

Table 1 入院時検査所見

【血算】		【生化学・免疫】	
RBC	4.83 × 10 ⁶ /μL	TP	6.8 g/dL
Hb	14.6 g/dL	Alb	3.6 g/dL
Plt	318 × 10 ³ /μL	T-Bil	0.3 mg/dL
WBC	24,100 /μL	BUN	19 mg/dL
Neu	95.5 %	Cr	0.9 mg/dL
Eos	0.0 %	Na	141 mmol/L
Lym	3.0 %	K	4.1 mmol/L
Mon	1.0 %	Cl	103 mmol/L
ESR	18 mm/hr	Ca	9.7 mg/dL
【血液ガス (NC 2L/min)】		AST	19 IU/L
pH	7.41	ALT	24 IU/L
PaCO ₂	44 Torr	ALP	174 IU/L
PaO ₂	107 Torr	LDH	261 IU/L
HCO ₃	27 mmol/l	CRP	1.6 mg/dl
SaO ₂	96.0 %	KL-6	4,326 U/mL
		SP-D	295.1 μg/L

はじめに

特発性間質性肺炎の治療薬として、pirfenidone や cyclosporin A (CsA), N-acetylcysteine (NAC) などの新しい薬剤が近年複数検討されている。CsA と同じ calcineurin inhibitor である tacrolimus (FK506) は活性化 T 細胞に対して選択的に作用する免疫抑制剤である。CsA と化学構造は全く異なるが作用機序はほぼ同じであり、その免疫抑制効果は CsA の 100 倍程度とされている。間質性肺炎に対する治療効果についてはほとんど報告されていないが、皮膚筋炎、多発筋炎などの膠原病に合併する間質性肺炎において有効であったとする報告が散見される。今回、prednisolone (PSL), CsA による治療に抵抗性を示す、進行性の特発性間質性肺炎 (IIP) 1 症例に対し tacrolimus を投与し、臨床上一定の治療効果が得られた。間質性肺炎治療において tacrolimus の期待される効果について若干の考察を加えて報告する。

症 例

42 才男性

主 訴：労作時呼吸困難 (Hugh-Jones V 度)

家族歴：父、従兄が間質性肺炎で死亡 (詳細不明)

既往歴：特記すべきこと無し

生活歴：喫煙 20-40 歳, 20-30 本/日, ペットの飼育歴は無し。

職業歴：リフォーム業。シリコン、シンナー等の吸入歴有り。2003 年 3 月以降は事務職。

現病歴：2003 年 3 月、検診にて間質性肺炎を指摘された。同年 3 月当院初診、胸腔鏡下肺生検を実施し、分類不能型間質性肺炎と病理診断された。2004 年 1 月労作時呼吸困難の増悪と胸部 CT 上 ground glass opacity (GGO) の増加を認め、PSL 60 mg/day にて治療を開始した。しかし、労作時呼吸困難は進行性で同年 5 月より CsA 100mg/day の併用を開始、同年 12 月には在宅酸素療法を導

入した。その後は PSL の減量が可能で、PSL 25 mg/day, CsA 100 mg/day で維持療法を行っていた。2005 年 11 月より労作時呼吸困難が進行し、胸部 CT 上の増悪を認めたため、2006 年 4 月入院となった。

入院時現症：身長 165 cm, 体重 54.2 kg, 体温 36.7 °C, 血圧 134/84 mmHg, 脈拍 97 /min 整, 呼吸数 16 /min, 意識清明で両側背部に fine crackle を聴取した。ばち指は認められなかった。

入院時検査所見：WBC 24100 /μL, CRP 1.6 mg/dL であった。KL-6 4,326 U/mL, SP-D 295.1 μg/L で間質性肺炎マーカーの上昇を認めた (Table 1)。

画像所見：胸部 X 線写真では両側下肺野優位、び漫性に網状影を認め、容積減少を伴っていた (Figure 1a)。胸部 CT では比較的均一な GGO が両側下葉優位に認められ、明らかな蜂巣肺を認めなかった。主に下葉胸膜直下に認められた GGO が約 3 年の経過で進行し、その濃度と範囲が増大した (Figure 1b, c)。

肺生検時の病理組織所見：胸腔鏡下肺生検を右 S³ と S⁸ より実施した。病変の分布は汎小葉性分布を示し、線維性に肺胞壁が肥厚しており、大部分は fibrotic NSIP 類似の組織像であった (Figure 2a)。しかし、一部に肉芽腫形成を認め、気管支血管束周囲や小葉間間質など広義間質に病変が強く、一部リンパ球などの炎症細胞浸潤を認めることから unclassified type と診断した (Figure 2b, c, d)¹⁾。

虎の門病院 呼吸器センター 内科

* 研究協力者

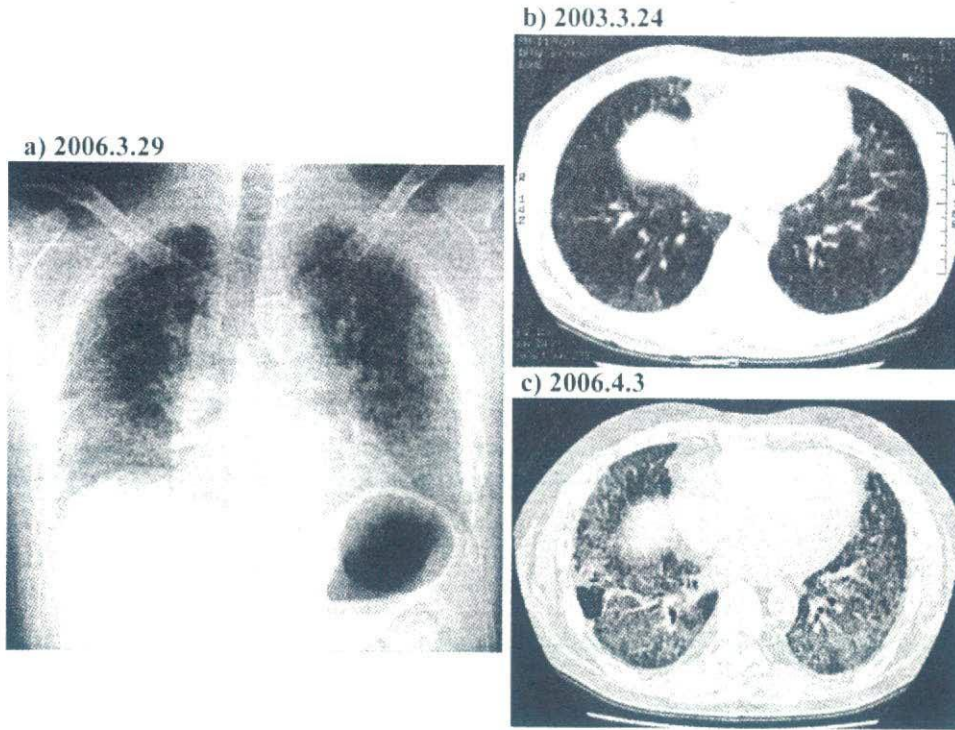


Figure 1 画像所見. a) 入院時胸部単純写真. b) 当院初診時胸部 CT. c) 入院時胸部 CT.

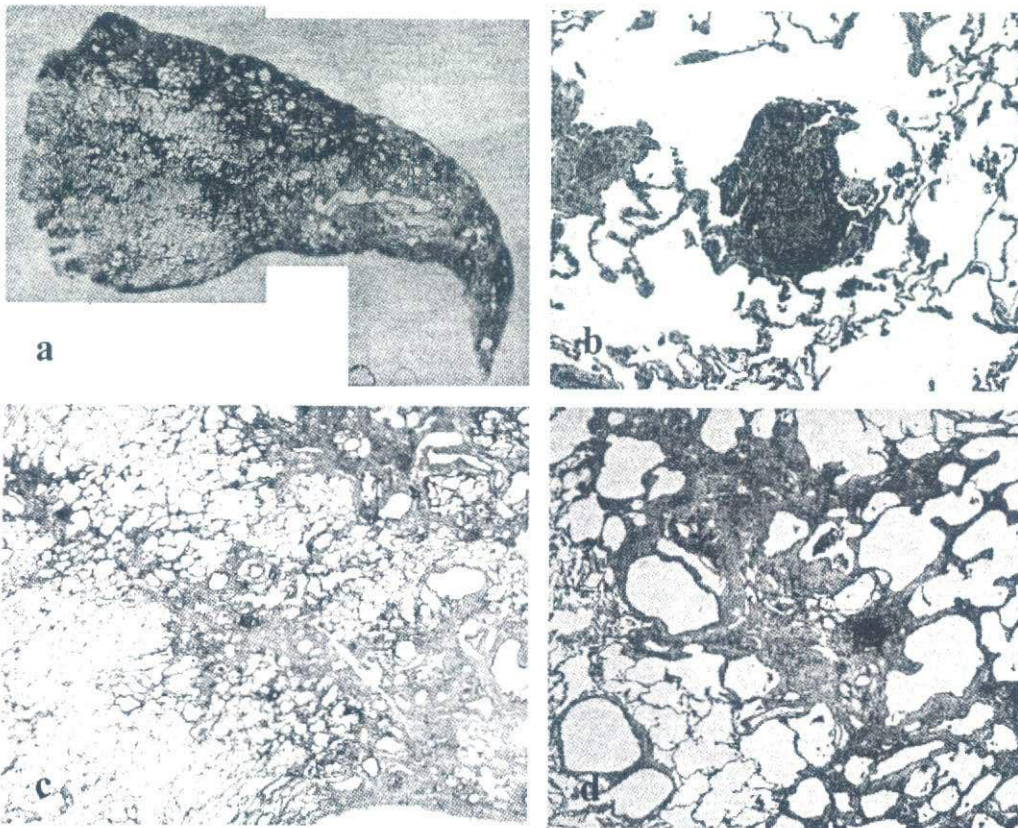


Figure 2 VATS 肺生検時病理組織学的所見. a) 右 S⁸ のルーペ像. HE 染色. 胸膜直下に線維性変化が強い. 小葉内の分布は diffuse で比較的均一である. b) 右 S⁸ の一部に肉芽腫形成を認める. c) 弱拡大 HE 染色. 小葉間質や気管支血管束周囲にも病変が分布する. d) HE 同部位の強拡大 HE 染色.

入院経過：進行する呼吸困難に対し mPSL 1 g/day ×3 日間のステロイドパルス療法を2回施行した。CsAはトラフが100～150 ng/mLに保たれるように調節した。PSLはパルス療法後 PSL 1mg/kg/dayで維持した (Figure 3)。しかし、胸部CT上左下葉を中心にGGOが増悪した (Figure 4a)。そのためCsAをtacrolimusに変更した。Tacrolimusの初期投与量は経口0.075 mg/kg/dayとし、トラフ5-15 ng/mLを目標として調節した。投与3週間後に胸部CT上左下葉のGGOが改善傾向となり、牽引性気管支拡張の軽減を認めた (Figure 4b)。

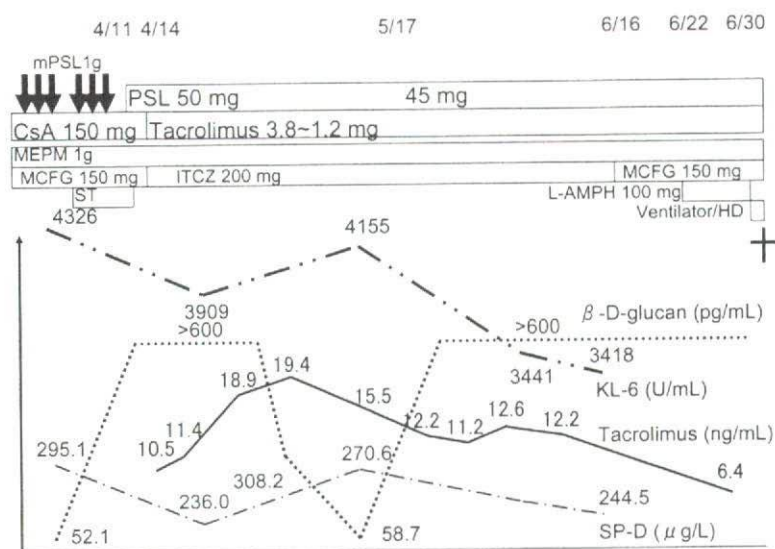


Figure 3 経過表

KL-6とSP-DはCTの所見改善の後に低下傾向となった。Tacrolimusの投与によって安静時PaO₂は明らかな変化を認めなかったが、自覚症状はHugh-Jones V度からIV度に軽減し、ADLの改善を認めた。しかし、その後胸部CT上同部位が再度増悪し (Figure 4c)、翌日急速に呼吸状態が悪化、ショックとなったため気管内挿管、人工呼吸管理とした。その後さらに腎不全が進行、多臓器不全となり緊急人工透析を実施したが、死亡した。経過中β-D-glucanが上昇し、喀痰より複数回 *Aspergillus fumigatus* が分離されたため、経過中MCFCG、ITCZ、liposomal AMPH-Bなどの抗真菌薬を併用した。多臓器不全の原因は敗血症性ショックと考えられたが臨床的に証明できなかった。

解剖時組織所見：肉眼所見では両側下葉の容積が減少し、含気に乏しくとくに左下葉は灰白色調であった (Figure 5a)。肉眼的に蜂巣肺を認めず、両側上葉は赤褐色調で斑状の出血を伴っていた。病理組織学的には背景の間質性肺炎は主に下葉を中心に拡がり、正常の肺小葉は残存していない、完成された顕微鏡的蜂巣肺を呈した。このため病理組織学的にはUIP patternと診断した (Figure 5b)。気腔内に好中球が浸潤し、

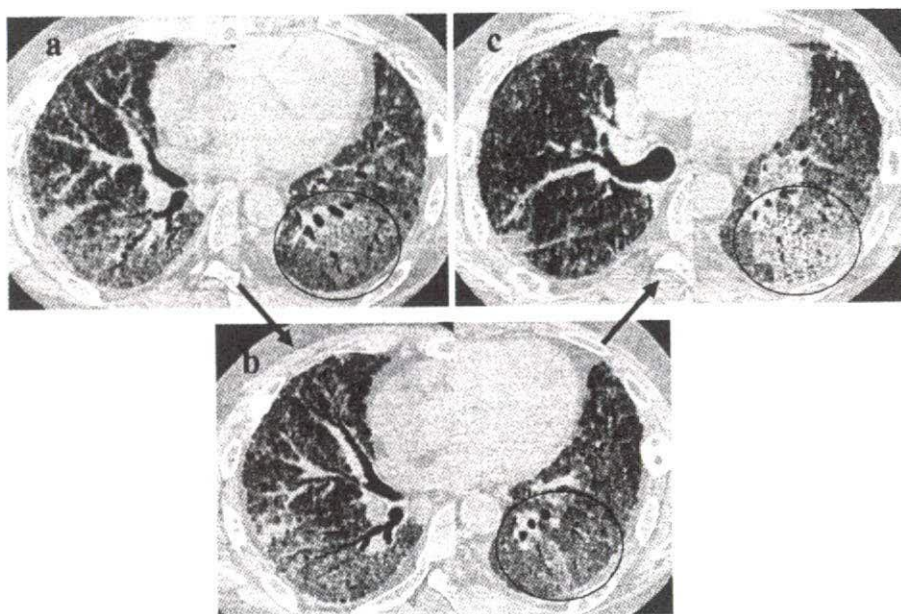


Figure 4 胸部CT所見。a) mPSLパルス療法後、左下葉のGGOの濃度が増加。b) Tacrolimus投与後、同部位のGGOが一部改善し、牽引性気管支拡張も軽減。c) 死亡3日前、病変の再増悪を認める。

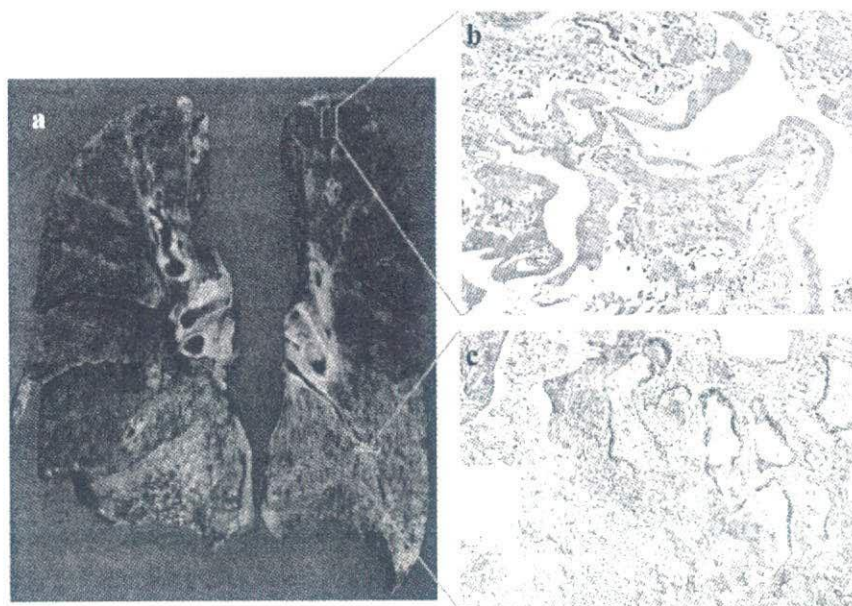


Figure 5 剖検所見. a) 解剖時マクロ像. 蜂巢肺を認めないが下葉の器質化, 上葉のうっ血を認める. b) 下葉の弱拡大像. HE染色. 顕微鏡的蜂巢肺を認め, 高度に炎症を合併している. c) 上葉の強拡大 HE染色. DADの所見で硝子膜の形成を認める.

粘液が充満していた. 菌種の同定は不明であったが, 破碎状の酵母様～糸状真菌が散見された. 上葉は広範に硝子膜の形成を認め, 高度の細胞浸潤を伴っており, DAD pattern と考えられた (Figure 5c).

考 察

本症例における tacrolimus 治療の評価に関しては, まず有効性判定は自覚症状, 胸部 CT など画像所見, 動脈血ガス分析, 肺機能検査 (%VC, DLCO), ADL 評価, KL-6 などの血清間質性肺炎マーカーなどで行った. 本症例は使用開始時に Hugh-Jones IV ~ V 度と自覚症状が強く肺機能検査は施行できなかった. 血液ガス分析の経過には明らかな変化はみられなかった. 自覚症状はわずかの時間ではあったが, 一時的に離床してリハビリテーションが可能なるほどに改善した. 胸部 CT では感染症合併までの期間は所見の改善が見られた. 以上より一定の臨床的効果があったものと考えられる. しかし, 感染症のコントロールがつかず, 最終的に敗血症性ショックで死亡した. 臨床経過においては β -D-glucan が持続高値でアスペルギルスの感染が問題となった. 剖検時には細菌性肺炎以外にサイトメガロウイルス肺炎も認められ, 免疫抑制剤の投与

には十分な感染症のコントロールが肝要であるといえる.

Tacrolimus は放線菌 *Streptomyces tsukubaensis* より同定された. 細胞内で FK506 binding protein (FKBP) と結合し, calcineurin を競合的に阻害, 結果的に NK-AT の活性化を阻害することで IL-2 などの炎症性サイトカインの産生を低下させる. これによって活性化された T 細胞の増殖を抑制する²⁾. 間質性肺炎や各種膠原病の治療において, 多数症例に関する検討がほとんどなされていないが, とくにステロイド治療に抵抗性の難治性皮膚筋炎, 多発筋炎などに合併する間質性肺炎において有効であったとする報告が散見される^{3,4)}. Oddis ら³⁾は抗 aminoacyl-tRNA synthetase 抗体症候群に合併した間質性肺炎で, PSL に加え methotrexate, cyclophosphamide などの免疫抑制剤併用療法が無効であった患者 8 例に対し tacrolimus を経口投与し, 臨床症状, 肺機能検査や CT などの検査所見の改善を認めたと報告した. 本邦でも Ochi ら⁴⁾が皮膚筋炎・多発筋炎に合併した間質性肺炎の患者 2 人に tacrolimus が有効であったと報告した.

線維芽細胞の培養系における *in vitro*, およびマウスの *in vivo* blemomycin モデルでの検討では, TGF- β 依存性の膠原線維産生が抑制され, 肺の線維化が軽減したことが示されており⁵⁾, tacrolimus に

は抗線維化作用があると考えられている。

以上から tacrolimus は間質性肺炎の治療薬として臨床応用が可能であることが示唆される。今後多施設、前向き検討に向けて症例の集積が必要である。

参考文献

- 1) 宮本 篤, 本間 栄, 高谷久史, 杉野圭史, 坂本 晋, 泉川公一, 川畑雅照, 岸 一馬, 坪井永保, 元井紀子, 黒崎敦子, 吉村邦彦: 特発性間質性肺炎「分類不能型」の臨床病理学的検討. 難治性疾患克服研究事業びまん性肺疾患調査研究班平成16年度研究報告書. p110-117, 2005.
- 2) Taylor AL, Watson JE, Bradley JA: Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56: 23-46.
- 3) Oddis CV, Scirba FC, Elmagd KA, Starzl TE: Tacrolimus in refractory polymyositis with interstitial lung disease. *Lancet* 1999; 353 (9166): 1762-1763.
- 4) Ochi S, Nanki T, Takada K, Suzuki F, Komano Y, Kubota T, Miyasaka N: Favorable outcomes with tacrolimus in two patients with refractory interstitial lung disease associated with polymyositis/dermatomyositis. *Clin Experiment Rheumatol* 2005; 23: 707-710.
- 5) Nagano J, Iyonaga K, Kawamura K, Yamashita A, Ichiyasu H, Okamoto T, Suga M, Sasaki Y, Kohroggi H: Use of tacrolimus, a potent antifibrotic agent, in bleomycin-induced lung fibrosis. *Eur Respir J* 2006; 27: 460-469.

第2章

病理・病態生理

病 因

要 旨

特発性肺線維症（IPF）の病因はいまだ不明である。当初は何らかの原因物質により肺の炎症反応が引き起され、その結果異常な組織修復のため、過剰な筋線維芽細胞の増殖や細胞外マトリックスの沈着が引き起されて、正常肺胞構造が破綻すると考えられていた。その後、線維化の過程は先行炎症なしに引き起されうること、かつ慢性的な肺胞上皮細胞傷害の結果、線維化に至るとする説が提唱された。現在、さらに両説の融合した形で、IPFにおける線維化は、初期に起る正体不明の組織傷害と、凝固異常、炎症、上皮細胞や血管内皮細胞の修復再生の異常などの、重複かつ連続的な病態の結果、肺胞構築異常を伴う線維化が完成される、と考えられるに至っている。近年のマイクロアレイなどを駆使した分子生物学的解析により、発症機序は今後さらに明瞭に解明されていくものと期待される。

はじめに

特発性肺線維症（IPF）は、原因不明の間質性肺炎である特発性間質性肺炎（IIPs）の中で最も頻度が高く、かつ予後の不良な疾患である^{1,2)}。IPFは極めて重要な疾患でありながら、その病因に関しては、いまだ完全な解明がなされていない。しかしながら、肺胞上皮細胞の形態および機能の変化が主要な病態であることから、肺胞上皮細胞の傷害と細胞死（アポトーシス）がIPFの発症機序と直接かかわっているものと推定されている³⁾。ただし、傷害を引き起す原因はこれまでのところ判明しておらず、また組織傷害後に起る生体側の反応についても、個体差、遺伝的背景、加齢、あるいは環境などの複合的要因に左右される（図1）。現在までに、潜在的ウイルス感染症、喫煙習慣、環境要因、サーファクタントタンパクC遺伝子変異や、TNF α 、TGF β 1遺伝子の多型などが、IPFの発症にかかわる因子として報告されている³⁾。

● キーワード

炎症
線維化
肺胞上皮細胞
傷害
間葉系細胞

本稿では、IPF の病因に関する仮説とそれらをめぐる議論の変遷に言及し、本症の病因を考察する。

特発性肺線維症の病因をめぐる議論の変遷

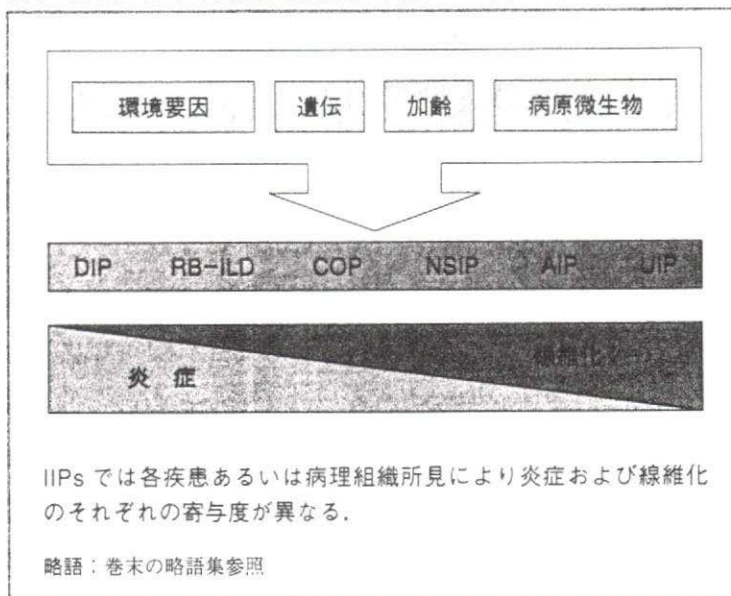
1. 炎症先行説

歴史的には、1980年代半ばからのIPF研究により、その成因に関して少なからぬ発展がもたらされた¹。当初は、線維化過程において過剰で制御不能な修復反応が起き、その初期変化は炎症細胞の病変局所への流入と、それに引き続く線維化を引き起す因子の放出であるとする仮説が信じられていた²。すなわち、IPFはある程度の肺の炎症反応とその後の異常な組織修復により、過剰な線維芽細胞や筋線維芽細胞の集簇とコラーゲンなどの細胞外マトリックス（ECM）の肺胞中隔内と肺胞内への沈着が引き起されて、正常肺胞構造が破綻するという病因論であった。この仮説から、初期の炎症過程を制御できれば線維化も抑制できるという推論が生まれ、IPFに対して副腎皮質ステロイド（CS）やアザチオプリンが投与される根拠となってきており、この治療への適用は現在まで今なお引き継がれている。しかしながらその後、先行する炎症が線維化を引き起すかに関して疑義が上がり、IPFの病因をめぐる議論がにわかに活気づいた。

2. 炎症非先行説

すなわち、線維化の過程は先行する炎症とは無関係に引き起されること、かつ慢性的な肺胞上皮細胞傷害に対する異常な上皮系細胞や上皮細胞-間葉系細胞の相関の結果線維化が招来される、とする説が唱えられたためである^{3,4}。これには、従来の抗炎症療法がIPFではほとんど奏効しないという事実や、幾つかの炎症反応マーカーの値が、IPFにおける重症度やその予後に

図1 IIPsにおける炎症と線維化（文献³より引用改変）

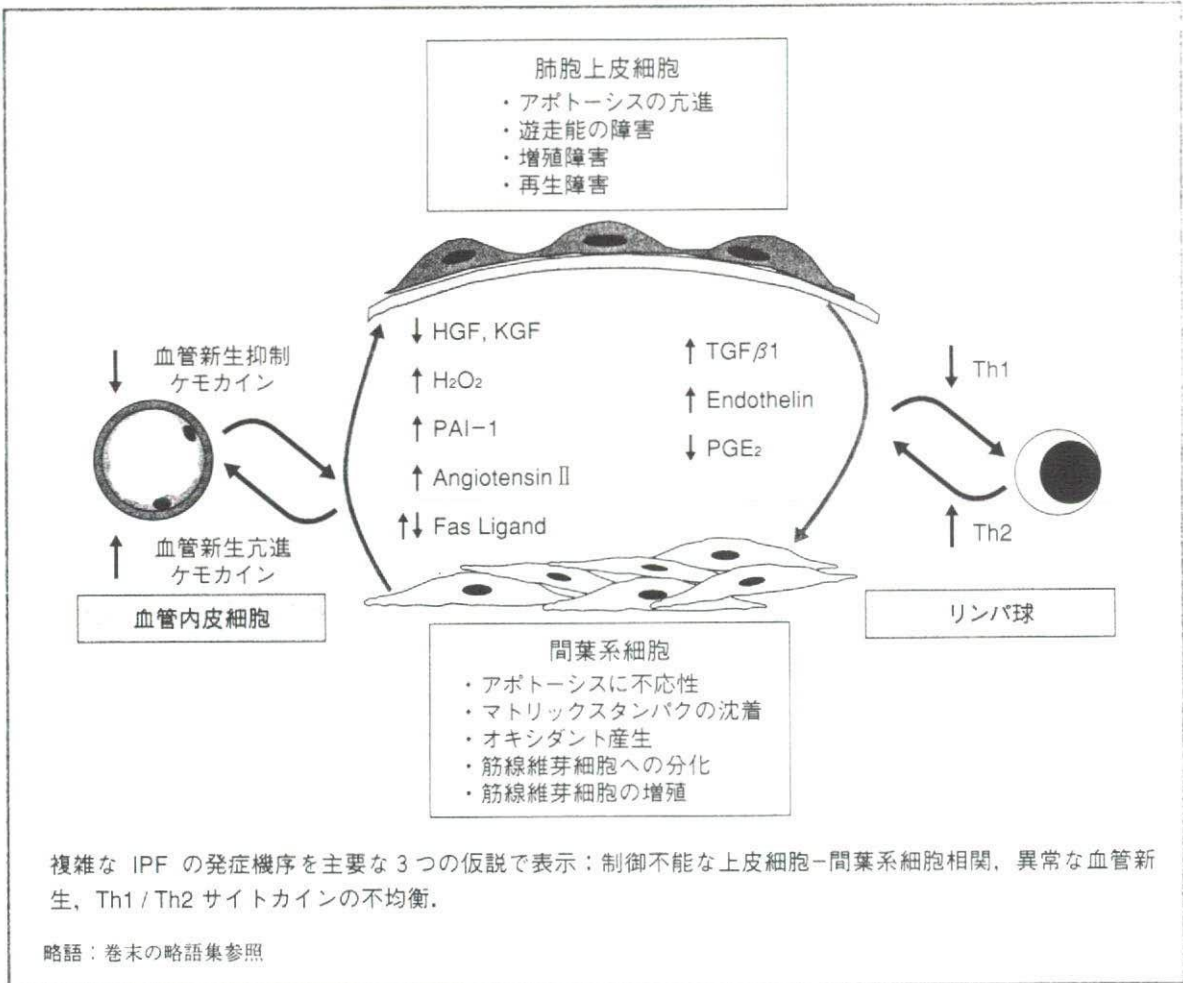


関連しないことが、この仮説を支持する論拠として引き合いに出されている。また、高分解能 CT 上で見られるすりガラス陰影 (GGO) が、IPF 以外の複数の間質性肺疾患では胞隔炎症の広がりや重症度に相関して認められるのに対して、IPF ではこの GGO が必ずしも炎症反応とは関係しないという点もその論拠の 1 つである。ただし、この Selman らの仮説もその正当性を立証する根拠が希薄であると批判されている⁸⁾。これは、いかなる組織においても傷害に伴って常に炎症反応が惹起され組織修復が起ることが周知であるためである。

この論点に関連して、最近の Zuo ら⁹⁾ の研究成果から、IPF の持つ新たな側面が浮かび上がり、IPF の病因は従来考えられていたよりも一層複雑であることが推定された。彼らは病理組織学的に通常型間質性肺炎 (UIP) と診断された患者由来の肺組織を用いてのマイクロアレイ解析を行った。この結果、健常肺組織検体に比べ、IPF/UIP 患者の肺組織において遺伝子発現パターンに明瞭な差違が確認され、発現レベルが有意に異なっている 100 以上の遺伝子群が同定された。これらは、① 平滑筋の収縮、分化にかかわる遺伝子群、② 間葉系基質の形成、分解、シグナル伝達系にかかわる遺伝子群、③ アンチオキシダント、一部のケモカイン遺伝子群、④ 免疫グロブリンや補体系など、4 つのグループに大別された。一方、T 細胞系活性化やアポトーシスにかかわる TNF α や Fas 経路の遺伝子の特異的活性化は認められなかった。これらの包括的遺伝子発現プロファイルからは、IPF/UIP の病態形成には、組織傷害から炎症を介さずにリモデリングとしての線維化に直接至る経路の存在が推定できるが、その一方で、免疫グロブリン遺伝子の発現亢進がみられた結果から、少なくとも何らかの潜在的で未知の“抗原”の存在と、それに対するリンパ増殖性の免疫反応の関与が推定され、“炎症過程なしでの上皮細胞傷害-異常組織修復反応”仮説を支持することが難しくなることが読み取れる⁸⁾。

3. 傷害先行・炎症続発説

上記 2 つの仮説を融合する形で、上述したような最近第 3 の仮説が提唱されている^{3,8)}。すなわち、肺の傷害の結果として炎症が惹起されるし、肺への反復傷害により生じる免疫反応の 1 つの形として IPF が発症するというものである。このような傷害因子の反復する肺への

図2 IPFの発症機序(文献³⁾より引用改変)

暴露や、何らかの抗原暴露が 2 型ヘルパー T (Th2) 細胞免疫を活性化させ、内皮細胞や上皮細胞の修復を遅延させて、さらに傷害部位に対して線維化を引き起す成長増殖因子が放出されることになる。これらの成長増殖作用を有するサイトカインが線維芽細胞の局所への遊走と増殖、さらに筋線維芽細胞への分化を促す結果になる、とするものである。IPF では筋線維芽細胞が過剰のコラーゲン、プロテオグリカンなどの ECM を産生分泌するが、これら線維芽細胞や筋線維芽細胞は通常のアポトーシスを起さず、肺胞腔内を占めつつ、さらにその場所への ECM 沈着や線維化、将来血管新生をする方向に進む(図 2)³⁸⁾。さらに、病態が進むと肉芽様組織の形成が起り、ますます組織傷害の修復が起りにくくなる。一方で、腫大した II 型肺胞上皮細胞は傷害を受けた基底膜の修復を図るが、もはや正常な肺機能への回復

は不可能である。このような異常な修復過程は、基本的に時間的には同期して起らず、また fibroblastic foci (focus) の増加と、蜂巢肺の形成、間質の炎症などの IPF (組織学的には UIP) に特徴的な病変は、間に健常部分を挟みながら進行する。このように、IPF において線維化が進行する過程では、初期に起る正体不明の組織傷害と、凝固異常、炎症、異常な肉芽形成、上皮細胞や血管内皮細胞の修復再生の異常などの、重複かつ連続的な病態の結果、肺胞構築異常を伴う線維化が完成されることになる^{314,8)}。

特発性肺線維症 (IPF) 発症にかかわる

主要コンポーネント

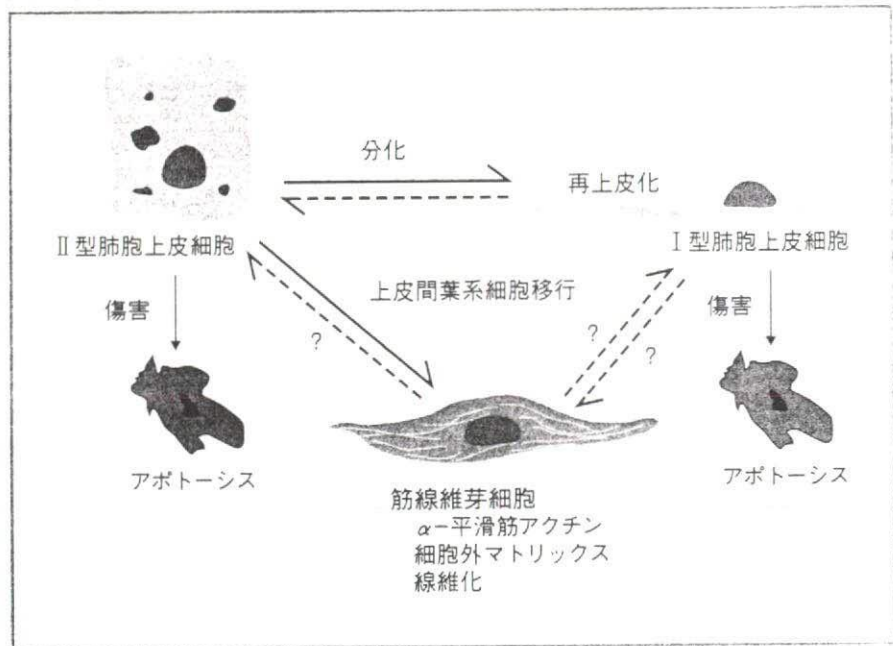
1. 肺胞上皮細胞

前述したように肺胞上皮細胞の傷害とアポトーシスが IPF の初期の病態として重要であり、II 型肺胞上皮細胞が増殖や細気管支上皮化、再生性過形成などの形態的变化を呈することが報告されている。このような異型性を示し、アポトーシスに陥った肺胞上皮細胞を背景として、線維芽細胞および筋線維芽細胞が集簇し、ECM が異常沈着した fibroblastic foci が形成される。特に上皮細胞のアポトーシスと再生の顕著な病変組織の近傍にこれらの筋線維芽細胞が集結しやすい⁹⁾。IPF では、これら肺胞上皮細胞と間葉系細胞相互間での制御不能となった相互関係が悪循環を形成しながら、肺胞上皮細胞のさらなる傷害とアポトーシス、および間葉系細胞の活性化をもたらし、高度な線維化へと進展する。

傷害を受けた肺胞上皮細胞の修復時には、いわゆる幹細胞からの分化と増殖が想定されているが、幹細胞の所在として肺局所の内在性の幹細胞、あるいは骨髄由来の外來性の幹細胞の両者が考えられる (図 3)¹⁰⁻¹²⁾。また、II 型肺胞上皮細胞自体も分裂再生能を有する幹細胞の 1 つである。IPF においては修復された上皮細胞は本来の肺胞上皮細胞とは性格を異にし、アポトーシスに陥りやすく、さらには TGFβ1 などの間葉系細胞の増殖因子を過剰発現して、病態形成にかかわることになる。

2. 間葉系細胞

IPF における線維化の最前線は線維芽細胞 / 筋線維芽細胞の集簇し

図3 肺胞上皮細胞の分化-間葉系細胞移行の模式図 (文献¹⁵より引用改変)

た fibrotic foci である^{3,4,8}。組織や臓器にかかわらず、線維芽細胞は共通した組織修復過程に関与する。一方、筋線維芽細胞は収縮可能で極めて可動性が高く、線維芽細胞と平滑筋細胞の両者の性格を有し、ECM を産生分泌しうる細胞である。上皮細胞の傷害が起ると、その部位に間葉系細胞が浸潤し、筋線維芽細胞に分化して ECM を分泌するとともに、組織修復の橋渡しの役割を担う³。

この肺の線維化過程にかかわる間葉系細胞の起源は、最近の研究から複数存在することが明らかにされた。すなわち、① もともと肺局所に存在した間質の線維芽細胞、② 末梢循環血液中の線維細胞、③ 骨髄由来の線維芽細胞前駆細胞、④ 肺上皮細胞からの上皮-間葉系細胞転換 (EMT) によるもの、である^{3,13-15}。特に後者③、④ 2つの間葉系細胞の由来に関しては、最近数年間の研究の発展が目覚ましい(図3)。ただし、それぞれの起源の間葉系細胞が、具体的に IPF 患者の病態において、重症度や治療に対する反応態度なども含めて、どの程度の割合を占め、どのように関与しているかは、今後の研究に待たなければならない。

3. 炎症と Th1 / Th2 仮説

すでに述べたように、IPF の発症過程での炎症の意義や役割に関しては、議論が多く、いまだ解決をみていない。この点に関して、最近

の研究の興味は炎症にかかわる Th1 サイトカインと線維化にかかわる Th2 サイトカイン発現の均衡に焦点が当てられている³⁾。すなわち、Th1 / Th2 仮説では、進行性の線維化は慢性的で持続性の抗原刺激に対する制御の逸脱した免疫/炎症反応によって起り、特に Th2 優位となるサイトカイン環境で線維化病態が起るとするものである¹⁶⁾。これまでに、プレオマイシンを用いた動物実験のみならず、実際の IPF 症例の病理組織学的検討でも Th2 サイトカイン受容体の高発現などにより、この Th2 優位の Th1 / Th2 偏在仮説が実証されている。

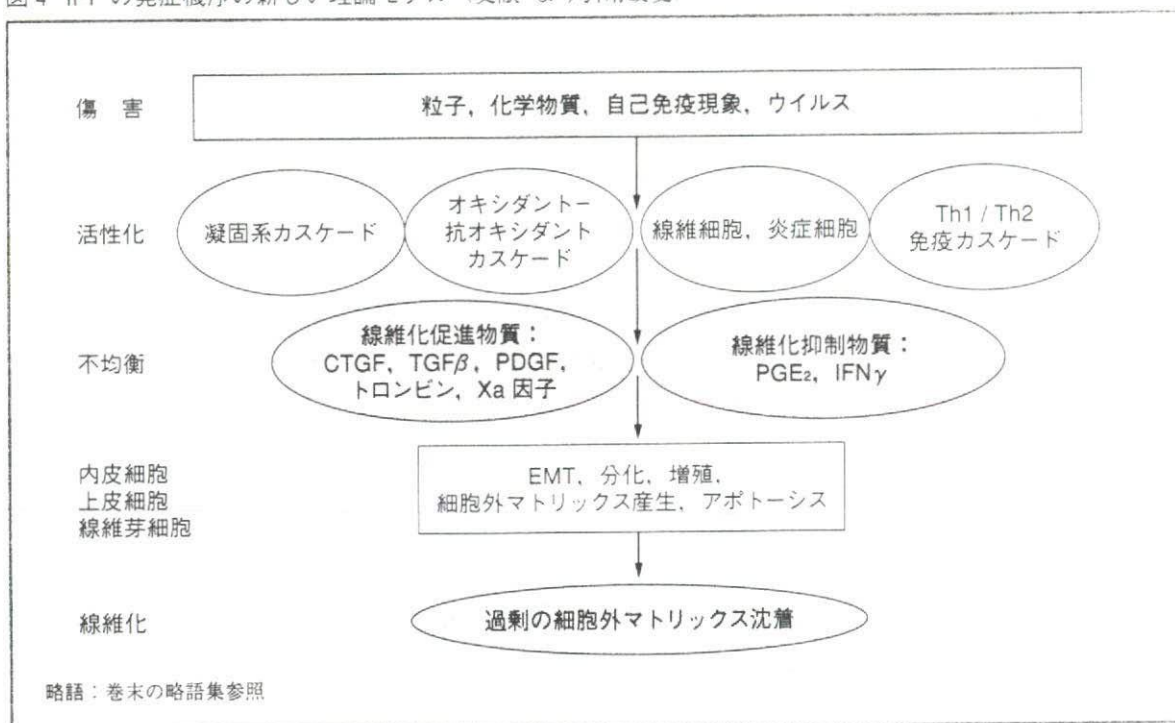
4. 血管新生

傷害部位の治癒過程では、血管新生が極めて重要である。しかしながら、IPF の発症にかかわる血管新生の意義については、明確な結論が得られていない³⁾。IPF 患者では血管新生を促進するケモカインの発現が亢進し、逆に血管新生の抑制に働くケモカイン発現が抑制されているとする報告も見られる¹⁷⁾。IPF の発症からの時間的経過や空間的分布の違いにより、この血管新生促進 / 血管新生抑制の均衡が必ずしも一様ではないことが推測されている³⁾。

今後の課題

IPF の病因論に関係して、米国胸部学会 / ヨーロッパ呼吸器学会 (ATS / ERS) 国際的 Consensus Statement で整理された IIP の 7 つの病型の中でも、特に IPF / UIP と非特異性間質性肺炎 (NSIP) が全く独立した病態であるか、あるいは分子発症機序も含めてその異同はいかなる点にあるか、などについてさまざまな議論がなされている¹²⁻¹⁵⁾。同一症例で複数葉から外科的生検を行った Flaherty ら¹⁹⁾ の 109 例の検討では、すべての生検材料が UIP を示した concordant UIP (51 例)、NSIP を示した concordant NSIP (20 例) に対して、同一個体の複数検体間で UIP と NSIP 所見の混在していた discordant UIP が 28 例あり、同一葉内での 2 つ以上の病理組織所見が得られた 11 例のうち 8 例が discordant UIP であったとされている。さらに重要なことに、病勢の進展に伴い、cellular NSIP → fibrotic NSIP → UIP へ進行する可能性が示唆されている^{8, 18)}。

一方、遺伝発現プロファイルの相違に関して、Yang ら²⁰⁾ は 16 例の孤発性 IIP と 10 例の家族性 IIP の症例の肺組織のマイクロアレイ

図4 IPFの発症機序の新しい理論モデル（文献¹より引用改変）

解析において9例の健常者肺組織との比較検討から、IPF / UIP と NSIP では遺伝子転写発現のプロファイルは極めて相似していると結論している。このように、遺伝子発現プロファイルからみた IPF / UIP と NSIP の異同に関しては大きな差はない、とする説が現時点での主流である²¹。

したがって、IPF を NSIP と明確に区別する金科玉条的基準は実は存在しないとも言えよう²¹。わずかな組織所見のみに基づく分類よりも、臨床像、画像所見、病理組織学的所見などを総合した IIPs の新しい疾患分類が必要と考えられるゆえんである。すなわち、その発症機序は単一ではなく、発症から病態形成まで複数の経路がかかわると考えるほうが、より現実的かつ科学的であり、将来の新しい有効な治療の開発を可能にするものと考えられる（図4）²¹。

吉村 邦彦

文 献

- 1) American Thoracic Society: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2 Pt 1): 646-664, 2000.
- 2) American Thoracic Society/European Respiratory Society: American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 277-304, 2002.
- 3) Horowitz J C, et al: Idiopathic pulmonary fibrosis: new concepts in pathogenesis and implications for drug therapy. *Treat Respir Med* 5: 325-342, 2006.
- 4) Maher T M, et al: Idiopathic pulmonary fibrosis: multiple causes and multiple mechanisms? *Eur Respir J* 30: 835-839, 2007.
- 5) Crystal R G, et al: Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic, and biochemical aspects. *Ann Intern Med* 85: 769-788, 1976.
- 6) Selman M, et al: Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134: 136-151, 2001.
- 7) Selman M, et al: The epithelial/fibroblastic pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29 (3 Suppl): S93-97, 2003.
- 8) Strieter R M: Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel. *Chest* 128 (5 Suppl 1): 526S-532S, 2005.
- 9) Zuo F, et al: Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6292-6297, 2002.
- 10) Krause D S, et al: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105: 369-377, 2001.
- 11) Gharaee-Kermani M, et al: New insights into the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a potential role for stem cells in the lung parenchyma and implications for therapy. *Pharm Res* 24: 819-841, 2007.
- 12) Krause D S: Bone Marrow-derived Cells and Stem Cells in Lung Repair. *Proc Am Thorac Soc* 5: 323-327, 2008.
- 13) Hashimoto N, et al: Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 113: 243-252, 2004.
- 14) Willis B C, et al: Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166: 1321-1332, 2005.
- 15) Willis B C, et al: Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 3: 377-382, 2006.
- 16) Wynn T A: Fibrotic disease and the T (H) 1/T (H) 2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 4: 583-594, 2004.
- 17) Keane M P, et al: The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 159: 1437-1443, 1997.
- 18) Martinez F J: Idiopathic interstitial pneumonias: usual interstitial pneumonia versus nonspecific interstitial pneumonia. *Proc Am Thorac Soc* 3: 81-95, 2006.
- 19) Flaherty K R, et al: Histopathologic variability in usual and nonspecific interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1722-1727, 2001.
- 20) Yang I V, et al: Gene expression profiling

of familial and sporadic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 45-54, 2007.

21) Rosas IO, et al: When it comes to genes—

IPF or NSIP, familial or sporadic—they're all the same. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 5-6, 2007.



ELSEVIER

respiratoryMEDICINE

Anti-endothelial cell antibodies in patients with interstitial lung diseases

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

The Second Division, Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, 431-3192, Hamamatsu, Japan

Received 4 May 2007; accepted 24 July 2007

Available online 11 September 2007

KEYWORDS

Anti-endothelial cell antibodies;
Idiopathic interstitial pneumonias;
Nonspecific interstitial pneumonia

Summary

Background: Anti-endothelial cell antibodies (AECA) are circulating antibodies that bind to endothelial antigens and induce endothelial cell damage. AECA have been detected in patients with collagen vascular disease (CVD) and their presence is associated with interstitial lung disease (ILD) in cases of CVD. However, the prevalence of AECA in patients with idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) is not known.

Methods: We investigated the prevalence of AECA in patients with IIPs. We also examined whether the expression of AECA differed among the histologic subgroups usual interstitial pneumonia (UIP) and nonspecific interstitial pneumonia (NSIP), and compared the values with those of CVD-associated ILD (CVD-ILD). Twenty patients with IIPs and 24 patients with CVD-ILD were studied. Serum samples were examined for AECA by cellular enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using human umbilical vein endothelial cells. Values are expressed as ELISA ratios (ER).

Results: All sera from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/UIP were negative for AECA, whereas 5 out of 10 with idiopathic NSIP, 5 out of 14 with CVD-UIP and 4 out of 10 with CVD-NSIP tested positive ($p < 0.05$). ER values were significantly lower in patients with IPF/UIP than idiopathic NSIP, CVD-UIP or CVD-NSIP ($p < 0.05$). Among idiopathic NSIP, CVD-NSIP and CVD-UIP patients, the ER values did not differ.

Conclusions: Among IIP patients, only those with idiopathic NSIP, not IPF/UIP, tested positive for AECA. The prevalence of AECA in idiopathic NSIP patients was similar to that in CVD-ILD patients. These results may provide important information to understand the distinct pathophysiology of each form of IIPs.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding author. Tel.: +81 53 435 2263; fax: +81 53 435 2354.

E-mail address: inui@hama-med.ac.jp (N. Inui).

Introduction

Anti-endothelial cell antibodies (AECA) are a heterogeneous group of antibodies recognizing various antigenic determinants on human endothelial cells. Although their precise pathogenic role remains unclear, studies *in vitro* suggest that AECA bind to endothelial cell membrane antigens and damage endothelial cell either through antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity or the recruitment of natural killer cells.^{1–3} AECA also upregulate the expression of adhesion molecules on endothelial cells and induce the secretion of cytokines and chemokines, which cause leukocyte homing, recruitment and adhesion to endothelial cells.^{4,5} AECA have been detected in patients with collagen vascular diseases (CVDs), including systemic lupus erythematosus (SLE), systemic sclerosis (SSc) and rheumatoid arthritis (RA), as well as in patients with systemic vasculitic diseases.^{6–13} Although the prevalence of AECA varies among these diseases, it is correlated with disease activity and the degree of organ damage, and is regarded as a risk factor for disease relapse in vasculitis.^{7–12,16}

Interstitial lung diseases (ILDs) are a group of diseases that involve the space between the epithelial and endothelial basement membranes. ILDs have hundreds of etiological factors, including environmental exposure and drugs. ILDs are common in patients with CVD and are a major determinant of their prognosis. Recent studies have shown a relationship between AECA and ILD in patients with CVD. In polymyositis and dermatomyositis (PM/DM), AECA were detected significantly more frequently in patients with PM/DM associated ILD than in those with PM/DM only.^{14,15} In patients with SSc, AECA were found to be associated with ILD and an indicator of alveolar-capillary impairment.¹⁶

Idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) are a category of diseases of unknown etiology and are recommended to be further subdivided into clinico-radiologic-pathologic entities.¹⁷ Among IIPs, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), which has the pathological features of usual interstitial pneumonia (UIP), and nonspecific interstitial pneumonia (NSIP), are perhaps the most clinically important and frequently occurring. It is critical to differentiate between IPF/UIP and NSIP pathologically, because of differences in survival and response to corticosteroids.

Interestingly, endothelial cell injury has recently been shown to occur in a fibrotic process in patients with ILD, including those with IIPs and CVD-associated ILD (CVD-ILD).¹⁸ Thus, it is suggested that AECA are involved in endothelial cell injury in certain groups of IIPs because of a possible pathogenic role. To date, however, there has been no attempt to examine the prevalence of AECA in patients with IIPs. In the present study, we aimed to evaluate the prevalence of AECA directed against human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in patients with IIPs. In addition, we examined whether the prevalence and levels of AECA differ among the histologic subgroups of IIPs, and compared the values with those for CVD-ILD. Finally, we further studied the relationship between AECA and clinical or serological features to clarify the clinical significance of these antibodies in patients with ILD.

Materials and methods

Patients and controls

Twenty patients with IIPs and 24 patients with CVD-ILD who consecutively underwent a surgical lung biopsy between 1998 and 2006 were included in this study. The diagnosis of IIP was based on clinical, radiographic, and pulmonary physiological features, according to the ATS/ERS consensus classification.¹⁷ Histological classification of ILDs was performed based on pathologic findings in surgical lung biopsy specimens according to the current classification.¹⁷ The underlying diseases in patients with CVD-ILD were RA ($n = 6$), SSc ($n = 5$), Sjögren syndrome ($n = 6$) and PM/DM ($n = 7$), all of which fulfilled the diagnostic criteria.^{19–22} Serum samples were collected at the time of diagnosis, when none of the patients were under systemic steroid or immunosuppressive therapy, and stored at -30°C until this investigation. Sera from 35 healthy volunteers matched for age and sex served as controls. The study protocol was approved by our institutional review board for human research. Informed consent was given by each patient.

Data collection

Clinical data, including sex, age, smoking history, symptoms and outcome was obtained from medical records. Pulmonary function tests and laboratory parameters, including serum lactate dehydrogenase (LDH), KL-6 and surfactant protein D (SP-D), were assessed.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of AECA

The ELISA to detect AECA in sera was performed as described previously,⁶ with some modifications. In brief, HUVEC at passage 3 were seeded in a 96-well flat-bottomed microtiter plate (Nunc, Denmark) at a concentration of 2×10^4 cells/well and allowed to grow to confluence as a monolayer for 2–3 days. Cells were fixed with 0.1% glutaraldehyde for 10 min at 4°C , and nonspecific binding sites were blocked with phosphate buffered saline (PBS)-bovine serum albumin (BSA, Sigma) for 1 h at 37°C . After five washes, 100 μL of serum diluted 1:1000 in PBS-1% BSA was added to each well in triplicate for 1 h at 37°C . The wells were washed 5 times with PBS-1% BSA and incubated with horseradish peroxidase-conjugated rabbit F(ab')₂ anti-human IgG (DAKO, Denmark) diluted 1:800 in PBS-1% BSA for 1 h at 37°C . After five more washes with PBS-1% BSA, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB; DAKO, USA) was added as a substrate and incubated at room temperature. After 10 min, the enzyme reaction was stopped by the addition of 1 M H_2SO_4 , and optical density (OD) was measured at 450 nm using an ELISA reader (BioTek, USA). The results were expressed as an ELISA ratio (ER) = $(S-A)/(B-A)$, where S is the OD of the sample tested, and A and B indicate the OD of negative and positive controls, respectively. All assays included at least one positive and one negative control sample on each plate. As a positive control, a highly positive serum sample from an SLE patient without lung disease was used. As described in previous studies, a sample was judged

to be positive when the ER was greater than the mean+3SD of the healthy control group.

Statistic analysis

All values were analyzed using StatView version 4.5 (Abacus Concept, CA). The Mann-Whitney *U*-test and ANOVA were used for the statistical analysis. Correlations between different parameters were evaluated with Spearman's rank correlation coefficient. *p* values less than 0.05 were considered significant. All data are expressed as means \pm SD.

Results

Characteristics of patients

According to the histological findings, 10 of the IIP patients were classified as having UIP and 10 as having NSIP. In addition, among patients with NSIP, 2 patients were classified as having a cellular pattern and 8 patients were classified as having a fibrosing pattern. Using the same histological criteria, 14 of the CVD-ILD patients were categorized as having UIP and 10 as having NSIP. The clinical features and laboratory parameters are summarized in Table 1. Males predominated among those with IPF/UIP (*p*<0.05). Age, smoking history and laboratory findings did not differ among the four groups. Serum levels of KL6 and SP-D, useful markers for the diagnosis and activity of interstitial pneumonia, also did not differ among the groups.

A control group comprising 21 males and 14 females with a mean age of 54 (range, 21–84) was studied to determine

the cut-off value of AECA. These individuals did not show any clinical, radiological or serological evidence of pulmonary disease or CVD.

Expression of AECA in sera

In the control group, the ER value (mean \pm SD) of AECA was 0.246 ± 0.101 . There was no significant difference in the ER with regard to gender, age and smoking habits. The cut-off value of AECA was determined to be 0.549 using Rosenberg's method.^{6–8,11,15,16}

With this cut-off value, 5 of the 20 patients with IIP (25%) and 9 of the 24 patients with CVD-ILD (37.5%) were positive for AECA. Compared with control levels, the prevalence and ER values of AECA were significantly increased in both IIP patients and CVD-ILD patients. No significant difference was found in the ER between patients with IIPs and those with CVD-ILD (0.597 ± 0.259 and 0.476 ± 0.178 , respectively) (Figure 1). Next, we compared the expression of AECA among the histologic subgroups UIP and NSIP. Interestingly, all of the sera from patients with IPF/UIP tested negative for AECA, whereas the samples from 5 out of 10 patients with idiopathic NSIP (50%) were positive, indicating that the prevalence of AECA was significantly higher in cases of idiopathic NSIP than in cases of IPF/UIP. Among patients with idiopathic NSIP, 1 out of 2 patients with cellular NSIP and 4 out of 8 patients with fibrosing NSIP were positive for AECA. In CVD-ILD, 5 out of 14 patients with CVD-UIP (35.7%) and 4 out of 10 patients with CVD-NSIP (40%) were found to be positive. As shown in Figure 2, the ER value of AECA was significantly lower in patients with IPF/UIP than those with

Table 1 Patients' characteristics.

	IIP		CVD-associated ILD	
	IPF/UIP	Idiopathic NSIP	CVD-UIP	CVD-NSIP
Patients (<i>n</i>)	10	10	14	10
Age (years)	63.2 \pm 8.5	58.6 \pm 9.2	60.7 \pm 7.5	54.5 \pm 9.7
Male	10 (100)*	3 (30)	10 (71)	4 (40)
Smoker	10 (100)	4 (40)	10 (71)	4 (40)
FVC (L)	2.7 \pm 0.8	2.3 \pm 0.7	2.3 \pm 0.8	2.2 \pm 0.8
FVC (%)	83.3 \pm 25.7	74.6 \pm 17.5	75.4 \pm 20.6	72.8 \pm 19.9
PaO ₂ (mmHg)	76.7 \pm 7.3	78.9 \pm 8.5	79.9 \pm 20.6	82.6 \pm 9.2
LDH (IU/L)	232 \pm 47	255 \pm 59	238 \pm 73	277 \pm 183
IgG (mg/dL)	1568 \pm 371	1555 \pm 306	1705 \pm 514	1845 \pm 460
KL-6 (U/mL)	936 \pm 727	2112 \pm 1699	1004 \pm 1203	969 \pm 520
SP-D (ng/mL)	266 \pm 182	253 \pm 129	260 \pm 328	241 \pm 180
BAL parameters				
Total cells $\times 10^5$ mL ⁻¹	4.5 \pm 3.5	1.9 \pm 0.6	2.9 \pm 1.9	2.4 \pm 1.5
Macrophages (%)	96.5 \pm 4.1	86.4 \pm 12.2	87.7 \pm 13.6	75.4 \pm 28.3
Lymphocytes (%)	2.5 \pm 1.8	9.2 \pm 10.3	5.2 \pm 3.8	16.1 \pm 21.2 [†]
Neutrophils (%)	0.6 \pm 0.9	1.0 \pm 1.4	6.9 \pm 1.4	1.5 \pm 2.4
Eosinophils (%)	0.5 \pm 0.7	1.3 \pm 2.5	1.3 \pm 1.1	1.1 \pm 1.8
Ratio of CD4/CD8	2.2 \pm 2.3	1.5 \pm 1.5	2.3 \pm 2.6	1.4 \pm 0.9

Data are presented as no or mean \pm SD.

**p*<0.05 compared with Idiopathic NSIP and CVD-NSIP.

[†]*p*<0.05 compared with IPF/UIP and CVD-UIP.

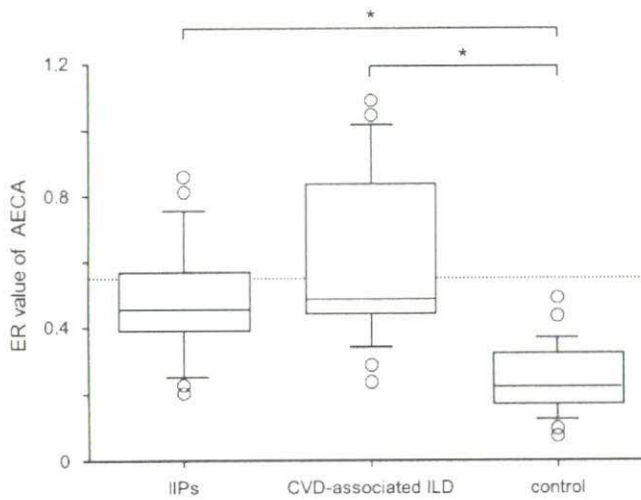


Figure 1 ER value of AECA in patients with IIPs, CVD-associated ILD and the control group. The dotted line represents the cut-off value. Horizontal lines, boxes, error bars and circles represent the median, 25th and 75th percentile, 10th and 90th percentile, and data apart from 10th or 90th percentile, respectively. AECA, anti-endothelial cell antibodies; ER, ELISA ratio. * $p < 0.0001$.

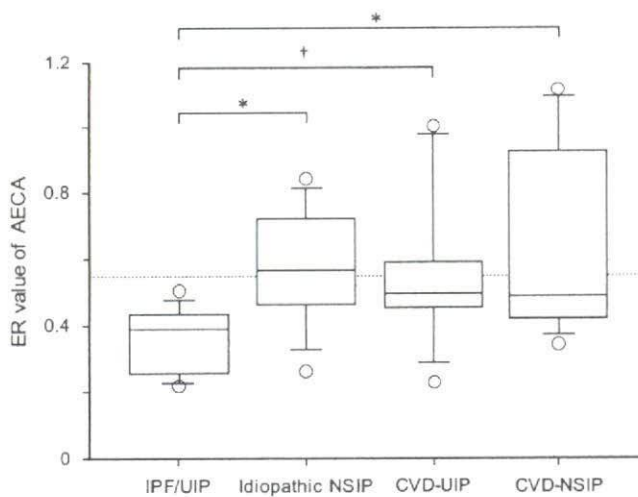


Figure 2 ER value of AECA in patients in each subgroup. The dotted line represents the cut-off value. Specifics of the box plot are as described in Figure 1. AECA, anti-endothelial cell antibodies; ER, ELISA ratio. * $p < 0.01$, † $p < 0.05$.

idiopathic NSIP, CVD-UIP or CVD-NSIP ($p < 0.05$). Among patients with idiopathic NSIP, CVD-NSIP and CVD-UIP, the prevalence and ER values of AECA were not significantly different. In cases of CVD-ILD, the ER value and prevalence was not significantly different among the four underlying CVDs (data not shown).

Relationship between AECA levels and clinical parameters

The ER values of AECA in sera did not correlate with pulmonary function, laboratory parameters including serum

levels of KL6, SP-D and other autoimmuno-antibodies, or the differential fraction of alveolar cells (Figure 3). Even among IIP patients only, ER values were not related to these findings. Of the IPF/UIP patients who tested negative for AECA, 5 died of respiratory failure. Among the idiopathic NSIP patients, 1 AECA-negative individual did not respond to corticosteroids and died of respiratory failure. Among the CVD-NSIP patients, 1 AECA-positive individual with SSc, who did not receive therapy because his respiratory condition was stable, died of renal crisis. Collectively, among our cases, there was no correlation between the presence of AECA and clinical features such as responsiveness to treatment and prognosis.

Discussion

The present study investigated the expression and clinical significance of AECA in patients with IIPs compared with those with CVD-ILD. We found a significant difference in the prevalence and ER values of AECA among the histologic subgroups of IIPs. One half of all idiopathic NSIP patients had AECA, while none of the IPF/UIP patients did. In addition, the ER values of AECA were significantly higher in cases of idiopathic NSIP than in cases of IPF/UIP. By contrast, among patients with CVD-ILD, no difference was found in the prevalence or ER values of AECA, which were similar to those in cases of idiopathic NSIP, between patients with CVD-UIP and those with CVD-NSIP. There was no significant relationship between the expression of AECA and clinical or laboratory findings.

IIPs have been classified into subgroups, each with a distinct histologic pattern and prognosis. It has been suggested that each subgroup has a different pathologic process. In this context, it is interesting that AECA were only found in idiopathic NSIP patients (50%), and not IPF/UIP patients (0%). Although the precise role of AECA in ILD remains unclear, the variation in the expression of AECA among the histologic subgroups of IIPs may be associated with a distinct pathogenesis. Recently, Fujita et al.²³ suggested that certain cases of idiopathic NSIP could be considered identical to CVD-NSIP, because the clinical characteristics were quite similar despite the presence of underlying CVD. Consistent with this, our previous study showed that in terms of prognosis and responsiveness to therapy, idiopathic NSIP was similar to CVD-NSIP.²⁴ Interestingly, the present study revealed the prevalence and ER values of AECA in patients with idiopathic NSIP to be comparable to those in patients with CVD-UIP and CVD-NSIP. In terms of the expression of AECA, idiopathic NSIP was more similar to CVD-ILD than IPF/UIP. As idiopathic NSIP is a provisional category that requires further elucidation and definition as described in the ATS/ERS statement,¹⁷ this antibody might be used to account for a part of this entity.

We evaluated the relationship between AECA expression and pulmonary function and laboratory findings, such as KL-6 levels and SP-D values. Impaired lung function, shown by a decreased FVC and low PaO_2 value in cases of ILD, is considered to reflect disease severity.²⁵ KL-6 is mainly expressed on type II pneumocytes and respiratory epithelial cells, and serves as a useful clinical marker that reflects the disease activity of ILD.²⁶ SP-D, a lung-specific protein, is also

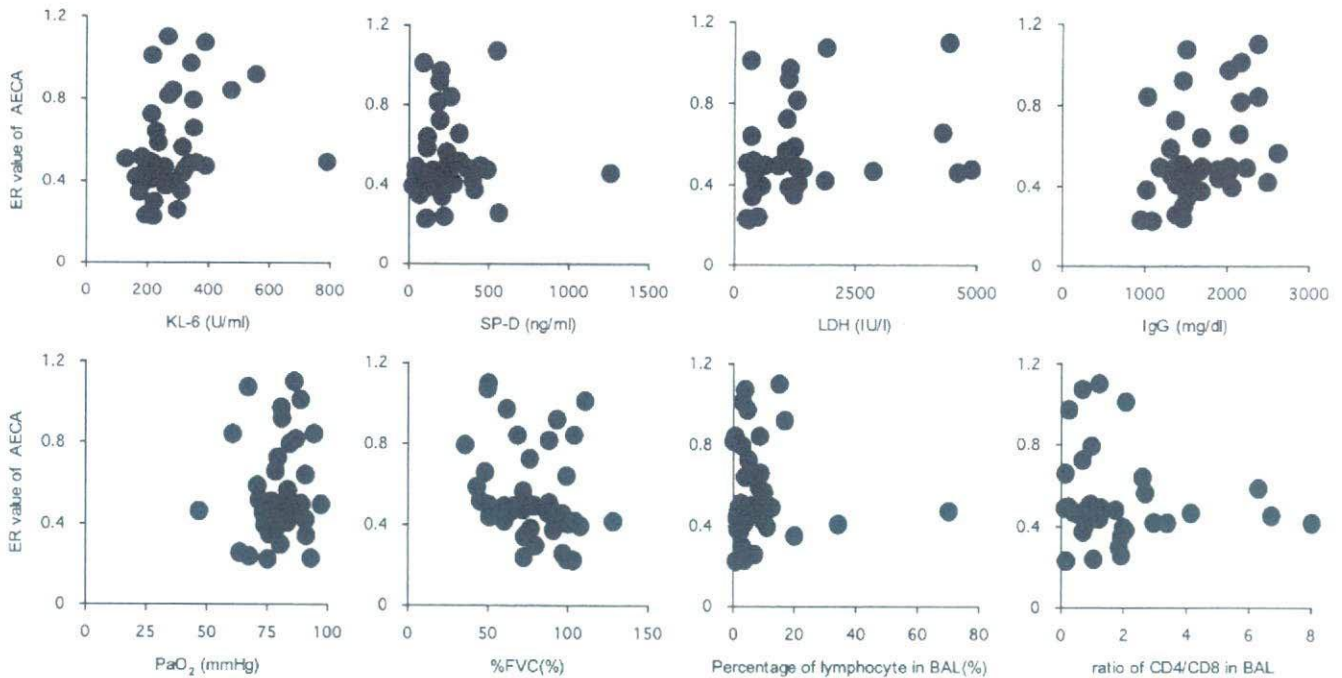


Figure 3 Association of AECA and the findings concerned with ILDs. AECA, anti-endothelial cell antibodies; ER, ELISA ratio; BAL, bronchoalveolar lavage.

considered to be a useful marker of ILD.²⁷ In the present study, no relation was found between the ER values of AECA and these parameters. We also evaluated the relationship in patients with IIP only to exclude the influence of underlying CVD. However, there was no significant correlation among these parameters. Thus, AECA cannot be used as a serum marker that represents disease activity or severity.

ILDs are characterized by damage to the lung parenchyma with varying patterns of inflammation and fibrosis, which mainly target alveolar epithelial cells.^{17,28,29} In addition to these epithelial cell changes, it was recently reported that vascular damage is also present in patients with ILDs.^{18,30} Takabatake et al.¹⁸ demonstrated pulmonary endothelial cell injury in ILD patients by assessing the kinetics of ¹²³I-metaiodobenzylguanidine (¹²³I-MIBG). In patients with ILDs, the rate at which ¹²³I-MIBG was washed out from the lungs, which reflects pulmonary endothelial cell injury, was reduced compared with that in normal controls. Moreover, the washout rate was correlated with parameters for disease severity. In Takabatake's study, however, it is not clear whether the degree of endothelial cell injury differed among histologic subgroups of ILD, because a pathologic diagnosis by surgical lung biopsy was not done. Based on the results of the present study, the expression of AECA may be attributable, in part, to the endothelial cell injury observed in ILD, especially idiopathic NSIP and CVD-ILD. On the other hand, a recent study reported that levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) were decreased in BAL fluids in patients with IIPs and CVD-ILDs.³⁰ The reduction in VEGF, which plays a multifunctional role in the maintenance of vascular structure and function, induces apoptosis of endothelial cells, leading to damage to the microcapillary endothelium. Taken together, these findings suggest that injury to the endothelial cells contributes in part to the

pathological changes in patients with ILDs, and that AECA might be related to this process.

Recently, Margo et al.³¹ indicated the presence of AECA in IPF patients. In contrast to our study, 12 sera from 18 patients reacted with HUVEC. We suppose some reasons for this discrepancy. One is that they used an indirect immunofluorescence technique to detect AECA. Another reason is that the targeted patients differed greatly. They contained cases of pulmonary hemorrhage and lung transplantation. Moreover, all biopsies showed morphologic evidence of microvascular injury, which suggested ILDs associated with vasculitis rather than idiopathic ILDs. In this study, we included biopsy-proven IPF and idiopathic NSIP patients and excluded patients with apparent vasculitis. Studies of ILDs sometimes cause confusion, because intended patients differ from study to study. We need further studies in a larger cohort of biopsy-proven, selected idiopathic patients to improve our understanding of the role of AECA in IIPs.

In conclusion, among IIP patients, we detected AECA only in those with idiopathic NSIP, not those with IPF/UIP, and the prevalence and ER values of AECA in cases of idiopathic NSIP were similar to those in cases of CVD-ILD. Although the role of AECA in ILD remains unclear, this difference in expression level between IPF/UIP patients and idiopathic NSIP patients might be associated with different pathologic processes. In addition, it is suggested that idiopathic NSIP is more similar to CVD-ILD than IPF/UIP in terms of AECA expression. These results may provide important knowledge that contributes to a better understanding of the distinct pathophysiology of each form of IIPs. Further studies will elucidate the characteristics of the antigen recognized by AECA and its precise role in the pathophysiology of ILDs.