

# 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 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<sup>1)</sup>。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し、また、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した。また、これまで、急性増悪時の血中 IL-6 および血中可溶性 ICAM-1 増加など炎症性因子増加を報告したが、気道収縮や気道過分泌に関係する化学伝達物質の動態は不明であった。また、気管支喘息を中心に気道炎症に関係すると言われている好酸球の活性化についての研究もウイルス感染急性増悪時に行われていなかった。そこで、今年度は気管支喘息、慢性肺気腫増悪時の気道ウイルスを同定し、同時に血中ヒスタミン、血中好酸球塩基性蛋白 (ECP)、尿中LTE4を測定して病態との関係を検討した。

## 方法

当科通院中の慢性肺気腫患者20人、気管支喘息120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を用いて細胞接種法によりインフルエンザなどのウイルスを同定するとともに<sup>2)</sup>、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<sup>3)</sup>。急性増悪時の血中および尿中因子の変化を検討するため、血中ヒスタミンおよびECP、尿中LTE4を測定した。

## 結果

対象患者のうち平成11年4月から12年12月の期間で慢性肺気腫患者20例中10例、気管支喘息120例中30例が急性上気道炎症状を呈し、この内、慢性肺気腫2例、気管支喘息7例でライノウイルスRNAが検出された(表1)。また、慢性肺気腫2例、気管支喘息9例で細胞接種によるウイルス検出によってA型インフルエンザウイルスを中心にウイルスが検出された(表1)。急性増悪をきたした気管支喘息30例において尿中LTE4と血中ヒスタミン濃度はコントロールに比べて上昇した(図1)。ステロイド投与による症状改善後、尿中LTE4および血中ヒスタミン濃度はコントロール対象者の値に戻った。また、血中ECP値も気管支喘息急性増悪時に上昇し、症状改善後、低下した(図1)。急性増悪時の尿中LTE4、血中ヒスタミン、血中ECP値はアトピー型喘息患者で、非アトピー型喘息患者に比べて高い値を示した(表2)。慢性肺気腫患者においても、尿中LTE4、血中ヒスタミン、血中ECP値ともに急性増悪時にコントロール対象者に比べて上昇した(図2)。慢性肺気腫患者におけるこれらの因子の上昇の程度は非アトピー型喘息患者と同じ程度であった。

表1 気道ウイルス同定

	気管支喘息 n=30	慢性肺気腫 n=6
ライノウイルス	7	2
A型インフルエンザ	5	2
エンテロウイルス	1	0
ハラインフルエンザウイルス	1	0
アデノウイルス	1	0
単純ヘルペスウイルス	1	0

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

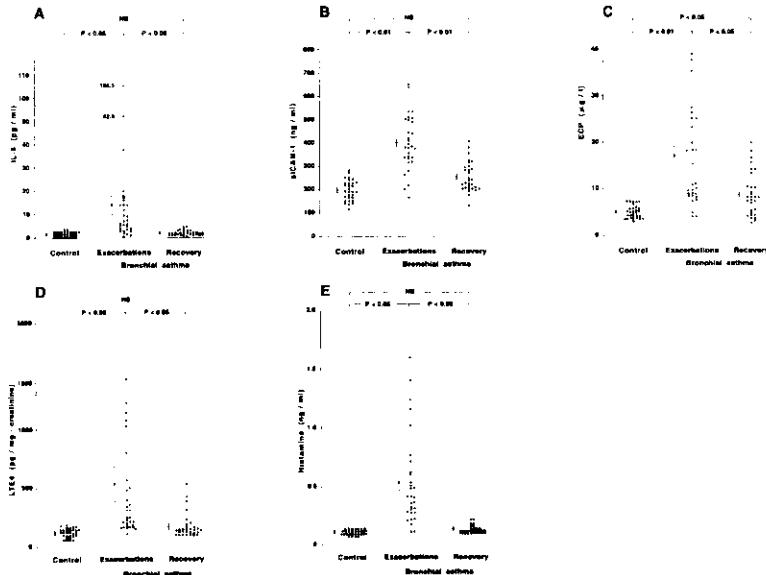


図1 正常者、気道ウイルスに伴う急性増悪時および回復時の気管支喘息における血中IL-6値、可溶性ICAM-1 (sICAM-1) 尿中LTE4値、血中ヒスタミン値および血中ECP値。

気道ウイルス感染気管支喘息および慢性肺気腫急性増悪時の炎症性・気道収縮性因子上昇

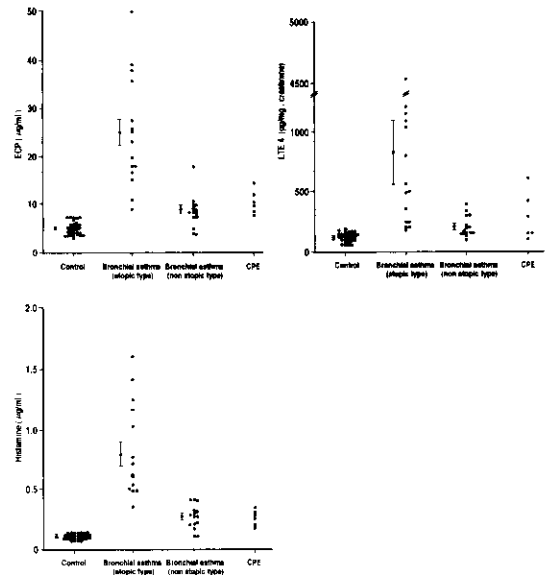


図2 正常者、気道ウイルスに伴う急性増悪時のアトピー型および非アトピー型気管支喘息、慢性肺気腫における尿中LTE4値および血中ヒスタミン値および血中ECP値。

表2 Contents of serum ECP, urinary LTE4 and plasma histamine in bronchial asthma during exacerbations and 4 weeks after treatment with oral glucocorticoids

Bronchial asthma	Age (yr)	Sex (M/F)	Serum ECP ( $\mu\text{g/l}$ )		Urinary LTE4 (pg/mg $\cdot$ creatinine)		Histamine (ng/ml)	
			Exacerbations	Recovery	Exacerbations	Recovery	Exacerbations	Recovery
Atopic type (n=15)	49 $\pm$ 5	8M/7F	25.4 $\pm$ 2.9 **	12.1 $\pm$ 1.0	855 $\pm$ 280 **	229 $\pm$ 36	0.79 $\pm$ 0.10 **	0.13 $\pm$ 0.01
Nonatopic type (n=15)	67 $\pm$ 5	7M/8F	8.5 $\pm$ 0.9 *	5.1 $\pm$ 0.5	215 $\pm$ 22 *	123 $\pm$ 6	0.27 $\pm$ 0.03 *	0.12 $\pm$ 0.01

Values are mean  $\pm$  SE.

ECP: eosinophil cationic protein, LTE4: leukotriene E4

\*  $p < 0.05$  from Recovery. \*\*  $p < 0.05$  from nonatopic type

## 考案・結論

好酸球塩基性蛋白(ECP)は好酸球から放出される顆粒蛋白の一種である。この顆粒蛋白は細胞傷害性があり、気道上皮細胞傷害や気道過敏性をもたらして気管支喘息の増悪に関係すると報告されている。血清ECP値は気管支喘息患者における好酸球活性化の指標として知られている<sup>4)</sup>。今回の研究で気管支喘息で認めた血清ECP値はこれまでに報告された気管支喘息における値と同じレベルであった。気道ウイルス感染は、ライノウイルス実験感染で明らかになったように<sup>9)</sup>、気管支喘息において好酸球性気道炎症を生じていると示唆される。慢性肺気腫においてもウイルス感染が好酸球性蛋白放出を促進していると考えられる。

ロイコトリエンは気道平滑筋収縮や気道分泌作用が知られている。LTE4はロイコトリエンの安定な代謝物であり、生体におけるロイコトリエン合成の指標と考えられている。今回の研究で、気道ウイルス感染による尿中LTE4の増加が明らかになった。特に、アトピー型気管支喘息における尿中LTE4レベルは以前に報告された喘息発作と同程度であった<sup>6)</sup>。従って、気道ウイルス感染は気道あるいは循環血液中にロイコトリエンを合成し、気管支喘息や慢性肺気腫の増悪に関係すると考えられる。

急性増悪時の気管支喘息における血漿ヒスタミン値は以前に報告されたライノウイルス感染後の抗原負荷時と同様の値を示した<sup>7)</sup>。血漿ヒスタミン値は血清ECPや尿中LTE4と同様にアトピー型喘息でより高い値を示した。今回の研究で気道ウイルス感染に伴う急性増悪時に気管

支喘息患者および慢性肺気腫患者において、血清ECP、尿中LTE4および血漿ヒスタミンの上昇を認めた。これらの因子は気道ウイルス感染における気道炎症や急性増悪の病態と関係していると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, et al: Community study of role of viral infections of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995;310:1225-1228.
- 2) Numazaki Y, Oshima T, Ohmi A, et al: A microplate method for isolation of viruses from infants and children with acute respiratory infections. *Microbiol Immunol* 1987; 31: 1085-1095.
- 3) 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.
- 4) Venge P, Bystrom J, Carlson M, et al: Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1172-1186.
- 5) Fraenkel DJ, Bardin PG, Sanderson G, et al: Immunohistochemical analysis of nasal biopsies during rhinovirus experimental colds. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1130-1136.
- 6) Oosaki R, Mizushima Y, Kawasaki A, et al: Urinary excretion of leukotriene E4 and 11-dehydrothromboxane B2 in patients with spontaneous asthma attacks. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114: 373-378.
- 7) Calhoun WJ, Swenson CA, Dick EC, et al: Experimental rhinovirus 16 infection potentiates histamine release after antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1267-1273.

# 慢性肺気腫発症における ヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子多型性の関与

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

## 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<sup>1)</sup>、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<sup>2)</sup>。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<sup>2)</sup>。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、私たちは慢性肺気腫では喫煙中のオキシダントに対する防御能力が弱いのではないかと考え、慢性肺気腫における長いGT反復配列の遺伝子多型性を報告した<sup>3)</sup>。本年度は呼

吸不全調査研究班に登録された若年性肺気腫の患者を対象にGT反復配列を検討した。また、末梢血白血球からlymphoblastoid cell line (LCL細胞)を作成し、オキシダントによる細胞傷害性とGT反復配列との関係を調べた。

## 対象と方法

呼吸不全調査研究班に登録されている、50歳以下で発症した若年性肺気腫のうち、末梢血の提供に応じてもらった患者は31名であった。このうち、肺機能検査やCT写真で肺気腫と確定できた症例20名を解析の対象とした(平均年齢53.8歳、平均Brinkman's index 826)。また、昨年度に報告した年齢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)の喫煙男性を比較の対象とした。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。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、オキシダントによる細胞傷害性とGT反復配列多型性との関係を調べるため、末梢血白血球にEpstein-Barrウイルスを感染させてlymphoblastoid cell line (LCL細胞)を作成した。クラスSSとLLおよびMLに相当するGT反復配列を持つ細胞に過酸化水素を8時間作用させ、TUNEL法で染色してアポトーシスに陥った細胞の割合をFACS analysisで計算した。

## 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

1) 東北大学医学部附属病院老人科

2) 千葉大学医学部肺病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

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1)。若年性肺気腫においても、長いGT反復配列を持つ割合は非慢性肺気腫に比べて明らかに高く認められた( $p < 0.05$ ) (表2)。また、長いGT反復配列を持つ遺伝子型の割合は若年性肺気腫においても通常慢性肺気腫と同様に高い値を示した( $p = 0.05$ ) (表2)。さらに過酸化水素(300, 600, 900  $\mu\text{M}$ , 8時間)によるLCL細胞の傷害性を調べたところ、長いGT反復配列を持つ細胞(●; LL)のviabilityは濃度依存性に低下したのに対して短いGT反復配列を持つ細胞(○; SS)のviabilityは低下し難いことが明らかになった(図2)。

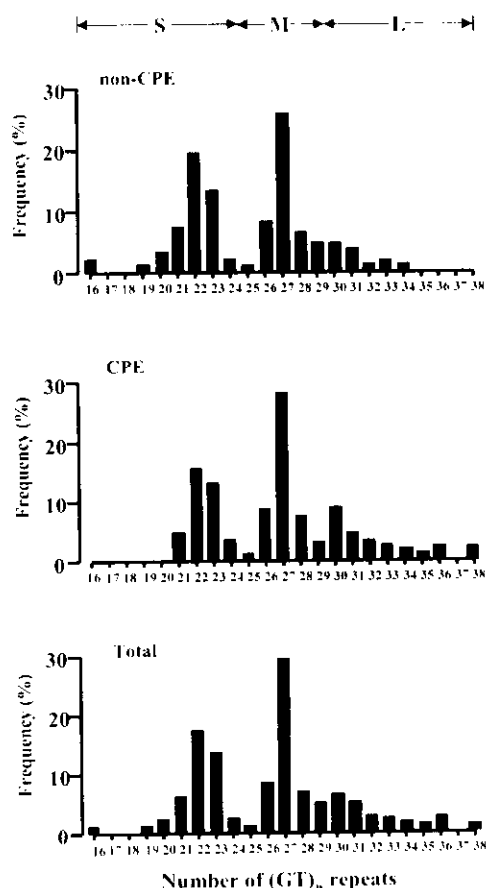


図1 Frequency distribution of the numbers of (GT)<sub>n</sub> repeats in patients without CPE (non-CPE, n=100), patients with CPE (CPE, n=101) and total patients (Total, n=201).

表1

Allelic Frequencies at the Polymorphic Locus

Allele class	No. (%) of patients		Odds ratio (95% CI)
	non-CPE (n=200)	CPE (n=202)	
Class I (30 ≤)	20 (10%)	42 (21%)	2.4 (1.3-4.1) <sup>**</sup>
Class M (25 ≤, <30)	88 (44%)	93 (46%)	1.1 (0.7-1.6)
Class S (<25)	92 (46%)	67 (33%)	0.6 (0.4-0.9) <sup>**</sup>

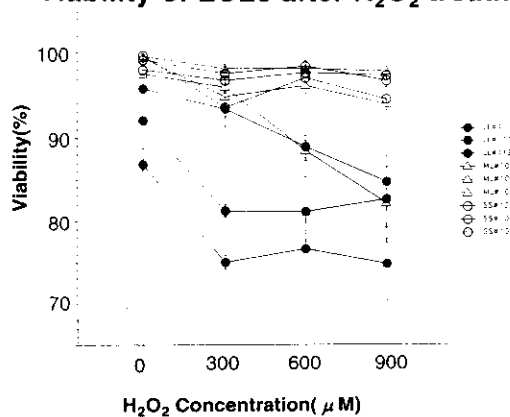
\*  $p < 0.02$   
 \*\*  $P < 0.004$

Genotypic Frequencies at the Polymorphic Locus

Genotype	No. (%) of patients		Odds ratio (95% CI)
	non-CPE (n=100)	CPE (n=101)	
Group I (L/L, L/M, L/S)	20 (20%)	38 (38%)	2.4 (1.3-5.7) <sup>**</sup>
Group II (M/M, M/S, S/S)	80 (80%)	63 (62%)	

\*  $P < 0.008$

Viability of LCLs after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment



Survival of LCLs after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment at 900  $\mu\text{M}$

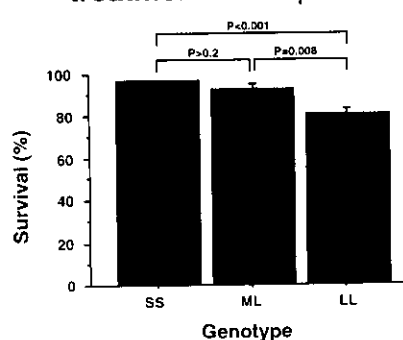


図2 (Top): Concentration-response effects of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on the viability of lymphoblastoid cell line (LCLs) with various (GT) repeats. (Bottom): Survival rate of LCLs with various (GT) repeats 8 h after exposure to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 900  $\mu\text{M}$ ).

表 2

## Allelic Frequencies at the Polymorphic Locus

Allele	non CPE (n=200)	young CPE (n=40)	Odds ratio (95% CI) vs the others
Class L	20 (10%)	9(22.5%)	2.6(1.1-6.1) *
Class M	88 (44%)	11(27.5%)	0.5(0.2-1.0)
Class S	92 (46%)	20(50.0%)	1.2(0.6-2.3)

\* p&lt;0.05

## Genotypic Frequencies at the Polymorphic Locus

Genotype	non CPE (n=100)	young CPE (n=20)	Odds ratio (95% CI) *
Group I	20 (20%)	8 (40%)	2.7(1.0-7.2)
Group II	80 (80%)	12 (60%)	

\* p=0.05

## 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 $\alpha$ 1-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<sup>9)</sup>。これまで、私たち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てきた。結果、高齢で発症する慢性肺気腫において30回以上の長いGT反復配列を有する割合が有意に上昇した。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。今回の研究において、若年発症の肺気腫においても同様の結果が得られ、GT反復配列の長い割合が高いことが明らかになった。全国的に集めた若年性肺気腫の末梢血を用いた今回の研究においても、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支持された。しかし、高齢発症の肺気腫と若年発症の肺気腫の間には差が認められず(結果未報告)、GT反復配列だけでは発症年齢の差の原因は説明が出来ないと考えられる。発症年齢に関係する他の遺伝要因あるいは環境要因の存在が示唆される。さらに、LCL細胞を用いた実験において、GT反復配列数が長いと過酸化水素

による細胞傷害性が強く発現することが明らかになった。私たちは長いGT反復配列を持つ細胞でHO-1遺伝子発現が抑制されることを以前に報告したが<sup>3)</sup>、その結果から考えると、長いGT反復配列がオキシダントによるHO-1発現を抑制し、細胞傷害に対する防御機能を低下させることを示唆している。極端な例としてHO-1欠損症例のLCL細胞の報告がある<sup>9)</sup>。HO-1欠損LCL細胞ではヘミンの作用によってLCL細胞の生存率が明らかに低下する。今回の実験結果はヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子多型性と細胞傷害性の関係を別の角度から明らかにしたと考えられる。

## 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) Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, et al: Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-I gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am.J.Hum. Genet.*2000;66:187-195.
- 4) 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.
- 5) Smith CAD, Harrison DJ: Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997;350:

630-633.

- 6) Yachie A, Niida Y, Wada T, et al: Oxidative stress caused enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 1999;103:129-135.

# 肺気腫発症と喫煙感受性

## —Cathepsin S 遺伝子変異の意義—

山口佳寿博\* 仲村 秀俊 峰松 直人 舘野 博喜  
中島 隆裕

### 【はじめに】

喫煙者の10–20%にしか臨床的に問題となるような肺気腫が発生しない<sup>1)</sup>。さらに、同じ生涯喫煙量を有する人達を比較しても肺機能上の閉塞性換気障害ならびにCT検査による肺野気腫病変の程度には著明なバラツキを認める<sup>2)</sup>。これらの疫学調査の結果は喫煙に起因する肺気腫発症には内的因子が重要な規定因子として作用することを示唆する。気腫病変は肺に存在するproteaseとantiproteaseの不均衡ならびにそれを修飾するoxidantとantioxidantの不均衡によってもたらされる。これらの不均衡の結果、最終的にprotease活性の持続的な過剰が発生し肺胞構築の破壊を招来する。発生機序が最も明確な $\alpha_1$ -antitrypsin欠損に起因する家族性の肺気腫では好中球elastaseに対する抑制物質 $\alpha_1$ -antitrypsinの欠損によって好中球elastaseの活性が高まり肺胞破壊が進行する。1990年代に入り喫煙に起因する気腫病変の原因として好中球よりも肺胞マクロファージ由来のproteaseがより重要であることが指摘された<sup>3)</sup>。肺胞領域では肺胞マクロファージの絶対数が好中球数に較べ圧倒的に多いことが肺胞マクロファージが炎症細胞としてより重要であることの原因である。肺胞マクロファージからは metalloprotease、aspartic protease、cysteine proteaseなど種々のproteaseが分泌されるが、その中でcysteine proteaseに属するcathepsin Sが生理的条件下で好中球elastaseに匹敵する蛋白分解能を有することが判明した。以上のことを背景として、本研究では肺胞マクロファージが喫煙に起因する肺気腫発症に重要な役割を果たすものと仮定した。さらに、肺胞マクロファージから分泌されるcathepsin Sの遺伝子レベルでの変異・多型がcathepsin Sの産生量あるいは酵素活性を修飾し、ある個体が喫煙に暴露された時の気腫病変の程度を規定する内的因子として作用するものと仮定した。即ち、cathepsin

Sの遺伝子変異が気腫病変発症に対する喫煙感受性を規定する重要な内的・個体因子であると考えた。本研究では、この仮説を検証するために非喫煙健常成人ならびに喫煙者のcathepsin S遺伝子変異を解析しそれらと肺機能、CT所見との相関を検討した。

### 【対象と方法】

108名の喫煙者ならびに111名の非喫煙健常成人を対象とした。108名の喫煙者は50歳以上（平均：67±9歳）、生涯喫煙量（プリンクマン指標（BI））が200以上（平均：1220±620）、かつ肺機能を障害する他の肺病変を認めないことを選択の基準とした。巨大嚢胞、気管支拡張症、気管支喘息、肺癆、肺線維症、肺血管病変ならびに他の臓器に重篤な疾患を有する症例は除外したので本研究で選択した喫煙者は喫煙に起因した非常に軽症の肺気腫から重篤な肺気腫を発症した症例である。非喫煙症例として呼吸器症状を有さず胸部X-Pが正常の若年健常者111名を選択した（平均年齢：32±8歳）。若年非喫煙者を対称として選択したのは有意な肺気腫を発症した喫煙者と比較して質的に同様のcathepsin S遺伝子変異が非喫煙若年者においても存在することを証明したかったためである。もしこのことが証明されれば解析したcathepsin Sの遺伝子変異が喫煙習慣、加齢現象とは無関係に存在する個体本来の内的因子と考えることができるためである。

喫煙者全例に対してスパイログラム、呼気気速—気量曲線、肺気量分画、一回呼吸法—酸化炭素肺拡散能力値（DLco）を測定した。肺機能検査終了前後2週間以内に胸部CT検査を施行し肺野気腫性病変（LAA：low attenuation area）の程度をGoddardら<sup>4)</sup>によって提出された視覚法で解析した。左右両肺を上肺野、中肺野、下肺野に分画しCT各画像から気腫病変の程度を4段階に分類し計24点を満点（両肺全体が気腫化）として定量化した。CT画像は電圧120kVp、電流200 mA、scan時間1秒、slice幅5mmで撮影した。window levelを−500HU、window width

慶応義塾大学医学部内科学教室

\*「呼吸不全」調査研究班 分担研究者



を1500HUに設定しlow-spatial frequency algorithmで画像を構築した。

対象者の末梢血から DNA を分離し、Cathepsin S の promoter 領域ならびに翻訳領域 exon における遺伝子多型をSSCP法 (single strand coformation polymorphism) で解析した。6例にあってはCathepsin Sのpromoter領域全長をシーケンスした。最終的に検出された7種類の遺伝子多型のうち6種類は ARMS 法 (amplified refractory mutation system) によって、CA repeatに関する遺伝子多型はSSCP法によって解析した。

## 【結果】

108名の喫煙者におけるCathepsin Sの遺伝子解析より7種類の多型を新たに見出した。多型の大部分は promoter 領域に認められたが翻訳領域exonにおいても存在した。Promoter領域では、①-902位のA/G変位、②-818から-797位におけるCA repeatの変位、③-589位におけるA/G変位、④-316から-313位におけるTCCC欠損を認めた。翻訳領域ではexon 1におけるT/C変位 (⑤) とA/G変位 (⑥) ならびにexon 4におけるC/T変位 (⑦) を認めた。これらの7種類の遺伝子変位のうち多くのものは連鎖非平衡を示し、cathepsin S遺伝子に関する genotype は①⑥ (I 群)、③④⑤⑦ (II 群) ならびに② (III 群) に分類することができた。各 genotype 群において2本のDNA共に変位を示した場合をM (mutant)、どちらか一方のDNAのみが変位を示した場合をH (hetero)、両方のDNAで変位を認めなかった場合をW (wild) と定義した。I、II、III群がM、H、Wのどの型を呈するかによって解析の対象とした喫煙者を互いに重なるの無いAからEの5群に分類することができた。A群はH/H/W、B群はM/M/W、C群はW/W/W、D群はM/H/H、E群はH/W/Hのgenotypeを有した。他の組み合わせを呈した症例も少数存在したが喫煙者の95%がAからE群のどれかに所属した。C群はI、II、III群ともにW型でありcathepsin S遺伝子に全く変異を認めない喫煙者の集合と考えることができる。一方、A群、E群はcathepsin S遺伝子変異の程度が軽微な喫煙者の集合を示す。また、B群、D群はcathepsin Sの遺伝子変異が強い喫煙者集合と考えることができる。喫煙者全例におけるC群の頻度は17%、B群は19%、D群は15%、A群は30%、E群は14%であった。

喫煙者をcathepsin SのgenotypeをもとにA群からE群に分類したが、これら5群間において年齢、生涯喫煙歴に有意差を認めなかった。同様に、一秒率 (FEV<sub>1</sub>%)、 $\dot{V}_{50}$ においても有意な差を検出できなかった。しかしなが

ら、D<sub>L</sub>/V<sub>A</sub>はC群において最も低値を示す傾向を認め、D群のそれはC群に較べて有意に高値であった。B群のD<sub>L</sub>/V<sub>A</sub>値もC群のそれに較べて大きい傾向を呈した。CT画像によって判定した気腫病変、LAAの程度はC群で最も著明で、B群、D群で有意に低値であった (図1)。

111名の非喫煙若年者におけるcathepsin S遺伝子変異の内容ならびに頻度は喫煙者のそれらと較べて有意差を認めなかった。

## 【考案・結論】

本研究の結果、肺泡マクロファージによって産生・分泌される蛋白分解酵素 cathepsin S の遺伝子変位が転写活性を司る promoter 領域を中心に高頻度に認められることが明らかとなった。驚くべきことに、喫煙者、非喫煙者の別なく解析対象の80%以上に cathepsin S に関して何らかの遺伝子変異が存在することが判明した。喫煙者において cathepsin S の遺伝子変異と肺機能ならびにCT画像上のLAAの程度との相関を解析した所、promoter領域を中心とした遺伝子変異が全く存在しないC群でD<sub>L</sub>/V<sub>A</sub>の低下とLAAの有意な増加を認めた (図1)。一方、cathepsin Sのpromoter領域を中心に遺伝子変異が強い喫煙者B群、D群においてはC群とは逆にD<sub>L</sub>/V<sub>A</sub>が比較的維持されLAAも有意に低値を示した。これらの所見はcathepsin Sのpromoter領域の変異が肺野気腫病変の発生に関して喫煙感受性を規定する重要な内的因子として作用すること、cathepsin Sのpromoter領域の変異が強いほど喫煙に対する感受性が低下することを示唆する。以上より、C群 (cathepsin Sの遺伝子変異が無い) が喫煙感受性群、B群、D群 (cathepsin Sの遺伝子変異が強い) が喫煙非感受性群と定義することが可能と考えられた。本研究で喫煙感受性が高いC群に属する喫煙者の割合は17%であり、この値は従来の疫学調査によって明らかにされた喫煙感受性を示す喫煙者の割合、10-20%によく一致する<sup>1)</sup>。一方、B群あるいはD群に属する喫煙非感受性の割合は34%であった。

Cathepsin Sのpromoter領域に遺伝子変異が存在すると転写活性が抑制されcathepsin Sの蛋白合成が十分に行われないことが予想される。その結果として、同じ生涯喫煙量 (環境因子) に暴露されたとしても cathepsin S の promoter 領域に変異が強い人では肺野の気腫化が低く抑えられたものと考察した。

非喫煙健常若年者の cathepsin S の遺伝子変異は内容、頻度とも喫煙者の解析結果と統計学的に一致した。この結果は非喫煙健常若年者にあっても cathepsin S の遺伝子変異が存在しない、あるいは少ない人が将来喫煙を行う

と気腫病変を発生する可能性があることを示唆する。以上より、cathepsin S の遺伝子変異解析は喫煙習慣の有無とは無関係に喫煙感受性を検出する臨床的診断法になり得るものと考えられた。この点は重要であり、従来の肺機能、CT検査が微細であっても気腫病変が形成されていない限りそれを検出することができなかったのに対して cathepsin S の遺伝子変異解析は気腫化が発生する前にその人が長期の喫煙を行った場合に気腫病変が発症するか否かを予測する方法であり、気腫化の“ゼロ”からの診断法と考えることができる。

本研究の解析から以下の結論を得た。1) 肺胞マクロファージで産生・分泌される cathepsin S の遺伝子変異、特に promoter 領域の変異が喫煙感受性を規定する重要な内的因子の一つとして作用する可能性が示唆された。2) cathepsin S の遺伝子変異を解析することによって気腫病変が発生する前にある人が喫煙によって気腫病変が発症するかどうかを検索できる可能性が示唆された。

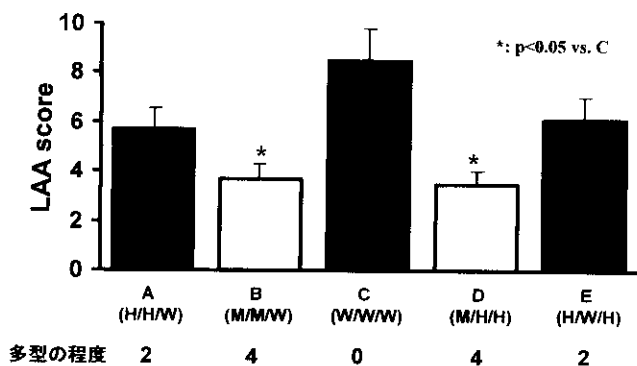


図1 Cathepsin S遺伝子変異とLAA

### 【参考文献】

- 1) Fletcher C, Peto R: The natural history of chronic airway obstruction. Br Med J 25:1645, 1977.
- 2) Soejima K, Yamaguchi K, Kohda E, Matsubara H, Oguma T, Inoue T, Nishio K, Takeshita K, Ito Y, Okubo Y, Tateno H, Shiomi T: Longitudinal follow-up study of smoking-induced lung-density changes by high-resolution computed tomography. Am J Respir Crit Care Med 161: 1264, 2000.
- 3) Shapiro SD : The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 160:S29, 1999.
- 4) Goddard PR, Nicholson EM, Laszlo G, Watt I: Computed tomography in pulmonary emphysema. Clin Radiol 33: 379, 1982.

### 【2000年度の呼吸不全関連研究業績】

Soejima, K., Yamaguchi, K., Kohda, E., Matsubara, H., Oguma, T., Inoue, T., Nishio, K., Takeshita, K., Ito, Y., Okubo, Y., Tateno, H. and Shiomi, T.: Longitudinal follow-up study of smoking-induced lung-density changes by high-resolution computed tomography. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161 (4): 1264-1273, 2000.

# 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 横堀 直子 鯉沼みゆき 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は肺気腫患者の末梢気道や肺胞実質領域にリンパ球やマクロファージなどの慢性的な炎症細胞の浸潤が観察されているが<sup>1)2)</sup>、気腫病変の形成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す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<sup>3)4)</sup>、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ている<sup>5)6)</sup>。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(肺気腫群13例:男性10例、女性3例、全例喫煙歴あり)。対象としては末梢性肺癌の切除時に採取された健常部分の肺組織を用いた(喫煙対象群8例:男性7例、女性1例:非喫煙対象群11例、男性2例、女性9例)。採取された肺組織断片は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 $\mu$ mの薄切切片を作成した。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、アポトーシス細胞の断片化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。免疫組織染

色には、一次抗体として抗一本鎖DNA抗体(ダコ社)、抗活性化カスパーゼ-3抗体(New England Biolabs社)、抗Bax抗体(カルピオケム社)、抗PCNA抗体(サンタクルズ社)、抗トポイソメラーゼII抗体(ダコ社)を用いた。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。TUNELと免疫組織染色の二重染色には、TUNEL法を行なった後、一次抗体として抗上皮膜抗原(EMA)抗体(ダコ社)、抗サーファクタント・プロテインA(SP-A)抗体(ダコ社)、抗血管内皮(CD31)抗体(ダコ社)を用いて免疫染色を行なった。抗Bax抗体、抗CD31抗体、抗トポイソメラーゼII抗体の染色前には、抗原賦活化のために標本にマイクロウェーブ処理を施した。抗PCNA抗体の染色前には標本を2N塩酸で処理した。陽性細胞数の定量化のためには、顕微鏡観察下(x200)にて一標本から無作為に20視野を選択して視野中の総肺胞壁細胞と陽性肺胞壁細胞を数え、陽性細胞率を算出した。

## 結果

肺気腫群の肺組織では、肺胞壁の一部にTUNEL法や抗一本鎖DNA抗体を用いた免疫染色法で陽性に染まるアポトーシス細胞が観察された。TUNEL法で陽性に染色された細胞は、抗EMA抗体や抗SP-A抗体を用いた免疫染色法により陽性に染色されたことから肺胞上皮細胞と考えられた。また肺胞壁細胞の一部は抗活性化カスパーゼ-3抗体で陽性に染色されたことから、アポトーシスにはカスパーゼの活性化を介する機序が考えられた。各群の肺組織について定量化して検討すると肺気腫群では非喫煙対照群と比べて肺胞壁細胞のTUNEL陽性率が有意に高値であった(図1A)。またアポトーシスを促進するBax蛋白の肺胞壁細胞における発現率を検討すると肺気腫群では対照非喫煙群に比べて有意に高値であった(図1B)。またアポトーシスと肺機能値との関係を検討すると、肺胞壁におけるTUNEL陽性率とBax蛋白発現率はともにFEV<sub>1.0</sub>%と負の相関関係を示した(p<0.05)(図2A、B)。

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

一方、細胞増殖のマーカーであるPCNA抗原やトポイソメラーゼII抗原も非喫煙対照群に比べて肺気腫群の肺胞壁において有意に増加していた。PCNA陽性細胞は抗SP-A抗体で陽性に染色されたことからII型肺胞上皮細胞と考えられた。

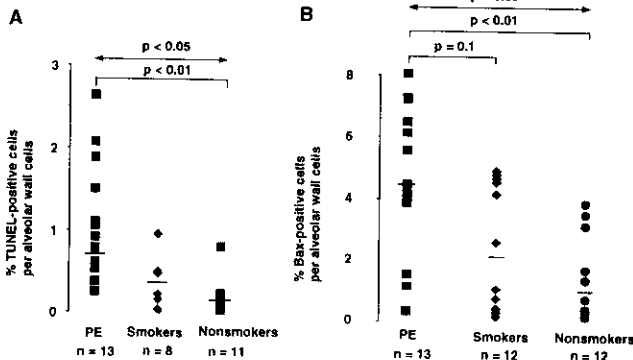


図1 肺気腫患者 (PE)、喫煙対照社 (S)、非喫煙対象者 (NS) における肺胞壁のアポトーシス細胞数 (A) と Bax陽性細胞数 (B) の割合

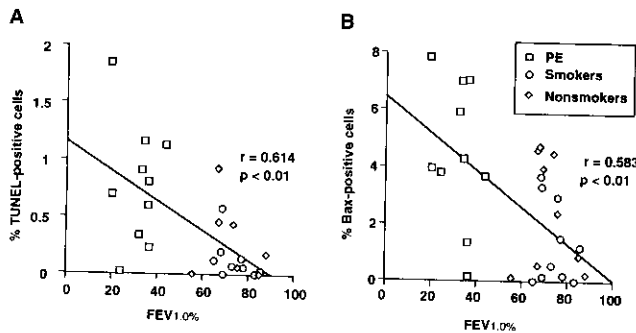


図2 FEV<sub>1.0</sub>%と肺胞壁におけるアポトーシス細胞数 (A)、Bax陽性細胞数 (B) との相関関係

## 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と末梢性肺癌の切除により得られた肺組織を用いて肺胞壁細胞のアポトーシスによる細胞死について検討した。その結果、気腫患者の肺組織では肺胞上皮細胞のアポトーシスが有意に増加していることが知られた。肺気腫患者におけるアポトーシス細胞の増加は最近の研究結果と合致している<sup>9)</sup>。私どもの報告では、さらに1) 肺気腫患者におけるアポトーシス細胞の主体は肺胞上皮細胞であること、2) カスパーゼ-3の活性化を伴うこと、3) アポトーシスを促進するBax蛋白の増加を伴うこと、4) 肺胞壁細胞のアポトーシスの頻度は

FEV<sub>1.0</sub>%と逆相関していることが明らかにされた。

肺気腫患者における肺胞上皮細胞のアポトーシスの機序は明らかではないが、*in vitro*の研究では1) エラスターゼなどによる細胞外基質の分解により上皮細胞の剥離とアポトーシスが生じること<sup>7)</sup>、2) オキシダントにはアポトーシス誘導作用があること<sup>8)</sup>、3) 気腫肺で増加が指摘されているCD8陽性Tリンパ球にはアポトーシス誘導作用があること<sup>9)</sup>、4) 気腫肺では肺胞上皮細胞が機械的に過伸展されていると考えられるが、このような細胞の過伸展はアポトーシスをもたらすこと<sup>10)</sup>が知られている。肺気腫患者の肺組織においては、このような機序を介して肺胞上皮細胞にアポトーシスが生じている可能性が考えられる。

私どもはPCNA抗原やトポイソメラーゼII抗原に対する免疫組織染色を行ない、肺胞壁の細胞増殖についても検討した。その結果、肺気腫患者の肺組織ではII型肺胞上皮細胞の増殖が観察されたことから、気腫化肺組織ではアポトーシスによる肺細胞の消失と増殖による肺細胞の補填が同時に進行していることが知られた。推論ではあるが、肺気腫患者の肺組織ではアポトーシスと増殖の間の不均衡が気腫化肺にみられる肺胞壁の破壊・消失の機序に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) Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, et al: Upregulation of gelatinase A, and B, collagenase 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000,117: 684-694
- 6) 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.
- 7) Aoshiba K, Rennard SI, Spurzem JR: Cell-matrix and cell-cell interactions modulate apoptosis of bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 272:L28-L37,1997.
- 8) Nakajima Y, Aoshiba K, Yasui S, et al : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces apoptosis of bovine bronchial epithelial cells in vitro. *Life Sciences* 64:2489-2496, 1999.
- 9) Kemney DM, VyasB, Vukmanovic-Stejic M, et al: CD8+ T cell subsets and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: s33-s37.6 Edwards
- 10) YS, Sutherland LM, Power JH, et al : Cyclic stretch induces both apoptosis and secretion in rat alveolar type II cells. *FEBS Lters* 1999, 448:127-130.

# COPD患者における重症度とlean body mass (LBM) の 分布および運動耐容能との関連

吉川 雅則 米田 尚弘\* 竹中 英昭 福岡 篤彦  
岡本 行功 岡村 英生 塚口 勝彦 成田 亘啓

## 【はじめに】

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) では、栄養障害が臨床病態や予後と関連しており、栄養状態の評価は臨床的に重要である。栄養評価法として体成分分析 (body composition analysis) が重視されており、近年 bioelectrical impedance analysis (BIA)<sup>1) 2)</sup> や dual energy X-ray absorptiometry (DXA)<sup>3) 4)</sup> などを用いて簡便で非侵襲的にしかも正確な全身の体成分の評価が可能となった。特に、骨格筋量の指標である lean body mass (LBM) は呼吸筋力<sup>2) 3)</sup> や運動耐容能<sup>4) 5)</sup> との関連が報告されており、LBM の減少が COPD 患者の機能障害の一要因となっている。従って、呼吸リハビリテーションの構築において、全身各部位での筋肉量即ち筋萎縮の状況を把握することは有用である。

近年、下肢運動筋の筋力<sup>6) 7)</sup> や oxidative capacity<sup>8) 9)</sup> が運動能の規定因子として報告され、下肢筋の機能的、質的变化が重視されている。一方、下肢の筋力トレーニングでは運動能の改善が得られないとする報告<sup>10) 11)</sup> もあり、下肢運動筋と運動能との関連は必ずしも明確ではない。今回我々は、DXA を用いて LBM の分布状態を、上肢、下肢、体幹の各部位において個別に評価し、さらに下肢の LBM が最大運動能の規定因子となるか否かを閉塞性障害の重症度別に検討した。

## 【対象と方法】

対象は外来通院中の男性 COPD 患者 38 例で、平均年齢  $68.6 \pm 5.5$  歳、 $FEV_1 / FVC$  は平均  $42.4 \pm 11.9\%$ 、 $FEV_1\%$  predicted は平均  $47.2 \pm 24.7\%$  であった。ATS の基準<sup>12)</sup> に従い、 $FEV_1\%$  predicted が 35% 以上の非重症群 (A 群) 21 例と 35% 未満の重症群 (B 群) 17 例の 2 群に分けて検討した。

奈良県立医科大学第二内科

\*「呼吸不全」調査研究班 分担研究班

## 1. 呼吸機能検査

FUDAC 70 (フクダ電子社製) を用いて標準的方法で行なった。肺拡散能は 1 回呼吸法、肺気量はヘリウム希釈法で測定した。

## 2. 体成分分析

体成分分析は Runar DPX (ルナー社製) を用いて DXA で行なった。骨塩量 (bone mineral content ; BMC)、脂肪量 (fat mass ; FAT)、LBM の 3 成分が測定可能であるが、筋肉量の指標となる LBM について検討した。全身の LBM である Total LBM に加え、上肢、下肢、体幹の 3 部位の LBM を個別に評価し、各々の標準体重 (ideal body weight ; IBW) に対する比率、Total LBM / IBW、LBM arms / IBW、LBM legs / IBW、LBM trunk / IBW を算出した。また、LBM の分布状態を評価するために、各部位 LBM の Total LBM に対する比率である、LBM arms / Total LBM、LBM legs / Total LBM、LBM trunk / Total LBM を評価し、さらに四肢 LBM の Total LBM に対する比率  $LBM\ arms + legs / Total\ LBM$  を求めた。

## 3. 運動負荷試験

呼気ガス分析下に自転車エルゴメーターで毎分 10W のランプ負荷による運動負荷試験を行なった。運動負荷は symptom limit まで行い、最大換気量 (maximal exercise ventilation ;  $\dot{V}E_{max}$ )、最大酸素摂取量 (maximal oxygen uptake ;  $\dot{V}O_{2max}$ )、最大負荷量 (maximal work rate ; WRmax)、最大心拍数 (maximal heart rate ; HRmax) を測定した。呼気ガス分析は Vmax229 (SensorMedics 社製) を用いて breath by breath 法で測定し、運動中はパルスオキシメーターによる経皮的酸素飽和度 ( $SpO_2$ ) をモニターリングした。

## 4. 統計学的解析

2 群間の比較は unpaired t test で行い、 $\dot{V}O_{2max}$  と各肺機能指標および LBM との関連は Pearson の相関係数で評価し

た。また、各群別に Stepwise 法による多変量解析を用いて  $\dot{V}O_2\text{max}$  の規定因子を求め、回帰式を作成した。いずれも  $p < 0.05$  を有意とした。

## 【結果】

### 1. 患者背景および肺機能の比較 (Table 1)

両群間で年齢、身長に有意差はなかったが、%IBW および BMI は B 群で有意に低く、より高度な栄養障害を認めた。B 群では閉塞性換気障害、肺過膨張は A 群より重症であったが、%DLco、PaO<sub>2</sub> は有意差を認めなかった。

### 2. Total LBM および部位別の LBM の比較 (Figure 1)

Total LBM / IBW は A 群  $73.6 \pm 5.1\%$ 、B 群  $63.2 \pm 5.7\%$  と

B 群で有意に低下していた ( $p < 0.001$ )。LBM arms / IBW は A 群  $7.0 \pm 1.5\%$  に対し B 群  $5.7 \pm 1.1\%$ 、LBM legs / IBW は A 群  $25.6 \pm 2.7\%$  に対し B 群  $20.9 \pm 2.9\%$ 、LBM trunk / IBW は A 群  $34.5 \pm 2.3\%$  に対し B 群  $30.0 \pm 2.6\%$  とそれぞれ B 群で有意に低下していた ( $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$ )。

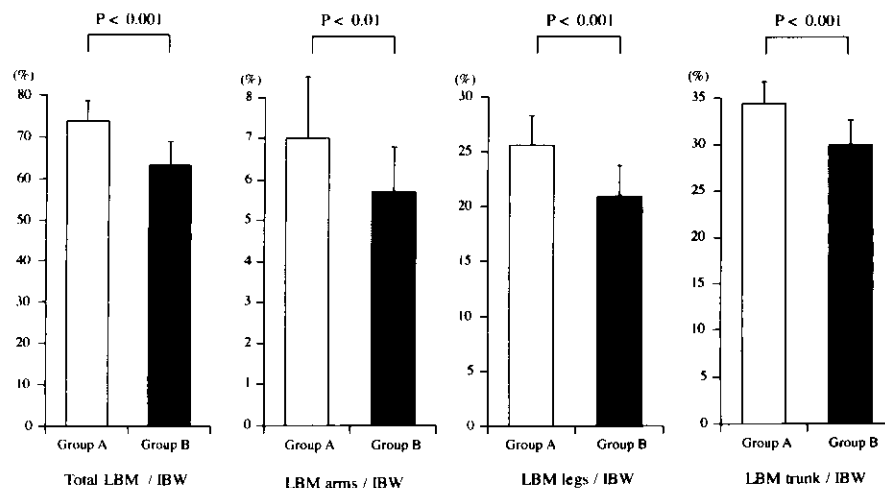
### 3. LBM の分布状態の比較 (Figure 2)

LBM arms / Total LBM は、A 群  $9.5 \pm 1.8\%$ 、B 群  $8.9 \pm 1.2\%$ 、LBM trunk / Total LBM は A 群  $47.0 \pm 2.1\%$ 、B 群  $47.5 \pm 1.6\%$  といずれも有意差を認めなかった。一方、LBM legs / Total LBM は A 群  $34.7 \pm 2.1\%$ 、B 群  $33.0 \pm 2.2\%$  と B 群で有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。また、LBM

**Table 1** Anthropometric and Pulmonary Function Data of Patients with COPD

	Classification on the basis of FEV <sub>1</sub>	
	Group A FEV <sub>1</sub> $\geq 35\%$ predicted	Group B FEV <sub>1</sub> $< 35\%$ predicted
Age, yr	68.2 $\pm$ 5.3	69.1 $\pm$ 5.9
Height, cm	163.4 $\pm$ 8.3	161.3 $\pm$ 6.9
Weight, kg	51.9 $\pm$ 5.0	44.7 $\pm$ 7.5 †
%IBW	88.0 $\pm$ 7.4	76.9 $\pm$ 9.5 ‡
BMI, kg/m <sup>2</sup>	19.4 $\pm$ 1.6	17.1 $\pm$ 2.1 ‡
FEV <sub>1</sub> , %predicted	63.6 $\pm$ 22.5	27.6 $\pm$ 4.9 ‡
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	50.2 $\pm$ 10.0	33.0 $\pm$ 5.5 ‡
VC, %predicted	93.3 $\pm$ 20.8	70.7 $\pm$ 19.6 †
DLco, %predicted	51.6 $\pm$ 22.1	40.1 $\pm$ 23.2
RV/TLC, %	53.9 $\pm$ 9.4	64.2 $\pm$ 9.4 †
MVV, %predicted	69.7 $\pm$ 29.2	30.7 $\pm$ 6.7 ‡
PaO <sub>2</sub> , mmHg	74.5 $\pm$ 7.8	69.9 $\pm$ 8.9
PaCO <sub>2</sub> , mmHg	42.5 $\pm$ 4.2	46.5 $\pm$ 5.1 *

Values are mean  $\pm$  SD. %IBW=percentage of ideal body weight; BMI=body mass index  
\*  $p < 0.05$ . †  $p < 0.01$ . ‡  $p < 0.001$  for the difference between group A and group B.



**Figure 1** Lean body mass (LBM) in arms, legs and trunk

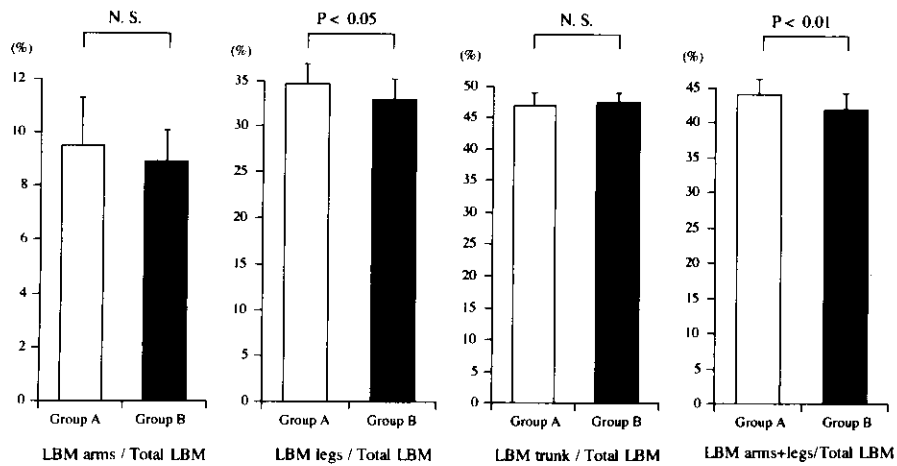


Figure 2 Distribution of lean body mass (LBM)

Table 2 Physiologic Variables During Maximal Exercise on Cycle Ergometry

	Classification on the basis of FEV <sub>1</sub>	
	Group A FEV <sub>1</sub> ≥ 35% predicted	Group B FEV <sub>1</sub> < 35% predicted
$\dot{V}E_{max}$ , L/min	38.3 ± 9.5	23.9 ± 7.8 ‡
WR <sub>max</sub> , W	64.7 ± 24.0	35.3 ± 16.6 ‡
$\dot{V}O_{2max}$ , mL/min	753.4 ± 271.3	414.5 ± 115.9 ‡
$\dot{V}O_{2max}$ , %predicted	63.9 ± 18.5	42.5 ± 10.8 ‡
$\dot{V}E_{max}/MVV$ , %	77.3 ± 24.0	104.1 ± 17.0 †
HR <sub>max</sub> , %predicted	82.6 ± 9.8	83.9 ± 10.1
$\Delta SpO_2$ , %	4.9 ± 5.9	6.9 ± 4.8

Values are mean ± SD.  $\dot{V}E_{max}$ =maximal exercise ventilation; WR<sub>max</sub>=maximal work rate;  $\dot{V}O_{2max}$ =maximal oxygen uptake; HR<sub>max</sub>=maximal heart rate;  $\Delta SpO_2$ =the difference in SpO<sub>2</sub> between at rest and at maximal exercise. †: p<0.01, ‡: p<0.001 for the difference between group A and group B

Table 3 Relationship between  $\dot{V}O_{2max}$  and Pulmonary Function and LBM in legs

	Group A FEV <sub>1</sub> ≥ 35% predicted	Group B FEV <sub>1</sub> < 35% predicted
FEV <sub>1</sub> , L	0.701 †	0.514 *
DL <sub>co</sub> , mL/min/mmHg	0.464 *	0.063
RV/TLC, %	-0.506 *	-0.540 *
MVV, L/min	0.754 ‡	0.666 †
LBM <sub>legs</sub> , kg	0.634 †	0.406
LBM <sub>legs</sub> /IBW, %	0.482 *	0.394

Values are Pearson's correlation coefficients. LBM=lean body mass; IBW=ideal body weight. \*: p<0.05, †: p<0.01, ‡: p<0.001

arms+legs/Total LBMではB群での低下がより明らかに認められた (p<0.01)。

#### 4. 運動能の比較 (Table 2)

$\dot{V}E_{max}$ 、WR<sub>max</sub>、 $\dot{V}O_{2max}$ のいずれもB群で有意に低下していた。一方、HR<sub>max</sub> %predictedと運動中のSpO<sub>2</sub>低下は両群間で有意差を認めず、dyspnea indexである $\dot{V}E_{max}/MVV$ はB群で有意に高値を示した。



## 5. $\dot{V}O_2\max$ と肺機能およびLBM legsとの関連

(Table 3)

$\dot{V}O_2\max$ と肺機能との関連では、両群ともFEV<sub>1</sub>、RV/TLC、MVVとは有意に相関していたが、%DLcoとの相関はA群でのみ認められた。また、LBM legs、LBM legs/IBWともにA群では有意な相関を認めたが、B群では関連を認めなかった。

## 6. 多変量解析

Stepwise法による多変量解析を用いて $\dot{V}O_2\max$ の回帰式を求めた。Total groupおよびA群ではMVVとLBM legs/IBWが有意な規定因子として選択された。回帰式はTotal group:  $\dot{V}O_2\max = 7.562 \times MVV + 27.521 \times LBM \text{ legs} / IBW - 337.34$  ( $R^2 = 0.824$ )、A群:  $\dot{V}O_2\max = 7.155 \times MVV + 41.329 \times LBM \text{ legs} / IBW - 661.74$  ( $R^2 = 0.770$ )であった。B群ではMVVのみが有意な規定因子であり、回帰式は $\dot{V}O_2\max = 11.609 \times MVV + 142.601$  ( $R^2 = 0.444$ )であった。

### 【考案】

今回の検討では、LBMをDXA法で測定し、上肢、下肢、体幹の3部位について個別に評価した。以前より、COPD患者におけるLBMの減少が報告されていたが、部位別の評価はされていなかった。FEV<sub>1</sub>予測値比が35%未満の重症例では、35%以上の非重症例と比較し、3部位のLBMはすべて有意に低下していることが明らかになった。

DXA法は非侵襲的な体成分分析法としては、現在最も信頼性が高い評価法のひとつである<sup>13)</sup>。BIA法も簡便で、しかもベッドサイドでも測定可能であり、COPD患者を対象とした検討もみられる。しかし、BIA法ではDXA法と比較しLBMを過大評価する可能性が指摘されている<sup>13)</sup>。しかも、DXA法では上肢、下肢、体幹部分を個別に評価する事が可能であり、特に四肢でのLBMは、わずかな皮下結合組織を除き、かなり正確に筋肉量を反映している。

さらに、上肢、下肢、体幹の各部位での筋萎縮の程度が、重症度によって異なるか否かを検討するために、全身のLBMに対する各部位でのLBMの比率を比較した。上肢、体幹での比率は重症例と非重症例で有意差を認めず、全身のLBMの減少に伴って、proportionalに減少していると考えられた。一方、下肢LBMの比率は重症例で有意に低下しており、下肢筋のdisproportionalな萎縮が示唆された。一般に、栄養障害による筋萎縮では上肢が下肢と同等かそれ以上に機能障害をきたす<sup>14)</sup>が、今回の検討

では重症例ではより高度な栄養障害を呈したにもかかわらず、下肢筋のdisproportionalな萎縮を認めた。これは、下肢筋の萎縮の要因として、栄養障害のみではなく肺機能低下に起因する日常生活活動の制限が関与している可能性を示唆している。

近年、COPD患者の運動能の規定因子として、末梢運動筋の機能的、質的变化が注目されている。下肢筋の筋力を運動能の規定因子とする報告<sup>6)7)</sup>や、筋肉内のoxidative enzymeの減少<sup>8)9)</sup>や、type I myosin heavy chain<sup>15)</sup>の減少が運動能の低下と関連するとの報告もあるが、筋量との関連については明確ではない。今回の検討では、非重症例では下肢筋量と $\dot{V}O_2\max$ は有意に相関していた。その機序として、 $\dot{V}O_2\max$ が心肺機能のみならず、実際に酸素を消費する運動筋の筋量によっても規定される可能性が考えられる<sup>16)</sup>。また、COPD患者の運動早期でのlactateの上昇は、運動筋でのcitrate synthase (CS)や3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH)などのoxidative enzymeの減少に起因しており、これらの酵素活性と $\dot{V}O_2\max$ との相関が報告されている<sup>9)</sup>。この様な筋肉のoxidative capacityの低下が、筋量の減少か、構造的変化か、あるいは両者に起因するものかは明確な結論が得られていない。しかし、<sup>31</sup>P-NMRによる骨格筋代謝の検討<sup>17)</sup>では、運動時のanaerobic glycolysisは筋量と相関していると報告されており、少なくとも筋量がoxidative capacityの規定因子の一つであると考えられる。

また、下肢の筋力トレーニングは筋力の増強には有効であるが、必ずしも $\dot{V}O_2\max$ や6分間歩行距離で評価した運動能を改善しないと報告がある<sup>18)19)</sup>。今回の検討では、重症例では、下肢筋量は $\dot{V}O_2\max$ の有意な規定因子ではなく、換気能力のみが $\dot{V}O_2\max$ を規定していた。従って、末梢運動筋が運動能に関与するか否かは重症度に依存し、重症例では下肢筋のトレーニングの運動能に対する改善効果は限定的である可能性が示唆された。また、Richardsonら<sup>18)</sup>も重症COPD患者では最大運動時でも運動筋はmetabolic reserveを有していることを示し、重症患者では末梢運動筋の機能低下よりも心肺機能の低下が運動能の低下に重大な影響を及ぼすと結論している。

今回の検討では、肺機能障害重症例ではLBMは四肢、体幹ともに非重症例よりも有意に減少していた。特に下肢のLBMはdisproportionalに減少していたが、 $\dot{V}O_2\max$ の有意な規定因子ではないことが示された。従って、重症例では、 $\dot{V}O_2\max$ で評価される最大運動能の改善に下肢筋トレーニングの有効性は低く、lung volume reduction surgeryも含めた換気能の有意な改善をもたらす治療法の必要性が示唆された。

## 文 献

- 1) Schols AMWJ, Wouters EFM, Soeters PB, et al. Body composition by bioelectrical impedance analysis compared with deuterium dilution and skinfold anthropometry in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 421-424
- 2) Schols AMWJ, Soeters PB, Dingemans AMC, et al. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis* 1993;147: 1151-1156
- 3) Nishimura Y, Tsutsumi M, Nakata H, et al. Relationship between respiratory muscle strength and lean body mass in men with COPD. *Chest* 1995; 107: 1232-1236
- 4) Yoshikawa M, Yoneda T, Kobayashi A, et al. Body composition analysis by dual energy x-ray absorptiometry and exercise performance in underweight patients with COPD. *Chest* 1999; 115: 371-375
- 5) Schols AMWJ, Mostert R, Soeters PB, et al Nutritional state and exercise performance in patients with chronic obstructive lung disease. *Thorax* 1989; 44: 937-941
- 6) Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 976-980
- 7) Hamilton AL, Killian KJ, Summers E, et al. Muscle strength, symptom intensity and exercise capacity in patients with cardiorespiratory disorders. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 2021-2031
- 8) Jakobsson P, Jorfeldt L, Henriksson J. Metabolic enzyme activity in the quadriceps femoris muscle in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:374-377
- 9) Maltais F, Simard A, Simard C, et al. Oxidative capacity of skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 288-293
- 10) Simpson K, Killian K, McCartney N, et al. Randomized controlled trial of weightlifting exercise in patients with chronic airflow limitation. *Thorax* 1992; 47: 70-75
- 11) Bernard S, Whittom F, LeBlanc P, et al. Aerobic and strength training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 896-901
- 12) American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: S77-S120
- 13) Pichard C, Kyle UG, Janssens JP, et al. Body composition by x-ray absorptiometry and bioelectrical impedance in chronic respiratory insufficiency patients. *Nutrition* 1997; 13: 952-958
- 14) Hymnsfield SB, Williams PJ. Nutritional assessment by clinical and biochemical methods. In Shils ME and Olson JA editors. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Philadelphia: Lea and Febigen, 1994;812-814
- 15) Maltais F, Sullivan MJ, LeBlanc P, et al. Altered expression of myosin heavy chain in the vastus lateralis muscle in patients with COPD. *Eur Respir J* 1999; 13: 850-854
- 16) Wassermann K, Hansen JE, Sue DY, et al. Principles of exercise testing and interpretation. 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1994; 114-116
- 17) Kutsuzawa T, Shioya S, Kurita D, et al. <sup>31</sup>P-NMR study of skeletal muscle metabolism in patients with chronic respiratory impairment. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1019-1024
- 18) Richardson RS, Sheldon J, Poole DC, et al. Evidence of skeletal muscle metabolic reserve during whole body exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:881-885

# COPDにおけるLAA clusterの構造に関する フラクタル解析

三嶋 理晃<sup>1)\*</sup> 平井 豊博<sup>1)</sup> 中野 恭幸<sup>2)</sup> 室 繁郎<sup>2)</sup>  
阪井 宏彰<sup>3)</sup> 田久保康隆<sup>3)</sup> 西村 浩一<sup>2)\*</sup> 宮岡 史代<sup>1)</sup>  
清水 孝一<sup>2)</sup> 中村 敬哉<sup>2)</sup> 陳 和夫<sup>1)</sup> 中村 孝志<sup>1)</sup>

## はじめに

肺の気管支分岐様式や肺血流分布にはフラクタル構造があることが知られている<sup>1)2)</sup>。私共は、HRCTにおける連続した低吸収領域 (LAA cluster:CLA) の大きさと累積度数がべき乗分布を示してフラクタル性を持つことを報告し、これにより得られたフラクタル次元は早期の肺気腫病変の検出に有用であることを示した<sup>3)</sup>。しかし、CLAの大きさと数の関係がフラクタル性を持つことが、個々のCLA自身の構造のフラクタル性の存在を示すものではない。そこで、私共は、肺気腫病変の進展機序を明確にするために、CLAの構造に関するフラクタル解析を行ったので報告する。

## 対象と方法

対象は COPD 患者33名の上・中・下肺野を対象とした。CT撮像条件は本研究会の撮像案に準拠した日本呼吸器病学会のガイドラインの条件を採用した<sup>4)</sup>。-960HU以下の部分を低吸収領域 (LAA) とし、CLAを自動抽出した。解析は大きさが1000pixel以上のCLAに対して行った (総数:251個)。各CLAに対して、視野を (jxj) の大きさのgridに分割し、-960以下のCT値のpixelの個数が1以上 (jxj) 未満を内部に持つ grid の個数を計測した (Nj)。この操作をj=5からj=(CLA size)<sup>0.5</sup>までjを1ずつ増加させながら繰り返した。両対数表示のもとに grid の size (resolution scale)、Nj (boundary length) の関係を図示し、直線相関係数 (r) をフラクタル性を示す指標、傾きをフラクタル次元 (Df) として算出した。

## 結果

図-1に様々な大きさを持つCLA ((1):1803,(2):4100,(3):10870 pixels) の、resolution scaleとboundary lengthの関係を両対数表示で示す。いずれも明確な直線関係を示し、直線相関係数 (r) は各々、0.992、0.989、0.993であった。また直線の傾きより求めたフラクタル次元 (Df) は各々、1.262、1.438、1.533であった。

すべてのCLA (n=251) のrおよびDfの平均値は0.990 ± 0.004、1.44 ± 0.07 (mean ± SD) であった。図-2にcluster sizeとDfの関係を示すが、Dfはcluster sizeが大きくなるに従って、大きくなる傾向を示していた (r=0.707、p<0.0001)。

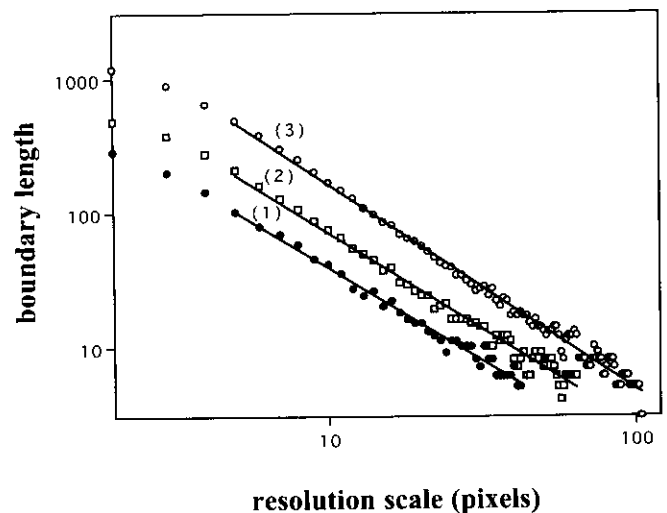


図-1: 異なった大きさのCLAのresolution sizeとboundary lengthの関係

- 1) 京都大学医学部理学療法部
- 2) 同呼吸器内科
- 3) 同呼吸器外科
- 4) 滋賀成人病センター

\* 「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

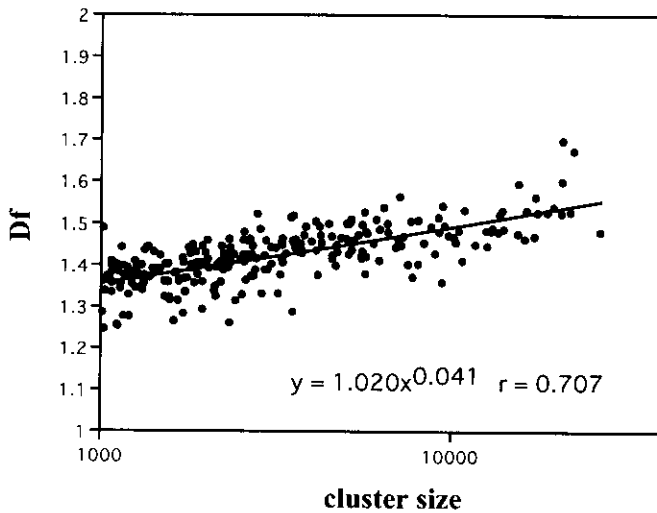


図-2 : CLA の大きさ (Cluster Size) とフラクタル次元 (Df) の関係

### 考案

本来のフラクタル構造は、無限に小さい構造まで自己相似性が存在することであるが、自然界の構造では必ず最小の構造単位によってフラクタル構造の限界が規定される<sup>9)</sup>。特にCTでは肺構造の最小限界よりもCTの解像力の限界がフラクタル解析の精度に影響を与える。この問題に対して私共は、任意のフラクタル次元を作成することのできる「Kochモデル」を用いて計測の妥当性を確認している。

一般に、測度（計測する物差し）の大きさと計測値が両対数表示で直線関係にあるとフラクタル構造があると判定される。またフラクタル次元(Df)は構造の複雑性を示す指標であり、構造が複雑になると Df が大きくなる。CLAにおいて、測度の大きさである resolution scale と計測値の boundary length が両対数表示における直線相関の計

数 (r) が1に近いことは、CLAがフラクタル構造を持っていることを示し、気管支分岐や肺血流がフラクタル構造を持っている事実を考え合わせると、肺気腫の進展が肺の基本構造に制約されていることを示唆している。また、CLAの大きさとDfが正の相関を示していることは、肺気腫が進行するに従ってCLAの構造が複雑になって行く事を示唆している。

今回解析した症例はすべて小葉中心性肺気腫であるが、おそらく、肺嚢胞のようなCLAは内部構造が全くない簡単な構造のために、フラクタル次元が非常に低いと予想される。また汎小葉性肺気腫では小葉中心性肺気腫とは異なったフラクタル次元を有する可能性もあり、内部構造の複雑性を定量的に示すDf値は、LAAを持つ様々な病変の鑑別診断に有用である可能性がある。

### 文献

- 1) Weibel ER: Fractal geometry: a design principle for living organisms. Am. J. Physiol 1991; 261: 361-369.
- 2) Glenny RW, Robertson HT: Fractal properties of blood flow characterization of spatial heterogeneity. J Appl Physiol 1990; 69(2); 532-545.
- 3) Mishima M, Hirai T, Itoh H, et al: Complexity of terminal airspace assessed by lung CT in normal subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 8829-8834.
- 4) 日本呼吸器病学会COPDガイドライン作成委員会編: COPD (慢性閉塞性肺疾患) 診断と治療のためのガイドライン. メディカルレビュー社. 1999; pp14-pp18.
- 5) RigautJP. An empirical formulation relating boundary lengths to resolution in specimens showing "non-ideally fractal" dimensions. J Microsc 1976; 133: 41-54.