間質性肺線維症における循環血液中好中球の スーパーオキシド産生能

——臨床例と肺線維症モデルからの検討——

石原陽子*¹⁾, 和頼房代・渡辺晴雄*²⁾, 香川 順*¹⁾

Superoxide anion release from circulating neutrophils in interstitial pulmonary fibrosis—Study of patients and experimental animal model

The superoxide anion (O_2^-) release from circulating neutrophils (c-PMN) in interstitial lung diseases, idiopathic interstitial pneumonitis (IIP), sarcoidosis (SA) and rheumatic pneumonitis (RA) was studied. At the same time, we demonstrated that the mechanism of acceleration of phorbol myristate acetate (PMA)-induced O_2^- release in c-PMN by using animal model of bleomycin (BLM)-induced lung injury and pulmonary fibrosis. ① Spontaneous O_2^- release was not differ from healthy volunteer group and IIP, RA, SA groups. ② Time course of PMA-induced O_2^- release from c-PMN in IIP was increased significantly compared with that of healthy volunteer, RA and SA groups. ③ f-MLP-induced O_2^- release of c-PMN in IIP group was lower than that of healthy volunteer group. ④ On the stage of acute inflammation induced by intratracheal injection of BLM to guinea pigs, f-MLP and alpha-TNF-induced O_2^- release from c-PMN in BLM group were increased significantly, but not in spontaneous and PMA stimulation. ⑤ On the progress stage of BLM-induced fibrosis, various stimulants-induced and spontaneous O_2^- release were not differ from saline injected group and BLM group.

These results suggested that c-PMN in IIP patients may affect in pathogenesis of interstitial pulmonary fibrosis which was under the stable stage. And this accelerated PMA-dependent O_2^- release could be induced by the change of intracellular signal pathways which transmitted from protein kinase C stimulation to NADPH oxidase activation.

Yoko Ishihara*¹⁾, Fusayo Wagai・
Haruo Watanabe*²⁾, Jun Kagawa*¹⁾

key words: superoxide anion release,
idiopathic interstitial pneumonitis (IIP),
phorbol myristate acetate,
bleomycin-induced fibrosis,
neutrophils

肺疾患の成因における好中球の役割について種々検索されているが、特に、特発性間質性肺炎 (IIP) の発症機序において、Crystal らは、肺胞マクロファージから放出された好中球遊走因子により、気管支肺胞領域に出現した好中球からのオキシダントやプロテアーゼ放出が肺実質を障害することにより招来されるシェーマを提唱している¹⁾。

しかし、本邦の IIP 患者では気管支肺胞系への好中球の出現は数パーセントにすぎず、また、好中球が多くみられる症例においても、その増加は初期ではなく病勢が進行した時期にみられることから、本疾患への好中球の関与が疑問視されている^{2,3)}。

今回は、IIP を含むびまん性間質性肺炎の病態における循環血液中の好中球の役割を検討する目的で、特発性間質性肺炎 (IIP)、リウマチ肺 (RA)、サルコイドーシス (SA) 患者の末梢血液中の好中球 (c-PMN) のスーパーオキシド (O_2^-) 産生能を検討した。また、モルモットに bleomycin 肺線維症を作成し、初期の肺傷害から肺間質の線維化成立までの c-PMN の O_2^- 産生能の経時的な変動についても検討した。

対象と方法

すでに診断が確定し、現在レントゲン上では病態の進展が認められず、かつ、ステロイド剤および抗生物質を投与していない患者を対象とした。

(1) ヒト末梢血液中好中球 (c-PMN) の分離

IIP, RA, SA および健常者の末梢血液に、0.1 M EDTA Na (pH 7.4) が血液 9 容積に対して 1 容積になるように添加した。1100 rpm, 15 分間遠沈し、血小板を除去後デキストランを加えて赤血球と白血球を分離した。好中球は不連続性 Percoll 法により分離し⁴⁾、albumin 含 Hepes buffer で

*¹⁾ Department of Hygiene and Public Health, Tokyo Women's Medical College 東京女子医科大学衛生学公衆衛生学教室

*²⁾ Tokyo Women's Medical College, Second Hospital, Internal Medicine I, Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan 東京女子医科大学第二病院内科 I

表 1 White blood cell count and cell differential of peripheral blood in patients and healthy volunteers

mean $\pm$ SD(n)	WBC (μ l)	cell differential (%)					
		st.	seg.	lym.	mono.	eosino.	baso.
control (14)	6778.5	4.8	52.5	36.6	3.2	2.2	0.3
SD	± 1855.0	± 1.8	± 13.8	± 13.2	± 1.7	± 1.8	± 0.6
IIP (6)	8040.0	3.4	59.8	30.4	4.6	1.4	0.2
SD	± 2956.8	± 1.9	± 10.5	± 8.4	± 3.3	± 1.6	± 0.4
RA (3)	7150.0	4.0	58.0	31.0	3.5	3.5	0.0
SD	± 1767.7	± 2.8	± 1.4	± 1.4	± 2.1	± 3.5	± 0.0
sarcoidosis (3)	5600.0	5.0	47.0	41.5	4.0	2.5	0.0
SD	± 282.8	± 1.4	± 4.2	± 9.1	± 4.2	± 0.7	± 0.0

洗浄後, 細胞数, viability, purity を測定した. 今回用いた好中球の purity および viability はそれぞれ 93.8 ± 1.1 , $99.5 \pm 0.1\%$ であり, 健常者と各疾患群の間に有意差は認められなかった.

(2) bleomycin(BLM) 肺線維症モデルの作成と循環血液中からの c-PMN の分離

体重 400 g 前後(4 週齢)の SPF Hartley 系雄モルモットに, 麻酔下で生理食塩水(生食)に溶解した BLM を体重 100 g 当たり 1 U/0.1 ml の経気道投与を行った. control 群には同量の生食を, 同一方法で投与した. 実験期間中, 動物は恒温恒湿のクリーンルームで飼育した. BLM 投与後, 1, 3, 7, 10, 20, 30, 50, 90 日目に, ネブタール麻酔下に腹部大動脈より採血した. 血液 9 容積に対し 0.1 M EDTA Na 溶液(pH 7.4)を 1 容積添加した. 血液は, 2500 rpm で 10 分間遠沈後, バッフィコートに滅菌蒸留水を加えて溶血させた. 白血球は, 不連続性 Percoll 法によりリンパ球と PMN に分離した⁵⁾. 回収された PMN は, albumin 含 Hepes buffer で洗浄後, 細胞数, viability, purity を測定した. 今回用いた好中球の purity および viability は, それぞれ 90% 以上であり, control 群と BLM 群の間に有意差を認めなかった.

(3) c-PMN の O_2 産生能の測定

分離された c-PMN は, 96穴マイクロウエルに 1 ウエル当たり 2.5×10^5 個で分注し, 37°C 30 分間インキュベートした. 細胞をウエルに付着させたあと, 反応液を添加してチトクローム C還元法により, 550 nm, 770 nm の 2 波長下でマイク

ロプレートリーダーを用いて経時的に O_2 量を測定した. なお, O_2 量は下記の式により算定した.

$$O_2(\text{nmol}) = (\text{test OD} - \text{assay blank OD}) / 6.3 \times 100$$

データは, one-way analysis of variance と Dunnett's test および Mann Whitney test により解析し, P が 0.05 以下を有意差ありとした.

結 果

表 1 に, IIP, SA, RA および健常者の末梢血液中の白血球数(WBC)と, その分画像のプロフィールを示した. WBC は, 健常者に比し, IIP, RA で高値を示す傾向が, SA で低値を示す傾向がみられたが, 有意差は認めなかった. 細胞分画像では, SA でリンパ球の割合が健常者, RA, IIP に比し高値を示したが, 有意な増加ではなかった.

図 1 に, 健常者(control), IIP, RA, SA 患者の c-PMN からの phorbol myristate acetate(PMA) 10^{-7} M 刺激下における O_2 放出量が示してある. 無刺激状態における c-PMN からの O_2 放出量は, control, IIP, RA, SA でそれぞれ 1.01 ± 0.64 , 1.17 ± 0.62 , 1.58 ± 0.52 , 0.90 ± 0.86 (nmol/ 2.5×10^5 /60 min)であり, 群間で有意差はみられなかった. PMA 刺激下の O_2 放出量は, control と RA, SA 間に明らかな差を認めないが, IIP で放出量の亢進がみられた.

図 2 に示すように, IIP 群では刺激剤添加 15 分後からすでに他の 3 群に比し有意に高く, 60 分間の経時的な O_2 放出量の変動には IIP 群と control,

図1 Comparison of PMA(10^{-7} M)-induced superoxide anion release from c-PMNs in patients and healthy volunteers

図2 Time course of PMA(10^{-7} M)-induced superoxide anion release from c-PMN in patients and healthy volunteers
*: $P < 0.05$

RA, SA 群の間に有意差が認められた(ANOVA $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$).

PMA は、細胞内 protein kinase C(PKC)に直接作用することにより O_2^- 放出を引き起こすとされている。つぎに、この IIP 患者における O_2^- 放出量の亢進が、細胞膜受容体依存性の刺激剤においても誘導されるものなのか否かについて検討した。表2にその結果が示してある。N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (f-MLP) 刺激による O_2^- 放出量は、健常者と比較すると、IIP 患者で低値を示す傾向がみられた。

種々のびまん性間質性肺病変を有する患者の c-PMN を検討したが、IIP 患者でのみ PMA 刺激による c-PMN の O_2^- 放出量の亢進がみられた。さらに、この増強効果について検討する目的で、動物疾患モデルを作成して検索した。

図3は、モルモットの BLM 経気道投与3カ月後の c-PMN の PMA (10^{-7} M) 刺激下における O_2^- 放出量の time course を示したものである。

表2 PMA and f-MLP-induced superoxide anion release from c-PMN in healthy volunteers and patients with IIP

PMN (n)	nmol/ 2.5×10^5 cells/60 min mean $\pm$ SD		
	unstimulate	PMA 10^{-7} M	f-MLP 10^{-7} M
healthy (6)	1.04 ± 0.62	6.26 ± 1.63	$2.19 \pm 1.45(3)$
IIP (6)	1.04 ± 0.66	7.40 ± 0.86	$1.18 \pm 0.11(3)$

図3 Time-course of PMA(10^{-7} M)-induced superoxide anion release from c-PMN in control and BLM-induced pulmonary fibrosis guinea pigs

生食を経気道的に投与した control 群と BLM 群の経時的な O_2^- 放出量には、有意差は認められなかった。光顕による形態学的観察では、BLM 投与30日目より細気管支の周囲に局所的な結合織の増殖を伴った肺胞壁の肥厚がみられ、投与90日目においてはさらに肺胞間質に高度な線維化が認められた。

図4は、control 群と BLM 群における PMA および細胞膜受容体刺激剤による c-PMA の O_2^- 放出量の実験50日目までの変動をまとめたものである。BLM 群では、炎症期に自発的な(unstimulate) O_2^- 放出量の増加と、f-MLP と α -TNF による細胞膜受容体依存性の O_2^- 放出量の有意な上昇が認められた。PMA 刺激では、control 群と BLM 群の間に有意差を認めなかった。しかし、自発的および f-MLP, α -TNF 刺激における O_2^- 放出量の増加は、BLM 投与10日目で消失し、肺の線維化が認められる30日以降においては、いずれの刺激剤においても control 群と BLM 群の間に有意差を認めなかった。

考 察

以上の実験成績から、びまん性の肺線維症を招来した IIP, RA, SA 患者の病態安定期において、IIP 患者でのみ c-PMN の PMA 刺激による O_2^- 放出量の亢進が認められた。この現象は、“終焉なき炎症”と特徴づけられる IIP 患者において、レントゲン上肺の線維化の進行が認められない状況下においても、循環血液中の PMN の機能変化が生じている可能性を示唆するものといえる。この c-PMN の活性化が炎症反応に付随するものなのか否かについて BLM を用いて検討したが、成因が異なるため断定はできないが、初期の炎症時には細胞膜受容体依存性の刺激剤による O_2^- 放出量のみが亢進された。これは、炎症時に肺組織に動員された PMN が、炎症反応に伴い放出される種類の chemical mediators により活性化され、肺の傷害機転に関与している可能性を示唆していた。しかし、モルモットの実験系においては PMA による反応は BLM 群と control 群との間に差を認めず、また、肺の線維化進展過程においても増強効果は認められなかった。この結果は、IIP 患者における PMA 刺激による c-PMN からの O_2^- 放出量の亢進が、かならずしも炎症反応の際や、肺間質の線維化に伴った現象ではないことを示唆するものといえよう。

PMA は前述したように、分子量が小さいため細胞膜を通過して細胞内の PKC に直接作用することが報告されている⁶⁾。生体に存在する物質ではないが、強力な O_2^- 放出を引き起こす。PKC 刺激から細胞膜 NADPH oxidase 活性による細胞膜での O_2^- 産生放出の一連の情報伝達機構については、まだ十分には解明されていない。PMA 刺激による O_2^- 放出量が IIP 患者で亢進したことは、これらの患者の c-PMN の細胞内情報伝達機構が up-regulation されている可能性を想定させる。門田ら⁷⁾も、間質性肺疾患患者の末梢血好中球を concanavalin A と cytochalasin E で刺激した際の O_2^- 放出量を検討し、RA や SA と健常者の値には有意差を認めないが、IIP 患者で高値を示すことを報告している。この成績は、刺激剤が異なるものの筆者らの実験成績と一致するものであった。

IIP 発症のイニシエータとしては、これまで Turner-Warwick ら⁸⁾が immune complex(CI)の

図4 The effect of PMA, f-MLP and alpha-TNF on superoxide anion generation in c-PMN of control and BLM-treated guinea pigs

存在を示唆しており、この CI が肺胞マクロファージに作用し、neutrophil chemotactic factor (NCF) の放出を促し⁹⁾、その結果、気管支肺胞系へ PMN が遊走するとされる。Ozaki ら¹⁰⁾は、気管支肺胞洗浄液中に PMN の増加を認める IIP 患者において、 C_{5a} des-arg や leukotriene B_4 のような NCF が上昇していることを報告している。

これらの報告は、免疫反応と炎症反応が共存し、それらの反応に伴い IgG や肺胞マクロファージなどからの種々の chemical mediator 酵素類が放出され¹¹⁾、c-PMN に影響を与えている可能性を示している。

これまでに、肺線維化の病態生理における PMN の役割や PMN から放出されたスーパーオキシド、酵素などの作用について検索されてきた。PMN を枯渇させた実験では、対照群に比し枯渇させた群で肺組織のコラーゲン合成能が亢進するところから、PMN が肺線維化過程において抑制的に作用していることが示唆されている^{12,13)}。しかし、IIP 患者における c-PMN の細胞機能について検討した研究は少ない。筆者らは、無麻酔下でヒツジに自家血漿で作成した zymosan-activated plasma(ZAP)を投与し、末梢血液中の PMN の PMA($10^{-7}M$)刺激下における O_2^- 放出量を検討し、down-regulation が招来されていることを報告した⁵⁾。この現象は、ZAP 投

与終了 24 時間後に観察されること, ZAP 投与終了後に末梢血液中の白血球数が投与前の約 150% まで overshoot することから, 骨髓などの細胞貯蔵器から放出される以前に down-regulation を受けている可能性を示唆した. 患者から採取後 2~3 時間にわたり分離操作や洗浄操作を施行された細胞において, このような機能変化が観察されたことは, c-PMN 機能が強く影響を受けている可能性を示していた. また, IIP 患者における c-PMN の up-regulation が margination の際や骨髓で生じている可能性も考えられる. この機能変化の病態生理上の意義についてもさらに検討が必要であろう.

IIP 患者の c-PMN が正常機能を逸脱している可能性が示唆されたが, また, 気管支肺胞系に遊走された細胞のみならず, 肺毛細血管床を瞬時に通過する c-PMN も, IIP の病態進展過程に深く関与している可能性が示唆された.

文 献

- 1) Cantin, A., Crystal, R.G.: Interstitial pathology: An overview of the chronic interstitial lung disorders. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 76(suppl. 1): 83-91, 1985.
- 2) Yasuoka, S., Nakayama, T., Kawano, T., Ogushi, F., Doi, H., Hayashi, H., Tsubura, E.: Comparison of cell profiles of bronchial and bronchoalveolar lavage fluids between normal subjects and patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Tohoku J. Exp. Med.* 146: 33-45, 1985.
- 3) Izumi, T., Nagai, S., Kitaichi, M., Fujimura, N.: Clinical value of the measurement of BALF cell subsets in interstitial lung diseases. *Chest* 89: 137s-138s, 1986.
- 4) Ishihara, Y., Rosolia, D.L., McKenna, P.J., Peters, S.P., Albertine, K.H., Gee, M.H.: Calcium is required for PMA induced superoxide release from human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 48: 89-96, 1990.
- 5) Albertine, K.H., Cerasoli, F. Jr., Tahamont, M.V., Ishihara, Y., Flynn, J.T., Peters, S.P., Gee, M.H.: Zymosan-activated plasma causes prolonged decreases in PMN superoxide release in sheep. *J. Appl. Physiol.* 67(6): 2481-2490, 1989.
- 6) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature (London)* 312: 371-373, 1984.
- 7) 門田淳一, 朝長昭光, 山田耕三, 福島喜代康, 中島 学, 平谷数人, 植田保子, 広田正毅, 齊藤 厚, 原 耕平: 各種呼吸器疾患とくに間質性肺疾患における好中球スーパーオキシド産生能. *日胸疾会誌* 24: 977-984, 1986.
- 8) Turner-Warwick, M., Haslam, P.L., Weeks, J.: Antibodies in some chronic fibrosing lung diseases: II. Immunofluorescent studies. *Clinical Allergy* 1: 209-219, 1971.
- 9) Crystal, R.G., Gadek, J.K., Ferrans, V.J., Fulmer, J.D., Line, B.R., Hunninghake, G.W.: Interstitial lung disease: Current concepts of pathogenesis, staging, and therapy. *Am. J. Med.* 70: 542-568, 1981.
- 10) Ozaki, T., Hayashi, H., Tani, K., Ogushi, F., Yasuoka, S., Ogura, T.: Neutrophil chemotactic factors in the respiratory tract of patients with chronic airway diseases or idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145: 85-91, 1992.
- 11) Reynolds, H.Y.: Idiopathic interstitial pulmonary fibrosis. Contribution of bronchoalveolar lavage analysis. *Chest* 89: 139s-144s, 1986.
- 12) Thrall, R.S., McCormic, J.R., Ward, P.A.: The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in neutrophil-depleted and complement-depleted rats. *Am. J. Pathol.* 105: 76-81, 1981.
- 13) Clark, J.G., Kuhn, C. III: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters: Effect of neutrophil depletion on lung collagen synthesis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126: 737-739, 1982.