

令和 2 年 10 月 8 日現在

機関番号：83106

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09635

研究課題名（和文）免疫組織化学と元素分析による肺組織解析 - 職業性肺疾患の正しい病態理解のために -

研究課題名（英文）Immunohistochemistry and elemental analysis for occupational lung disease

研究代表者

森山 寛史（MORIYAMA, HIROSHI）

独立行政法人国立病院機構西新潟中央病院（臨床研究部）・統括診療部・呼吸器内科医師

研究者番号：60463981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：職業や生活環境で吸入した物質は肺内に入り人体に影響をおよぼします。吸入した物質を元素レベルで同定して細胞との関わりを解析することで、職業性肺疾患を新たな視点から明らかにすることを目指しました。2011年にオンラインによる元素分析システムを導入して研究期間内に国内外から29例の職業性肺疾患の元素分析を行いました。シリコン、アルミニウム、鉄など一般的な元素以外に、タンタル、コバルト、タンゲステン、ジルコニウムなど特殊な元素が同定され直接的な診断や病態解明に役立ちました。免疫組織化学では、炎症時に出現するマクロファージと炎症を鎮める方向に働くマクロファージがそれぞれ動員されていることがわかりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

職業性肺疾患は、環境や作業により様々な物質を肺内に吸入することがきっかけとなります。吸入した粉塵の種類により様々な疾患を発症することから、吸入物の同定と組織の反応を詳しく調べることは、原因の究明とさらには発症の予防に役立つ可能性があります。生体試料の元素分析は、組織内に含まれる様々な物質を元素レベルで同定する解析法です。吸入した元素と粉塵の処理にあたる細胞の関係を調べて職業性肺疾患の病態解明に役立ちました。

研究成果の概要（英文）：Occupational lung disease is triggered by inhalation of various substances into the lungs depending on the environment and work. Since various types of inhaled dust cause various diseases, detailed identification of inhalants and tissue reaction may be useful in clarifying the cause and preventing the onset of the disease. Elemental analysis of biological samples is an analysis method that identifies various substances contained in tissues at the elemental level. In this study, we investigated the relationship between inhaled elements and cells that process dust, and used it to elucidate the pathology of occupational lung disease.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：元素分析 職業性肺疾患 免疫組織化学 マクロファージ スカベンジャー受容体 アルミニウム シリコン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

職業に関連して有害な粒子、霧、蒸気、ガスなどを吸いこむことで発症する肺疾患を、職業性肺疾患と呼ぶ。肺組織を対象とした元素分析は、職業性肺疾患の原因となる粉塵の検出に有力な解析手段の一つである(Respir Investig, 2014)。申請者らは超硬合金肺を対象に、元素分析と免疫組織化学を応用してその発症機序を明らかにしてきた(AJRCCM, 2007)。超硬合金の成分であるタングステンやコバルトは本来生体にはない元素であるため、微量でも検出されれば肺疾患の原因であると推定できる。しかしながら、アルミニウムやケイ素など、通常でも肺組織にみられる吸入元素が原因と思われる肺疾患も多くみられる。

2. 研究の目的

本研究では、疾患特異的要素によらない職業性肺疾患の肺組織を対象に、免疫組織化学と元素分析を用いてその病態を明らかにする、ことを目的とする。

3. 研究の方法

元素分析受付システムによりオンラインで依頼を受け付ける。

病歴(職業歴、曝露歴)を確認して、依頼施設から目的とする肺組織のパラフィンブロック検体を送って頂く。パラフィンブロックから厚さ3 μ mの薄切連続組織切片を作成して、元素分析用の高純度ガラスカーボンに貼付する。前後の連続切片は、病理標本用にhematoxylin-eosin染色を行い、目的とする元素分析の領域を確定するために用いる。解析が可能な症例では、免疫組織化学により、ヒトスカベンジャー受容体の代表的なモノクローナル抗体である抗CD68および抗CD163抗体の発現を検討する。

元素分析には、波長分散型電子線マイクロアナライザー EPMA-1610(島津製作所)を用いる。EPMA-1610は高輝度電子銃により極めて細い電子線を試料に照射して、試料から発生する元素固有の特性X線を波長の長さの違いにより検出する装置である。0.1 μ mレベルの分析が可能であり、試料の形状にとらわれず、各元素から発生する特性X線を検出して半定量が可能である。また2次元解析が可能であり、肺組織切片上に各元素の存在部位を明瞭に描出することで、肺病理組織と各元素の関係を明らかにすることができる。

元素分析結果を各依頼施設に報告する。

依頼先の臨床医には分析結果と病歴をあわせて、臨床情報を再度検討して頂く。

4. 研究成果

2017年から2019年度までの3年間に、元素分析照会用フォームを通して国内外から30件の元素分析の問い合わせがあり、合計29例(分析領域として合計65箇所)の元素分析を行った。分析依頼のあった検体は、外科的肺生検19例、経気管支肺生検8例(うち1例は気管支肺胞洗浄検体分析もあり)、手術ほか2例であった。

元素分析は分析用の標本とその連続切片の病理組織を対比しながら、分析部位として2~3か所の領域を選択して、波長分散型電子線マイクロアナライザー EPMA-1610で同じ領域の元素分析を行った。全29例で検出された元素は、24種類であった(表1)。

1症例あたりで検出された元素数は10~18で、S硫黄、Kカリウム、Caカルシウム、Pリン、Fe鉄、O酸素など、すべての症例で検出された必須元素のほか、**人体に必須ではない元素 Si シリコン、Al アルミニウムが全ての症例で検出された。**正常肺では認めないまれな元素として、Crクロム、Wタングステン、Zrジルコニウム、Mnマンガン、Taタンタル、Niニッケル、Snスズ、Cu銅、金Au、Inインジウム、Gaガリウムが検出された。超硬合金、アルミニウム、インジウムなど職業・環境を通して、吸入された物質と肺組織との関連が明らかとなった症例もあった。

元素分析の結果、超硬合金肺7例、アルミニウム肺3例、インジウム肺1例、溶接工肺1例、珪肺1例、肺胞蛋白症(2次性を含め)2例、その他塵肺10例を認めたが、超硬合金肺が疑われながら超硬合金成分が検出されなかった症例も4例含まれていた。

(表1)

全29症例で検出された元素

元素	元素記号	検出症例数
Silicon	Si	29
Aluminum	Al	29
Sulfur	S	29
Potassium	K	29
Iron	Fe	29
Calcium	Ca	29
Phosphorus	P	29
Oxygen	O	29
Titanium	Ti	28
Sodium	Na	27
Magnesium	Mg	26

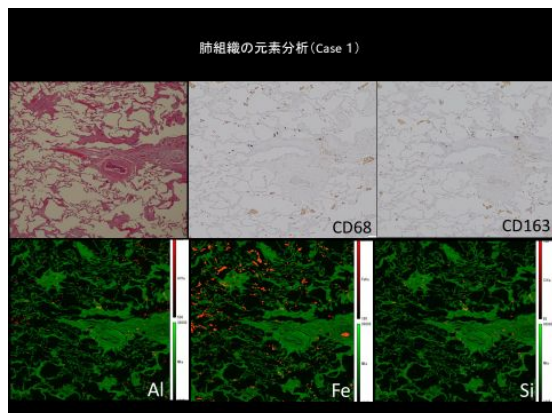
Chlorine	Cl	19
Chromium	Cr	9
Tungsten	W	7
Zinc	Zn	6
Zirconium	Zr	5
Manganese	Mn	4
Tantalum	Ta	4
Nickel	Ni	3
Tin	Sn	3
Copper	Cu	1
Gold	Au	1
Indium	In	1
Gallium	Ga	1

元素分析の代表的結果 (図 1 ~ 3)

上段左図：病理組織図 (Hematoxylin-eosin 染色) 上段中図：抗 CD68 抗体、上段右図：抗 CD163 抗体、下段：2次元元素分析図 (生体組織に必ず含まれる窒素 N を緑色で描出していて、その上に黄色から赤色の目的とする元素が描出されている) Al：アルミニウム、Fe：鉄、Si：シリコン

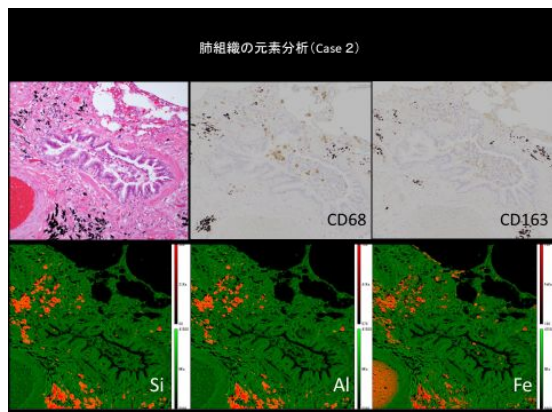
(図 1) 元素分析症例 1

アルミニウム加工業 肺組織元素分析図

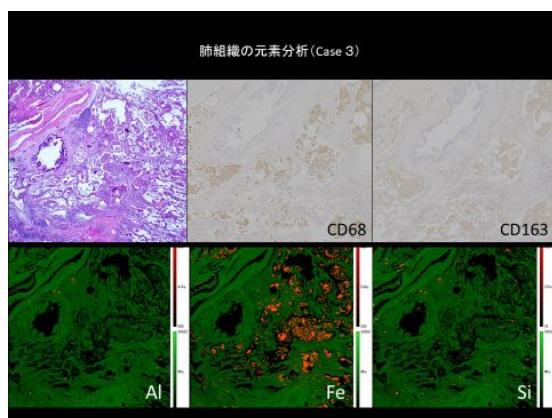


(図 2) 元素分析症例 2

金属加工業 肺組織中元素分析図



(図 3) 元素分析症例 3
金属材料取り扱い職歴 肺組織元素分析図



元素分析で得られた Fe、Si、Al の 2 次元元素分析図から、元素の局在が明らかとなった。

アルミニウム肺では Al が豊富に検出されるとともに Fe、Si も同時に検出された。通常の病理組織 Hematoxylin-eosin 染色で、細気管支周囲や線維化部位に黒色粒状物として認める部位には、これらの元素が沈着していた (図 1)。

肺内に侵入した金属や鉱物由来の粉塵を捕捉して処理するために、マクロファージは多様な食機能の中で、スカベンジャー受容体を発現して異物の処理にあたる。免疫組織化学で用いる抗 CD68 抗体はマクロファージの class D スカベンジャー受容体であり、肺胞マクロファージでは発現がみられることが多い。一方で抗 CD163 抗体はスカベンジャー受容体の class B に属し、疾患により、発現が変化すると考えられる。

近年マクロファージが発現する表面マーカーにより、マクロファージの機能分類が提唱されている (J Immunol, 2000)。M1 マクロファージは病原体に対する防御機能をもち炎症反応を活性化する。CD68 はその表面マーカーのひとつである。M2 マクロファージは、抗炎症反応や創傷治癒などにはたらき、CD163 は表面マーカーのひとつである。

肺内に侵入した粉塵に対する組織反応を免疫組織化学により、M1/M2 マクロファージの発現を検討してみると、アルミニウム肺では CD68・CD163 陽性細胞をほぼ同様に認め (図 1) M1/M2 マクロファージがともに発現している。金属加工業の肺組織では、細気管支周囲で、CD68 陽性細胞を多く認め、M1 マクロファージの発現がみられた (図 2)。超硬合金肺を疑うような病理組織像でありながら W、Co など超硬合金成分を一切認めなかった肺組織では (図 3) CD68 陽性細胞と CD163 陽性細胞はほぼ同等であり、CD68 が多く分布している部位も認め、M2 マクロファージが優位ではないことが判明した。

職業性肺疾患では、種々の粉塵を吸入する可能性があるが、本研究では Al、Fe、Si はすべての症例で認めており、M1/M2 マクロファージは、組織内の粉塵の沈着部位で、炎症部位から線維化病変部まで発現していた。

職業性肺疾患における肺組織内の元素分析と免疫組織化学を通して、本研究により吸入した粉塵と食細胞の反応による生体肺組織の多様性を示すことができた。

本研究にあたり、貴重な検体の元素分析のご依頼を頂いた全てのご施設の先生方に深謝を申し上げます。

(引用文献)

Moriyama H, Kobayashi M, Takada T, Shimizu T, Terada M, Narita J, Maruyama M et al. Two-dimensional analysis of elements and mononuclear cells in hard metal lung disease. Am J Respir Crit Care Med 176:70-7, 2007.

Takada T, Moriyama H, Suzuki E. Elemental analysis of occupational and environmental lung disease by electron probe microanalyzer with wavelength dispersive spectrometer. Respir Investig 52:5-13, 2014.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. J Immunol 164: 6166-6173, 2000.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yorozuya Takafumi, Ikeda Kimiyuki, Chiba Hirofumi, Saito Atsushi, Kuronuma Koji, Nishikiori Hiroataka, Miyajima Satsuki, Takahashi Mamoru, Yoshikawa Takumi, Takahashi Youhei, Taya Tetsuya, Mori Yuki, Umeda Yasuaki, Otsuka Mitsuo, Moriyama Hiroshi, Takahashi Hiroki	4. 巻 58
2. 論文標題 Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis Diagnosed after Exposure to a Fire Extinguisher Containing Silica Powder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2067 ~ 2072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1557-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kurosaki Fumio, Takemura Tamiko, Bando Masashi, Kuroki Tomonori, Numao Toshio, Moriyama Hiroshi, Hagiwara Koichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Progressive plasterer's pneumoconiosis complicated by fibrotic interstitial pneumonia: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12890-018-0776-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 後町杏子、清水宏繁、植草利公、森山寛史、渋谷和俊、本間栄	4. 巻 8
2. 論文標題 旋盤工に発症した切削油による急性過敏性肺炎と超硬合金肺を合併した1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日呼吸誌	6. 最初と最後の頁 204 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirano Taizou, Numakura Tadahisa, Moriyama Hiroshi, Saito Ryoko, Shishikura Yutaka, Shiihara Jun, Sugiura Hisatoshi, Ichinose Masakazu	4. 巻 18
2. 論文標題 The first case of multiple pulmonary granulomas with amyloid deposition in a dental technician; a rare manifestation as an occupational lung disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12890-018-0654-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 濱田恵理子、中山絵美、北村知嵩、前倉俊也、大谷安司、森山寛史
2. 発表標題 BAL、TBLB、元素分析により診断した超硬合金肺の一例
3. 学会等名 第42回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山寛史
2. 発表標題 電子線マイクロアナライザーによる肺組織の元素分析のオンライン受付システムの確立
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久田修、鈴木拓児、山内浩義、森山 寛史、柴原泰三、大河内眞也、坂東政司、萩原弘一
2. 発表標題 東日本大震災直後に発症した抗GM-CSF自己抗体陰性の肺胞蛋白症の一例 - 発症7年6ヶ月の経過
3. 学会等名 第98回間質性肺疾患研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H Moriyama, M Kobayashi, A Aoki, K. Asakawa, T Sakagami, T Koya, T Ohdaira, T Takada, T Kikuchi.
2. 発表標題 Establishment of a web-based inquiry system for elemental analysis of lung tissue of occupational lung disease.
3. 学会等名 2017 American Thoracic Society International Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 萬谷峻史、多屋哲也、池田貴美之、高橋 守、千葉弘文、山田 玄、森山寛史、高橋弘毅
2. 発表標題 消化剤吸引を契機に発症した自己免疫性肺胞蛋白症の1例
3. 学会等名 第40回日本呼吸器内視鏡学会学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	高田 俊範 (TAKADA Toshinori) (40361919)	新潟大学・医歯学総合病院・特任教授 (13101)	