

学 位 論 文 題 名

Increased Susceptibility to Silicosis TNF- α Production in C57BL/6J Mice

(C57BL/6Jマウスのシリカ吸入に対しての感受性増加とTNF- α 産生の増加)

学位論文内容の要旨

[目的] 以前我々は、特発性間質性肺炎（IIP）の肺組織における鉱物分析にてシリカおよびアルミニウムがコントロールに比べて有意に多いことを明らかにした。また、IIPならびに珪肺症の形成過程においてサイトカイン、特にtumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 α (IL-1 α)および活性酸素の関与が明らかにされている。その一方で、IIPの発症には珪肺症の場合と同様、宿主の感受性が大きく関与している。そこで、IIPの宿主感受性の一端を明らかにする目的で、活性酸素の一種であるオゾン感受性の差が明らかなマウスを用いて、シリカに対する感受性の差異を検討した。また、その機序を明らかにする目的で、時間をおって炎症指標の変化や気管支肺胞洗浄液（BALF）細胞から分泌されるTNF- α , IL-1 α を測定した。

[対象と方法] 8週令の雄オゾン感受性C57BL/6Jマウスおよびオゾン抵抗性C3H/HeJマウスに、シリカ50mg/生食60mlを気管内に投与し、2日後、28日後に炎症の指標として肺湿重量の体重に対する割合、BAL総細胞数、BALF上清中の総蛋白質量を、肺線維化の指標としてhydroxyproline (HOP)、病理を検討した。また、BAL細胞 1×10^5 個の48時間培養後の上清を用いてELISA法によりTNF- α , IL-1 α を測定した。両種のマウスに同量の生食を投与しコントロールとした。

統計学的検討は、ANOVAにて解析し、Fisher's protected least significant difference procedure およびScheffe's F testをpost-hoc testとして使用した。p<0.05をもって統計学的に有意とした。

[結果] 1.炎症性病変の程度およびその変化。

両群のシリカ投与2日後の肺湿重量比は、それぞれのコントロールの肺湿重量比に比較して有意に増加していたが、両群間では差がなかった。シリカ投与28日後C57BL/6Jの肺湿重量比は 13.2 ± 1.4 (以下mean $\pm$ SE)でシリカ投与C3H/HeJの 10.9 ± 0.6 よりも有意に増加していた。BALF中の総蛋白質量は、シリカ投与2日後、両群で各群のコントロールに比較し有意に増加していたが、両群間に差はなかった。28日後シリカ投与したC57BL/6Jの総蛋白質量は 306 ± 55 mg/mlで、この群でのみコントロールと比較し有意差があり、シリカ投

与C3H/HeJの 208 ± 28 mg/mlよりも有意に増加していた。シカ投与2日後、BAL総細胞数はC57BL/6J、C3H/HeJのそれぞれにおいて $137 \pm 25 \times 10^4$ /ml、 $206 \pm 37 \times 10^4$ /mlで両群ともコントロールに比し有意に増加していたが、両群間の比較では、C3H/HeJで有意に多かった。28日後の検討ではシカ投与のC57BL/6Jで $416 \pm 146 \times 10^4$ /mlでありコントロールの $74 \pm 16 \times 10^4$ /mlに比しでこの群でのみ有意に増加していた。両群間の比較では、シカ投与C57BL/6Jでシカ投与C3H/HeJの $215 \pm 38 \times 10^4$ /mlよりも有意に多かった。

2.肺線維化指標の変化

病理学的検討では、Aschcroftの分類に基づいて線維化を定量化した。2日後の病理像では、両群間に差はなく、シカ投与28日後C57BL/6Jで 2.40 ± 0.45 とC3H/HeJの 1.28 ± 0.18 よりも有意に高値であった。シカ投与2日後のHOPの検討では、両群でコントロールに比較して有意にHOP量が低下していたが両群間で有意差はなかった。シカ投与28日後C57BL/6JのHOPは 165 ± 29.4 mg/lungで、この群でのみ有意にコントロールの 91.3 ± 1.6 mg/lungに比べて増加し、シカ投与C3H/HeJの 84.7 ± 2.1 mg/lungと比べても有意に増加していた。

3.TNF- α 、IL-1 α の比較

TNF- α の検討では、2日後シカ投与C57BL/6Jで 158 ± 43 pg/mlとなりこの群でのみコントロールの 550 ± 97 pg/mlに比較し有意なTNF- α の低下がみられた。両群間の比較ではC57BL/6Jのコントロール群がC3H/HeJのコントロール群の 75 ± 13.2 pg/mlに比較し有意に高かった。28日後の検討では、シカ投与C57BL/6Jで 1527 ± 294 pg/mlであり、コントロール群の 590 ± 123 pg/mlに比し有意な増加を示し、シカ投与C3H/HeJの 527 ± 294 pg/mlよりも有意に高かった。IL-1 α の検討では、シカ投与後2日後、28日後とも両群間に有意差はなかった。

[考案] Callisらは、種々のマウスでシカに対する感受性の差異を検討し、DBA/2を高感受性、C3H/HeJマウスを低感受性であると報告した。また、C57BL/6J、C57BL/10、BALB/Cらも高感受性の可能性があることを報告した。一方、Kleebergerらは、C57BL/6Jがオゾン感受性であり、C3H/HeJマウスがオゾン抵抗性であることを報告している。そこで、Callisらの報告の追試を行うと共に、その機序を明らかにする目的で、オゾン感受性C57BL/6Jマウスとオゾン抵抗性C3H/HeJマウスを用いて今回の実験を行った。その結果、C57BL/6Jは、気管内注入によるシカに対し、C3H/HeJよりも28日後において炎症性反応および線維化反応とも有意に高度な反応を示した。しかしながら、2日後の変化ではC57BL/6JはC3H/HeJに比較してBALF中総細胞数が有意に低下していた。シカ投与後に走化因子を気管内に追加注入した場合は線維化の程度が軽いことや、シカ投与前の放射線照射にて初期の反応を低下させた群に線維化が強いとの報告があり、今回の検討で急性期におけるC57BL/6Jの低反応が慢性期における高度な線維化に結びついている可能性が考えられた。また、サイトカインの検討では、2日後のC57BL/6Jのコントロール群および28日後のシカ投与C57BL/6Jにて有意にTNF- α の増加がみられた。TNF- α は、強力な好中球や単球の走化因子であり、好中球を活性化し活性酸素を放出させることが知られている。さ

らにPiguetらのTNF- α モノクローナル抗体にて珪肺症の発生を抑えた実験から、珪肺症の発生にTNF- α は重要である。今回の検討でのC57BL/6JのTNF- α の増加はC57BL/6Jの高反応に結びついている可能性が高いと考えられた。

[結論] オゾン感受性C57BL/6Jマウスは、気管内注入によるシカに対し、オゾン非感受性C3H/HeJマウスよりも28日後において炎症性反応および線維化反応とも有意に高度に反応を示した。C57BL/6Jの急性期の低反応および急性期慢性期を通じてのTNF- α の増加が慢性期での高反応に結びついている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和
副 査 教 授 皆 川 知 紀
副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

Increased Susceptibility to Silicosis TNF- α Production in C57BL/6J Mice

(C57BL/6Jマウスのシリカ吸入に対する感受性増加とTNF- α 産生の増加)

目的：以前我々は、特発性間質性肺炎(IIP)の肺組織における鉍物分析にてシリカおよびアルミニウムがコントロールに比べて有意に多いことを明らかにした。近年の肺線維化過程の研究から、IIPならびに珪肺症の形成過程においてサイトカイン、特にtumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 α (IL-1 α)および活性酸素の関与が明らかにされている。また一方ではIIPが家族発症する事などから、IIPの発症に宿主の感受性が関与していると考えられている。Callisらにより既にマウスのシリカに対する感受性の種差は報告されているが、その機序についての報告はない。そこでIIPに対する感受性の機序を明らかにする目的で、線維化にも関与するとされる活性酸素に対する感受性が明らかなマウスを用いてシリカに対する感受性の差異を調べた。さらに、気管支肺胞洗浄液(BALF)細胞から分泌されるTNF- α , IL-1 α の定量や炎症性指標の経過を調べて感受性差異の機序を検討した。

方法：対象は、8週令の雄オゾン感受性C57BL/6Jマウスおよびオゾン抵抗性C3H/HeJマウスである。これらにシリカ50mg/生食60 μ lを気管内に投与し、2日後、28日後に炎症の指標として肺湿重量の体重に対する割合、BALF総細胞数、BALF上清中の総蛋白質量をもちいた。肺線維化の指標としては、病理組織の線維化を半定量化した指数を用い、さらにhydroxyproline (HOP)量も検討した。また、BAL細胞1x10⁵個の48時間培養後の上清を用いてenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法によりTNF- α , IL-1 α を測定した。両種のマウスに同量の生食を投与しコントロールとした。

結果：シリカ投与2日後、オゾン非感受性マウスのBALF総細胞数はオゾン感受性マウスの1.5倍の有意な増加を示した。シリカ投与28日後、体重に対する肺湿重量の比、BALF総蛋白質量、BALF総細胞数がシリカ投与オゾン感受性マウスにおいてオゾン非感受性マウスに比しそれぞれ約1.5倍の有意な増加を示した。線維化の程度の比較において、2日後では両群間に差はなかったが、シリカ投与28日後オゾン感受性マウスは、オゾン非感受性マウスに比較して病理学的には約2倍の線維化を示し、HOP量においては約1.5倍に有意に増加していた。

2日後のTNF- α の検討では、生食投与群のオゾン感受性マウスにおいてオゾン非感受性

群に比較しTNF- α が7倍に増加し、また28日後の検討では、シカ投与O β ン感受性マウスでコントロール群よりも3倍に増加し、シカ投与O β ン非感受性マウスに比較し26倍の増加が認められいずれも有意差を認めた。同時に調べたIL-1 α については両群間に有意差を認めなかった。

結論：O β ン感受性マウスは、気管内投与シカに対し28日後においてO β ン非感受性マウスよりも炎症性変化および線維性変化とも高度な反応を示した。O β ン感受性マウスの2日後の低反応および2日後、28日後を通じてのTNF- α の増加がシカに対する高反応に結びついていた。

口頭発表にあたり、皆川教授よりO β ン感受性およびシカに対する感受性が同じ遺伝子異常によるものかどうかについて、上出教授より両マウスにシカを皮下に投与した際に予想される反応性の差異について、細川教授から急性期の炎症の程度と慢性期の線維化の関連についての質問があり、申請者は概ね妥当に答えたと思う。また、皆川教授、上出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。

これまでにシカに対する感受性の種差の機序について検討されておらず、種差とTNF- α 産生の増加やO β ン感受性との関連を示したことは意義あるものと考えられ、よって本論文は博士（医学）に相当するものと認めた。