

(refID) (500 k GeneChip 上の SNP のうち 100,000 番目の SNP) の位置を疾患遺伝子の設定位置とした。そしてこの位置に 10 世代前の共通先祖由来の共通先祖由来領域を有している 15 名の患者を作成した。ここでは、もとの 15 名の患者の rs16823424 周辺の SNP 遺伝型データを、共通先祖として設定した特定被験者のデータと置き換えている (図 6B)。置換断片の長さは、式 2 で  $m=10$  とおいた指数分布を取る乱数から無作為に抽出した。すなわち 2 名の患者は、図 2B において  $m=n=10$  とした関係となる。「患者群」はこれらの 15 名の患者に加え、30 名の互いに親戚関係のない患者を含む (図 6C)。「対照群」は 45 名の互いに親戚関係のない日本人で、Affymetrix 社のウェブサイトから取得し

たデータである。我々の目的は、これらのデータより疾患遺伝子の存在する rs16823424 領域を同定することであるが、以下のような手順で行った。まず、染色体領域を微小領域に分割する。次に「患者群」を用い、各微小領域ごとに最も多くの患者に共有されているホモ接合ハプロタイプ (最頻ホモ接合ハプロタイプ) を求める。この最頻ホモ接合ハプロタイプをつなぎ合わせ、一つの全染色体レベルのホモ接合ハプロタイプを作成する。このホモ接合ハプロタイプを有する仮想の個人を「代表者」と命名する (図 6C step 1)。「代表者」と「患者群」、「対照群」を比較し、ホモ接合ハプロタイプ保存領域を共有する被験者数を、各群各領域ごとに調べる。最後に各領域でホモ接合ハプロタイプ

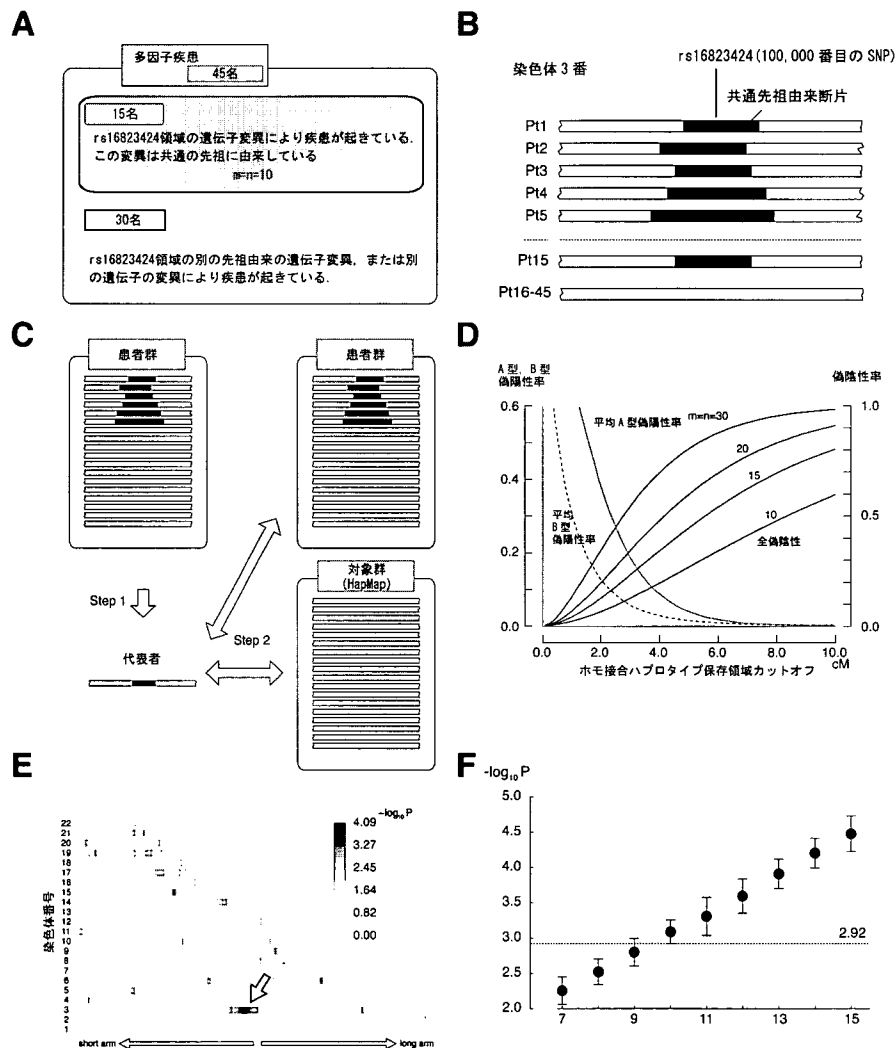


図 6 多因子疾患のシミュレーション  
 モデル多因子疾患の構造。15 名の患者では、共通の先祖に由来した rs16823424 領域の遺伝子変異が疾患を引き起こしている (A)。「患者群」の作成。黒帯は共通先祖として設定した特定患者由来の rs16823424 領域の断片を示す。Pt: 患者 (B)。解析法 (C)。「対照群」での偽陰性、および A 型偽陽性、B 型偽陽性平均値の全常染色体領域に対する割合 (D)。各染色体領域の  $-\log_{10}(P)$  値を示す濃度図。白矢印は rs16823424 の位置を示す (E)。100 セットの「患者群」を、各数の患者に対して作成して算出した  $-\log_{10}(P)$  値。平均土標準偏差を示す。2.92 は最大のバックグラウンド値 (rs16823424 領域外での最大の  $-\log_{10}(P)$  値) (F)。

保存領域を共有する被験者数に有意な差があるかどうかを  $P$  値を用いて検討する。全常染色体領域で最小の  $P$  値 (すなわち最大の  $-\log_{10}P$  値) を示す領域を、疾患遺伝子候補領域とする。

解析に先立ち、ホモ接合ハプロタイプ保存領域カットオフ値を決定した (図 6D)。複数の時代の共通先祖 (何世代前の共通先祖かは  $m$  と  $n$  で表した) について、偽陰性率を計算した。世代数が増すにつれ、共通先祖由来領域の長さは減少する。そのため、 $m$  と  $n$  が大きな場合、共通先祖由来領域の検出はより困難になる。ホモ接合ハプロタイプ保存領域カットオフ値 5.0 cM を、 $m=n=10$  の場合に適切な値であると判断し、以後の解析はこの値を使用して行った。偽陰性の全長は、解析に使用する SNP の数を増やすことにより減らすことができる。このことに関しては後に考察する。

そして解析を行った。図 6E は  $-\log_{10}(P)$  値の濃度図である。より黒い部分がより有意であることを示す。rs16823424 領域は  $-\log_{10}(P)$  が 4.48 で、全常染色体領域で  $-\log_{10}(P)$  値が 3.0 以上 (すなわち  $P < 0.001$ ) である唯一の領域であった。この領域外の  $-\log_{10}(P)$  の最大値は 2.92 で、この値を解析のバックグラウンド値と設定した。

我々は、次に検出限界に関する検討を行った。45 名中、rs16823424 に共通先祖由来領域を有する患者を 7 から 15 までのそれぞれの数含む「患者群」を、各数値ごとに 100 セット作成し解析した。共通先祖由来領域所有患者数が 9 以下の場合、rs16823424 領域の  $P$  値は、多くの場合バックグラウンドよりも高くなる (図 6F)。よって、45 名中 10 名 (22%) が検出限界であると結論づけた。

### 複数の領域の同時検出と、共通先祖の存在した世代数の影響

我々は、次に 3 種の異なる疾患遺伝子を有する多因子疾患のシミュレーションを行った。疾患遺伝子 1 は rs16823424 (500 k GeneChip 上の 100,000 番目の SNP) に、疾患遺伝子 2 は rs4473885 (200,000 番目) に、疾患遺伝子 3 は rs11200928 (300,000 番目) に存在すると設定した。それぞれの疾患遺伝子が由来した共通先祖は  $m=n=15, 20$ , および  $25$  とした。45 患者からなる「患者群」は 100 セット作成した。「患者群」の被験者

1-15 は特定被験者(共通先祖)由来の断片を有するが、その長さは  $m=n=15$  に相当する指数分布に従う。被験者 16-30 は同様に  $m=n=20$  に相当する断片を有し、被験者 31-45 は  $m=n=25$  に相当する断片を有する (図 7A)。ホモ接合ハプロタイプ保存領域カットオフ値は 5.0 cM を使用した。図 7B に、3 つの標的領域が同時検出された例を示す。検出限界は 45 名中 10 名 (22%) ( $m=n=15$ )、13 名 (29%) ( $m=n=20$ ) そして 13 名 (29%) ( $m=n=25$ ) であり、これ以上では半数以上の解析でバックグラウンドより小さな  $P$  値が得られた。

### 考 察

本研究で、我々はホモ接合ハプロタイプを導入した。相同染色体の双方が同一のホモ接合ハプロタイプを取るため、2 本の相同染色体を 1 本の染色体であるかのように扱うことができる。この結果、2 名の患者の常染色体を直接比較し、共通先祖由来の断片を探ることができる。

ホモ接合ハプロタイプは共通先祖由来の断片を探す手法であるため、優性、劣性双方の遺伝子の探索が可能である。解析はノンパラメトリック、すなわち家系情報を必要としない。「患者群」は疾患を有する被験者のみから成るため、浸透率を考慮する必要が無い。これらの特徴により、疾患遺伝子の解析計画の立案、解析結果の解釈は単純なものとなる。

ホモ接合ハプロタイプ解析の別の特徴は、アルゴリズムが単純なことである。このため、多くのパーソナルコンピュータで解析施行可能と考えられる。9 名の被験者を有する Marfan 症候群 (図 5) の解析は、我々のラップトップコンピュータでは 6 秒で終了した。それぞれ 45 名の「患者群」、「対照群」を使用した解析 (図 6E) の所要時間は 5 分であった。計算時間は被験者数の 2 乗に比例すると考えられ、被験者数がある程度増えても、解析は相応の時間で終了する。

我々は古典的な Haldane の Poisson モデルを使用した。実際には、交叉は染色体全域で均等に起こる訳ではない。不均等を生じる主要な原因の一つは交叉干渉 (crossover interference)<sup>14)</sup> である。しかしながら、交叉干渉は短い共通先祖由来領域を減少させる方向に働くため、共通先祖由来領域の検出確率は上昇することになる。よって、我々は交叉干渉を考慮した補正を

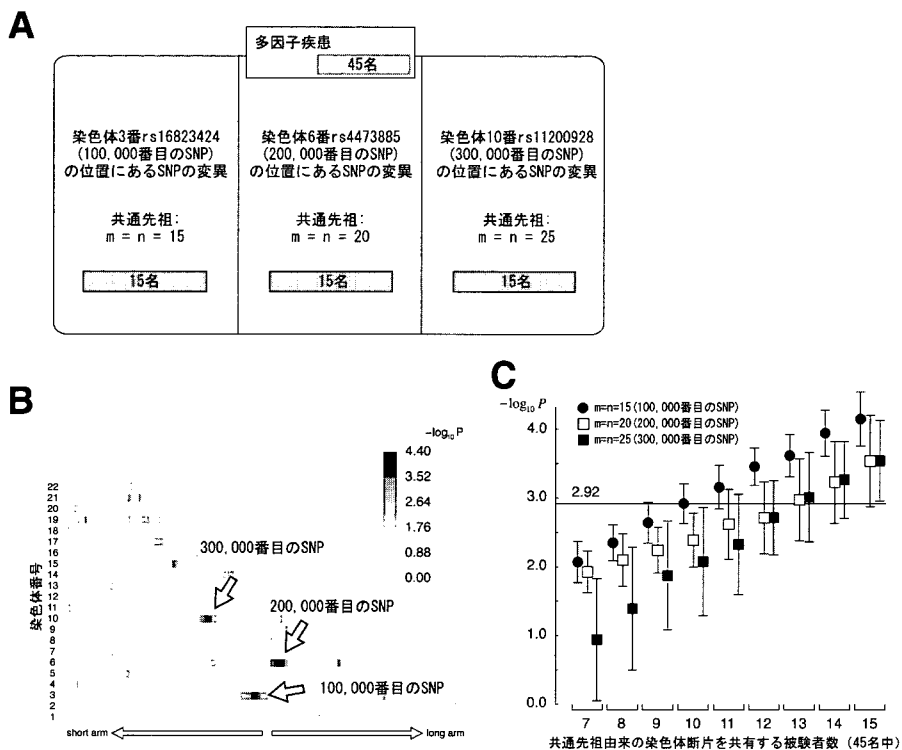


図7 複数のターゲット検出, および世代数の影響  
疾患の構造 (A), 3領域の同時検出の例. 白い矢印でそれぞれのSNP領域を示す (B),  $-\log_{10}(P)$  の分布 (C).

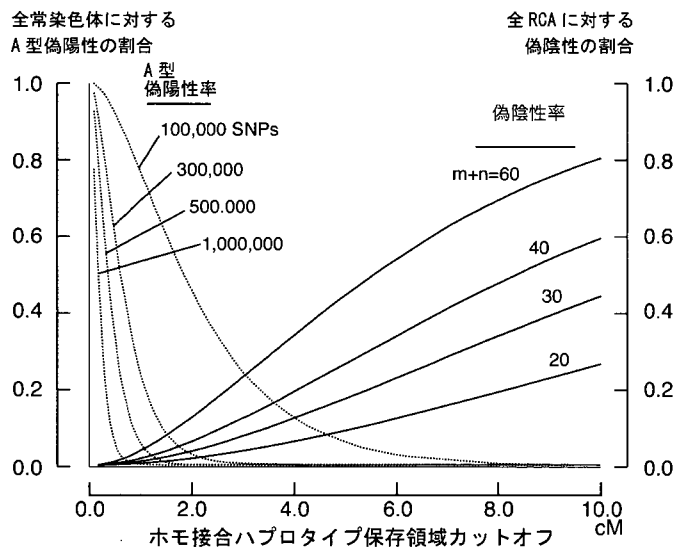


図8 SNP数の影響, および解析範囲となる共通先祖の存在世代  
偽陰性は各種  $m+n$  値に対して描画した. A型偽陽性は, いくつかの解析SNP数について示した.

導入しなかった。

家系内に近親婚がある場合, 共通先祖由来の断片が, 同時に2本の相同染色体に存在する可能性がある(図2A, 被験者2). 共通先祖由来領域は2本の相同染色体の共通先祖由来断片の和集合となるため, 近親婚のある場合, 共通先祖由来領域の平均長は増加する。

これは共通先祖由来領域の検出感度を上昇させる方向に働く。実際の家系では, 先祖に亘って近親婚の情報を得ることは難しいこともあり, 我々は近親婚を考慮した補正を導入しなかった。

$m+n > 30$  の共通先祖由来の断片の検出には, 本研究で使用したSNP数は十分とは言えない(図6D). A

型の偽陽性は使用 SNP 数とともに減少する (図 8) (B 型の偽陽性は実際のデータに大きく依存しているため、グラフには示さなかった)。より多くの SNP が使用できれば、より小さなホモ接合ハプロタイプ保存領域カットオフ値を使用できると思われる。図 8 から推定すると、1,000,000 個の SNP を使用することにより検出対象を  $m+n>60$  にまで拡大できるかもしれない。

多因子疾患モデルにおいて、我々は 45 名の被験者からなる「患者群」を使用した。しかしながら、より少ない被験者でも解析可能である。ややバックグラウンドは高くなるが、18 名中 6 名の共通祖先由来領域を有する「患者群」を利用した場合でも、良好な解析が可能であった (データは示さない)。

疾患遺伝子解析に使用される主要な解析手法として、ハプロタイプ解析、連鎖解析、罹患同胞対解析、全ゲノム関連解析が挙げられる<sup>15)</sup>。前 2 者は家系を対象としており後 2 者は一般集団を対象としている。 $m+n<3$  の場合、ホモ接合ハプロタイプ解析は良好に働かない。実際、ホモ接合ハプロタイプは親と子を区別できない (図 5A) が、ハプロタイプ解析や連鎖解析は 2 世代のみから成る家系でも疾患遺伝子検索が可能である<sup>16)</sup>。 $m+n\geq 3$  のペアを含む家系の場合、ホモ接合ハプロタイプは良好に働く (図 5)。 $6\leq m+n\leq 50$  の場合、ホモ接合ハプロタイプは有効であるが、ハプロタイプ解析や連鎖解析は、施行すること自体が困難である。ホモ接合ハプロタイプの魅力的な使用方法として、罹患血縁患者解析が考えられる<sup>17)</sup>。式 1 によると、はとこ同士の患者が 1 対存在すると、候補領域が  $1/16$  に狭められることになる。すなわち 3 対のはとこ同士の患者が得られた場合、候補領域が全常染色体の  $(1/16)^3=1/4096$  にまで狭められ得る。もう一つホモ接合ハプロタイプの魅力的な利用方法としては、全ゲノム関連解析で蓄積したデータの 2 次使用が考えられる。ホモ接合ハプロタイプ解析はそれほど多くの患者数を必要としないため、蓄積患者の小グループ解析が可能になる。地政学的、民族的層別化により、疾患遺伝子の存在する共通祖先由来領域を明らかにすることができるかもしれない。

本研究で、我々はホモ接合ハプロタイプを導入し、その使用方法を報告した。ホモ接合ハプロタイプは簡単に取得でき、かつ直感的である。現在、人々は活発に移動するようになっているが、日本を含む多くの国

は、政治的、地理的に人々の動きを制限してきた歴史を有する。患者集積地域では、特定の先祖を原因とした疾患遺伝子が原因となっているものもあるだろう。そのような地域を対象とした研究では、ホモ接合ハプロタイプは有用なものとなろう。ホモ接合ハプロタイプは、単因子疾患、多因子疾患双方の疾患遺伝子同定に寄与するものと思われる。

## 謝 辞

我々は、広島大学の川上秀史教授に、原稿を批判的に検討してくれたことに関して感謝する。八塚由紀子さんには、技術的な面で貢献していただいた。この研究は厚生労働科学研究特定疾患対策研究事業の援助を受けている。

## ウェブサイト

本研究で参照したウェブサイトは以下のようである。

Affymetrix, <http://www.affymetrix.com>

International HapMap project, <http://www.hapmap.org>

National Center for Biotechnology, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

GCC, the GNU Compiler Collection, <http://gcc.gnu.org>

## 文 献

- 1) Long JC, Williams RC, Urbanek M (1995) An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *American journal of human genetics* 56: 799-810
- 2) Morton NE (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *American journal of human genetics* 7: 277-318
- 3) Kruglyak L, Lander ES (1995) Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *American journal of human genetics* 57: 439-454
- 4) The International HapMap Consortium (2003) The International HapMap Project. *Nature* 426: 789-796

5) Di Rienzo A, Hudson RR (2005) An evolutionary framework for common diseases: the ancestral-susceptibility model. *Trends Genet* 21: 596-601

6) Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA (2004) Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature* 429: 446-452

7) Gillanders EM, Pearson JV, Sorant JM, Trent JM, O'Connell JR, Bailey-Wilson JE (2006) The value of molecular haplotypes in a family-based linkage study. *American journal of human genetics* 79: 458-468

8) Amos CI, Dawson DV, Elston RC (1990) The probabilistic determination of identity-by-descent sharing for pairs of relatives from pedigrees. *American journal of human genetics* 47: 842-853

9) Zhang K, Zhao H (2006) A comparison of several methods for haplotype frequency estimation and haplotype reconstruction for tightly linked markers from general pedigrees. *Genet Epidemiol* 30: 423-437

10) Haldane JBS (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J Genet* 8: 299-309

11) Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, Sigurdardottir S, Barnard J, Hallbeck B, Masson G, Shlien A, Palsson ST, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Stefansson K (2002) A high-resolution recombination map of the human genome. *Nature genetics* 31: 241-247

12) Hayward C, Brock DJ (1997) Fibrillin-1 mutations in Marfan syndrome and other type-1 fibrillinopathies. *Hum Mutat* 10: 415-423

13) Pritchard DJ, Korf BR (2003) *Medical Genetics at a Glance*. Blackwell Publishing, Birmingham

14) Sturtevant AH (1915) The behavior of chromosomes as studied through linkage. *Z Indukt Abstammungs-Vererbungsl* 13: 234-287

15) Strachan T, Read A (2003) *Human Molecular Genetics*. Garland Science/Taylor & Francis Group, Oxfordshire, UK

16) Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Brown MA, Kaplan FS (2006) A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes

inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nature genetics* 38: 525-527

17) Risch N (1990) Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of affected relative pairs. *American journal of human genetics* 46: 229-241

## 補 遺

### 式 1 の導出

$RCA(1, 1)$  の計算を例として示す (図 a1)。

A と B は共通先祖である。m1-1 と m1-2 は被験者 m1 の 2 つの相同染色体, n1-1 と n1-2 は被験者 n1 の 2 つの相同染色体である。m1-1 の半分は m0-1 に由来し, 残りの半分は m0-2 に由来している。n1-1 の半分は n0-1 に由来し, 残りの半分は n0-2 に由来している。被験者 m1 と n1 では, 共通先祖由来領域の全常染色体領域に対する割合は, m1 と n1 が特定の部位に同一の染色体断片を共有する確率と同一である。その確率は, m1-1, m1-2, n1-1 および n1-2 が全て異なる染色体由来の断片を有する確率を 1 から引いたものであるから,

$$RCA(1, 1) = 1 - \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{3}{4}.$$

この他の  $m, n$  に対する  $RCA(m, n)$  は同様に求められる。それをまとめたものが式 1 である。

### 偽陰性, A 型偽陽性, B 型偽陽性の計算

(i) 偽陰性の全常染色体領域に対する割合 ( $R_{false\ negatives}$ )

Haldane の Poisson model を使用した場合, 世代  $m$  (図 2B 参照) における先祖由来の染色体断片の長さ ( $x$ ) は, 確率密度関数

$$f(x) = \lambda e^{-\lambda x} \quad \lambda = \frac{m}{100}(cM^{-1}). \quad (\text{式 a1})$$

で表される指数分布となる。共通先祖由来領域は, 各被験者の 2 本の相同染色体の和集合を取り, さらに 2 名の被験者について積集合を取ったものである。式 1 より  $m+n$  (図 2B を参照) が十分に大きいときは, ホモ接合ハプロタイプ保存領域カットオフ値  $c$  に対する  $R_{false\ negatives}$  は

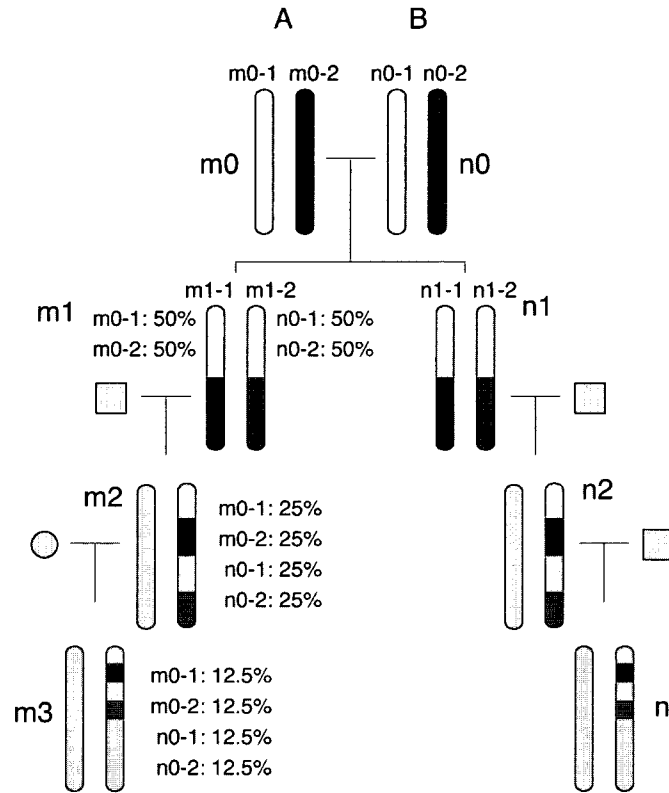


図 a1 式 1 の導出。灰色の円と四角は配偶者を示す。灰色の染色体領域は、共通先祖(すなわち A および B)由来断片を有していない配偶者から由来したものである。

$$R_{False\ negatives} \approx \frac{\int_0^c xf(x)dx}{\int_0^\infty xf(x)dx},$$

$$= 1 - e^{-\lambda c} (1 + \lambda c)$$

で与えられる。ここで、

$$f(x) = \lambda e^{-\lambda x} \quad \lambda = \frac{m+n}{100} (cM^{-1}). \quad (\text{式 a2})$$

である。しかしながら、 $m+n$  が小さいとき、 $R_{False\ negatives}$  は式 a2 から計算した値から離れてくる。われわれは、小さな  $m+n$  の値に対する  $R_{False\ negatives}$  を、100,000 家系を使用したモンテカルロ法により計算した (表 a1)。 $m+n > 12$  の場合、式 1 は良い近似値を与える (表 a1 参照:  $m+n=12$  の値を比較のこと)。

(ii) A 型偽陽性の、全 RCA 領域に対する割合 ( $R_{Type\ A\ false\ positives}$ )

$N_{SNP}$  を遺伝型決定を行った全 SNP 数とし、 $P_n$  と  $Q_n$  を  $n$  番目の SNP のメジャーアレルとマイナーアレルの存在比率とする。メジャーアレルとマイナーアレルの平均存在比率は ( $\bar{F}_{major\ allele}$ ) および ( $\bar{F}_{minor\ allele}$ ) は

$$\bar{F}_{major\ allele} = \frac{\sum_{n=1}^{N_{SNP}} P_n}{N_{SNP}}, \quad \bar{F}_{minor\ allele} = \frac{\sum_{n=1}^{N_{SNP}} Q_n}{N_{SNP}},$$

型の一致しない比較可能 SNP の数 ( $N_{mismatched\ compSNP}$ ) は、概算

$$N_{mismatched\ compSNP} \approx \frac{2(\bar{F}_{major\ allele})^2(\bar{F}_{minor\ allele})^2 N_{Pt1} N_{Pt2}}{N_{SNP}},$$

で与えられる。ここで、 $N_{Pt1}$  および  $N_{Pt2}$  は、Pt1 および Pt2 で遺伝型を決定し得た SNP である。 $N_{mismatched\ compSNP}$  は大きな数ではない。例えば、500 k GeneChip を使用した場合、 $N_{mismatched\ compSNP}$  は最大 22,000 であり、各比較可能 SNP 間の距離は平均 0.16 cM となる。この距離は多くのハプロタイプブロックより大きいので、全常染色体上にランダムに分布していると仮定できる。その場合、 $L_{autosome}$  を常染色体の全遺伝長として、2つの比較可能 SNP の間の距離は、確率密度関数

$$f(x) = \lambda e^{-\lambda x} \quad \lambda = \frac{N_{mismatched\ compSNP}}{L_{autosome}},$$

の指数関数に従う。よって、カットオフ値  $c$  について、

表 a1 各ホモ接合ハプロタイプ保存領域カットオフ値での、全常染色体領域に対する偽陰性の割合

m	n	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2	2.2	2.4	2.6	2.8	3	3.2	3.4	3.6	3.8	4	4.2	4.4	4.6	4.8	5	5.2	5.4	5.6	5.8	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Calculated using the Monte Carlo method																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
2	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.005	0.006	0.006	0.007	0.008	0.008	0.008	0.009	0.010	0.011	0.012	0.013	0.013	0.014	0.015	0.016	0.017	0.018	0.019	0.020	0.021	0.022	0.023	0.024	0.025	0.026	0.027	0.028	0.029	0.030	0.031	0.032	0.033	0.034	0.035	0.036	0.037	0.038	0.039	0.040	0.041	0.042	0.043	0.044	0.045	0.046	0.047	0.048	0.049	0.050	0.051	0.052	0.053	0.054	0.055	0.056	0.057	0.058	0.059	0.060	0.061	0.062	0.063	0.064	0.065	0.066	0.067	0.068	0.069	0.070	0.071	0.072	0.073	0.074	0.075	0.076	0.077	0.078	0.079	0.080	0.081	0.082	0.083	0.084	0.085	0.086	0.087	0.088	0.089	0.090	0.091	0.092	0.093	0.094	0.095	0.096	0.097	0.098	0.099	0.100	0.101	0.102	0.103	0.104	0.105	0.106	0.107	0.108	0.109	0.110	0.111	0.112	0.113	0.114	0.115	0.116	0.117	0.118	0.119	0.120	0.121	0.122	0.123	0.124	0.125	0.126	0.127	0.128	0.129	0.130	0.131	0.132	0.133	0.134	0.135	0.136	0.137	0.138	0.139	0.140	0.141	0.142	0.143	0.144	0.145	0.146	0.147	0.148	0.149	0.150	0.151	0.152	0.153	0.154	0.155	0.156	0.157	0.158	0.159	0.160	0.161	0.162	0.163	0.164	0.165	0.166	0.167	0.168	0.169	0.170	0.171	0.172	0.173	0.174	0.175	0.176	0.177	0.178	0.179	0.180	0.181	0.182	0.183	0.184	0.185	0.186	0.187	0.188	0.189	0.190	0.191	0.192	0.193	0.194	0.195	0.196	0.197	0.198	0.199	0.200	0.201	0.202	0.203	0.204	0.205	0.206	0.207	0.208	0.209	0.210	0.211	0.212	0.213	0.214	0.215	0.216	0.217	0.218	0.219	0.220	0.221	0.222	0.223	0.224	0.225	0.226	0.227	0.228	0.229	0.230	0.231	0.232	0.233	0.234	0.235	0.236	0.237	0.238	0.239	0.240	0.241	0.242	0.243	0.244	0.245	0.246	0.247	0.248	0.249	0.250	0.251	0.252	0.253	0.254	0.255	0.256	0.257	0.258	0.259	0.260	0.261	0.262	0.263	0.264	0.265	0.266	0.267	0.268	0.269	0.270	0.271	0.272	0.273	0.274	0.275	0.276	0.277	0.278	0.279	0.280	0.281	0.282	0.283	0.284	0.285	0.286	0.287	0.288	0.289	0.290	0.291	0.292	0.293	0.294	0.295	0.296	0.297	0.298	0.299	0.300	0.301	0.302	0.303	0.304	0.305	0.306	0.307	0.308	0.309	0.310	0.311	0.312	0.313	0.314	0.315	0.316	0.317	0.318	0.319	0.320	0.321	0.322	0.323	0.324	0.325	0.326	0.327	0.328	0.329	0.330	0.331	0.332	0.333	0.334	0.335	0.336	0.337	0.338	0.339	0.340	0.341	0.342	0.343	0.344	0.345	0.346	0.347	0.348	0.349	0.350	0.351	0.352	0.353	0.354	0.355	0.356	0.357	0.358	0.359	0.360	0.361	0.362	0.363	0.364	0.365	0.366	0.367	0.368	0.369	0.370	0.371	0.372	0.373	0.374	0.375	0.376	0.377	0.378	0.379	0.380	0.381	0.382	0.383	0.384	0.385	0.386	0.387	0.388	0.389	0.390	0.391	0.392	0.393	0.394	0.395	0.396	0.397	0.398	0.399	0.400	0.401	0.402	0.403	0.404	0.405	0.406	0.407	0.408	0.409	0.410	0.411	0.412	0.413	0.414	0.415	0.416	0.417	0.418	0.419	0.420	0.421	0.422	0.423	0.424	0.425	0.426	0.427	0.428	0.429	0.430	0.431	0.432	0.433	0.434	0.435	0.436	0.437	0.438	0.439	0.440	0.441	0.442	0.443	0.444	0.445	0.446	0.447	0.448	0.449	0.450	0.451	0.452	0.453	0.454	0.455	0.456	0.457	0.458	0.459	0.460	0.461	0.462	0.463	0.464	0.465	0.466	0.467	0.468	0.469	0.470	0.471	0.472	0.473	0.474	0.475	0.476	0.477	0.478	0.479	0.480	0.481	0.482	0.483	0.484	0.485	0.486	0.487	0.488	0.489	0.490	0.491	0.492	0.493	0.494	0.495	0.496	0.497	0.498	0.499	0.500	0.501	0.502	0.503	0.504	0.505	0.506	0.507	0.508	0.509	0.510	0.511	0.512	0.513	0.514	0.515	0.516	0.517	0.518	0.519	0.520	0.521	0.522	0.523	0.524	0.525	0.526	0.527	0.528	0.529	0.530	0.531	0.532	0.533	0.534	0.535	0.536	0.537	0.538	0.539	0.540	0.541	0.542	0.543	0.544	0.545	0.546	0.547	0.548	0.549	0.550	0.551	0.552	0.553	0.554	0.555	0.556	0.557	0.558	0.559	0.560	0.561	0.562	0.563	0.564	0.565	0.566	0.567	0.568	0.569	0.570	0.571	0.572	0.573	0.574	0.575	0.576	0.577	0.578	0.579	0.580	0.581	0.582	0.583	0.584	0.585	0.586	0.587	0.588	0.589	0.590	0.591	0.592	0.593	0.594	0.595	0.596	0.597	0.598	0.599	0.600	0.601	0.602	0.603	0.604	0.605	0.606	0.607	0.608	0.609	0.610	0.611	0.612	0.613	0.614	0.615	0.616	0.617	0.618	0.619	0.620	0.621	0.622	0.623	0.624	0.625	0.626	0.627	0.628	0.629	0.630	0.631	0.632	0.633	0.634	0.635	0.636	0.637	0.638	0.639	0.640	0.641	0.642	0.643	0.644	0.645	0.646	0.647	0.648	0.649	0.650	0.651	0.652	0.653	0.654	0.655	0.656	0.657	0.658	0.659	0.660	0.661	0.662	0.663	0.664	0.665	0.666	0.667	0.668	0.669	0.670	0.671	0.672	0.673	0.674	0.675	0.676	0.677	0.678	0.679	0.680	0.681	0.682	0.683	0.684	0.685	0.686	0.687	0.688	0.689	0.690	0.691	0.692	0.693	0.694	0.695	0.696	0.697	0.698	0.699	0.700	0.701	0.702	0.703	0.704	0.705	0.706	0.707	0.708	0.709	0.710	0.711	0.712	0.713	0.714	0.715	0.716	0.717	0.718	0.719	0.720	0.721	0.722	0.723	0.724	0.725	0.726	0.727	0.728	0.729	0.730	0.731	0.732	0.733	0.734	0.735	0.736	0.737	0.738	0.739	0.740	0.741	0.742	0.743	0.744	0.745	0.746	0.747	0.748	0.749	0.750	0.751	0.752	0.753	0.754	0.755	0.756	0.757	0.758	0.759	0.760	0.761	0.762	0.763	0.764	0.765	0.766	0.767	0.768	0.769	0.770	0.771	0.772	0.773	0.774	0.775	0.776	0.777	0.778	0.779	0.780	0.781	0.782	0.783	0.784	0.785	0.786	0.787	0.788	0.789	0.790	0.791	0.792	0.793	0.794	0.795	0.796	0.797	0.798	0.799	0.800	0.801	0.802	0.803	0.804	0.805	0.806	0.807	0.808	0.809	0.810	0.811	0.812	0.813	0.814	0.815	0.816	0.817	0.818	0.819	0.820	0.821	0.822	0.823	0.824	0.825	0.826	0.827	0.828	0.829	0.830	0.831	0.832	0.833	0.834	0.835	0.836	0.837	0.838	0.839	0.840	0.841	0.842	0.843	0.844	0.845	0.846	0.847	0.848	0.849	0.850	0.851	0.852	0.853	0.854	0.855	0.856	0.857	0.858	0.859	0.860	0.861	0.862	0.863	0.864	0.865	0.866	0.867	0.868	0.869	0.870	0.871	0.872	0.873	0.874	0.875	0.876	0.877	0.878	0.879	0.880	0.881	0.882	0.883	0.884	0.885	0.886	0.887	0.888	0.889	0.890	0.891	0.892	0.893	0.894	0.895	0.896	0.897	0.898	0.899	0.900	0.901	0.902	0.903	0.904	0.905	0.906	0.907	0.908	0.909	0.910	0.911	0.912	0.913	0.914	0.915	0.916	0.917	0.918	0.919	0.920	0.921	0.922	0.923	0.924	0.925	0.926	0.927	0.928	0.929	0.930	0.931	0.932	0.933	0.934	0.935	0.936	0.937	0.938	0.939	0.940	0.941	0.942	0.943	0.944	0.945	0.946	0.947	0.948	0.949	0.950	0.951	0.952	0.953	0.954	0.955	0.956	0.957	0.958	0.959	0.960	0.961	0.962	0.963	0.964	0.965	0.966	0.967	0.968	0.969	0.970	0.971	0.972	0.973	0.974	0.975	0.976	0.977	0.978	0.979	0.980	0.981	0.982	0.983	0.984	0.985	0.986	0.987	0.988	0.989	0.990	0.991	0.992	0.993	0.994	0.995	0.996	0.997	0.998	0.999	1.000	1.001	1.002	1.003	1.004	1.005	1.006	1.007	1.008	1.009	1.010	1.011	1.012	1.013	1.014	1.015	1.016	1.017	1.018	1.019	1.020	1.021	1.022	1.023	1.024	1.025	1.026	1.027	1.028	1.029	1.030	1.031	1.032	1.033	1.034	1.035	1.036	1.037	1.038	1.039	1.040	1.041	1.042	1.043	1.044	1.045	1.046	1.047	1.048	1.049	1.050	1.051	1.052	1.053	1.054	1.055	1.056	1.057	1.058	1.059	1.060	1.061	1.062	1.063	1.064	1.065	1.066	1.067	1.068	1.069	1.070	1.071	1.072	1.073	1.074	1.075	1.076	1.077	1.078	1.079	1.080	1.081	1.082	1.083	1.084	1.085	1.086	1.087	1.088	1.089	1.090	1.091	1.092	1.093	1.094	1.095	1.096	1.097	1.098	1.099	1.100	1.101	1.102	1.103	1.104	1.105	1.106	1.107	1.108	1.109	1.110	1.111	1.112	1.113	1.114	1.115	1.116	1.117	1.118	1.119	1.120	1.121	1.122	1.123	1.124	1.125	1.126	1.127	1.128	1.129	1.130	1.131	1.132	1.133	1.134	1.135	1.136	1.137	1.138	1.139	1.140	1.141	1.142	1.143	1.144	1.145	1.146	1.147	1.148	1.149	1.150	1.151	1.152	1.153	1.154	1.155	1.156	1.157	1.158

接合ハプロタイプ保存領域と共通先祖由来領域を含まないホモ接合ハプロタイプ保存領域 (すなわち A 型偽陽性) を区別することは不可能である。よって、我々は全てのホモ接合ハプロタイプ保存領域は共通先祖由来領域を含むとして  $R_{Type\ B\ false\ positives}$  を計算した。

この場合、 $R_{Type\ B\ false\ positives}$  の値は過大評価となるが、適切なホモ接合ハプロタイプ保存領域カットオフ値を決定するためには過大評価の方が過小評価よりも適切であると考えた。



## 特発性間質性肺炎患者の術後の急性増悪に関する臨床的検討

坂本 晋<sup>1</sup> 宮本 篤<sup>1</sup> 高谷 久史<sup>1</sup> 岸 一馬<sup>1</sup>  
坪井 永保<sup>1</sup> 河野 匡<sup>2</sup> 藤井 丈士<sup>3</sup> 吉村 邦彦<sup>1\*</sup>

背景：IPF/UIP を含む特発性間質性肺炎 (IIPs) に高率に肺癌が合併するが、その術後にときに間質性肺炎の急性増悪をきたしうることが知られている。しかしながら間質性肺炎の組織型や術式と急性増悪の関連などについての報告は少ない。

方法：1994 年から 2006 年の 12 年間の当院呼吸器センターにおける間質性肺炎の手術症例 67 例 (男性 55 例, 女性 12 例) について、間質性肺炎の組織型, 手術目的, 手術方法, 術後の急性増悪の頻度などに関して retrospective に検討した。

結果：全身麻酔下での手術の目的は、肺癌切除 47 例 (IPF 30 例, non-IPF 17 例), 間質性肺炎の生検 20 例 (IPF 8 例, non-IPF 12 例) であった。術後の急性増悪は 2 例 (2.9%) で起こり、肺癌に対する開胸肺葉切除 1 例, 間質性肺炎に対する胸腔鏡下肺生検が 1 例であった。術後増悪した 2 例は基礎疾患がともに IPF/UIP であり、術後急性増悪の頻度は IPF 手術例全体の 5.3% であった。一方、IPF/UIP 以外の間質性肺炎での術後の急性増悪は認められなかった。術後急性増悪例は治療抵抗性で 2 例とも増悪後それぞれ 12, 82 日で死亡した。

結論：IPF/UIP 症例は手術後に急性増悪をきたす可能性があり、その予後はきわめて不良であるため、その適応を十分に吟味のうえ、肺保護を念頭においた麻酔管理が重要である。

### Acute Exacerbation of Idiopathic Interstitial Pneumonias Following Surgical Lung Operations

Sakamoto S<sup>1</sup>, Miyamoto A<sup>1</sup>, Takaya H<sup>1</sup>, Kishi K<sup>1</sup>, Tuboi E<sup>1</sup>,  
Kohno T<sup>2</sup>, Fujii T<sup>3</sup>, and Yoshimura K<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine

<sup>2</sup>Department of Thoracic Surgery

<sup>3</sup>Department of Pathology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan

Background: Idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) are frequently associated with lung cancer. In this regard, indication for surgery including lung biopsy needs to be carefully assessed by thorough evaluation for pulmonary function and possibility of developing acute exacerbation after surgery. Since the occurrence of acute exacerbation following surgical operation remains largely unreported, we analyzed the incidence, clinical features and prognosis of these conditions.

Subjects and Methods: We conducted a retrospective study of consecutive patients who underwent lung surgery to operate lung cancer or to establish a diagnosis of diffuse lung disease during the period from 1994 to 2006. Patients who developed an acute exacerbation following lung operation were assessed carefully for clinical data, surgical time, anesthesia data, histological diagnosis, HRCT images and clinical features of the acute exacerbation.

Results: Sixty seven consecutive patients (male: 55, female: 12) with interstitial pneumonia who underwent a surgical lung operation were analyzed. The purposes of operation were lobectomy for lung cancer in 47 patients (IPF: 30, non-IPF 17), and lung biopsy for diffuse lung disease in 20 (IPF 8, non-IPF 12). Two patients with idiopathic pulmonary fibrosis (2.9% in total) developed acute exacerbation 4 to 6 days after the lung operation. One patient was performed lobectomy for lung cancer, and the other was done biopsy for interstitial pneumonia. The former received 100% oxygen ventilation for long time and the latter had long operation time and high activity of interstitial pneumonia before the operation. At the acute exacerbation, the extent of parenchymal involvement on HRCT images was greater on the non-operated side than the operated side. For acute exacerbation, corticosteroid pulse therapy followed by maintenance corticosteroid administration (0.5-1.0 mg/kg) were conducted in both cases. These patients also received a low dose of cyclosporine A (100-150 mg/day). However, both patients died of respiratory failure 12 and 82 days after the onset of acute exacerbation, respectively.

Conclusion: It is essential to be aware of the possibility of developing acute exacerbation of interstitial pneumonia following lung operation, because the prognosis of these conditions is very poor. Intraoperative respiratory management such as high oxygen concentration and mechanical ventilation are likely possible etiologic factors. Therefore, lung-protected mechanical ventilation under appropriate anesthesia is required for IPF patients.

緒 言

特発性肺線維症 (IPF) は予後不良の疾患であるが、なかでも「一ヶ月以内の経過で新たなびまん性の陰影の出現を伴う呼吸困難、低酸素血症の増悪」と定義されるその急性増悪は、治療抵抗性で致死的な病態である<sup>1-13)</sup>。IPF/UIP を含む特発性間質性肺炎 (IIPs) に高率に肺癌が合併し、さらにその術後にときに間質性肺炎の急性増悪をきたしうることが知られている<sup>2,4-13)</sup>。しかしながら、間質性肺炎の組織型や術式と急性増悪の関連などについての報告は少ない。

今回、当院呼吸器センターにおける間質性肺炎の手術症例について、間質性肺炎の組織型、手術目的、手術方法、術中の一回換気量、術後の急性増悪の頻度その予後などに関して検討した。

対象と方法

1994年から2006年の12年間で当院呼吸器センターにおける間質性肺炎の手術症例67例(男性55例、女性12例)を対象として、間質性肺炎の組織型、手術目的、術前肺機能、手術方法、手術時間、麻酔方法、麻酔時間、術中の動脈血酸素分圧 (PaO<sub>2</sub>)、一回換

気量、ステロイド投与の有無、術後の急性増悪の頻度などに関して検討した。また術後急性増悪した症例について、その臨床像、治療効果、予後について retrospective に検討を行なった。

結 果

全身麻酔下での手術の目的は、肺癌切除47例、間質性肺炎の生検が20例で、特発性肺線維症 (IPF) の肺癌切除が30例 (45%)、生検が8例 (12%)、IPF以外の間質性肺炎 (non-IPF) の肺癌切除が17例 (25%)、生検が12例 (18%)であった。この手術方法としてIPFでは肺葉切除が23例 (35%)、部分切除が7例 (10%)、生検が8例 (12%)、non-IPFでは肺葉切除が17例 (25%)、生検が12例 (18%)であった。

術前の肺機能は、IPFの肺葉切除例で肺活量 (VC) が2.74-4.86 L (平均3.65 L)、non-IPFの肺葉切除例で1.58-4.02 L (平均3.3 L)、IPFでの生検1.52-2.78 L (平均2.08 L)、non-IPFでの生検1.4-3.58 L (平均2.58 L)と、肺葉切除術の場合が生検と比較して術前の肺機能がよい傾向にあった (Figure 1)。

麻酔方法としては、sevofrane、笑気、酸素による麻酔法がほとんどの症例で用いられており、吸入麻酔薬

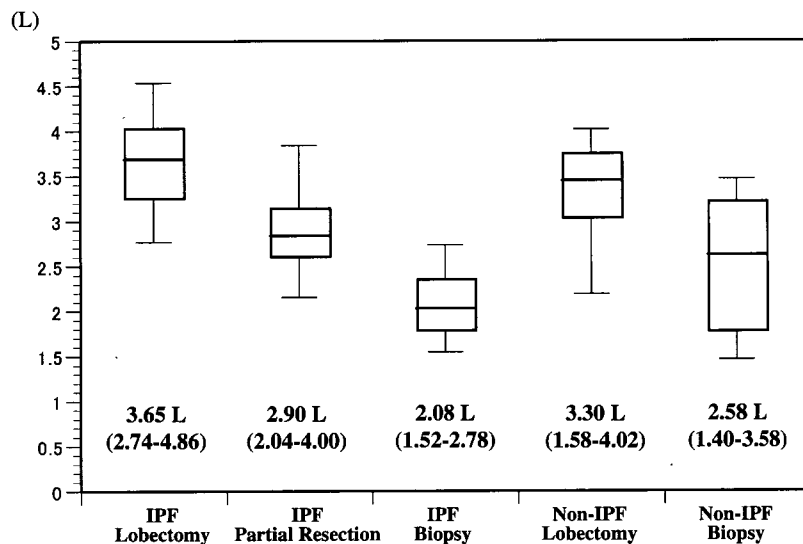


Figure 1 Vital Capacity before Surgical Procedures

1 虎の門病院呼吸器センター内科  
 2 同 呼吸器センター外科  
 3 同 病理学科  
 \* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

としては isoflurane, 静脈麻酔薬としては propofol などとも少数ながら用いられていた。

手術時間は IPF 症例における肺葉切除が 154-435 分 (平均 288 分), 部分切除が 30-195 分 (平均 117 分), 生検が 50-170 分 (平均 104 分) で, non-IPF 症例での肺葉切除が 117-355 分 (平均 221 分), 生検が 50-240 分 (平均 115 分) であり, 肺葉切除がいずれの組織型でも生検や部分切除に比して有意に手術時間が長かった (Figure 2). 同様に麻酔時間に関しても, IPF における肺葉切除が 215-570 分 (平均 385 分), 部分切除が 135-315 分 (平均 214 分), 生検が 110-210 分 (平均 142 分), non-IPF における肺葉切除が 195-480 分 (平均 308 分), 生検が 110-320 分 (平均 183 分) であり, 肺葉切除がいずれの組織型でも生検や部分切除に比して有意に麻酔時間が長かった。

麻酔時の一回換気量 (TV) は, 両肺換気時には, IPF の肺葉切除が 300-600 ml (平均 486 ml), 部分切除が 400-530 ml (平均 468 ml), 生検が 250-630 ml (平均 406 ml) であり, 一方 non-IPF 症例における肺葉切除が 290-600 ml (平均 515 ml), 生検が 380-550 ml (平均 450 ml) で, いずれの組織型においても体重あたり 7-8 ml/kg の 1 回換気量が設定されていた (Table 1). 片肺換気時には, IPF 症例における肺葉切除が 250-550 ml (平均 371 ml), 部分切除が 120-380 ml (平均 284 ml), 生検が 200-380 ml (平均 273 ml) であり, non-IPF 症例における肺葉切除が 200-480 ml (平均 358 ml), 生検が 250-420 ml (平均 321 ml) で, いずれの組織型においても体重あたり 4-6 ml/kg の 1 回換気量

が設定されていた (Table 2). 両肺, 片肺のいずれの換気に関しても volume control で人工呼吸管理がされており, pressure control での呼吸管理をされた症例はなかった. 当院では術前から corticosteroid (CS) を投与されていた症例はなく, 手術直前や術中, 手術直後に CS が投与された症例もなかった。

手術中の動脈血ガス分析では PaO<sub>2</sub> が, IPF の肺葉切除において 81-254 Torr (平均 148 Torr), 部分切除が 76-234 Torr (平均 151 Torr), 生検が 105-230 Torr (平均 155 Torr) であり, 一方 non-IPF の肺葉切除で 81-218 Torr (平均 140 Torr), 生検が 63-232 Torr (平

Table 1 Tidal Volume at Anesthesia (Both Lungs)

IPF Lobectomy	300 - 600 ml (mean 486)
IPF Partial resection	400 - 530 ml (mean 468)
IPF Biopsy	250 - 630 ml (mean 406)
Non-IPF Lobectomy	290 - 600 ml (mean 515)
Non-IPF Biopsy	380 - 550 ml (mean 450)

Table 2 Tidal Volume at Anesthesia (Unilateral Lung)

IPF Lobectomy	250 - 550 ml (mean 371)
IPF Partial resection	120 - 380 ml (mean 284)
IPF Biopsy	200 - 380 ml (mean 273)
Non-IPF Lobectomy	200 - 480 ml (mean 358)
Non-IPF Biopsy	250 - 420 ml (mean 321)

### Time Required for Surgical Procedures

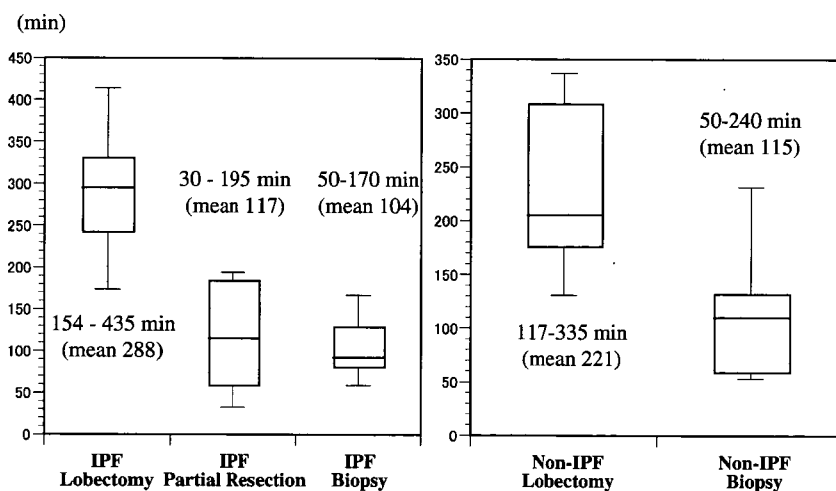


Figure 2 Time Required for Surgical Procedures

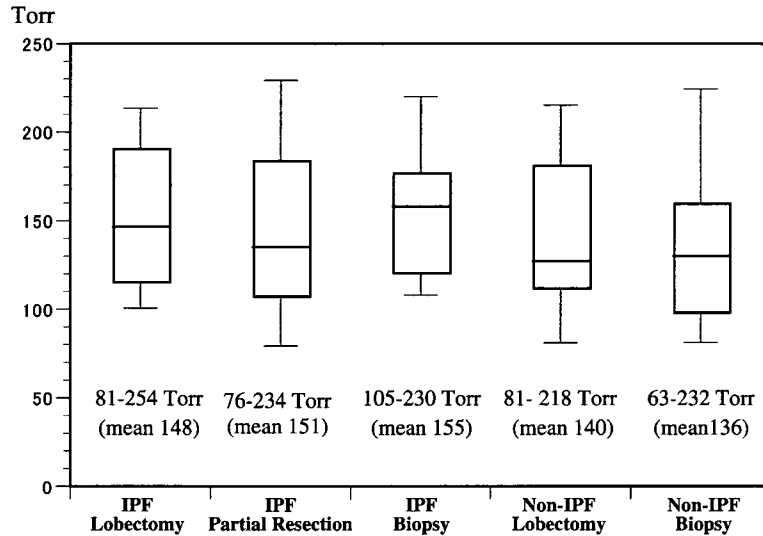


Figure 3 Mean PaO<sub>2</sub> during Surgical Procedures

Table 3 Comparison between non-Exacerbated-IPF Cases and An Exacerbated-IPF Case after Lobectomy

	Non-exacerbated (22 cases)	Exacerbated (1 case)
Age	65.9 year-old (43 - 73)	72 year-old
Sex	M:F= 21:2	M:F= 1:0
Operation Time	288 min (136 - 435)	240 min
Anesthesia Time	385 min (215 - 570)	335 min
Anesthesia	GOS : 17, OP: 2	GOI
TV (Both lungs)	486 ml (300 - 600)	560 ml
TV (Unilateral lung)	371 ml (250 - 550)	350 ml
PaO <sub>2</sub> during operation	148 Torr (81 - 254)	135 Torr
FiO <sub>2</sub> > 60%	105 min (0 - 315)	240 min
FiO <sub>2</sub> = 100%	26 min (0 - 315)	45 min
Pre-ope KL- 6	276 - 2718 U/ml (1035)	1200 U/ml
Pre-ope PaO <sub>2</sub>	79 Torr (71 - 99)	78 Torr
Pre-ope FVC	3.65 L (2.74 - 4.86)	3.36 L
Pre-ope %VC	110% (74 - 138)	104%

均 136 Torr) であり、各群での差は認められなかった。各群ともにやや動脈血液中の酸素分圧が高かった (Figure 3)。

術後の急性増悪は 2 例 (2.9%) でみられ、肺癌に対する開胸肺葉切除 1 例、間質性肺炎に対する胸腔鏡下肺生検が 1 例であった。これらの 2 例は基礎疾患とともに IPF/UIP であり、術後急性増悪の頻度は IPF 手術例全体の 5.3% であった。一方、IPF/UIP 以外の間質性肺炎では術後の急性増悪は認められなかった。肺葉切除で急性増悪した症例においては、術中の 100% の酸素濃度での換気時間、60% 以上の酸素濃度での換気時間が、増悪しなかったその他の症例より長かった。麻酔法や、手術時間、麻酔時間、術中の一回換気量、PaO<sub>2</sub>、術前の肺機能などは差が見られなかった

(Table 3)。一方、生検後の増悪例においては、手術時間、麻酔時間は増悪しなかった他の症例より長く、術前の KL-6, SP-D の値も高値であった。生検例においては人工呼吸管理中の 1 回換気量、酸素濃度ともに非常に厳密に管理されており、術前の肺機能や術中の PaO<sub>2</sub> の値も良好に保たれ、増悪のみられなかった症例と差はなかった (Table 4)。

肺葉切除後の急性増悪症例は、術後 6 日目に手術の対側肺よりおこり、ステロイドパルス療法やシクロスポリン A などの治療に一旦は反応したものの、増悪を繰り返し、術後第 82 病日に死亡した。生検後の術後増悪症例は、術後 4 日目より同様に手術の対側肺優位におこり、ステロイドパルス療法やシクロスポリン A などの治療に抵抗性で、右気胸を合併し術後第 12 病日

**Table 4** Comparison between non-Exacerbated-IPF Cases and An Exacerbated-IPF Case after VATS-Biopsy

	Non-exacerbated (7 cases)	Exacerbated (1 case)
<b>Age</b>	<b>61.3 year-old (39 - 74)</b>	<b>72 year-old</b>
<b>Sex</b>	<b>M:F= 6:2</b>	<b>M:F= 1:0</b>
<b>Operation Time</b>	<b>94 min (50 - 160)</b>	<b>170 min</b>
<b>Anesthesia Time</b>	<b>132 min (110 - 150)</b>	<b>210 min</b>
<b>Anesthesia</b>	GOS: 5, GOI: 1, OP: 1	GOS
<b>TV (Both lungs)</b>	406 ml (250 - 630)	360 ml
<b>TV (Unilateral lung)</b>	273 ml (200 - 380)	200 ml
<b>PaO<sub>2</sub> during operation</b>	155 Torr (105 - 230)	105 Torr
<b>FiO<sub>2</sub> &gt; 60%</b>	13 min (0 - 75)	0 min
<b>FiO<sub>2</sub> = 100%</b>	3.7 min (0 - 30)	0 min
<b>Pre-ope KL- 6</b>	<b>562 - 1610 U/ml (965)</b>	<b>2186 U/ml</b>
<b>Pre-ope PaO<sub>2</sub></b>	88 Torr (76 - 100)	88 Torr
<b>Pre-ope FVC</b>	2.08 L (1.52 - 2.78)	2.36 L
<b>Pre-ope %VC</b>	66% (51 - 95)	76%

に呼吸不全で死亡した。

## 考 察

IPF の術後増悪はこれまでも報告されているが、その背景、手術、麻酔時間、術中の換気条件など、に関して検討した報告は少ない。Kondoh ら<sup>3)</sup> は 236 例の生検例について、術後の急性増悪について検討し、5 例 (2.1%) で急性増悪が発症し、その内訳は IPF 3 例、NSIP 1 例、COP 1 例であり、このうち IPF の 2 例が死亡したと報告している。今回の検討においても術後の急性増悪は 2 例 (2.9%) でおこり、肺癌に対する開胸肺葉切除 1 例、間質性肺炎に対する胸腔鏡下肺生検 1 例であった。IPF のみで検討すると、IPF の肺手術例全体の 5.3% で急性増悪が発症しており、IPF の全身麻酔手術は十分な注意が必要と考えられた。術後急性増悪をおこした症例のなかでも肺葉切除例においては、非増悪例と比較して、年齢が比較的高く、手術中の高濃度酸素での換気時間が長かった。高濃度酸素による肺傷害は以前より報告されており<sup>14-16)</sup>、術後に手術した肺と反対側から発症していること、麻酔法や、手術時間、麻酔時間、術中の一回換気量、PaO<sub>2</sub>、術前の肺機能などには差がみられなかったことより、高濃度酸素曝露が急性増悪の誘因となった可能性があった。一方、生検で急性増悪をおこした症例においては、手術時間、麻酔時間が増悪しなかった症例より長く、術前の KL-6、SP-D が高値であった。生検例においては人工呼吸管理中の 1 回換気量、酸素濃度ともに低めに設定の上、厳密に管理されており、術前の肺機能や術中

の PaO<sub>2</sub> の値も良好で増悪しなかった症例と差はなかった。この症例に関しては、術前の間質性肺炎の活動性が高かったこと、人工呼吸による換気時間が非増悪例と比較して長時間であったことが増悪の誘因となった可能性があった。また近年人工呼吸器関連肺傷害 (ventilator-induced lung injury; VILI) が特に ARDS に関連して報告されるようになり<sup>17,18)</sup>、できるだけ低い一回換気量で PEEP を高く設定することで ARDS の予後が改善するといわれている。IPF においても上葉と下葉では肺のコンプライアンスが異なり、volume control で換気した場合、一回換気量を抑えても下葉の蜂巢肺の換気は不良で、上葉に多く残存している健常肺に対しては、過剰な圧、容量負荷がかかっている可能性がある。このような健常肺への容量負荷が、肺胞の過膨張によるオーバーストレッチと肺胞の拡張、虚脱に伴うシェアストレス、さらにそれに伴って放出される inflammatory bioactive substances が VILI をおこすといわれており、IPF の場合はこの VILI が急性増悪のきっかけになる可能性がある。この点に関して、人工呼吸時の換気の不均衡を volume control 換気から pressure control 換気にすることで是正できるといわれており、pressure control 換気の導入や圧補正をしながら容量を設定できる pressure control のモードも開発されており、今後このような換気方法での急性増悪の頻度の差などの検討が必要と考えられる。

IPF の術後急性増悪例は 2 例とも死亡しており、治療抵抗性で予後不良であった。その特徴として、手術した肺の反対側に優位に発症し、徐々に手術側に拡が

り呼吸不全をきたすという経過を2例ともにたどっている。それぞれ、術後4日目、6日目から増悪が始まっていた。急性増悪に対して、ステロイドパルス療法、シクロスポリンAなどが試みられたが、いずれも治療に十分反応せず、呼吸不全に陥っている。生検後の増悪例に関しては、術後早期からCSを大量に投与せざるをえない状況となり、結果的に手術側の気胸がさらに呼吸不全を悪化させる結果となった。このように術後に発症するIPFの急性増悪は術後という特殊な状態であるため、肺実質のみならず、手術創や縫合部に対する注意も払わなければならない。

予防的なCS投与は当院では行なわれていなかったが、施設によっては術前や術中にCS投与が行なわれている。予防的CS投与に関してはevidenceはなく、今後CS予防投与を行なっている施設と、そうでない施設との間での急性増悪の頻度の差異などの検討が必要と思われる。CSの減量が急性増悪の原因となることを考えると、安易なCS投与は避けるべきと思われるが、手術侵襲による炎症性のサイトカインの放出にCSがどのように作用するかなどは、不明な点が多く今後の検討課題と考えられた。消化器や血管系の術後のSIRSに対してsivelestat sodium hydrateを使用し術後の合併症が減ったとの報告もあり、IPFの術後に投与することで急性増悪が予防できるか否かも非常に興味深い。呼吸の換気方法も含め、このような薬剤の予防投与については今後、多施設による前向き研究が必要と考えられる。

## 結 論

IPF/UIP症例は手術後に急性増悪をきたす可能性があり、その予後はきわめて不良であるため、手術適応を十分に吟味のうえ、肺保護を念頭においた麻酔管理が重要である。

## 参考文献

- 1) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277-304.
- 2) Kondoh Y, Taniguchi H, Kawabata Y, et al. Acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis. Analysis of clinical and pathologic findings in three cases. *Chest* 1993; 103: 1808-12.
- 3) Kondoh Y, Taniguchi H, Kitaichi M, et al. Acute exacerbation of interstitial pneumonia following surgical lung biopsy. *Respir Med* 2006; 100: 1753-9.
- 4) Ambrosini V, Cancellieri A, Chilosi M, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: report of a series. *Eur Respir J* 2003; 22: 821-6.
- 5) Dallari R, Foglia M, Paci M, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2004; 23: 792-6.
- 6) Enomoto T, Kawamoto M, Kunugi S, et al. Clinicopathological analysis of patients with idiopathic pulmonary fibrosis which became acutely exacerbated after video-assisted thoracoscopic surgical lung biopsy. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2002; 40: 806-11 (Abstract in English).
- 7) Horio H, Nomori H, Morinaga S, et al. Exacerbation of idiopathic interstitial pneumonia after lobectomy for lung cancer. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1996; 34: 439-43 (Abstract in English).
- 8) Takeuchi E, Yamaguchi T, Mori M, et al. Characteristics and management of patients with lung cancer and idiopathic interstitial pneumonia. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1996; 34: 653-8 (Abstract in English).
- 9) Tanimura S, Tomoyasu H, Banba J, et al. A clinical analysis of surgical cases of lung cancer complicated with idiopathic interstitial pneumonia. *Nihon Kyobu Rinsyo* 1992; 51: 208-13 (Abstract in English).
- 10) Takenaka K, Yoshimura A, Okano T, et al. Acute exacerbation of idiopathic interstitial pneumonia complicated by lung cancer, caused by treatment for lung cancer. *Haigan* 1999; 39: 955-62 (Abstract in English).
- 11) Uefuchi M, Yamaguchi T, Okada, et al. Clinical examination of acute exacerbation of idiopathic interstitial pneumonia (IIP) combined with lung cancer after anti-cancer treatment. *Haigan* 2001; 41: 281-

- 85 (Abstract in English).
- 12) Fujiwara K, Kai Y, Yamabe K, et al. A case of acute exacerbation of idiopathic interstitial pneumonia after lobectomy for lung cancer. *Nihon Kyobu Rinsyo* 1993; 52: 782-6 (Abstract in English).
- 13) Sakamoto M, Hirata N, Ichikado K, et al. A case of interstitial pneumonia acutely developed initially in the contralateral lung after surgical lobectomy for the lung cancer. *Proceedings of the 65<sup>th</sup> Interstitial Lung Disease Research Conference*. 2001; p2-10 (in Japanese).
- 14) Morley M, Wright F, Stanley K, et al. Oxygen toxicity in man. *N Engl J Med* 1970; 283: 1473-8.
- 15) Robert MJ. Pulmonary oxygen toxicity. *Chest* 1985; 88: 900-5.
- 16) Ekimoto H, Takada K, Takahashi K, et al. Effect of oxygen concentration on pulmonary fibrosis caused by pepleomycin in mice. *J Antibiotics* 1984; 6: 659-63.
- 17) Marini JJ. Pressure-targeted, lung-protective ventilatory support in acute lung injury. *Chest* 1994; 105: 109-15.
- 18) Finfer S, Rocker G. Alveolar overdistension is an important mechanism of persistent lung damage following severe protracted ARDS. *Anaesth Intens Care* 1996; 24: 569-73.

## 特発性肺線維症患者肺の血管・リンパ管構築変化による 急性増悪の発症機序

海老名雅仁<sup>1\*\*\*</sup> 小山 正平<sup>1</sup> 柴田 直子<sup>1</sup> 谷口 博之<sup>3\*\*\*</sup>  
宮庄 拓<sup>4</sup> 木村雄一郎<sup>1</sup> 田澤 立之<sup>1</sup> 石坂 彰敏<sup>5</sup>  
近藤 丘<sup>2\*\*</sup> 貫和 敏博<sup>1\*</sup>

背景と目的：特発性肺線維症患者の予後はその著しい線維化亢進に加え、まだ発症機序が理解されていない急性増悪によって規定される。その急性増悪の発症機序の解明は、難治性が際立つ特発性肺線維症の病態を理解するのみならず、その有効な治療法の開発の基礎となることが予想される。急性増悪の病態とよく類似している急性肺障害の発症に関わることが示されている HMGB1 がどのように関与しているのかを検証した。

方法：特発性肺線維症患者の急性増悪前後の気管支肺洗浄液 (BALF) 中の HMGB1 および 18 種の炎症性サイトカイン、および SPD および KL6 の濃度の変動を測定した。また特発性肺線維症患者の外科的肺生検時と急性増悪後剖検時の肺組織検体における HMGB1 の組織内発現を観察し、形態計測をおこなった。

結果：急性増悪後の BALF 中の HMGB1 は時間経過とともに増加していくことが示された。18 種のサイトカインに関しては MCP-1 のみが HMGB1 と正の相関をみて上昇していた。KL6 もまた時間経過とともに上昇していたが HMGB1 との相関は見られなかった。SPD は経過中高値であったが一定であった。特発性肺線維症の外科的肺生検された肺組織内では HMGB1 の発現は肺胞上皮細胞や肺胞マクロファージの核内にとどまるのに対し、急性増悪後の剖検肺組織ではこれらの細胞の細胞質内に観察された。肺障害や線維化を促進する HMGB1, MCP-1, KL6 といった生物活性物質の肺内上昇を、肺線維症患者の血管・リンパ管の構築変化から説明し、急性増悪の発症機序を考察した。

## Pathogenesis of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis through remodeling of blood and lymphatic capillaries

Masahito Ebina<sup>1</sup>, Shohei Koyama<sup>1</sup>, Naoko Shibata<sup>1</sup>, Yuichiro Kimura<sup>1</sup>, Taku Miyasho<sup>2</sup>, Shingo Yamada<sup>3</sup>, Hiroyuki Taniguchi<sup>5</sup>, Akitoshi Ishizaka<sup>6</sup>, Ikuro Maruyama<sup>7</sup>, and Toshihiro Nukiwa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai,

<sup>2</sup>Department of Veterinary Biochemistry, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, <sup>3</sup>Central Institute, Shino-Test Corporation, Kanagawa,

<sup>4</sup>Virus Research Center, National Hospital Organization, Sendai Medical Center, Sendai, <sup>5</sup>Department of Respiratory Medicine and Allergy, Tosei General Hospital, Seto, <sup>6</sup>Department of Medicine, Keio University, Tokyo, <sup>7</sup>Department of Laboratory and Molecular

Medicine, Kagoshima University, Kagoshima, Japan

Acute exacerbation can cause fatalities in patients with idiopathic pulmonary fibrosis without obvious etiology. As a pathogenic factor in acute exacerbation, we evaluated the expression of high-mobility group box-1 protein (HMGB1), a chief mediator of acute lung injury, in the lungs of patients after acute exacerbation. We found that HMGB1 was persistently elevated in the alveolar fluids of the seven patients after acute exacerbation in positive correlation only with monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) among 18 inflammatory cytokines examined. Intense cytoplasmic staining for HMGB1 was observed in alveolar macrophages and epithelial cells, distributed in the alveolar damaged lesions in the lungs of patients who died after acute exacerbation, but not in the biopsied lung tissues. The capillary endothelial cells in these damaged lesions showed decreased expression of thrombomodulin which blocks the functions of HMGB1. The severe disruption of superficial lymphatics observed in lung tissues of patients with idiopathic pulmonary fibrosis were supposed to impair the alveolar clearance and increase the HMGB1 in the lungs after acute exacerbation. We concluded that the sustained elevation of HMGB1 and MCP-1 in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis would aggravate this refractory disease after acute exacerbation.



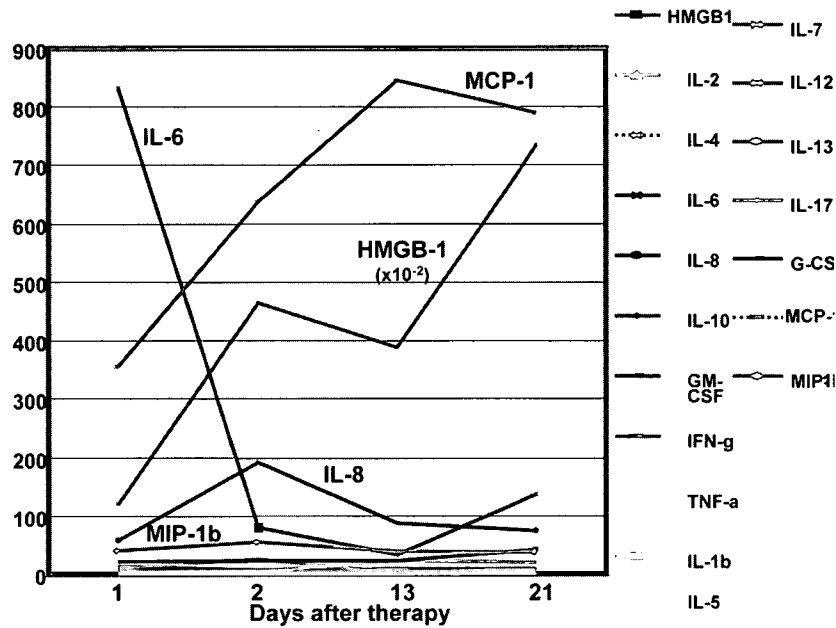


図1 特発性肺線維症患者の急性増悪後のBALF中のサイトカイン・増殖因子  
69歳男性。無治療で経過観察中、微熱出現してから7日目で呼吸困難感の増悪を感じて来院。急性増悪との診断を受け、一日目からステロイドパルス療法が開始され、上昇していたIL6は急速に減少したもののHMGB1とMCP1はステロイド治療中でも上昇し続けた。

はじめに

特発性肺線維症患者における急性増悪は日本において確立された疾患概念であり(1)、近年欧米のなかに浸透しつつあるものの、まだ公的には認知されているとはいえない。その大きな問題は除外診断のところで感染をどれほど否定しきれているのか、という疑問である。たしかに急性増悪をきたした多くの患者の初期病変は一樣に感冒様症状といわれる極軽度の症状か発症するように思われる。発熱やCRPの上昇といったことも感染を否定しきれないおもいを強くする。しかし問題はなぜそのような軽度の症状から急性肺障害に類似した重症な病態になるのか、ということであろう。それは特発性肺線維症や間質性肺炎のような肺病変がない患者におこる急性肺障害の原因を考

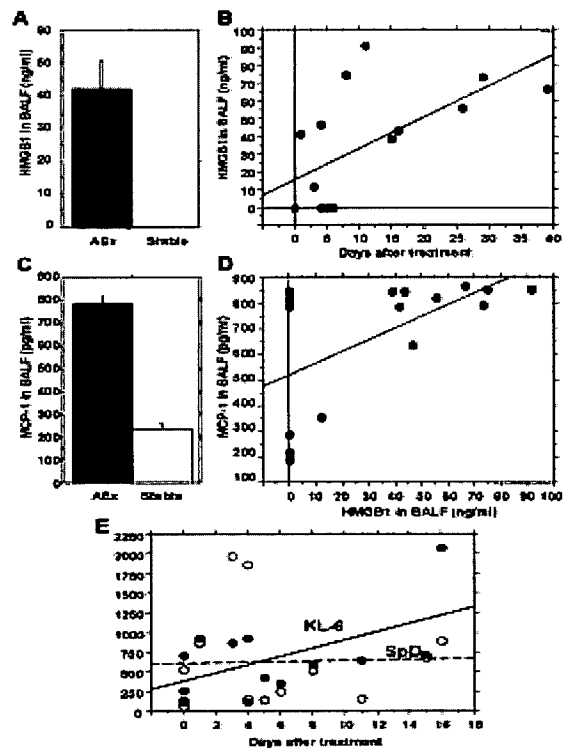


図2 急性増悪患者7人のBALF中のサイトカイン・増殖因子  
A: 急性増悪前には検出されていないHMGB1が急性増悪後に増加する。  
B: 7人の結果を集積してみると経過とともにHMGB1の肺内濃度が上昇し続けていることがわかる。  
C: MCP-1もまた急性増悪後に急増する。  
D: MCP-1とHMGB-1の間には相関関係がある。  
E: BALF中SPD(○)は高値で一定の傾向があるのに対してKL-6(●)は上昇傾向を示す。

- 1 東北大学病院 遺伝子・呼吸器内科
- 2 同 呼吸器外科
- 3 公立陶生病院 呼吸器・アレルギー科
- 4 酪農学園大学
- 5 慶応大学医学部 呼吸器内科
- \* 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

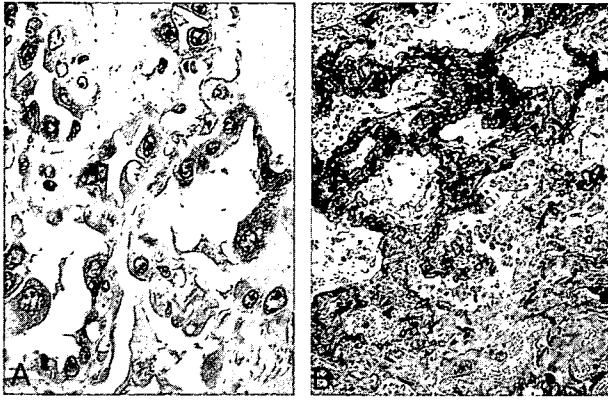


図3 急性増悪患者肺における HMGB1 の発現  
 A: 剖検肺における急性増悪患者肺では HMGB1 が再生 II 型肺胞上皮細胞や肺胞マクロファージの細胞質内に強発現しているのが観察される。  
 B: CD34 を赤で、HMGB1 を茶色で免疫二重染色をした後に EM 染色を重ねて観察すると、肺胞毛細血管増殖病変周辺に HMGB1 発現細胞が増加し、線維化病変内には出現していないことがわかる。

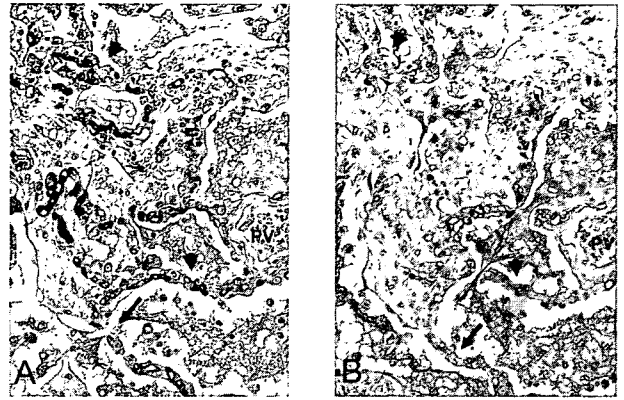


図4 急性増悪患者肺組織の連続切片でみる肺胞毛細血管の TM 発現の変化  
 A: 肺胞毛細血管内皮細胞を CD34 (赤) と HMGB1 発現細胞 (茶) を免疫二重染色法で観察する。  
 B: A の連続切片において肺胞毛細血管内皮細胞が発現する TM (赤) と HMGB1 発現細胞 (茶) を免疫二重染色法で観察する。A と比べて TM の産生が著しく減じている。

Area of TM+ endothelial cells  
 Area of CD34+ endothelial cells X100 (%)

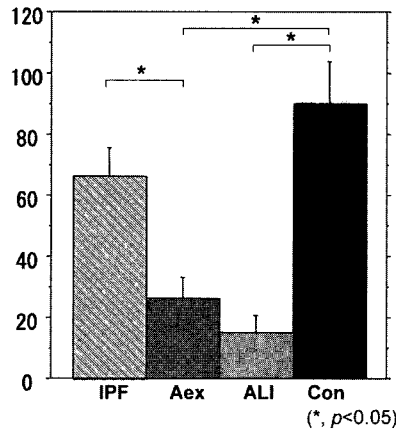
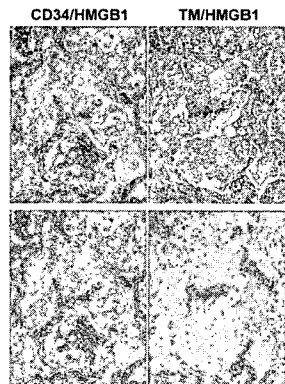


図5 CD34 陽性肺胞毛細血管内皮細胞の TM 産生の変化

連続切片を CD34 と TM を免疫染色 (赤) で示し、その面積比 TM/CD34 を形態計測法で求める。それを外科的肺生検 (VATS) で得られた IPF 患者肺、IPF の急性増悪患者肺、急性肺損傷患者肺を剖検で得られた正常対照肺の結果と比較する。IPF 患者では安定した状態においてすでに 30% 程度 TM 産生が減少しているが、急性増悪後には ALI 同様約 80% 近く減少する。

えるとその差は歴然としている。これらの肺病変のない状態の肺にびまん性肺障害 (diffuse alveolar damage) をともなう急性肺障害をきたすには、エンドトキシンやその多くは自殺目的の農薬などの摂取、鳥インフルエンザ (H5N1) のような毒性の強いウイルス (2)、抗がん剤などによる副作用などがあげられる。特発性肺線維症患者の急性増悪ではこうした強烈な組織毒性がその発症に見当たらないことが極めて重要であると考えられる。

私たちは特発性肺線維症患者の急性増悪患者 7 名の気管支肺洗浄液 (bronchial alveolar lavage fluid) を

解析することができた。その BALF 中の 19 種の炎症性サイトカイン・増殖因子をしらべてみると HMGB1 と MCP-1 が時間経過とともに高まっていくことを観察した。また間質性肺炎の血清マーカーである SPD と KL6 のうち KL6 が同様にその濃度が上昇していることを見出した。さらに急性増悪をきたしてなくなった患者の剖検肺を観察すると、(1) 急性増悪の病変が、以前私たちがしめした肺胞毛細血管増殖病変に生じていること、(2) 小葉間隔壁および胸膜直下のリンパ管が消失傾向にあることを見出した。これらの観察は急性増悪の発症機序を示していると考えられる。

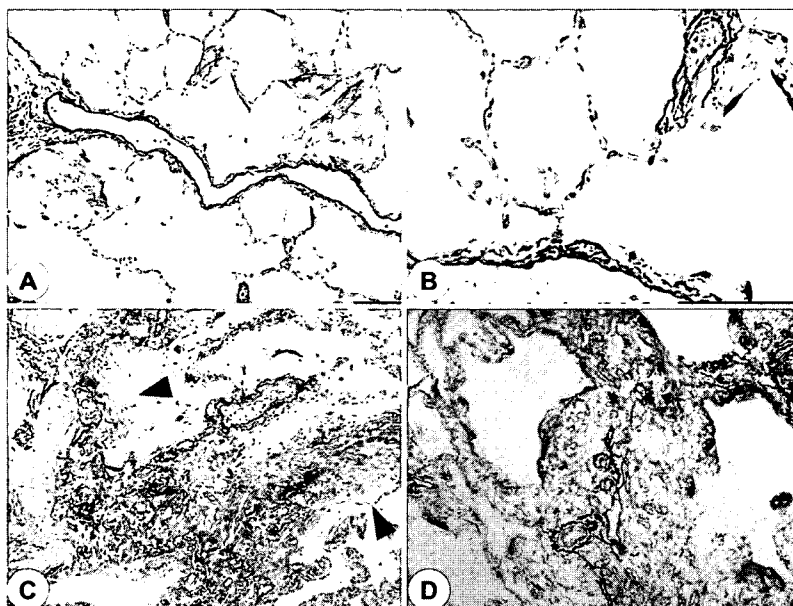


図6 小葉間隔壁内のリンパ管  
 正常肺における小葉間隔壁内のリンパ管 (AB) に比べ、VATS で得られた IPF/UIP 患者肺 (CD) ではリンパ管 (赤) が線維化病変の中であって閉ざされ、分断されている。

方 法

特発性肺線維症を含む特発性間質性肺炎、および急性増悪の診断に関しては厚生労働省および呼吸器学会のガイドライン (3) に準じて行った。陶生病院において7人の特発性肺線維症の急性増悪発症患者7人から採取された気管支肺胞洗浄液に対して High-mobility group box-1 protein (HMGB1) と TGF- $\beta$  を ELISA で、interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\beta$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) を Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて測定した。外科的肺生検患者肺組織は特発性肺線維症患者10名、器質化肺炎患者6名、細胞性非特異性間質性肺炎 (cNSIP) 6名、および慢性肺病変をもたない患者5名から得られた。剖検肺は特発性肺線維症患者で急性増悪をきたしてなくなった患者8名、急性肺障害をきたしてなくなった患者3名、肺がんや慢性肺病変を持たない患者6名から得られた。標本は10%緩衝ホルマリン液で固定した。剖検肺の場合には25 cm 水圧で12時間進展固定した。これらの患者肺を用いることに関しては東

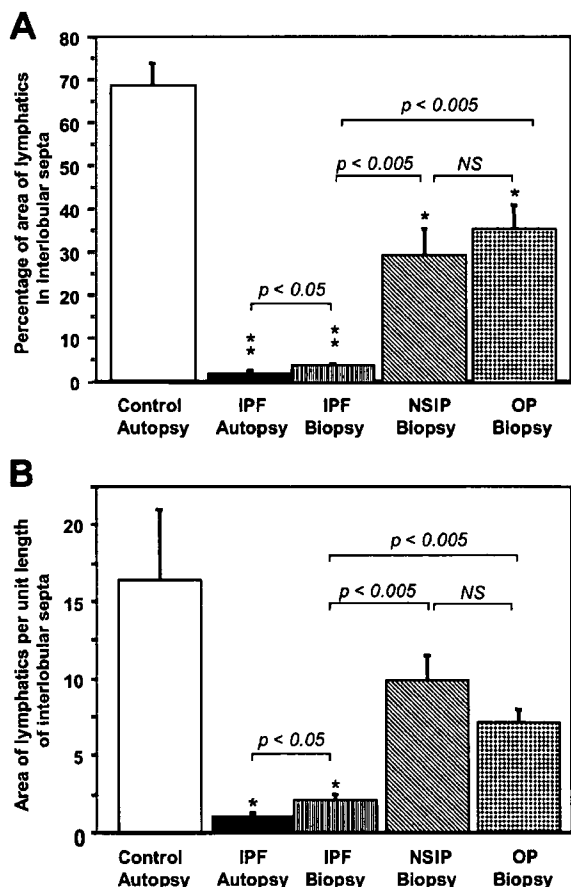


図7 小葉間隔壁内のリンパ管の面積比と長さ  
 小葉間隔壁内のリンパ管の面積比 (A) と長さ (B) を正常対照剖検肺、IPF 患者の VATS 肺、IPF 急性増悪患者肺、cNSIP 患者および器質化肺炎 (OP) 患者の VATS 間で比較した。IPF は VATS でも急性増悪後もそのほかの肺と比べて小葉間隔壁内のリンパ管の面積比も長さも著しく減少している。

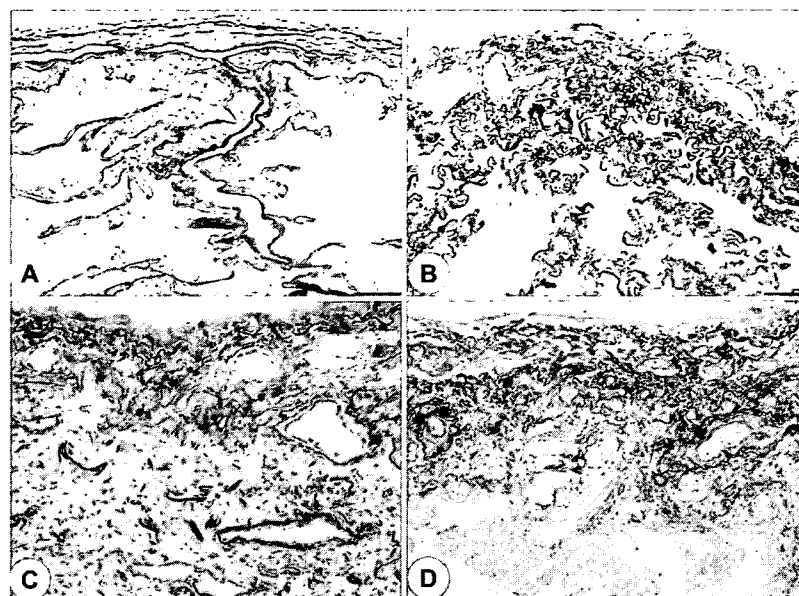


図8 胸膜下組織内のリンパ管  
 正常肺における胸膜下組織内のリンパ管 (A) に比べ, VATS で得られた IPF/UIP 患者肺 (B-D) では, 小葉間隔壁内のリンパ管同様, リンパ管 (赤) が線維化病変の中であって閉ざされ, 分断されている。

北大学医学部の倫理委員会で承認を受けた。

免疫染色に用いた抗体は以下の通りである。抗 HMGB1 モノクローナル抗体 (1:3,000, Shino-test), 抗ヒト thrombomodulin モノクローナル抗体 (TM1009, 1:100, DAKO Company Ltd., Glostrup, Denmark), 抗 CD34 モノクローナル抗体 (4A1, 1:100, Nichirei Co., Tokyo, Japan), and 抗ヒト von Willebrand factor (vWF) モノクローナル抗体 (F8/86, 1:1,000, Nichirei), 抗ヒト podoplanin モノクローナル抗体 (1:200, AngoBio Co., Del Mar, CA, USA), 抗ヒト VEGF-C ポリクローナル抗体 (1:200, IBL, Takasaki, Japan), 抗ヒト VEGF-D ポリクローナル抗体 (1:10, R & D Systems), 抗 KL-6 モノクローナル抗体 (1:50, Sanko-Junyaku Co. Ltd.), 病理形態計測には Lumina Vision (Mitani Corporation, Fukui, Japan) を用いた。

## 結果と考察

急性増悪患者の BALF の解析: 公立陶生病院の特発性肺線維症患者のうち急性増悪で入院となった患者から経時的に採取された BALF 中の 19 の炎症性サイトカイン・増殖因子を解析した。典型的な患者の結果を図 1 に示す。入院当初増加していた IL-6 はステロイドパルス療法開始後急速に低下しているものの、

HMGB1 と MCP1 は日をおって増加している (図 1)。7 名中 3 名については急性増悪前の検体も得られていたが、これらの患者の BALF には HMGB1 は検出されなかったのに対し、急性増悪後の BALF 中には HMGB1 が有意に増加していた (図 2A)。また日数をおいてこれらのサイトカインの変化をみると入院後にステロイドパルス療法を中心とした治療が開始されているにもかかわらず、BALF 中の HMGB1 濃度が上昇傾向を示していることが示された (図 2B)。またこれらのサイトカインの中で MCP-1 もまた急性増悪前後で上昇しており (図 1C), HMGB1 と関連していることも示された (図 2D)。間質性肺炎の血清マーカーである KL6 と SPD に関しては、SPD は高いまま推移する傾向を示し、KL6 は上昇傾向を示したものの HMGB1 との相関は認めなかった (図 2E)。

急性増悪患者肺における HMGB1: 特発性肺線維症患者肺における HMGB1 の発現を観察した (図 3)。HMGB1 は II 型肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージの、核内よりもむしろ細胞質内に多く発現を認めた (図 3A)。またこれらの HMGB1 産生細胞はこれらの患者のより線維化のおよんでいない肺胞毛細血管増殖病変 (Ref) の周辺に観察され、線維化病変内には分布をほとんど認めなかった (図 3B)。この肺胞毛細血管増殖病変の周囲にはいわゆる硝子膜形成とよばれる帯状のエオジン高染色性物質が肺胞壁に