

難治性肺線維性疾患の重症化因子に関する検討

- ¹⁾ 鳥取大学医学部統合内科医学講座分子制御内科学分野 (主任 清水英治教授)
²⁾ 鳥取大学医学部生命科学科生体情報機能学講座病態生化学分野
³⁾ 鳥取大学医学部器官制御外科学講座救急・災害医学分野

石川総一郎¹⁾, 七條 碩²⁾, 高田美樹³⁾, 橋本 潔¹⁾

Factors for serious development of refractory pulmonary fibrosis

Soichiro ISHIKAWA¹⁾, Yutaka HICHIJO²⁾, Miki TAKATA³⁾, Kiyoshi HASHIMOTO¹⁾

¹⁾ *Division of Medical Oncology and Molecular Respirology, Department of Multidisciplinary Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683-8504, Japan.*

²⁾ *Division of Pathological Biochemistry, Department of Biomedical Sciences, School of Life Sciences, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683-8504, Japan*

³⁾ *Division of Emergency and Disaster Medicine, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683-8504, Japan*

ABSTRACT

Refractory pulmonary fibrosis is a progressive and fatal lung disease. Although the fibrosing mechanisms are not fully understood. To identify differentially expressed bronchoalveolar lavage fluid (BALF) proteins on bleomycin-induced (BLM) mice compared to vehicle-treated mice (negative control: NC) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) cases compared to sarcoidosis cases, we performed proteomic approaches using shotgun proteomic analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Complement C3 and Serotransferrin expressions in BALF were significantly higher on BLM mice than those on NC. But these protein expressions in BALF were significantly lower on IPF cases than those on sarcoidosis cases. We performed immunohistochemical analyses of pulmonary complement C3 in 14 patients with refractory pulmonary fibrosis, including fibrotic non-specific interstitial pneumonia (n = 10), IPF (n = 3) and chronic hypersensitivity pneumonitis (n = 1). The Kaplan-Meier method revealed that refractory pulmonary fibrosis patients with low expression of complement C3 (n = 6) had a significantly poorer prognosis than those with high expression of complement C3 (n = 8). These results indicate that expression level of complement C3 may have an important role in serious development of refractory pulmonary fibrosis. (Accepted on January 30, 2013)

Key words : pulmonary fibrosis, complement C3, serotransferrin, immunohistochemistry, shotgun liquid chromatography-tandem mass spectrometry

はじめに

難治性肺線維性疾患とは、慢性の経過で肺に不可逆性の線維化が進行し、治療抵抗性を示す予後不良な疾患群の総称である。

その代表疾患の一つである特発性肺線維症 (ideopathic pulmonary fibrosis : IPF) は、特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonias : IIPs) の7種存在する組織型の一型であり¹⁾、その中では最も頻度が高い。原因は不明で、慢性かつ進行性の経過を辿り予後不良である。罹患率は10万人に対して14.0-42.7人程度とされ²⁾、特に50歳以上の男性に多く、平均生存期間は2.5年とされる。病理学的には通常型間質性肺炎 (usual interstitial pneumonia : UIP) を呈し、特徴として胸膜直下あるいは小葉間結合織に沿った部を中心に肺胞構造の改変を伴う密な線維化と比較的幼若な線維芽細胞巢の混在や蜂巢肺形成を認め、病変は空間的に不均一な斑状分布を示す場合が多い。

線維性非特異性間質性肺炎 (fibrotic non-specific interstitial pneumonia : fNSIP) は、IIPsの一型である非特異性間質性肺炎 (non-specific interstitial pneumonia : NSIP) の内特に線維性変化の高度な亜型である³⁾。亜急性から慢性の発症で徐々に進行し、IPFと比較すれば予後良好であるが⁴⁾、線維化が進行し経時的に肺機能が低下する症例では平均生存期間は52ヶ月である⁵⁾。好発年齢は40-50歳だが、20歳以下の若年層にも発症する。高分解能CTにおいて、蜂巢肺形成は稀ですりガラス影や網状影が主体となる。病理学的特徴としては、病変は小葉中心から小葉辺縁にかけて比較的均一に分布し、時相の均一な間質の線維化を示し、肺胞構造は保持される場合が多い³⁾。IPFと比較して、気管支血管束に沿った病変の拡がり特徴的であるとされる。

過敏性肺炎 (hypersensitivity pneumonia : HP) は、真菌や担子菌などの有機粉塵の吸入により発症するⅢ型およびⅣ型アレルギー性疾患である。亜急性に発症し治療に反応するものが多いものの、抗原暴露が持続し慢性化した慢性過敏性肺炎 (chronic HP) においては、広範な線維化や蜂巢肺形成を認めIPFとの鑑別が困難な場合も多い⁶⁾。高度な線維化をきたす場合、抗原回避などの治療に反応せず、病勢を抑制できない場合が多

く、その際の平均生存期間は30-46ヵ月と報告される⁷⁾。

これら難治性肺線維性疾患においては時々、肺野に新たな陰影が出現するとともに急速かつ重篤な呼吸不全を呈する急性増悪という病態がみられ、その場合の治療反応性は特に乏しく、生命予後は極めて不良である^{8,9)}。

難治性肺線維性疾患の成因に関しては、何らかの刺激により生じた肺胞壁における過剰な慢性炎症が線維化を惹起すると長年考えられてきた。この考えのもとに、ステロイド薬や免疫調整薬などの強い抗炎症作用を有する薬剤が治療に用いられてきたが、その成績は必ずしも芳しいものではなかった。このため、近年では多系統機序説が提唱されている¹⁰⁾。すなわち自己免疫やウイルス感染など種々の原因により肺に傷害をきたすと、Th1/Th2免疫カスケードやオキシダント-アンチオキシダントカスケード、凝固カスケードなどが活性化し、結合組織成長因子 (connective tissue growth factor : CTGF)、トランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor : TGF)- β 、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor : PDGF)、トロンビンといった線維化メディエーターとIL-10, 12, IFN- γ などの抗線維化メディエーターの間に不均衡が生じる。これらのメディエーターは、肺胞上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症細胞など種々の細胞の機能に影響を与え、細胞間相互作用の変化により過剰な細胞外基質の蓄積を介した肺の線維化を助長するという。しかしながら一方では、IPF症例におけるマイクロアレイ解析によると、慢性炎症に関わるサイトカイン、ケモカイン、補体などの遺伝子群の重要性も報告されており¹¹⁾、依然として炎症機序説を否定し得ない。難治性肺線維性疾患の病態に関しては上述のように不明な点が多く、重篤な線維化の鍵を握るタンパク質を網羅的に解析する意義は大きい。

近年めざましいタンパク質解析技術の進歩により、疾患の病態解明においてプロテオーム解析を用いたタンパク質分析によるアプローチが行われるようになった。呼吸器疾患においては、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid : BALF) を用いた解析が頻繁に行われ、IPFやHP、サルコイドーシス、強皮症関連間質性肺炎などにおけるプロテオーム解析の報告がある^{12,13)}。

プロテオーム解析の手法としては、従来二次元電気泳動法 (two-dimensional electrophoresis : 2-DE) で得られたサンプルを質量分析装置により定量する手法が広く用いられてきた。しかしながら、分析できるタンパク質の種類に限られたり、再現性の高い結果を得にくかったりするなどの問題点を有していた。近年2-DEを介したプロテオーム解析に替わる手法として、生体より得られた試料をプロテアーゼ消化し、ペプチド混合物を直接液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析装置 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry : LC/MS/MS) で解析するショットガン法が開発された。この方法では、アガロースゲルの切り出し過程を経ずにサンプルを直接解析するため、より再現性の高い結果を得やすく、従来法では解析困難であった高分子量タンパク質や塩基性タンパク質の解析も可能になった。また異なるサンプルを異なる安定同位体試薬で標識することにより、サンプル間のタンパク質発現量をより厳密に比較することも可能となった。

今回我々は、難治性肺線維性疾患の重症化の鍵を握る分子を同定するべく、ブレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘発肺線維性モデルマウス (BLMマウス) とヒトIPF症例の双方のBALFを用いてショットガン法によるプロテオーム解析を行った。マウスの解析とヒトの解析の双方において肺線維性の重症化に関与していると考えられたComplement C3とSerotransferrinの内、Complement C3に関しては、難治性肺線維性疾患症例の外科的肺生検組織を用いた免疫組織化学による評価が可能であったので、合わせて報告する。

材料および方法

実験動物

野生型C57BL/6Nマウス (Charles River Japan, Yokohama, Japan) を、体重14.5 gから15.0 g前後に成長させた後に以下の処置を施した。BLM (ブレオ注射用5 mg, Nippon Kayaku, Tokyo, Japan) 1バイアルを、生理食塩水 (生食) 400 μ l で溶解し、この溶解液を浸透圧ポンプ (model 2001 Alza Pharmaceuticals, Palo Alto, CA, USA) 1個につき200 μ l注入し、BLMマウス用ポンプとした。ネガティブコントロール (negative control : NC) マウス (NCマウス) には、生食

200 μ lを入れたポンプを使用した。マウスをジエチルエーテル (Wako, Osaka, Japan) で吸入麻酔後、後頸部の皮膚に切開を加え、背部の皮下を鈍的に剥離した。皮下に設けたスペースにポンプを挿入し縫合した¹⁴⁾。ポンプ挿入日をday 1とした。

マウスの気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL) と肺組織採取

day11からday42のマウスに対して、ジエチルエーテル麻酔後、経心腔脱血処理により屠殺し、全肺に対して6 mlの生食を用いてBALを行った。回収したBALFは1,300 rpm, 10 min, 4℃で遠沈後、cell pelletをスライドグラス上に塗布しDiffQuick染色 (SYSMEX CORPORATION, Kobe, Japan) を行い、鏡検にて白血球細胞分画を算定した。BALF上清はプロテオーム解析用とし、-80℃で凍結保存した。BAL終了後に右肺組織を採取し、10%ホルマリンを満たした10 ml注射器筒内で十分に陰圧をかけ伸展固定を行い、通常処理過程を経た後、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色標本を作成した。

マウス肺の病理組織学的解析

肺の線維化の半定量に関しては、マウス肺組織のH-E染色標本を用いて、線維化の程度に応じてAshcroft score (AS) を0 (線維化なし) から8 (完全な線維性組織) の範囲内でスコアリングした¹⁵⁾。

実験動物として作製したBLMマウス雄12匹、雌20匹のASを参考に、ASの異なる雄、雌4匹ずつを実験に用いた。またNCマウスには、作製したマウスの雄13匹、雌16匹の中から、各々のBLMマウスと性別、週齢、ポンプ挿入時の体重が同等であるマウスをそれぞれ1匹、計8匹選択した。

IPF症例およびサルコイドーシス (サ症) 症例のBAL

平成13年3月から平成23年4月までに当科でHRCT所見、外科的肺生検、あるいはその双方によりIPFと診断された症例のうち、BALが施行された6例 (男性5例、女性1例) を解析対象とした。年齢、性別、喫煙歴をそれぞれのIPF症例に合致させたサ症症例を1例ずつ選択し、計6例 (男性5例、

女性1例)のBALFを対照検体とした。BALは一般臨床で施行する方法で行い、得られたBALFはマウスのBALFと同様の処理を施した。

タンパク質の精製とショットガンプロテオーム解析

-80℃で凍結保存されていたマウスおよびヒトのBALF上清を解凍後、800 μ lを遠心分離(10,000 rpm, 10 min, 4℃)し、その上清500 μ lを回収した。得られた上清500 μ lを限外ろ過カートリッジ (AmiconUltra-0.5 ml 10 K, Millipore, Billerica, USA)を用いて、さらに遠心分離(14,000 rpm, 15 min, 室温)した。ろ液を廃棄し50 mM triethylammonium hydrogencarbonate solution (TEAB) (Wako, Osaka, Japan)を加え、遠心分離(14,000 rpm, 15 min, 室温)を行い、この操作を4回繰り返した。限外ろ過カートリッジの膜上に残ったタンパク質溶液約30 μ lを遠心分離(1,000 rpm, 2 min, 室温)し、測定用サンプルとした。

500 mM TEABを用いてサンプル溶液中のタンパク質濃度が100 μ g / 20 μ lとなるよう濃度調整を行い、20 μ lをiTRAQ Reagent Multi-Plex Kit (ABSciex, Foster City, USA)により還元、システインブロックした後、トリプシン消化した。トリプシン消化後のサンプルに対し、iTRAQ Reagent Multi-Plex Kit内の4種の安定同位体標識試薬を用いて各サンプルのペプチド混合物を標識した。その後すべてのサンプルを混和し、0.1%ギ酸 (Wako, Osaka, Japan)を用いてpH 2.5から3.3に調整後、陽イオン交換カラム (ICAT Cartridge-CationExchange : AB Sciex, Foster City, USA)を用いて精製し、得られた各1mlのフラクションサンプル6種類を遠心濃縮機/低温トラップ (TIETECH, Nagoya, Japan)により39℃で12時間から15時間かけて約100 μ lになるまで遠心濃縮した。

濃縮した溶液に、全量が1 mlとなるように0.1%ギ酸を加え、カラム (Sep- Pak Light C18 Cartridges, Waters, Milford, USA)を用いて固相抽出を行った。溶出画分1 mlを再度遠心濃縮機/低温トラップにより、100 μ lになるまで39℃、5時間から8時間かけて遠心濃縮し、最終サンプル溶液とした。

最終サンプル溶液20 μ lを用いて、LC/MS/MS

(QTRAP 5500, Applied Biosystems, Carlsbad, USA)によるショットガンプロテオーム解析を行った。得られたデータを用いて、Protein Pilotソフトウェア (AB Sciex, Foster City, USA)により発現タンパク質を同定し、サンプル間における発現量を比較した。

難治性肺線維性疾患症例と生検肺の病理組織学的解析

平成12年から平成24年の間に当院においてvideo assisted thoracoscopic surgery (VATS)下肺生検を施行し、IPF, NSIP, またはchronic HPと診断した14例を対象症例とした。生検肺組織は10%ホルマリンにより固定し、パラフィン包埋した。病理組織学的診断は2名の異なる病理医により行い、診断に乖離が生じた場合には、呼吸器内科医、放射線科医、病理医の総合討議によるClinico-Radiological-Pathological Diagnosisをもって診断とした。なお対照検体として、平成14年から平成21年の間に当院において外科的肺切除を施行した肺腺癌6症例の肺組織の内、癌組織から可能な限り離れた部の正常肺組織を使用した。

生検肺組織のH-E染色標本を用いてASを算定し、線維化の重症度の指標とした。

免疫組織化学においては、パラフィン包埋切片を3 μ mに薄切し、シランコーティングスライドガラス上で乾燥させた切片を用いた。キシレン、エタノールにより脱パラフィン、脱水を行い、0.01 mol/l クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 内で92℃、20分間のマイクロウェーブ処理にて抗原を賦活した。1次抗体には、anti-Complement C3 antibody (LifeSpan BioSciences, mouse monoclonal, 10 μ g/ml) およびanti-Transferrin antibody (Acris Antibodies, mouse monoclonal, 10 μ g/ml), anti-Transferrin antibody (abcam, rabbit polyclonal, 2 μ g/ml)を使用した。免疫反応はstreptavidin-biotin-peroxidase complex technique (SAB) 法を用いて検出し、発色はdiaminobenzidine (DAB) により行い、最後にhematoxylinを用いて核染色を施した。光学顕微鏡にて100倍視野でランダムに5視野を鏡検し、そのいずれかにおいて肺胞マクロファージおよび気道上皮細胞における陽性反応が確認された場合に陽性症例と判定した。

表1

a BLMマウスの背景とBALF所見										
個体番号	性別	ポンプ挿入時体重 (g)	解剖時ポンプ挿入時からの日数 (日)	週齢 (週)	回収率 (%)	BALF細胞分画 (%)				肺組織評価 Ashcroft score (AS)
						Mφ	Lym	Neu	Eo	
BLM1	♂	14.5	14	6	73	77.0	4.5	18.5	0.0	1.11
BLM2	♂	14.7	18	7	77	80.0	13.0	7.0	0.0	2.14
BLM3	♂	14.5	33	9	83	85.0	9.5	5.5	0.0	3.42
BLM4	♂	14.8	42	10	80	87.5	11.5	1.0	0.0	4.24
BLM5	♀	14.4	11	6	80	81.5	5.5	13.0	0.0	0.98
BLM6	♀	14.5	25	8	87	85.8	12.2	2.0	0.0	1.93
BLM7	♀	15.0	17	7	58	23.3	72.7	4.0	0.0	3.20
BLM8	♀	15.1	32	9	92	58.0	38.0	4.0	0.0	4.12

b NCマウスの背景とBALF所見										
個体番号	性別	ポンプ挿入時体重 (g)	解剖時ポンプ挿入時からの日数 (日)	週齢 (週)	回収率 (%)	BALF細胞分画 (%)				肺組織評価 Ashcroft score (AS)
						Mφ	Lym	Neu	Eo	
NC1	♂	14.7	13	6	90	93.0	7.0	0.0	0.0	0.00
NC2	♂	14.3	18	7	87	95.5	4.0	0.5	0.0	0.00
NC3	♂	14.9	33	9	83	96.5	3.5	0.0	0.0	0.00
NC4	♂	14.6	42	10	77	100.0	0.0	0.0	0.0	0.00
NC5	♀	14.5	12	6	90	99.0	1.0	0.0	0.0	0.00
NC6	♀	14.9	25	8	83	97.0	3.0	0.0	0.0	0.00
NC7	♀	15.6	17	7	83	95.5	4.0	0.5	0.0	0.00
NC8	♀	14.4	32	9	90	99.0	1.0	0.0	0.0	0.00

統計学的解析

BALF検体間の白血球分画およびタンパク質発現量の差異は、t検定により検出した。種々の臨床病理学的因子間の相関に関しては χ^2 検定またはFisherの直接確率計算およびMann-Whitney検定により解析した。生存分析はKaplan-Meier法により行い、log-rank法により有意差を検定した。いずれの検定においても、 $p < 0.05$ をもって統計学的有意差があるものと判定した。

倫理指針

本研究は鳥取大学医学部倫理審査委員会の審査と承認のもとに行い、ヒト検体を用いた検討はヘルシンキ宣言に準拠して施行した。

結果

マウスの背景とBALF所見

表1に、プロテオーム解析に用いたマウスの個体番号、それぞれの性別、ポンプ挿入時の体重、解剖時のポンプ挿入時からの日数と週齢、BALFの回収率と白血球分画およびASを示す (BLMマウス：表1-a, NCマウス：表1-b)。

BLMマウス群におけるBALFのマクロファージ分画は、NCと比較し有意に少なく ($p = 0.014$)、好中球分画 ($p = 0.016$) はBLMマウス群で有意に多かった。なお、リンパ球分画は両群間に有意な差はみられず ($p = 0.068$)、好酸球は両群ともに検出されなかった。

BLMマウス群のASに関しては、雄は1.11, 2.14, 3.42, 4.24, 雌は0.98, 1.93, 3.20, 4.12と線維化の軽度なものから中等度なもので、ASが偏ら

表2

a IPF症例の患者背景とBALF所見

症例	性別	年齢 (歳)	喫煙歴	生命 予後	生存期間 (週)	KL-6 (U/ml)	%VC (%)	%DLCO (%)	AaDO ₂ (Torr)	総細胞数		細胞分画 (%)			
										($\times 10^6$ /ml)	M ϕ	Lym	Neu	Eo	Baso
IPF1	男	77	あり	死亡	73	737	91.4	35.4	33.1	0.93	83	6	11	0	0
IPF2	男	80	あり	生存	91	999	108.8	64.9	0.8	5.70	96	0	2	2	0
IPF3	男	70	あり	死亡	52	666	38.6	*	23.3	0.70	76	4	9	10	1
IPF4	男	68	あり	生存	84	968	87.1	38.5	12.0	1.41	94	5	1	0	0
IPF5	男	67	あり	死亡	48	1020	77.7	25.3	16.6	*	86	3	3	8	0
IPF6	女	69	なし	生存	204	774	61.1	42.4	13.2	1.05	80	10	9	1	0

b サ症症例の患者背景とBALF所見

症例	性別	年齢 (歳)	喫煙歴	生命 予後	生存期間 (週)	KL-6 (U/ml)	%VC (%)	%DLCO (%)	AaDO ₂ (Torr)	総細胞数		細胞分画 (%)			
										($\times 10^6$ /ml)	M ϕ	Lym	Neu	Eo	Baso
サ症1	男	28	あり	*	*	*	133.3	*	-2.2	0.66	59	41	0	0	0
サ症2	男	31	あり	*	*	*	*	*	*	*	84	16	0	0	0
サ症3	男	74	あり	生存	579	*	110.2	76.7	*	0.90	75	16	9	0	0
サ症4	男	55	あり	*	*	270	120.4	95.0	*	1.76	93	7	0	0	0
サ症5	男	57	あり	生存	175	213	136.6	55.3	35.2	0.07	28	69	1	2	0
サ症6	女	60	なし	*	*	*	126.3	95.2	*	0.08	77	23	0	0	0

* : 不明

ないように選択した。

NCに関しては、性別、週齢、ポンプ挿入時の体重が8匹のBLMマウス各々と同等になるよう雄、雌4匹ずつ選択し、それぞれのBLMマウスに対応する個体番号とした (BLM1-NC1, BLM2-NC2, BLM3-NC3, BLM4-NC4, BLM5-NC5, BLM6-NC6, BLM7-NC7, BLM8-NC8)。

ヒトIPF症例およびサ症症例の背景とBALF所見

表2に、プロテオーム解析に用いたヒト症例の症例番号、それぞれの臨床的背景、検査データ、BALFの総細胞数と白血球分画を示す (IPF症例：表2-a, サ症症例：表2-b)。

IPF症例群とサ症症例群の比較において、BALFの総細胞数 ($p = 0.264$)、マクロファージ分画 ($p = 0.128$)、リンパ球分画 ($p = 0.053$)、好中球分画 ($p = 0.078$)、好酸球分画 ($p = 0.112$)、好塩基球分画 ($p = 0.363$) のいずれにおいても両群間に有意差は認められなかった。

性別、年齢、喫煙歴をそれぞれのIPF症例に可能な限り合致させたサ症症例を1例ずつ選択し、各々のIPF症例に対応する症例番号とした (IPF1-サ症1, IPF2-サ症2, IPF3-サ症3, IPF4-サ症4,

IPF5-サ症5, IPF6-サ症6)。

ショットガンプロテオーム解析と肺線維症重症化関連タンパク質の選別

ショットガンプロテオーム解析の結果検出されたタンパク質の種類と、肺線維症の進展に関与していると判断したタンパク質の選別過程を図1に示す。

まず雄マウスの4対の比較を行い (BLM1 vs. NC1, BLM2 vs. NC2, BLM3 vs. NC3, BLM4 vs. NC4), BLMマウスにおいて各々のペアであるNCマウスと比べて有意に高発現または低発現しているタンパク質をすべて選別した。続いて雌マウスの4対の比較を行い (BLM5 vs. NC5, BLM6 vs. NC6, BLM7 vs. NC7, BLM8 vs. NC8), BLMマウスにおいて各々に対応するNCマウスと比べて有意に高発現または低発現しているタンパク質をすべて選別した。性別によるバイアスを除外する目的で、雄の実験で得られた結果と雌の実験で得られた結果の双方に共通するタンパク質をマウスの解析における肺線維症重症化関連タンパク質であると判断した。

次にヒトの6対の比較を行い (IPF1 vs. サ症1,

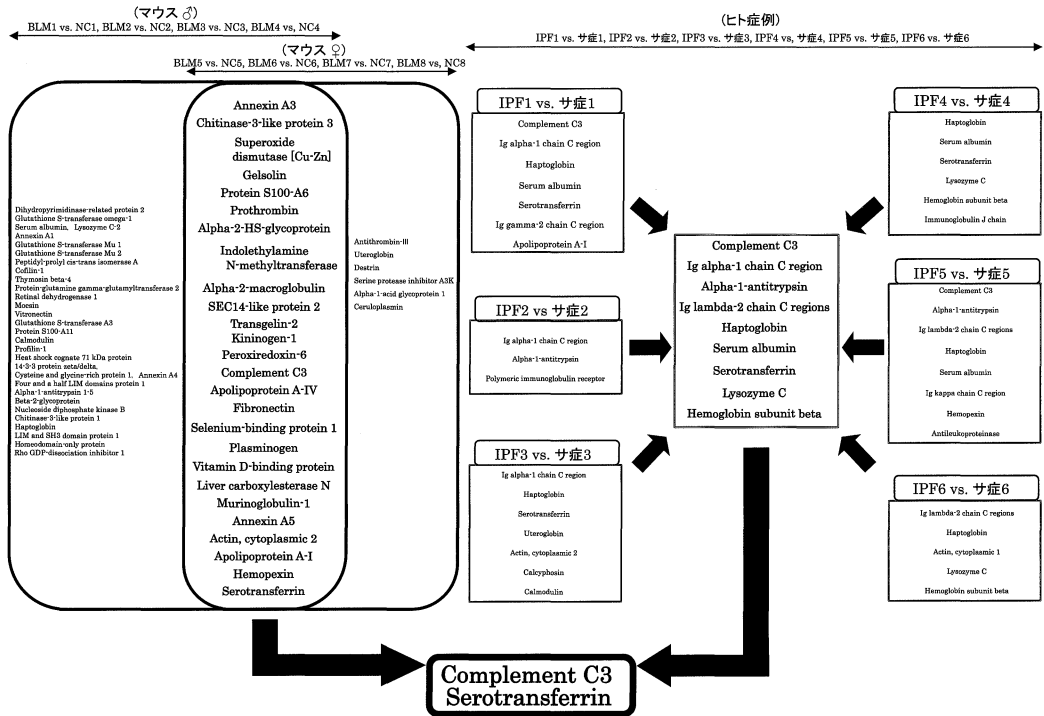


図1 ショットガンプロテオーム解析と肺線維症重症化関連タンパク質の選別

雄ブレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘発肺線維症モデルマウス (BLMマウス) とネガティブコントロール (negative control: NC) マウス (NCマウス) の気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) を用いて、BLM1 vs. NC1, BLM2 vs. NC2, BLM3 vs. NC3, BLM4 vs. NC4の4対の比較を行い、発現量に有意差を認めるタンパク質をすべて選別した。雌マウスにおいても同様の比較を行い、発現量に有意差を認めるタンパク質をすべて選別した。双方に共通なものを、性別に関わらずマウス肺線維症の進展に関与するタンパク質であると判断した。ヒト症例においては、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) 症例とサルコイドーシス症 (サ症) 症例のBALFを使用し、IPF1 vs. サ症1, IPF2 vs. サ症2, IPF3 vs. サ症3, IPF4 vs. サ症4, IPF5 vs. サ症5, IPF6 vs. サ症6の比較を行い、発現量に有意差を認めるタンパク質をそれぞれ選別した。少なくとも2対以上の比較で再現性を認めたものを、ヒト肺線維症の進展に関与するタンパク質であると判断した。マウスとヒトに共通していたComplement C3とSerotransferrinを、動物種に関わらず肺線維症の進展に関与するタンパク質であると判断した。

IPF2 vs. サ症2, IPF3 vs. サ症3, IPF4 vs. サ症4, IPF5 vs. サ症5, IPF6 vs. サ症6), IPF症例において各々の対であるサ症症例と比較して有意に高発現または低発現しているタンパク質をそれぞれの対で選別した。6対の内女性は1対のみであったため、性別によるバイアスは除外し得ないものと考え、6対の内少なくとも2対以上において再現性が認められたものを、ヒト症例のBALFを用いた解析における肺線維症重症化関連タンパク質と判断した。

最後に、マウスとヒトの結果に共通していたComplement C3とSerotransferrinを、動物種に関

わらず肺線維症の重症化に関連するタンパク質であると判断した。

ショットガンプロテオーム解析におけるComplement C3とSerotransferrinの発現

ショットガンプロテオーム解析におけるComplement C3, Serotransferrinの結果の詳細を図2に示す。

図2-aでは、各NCマウスにおけるComplement C3の発現量を1とした時のそれぞれに対応するBLMマウスにおける相対発現量を示している。全てのBLMマウスにおいて、Complement C3の

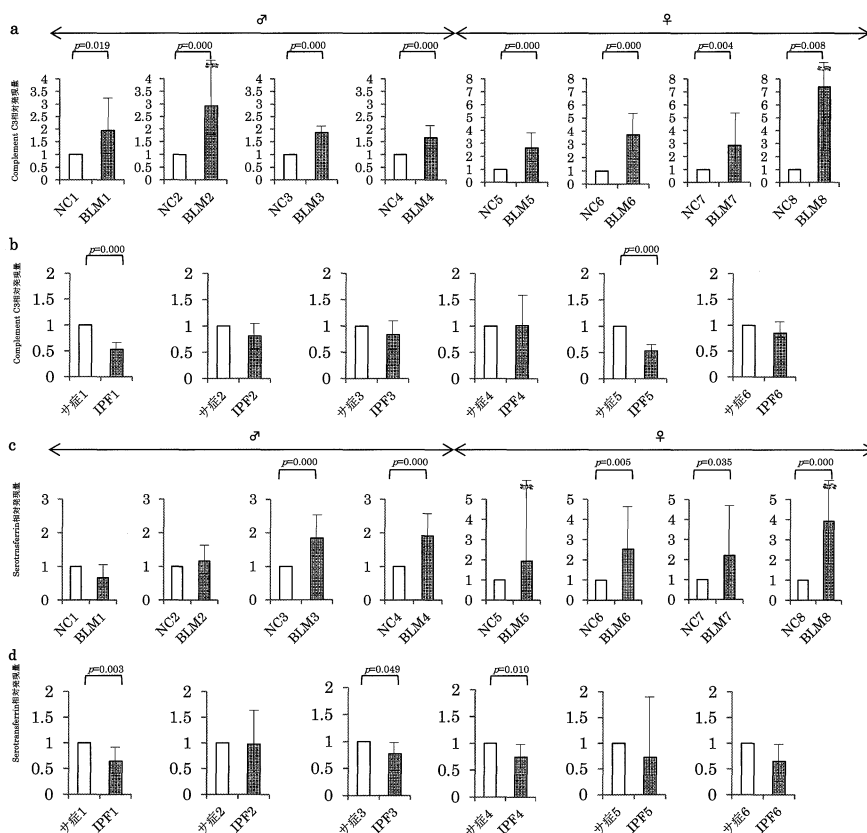


図2 ショットガンプロテオーム解析におけるComplement C3およびSerotransferrinの発現

ショットガンプロテオーム解析におけるComplement C3, Serotransferrinの結果の詳細を示す。

a: 各NCマウスにおけるComplement C3の発現量を1とした時の、各々に対応するBLMマウスにおける相対発現量を示している。全てのBLMマウスにおいて、Complement C3の相対発現量は各NCマウスと比較して有意に高値であった。

b: 各サ症例におけるComplement C3の発現量を1とした時の各々に対応するIPF症例における相対発現量を示している。IPF1およびIPF 5におけるComplement C3の相対発現量は各サ症例と比較して有意に低値であり、マウスのBALFとは相反する結果を示した。

c: 各NCマウスにおけるSerotransferrinの発現量を1とした時の各々に対応するBLMマウスにおける相対発現量を示している。BLM3, 4, 6, 7, 8において、Serotransferrinの相対発現量は各NCマウスと比較して有意に高値であった。

d: 各サ症例におけるSerotransferrinの発現量を1とした時の各々に対応するIPF症例における相対発現量を示している。IPF1, 3, 4におけるSerotransferrinの相対発現量は各サ症例と比較して有意に低値であり、マウスのBALFとは相反する結果を示した。

相対発現量は各NCマウスと比較して有意に高値であった (BLM1/NC1 : $p = 0.019$, BLM2/NC2 : $p = 0.000$, BLM3/NC3 : $p = 0.000$, BLM4/NC4 : $p = 0.000$, BLM5/NC5 : $p = 0.000$, BLM6/NC6 : $p = 0.000$, BLM7/NC7 : $p = 0.004$, BLM8/NC8 : $p = 0.008$)。

図2-bでは、各サ症例におけるComplement

C3の発現量を1とした時のそれぞれに対応するIPF症例における相対発現量を示している。IPF1およびIPF 5におけるComplement C3の相対発現量はそれぞれサ症1およびサ症5と比較して有意に低値であり、マウスのBALFとは相反する結果を示した (IPF1/サ症1 : $p = 0.000$, IPF5/サ症5 : $p = 0.000$)。

表3

外科的肺生検を施行した14症例の臨床病理学的因子

症例	年齢 (歳)	性別	総合 診断	生命 予後	生存期間 (週)	死因	喫煙歴	KL-6 (U/ml)	AaD02 (Torr)	%VC (%)	%DL _{co} (%)	AS	Complement C3
1	50	女	fNSIP	生存	287		never	278	10.8	90.2	68.7	7.3	陽性
2	58	女	fNSIP	死亡	399	AAA破裂	current	731	7.5	91.7	63.2	4.8	陰性
3	53	女	fNSIP	生存	381		current	8681	23.1	73.0	34.9	5.9	陽性
4	72	男	fNSIP	死亡	300	急性増悪	never	1358	9.0	117.8	71.5	6.4	陰性
5	64	女	fNSIP	生存	540		never	2697	32.4	60.9	41.4	6.1	陽性
6	64	男	IPF/UIP	死亡	640	急性増悪	former	1100	21.7	95.8	39.3	5.2	陽性
7	75	男	fNSIP	死亡	119	急性増悪	never	2178	34.2	56.2	28.2	6.8	陰性
8	68	男	chronic HP	生存	254		never	1236	21.6	72.5	54.8	7.7	陽性
9	62	男	fNSIP	死亡	65	急性増悪	current	1614	26.8	63.8	*	6.6	陰性
10	62	男	fNSIP	死亡	104	急性増悪	never	1125	34.8	67.1	36.4	6.1	陽性
11	66	男	fNSIP	死亡	249	急性増悪	current	1700	18.6	78.1	43.7	5.3	陰性
12	50	男	IPF/UIP	生存	278		never	607	5.1	86.4	54.5	4.4	陽性
13	69	女	IPF/UIP	生存	167		never	774	13.5	61.1	42.4	7.5	陽性
14	42	女	fNSIP	生存	60		former	4280	8.3	67.5	48.5	5.2	陰性

*：症例9のDL_{co}は施行できず

fNSIP：fibrotic non-specific interstitial pneumonia, IPF/UIP：idiopathic pulmonary fibrosis/Usual interstitial pneumonia, HP：hypersensitivity pneumonitis

AAA：abdominal aortic aneurysm (腹部大動脈瘤)

AS：Ascroft Score

図2-cでは、各NCマウスにおけるSerotransferrinの発現量を1とした時のそれぞれに対応するBLMマウスにおける相対発現量を示している。BLM3, 4, 6, 7, 8において、Serotransferrinの相対発現量はそれぞれNC3, 4, 6, 7, 8と比較して有意に高値であった (BLM3/NC3：p = 0.000, BLM4/NC4：p = 0.000, BLM6/NC6：p = 0.005, BLM7/NC7：p = 0.035, BLM8/NC8：p = 0.000)。

図2-dでは、各サ症例におけるSerotransferrinの発現量を1とした時のそれぞれに対応するIPF症例における相対発現量を示している。IPF1, 3, 4におけるSerotransferrinの相対発現量はそれぞれサ症1, 3, 4と比較して有意に低値であり、マウスのBALFとは相反する結果を示した (IPF1/サ症1：p = 0.003, IPF3/サ症3：p = 0.049, IPF4/サ症4：p = 0.010)。

免疫組織化学的検討を行った難治性肺線維性疾患患者の臨床病理学的因子

VATS下肺生検を施行した14症例の内訳は、男性8例、女性6例、年齢は42歳から75歳であった。喫煙歴は8例がnever smoker, 2例がformer smoker, 4例がcurrent smokerであった。総合診断はfNSIPが10例、IPFが3例、chronic HPが1例

であった。IPFの1例に関しては、病理組織診断がfNSIPとUIPに乖離したため、呼吸器内科医、放射線科医、病理医の総合討議によりIPFと総合診断した。14例中7例が死亡し、死因に関しては6例が原病の急性増悪、1例が腹部大動脈瘤破裂であった (表3)。

生検肺組織を用いた免疫組織化学的検討

VATS下生検肺組織を用いて、Complement C3とSerotransferrinの免疫組織化学的検討を行った。Serotransferrinに関しては、異なる2種の1次抗体を用いて検討したものの、血管内や肺胞腔内の液性成分に免疫反応を認めるのみで評価に耐え得る結果ではなかった。一方Complement C3に関しては免疫組織化学による評価が可能であったので、結果を図3に示す。

全14症例の内、8例がComplement C3陽性、6例がComplement C3陰性と判定した。肺癌症例より得られた正常コントロール肺組織においては、6症例全てにおいて肺胞マクロファージ内に強いComplement C3陽性反応を認め、気道上皮細胞においてもわずかに反応が観察された。その内2症例の結果を図3-a, bに示している。図3-c, dは、代表的なComplement C3陽性症例の結果を

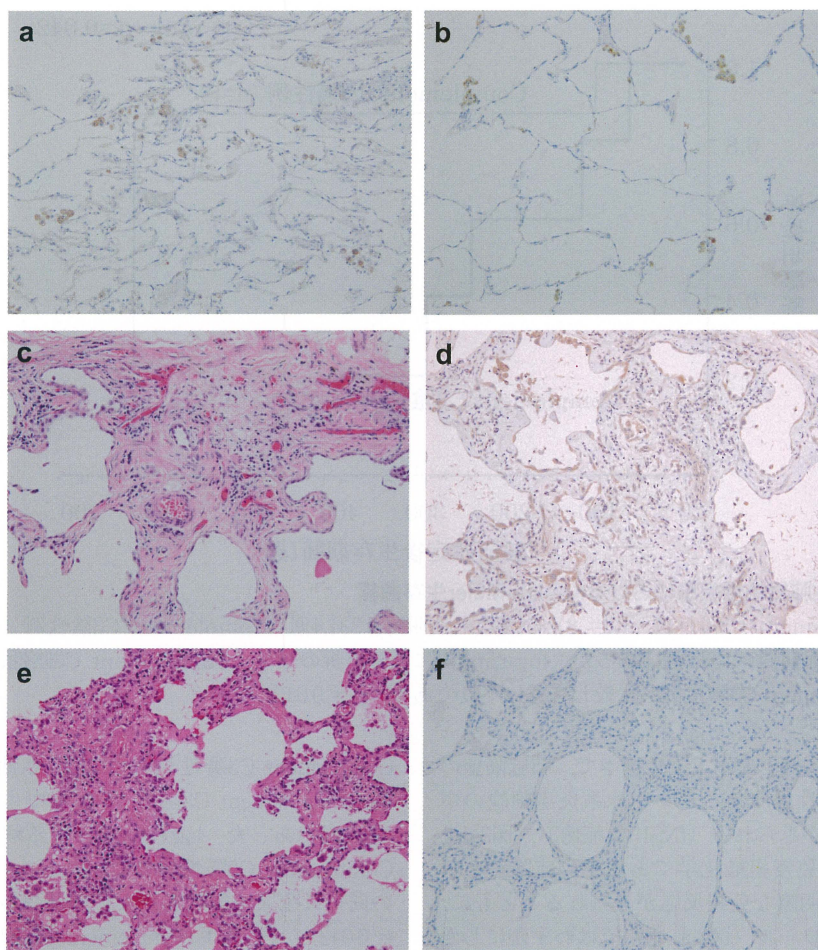


図3 Video assisted thoracoscopic surgery (VATS) 下肺生検組織を用いたComplement C3の免疫組織化学

難治性肺線維性疾患と診断された14症例のVATS下肺生検組織を用いて行った免疫組織化学の内、評価が可能であったComplement C3の結果を示す。

a, b: 異なる肺癌症例より得られた正常コントロール肺組織におけるComplement C3の免疫組織化学。2症例のいずれにおいても肺胞マクロファージ内に強いComplement C3陽性反応を認める。気道上皮細胞における反応もわずかに観察される。

c: 代表的なComplement C3陽性症例のH-E染色像。肺胞隔壁の顕著な線維性肥厚と、リンパ球系炎症細胞の中等度の浸潤がみられる (fNSIP: 症例3)。

d: cの症例におけるComplement C3の免疫組織化学。肺胞マクロファージに明瞭な免疫反応がみられるとともに、正常コントロール肺組織 (a, b) でわずかな反応しかみられなかった気道上皮細胞に明瞭なComplement C3陽性反応が確認される。

e: 代表的なComplement C3陰性症例のH-E染色像。肺胞隔壁の顕著な線維性肥厚と、主にリンパ球系炎症細胞の中等度の浸潤がみられる (fNSIP: 症例14)。

f: cと同じ症例におけるComplement C3の免疫組織化学。気道上皮細胞においてComplement C3の免疫反応がみられないだけでなく、正常コントロール肺組織 (a, b) で観察されるマクロファージの陽性反応も確認されない。

全14症例中、8例がComplement C3陽性、6例がComplement C3陰性であった。

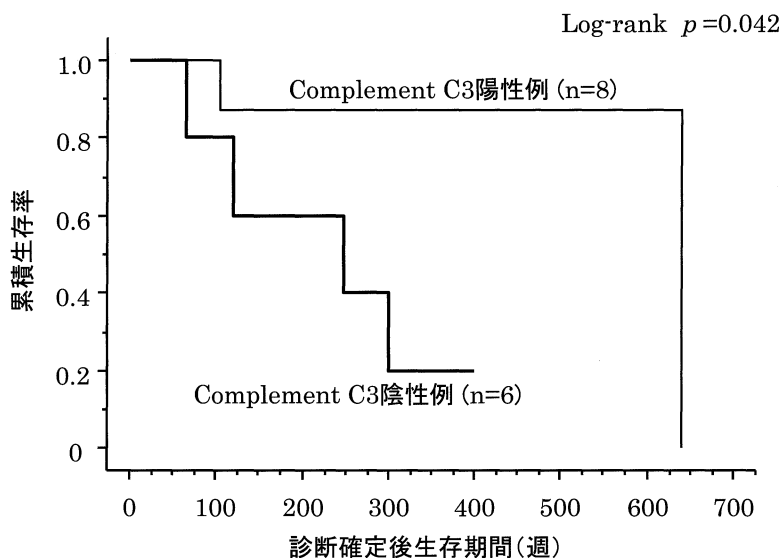


図4 難治性肺線維性疾患におけるKaplan-Meier生存曲線

Complement C3陽性例 (n = 8) の平均生存期間は331.4週, Complement C3陰性例 (n = 6) の平均生存期間は198.7週であった. log-rank法による解析の結果, Complement C3陰性例の予後はComplement C3陽性例と比較し有意に不良である ($p = 0.042$).

示している. 図3-cはH-E染色標本で, 肺胞隔壁の顕著な線維性肥厚と, リンパ球系炎症細胞の中等度の浸潤がみられる (fNSIP: 症例3). 図3-dはその症例の免疫組織化学であるが, 肺胞マクロファージに明瞭な免疫反応がみられるとともに, 正常コントロール (図3-a, b) ではわずかにしか観察されなかった気道上皮細胞における明らかなComplement C3陽性反応が確認される. この傾向は8例の陽性症例に共通していた. 図3-e, fは, 代表的なComplement C3陰性症例の結果を示している. 図3-eはH-E染色標本で, 肺胞隔壁の顕著な線維性肥厚と, リンパ球系炎症細胞の中等度の浸潤がみられる (fNSIP: 症例14). 図3-fはその症例の免疫組織化学であるが, 気道上皮細胞におけるComplement C3の免疫反応がみられないだけでなく, 正常コントロール (図3-a, b) で観察されたマクロファージにおける陽性反応も確認されない. この傾向は6例の陰性症例のすべてに共通していた.

生存分析

Kaplan-Meier法を用いて行った難治性肺線維性疾患14症例の生存分析の結果を図4に示す.

Complement C3陽性例の平均生存期間は331.4週, Complement C3陰性例の平均生存期間は198.7週であった. log-rank法による解析の結果, Complement C3陽性例とComplement C3陰性例の間には生命予後に有意な差異が認められた ($p = 0.042$). すなわちComplement C3陰性例の方が陽性例に比べて有意に予後不良であった.

考 察

Complement C3は, ジスルフィド結合した α 鎖と β 鎖からなる分子量180kDa, アミノ酸残基1663の血漿タンパク質である. 19世紀後半に発見された補体の一種で, 補体活性化経路である古典経路, 副次経路, レクチン経路のすべてにおいて中心的な役割をはたす¹⁶⁾. 補体系には, Complement C1からC9までの9種類および, B因子, D因子, プロベルジンの計12種類が存在し, これらが生体防御反応において一連のカスケードを形成している. Complement C3は, 活性化されるとC3aとC3bに分解され, C3aは肥満細胞, 好中球, リンパ球などを刺激することで血管作動性物質を産生, 放出し, 血管透過性の亢進や平滑筋収縮を惹起することが知られており, C3bは微

生物に結合することでオプソニン効果を発揮する他、Complement C3, C5転換酵素の一部として機能することが知られている¹⁶⁾。Complement C3は、ヒトの体内では肝臓の他にマクロファージや単球で産生され、血漿中に豊富に存在する¹⁷⁾。全身性エリテマトーデスや膜性増殖性糸球体腎炎で免疫複合体の形成に伴い消費性に血清Complement C3が低下する現象は、患者の診断や病勢把握に頻用されている^{18,19)}。

ヒト正常肺組織においては、C3bの分解産物であるC3cが肺胞マクロファージに特に多く存在し、肺胞上皮にも比較的少量存在すると報告されており、Complement C3は主に肺胞マクロファージに局在する²⁰⁾。一方肺疾患症例においては、かねてよりBALFを使用したComplement C3の発現に関する報告が散見される。亜急性過敏性肺炎症例のBALFをELISA法で検討し、Complement C3の発現量がサ症症例のBALFと比べて有意に高値であったというSodaらの報告²¹⁾や、IPF患者のBALFを2-DE法で解析し、Complement C3の発現量がサ症症例のBALFと比べて有意に低値であったというRottoliらの報告¹³⁾である。これらの報告は、同じ肺の疾患のBALFを検討した結果であるにもかかわらず、一方ではComplement C3の発現量が高値で、一方では低値であるという相反する結果に思われる。しかしながら、これらの結果は我々が行ったショットガンプロテオーム解析の結果と非常に似通っている。すなわち我々の解析においても、Complement C3の発現は、NCマウスと比べてBLMマウスのBALFで有意に高値であり、またサ症症例と比較してIPF症例のBALFで有意に低値であった (IPF1 vs. サ症1, IPF5 vs. サ症5)。BLMマウスは従来肺線維症のモデルとして頻用され、種々の程度の線維化病変を呈するものの、その成立過程はまぎれもなく薬剤により誘発した肺の炎症である²²⁾。すなわちBLMマウスにおける肺の線維化は炎症を起源としている。今回の解析でみられたBLMマウスのBALF中Complement C3の高値は、肺に炎症が惹起され、続いて線維化病変を形成する過程における高発現であると解釈できる。亜急性過敏性肺炎も有機粉塵の吸入により肺に誘発される炎症であり、抗原を回避しなければ後に線維化を形成する。病変の成立過程はBLMマウスの病変に類似しており、Sodaらの報告でBALF中Complement

C3が高発現した事実は納得できる。一方IPFは原因不明の難治性肺線維性疾患である。Rottoliらの考察に、IPF症例のBALF中Complement C3が低発現である理由についての記載はないが、我々のショットガンプロテオーム解析とまったく同様の結果が得られたことは大変興味深い。

先述したように、昨今難治性肺線維性疾患の成因に関しては、炎症機序説でなく炎症を含めた多系統機序説が主流である。IPF症例のBALFにおけるComplement C3の低発現は、肺の線維化の進展において炎症を介するプロセスに関与しているとは思えないが、その他の成因に関与している可能性は十分に考えられる。近年Complement C3のヘルパーT細胞に対する興味深い作用が明らかになった。PekkarinenらはComplement C3ノックアウトマウスを卵白アルブミンにより感作刺激し、リンパ節におけるサイトカインの発現に関する検討を行った結果、コントロールと比較してIFN- γ 及びIL-12の低下が確認され、Complement C3とIFN- γ 、IL-12の発現に正の調節機構が存在することを報告した²³⁾。IFN- γ は極めて重要な線維化抑制因子である²⁴⁾。Pekkarinenらの報告を勘案すれば、肺におけるComplement C3の低発現は、同時にIFN- γ の低発現を惹起し、Th1/Th2バランスをTh2優位の不均衡に陥らせ、肺の線維化を助長する可能性が考えられる。

ショットガンプロテオーム解析の結果を受け、我々は難治性肺線維性疾患患者のVATS下肺生検組織におけるComplement C3の発現について免疫組織化学的検討を加えた。正常肺組織においては主に肺胞腔内マクロファージとわずかに気道上皮細胞に局在を認めたものの、難治性肺線維性疾患患者の肺組織においては、陽性例ではマクロファージのみならず気道上皮細胞にも明らかな局在を認め、陰性例ではマクロファージ、気道上皮細胞ともに局在がみられなかった。また生存分析では、Complement C3陰性症例群は陽性症例群と比較して有意に生命予後不良であった。これらの結果を勘案すれば、難治性肺線維性疾患における気道上皮細胞におけるComplement C3の高発現は生命予後の悪化を抑制している可能性がある。第一に想起される機序は、補体の代表的機能である感染防御機構である。実際、免疫組織化学におけるComplement C3陰性の6例の予後は、観察期間が60週と短い1例 (症例14) の生存が確認

されたのみで、1例は他病死、4例は肺感染症を契機に発症した急性増悪で死に至った。症例数の不足により統計学的有意差は検出されなかったものの、Complement C3陰性例では、感染を契機に発症する急性増悪に特に注意を払うべきかもしれない。第二に想起される機序は、Complement C3による線維化抑制機構である。Complement C3陰性の6例の内他病死と観察期間の短い1例(症例14)を除く4例すべてにおいて、高分解能CTにおける線維化病変と%VCの経時的な増悪が確認された。先に述べたように、Complement C3の低発現は、IFN- γ の低発現を伴い肺の線維化を助長する恐れがあり、このことが生命予後に悪影響をおよぼしているのかもしれない。

一方でVATS下肺生検組織におけるComplement C3の発現は、表3に示した年齢、性別、総合診断、喫煙歴、各種臨床検査データ、ASと統計学的に相関していなかった(未掲載データ)。このことから、Complement C3陰性は独立した予後不良因子である可能性が考えられた。多変量解析では有意な結果を得られなかったものの(未掲載データ)、症例数の不足による影響を除くできないため、今後さらに検討を継続する予定である。

近年、IFN- γ の抗線維化作用に着目しIFN- γ 製剤であるIFN- γ 1bのIPF症例に対する皮下投与が欧米を中心に行われた。初期のプラセボとの無作為化比較試験により呼吸機能障害が軽度な症例において生命予後を延長する効果が認められたが²⁵⁾、大規模臨床試験(The INSPIRE Trial)²⁶⁾において有意な生命予後の改善は認められず、現在では使用すべきでないと結論づけられている²⁾。しかしながら、The INSPIRE Trialでは肺におけるIFN- γ の存在やComplement C3の局在を事前に評価したわけではない。炎症に起因する難治性肺線維性疾患症例にIFN- γ 1bを投与すれば、炎症促進作用により病変は悪化するかもしれない。反対にTh1/Th2不均衡による難治性肺線維性疾患症例にIFN- γ 1bを投与すれば、Th1/Th2免疫カスケードの調整を介して病変の増悪を抑制できるかもしれない。多系統機序により発症するIPF症例すべてに対するIFN- γ 1bの有意な効果は証明されなかったかもしれないが、IFN- γ 1bが奏効する症例群の存在まで否定されたわけではない。我々の検討では、症例間で肺組織におけるComplement

C3の発現が異なっており、それに伴いIFN- γ の発現も症例間で異なっている可能性が示唆された。今後症例数を増やしながらComplement C3やIFN- γ などの肺における発現を検証し、IFN- γ の低下が疑われる限られた症例に対する層別治療の可能性について検討していきたい。IFN- γ に関しては吸入による治療が検討されつつあり、昨年IPF症例における安全性と有効性が示唆された²⁷⁾。他にもTh1/Th2免疫カスケードを調整する作用を有する α -galactosylceramide²⁸⁾や補体経路を強力に活性化するレクチンRa-Reactive factor²⁹⁾は一定の難治性肺線維性疾患症例に有効である可能性があり、現在実験用モデル動物への投与を検討中である。

一方、血中のFe³⁺と結合し輸送に関わる糖タンパク質であるSerotransferrin(Transferrin)に関しては、免疫組織化学による評価がかなわなかった。しかしながらPachtらは、肺胞上皮被覆液中のTransferrinがアンチオキシダント活性を有し肺を酸化ストレスから保護している可能性を報告している³⁰⁾。我々のヒト症例におけるショットガンプロテオーム解析の結果に合致する知見であると考えられる。IPF症例においては、肺におけるTransferrinの低発現が酸化還元不均衡を惹起し線維化を促進している可能性もあり、今後他の手法を用いた検討を行う価値があるものと思われる。

本研究において我々は、BLMマウスおよびIPF症例のBALFを用いたショットガンプロテオーム解析を行い、Complement C3およびSerotransferrinが肺の線維化と密接に関与している可能性を示した。また、難治性肺線維性疾患症例の肺組織におけるComplement C3の低発現状態が、患者の生命予後を悪化させる要因になり得ることを示した。難治性肺線維性疾患の病態解明と治療戦略の双方において重要な知見であると考えた。

結 語

難治性肺線維性疾患症例の肺におけるComplement C3の抑制状態は、患者の生命予後に重大な悪影響を与える可能性がある。

本稿を終えるにあたり、終始懇切なるご指導とご高

閣を賜りました鳥取大学医学部統合内科医学講座分子制御内科学分野 清水英治教授, またご高閣を賜りました鳥取大学医学部病理学講座器官病理学分野 梅北善久教授, 鳥取大学医学部器官制御外科学講座麻酔・集中医療医学分野 稲垣喜三教授に深謝致します。また, ご協力を頂きました鳥取大学医学部統合内科医学講座分子制御内科学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 杉山幸比古, 高橋弘毅, 海老名雅仁, 他. 特発性間質性肺炎 診断と治療の手引き. 日本呼吸器学会 びまん性肺疾患診断・治療ガイドライン作成委員会編, 呼吸器内科学, 第2版, 東京, 南山堂, 2011. p. 3-4.
- 2) Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; **183**: 788-824.
- 3) American Thoracic Society /European Respiratory Society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **165**: 277-304.
- 4) Nicholson AG, Colby TV, Dubois RM, et al. The prognostic significance of the histologic pattern of interstitial pneumonia in patients presenting with the clinical entity of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **162**: 2213-2217.
- 5) Park IN, Jegal Y, Kim DS, et al. Clinical course and lung function change of idiopathic nonspecific interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2009; **33**: 68-76.
- 6) Yoshizawa Y, Ohtani Y, Hayakawa H, et al. Chronic hypersensitivity pneumonitis in Japan: a nationwide epidemiologic survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **103**: 315-320.
- 7) Ohtani Y, Saiki S, Kitaichi M, et al. Chronic bird fancier's lung: histopathological and clinical correlation. An application of 2002 AST/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax* 2005; **60**: 665-671.
- 8) Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **176**: 636-643.
- 9) Miyazaki Y, Tateishi T, Akashi T, et al. Clinical predictors and histologic appearance of acute exacerbation in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2008; **134**: 1265-1270.
- 10) Maher TM, Wells AU, Laurent GJ. Idiopathic pulmonary fibrosis: multiple causes and multiple mechanisms?. *Eur Respir J* 2007; **30**: 835-839.
- 11) Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* 2007; **132**: 1311-1321.
- 12) Wattiez R, Hermans C, Cruyt C, et al. Human bronchoalveolar lavage fluid protein two-dimensional database: study of interstitial lung diseases. *Electrophoresis* 2000; **21**: 2703-2712.
- 13) Rottoli P, Magi B, Perari MG, et al. Cytokine profile and proteome analysis in bronchoalveolar lavage of patients with sarcoidosis. pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics* 2005; **5**: 1423-1430.
- 14) Harrison JH Jr, Lazo JS. High dose continuous infusion of bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; **243**: 1185-1194.
- 15) Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988; **41**: 467-470.
- 16) Walport MJ. Complement: first of two parts. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1058-1066.
- 17) Morgan BP, Gasque P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when, and why?. *Clin Exp Immunol* 1997; **107**: 1-7.
- 18) Peter HS. Complement and immune complexes in systemic lupus erythematosus.

- In: Wallace EL, eds. autoimmune disease: Dubois' lupus Erythematosus. 3rd ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1987. p. 185-193.
- 19) Scott DM, Amos N, Sissons JGP, et al. The immunoglobulin nature of nephritic factor (NeF) . Clin Exp Immunol 1978; **32**: 12-24.
 - 20) Suzuko T, Hiromoto Y. Morphological observation of surfactant, IgG, C3 and C1q in the alveolar area. J Jpn Med Soc Biol Interface 1999; **30**: 51-56.
 - 21) Soda K, Ando M, Sakata T, et al. C1q and C3 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. Chest 1988; **93**: 76-80.
 - 22) Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008; **295**: L379-L399.
 - 23) Pekkarinen PT, Vaali K, Junnikkala S, et al. A functional complement system is required normal T helper cell differentiation. Immunobiology 2011; **216**: 737-743.
 - 24) Elias JA, Freundlich B, Kern JA, et al. Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. Chest 1990; **97**: 1439-1445.
 - 25) Raghu G, Brown KK, Bradford WZ, et al. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med 2004; **350**: 125-133.
 - 26) King TE Jr, Albera C, Bradford WZ, et al. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE) : a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. Lancet 2009; **374**: 222-228.
 - 27) Diaz KT, Skaria S, Harris K, et al. Delivery and safety of inhaled interferon-gamma in idiopathic pulmonary fibrosis. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv 2012; **25**: 79-87.
 - 28) Ru W, Peijie C. Modulation of NKT cells and Th1/Th2 imbalance after alpha-GalCer treatment in progressive load-trained rats. Int J Biol Sci 2009; **5**: 338-343.
 - 29) 川上正也. 補体活性化レクチンRaRFの研究. 日本細菌学雑誌 1999; **54**: 603-616.
 - 30) Pacht ER, Davis WB. Role of transferrin and ceruloplasmin in antioxidant activity of lung epithelial lining fluid. J Appl Physiol 1988; **64**: 2092-2099.