

学 位 論 文 題 名

Neutrophil elastase associated with alveolar
macrophages form older volunteers

（健常中高年者における肺胞マクロファージ中の好中球エラスターゼ）

学位論文内容の要旨

研究目的

肺気腫は、ほとんどが中高年以上の喫煙者に発症する疾患で、肺の弾性収縮力を担う肺胞壁エラスチン線維の不可逆的破壊を特徴とする。しかし、臨床的には重喫煙者の一部にしか肺気腫を発症しないことから、喫煙に対する個体の感受性の差が注目される。そこで、本研究は従来報告とは異なるアプローチによってこの喫煙感受性因子の一端を明らかにしようと試みた。多くの自覚症状のない中高年ボランティアの中から、肺CT検査によって臨床的肺気腫発症前の気腫病変を有する被験者を選び出し、同程度の喫煙歴がありながら同検査で気腫病変のない被験者や非喫煙者と比較することにより、単に喫煙という刺激に対する生体反応を見るばかりでなく、より直接的に気腫化に関与する機序を検索した。本研究は喫煙により増加する炎症細胞のひとつである肺胞マクロファージが気腫化に関与しているとの仮定に基づき、この細胞の特殊な機能、すなわち好中球から放出される好中球エラスターゼをレセプターを介して取り込み、活性を保持したまま再放出するという機能に着目した。この機能の個体差が気腫化に関する喫煙感受性を反映する因子であるか否かを検討した。

対象と方法

自覚症状のない中高年男性ボランティア36名（平均年齢 61 ± 2 SE 歳）を対象に同意を得たうえで、肺高解像CT検査、呼吸機能検査、採血、気管支肺胞洗浄（BAL）を行った。肺CTでの気腫化の診断は呼吸器内科医3名が独立して、各対象の喫煙歴や呼吸機能の情報を伏せて読影し、low attenuation area（以下LAAと略す）の有無で評価した。3名が一致して肺野の一部にでも明らかにLAAが存在すると評価した群をLAA(+)群、それ以外の群をLAA(-)群とした。また、LAA(+)群はその気腫化の程度をvisual scoring methodsによりグレード1から5の5段階に分類した。現在の喫煙習慣と肺CTでの気腫性変化の有無によりLAA(-)非喫煙者群(n=9)、LAA(-)喫煙者群(n=13)、LAA(+)群(n=14、うち非喫煙者4名)の3群に分類した。血液検査では、検査の数日前からの喫煙量を反映する血漿コチニン濃度を測定した。BAL回収液よりFicoll-Paqueを用い肺胞マクロファージを分離し $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した後 -70°C にて保存した。解凍後超音波破碎によりマクロファージを溶解し、その上清の酵素活性を好中球エラスターゼに高感度の合成基質methoxysuccinyl-alanyl-alanyl-prolyl-valyl paranitroanilide (MEOSAAPVNA)を用いて分光光度法により測定した。さらにその活性が好中球エラスターゼに特異的なものであるか否かを確かめるため、各種プロテアーゼインヒビターを加えその抑制率を検討した。また、肺胞マクロファージを $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し24時間培養し、培養液上清の好中球エラスターゼ- $\alpha 1$ -アンチトリプシン複合体濃度をELISA法にて測定した。

結果

対象は、病歴、理学所見、胸部単純レントゲン写真、呼吸機能、血液諸検査において、全員明らかな感染や炎症所見はなく、また胸部疾患は認められなかった。LAA(-)非喫煙者群、LAA(-)喫煙者群、LAA(+)群の3群間で年齢には差がなかった。LAA(-)喫

煙者群、LAA(+)群間では累積喫煙量と血漿コチニン濃度のいずれについても差はなかった。LAA(+)群のなかでその気腫化の程度はグレード2以下の軽度の気腫化所見を呈するものが14名中11名であった。

BAL中マクロファージ数はLAA(-)喫煙者群、LAA(+)群ともにLAA(-)非喫煙群に対してそれぞれ有意に高値を示し喫煙の影響が明らかであった (23.9 ± 4.0 SE、 26.3 ± 7.2 vs $6.6 \pm 1.5 \times 10^4/\text{ml}$, $p < 0.05$)。一方、同一個数マクロファージ溶解液上清の酵素活性は個体差が大きいにも関わらず喫煙歴とは関係がなかった。しかし、気腫病変を有するLAA(+)群では同程度の喫煙歴をもつLAA(-)群と比較して有意に高値を示した (1.16 ± 0.40 SE vs 0.34 ± 0.07 nM, $p < 0.05$)。この酵素活性は好中球エラスターゼに特異的なものではなく、好中球エラスターゼ阻害剤であるPMSFによりLAA(-)喫煙者群では41%抑制されたが、LAA(+)群では71%抑制された。マクロファージ培養液中の好中球エラスターゼ- α_1 -アンチトリプシン複合体濃度は、LAA(+)群ではLAA(-)群に比べ有意に高値を示した (17.4 ± 6.5 SE vs 1.8 ± 0.6 $\mu\text{g/l}$, $p < 0.05$)。

考案

肺気腫の外的要因として喫煙は最も重要な原因物質である。タバコ成分自体あるいは炎症細胞から放出されるオキシダントや種々のプロテアーゼなどの攻撃因子が、生体の緻密な防御機能を上回るときに不可逆的な肺の破壊が進行し肺気腫発症に至ると考えられている。

本研究は、自覚症状のない中高年ボランティアを対象としたことに特徴がある。肺気腫患者を対象にする場合、気管支肺胞洗浄の回収率も悪く、加えて気道感染の影響を無視できない。肺高分解能CTスキャンで初期の気腫病変をとらえることにより気腫化の生成過程を反映する因子を明らかにしようとした。

肺胞マクロファージは、セリン、メタロ、システインプロテアーゼ等の各種プロテ

アーゼとそれらのインヒビターを有し、その機能の調節が肺の再構築や種々の炎症に関与していると考えられている。今回著者らが着目した好中球エラスターゼは各種プロテアーゼのなかでも最も強力なプロテアーゼであり、エラスチンのみでなく、他の結合組織に対しても広く活性を有している。好中球エラスターゼは主に好中球から放出されるが、肺内にははるかに多くのマクロファージが存在する。レセプターを介してマクロファージに取り込まれた好中球エラスターゼは細胞内で長期間活性を保持し再放出することが報告されている。肺胞マクロファージは好中球と異なり細胞外マトリックスに接着し可溶性インヒビターの作用を避け直接エラスチンを攻撃する可能性も指摘されている。しかも肺胞マクロファージは好中球よりも肺内に長く留まっているとの報告もある。このような理由から、著者らは肺胞マクロファージの持つ好中球エラスターゼが肺の気腫化に強く関与しているのではないかとの仮説を持つに至った。

今回の研究結果は、その仮説を立証するものであり、肺胞マクロファージの持つこの特殊な機能は喫煙暴露に対する生体反応を反映しているのではなく、肺気腫の内因としての喫煙感受性の一部を説明するものと考えられた。

結語

中高年ボランティアにおいて、肺胞マクロファージ中の合成基質MEOSAAPVNAに対する酵素活性は同じ喫煙歴を持ちながら気腫変化のある群ではない群に比べて有意に高く、その活性に占める好中球エラスターゼの関与は大きかった。また培養肺胞マクロファージからの好中球エラスターゼ放出能も前者で有意に高かった。以上より、肺胞マクロファージ中の好中球エラスターゼは肺の気腫病変に関する喫煙感受性を説明するひとつの因子である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 斉 藤 和 雄

学 位 論 文 題 名

Neutrophil elastase associated with alveolar
macrophages form older volunteers

(健常中高年者における肺泡マクロファージ中の好中球エラスターゼ)

目的と方法：肺気腫は、ほとんどが中高年以上の喫煙者に発症する疾患で、肺の弾性収縮力を担う肺泡壁エラスチン線維の不可逆的破壊を特徴とする。しかし、臨床的には重喫煙者の一部にしか肺気腫を発症しないことから、喫煙に対する個体の感受性の差が注目される。本研究は多くの自覚症状のない中高年ボランティアの中から、肺CT検査によって臨床的肺気腫発症前の気腫病変を有する被験者を選び出し、同程度の喫煙歴がありながら同検査で気腫病変のない被験者や非喫煙者と比較することにより、単に喫煙という刺激に対する生体反応を見るばかりでなく、より直接的に気腫化に関与する機序を検索した。喫煙により増加する炎症細胞のひとつである肺泡マクロファージが好中球から放出される好中球エラスターゼをレセプターを介して取り込み、活性を保持したまま再放出するという機能に着目した。対象は自覚症状のない中高年男性ボランティア36名（平均年齢 61 ± 2 SE 歳）。肺高解像CT検査、呼吸機能検査、採血、気管支肺泡洗浄（BAL）を行った。肺CTでの気腫化の診断は呼吸器内科医3名が独立して、各対象の喫煙歴や呼吸機能の情報を伏せて読影し、low attenuation area（以下LAAと略す）の有無で評価した。現在の喫煙習慣と肺CTでの気腫性変化の有無によりLAA(-)非喫煙者群(n=9)、LAA(-)喫煙者群(n=13)、LAA(+)群(n=14、うち非喫煙者4名)

の3群に分類した。BAL回収液より肺胞マクロファージを分離しその溶解液上清の酵素活性を好中球エラスターゼに高感度の合成基質 methoxysuccinyl-alanyl-alanyl-prolyl-valyl paranitroanilide (MEOSAAPVNA)を用いて分光光度法により測定した。また、肺胞マクロファージを24時間培養し、培養液上清の好中球エラスターゼ- α_1 -アンチトリプシン複合体濃度をELISA法にて測定した。

結果：同一個数マクロファージ溶解液上清の酵素活性は気腫病変を有するLAA(+)群では同程度の喫煙歴をもつLAA(-)群と比較して有意に高値を示した。マクロファージ培養液中の好中球エラスターゼ- α_1 -アンチトリプシン複合体濃度は、LAA(+)群ではLAA(-)群に比べ有意に高値を示した。

結語：肺胞マクロファージ中の好中球エラスターゼは肺の気腫病変に関する喫煙感受性を説明するひとつの因子である。

口頭発表にあたり、上出教授より、肺胞マクロファージ中の好中球エラスターゼの調節機序に関して、斉藤（和）教授より対象年令、個体差を規定している因子について、浅香教授より肺気腫の早期診断、好中球と炎症に関してそれぞれ質問があった。申請者は概ね妥当に答えたと思う。

また、上出教授、斉藤（和）教授より個別に審査を受け、合格との御返事をいただいている。

本論文は肺胞マクロファージの持つ好中球エラスターゼは喫煙暴露に対する反応を反映しているのではなく、肺気腫発症の内因としての喫煙感受性の一部を説明することを初めて報告した。臨床的にも肺気腫の素因の一端を明らかにする意義ある研究と思われる。よって本論文は博士（医学）に相当するものと認めた。