

**Table 1** Backgrounds of the patients with chronic hypersensitivity pneumonitis

	UIP / fNSIP like pattern	cNSIP / COP like pattern	P-value
Age (years)	63.3±2.1	59.6±3.6	NS
Gender (Male/Female)	13/11	2/3	NS
Antigen class (avian/ mold or humidifier /others)	8/9/7	1/1/3	NS
Smoking history (+/-)	13/11	2/3	NS
Pack-years	24.4±6.0	5.8±4.5	NS
Pulmonary function test			
VC (% predicted)	71.7±3.5	84.1±9.8	NS
DLco (% predicted)	47.6±3.0	61.5±8.5	NS
FEV <sub>1.0</sub> /FVC (%)*	88.4±1.1	81.3±2.7	0.0433
KL-6 (U/ml)	1689±249	1709±851	NS

Data are shown as mean ± SEM.

Statistical significance was tested by Mann-Whitney U test or Chi-square test.

## A. 研究目的

過敏性肺炎は長期間の抗原暴露により線維化をきたし、病理組織所見より usual interstitial pneumonia (UIP) 類似パターン, fibrotic-non-specific interstitial pneumonia (f-NSIP) 類似パターン, cellular-non-specific interstitial pneumonia (c-NSIP) 類似パターン, cryptogenic organizing pneumonia (COP) 類似パターンの4つのパターンに分類されることが知られている。また、一部の慢性過敏性肺炎症例は治療抵抗性で線維化が次第に進行し、予後不良であることが知られている。しかしながら、慢性過敏性肺炎の病態は十分に解明されていない。

近年、ゲノム研究の進歩により、数十万ヶ所の遺伝子多型情報や数万種類におよぶ遺伝子発現情報を網羅的・体系的に把握することが可能になってきており、様々な疾患の病態に関する研究は飛躍的な進歩を遂げてきた。これにより、各患者の遺伝的多様性と疾患に伴う分子病態の変化を網羅的かつ迅速に新規診断マーカー、治療標的分子をスクリーニングすることが可能になってきた。

本研究の目的は、本研究では外科的肺生検施行された症例における慢性過敏性肺炎の臨床像ならびに分子像を解析することである。同時に慢性過敏性肺炎の新規のバイオマーカーならびに治療標的の候補分子を同定することも目指したい。

## B. 研究方法

2002年から2011年までに外科的肺生検が施行さ

れ、慢性過敏性肺炎と診断した29症例について、臨床病理学的因子を検討した。

さらに病理学的に線維化を伴う10症例の外科的肺生検組織から抽出したmRNAを用いてマイクロアレイによる網羅的発現解析を施行した。マイクロアレイ解析はIllumina Human WG-6 v3 BeadChipsを用いて行った。クラスター解析をM.EisenによるClusterおよびTreeViewのソフトを用いて行った(<http://rana.lbl.gov/eisen/>)。また、得られた発現情報より発現上昇遺伝子と発現低下遺伝子を抽出した。さらに、発現上昇遺伝子の機能的分類を、the NIH DAVID online tools (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究の対象者は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文部省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に沿って作製され、当院のヒトゲノム研究倫理審査研究会で承認された文書によるインフォームド・コンセントが得られた症例とした。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。

## C. 研究結果

### 1) 臨床像の解析

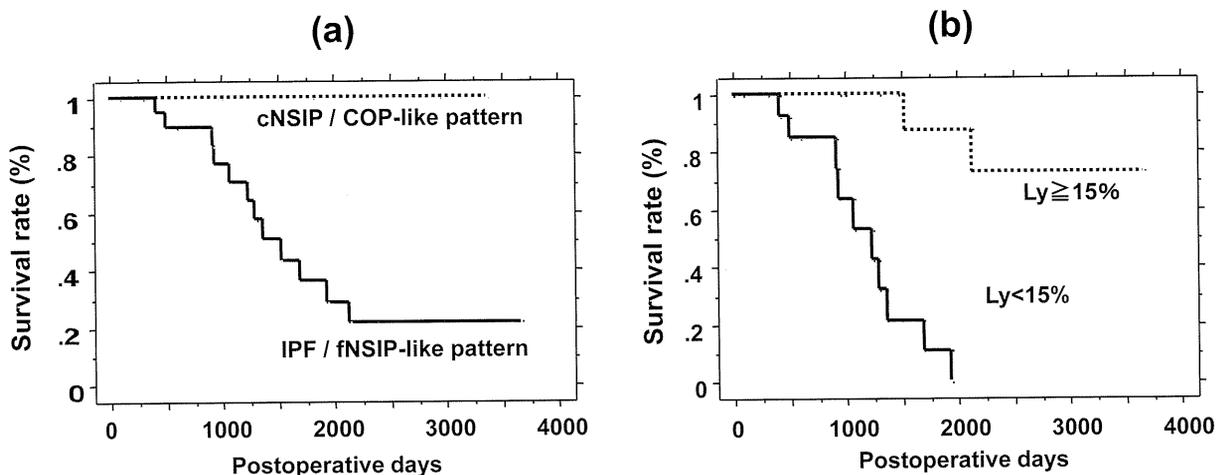
Table 1, 2に示すように、20症例がUIP類似パターン、4症例がfNSIP類似パターン、1症例がcNSIP類似パターン、4症例がCOP類似パターンに分類された。線維化を伴う慢性過敏性肺炎症例群(UIP類似

**Table 2** BALF findings of the patients with chronic hypersensitivity pneumonitis

	UIP / fNSIP like pattern	cNSIP / COP like pattern	P-value
Total cell count ( $\times 10^5/\text{ml}$ )	2.86 $\pm$ 0.36	1.94 $\pm$ 0.32	NS
Macrophages (%)	67.7 $\pm$ 5.8	70.4 $\pm$ 4.8	NS
Neutrophils (%)	4.4 $\pm$ 1.0	4.9 $\pm$ 1.9	NS
Lymphocytes (%)	24.9 $\pm$ 5.9	23.3 $\pm$ 6.2	NS
Eosinophils (%)	3.2 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 0.5	NS
CD4/CD8 ratio	3.1 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.6	NS
Total cell count ( $\times 10^5/\text{ml}$ )	2.86 $\pm$ 0.36	1.94 $\pm$ 0.32	NS

Data are shown as mean  $\pm$  SEM.

Statistical significance was tested by Mann-Whitney U test or Chi-square test.



**Figure 1** Kaplan-Meier survival curves for patients with hypersensitivity chronic pneumonitis, stratified by the presence of fibrosis (a) and BALF findings (b).

パターン、fNSIP類似パターン)と線維化を伴わない慢性過敏性肺炎症例群(cNSIP類似パターン、COP類似パターン)の2群に分けて患者背景を検討したが、FEV<sub>1.0</sub>/FVC (%)は線維化を伴う慢性過敏性肺炎で線維化を伴わない慢性過敏性肺炎と比較して高い傾向を認めた。気管支肺胞洗浄液(BALF)の解析では2群間に有意な差を認めなかった。

さらに、病理組織所見・BALF所見による予後予測の可能性について検討をした。線維化を伴う慢性過敏性肺炎症例群では平均生存期間は4.2年で、線維化を伴わない慢性過敏性肺炎症例群と比較して予後が不良の傾向を認めた。また、BALF所見でリンパ球の増加を認めない症例(リンパ球<15%)はリンパ球の増加を認める症例(リンパ球 $\geq$ 15%)の症例と比較して予後不良の傾向を認めた。

## 2) 線維化を伴う慢性過敏性肺炎の外科的肺生検組織を用いた網羅的発現解析

線維化を伴う慢性過敏性肺炎10症例の外科的肺生検組織から抽出したRNAを用いてマイクロアレイによる網羅的発現解析を施行した。クラスター解析では、線維化を伴う慢性過敏性肺炎10症例は図2に示すように730遺伝子で2群に分かれる傾向を認めたが、明確には分けることはできなかった。

正常肺と比較して線維化を伴う慢性過敏性肺炎では162遺伝子が発現上昇していたのに対して、290遺伝子が発現低下していた。次に発現上昇している遺伝子群の機能的分類を行った。Biological processによって分類するとcell adhesion, biological adhesion, skeletal system development, skeletal system morphogenesis, skeletal system, protein maturation, protein processing, protein maturation by peptide bond cleavageに関連する遺伝子が多かった

(図3). さらに Cellular localization によって分類すると extracellular region, extracellular region part などに関連する遺伝子群が特徴的であり, 膜, 分泌蛋白をコードする遺伝子群が多数含まれていた(図4). Molecular function によって分類すると ion binding, cation binding, metal ion binding, calcium ion binding

などに関連する遺伝子が多かった(図5). 発現上昇遺伝子の属する Pathway 解析では, KEGG pathway 上の complement and coagulation cascades に関連する遺伝子が多かった.

#### D. 考察

本研究では外科的肺生検を行った慢性過敏性肺炎 29 症例の検討では, 線維化を伴う慢性過敏性肺炎, BALF 所見でリンパ球数が 15% 以上に増加しない症例では予後が不良な傾向を認めた. 線維化を伴う 10 症例の外科的肺生検組織から抽出した mRNA をマイクロアレイによる網羅的発現解析を施行した. 発現上昇している遺伝子群の機能的分類により, 発現上昇遺伝子の特徴を知ることができた. これらの遺伝子は, 慢性過敏性肺炎の線維化に関わる分子学的病態を示していた.

本研究で検討した慢性過敏性肺炎 29 症例の臨床像に関しては, 今までの報告と合致するものであった. 今後は, 詳細な画像所見ならびに病理所見を検討することにより, 慢性過敏性肺炎の病態を解明したいと考えている.

慢性過敏性肺炎のクラスター解析においては, 明確に 2 群にクラスターで分けられなかった. しかし, クラスター解析の結果, 生存期間, BALF 所見, 呼

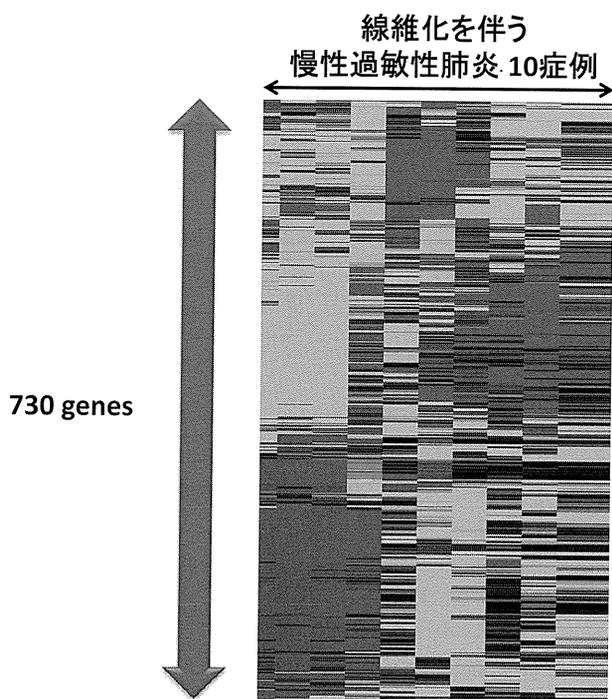


Figure 2 Hierarchical clustering analysis

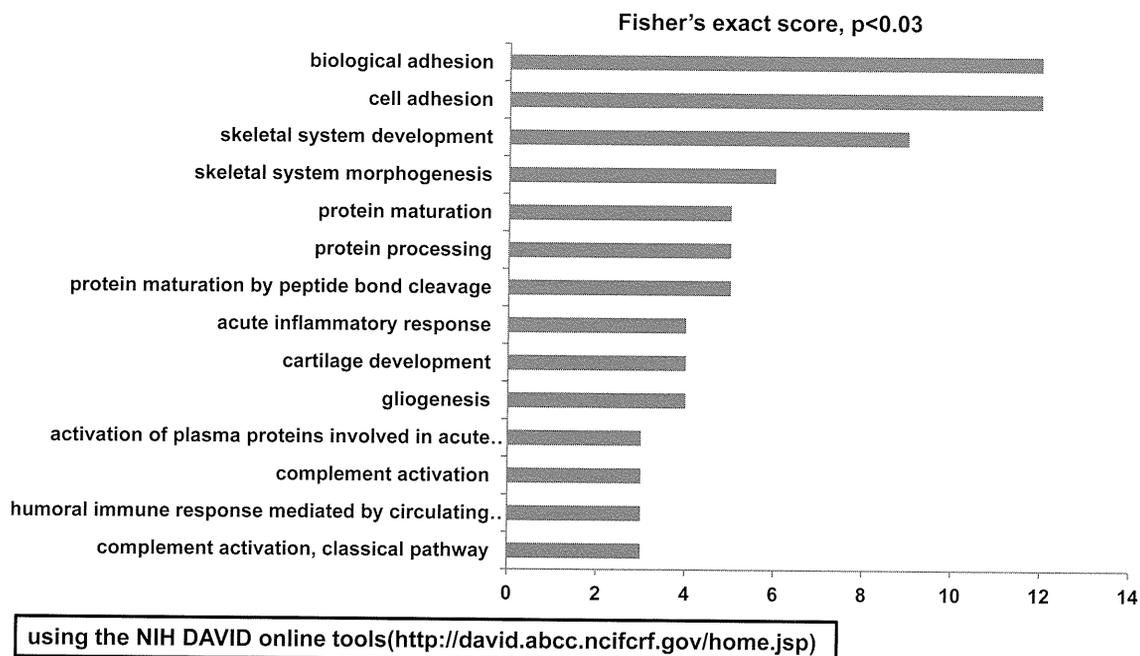


Figure 3 Functional classification of up-regulated genes: Biological process

吸機能検査などとその発現レベルが強い相関を認める遺伝子も存在していた。今後、これらの分子については肺組織を材料に組織免疫染色を行い、Morphometry解析を行うことにより、hyperplastic alveolar epithelium, fibrotic fociなどの肺局所における発現も含めて病理学的意義を詳細に検討すること

を考えている。

発現上昇している遺伝子群の機能的分類では、Biological processによる分類では、skeletal systemやprotein maturationに関連する遺伝子が慢性過敏性肺炎に特徴的な遺伝子と考えられた。Cellular localizationによる分類では、膜、分泌蛋白をコードする遺伝子

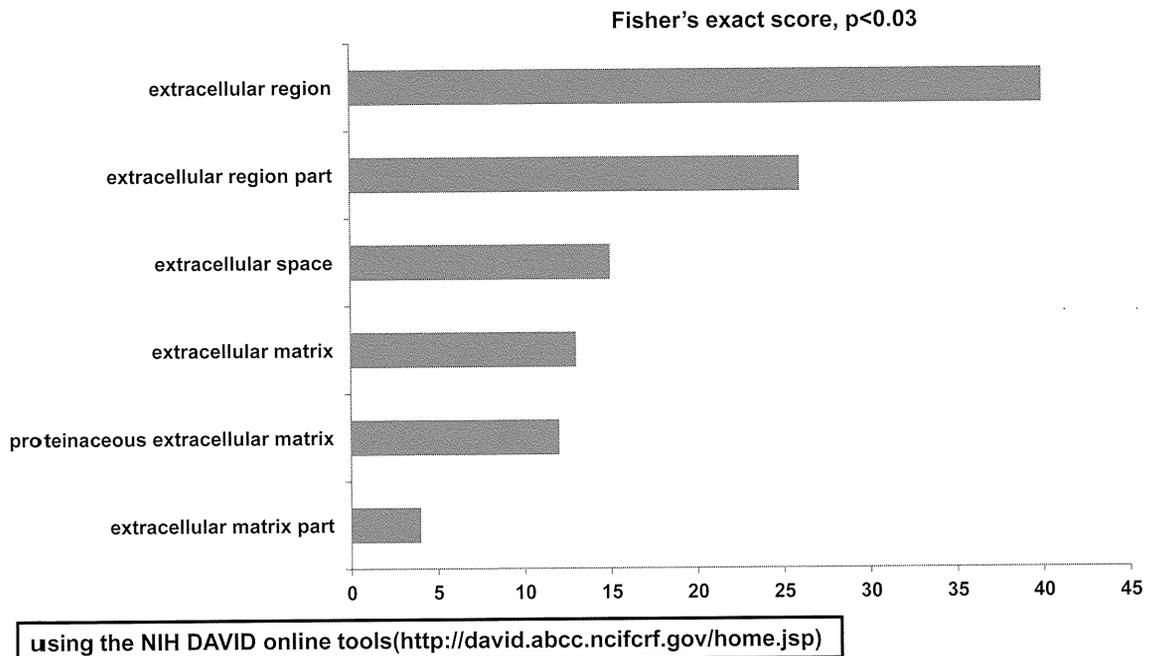


Figure 4 Functional classification of up-regulated genes: Cellular localization

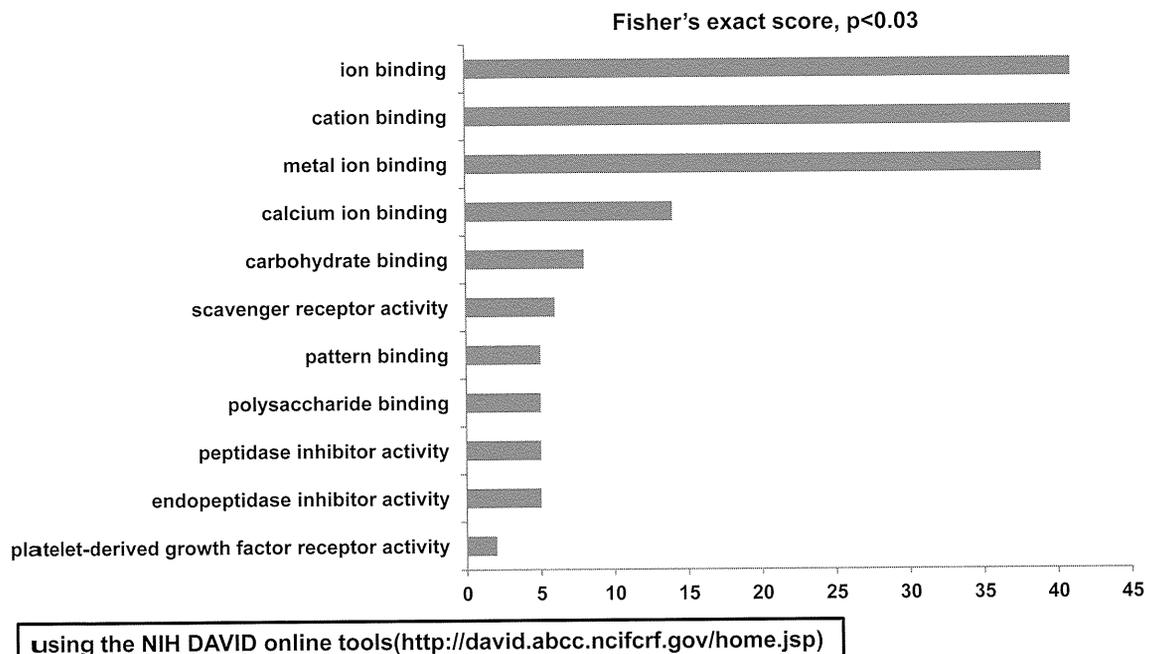


Figure 5 Functional classification of up-regulated genes: Molecular function

群が多数含まれていた。膜、分泌タンパクをコードする分子は、患者の血液中に存在すると予想されるため、血清バイオマーカーとして診断への応用の可能性と抗体療法などの治療への応用可能性があり、今後の解析が期待されると考えられている。また、KEGG pathway 上の complement and coagulation cascades に関連する遺伝子が多かったことは慢性過敏性肺炎に特徴的なものと考えられた。

今後は、膜、分泌タンパクに注目し、新規のバイオマーカーならびに治療標的の候補分子の臨床応用を目指したい。現在までに、私たちはゲノムワイドな遺伝子発現情報解析からバイオインフォマティクス解析、迅速血清診断システム、siRNA とブレオマイシン肺線維症モデルを用いた発現阻害実験などを駆使して効率的にスクリーニングする探索戦略を確立している。今後はこの探索戦略を用いて、(1)慢性過敏性肺炎の新たな血清バイオマーカーを開発すること、及び(2)siRNA を用いた慢性過敏性肺炎に対する新たな治療法を臨床応用するための基盤研究を行うことを目指したいと考えている。

## E. 結論

慢性過敏性肺炎に対する網羅的遺伝子発現解析によって、その分子学的病態を知ることができた。また、新規の血清バイオマーカー、治療標的として多数の解析候補遺伝子を得ることができたので、今後、解析を進めていく予定である。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Kawase S, **Hattori N**, **Ishikawa N**, Horimasu Y, Fujitaka K, Furonaka O, Isobe T, Miyoshi S, Hamada H, Yamane T, Yokoyama A, **Kohno N**. Change in serum KL-6 level from baseline is useful for predicting life-threatening EGFR-TKIs induced interstitial lung disease. *Respir Res* 12: 97, 2011.
- 2) **Ishikawa N**, Mazur W, Toljamo T, Vuopala K,

Rönty M, Horimasu Y, **Kohno N**, Kinnula VL. Ageing and long-term smoking affects KL-6 levels in the lung, induced sputum and plasma. *BMC Pulm Med* 11: 22, 2011.

- 3) **Ishikawa N**, **Hattori N**, Tanaka S, Horimasu Y, Haruta Y, Yokoyama A, **Kohno N**, Kinnula VL. Levels of surfactant proteins A and D and KL-6 are elevated in the induced sputum of chronic obstructive pulmonary disease patients: a sequential sputum analysis. *Respiration* 82: 10-8, 2011.
- 4) Kondo T, **Hattori N**, **Ishikawa N**, Murai H, Haruta Y, Hirohashi N, Tanigawa K, **Kohno N**. KL-6 concentration in pulmonary epithelial lining fluid is a useful prognostic indicator in patients with acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* 12: 32, 2011.
- 5) Nakashima T, Yokoyama A, Inata J, **Ishikawa N**, Haruta Y, **Hattori N**, **Kohno N**. Mucins carrying selectin ligands as predictive biomarkers of disseminated intravascular coagulation complication in acute respiratory distress syndrome. *Chest* 139:296-304, 2011.

### 2 学会発表

- 1) **Ishikawa N**, **Hattori N**, Yoshioka K, Horimasu Y, Ohtsuki Y, Yokoyama A, **Kohno N**. KL-6/MUC1 carrying sialyl Lewis<sup>x</sup> (SLAK) is a new serum biomarker for fibrosing interstitial lung diseases. American Thoracic Society International Conference (2011.5.13-18, Denver)
- 2) Horimasu Y, Ohshimo S, **Ishikawa N**, Tanaka S, Yoshioka K, Bonella F, **Hattori N**, **Kohno N**, Guzman J, Costabel U. Serum KL-6 is a useful diagnostic and prognostic biomarker in idiopathic interstitial pneumonia in German patients. American Thoracic Society International Conference (2011.5.13-18, Denver)
- 3) Kawase S, **Hattori N**, **Ishikawa N**, Horimasu Y, Furonaka O, Isobe T, Hamada H, Yokoyama A, **Kohno N**. Krebs von den lungen-6 (KL-6) is a useful biomarker for life threatening EGFR-TKI related interstitial lung disease. American Thoracic Society International Conference (2011.5.13-18, Denver)

- 4) Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Tanaka S, Yoshioka K, Ohshimo S, Bonella F, Guzman J, Costabel U, Kohno N. Serum SP-A and SP-D: different cutoff values for German and Japanese patients to diagnose idiopathic interstitial pneumonia. European Respiratory Society Annual Congress (2011.9.24-28, Amsterdam)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし.
2. 実用新案登録  
なし.
3. その他  
なし.

# 鳥関連慢性過敏性肺炎の診断における臨床的問題点

橋本 成修<sup>1</sup> 田口 善夫<sup>1\*</sup> 田中 栄作<sup>1</sup> 羽白 高<sup>1</sup> 黄 文禧<sup>1</sup>  
寺田 邦彦<sup>1</sup> 安田 武洋<sup>1</sup> 加持 雄介<sup>1</sup> 中塚 賀也<sup>1</sup> 辻 貴宏<sup>1</sup>  
安田 一行<sup>1</sup> 野間 恵之<sup>2</sup> 小橋陽一郎<sup>3</sup>

【背景】鳥関連慢性過敏性肺炎（以下鳥関連 CHP）の診断において、鳥抗原に体する特異抗体測定が商業化され、簡易的に測定することが可能となり、その有用性が報告されているが、その抗体値の解釈が難しい場合がある。

【目的】当院で診断した鳥関連 CHP における鳥抗原に対する特異抗体の診断への寄与について検討する。

【方法】対象は、2008年1月～2011年7月、当院で慢性間質性肺炎に対し外科的肺生検を施行した47例。鳥関連 CHP 診断に吉澤らの慢性過敏性肺炎の診断基準を用いた。イムノキャップ特異 IgG キット（ファディア株式会社、東京）を用いて、血清のハト IgG、オウム IgG、セキセイインコ IgG を測定した。cut-off 値は、ハト IgG が 14.0mgA/L、オウム IgG が 18.0mgA/L、セキセイインコ IgG が 7.5mgA/L とした。

【結果】鳥関連 CHP と診断したのは10例。鳥抗原に体する特異抗体陽性は8例、リンパ球刺激試験陽性は3例、両者陽性1例。ハト IgG 陽性8例、オウム IgG 陽性6例、セキセイインコ IgG 陽性5例。オウムおよびセキセイインコ IgG 陽性者はいずれもハト IgG 陽性であった。抗原回避を行った4例について、いずれの症例も、回避後、安定した経過を示した。

【考案】イムノキャップ法を用いた鳥抗原に対する特異抗体の測定は簡便で有用であるが、cut-off 値次第で診断が左右される可能性がある。当院で診断した鳥関連 CHP に対し別の cut-off 値を用いた場合、半数以上が偽陰性となり診断に至らなかった可能性があった。抗体値のみならず、臨床経過、画像、病理組織など総合的に判断する必要がある。

【結論】イムノキャップ法を用いた鳥抗原に対する特異抗体測定は簡便である一方、その解釈には注意を要し、総合的な判断が必要である。

---

<sup>1</sup> 天理よろづ相談所病院 呼吸器内科

<sup>2</sup> 同 放射線部

<sup>3</sup> 同 医学研究所

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

## 緒 言

慢性経過を呈する間質性肺炎の中に、鳥関連慢性過敏性肺炎(以下鳥関連CHP)が存在している可能性があり、それを特発性間質性肺炎と鑑別することは重要である<sup>1)</sup>。吉澤らの診断基準<sup>2)</sup>によると、CHPの診断には、臨床症状や呼吸機能、画像あるいは病理組織による評価のほか、環境誘発や抗原吸入誘発試験、もしくは当該抗原に対する抗体あるいはリンパ球増殖試験が必要である。しかし、誘発試験や抗体などの検査が可能な施設は限られており、臨床現場の多くでは検査の実施そのものが難しいのが現状である。

最近、鳥抗原に体する特異抗体測定が商業化され、簡易的に測定することが可能となり、鳥関連CHPの診断への有用性が報告されているが、その抗体値の解釈について難しい場合がある<sup>3)5)</sup>。

今回、当院で診断した鳥関連CHPにおける鳥抗原に対する特異抗体の診断への寄与について検討する。

## 対象・方法

対象は、2008年1月から2011年7月の間に、当院で慢性間質性肺炎に対し外科的肺生検を施行した47例である。鳥関連CHP診断には、吉澤らの慢性過敏性肺炎の診断基準を用いた。鳥抗原に対する特異抗体の測定には、イムノキャップ特異IgGキット(ファディア株式会社、東京)を用いて、血清のハトIgG、オウムIgG、セキセイインコIgG抗体値を測定した。鳥の糞、羽毛などの抽出物を抗原として使用している。特異抗体のcut-off値は、2009年に当院より報告したものを採用しており<sup>4)</sup>、ハトIgGが14.0mgA/L、オウムIgGが18.0mgA/L、セキセイインコIgGが7.5mgA/Lとした。この3種類のうちいずれかが陽性的の場合、特異抗体陽性と判定した。ハト血清リンパ球刺激試験(以下LST)はSI値200%以上を陽性とした<sup>6)</sup>。

## 結 果

外科的肺生検を施行した47例中、鳥関連CHPと診断したのは10例であった。平均年齢67.6歳、男

表1. 鳥抗原に対する特異抗体とLST

患者番号	ハトIgG	オウムIgG	セキセイインコIgG	LST
①	32.0	39.1	34.5	241.2
②	29.8	30.8	16.0	162
③	28.4	29.0	11.0	102.6
④	26.6	20.1	8.0	161
⑤	15.5	25.7	15.2	115.7
⑥	19.4	18.7	5.8	188.5
⑦	28.9	7.8	7.4	95.8
⑧	21.0	16.3	5.2	—
⑨	—	—	—	269.2
⑩	8.7	9.5	4.9	205.1

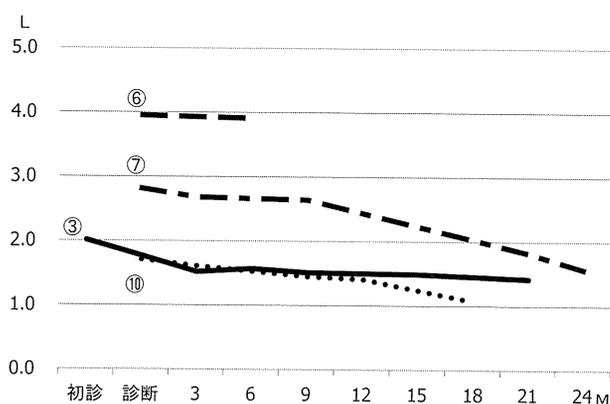


図1. 抗原回避例でのVC変化

性8名、女性2名、潜在性発症型8例、再燃症状軽減型2例であった。

鳥抗原に体する特異抗体陽性者は8名、LST陽性者は3名、両者陽性1名であった(表1)。特異抗体の内訳は、ハトIgG陽性8名、オウムIgG陽性6名、セキセイインコIgG陽性5名であった。オウムおよびセキセイインコIgG陽性者はいずれもハトIgG陽性であった。

鳥関連CHPと診断された10例の初期対応について、抗原回避4例、薬物治療4例(ステロイド+免疫抑制剤:3例、ステロイド単剤:1例)、不明2例であった。抗原回避を行った4例について、いずれの症例も、改善はないものの一定期間は安定した経過を示した(図1)。患者番号③について、初診時から診断まで時間経過があり、その間にVCの低下を認めていたが、診断後、抗原回避を行ったところ、以後VCは低下せず、約1年半安定した経過をたどった。

## 考 察

最近、稲瀬らより、鳥関連過敏性肺炎の診断におけるイムノキャップ法の有用性について報告された<sup>3)</sup>。その報告では、急性鳥関連過敏性肺炎の診断においてハト・セキセイインコの特異抗体は感度・特異度とも優れ、診断において極めて有用であり、慢性鳥関連過敏性肺炎の診断においても、感度が30%弱と低いが、特異度は100%と高く、簡便に使用できる検査法としては価値あるものとしている。慢性過敏性肺炎では、抗体陽性率が低いことが知られており、特に潜在性発症型では陽性率が35%程度であると報告されており、妥当な結果ともいえる。しかしながら、稲瀬らが報告しているcut-off値を採用した場合、当院の症例に当てはめると、患者番号1, 2, 5の3例のみがセキセイインコIgG陽性となり、その他の5例は鳥関連CHPの診断に至らず、特発性間質性肺炎と診断されていた可能性がある。従って、当院のcut-off値を用いても十分診断に寄与していたことがわかる。

特異抗体のcut-off値について、当院で用いたものは稲瀬らの報告<sup>3)</sup>に比し低い値を採用しており、当然のことながら、当院のcut-off値では稲瀬らの報告に比し、感度が上がり特異度が低いことがわかる(表2)。

ただ、2009年の当院の報告<sup>4)</sup>と、稲瀬らの報告<sup>3)</sup>をみると、コントロールとしている健常者の特異抗体値に違いがあることがわかった。例えば、健常者のハトIgGにおいて、当院の平均は $7.70 \pm 3.4\text{mgA/L}$ (最小値3.03, 最大値16.4)、一方、稲瀬らの報告では $16.6 \pm 1.9\text{mgA/L}$ と当院の方が低く、cut-off値およびその感度・特異度に影響している可能性は否定できない。

もちろん、cut-off値は感度・特異度の最もよいところで設定するものであるが、当然のことながら、偽陽性・偽陰性の問題があるため、抗体値に偏重せず、臨床経過(接触歴も含め)、画像、病理を総合的に判断することが重要と考える。

表2. 特異抗体cut-off値及び感度・特異度

特異抗体		当院	稲瀬ら
ハト	cut-off	14.0	35.9
	感度	94%	27%
	特異度	88%	100%
セキセイインコ	cut-off	7.5	13.4
	感度	94%	27%
	特異度	97%	100%

イムノキャップ特異IgGを用いた鳥抗原に対する特異抗体の更なる検討のため、今後、より大規模で、かつコントロール群や膠原病肺など他疾患群との比較などが必要と考える。

## 文 献

- 1) 田口善夫. : IPFの多くは慢性過敏性肺炎か. 呼と循2008;56:1021-26.
- 2) 吉澤靖之, 宮崎泰成, 大谷義夫, 他: 特発性肺線維症とその周辺. 類縁疾患と治療. 3. 慢性過敏性肺炎. 最新医学2005;60:2617-24.
- 3) 羽白高, 田口善夫, 田中栄作, 他: イムノキャップ特異IgGキットを用いたハトIgG抗体値測定の試み. びまん性肺疾患に関する調査研究班 平成20年度研究報告書. 158-161.
- 4) 羽白高, 田口善夫, 田中栄作, 他: イムノキャップ特異IgGキットを用いたハト・オウム・セキセイインコIgG抗体値のカットオフ値の検討. びまん性肺疾患に関する調査研究班 平成21年度研究報告書. 187-89.
- 5) 稲瀬直彦, 鶴浦康司, 宮崎泰成, 他: 鳥関連過敏性肺炎の診断における鳥特異抗体. 日呼吸会誌2011;49:717-22.
- 6) 井上哲郎, 田中栄作, 櫻本稔, 他: 鳥関連慢性過敏性肺炎8例の臨床的検討. 日呼吸会誌2006;44:550-55.

# 環境中鳥関連抗原の測定

筒井 俊晴 宮崎 泰成 稲瀬 直彦\*

【目的】過敏性肺炎は特異抗原のアレルギー性反応による間質性肺炎であり、診断治療において抗原の特定および居住環境の関与の有無が重要である。鳥関連過敏性肺炎においては鳥飼育歴がなくとも周囲環境による無自覚曝露・間接曝露を受けている可能性がある。そこで鳥関連抗原の曝露状況を定量的に評価することを目的として、鳩糞抽出物(pigeon dropping extracts, PDE)を用いて居住環境中の鳥関連抗原の測定系を確立した。【対象と方法】疑い例を含む鳥関連過敏性肺炎患者、無症候性鳥飼育者、健常非曝露者の3群で自宅室内よりダストサンプルを採取し sandwich ELISA 法でサンプル中の PDE 濃度を測定した。抗 PDE 多クローン抗体および単クローン抗体を作製し、固相化に抗 PDE 多クローン抗体、検出抗体に抗 PDE 単クローン抗体をそれぞれ使用した。【結果】無症候性鳥飼育者および自宅敷地内で鳥を飼育していた直接曝露のある鳥関連過敏性肺炎疑い患者の2例で高濃度の PDE を検出した。また鳥飼育歴がなく、羽毛布団や鶏糞肥料の使用および近隣住居からの間接曝露で発症したと考えられる慢性鳥過敏性肺炎患者の自宅室内からも直接曝露症例と同程度に高濃度の PDE を検出した。また健常非曝露者においても微量の PDE を検出した。【結論】本法による鳥関連抗原の測定で、直接鳥飼育がない症例においても鳥飼育者と同程度に高濃度の PDE を検出することができた。本法は鳥関連抗原間接曝露の証明および鳥関連過敏性肺炎患者における抗原回避の指標として臨床応用できる可能性が示唆された。

---

東京医科歯科大学呼吸器内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

## 「背景」

過敏性肺炎は特異抗原のアレルギー性反応による間質性肺炎であり、診断治療において抗原の特定および居住環境の関与の有無が重要である。鳥関連過敏性肺炎においては鳥飼育歴がなくとも周囲環境による無自覚曝露・間接曝露を受けている可能性がある。これまでに間接曝露による発症を疑われた鳥関連過敏性肺炎の報告が散見されるが<sup>1)2)3)4)</sup>、これを証明する方法については明らかにされていない。そこで鳥関連抗原の曝露状況を定量的に評価することを目的として、鳩糞抽出物(pigeon dropping extracts, PDE)を用いて居住環境中の鳥関連抗原の測定を行った。

## 「対象と方法」

疑い例を含む鳥関連過敏性肺炎患者、無症候性鳥飼育者、健康非曝露者の3群で自宅室内よりダストサンプルを採取した。

### 1) 検体収集

ハウスダスト収集などに用いられる専用キット(DUSTREAM™ Collector, INDOOR Biotechnologies, Inc., Charlottesville, VA, USA)を用いた(図1)。所属の40μmのフィルターをキット上部に取り付け、キット全体を自宅用掃除機のノズル先端に固定する。掃除機をかける要領で在室時間の長いリビングや寝室、書斎の隅や窓の棧などからダストサンプルを採取した。得られたサンプルは紙くず、頭髮などの大きな混入物を目視下に除去した後、100mgをPBST 4mlに溶解しHorizontal mixerにて2時間攪拌した。溶解液上清を40μmのフィルターでろ過し、-20℃で保存した。

### 2) 抗体作製

PDEは都内で採取した新鮮な鳩糞を24時間20倍量のPBSで溶解し透析膜にて透析後-80℃で保存し

た<sup>5)</sup>。PDEに対する多クローン抗体および単クローン抗体を下記手順で作製した。多クローン抗体の作製についてはColiganらが報告した方法を用いた<sup>6)</sup>。7週齢雌のウサギ(Japan white Rabbit)をComplete Freund's adjuvant(Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA)を混合したPDE 300μgで2週毎に免疫し、免疫後の抗体価が十分に上昇していることを確認した後、protein A(ImmunoPure IgG Purification Kit, Pierce, Rockford, IL, USA)を用いてIgG分画のみ精製し抗PDE多クローン抗体を作製した。抗PDE単クローン抗体の作製は6週齢雌のマウス(BALB/c)を免疫して行った。Complete Freund's adjuvantを混合したPDE 100μgで2週毎に免疫し、脾臓細胞と骨髄腫細胞をPEG下で融合させ抗体産生能を有するハイブリドーマを作製した。ELISA法にて特異性の高い産生能をもつ株をスクリーニングし、マウスの腹腔内でクローニングして抗PDE単クローン抗体を作製した。(本学病理部江石義信先生との共同研究)

### 3) 測定

抗原量の測定は抗PDE抗体を用いてSandwich ELISA法で行った。抗PDE多クローン抗体を10μg/mlの濃度でELISAプレート(Immulon 2HB Flat Bottom Microtiter Plates, Thermo Electron, Inc., Milford, CT, USA)に100μl固相化し、PBSTで3回洗浄した後1%BSA in PBS 200μlでブロッキングした。洗浄後抗原(PDE 10mg/ml)の10倍希釈系列およびサンプルをそれぞれ100μl添加し90分37度で静置。次に検出抗体として10μg/mlの抗PDE単クローン抗体を100μl添加し2時間室温で静置。さらに20000倍希釈したビオチン標識二次抗体(Biotynylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody [BA-9200], Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を添加し1時間室温で静置。最後に200倍希釈のHRP標識ストレプトアビジン(Streptavidin-HRP, R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)100μlを添加し、遮光して20分室温で静



図1 DUSTREAM™ Collector

置した。発色基質 (Substrate Reagent Pack, R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を添加し, 20分遮光して反応させた後450nmで吸光度を計測した。抗原の希釈系列から得られた標準曲線よりサンプル中のPDE濃度を算出した(図2)。

## 「結 果」

鳥関連過敏性肺炎患者または疑い患者9例, 無症候性鳥飼育者1例, 健常非曝露者2例の計12例で測定を行った(表1)。室内に2羽の鳩を飼育している無症候性鳥飼育者では1gのダストサンプル中に

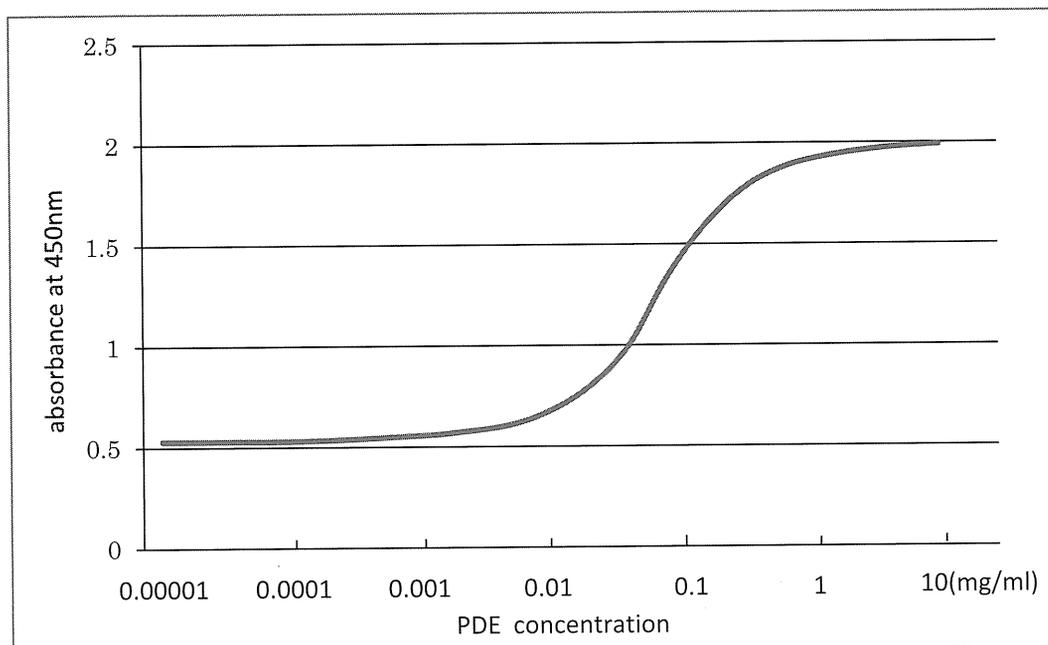


図2 PDE希釈系列による標準曲線

表1 臨床情報および抗原量測定結果のまとめ

症例	年齢	性別	群	鳥飼育*	間接曝露 <sup>+</sup>	血清抗PDE抗体	LST	抗原量(μg/g)
1	60	M	cBRHP	(-)	(+)	(+)	(+)	142
2	61	M	possible cBRHP	(-)	(+)	(+)	(-)	24.4
3	72	M	possible cBRHP	(-)	(+)	(+)	(-)	ND
4	68	M	possible cBRHP	(-)	(+)	(-)	N/A	ND
5	76	F	possible cBRHP	(-)	(+)	(-)	N/A	ND
6	66	F	possible cBRHP	(-)	(+)	(+)	(-)	3.2
7	33	M	healthy volunteer	(-)	(-)	N/A	N/A	3.2
8	69	F	possible cBRHP	(-)	(+)	(+)	N/A	ND
9	25	F	asymptomatic breeder	(+)	(+)	N/A	N/A	193.2
10	60	M	probable cBRHP	(+)	(+)	(+)	N/A	185.2
11	59	M	cBRHP	(-)	(+)	(+)	N/A	ND
12	34	M	healthy volunteer	(-)	(-)	N/A	N/A	26.4

LST=lymphocyte stimulation test

cBRHP=chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis

\*:present breeding, <sup>+</sup>:using feather quilt, poultry manure and so on

N/A=not applicable

ND=not detected

193.2 $\mu$ gのPDE(乾燥重量換算)を検出した。また自宅敷地内で鶏を2羽飼育し、200mほど離れた民家で数百羽のレース鳩を飼育する環境で生活していた症例10においても鳥飼育者と同程度のPDEを検出した。当院で慢性鳥関連過敏性肺炎と診断した症例1では鳥飼育歴はないものの、羽毛布団使用、鶏糞肥料使用、隣家で鳩を数羽飼育しているという曝露状況であったが、142 $\mu$ g/gと飼育者とはほぼ同程度に高濃度のPDEを検出した。また健常非曝露者の自宅室内においても数 $\mu$ gのPDEを検出した。今回の測定においては健常非曝露者でもある程度のPDEを検出することができたため、1 $\mu$ g/g以下のPDE濃度については検出感度以下としたが、サンプル濃度を調整することで1 $\mu$ g/g以下の濃度でも測定することが可能である。

## 【考 察】

今回我々は抗PDE多クローン抗体に加えて、単クローン抗体を用いることで微量域のPDE検出が可能にすることができた。羽毛布団、ダウンジャケット、鳥類剥製、鶏糞肥料など間接曝露の原因となりうる因子のない環境においても微量なPDEを検出したことから、大気中に浮遊する鳥関連抗原が自宅サンプル中のPDE濃度に影響を及ぼした可能性が示唆された。

過去に当科より倉持らが「鳥関連過敏性肺炎における環境中鳥関連抗原量の測定に関する研究」としてsandwich ELISA法による鳥関連抗原の測定法について報告した<sup>7)</sup>が、検出抗体として抗PDE多クローン抗体をビオチン化して使用した。鳥関連過敏性肺炎患者の居住環境において健常非曝露者と比較して有意に抗原量が多かったと結論したが、その際自宅敷地内に数百羽のレース鳩を飼育する患者のダストサンプルにおいても数 $\mu$ gの量しか検出されなかった。今回の測定系では、同じような環境で採取したダストサンプルにおいても過去の報告と比較して高濃度のPDEが検出できた。多クローン抗体による非特異的反応が強く、バックグラウンドの吸光度が高くなってしまふことが検出力に影響を及ぼしたものと推察される。抗PDE単クローン抗体を使用することで、非特異的反応を抑えることができたため検出感度が向上したと考えられる。

過敏性肺炎の治療において抗原回避は重要であるが、鳥関連過敏性肺炎においては間接曝露を受けやすく、環境整備後もその有効性を評価することは難しい。また、近隣での鳥飼育状況や周辺の自然環境などでも自宅内で曝露する抗原量に差が出てくる可能性があり、詳細な接触歴の問診を行っても曝露状況を正確に評価することは難しい。鳥関連抗原の曝露状況を定量的に評価することで、抗原回避前後での抗原量の変化を確認することが可能となる。したがって環境中鳥関連抗原量の測定を行うことで、鳥関連過敏性肺炎患者における抗原回避の治療効果をより一層明確に評価することができる。今後はサンプル数を増やし、鳥関連抗原の曝露状況を定量的に評価した上で予後との関連について検討したい。また間接曝露の証明や環境整備の有効性についても臨床応用していくことを考えている。

## 【結 論】

抗PDE単クローン抗体を用いたsandwich ELISA法により環境中鳥関連抗原の測定を行った。健常非曝露者の自宅室内においても微量のPDEを検出することが可能であったことから、本法のPDE検出感度は良好であったと考えられる。直接鳥飼育がない症例においても鳥飼育者と同程度に高濃度のPDEを検出することができた。本法は鳥関連抗原による間接曝露の証明および鳥関連過敏性肺炎患者における抗原回避の指標として臨床応用できる可能性がある。

## 参考文献

- 1) Kokkarinen JI, Tukiainen HO, Terho EO. Hypersensitivity pneumonitis due to native birds in a bird ringer. *Chest* 1994;106:1269-71.
- 2) Du Marchie Sarvaas GJ, Merkus PJ, de Jongste JC. A family with extrinsic allergic alveolitis caused by wild city pigeons: A case report. *Pediatrics* 2000;105:E62-5.
- 3) Choy AC, Patterson R, Ray AH, Roberts M. Hypersensitivity pneumonitis in a raptor handler and a wild bird fancier. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;74:437-41.

- 4) Saltoun CA, Harris KE, Mathisen TL, Patterson R. Hypersensitivity pneumonitis resulting from community exposure to Canada goose droppings: when an external environmental antigen becomes an indoor environmental antigen. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;84:84-6.
- 5) Tebo TH, et al. Antigens in pigeon breeder's disease: isolation of a homogeneous antigen from pigeon dropping extract and its relationship to pigeon serum antigens. *J Reticuloendothel Soc* 1975;18:196-203.
- 6) Coligan JE, et al. *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley and Sons, 1997;1-9.
- 7) Kuramochi J, Inase N, Takayama K, Miyazaki Y, Yoshizawa Y. Detection of indoor and outdoor avian antigen in management of bird-related hypersensitivity pneumonitis. *Allergology International* 2010;59:223-228.

# IV. 基 礎 研 究

## IPF 急性増悪の遺伝子解析 (萩原弘一)

# 特発性肺線維症急性増悪および薬剤性肺障害に關与する 日本人特異的遺伝素因に關する研究

研究協力者 埼玉医科大学医学部教授 萩原弘一

本研究は、薬剤性肺障害および特発性肺線維症急性増悪に關与する遺伝因子の同定を目的としている。近年、日本人肺の脆弱性が指摘されている。(1) 薬剤性肺障害が他国(西洋や他のアジア人)より高頻度で見られ、高率に致死的な経過をたどること、(2) 肺線維症を有する患者で他国より高頻度に急性増悪が起り、高い致死率を示すと推定されることが典型例である。薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪に關与する遺伝因子は多数あると想定されるが、その中でも特に強く關与する遺伝因子を1つ想定すると、民族差を説明しやすい。この考察を支持するものとして、集団の中で良く見られる疾患でも、一人の先祖から生じ集団内に広がった遺伝因子が關与しているという「common disease-common variant-common origin 仮説」がある。本研究では、(1) 薬剤性肺障害に關与する遺伝因子が「common disease-common variant-common origin 仮説」に従い日本人に広がった、(2) 特発性肺線維症急性増悪に關与する遺伝因子も「common disease-common variant-common origin 仮説」に従い日本人に広がった、という作業仮説にて研究を行っている。

サンプル採集は、薬剤性肺障害および特発性肺線維症急性増悪が疑われる呼吸器疾患患者より、末梢血リンパ球を採取、DNAを分離するとともに、EBウイルスを感染させてB細胞を不死化し、再度のDNA調整に備えている。

今後サンプル収集を継続し、全ゲノムハプロタイプ解析、全ゲノム関連解析、全ゲノムコピー数解析、Homozygosity mapping on homozygosity haplotypeなど、各種手法による解析を行う予定である。

## A. 研究目的

本研究は、薬剤性肺障害および特発性肺線維症急性増悪に關与する遺伝因子の同定を目的としている。

近年、日本人肺の脆弱性が指摘されている(Azuma A, Hagiwara K, Kudoh S. *Am J Respir Crit Care Med.* 177:1397, 2008). (1) 薬剤性肺障害が他国(西洋や他のアジア人)より高頻度で見られ、高率に致死的な経過をたどること(Azuma and Kudo, *JMAJ* 50:1-7, 2007: 表 1), (2) 肺線維症を有する患者で他国より高頻度に急性増悪が起り、高い致死率を示すと推定されることが(Azuma et al. *Am J Respir Crit Care Med.* 177:1397, 2008)が典型例である。これ以外にも(3) 皮膚筋炎に伴うびまん性肺胞障害(DAD)型の急性間質性肺炎は海外では非常に少ない(Kameda et al. *J Rheumatol* 34:1719, 2005 及び 亀田私信). (4) 肺線維症

合併肺手術後の肺線維症急性増悪は海外にはあまり見られない(工藤私信)などがある。日本人は、特定の条件下で、びまん性肺胞障害(DAD)を起こしやすいようだ。

世界に民族差が明確な疾患は多数ある。病態に明確な民族差がある場合、民族特異的な遺伝因子があると考えられる。好例は「下戸の遺伝子」(ALDH2の変異遺伝子: アルコール代謝機能が低下する)である。「酒が飲めない人」は東洋人に限られる。「下戸の遺伝子」は中国で生じ、地域で広がったものからである(Goeddel et al. *Hum Genet* 88:344, 1992). 日本には弥生時代に渡来人がもたらした。日本に入って2000年程度という新しい遺伝子だが、現日本人に高率に見いだされる(Shibuya et al. *Am J Hum Genet* 43:741, 1988). 特殊な状況(「下戸の遺伝子」ではアルコール摂取)のみで明確になる遺伝子は通

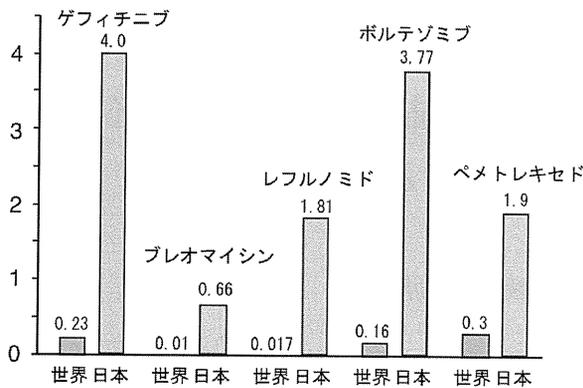


図1 日本と世界の薬剤性肺障害発生率  
日本人は特定の薬剤で薬剤性肺障害を起こしやすい

常の生活では選択を受けないため、集団内に広がりやすい。

薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪に関与する遺伝因子は多数あると想定されるが、その中でも特に強く関与する遺伝因子を1つ想定する(下戸におけるALDH2のように)と、民族差を説明しやすい。その遺伝因子が過去の日本で生じたと仮定すると、日本は島国であるため、日本でのみ高率に見られる疾患が生じる。肺の防御力を弱める遺伝因子なら、薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪等の共通の原因にもなりうるだろう。

この考察を支持するものとして、集団の中で良く見られる疾患でも、一人の先祖から生じ集団内に広がった遺伝因子が関与しているという「common disease-common variant-common origin仮説」がある(図2)。呼吸器では $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症、嚢胞性線維症がこの仮説に当てはまる。近年、この仮説は広く多因子疾患に当てはまることが分かって来た。現在施行されている疾患遺伝子解析の多くは、この仮説に基づいて開発された全ゲノム関連解析(genome-wide association study:GWAS)を用いて行なわれている。呼吸器でも「ドイツのサルコイドーシスに関与する遺伝子(Hoffman et al. Nat Genet 40:1103, 2008)」「ヨーロッパの肺癌に関与する異常ニコチン受容体遺伝子(Thorgeirsson et al. Nature 452:638, 2008)」が見つかっている。

本研究では、(1)薬剤性肺障害に関与する遺伝因子が「common disease-common variant-common origin仮説」に従い日本人に広がった、(2)特発性肺線維症急性増悪に関与する遺伝因子も「common disease-common variant-common origin仮説」に従い日本人

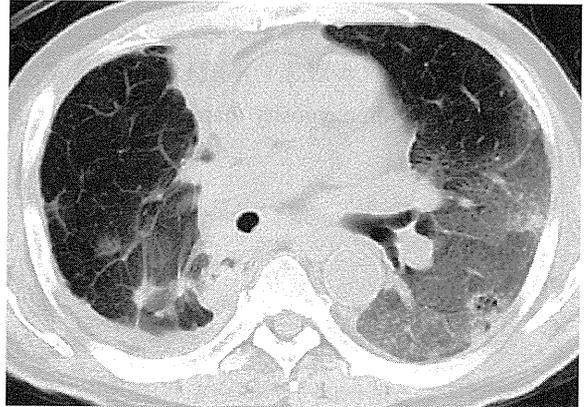
に広がった、という作業仮説のもと、両者が同一である可能性、異なる可能性を共に考慮に入れながら、各種解析手法により、両者の遺伝因子を特定する。両者の遺伝因子が同一か否か、比較対照しながら平行して研究する。

## B. 研究方法

本研究では、特発性肺線維症、薬剤性肺障害を発症した患者より末梢血リンパ球を採取し、EBウイルスで不死化して保存するとともに、DNAを採取し、高密度SNP(単塩基多型)アレイにてSNP遺伝子型を決定する。さらに、高速シーケンサーを用いてエクソーム解析を行う。これとともに、患者画像を含めた臨床情報を収集する。臨床情報に基づき、収集患者を再分類し、少数例での遺伝解析が可能なHM法、HH法、HMonHH法を主として使用し、疾患遺伝子の同定を行う。

以下に、本研究で収集した患者のCT画像を提示する。

図2 薬剤性肺障害CT画像



ゲフィチニブによる薬剤性肺障害

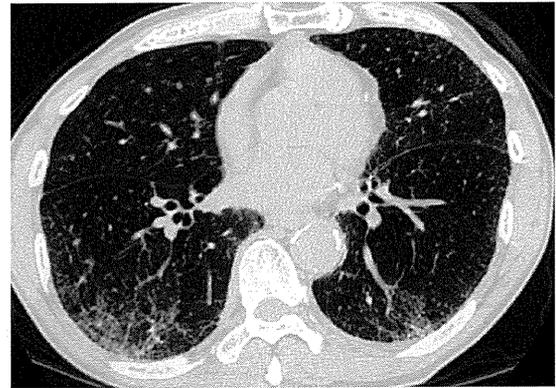


バクリタキセルによる薬剤性肺障害



ブレオマイシンによる薬剤性肺障害

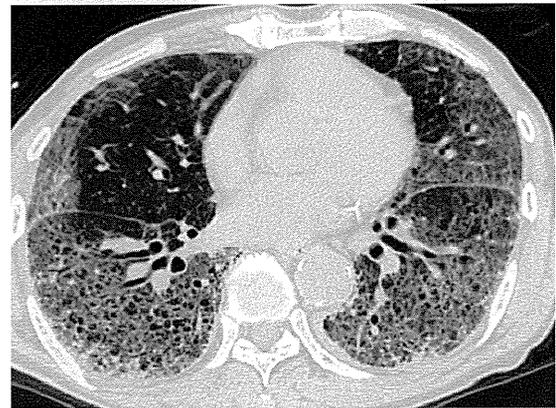
パクリタキセルによる薬剤性肺障害



発症前

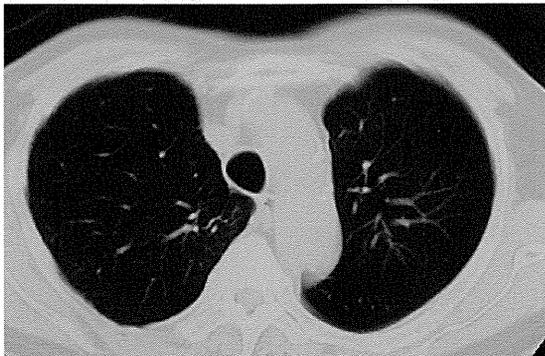


ドセタキセルによる薬剤性肺障害



発症後

図3 発症前後の画像の提示  
ゲフィチニブによる薬剤性肺障害



発症前

UFTによる薬剤性肺障害



発症前

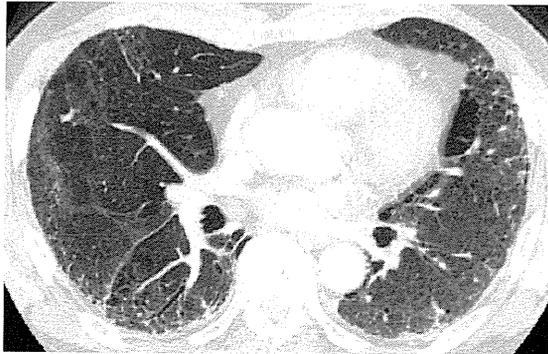


発症後

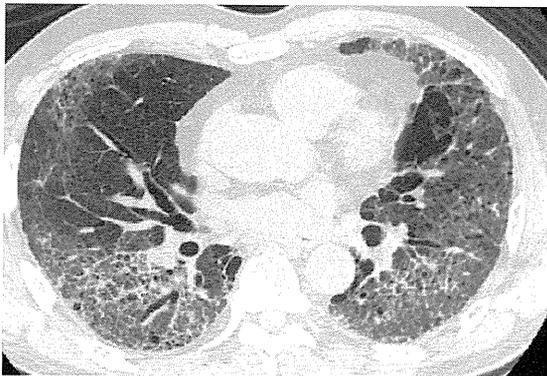


発症後

特発性肺線維症患者にトポテカン投与して発症した間質性肺疾患。この症例では特発性肺線維症急性増悪ともトポテカンによる薬剤性肺障害とも言え、両者は区別できない。



発症前



発症後

現在、さまざまな薬剤を原因とした薬剤性肺障害、特発性肺線維症急性増悪症例が収集されているが、そのリストを以下に示す。現時点で臨床データが収集されておらず、この表に加えていないものも多数ある。

- |             |    |            |     |
|-------------|----|------------|-----|
| • イレッサ+タルセバ | 41 | • S-1      | 4   |
| • ドセタキセル    | 23 | • インターフェロン | 3   |
| • メトトレキサート  | 11 | • UFT      | 2   |
| • バクリタキセル   | 11 |            |     |
| • アリムタ      | 8  |            |     |
| • アムルピシン    | 8  |            |     |
| • アミオダロン    | 7  | • IPF AE   | 109 |
| • ゲムシタビン    | 6  |            |     |
| • 漢方薬       | 6  |            |     |
| • イリノテカン    | 4  |            |     |
| • レボフロキサシン  | 4  |            |     |

誤診の評価、遺伝子の効果の評価

薬剤性肺障害の診断は、他疾患を除外してなされるので、誤診が起こりやすいと考えられる。

本研究では肺障害の原因となる効果の強い遺伝子を想定しているが、肺障害に特定の遺伝子多型、遺伝子変異とどの程度一対一対応しているかにより、遺伝子同定に必要な症例数が異なる。誤診が少なく、遺伝子の効果が大きなほど、責任遺伝子の同定が容易になる。

図4 収集症例と実際の責任遺伝子を保有する症例とのずれ

遺伝子Xの多型、  
変異

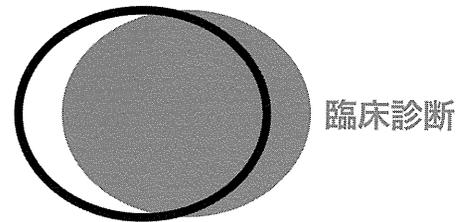
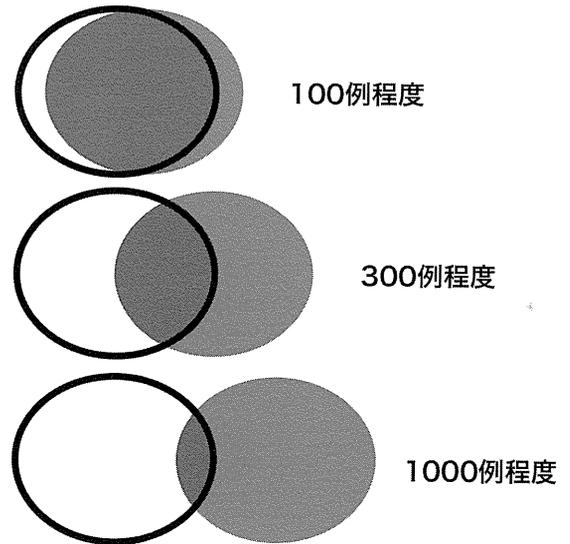


図5 遺伝子解析に必要な症例数。同一の遺伝子を有する症例の割合が少ない程、遺伝子解析に必要な症例数が増える。



現在の集積症例数は以下のようなになる。

全集積症例数 433 症例

画像収集症例 215 症例

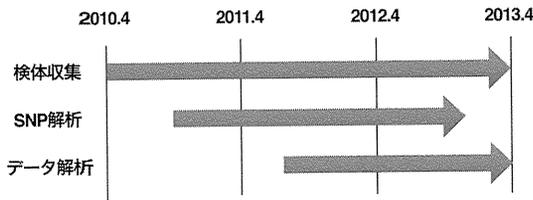
SNP 解析症例 257 症例 (今年度末)

エクソーム解析症例 52 症例 (今年度末)

工程表

検体収集は2011年度までと想定していたが、

2012年度いっぱい継続することにした。



現在の集積症例を次のように積み増すことを目標とする。

- 全集積症例数 433 症例 -> 500 症例以上
- 画像収集症例 215 症例 -> 500 症例以上
- SNP解析症例 257 症例 -> 300 症例以上
- エクソーム解析症例 52 症例(年度末予定) -> 100 症例以上

コア解析

「極端な表現型を示す症例」のみを収集すると、同一の遺伝子を有する症例を選択する可能性が高まる。これを考慮し、以下の症例で解析を行う。

- 薬剤性肺障害 40 例 vs control
- 薬剤性肺障害 80 例 vs control
- 薬剤性肺障害 120 例 vs control
- IPF 急性増悪 40 例 vs control
- IPF 急性増悪 80 例 vs control

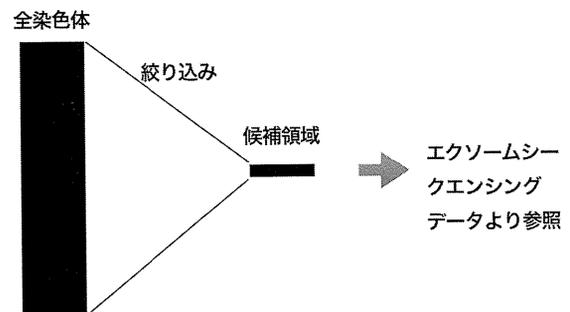
IPF 急性増悪 120 例 vs control

- 薬剤性肺障害 + IPF 急性増悪 40 例 vs control
- 薬剤性肺障害 + IPF 急性増悪 80 例 vs control
- 薬剤性肺障害 + IPF 急性増悪 120 例 vs control

従来のGWAS(全ゲノム関連解析)は感度が良好ではないので、少数例を用いた解析が可能なHH analysis, HHGWAS, HM on HH法を用いて解析する。

エクソーム解析

エクソーム解析は100例程度収集したい。SNPデータ解析より染色体領域を絞り込み、エクソームシーケンスにより変異遺伝子を同定する。



D. 考察

計画は順調に進行している。2012年度はバイオインフォマティクス解析が中心になる予定である。