

びまん性汎細気管支炎の気管支肺胞洗浄液中 デフェンシンに関する検討

宮崎医科大学第3内科

迎 寛 芦谷 淳一 中里 雅光
谷口 治子 伊達 紫 伊井 敏彦
塩見 一剛 増本 英男 松倉 茂

長崎大学第2内科

門田 淳一 河野 茂 原 耕平

(平成7年5月25日受付)

(平成7年6月21日受理)

Key words: diffused panbronchiolitis, defensins, bronchoalveolar lavage, interleukin-8, macrolides

要 旨

びまん性汎細気管支炎 (DPB) において, 好中球のアズール顆粒に存在し, 抗菌活性や細胞障害活性を有するデフェンシンの気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中濃度および肺組織中免疫活性に関して検討を行った。DPB では健常者や特発性肺線維症患者と比較して, BALF 中のデフェンシン値は著明に増加しており, 同時に測定した BALF 中好中球数やインターロイキン 8 (IL-8), 好中球エラスターゼ値と有意に相関していた。DPB の開胸肺生検組織を用いた免疫組織染色では, デフェンシンは細気管支上皮表面や気道内の好中球や浸出物に染色された。マクロライド剤による治療後には, BALF 中の好中球数や IL-8 値の低下とともに BALF 中デフェンシン値も有意に低下した。これらの結果より, DPB では気道内に集積した好中球よりデフェンシンが放出され, 細気管支上皮に沈着することにより, 気道局所での組織障害を引き起こしている可能性が推測された。

序 文

現在, 気道内に集積した好中球がびまん性汎細気管支炎 (DPB) の病態に深く関与していることが明らかにされているが^{1)~3)}, 気道内に集積した好中球がいかに DPB での肺障害の発症に関与しているかは未だ不明である。デフェンシンは好中球で産生, 放出される塩基性ペプチドであり, 細菌などに対する抗菌活性を有すると共に, 強い細胞障害活性を持つ⁴⁾ことから DPB での組織障害に関与している可能性が推察される。今回, DPB の病態におけるデフェンシンの関与を明らかにす

るために, DPB 症例の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中および開胸肺生検組織中デフェンシンを検討し, 興味ある結果を得たので報告する。

材料と方法

対象: 厚生省の診断の手引きをたした DPB 症例 32 例 (男性 21 例, 女性 11 例, 平均年齢 47.5 ± 13.7 歳) を対象とした。また好中球が病態に関与していることが推測される特発性肺線維症 (IPF)⁵⁾ 患者 13 例 (男性 6 例, 女性 7 例, 平均年齢 61.7 ± 10.4 歳) および健常者 12 例 (男性 10 例, 女性 2 例, 平均年齢 24.7 ± 4.8 歳) を対照群とした。これら両群では全例に気管支肺胞洗浄 (BAL) を施行し, BALF の解析を行った。また, 健常者 86 例と種々

別刷請求先: (〒889-16) 宮崎郡清武町大字木原5200
宮崎医科大学第3内科 迎 寛

平成7年9月20日

の良性呼吸器疾患患者93例(DPB 16例, IPF 14例, 細菌性肺炎17例, マイコプラズマ肺炎 5 例, 肺結核 6 例, 肺真菌症 5 例, 過敏性肺臓炎10例, サルコイドーシス 7 例, 気管支喘息 7 例, 成人呼吸促進症候群 (ARDS) 6 例) において血漿中のデフェンシン値の測定を行った。DPB 32例中12例ではマクロライド剤 [エリスロマイシン (EM) 3 例, クラリスロマイシン (CAM) 3 例, ロキシシロマイシン (RXM) 6 例] による治療後に再度 BALF の検討を行った。

BAL: BAL は気管支ファイバースコープを右中葉亞区域枝へ wedge し, 滅菌生食水50ml で 3 回, 計150ml で洗浄を行い, 2 枚重ねのガーゼで濾過後, 遠沈し細胞成分の検討を行うとともに, その上清を BALF として -80°C で凍結保存し使用した。細胞分画に関しては cytopsin 2 (SHANDON) を用い, 1,100rpm で 2 分間スピンス, スライド標本作製し, May-Giemsa 染色を行い, 顕微鏡下で観察, 判定した。

デフェンシン, インターロイキン 8 (IL-8), 好中球エラスターゼの測定: BALF 中のデフェンシンは RIA 法を用いて既報⁶⁾のように測定した。また IL-8値は enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法によりトーレ・フジバイオニクス社製の IL-8 ELISA キットを用い, また好中球エラスターゼは enzyme immunoassay (三和化学

研究所)を用いて測定した。

免疫組織化学的染色⁷⁾: DPB 患者の開胸肺生検組織を用いた。ホルマリン固定したパラフィン包埋切片を脱パラ後, 内因性ペルオキシダーゼを失活し, 正常ヤギ血清にて非特異的反応をブロックし, 抗デフェンシン抗体と反応した。その後, ビオチン化二次抗体を加え, ペルオキシダーゼ標識アビジン, ビオチン複合体と反応した。過酸化水素加 DAB 基質を加え発色後, メチルグリーンにて核染色した。コントロールとして45歳の肺結核患者の手術標本の正常部位を用いた。

統計学的方法: 各群間の比較には, 一元配置分散分析法 (ANOVA) と Scheffe 法を, マクロライド治療前後の比較には Student's paired t test を用い, 危険率 5% を有意水準とした。また, 2 群間の相関関係の検定には Spearman の順位相関係数を用いた。結果はすべて平均値と標準偏差で示した。

成 績

Fig. 1 左に示すように, BALF 中の好中球比率は過去の報告^{1)~3)}と同様に今回の検討でも, DPB では $70.2 \pm 19.0\%$ と健常者 ($0.9 \pm 0.8\%$) や IPF ($8.6 \pm 11.2\%$) と比較し有意に増加していた。また, BALF 好中球実数においても DPB では $99.6 \pm 130.5 \times 10^4 \text{cell/ml}$ と健常者 ($0.2 \pm 0.2 \times 10^4 \text{cell/ml}$, $p < 0.01$) や IPF ($2.6 \pm 4.3 \times 10^4 \text{cell/}$

Fig. 1 The percentage of neutrophil (left) and the concentration of defensins (right) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) obtained from healthy volunteers, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and diffuse panbronchiolitis (DPB).

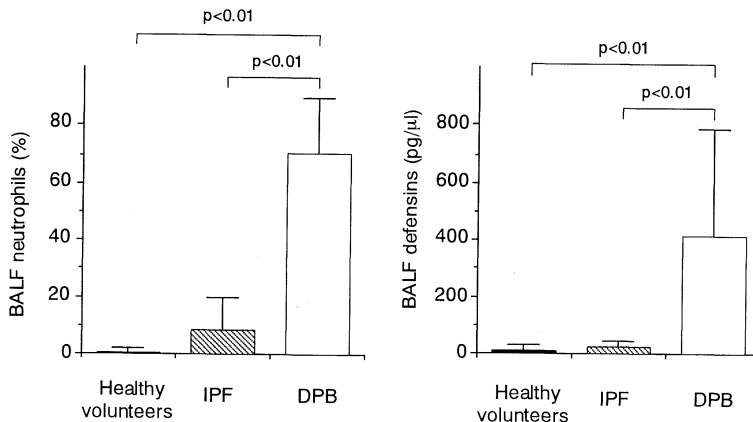
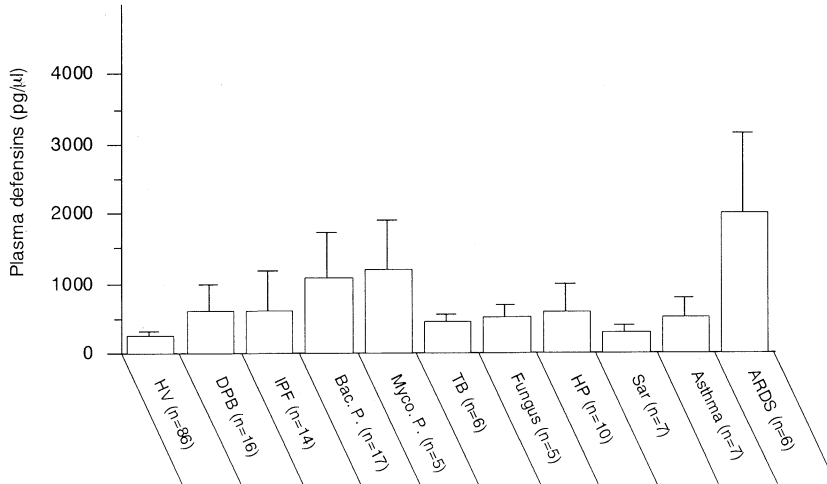


Fig. 2 Plasma values of defensins in patients with various nonmalignant lung diseases and in healthy volunteers. HV, healthy volunteers; Bac. P., bacterial pneumonia; Myco. P., mycoplasma pneumonia; TB, tuberculosis; HP, hypersensitivity pneumonitis; Sar, sarcoidosis; ARDS, adult respiratory distress syndrome.



ml, $p < 0.01$)と比較し有意に高値を示した。IPFでは好中球比率や実数ともに健常者よりも若干高値を示したが有意差はなかった。BALF中のデフェンシン値はFig. 1右に示すようにDPBで $414.1 \pm 372.4 \text{ pg}/\mu\text{l}$ と他群に比較して著明に高値を示した(IPF $23.5 \pm 25.5 \text{ pg}/\mu\text{l}$, 健常者 $16.1 \pm 15.2 \text{ pg}/\mu\text{l}$)。一方, DPBでの血漿中のデフェンシン値($617.5 \pm 364.6 \text{ pg}/\mu\text{l}$)はIPF($634.8 \pm 560.5 \text{ pg}/\mu\text{l}$)と同様に健常者($254.8 \pm 66.3 \text{ pg}/\mu\text{l}$)と比較して軽度高値を示したが有意差はなかった(Fig. 2)。しかし, DPBの血漿中デフェンシン値は肺炎(細菌性 $1,080.6 \pm 678.5 \text{ pg}/\mu\text{l}$, マイコプラズマ $1,223.3 \pm 695.2 \text{ pg}/\mu\text{l}$)やARDS($2,009.1 \pm 1,160.4 \text{ pg}/\mu\text{l}$, $p < 0.01$)の値と比較すると低値であった(Fig. 2)。また, DPBでは血漿中とBALF中のデフェンシン値には有意な相関は見られなかった。Fig. 3上段に示すようにDPBではBALF中の好中球比率とデフェンシン値には有意な相関がみられた。BALF中のIL-8値は, DPB($n=22$)では $346.3 \pm 349.9 \text{ pg}/\text{ml}$ と高値を示しており, BALF中のデフェンシンと有意な相関がみられた(Fig. 3中段)。また, BALF中の好中球エ

ラスターゼは健常者($n=7$)ではすべて感度以下であったが, DPB($n=17$)では $1,890.2 \pm 1,790.7 \mu\text{g}/\text{l}$ と著明に高値を示した。またBALF中の好中球エラスターゼ値もデフェンシン値と有意な相関がみられた(Fig. 3下段)。次に健常肺と開胸肺生検により組織学的にDPBと診断された組織に対するデフェンシンの免疫組織染色の結果をFig. 4に示す。健常肺(Fig. 4A)組織中では好中球のみデフェンシンが染色されたが, DPB(Fig. 4B)では気道内の好中球や滲出物に加え, 細気管支上皮表面に強い染色を認めた。特に炎症が強い細気管支領域に強く染色される傾向がみられた。マクロライド剤の治療前後におけるBALF中のデフェンシン, IL-8および好中球比率の変化をFig. 5に示す。治療により, BALF中の好中球比率やIL-8値の低下とともにデフェンシン値も著明に低下した。

考 察

本間, 山中ら⁹⁾によりDPBの疾患概念が提唱されてから四半世紀を経ようとしている。その間, 工藤ら⁹⁾によりEM療法の有効性が明らかとされ, 近年その作用機序の解明に伴い, DPBの病態

Fig. 3 Correlation between the concentration of defensins and the percentage of neutrophils (upper), the concentration of interleukin (IL)-8 (middle) or neutrophil elastase (lower) in BALF obtained from DPB.

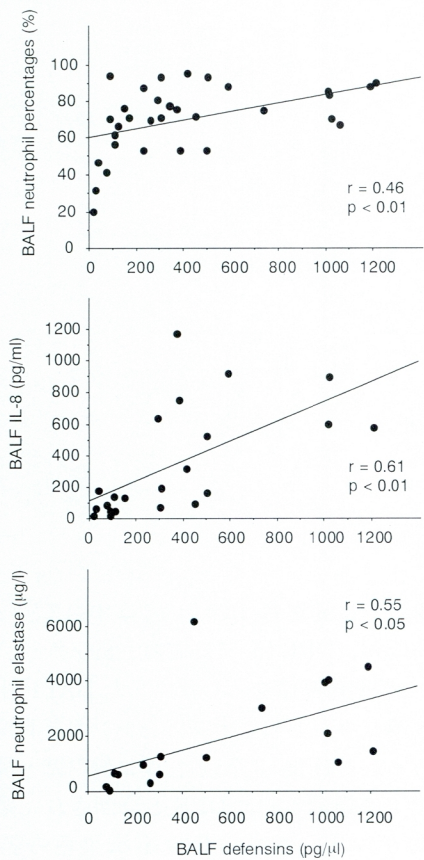


Fig. 4 Immunohistochemical staining of defensins in open-lung biopsy specimens from a control (A) and a representative patient with DPB (B).

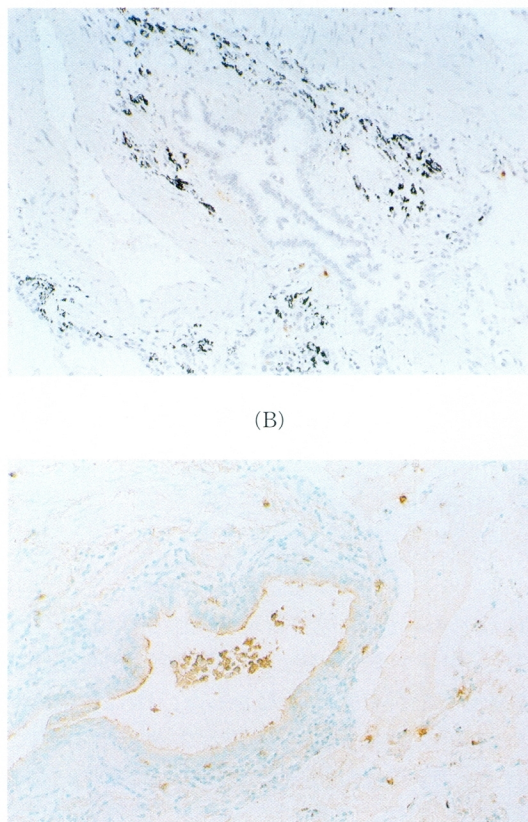
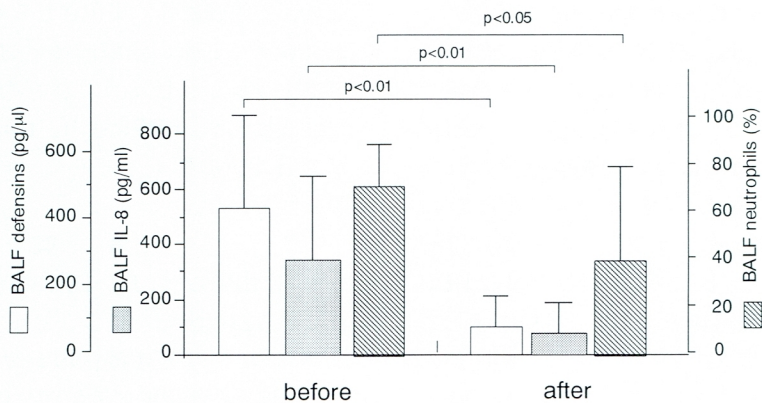


Fig. 5 Comparison of levels of defensins, IL-8 or neutrophil percentages in BALF from 12 patients with DPB before and after treatment with macrolides.



が次第に明確にされてきている。現在、DPBの病態としては、1) IL-8等の炎症性サイトカインによる気道内への好中球の浸潤¹⁰⁾¹¹⁾、2) 気道過剰分泌¹²⁾、3) 活性化したリンパ球の呼吸細気管支領域への浸潤¹¹⁾¹³⁾などが報告されている。特に、1)に関してはDPBの気道障害に好中球由来の活性酸素や組織障害性因子が直接関与していることが推察されている。しかし、DPBでは好中球の病態上の役割に関する研究報告は少なく、Ichikawaら¹⁴⁾によりBALF中の好中球エラスターゼ活性の上昇が報告されているにすぎない。

好中球による殺菌は、活性酸素やリソゾーム顆粒から放出される殺菌蛋白の作用により行われる。デフェンシンは好中球のアズール顆粒に存在し、好中球の総蛋白の5～7%、またアズール顆粒中蛋白の30～50%を占め⁴⁾、1個の成熟ヒト好中球は3～5pgのデフェンシンを含有している⁶⁾。一方、好中球をphorbol myristate acetateなどで刺激するとデフェンシンは細胞外に放出され、細胞外での抗菌にも機能している可能性が示唆されている¹⁵⁾。デフェンシンはグラム陽性、陰性菌、真菌およびenveloped virusesに対して幅広い抗微生物作用を有している⁴⁾。デフェンシンによる抗微生物作用はデフェンシンに4残基含まれているアルギニンが細胞膜リン脂質と反応した後に形成されるイオンチャンネルにより膜透過性が変化することによると考えられている⁴⁾。デフェンシンのこの細胞膜作用は病原微生物に特異的なものでないために、正常細胞やガン細胞に対しても細胞障害活性を示すことも報告されている。デフェンシンには他に肥満細胞からのヒスタミン放出作用、単球走化性作用や抗ACTH作用など様々な作用が報告されている⁴⁾。

Okrentらは好中球由来の顆粒蛋白の中でデフェンシンが肺の線維芽細胞や上皮細胞に対する強い細胞障害活性を持つことを報告している¹⁶⁾。また、彼らは好中球由来の組織障害性因子の中でよく知られている好中球エラスターゼの持つ血管内皮細胞に対する障害活性はデフェンシンよりも強いことを示している¹⁶⁾。本研究によりDPBでは肺組織と好中球が直接接触する局所で高濃度の

デフェンシンが存在していることが明らかにされた。またDPBの開胸肺生検組織を用いた免疫組織染色でも細気管支上皮表面でデフェンシンの強い免疫染色像がみられ、炎症の程度が強いほど染色の程度も強かった。これらの所見はデフェンシンがDPBで直接的に肺障害を起こしている可能性を示唆するものである。

工藤らの報告⁹⁾以来、EMの作用機序が次第に明らかとなってきている。最近ではEMと同様の14員環系マクロライド剤であるRXMやCAMにもDPBに対する効果が報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。今回の検討でも、以前の報告¹⁰⁾¹⁷⁾と同様にマクロライド剤による治療後にBALF中IL-8値の有意な減少がみられ、それとともにBALF中の好中球数およびデフェンシン値の減少がみられた。これらの結果より、マクロライド剤は肺局所でIL-8などの炎症性サイトカインの産生を低下させ、好中球の気道内浸潤を抑制することにより、デフェンシンや好中球エラスターゼなどの好中球顆粒蛋白因子による肺障害を抑制し、DPBの病態を改善するものと推察される。

文 献

- 1) 迎 寛, 崎戸 修, 織田裕繁, 千住玲子, 平谷 一人, 門田淳一, 福島喜代康, 小森清和, 河野 茂, 原 耕平: びまん性汎細気管支炎におけるBALF細胞所見の検討—エリスロマイシン投与前後の比較検討—。感染症誌, 65: 692—697, 1991.
- 2) Kadota, J., Sakito, O., Kohno, S., Sawa, H., Mukae, H., Oda, H., Kawakami, K., Fukushima, K., Hiratani, K. & Hara, K.: A mechanism of erythromycin treatment in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 147: 153—159, 1993.
- 3) Mukae, H., Hirota, M., Kohno, S., Komori, K., Fukushima, K., Hiratani, K., Kadota, J. & Hara, K.: Elevation of tumor-associated carbohydrate antigens in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 148: 744—751, 1993.
- 4) 長岡 功, 山下辰久: デフェンシン。臨床免疫, 27: 229—236, 1995.
- 5) Lynch, J.P.: III, Standiford, T.J., Rolfe, M.W., Kunkel, J.L. & Strieter, R.M.: Neutrophilic alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. The role of interleukin-8. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145: 1433—1439, 1992.

- 6) Shiomi, K., Nakazato, M., Ihi, T., Kangawa, K., Matsuo, H. & Matsukura, S.: Establishment of radioimmunoassay for human neutrophil peptides and their increases in plasma and neutrophil in infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195: 1336—1344, 1993.
- 7) Date, Y., Nakazato, M., Shiomi, K., Toshimori, H., Kangawa, K., Matsuo, H. & Matsukura, S.: Localization of human neutrophil peptide (HNP) and its messenger RNA in neutrophil series. *Ann. Hematol.*, 69: 73—77, 1994.
- 8) Homma, H., Yamanaka, A., Tanimoto, S., Tamura, M., Chijimatsu, Y., Kira, S. & Izumi, T.: Diffuse panbronchiolitis. A disease of the transitional zone of the lung. *Chest*, 83: 63—69, 1983.
- 9) 工藤翔二, 植竹健司, 萩原弘一, 平山雅清, 許 栄宏, 木村 仁, 杉山幸比古: びまん性汎細気管支炎に対するエリスロマイシン少量長期投与の臨床効果に関する研究—4年間の治療成績. *日胸疾会誌*, 25: 632—642, 1987.
- 10) Oishi, K., Sonoda, F., Kobayashi, S., Iwagaki, A., Nagatake, T., Matsushima, K. & Matsumoto, K.: Role of interleukin-8 (IL-8) and an inhibitory effect of erythromycin on IL-8 release in the airways of patients with chronic airway diseases. *Infect. Immun.*, 62: 4145—4152, 1994.
- 11) Mukae, H., Kadota, J., Kohno, S., Kusano, S., Morikawa, T., Matsukura, S. & Hara, K.: Increase in activated CD8+ cells in bronchoalveolar lavage fluid in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, (in press).
- 12) Goswami, S.K., Kivity, S. & Marom, Z.: Erythromycin inhibits respiratory glycoconjugate secretion from human airways in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141: 72—78, 1990.
- 13) Sato, A., Chida, K., Iwata, M. & Hayakawa, H.: Study of bronchus-associated lymphoid tissue in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 146: 473—478, 1992.
- 14) Ichikawa, Y., Ninomiya, H., Koga, H., Tanaka, M., Kinoshita, M., Tokunaga, N., Yano, T. & Oizumi, K.: Erythromycin reduces neutrophils and neutrophil-derived elastolytic-like activity in the lower respiratory tract of bronchiolitis patients. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 146: 196—203, 1992.
- 15) Ganz, T.: Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 55: 568—571, 1987.
- 16) Okrent, D.G., Lichtenstein, A.K. & Ganz, T.: Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule proteins to human lung-derived cells and endothelial cells. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141: 179—185, 1990.
- 17) 門田淳一, 崎戸 修, 河野 茂, 阿部 航, 白井亮, 川上かおる, 飯田桂子, 森川 透, 草野史郎, 原 耕平: 慢性下気道感染症に対するロキシシロマイシン長期治療—臨床効果とサイトカインにおよぼす影響—. *感染症誌*, 68: 27—33, 1994.
- 18) 三笠桂一, 澤木政好, 喜多英二, 中西 満, 前田光一, 浜田 薫, 竹内章治, 増谷喬之, 佐野麗子, 国松幹和, 樫葉周三, 成田亘啓: 慢性下気道感染症における Erythromycin (EM) 長期化学療法の検討. 第4報. EM無効例に対する Clarithromycin の有効性について—. *感染症誌*, 66: 1097—1104, 1992.

A Study of Defensins in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Patients with
Diffuse Panbronchiolitis

Hiroshi MUKAE¹⁾, Jun-ichi ASHITANI¹⁾, Masamitsu NAKAZATO¹⁾, Haruko TANIGUCHI¹⁾,
Yukari DATE¹⁾, Toshihiko IHI¹⁾, Kazutaka SHIOMI¹⁾, Hideo MASHIMOTO¹⁾,
Jun-ichi KADOTA²⁾, Shigeru KOHNO²⁾, Kohei HARA²⁾
& Shigeru MATSUKURA¹⁾

¹⁾The Third Department of Internal Medicine, Miyazaki Medical College

²⁾The Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine

We estimated defensins, antimicrobial and cytotoxic peptides localized in azurophil granules of neutrophils, in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in patients with diffuse panbronchiolitis (DPB). BALF from DPB patients contained a higher concentration of defensins than those from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and healthy volunteers. A significant correlation was observed between the concentration of defensins and the number of neutrophils, the concentration of interleukin-8 or neutrophil elastase in BALF of DPB patients. An immunohistochemical study of open-lung biopsy specimens from DPB patients showed a strong immunoreactivity for defensins in neutrophils and mucinous exudates in the airways and in the surface of bronchiolar epithelial cells. After treatment with macrolide antibiotics, significant reductions in the concentrations of defensins, IL-8 and neutrophil numbers in BALF of DPB patients were observed. These findings suggest that the lung injury in DPB could be caused by defensins released by neutrophils accumulated in the airways.