

# 間質性肺疾患の病態に関する研究 — 気管支肺胞洗浄液中サイトカインの検討 —

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

杉 本 啓 介

(平成6年2月28日受稿)

**Key words:** 間質性肺疾患, 気管支肺胞洗浄法 (broncho alveolar lavage: BAL), Interleukin 1 (IL-1), transforming growth factor  $\alpha$ , transforming growth factor  $\beta$

## 緒 言

間質性肺疾患は肺の間質に種々の病変をきたす疾患の総称である。このうち特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia: IIP)<sup>1)2)</sup>は、原因不明で急性あるいは慢性の経過で発症し、再燃増悪を繰り返しながら徐々に線維化の進行する疾患である。一方膠原病肺<sup>3)~5)</sup>は各種膠原病の病態を背景として肺に病変を合併したものである。そして膠原病における標的臓器は様々であるが、病変の主座は全身の結合組織であり、うち肺病変としては胸膜病変と共に間質性肺炎あるいは肺線維症として認められるものが多い。これらの間質性肺疾患における肺線維化の機序には種々のサイトカインの関与が推察されている<sup>6)~8)</sup>。そこで気管支肺胞洗浄法 (broncho alveolar lavage: BAL)<sup>9)10)</sup>により肺局所の病態を反映する上清成分並びに細胞成分を採取し、サイトカインとして Interleukin 1 (IL-1), transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) について測定を行い、間質性肺疾患における肺線維化病態との関連を検討した。

## 対象と方法

### 1. 対 象

特発性間質性肺炎 (IIP) 7例, 年齢中央値56歳 (50—79歳, 全例男性), 膠原病肺11例を対象とした。膠原病肺の内訳は、慢性関節リウマチ

に合併した間質性肺炎 (以下 RA+IP) 6例, 年齢中央値59歳 (46—65歳, 男女比3/3), 強皮症に合併した間質性肺炎 (以下 PSS+IP) 3例, 年齢中央値52歳 (50—54歳, 男女比1/2), 皮膚筋炎または多発性筋炎に合併した間質性肺炎 (以下 DM+IP) 2例 (年齢45歳, 63歳, 男女比1/1) であり, 健康人対照10例, 年齢中央値27歳 (26—40歳, 男女比9/1) と比較検討した。

尚 IIP は1980年度の厚生省特定疾患肺線維症研究会の診断基準<sup>11)</sup>により診断した。膠原病肺は、膠原病を各診断基準<sup>12)~14)</sup>により診断し、これに胸部 X 線像にて間質性陰影を認めるものを本症とした。

### 2. 方 法

#### 1) 気管支肺胞洗浄法 (BAL)

BAL は既報<sup>9)10)</sup>の如く右肺中葉の区域気管支 B<sub>4</sub> または B<sub>6</sub> のいずれかに気管支ファイバースコープを wedge し, 37℃ の無菌生理食塩水を 1 回に 50ml 注射器にて注入し, 吸引器を用いて洗浄液を回収した。この操作を 4 回繰り返し, 計 200 ml にて洗浄を行った。洗浄液は回収量を測定し, 滅菌ガーゼで濾過したのち, シリコン処理試験管を用いて遠沈 (250G, 10分) し, 上清と細胞成分に分離した。上清は測定の時期まで一部を凍結乾燥末に, 残りはそのまま -70℃ に凍結保存した。細胞成分は細胞分類やリンパ球サブセットを検討した後, 細胞数を  $1 \times 10^6$  コ/ml に調整して, 1% FCS 加 RPMI-1640 にて 2 日間培養

し、遠沈後上清を採取した。この培養上清に関しても測定まで $-70^{\circ}\text{C}$ に保存した。

#### 2) BALF 上清の濃縮

BALF 上清はサイトカイン測定用に濃縮の必要があり、分子量3,000以下の物質を濾過するセントリコン3 (グレースジャパン株式会社, アミコン事業部) を用いて20倍に濃縮した。各検体を2mlずつセントリコン3に注入しアングル型ロータの超遠沈機で5000G, 3時間遠沈し、 $50\mu\text{l}$ になるまで濃縮した。尚、BALF 細胞培養上清に関しては、濃縮せずそのままサイトカインを測定した。

#### 3) TGF- $\alpha$ と IL-1 $\alpha$ の測定

TGF- $\alpha$  と IL-1 $\alpha$  の測定はいずれも大塚アッセイ研究所の TGF- $\alpha$  測定キット, IL-1 $\alpha$  測定キットを用いて測定した。あらかじめ一次抗体を coating してあるプレート (96穴) を洗浄後、標準液または検体を分注し、静置後、洗浄し続いて2次抗体 (抗ヒト TGF- $\alpha$  or IL-1 $\alpha$  家兎血清) を反応させ、洗浄後3次抗体 (peroxidase 標識抗家兎 IgG 山羊抗体) を加えた。最後に洗浄後、発色剤 (O-Phenylenediamine) を添加し反応後 ELISA リーダー (吸光度490nm) にて吸光度を測定し、検量線から TGF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  の各々を算出した。検体としては、BALF 細胞培養上清と濃縮した BALF 上清を用いた。また TGF- $\alpha$  に関しては、血清についても測定した。

#### 4) TGF- $\beta$ の測定

TGF- $\beta$  はアマーシャム社の TGF- $\beta$  ELISA システムを用いて測定した。測定方法は TGF- $\alpha$  とほぼ同様であり、一次抗体を coating したプレート (96穴) に、標準液または検体を分注し、静置後、2次抗体 (抗ヒト TGF- $\beta$  ウサギ血清), 3次抗体 (ビオチン標識抗ウサギ IgG 山羊抗体), 発色剤 (O-Phenylenediamine) を各々反応させ ELISA リーダー (吸光度490nm) にて吸光度を測定した。このシステムに用いられている抗体は、活性型 TGF- $\beta$  と特異的に結合する。一方、生体内で産生される TGF- $\beta$  はほとんどが活性を持たない潜在型として存在しているため、あらかじめ検体を酸で処理し潜在型 TGF- $\beta$  を全て活性型に変換<sup>15)</sup>してから測定を行った。

#### 5) BALF 上清中 procollagen type III (P<sub>III</sub>P) の測定

BALF 上清中の P<sub>III</sub>P は Behring 社のリアグノスト P<sub>III</sub>P coated tube キットを用い、イムノラジオメトリック法にて測定した。検体としてはセントリコン3により濃縮した BALF 上清を用いた。抗 P<sub>III</sub>P マウスモノクローナル抗体を coating した試験管に標準血清、検体を入れ、振盪しながら反応させた後洗浄し、ヨウ化 procollagen III peptide mouse monoclonal antibody (<sup>125</sup>I) を加え  $\gamma$  線 scintillation counter で測定した。

#### 6) BALF 中 soluble IL-2 receptor (sIL-2R) の測定

BALF 中 sIL-2R の測定は、BALF 凍結乾燥末を蒸留水にて溶解し、BALF 原液に対して最終的には10倍濃縮に調整した検体を用いて、CELL-FREE IL-2R TEST KIT (T CELL SCIENCE 社) により測定した。一次抗体 (2R1.2: 抗 Tac 抗体) を coating したプレートに標準液または検体を  $50\mu\text{l}$  ずつ分注し、引き続いて2次抗体 (7G7/B6: HRP 標識抗 IL-2R 抗体) を  $100\mu\text{l}$  ずつ加え、室温にて3時間 incubate し洗浄後、発色剤を添加し反応後、ELISA リーダー (吸光度490nm) にて吸光度を測定し検量線より sIL-2R 濃度を算出した。

## 結 果

### 1. 間質性肺疾患における BALF

#### 1) 回収率と総細胞数

対象症例に BAL を実施し、その回収率と総細胞数を健康人対照と比較した (表1)。回収率に関しては、IIP, 膠原病肺群は健康人対照に比較して1%以下の危険率で有意に低率であった。また総細胞数を回収量で除した総細胞密度は、

表1 間質性肺疾患の BALF

対 象	(n)	回収率 (%)	総 細 胞 数	
			( $\times 10^6$ )	( $\times 10^3/\text{ml}$ )
IIP	(7)	47.5 $\pm$ 16.7	14.2 $\pm$ 14.1	154.1 $\pm$ 116.3
膠原病肺	(10)	57.7 $\pm$ 13.5	20.3 $\pm$ 11.8	174.2 $\pm$ 99.1
健康人対照	(10)	72.4 $\pm$ 9.51	16.7 $\pm$ 6.68	117.3 $\pm$ 51.8

表2 間質性肺疾患における BAL 液中細胞分類

a) 細胞比率		細胞分類(%)				
対象	(n)	マクロファージ	リンパ球	好中球	好酸球	好塩基球
IIP	(7)	84.3±8.34	8.0±5.7	2.94±2.34	3.37±2.17	0.14±0.35
膠原病肺	(10)	75.4±23.6	20.4±23.3	2.39±1.92	1.78±2.12	0.03±0.09
健康人対照	(10)	91.3±5.33	7.8±5.5	0.63±0.41	0.23±0.30	0.01±0.03

b) 細胞密度		細胞密度(×10 <sup>3</sup> /ml)				
対象	(n)	マクロファージ	リンパ球	好中球	好酸球	好塩基球
IIP	(7)	132±99.6	12.3±15.5	5.51±6.45	3.52±1.91	0.113±0.277
膠原病肺	(10)	136±99.5	32.8±44.0	2.95±2.73	2.38±4.53	0.0748±0.212
健康人対照	(10)	108±50.1	8.46±6.71	0.762±0.649	0.245±0.337	0.011±0.033

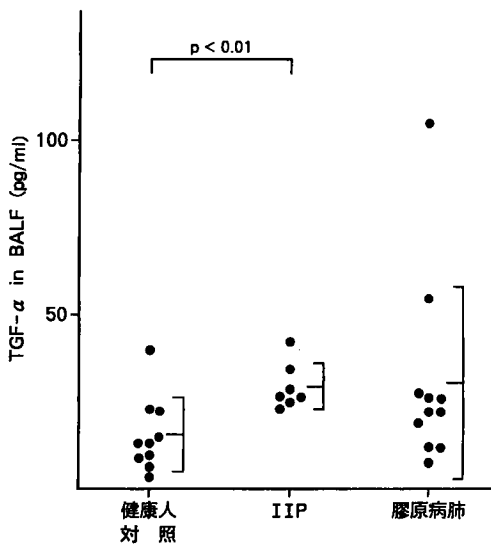


図1 間質性肺疾患における BALF 中 TGF- $\alpha$   
IIP の BALF 中 TGF- $\alpha$  は健康人対照に比べ有意 ( $P < 0.01$ ) に高値であった。

特に膠原病肺において高値を示した。

2) 間質性肺疾患における BALF 中細胞成分と細胞密度

BALF 中各細胞密度を比較したところ、好中球密度に関しては健康人対照に比べ IIP と膠原病肺がいずれも有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。リンパ球密度、好酸球密度についても、IIP、膠原病肺は対照に比べ高値をとる傾向を示した。

好塩基球に関しては細胞1,000個以上の観察でもほとんどの症例で認められなかった(表2)。BALF 中 T-cell subset に関しては、健康人対照と有意差は認めなかったが、IIP では CD4 がやや多く、CD4/CD8 比が高値となる傾向を示した。

2. 間質性肺疾患における BALF 上清中 TGF- $\alpha$

各種間質性肺疾患における BALF 上清中 TGF- $\alpha$  を測定した。IIP  $29.2 \pm 6.76$  pg/ml (mean  $\pm$  SD)、膠原病肺  $29.9 \pm 27.5$  pg/ml に対し健康人対照  $15.5 \pm 10.6$  pg/ml であり、IIP 群では健康人対照に比べ有意 ( $P < 0.01$ ) に高値であり、膠原病肺も高値をとる傾向がみられた(図1)。膠原病肺の中では RA+IP が、PSS+IP、DM+IP に比べ高値となる傾向を認めた。

3. 間質性肺疾患における BALF 上清中 TGF- $\beta$

BALF 上清中 TGF- $\beta$  に関しては、IIP  $23.7 \pm 13.8$  ng/ml、膠原病肺  $25.8 \pm 19.2$  ng/ml に対し健康人対照では  $9.53 \pm 2.59$  ng/ml であり、IIP と膠原病肺では有意 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) に高値であった(図2)。膠原病肺の中では、TGF- $\alpha$  と異なり DM+IP、PSS+IP が RA+IP に比べ高値をとった。

4. 間質性肺疾患における BALF 上清中 IL-1 $\alpha$

BALF 上清中 IL-1 $\alpha$  に関しては、20倍濃縮

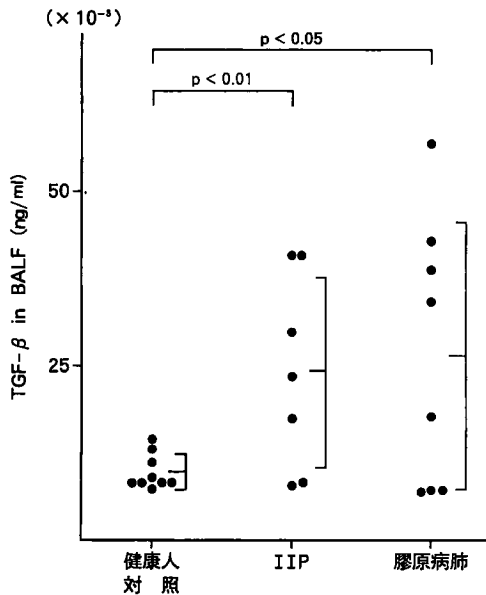


図2 間質性肺疾患における BALF 中 TGF- $\beta$   
TGF- $\beta$  は IIP, 膠原病肺において健康人対照に比べ有意 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) に高値であった。

の状態健康人対照 8 例中 5 例, IIP 5 例中 3 例, 膠原病肺 6 例中 3 例が測定限界以下であった。測定可能であった症例に関しては RA+IP に 1 例のみ高値例を認めた。

#### 5. 血清中 TGF- $\alpha$ の検討

血清中 TGF- $\alpha$  は健康人対照  $460 \pm 138$  pg/ml に対し, IIP  $603 \pm 372$  pg/ml, 膠原病肺  $596 \pm 277$  pg/ml であり疾患群でやや高値であったが, BALF 中 TGF- $\alpha$  に見られるほどの差ではなかった。

#### 6. 血清中と BALF 上清中 TGF- $\alpha$

各症例において血清中と BALF 上清中の TGF- $\alpha$  の関連を検討する目的で, 各々の TGF- $\alpha$  比 (BALF 中 TGF- $\alpha$ /血清中 TGF- $\alpha$ ) を求め比較した。健康人対照  $0.043 \pm 0.024$  に対し, IIP  $0.066 \pm 0.033$ , 膠原病肺  $0.058 \pm 0.039$  であり疾患群でやや高い傾向であった。尚, 血清中と BALF 上清中 TGF- $\alpha$  の間には相関を認めなかった。

#### 7. BALF 細胞培養上清中の IL-1 と TGF

BALF 細胞の培養を行い, 培養液中の TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\alpha$  を各々測定した。IL-1 $\alpha$  は

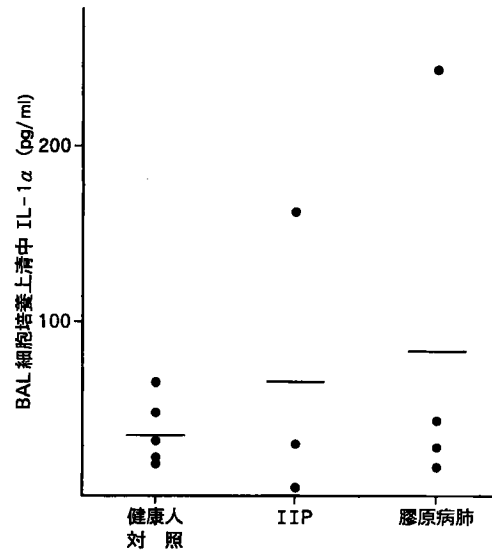


図3 間質性肺疾患の BALF 細胞産生 IL-1 $\alpha$   
BALF 細胞培養上清中の IL-1 $\alpha$  は, 間質性肺疾患症例において高値例を認めた。

全例測定可能であり, 健康人対照に比べ疾患群に高値例を認めた(図3)。個々の症例における培養液中と BALF 上清中の IL-1 $\alpha$  には相関を認めなかった。尚, TGF- $\alpha$  に関しては, セントリコンで濃縮した状態でも健康人対照を含むほとんどの培養液で, 測定限界以下となり RA+IP と IIP の各 1 例でのみ測定可能であった。また TGF- $\beta$  に関しては BALF 細胞培養液とコントロールとして測定した培養液 (1% FCS 加 RPMI-1640) の TGF- $\beta$  濃度に差がみられなかった。

#### 8. 間質性肺疾患における肺機能と TGF の関連 1) % VC との関連について

肺の線維化進展に伴う拘束性変化と, BALF 上清中 TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  の関連を見る目的で % VC 80% で症例を区分して比較した(図4)。TGF- $\alpha$  に関しては 2 群間で差を認めなかったが, TGF- $\beta$  では拘束性変化の強い % VC 80% 以下の群において, 高値となる傾向を示した。

#### 2) % DLco との関連

肺拡散能を反映する % DLco との関連においても, % DLco 70% で症例を区分して比較した。

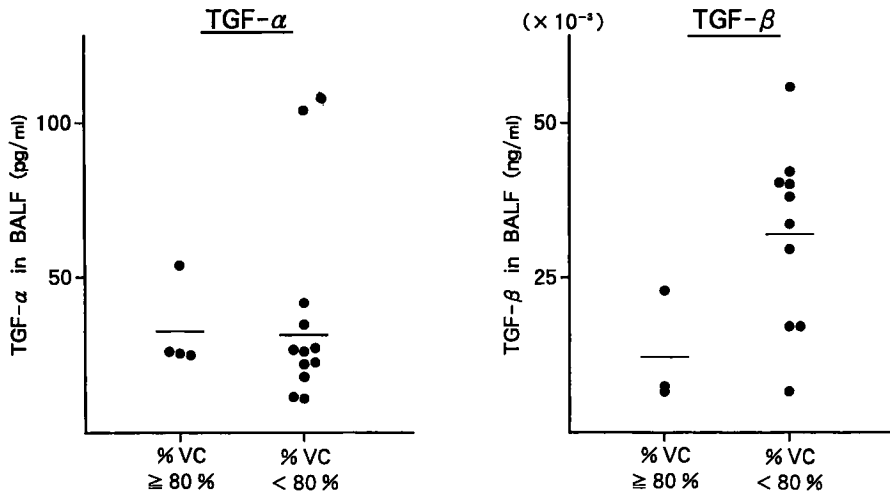


図4 間質性肺疾患の肺活量と TGF  
% VC80%で症例を区分し BALF 中の TGF を比較したところ TGF-α では差を認めなかったが, TGF-β では拘束性変化の強い群で高値となる傾向を示した。

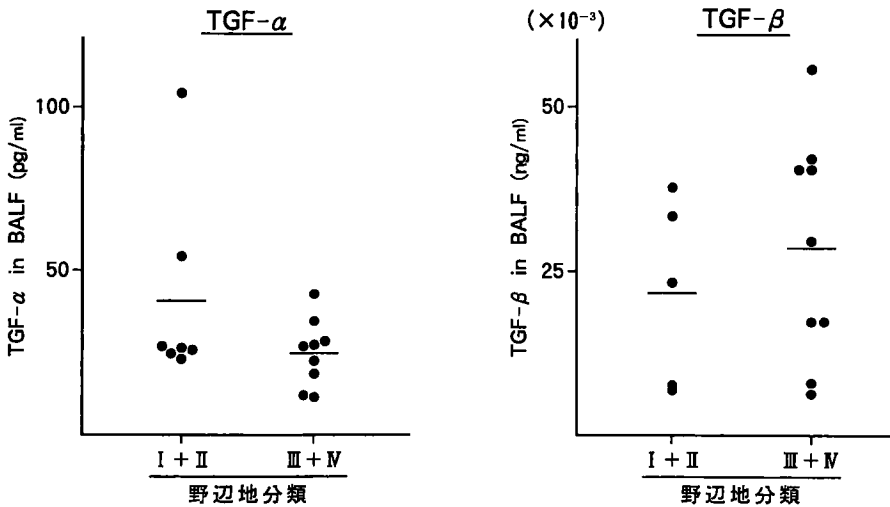


図5 間質性肺疾患における胸部 X 線所見と BALF 中 TGF  
胸部 X 線上, 線維化進行例で TGF-β は高値であったが, TGF-α は逆に低値となる傾向であった。

BALF 上清中 TGF-α は% DLco70%以上の軽度の拡散能障害の群において高値となる傾向を示し, TGF-β は70%以下の高度の拡散能障害の群において高値となる傾向を示した。

9. 間質性肺疾患における胸部 X 線所見と BALF 上清中 TGF

間質性肺疾患の胸部陰影を野辺地分類<sup>16)</sup>に従

い I 型から IV 型に分け, I 型あるいは II 型の陰影を呈する群 (I + II 型) と III 型あるいは IV 型の陰影を呈する群 (III + IV 型) に症例を区分し, BALF 上清中 TGF-α, TGF-β を比較した (図 5)。TGF-α は, III + IV 型に比べ I + II 型がより高値を取る傾向を示し, TGF-β は I + II 型に比べ III + IV 型すなわち肺線維化の進行している

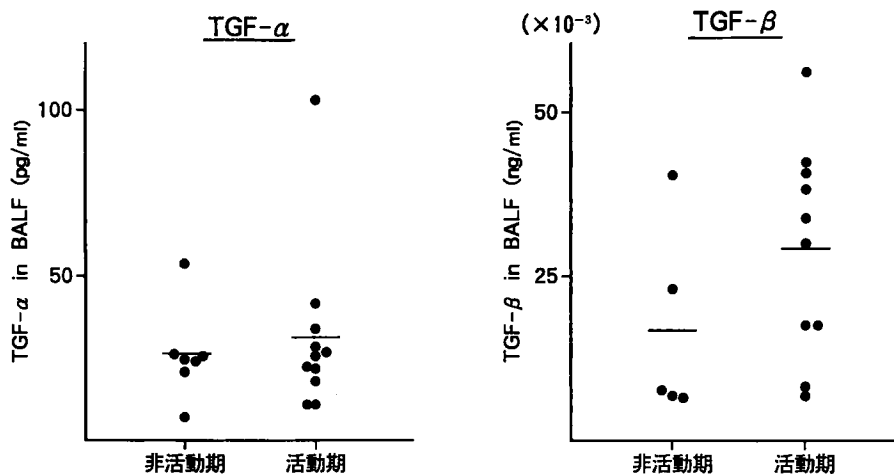


図6 間質性肺疾患の活動性とBALF中TGF  
BALF中TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 共に間質性肺疾患の活動性の高い群で高値となる傾向であった。

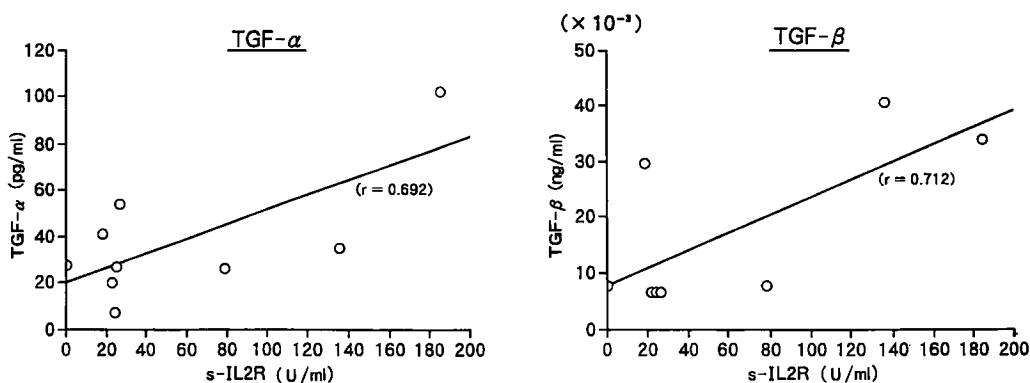


図7 BALF中sIL-2RとTGFの相関  
BALF中TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ とも、sIL-2Rと有意 ( $p < 0.05$ ) の正の相関を認めた。

群においてより高値を示す傾向であった。

#### 10. 間質性肺疾患の活動性とBALF上清中サイトカイン

間質性肺疾患の活動性を肺機能、血液ガス、胸部X線所見等の変動と、Gaシンチ所見に基づいて判定し、BAL施行時の各症例を活動期群と非活動期群に区分し、BALF上清中TGF- $\alpha$ 並びにTGF- $\beta$ を比較した(図6)。TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ は共に非活動期に比べ、活動期と判定した症例で高値となる傾向を認めた。

#### 11. BALF上清中procollagen type IIIとTGFの関連

BALF上清中PIIPは健康人対照 $0.0286 \pm 0.048$ に対しIIP $0.866 \pm 1.21$ 、膠原病肺 $0.175 \pm 0.194$ で数値のばらつきが大きく各群間に有意差は認めなかったが間質性肺疾患において高値であった。BALF上清中PIIPとTGFの相関については例数は少ないがTGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ とも正の相関( $r = 0.490$ ,  $r = 0.862$ )が窺われ、肺線維化病態と肺局所のTGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ の関連が示唆された。

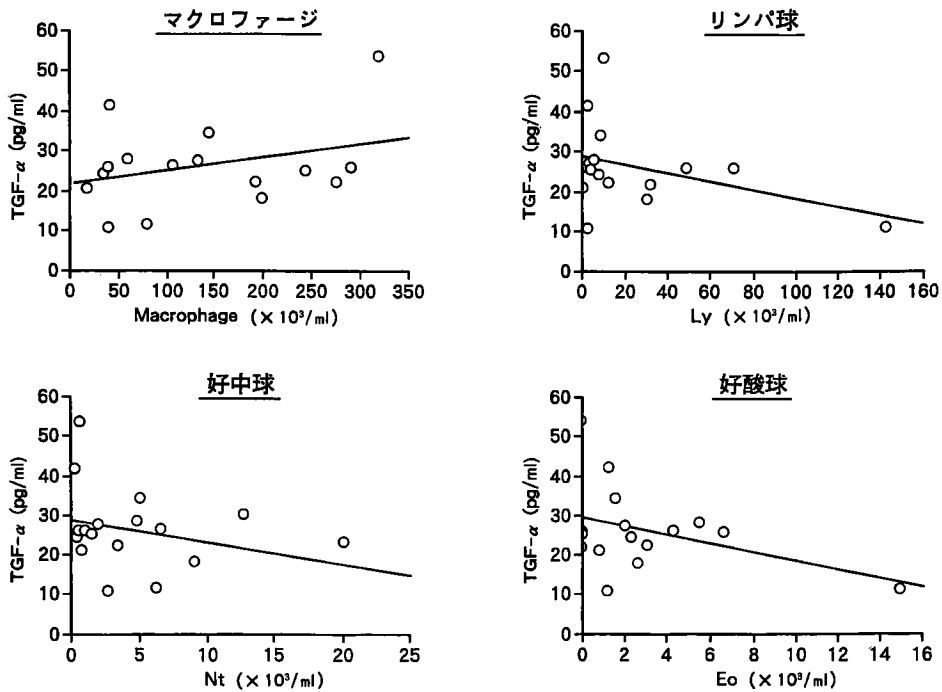


図8 間質性肺疾患における BALF 中細胞密度と TGF- $\alpha$   
BALF 中 TGF- $\alpha$  とマクロファージ密度の間に正の相関を認めたが、その他の細胞成分との相関は認めなかった。また TGF- $\beta$  に関してはいずれの細胞成分との相関も見られなかった。

12. BALF 上清中 sIL-2R と TGF の関連

BALF 上清中 sIL-2R は健康人対照 $10.0 \pm 8.19$ U/ml に対し、IIP $58.5 \pm 61.7$ 、膠原病肺 $56.7 \pm 71.5$ であり間質性肺疾患において著明に高値であった。BALF 上清中の sIL-2R と TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  の相関を検討したところ各々有意の正の相関 ( $r=0.692$ ,  $r=0.712$ ,  $P<0.05$ ) を認めた (図7)。

13. BALF 細胞密度と BALF 上清中 サイトカイン

間質性肺疾患の BALF 中各細胞成分の密度と BALF 上清中 TGF の相関を検討した。TGF- $\alpha$  に関しては、BALF 中のマクロファージ密度との間には正の相関が窺われたが他の細胞成分との間には関連を認めなかった (図8)。一方、TGF- $\beta$  に関してはいずれの細胞成分とも相関を認めなかった。また BALF 細胞の各 T-cell subset と BALF 上清中 TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  とは相関を示さなかった。さらに、BALF 細胞培養

液中 IL-1 $\alpha$  についても検討を行ったが、BALF 中各細胞成分との相関は認めなかった。

考 察

IIP は原因不明の間質性肺炎であるが、その病態に関しては、種々の検討がなされており<sup>17)-22)</sup>、何らかの障害あるいは抗原が肺において炎症性細胞群を活性化し種々のサイトカイン産生から胞隔における炎症が進展・維持され、線維芽細胞に対するこれらのサイトカイン刺激による増殖、活性化から膠原線維の増加がもたらされ、肺線維化が進行すると考えられている<sup>1)</sup>。これに対し膠原病肺は、免疫異常に基づく血管を含む結合組織の炎症を基盤に起こるものと推測<sup>23)</sup>されている。膠原病性肺病変の主たるものは胸膜炎と間質性肺炎であり、臨床的には特に肺病変のみが先行した膠原病肺症例は、IIP との鑑別困難なことが多い。従って間質性肺炎の成立機序は異なっているも、肺線維化過程の多くの部分は共通していることが考えられる。

サイトカインは免疫応答、炎症反応などの生体防御に重要な役割を果たしている生理活性因子であり、生体の高次機能を維持するために重要な因子である。サイトカインは一つの物質でありながら、多機能を有すると同時に数種のものが生理学的に似たような構造を持ち、target cell に対して同様の反応を示すことも多い<sup>23)</sup>。またサイトカインの中には異なる target cell を介して、相反する二つの作用を示すものもある。例えば TGF- $\beta$  は、リンパ球の IL-1 receptor 発現の抑制により、IL-1 に対する増殖反応を抑制する<sup>24)</sup>一方、マクロファージや線維芽細胞に対しては強力な遊走因子として働く<sup>25)</sup>。

肺局所においては種々のサイトカインが巧妙なネットワークを形成し、肺線維化病態を調節していることが推察される<sup>8)26)-28)</sup>。肺線維化に関与するサイトカイン<sup>29)30)</sup>としては、platelet derived growth factor (PDGF)<sup>31)-34)</sup>、insulin-like growth factor (IGF)<sup>35)36)</sup>、epidermal growth factor (EGF)、fibroblast growth factor (FGF)<sup>36)</sup>等が今回検討した IL-1<sup>37)</sup>、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ <sup>38)</sup>と共に報告されている。IL-1 は分子量 12,000~15,000 のマウス胸腺細胞に対する分裂促進活性を有する物質として報告<sup>39)-41)</sup>されたが、発熱物質として作用する他、リンパ球や線維芽細胞の増殖促進作用、肝細胞に対する急性期蛋白の産生促進にも作用する。IL-1 には、IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$ <sup>40)42)</sup> の 2 種類が区別され、アミノ酸レベルでの相同性は 27% であるが、その生物活性はほぼ同一でありレセプターも同じである。今回測定を行った BALF 上清中 IL-1 $\alpha$  に関しては RA+IP の 1 例で著高を示したのみで、ほとんどの例で測定限界以下であった。従って肺線維化病態への IL-1 $\alpha$  の関与は乏しいと考えられた。

一方、TGF<sup>43)</sup>は、正常ラットの腎臓由来の fibroblast を transformed cell 様形態に変え、かつ細胞に浮遊性を与える因子として見いだされた。この TGF にも TGF- $\alpha$ <sup>44)</sup>と TGF- $\beta$ <sup>45)</sup> の 2 種がある。これらは共に上記のような性質を持っているが、全く別の物質であり構造、生物活性ともに異なっている。TGF- $\alpha$ <sup>46)</sup>は分子量 5,000~20,000 で構造的にも EGF と類似し、ま

たほとんど同じ生理活性を持っている。その作用としては、上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞を含む多くの細胞の DNA 合成を促進し細胞形態にも影響を与える。TGF- $\alpha$  はもともと、種々の腫瘍ウイルスによってトランスフォームされた細胞に認められ、自然発生癌でも TGF- $\alpha$  産生能を有するなど、悪性腫瘍の発生やその増殖との関連で多くの報告がある<sup>47)48)</sup>。これに対し TGF- $\beta$ <sup>49)</sup>は分子量は約 25,000 で基本的には各種細胞の増殖を抑制し、線維芽細胞に対しては、分化の強力な誘導作用、細胞外マトリックス蛋白の合成促進作用を示す。また軟寒天培地中では線維芽細胞の増殖を促進するなど細胞株や培養条件により異なった反応を示す。ヒト正常線維芽細胞の plasminogen activator 分泌に対し、TGF- $\alpha$  が促進に働き、TGF- $\beta$  は逆に抑制する<sup>50)</sup>。plasminogen activator は plasminogen を活性型 plasmin に変換し、フィブロンectin、ラミニンなどの細胞接着蛋白質を含む種々の蛋白質を非特異的に分解する。

今回の検討では間質性肺炎の活動性との関連で TGF- $\alpha$  と TGF- $\beta$  とが共に活動期には高値であった。しかしながら、肺機能や胸部 X 線陰影との関連においては肺活量、肺拡散能の低下群において TGF- $\beta$  が高値で、TGF- $\alpha$  は逆に低値となるなど、異なった動態を示していた。このことより肺線維化の進展において TGF- $\alpha$  と TGF- $\beta$  の関与する病態が異なると考えられた。TGF- $\alpha$  は間質性肺炎の活動期に線維芽細胞の増殖や胞隔内の炎症維持に関与し、TGF- $\beta$  は肺内の線維芽細胞に働き膠原線維を増加させ、肺線維化を進展させるように働いていることが推察される。プレオマイシンによる肺線維症において、肺の endothelial cell の膠原線維産生が、抗 TGF- $\beta$  抗体を加えることにより、阻害される報告<sup>51)52)</sup>もされており、TGF- $\beta$  が肺の線維化に重要と考えられた。肺局所における線維芽細胞の増殖、分化、線維化進展については、さらに様々なサイトカインや肺局所に集積する好中球あるいは好酸球により放出される種々の蛋白分解酵素、細胞接着因子、superoxide, peroxidase 等が複雑に絡み合い、胞隔レベルにおける炎症が維持され、線維化が進行するものと



考えられる<sup>53)-55)</sup>。

膠原線維は正常肺組織においても重要な構成成分であり、I—IV型に分類され、III型は主として気管支周囲と胞隔間質に分布し<sup>57)58)</sup>、間質性肺疾患の初期に増加するとされている<sup>59)</sup>。P11PはIII型 collagen 合成上の中間代謝産物で、procollagen が aminoprotease により N 末端で切断されたもの<sup>60)</sup>であり、膠原線維の増生、線維化を反映する因子と考えられている。以前より肝硬変症や各種悪性腫瘍、骨髄線維症などで血清中 P11P の増加が報告<sup>60)</sup>されており、筆者らも間質性肺疾患における血清中 P11P の増加を報告<sup>61)</sup>している。今回、肺の線維化をより直接的に評価するために、BALF 中 P11P を測定し、サイトカインの関連を検討した。BALF 中 P11P は健康人対照に比べ、IIP と膠原病肺において高値をとり、BALF 中 TGF- $\alpha$  並びに TGF- $\beta$  と正の相関を認めた。従って、TGF が間質性肺疾患における線維化病態と密接に関連していると推察された。

sIL-2R<sup>62)63)</sup>は IL-2 結合能に関して、細胞表面の IL-2 receptor と同程度であり<sup>64)</sup>、IL-2 依存性免疫応答の down regulation や生体内における IL-2 の半減期を延長する等の機能が推察されている。BALF 中 sIL-2R は肺局所の免疫応答活性を反映しており、間質性肺炎の活動性を表す指標の一つとして BALF 中 sIL-2R を測定した。IIP 並びに膠原病肺の BALF 中 sIL-2R は健康人対照に比べ有意に高値であり、さらに BALF 中 TGF- $\alpha$  あるいは TGF- $\beta$  と正の相関を示し、IL-2 の関与する病態と TGF 産生との関連が窺われた。

BALF 中の各種細胞成分とサイトカインの相関を検討したところ、TGF- $\alpha$  に関しては BALF 中マクロファージ密度との間のみ正の相関が窺われたが、TGF- $\beta$  では認めなかった。TGF- $\alpha$  は前述の如く腫瘍細胞のみならず、活性化されたマクロファージでも産生されることが知られている<sup>65)</sup>。TGF- $\beta$  に関してはプレオマイシンなどによって急性に起こる肺の線維化では肺胞マクロファージで産生されるが、IIP などの慢性の肺線維化の場合は、マクロファージではなく気管上皮細胞やII型肺胞上皮における TGF- $\beta$

の産生が報告<sup>66)</sup>されている。間質性肺炎においても急性、慢性あるいは活動性、非活動性など多様な病態があり、炎症と線維化が同時に進行し、関与する細胞成分、液性因子についても多彩であり、今回検討したサイトカイン以外の因子についての解析も今後必要と思われた。

## 結 論

間質性肺疾患において BALF 中 IL-1 $\alpha$ 、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  と血清中 TGF- $\alpha$  の定量を行い、その病態との関連で検討した。

1. BALF 中の TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  はいずれも健康人対照に比べ高値となる傾向であった。
2. BALF 中 IL-1 $\alpha$  はほとんど測定不能であったが、BALF 細胞培養上清中では測定可能であり、間質性肺疾患において高値となる傾向を示した。
3. BALF 中 TGF- $\alpha$  は肺活量、肺拡散能の減少が軽度の群で高値であり、高度障害群では TGF- $\beta$  が高値であった。また胸部X線上で線維化進展との関連でも TGF- $\alpha$  は軽度の群で高値であり、TGF- $\beta$  は高度線維化群で高値であった。
4. BALF 中 TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  は共に間質性肺疾患の活動期群で高値を示した。
5. BALF 中 TGF- $\alpha$  と TGF- $\beta$  は各々 P11P あるいは sIL-2R との間に正の相関を示した。
6. BALF 中マクロファージ密度と TGF- $\alpha$  の間には正の相関を認めたが、TGF- $\beta$  との間には相関性を認めなかった。

以上 IL-1 $\alpha$ 、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  の検討成績から、各々間質性肺疾患の多様な病態との関連があり肺線維化に重要と考えられた。

稿を終えるにあたり、終始御指導御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表すと共に直接御指導頂いた多田慎也講師に深謝致します。

(本論文の要旨は、第33回日本胸部疾患学会総会において発表した。)

## 文 献

- 1) 木村郁郎, 多田慎也: 特発性間質性肺炎. 呼吸と循環 (1988) **36**, 941—947.
- 2) Carrington CB, Gaensler EA, Coutu RE, FitzGerald MX and Gupta RG: Natural history and treated course of usual and desquamative interstitial pneumonia. *N Engl J Med* (1987) **298**, 801—809.
- 3) Hunninghake GW and Fauci AS: Pulmonary involvement in the collagen vascular diseases. *Am Rev Respir Dis* (1979) **119**, 471—503.
- 4) Eisenberg H: The interstitial lung diseases associated with the collagen-vascular disorders. *Clin Chest Med* (1982) **3**, 565—575.
- 5) 岡安大仁, 堀江孝至, 澤田滋正: 膠原病性肺臓炎. 内科 MOOK (1983) **22**, 160—165.
- 6) Crystal RG, Gadek JE, Ferrans VJ, Fulmer JD, Line BR and Hunninghake GW: Interstitial lung disease: Current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am J Med* (1981) **70**, 542—568.
- 7) 貫和敏博: 肺細胞由来の増殖因子. 代謝 (1990) **27**, 777—786.
- 8) 貫和敏博, 本間 栄, 田村尚亮, 高橋和久, 吉良枝郎: 肺の線維化をめぐる細胞とサイトカイン. 最新医学 (1992) **47**, 1303—1309.
- 9) 木村郁郎: 気管支肺胞洗浄液. 免疫と疾患 (1982) **4**, 329—336.
- 10) 北村 諭, 石井芳樹: BALF 検査法. 日本臨床 (1990) **3**, 490—496.
- 11) 田村昌士: 特発性間質性肺炎の診断基準 (改訂案) について. 厚生省特定疾患間質性肺疾患調査研究班昭和55年度研究報告書 (1981) pp 4—6.
- 12) Mitchell DM and Fries JF: An analysis of the American Rheumatism Association criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (1982) **25**, 481—487.
- 13) 石川栄一, 田村多絵子: 汎発性強皮症の診断基準. 臨床医 (1982) **8**, 2433—2438.
- 14) 木下牧子, 横張龍一: 皮膚筋炎, 多発性筋炎. 治療 (1987) **69**, 1407—1412.
- 15) Brown PD, Wakefield LM, Levinson AD and Sporn MB: Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors* (1990) **3**, 35—43.
- 16) 三上理一郎, 野辺地篤郎: 原因不明のびまん性間質性肺線維症の臨床病理学的研究. 日本臨床 (1969) **27**, 1829—1861.
- 17) Reid J: The pathogenesis of the Hamman Rich syndrome. *Am Rev Tuberc Pulm Dis* (1958) **78**, 353—362.
- 18) Kravis TC, Ahmed A and Brown TE: Pathogenic mechanisms in pulmonary fibrosis collagen-induced migration inhibition factor production and cytotoxicity mediated by lymphocytes. *J Clin Invest* (1976) **58**, 1223—1232.
- 19) Nagay H, Elmore M and Ford CD: Idiopathic interstitial pulmonary fibrosis. An immune complex disease? *Am Rev Respir Dis* (1973) **107**, 826—830.
- 20) Kaplan RL, Schockert AL, King TE, Maulitz RM, Good JT, Stanford RE and Sahn AS: A model of immune complex-mediated pleuropulmonary injury. Evidence of deposition of circulating immune complexes in the lung. *Am J Pathol* (1980) **100**, 115—130.
- 21) Gadek JE, Kelman JA and Fells G: Collagenase in the lower respiratory tract of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* (1979) **301**, 737.
- 22) 田村昌士, 鶴浦哲朗: 特発性間質性肺炎. 臨床成人病 (1989) **19**, 2105—2110.
- 23) 平野俊夫: サイトカインとは (概論); サイトカインと疾患, 平野俊夫編, 羊土社, 東京 (1993) pp12—

- 24.
- 24) Dubois CM, Ruscetti FW, Palaszynski EW, Falk LA, Oppenheim JJ and Keller JR : Transforming growth factor  $\beta$  is a potent inhibitor of Interleukin 1 (IL-1) receptor expression : Proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. *J Exp Med* (1990) **172**, 737-744.
  - 25) Raghow R : Role of transforming growth factor  $\beta$  in repair and fibrosis. *Chest/Suppl.* (1991) **99**, 61S-65S.
  - 26) Shaw RJ : The role of lung macrophages at the interface between chronic inflammation and fibrosis. *Respir Med* (1991) **85**, 267-273.
  - 27) Thornton SC, Por SB, Walsh BJ, Penny R and Breit SN : Interaction of immune and connective tissue cells : The effect of lymphokines and monokines on fibroblast growth. *J Leukocyte Biol* (1990) **47**, 312-320.
  - 28) Elias JA, Freundlich B, Kern JA and Rosenbloom J : Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest* (1990) **97**, 1439-1445.
  - 29) 尾関恒雄, 大内和雄, 今西健一 : 線維芽細胞成長促進因子. *医学と薬学* (1987) **18**, 1465-1467.
  - 30) 蒲生 忍, 清水信義 : 線維芽細胞と増殖因子レセプター. *日本臨床* (1989) **47**, 831-835.
  - 31) Brody AR and Bonner JC : Platelet-derived growth factor produced by pulmonary cells. *Chest/Suppl.* (1991) **99**, 50S-52S.
  - 32) Shaw RJ, Benedict SH, Clark AF and King TE : Pathogenesis of pulmonary fibrosis in interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* (1991) **143**, 167-173.
  - 33) Marinelli WA, Polunovsky VA, Harmon KR and Bitterman PB : Role of platelet-derived growth factor in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* (1991) **5**, 503-504.
  - 34) Nagaoka I, Trapnell BC and Crystal RG : Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* (1990) **85**, 2023-2027.
  - 35) Mccusker RH, Hubner CC, Bayne ML, Cascieri MA and Clemmons DR : Insulin-like growth factor (IGF) binding to human fibroblast and glioblastoma cells : The modulating effect of cell released IGF binding proteins (IGFBPs). *J Cell Physiol* (1990) **144**, 244-253.
  - 36) Delapp NW and Dieckman DK : Effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) and insulin-like growth factors type I (IGF-I) on adult human keratinocyte growth and fibronectin secretion. *J Invest Dermatol* (1990) **94**, 777-780.
  - 37) Singh JP, Adams LD and Bonin PD : Mode of fibroblast growth enhancement by human interleukin -1. *J Cell Biol* (1988) **106**, 813-819.
  - 38) Raghu G, Masta S, Meyers D and Narayanan AS : Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor  $\beta$ . *Am Rev Respir Dis* (1989) **140**, 95-100.
  - 39) Gery I, Gershon RK and Waksman BH : Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. *J Exp Med* (1972) **136**, 128-142.
  - 40) March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price U, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, Conlon PJ, Hopp TP and Cosman D : Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* (1985) **315**, 641-647.
  - 41) 笠原 忠, 向田直史 : インターロイキン1の産生と作用の機構. *蛋白質核酸酵素* (1991) **36**, 1140-1148.
  - 42) 小林芳郎 : インターロイキン1 : サイトカイン, 大沢利昭編, 東京化学同人, 東京 (1990) pp 1-12.
  - 43) Todaro GD, De Larco JE and Cohen S : Transformation by murine and feline sarcoma viruses

- specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells. *Nature* (1976) **264**, 26—31.
- 44) Lamontagne LR, Gauldie J, Stadnyk A, Richard C and Jenkins E : In vivo initiation of unstimulated in vitro Interleukin-1 release by alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* (1985) **131**, 326—330.
  - 45) Kahlin N, Berezney O, Sporn M and Greenberg AH : Macrophage production of transforming growth factor  $\beta$  and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J Exp Med* (1989) **170**, 727—737.
  - 46) 大村栄治, 対馬敏夫 : TGF- $\alpha$  の構造と機能. 蛋白質核酸酵素 (1991) **36**, 1343—1349.
  - 47) Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JV, Williams RD, Bringman TS and Berger WH : Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors  $\alpha$  and  $\beta$  and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res* (1987) **47**, 707—712.
  - 48) Ohmura E, Okada M, Onoda N, Kamiya Y, Murakami H, Tsushima T and Shizume K : Insulin-like growth factor I and transforming growth factor  $\alpha$  as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res* (1990) **50**, 103—107.
  - 49) 宮園浩平 : TGF- $\beta$  の構造と作用. 蛋白質核酸酵素 (1991) **36**, 1350—1356.
  - 50) 宮崎 香 : TGF- $\alpha$  と TGF- $\beta$  の生理的役割. 臨床免疫 (1990) **22**, 541—550.
  - 51) Phan SH, Gharaee-Kermani M, Wolber F and Ryan US : Stimulation of rat endothelial cell transforming growth factor  $\beta$  production by bleomycin. *J Clin Invest* (1991) **87**, 148—154.
  - 52) Phan SH, Gharaee-Kermani M, Wolber F and Ryan US : Bleomycin stimulates production of transforming growth factor  $\beta$  by rat pulmonary artery endothelial cells. *Chest/Suppl.* (1991) **99**, 66S.
  - 53) 石崎武志, 宮保 進 : 血管内皮細胞と間質性肺病変. 最新医学 (1992) **47**, 1310—1317.
  - 54) Coggeshall JW, Lefferts PL, Butterfield MJ, Bernard GR, Carroll FE and Snapper JR : A model of increased pulmonary microvascular permeability pulmonary edema in sheep. *Am Rev Respir Dis* (1987) **136**, 1453—1458.
  - 55) Tate RM, Vanbenthuyzen KM, Shasby DM, Mcmurtry IF and Repine JE : Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lung. *Am Rev Respir Dis* (1982) **126**, 802—806.
  - 56) Said SI and Foda HD : Pharmacologic modulation of lung injury. *Am Rev Respir Dis* (1989) **139**, 1553—1564.
  - 57) Madri JA and Furthmayr H : Collagen polymorphism in the lung. An immunohistochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* (1980) **11**, 355.
  - 58) Bateman ED and Turner-Warwick M : Cryptogenic fibrosing alveolitis ; prediction of fibrosing activity from immunohistochemical studies of collagen types in lung biopsy specimens. *Thorax* (1983) **38**, 93.
  - 59) Crystal RG and Kawanami O : Collagen and collagenase in occupational lung disease. *JUOEH (Suppl)* (1982) **4**, 85.
  - 60) Low RB, Cutroneo KR, Davis GS and Giancola MS : Lavage type III procollagen N-terminal peptide in human pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Lab Invest* (1983) **48**, 755—759.
  - 61) 木村郁郎, 多田慎也, 横田 聡, 杉本啓介 : 各種間質性肺疾患における血清中 procollagen type III の検討. 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成3年度研究報告書 (1991) pp91—93.
  - 62) Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B, Yarchoan R and Nelson DL : Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J Immunol* (1985) **135**, 3172—3177.

- 63) 横田 聡：膠原病肺の病態に関する研究。第2編 膠原病肺における血清中および気管支肺胞洗浄液中 soluble IL-2 receptor の検討。岡山医誌 (1992) **104**, 701—711.
- 64) Rubin LA, Jay G and Nelson DL : The released interleukin 2 receptor binds interleukin 2 efficiently. *J Immunol* (1986) **137**, 3841—3844.
- 65) Madtes DK, Raines EW, Sakariassen KS, Assoian RK, Sporn MB, Bell GI and Ross R : Induction of transforming growth factor  $\alpha$  in activated human alveolar macrophages. *Cell* (1988) **53**, 285—293.
- 66) Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH and Greenberg AH : Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\beta$  in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* (1991) **5**, 155—162.

## **The pathogenesis of interstitial pneumonia and the role of cytokines**

**Keisuke SUGIMOTO**

**Second Department of Internal Medicine,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. I. Kimura)**

Various cytokines are known to participate in the pathogenesis of interstitial pneumonia followed by lung fibrosis due to the proliferation of fibroblasts and production of collagen fibers.

Patients with interstitial pneumonia including idiopathic interstitial pneumonia (IIP) and interstitial pneumonia with collagen vascular disease (IP with CVD) were examined by bronchoalveolar lavage (BAL). Cytokines such as IL-1 $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$  in BAL fluid were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The concentrations of TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in BAL fluid of patients with IIP and IP with CVD were higher than those of normal control, while IL-1 $\alpha$  in BAL fluid was detected in few patients. The level of TGF- $\beta$  in BAL fluid was higher in patients with greater decreases in pulmonary function and overt fibrosis on chest X-ray film, although TGF- $\alpha$  was higher in patients with milder disorders. The concentrations of TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  showed positive correlation with soluble IL-2 receptor as well as procollagen type III in BAL fluid.

These results indicated that cytokines regulating lung fibrosis play important roles in the pathogenesis of interstitial pneumonia.