

# 肺胞マクロファージから産生される Interleukin-1 $\beta$ , Tumor necrosis factor $\alpha$ の石綿肺病態における働きに関する研究

奈良県立医科大学第2内科学教室

徳山 猛

## THE ROLE OF TUMOR NECROSIS FACTOR $\alpha$ AND INTERLEUKIN-1 $\beta$ PRODUCED BY ALVEOLAR MACROPHAGES IN THE PATHOGENESIS OF PULMONARY ASBESTOSIS

TAKESHI TOKUYAMA

Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received November 24, 1995

*Abstract*: Current concepts of the pathogenesis of fibrotic changes in pulmonary asbestosis implies the roles of alveolar macrophages and cytokines produced by themselves. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) are multifunctional cytokines produced by alveolar macrophages (AMs), cytokines which regulate inflammation and fibrosis. The aim of this study was to evaluate the role of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  secreted by AMs in the pathogenesis of pulmonary asbestosis. We isolated AMs by bronchoalveolar lavage from 11 subjects exposed to asbestos (AE) for a long time ( $32 \pm 8$  yrs) and from 7 healthy controls (HC). AMs were stimulated with/without lipopolysaccharide ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) for 24 h and supernatants were assayed for TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by enzyme linked immunosorbent assay. AMs from AE produced higher levels of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  upon stimulation with lipopolysaccharide than did the cells of HC. TNF $\alpha$  concentrations in BALFs were significantly higher in AE than in HC. IL-1 $\beta$  concentrations in BALFs were very low, and there was no significant difference between AE and HC. TNF $\alpha$  concentrations in BALFs and TNF $\alpha$  production from AMs positively correlated with the percentage of neutrophil in BALFs. AE were divided into two groups by roentgenographic profuound according to the ILO/UC classification (progressive group: more than 2, early group: less than 1). TNF $\alpha$  concentrations in BALFs were significantly higher in the progressive group than in the early group. In conclusion, these results indicate that TNF $\alpha$  is constitutively secreted by AMs from AE and is possibly associated with the pathogenesis of alveolitis and fibrosis due to asbestos exposure.

### Index Terms

asbestos exposure, interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , bronchoalveolar lavage, alveolar macrophage, pulmonary asbestosis

### 緒 言

石綿肺は高濃度石綿曝露により肺にびまん性の線維化

をきたす疾患で、曝露後潜行性に進行、数年から十数年後に発症し、曝露中止後も進行すると考えられている。その発症は曝露量と相関することがよく知られているが、

個々の症例についてみると必ずしも量-反応関係が存在するとは限らず、宿主側の要因、特に免疫異常がその発症に重要な因子であることが知られている<sup>1)</sup>。数多くの病態研究にも関わらず、石綿による肺線維化の機序の詳細は現在も不明のままであるが、肺末梢に吸入された石綿繊維がマクロファージ(Mφ)の浸潤を中心とした炎症性変化を起こし、肺傷害・炎症・線維化を起こす様々なメディエーターがMφから分泌され、線維化が起こるものと推測されている<sup>2)3)</sup>。

interleukin-1β(IL-1β)と tumor necrosis factor α(TNFα)は主に単核貪食細胞から産生され、免疫応答、炎症、線維化などに関与する多機能を有するサイトカインとして注目されており<sup>4)5)</sup>、様々な急性、慢性肺疾患の病態で重要な働きをしていることが報告されている<sup>6-14)</sup>。著者は石綿曝露による肺線維化でのIL-1βとTNFαとの働きを知るため、石綿肺患者を含む石綿曝露者の気管支肺胞洗浄液中と肺胞Mφから産生されるこれらのサイトカインについて検討し、新しい知見を得たので報告する。

### 対 象

奈良県立医科大学第2内科外来を受診した、某石綿工場で勤務していた経歴を有し肺感染症を認めない11例を対象とし、これを曝露群とした。この石綿工場では主にカナダ産クリソタイトが使用されており、紡績、建築材料の加工が行われていた。年齢は54歳から71歳(平均62歳)、曝露期間は平均32年(21~42年間)、曝露中止後の平均期間は6年(0~14年間)、喫煙歴は2例が喫煙者、9例が非喫煙者であった。胸部X線写真は1980年ILO/UC分類にしたがい3名の熟練した読影者が独立に読影し、0型4例、1型2例、2型4例、3型1例と判定した(Table 1)。

対照は粉塵曝露歴のない7例の健常ボランティア、年齢26~46歳(平均32歳)、2例が喫煙者、5例が非喫煙者で、これを対照群とした。

すべての対象者に対して事前に本研究に関する十分な説明を行い、調査研究協力に関し了承を得た。

### 方 法

#### 1) 気管支肺胞洗浄

4%リドカイン(キシロカイン)約5mlで上気道を麻酔し、気管支ファイバースコープを挿入、右の前肺底区支(B<sup>8</sup>)に楔入、生理食塩水50ml×5回、合計250mlを注入洗浄した。洗浄液の回収は壁付けの吸引器を使用した。回収後気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage

fluid: BALF)は2枚重ねのガーゼで濾過し、その後300g、10分間遠心し、細胞成分と上清成分とに分離した。少量のBALFで細胞数と細胞分画との計測を行った。cytocentrifuge preparation(サクラ精機社、東京)で標本を作製し、May-Grünwalds Giemsa染色し、形態的にMφ、リンパ球、好中球、好酸球を分類し、合計200細胞中の各比率を算出した。なお上皮細胞は計測に加えなかったが、全例2%未満であった。

#### 2) BALFMφの分離

細胞成分はphosphate buffered saline without calcium and magnesium(宝酒造、京都)(PBS(-))で2回洗浄し、complete medium(10%非動化fetal bovin serum(Gibco, Grand Island, NY, USA), 100 U/ml ペニシリン, 100 μg/ml ストレプトマイシン添加 RPMI 1640 medium(Gibco, Grand Island, NY, USA))で1-2×10<sup>6</sup>/mlに調整、これをあらかじめfetal bovin serum(FBS)をコーティングしたプラスチックペトリディッシュに添加し、37°C、1時間孵置した。非付着細胞を37°C PBS(-)で洗浄除去後、5% FBS加0.2 ethylene-diaminetetracetic acid(和光純薬、大阪)を5ml加え付着細胞を回収した。付着細胞は98%以上が肺胞Mφで、トリンパンプルー染色で85%以上の生存が確認された。

#### 3) 培養上清の調整

肺胞Mφをcomplete mediumで2.5×10<sup>5</sup>/mlに調整し、96穴マイクロプレート(Corning, NY, USA)に200 μl注入、最終濃度10 μg/mlのlipopolysaccharide(E. coli 0127; DIFCO, Detroit, Michigan, USA)(LPS)添加、または非添加状態で37°C、5% CO<sub>2</sub>下で24時間培養した。これを1400g、10分遠心後培養上清を回収、測定まで-80°Cで保存した。本上清中のIL-1β、TNFαを測定し、肺胞Mφの両サイトカイン産生能とした。

Table 1. Characteristics of asbestos exposures

Case	Age	Duration of exposure	Smoking	Chest XP†
1	57	23	smoker	0/1
2	56	24	non-smoker	0/1
3	60	27	non-smoker	0/1
4	68	28	non-smoker	0/1
5	54	27	non-smoker	1/1
6	69	41	non-smoker	1/2
7	69	38	non-smoker	2/2
8	62	42	non-smoker	2/2
9	61	42	smoker	2/2
10	71	35	non-smoker	2/3
11	56	21	non-smoker	3/3

† profound of chest roentgenogram according to the ILO/UC classification (1980)

4) BALF の濃縮

BALF は限定濾過法で濃縮した. centriprep 10 (AMICON, Beverly, MA, USA) に BALF を注入し, 2300 g, 4°C で遠心, 30 倍に濃縮し, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  測定まで -80°C で保存した.

なお濃縮による IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  の吸着等による影響の有無を検討したところ, 両者とも 450 pg/ml までの各濃度で濃縮により約 80% の IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  が回収され, 限外濾過濃縮により定量的に BALF 中 TNF $\alpha$  が測定できることが示された (Fig. 1).

5) サイトカインの測定

enzyme linked immunosorbent assay 法 (ヒト IL-1 $\beta$  IRMA キット・ヒト TNF $\alpha$  IRMA キット; MED-GENIX, Fledurus, Belgium) で培養上清中と濃縮 BALF 中との IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  を測定した. 抗ヒト IL-1 $\beta$ ・抗ヒト TNF $\alpha$  モノクローナル抗体を固層化した 96 穴マイクロプレートに各サンプル, horse radish periox-

idase 標識抗ヒト IL-1 $\beta$ ・TNF $\alpha$  モノクローナル抗体を順次反応させ, 最後に反応により形成した複合体中の酵素活性を測定することにより IL-1 $\beta$ ・TNF $\alpha$  活性を定量した. 測定感度は, IL-1 $\beta$  が 8.8 pg/ml, TNF $\alpha$  が 6.9 pg/ml で, これ以下の時 0 pg/ml とした.

統計

本研究の結果は平均土標準偏差で示し, 統計学的解析は Mann-Whitney U test, Pearson's correlation coefficient を用いた.

成 績

1) BALF 細胞分画 (Table 2)

細胞数は対照群と比べ石綿曝露群で軽度増加傾向にあり, 細胞分画では石綿曝露群非喫煙者で好中球分画の有意の増加を認めた ( $p < 0.05$ ).

2) 肺胞 M $\phi$  サイトカイン産生能

LPS 非添加状態の肺胞 M $\phi$  サイトカイン産生は対照

Table 2. BALF findings of asbestos exposures and control subjects

	Control		Asbestos exposure	
	non-smoker (n=5)	smoker (n=2)	non-smoker (n=9)	smoker (n=2)
Fluid recovery (%)	56.6 $\pm$ 12.6	51.2 $\pm$ 9.9	47.1 $\pm$ 8.2	38.0 $\pm$ 2.8
Cell number ( $\times 10^6$ /ml)	1.28 $\pm$ 0.47	2.33 $\pm$ 1.03	2.29 $\pm$ 1.28	3.62 $\pm$ 2.60
Cell proportions				
Macrophage (%)	86.4 $\pm$ 7.0	85.3 $\pm$ 0.4	77.8 $\pm$ 14.1	72.7 $\pm$ 31.3
Lymphocyte (%)	12.8 $\pm$ 6.2	14.4 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 5.8	10.7 $\pm$ 8.3
Neutrophil (%)	0.1 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 10.8§	15.4 $\pm$ 21.4
Eosinophil (%)	0.8 $\pm$ 1.3	0 $\pm$ 0	1.8 $\pm$ 1.8	13.5 $\pm$ 1.6
CD4/CD8 ratio	1.56 $\pm$ 0.46	1.51 $\pm$ 0.04	1.63 $\pm$ 1.98	0.94 $\pm$ 0.42

§  $p < 0.05$ ; when compared with non-smoking control subjects

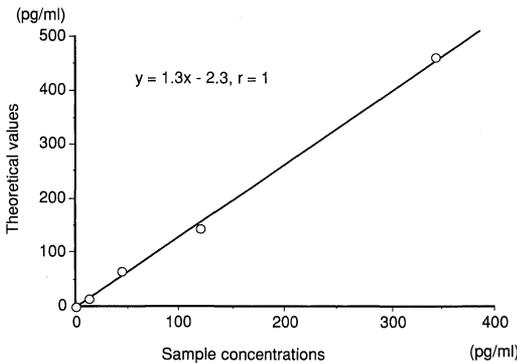


Fig. 1. Relationship between measured values of TNF $\alpha$  and those theoretical concentration in  $\times 30$  concentrated BALF.

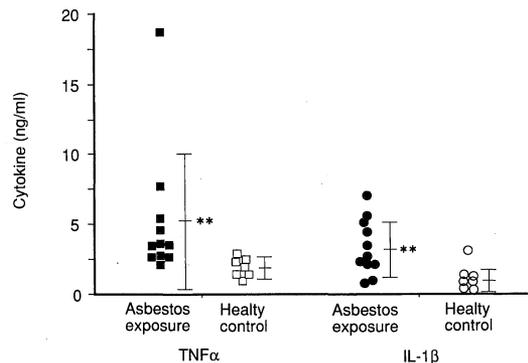


Fig. 2. IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  production by 10  $\mu$ g/ml LPS stimulated alveolar macrophages. Data were represented as mean  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.01$  (compared to healthy control.)

群(IL-1 $\beta$ : 16 $\pm$ 12 pg/ml, TNF $\alpha$ : 108 $\pm$ 63 pg/ml)と比べ、曝露群(IL-1 $\beta$ : 46 $\pm$ 38 pg/ml, TNF $\alpha$ : 590 $\pm$ 1543 pg/ml)で高い傾向であった。LPS 10  $\mu$ g/mlを添加し、24時間培養での肺胞M $\phi$ サイトカイン産生能は、LPS非添加状態に比べ、顕著に増加し、曝露群は対照群と比べ有意に高かった(IL-1 $\beta$  3,329 $\pm$ 1,993 pg/ml vs 1,135 $\pm$ 1,034 pg/ml,  $p < 0.01$ ; TNF $\alpha$  5,275 $\pm$ 4,766 pg/ml vs 1,996 $\pm$ 656 pg/ml,  $p < 0.01$ ) (Fig. 2)。曝露群でのこれらのサイトカイン産生能の増加が添加したLPS濃度に対する反応性の違いによるものかどうかを検討するため、両群の肺胞M $\phi$ に0.1, 1, 10, 100  $\mu$ g/mlのLPSをそれぞれ添加し、24時間培養した。両群ともLPS濃度依存性にIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 産生は増加し、LPS各濃度で対照群と比べ曝露群でIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 産生能は著明に増加した(Fig. 3)。さらにLPS 10  $\mu$ g/ml刺激状態の肺胞M $\phi$ IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 産生能の培養時間による変化を曝露群と対照群で測定した。IL-1 $\beta$ 産生は24時間培養で、TNF $\alpha$ 産生は12時間培養で最高に達した。各培養時間で曝露群は対照群よりIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 産生能の増加を認めた(Fig. 4)。

両群とも喫煙による明らかな差は認めなかった。また対照群は曝露群と比較し年齢が有意に低いことから、これらのサイトカイン産生能の加齢による影響を検討するため末梢肺癌症例4例(55~78歳, 平均66歳)の健側肺のBALFM $\phi$ でIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 産生能を測定したが、対照群と差はなく(IL-1 $\beta$ : 1008 $\pm$ 328 pg/ml, TNF $\alpha$ :

2032 $\pm$ 1138 pg/ml)、曝露群と比べ有意に低い値であった( $p < 0.05$ )。

無刺激とLPS 10  $\mu$ g/ml刺激とのTNF $\alpha$ 産生能の相関を検討したところ、有意の正の相関関係を認めた( $r = 0.95$ ,  $p < 0.01$ )。しかしIL-1 $\beta$ 産生能では明らかな相関関係は認めなかった。

### 3) BALF中IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$

30倍に濃縮したBALF中TNF $\alpha$ は曝露群43 $\pm$ 70 pg/mlで、対照群8 $\pm$ 7 pg/mlと比較し有意の増加を認めた( $p < 0.05$ )。BALF中アルブミン濃度(mg/dl)との比でも曝露群2.2 $\pm$ 2.8で対照群0.4 $\pm$ 0.3と比較し有意の増加を認めた( $p < 0.01$ ) (Table 3)。30倍に濃縮したBALF中IL-1 $\beta$ は検出感度以上であったのは曝露群11例中4例(14 $\pm$ 18 pg/ml)、対照群7例中2例(6 $\pm$ 11 pg/ml)のみで、両群に差は認めなかった。

BALF中TNF $\alpha$ 濃度と肺胞M $\phi$ TNF $\alpha$ 産生能との相関を検討したが、有意の相関は認めなかった。

### 4) サイトカインとBALF細胞分画の相関

対照群と曝露群とを合わせた全対象者のBALF中TNF $\alpha$ , 肺胞M $\phi$ TNF $\alpha$ 産生能とBALF中好中球分画との間に有意の正の相関を認めた(Fig. 5)。

### 5) サイトカインと曝露歴, 胸部X線写真所見との相関

石綿曝露期間, 曝露開始からの期間, 曝露を中止してからの期間とサイトカインとの関連を検討したが、明らかな関連は認めなかった。

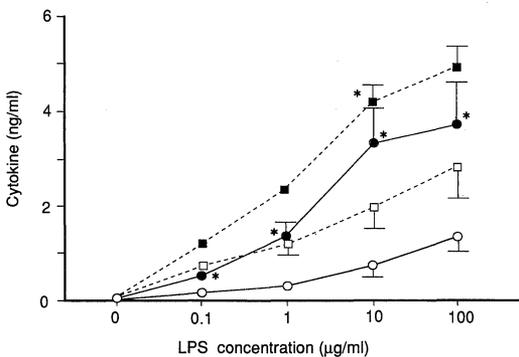


Fig. 3. IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  production by stimulated alveolar macrophages with various concentrations of LPS. Data were represented as Mean $\pm$ SD. \* $p < 0.05$  (compared to healthy control).

○—○: IL-1 $\beta$  in healthy control; ●—●: IL-1 $\beta$  in asbestos exposure group; □—□: TNF $\alpha$  in healthy control; ■—■: TNF $\alpha$  in asbestos exposure group.

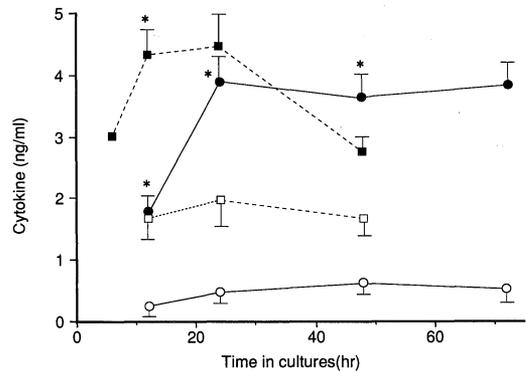


Fig. 4. Kinetics of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  production by alveolar macrophages stimulated with 10  $\mu$ g/ml LPS. Data were represented as Mean $\pm$ SD. \* $p < 0.05$  (compared to healthy control).

○—○: IL-1 $\beta$  in healthy control; ●—●: IL-1 $\beta$  in asbestos exposure group; □—□: TNF $\alpha$  in healthy control; ■—■: TNF $\alpha$  in asbestos exposure group.

Table 3. TNF $\alpha$  in concentrated BALF

	Asbestos exposure	Healthy control
Alb(mg/dl)	1.86 $\pm$ 0.94	1.83 $\pm$ 1.69
TNF $\alpha$ (pg/ml)	43 $\pm$ 70	8 $\pm$ 7 §
TNF $\alpha$ /Alb	2.8 $\pm$ 2.8	0.4 $\pm$ 0.3 §

§ p<0.05 compared to healthy group

Table 4. TNF $\alpha$  concentration and neutrophils in BALF

	Early group (n=6)	Progressive group (n=5)
TNF $\alpha$ (pg/ml)	14.3 $\pm$ 8.8	77.4 $\pm$ 97.7
TNF $\alpha$ /Alb	9.1 $\pm$ 5.5	36.7 $\pm$ 37.8 §
Neu(%)	4.9 $\pm$ 6.4	20.0 $\pm$ 12.1 §

Progressive group consists of asbestos exposures who have more than category 2 on chest roentgenographic profound according to the ILO/UC classification, and early group less than category 1. § p<0.05 compared to early group

胸部X線写真上, 肺野病変をILO/UC分類の2以上の進行群と1以下の群に分類すると, 進行群でBALF中好中球分画, TNF $\alpha$ 濃度が有意に高かった(Table 4).

## 考 察

石綿肺は職業的石綿曝露によりびまん性の肺線維化をきたす疾患で, 組織学的には, 初期病変は石綿繊維が沈着した肺胞道と呼吸細気管支への肺胞M $\phi$ の集積, 線維性肥厚がみられ, さらにこれらの気道に隣接する肺胞腔内に浸出物, 肺胞壁には線維芽細胞の増生・線維性肥厚が認められ, 進行すると蜂巣肺を形成する<sup>1)</sup>. 石綿肺の線維化病態の機序の詳細は現在も不明であるが, 吸入され末梢気道に到達した石綿繊維の慢性的な刺激によりM $\phi$ の浸潤を主とした炎症を起こし, これらのM $\phi$ から肺傷害, 炎症, 線維化を起こすメディエータが産生され徐々に肺線維化が進行するものと考えられている<sup>1-3)</sup>. 肺局所の炎症を評価するために様々な方法が報告されているが, 1974年 Reynolds<sup>15)</sup>により開発された気管支肺胞洗浄法(bronchoalveolar lavage: BAL)は, 末梢気道と肺胞領域との炎症細胞を直接採取できる検査として多くのびまん性間質性肺疾患の活動性や病態の研究に用いられている. 特発性間質性肺炎を中心とする肺線維症は間質の線維化として概念化されてきたが, 最近の研究からは以前に形成された線維化の集積が, 現在間質として存在していることを示しているにすぎず, 早期の線維化形成過程の検索から, すべての線維化をきたす肺疾患の線維化の場は, おもに肺胞腔内であることが明らかになっている<sup>16)</sup>. この意味でBALで回収された成分は, 肺胞腔内から回収される検体で, 線維化の研究に適していると考えられる. 一般にBALは回収の良好な中葉で行われており, 石綿曝露者のBALの報告も中葉のみで行われているが, 中葉は非特異的な炎症が起こりやすい部位であり, 石綿肺は下葉から進展していくことなどから, 本研究では下葉で最も回収率のよい前肺底区(S<sup>8</sup>)を洗浄標的部位とした. 石綿曝露者のBALの報告は比較的少なく, 細胞数の軽度増加を認めること, 細胞分画では石綿肺患者で好中球・好酸球が増加すること, 良性石綿性胸膜炎でリンパ球が増加し, CD4/CD8比が上昇することなどが報告されているにすぎない<sup>17)</sup>. 今回の検討では, 他の石綿曝露者のBALの報告とはほぼ同様の成績で, 細胞数の軽度増加, 石綿肺患者で好中球分画が増加していることが見出された.

IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ は免疫応答・炎症・線維化などに関与する調節性サイトカインで, 生体内では主に単核貪食細胞から産生されている<sup>5)6)</sup>. 動物実験ではIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$

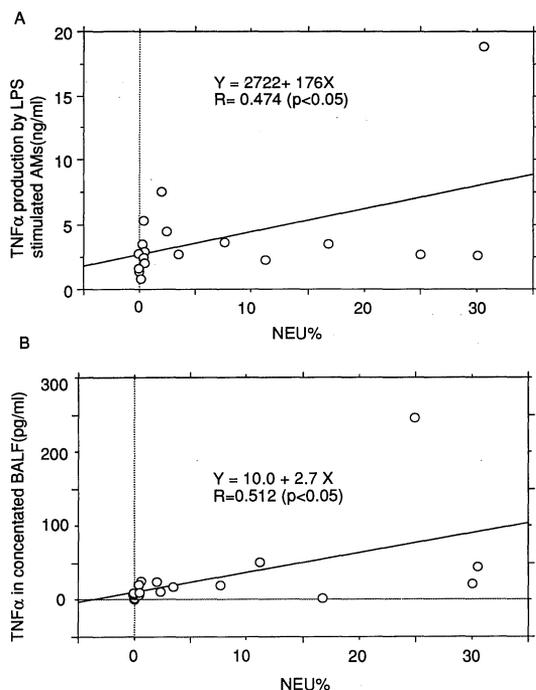


Fig. 5. Relationship between %neutrophils in BALF and TNF $\alpha$  production by LPS stimulated alveolar macrophages(A), or between the former and TNF $\alpha$  levels in concentrated BALF(B).

が石綿肺<sup>7)</sup>, 珪肺<sup>7)</sup>, プレオマイシン肺臓炎<sup>9)</sup>の成立に重要な働きをしていると報告されており, また臨床的には特発性間質性肺炎<sup>10)</sup>, 慢性関節リウマチに伴う間質性肺炎<sup>11)</sup>, 炭坑夫塵肺<sup>12)</sup>, サルコイドーシス<sup>13)</sup>患者の肺胞 M $\phi$  IL-1 $\beta$  産生能, TNF $\alpha$  産生能の上昇, 成人呼吸窮迫症候群患者の BALF 中 TNF $\alpha$  濃度の上昇が報告されており<sup>14)</sup>, 肺の急性・慢性炎症, 線維化に IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  が重要な働きをしていると考えられている. *in vitro* で石綿繊維に曝露するとラット肺胞 M $\phi$  からの IL-1<sup>18)</sup>, TNF $\alpha$ <sup>19)</sup>産生が上昇すると報告され, また著者らは<sup>20)</sup>ヒトで M $\phi$  の前駆細胞である末梢血単球が, *in vitro* での石綿繊維刺激により IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  産生を起こすことを報告しており, これらのサイトカインがヒトでの石綿肺の病態で重要な働きをしていることが推測されるが, ヒトでの検討はほとんどなされていない<sup>21)</sup>.

曝露群の肺胞 M $\phi$  IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  産生能を対照群と比較したところ, LPS 非刺激状態では曝露群で高い傾向にあるが, 有意差は認めない. しかし LPS 刺激により曝露群で有意に IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  産生能が上昇したが, これらの上昇は LPS 濃度や培養上清を採取する培養時間の違いのために起こったものでない. M $\phi$  はインターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) やインターロイキン 2 (IL-2) などの刺激により priming 状態になり, LPS のような適当な triggering 刺激により IL-1 $\beta$ <sup>22)</sup>, TNF $\alpha$  産生<sup>23)</sup>が認められることが知られている. また石綿曝露群で肺胞 M $\phi$  からの IFN- $\gamma$  産生能が上昇しているとの報告があり<sup>24)</sup>, 曝露群の LPS 添加後の IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  産生能の有意の上昇は肺胞 M $\phi$  が *in vivo* で石綿繊維により直接刺激または IFN- $\gamma$  などのサイトカインを介して priming されていたものと考えられる.

さらにこの肺胞 M $\phi$  の IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  産生能が *in vivo* の状態を反映しているかどうかを検討するため, BALF 中 IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  濃度を測定した. BALF 中 TNF $\alpha$  濃度は対照群と比べ曝露群で有意に上昇している. しかし BALF 中 IL-1 $\beta$  は両群とも低値を示し, 両群間に差は認めない. 1993 年 Zhang<sup>21)</sup>らは石綿肺患者と特発性間質性肺炎患者とで肺胞 M $\phi$  の TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  産生能が, 健常対照と比較し有意に上昇し, 肺胞 M $\phi$  中の TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mRNA が有意に増加していることを報告している. 方法で示したように, TNF $\alpha$  同様 IL-1 $\beta$  も限外濾過による濃縮で定量的に測定できることを確認しており, 測定方法に問題はないと考えられる. 末梢血単球では, 壁への付着, リコンビナント C5a,  $\beta$ -glucan polymer, calcium ionophore などの刺激により, IL-1 $\beta$  ペプチドの合成を伴わない IL-1 $\beta$  mRNA の合成が起

ることが報告されている<sup>25)26)</sup>. これらの刺激により合成される IL-1 $\beta$  mRNA は半減期は正常で, これらの刺激により "prime" された細胞は, ごく少量の LPS などの刺激により "prime" されていない細胞と比較し, IL-1 $\beta$  ペプチドが高濃度に合成される. 以上から石綿曝露者の肺胞 M $\phi$  は IL-1 $\beta$  産生に関し priming されており, LPS 刺激に対する産生能は上昇しているが, *in vivo* では合成・分泌されていないものと考えられる. また石綿曝露群で BALF 中 TNF $\alpha$  が上昇していたことは, *in vitro* で石綿繊維を曝露すると肺胞 M $\phi$  からの TNF $\alpha$  産生が上昇し<sup>19)</sup>, 肺で TNF $\alpha$  を産生する細胞は主に M $\phi$  と考えられていることから<sup>6)</sup>, *in vivo* で吸入曝露された石綿繊維の刺激により M $\phi$  が活性化され TNF $\alpha$  の産生が持続的に上昇しているものと考えられる.

TNF $\alpha$  は炎症細胞や血管内皮細胞に働き, 炎症を起こすと考えられている. すなわち好中球, リンパ球や単球を直接活性化させ, 血管内皮細胞や線維芽細胞などの間質細胞に働き炎症細胞遊走因子を分泌させることにより間接的に炎症細胞の遊走を促進することや, TNF $\alpha$  が血管内皮細胞に働き接着分子の表出を促進し, 透過性を亢進させることなどが報告されている<sup>5)</sup>. 炎症細胞に対する TNF $\alpha$  の影響を検討するため BALF 中細胞分画と TNF $\alpha$  との相関を検討した. 石綿曝露群では好中球分画が増加しており, BALF 中 TNF $\alpha$  濃度と肺胞 M $\phi$  TNF $\alpha$  産生能とに正の相関関係を認め, 好中球の浸潤に TNF $\alpha$  が関与していることが推測される. TNF $\alpha$  を経気道的または全身的に投与すると肺に急性好中球浸潤を中心とする炎症を起こすことが報告されている<sup>27)28)</sup>. 急性の免疫複合体によるラット胞隔炎モデルでの検討では, 免疫複合体を経気道的に投与後, BAL で経過を観察したところ好中球を中心とする炎症細胞の増加と TNF $\alpha$  活性の上昇とを認め, この TNF $\alpha$  は免疫組織学的に M $\phi$  から産生されることが示されている. また抗 TNF $\alpha$  抗体を投与することにより好中球の浸潤は著明に抑制され, TNF $\alpha$  が好中球の浸潤に重要な働きをするという報告もある<sup>29)</sup>. ラット石綿肺モデルで, 経気道的に石綿繊維を投与すると好中球を中心とする炎症が起こり, 肺胞 M $\phi$  からの TNF $\alpha$  産生が著明に増加することが報告されている<sup>19)</sup>. 以上のことから石綿肺の慢性の肺局所の炎症で好中球浸潤に TNF $\alpha$  が重要な働きをしていることを推測される.

さらに石綿曝露者の X 線写真上の肺線維化の程度と TNF $\alpha$  との関連を検討したところ, 胸部 X 線写真上 ILO/UC 分類で 2 以上あった線維化の進行している群は, 1 以下の線維化の軽度な群と比較し, BALF 中好中球と

TNF $\alpha$  とが増加している。BALF 中の好中球の増加は石綿肺<sup>15)</sup>や成人呼吸窮迫症候群<sup>30)</sup>, 特異性間質性肺炎<sup>31)</sup>, リウマチ肺<sup>32)</sup>等の急性・慢性間質性肺炎患で認められることが報告されている。線維化病態での好中球の作用は議論のあるところであるが, 正常肺組織を破壊して線維化を進展させているものと考えられている<sup>33)</sup>。すなわち活性化された好中球から分泌される活性化酸素, エラスターゼ, コラーゲナーゼなどが肺組織傷害を起し, この肺組織傷害を修復する過程で線維化をきたすものと考えられている。TNF $\alpha$  は好中球を活性化させ, これらのメディエーターの分泌を促進することが報告されている<sup>5)</sup>。また TNF $\alpha$  は in vitro で線維芽細胞の増殖を促進する作用があり<sup>34)</sup>, 肺線維化の動物モデルで, 抗 TNF $\alpha$  抗体が線維化の進行を阻害することが報告されており<sup>35)</sup>, 今回の検討で線維化が進行した群で TNF $\alpha$  が高値であったことから, 石綿肺病態では TNF $\alpha$  が直接線維芽細胞の増殖を促し, 線維化を促進している可能性が考えられる。

## 結 語

石綿曝露により起こる肺線維化病態での肺胞 M $\phi$  から産生される IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  の働きを解明する目的で, 石綿肺患者を含む石綿曝露者の気管支肺胞洗浄を行い, 肺胞 M $\phi$  の IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  産生能および, 気管支肺胞洗浄液中 IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  濃度を測定解析した。

1) 石綿曝露者の肺胞 M $\phi$  IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  産生能は, いずれも健常対照に比し上昇していたが, 気管支肺胞洗浄液中では, TNF $\alpha$  濃度のみ健常対照に比し上昇しており, 石綿曝露者では in vivo で IL-1 $\beta$  は増量しないで, TNF $\alpha$  が持続的に上昇していることをはじめて明らかにした。

2) 肺胞 M $\phi$  TNF $\alpha$  産生能と気管支肺胞洗浄液中 TNF $\alpha$  濃度とは, 気管支肺胞洗浄液中好中球分画の割合と正の相関関係を認め, 好中球の浸潤に TNF $\alpha$  が関与している可能性を新たに示した。

3) 石綿肺病変が進展している群と進展のほとんど見られない群を比較したところ, 進展している群で気管支肺胞洗浄液中好中球分画の割合と TNF $\alpha$  濃度とが有意に高く, TNF $\alpha$  は好中球を介して, あるいは直接的に線維芽細胞に作用することにより, 石綿曝露による肺線維化の病態に関与している可能性を新たに示した。

以上から石綿曝露者で, 肺胞 M $\phi$  は in vivo で恒常的に TNF $\alpha$  を産生し, この TNF $\alpha$  が線維芽細胞に直接作用するあるいは, 好中球の遊走と活性化とを惹起, 肺組織傷害を起すことにより間接的に線維化の進展に働い

ていることを示唆する新しい知見を得た。

なお本論文の要旨は 1992 年度アメリカ胸部疾患学会 (1992 年 5 月マイアミ), 第 33 回日本胸部疾患学会総会 (1993 年 4 月横浜), 第 90 回日本内科学会総会 (1993 年 5 月岡山) で発表した。本研究の一部は厚生省が補助金 (4-9) の補助を得た。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲賜りました奈良県立医科大学第 2 内科学教室成田亘啓教授に心から感謝の意を表しますとともに, 御校閲・御助言賜りました腫瘍放射線医学教室大石 元教授ならびに公衆衛生学教室米増國雄教授に深謝申し上げます。また直接に御指導, 御教示いただきました米田尚弘助手に感謝いたします。さらに本研究に御協力いただいた第 2 内科学教室諸兄に感謝致します。

## 文 献

- 1) 成田亘啓, 春日宏友, 三上理一郎: Annual Review 呼吸器. 中外医学社, 東京, p185, 1989.
- 2) William, N. R., William, D. T. and Arnold, R. B.: Am. Rev. Respir. Dis. 143: 408, 1991.
- 3) Rom, W. N., Bitterman, P. B., Rennard, S. I., Cantin, A. and Crystal, R. G.: Am. Rev. Respir. Dis. 136: 1429, 1987.
- 4) Oppenheim, J. J., Kovacs, E. J., Matsushima, K. and Durum, S. K.: Immunol. Today 7: 45, 1987.
- 5) Ulich, T. R.: Cytokine of the lung. in Lung biology in health and disease (Kelly, J., ed.). Vol. 61, Marcel Dekker, New York, p307, 1993.
- 6) Kelley, J.: Am. Rev. Respir. Dis. 141: 765, 1990.
- 7) Bissonnette, E. and Rola-pleszczynski, M.: Immunology 13: 329, 1989.
- 8) Hartmann, D. P., Georgian, M. M., Ogiso, Y. and Kagan, E.: Clin. Exp. Immunol. 55: 643, 1984.
- 9) Piguet, P. F., Collart, M. A., Grau, G. E., Kapanci, Y. and Vassalli, P.: J. Exp. Med. 170: 655, 1989.
- 10) Nagai, S., Aung, H., Takeuchi, M., Kusume, K. and Izumi, T.: Chest 99: 674, 1991.
- 11) Gosset, P., Perex, T., Lassalle, P., Duquesnoy, B., Farre, M. J., Tonnel, A. B. and Capron, A.: Am. Rev. Respir. Dis. 143: 593, 1991.

- 12) Lassalle, P., Grossert, P., Aerts, C., Fournier, E., Lafitte, J. J., Degreef, J. M., Wallaert, B., Bernard, A. and Viosin, T. : *Exp. Lung. Res.* **16** : 73, 1990.
- 13) Spatafora, M., Merendino, A., Chiappara, G., Gjomarkaj, M., Melis, M., Bellia, V. and Bonsignore, G. : *Chest* **96** : 542, 1989.
- 14) Millar, A. B., Singer, M., Meager, A., Foley, N., M., Johnson, N. and Rook, G. A. W. : *Lancet* **2** : 712, 1989.
- 15) Reynolds, H. Y. : *Am. Rev. Respir. Dis.* **135** : 250, 1984.
- 16) Crouch, E. : *Am. J. Physiol.* **259** : 159, 1990.
- 17) Xaubet, A., Rodriguez-Roisin, R., Bombi, J. A., Marin, A., Roca, J. and Agusti-Vidal, A. : *Am. Rev. Respir. Dis.* **133** : 848, 1984.
- 18) Oghiso, Y. and Kubota, Y. : *Microbiol. Immunol.* **31** : 275, 1984.
- 19) Dubois, C. M., Bissonnette, E. and Rola-Pleszczynski, M. : *Am. Rev. Respir. Dis.* **139** : 1257, 1984.
- 20) 德山 猛, 米田尚弘, 塚口勝彦, 吉川雅則, 夫彰啓, 福岡和也, 友田恒一, 仲谷宗裕, 春日宏友, 成田亘啓, 田村猛夏, 宮崎隆治 : *呼吸* **13** : 282, 1994.
- 21) Zhang, Y., Lee, T. C., Gullemin, B., Yu, M. and Rom, W. N. : *J. Immunol.* **150** : 4188, 1993.
- 22) Newton, R. C. : *Immunology* **56** : 441, 1984.
- 23) Nedwin, G. E., Svedersky, L. P., Bringman, T. S., Palladino, M. A. and Goeddel, D. V. : *J. Immunol.* **135** : 2492, 1985.
- 24) Robinson, R. W. S., Rose, A. H., Hayes, A. and Musk, A. W. : *Am. Rev. Respir. Dis.* **138** : 278, 1984.
- 25) Schindler, R., Clark, B. D. and Dinarello, C. A. : *J. Biol. Chem.* **265** : 10232, 1990.
- 26) Schindler, R., Gelfand, J. A. and Dinarello, C. A. : *Blood* **76** : 1631, 1990.
- 27) Ulich, T. R., Yin, S., Guo, K., del Castillo, J., Eisenberg, S. and Thompson, R. C. : *Am. J. Pathol.* **138** : 521, 1991.
- 28) Stephens, K. E., Ishizaka, A., Larrick, J. W. and Raffin, T. A. : *Am. Rev. Respir. Dis.* **138** : 1300, 1988.
- 29) Warren, J. S., Yabroff, K. R., Remick, D. G., Kunkel, S. L., Chensue, S. W., Kunkel, R. G., Johanson, K. J. and Ward, P. A. : *J. Clin. Invest.* **84** : 1873, 1989.
- 30) Weiland, J. E., Davis, W. B., Holter, J. F., Mohammed, J. R., Dorinskiy, P. M. and Gadek, J. E. : *Am. Rev. Respir. Dis.* **133** : 218, 1986.
- 31) Crystal, R. G., Bitterman, P. B., Rennard, S. I., Hance, A. J. and Keogh, B. A. : *N. Engl. J. Med.* **310** : 154, 1984.
- 32) Garcia, J. G. N., James, H. L., Zinkgraf, S., Perlman, M. B. and Keogh, B. : *Am. Rev. Respir. Dis.* **92** : 811, 1987.
- 33) Snider, G. L. : *Am. Rev. Respir. Dis.* **127** : 535, 1983.
- 34) Lwibovich, S. J., Polverini, P. J., Shepard, M. H., Wiseman, D. M., Shively, V. and Nussewir, N. : *Nature* **329** : 630, 1987.
- 35) Piguet, P. F., Collart, M. A., Grau, G. E., Sappino, A. P. and Vassalli, P. : *Nature* **344** : 245, 1990.