

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310067

研究課題名(和文)石綿肺早期発見と病態解明をめざすイオンビームを応用した新手法の開発

研究課題名(英文)Development of new technology using ion beam for the investigation of pathogenesis and an early diagnosis of asbestosis

研究代表者

土橋 邦生(Dobashi, Kunio)

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：00241894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺組織内の微量の元素分布を測定できるmicroPIXEを使用し、アスベストなど吸入粉塵による肺線維症の発症機序の解析をおこなった。珪素を経鼻投与したマウスや肺線維症の患者の肺組織での検討から、肺組織中の珪素表面に鉄が多量に沈着し、その周囲に酸化ストレスや細胞死を誘導するマーカーの発現が増強することが明らかとなった。また、肺線維症の患者12例の解析から、2例に吸入粉塵が原因と思われる多量の珪素が検出された。さらに職場での25年間のアルミニウム吸入によると思われる肺線維症患者の肺組織を、microPIXEにて測定したところ多量のアルミニウムの沈着を同定し、労災申請につながった。

研究成果の概要(英文)：In-air microparticle-induced X-ray emission (in-air micro-PIXE) analysis is employed to assess the spatial distribution and content of small amount of element in lung biopsy specimens. We analyzed the pathogenesis of lung fibrosis induced by inhaled asbestos or dust by microPIXE. The analysis of lung tissues from mice administrated silica particle and lung fibrosis patients showed significant increase of iron level on silica particle. And the expression of markers of oxidative stress and apoptosis were co-localized with silica particles. Lung tissues from 12 lung fibrosis patients were subjected to in-air micro-PIXE analysis. Two IIP patients showed a large quantity of Si and the co-localization of Si and Fe deposition with Fas expression.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：大気microPIXE 石綿肺 アスベスト 肺線維症 特発性間質性肺炎 粉塵 元素分布 イオンビーム

1. 研究開始当初の背景

大気 microPIXE は、大気中でイオンビームを用いて Mg からウランまでの微量元素を同時に高感度で分析できる方法である。通常の質量分析では組織や細胞内での各元素分布を明らかにすることはできないが、microPIXE は、生体組織での元素の局在を μm オーダの空間分解能で、元素ごとに 2 次元分布を観察することができる。アスベストは、天然の鉱物繊維で長さは約 $8 \mu\text{m}$ 、幅約 $0.1 \mu\text{m}$ 、断熱性、耐火性、防音性、耐腐食性に優れており、建築用製材などに多く用いられてきた。しかし、アスベストの吸入は、肺線維症や肺ガンの原因で、発病までの潜伏期間が数 10 年と長いことから、「静かな時限爆弾」とも言われ、大変な社会問題となっている。アスベストによる癌発症や肺線維症進展のメカニズムは不明な点が多く、有効な治療方法もない現状において、その解明が急務である。特にアスベストに含まれる金属が周囲組織にどのような影響を及ぼし、その結果どのように疾患が発症するかについては、重要な点であるにもかかわらず、2 次元的に金属元素分布を測定するよい方法がないため、明らかにすることができなかつた。今回、我々は、アスベストの肺組織内における局在とアスベストの組成につき microPIXE を用いて解析することを試み、画像化に世界で初めて成功した。(引用)(日本原子力学会 2010 年度関東・甲越支部 原子力知識・技術の普及貢献賞受賞)

図 1 は、元素ごとに組織内分布をみたものであるが、上段の正常肺では Si (左端) は検出されても少量であり、Mg (中央) や Fe (右端) は観察されないが、下段の石綿肺では、

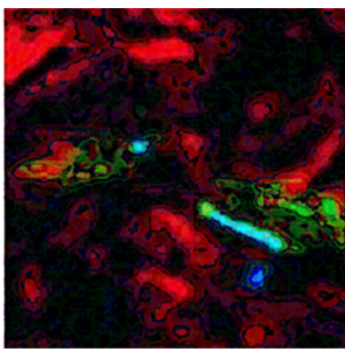


図 1 .Si を緑、Mg を青で表し、合成すると水色に棒状のアスベストが描出される。(矢印で示す)白黒では、白い棒状に認められる。

左端の多量の Si に一致して Mg と Fe が共存し、容易にアスベストと同定される。一方、アスベストは、肺や細胞株に p53、c-jun、c-fos、fra-1 などの遺伝子産物の発現を増強させるとの報告があるので、(Panduri et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 34:443-52, 2006) 我々は、microPIXE を利用し、これら遺伝子産物とアスベストの金属分布との関係を解析しようと思いついた。その後の研究で、肺組織連続切片を利用して免疫組織染色と microPIXE データの組み合わせにより、肺組織中のアスベスト周囲に、アポトーシスに参与する FAS の過剰発現がみ

られることを明らかとした。(引用、)

臨床的研究については、肺線維症患者の中に、職場などでアスベストやその他粉塵吸入歴はあるが胸部 CT など典型的の像を呈しない患者では、原因の同定が難しく労災申請もおこなえない場合がある。このような患者から生検にて肺組織を採取し、microPIXE 法にて組織中のアスベストや粉塵を検出し、肺線維症の原因を明らかにすることは、労働環境改善や労災申請など社会的に極めて有用である。

2. 研究の目的

本研究では、モデルマウスならびに石綿肺を含む肺線維症患者から肺組織を採取し、連続切片を作成し、microPIXE による 2 次元元素分布の測定と免疫組織染色などを用いてアスベストなどの吸入粉塵の近傍の組織の肺線維化関連蛋白質の発現を他の部位と比較することにより同定し、吸入粉塵の組成と肺線維化の機序の関係を明らかとする。さらに、原因不明の肺線維症とされた患者の中に、実はアスベストなど職業・環境中の粉塵を慢性的に吸入して、発症した肺線維症が含まれている。各地の医療機関より依頼された検体を microPIXE にて解析し、その原因を明らかとして、場合によれば、労災申請に役立てる。

3. 研究の方法

(1) 石綿肺を含む粉塵暴露により発症する肺線維症の病態解明：マウスモデル実験をおこなった。Si 粉末は phosphate buffered saline に懸濁し超音波粉砕し、 1.5mg/g body weight を C57Bl/6 マウスに経鼻的に投与した。コントロールとして PBS を経鼻的に投与した。1 週目と 8 週目の肺組織中のシリカを micro-PIXE で解析した。肺組織は鉄染色 (Belin blue stain) や免疫組織染色で FAS などの発現を測定した。

(2) 肺線維症患者の肺生検または気管支鏡採取肺組織での職業・環境吸入物質の関与の検討と発症機序の解明：肺線維症患者の生検または気管支鏡により採取した組織のパラフィン包埋から連続切片を切り出し、一部から microPIXE 用サンプルを作成し、microPIXE にて測定し、1 部は通常の組織染色ならびに免疫組織染色をおこなった。

4. 研究成果

(1) マウスモデル：珪素を経鼻投与したシリカマウスの実験から、吸入開始後 7 日目と 56 日目のマウスの肺組織を比較した。microPIXE の解析からどちらも珪素は多量に検出されたが、56 日目のマウスでは、図 2 に示すように、珪素に一致して多量の鉄が検出され、珪素に対する鉄の比率が高かった。これは、肺組織内の珪素表面に体内の鉄が、次第に沈着していくことが、判明した。組織を見ると、この珪素と鉄の複合体に一致して、

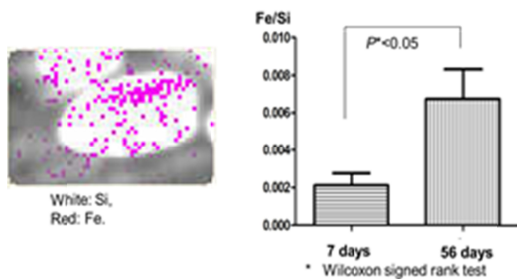


図2 左図は、白い部分が組織に沈着した珪素、赤い部分が鉄。右図は、58日後の肺組織では、珪素に一致して多量の鉄が検出された。

肉芽組織が形成されていた。免疫組織染色では、肉芽組織の中にある組織球には、アポトーシス（細胞死）を誘導する Fas や、オートファジー（自食作用）機能を阻害する p62 の発現が増加していることが明らかとなった。このことは、珪素・鉄複合体は、組織を破壊し、オートファジーを阻害することで病変を形成することが明らかとなった。（論文）鉄は、電子の授受を触媒する作用が強く、局所で酸化還元反応を引き起こしやすく、酸化ストレスを発生しやすい。

（2）患者組織を使用した研究

間質性肺炎患者の組織を使用した、酸化ストレスの肺線維症発症機序への関与の解析：細胞運動などに関与する rho キナーゼのエフェクター分子である、ROCK（Rho-associated coiled-coil containing protein kinase）が、マウスの肺線維症モデルで、活性化されていることが判明しているが、肺線維症患者でも高発現しており、しかも、それに一致して、酸化ストレスのマーカーである 8-iso prostaglandin-F2alpha が高発現していることを明らかとした。このことは、rho キナーゼの活性化が肺線維症に関与し、しかもそれは、酸化ストレスにより引き起こされていることが示唆された。（論文）さらに、（1）と（2）の結果から、アスベストを含めた珪素粉塵吸入による肺の線維化の発症機序が示唆された。

肺線維症発症における粉塵吸入の関与の検討：肺線維症患者における吸入粉塵の関与の解析：12 症例の肺線維症患者とコントロールとして肺線維症のない肺がん患者 9 人の肺組織を microPIXE にて解析した。珪素は肺線維症群で 58.3%、コントロール群で 44.4% に検出された。鉄は、肺線維症群で 25%、コントロール群で 11.1% に検出された。組織成分であるイオウに対する珪素と鉄の含量は両群で差はなかった。ただ、2 例の肺線維症患者において、多量の鉄の含有が明らかとなり、同時に鉄と珪素の位置が一致し、しかも、細胞死を誘導する Fas の発現増強も同部位に見られた。以上より、肺線維症の一部では、



図3 白い部分が肺組織に沈着したアルミニウム

吸入された珪素が、原因となり発症したことが示唆された。

他施設からの検査依頼とその結果：他施設から検体依頼が、2012 年度 4 例、2013 年度 5 例、2014 年度 5 例あった。多くの症例では、特に顕

著な粉塵の沈着はなかった。このうち、2013 年度に依頼を受けた間質性肺炎症例において、職場で使用しているアルミニウムへの暴露が原因の可能性があるとこのことで、その証明のため microPIXE での解析をおこなった。解析の結果、図 3 に示すごとく、大量のアルミニウムが肺組織に沈着していることが判明し、労災申請することができた。（論文）

肺胞蛋白症の病因解析：ヘアドレッサーで喫煙者の肺胞蛋白症患者の病変部を、microPIXE にて解析した。肺生検組織中に、アルミニウム、マグネシウム、珪素、チタニウム、クロム、銅、マンガンなどが検出され、特に多量の珪素が検出された。さらに、病変部の肺胞マクロファージは、他の部位と比較して多量の鉄を含有していた。発症に吸入粉塵の関与と肺胞マクロファージの鉄の呑食の関与が示唆された。（論文 8）

（3）職業によって引き起こされる疾患のうち、アレルギー疾患は、患者も医療関係者もあまり注意をはらわず、漫然とアレルギー疾患の治療を続け、原因追求をおこなわないことが多い。側で、職業・環境中の物質の重要性を啓蒙するため、日本での職業性喘息の現状の総説を書き（論文）さらに、職業性アレルギー疾患診療ガイドラインを作成し、その要旨を英文で論文とし、世界に発信した。（論文）

<引用文献>

- Shimizu Y, Dobashi K, Kusakbe T, Nagamine T, Oikawa M, Satoh T, Haga J, Ishii Y, Ohkubo T, Kamiya T, Arakawa K, Sano T, Tanaka S, Shimizu K, Matsuzaki S, Utsugi M, Mori M. In-air micro-particle induced X-ray emission analysis of asbestos and metals in lung tissue. *Int J Immunopathol Pharmacol.* (査読あり) 2008 Jul-Sep;21(3):567-76. <http://www.biolfesas.org/ijip/vol21num3.htm>
- Shimizu Y, Matsuzaki S, Satoh T, Ohkubo T, Yokoyama A, Ishii Y, Kamiya T, Arakawa K, Shimizu K, Tanaka S, Mori M,

Dobashi K. Influence of tissue particles on Fas expression in idiopathic interstitial pneumonia. *Front Biosci (Elite Ed)*. (査読あり) 2011 Jan 1;3:65-73.

<https://www.bioscience.org/new-archive-pages/2011-2/elite-edition-volume-3e-2011>

Matsuzaki S, Shimizu Y, Dobashi K, Nagamine T, Satoh T, Ohkubo T, Yokoyama A, Ishii Y, Kamiya T, Arakawa K, Makino S, Utsugi M, Ishizuka T, Tanaka S, Shimizu K, Mori M. Analysis on the co-localization of asbestos bodies and Fas or CD163 expression in asbestos lung tissue by in-air micro-pixe. *Int J Immunopathol Pharmacol*. (査読あり) 2010 Jan-Mar;23(1):1-11.

<http://www.biolifesas.org/ijip/abstracts-vol23n1.pdf>

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 8件)

Chino, H, Hagiwara E, Sugisaki M, Baba T, Koga Y, Hisada T, Kaira K, Okudela K, Takemura T, Dobashi K, Ogura T, Pulmonary Aluminosis Diagnosed with In-air Microparticle Induced X-ray Emission Analysis of Particles. *Internal Medicine*, (査読あり) 2015, In press.

<http://www.naika.or.jp/imonline/>

Shimizu Y, Dobashi K, Nagase H, Ohta K, Sano T, Matsuzaki S, Ishii Y, Satoh T, Koka M, Yokoyama A, Ohkubo T, Ishii Y, Kamiya T, Co-localization of iron binding on silica with p62/sequestosome1 (SQSTM1) in lung granulomas of mice with acute silicosis. *J Clin Biochem Nutr*.(査読あり)2015 Jan;56(1):74-83.

DOI: 10.3164/jcfn.14-44.

Shimizu Y, Dobashi K, Sano T, Yamada M, ROCK activation in lung of idiopathic pulmonary fibrosis with oxidative stress. *Int J Immunopathol Pharmacol*. (査読あり) 2014 Jan-Mar;27(1):37-44.

<http://www.biolifesas.org/contentsrosso.htm>

Dobashi K, Akiyama K, Usami A, Yokozeki H, Ikezawa Z, Tsurikisawa N, Nakamura Y, Sato K, Okumura J; Japanese Guideline for Occupational Allergic Diseases 2014. *Allergol Int*. (査読あり) 2014 Sep;63(3):421-42.

DOI: 10.2332/allergolint.14-RAI-0771.

Shimizu Y, Dobashi K, Proton

ion-microbeam elemental analysis for inhaled particle-induced pulmonary diseases: application for diagnosis and assessment of progression., *Curr Med Chem*. (査読あり) 2013 Feb 1;20(6):789-93.

DOI: 10.2174/0929867311320060005

Dobashi K. Occupational asthma in Japan. *Asia Pac Allergy*. (査読あり) 2012 Jul;2(3):173-80.

DOI: 10.5415/apallergy.2012.2.3.173.

Shimizu Y, Matsuzaki S, Satoh T, Koka M, Yokoyama A, Ohkubo T, Ishii Y, Kamiya T, Fueki M, Mori M, Dobashi K, In-air microparticle induced X-ray emission analysis of particles in interstitial pneumonia lung tissue obtained by transbronchial biopsy., *J Clin Biochem Nutr*. (査読あり) 2011 Sep;49(2):125-30.

DOI: 10.3164/jcfn.10-127.

Shimizu Y, Matsuzaki S, Dobashi K, Yanagitani N, Satoh T, Koka M, Yokoyama A, Ohkubo T, Ishii Y, Kamiya T, Mori M., Elemental analysis of lung tissue particles and intracellular iron content of alveolar macrophages in pulmonary alveolar proteinosis., *Respir Res*. (査読あり) 2011 Jun 30;12:88.

DOI: 10.1186/1465-9921-12-88.

[学会発表](計 9件)

Koga, Y. In-air microparticle induced X-ray emission analysis of inhaled particulates in thoracic lymph node in a patient with asbestos exposure. 2015 ATS International Conference, 2015.05.18, Denver, U.S.A.

古賀康彦、間質性肺炎症例におけるパラフィン切片を用いた In-air micro PIXE 解析による肺内微粒子の元素解析。日本職業・環境アレルギー学会、2014.06.26, 福岡市 福岡ソフトリサーチパーク (SRP)センタービル

古賀康彦、The efficacy of in-air microanalysis of particles in interstitial pneumonia lung tissue. 第9回高崎量子応用研究シンポジウム。2014.10.10. 群馬県高崎市 高崎シティーギャラリー。

Koga, Y. The efficacy of Inair microanalysis of particle in interstitial pneumonia lung tissue in patients with or without occupational exposure. 2015 ATS International Conference, 2014.05.19, San Diego, U.S.A.

杉崎 緑、大気マイクロピクシーで診断したアルミニウム肺の一例。第207回日

本呼吸器学会関東地方会。2013.11.16.
東京、エーザイ株式会社本社
土橋邦生、特発性間質性肺炎患者における吸入粉塵の影響の量子ビームによる解析、第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 2013,4,21.神戸市、神戸国際会議場。
Dobashi K.Analysis on co-localization of Si and Fe in lung tissue of silica-inhaled mouse by In-air micro-PIXE. 2013 ATS International Conference. 2013.5.21. Philadelphia USA.
佐藤隆博、ミドリゾウリムシ内の Eu の三次元分布測定。第 28 回 PIXE シンポジウム。2012.11.9. 東京。東京工業大学大岡山キャンパス。
清水泰生、二次性肺胞蛋白症の肺組織切片中の粉塵及びマクロファージ細胞内における in-air micro-PIXE 解析。第 28 回 PIXE シンポジウム。2012.11.9. 東京。東京工業大学大岡山キャンパス。

〔その他〕

ホームページ等

<http://dobashi-lab.health.gunma-u.ac.jp/21.html>

本研究の成果は、上記ホームページ内

<http://dobashi-lab.health.gunma-u.ac.jp/pdf/puxe.pdf>

に記載した。

6. 研究組織

(1)研究代表者

土橋 邦生 (Dobashi, Kunio)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：00241894

(2)研究分担者

佐藤 隆博 (Sato, Takahiro)

独立行政法人日本原子力開発機構・放射線

高度利用施設部・研究員

研究者番号：10370404

(3)研究分担者

石塚 全 (Ishizuka, Tamotsu)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：50302477

(4)研究分担者

清水 泰生 (Shimizu, Yasuo)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：80396621