

—原 著—

びまん性肺胞傷害における線維化と筋線維芽細胞

居来提 托乎提 中山 智子 石崎 正通 福田 悠

日本医科大学解析人体病理学

Fibrosis and Myofibroblasts in Diffuse Alveolar Damage

Julaite Tohute, Tomoko Nakayama, Masamichi Ishizaki, and Yuh Fukuda

Department of Analytic Human Pathology, Nippon Medical School, Tokyo

Abstract

Objective: Diffuse alveolar damage (DAD) is a pathological pattern of acute respiratory distress syndrome that can be a direct cause of death in many diseases. The process of fibrosis and myofibroblasts (MFS) in DAD were investigated.

Methods: Lung tissues obtained at autopsy from 23 cases of DAD were studied with light microscopy and the light microscopic immunoperoxidase method.

Results: Four cases of exudative stage DAD and 18 cases of organizing stage DAD were detected. All cases showed hyaline membranes and α smooth muscle actin-positive MFS. MFS were located in the alveolar walls in the exudative stage. MFS were observed in the intra-alveolar spaces in all 18 cases of the organizing stage. Fifteen of 18 cases showed Mib-1-positive proliferating MFS in the alveolar spaces. Eleven of 18 cases of the organizing stage showed proliferation of MFS in the alveolar walls themselves, in addition to that in the intra-alveolar spaces.

Discussion: In previous reports, intra-alveolar fibrosis composed of MFS or fibroblasts or both was essential in lung fibrosis. In this study, we found that ① in the early stage of DAD, MFS appear in the alveolar walls, ② in organizing DAD, intra-alveolar fibroses were formed as in the previous reports, ③ in addition, fibroses were formed in the alveolar walls themselves in 11 of 18 cases of organizing DAD.

(日本医科大学医学会雑誌 2006; 2: 18-24)

Key words: acute respiratory distress syndrome, diffuse alveolar damage, myofibroblast, α -smooth muscle actin, Type IV collagen

緒 言

急性(成人)呼吸窮迫症候群(acute [adult] respiratory distress syndrome: ARDS)は1967年に Ashbaughらによって提唱された概念である¹。患者

が手術や敗血症といった侵襲を受けた際、その経過中に急性かつ進行性の呼吸困難が出現し、胸部X線上びまん性陰影がみられ重篤な呼吸不全を示す一連の症候群である。病態としては非心原性の肺水腫であり、肺の炎症と微小血管の透過性亢進を特徴とする症候群である。病理学的には浮腫、硝子膜形成、炎症細胞浸

Correspondence to Yuh Fukuda, Department of Analytic Human Pathology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

E-mail: fukuda@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

Table 1 Clinical matter

No	Age	Sex	Dyspnea onset time before the death	Primary disease	Chemotherapy
1	82	F	2d	Acute myocardial infarction	
2	75	M	11d	Sepsis	
3	63	F	2d	Hepatoma	○
4	61	F	2m, 5w, 3d *	Lung cancer	○
5	74	M	10d	Dermatomyositis, IP	
6	71	F	11d	Hepatoma	○
7	40	M	7d	Lung cancer	○
8	73	F	5d	Hepatoma	○
9	56	M	11d	Malignant lymphoma	○
10	71	F	12d, 5d *	Adult T-cell leukemia	○
11	76	F	9d	Infectious endocarditis	
12	69	F	9d	Sepsis	
13	34	F	3w, 10d *	Pneumonia	
14	81	M	15d	Malignant lymphoma	○
15	69	M	22d	Lung cancer	
16	73	M	13d	IPF	
17	70	M	5w, 1d *	Microscopic polyangitis, IP	
18	70	M	10w	IPF	
19	55	F	6w, 8d *	Localized scleroderma, IP	
20	74	M	4W	Rheumatoid arthritis, IP	
21	78	M	5w	IPF	
22	59	F	3w	Lung cancer	○
23	69	M	1w	Malignant mesothelioma	

IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis

IP: Interstitial pneumonia

*: repeated episode of dyspnea

潤, 線維化などを特徴とするびまん性肺胞傷害(diffuse alveolar damage: DAD)である²³。死亡率は60~90%と高率で, 近年, 種々の疾患の直接死因として注目されている⁴⁻⁶。発症の誘因となる原因が不明で急性の経過を取る類似の病態は特発性急性間質性肺炎と称されている^{7,8}。

DADでは, 原因の有無, 原因の種類にかかわらず, 病理学的には肺に共通の病理像が見られる。DADの病理像は発症1週間を境として, 毛細血管の透過性亢進による浮腫と硝子膜の形成を認める浸出期, 肺胞に線維化が起こる器質化(増殖)期の二相に分類される²³。また器質化期は, 活性化された間質細胞が肺胞腔内に侵入し³⁹, 腔内の線維化を形成する早期器質化期と線維性コラーゲンなど細胞外基質の沈着により線維化が完成されて, 肺胞領域構造の崩壊と改築を認める後期器質化期に分類される²³。

今までの報告では, 筋線維芽細胞(myofibroblast: MF)もしくは線維芽細胞(fibroblast)が, 肺胞上皮基底膜の断裂部位から肺胞腔内に侵入し, 肺胞腔内で細胞外基質を産生・沈着させることにより線維化が形成されることが示されている³⁹。筋線維芽細胞とは線

維芽細胞と平滑筋細胞の両者の特徴を持つ細胞とされている¹⁰⁻¹²。筋線維芽細胞はコラーゲンなどの種々の細胞外基質の産生能が高く, 通常型間質性肺炎や, ケロイド等の難治性の線維性疾患においては, その中心となる細胞と考えられている¹⁰⁻¹²。DADの各時相における線維化の場と筋線維芽細胞に関する詳細な検討の報告はされていない。そこで, 本稿では, DADの組織像の特徴を検討するとともに, DADの器質化期に起きる線維化の部位と筋線維芽細胞の出現について検討した。

研究対象および方法

1. 対象と内訳 (Table 1)

1992年10月~2003年9月の間に日本医科大学付属病院において呼吸不全あるいは多臓器不全により死亡し, 5時間以内に病理解剖された症例のうち, DADと組織診断された23症例を対象とした。

23例中男性は12例, 女性は11例で, 平均年齢は65.5歳であった。原疾患は悪性腫瘍が11例であり, その中で9例に化学療法が行われていた。基礎に間質

Table 2 Immunohistochemistry

Antibody	Maker	Dilution	Animal	Pretreatment
α -SMA	DAKO	300×	Mouse	CCA 120℃ 20min
Mib-1	DAKO	100×	Rabbit	CCA 120℃ 20min
Type IV collagen	SBA	300×	Goat	0.1% pep 1h, 0.05%pronase E 10min
Keratin	DAKO	3,000×	Rabbit	0.1% pep 10 ~ 60min

SBA: Southern Biotechnology Associates, Inc.

Pep: pepsin

CCA: citraconic anhydride²³

性肺炎があったのは7例で、そのうち特発性は3例で、全例が通常型間質性肺炎 (usual interstitial pneumonia; UIP) であった。残りの3例は膠原病に合併した間質性肺炎 (interstitial pneumonia; IP) で、2例が UIP パターン、1例が非特異性間質性肺炎 (non specific interstitial pneumonia; NSIP) パターンであった。敗血症2例を含む感染症が4例、急性心筋梗塞が1例であった。

2. 方法

全例 20% ホルマリン固定、パラフィン包埋し、3 μ m で薄切した切片を用いた。

1) 光顕像。Hematoxylin eosin (HE), Alcian blue periodic acid Schiff (Al-PAS), Elastica Masson Goldner (EMG) 染色を行い、DAD の時相、DAD の特徴の一つである硝子膜の形成と器質化の程度、肺胞腔内と肺胞壁に増生した線維芽細胞の出現の程度、Mallory body の出現の程度を検討した。

2) 免疫組織化学染色 (Table 2)。パラフィン連続切片を用い、酵素抗体法 (ABC 法) で免疫染色を施行した。使用した抗体は、抗 α 平滑筋アクチン (α -SMA) 抗体で筋線維芽細胞を同定し、抗 Mib-1 抗体と HE 重染色による検討から細胞増殖能を確認した。IV 型コラーゲン抗体で肺胞壁基底膜を同定した。抗ケラチン抗体で肺胞および気道上皮細胞を同定した。

各症例において各検討項目は光顕的にその程度を - (陰性: 全く染色性が認められない), $\pm$ (ごく一部に陽性: 対象とする細胞に 1~10% の陽性), + (弱陽性: 11~30% の陽性), ++ (中等度陽性: 31~50% の陽性), +++ (強陽性: 51% 以上の陽性) の 5 段階で scoring し、半定量的に評価を行った (Table 3, 4)。なお、各症例は筆頭著者と 2 名の病理医で検討し、その程度を決定した。

結 果

1. 光顕所見 (Table 3)

一般染色で、光顕的に DAD の組織像の経時的変化を検討した。23 例中のうち、浸出期は 5 例で、早期器質化期は 6 例、後期器質化期は 12 例であった。発症から 1 週間までの浸出期の DAD は、硝子膜の出現を特徴とする (Fig. 1a)。EMG 染色では、典型的な硝子膜は灰緑色を示し、フィブリンは鮮紅色を呈するので、HE 染色で硝子膜と同様な色調を示すフィブリンとの鑑別が容易である。全例に肺胞道を中心にして硝子膜の形成を認めた。早期器質化期では硝子膜形成部位に線維芽細胞の増生が顕著である (Fig. 1b)。3~4 週間以後では、密な膠原線維の沈着により硝子膜が存在した肺胞道から肺胞をとり囲むような線維化となる (Fig. 1c)。Al-PAS 染色では、早期の線維化病巣には細胞外基質であるグリコサミノグリカンが豊富なので、青染する。また、弾性線維を染色する EMG 染色により、本来の肺胞壁の弾性線維の分布から主な線維化の場所を同定した。検討した 23 例中 20 例で、肺胞腔内に線維芽細胞が増生している像を認めた。また 12 例では、肺胞壁自体に線維芽細胞が腫大し、増生している像を認めた。線維化領域には、肺胞上皮細胞の高度な傷害により出現するサイトケラチンなどの細胞骨格の異常凝集物である Mallory body を 23 例中 5 例で認めた。

2. 免疫組織化学染色

(1) ケラチン (Keratin) 免疫染色。肺胞腔内をおおう II 型肺胞上皮細胞は高度な傷害により増生、腫大し、I 型肺胞上皮細胞とともに多くの部分で肺胞壁から剝離している。器質化期に形成された肺胞腔内の線維化の部分には、多くの場所で上皮細胞の被覆がみられず、傷害部の再生が不良である事を示している (Fig. 1d)。

Table 3 Light microscopic findings

No	Hyaline membrane	Intraalveolar fibroblast	Mural fibroblast	Mallory body	Phase of DAD
1	++	±	+	—	Ex 5d
2	++	±	—	—	Ex 1w
3	++	±	+	—	Ex 5d
4	++	±	±	—	Ex 5d
5	++	+	+	—	Ex 1w
6	+	++	++	—	Early org 2w
7	++	++	+	—	Early org 10d
8	+++	++	+	—	Early org 10d
9	+	++	++	+	Early org 2w
10	+++	+++	++	—	Early org 2w
11	+++	+	—	—	Early org 10d
12	±	++	—	—	Late org 2 ~ 3w
13	+	++	—	+	Late org 3w
14	±	+++	—	—	Late org 3w
15	+	+++	+	+	Late org 2 ~ 3w
16	±	+++	—	—	Late org 2 ~ 3w
17	±	+++	—	—	Late org 3w
18	±	+++	—	—	Late org 3w ~
19	±	+++	—	—	Late org 3w
20	±	+++	—	+	Late org 3w ~
21	±	++	—	—	Late org 4w
22	+	++	+	—	Late org 1w, 3w
23	±	+++	+	++	Late org 3w

Ex: Exudative stage of DAD

Early org: Early organizing stage of DAD

Late org: Late organizing stage of DAD

(2) IV型コラーゲン免疫染色. 肺胞上皮基底膜を染色するIV型コラーゲンにより線維化の場を検討した. 今回検討した器質化期DAD 18例の全例に肺胞腔内の線維化が観察され, 肺胞腔内線維化巣の筋線維芽細胞の間にもIV型コラーゲンが線状に陽性であった (**Fig. 1e**). また, 器質化期DAD 18例中11例に筋線維芽細胞の増生は肺胞腔内だけではなく, 肺胞壁自体にもある事を確認した (**Fig. 1f**).

(3) α -SMA免疫染色. ほぼ全例に筋線維芽細胞の出現を認めた. 器質化期を示した18例では肺胞腔内で高度な筋線維芽細胞の出現を認めた. 肺胞腔内に出現する多くの線維芽細胞は α -SMAが陽性で, 筋線維芽細胞の性格を示した (**Fig. 1g**). 肺胞壁自体の線維化を示したのは, 23例中11例で壁の肥厚と腫大した α -SMA陽性の筋線維芽細胞の出現を認めた (**Fig. 1h, i**).

(4) Mib-1免疫染色. Mib-1とHEの重染色による検討から, 器質化期の15/18例では, 肺胞腔内の線維化巣内にMib-1が核に陽性の筋線維芽細胞が認められ, 筋線維芽細胞が遊走して侵入するだけではなく, 腔内の線維化巣局所で増生している事が確認された

(**Fig. 1j**). また, 肺胞壁自体の線維化部には11例でMib-1陽性の線維芽細胞が認められ, 肺胞壁内でも線維芽細胞の増生があることが確認された.

考 察

今までの報告から特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonias: IIPs) をはじめとする肺線維症においては, 疾患ごとに肺胞腔内に形成される線維化の形態に特徴があることが知られている¹³⁻¹⁶. 線維化の結果として起こる肺胞の改築の程度が疾患予後とも密接に関連している¹³⁻¹⁶. このうちDADでは, 病変の分布はびまん性均一である. DADにおける線維化病巣は, 今までの報告では, 筋線維芽細胞もしくは線維芽細胞が肺胞上皮基底膜の断裂部位から肺胞腔内に侵入し, 肺胞腔内で増殖し細胞外基質 (ECM) を産生・沈着させることにより線維化が形成されるとされている^{3,9,13}. 今回の検討で, 線維芽細胞の増殖が肺胞腔内のみではなく, 器質化期に属する18例中11例で, 肺胞壁自体でも線維芽細胞が増殖し, 筋線維芽細胞化している像を認めている. DAD以外の線維化を

Table 4 immunohistochemistry

No	Keratin/ epithelial damage	aSMA/ intraalveolar MF	aSMA/ mural MF	IV Coll/ intraalveolar fibrosis	Mib-1/ intraalveolar F
1	++	±	+	—	—
2	+++	±	—	—	—
3	++	+	+	—	++
4	+	±	—	—	—
5	++	+	+	—	+
6	++	+++	+	+	++
7	++	±	+	—	—
8	+++	+	+	—	—
9	++	+	+	+	+
10	++	++	++	+	+
11	++	±	—	—	+
12	++	+	—	+	—
13	++	+++	—	+++	+
14	++	++	—	++	+
15	++	+	+	+	+
16	++	+++	—	+	+++
17	+	+++	—	++	++
18	++	++	—	++	+
19	+++	++	—	+++	++
20	++	+++	—	+++	++
21	++	+++	—	+	++
22	+	+	+	++	+
23	++	+++	+	+++	++

aSMA: a Smooth Muscle Act

MF: myofibroblast

IV Coll: type IV collagen

F: fibroblast

来たす間質性肺炎では、線維化の場合は肺胞腔内であることが示されている。DADにおける肺胞壁自体での筋線維芽細胞の出現、増生の機序はどの様に考えたらよいのであろうか。DADは、その名のとおおり、びまん性の肺胞壁の傷害がその出発である。肺胞上皮細胞および毛細血管内皮細胞は広汎に傷害され、血管からの浸出物と細胞崩壊物より硝子膜が形成される。その過程で肺胞壁自体の線維芽細胞の活性化がもたらされ、局所で増生し、筋線維芽細胞化しているものと考えられる。

Transforming growth factor β (TGF β) は線維芽細胞の細胞外基質産生を増加させる他に、線維芽細胞を筋線維芽細胞化することが知られている^{10,12}。DADでも傷害が特に強い場合は、種々の matrix metalloproteinase (MMP) などのプロテアーゼによる細胞外基質の変化と、TGF β を含むサイトカインの働きにより、肺胞壁という場においても線維芽細胞が活性化され、増生し、筋線維芽細胞化が起こっているものと考えられる。

DADの全例で硝子膜の形成があり、しかも、腔内

線維化巣を覆う上皮細胞の再生は乏しい傾向であった。5例では肺胞上皮細胞の変性所見である Mallory body が出現しており^{3,16,17}、間質から肺胞上皮が剥離している像が確認された。Mallory body は、細胞骨格であるケラチンの凝集物であり、基底膜への接着能が悪く、剥離傾向の強い細胞とされている^{3,16,17}。筋線維芽細胞の出現と上皮の再生が悪いことは、治りにくい肺線維症の特徴の一つであることが報告されており¹³、DADもその特徴を示す病態であるといえる。

癌に伴う DAD 症例の 11 例中 9 例で抗癌剤化学療法が行われているが、その内 1 例ではイレッサ（ゲフィチニブ）を使用している。組織像自体は通常の熱傷や敗血症などに伴う DAD との差異は見られないが、イレッサ使用症例では、特徴として新旧の時相の混在した DAD の組織像がみられている^{18,19}。抗癌剤自体が DAD 発症の原因である可能性がある。また、23 例中 7 例では DAD 発症前に間質性肺炎（IP）パターンが存在しており、その内 3 例は特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis: IPF）である。臨床的には IPF もしくは間質性肺炎（IP）の急性増悪とし

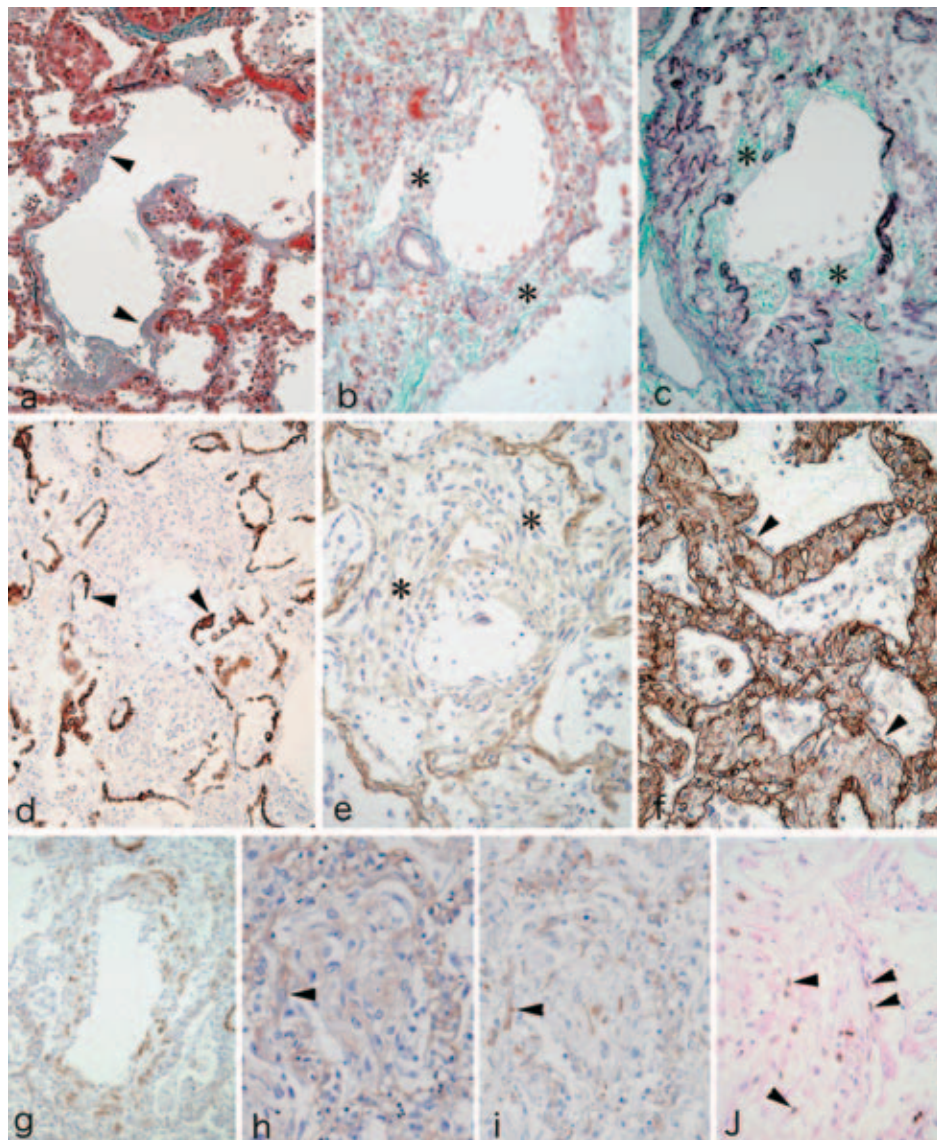


Fig. 1

- a. Exudative stage of DAD. Amorphous hyaline membrane (**arrowheads**) is formed in the alveolar space and adhered to the alveolar walls of the area of alveolar duct. (EMG stain)
- b. Early organizing stage of DAD. Increased fibroblasts are present in association with the deposit of loose collagen component (**asterisks**). (EMG stain)
- c. Late organizing stage of DAD. Dense collagen component (**asterisks**) is deposited in the area of alveolar duct. (EMG stain)
- d.-j. Early organizing stage of DAD. d. Keratin-positive alveolar epithelial cells (**arrowheads**) are discontinuous and detached from the organized alveolar walls.
- e. In all cases of organizing stage of DAD, the organization (**asterisks**) is found in the area of intraalveolar space. Finely fibrous type IV collagen is found in intraalveolar area. (type IV collagen)
- f. In some cases, alveolar walls themselves (**arrowheads**) are thickened and fibroblasts are increased in their walls. (type IV collagen)
- g. Increased fibroblasts located in intraalveolar space are α smooth muscle actin-positive myofibroblasts. (α smooth muscle actin)
- h. and i. are serial section. In some cases, α smooth muscle actin-positive myofibroblast (**arrowhead**) is also found in the thickened alveolar wall. h.: (type IV collagen), i.: (α smooth muscle actin)
- j. Fibroblasts (**arrowheads**) in intraalveolar fibrosis are Mib-1 positive and a fibroblast shows mitotic figure. (Mib-1)

て理解されていた症例である。IPF, IP の存在は DAD 発症の危険因子であるとされているが、今回の検討でも基礎疾患のうち、非腫瘍性疾患としては最も多くを占めており、同様の傾向を示しているものと考えられる²⁰⁻²³。

結 論

今回の検討で明らかになった点は

1. DAD では、線維化が肺胞腔内に形成されるだけでなく、症例によっては、肺胞壁自体でも線維芽細胞の増生がおこり、線維化を形成する。
2. DAD の線維化巣では、筋線維芽細胞が増生しており、特に肺胞腔内の線維化巣で顕著な増生を示している。
3. DAD における肺胞壁での筋線維芽細胞の出現、線維化は広汎な肺胞壁の傷害自体が引き起こしているものと考えられる。

謝辞：研究に当たり、ご助言ご指導いただきました日本医科大学解析人体病理学教室の先生方、染色室の技師の方々に深謝致します。また、日本に留学する機会と奨学金を戴きました中国新疆ウイグル自治区教育庁にも深謝致します。

文 献

1. Ashbaugh DG, Bieglow DB, Petty TL, Levine BE: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2: 319-323.
2. Katzenstein AL, Bloor CM, Liebow AA: Diffuse alveolar damage-the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am J Pathol* 1976; 85: 209-228.
3. 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* 1987; 126: 171-182.
4. 谷本高男, 今関信夫, 大河内康実, 尾関雄一, 松原修: DAD の病理組織像について、特に血管新生と肺の改築との関連について。 *日本胸部臨床* 2004; 63: 24-30.
5. 北市正則, 柳 重久: II 特発性間質性肺炎の臨床、基本病理像 (2) NSIP, COP/BOOP, AIP/DAD, RB-ILD, DIP, LIP について。 *日本胸部臨床* 2003; 11: s75-s83.
6. 金澤 實: 急性肺傷害/急性呼吸促進症候群とびまん性肺胞傷害、病態と治療、ALI/ARDS の概念と歴史的背景。 *日本胸部臨床* 2004; 63: 1-15.
7. Katzenstein AL, Myers JL, Mazur MT: Acute interstitial pneumonia. A clinicopathologic, ultrastructural, and cell kinetic study. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 256-267.
8. 特発性間質性肺炎 診断と治療の手引き。編集 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, 2004; 南江堂 東京。
9. Fukuda Y, Ferrans VJ, Schoenberger CI, Rennard SI, Crystal RG: Patterns of pulmonary structural remodeling following experimental paraquat toxicity: The morphogenesis of intraalveolar fibrosis. *Am J Pathol* 1985; 118: 452-475.
10. 福田 悠: Annual review 呼吸器 1999. 1 呼吸器系の生物学 (8) 筋線維芽細胞。1999; pp 57-67, 中外医学社 東京。
11. 福田 悠: 肺線維症における筋線維芽細胞。 *病理と臨床* 2003; 21: 366-373.
12. Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G: Myofibroblast. In *Histology for Pathologists*, second edition (Sternberg SS, eds), 1997; pp 129-165, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
13. 福田 悠: 病理形態像からみた治る間質性肺炎と治らない間質性肺炎。 *Respiratory Medicine* 2002; 1: 485-491.
14. Basset F, Ferrans VJ, Soler P, Takemura T, Fukuda Y, Crystal RG: Intraluminal fibrosis in interstitial lung disorders. *Am J Pathol* 1986; 122: 443-461.
15. Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N: Localization of matrix metalloproteinases -1, -2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase -2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 1998; 78: 687-698.
16. Fukuda Y, Basset F, Ferrans VJ, Yamanaka N: Significance of early intra-alveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsy specimens from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Human Pathol* 1995; 26: 53-61.
17. Warnock ML, Press M, Churg A: Further observations on cytoplasmic hyaline in the lung. *Hum Pathol* 1980; 11: 59-65.
18. 中山智子, 福田 悠: 薬剤性肺炎の病理組織像。 *分子呼吸器病誌* 2004; 6: 22(470)-27(475).
19. 福田 悠: イレッサ肺傷害の up to date 2) イレッサによる急性肺傷害の病理。 *呼吸器科* 2003; 4: 50-57.
20. 吉村邦彦, 中谷龍王, 中森祥隆, 蝶名林直彦, 立花昭生, 中田絃一郎, 岡野 弘, 谷本普一: 特発性間質性肺炎の急性増悪に関する臨床検討ならびに考案。 *日本胸部疾患学会誌* 1984; 22: 1012-1020.
21. 田口善夫: 特発性間質性肺炎の診断と治療。特発性肺線維症の急性増悪。 *日本呼吸器学会誌* 2004; 42: 28-31.
22. Saydain G, Islam A, Afessa B, Ryu JH, Peters SG: Outcome of patients with idiopathic pulmonary fibrosis admitted to the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 839-842.
23. Namimatsu S, Ghazizadeh M, Sugisaki Y: Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: A universal antigen retrieval method. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 3-11.

(受付: 2005年 3 月 30 日)

(受理: 2005年 10 月 25 日)