

学 位 論 文 題 名

Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema

（無症候性肺気腫における気管支肺胞洗浄液中好中球エラスターゼの増加）

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が注目される。そこで、本研究は従来 of 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。本研究では多種類のプロテアーゼのうちエラスチン線維分解能が最も強力である好中球エラスターゼに着目した。そして血液や尿よりも肺局所の状況をより良く反映しうる気管支肺胞洗浄液(BALF)を検体とし、そこに見られる好中球エラスターゼとその関連因子の個体差が、気腫化に関する喫煙感受性を反映している可能性について検討した。

対象と方法

自覚症状のない中高年男性ボランティア39名（平均年齢 63 ± 10 SD 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(+)群についてはその気腫化の程度を視覚的にグレード1から5の5段階に分類した。現在の喫煙習慣と肺CTでの気腫化の有無によりLAA(-)非喫煙者群($n=13$)、LAA(-)喫煙者群($n=13$)、LAA(+)喫煙者群($n=10$)の3群に分類した。LAA(+)の現在非喫煙者3名は小人数のため除外した。現在の喫煙習慣を客観的に裏付けるために検査当日、過去数日間の喫煙量を反映する血漿コチニン濃度を測定した。BALは右肺中葉で行ない50mlの生理的食塩水の注入と回収を4回繰り返した。最初の回収液は肺胞領域よりも気道の状況を反映するため除外し、残り3回の回収液を肺胞分画BALFとしその非濃縮上清を用いた。BALFの好中球エラスターゼ濃度を好中球エラスターゼ- α 1-アンチトリプシン複合体濃度としてELISA法にて測定した。BALFの好中球エラスターゼ抑制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、 α 1-アンチトリプシンは好中球エラスターゼの作用を受けてそれと結合したり分解されたりすることを踏まえて、BALF中の α 1-アンチトリプシンの分子量の違いによる存在様式をWestern blot法により調べた。

結果

対象は全員明らかな感染、炎症所見、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(+)喫煙者群の3群間で年齢には差がなかった。喫煙

者群2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(+)喫煙者群の気腫化の程度は全員グレード2未満の軽度であった。BALFの総細胞数は喫煙者の2群とも非喫煙者群に比べ多かったが、喫煙者内では両群間で差はなかった。マクロファージと好中球の比率は3群間で差がなかった。BALF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(+)喫煙者群では、非喫煙者群より有意に高値であるのみならず (0.52 ± 0.10 vs 0.21 ± 0.03 SE $\mu\text{g}/\text{mg}$ albumin, $p<0.01$)、同程度の喫煙歴をもつLAA(-)喫煙者群と比べても有意に高値を示した (0.52 ± 0.10 vs 0.23 ± 0.07 SE $\mu\text{g}/\text{mg}$ albumin, $p<0.01$)。BALFの好中球エラスターゼ抑制活性はLAA(+)喫煙者群では非喫煙者群より高値の傾向が見られたが (1.43 ± 0.25 vs 0.89 ± 0.09 SE nmol/mg albumin, $p=0.06$)、LAA(-)喫煙者群と比べると有意な差がなかった。Western blot法でみたBALF中の α_1 -アンチトリプシンは54kDの固有の分子量に加えて分解された低分子量の存在様式も確認されたがその出現頻度は3群間で差がなかった。

考案

肺気腫の外因として最も重要なものは喫煙である。喫煙により肺内に集まった炎症細胞から放出される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まわ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スキャンで軽度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。BALFは生体内の肺胞被覆液が希釈され回収されたものであり、その成分は肺胞の炎症や破壊、再構築の状況を間接的に反映している。攻撃因子として肺内の炎症細胞から放出されるプロテアーゼにはセリン、メタロ、システインプロテアーゼ等があるがこれらの中で肺胞壁エラスチン線維を最も強力に分解するのは好中球エラスターゼである。好中球

エラスターゼはBALF中ではそれより過剰に存在する阻害物質 α 1-アンチトリプシンと常に複合体を形成しているため、BALFの好中球エラスターゼ- α ₁-アンチトリプシン複合体の濃度は、炎症細胞から放出された好中球エラスターゼの総量を反映している。今回の研究結果では、同程度の喫煙暴露を受けている者の中で気腫病変のある群ではない群と比べて、BALFの炎症細胞数には差がないのに放出された好中球エラスターゼの総量は高値を示した。この結果は、気腫病変のある群では炎症細胞からの好中球エラスターゼ放出能が亢進していることを示唆している。一方、BALFの好中球エラスターゼ抑制活性は、防御因子である α 1-アンチトリプシン等の蛋白分解酵素阻害物質の活性を表している。この活性の低いことが肺気腫を起こしやすくなるとの考え方もあるが、本研究の結果ではこの活性は喫煙者全体で高い傾向はあったが、その中において気腫病変のある群を特徴づける因子ではなかった。また、BALF中の好中球エラスターゼ量が高値の群では、 α 1-アンチトリプシンが好中球エラスターゼ自身によって小分子量により多く分解されている可能性も予測されたが、Western blot法ではその群に特徴的な結果は得られなかった。

結語

中高年ボランティアにおいて、BALF中の好中球エラスターゼ量は同じ喫煙歴を持ちながら気腫病変のある群ではない群に比べて有意に高かった。従って、好中球エラスターゼは肺の気腫化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 細 川 真澄男
副 査 教 授 小 山 富 康

学 位 論 文 題 名

Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema

(無症候性肺気腫における気管支肺胞洗浄液中好中球エラスターゼの増加)

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、喫煙により肺内のエラスターゼ・アンチエラスターゼ不均衡が引き起こされ、肺の弾性線維（エラスチン）の不可逆的破壊をきたした結果起こる疾患である。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、喫煙に対する感受性の個体差が注目される。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早期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、単に喫煙刺激に対する生体反応を見るばかりでなく、より直接的な気腫化の機序である喫煙感受性について検索した。本研究では肺内の炎症細胞から放出される種々のプロテアーゼのうちエラスチン分解能が最も強力な好中球エラスターゼに着目した。検体は血液や尿よりも肺局所の状況をより良く反映する気管支肺胞洗浄液(BALF)を用い、その中の好中球エラスターゼとその関連因子の個体差が、気腫化に関する喫煙感受性を反映するか否かを検討した。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63±10 SD 歳）。肺高分解能CT、呼吸機能検査、血液検査、気管支肺胞洗浄(BAL)を施行した。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、気腫病変low attenuation areaの有無で評価した。対象を現在の喫煙習慣と肺CTでの気腫病変の有無によって、非喫煙者の気腫病変なし群(n=13)と、喫煙者の気腫病変なし群(n=13)、喫煙者の気腫病変あり群(n=10)の3群に分類した。血液検査では全ての対象に炎症所見、 α 1-アンチトリプシン欠損症がみられないことを確認し、検査数日前からの喫煙暴露量の客観的評価のためニコチンの代謝産物であるコチニンの濃度を測定した。BALは、右肺中葉を生理的食塩水50mlずつで4回洗浄し、最初の回収液は気道の状況を反映するため除外し、後半3回の回収液をより肺胞成分を反映する分画としてその上清を測定に用いた。好中球エラスターゼの量を、好中球エラスターゼ・ α 1-アンチトリプシン複合体の量としてsandwich ELISA法で測定し、好中球エラスターゼ抑制能を、好中球エラスターゼ試薬とこの酵素に高感度の合成基質methoxysuccinyl-alanyl-alanyl-prolyl-valyl paranitroanilide

(MEOSAAPVNA)を用いて吸光光度法で測定した。また肺内での好中球エラスターゼの量や活性を反映して、 α 1-アンチトリプシンの分子が好中球エラスターゼとの複合体を形成したり分解されたりすることを踏まえて、 α 1-アンチトリプシンの存在様式をWestern blot法で調べた。

結果：年齢と血漿 α 1-アンチトリプシン濃度は3群間で差はなかった。喫煙者2群間で喫煙指数と血漿コチニン濃度に差はなかった。BALFの総細胞数は喫煙者の2群とも非喫煙者群に比べ多かったが、喫煙者内では2群間に差はなかった。マクロファージと好中球の比率は3群間で差がなかった。BALF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気腫病変ありの喫煙者群では、非喫煙者群に対してばかりではなく、同程度の喫煙歴をもつ気腫病変なしの喫煙者群と比べても有意に高値を示した。BALF中の好中球エラスターゼ抑制能は3群間で有意差がなかった。Western blot法でみたBALF中の α 1-アンチトリプシンは54kDの固有の分子量に加えて分解された低分子量の存在様式も確認されたがその出現頻度とdensitometerでみたそれぞれのバンドの α 1-アンチトリプシン量は3群間で差がなかった。

結語：BALF中の好中球エラスターゼ量は肺の気腫化に関する喫煙感受性を反映するひとつの因子である。

口頭発表にあたり、細川教授より喫煙者及び早期肺気腫の予後、好中球エラスターゼ量の個体差を規定している因子に関して、小山教授より好中球エラスターゼ量と炎症の関係、対象の集め方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、細川教授、小山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、BALF中の好中球エラスターゼ量は、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反映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。