

200731023A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

びまん性肺疾患に関する調査研究班

平成 19 年度研究報告書

平成 20 年 3 月

主任研究者 貫和敏博

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業
びまん性肺疾患に関する調査研究班
平成 19 年度研究報告

目 次

班員名簿

総括研究報告

総括研究報告—平成 19 年度研究—	3
	主任研究者 貫和 敏博

研究班平成 19 年度経過報告	19
-----------------	----

研 究 報 告

疫学的調査研究

間質性肺炎の画像疫学に関する検討	41
	上甲 剛 他
臨床調査個人票に基づく特発性間質性肺炎の全国疫学調査 2006	45
	大野 彰二 他
特発性間質性肺炎患者の前向き WEB 登録の経過報告	53
	海老名雅仁 他
特発性間質性肺炎合併肺癌患者の外科手術に関する実態調査	62
	宮本 篤 他
特発性肺線維症の急性増悪に関する 2 次アンケート調査の解析結果報告	67
	谷口 博之 他

特発性間質性肺炎

(班員, 班協力者名)

間質性肺炎における抗 SP-D 自己抗体	75
	高橋 弘毅 他
難治性・線維性非特異性間質性肺炎 (severe/fatal fibrotic non-specific interstitial pneumonia) の提唱と その患者群の臨床・病理学的検討	81
	海老名雅仁 他
レドックス関連蛋白セレノプロテイン P (SEPP) の特発性間質性肺炎 (IPF) 病態における意義	87
	谷野 功典 他
診察前検査に対応可能な CLEIA 法を用いた KL-6 測定試薬の基礎的検討	90
	伊東 裕之 他
間質性肺炎における血清中 amphiregulin の検討	95
	前山 隆茂 他
慢性鳥関連過敏性肺炎 (chronic bird-related hypersensitivity: BRHP) の病態解明 —— 肺局所における原因抗原の局在と樹状細胞との関連 ——	99
	宮崎 泰成 他

びまん性肺胞傷害の多様性とその線維化形成機序	104	福田 悠 他
特発性間質性肺炎および膠原病肺の免疫抑制療法中に発生したサイトメガロウィルス抗原血症の検討	108	新井 徹 他
呼吸機能障害を認めない特発性肺線維症症例の検討	113	谷口 博之 他
シクロスポリン吸入の薬物動態	118	千田 金吾 他
外科的肺生検確定 fibrosing interstitial pneumonia 症例に対する少量ステロイドおよびシクロスポリン A の前向き検討	122	一門 和哉 他
間質性肺炎 (IP) および IP 合併肺癌組織における SUV 値と Glut-1 の対比	126	磯部 和順 他
日本人に見られる急性肺障害・間質性肺炎の遺伝学的研究	134	萩原 弘一
日本に於ける SP-C 遺伝子変異からみた間質性肺炎の成立機序と臨床像	139	瀬戸口靖弘 他
短期培養骨髄間葉系幹細胞移植によるプレオマイシン誘導肺線維症病態改善効果の検討	145	西脇 徹 他
プレオマイシン肺線維症モデルマウスにおける RNA 干渉を利用した PAI-1 の発現抑制による抗線維化作用の検討	152	服部 登 他
アポリポ蛋白 E 欠損マウスにおけるシリカ肺傷害の減弱	156	長瀬 洋之 他
$\alpha v \beta 8$ インテグリンによって活性化される TGF- β の肺上皮細胞アポトーシス及び上皮細胞と線維芽細胞間相互作用における重要性の検討	162	荒屋 潤 他
肺胞上皮細胞における上皮間葉転換とその収縮能の検討について	167	山内 康宏 他
プレオマイシン肺線維症モデルにおける imatinib の抗線維化メカニズム ～ $\alpha 1$ -acid glycoprotein と fibrocyte の役割～	174	西岡 安彦 他
サルコイドーシス		(班員, 班協力者名)
サルコイドーシス重症度分類 (試案)	183	折津 愈 他
難治性サルコイドーシスの実態調査にむけてのパイロット研究	188	杉崎 勝教 他
サルコイドーシスの組織診断における気管支内超音波ガイド下 transbronchial needle aspiration biopsy (EBUS-TBNA) の有用性	191	石井 芳樹 他
2004 年サルコイドーシス臨床調査個人票における組織診断群と臨床診断群ならびに疑診群の比較	196	森本 泰介 他
アクネ菌によるオートファジー誘導とサルコイドーシス病変部におけるアクネ菌蘇生促進因子の免疫組織学的証明	200	古川あすか 他
サルコイドーシスにおける Cathepsin S 遺伝子多型の意義	209	山口 悦郎

びまん性汎細気管支炎 (DPB)	(班員, 班協力者名)	
びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子研究		217
	土方美奈子 他	
狭窄性細気管支炎 (CBO)	(班員, 班協力者名)	
ラット移植肺へのインターロイキン-10 経気道的遺伝子導入が同種免疫反応に伴うグラフト 細気管支上皮細胞傷害に及ぼす影響		223
	大石 久 他	
閉塞性細気管支炎誘発物質であるアマメシバ (<i>Sauropus Androgynus</i>) の成分分析		228
	長谷川好規 他	
追加発表	(班員, 班協力者名)	
肺高血圧症を合併した特発性肺線維症の臨床的検討		237
	杉野 圭史 他	
サルコイドーシスの診断基準と診断の手引き-2006		243
研究成果の刊行に関する一覧表		259

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
びまん性肺疾患に関する調査研究班 名簿 [平成19年度]

役 職	氏 名	所属施設名	職 名
主任研究者	貫 和 敏 博	東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座 呼吸器病態学分野	教 授
分担研究者	近 藤 丘	東北大学加齢医学研究所 呼吸器再建研究分野	教 授
〃	杉 山 幸 比 古	自治医科大学 呼吸器内科	教 授
〃	江 石 義 信	東京医科歯科大学 人体病理学	教 授
〃	吉 澤 靖 之	東京医科歯科大学 呼吸器内科	教 授
〃	松 島 綱 治	東京大学大学院医学系研究科 分子予防医学	教 授
〃	滝 澤 始	帝京大学医学部附属溝口病院 第四内科	教 授
〃	吾 妻 安 良 太	日本医科大学 内科学講座 呼吸器・感染・腫瘍部門	准教授
〃	福 田 悠	日本医科大学 解析人体病理学	教 授
〃	慶 長 直 人	国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部	部 長
〃	井 上 義 一	独立行政法人国立病院機構 近畿中央胸部疾患セ ンター 臨床研究センター呼吸不全・難治性肺疾 患研究部	部 長
〃	上 甲 剛	大阪大学大学院医学系研究科 保健学専攻 機能診断科学講座	教 授
〃	河 野 修 興	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 分子内科学	教 授
〃	曾 根 三 郎	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 分子制御内科学	教 授
〃	菅 守 隆	社会福祉法人恩賜財団 済生会熊本病院 呼吸器センター	部 長
研究協力者	高 橋 弘 毅	札幌医科大学 第三内科	教 授
〃	石 井 芳 樹	獨協医科大学 呼吸器・アレルギー内科	教 授
〃	大 田 健	帝京大学医学部 呼吸器内科	教 授
〃	瀬 戸 口 靖 弘	東京医科大学病院 第一内科	准教授
〃	折 津 愈	日本赤十字社医療センター 呼吸器内科	部 長
〃	吉 村 邦 彦	虎の門病院 呼吸器センター内科	部 長
〃	千 田 金 吾	浜松医科大学 第二内科	准教授

役 職	氏 名	所属施設名	職 名
研 究 協 力 者	長 谷 川 好 規	名古屋大学大学院医学系研究科 病態内科学講座 呼吸器内科学分野	教 授
〃	山 口 悦 郎	愛知医科大学医学部 呼吸器・アレルギー内科	教 授
〃	谷 口 博 之	公立陶生病院 呼吸器・アレルギー内科	部 長
〃	田 口 善 夫	天理よろづ相談所病院 呼吸器内科	部 長
〃	杉 崎 勝 教	独立行政法人国立病院機構 西別府病院 内科	内科部長
〃	中 西 洋 一	九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設	教 授
〃	萩 原 弘 一	埼玉医科大学医学部 呼吸器内科	教 授
〃	棟 方 充	福島県立医科大学 呼吸器科学講座	教 授
〃	本 間 栄	東邦大学医学部 呼吸器内科	教 授
〃	竹 内 正 弘	北里大学薬学部 臨床統計部門	教 授
〃	桑 野 和 善	東京慈恵会医科大学 内科学講座 呼吸器内科	教 授
〃	海 老 名 雅 仁	東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座 呼吸器病態学分野	准教授

総括研究報告
——平成19年度研究——

平成 19 年度
厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
びまん性肺疾患に関する調査研究班

主任研究者 貫 和 敏 博
(東北大学加齢医学研究所 教授)

研究目的

びまん性肺疾患に関する調査研究は、特定疾患治療研究事業対策疾患である特定間質性肺炎とサルコイドーシスの二つの疾患に加え、びまん性班細気管支炎、および難治で知られる狭窄性細気管支炎を研究対象疾患とし、これらの疾患の基礎的病態研究、臨床的患者病態の詳細な検討を行うことによって、早期診断・早期治療、新しい診断法、難治性病態からの離脱を目的とした新しい治療法を開発し、ガイドライン化を通して国民の健康を促進することを目的としている。

研究方法

当該研究班の研究は臨床研究から基礎研究にいたるまで広範な領域にわたる種々様々な研究を駆使することによって執り行っており、その詳細においては以下に述べるそれぞれの研究内容において詳細に述べる。これらの研究においては当然のことではあるが倫理面への配慮は十分に行っている。すなわち、臨床研究は GCP を巡視し、特に結果の公表、論文発表などに関してプライバシー保護の観点に留意し、守秘義務を徹底した。また研究の目的などを充分説明した上で納得の得られた患者の自由意志によりエントリーを行い、検体採取につとめた。また全ての実験動物は、National Society for Medical Research による“Principals of Laboratory Animal Care”および National Academy of Sciences (NIH 公刊) による“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publication No. 86-23, revised 1985) に従って、愛護的に取り扱った。

研究の要旨

特発性間質性肺炎：日本呼吸器学会の共同作業として策定した「特発性間質性肺炎の診断と治療のガイド

ライン」(2004) に沿って班関連施設による特発性間質性肺炎症例の WEB 登録制を構成し、長期経過観察システムを欧米に先駆けて確立し登録制の中間解析結果を行った。また胸部 CT 画像による疫学調査を、胸部異常陰影の長期観察によって間質性肺炎の複雑な病態変化を明らかにし、早期病態の画像的診断の可能性を示した。臨床個人票に基づく臨床調査研究も継続して行い、特発性間質性肺炎およびサルコイドーシスの疾患現状の把握を試みた。特発性肺線維症で予後を決定するといわれる急性増悪に関しては、昨年度報告した WEB 登録による後ろ向き調査の結果に基づき、さらに詳細な多施設アンケート調査を行い、解析した。また外科手術時に問題となる急性増悪について予防薬投与の実態調査を行った。間質性肺炎の血清マーカーである SP-A/D や KL-6 に関し、抗 SP-D 抗体産生の可能性や新しい KL-6 迅速診断法の有効性を示した。特発性肺線維症と同様に急激な線維化病態をたどる予後の悪い fibrotic NSIP (severe/fatal f-NSIP) を抽出し、その線維化病態が肺胞壁にあることをしめし、疾患としての独立性を示した。またレドックス関連蛋白や血清中 EGFR リガンドの一つである amphiregulin の間質性肺炎の病態に与える影響を検討した。治療に関しては現在難治性間質性肺炎患者にステロイドとともに投与されているサイクロスポリンの血中動態や有効性に関して解析を行った。家族性肺線維症は一般に若年で発症し予後が悪いことが知られるが、その中にサーファクタントプロテイン C の遺伝子異常によるものを検出し、新規遺伝子異常も示した。さらにまた肺線維症発症患者が共通して持つと考えられる遺伝子異常に関して解析を開始した。新しい治療法の開発としては短期培養骨髄間葉系幹細胞移植による炎症・線維化抑制効果を示した。また PAI-1 抑制による、あるいは imatinib の抗線維化機序の解析を試みた。シリカモデルは従来のプレオマイシン肺障

害による線維化モデルよりも強い線維化病変が生じることが知られているがこのシリカ肺のマイクロアレイ解析によりアポリポ蛋白Eが疾患形成にかかわる重要な因子であることが初めて示され、今後患者肺での検討が期待された。

サルコイドーシス：サルコイドーシス学会との共同による新しい診断指針がほぼ完成し、さらに重症度判定や難治性に関する意識調査などを行った。P. acnesの遺伝子解析を進め、蘇生促進因子による冬眠型アクネ菌の内因性活性化に関する研究を行い発症機序への関与の可能性を示した。患者側の持つ疾患感受性遺伝子の探索を引き続き行い、Cathepsin-S 遺伝子多型との関与を検討した。

びまん性汎細気管支炎：DPBの疾患感受性遺伝子の座は、さらにHLA-B遺伝子座より300Kbほどテロメア側の200Kbにあって疾患感受性ハプロタイプを構成している可能性が示された。

狭窄性細気管支炎に関してはBOの疾患モデルを利用してその発症機序におけるアマメシバの関与を示した。また肺移植モデルにおけるIL-10による治療効果を示した。

研究結果および考察

特発性間質性肺炎

疫学的全国調査

間質性肺炎の画像疫学に関する検討

2003年4月から2004年3月にかけて低線量全肺thin-section CTによる肺癌検診を行った1,045例(男性721例、女性324例；年齢40-79歳、平均：58歳)を用いて間質性陰影の有病率を算出した。調整有病率はIIPs, UIP, NSIP, unclassifiedがそれぞれ10万人当たり6,270, 628, 368, 4,558人となり、これまでに報告されているものの約30-300倍となった。また、追跡可能な症例に対し4-5年のfollow-up評価を行った結果 unclassified に関しては下葉%involvementの増加が見られた症例も多く、数例についてはUIP, NSIPへの変化が認められており、間質性肺炎の早期像が確定できる可能性を見出した。

臨床個人調査票に基づく特発性間質性肺炎の疫学調査-2006

平成18年の特発性間質性肺炎・臨床調査個人票を用いて全国疫学調査を行った。31府県から1,831例

(新規770/更新1,061)の個人票が回収でき、そのうち1,540例(新規641/更新899)が特発性肺線維症で全体の84.1%を占めていた。NSIPは201例(11%)であった。特発性肺線維症の発症年齢は平均64.1歳で、男性998例、女性542例で男女比は1.84対1であった。重症度分類はI/II/III/IV期で144/88/418/773例であった。新規641例については、診断法、症状、画像所見、肺機能検査などが解析可能であった。病理学的診断は57例(8.9%)でしか行われておらずほとんどが臨床診断例であった。捻髪音/乾性咳嗽/労作時呼吸困難/ばち指の陽性率はそれぞれ99/92/97/49%でHRCT所見は92%の症例で胸膜直下の蜂巣肺所見を認めていた。呼吸機能では拘束性障害/拡散障害が82/92%に認め、6分間歩行試験時のSpO₂<90%は92%に認められた。血清KL-6の増加も97%に認められた。薬物治療は新規例の49%、更新例の63%で行われていた。

特発性間質性肺炎患者の前向きWEB登録結果報告

2005年4月から現在に至るまで当該担当医療施設で検査あるいは治療を行っている患者を対象としてWEB登録を行い、その初診時からの経過を観察する前向きWEB登録の結果をまとめた。総登録数は29施設から218例であり、そのうちIPFが145例(66.5%)、NSIPが48例(22.0%)、その他が8例であった。しかし登録もれと思われる未入力症例が17例(7.8例)にのぼり、再入力が必要であった。発症からエントリーされるまでの症例は5年以上が32%あり、今後の推移が注目される。死亡症例は26例でありこのうち急性増悪が42%、原疾患の悪化が38.5%であった。世界的にも注目される前向き調査であり、今後の患者およびそのデータの集積が必要である。

特発性間質性肺炎合併例に対する外科手術後の急性増悪に関する全国実態調査

特発性間質性肺炎(とくに特発性肺線維症, IPF)では、合併した肺癌症例に対する外科手術、あるいは間質性肺炎の病理組織学的診断のための外科的肺生検後に、高率に急性増悪をきたすことが知られており、その場合の致死率が90%にもおよぶため、臨床上市きわめて重大な問題である。術後の急性増悪の発症には、手術時間、片肺換気での肺伸展ストレス、周術期の高濃度酸素暴露、などがリスク因子になると考えられている。当班の分担研究ならびに研究協力施設、全国の呼吸器診療を標榜する日本呼吸器学会ないし日

本呼吸器外科学会認定の計 701 施設を対象として、その実態を調査したので、その結果を報告した。

特発性肺線維症の急性増悪に関する 2 次アンケート調査研究

特発性肺線維症 (IPF) の急性増悪は、ひとたび発症すると極めて予後不良である。以前、田口らの報告した「WEB 登録による IPF 急性増悪症例のレトロスペクティブ調査の解析結果報告」では 37 施設中 23 施設から 296 例が集積されたがその結果に基づき、今回は症例数の多い上位 11 施設の 2000 年 1 月から 2007 年の 11 月までの全症例についてアンケート形式にて、さらに踏み込んだ 2 次調査を企画した。その要点としては ① IPF の急性増悪の診断基準改定案の妥当性の評価、② 急性増悪に対する新規治療 (エラストアーゼ阻害薬、抗凝固療法、PMX 療法など) や非侵襲的陽圧換気法 (NPPV) を含む呼吸管理方法の実態調査、③ 間質性肺炎マーカー (KL-6, SP-A, SP-D) についてその普及度や有用性、④ 初診時 IPF 急性増悪例の実態や予後を調査であり、今回は集積可能であった症例について報告した。

臨床・病理・画像診断に関する研究

間質性肺炎における抗 SP-D 自己抗体

皮膚筋炎、特に筋症状を認めない Amyopathic Dermatomyositis (ADM) に合併した間質性肺炎は治療に抵抗性で予後不良である。ADM 症例で間質性肺炎の存在にもかかわらず血清 SP-D が低値をとる場合、血中に抗 SP-D 自己抗体が存在し抗 SP-D モノクローナル抗体とエピトープを競合するため見かけ上の低値を示すという仮説から、Western blot 法、ELISA 法を用いて患者血清中の自己抗体の検出を試み、抗 SP-D 自己抗体の存在を確認した。その結果、ADM12 症例中 6 例 (50%) で陽性であった。特発性肺線維症 (IPF) 症例 45 例でも自己抗体の検討を行い、陽性例は 4 例 (8.9%) であった。健常者では、50 例中 1 例のみ陽性 (2%) であった。また自己抗体のエピトープの検討では、自己抗体は SP-D の肺コレクチンとしての機能を発現するのに重要な領域である糖鎖認識領域に結合することがわかった。ADM 合併間質性肺炎は急速に進行し予後不良であるが、自己抗体が SP-D と結合し、その機能を阻害する可能性があり、ADM 合併間質性肺炎の急速な進行に関与している可能性が示唆された。

Severe/Fatal fibrotic non-specific interstitial pneumonia の提唱とその患者群の臨床・病理学的検討

特発性間質性肺炎のなかでも特発性肺線維症 (IPF) の難治性は際立っているものの、線維性非特異性間質性肺炎 (fibrosing non-specific interstitial pneumonia, f-NSIP) のなかにも IPF 同様に非常に予後の悪いものがある。これらの治療が奏功しない f-NSIP (Severe/Fatal f-NSIP) の患者臨床像および病理学的特徴を探ることを試みた。2003-2007 年まで東北大学病院に入院加療をしながらも治療効果がみられなかった、かつ外科的あるいは剖検肺にて f-NSIP と診断がついた症例は 8 人 (男性/女性、6/2) が難治性 f-NSIP であった。労作時呼吸困難などの自覚症状は平均 54±9 歳 (±SEM) で感じ、近医を受診後平均 16±10ヶ月の間無治療経過観察をされ、症状の悪化のため当院外来に紹介されていた。8 人中 5 人 (54±11 歳) はステロイドやネオオーラルによる治療後 18±18ヶ月でなくなっていた。これらなくなった患者の病理像は、IPF/UIP 患者肺では線維化は小葉間隔壁といった小葉辺縁に來たし肺胞壁にはむしろ血管が増加しているとは全く異なっており、その肺胞壁は一様な線維化とともに肺胞血管が消失する傾向を認めた。これらの難治性という臨床経過では似通った 2 つの疾患が病態の場がまったくことなる可能性が示された。

レドックス関連蛋白セレノプロテイン P (SEPP) の特発性間質性肺炎 (IPF) 病態における意義

SEPP に対する単クローン抗体を開発し、それを利用した ELISA システムを使用して、健常者、IPF を含む各種 IIPs 患者、COPD、喘息、肺炎などの呼吸器疾患患者血清中の SEPP 濃度を測定し、IPF の病態 (重症度、予後、他のマーカーなど) との関連性の検討を試みた。これまで、SEPP に対する単クローン抗体は作成され、その抗体を使用した ELISA システムも構築された。また、実際の健常者、呼吸器疾患患者検体を用いた測定では、血清 SEPP 濃度はこのシステムにおいて測定可能であった。現在、この ELISA システムの再現性・安定性の確認、更に測定前の検体の保存状態による SEPP 濃度変化の有無などについての検討を行った。

診察前検査に対応可能な CLEIA 法を用いた KL-6 測定法の基礎的検討

診察前検査に対応可能な KL-6 測定試薬の基本的な性能について検討した。平成 19 年 2 月～6 月の間に

当院から外部委託 (ピコルミ KL-6) によって測定された 40 検体およびプール血清を用いた。同時再現性は CV2.6~3.7%, 日差再現性は CV2.3~4.1%, キャリブレーションの日差再現性は各ポイントで CV 3% 以内であった。検出限界は 1.4 U/ml まで認められ、希釈直線性は、約 5,000 U/ml の検体で良好な直線性を確認できた。ビリルビン、ヘモグロビン、乳びによる測定値への影響は認められなかった。室温・冷蔵・凍結の条件下での 20 日間の検体の安定性は変動幅±10% 以内と良好であった。ECLIA 法との相関性は傾き 0.95, 相関係数 0.94 と互換性のある結果であった。本試薬の測定レンジは 10,000 U/ml まであり再検査の頻度が少ないこと、また反応時間が約 30 分と短時間のため検査受付から 1~1.5 時間以内での結果報告が可能なことより、診察前検査に対応可能であると思われる。

amphiregulin のヒト検体での検討

ヒト肺癌患者では血清中 EGFR リガンドの一つである amphiregulin 濃度と予後の関連が報告されているが、びまん性肺疾患での検討はない。肺損傷マウスモデルでは肺組織で amphiregulin の発現が増加しているとの報告があるが、詳細は不明である。我々の検討ではブレオマイシン・マウス肺臓炎モデルにおいて肺組織中の amphiregulin は増加しており、amphiregulin と肺損傷・線維化との関連が示唆される。そこで間質性肺疾患におけるヒト検体での amphiregulin 測定した。特発性肺線維症 (IPF, $n=17$), 非特異性間質性肺炎 (NSIP, $n=5$), 膠原病関連間質性肺炎 (CVD-IP, $n=9$) および対象健常者 (HV, $n=18$) から血液を採取して血清中 amphiregulin 濃度を ELISA 法で測定した。HV 群と比べて疾患群では、血清中 amphiregulin は有意に上昇していた。各疾患群と HV 群との比較では、IPF 群で有意に上昇していた。血清中 amphiregulin と血清中 LDH, 血清中 KL-6 との間にいずれも相関は認めなかった。血清中 amphiregulin と酸素化の程度や BAL 中リンパ球上昇の程度に、いずれも差はなかった。肺機能では、%VC 70% 未満群で 70% 以上群と比べて amphiregulin は高い傾向を示した。血清中 amphiregulin 濃度は間質性肺疾患で上昇していた。%VC 70% 未満群ではより高い傾向がみられたことから、疾患進行度と関連している可能性を認めた。

慢性鳥関連過敏性肺炎 (chronic bird-related hypersensitivity: BRHP) の病態解明-肺局所における原因抗原の局在と樹状細胞との関連

Chronic BRHP を対象に肺局所における原因抗原の局在を明らかにし、抗原提示細胞である樹状細胞の病態への関与を検討した。原因抗原 (鳩排泄物抽出物; pigeon dropping extracts, PDE) に対する抗体 (抗 PDE 抗体) で免疫染色をすると、再生上皮の基底膜側が染色され、myeloid dendritic cell (DC) のマーカーである CD1a 陽性細胞の分布と似ており、この樹状細胞が抗原をプロセスしている可能性があることから 2006 年 3 月までの過去 12 年間に当院呼吸器内科および関連施設にて診断され、胸腔鏡下肺生検 (VATS) を施行した chronic BRHP 40 例、acute BRHP および膠原病肺の手術標本と比較検討した。myeloid DC のマーカーである CD1a 陽性細胞の分布と抗原を取り込んでいると考えられる PDE 陽性細胞が近い分布を示した。BRHP モデルにおいては、Th2 優位である A/J マウスは、Th1 優位である C57BL/6 に比較して強く線維化病変を呈していた。BRHP の肺病変形成における PDE と樹状細胞の役割を検討した。

びまん性肺胞傷害 (DAD) の多様性と線維化形成機序

DAD には、1) 高度感染症などによる DAD, 2) 特発性、薬剤などによる急性間質性肺炎 (AIP) 型があると考えられている。肺に局限する AIP 型は、多臓器不全を伴う感染症などによる DAD よりは、予後良好であることが知られている。AIP 型の予後に関連した肺病変の特徴、線維化形成機序を、電顕、MMP について免疫組織化学、gelatin zymography で解析した。その結果 1) AIP, AIP 型 DAD は、高度感染症などによる DAD より肺病変が局在する傾向がある。2) AIP, AIP 型 DAD では、肺胞壁自体での筋線維芽細胞の増生、基底膜、弾性線維などの破壊が目立つ。その理由の一つに、MMP-2 の増加と活性化が示唆される。3) また、治癒の過程には、膠原線維の減少がみられるが、その過程に、MMP-1, 筋線維芽細胞による膠原細線維の貪食が関与することが示唆された。

治療と予後に関する研究

特発性間質性肺炎および膠原病肺の免疫抑制療法中に発生したサイトメガロウイルス抗原血症の検討

間質性肺炎加療中に発生した cytomegalovirus

(CMV) 抗原血症の検討を、当院にて 2002 年から 2006 年に加療を行った間質性肺炎症例のうち、治療経過中に CMV 抗原血症を生じた症例 44 例 (男性 28 例, 女性 16 例) の検討を行った。特発性間質性肺炎 31 例, 多発性筋炎/皮膚筋炎に伴う間質性肺炎 4 例, 顕微鏡的多発血管炎 4 例, 関節リウマチ関連間質性肺炎 4 例, シェーグレン症候群 1 例であった。全例ステロイド投与中であつた。初回 CMV 抗原陽性細胞 (対 50,000 個) 5 個以上を示した 25 例中 19 例で当初から ganciclovir (GCV) による加療が行われた。陽性細胞 5-10 個で GCV 投与が開始されなかった 5 例のうち 1 例は陽性細胞数の増加を示し, GCV 治療が開始された。初回 CMV 抗原陽性細胞が 5 個未満であつた 19 例中 3 例では当初から GCV 投与が開始され, 3 例では陽性細胞が 6~256 個に増加し, GCV 投与が行われた。これらの結果から間質性肺炎の免疫抑制療法中に CMV 抗原血症を生じた場合, 50,000 細胞中 4 個以下の少数細胞陽性例の場合も特に 1ヶ月以内は慎重な観察が必要であることを示した。

呼吸機能障害を認めない特発性肺線維症症例の検討

特発性肺線維症 (IPF) の自然経過を理解するうえで, その早期像を検討することは重要である。今回, 外科的肺生検にて UIP 所見を確認した IPF 症例の中で, 呼吸機能障害を認めない早期症例の臨床的検討を行った。過去に IPF/UIP と診断された症例で, 呼吸機能が正常 (肺活量 80% 以上かつ拡散能 80% 以上) である症例を抽出した。病理診断は, 病理医 2 名により再検討され, 2 名の合意が得られた場合を今回の検討対象とした。臨床像, 検査所見, BAL 所見などに加え, 肺生検時の高分解能 CT (HRCT) における種々の画像所見を, 2 名の放射線科医が独立して検討した。その結果 25 例が初期の検討に抽出され, このうち 6 例が, 組織所見の再検討により除外され 19 例が今回の検討対象となった。男性 16 例, 女性 3 例, 外科的肺生検施行時の平均年齢 61.1 ± 9.6 歳, PaO₂ 85.2 ± 11.1 mmHg, %VC $101.5 \pm 14.6\%$, %DLco $100.4 \pm 17.0\%$, KL-6 $1,089 \pm 1,497$ U/ml, SP-D 197.8 ± 138.0 ng/ml であつた。13 例は検診発見例で, 7 例は無症状であつた。BALF 所見は, cell counts $3.9 \pm 4.9 \times 10^5$ /ml, Mac. $84.7 \pm 16.2\%$, Neu. $1.8 \pm 2.1\%$, Lym $9.7 \pm 14.5\%$, Eos $3.9 \pm 7.9\%$, CD4/8 ratio 1.69 ± 1.86 であつた。HRCT 所見では, UIP pattern が 14 例 (confident 4, possible; 10) で, その他の 5 例は NSIP pattern であつた。経過

中, 19 例中の 9 例が %VC 80% 未満あるいは %DLco 80% 未満の呼吸機能障害に進行した (中間期間; 45.0 ± 13.5 mo)。単変量解析では, BALF 中 Neu (%) ($p=0.011$, odds ratio 2.51) と HRCT 上の蜂巢肺所見 (HNCB) (%) ($p=0.041$, odds ratio 2.23/5%) が, 呼吸機能障害への有意な寄与因子であつた。

シクロスポリン吸入の薬物動態

シクロスポリン (CsA) は腎, 肝, 肺など臓器移植後の患者や, 自己免疫疾患では尋常性乾癬, 再生不良性貧血, ネフローゼ症候群, 全身型重症筋無力症など, 難治な重症患者および従来の治療に抵抗を示す患者に効果が期待できる薬剤として有用性が認められている。その効果は用量依存性であるが, 腎機能障害などの副作用も用量依存性に見られ, 治療上のジレンマがある。間質性肺炎, とくに特発性肺線維症は, 進行性の呼吸機能障害を示す予後不良の疾患である。現在有効な治療法は確立されていないが, 通例的に副腎皮質ステロイド剤と免疫抑制剤の併用療法が行われている。近年, 多発性筋炎や皮膚筋炎に対して CsA の良好な成績が報告されていることもあり, 特発性肺線維症に対する効果も期待されている。今回我々は, シクロスポリン吸入の薬物動態を確認するため, 健常人にたいしてシクロスポリンの吸入投与を行い, 吸入後の血中濃度を測定し, 副作用とあわせて検討した。

外科的肺生検確定 間質性肺炎症例に対する少量ステロイドおよびシクロスポリン A の前向き検討 (preliminary study)

外科的肺生検施行症例に対して, 少量ステロイドとシクロスポリン A (以下 CsA) の併用効果を, 前向きに検討し, f-NSIP にこの併用治療が有効かどうか, f-NSIP/UIP 鑑別困難症例における CRP diagnosis 上の, 治療反応性をみる上で, 臨床的指標となりうるかの 2 点を検討した。対象症例は, 当科にて 2004 年 10 月以降, VATS 肺生検にて診断された線維性間質性肺炎 (UIP/f-NSIP) 23 症例のうち, 治療開始後 6 ヶ月以上経過した 15 症例を対象とし, 治療内容は, 一律に PSL 10 mg/day に固定し, これに CsA 2-3 mg/kg/day を併用 (トラフ 90-150 ng/ml) とし, 平均観察期間は 13.2 ヶ月であつた。結果は治療開始前後の比較にて診断一致 f-NSIP 群は有意に %VC の上昇と KL-6 の低下を認めたのに対し, 診断不一致群では, 有意な改善はみられませんでした。

間質性肺炎 (IP) および IP 合併肺癌組織における SUV 値と Glut-1 の対比

IP 病変でも SUV 値が上昇するが、腫瘍病変に比較すると低値である。また、SUV 値とグルコーストランスポーター-1 (Glut-1) 陽性細胞は病理学的な相関が高い。2004 年 12 月-2007 年 10 月まで当センターで FDG-PET を施行した IP 合併肺癌 19 例 (IP-LC 群), 肺癌非合併例 22 例 (IP 群)。肺癌病変と IP 領域の平均 SUVmax を測定し比較検討した。さらに、手術検体にて Glut-1 染色結果との対比を行った。IP-LC 群の平均年齢は 70.1 歳 (58~87 歳), 男/女: 17/2, 肺癌の組織型は Ad/Sq/Small/NSLC: 4/7/5/3。IP 群では 69.5 歳 (58~81 歳), 男/女: 12/10, IP の分類は特発性 IP (IIPs) が 18 例で, うち UIP が 12 例 (IPF/UIP: cIPF=3:9), non-UIP が 6 例 (non-UIP: NSIP: unclassified=3:2:1), 膠原病合併 IP (CVD-IP) が 4 例 (RA: SSc: PM: シェーグレン=1/1/1/1)。IP-LC 群の平均 SUVmax は肺癌病変では 7.3 ± 4.0 (2.2~16.8), IP 領域では 1.7 ± 0.4 (0.9~2.2) であり肺癌病変で有意な上昇が認められた ($P < 0.001$)。また、組織型別では Sq, Ad が高い傾向にあったが IP 領域と判別困難なものは認めなかった。一方、IP 群の平均 SUVmax は 1.8 ± 0.8 (0.9~4.1) であり、UIP と non-UIP と CVD-IP に有意差は認められなかった。IP-LC 群と IP 群の IP 領域に有意差は認められなかった ($P = 0.53$)。さらに、Glut-1 染色では癌病変だけでなく、IP 領域における II 型肺胞上皮細胞、一部の異型扁平上皮化生細胞に陽性所見を認めた。

びまん性肺疾患の遺伝学的解析

我々はまず GeneChip データを用いて遺伝学的解析を行なうためのアルゴリズムであるホモ接合ハプロタイプ法、およびそのプログラムを開発した。疾患感受性遺伝子 (以後疾患遺伝子と記載) の探索を行う場合、多数の患者が常染色体中に共通に有する共通先祖由来の染色体断片 (以後共通先祖由来断片と記載) の探索は、単因子疾患、多因子疾患双方に有望な手法と考えられる。このような断片では患者間でハプロタイプ (haplotype) が保存されており、それを利用して同定できるはずである。しかしながら、ハプロタイプの同定は現在の手法では容易ではなく、全ゲノムレベルで高密度のハプロタイプを得ることは不可能に近い。我々は、ハプロタイプの代替として、ホモ接合ハプロタイプ (homozygosity haplotype: HH) を考案し

た。ホモ接合ハプロタイプ (HH) はホモ接合型の SNP のみを使用するハプロタイプのサブセットであり、高密度 SNP 型情報より容易に得ることができる。2 コピーある相同染色体は同一のホモ接合ハプロタイプ (HH) を取る。それゆえ 2 本の相同染色体を 1 本であるかのように取り扱うことができる。その結果として、多数の患者の常染色体同士を直接比較することが可能になる。我々は、単因子疾患の例として常染色体優性遺伝である Marfan 症候群患者を多数有する大家系、多因子疾患の例として 10-25 世代前に存在した共通先祖由来疾患遺伝子が原因となった仮想多因子疾患患者集団の両者を使用して検討を行った。ホモ接合ハプロタイプ (HH) を使用した解析により、両者で疾患遺伝子の存在領域を同定できた。ホモ接合ハプロタイプ (HH) は、単因子疾患、多因子疾患の両者に対し、有望な疾患遺伝子同定法となると考えられる。本手法、および既存の遺伝学的解析手法を用い、疾患遺伝子解析を計画し着手した。

日本に於ける SP-C 遺伝子変異からみた間質性肺炎の成立機序と臨床像

2004 年から 2007 年の 4 年間に家族性間質性肺炎 (FIP) 20 症例、非家族性間質性肺炎 (sporadic IP: SIP) 38 症例について画像、病理所見、発症年齢、surfactant protein C 遺伝子 (SFTPC) の遺伝子解析、変異 SFTPC のクローニングと機能解析を行ってきた。変異 SFTPC は FIP で 7 症例、SIP で 4 症例であった。発症年齢では、20 歳以上の adult-onset、20 歳未満の infant-onset で分けると FIP では adult-onset が 5 症例、infant-onset が 2 症例、SIP では 4 症例全例 infant-onset で生後 1ヶ月以内の発症であった。画像、病理学的には、FIP は、UIP pattern で SIP は、UIP パターンは存在せず NSIP パターン、DIP パターン、肺胞蛋白症であった。変異 SFTPC は、FIP では、exon3 の missense mutation で proSP-C の C 末側の BRICHOS Domain の変異を示し、II 型肺胞上皮細胞は、アポトーシスを起こすカシャペロン蛋白の発現を誘導し adaptation も起こっていることが認められた。また、SIP では、exon2 の missense mutation を認める症例では、SP-C のコア部分の α ヘリクス構造改変が生じていることが予測された。Exon3 の missense mutation を認めるものの中で、proSP-C の C 末側の BRICHOS Domain より外側の変異を生じているものは、II 型肺胞上皮内では early endosome での変異 proSP-C の蓄積をまね

き、SP-C の recycle の異常が起こっていることが推測された。今回の研究では欧米で報告されている遺伝子変異と異なる変異を発見し、また、その変異の位置により II 型肺胞上皮の機能異常が異なること、また臨床の表現型が異なることを明らかにした。間質性肺炎全体からみると SP-C 遺伝子変異を伴う間質性肺炎は、少数であるが、II 型肺胞上皮細胞の機能異常も間質性肺炎の成立に関与している点は、今後の間質性肺炎の成立の機序を考える上で示唆に富む事象と考えられた。

基礎的病態に関する研究

短期培養骨髄間葉系幹細胞移植によるプレオマイシン誘導肺線維症病態改善効果の検討

難治性びまん性肺疾患治療において、再生医学の応用は呼吸器医療の将来を考える上で、重要かつ期待される課題と思われる。他の様々な疾患領域についてもそうであるように、骨髄間葉系幹細胞 (BMMSCs) 移植による治療は、自家骨髄を使用できる可能性を含み、幹細胞を医療に用いる際に生じる倫理的な問題を払拭しうるという利点を有する。しかしながら、これまでの研究のほとんどは培養増殖した BMMSCs を対象としているため、臨床応用を考える際に、培養過程における細胞の変化や異物混入、および細胞処理に要する設備・費用などの問題が生じうる。今回我々は、前年度に引き続き、培養過程における BMMSCs の細胞特性の変化を解析し、それらが、移植治療に不利なものであることを見出した。さらに、短期培養 (2 時間培養) BMMSCs と通常培養群との移植効果の比較をプレオマイシン誘導肺線維症モデルにおいて行った。短期培養 BMMSCs は急性疾患においても利用できる自家細胞であり、他の疾患領域も含めた今後の BMMSCs 移植療法において使用を検討すべき細胞群であると考え、報告した。

プレオマイシン肺線維症モデルマウスにおける、RNA 干渉を利用した PAI-1 発現抑制による抗線維化作用の検討

間質性肺炎における PAI-1 の発現を検証し、さらに動物実験として、RNA 干渉を用いた PAI-1 の発現抑制が、プレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルにおいて抗線維化作用を示すかを検討するためにヒト間質性肺炎手術検体を抗 PAI-1 抗体で免疫染色し、PAI-1 の高発現部位を検討した。次に、マウス PAI-1 に対す

る siRNA (PAI-1-siRNA) を作製した。siRNA の投与経路を確立するために、C57/BL6 マウスへの BLM (1.5 mg/kg) 気管内投与後 3 日目に、PAI-1-siRNA の経気管あるいは経鼻投与を行い、siRNA 投与 2 日後の BAL 洗浄液中の PAI-1 を測定した。siRNA の投与経路を経鼻と確定し、C57/BL6 マウスへの BLM (1.5 mg/kg) 気管内投与後 1, 4, 8, 11 日目に PAI-1-siRNA の投与を行い、BLM 投与後 14 日目に BAL 洗浄液中の PAI-1 抑制効果、さらに、全肺のコラーゲン量を sircol collagen assay にて測定し線維化の程度を評価した。その結果 PAI-1 は、正常肺組織に比べヒト間質性肺炎組織において高度の発現を示した。特に増生した II 型肺胞上皮細胞や気管支上皮細胞、肺胞マクロファージにおいて発現が高かった。プレオマイシン経気管投与後マウスへの PAI-1-siRNA の経気管、経鼻投与いずれもが同様の PAI-1 抑制効果を認めることがわかった。投与経路をより簡便な経鼻投与とし、プレオマイシン経気管投与後マウスに対して PAI-1-siRNA の繰り返し投与を行うことで、BAL 洗浄液中の PAI-1 が抑制されるとともに、肺内のコラーゲン量の増加も抑制された。肺線維症の治療法として、PAI-1 を標的とした siRNA を応用しうる可能性が示唆された。

アポリポ蛋白 E 欠損マウスにおけるシリカ肺傷害の減弱

様々な原因による肺傷害、および続発する線維化に関与する治療的候補分子は広く探索されてきているが、その治療戦略は完全には確立していない。本研究では、肺傷害や線維化の新たな治療標的を検索することを目的とした。具体的には、シリカ肺傷害モデルにおいて発現増強する分子を、cDNA アレイを用いて明らかにし、候補分子の生体内での役割を *in vivo* で検討した。その結果 6 週齢の C57/BL6j マウスに、16 mg のシリカ粒子を点鼻し、肺傷害モデルを作成した。14 日後に、肺組織由来の total RNA を抽出した。Gene Navigator cDNA Array System (TOYOBO) を用いて、約 600 種の遺伝子発現をシリカ投与群と生理食塩水投与群で比較した。検討した遺伝子の中で、アポリポ蛋白 E (ApoE) 発現が、シリカ投与群において、2.02 倍と高値であった。次に、ApoE 欠損マウスである B6.KOR-Apoe^{shl} マウス (Japan SLC)、およびコントロール群として、C57/BL6j マウスにシリカ粒子を点鼻投与し、14 日後に解析した。ApoE 欠損マウスでは、気

管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数, 好中球数, リンパ球数, マクロファージ数は有意に減少していた。さらに, 17 種の BALF 中ケモカイン, サイトカイン濃度を Luminex[®] (Hitachi) で測定したところ, IL-12 p40, MCP-1 濃度が, ApoE 欠損マウスで有意に減少していた。これらの結果 肺傷害における ApoE の役割には不明な点が多く, 既報としても殆ど検討されていない。ApoE は, 専ら脂質代謝に関与する分子として位置づけられているが, シリカ肺傷害モデルにおいては, ApoE 蛋白が向炎症作用を有していることが示唆された。

$\alpha v \beta 8$ インテグリンによって活性化される TGF- β の, 肺上皮細胞アポトーシスおよび上皮細胞と線維芽細胞間相互作用における重要性の検討

我々は人の肺由来の線維芽細胞における $\alpha v \beta 8$ インテグリンの発現と, TGF- β の活性化が, COPD の気道リモデリングへ関与している可能性を見出した (Araya J. et. al. J Clin Invest. 2007 Oct 25)。TGF- β は IPF の線維化においても中心的な役割を担う重要なサイトカインである。まず, 正常コントロール (4 例) IPF (6 例) における比較により, IPF 由来の線維芽細胞において $\beta 8$ インテグリンがより高発現し, 高容量の TGF- β を活性化している事を見出した。この事は $\alpha v \beta 8$ インテグリンにより活性化された TGF- β が IPF の病態進展において重要な役割を果たしている可能性を示唆している。肺胞上皮のアポトーシスが IPF の病態に関与し, TGF- β がアポトーシスの誘導に働いている可能性が報告されている。 $\beta 8$ インテグリンにより活性化される TGF- β は細胞表面から遊離され, オートクラインまたパラクラインファクターとして作用する。つまり TGF- β による上皮細胞と線維芽細胞の相互作用をアポトーシスへの関与の観点から明らかにする上で, $\beta 8$ インテグリンが重要な分子であると考えられる。さらに代表的な炎症性サイトカインである IL-1 β により, $\beta 8$ インテグリンの発現及び TGF- β 活性化が誘導される。つまり炎症に引き続いて起こる線維化の機序解明の点からも非常に興味深い知見が得られると考えられる。そこで今後, 我々は UCSF との共同研究として, 以下の検討を行い IPF 進展におけるアポトーシスおよび $\beta 8$ インテグリンにより活性化される TGF- β の役割が Epithelial-mesenchymal interaction の観点から明らかに出来る可能性があると考えた。

肺胞上皮細胞における上皮間葉転換とその収縮能の検討

特発性肺線維症は, 慢性かつ進行性に高度な線維化・拘束性換気障害を来し, 不可逆性の蜂巢肺形成を来す予後不良な疾患である。近年, 組織線維化において, ある環境下において上皮細胞がその極性を消失し間葉系細胞としての極性を獲得し間葉系細胞へ転換する上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) という概念の関与が着目されてきている。そこで我々は, 肺胞上皮細胞における上皮間葉転換に着目し, 間葉系細胞の重要な機能である収縮能について検討した。方法: 肺胞上皮細胞株 A549 細胞を用いて, Transforming Growth Factor- $\beta 1$ および Tumor Necrosis Factor- α により 48 時間刺激し, 形態学的変化を, 免疫染色法にて, 上皮細胞マーカーの E-cadherin と間葉系細胞マーカーの Vimentin の発現を検討した。さらに, quantitative PCR 法にて E-cadherin, Vimentin の mRNA の発現を検討した。EMT を経た間葉系細胞の収縮能の獲得について, Gel Contraction 法 (培養細胞を type I collagen により作成された gel に包埋播種し, 細胞収縮能を gel size の収縮として評価する) を用いて検討した。A549 細胞に TGF- $\beta 1$ (5 ng/ml) で 48 時間刺激したところ, 形態学的に丸石様細胞が紡錘型の細胞に転換し, 免疫染色では E-cadherin の発現は消失し, Vimentin を発現する細胞へと転換した。また, qPCR では, E-cadherin の発現低下と vimentin の発現増加を認めた。TGF- $\beta 1$ (5 ng/ml) と TNF- α 10 ng/ml との共刺激では, TGF- $\beta 1$ 単独に比べ, 上記効果発現の増強を示した。次に, EMT を経て間葉系化した細胞での Gel Contraction 法により収縮能を検討した。TGF- $\beta 1$ により EMT を経た細胞は, A549 細胞に比べて有意に収縮し, さらに, TGF- $\beta 1$ と TNF- α により EMT を経た細胞は, その収縮能はさらに大きかった。まとめ: A549 細胞は, TGF- $\beta 1$ 刺激により上皮間葉転換を経て間葉系細胞に転換した。さらに, TNF- α は TGF- $\beta 1$ による EMT を促進し, より間葉系細胞への転換を誘導した。EMT を経た間葉系細胞は, より強い収縮能を獲得しており, TNF- α はその効果を増強した。

ブレオマイシン誘発肺線維症モデルにおける imatinib の抗線維化メカニズム: α_1 -acid glycoprotein と fibrocyte の役割

分子標的治療薬である imatinib の PDGF レセプ

ターリン酸化阻害作用に注目し、マウスブレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルにおける抗線維化効果について報告したが今回は投与時期による効果の差を検証した。8週齢の C57BL/6 マウスに BLM を Alzet mini-osmotic pump を用いて持続皮下投与することにより肺線維症モデルを作成した。Imatinib (Novartis) は15日目から14日間 50 mg/kg/day を腹腔内に、エリスロマイシン (EM) は 5 mg/kg/day, クラリスロマイシン (CAM) は 20 mg/kg/day を同時に皮下投与した。28日目に Sircol Collagen Assay を用いて肺コラーゲン含量の定量と、肺組織切片の HE 染色による組織学的な線維化の評価を行った。BLM 投与後、マウス血清中には3日目より、肺組織では7日目より AGP が上昇した。In vitro で、AGP は imatinib の肺線維芽細胞増殖抑制効果を阻害した。EM あるいは CAM の添加は AGP の作用を解除し、imatinib の増殖抑制効果を回復させた。BLM モデルにおいて、imatinib とマクロライドの併用は後期投与のみで抗線維化効果を示し、in vivo で肺線維芽細胞の増殖を抑制した。一方、ヒト fibrocyte には PDGF レセプターが発現し、PDGF 刺激で遊走することが確認された。Imatinib は、PDGF による fibrocyte の遊走を阻害した。BLM モデルにおいても、imatinib 投与は肺 fibrocyte 数を減少させた。以上から、imatinib は線維化早期において fibrocyte の遊走を阻害することにより、また後期において肺線維芽細胞の増殖を抑制することにより抗線維化効果を発揮すること、AGP 濃度によりその作用が影響を受けることが明らかとなった。

サルコイドーシス

サルコイドーシスの重症度分類—サ症の機能障害の視点から—

以前より「サルコイドーシスの重症度分類」については検討されてきたが、いまだ結論を得ていない。従来サルコイドーシスの臨床経過および治療効果の観点から、遷延性サルコイドーシス、難治性サルコイドーシス、重症サルコイドーシスなどの呼称が使用されてきたが、これらにおいて定義されたものはなく、あいまいに使用されてきている。今回我々は、サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会の評議員の先生方にアンケートをお願いし、その意見を中心に統一した定義を提案したい。また難治性サルコイドーシスおよび重症サルコイドーシスを合わせて、機能障害サ症と新た

に呼称することとし、患者さんの公費負担の軽減を念頭に、重症度分類を機能障害サ症の視点から検討することとした。この機能障害の内容に関しては各臓器により異なるため、肺、眼、心臓、神経などのそれぞれの専門家によりその内容を検討していただき、身体障害者障害程度等級とは別な視点で重症度分類の素案を提案したいと考えている。

難治性サルコイドーシスの実態調査に向けてのパイロット研究

難治性サルコイドーシスあるいは重症サルコイドーシスと呼ばれる症例は一般にはステロイド治療を行っても十分に自覚症状や検査所見の改善が得られない症例をさすものと考えられる。今後こうした症例についての定義を明らかにし全国的な実態調査を行う予定であるが、そのパイロット的な検討として以下のような検討を行った。まず以前びまん性肺疾患調査研究班でステロイド剤 (以下ス剤) による治療を行った症例の全国調査を行い 46 施設から 187 例の症例を集積したが、そのときのデータを利用して難治性症例の頻度やその概要について検討した。対象は 1995 年から 2000 年までの 5 年間にステロイド内服治療を受けて 1 年間以上経過観察を行った 187 症例である。この間のサルコイドーシス (以下サ症) 全症例のうちのス剤治療症例の割合は 10.3% であった。これらの症例のうち治療を行ったが自覚所見が変化しないか増悪した症例は 45 例でその割合は 24% であった。従ってサ症全体でこうした難治例は凡そ 2.5% 程度と考えられた。この 45 例について検討しその概要を報告する。また現在われわれの外来に受診中のサ症患者でこうした定義にあてはまる症例についても報告を行う。

サルコイドーシスの組織診断における気管支内超音波ガイド下 transbronchial needle aspiration biopsy (EBUS-TBNA) の有用性

サルコイドーシスの組織診断は、ほとんどの場合、TBLB によって行われている。しかし、TBLB の陽性率は必ずしも満足のいくものではなく、特に画像上肺野病変が明らかでない I 期症例では、陽性率は低いと報告されている。サルコイドーシスの多くの症例では、肺門縦隔リンパ節の腫大を伴っており、経気管支的なアプローチは診断率の向上に有用と考えられたが、これまでブラインドでの TBNA は手技の熟練も要し、必ずしも普及していない。我々は、臨床的にサルコイ

ドーシスと診断された53例(I期25例, II期28例). 気管支鏡検査時にTBLB, BALとともにEBUS-TBNAを行った. 全体ではTBNAにて非乾酪性類上皮肉芽腫を認めた陽性率は53例中44例(83.0%)であり, TBLBの陽性率は71.7%であった. I期症例では, TBNA 80%, TBLB 60%, II期症例ではTBNA 85.7%, TBLB 89.3%であり, I期症例ではTBLBの陽性率はII期症例に比較し有意に低かったが, TBNAの陽性率は有意差がなかった. TBNAとTBLBを併用することによってI期症例でも96.2%, II期症例では100%の組織診断が可能であった.

2004年サルコイドーシス臨床調査個人票における組織診断群と臨床診断群ならびに疑診群の比較

我々は昨年の班会議にて2004年のサルコイドーシス(サ症)認定患者の臨床調査個人票を解析し, 新規認定患者のうち組織診断群(1,027名)の解析を修了し, 結果を報告した. 今回はわが国固有に繁用されてきた「臨床診断群」(358名)ならびに「疑診群」(294名)の妥当性を評価する目的で, 昨年解析対象から除外した非組織診断群を解析し, 組織診断群との比較を行った. 組織診断群: 非組織診断群では, 発症年齢分布は相似形を呈したが, 眼サ症患者を反映してか中高年女性の比率が若干増加していた. 全体に女性の比率は64.6%:68.2%, 有自覚症状率は73.8%:77.6%, 健診発見例の比率は28.0%:26.5%であった. 自覚症状に関しては視力障害28.8%:46.2%, 皮膚症状9.6%:1.4%と差が認められ, 眼所見は満たしても組織診断にいたる症例が少なく, また皮膚症状は組織診断を取得できた症例が比較的多かった. 心臓所見は両群ともに約1/4に存在した. 「臨床診断群」ならびに「疑診群」はその信憑性において妥当であると考えられたが, 罹患臓器について偏りがあり, 組織診断の得にくい眼サ症, 心サ症等, わが国特有の診断指針の策定が必要であると考えられた. BHLが診断基準に導入されたことでさらに臨床診断群が増加するものと考えられるが, 国際比較の視点からは主治医判定に依存してきた罹患臓器判定を, 一定の基準(正常値の2倍以上など)を明記することで容認性を向上する必要性が指摘できた.

アクネ菌の蘇生促進因子による冬眠型アクネ菌の内因性活性化に関する研究

蘇生促進因子(Rpf: Resuscitation promoting factor)は*Micrococcus luteus*の培養上清から発見された分泌型の菌体蛋白で, 休眠状態(Dormant-phase)か

らの蘇生, 増殖を促進する機能を有している. マイコバクテリアを含むGCリッチグラム陽性細菌においても相同性が高く, さらに保存性が高い蛋白が同定されており, 同様の機能をもつことが確認されている. また菌種交差性も認められている. 近年では, 結核の再燃において休眠型の結核菌が内因性活性化する機構としてその関与が注目されている.

これまでの解析から, 病変部アクネ菌は通常細菌が有する細胞壁構造を欠失しておりL型細菌に特徴的な出芽様分裂像を呈する. 細胞内に不顕性感染したアクネ菌は休眠状態で潜伏感染しており, おもに環境要因を契機として休眠状態のアクネ菌が内因性に活性化され細胞内増殖する. アクネ菌の細胞内増殖は, 本菌に対するアレルギー素因を有する患者において, 過度のTh1型免疫反応を誘導することで肉芽腫形成を惹起しているものと推察される. アクネ菌の全ゲノム配列(GeneBank sequence AE017283)を用いて, 既知の結核菌Rpf配列(RpfB)とのhomology検索により, アクネ菌Rpf遺伝子配列(1,194bps)を決定した. 本遺伝子配列からリコンビナント蛋白を作成し, これをマウスに免疫することでアクネ菌Rpf蛋白に対する単クローン抗体(RPF抗体)を作成した. 本抗体を用いてパラフィン組織切片での免疫染色を行うと, HW小体が認められるサルコイドーシスリンパ節28例中12例(43%)において, HW小体に一致する陽性所見を検出することが可能であった. HW小体を認める対照群リンパ節10例ではすべて陰性であったことから, RPF抗体による陽性所見の検出はアクネ菌の内因性活性化を示唆する所見と考えられた. このことから, サルコイドーシス病変部に潜伏感染している冬眠型のアクネ菌は, なんらかの環境要因を契機として, 潜伏感染細胞内で自らが産生分泌する蘇生促進因子により活性化し細胞内増殖しているものと考えられる.

Cathepsin-S 遺伝子多型とサルコイドーシスの相関

サルコイドーシスの発症や臨床像を規定する遺伝素因を明らかにすべく, サルコイドーシスにおいて強発現している遺伝子から選択した遺伝子の多型の意義を過去3年に亘って検討している. 今年はサルコイドーシスの肺胞マクロファージにより発現される遺伝子の網羅的検索の結果, 3番目に強い発現を示したcathepsin-S(CTSS)の遺伝子多型について解析した. 対象は195名の健常対照者と256名のサルコイドー

狭窄性細気管支炎

シス患者。HapMap project による data base より連鎖不平衡の乏しい tag SNP を二つ (rs10888390 G/A, rs11576175 G/A) 選択し, allele-specific PCR 法で多型を同定した。次いで SNP Alyze[®] (Dynacom) を用いて疾患との相関やハプロタイプの推定頻度を計算した。2つの SNP の個々の検討では, サルコイドーシスの発症との相関は確認されなかったが, 主だった4つのハプロタイプ頻度は全体としてサルコイドーシスと対照で有意差を示した ($p=0.005$)。個別のハプロタイプでは, もっとも頻度の高い G(rs10888390)-G(rs11576175) では $p=0.052$, G-A ($p=0.042$), A-A ($p=0.0001$) であった。しかし二つの SNP は他の臨床諸指標とは相関を認めなかった。cathepsin-S はサルコイドーシスの発症因子である可能性が示唆された。

びまん性汎細気管支炎 (DPB)

びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子研究

昨年度までに HLA-B 遺伝子座と HLA-A 遺伝子座の間に存在する DPB の疾患感受性候補領域の絞り込み・絞り込まれた領域内の網羅的多型探索・遺伝子クローニングを行ってきた。疾患感受性候補領域内に我々がクローニングした2つの遺伝子の気道上皮細胞での発現については不明な点が多い。

同意のもとに手術切除肺・気管支から得たヒト気管支上皮細胞を air liquid interface 培養し, 疾患感受性候補領域内にクローニングした2つの遺伝子の mRNA 発現を RT/PCR にて解析した。その結果, alternative splicing により, いくつかの transcripts がヒト気道上皮細胞において発現していることがわかった。

我々は疾患感受性遺伝子の探索を行ってきているが, 一方で, 多くの疾患は多因子疾患であり, 内的要因 (遺伝的要因) と外的要因 (環境要因: 病原体や毒物等々) の複雑な相互作用により発症にいたると考えられる。我々は, ウイルス感染が原因の一部として想定されながらも, 今まで一定の見解が得られていない呼吸器疾患について, PCR 法をベースにした新しいウイルス発見方法を用いて, 網羅的にウイルス遺伝子を探索するという全く新しいアプローチを試みている。びまん性肺疾患の原因あるいは病態に関与するウイルス感染が発見できれば, 病態の解明・治療法の開発へつながる可能性があると考えられる。

ラット移植肺へのインターロイキン-10 経気道的遺伝子導入が拒絶反応に伴うグラフト細気管支上皮細胞傷害に及ぼす影響

肺移植後, 骨髄移植後にみられる閉塞性細気管支炎は, 移植患者の長期予後を規定する合併症である。同種免疫反応による細気管支上皮細胞傷害とこれに引き続く反応性の線維性結合組織の増生が本体であることが推測されているものの, 治療法は確立されていないのが現状である。我々は, 摘出肺へのインターロイキン-10 (IL-10) 経気道的遺伝子導入が, 移植肺の急性拒絶反応を抑制することをラット肺移植モデルを用いて示してきた。今回は, 本法が, ラット移植肺の細気管支上皮細胞傷害を抑制するか否かにつき病理学的に検討した。BN ラットより左肺を摘出し, あらかじめ作成した遺伝子 (IL-10 群: pCMVh-IL10, コントロール群: pCMV β) をカチオン性脂質とともに経気道的に注入した後, Lew ラットに同所性肺移植を行った。移植後6日目に移植肺を摘出し, 病理標本作成し, 切片中のすべての細気管支をその上皮脱落の割合にしたがって, 「脱落なし」=上皮脱落なし, 「中等度脱落」=1-50%の上皮脱落, 「重度脱落」=51-100%の上皮脱落3つのカテゴリーに分類しそれぞれの個数を記録した。上皮脱落の程度の分布に両群間で差があるかどうかを検討した。コントロール群の切片中の総細気管支数は180個で, 「脱落なし」を示したのは47 (26.1%), 「中等度脱落」は60 (33.3%), 「重度脱落」は73 (40.6%) であった。一方, IL-10 群の切片中の総細気管支数は212であり, 「脱落なし」は124 (58.5%), 「中等度脱落」は57 (26.9%), 「重度脱落」は31 (14.6%) であった。気道上皮脱落の程度の分布に両群間で有意差を認め ($p<0.001$), IL-10 群で拒絶反応に伴う気道上皮傷害が有意に抑制された。

Sauropus Androgynus 抽出物を用いた閉塞性細気管支炎発症機序の検討

閉塞性細気管支炎 (以下 BO) は, 慢性進行性の予後不良の疾患であるが, その病因は不明である。最近では, 骨髄移植, 心肺移植後の予後を規定する重大な合併症として注目されているが, 有効な治療法はなく病態機序の解明が待たれている。近年, 東南アジア産の植物であるアマメシバ (*Sauropus Androgynus* 以下 SA) の葉抽出物の摂取により発症した BO 症例が報

告され、その発症には炎症、血管新生、線維化に関するさまざまなメディエーターの関与が推測されている。我々は、SA が単球系細胞、気道上皮細胞、血管内皮細胞に及ぼす直接の影響を検討すると共に、SA の分画化により BO 発症に関与する責任物質の検討を試みた。上記の各細胞（各種細胞株、およびヒト末梢血単球、ヒト肺胞マクロファージ）に SA 溶液および溶媒抽出法で作成した SA の各分画を加え培養し、サイトカインの産生（ELISA 法）、細胞の増殖能（MTT 法）、アポトーシスの誘導能（FACS 法）を評価した。さらに、責任物質を含むと考えられた分画に対してクロマトグラフィー法を用いてさらなる細分化を行い検討した。単球系腫瘍細胞株（THP-1, RAW）、ヒト末梢血単球、ヒト肺胞マクロファージの培養液中に SA（DMSO 溶解液）を添加すると、対照に比較して有意に TNF- α の産生が増大した。次に SA をヘキササン、アセトン、メタノール、水の順に溶解抽出し、それぞれの分画を単球系細胞培養液中に添加すると水溶性分画（以後 aqSA）のみに強い TNF- α 産生誘導がみられた。この aqSA は単球系細胞株 THPI より MIG, IP-10, MDC, IL-8, VEGF の産生も有意に増強した。aqSA 刺激による正常ボランティア末梢血単球からの TNF- α 産生誘導では、有意な個人差がみられ、機序は未解明であるが、SA を摂取した人の一部のみに BO を発症することと関連する可能性がある。一方で肺胞上皮細胞（A549）に対しては、SA（DMSO 溶解液）、aqSA とともに上記の炎症性サイトカイン、ケモカインの産生増強は認められなかった。また、aqSA は内皮細胞株 MS-1 の増殖を 48 時間で有意に抑制し一部の細胞は AnnexinV 陽性でアポトーシスが誘導されていると考えられた。以上の結果からは aqSA が BO の発症に関与する物質を含有している可能性が考えられた。そこで、aqSA を、分離 TLC（thin-layer chromatography）を用いて分配すると Rf 値が中等度の分画に強い単球系細胞からの TNF- α 産生誘導がみられ、silica gel column chromatography での分配でも、やや極性の低い分画に TNF- α 産生誘導が強かった。これは aqSA の中でも、比較的水親和性の軽度な分画に単球系細胞を介して生体に炎症を引き起こす物質が含有されていることを示唆していた。アマメシバの水溶性分画には BO の発症に関与する物質が含有されている可能性がある。

評 価

1) 達成度について

研究目的で目標としたほとんどが十分に検討され、また報告書としてまとめられた。とくに大きな研究目的であった特発性間質性肺炎患者の WEB 登録制の確立は今後のさまざまな疾患における臨床研究の基となることが予想される。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

当該研究の多くは英文論文として報告されるに至り、その学術的な意義は極めて高い。また欧米の臨床医学研究の中心的な役割をもつ米国国立衛生研究所（National Institute of Health, NIH）においても当該班で着手した画像診断による疫学調査の研究内容や WEB 登録制に大きな関心を寄せ、今後共同研究の可能性も検討されている。

3) 今後の展望について

当該研究班で確立された WEB 登録制による患者情報の蓄積および画像疫学の経過追跡は今後の研究でもぜひとも継続され、そしてまた随時その情報の解析を各年とりまとめて報告されることによって、いまままで不明のままにされていた難治性患者の全臨床経過が明らかになる。早期診断の根拠や治療法の評価の指標にもなり、この研究結果の重要性と意義は世界的にも極めて高い。臨床上きわめて問題の大きい急性増悪の発症や肺がんの併発の理解も得られることが期待される。

4) 研究内容の効率性について

これらの臨床的・基礎的な先端的な試みが、多くの臨床研究施設および基礎研究施設からなる分担研究者・共同研究者が共有することは欧米においてもほとんど見られない日本の誇るべきシステムであり、非常に効率のいい研究体制であることは疑いようもない。

結 論

従来国内で総合されていなかった特発性間質性肺炎の患者情報が、当該班関連専門施設による患者情報 WEB 登録制による臨床情報の集積によって今年度初めてその解析結果がなされたことは、今後多数の患者の長期にわたる臨床記録が合同で調査できるようになり、欧米に先んじたシステムが整ったことを意味しており極めてきわめて貴重な情報となる。新個人票に基づく調査とあわせて、今後の厚生医療対策にも役立つ

つことも期待される。また画像疫学調査の研究からは早期画像診断という、これもまた米国でようやくこれから目指そうという臨床研究を先んじて着手し、早期診断の可能性を示したことも特筆すべきことである。間質性肺炎患者の生命予後を左右する急性増悪に関しても長年にわたり当該班が中心になって研究がなされ、その多くはようやく今欧米の研究施設が注目し

始めるようになった。これらの臨床研究を中心に発展してきた研究が、基礎研究における解析に基づいてなされるようになったことも、この領域の病態理解を介した新しい診断法や治療法の確立を可能にしている。今後もまた画期的な研究が発展し、対象としている難治性疾患の患者救済がなされることが切望される。