

はじめに

肺線維症において、活性酸素は肺胞マクロファージや好中球などの炎症細胞から産生され、直接肺組織を傷害するほか、炎症反応を惹起し、その病態形成に大きく関与していると考えられる¹⁾。Superoxide dismutase (SOD) は1965年にウシ血液中の抗炎症蛋白として抽出され、1969年に活性酸素の一つである superoxide anion を特異的に除去することが明らかにされた。PC-SOD は、SOD の細胞親和性を高める目的で、recombinant human SOD にレシチン誘導体を共有結合させた chemically modified SOD であり、新しい肺線維症の治療薬として期待されている²⁾。一昨年度、我々はブレオマイシン (BLM) の腹腔内投与によるマウス肺線維症モデルに対して、PC-SOD を投与してその抑制効果について報告した³⁾。本年度は、PC-SOD がサイトカインネットワークに及ぼす影響を明らかにする目的にて、気管支肺胞洗浄 (BAL) より得られた細胞中のサイトカイン発現について RT-PCR 法を用いて検討を行った。

対象と方法

10週齢の雄性ICRマウスに10 mg/kg/日のBLMを腹腔内(ip)に連続10日間投与して肺線維症を作成した^{4,5)}。同モデルについて、以下の治療群あるいは対照群を設定した。A:生理食塩水(ip)および10%キシリトール溶液経静脈(iv)投与群、B:BLM(ip)および10%キシリトール溶液(iv)投与群、C:BLM(ip)およびPC-SOD 1 mg/kg/日(iv)投与群、D:BLM(ip)およびPC-SOD 10 mg/kg/日(iv)投与群、E:BLM(ip)およびメチルプレドニゾロン(mPSL) 15 mg/kg/日(iv)投与群の5群を設定した。PC-SOD、mPSLはBLMの腹腔内投与と同時に、連続10日間尾静脈より投与した。各群とも、10日間のBLM投与終了後の翌日(1日目)、29日目にエーテルによる吸入麻酔の後に頸椎脱臼を施して屠殺し、BALを施行した。BAL所見(総細胞数、細胞分類)およびBALより得られた細胞中のサイトカイン発現についてRT-PCR法を用いて検討をおこなった^{4,5)}。統計学的検討にはOne-factor ANOVAを用い、p値<0.05をもって有意差ありとした。

結 果

BLM投与(B群)によって、1日目および29日目のBAL細胞にIL-1 β 、PDGF-A mRNAの発現増強が認められた(図1)。

広島大学第二内科

* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

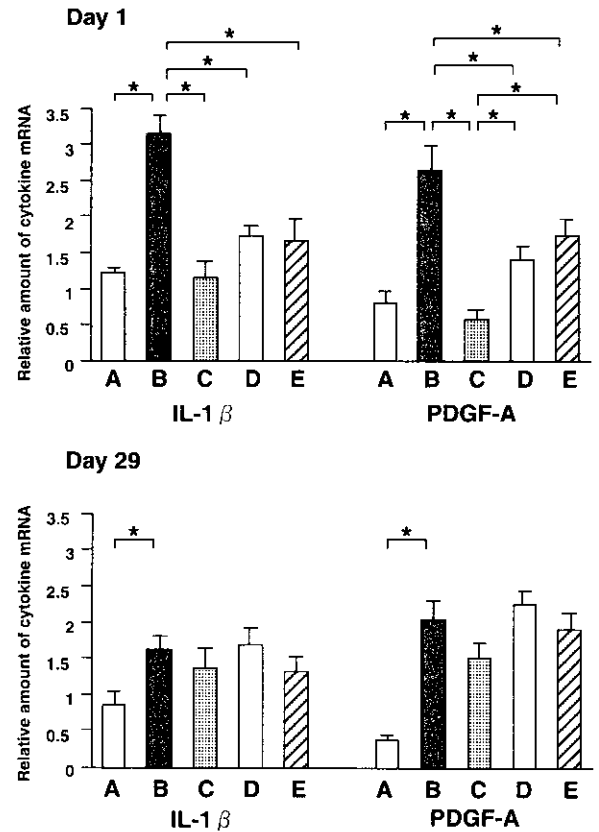


図1 BAL細胞におけるサイトカイン mRNA の発現。* p<0.01

1日目でのBAL細胞では、IL-1 β 、PDGF-AともにPC-SOD投与群(C、D群)およびmPSL投与群(E群)において、BLM投与群(B群)と比較して有意な発現の抑制が認められた。また、PDGF-Aについては、C群がD群、E群と比較して有意に発現が低かった。

29日目でのBAL細胞では、いずれの治療群でもBLM投与群(B群)と比較してIL-1 β およびPDGF-Aの有意な発現の抑制は認められなかった⁶⁾。

考案・結論

一昨年度、我々が報告したBLMの腹腔内投与によるマウス肺線維症モデルに対するPC-SODの治療効果についての検討では、PC-SOD 1mg/kg/日投与群で有意な線維化抑制効果が認められた。肺線維症において活性酸素は、肺胞マクロファージや好中球などの炎症細胞から産生され直接肺組織を傷害するほか、炎症反応を惹起し、その病態形成に関与していると考えられるが、その詳細については不明な点も多い。

本研究において認められた、PC-SODによる肺線維化抑制効果の発現の機序としては、(1)活性化BLMによる細胞傷害の抑制、(2)炎症反応、炎症細胞浸潤の抑制、(3)炎症細胞からの活性酸素除去、(4)線維芽細胞増殖

抑制などによる抗線維化作用等が考えられる。炎症細胞浸潤については、治療群として設定した3群いずれもBAL所見において総細胞数の減少を認めており、PC-SOD, mPSLともに抑制効果を有していると推察されるが、PC-SOD 1mg/kg/日投与群以外の群では線維化抑制効果は認められず、本モデルにおいて、線維化抑制のためには(3)、(4)の段階に対する作用が重要な位置を占めていると考えられた。

BAL細胞におけるサイトカイン mRNA 発現の検討では、すべての治療群において proinflammatory cytokine である IL-1 β の発現抑制が認められたが、線維芽細胞の強力な増殖因子である PDGF-A については、PC-SOD 1mg/kg/日投与群における発現抑制効果が他の治療群に比し有意に大きかった。これらの結果と、前回の我々の研究結果を合わせて考えると、肺線維化においてサイトカインが極めて重要な役割を果たしており、PC-SOD はサイトカイン発現を調節することにより線維化抑制効果を示している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Macnee W, Rahman I: Oxidants/antioxidants in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1995; 50 (Suppl): S53-S58.
- 2) Igarashi R, Hoshino J, Takenaga M, et al: Lecithinization of superoxide dismutase potentiates its protective effect against Forssman antiserum-induced elevation in guinea pig airways resistance. *J Pharmacol Exp* 1992; 262 (3): 1214-1219.
- 3) 山木戸道郎, 玉川孝太郎, 峠岡康幸, 前田晃宏, 前田裕行, 檜山桂子, 石岡伸一: プレオマイシン肺線維症モデルに対するレシチン化 SOD (PC-SOD) の抑制効果. 厚生省特定疾患呼吸器系疾患調査研究班びまん性肺疾患分科会平成9年度研究報告書 1998; 63-65.
- 4) Maeda A, Hiyama K, Yamakido H, et al: Increased expression of platelet-derived growth factor A and insulin-like growth factor-I in BAL cells during development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Chest* 1996; 109: 780-786.
- 5) Taooka Y, Maeda A, Hiyama K, et al: Effects of neutrophil elastase inhibitor on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Crit Care Med* 1997; 156: 260-265.
- 6) Tamagawa K, Taooka Y, Maeda A, et al: Inhibitory effects of a lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Resp Crit Care Med*, in press.

間質性肺炎の治療—マウス肺線維症モデルで抗 PDGF 抗体および trapidil による PDGF 抑制は肺の線維化を改善する—

大田 健* 中野 純一 有岡 仁 山下 直美

特発性間質性肺炎の病態の解明と新たな治療戦略の展開を目的に、シリカを用いたマウス肺線維症モデルで線維芽細胞の competence factor である血小板由来成長因子 (PDGF) について検討した。まず抗 PDGF 抗体を持続的に投与し、シリカ投与後 2 週目に気管支肺胞洗浄液 (BAL)、病理学的スコアとハイドロキシプロリン (HyP) について検討した。同抗体により BAL で炎症細胞の肺の集積が抑制され、病理および HyP も有意 ($p < 0.01$) に改善した。さらに PDGF の拮抗薬である trapidil (0.2 ~ 1mg/匹) を最初の 2 週間にわたり連日投与したところ BAL (好中球)、病理、HyP を有意に抑制した。さらにまた trapidil (1mg/匹) は線維化が成立した後の 2 週から 4 週目に投与しても BAL、病理、HyP を有意 ($p < 0.05$) に改善した。PDGF は間質性肺炎で重要であり、trapidil を含めその作用を抑制することは新たな治療として期待される。

New therapeutic strategy for idiopathic interstitial pneumonitis (IIP) — a-PDGF and trapidil inhibit the developing of pulmonary fibrosis in mice with silica particles —

K. Ohta, J. Nakano, H. Arioka, N. Yamashita

Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

It has been demonstrated that orchestration of inflammatory cells and pro-inflammatory cytokines is important for the processes of lung fibrosis. Here we focused on a role of platelet derived growth factor (PDGF) in the process of pulmonary fibrosis with silica.

Firstly, in this study we demonstrated that anti-PDGF antibody completely inhibited the inflammatory response and developing of fibrous changes in our murine model of lung fibrosis. Secondly, we attempted to clarify if trapidil which has an antagonistic effect to PDGF could avoid an inflammatory processes and abrogate the pulmonary fibrosis in our murine model. We administered 16mg silica particles to a C57BL/6 mouse intranasally to induce pulmonary inflammation and fibrosis. In some mice either trapidil 0.04, 0.2 or 1.0 (mg/mouse) was given daily via subcutaneous injection after the silica administration. At day 14 we studied histopathology, BALF and the content of hydroxyproline in the lung.

As results, the histopathological examination revealed that the treatment with trapidil suppressed the development of pulmonary inflammation and fibrosis according with significant suppression of neutrophil accumulation in BALF. Moreover, the increase of hydroxyproline content (mg/lung) with silica (295.1 ± 23.5 with saline vs 527.9 ± 21.5 with silica as mean \pm SEM, $p < 0.05$) significantly decreased by the treatment with trapidil 0.2 and 1.0 down to 284.2 ± 24.0 and 286.3 ± 22.0 respectively ($p < 0.05$), confirming that trapidil could inhibit pulmonary fibrosis in this study. Interestingly, in our further study trapidil suppressed the increase of hydroxyproline content even if it was given from day 14 to 28 when pulmonary fibrosis had already occurred by silica. These results demonstrated that trapidil suppressed the inflammatory changes and fibrosis induced by silica not only at early phase but also after the time point when fibrosis has occurred. We speculated that trapidil inhibited the processes of lung fibrosis via its antagonistic effect to PDGF which leads to suppress the activation of fibroblast.

In conclusion, this study demonstrated that PDGF is essential for developing of pulmonary fibrosis and trapidil may act as a therapeutic agent for this disease with its antagonistic effect to PDGF.

はじめに

特発性間質性肺炎はいまだその有効な治療が確立しておらず、その病態の解明と新たな治療戦略の展開が必要である。間質性肺炎の成立には種々の炎症性細胞や炎症性サイトカインの関与が注目されている¹⁻³⁾。この研究では炎症性サイトカインのなかで線維芽細胞の competence factor である血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor, PDGF) が肺の線維化の過程で重要な役割を果たしているのではないかと考え、検討した。さらにその治療戦略として PDGF を制御することで線維化を抑制あるいは改善しうるかについて PDGF 拮抗作用を有する trapidil を用いて検討した。

方 法

我々は従来よりシリカを用いたマウス肺線維症モデルを確立している。そのモデルではシリカ投与から2週目までに強い炎症性変化と線維化が起こり、その後4週目までさらに線維化が進行することを確認している。

まずこのモデルにおける PEGF の関与を検討するために抗 PDGF 抗体 400 micg をシリカ 16mg 投与前日より持続的に皮下注射し、シリカ投与後2週目に気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) で炎症性反応を検討し、さらに線維化に関しては病理学的スコア (Ashcroft score) と生化学的指標であるヒドロキシプロリンについて検討した。対照群として生食のみ投与、シリカ投与のみ、あるいはシリカに加え goat IgG (sham control) を持続皮下注射した3群を作成した。

さらに抗 PDGF 抗体を用いた実験を踏まえ、PDGF に対する拮抗作用を要する trapidil を用いて、肺の線維化が抑制できるかを検討した。

まずシリカ投与の時点より連日 trapidil (0.04, 0.2, 1.0 mg/mouse) を皮下注射し最初の2週目までの炎症および線維化を抑制しうるかを検討した。

またさらにシリカ投与による肺の線維化が成立している状態で trapidil が有効であるかを検討するため、シリカ投与後2週間経過した時点より trapidil (0.2, 1.0 mg/mouse) を連日皮下注射し4週目での肺の炎症所見と線維化についても検討を行った。

結 果

シリカ投与の前日から持続的に抗 PDGF 抗体 (a-PDGF) を投与した実験で、Fig.1 のごとく病理学的な検討

帝京大学医学部内科

* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

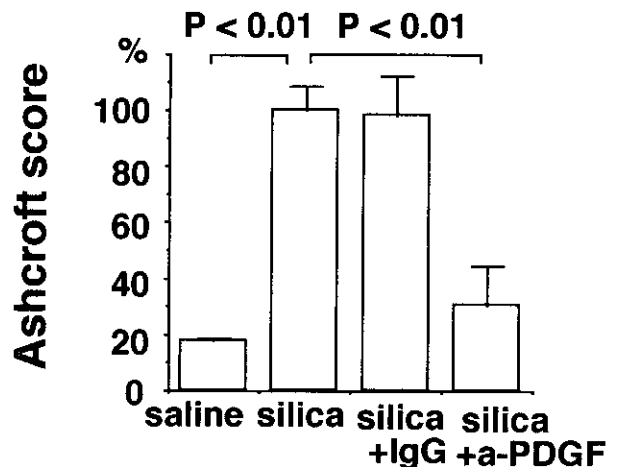


Fig.1

(Ashcroft score) でシリカ投与により明らかに炎症および線維化が惹起され、その線維化は goat IgG 抗体で全く影響を受けないが、a-PDGF により著明に抑制され、ほぼ生食コントロール群のレベル近くまで線維化が抑えられた ($p < 0.01$)。またヒドロキシプロリンの測定でも Fig.2 に示すように病理所見と同様にシリカ投与により 240 ± 8 (micg/lung) から 510 ± 12 と増加した HOP が ($p < 0.01$) が 265 ± 21 と明らかに ($p < 0.01$) 抑制されることが示された。また BALF の検討ではシリカ投与により増加した単球とリンパ球が a-PDGF により有意 ($p < 0.05$) に低下し、好中球も減少傾向であることが示された。従ってこのマウスの肺線維症モデルにおいて PDGF がその線維化の成立に重要であることが示唆された。

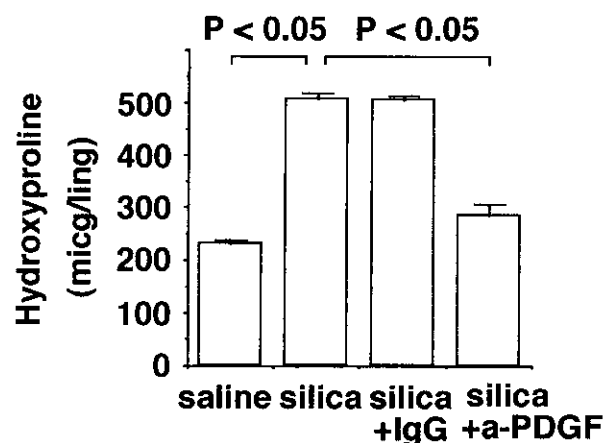


Fig.2

以上の結果を踏まえ、PDGF に対して拮抗作用を有する trapidil を用いた実験を次に示す。まずシリカ投与と同時に連日 trapidil を2週間にわたり投与した場合、BALFで

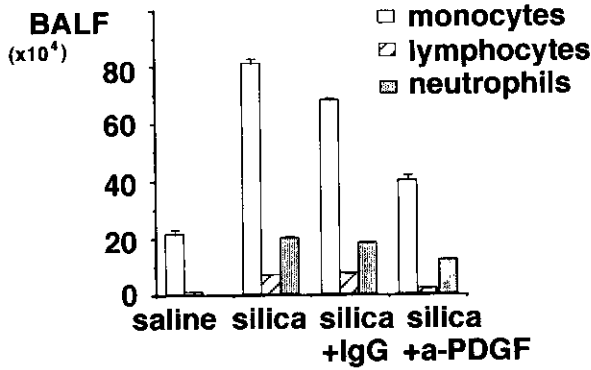


Fig.3

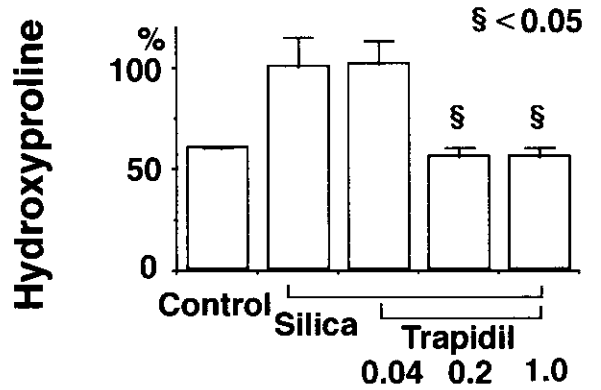


Fig.6

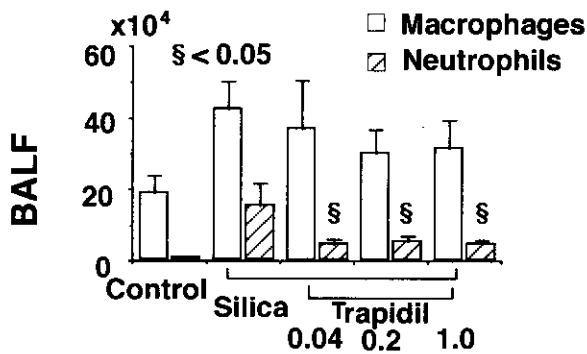


Fig.4

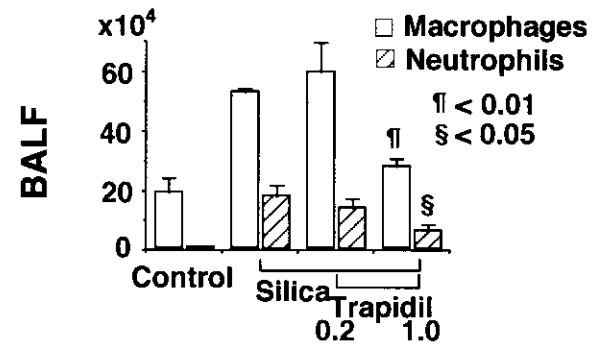


Fig.7

は Fig.4 のごとく trapidil (0.04 ~ 1.0mg/mouse) により好中球の集積が有意に抑制され ($p < 0.05$) 炎症反応が軽減することが認められた。また線維化についても Fig.5 のように病理学的な所見も trapidil (0.04 ~ 1.0mg/mouse) で有意に抑制された。またハイドロキシプロリンは生食群 295.1 ± 23.5 、シリカ群 527.9 ± 21 と有意に増加するも ($p < 0.05$) trapidil の 0.2 および 1.0 の投与でそれぞれ 284.2 ± 24.0 と 286.3 ± 22.0 と明らかに低下し ($p < 0.05$)、シリカによるハイドロキシプロリンの増加も trapidil (0.2 ~ 1.0mg/mouse) の投与で抑えられることが示された。従ってシリカ投与による肺における炎症性反応および線維化が trapidil に

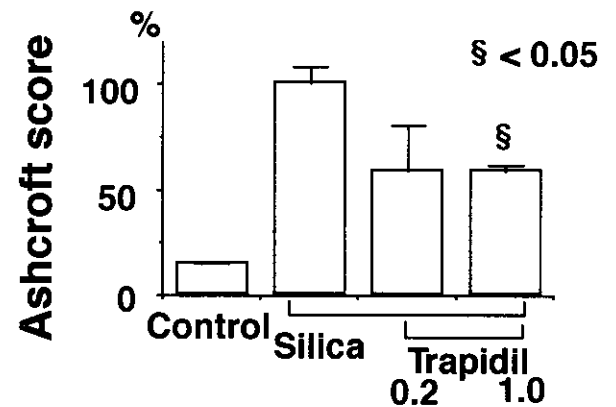


Fig.8

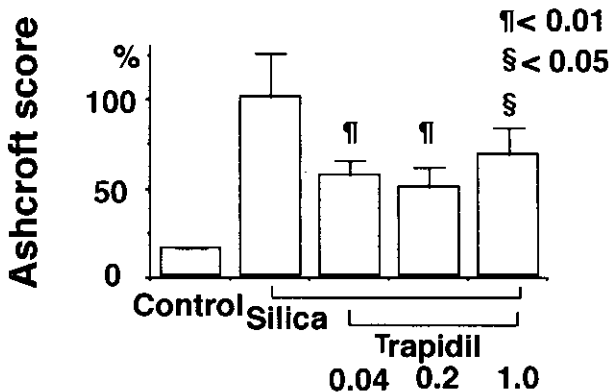


Fig.5

より軽減することが明らかとなった。そこで次に我々の肺線維症モデルですでに線維化が成立した時点から trapidil を投与した場合でも、その後の線維化を抑制あるいは改善しうるかを検討した。すなわちシリカ投与後 3 ~ 4 週目の 14 日間にわたり trapidil (0.2 ~ 1.0mg/mouse) を投与し炎症反応と線維化について検討した。trapidil 1.0mg/mouse の投与で Fig.7 で示すように BALF でマクロファージと好中球のいずれも減少し、Fig.8 のごとく病理学的な所見および Fig.9 のハイドロキシプロリンとともに有意に ($p < 0.05$) 改善することが示された。

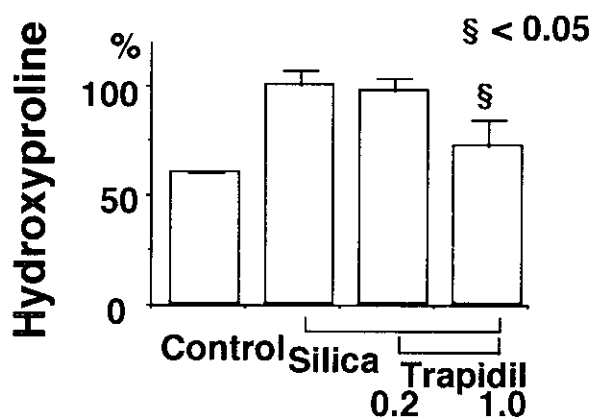


Fig.9

考案・結論

従来より特発性間質性肺炎の成立過程に関与しうる種々のサイトカインについて検討がなされている。そのなかで特に線維芽細胞の活性化を促進するサイトカインとしては腫瘍壊死因子 (tumor necrotizing factor- β , TGF- β)^{4,5)}、インスリン様成長因子 (insulin like growth factor-I, IGF-I)^{6,7)}、それと今回我々の検討した PDGF などあげることができる⁸⁻¹¹⁾。実際にこれらのサイトカインは実験的な肺線維症で活性化されることが報告されている^{4,7,8-11)}。また臨床的な検討においても間質性肺炎の患者における組織あるいは BALF 細胞においてこれらサイトカインの受容体あるいは産生の亢進していることが報告されている¹²⁻¹⁵⁾。すなわち肺の線維化の過程でこれら線維芽細胞を活性化するサイトカインが重要であることが示唆されている。今回、我々はこれらのサイトカインの中でも線維芽細胞に対する competence factor である PDGF の作用を制御することが、肺の線維化の根幹の過程を抑制し治療的な効果が期待できるのではないかと考え検討を行った。

PDGF に対する抗体を投与することでシリカによる肺での炎症と線維化が抑制されたことより、この肺線維症モデルにおいても PDGF が重要な役割を果たしていること、そして PDGF の作用を制御することが治療として期待できることが示された。そこでさらに PDGF に対する拮抗作用を有する trapidil でこの肺の線維化が抑制できるかを検討した。Trapidil は臨床的には動脈硬化に対する治療薬として血小板機能抑制や phosphodiesterase 阻害作用などが知られているが¹⁴⁾、*in vitro* の実験では PDGF の antagonist として抑制的に働き¹⁵⁾、また血管内皮細胞の研究では PDGF の作用を細胞内シグナル伝達の過程で阻害することも報告されている¹⁶⁾。さらに *in vivo* の実験でも腎臓の間質細胞や glioma などの増殖を抑制することも報告されている¹⁷⁻¹⁸⁾。従って我々は間質性肺炎の肺線維化に対しても治療的な効果があるのではないかと考え実験を行った。その結果、シリカ投与の直後から trapidil を

連日与えると 2 週目の時点で炎症反応や線維化の所見が有意に抑制されることが示された。また臨床の間質性肺炎の治療ではすでに線維化の成立している病変に対しても効果を発揮することが必要である。そこで我々のモデルで線維化の成立しているシリカ投与後 2 週間経過した時点から trapidil を連日与えて検討した。その結果 trapidil 1mg/mouse の投与により肺の炎症と線維化が抑制できることが示された。今回の実験より間質性肺炎での線維化の成立には PDGF が重要であり、trapidil を含めその制御は間質性肺炎の新たな治療として期待できることが示された。今後の検討課題としてはまずヒトの特発性間質性肺炎は多因子により成立している可能性もあり、今回の成果が他の線維症モデルでも同様に効果を発揮するのか確認する必要がある。またさらにそれらの実験系とヒトとの相違も考慮する必要があるが、ヒトの間質性肺炎でも PDGF の発現が亢進し、肺線維症患者の線維芽細胞は健常群と比較して PDGF による遊走活性が亢進していることなどから¹⁹⁻²⁰⁾、ここで示すことのできたように PDGF を制御することはやはり将来に期待できる治療戦略であろう。また trapidil に関しては最終的にはヒトの肺線維化に対する効果を発揮するために trapidil として投与すべき容量と治療期間などについてもさらに検討する必要がある。

参考文献

- 1) Thornton SC, Robbins JM, Penny R, Breit SN. Fibroblast growth factors in connective tissue disease associated interstitial lung disease. Clin Exp Immunol; 90 (3): 447-452, 1992.
- 2) Vaillant P, Menard O, Vignaud JM, Martinet N, Martinet Y. The role of cytokines in human lung fibrosis. Monaldi Arch Chest Dis; 51 (2): 145-152, 1996.
- 3) Martinet Y, Menard O, Vaillant P, Vignaud JM, Martinet N. Cytokines in human lung fibrosis. Arch Toxicol Suppl; 18: 127-139, 1996.
- 4) Jagirdar J, Begin R, Dufresne A, Goswami S, Lee TC, Rom WN. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. Am J Respir Crit Care Med; 154(4 Pt 1): 1076-1081, 1996.
- 5) Thrall RS, Vogel SN, Evans R, Shultz LD. Role of tumor necrosis factor-alpha in the spontaneous development of pulmonary fibrosis in viable motheaten mutant mice. Am J Pathol; 151 (5): 1303-1310, 1997.
- 6) Li H, He B, Que C, Weng B. Expression of TGF-beta 1, PDGF and IGF-1 mRNA in lung of bleomycin-A5-induced pulmonary fibrosis in rats. Chin Med J; 109 (7): 533-536, 1996.

- 7) 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 (3) : 780-786, 1996.
- 8) Antoniadis HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, Selman M. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* ; 86 (4) : 1055-1064, 1990.
- 9) Denis M, Neutralization of transforming growth factor-beta 1 in a mouse model of immune-induced lung fibrosis. *Immunology*; 82 (4) : 584-590, 1994.
- 10) Liu JY, Morris GF, Lei WH, Hart CE, Lasky JA, Brody AR, Rapid activation of PDGF-A and -B expression at sites of lung injury in asbestos-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17 (2) : 129-140, 1997.
- 11) Tani K, Ogushi F, Takahashi H, Kawano T, Endo T, Sone S, Thrombin stimulates platelet-derived growth factor release by alveolar macrophages in rats--significance in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Med Invest* : 44 (1-2) : 59-65, 1997.
- 12) Shaw RJ, Benedict SH, Clark RA, King TE Jr. Pathogenesis of pulmonary fibrosis in interstitial lung disease. Alveolar macrophage PDGF (B) gene activation and up-regulation by interferon gamma. *Am Rev Respir Dis* : 143 (1) : 167-173, 1991.
- 13) Mio T, Nagai S, Kitaichi M, Kawatani A, Izumi T, Proliferative characteristics of fibroblast lines derived from open lung biopsy specimens of patients with IPF (UIP). *Chest*; 102 (3) : 832-837, 1992.
- 14) Bonfardeci G, Cimminiello C, Cantini L, Arpaia G, Aloisio M, Pozzi F, Platelet and endothelial response with trapidil in patients with peripheral obliterative arteriopathy. *Int Angiol*; 13 (4) : 339-342, 1994.
- 15) Peterson TC, Isbrucker RA, Hooper ML, In vitro effect of platelet-derived growth factor on fibroproliferation and effect of cytokine antagonists. *Immunopharmacology*; 28 (3) : 259-270, 1994.
- 16) Hoshiya M, Awazu M, Trapidil inhibits platelet-derived growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase cascade. *Hypertension*; 31 (2) : 665-671, 1998.
- 17) Gesualdo L, Di Paolo S, Ranieri E, Schena FP, Trapidil inhibits human mesangial cell proliferation: effect on PDGF beta-receptor binding and expression. *Kidney Int* ; 46 (4) : 1002-1009, 1994.
- 18) Tada M, Aida T, Hosokawa M, Kobayashi H, Sawamura Y, Abe H, Antiproliferative effect of trapidil on PDGF-associated growth of human glioma cell lines in vitro. *Neurol Med Chir (Tokyo)* Jun; 31 (6) : 313-317, 1991.
- 19) Sugauma H, Sato A, Tamura R, Chida K, Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions. *Thorax*; 50 (9) : 984-989, 1995.
- 20) Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG, Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*; 85 (6) : 2023-2027, 1990.

間質性肺炎増悪症例に対する N-アセチルシステイン吸入療法の有用性に関する臨床的検討

本間 栄 川畑 雅照 岸 一馬 坪井 永保
成井 浩司 中谷 龍王 中田紘一郎*

【目的】間質性肺炎増悪症例における N-アセチルシステイン(NAC)単独吸入療法の有用性を臨床的に検討した。【対象と方法】対象は 99 年 1 月から 11 月までに当科に入院した未治療の間質性肺炎増悪症例 9 例(全例男性, 平均年齢 72 歳)で, 病型は特発性間質性肺炎(IIP)の慢性型, 定型例が 6 例, その他の間質性肺炎が 3 例であった。方法は NAC 吸入療法研究会のプロトコールに準じ NAC (352.4mgx2/日)を超音波ネブライザーで吸入し, 吸入前および 1, 3, 6, 9 カ月後(平均観察期間:5 カ月)に臨床症状(呼吸困難度, 咳, 痰の重症度), 血液ガス, 肺機能, 胸部 X 線所見, 炎症パラメーター(KL-6, sIL-2R, LDH, CRP)について比較し効果を判定した。【結果と考察】IIP1 例を含む 9 例中 3 例(33.3%)において自覚症状, 血液ガス, 画像, 炎症パラメーター等が改善し, 今後間質性肺炎症例に対し試みる価値のある治療法と考えられた。

An assessment of clinical effectiveness of inhaled N-Acetylcysteine in progressive pulmonary fibrosis

Sakae Homma, Masateru Kawabata, Kazuma Kishi, Eiyasu Tsuboi
Koji Narui, Tatsuo Nakatani, Koichiro Nakata

Division of Respiratory Diseases, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan

To assess the effects of inhaled N-Acetylcysteine (NAC) therapy in pulmonary fibrosis (PF), we conducted a review of nine patients (9 males with mean age of 72 yrs) with progressive PF during the period from January through November in 1999. All patients were treated with 352.4mg of inhaled NAC two times daily for 1 to 9 months with mean duration of 5 months. Before and after the NAC therapy, subjective symptoms (dyspnea, cough, sputum), pulmonary function tests (PFT), blood gas analysis, X-ray images and serum inflammatory parameters (KL-6, sIL-2R, LDH, CRP) were evaluated. According to the classification of PF, among nine patients with PF, six patients had idiopathic interstitial pneumonia (IIP), one had PF with positive rheumaoid factor, one had PF with MPO-ANCA-associated vasculitis, and one had unclassified PF respectively. Clinical features were a history of dry cough and/or fine crackles in all patients. Chest radiographs showed honeycomb lesions in the lung basis associated with ground glass opacities in all patients. The PFT revealed restrictive impairment associated with hypoxemia in all patients. Some of parameters indicating the activity of PF such as serum KL-6, sIL-2R and /or LDH were elevated before inhaled NAC therapy in all patients. Some of these subjective and objective abnormalities significantly improved during NAC treatment in three out of 9 patients (33.3%). They were one with IIP, one with PF with positive rheumaoid factor and one with PF with MPO-ANCA-associated vasculitis. Four patients remained unchanged and two patients deteriorated. It is empahsized that NAC inhalation should be considered as an adjunct therapy for progressive PF.

はじめに

間質性肺炎の急性増悪は早期診断、早期治療を要する致死率の高い疾患であるが臨床的には従来のステロイド剤あるいは免疫抑制剤を主とする治療法では限界がある。そこでアンチオキシダントでありサイトカインや接着分子の発現も抑制する N-アセチルシステイン (NAC) 吸入療法¹⁾ が間質性肺炎増悪症例における新しい治療法になりうるか否かを臨床的に検討した。

対象と方法

対象は 99 年 1 月から 11 月までに当科に入院した未治療の間質性肺炎増悪症例 9 例(全例男性, 平均年齢 72 歳)で, 病型は特発性間質性肺炎 (IIP) の慢性型, 定型例が 6 例, その他の間質性肺炎が 3 例である。

方法は NAC 吸入療法研究会のプロトコールに準じ NAC (352.4mgx2/日) を超音波ネブライザーで吸入し, 吸入前および 1, 3, 6, 9 カ月後 (平均観察期間:5 カ月) に以下の判定項目即ち, 臨床症状 (呼吸困難度, 咳, 痰の重症度), 血液ガス所見, 呼吸機能検査所見, 胸部 CT 所見, 炎症パラメーター (KL-6, sIL-2R, LDH, CRP) について比較し効果を判定した。

結 果

治療効果の結果をまとめ表 1 に示す。著明改善が 9 例中 1 例, 改善が 2 例, 不変が 4 例, 悪化が 2 例に認められた。改善 3 例の病型はそれぞれ蜂窩肺形成の明らかなリウマチ因子 (RF) 陽性の間質性肺炎 (症例 1), MPO-ANCA 陽性の間質性肺炎 (症例 2), 慢性型 (定型型) の IIP (症例 3) で, 改善項目は症例 1 では呼吸困難, 咳などの自覚症状, 血液ガス, 肺活量, CT 画像, KL-6 で, 症例 2 は自覚症状, CT 画像, KL-6, 症例 3 は自覚症状, 血液ガス, CT 画像であった。自覚症状, 他覚所見共に不変の 4 例は IIP が 3 例 (症例 4 ~ 6), 分類不能な間質性肺炎が 1 例 (症例 9), 悪化の 2 例はいずれも IIP であった (症例 7 ~ 8)。

症例報告

次に著明な改善が得られた症例 1 を具体的に呈示する。63 歳男性, 会社員で主訴は咳嗽, 咯痰, 労作時呼吸困難。喫煙歴は 20 本/日 x 38 年間 (26 ~ 63 歳), 既往歴は 61 歳時に肺結核で内服治療を受けている。現病歴は '99 年

虎の門病院呼吸器科, 沖中記念成人病研究所

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

Case No.	年齢	性	臨床診断	効果	改善項目
1 (T,F)	63	M	IP(RF+)	著明改善	D, S, PaO ₂ , VC, CT, KL-6
2 (T,M)	82	M	IP(MPO-ANCA+)	改善	D, C, CT, KL-6
3 (M,K)	70	M	IIP (定型型)	改善	D, S, PaO ₂ , CT
4 (H,S)	80	M	IIP (定型型)	不変	
5 (K,O)	77	M	IIP (定型型)	不変	
6 (J,S)	73	M	IIP (定型型)	不変	
7 (Y,I)	64	M	IIP (定型型)	悪化	
8 (Y,H)	64	M	IIP (定型型)	悪化	
9 (H,K)	72	M	IP-unclassified	不変	

D=dyspnea, S=sputum, C=cough, VC=vital capacity.

表 1 NAC 吸入療法の効果

3 月 20 日より咳嗽, 咯痰, 発熱が出現。22 日には労作時呼吸困難 (H-J III 度) が加わり近医を受診し, 胸部単純 X 線で両側中下肺野に網状影を指摘され精査加療目的で 4 月 2 日当院へ入院となった。入院時身体所見では胸部聴診上, 両側背部に fine crackle を聴取し, 四肢に clubbed finger を認めた。胸部単純 X 線の経時変化は 96 年に右肺尖部の結核病巣の他に両側中下肺野に極くわずかな網状影を認め, 97 年には網状影が明瞭となり 99 年の入院時では両側中下肺野の線状網状影の増強と下葉の volume 減少を認めた (図 1)。胸部 CT では, 両側肺底部背側を中心に蜂窩肺を認め, その周囲には ground glass opacity (GGO) が拡がっていた。

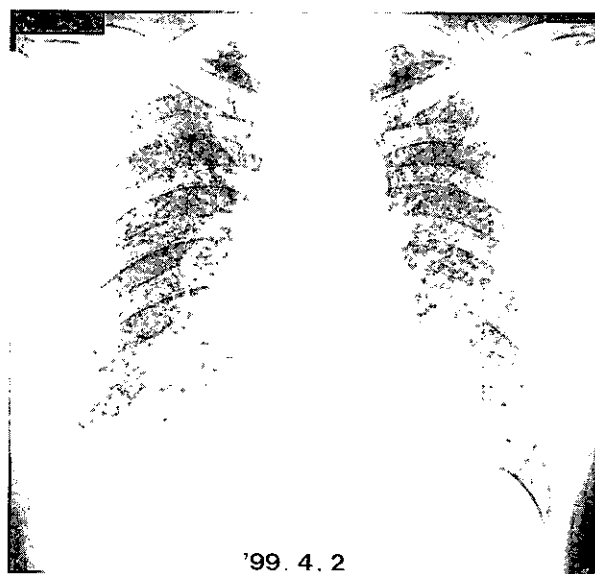


図 1 胸部単純 X 線写真 (Case 1)。両側中下肺野の線状網状影の増強と下葉の volume 減少が認められる。

入院時検査所見は白血球数 11300/ml, 赤沈 58mm/hr, CRP 1.2mg/dl と軽度の炎症所見を認め IgG, IgA, 抗核抗

体, RFの軽度増加を示していた。尚, 間質性肺炎の活動度のマーカーとしてのKL-6が1130U/ml, sIL-2Rが827U/mlと増加していた(表2)。呼吸機能検査所見は%DLCOが59%と低下し, 血液ガス分析では安静時PaO₂が77torrで6分間歩行試験後69torrまで低下した。喀痰培養は常在菌のみで肺カリウムシンチでは両側中下肺野にびまん性に取り込みの亢進が認められた(表3)。

Complete blood count	Serology	Urine
WBC. 11300 /ml	ESR 58 mm/hr	糖 (-)
Hb. 13.8 g/dl	CRP 1.2 mg/dl	蛋白 (-)
PIL 41.8 × 10 ⁴ /ml	IgG 2811 mg/dl	潜血 (-)
	IgA 520 mg/dl	
Chemistry	IgM 129 mg/dl	
TP 8.6 g/dl	IgE 84 mg/dl	
BUN 9 mg/dl	CH ₅₀ 42 U	
Cr. 1.0 mg/dl	抗核抗体 160 d	
Na 139 mEq/l	RF 46 U/ml	
K 3.9 mEq/l	IgG-RF 1.6	
Cl 101 mEq/l	MPO-ANCA 10 EU->	
GOT 31 IU/l	CEA 3.7 UG/L	
GPT 83 IU/l	KL-6 1130 U/ml	
LDH 141 IU/l	sIL-2R 827 U/ml	
CK 52 IU/l		

表2 Laboratory findings (Case 1)

Pulmonary Function Test		Sputum	
VC 2.77 L	%VC 80%	培養; Normal flora	
FEV _{1.0} 2.26 L	FEV _{1.0%} 82%	細胞診; Class 2	
RV 1.69 L	%RV 83%	⁶⁷Ga Scintigraphy	
D _{LCO} 12.3 ml/min/mmHg (59%)	D _{LCOVA} 8.7 ml/min/mmHg (84%)	両側中下肺野にびまん性にuptake亢進	
Blood Gas Analysis (room air)			
pH 7.42	PaCO ₂ 39 torr	pH 7.42	PaCO ₂ 39 torr
PaO ₂ 77 torr	BE 0.8 mmol/L	PaO ₂ 69 torr	BE 0.8 mmol/L
(安静時)		(6分間歩行試験後)	

表3 Pulmonary function test etc. (Case 1)

入院後7カ月間の臨床経過を表4に示す。4月中旬よりNAC吸入療法を開始したところ約1カ月後の5月中旬よりHugh Jones III度の呼吸困難がII度に軽減しPaO₂も77torrから87torrまで10torr改善した。8月まではKL-6, sIL-2R, LDHは不変あるいは増加傾向を示したがKL-6は6カ月後の10月より徐々に低下傾向を示した。呼吸機能検査所見もVCが2.77Lから3.15Lまで徐々に改善したが%DLCOは不変であった。治療前後の胸部CTの変化(図2)では気管分岐部と肺底部レベル共に治療1カ月後には両側背側のGGO濃度の改善が明らかとなり3カ月後, 6カ月後にも増悪傾向は認められなかった。

考 案

びまん性間質性肺炎は急性増悪を生ずると治療抵抗性で極めて致命率の高い予後不良な疾患である。その原因として従来から原因が全く不明であるHIPの他に膠原病,

	'99年 4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月
Medication	入院	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	NAC 354.2 mg x 2 / day							
Symptom	cough / sputum							
	DOE III							
Labo Data	PaO ₂ 77 mmHg	86	87	85	85			
	KL-6 1130 u/ml		1360	1780	1480	1020		
	sIL-2R 827 u/ml		863	681	877			
	LDH 141 IU/l	148	166	139	150	148		
PFT	VC 2.77L	2.96L				3.15L		
	%VC 80%	86%				91%		
	%D _{LCO} 59%	58%				58%		
	%D _{LCOVA} 84%	77%				74%		

表4 Clinical course (Case 1)

特に慢性関節リウマチ, 多発性筋炎/皮膚筋炎等に高率に合併することが報告されている。治療はステロイド剤大量投与あるいは免疫抑制剤の併用が試みられてきたが何

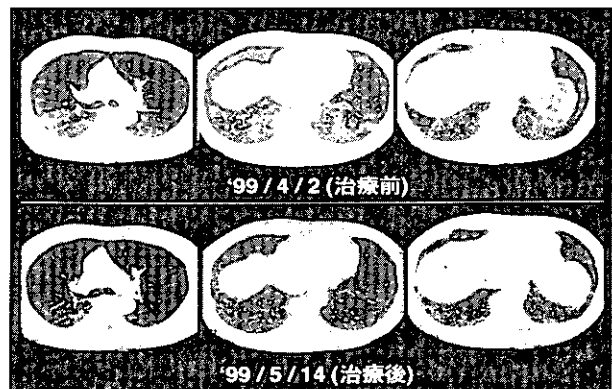


図2 胸部CT写真(Case 1)。治療前後の胸部CTの変化: 気管分岐部と肺底部レベル共に治療1カ月後には両側背側のGGO濃度の改善が認められる。

れも予後の改善には殆ど寄与していない。そこでNACの単独あるいは併用吸入療法が種々の間質性肺炎症例における新しい治療法になりうるか否かをその活動度のマーカーである血清中KL-6²⁾, sIL-2R値³⁾ならびにHRCT画像などを用い臨床的に解明することが重要となる。

過去に著者は動物実験モデルでARDSにおけるNACの有効性を確認した⁴⁾。その後臨床応用においてもその有効性が確認され⁵⁾, 1996年以來間質性肺炎においても臨床的有効性を認めたとする報告が散見されるようになった⁶⁾。しかし従来の投与方法はいずれも注射あるいは経口投与で吸入による有効性は石井ら⁷⁾のHIPを対象として61%の改善を認めたという報告以外にはない。

今回我々も間質性肺炎増悪9症例におけるNAC単独吸入療法の有用性を検討した結果, 9例中3例(33.3%)において自覚症状, 画像, 血液ガス所見等の有意な改善が認められ今後, 間質性肺炎症例に対し試みる価値のある治療法と考えられた。

文 献

- 1) 石井芳樹, 川口一男, 北村 諭: 特発性間質性肺炎 (HP) に対する N-アセチルシステイン (NAC) 吸入療法の試み. 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成7年度研究報告書 1996; 121-123.
- 2) Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M and Akiyama M: New serum indicator of interstitial pneumonitis activity: sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest* 1989; 96: 68-73.
- 3) 本間 栄, 神林 宏, 川畑雅照, 岸 一馬, 坪井永保, 成井浩司, 中谷龍王, 遠藤雄三, 中田紘一郎: 間質性肺炎における血清 Soluble IL-2Receptor 値 (sIL-2R) 測定の意義. *日呼吸会誌* 1999; 37: 178.
- 4) Homma S, Bellows CF, Brain JD: The effect of N-Acetylcysteine on Zinc-65 clearance and lung injury following zinc chloride instillation in rats. *Am Rev Resp Dis* 1991; 143: A699.
- 5) Suter PM, Domenighetti G, Schaller M-D, Laverriere M-C, Ritz R and Perret C: N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. *Chest* 1994; 105: 190-194.
- 6) Behr, J., Maier, K., Degenkolb, B., Krombach, F and Vogelmeier, C: Antioxidative and clinical effects of high-dose N-Acetylcysteine in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1897-1901.
- 7) 石井芳樹, 北村 諭: 間質性肺炎に対する N-アセチルシステイン (NAC) 吸入療法. *分子呼吸器病* 1998; 2: 451-453.

特発性間質性肺炎に対するコルヒチンの臨床評価

三木 誠 秋山 健一 海老名雅仁 萩原 弘一
中村 晃 森 ゆり子 貫和 敏博*

治療法が確立していない特発性間質性肺炎に対して、現在用いられているステロイド剤や免疫抑制剤は炎症を制御するものの線維化を抑制することはできず、また長期投与による副作用も無視できないため、これらに代わる薬剤の開発が期待されている。本研究は、抗線維化作用を有するコルヒチン(1.0mg/day経口)を間質性肺炎慢性型の治療に用い、Douglasらの報告(*Am J Respir Crit Care Med* 158: 220-225, 1998)の効果を検討することを目的とするパイロット研究である。

間質性肺炎患者8例(男性6名、女性2名、50～73歳、平均64.0歳)をエントリーし、東北大学医学部倫理委員会に承認されたプロトコールに従い、治療前、治療3ヶ月後及び6ヶ月後の画像所見、生理学(PaO₂, %VC, %DLco)及び生化学(LDH, KL-6)検査所見を比較し、総合的に効果及び副作用を検討した。

8例中1例に食欲不振と軽度の肝機能障害が認められ、投与を中止したが、その他の症例には副作用を認めず、長期間の投与が可能であると考えられた。画像所見、生理学的機能、血液生化学所見などの効果判定パラメーターは不変あるいは改善傾向を示し、特にKL-6値は急性増悪を起こした1例を除いた6例全てにおいて有意に改善し、上皮・間質レベルでの傷害が軽減している可能性が示唆された。

さらに長期間の観察が必要ではあるが、今回のパイロット試験を踏まえ、副作用の少ない補助的治療法として、コルヒチン投与症例をさらに集積し、評価すべきであると考えられる。

Clinical assessment of colchicine for the therapy of idiopathic pulmonary fibrosis

M. Miki, K. Akiyama, M. Ebina, K. Hagiwara
A. Nakamura, Y. Mori and T. Nukiwa

Department of Respiratory, Oncology, Molecular Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

Colchicine has anti-inflammatory and anti-fibrotic properties *in vivo* and *in vitro*, and recently has been proposed as a novel drug for therapy of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Eight patients with pulmonary fibrosis who had received no prior therapy including corticosteroid and immunosuppressant entered into this study. Colchicine was administered at a daily dose of 1.0 mg, and the response to the therapy was assessed by the serial chest radiographs, pulmonary function tests and serological findings during 6 months. One patient dropped out for liver dysfunction, but other 7 had no remarkable adverse effect. Colchicine decreased the serum KL-6 levels more than 10%, although it could not recover the pulmonary function and the shadow on chest radiograph. By the assessment criteria, six patients improved or remained stable, and one worsened and died for the acute exacerbation. Despite limitations of this analysis, colchicine may be of benefit in IPF and should be considered for further clinical trial.

はじめに

特発性間質性肺炎は原因不明の肺疾患であり、臨床的には進行する呼吸困難や低酸素血症を認め、感染などを契機に急性増悪をきたし、致死的な経過をたどる予後不良な疾患である。特発性間質性肺炎の治療法に確立されたものはなく、現在用いられているステロイド剤や免疫抑制剤は、初期段階としての炎症を制御するものの、これに続く線維化を抑えることはできない。また長期投与に言及すれば、副作用のため中止せざるをえない例や、重篤な合併症をきたす症例もある。従って、これらに代わる薬剤の開発が期待されているのが治療の現状である。

コルヒチンは、痛風発作時に用いられている薬剤であるが、肺胞マクロファージからのTNF- α の放出を抑制して炎症を抑える¹⁾。肺胞マクロファージからPDGF²⁾、IGF、AMDGF、fibronectinなどの線維芽細胞増殖因子が産生されるのを抑制し³⁾、さらにはコラーゲン合成を抑制して⁴⁾、肺の線維化を防ぐことが明らかにされた。またアポトーシス抑制により上皮細胞保護作用があることが、最近報告された⁵⁾。実際に特発性間質性肺炎患者に用いて、ステロイドと同等以上の効果を認めている⁶⁻⁸⁾。実際、我々は急性増悪後のステロイド治療において、コルヒチンを併用することで再増悪をきたさずにステロイドの減量に成功した症例を経験し、コルヒチンの有用性を確認している(図1)。

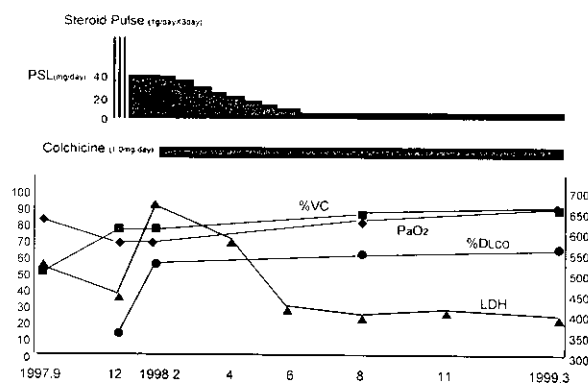


図1 コルヒチン併用によりステロイドの減量に成功した症例

以上をふまえ、本研究は抗線維化作用を有するコルヒチン(1.0mg/day 経口)を間質性肺炎慢性型患者の治療に用い、Douglasらの報告⁷⁾の効果を追試し、臨床指標の推移を検討することでその有用性を調べることを目的とするパイロット研究である。

対象と方法

医療保険上、コルヒチンを呼吸器疾患に用いることが認められていないため、東北大学医学部倫理委員会に臨床試験のプロトコルを提出し、平成10年10月に試験の承認を得た。症例の除外基準は、①経口摂取が不可能な例、②重篤な合併症を有する例、③他疾患でコルヒチンを投与中の症例、④コルヒチンに対し過敏症の既往のある症例、⑤前治療がある症例とした。

このプロトコルに従い、平成10年12月から平成11年7月までに当科に入院した患者の内、厚生省班会議の診断基準に基づき、新規に慢性型間質性肺炎の診断がついた患者8例(男性6名、女性2名、50~73歳、平均64.0歳)からインフォームド・コンセントを得て、臨床試験にエントリーした。本疾患の治療薬として既に認められているステロイド剤や免疫抑制剤の併用は行わず、コルヒチン1.0mg/dayのみを経口投与した。ただし、気管支拡張剤や去痰剤などその他の薬剤の服用は認めた。投与中止基準としては、①副作用あるいは合併症により投与継続不能と判断した場合、②増悪症例、③患者、家族から投与中止の申し出があった場合とした。

治療前、治療3ヶ月後及び6ヶ月後の画像所見、生理学検査(PaO₂, %VC, %DLco)及び生化学検査(LDH, KL-6)を比較し、American Thoracic Societyの評価基準⁹⁾を参考にして、レントゲン写真上明らかに陰影が変化した場合、%DLcoが15%以上変動した場合、その他のパラメーターが10%以上変動した場合を改善または増悪と判定して、それぞれを+1, -1とスコア化して総合点を算出し、総合点が+2以上を改善, -2以下を増悪として総合評価を決定した。また、末梢血検査(白血球数、赤血球数、血小板数)、生化学検査(蛋白、肝機能、腎機能、電解質、脂質、血糖、CRPなど)、尿所見、自覚症状を定期的に調べ、副作用の発現頻度も併せて検討した。

結果

6ヶ月間の経過観察の結果、8例中1例に食欲不振と軽度の肝機能障害が見られ、投与を中止した(表1)。画像所見に関しては、急性増悪を起こして死亡した1例(患者B)を除き、6ヶ月間全く変化は認められなかった(データ提示せず)。

生理学的な評価パラメーターとして、PaO₂, %VC, %DLcoを検討した。PaO₂に関しては、患者Aの6ヶ月後のデータに10%以上の増悪を認めた(図2)。患者Bは3ヶ月後の時点では不変であったが、4ヶ月後の時点で急性増悪を起こし10%以上の増悪を認めたものの死亡し、6ヶ月後のデータは欠落となった。%VCに関しては、患者Aと患者Cの6ヶ月後のデータに10%以上の増

adverse event	本研究 (n=8)	Douglasらの報告 (n=14)
subjective		
depression	0	7
diarrhea	0	57
insomnia	0	7
muscle cramps	0	14
nausea	13	21
objective		
liver dysfunction	13	0
proteinuria	0	21

表 1 副作用の発現頻度 (%)

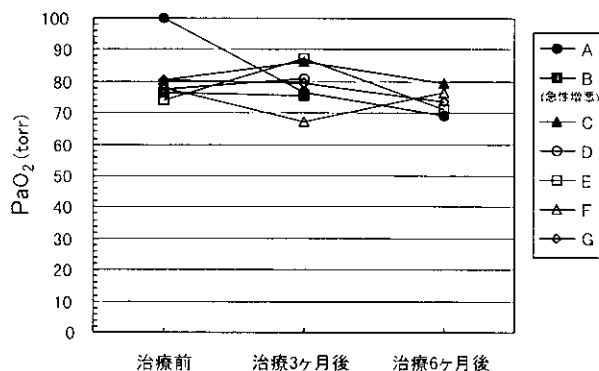


図 2 治療前後の PaO₂ の変化

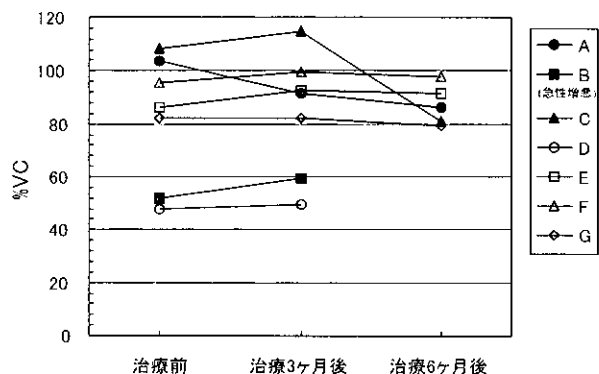


図 3 治療前後の %VC の変化

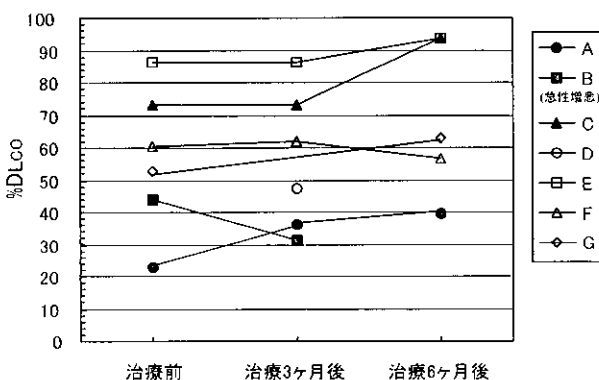


図 4 治療前後の %DLco の変化

悪を認めた (図 3) が、これに反して %DLco は、6 ヶ月後に 15% 以上の改善を認め、paradoxical な結果となった (図 4)。患者 B は両者とも増悪を示し、他の症例では不変であった。

生化学的な評価パラメーターとして、LDH、KL-6 を検討した。LDH に関しては、患者 B は 3 ヶ月後の時点で 10% 以上の増悪を認めた (図 5)。患者 A の 3 ヶ月後のデータに 10% 以上の改善を認め、6 ヶ月後に治療前の値と比較して 10% 以上の増悪を認めた。患者 C は、3 ヶ月後のデータに 10% 以上の増悪を認め、6 ヶ月後に治療前の値と比較して 10% 以上の改善を認めた。図 6 に示したように、急性増悪を起こした 1 例 (患者 B) を除き、6 例全症例の KL-6 値は改善し、気道・肺胞上皮および間質レベルでの細胞傷害が軽減している可能性が示唆された (図 6)。

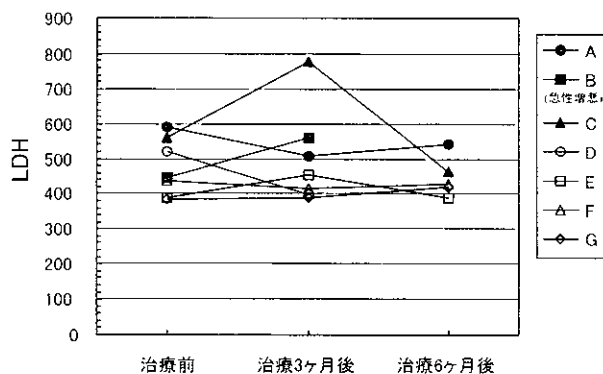


図 5 治療前後の LDH の変化

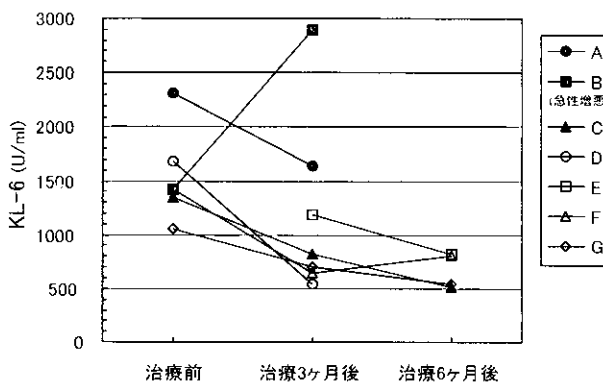


図 6 治療前後の KL-6 の変化

表 2 に各パラメーターの平均値を示した。急性増悪を起こして死亡した患者 B のデータが欠落したため、6 ヶ月後の %DLco、PaO₂、KL-6 の平均値が改善したが、6 症例での平均を算出しても統計学的な有意差は認められなかった (データ提示せず)。

総合評価に関しては、間質性肺炎以外の外因性の炎症をも反映してしまう CRP を除いて、PaO₂、%VC、%DLco、LDH、KL-6 の 5 項目で評価した。総合点は、患者 A が -1、B が -4、C が +2、D、E、F、G が +1 となり、改善 1 例、

不変5例, 増悪1例となった(表3).

パラメーター	治療前	3ヶ月後	6ヶ月後
PaO ₂	81.1±8.6	79.1±6.9	71.7±7.3
%VC	82.3±23.9	84.2±22.9	87.0±6.8
%DLco	53.9±27.6	56.0±21.6	69.2±21.4
LDH	475±82	500±137	447±52
KL-6	1541±429	1205±838	669±140

表2 治療前後の各パラメーターの変化

effect	number
improved	1
stable	5
deteriolated	1
dropped out	1
total	8

表3 総合評価

考 察

コルヒチンは痛風に対して古くから用いられているが, *in vitro*¹⁻⁵⁾ や *in vivo*^{10,11)} で間質性肺炎に効果が証明され, 新しい治療薬として注目されている薬剤である^{12,13)}. 特に最近白血球への作用^{14,15)} や血管新生との関連¹⁶⁾ が報告されています。今回の我々の結果でも間質性肺炎に対する有効性が確認され, 特にKL-6値の改善は初めての報告であり, コルヒチンの作用機序が気道・肺胞上皮および間質レベルでの細胞傷害の軽減によるものであることが示唆された。

6ヶ月間の経過観察の結果, 8例中1例に食欲不振と軽度の肝機能障害が見られたが, その他の症例には全く副作用を認めず, さらなる長期間の投与が可能であると考えられた(表1). この頻度は, Douglasらの報告に比較して低いが, 理由としては観察期間がまだ6ヶ月間と短いこと, 我々の量に比べ彼らの用いた量が1.2 mg/dayとわずかに多いこと, 人種差による影響などが考えられた。

急性増悪を起こした1例(患者B)は, 治療開始前の%VCが50%を下回っており, 昨年重症度分類策定¹⁷⁾の際に報告した「%VCが50%以下の症例は全例2年以内に死亡する」というデータに合致した。この症例を除き, その他6例のKL-6値は改善を認め, 気道・肺胞・間質レベルでの細胞傷害が軽減している可能性が示唆された(図1). しかし, その他の治療効果の指標(画像所見, 生理学的機能, 血液生化学所見など)は殆ど変化せず(表2), すでに出来上がった線維化病変および縮小した肺の構造を変化させないと推測された。

さらに長期間の観察が必要ではあるが, 予後因子として重要であり傷害の程度を強く反映するマーカーである

KL-6を改善させたことは評価に値し, それに加えて副作用の少ない補助的治療法として, コルヒチン投与症例をさらに集積し評価すべきである。

間質性肺炎の効果判定として現在各種肺機能パラメーターの改善度が用いられている。しかし, 今回示した症例や他の施設の報告を見ても, 慢性安定期においてはこれらのパラメーターに変化を認めることは少なく, Douglasら⁷⁾がstudy endpointとした「Failure (parameter decline, acute exacerbation, etc.)にいたらない」という新たな評価概念の意義を検討し, 難治間質性肺炎の新薬の臨床試験に積極的に取り入れるべきであると考えられた。この点からも, コルヒチンは評価に値する薬剤であると考えられる。

参考文献

- Allen JN, Herzyk DJ, Wewers MD. Colchicine has opposite effects on interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha production. *Am J Physiol* 261: L315-321, 1991.
- Rennard SI, Bitterman PB, Ozaki T, et al. Colchicine suppresses the release of fibroblast growth factors from alveolar macrophages *in vitro*. The basis of a possible therapeutic approach of the fibrotic disorders. *Am Rev Respir Dis* 137: 181-185, 1988.
- Wangoo A, Haynes AR, Sutcliffe SP, et al. Modulation of platelet-derived growth factor B mRNA abundance in macrophages by colchicine and dibutyryl-cAMP. *Mol Pharmacol* 42: 584-589, 1992.
- Entzian P, Schlaak M, Seitzer U, et al. Antiinflammatory and antifibrotic properties of colchicine: implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 175: 41-51, 1997.
- Feng G and Kaplowitz N. Colchicine protects mice from the lethal effect of an agonistic anti-Fas antibody. *J Clin Invest* 105: 329-339, 2000.
- Douglas WW, Ryu JH, Bjoraker JA, et al. Colchicine versus prednisone as treatment of usual interstitial pneumonia [see comments]. *Mayo Clin Proc* 72: 201-209, 1997.
- Douglas WW, Ryu JH, Swensen SJ, et al. Colchicine versus prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. A randomized prospective study. Members of the Lung Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 220-225, 1998.
- Selman M, Carrillo G, Salas J, et al. Colchicine, D-penicillamine, and prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a controlled clinical trial. *Chest* 114: 507-512, 1998.

- 9) Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 646-664, 2000.
- 10) Ledwozyw A. The effect of colchicine and vinblastine on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Acta Physiol Hung* 82: 383-389, 1994.
- 11) Entzian P, Zahringer U, Schlaak M, et al. Comparative study on effects of pentoxifylline, prednisolone and colchicine in experimental alveolitis. *Int J Immunopharmacol* 20: 723-735, 1998.
- 12) DeRemee RA. New approaches to the treatment of pulmonary fibrosis [editorial: comment]. *Eur Respir J* 7: 427-428, 1994.
- 13) Nicod LP. Recognition and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs* 55: 555-562, 1998.
- 14) Tsai MA, Waugh RE, Keng PC. Passive mechanical behavior of human neutrophils: effects of colchicine and paclitaxel. *Biophys J* 74: 3282-3291, 1998.
- 15) Modschiedler K, Weller M, Worl P, et al. Dapsone and colchicine inhibit adhesion of neutrophilic granulocytes to epidermal sections. *Arch Dermatol Res* 292: 32-36, 2000.
- 16) Zarencyrizi F, Yang DJ, Oh CS, et al. Synthesis of [^{99m}Tc]ethylenedicysteine-colchicine for evaluation of antiangiogenic effect. *Anticancer Drugs* 10: 685-692, 1999.
- 17) 貫和敏博, 阿部達也, 八重柏政宏, 三木 誠, 阿部重房, 中村 晃, 森ゆり子, 西條康夫, 海老名雅仁, 佐藤 研, 岸 一馬, 中田紘一郎, 松村栄久, 山口善夫: 特発性間質性肺炎の重症度分類策定と考え方. 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成10年度研究報告 36-41, 1999.

抗サイトカイン遺伝子発現による実験的肺線維化の抑制

林 清二* 森 雅秀 新井 徹

実験的肺線維症動物モデルにおける遺伝子治療の試みがこれまでいくつかなされてきた。遺伝子導入は蛋白発現は持続的かつ安定的な蛋白発現を可能にする点で有利とされる。今回我々は、新しい遺伝子導入法である、発現蛋白を血中で高濃度に維持できる筋肉内遺伝子注入電気穿孔法を用い、線維化を促進させる TGF- β に対して拮抗する因子である decorin を発現させ、肺線維化を抑制することを試みた。まず、この方法によって ELISA 系が確立している human IL-10 遺伝子をマウスに導入した。hIL-10 は導入翌日から血清中にて検出可能となり、少なくとも 1 週間以上に渡って 50pg/ml 前後の濃度を維持したが、これは以前我々が hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome 腹腔内投与にて得た血中濃度の数十倍であった。次に、human decorin 遺伝子を導入し、ブレオマイシン肺線維症モデルマウスにおける抗線維化効果を検討した。decorin は TGF- β に拮抗することが既に知られている。C57BL/6 マウスにブレオマイシン 24mg/kg x5 日間連続皮下投与を行った後、9 日目に decorin 遺伝子導入を行った。28 日目に肺湿重量と hydroxyproline 定量によって線維化の評価を行った。ブレオマイシン導入による線維化が decorin 遺伝子導入によって軽減傾向を認めた。

Regulation of pulmonary fibrosis by gene transfer of anti-cytokine molecules

Seiji Hayashi, Masahide Mori, Toru Arai

Department of Molecular Medicine, Osaka University Medical School

Previously several investigators attempted to regulate pulmonary fibrosis with gene therapy *in vivo*. Protein expression by gene therapy with coding genes has advantages over administration of the recombinant protein that continuous and stable expression is enabled. In this investigation, we have attempted a new method of gene therapy with systemic delivery, namely *in vivo* gene transfer into muscle by electroporation.

In order to assess the efficiency of this method, we first introduced human IL-10 gene into mice. Human IL-10 in the serum was detected one day after the gene transfer, and 30 to 70pg/ml of human IL-10 was detected from day 3 through day 7. The gene expression was higher compared to our conventional method, the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome method. Next we introduced human decorin gene, that was thought to regulate transforming growth factor- β (TGF- β) activity, to assess the antifibrotic effect on the mice of bleomycin-induced lung fibrosis model. C57BL/6 mice were injected subcutaneously with bleomycin (24mg/kg/day) from days 0 to 5, and 100 μ g of plasmid cDNA of decorin gene was injected into muscle with electric pulses on day 9. On day 28, introduction of human decorin gene by this method tended to reduce the increase in the wet lung weight and hydroxyproline content of the lungs induced by bleomycin.

In vivo gene transfer into muscle by electroporation is a new and effective method for gene expression. The present investigation suggested that the decorin gene expression may be effective for amelioration of pulmonary fibrosis.

はじめに

特発性肺線維症では、各種の cytokine や growth factor が重要な役割を果たしていることが明らかになっている^{1,2)}。なかでも transforming growth factor- β (TGF- β) は肺の線維化を促進させる因子として重要であることが指摘されている^{3,4,5)}。

一方、これまで実験的肺線維化動物モデルにおける治療の試みがいくつかなされてきた。遺伝子導入による蛋白発現は、精製蛋白そのものを投与する場合に比べ、その投与方法が比較的容易であること、持続的安定的な蛋白発現を得られる可能性があること、発現細胞の選択が可能であることなどの利点があるが、逆に発現レベルの厳密なコントロールは困難である。また、びまん性肺疾患を対象とした場合には、経気道的投与では末梢までの到達がかなり困難になることや繰り返し投与する際の vector に対する抗原性の獲得が問題となってくる可能性がある。

以上を踏まえ、今回我々は TGF- β を制御し、高レベルの蛋白発現を得られる遺伝子導入法と組み合わせて、肺線維症モデルにおいて有効な治療法を開発する方針とした。TGF- β と拮抗することが報告されている細胞外 matrix の一つである decorin の遺伝子を筋肉内注入電気穿孔法を用いて、プレオ肺線維症マウスモデルに応用した。

方 法

(1) 筋肉内注入電気穿孔法による生体内発現

今回用いた筋肉内注入電気穿孔法は宮崎らによって一昨年に報告された方法で、従来の naked DNA の筋注法より格段に高発現が得られるとされている⁶⁾。

目的の遺伝子を組み込んだ plasmid cDNA を生理食塩水で希釈して 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ とした。Pentobarbital 1mg の腹腔内投与にてマウスを麻酔後、左右の前脛骨筋に 29G 針を用いて plasmid cDNA を 50 μg (33 μl) ずつ筋注した。その直後に筋注部分を挟むように 5mm 幅の双極針を穿刺して、100V125 μF の放電を 1 秒毎に 8 回行った (Gene Pulser, BIO-RAD)。予備実験として、以前我々が報告した pCAGGS-humanIL-10 を上記方法によって投与し、経時的に採血を行った (day0, 1, 3, 7, 14, 各群 n=2)。採血は右心室から行い、4 $^{\circ}\text{C}$ にて一晩放置後血清分離して -20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。血清 IL-10 は ELISA kit (EH-IL10, ENDOGEN) を用いて測定した。

(2) Decorin 遺伝子の構築と遺伝子発現の確認

human decorin 遺伝子を chicken β -actin promoter 支配

下の発現ベクターである pCAGGS expression vector⁷⁾ に組み込んだ pCA-decorin を作製した (Fig.1)。蛋白発現の確認のため、ヒト肺胞上皮細胞株 A549 細胞にネオマイシン耐性遺伝子と共に導入し、G418 含有 medium で培養して選択した。この培養上清を回収し、SDS-PAGE, Western Blotting を行い、rabbit 抗 human decorin 抗体 (GibcoBRL) を用いて検出した。また対照として lacZ 遺伝子も同様に pCAGGS expression vector に組み込んだ。

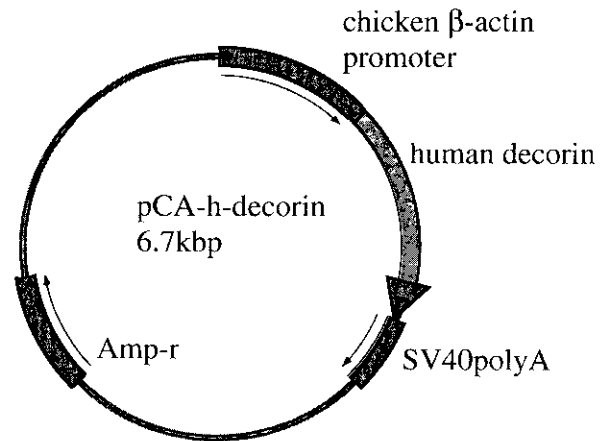


Fig.1

(3) プレオマイシン肺線維症マウスモデルに対する遺伝子治療

プレオマイシンによる肺線維症マウスモデルを以下のようにつく製した。8 週令雄 C57BL/6 マウス 12 匹に対し、プレオマイシン (日本化薬) を 24mg/kg ずつ 5 日連続 (day0-4) で腹部皮下に投与した。さらに、その後 (day9) に上記の筋肉内注入電気穿孔法によって pCA-decorin を 6 匹に各 100 μg 投与した。対象群として、pCA-lacZ を 6 匹に各 100 μg 投与した。28 日目に両肺を摘出し、肺湿重量を測定した。

(4) Hydroxyproline の定量

Woessner らの方法に準じて行った⁸⁾。すなわち、マウス全肺を 6N HCl 2ml とともにアンプル管に封入し、105 $^{\circ}\text{C}$ 、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 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分反応させた。冷却後、分光光度計にて 562nm の吸光度を測定し、hydroxyproline 標準液との比較で定量を行った。

結 果

(1) 筋肉内注入電気穿孔法による human IL-10 の生体内発現

はじめに筋肉内注入電気穿孔法による蛋白発現の程度を再確認する目的で、以前我々が報告した hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome 腹腔内投与

法との比較を pCAGGS-hIL-10 を用いて行った。HVJ-liposome 腹腔内投与方法では、血清中の human IL-10 の発現は最大 2 ないし 3pg/ml であったが、筋肉内注入電気穿孔法では最大 71pg/ml の高発現と 1 週間以上の持続を確認した (Fig.2)。導入遺伝子の全身発現において、この方法は有効であると考えられた。

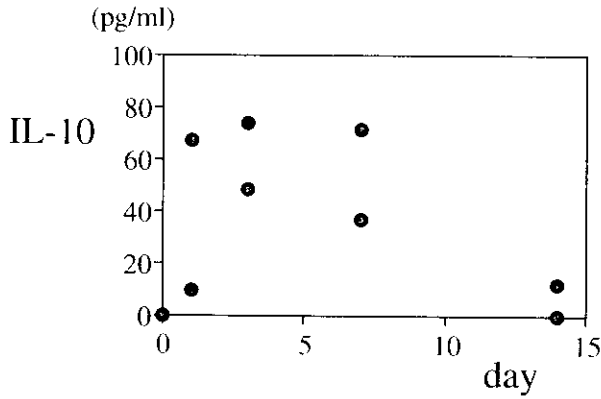


Fig.2

(2) decorin 遺伝子の発現の確認

ヒト肺胞上皮細胞株 A549 細胞へ pCA-decorin を導入し安定発現させた細胞株での培養上清において、Western Blotting 法によって decorin 蛋白の発現を確認した (Fig.3)。

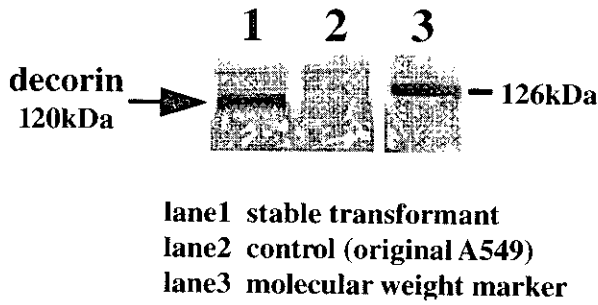


Fig.3

(3) プレオマイシン肺線維症マウスモデルに対する遺伝子治療

decorin 遺伝子の発現が、プレオマイシン肺線維症マウスモデルにおいて有効な治療方法となり得るかどうかについて検討を行った。線維化の指標として摘出肺の湿重量と hydroxyproline の定量を行った。治療群及び対照群 (各群 n=6) において、肺湿重量 (mg) は 170.3 ± 23.7 と 199.8 ± 24.6 (mean \pm SEM, $p=0.38$, Fig.4), hydroxyproline の定量 (μg) は 208.5 ± 15.4 と 259.0 ± 33.6 (mean \pm SEM, $P=0.21$, Fig.5) であった。

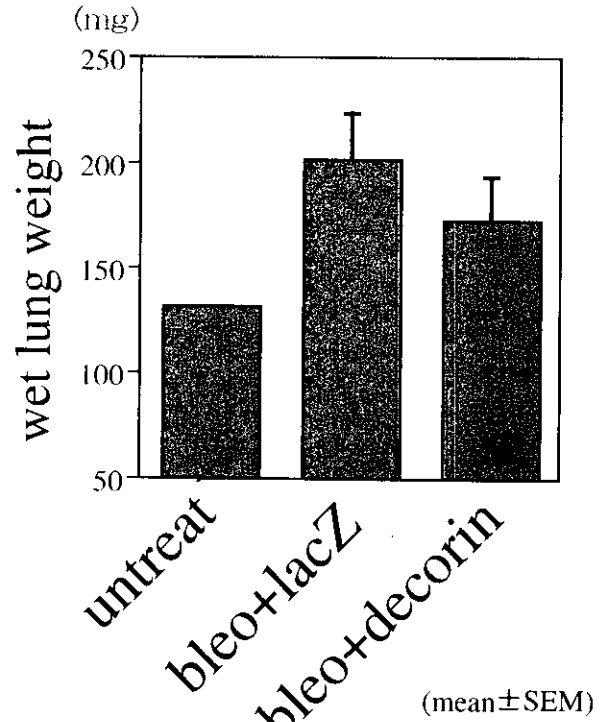


Fig.4

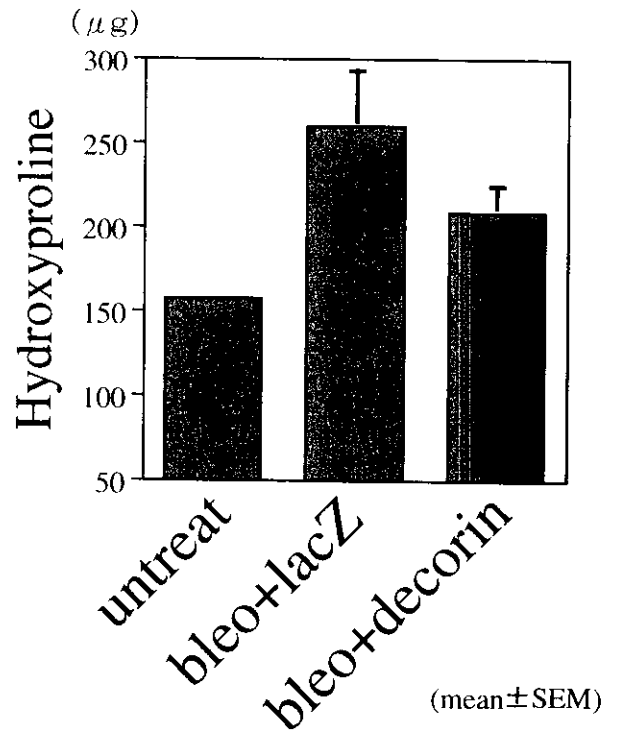


Fig.5

考案・結論

遺伝子導入によって疾患の治療を図る遺伝子治療については、様々な試みがなされている。肺線維症のようなびまん性の慢性疾患においては、炎症や線維化を抑制する因子の投与が持続的安定的に行えることがその利点と考えられる。これまで報告された実験的肺線維化動物モデルにおける遺伝子治療の報告はHVJ-liposome法を用いてPDGF soluble receptorを投与した我々の報告¹⁰⁾とadenovirus vectorを用いてSmad7を投与した報告がある¹¹⁾が、いずれも経気道的に投与している。将来の肺線維症に対する臨床応用まで視野に入れた場合、経気道的投与ではその到達が比較的中枢側に偏る可能性が高く、多くの症例で線維化の病変部位が中枢ではなくむしろ胸膜直下から始まる末梢を中心に分布していることを考慮すると、投与経路として全身的投与も検討する必要がある。今回、我々が選択した筋肉内注入電気穿孔法による全身発現は手技が比較的容易な上に持続的な高発現を得られることが2グループから報告されている^{6,12)}。また、我々もIL-10遺伝子を用いて従来法と比較したところ、それを支持する結果であった(Fig.2)。また、マウスモデルにおいては尾静脈からの投与と違い、筋肉組織で発現した蛋白が下大静脈を通過して直接肺へ到達する利点がある。

線維化を抑制する因子として、肺や他臓器において多くの種類が検討されているが、今回我々はdecorinを用いた。細胞外matrixの一つであるdecorinは当初*in vitro*でTGF- β と拮抗することが報告され¹³⁾、その後実験的腎炎モデルにおいてdecorinの精製蛋白¹⁴⁾あるいは遺伝子導入¹⁵⁾の有効性が報告された。また、実験的肺線維症モデルにおいても、ハムスターにプレオマイシンとdecorinの精製蛋白を同時に経気道的に投与することで線維化の抑制が図れたことが報告されている¹⁶⁾。この研究では両者の分布が一致すると予想されるため、プレオマイシンの経静脈的投与モデルにも同様の効果がえられるかどうかは確かではない。

現段階ではまだ予備実験の段階であるため有意差を得ることはできなかったが、さらに今後検討を重ねていく予定である。

参考文献

1) 林 清二：間質性肺炎発症とサイトカイン。日本内科学会雑誌 87: 163-8, 1998.
 2) 菅 守隆, 岡本竜哉, 彌永和宏: 肺のリモデリング-肺障害とリモデリングの分子生物学的機構-. 呼吸 17: 254-66, 1998.
 3) Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenberg AH.

Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 155-62, 1992.
 4) Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6642-6, 1991.
 5) Yoshida M, Sakuma J, Hayashi S, Abe K, Saito I, Harada S, Sakatani M, Yamamoto S, Matsumoto N, Kaneda Y, Kishimoto T. A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor beta 1, or platelet-derived growth factor B gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9570-4, 1995.
 6) Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol* 16: 867-70, 1998.
 7) Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108: 193-200, 1991.
 8) 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.
 9) Arai T, Abe K, Yoshida M, Mori M, Matsuoka M, Goya S, Kida H, Kaneda Y, Hayashi S. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury *in vivo*. *Am J Physiol* 278: L914-L922, 2000.
 10) Yoshida M, Sakuma-Mochizuki J, Abe K, Arai T, Mori M, Goya S, Matsuoka H, Hayashi S, Kaneda Y, Kishimoto T. *In vivo* gene transfer of an extracellular domain of platelet-derived growth factor beta receptor by the HVJ-liposome method ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 503-8, 1999.
 11) Nakao A, Fujii M, Matsumura R, Kumano K, Saito Y, Miyazono K, Iwamoto I. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* 104: 5-11, 1999.
 12) Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellac D, Schwartz B, Scherman D. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4262-7, 1999.
 13) Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346: 281-4, 1990.
 14) Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural