

総括報告

主任研究者 栗山 喬之

1. 研究要旨

本研究の目的の1つである肺高血圧症の発症機序の解明を目指し、動物実験としてモノクローリン肺高血圧症(MCT-PH)モデルを用いた検討を各方面より行った。初年度より引き続き炎症や細胞増殖に関与するマクロファージ遊走阻止因子(MIF)に着目した研究では、抗MIF抗体がMCT-PHの病態進展に対して抑制効果を有することが明らかとなった。また、ステロイド大量療法により肺動脈病変や右室肥大が抑制される可能性も示唆された。さらに、MCT-PHラットにみられる肺血管リモデリングの研究では、遊走した単核球が産生する誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)によりNO radicalが過剰産生され、血管リモデリングとしてのneointima形成に関与している可能性が示唆された。

臨床研究としては、本邦における慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)が女性にその発症頻度が高いことに着目し、臨床病態並びにHLAの解析を行った。その結果、高安病との関連性が示唆されるHLA B52陽性率が女性例で高率であり、さらに発症様式として潜伏発症の比率が高いことが判明した。このことから本邦におけるCTEPHの発症機序としては、深部静脈血栓症からの反復による欧米型の発症機序に加え、何らかの遺伝学的素因に規定された発症機序の存在が示唆された。また、小児PPH症例を対象とした治療前後での血中Adrenomedullin(AM)の測定により、血中AMがエンドセリンとともに原発性肺高血圧症(PPH)の肺血管病変の経時的評価を行う上で有用な指標となりうることが示唆された。

肺高血圧症の内科的治療としては、前毛細血管性肺高血圧症に対する一酸化窒素(NO)吸入の急性効果により、持続吸入並びに吸気時のみのパルス吸入ともに、有害作用無く選択的に肺血管抵抗を低下させることが可能であった。今後、在宅での臨床応用を視野に入れた研究が必要と思われた。また肺高血圧症に対する内科的治療指針確立を目指し、CTEPH、膠原病に伴う肺高血圧症(CoPH)、およびPPHを対象に、各疾患毎に現段階における内科的治療指針案の作成を試みた。CTEPHに対しては、重症度

により大きく2つに分け、Stage2以下の軽症例には抗凝固療法、在宅酸素療法などの内科的治療を優先し、Stage3以上の中等症以上の症例では、抗凝固療法を行った上で外科的な肺血栓内膜摘除術の適応を考慮するものとした。しかしながら、血栓付着が末梢優位の症例や重症な肺高血圧を有する症例に対しては、肺移植やPGI2持続静注療法の適応なども考慮され、今後の大きな検討課題と思われた。CoPHの治療指針としては、一部の症例で免疫療法やプレドニン内服治療が有効であり、実験的な成績と合わせ、今後ステロイド剤や免疫抑制剤による治療プロトコルの確立が望まれた。

PPHに対する内科的治療としては、経口可能なPGI2誘導体ベラプロストナトリウム(BPS)の長期内服により、肺循環動態の改善に加え生命予後の改善効果もみられ、有用な治療法である可能性が示唆された。また、PGI2持続静注療法に関しては、重症のPPH小児例においても一部の不良例を除き、長期効果は良好であった。またPPH成人例に対しても、肺循環動態および運動耐容能の改善が認められ、今後PPHに対して中心的な治療法となる可能性が示唆された。さらに、肺移植の適応も考慮される重症な血管原性肺高血圧症例においても、PGI2投与により自覚症状および運動耐容能の改善がみられた。しかしながら、BPSによる内服治療とPGI2持続静注療法の選択基準は明白とはいえ、両者の治療法をどう使い分けるかが今後の大きな課題と思われた。このPGI2持続静注療法に関しては、在宅でのポンプ療法が未だ保険適応となっていないため、その普及に大きな支障ともなっている。すでに在宅ポンプ療法を独自に行っている症例を対象とした臨床調査成績では、本療法による労作時の息切れや健康関連Quality of life(HRQL)の改善効果は明らかであり、適切な教育・指導を行えば安全に実施可能であることが示唆された。

PPHに対する内科的治療指針確立を目指した研究としては、初年度に内科的治療選択指針案の作成をすでに行っているが、今年後は、本研究班参加施設によるPPH新規症例の登録並びにこの治療選択指針案に沿ったプロスペクティブな研究を開始した。これまで全例で50例の登

録があり、このうち31例の新規症例では、NYHAⅡ度以下の症例を中心に8例が経口PGI₂療法を、NYHAⅢ度以上の症例を中心に22例でPGI₂持続静注療法が選択された。今後、HRQLなどへの影響についても検討を加え、PPHに対する内科的治療指針の確立を目指す予定である。

II. 研究目的

本研究の目的は、肺高血圧症の発症機序を解明すること、並びに各種肺高血圧症に対する内科的治療指針の確立を目指すものである。

肺高血圧症の発症機序の解明としては、動物実験モデルとしてMCT-PHラットを用い、肺高血圧進展における各種薬剤の抑制効果または増強効果を検討する。今年度は、MCT-PHにおける抗MIF抗体並びにステロイド大量投与による抑制効果について検討を加える。さらに、肺高血圧症の治療として臨床応用されている一酸化窒素(NO)に着目し、NO並びにiNOSのMCT-PHにおける役割を明らかにする。また、臨床例においてもCTEPH多数例をもとに遺伝学的素因の有無をはじめとして、肺高血圧症の成立機序についての糸口の解明を目指す。

PPH臨床例において、血中Aderenomedulin(AM)値の臨床的意義を明らかにし、PGI₂持続静注療法開始後の肺血管病変の経時的評価を行う上での有用性を検討する。また、前毛細血管性肺高血圧症においてNO吸入による在宅での治療の可能性も視野に入れ、NO吸入の肺循環動態へ及ぼす急性効果を明らかにする。

各種肺高血圧症の内科的治療指針の確立としては、PPH、CoPH、CTEPHの3疾患を取り上げ、これまでの内科的および外科的治療経験をもとに、有効性の高い治療法を選択し、重症度を加味した治療選択指針案の作成ならびにその普及を目指す。PPHに対する内科的治療法としては、経口PGI₂製剤であるBPSの長期内服療法と静注用PGI₂製剤による持続静注療法の2つを取り上げ、中心的施設におけるこれまでの臨床経験をもとに肺循環動態への効果並びに生存率改善効果について明らかにするとともに、副作用やトラブルの事例についても調査し、その対応策を見出す。さらに、PGI₂持続静注療法に関しては、肺移植適応症例における臨床的意義についても明らかにする。CTEPHに関しては、外科的治療である肺血栓内膜摘除術の効果を、生存曲線並びにHRQLの観点から評価を加え、外科的治療の有用性並びに適応基準を明白にする。また、特にPPHに関しては、わが国独自の内科的治療指針の確立が急務とされるが、PPHが稀少疾患でもあり、短期間に十分な対象例をもとにしたエビデンスを得るには多施設共同研究が必須といえる。そこで本研究班

参加施設によるPPH新規症例の登録を行い、治療選択指針案の妥当性に関してプロスペクティブな評価を加え、本邦におけるPPHに対する内科的治療指針の確立を目指す。

III. 研究方法

肺高血圧症の発症機序の解明を目指す動物実験としては、モノクロタリン肺高血圧症(MCT-PH)ラットを用いた。SDラットにモノクロタリン(MCT)を60-80mg/kg皮下投与し、肺高血圧モデルを作成し、ウサギ抗ラットMIF抗体、ステロイド薬大量投与による右室肥大の抑制効果、並びに肺小動脈の中膜肥厚の程度に及ぼす影響について組織学的に検討した。さらに、NO donorとしてL-Arginineの投与を、NOSの阻害薬としてAminoguanidineを投与し、肺循環動態への影響を観察するとともに、抗iNOS抗体並びに抗Nitrotyrosine抗体による免疫組織染色による評価も行った。

臨床研究としては、小児PPH連続14例を対象にPGI₂持続静注療法施行前後での静脈血中AM値を測定し、肺循環諸量並びに血中エンドセリン(ET-1)、BNP、ANPなどとの関連性を検討した。また、NO吸入の急性効果としては、PPH、CTEPH、CoPHなどの前毛細血管性肺高血圧症10例を対象として、鼻カニューラを用いた吸気時のみのパルス吸入並びにフェイスマスクを用いた持続吸入の肺循環動態への影響を検討した。また、CTEPH連続69例を対象に臨床病態、深部静脈血栓症の有無に加え、HLA Class Iの血清学的タイピングを行い、HLA B52の出現の有無を検討した。

PPHに対する内科的治療に関する研究としては、BPSの長期内服治療を行った24例と通常療法のみ34例の2群を対象に、BPS投与後の肺循環動態の測定ならびにKaplan-Meier法による生存曲線の比較を行った。PGI₂持続静注療法の効果に関しては、小児PPH18例および成人PPH、CoPHなどの血管原性肺高血圧症例20例を対象に、肺循環諸量、運動耐容能への効果を検討するとともに、副作用や合併症についても調査し本療法の有用性を評価した。このPGI₂持続静注療法の臨床的効果に関しては、肺移植適応検討中のPPHを中心とした肺高血圧症7例を対象とした検討も行った。また、すでに在宅にて静注用PGI₂製剤によるポンプ療法を6ヶ月以上施行しているPPH14例を対象に、本療法に伴う副作用やトラブルの事例をアンケート調査するとともに、SF-36を用いたHRQLの評価も行った。CoPHに対する内科的治療としては、CoPH9例を対象にプレドニン投与量と肺高血圧軽減効果について検討した。

CTEPHにおける内科的および外科的治療指針に関する研究としては、CTEPH57例を対象に手術施行群34例、手術適応であったが手術を行わず内科的治療を選択した内科治療重症群13例、手術適応と判断されなかった内科治療軽症群10例の3群に分け、3群間でKaplan-Meier法による生存曲線並びにSF-36を用いたHRQLの比較を行い、手術の有用性並びに手術適応基準の妥当性の評価を行った。本研究班参加施設によるPPHの内科的治療選択指針案に対するプロスペクティブな共同研究としては、PPHの新規登録並びに治療選択指針案に準じた治療選択を行い、指針案の妥当性を評価した。(倫理面への配慮) 臨床調査に関しては、調査の目的並びに調査結果により不利益の被ることのないことやプライバシーは完全に保護されることを文書にて説明したうえで、文書による同意を得た。また、薬剤による急性効果や治療選択に関しても、対象例に十分説明を行ったうえで、文書による同意を得て行った。肺高血圧症登録カードによる新規症例登録は、原則としてイニシャルにて行い、個人情報すべて事務局にて厳重に管理し、個人情報外部に漏れたり、プライバシーが侵害されることのないよう十分な配慮を行った。

IV. 研究成果

肺高血圧症の発症機序の解明を目指した動物実験では、MCT-PHモデルを用いた検討により肺高血圧の進展機序に関していくつかの新事実が明らかとなった。まず、炎症や細胞増殖に関与するマクロファージ遊走阻止因子(MIF)に対する抗体の投与により、右室収縮期圧には有意差はみられないものの、右室/左室重量比にみる右室肥大の程度は抑制され、同時に肺動脈平滑筋の肥厚も有意に軽減し、MCT-PHの病態進展に対して抑制効果が認められた。また、ヒトのステロイドパルス療法に準じた多量のステロイド投与では、有意差はみられなかったものの、肺動脈病変や右室肥大への抑制効果が示唆された。さらに、MCT-PHラットにみられる肺血管リモデリングの研究では、NO donor投与は肺高血圧の増強並びに肺動脈のneointima形成をもたらし、逆にNOSの阻害によりMCT-PHの血管リモデリングの改善効果が認められた。

臨床研究としては、小児PPH症例を対象としたPGI2持続静注療法前後での血中AMの測定により、血中AMは心不全の重症度に比例して上昇することが明らかとなった。さらに、右房圧および血中ET-1とは正の相関を認めたが、ANP、BNPとは一定の傾向を示さなかった。前毛細血管性肺高血圧症に対するNO吸入の急性効果では、持続吸入並びに吸気時のみのパルス吸入ともに、肺血管

抵抗は低下したが、大動脈圧、心拍数には変動はみられなかった。また、持続吸入、パルス吸入ともに室内気のNOxの汚染、血中メトヘモグロビンの増加は認められなかった。CTEPHを対象とした臨床研究では、臨床病態の特徴として女性例では潜伏型が7割と多数を占めていたのに比し、男性例では反復型が約2/3を占め、同時に深部静脈血栓症の合併頻度も男性で高率であった。また、HLA B52陽性率は、女性44%、男性29%と女性での陽性率が高率であった。

PPHに対する内科的治療法の1つである経口PGI2内服治療の効果では、BPSの長期投与により心拍出量(CI)は17%増加し、肺動脈平均圧(PAm)は13%、肺血管抵抗(PVR)は25%それぞれ有意に減少した。また、生存曲線の比較でも既存薬群に比しBPS投与群では有意に生存率が良好であった。一方、PGI2持続静注療法の効果では、小児例では治療開始前の心機能が不良であった4例で治療後早期の死亡がみられたが、3ヶ月以上経過した14例中13例が長期生存し、NYHA心機能分類の改善に加え、酸素吸入に対する反応性の回復も認められた。10例では在宅ポンプ療法へ切り替えられ治療を続行していた。成人例でも、長期観察が可能であった症例では、CIは38.5%増加し、PAmは13.3%、PVRは28.5%低下し、運動耐容能としての6分間歩行距離も平均290mから425mへ増加し、自覚症状の著明な改善も得られた。20例の対象例中、13例が在宅ポンプ療法へ移行し、4例は1~2ヶ月の投与後、PGI2からの離脱が可能であった。一方、肺移植適応検討中の肺高血圧症7例に対しても、PGI2投与はPAmの軽減作用がみられ、特に長期投与を行った4例中3例で自覚症状の改善が得られ有効であった。PGI2の在宅ポンプ療法を6ヶ月以上施行しているPPH症例のアンケート調査では、顎痛、顔面紅潮、足底痛、下痢、嘔吐などの副作用に加え、ポンプ・輸液システムに関連した何らかのトラブルを経験していたが、多くは在宅での対処が可能であった。また、ポンプ療法の施行に伴い、自覚症状としての息切れの有意な改善に加え、HRQLの評価でも全ての項目で有意な改善が認められた。一方、CoPHに対するステロイド治療では、プレドニゾン(PSL)30mg以上投与された症例でPAmの20%以上の減少がみられた。

CTEPHに対する治療法による比較では、手術施行群は内科治療重症群に比し有意に予後が良好であり、5年生存率は手術群が77%、内科治療重症群は34%であった。また、内科治療軽症群には死亡例はみられなかった。労作時の息切れおよびHRQLの評価でも、手術施行群は内科治療重症群に比し良好に保たれていた。

PPHの多施設共同による症例登録は、全例で50例の登録があり、このうち31例が平成11年1月1日以降に右心カテーテル検査を行い、内科的治療選択を行っていた。初年度に作成したPPHに対する内科的治療選択指針案に従い、NYHAⅡ度以下の症例を中心に8例が経口PGI2療法を、NYHAⅢ度以上の症例を中心に22例でPGI2持続静注療法が選択されていた。後者のPGI2持続静注療法を選択した22例中、在宅ポンプ療法施行により退院となった症例は2例にすぎず、肺移植へのレシピエント登録を行っている症例も7例にみられた。

V. 考察

本研究の目的の1つである肺高血圧症の発症機序の解明を目指した動物実験では、MCT-PHモデルにてMIFの肺高血圧症への関与を証明し得た。MIFはステロイドの作用に拮抗し、組織障害や修復過程で関与する可能性が考えられている。一方で、ステロイドの大量投与はMCT-PHモデルにおいて肺高血圧の抑制効果が示唆されたことより、今後、MIFの肺高血圧抑制作用の詳細なメカニズムを解明するうえで、サイトカインや成長因子に対する効果についても検討する必要があるものと思われた。この抗MIF抗体を用いた治療は、血管平滑筋増殖による血管壁の肥厚を直接制御する新たな治療法としても期待できるものと考えられた。また、MCT-PHラットにみられる肺血管リモデリングの研究では、遊走した単核球が産生する誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）によりNO radicalが過剰産生され、neointima形成に関与している可能性が示唆された。このことは、臨床例におけるNO吸入による肺高血圧軽減効果とは相反するものであり、興味深いものといえるが、NO吸入の臨床応用へ向けて更なる検討が必要と思われた。

臨床研究としては、血中AMがエンドセリンとともにPPHの肺血管病変の経時的評価を行う上で有用な指標となりうるものが示唆された。PPHにおいて内科的治療法の選択やPGI2の投与量を調節するうえで、この血中AMを指標の1つとして用いることも可能であり、内科的治療選択ガイドラインへの組み込みも今後考慮すべきものと思われた。また、前毛細血管性肺高血圧症に対するNO吸入の急性効果の検討では、持続吸入並びに吸気時のみのパルス吸入ともに、有害作用無く選択的に肺血管抵抗を低下させることが可能であった。本療法は、導入が比較的容易であり、PGI2持続静注療法のような煩雑さがない利点も有していることから、今後、在宅での臨床応用を視野に入れた多施設共同での臨床試験が必要と思われた。本邦におけるCTEPHは女性にその発症頻度が高く、高安

病との疾患関連性が示唆されるHLA B52陽性率も女性例で高率であった。さらに発症様式として潜伏発症の比率が高いことから、本邦におけるCTEPHの発症機序としては、深部静脈血栓症からの反復による欧米型の発症機序に加え、何らかの遺伝学的素因に規定された発症機序の存在が示唆された。こうした遺伝学的素因を有した症例において、肺動脈レベルでの血栓付着ないしは残存のメカニズムの解明が必要であり、手術症例の摘出血栓内膜や肺組織標本を用いた検討が今後の課題と思われた。

各種肺高血圧症に対する内科的治療指針確立を目指した取り組みとしては、CTEPH、CoPH、PPHを対象に、各疾患毎に現段階における内科的治療指針案の作成を試みた。CTEPHに対しては、重症度により大きく2つに分け、Stage2以下の軽症例には抗凝固療法、在宅酸素療法などの内科的治療を優先し、Stage3以上の中等症以上の症例では、抗凝固療法を行った上で外科的な肺血栓内膜摘除術の適応を考慮するものとした。手術施行症例の生命予後およびHRQLは、手術適応であるのに手術を施行しなかった内科治療重症例に比し有意に良好であり、外科的治療の有用性が再確認された。しかしながら、血栓付着が末梢優位の症例や重症な肺高血圧を有する症例に対しては、肺移植やPGI2持続静注療法の適応なども考慮され、今後の大きな検討課題と思われた。CoPHの治療指針としては、一部の症例で免疫療法やプレドニン内服治療が有効であり、実験的な成績と合わせ、今後ステロイド剤や免疫抑制剤による多施設共同での治療プロトコルの確立が望まれた。

PPHに対する内科的治療としては、経口可能なPGI2誘導体BPSの長期内服により、肺循環動態の改善に加え生命予後の改善効果もみられ、有用な治療法である可能性が示唆された。また、PGI2持続静注療法に関しては、重症のPPH小児例においても一部の応答例を除き、長期効果は良好であった。またPPH成人例に対しても、肺循環動態および運動耐容能の改善が認められ、今後PPHに対してPGI2持続静注療法が中心的な治療法となる可能性が示唆された。しかしながら、BPSによる内服治療とPGI2持続静注療法の選択基準は明白とはいえず、両者の治療法をどう使い分けるかが今後の大きな課題と思われた。このPGI2持続静注療法に関しては、適切な投与方法や用量の設定法は未だ確立されてなく、今後多症例での検討が必要であり、この意味においても多施設共同でのプロスペクティブな臨床研究の成果が期待される。このPGI2持続静注療法に関しては、在宅でのポンプ療法が未だ保険適応となっていないため、その普及に大きな支障ともなっている。しかしながら、すでに在宅ポンプ療法を独自に

行っている症例を対象とした臨床調査成績では、本療法による労作時の息切れや健康関連QOLの改善効果は明らかであり、適切な教育・指導を行えば安全に実施可能であることが示されたものといえる。

PPHに対する内科的治療指針確立を目指した研究としては、初年度に内科的治療選択指針案の作成をすでに行っているが、今年後は、本研究既参加施設によるPPH新規症例の登録並びにこの治療選択指針案に沿ったプロスペクティブな研究を開始した。これまで全例で50例の症例登録が得られ、このうち31例の新規症例では、NYHA II度以下の症例を中心に8例が経口PGI₂療法を、NYHA III度以上の症例を中心に22例でPGI₂持続静注療法が選択された。今後、HRQLなどへの影響についても検討を加え、最終年度までにPPHに対する内科的治療指針の確立を目指す予定である。

VI. 結論

本研究の目的は、肺高血圧症の発症機序を解明すること、並びに各種肺高血圧症に対する内科的治療指針の確立を目指すものである。肺高血圧の発症機序の解明を目指した基礎的研究では、モノクロタリン肺高血圧症ラットの肺高血圧発症に、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)や単核球が産生する誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の関与が示唆された。また、各種肺高血圧症に対する内科的治療指針としては、原発性肺高血圧症に対して経口PGI₂製剤の内服とPGI₂持続静注療法を柱とした内科的治療選択指針案を作成し、新規症例の登録と合わせプロスペクティブな多施設共同研究を開始した。慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対しては、外科的治療法である肺血栓内膜摘除術の適応基準を中心として、重症度基準に基づいた治療選択指針を作成した。

VII. 発表論文

- 1) Nijima M, Kimura H, Edo H, Shinozaki T, Kang J, Masuyama S, Tatsumi K, Kuriyama T: Manifestation of pulmonary hypertension during REM sleep in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1766-1772.
- 2) Okada O, Tanabe N, Yasuda J, Yoshida Y, Katoh K, Yamamoto T, Kuriyama T: Prediction of life expectancy in patients with primary pulmonary hypertension. A retrospective nationwide survey from 1980-1990. *Inter. Med.* 1999; 38: 12-16.

- 3) 安田順一、岡田修、栗山喬之、長尾啓一、山岸文雄、橋爪一光、鈴木光：閉塞性換気障害を伴った肺結核後遺症における肺循環動態と胸部X線所見の検討 *結核* 1999; 74: 5-18.
- 4) 佐藤圭一、岡田修、田辺信宏、加藤邦彦、安田順一、山本司、齊藤正佳、森典子、栗山喬之：肺血管が1次性に冒されて生じる肺高血圧症における酸素吸入の呼吸・循環動態への影響 *日呼吸会誌* 1999; 37: 449-457.
- 5) 安田順一、岡田修、栗山喬之、長尾啓一、山岸文雄、橋爪一光、鈴木光：高炭酸ガス血症を伴った肺結核後遺症における肺循環動態と胸部x線所見の検討 *結核* 1999; 74: 585-598.
- 6) 潤間隆宏、田辺信宏、飯森隆志、梁川範幸、岡田修、北原宏、栗山喬之：造影らせんCTを用いた肺血栓塞栓症の診断に関する検討 *臨床放射線* 1999; 44: 161-166.
- 7) Kimura H, Kasahara Y, Kurosu K, Sugito K, Takiguchi Y, Terai M, Mikata A, Natsume M, Mukaida N, Matsushima K, Kuriyama T: Alleviation of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension by Antibodies to Monocyte Chemotactic and Activating Factor/Monocyte Chemoattractant Protein-1. *Lab. Invest.* 1998; 78: 571-581.
- 8) Kimura H, Nijima M, Abe Y, Edo H, Sakabe H, Kojima A, Hasako K, Masuyama S, Tatsumi K, Kuriyama T: Compensatory excretion of prostacyclin and thromboxane metabolites in obstructive sleep apnea syndrome. *Intern. Med.* 1998; 37: 127-133.
- 9) Yamamoto T, Kimura H, Okada O, Katoh K, Tanabe N, Yasuda J, Yoshida Y, Kuriyama T: Arterial and mixed venous oxygen desaturation during incremental exercise in patients with chronic pulmonary disease. *Intern. Med.* 1998; 37: 280-285.
- 10) Igari H, Tatsumi K, Sugito K, Kasahara Y, Saito M, Tani T, Kimura H, Kuriyama T: Role of EDRF in pulmonary circulation during sustained hypoxia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998; 31: 299-305.
- 11) Sugito K, Tatsumi K, Igari H, Kasahara Y, Tani T, Kimura H, Hayashi F, Kuriyama T: Role of carotid body in pressure response

- of pulmonary circulation in rats. *Respiration Physiology* 1998 ; 111 : 283-293.
- 12) Saito S, Nishimura M, Shirano H, Makita H, Tsujino I, Shibuya E, Sato F, Miyamoto K, Kawakami Y : Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1999 ; 159 : 1014-1018.
 - 13) Saito S, Miyamoto K, Nishimura M, Aida A, Saito H, Tsujino I, Kawakami Y : Effects of inhaled bronchodilators on pulmonary hemodynamics at rest and during exercise in patients with COPD. *Chest* 1999 ; 115 : 376-382.
 - 14) 谷野美智枝、本多敏朗、信濃秀希、谷野功典、辻野一三、斉藤俊一、西村正治、宮本顕二、川上義和 : モザイクパターンの胸部CT像が診断に有用であった慢性肺血栓塞栓症の1例 日呼吸会誌 1999 ; 37 : 594-599.
 - 15) Makita H, Nishimura M, et al : Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on LPS-induced pulmonary neutrophil accumulation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1998 ; 158 : 573-579.
 - 16) Wang Y, Kanatsuka H, Akai K, Sugimura A, Kumagai T, Komaru T, Sato K, Shirato K. : Effects of low doses of endothelin-1 on basal vascular tone and autoregulatory vasodilation in canine coronary microcirculation in vivo. *Jpn. Circ. J.* 1999 ; 63 : 617-623.
 - 17) Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Murakami H, Sasano H, Shirato K, Shibahara S. : Adrenomedullin in monocytes and macrophages : possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis. *Clinical Science.* 1999 ; 97 : 247-251.
 - 18) Kumasaka N, Sakuma M, Shirato K : Incidence of pulmonary thromboembolism in Japan. *Jpn. Circ. J.* 1999 ; 63 : 439-441.
 - 19) Seki T, Okayama H, Kumagai T, Kumasaka N, Sakuma M, Isoyama S, Shirato K, Odaka H. : Arg506Gln mutation of the coagulation factor V gene not detected in Japanese pulmonary thromboembolism. *Heart & Vessels.* 1998 ; 13 : 195-198.
 - 20) 白戸邦男、佐久間聖二、熊坂祝久 : 肺血栓塞栓症の診断と治療 日内会誌 1998 ; 87 : 1892-1896.
 - 21) 佐地勉、太田八千雄、木藤信之 : 原発性肺高血圧症の新しい治療方針 *Current Opinion in Cardiology* 1998 ; 19 : 26-34.
 - 22) 太田八千雄、佐地勉、木藤信之、三浦正次、浜田勇、俣野順 : 生体肺葉移植を受けた原発性肺高血圧症の本邦3小児例 日本小児循環器学会誌 1998 ; 14 : 42-46.
 - 23) 佐地勉、松裏裕行、小澤安文、中山智孝、星田宏、石北隆、平山佳代子、田村恵子 : 原発性肺高血圧症の新しい治療法 *Tokyo Heart J* 1998 ; 18 : 70-76.
 - 24) 佐地勉 : 小児期の原発性肺高血圧症の概念 日本小児循環器学会誌 1998 ; 14 : 8-10.
 - 25) 吉田俊治、片山雅夫、鳥飼勝隆 : 全身性エリテマトーデスの肺病変、肺血管病変 *The Lung* 1998 ; 6 : 281-284.
 - 26) 吉田俊治、浅野真一、鳥飼勝隆 : 膠原病の治療法、自己管理とQOL 日内会誌 1998 ; 86 : 1414-1420.
 - 27) Kunieda T, Nakanishi N, Satoh T, Kyotani S, Okano Y, Nagaya N. : Prognoses of primary pulmonary hypertension and chronic major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension determined from cumulative survival curves. *Intern. Med.* 1999 ; 38 : 543-546.
 - 28) Okano Y, Satoh T, Tatewaki T, Kunieda T, Fukuyama S, Miyazaki N, Beppu Y. : Pulmonary artery sarcoma diagnosed using intravascular ultrasound images. *Thorax.* 1999 ; 54 : 748-749.
 - 29) Kakishita M, Nishikimi T, Okano Y, Satoh T, Kyotani S, Nagaya N, Fukushima K, Nakanishi N, Takishita S, Miyata A, Kangawa K, Matsuo H, Kunieda T. : Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Clinical Science.* 1999 ; 96 : 33-39.
 - 30) 里見和浩、佐藤徹、京谷晋吾、福島聖二、岡谷嘉明、中西宣文、国枝武義 : 肺高血圧症におけるPGE1長期投与の有用性. 日呼吸会誌 1999 ; 36 : 421-427.
 - 31) 国枝武義、河合忠一、白土邦男、上松瀬勝男、由井芳樹 : 原発性肺高血圧症に対するエポプロステノールナトリウムの臨床評価 臨床医薬 1998 ; 14 : 1091-1119.

- 32) 国枝武義：特発性肺高血圧症の治療はどこまで来たか
日本胸部臨床 1998； 57： 105-115.
- 33) Nagaya N, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Nakanishi N, Yamagishi M, Kunieda T, Miyatake K.: Serum uric acid levels correlate with the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999； 160： 487-492.
- 34) Ando M, Takamoto S, Okita Y, Matsukawa R, Nakanishi N, Kyotani S, Satoh T.: Operation for chronic pulmonary thromboembolism accompanied by thrombophilia in 8 patients. *Ann. Thorac. Surg.* 1999； 66： 1919-1924.
- 35) 京谷晋吾、中西宣文：原発性肺高血圧症の新しい治療 (Prostacyclin 持続点滴療法) 治療 1999； 82： 81-85.
- 36) Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Kyotani S, Satoh T, Nakanishi N, Matsuo H, Kangawa K.: Secretion patterns of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide in patients with or without pulmonary hypertension complicating atrial septal defect. *Am. Heart J.* 1998； 136： 297-301.
- 37) Nakayama Y, Sugimachi M, Nakanishi N, Takaki H, Okano Y, Satoh T, Miyatake K, Sunagawa K.: Noninvasive differential diagnosis between chronic pulmonary thromboembolism and primary pulmonary hypertension by means of Doppler ultrasound measurement. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998； 31： 1367-1371.
- 38) Nagaya N, Nakanishi N, et al. Plasma Brain Natriuretic Peptide Levels Increase in Proportion to Extent of Right Ventricular Dysfunction in Patients with Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1998； 31： 202-208.
- 39) Okada K, Tanaka Y, Bernstein M, Botney MD.: Hemodynamics modulate pulmonary artery response to injury. *Chest* 1998； 114 (1 Suppl)： 7S-8S.

分 担 研 究 報 告

モノクロータリン (MCT) 肺高血圧症ラットにおける 抗マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) 抗体の効果

西村 正治¹⁾ 牧田比呂仁¹⁾ 辻野 一三²⁾ 谷野 功典¹⁾
宮本 顕二³⁾ 西平 順³⁾ 川上 義和¹⁾

はじめに

1989年、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) のcDNAがクローニングされて以来その分子病態学的研究が可能となり¹⁾、現在までに多くの臓器や細胞で産生され、種々の炎症や免疫反応に関与することが報告された²⁻⁴⁾。またMIFの特有の機能として、グルココルチコイドの抗炎症作用に拮抗することから、局所において炎症を調節している可能性が報告されている⁵⁾。呼吸器疾患におけるMIFの役割は、エンドトキシン (LPS) 投与ラット肺組織や急性呼吸促進症候群 (ARDS) 患者の気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中でMIFが増加していること、また、MIFがヒト好酸球でも産生され気管支喘息患者のBAL液中に増加していることから、好中球または好酸球性の急性気道炎症での関与が確認されている⁶⁻⁸⁾。しかし、慢性期の炎症や組織のリモデリングにおけるMIFの意義やメカニズムに関する報告はない。

原発性肺高血圧症 (PPH) は原因不明の致命的な疾患であり、肺高血圧の発症機序や病態進展機序の早期解明が望まれる。現在、プロスタサイクリン合成酵素 (Prostacyclin synthase: PGIS) の過剰発現が肺高血圧の進展を抑制することが解明されており、PPH症例におけるプロスタサイクリンの持続投与の有効性が証明され新たな治療法として期待されている。しかし、半減期が短いこと、投与経路の感染やコストの面での問題点も指摘されている^{9,10)}。

これまでに我々は、動物モデルの実験において抗MIF抗体投与により、急性肺傷害や急性肝不全などの急性期の炎症が抑制されることを証明した^{11,12)}。また、昨年MCT投与ラットにおいて、病理組織学的に肺動脈中膜の肥厚を

確認し、気道上皮細胞に加えマクロファージや肺動脈中膜にMIFが存在し、このMCTモデルにおけるMIFの関与を証明した。近年、MIF生物学的機能として急性炎症の他、広く免疫反応や細胞増殖に関与することから、慢性の炎症や組織のリモデリングの際にも重要な因子として役割を果たしている可能性が考えられ、PPHの病態進展において直接、血管平滑筋増殖による血管壁の肥厚を制御する新たな治療法として期待できる^{3,13)}。本研究では肺高血圧症進展におけるMIFの関与を、抗MIF抗体による肺高血圧症の抑制効果で評価し、新たな治療法と成る可能性を検討した。

対象と方法

対象: SDラット (Specific pathogen free) 33匹、雄、約6週齢 (222 ± 8g [mean ± SD]) を実験に用いた。
方法:

1. 抗MIF抗体の効果

ラット (n = 12) を、対照血清 + MCT (MCT群) と抗MIF抗体 + MCT (抗体群) の2群に分け実験を行った。抗体はウサギ抗ラットMIF抗体、5mg/kgをMCT投与2時間前と3日毎に合計7回、腹腔内に投与した。対照血清として非免疫ウサギγグロブリンを使用した。MCTは2% MCT (Crotaline, Sigma) 溶液80mg/kgを上背部皮下に一回投与し、対照には生理食塩水を同様に一回投与した。MCT投与3週後、ペントバルビタール (50mg/kg) 腹腔内投与により麻酔。以下の項目について検討した。

1) 右室収縮期圧: 気管切開し金属チューブ (18G) を挿管し、人工呼吸器装着 (TV = 2.5ml, 75/min) 下で開胸。右室にポリエチレンカテーテル (PE50, Becton Dickinson) を右室内に挿入し、圧トランスデューサで右室内圧を連続的に測定した。

2) 右室/左室 + 中隔重量比 (RV/LV + S): 心房を切除した後、右室のみを単離し、右室肥大の指標としてRV/LV + Sを求めた。

1) 北海道大学第一内科
2) 同医療技術短期大学部
3) 同中央研究部

ゲラチン・バリウム手技：右心室よりヘパリン 500 単位注入後、肺動脈にポリエチレンカテーテル（16G）を肺動脈主幹部に挿入し留置。20 cmH₂O、37℃リン酸緩衝液 20ml で 3 分間以上灌流し、肺血管内血液駆出した。その後、同部位より定圧（73.5mmHg）で一定時間（3分間）ゲラチン・バリウム混合液を注入し、また、気管チューブより 10% 中性緩衝ホルマリン溶液を注入（30 cmH₂O）し伸展固定した。

3) % media wall thickness (% WT)：各ラットの左肺よりプレパラートを作成し、Elastica-Masson 染色を施行した。終末細気管支から呼吸細気管支周囲にある正円形の肺動脈（外径 50-150 μm）について、画像解析装置（MCID）を用いて肺動脈の外径に対する中膜厚の比、(% WT = 肺動脈中膜厚 × 2 / 肺動脈の外径 × 100) を各プレパラート 18 個ずつ測定した。

4) 筋層の分布：健常肺では通常筋層のみ見られない、呼吸細気管支から肺胞道や肺胞周囲にある 50 μm 以下の肺動脈について、MCT 肺高血圧に伴う筋層出現の有無を、(1) 肺小動脈壁内腔に筋層が全く認められない (non-muscular)、(2) 一部に見られる (partially-muscular)、(3) 全周に認められる (completely-muscular) に分類し、各群の筋層出現頻度を評価した。

2. MIF 濃度の経時変化

別のグループの SD ラットを用い (n = 21)、MCT 投与前、MCT 投与後 1 日、3 日、1 週、2 週、3 週、4 週で脱血、肺血管を生理食塩水で洗浄、24ml の生理食塩水で

気管支肺胞洗浄した後、肺を摘出した。各肺組織サンプルのホモジネート上清の MIF 濃度の変化を ELISA で測定した。

統計処理：測定値は平均値 ± 標準誤差で示した。2 群間の比較は Mann-Whitney の u 検定を用い p < 0.05 を有意とした。

結果

1. 右室収縮期圧：MCT 群は 41.8 ± 5.8mmHg (n = 5)、抗体群は 27.0 ± 3.5mmHg (n = 3) で、2 群間に有意差を認めなかった (p = 0.099) (図 1)。
2. RV/LV + S：MCT 群 (0.58 ± 0.5) に比較し、抗体群 (0.45 ± 0.3) で有意に低下し、抗 MIF 抗体投与により右室肥大の進行を抑制した (p < 0.05、各々 n = 6) (図 2)。
3. % WT：血管内腔にゲラチンバリウムが充填されている血管径 50-150 μm の肺動脈中膜厚は、MCT 群で 4.95 ± 0.15 %、抗体群で 3.42 ± 0.16 % と、抗 MIF 抗体投与により血管平滑筋の肥厚を有意に抑制した (p < 0.05) (図 3)。
4. 血管径 50 μm 以下の肺小動脈における筋層出現頻度は、抗 MIF 抗体投与では MCT 群に比較し有意に抑制した (p < 0.05) (表 1)。
5. 肺組織 MIF 濃度の経時変化：MCT 投与前、投与後 1 日めに比較して、3 日め以降、肺ホモジネート上清中 MIF 濃度の低下がみられた (図 4)。

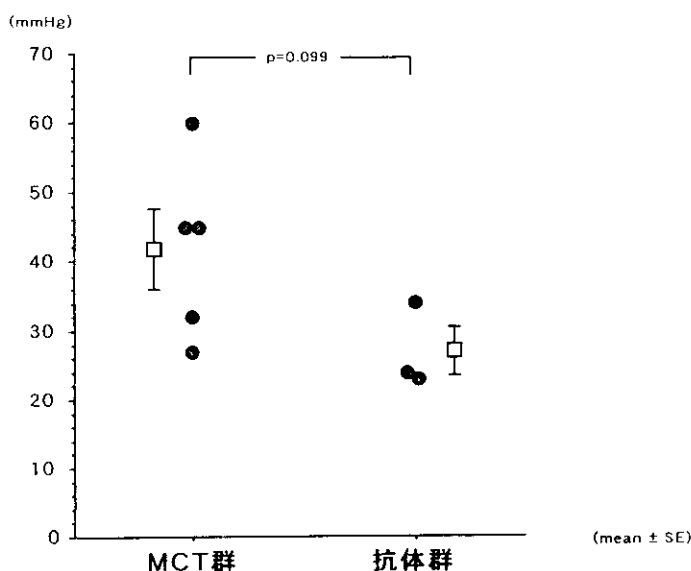


図 1 右室収縮期圧 MCT 投与 3 週目：抗 MIF 抗体投与による変化は認められなかった。

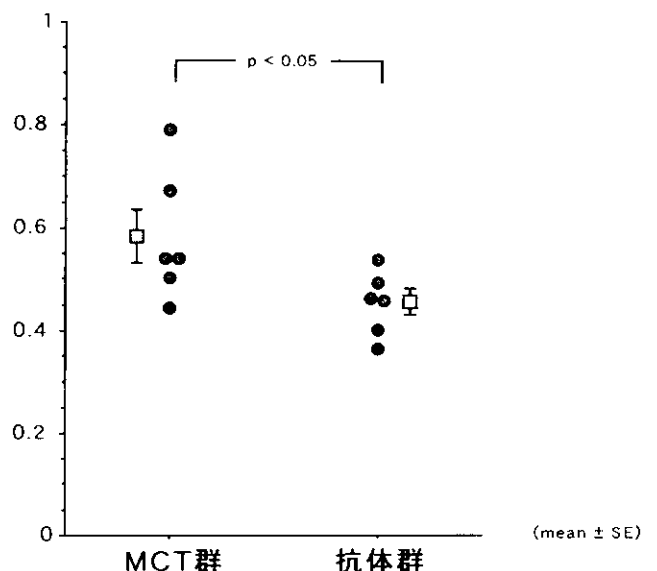


図 2 RV/LV + SMCT 投与 3 週目：MCT 投与による右室肥大が抗 MIF 抗体により有意に抑制された。

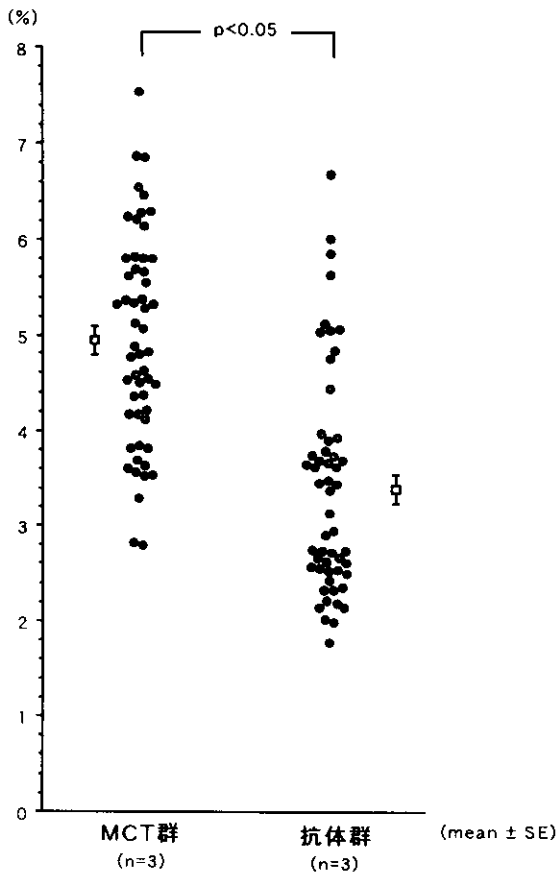


図3. % WT = 肺動脈中膜厚 \times 2 / 肺動脈の外径 \times 100
 MCT投与3週目：抗MIF抗体投与により肺動脈中
 膜平滑筋の肥厚を有意に抑制した。
 (血管径 50-150 μ m)

表1. 肺胞と肺胞周囲の肺動脈壁の筋層分布 MCT投与3週目：
 無処置ラットに比較してMCT群で有意に筋層が広い範囲
 で分布し、抗MIF抗体で有意にその範囲を抑制した。
 (血管径 50 μ m 以下)

	Control (n = 1)	MCT群 (n = 3)	抗MIF抗体群
nonmuscular	18 (100%)	12 (22%)	40 (74%)
partially muscular	0 (0%)	35 (65%)	12 (22%)
completely muscular	0 (0%)	7 (13%)	2 (4%)
		*	†

(* : vs Control, † : vs MCT群)

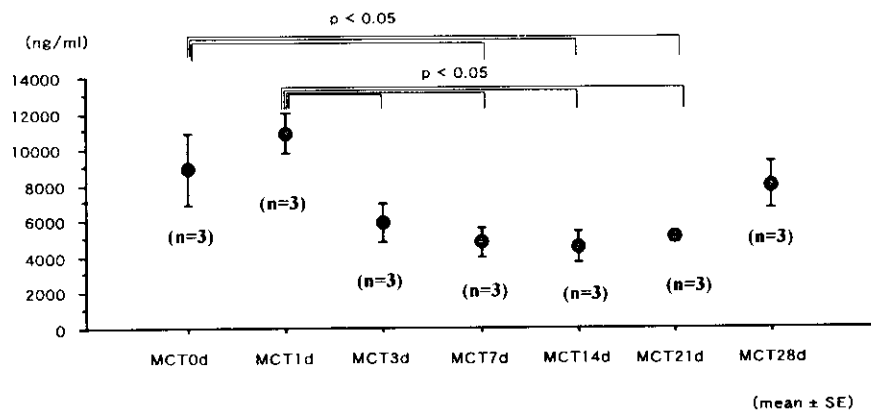


図4. 肺組織MIF濃度の経時変化MCT投与前、投与後1日めに比較して、3日め以降、
 肺ホモジネート上清中MIF濃度の低下がみられた。

考案・結論

MCT投与による右室収縮期圧の上昇に対し、抗MIF抗体投与の抑制効果はみられなかったが、抗MIF抗体投与により右室/左室中隔比と肺動脈中膜肥厚を抑制し、また径50 μm 以下の肺小動脈における筋層出現頻度が抑制した。本研究は抗MIF抗体投与が肺高血圧の病態進展を有意に抑制することを示し、MIFの肺高血圧症への関与を証明した最初の報告である。今回の実験では心拍出量は測定していないため、肺血管抵抗に対する抗MIF抗体の影響を評価することはできなかった。しかし、右室収縮期圧は有意差には至らなかったにもかかわらず、肺高血圧症の進展に伴う病理組織学的所見である右室肥大、肺動脈中膜の肥厚、径50 μm 以下の肺小動脈における筋層出現の3つの指標で、抗MIF抗体投与は肺高血圧症の進展を抑制しており、抗MIF抗体投与により肺血管抵抗が低下した可能性が考えられた。

昨年報告したMCT肺高血圧症ラットにおいて血液や気管支肺腔洗浄液のMIF濃度は10-100ng/mlであったのに対し、肺組織中には100倍以上の高濃度のMIF蛋白を証明した。しかし、予想に反してMCT投与により肺組織中MIF濃度は減少した。この原因は明らかではないが、初期に細胞外に高濃度のMIFが放出された結果、細胞内MIFのdown-regulationが起こった可能性もあると考えられた。

昨年、肺高血圧症症例の肺組織でPGISが減少していること、また、動物実験モデルにおいて肺組織におけるPGISの過剰発現が、肺高血圧症の進展を抑制することが報告され、PGISが肺高血圧症の病態または治療において重要な役割を果たすことが明らかとなった¹¹⁾。更に、肺血管リモデリングにおけるmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)やtransforming growth factor (TGF)などのサイトカインや成長因子の関与が示唆され、動物実験モデルにおいて抗MCP-1抗体投与による肺高血圧症進展に対する抑制効果が報告されている¹²⁾。本実験による肺高血圧症の進展抑制作用のメカニズムが、単に早期の好中球性炎症を制御した結果であるのか、これら肺血管のリモデリングに関与するPGIS、MCP-1、TGFなどのサイトカインや成長因子に対する効果を有するかは今後の検討課題である。しかし、昨年の実験でMCT肺高血圧ラットにおける血管病変におけるMIF関与を証明したこと、抗MIF抗体が病理組織学的に肺血管病変を抑制したことは、肺高血圧症の病態進展において直接、血管平滑筋増殖による血管壁の肥厚を制御する新たな治療法として期待できるものと考えられた。今後、病態進展に関

与するサイトカイン放出能に対するMIFの影響を検討し、抗MIF抗体を投与による肺高血圧の抑制効果が、どの段階で炎症を制御することにより発揮されるかを解明することが望まれる。

参考文献

- 1) Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, and David JR: Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7522-7526.
- 2) Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Calandra T, Gerns D, Donnelly T, Atkins RC, and Bucala R: Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 235-246.
- 3) Metz CN and Bucala R: Role of Macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response. *Adv Immunol* 1997; 66: 197-223.
- 4) Swope MD and Lolis E: Macrophage migration inhibitory factor: Cytokine, Hormone, or Enzyme?. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999; 1-32.
- 5) Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel L, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, and Bucala R: MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995; 377: 68-71.
- 6) Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelker W, Manogue KR, Cerami A, and Bucala R: MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993; 365: 756-759.
- 7) Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace W, Metz CN, Bruce LJ, and Bucala R: Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nature Med* 1997; 3: 320-323.
- 8) Rossi AG, Haslett C, Hirani M: Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J Clin Invest* 1998; 101: 2869-2874.

- 9) Geraci MW, Gao B, Shepherd DC, Moore MD, Westcott JY, Fagan KA, Alger LA, Tudor RM, Voelkel NF: Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1999; 103:1509-1515.
- 10) McLaughlin VV, Genthner DE, Panella MM, and Rich S: Reduction in pulmonary vascular resistance with long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1998; 338:273-277.
- 11) Makita H, Nishimura M, Miyamoto K, Nakano T, Tanino Y, Hirokawa J, Nishihira J, and Kawakami Y: Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:573-579.
- 12) Kobayashi S, Nishihira J, Watanabe S, and Todo S: Prevention of lethal acute hepatic failure by antimacrophage migration inhibitory factor antibody in mice treated with bacille calmette-guerin and lipopolysaccharide. *Hepatology* 1999; 29:1752-1759.
- 13) Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H et al: Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human cornea. *FEBS Letters* 1998; 385:225-228.
- 14) Kimura H, Kasahara Y, Kurosu K, et al: Alleviation of monocrotaline-induced pulmonary hypertension by antibodies to monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* 1998; 78:571-581.

Monocrotaline (MCT) による肺血管リモデリングにおける一酸化窒素合成酵素 (NOS) の役割

田中 良弘

はじめに

原発性肺高血圧症 (Primary pulmonary hypertension: 以下 PPH) は原因不明の肺動脈血管抵抗の上昇により肺動脈圧が亢進し、最終的には右心不全に陥り死亡する予後不良の疾患である¹⁾。PPH 患者の肺動脈リモデリングはびまん性の新生内膜過形成 (neointimal hyperplasia) により特徴づけられるが、その形成のメカニズムは未だ不明である²⁾。この neointima 形成のメカニズムを理解することは PPH の病態を把握し、治療法の選択を行う際に非常に重要であると考えられる³⁾。

Monocrotaline (以下 MCT) による肺動脈リモデリングは toxin による進行性で特異的な肺血管炎の結果で起り、elastin、collagen 等の細胞外マトリックス (ECM) 沈着を伴った肺動脈中膜肥厚が生ずる⁴⁾。我々は MCT による肺血管リモデリングにおける一酸化窒素 (NO) 及び NOS の果たす役割を調べるため、MCT モデルを用いて NO donor である L-Arginine (L-Arg) と特異的な iNOS inhibitor である Aminoguanidine (AG) が MCT 投与後の肺血行動態と組織変化に及ぼす影響を検討し、合わせてリモデリング肺血管における iNOS の局在と NO radical の一つである Peroxynitrite (ONOO⁻) による蛋白 (tyrosine) のニトロ化反応の関与を免疫組織染色を用いて病理学的に検討した。

対象と方法

1. 動物モデル: Fisher 344 rat (雄, 9 週齢, 280-310g, n = 32) を以下の 3 群に分け、Day 0 に MCT (60mg/kg) を皮下注射し、Day 63 (9 週後) に犠死せしめた。

(1) MCT + NO donor 群 (n = 6):

MCT を皮下注射して 1 週目から L-Arginine (L-Arg) 5g/L を 8 週間飲水投与した。

(2) MCT + iNOS inhibitor 群 (n = 6):

MCT を皮下注射して 1 週目から Aminoguanidine (AG) 4g/L を 8 週間飲水投与した。

(3) Control 群:

MCT を投与せず L-Arg (n = 5) または AG (n = 5) を 8 週間飲水投与した。

2. 肺血行動態: Ketamine chloride 0.1 ml と Atropine sulfate 0.1 ml の皮下注射、Sodium pentobarbital 0.1 ml の腹腔内注射によりラットを麻酔して挿管し、人工呼吸器 (Harvard respirator model 300, 一回換気量 3.0 ml, 呼吸回数 60/分, PEEP 1.0 cmH₂O) を装着の後に bipolar coagulator により胸骨を小切開し、直視下に右心室から 24G catheter を肺動脈に挿入し、肺動脈圧 (PAP) を測定した。心肺は摘出後に分離し右心室/左心室+中隔重量比 (RV/LV+Sep) を計測した。左肺は気道から 10% 中性緩衝ホルマリンを 15 cm H₂O の圧で注入し室温下で 24 時間固定した後、30%・50%・70% ethanol で逐次脱水し、パラフィン包埋した。右肺は液体窒素中で凍結し -70℃ で保存した。

3. 組織学的検索: Hematoxylin Eosin (HE) 染色、Elastica-van Gieson (EVG) 染色を用いて肺血管を観察した。免疫組織染色は NOS の局在を抗 inducible NOS (iNOS) 抗体 (rabbit)、抗 endothelial NOS (eNOS) 抗体 (rabbit)、また peroxynitrite (ONOO⁻) によっておこる蛋白 (tyrosine) ニトロ化反応を抗 nitrotyrosine (NT) 抗体を用いて、それぞれヒストファイン Streptavidin-Biotin Peroxydase (R, M) キット (Nichirei Co, Ltd.) により染色した。

結果

1. 肺血行動態: Fisher ラットを用いた MCT モデルでは Sprague-Dawley rat に比較して MCT による血管傷害はより肺動脈に限局し、肺高血圧の進行が緩徐であるた

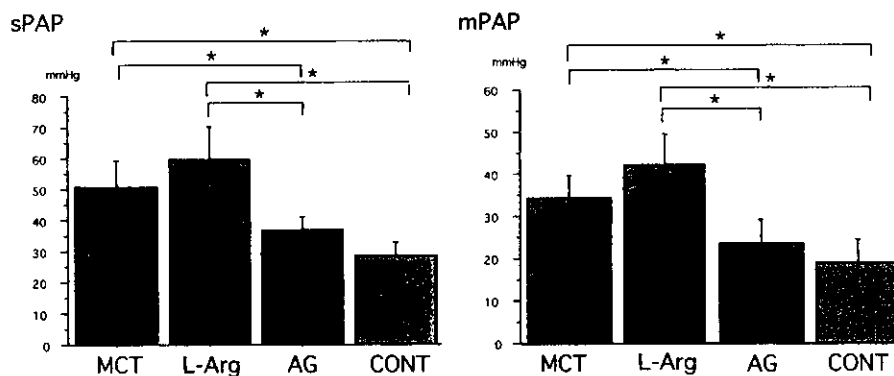


図1 MCT投与9週後の肺動脈圧

MCT群・MCT+L-Arg群はAG群・Control群と比べて収縮期肺動脈圧(sPAP)および平均肺動脈圧(mPAP)ともに有意に上昇している。またMCT+L-Arg群は有意差が見られないものの、sPAPおよびmPAPがMCT群よりもさらに上昇傾向を示している。MCT+AG群では肺動脈圧はControl群と有意差を認めない(* $p < 0.05$)。

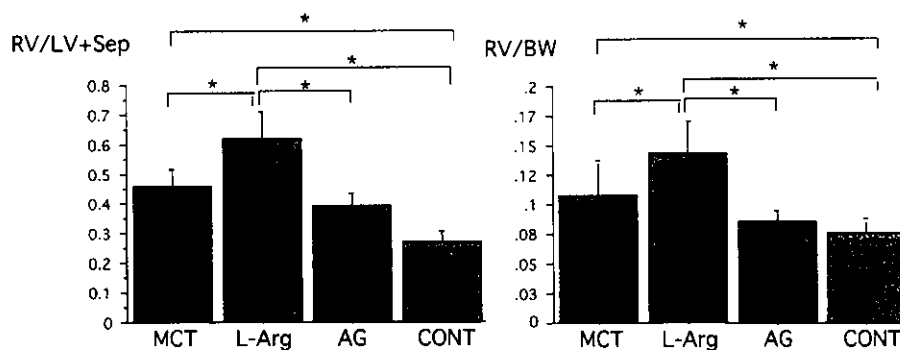


図2 MCT投与9週後の右心負荷

MCT群・MCT+L-Arg群はControl群・AG群と比べて右室/左室重量比(RV/LV+Sep)および右室/体重(RV/BW)ともに有意に上昇している。またMCT+L-Arg群とMCT群間にも有意差が認められる。MCT+AG群ではControl群との間に有意差を認めない(* $p < 0.05$)。

め、ラットの長期生存を可能にする”。本実験でも Fisher はMCT皮下注後63日目まで全例が生じたものの、特にMCT+NO donor群で重症肺高血圧によると思われる著しい努力性呼吸が認められた。また肺血行動態では(図1)に示すようにMCT群はControl群と比べて収縮期肺動脈圧(sPAP)および平均肺動脈圧(mPAP)ともに有意に上昇していた。また我々の予想に反してMCT+NO donor群では有意差が見られないもののsPAPおよびmPAPがMCT群よりも更に上昇傾向を示しており、反対にMCT+iNOS inhibitor群では有意差をもって低下していた($P < 0.05$)。また右心負荷の程度を示す右室/左室重量比(RV/LV+Sep)および右室/体重比(RV/BW)でも(図2)の様に、MCT群はControl群と比

べて有意に増大し($P < 0.05$)、MCT+NO donor群では更にMCT群よりも有意に増大を示していた($P < 0.05$)。これに対しMCT+iNOS inhibitor群ではMCT群、MCT+NO donor群に比較して有意に低下しており($P < 0.05$)、RV/BWではControlとの間に有意差は認められなかった。以上よりNO donorであるL-ArginineがMCTによって誘発される肺高血圧を増悪させている可能性があると考え、各群の組織像を病理学的に比較検討した。

2. 組織学的評価: HE及びEVG染色で、MCT+NO donor群の細葉肺動脈から区域枝レベルの弾性肺動脈にかけて neointima 形成・中膜肥大・外膜肥厚を伴う著しい肺動脈のリモデリングが認められたのに対し、MCT+iNOS

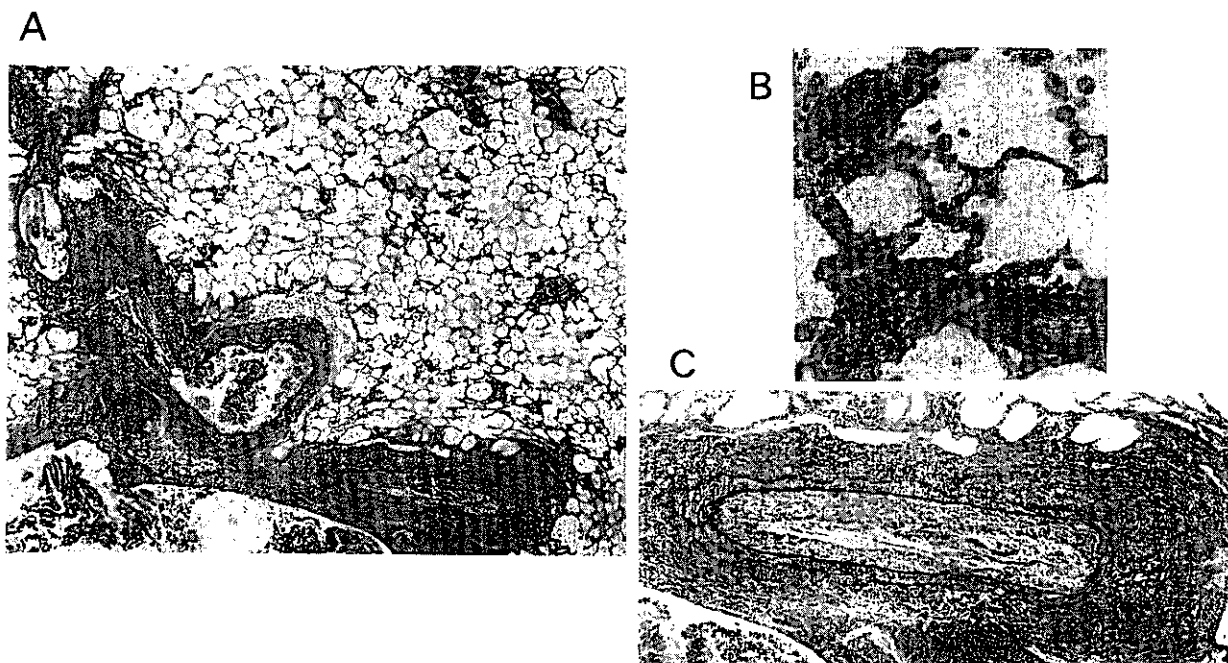


図3 MCT + NO donor群の肺血管リモデリング

〈細葉肺動脈から弾性肺動脈にかけて中膜、外膜の肥厚と共に neointima 形成が認められる。〉

A. MCT + NO donor群の肺 (EVG 染色×40)、B. 細葉肺動脈 (EVG 染色×200)、C. 弾性肺動脈 (EVG 染色×200)

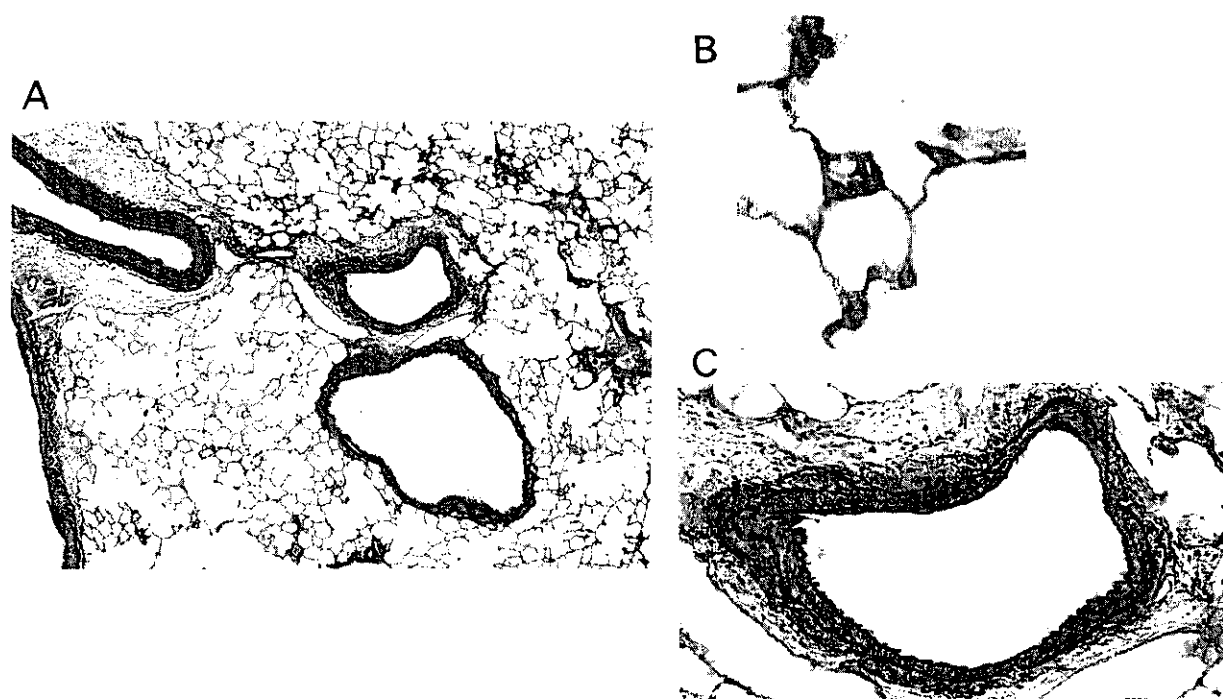


図4 MCT + iNOS inhibitor群の肺血管リモデリング

〈細葉肺動脈はほぼ正常に保たれ、肺動脈モデリングは抑制されている。〉

A. MCT + iNOS inhibitor群の肺 (EVG 染色×40)、B. 細葉肺動脈 (EVG 染色×200)、C. 弾性肺動脈 (EVG 染色×200)

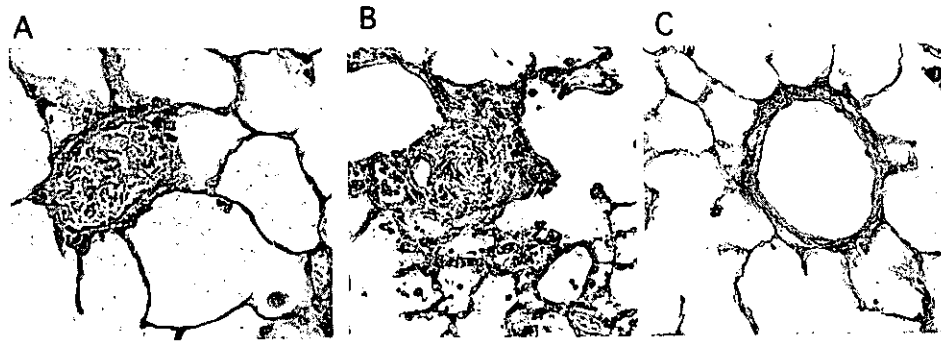


図5 細葉肺動脈でのinducible NOSの発現
A. Control群、B. MCT + L-Arginine群、C. MCT + iNOS inhibitor群 (各群×400)

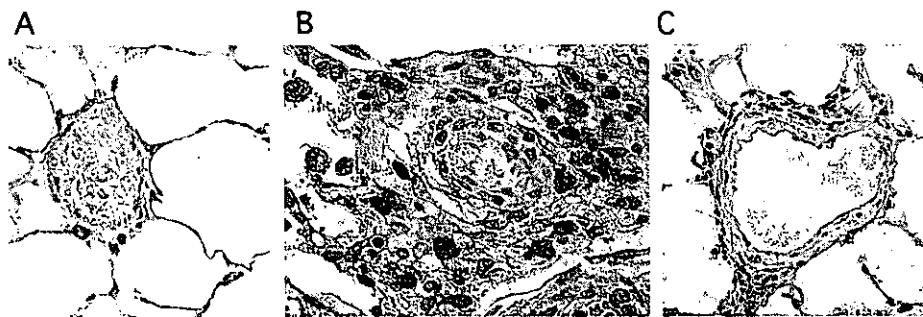


図6 細葉肺動脈でのNitrotyrosineの発現
A. Control群、B. MCT + L-Arginine群、C. MCT + iNOS inhibitor群 (各群×400)

inhibitor群では細葉肺動脈はほぼ正常に保たれ、弾性肺動脈も軽度の中膜肥大が認められる以外、MCT群、MCT + NO donor群と比較して肺動脈リモデリングは抑制されていた。(図3, 4)。

免疫組織染色では、MCT + NO donor群で肺動脈壁に集簇したマクロファージと思われる単核球を主体にiNOSとNTが強く染色されたが、MCT + iNOS inhibitor群では肺血管壁にiNOS、NTの発現は抑制されていた(図5, 6)。また各群ともに肺動脈内皮に散在性にeNOSの発現が認められたものの、群間で明らかな差は認められず、その特徴は見出せなかった(病理像提示せず)。

考察

Fisherラットを用いた実験で見られたMCT + L-Arginine群の9週目の肺動脈にneointimaの形成がおこる事実は予想に反した結果であったため、我々は更にMCTによる肺血管障害がFisherより強く生じるSprague-Dawleyラット(n=18)を用いてFisherの時と同様のプロトコールで追加実験を行った。Sprague-DawleyはFisherと比べて肺血管リモデリングが急速に生じるため、

Fisherほど長期間生存しないのが特徴である⁸⁾が、MCT(60mg/kg)投与5週後の肺血行動態はFisherの時と同様にL-ArginineによりMCT投与後の肺高血圧が増悪し、Aminoguanidineにより改善した。これら一連の実験結果から我々はMCTによる肺血管傷害において、No donorであるL-Arginineを投与することによって肺血管リモデリングが助長され、iNOS inhibitorであるAminoguanidine投与によりリモデリングが抑制されると結論づけた。

免疫組織染色の結果はこれを裏付けるものであった。MCT + L-Arginine投与群においてはperoxynitrite(ONOO⁻)の蛋白結合物質であるnitrotyrosineが、neointimaによって閉塞した細葉肺動脈周囲に浸潤した単核球(マクロファージ)に強く染色され、肺血管障害部分でおこるNOの過剰な産生がNO radicalであるperoxynitrite(ONOO⁻)の産生を惹起している可能性が示唆された。従って我々はMCTによる肺血管リモデリングにおいてNO radicalの関与を指摘する以下のような仮説を提唱した(図7)。すなわちMCT投与後の急性期に肺動脈の炎症が惹起されるが、L-Arginine投与は

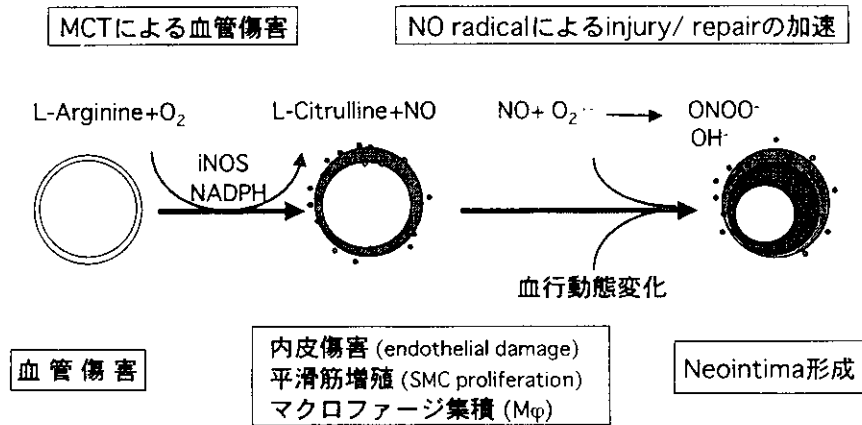


図7 MCTの肺血管リモデリングにおけるNo radicalの関与(仮説)

肺血管周囲に浸潤したマクロファージの産生するiNOSを介して過剰なNO産生を促す。さらに炎症細胞が産生する superoxide anion (O₂^{·-}) と反応して peroxynitrite (ONOO^{·-}) が産生され、蛋白 (tyrosine) と結合して nitrotyrosine となる。この一連の反応は肺血管傷害後の組織修復反応 (injury/repair) を誘導し、平滑筋増殖・マクロファージ集積をさらに助長することによりリモデリングを加速させる。肺血管傷害後の血圧上昇も neointima 誘導の一つの原因である¹⁾が、MCT+L-Arginineによる肺血管傷害の加速と肺動脈圧上昇もリモデリングのパターンを中膜肥太パターンから neointima パターンに転換させている一つの因子と考えられる。しかしこのメカニズムの詳細に関してはさらに今後の検討を要すると思われる。

結語

1. Monocrotalineにより誘動される肺血管リモデリングでは、L-Arginineの投与によりリモデリングが増悪し、細葉肺動脈を中心としたneointima形成に変化する。この組織変化は inducible NOS inhibitorである Aminoguanidineの投与により抑制される。
2. Monocrotalineにより誘動される肺血管リモデリングでは、iNOSおよびNO radicalが密接に関与していると考えられる。肺血管周囲に遊走したマクロファージから過剰なiNOSが産生され、局所でperoxynitrite (ONOO^{·-}) が産生されて肺血管傷害を助長している可能性があると考えられる。

参考文献

1) Rubin, L.: Current concepts, Primary Pulmonary Hypertension. New Eng. J. Med. 336: 111-

117, 1997

- 2) Botney, M. D., Kaiser, L. R., Cooper, J. D. et al.: Extracellular matrix protein gene expression in atherosclerotic pulmonary arteries. Am. J. Pathol. 140: 357-364, 1992
- 3) Botney, M. D., Liptay, M. J., Kaiser, L. R. et al.: Active collagen synthesis by pulmonary arteries in human primary pulmonary hypertension. Am. J. Pathol. 143: 121-129, 1993
- 4) Botney, M. D., Bahadori, L., Gold, L. I.: Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension: potential role for transforming growth factor- β . Am. J. Pathol. 144: 286-295, 1994
- 5) Bahadori, L., Milder, J., Gold, L. I. et al.: Active macrophage-associated TGF- β colocalizes with type I procollagen gene expression in atherosclerotic human hypertensive pulmonary arteries. Am. J. Pathol. 146: 1140-1149, 1995
- 6) Botney, M.D.: Role of hemodynamics in pulmonary vascular remodeling. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 159: 361-364, 1999
- 7) Todorovich-Hunter, L., Johnson, D.J., Ranger, P. F. et al.: Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline: a biochemical and ultrastructural study. Lab. Invest. 58: 184-195, 1988
- 8) Tanaka, Y., Bernstein, M. L., Mecham, R. P., Patterson, G. A., Cooper J. D., Botney MD: Site-specific responses to monocrotaline-induced vascular injury: evidence for two distinct

- mechanisms of remodeling. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 15 (3) : 390-397, 1996
- 9) Tanaka, Y., Schuster, D. P., Davis, E. C. et al. : The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *J. Clin. Invest.* 98 (2) : 434-42, 1996
- 10) Tanaka Y., Okada K., Sensaki, K., Ozeki, Y., Tanaka S., Pulmonary vascular remodeling following long-term exposure to subclavian-pulmonary artery shunt. *Am. J. Respir. Critic. Care Med.* 159 (3) : A154, 1999
- 11) Okada K, Tanaka Y, Bernstein ML, Zhang W, Patterson GA, Botney MD : Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury - A neointimal model of pulmonary hypertension. *Am. J. Pathology.* 151 (4) : 1019, 1997
- 12) Botney M.D. : Pathogenesis of primary pulmonary hypertension, in Pathogenesis of lung injury at the molecular level, ALA/ATS postgraduate course 19 : 1999

原発性肺高血圧症における血漿 Adrenomedullin (AM) 値の臨床的意義

中山 智孝 佐地 勉

はじめに

Adrenomedullin (AM) は1993年ヒト褐色細胞腫より北村、寒川らによって発見された強力な降圧活性を有する生理活性ペプチドである¹⁾。続いて radioimmunoassay (RIA) の開発により重症高血圧、腎不全、心不全、肺高血圧などの疾患においてもその重症度とともに血中AM濃度が上昇することが報告されている²⁾。また原発性肺高血圧症 (PPH) において血中AMが他の血管作動性物質 (ANP, BNP, エンドセリン-1) と同様に上昇していることも近年確認されているが、血中で増加したAMの臨床的意義や他の血管作動性物質との関係についても明らかにはされていない。さらにプロスタサイクリン (PGI₂) 持続静注療法を開始したPPH患者における血中AMの動態も不明である。本研究の目的はPGI₂持続静注療法開始後の血中AMの動態を調べることで、また血中AMが肺血管病変を経時的に評価をする上で有用な指標となりうるかを検討することである。

対象と方法

東邦大学大森病院で観察中の小児PPH患者連続14名 (5~16歳、中央値12歳) を対象とした。全例末梢静脈から採血し、異なる時期すなわち初診時またはPGI₂持続静注療法開始時 (n=13)、PGI₂療法開始1ヶ月後 (n=7)、3ヶ月後 (n=7)、1年後ないしそれ以降 (n=5) に得られた計32検体において血漿中成熟型AMをRIA法により測定した。NYHA心機能分類、血中ANP、BNPならびにエンドセリン-1 (ET-1)、心臓カテーテル検査時に測定した肺動脈圧、右心房圧、心係数、総肺血管抵抗などの肺循環諸量との関連性を検討した。

結果

血中AMはNYHA心機能分類の重症度に比例して上昇したが、NYHA I~IIIでは軽度上昇 (1.1~1.8FMOL/ml) に留まったのに対し、NYHA IVで有意な上昇 (4.2FMOL/ml) を示した (図1)。PGI₂持続静注療法開始後の血中AM

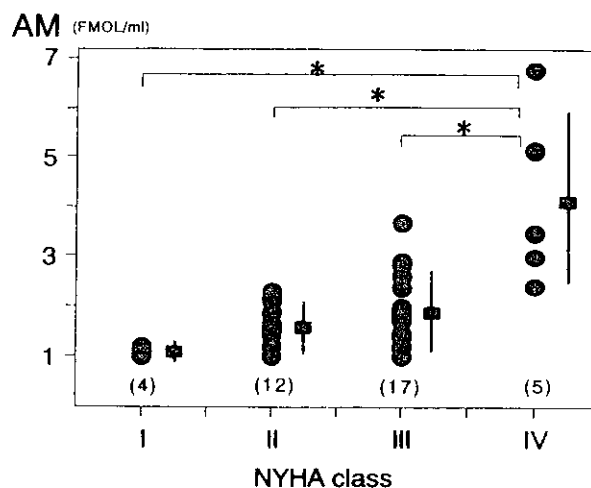


図1：血中AMとNYHA心機能分類

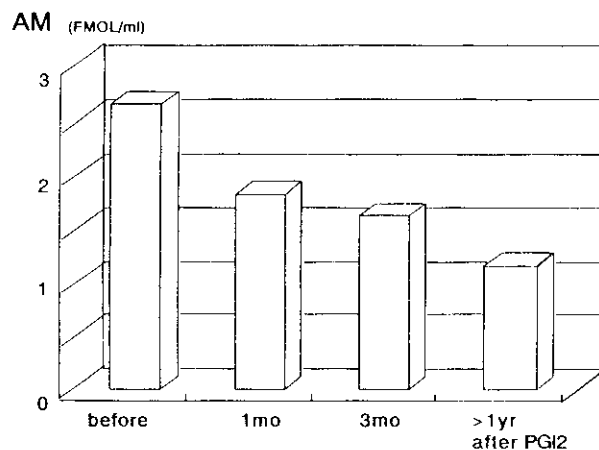


図2：PGI₂持続静注療法開始後の血中AMの変化