

図1:
Histological appearance of carbon dust deposition (CDD) observed after hematoxylin-eosin staining in the “normal lung” area. (a) Peribronchiolovascular (BV) area under low power showing multiple black spots of CDD (arrows). The degree of CDD was considered to be Grade 3. (b) High-power view of the BV area showing features of CDD. CDD accumulated along the lymphatic ducts. The degree of CDD was considered to be Grade 3. (c) View of the septal (SP) area under low power showing a few black spots along the pleura (arrows). The degree of CDD was considered to be Grade 1.

葉が 0.00 ± 1.00 ，下葉が -0.14 ± 1.36 で，有意な差は見られなかった ($P=0.48$) [図2].

31人が喫煙歴，6人が職業的な粉塵曝露歴を有した．喫煙や粉塵曝露による影響を除去し，より正常状態に近い状態を検討するため，これらを排除した

状態で検討したが，BV-SPスコアは同様に，肺の上下で有意に差が見られた ($P < 0.01$ for both).

気腔内マクロファージのBV-SPスコアも，炭粉沈着と同様の傾向を示した．上肺野から採取した切片 (BV-SPスコア： 0.47 ± 0.98) は下肺野から採取し

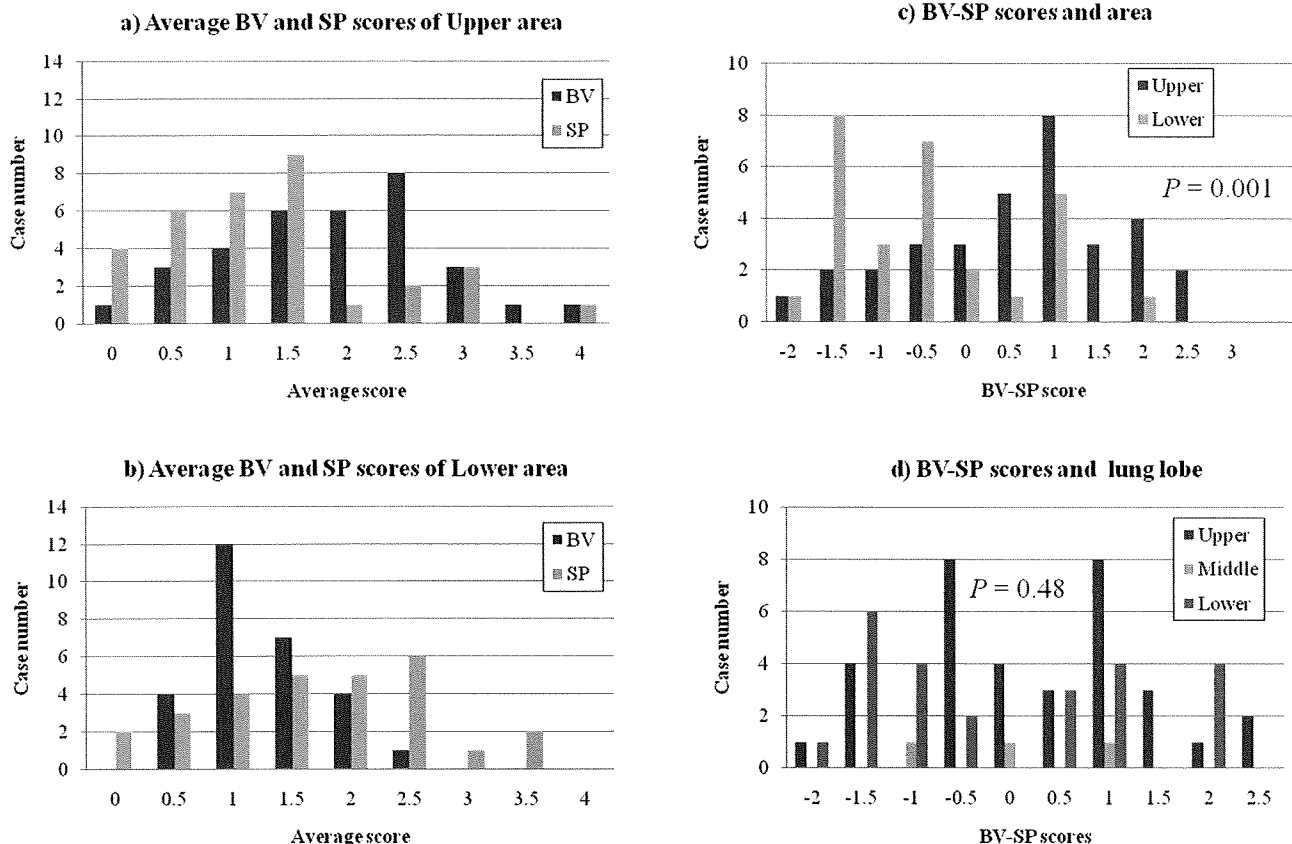


図2: Correlation between CDD scores and areas or lobes

(a) Average scores of each specimen obtained from the upper area. (b) Average scores of each specimen obtained from the lower area. (c) BV-SP* scores of both areas. A high BV-SP score was considered to be an indicator of predominance of the peribronchiolovascular (BV) route. Specimens from the lower area tended to show a negative score and those from the upper area tended to show a positive score. (d) Unlike (c), no specific association is seen between the lobes.

* BV-SP: peribronchiolovascular areas (BV)-subpleural/intrapleural or septal areas (SP)

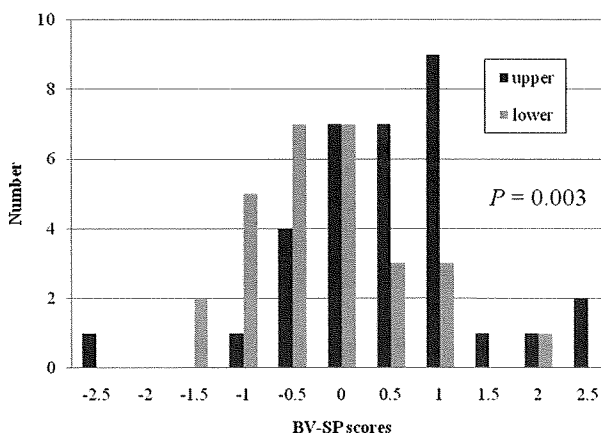


図3: Correlation between AM BV-SP scores and Areas

BV-SP scores of alveolar macrophage (AM) in both areas. Specimens from the lower area showed a negative score and those from the upper area showed a positive score.

た切片(BV-SPスコア: -0.17 ± 0.82)に比し, 有意に大きなスコアを呈した($P = 0.003$). 肺葉間での比較では有意な差が見られなかった($P = 0.98$) [図3].

正常背景肺に見られたその他の非特異的組織学的

所見を Table 2 に示す. これらの所見はいずれも微細で incidental なものと考えたが, 肺癌との関連性ははっきりしない. 所見としては小葉中心性肺気腫, 小さな線維性癒痕, PBM, dust macule の頻度が

Table 2. Incidental histological findings

	Lung lobe			Area			
	Upper (n = 34)	Middle (n = 3)	Lower (n = 24)	Upper (n = 33)	Lower (n = 28)		
Bronchiole							
Peribronchiolar metaplasia	7	1	11	N.S.	10	9	N.S.
Macrophage accumulation	5	2	8	N.S.	7	8	N.S.
Cellular bronchiolitis	7	0	3	N.S.	4	6	N.S.
Constrictive change	3	1	6	N.S.	3	7	N.S.
Dilatation	10	1	2	N.S.	8	5	N.S.
Parenchyma/Interstitium							
Centrilobular emphysema	26	1	16	N.S.	24	19	N.S.
Bulla	4	0	4	N.A.	5	3	N.S.
Peripheral fibrosis	15	2	10	N.S.	13	14	N.S.
OP focus	2	0	3	N.A.	2	3	N.S.
Dust macules	9	1	6	N.S.	12	4	N.S.
Tiny focus of interstitial inflammation	3	1	4	N.S.	1	7	0.019
Fibrotic scar	2	0	0	N.A.	2	0	N.S.
Smooth muscle nodule	4	1	3	N.S.	3	5	N.S.
Granuloma	3	0	5	N.S.	2	6	N.S.
Minute meningothelial like nodule	2	1	1	N.S.	2	2	N.S.

N.S.: No significant difference was seen. N.A.: No statistical analysis was performed.

All findings were scant and did not reach the pathological degree.

高かった。また、検討した所見のうち、微小な間質の炎症性病変のみが有意に差を持って、下肺野優位に認められた ($P = 0.019$)。いずれの病変も炭粉沈着と明らかな相関は見られなかった。

D. 考 察

本研究の目的は肺の上下において、リンパ路に沿った吸入物質沈着の二次小葉内分布に違いがあるかを検討することであり、びまん性肺疾患の病理学的・病因論的な成り立ちを理解するのにつながると考えられた。上肺野から採取された切片では下肺野からの切片に比し、有意に高いBV-SPスコアが観察され、炭粉沈着および気腔内マクロファージの分布は肺の上下で異なることが示された。また、この結果より、肺の主たるリンパ路は頭尾方向における位置関係によって異なり、肺葉にはよらないことが推察された。

2002年のATS/ERS consensus meeting以降、典型的なUIP/IPFを除く間質性肺炎の診断は外科的肺生検をもとに、臨床・画像・病理学の総合的検討に基づきなされるよう推奨されている。外科的肺生検の組織学的診断においては、病因論的背景を推察することがしばしば求められるものの、困難なのが現実である。所見の小葉内分布の違いを頭尾方向の位置関係を踏まえて検討することは、疾患の病因を予想するのに役立つ可能性もある。つまり、生検部位を選ぶ際には、単に異なる肺葉から採取するというのではなく、上肺野および下肺野から採取するというよ

うに、頭尾方向での位置関係の異なる部位から採取するほうが望ましいと考えられる。

FlahertyらはUIPにおける組織学的所見の多様性を示し、discordant UIPという概念を提示した。彼らの言ったものは、複数のlobeから採取されたVATS検体を検討すると、lobeによって異なる組織パターンを呈する症例があるというものであったが、これも実はlobeというよりareaが関与している可能性がある。

我々の研究の問題点の一つは、動的状態を観察したのではなく、既に切除された組織を用いた研究ということである。強い炭粉沈着が大きなリンパ流を反映しているとは言えず、主たるリンパ路が肺の上下で実際に異なるかどうか、更なる研究が必要と考えられる。

また、今回我々は比較的正常と思われる組織を用いた検討を行ったが、実際に線維化などで構造改変のある状態、その他の病的状態において、リンパ流が同様の動きを呈するかは不明である。もし、改変した肺組織においても気腔内の病原物質が同様の動きをしたと仮定すれば、線維化病変境界部で目立った病変進行も説明がつくと思われる。更に、我々は担癌患者より正常肺組織のサンプルを採取しており、完全に正常な肺のサンプルということは出来ないかもしれない。

今回、我々は、水平断面における分布の違いについては検討を行っていない。肺は、頭尾方向ならず水平方向においても、複雑で不均一な血流分布を呈していることが知られており、水平断面における部

位においても病変分布に違いが出る可能性はあると考えられる。動物モデルを用いた研究を含め、更なる検討が必要と思われる。

E. 結 論

リンパ路に沿った吸入物質沈着は肺の上下で有意に異なる二次小葉内分布を呈した。上肺野から採取した切片では気管支血管束周囲，下肺野から採取した切片では小葉辺縁～胸膜に沿った分布傾向が見られた。気腔内マクロファージに関しても同様の傾向が見られた。なお，肺葉間での比較では有意な差は見られなかった。びまん性肺疾患の生検組織は，肺

の上下によって異なる二次小葉内分布を呈する可能性もあり，異なる肺葉からの採取というのみではなく，頭尾方向の位置関係を考慮して採取する必要もあると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

- A. 論文発表：投稿予定だが未
- B. 学会発表：2009年6月，Pulmonary pathology society の biennial meeting にて発表

Ⅲ. 基礎的研究

IPFにおける上皮細胞老化について

荒屋 潤 皆川 俊介 野尻さと子 弓野 陽子 小島 淳
沼田 尊功 原 弘道 河石 真 中山 勝敏 桑野 和善*

IPF肺では、肺胞構造改変領域を中心にsquamous metaplasiaやbronchiolizationなど上皮細胞の異常な再生を認め、これが肺の線維化に参与している可能性がある。加齢は特発性肺線維症(IPF)の重要な危険因子であり、replicativeな老化を制御するテロメア長の短縮がIPFの肺胞上皮細胞で報告されている。また肺線維化進展の中心的役割を果たすサイトカインであるtransforming growth factor (TGF)- β は上皮細胞に対して、replicative及びprematureな細胞老化を誘導する。近年細胞老化と関連するclass IIIのHDACであるsirtuin familyが同定され、そのうちSIRT6はDNA修復と関連し、ノックアウトマウスは早老症様の表現型を呈する。そこで我々はIPF肺では気道上皮細胞を含むアポトーシス抵抗性の再生上皮細胞が細胞老化を誘導され、異常なサイトカイン産生からepithelial-mesenchymal interactionにより線維芽細胞へ作用して肺線維化進展に寄与する可能性、さらにはSIRT6がTGF- β による老化誘導を制御する事によりその病態に参与する可能性を考え検討を行った。senescence associated β -galactosidase (SA- β -gal)染色及びp21発現からIPF肺では上皮細胞の老化亢進を認め、in vitroの検討からTGF- β が気道上皮細胞老化促進からinterleukin (IL)-1 β 分泌による異常なepithelial-mesenchymal interactionを介して線維化病態に参与する可能性と、SIRT6がその過程に抑制的に働かう事が考えられた。上皮細胞老化がIPFの病態に参与している可能性が示唆された。

Lung epithelial cell senescence in IPF

Jun Araya, Shunsuke Minagawa, Satoko Nojiri, Yoko Yumino, Jun Kojima, Takanori Numata,
Hiromichi Hara, Makoto Kawaishi, Katsutoshi Nakayama, and Kazuyoshi Kuwano.

Division of Respiratory medicine, Department of Internal medicine, The Jikei University School of Medicine

Aberrant re-epithelialization of remodeled airspaces is a prominent pathologic finding in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and is implicated in IPF pathogenesis. Recent studies suggest that epithelial senescence is a risk factor for development of IPF, indicating such aberrant re-epithelialization may be influenced by the acceleration of cellular senescence. Among the sirtuin family, SIRT6, a class III histone deacetylase (HDAC), has been demonstrated to antagonize senescence. We evaluated the senescence of bronchiolization in association with SIRT6 expression in IPF lung. Senescence associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining and immunohistochemical detection of p21 were performed to evaluate cellular senescence. As a model for TGF- β -induced senescence of abnormal re-epithelialization, we used primary human bronchial epithelial cells (HBEC). The changes of SIRT6, p21, and interleukin (IL)-1 β expression levels in HBEC and alpha-smooth muscle actin (α SMA) expression levels in fibroblasts were evaluated. In IPF lung samples an increase in markers of senescence and SIRT6 expression was found in the bronchial epithelial cells lining cystically remodeled airspaces. We found that TGF- β induced senescence in primary HBEC by increasing p21 expression, and while TGF- β also induced SIRT6, it was not sufficient to inhibit cellular senescence. However, overexpression of SIRT6 efficiently inhibited TGF- β -induced senescence via proteasomal degradation of p21. TGF- β -induced senescent HBECs secreted increased amounts of interleukin (IL)-1 β , which was sufficient to induce myofibroblast differentiation in fibroblasts. These findings suggest that accelerated epithelial senescence plays a role in IPF pathogenesis through perpetuating abnormal epithelial-mesenchymal interactions, which can be antagonized by SIRT6.

(はじめに)

特発性肺線維症(IPF)は病理学的にコラーゲンを中心とするextracellular matrix(ECM)の不規則な沈着に伴う嚢胞性の構造改変と、bronchiolizationやcuboidal metaplasiaなど異常な上皮化が特徴である。IPFは加齢とともにその頻度が増加する老化関連肺疾患といえる。事実IPFは50歳以上の患者に多く、加齢はその発症の最も重要なリスクファクターの一つとされている¹⁾。近年IPFの病態とテロメア機能との関連性が示唆されており、家族歴のあるIPF患者の8-15%にTelomeraseコンポーネントのhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT)及びhTRの遺伝子異常があり²⁾、さらに肺胞上皮細胞のテロメア長の短縮がIPFの危険因子である事が報告された³⁾。細胞老化は、細胞分裂によるテロメア長の短縮により増殖が制限される結果起こるreplicative senescenceと、酸化ストレスや過度の増殖刺激などにより誘導されるstress-induced premature senescenceに大きく分けられる⁴⁾。老化細胞は、不可逆性の細胞増殖の停止、アポトーシスへの抵抗性を示し、さらには種々の炎症性サイトカインやgrowth factorの過剰分泌はsenescence associated secretion phenotypeとされ、正常な治癒過程の遅延や、炎症惹起などにより種々の病態への関与が考えられている。

多機能サイトカインであるTransforming growth factor (TGF)- β はパラクライン、オートクラインファクターとして作用して、肺の発生においてだけでなく、創傷治癒、線維化病変の形成に重要な役割を果たしており、事実IPFでは、その線維化進展において中心的役割を果たしていると考えられている⁵⁾。TGF- β は上皮細胞に対してreplicative及びpremature senescenceを誘導する事が知られており、さらにTGF- β がその細胞内signal transducer proteinであるSmad3を介してtelomeraseのコンポーネントであるhTERT発現を抑制することが報告されている⁶⁾。これらの事はTGF- β が直接的な線維化促進作用だけでなく、上皮細胞の老化を介してIPF病態に関与している可能性を示唆している。

近年酵母の寿命延長に関わる因子として silent

information regulator 2 (Sir2) 遺伝子が同定され、哺乳類にも sirtuin family (SIRT1-7) として存在する事が示された。sirtuin familyはNAD依存性 histone deacetylase (HDAC)であり、histone及びp53やNF- κ Bなど転写因子の脱アセチル化により代謝、炎症、老化などの細胞機能を調整している⁷⁾。SIRT1,6のノックアウトマウスにおいて炎症や早老の表現型が認められており、COPD患者由来肺組織でのSIRT1の発現低下と炎症との関連性が明らかにされ、呼吸器病態への関与が示唆された⁸⁾。SIRT6には活性酸素(ROS)によるDNA傷害を修復するbase excision repair (BER)活性があり⁹⁾、replicative senescenceの制御機構であるtelomereの代謝と機能調整をする事がさらに報告された¹⁰⁾。しかしながらIPF含め肺の病態におけるSIRT6の役割はこれまで明らかになっていない。

今回我々は、IPF肺組織における上皮細胞の加速した老化。またTGF- β が肺上皮細胞に細胞老化を誘導し、その老化がSIRT6により制御されている可能性。さらに老化上皮細胞が上皮-間葉系細胞相互作用の観点から線維化進展に影響を与えている可能性を考え検討を行った。

(対象と方法)

東京慈恵会医科大学において施行された、肺癌手術検体の癌進展の認められない気道と肺の一部を使用した。(学内倫理委員会承認済み)

免疫組織学的検討：OCT compoundを用い肺組織凍結切片を作成し、免疫蛍光染色及び後述のsenescence associated(SA) β -galactosidase (gal)染色を行った。またホルマリン固定肺組織を用いて老化関連cyclin-dependent kinase inhibitorであるp21の免疫組織染色を行った。

細胞培養分離：肺がん手術検体の肺実質正常部位を約1~2mm程度の組織片とし、培養プレート上で培養した。約2週間程度で線維芽細胞の増殖が認められた。細胞は10%FCSを含むDMEMにて培養した。気道上皮細胞は肺がん手術検体の気管支より、蛋白分解酵素処理により分離した。分離した上皮細胞は10 μ g/mlのtype I collagenでコートした培養プレート上でbronchial epithelial growth medium (BEGM)にて継体培養した。

東京慈恵会医科大学呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

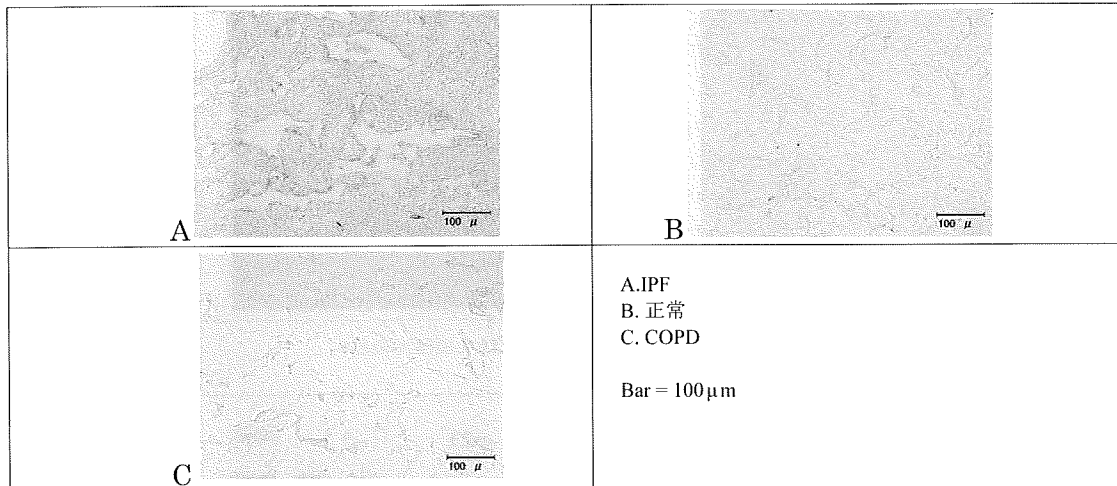


図1 IPF肺における上皮細胞老化(senescence associated β -galactosidase 染色)

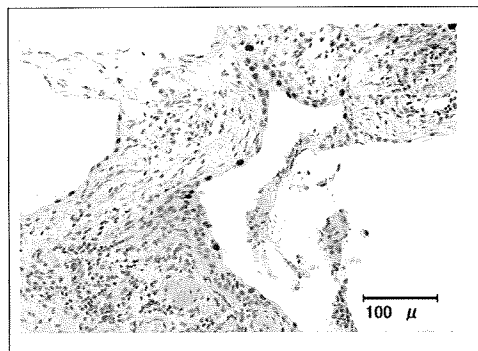


図2 IPF肺における上皮細胞老化(p21 免疫組織染色)

発現遺伝子導入による過剰発現と siRNA による knock down : SIRT6 wild type 発現プラスミド(Chua KF Stanford 大学より供与)及びhTERT 発現プラスミド, SIRT6 siRNA 及び p21 siRNA を Amaxa Neucleofector system を使用し遺伝子導入した.

遺伝子発現 : semiquantitative RT-PCRにより半定量的に行った.

蛋白発現 : Western blotting法により検討した.

細胞周期検討 : propidium iodide(PI)染色によるDNA含量の検討により行った. (flowcytometry法)

細胞老化の検討 : SA β -gal (β -galactosidase staining kit)染色で検討した.

(結 果)

1. IPF肺組織において上皮細胞の老化亢進を認める.

正常肺組織(6例, 平均62.7歳), COPD肺組織(6例,

平均66.3歳), IPF肺組織(6例, 平均64.8歳)肺組織の凍結切片を用いたSA β -gal染色では, IPF全例の肺の bronchiolization, cuboidal metaplasia, squamous metaplasia など内腔を覆う上皮細胞に染色を認めた(図1-A). 一方, 正常肺及びCOPD肺組織では上皮細胞に明らかな染色陽性は認めなかった(図1-B,C). また p21 免疫組織染色でも正常肺組織では染色を認めず, IPF肺組織では上皮細胞に陽性細胞を認めた(図2). IPF肺組織内で正常領域, 活動性のある線維化領域, 早期線維化巣, のう胞化した晚期線維化領域に分けて p21 の陽性率を半定量的に検討した. 正常及び完成された線維化領域ではほとんど染色を認めず, 一方活動性のある線維化領域, 早期線維化巣を覆う上皮細胞では20%以上に陽性細胞を認めた. また SIRT6 による免疫蛍光染色では同様に正常肺では染色を認めず, IPF肺組織では構造改変領域の内腔を覆う上皮細胞に強い染色を認めた(図3-A,B).

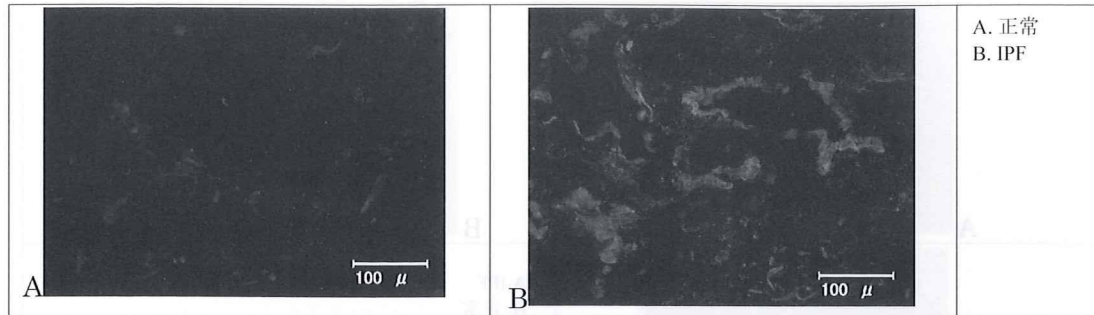


図3 IPF肺におけるSIRT6発現(SIRT6免疫蛍光染色)

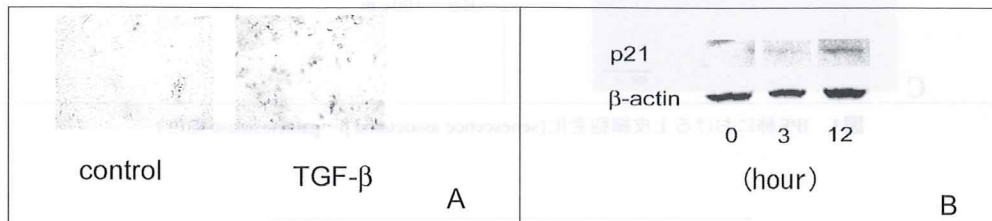


図4 TGF-βによる気道上皮細胞の老化誘導

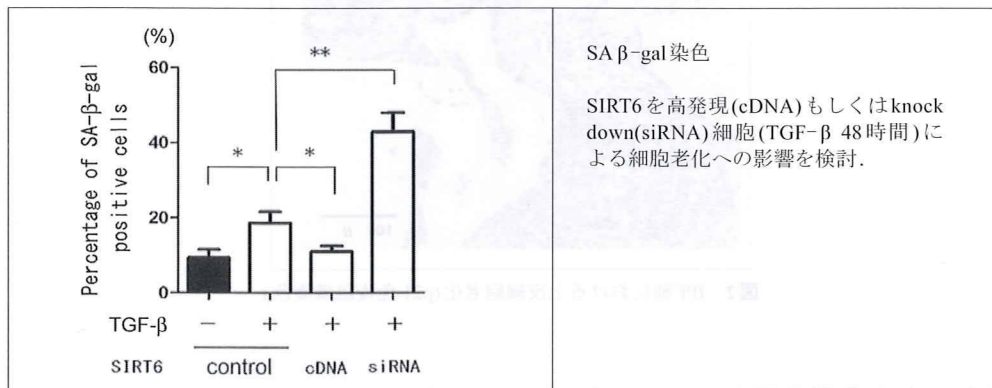


図5 SIRT6によるTGF-β誘導気道上皮細胞老化の抑制

2. TGF-βは気道上皮細胞にp21発現を介して老化を誘導する。

正常気道から分離培養した気道上皮細胞を、TGF-β (2ng/ml) で48時間刺激後に細胞老化をSA β-gal染色、p21発現及び細胞周期分析にて検討した。SA β-gal染色ではTGF-βは約50%の細胞に老化を誘導した(図4-A)。同時にp21の発現増加を認め、細胞周期分析でのG1/G0期の細胞分画が平均43.5%から平均55.2%に増加し細胞周期停止をきたしていると考えられ、さらにその後の48時間の培養でも平均57.3%であり、不可逆性変化と考えられた(図4-B)。またp21siRNAはTGF-βによる気道上皮細胞老化を抑制した。

3. SIRT6はTGF-βによる気道上皮細胞老化を制御する。

SIRT6の細胞老化に与える影響を明らかにする

ため、wild type SIRT6発現プラスミド及びSIRT6 siRNAを遺伝子導入し検討した。それぞれ効率よく発現が誘導またはknock downされた。さらにこれらの細胞でTGF-β.(2ng/ml) 48時間刺激後に細胞老化を検討した。SIRT6高発現細胞ではTGF-βによる老化誘導が抑制され、またknock down細胞では細胞老化の亢進を認めた。また同様にSIRT6高発現はp21発現を抑制し、逆にknock downはp21発現を亢進させた(図5)。

4. TGF-βにより老化が誘導された気道上皮細胞はIL-1β産生を介して筋線維芽細胞を誘導する。

TGF-βにより老化が誘導された気道上皮細胞ではIL-1β発現が亢進しており、これはSIRT6高発現による老化抑制により低下した。老化気道上皮細胞培養液(48時間培養)で線維芽細胞を刺激(48時間)したところ、線維芽細胞でα-smooth muscle actin (SMA)

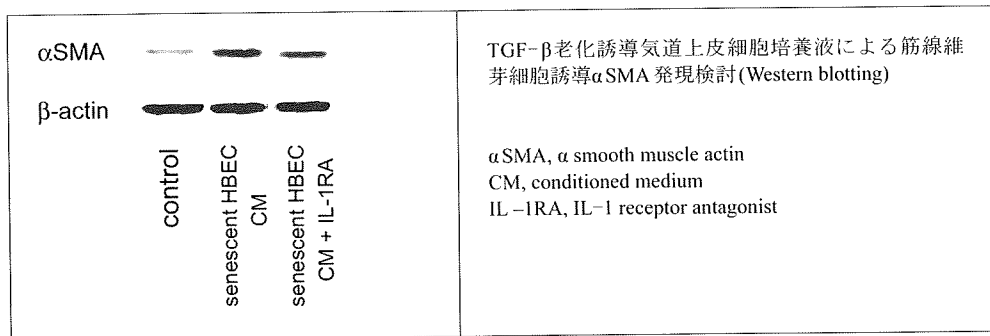


図6 TGF- β 老化誘導気道上皮細胞におけるIL-1 β 発現と筋線維芽細胞誘導

発現が亢進し、これはIL-1 receptor antagonistを培養液に加えることにより抑制された。(図6)

(考 察)

IPF肺組織の bronchiolization, cuboidal metaplasia, squamous metaplasia など内腔を覆う異常な上皮細胞に細胞老化の亢進を認め、p21陽性細胞の分布からはIPF組織内でも正常及び完成した線維化部位よりも、早期線維化巣を含む活動性の高い線維化病変を覆う上皮細胞での老化がより亢進していた。つまり、線維化病態進展の早期段階からの上皮細胞老化の病態への関与が考えられた。IPFの肺の肺胞内微小環境においてはTGF- β , Fas ligand, 活性酸素など、pro-apoptoticな刺激が豊富に存在し、正常な肺胞上皮細胞に対してapoptosisを誘導している^{11,12)}。そのため傷害部位を再上皮化する bronchiolization, cuboidal metaplasia, squamous metaplasiaなどの上皮細胞は相対的にapoptosis抵抗性である必要がある。apoptosis抵抗性上皮細胞による再上皮化後もpro-apoptoticな刺激が持続的に存在するため、結果的に細胞老化を誘導している可能性がある。事実今回我々の検討でも、肺胞上皮細胞と比べてapoptosis抵抗性である気道上皮細胞に対してTGF- β は細胞老化を誘導した。TGF- β は不活性型で存在し、その活性化機序が機能制御の上で重要であり、活性酸素はその活性化因子である。つまりIPF病態における過剰な活性酸素の存在はそれ自体、さらにはTGF- β の活性化を介して上皮細胞老化に関わる可能性がある¹³⁾。

我々は老化が誘導された上皮細胞が線維化進展に関与する可能性を、epithelial-mesenchymal interactionの観点から明らかにした。老化誘導され

た細胞は炎症性サイトカインやgrowth factorを過剰分泌することが知られており、事実我々がTGF- β により細胞老化を誘導した気道上皮細胞では代表的炎症性サイトカインであるIL-1 β 産生が亢進していた。またこのIL-1 β がパラクラインファクターとして作用して、線維芽細胞に筋線維芽細胞を誘導することがIL-1 receptor antagonistによる α SMA発現抑制から明らかとなった。パラクラインファクターを介するepithelial-mesenchymal interactionは正常な器官形成だけでなく、気道を含む呼吸器疾患においても重要な役割を果たすことが明らかとなっている。今後、老化を含めた上皮細胞のphenotypeが線維芽細胞に及ぼす影響をさらに詳細に検討する必要がある。

COPDでのSIRT1発現低下による炎症への影響以外はsirtuin familyの呼吸器病態への関与はほとんど明らかとなっていない⁸⁾。今回SIRT6がIPFの上皮細胞で高発現しており、TGF- β による気道上皮細胞老化誘導をp21のプロテアソームによる分解により細胞老化を制御している可能性が示唆された。細胞老化が腫瘍発生制御の機序の一つと考えられている点からは、細胞老化に対する治療は慎重な検討が必要である。しかしながらSIRT6が細胞老化の制御という点から、IPF病態理解のうえで重要な分子である可能性があり、その治療的な側面に関してもさらなる検討が必要であると考えている。

(結 論)

IPF肺組織ではbronchiolizationを含む異常な再生上皮細胞の細胞老化が亢進しており、epithelial-mesenchymal interactionにより線維化進展に寄与し、SIRT6が細胞老化制御によりその病態にかかわる可

能性が示唆された。今後、上皮細胞老化の線芽細胞に及ぼす影響と SIRT6 による細胞老化制御の機序に関してさらに詳細な検討を行う予定である。

参考文献

- 1) American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 646-64.
- 2) Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:7552-7.
- 3) Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, Danoff S, Su SC, Cogan JD, Vulto I, Xie M, Qi X, Tudor RM, Phillips JA 3rd, Lansdorp PM, Loyd JE, Armanios MY. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:13051-6.
- 4) Passos JF, Saretzki G, von Zglinicki T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 2007; 35:7505-13.
- 5) Sheppard D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3:413-7.
- 6) Li H, Xu D, Li J, Berndt MC, Liu JP. Transforming growth factor beta suppresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by Smad3 interactions with c-Myc and the hTERT gene. *J Biol Chem.* 2006; 281:25588-600.
- 7) Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 2006; 20:2913-21.
- 8) Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, Rahman I. SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177:861-70.
- 9) Mostoslavsky R, et. al.. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006;124:315-29.
- 10) Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TL, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature.* 2008; 27: 492-6.
- 11) Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, Yoshimi M, Nakamura N, Fujita M, Maeyama T, Hara N. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol* 2002; 168(12): 6470-8.
- 12) Cantin AM, North SL, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Oxidant-mediated Epithelial Cell Injury in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Clin Invest* 1987; 79: 1665-1673.
- 13) Pociask DA, Sime PJ, Brody AR. Asbestos-derived reactive oxygen species activate TGF-beta1. *Lab Invest* 2004; 84(8): 1013-23.

ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける PDGF レセプター α , β 阻害抗体の抗線維化効果

西岡 安彦* 岸 昌美 青野 純典 東 桃代 曾根 三郎

我々は、がん分子標的治療薬であるイマチニブの肺線維症抑制効果について報告してきた。イマチニブはPDGFレセプター(PDGFR)のリン酸化阻害を介してブレオマイシンモデルマウスに対する抗線維化効果を発揮するが、イマチニブの抗線維化効果におけるPDGFR- α , β の個々の役割は不明な点が多い。最近の報告ではイマチニブのIPFに対する治療効果は証明されず、PDGFRを介した治療戦略をIPFに応用するには更なる検討が必要と考えられる。今回我々は肺線維症におけるPDGFR- α , β の役割を明らかにするため、PDGFR- α , β に対する特異的阻害抗体を用いて、ブレオマイシンモデルマウスにおける抗線維化効果について検討した。まず、マウス肺線維芽細胞のPDGFR- α , β 発現をフローサイトメトリーで確認した。マウス肺線維芽細胞を培養し、PDGFR- α , β の特異的阻害抗体であるAPA5, APB5がPDGF-AA, BBの増殖作用を抑制することを確認した。次にブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを用いて、APA5, APB5の抗線維化効果を検証した。その結果、マウス肺線維芽細胞にPDGFR- α , β は同等に発現していた。マウス肺線維芽細胞のPDGF-AA, BBによる増殖作用をAPA5, APB5は特異的に抑制した。ブレオマイシン誘発肺線維症は、APB5投与群のみで有意に抑制された。肺線維化形成にはPDGFR- β がより重要な役割を果たしていることが推測され、抗PDGFR- β 抗体による抗線維化療法の可能性が示唆された。

Anifibrotic Effects of Blocking Antibody Specific for PDGF Receptor- α or β on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice

Yasuhiko Nishioka, Masami Kishi, Momoyo Azuma, Yoshinori Aono, and Saburo Sone

Department of Respiratory Medicine and Rheumatology The University of Tokushima Graduate School

Idiopathic pulmonary fibrosis is a progressive and lethal pulmonary disorder. We reported that imatinib prevented bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis in mice via inhibiting phosphorylation of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). Since imatinib can inhibit both PDGFR- α and β , the role of inhibition of PDGFR- α or β in antifibrotic effects of imatinib is still unclear. To clarify the role of each PDGFR, we used the blocking antibody specific for PDGFR- α or β in BLM-induced pulmonary fibrosis model in mice. First we confirmed the expression of PDGFRs in murine lung fibroblasts by a flow cytometric analysis. Next we examined inhibitory effects of APA5 and APB5 on the growth of lung fibroblasts stimulated with PDGF by using ^3H -thymidine incorporation assay. Then we investigated whether APA5 and APB5 could prevent lung fibrosis in BLM-model of C57BL/6 mice. Mice were treated i.p. with 1mg of APA5 or APB5 every other day, and assessed pulmonary fibrosis by Ashcroft score on day28.

Expressions of PDGFR- α and β in murine lung fibroblasts were similar. Addition of APA5 and APB5 inhibited the growth of fibroblasts induced by PDGF-AA and BB, respectively. APB5 prevented the growth of fibroblasts more strongly than APA5. In addition, administration of APB5 was more effective in inhibiting pulmonary fibrosis than APA5 in BLM-induced model. It is likely that the PDGFR- α and β play a different role in BLM-induced pulmonary fibrosis in mice. The specific approach using the blocking antibody for PDGFR- β might be more useful for treatment of pulmonary fibrosis.

はじめに

特発性肺線維症は慢性進行性の肺疾患であり、いまだ生命予後を延長する治療法が確立されておらず新規治療法の開発が望まれている。我々は血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor : PDGF)に注目し、PDGFR阻害薬であるイマチニブの肺線維症における抗線維化効果について検討してきた¹⁾。その結果、線維化後期ではイマチニブによる抗線維化効果がAGPにより阻害されるが、マクロライドとの併用によりAGPの抑制効果が解除され、抗線維化効果が増強すること、線維化早期においてもイマチニブはPDGFR阻害作用を介してfibrocyteの遊走抑制作用を示し、抗線維化効果を発揮することを報告した^{2, 3)}。

一方、肺線維症においてPDGFR- α , β のいずれがより重要な役割を果たしているかは明らかでない。肺胞上皮にもPDGFR- α が発現していることが報告されており⁴⁾、肺胞上皮の再生・増殖においてもPDGFR- α は重要な役割を果たしている可能性が示唆される。以上から、今回我々は肺線維症におけるPDGFR- α , β の役割をより詳細に検討するため、PDGFR- α , β に特異的な阻害抗体を用いてブレオマイシン肺線維症モデルにおける抗線維化効果を検討した。

方 法

PDGFR- α , β の特異的阻害抗体APA5, APB5(理化学研究所 西川先生より供与)を使用した⁵⁾。APA5, APB5はハイブリドーマ細胞の培養上清から硫酸沈殿あるいはProteinGカラムにより精製した。肺線維芽細胞のPDGFR- α , β の発現をフローサイトメトリーで確認した。マウス肺線維芽細胞を培養し、APA5, APB5がPDGFR- α , β のリン酸化阻害効果を持つことをWestern blottingで確認し、PDGF-AA, BBによる増殖作用を特異的に阻害することを³H-thymidine incorporation assayを用いて検証した。最後にブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを

用いて、APA5, APB5の抗線維化効果を比較した。モデルマウスは5週齢のC57/BL6マウスにブレオマイシン140mg/kgをAltzet Osmotic Minipumpを用いて約7日間かけて持続皮下投与することにより作成した。APA5, APB5は、1mgずつ隔日で腹腔内投与した。28日目にマウスをsacrificeし、HE染色による組織学的な線維化の評価(Ashcroft score)を行った。次にマウス肺胞上皮におけるPDGFRの発現を確認するため、PDGFR- α , β 抗体を用いた免疫組織染色を行った。さらに、上皮障害修復過程に与える影響を検討するため14日目の炎症期に肺胞洗浄を行いBALF中の細胞数を集計した。同時期に肺胞上皮において分裂期にある細胞数を確認するためKi67抗体を用いた免疫組織染色を実施した。

結 果

フローサイトメトリーによる解析から、C57BL/6由来およびCCL-206マウス肺線維芽細胞には、PDGFR- α , β が同等に発現していた(図1)。一方、PDGF-AA, BB(10ng/ml)はそれぞれPDGFR- α , β のリン酸化を誘導し、APA5およびAPB5 (10 μ g/ml)は、PDGFR- α , β のリン酸化を抑制した(図2)。次に、マウス肺線維芽細胞のPDGF-AA, BB(10ng/ml)による増殖作用に対するAPA5, APB5の効果を検討したところ、APA5, APB5はそれぞれ特異的にPDGF-AAおよびBBによる肺線維芽細胞の増殖を抑制した。APB5はAPA5より強く、用量依存的な抑制効果を示した(図3)。最後に、ブレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いて、APA5およびAPB5の抗線維化効果を検討した。肺線維症は、APB5の投与で有意に抑制されたが、APA5には抑制効果を認めなかった(図4, 5)。IPF肺およびブレオマイシンモデルマウスの肺において、PDGFR- α はより強く肺胞上皮細胞上に発現しており、PDGFR- β は主として間質に発現していることを免疫組織染色で確認した(図6)。炎症期のブレオマイシンモデルマウスにおいて、BALFを行い細胞数を集計したところ有意な差はなく、炎症の程度に違いは認めなかった(図7)。肺胞上皮細胞修復の過程にあると考えられる分裂期の細胞数を確認するためKi67染色を行ったところ、生食群と比較して、ブレオマイシン投与群では肺胞上皮細胞のKi67陽性細胞が増加してい

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
呼吸器・膠原病内科学分野

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

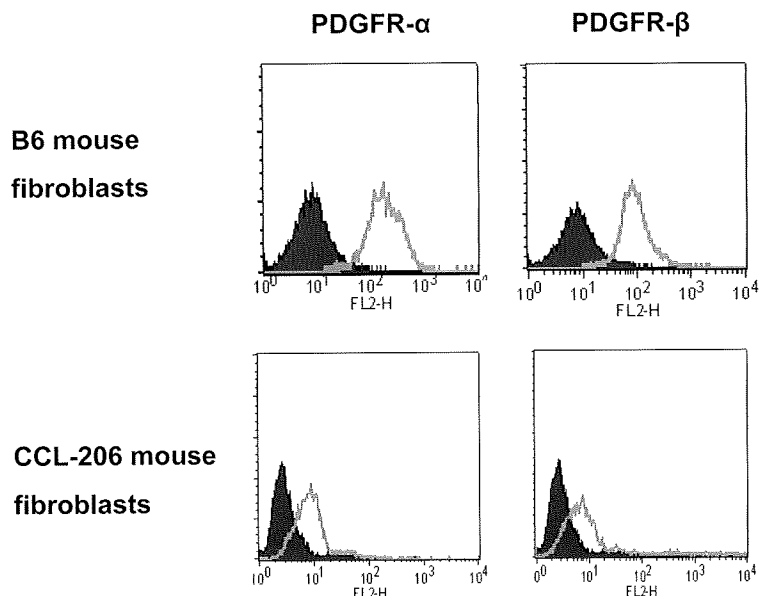


図1. マウス肺線維芽細胞におけるPDGFR- α , β の発現
C57/BL6, CCL-206マウス肺線維芽細胞のPDGFR- α , β の発現をフローサイトメトリーで確認した. いずれの細胞株においても, PDGFR- α , β は同等に発現していた.

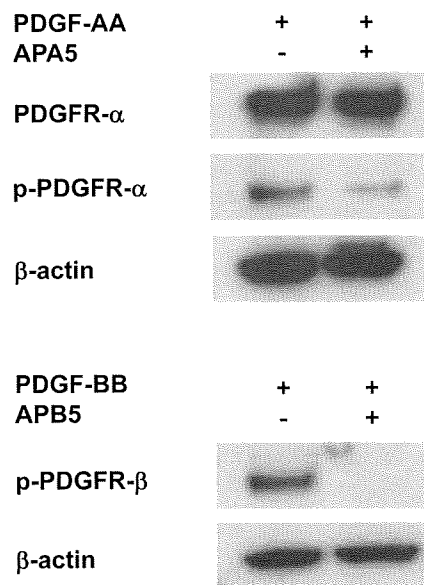


図2. APA5, APB5によるPDGFR- α , β のリン酸化阻害効果
APA5, APB5(10 μ g/ml)はPDGF-AA, BB(10ng/ml)によるPDGFR- α , β のリン酸化を抑制する効果があることを, Western blottingで確認した.

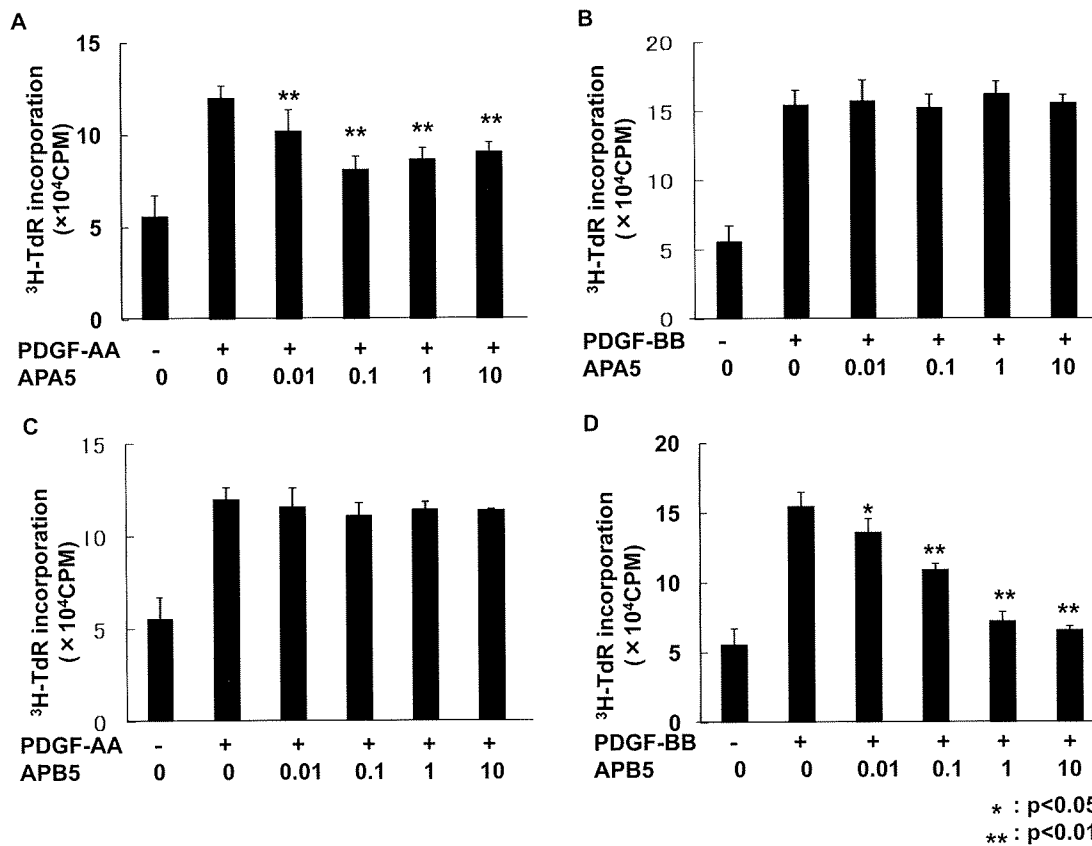


図3. APA5, APB5によるマウス肺線維芽細胞の増殖抑制効果
A: APA5はPDGF-AA (10ng/ml)による増殖作用を抑制した. B: APA5はPDGF-BBによる増殖作用を抑制しなかった. C: APB5はPDGF-AAによる増殖作用を抑制しなかった. D: APB5はPDGF-BB (10ng/ml)による増殖作用を容量依存的に抑制した.

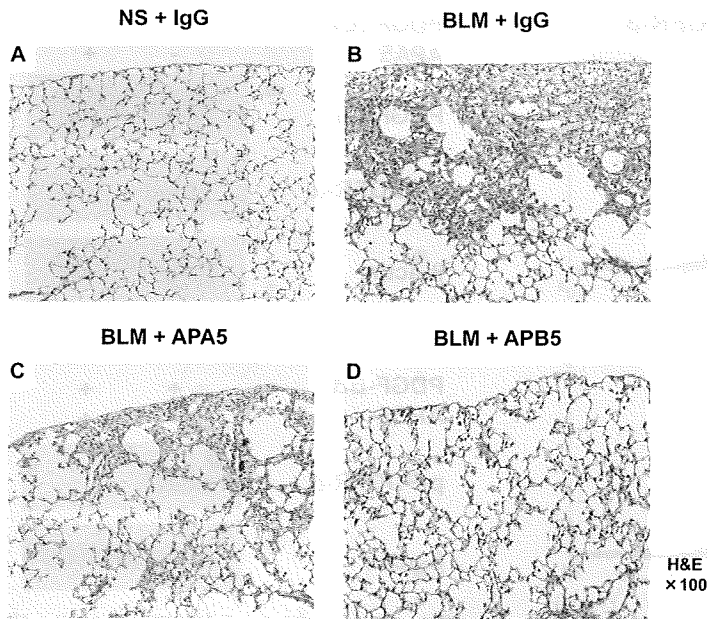


図4. プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおけるAPA5, APB5の肺線維化抑制効果
H&E染色

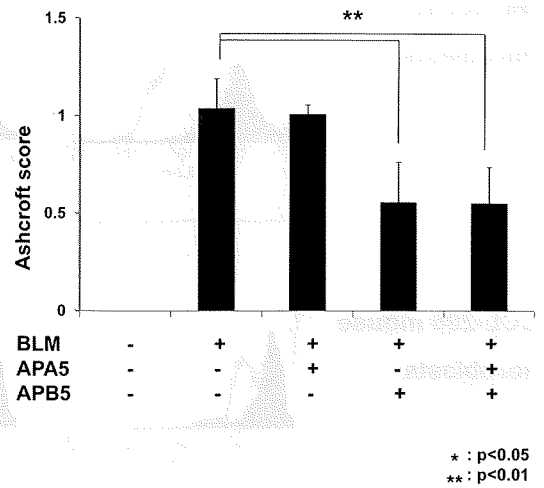


図5. プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおけるAPA5, APB5の肺線維化抑制効果
Ashcroft scoreはAPB5で有意に抑制されたが、APA5においては抑制されなかった。

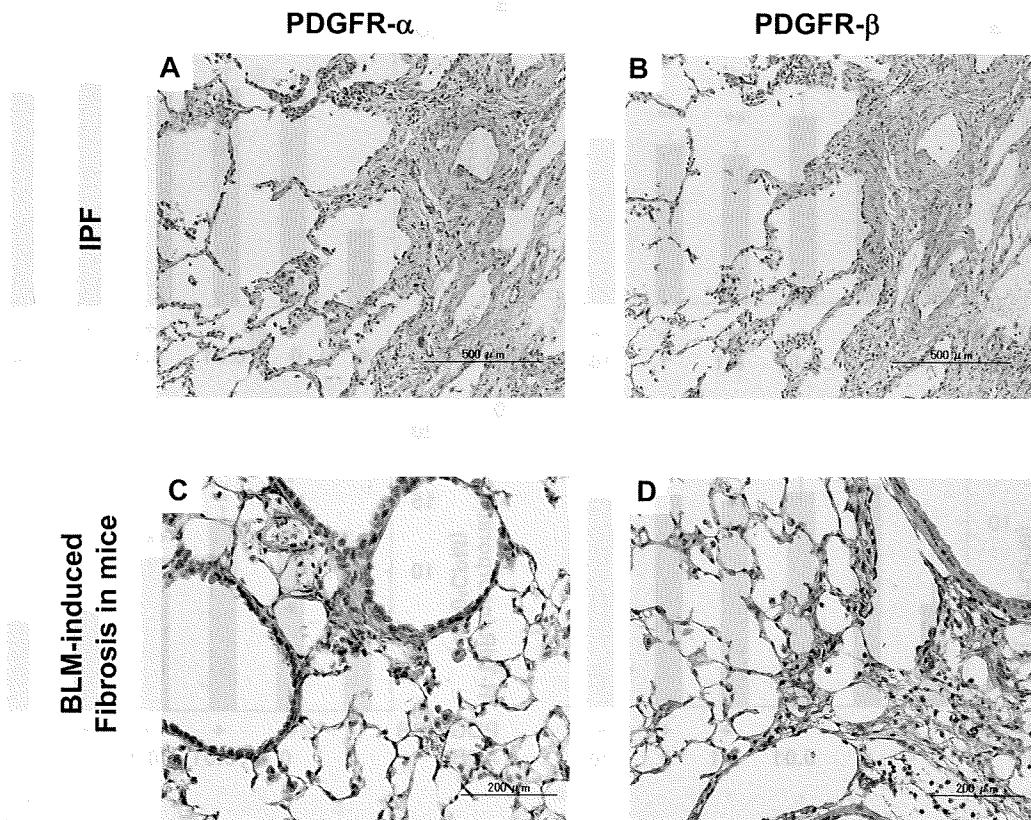


図6. IPF肺およびプレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスの肺におけるPDGFR- α , β の局在
IPF肺およびプレオマイシンモデルマウスの肺において、PDGFR- α はより強く肺上皮細胞上に発現しており、PDGFR- β は主として間質に発現していることを免疫組織染色で確認した。

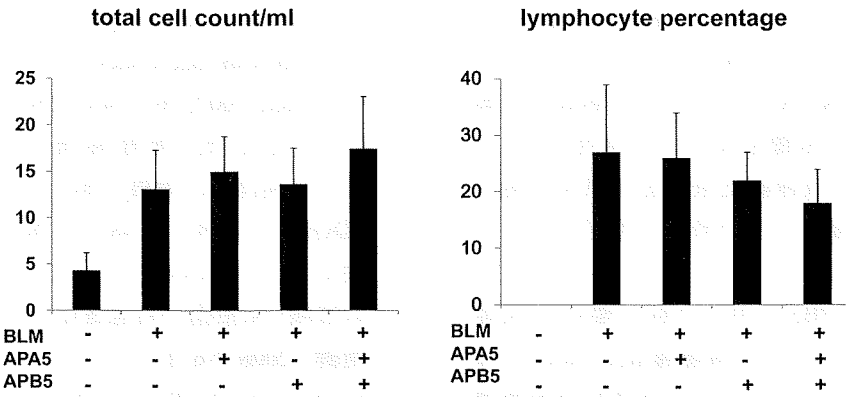


図7. プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスのBALF所見
プレオマイシンモデルマウスにおいてday14にBALFを行い細胞数を集計したところ有意な差は見られなかった。

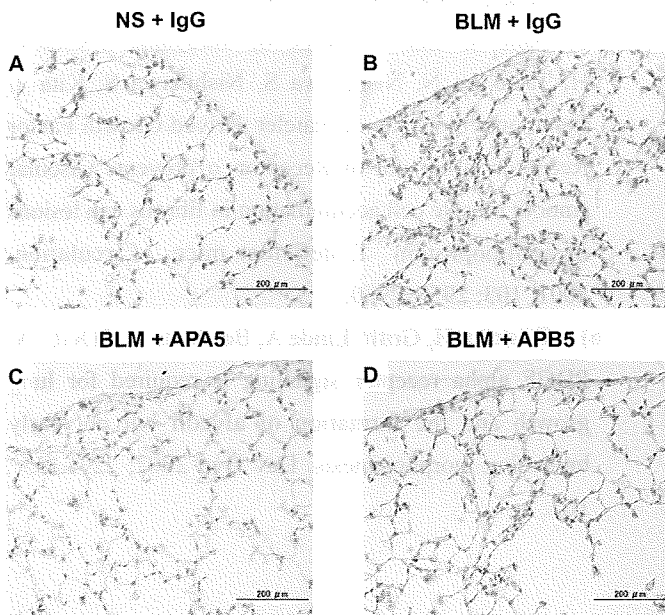


図8. プレオマイシン肺線維症モデルマウス肺のKi-67染色
A: Ns+IgG B: Bleomycin+IgG C: Bleomycin+APA5 D: Bleomycin+APB5 生食群と比較して、プレオマイシン投与群では肺胞上皮細胞のKi67陽性細胞が増加した。プレオマイシン単独投与群と比較して、APA投与群ではKi67陽性細胞が減少している傾向が認められたが、APB投与群ではそのような傾向は認められなかった。

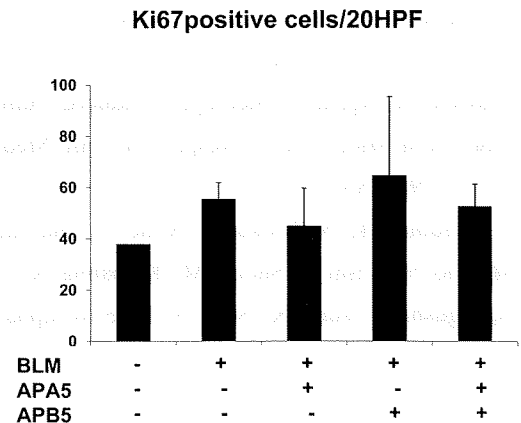


図9. プレオマイシン肺線維症モデルマウス肺のKi67染色(定量的評価)
20視野でKi67陽性の肺胞上皮細胞数を集計した。有意な差は確認できなかったが、プレオマイシン単独投与群と比較して、APA5投与群にて肺胞上皮のKi67陽性細胞数が減少している傾向が見られた。

た。プレオマイシン単独投与群と比較して、APA投与群ではKi67陽性細胞が減少している傾向が認められたが、APB投与群ではそのような傾向は認められなかった。20視野でKi67陽性の肺胞上皮細胞数を集計したところ、有意な差は確認できなかったが、プレオマイシン単独投与群と比較してAPA5投与群にて肺胞上皮のKi-67陽性細胞数が減少している傾向が見られた(図8, 9)。

考 察

胎生期におけるPDGFの役割には違いがあり、PDGF-AAをノックアウトしたマウスでは肺気腫様の変化が生じるが、PDGF-BBのノックアウトマウスでは肺形成に及ぼす効果は報告されていない⁶⁾。また、ヒト線維化肺で肺胞上皮細胞にPDGFR- α が優位に発現しているという報告があり、肺胞上皮傷害の修復過程にPDGFR- α が関与している可能性

がある⁶⁾。以上から、PDGFR- α とPDGFR- β では、肺線維症において異なる役割を果たしている可能性がある。一方、PDGFR- α の阻害は、肺胞上皮細胞の障害修復過程に影響を及ぼす可能性があり、PDGFRを標的とした抗線維化療法を考慮する場合PDGFR- α の働きを阻害しない形でのアプローチがより有効と考えられる。

今回の実験でもAPB5を用いた群で優位に線維化を抑制する傾向があり、肺線維化においてはPDGFR- β 単独を標的とする方がより良好な治療効果が期待できると考えられる。今後の課題として、抗PDGFR抗体を用いてPDGFR- α , β の肺胞上皮傷害への関与を検証していくとともに、PDGFR- β 単独を阻害する治療の有用性を確認していく予定である。

参考文献

- 1) Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Ugai M, Kishi J, Uehara H, Izumi K, Sone S. Imatinib as a Novel Antifibrotic Agent in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1279-1285.
- 2) Azuma M, Nishioka Y, Aono Y, Inayama M, Makino H, Kishi J, Shono M, Kinoshita K, Uehara H, Ogushi F, Izumi K, Sone S. Role of alpha1-acid glycoprotein in therapeutic antifibrotic effects of imatinib with macrolides in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 76: 1243-1250.
- 3) 西岡安彦, 青野純典, 東 桃代, 木下勝弘, 片岡昌美, 曾根三郎. 骨髄由来fibrocyteとPDGFシグナル. 第48回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム4 社会のニーズに応える呼吸器学の展開-肺損傷から線維化へのパラダイムとその制御-2008年6月
- 4) Kirsi V, Steffen O, Outi L, Kaisa S, Marjukka M, Vuokko L K Peroxiredoxin II expression and its association with oxidative stress and cell proliferation in human idiopathic pulmonary fibrosis. *J Histochem Cytochem*. 2008; 56: 951-959.
- 5) Sano H, Sudo T, Yokode M, Murayama T, Kataoka H, Takakura N, Nishikawa S, Nishikawa S, Kita T. Functional blockade of Platelet-Driven Growth Factor Receptor- β but not of Receptor- α prevents vascular smooth muscle cell accumulation in fibrous cap lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2001; 103: 2955-2960.
- 6) Boström H, Gritli-Linde A, Betsholtz C. PDGF-A/PDGF alpha-receptor signaling is required for lung growth and the formation of alveoli but not early branching morphogenesis. *Dev Dyn* 2002; 223: 155-162.

シリカによる慢性肺線維化モデル確立のための長期検討

長瀬 洋之 原 麻恵 鈴木 真穂 大田 健*

【目的】ヒトの特発性肺線維症は緩徐に進行する線維化を特徴とするが、病態解析のための動物モデルは十分には確立していない。シリカによる肺線維症モデルは、緩徐に進行する線維化を示す点で有用なモデルとなる可能性があるが、長期の時系列的な病態変化、特に局所液性因子の時間経過は十分に検討されていない。慢性肺線維化モデルを確立する目的で、シリカによる肺病変を24週にわたって観察した。

【方法】8週齢のC57/BL6jマウスにシリカ16mgを点鼻投与し、1, 2, 4, 8, 12, 24週後に気管支肺胞洗浄(BAL)及び肺組織採取を行った。

【結果】BAL総細胞数、好中球、リンパ球、マクロファージ数は1週にピークを迎え、以後消退したが、肺ハイドロキシプロリン量は4-8週後に、組織学的変化は12週後に遅れてピークを示した。Luminexによる、BALF上清の網羅的解析では、1週後にピークを示し速やかに低下する因子(IL-1 α , IL-6, 12, 17, TNF- α , IL-4, 5, G-CSF), 1週後にピークを示し、上昇が4-8週まで遷延する因子(IL-1 β , 13, GM-CSF, MCP-1, RANTES, MIP-1 α , β , KC)が多かったが、IL-9のみは24週後に遅れてピークを示した。

【結論】シリカによる肺病変は、炎症細胞浸潤、HOP増加、組織学的変化の順に生じ、慢性肺線維化モデルとしては、8週以降が最適解析時期と考えられた。BALF液性因子では、IL-9のみピークが遷延し、既報とあわせると後期に上昇して抗線維化に働くネガティブフィードバック機構を担っていることが想定された。

Long-term analysis of silica-induced lung inflammation and fibrosis in mouse.

Hiroyuki Nagase, Asae Hara, Maho Suzukawa, Ken Ohta

Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

【Background】 Although idiopathic pulmonary fibrosis is characterized by slowly progressive lung fibrosis, suitable animal model has not been fully established yet. Silica-induced lung fibrosis model has been reported to show progressive fibrosis which persists for long term, but precise time-course of the disease progression especially concerning local cytokines and chemokines has not been fully investigated. In this study, we investigated the time kinetics of silica-induced inflammation and fibrosis for up to 24 weeks to establish the chronic progressive lung fibrosis model.

【Methods】 We intranasally administered 16 mg of silica particles to 8-week-old male C57/BL6j mice, and bronchoalveolar lavage (BAL) was performed after 1, 2, 4, 8, 12 and 24 weeks and differential cell counts were determined. The protein levels of 17 cytokines and chemokines in BALF was analyzed by Luminex[®] system. Hydroxyproline content and lung histology was also analyzed.

【Results】 The maximum number of total cell counts, neutrophils, lymphocytes and macrophages in BALF was observed 1 week after silica administration. In contrast, the increase in hydroxyproline content and histological change occurred later and its peak was observed after 4-8 week and 12 week, respectively. When we measured the levels of cytokines and chemokines in BALF, the time course was different in various mediators and could be divided into three patterns. As for IL-1 α , IL-6, IL-12, IL-17, TNF- α , IL-4, IL-5 and G-CSF, the maximum concentration was transiently observed 1 week after administration and decreased rapidly. Concerning IL-1 β , IL-13, GM-CSF, MCP-1, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β and KC, the peak level was observed after 1 week and maintained the level up to 4-8 weeks after administration. In contrast, the level of IL-9 gradually increased and showed the highest level after 24 weeks.

【Conclusions】 Silica administration initially induced inflammatory cells accumulation and, in later phase, the increase in hydroxyproline content and histological change occurred. To analyze the chronic fibrotic change, the suitable period was suggested to be 8 weeks after silica administration. Among various cytokines in BALF, the peak level of IL-9 was observed in later phase and the specific role of IL-9 in fibrotic process was suggested.

はじめに

特発性肺線維症をはじめとする、肺線維化を来す疾患の病態にはいまだに不明な点が多く、その治療戦略も十分には確立していない。特に、臨床的に遭遇する肺線維症は、すでに線維化が進行した病期に至っている事が多く、病態の自然史については不明な点が多い。そこで、肺線維化のメカニズムを研究する目的で、肺線維症モデルが広く利用されている。なかでも、マウスに対してブレオマイシン投与を行う肺線維症モデルが広く利用されている。ブレオマイシンによる実験的肺線維化は投与後2週間程度でピークを迎えるとされ¹⁾、その後は自然修復に至ることが報告されている²⁾。一方、ヒトにおける肺線維症は、長期にわたって線維化が緩徐に進行する疾患であり、ブレオマイシンモデルの時間経過とは異なる部分がある。

他の肺線維症モデルとして、シリカ粒子による肺線維化が検討されている。シリカ粒子による線維化は12週にわたって持続する事が報告されており³⁾、長期に進行する線維化を検討するために適したモデルである可能性がある。しかしながら、シリカによる実験的肺線維症の詳細な時間経過、特に局所の液性因子の変動については十分に解析されていない。

そこで、今回我々は慢性進行性の肺線維化モデルを確立する目的で、シリカ点鼻投与による肺病変を24週にわたって観察した。特に気管支肺胞洗浄液中の液性因子を網羅的に検討し、その時間経過を明らかにする事も目的とした。

方 法

● 試薬と動物

8週齢雄のC57BL/6マウスを用いた (Japan SLC)。シリカ粒子 (石英標準試料/JAWE459/遊離珪酸分析用、日本作業環境測定協会、東京)は、生理食塩水に懸濁後、ultrasonicateしたものをを用いた。

● 実験プロトコル

C57BL/6マウスに対し、16 mgのシリカ粒子を単回点鼻し1, 2, 4, 8, 12, 24週後に解析した。評価項目

として、気管支肺胞洗浄液 (BALF)中の細胞数、細胞分画、BALF中サイトカイン・ケモカイン濃度を検討した。BALは、マウスの気管内に28 Gのカニューレを挿入し、生理食塩水0.7 mlを注入、回収することを繰り返し5 mlのBALFを採取し、遠心分離後、上清を-80°Cで保存した。凍結した上清はFreeze dry処置後に、測定時に10倍濃縮となるように、0.5% BSAを含むPBSで溶解した。

BALF中サイトカイン・ケモカイン濃度は、Mouse Cytokine 17-Plex Panel Kit (BIO-RAD, Hercules, USA)を用い、蛍光マイクロビーズアレイシステムであるLuminex[®] (Hitachi, Tokyo) で測定し、G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17, monocyte chemotactic protein (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , RANTES, keratinocyte chemoattractant (KC)の17ターゲットの濃度を測定した。各ターゲットに対する特異的一次抗体には、ターゲット毎に異なる蛍光強度で標識された17種類のビーズが結合しており、ビオチン結合特異的二次抗体、ストレプトアビジン-PEでターゲットの濃度を検出した。すなわち、Freeze dry後のBALF上清50 μ lをビーズ結合一次抗体と30分反応させ、洗浄後二次抗体と30分反応、さらに洗浄後、ストレプトアビジン-PEと10分反応させ、Luminex[®]で測定した。

また、線維化の生化学的指標としてヒドロキシプロリン量を測定した。まず肺を凍結乾燥し、乾燥標本の重量を測定後、6 N HCl 2 mlで浮遊し、130 °Cで加熱溶解した。溶解液にメチルレッド (Wako, 大阪)を滴下後、NaOHで中和し、さらに蒸留水を加え、遠心後の上清をサンプルとした。スタンダードとして、L-ヒドロキシプロリン (Wako, 大阪)の希釈系列を作成した。サンプルおよびスタンダードにクロラミンT (Wako, 大阪)、過塩素酸 (Wako, 大阪)、エールリッヒ試薬 (Wako, 大阪)を加え振盪した。60°Cで20分間加熱後、室温に放置して冷却後、561 nmにおける吸光度をプレートリーダー (BIO-RAD, Hercules, USA)を用いて測定した。

組織学的検討については、肺を摘出後、ただちに10%中性緩衝ホルムアルデヒド液に浸漬し、10 cmH₂O圧で一晩伸展させ固定した。その後、パラフィン包埋し薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色にて病理標本作製した。強拡大の視野において、病

帝京大学内科学講座呼吸器・アレルギー学

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

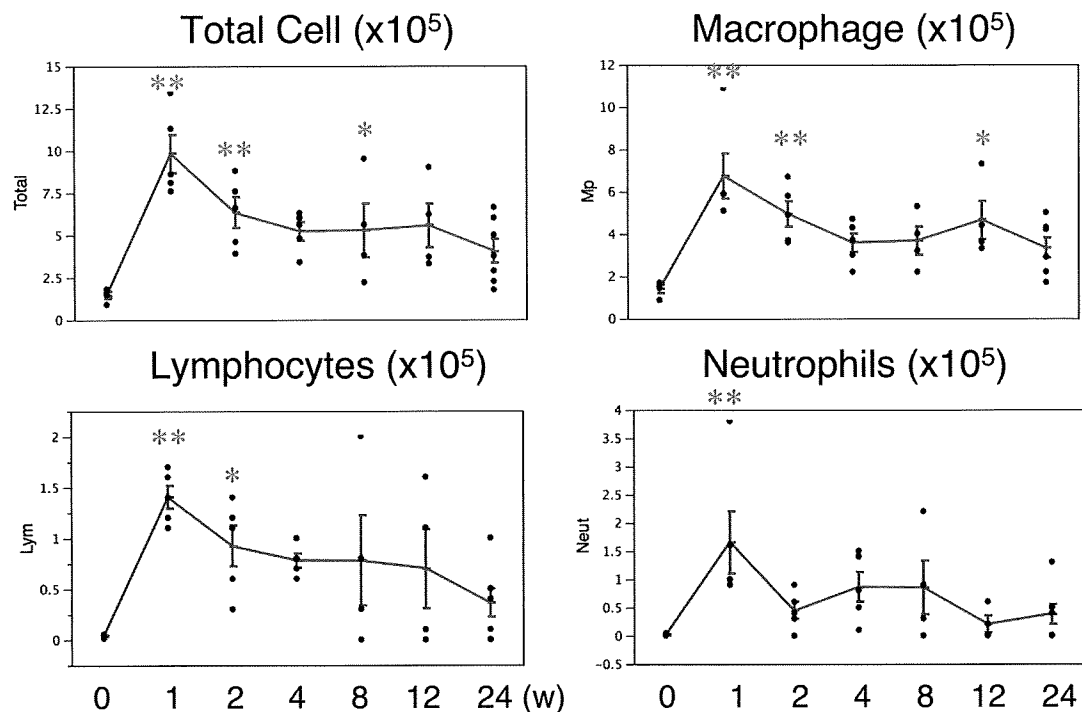


図1. BALF中総細胞数と細胞分画の時間経過 (n=4~7)
シリカ点鼻前, 点鼻後1, 2, 4, 8, 12, 24週後に気管支肺胞洗浄を施行し, 細胞分画を計数した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs シリカ投与前値.

変を炎症および線維化の強度により0~8に分類して算出し, 1匹あたり200視野について集計し, その平均値をAshcroft Scoreとした.

● 統計: 各測定項目の時間経過における比較は, one-way ANOVA検定を行い, 群間有意差を認めた場合, シリカ投与前と, 各時間における測定値との差をDunnnett検定を用いて比較した.

結 果

シリカ点鼻後のBALF総細胞数および, 各細胞分画の時間経過を図1に示す. BALF総細胞数は, シリカ点鼻1週後にピークを迎え, 8週後まで有意な増加が持続した. 細胞分画は, リンパ球, マクロファージ数は, 1週後にピークを迎えたが, 有意な増加は2週後まで持続した. 一方, 好中球数はやはり投与1週後にピークを迎えたが, 有意な増加は1週後までであり, 他の細胞分画に比較して, 早期に減少した.

次に, 肺重量, 線維化の指標としてのヒドロキシプロリン量, 組織学的変化を示すAshcroftスコアの時間経過について図2に示す. 肺重量は1週間後にピークを示したが, 有意な増加は8週後まで持続

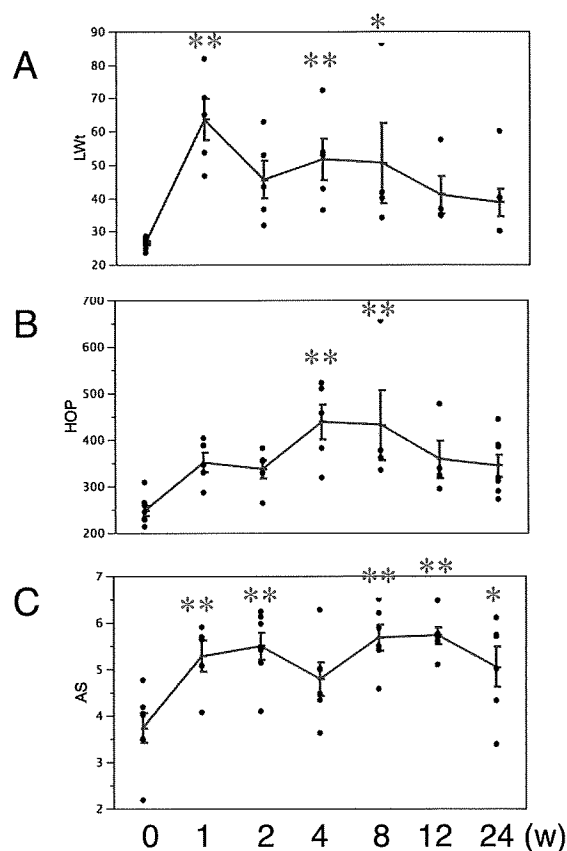


図2. 肺重量, ヒドロキシプロリン量, 組織スコアの時間経過
A. 肺重量 (g, n=4~7), B. ヒドロキシプロリン量 ($\mu\text{g}/\text{lung}$, n=4~7), C. Ashcroft Score (n=5~7)の時間経過を示す. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs シリカ投与前値.