

学位論文題名

# Increased Levels of Interleukin-8 in BAL Fluid from Smokers Susceptible to Pulmonary Emphysema

(肺気腫を発症しやすい喫煙者における  
気管支肺胞洗浄液中インターロイキン8の上昇)

## 学位論文内容の要旨

### 【研究目的】

肺気腫は長年の喫煙により肺胞壁エラスチンが不可逆的に破壊されて起こる疾患で、その病因は肺内のプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡で説明される。エラスチン分解能を有するプロテアーゼはマクロファージや好中球などの炎症細胞由来であり喫煙によって誘導される。この仮説を証明する成績は数多く存在するが、なぜ一部の喫煙者だけが肺気腫になるかを説明するものはない。我々はこれまでに自覚症状のない多数の中老年者を対象に高分解能 CT 検査で肺気腫病変の有無を診断し、さらに気管支肺胞洗浄(BAL)検査を行って、早期肺気腫患者と同程度に喫煙歴が有りながら病変がない健常者との比較をする一連の研究を行ってきた。その結果、両群で BAL 液中肺胞マクロファージ数や好中球数は同程度に上昇しているにもかかわらず、患者群では BAL 液中好中球エラスターゼ・ $\alpha 1$  アンチトリプシン (NE- $\alpha 1$ PI) 複合体量が多いこと、この複合体量がエラスチン分解産物である elastin-derived peptide 量と有意に相関すること、好中球特異的蛋白である human neutrophil lipocalin (HNL)濃度が有意に高いことなどを報告してきた。これらの成績はいずれも好中球活性化が肺気腫病変形成に関与している可能性を示唆する。そこで、本研究ではこの背景にある機序を知るために、3 種類の好中球遊走活性化因子、interleukin-8 (IL-8), epithelial neutrophil activating protein-78 (ENA-78), leukotriene B4 (LTB4)と 2 種類の単球系遊走因子、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1  $\alpha$  (MIP-1  $\alpha$ )の BAL 液中濃度を同様の対象群で測定した。さらに BAL 液中 IL-8 の細胞起源の一つとして肺胞マクロファージに着目し、培養上清中濃度と IL-8 mRNA 量を定量評価した。

### 【対象、方法】

対象は明らかな呼吸器症状はないが肺疾患の検診を目的として北大第一内科を受診した 61 名の中老年者である(男性 55 名、女性 6 名; 平均年齢  $55 \pm 11$ SD 歳)。問診、血液検査、呼吸機能検査、肺高分解能 CT 検査を行い、肺気腫病変のない過去喫煙者 7 名(非喫煙者 2 名を含む)、肺気腫病変のある過去喫煙者 9 名、肺気腫病変のない現在喫煙者 20 名、気腫病変のある現在喫煙者 25 名の 4 群に分類した。BAL は気管支鏡を右肺中葉亜区域支に喫入し、生理的食塩水を 50ml ずつ 4 回に分けて注入と吸引を繰り返した。肺胞領域をより反映するとされる後半の 3 回分の回収液を今回の研究に用いた。ガゼで濾過して粘液を除去した後遠心分離し細胞成分と上清に分けた。細胞成分については総細胞数、細胞分画を算定し、上清は回収量を測った後-70℃で保存した。NE- $\alpha 1$ PI 複合体、ENA-78、LTB4 濃度は BAL 原液で、IL-8、MCP-1、MIP-1  $\alpha$ 濃度は、BAL 液を遠心式簡易濃縮器で 10 倍から 15 倍に濃縮したうえでいずれも ELISA 法により測定した。得られた肺胞マクロファージは 24 時間無刺激下で培養し、その上清中の IL-

8 濃度を測定した。そのうち 16 名の喫煙者については、肺泡マクロファージの総 RNA を抽出して、fluorogenic real time RT-PCR 法により細胞数あたりの IL-8 mRNA 量を比較検討した。統計は、年齢、呼吸機能検査値、BAL 液中の炎症細胞数については 4 群間で ANOVA を行った後、各 2 群間の検定には Fisher 法を用いた。遊走活性化因子の濃度については正規分布をしていなかったため、4 群間の検定に Kruskal-Wallis test を行った後、2 群間の差異を Mann-Whitney U test で検討した。いずれの場合も  $p < 0.05$  を有意とした。

#### 【結果】

喫煙指数は、肺気腫病変の有無にかかわらず現在喫煙者 2 群間では同様であった。呼吸機能検査では対標準一秒量、一秒率、肺拡散能のいずれも肺気腫病変のある喫煙者で病変のない喫煙者に比べて軽度ではあるが有意に低く、呼吸生理学的にも軽度の肺気腫の存在が確認された。BAL 液中総細胞数、肺泡マクロファージ比率は現在喫煙者 2 群では過去喫煙者 2 群と比較して有意に増加しており慢性喫煙の影響を認めた。しかし、現在喫煙者 2 群間では肺泡マクロファージ数、好中球数に有意差はなかった。BAL 液中 IL-8 濃度は肺気腫病変のある現在喫煙者では病変のない現在喫煙者に比べて有意に高く、しかも全体として IL-8 濃度は NE- $\alpha$ 1PI 複合体量と有意に相関した。一方、LTB4 濃度は肺気腫病変のある過去喫煙者では病変のない 2 群と比較して有意に高かったが、現在喫煙者 2 群間では有意差がなかった。ENA-78 濃度は 4 群間で有意差がなかった。また、MCP-1、MIP-1 $\alpha$  濃度に関しても、4 群間で有意差がなかった。肺泡マクロファージ培養上清中の IL-8 濃度は現在喫煙者 2 群間で差異がなく、しかも、現在喫煙者 2 群では過去喫煙者 2 群に比べて有意に低かった。また、肺泡マクロファージの IL-8 mRNA 量も現在喫煙者 2 群間で有意差がなかった。

#### 【考察】

この研究の特徴は、その対象として臨床的に明らかな肺気腫患者ではなく、高分解能 CT 検査によって早期肺気腫病変を有する被検者を選んでいることである。喫煙歴がほぼ同様な肺気腫病変なし群と比較検討することにより、喫煙者の中で肺気腫を発症する者としめない者との差を明らかにすることが可能と考えた。この喫煙者の 2 群では BAL 液中総細胞数や肺泡マクロファージ数は過去喫煙者の 2 群と比べて同程度に増えており、好中球数にも全く差がない。しかし、BAL 液中の 3 種類の好中球遊走活性化因子と 2 種類の単球系遊走活性化因子を検討したところ、唯一 IL-8 濃度がこの 2 群を分け、しかも NE- $\alpha$ 1PI 複合体量と相関することが示された。ENA-78、LTB4 も IL-8 と同様に強力な好中球遊走活性化因子であり、明らかな気道炎症を有する進行した肺気腫患者の喀痰ではいずれも IL-8 と同様に増加していると報告されている。今回の研究では、自覚症状がない早期肺気腫患者では進行した肺気腫患者とは違って、BAL 液中の 3 種類の好中球遊走活性化因子の動きは異なっており、早期の肺気腫病変形成過程では IL-8 が重要な役割を果たしている可能性を初めて示した。これまで、MCP-1 と MIP1 $\alpha$  は肺泡マクロファージ遊走活性化を介して肺気腫病変形成に関与していると推測されていた。しかし、いずれの因子も現在喫煙や肺気腫病変の有無で差異を認めなかった。次に我々は BAL 液中の IL-8 の細胞起源として肺泡マクロファージに着目した。しかし、培養上清中への放出量でも IL-8 mRNA 量で評価しても、肺気腫病変との関連はみいだせなかった。肺泡及び気道上皮細胞も IL-8 を産生・放出することから、早期肺気腫患者でみられる BAL 液中 IL-8 濃度の上昇はこれらの上皮細胞の喫煙に対する個体感受性で説明されるかもしれない。

#### 【結語】

早期肺気腫病変形成過程における肺内の好中球活性化には IL-8 の関与が示唆される。これが喫煙に対する肺気腫病変の起こりやすさの個体差を説明する因子のひとつである。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 加 藤 紘 之  
副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

## Increased Levels of Interleukin-8 in BAL Fluid from Smokers Susceptible to Pulmonary Emphysema

(肺気腫を発症しやすい喫煙者における  
気管支肺胞洗浄液中インターロイキン8の上昇)

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は在宅酸素を必要とする原因疾患の約半数を占め世界的に見ると2020年には死因の第3位になることが予想されている。肺気腫はCOPDの一つであり肺胞壁エラスチンの不可逆的破壊を特徴とする疾患である。喫煙は肺気腫発症の重要な危険因子であるが、すべての喫煙者が肺気腫を発症するわけではなく、なぜ一部の喫煙者だけが肺気腫になるのかは明らかではない。我々はこれまでに自覚症状のない中高年者を対象に、高分解能CT検査で肺気腫の有無を診断し、さらに気管支肺胞洗浄(BAL)検査を行い、早期肺気腫患者と同程度に喫煙歴が有りながら病変のない健常者との比較をする一連の研究を行ってきた。その結果、肺気腫病変形成において好中球活性化の関与が示唆された。そこで、本研究ではこの背景機序を検討する目的で、3種類の好中球遊走活性化因子 interleukin-8 (IL-8)、epithelial neutrophil activating protein-78 (ENA-78)、leukotriene B4 (LTB4)と2種類の単球系遊走因子 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )のBAL液中濃度を同様の対象群で測定した。さらにBAL液中IL-8の細胞起源の一つとして肺胞マクロファージに着目し、培養上清中濃度とIL-8 mRNA量を定量評価した。BAL液中総細胞数、肺胞マクロファージ数は現在喫煙者2群では過去喫煙者2群と比較して有意に増加しており、慢性喫煙の影響を認めたが、現在喫煙者2群間では肺胞マクロファージ数、好中球数に差はなかった。BAL液中IL-8濃度は肺気腫病変のある現在喫煙者では病変のない現在喫煙者に比べて有意に高く、IL-8濃度は好中球エラスターゼ $\cdot\alpha$ 1アンチトリプシン複合体量と有意に相関した。一方、ENA-78、LTB4、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 濃度は現在喫煙者2群間で差がなかった。また、肺胞マクロファージ培養上清中のIL-8濃度は同2群間で差がなく、しかも現在喫煙者群では過去喫煙者群に比べて有意に低かった。肺胞マクロファージのIL-8 mRNA量も現在喫煙者2群間で差がなかった。以上より、早期肺気腫病変形成には3種類の好中球遊走活性化因子の中でIL-8を介した好中球活性化が関与しており、同じ喫煙刺激に対するIL-8産生の個体差が、肺気腫発症の個体差を反映する可能性があると考えられた。さらにその個体差は、肺胞マクロファージのIL-8産生能では説明されないことが示された。

発表後、副査加藤教授より、肺気腫における他の炎症性サイトカインの関与についての質疑があった。本研究で示したように病初期にはIL-8の関与が示唆されるが、進行した肺気腫患者の喀痰中にはENA-78やLTB4が増加しているとの報告があり病期によって関与するサイトカ

インが異なっている可能性がある」と答えた。また、喫煙・肺気腫の有無によるマクロファージの機能への影響についての質疑があった。非喫煙者と喫煙者のマクロファージ機能について LTB<sub>4</sub>、IL-1βなどの放出能を検討した報告があるが、今回の結果と同様に、喫煙者で放出量が低下していると報告されており、喫煙によってマクロファージ機能は低下している可能性がある」と答えた。また、非喫煙者における肺気腫発症のリスクについての質疑があった。非喫煙者でも大気汚染、受動喫煙、職業上の塵埃などの環境因子が肺気腫発症に影響する可能性がある」と答えた。続いて、副査西村教授より、BAL 液中の好中球数が肺胞破壊病変部での好中球数を反映するののかという質疑があった。BAL では肺胞に存在する一部の好中球しか回収していない可能性があり、必ずしもエラスチンの破壊現場に集積している好中球数を反映していない可能性があり、BAL 手技の限界について答えた。また、肺気腫病変のある過去喫煙者での LTB<sub>4</sub> 濃度上昇の意義についての質疑があった。喫煙をやめても肺気腫が進行する一部の患者が存在しておりそれらの患者の肺内での炎症に LTB<sub>4</sub> が関与している可能性がある」と答えた。次に肺気腫発症の個体差を規定する因子、今後の研究の方向などについての質問があった。遺伝的背景及び生後に獲得された免疫学的体質などが肺気腫発症の個体差を規定している可能性があること、今回の結果からは喫煙刺激に対する気管支・肺胞上皮細胞からの IL-8 産生の個体差が喫煙感受性、肺気腫発症の個体差を規定している可能性が示唆されることを答えた。主査長嶋教授からは、肺気腫発症における人種差の影響についての質疑があった。人種間によって喫煙量と肺気腫発症頻度の関係が必ずしも関係はないこと、肺気腫に関与する遺伝子多型が人種間で異なることから、人種差が大きい可能性を答えた。また、喫煙で肺のマクロファージが増加する理由、末梢血液細胞が喫煙によって受ける影響などについての質疑があった。喫煙刺激によって骨髄からの単球、未成熟な好中球の動員が末梢血中の好中球数の増加、機能の変化をもたらすこと、肺内で肺胞マクロファージが分裂、増殖しやすい性質を獲得するという報告があることを答えた。

審査員一同は、IL-8 を介した好中球活性化の多寡が早期肺気腫病変形成の個体差を説明することを示した初めての研究として高く評価し、博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。