

## 大気 microPIXE によるアスベスト等吸入粉塵による肺線維症発症機序と予後因子の解析



土橋 邦生

Dobashi Kunio

(群馬大学大学院保健学研究科)

### 1 はじめに

アスベスト等の吸入粉塵による肺線維症や肺癌の発症機序の解明は、急務である。また、原因不明である特発性間質性肺炎の中に職場や環境中の吸入粉塵により発症した例がかなり混入している。それらが明らかになれば、職場や環境整備を行い、重症化や新規患者の発症予防を行うことができる。大気 micro Particle Induced X-ray Emission (以下 microPIXE) は、大気中でイオンビームを用いて Mg から U までの微量元素を同時に高感度で分析できる方法であり、生体組織での元素の局在を  $\mu\text{m}$  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(図1)。今まで、筆者らは、microPIXE を使用しアスベストの肺組織内での局在と組成の画像化に世界で初めて成功し、石綿肺や間質性肺炎の原因

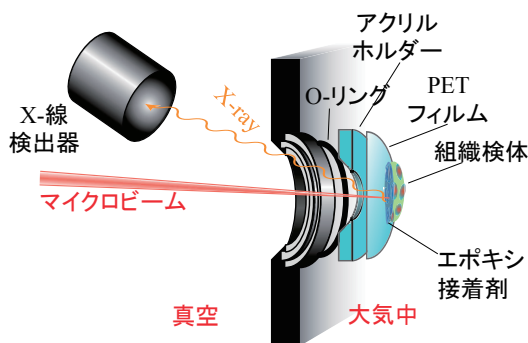


図1 microPIXE

追及や病態解明に多くの成果を発表してきた。今回筆者らの行ってきた研究を紹介すると共に、今後の展望について述べる。

### 2 アスベストによる肺線維化機序の解明

アスベストによる癌発症(中皮腫や肺癌等)や肺線維症進展のメカニズムは不明な点が多く、有効な治療方法も無い。中でも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無いため、明らかにすることができなかった。筆者らは、アスベスト吸入患者の肺組織内においてアスベストの局在と元素組成を microPIXE にて解析することを試み、画像化に世界で初めて成功した。図2は、元素ごとに組織内分布を見たものであるが、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、左端に多量の Si がべっとりと塊を作って存在し、しかも 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。図2を合成したものが図3である。中央右にアスベストがきれいに検出され、肺内のアスベストを画像化することができた(矢印)<sup>1)</sup>(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)。同時にアスベスト肺では、

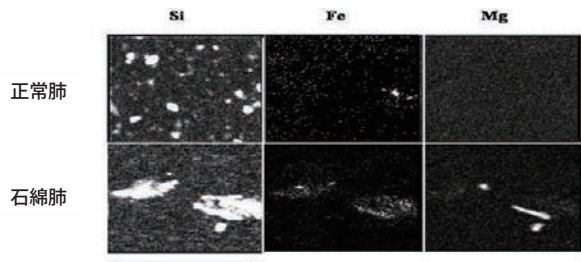


図2 肺組織内の各元素の分布を見ると上段の正常肺に比べ下段の石綿肺は、左図の多量の Si の一部に一致して中央の図の Fe と右図の Mg が棒状に共存している

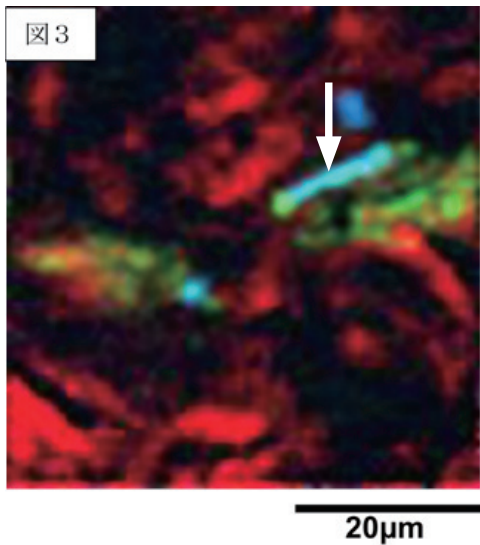


図3 図2に示した各元素を合成すると肺内アスベストが画像化される。(白矢印)周囲には、アスベスト以外の多くの Si, Mg, Fe も観察される

アスベスト以外に各種金属や Si の沈着が多いことも明らかとなった。更に肺組織の連続切片を使用し、免疫組織染色と比較することにより、肺組織内のアスベスト周囲には、Fe が多く集積し、そこにアポトーシスを誘導する Fas の発現が増強する事や炎症を引き起こすマクロファージ (CD163 発現細胞) の集積が誘導されると報告した (図4)<sup>2)</sup>。しかも図5に示すごとく、同じアスベスト吸入肺の組織内でも FAS や CD163 の発現している部分では、これらを発現していない部分に比べ、細胞成分である S の量に対する Si と Fe の量の比率が顕著に高くなっていることが示され、FAS や CD163 の発現に Fe や Si の関与が示唆された<sup>2)</sup>。更に、最近筆者らは、吸入されたアスベストは、リンパ流に乗り肺内リンパ管を通りリンパ節に運ばれ、そこに肺よりも高濃度に集積することも確認し、悪性中脾腫が胸部だけでなく腹部等他の部位にも発症する機序の一端を明らか

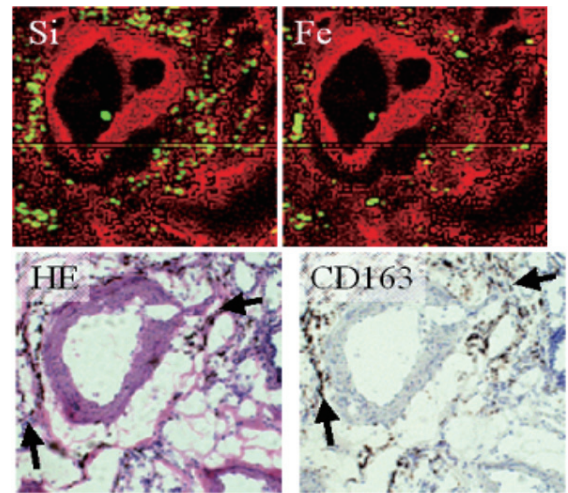


図4 アスベスト吸入により発症した肺線維症の患者の肺組織

上段は microPIXE による元素分布解析 (左: Si, 右: Fe)。下段は、左が通常の H.E 染色。右がマクロファージに特異的に発現される CD163 の免疫染色。矢印の部分に強く発現がされており、Si と Fe の分布と一致する

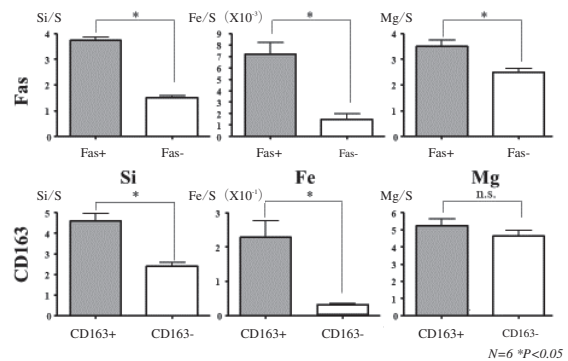


図5 microPIXE で測定した、アスベスト吸入肺組織における Fas と CD163 発現部位と非発現部位での各元素の S (組織成分を示す) に対する比率

とした<sup>3)</sup>。更に、現在、連続切片を利用し microPIXE 解析と免疫組織染色とレーザーマイクロダイセクション法にて採取したアスベスト周囲の細胞の遺伝子解析の結果とを比較し、吸入粉塵の周囲組織にいかなる遺伝子産物の発現が増強しているか、どのような遺伝子変異が起こっているかを明らかとすることにより、発癌機序を解明しようとしている。

### 3 原因不明の肺線維症に潜む職場吸入粉塵が原因の肺線維症の診断と社会貢献

職業性喘息を始め、職場環境に存在する粉塵吸入により惹起される疾患は、大量粉塵吸入の持続により、重篤となりやすい。筆者らは、特発性肺線維症

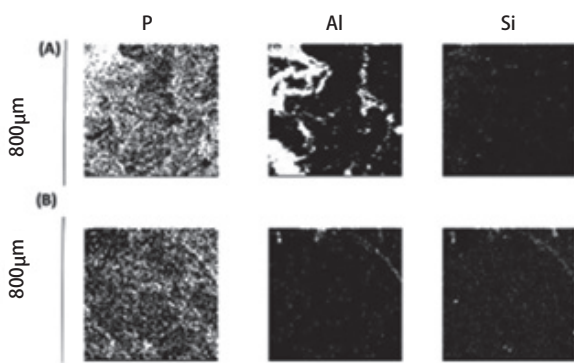


図6 アルミナ工場労働者(A)のmicroPIXE解析像、粉塵吸入の無い肺線維症患者(B)に比較すると中央の列の如くAlが多量に検出された

と診断された症例の中に、実は職場粉塵による肺線維症が紛れている可能性を想定していた。他県の病院から原因不明の肺線維症と診断された患者がいるが、アルミナ工場で働いていたので、アルミニウムの吸入が原因ではないか検査してほしいと依頼され、microPIXEにて測定したところ、肺組織から大量のアルミニウムが観察され(図6)、アルミナの持続的吸入により引き起こされた肺線維症であり、労働災害の可能性のあることを報告した。その結果、患者は労災認定された<sup>4)</sup>。前記成果により、既に複数の施設から、職場や環境中の粉塵吸入による肺線維症の疑いがある患者の組織が送られてきていてmicroPIXEでの測定を依頼されている。今後症例を積み上げることにより、職業性暴露による肺線維症の確定診断の方法として、本法が認知される可能性がある。

#### 4 気管支鏡採取肺組織中のアスベストの同定による早期診断法の確立

アスベスト吸入歴はあるにもかかわらず胸部CTで石綿肺の像を呈しない患者では、石綿肺の認定などが難しく、定期検診の実施が遅れてしまっている。一方、従来組織からのアスベスト検出法は、外科的処置により多量の組織を採取し、組織を酸で溶解してその中のアスベストを数える方法であるが、この検査ができる施設は限られていて、迅速な診断は困難であり、保険診療でカバーされない。そこで、このような患者から気管支鏡で微量肺組織を採取し、切片を作成しmicroPIXE法にて組織中のアスベ

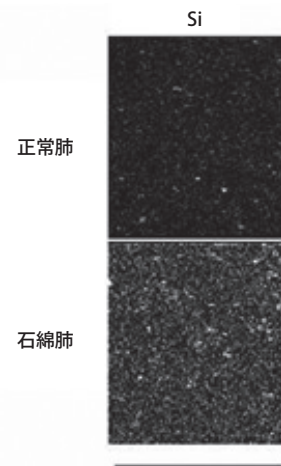


図7 正常肺と石綿肺組織中に観察されるSiの分布。石綿肺ではSiを含む多量の粒子が認められる

トを検出し、正常人の肺組織と比較するという、microPIXEを使用した石綿肺の新しい早期診断方法を確立することにより、CTに所見が現れる以前に石綿肺を早期に確認し、定期検診を早期に始められれば、癌や中皮腫の早期発見に繋がり、患者に極めて大きな利益をもたらすことが期待される。アスベストには、クリソタイルやクロシドライト等構成成分によりいくつかの種類がある。その中で例えば、クリソタイルは、アスベスト小体を作りやすく、また、吸入された各種アスベストにおいてもアスベスト小体を形成するものは少なく、筆者らのmicroPIXEによる検討でも、肺内にはアスベスト小体を形成しない従来の顕微鏡による方法では、検出しにくい多くのアスベストがアスベスト吸入患者の肺には存在していることを明らかとしている。図7に示すごとく、アスベスト吸入肺(石綿肺)にはアスベスト非吸入肺(正常肺)に比較し、歴然とした差をもって多くの組織内アスベストを検出することができる<sup>5)</sup>。

#### 5 今後の期待される課題

①特発性間質性肺炎の予後因子としての吸入粒子の関与の解析：特発性肺線維症の予後は、決して良いものではないが、それでも進行の早い症例と遅い症例が存在する。その予後を規定する因子はいまだに明確になっているとは言い難い。筆者らは、病状の進行に環境からの吸入粒子が影響を与えている可



能性を想定し、これを明らかにしようと試みている。既に特発性肺線維症患者 12 例中 2 例の肺組織中に異様に Fe が多く検出されたことを報告しており、このことは環境中から多量の粉塵を吸入している患者が存在していることを示唆している<sup>5)</sup>。現在筆者らは、特発性間質性肺炎患者において、microPIXE による肺組織中の元素解析と肺機能の低下速度、CT 画像での線維化の進行、肺線維症のマーカーである KL-6 の変化とを経時的に観察し、環境因子の特発性間質性肺炎に与える影響を解析している。関連があることが明らかとなれば、環境整備等により予後の改善に役立つことが期待される。

② イオン誘起発光顕微分光 (Ion Luminescence Microscopic Imaging and Spectroscopy:ILUMIS) を用いた解析: ILUMIS は、群馬大学理工学府の加田らが開発している方法である。この方法は、microPIXE でサンプルに水素イオンビームを当てる時、側方にある X 線測定器と分光器により、組織から放出された X 線を測定することにより、組織中の金属元素及び化合物の種類及び量を 2 次元的に測定できる。microPIXE と同時測定により、個別粒子の内部状態や化学組成を分析・イメージングでき、組織内の化合物やタンパク質の同定が可能である画期的装置である。今後、筆者らが microPIXE で行ってきた吸入粉塵と肺線維症の関連の研究に microPIXE+ILUMIS の同時測定を導入することにより、今までの組織中の元素のみの解析から化合物、タンパク質のレベルでの解析へと進化できる。前述のアルミニウム肺の場合、microPIXE のみではアルミニウムの存在は確認できるが、アルミニウム化合物のどれが存在するかは同定できない。そこで、この組織を microPIXE+ILUMIS に向け、アルミナ ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) であることを証明することができる。次に、当院患者または全国の病院から送られた粉塵吸入が疑われる肺線維症患者の肺組織について microPIXE+ILUMIS の同時測定をすることにより吸入粉塵の性状を化合物や有機物の単位で明らかにできる。更に、患者の環境から粉塵が採取できれば、それを同装置で測定し、その性状を明らかとし、組織内吸入物質と比較する

ことで、肺線維症の原因物質が環境粉塵であったと明確に同定できる。これにより、環境整備により病状の悪化を食い止め、更に職場粉塵の場合は、患者の労災申請に役立て、また、職場環境の改善を促すことにより、更なる患者の発症を予防することができる。また、アスベストによる肺線維化機序の解明と関連して、Fas や CD163 発現部位には多量の Fe が存在するので、免疫染色した切片と microPIXE+ILUMIS 同時測定した切片を比較検討することにより、いかなる鉄化合物の時に、Fas や CD163 がアスベスト周囲に発現しやすいか解析する。もちろん、アスベスト以外の吸入粉塵による肺線維症患者肺組織においても、肺内の吸入物質を化合物として同定し、どの化合物がアポトーシスや炎症関連蛋白質を発現させているかを明らかとし、病態解明に役立てる。

## 6 終わりに

microPIXE を使用した筆者らの研究成果と今後の展望を述べた。本測定法は、今後ますます基礎・臨床医学の研究になくてはならないものになると確信している。

## 参考文献

- 1) Shimizu, Y., *et al.*, In-air micro-particle induced X-ray emission analysis of asbestos and metals in lung tissue. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **21** (3) 567-76 (2008)
- 2) Matsuzaki, S., *et al.*, 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*, **23** (1) 1-11 (2010)
- 3) Koga, Y., *et al.*, Elemental and immunohistochemical analysis of the lungs and hilar lymph node in a patient with asbestos exposure, a pilot study. *Environ Health Prev Med*, **21** (6) 492-500 (2016)
- 4) Chino, H., *et al.*, Pulmonary Aluminosis Diagnosed with In-air Microparticle Induced X-ray Emission Analysis of Particles. *Intern Med*, **54** (16) 2035-40 (2015)
- 5) Shimizu, Y., *et al.*, Influence of tissue particles on Fas expression in idiopathic interstitial pneumonia. *Front Biosci (Elite Ed)*, **3**, 65-73 (2011)