

びまん性肺胞障害および急速進行性肺線維症における筋線維芽細胞の関与

—免疫組織学的検討—

小橋 吉博, 真鍋 俊明*

臨床的に, 成人呼吸促迫症候群 (Adult respiratory distress syndrome, ARDS) と診断した症例を, Katzenstein らの定義に従い, 明らかな病因を有するびまん性肺胞障害 (Diffuse alveolar damage, DAD) と病因不明の急性間質性肺炎 (Acute interstitial pneumonia, 別名 Accelerated pulmonary fibrosis, APF) に分類し, 両病態の肺内線維化巣にどういった性状の筋線維芽細胞が認められるか比較検討した. 硝子膜形成を特徴とする DAD の浸出期 (急性期) では, 間葉系細胞はビメンチンのみ陽性の線維芽細胞であったが, 増殖期 (器質化期) になるとビメンチン陽性, α -平滑筋アクチン陽性, デスミン陰性の筋線維芽細胞に変化していた. 一方, APF 症例では, intraluminal diffuse fibrosis が優位な 1 例でビメンチン, α -平滑筋アクチン, デスミンすべてが陽性の筋線維芽細胞が認められたが, 大半は DAD と同じ性状の筋線維芽細胞であった. 以上のことから, DAD, APF の両者とも肺胞腔内の線維化形成には筋線維芽細胞が関与するが, 筋線維芽細胞の性状は線維化の時期によって異なることが明らかとなった. (平成 9 年 4 月 12 日受理)

The Property of Myofibroblasts in Cases of Diffuse Alveolar Damage (DAD) and Accelerated Pulmonary Fibrosis (APF)

Yoshihiro KOBASHI and Toshiaki MANABE*

Autopsy tissues obtained from 20 cases of adult respiratory distress syndrome (ARDS) were clinically classified in two groups; diffuse alveolar damage (DAD) with obvious etiology (9 cases) and accelerated pulmonary fibrosis (APF) with unknown etiology (11 cases) and studied immunohistologically for the participation of myofibroblasts in the development of fibrosis.

In the exudative stage (acute stage) of DAD with hyaline membrane, the pulmonary interstitial cells were fibroblasts with only vimentin positivity, but in the proliferative stage (organizing stage), they became myofibroblasts with vimentin and α -smooth muscle actin immunopositivity but without desmin. Likewise, in the cases of APF, the pulmonary interstitial cells were myofibroblasts with vimentin and α -smooth muscle actin immunopositivity but without desmin in most cases. In one

川崎医科大学附属川崎病院 内科
〒700 岡山市中山下2-1-80

Department of Internal Medicine, Kawasaki Hospital,
Kawasaki Medical School: Nakasange 2-1-80,
Okayama, 700 Japan

* 川崎医科大学 病理学教室

Department of Pathology, Kawasaki Medical School

case, however, in which intraluminal diffuse fibrosis was dominant, the pulmonary interstitial cells were myofibroblasts with vimentin, and both α -smooth muscle actin and desmin immunopositivity.

These results suggest that myofibroblasts play an important role in the formation of the intraluminal fibrosis of both DAD and APF, and the properties of myofibroblasts differ with the stage of intraluminal fibrosis. (Accepted on April 12, 1997) *Kawasaki Igakkaishi* 23(1) : 27-34, 1997

- Key Words** ① Diffuse alveolar damage (DAD)
 ② Accelerated pulmonary fibrosis (APF)
 ③ Myofibroblast ④ Immunohistological study
 ⑤ Intraluminal fibrosis

緒 言

1987年に福田ら¹⁾は、臨床的にARDS、そして病理組織学的にはびまん性肺障害 Diffuse alveolar damage (DAD) と診断された症例において、肺胞腔内線維化巣で筋線維芽細胞が増殖し、線維化過程に重要な役割を果たしていたことを電子顕微鏡を用いて証明した。

Katzensteinら^{2),3)}は、このARDSと診断した症例に対する病理診断名を、1982年にショックなどの明らかな病因を有し、硝子膜形成を特徴とするDADおよびその器質化期 Organized DAD、そして1986年には病因不明で硝子膜があっても軽度で、同様に間質に線維化をきたすAIPとの2つに分けて呼名することを提案した。しかし、1996年に私共はこのAIPに合致した症例を詳細に検討した結果、線維化の主体が間質内ではなく肺胞腔内であったこと、さらに病態が不可逆性であったことからAPFと呼名を変更すべきと報告

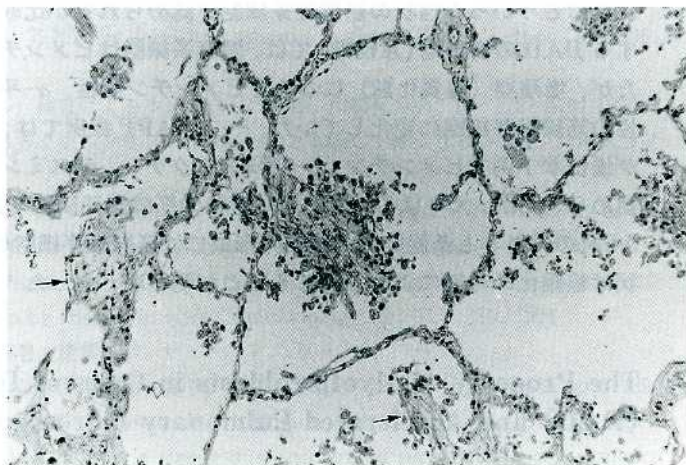


Fig. 1. Case 4 : Hyaline membrane (arrow) dominates in the acute (exudative) stage but intraluminal fibrosis is mild. (HE, $\times 40$)

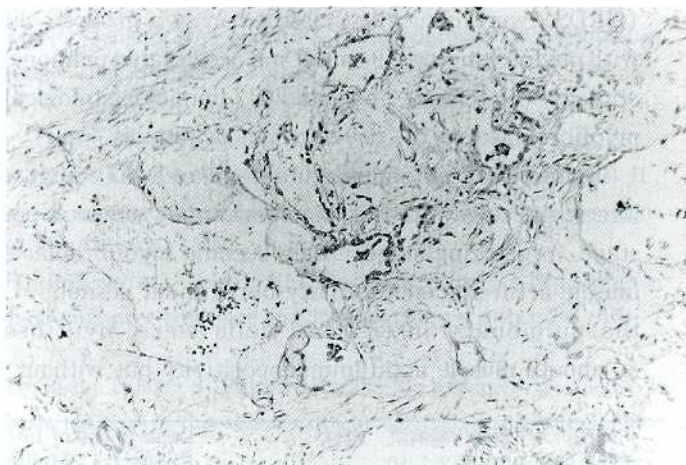


Fig. 2. Case 5 : Intraluminal diffuse fibrosis dominates but interstitial fibrosis is mild. (HE, $\times 100$)

した⁴⁾。そこで、今回私共は ARDS の症例を病理学的に Organized DAD, APF に分類し、筋線維芽細胞の線維化形成への関与の有無とその筋線維芽細胞の性状を免疫組織学的に検討することとした。

材料および方法

材料は、1974年4月から1993年3月までに川崎医科大学附属病院で剖検された2776例から、突然の呼吸困難で発症し、人工呼吸管理を要する著明な低酸素血症、非心原性肺水腫陰影を有し、臨床的に ARDS の基準を満たした症例で、発症から6カ月以内に呼吸不全で死亡した20例を抽出した。これらを、明らかな病因を有した DAD 9例(急性期と考えられる硝子膜形成期から慢性期と考えられる器質化期まで)、明らかな病因を有しない APF 11例に分類した。通常の方法に従って組織を20%ホルマリンで固定した後、パラフィンで固定した後、パラフィン包埋し、4 μ m に薄切した。脱パラフィン後、ヘマトキシリン-エオジン染色(HE染色)ならびに免疫染色として Avidin-Biotin Complex 法(ABC法, Vector社)により染色した。免疫染色にはジアミノベンジジン(Diaminobenzidine, DAB, 片山化学工業)発色を用い、一次抗体は抗ビメンチン、抗マクロファージ、抗 α -平滑筋アクチン、抗デスミン(いずれも monoclonal 抗体, DAKO社, Denmark)を用いた。なお、抗マクロファージ抗体(CD-68, monoclonal 抗体, DAKO社, Denmark)は線維化巣の間葉系細胞の識別するために用いた。結果

は、間葉系細胞の免疫組織所見を肺腔内と間質内に分けて、染色度合で任意に- (100%陰性)、 \pm (50%以下が弱陽性)、+ (100%弱陽性)、# (100%中等度陽性)、## (100%強度陽性)の5段階に分けて評価した。

成 績

1. 組織所見

肺内線維化様式を肺腔内と間質内に分け、肺腔内線維化巣を充実性に肺腔内を満たす intraluminal diffuse fibrosis, マッソン体に類

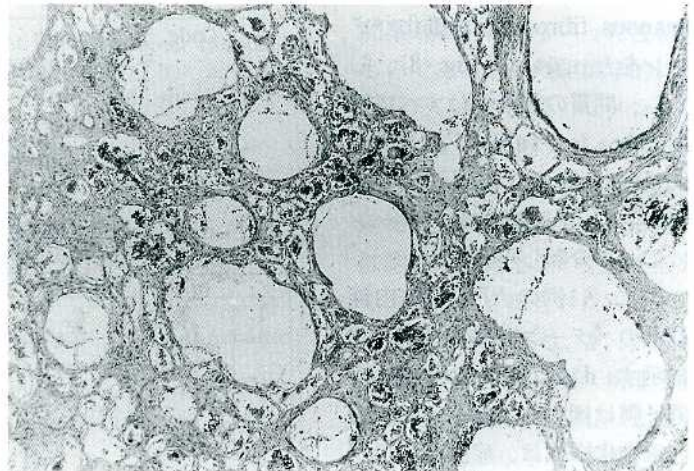


Fig. 3. Case 1: Intraluminal membranous fibrosis dominates but interstitial fibrosis is mild. (HE, $\times 40$)

Table 1. Histological findings in the cases of diffuse alveolar damage (DAD)

Case	Hyaline membrane	Pulmonary fibrous pattern			
		Intraluminal fibrosis			Interstitial fibrosis
		diffuse	polypoid	membranous	
1	+	-	+	#	+
2	#	\pm	\pm	+	+
3	#	-	+	+	\pm
4	+	-	+	+	\pm
5	\pm	#	\pm	+	+
6	\pm	+	+	#	+
7	#	-	+	+	\pm
8	+	\pm	\pm	#	+
9	\pm	\pm	+	+	+

Code - : none, \pm : equivocal, + : few or slight
: some or moderate, ## : many or marked

似したポリープを形成する intraluminal polypoid fibrosis, 膜様に肺胞口を閉鎖して形成される intraluminal membranous fibrosis の3つに分類した。DADの急性期(浸出期)で硝子膜が優位にみられた症例4, 7は, 肺内線維化巣の形成は軽度であった (Fig. 1)。また肺胞腔内線維化巣は, 症例5が intraluminal diffuse fibrosis (Fig. 2) を, 症例1, 6, 8が intraluminal membranous fibrosis の線維化パターンをとっていた (Fig. 3)。しかし, 間質の線維化はすべて軽度であった。Table 1に9例のDADの組織所見を硝子膜の有無および肺内線維化のパターンによって分類し示した。

次に, 11例のAPFの肺内線維化のパターン分類を Table 2に示す。DAD症例で目立った硝子膜はほとんどなく, 肺胞腔内線維化様式は, 症例2, 11が intraluminal diffuse fibrosis, 症例5は intraluminal membranous fibrosis の線維化パターンであった。DADと同様に症例ごとで異なった肺胞腔内線維化形式が混在してみられたが, 肺胞腔内線維化が間質の線維化に比し, 全例で優位にみられていた。

2. 免疫組織所見

9例のDADにおける肺胞腔内と間質内における間葉系細胞の免疫組織所見の結果を Table 3に示した。急性期(浸出期)の症例3, 7は肺胞腔内線維化巣が軽度で肺胞腔内, 間質内いずれも間葉系細胞はビメンチンのみが陽性で, α -平滑筋アクチン, デスミンとも陰性の線維芽細胞に近い紡錘形の細胞 (Fig. 4) であった。また症例4, 9では, ビメンチン, α -平滑筋アク

Table 2. Histological findings in the cases of accelerated pulmonary fibrosis (APF)

Case	Hyaline membrane	Pulmonary fibrous pattern			
		Intraluminal fibrosis			Interstitial fibrosis
		diffuse	polypoid	membranous	
1	-	#	+	#	±
2	-	#	-	-	±
3	±	#	#	±	+
4	+	+	#	#	±
5	±	±	#	±	+
6	±	#	+	#	±
7	+	#	+	±	+
8	±	+	+	#	±
9	±	+	±	#	±
10	±	±	#	+	±
11	-	#	-	-	±

Code - : none, ± : equivocal, + : few or slight
: some or moderate, ## : many or marked

Table 3. Immunohistochemical staining of diffuse alveolar damage (DAD)

Case	Intraluminal			Interstitial		
	Anti-vimentin	Anti-smooth muscle actin	Anti-desmin	Anti-vimentin	Anti-smooth muscle actin	Anti-desmin
1	#	#	-	+	+	-
2	+	#	-	+	#	-
3	#	±	-	#	±	-
4	+	+	±	+	+	±
5	#	#	-	#	#	-
6	#	#	-	#	#	-
7	#	±	-	#	±	-
8	#	+	-	+	+	-
9	+	#	±	+	#	±

Intensity of immunopositive cells arbitrarily graded from - (negative) to # (strongly positive)

チンのみでなくデスミンも染まる間葉系の細胞が認められたが, 大半の症例ではビメンチン陽性, α -平滑筋アクチン陽性, デスミン陰性の筋線維芽細胞と考えられる間葉系の細胞が肺胞腔内および間質内に増殖していた (Figs. 5a, 5b)。次に, APF 11例での間葉系細胞の免疫組織所見の結果は Table 4に示したように, 10例ではビメンチン陽性, α -平滑筋アクチン陽性, デスミン陰性の筋線維芽細胞と考えられる間葉系の細胞が増殖していたが, 症例11ではデスミンも陽性の筋線維芽細胞と思われる間葉系の細胞が肺胞腔内, 間質内に増殖していた (Figs. 6a, 6b,

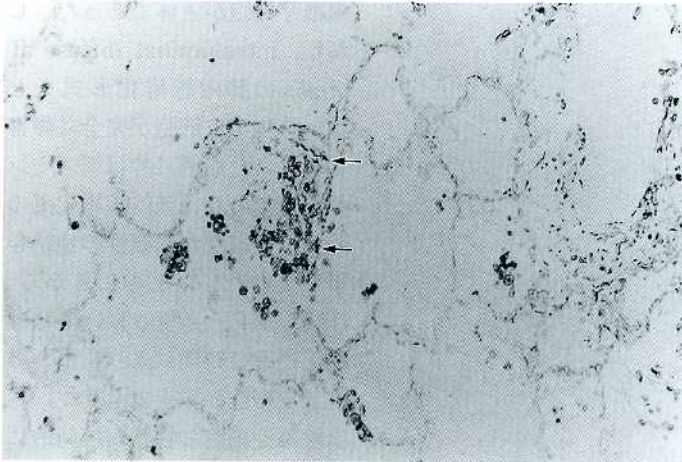


Fig. 4. Immunohistochemical findings of case 7 in the acute stage of DAD. (Vimentin, $\times 100$)
Pulmonary interstitial cells most likely represent fibroblasts because only vimentin is positive (arrow), but α -smooth muscle actin and desmin are negative (not shown in this photomicrograph).

Table 4. Immunohistochemical staining of accelerated pulmonary fibrosis (APF)

Case	Intraluminal			Interstitial		
	Anti-vimentin	Anti-smooth muscle actin	Anti-desmin	Anti-vimentin	Anti-smooth muscle actin	Anti-desmin
1	+	+	-	+	+	-
2	##	##	-	+	+	-
3	##	##	-	+	+	-
4	+	##	-	+	+	-
5	+	+	-	+	±	-
6	##	##	-	##	+	-
7	##	##	-	##	+	-
8	##	##	-	+	+	-
9	##	##	-	+	+	-
10	##	##	-	+	+	-
11	##	##	+	+	+	±

Intensity of immunopositive cells arbitrarily graded from - (negative) to # (strongly positive)

6c).

考 察

1987年に福田ら¹⁾は、DADの症例における肺胞構造の改築では間質の線維化よりも肺胞腔内の線維化が重要で、この時期における電子顕微鏡による観察では、筋線維芽細胞が肺胞腔内に増殖していることを明らかにした。一方、Skalli

ら⁵⁾は、筋線維芽細胞の病的意義を唱え、正常の肉芽組織で増殖していた間葉系の細胞は線維芽細胞であったのが、肥大した線維化巣においては大半の間葉系の細胞は α -平滑筋アクチンの性状を有するようになり、筋線維芽細胞に変化していたことを免疫組織学的に証明した。

私共は、器質化肺炎の症例でマッソン体周囲にフィブリンを伴う症例と伴わない症例に分類し、マッソン体を構成している間葉系細胞がどういった性状のものであるか免疫組織学的に検討した。その結果、ピメンチン陽性、 α -平滑筋アクチン陽性、デスミン陰性の筋線維芽細胞が組織所見や治療効果に無関係で肺胞腔内線維化巣の主体をなしていることを報告した⁶⁾。

そこで今回は、臨床的にARDSと診断し、臨床病理学的にはOrganized DADとAPF (Katzensteinらの提唱するAIP)の症例に分けて、これら予後不良の症例にいかなる性状の間葉系の細胞が関与しているかも併せて検討した。

最近の知見では、筋線維芽細胞が線維芽細胞や筋芽細胞に変化していく可能性も示唆されて

いる⁷⁾。この筋線維芽細胞は、免疫学的にはピメンチンが陽性のV型、ピメンチン+ α -平滑筋アクチンが陽性のVA型、ピメンチン+ α -平滑筋アクチン+デスミンが陽性のVAD型、ピメンチン+デスミンが陽性のVD型の4つのタイプに分類される⁸⁾。今回の検討は、連続切片を使用し別個に染色した標本から推測したもので、完全に同一の細胞に異なる抗原が存在していると積極的に結論できないが、連続切片上では同一



A



B

Fig. 5. Immunohistological findings of case 5 in the organized stage of DAD.

A: Pulmonary interstitial cells are made of spindle cells with vimentin positivity (arrow) (Vimentin, $\times 100$).

B: Pulmonary interstitial cells showing α -smooth muscle actin-positivity (arrow) (α -smooth muscle actin, $\times 100$).

と思われる細胞が陽性であることが確認できた。DAD 症例のうち硝子膜形成が中心となる急性期の症例において肺胞腔内の間葉系の細胞はビメンチンのみ陽性であったため線維芽細胞もしくは V 型の筋線維芽細胞と考えられた。しかし、器質化期には VA 型筋線維芽細胞が肺胞腔内、間質内で認められ、間葉系の細胞の性状が V 型から VA 型に変化していた。一方、APF の症例でも間様の変化、性状を示しており、VA 型の筋

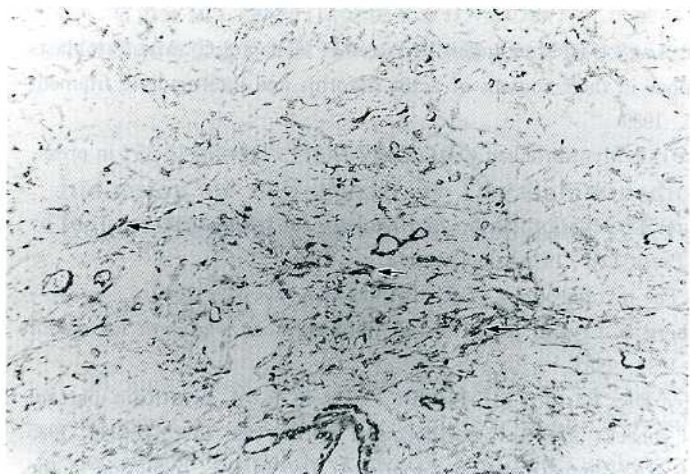
線維芽細胞が主体であった。しかし、intraluminal diffuse fibrosis の肺内線維化形式をとり、肺胞上皮細胞が完全に障害されていた症例 11 ではデスミンも陽性であり、肺内線維化巣の間葉系の細胞が筋原性の性状を帯びていた。以上のことから、DAD、APF 症例においては線維化過程の時期により、また肺胞上皮細胞の障害の程度により、筋線維芽細胞の性状が経時的に変化していくことが推測された。しかし、筋線維芽細胞の性状が V 型が軽症、VAD 型に変化することが症例の重症化とは関連せず、予後の指標にはなりえなかった。組織障害には間葉系細胞以外に活性化した肺胞マクロファージから分泌される種々の線維芽細胞増殖因子、遊走因子、また肺胞障害に伴い浸潤してきた炎症細胞から結合織成分を融解する種々の蛋白分解酵素等が筋線維芽細胞とネットワークを形成し、筋線維芽細胞の性状を変化させていくと考えられている^{9)~11)}。さらに今回の検討では電子顕微鏡による観察は行わなかったため、微細な形態レベルでの変化は不明であり、DAD 急性期のビメンチンのみ陽

性であった間葉系の細胞は線維芽細胞か、V 型筋線維芽細胞か断定できないが、DAD の大半の症例および APF 症例において肺内線維化の主役となる間葉系の細胞は少なくとも線維芽細胞よりもむしろ筋線維芽細胞の性状に近い細胞と考えられた。この結果は過去の報告¹⁾と一致している。

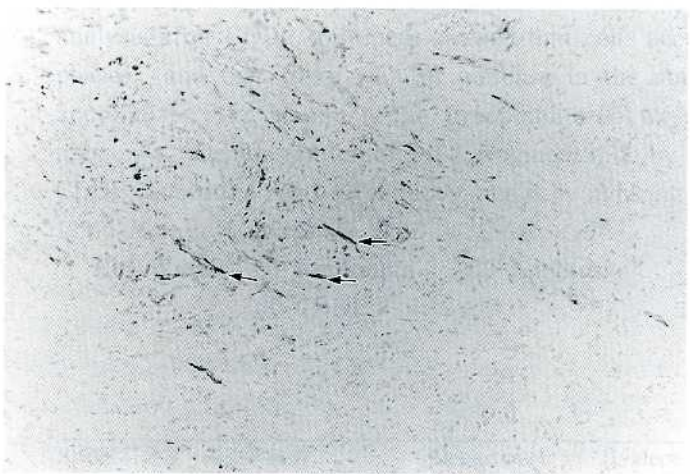
以上のことから、Katzenstein が病理学的に提唱した DAD、AIP の症例に対して、免疫組織学



A



B



C

Fig. 6. Immunohistochemical findings of case 11 with APF.
A : Pulmonary interstitial cells are vimentin-positive (arrow) (Vimentin, $\times 100$).
B : Pulmonary interstitial cells are also positive for α -smooth muscle actin (arrow) (α -smooth muscle actin, $\times 100$).
C : They are desmin-positive (arrow), as well (Desmin, $\times 100$).

的検討を行ったが、両者ともに肺内線維化には筋線維芽細胞が関与し、その免疫学的性状は線維化の時期によって異なっていたものの、多くはVA型でほぼ同じであった。両病態では、原

因如何にかかわらず、組織所見は同じであり、原因が明らかであるか否かによって、その呼称を変える意義はないと考えられた。

文 献

- 1) Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, Masugi Y : The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* 126 : 171—182, 1987
- 2) Katzenstein A, Askins F : Surgical pathology of non-neoplastic lung disease. Philadelphia, Sanders, 1982, pp 9—42
- 3) Katzenstein A, Myers L, Mazur T : Acute interstitial pneumonia. A clinicopathologic, ultrastructural, and cell kinetic study. *Am J Surg Pathol* 10 : 256—267, 1986
- 4) Kobashi Y, Manabe T : The fibrosing process in "accelerated pulmonary fibrosis". *Kawasaki Med J* 22 : 27—40, 1996
- 5) Skalli O, Schurch W, Seemayer T, Lagace R, Montandon D, Pittet B, Gabbiani G : Myofibroblasts from diverse setting are heterogenous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 60 : 275—285, 1989
- 6) 小橋吉博, 真鍋俊明 : 器質化肺炎における Myofibroblast の免疫組織学的検討. *日胸疾会誌* 35 : in press, 1997
- 7) Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G : Myofibroblast. *In Histology for pathologist*, vol 1, ed by Sternberg SS. New York, Raven Press, Ltd. 1992, pp 109—144
- 8) Lipper S, Kahn LB, Reddick RL : The myofibroblast. *Pathol Annu* 15 : 443—470, 1980
- 9) Bitterman PB, Rennard SI, Adelberg S, Crystal RG : Role of fibronectin as a growth factor for fibroblasts. *J Cell Biol* 97 : 1925—1932, 1983
- 10) Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP, Ross R : A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 43 : 277—286, 1985
- 11) Gadek JE, Hunninghake GW, Eells GA, Zimmerman RL, Keogh BA, Crystal RG : Evolution of the protease-antiprotease theory of human destructive lung disease. *Bull Europ Physiopathol Resp* 16(Suppl) : 27—40, 1980