

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590885
 研究課題名 (和文) 特発性間質性肺炎は本当に原因不明の間質性肺炎か？
 ～定量的元素分析を用いた解析～
 研究課題名 (英文) Is idiopathic interstitial pneumonia really etiology-unknown disease? A quantitative element analysis will be performed.
 研究代表者
 高田 俊範 (TAKADA TOSHINORI)
 新潟大学・医歯学系・講師
 研究者番号：40361919

研究成果の概要：X線マイクロアナライザーと画像解析ソフトウェアを用いて、間質性肺炎肺組織中に存在する元素量を半定量化した。特発性肺線維症8例と膠原病に伴う間質性肺炎10例を対象として、窒素、ケイ素、アルミニウム、鉄、マグネシウム、チタンの各元素の数値を統計学的に比較したところ、特発性肺線維症においてケイ素とアルミニウムが有意に多く含まれていた。また組織量を示す窒素で除した値の比較でも、同様の差がみられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：間質性肺炎、電子線マイクロアナライザー、超硬合金肺、元素分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 間質性肺炎は、原因不明のものと原因が明らかなものに大別される。原因不明の間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia [IIP]) には7つの病型が含まれる (AJRCCM 2002;165:277)。これらのうち、臨床的に最も頻度が高く、予後も悪いものが特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis [IPF]) と呼ばれる病型である。IPFは特発性 (=原因不明) という名前の通り明らかな原因がなく、また診断基準にも「薬剤、環境暴露および膠原病などの、間質性肺疾患をきたす明らかな原因がある場合を除外」とさ

れている (AJRCCM 2002;165:277)。

(2) しかしながら、これまで多くの報告で、さまざまな環境因子と IPF との関与が示唆されてきている。多数報告のメタ解析の結果から、喫煙、農業従事、家畜飼育、木材粉塵、金属粉塵および石材の6つの環境因子が、IPF発症と有意に関連することが示された (ProcAmThoracSoc 2006;3:293)。これらの吸入粉塵がきっかけとなり、肺胞上皮障害→異常な創傷治癒→肺線維化という一連の病的機序が起こり、IPFを発症すると考えられている。しかし、吸入された粉塵が肺胞上皮障害を起こす機序は明らかではない。

2. 研究の目的

吸入粉塵がどのような機序で肺胞上皮障害を起し IPF を発症するか、を明らかにするため、以下のような研究を行う。

(1) 半定量化解析法の確立

従来肺組織の元素分析に使用されてきたエネルギー分散型 X 線解析に比べ、私たちの使用する「カーボン台薄切組織分析法」を用いた波長分散型 X 線マイクロアナライザー [electron probe microanalyzer (EPMA)] 解析は、生体試料を対象とした二次元解析が可能であるという特長がある。しかしながら、定量解析には適さないという欠点があった。そこでまず、EPMA によって得られた画像データを電子ファイルとして取り出し、画像解析ソフトウェアを用いて各元素含有量を半定量化する手法を確立する。この際、これまで研究対象としてきた超硬合金肺 (hard metal lung disease [HMLD]) を対象とする。HMLD の肺組織には健常肺にはみいだされないタングステン(W)が存在するため、定量化の基準試料として有用と考えられる。

(2) IPF 検体を対象とした元素分析

次いで、IPF の生検あるいは剖検肺組織を対象として、EPMA を用いた元素の定性・定量分析を行う。私たちが使用している EPMA では、C(炭素)より元素番号の大きい元素は理論的に全て検出することができるため、これまで IPF 発症との関連が報告されている粉塵を構成するほとんどの元素の検出が可能である。EPMA を用いた定性・定量解析により、IPF 肺のどの部位に、どの元素が、どれくらい沈着しているか、を調べる。

(3) 沈着粉塵と肺間質病変との関連

IPF では、①持続する肺胞上皮障害、② Th1-Th2 細胞の不均衡および炎症、③異常な創傷治癒、の3段階の機序により肺線維化が生じていると考えられている (NEJM 2001;345:517)。このそれぞれの病変部位と吸入粉塵との関連をみるため、通常の HE 染色および免疫染色を用いて①肺胞上皮障害部位、②炎症細胞浸潤部位、および IPF に特徴的と言われる iii) fibroblastic foci (Ann Intern Med 2001;134:136)を確認し、吸入元素の分布と比較する。これにより、吸入された粉塵がどのように IPF 発症に関与しているかを推測する。

3. 研究の方法

(1) 波長分散型 EPMA を用いた半定量的解析手技の確立

今回はまず、①HMLD 肺と、他疾患で肺切除を受けた肺の健常部分を対象に、②W を標

的とした EPMA 解析を行う。この際、EPMA 検出に用いるピクセルサイズと、各ピクセルのスキャン時間を一定とする。③こうして得られた W の分布図を電子ファイル化し、ライフサイエンス領域の画像処理解析に広く使用されている Scion Image (NIH Image; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>)を用いて、W の面積を数値化する。その際に①健常肺では W が検出されないこと、②W 分布の広がりや反映していること、の2点が数値に表れるように、①カットオフ値の設定・調整、②必要に応じて画像解析面積の設定を行う。研究が計画どおりに進まないときには、上記 NIH image の website に問題点を問い合わせ、あるいは島津製作所の技術者などと協議する。

(2) 肺生検試料のデータベース作成

当施設および当科関連施設で外科的肺生検を受けた IPF の肺組織、IPF と診断されたが死亡した症例の剖検肺組織、間質性肺炎をきたすような明らかな原因がなく、外科的肺生検を受けた IPF 以外の IIP、疾患コントロールとして外科的肺生検を受けた膠原病に伴う間質性肺炎(CVD-ILD)、および他疾患で肺切除を受けた症例の健常部分を対象とする。これらの症例の臨床データを基に、症例データベースを作成する。

(3) 肺生検組織を用いた免疫染色の条件決定
Th1, Th2 細胞、肺胞上皮にみられるアポトーシス関連分子、fibroblastic foci を構成する線維芽細胞が発現する分子などの、これまで IPF 発症・進展との関連が見いだされている細胞・分子などの発現をみるため、CD3, 4, 8, 19, IFN-g, IL-4, Fas および Fas-L などに対する単クローン抗体と肺生検組織を用いて、抗体濃度や反応時間など免疫染色の条件決定を行う。

(4) IPF 検体の解析

IPF の肺障害の場合として①肺胞上皮障害部位、②炎症細胞浸潤部位、および IPF に特徴的と言われる③fibroblastic foci が提唱されている (NEJM 2001;345:517)。このそれぞれの部位で元素の定性・定量分析、および肺病変関連分子の発現を解析する。

①まず通常の HE 染色あるいは EVG 染色で、肺胞領域、炎症細胞浸潤領域、および fibroblastic foci を確認する。

②それぞれの部位で、まず以下の各元素の定性分析を行う。対象元素は当初は Al, Si, Ti, Cr, Fe, Co, Ta, W, および Zn とする。Co と W を含んでいるのは、HMLD の研究から、一見 usual interstitial pneumonia (UIP) と思われる組織型でも W が検出され、HMLD と診断した症例を経験したことによる。

③IPF 肺組織に共通に含まれる元素が検出されたら、その元素に対して定量分析を行う。Scion Image の設定は研究方法の(1)に準ずるが、組織に含まれる絶対量が W と異なるため、同じカットオフ値ではノイズが増える、あるいはシグナルが減る可能性がある。その場合は、健常肺をコントロールとしてカットオフ値を再検討する。

(4) 元素分析を行った肺組織の連続切片を、方法3で検討した条件で免疫染色を行う。各部位での陽性細胞数をカウントし、検出元素定量値との相関を統計的に解析する。

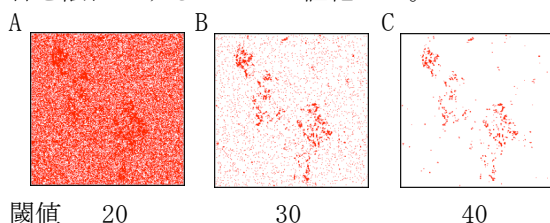
(5) IPF 以外の IIP 検体の解析

IPF 以外の IIP (特に fibrosing non-specific interstitial pneumonia [f-NSIP])についても、IPF と同様のステップで検討する。

4. 研究成果

(1) 波長分散型 X線マイクロアナライザー (EPMA) データの半定量化

①ヒト間質性肺炎あるいは健常部分の肺組織を対象とし、②組織のパラフィン切片を3 μm に薄切し高純度ガラスカーボン台に載せ、③約1 μm^2 (1.024mm X 1.024mm, 一辺256ピクセル)の測定範囲内に電子線照射を行う、④その際に発生した元素特有の特性X線を、4 μm 四方のピクセル単位で検出し、⑤元素ごとに一定の閾値以上の場合を陽性、閾値以下の場合を陰性とするすることで二値化した。

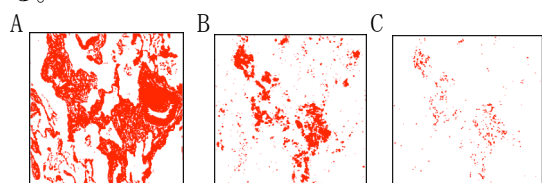


図にWを検出した解析例を示す。閾値を20(A)とすると多くのノイズを拾い、シグナルがバックグラウンドに埋もれてしまう。閾値を30(B), 40(C)と上げるにつれバックグラウンドのノイズが減り、実際に元素が存在するピクセルのみを拾い上げることができる。こうして各元素ごとに、組織が存在しない air space に取り込みがなく元素の存在するピクセルのみを陽性とする最小の値を閾値に設定した。こうして得られた各元素の閾値を示す。

元素	Si	W	Al	Ti	Fe	Cr	Zn	Ni	Mg
閾値	40	40	320	500	150	90	80	160	400

⑥陽性ピクセル数を Scion image software を用いて計数した。こうした手法により、EPMA データを半定量化することができた。計測範囲 256x256=268356 pixels のうち、いく

つの陽性ピクセルがあるかを示すことになる。



107236 pixels 29994 pixels 5332 pixels
図AはN、BはSi、CはWを検出した例を示す。Nは組織分布を反映するため、Aでシグナルがない部分は air space を示す。したがってSiを含むピクセルがWを含むピクセルより多いことがわかる。ただし各ピクセル内の元素量の多少については不明である。

(2) 超合金肺(HMLD)患者

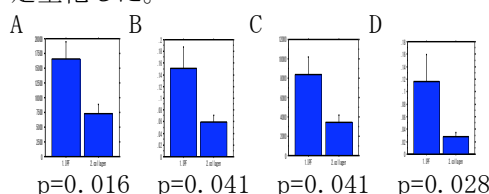
超合金の吸入歴があり外科的肺生検により診断された10例のHMLD患者と、肺癌非腫瘍部より得られた6例のコントロールの肺組織を対象とし、上記(1)の手法を用いて定量解析を行った。①HMLD群はコントロール群に比べ、タングステン陽性ピクセル数が有意に多かった、②タングステン以外にもアルミニウム、鉄、チタン、クロムおよびニッケルの陽性ピクセル数が有意に多かった。③肺線維化による変化を補正するために、これら元素の陽性ピクセル数を窒素を含むピクセル数で除した値の比較でも、同様の結果であった。

以上の結果から、本法により肺組織内に含まれる元素の半定量が可能であること、また半定量化された数値は、ある程度実際の元素量を反映していると考えられた。(3)肺生検試料の症例データベース作成

当施設および関連医療機関で外科的肺生検を行われた、①IIP(特にIPF)および、②膠原病に伴う間質性肺炎(CVD-ILD)の症例データベースを作成した。これによりIPF 8例、CVD-ILD 10例の臨床データが集まった。IPF症例の平均年齢は68.3才、男性6名女性2名、8名中6名が喫煙歴を持ち、全例病理学的にUIPと診断されている。一方、CVD-ILDの平均年齢は54.1才とIPFに比し若い。男性4名女性6名、喫煙歴を持つのは2名のみで、病理学的診断はUIP、NSIPなどが含まれる。

(4) IPF と CVD-ILD の EPMA 半定量化値の比較

(3)でデータベースを作成した試料を(1)の方法に従い、窒素、ケイ素、アルミニウム、鉄、マグネシウム、チタンの各元素につき半定量化した。



それぞれ IPF 8 例と CVD-ILD 10 例を対象とし、A:Si, B:Si/N, C:Al, D:Al/N について Mann-Whitney U test を用いて統計学的に比較した。図で示すように、IPF においてケイ素とアルミニウムが有意に多く含まれていた。組織量を示す窒素で除した値の比較でも、同様の差がみられた。また組織量をあらわす窒素の量は両群で差はなかった(p=0.657)。以上の結果から、Al, Si などの金属吸入が IPF 発症の原因の一つとなっている可能性が示唆された。またこれ以外の元素(W, Ti, Fe, Cr, Zn, Ni, Mg)については、半定量値そのものでは両者の間に差はみられなかった。しかしながら窒素で除した値を比較すると、CVD-ILD に比べ IPF で Cr と Zn が有意に多く、これらの微量に存在する元素も IPF 発症に関与している可能性が疑われた。

(5)免疫染色を用いた病態解析
免疫染色を用いた炎症細胞と Si, Al などの吸入元素などとの関連は、現在解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

①Watanabe K, Okawa S, Kanatani M, et al. Surface analysis of commercially pure titanium implant retrieved from rat bone. Part 1: Initial biological response of sandblasted surface. Dent Mater J 28: 178-184, 2009, 査読有

②Fujimori F, Takada T, Suzuki E, et al. Differences of lymphocyte profile between BAL fluid and human lung tissue from patients with interstitial lung disease. Brit J Biomed Sci 65: 63-67, 2008, 査読有

③Moriyama H, Takada T, Terada M, Watanabe K, Suzuki E, et al. Two-dimensional analysis of elements and mononuclear cells in hard metal lung disease. Am J Respir Crit Care Med 176: 70-77, 2007, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

①森山寛史、高田俊範、寺田正樹、鈴木榮一他. 波長分散型X線マクロアナライザーを用いた職業性肺疾患の微量元素分析. 間質性肺炎分子病態研究会 (平成20年8月23日、東京)

②島岡雄一、高田俊範、寺田正樹、鈴木榮一他. 波長分散型X線マイクロアナライザーを

用いた超硬合金肺の肺内元素数値化の試み. 間質性肺炎分子病態研究会 (平成19年8月25日、東京)

③Shimaoka Y, Takada T, Terada M, Watanabe K, Suzuki E, et al. Quantitative analysis of lung elements of hard metal lung disease detected by two-dimensional electron probe microanalyzer. 2007年米国胸部疾患学会 (平成19年5月22日、米国サンフランシスコ)

[図書] (計 2 件)

①森山寛史、高田俊範、寺田正樹、鈴木榮一. 日本臨床社、呼吸器症候群 (第二版)、II びまん性肺疾患、2008年、569～571ページ.

②渡辺孝一. リアライズ理工センター、微細加工と表面処理-ナノ・マイクロ構造による光学、摩擦、ぬれ等の機能実現-、2007年、267-270ページ.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 生体組織中の微量元素分析装置
発明者: 小林正義、渡辺孝一
権利者: 株式会社新潟ティールオー
種類: 特許
番号: 3959744 号
取得年月日: 平成19年5月25日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 俊範 (TAKADA TOSHINORI)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号: 40361919

(2)研究分担者

鈴木 榮一 (SUZUKI EIICHI)
新潟大学・医歯学総合病院・教授
研究者番号: 30187710
寺田 正樹 (TERADA MASAKI)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号: 50401740

(3)連携研究者

渡辺 孝一 (WATANABE KOICHI)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 20018766