

図1. 男性肺気腫症例の発症年齢分布 (喫煙者 vs. 非喫煙者)

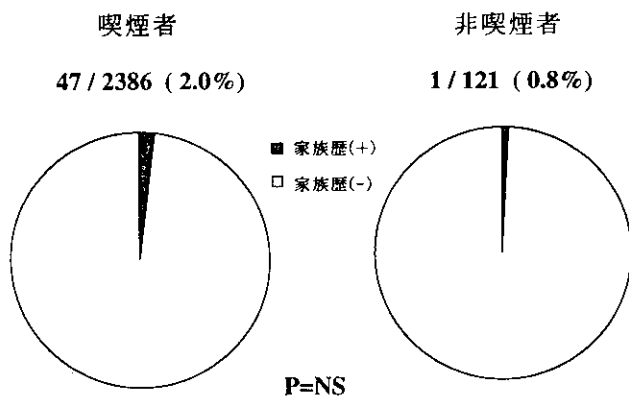


図2. 肺気腫の家族歴の有無 (喫煙者 vs. 非喫煙者)

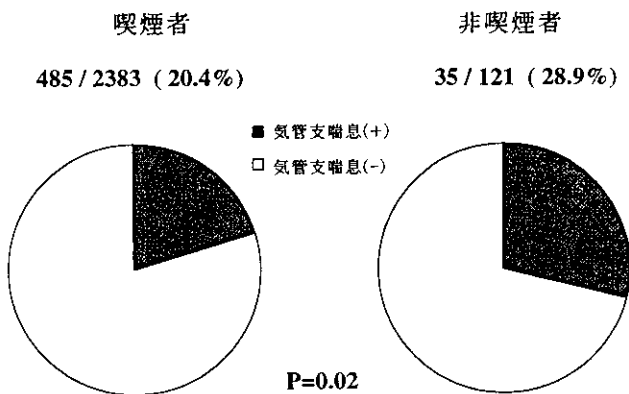


図3. 気管支喘息合併の有無 (喫煙者 vs. 非喫煙者)

表1. 肺機能検査成績

	喫煙者	非喫煙者	
% VC (%)	77.6 ± 0.4	68.5 ± 1.9	P < 0.01
FEV _{1.0} (%)	45.9 ± 0.2	48.8 ± 1.2	P < 0.01
PaO ₂ (Torr)	70.9 ± 0.2	68.8 ± 1.2	P = NS
PaCO ₂ (Torr)	42.6 ± 0.1	43.9 ± 0.8	P = NS

2. 男性例と女性例の対比

発症年齢の分布 (図4)・肺気腫の家族歴の有無 (図5)・喫煙本数に発症年齢までの年数を掛け合わせた数の分布 (図6)・診断時の肺機能検査成績 (表2) を示す。女性の方が発症年齢は若干高いことが認められた (男性 64.1 ± 0.2歳 vs. 女性 65.5 ± 0.6歳; P < 0.05)。肺気腫の家族歴の有無には両群間で有意差は認められなかった。喫煙本数に発症年齢までの年数を掛け合わせた数は、男性の方が有意に高値を呈していた。

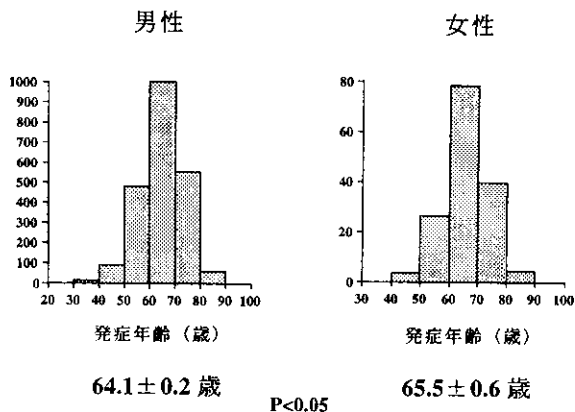


図4. 喫煙肺気腫症例の発症年齢分布 (男性 vs. 女性)

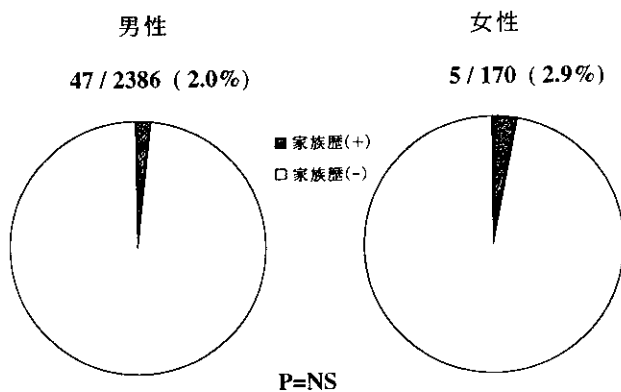


図5. 肺気腫の家族歴の有無 (男性 vs. 女性)

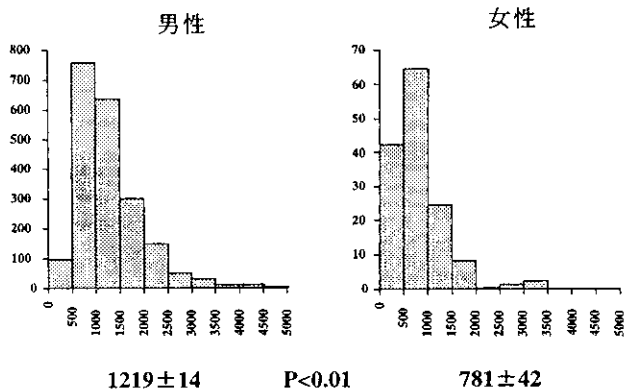


図6. 喫煙本数 x (発症年齢 - 喫煙開始年齢) (男性 vs. 女性)

表2. 肺機能検査成績

	男性	女性	
% VC (%)	77.6 ± 0.4	71.7 ± 1.6	P < 0.01
FEV _{1.0} % (%)	45.9 ± 0.2	48.8 ± 0.9	P < 0.01
PaO ₂ (Torr)	70.9 ± 0.2	67.6 ± 0.9	P < 0.01
PaCO ₂ (Torr)	42.6 ± 0.1	44.2 ± 0.7	P < 0.05

3. 若年発症群と老年発症群の対比

喫煙本数に発症年齢までの年数を掛け合わせた数の分布 (図7)・診断時の肺機能検査成績 (表3) を示す。喫煙本数に発症年齢までの年数を掛け合わせた数は、50歳を越えて発症した老年発症群の方が、若年発症群と比較して有意に高値を呈していた。

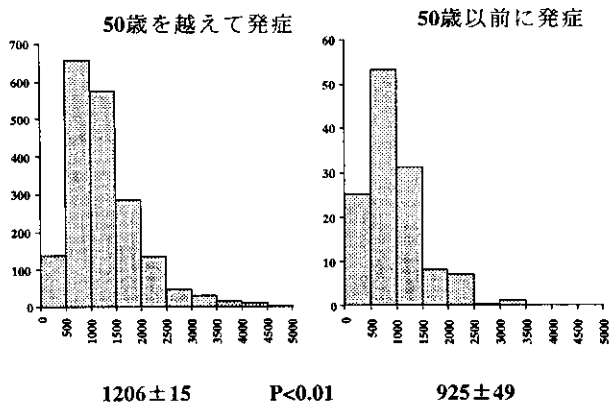


図7. 喫煙本数 x (発症年齢- 喫煙開始年齢)
(50歳以降の発症 vs. 50歳以前の発症)

表3. 肺機能検査成績

	老年群	若年群	
% VC (%)	79.3 ± 0.5	83.6 ± 1.9	P < 0.05
FEV _{1.0} % (%)	47.2 ± 0.3	47.1 ± 1.5	P = NS
PaO ₂ (Torr)	70.6 ± 0.3	70.9 ± 1.2	P = NS
PaCO ₂ (Torr)	42.7 ± 0.2	41.3 ± 0.6	P < 0.05

4. 若年発症群の中で、典型例と非典型例の対比

喫煙本数に発症年齢までの年数を掛け合わせた数の分布 (図8)・診断時の肺機能検査成績 (表4) を示す。喫煙本数に発症年齢までの年数を掛け合わせた数は、定型例の方が、非定型例と比較して有意に高値を呈していた。

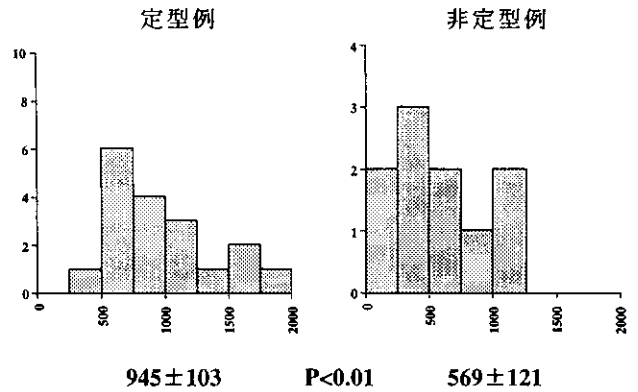


図8. 喫煙本数 x (発症年齢- 喫煙開始年齢)
(定型例 vs. 非定型例)

表4. 肺機能検査成績と発症年齢

	定型例	非定型例	
% VC (%)	94.4 ± 6.6	83.5 ± 5.6	P = NS
FEV _{1.0} % (%)	35.8 ± 2.2	35.0 ± 3.5	P = NS
PaO ₂ (Torr)	73.1 ± 2.2	64.5 ± 3.3	P = 0.053
PaCO ₂ (Torr)	41.8 ± 1.2	45.8 ± 2.5	P = NS
発症年齢	46 ± 1	40 ± 3	P = 0.03

考察

COPDはアメリカでは死因の第四位に挙げられており、予後に大きな影響を持つ疾患とされている。生活様式が欧米化しているわが国においても、今後COPDの疫学が明らかになれば、生命予後に対するCOPDの重要性は再確認されるかもしれない。喫煙者の10-15%は喫煙に感受性があり、COPDに至ると一般にいわれているが、わが国においては、その根拠は定かではない。喫煙量と肺機能障害にはある程度関係があるとされているが、喫煙に対して閉塞性換気障害がどのように進展するかに関しては、かなりの個人差があると考えられる⁹⁾。COPD発症に関する喫煙感受性はせいぜい10-15%であること、また、若年にて肺気腫を発症してくる喫煙者をわれわれも確認していることは、喫煙に対する遺伝的な感受性の存在を示唆している⁹⁾。

(1) 喫煙例と非喫煙例の対比

以上のように、COPD発症に関しては喫煙の影響が大きく取り上げられてはいるが、喫煙歴がなく発症してくるCOPD症例も存在している。その絶対数は少ないが

(2:1)、その群の特徴は何であるのかを臨床疫学的に検討した。非喫煙者が、遺伝的要因のみで発症してくるとは考えにくく、何らかの遺伝的素因の上に、受動喫煙も含めてやはり何らかの環境因子が加わってCOPDに至っているものと考えられる。喫煙という明かな影響が認められないことが影響してか、発症年齢はより高齢化しており、特に70歳以降での発症が半数を占めていた(非喫煙者 vs. 喫煙者: 49.1% vs. 28.1%)。また、拘束性換気障害の程度は強かったが、閉塞性換気障害の程度も軽度であった(表1)。

1970年代の研究により、COPDには家族性・遺伝性があることが認められている^{37,48)}。今回の検討では、非喫煙者においては、肺気腫の家族歴は0.8%にしかすぎなかった。一方、喫煙者における肺気腫の家族歴も2.0%であり、両群の間で有意差は認められなかった。これらのことより、家族歴からみて、遺伝的な因子が肺気腫の発症に関与している可能性は、喫煙者・非喫煙者ともに薄いとみえるかもしれない。遺伝的な要因で、単一の因子でCOPDの発症に関与してくるのは α 1-antitrypsinの欠損である⁹⁾。これ以外の遺伝的な因子も、COPDの危険因子になりうるものが、最近いくつかは認められてきてはいるが、単一でCOPDの進展に関与してくるようなものは認められていない¹⁰⁾。COPDの発症には、遺伝的な素因の上に、環境因子が強く働くことが条件かもしれない。

Non-smoking related obstructive lung disease (M. Schwarz 1997)の中に、通常肺気腫は含まれていないようである。DPB、後天的な要因により気管支拡張症、呼吸細気管支炎・感染性細気管支炎に続発する閉塞性細気管支炎・肺気腫などが含まれるようであり、感染の要因が強い疾患群であるのかもしれない。今回の対象の非喫煙者の肺気腫の詳細は不明であるが、喫煙者に発症する肺気腫とは異なる疾患群をみている可能性も考えられる。

COPDの発症が、遺伝的素因の上に環境因子が蓄積して起こることを初めて提唱したのは、オランダの研究グループであり、「Dutch Hypothesis」と呼ばれている。COPDの遺伝的素因として気道過敏性やアレルギー反応を成因の主体と考えている。最近、COPDの中で気管支喘息と鑑別が困難な病態を占める一群があることより、COPDの発症に気管支喘息と共通するアトピー素因が関与している可能性も指摘されている。また、気道過敏性を支配する遺伝的素因の有無が、COPDの発症と重症度を左右している可能性も考えられている。今回の対象例の検討では、非喫煙者において気管支喘息の合併頻度が有意に高値を呈していた。非喫煙者群が喫煙者と同様の

肺気腫病変を呈していたとすると、喫煙による肺病変に伴う気道過敏性の亢進は、喫煙にはよらないのかもしれない。

(2) 男性例と女性例の対比

通常、喫煙習慣が男性に多いことから、COPDは男性の病気と考えられているが¹¹⁾、若年発症のCOPDでは女性が多いという報告がある^{12) 13)}。また、喫煙は、男性よりも女性に肺機能障害という点において大きな影響があるという報告がある¹⁴⁾。今回の検討において、女性例の肺気腫症例は数的には少ないものの、特筆すべき結果は、表6に示した喫煙感受性を示すと考えられる値が、女性の方が有意に低値であったということである。女性群では、喫煙本数が少なくても閉塞性換気障害に至り、呼吸困難が出現する症例が一部あるということはいえる。男性例の一部では、喫煙感受性がより低いために、重喫煙になりはじめて呼吸困難が出現するのかもしれない。または、自覚症状があっても、喫煙を続けているという可能性もある。しかし、閉塞性換気障害の程度は男性の方が強かったが、拘束性換気障害は男性の方が軽度であった。女性の方が喫煙感受性が高ければ、今後女性の喫煙率が増加しているわが国においては、10年後・20年後にその結果が出てくるのかもしれない。

(3) 男性喫煙者で、若年発症群と老年発症群の対比

男性50歳以前の若年で肺気腫を発症する群がわが国においても明らかに存在することは、昨年までに認めている。今回は、喫煙者で50歳を境として、それ以前に発症してくる症例の方が、喫煙感受性が高いのではないかと、という仮説を検定した。両群間で、閉塞性換気障害の程度には有意差は認められなかったが、%VCは若年群の方が高値を呈していた。結果としては仮説どおりであり、同様の閉塞性換気障害に至り、呼吸困難が出現するまでに、50歳以前で発症した症例の方が、喫煙本数は有意に低値であった。これは、若年発症群の方が、喫煙感受性が高いことを示唆している。以前に報告したように、若年発症の肺気腫では、20歳以前からの喫煙開始が大多数を占めていた(86%)。この群の喫煙感受性は、おそらく遺伝的要因による影響を強く受けていると考えられるが、その要因が何であるのかは不明のままである。しかし、早期の喫煙は、喫煙感受性に関与しうる何らかの遺伝子発現を促進するとも考えられる。

(4) 若年発症喫煙群の中で、典型例と非典型例の対比

若年発症の肺気腫群は、喫煙に対する感受性が亢進し

ている一群である可能性がある。若年発症の中でも、CT画像の検討により、LAAが明らかに認められる典型例と、LAAは明かとはいえないが、過膨張所見を認める非典型例があることを昨年報告している。この典型例と非典型例の比較において、喫煙感受性を検討した結果、非典型例は喫煙感受性が高く、少ない喫煙本数にて閉塞性換気障害が成立していることが認められた(図8)。さらに、非典型例の方が、発症年齢がより若年であった。これらの若年発症群は、何らかの遺伝的因子の上にも、喫煙という環境要因が加わり発症したものと考えると、非典型例は非常に喫煙感受性が亢進していることになる。非典型例において、LAAが明かでないのは、肺胞構造の破壊に至る前に、閉塞性障害が成立するような細気管支病変が先行しているのかもしれない¹⁹⁾。

文献

1. 巽 浩一郎、他. 日本における慢性肺気腫症の実態、呼吸不全調査研究班 平成9年度研究報告書 23-28, 1998.
2. 巽 浩一郎、他、呼吸不全6疾患の全国疫学調査-わが国における若年性肺気腫の検討-。呼吸不全調査研究班 平成9年度研究報告書 29-35, 1998.
3. 巽 浩一郎、他、肺好酸球性肉芽腫症および若年性肺気腫の診断基準・重症度基準。呼吸不全調査研究班 平成10年度研究報告書 23-31, 1999.
4. Burrows B, et al. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis* 115: 195-205, 1977.
5. Silverman EK, et al. Risk factors for the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Med Clin North Am* 80: 501-522, 1996.
6. Larson RK, et al. Genetic and environmental determinants of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 72: 627-632, 1970.
7. Kueppers F, et al. Familial prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in a matched pair study. *Am J Med* 63: 336-342, 1977.
8. Cohen BH, et al. Risk factors in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Epidemiol* 105: 223-232, 1977.
9. Laurell CB, et al. The electrophoretic alpha₁-globulin pattern of serum in alpha₁-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Invest* 15: 132-140, 1963.
10. Schellenberg et al. Vitamine D binding protein variants and the risk of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 957-961, 1998.
11. Davis RM, et al. Changes in risk factors: the epidemiology of cigarette smoking and its impact on chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 140: S82-84, 1989.
12. Silverman EK, et al. Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstructive and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1770-1778, 1998.
13. Damsgaard T, et al. Prognosis in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Med Scand* 196: 103-108, 1974.
14. Prescott E, et al. Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study. *Eur Respir J* 10: 822-827, 1997.
15. Gelb AF, et al. Pseudophysiological emphysema resulting from severe small-airways disease. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 815-819, 1998.

慢性肺気腫とヘムオキシゲナーゼ遺伝子多型性の関連

山谷 睦雄¹⁾*** 冲永 壮治¹⁾ 山田 紀広¹⁾ 中山 勝敏¹⁾
佐々木英忠¹⁾ 巽 浩一郎²⁾ 福地義之助³⁾** 栗山 喬之²⁾*

はじめに

慢性肺気腫に代表される慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD) は世界における主要死亡原因の1つであり、罹患率・死亡率とも増加している。喫煙はCOPD発症の最大の危険因子として認められているが、一方で喫煙者の10%前後のみにCOPDが発症するとの報告があり¹⁾、喫煙に対する感受性を含めCOPDの発症因子・発症機序は不明である。現在、慢性肺気腫の発症機序として2つの仮説、プロテアーゼ・抗プロテアーゼ説およびオキシダント・抗オキシダント説が提唱されている。オキシダント・抗オキシダント説はオキシダントの直接傷害および抗プロテアーゼ抑制作用による肺組織破壊が慢性肺気腫を惹起すると説明しているが、喫煙者の抗オキシダント産生機能と慢性肺気腫発症との関係は不明であった。

ヘムオキシゲナーゼはヘムをビリベルジンと鉄に代謝し、一酸化炭素やビリルビン、フェリチンを産生する酵素である²⁾。誘導型ヘムオキシゲナーゼはオキシダントや高酸素による細胞破壊を防御する抗オキシダント作用を持ち、生体におけるオキシダント物質とのバランスを保つ働きをしていると考えられている²⁾。ヘムオキシゲナーゼの誘導はヘムオキシゲナーゼ遺伝子の上流に位置するGT反復配列で制御され、長いGT反復配列ほど抑制作用が強いことが最近報告された。これらの知見から私共は慢性肺気腫では非慢性肺気腫に比べてGT反復配列によるヘムオキシゲナーゼの誘導抑制が強く、喫煙中のオキシダントに対する防御能力が弱いために発症するのではないかと考え研究を進めた。

対象と方法

年齢50歳以上の慢性肺気腫患者101名(平均年齢66.8歳、平均Brinkman's index 1006)、非慢性肺気腫100名(平均年齢67.1歳、平均Brinkman's index 938)の喫煙男性を対象とした。慢性肺気腫の診断は原則的に、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息の診断と治療指針(日本胸部疾患学会1995年)に従い、理学的所見、呼吸機能所見、胸部画像所見などを参考にした。以上の対象から血液を採取しDNAを抽出した。これを鋳型としてPCRを行った。2種のプライマーはHO-1遺伝子5'上流域のGT反復配列領域をはさむ位置とした(図1)³⁾。その際プライマーの一方を蛍光色素でラベルし、PCR産物のシーケンスを行いGT反復配列の長さを比較した。さらに、GT反復配列多型性間におけるHO-1遺伝子発現の相違を、トランスフェクションを用いた一過性の遺伝子発現で調べた⁴⁾。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、GT反復配列数16, 20, 29, 38をトランスフェクションした培養細胞(Hep3BおよびA549細胞)で比較した。

結果

PCR産物のシーケンスの結果、各々の個体は長さの異なる2種類のGT反復配列を有した。肺気腫群、非肺気腫群全体をまとめるとGT反復配列の長さは3つのピークを持って分布し、24回以下、25-29回、30回以上の3クラスに分けられた(図1)。このうち30回以上の長いGT反復配列を持つ割合は非慢性肺気腫に比べて慢性肺気腫において明らかに高く認められた($p < 0.008$)(表1)。また、反復回数30回以上の遺伝子を有する喫煙者が慢性肺気腫に罹患するリスクは29回以下のGT反復配列を有する喫煙者の2.4倍であった(表2)。さらに過酸化水素(500 μ M, 3時間)によるヘムオキシゲナーゼ遺伝子の誘導をルシフェラーゼ活性で調べたところ、長いGT反復配列を遺伝子導入した培養細胞ではヘムオキシゲナーゼ遺伝子発現の誘導がより強く抑制されることが明らかになった(図2)。

1) 東北大学医学部附属病院老人科

2) 千葉大学医学部肺癌研究施設第二臨床研究部門

3) 順天堂大学呼吸器内科

* 「呼吸不全」調査研究班 主任研究者

** 「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

*** 「呼吸不全」調査研究班 研究協力者

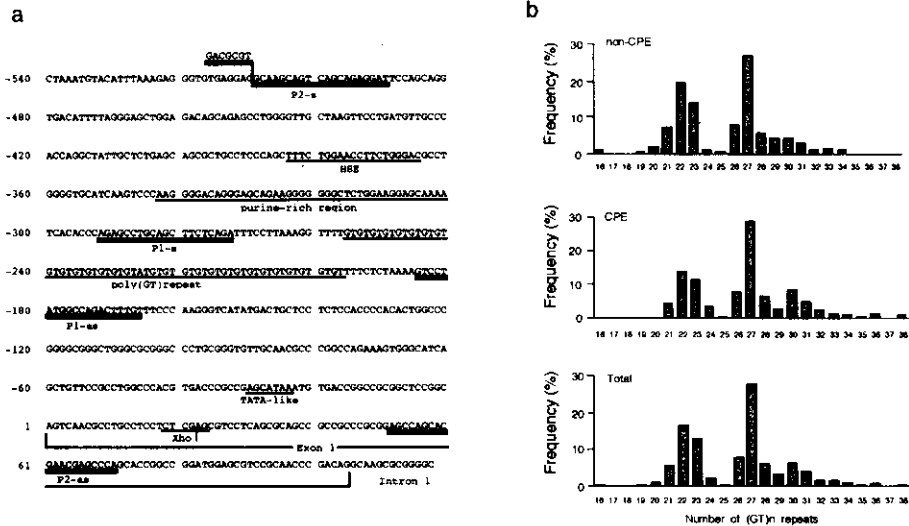


図1

- (a) Nucleotide sequence of the 5'-flanking region and exon 1 of the human HO-1 gene (Shibahara et al. 1989). The fragment between P1-s and P1-as was amplified by PCR and the number of (GT) n repeats was determined with a DNA sequencer.
- (b) Frequency distribution of the numbers of (GT) n repeats in patients without CPE (non-CPE, n = 100), patients with CPE (CPE, n = 101) and total patients (Total, n = 201).

表1 Allele Frequencies at the Polymorphic Locus

ALLELE CLASS	No. (%) OF PATIENTS		ODDS RATIO (95 % CI) VEESES ALLELE CLASS			
	Without CPE (n=200)	With CPE (n=202)	All Other Classes	S	M	L
L	20 (10)	42 (21)	2.4 (1.3 - 4.1) ^a	2.9 (1.6 - 5.3) ^b	2.0 (1.1 - 3.6) ^c	1.0
M	88 (44)	93 (46)	1.1 (.7 - 1.6)	1.5 (.9 - 2.2)	1.0	
S	92 (46)	67 (33)	0.6 (.4 - .9) ^d	1.0		

^a P < .004.

^b P < .001

^c P < .03.

^d P < .02.

表2 Genotype Frequencies at the Polymorphic

GENOTYPE SUBGROUP	No. (%) OF PATIENTS		ODDS RATIO (95 % CI)
	Without CPE (n = 100)	With CPE (n = 101)	
I	20 (20)	38 (38)	2.4 (1.3 - 5.7) ^a
II	80 (80)	63 (62)	

^a P < .008.

若年性肺気腫におけるHO-1遺伝子多型性および非若年性肺気腫との違いを調べるため、平成10年度から、呼吸不全調査研究班に登録された若年性肺気腫合計64症例の採血を主治医に依頼してきた。この結果、平成11年12月現在で31症例の協力が得られ、DNAを抽出した。また、このうち28症例において、リンパ球の継代培養に成功した。

考案・結論

従来、慢性肺気腫の発症原因としてプロテアーゼ・抗プロテアーゼの不均衡が提唱され、発症遺伝子としてα1-アンチトリプシン欠損症が明らかにされてきた。最近、これに加えて、オキシダント・抗オキシダントの不均衡が

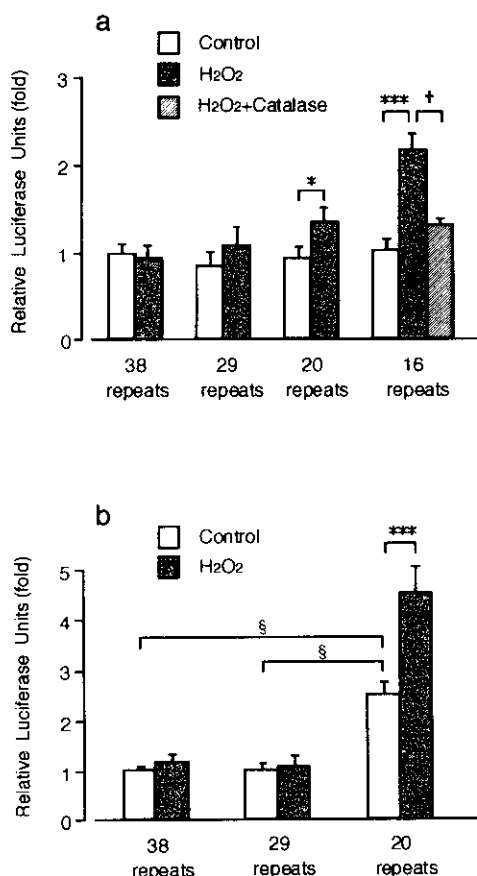


図2

Promoter activities of 5'-flanking regions of the HO-1 gene in either A549 cells (a) or Hep3B cells (b) transfected with the recombinant gene carrying either (GT)₁₆, (GT)₂₀, (GT)₂₉ or (GT)₃₈ repeat after treatment with H₂O₂ (500 μM, 3h) or distilled water (control).

指摘されている。Smithらは抗オキシダント酵素である microsomal epoxide hydrolase 活性が慢性肺気腫で低下する遺伝子多型性を報告した²¹。今回の研究では、抗オキシダント作用を有する酵素であるHO-1の発現が慢性肺気腫で低下しているという仮説をたて、HO-1遺伝子GT反復配列多型性と慢性肺気腫との関連について検討した。結果、30回以上の長いGT反復配列を有する割合が慢性肺気腫において有意に上昇した。また、反復回数30回以上の遺伝子を有する喫煙者が慢性肺気腫に罹患するリスクは29回以下のGT反復配列を有する喫煙者の2.4倍であった。この結果、長いGT反復配列をもつ喫煙者において、抗オキシダント作用を持つヘムオキシゲナーゼの誘導が抑制され、慢性肺気腫が発症するリスクが大き

いと結論された。さらに、培養細胞を用いた実験において、トランスフェクションしたGT反復配列数と過酸化水素によるHO-1発現誘導との間に負の相関関係を認めた。これは、長いGT反復配列がオキシダントによるHO-1発現を抑制することを示している。このように、慢性肺気腫の発症要因としてHO-1遺伝子多型性の関与が示唆された。

HO-1遺伝子の発現機構は詳細に調べられているが、喫煙という酸化刺激がHO-1発現のどの経路をとるのか不明であり、今後の課題である。GT反復配列はプロラクチン遺伝子など他の遺伝子発現制御作用を持つことが報告されている²²。逆に、GT反復配列を取り除くとHO-1遺伝子は熱ショックで発現が誘導される²³。今回の結果はこれらの報告に沿ったものである。HO-1は抗酸化作用を持ち、代謝産物であるビリルビンやフェリチン、一酸化炭素などの関与が示唆されている²⁴。ビリルビンは強力な抗酸化作用が報告されており、炎症を沈静化する。従って、慢性肺気腫に限らず、多くの炎症性肺疾患にもHO-1が関与していると考えられる。

参考文献

1. Hanrahan JP, Sherman CB, Bresnitz EA, et al: Cigarette smoking and health. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:861-865.
2. Maines MD: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-554.
3. Shibahara S, Sato M, Muller R, et al: Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter. *Eur J Biochem* 1989;179:557-563.
4. Okinaga S, Takahashi K, Takeda K, et al: Regulation of human heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress. *Blood* 1996;87:5074-5084.
5. Smith CAD, Harrison DJ: Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997;350:630-633.
6. Nylor LH, Clark EM. d (TG) n·d (CA) n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucl Acids Res* 1990;18:1595-1601.

肺気腫における気腫病変の形成機序に関する研究

青柴 和徹 鯉沼みゆき 横堀 直子 永井 厚志*

はじめに

肺気腫病変の形成には慢性炎症から肺組織の破壊と消失へ至る過程が想定されているがその機序は不明である。近年の研究において肺気腫患者の末梢気道や肺胞実質領域にはリンパ球やマクロファージなどの炎症細胞の浸潤が観察されているが¹⁾²⁾、その詳細な炎症像や気腫病変の形成過程における役割は明らかではない。一方、このような慢性炎症像に付随してみられる肺組織の破壊と消失の機序には従来よりエラスチン、コラーゲンなどの細胞外基質の分解が想定されてきたが³⁾⁴⁾、これとは別に肺を構成する肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、間質細胞などの細胞死が気腫化の要因である可能性も考えられる⁵⁾。本研究では肺容量減少術により切除された気腫化肺組織を用いて、気腫病変の形成機序における炎症細胞と細胞死の関与について検討した。

対象と方法

厚生省特定疾患「呼吸不全調査分科会」協力施設にて行なわれた肺気腫に対する肺容量減少術により切除された肺組織を対象とした(11例、男性:7例、女性:4例)。採取された肺組織断片を注射器に入れて陰圧で拡張し、10%ホルマリン中で固定後パラフィン包埋したのち3 μ mの薄切切片を作成した。免疫組織染色には、一次抗体として抗CD68(マクロファージマーカー)、抗CD45RO(メモリーTリンパ球)、抗CD4、抗CD8抗体(ダコ社)を用いた。抗原賦活化のために標本を抗CD68染色前にペプシン処理、抗CD4、抗CD8染色前にオートクレーブ処理(120 $^{\circ}$ C、20分)を施した。二次抗体にはビオチン標識抗IgG抗体を用い、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた後ジアミノベンジジン(DAB)を用いて発色した。さらに抗CD4、抗CD8染色には検出感度を増加させるためにCSAシステム(ダコ社)を用いた。

TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)法による死細胞(アポトーシス細胞)の検出には、Takara in situ Apoptosis Detection kit(タカラ酒造)を用いた。すなわち標本をプロテナーゼKにて処理した後、細胞の断片化DNAの遊離3'-OH末端にターミナルトランスフェラーゼ(TdT)を用いてフルオレセイン-dUTPを取り込ませた。次にペルオキシダーゼ標識抗フルオレセイン抗体を反応させ、DABにて発色した。

結果

免疫組織染色においては、肺胞実質の気腫化領域、線維化領域と末梢気道周囲組織に広範なTリンパ球(CD45RO陽性細胞)の浸潤が観察された(図1)。Tリンパ球のサブセットを検討すると、肺胞実質の気腫化領域にはCD4

T cell
(CD45RO)



図1 肺気腫患者の切除肺組織におけるTリンパ球(CD45RO陽性)の免疫染色。
上段:末梢気道領域、下段:肺胞実質領域。
DAB染色、100倍。

東京女子医科大学 第一内科

*「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

陽性Tリンパ球が優位に、線維化領域と気道周囲組織にはCD8陽性Tリンパ球が優位に浸潤していた(図2)。マクロファージ(CD68陽性細胞)は肺胞実質の線維化領域と気道周囲組織に多くみられた。また、TUNEL染色においては炎症細胞と気腫化領域の肺胞上皮細胞の一部に

陽性細胞が観察された(図3)。現在、形態計測の手法を用いて肺組織中の炎症細胞とTUNEL陽性細胞の定量評価を行なうとともに正常非喫煙者、喫煙者の切除肺組織を用いて比較検討中である。

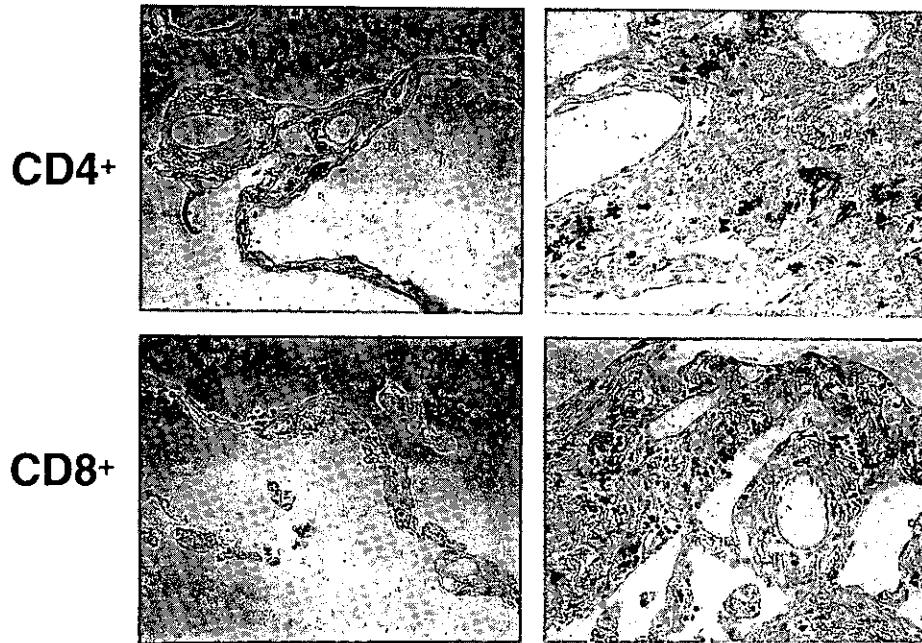


図2 肺気腫患者の切除肺組織におけるCD4陽性およびCD8陽性Tリンパ球の免疫染色。左：気腫化肺胞領域、右：線維化肺胞領域。DAB染色、100倍。

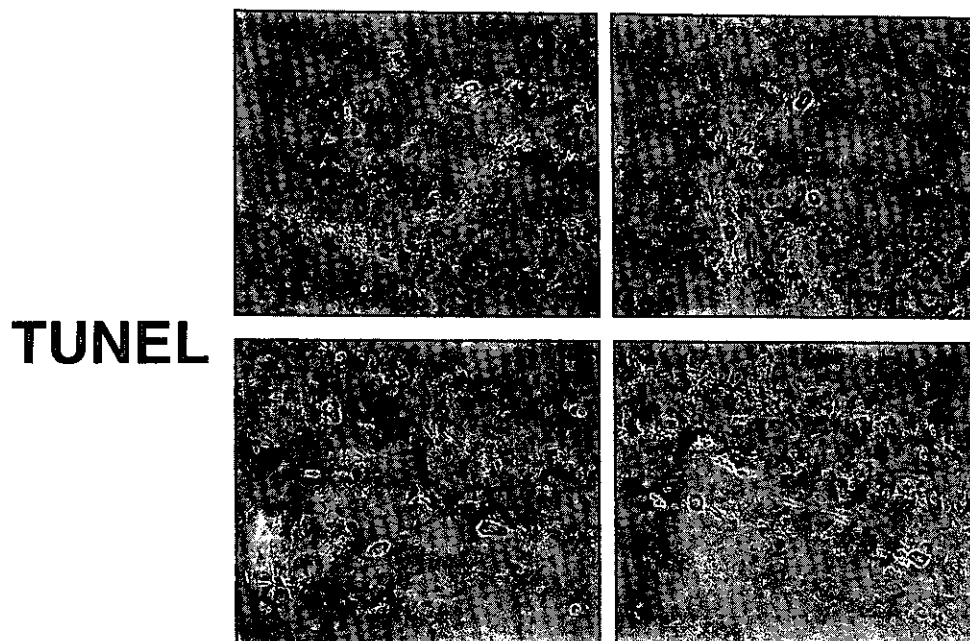


図3 TUNEL染色。DAB染色、200倍。

考案・結論

本研究では肺容量減少術により得られた肺気腫患者の切除肺組織を用いて、末梢気道と肺胞実質に浸潤した炎症細胞を免疫組織学的に検討した。末梢気道周囲においてはCD8陽性Tリンパ球とマクロファージを主体とする炎症細胞の浸潤が観察されたが、この結果は近年の複数の研究成績と合致している⁹⁾。これまでのところ末梢気道周囲に浸潤したCD8陽性細胞の役割は不明であるが、その細胞傷害作用により末梢気道の破壊や線維化ないしリモデリングの形成に関与している可能性が考えられる。また、Tc1タイプのCD8陽性Tリンパ球はインターフェロン γ などのTh1サイトカインを産生する作用のあることから気道周囲組織にみられるマクロファージの集積と活性化を介して末梢気道の傷害をもたらしている可能性がある。

一方、肺気腫患者の肺胞実質における炎症細胞の浸潤を検討した報告はこれまでにほとんどない。本研究では肺胞実質のうち気腫化領域にはCD4陽性Tリンパ球優位の、一方、線維化領域にはCD8陽性Tリンパ球とマクロファージ優位の炎症細胞の浸潤が観察された。特に気腫化肺胞領域にはCD4陽性リンパ球の浸潤が多数見られたが、その細胞特性から考えてCD4陽性リンパ球が直接的に肺胞壁を破壊したとは考えにくい。活性化したCD4陽性リンパ球、特にTh1CD4細胞が炎症性サイトカインの産生と好中球やマクロファージの活性化を介して肺胞壁の破壊を間接的にもたらす機序が推測されるが、その証明には今後の検討が必要である。以上、本研究の免疫組織染色の結果からは気腫化肺組織における気腫化領域と線維化領域、末梢気道周囲領域ではサブタイプの異なるTリンパ球が浸潤していることが示唆された。今後、サイトカインに対する免疫二重染色を試みてTh1/Th2およびTc1/Tc2リンパ球サブセットを同定するとともに気腫病変におけるこれらTリンパ球の役割を明らかにしたいと考えている。

さらに本研究では、気腫化肺組織のTUNEL染色において炎症細胞のみならず肺胞上皮細胞の一部に細胞死の出現が観察された。このようなTUNEL陽性細胞がアポトーシス細胞であるのかネクローシス細胞であるのかは今後の検討課題であるが、気腫化肺にみられる肺胞壁の

破壊・消失の機序に細胞死が関与している可能性が示唆された。

謝辞

肺組織の提供をご快諾いただきました厚生省特定疾患「呼吸不全調査分科会」協力施設に深謝いたします。岡山大学 第二外科、福岡大学 第二外科、日本医科大学 第二外科、埼玉医科大学 第一外科、東海大学 外科、静岡市立静岡病院 胸部外科、信州大学 第二外科、大阪大学 第一外科、国立療養所 広島病院、国立療養所 山陽病院、奈良県立医科大学 第三外科、宮崎医科大学 第二外科

文献

- 1) Saetta M: Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: s17-s20.
- 2) Cosio MG, Guerassimov A: Chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: s21-s25.
- 3) Janoff A: Elastase and emphysema: current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 417-433.
- 4) Tetley TD: Proteinase imbalance: its role in lung disease. *Thorax* 1993; 48: 560-565.
- 5) 青柴和徹、永井厚志: 慢性閉塞性肺疾患: 発症進展にかかわるアポトーシスの役割 *日本臨床* 1999; 57: 42-45.
- 6) Saetta M, Di Stefano A, Turato G, et al: CD8+ T-lymphocytes in the peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 822-826.
- 7) Lams BEA, Sousa AR, Rees PJ, et al: Immunopathology of the small-airway submucosa in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1518-1523.

慢性肺気腫あるいは呼吸不全におけるウイルス感染

山谷 睦雄* 鈴木 朋子 細田 昌良 佐々木英忠

はじめに

気管支喘息や慢性気管支炎はウイルス感染が引き金になって急性増悪し、呼吸不全をきたすことが多い。ライノウイルス、インフルエンザウイルス、RSウイルスなどが同定され、二次性の細菌感染が更に症状を悪化させる¹⁾。ウイルス感染は気道上皮の剥離脱落や気道壁の浮腫を介して気道内腔を狭窄すると言われている。また、炎症性サイトカイン、ヒスタミンやキニンが気道炎症や気管支平滑筋収縮を生じて気流障害を促すと考えられている。慢性肺気腫も感冒を機会に急性増悪すると知られているが、起因ウイルスの同定や病態の把握はこれまでなされていない。昨年度、慢性肺気腫および気管支喘息の急性増悪においてインフルエンザウイルス等のウイルス感染と低酸素血症、ピークフロー値の低下、呼気CO値上昇、血中可溶性ICAM-1およびIL-6上昇を報告したが、細胞接種法ではライノウイルスを検出出来なかった。気管培養細胞を用いて、炎症性サイトカイン、ICAM-1、LDL受容体合成亢進を報告してきたが、気道狭窄の原因としての喀痰分泌亢進機序は不明であった。本年度は1)慢性肺気腫の急性増悪とライノウイルス感染の関係を明らかにすること、2)気管上皮細胞のムチン合成に対するライノウイルス感染の効果を明らかにすることにつき、研究を行った。

方法

①当科通院中の慢性肺気腫患者20人、気管支喘息71人を対象に気道感染症状に随伴した急性増悪時に咽頭ぬぐい液、鼻汁、うがい液を採取しRNAを抽出してRT-PCR法にてライノウイルスRNAの存在を調べた²⁾。患者の肺機能を検討するため、動脈血血液ガス分析とピークフロー値を測定した。ピークフロー値はピークフローメーター(Personal Best)で測定した。急性増悪時の血中因子の変化を検討するため、血中IL-6および可溶性ICAM-1を測定した。

東北大学医学部附属病院老人科

*「呼吸不全」調査研究班 研究協力者

②剖検気管上皮細胞を滅菌試験管に培養し、14型ライノウイルス 10^5 TCID₅₀/mlを60分間感染させた³⁾。感染後2、4、8、12、24時間後に上皮細胞を回収しRNAを抽出した。RT-PCR法によりムチン遺伝子の内、MUC2、MUC5AC、MUC5BmRNAを検索した⁴⁾。また、感染後2、4、8、12、24時間後に培養液を回収しMUC5ACに特異的なモノクローナル抗体(Chemicon International, Temecula, CA)を用いてELISA法にてムチン放出量を測定した。

結果

①対象患者のうち平成11年4月から12月の期間で慢性肺気腫患者20例中5例、気管支喘息71例中19例が急性上気道炎症状と呼吸困難症状を呈した。この内、慢性肺気腫2例、気管支喘息3例でライノウイルスRNAが検出された(図1)。ライノウイルスRNAは咽頭ぬぐい液1例、うがい液2例、鼻汁2例で陽性であった(表1)。

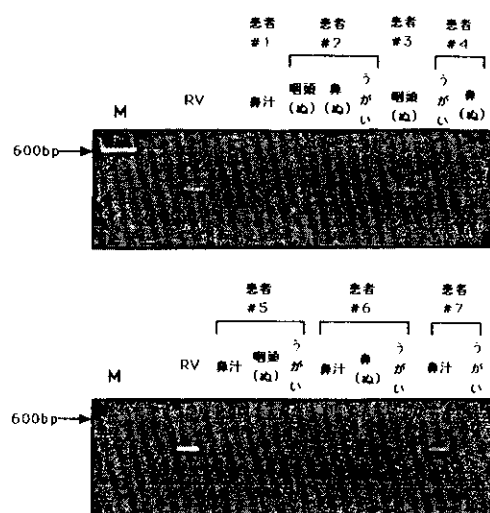


図1. RT-PCR法による患者検体からのライノウイルスRNA同定の一例。咽頭ぬぐい液(患者3)、鼻汁(患者7)などからライノウイルスRNAが検出される。陽性コントロール(RV)はライノウイルス感染した気管上皮細胞から抽出したRNAを用いた。

表1. ライノウイルス検出率

	被験者数	陽性数
RT-PCR 法	24	5*
慢性肺気腫	5	2
気管支喘息	19	3
細胞接種法	71	0**
慢性肺気腫	17	0
気管支喘息	54	0

*	**
うがい液 2例	A型インフルエンザ 17例
鼻汁 2例	C型インフルエンザ 1例
咽頭ぬぐい液 1例	パラインフルエンザ 1例
	アデノウイルス 1例
	単純ヘルペスウイルス 1例
	エンテロウイルス 1例

残り19例中1例で細胞接種によるウイルス検出によってエンテロウイルスが陽性であった。これに対して、1999年12月まで細胞接種によるウイルス検出法で行った慢性肺気腫17例、気管支喘息54例の急性上気道炎ウイルス検査のうち、それぞれ4例（インフルエンザA型2例、アデノウイルス1例、単純ヘルペスウイルス1例）、および18例（インフルエンザA型15例、インフルエンザC型1例、パラインフルエンザ1例、エンテロウイルス1例）が陽性であった。これら71例中、ライノウイルスは1例も細胞接種で検出されなかった（表1）。ライノウイルスRNAが検出された5例は、これまで他のウイルスが検出された場合と同様に呼吸困難感、動脈血酸素濃度低下（図2）、ピークフロー値低下（図2）、血中IL-6（図3）および血中可溶性ICAM-1（図4）の増加を示した。

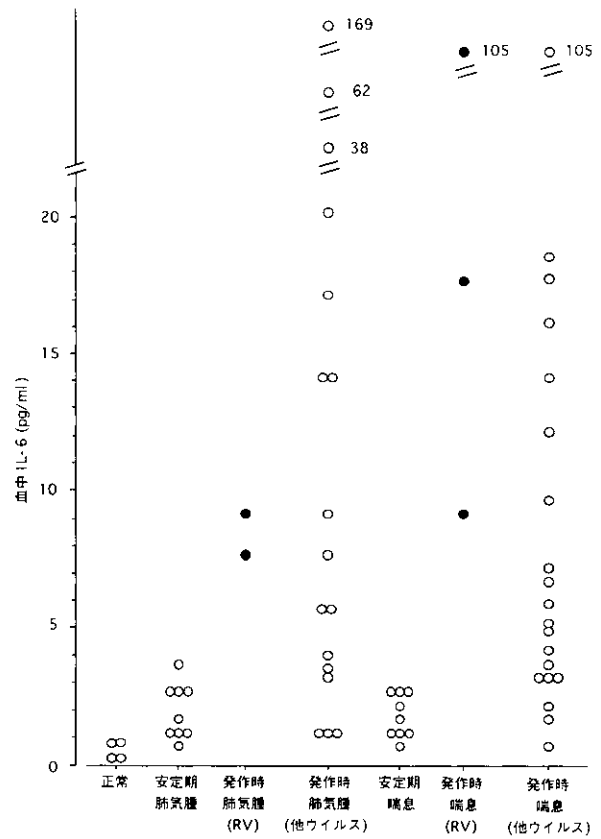


図3. 正常者、安定期肺気腫および気管支喘息、ライノウイルス感染（RV）あるいは他のウイルス感染に伴う急性増悪時の肺気腫および気管支喘息における血中IL-6値。

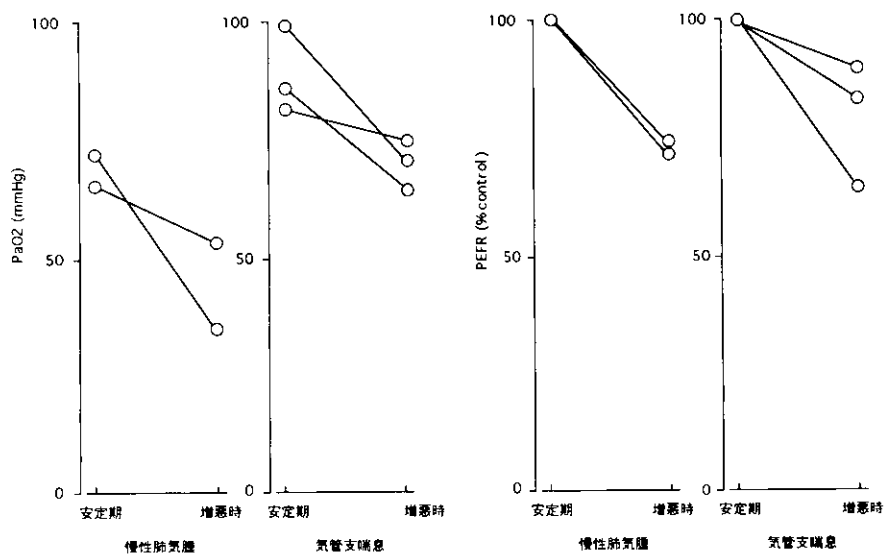


図2. ライノウイルス感染に伴う急性増悪前後における、慢性肺気腫および気管支喘息患者の動脈血酸素濃度およびピークフロー値の変化。

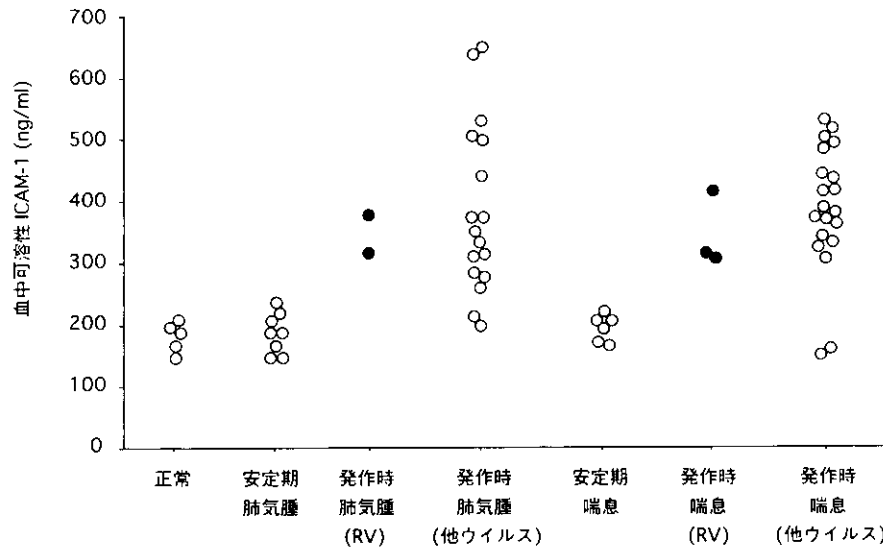


図4. 正常者、安定期肺気腫および気管支喘息、ライノウイルス感染 (RV) あるいは他のウイルス感染に伴う急性増悪時の肺気腫および気管支喘息における血中可溶性ICAM-1値。

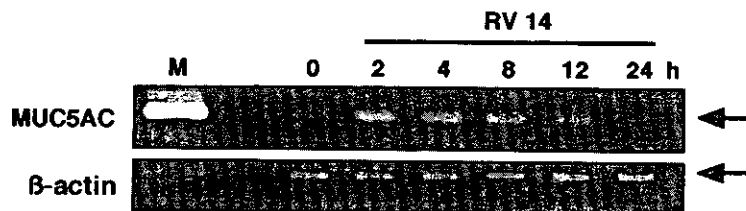


図5. ムチン遺伝子 MUC5ACmRNA 発現に及ぼすライノウイルス感染の効果。ライノウイルス感染後、ヒト気管上皮細胞の MUC5ACmRNA 合成は時間経過とともに増加する。

MUC5AC proteins in culture medium

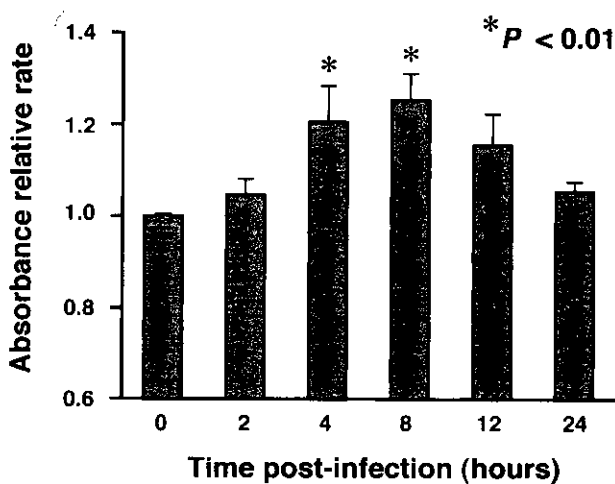


図6. ヒト気管上皮細胞培養液のムチン放出量に及ぼすライノウイルス感染の効果。ライノウイルス感染後、ヒト気管上皮細胞培養液のMUC5ACムチン放出量は時間経過とともに増加する。

② ライノウイルス14型感染後、培養ヒト気管上皮細胞においてムチン遺伝子 MUC5ACmRNA の発現が増加した。MUC5ACmRNA はライノウイルス感染後2時間から増加し始め、12時間後まで持続した (図5)。ヒト気管上皮細胞においてムチン遺伝子 MUC2, MUC5B の mRNA の発現を、ライノウイルス感染前後とも認めなかった。ELISA 法で調べた培養液ムチン放出量は4-8時間後においてコントロールに比べて1.2-1.3倍に有意に増加した (図5)。

考案・結論

本年度の研究で、上気道感染を伴った慢性肺気腫および気管支喘息の急性増悪時にライノウイルスが同定された。RT-PCR法を用いたライノウイルスRNA検索が従来の細胞接種法に比べて検出感度の高いことが明らかになった。これらの結果は気管支喘息患者に対して行った最近の報告に一致している⁶⁾。陽性率が20%前後とまだ低い、陰性の検体は上気道炎症症状の出現から3日以上経

過したものが多く傾向がある。今後、検体採取を早める工夫が必要である。ライノウイルス陽性数がまだ数例しかないが、この症例においても、ライノウイルス以外のウイルスと同様に動脈血酸素濃度低下、ピークフロー値低下などの肺機能低下を認めた。また、IL-6や可溶性ICAM-1などの血中炎症性因子の上昇を認めた。上気道炎症を反映するものと思われる。培養細胞を用いた研究において、気管上皮細胞からのムチン合成および放出亢進を認めた。ライノウイルス感染による気道内喀痰増加には神経性あるいは液性因子を介したムチン分泌、水分分泌が関与すると考えられているが、今回の研究では気管上皮細胞に対するライノウイルスの直接作用によるムチン合成亢進が明らかになった。これまで、RT-PCR法を用いたムチンmRNA測定が報告されており^{1,5)}、今回の研究でもこれを用いた。定量的PCR法を使って、より定量性のあるmRNA測定をする予定である。ELISA法に用いた抗体はMUC5Aに特異的な抗体を用いた。ELISA法で測定したムチン合成がMUC5ACmRNA発現にやや遅れており、この遅れを蛋白合成時間とみなすと、時間経過はほぼ一致していると考えられる。ムチン合成の細胞内機序について今後の研究課題として残っている。

参考文献

1. Johnston SL, Pattemore PK, Saderson G, et al: Community study of role of viral infections of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995; 310: 1225-1228.
2. Johnston SL, Sanderson G, Pattemore PK, et al: Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 111-117.
3. Terajima M, Yamaya M, Sekizawa K, et al: Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium: role of ICAM-1 and IL-1 β . *Am J Physiol* 1997; 273: L749-L759.
4. Koo JS, Yoon JH, Gray T, et al: Restoration of the mucous phenotype by retinoic acid in retinoid-deficient human bronchial cell cultures: changes in mucin gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 43-52.
5. Buisine MP, Devisme L, Copin MC, et al: Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 209-218.
6. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC: Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 1993; 307: 982-986.

早期肺気腫患者における肺胞マクロファージ中の secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)

西村 正治* 竹藪 公洋 別役 智子 谷野美智枝
川上 義和

はじめに

Secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) はセリンプロテアーゼインヒビターの一つで、主として気道上皮から分泌されるが、II型肺胞上皮にも発現していることが知られている。エラスチンとの親和性が高く、最も強力なエラスチン分解能をもつ好中球エラスターゼの活性を阻害することから肺の気腫病変との関係も注目されている^{1,2)}。我々はこれまでの一連の研究で、肺高解像能CTを用いて診断した早期肺気腫患者と同年齢で同等の喫煙歴を持ちながら肺CTで気腫病変のない対照群を比較することによって、早期肺気腫患者における好中球の役割や好中球エラスターゼの役割を明らかにしてきた³⁻⁵⁾。

最近、Jin FYらはSLPIがLPSに対する肺損傷抵抗性マウスの肺胞マクロファージにも発現していることを示し、マウス系によるLPS肺損傷の抵抗性の差異はこの肺胞マクロファージのSLPI発現や産生能によって規定されていることを分子生物学的手法を駆使して見事に証明した⁶⁾。つまり、外因性刺激に対する肺損傷の感受性が肺胞マクロファージのSLPI産生能によって一部決定しているということである。これまで、ヒトの肺胞マクロファージがSLPIを保有しているか、あるいは、自身が産生しているかを確かめた報告はない。また、仮にヒトの肺胞マクロファージもSLPIを産生・分泌するとしてそれが外因である喫煙による慢性肺障害である肺気腫の発症と関連しているか否かを検討した報告はない。

そこで、今回我々はこれまでの研究と同様の手法と対象を用いて、気管支肺胞洗浄液から得られた肺胞マクロファージ培養液中にSLPIが分泌されるか否かを免疫学的蛋白量測定により最初に確認した。その結果、SLPIが無刺激で培養上清中に時間依存性に放出されることが確か

められたので、次にその放出量と現在喫煙の有無、気腫病変の有無との関係を検討した。最後に、肺胞マクロファージ培養上清中のSLPI放出量と気管支肺胞洗浄液中のSLPI量の関連についても検討した。

対象と方法

対象は呼吸器自覚症状のない中高年者22名で、問診、炎症所見や肝機能、 α 1-アンチトリプシンなどの採血、肺高解像能CT、気管支肺胞洗浄、呼吸機能検査を施行した。肺高解像能CTで気腫病変の有無を呼吸器内科医3名で判定した。

気管支肺胞洗浄はRennardらの報告に準じてsequential BAL法を用いた。右中葉支より生理的食塩水を50mlずつ4回に分けて注入し、最初の50mlからの回収液は太い気道から得られた成分を比較的反映する分画として今回の測定には用いず、残り150mlからの回収液を比較的肺野領域の成分を反映すると仮定して以下の解析に用いた。遠心分離の後、細胞成分について細胞数、細胞分画を算出し、細胞接着法により肺胞マクロファージを抽出し、無血清培地で24時間培養を行った(1×10^6 個/ml RPMI-1640)。

肺胞マクロファージ培養液及び気管支肺胞洗浄液上清中のSLPI蛋白量をR&D社のELISAキットを用いて測定した。なお、一部の検体(n=5)についてはあらかじめ蛋白合成阻害剤であるcyclohexamide 0.5mg/ml添加した後同様に培養を行った。

2群間の差の検討にはMann Whitney U testを用い、 $p < 0.05$ で有意と判定した。

結果

対象は肺高解像能CTでみた気腫病変のない群9名(現在非喫煙者2名、現在喫煙者7名)と気腫病変を有する早期肺気腫群13名(現在非喫煙者2名、現在喫煙者11名)であった(表1)。年齢、喫煙指数に有意差はなかった。

北海道大学医学部第一内科

*「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

表1 被験者の特徴

対象数	気腫病変なし		気腫病変あり	
	現在非喫煙者 n=2	現在喫煙者 n=7	現在非喫煙者 n=2	現在喫煙者 n=11
年齢、歳	51 ± 3		56 ± 3	
喫煙指数、箱・年数/日	34 ± 6		40 ± 9	
一秒率、%	81 ± 2		72 ± 4	
肺拡散能、%	102 ± 4		93 ± 3	

表2 気管支肺胞洗浄液の特徴

	気腫病変なし	気腫病変あり
回収率、%	57 ± 7	45 ± 6
総細胞数、10 ³ /ml BALF	59 ± 30	50 ± 21
肺胞マクロファージ、%	90 ± 2	92 ± 2
好中球、%	1.2 ± 0.4	0.5 ± 0.1

(pg/ml medium)

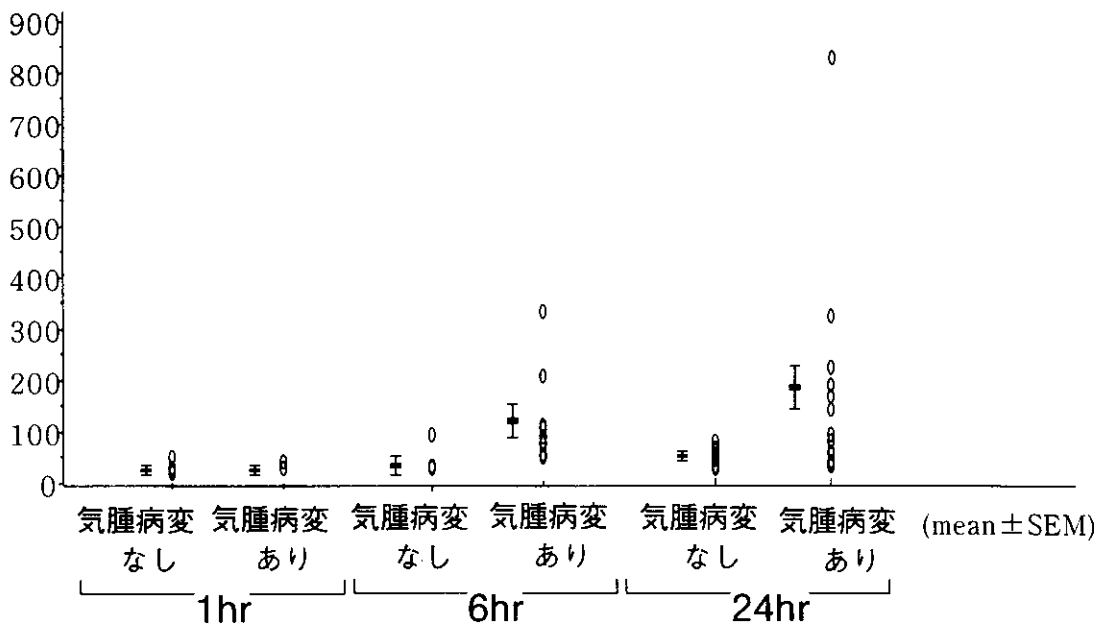


図1 肺胞マクロファージ培養上清中のSLPI濃度

一秒率、肺拡散能は気腫病変あり群で平均値は低下していたが有意差には至らなかった。気管支肺胞洗浄液の特徴を表2に示した。回収率、総細胞数、肺胞マクロファージの比率、好中球の比率に2群間の有意差はなかった。

肺胞マクロファージ培養上清中には培養1h後ですでにSLPIが検出された。その量は6h後、24h後まで経時的に上昇した(図1)。気腫病変なし群とあり群を比較すると、両群の差は経時的に顕著となり、24h培養後には図2に示すように気腫病変あり群で有意にSLPI放出量が多かった(175.1 ± 59.0 vs. 47.0 ± 5.6 SE pg/ml medium, $p < 0.05$)。しかし、現在喫煙の有無で肺胞マクロファージからのSLPI放出量を比較しても図2から明らかなように喫煙の影響は認められなかった。

(pg/ml medium)

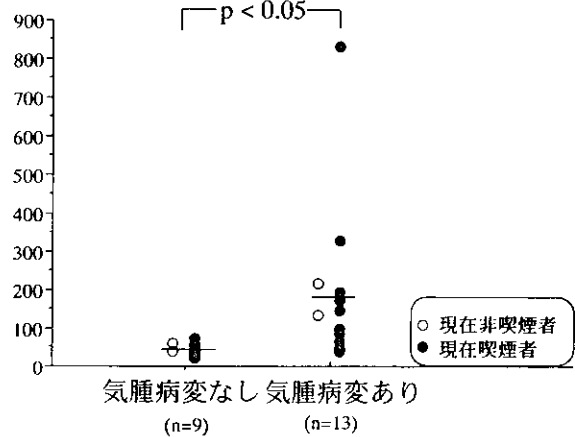


図2 肺胞マクロファージ24h培養上清中のSLPI濃度の比較

図3に示すように、肺胞マクロファージ24h培養上清中に検出されたSLPI蛋白量は同じ被験者の気管支肺胞洗浄液上清中に検出された量ときわめてよい相関が認められた ($r^2 = 0.883$, $p < 0.05$)。5例についてcyclohexamide添加による肺胞マクロファージ培養液中のSLPI蛋白量を測定したが、添加をしない場合と比べてSLPI放出の低下はなかった (cyclohexamide添加なし24hr後; 35.1 ± 8.5 SE pg/ml medium、cyclohexamide添加24hr後; 43.0 ± 9.8 SE pg/ml medium, NS)。

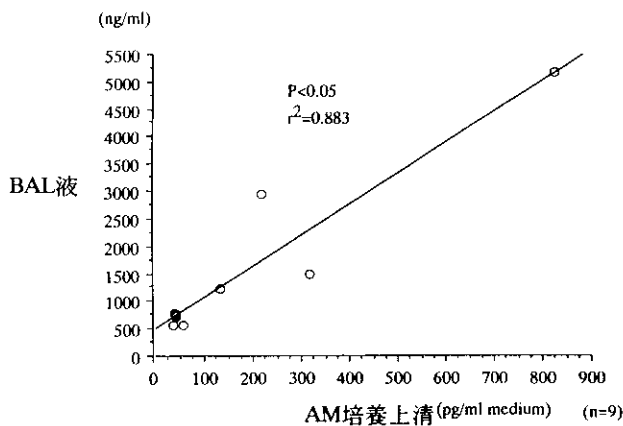


図3 肺胞マクロファージ24h培養上清と気管支肺胞洗浄液中のSLPI濃度の相関

考案・結論

本研究はヒトの肺胞マクロファージ培養液中にもSLPIが存在することを免疫学的蛋白量を測定することで初めて示した。さらに、肺胞マクロファージからのSLPI放出量は、気腫病変あり群ではなし群に比べて有意に多いことが明らかとなったが、現在喫煙の有無では全く影響はなかった。最後に、この肺胞マクロファージからのSLPI放出量は同じ被験者の気管支肺胞洗浄液濃度とも相関することを示した。

培養した肺胞マクロファージからSLPIが放出された機序については、マウスのようにヒトの肺胞マクロファージもSLPIを産生している可能性と気道上皮やII型肺胞上皮から分泌されたSLPIを肺胞マクロファージが取り込んでいる可能性がある。Cyclohexamide添加による培養でもSLPI放出量が低下しなかったことから、少なくとも培養中に肺胞マクロファージがSLPIを合成している可能性は少ないものと考えられる。しかし、ヒトの肺胞マクロファージが本当にSLPIを産生しているか否かは今後mRNA発現の有無をRT-PCR法を用いて確認する必要があるだろう。

肺気腫は好中球や肺胞マクロファージなどの炎症細胞とエラスチンなどの細胞外マトリックスの接着部位におけるプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡により生ずるとされる。SLPIは12kDaという低分子量のアンチプロテアーゼであるため、その接着部位にも容易に侵入し肺胞破壊を抑える可能性が指摘されている³⁾。我々はこれまでの一連の研究で、早期肺気腫患者の気管支肺胞洗浄所見やそこから得られる肺胞マクロファージの特徴として以下の知見を報告してきた。① 気管支肺胞洗浄液中の好中球エラスターゼが多い³⁾、② 肺胞マクロファージにも好中球エラスターゼが多く取り込まれている⁴⁾、③ 好中球活性化のマーカーであるhuman neutrophil lipocalinや好中球由来のMMP-8, MMP-9も気管支肺胞洗浄液中で高い⁵⁾、④ 気管支肺胞洗浄液中のエラスチン分解産物(EDP)は好中球エラスターゼの量や活性と正の相関を示す⁶⁾、などである。しかも、これらの所見は今回の被験者でもそうであったように気管支肺胞洗浄液中の有意な好中球数増加がないにもかかわらず認められた。つまり、好中球数増加が認められないにもかかわらず、好中球活性化の証拠がいくつも認められるのが早期肺気腫患者の特徴である。本研究は、好中球エラスターゼのインヒビターであるSLPIが気管支肺胞洗浄液と肺胞マクロファージ中に多くあることが早期肺気腫患者のもうひとつの特徴であることを示したものである。この結果を肺内で増加した好中球エラスターゼに対する代償機構ととらえるべきか⁷⁾、あるいは、喫煙という外因に対する慢性肺損傷の感受性を決定する一面ととらえるべきかについては今後さらなる検討の余地がある。

参考文献

- 1) Kramps JA, Te Boekhorst AH, Franson JA, Ginsel LA, Dijkman JH. Antileukoprotease is associated with elastin fibers in the extracellular matrix of the human lung. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 471-476
- 2) Llewellyn-Jones CG, Lomas DA, Stockley RA. Potential role of recombinant secretory leucoprotease inhibitor in the prevention of neutrophil mediated matrix degradation. *Thorax* 1994; 49: 567-572.
- 3) Yoshioka A, Betsuyaku T, Nishimura M, Miyamoto K, Kondo T, Kawakami Y. Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 2127-2132.

- 4) Betsuyaku T, Yoshioka A, Nishimura M, Miyamoto K, Kawakami Y. Neutrophil elastase associated with alveolar macrophages from older volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 ; 151 : 436-442.
- 5) Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Per Venge, Shengyuan Xu, Kawakami Y. Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 159 : 1985-1991.
- 6) Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Takeyabu K, Miyamoto K, Kawakami Y. Elastin-derived peptides and neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 ; 154 : 720-724.
- 7) Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Tanino M, Miyamoto M, Kawakami Y. Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Eur Respir J* 1998 ; 12 : 1033-1039.
- 8) Jin FY, Nathan C, Radzioch D, Ding A. Secretory leucocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 1997 ; 88 : 417-426.
- 9) Abbinante-Nissen JM, Simpson LG, Leikauf GD. Neutrophil elastase increases secretory leukocyte protease inhibitor transcript levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1993 ; 265 : L286-L292.

慢性気道炎症における macrophage migration inhibitory factor (MIF) の関与

辻野 一三¹⁾ 西村 正治¹⁾* 牧田比呂仁¹⁾ 谷野 功典¹⁾
宮本 顕二²⁾ 西平 順³⁾ 川上 義和¹⁾

はじめに

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は1966年マクロファージの遊走を阻止するサイトカインとして初めて報告された¹⁾²⁾。しかし近年ではMIFが種々の炎症や免疫反応に関与し、さらにグルコルチコイドの抗炎症作用に拮抗する新しいタイプのサイトカインであることが報告されている³⁾⁴⁾。呼吸器科領域ではエンドトキシン (LPS) 投与ラットや急性呼吸促進症候群 (ARDS) における肺傷害への関与が報告され⁵⁾⁶⁾、さらに我々も抗MIF抗体がLPSによるラット肺への好中球遊走を抑制することを報告した⁷⁾。

一方、最近気管支喘息患者のBAL液中でMIF濃度が上昇していることが報告された⁸⁾。これを背景に我々は気管

支喘息および慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者の誘発喀痰中のMIF濃度が健常者より高値であることを昨年の本学会で発表した。今年度は検討症例数を増やし、また他の気道炎症を反映するパラメータとの関連、さらに免疫染色によるヒトの肺組織でのMIFの局在についても検討した。

対象と方法

対象 (Table 1) :

●気管支喘息: American thoracic society (ATS) のガイドラインに基づいて診断した22症例。年齢45 ± 15 (SD) 歳。男/女: 13/7名。22例中12例は吸入ステロイド剤 (ス剤) を投与され、10例はス剤以外の薬物のみで治療されていた。

Table 1: characteristics of the subjects

	Control	Bronchial asthma		COPD
		steroid naive	steroid treated	
n	10	12	10	22
age	36 ± 4	43 ± 5	47 ± 5*	68 ± 2****
sex (man/woman)	8 / 2	8 / 4	7 / 3	21 / 1
smoker/nonsmoker	4 / 6	6 / 6	4 / 6	22 / 0
% vital capacity (%)	97.6 ± 3.8	93.9 ± 6.7	77.2 ± 4.6*	72.7 ± 4.7***
FEV ₁ (ml)	3290 ± 280	2420 ± 300*	1860 ± 230*	1090 ± 140*****
FEV ₁ /FVC	85.8 ± 1.3	70.1 ± 4.3*	70.9 ± 3.2*	46.0 ± 3.3*****

Data are shown as mean ± SEM

* p < 0.05 vs controls, ** p < 0.05 vs steroid naive, *** p < 0.05 vs steroid treated

1) 北海道大学医学部第一内科

2) 北海道大学医療技術短期大学部

3) 北海道大学中央研究部

* 「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

● COPD: 症状、呼吸機能、胸部X線写真および胸部CTで診断した安定期にある22症例。年齢68 ± 8 (SD) 歳。男/女: 21/1名。余例、ス剤投与は受けていなかった。

● 健常者: 呼吸、循環器系疾患のあきらかな既往歴のない10例。年齢36 ± 13歳。男/女: 10/0名。

方法：

●実験1. 血清MIF濃度の比較：上記対象の血清MIF濃度をELISA法で測定し、4群間（喘息群はス剤非投与群と投与群に分けて検討）で比較した。

●実験2. 誘発喀痰中MIF濃度の比較：上記対象の誘発喀痰中MIF濃度をELISA法で測定し、同様に4群間で比較した。

*喀痰の誘発方法：salbutamol 200 μ gを吸入し、10分後より3%の高張食塩水を5分間吸入。吸入後十分にうがいし、口腔内の水分を可及的に拭いとった後に喀出された痰をポリエチレン製の容器に採取。4°Cで保存し、2時間以内に次の処理を行った。

・喀痰の処理：採取された喀痰の重量を測定し、同量の0.1% dithiothreitol (DTT) を加え37°Cで30分間インキュベート。喀痰が十分に溶解したことを確認してから400g、4°Cで10分間遠沈。上清を-80°Cで保存し、後日MIFおよびeosinophil cationic protein (ECP)、好中球エラスターゼ (NE) 濃度をELISA法で測定した。ペレットは少量のPBSで再浮遊させた後、リジンコーティングしたスライドガラスに塗抹し、冷風で乾燥。メタノール固定した後、Diff Quickで染色した検体を検鏡し200個以上の非扁平上皮細胞をカウントし細胞分画を算出した。全細胞中扁平上皮細胞が50%を越えた場合は唾液混入の影響を考え、検討には加えなかった。

●実験3. MIF濃度と他のパラメータとの関係

ス剤非投与・投与の気管支喘息群、およびCOPD群の喀痰中MIF濃度と以下のパラメータの関係をみた。

・自覚症状：気管支喘息ではATSのガイドラインに基づく4段階の重症度分類別に喀痰中MIF濃度を比較。COPDではFletcherの慢性気管支炎の基準の満たす例と満たさない例とで同じくMIF濃度を比較。

・血清MIF濃度

・呼気中一酸化窒素 (NO) 濃度：呼気抵抗をかけ、かつ呼気流速を約100 ml/minに保ちながら化学発光法で測定した (Sievers 280NOA)。

・誘発喀痰中のパラメータ：細胞分画、上清中ECP濃度、上清中好中球エラスターゼ (NE) 濃度

●実験4. ヒト肺組織のMIF免疫染色

肺組織は3症例の肺癌患者の摘出肺検体を用いた。3症例中1例は肺癌以外に呼吸器科的な基礎疾患のない症例、1例は吸入ス剤投与を受けていた気管支喘息合併例、1例は肺気腫合併症例だった。免疫染色はホルマリン固定およびパラフィン包埋された標本を、脱パラフィン、加水したのちDAKO社製CSA systemを用いて抗ヒトMIF抗体で免疫染色した。

統計は気管支喘息の各重症度間の誘発喀痰中MIF濃度はANOVAおよびpost hoc testで比較。他の群間比較は対応のないt検定で、相関はSpearmanの相関係数を用いて解析した。危険率5%以下を有意とした。

結果

1. 血清MIF濃度：血清MIF濃度は健常者 5.0 ± 1.2 (SE) ng/ml、気管支喘息のス剤非投与群 6.0 ± 1.2 ng/ml、同投与群 9.4 ± 2.7 ng/ml、COPD群 6.1 ± 0.9 ng/mlで気管支喘息のス剤投与群のみが健常者よりも有意に高値だった (Fig 1)。

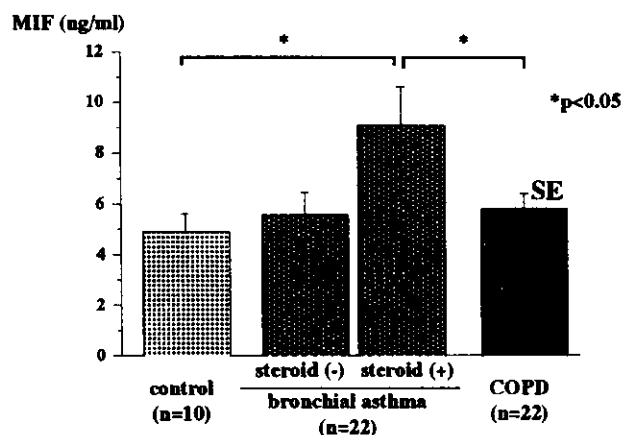


Figure 1 : comparison of MIF levels in serum

2. 誘発喀痰中MIF濃度：気管支喘息群（ス剤非投与群 84.3 ± 12.7 ng/ml、投与群 60.7 ± 14.6 ng/ml）、COPD群 (112.2 ± 12.8 ng/ml) いずれも健常者 (20.9 ± 4.4 ng/ml) より有意に高かった (Fig 2)。

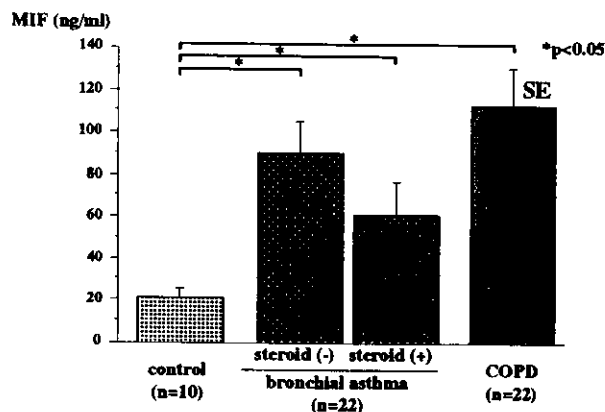


Figure 2 : comparison of MIF levels in induced sputum