

図2 IIP 7例の各スコアで評価された肺胞壁に占める毛細血管の面積比を vessel densities (%) としてもとめ比較した。正常肺 3 例の測定値はすべてスコア 0 の群にいられている。スコア 1-3 は正常に比し著明に高まっているが、線維化が進むにつれて面積比は正常肺に比し逆に有為に低くなる。

#### 考案・結論

肺線維症における血管変化に関する従来のほとんどの研究は、進行した病状に伴う肺動脈圧亢進を反映する肺動脈血管壁の変化に関するものであり、1963年にTurner-Warwickが初めて指摘した新生血管は、肺動脈と体循環系の血管をつなぐby-passであった。1991年になってPeaoらはブレオマイシン肺線維症の実験モデルの肺胞毛細血管の構造破壊があった後に、近接する気管支動脈から血管新生が生じることを示した<sup>1)</sup>。Kawanamiらもまた肺の線維化過程は局所的な血管新生を伴うことを示唆している<sup>2)</sup>。DeffebackやCudokowiczらは、逆に肺胞壁の毛細血管には再生能はないであろうとしている<sup>3,4)</sup>。最近、ThurstonらがC57BL/6とC3Hの慢性炎症による気道における新生血管の程度には、どちらもマウスでありながら著しい差があることを報告しているが<sup>5)</sup>、新生血管に関するこれらの相反する結果は、用いた動物の反応の差である可能性も考えられる。また、ごく最近まで、血管内皮細胞は一般の病理的組織標本上、観察することが困難であったという背景がある。それは従来内皮細胞を免疫染色するのに用いられていたvWF抗体が肺の毛細血管の内皮細胞ではほとんど反応せず、組織切片上で示しえなかつたためでもある<sup>5,6)</sup>。また、様々な抗体による反応の違いから、不均一性(heterogeneity)も考えられている<sup>7)</sup>。

今回示した、肺線維症の極初期の段階と考えられるスコア 1-2 における肺胞毛細血管の著明な拡張に関しては、すでにSpencerらによって記載されており、極初期の段階では肺胞毛細血管は非常に膨れ上がり、うっ血し、

それは毛細血管の透過性が亢進しているためであろうとしている<sup>8)</sup>。しかし、肺胞壁中の毛細血管が2重、3重になっている所見は、Peaoらの指摘している動物モデルの血管新生とも異なっており、初めての報告である。この所見はAsaharaらが示した血管新生の新しい機序、すなわち、末梢血中に血管内皮細胞の幹細胞が存在し、分化して毛細血管を形成するという報告<sup>9)</sup>と合わせて考えると興味深い。しかし、肺胞毛細血管はその後、線維化の進行とともに次第に減少し、高度な線維化巣における毛細血管密度は正常組織よりも有意に少なくなる。肺線維症発症早期での毛細血管新生が病態に対して、はたして抑制的に働くのか、進行させる方向に働いているのかを見極める必要がある。現在私どもは、新生血管の産生物質による線維化への影響の解析を続けており、また、それを治療にどうむすびつけられるかといった観点から、新しい治療法確立の可能性を探っている。

新生血管という新しい観点からの間質性肺炎の研究は、肺線維症の急性増悪期に至る時期の診断、その予防的治療、そして致死性の増悪期における治療という、呼吸器疾患のなかでも最も難解な問題に対する新しい戦略の立て直しに寄与することを予期している。

#### 参考文献

- 1) Peao MND, Aguas AP, de Sa AC, Grande NR. Neof ormation of blood vessels in association with rat lung fibrosis induced by bleomycin. *Anat Record* 238;57-67, 1994.
- 2) Kawanami O. The endometrium of the pulmonary microvessels. *J. Nippon Med. Sch*; 64(6)495-511, 1997.
- 3) Deffeback ME, Charan NB, Lakshminarayan S, Butler J. The bronchial circulation. Small, but a vital attribute of the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:463-481, 1987.
- 4) Cudokowicz L. Bronchial arterial circulation in man. Normal anatomy and responses to disease. "Pulmonary vascular diseases". Moser KM, ed. Lenfant C. executive ed. *Lung Biology in Health and Disease*. vol. 14;111-232, 1979. Marcel Dekker, New York, Basel.
- 5) Thurston Gavin, Murphy TJ, Baluk P, Lindsey JR, McDonald DM. Angiogenesis in mice with chronic airway inflammation. Strain-dependent differences. *Am. J. Pathol.* 153:1099-1112, 1998.
- 6) Yamamoto M, Shimokata K, Nagura H. An immunohistochemical study on phenotypic heterogeneity heterogeneity of human pulmonary vascular

endothelial cells. Virchows Archiv. A. Pathol. Anat. Histopathol. 412;479-486, 1988.

7) Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. Am. J. Pathol. 141;673-683, 1992.

8) Spencer H. Idiopathic Interstitial Fibrosis of the

Lung. 788-797. in Pathology of the lung. Fourth edition Pergamon Press, Oxford, 1985.

9) Asahara T, Murohara T, Sullivan a, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275;964-967, 1997.

# Differential Display 法による肺線維化促進因子の検索

山木戸道郎\* 前田 晃宏 玉川孝太郎 前田 裕行  
檜山 桂子 石岡 伸一

特発性間質性肺炎 (IIP) は、原因不明・予後不良の疾患で多くは慢性進行性の経過をとる。ヒトゲノムには約 10 万個の遺伝子がコードされているが、個々の細胞で発現しているのはそのうち約 15% に過ぎない。組織の発生分化、様々な疾患における病態においても、個々の細胞のゲノムは質・量とも同一で、各遺伝子の発現量の違いがその変化をもたらしている。ゆえに、遺伝子発現の違いを検討することにより、疾患の原因・病態の鍵となる遺伝子が同定される可能性がある。differential display 法は、遺伝子発現量の差異を比較検討する方法の一つである。IIP 患者の BAL 細胞を用いた検討では、IIP 患者において共通に発現が増強しているバンドも認められたが、IIP に特異的と考えられるような結果は得られなかった。現在我々は、ブレオマイシン投与によるマウス肺線維症モデルを対象に遺伝子発現量の差異を検討中である。

## Search for fibrogenic factors in the lung by differential display

Michio Yamakido, Akihiro Maeda, Kotaro Tamagawa, Hiroyuki Maeda  
Keiko Hiyama, and Shinichi Ishioka

*The Second Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine Hiroshima, Japan*

Idiopathic interstitial pneumonia (IIP) is commonly lethal, and current therapies for this disease have little effect on patient prognosis. Despite many recent studies, its etiology remains uncertain. Differential display is a method designed to identify and isolate differentially expressed genes. We investigated gene expression in bronchoalveolar lavage (BAL) cells in patients with IIP using differential display. The pattern of display on a standard sequencing gel varied among the patients with IIP. The differences in the proportion of each type of cells in clinical samples as well as in clinical stages of IIP patients may influence the results of differential display. Then we are now investigating gene expression in murine lungs with pulmonary fibrosis induced by bleomycin.

はじめに

特発性間質性肺炎 (IIP) は、原因不明の疾患で多くは慢性進行性の経過をとる。有効な治療法がなく予後不良である。IIP の病態は、急性期の肺胞隔炎に引き続く過剰修復と肺構造の改築であると理解され、種々の細胞が産生・放出するサイトカインをはじめとするケミカルメディエーターが重要な役割を果している<sup>1)</sup>。なかでも、主に肺胞マクロファージが産生する tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF)-I は、線維芽細胞の増殖や細胞外基質の増加・沈着を直接刺激する因子として重要である<sup>2)</sup>。しかし、肺胞マクロファージを活性化してこれらのサイトカインを産生させるメカニズムは不明である。

ヒトゲノムには約 10 万個の遺伝子がコードされているが、個々の細胞で発現しているのはそのうち約 15% に過ぎない。組織の発生分化、様々な疾患における病態においても、個々の細胞のゲノムは質・量とも同一で、各遺伝子の発現量の違いがその変化をもたらしている。ゆえに、遺伝子発現の違いを検討することにより、疾患の原因・病態の鍵となる遺伝子が同定される可能性がある<sup>3)</sup>。differential display (DD) 法は、遺伝子発現 (mRNA) 量の差異を比較検討する方法の一つである (図 1)<sup>3,4)</sup>。我々は、DD 法を用いて新たな肺線維化促進因子の同定を試みた。

Differential Display法

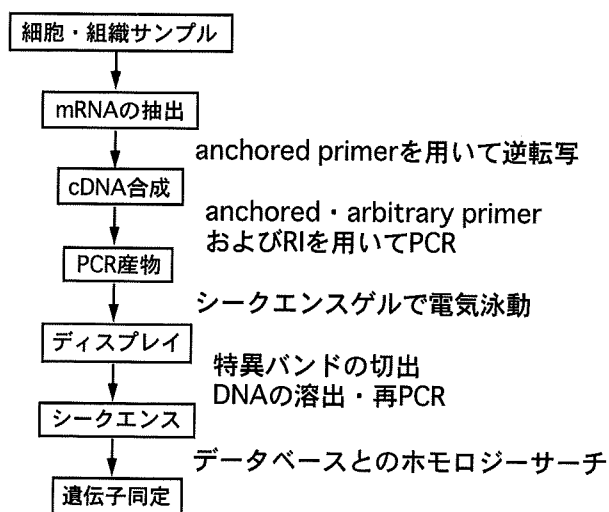


図 1

広島大学医学部第二内科学教室

\* びまん性肺疾患分科会 分科会員

対象と方法

組織あるいは細胞から、total RNA を抽出後、Poly A テイルとアニールする T<sub>15</sub> に 2 塩基がついたアンカープライマーを用いて逆転写した。次に、同じアンカープライマーと 10mer の任意 (arbitrary) プライマーを用いてアイソトープ存在下に 40 サイクルの PCR にかけて増幅、PCR 産物は 7M ウレアを含むシークエンスゲルで泳動し、ディスプレイパターンを検討した (図 2)。プライマーは、インターナルコントロールとして house keeping gene である Phosphoglycerate kinase (PGK) が増幅されるようにセットしたプライマーセット 1 と、別の配列を増幅するプライマーセット 2 の 2 つのセットを用いた<sup>5)</sup>。

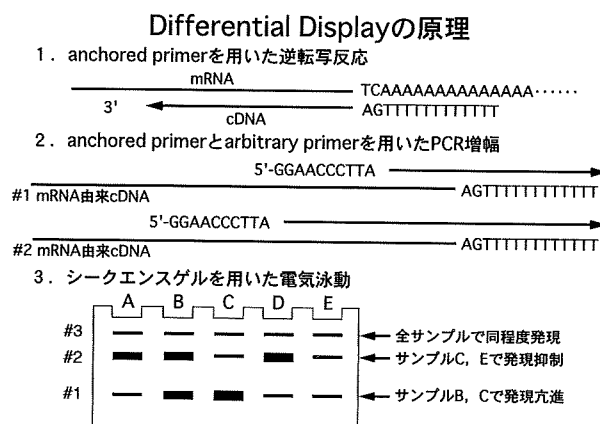


図 2

結 果

IIP 患者の BAL 細胞を用いた検討では、IIP 患者において共通に発現が増強しているバンドも認められたが、

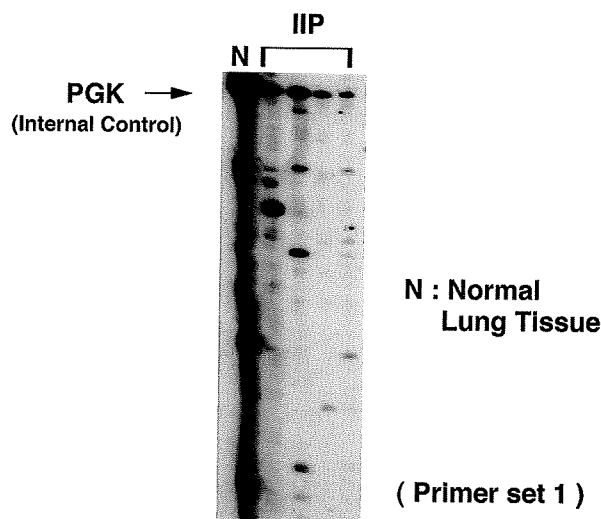


図 3

ディスプレイパターンは個々の患者で異なり、IIP に特異的と考えられるような結果は得られなかった (図 3, 4).

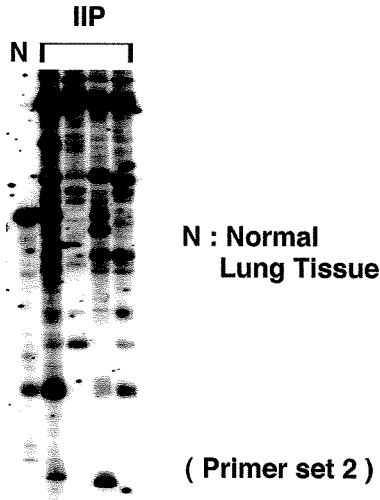


図 4

#### 考案・結論

DD 法では、PCR と任意に設定された特殊なプライマーセットの応用により、多数の mRNA のランダムな増幅による比較が可能であり、細胞の mRNA 発現の変化を全体的に観察するときには優れている<sup>3)</sup>。泳動した時に 1 レーンあたり 100 本程度のバンドまでは判定可能で、細胞あたり約 15,000 種の mRNA が発現していることを考えると、理論的には 150 組のプライマーセットで全 mRNA 種を網羅することができる<sup>3)</sup>。IIP 患者の BAL 細胞を用いた検討では、IIP に特異的と考えられるようなディスプレイパターンは得られなかった。その原因として、各検体における細胞構成やその比率の違いがあげられる。異なる細胞では、各遺伝子の発現量の違いがその変化をもたらしていると考えられる。そのほか、個体差や病期の違いが影響していることが考えられる。

我々は、IIP の動物モデルとしてブレオマイシン (BLM) 投与による誘発肺線維症マウスを用いた研究で、急性期において肺胞マクロファージが産生する IL-1 $\beta$  が肺胞隔炎を引き起こし、病初期から持続的に肺胞マクロファージが産生する PDGF-A および IGF-I が線維化に関連していることを証明した<sup>6,7)</sup>。しかし、本モデルにおけるマクロファージの活性化の機序は不明である。BLM 誘発肺線維症の最も初期にみられる変化の一つに血管内

皮細胞の傷害がある<sup>8)</sup>。血管内皮細胞は、種々の刺激により各種メディエーターを放出することが知られており、BLM 投与により血管内皮細胞が何らかのマクロファージ活性化因子を産生する可能性が考えられる。現在我々は、新たな肺線維化促進因子の同定を目的として、BLM 誘発肺線維症マウスを対象に遺伝子発現量の差異を検討中である。本研究により線維化促進因子が同定されれば、その発現あるいは作用抑制が、現在有効な治療法のない IIP の新たな治療法になる可能性があり、その意義は深いと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA: Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. *N Engl J Med* 310:154-166, 235-244, 1984.
- 2) Kelley J: Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 141:765-788, 1990.
- 3) 檜山桂子, 石岡伸一, 山木戸道郎: Differential display/Subtraction method. *分子呼吸器病* 1:459-461, 1997.
- 4) Liang P, Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971, 1992.
- 5) Wiwien HW, Hiyama K, Maeda H, Ishioka S, Yamakido M: Differential display of messenger RNA expressed in bronchoalveolar lavage cells in pulmonary sarcoidosis patients. *Hiroshima J Med Sci* 45:1-10, 1996.
- 6) Maeda A, Hiyama K, Yamakido H, Ishioka S, Yamakido M: Increased expression of platelet-derived growth factor A and insulin-like growth factor-I in BAL cells during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Chest* 109:780-786, 1996.
- 7) Taooka Y, Maeda A, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M: Effects of neutrophil elastase inhibitor on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 156:260-265, 1997.
- 8) Aso Y, Yoneda K, Kikkawa Y: Morphologic and biochemical study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice. *Lab Invest* 35:558-568, 1976.

# 間質性肺炎に対する新しい治療法の開発

## —ブレオマイシン肺傷害に対する interleukin-10 の抑制効果の検討—

林 清二\* 新井 徹 松岡 洋人 森 雅秀

ヒト IL-10 発現ベクターをマウス腹腔内に生体内導入しブレオマイシン肺傷害に対する抑制効果を検討した。ヒト IL-10 導入群では対照群に比較して経気道的ブレオマイシン投与7日後の肺の炎症を反映する気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の myeloperoxidase 活性と BALF 細胞の tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA, 21 日後の肺の線維化を反映する hydroxyproline 量はいずれも有意に抑制された。IL-10 の肺線維芽細胞のコラーゲン産生に対する直接効果を *in vitro* にて検討した。定常状態および transforming growth factor- $\beta$  刺激下での肺線維芽細胞のコラーゲン mRNA は、いずれも IL-10 の添加により抑制された。以上より抗炎症性サイトカインである IL-10 は炎症抑制作用とともに直接肺の線維化を抑制し、特発性肺線維症の治療に有用な可能性が示唆された。

## Inhibitory effects of interleukin-10 on bleomycin induced lung injury

Seiji Hayashi, Toru Arai, Hiroto Matsuoka, Masahide Mori

*Department of Molecular Medicine, Osaka University Medical School*

We investigated the inhibitory effects of interleukin-10 (IL-10) on a murine model of lung injury induced by bleomycin (Bleo). Hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome containing human IL-10 expression vector (hIL10-HVJ) or balanced salt solution (Cont-HVJ) was intraperitoneally injected to 7-week-old C57BL/6 male mice on day-3. They were received an intratracheal instillation of Bleo (0.8mg/kg) on day 0. Myeloperoxidase activity of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA of BALF cells on day 7, and hydroxyproline content of the whole lung on day 21 were inhibited significantly by hIL10-HVJ treatment. Using human lung fibroblast cell line, WI-38, I determined the direct effects of IL-10. Type I collagen mRNA both in a static state and under the transforming growth factor- $\beta$  stimulation was significantly decreased in the presence of IL-10. These inhibitory effects of IL-10 on lung inflammation and fibrosis suggest exogenous IL-10 may be useful in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis.

## 研究目的

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) は、進行性に肺の線維化をきたす原因不明の疾患で、発症後の5年生存率は約50%と非常に予後不良である<sup>1,2)</sup>。IPFの病態については不明な点が多いが、何らかの原因によって肺胞上皮細胞傷害と肺間質の炎症が生じ、その治癒機転が遷延する過程で線維化が発生すると考えられてきた。近年、IPFの肺におけるサイトカイン発現の解析が進められ、IPFの肺胞マクロファージにおいて主に炎症に関与する tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、interleukin (IL)-1 $\beta$ 、IL-8、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1、線維化に関与する platelet derived growth factor (PDGF)、insulin like growth factor (IGF)-I、transforming growth factor (TGF)- $\beta$ の産生が亢進することが報告されている。したがって、好中球の肺への遊走と活性化、活性酸素、反応性窒素酸化物や種々の蛋白分解酵素による炎症の発生と遷延化、線維芽細胞の増殖と細胞外マトリックスの産生亢進による線維化の進行のいずれの過程においても肺胞マクロファージは中心的な役割を果たしていると考えられる。

これまで IPF に対しては、ステロイド<sup>1)</sup>や cyclophosphamide、azathioprine などの免疫抑制療法が行われてきた。しかし、ステロイドは炎症病巣に対しては有効な場合もあるが、線維化の抑制は困難で予後の改善には寄与しない<sup>1)</sup>とされ、有効な治療法が確立されていないのが現状である。そこで肺線維症の治療法の開発と肺の線維化の病態解析のため、プレオマイシンやシリカによる肺傷害モデルを用いて、種々の薬剤やサイトカインに対する抗体等の投与実験が行われてきた。抗 TNF- $\alpha$  抗体、soluble TNF $\alpha$  receptor、IL-1 receptor antagonist などは、炎症において中心的な役割を果たすサイトカインを直接阻害することで、一定の線維化抑制効果が確認され、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  が肺線維化に重要な役割を果たすことが明らかにされた。

IL-10 は、ヘルパーTリンパ球の1つである Th2 細胞、Bリンパ球、単球、マクロファージ、keratinocyte から分泌され、炎症における種々の反応を抑制することから抗炎症性サイトカインと呼ばれている<sup>3)</sup>。例えばマクロファージからの IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカイン、活性酸素、反応性窒素酸化物の産生、MHC classII antigen の発現を抑制し、Th1 細胞からの Interferon- $\gamma$  の産生を抑制する。さらに好中球に対しても IL-8 の産生抑制<sup>4)</sup> や apoptosis の誘導作用<sup>5)</sup> を持つことが明らかとなった。また、他の慢性炎症性疾患のモ

デル動物に対しても治療効果を示した<sup>6)</sup>。

Th2 サイトカインである IL-10 は Th1 を抑制するが、Th2 の抑制作用についても報告され<sup>7)</sup>、Th1 と Th2 のバランス調節の中樞を担うサイトカインであると思われる。ヘルパーTリンパ球のサブセットである Th1 と Th2 のバランスは疾患の発生や進行に深く関わることが知られ、肺線維症においても Th1 反応主体の炎症の時期から何らかの理由で Th2 反応主体に変化することが肺の線維化に重要ではないかと考えられている<sup>8)</sup>。

そこで HVJ (hemagglutinating virus of Japan) -liposome 法により human IL-10 を生体内で持続的に発現させたマウスにプレオマイシンを投与することにより、肺の炎症と線維化に対する IL-10 の効果と病態における意義について検討を加えた。

## 研究方法

### 1) ベクターの作製

human interleukin-10 (hIL-10) を生体内発現させるため、hIL-10 を含むプラスミド (ATCC No. 68192) から hIL-10 cDNA を切り出し、chicken  $\beta$ -actin promoter 支配下の発現ベクターである pCAGGS expression vector<sup>9)</sup> に組み込んだ pCA-hIL10 を作製した。ベクターの *in vitro* での発現確認のため pCA-hIL10 を FuGENETM6-Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Germany) にて A549 細胞に導入し、24 時間後の培養上清を採取した。

### 2) Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) - liposome 法

HVJ-liposome 作製の基本的な操作は金田ら<sup>10)</sup>の方法に従った。要約すると 10 mg の lipid mixture (phosphatidyl choline : phosphatidyl serine : cholesterol ; 質量比 24 : 5 : 10) と balanced salt solution (BSS) に溶解したプラスミド DNA、High Mobility Group-1 (HMG-1) とを混合し、ボルテックス、攪拌、ソニケートにより liposome の内部にプラスミド DNA を包含させる。さらに 198mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線で不活化した HVJ を liposome 表面に融合させた。作製した HVJ-liposome 原液から目的のプラスミド含有単層 liposome を sucrose gradient 法にて精製単離した。

### 3) HVJ-liposome を用いた生体内遺伝子導入

pCA-hIL10 を封入した HVJ-liposome (hIL10-HVJ) を balanced salt solution (BSS) で希釈し、7 週令オス C57/BL6 マウス (日本 SLC, Hamamatsu, Japan) 一匹あたり 300  $\mu$ l ずつ腹腔内投与した。300  $\mu$ l の HVJ-liposome には約 5-10  $\mu$ g のプラスミド DNA が含まれて

いる。対照群としてはBSSのみを含むHVJ-liposome (Cont-HVJ)を腹腔内に投与した。

#### 4) プレオマイシン肺傷害モデルの作製

7週令オスC57/BL6マウスをpentobarbital(ダイナボット, Osaka, Japan) 1mgの腹腔内投与にて麻酔後, Hamilton syringe (HAMILTON COMPANY, Nevada, USA)を用いてルーベ下で塩酸プレオマイシン(日本化薬, Tokyo, Japan) 0.8mg/kgを経気道的に注入した。気管支肺胞洗浄(BAL; broncho-alveolar lavage)は生理食塩水1mlで5回行った。採血は右心室から行い, 室温にて4時間放置後, 血清分離し-20℃で保存した。全肺の採取はBALと同時にせず, 採取後-20℃に保存した。

#### 5) 気管支肺胞洗浄液(BALF; broncho-alveolar lavage fluid)中のmyeloperoxidase(MPO)活性の測定

基本的な操作はDenisら<sup>11)</sup>の方法に従った。すなわち, マウスBALFを1500rpm, 5分間遠心し, その沈殿物を1mlの $K_2HPO_4$  bufferに再浮遊させ, SONIFIER B-12 (Branson Sonic Power Company, Danbury)を用いLevel7, 90秒ソニケートした。次に12,000G 10分間遠心し, その上清350 $\mu$ lに300 $\mu$ lの0.25% bovine serum albumin (BSA) 含有Hanks's BSS (HBSS), 250 $\mu$ lの0.1M  $K_2HPO_4$  buffer pH7.0, 50 $\mu$ lの1.25mg/ml o-dianisidine, 50 $\mu$ lの0.05%  $H_2O_2$ をそれぞれ加え, 25℃15分間反応させた。50 $\mu$ lの1%  $NaN_3$ を加えて反応を停止した後, 分光吸光度計にて460nmの吸光度を測定した。

#### 6) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

培養上清, 血清中のhIL-10はhuman IL-10 ELISA Kit (Endogen, Cambridge, USA), 腹腔洗浄液中のhIL-10はUltra-sensitive human IL-10 ELISA Kit (Cosmobio, Tokyo, Japan), 血清中のmouse TNF- $\alpha$ はmouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit (R&D, Minneapolis, USA)を用いて測定した。

#### 7) 全肺中のhydroxyprolineの定量

Woessnerら<sup>12)</sup>の方法に準じて行った。すなわち, マウス全肺を6N HCl 2mlとともにアンブル管に封入し, 105℃, 18時間加熱した検体を飽和LiOHにて中和, 蒸留水にて10倍希釈した後, 発色基質を加えて60℃, 30分反応させた。冷却後, 分光吸光度計にて562nmの吸光度を測定し, 10から0 $\mu$ g/mlまでの数段階のhydroxyproline標準液との比較で定量を行った。

#### 8) RNAの抽出とreverse transcription (RT)

マウスBALFは1500rpm, 5分遠心後の細胞成分に, 培養細胞は上清除去後, Isogen (Nippongene, Tokyo, Japan) 1mlを加えて溶解し, Ethacinmate (Nippongene, Tokyo, Japan)を用いてisopropanol沈澱, etanol沈澱を行い, RNAを回収した。RNA PCR Kit Ver.2.1 (TaKaRa, Kyoto, Japan)を用い, RNA 800ngを含む10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 5mM  $MgCl_2$ , 1mM各deoxynucleotide (dNTP), 1U/ $\mu$ l RNase inhibitor, 2.5 $\mu$ M random primer, 0.25U/ $\mu$ l reverse transcriptaseの反応液20 $\mu$ lを30℃10分, 42℃30分, 99℃5分, 5℃5分反応させてcDNAを作製した。

#### 9) polymerase chain reaction (PCR)

Taq polymerase (TaKaRa, Kyoto, Japan) 1.25U, 各dNTP200 $\mu$ M, 1 $\times$ PCR buffer (TaKaRa, Kyoto, Japan), sense primer 0.4 $\mu$ M, antisense primer 0.4 $\mu$ MとtemplateとしてcDNAを含む50 $\mu$ lの反応液をThermal Cycler MP (TaKaRa, Kyoto, Japan)を用いて94℃30秒, 至適annealing温度にて30秒, 72℃1分の反応を至適cycle数行った。至適annealing温度とcycle数は, mouse TNF- $\alpha$ で57℃, 32cycle, mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)で57℃, 27cycle, human type1 collagenで56℃, 30cycle, human GAPDHで60℃, 30cycleであった。PCR productは, 2%アガロースゲルで100V, 1時間電気泳動後ethidium bromideにて染色し, FMBIO II Multi-View System (TaKaRa, Kyoto, Japan)にてバンドの信号強度を測定した。

#### 10) RT-PCR法によるBALF細胞中のTNF- $\alpha$ mRNAの半定量

TNF- $\alpha$  mRNAの定量にはcDNA液4 $\mu$ l, 内部標準とするGAPDH mRNAの定量にはcDNA液の10倍希釈液2 $\mu$ lをtemplateとしてPCRを行った。電気泳動後のTNF- $\alpha$ とGAPDHのバンドの信号強度の比を算出し, TNF- $\alpha$  mRNA量とした。

#### 11) human lung fibroblastのtype1 collagen mRNAのcompetitive PCRによる定量

Competitive DNA Construction Kit (Takara, Kyoto, Japan)を用いてhuman type1 collagen mRNA, human GAPDH mRNA定量のための $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  copy/ $\mu$ lの標準competitor DNA液を作製した。WI-38から抽出したRNAをRT反応させたcDNA液1 $\mu$ lといずれかの標準competitor DNA液1 $\mu$ lを含むPCR反応液50 $\mu$ lを作製しcompetitive PCRを行っ



た. 電気泳動後, target cDNA (human type1 collagen または human GAPDH) と competitor DNA のバンドの信号強度の比 (T/C) と competitor DNA の copy 数をプロットし, T/C=1 となる competitor DNA の copy 数をもって target DNA の copy 数とした. type1 collagen と GAPDH の copy 数の比を算出し type1 collagen mRNA 量とした.

#### 12) PCR primer sequence

mouse TNF- $\alpha$  sense primer:  
5'-GCAGGTCTACTTTAGAGTCATTGC,  
mouse TNF- $\alpha$  antisens primer :  
5'-TCCCTTTGCAGAACTCAGGAATGG,  
mouse GAPDH sense primer :  
5'-GGTGAAGGTCCGGTGTGAACGGATT,  
mouse GAPDH antisense primer :  
5'-ATGCCAAAGTTGTCATGGATGACC,  
human type1 collagen sense primer :  
5'-CTGGTCCCAAGGGTAACAG,  
human type1 collagen antisense primer :  
5'-GCCAGGAGAACCACGTTC,  
human GAPDH sense primer:  
5'-TGCCTCCTGCACCACCAACTGC,  
human GAPDH antisense primer :  
5'-AATGCCAGCCCCAGCGTCAAAG

#### 13) human lung fibroblast の培養

human lung fibroblast, WI-38 (RIKEN GENE BANK, Saitama, Japan) を 10% fetal bovine serum (FBS), 100U/ml penicillin G, 10 $\mu$ g/ml streptomycin を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用い, 5%CO<sub>2</sub>, 95%air の incubator 内で培養した. 12 穴 dish に 1.5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well で細胞を加え, 3 日後に confluence に到達後, 50 $\mu$ g/ml ascorbate, 0.4%FBS 加 DMEM に入れ替えて 24 時間培養した. その後 human TGF- $\beta$  (R&D, Minneapolis, USA), human IL-10 (Pharmingen, California, USA) 存在下にて, さらに 24 時間培養した.

#### 14) *in vitro* cell viability assay

Carmichael ら<sup>18)</sup> の方法に準じて MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) を用いて cell viability を測定した. すなわち, 96 穴 plate に WI-38 を 2.25 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well で加え, 13) と同様にして human TGF- $\beta$  または human IL-10 刺激 24 時間後, MTT を 50 $\mu$ g/well 加えて 6 時間培養した. 上清 150 $\mu$ l を除去後 DMSO (Wako, Osaka, Japan) 150 $\mu$ l を加えて formazan crystal を溶解し, 分光光度計にて 490nm

の吸光度を測定した.

#### 15) 統計学的検討

すべての数値は mean $\pm$ SD で示した. 統計学的解析には, 対応の無い Student's t-test を用い危険率 5% 以下を有意差ありとした. ただし, マウス血清中の TNF- $\alpha$  については Man-Whitney U 検定を用いた.

## 結 果

### 1) プレオマイシン肺傷害モデルにおける肺の炎症と線維化の経時的変化

プレオマイシン投与による肺傷害の経時的変化を知るため, 肺への好中球の集積を反映し炎症の指標となる MPO 活性と, 肺の膠原線維量を反映し線維化の指標となる hydroxyproline 量を測定した.

プレオマイシン投与後 0, 3, 7, 14, 21 日後の BALF 中の MPO 活性を測定した. MPO 活性は投与前の 0.007 $\pm$ 0.002 に対して 3 日後には 0.007 $\pm$ 0.001 と変化を認めず, 7 日後には 0.123 $\pm$ 0.034 と上昇 (p<0.01) を認めた. また, 21 日後には 0.029 $\pm$ 0.034 で 7 日後に比較して有意に低下した (p<0.05). さらに肺の炎症の程度を反映すると思われる血清中の TNF- $\alpha$  濃度は, 7, 14 日後で有意に (p<0.05) 上昇し, 7 日後の 15.20 $\pm$ 10.77pg/ml がピークであった. 次にプレオマイシン投与後 0, 7, 14, 21 日後の肺の hydroxyproline 量を定量した. 7, 14, 21 日後の hydroxyproline 量は, 投与前に比較して有意に (p<0.05) 増加し, 21 日後の 417.0 $\pm$ 127.85 $\mu$ g/lung まで増加傾向を認めた.

したがって以下の実験では, プレオマイシン肺傷害に対する治療効果は, プレオマイシン投与後 7 日目の炎症に対する効果と 21 日目の線維化に対する効果で評価することとした.

### 2) pCA-hIL10 の *in vitro* での hIL-10 発現の確認

pCA-hIL10 を導入した A549 細胞の培養上清中の hIL-10 濃度は 55.2ng/ml で, 対照の A549 細胞上清では感度以下であった.

### 3) HVJ-liposome 法を用いた生体内遺伝子導入による hIL-10 発現の確認

hIL10-HVJ または Cont-HVJ を 7 週令オス C57/BL6 マウスの腹腔内に投与し, 1, 2, 3, 7 日後の血清中の hIL10 濃度を測定した. 無処置群および Cont-HVJ 群では感度以下であったのに対し, hIL10-HVJ 群では HVJ-liposome 投与 1 日後に 2.23 $\pm$ 2.30pg/ml と有意 (p<0.05) な増加を認めた. 次に hIL10-HVJ または

Cont-HVJ 腹腔内投与後 3 日目に phosphate buffered saline (PBS) 5 ml で腹腔内を洗浄し, 回収液中の hIL-10 濃度を測定した. hIL10-HVJ 群では  $2.47 \pm 0.53 \mu\text{g/ml}$  に対して Cont-HVJ 群では測定感度以下であった.

#### 4) プレオマイシン肺傷害モデルに対する hIL-10 の抑制効果

プレオマイシン投与による肺の炎症を IL-10 が抑制するかを検討するため以下の実験を行った. hIL10-HVJ または Cont-HVJ を 7 週令オス C57/BL6 マウスに腹腔内投与した 3 日後, プレオマイシンを経気道的に投与した. プレオマイシン投与後 7 日目に BALF 中の MPO 活性測定を行った (Figure 1 A). HVJ-liposome, プレオマイシンともに投与されなかった無処置群 ( $0.012 \pm 0.003$ ) に比較してプレオマイシンを投与した Cont-HVJ 群 ( $0.232 \pm 0.105$ ), hIL10-HVJ 群 ( $0.110 \pm 0.040$ ) では有意 ( $p < 0.01$ ) に MPO 活性の上昇を認めしたが, hIL10-HVJ 群では Cont-HVJ 群に比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に MPO 活性が抑制された. 同様にプレオマイシン投与後 7 日目に BAL を行い, RT-PCR 法にて BALF 細胞中の TNF- $\alpha$  mRNA の半定量を行った (Figure 1 B). Cont-HVJ 群 ( $0.229 \pm 0.097$ ) に比較して hIL10-HVJ 群 ( $0.120 \pm 0.061$ ) では有意 ( $p < 0.05$ ) な TNF- $\alpha$  mRNA の抑制効果を認めしたが, 無処置群 ( $0.086 \pm 0.056$ ) と hIL10-HVJ 群の間に有意差を認めなかった. プレオマイシン投与後 7 日目の血清 TNF- $\alpha$  は, Cont-HVJ 群 ( $28.54 \pm 43.17 \text{pg/ml}$ ) に比較して hIL10-HVJ 群 ( $1.78 \pm 4.36 \text{pg/ml}$ ) で, Man-Whitney U 検定にて低下傾向が認められた.

次に, IL-10 がプレオマイシン投与による肺の線維化を抑制するかを検討するため以下の実験を行った. プレオマイシン投与後 21 日目の全肺中の hydroxyproline を定量した (Figure 2). 無処置群 ( $221.4 \pm 5.5 \mu\text{g/lung}$ ) に比較してプレオマイシンを投与した Cont-HVJ 群 ( $405.5 \pm 69.4 \mu\text{g/lung}$ ), hIL10-HVJ 群 ( $307.8 \pm 23.2 \mu\text{g/lung}$ ) では有意 ( $p < 0.01$ ) に肺 hydroxyproline 量は増加したが, hIL10-HVJ 群では Cont-HVJ 群に比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に肺 hydroxyproline 量が減少した.

#### 5) IL-10, TGF- $\beta$ 刺激による肺線維芽細胞の human type1 collagen mRNA 量の変化

肺線維芽細胞の定常状態のコラーゲン産生に対する IL-10 の抑制効果, TGF- $\beta$  刺激下の肺線維芽細胞のコラーゲン産生増強に対する IL-10 の抑制効果を検討するため以下の実験を行った. ヒト肺線維芽細胞 WI-38 を 0.2 から  $20 \text{ng/ml}$  の IL-10 または 0.1 から  $10 \text{ng/ml}$  の TGF- $\beta$  を加えた 0.4% FBS,  $50 \mu\text{g/ml}$  ascorbate 加 DMEM

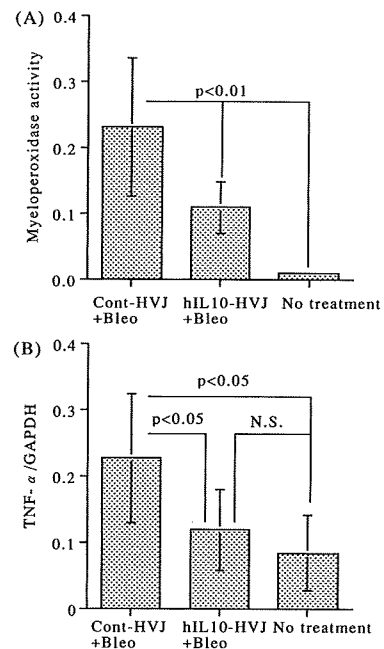


Figure 1 Mice received HVJ-liposome i. p. on day -3 and bleomycin i. t. on day 0 were sacrificed on day 7 and BAL was performed to quantify MPO activity and mRNA of TNF- $\alpha$  in BALF cells. Total RNA of BALF cells was extracted and reverse-transcribed. cDNA of TNF- $\alpha$  and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific sets of primers. PCR products were electrophoresed in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The density of the products were calculated with FMBIO II Multi-View System. TNF- $\alpha$  mRNA amount was presented as ratio of PCR product density, TNF- $\alpha$ /GAPDH. MPO activity (A) and mRNA of TNF- $\alpha$  (B) of hIL10-HVJ treated mice decreased significantly ( $p < 0.01$ ) as compared with Cont-HVJ treated mice. (C) Serum TNF- $\alpha$  slightly decreased (Man-Whitney U test,  $p < 0.10$ ) by hIL10-HVJ treatment. Values are presented as mean  $\pm$  SD. N. S. : Not significant.

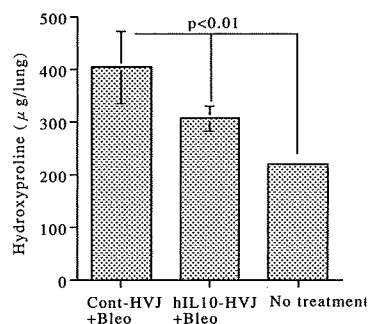


Figure 2 Mice received HVJ-liposome i. p. on day -3 and bleomycin i. t. on day 0 were sacrificed on day 21 and hydroxyproline of whole lung was quantified. Lung hydroxyproline content of hIL10-HVJ treated mice decreased significantly ( $p < 0.01$ ) as compared with Cont-HVJ treated mice. Values are presented as mean  $\pm$  SD.

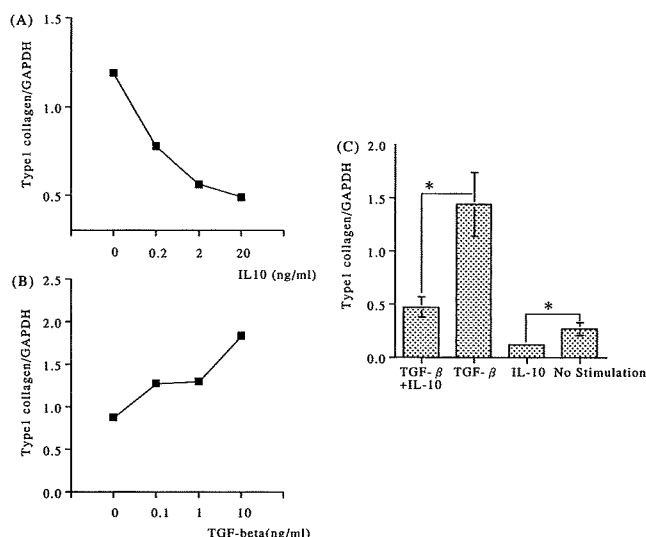


Figure 3 Human lung fibroblast, WI-38, was stimulated by IL-10 and/or transforming growth factor (TGF) - $\beta$ , and mRNA of type I collagen and GAPDH were quantified by competitive PCR described in Methods. Type I collagen mRNA amount was presented as ratio to GAPDH. Type I collagen mRNA decreased by IL-10 (A) and increased by TGF- $\beta$  (B) in a dose-dependent manner. (C) IL-10 (20ng/ml) blocked TGF- $\beta$  (10ng/ml) -induced upregulation of type I collagen mRNA significantly (\*:  $p < 0.05$ ). Values are presented as mean  $\pm$  SD.

中で 24 時間培養後の human type I collagen mRNA 量を competitive PCR 法にて定量した。type I collagen mRNA は IL-10 により dose dependent に減少し (Figure 3 A), TGF- $\beta$  (Figure 3 B) により dose dependent に増加した。一方, TGF- $\beta$  (10ng/ml) の単独刺激に比較して, IL-10 (20ng/ml) と TGF- $\beta$  (10ng/ml) の同時刺激により type I collagen mRNA は有意 ( $p < 0.05$ ) に減少した (Figure 3 C)。TGF- $\beta$ , IL-10 刺激後の cell viability は, 無刺激時と比較して有意差を認めなかった。

## 考 察

IL-10 は肺の炎症に対して抑制効果を示した。肺への好中球集積を反映する MPO 活性のプレオマイシン投与後の経時的変化から, 炎症のピークは投与後 7 日目にあると考えられた。この 7 日目における BALF 中の MPO 活性, BALF 細胞中の TNF- $\alpha$  mRNA は hIL10-HVJ の投与により有意に抑制されており, IL-10 はプレオマイシンによる肺の炎症を著明に抑制することが示された。免疫複合体誘発性肺傷害モデルに対する recombinant IL-10 の経気道的投与実験<sup>14)</sup>で, 肺血管内皮細胞上の intercellular adhesion molecule (ICAM) -1 の発現の減少が示されている。したがって, プレオマイシン肺傷害モデルにおいても BALF 細胞の主体をなす肺胞マクロファージの活性化の抑制とともに, 肺血管内皮細胞上の接着因子の発現抑制により, 好中球浸潤が抑制された

ものと考えられる。

IL-10 は炎症を抑制するとともに慢性期の肺の線維化に対しても抑制効果を示した。プレオマイシン肺傷害モデルにおいて膠原線維量を反映する hydroxyprilene 量にて評価される線維化の程度は, 投与後 21 日目まで増強を続けるが, 21 日目の hydroxyproline 量は hIL10-HVJ の投与により有意に抑制された。

今回 HVJ-liposome 法による生体内遺伝子導入により持続的発現を試みたのは, IL-10 の血中半減期が 30 分程度<sup>15)</sup>と非常に短いためである。導入後の血中濃度のピークは HVJ-liposome 投与後 1 日目で約 2 pg/ml, 腹腔洗浄液中では約 3 pg/ml であった。in vitro において IL-10 は 200pg/ml から 20ng/ml 程度の濃度で抗炎症効果<sup>16)</sup>を示すことから, 肺において抗炎症効果を期待するには必ずしも十分な結果とは言えない。しかし, IL-10 は in vitro において TNF- $\alpha$  や basic fibroblast growth factor 刺激による血管平滑筋細胞の増殖に対して 10fg/ml から 1 pg/ml という低濃度で抑制効果を示すとの報告<sup>17)</sup>もある。また, liposome の腹腔内投与を用いた luciferase 遺伝子導入による系で肺に luciferase 活性を認めた報告<sup>18)</sup>もあり, hIL10-HVJ 投与マウスの BALF 中の hIL-10 は感度以下ではあったが (data not shown), 肺局所での発現が効果をもたらした可能性も考えられる。

IL-10 はプレオマイシン投与後の肺の炎症, 線維化とともに抑制することが示されたが, 線維化抑制の作用機序の解析のため, 肺線維芽細胞に対する IL-10 の in

*in vitro*における効果を検討した。これまでの他臓器の細胞外マトリックス産生細胞に対する検討では、定常状態<sup>19)</sup>や癒痕部分<sup>20)</sup>の皮膚線維芽細胞に対する1型コラーゲン産生抑制効果、骨髄間質細胞の骨基質産生細胞への分化抑制効果<sup>21)</sup>が報告されている。しかし、肺線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生に対するIL-10の直接効果については未だ検討されていない。今回の検討では、IL-10は肺線維芽細胞の定常状態でのコラーゲン産生とともにTGF- $\beta$ 刺激下でのコラーゲン産生をも抑制することが示された。したがって、プレオマイシン肺傷害マウスに対するhIL10-HVJの抗線維化効果は炎症の抑制を介するだけでなく、線維芽細胞に対する直接効果の可能性が示唆された。

線維化に対するIL-10の直接効果については、一見今回の結果に矛盾すると思われる報告もある。Huaxら<sup>22)</sup>は、IL-10 knockout mouse に対し経気道的にシリカを投与すると、24時間後のBALF中のlactate dehydrogenase活性、総蛋白、総細胞数の増加といった炎症所見は正常マウスに比べて増強するが、30日後の線維化は軽減するため、IL-10は線維化に促進的に働く可能性があるとして報告している。しかし、シリカによる肺線維化モデルで初期の細胞浸潤等の炎症所見が強い程、線維化が弱くなることは、これまでにも報告されている。シリカ投与マウスに経気道的に白血球遊走因子を投与すると線維化は抑制され<sup>23)</sup>、放射線照射にて初期の炎症反応を抑制すると線維化は亢進する<sup>24)</sup>。この現象は、炎症が強い方が肺胞から速やかにシリカが除去され、最終的な線維化が抑制されるためと考えられている。つまりHuaxらの結果は必ずしもIL-10の線維化促進効果を示唆するものではない。しかし、IPF治療に対するIL-10の応用を考えた場合、線維化に対する直接作用は重要な意味を持つ。したがってIL-10 knockout mouseのプレオマイシン反応性や*in vitro*における肺線維芽細胞の増殖に対する効果などによりさらに慎重に検討する必要があると思われる。

プレオマイシン肺傷害においてIL-10の抑制効果が示されたが、一般にプレオマイシン肺傷害に対して有効な薬剤が必ずしもIPFに有効な訳ではない。炎症のみを抑制する薬剤は、炎症期から線維化期へと比較的均一に病変が変化するプレオマイシン肺傷害に対しては、炎症の抑制を介して線維化にも有効であるが、炎症病巣と線維化病巣が混在することが組織学的な特徴であるIPFに対しては著明な線維化抑制効果を示さないのではないかと考えられる。ステロイドは多彩な抗炎症作用とともにコラーゲン産生抑制効果を有し、プレオマイシン肺傷害モデル<sup>25)</sup>のみならずIPFに対しても有効性が期待されたが、多くの場合無効で予後の改善効果はない。一般的にステロイドはマクロファージや単球からの炎症性サイトカイ

ンと同時にIL-10の産生も抑制し<sup>26)</sup>、線維化に関わるTGF- $\beta$ <sup>27)</sup>やPDGF<sup>28)</sup>の肺胞マクロファージでの産生を抑制しない。IPFにおいてTGF- $\beta$ は肺胞マクロファージだけではなく、線維化病巣の気道上皮細胞からも分泌され<sup>29)</sup>、これらはステロイドによる制御を受けないため十分な線維化抑制効果が得られなかったと考えられる。

一方、IL-10は抗炎症作用、肺線維芽細胞に対するコラーゲン産生抑制効果とともに、マクロファージからのTGF- $\beta$ 産生抑制効果<sup>30)</sup>を示し、ステロイドよりも強力な線維化抑制効果が期待される。また、肝臓の細胞外マトリックスの主たる産生細胞であるhepatic stellate cell (HSC)をTGF- $\beta$ で刺激するとIL-10の分泌が増加し、HSCのコラーゲン産生は抗IL-10抗体の添加により増強することから、HSCにおいてIL-10はTGF- $\beta$ にnegative feedbackに働く<sup>31)</sup>とする報告もある。肺線維芽細胞からのIL-10産生の報告は現在のところ認めていないが、IPFの肺胞マクロファージ中のIL-10mRNAは健常人に比べ増加しているにもかかわらず、BALF中のIL-10は減少している<sup>32)</sup>ことから、IL-10はIPFの病態において中心的な意義を持つとも考えられる。そういった意味でも、IL-10はIPFの新しい治療となる可能性を秘めている。

IPFに対するステロイドに替わる治療としては、D-penicillamine<sup>33)</sup>やCyclosporin<sup>34)</sup>が試みられているが、現在のところ著明な効果を得るには至っていない。IL-10は健常人に対して短期投与では目立った副作用を示していない<sup>35)</sup>ことから臨床応用も期待されるが、systemic lupus erythematosus (SLE)の発生、病態にIL-10が関与している可能性を示唆する報告<sup>36, 37)</sup>もあり、長期投与による副作用については今後さらに検討が必要と考えられる。

#### 参考文献

- 1) Carrington CB, Gaensler EA, Coutu RE, Fitzgerald MX, Gupta RG. Natural history and treated course of usual and desquamative interstitial pneumonia. *N Engl J Med* 298:801-809, 1978
- 2) Izumi T, Nagai S, Kondo Y, Tamura M. Ten-year follow up of 222 patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) -a nation-wide survey report in Japan. *Am Rev Respir Dis* 145:A218, 1992
- 3) Moore KW, Rousset F, Banchereau J. Evolving principles in immunopathology:interleukin 10 and its relationship to Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Springer Semin Immunopathol* 13:157-166, 1991
- 4) Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW,

- Billah MM. Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood* 83:2678-2683, 1994
- 5) Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation *in vivo* by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol* 271:L566-L571, 1996
  - 6) Walmsley M, Katsikis PD, Abney E, Parry S, Williams RO, Maini RN, Feldmann M. Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen induced arthritis. *Arthritis Rheum* 39:495-603, 1996
  - 7) Wynn TA, Morawetz R, Scharton-Kersten T, Hieny S, Morse III HC, Khun R, Muller W, Cheever AW, Sher A. Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2-type cytokine responses *in vivo*. *J Immunol* 159:5014-5023, 1997
  - 8) Wallace WA, Ramage EA, Lamb D, Howie SE. A type-2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA). *Clin Exp Immunol* 101:436-441, 1995
  - 9) Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-200, 1991
  - 10) Kato K, Kaneda Y, Sakurai M, Nakanishi M, Okada Y. Direct injection of hepatitis B virus DNA into liver induced hepatitis in adult rats. *J Biol Chem* 266:22071-22074, 1991
  - 11) Denis M, Guojian L, Widmer M, Cantin A. A mouse model of lung injury induced by microbial products: implication of tumor necrosis factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10:658-664, 1994
  - 12) Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch Biochem Biophys* 93:440-447, 1961
  - 13) Carmichael J, Degraff EG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay; assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942, 1987
  - 14) Shanley TP, Schmal H, Friedl HP, Jones MH, Ward PA. Regulatory effects of intrinsic IL-10 in IgG immune complex-induced Lung Injury. *J Immunol* 154:3454-3460, 1995
  - 15) Gerard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenaabee P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 177:547-50, 1993
  - 16) Thomassen MJ, Divis LT, Fisher CJ. Regulation of human alveolar macrophage inflammatory cytokine production by interleukin-10. *Clin Immunol Immunopathol* 80:321-324, 1996
  - 17) Selzman CH, McIntyre Jr. RC, Shames BD, Whitehill TA, Banerjee A, Harken AH. Interleukin-10 inhibits human vascular smooth muscle proliferation. *J Mol Cell Cardiol* 30:889-896, 1998
  - 18) Thierry AR, Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, Rabinovich PR, Gallo RC, Mahan LC. Systemic gene therapy: Biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9742-9746, 1995
  - 19) Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloproteinase gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 94:2489-2492, 1994
  - 20) Wangoo A, Laban C, Cook HT, Glenville B, Shaw RJ. Interleukin-10 and corticosteroid-induced reduction in type I procollagen in a human ex vivo scar culture. *Int J Exp Path* 78:33-41, 1997
  - 21) Vlasselaer PV, Borremans B, Dasch UV, JR, Waal-Malefyt RD. Interleukin 10 inhibits transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) synthesis required for osteogenic commitment of mouse bone marrow cells. *J Cell Biol* 124:569-577, 1994
  - 22) Huaux F, Louahed J, Hudspith B, Meredith C, Delos M, Renaud JC, Lison D. Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:51-59, 1998
  - 23) Adamson IYR, Friedl H, Bowden DH. Instillation of chemotactic factor to silica-injected lungs lowers interstitial particle content and reduces pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 141:319-326, 1992
  - 24) Adamson IYR, Letourneau HL, Bowden DH. Enhanced macrophage-fibroblast interactions in the pulmonary interstitium increases fibrosis after silica injection to monocyte-depleted mice. *Am J Pathol* 134:411-418, 1989
  - 25) Phan SH, Thrall RS, Williams C. Bleomycin-induced lung fibrosis: effects of steroid on lung collagen metabolism. *Am Rev Respir Dis* 124:428-

- 434, 1981
- 26) Brattsand R, Linden M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment Pharmacol Ther* 10 (Suppl.2): 81-90, 1996
- 27) Batuman OA, Ferrero AP, Diaz A, Jimenez SA. Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1 gene expression by glucocorticoid in normal human T lymphocytes. *J Clin Invest* 88:1574-1580, 1991
- 28) Haynes AR, Shaw RJ. dexamethason-induced increase in platelet-derived growth factor (B) mRNA in human alveolar macrophage and myelomonocytic HL60 macrophage-like cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:198-206, 1992
- 29) Khalil N, O'Connor R, Unruh H, Warren P, Kemp A, Berezney O, Flanders K, Greenberg AH. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth-factor beta (TGF- $\beta$ ) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:155-162, 1990
- 30) Linder H, Holler E, Ertl B, Multhoff G, Schreglmann M, Klauke I, Schultz-Hector S, Eissner G. Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and prevent repair: Role of cytokines. *Blood* 89:1931-1938, 1997
- 31) Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin-10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 273:302-308, 1998
- 32) Martinez JA, King TE, Jr., Brown K, Jennings CA, Borish L, Mortenson RL, Khan TZ, Bost TW, Riches DW. Increased expression of the interleukin-10 gene by alveolar macrophages in interstitial lung disease. *Am J Physiol* 273:L676-L683, 1997
- 33) Selman M, Carrillo G, Salas J, Padilla RP, Perez-Chavira R, Sansores R, Chapela R. Colchicin, D-penicillamine, and predonisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a controlled clinical trial. *Chest* 114:507-512, 1998
- 34) Venuta F, Rendina EA, Ciriaco P, De Giacomo T, Pompeo E, Bachetoni A, Ricci C. Efficacy of cyclosporine to reduce steroids in patients with idiopathic pulmonary fibrosis before lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 12:909-914, 1993
- 35) Huhn RD, Radwanski E, Gallo J, Affrime MB, Sabo R, Gonyo G, Monge A, Cutler DL. Pharmacodynamics of subcutaneous recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 62:171-180, 1997
- 36) Hagiwara E, Gourley MF, Lee S, Klinman DK. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10: interferon-gamma-secreting cells in the peripheral blood. *Arthritis Rheum* 39:379-385, 1996
- 37) Mehrian R, Quismorio FP Jr, Strassmann G, Stimmeler MN, Horwitz DA, Kitridou RC, Gauderman WJ, Morrison J, Brautbar C, Jacob CO. Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:596-602, 1998

# NAC 吸入による BAL 液中ケモカインおよび 脂質過酸化抑制効果の検討

萩原 真一 石井 芳樹 北村 諭\*

【目的】ブレオマイシン (BLM) 肺臓炎の病態におけるケモカインの役割と酸化的負荷の指標として過酸化脂質量を BAL 液中で経時的に測定し, N-acetylcysteine (NAC) の吸入がこれらを抑制するか否かを検討した。【対象と方法】ICR マウスに対して, BLM 150mg/ml を尾静脈内投与し, NAC は 70mg/ml 濃度のものを一回につき 30ml, 一日 2 回, 30 分ずつ 4 週間吸入させた。day0 (BLM 投与直前), BLM 投与後 day 3, 7, 14, 21, 28 に BAL を施行して, BAL 液中の MIP-2, KC, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 を ELISA 法にて, また, BAL 液中の過酸化脂質量を測定し, 生食静注+NAC 吸入群, BLM 静注+生食吸入群, BLM 静注+NAC 吸入の 3 群間において比較検討した。【結果と結論】MIP-2, KC, MIP-1 $\alpha$  は BLM 静注+生食吸入群において day7 に, 過酸化脂質は day 3, 7, 14 に有意な上昇を認め, BLM 静注+NAC 吸入群はこれらの上昇を有意に抑制した。NAC の吸入は BLM 肺臓炎においてケモカインおよび脂質過酸化を抑制することにより肺臓炎を軽減するものと思われる。

## Effect of NAC Inhalation on Chemokines and Lipid Peroxides Production in BALF in BLM-induced Pneumonitis

Shin-ichi Hagiwara, Yoshiki Ishii, Satoshi Kitamura

*Department of Pulmonary Medicine, Jichi Medical School, Tochigi 329-0498, Japan*

【Purpose】In order to clarify the role of chemokines and reactive oxygen species (ROSs) in the pathophysiology of bleomycin (BLM)-induced pneumonitis, we have measured CXC and CC chemokines and lipid hydroperoxide (LPO) in BALF, and examined whether inhaled NAC represses these chemokines and LPO production. 【Materials and Methods】Male ICR mice were given a single intravenous injection of BLM (150mg/kg). Thirty milliliters of NAC (70mg/ml) or saline was inhaled twice a day for 28 days using an ultrasonic nebulizer. BAL was performed on day 0 (just before BLM or saline injection), 3, 7, 14, 21 and 28. MIP-2, KC, MIP-1 $\alpha$  and MCP-1 were measured in BALF by ELISA at corresponding day. LPO was also quantified in BALF by colorimetric assays.

【Results and Conclusion】Total cell count in BALF was significantly increased at day 7 with the maximum level of neutrophils and lymphocytes counts, and this cellular accumulation was decreased by NAC. MIP-2, KC and MIP-1 $\alpha$  were mostly elevated on day 7 in BLM alone group, however these elevations were significantly repressed by NAC inhalation ( $p < 0.05$ ). MCP-1 was gradually increased until day 14 and the elevated level remained unchanged until day 28, and NAC inhalation tended to attenuate the elevation during this period, but statistically not significant. LPO was markedly increased on day 3 in the BLM alone group, and this increase was significantly repressed by NAC inhalation ( $p < 0.05$ ). These results suggested that aerosolized administration of NAC attenuated BLM-induced pneumonitis via the repression of chemokines and LPO productions.

はじめに

間質性肺炎の病態に oxidant-antioxidant の不均衡が深く関与していることから、我々はこれまで間質性肺炎に対する antioxidant 補充療法として N-acetylcysteine (NAC) の吸入投与を試みてきた。NAC は経口または経静脈内投与では血中で代謝されてしまい、肺組織や BAL 液中には NAC として到達、作用させることはほとんど不可能である<sup>1,2)</sup>。元来、NAC にはその分子構造の SH 基に由来する還元作用により、それ自体 free radical の消去能を有しているが、そのほかにも GSH の基質となり、細胞内レドックス環境を安定化させることより、E-selectin, ICAM-1 などの接着分子発現や<sup>3)</sup> TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1 などのサイトカイン産生を抑制したり<sup>4,5)</sup>、肺線維芽細胞の増殖の抑制<sup>6)</sup> や matrix metalloproteinase (MMP) の活性化を制御するなど<sup>7)</sup>、広く抗炎症、抗線維化作用の期待される薬剤である。このような NAC の多様な作用を引き出すには直接肺に吸入させることは理にかなった方法と考えられる。マウスのブレオマイシン (BLM) 肺臓炎モデルを用いた検討では、NAC の吸入は BLM 誘発性肺臓炎において、好中球、リンパ球、マクロファージの浸潤を抑制することにより胞隔炎を軽減し、引き続き肺線維化を抑制することを報告してきた<sup>8)</sup>。

今回、NAC 吸入による BLM 肺臓炎の軽減の機序を調べる目的に、BAL 液中のケモカインおよび肺内酸化的負荷の指標として過酸化脂質産生量を測定し、NAC 吸入によりこれらが抑制されるか否かを検討した。

対象と方法

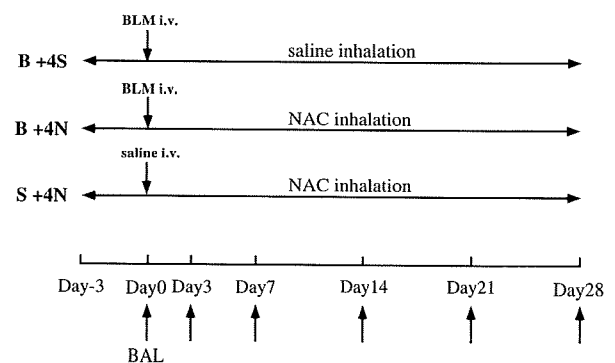
7 週齢雄性 ICR マウスを対象として、BLM は 150mg/kg B. W. を 0.2ml の生理食塩水に溶解し、尾静脈より単回投与して肺臓炎モデルを作製した。検討グループは 3 群に分けて検討した。尾静脈より BLM を投与し生理食塩水を 4 週間吸入させた B+4S 群、BLM 静注と NAC の 4 週間吸入を行った B+4N 群、生理食塩水静注と NAC 吸入を行った S+4N 群である (表 1)。なお、生理食塩水静注後 NAC の吸入群と生理食塩水吸入群とでは肺の線維化所見、BALF 細胞所見に影響を認めないことを確認していることから、今回の実験においても NAC 単独吸入群をコントロールとして用いた。NAC は生理食塩水で溶解し 70mg/ml の濃度として 30ml を 1 回につき 30 分、1 日 2 回、超音波ネブライザーを用いて、チャンバー (容積 45L) の中で吸入させた。なお、NAC の吸

入は BLM 投与 3 日前から開始して投与後 28 日目まで連日行った。BLM 投与直前 (day0), BLM 投与後 3 日目 (day3), 7 日目 (day7), 14 日目 (day14), 21 日目 (day21) および 28 日目 (day28) に全肺に対して BAL を施行した。BAL は全肺に対して生理食塩水 1 ml ずつを計 5 回繰返した。得られた BAL 液では細胞数と細胞分画の検討を行った後、1000rpm, 10 分間遠心分離しその上清の一部をケモカイン測定用に -20℃ に凍結保存し、また上清の一部は過酸化脂質測定用に過酸化脂質抽出後 -80℃ で凍結保存した。

CXC ケモカインとして macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), cytokine induced neutrophil chemoattractant (KC), また CC ケモカインとして macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) をそれぞれ ELISA kit にて測定した。過酸化脂質は Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay kit (CAYMAN CHEMICAL) を用いて測定した。

統計学的検討は unpaired-t test を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

表 1 Study design



結 果

(1) NAC 吸入後の BAL 細胞の変化

BAL 液中総細胞数は、BLM 投与後 7 日目より有意に上昇し、14 日目にピークに達した後は細胞数の増加した状態が 28 日目まで持続した。マクロファージ数も総細胞数の変化とほぼ同様な経過を示した。NAC の吸入により総細胞数、マクロファージ数の増加は抑制される傾向を示した。好中球数は 7 日目に最も上昇し、14 日目以降は急速に減少した。リンパ球数も 7 日目に上昇し、14 日目をピークとしてその後急速に減少した。NAC の吸入は、好中球数、リンパ球数の 7 日目、14 日目の増加を有意に抑制した (図 1)。

自治医科大学呼吸器内科

\* びまん性肺疾患分科会 分科会員 (監事)



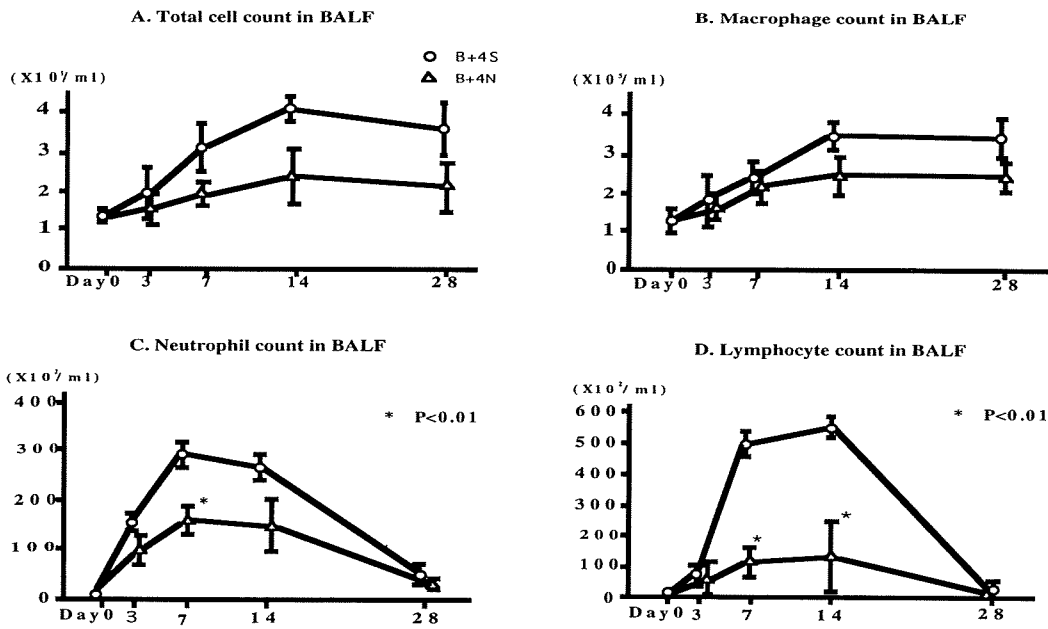


図1 BLM静注後4週間のNAC吸入によるBAL液中総細胞数, 細胞分画の変化. 総細胞数はday7に有意に上昇し, その上昇傾向はday28まで持続した (A). マクロファージ数も総細胞数と同様の傾向を示した (B). 好中球数 (C), リンパ球数 (D) はそれぞれday7, day14に最大となった. NACの吸入により好中球数, リンパ球数は有意に減少した. (測定はそれぞれのポイントで全てn=3)

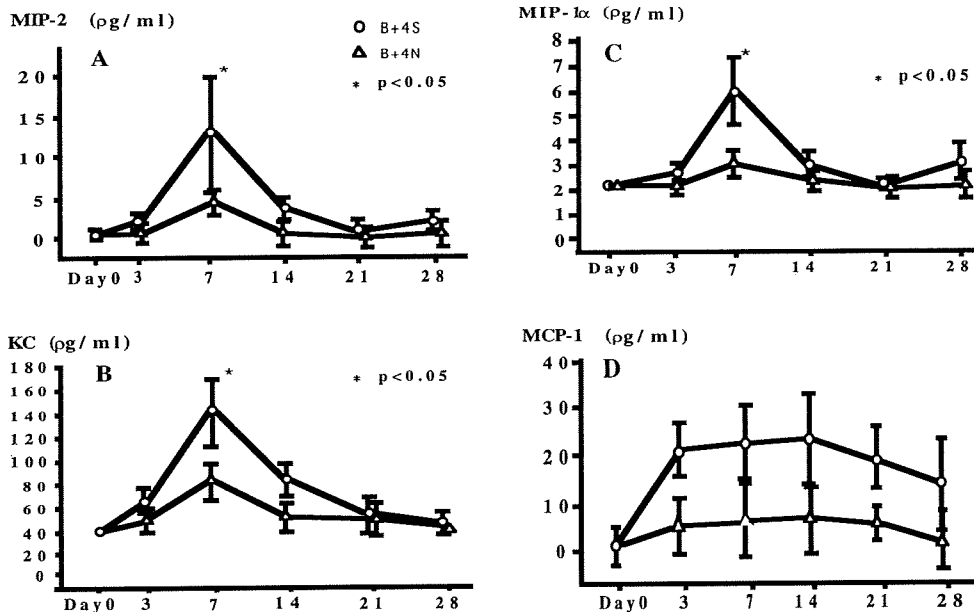


図2 CC chemokineであるMIP-1 $\alpha$ とCXC chemokineであるMIP-2, KCはB+4S群でday7に上昇ピークを認めた. これらの上昇はNACにより有意に抑制された. もう一つのCC chemokineであるMCP-1はB+4S群でBLM静注後day3より徐々に上昇し, day14以降徐々に低下した. NACの吸入はこの上昇を抑制する傾向を示した. S+4N群のMIP-1 $\alpha$ , MCP-1, MIP-2は測定感度以下であった. KCレベルは4週間を通して約40ng/mlであった. (測定はそれぞれのポイントで全てn=3)

(2) NAC 吸入後の BAL 液中ケモカインの変化

マクロファージに対するケモカインである MCP-1 は BLM 投与後 3 日目より徐々に上昇し始め, 14 日目まで上昇した後, 徐々に減少する経過が認められた. NAC の吸入によりこの上昇は抑制される傾向を示した. マク

ロファージ, リンパ球に対するケモカインである MIP-1 $\alpha$  は, 7 日目に上昇が認められ, その後急速に低下した. NAC はこの 7 日目の上昇を有意に抑制した. 好中球に対するケモカインである MIP-2, KC は, とともに MIP-1 $\alpha$  同様 BLM 投与後 7 日目に上昇が認められ, その後急

速に低下した。NAC は7日目の上昇を有意に抑制した(図2)。

### (3) NAC 吸入後の BAL 液中過酸化脂質の変化

過酸化脂質の生成量は BLM 投与後3日目に最上昇し、7、14日目にも軽度の上昇が認められた。NAC 吸入群では BLM 投与後3、7、14日目の産生を有意に抑制した(図3)。

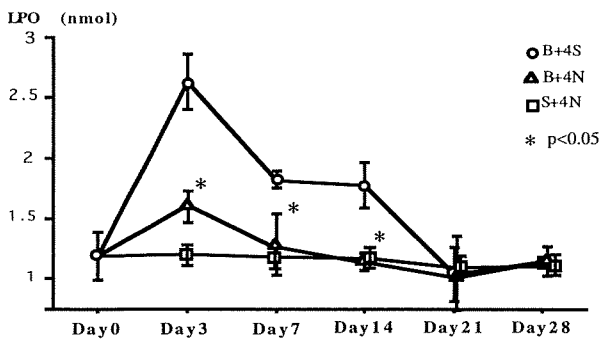


図3 BAL液中過酸化脂質量の変化。  
BAL液中過酸化脂質はday3で最大に増加し、NACの吸入はday3、7、14の増加を有意に抑制した。  
(測定はそれぞれのポイントでn=3)

## 考 察

我々はこれまでマウスの BLM 肺臓炎モデルを用いて NAC の吸入投与により、肺臓炎および肺線維化が抑制されることを報告してきた。今回はその抑制の機序を調べるために、種々の炎症細胞の遊走と活性化に重要なケモカインの産生に対する NAC 吸入の効果と、肺内の oxidant-antioxidant の不均衡に由来する肺内の酸化ストレスの指標として BAL 液中の過酸化脂質量を測定し、NAC の吸入によりその生成が抑制されるか否かを検討した。

まず、BAL 細胞の検討では、総細胞およびマクロファージ数は4週間の経過の中で、BLM 投与後14日目をピークとして上昇したが、その後も細胞数の増加した状態が28日目まで持続した。一方、好中球は7日目に、またリンパ球数は14日目をピークとして BLM 投与後7~14日に上昇を認めたが、その後は急速に減少した。NAC の吸入は BAL 液中の好中球、リンパ球数の増加を有意に抑制した。これらの細胞の遊走、活性化には、それらに特異的な chemoattractant としてケモカインが重要な役割を果たしている。単球/マクロファージ、リンパ球に対するケモカインとして MCP-1、MIP-1 $\alpha$  を、また好中球に対するケモカインとして MIP-2、KC を測定したところ、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-2、KC についてはその BAL 液中の細胞数の変化に対応するように、NAC の吸入は

有意差をもって抑制した。MCP-1 についても有意差は得られなかったものの、明らかに抑制する傾向が認められた。

我々はすでに *in vitro* の系において、BLM によって IL-8、MCP-1 の産生亢進や ICAM-1、E-Selectin などの接着分子発現増強が、NAC により抑制されることを示してきた。これらのケモカインと接着分子は転写因子である NF- $\kappa$ B の活性化により産生が刺激されることが報告されている<sup>9)</sup>。NAC は NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することから<sup>10, 11)</sup>、NF- $\kappa$ B の不活化を介してケモカイン産生と接着分子発現を抑制し、それによって肺内への細胞集積を減少させたものと考えられる。細胞浸潤を伴う肺の炎症が、何故引き続く肺線維化を引き起こすのかはまだ解明されていない。しかしながら、BLM 誘発肺線維症ウサギモデルでは肺傷害の重症度と其後の肺線維化との間に相関関係が認められている<sup>12)</sup>。

NAC の抗炎症効果のもう一つの作用は抗酸化作用にあると考えられる。我々は、酸化ストレスの一つの指標である過酸化脂質を BAL 液中で測定した。その結果、NAC の肺内への直接吸入により活性酸素種の消去作用が確認できた。BLM 誘発肺傷害の機序として活性酸素種が関与しているという多くの報告があり、その細胞傷害の機序はフリーラジカル産生を介して、それによる DNA 切断<sup>13)</sup>と細胞膜の脂質過酸化によると考えられる<sup>14)</sup>。Norbert は BLM と NAC をラット肺の経気管内に投与して、病理学的変化が BLM 単独投与に比べて軽度であり、BLM の肺毒性をほぼ完全に防御することを証明した<sup>15)</sup>。BLM の投与経路については Norbert らとは異なるが、我々の data も同様の結果を示した。これまでの検討から気道上皮被覆液 (Epithelial Lining Fluid ; ELF) 中の GSH は NAC の吸入投与で補うことが可能であることから、NAC の吸入による肺傷害の抑制は NAC による直接的なフリーラジカル消去能とグルタチオン生成を介したレドックスサイクルの増強といった両面から得られたものと考えられる。

我々はまた CXC、CC ケモカインの上昇に先立ち、過酸化脂質が生成されることを示した。これらの所見は reactive oxygen radical がケモカイン産生より早期に放出され、それらが IL-1 や TNF- $\alpha$  などのサイトカイン産生を介して、または直接にケモカイン遺伝子発現の活性化を誘導した可能性を示唆している。

以上をまとめると、NAC 吸入は BLM 誘発性急性肺臓炎と引き続く肺線維化に関して抑制効果を示した。その抑制機序として NAC それ自身によるケモカイン産生抑制または reactive oxygen radicals の消去による細胞傷害の軽減による可能性が考えられた。

## 結 論

(1) NAC 吸入は BLM 投与後急性期の炎症細胞浸潤を抑制することにより、引き続き線維化を抑制したものと考えられた。

(2) 炎症細胞浸潤の抑制は肺局所における free radical の除去による直接的な細胞傷害の軽減と、ケモカイン産生の抑制を介しているものと考えられた。

## 参考文献

- 1) Cotgreave IA., Eklund A., Larsson K., Moldeus PW.. No penetration of orally administered N-acetylcysteine into bronchoalveolar lavage fluid. *Eur J Respir Dis.* 70:73-77, 1987.
- 2) Bridgeman MME., Marsden M., Selby C., Morrison D., MacNee W.. Effect of N-acetyl cysteine on the concentrations of thiols in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue. *Thorax.* 49:670-675, 1994.
- 3) 坂東政司, 石井芳樹, 北村 諭. 肺血管内皮細胞における接着分子の発現とその制御—細胞内レドックス環境および転写因子 NF- $\kappa$ B の関与—. *炎症.* 19:39-46, 1999.
- 4) 石井芳樹, 山沢英明, 北村 諭. 肺細胞における接着分子の発現と制御—オキシダントの役割—. *日胸疾会誌.* 34, 増刊号: 126-130, 1996.
- 5) 石井芳樹, 萩原真一, 北村 諭. 肺の炎症と線維化における接着分子およびケモカインの役割. *日胸疾会誌.* 35, 増刊号: 214-220, 1997.
- 6) Cantin AM, Larivee P, Begin RO: Extracellular Glutathion Suppress Human Lung Fibroblast Proliferation. *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3:79-85, 1990.
- 7) Tyagi SC., Kumar S., Borders S.. Reduction-oxidation (redox) state regulation of extracellular matrix metalloproteinases and tissue inhibitors in cardiac normal and tranformed fibroblast cells. *J Cell Biochem.* 61:139-151, 1996.
- 8) 萩原真一, 石井芳樹, 北村 諭. N-acetylcysteine の吸入はブレオマイシン肺臓炎を抑制する. 厚生省特定疾患 呼吸器系調査研究班 びまん性肺疾患分科会 平成 8 年度研究報告書: 37-39, 1997.
- 9) Blackwell TS. and Christman JW.. The role of Nuclear- $\kappa$ B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 17:3-9, 1997.
- 10) Schreck R., Rieber P., Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *The EMBO Journal.* 10:2247-2258, 1991.
- 11) Tozawa K., Sakurada S., Kohri K., and Okamoto T.. Effects of anti-nuclear factor  $\kappa$ B reagents in blocking adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells. *Cancer research.* 55:4162-4167, 1995.
- 12) Shen AS., Haslet C., Feldsin DC., Henson PM., Cherniack RM. The intensity of chronic lung inflammation and fibrosis after bleomycin is directly related to the severity of acute injury. *Am Rev Respir Dis.* 137:564-571, 1988.
- 13) Trush MA., Mimnaugh EG., Ginsburgh E., Gram TE. Studies on the interaction of bleomycin A with rat lung microsomes. Involvement of adventitious iron and reactive oxygen in bleomycin-mediated DNA chain breakage. *J Pharmacol Exp Ther.* 221:159-165, 1982.
- 14) Passero MA., Held JK., Shearer PN. Effects of bleomycin, O<sub>2</sub> concentration, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on peroxidation of arachidonic acid. *Am Rev Respir Dis.* 127 suppl:287, 1983.
- 15) Norbert Berend. Inhibition of bleomycin lung toxicity by N-acetylcysteine in the rat. *Pathology.* 17:108-110.

# びまん性汎細気管支炎