

153, 1999.

3) MacDonald SL, Rubens MB, et al. Nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumo-

nia : comparative appearances at and diagnostic accuracy of thin-section CT. *Radiology* 2001 ; 221 : 600-5.

IIPs 早期発見のシステム開発に向けて —— 肺 CT 被検診者を対象とした間質性 肺炎の実態調査 ——

高橋 弘毅^{1*} 森田 祐二² 藤井 正範¹ 原田 一暁¹
千葉 弘文¹ 白鳥 正典¹ 阿部 庄作¹

特発性間質性肺炎 (IIPs) の線維化病巣は不可逆的であるので、線維化へ進展する前に治療を開始すべきであろうとの認識が定着しつつある。早期患者を的確に見出すために、我々は HRCT と特異的血清マーカーを用いた診断システムを開発中である。また、このプロジェクトを進めるには対象患者の研究協力が必要である。そこで、本年度は肺 CT ドックを受けた 1,019 名 (男 876 名, 女 143 名) の CT 所見を後向きに検討し、研究対象となる潜在的患者がどのくらいの頻度で存在するのかを明らかにした。IP 所見の有無と程度を判定し、Grade-0: 病変なし, Grade-1: 僅か (疑い例), Grade-2: 明らか (確実例) の 3 群に分類した。その結果、受診者の 57 名 (5.59%) と 33 名 (3.24%) に各々 Grade-1 と Grade-2 の IP 病変を認めた。両群を合わせると 90 名であり、総受診者の 8.83% に IP 病変が発見された。肺ドック受診者は IIPs 患者を効率的に発見するための有望な集団であることが示唆された。

Development of diagnostic system to detect early IIPs —— Survey of IP in participants received Pulmonary Dock ——

H. Takahashi, Y. Morita, M. Fujii, K. Harada, H. Chiba
M. Shiratori, and S. Abe.

Third Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

It is a major concept that patients with early stage of idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) are on a strategy for effective treatments before progression of fibrosis, since the pathological change is basically irreversible. To find such patients, we need a development of diagnostic system using high resolution CT and specific serum markers. To advance this research project, we also need to know the prevalence of early IIPs under the cooperation of volunteers having abnormal findings on CT. We analyzed findings on CT retrospectively in 1,019 of participants received a through physical check of the lungs, so called Pulmonary Dock. IP changes on CT were divided into three grades based on the degree of their extent as follows: Grade-0; without any IP changes, Grade-1; having faint changes (suspicious case), Grade-2; having extensive changes (definite case). 57 (5.59%) and 33 (3.24%) participants showed CT findings of Grade-1 and Grade-2, respectively. Sum of them (n=90) was 8.83% of total participants. In conclusion, participants received Pulmonary Dock seems to be good targets for effective detection of patients with IIPs.

はじめに

特発性間質性肺炎 (IIPs) の発見は早期であることが望ましい。その第一の理由として、IIPs 中で頻度の最も高い特発性肺線維症は不可逆的に進行性し慢性呼吸不全に陥る危険性が高く、進行する前にこれを未然に防ぐことの重要性が挙げられる。第二には、たとえ早期であっても急性増悪を生じ急死する場合があるので、注意を喚起する必要があることであり、それに関して trigger となる感染の予防対策と禁煙を指導することが重要である。第三には、肺がんの合併が極めて高頻度に生じることであり、胸部 CT 検査を定期的実施するように勧めるべきである。したがって、早期発見の必要性について、医師だけではなく患者自身にも十分に理解してもらうことが大切である。

我々は胸部 high resolution CT (HRCT) が IIPs の早期発見に有用な検査手段と考え、CT-DICOM 画像から CT 値を抽出する解析ソフト (OSIRIS) を用いて、画像を定量化するシステムを開発中である¹⁾。また、特異的血清マーカー (SP-A, SP-D, KL-6) が早期 IIPs 患者において異常高値を呈する場合があることを明らかにした。

本年度は詳細な臨床検討を行う被験者を発見することを目的に、潜在的間質性肺炎患者の実態調査を実施した。

方 法

平成 13, 14 年に北海道労働保健管理協会が実施した肺ドックを受診した 1,019 名 (男 876 名, 女 143 名) の健診スクリーニング CT 所見を後向きに検討した。対象者には、過去に間質性肺炎と診断を受けた者は含まれていない。CT 検査には日立 RADIX Turbo が用いられ、120 KV, 50 mA, WL-700, WW 1400, 10 mm 厚, 10 mm 間隔の条件下で撮像されたフィルムを使用し、呼吸器科医師 3 名の合議により評価した。評価項目は、間質性肺炎 (IP) 病変と肺気腫 (PE) 病変とした。IP 病変を肺尖から肺底区までの全肺野における広がりによって、Grade-0: 病変なし、Grade-1:

Grade-1



Grade-2

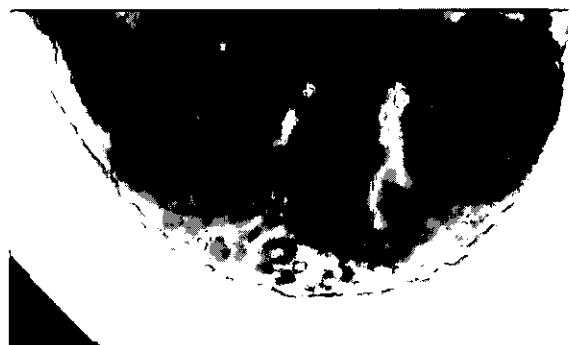


図 1 CT 所見による IP 病変の分類

僅か (疑い例), Grade-2: 明らか (確実例) の 3 通りに分類した。なお、病変が 1 スライスにのみに認められた場合は炎症性瘢痕とみなし、Grade-0 とした。また、Grade-1 には gravitational dependent opacity による病変が少なからず含まれている可能性がある。Grade-1, -2 と判定された CT 所見のうち、典型症例を図 1 に示す。一方、PE 病変については、肺尖から肺底区までの全肺野における Low attenuation area (LAA) と bulla の広がりによって、Grade-0: 異常病変なし、Grade-1: 僅か ($\sim < 5\%$), Grade-2: 少し目立つ ($5\% \leq \sim < 25\%$), Grade-3: 比較的広範に分布 ($25\% \leq \sim < 50\%$), Grade-4: 極めて広範に分布 ($50\% \leq \sim$) の 5 通りに分類した。

研究成果

IP 病変および PE 病変の有所見者数を表 1 に示す。受診者 1,019 名中 57 名 (5.59%) と 33 名 (3.24%) に各々 Grade-1 と Grade-2 の IP 病変を認めた。両群を合わせると 90 名であり、総受診者の 8.83% に IP 病変が発見された。IP 病変確実例 33 名の性差 (男 97%, 女 3%) は、総受診者 (男 86%, 女 14%) に比し男に高率であった ($p < 0.073$, Fisher の直接法) (表 2)。IP 病変有

¹ 札幌医科大学第三内科

² 北海道労働保健管理協会

* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

表 1 有所見者数と頻度

	総数	(%)
総受診者	1,019	100
IP		
Grade-1	57	5.59
Grade-2	33	3.24
Total	90	8.83
PE		
Grade-1	65	6.38
Grade-2	44	4.32
Grade-3	16	1.57
Grade-4	11	1.08
Total	136	13.3

表 2 IP 病変有所見者の性別

	総数	性別	
		男	女
総受診者	1,019	876 (86%)	143 (14%)
IP 有所見者			
Grade-1	57	49 (86%)	8 (14%)
Grade-2	33	32 (97%)	1 (3%)
Total	90	81 (90%)	9 (10%)

所見者 90 名の平均年齢 (57.5 歳) は総受診者 (51.5 歳) に比し高齢であった。さらに, Grade-2 の平均年齢 (61.6±9.83 歳) は Grade-1 (55.2±10.1 歳) に比し有意に高く ($p=0.0056$), 度数分布図においても高齢に偏位した分布を示した (図 2)。しかし, Grade-1 群 57 名中 26 名 (45.6%), Grade-2 群 33 名中 13 名 (39.4%) は 60 歳未満であった。IP 病変有所見と喫煙習慣との関係を (表 3) に示す。総受診者の喫煙率 (74%) に比し, IP 病変 Grade-1 群の喫煙率 (79%) は有意な高値を示さなかったが, Grade-2 群の喫煙率 (90%) は有意に高値であった ($p=0.0256$, Fisher 直接法)。Grade-2 群の喫煙指数は Grade-1 群に比し有意に高かった ($p=$

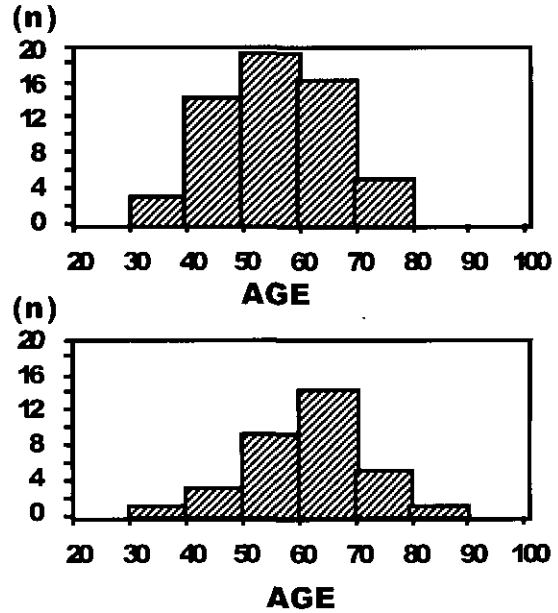


図 2 IP 病変有所見者の年齢分布

0.0062, Mann Whitney-U).

PE 病変は合計 136 名, 全体の 13.3% にみられた (表 1)。PE 所見と年齢分布との関係においては, Grade-1, -2, -3, -4 の各平均年齢±標準偏差が 51.1±9.23, 57.6±8.68, 59.4±6.80, 62.9±7.31 歳であり, 病変の程度が広範であるほど平均年齢が高い傾向が示された ($p<0.0001$, Kruskal-Wallis)。PE 病変有所見者の喫煙率 (99%) は総受診者のそれに比し有意に高率であった ($p<0.0001$, Fisher 直接法)。また, 病変の程度が広範であるほど, 喫煙指数が高い傾向がみられた ($p=0.0348$ (Kruskal-Wallis))。IP 病変と PE 病変との関係を検討した結果, 両病変が有意に合併しやすい傾向は認められなかった。

表 3 IP 病変有所見者の喫煙習慣

	総数	喫煙歴		B.I.
		有り	無し	
総受診者	1,019	754 (74%)	265 (26%)	
IP 有所見者				
Grade-1	57	45 (79%)*	12 (21%)	890±93
Grade-2	33	30 (90%)**	3 (10%)	1103±73 ※
Total	90	74 (82%)***	16 (18%)	960±68

* $p=0.5333$, ** $p=0.0256$, *** $p=0.0999$ (v.s. 総受診者, Fisher 直接法)

※ $p=0.0062$ (v.s. Grade-1, Mann Whitney-U)

考察・結論

IIPsの有病率に関する疫学的調査に関して、本邦では人口10万対4.08であると報告した1993年の本間らの北海道地区調査²⁾以来、集約されたものがない。Finlandから出された最近の報告³⁾では、IPFの有病率は人口10万対16-18と述べられている。しかし、いずれにおいても早期病変に着目した調査結果は示されていない。今回、肺ドックを受診した1,019名の胸部CT所見を検討した。その結果、90例(8.83%)にIP病変が観察された。確実例に限定しても33例(3.24%)であり、従来の有病率に比し極めて高率であった。その主な原因を以下のように推論する。第一に、有所見者の殆どが胸部X-p所見では異常がなく胸部CT所見でようやく病変を検出できる早期例であり、潜在的患者が多く含まれている可能性、第二に受診者の多くが喫煙歴のある40歳以上の男性であり、母集団がIIPsの好発因子を有する対象に偏位していた可能性、第三にはIP病変と鑑別の困難な所見、例えばgravitational effectをIP病変として誤認判定された症例が含まれている可能性が考えられる。したがって、今回の有所見率が本邦でのIIPs有病率を直接的に示しているとは考え難い。しかし、少なくとも肺ドック受診者群はIIPsを効率的に発見するための有効な集団であるといえる。

一般の健診CT検査は、肺癌、肺気腫を主な対象疾患とし施行される傾向があり、IP病変については、「炎症性癒痕」あるいは「陳旧性結核」と判定され、精密検査の対象外とされている症例は少なくないと思

われる。本調査で明確化された早期IP病変の特徴を健診CT検査を施行している医療機関へ啓蒙するうえで、IIPs早期例発見のための指針を作成する必要がある。

次年度の取り組みとして、肺ドック受診者を母集団とし、スクリーニングCT検査でIP病変有所見者を抽出し、対象者に本研究の重要性を説明し、志願被験者としての研究協力を要請する。十分な説明と同意を得たうえで、胸部HRCT、血清マーカー(SP-A, SP-D, KL-6)、呼吸機能検査を施行し、早期IIPsの詳細な分析を行う予定である。

参考文献

- 1) 高橋弘毅, ほか. 早期の特発性間質性肺炎の病態解析のための胸部HRCT値解析と血清マーカー. 厚生労働科学研究特定疾患対策研究事業びまん性肺疾患研究班. 平成14年度研究報告書2003; p. 86-90.
- 2) 本間行彦, ほか. 北海道特定疾患事業よりみたIIPの発生率-13年間の経緯-, 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成4年度研究報告書1993; p. 202-204.
- 3) Hodgson U, Laitinen T, Tukiainen P. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax*. 2002; 57: 338-42.

間質性肺炎における肺内無機沈着物の定量と元素分析

土屋 公威 稲瀬 直彦 臼井 裕 吉澤 靖之*

間質性肺炎の肺組織における無機粉塵の沈着について検討し疾患による比較を行った。検討症例は19例、男性10例、女性9例、年齢64.9歳。疾患別では慢性鳥飼病9例、膠原病肺4例(関節リウマチ1例、強皮症1例、シェーグレン症候群1例、強皮症+シェーグレン症候群1例)、特発性肺線維症(IPF)4例、職業曝露歴を有する間質性肺炎2例(鉄工所勤務で鉄を扱いかつRAを疑わせる症状のある症例、及び機械加工業で鉄、チタン、銅、ステンレスを扱っていた症例)。外科的肺生検あるいは剖検肺組織で無作為に10視野(×120)を選択し、偏光顕微鏡で複屈折性を示す粒子数を測定した。検討症例19例中8例と対照群3例(肺癌切除肺の非癌部2例、肺気腫1例)ではエネルギー分散型X線分光法(EDS)で沈着物の元素分析も行った。慢性鳥飼病群(44.6±23.0個)、IPF群(364.5±547.5個)は膠原病肺群(20.5±6.4個)と比較して粒子数が多い傾向にあった。IPF群の中に非常に粒子数の多い症例があった。元素分析では大部分がAl、Si主体の粒子であったが、IPFや職業曝露のある症例ではFe、Ti、Crなども検出された。IPFには潜在的な曝露がある可能性があり、間質性肺炎患者の診断と病態解明において偏光顕微鏡、走査電顕等の精査も考慮すべきと考えられた。

Quantitative measurement and elemental analysis of inorganic particles in the lung tissues of interstitial pneumonias

Kimitake Tsuchiya, Naohiko Inase, Yutaka Usui, and Yasuyuki Yoshizawa

Integrated pulmonology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo Japan

We semi-quantitated the deposition of inorganic particles in 19 patients (10 men and 9 women with mean age of 64.9) with various interstitial pneumonia (IP). Nine patients with chronic bird fancier's lung (cBFL), four with collagen vascular disease (CVD) (RA, PSS, Sjögren syndrome, PSS with Sjögren syndrome), four with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and the other two (IP with a history of occupational exposure) were studied. Birefringent particles in lung tissues (VATS 12, autopsy 7) were counted in randomly selected 10 fields by polarizing light microscopy in all patients. Elemental analyses were performed by scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy in eight patients with IP and three control patients (2 with lung cancer and 1 with emphysema). The number of birefringent particles in patients with cBFL and IPF was greater as compared to CVD. Enormous particles were detected in one patient with IPF. In elemental analyses, aluminium (Al) and silicon (Si) were detected in all patients. In cases of IPF and another case with a history of exposure to dusts, iron (Fe), titanium (Ti) and chromium (Cr) were also detected. The examination by polarizing light microscopy and scanning electron microscopy should be considered for the accurate diagnosis of patients with IP who may have an unrecognized exposure to inorganic dusts, especially in diagnosing IPF.

はじめに

粉塵を気道から吸入した場合、比較的大きいものは気道に沈着し線毛によって口腔側へ戻されるが、微小なものは肺胞マクロファージに貪食されたり血管系、リンパ系を通じて血中に吸収される。その中間の大きさ(1~5 μm 程度)の粉塵が大量に吸入された場合、特に気道クリアランスが低下した場合には細気管支、肺胞に粉塵が過剰沈着し線維増殖性変化が起きる。主に職業性のものが塵肺と呼ばれ、原因となりうる無機粉塵としては遊離珪酸、珪酸化合物、金属(アルミニウム、鉄、ベリリウム)、炭素などがある。しかし、直接扱う職業性物質でなくても作業場での環境も含めて無自覚の環境曝露の無機物質を長年に亘って吸入する可能性があると考えられ、それらが肺の線維化に関与したり、他の原因による間質性肺炎に影響を与える可能性が考えられる。過去の報告では様々な環境曝露、金属や木の粉塵曝露が肺線維症発症のリスクファクターとして上げられており肺線維症発症リスクは曝露年数に伴って上昇するとされている¹⁾。また特発性肺線維症(IPF)の診断に際し職業性の典型的塵肺を除外することは容易だが、診断例の中に典型的塵肺を呈さない粉塵吸入肺が含まれている可能性があり周囲環境を含めた過去からの生活歴を詳細に聴取することが重要とされている²⁾。

肺組織の元素分析に関しては1980~1990年代を中心にいくつか報告があり、IPFではケイ素、アルミニウム、マグネシウム、セレン、チタンが多いと報告されている³⁾⁻⁶⁾。またIPF症例のリンパ節を分析した検討ではニッケルが多いとされており⁷⁾、吸入物質の元素組成と肺線維化との関連が示唆されているが、これらの報告はいずれもATS/ERS consensus statement以前であり間質性肺炎診断のスタンダードが確立する前である。また以前の報告では特発性間質性肺炎(IIP)としている症例においても職業歴に土木工事、製鉄所、溶接工、配管工、金物製造業などが含まれており粉塵吸入の関与が除外されておらず、現在から見ると診断の精度に疑問が残る。特発性間質性肺炎群(IIPs)に関してはいくつかの疾患が含まれる疾患群であるとの見地から様々な変遷

を経て分類が変更、追加されており、最近の高分解能CT、外科的肺生検の普及もあり現在ではIPF、NSIP、COP/BOOP、DIP、RB-ILD、LIP、AIPに分類されるに至っている¹⁾⁸⁾。このような間質性肺炎の新しい認識、分類の理解のもとで、IPFと診断された例、原因が同定されている間質性肺炎症例について吸入粉塵の影響を検討することは意義あることと思われる。

今回我々は間質性肺炎における無機粉塵の沈着およびその元素組成について調べ、様々な環境における吸入物質の病態への関与を明らかにし疾患による比較を行うことを目的として検討を行った。

対象と方法

対象は当院において胸腔鏡下肺生検あるいは剖検が行われた19例で、疾患は慢性鳥飼病9例、膠原病肺4例、IPF4例、残り2例は粉塵吸入の職業曝露歴を有する間質性肺炎症例(①鉄工所勤務で鉄を削る仕事に従事しかつRAを疑わせる症状も合併した症例、②機械加工業で鉄を中心にチタン、ステンレス、銅も扱う仕事に従事していた症例)。平均年齢は64.9歳、男性10例、女性9例。各症例につきHE標本を偏光顕微鏡($\times 120$ 倍)で観察し、気管支周囲5視野、線維化肺部分5視野の計10視野を無作為に選択し複屈折性を示す粒子数を測定した。8例については粒子の定性分析としてHE標本と連続する切片を用いて偏光下で粒子が特に多い部位について走査電顕による元素分析を行った。また対照群3例(肺癌切除肺の非癌部2例、肺気腫1例)についても同様に元素分析を行った。パラフィン包埋した組織より4 μm の厚さで切片を切り出しこれをキシレン5分 $\times 3 \rightarrow 100\%$ エタノール5分 $\times 2$ と脱パラフィン、脱キシレンを行った後に乾燥させオスミウムガスによるコーティングを行い一晩置いたものを電顕用試料とした。

元素分析にはエネルギー分散型X線分光法(Energy Dispersive X-ray spectroscopy, EDS)を用いた。まず高倍率($\times 5,000$ 倍)で1~5 μm 程度の粒子を同定し元素分析(点分析)(図1)を施行。同時に電子プローブを一定方向に移動させて元素濃度分布を測定する線分析(図4,5)や、任意の面積に電子プローブを走査し各々の点から発生するX線を1個の輝点となるように表示する面分析(図6)も行い元素分布を確認した。次に肺組織全体の評価として比較的

東京医科歯科大学呼吸器内科

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

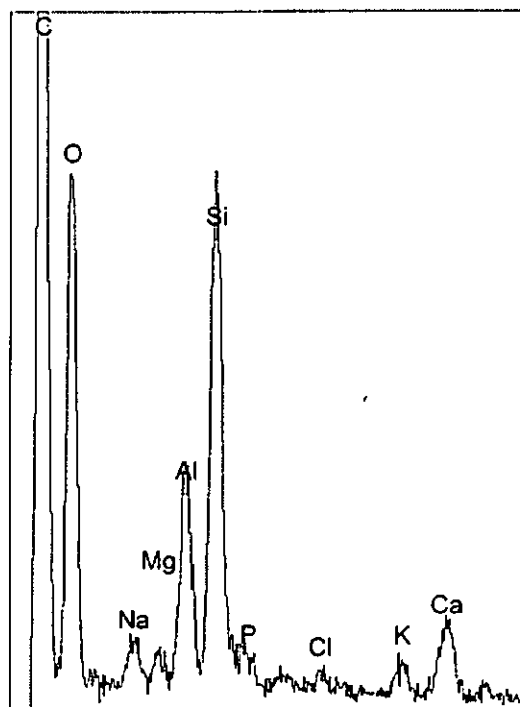


図1 EDS分析例

低倍率 (×1,000倍) で無作為に計5視野を選択して元素分析を行った。症例間の比較は、各元素の重量濃度を組織量を反映すると考えられている硫黄 (S) に対する濃度比で表した。EDSは、走査電子顕微鏡 (scanning electron microscopy, SEM) 下に照射電子によって発生する特性 X 線を分析することによって元素を同定し、スペクトルの強度分布から組成分析を行うものである (図1: 分析例)。

結 果

1. 患者背景

慢性鳥飼病 (n=9), 膠原病肺 (n=4), IPF (n=4) の3群の患者背景では、慢性鳥飼病で鳥飼育歴が多いものの、3群間で患者背景に明らかな差は認めなかった (表1)。組織パターンは3群とも全例 UIPパターンであった。3群のCT画像所見はそれぞれ、慢性鳥飼病 (IPF類似のパターン6例, 上肺野中心の線維化1例, スリガラス状陰影主体1例, 小葉間隔壁肥厚主体1例), 膠原病肺 (IPF類似のパターン1例, 浸潤影+スリガラス状陰影主体3例), IPF (典型的IPFパターン4例) であった。また職業曝露例2例は、上~中肺野分布の気道に沿った線維化1例と散在するスリガラス状陰影を合併した下肺野優位の線維化1例であった。

2. 偏光顕微鏡下での観察

偏光顕微鏡下で HE 標本を観察し肺組織内の複屈折性を示す粒子の数を気管支周囲 (BVB: bronchovascular bundle) と線維化肺部分 (FL: fibrotic lung) に分けて測定を行った。粒子を認める部位に関しては慢性鳥飼病 (BVB: 29.9±18.7, FL: 14.7±11.2), 膠原病肺 (BVB: 14.3±4.9, FL: 6.3±1.5) において気管支周囲に多い傾向を認め、IPF (BVB: 151.5±198.2, FL: 213.0±350.7) では線維化肺部分に多い傾向を認めたが有意な差は認めなかった (図2)。IPFでは粒子数が特に多い症例を1例認めた (図2)。全視野合計の粒子数の3群間の比較では、膠原病肺 (20.5±6.4個) と比較して慢性鳥飼病 (44.6±23.0個), IPF (364.5±547.5個) で粒子を多く認めた (P<0.05) (図3)。職業歴で金属粉塵曝露が考えられる2例 (鉄工業,

表1 患者背景

	cBFL (n=9)	CVD (n=4)	IPF (n=4)
年齢(歳)	63.7±10.5	60.0±3.6	72.8±7.9
性別(男:女)	5:4	1:3	2:2
喫煙歴あり	3/9 (33%)	1/4 (25%)	0/4 (0%)
都心部に居住	5/9 (56%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)
粉塵曝露歴あり	1/9 (11%)	1/4 (25%)	1/4 (25%)
鳥飼育歴あり	9/9 (100%)	1/4 (25%)	1/4 (25%)
組織パターン	UIP 9/9(100%)	UIP 4/4(100%)	UIP 4/4(100%)

cBFL: chronic bird fancier's lung, CVD: collagen vascular disease
 IPF: idiopathic pulmonary fibrosis, UIP: usual interstitial pneumonia

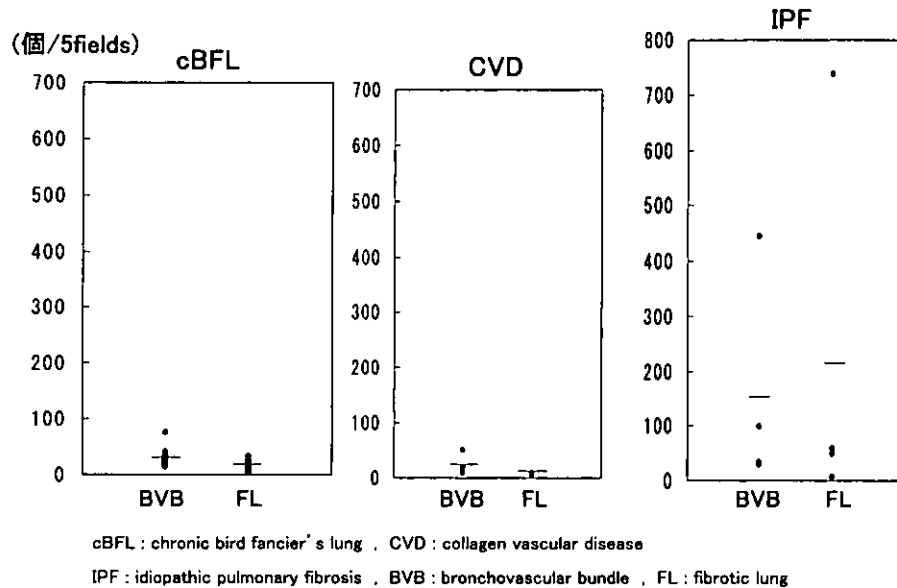


図2 肺組織内の複屈折性粒子数

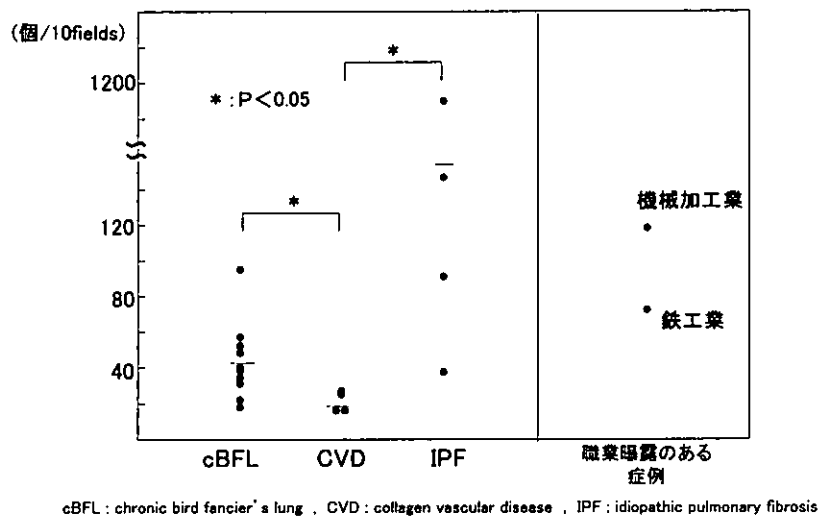


図3 肺組織内の複屈折性粒子数 (全視野)

機械加工業) についても測定したところ粒子数が多い傾向を認めた (図 3)。

3. 走査電子顕微鏡下での元素分析

次に HE 標本と連続する切片を用いて元素分析を行った。慢性鳥飼病症例、IPF 症例で線分析 (図 4, 5) 及び面分析 (図 6) を施行してみるとアルミニウム (Al)、ケイ素 (Si)、チタン (Ti) などのピークを認め、そのピークが粒子に一致していることからこれらの元素は生体内の元素ではなく外部からの吸入物質と考えられた。鳩排泄物を同様に分析するとアルミニウム、ケイ素を含む粒子を多数認めた (図 7)。各症例で粒子に含まれる形で同定 (走査電顕、×5,000 倍) した

元素を (表 2) に示す。全症例でアルミニウム、ケイ素を認めた。IPF や職業曝露 (鉄工所勤務) が疑われる症例ではチタン、クロム (Cr)、鉄 (Fe) なども認めた。対照として肺癌症例の正常肺部分 2 例、肺気腫症例 1 例での分析を行ったところアルミニウム、ケイ素を含む粒子を認めた (表 2)。また、比較的低倍率 (走査電顕、×1,000 倍) で計 5 視野の元素分析を行いそれぞれ元素別の重量濃度を算出し 5 視野の平均値を出した。各元素について組織量を反映すると思われる硫黄 (S) に対する濃度比を出し症例間の比較を行ったところ (図 8, 9)、IPF や職業曝露がある症例ではケイ素を多く認めた。また膠原病肺でマグネシウムやケイ素が多い

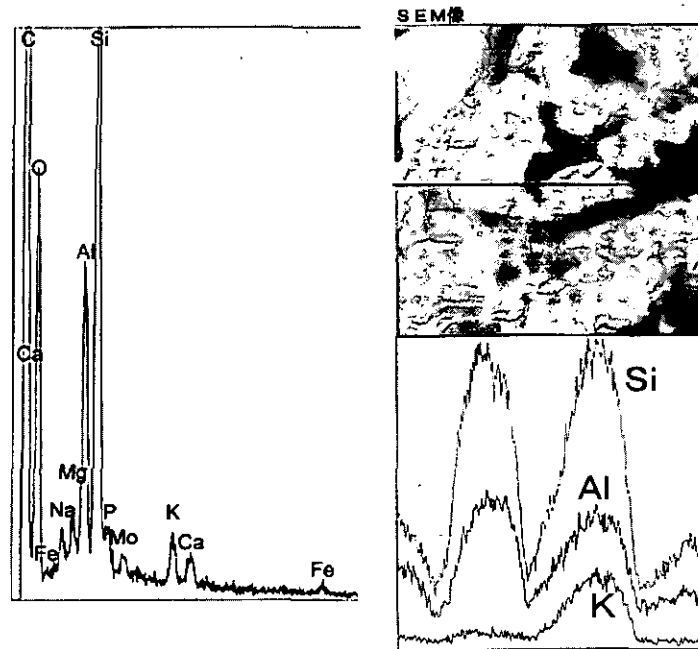


図4 慢性鳥飼病症例 (左図: 粒子の元素分析, 右図: 線分析)

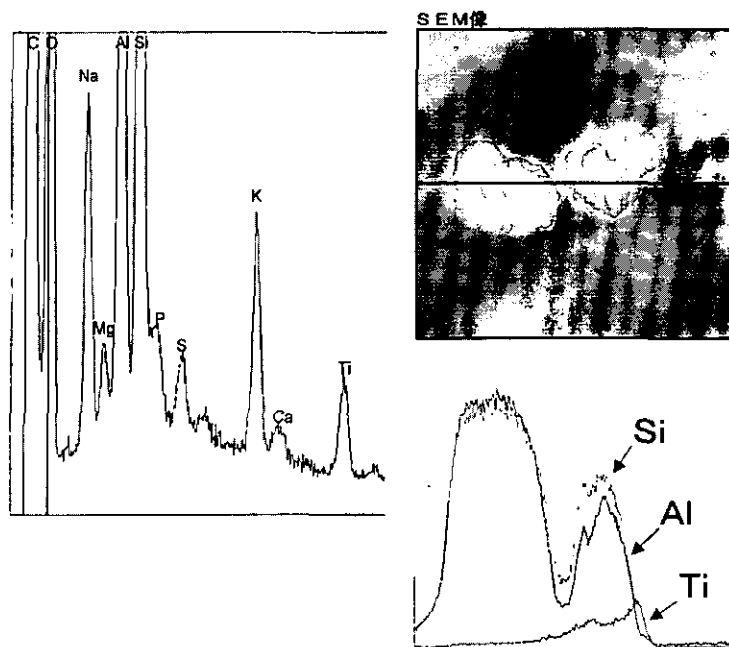


図5 IPF 症例① (左図: 粒子の元素分析, 右図: 線分析)

症例があった。IPF 症例で鉄，クロムを多く認めた。

考 察

偏光顕微鏡による肺組織観察については、塵肺症例において偏光顕微鏡，電顕両者での検討を行った報告があるが⁹⁾¹⁰⁾，偏光顕微鏡での観察は silica (遊離珪酸) 及び silicate (珪酸塩) の存在を微小なものまで確認

でき、通常の病理標本で観察できることからスクリーニング検査として有効と思われる。一方、塵肺以外の肺疾患で偏光顕微鏡での観察を検討した報告は少ない。今回我々は、吸入因子が関与する慢性鳥飼病、吸入因子の関与が少ない膠原病肺、詳細な問診で環境、粉塵曝露の関与は少ないと判断した IPF 診断例について偏光下での観察結果を検討した。

慢性鳥飼病、IPF で多い傾向を認めた沈着物につい

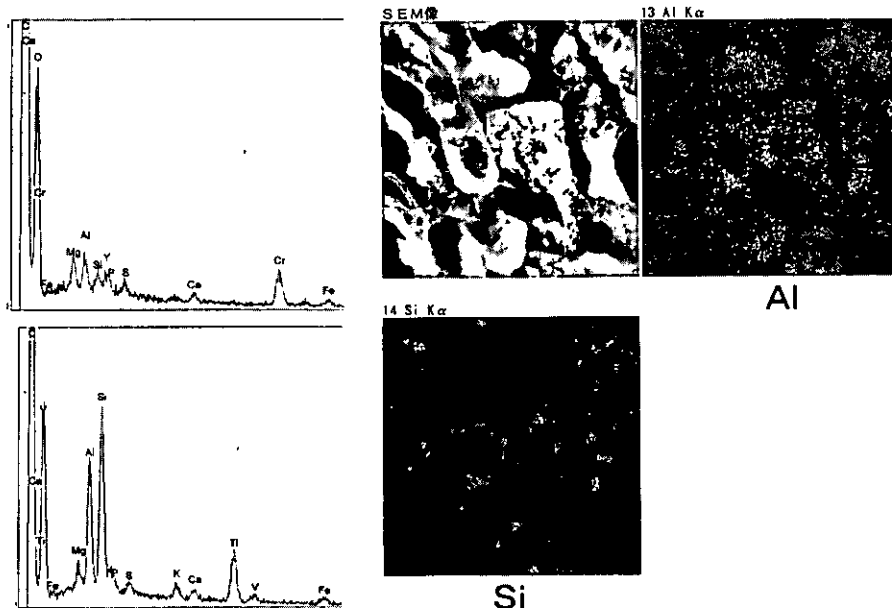


図6 IPF 症例② (左図: 粒子の元素分析, 右図: 面分析)

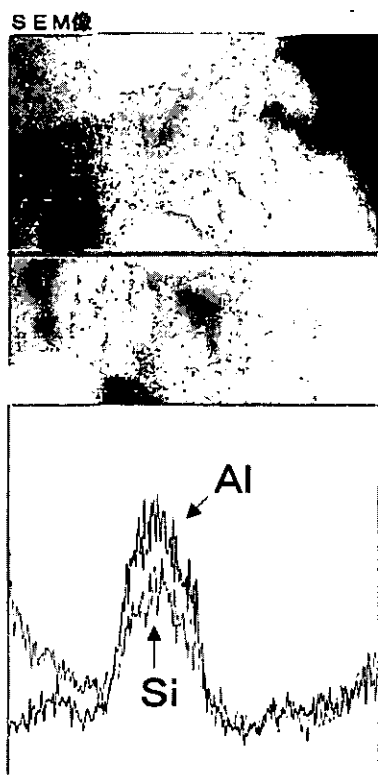


図7 鳩排泄物の元素分析

ては、職業歴、環境曝露、鳥飼育歴などが因子として考えられるが、慢性鳥飼病については曝露の状況より鳩排泄物に含まれる粉塵を吸入した可能性が高いと考えた。ただし今回の結果が慢性鳥飼病に特異的なものかどうかについては、他の慢性過敏性肺炎との比較

も必要であり今回の検討のみでは断定できない。定性分析として行った電顕下での元素分析では慢性鳥飼病の肺組織及び鳩排泄物の両者で共通してアルミニウム、ケイ素を含む粒子を多く認めた。アルミニウム、ケイ素は鉄とともに土壤に多く含まれる元素として知られており¹¹⁾¹²⁾、土壤由来の粉塵が考えられた。今回の検討では他疾患肺、正常肺など全ての症例でアルミニウム、ケイ素を含む粒子を認め、過去の報告でも正常肺において silicate (珪酸塩) は多くみられているが¹³⁾、慢性鳥飼病においてこういった粉塵の量が特に多いことはこれらが肺局所における免疫反応を修飾あるいは直接病態に関与している可能性も考えられた。また IPF においては潜在的な曝露歴がある可能性が考えられ、沈着物の量、種類を更に検討し肺線維化のメカニズムとの関連についても検討が必要と考える。

疾患による元素分析の比較 (図8, 図9) では症例が少数であり、この方法では生体内の元素も含まれるため今回は一定の傾向は認めなかったが、IPF や職業曝露歴 (金属粉塵曝露) の関与がある症例でケイ素、鉄、クロムを多く認めたことは病態との関連が疑われ、また吸入因子の関与が少ないと思われる膠原病肺でもマグネシウムやケイ素が多い症例があったことより把握しきれていない環境曝露がある可能性も考えられた。

電顕での元素分析は、職業歴は明確でないが塵肺症

表2 肺組織内粒子の元素分析

診断	年齢・性	職業	粒子として同定した元素
① 慢性鳥飼病	42 F	主婦	Al, Si
② 慢性鳥飼病	63 F	主婦	Al, Si
③ 慢性鳥飼病	59 M	小鳥屋	Al, Si
④ 膠原病肺(RA)	62 M	事務職	Al, Si
⑤ 膠原病肺(PSS)	57 F	事務職	Al, Si, Mg
⑥ IPF	75 M	植木職人	Al, Si, Ti, Cr, Fe
⑦ IPF	63 F	自動車工場の事務	Al, Si, Ti, Cr, Co, Fe
⑧ IP(RA疑い)	68 M	鉄工所(粉塵曝露あり)	Al, Si, Ti, Cr, Fe
⑨ 肺癌(正常肺部分)	70 F	主婦	Al, Si
⑩ 肺癌(正常肺部分)	69 F	主婦	Al, Si
⑪ 肺気腫	55 M	印刷業	Al, Si

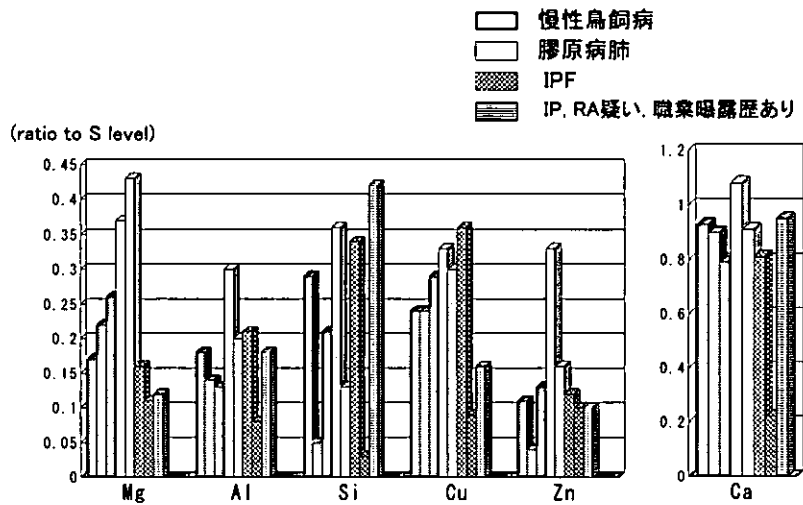


図8 肺組織(全体)の元素分析①
(走査電顕, ×1,000, 5 fields)

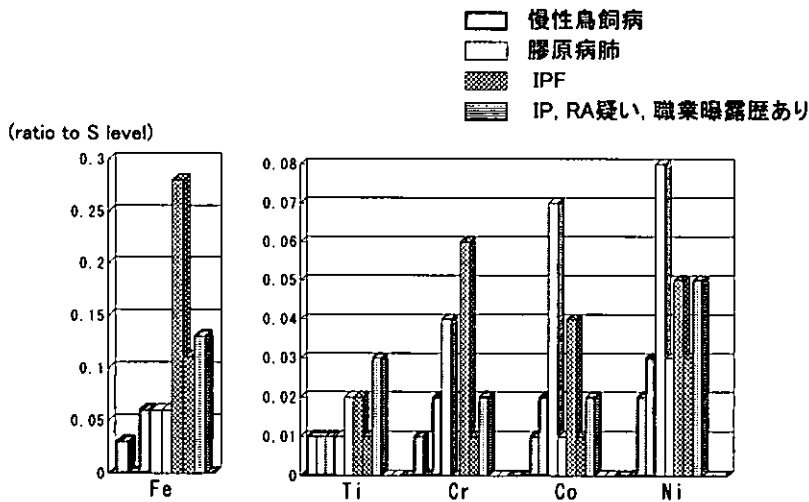


図9 肺組織(全体)の元素分析②
(走査電顕, ×1,000, 5 fields)

が疑われる場合、顕微鏡で同定困難なタイプの石綿線維の存在及びその種類の同定などにおいて有効であるとされる¹⁴⁾。肺疾患においては塵肺症が明らかな症例に限らず適応を広く考え患者背景と肺疾患の関連を積極的に疑い精査することが重要と思われる。間質性肺炎などの呼吸器疾患において、患者の生活環境、職業、住居、趣味等を詳細に聴取することの重要性は明らかであるが、短期間の経歴、かなり以前の生活歴などは問診だけでは不十分な場合がある。今回行った偏光顕微鏡での観察、EDSによる分析は通常のHE標本、パラフィン切片を使用でき電顕用試料作成も簡便であり組織採取が可能であれば一つの選択肢として考慮すべきと思われる。今後症例を蓄積して患者背景と間質性肺炎発症との関連についてさらに検討していきたい。

参考文献

- 1) American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 646-664, 2000.
- 2) 吉澤靖之. IIPsの診断と治療、鑑別すべき疾患. *日呼吸会誌*. 42: 43-48, 2004.
- 3) Monso E, Tura JM, Marsal M, et al. Mineralogical microanalysis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Environ Health* 45: 185-188, 1990.
- 4) 本間行彦, 井上幹朗, 小笠原英紀, 他. 特発性間質性肺炎 (IIP) 症例における肺内無機粉塵の測定. 厚生省特定疾患間質性肺疾患調査研究班 昭和60年度研究報告書. 203-207, 1986.
- 5) 井上幹朗. 特発性間質性肺炎における肺内無機塵埃の定量, 定性. *北海道医学雑誌* 61: 745-754, 1986.
- 6) 田村昌士, 久保田公宜, 小川純一, 他. 粒子励起X線分析法による特発性間質性肺炎の肺内微量元素の定量—吸入無機粉塵が成因に及ぼす影響について—. 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班 平成4年度研究報告書. 205-208, 1993.
- 7) 橋本尚子, 田島 洋, 溝口 勲, 岩井和郎. 特発性間質性肺線維症例の肺門縦隔リンパ節に含まれる元素含有量の分析. *日胸疾会誌* 30: 2061-2068, 1992.
- 8) American Thoracic Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 277-304, 2002.
- 9) Wang BS, et al. Application of polarized microscopy and analytic electron microscopy in pneumoconiotic pathologic examination. *Chin J Tubercul Respir Dis* 12: 103-104, 1989.
- 10) McDonald JW, Roggli VL. Detection of silica particles in lung tissue by polarizing light microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 119: 242-246, 1995.
- 11) Yamasaki S, Takeda A, Nanzyo M, et al. Background levels of trace and ultra-trace elements in soils of Japan. Proceeding of extended abstracts of 5th International Conference on the Biogeochemistry of trace elements 622-623, 1999.
- 12) 加藤邦彦, 小原 洋, 中井 信, 他. 日本の沖積土壌における元素組成. *土肥誌* 71(2): 143-153, 2000.
- 13) Monso E, Tura JM, Pujadas J, et al. Lung dust content in idiopathic pulmonary fibrosis: a study with scanning electron microscopy and energy dispersive x ray analysis. *Br J Ind Med* 48: 327-331, 1991.
- 14) 大島 晋 他. 分析電顕の応用—じん肺, 金属等の沈着—. 病理組織診断における電子顕微鏡の有用性, 文光堂, 東京, 148-175, 1992.

マウス LPS 急性肺傷害モデルにおける一酸化窒素の 炎症調節作用・オリゴヌクレオチドマイクロ アレイを用いた包括的遺伝子発現解析

岡本 竜哉¹ Albert van der Vliet² 菅 守隆^{1*}

肺の炎症局所で産生される一酸化窒素 (NO) は、ONOO⁻ 等の反応性窒素化合物に変換され、組織障害に直接的に寄与する一方、種々の炎症メディエーターの発現を遺伝子レベルで間接的に調節している可能性が報告され、注目されている。今回我々は、誘導型 NO 合成酵素 (NOS2) 欠損マウスおよび野生型 C57BL/6 マウスに LPS を経鼻投与し急性肺傷害モデルを作成、BAL 液中の NOx⁻、サイトカイン、MMP 活性レベル、また肺組織中の mRNA 発現プロファイルをオリゴヌクレオチドマイクロアレイ (GeneChip[®] Affymetrix) を用いて比較検討し、NO の炎症調節作用について検討した。LPS 投与により、組織学的に好中球浸潤を主体とする急性肺傷害が惹起された。野生型マウスにおいては LPS により NOS2 の誘導が RT-PCR にて確認された。どちらのマウスにおいても、BAL 中の好中球数、蛋白レベル、サイトカインレベル、MMP-9 の産生の亢進が認められ、投与後 24 時間をピークとし、その後消退した。また、BAL 蛋白においては、反応性窒素化合物の指標であるニトロクロシンの生成を HPLC にて証明した。これらの反応は、NOS2 欠損マウスにおいては野生型マウスに比べいずれも軽度であった。マイクロアレイによる包括的遺伝子発現解析を行ったところ、LPS による種々の炎症性サイトカイン、ケモカイン、ストレス蛋白、CD14 などの誘導が NOS2 欠損マウスにおいては野生型マウスに比べ減少していることが明らかとなった。以上より、NOS2 由来の NO は、LPS による急性炎症を促進的に調節する炎症メディエーターである可能性が示唆された。

Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice

Tatsuya Okamoto¹, Albert van der Vliet², Moritaka Suga¹

¹Department of Respiratory Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

²Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of California, Davis

Acute lung inflammation and injury was induced by intranasal instillation of lipopolysaccharide (LPS) in normal and NOS2-deficient (NOS2^{-/-}) C57BL/6 mice. LPS-induced increases in extravasated airway neutrophils, and in lung lavage fluid levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), were lower in NOS2^{-/-} mice compared to wild-type mice, indicating that NOS2-derived nitric oxide (NO) participates in inflammatory cytokine production and neutrophil recruitment. Instillation of LPS also caused increased total lung lavage protein levels and induction of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), as indices of lung epithelial injury, and increased tyrosine nitration of lung lavage proteins, a marker of oxidative injury. All these responses were less pronounced in NOS2^{-/-} mice compared to wild-type mice. Oligonucleotide microarray (GeneChip[®]) analysis of global lung gene expression revealed that LPS inhalation induced a range of transcripts encoding pro-inflammatory cytokines and chemokines, stress-inducible factors and other extracellular factors, and suppressed mRNAs encoding certain cytoskeletal proteins and signaling proteins, responses that were generally attenuated in NOS2^{-/-} mice. Comparison of both mouse strains revealed altered expression of several cytoskeletal proteins, cell surface proteins, and signaling proteins in NOS2^{-/-} mice, changes that may partly explain the reduced responsiveness to LPS. Collectively, our results suggest that NOS2 participates in the acute inflammatory response to LPS by multiple mechanisms, by involvement in pro-inflammatory cytokine signaling and by altering the expression of various genes that affect inflammatory-immune responses to LPS.

はじめに

肺の感染・炎症病態において、局所で過剰に産生される一酸化窒素 (NO) は、炎症・免疫調節因子として作用し、生体防御において重要な役割を演じている。NO は NO 合成酵素 (NO synthase; NOS) により生成されるが、炎症病態においては主に NOS2 (inducible isoform of NOS) の誘導を介してなされる。肺においては、気道上皮、肺胞上皮、肺胞マクロファージ、そして浸潤炎症細胞などが NOS2 を発現し、NO の過剰産生に関与する。NOS 阻害薬、あるいは NOS 欠損マウスを用いた種々の研究から、NO は炎症反応を促進あるいは抑制いずれの方向にも調節し得ることが報告されており、従って、NO は炎症病態において時に防御的に、そして時に攻撃的に作用するものと考えられている¹⁾。この NO の有する二面性は、様々な酸化還元状態をとり得るという NO の化学的特性に起因するものと我々は考えている。一般に炎症局所では、NO と同時に活性酸素種も同時に産生される。この場合、NO は NO₂ や ONOO⁻ 等の反応性窒素化合物 (reactive nitrogen species; RNS) に変換され、その強力な酸化能により宿主の細胞・組織を直接的に傷害するばかりか、NF- κ B の活性化を引き起こし、種々の炎症性メディエーターの誘導を惹起する。一方で、NO は、グルタチオンなどと反応し S-ニトロソチオール (RSNO) を生じ、種々の生理活性蛋白のチオール基をニトロソ化 (ニトロ基転移反応) し、その生理活性を修飾する。この反応を通じて、NF- κ B は標的遺伝子のプロモーター領域に対する結合能を失い²⁾、さらに核への移行もまた阻害されることを私たちは報告した³⁾。以上より、NO が炎症反応を促進あるいは抑制いずれの方向に調節するかは、その炎症局所に RNS あるいは RSNO のどちらがより優位に生じているかにより決まるものと推測されるが、それは、細胞の種類、生じる NO と活性酸素種のバランス、そして炎症反応の段階、そして種などにより変わってくるものと考えられる。今回我々は、LPS を野生型 (wild-type) と NOS2 欠損マウス (NOS2^{-/-}) に経鼻投与することで、肺に局限した急性肺炎モデルを作成し、種々の

炎症パラメーターの比較、ひいては、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて包括的遺伝子発現プロフィールの比較検討を行ない、肺の急性炎症病態における NO の役割を検討した。

実験方法

1) LPS 点鼻吸入急性肺炎モデル

雄 (25-30 g) の野生型 C57BL/6 マウス (n=19) と NOS2^{-/-} マウス (n=19) に 40 μ l の LPS (250 μ g/ml; *E. coli* 055: B5) を点鼻投与 (350 μ g/kg) した。24 時間後に sacrifice し、BAL を行った。細胞分画をカウントし、上清液 (BALF) 中の蛋白濃度、各種炎症性サイトカイン濃度 (ELISA)、MMP-9 活性 (zymogram)、NO₂⁻/NO₃⁻ 濃度 (O₃ 化学発光法) を測定した。一部は濃縮したのち pronase 処理し、ニトロチロシン量を測定した (ECD-HPLC 法)。右肺は固定し、組織学的に検討した。左肺から total RNA を抽出し、RT-PCR (NOS2, MMP-9) やオリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析を行った。

2) オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析

野生型マウスと NOS2^{-/-} マウスのそれぞれコントロール群と LPS 投与群、計 4 群において、等量の total RNA を 6 匹分プールし、first strand cDNA, second strand cDNA, biotin-labeled cRNA の順に作成、フラグメント化したのち、Murine Genome U74Av2 Gene-Chip[®] array (Affymetrix) に hybridize した。読み取ったデータは Microarray Suite 5.0 software にて解析し、mRNA の発現量 (expression value) を求めた。4 群間の発現パターンを D-chip program を用いてクラスター分析した。

結 果

野生型マウスにおいては LPS 点鼻投与により肺組織中の NOS2 mRNA の誘導と BALF 中の NO₂⁻/NO₃⁻ の産生を認め、一方 NOS2^{-/-} マウスにおいては認めなかった (not shown)。LPS 投与により組織学的に肺胞壁および気腔内に斑状に分布する好中球浸潤を主体とする急性肺傷害が投与後 24 時間をピークに惹起された (図 1-A)。BAL では、好中球の著明な増加をいずれのマウスにおいても認めたが、NOS2^{-/-} マウスにおいては野生型マウスに比べ軽度であった。肺胞

¹ 熊本大学大学院 呼吸器病態学分野

² University of California Davis

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

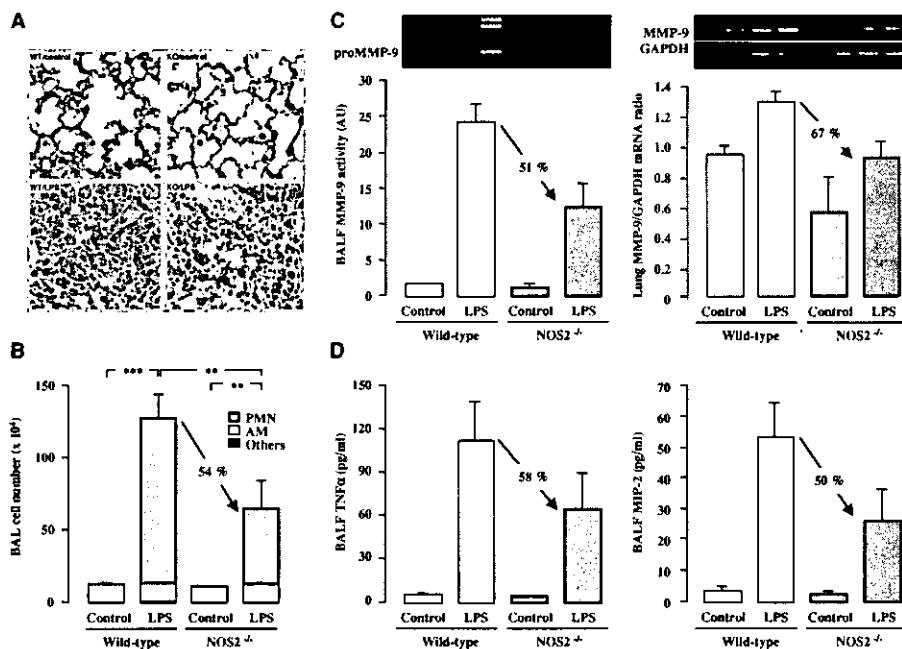


図 1 LPS-induced acute lung inflammation and injury in both wild-type and NOS2^{-/-} mice. (A) Histopathological findings of LPS-induced acute lung inflammation by light microscopy (HE-stained sections). (B) Differential cell analysis in lung lavage fluids obtained 24 hrs after instillation of LPS or PBS (control). Significantly different from control (day zero): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (C) Analysis of MMP-9 activities in BAL fluids and mRNA levels in lung tissues from mice treated with LPS or PBS (control). (D) Analysis of TNF α and MIP-2 levels in BAL fluids from mice treated with LPS or PBS (control).

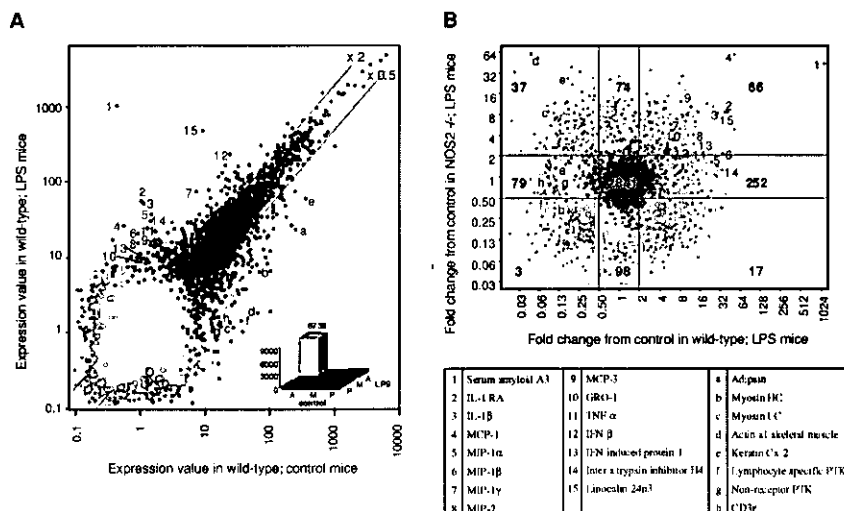


図 2 Global gene expression analysis of lung tissues by oligonucleotide microarrays. Expression values of the 12451 genes included in the U74Av2 GeneChip[®] were plotted to compare wild-type control and LPS-treated mice (A). According to the detection calls (A, M, P), genes with the call combination of AA were displayed in white, combination of PP were in light grey, and other 7 combinations (MA, AM, MP, PM, MM, AP, PA) were in dark grey. (B) Fold change of the expression value in LPS treated mice compared to control were plotted for wild-type and NOS2^{-/-} mice, with fold changes between 0.5 and 2 considered to be not significant. The number of genes in each section are listed (excluding genes with AA calls). In each panel, "highly induced" (fold change > 8) or "suppressed" (fold change < 0.125) genes in response to LPS are labeled # 1-15 and # a-h, respectively.

マクロファージの数は変化を認めなかった (図 1-B)。肺傷害において重要とされる matrix metalloproteinase (MMP)-9 は、BALF 中の活性および肺組織中の mRNA 量いずれも LPS により増加し、さらに BALF 中の TNF α や MIP-2 の量もまた、LPS により著明に

増加を認めた。興味あることにこれらの反応は、NOS2^{-/-} マウスにおいては野生型マウスに比べいずれも軽度であった (図 1-C, D)。また、BAL 蛋白においては、RNS の指標であるニトロチロシンの生成を HPLC にて証明した (not shown)。以上、NOS2^{-/-} マ

ウスにおいては炎症反応が全体的に軽度であるという結果から、NOはこのモデルにおいては炎症反応を促進している可能性が示唆され、このことを、確認するためにオリゴヌクレオチドマイクロアレイによる包括的遺伝子発現解析を行った。図2-Aに野生型マウスにおける結果を示す。コントロール群、LPS投与群いずれにおいても有意に発現している遺伝子は赤の点で、いずれにおいても発現していない遺伝子は黄の点で、そして一方の群でのみ発現している遺伝子を青の点で示した。12451個の遺伝子のうち、298個(2.4%)の遺伝子がLPSにて2倍以上に誘導され、227個(1.8%)の遺伝子がLPSにて1/2倍以下に抑制された(図2-A)。8倍以上に誘導されたものには、TNF α 、IL-1 β といった炎症性サイトカインや、MCP-1、MIP-2といったケモカインなどの蛋白が含まれ、その多くは細胞外蛋白であった。一方、1/8以下に抑制されたものには、アクチン、ミオシン、ケラチンといった細胞骨格蛋白やある種のチロシンキナーゼといった情報伝

達に参与する蛋白が含まれ、その多くは細胞内蛋白であった。NOS2^{-/-}マウスにおいても同様の傾向であった。両群を比較するため、LPS投与によるmRNAの発現量の変化率をプロットしてみた(図2-B)。少なくとも一方の群で有意に発現している遺伝子(赤、青)は、3,467個と全体の27.8%で、その大部分(2,841個; 81.9%)はどちらのマウスにおいてもLPSにより影響を受けなかった。66個(0.5%)の遺伝子のみが、両群においてLPSにて誘導され、その発現量の平均値は、NOS2^{-/-}マウスにおいて、その程度は低かった(野生型; 57.1 vs NOS2^{-/-}マウス; 35.9)。4群間の遺伝子発現のパターンをD-chip programを用いてクラスター分析したところ、7つに分類された(図3-A)。このうち、クラスターB1は、いずれのマウスにおいてもLPSにより誘導されるが、その程度がNOS2^{-/-}マウスにて低値である遺伝子群で、この中には種々の炎症性サイトカイン、ケモカイン、ストレス蛋白、CD14などが含まれており、その多くは細胞外蛋白であった(図3-

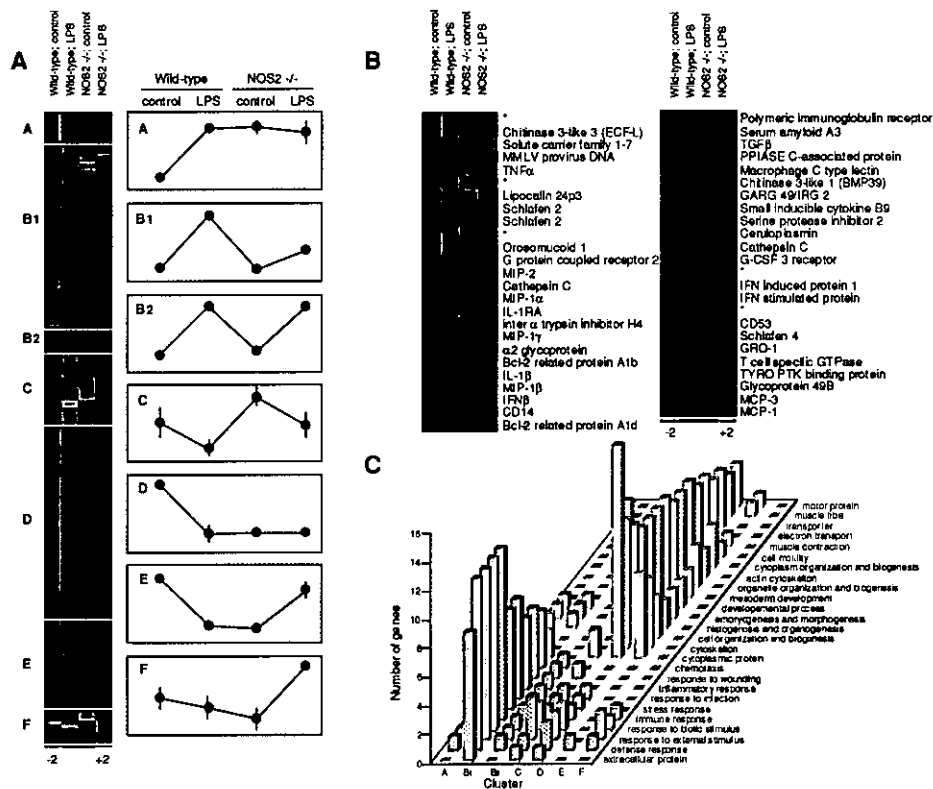


図3 Functional clustering analysis of gene expression data. (A) Cluster analysis was performed using the D-Chip program. Genes that were present at higher levels in the examined group are shown in progressively brighter shapes of red, and genes that were present at lower levels are shown in progressively brighter shapes of green. Seven distinct clusters (A, B1, B2, C, D, E, and F) were defined according to the expression pattern in the examined groups, and the average expression values are plotted in the right panels. (B) Enlarged display of Cluster B1 from panel A, including the corresponding gene name. (C) The relationship between gene clusters and functional category classification, based on the NCBI LocusLink database and GeneOntology terms. Gene numbers included in each functional category were determined for each cluster.

B, C)。一方クラスター D, E はコントロール群において比較した場合, NOS2^{-/-} マウスにおいて発現が低い遺伝子群で, この中には細胞の運動, 恒常性の維持, エネルギー代謝に関与する遺伝子が多く含まれていて, その多くは細胞内蛋白であった (図 3-C)。

考 察

NO が肺の炎症病態を促進・増悪させるという報告はこれまでも LPS 腹腔内投与モデル⁴⁾, アレルギー性気道炎症モデル⁵⁾, オゾン肺傷害モデル⁶⁾, そしてシリカ肉芽腫モデル⁷⁾などで, 報告がみられる。この NO の pro-inflammatory な作用の発現機序として, 第一に, RNS の生成を介して, その直接的な酸化作用, そしてチロシン残基に対するニトロ化作用により種々の生理活性蛋白が機能障害を受け, 最終的には細胞が傷害されることが挙げられる。事実, 本モデルにおいても LPS 投与によりニトロチロシンが検出され, 肺局所において RNS が生成していたことが示唆される。今回我々は, このような NO/RNS による直接的な作用のみならず, NO が炎症に関連した遺伝子の発現を誘導する可能性を in vivo で明らかにするため, オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて包括的遺伝子発現解析を行った。その結果, 種々の炎症性サイトカイン, ケモカイン, ストレス蛋白, CD14 などが LPS により誘導され, その程度は NOS2^{-/-} マウスにおいて全般的に有意に低く, NO が炎症反応において情報伝達物質の一つとして役割を担っていることが明らかになった。その機序として, 第一に, LPS の認識において TLR4 と並んで重要とされる CD14 の発現量が NOS2^{-/-} マウスにおいて低値であるという結果は, この現象を説明し得る一つの知見と考えられる。次に, LPS による炎症反応において中心的なイベントの一つに NF- κ B の活性化が挙げられる⁸⁾。そして, NO が, おそらく RNS の生成を介して NF- κ B の活性化に関与することは, 肺胞マクロファージや末梢血単球その他の細胞において報告されている¹⁰⁾。従って, NOS2^{-/-} マウスにおいて炎症反応が軽度である理由の一つとして, RNS の生成量が低いため NF- κ B の活性化が低いことが第二の機序として考えられる。さらに, LPS に対する反応性の差違は, コントロール状態での何らかの遺伝子の発現量の違いに基づいている可能性も考える必要がある。その意味で, コント

ロールでの発現量が NOS2^{-/-} マウスにおいて低値であるクラスター D, E は大変興味深い。このクラスターに含まれる遺伝子には, 細胞骨格蛋白 (アクチン, ミオシン, ケラチンなど) が含まれている。このことが何を意味するのかよく分からないが, 細胞骨格蛋白は細胞の運動や増殖のみならず細胞内情報伝達物質の移動に関与している可能性もあり, 今後解析していかなければならない。その他, このクラスターには, IL-1 receptor associated kinase (IRAK), lymphocyte-specific PTK (p56^{Lck}) など炎症反応における情報伝達に重要な因子も含まれており, 興味深い¹⁰⁾。

結 論

NOS2 由来の NO は, LPS による急性炎症を促進的に調節する炎症メディエーターである可能性が示唆された。このことは NO が自然免疫において重要な役割を演じる一方, 組織傷害にも関与する二面性を有していることを意味しており, 従って NO 生成の組織特異的な, あるいは炎症の段階に応じた適切な制御が, 肺の炎症病態の新たな治療戦略として今後期待される。

参考文献

- 1) Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, and Hobbs AJ. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol* 166: 3873-81, 2001.
- 2) Marshall HE, and Stamler JS. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 40: 1688-93, 2001.
- 3) Okamoto T, Valacchi G, Gohil K, Akaike T, and van der Vliet A. S-nitrosothiols inhibit cytokine-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 463-73, 2002.
- 4) Kristof AS, Goldberg P, Laubach V, and Hussain SN. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1883-9, 1998.
- 5) Xiong Y, Karupiah G, Hogan SP, Foster PS, and

- Ramsay AJ. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. *J Immunol* 162: 445-52, 1999.
- 6) Fakhrzadeh L, Laskin JD, and Laskin DL. Deficiency in inducible nitric oxide synthase protects mice from ozone-induced lung inflammation and tissue injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 413-9, 2002.
- 7) Srivastava KD, Rom WN, Jagirdar J, Yie TA, Gordon T, and Tchou-Wong KM. Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 527-33, 2002.
- 8) Poynter ME, Irvin CG, and Janssen-Heininger YM. A prominent role for airway epithelial NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation. *J Immunol* 170: 6257-65, 2003.
- 9) Lander HM, Sehajpal P, Levine DM, and Novogrodsky A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol* 150: 1509-16, 1993.
- 10) Okamoto T, Gohil K, Finkelstein EI, Bove P, Akaike T, and Van Der Vliet A. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L198-209, 2004.

ブレオマイシン誘発肺線維症モデルにおける分子標的 治療薬 Imatinib (Gleevec) の抗線維化効果

西岡 安彦¹ 青野 純典¹ 上原 久典²
泉 啓介² 曾根 三郎^{1*}

Imatinib は CML の治療薬として知られているが、PDGFR リン酸化阻害作用を有し、肺線維芽細胞増殖抑制による抗線維化作用が期待できる。ブレオマイシン肺線維症モデルを用いてその抗線維化作用について検討した。ブレオマイシンを持続注入用ポンプを用いて C57/BL6 マウスに持続皮下投与を行い、BLM 投与開始日より連日 imatinib を腹腔内投与し 28 日後に sacrifice した。Sircol Collagen Assay による肺のコラーゲン定量と Ashcroft score を用いた肺線維化の定量化を行った。また、マウス肺線維芽細胞を用い imatinib の増殖抑制効果を 3H-TdR 取り込み試験を用いて測定し、さらに PDGFR のリン酸化阻害を immunoblot により検討した。imatinib は PDGF による肺線維芽細胞の増殖反応及び PDGFR のリン酸化を濃度依存性に抑制した。BLM 肺線維症モデルによる組織学的検討から imatinib 投与は BLM 投与により誘発される肺線維化を有意に抑制した。以上より肺線維症に対する抗線維化薬として imatinib の臨床応用の可能性が示唆された。

Anti-fibrotic effects of imatinib in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice

Yasuhiko Nishioka¹, Yoshinori Aono¹, Hisanori Uehara²
Keisuke Izumi², and Saburo Sone¹

¹Departments of Internal Medicine and Molecular Therapeutics, and

²Molecular and Environmental Pathology, Course of Medical Oncology,
University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and lethal pulmonary disorder. We examined the anti-fibrotic effects of imatinib using a bleomycin-induced lung fibrosis model in mice because imatinib is a specific inhibitor of tyrosine kinase in platelet-derived growth factor receptors (PDGFR). Imatinib significantly inhibited the growth of primary murine lung fibroblasts and the autophosphorylation of PDGFR- β induced by PDGF. Administration of imatinib prevented bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Analysis of bronchoalveolar lavage cells demonstrated that imatinib did not suppress early inflammation on day 7 and 14 caused by bleomycin, but clearly ameliorated subsequent fibrosis in the late stages. These results suggest that PDGF could be a critical growth factor in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, and that imatinib might be useful for the treatment of pulmonary fibrosis in humans.