珪肺症における抗コラーゲン抗体産生に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 長岡, 匡 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8114

金沢大学十全医学会雑誌　第98巻　第2号　489－506（1989）

珪肺症における抗コラーゲン抗体産生に関する研究

金沢大学医学部公衆衛生学講座（主任：岡田　晃教授）
長　岡　　匡
（平成1年3月11日受付）

珪肺症は，肺に生じた線維増殖性変化の疾病であるが，その主体はコラーゲンの増生である．本研究では，珪肺症患者血清中の抗コラーゲン抗体について検討し，また免疫グロブリンおよび珪肺症でよく認められる各種自己抗体である抗 nDNA 抗体，抗核抗体 (anti-nuclear antibodies, ANA)，リウマトイド因子 (rheumatoid factor, RF)，免疫複合体 (immune complex, IC) を測定し，抗コラーゲン抗体との関連性について検討した．さらに血清 procollagen III peptide (PIIIP) との関連についても考察を行った．珪肺症患者134名および健常者40名の血清を用いて，抗コラーゲン抗体を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した．珪肺症患者血清中の抗コラーゲン抗体価は，抗ヒトⅠ型コラーゲン抗体，抗ヒトⅢ型コラーゲン抗体が対照群に比べて有意に高値であった ($P<0.001$)．しかし抗ウシⅠ型コラーゲン抗体，抗ヒトⅣ型コラーゲン抗体には，両群間に差は認められなかった．珪肺症患者の抗コラーゲン抗体陽性率は，抗ヒトⅠ型コラーゲン抗体が34.3%，抗ヒトⅢ型コラーゲン抗体が35.1%と高率であったのに対し，抗ウシⅠ型コラーゲン抗体は12.7%，抗ヒトⅣ型コラーゲン抗体は8.2%と低率であった．また各抗コラーゲン抗体価を塵肺胸部X線分類による病型別に比較したが差は認められず，粉塵作業年数別で検討したところ，抗ヒトⅣ型コラーゲン抗体は，粉塵作業年数が増すとともに高値を示す傾向が認められたが，抗ヒトⅠ型コラーゲン抗体，抗ウシⅠ型コラーゲン抗体，抗ヒトⅢ型コラーゲン抗体ではそのような傾向は認められなかった．これらのことより，抗コラーゲン抗体は，珪肺症のより早期の段階から出現することが示唆された．また免疫グロブリンは，珪肺症患者では IgG, IgA, IgE が対照群に比較して有意に高値であった．また IgG と抗ヒトⅠ型コラーゲン抗体との間に正の有意な相関関係を認めた．珪肺症患者の自己抗体陽性率は，抗 nDNA 抗体11.2%，ANA 13.4%，RF 10.4%，IC 9.0%と対照群に比較して高率であった．珪肺症患者の抗 nDNA 抗体陽性者は，陰性者に比較し抗ヒトⅠ型コラーゲン抗体は低値を示したが，ANA 陽性者は，陰性者に比較し抗ヒトⅠ型コラーゲン抗体は高値を示した．また RF 陽性者も，陰性者に比較し各抗コラーゲン抗体は高値の傾向を示し，IC 陽性者も，陰性者に比較し抗ウシⅠ型コラーゲン抗体は高値を示した．一方珪肺症患者では対照群に比較して，血清 PIIIP は有意に高値を示した ($P<0.05$)．しかし抗コラーゲン抗体との関連性は認められなかった．以上のことより珪肺症において抗コラーゲン抗体は，免疫グロブリンおよび各種自己抗体と関連していることが示唆され，体液性免疫の亢進による免疫異常も抗コラーゲン抗体の産生に関与していると考えられた．抗コラーゲン抗体を測定することは，珪肺症における早期の肺の線維化および自己免疫異常の発現に関する指標として有意義であると考えられた．

Key words silicosis, anti-collagen antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), autoantibody, procollagen III peptide

Abbreviations: ANA, anti-nuclear antibodies; ANOVA, analysis of variance; BSA, bovine serum albumin; BⅠ, bovine type Ⅰ collagen; EDTA, ethylenediaminetetra-acetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FITC, Fluorescein isothio cyanate; HRP, horseradish peroxydase; HⅠ, human type Ⅰ collagen; HIII, human type III

珪肺症は，「遊離けい酸じん又は遊離けい酸 (SiO_2: シリカ) を含む粉じんを吸入することによって肺に生じた線維増殖性変化の疾病」と定義され[1]，塵肺症のなかでは最も多くみられかつまた，最も線維化の強い疾患である．珪肺症では多量のシリカを長期間吸入することにより肺の線維化が進行し，ついには珪肺結節を形成するに至るが，粉塵暴露がやんだ後も病変は徐々に拡大する慢性でかつ進行性の疾患でもあり[2]，珪肺症の線維増殖性病変の主体はコラーゲンの増生であることも知られている[3]．一方，肝臓に線維化を来す疾患である肝硬変，慢性持続性肝炎などでは，抗コラーゲン抗体が検出され[4]，また肺に線維化をきたす特発性肺線維症でも抗コラーゲン抗体の存在が認められている[5]．しかし，珪肺症における抗コラーゲン抗体検出についての報告は未だなく，そこで本研究では，珪肺症患者血清中の抗コラーゲン抗体を，酵素抗体免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)[6]にて測定し，珪肺症の発症，進展に関するその意義，役割を検討することとした．また，珪肺症には肺結核[7]あるいは膠原病[8)~11)]がしばしば合併することが知られており，免疫異常の存在も示唆されている．このことからも，珪肺症の発症および進展には何らかの免疫異常，特に自己免疫機序が重要な役割を果たしていることが推測される．今回，免疫グロブリン[12)~15)]および珪肺症でよく認められる各種自己抗体である抗DNA抗体[11)14)16)17)]，抗核抗体[18)~23)]，リウマトイド因子[9)10)24)~26)]，免疫複合体[18)]なども測定し，抗コラーゲン抗体との関連性について検討した．さらに肝臓および肺の線維化の早期の指標となる血清プロコラーゲンIIIペプチド (procollagen III peptide, PIIIP)[27)]との関連についても考察を行った．

対象および方法

I．対　象

富山県東部在住の男性粉塵作業出稼ぎ者 (90%以上が隧道建設業) で珪肺症と診断されているもの134名を対象とした．年齢は50～69歳 (平均年齢60.2歳) で粉塵作業年数は，1～40年 (平均17.2年) であった．塵肺法で定められた胸部X線病型分類の内訳は，0型11名 (8.2%)，1型63名 (47.0%)，2型37名 (27.6%)，3型4名 (3.0%)，4型19名 (14.2%) であった．血清は，採血後その日のうちに遠心分離し，測定まで－80°Cで凍結保存した．

また健康診断受診者のうち，健常で粉塵作業歴のない男性40名を対照群とした．対照群の血清も上記と同様に保存し用いた．対照群の年齢は，48～71歳 (平均年齢58.1歳) であった．なお，両群とも肝機能異常者は除外した．

II．コラーゲン

抗原としてヒトI型コラーゲン (Human type I collagen, HI)，ウシI型コラーゲン (Bovine type I collagen, BI)，ヒトIII型コラーゲン (Human type III collagen, HIII)，ヒトIV型コラーゲン (Human type IV collagen, HIV) を用いた．HI (ヒト胎盤由来，No.Y-1)，HIII (ヒト胎盤由来，No.Y-2)，HIV (ヒト胎盤由来，No.Y-3) は，富士薬品工業 (高岡) 製，BI (ウシ真皮由来，No.40231) は，コラボレィティブ社 (U.S.A.) 製のものを用いた．

III．SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

各コラーゲンの純度を確認するため SDS-PAGE[28)]を行った．各コラーゲンの0.1%溶液 50μl，0.5Mトリス HCl (PH 6.8) 10μl，10% SDS (半井，京都) 10μl をチューブに採り，100°Cで5分間加熱後，50%グリセロール，0.005%ブロムフェノールブルー (BPB) (和光，大阪) 溶液をそれぞれ各 10μl 添加し，全量 70μl のうち 20μl を泳動用試料とした．スラブゲル電気泳動装置 (KS-8000SE，マリソル社，東京) を用い，7.5%アクリルアミドスラブゲルの SDS-トリス-グリシン系にて，20mA で3時間泳動した．泳動後，0.1%クマシーブルー色素 (半井)-50%メタノール-10%酢酸水溶液にて30分染色後，水洗し，5%メタノール-7.5%酢酸溶液にて脱色した．各コラーゲンサンプルは還元前と2-メルカプトエタノール (半井) にて還元後に電気泳動した．

IV．抗血清

ヒトI型コラーゲン，ヒトIII型コラーゲンをマウスに免疫にして得られたモノクローナルマウス抗ヒトI型コラーゲン抗体，モノクローナルマウス抗ヒトIII型コラーゲン抗体 (いずれも和歌山県立医科大学第1病理学教室大島章教授より恵与された) およびポリクローナル抗ウシI型コラーゲン抗体 (AB-1010，アドバンス社，東京) を使用した．

---

collagen; HIV, human type IV collagen; IC, immune complex; IL-1, interleukin-1; nDNA, native deoxyribonucleic acid; OD, optimal density; OPD, o-phenylenediamine; PBS, phosphate buffered saline; PSS, progressive systemic sclerosis; PIIIP, procollagen III

V．抗コラーゲン抗体の測定

抗コラーゲン抗体は，Rennard ら[29]の方法によりELISA 法[6]で測定した（図1）．

各コラーゲンを5mM 酢酸に溶解後，0.05M トリス-HCl 緩衝液（PH 7.6，含0.15M NaCl，0.02% NaN_3）を加え，10μg/ml の濃度に希釈して抗原溶液とした．抗原溶液 100μl をポリスチレンマイクロタイタープレート（Dynatech Laboratories, Inc. Immulon 1 Plates, Virginia, U.S.A.）の各ウェルに加え，4℃で一夜静置後に phosphate buffered saline (PBS)-0.05% Tween20（和光）(PBS-Tween) で Washer (Sera Washer-96, Biotec, 東京) を用い洗浄した．非特異的反応を抑える目的で，200μl の PBS-Tween-1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Company, St.Louis, U.S.A.) で2時間アフターコーティングした後洗浄した．前もって56°C，30分間加熱により非働化した血清を PBS-Tween-3mM EDTA-0.1% BSA で50倍に希釈したもの，または抗血清をプレートに加え，37°Cで2時間インキュベート後，PBS-Tween で洗浄した．次いで PBS-Tween で1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (No.3201-0081, H & L 鎖, Cappel Labo, U.S.A.) または，ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG (No.6450, H & L 鎖, Tago, U.S.A.) あるいは，ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (No.6400, H & L 鎖, Tago, U.S.A.) を加え，37°Cで1時間反応させた．再度 PBS-Tween で洗浄後，o-phenylenediamine (OPD) (Sigma Chemical Company) に H_2O_2 を加えて調整した基質溶液を加えて，室温にて30分間発色させ，さらに $4NH_2SO_4$ を加え反応を停止した後，automated microplate photometer (MTP-22, Corona 社，茨城）にて492nm の吸光度を測定した．また，非特異的反応を除くため，対照として抗原（コラーゲン）用の緩衝液のみでコートしたプレートのウェルに各被検血清，または抗血清を加え上記と同様の操作を施した場合の発色値をブランク値とし，抗原をコートした場合の発色値からブランク値を差し引いた値を抗コラーゲン抗体価とした．

Coating of collagen (HI, BI, HIII, HIV)

collagen (10μg/ml) in 0.05M Tris-HCl-buffer, PH 7.6/0.02% NaN_3
100μl in each microtiter plate well

Overnight at 4℃

wash with PBS-0.05% Tween 20×3
200μl PBS-0.05% Tween 20/1% BSA

2hr at 37℃

wash with PBS-0.05% Tween 20×3
100μl serum diluted 1:50 (or anti-serum) with PBS-0.05% Tween 20/3m MEDTA/0.1% BSA

2hr at 37℃

wash with PBS-0.05% Tween 20×3
100μl peroxidase conjugated goat anti human (or mouse or rabbit) IgG antibody diluted 1:1000 with PBS-0.05% Tween 20

1hr at 37℃

wash with PBS-0.05% Tween 20×3
100μl freshly prepared substrate (OPD)

30min at room temperature

100μl 4N H_2SO_4

OD_{492} measurement

Fig. 1. The procedure of ELISA for detection of anti-collagen antibodies.

VI．インヒビション試験

抗血清に，あらかじめ HI，BI，HIII，HIV を加え37°Cで30分間反応させた後，上述した ELISA 法にて同様に測定した．また抗コラーゲン抗体価の高い珪肺症患者血清2検体について同様のインヒビション試験を行い抗コラーゲン抗体の特異性を検討した．

VII．抗 nDNA (native DNA) 抗体の検出

蛍光抗体間接法であるフルオロ nDNA test (MBL 社，名古屋) を用いた．すなわち，Crithidia luciliae を塗抹したスライドグラスに血清（5倍および10倍希釈）を滴下し，抗原抗体反応を行い，二次抗体 (FITC 標識抗ヒトイムノグロブリン) を滴下し再度抗原抗体反応を行い，直ちに蛍光顕微鏡の400倍で鏡検した．5倍希釈血清にて Kinetoplast に著しい蛍光が認められ peripheral 状に染色されるものを陽性とし

peptide; RA, rheumatoid arthritis; RF, rheumatoid factor; SDS, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SLE, systemic lupus erythematosus; ssDNA, single stranded deoxyribonucleic acid

た．

Ⅷ．抗核抗体 (anti-nuclear antibodies, ANA) の検出

蛍光抗体間接法であるフルオロ HEPANA test (MBL 社) を用いた．HEP-2 細胞 (ヒト喉頭癌由来) を塗抹したスライドグラスに血清 (20倍および40倍希釈) を滴下し，抗原抗体反応を行い，次いで二次抗体 (FITC 標識抗ヒトイムノグロブリン) を滴下し，再度抗原抗体反応を行い，直ちに蛍光顕微鏡の200倍で鏡検した．20倍希釈血清にて明らかに核全体あるいは核内局所に特異蛍光が観察されるものを陽性とした．

Ⅸ．リウマトイド因子 (rheumatoid factor, RF) の検出

RA-E kit (MBL 社) を用いた．すなわちラテックス凝集反応により，明らかな凝集を認めるものを RF 陽性とした．

Ⅹ．免疫複合体 (immune complex, IC) の検出

Sanassay IC (三光純薬，東京) を用いた．補体第1成分 Clq が Immune complex と結合する性質を利用した Clq solid-phase ELISA 法であり，まずマイクロプレートに Clq を吸着させ，被検血清 (あるいは標準血清) を加え，次いで，ALP 標識抗ヒト IgG 抗体を添加した．さらに基質液，発色試薬を加え，490nm で比色定量し，標準血清の検量線から被検血清中の IC を定量した．5 μg/ml 以上を陽性とした．

XI．免疫グロブリンの測定

IgG, IgA, IgM は MBL プレート (MBL 社) を用い一元免疫拡散法にて測定した．血清をマイクロシリンジで 4 μl ずつプレートの寒天の小孔に注入し，室温にて48時間 (IgM は72時間) 反応させ，沈降輪の直径を測定した．濃度既知の標準血清にて標準曲線を作成し，各血清から得られた沈降輪の直径に対応する濃度を求めた．

IgE は，EIA IgE test (MBL 社) を使用し ELISA 法により測定した．

XII．血清 PⅢP の測定

リアグノストプロコラーゲンⅢペプチドキット (ヘキスト社，東京) を使用し競合反応系の二抗体法で測定した．すなわち，血清を，5，20，50倍に希釈し，それらの 100μl に抗PⅢP血清を加え，4°Cで16時間インキュベートした．その後，100μl の ^{125}I PⅢPを加え，4°Cで2時間インキュベーションし，500μl の

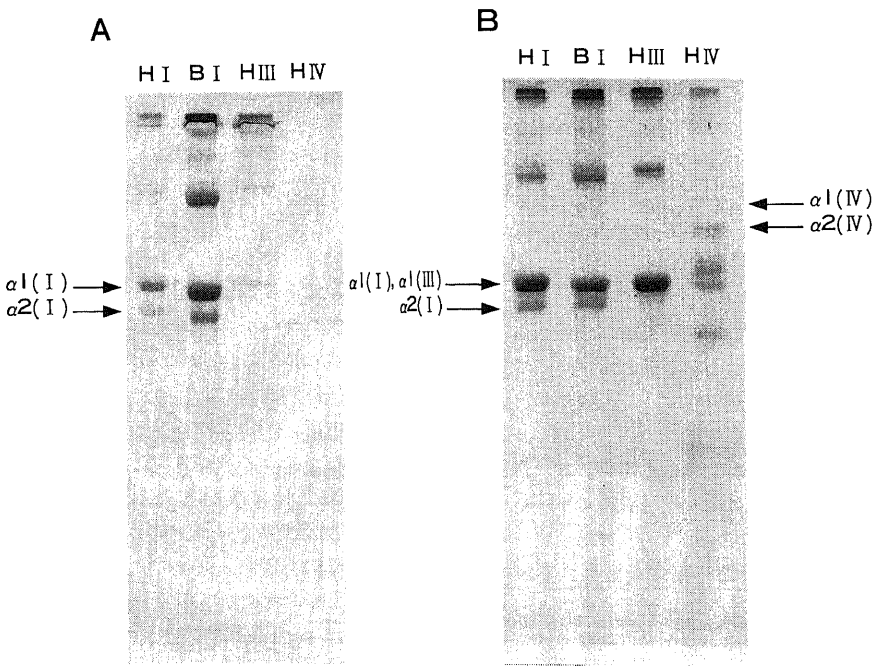

Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern of human type I (H I), bovine type I (B I), human type III (HⅢ) and human type IV (HⅣ) collagens. A, Each collagen was electrophoresed without reduction; B, Each collagen was electrophoresed with reduction by 2-mercaptoethanol.

B・F分離剤を加えて4℃で20分間静置した後，被検血清中の PIIIP に結合しなかった抗 PIIIP と ^{125}I PIIIPとの結合物を 2500rpm で20分間遠沈分離し，γ-カウンターで測定した．各濃度の標準血清および被検血清の測定値を基に log scale 上に希釈曲線を描き，50% intercept 法で PIIIP 値を算定した．

XIII．統計学的検討法

結果はすべて平均値±標準誤差 (Mean±S.E.M.) で示した．また2群間の平均値の差の検定は，まず等分散のF検定を行い，等分散の場合は Student の t 検定，等分散でない場合は Welch の t 検定を行った．また多群間の平均値の差の検定は，一元配置分散分析を行った後 Scheffé の多重比較法を用いた．2変量の相関関係は Pearson の積率相関係数 (r) を求め，有意差の検定は t 検定によった．また血清 IgE 値では，得られた数値を対数変換した値を用いた．いずれも，危険率5%水準 (両測検定) で有意差ありとし，また危険率10%未満の場合は傾向ありとした．

成　　績

I．各型コラーゲンの分析

各型コラーゲンの SDS-PAGE のパターンを図2に示した．HI，BI はともに α 1 (I) および α 2 (I) 鎖より構成され，同様のパターンを示した．また HIII にもわずかながら α 1 (I) および α 2 (I) が認められた．HIV には，いずれの α 鎖も認められなかった (図 2A)．

また2メルカプトエタノールによって還元した際には HI，BI は，還元前と比べて変化は認められなかった．HIII は，主に α 1 (III) 鎖から構成されていたが，わずかに α 2 (I) も認められた．HIV は，α 1 (IV) および α 2 (IV) 鎖から構成されていることが示されたが，非ヘリックス部分のペプシン感受性により種々の分子量の α 鎖の断片が認められた (図 2B)．

II．抗コラーゲン抗体の型特異性

抗コラーゲン抗体を ELISA 法により測定できることを確認するため各抗血清を用い検討した．

1．マウスモノクローナル抗 HI 抗体

図3A に示す様に，マウスモノクローナル抗 HI 抗体は HI および BI に対しては濃度依存性の反応を

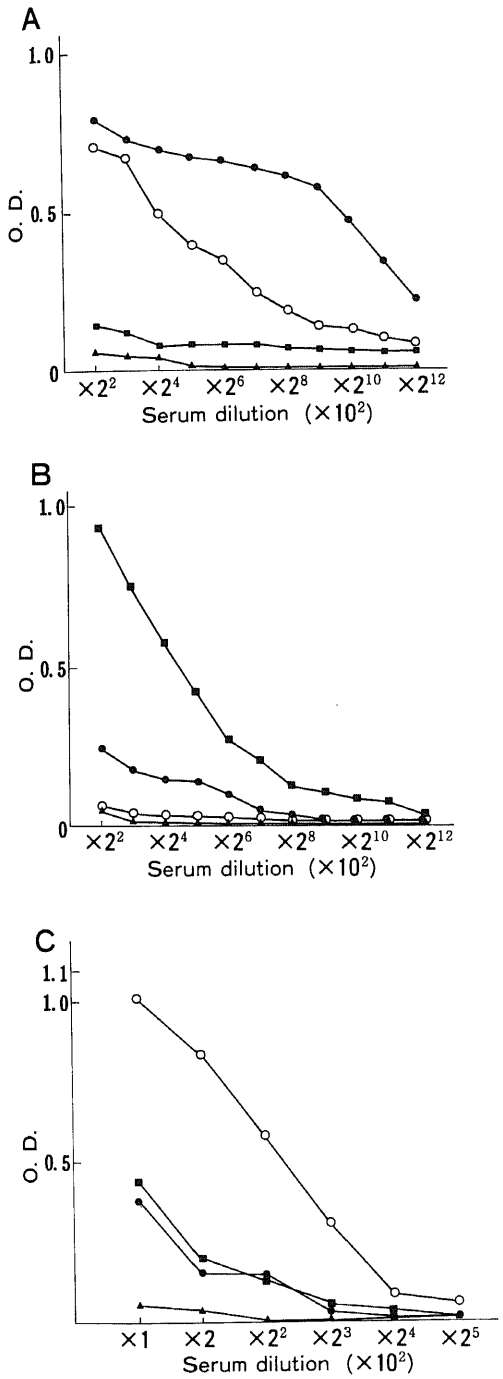

Fig. 3. Titration of mouse monoclonal anti-human type I (A), mouse monoclonal anti-human type III (B) and rabbit polyclonal anti-bovine type I (C) collagen antisera by ELISA. The vertical axis shows optimal density and the transverse axis shows the serum dilution of antisera. ●——●, coated well with human type I collagen; ○——○, coated well with bovine type I collagen; ■——■, coated well with human type III collagen; ▲——▲, coated well with human type IV collagen.

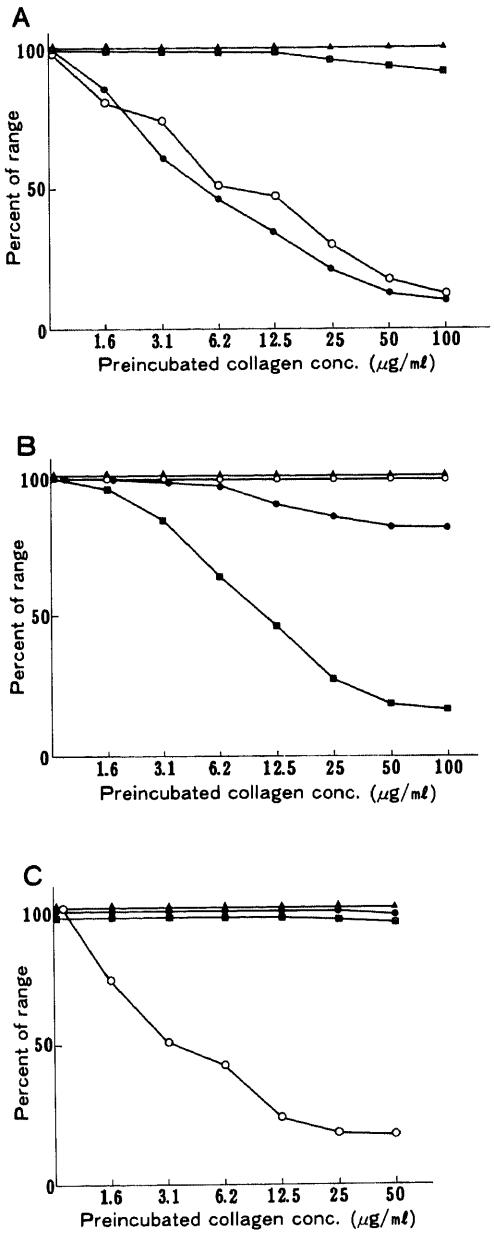

Fig. 4. ELISA inhibition tests of the antibodies to human type I (A), human type III (B) and bovine type I (C) collagens. The vertical axis shows % optimal density compared with that of noninhibited condition and the transverse axis shows the concentration of collagen used for inhibiton. ●——●, preincubated with human type I collagen; ○——○, preincubated with bovine type I collagen; ■——■, preincubated with human type III collagen; ▲——▲, preincubated with human type IV collagen.

示した．しかし HIII, HIV には何らの反応も示さなかった．また，抗血清にあらかじめ種々の濃度の HI，BI，HIII, HIV をそれぞれ加えておきインヒビション試験を行った．その結果，HI あるいは BI を加え preincubation した抗血清の反応が抑制され，加えた HI および BI の濃度と反応の抑制の程度との間には，量-反応関係が認められた．HIII, HIV を加えた場合には，ほとんど抑制されなかった (図 4A).

2．マウスモノクローナル抗 HIII 抗体

図 3B に示す様に，マウスモノクローナル抗 HIII 抗体は HIII に対して濃度依存性の反応を示した．また，HI に対してもわずかながらその反応が認められた．BI，HIV に対しては何らの反応も認められなかった．インヒビション試験では HIII を加えて preincubation した抗血清に，濃度依存性の抑制反応が認められた．また HI を加えた際にも高濃度では，わずかながら抑制が示された．しかし BI，HIV を加えた場合には抑制されなかった (図 4B).

3．ウサギポリクローナル抗 BI 抗体

図 3C に示す様に，ウサギポリクローナル抗 BI 抗体は，BI に対して濃度依存性の反応を示した．また，HI および HIII に対しても高濃度の場合にその反応が認められた．インヒビション試験では，BI を preincubation したものに，濃度依存性の抑制反応が認められた．しかし HI，HIII, HIV では抑制されなかった (図 4C).

III．珪肺症患者血清中の抗コラーゲン抗体価

ELISA 法により測定した各抗コラーゲン抗体の抗体価の分布を対照群と珪肺症患者群とで対比させて，図 5 に示した．

抗 HI 抗体価は，珪肺症患者では，吸光度 (optimal density, OD) 値0.336±0.020 (Mean±S.E.M.) と，対照群の0.154±0.019に比し有意に高値であった ($p<0.001$).

また抗 HIII 抗体価も，珪肺症患者では，OD 値0.519±0.021と，対照群の0.306±0.024に比し有意に高値であった ($p<0.001$).

これに対し，抗 BI 抗体価および抗 HIV 抗体価は，珪肺症患者ではそれぞれ0.202±0.025，0.101±0.017，対照群では，0.174±0.028，0.084±0.025であり両群間に有意差は認められなかった．

また，OD 値が，対照群の平均値＋2標準偏差以上の者を陽性者としてその出現頻度をみると抗 HI 抗体については，珪肺症患者134名中46名 (34.3%)，抗 HIII 抗体では47名 (35.1%) と高率であったのに対し，抗 BI 抗体では，17名 (12.7%)，抗 HIV 抗体では11

名 (8.2%) と低率であった.

次に抗コラーゲン抗体価を塵肺症胸部X線病型分類との関連で検討してみた (表1).

各病型における抗 HI 抗体価, および抗 HIII 抗体価は, 対照群に比し有意に高値を示すことが認められたが, 胸部X線分類による病型間では有意差は認められなかった.

また粉塵作業年数の判明している127名について粉塵作業年数を10年間隔でくぎり, 抗コラーゲン抗体価を検討してみた (表2).

抗 HIV 抗体では, 粉塵作業年数の増加とともに OD 値も高くなる傾向が認められた. しかし抗 HI 抗体, 抗 BI 抗体, 抗 HIII 抗体には, 作業年数との間に量-反応関係は認められなかった.

また表3に示す様に各抗コラーゲン抗体の抗体価の相関関係を検討してみたところ, 抗 HI 抗体と抗 BI 抗体の間には $r=0.235$ ($P<0.01$), また抗 HI 抗体と抗 HIII 抗体の間に $r=0.172$ ($P<0.05$), また抗 BI 抗体と抗 HIV 抗体の間に $r=0.274$ ($P<0.001$) とそれぞれ正の有意な相関が認められた. 抗 HI 抗体と抗 HIV 抗体, 抗 BI 抗体と抗 HIII 抗体, 抗 HIII 抗体と抗 HIV 抗体との間には有意な相関関係は認められなかった.

また, 抗コラーゲン抗体価が高値を示した珪肺症患者2名の血清を用いてインヒビション試験を行ったところ, 抗コラーゲン抗体価は, HI および HIII により

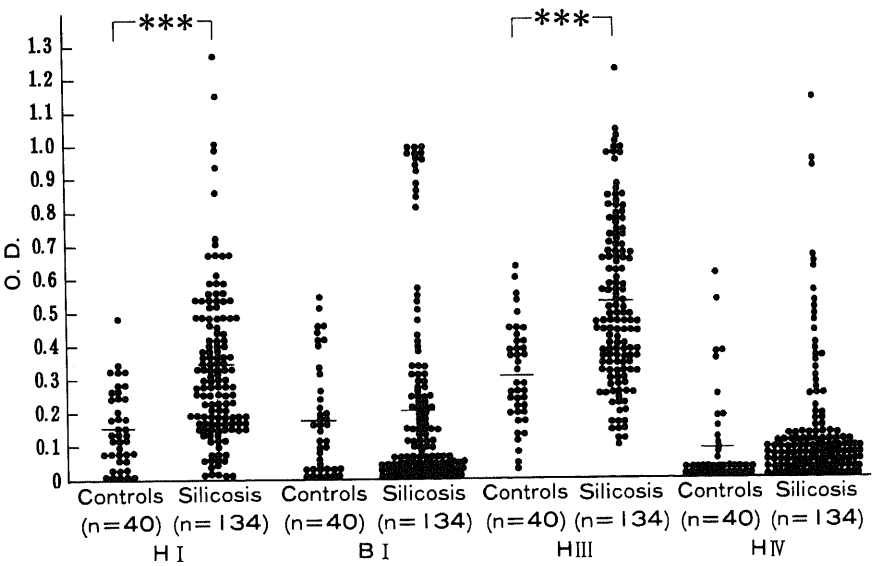

Fig. 5. Anti-collagen antibody titers (O. D.) of human type I collagen (HI), bovine type I collagen (BI), human type III collagen (HIII) and human type IV collagen (HIV) in sera of controls and patients with silicosis. The vertical axis shows optimal density. ***$P<0.001$ vs. controls by t-test.

Table 1. Anti-collagen antibodies titers (O.D.) in the sera of controls and patients with silicosis according to the roentgenographic category of pneumoconiosis

	Controls (n=40)	PR 0, 1 (n=74)	PR 2 (n=37)	PR 3 (n=4)	PR 4 (n=19)
HI	0.154±0.019	0.344±0.027***	0.349±0.043**	0.408±0.175	0.267±0.041
BI	0.174±0.028	0.224±0.039	0.193±0.045	0.104±0.063	0.150±0.033
HIII	0.306±0.024	0.487±0.026**	0.564±0.040***	0.617±0.068	0.536±0.072*
HIV	0.084±0.025	0.103±0.026	0.106±0.029	0.000±0.000	0.085±0.037

Each value represents the mean±S.E.M. *$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$ vs. controls by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison test.

抑制された（図6）.

Ⅳ. 免疫グロブリン

表4に示す様に珪肺症患者では，IgG，IgA および IgE は対照群に比し有意に高値を示していた．しかし IgM では，対照群との間に有意差は認められなかった．胸部X線分類による病型別には，IgG は，第2，3型で高値を示し，IgA は，病型が進むほど高値を示す傾向が認められた．

また，免疫グロブリン相互の相関関係を検討してみたところ，IgG と IgA の間に r＝0.368と正の有意な

Table 2. Anti-collagen antibodies titers (O.D.) in the sera of patients with silicosis according to the pneumoconiotic working years

	Working Years 1-10 Year (n=43)	Working Years 11-20 Year (n=38)	Working Years 21-30 Year (n=33)	Working Years 31-40 Year (n=13)
H I	0.378±0.042	0.269±0.027	0.314±0.035	0.416±0.074
B I	0.197±0.046	0.174±0.038	0.246±0.061	0.151±0.072
H III	0.520±0.028	0.533±0.043	0.500±0.050	0.544±0.075
H IV	0.051±0.016	0.076±0.024	0.152±0.050	0.173±0.064

Each value represents the mean±S.E.M.

Table 3. Matrix of correlation coefficients between anti-collagen antibodies titers, levels of immunoglobulins and procollagen III peptide

	H I	B I	H III	H IV	IgG	IgA	IgM	IgE	P III P
H I	···								
B I	0.235**								
H III	0.172*	-.035							
H IV	0.068	0.274***	0.074						
IgG	0.159*	0.032	0.082	-.032					
IgA	0.051	0.034	0.090	0.054	0.368***				
IgM	0.051	-.088	-.036	-.048	0.206**	0.021			
IgE	0.101	0.027	0.140+	-.057	0.136+	0.080	-.073		
P III P	-.079	0.060	0.073	0.020	0.103	0.010	0.012	0.060	···

+P<0.1, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 by t-test. (n=174)

Table 4. Levels of immunoglobulins in the sera of controls and patients with silicosis according to the roentgenographic category pneumoconiosis

	Controls (n=40)	PR 0, 1 (n=74)	PR 2 (n=37)	PR 3 (n=4)	PR 4 (n=19)	Total silicosis (n=134)
IgG (mg/dl)	1,697±55	1,897±54	2,089±91##	2,430±269#	2,008±125	1,981±44***
IgA (mg/dl)	312±17	344±14	374±26	365±78	414±34#	363±12*
IgM (mg/dl)	169±9	162±8	156±11	232±64	170±17	163±6
IgE (IU/ml)	146±35	294±53	357±82	475±342	400±133	332±42***

Each value represents the mean±S.E.M. #P<0.1, ##P<0.05 vs. controls by ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison test. *P<0.05, ***P<0.001 vs. controls by t-test.

相関関係が認められた (P<0.001). IgG と IgM の間にも r =0.206と正の有意な相関関係が認められた (P<0.01). IgG と IgE との間には相関の傾向が認められた. しかし IgA と IgM, IgA と IgE, IgM と IgE との間には有意な相関関係は認められなかった (表3).

V. 抗コラーゲン抗体価と免疫グロブリン値との相関

抗 H I 抗体と IgG との間に r =0.159と正の有意な相関関係が認められた (P<0.05). また抗 HIII 抗体と IgE との間に有意な相関の傾向が認められた. しかし他の抗コラーゲン抗体と免疫グロブリンとの間には特記すべき相関関係は認められなかった (表3).

VI. 抗 nDNA 抗体, ANA, RF, IC の陽性率

表5に, 抗 nDNA 抗体, ANA, RF, IC の陽性者数とその頻度 (%) を胸部X線分類による病型別に示した.

1. 抗 nDNA 抗体

抗 nDNA 抗体は, 対照群では全員陰性であったが, 珪肺症患者では134名中15名 (11.2%) が陽性と高率であった. 胸部X線分類による病型別でみるとその間に差は認められなかった.

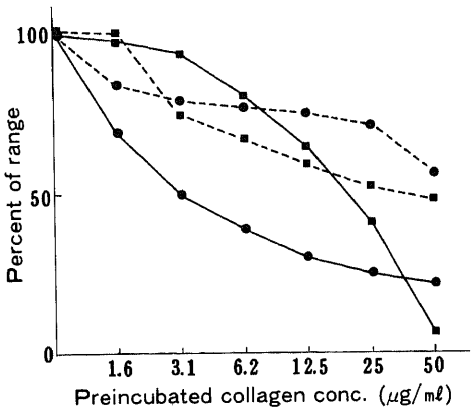

Fig. 6. ELISA inhibition tests of the antibodies in sera of two patients with silicosis for human type I collagen and human type III collagen. The solid line shows the antibodies of one patient, and the dotted line represents that of another patient. The vertical axis shows % optimal density compared with that of noninhibited condition, and the transverse axis shows the concentration of collagen used for inhibiton. ●——● preincubated with human type I collagen; ■——■, preincubated with human type III collagen.

Table 5. The prevalence of nDNA, ANA, RF and IC in the sera of controls and patients with silicosis according to the roentgenographic category of pneumoconiosis

	Controls (n=40)	PR 0, 1 (n=74)	PR 2 (n=37)	PR 3 (n=4)	PR 4 (n=19)	Total silicosis (n=134)
nDNA	0(0%)	9(12.2%)	2(5.4%)	1(25%)	3(15.8%)	15(11.2%)
ANA	1(2.5%)	4(5.4%)	7(18.9%)	1(25%)	6(31.6%)	18(13.4%)
RF	1(2.5%)	8(10.8%)	4(10.8%)	0(0%)	2(10.5%)	14(10.4%)
IC	0(0%)	7(9.5%)	4(10.8%)	0(0%)	1(5.3%)	12(9.0%)

Cases(%)

Table 6. Comparison of anti-collagen antibody titers (O.D.) between negative and positive groups of nDNA, ANA, RF and IC

	nDNA		ANA		RF		IC	
	Negative (n=119)	Positive (n=15)	Negative (n=116)	Positive (n=18)	Negative (n=120)	Positive (n=14)	Negative (n=122)	Positive (n=12)
H I	0.351±0.022	0.216±0.039	0.319±0.019	0.443±0.081	0.326±0.020	0.420±0.091	0.334±0.021	0.356±0.079
B I	0.194±0.026	0.259±0.083	0.197±0.027	0.229±0.073	0.188±0.025	0.316±0.106	0.183±0.024	0.392±0.128
HIII	0.521±0.021	0.501±0.065	0.516±0.023	0.535±0.059	0.507±0.022	0.623±0.074	0.513±0.013	0.582±0.065
HIV	0.104±0.019	0.076±0.038	0.104±0.019	0.082±0.036	0.099±0.017	0.124±0.082	0.103±0.018	0.083±0.047

Each value reprsents the mean±S.E.M. *P<0.05 by t-test.

2．ANA

ANA は，対照群では40名中１名 (2.5%) が陽性であったが，珪肺症患者では陽性者は134名中18名 (13.4%) と高率であった．また胸部X線分類による病型が進むほど陽性者は高率を示した．ANA のタイプは，speckled ９名，peripheral ５名，homogeneous ４名であった．

3．RF

RF は，対照群では，40名中１名 (2.5%) が陽性であったのに対し，珪肺症患者では陽性者は134名中14名 (10.4%) と高率であった．胸部X線分類による病型別でみるとその間に差は認められなかった．

4．IC

IC は，対照群では全員陰性であったが，珪肺症患者では陽性者は134名中12名 (9.0%) と高率であった．胸部X線分類による病型別でみるとその間に差は認められなかった．

Ⅶ．抗コラーゲン抗体と抗 nDNA 抗体，ANA，RF，IC との関連

珪肺症患者134名のうち抗 nDNA 抗体，ANA，RF，IC の陽性者と陰性者との間で抗コラーゲン抗体の抗体価を比較検討した (表６)．

1．抗 nDNA 抗体と抗コラーゲン抗体との関連

抗 nDNA 抗体陽性者は陰性者に比較して抗 H I 抗体は有意に低値を示した ($P<0.05$)．他の抗コラーゲン抗体では，陽性者，陰性者間には有意差は認められなかった．

2．ANA と抗コラーゲン抗体との関連

ANA 陽性者は陰性者に比較して抗 H I 抗体は有意に高値を示した ($P<0.05$)．他の抗コラーゲン抗体では，陽性者，陰性者間には有意差は認められなかった．

3．RF と抗コラーゲン抗体との関連

RF 陽性者では，陰性者に比較して有意差は認められなかったものの各抗コラーゲン抗体価は高値の傾向を示した．

4．IC と抗コラーゲン抗体との関連

IC 陽性者は陰性者に比較して抗 B I 抗体が有意に高値を示した ($P<0.05$)．他の抗コラーゲン抗体では，陽性者，陰性者間には有意差は認められなかった．

Ⅷ．血清 PⅢP

図７に示す様に血清 PⅢP 値は珪肺症患者では 11.54±0.39ng/ml と対照群の 9.89±0.20ng/ml に比較して有意な高値を示した ($P<0.05$)．しかし胸部X線分類による病型間には差は認められなかった．また血清 PⅢP 値と抗コラーゲン抗体価，および免疫グロブリン値との間に有意な相関関係は認められなかった (表３)．

考　　察

コラーゲンは，結合組織 (connective tissue) を構成するタンパク質であり，動物の含有する全タンパク量の１/３，また肺結合組織においては，全タンパク量の11%を占めている[30]．

α鎖と呼ばれるポリペプチド鎖３本が３重らせん構造 (triple helix) を形成し，α鎖の種類，または構造の違いによって，現在Ⅰ型～XI型の11種類が存在することが知られており[31]，さらに最近XII型が同定されている[32]．肺組織には，Ⅰ型～Ⅴ型コラーゲンが存在し

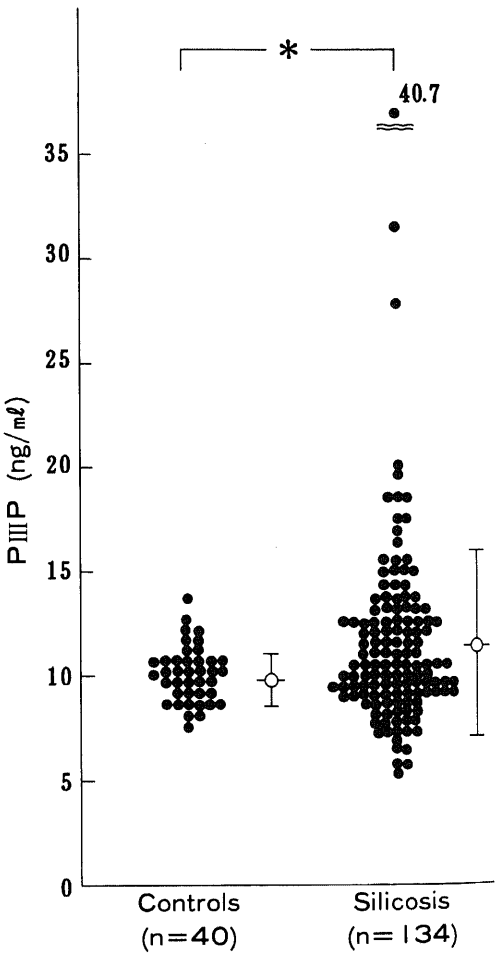

Fig. 7. A comparison of procollagen III peptide between controls and patients with silicosis. Each bar represents the mean±S. D. *$P<0.05$ by t-test.

ており[33)34)]，その中でも主となる間質型コラーゲンであるⅠ型とⅢ型コラーゲンは肺間質に存在し[34)]，膜型コラーゲンであるⅣ型コラーゲンは基底膜に存在している[35)]．またⅡ型コラーゲンは気管支軟骨に含まれており[34)]，Ⅴ型コラーゲンは肺間質および肺間質と基底膜の間に存在している[35)]．

一方，珪肺症は，遊離珪酸 (SiO_2: シリカ) を含む粉塵を吸入することによって肺に生じた線維増殖性変化の疾病である[1)]．0.5～5 μm のシリカ粒子が，肺胞に侵入し，肺胞内のマクロファージと接触し，貪食される[36)]．この時マクロファージが崩壊し，fibrogenic factor であるインターロイキン1 (interleukin-1, IL-1) が産生されて[37)]，T細胞を刺激してT細胞の反応性を高める一方，線維芽細胞 (fibro blast) を刺激して，コラーゲンを増生する[38)]．また線維芽細胞の蛋白合成および DNA 合成は，マクロファージから遊離した RNAase によって阻害されるが，シリカはこのマクロファージの RNAase の活性を低下させることによってさらにコラーゲンの産生を促進するとされる[39)40)]．一方，IL-1 によって刺激されたT細胞は，T-B 細胞相互作用によってB細胞を刺激し，B細胞は形質細胞となり，免疫グロブリンを産生する[41)]．死滅したマクロファージから遊離したシリカは，再び別のマクロファージに貪食されて，細胞毒性を発揮する．このような一連の機序が繰り返されることにより，コラーゲンが増加して，肺の線維化病変の形成が進展すると考えられている[42)]．また Pernis ら[43)]によると，シリカをあらかじめ注射したウサギでは，卵白アルブミンに対する抗体産生が著しく増強されることから，シリカに adjuvant 効果があることも知られている．

また Vigliani ら[44)]が，肺疾患では，肺組織に含まれるエラスチン，レチキュリン，コラーゲン等に対する抗体が産生される可能性を指摘しており，さらに Burrell ら[45)]は，抗グロブリン消費試験により，慢性肺疾患患者血清中に，不溶性のエラスチンやコラーゲンに対する抗体の存在を証明している．Hagadorn ら[46)]はこの抗肺抗体は IgA に属するものではないかと報告しており，Mccombs[47)]は，この抗肺抗体が，Gell & Coombs のⅡ型のアレルギーとして肺における自己抗体として作用しているのではないかと推論している．

一方，肝硬変，慢性持続性肝炎等の肝臓に線維化を来す疾患および特発性肺線維症等の肺に線維化を来す疾患でも抗コラーゲン抗体が検出されている[4)5)]．このことについて珪肺症に関してはまだ確認されておらず，今回，著者は珪肺症患者血清においても抗コラーゲン抗体が検出され得るかどうかを明らかにするという目的で本研究を行った．

血清中の抗コラーゲン抗体の検出法として，間接赤血球凝集反応 (Passive hemagglutination)[6)]と，ラジオイムノアッセイ[48)]，免疫蛍光法[49)]等があるが，近年，酵素抗体免疫測定法 (ELISA)[6)]によってより簡便に測定することが可能になった．そこで著者もこの ELISA 法を用いて，抗コラーゲン抗体を測定することとした．この ELISA 法を用いる際の問題点としては，第1番目として非特異的反応が認められること，第2番目に各型コラーゲンとの交差反応性が認められることである．本研究では，まず ELISA 法による測定法の基礎的検討として，この2点についての吟味を行った．

第1番目の非特異的反応を抑える目的で，まずプレートウェル内の抗原でコーティングされなかった部分をカバーする目的で BSA を含む PBS-Tween を加え充分に反応させた (アフターコーティング)．次に，血清中に含まれる cold insoluble globulin とコラーゲンとの相互作用を抑えるため，血清の希釈時に ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) を加えた．また，ヒト血清での非特異的陽性例を除くため，対照として，抗原 (コラーゲン) 用の緩衝液のみでコーティングしたプレートウェルに各被検血清を加え，非特異反応による発色値 (OD 値) を求め，これをブランク値として，抗原をコートした場合の発色値からこのブランク値を差し引くなどの操作を行った．

第2番目の交差反応性については次の如く検討した．各コラーゲンは，基本的にα鎖の3本鎖ヘリックスから構成され，そのアミノ酸組成が極めて類似しているため，各型コラーゲンを精製することは難しいとされている．著者が抗原として用いた市販のコラーゲンには SDS-PAGE による分析により，還元前 (図2A) の HIII にわずかながら，α1 (Ⅰ) およびα2 (Ⅰ) が検出され，HIII に微量ながらＨＩを含んでいる事が示唆された．しかしモノクローナル抗 ＨＩ 抗体を用いた検討では，HIII には反応せず (図3A)，またインヒビション試験でも HIII では抑制されず，HIII に含まれる ＨＩ はごく微量なもので，測定には支障をきたさないことが確認された．またモノクローナル抗 ＨＩ 抗体を用いた検討で，ＨＩ のみならず ＢＩ にも反応したこと (図3A)，またインヒビション試験でも ＨＩ のみならず ＢＩ によっても抑制されたこと (図4A) は，ＨＩ と ＢＩ には交差反応性がある[50)]ためと考えられた．次にモノクローナル抗 HIII 抗体を用いた検討で，ＨＩ がわずかに反応し (図3B)，またイン

ヒビション試験でもＨＩでやや抑制された(図4B).この理由として用いた抗HIII抗体が純粋でないことも考えられたが，エピトープ(抗原決定基)1つだけを認識するモノクローナル抗体を用いていることにより，抗原として用いたＨＩに微量ながらHIIIを含んでいることが示唆された．しかしモノクローナル抗HIII抗体を用いた検討で，HIIIに対する反応に比べOD値がかなり低いこと，またインヒビション試験でもＨＩでの抑制は，HIIIに対してかなり低いことなどより，測定に際しては支障がないと考えられた．またポリクローナル抗ＢＩ抗体を用いた検討で，ＢＩのみならずＨＩ，HIIIに対して反応が認められたが(図3C)，これは抗ＢＩ抗体はポリクローナル抗体であることより，モノクローナル抗体に比較して交差反応性がより多いこと，そして希釈倍数が少ないことが原因と考えられた．インヒビション試験ではＨＩ，ＢＩにより抑制されなかったこと(図4C)から，測定に際してはこの点に関しても支障がないと考えられた．

以上より型特異的抗コラーゲン抗体の測定が可能であることを確認したうえで，珪肺症患者血清の抗コラーゲン抗体を測定した．珪肺症患者では，対照群に比較して抗ＨＩ抗体価および抗HIII抗体価が有意に高値であった．これに対して，抗ＢＩ抗体価，抗HIV抗体価には，両群間で有意差を認めなかった(図5)．なお，ＢＩがＨＩと交差反応性があるため，一般的に安価なＢＩを抗原に用いて抗コラーゲン抗体を測定していることより，今回抗ＨＩ抗体のみならず，抗ＢＩ抗体についても検討したが，珪肺症患者血清において抗ＨＩ抗体は対照群に比し有意な高値を示したのに対し，抗ＢＩ抗体では有意差を認めなかった．この理由として珪肺症患者血清中の抗Ｉ型抗体が，ＢＩよりも種特異的にＨＩに反応したためと考えられ，抗コラーゲン抗体の測定には，同種であるヒトコラーゲンを用いる必要があると考えられた．また各型抗コラーゲン抗体は胸部Ｘ線分類による病型の間においては，差は認められず，粉塵作業年数別に検討すると，抗ＨＩ抗体，抗ＢＩ抗体，抗HIII抗体に関しては作業年数間に有意差は認められず，一方抗HIV抗体では，粉塵作業年数が増すほど高値をとる傾向を示した．これらのことから珪肺症患者血清において抗コラーゲン抗体は，比較的早期の段階で出現することが示唆された．肺組織には，Ｉ型～Ｖ型コラーゲンが存在している[33)34)]が，肺に線維化がおこるとコラーゲン含量は通常の3倍にも膨れ上がり，線維化の初期ではIII型が増量し，やがてＩ型が増加してきてＩ型：III型の比率が増大する[51)]．Quinonesら[52)]によると，ブレオマイシンを投与したラット肺組織では，正常肺に比べて，Ｉ，III型コラーゲンの生合成は3倍以上に高まるが，IV型コラーゲンは低下することが報告されており，本研究で抗ＨＩ抗体および抗HIII抗体が高値であったのに対し抗HIV抗体が低値であったのは，このような背景の関連も考えられる．また，抗HIV抗体に，粉塵作業年数が増すほど増加していく傾向が認められたことは非常に興味深い現象であり，肺の線維化が進行し，基底膜が破壊されることによって徐々に抗HIV抗体が産生されていくという過程が推察される．

また，抗コラーゲン抗体が高値を示した珪肺症患者の血清を用いたインヒビション試験にて，抗コラーゲン抗体価がＨＩおよびHIIIにより抑制されたことから，珪肺症患者血清には抗ＨＩ抗体および抗HIII抗体が存在することを確認することができた．

また，肺気腫では，抗Ｉ型コラーゲン抗体[53)]が，特発性肺線維症では抗Ｉ，III，Ｖ型コラーゲン抗体[5)]が，さらに全身性進行性硬化症(progressive systemic sclerosis, PSS)では抗Ｉ，IV型コラーゲン抗体が検出されるという報告[54)]からも，肺の線維化の進展に伴い，それぞれの病態に応じて各種の抗コラーゲン抗体が産生されていくことが考えられる．一方自己免疫疾患である慢性関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)の患者血清中には軟骨の主成分である抗II型コラーゲン抗体が検出されること[48)49)55)]，さらに，ラットにII型コラーゲンを注射すると，RAに類似した多発性関節炎が生じることより，RAの発症および病態形成に，II型コラーゲンが強く関与することが指摘されている[56)]．珪肺症においても抗コラーゲン抗体が自己抗体としてその病態の進展に関与していることも推察される．

ViglianiとPernis[12)]が始めて塵肺症において免疫グロブリンが上昇することを示して以来，珪肺症に関しても体液性免疫が亢進することが知られているが，本研究では免疫グロブリンは，対照群に比べ，IgG，IgAおよびIgEが増加していた．これに対してIgMには特記すべき差は認められず，大成ら[13)]，海老原[14)]の報告と同様であった．また胸部Ｘ線分類による病型別では，珪肺症の進展に伴ってIgGの増加が認められ，IgAは第4型で有意な増加の傾向を示したが，IgMとIgEは一定の傾向を示さなかった．また高本ら[15)]は，塵肺症の第4型においてIgEの増加を認めており，重症の塵肺症患者に認められる喘息様発作等の臨床所見との関連を指摘している．著者も本研究の珪肺症患者でIgEの増加を認めたが，このことから珪肺症とアレルギー機序との関連が示唆されよう．また抗

コラーゲン抗体と免疫グロブリンとの相関を検討したところ，抗 HI 抗体と IgG との間に有意な相関を認めた．しかし他の各抗コラーゲン抗体との相関は認められなかった．

また珪肺症患者の血清からは各種の自己抗体が検出されることから自己免疫疾患としての側面も重視されている．そこで本研究では，珪肺症における自己抗体と抗コラーゲン抗体との関連性も追究した．

抗 DNA 抗体は，2本鎖 DNA に対する抗体（抗 nativeDNA 抗体または抗 double stranded DNA 抗体）と1本鎖 DNA に対する抗体（抗 single stranded DNA 抗体，抗 ssDNA 抗体）の2種類があり，抗 nDNA 抗体は，抗 ssDNA 抗体に比して全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematousus，SLE）により特異的であるとされている．しかし抗 nDNA 抗体は，混合性結合組織病（mixed connective tissue disease，MCTD），PSS，シェーグレン症候群（sjögren's syndrome，SjS），皮膚筋炎（dermatomyositis，DM），RA 等の膠原病でも陽性例が報告されている[16]．今回，著者は Crithidia を用いる蛍光抗体法によって抗 nDNA 抗体を測定したが，珪肺症患者134名中15名（11.2%）に陽性例が認められた．Cledes ら[11]と，大橋ら[17]は，珪肺症患者で SLE 様症状を呈した症例に抗 nDNA 抗体を認めており，珪肺症と SLE との相似性を述べている．海老原[14]は，塵肺症患者176名中53名（30.1%）に抗 DNA 抗体を認めたと報告しているが，これは，抗 nDNA 抗体および抗 ssDNA 抗体の両方を測定したため，今回の著者の結果より高率に出現したものと思われる．

ANA も SLE 患者に特徴的に見い出される自己抗体であるが，珪肺症患者にも ANA が検出されることは従来からしばしば指摘されている[18~22]．今回，著者は珪肺症患者134名中18名（13.4%）に ANA を検出した．また胸部X線病型が進展するほど ANA の陽性率は高率になる傾向を認めた．Doll ら[18]は，珪肺症患者53名中26%に，Turner-Warwick[19]は39名中44%に，Jones ら[20]は39名中44%に，また Kang ら[21]は，31名中28.5%に，ANA を検出し，Lippmann ら[22]は，炭坑夫156名中34%，また Turner-Warwick ら[23]は，石綿肺患者80名中29%に ANA を検出している．Lippmann ら[22]の報告以外では，いずれも胸部X線病型が進んだものに ANA が高率に認められており，今回の著者の結果と同様の成績であった．

RF は，変性 IgG に対する自己抗体で，主として IgM に属するタンパクであり，RA の患者血清の80%に証明されており，その他の膠原病，肝胆道疾患等にも認められている[24]．Caplan[9,10]が，RA に罹患した炭坑夫の胸部レントゲンに大きな結節性陰影を報告して以来，塵肺症と RA との関連が注目されてきた．今回，著者は珪肺症患者134名中14名（10.4%）に RF 陽性を認めた．胸部X線分類による病型別にみるとその間に差は認めなかった．Pernis ら[25]は，珪肺症患者212名中15.5%に，Doll ら[18]は53名中28%に，Kang ら[21]は31名中6.5%に，Turner-Warwick は[19]39名中7%に，須賀ら[26]は202名中9.7%に RF 陽性者を認めている．Doll ら[18]は，胸部X線分類による病型別には差を認めておらず，今回の著者の結果と同様であった．

Doll ら[18]は，Raji cell assay を用いて，初めて珪肺症患者53名中31%に IC を検出した．しかし胸部X線病型や肺機能障害との相関は認められなかったと報告している．本研究では珪肺症患者134名中12名（9.0%）に IC を検出し，Doll らのそれに比較して低率であったが，これは検出法として Clq ELISA 法を用いたことなどの方法の違いが理由にあげられよう．また Doll らと同様に胸部X線病型分類による病型間の差は認められなかった．

本研究より，珪肺症患者において抗 nDNA 抗体，ANA，RF，および IC の4種類の自己抗体が高率に認められた．小林ら[5]は，特発性肺線維症において抗コラーゲン抗体を検出しているが，特に IC 陽性者において抗コラーゲン抗体が上昇することを報告している．今回，珪肺症における抗コラーゲン抗体は，抗 nDNA 抗体陽性者では，抗 HI 抗体が低値を示したが，ANA 陽性者では抗 HI 抗体が高値を示し，RF 陽性者においては全ての抗コラーゲン抗体が高値の傾向を示し，IC 陽性者においては抗 BI 抗体が高値を示した．すなわち抗 nDNA 抗体以外の自己抗体陽性者で抗コラーゲン抗体陽性の傾向が認められた．一方 Pearson[57]は，ラットに Freud の complete adjuvant を注射することにより，自己免疫疾患としての RA 様の病変が発症したことを報告しているが，シリカが adjuvant 効果を有することもよく知られている．したがって珪肺症においては，その主因子であるシリカの adjuvant 効果によって各種の自己抗体が産生されてくることが想定される．以上のことから本研究で確認された珪肺症における抗コラーゲン抗体もシリカによる adjuvant 効果により生じる一種の自己抗体として理解することが可能である．

コラーゲンは，生合成の過程で，細胞内でまずプロコラーゲンとして合成され，細胞外に分泌された後，endopeptidase によってN末端，C末端の peptide が

切断されてコラーゲン分子が重合していく．従って，血中に放出される切断された peptide である PIIIP を測定することにより，体内でのIII型コラーゲンの増加を知ることができる．血清 PIIIP は，肝疾患における肝の線維化の指標としてよく知られているが，岡崎ら[27]は，塵肺症や，悪性リンパ腫患者に治療としてブレオマイシンを投与して肺線維化をおこした者で血清 PIIIP の上昇を報告している．そこで今回著者も珪肺症患者における血清 PIIIP についても観察したところ，対照者に比較して高値であった．このことからも珪肺症患者においてはIII型コラーゲンが増加していることが示唆された．しかし胸部X線分類による病型別ではその差を認めず，また血清 PIIIP と抗コラーゲン抗体との相関も認められなかった．

以上により珪肺症患者においては，病型が軽度の第1型に抗コラーゲン抗体が検出され，また抗コラーゲン抗体は，免疫グロブリンとの間に有意な相関を認め，さらには自己抗体である ANA，RF，IC の陽性者で高値の傾向が認められた．これらのことから珪肺症における抗コラーゲン抗体の産生は，肺の線維化に伴うコラーゲンの増生および体液性免疫の亢進といった免疫異常，さらにはシリカによる adjuvant 効果に基づくものと考えられた．珪肺症は，粉塵暴露がやんだ後も病変は徐々に大きくなる慢性でかつ進行性の疾患であり，有効な治療法が無く，予防措置，早期発見，職場環境の転換が必要となる．珪肺症における抗コラーゲン抗体は，病型が軽度である第1型の段階より出現することが確認され，それは ELISA 法により簡便に測定できることから，肺の線維化および自己免疫異常の発現に関して，より早期の指標として重要であることが指摘された．

結　　論

珪肺症患者134名および健常人40名の血清中抗コラーゲン抗体を ELISA 法を用いて測定した．また免疫グロブリン，抗 nDNA 抗体，ANA，RF，IC，PIIIPなどとの関係を検討し以下の結論を得た．

1．珪肺症患者血清中の抗コラーゲン抗体価は，抗 HI 抗体，抗 HIII 抗体が健常人に比べて有意に高値であった．抗 BI 抗体，抗 HIV 抗体では，両群間に差は認められなかった．珪肺症患者の抗体陽性率は，抗 HI 抗体が34.3%，抗 HIII 抗体が35.1%と高率であったのに対し，抗 BI 抗体は12.7%，抗 HIV 抗体は8.2%と低率であった．

2．各抗コラーゲン抗体を塵肺胸部X線分類による病型別に比較したが，病型間に有意な差は認められなかった．さらに粉塵作業年数別に検討したところ，抗 HIV 抗体は，粉塵作業年数の増加とともに高値を示す傾向が認められたが，抗 HI 抗体，抗 BI 抗体，抗 HIII 抗体には粉塵作業年数による差は認められなかった．抗コラーゲン抗体は，珪肺症の早期の段階より出現することが示唆された．

3．抗コラーゲン抗体価は，インヒビション試験において，HI および HIII により抑制された．

4．珪肺症患者の免疫グロブリンは，IgG，IgA，IgE が対照群に比較して有意に高値であった．IgM は対照群との間に差異を認めなかった．また IgG は，胸部レントゲン病型の進んだもので高値を示し，IgA も病型が進展するほど高値を示す傾向が認められた．IgG と抗 HI 抗体の間には正の有意な相関関係を認めた．

5．珪肺症患者の自己抗体陽性率は，対照群に比較して，抗 nDNA 抗体11.2%，ANA 13.4%，RF 10.4%，IC 9.0%と高率であった．抗 nDNA 抗体陽性者は，陰性者に比較し抗 HI 抗体は低値を示したが，ANA 陽性者は，陰性者に比較し抗 HI 抗体は高値を示した．RF 陽性者は，陰性者に比較し各抗コラーゲン抗体は高値の傾向を示した．IC 陽性者も，陰性者に比較し抗 BI 抗体は高値を示した．これらのことより抗コラーゲン抗体と各種自己抗体との関連性が示唆された．

6．珪肺症患者では対照群に比較して，血清 PIIIP は有意に高値を示したが，抗コラーゲン抗体との関連性は認められなかった．

以上のことより珪肺症における肺の線維化の主体をなすコラーゲンの増生によって抗コラーゲン抗体が生成され，体液性免疫の亢進による免疫異常も抗コラーゲン抗体の産生に関与していると考えられた．抗コラーゲン抗体は，病型が軽度の第1型より出現し，それは ELISA 法により簡便に測定できることから，抗コラーゲン抗体の測定は，珪肺症における早期の肺の線維化および自己免疫異常発現に関する指標として有意義と考えられた．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御懇篤なる御指導，御校閲を賜りました恩師岡田晃教授に深甚なる謝意を表します．また，終始御指導頂きました金沢医科大学公衆衛生学教室田畑正司博士ならびに御校閲頂きました有泉誠助教授に心から感謝致します．さらに快く貴重なる試料を提供して頂きました和歌山県立医科大学第1病理学教室大島章教授に厚く感謝の意を表します．併せて検体の収集に御協力頂きました金沢医科大学公衆衛生学教室河野俊一教授，中川秀昭助教授ならびに御助言を頂きました金沢大学第1病理学教室上田善道先生に深謝致

します.

文　献

1) **労働省安全衛生部労働衛生課:** じん肺診査ハンドブック, 改訂第4版, 18-19 頁, 中央労働災害防止協会, 東京, 1987.

2) **Heppleston, A. G.:** The disposal of dust in the lungs of silicotic rats. Am. J. Pathol., **40,** 493-506 (1962).

3) **Heppleston, A. G. & Styles, J. A.:** Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica. Nature, **214,** 521-522 (1967).

4) **Suou, T., Sawada, H., Yamada, S. & Hirayama, C.:** Humoral and cellular immunity to collagen in liver disease. In C. Hirayama & K. I. Kivirikko (eds.), Pathobiology of Hepatic Fibrosis, 1st ed. p153-163, Elsevier Sience Publishers (Biomedical Division), Amsterdam, 1985.

5) **小林信之, 中川武正, 須甲松信, 高橋孝喜, 大田 健, 滝沢 始, 奥平博一, 伊藤幸治, 村田克己, 宮本昭正:** 特発性肺線維症患者血清中の抗コラーゲン抗体の検討. 日胸疾会誌, **25,** 969-976 (1987).

6) **堀 久枝:** 抗体検出法, コラーゲン実験法 (永井 裕, 藤本大三郎編), 第1刷, 154-167 頁, 講談社, 東京, 1985.

7) **Snider, D. E.:** The relationship between tuberculosis and silicosis. Am. Rev. Respir. Dis., 455-460 (1978).

8) **Rodnan, G. P., Benedek, T. G., Medsger, T. A. & Cammarata, R. J.:** The association of progressive systemic sclerosis (scleroderma) with coal miner's pneumoconiosis and other forms of silicosis. Ann. Intern. Med., **66,** 323-334 (1967).

9) **Caplan, A.:** Certain unusual radiological appearances in the chest of coal miners suffering from rheumatoid arthritis. Thorax., **8,** 29-37 (1953).

10) **Caplan, A., Payne, R. B. & Withey, J. L.:** A broader concept of Caplan's syndrome related to rheumatoid factors. Thorax., **17,** 205-212 (1962).

11) **Cledes, J., Herve, J. P., Clavier, J., Youinou, P. & Olivier, J. P.:** Pulmonary silicosis and disseminated lupus erythematosus. Poumon. Coeur., **39,** 205-207 (1983).

12) **Vigliani, E. C. & Pernis, B.:** An immunological approach to silicosis. J. Occup. Med., **1,** 319-328 (1959).

13) **大成浄志, 粟屋昌一, 中島武嗣, 山木戸道郎, 西本幸男:** 各種塵肺における免疫グロブリン値について. 日本胸部臨床, **30,** 174-181 (1970).

14) **海老原勇:** 粉じん作業者にみられる免疫異常に関する疫学的研究. 粉じんと健康障害, 初版, 131-157 頁, 労働科学研究所出版部, 東京, 1986.

15) **高本正祇, 原田泰子, 山田穂積, 原田 進, 石橋凡雄, 杉山浩太郎:** 塵肺症における血清免疫学的研究. 臨床と研究, **54,** 2226-2230 (1970).

16) **熊谷俊子, 奥村伸生, 亀子光明, 丸山喜代次, 清沢研道, 金井正光:** ELISA 法による抗2本鎖 DNA 抗体, 抗1本鎖 DNA 抗体の測定. 衛生検査, **36,** 1614-1621 (1987).

17) **大橋 晃, 入宇田能順, 仲 紘嗣, 山田一範, 河内秀希, 佐藤富士夫:** 高 γ-グロブリン血症を伴い adjuvant 病様病像を呈した珪肺症の1症例. 日内会誌, **62,** 50-55 (1973).

18) **Doll, N. J., Stankus, R. P., Hughes, J., Weill, H., Gupta, R. C., Rodriguez, M., Jones, R. N., Alspaugh, M. A. & Salvaggio, J. E.:** Immune complexes and autoantibodies in silicosis. J. Allergy. Clin. Immunol., **68,** 281-285 (1981).

19) **Turner-Warwick, M.:** Immune reactions in pulmonary fibrosis. Schweiz. med. wschr., **107,** 171-175 (1977).

20) **Jones, R. N., Turner-Warwick, M., Ziskind, M. & Weill, H.:** High prevalence of antinuclear antibodies in sandblaster's silicosis. Am. Rev. Respir. Dis., **113,** 393-395 (1976).

21) **Kang, K. Y., Yagura, T., Sera, Y., Yokoyama, K. & Yamamura, Y.:** Antinuclear factor in pneumoconioses and idiopathic pulmonary fibrosis. Med. J. Osaka Univ., **23,** 249-256 (1973).

22) **Lippmann, M., Eckert, H. L., Hahon, N. & Morgan, W. K. C.:** Circulating antinuclear and rheumatoid factors in coal miners. Ann. Intern. Med., **79,** 807-811 (1973).

23) **Turner-Warwick, M. & Parkes, W. R.:** Circulating rheumatoid and antinuclear factors in asbestos workers. Br. Med. J., **3,** 492-495 (1970).

24) **安倍 達:** リウマトイド因子とその臨床的意義. 臨床科学, **11,** 1510-1518 (1975).

25) **Pernis, B., Vigliani, E. C. & Selicoff, I. J.:** Rheumatoid factor in serum of individuals

exposed to asbestos. Ann. N. Y. Acad. Sci., **132,** 112-127 (1965).

26) 須賀哲夫，西岡久寿樹，御巫清允，斉藤健一，千代谷慶三，鳥巣岳彦，津田 稔：珪肺症におけるリウマチ発症機序に関する研究－第1報．リウマチ，**17,** 662 (1977).

27) 岡崎 勲，丸山勝也，奥野府夫，鈴木秀郎，青柳和裕，瀬良良澄：じん肺患者の血清 Type III procollagen peptide. J. UOEH., **5,** 461-467 (1983).

28) 永井 裕，田中静子：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法．コラーゲン実験法．(永井 裕，藤本大三郎編)，第1刷，63-88頁，講談社，東京，1985.

29) Rennard, S. I., Berg, R., Martin, G. R., Foidart, J. M. & Robey, P. G.: Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. Anal. Biochem., **104,** 205-214 (1980).

30) Bradley, K. H., Mcconnell, S. D. & Crystal, R. G.: Lung collagen composition and synthesis. Characterization and changes with age. J. Biol. Chem., **249,** 2674-2683 (1974).

31) Miller, E. J.: The structure of fibril-forming collagens. Ann. New York. Acad. Sci., **460,** 1-13 (1985).

32) Gordon, M. K., Gerecke, D. R. & Olsen, B. R.: Type XII collagen: Distinct extracellular matrix component discobered by cDNA cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **84,** 6040-6044 (1987).

33) Raghu, G., Striker, L. J., Hudson, L. D. & Striker, G. E.: Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. Am. Rev. respir. Dis., **131,** 281-289 (1985).

34) Madri, J. A. & Furthmayr, H.: Collagen polymorphism in the lung. Human. Pathol., **11,** 353-366 (1980).

35) Konomi, H., Hayashi, T., Nakayasu, K. & Arima, M.: Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. Am. J. Pathol., **116,** 417-426 (1984).

36) Yeh, H. C., Phalen, R. F. & Raabe, O. G.: Factors influencing the deposition of inhaled particles. Environ. Health. Perspect., **15,** 147-156 (1976).

37) Schmidt, J. A., Mizel, S. B. & Green, I.: A fibroblast proliferation factor isolated from human MLR supernatants has physical and functional properties similar to human interleukin 1 (IL-1). Fed. Proc., **40,** 1084 (1981).

38) Schmidt, J. A., Oliver, C. N., Lepa-Zuniga, J. L., Green, I. & Gery, I.: Silica-stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin 1. A potential role for interleukin 1 in the pathogenesis of silicosis. J. Clin. Invest., **73,** 1462-1472 (1984).

39) Aho, S.: Purification of two ribonucleases from macrophage culture medium and studies on their effect on granulation tissue fibroblasts. Acta chem. Scand. B., **34,** 707-714 (1980).

40) Aho, S. & Kulonen, E.: Involvement of ribonuclease in the interactions of macrophages and fibroblasts in experimental silicosis. Experimentia., **36,** 29-31 (1980).

41) Pernis, B. & Vigliani, E. C.: The role of macrophages and immunocytes in the pathogenesis of pulmonary diseases due to mineral dusts. Am. J. Indust. Med., **3,** 133-137 (1982).

42) Allison, A. C.: Lysosomes and the toxicity of particulate pollutants. Arch. Intern. Med., **128,** 131-139 (1971).

43) Pernis, B. & Paronetto, F.: Adjuvant effect of Silica (Tridymite) on antibody production. Proc. Soc. Exp. Biol. M., **110,** 390-392 (1962).

44) Vigliani, E. & Pernis, B.: An immunological approach to silicosis. In Proceedings of the Pneumoconiosis Conference, Johannesburg, 1959, p395, J. & A. Churchill, Ltd., London, 1960.

45) Burrell, R. G., Wallace, J. P. & Andrews, C. E.: Lung antibodies in patients with pulmonary disease. Am. Rev. Respir. Dis., **89,** 697-706 (1963).

46) Hagadorn, J. E. & Burrell, R.: Lung-reactive antibodies in IgA fractions of sera from patients with pneumoconiosis. Clin. exp. Immunol., **3,** 263-267 (1968).

47) Mccombs, R. P.: Diseases due to immunologic reactions in the lungs (First of two parts). New. Eng. Jour. Med., **286,** 1186-1194 (1972).

48) Stuart, J. M., Huffstutter, E. H., Townes, A. S. & Kang, A. H.: Incidence and specificity of antibodies to Types I, II, III, IV and V collagen in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases as mesured by ^{125}I-radioimmunoassay.

Arthritis Rheum., **26**, 832-840 (1983).

49) **Beard, H. K., Ryvar, R., Shingle, J. & Greenbury, C. L.**: Anticollagen antibodies in sera from rheumatoid arthritis patients. J. Clin. Pathol., **33**, 1077-1081 (1980).

50) **Furthmayr, H.**: Immunization procedures, isolation by affinity chromatography, and serological and immunochemical characterization of collagen specific antibodies. In H. Furthmayr (ed.), Immunochemistry of the Extracellular Matrix, Vol. I, 1st ed., p143-178, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1982.

51) **Seyer, J. M., Hutcheson, E. T. & Kang, A. H.**: Collagen polymorphism in idiopathic chronic pulmonary fibrosis. J. Clin. Invest., **57**, 1498-1507 (1976).

52) **Quinones, F. & Crouch, E.**: Biosynthesis of interstitial and basement membrane collagens in pulmonary fibrosis. Am. Rev. Respir. Dis., **134**, 1163-1171 (1986).

53) **Michaeli, D. & Fudenberg, H. H.**: Antibodies to collagen in patients with emphysema. Clin. Immunopath., **3**, 187-192 (1974).

54) **Mackel, A. M., Delustro, F., Harper, F. E. & Leroy, E. C.**: Antibodies to collagen in scleroderma. Arthritis Rheum., **25**, 522-531 (1982).

55) **Steffen, C. & Timple, R.**: Antigenicity of collagen and its application in the serological investigation of rheumatoid arthritis sera. Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol., **22**, 333-349 (1963).

56) **Trentham, D. E., Townes, A. S. & Kang, A. H.**: Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. J. Exp. Med., **146**, 857-868 (1977).

57) **Pearson, C. M.**: Experimental joint disease. Observations on adjuvant-induced arthritis. J. Chronic. Dis., **16**, 863-874 (1963).

Studies on Production of Anti-Collagen Antibodies in Silicosis

Tadasu Nagaoka, Department of Public Health, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920

—J. Juzen Med. Soc., 98, 489—506 (1989)

Key words silicosis, anti-collagen antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), autoantibody, procollagen Ⅲ peptide

Abstract

Silicosis is a disease characterized by pulmonary fibrotic change, consisting mainly of increases in collagen. In the present study, anti-collagen antibodies in sera of patients with silicosis were examined and its relationship with immunoglobulins, autoantibodies and procollagen Ⅲ peptide (PⅢP) was investigated. The autoantibodies examined were anti-nDNA antibodies, anti-nuclear antibodies (ANA), rheumatoid factor (RF) and immune complex (IC) which are all often detected in sera of patients with silicosis. Using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), anti-collagen antibodies in sera of 134 patients with silicosis and 40 normal subjects were measured. The mean levels of anti-human type I collagen (HⅠ) antibodies and anti-human type Ⅲ collagen (HⅢ) antibodies in patients with silicosis were significantly higher than those in normal subjects ($p<0.001$). However, there were no differences in the mean levels of either anti-bovine type I collagen (BⅠ) antibodies or anti-human type Ⅳ collagen (HⅣ) antibodies between patients with silicosis and normal subjects. Of the patients with silicosis, 34.3% had anti-HⅠ antibodies and 35.1% had anti-HⅢ antibodies, whereas only 12.7% and 8.2% of the patients had anti-BⅠ antibodies and anti-HⅣ antibodies, respectively. There were no

differences in the appearance of any type of anti-collagen antibody compared among roentogenographic categories of pneumoconiosis. There was a tendency of elevation of anti-HⅣ antibodies according to pneumoconiotic working years, but there were no such relations observed between anti-HⅠ, BⅠ, HⅣ antibodies and pneumoconiotic working years. These results suggest that anti-collagen antibodies in sera of patients with silicosis are made at an early stage of the disease. In addition, IgG, IgA and IgE in sera of patients with silicosis were significantly higher than those in normal sujects. There was also a statistically significant positive correlation between IgG and anti-HⅠantibodies ($p<0.05$). There were high percentages of anti-nDNA antibodies (11.2%), ANA (13.4%), RF(10.4%) and IC (9.0%) in sera of patients with silicosis compared with those of normal subjects. Levels of anti-HⅠantibodies in anti-nDNA antibody-positive sera were significantly lower than those in anti-nDNA antibody-negative sera. Levels of anti-HⅠ antibodies in ANA-positive sera were significantly higher than those in ANA-negative sera. Levels of all anti-collagen antibodies in RF-positive sera showed a tendency to be higher than those in RF-negative sera. Levels of anti-BⅠantibodies in IC-positive sera were significantly higher than those in IC-negative sera. Levels of serum PⅢP in sera of patients with silicosis were significantly higher than those in normal subjects ($p<0.05$). However, there was no correlation between serum PⅢP and anti-collagen antibodies. These results suggest some relation in silicosis between anti-collagen antibodies and immunoglobulins as well as between anti-collagen antibodies and autoantibodies. It is also suggested that immunoabnormality due to elevation of humoral immunity is related to production of anti-collagen antibodies. Estimation of anti-collagen antibodies in sera of patients with silicosis is considered to be a useful prognostic index of lung fibrosis and autoimmune abnormality in silicosis.