

ブレオマイシン肺線維症に対する EP4 選択的 作動薬の抑制効果の検討

細野 達也 坂東 政司 山沢 英明 大野 彰二 杉山幸比古*

5-lipoxygenase knock out mouse においてブレオマイシン (BLM) 肺障害が PGE₂ 増加により抑制されることが報告されている。PGE₂ には 4 つの受容体が存在し、EP2/EP4 受容体を介した線維化抑制効果が期待されている。BLM 肺線維症モデルにおける EP4 選択的作動薬 (ONO-AE1-329) の肺線維化抑制効果について検討した。BLM (1 mg/kg) を気管内投与した C57BL/6 マウスに、前期・後期に群別し ONO-AE1-329 を 1 日 2 回投与した。EP4 前期投与群はコントロール群や後期投与群と比較し生存率や急性期の体重減少を改善させたが、day 28 での肺ハイドロキシプロリン量を低下させなかった。また、EP4 投与群では day 7 での気管支肺胞洗浄液中の総細胞数や好中球数の低下傾向が認められた。EP4 作動薬の BLM 肺線維症モデルにおける効果は、線維化抑制よりも急性期の炎症抑制による可能性が高いと考えられた。

Inhibitory effect of PGE₂ receptor subtype, EP4, on survival in bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Tatsuya Hosono, Masashi Bando, Hideaki Yamasawa, Shoji Ohno, and Yukihiko Sugiyama

Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine, Jichi Medical University

Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice rendered leukotriene deficient by knockout of the 5-lipoxygenase gene was attenuated through increasing level of prostaglandin E₂ in bronchoalveolar lavage fluid. Prostaglandin E₂ effects changes in target cells via signaling through four E-prostanoid receptors. C57BL/6 mice received a single tracheal instillation of bleomycin on day 0. After randomly allocated, mice were treated with subcutaneous injection of either normal saline or specific agonist for EP4. Kaplan-Meier life table analysis showed that the survival rate of mice treated with EP4 specific agonist in early phase was significantly higher than those treated with normal saline or EP4 specific agonist in late phase. EP4 specific agonist significantly reduced the number of lymphocytes in bronchoalveolar lavage on day 7. The hydroxyproline content was similar in both groups. These results suggest that EP4 specific agonist reduced acute inflammation but did not reduce subsequent fibrosis in the lung after bleomycin treatment.

表 1. PGE₂ 受容体

	EP1	EP2	EP3	EP4
分布	腎臓>>胃	子宮>肺,脾臓 ≧胸腺,回腸, 肝臓	腎臓>子宮> 胃>>肺,胸腺, 脳	子宮>回腸> 胸腺>心臓> 肺
薬理作用	①消化管・気 管支などの平 滑筋収縮 ②神経伝達 物質遊離促 進	①回腸・気管支 平滑筋弛緩 ②血管平滑筋拈 張	①子宮収縮 ②胃酸分泌抑 制 ③尿細管の再 吸収阻害 ④脂肪分解抑 制 ⑤神経伝達物 質の遊離抑制	①伏在・頸静 脈弛緩 ②T細胞細胞 死抑制
Second messenger	Ca ²⁺ チャ ネル活性化	AC活性化 cAMP ↑	AC抑制 cAMP ↓	AC活性化 cAMP ↑

はじめに

特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)) は肺線維化を来たす難治性疾患である。原因は不明であり有効な治療法も確立されていないが、分子生物学的進歩とともにその病態に関与する種々の因子が解明されつつある。その中でアラキドン酸代謝産物の関与についても注目されており、5-lipoxygenase knock out mouse において bleomycin (BLM) 投与による肺障害の抑制が報告されている。機序として、BLM 投与にて誘導される cysteinyl-leukotrienes (LTC₄/D₄/E₄) の産生阻害や、抗線維化作用を持つ PGE₂ や IFN- γ などの増加が想定されている¹⁾。PGE₂ の抗線維化作用として、fibroblast の遊走・増殖抑制^{2,3)}、fibroblast から myofibroblast への形質転換の抑制⁴⁾、fibroblast からの collagen 産生抑制⁵⁾ などが報告されている。

IPF と PGE₂ との関連を検討したものは、fibroblast や macrophage からの PGE₂ 基礎濃度や刺激に対する産生能、cyclooxygenase (COX) 発現の低下などが報告されており⁶⁻¹⁰⁾、IPF における PGE₂ の重要性が示されている。

PGE₂ には EP1 から EP4 までの 4 種類の受容体が存在し (表 1)、抗線維化作用として EP2 と EP4 を介した経路が重要とされている^{3,4,11)}。著者らは以前、EP2

の選択的作動薬 (ONO-AE1-259) による肺線維化抑制の検討を行った¹²⁾。EP2 選択的作動薬投与により BLM 肺線維化モデルの気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞増加は抑制傾向を認めたが、有意差は得られなかった。また、EP2 選択的作動薬投与により肺線維化の抑制効果は認められず、EP2 の長期もしくは後期投与にて肺線維化の指標であるハイドロキシプロリン (HYP) 量が増加する傾向を認めた。

今回著者らは、EP2 より刺激に対する反応時間が短く、誘導的な反応を示す EP4 の選択的作動薬による肺線維化抑制効果について検討した。

方 法

肺線維症モデルは 8-10 週齢の C57BL/6 マウス (20 g 程度) に対し、BLM (1 mg/kg) を day 0 に気管内投与することにより作成した。

実験 1 では、day-1 から day 27 まで EP4 選択的作動薬 (ONO-AE1-329) を低用量 (30 μ g/kg) と高用量 (100 μ g/kg) に群別し、1 日 2 回皮下投与を行った。コントロールとして生食投与群を設定し、day 7 での気管支肺胞洗浄による炎症性変化の検討と、day 28 での肺組織の線維化の検討を行った。

実験 2 では、同様の群設定で、day-1 から day 13 までの前期投与と、day 14 から day 27 までの後期投与にて検討を行った。

自治医科大学呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

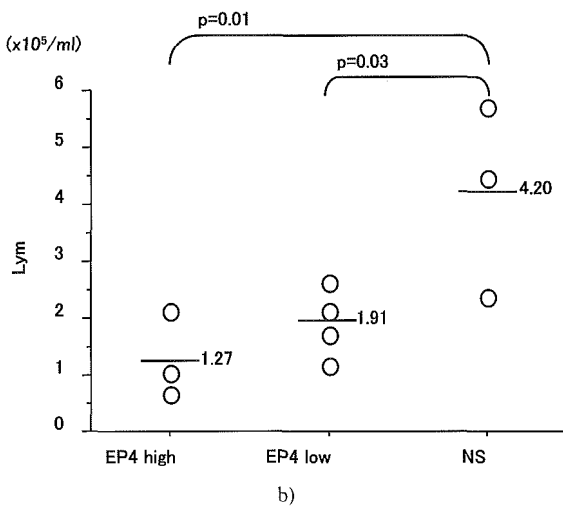
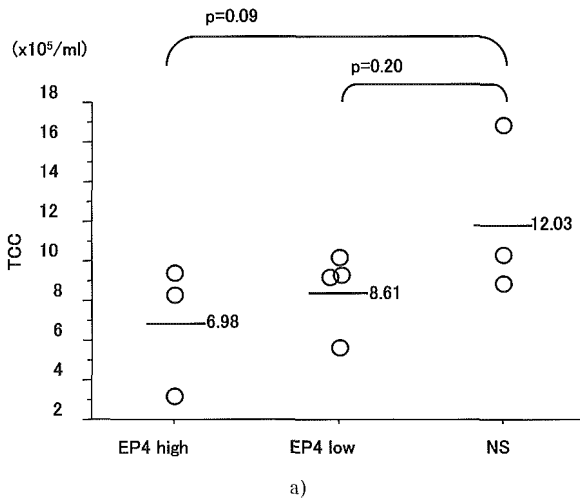


図 1. BLM 投与 7 日後における気管支肺胞洗浄. a) 総細胞数 b) リンパ球数

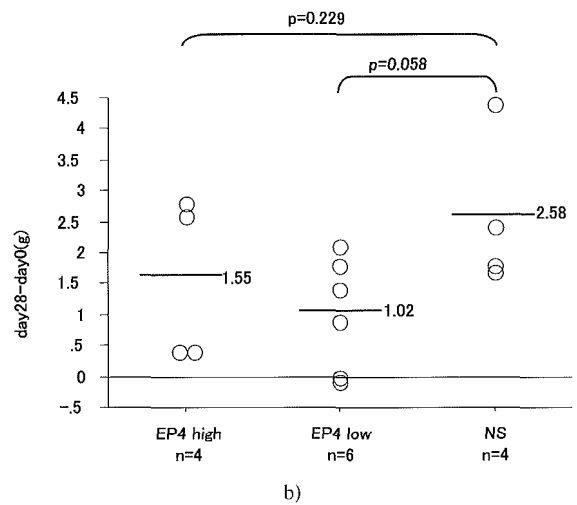
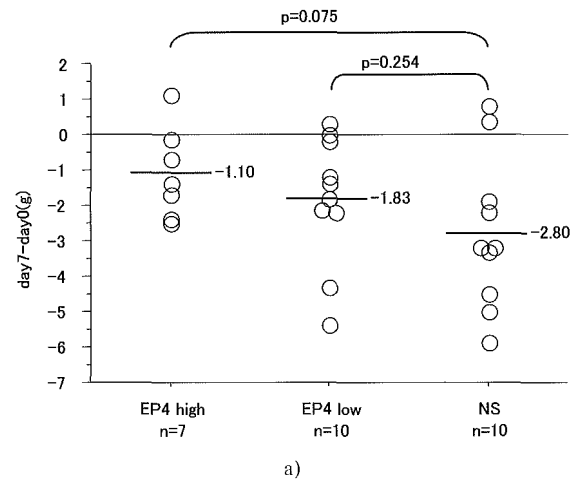


図 3. BLM 投与後の体重変化. a) 投与 7 日後 b) 投与 28 日後

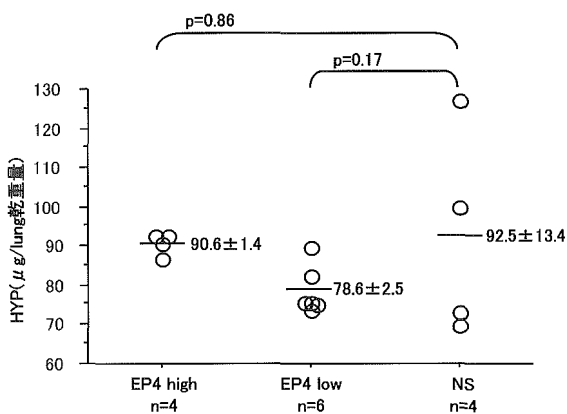


図 2. BLM 投与 28 日後における肺ハイドロキシプロリン量.

結 果

実験 1: BLM 投与 day 7 での気管支肺胞洗浄では、

EP4 選択的作動薬の投与量に応じた総細胞数の増加抑制傾向と、リンパ球数の有意な増加抑制が認められたが (図 1), day 28 における肺 HYP 量の抑制は得られなかった (図 2). BLM 投与後の体重変化は、day 7 において、EP4 選択的作動薬の投与量に応じた体重減少の抑制傾向が認められたが、day 28 においては体重増加が不良な傾向を示した (図 3).

実験 2: BLM 投与後の生存率は、EP4 選択的作動薬の前期投与にて、生食投与や後期投与より有意な改善を示した。一方、EP4 選択的作動薬の後期投与により BLM 投与後期での死亡が増加する傾向を認めた (図 4). また、EP4 選択的作動薬の前期投与により、day 14 での体重減少が有意に抑制された (図 5). しかし、これまでの検討と同様に day 28 での肺 HYP 量の抑制効果は認められなかった (図 6).

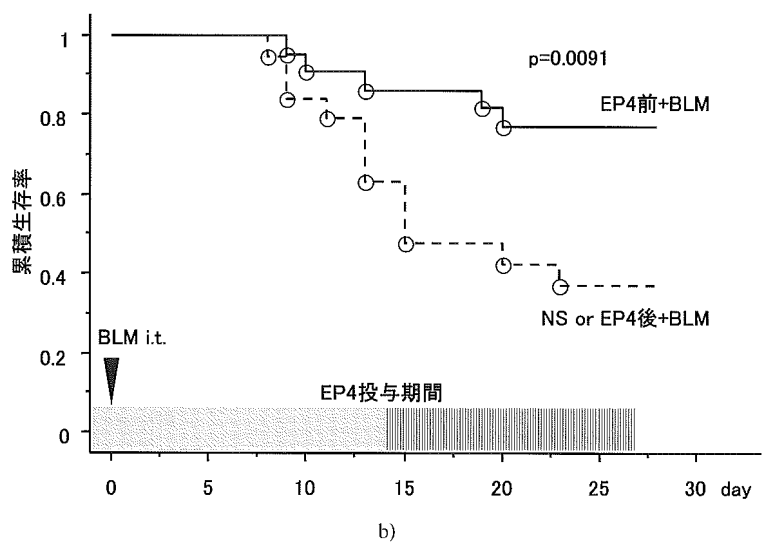
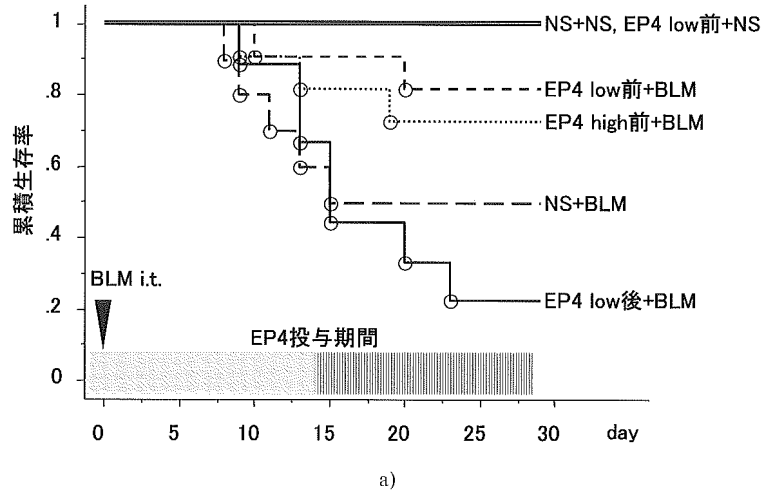


図4. BLM 投与後の生存曲線. a) 投与群別 b) EP4 前期投与の有無別

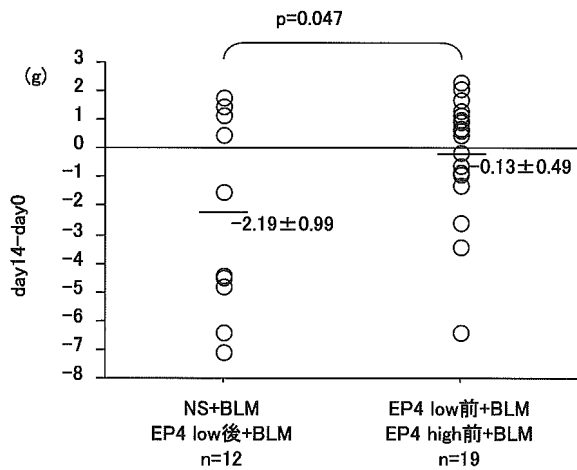


図5. BLM 投与後の体重変化.

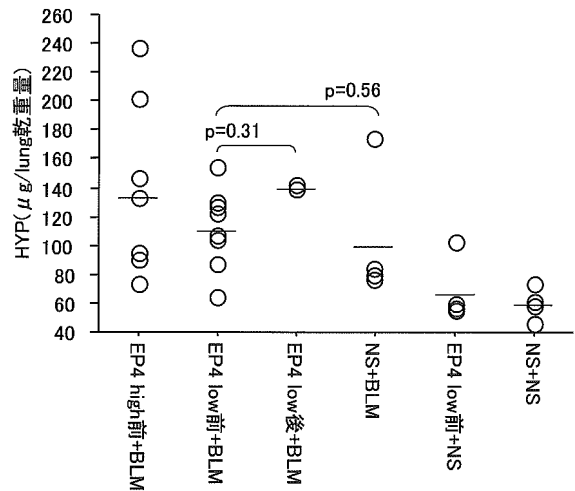


図6. BLM 投与28日後における肺ハイドロキシプロリン量.

考 察

肺線維症におけるエイコサノイド、特に PGE₂ の病態への関与が想定され、治療への応用が期待されている¹¹⁾。今回、BLM 投与による肺線維化モデルを用いて、EP4 選択的作動薬による肺線維化の抑制効果を検討した。

EP4 選択的作動薬の前期投与にて生存率・体重減少の改善が認められた。BLM 投与による肺線維化は急性肺傷害に引き続き起こる一過性の肺線維化と考えられており、BLM 投与により惹起された急性炎症の抑制効果が改善の機序として考えられた。EP4 選択的作動薬の抗炎症作用としては、肝臓の虚血・再灌流モデルにおいて、再灌流前の EP4 作動薬投与により肝機能障害が改善したとするものや¹³⁾、EP4 (EP2) 作動薬投与により単球の LPS 刺激による IL-18 産生が抑制されたとするもの¹⁴⁾などが報告されている。

BLM 投与による肺線維化モデルに EP2 選択的作動薬の投与を行った検討では、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞増加の抑制傾向は認められたものの、生存率の改善は得られなかった。EP2 による刺激伝達は、Gs 蛋白→adenylyl cyclase (AC)→cAMP→protein kinase A を介する経路のみであるのに対し、EP4 による刺激伝達は AC による刺激伝達の経路に加え、phosphatidylinositol 3-kinase→phosphoinositide-dependent kinase-1 や extracellular signal-regulated kinaseなどを介した経路が報告されており¹⁵⁾、複数の刺激伝達経路の存在が効果の差に関与したものと考えられた。

EP4 選択的作動薬の長期および後期投与にて生存率・体重減少の悪化傾向が認められた。BLM 肺線維化モデルでの EP 発現変化の検討では、BLM 投与後には EP2・EP4 とともに低下傾向を示し、また、BLM 投与後の fibroblast 採取時期によって PGE₂ 投与による増殖能の変化が認められ、BLM 投与早期では抑制、後期では促進するとされており¹⁶⁾、今回の検討でも同様の機序が想定された。また、PGE₂ の持続刺激と炎症の誘導についても報告されており^{17,18)}、長期および後期での投与による炎症の誘導の可能性も考えられた。

結 論

1) EP4 選択的作動薬は BLM 肺線維症モデルにおいて生存率を改善させた。

2) 機序として急性期の抗炎症効果による可能性が高いと考えられた。

参考文献

- 1) Peters-Golden M, Bailie M, Marshall T, et al. Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 229-235.
- 2) Bitterman PB, Wewers MD, Rennard SI, et al. Modulation of alveolar macrophage-driven fibroblast proliferation by alternative macrophage mediators. *J Clin Invest* 1986; 77: 700-708.
- 3) White ES, Atrasz RG, Dickie EG, et al. Prostaglandin E₂ inhibits fibroblast migration by EP2 receptor-mediated increase in PTEN activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 135-141.
- 4) Kolodnick JE, Peters-Golden M, Larios J, et al. Prostaglandin E₂ inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E₂ prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 537-544.
- 5) Goldstein RH, Polgar P. The effect and interaction of bradykinin and prostaglandins on protein and collagen production by lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1982; 257: 8630-8633.
- 6) Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, et al. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E₂ and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1995; 95: 1861-1968.
- 7) Vancheri C, Sortino MA, Tomaselli V, et al. Different expression of TNF α receptors and prostaglandin E₂ production in normal and fibrotic lung fibroblasts: potential implications for the evolution of the inflammatory process. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 628-634.
- 8) Keerthisingam CB, Jenkins RG, Harrison NK, et al. Cyclooxygenase-2 deficiency results in a loss of the anti-proliferative response to transforming growth factor- β in human fibrotic lung fibroblasts and promotes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.

- Am J Pathol 2001 ; 158 : 1411-1422.
- 9) Marchand-Adam S, Marchal J, Cohen M, et al. Defect of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 168 : 1156-1161.
- 10) Petkova DK, Clelland CA, Ronan JE, et al. Reduced expression of cyclooxygenase (COX) in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Histopathology* 2003 ; 43 : 381-386.
- 11) Charbeneau RP, Peters-Golden M. Eicosanoids : mediators and therapeutic targets in fibrotic lung disease. *Clin Sci* 2005 ; 108 : 479-491.
- 12) 細野達也, 田島俊児, 山沢英明, 他. EP2 選択的作動薬による肺線維化抑制の検討. *日呼吸会誌* 2005 ; 43 増刊 : 174.
- 13) Kuzumoto Y, Sho M, Ikeda N, et al. Role of EP4 prostaglandin E2 receptor in the ischemic liver. *Transplant Proc* 2005 ; 37 : 422-424.
- 14) Takahashi HK, Iwagaki H, Mori S, et al. Prostaglandins E₁ and E₂ inhibit lipopolysaccharide-induced interleukin-18 production in monocytes. *Eur J Pharmacol* 2005 ; 517 : 252-256.
- 15) Fujino H, Salvi S, Regan JW. Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP₂ and EP₄ prostanoid receptors by prostaglandin E₂. *Mol Pharmacol* 2005 ; 68 : 251-259.
- 16) Moore BB, Ballinger MN, White ES, et al. Bleomycin-induced E prostanoid receptor changes alter fibroblast responses to prostaglandin E₂. *J Immunol* 2005 ; 174 : 5644-5649.
- 17) Long JA, Fogel-Petrovic M, Knight DA, et al. Higher prostaglandin E2 production by dendritic cells from subjects with asthma compared with normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 ; 170 : 485-491.
- 18) Godard P, Chantreuil J, Clauzel AM, et al. Plasma concentrations of prostaglandins E2 and F_{2α} in asthmatic patients. *Respiration* 1981 ; 42 : 43-51.

Mechanical stress 下における HGF と肺胞上皮細胞の TGF- β 1 産生能について

根井 貴仁 松田久仁子 齊藤 好信 阿部 信二
臼杵 二郎 吾妻安良太* 工藤 翔二

【背景】 肺の線維化に TGF- β などの成長因子の産生に関与していることが昨今報告されている。またこれらの成長因子の作用抑制が線維化抑制に寄与できる可能性が示唆されている。傷害修復因子である HGF が肝細胞をはじめとした各種臓器の修復に密接な影響を及ぼしているが、肺の線維化に対する影響はまだ不明な点が多い。【目的】 HGF が肺胞上皮細胞の TGF- β 1 産生能に対する影響を明らかにする。【方法】 肺胞上皮細胞 (A549) は一方向ストレッチによるメカニカルストレス下で TGF- β 1 の産生亢進が知られている。この現象を利用し HGF の存在下でストレッチ群と非ストレッチ群で TGF- β 1 の産生について ELISA, RT-PCR を用いて比較検討した。【結果】 HGF 投与群では明らかな産生増加は認めなかったが IFN- γ 共存下では TGF- β 1 の産生増加が認められた ($p=0.02$)。【考察】 HGF が基底膜の形成抑制や膠原線維の集簇を抑制することが報告されており、線維化の抑制への期待がなされているが、修復因子という点で直接作用させた場合に TGF- β 1 産生が亢進する可能性が高いことが考慮された。更に IFN- γ 共存下では有意差をもって産生が増加しており、IFN- γ の線維化抑制とは逆の結果となった。肺胞上皮のみの検討であったがその他の細胞株において検討が必要である。

The production of transforming growth factor- β 1 influences hepatocyte growth factor under mechanical stress

Takahito Nei, Kuniko Matsuda, Yoshinobu Saito, Shinji Abe,
Jiro Usuki, Arata Azuma, and Shoji Kudoh

The 4th Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

[Background] Recently, many reports have focused on the relationship between lung fibrosis and growth factors such as transforming growth factor (TGF) β . It is suggested that inhibition of such growth factors inhibits progression of lung fibrosis. Hepatocyte growth factor (HGF), which is involved in healing from injuries, has a major influence on various aspects of visceral healing, but its influence on pulmonary fibrosis remains an unresolved issue. [Aim] We attempted to clarify whether HGF influences the production of TGF- β 1 by alveolar epithelial cell. [Method] TGF- β 1 production by the alveolar epithelial cells line A549 is known to be up-regulated under mechanical stress, as with unidirectional stretch. We evaluated TGF- β 1 production by the ELISA method and compared effects in the presence versus the absence of HGF. [Result] We found no evidence that increasing TGF- β 1 production influenced the actions of HGF, while it does influence the actions of Interferon- γ (IFN- γ , $p=0.02$). [Discussion] HGF reportedly inhibits formation of a basal membrane and the establishment of collagen fibers. Thus, we anticipate that it would diminish fibrosis. However, TGF- β 1 production was suggested to be enhanced when we induced HGF production directly, in alveolar epithelial cells, as a healing factor. Furthermore, production of TGF- β 1 increased significantly in the presence of IFN- γ . Our data show the possibility of inhibiting fibrosis progression. These data are from alveolar epithelial cell lines, but we advocate further examination of other cell lines.

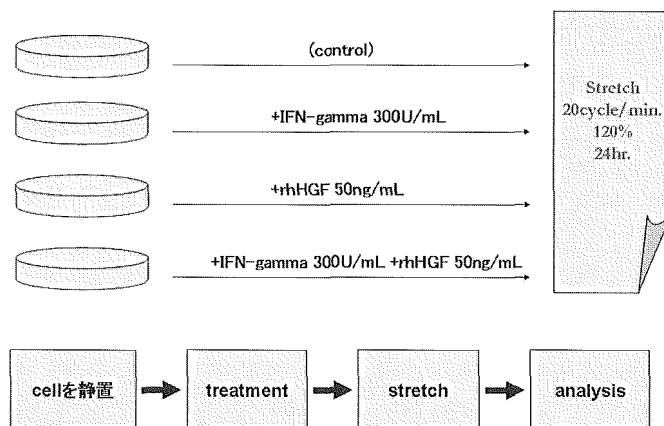


図 1. 一方向伸展刺激による肺細胞への形態学的影響

伸展率 20%, 20 回/分で 24 時間の伸展刺激を加えたところ, A549 (ヒト肺胞上皮) 細胞並びに HPAE26 (ヒト肺血管内皮) 細胞においては伸展方向とは垂直方向に細胞の扁平化が認められた。マウス肺線維芽細胞 (初代培養細胞) においては伸展方向と同方向に細胞の扁平化を認め、特にヒト由来の肺線維芽細胞 (初代培養細胞) においてはその傾向が顕著であった。

はじめに

特発性肺線維症 (IPF/UIP) の臨床病理学的特徴として (1) 肺底部胸膜直下からはじまる線維化, (2) 加齢肺に生じやすい, (3) びまん性肺胞障害 (DAD) を生じやすい, (4) 高率で肺癌を合併する (10-30%), (5) 糖尿病の関与が示唆されている, などが挙げられる。このうち我々は肺の線維化が胸膜直下肺底部からはじまることに着目した。この部位は肺のなかで最も重力の影響を受ける部位であり, 微小の無気肺が生じ, 虚血再灌流 (shear stress) を繰り返す部位でもある。特に肺胞の一群が虚脱すると pleats と呼ばれる肺胞の折り畳み現象が生じ, 周囲肺組織が拡張することによりその肺胞群を拡張させようと大きな力 (メカニカルストレス) が働く¹⁾。周囲肺組織が拡張した場合は虚脱肺部分に非常な大きな拡張力が働く。この周囲から肺単位へ与えられる支持力は相互依存力 (interdependence) とよばれ, 肺胞の安定性を維持するのに重要であると考えられている²⁾。以上のことから肺底部胸膜直下においては肺内の他の部位よりも大きなメカニカルストレスが働いていることになる。また吸気・呼気における肺尖部と肺底部の HRCT (high resolution CT) の CT 値解析³⁾ から「肺の伸び縮み」は肺内において均等ではないことが示唆されている。昨年度はこれらの考えのもと一方向伸展刺激装置を用

いた *in vitro* の実験系にて, 2 型肺胞上皮細胞 (A549) などを用いて 2 次元でメカニカルストレスを加えたところ, 分泌蛋白量や PDGF, TGF- β を始めとした growth factor の産生増加を認めた。これはメカニカルストレスが細胞に何らかの影響を与えていることを示しており, 十分に肺の線維化に何らかの関与をもたらしていると思われる。またストレッチによるこのような細胞の反応を抑制することも抗線維化療法に発展することも十分に考慮された。

近年 hepatocyte growth factor (HGF) の抗線維化作用⁴⁻⁷⁾ が数多く報告されており, 我々はまず HGF がこのようなメカニカルストレッチによる肺胞上皮細胞の反応を抑制できるか否かを簡単な実験系を用いて検討することとした。

材料と方法

ヒト肺扁平上皮癌由来細胞株である A549 細胞を培養して主に実験に用いた。メカニカルストレスとして Streck 社の細胞伸展装置 (ST-140 システム) を用い, シリコンチャンバー上で 24 時間培養した各細胞に HGF を 24 時間作用させたのちに一軸方向の伸展刺激を加えた。伸展条件として 20% の伸展率で 20 回/分, 24 時間で刺激した。24 時間の刺激の後更に 24 時間 incubator 内で 24 時間静置した後, 伸展による形態変化を倒立顕微鏡で観察し, 培養上清にて TGF- β 1 の発現の検討を行った。また HGF の作用については, その受容体である c-Met/HGFR の発現が IFN-

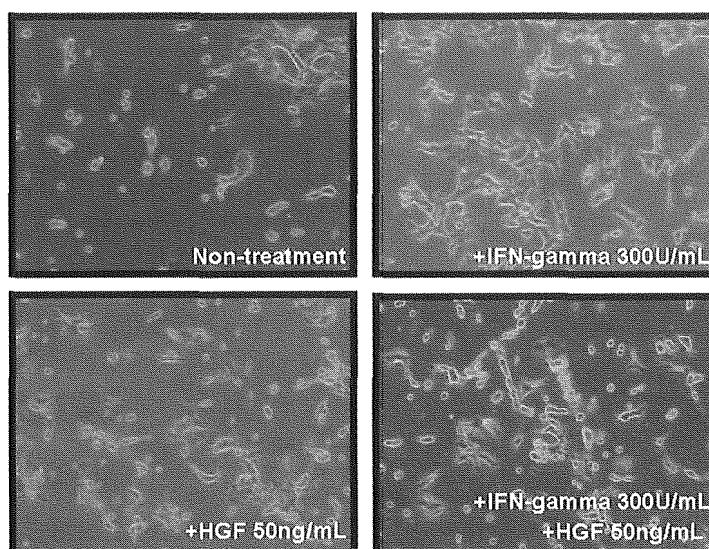


図 2. 一方向伸展刺激による肺細胞の蛋白産生に及ぼす影響

A549 細胞を用いて伸展率 20%, 20 回/分の条件で 3 時間の伸展刺激を加えたところ, 培養上清中の蛋白産生はコントロール群と変化なかったが, 24 時間の伸展刺激では有意差は認めなかったものの伸展群において蛋白産生が増加する傾向が認められた。

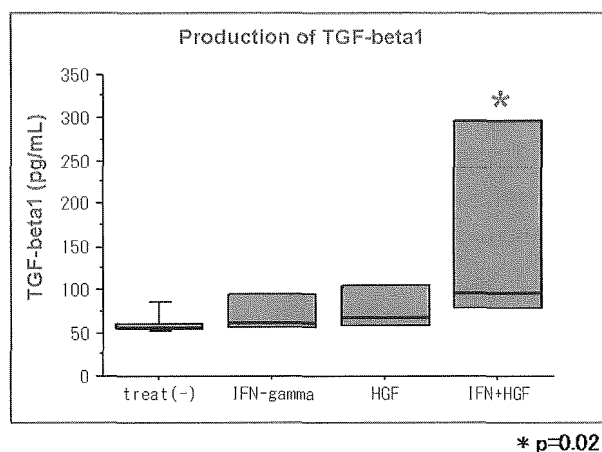


図 3. 一方向伸展刺激が肺細胞の増殖に及ぼす影響

A549 細胞を用いて伸展率 20%, 20 回/分の条件で 24 時間伸展刺激を加えた細胞はコントロール群と比較して有意な細胞増加を認めた。

gamma の存在下で up-regulate される報告⁸⁾を元に IFN-gamma の共存下における検討も併せて実施した。

結 果

(1) 細胞伸展が細胞形態に与える影響 (図 2)

各細胞に伸展率 20%, 20 回/分で刺激を加えたところ, 伸展方向とは垂直方向に細胞の扁平化が認められた。特に HGF を作用させたものではその傾向が顕著

であった。

(2) TGF- β 1 産生への影響 (図 3)

培養上清中の TGF- β 1 産生能は HGF, 更に IFN-gamma + HGF 作用下で増加を認めた。

考 察

IPF/UIP の病態に関しては何らかの繰り返される刺激によって肺胞上皮細胞の障害が持続し, その修復過程において線維化が進行するという概念が受け入れられている⁹⁾一方, 最近では肺線維化における線維芽細胞が肺外由来, 特に骨髓前駆細胞や末梢血由来の可能性が示唆されて^{10,11)}おり未だ不明な点が多い。IPF 患者の発症前の画像所見を検討すると, すでに肺底部胸膜直下に網状陰影やすりガラス陰影を認められることが多く, 無症状の段階で肺の線維化が始まっているものと思われる。今回, 我々はこの線維化がスタートする肺底部胸膜直下という部位に着目し, この部位に特有のメカニカルストレスが肺の構成細胞に及ぼす影響を検討した。実際には 3 次元的な様々なストレスが加わっていると考えられるが, 今回は単純な一方向伸展刺激の実験系で行った。肺胞上皮細胞が伸展方向と垂直の向きに紡錘形様に形態変化することを認めた。腎臓の線維化においては Epithelial mesenchymal transition (EMT)¹²⁾が報告されており, 肺の線

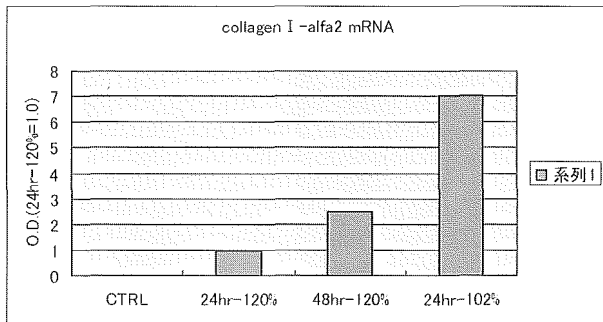


図 4. 一方向伸展刺激が肺細胞の遺伝子発現に及ぼす影響
A549 細胞を用いて伸展率 20%, 20 回/分の条件で 3, 24 時間伸展刺激を加えた後, それぞれの細胞から RNA を抽出して TGF- β 1mRNA 発現を real-time PCR (Gene Amp 5700) 法にて検討したところ, 3 時間伸展刺激においては TGF- β 1mRNA 発現に有意な変化を認めなかったものの, 24 時間刺激においては TGF- β 1mRNA の有意な発現増加を認めた。

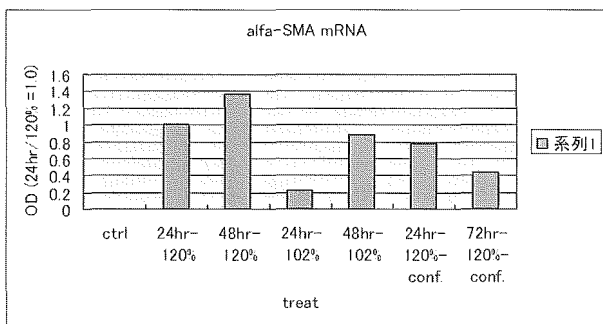


図 5.

維化における検討も必要と思われる。昨年以降, 伸展させた肺胞上皮細胞を用いて E-cadherin, α -smooth muscle actin (α SMA), Type I collagen alfa 2 の発現を検討したところ, E-cadherin の発現に差を認めることはできなかったが, α SMA と Type I collagen alfa 2 は増加する傾向を認めている。(図 4, 5, 発表当日ではデータは未公開)

TGF- β 1 ならびにそのレセプターは肺を構成する全ての細胞, 炎症細胞に発現することは知られており, IPF/UIP においては特に fibrotic foci や線維化病変部位に高頻度に発現し, 肺の線維化や修復過程において最も中心的な働きをしている因子である¹³⁾。また IPF/UIP 肺においては肺胞上皮細胞で発現していることが知られており¹⁴⁾、一昨年に我々の基礎研究において伸展刺激により TGF- β 1mRNA 発現が有意に増加を認めたことから慢性的な伸展刺激が線維化において何らかの働きをしているものと推測される。

今回の我々の追加実験では昨今報告された HGF

の肺胞上皮に対する作用として抗線維化作用を細胞レベルで証明することが大きな目的の一つであったが, 結果は全く逆のものとなった。つまり細胞レベルでは HGF や IFN- γ は TGF- β 1 の産生亢進を惹起する可能性がある, つまり線維化を促進させることが示唆された結果となった。

実際の生体の肺においては様々な細胞が相互に作用することで障害, 炎症, 修復, 線維化, 再生などを担っており, 個々の細胞を一方向のみでの検討では不十分である。また細胞培養において細胞が細胞接着の関連でどの程度 confluence の状態になっているかも結果を左右させる因子であると考えられる。

今後, マウスなどの肺を用いた肺全体に伸展刺激を加えて細胞の形態変化, 遺伝子発現など検討を行っていく予定である。

文 献

- 1) Gil H, Bachofen H, Gehr P, and Weibel ER. 1979. Alveolar volume-surface area relation in air- and saline-filled lungs fixed by vascular perfusion. *J App Physiol.* 47: 990-1001.
- 2) Mead J, Takishima T, and Leith D. 1970. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J App Physiol.* 28: 596-608.
- 3) Stern EJ, and Webb WR. 1993. Dynamic imaging of lung morphology with ultrafast high-resolution computed tomography. *J Thorac Imag.* 8: 273-282.
- 4) Sylvain Marchand-Adam, et. al. 2003. Defect of Hepatocyte Growth Factor Secretion by Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 168: 1156-1161.
- 5) Makoto Dohi, et. al. 2000. Hepatocyte Growth Factor Attenuates Collagen Accumulation in a Murine Model of Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 162: 2302-2307.
- 6) Masaki Watanabe, et. al. 2005. Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer to Alveolar Septa for Effective Suppression of Lung Fibrosis. *MOLECULAR THERAPY.* 12(1): 58-67.
- 7) Akiko Furuyama, et. al. 2004. Hepatocyte growth factor inhibits the formation of the basement membrane of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J*

- Physiol Lung Cell Mol Physiol. 286 : L939-L946.
- 8) Toshifumi Nagahori, et al. 1999. Interferong Upregulates the c-Met/Hepatocyte Growth Factor Receptor Expression in Alveolar Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21 : 490-497.
- 9) Gross TJ, and Hunninghake GW. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 345 : 517-525.
- 10) Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, and Phan SH. 2004. Bone-marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. 113 : 243-252.
- 11) Abe S, Boyer C, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Sharp JG, and Rennard SI. 2004. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 170 : 1158-1163.
- 12) Kalluri R, and Neilson EG. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 112 : 1776-1784.
- 13) Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, and McDonald JA. 1991. Transforming growth factor beta 1 is present at the sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88 : 6642-6646.
- 14) Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, and Greeberg AH. 1991. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 5 : 155-162.

間質性肺炎合併肺癌外科的切除例における間質性病変の検討

本庄 原¹ 小橋陽一郎¹ 野間 恵之² 田口 善夫^{3*}

肺癌に合併する間質性肺炎は一般に UIP の頻度が高いといわれている。今回我々は 2000 年から 2005 年までに当院で肺全摘および肺葉切除術を施行された原発性肺癌連続症例 517 例のうち、病理組織学的に胸膜直下から幅 1 cm 以上の広がりで見られる間質性病変が存在し、膠原病や塵肺など原因の明らかかなものを除外した 37 症例 (7.2%) の画像および病理組織学的所見を検討した。ほとんどが重喫煙者で (喫煙指数平均値 1354)、画像上明らかな肺気腫を 27 例で認めた。組織学的に UIP パターンに近いと考えられた病変でも、気腫性変化が目立つなど UIP の典型像とは異なっていた。間質性病変の発生病態については重度の喫煙に伴う二次的変化も加わっている可能性があり、今後更なる検討が必要と思われた。

The investigation of interstitial lung disease in the lungs surgically resected for primary lung cancer

Gen Honjo¹, Yoichiro Kobashi¹, Satoshi Noma², and Yoshio Taguchi³

¹Department of Pathology, Tenri Hospital

²Department of Radiology, Tenri Hospital

³Department of Respiratory Medicine, Tenri Hospital

Usual interstitial pneumonia (UIP) is generally considered to be the most frequent pattern in idiopathic interstitial pneumonias with lung cancer. We retrospectively reviewed continuous 517 cases of primary lung cancer resected by lobectomy or pneumonectomy in our hospital between 2000 and 2005. In pathological examination of resected lungs, excluding the cases associated with collagen vascular disease or pneumoconiosis, interstitial lung disease extending for more than 1cm from subpleura was seen in 37 cases (7.2%). The patients were all smokers and the mean of Brinkman index was 1354. Radiologically, interstitial pneumonia was definitive in 4 cases and faint in 33 cases on HRCT. Emphysematous change was definitive in 27 cases. The pathological findings of the lesions considered to be similar to UIP pattern were not necessarily compatible with those of typical UIP, for reasons of concomitance with marked emphysematous change. It was suggested that secondary change due to strong smoking might be included to the progress of interstitial lung disease.

はじめに

肺癌に合併する間質性肺炎は一般に UIP の頻度が高いといわれている。今回、我々は間質性肺炎を合併した肺癌の外科的切除症例を対象として、画像および病理組織学的検討を行なった。

対象と方法

対象は 2000 年から 2005 年までに当院で肺全摘および肺葉切除術を施行された原発性肺癌連続症例 517 例。切除肺は全例、気管支断端から 10% ホルマリンを注入して伸展固定を行ない、原則として水平断に 5~10 mm 厚で連続断面を作成した。腫瘍部以外の領域から肉眼的観察で線維化病変の強いところを中心に 3 切片以上切り出し、HE と EvG 染色を施行した。病理組織学的に胸膜直下から 1 cm 以上の広がりで見出された間質性病変を認める症例のうち、膠原病や塵肺など原因の明らかかなものを除外し、HRCT 画像、病理組織像の再検討を行なった。

結 果

対象症例 517 例の組織型は (表 1)、腺癌 314 例、扁平上皮癌 173 例、小細胞癌 6 例、大細胞癌 6 例 (大細胞神経内分泌癌を含む)、腺扁平上皮癌 13 例、癌肉腫 1 例、治療の影響のため組織型が不明なもの 4 例であった。

病理組織学的に間質性病変が認められたのは 37 症例 (7.2%) で、その内訳は (表 2)、男性 34 人、年齢は 59~83 歳 (平均 71.8 歳)、女性 3 人、64~78 歳 (平均 71.6 歳)、全体の平均年齢は 71.7 歳であった。全例に喫煙歴があり、本数は 3 本×30 年~100 本×45 年で、喫煙指数の平均値は 1354 であった。切除部位は左上葉が 1 例、左下葉が 7 例、右上葉が 7 例、右中葉が 0 例、右下葉が 16 例、右中下葉が 4 例、左全摘が 1 例であった。腫瘍径は 1~8 cm で全例が末梢型であった。組織型は腺癌が 4 例、扁平上皮癌が 29 例、腺癌と扁平上皮

癌の異時性多発が 1 例、小細胞癌が 1 例、大細胞癌が 1 例、腺扁平上皮癌が 1 例であった。

胸部 CT 所見のまとめを表 3 に示す。間質性肺炎の明らか (definite) な症例は 4 例で、病変の軽度 (faint) な症例は 33 例であった。また 27 例に肺気腫が認めら

表 1

2000~2005年当院における原発性肺癌肺全摘、肺葉切除術症例の内訳

腺癌	314
扁平上皮癌	173
小細胞癌	6
大細胞癌	6
腺扁平上皮癌	13
癌肉腫	1
分類不明癌 (治療後)	4
合計	517

表 2

対象37症例

男	34	59~83歳	喫煙歴 全例(+)
女	3	64~78歳 (平均72歳)	3本×30年~ 100本×45年 (BI 平均1354)
腫瘍径	1cm~8cm	腫瘍組織型	
腫瘍部位		腺癌	4
末梢型	37	扁平上皮癌	29
中枢型	0	腺癌+扁平上皮癌	1
		小細胞癌	1
		大細胞癌	1
		腺扁平上皮癌	1

表 3

画像所見のまとめ

胸部CTにおける	definite	4
間質性肺炎の存在	faint	33
肺気腫	(+)	27
	(-)~(±)	10

¹ 天理よろづ相談所病院病理部

² 同 放射線部

³ 同 呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

表 4
組織所見のまとめ

	線維化の 広がり	肺気腫		計
		(+)	(-)	
UIP pattern + emphysematous change	>1.5cm	13		13
UIP pattern + centrilobular fibrosis	>1.5cm	9	2	11
UIP pattern	1~1.5cm	3	8	11
f-NSIP pattern			2	2
		25	12	37

れた。

間質性病変についての病理所見のまとめを表 4 に示す。UIP パターンに近い病変で気腫性変化が目立つ症例が 13 例、UIP パターンに近い病変であるが、小葉中心性の線維化病変を伴うなど定型的でないものが 11 例（うち背景に肺気腫の見られる症例が 9 例）、UIP パターンに近い病変であるが病変の広がりが胸膜から 1~1.5 cm の広がりに留まるものが 11 例（うち背景に肺気腫の見られる症例が 3 例）、f-NSIP パターンが 2 例であった。

UIP パターンに近い病変で気腫性変化が目立つ代表的な症例を示す（図 1~2）。胸部 CT（腹臥位）では

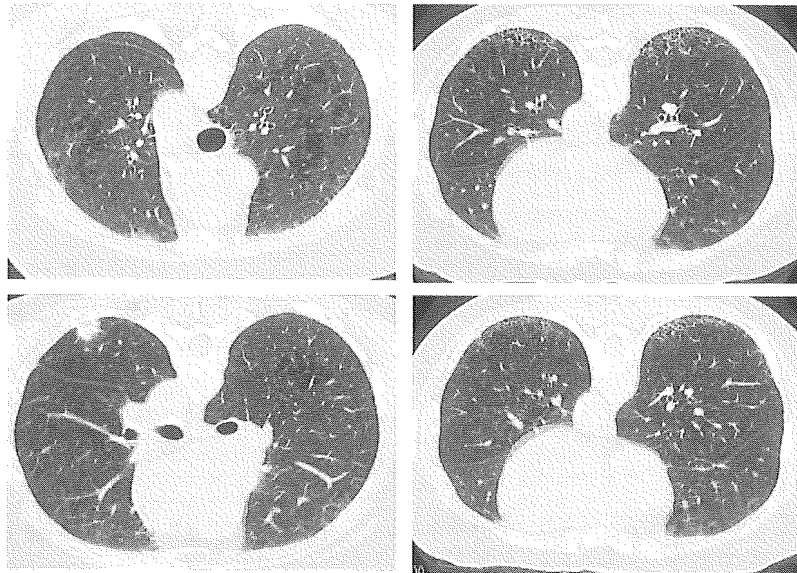


図 1

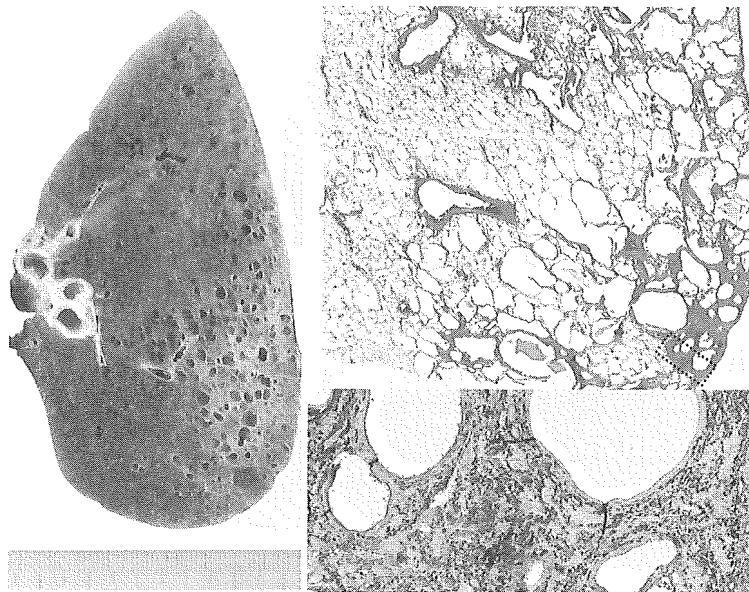


図 2

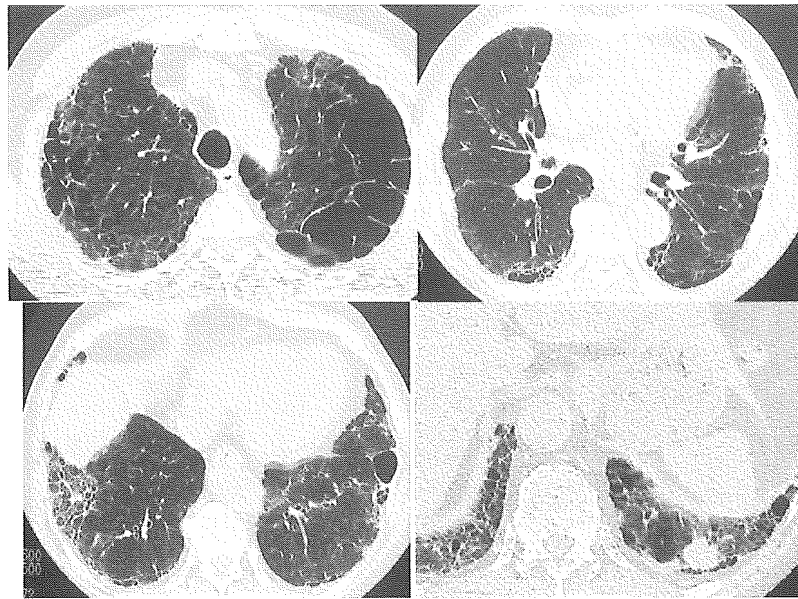


図 3

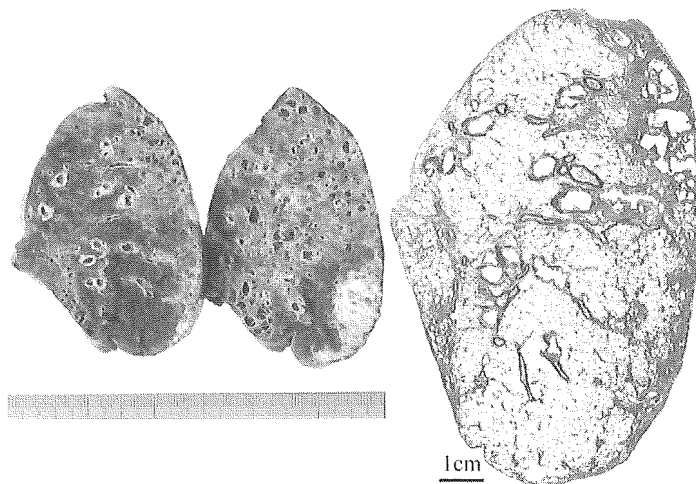


図 4

上葉に気腫性変化が見られる。僅かなすりガラス影を主体とした陰影が多い。腹臥位でも消退しないことから重力効果は除外され、間質性肺炎があると言わざるを得ない。肉眼像では径 4 mm 以下嚢胞状の穴あきが多数見られ一見蜂巢肺様を呈する。強拡大では蜂巢肺とするか肺気腫に線維化を伴った病変とするか評価が難しい。胸膜下の一部に密な線維化病変が存在するが、EvG 染色では背景の肺胞構造が比較的残る。定型的な UIP ではどちらかという弾性線維が消失傾向を示すことから、定型的な UIP の像とは言い難い。

胸部 CT で間質性肺炎が明らかであった症例を示す (図 3~4)。気腫が存在するために蜂巢肺かどうかの評価が難しい。肉眼的には嚢胞が多数存在し一見蜂

巣肺様に見えるが、ルーペ像では嚢胞の多くが牽引性細気管支拡張である。

考 察

当院で 2000~2005 年に原発性肺癌の肺全摘および肺葉切除術を施行された連続症例 517 例のうち、組織学的に胸膜直下から 1 cm 以上の広がりで見られた間質性病変を合併していた症例は 37 例 (7.2%) で、頻度は従来の報告よりも高かった^{1,2)}。

胸部 CT 画像で間質性肺炎の明らかな症例は 4 例であった。残りの 33 例は CT でも陰影は faint であり、重力効果との鑑別が必要な症例も含まれる。この

ため画像診断時には十分な注意が必要と思われた。肺気腫の明らかな症例は画像上 27 例，組織上 25 例でほぼ一致していた。

組織学的に UIP パターンに近い病変とされた症例は大きく 2 種類に分類された。1 つは気腫性変化が目立ち気嚢壁に線維化を伴ったのか，蜂巢肺が気腫性に拡張したのか区別が不明瞭なもの，もう 1 つは気腫性変化が比較的軽度で，小葉中心性に線維化病変が見られ，蜂巢肺様の病変が主に牽引性細気管支拡張よりなるものである。いずれにしても UIP パターンの定型像とは異なった印象で，前者の気腫性変化の強いものは，従来から指摘されているように，こうした病変の発生病態に喫煙の影響が強いものと考えられる。後者の気道中心性病変が目立つものは膠原病肺や慢性過敏性肺臓炎で見られる UIP パターンに一見類似している。ただこうした変化も，気腫を惹起する反応とは

異なるものの，気道病変ということから RB-ILD などの関連でタバコの影響も考慮され，職歴など生活歴に焦点を当てた今後更なる検討が必要と思われた。

参考文献

- 1) 河端美則，青山克彦，星永進他。肺癌切除肺の Usual Interstitial Pneumonia 病変とその急性増悪の病理学的検討。肺癌。2005；45：115-121。
- 2) 福島一雄，河端美則，内山隆司他。肺癌切除肺にみられた限局性慢性間質性肺炎（限局性 UIP）の検討。肺癌。1996；36：237-244。
- 3) 南部静洋，岩田猛邦，小橋陽一郎他。剖検症例からみた特発性間質性肺炎と肺癌発症との関連について—環境因子からの検討—。日胸疾会誌。1991；29：1275-1281。

サルコイドーシス

サルコイドーシス診断基準改訂について

折津 愈^{1)*} 杉崎 勝教^{2)*} 津田 富康³⁾

サルコイドーシスの診断基準改訂が、サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会とびまん性肺疾患調査研究班によって検討された。その基本概念は、本症は多臓器病変であること、現在診断基準に使用されている検査所見を見直すこと、肺、眼、心臓、神経・筋、皮膚の病変の手引きを参考にすることである。

今回その最終案がまとまったので提示する。

Diagnostic criteria revision of sarcoidosis

Masaru Oritsu¹ Katsunori Sugisaki², and Tomiyasu Tsuda³

¹*Department of Respiratory Medicine Japanese Red Cross Medical Center*

²*Department on Internal Medicine National Nishibeppu Hospital*

³*Adviser of Shin Beppu Hospital*

Diagnostic criteria revision of sarcoidosis was discussed by Japan Society of sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders and Annual Research on Diffuse Lung Diseases, Japanese Ministry of Health Labor and Welfer.

The basic concepts to revision are follows; reconfirm that sarcoidosis is multisystem disorder, reviews laboratory findings use to diagnosis criteria now. and establish the diagnostic guideline of lung, eye, heart, nervous system, skin sarcoidosis. Because the last plan was unified this time, we show it.

はじめに

ここ数年にわたりサルコイドーシス診断基準の改訂がサルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会とびまん性肺疾患調査研究班の共同作業として検討されてきた。その改訂の必要性は、現行の診断基準における検査所見の陽性率が、平成 16 年度の杉崎らの全国集計結果から変動をみせていること、また臨床的に強くサルコイドーシスを疑う症例において診断基準を満たさない症例が多くなってきていることなどがあげられる。今回長年における検討の結果、サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会診断基準作成委員会の津田委員長を中心とする最終案がまとまったのでここに提示する。

サルコイドーシス診断基準最終案

サルコイドーシスの診断基準 — 2005 —

I. 緒言 (改定の目的)

サルコイドーシスの診断基準は本邦では 1960 年の国際会議基準が採用されてきたが、1989 年に第 1 回の診断基準が厚生省サルコイドーシス調査研究班で報告¹⁾され、1992 年に改訂されて以後、現在の診断基準(難病の診断と治療指針「厚生省保険医療局疾病対策課監修、難病医学研究財団企画委員会編集平成 9 年 2 月初版」²⁾)として活用されている。この 1989 から 2003 年の 14 年間は我が国のサルコイドーシスに対する関心が急速に高まり欧米のレベルに到達した時期でもある。同様にサルコイドーシスに対する知識や診断技術も当然急速な進歩をとげた。画像診断では HRCT、⁶⁷Ga シンチグラフ等の核医学検査、検査では血清 ACE の測定、気管支肺泡洗浄細胞法の活用などがなされるようになり、より正確に診断出来るようになった。一方、我が国のサルコイドーシスの症例数の増加^{3,4)}(推定有病者数: 1972 年; 3,329 名, 1991 年; 15,100 名)は各臓器におけるサルコイドーシスの関与を改めて示すこととなり、各臓器におけるサルコイドーシス診断の必要性が求められるようになった。今

回の診断基準改訂の重要点は総合的な診断の必要性は(サルコイドーシスは全身性疾患であり)勿論であるが、個々の臓器障害を診断する基準「心臓サルコイドーシスの診断の手引き」や「眼サルコイドーシスの診断の手引き」などを充実したものとするのも主な目的として改訂した。しかし建前上は従来の我が国の診断基準を基本とし、これに一部修正を加え現状を反映したものとし、臓器別診断基準を充実し、且つ出来る限り多くの論文紹介(エビデンス)を追加した改訂になるよう努力した。また、見落としがちな結節性紅斑、急性サルコイドーシス(Lofgren's syndrome)、亜慢性サルコイドーシス(Heerfordt's syndrome)の項目の追加記載も行った。

文 献

- 1) 平賀洋明: サルコイドーシス分科会報告。厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班, 昭和 63 年度研究報告書 13-16, 1989.
- 2) びまん性肺疾患調査研究班: サルコイドーシス。難病の診断と治療指針。厚生省保険医療局疾病対策課監修, 難病医学研究財団企画委員会編。62-70, 1997.
- 3) 山口百子: 日本におけるサルコイドーシスの疫学。病理と臨床 13: 762-766, 1995.
- 4) Yamaguchi M, Hosoda Y, et al: Epidemiological study on sarcoidosis in Japan. Recent trends in incidence and prevalence rates and changes in epidemiological features. Sarcoidosis 6: 138-146, 1989.

II. サルコイドーシスの概念

サルコイドーシスは 1877 年に Hutchinson J^{1,2)}による皮膚病変の記載から数えて 126 年になる。しかしその原因は諸説あるもののまだ明確な証拠を示した報告はない。1991 年第 12 回国際サルコイドーシス学会において日本サルコイドーシス学会におけるサルコイドーシスの概念が発表された³⁾。その内容は「サルコイドーシスは原因不明の多臓器疾患であること、その病理組織は非乾酪性類上皮細胞肉芽腫であること、免疫学的には皮膚の遅延型過敏反応が抑制されていること、診断には臨床および X 線所見に加えて罹患部位

¹ 日赤医療センター呼吸器内科

² 独立行政法人国立病院機構 西別府病院内科

³ 国家公務員等共済立新別府病院顧問

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

に類上皮細胞肉芽腫が存在すれば診断が確実になること、病変部位における CD4 陽性 T 細胞/CD8 陽性 T 細胞比の増加 (Th-1 型反応) が見られること、その他の検査所見としては血清 ACE 活性上昇, ガリウムの取り込みの増加, Ca 代謝の異常, 気管支粘膜の蛍光血管造影所見の異常があること, 経過として多くは自然治癒するが, 潜行性発病や多臓器に肺外病変のある例は慢性に進行し, 線維化に進展することもあること, 副腎皮質ホルモン剤の治療は症状を改善させ, 肉芽腫形成を抑制し, 血清 ACE 値とガリウムの取り込みを正常化すること。」である。

以上はサルコイドーシスの臨床と病態をよく整理している。この概念はとりもなおさずサルコイドーシスの診断の要点を記載したに等しい。この要点を臨床的データで証明することが, とりもなおさず診断基準の骨格をなすものと考えられる。

文 献

- 1) Hutchinson J: Anomalous disease of the skin of the fingers: Case of livid papillary psoriasis. In Illustrations of clinical surgery. Vol 1. J & A Churchill, London, p 42-43, 1877.
- 2) Hutchinson J: On eruptions which occur in connection with gout. Case of Mortimer's malady. Arch Surg 9: 307-314, 1898.
- 3) 山本正彦, 細田 裕ほか: サルコイドーシスの概念 (1991) について, 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班, 平成 3 年度研究報告書, p 38-40, 1992.

III. 臨床的所見

1. 全身症状

発熱, 倦怠感等

2. 臓器別症状

呼吸器症状: 咳, 息切れ, 呼吸困難。

眼症状: 飛蚊症, 霧視, 視力障害。

皮膚症状: 丘疹, 皮下結節, 結節, 環状皮疹その他の皮膚病変。

循環器症状: めまい, 失神, 動悸などの不整脈症状, 心不全症状。

神経・筋症状: 末梢神経症状 (知覚, 運動障害, 脳

神経症状), 中枢神経症状 (痙攣, 尿崩症, 頭痛), 筋症状 (筋力低下, 筋痛, 腫瘤)

腎症状: 腎不全症状, 高カルシウム血症による頭痛, めまい

消化器症状: 黄疸, 胃腸症状

脾症状: 脾機能亢進症状, 脾腫

リンパ節症状: 表在および深在性リンパ節腫脹。

骨・関節症状: 腫瘤, 関節痛, 変形

3. 身体所見・検査所見

各臓器別診断の手引きを参照する。

IV. 病理組織所見

類上皮細胞からなる乾酪壊死を伴わない肉芽腫病変で, 異物型巨細胞やラングハンス型巨細胞も認められる。また巨細胞の内部には星状小体 (asteroid body), Schaumann 小体等の細胞内質内封入体を認めることがある。

生検部位: 経気管支, 胸腔鏡下あるいは開胸肺生検, リンパ節, 皮膚, 筋, 肝, 結膜, 心筋, 耳下腺, 脳, 脊髄, 末梢神経, 腎, 骨, 胃腸生検などが現在行われている。クペイム反応は現在我が国では反応液の作成が出来ないため行われていない。

V. サルコイドーシスの臨床病型

1. 典型例: 慢性サルコイドーシス

一般にサルコイドーシスは著明な自他覚症状に乏しく, 発熱や疼痛に乏しいために, 発見された時は多臓器にまたがるが多く, 発病の時期を想定できない。そのため多くの症例は慢性型と考えられる。しかし欧米の文献をみても, 病期を明確に判断する基準はなく一定の規定はない。初診時より 2 年以上臨床症状が継続するものを慢性サルコイドーシスと便宜的に考え, 治療方法の選択に利用する傾向もある。我が国では下記の 1, 2 の病型および低頻度であるが我が国でも報告のある急性呼吸不全発症例以外は多くが慢性サルコイドーシスと考えられている。言い換えるとサルコイドーシスと一般に考えている症例はその大部分は慢性型を指しているものと考えてよい。予後は一般には良好であるが, 予後不良の難治性的場合もある。