

氏 名(本籍)	稲 元 民 夫 <small>いなもと たみ お</small>
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 第 4 1 9 号
学位授与年月日	平 成 3 年 2 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目	実験的アスベスト症に関する免疫学的研究 —とくに肺胞マクロファージの生体防衛 機構について—
--------	--

論文審査委員(主査)	教 授 扇 元 敬 司
	教 授 正 木 淳 二
	教 授 堀 口 雅 昭

論文内容要旨

第1章 序論

アスベスト（石綿）とは化学組成がそれぞれ異なる線維状珪酸塩鉱物に付けられた総称で、蛇紋石質アスベストと角閃石質アスベストの二つに大きく分類される6つの鉱物から成る。そのうち工業的に主に利用されているのはクリソタイル（Chrysotile）、クロシドライト（Crocidolite）、アモサイト（Amosite）である。

アスベストが大量に使われ出した19世紀以降に健康障害に関する各種の報告がみられるようになり、この傷害に対しpulmonary asbestosis（石綿肺）という言葉が用いられるようになった。

石綿肺はアスベストを吸入することにより、呼吸細気管支や胞隔に病変を惹起する疾患で、気管支肺肺炎の形で始まる進行性びまん性線維増殖を肺に起こす。このびまん性肺線維症は、数年ないし数十年の経過で徐々に進行し、重症例では、肺は蜂の巣状の構造を示すようになり機能不全となり死亡する。

このアスベスト肺発現メカニズムについては、物理的な刺激により、炎症、線維化、さらには腫瘍が誘発されるという説があるが、このことだけでは十分な説明はできない。最近では、マクロファージが臨床的アスベスト症と実験的アスベスト症の両方で傷害部を包囲する重要な構成細胞であること、患者に様々な免疫異常が認められることからマクロファージおよびそれに続く免疫系の関与が、大きな役割を果たしている可能性が指摘されている。また、アスベストを取込んだマクロファージは、免疫応答を活性化させ、その後に出現する炎症、線維化などに影響しているという説もある。

そこで、本実験はアスベスト起因肺線維症の発現メカニズムにおける肺胞マクロファージの役割をより明確にするために、ラットの吸入モデルを用いて、アスベストの暴露と肺胞マクロファージの産生する種々の炎症調節物質の変動ならびに肺胞マクロファージの亜集団の変動の関連性を検討した。

第2章 アスベスト症モデル動物の作成および実験諸条件の検討

アスベスト吸入モデルには4週齢雌乳オスのinbred Fischer 344系ラットを用い、アスベスト吸入暴露装置（図1）にて、1日8時間、

週5日、計4週間（総日数28日間）in vivoでアスベストを吸入させた。アスベストはCrocidoliteとChrysotileを用い、それぞれは時間重量平均で11.1-11.5mg/m³、10.5-10.7mg/m³、対照群には清浄空気のみを吸入させた。

このようにして作成したアスベスト暴露動物は病理組織学的に、Crocidolite群は暴露終了直後から、Chrysotile群は暴露終了後1ヶ月から、肺胞分岐部の肥厚、膠原線維の増加、胸膜の肥厚など、びまん性の肺線維症を発症していることが確認された（図2）。Crocidolite群の方が重度であったが、両暴露群には有意な差はみられなかった。

組織のコラーゲンの化学成分であるヒドロキシプロリンは、Crocidolite群は暴露開始7日目から、その含量が増加し、17日以降は対照群より有意に増加していた（図3）。Chrysotile群は暴露開始17日目以降、対照群より高い含量を示したが、暴露開始90日以降に有意な差となった。Crocidolite群のヒドロキシプロリン含量は、Chrysotile群のそれよりも有意に高い値を示した。

このように本実験で作成したアスベスト暴露ラットは暴露により、病理組織学的にも、分析化学的にも、肺線維症を発症しており、その発病性はCrocidoliteアスベストの方がChrysotileアスベストより強く、Crocidoliteアスベストの暴露では、暴露7日にはすでに線維の増加が始まっていることが示された。

第3章 アスベスト性肺線維症の発現におよぼす種々の炎症性調節物質の役割

BCDF活性について

BCDF（IL-6）は抗体産生細胞であるB細胞の最終的な分化に関与するリンホカインであることから、アスベストの吸入に伴う抗体産生において、肺胞マクロファージとリンパ球との相互作用によるBCDFの産生増加がみられるかを検討した。

暴露終了後3ヶ月のCrocidolite群の無刺激の脾臓リンパ球培養上清中のBCDF活性は、対照群より有意に活性が上昇した（表1）。Chrysotile群は両者の中間に位置する活性を示した。DNP-BGGの免疫によって、免疫ラットの肺胞マクロファージの脾臓リンパ球への

添加がBCDF Index 値をいずれも2以上に上昇させたが(表2)、これによって免疫群と非免疫群との間にも、また対照群と暴露群との間にも差はみられなかった。

これらのことから、本実験で観察されたIgG分泌細胞の増加はBCDF依存性であると断定することは出来なかったが、暴露終了後3ヶ月のCrocidolite群の脾臓リンパ球単独24時間培養の上清が有意に高いBCDF活性を示したことから、本実験で用いたヒトCESS細胞は、ラットの因子に反応する可能性が示唆された。

ガンマインターフェロンについて

IFN- γ はマクロファージの機能と表面Ia抗原の表出を高め、また線維芽細胞の増殖を刺激し、肺胞マクロファージからも分泌されることから、アスベスト暴露のラット脾臓Tリンパ球と肺胞マクロファージのIFN産生におよぼす影響を検討した。

マウスL細胞を指示細胞として、EBVウイルスに対するCon A刺激脾臓リンパ球培養上清中の抗ウイルス活性を測定したところ、アスベスト暴露群は対照群よりもやや高い抗ウイルス活性を示し、Crocidolite暴露群の方がChrysotile暴露群よりも高い傾向があった(表3)。これはIFNの産生が全身性のものではなく、比較的局限に限定されていることを示していると思われた。ラットLMS-C2細胞とVSVウイルスによる抗ウイルス活性の測定では、Poly(I):Poly(C)で刺激したもののみが抗ウイルス活性を示した。また、ラット細胞によるIFN assayでも、脾臓リンパ球と肺胞マクロファージの抗ウイルス活性は、培養時間による差や群間の差および暴露時間による差は認められなかった。しかしながら、アスベスト暴露17日目のChrysotile暴露群の無処理のもので、特発性の抗ウイルス活性の産生が認められた(表4)。このことは、この時期に肺胞マクロファージがアスベストにより非特異的に活性化されていることを示している。

Arachidonic acid 代謝物について

ロイコトリエンB₄、C₄、D₄、E₄は急性アレルギー性肺炎に重要なmediatorであることが知られており、またプロスタグランディンE₁(PGE₁)とE₂(PGE₂)は抗炎症作用も持つことが知られている。ま

た、アスベストやサイモザンのような種々の粒子は、肺胞マクロファージからのin vitroでのプロスタグランジンとロイコトリエンの選択的な放出を引き起こすことが示されていることから、アスベスト性肺損傷におけるアラキドン酸代謝物の変化をみた。

PGE₂は無刺激でもアスベスト暴露群には産生されたが、対照群には産生されず、Chrysotile暴露群よりもCrocidolite暴露群のほうが多い傾向があった。サイモサンAの刺激はすべての群に産生増加をもたらした(図4)。LTB₄の産生は、無刺激では暴露群には産生されず、サイモサンAより増加したが、暴露群よりも対照群の方が産生が多かった(図5)。また、暴露群は培養時間が長くなると産生が減少したことから、分解ないし代謝が促進されているものと思われる。LTCの産生はサイモサンAの有無にかかわらず、対照群とChrysotile暴露群には差がなく、Crocidolite暴露群はこれら2群より低かった(図6)。肺洗浄液中のアラキドン酸代謝物はいずれも対照群が最も高く、次いでChrysotile暴露群、Crocidolite暴露群の順であった(図7)。このことはマクロファージのPGE₂産生は活性化されているにもかかわらず、肺の微小環境全体としては検索したアラキドン酸代謝物に対し、白血球の浸潤によるそれ以上の炎症の憎悪を防ぐため、なんらかの抑制機構が働いていることを表現しているのではないかと思われる。

炎症性走化因子について

肺胞マクロファージはアスベスト臨床例、実験的アスベスト症のいずれにおいても、傷害部に集積する細胞であり、様々な刺激に反応して走化性物質を分泌する細胞であることから、アスベストの暴露による肺胞マクロファージからの線維芽細胞に対する走化性因子の放出を、ラット由来線維芽細胞CRL1213を指示細胞として測定した。

アスベスト暴露群の走化性活性は、対照群よりも有意に高い線維芽細胞の走化性活性を示した。またChrysotileアスベスト暴露群とCrocidoliteアスベスト暴露群との間には有意な活性の差異は見られなかったが、Crocidoliteアスベスト暴露群が高い活性を示す傾向があった(図8)。この培養上清中の因子はcheckerboard assayによって、指示細胞に対しchemokinesis作用よりもchemotaxis作用を持っていること

が示された。この肺胞マクロファージの産生する走化性因子は易熱性で、透析性が有り、トリプシン感受性の蛋白であった。

培養上清は線維芽細胞に対し強い走化性活性を示したことから、フィブロネクチンが関与している可能性が示唆された。

第4章 アスベストの吸入に伴う肺胞マクロファージの活性化と亜集団の変化

肺胞マクロファージの亜集団の変化

アスベストによる炎症の場へ動員された肺胞マクロファージは形態学的にも機能的にも不均一な集団であると考えられることから、等張Percollによる連続密度勾配遠心法により肺胞マクロファージの分画を試み、その形態学的変化を検索した。

分画後の回収総細胞数の70%以上は画分6と7に回収され、対照群は画分7(比重1.064-1.072)を中心とした1峰性の分布を示し、一方、アスベスト暴露群は画分7を同じく中心とするものの、左右に分布の広がりを見せた(図9)。暴露途中の7および17日目のCrocidolite暴露群は、高比重の画分(8から10まで)に対照群より有意に多くの肺胞マクロファージが回収された。Chrysotile暴露群はこれより、少ないものの同様な変化がみられた。Crocidolite暴露群の分布の変化は、暴露終了後、2-3週および2-5ヶ月の時点でも観察された。アスベスト暴露群は、肺胞洗浄細胞に占める多核巨細胞の割合が、全画分において、対照群より有意に増加し、特に比重の重い画分9と10に顕著であった。この変化は全実験期間を通じて観察された。

これらのアスベスト暴露に伴う肺胞マクロファージ亜集団の変化は、血中の単球からのマクロファージの肺炎症部への動員による、高比重細胞の増加と細胞の不均一な増加を示している。

肺胞マクロファージの活性化と細胞膜表面のIa抗原の表出

アスベストの吸入により肺胞マクロファージは、活性化を受けていると考えられることから、Ia抗原の表出を活性化の指標として用い、肺胞マクロファージの亜集団の変化との関連性を検討した。

Ia陽性細胞はアスベスト暴露群の多くの画分で増加し、Crocidolite

暴露群はChrysotile暴露群よりも増加が著しかった（表5）。このIa陽性細胞の増加は全実験期間を通じて観察され、暴露7日目では、より比重の重い画分での増加がみられ、その後、暴露17日目には、画分5-6の中度比重の画分に多くなった。暴露終了後2-3週および2-5ヶ月では、死細胞の多い画分1-3を除いたその他の画分全体に増加した。多核巨細胞に占めるIa陽性細胞の割合もアスベストの暴露により有意に増加し、Crocidolite暴露群の方がChrysotile暴露群よりも高い割合で出現する傾向がみられた。Ia陽性巨細胞の増加は全実験期間でみられ、対照群には全く観察されなかった。

この様に、アスベスト暴露に伴い、Ia抗原を細胞表面に表出した細胞が増加し、異なる亜集団が、それぞれ活性化されていることが示された。また、Ia陽性多核巨細胞の出現は、活性化された特異な集団の存在を示しているものと思われた。

第5章 アスベスト性肺線維症発現に及ぼす肺胞マクロファージ由来IL-1の役割

IL-1は線維芽細胞の増殖を刺激すると共に、培養線維芽細胞にコラーゲナーゼ産生を増加させることが知られており、肺線維症の発現に重要な役割をはたしていると考えられる。そこで、培養上清のマウス胸腺細胞によるIL-1の測定を行った。

肺胞マクロファージのIL-1産生はLPSの刺激により促進されたが、Neuman and Tytell培地では無刺激でもIL-1の産生が認められた

（表6）。IL-1の産生はアスベストの暴露により、暴露7日目から暴露終了後13ヶ月までの全期間を通じて増加した（表7）。LPS刺激のものではアスベスト暴露群間には差がみられず、Chrysotile群の方が産生が多い傾向があったが（図11）、無刺激での産生はCrocidolite群の方が高い傾向があった（図10）。無刺激のものでのIL-1産生は、暴露7日目では画分7、8-10の比重の重い画分に多くみられ、時間の経過と共に、軽い画分へ産生域が拡大する傾向がみられた。

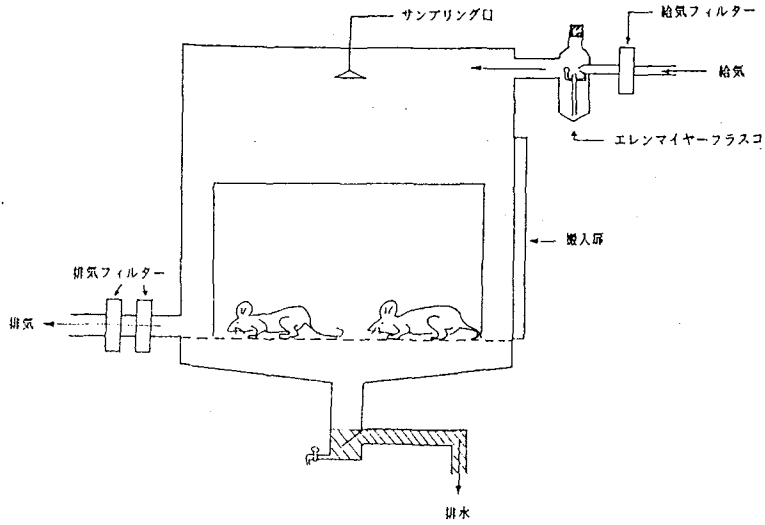
このようにアスベストに暴露されることにより、肺胞マクロファージは特発的にIL-1を産生し、それが暴露終了後13ヶ月のラットでも持続していることから、線維芽細胞を機能的に過度に刺激するこの物質の肺線維症発現に関する重要性が示された。

第6章 総合考察

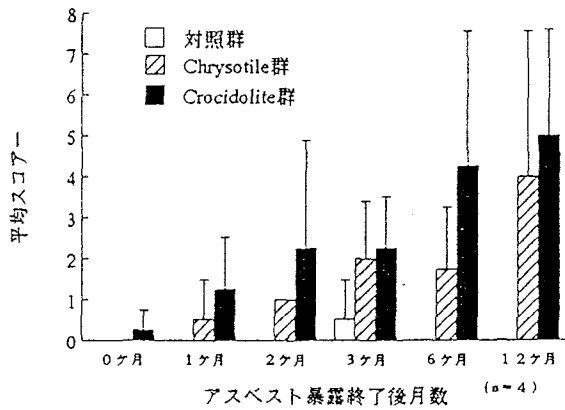
本研究はアスベストの暴露は等張Percoll連続密度勾配遠心法によって分けられる肺胞マクロファージの亜集団に多核巨細胞と高比重のマクロファージの増加を特徴とする著しい変化をもたらすことを明かにした。高密度の画分の肺胞マクロファージは未成熟であることが報告されていることから、この細胞の増加は、新たに炎症の場に動員された未成熟の単球ないし、またはマクロファージの存在を示している。一般に肺胞マクロファージの集団は不均質であり、その全体の機能は種々の異なる機能を持つ個々の細胞の集合からなっている。機能的に活性化した食細胞の数の不均一な増加は、ザルコイドージスや他の腫瘍性肺疾患で見られるように、マクロファージ介在性の肺損傷を引き起こす。本研究でもアスベストの暴露によって複数の細胞画分がIL-1を産生していることから、アスベスト症でも同じ様なメカニズムが働いていると思われる。IL-1は本実験で産生増加が証明された走化性因子、変化の認められたアラキドン酸代謝物と共に、線維芽細胞を誘導増殖させ、局所性の感染症では病巣を線維膜で隔離する様に働き、疾病を治癒させるが、アスベストは肺胞空間にびまん性に散在しており限局していないため、この生体防衛反応は、結果的に肺全体に線維化を引き起こし、アスベスト症を発現させる方向に働くことになる(図12)。特にこのIL-1の産生は特発的であり、かつ持続的に産生されていることから、アスベスト性肺線維症を発現させる主要因となっていると思われる。ほとんどの画分の細胞にIa陽性細胞が増加したことは、本実験で証明された肺胞マクロファージの機能的な活性化を形態学的に証明している。このIa陽性細胞の増加は多核巨細胞において顕著で、機能的に活性化した食細胞の特殊な亜集団を代表しているものと思われる。このマクロファージの細胞膜の融合はIFN γ によって誘導されるが、本実験で証明されたIFNの特発的産生は、この巨細胞の増加を裏付けるものである。

この様に本実験の結果は、アスベスト症の発現には肺胞マクロファージがそれに続く免疫系の関与する中でKey的な役割を演じていることを強く支持するものであった。

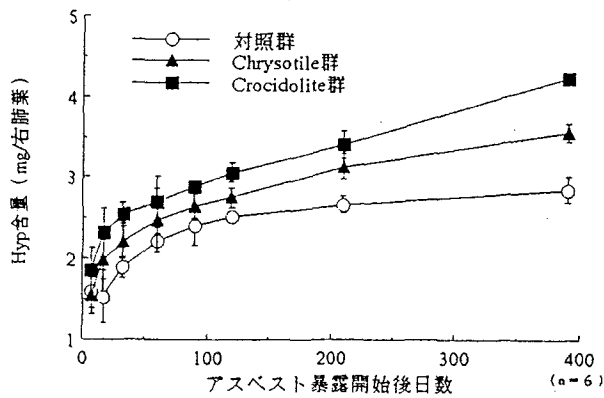
(図1) アスベスト暴露チャンバーの構造



(図2) 病理所見によるアスベスト・スコアの推移



(図3) ハイドロキシプロリン含量の推移



(表1) ラット脾臓リンパ球培養上清のBCDF活性

(暴露終了後3ヶ月)				
培養時間	BCDF Index			
	対照群	Chrysotile群	Crocidolite群	ACI
24hrs	1.17±0.23	1.37±0.14	2.32±0.59*	2.90±2.14
陽性対照	2.36±0.82			

* (p<0.05)でCONに対し有意差あり (n=5)

細胞濃度 = 5×10^6 /ml

ACI = 無処理 ACI ラット(6ヶ月齢)

(表2) DNP-BGG免疫、非免疫ラットの各種培養上清中のBCDF活性

暴露群	培養処理区	BCDF Index					
		非免疫群			DNP-BGG免疫群		
		24時間	48時間	72時間	24時間	48時間	72時間
対照群	AM	1.02	1.30	0.71	1.17	1.70	1.07
	AM+DNP-BGG	1.25	1.22	1.41	1.41	1.74	1.39
	AM+SC	0.81	1.53	0.92	1.40	1.78	1.44
	AM+SC+DNP-BGG	1.39	2.08	1.40	1.26	2.04	1.22
	SC	0.91	1.74	0.90	1.32	1.51	1.28
	SC+DNP-BGG	1.38	1.49	1.21	1.47	1.84	1.45
Chrysotile群	AM	0.98	2.01	1.18	0.66	1.93	1.05
	AM+DNP-BGG	0.91	1.42	1.07	0.84	1.55	1.28
	AM+SC	0.85	2.29	0.89	0.79	1.67	1.17
	AM+SC+DNP-BGG	1.14	1.90	1.18	1.27	2.08	1.72
	SC	0.82	1.47	1.05	1.14	2.05	1.17
	SC+DNP-BGG	0.82	1.97	0.73	0.94	1.49	1.49
Crocidolite群	AM	0.71	1.84	1.00	1.09	1.54	1.13
	AM+DNP-BGG	1.15	1.90	1.24	0.85	1.09	0.92
	AM+SC	1.08	1.54	0.98	1.23	1.48	1.07
	AM+SC+DNP-BGG	1.71	1.88	1.22	1.34	2.26	1.49
	SC	1.07	1.55	1.02	1.16	1.92	1.07
	SC+DNP-BGG	0.95	1.83	1.01	1.03	1.49	1.00

陽性対照 = 3.06

陰性対照+DNP-BGG = 0.92

AM = 肺胞マクロファージ (5×10^5 /ml)

(n=2)

SC = 脾臓細胞 (2.5×10^6 /ml)DNP-BGG 濃度 = 200 μ g/ml

(表3) マウスL細胞によるIFN assay

Con A刺激脾臓リンパ球培養上清中の抗ウイルス活性
(暴露終了後3ヶ月)

暴露群	Con A濃度 (μ g/ml)	抗ウイルス活性		
		24時間	48時間	72時間
対照群	0	0	0	0
	0.5	0	0	0
	1.0	0	4	4
	5.0	4	16	8
	10.0	16	16	32
	25.0	32	64	32
	50.0	32	64	64
Chrysotile群	0	0	0	0
	0.5	0	0	4
	1.0	4	4	4
	5.0	16	32	32
	10.0	32	32	32
	25.0	64	64	32
	50.0	64	128	64
Crocidolite群	0	0	0	0
	0.5	0	0	0
	1.0	0	4	8
	5.0	8	32	32
	10.0	32	64	32
	25.0	64	256	128
	50.0	128	256	256

(n=3)

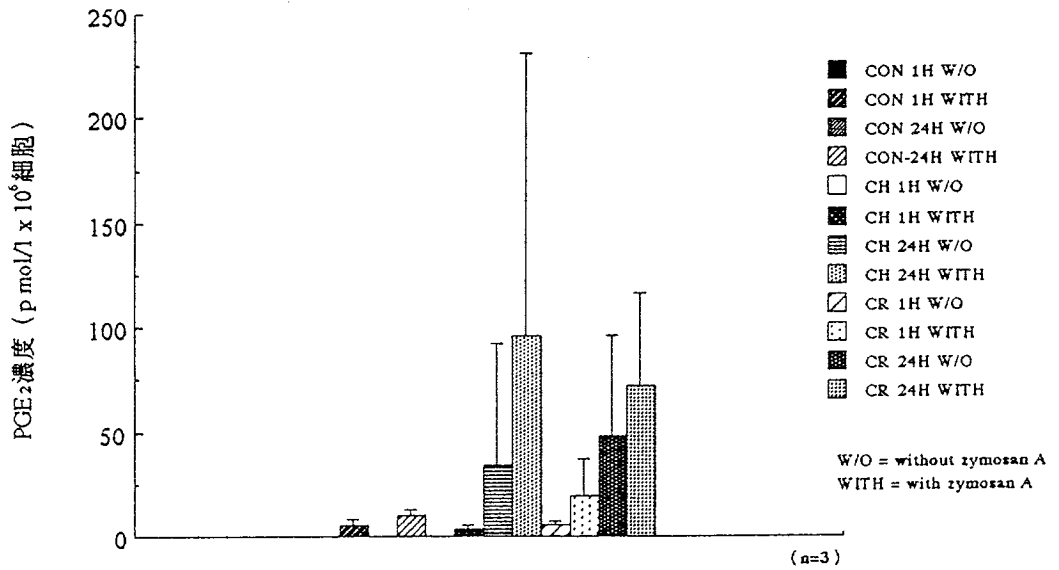
(表4) ラットLMS-C2細胞によるIFN assay

肺胞マクロファージ培養上清の抗ウイルス価の推移

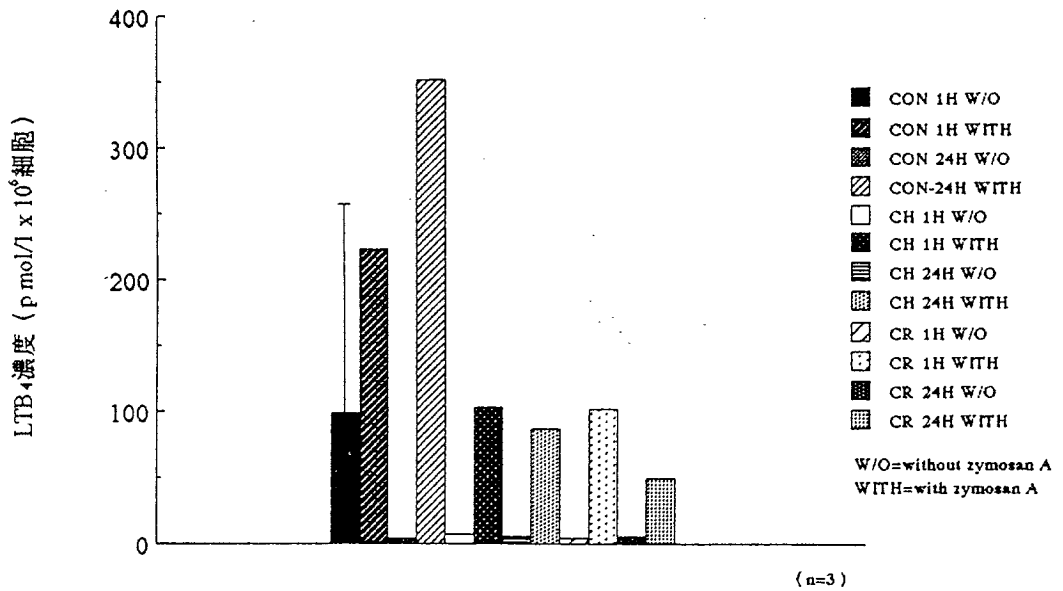
暴露期間	暴露群	誘導物質	抗ウイルス価		
			0時間	24時間	48時間
暴露開始7日目	対照群	無処理	0	0	0
		IC/DEAE(100/200)	0	64	64
	Chrysotile群	無処理	0	0	16
		IC/DEAE(100/200)	0	512	1024
	Crocidolite群	無処理	0	0	0
		IC/DEAE(100/200)	0	512	512
暴露開始17日目	対照群	無処理	0	0	0
		IC/DEAE(100/200)	1	1024	512
	Chrysotile群	無処理	0	0	16
		IC/DEAE(100/200)	1	1024	1024
	Crocidolite群	無処理	0	0	0
		IC/DEAE(100/200)	1	1024	1024
暴露後1ヶ月	対照群	無処理	N/A	N/A	N/A
		IC/DEAE(100/200)	N/A	N/A	N/A
	Chrysotile群	無処理	N/A	N/A	N/A
		IC/DEAE(100/200)	N/A	N/A	N/A
	Crocidolite群	無処理	<20	<20	<20
		IC/DEAE(100/200)	<20	1280	1280
暴露後8ヶ月	対照群	無処理	0	0	0
		IC/DEAE(100/200)	0	256	256
	Chrysotile群	無処理	0	0	0
		IC/DEAE(100/200)	1	512	526
	Crocidolite群	無処理	0	0	1
		IC/DEAE(100/200)	1	512	512

IC/DEAE(100/200) = 100 μ g/ml Poly(I):Poly(C), 200 μ g/ml DEAE dextran (n=2)

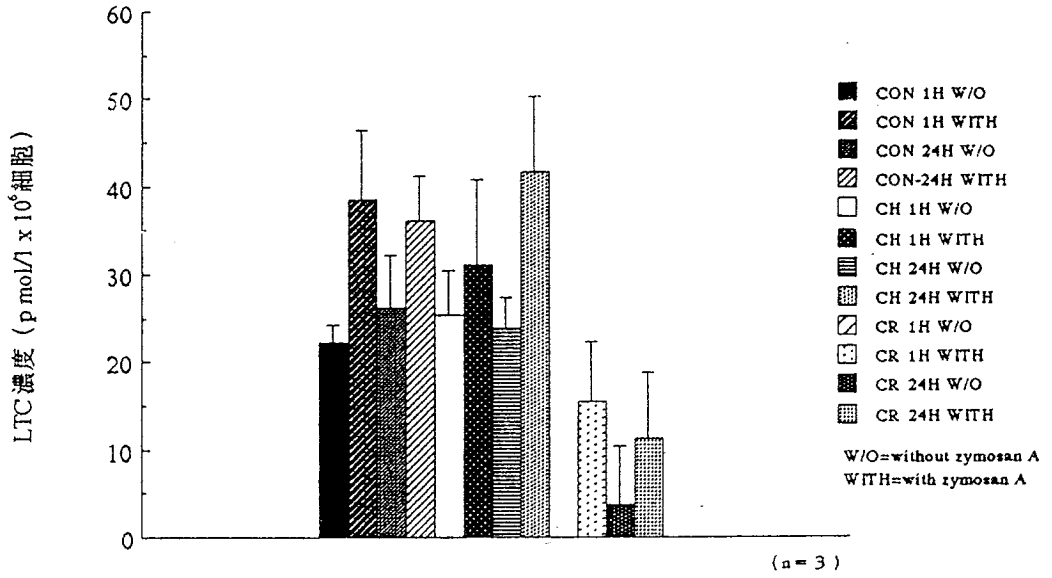
(図4) アスベスト暴露7日目の肺胞マクロファージ
培養上清中のPGE₂濃度



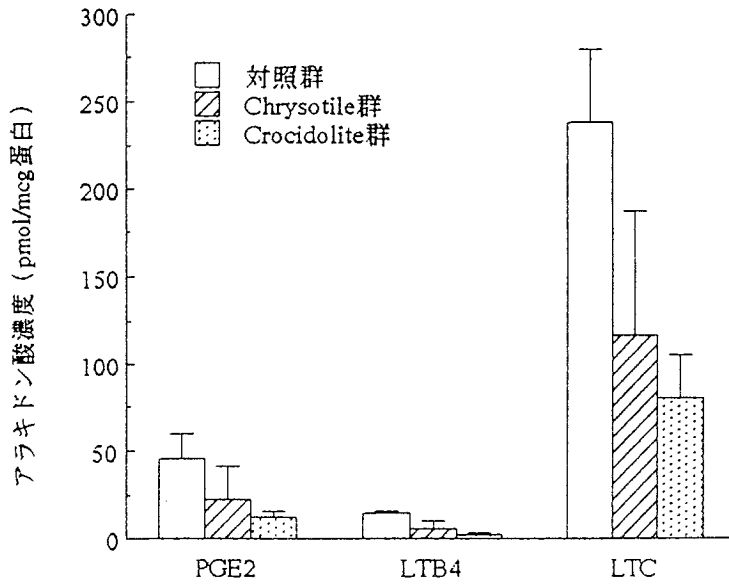
(図5) アスベスト暴露7日目の肺胞マクロファージ
培養上清中のLTB₄濃度



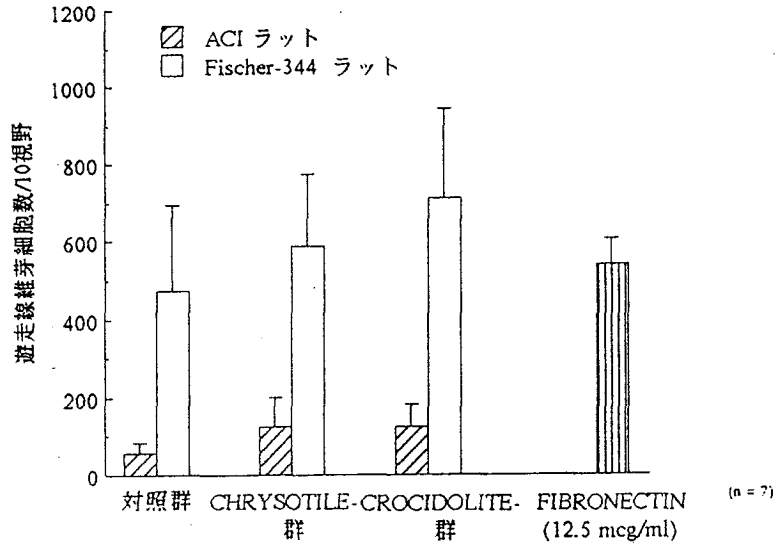
(図6) アスベスト暴露7日目の肺胞マクロファージ
培養上清中のLTC濃度



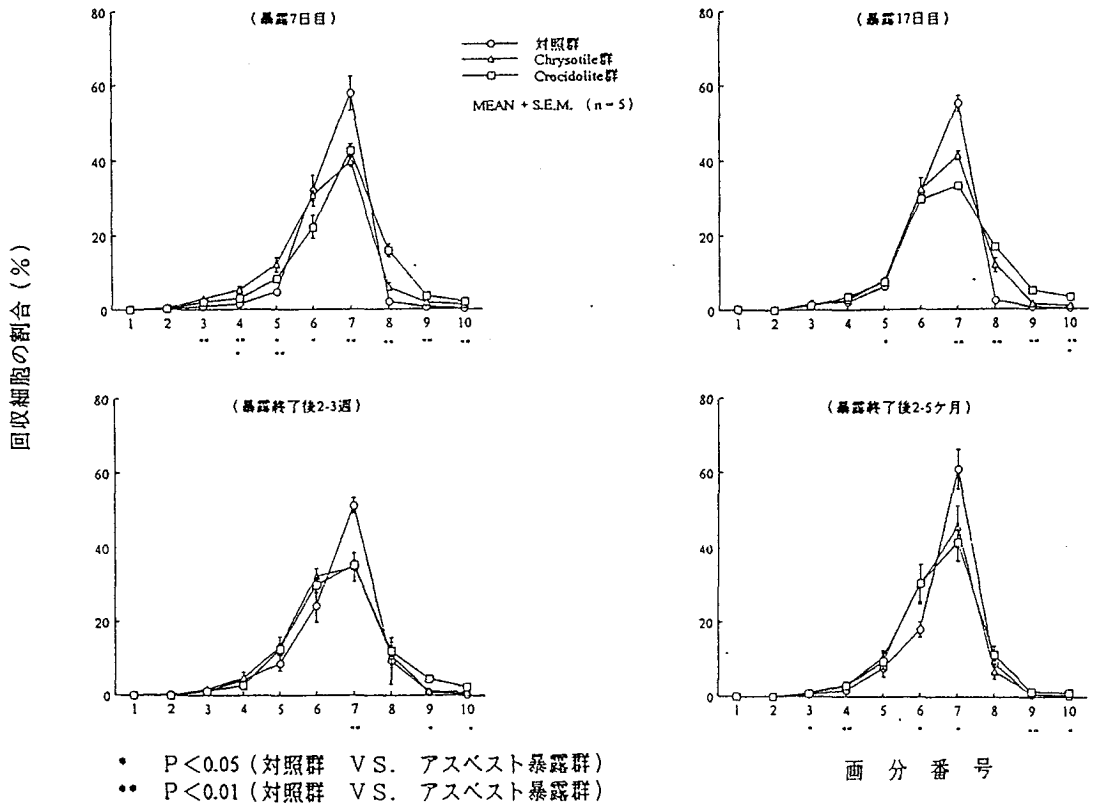
(図7) アスベスト暴露7日目の肺洗浄液中の
各種アラキドン酸濃度



(図8) 肺胞マクロファージ培養上清中の繊維芽細胞走化性活性



(図9) アスベスト暴露による肺胞マクロファージのサブポピュレーションの変化



(表5) Ia 陽性肺胞マクロファージの割合

暴露期間	画分番号	陽性率 (%)		
		対照群	Chrysotile群	Crocidolite群
暴露7日目	未分画	3.43 ± 1.60	4.67 ± 1.01	7.95 ± 1.40 *
	1	-	-	-
	2	0.58 ± 0.58	-	0.15 ± 0.15
	3	0.49 ± 0.27	1.72 ± 0.56 *	2.01 ± 0.47 *
	4	1.53 ± 0.84	2.55 ± 0.67	2.55 ± 0.90
	5	2.93 ± 1.67	4.04 ± 1.82	3.01 ± 0.44
	6	1.74 ± 0.49	3.38 ± 1.53	4.69 ± 1.27 *
	7	1.04 ± 0.35	3.43 ± 1.10 *	5.84 ± 1.90 *
	8	1.72 ± 0.40	1.03 ± 0.62	4.13 ± 1.50 *
	9	0.49 ± 0.49	1.14 ± 0.48	5.10 ± 1.38 **
	10	0.20 ± 0.20	3.77 ± 2.14	3.24 ± 0.97 **
暴露17日目	未分画	2.81 ± 1.57	9.89 ± 1.48 **	11.84 ± 2.62 **
	1	-	-	-
	2	-	0.80 ± 0.51	0.27 ± 0.27
	3	1.46 ± 1.02	5.16 ± 1.81	2.28 ± 0.80
	4	1.25 ± 0.65	5.82 ± 1.83 *	3.52 ± 1.73
	5	1.44 ± 0.70	8.89 ± 2.80 *	9.10 ± 3.58 *
	6	1.27 ± 1.06	6.58 ± 2.70	9.38 ± 2.20 **
	7	2.06 ± 1.42	6.21 ± 1.57 *	6.19 ± 2.15
	8	1.59 ± 0.62	3.91 ± 0.79 *	4.38 ± 1.51
	9	2.13 ± 2.13	3.13 ± 1.27	7.92 ± 4.93
	10	2.64 ± 2.33	2.14 ± 1.24	4.78 ± 1.36
暴露終了後 2-3週	未分画	1.54 ± 0.55	9.86 ± 3.23 *	19.53 ± 2.29 **
	1	-	-	-
	2	1.03 ± 1.03	1.02 ± 0.49	2.97 ± 1.43
	3	1.63 ± 0.67	4.53 ± 3.43	4.95 ± 1.34
	4	2.54 ± 1.21	6.83 ± 2.94	10.15 ± 0.92 **
	5	1.34 ± 0.81	7.52 ± 5.02	11.95 ± 2.35 **
	6	0.91 ± 0.52	6.80 ± 5.06	9.08 ± 2.63 *
	7	1.21 ± 0.66	5.98 ± 4.58	10.14 ± 2.96 *
	8	5.04 ± 0.86	6.47 ± 3.07	9.27 ± 2.20
	9	3.42 ± 1.40	6.23 ± 3.65	11.04 ± 3.20
	10	5.12 ± 2.87	12.15 ± 7.56	15.75 ± 2.82 *
暴露終了後 2-5ヶ月	未分画	4.12 ± 1.86	9.89 ± 2.39 *	13.82 ± 4.95
	1	0.68 ± 0.68	1.16 ± 1.16	2.50 ± 2.50
	2	0.88 ± 0.88	1.99 ± 1.78	5.44 ± 5.44
	3	3.22 ± 1.38	1.20 ± 0.60	4.39 ± 2.65
	4	2.80 ± 0.98	6.37 ± 2.83	6.61 ± 3.57
	5	3.94 ± 1.42	4.95 ± 1.52	9.64 ± 1.78 *
	6	1.70 ± 0.47	5.97 ± 2.97	10.31 ± 4.98
	7	1.99 ± 0.20	8.69 ± 3.85	7.80 ± 1.63 **
	8	2.30 ± 0.49	2.80 ± 1.79	5.64 ± 1.03 **
	9	4.01 ± 2.26	6.19 ± 3.16	8.57 ± 3.85
	10	5.63 ± 0.99	8.73 ± 1.79	12.43 ± 6.66

* P < 0.05 (対照群 VS. アスベスト暴露群)

** P < 0.01 (対照群 VS. アスベスト暴露群)

平均 ± 標準誤差 (n=5)

(表6) 未分画肺胞マクロファージ培養上清中のIL-1活性

(暴露17日目)

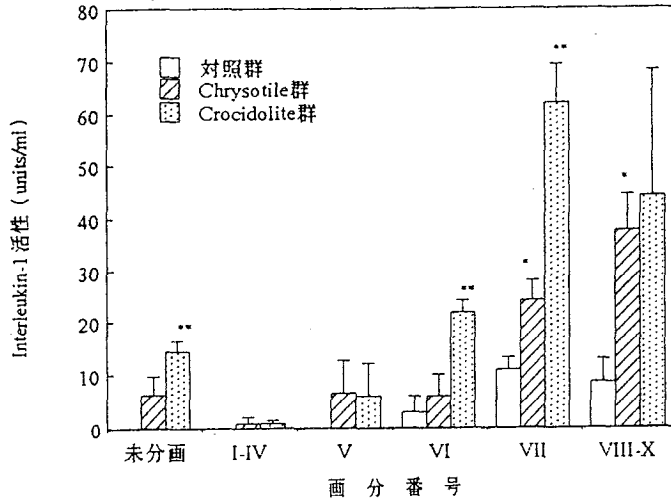
群	培地の種類					
	RPMI-1640		F-12		NT	
	無刺激	LPS*	無刺激	LPS	無刺激	LPS
対照群	-	12.44	-	17.23	-	43.30
Chrysotile群	-	141.03	-	132.81	18.09	202.66
Crocidolite群	-	64.73	-	71.52	14.45	99.90

細胞濃度 = 2.5 x 10⁶/ml 24時間培養

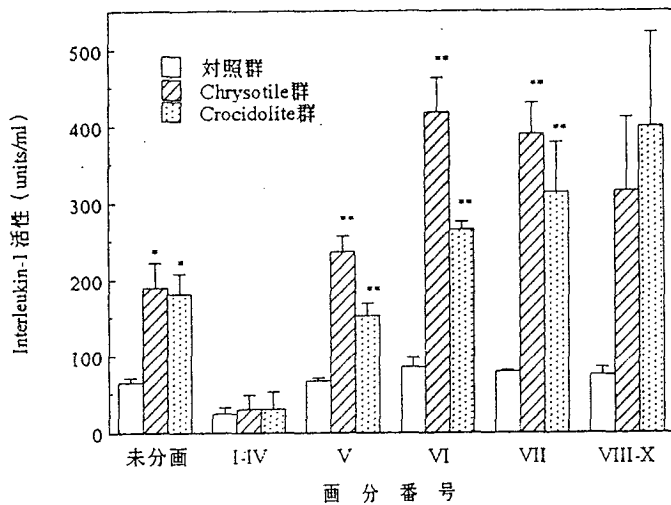
(Unit/ml)

* 100mcg/ml (E.coli O55:B5)

(図10) 無刺激肺胞マクロファージ培養上清中のIL-1活性
(暴露7日目)



(図11) LPS刺激肺胞マクロファージ培養上清中のIL-1活性
(暴露7日目)



(表7) 未分画肺胞マクロファージ培養上清中のIL-1活性の推移
(NT培地)

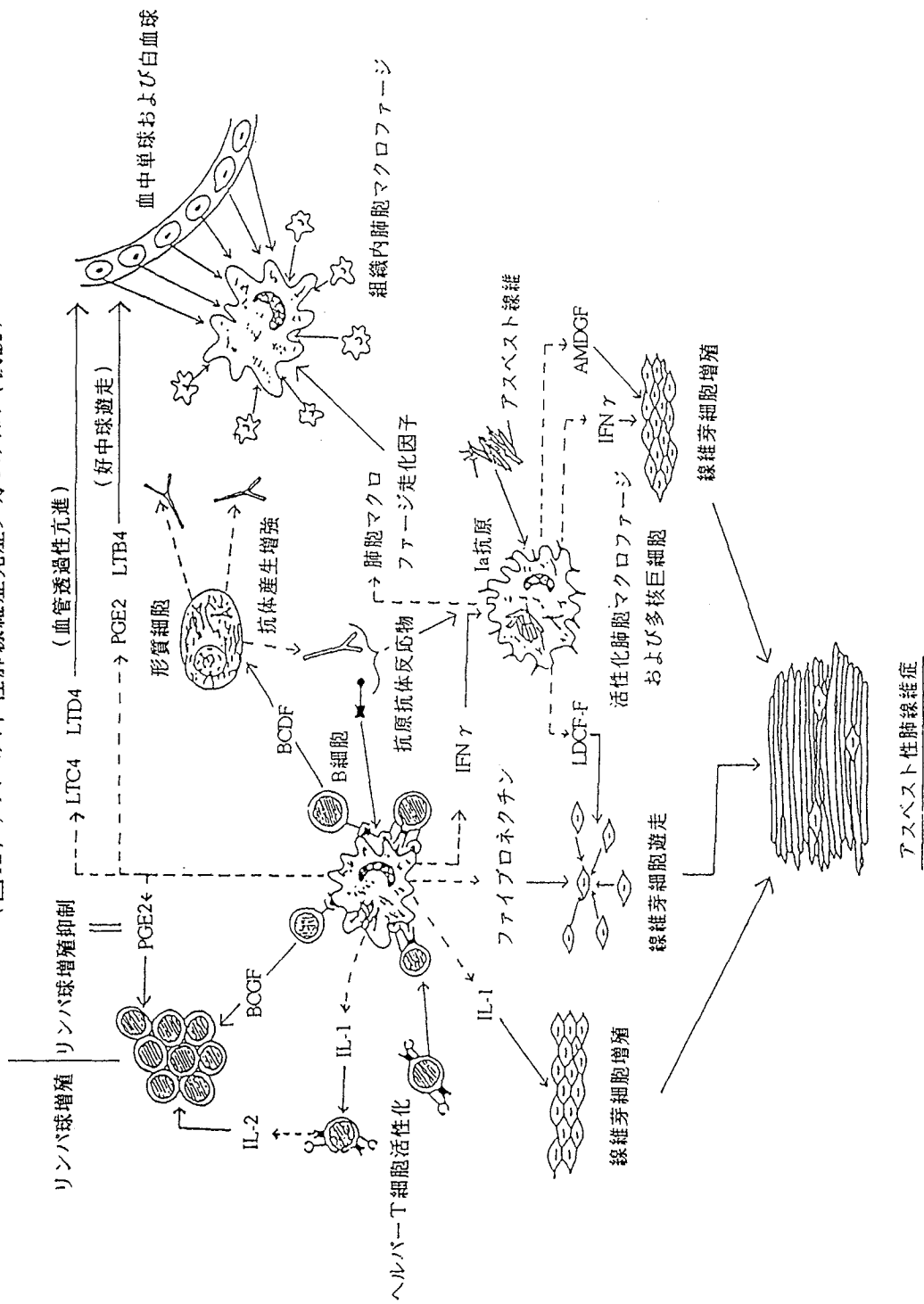
群	暴露後月数					
	8ヶ月		11ヶ月		13ヶ月	
	無刺激	LPS*	無刺激	LPS	無刺激	LPS
対照群	-	47.82	-	63.34	-	21.90
Chrysotile群	-	71.74	12.53	110.54	-	196.81
Crocidolite群	-	103.75	14.75	117.53	4.89	135.53

細胞濃度 = 2.5×10^6 /ml 24時間培養

(Unit/ml)

* 100mcg/ml (E.coli O55:B5)

(図12) アスベスト性肺線維症発症メカニズム (仮説)



審査結果の要旨

本論文は、アスベストを吸入して呼吸細気管支や胞隔に病変を惹起する疾患、すなわちアスベスト肺発現メカニズムについて実験動物をもちいて免疫学的解析をおこなったものである。勿論、アスベスト肺発現の機作については諸説あるが、本研究では、肺胞マクロファージの生体防衛機構が本症発現におよぼす側面について追及した。臨床的アスベスト症と実験的アスベスト症ともにマクロファージは、障害部を包み囲む重要な構成細胞で様々な免疫異常をひきおこすことが知られている。そこでアスベスト吸入モデルとしてFischer344系ラットをアスベスト吸入暴露装置で飼育した結果、肺胞マクロファージの亜集団に多核巨細胞と高比重のマクロファージの増加を特徴とする著しい変化をもたらすことを見出した。

この細胞の増加から、新たに炎症の場に動員された未成熟の単球、またはマクロファージの存在を示し、またザルコイドーシスや他の腫瘍性肺疾患でも見られるマクロファージ介在性の肺損傷を引き起こすことを見出した。また線維芽細胞に対する走化性因子の産生増加、アラキドン酸代謝物の産生の変化を証明して、生体防衛反応肺全体に線維化を引き起こしてアスベスト症を発現させる方向に働くことになることをも明らかにした。とくに、ここで測定したインターロイキンI (IL-1) は、アスベストの吸入により特発的で、かつ持続的な産生で線維芽細胞の増殖を促進して培養線維芽細胞にコラーゲナーゼ産生を増加させてアスベスト性肺線維症を発現する主要因となっていると推論した。一方、アスベストの吸入によって、ほとんどの画分の細胞に免疫関連抗原陽性細胞が増加することや、肺胞マクロファージの機能的な活性化を形態学的に観察して活性化した食細胞の特殊な亜集団が存在していることを明らかにした。マクロファージの細胞膜の融合は、ガンマーインターフェロン (IFN γ) によって誘導されるが、本実験では、このIFNの特発的産生も認め巨細胞の増加を裏付けた。この様に本実験の結果は、アスベスト症の発現には肺胞マクロファージがそれに続く免疫系の関与する中で引金としての役割を演じていることを強く支持するものであった。

以上のように本研究では、ラットをもちいた実験的アスベスト症発現の機作を肺胞マクロファージの生体防衛機構の側面から追及し考察したもので、得られた知見は実験動物をもちいた動物生命科学の研究の一分野をなすもので、今後の地球環境の保全に大きく貢献するものと考えられる。よって審査員一同は、本論文提出者が農学博士の学位を授与されるに十分な資格を有するものと判定した。