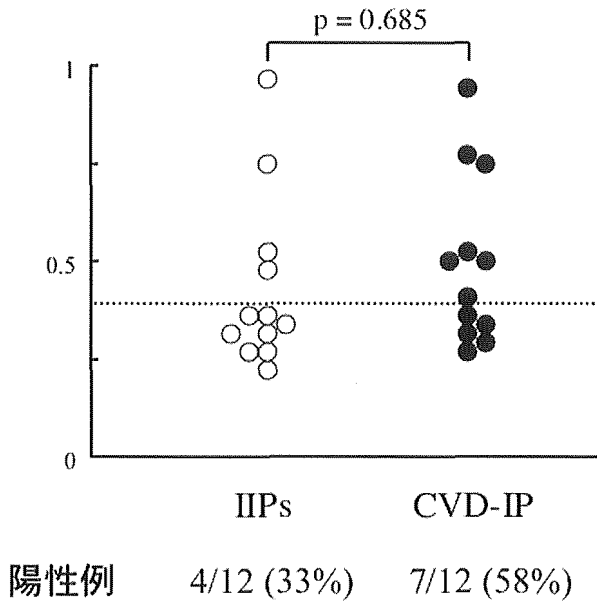


Figure 2. IIPs と CVD-IP の AECA 値 (ER)

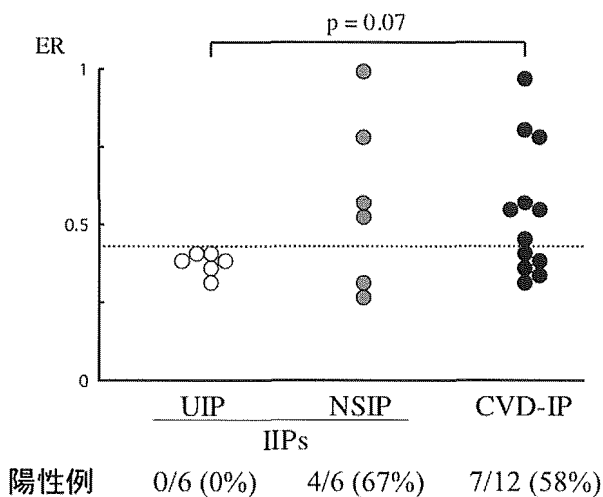


Figure 3. UIP, IIP-NSIP と CVD-IP の AECA 値 (ER)

が男性だった。各検査所見は 3 群間で有意な差はみられなかった。CVD-IP の基礎疾患は、PM/DM, RA, SSc, SLE が各 3 例だった。

陽性コントロールとした、間質性肺炎のない SLE 症例での結果を示す (Fig. 1)。検量線から、血清の濃度に依存性した吸光度が得られていることが確認され、この結果に基づき今回の検討は、1,000 倍希釈の血清で行った。

IIP と CVD-IP の AECA 値 (ER) の結果を示す (Fig. 2)。ER は IIP (0.427 ± 0.101) と CVD-IP (0.427 ± 0.101) の両群で有意な差はみられなかった ($p=0.685$)。また、cut off 値を用いて比較すると、

AECA は IIP では 12 例中 4 例 (33%) で、CVD-IP は 12 例中 7 例 (58%) で陽性だった。

IIP を組織型で分け検討すると (Fig. 3)、IPF/UIP は AECA が全例で陰性だったのに対して、NSIP は 4 例 (67%) が陽性だった。IPF/UIP は CVD-IP と比べ ER が低値の傾向 ($p=0.07$) にあり、一方 NSIP は CVD-IP と同様の傾向を示した。

さらに、IIP と CVD-IP をそれぞれ組織型で比較すると、IIP は UIP と NSIP で陽性率に差があったのに対して、CVD-IP においては、UIP, NSIP とともに 50% の陽性率であり、組織型による違いはなかった (Fig. 4)。

CVD-IP の基礎疾患ごとの AECA の陽性例は PM/DM, RA, SSc, SLE がそれぞれ 2, 1, 1, 3 例で、各疾患とも従来の報告とほぼ同様の陽性率あった。

AECA と既存の間質性肺炎のマーカースとの関連では、IIP および CVD-IP の全症例でみると、KL-6, %VC, PaO₂, BAL-lym はいずれも AECA と間に有意な相関はなく (Fig. 5)、IIP のみでも、やはり有意な相関はなかった (Fig. 6)。

また、AECA と予後や治療反応性についても有意な関連はなかった。

考 察

AECA は SLE などの膠原病や血管炎を来す疾患で検出され、臓器病変や活動性によって検出率が変化することが報告されている。各疾患における陽性率は SLE で 15-85%、SSc で 28-85%、PM/DM で 44-60% とされるが、報告により差がみられる⁵⁾。

AECA の作用として、血管内皮細胞に存在する抗原に結合することにより、内皮細胞からの IL-6 や IL-8 などの種々のサイトカインの放出や、接着因子の発現、白血球の浸潤を促進するなどが考えられる。また内皮細胞の apoptosis を誘導し、内皮障害を生ずることが知られており、これらの作用が血管炎や血管障害を起こすことが推察されている。しかし、対応する抗原は明らかとなっておらず、その病因的意義については不明な点も多い^{1,5)}。

D'Cruz らは皮膚筋炎や多発筋炎を含む特発性筋炎症例において、間質性合併例は、非合併例に比べ、AECA の陽性率が有意に高いことを示し、AECA がこれらの疾患において、間質性肺炎合併の指標になり

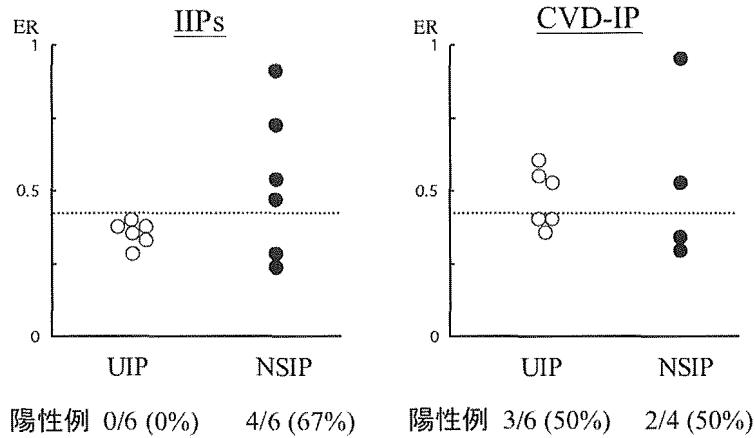


Figure 4. 組織所見による AECA の比較

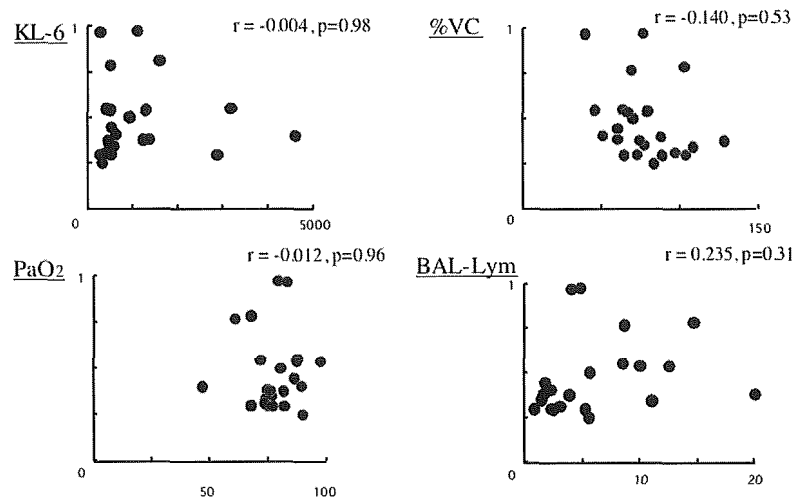


Figure 5. AECA と既存マーカーとの関連 (全症例)

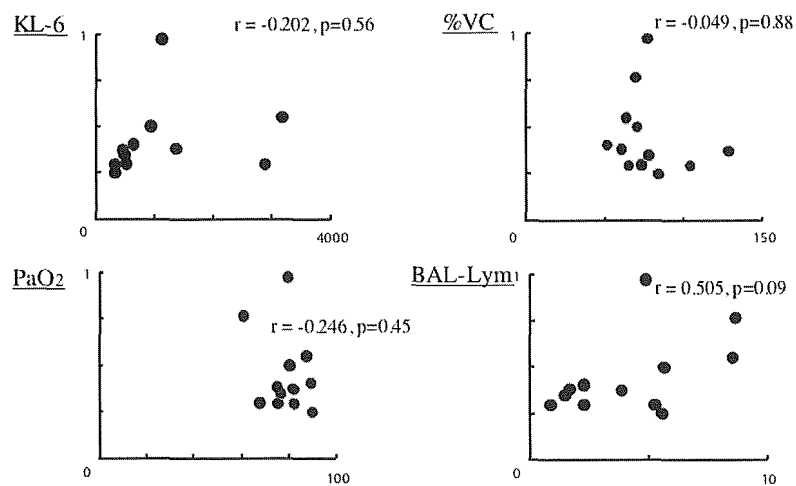


Figure 6. AECA と既存マーカーとの関連 (IIP 症例)

うることを報告した²⁾。また、Ihnらは全身性硬化症の症例で、同様に間質性肺炎合併例では有意にAECA陽性例が多いことを報告した³⁾。以上から膠原病においては、AECAが間質性肺炎の発症に関連があることが推察されている。しかし、これらの報告においては、AECAが間質性肺炎発症に及ぼす機序については明らかにされていない。

我々の検討からは、IIP-NSIP症例の6例中4例でAECA陽性例が見いだされた。IPF/UIPは全例が陰性であり、両者の病態の違いが推察され、IIP-NSIPはむしろCVD-IPと類似した病態である可能性が示唆された。間質性肺炎における病変の主座は胸隔であり、AECAが血管障害を来しようとした場合、それが間質性肺炎の発症にどのように関わるのか明らかではない。今回は組織学的に血管炎のない症例を対象としているが、間質性肺炎におけるAECAの意義については、陽性例と陰性例での組織学的あるいは臨床像の詳細な比較検討が必要であると思われる。また、IIPには肺病変先行型膠原病が含まれている可能性があり、IIPのAECA陽性例については、その長期的な経過を含めた検討により、CVD-IPとの異同が明らかになるとと思われる。

一方、IIPと診断された後、無治療での経過観察中や治療終了後に膠原病が明らかになり、肺病変先行型膠原病と診断される症例を時に経験する。診断時に明らかな膠原病を示唆する所見がない場合は、IIPと肺病変先行型膠原病の鑑別は不可能であり、今回示されたAECAがIIP-NSIPに特異的なものであるのか、あるいは肺病変先行型膠原病を示唆するものであるのかなどは、長期にわたる経過観察を加えた検討が必要であろう。

AECAは既存の間質性肺炎の指標との相関はみられず、また治療反応性や予後との明らかな関連も認めなかった。しかし、今回の症例は治療例が少なく、十分な検討ができなかった。さらに症例を積み重ね、治療経過や再燃時のAECAの推移を調べることにより、既存の指標とは異なる間質性肺炎の指標となる可能性もあるのではないかと考えている。

以上より、今後さらに症例を積み重ね、AECAのIIPにおける意義について検討していく必要があると考えられた。

まとめ

(1) IPF/UIPは全例でAECAが陰性だったが、IIPs-NSIPでは4例(66%)、CVD-IPは7例(58%)で陽性だった。

(2) 組織型では、IIPsはNSIPのみでAECAの陽性例があったのに対して、CVD-IPはUIP、NSIPに陽性例の差はなかった。

(3) 既知のマーカーや呼吸機能検査とAECAに相関は見られなかった。

(4) 治療反応性や予後とも明らかな関連はなかった。

結語

AECAの検討からは、IIPsにおいてUIP/IPFとNSIPは病態が異なる可能性があり、またIIP-NSIPとCVD-IPの類似性が示された。

参考文献

- 1) Meroni P, Ronda N, Raschi E, Borghi M. Humoral autoimmunity against endothelium: theory or reality? *Trends in immunology* 2005; 26: 257-281.
- 2) D'Cruz D, Keser G, Khamashta MA, Direskeneli H, Targoff IN, Miller F, Hughes GRV. Antiendothelial cell antibodies in inflammatory myopathies: distribution among clinical and serologic groups and association with interstitial lung disease. *J Rheumatol* 2000; 27: 161-164.
- 3) Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Igarashi A, Yazawa N, Kubo M, Kikuchi K, Takehara K, Tamaki K. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 203-209.
- 4) Rosenbaum J, Pottinger BE, Woo P. Measurement and characterization of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol* 1988; 72: 450-45.
- 5) Youinou P. New target antigens for antiendothelial cell antibodies. *Immunobiology* 2005; 210: 789-79.

特発性肺線維症の急性増悪に関する 免疫血清学的因子の検討

小山 正平¹ 海老名雅仁^{1***} 谷口 博之² 宮庄 拓³ 西村 秀一⁴ 佐々木ときわ¹
木村雄一郎¹ 田澤 立之¹ 石坂 彰敏⁵ 近藤 丘^{6**} 貫和 敏博^{1*}

【背景と目的】特発性肺線維症 (IPF) の急性増悪のメカニズムに関しては未だ不明な点が多い。我々は IPF 急性増悪患者より採取した肺胞洗浄液 (BALF) および血漿に関して免疫血清学的検査およびウイルス検査を施行し、急性増悪発症のメカニズムについて検討した。【方法】1998年7月から2005年6月までに公立陶生病院に入院された IPF 急性増悪の患者6名の BALF および血漿, 2001年4月から2005年11月までに東北大学病院遺伝子呼吸器内科に検査入院もしくは外来受診された安定期 IPF 患者18名の BALF および血漿に関して、まず IPF 急性増悪発症時の BALF に関して12種類のウイルス培養を施行し、さらに対象となった全ての BALF および血漿について17種類のサイトカイン濃度を測定した。【結果】急性増悪患者の BALF に関して12種類のウイルス培養はいずれも陰性であった。また BALF 中のサイトカインに関しては、急性増悪時に安定期と比べ、IL-6, IFN γ , TNF α のほか IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, GCSF, GM-CSF, MCP-1 (13/17 種類) が有意に上昇していた。さらに急性増悪の BALF 中では予後不良の症例ほど IL-6, IFN γ , TNF α が高値であった。血漿中サイトカインに関しては、IL-6, IL-7, IL-8, IL-10 が安定期と比べ急性増悪時に有意に上昇していた。【結論】IPF 急性増悪の誘因としてウイルス感染は否定的と考えられた。またサイトカインの解析については今後さらに検討症例を増やし、さらに同一患者のデータを経時的に追うことで、急性増悪の病態解明や予後予測、治療効果判定、急性増悪の早期診断に役立つ可能性があると考えられた。

Variations of Cytokines in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) and Serum of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis on Acute Exacerbation

S. Koyama¹, M. Ebina¹, H. Taniguchi², T. Miyasho³, H. Nishimura⁴, T. Sasaki¹,
Y. Kimura¹, R. Tazawa¹, A. Ishizaka⁵, T. Kondoh, and T. Nukiwa¹

¹ROMM/IDAC, Tohoku Univ, Sendai, Japan ;

²Tosei Hospital ;

³Rakuno Gakuen Univ ;

⁴National Hospital Organization, Sendai Medical Center ;

⁵Keio Univ ;

⁶Department of Thoracic Surgery Institute of Development, Aging and Cancer Tohoku Univ.

Rationale : Although the onset of acute exacerbation (Aex) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) has been notified worldwide, the mechanism still remains uncertain. We tried to find out the initial onset of acute exacerbation and its time-course by analyzing BALF and serum of these patients. **Methods :** We examined both BALF and serum samples of 6 patients with Aex, and the serum of 14 out-patients of IPF. The concentrations of 17 cytokines in BALF and serum were measured. These BALF samples were also subjected to virus isolation by inoculation into cultured cells of human embryonic fibroblasts, and cell lines, HEp-2; Vero; HMV-II, MDCK, LLC-MK2 cells. **Results :** No active viral infection was detected by any of these BALF materials. The levels of IL-2, IL-5 and IL-6 in BALF were elevated at the onset but decreased promptly after the treatment. The levels of IL-8, TNF α , IFN γ in BALF were increased gradually even after the treatment. The levels of IL-6, IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, GCSF, GM-CSF, MCP-1 in BALF were significantly elevated in 6 patients with IPF at Aex in comparison with stable condition of 9 out-patients with IPF (Mann Whitney U test). Serum levels of IL-6, IL-7, IL-8 and IL-10 were significantly elevated in 5 patients with IPF at Aex in comparison with stable condition of 10 out-patients with IPF (Mann Whitney U test). **Conclusions :** Viral infection was clearly denied to cause the onset of the acute exacerbation. The increased levels of IL-8, TNF α , IFN γ in BALF even after treatment in the patients with poor survival should be targeted by new strategy. As for the serum markers, IL-6 could be useful for detecting Aex of IPF.

緒 言

特発性肺線維症 (IPF) の急性増悪は, IPF の慢性経過中に急速な呼吸不全の進行を認める病態であり, わが国で初めて提唱された概念である¹⁾²⁾. IPF の急性増悪は, その経過中に1ヶ月以内で, ① 呼吸困難の増強, ② HRCT 上蜂巢肺以外の新たなスリガラス陰影・浸潤影の出現, ③ 同一条件下で PaO₂ 10 Torr 以上の低下のすべてを認め, 明らかな感染, 気胸, 悪性腫瘍, 肺塞栓, 心不全が除外されるものと定義される. 急性増悪発症の誘因となりうるものとしては, ステロイドの減量³⁾ や手術, 肺胞洗浄などの検査手技など⁴⁾ が知られているが, その原因や発症メカニズムに関しては依然として不明な点が多い.

今回我々は急性増悪の原因としてウイルス感染の可能性, 急性増悪患者の BALF・血液中のサイトカインのふるまいを検証したので報告する.

患者と方法

1. 対象

1998年7月~2005年6月までに公立陶生病院アレルギー呼吸器内科, 2001年4月~2005年11月までに東北大学病院遺伝子呼吸器内科を受診した外来 IPF 患者 14 名及び IPF 急性増悪で入院した患者 8 名の計 22 名を対象として, BALF・血漿に関してウイルス検査・免疫血清学的検査を施行した. 尚, IPF の診断に関しては, VATS にて UIP を確認できたのは 22 例中 10 例, 残り 12 例は ATS/ERS の international consensus statement⁵⁾ に準じた IPF の臨床診断基準を満たしたため診断した.

BALF を検査できたのは 22 名中 15 例 (表 1). まず急性増悪患者 6 名の入院時の BALF について 12 種の

ウイルス検索を施行した. さらに急性増悪患者 6 名と外来無治療患者 9 名の BALF について 17 種のサイトカイン濃度を測定した.

血漿は (表 2) に示す 22 名中 15 名に関して 17 種のサイトカイン濃度を測定した.

2. ウィルス検査

ウイルス分離は国立病院機構仙台医療センターウイルスセンターの協力で施行した. Eagle's minimum essential medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) に 0.5% gelatin, penicillin G 500 Units/ml, streptomycin 500 mg/ml を加えて medium を作成し, BALF を medium に移した後 4,000 g 4°C 15 min で遠心. その上清を 12 種のウイルス (influenza viruses, parainfluenza viruses, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, adenoviruses, enteroviruses, cytomegalovirus, herpes simplex virus, human coronavirus 229E, human metapneumovirus) の発育に十分な条件を備えた培養細胞 (human embryonic fibroblasts, and cell lines, HEp-2; Vero; HMV-II, MDCK, LLC-MK2 cells) に接種し, 2 週間細胞変性の状況を確認した. 最初の週間で変性が生じなければ, 継代してさらにもう 2 週間変性の状況を確認した.

3. サイトカイン測定

BALF は 2,000 rpm 4°C 10 min で遠心後その上清 200 μ l, 血漿は EDTA 添加の採血管に採取した血液を 1,500 rpm 4°C 10 min で遠心後その上清 100 μ l それぞれ準備し, Bio-Plex cytokine assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc.) を使用し ELISA にて 17 種類のサイトカイン (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, GM-CSF, G-CSF, MCP-1, TNF α , IFN γ , MIP-1 β) を測定した.

4. 統計学的解析

すべての統計学的解析は SPSS (SPSS Inc.) を用いて行った. 検定には Mann-Whitney U test を用いた. P 値が 0.05 未満を有意差ありと判定した.

結 果

1. 急性増悪時の BALF 中のウイルス検索

急性増悪を発症した患者から採取した BALF について 12 種類のウイルス培養を施行したところ, いずれの培養細胞にも細胞変性は生じなかった. 少なくとも活動性のあるウイルスの存在は認めなかった. 以上

¹ 東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍分野

² 公立陶生病院呼吸器・アレルギー内科

³ 酪農学園大学

⁴ 国立病院機構仙台医療センター ウィルスセンター

⁵ 慶応大学呼吸器内科

⁶ 東北大学呼吸器外科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 主任研究者

** びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

*** びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

から急性増悪の誘因としてウイルス感染は否定的と考えられた。

2. IPF 患者の BALF 中サイトカインの比較検討

IPF 安定期 (Obs) と比較して急性増悪期 (AEx) に有意に BALF 中で増加しているサイトカインは、測定した 17 種類のうち 13 種類 (TNF α , IFN γ , IL-6, IL-1 β , IL-5, IL-7, IL-10, IL-13, GCSF, MCP-1 以上は P<0.01, IL-2, IL-8, GM-CSF 以上は P<0.05) であった (図 1)。そのうち、IL-6, TNF α , IFN γ は特に予後不良例 (症例 1, 2) で高い傾向を示した (図 2)。また、急性増悪治療経過中に BALF を再検できた 3 例 (症例 3, 4, 5) に関して、IL-2, IL-5, IL-6 は治療により予後に関わらず低下する傾向を示し、IL-8, IFN γ , TNF α は予後不良例で治療に関わらず上昇傾向を示した (図 3)。

表 1 (Mean \pm SD)

| BALF | 外来無治療 | 急性増悪 |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| 患者 | n = 9 | n = 6 |
| 男 / 女 | 6 / 3 | 4 / 2 |
| 年齢 | 60.3 \pm 8.5 | 70.0 \pm 3.1 |
| 喫煙 / 非喫煙 | 6 / 3 | 4 / 2 |
| BI ※ | 774 \pm 265 | 775 \pm 623 |
| PaO ₂ / FiO ₂ | 347 \pm 90.1 | 174 \pm 34.2 |
| BALF 分画 | | |
| 細胞数 $\times 10^3$ /mm ³ | 2.94 \pm 1.46 | 3.31 \pm 1.98 |
| M Φ % | 88.6 \pm 6.41 | 79.4 \pm 18.0 |
| Neutro % | 2.75 \pm 1.39 | 16.6 \pm 18.5 |
| Lymph % | 5.00 \pm 3.90 | 3.68 \pm 2.66 |
| Eosino % | 3.28 \pm 3.53 | 0.08 \pm 0.11 |
| CD 4 / 8 | 1.30 \pm 0.81 | 1.34 \pm 1.32 |

※BI = Brinkmann Index

3. IPF 患者の血漿中サイトカインの比較検討

BALF 中のサイトカインに関しては 17 種中 13 種で急性増悪時に有意な上昇を認めたが、血液所見にも反映されるのはその一部 (4/13 種類) のみであった。IL-6, IL-8, IL-10 は無治療・治療中と比べ急性増悪で、IL-7 は無治療と比べ治療中・急性増悪でそれぞれ有意に高値を示した (図 4)。また IL-6 は予後不良例ほど高値を示す傾向が見られた (表 3)。

考 察

IPF 急性増悪の原因をウイルス感染とする見解は以前より提唱されており今なお賛否両論である⁶⁾⁷⁾。今回の急性増悪患者の BALF におけるウイルス培養の検討ではいずれも陰性の結果であり、ウイルス感染の関与については否定的な結果であった。急性増悪の場合、早期に免疫抑制療法を開始することがほとんどであり、ペア血清によるウイルス抗体価の評価は現実的に困難である。今回の検討では、ウイルス培養という形でのみ評価しているが、今後は PCR も追加して検討を行う予定である。

IPF 患者の BALF 中サイトカインに関しては、これまでも複数報告があり、IL-8, MCP-1, GM-CSF, G-CFS などが有意に上昇していることが示されている⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。しかし、急性増悪時の BALF 中サイトカインを検討した報告はこれまでに無く、これまでの報告はいずれも安定期 IPF 患者と健常人を比較した報告であった。今回の検討から急性増悪時には安定期と比較

表 2 (Mean \pm SD)

| 血漿 | 健常 | 無治療 | 治療中 | 急性増悪 |
|-------------------------------------|-----------|-------------------|------------------------|------------------------|
| 患者 | n = 5 | n = 5 | n = 5 | n = 5 |
| 男 / 女 | 5 / 0 | 3 / 2 | 4 / 1 | 2 / 3 |
| 年齢 | 33.8 | 60.4 | 62.4 | 69.8 |
| 喫煙 / 非喫煙 | 0 / 5 | 3 / 2 | 3 / 2 | 2 / 3 |
| BI | | 411 \pm 378 | 401 \pm 431 | 487 \pm 719 |
| マーカー | 当院正常値 | | | |
| KL-6 (U/ml) | 100 ~ 458 | 871.2 \pm 682.1 | 1763 \pm 682.0 | 2159 \pm 2164 |
| SP-D (ng/ml) | 0 ~ 110 | 245.6 \pm 148.3 | 282.0 \pm 309.2 | 291.9 \pm 110.1 |
| LDH (mg/dl) | 119 ~ 229 | 166.0 \pm 245.0 | 277 \pm 44.2 | 661.0 \pm 293.7 |
| CRP (mg/dl) | 0 ~ 0.7 | 0.30 \pm 0.30 | 0.28 \pm 0.13 | 16.0 \pm 8.86 |
| PaO ₂ / FiO ₂ | | 414.8 \pm 50.5 | 378.7 \pm 56.3 | 180.5 \pm 39.2 |
| 呼吸機能 | | | | |
| %VC | | 64.3 \pm 37.7 | 59.8 \pm 18.2 | |
| %DLCO | | 46.4 \pm 25.6 | 42.6 \pm 21.8 | |
| 治療 | | | PSL 2/5 PSL+CyA 3/5 | PSL 1/5 PSL+CyA 1/5 |

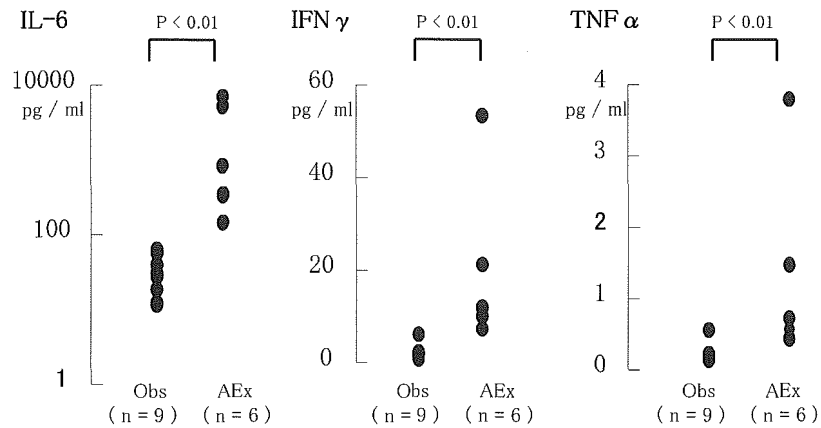
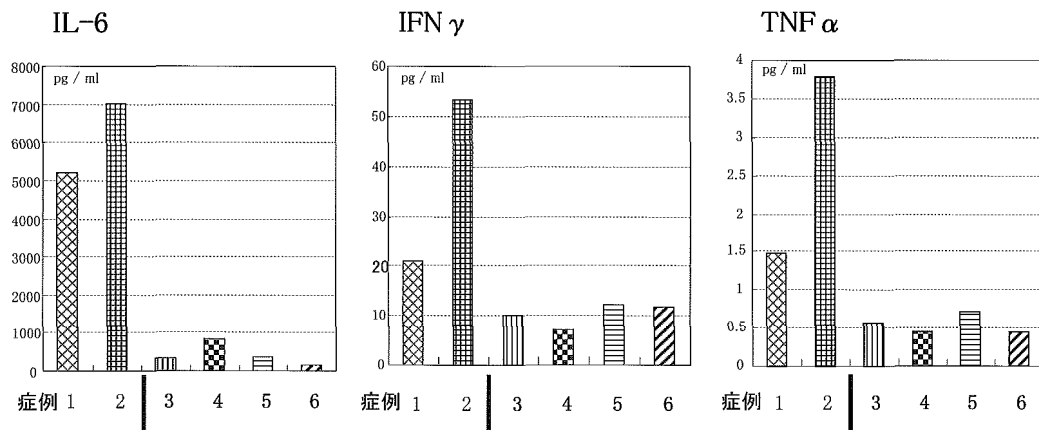


図1 IPFの安定期 (Obs) および急性増悪期 (AEx) のBALF中サイトカイン濃度
測定したサイトカイン17種類のうち13種類がAExに有意に上昇を認めたが、ここでは特に有意差が顕著であった3種類を提示



| 4W以内に死亡 | | | 4W以降に死亡 | | | | | |
|---------|--------|-----------|---------|---------|-----------|-----|---------|-----------|
| 症例 | 死亡日 | 治療 | 症例 | 死亡日 | 治療 | 症例 | 死亡日 | 治療 |
| 症例1 | Day 18 | PSL + CPA | 症例3 | Day 62 | PSL + CyA | 症例5 | Day 168 | PSL |
| 症例2 | Day 23 | PSL | 症例4 | Day 152 | PSL + CPA | 症例6 | Day 547 | PSL + CyA |

図2 BALF中のサイトカインと予後との関係
AEx 6例のBALF中サイトカイン (IL-6, IFN γ , TNF α) を生存日数4週以前と以降で比較

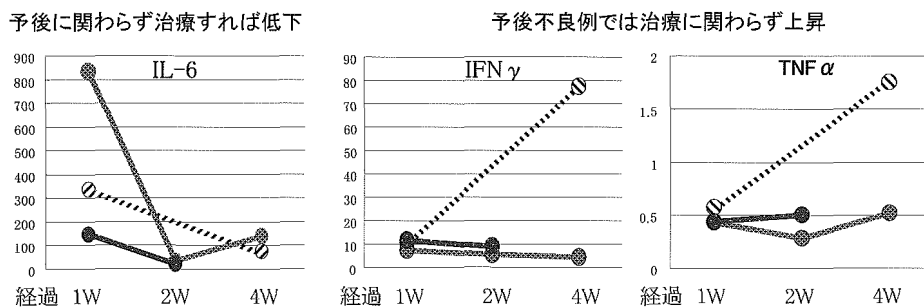


図3 BALF中サイトカインの治療による変化
治療経過中にBALをフォローできた3例 (症例3, 4, 5) のBALF中サイトカインの変化
死亡日は、症例3 (斜線); Day 62, 症例4 (丸点); Day 152, 症例5 (黒点); Day 547

して、さらに多種多様のサイトカインが著明に変化することが判明した。肺の線維化は、Th1 サイトカインと Th2 サイトカインの不均衡 (Th2>Th1) によってもたらされるとの報告がある¹⁰⁻¹²⁾が、今回の結果からは急性増悪時には、Th2 のみではなく Th1 サイトカインも有意に上昇することが分かった。一方、CD4+ T細胞の分化方向を決定する際に重要な IL-12 (Th1 方向) や IL-4 (Th2 方向) については有意な上昇を認めなかった。

血漿中のサイトカインに関しては、IPF 患者といえども様々な要因の影響を受けてしまうため正確な評価は困難であるが、検査が簡便で臨床的に非常に有用であることや、実際に BALF の所見をどれだけ反映するかの確認の意味から検討を行った。評価できた症例はごく少数ではあるが、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10 は BALF 所見を反映している可能性が示唆された。

BALF 中 MCP-1 や血漿中 IL-8 が、呼吸機能や疾患活動性などの臨床所見と相関することがすでに報告されている⁸⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。それら以外に BALF 中 IL-6、IL-8、IFN γ 、TNF α などは治療効果判定や予後予測などに有用と考えられた。

今回の結果から IPF 急性増悪時には、かなり複雑なネットワークを経由して様々なサイトカインが分泌されていることが分かった。J Gauldie らによる遺伝子導入によりサイトカインを強発現した動物モデルの検討では、IL-1 β ¹⁶⁾、TNF α ¹⁷⁾、GM-CFS¹⁸⁾、TGF β 1¹⁹⁾ のみが線維化を誘導できることが示されている。もともと Th2 サイトカイン優位の状況下で、何らかの原因が加わると、まず IL-1 β 、TNF α 、GM-CFS、TGF β 1 が分泌され、次々と下流のサイトカインが誘導されるという過程が想定できる。しかしながら Th サイトカインの不均衡をもたらす原因、IL-1 β 、TNF α 、GM-CFS、TGF β 1 を誘導する原因についてはさらなる検討が必要である。

今後の課題としては、検討症例を増やし、出来るだけ同一患者の経過を観察し、急性増悪発症に至るまでの免疫血清学的所見の経時的变化を確認するとともに、急性増悪の病態解明や早期診断・治療効果判定などの臨床応用も念頭に入れ検討していくことが必要である。

参考文献

- 1) Yoshimura K, Nakatani T et al : Acute exacerbation in idiopathic interstitial pneumonia. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi. 22 (1984) 1012-1020.
- 2) Kondoh Y, Taniguchi H, Kawabata Y et al : Acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis : analysis of clinical and pathological findings in three cases. Chest 103 (1993) 1808-1812
- 3) Kondoh Y, Saiki S : Acute exacerbation in idiopathic interstitial pneumonia. University of Tokyo Press, Tokyo, 1989 ; 34-42.

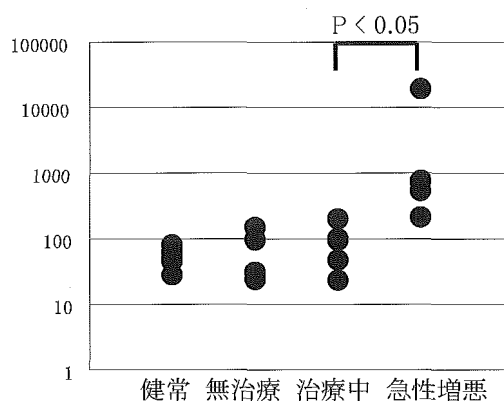


図4 血漿中 IL-6 の IPF 経過別比較
健常・無治療・治療中と比較し急性増悪例で有意に高値

表3 急性増悪 5 例の血漿中 IL-6 と予後

| AEX 症例 | 死亡日 | IL-6 (pg/ml) | LDH (mg/dl) | CRP (mg/dl) | SP-D (ng/ml) | KL-6 (U/ml) | PaO ₂ / FiO ₂ |
|--------|-----|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------------------------------|
| 65 F | 2 | 19059.82 | 280 | 8.7 | 219.7 | 765 | 127.5 |
| 69 M | 19 | 759.59 | 650 | 24.3 | - | - | 214.7 |
| 72 M | 50 | 738.59 | 1046 | 7.5 | 326 | 5360 | 223.8 |
| 67 F | 61 | 536.86 | 504 | 13 | 190 | 911 | 167.1 |
| 76 F | 168 | 214.16 | 825 | 26.5 | 432 | 1600 | 169.3 |
| 基準 | | 0.2~4.6 | 119~229 | 0~0.7 | 0~110 | 100~458 | |

- 4) Hiwatari N, Shimura S, Takishima T, et al : Bronchoalveolar lavage as a possible cause of acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Tohoku J Exp Med.* 174 (1994) 379-386
- 5) American Thoracic Society : Idiopathic pulmonary fibrosis : diagnosis and treatment. International consensus statement. ATS and ERS. *Am J Respir Crit Care Med.* 161 (2000) 646-664.
- 6) Takahashi T, Munakata M et al : Role of viral infections in acute exacerbation of idiopathic interstitial pneumonia. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 33 (1995) 723-727.
- 7) Ambrosini V, Cancellieri et al : Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis : report of a series. *Eur Respir J.* 22 (2003) 821-826
- 8) Suga M, Iyonaga K, Ando M et al : Clinical significance of MCP-1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J.* 14 (1999) 376-382.
- 9) Mukae H et al : Raised plasma concentrations of alpha-defensins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 57 (2002) 623-628.
- 10) Keane MP, Arenberg DA et al : The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol.* 159 (1997) 1437-1443.
- 11) Matsuyama W, Watanabe M, Arimura K et al : Activation of discoidin domain receptor 1 on CD14-positive bronchoalveolar lavage fluid cells induces chemokine production in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol.* 174 (2005) 6490-6498.
- 12) Lukacs NW, Kunkel SL et al : Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. *Chest.* 120(2001) Suppl 5S-8S.
- 13) Sime PJ, O'Reilly KM : Fibrosis of the lung and other tissues : new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol.* 99 (2001) 308-319.
- 14) Ziegenhagen MW et al : Serum level of interleukin 8 is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and indicates disease activity. *Am J Respir Crit Care Med.* 157 (1998) 762-768
- 15) Meloni F, Caporali R et al : BAL cytokine profile in different interstitial lung diseases : a focus on systemic sclerosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 21 (2004) 111-118.
- 16) Kolb M, Pitossi F, Gauldie J et al : Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 107 (2001) 1529-1536.
- 17) Sime PJ, Gauldie D, Xing Z, Gauldie J et al : Transfer of tumor necrosis factor- α to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor- β 1 and myofibroblasts. *Am J Pathol.* 153 (1998) 825-832.
- 18) Xing Z, Sime PJ, Gauldie J et al : Overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces pulmonary granulation tissue formation and fibrosis by induction of transforming growth factor- β 1 and myofibroblast accumulation. *Am J Pathol.* 150 (1997) 59-66.
- 19) Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Gauldie J et al : Adenoviral-mediated gene transfer of active TGF- β 1 induces prolonged aggressive fibrosis in rat lung. *J Clin Invest.* 100 (1997) 768-776.

間質性肺炎線維化巣における血管新生とリンパ管新生の検討

中山 智子 小野美紀子 山元 滋樹 福田 悠*

間質性肺炎では、COP や NSIP といった治癒傾向に向かう予後良好のものと、UIP, AIP/DAD を主とした予後不良のものがある。これまでに我々は増生する上皮細胞、線維芽細胞、沈着する細胞外基質などの相違点を報告してきた。今回は線維化の吸収の観点から、線維化巣における血管、リンパ管新生を検討した。生検で得られた UIP パターン 18 例、NSIP パターン 24 例、剖検で得られた DAD パターン 16 例において、線維化領域における血管、およびリンパ管新生の程度を光顕的、免疫組織化学的に検討した。線維化巣において、血管新生、リンパ管新生はともに NSIP で多く、UIP で少なく、DAD 増殖期では血管新生はほとんどなく、リンパ管新生は NSIP について多くみられた。これらの結果より、血管新生は線維化の吸収に関与することが示唆され、リンパ管新生は、炎症細胞の流出、水分の流出、線維化の吸収に関与することが示唆された。

Angiogenesis and lymphangiogenesis in intra alveolar fibrosis in interstitial pneumonias

Tomoko Nakayama, Mikiko Ono, Masuki Yamamoto, and Yuh Fukuda

Department of Analytic Human Pathology, Nippon Medical School

In wound healing process, angiogenesis and lymphangiogenesis occur in granulation tissue. These promote absorption of inflammatory cells, edema fluid and extracellular matrix. In interstitial pneumonia, it is thought that the process of absorption of fibrosis passes through the process that is similar to wound healing. We aimed at absorption of fibrosis and examined about angiogenesis and lymphangiogenesis in intra-alveolar fibrosis in interstitial pneumonia. We examined 18 cases of UIP, 24 cases of NSIP and 16 cases of DAD. Angiogenesis in early intra-alveolar fibrosis is detected with microscopically and immunohistochemistry for anti CD34 antibody. Lymphangiogenesis in intra-alveolar fibrosis is detected by microscopically and immunohistochemistry for D2-40 antibody. There are many angiogenesis and lymphangiogenesis in NSIP, but there are few in UIP. Angiogenesis is not almost found in intraalveolar fibrosis of DAD. However, lymphangiogenesis of DAD is more remarkable than UIP. From these results, it is suggested that angiogenesis in fibrosis involves in absorption of fibrosis and lymphangiogenesis involves in the elimination of inflammatory cells and edema fluid and the absorption of fibrosis.

はじめに

間質性肺炎は現在病理組織学的に7型に分類されている。このうち、予後不良のものとしては、慢性進行性である通常型間質性肺炎 (Usual interstitial pneumonia: UIP) と、急速進行性である急性間質性肺炎 (Acute interstitial pneumonia: AIP) があり、AIPの組織パターンはびまん性肺胞傷害 (Diffuse alveolar damage: DAD) とほぼ同義とされている。これまでに我々は、予後不良の病型においては、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) や非特異性間質性肺炎 (Non specific interstitial pneumonia: NSIP) をはじめとする予後が良好なタイプとは異なることを示してきた¹⁾。今回は線維化の吸収といった点に着目し、線維化巣における血管、リンパ管新生に関して検討した。予後良好な COP では腔内のポリープ型線維化に多くの血管の侵入が認められることより、線維化の吸収には、線維化巣での血管新生が大きく関与することが考えられている²⁾。また、正常肺でのリンパ管の分布は広義間質内にあり、肺胞領域での分布はみられないが、間質性肺炎では、線維化領域に、リンパ管の新生が認められる症例が存在し、同様に線維化の吸収に関与している可能性がある。そこで、UIP, NSIP, DAD の腔内線維化と血管、リンパ管新生に関して検討し、疾患の予後および病態との関連性に関して考察した。

対象と方法

1. 肺組織

胸腔鏡下肺生検で診断した UIP パターン 18 例、NSIP パターン 24 例、剖検肺で診断した増殖期 DAD 16 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 あるいは 20% ホルマリン液に固定後、パラフィン包埋を行なった。

日本医科大学解析人体病理学

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

2. 光顕および免疫組織化学

薄切標本は、全例に Hematoxylin-eosine (HE), Alcian blue-PAS (Al-PAS), Elastica-Masson-Goldner (EMG) 染色を行なった。免疫組織化学は各病型の一部において、avidin-biotin peroxidase 法により、血管の同定には抗 CD34 抗体を、リンパ管の同定には D2-40 抗体を用いて行なった。

3. 判定方法

血管については、各症例全視野で、Al-PAS 染色で青染する早期腔内線維化巣内の新生血管の有無を確認し、早期線維化巣の総数に対する血管新生を認める線維化巣の数が 50% 以上の症例を +++, 25-50% を ++, 1-25% を +, 0% を - とし、比較検討した。

リンパ管については、EMG 染色標本で 100 倍視野下に線維化面積が 70% を超える病変部で各症例 10 視野のリンパ管の数を集計した。リンパ管数が 20 個以上/視野を +++, 10~20 個/視野を ++, 1~10 個/視野を +, 0 個/視野を 0 とし、症例ごとに平均化の上、比較検討した。

結 果

1. 光顕および免疫組織化学

(1) 血管新生 (Fig. 1)

光顕的には、NSIP (Fig. 1B) の早期線維化巣には血管の新生が多く認められる。UIP (Fig. 1A), および DAD (Fig. 1C) の早期の腔内線維化巣には血管新生が非常に乏しく、特に DAD においては、ほとんど血管新生がみられなかった。

(2) リンパ管新生 (Fig. 2)

正常肺でのリンパ管の分布は広義間質内にあり、肺胞領域での分布はみられない。UIP (Fig. 2A) に比較して、NSIP ではリンパ管新生が顕著なものが存在する (Fig. 2B)。DAD では、多くのリンパ管新生が認められる (Fig. 2C)。線維化の形態として OP パターンが有意な部位にリンパ管新生はほとんどなく、閉塞型の浮腫性の疎な線維化部に多く認められた。

2. 各間質性肺炎病型における比較結果 (Fig. 3-5)

(1) 血管新生 (Fig. 3, 4)

各間質性肺炎における血管新生の比較においては (Fig. 3), 血管新生の程度が最も多いのは NSIP であり、UIP, DAD はこれに比較してその多くが +~0 の程度であった。特に DAD では 13/16 例において、線維化内に血管の新生が全く認められなかった。

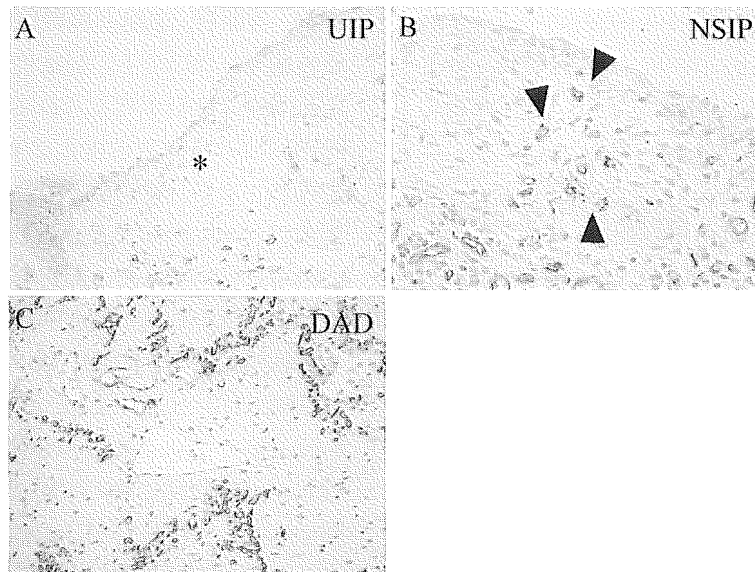


Fig. 1 Angiogenesis in early intra-alveolar fibrosis detected with immunohistochemistry for anti CD34 antibody.
 A. UIP: Capillary is not detected in fibroblastic focus (mural incorporated intra-alveolar fibrosis).
 B. NSIP: A lot of capillaries (arrow heads) are detected in early fibrotic lesion (mural incorporated intra-alveolar fibrosis).
 C. DAD: Capillary is not detected in obliterated intra-alveolar fibrosis.

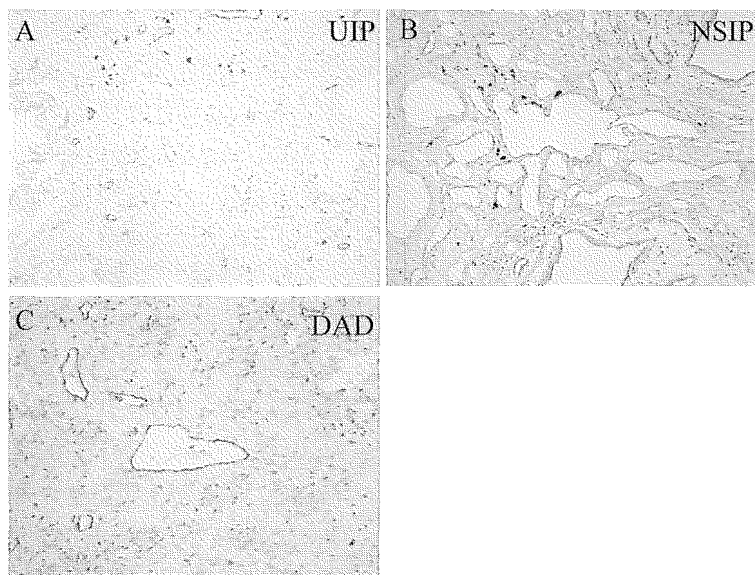


Fig. 2 Lymphangiogenesis in intra-alveolar fibrosis detected with immunohistochemistry for D2-40 antibody.
 A. UIP: Lymph vessel is not detected in fibrotic lesion (obliterated intra-alveolar fibrosis).
 B. NSIP: A lot of lymph vessels are detected in fibrotic lesion (obliterated intra-alveolar fibrosis).
 C. DAD: Lymph vessels are remarkable in fibrotic lesion (obliterated intra-alveolar fibrosis).

腔内線維化の型と血管新生の程度の検討では (Fig. 4), NSIP のポリープ型, 壁在型の線維化巣に血管新生が多く認められた。また, 線維化の形態は同じ閉塞型であっても, NSIP においては, 他の二型に比較して血管新生が多くみられた。

(2) リンパ管新生 (Fig.5)

NSIP に最もリンパ管新生が多くみられ, 次いで

DAD でもリンパ管新生が目立つものがみられ, UIP では少なかった。

考 察

一般的な創傷治癒の過程として, 形成される肉芽組織内には多くの血管やリンパ管の新生が起こり, 炎症

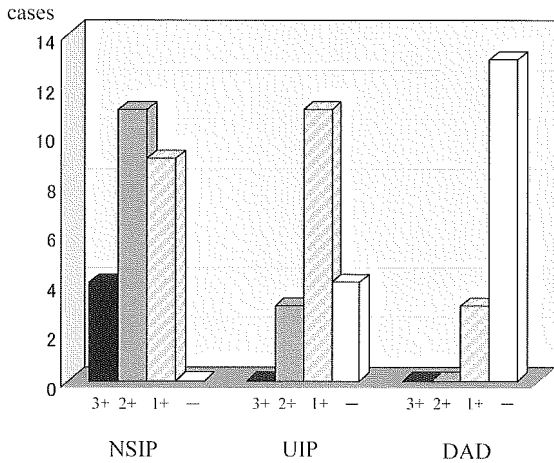


Fig. 3 The degree of angiogenesis in intra-alveolar fibroses of NSIP, UIP and DAD

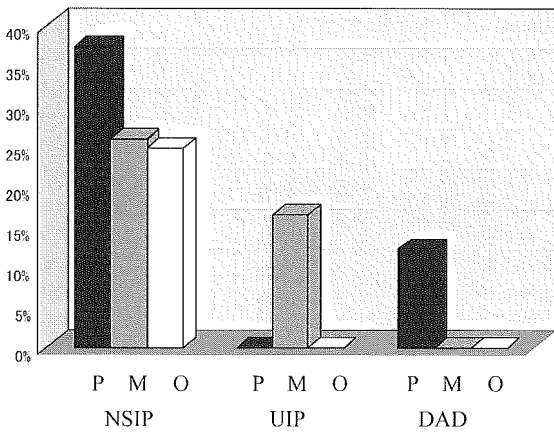


Fig. 4 Relationship between the types of intra-alveolar fibrosis and the degree of angiogenesis.
 P : Polyp (Bud) type intra-alveolar fibrosis.
 M : mural incorporation type intra-alveolar fibrosis.
 O : obliteration type intra-alveolar fibrosis.

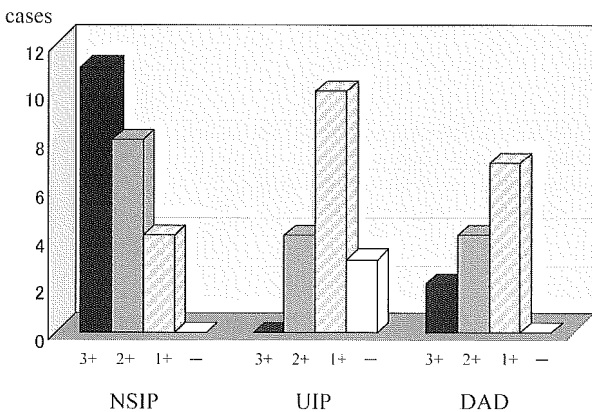


Fig. 5 The degree of lymphangiogenesis in intra-alveolar fibroses of NSIP, UIP and DAD

細胞、浮腫液、細胞外基質の吸収が促進される³⁴⁾。間質性肺炎においても、線維化の吸収の過程は、創傷治療と同様の機転が考えられる。予後良好な COP では腔内のポリープ型線維化に多くの血管侵入が認められることより、線維化の吸収には、線維化巣での血管新生が大きく関与するものと思われる²⁾。今回の検討の結果においても、予後良好である NSIP では血管新生が多く認められ、予後不良の UIP, DAD では血管新生が非常に乏しい結果であった。これまでの報告では、IPF/UIP においては、血管新生やそれに関与する Vascular endothelial growth factor (VEGF) をはじめとした血管新生に関与するサイトカインの産生が増強するという報告⁵⁾と低下するという報告⁶⁾の両方がみられる。早期腔内線維化巣の検討では、COP に比し UIP で少ないことが報告されている²⁾ 今回の検討では、NSIP に比し UIP では明らかに新生血管は少なく、かつ同様に急性経過をとる予後が不良な DAD においても、UIP 以上に血管新生が乏しいという結果であった。さらに、腔内線維化の型で比較しても、上皮や基底膜障害が強い際に認められる閉塞型腔内線維化でみると、血管新生は UIP, DAD にはみられないが NSIP ではよく認められる。血管新生に関しては、疾患予後とあわせて考慮すると、線維化の吸収に深く関与することが示唆される。

リンパ管は生理的条件下においては、第二の脈管系として主に細胞外液の吸収を行うほかに、異物、細菌など粗大分子や、炎症細胞の吸収にも働き、炎症の終焉に関与するとされている⁷⁾。血管新生と同様に、NSIP ではリンパ管の新生が目立つ症例が多くみられた。リンパ管新生が目立つ領域は、膠原線維の疎な閉塞型の腔内線維化領域であった。また、DAD においても NSIP よりは程度は低いですが、UIP に比べリンパ管の新生像が目だってみられた。DAD においては、他の IP に比較すると、血管透過性の亢進も強く、局所の水分量はかなり増大しているものと思われることより、リンパ管新生は炎症の終焉に伴うリンパ球などの炎症細胞の流出、水分の流出、線維化の吸収に主に関与していることが示唆される。

以上より、線維化巣における血管、リンパ管新生の程度は線維化吸収において重要な指標の一つと考えられる。

今後は実際の線維化巣において、血管、リンパ管新生に関与する因子の発現、産生に関しての検討を予定

している。

参考文献

- 1) Fukuda, Y., Mochimaru, H., Terasaki, Y., Kawamoto, M., Kudoh S. Mechanism of structural remodeling in pulmonary fibrosis. *Chest*. 120 : 41S-43S, 2001
- 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) Bauer SM, Bauer RJ, Velazquez OC. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovascular Surg*. 39(4) : 293-306, 2005.
- 4) Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol*. 156(5) : 1499-504, 2000.
- 5) Ebina M, Shimizukawa M, Shibata N, Kiumura Y, Suzuki T, Endo M, Sasano H, Kondoh T and Nukiwa T. Heterogenous increase of CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 169 : 1203-1208, 2004.
- 6) Cosgrove GP, Brown KK, Schiemann WP, Serls AE, Parr JE, Geraci, MW, Schwarz MI, Cool CD, Scott Worthen G. Pigment Epithelium-derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis. A Role in Aberrant Angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 170 : 242-251, 2004.
- 7) Kari A, Tuomas T, and Tatiana V. Petrova. Lymphoangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 438 : 946-953, 2005.

慢性鳥飼病における急性増悪の病態に関する検討 — Th1/2 タイプケモカインの役割について —

宮崎 泰成 岸 雅人 仁多 寅彦 大谷 義夫
稲瀬 直彦 吉澤 靖之*

特発性肺線維症 (IPF) の“急性増悪”は、その臨床経過や予後の重要な因子と考えられるが、その概念は日本だけでなく欧米でも同様に認められるようになってきている。慢性鳥飼病を含めた慢性過敏性肺炎においても同様に急性増悪の症例が散見され、それらの症例は IPF と同様に予後不良である。一方、間質性肺炎の慢性化及び線維化の研究が進んでおり、Th1 と Th2 タイプケモカインがその線維化のプロセスに大きく関わっていることが分かってきている。そこで慢性鳥飼病の急性増悪における Th1/Th2 ケモカインバランスの役割を検討した。1994 年から 2005 年の間に当科で慢性鳥飼病と診断した 39 例が対象で、診断時の血清、気管支肺胞洗浄 (BAL) および外科的肺生検、さらに急性増悪時の血清および剖検肺組織を増悪群と非増悪群に分けて検討した。増悪因子としては、診断の血清及び BAL での TARC/IP-10 比の上昇が増悪群で有意に上昇、Th2 タイプケモカインレセプター陽性細胞が診断時肺組織中で有意に高く、急性増悪時の剖検肺組織ではさらに上昇していた。Th2 タイプケモカインは、増悪群での病態の進行及び急性増悪の発症に深く関わっていると考えられた。

Th1 and Th2 type chemokines and their receptors in Chronic Bird Fancier's Lung (cBFL) with acute exacerbation

Yasunari Miyazaki, Masato Kishi, Torahiko Jinta, Yoshio Ohtani,
Naohiko Inase, and Yasuyuki Yoshizawa

Department of Integrated Pulmonology, Tokyo Medical and Dental University

Recent research in pulmonary fibrosis suggests Th1 and Th2 chemokine may contribute to its fibrosing processes. “Acute Exacerbation” in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a significant factor for its clinical course and prognosis. We have experienced acute exacerbations and poor prognosis consequent to acute exacerbation in cBFL as seen in IPF. The role of Th1/Th2 chemokine balance has not been investigated in cBFL. The aim of this study was to evaluate the relevance of TARC and IP-10 level, and also CCR4 and CXCR3-positive lymphocytes in the pathogenesis of cBFL. TARC and IP-10 concentrations in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and BALF cell findings in 38 patients of cBFL including 14 with acute exacerbations, 10 patients of acute BFL and 5 healthy volunteer with no avian exposure were compared. CCR4 and CXCR3-positive cells were counted in surgical and autopsy lung specimens by immunohistochemistry. TARC to IP-10 ratio in serum and BALF were significantly increased in cBFL with acute exacerbation (AE) compared to cBFL without acute exacerbation (NAE) ($p < 0.001$ in serum, $p = 0.006$ in BALF). CCR4 to CXCR3-positive cell ratio during the exacerbated state of AE is higher than in the stable state of AE ($p = 0.016$). These results suggest that higher TARC to IP-10 ratio in serum and BALF may be a good predictor of acute exacerbation at the time of diagnosis, and have a role in the process of acute exacerbation. Moreover CCR4-positive lymphocytes may contribute to this process.

表 1. 対象

| Demographics of the patients | | | | |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|---------------------|
| | AE | NAE | Acute | p value (AX vs NAX) |
| Number of cases | 14 | 25 | 11 | |
| Female/male | 5/9 | 11/14 | 7/4 | NS |
| Age yrs | 64.1±8.1 | 62.4±8.9 | 52.9±13.8 | NS |
| Nonsmokers | 0 | 9 | 1 | 0.0134 |
| Current smokers | 8 | 5 | 2 | NS |
| Ex-smokers | 5 | 11 | 7 | NS |
| VC% pred | 73.5±29.2 | 91.0±21.7 | 85.9±22.8 | 0.461 |
| TLC% pred | 69.9±23.7 | 83.2±19.0 | 85.5±23.4 | 0.149 |
| FEV1/VC % | 83.2±8.6 | 82.8±9.5 | 75.0±15.0 | NS |
| PaO2 mmHg | 77.5±9.3 | 78.9±12.5 | 69.0±9.4 | NS |
| A-aDO2 mmHg | 20.0±10.7 | 16.9±11.0 | 31.2±11.3 | NS |
| Duration of illness, yrs | 7.4±2.1 | 6.4±1.8 | | NS |

AX: acute-exacerbation group of chronic bird fancier's lung.
 NAX: non-acute exacerbation group of chronic bird fancier's lung.
 Acute: a group of acute bird fancier's lung.

はじめに

特発性肺線維症 (IPF) の“急性増悪”は、その臨床経過や予後の重要な因子と考えられるが、その概念は日本国内だけでなく近年欧米でも同様に認められるようになってきている¹⁻⁴⁾。慢性鳥飼病を含めた慢性過敏性肺炎においても同様に急性増悪の症例が我々の報告を含めて報告されている⁵⁻⁸⁾。これらの症例は IPF と同様に予後不良であり、びまん性肺胞傷害 (DAD) の病理組織像を呈していた。

鳥飼病を含む過敏性肺炎は、免疫学的な機序で起る原因の明らかな間質性肺炎の代表的疾患である。その病態には、アレルギー性炎症とくに Th1/2 パラダイムが関わっていると考えられている⁹⁾。そこで Th1/Th2 ケモカインバランスの役割を慢性鳥飼病で検討した。ケモカインとそのレセプターは、様々なサブセットの白血球が選択的に病変局所へ集積する際に重要な分子であることが知られている。IP-10/CXCL10 は、Th1 に特異的に発現している CXCR3 の特異的リガンドであり、さらに TARC/CCL17 は、Th2 に特異的に発現している CCR4 の特異的リガンドである。慢性鳥飼病の急性増悪症例と非増悪症例でこれらのケモカインとそのレセプターがどのように変化し病態にどのように関わっているかを検討した。

方法と対象

1994年1月から2005年12月の間に当科で慢性鳥飼病と診断した39例を対象とし、診断時の血清、気管支肺胞洗浄 (BAL) および外科的肺生検標本、さらに急性増悪時の血清および剖検標本を検討した。観察期

間に急性増悪した症例14例 (増悪群, AE 群) と急性増悪していない25例 (非増悪群, NAE 群) とに分け、臨床病理学的検討と臨床検体のケモカイン及びケモカインレセプターの検討を行った。IPF 臨床診断基準第4次改訂の「IPFの急性増悪の定義」を参考に急性増悪の診断をした。ELISA: IP-10 および TARC ELISA Kit (R&D) を使用し、血清および BAL 中の IP-10 および TARC を測定した。免疫染色: パラフィン包埋された標本から4 μ mの切片を作成し、脱パラ後、クエン酸にて抗原賦活した。1次抗体として CXCR3 (BD), CCR4 (協和発酵), IP-10 (PEPROTECH), TARC (R&D) 抗体を使用し、ビオチン化抗マウス IgG あるいは抗ラビット IgG の2次抗体を使用し、ABC Kit (Vector) でシグナルを増幅し、DAB あるいは AIP で発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。統計は、Fisher's PSLD にて分散分析を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果と考察

1. 急性増悪群の臨床像は、IPF に近い

診断時の臨床像を、増悪群と非増悪群で比較した (表1)。参考として急性鳥飼病11例も併記した。慢性鳥飼病39例中14例が急性増悪し、観察期間中の発症率は35.9% (14/39) であった。両群間で男女差および年齢に有意差はなかったが、非増悪群で非喫煙者が有意に多く認められた。肺機能検査および血液ガス所見では、VC% (増悪群 vs 非増悪群: 73.5% vs. 91.0%) および TLC% (増悪群 vs 非増悪群: 69.6% vs. 83.2%) の有意な低下を増悪群に認めたが血液ガス所見に差はなかった。一方、診断時の BALF 所見を検討する (表2) と、増悪群は非増悪群に比べ、好中球分画が10.7% (非増悪群: 2.4%) で高く、リンパ球分画が17.4% (非増悪群: 38.3%) と低く有意差を認めた。剖検肺がある

表 2. BALF 所見

Profile of bronchoalveolar lavage.

| | AE | NAE | Acute | p value (EX vs. NEX) |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------|
| Subjects n | 9 | 21 | 10 | |
| Total cell, x106 | 42.5±22.9 | 40.4±27.7 | 68.6±37.1 | NS |
| Macrophages, % | 69.3±16.8 | 57.3±26.9 | 14.0±10.1 | NS |
| Lymphocytes, % | 17.4±5.5 | 38.3±27.9 | 83.6±8.6 | 0.0175 |
| Neutrophils, % | 10.7±13.8 | 2.4±2.8 | 0.8±0.9 | 0.0037 |
| Eosinophils, % | 2.6±4.3 | 1.9±2.6 | 1.6±3.0 | NS |
| CD4/8 | 4.6±6.7 | 4.6±4.6 | 2.5±2.9 | NS |

表 3. 誘因

| 病型 | 誘因 | 診断から急性増悪まで (年) | 病理 | 転帰 |
|---------|-----------|----------------|---------|----|
| 潜在性発症型 | 不明 | 9 | UIP+DAD | 死亡 |
| 潜在性発症型 | 鳥接触の再開 | 9 | UIP+DAD | 死亡 |
| 潜在性発症型 | 不十分な抗原回避 | 6 | | 生存 |
| 潜在性発症型 | ステロイド減量 | 9 | UIP+DAD | 死亡 |
| 潜在性発症型 | 不十分な抗原回避 | 6 | UIP+DAD | 死亡 |
| 再燃症状軽減型 | 不十分な抗原回避 | 6 | fNSIP | 死亡 |
| 潜在性発症型 | 不明 (肺塞栓症) | 5 | UIP+DAD | 死亡 |
| 潜在性発症型 | 不明 (肺塞栓症) | 8 | UIP | 死亡 |
| 潜在性発症型 | 不明 | 6 | | 死亡 |
| 潜在性発症型 | ステロイド減量 | 9 | | 死亡 |
| 潜在性発症型 | ステロイド減量 | 6 | UIP | 死亡 |
| 潜在性発症型 | 羽毛布団使用再開 | 12 | UIP | 生存 |
| 潜在性発症型 | ステロイド減量 | 4 | UIP | 死亡 |
| 潜在性発症型 | 不十分な抗原回避 | 9 | | 生存 |

7.428571429 U9N1 A3D11

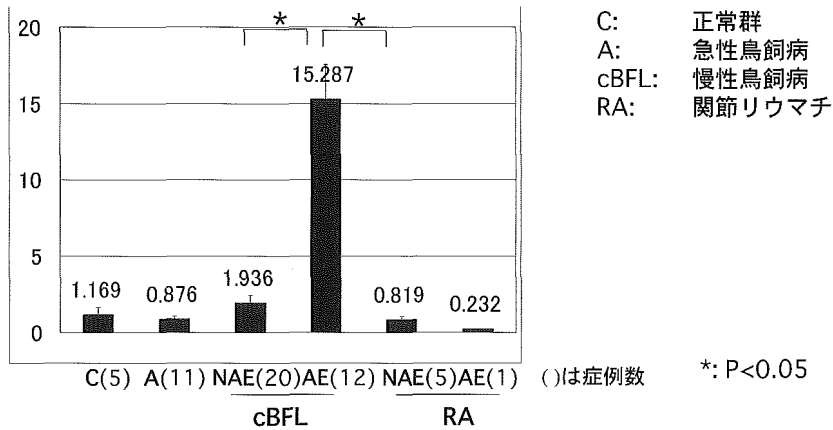


図 1. 血清 TARC/IP-10 比は増悪群の血清で有意に上昇している。

5 例すべてで DAD を認めた (表 3)。急性増悪による死亡率 (表 3) は、78.6% (14 例中 11 例) と Kim らが最近報告⁴⁾したデータの 81.8% とほぼ同じである。IPF の臨床像をまとめた King らの報告¹⁰⁾では、喫煙者が 65% であり、平均の VC% は 66%, TLC% は 71% と低く、IPF 急性増悪をまとめた 5 例の報告¹¹⁾では、診断時の BAL で、著明な好中球分画の増多を認めていた。診断時の増悪群の臨床像はむしろ IPF に近いと考えられる。

2. 急性増悪の誘因は、抗原の再曝露あるいは抗原曝露の持続が疑われる

次に急性増悪の原因について検討した (表 3)。誘因

としては、抗原再曝露あるいは、不適切なステロイド減量を 14 例中 10 例で認め、残りの 4 例は原因不明で、その内 2 例では病理解剖で肺塞栓症による低酸素血症が急性増悪の誘因と考えられたが詳細は不明である。

3. 診断時増悪群の血清及び BALF 中では、Th2 タイプケモカインがより優位となり、より多くの CCR4 陽性 (Th2) リンパ球が肺組織に浸潤している

急性増悪の誘因あるいは原因は現在のところ不明な点が多い。IPF の急性増悪を予測する因子を臨床像において検討した報告⁴⁾でも、予測因子は明らかにで