

はじめに

これまでわれわれは肺傷害急性期に好中球エラストラーゼが重要な役割を果たすこと<sup>1)</sup>、好中球の細胞浸潤には血管内皮の接着分子関与が不可欠であることを示し<sup>2)</sup>、さらにプレオマイシン (BLM) 肺線維症はエリスロマイシン (EM) により抑制されることを確認した<sup>3)</sup>。

今回われわれはエリスロマイシン (EM) と同様の 14 員環マクロライドであるロキシシロマイシン (RXM)、クラリスロマイシン (CAM) の BLM 肺線維症に対する抑制効果を検討した。さらに 14 員環マクロライドの抗炎症、抗線維化作用機序解明のため、BLM 肺傷害における好中球の役割、好中球と血管内皮間接着分子である CD62E (E-selectin)、CD62P (P-selectin)、VCAM-1 の mRNA 発現及び 14 員環マクロライドのこれらに対する作用について経時的に検討した。

#### 対象と方法

- 1) 動物：7 週齢、ICR 雄マウス
- 2) 薬剤：プレオマイシン (BLM) 100mg/kg；ロキシシロマイシン (RXM) 10mg/kg；エリスロマイシン (EM) 50mg/kg；クラリスロマイシン (CAM) 8.9mg/kg。
- 3) 肺線維化評価モデル作製投与スケジュール：N (生理食塩水投与群)、B (BLM 単独投与群)、BR (pre) (BLM と RXM 前投与群)、BC (pre) (BLM と CAM 前投与群)、BR (BLM と RXM 後投与群)、BC (BLM と CAM 後投与群) を設定し、Day0 に N 群は生食、B 群は BLM を 0.3ml 経静脈的に 1 回投与した。各群とも BLM 投与後 28 日にエーテル麻酔下にて脱血 sacrifice し、左肺では組織標本を作製し、HE 染色と Masson's trichrome 染色を行い、アシクロフトスコア<sup>4)</sup>に準拠し、比較検討を行った。右肺ではハイトロキシプロリン (HOP) 含有量の定量測定を行った。
- 4) 急性肺傷害モデル作製投与スケジュール：N (NS 投与群)、B (BLM 単独投与群)、BR (BLM と RXM 前投与群)、BE (BLM と EM 前投与群)、BC (BLM と CAM 前投与群) を設定し、Day0 に N 群は生食、B 群は BLM を 0.3ml 経静脈的に 1 回投与した。各群とも BLM 投与後 0h、6h、12h、24h、48h、72h、120h、144h、168h、216h、264h、312h にエーテル麻酔下にて脱血 sacrifice し、BAL を行い、肺組織を用い RT-PCR 方法より好中球と血管内皮間接着分子である CD62E、

CD62P、VCAM-1 の mRNA 発現について経時的に検討した。

#### 結 果

1) BLM 肺線維症評価モデルにおける病理組織学的結果：B 群のスコアは N 群と比較して有意に高く、RXM 前投与群、CAM 前投与群と後投与群は B 群と比較してスコアは有意に低値を示した (Figure 1)。

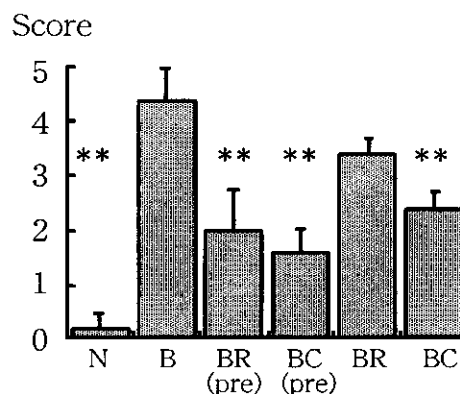


Figure 1 Comparison of Morphological Grade of Fibrosis. Fibrosis was scored by the method of Achcroft and co-workers. The score in BLM group was significantly high compared with that in NS group (\*\*P<0.01). The score in BLM+preRXM, BLM+preCAM and BLM+CAM groups was significantly reduced compared with that in BLM group (\*\*P<0.01).

2) HOP 定量測定結果：B 群は N 群と比較して高値を示し、RXM と CAM 前投与群は B 群と比較してやや低値を示した (Figure 2)。

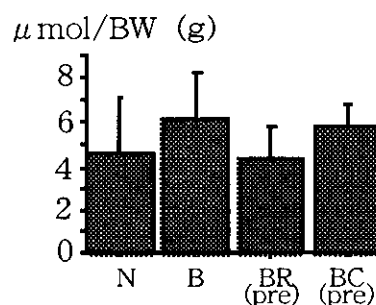


Figure 2 Comparison of Hydroxyproline Content.

3) BLM 急性肺傷害モデルにおける BALF 細胞数の経時的变化：総細胞数は BLM 投与後 168h から 216h まで増加した。好中球数は BLM 投与後 24h をピークに上昇し、144h から 264h まで再び上昇して 312h からは減少する傾向が認められた (Figure 3)。BLM 投与後 24h、144h 好中球数の増加に対し、14 員環マクロライド併用投与群は有意な抑制を示した (Figure 4)。

4) BLM 肺傷害における好中球・血管内皮間接着分子の mRNA 発現の経時的变化：CD62E と CD62P の mRNA 発

1. 日本医科大学第四内科  
 2. 筑波大学 TARA センター  
 \* 重点研究 研究協力者  
 \*\* 〃 主任研究者

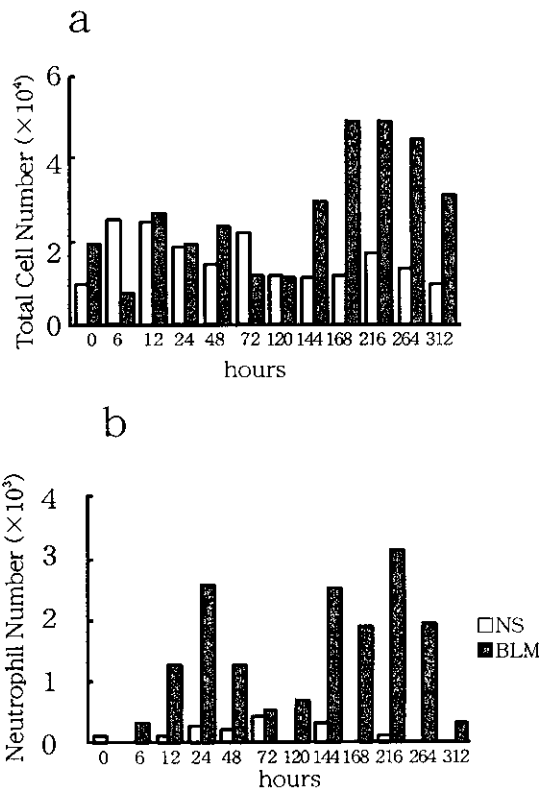


Figure 3 Time Course of Cell Number in BALF. The number of total cells in BALF increased with the peak at 168 to 264 hours after BLM injection (a). The number of neutrophils in BALF maximally increased at 24 hours and 144 to 264 hours after BLM injection (b).

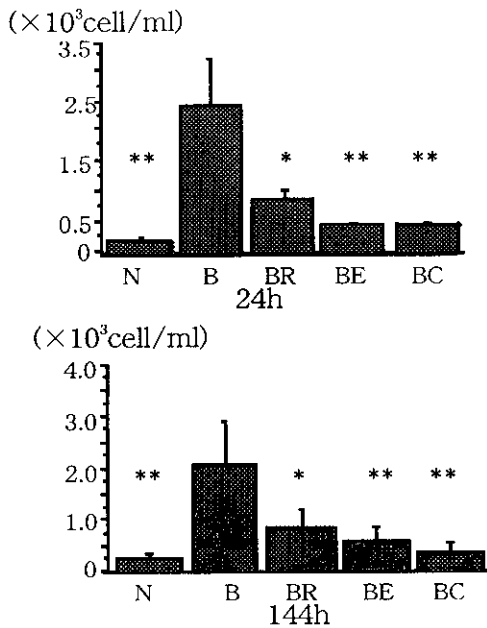


Figure 4 Influences of Macrolides on the Neutrophil Number in BALF of the Mouse Lung at 24 hours and 144 hours after BLM injection. Macrolides significantly inhibited neutrophil numbers in BALF (\*P<0.01, \*\*P<0.05).

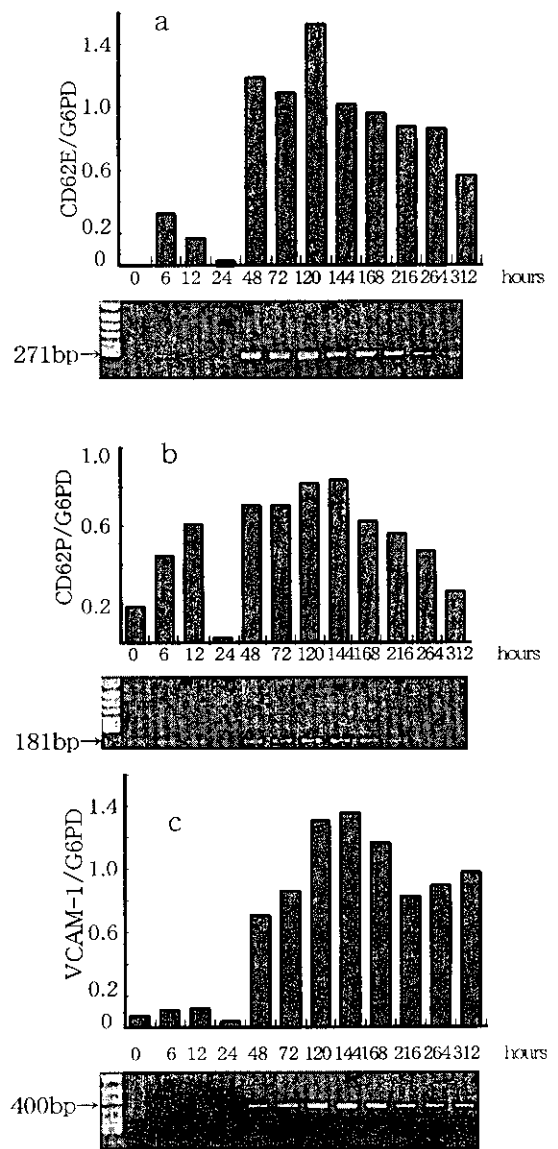


Figure 5 Time Course of CD62E (a), CD62P (b) and VCAM-1 (c) mRNA Induction in Lung Tissue Treated with BLM. CD62E and CD62P mRNA was induced at 6 to 12 hours and 48 to 264 hours after BLM injection. VCAM-1 mRNA was induced at 48 to 312 hours after BLM injection.

現は BLM 投与後 6h, 12h に増加し, 24h では著減したが, 48h から 264h まで再び増加した. VCAM-1 の発現は, BLM 投与後 48h から 312h まで増加した (Figure 5).

BLM 投与後 144h に誘導された CD62E, CD62P の mRNA の発現に対し, 14 員環マクロライドは抑制効果を示さなかった. 一方, VCAM-1 の mRNA の発現は 14 員環マクロライドの併用投与より有意に抑制された (Figure 6).

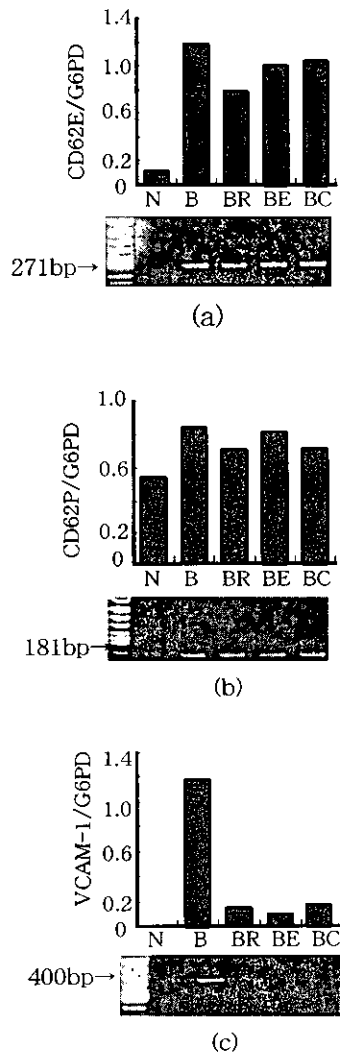


Figure 6 Influences of Macrolides on the Expression of CD62E, CD62P, VCAM-1 mRNA in the Mouse Lung at 144 hours Treated by BLM. Macrolides significantly inhibited the induction of VCAM-1 mRNA, but not remarkably inhibited the induction of CD62E and CD62P mRNA.

## 考 察

BLM 肺線維症に対し、EM が抑制効果を有することはすでに示したが、今回 BLM 肺線維症に対し、同様の14員環マクロライドである RXM, CAM が抑制効果を有することを認めた。

BLM 急性肺傷害モデルにおいては、好中球は BLM 投与後 24h をピークに気腔内に浸潤し、144h から 264h に再び気腔内に浸潤することを示した。CD62E と CD62P の mRNA 発現は BLM 投与後 6h, 12h に誘導され、24h では一旦消退したが 48h から 264h まで再び誘導された。VCAM-1 の発現は BLM 投与後 48h から 312h まで誘導された。

BLM 投与後の接着分子の mRNA 発現と、BALF 中の好中球数の経時的变化の相関について検討した。CD62E, CD62P の mRNA 発現誘導は好中球の2回の気腔内への浸潤に関わり、一方 VCAM-1 の mRNA 発現誘導は主に2回目の好中球の浸潤に関わると考えられる。今回の結果より、14員環マクロライド投与による VCAM-1 mRNA の著明な発現抑制は、好中球の2回目の気腔内浸潤を抑制し、線維化軽減に関与する可能性が示された。但し、14員環マクロライドは、好中球の2回の気腔内への浸潤を著明に抑制している。好中球浸潤の過程には様々な分子が関わっていると考えられ、VCAM-1 mRNA 発現抑制以外の機序について、さらなる検討を要する。

過去の研究成果と今回の結果より、14員環マクロライドの抑制効果は主に予防的効果であった。これはマクロライド前投与群 (-d3 から) では好中球の浸潤(2回のピーク)を抑制できるが、後投与群 (d3 から) では好中球の気腔内浸潤の第1回目ピークは抑制出来ないことを反映していると考えられる。臨床における、急性増悪、あるいは急性肺傷害を起こしやすい間質性肺炎の患者に対する、14員環マクロライドの予防的効果の可能性を示唆する。

## 結 論

- 1) BLM 肺線維症に対し、14員環マクロライドは抑制効果を有する。
- 2) 好中球の気腔内への浸潤は BLM 肺傷害を引き続く肺線維症の発症機序に関わり、14員環マクロライドはその浸潤を抑制することにより線維化の抑制効果を有すると考えられる。
- 3) 14員環マクロライドの VCAM-1 mRNA 発現の抑制することは好中球の気腔内への浸潤の抑制機序に関わり、線維化を抑制する一つの役割を果たしていると考えられる。

## 参考文献

- 1) Azuma A, Furuta T, Enomoto T, et al: Preventive effect of erythromycin on experimental bleomycin-induced acute lung injury in rats. *Thorax*. 53:186-9, 1998.
- 2) Azuma A, Takahashi S, Nose M, et al: Role of E-selectin in bleomycin induced lung fibrosis in mice. *Thorax*. 55:147-52, 2000.
- 3) 日胸患会誌 33 232, 1995.
- 4) Ashcroft T, et al: Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol.* 41:467-70, 1988.

# 高濃度酸素曝露によるブタのびまん性肺胞傷害モデルにおける matrix metalloproteinase の役割についての検討

具嶋 泰弘 菅 守隆\* 一門 和哉 彌永 和宏  
岡本 竜哉 佐藤 圭創 安藤 正幸

急性間質性肺炎 (AIP) の病態において肺胞上皮および血管内皮基底膜傷害が重要であり、その組織学的特徴はびまん性肺胞傷害 (DAD) である。マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、DAD の病変形成における肺胞構築の破壊と過剰な細胞外基質 (ECM) の分解を担う主要因子で、特に MMP-2 と MMP-9 は基底膜の主要構成成分である IV 型コラーゲンを基質とし、基底膜傷害における重要な役割が想定される。本研究では、ヨークシャー系ブタに高濃度酸素を曝露 (24-120 時間) することにより DAD/AIP モデルを作製し、このモデルにおける MMP の活性測定と組織での局在をゼラチンザイモグラフィ法および免疫組織染色法を用いて検討した。ブタに高濃度酸素を曝露すると、低酸素血症を伴う肺傷害が出現し、組織学的には DAD の浸出期早期から増殖期早期に至る所見を認めた。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の MMP-2、-9 活性は、ともに 72 時間以上の曝露群で増加していた。MMP-2 は主に肺胞マクロファージ、肺胞上皮に発現し、一方、MMP-9 は好中球、肺胞マクロファージに局在を認めた。MMP-9 は肺傷害の重症度および BALF 好中球数と強く相関しており、DAD の病変形成において MMP-9 とその主要産生細胞と考えられる好中球の重要性が示唆された。本モデルは、AIP/DAD の治療実験モデルとして重要であり、かつ MMP-9 は急性肺傷害のマーカーになりえると考えられる。

## Expression of Matrix Metalloproteinases in an Diffuse Alveolar Damage Model Induced by Hyperoxic Exposure in Pigs

Y. Gushima, M. Suga\*, K. Ichikado, K. Iyonaga  
T. Okamoto, K. Sato, M. Ando

*First Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, Japan*

Acute interstitial pneumonia (AIP) is a disease of unknown etiology, acute progression, and poor prognosis that is pathologically characterized by diffuse alveolar damage (DAD). In the pathogenesis of DAD, the basement membrane destruction is thought to be an important factor in determining the severity and prognosis of DAD. The matrix metalloproteinases (MMPs), a group of zinc neutral endopeptidases produced by a variety of cells, have crucial roles in the degradation of extracellular matrix (ECM) and the irreversible pulmonary structural remodeling. MMP-2 and MMP-9 are the members of MMPs and have the capacity to degrade type IV collagen, which is one of the major structural components of the basement membrane, and that these MMPs are thought to contribute to the basement membrane destruction in DAD. In this study, we established an experimental DAD/AIP model in pigs exposed to hyperoxia and evaluated the precise roles of MMPs in this condition using gelatin zymography and immunohistochemical analysis. The progression of acute lung injury in this model histologically ranged from the features of the early exudative to the early proliferative phase of diffuse alveolar damage (DAD), and MMP-2 and MMP-9 expressions in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) increased in these lungs with prolonged hyperoxic exposure. In immunohistochemical analysis, MMP-2 localized mainly in alveolar macrophages and alveolar lining epithelium and MMP-9 was detected in neutrophils and alveolar macrophages. MMP-9 activities correlated more closely with pathologic findings of DAD than MMP-2 activities. In addition, MMP-9 correlated with lung severity and the number of neutrophils in BALF, but MMP-2 did not. These results suggest that the pig is particularly useful as an animal model of DAD mimicking in human AIP, and that MMP-9, which is mainly produced by neutrophils in this model and is useful to assess the disease severity, plays important roles in the pathogenesis of DAD from the early exudative to the early proliferative phase.

はじめに

急性間質性肺炎 (AIP) は、厚生省びまん性肺疾患調査研究班の特発性間質性肺炎 (HP) 急性型に対応する概念で、原因不明の急性呼吸促進症候群 (ARDS) を呈する病態である<sup>1,2)</sup>。急速進行性、治療抵抗性の予後不良な疾患であり、その病態についてはまだ十分に解明されていない。AIP の組織学的特徴はびまん性肺胞傷害 (DAD) と呼ばれ、肺胞上皮基底膜傷害がその病態に深く関わっていることが報告されている。

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、種々の細胞外基質 (ECM) を分解する蛋白分解酵素で、大きく 4 つのサブグループに分類され、一般に、不活性型前駆体 (pro MMP) として産生され、細胞外で活性化される。MMP-2、MMP-9 は、ゼラチナーゼ群に属し、基底膜の主要構成成分のひとつである IV 型コラーゲンを基質とし分解する<sup>3)</sup>。

ヒトにおいて、DAD は種々の原因で惹起される。その中のひとつに高濃度酸素があり<sup>4)</sup>、臨床的に呼吸不全の治療手段として広く使用されているにもかかわらず、むしろ肺の障害を増悪させる可能性があるため重要な原因である。本研究では、肺の構造<sup>5)</sup>や免疫学的性質<sup>6)</sup>がヒトに類似しているブタに高濃度酸素を曝露することにより実験的 DAD モデルを作製し、DAD の病変形成機序の一端を MMP の立場から検討、解析した。

対象と方法

実験動物としてヨークシャー種ブタ (メス、10-15kg) を用い、酸素濃度 80 ~ 90% にて 24 ~ 120 時間にわたり曝露し、24 時間ごとに動脈血液ガス測定、末梢血白血球測定、気管支肺胞洗浄 (BAL)、組織のサンプリング、肺湿乾重量比の測定を行った。病理学的所見の評価は、次に示すような DAD で認められる 13 の所見につき 4 段階にスコア化し組織学的スコアとして個別に評価した (0= 所見なし、1= 軽度、2= 中等度、3= 重度)：肺胞上皮の破壊、肺毛細血管のうっ血、肺胞間質の浮腫、肺胞内浮腫、肺胞内出血、単核細胞浸潤、多核細胞浸潤、小葉間隔壁の肥厚、硝子膜形成、微小無気肺、II 型肺胞上皮細胞の過形成、線維芽細胞の増生、間質のコラーゲン沈着。

MMP-2、-9 の活性は、BALF 中のゼラチン溶解活性としてゼラチンザイモグラム法により測定した。即ち、あらかじめゼラチンを包埋したアクリルアミドゲルにて非還元下で SDS-PAGE を行った後、バッファー中にて 48 時間インキュベートし、タンパク染色を行った。ゼラチナー

ゼ酵素活性があるとゲル中に含まれる基質ゼラチンが分解され、酵素の分子量に応じた部位に白く抜けたバンドが得られる。その濃度を NIH Image にて定量化し、MMP 活性とした。また、抗 MMP-2 抗体、抗 MMP-9 抗体を用いて免疫組織染色を行い、組織における発現と局在を解析した。

結 果

高濃度酸素曝露による末梢血白血球数、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 比 (P/F 比)、BAL 細胞分画、肺湿乾重量比の変化を Fig.1 に示す。末梢血白血球数は酸素曝露による有意な変化は認めなかったが、P/F 比は 72 時間以上の曝露群で対照群に比較し有意に低下し、BAL 細胞分画では、72 時間以上の曝露群で白血球数の有意な増加を認めた。肺浮腫の指標である肺湿乾重量比は曝露 72 時間で有意な増加を認めた。

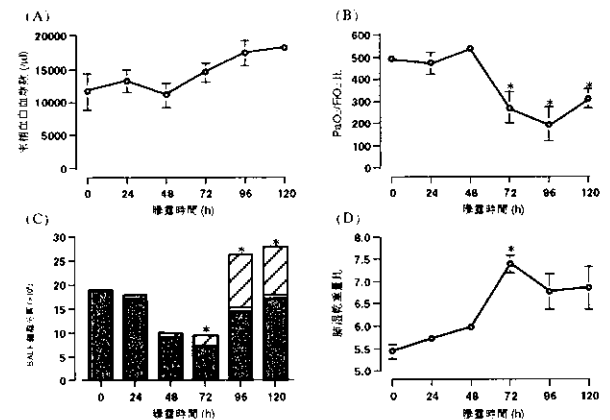


Fig.1 高濃度酸素曝露に伴う各種パラメーターの推移

高濃度酸素曝露による組織学的変化を Fig.2 に示す。48 時間以内の曝露群では、対照群と比較し、ごく軽度の間質の浮腫と間質への単核球浸潤を認めるのみであった。72 時間曝露では、好中球浸潤、硝子膜形成、小葉間隔壁の肥厚、II 型肺胞上皮の過形成が観察され、96 時間以上

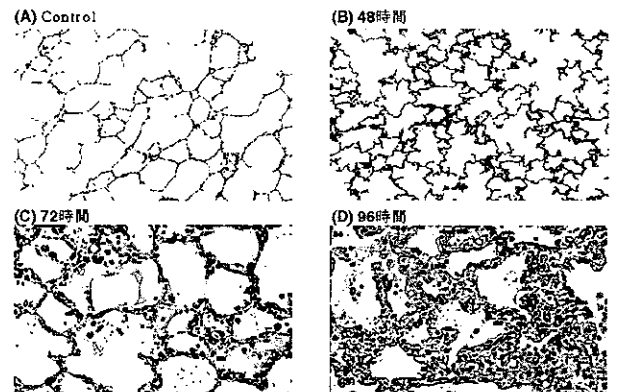


Fig.2 高濃度酸素曝露に伴う組織の経時的変化

熊本大学医学部第一内科  
\* 重点研究 分担研究者

の曝露群になると、これらの所見が顕著化し、線維芽細胞の増生が認められた。高濃度酸素曝露に伴う病理学的変化は、DAD の特徴を有し、本モデルでは、DAD の浸出期早期から増殖期早期に至る所見を認めた。曝露時間と組織学的スコアは次の通りであった；24 時間； $6.9 \pm 3.1$ 、48 時間； $8.9 \pm 2.3$ 、72 時間； $19.2 \pm 3.0$ 、96 時間； $23.5 \pm 1.9$ 、120 時間； $19.1 \pm 1.6$  (平均  $\pm$  SEM)。一方、コントロール群の病理学的スコアは、 $1.0 \pm 0.0$  であった。曝露時間と組織学的スコアの間には強い相関を認めた ( $r_s=0.86$ ,  $p<0.0001$ )。

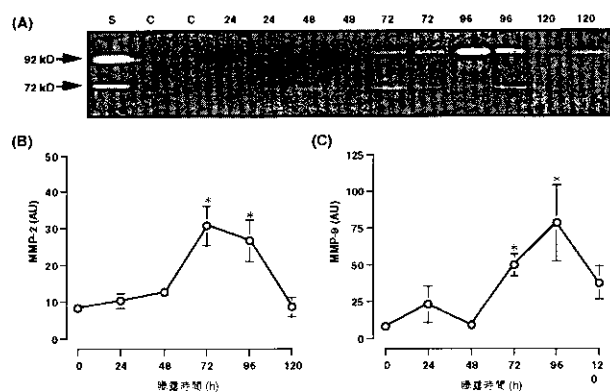


Fig.3 BALF を用いたゼラチンザイモグラムと MMP-2, MMP-9 活性の推移

BALF を用いたゼラチンザイモグラムの結果とゼラチン溶解活性を定量化したグラフを Fig.3 に示す。ザイモグラムでは、92 kD と 72 kD 付近にそれぞれ MMP-9, MMP-2 の前駆体と活性体の計 4 本のバンドを認めた。それぞれ、前駆体を定量化したところ、MMP-2 は、曝露 48 時間より増加傾向を認め、曝露 72、96 時間で対照群と比較し有意に増加し、120 時間でコントロールレベルまで低下した。一方、MMP-9 は曝露 72 時間以上で有意に増加し、96 時間でピークをとった。免疫組織染色を Fig.4 に示す。MMP-2 は、コントロールの肺で、肺胞マクロファージ、肺胞上皮などに弱い発現を認め、高濃度酸素に曝露することにより特に肺胞マクロファージにおいて発現の増強を認めた。一方、MMP-9 の発現は、コントロール肺で、肺胞マクロファージ、肺胞 II 型上皮細胞および気道

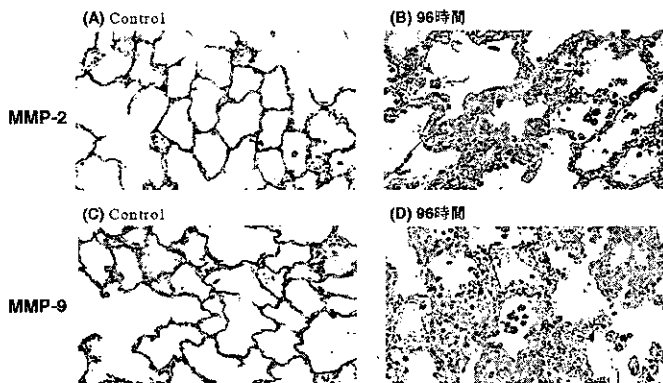


Fig.4 高濃度酸素曝露に伴う MMP-2, -9 の発現変化

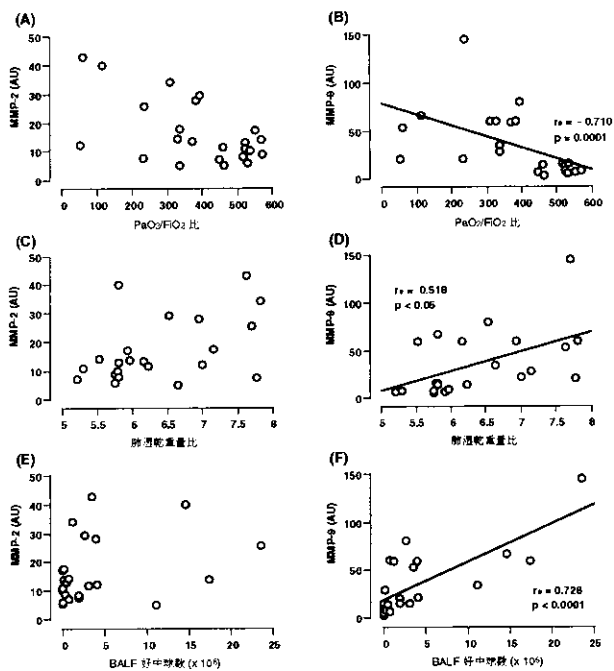


Fig.5 BALF 中 MMP 活性と各種パラメーターとの相関

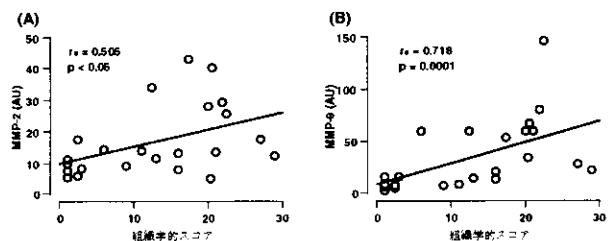


Fig.6 BALF 中 MMP 活性と組織学的スコアとの相関

上皮細胞に局在し、高濃度酸素曝露群では、それに加え肺胞マクロファージ、好中球に強い発現を認めた。

BALF 中 MMP 活性と各種肺傷害の指標との相関を Fig.5 に、BALF 中 MMP 活性と組織学的スコアとの相関を Fig.6 に示す。MMP-9 は肺傷害の程度を表す P/F 比、BAL 好中球数、および肺湿乾重量比との間に有意な相関を認めたが、MMP-2 はいずれとも相関がなかった。MMP-2, -9 活性ともに、組織学的スコアとの間に有意な正の相関を認めたが、MMP-9 でより強く相関していた。

#### 考案・結論

ブタに高濃度酸素を曝露することにより、特に 72 時間以上の曝露において低酸素血症を伴う肺傷害が出現し、組織学的には DAD の浸出期早期から増殖期早期に至る実験モデルを確立した。高濃度酸素は DAD の原因として重要であり、高濃度酸素曝露動物モデルは DAD の病因を解明する手段として有用である。大動物であるブタは肺の構造や免疫システムがヒトのそれと非常によく似ており、ヒトの病態をよく反映する。我々は最近、本モデル

を用いてブタ肺の高分解能CTを撮影し、その所見がヒトのDAD/ARDSと同様の所見を呈し、組織学的変化とも良い相関をすることを報告した<sup>7)</sup>。

ほ乳類の肺においては、ECMはコラーゲンやエラスチン、ラミニンといった非コラーゲン性のタンパクで構成され、構造と機能の両面を維持していくために重要な役割を果たしている<sup>8)</sup>。正常肺では、基底膜にIV型コラーゲンが存在する。Fukudaらは、ARDSや特発性肺線維症(IPF)などの疾患で基底膜が破壊されていることを報告している<sup>9)</sup>。基底膜の破壊にはMMP-2、-9が関与しており、ラットの高濃度酸素曝露やモルモットのLPS気管内投与急性肺傷害モデルでこれらMMPが増加しているとする報告がある。しかしながら、組織学的変化や疾患の重症度との関連について詳細に検討したものはなく、しかもこれらは齧歯類を用いたモデルである。本研究において、72時間以上の曝露でBALF中MMP-2、-9活性の増加を認めた。MMP-2は、48時間から増加傾向を認め、72、96時間で有意に増加し、一方、MMP-9は曝露72時間以上有意に増加し、96時間でピークとなった。MMP-2は、肺傷害の重症度との間に相関を認めなかったが、MMP-9はすべてのパラメーターと有意な相関を認めた。また、組織学的スコアとの間には、MMP-2、-9ともに有意な相関を認めたが、MMP-9の方がより強い相関があった。MMP-9は、本モデルにおいて重症度を反映するとともに病変形成に重要な役割を果たしており、BAL好中球数と強い相関があったこと、免疫組織染色で好中球に局在していたことから、その主要な産生細胞は好中球であることが示唆された。MMPは、前駆体として産生され、細胞外で活性化される。たとえば、好中球エラスターゼがMMP-9を活性化するという報告があり<sup>10)</sup>、我々も以前、二酸化窒素やパーオキシナイトライトがMMP-8を活性化することを報告している<sup>11)</sup>。本モデルにおけるMMPの活性化の機序は不明であるが、高濃度酸素曝露により様々なラジカル種が産生され、さらに本モデルで好中球エラスターゼが曝露時間に比例して増加していることを確認しており、これらラジカル種や好中球エラスターゼがMMPの活性化に関与していると考えられる。

MMP-2は、肺傷害とのパラメーターとは相関を認めなかったが、MMP-9に比較し、早期に増加する傾向を認めた。免疫染色では、肺胞マクロファージや肺胞上皮に局在を認め、これらが高濃度酸素曝露時に最初に酸素に曝される細胞であることから、MMP-2は、曝露開始後、明らかな肺傷害が出現する前のごく早期に産生され、初期病態に関与している可能性が考えられた。

DADの浸出期後期から増殖期早期にかけてMMP-2、-9が増加し、特にMMP-9は肺傷害の重症度およびBAL好中球数と強く相関しており、本モデルにおいてMMP-9とその主要産生細胞と考えられる好中球の重要性が示唆さ

れた。本モデルは、AIP/DADの治療実験モデルとして重要であり、かつMMP-9は急性肺傷害のマーカーになりえると考えられる。

## 参考文献

- 1) Katzenstein ALA, Myers JL, and Mazur MT. Acute interstitial pneumonia: a clinicopathologic, ultrastructural, and cell kinetic study. *Am J Surg Pathol.* 10: 256-267 (1986).
- 2) 田村昌士. 厚生省特定疾患「びまん性肺疾患調査研究班」平成3年度研究報告書(1992).
- 3) Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5: 2145-2154 (1991).
- 4) Katzenstein ALA, Bloor CM, and Liebow AA. Diffuse alveolar damage - the role of oxygen, shock, and related factors. *Am J Pathol.* 85: 210-228 (1976).
- 5) Todo G, and Herman PG. High-resolution computed tomography of the pig lung. *Invest Radiol.* 21: 689-696 (1986).
- 6) Gehrke I, and Pabst R. Cell composition and lymphocyte subsets in the bronchoalveolar lavage of normal pigs of different ages in comparison with germfree and pneumonic pigs. *Lung.* 168: 79-92 (1990).
- 7) Ichikado K, Suga M, Gushima Y, Johkoh T, Iyonaga K, Yokoyama T, Honda O, Shigeto Y, Tomiguchi S, Takahashi M, Itoh H, Ikezoe J, Müller N, and Ando M. Hyperoxia-induced diffuse alveolar damage in pigs: correlation between thin-section computed tomographic and pathologic findings. *Radiology.* (1999) (In press).
- 8) Madri JA, and Furthmayr H. Collagen polymorphism in the lung. An immunohistochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum Pathol.* 11: 353-366 (1980).
- 9) Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, and Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest.* 78: 687-698 (1998).
- 10) Ferry G, Lonchamp M, Pennel L, de Nanteuil G, Canet E, and Tucker GC. Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury. *FEBS Lett.* 402: 111-115 (1997).
- 11) Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, Ichimori K, and Maeda H. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 342: 261-274 (1997).

# ウサギ胎生期肺におけるマトリックスメタロプロテアーゼと そのインヒビターの役割

福田 悠\*

細胞と細胞外基質の関連および細胞外基質のリモデリングは胎生期肺の発生過程において重要であることが知られている。そこで、胎生期ウサギ肺におけるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) について検索した。免疫組織化学的に IV 型コラーゲン, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-2 を, *in situ hybridization* にて MMP-9 を検討した。また, ゲラチンゼイモグラフィーと MT1-MMP のウエスタンブロットングを行った。基底膜成分を構成する細胞外基質を基質とする MMP である MMP-2 と, その活性化に関与する MT1-MMP が特に胎生後期の肺胞上皮に陽性であった。ゲラチンゼイモグラフィーによる MMP-2 の活性化も同時に顕著に亢進し, ウエスタンブロットングによる MT1-MMP の経時的な増加も認められた。このことは, 胎生期における MMP/TIMP 系の関与と, 肺胞形成過程で重要な基底膜の非薄化に MMP-2 の活性化が関与していることを示すと考えられた。

## Role of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase in fetal rabbit lung

Yuh Fukuda

*Department of Pathology, Nippon Medical School*

Cell and extracellular matrix (ECM) interaction and ECM remodeling are known to be important in fetal lung development. We investigated the localization of matrix metalloproteinases (MMPs) in fetal rabbit lungs. Immunohistochemistry for type IV collagen, MMP-1, -2 and -9, membrane-type-1 MMP (MT1-MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2, and *in situ hybridization* for MMP-9 mRNA were performed. Gelatin zymography and Western blotting for MT1-MMP of lung tissue homogenates were also studied. MMP-1 and MT1-MMP were detected in the epithelial cells, and MMP-2 and TIMP-2 were detected in the epithelial cells and some mesenchymal cells in each stage. MMP-9 was found in the epithelial cells mainly in late stage. Gelatin zymography revealed the ratio of active MMP-2/latent MMP-2 increased dramatically during the course of development. MT1-MMP was detected in tissue homogenates, especially predominant in late stage. These findings suggest that MMPs and their inhibitor may contribute to the formation of airways and alveoli in fetal lung development, and activated MMP-2 of alveolar epithelial cells may function to provide an extremely wide alveolar surface.



はじめに

特発性間質性肺炎 (IIP), 器質化肺炎型間質性肺炎 (BOOP) における検索から, 線維化の吸収, 上皮細胞の再生, 線維化内の毛細血管新生にメタロプロテアーゼ (MMP) とそのインヒビター (TIMP) の関与が明らかにされている。<sup>1)</sup> すなわち, 可逆性の線維化病変をしめす BOOP では, MMP-2 の活性化が優位に認められ, 特に再生肺胞上皮細胞での MMP-2 の分布が特徴的であった。不可逆的な線維化を来す IIP では, MMPs に比べ TIMP が優位であった。今回, IP に伴う線維化, 改築は, 胎生肺における組織構築の模倣であるとの観点から胎生期肺の肺胞形成過程における MMP/TIMP について検索した。

胎生期肺は, 一般的に, 腺様期 (glandular stage), 管状期 (canalicular stage), 肺胞期 (alveolar stage) に分けられている。<sup>2)</sup> その過程には, 基底膜, 膠原線維, 弾性線維などの細胞外基質 (ECM) の変化と, その代謝に重要と考えられる MMP/TIMP の関与があることが報告されている。<sup>3-6)</sup> 肺胞形成過程 (alveolization) である胎生肺において MMP-1 (interstitial collagenase), MMP-2 (gelatinase A, type IV collagenase), MMP-9 (gelatinase B, type IV collagenase), membrane-type-1 (MT1)-MMP, TIMP-2 の分布と, 一部では量的変化を明らかにする。<sup>7)</sup> 治る線維化 (realveolization) と治らない線維化 (bronchiolization) の分岐点を解明する一助としたい。

材料と方法

うさぎの胎生期 (18 日から 30 日) 肺 (n=4), 生後 1 日

肺 (n=4) を用いた。胎児は, 母体の麻酔下のもとで, 帝切にて取り出した。肺は, 深麻酔状態下で切除した。

光顕的には, ホルマリン固定, パラフィン包埋し, HE 染色, Elastica Masson 染色にて観察した。

電顕的には, グルタル, オスミウム固定, エポン包埋, 超薄切片作成, 二重染色にて観察した。

免疫組織化学的には抗ヒト IV-collagen 抗体 (Southern Biotechnology Associates Inc.), 抗ヒト MMP-1 抗体 (clone 41-1E5, Fuji Chemical Industries, Ltd., Takaoka, Japan), 抗ヒト MMP-2 抗体 (clone 42-5D11, Fuji Chemical Industries), 抗ヒト MMP-9 抗体 (clone 56-2A4, Fuji Chemical Industries), 抗ヒト MT1-MMP (MT1-MMP) 抗体 (clone 114-1F2, Fuji Chemical Industries), 抗ヒト TIMP-2 抗体 (clone 68-6H4, Fuji Chemical Industries) を用いて, ABC 法にて検索した。MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-2 の抗体については, ウエスタンブロッティングにてウサギ組織に反応し, 免疫組織化学的に使用可能であることが報告されている。<sup>8)</sup> 抗 MT1-MMP 抗体については, 今回ウエスタンブロッティングにて, 検討した。

ゲラチンゼイモグラフィーは, 未固定凍結材料の SDS ホモジェネートを用いた。2mg/ml のゲラチンを含んだゲルに泳動後, 反応させ, クマシーブルーで染色した。それぞれのバンドについて, NIH イメージソフトを用い, 解析した。

ウエスタンブロッティングは, 未固定凍結材料の SDS ホモジェネートを用い抗 MT1-MMP 抗体を用い, 化学発光にて検索した。それぞれのバンドについて, NIH イメージソフトを用い, 解析した。



図 1 腺様期肺の免疫組織化学

A: Type IV collagen is present in walls of the capillaries and around the glands. The basement membrane around the stalk of the glands is thick, but that around the tip (T) of the gland is thin. B: The reaction for MMP-1 is located in the epithelial cells. C: Only slight reaction for MMP-9 is found in the epithelial cells. D: MMP-2 is slightly positive in the epithelial cells and some mesenchymal cells. E: MT1-MMP is detected in the epithelial cells. F: TIMP-2 is detected in the epithelial cells, endothelial cells and mesenchymal cells. T: tip of the gland. (bar=40 μm) 文献 7 より引用

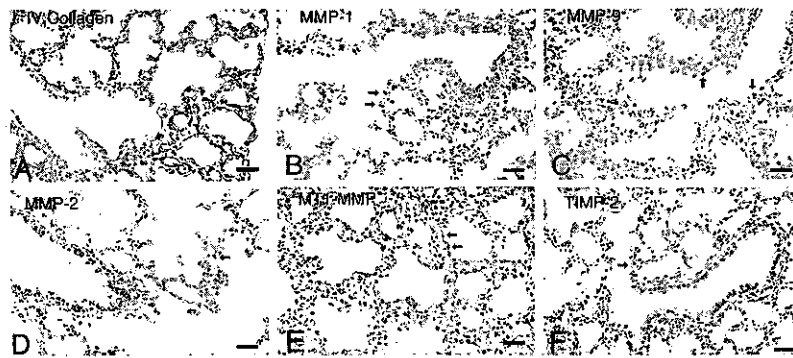


図2 肺胞期肺の免疫組織化学

A: Type IV collagen is distributed in the basement membranes. B: MMP-1 is found in the bronchial and type II alveolar epithelial cells (arrows). C: MMP-9 is positive in the bronchial and type II epithelial cells (arrows). D: MMP-2 is detected in the bronchial and type II epithelial cells (arrow). E: MT1-MMP is detected in type II and some thinning alveolar epithelial cells (arrows). F: TIMP-2 is detected in the epithelial cells of airways and type II epithelial cells (arrow). 文献7より引用

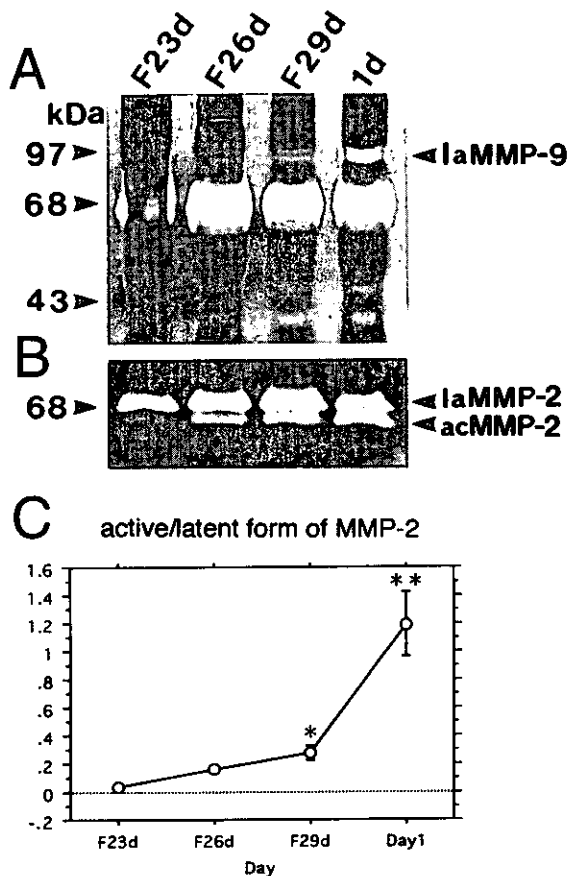


図3 ゼラチンザイモグラフィー

One mg (A) or 0.2 mg (B) of lung tissue is applied to each lane of gels. Gelatinolytic activities with various molecular weight are detected in the tissue extracts. Of them, the gelatinolytic activities of about 68 and 62 kd are predominant (B). They correspond to the latent form and the active form of MMP-2 respectively. Gelatinolytic activities of about 92 kd corresponding to MMP-9 are also detected in the later than 26 days of gestation (A). (C) Densitometric analysis of Figure 4B shows the ratio of active/latent forms of MMP-2 in one day after birth is significantly larger (\*\*\*) than those in other stages ( $p < 0.01$ ), and that in 29 days is significantly larger (\*) than that in 23 days ( $p < 0.05$ ). 文献7より引用

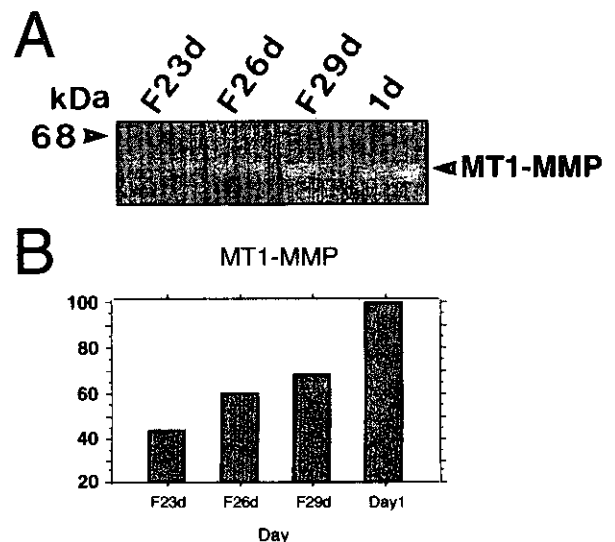


図4 MT1-MMPのウエスタンブロッティング

Chemiluminescent bands corresponding to MT1-MMP are detected in tissue homogenates of animals of each stage. (B) Densitometric analysis of Figure 5A shows the amount of MT1-MMP seems to be increased during the lung development. 文献7より引用

### 結果

胎生初期肺である腺様期では、上皮は腺様で、IV-collagen 陽性の上皮基底膜は、細気管支原基の壁で肥厚が著明であった(図1)。MMP-1, MT1-MMPは上皮細胞に、MMP-2とTIMP-2は上皮、間質細胞、内皮細胞に陽性であった(図1)。MMP-9は上皮細胞にごく軽度の陽性を示した(図1)。

管状期では、上皮細胞の丈は低くなり、内腔の開大がみられた。細気管支原基の末梢側には、肺胞原基の形成が確認された。上皮基底膜は、細気管支原基から、肺胞原基の壁で肥厚が認められた。免疫組織化学的には、MMP-1, MMP-9, MT1-MMPは上皮細胞に、MMP-2と

TIMP-2は上皮, 間質細胞, 内皮細胞に陽性であった。

肺胞期では, 肺胞の形成とともに, 上皮は菲薄化し, I型, II型上皮への分化が明らかとなった(図2)。基底膜は菲薄化し, 上皮, 内皮の基底膜は癒合し, 一層の空気血液関門を形成した。MMP-1, MMP-9, MT1-MMPは上皮細胞に, MMP-2とTIMP-2は上皮, 間質細胞, 内皮細胞に認められた(図2)。MT1-MMPは特にII型およびI型化する肺胞上皮細胞に局在して認められた。

ゲラチンザイモグラフィでは, latent MMP-9, latent MMP-2, active MMP-2が認められ, それぞれ, 経過を追って増加していた(図3A, B)。特にactive MMP-2/latent MMP-2比が, 経過を追って顕著に増加した(図3C)。

ウエスタンブロッティングでは, 各時期で, MT1-MMPが陽性で, まずこの抗体のウサギ組織での反応が明らかであることを示した(図4A)。量的には, 肺の発達の経過を追って増加していた(図4B)。

## 考 察

基底膜成分を構成する細胞外基質を基質とするMMPであるMMP-2と, その活性化に関与するMT1-MMPが特に胎生後期の肺胞上皮に陽性であり, MMP-2の活性化も同時に顕著に亢進していた。このことは, 肺胞形成過程で重要な基底膜の菲薄化にMMP-2の活性化が関与していると考えられた。

上皮細胞に出現し, 後期に特に増加したMMP-1, MMP-2, MMP-9, MT1-MMPは, 種々のECMをその基質としており, 細気管支の枝分かれ, 肺胞壁の菲薄化に関与していることが示唆される。<sup>3,6)</sup>

肺胞形成期における, MMP-2の活性化が顕著であることは, 今回のザイモグラフィで明らかである。MT1-MMPは, 生体内において, MMP-2の活性化因子の主体と考えられており, 腫瘍の浸潤において重要な働きをすることが知られている。<sup>9)</sup>今回, 胎生肺においてもウエスタンにてMT1-MMPの経時的な増加が確認された。胎生肺の特に肺胞形成期に, MMP-2の活性化が肺胞壁の基底膜の菲薄化, 肺胞の形成に関与することが示唆された。

可逆性のIPであるBOOPでも, 形態的, 免疫組織化学的に肺胞上皮細胞の良好な再生, 毛細血管の新生が特徴的に認められる。また, BOOPの再生上皮細胞にはMMP-2, MT1-MMPの陽性所見がみられ, ゲラチンザイモグラフィで顕著なMMP-2の活性化がみられている。<sup>1)</sup>このことは, まさにIPの治療過程において, 形態像のみではなくMMP/TIMP系においても, 肺胞形成過程を繰り返

しているものと考えられる。すなわち, MMP-2とその活性化は肺胞上皮細胞の再生に有利に作用しているものと考えられる。今後, MMP-2のノックアウトマウスにプレオマイシン肺線維症を作成観察し, MMP-2の役割を明確化したい。

## 文 献

- 1) Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab. Invest.* 78:687-698, 1998.
- 2) Fukuda, Y, Ferrans, VJ, Crystal RG. The development of alveolar septa in fetal sheep lung: Ultrastructural and immunohistochemical study. *Am J Anat* 167: 405-439, 1983.
- 3) Arden MG, Spearman MA, Adamson IYR. Degradation of type IV collagen during the development of fetal rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 99-105, 1993.
- 4) Casasco A, Casasco M, Reguzzoni, M, Calligaro A, Tateo S, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Occurrence and distribution of matrix metalloproteinase-2-immunoreactivity in human embryonic tissues. *Eur J Histochem* 39: 31-38, 1995.
- 5) Rolland G, Xu J, Tanswell AK, Post M. Ontogeny of extracellular matrix gene expression by rat lung cells at late fetal gestation. *Biol Neon* 73: 112-120, 1998.
- 6) Kinoh H, Sato H, Tsunozuka Y, Takino T, Kawashima A, Okada Y, Seiki M. MT-MMP, the cell surface activator of pro-MMP-2 (pro-gelatinase), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Sci* 109: 953-959, 1996.
- 7) Fukuda Y, Ishizaki M, Okada Y, Seiki M, Yamanaka N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in fetal rabbit lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279: L555-L561, 2000.
- 8) Tatsuguchi A, Fukuda Y, Ishizaki M, Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in normal human and rabbit stomachs. *Digestion* 60: 246-254, 1999.
- 9) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370:61-65, 1994.

# 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 貴和 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( $\text{PaO}_2$ , %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- $\alpha$ の放出を抑制して炎症を抑える<sup>1)</sup>。肺胞マクロファージからPDGF<sup>2)</sup>、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<sup>3)</sup>、さらにはコラーゲン合成を抑制して<sup>4)</sup>、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<sup>5)</sup>。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<sup>6-8)</sup>。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)。

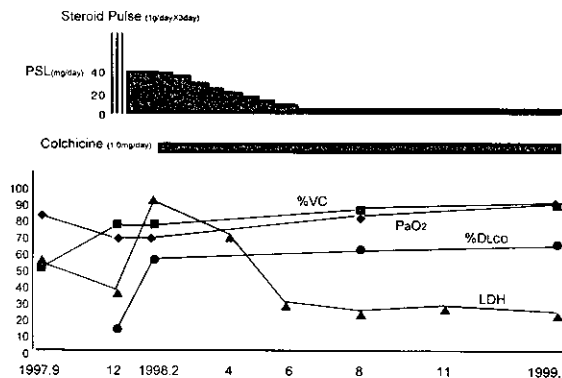


図1 コルヒチン併用によりステロイドの減量に成功した症例

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<sup>7)</sup>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(PaO<sub>2</sub>, %VC, %DL<sub>CO</sub>)及び生化学検査(LDH, KL-6)を比較し、American Thoracic Societyの評価基準<sup>9)</sup>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、%DL<sub>CO</sub>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、PaO<sub>2</sub>, %VC, %DL<sub>CO</sub>を検討した。PaO<sub>2</sub>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 (%)

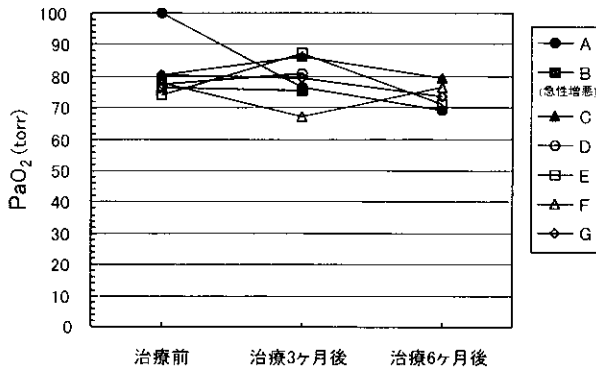


図 2 治療前後の PaO<sub>2</sub> の変化

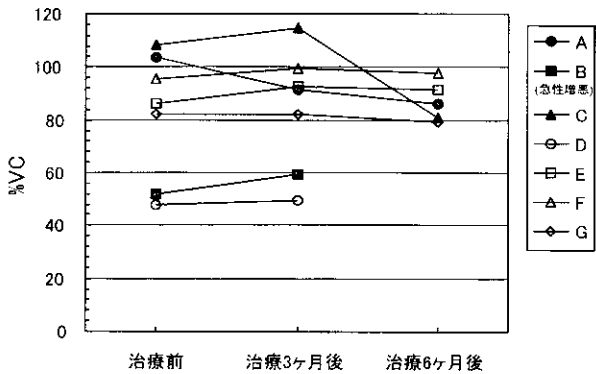


図 3 治療前後の %VC の変化

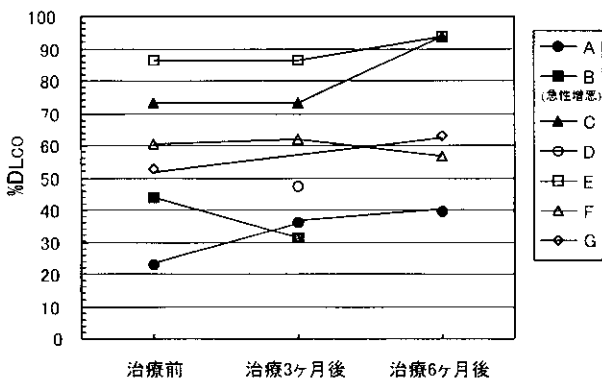


図 4 治療前後の %DLco の変化

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、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)。

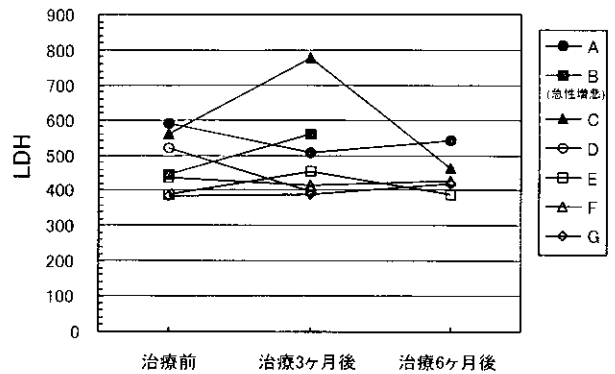


図 5 治療前後の LDH の変化

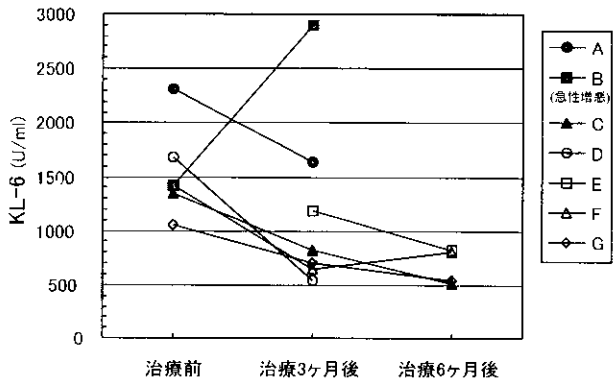


図 6 治療前後の KL-6 の変化

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, PaO<sub>2</sub>, 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、PaO<sub>2</sub>, %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 <sub>2</sub>	81.1±8.6	79.1±6.9	71.7±7.9
%VC	82.3±23.9	84.2±22.9	87.0±6.8
%DLco	53.9±27.5	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
deteriorated	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*<sup>1-5)</sup> や *in vivo*<sup>10, 11)</sup> 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<sup>12, 13)</sup>. 特に最近白血球への作用<sup>14, 15)</sup> や血管新生との関連<sup>16)</sup> が報告されてますます注目を集めている. 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<sup>17)</sup>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<sup>7)</sup>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

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Entzian P, Schlaak M, Seitzer U, et al. Antiinflammatory and antifibrotic properties of colchicine: implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 175: 41-51, 1997.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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) Zareneyrizi F, Yang DJ, Oh CS, et al. Synthesis of [<sup>99m</sup>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, 田口善夫: 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.



# 特発性間質性肺炎に対する N-アセチルシステイン (NAC) 吸入療法 — オープン臨床試験の成績 —

石井 芳樹<sup>1\*</sup> 北村 諭<sup>2</sup> 杉山幸比古<sup>3\*\*</sup>

特発性間質性肺炎 (IPF) の病態においては、オキシダントが重要な役割を演じており、アンチオキシダントの投与が治療として有用である可能性が考えられる。N-アセチルシステイン (NAC) は、グルタチオンの前駆物質であるとともに、それ自身も抗酸化作用を持つ薬剤で NF- $\kappa$ B の抑制作用などを介して接着分子発現やサイトカイン産生を抑制する作用も有する。マウスのプレオマイシンによる肺臓炎モデルでも NAC 吸入が炎症細胞浸潤と引き続く肺線維化形成を抑制した。そこで慢性型 IPF 症例の治療として NAC 吸入のオープン臨床試験を行った。対象は 28 例の慢性型 IPF 症例で、胸腔鏡下肺生検にて組織学的に UIP と診断された症例または CT 所見から蜂窩肺を認め臨床的に UIP と考えられる症例のうち肺炎など感染症による増悪期あるいは急性悪化期にある症例は除いた。また、ステロイドや免疫抑制剤など他の治療薬を使用している症例は除外した。N-アセチルシステイン吸入液 1A (352.4mg) を超音波ネブライザーで 1 日 2 回吸入し、経時的に、臨床症状 (労作時呼吸困難, 咳嗽, など), 画像所見 (胸部 CT, X 線検査), 肺機能検査所見 (%VC または %DLCO の 10% 以上の変動) を評価した。吸入開始後 3 ヶ月の時点における短期効果では, 28 例中 15 例 (53.6%) で全般的な改善を認めた。これに伴い, 間質性肺炎の活動性を示すマーカーである血液中 KL-6 濃度の有意な減少が見られた。吸入開始後 1 年以上継続した症例における長期効果は, 18 例中 8 例 (44.5%) に症状や画像所見, 肺機能所見の改善を認め, 総合的に薬剤の有用性が示された。最長 5 年までの長期使用例においても重篤な副作用や有害事象は認めず安全に使用できた。NAC 吸入は, IPF 症例の症状の改善, 肺機能や画像所見の悪化の予防に有用である可能性が示された。

## N-ACETYLCYSTEINE INHALATION THERAPY FOR IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS (IPF) — A Prospective, Open-label Phase II Study —

Yoshiki Ishii<sup>1</sup>, Satoshi Kitamura<sup>2</sup>, Yukihiro Sugiyama<sup>3</sup>

1. Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine,

2. Saitama Prefectural University,

3. Department of Pulmonary Medicine, Jichi Medical School

GSH in airway epithelial-lining fluid (ELF) is a key factor of antioxidant defense system that protects the pulmonary epithelium from oxidants released by inflammatory cells as well as inhaled oxidants. Deficiency of GSH in ELF was reported in patients with IPF. N-acetylcysteine (NAC) acts as a precursor of GSH and an antioxidant by itself in addition to its mucolytic activity. We evaluated the tolerability and usefulness of NAC inhalation in patients with IPF. Twenty-eight patients with an established diagnosis of IPF were treated with NAC inhalation (326.5mg) twice daily over 12 weeks using an ultrasonic nebulizer. The mean age of patients was 63  $\pm$  12 yr (22-77yr) and the mean duration of inhalation was 22  $\pm$  15 mo (3-53mo). Symptoms, mortality, lung function test, chest CT, and adverse effects were followed. Eighteen of 28 patients continued the therapy over 1 year. After 3 months, percentages of improved patients in symptoms, CT findings, and pulmonary function tests were 53.6, 17.9, and 38%, respectively. Serum levels of KL-6, a marker of pulmonary fibrosis, significantly decreased after 3 month inhalation. Eight of 18 patients (44.5%) who received this therapy over 12 months were assessed as clinically effective. The results of this study are encouraging. NAC inhalation is a promising new treatment for IPF.

## はじめに

特発性間質性肺炎 (IIP) は、慢性に緩徐に進行する予後不良の難病で、5 年生存率 50% 程度、10 年生存率 20% 程度といわれる。しばしば経過中に急性悪化をきたす。現在まで確立した治療はなく、活動性の高い場合、ステロイド剤や免疫抑制剤が用いられるが、その効果も明らかでない。病態と治療について多くの基礎的研究がなされており、様々な薬剤が動物モデルで試みられ、有用性が報告されているが、臨床的な効果が確立された薬剤はほとんどない。

間質性肺炎の病態においては、未知の刺激により肺胞マクロファージや集積した好中球などからオキシダントが放出され組織傷害を惹起している。このような病態における炎症細胞の集積や活性化には、サイトカインや接着分子が重要な役割を演じているが、最近オキシダントが細胞内情報伝達や遺伝子の転写因子の活性化などに関与しサイトカイン産生や接着分子発現といった炎症の病態を調節していることも示されている。このようにオキシダントは直接的あるいは間接的に肺傷害の中心的なメディエーターとして間質性肺炎の病態に関与している。

正常の気道粘膜には、種々のオキシダント刺激を防御するための anti-oxidant defense mechanism が存在する。その一つであるグルタチオンは、glutathione redox cycle のなかで働き、過酸化水素を水に変換する役割を果たしている。気道上皮被覆液 (epithelial lining fluid: ELF) には、この GSH が豊富に存在し、肺胞・気道上皮を oxidative stress から保護していると考えられる<sup>1)</sup>。特発性間質性肺炎 (IIP) をはじめとする間質性肺疾患の病態においては、肺胞マクロファージなど気道炎症細胞からの活性酸素産生が亢進し、antioxidant である気道上皮被覆液中のグルタチオン (GSH) 濃度が低下していることが知られている<sup>2,3)</sup>。したがって、これらの症例において減少した GSH を補充することが治療として有効である可能性がある。

N-アセチルシステイン (NAC) は、古くから去痰剤として用いられてきたが、GSH の前駆体であり細胞内 GSH 増加作用を有するうえ、それ自体にも antioxidant 作用がある薬剤である。さらに、NAC は NF- $\kappa$ B の活性化を抑制しサイトカインや接着分子の発現を抑制することも報告されている<sup>4)</sup>。我々は、プレオマイシン肺線維症モデルにおいて NAC の吸入が肺局所におけるサイトカイン産生や活性酸素産生を抑制し、肺への炎症細胞浸潤と引

き続く線維化を抑制しうることを確認した<sup>5)</sup>。これらの知見をふまえ、IIP 症例に対して NAC 吸入療法が有用であるか否か臨床試験を施行した。

## 対象と方法

慢性型の特発性間質性肺炎症例で厚生省研究班の診断基準を満たし、胸腔鏡下肺生検にて組織学的に UIP と診断された症例または CT 所見から蜂窩肺を認め臨床的に UIP と考えられる症例を対象とした。肺炎など感染症による増悪期あるいは急性悪化期にある症例やステロイド、免疫抑制剤など他の治療薬を使用している症例は除外した。試験は施設の IRB の許可を受け、患者からは文章による Informed consent を得た上で施行した。

NAC 吸入は、N-アセチルシステイン吸入液 (エーザイ) 1A326.5mg (2ml) に生食 8ml を加え 10ml とし、1 日 2 回朝夕超音波ネブライザーを用いて吸入した。この投与量で IIP 症例で減少した気道におけるグルタチオン濃度が補充し得ることは確認されている<sup>6)</sup>。

効果判定は、短期効果として吸入開始後 3-6 ヶ月の時点における効果を 1) 臨床症状 (労作時呼吸困難、咳嗽、など)、2) 画像所見 (胸部 CT、X 線検査)、3) 肺機能検査所見 (%VC または %DLCO の 10% 以上の変動) の 3 項目について吸入開始前と比較し、改善、不変、悪化のいずれかに判定した。また、これら 1)-3) の所見を総合して 4) 全般改善度を著明改善 1)-3) の 3 項目ともに改善の見られるもの、改善 (いずれか 1 項目以上改善が見られ他の項目に悪化の見られないもの)、不変、悪化の 4 段階で判定した。また、長期効果として 1 年以上治療を継続した症例について、最終観察時点における 1) 臨床症状 (労作時呼吸困難、咳嗽、など)、2) 画像所見 (胸部 CT、X 線検査)、3) 肺機能検査所見 (%VC または %DLCO の 10% 以上の変動) の評価を短期効果と同様に行い、さらに生命予後も考慮して著効、有効、無効、判定不能の 4 段階で臨床的有用性を判定した。

線維化のマーカーとして血清 KL-6 値を測定し治療に伴う変化を短期変動と長期変動に分けて検討した。

## 結 果

### 1) 症例のプロフィール

試験にエントリーしたのは、34 例であり、2 例は吸入による咳嗽の増加、および硫黄臭による気分不快を理由に開始直後に中止した。4 例は開始後 1 ヶ月以内に転院したため脱落した。効果判定の対象となったのは、NAC 吸入を 3 ヶ月間以上施行した 28 症例 (男性 13、女性 15) で年齢は平均 63 ± 12 歳 (22-77 歳)、吸入期間は、22 ± 15 ヶ月 (3-53 ヶ月) であった。1 年以上吸入を継続し長

1. 獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科  
2. 埼玉県立大学作業療法学科  
3. 自治医科大学呼吸器内科  
\* 重点研究 研究協力者  
\*\* \* 分担研究者

期効果判定の対象となった症例は、18 例であった。経過中死亡したものが 9 例で、慢性経過による呼吸不全死 3 例（1 例は 1 年以内、急性増悪による死亡が 6 例（4 例は 1 年以内）であった。開始 3 ヶ月以降で転院による脱落が 6 例であり、残り 13 例は、治療を継続して経過観察中である。

2) 短期効果

吸入開始後 3-6 ヶ月の時点における短期効果 (図 1) では、28 例中 53.6% (15 例) の症例で咳嗽、呼吸困難などの自覚症状の改善を認め、不変 39.3% (11 例)、悪化 7.1% (2 例) であった。画像所見は、17.9% (5 例) に明らかな改善を認め、1 例 (3.6%) に悪化を認めたが残りの 78.6% (22 例) は不変であった。肺機能検査では、施行可能であった 13 例中 5 例 (38%) に改善、2 例に悪化を認め残り 6 例は不変であった。3 項目を総合評価した全般的改善度の評価では、著明改善が 4 例 (14.3%)、改善が 11 例 (39.3%)、不変が 11 例 (39.3%)、悪化が 2 例 (7.1%) であり、改善以上が 53.6% (15 例) と良好な短期効果を示した。

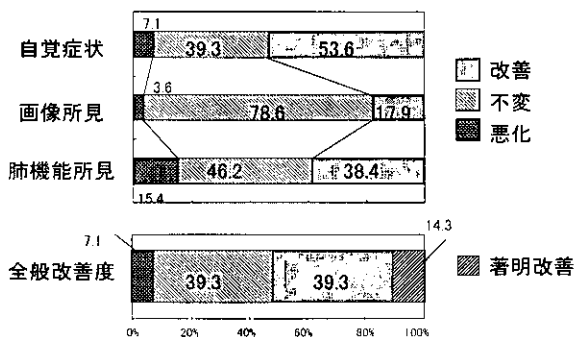


図 1 HIP 症例に対する NAC 吸入療法の短期効果 (吸入開始後 3 ヶ月の時点における効果判定) (n=28)

3) 長期効果

NAC 吸入開始後 1 年以上治療を継続し得た症例は、18 症例であった (図 2)。観察期間は、平均 30.5 ± 12 ヶ月 (16 ~ 53 ヶ月) であった。臨床症状はについて、改善 5 例 (27.8%)、不変 6 例 (33.3%)、悪化 7 例 (38.9%) であり。画像所見は、改善 3 例 (16.7%)、不変 10 例 (55.6%)、

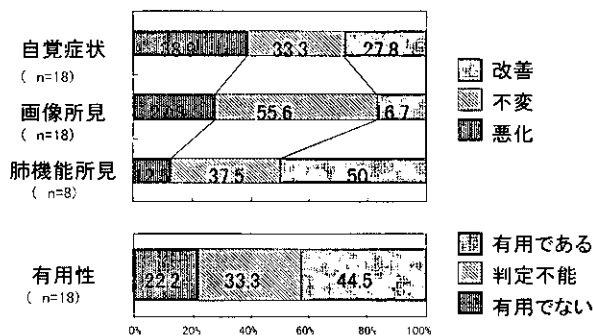


図 2 HIP 症例に対する NAC 吸入療法の長期効果 (吸入開始後 1 年以上の時点における効果判定) (n=18)

悪化 5 例 (27.8%) であった。肺機能所見については最終データが得られた 8 例中改善 4 例、不変 3 例、悪化 1 例であった。これらのデータを総合し、さらに生命予後も考慮して有用性あり、無効、判定不能の 4 段階で臨床的有用性を判定したところ、有用性あり 8 例 (44.5%)、判定不能 6 例 (33.3%)、有用性なし 4 例 (22.2%) であった。

4) 血清 KL-6 値の変動

NAC 吸入療法開始前の血清 KL-6 値は 2073 ± 1051 U/ml であり、吸入 3 ヶ月後には、1556 ± 847 U/ml と有意な低下を認めた (p<0.01) (図 3)。また、1 年以上吸入を継続した症例の最終観察時点での KL-6 値は、吸入前値の 25% 以上の変動を示したものを低下または上昇とすると 12 例 (66.7%) が低下し、4 例 (22.2%) が上昇し、残り 2 例 (11.1%) は不変であった。

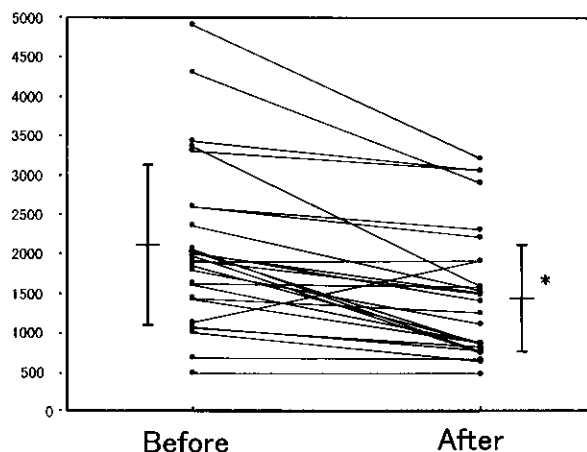


図 3 HIP 症例における NAC 吸入前後の血清中 KL-6 濃度の変化。NAC 吸入療法開始前と開始後 3 カ月に採血した。 (\*p<0.01)

考 察

HIP に対する NAC 吸入療法の有用性および安全性を知るためオープン臨床試験を行った。吸入開始後 3-6 ヶ月の時点における短期効果では、約半数の症例で自覚症状の改善を認め、一部の症例では画像所見や肺機能所見の改善も認められた。1 年以上治療を継続し得た症例の長期効果においても、臨床症状の改善は 27.8% に認められ、44.5% に臨床的有用性ありと判定された。最長 53 カ月の長期使用においても特別な副作用は認めず、安全性も確認された。今回の試験は、プラセボコントロールを置いていないため、正確にその有用性を論じることは困難であるが、予後不良で慢性進行性の疾患において、短期的、長期的にも約半数に自覚症状の改善が認められたという成績は、QOL の改善という面からも有用であると評価し得るものと思われる。間接的所見ではあるが、多くの症例で間質性肺炎の活動性マーカーである KL-6 値が NAC

吸入によって有意に低下をみたことは、NAC の薬剤としての効果を反映しており、画像所見や肺機能所見に改善がみられない症例においても線維化の進行を抑制している可能性は十分に考えられるものと思われた。

最近、ドイツのグループより NAC の経口剤が特発性肺線維症患者の肺機能や運動負荷時の血液ガス改善に有用であるとの報告がなされ<sup>7)</sup>、また、欧州では大規模な臨床試験が開始されている。わが国において、NAC は去痰剤としての気道内投与は承認されており、古くから用いられてきた薬剤であり、その安全性は確立されている。NAC は、経口投与では、気道におけるグルタチオン濃度は上昇するが NAC 自体は、気道には到達しないといわれる。吸入療法は、NAC 自体を炎症の場に直接作用させ、さらに GSH の補充も行われる点から、より効率の良い投与方法と考えられる。また、去痰剤としての作用も期待できるので吸入という投与方法は理にかなったものと思われる。今後さらに多施設で症例を集積し有用性が明らかにされることが期待される。

#### 参考文献

- 1) Cantin AM, et al.: Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* 1987; 63: 152-157.
- 2) Cantin AM, et al.: Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 139: 370-372.
- 3) Borok Z, et al.: Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet.* 1991; 338: 215-216.
- 4) Schreck R, et al.: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991; 10: 2247-2258.
- 5) Hagiwara S, Ishii Y, Kitamura S: Aerolized administration of N-acetylcysteine attenuates the lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 225-231.
- 6) 石井芳樹, 他: 特発性間質性肺炎 (IIP) に対する N-アセチルシステイン (NAC) 吸入療法の試み. 平成 7 年度びまん性肺疾患調査研究報告書. pp121-123, 1996.
- 7) Berh J, et al.: Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1897-1901.