

はじめに

1997年に木村らにより線虫の長寿命変異体である *daf-2* の遺伝学的解析および分子生物学的解析の結果、*daf-2* 線虫のインスリン様受容体遺伝子で長寿命遺伝子変異が発見されたり、この解析から、*daf-2* 線虫ではインスリン様シグナル伝達に異常があること、および、インスリン様シグナル伝達異常が個体寿命を延長させる可能性が示唆された。この機構はシグナル伝達異常により、MnSOD等の抗酸化酵素の発現が増大し、酸化ストレス耐性が獲得されるからと考えられる。同様の遺伝子変異がヒトのインスリン抵抗性の症例からも報告され、インスリン抵抗性の病態と個体の長寿化のメカニズムにおける共通性が示唆された²⁾。

一方、高濃度酸素は直接肺に対し、酸化ストレスをおよぼし、抗癌剤として臨床で用いられているブレオマイシンは活性酸素を発生させ、DNAの一部を破壊することによって抗癌作用を発揮するとされており、特に肺毒性が強く肺線維症をきたすことが知られている。このためブレオマイシンと高濃度酸素は肺における酸化ストレス実験に頻用される。

そこで、我々は、インスリン抵抗性の病態が、酸化ストレス耐性獲得をもたらす、肺線維症などの酸化ストレスにより引き起こされると考えられる肺疾患を抑制する可能性を考えた。この可能性を探索する目的でマウスのインスリン受容体遺伝子に線虫で発見された遺伝子変異を導入したマウスの作製を試みた。

酸化ストレス耐性を獲得していることが期待されるこのモデルマウスに高濃度酸素吸入やブレオマイシン投与を行うことにより、インスリンシグナル伝達異常が肺における酸化ストレス、間質性肺炎発症におけるインスリンシグナルの役割の病理学的役割の解明が期待される。

対象と方法

IRP1195L ヘテロ接合体マウスの作成

ラットのインスリン受容体遺伝子 (IR) の exon19 から 21 を含む cDNA 領域をプローブとして、129/Sv/J 系統由来のマウスのゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングし、マウスインスリン受容体ゲノムのエクソン 15 から 22 を含むゲノム DNA クローンを単離した。マウスのインスリン受容体エクソン 20 は線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒトにて保存されるチロシンキナーゼドメインに含まれ、この中にあるマウスインスリン受容体蛋白

1195番目のプロリン残基もいずれの動物種にも保存されている。線虫ではこのプロリン残基がロイシン残基に変異した変異体が長寿を示す。ヒトではこのプロリン残基がロイシン残基に変異した患者報告例があり、インスリン抵抗性を呈している。ターゲットベクター作製として、まずエクソン 20 とその周囲のイントロンを含む 1.1kb のゲノムカセットに対して、pAlter システム (ストラタジーン社製) を用い、1195 番目のプロリン残基をロイシン残基にする変異を導入した。またイントロン 20 に pMC1 ネオマイシン耐性遺伝子カセット (ストラタジーン社製) を挿入することによりネオマイシン選別が可能になるようにした。エクソン 20 を含むターゲットカセットの上下流に、相同するゲノム領域をそれぞれ 7.3kb、2.3kb 組み込み、相同組換えを起こし易くするようにした (図 1)。このターゲットベクターを線状化し、エレクトロポレーション法によって ES 細胞に導入した。ネオマイシン耐性 ES クローンを G418 及び GANC (ガンシクロビル) によって選択し、サザンブロット法、PCR 法によって相同組換え体を同定した。相同組換えの起こった ES クローンを用い、文献³⁾ 記載の凝集方法に準じて、生殖系列のキメラマウスを作製した。作製されたオスのキメラマウスを野生型の C57BL・6J のメスマウスと交配させ、PCR によってヘテロ接合体マウス (F1: 雑種第一代) の産

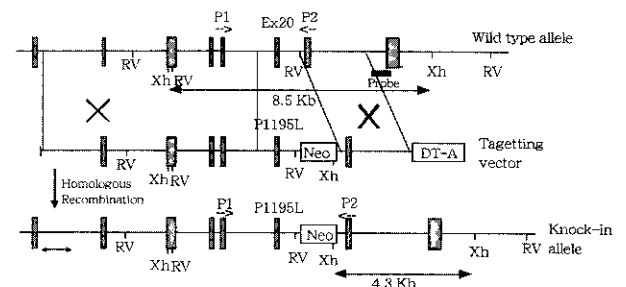


図1 IRP1195L 遺伝子改変マウス作製の為の標的ベクター構築を確認した。

PCR

エクソン 19 上にセンスプライマー、エクソン 21 上にアンチセンスプライマーを設定し増幅を行った。野生型では 4.4kb、変異インスリン受容体遺伝子では 5.7kb の PCR 増幅産物が得られた。

RT-PCR およびシークエンス

ホモ接合体マウス肝臓由来の全 RNA を鋳型にエクソン 19 上のセンスプライマーとエクソン 21 上のアンチセンスプライマーによって PCR 増幅をおこなった。RT-PCR 増幅産物をクローニングし、DNA 塩基配列を決定した。

1. 東京都老人総合研究所分子遺伝学部門
 2. 日本医科大学第四内科
- * びまん性肺疾患研究班 研究協力者

インスリン受容体チロシナーゼ活性測定

生後1日齢の野生型マウス、ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスの肝臓より、溶解緩衝液[最終濃度で1% トリトン X-100, 50mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 10 μ g/mL ロイペプチン, 10 μ g/mL ペプスタチン, 1mM PMSF] 中で均質化した。超遠心分離した上清を WGA レクチンアガロースカラム(ホーネン社製)に通すことにより膜蛋白を親和的に吸着させた。さらに 0.3M N-アセチルグルコサミンを通すことにより糖蛋白であるインスリン受容体蛋白を溶出、粗精製した。

この溶出物をインスリン[最終濃度 100nM]と1時間反応させた後、リン酸化反応液[最終濃度 3mM 塩化マンガ、50mM ATP, 0.1mCi[γ 32P]ATP] 中で 20 分反応させた。反応停止液[最終濃度 0.1M フッ化ナトリウム, 4mM パナジジン酸ナトリウム, 1mM EDTA, 1mM ピロリン酸ナトリウム]にてリン酸化反応を停止した。

上記リン酸化反応液を、あらかじめ抗インスリン受容体 C 末端抗体(徳島大学分子酵素学センター蝦名教授より分与)、または抗リン酸化チロシン抗体(PY20, ICN 社製)を吸着させたプロテイン A セファロース(ファルマシア)カラムを用いて免疫沈降した。沈降した自己リン酸化インスリン受容体蛋白を溶出緩衝液にて溶出し、10%SDS-PAGE 法により分離した。

血糖、インスリン測定

空腹時の血糖値、インスリン値を測定するため、マウスを 15 時間空腹にした。血糖値はグリコカード(アベンティスファーマ社製)にて、血清インスリン値はラットインスリン値をコントロールとする RAT INSULIN RIA KIT (リンコ・リサーチ社製)にて測定した。

プレオマイシン投与

野生型、ヘテロ接合体マウスに対し 3 匹ずつ尾静脈からプレオマイシン 100mg/kg を静脈注射した。コントロール群には生理食塩水を投与した。投与は初日にのみ行い、3 週間後に肺を取り出し、病理学的検索を行った。

結 果

ヘテロ接合体マウスの遺伝子変異の確認

ホモ接合体マウスを得るために、このヘテロ接合体マウスを交配させた。4 週間後の PCR によるインスリン受容体遺伝子型検定ではホモ接合体マウスを得られなかった(野生型:ヘテロ:ホモ=31:68:0)。生後1日目のマウスの遺伝子型を検討したところ、図2に示すようにホモ接合体マウスの出生を確認できた。

(+/+:+/PL:PL/PL=6:7:5)しかしホモ接合体マウスは出生はするものの生後1日目から発育障害を認めることから、

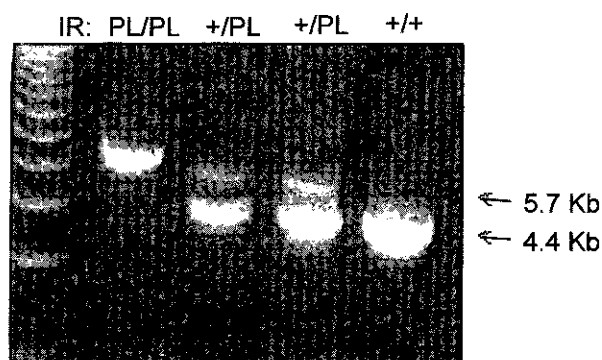


図2 ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスにおける遺伝子型の確認

遺伝子改変マウス新生児の肝臓より DNA を抽出し、エクソン 19 のセンスプライマーとエクソン 21 のアンチセンスプライマーを用いて RCR を行った。IRP1195L 改変アレルから 5.7kb のバンド、野生型 IR アレルからは 4.4Kb のバンドが増幅された。

過去のインスリン受容体欠損マウスに関する文献⁴⁾記載同様、出生後の発育障害、糖尿病性ケトアシドーシスによる死亡を起こしていることが考えられた。

このノックインホモ接合体マウスが予期せぬプライスなどにより完全欠損マウスとなっていないことを確認するため、RT-PCR を行った。PCR 産物は野生型同様に 441bp であった(図3)。この PCR 産物の塩基配列を調べたところ図4に示すように、計画通りの CCC(プロリン)->CTC (ロイシン) からなる 1 アミノ酸置換を起こしていることを確認し得た。またインスリン受容体抗体(C-19:サンタクルーズ社製)によるウェスタンブロットにて、ホ

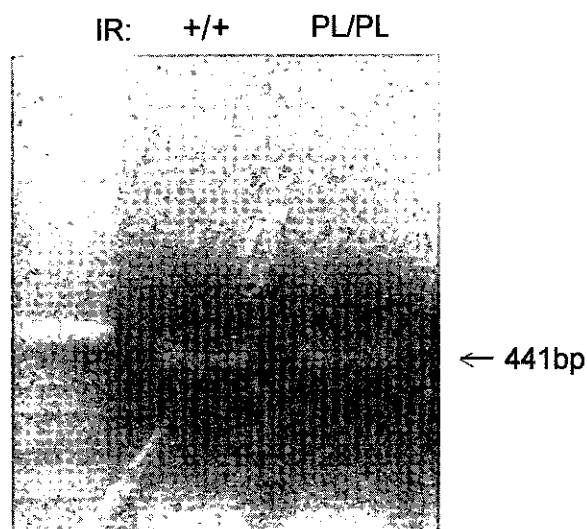


図3 ヘテロ接合体マウスにおける改変インスリン受容体遺伝子の遺伝子発現の確認

ホモ接合体マウス新生児肝臓より RNA を抽出し、エクソン 19 のセンスプライマーとエクソン 21 のアンチセンスプライマーで RT-PCR を行った。野生型マウス由来の肝臓と同様に、ホモ接合体マウスでも転写産物を検出した。

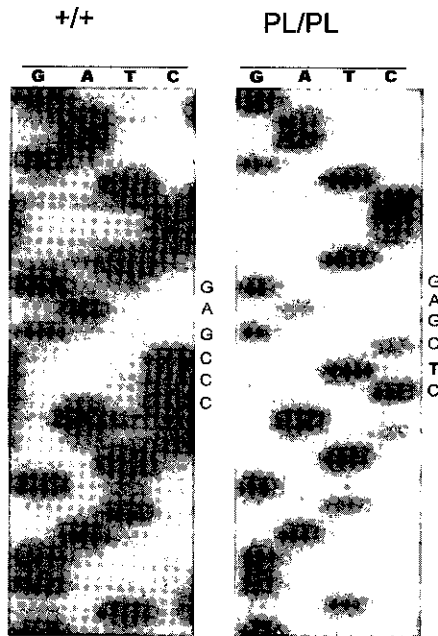


図4 ヘテロ接合体マウスにおけるインスリン受容体遺伝子の遺伝子変異の確認

ヘテロ接合体マウスより、インスリン受容体ゲノム遺伝子エクソン20をPCR増幅し、ノックインされたエクソンにおける1995番目のアミノ酸をコードする塩基配列がCCC→CTCに変換されたことを確認した。

モ接合体マウス由来の組織からもインスリン受容体蛋白ベータ鎖95kDを認めることから、変異マウスでは変異インスリン受容体が発現していることを確認した。

インスリン受容体変異マウスのインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性測定

IR P1195Lヘテロ接合体マウスの最大の特徴は、1アミノ酸変異によりインスリン受容体蛋白がキナーゼ活性を失った受容体となり、ドミナントネガティブ効果からインスリンシグナルを下流に伝達できなくなることにある。このことを確かめるために生後1日齢の野生型マウス、ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスでインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性測定をおこなった。図5にオートラジオグラフィーを示す。ホモ接合体マウスのインスリン受容体は、インスリンの有無に関わらず、自己リン酸化を認めなかった(レーン6)。ヘテロ接合体マウスのインスリン受容体の自己リン酸化は、インスリンの無い状態ではほとんど認められなかった。これは野生型マウスでも同様であった(レーン4)。インスリンを負荷すると、ヘテロ接合体マウスのインスリン受容体の自己リン酸化は増強したが、その程度は野生型マウスの20%未満であった。(図5a, b) また抗リン酸化チロシン抗体では95kDのインスリン受容体β鎖より大きな分子量の蛋白もリン酸化されていることが判明した。これは97kDの1型インスリン様増殖因子受容体(IGF-1R)のβ鎖と考

えられた。ホモ接合体でインスリン刺激後リン酸化が観察されるが(図5bレーン6)、このリン酸化はインスリンがインスリン様増殖因子受容体と結合し、シグナルを伝達していると考えられた。このヘテロ接合体マウスの所見はインスリン抵抗性の病態を支持するものである。

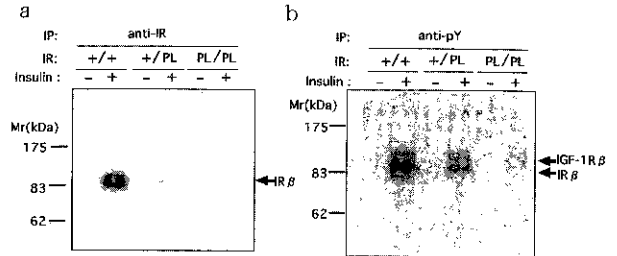


図5 ヘテロ接合体マウスにおける98%酸素吸入による98%酸素吸入下での生存曲線

a 野生型マウス(+/+),ヘテロ接合体マウス(+/PL),ホモ接合体マウス(PL/PL)の新生児肝臓より抽出したインスリン受容体蛋白にインスリン刺激を加え、自己リン酸化を検討した。その結果、ホモ接合体マウスはインスリン受容体のリン酸化は検出できなかった(レーン6)。ヘテロ接合体マウスはインスリン刺激後、弱いながら、インスリン受容体の自己リン酸化が検出された(レーン4)。bヘテロ接合体マウス(+/PL)におけるクロストークシグナルの検出。インスリンで刺激後、抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降を行い、シグナルのクロストークを検討した。その結果、ホモ接合体マウス及びヘテロ接合体マウスはインスリンからIGF-1受容体を介したシグナルが活性化されていることが判明した(レーン4およびレーン6の上のバンド)。この所見はインスリン抵抗性の病態を支持するものである。

インスリン受容体変異マウスにおけるインスリン抵抗性

表1に示すように、ヘテロ接合体マウスは出生後正常に発育し、12ヶ月齢においても野生型マウスとの体重の有意な差を示さなかった(野生型Vsヘテロ=38.6±4.1Vs35.1±2.8)。ヘテロ接合体マウスの血糖値は野生型に対して有意な増加を示さなかった(野生型Vsヘテロ=67.3±10.4Vs56.9±4.5)。この時の血清インスリン値は野生型マウス0.38に対してヘテロ接合体マウスは2.24と5.9倍に増加した(P<0.05)。これらの結果から、接合体マウスはインスリン受容体シグナルが極端に抑制されているが、IGF-1受容体を介したクロストークシグナルあるいは高インスリン血症による持続的なシグナルにより血糖および代謝を保っているために血糖および体重がコントロールされていることが判明した。これらの結果は接合体マウスの内分泌、代謝病態が、ヒトにおけるII型糖尿病の発症前状態つまり、インスリン抵抗性を示すが顕性糖尿病が発症していない病態を類似できるマウスモデルあることを示している。

インスリン受容体変異マウスにおける酸化ストレス耐性

これまでの線虫の研究からdaf-2長寿命線虫では、寿命

表1 ヘテロ接合体マウスにおける体重, 血糖, および血清インスリン値

	野生型マウス	IRP1195L ヘテロ接合体マウス
Body weight (g)	38.6±4.1 (n=6)	35.1±2.8 (n=12)
Blood glucose (mg/dL)	67.3±10.4 (n=6)	56.9±5.5 (n=12)
Plasma insulin (μU/mL)	0.38 (n=5)	2.24 (n=5)

12-month-old, male mice

が1.5倍に延長する以外に,酸化ストレスに対して耐性を獲得していることが報告されている⁵⁾,更に,その耐性メカニズムとしてスーパーオキシドを無毒化する酵素である MnSOD 活性が上昇していることが示唆されている.そこで,作製されたインスリン受容体変異ヘテロ接合体マウスが酸化ストレス耐性を獲得しているか検討するために,98%酸素チェンバー内でマウスを飼育し,酸素毒性に対する抵抗性を調べた.図6にその結果を示すが,ヘテロ接合体マウスは野生型マウスに対して酸素チェンバー内での生存が延長する傾向を認めた.そこで,酸素毒性に対する肺の反応を病理学的に検討する目的で,酸素負荷後のマウスの肺の切片をHE染色し,その病理像を比較した.

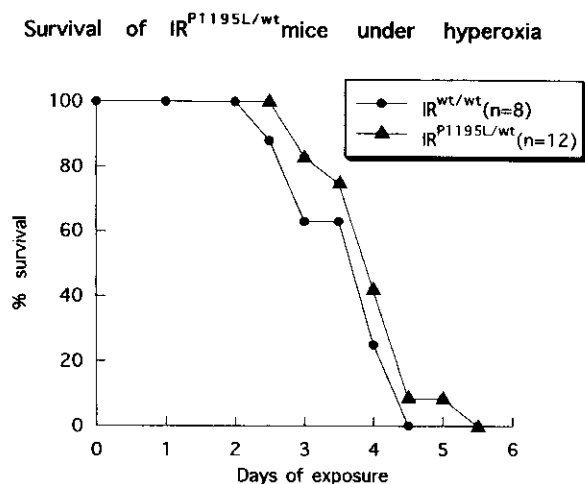


図6 98%酸素吸入下での生存曲線
ヘテロ接合体マウスは野生型マウスに比べ,98%酸素吸入下での生存が延長する傾向が認められた.

野生型マウスでは,98%酸素に反応し,細胞浸潤および高度に硝子膜形成を認め,肺胞構造の高度の破壊を認めるのに対し,ヘテロ接合体マウスは細胞浸潤が軽度で,硝子膜形成も軽度であった.(図7)この結果より,生存が延長した理由は,ヘテロ接合体マウスが酸素毒性に対して耐性を獲得し,ストレスに対する反応が軽度であったためであることが示唆された.そこで更に,耐性獲得のメカニズムを検討するために,肺における MnSOD の発現を調べた(図8).ヘテロ接合体マウスでは酸素負

後,野生型マウスに比べ MnSOD の発現が顕著に増強していた(図8, B, C:野生型マウス;E, F:ヘテロ接合体マウス).この事より,IR P1195L ヘテロ接合体マウスは,インスリン抵抗性の病態を示すと同時に,酸化ストレスに対して MnSOD の誘導が増強しているために,酸化ストレス耐性を獲得していることが明らかになった.そこで,酸素ストレス負荷を与えない状態で,活性酸素の処

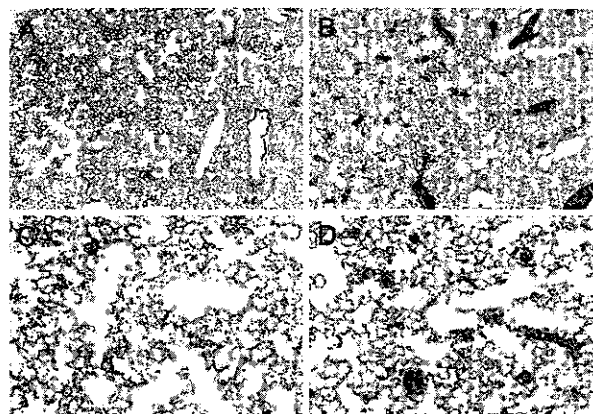


図7 ヘテロ接合体マウスにおける98%酸素吸入による急性肺臓炎

- A:野生型マウスの肺病理像,98%酸素吸入後2.5日で死亡,HE染色,弱拡大,高度の炎症細胞浸潤を認める
- B:ヘテロ接合体マウスの肺病理像,98%酸素吸入後3.5日で死亡,HE染色,弱拡大
- C:A切片の強拡大像,高度の硝子膜形成と肺胞破壊像を認める
- D:ヘテロ接合体マウスの肺病理像,強拡大.野生型マウスに比べ,硝子膜形成は軽度,炎症細胞浸潤の軽度,高度の鬱血像を認める.

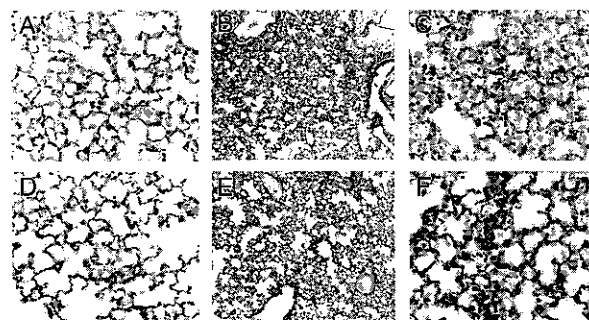


図8 ヘテロ接合体マウスにおける98%酸素吸入による急性肺臓炎における MnSOD 発現増強

- A:野生型マウスの肺における MnSOD の発現局在,HE染色,弱拡大.
- B:野生型マウスの肺における MnSOD の発現局在,酸素負荷前98%酸素吸入後2.5日で死亡,HE染色,弱拡大,肺胞上皮細胞で軽度の MnSOD の発現を認める.
- C:Bの強拡大病理像,肺胞の破壊像と細胞浸潤を認める.軽度の MnSOD の発現を認める
- D:ヘテロ接合体マウスの肺における MnSOD の発現局在,HE染色,弱拡大,
- E:ヘテロ接合体マウスの肺における MnSOD の発現局在,酸素負荷前98%酸素吸入後3.5日で死亡,HE染色,弱拡大,肺胞上皮細胞で MnSOD の発現増強を認める
- F:Eの強拡大病理像, MnSOD の発現増強を認める.

理酵素である SOD の活性を検討した(図 9)。肝臓における MnSOD の活性を検討すると、IR P1195L ノックインヘテロ接合体マウスは野生型マウスより活性が上昇していることが明らかとなった。この事より、IR P1195L ヘテロ接合体マウスは、構成的にも酸化ストレス耐性を獲得しているが、酸化ストレス負荷により、より酸化ストレス耐性が顕著化する事が示された。

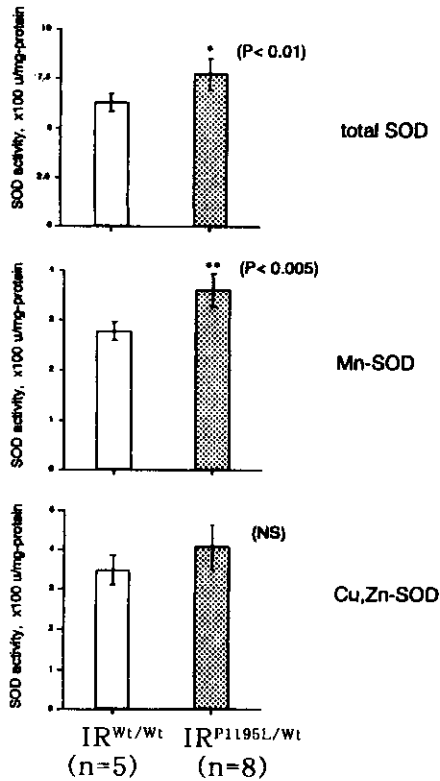


図 9 ヘテロ接合体マウス肝臓における MnSOD 活性
野生型マウス(白カラム)および IRP1195L ヘテロ接合体マウス(黒カラム)肝臓における SOD 活性(上段), MnSOD 活性(中絶), Cu/ZnSOD 活性(下段)を示す。ヘテロ接合体マウスの MnSOD 活性は野生型マウスの 1.3 倍の活性値を示した。

インスリン受容体変異マウスにおける肺線維症疾患感受性

酸化ストレスおよび酸化ストレス防御機構が個体寿命および加齢依存性疾患の発症メカニズムに重要な役割を果たすことが知られている^{6,8)}。これは、加齢現象および加齢依存性疾患の発症基盤が活性酸素による DNA 障害、活性酸素に対する細胞障害の蓄積によるという作業仮説に基づいている。この作業仮説が正しければ、ヘテロ接合体マウスは加齢依存性疾患に対して発症抵抗性を示すはずである。この仮説を証明するために、ヘテロ接合体マウスにプレオマイシンを投与し、加齢依存性疾患の 1 つである肺線維症に対する疾患感受性を検討した。

プレオマイシン 100mg/kg を経静脈投与し、3 週間後に肺組織における繊維化を病理学的に検討した。

ヘテロ接合体マウスの肺では野生型マウスに見られる肺線維化巣はほとんど観察されなかった(図 10 B および D)。この事実より、IR P1195L ヘテロ接合体マウスはインスリン抵抗性病態を有するだけでなく、肺線維症に対して疾患感受性が低下していることが示された。この実験事実は、更に活性酸素をベースに発症してくる加齢依存的疾患(動脈硬化、肺線維症、パーキンソン病、癌)の発症感受性も低下していることを示唆するものである。

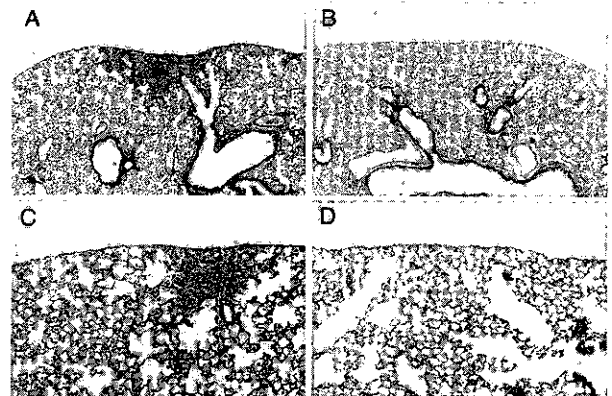


図 10 ヘテロ接合体マウスにおけるプレオマイシン誘発性肺線維症
A:野生型マウスの肺病理像、プレオマイシン 100mg/kg 投与後 3 週間目、弱拡大
B:野生型マウスの肺病理像、プレオマイシン 100mg/kg 投与後 3 週間目、強拡大
C:ヘテロ接合体マウスの肺病理像、100mg/kg 投与後 3 週間目、弱拡大。野生型マウスにみられる胸膜直下の繊維化病理像を認めない。
D:ヘテロ接合体マウスの肺病理像、100mg/kg 投与後 3 週間目、強拡大。野生型マウスに比べ、炎症細胞浸潤が少ない。

考案・結論

肺線維症には原因不明(特発性)に発症してくるタイプと、放射線や薬剤(プレオマイシン)の誘因や、膠原病などの基礎疾患に続発して発症してくるタイプが存在する。特発性肺線維症の発症原因に関しては原因が未だに特定されていない。活性酸素種 ROS、好中球プロテアーゼなどの傷害物質、ウイルス感染の関与、あるいは PDGF、TGF β 、IGF-1 などの線維化促進性サイトカインの関与が示唆されているが、炎症をひき起しているシグナルの本体は明らかにされていない。我々は本症が加齢依存的に発症する傾向を示す点に注目した。即ち、炎症のシグナルがいかなる伝達路であるにせよ、炎症反応の場としてシグナルを伝達している細胞に一定の加齢が必要とされるとの仮説が成立する。この考えをさらに展開すれば、加齢

を制御しているシグナルをコントロールすることにより、肺線維症の発症の感受性を変化させることが可能となり、予防医学的観点からのアプローチが可能になると考える。そこで、我々はこの仮説を証明するためにまずマウスのモデル系、つまり、加齢遅延モデルで肺線維症の発症感受性をプレオマイシン投与により検討してみた。これまでの研究からインスリンシグナルが寿命や酸化ストレス耐性に関与することが、線虫で示唆されていたが、本課題の実験結果よりマウスでも同様にインスリンシグナルが酸化ストレス耐性に関与することが示唆される。つまり、肺胞上皮細胞におけるインスリン受容体シグナル伝達が抑制されることにより、ストレス耐性が獲得されているが、今回の実験から活性酸素種の1つであるスーパーオキシドを無毒化するMnSODの発現が亢進したことが、そのメカニズムとして示唆される。興味深いことに、スーパーオキシドは肺線維症の発症機序としても注目されていることから、モデルマウスにプレオマイシンを投与してみた。野生型マウス肺では炎症細胞浸潤と肺線維化病変を認めたが、モデルマウスでは炎症細胞浸潤が軽度で線維化病変もほとんど認めなかった。この事実はプレオマイシンによる肺線維化の発症機序に活性酸素の関与を強く示唆するものである。更に、SODなどの防御システムを動員することにより肺線維症の発症を抑制できる可能性をも示すものである。肺線維症の多くの症例で胸膜下病変に特に強い病変を認めるが、MnSODの組織発現がやはり胸膜下組織に発現誘導を受けやすい事実を考慮すると、活性酸素種が、胸膜直下から発症してくる機序が推察され大変興味深い。

糖尿病と肺線維症の合併頻度が高いとの報告がある⁹⁾。我々の結果は、糖尿病の発症要因であるインスリン抵抗性が肺線維症の発症感受性を低下させていることを示唆するので、これまでの報告と一見矛盾する。しかし、もう少し我々の解析したモデル系を詳細に観察すると細胞内シグナルに相違点を見出すことが可能である。即ち、糖尿病では細胞内インスリンシグナル伝達異常が存在すると同時に高血糖による微少血管合併症が発生している。しかし、我々のマウスではこれまでの解析では微少血管病変は観察されない。従って、糖尿病による微少血管病変の合併が、肺線維症の発症に影響を及ぼしている可能性が示唆される。いずれにしても糖尿病の病体は複合的であり、肺線維症の発症要因として促進的要因と抑制的要因の両者を内在していても何ら不思議ではない。

肺線維症の発症原因は未だに不明であるが、今回の研究で発症背景、特に酸化ストレス耐性の獲得により、発症を遅らせたり、重症度を軽くしたりする戦略が可能であることが、示された点は注目に値する。一旦発症し、進行中である病態をインスリンシグナル伝達を変えることにより、どの程度治療することができるかに関しては

現時点では未知数であるが、今後検討すべき重要課題であると考えられる。

参考文献

- 1) Kimura, K. D., Tissenbaum H. A., Liu Y., and Ruvkun G. : *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277, 5328, 942-6. 1997
- 2) Kim H, Kadowaki H, Sakura H, Odawara M, Momomura K, Takahashi Y, Miyazaki Y, Ohtani T, Akanuma Y, Yazaki Y, *et al.* : Detection of mutations in the insulin receptor gene in patients with insulin resistance by analysis of single-stranded conformational, *Diabetologia*, 35 (3) : 261-6. 1992
- 3) Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. : Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;90 (18) : 8424-8. 1993
- 4) Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H: Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* ;12 (1) : 106-9. 1996
- 5) Honda, Y. and Honda S. : The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb J*, 13, 11, 1385-1393. 1999
- 6) Finkel, T. and Holbrook N. J. : Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature*, 408, 6809, 239-47. 2000
- 7) Melov, S., Ravenscroft J., Malik S., Gill M. S., Walker D. W., Clayton P. E., Wallace D. C., Malfroy B., Doctrow S. R., and Lithgow G. J. : Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics, *Science*, 289, 5484, 1567-9. 2000
- 8) Sohal, R. S. and Weindruch R. : Oxidative stress, caloric restriction, and aging, *Science*, 273, 5271, 59-63. 1996
- 9) 須賀達夫, 鈴木幸比古, 北村諭: 糖尿病を合併した特発性間質性肺炎症例の検討, *日胸疾会誌*, 32 (12) : 1131-1135

ブレオマイシン誘導線維症に関する基礎的研究

斉藤 好信¹ 菅原 勇^{2*} 吾妻安良太² 工藤 翔二^{2*}

IFN- γ 欠損マウスと野生マウスにブレオマイシン 30mg を吸入暴露させたところ、呼吸細気管支の分布に一致して小さな肉芽腫病変が誘導された。浸潤細胞はリンパ球、マクロファージで形質細胞、好酸球、好塩基球は認められなかった。ブレオマイシン非暴露対照マウスに比較して、ブレオマイシン暴露マウスの肺組織 IFN- γ , IL-1 β , TGF- β , TNF- α mRNA 発現は昂進していた。同じ量のブレオマイシンを吸入させた場合、IFN- γ 欠損マウスの方が肺病変の程度が重かった。

Basic study on Bleomycin-induced lung lesions.

Yoshinobu Saito¹, Isamu Sugawara², Arata Azuma², and Shoji Kudo²

1. Department of Molecular Pathology, The Research Institute of Tuberculosis

2. Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School, Tokyo, Japan.

Bleomycin-induced granulomatous lesions were generated in wild-type and IFN- γ deficient mice by automated inhalation exposure of solution containing 30 mg Bleomycin. It consisted of lymphocytes and macrophages. The granulomatous lesions in IFN- γ deficient mice were more conspicuous than those in wild-type mice. Expression level of TNF- α , IL-1 β , TGF- β and IFN- γ mRNA in Bleomycin-treated IFN- γ deficient mice was significantly higher than that in non-treated mice.

はじめに

1999 年 Ziesche らの報告により IFN- γ が肺線維症の発症に関与していることが示唆された¹⁾。原因不明のヒト肺線維症の病態を解明し、効果的な治療法を発見するのは急務であり、IFN- γ が有効な薬剤であることが証明されるなら、肺線維症患者にとって朗報である。

そこで、この報告の妥当性を確かめるべく、2 種類の BALB/c, C57BL/6 由来 IFN- γ 欠損マウスを用いて、プレオマイシンにより肺線維症が誘導できるかを試み、あわせて性、年齢の合致した野生マウスのプレオマイシン誘導肺線維症と比較検討した。

対象と方法

- 1) IFN- γ 欠損マウスと野生マウスに吸入暴露装置 (Model 099CA-4212, Glas-Col 社, 米国) を用いてプレオマイシン溶液 (10, 30mg) を吸入暴露させた。実験条件は、プレヒート 15 分, 霧状化 90 分, 換気 15 分, 殺菌 0 分とした^{2,3)}。吸入暴露後 7 週でマウスを解剖した。
- 2) 7 週後, マウスを解剖し, 肺, 脾, 肝, 腎の組織標本を作製した。ヘマトキシリン・エオシン染色, アザン染色を施して, 鏡検した。
- 3) 肺組織を一部, グルタル固定, オスミウムで後固定した後, Spurr 混合樹脂で包埋した。包埋標本から超薄切片を得て, 酢酸ウラン・酢酸鉛で重染色した後, 電子顕微鏡で観察した。
- 4) 新鮮肺組織を凍結し, そこから RNA を分離し, TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IFN- γ , エンドセリン-1 mRNA の発現を RT-PCR で調べた。

結 果

- 1) 図 1 に示すように肺に, 小さな肉芽腫様病変が作製できた。構成細胞はリンパ球, マクロファージで, 形質細胞, 好酸球, 好塩基球は認められなかった。膠原線維が細く, 病変に侵入していた。電子顕微鏡による観察でも, 同様の所見が得られた。野生マウスの肉芽腫病変より IFN- γ 欠損マウスの方が病変の程度が重かった。C57BL/6, BALB/c の間で, 病変の程度に有意差はなかった。
- 2) 陰性対照マウスに比べて, プレオマイシン投与マウ

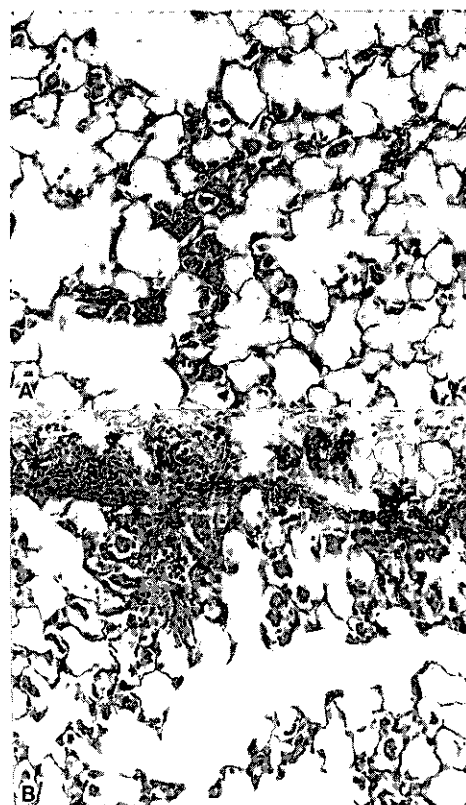


図 1 プレオマイシン誘導肺病変。
A. BALB/c マウスに誘導されたプレオマイシン肺線維病変。H&E 染色。× 200。リンパ球とマクロファージが浸潤している。
B. BALB/c 由来 IFN- γ 欠損マウスに誘導されたプレオマイシン肺線維病変。H&E 染色。× 200。

ス肺組織中の TNF- α , IL-1 β , TGF- β , IFN- γ mRNA 発現の程度が著明であった。さらに, プレオマイシン投与 IFN- γ 欠損マウス肺組織の方が, TNF- α , IL-1 β mRNA 発現の程度が強かった。エンドセリン-1 mRNA は, 陰性対照マウス, プレオマイシン投与マウス, プレオマイシン投与 IFN- γ 欠損マウスで発現に差がなかった (図 2)。

考 察

プレオマイシンをマウスに吸入暴露させた時, 肺に肉芽腫病変を, 再現性よく作製することができた。この病変は, 形質細胞, 好塩基球が存在しない点で, 過敏性肺臓炎と異なる⁴⁾。プレオマイシン抵抗性に関して, C57BL/6 マウスは, 感受性, BALB/c マウスは抵抗性であると報告されているが, 我々の実験では, 病変の程度に有意差は認められなかった⁵⁾。今後, この系統差をさらに, 調べる予定である。

今後, 組み替えマウス IFN- γ を投与して, プレオマイシン誘導肺病変を治療できるか検討したい。

1. (財)結核研究所・分子病理

2. 日本医科大学・第四内科

* びまん性肺疾患研究班 主任研究者

** * 研究協力者

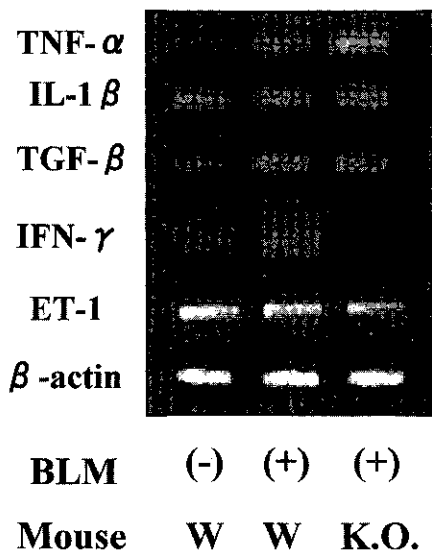


図2 ブレオマイシン誘導肺病変の RT-PCR.
 IFN- γ 欠損マウスで誘導されたブレオマイシン肺病変の方が、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β mRNA 発現がより高い。
 ET, endothelin; BLM, bleomycin; W, wild type mouse; K.O., IFN-gamma knockout mouse.

参考文献

- 1) R. Ziesche, E. Hofbauer, K. Wittmann, V. Petkov, and L-H Block: A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 341: 1264-1269, 1999.
- 2) I. Sugawara, H. Yamada, Y. Kazumi, N. Doi, K. Otomo, T. Aoki, S. Mizuno, T. Udagawa, Y. Tagawa and Y. Iwakura: Induction of granulomas in interferon-gamma gene-disrupted mice by avirulent but not by virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* 47: 871-877, 1998.
- 3) 菅原勇, 山田博之, 大友幸二, 青木俊明, 水野悟, 宇田川忠: 自動吸入暴露感染装置を用いた実験的結核モデル確立のための最適条件とその応用例. *Kekkaku*, 75: 463-469, 2000.
- 4) H. Takizawa, K. Ohta, T. Horiuchi, N. Suzuki, T. Ueda, M. Yamaguchi, N. Yamashita, A. Ishii, M. Suko, H. Okudaira, J. Shiga, T. Miyamoto and K. Ito: Hypersensitivity pneumonitis in athymic nude mice. *Am Rev Respir Dis* 146: 479-484, 1992.
- 5) I. Gur, R. Or, M. J. Segel, M. Shriki, G. Izbicki, and R. Breuer: Lymphokines in bleomycin-induced lung injury in bleomycin-sensitive C57BL/6 and -resistant BALB/c mice. *Exp Lung Res*, 26: 521-534, 2000.

Goodpasture 症候群モデルマウスの作製

中村 晃^{1,3} 湯浅 貴恵^{1,3} 氏家あづさ^{1,3} 小野栄夫^{1,3}
貫和 敏博^{2*} 高井 俊行^{1,3**}

Goodpasture 症候群は、肺と腎臓の両臓器に共通する抗糸球体基底膜抗体によって引き起こされる、肺出血と糸球体腎炎を特徴とする代表的な臓器特異的自身免疫疾患である。現在もお本症候群に対する治療は限られており、肺出血および糸球体腎炎いずれの病変も重篤で予後不良な疾患である。本症候群については疾患モデル動物、とりわけ糸球体腎炎モデルを用いた研究が盛んに行われてきた。これは腎糸球体基底膜成分を、異種の動物に免疫することで得られた抗血清を静注することにより惹起される糸球体腎炎で、馬杉腎炎とも呼ばれている。最近、この馬杉腎炎モデルの系において、免疫グロブリンのFc部分に結合するFc受容体(FcR)のノックアウトマウスを用いた興味深い研究報告がなされた。FcRはその機能上、大きく活性化型FcRと抑制型のFcRと二つに分けることができるが、このうち活性化のサブユニットγ鎖を欠損したFcRγ鎖ノックアウトマウスに、馬杉腎炎を誘導したところ、腎糸球体に免疫グロブリンや補体の沈着を認めるにもかかわらず、腎炎を発症しないことが判明した。一方FcRのうち、IgGに結合する抑制型のFcR、FcγRIIBを欠損したFcγRIIB欠損マウスに、同じ馬杉腎炎を誘導したところ、直後より多量のタンパク尿を認め約1週間でマウスは死亡した。これらの事実は、馬杉腎炎の発症はγ鎖を有した活性化型FcRと抑制型FcRであるFcγRIIBによって正と負に制御されていることを意味し、代表的な腎炎モデルにおけるFcRの重要な作用が明らかになった。一方、90年代に入り、Goodpasture 症候群の原因とされる抗糸球体基底膜抗体が、基底膜の主要な構成成分であるタイプIV型コラーゲンのNC1ドメインと呼ばれる部分に対する自己抗体であることが判明した。しかしながら、自己抗体産生の機序やその自己抗体が組織傷害にどう関与しているのかといった詳しい病態の発症機序は不明のままである。また有効な治療法も限られている。これまで一般的とされてきた先の馬杉腎炎モデルでは、腎炎のみが誘導され、Goodpasture 症候群の予後を左右する肺出血を認めることはなく、実際のヒト病態を反映していないため、必ずしも適切なモデルとはいえなかった。そこで本研究においては、先のFcγRIIBノックアウトマウスに、肺および腎臓の基底膜の主要成分であるタイプIVコラーゲンを免疫し、Goodpasture 症候群の新規疾患モデルマウスの作製を試みるとともに、モデルマウスにおけるFcRの作用機序の検討を試みた。FcγRIIBノックアウトマウスにウシタイプIV型コラーゲンを免疫すると、肺出血と糸球体腎炎を呈するGoodpasture 症候群に相同な病態を呈した。発症したFcγRIIBノックアウトマウスのみ腎糸球体基底膜に沿って免疫グロブリンの沈着を認め、その発症にはタイプIV型コラーゲンに対する自己抗体の関与が考えられた。また脾臓細胞の移入実験より、疾患の発症には、FcγRIIB欠損による自己抗体産生およびエフェクター細胞の機能亢進と、感作されたT細胞、B細胞双方が必要と考えられた。以上本研究で得られたGoodpasture 症候群モデルマウスは、肺出血および糸球体腎炎を発症し、糸球体基底膜に対する自己抗体産生といった実際のヒトの病態に合致する従来になかった適切な疾患モデルであり、本症候群の病態解析や治療薬研究に役立つと考えられた。

Type IV Collagen-induced Experimental Goodpasture's Syndrome in FcγRIIB-deficient mice

Akira Nakamura^{1,3}, Takae Yuasa^{1,3}, Azusa Ujike^{1,3}, Masao Ono^{1,3},
Toshihiro Nukiwa², and Toshiyuki Takai^{1,3}

1. Department of Experimental Immunology

2. Department of Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer

3. Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Corporation (JST)

The combination of hemorrhagic pneumonitis and rapidly progressive glomerulonephritis are characteristic features of Goodpasture's syndrome (GPS), an autoimmune disease resulting from the interaction of pathogenic anti-type IV collagen (anti-C-IV) antibodies with alveolar and glomerular basement membranes. Lack of a suitable animal model for this fatal disease has hampered both a basic understanding of its etiology and the development of therapeutic strategies. We now report a novel, representative model for GPS utilizing mice deficient in a central regulatory receptor for IgG antibody expression and function, the type IIB Fc receptor for IgG (FcγRIIB). Mutant mice immunized with bovine C-IV reproducibly develop massive pulmonary hemorrhage with neutrophil and macrophage infiltration and crescentic glomerulonephritis. The distinctive linear, ribbon-like deposition of IgG immune complex seen in GPS was observed along the glomerular and tubulointerstitial membranes of diseased animals. These results highlight the role of FcγRIIB in maintaining tolerance and suggest that it may play a role in the pathogenesis of human GPS.

はじめに

Goodpasture 症候群は、肺と腎臓の両臓器に共通する抗糸球体基底膜抗体によって引き起こされる、肺胞出血と糸球体腎炎を特徴とする代表的な臓器特異的自己免疫疾患である。本邦においては極めてまれな疾患であるが、欧米においては、10万人中0.3件の割合で発症が認められている¹⁾。比較的まれな疾患であるが、本症候群に対する治療法は限られており、肺胞出血および糸球体腎炎いずれの病変も重篤で予後不良な疾患である^{2,4)}。他の自己免疫疾患と同様、その病態についてはまだ不明な点が多く残されているが、古くから Goodpasture 症候群の疾患モデル動物として糸球体腎炎モデルを用いた研究が盛んに行われてきた。これは腎糸球体基底膜成分を、異種の動物に免疫することで得られた抗血清を静注することにより惹起される糸球体腎炎で、馬杉腎炎とも呼ばれている⁵⁾。通常、抗血清すなわち抗糸球体基底膜抗体を投与されたマウスは、タンパク尿や腎糸球体内に炎症細胞の浸潤や細胞性半月体の形成を認め、約2週間で死亡する。最近、この馬杉腎炎モデルの系において、免疫グロブリンのFc部分に結合するFc受容体(FcR)のノックアウトマウスを用いた興味深い研究報告がなされた⁶⁻⁸⁾。FcRは殆ど全ての免疫担当細胞上に発現し、抗体と細胞を繋ぐ重要な分子群である。FcRはその機能上、大きく活性化型FcRと抑制型のFcRと二つに分けることができるが、このうち活性化のサブユニット γ 鎖を欠損し、IgGやIgEからの活性化シグナルを細胞に伝達できなくなるFc γ R鎖ノックアウトマウスに、馬杉腎炎を誘導したところ、腎糸球体に免疫グロブリンや補体の沈着を認めるにもかかわらず、腎炎を発症しないことが判明した。一方FcRのうち、IgGに結合する抑制型のFcR、Fc γ RIIBを欠損したFc γ RIIB欠損マウスに、同じ馬杉腎炎を誘導したところ、直後より多量のタンパク尿を認め約1週間でマウスは死亡した。これらの事実は、馬杉腎炎の発症は γ 鎖を有した活性化型FcRと抑制型FcRであるFc γ RIIBによって正と負に制御されていることを意味し、代表的な腎炎モデルにおけるFcRの重要な作用が明らかになった。またこの腎炎モデルのみならず、関節炎モデルなど様々な自己免疫疾患モデルにおいてFcRの果たす重要な役割が、FcRノックアウトマウスを用いた解析から明らかになってきている^{9,10)}。一方、近年、Goodpasture 症候群の原因とされる抗糸球体基底膜抗体が、基底膜の主要な構成成分

分であるタイプIV型コラーゲンのNC1ドメインと呼ばれる部分に対する自己抗体であることが判明した¹¹⁻¹³⁾。しかしながら、なぜ自己であるタイプIV型コラーゲンに対する免疫寛容が破綻し、自己抗体が産生されるのか、そして自己抗体が組織傷害にどう関与しているのかといった詳しい病態の発症機序は依然不明のままである。また有効な治療法も限られている。そこで現在もなお、病態発症機構の研究のみならず、各種治療研究上、本症候群の適切な疾患モデル動物の存在は重要と考えられる。これまで一般的とされてきた先の馬杉腎炎モデルでは、腎炎のみが誘導され、Goodpasture 症候群の予後を左右する肺胞出血を認めることはなく、疾患研究に重要な動物モデルとしては、実際のヒト病態を反映していないため、必ずしも適切なモデルとはいえなかった。そこで本研究においては、先のFc γ R鎖およびFc γ RIIBノックアウトマウスに、肺および腎臓の基底膜の主要成分であるタイプIVコラーゲンを免疫し、Goodpasture 症候群の新規疾患モデルマウスの作製を試みるとともに、モデルマウスにおけるFcRの作用機序の検討を試みた。

対象と方法

使用動物

Fc γ RIIBノックアウトマウス¹⁴⁾およびFc γ R鎖ノックアウトマウス¹⁵⁾は東北大学加齢医学研究所遺伝子導入研究分野高井俊行教授らが作製したものを使用した。Fc γ RIIBノックアウトマウスは129/Svj(H-2b)とC57BL/6(B6, H-2b)のハイブリッドバックグラウンド(129/B6)である。Fc γ R鎖ノックアウトマウスはC57BL/6に8世代以上戻し交配したマウスである。それぞれのコントロールマウスとしてFc γ RIIBノックアウトマウスは129/B6バックグラウンドの野生型マウスを、Fc γ R鎖ノックアウトマウスはC57BL/6を使用した。実験には8週齢の雄および雌性マウスを用いた。また戻し交配およびコントロールに用いたC57BL/6マウスは日本チャールズ・リバー(横浜)より購入した。全てのマウスは東北大学加齢医学研究所附属動物実験施設腫瘍分室にて飼育管理された。

タイプIV型コラーゲンの免疫方法

免疫に用いたタイプIV型コラーゲンは新田ゼラチン社(東京)のウシタイプIV型コラーゲン(Cellmatrix IV)を使用した。このタイプIV型コラーゲンは1mM HCl, pH3.0に溶解しているため使用の際は1mM NaOHで中和した。タイプIV型コラーゲンは個体あたり1回につき150 μ gをフロイントアジュバントと混合し、マウス尾根部に免疫した。初回免疫は結核死菌 *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rvを含むコンプリートフロイントアジュバント(和光純薬, 大阪)で、追加免疫はインコンプリートフロイントアジュバント(和光純薬, 大阪)で第

1. 東北大学加齢医学研究所遺伝子導入研究分野
2. 同呼吸器腫瘍研究分野
3. 科学技術振興事業団 CREST

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者
 ** “ 研究協力者

14, 28, 42日目に行った。マウスは第56日目に屠殺し、病理学的検討を行った。

マウス血清抗タイプIV型コラーゲン抗体価の測定

マウス血清は実験開始後2週間毎に眼窩より採取した。血清中の抗コラーゲン抗体価はELISA法にて測定した。免疫に用いたウシタイプIV型コラーゲンに対する抗体価測定は、まずPBS(-)で20ug/mlの濃度に希釈したウシタイプIV型コラーゲンを96well plate (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ)に1wellあたり50ul添加し、4度冷蔵庫中に一晚静置し、固定した。次に0.05% tween 20, 1%Bovine Serum Albumin (BSA)を含んだPBS洗浄液でplateを3回洗浄し、0.5%BSA/PBSを1wellあたり250ul添加し、4度冷蔵庫中に一晚静置し、ブロッキングを行った。マウスタイプIV型コラーゲン抗体価の測定には、すでにマウスタイプIV型コラーゲンが5ug/ml濃度で固定されている、BIACOAT-cellware mouse type IV collagen 96well plate (Becton Dickinson Labware)を用いた。双方のplateに、0.1%BSA/PBSにて2500倍から5000倍に希釈したマウス血清を、1wellあたり50ul添加し、4度冷蔵庫中に一晚静置した。再び洗浄液で3回plateを洗浄した後に、0.1%BSA/PBSにて500倍希釈したペルオキシダーゼ horseradish peroxidase (HSP) 標識ヤギ抗マウス抗体 (IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM, IgA)を1wellあたり50ulずつ添加し、4度冷蔵庫中に一晚静置した。その後洗浄液で3回洗浄した後に、発色基質 TrueBlue Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Lab., Gaithersburg, MD)を1wellあたり50ulずつ添加し、約5~15分室温に静置し、発色を確認した後、反応停止液0.1%HClを1wellあたり50ulずつ添加した。最後にplateを吸光度計 Biolumin960 Microplate Reader (Molecular Dynamics Japan Inc, 東京)で波長450nmにおける吸光度を測定した。

腎機能の測定

マウス屠殺時(実験開始後第56日目)の血清を用い、BUN (Blood urea nitrogen)および血清クレアチニンCr値を、加齢医学研究所附属病院検査室のTOSHIBA TBA 80FRにて測定した。また尿タンパクはTetrabromophenol blue反応を利用しMicro AUTION MA-4260(京都第一科学, 京都)にて測定した。

病理標本の作製および免疫染色標本の作製法

実験開始後第56日目にマウスをジエチルエーテルもしくは頸椎脱臼にて屠殺し、肺は気管より10%中性ホルマリンを注入し伸展後に摘出し、同液中に室温で72時間固定した。また腎臓は摘出後10%中性ホルマリン中に室温で72時間固定した。眼球、心臓、肝臓も同様に固定した。固定後臓器を切りだし、パラフィン浸透後、包埋し、5umで薄切した。薄切標本はキシレンを用いた脱パラフィン、エタノールを用いた脱脂操作後に、ヘマトキシリン・エオジン染色した。腎臓についてはperiodic acid-Shiff (PAS)

染色も追加した。またPAS染色標本で無作為に選択した糸球体50個中に占める半月体形成糸球体の数を測定した。肺および腎切片については蛍光標識抗体を用いた免疫染色を行った。上記のパラフィン切片を脱パラフィン、エタノールを用いた脱脂操作後に、蒸留水で洗浄した後、抗原賦活剤STUF Serotec Target Unmasking Fluid (Serotec Co.)で90度10分間処理したのち、PBSで洗浄、5%BSA/PBSで30分間ブロッキングした。その後FITC標識ヤギF(ab')₂ fragments (H+L)抗マウスIgG, IgMおよびC3抗体(Zymed Ltd)を0.1%BSA/PBSで50倍希釈し添加後、室温で30分間反応させた。PBSで洗浄後マウントし蛍光顕微鏡(Olympus BX50, Olympus BH2-RFL-T3)にて観察した。

細胞分離および細胞移入実験法

実験開始後第56日目のFcγRIIBノックアウトマウスとその野生型マウスの脾臓を摘出し、メッシュを用い脾臓細胞を採取した。脾臓細胞は0.144M HCl溶液で赤血球を溶血させた後PBSに溶き、免疫を行っていないFcγRIIBノックアウトマウスあるいは野生型マウスに個体あたり 2×10^7 個静注し移入した。7日目にウシタイプIVコラーゲン150ugをIFAとともに免疫し、静注後第21日目にマウスを屠殺して肺及び腎臓を摘出し病理学的検討を行った。また、同様にして採取した脾臓細胞を、磁気ビーズを用いてB220陽性細胞とB220陰性細胞に分離した。脾臓細胞を抗マウスB220抗体磁気ビーズ(B220 MACS microbeads, Milenyi Biotech.)にて標識し、分離用マグネットValio MACS (Milenyi Biotech.)を用いて分離した。B220陽性細胞あるいはB220陰性細胞を、免疫を行っていないFcγRIIBノックアウトマウスあるいは野生型マウスに個体あたり 1×10^7 個移入し、7日目にウシタイプIVコラーゲンを免疫し、移入後第21日目にマウスを屠殺して病理学的検討を行った。

結 果

病理組織学的所見

FcγRIIBノックアウトマウス、野生型マウス、FcRγ鎖ノックアウトマウスおよびC57BL/6マウスいずれもウシタイプIV型コラーゲンを計4回免疫後、屠殺し、各臓器を摘出した。FcγRIIBノックアウトマウスは、摘出肺において肉眼像でも確認できる著しい肺出血を呈していた(Fig.1A)。H.E.染色による病理組織像でも、好中球やマクロファージの浸潤を伴う広範な肺出血を確認できた(Fig.1B-D)。これに対し野生型マウスでは、肉眼像および病理組織像でも肺出血は認められなかった(Fig.1E-G)。また腎病変については、FcγRIIBノックアウトマウスにおいて、腎皮質に好中球やマクロファージ、多核巨大細胞の浸潤を認めるとともに、メサングウム細胞の増

殖による半月体形成糸球体腎炎を呈していた (Fig.2A, B). 一方, 野生型マウスは腎病変を認めなかった (Fig.2C, D). 以上の病理学的所見および腎機能について Table 1 にまとめた. Fc γ RIIB ノックアウトマウスはほぼ全例において, 肺および腎病変を呈し, BUN および Cr といった腎機能検査値も上昇していた. さらに約 20% のマウスが実験経過中に肺胞出血により死亡していた. これに対してコントロールである野生型マウスでは, 病理学的に異常所見を認めず, 同様に FcR γ 鎖ノックアウトマウスおよび C57BL/6 マウスにおいても, 肺および腎臓のいずれの病変も認めなかった.

腎組織の免疫組織染色

Fc γ RIIB ノックアウトマウスの腎組織標本において, Goodpasture 症候群の特徴である, 腎糸球体系蹄に沿った免疫グロブリン IgG の沈着を認めた (Fig.3A). 一方野生型マウスでは, IgG の沈着は認められなかった (Fig.3B). 同様に FcR γ 鎖ノックアウトマウスおよび C57BL/6 マウスにおいても, IgG の沈着は認められなかった.

抗タイプ IV 型コラーゲン抗体価の測定

実験経過中に血清を採取し, 抗タイプ IV 型コラーゲン抗体価を測定した. 免疫に用いたウシタイプ IV 型コラーゲンに対する抗体価は, Fc γ RIIB ノックアウトマウスにおいて, 実験開始以降, 他のマウスに比較して有意に上昇していた (Fig.4A-D). 但し, IgG1 および IgG2a といった抗体価については, 野生型マウスでも実験終了時には Fc γ RIIB ノックアウトマウスとほぼ同程度の抗体価の上昇を認めた. FcR γ 鎖ノックアウトマウスでは IgG1 分画以外で抗体価の上昇は認められなかった. また IgA 抗体価は, いずれのマウスでも上昇しなかった.

次にマウスのタイプ IV 型コラーゲンに対する抗体価を測定した. 抗マウスタイプ IV 型コラーゲン抗体価は, Fc γ RIIB ノックアウトマウスにおいてのみ上昇しており (Fig.4F-I), 実験開始後 42 日目以降より IgG1, IgG2a および IgG2b 抗体の上昇を認めた.

脾臓細胞移入実験

実験開始後第 56 日目 (実験終了時) の Fc γ RIIB ノック

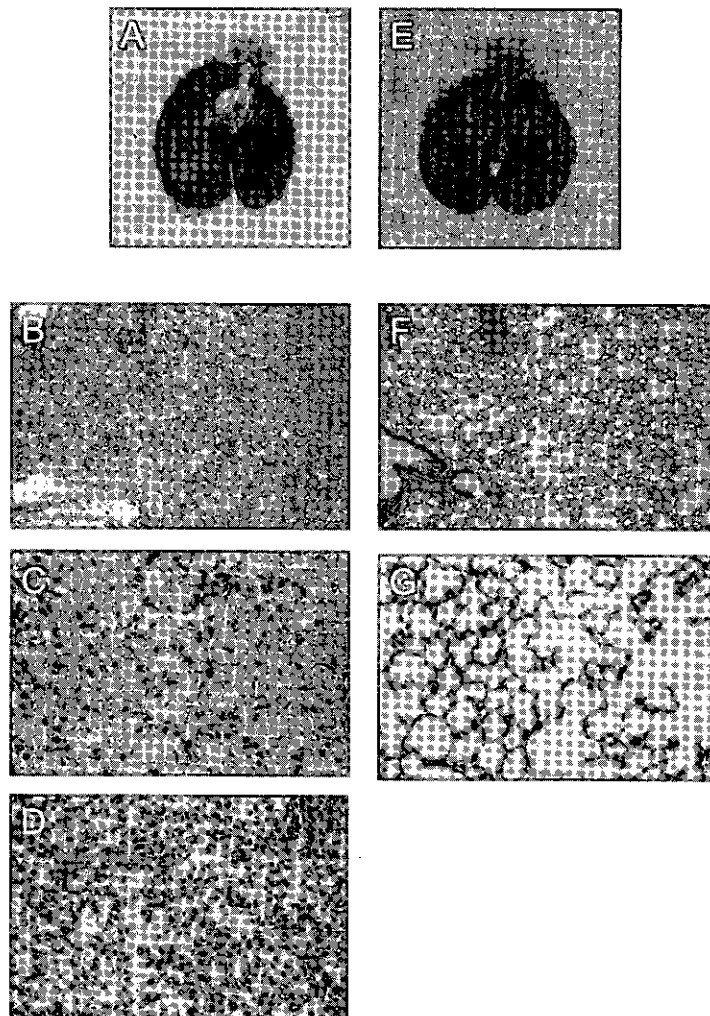


図1 Fc γ RIIB ノックアウトマウスおよび野生型マウスの肺病理組織標本

A-D は Fc γ RIIB ノックアウトマウス, E-G は野生型マウスで, A および E は肉眼像, B-D, F および G は H.E. 染色像 (B および F \times 25, C, D および G \times 100) である. Fc γ RIIB ノックアウトマウスで著しい肺胞出血を認めた.

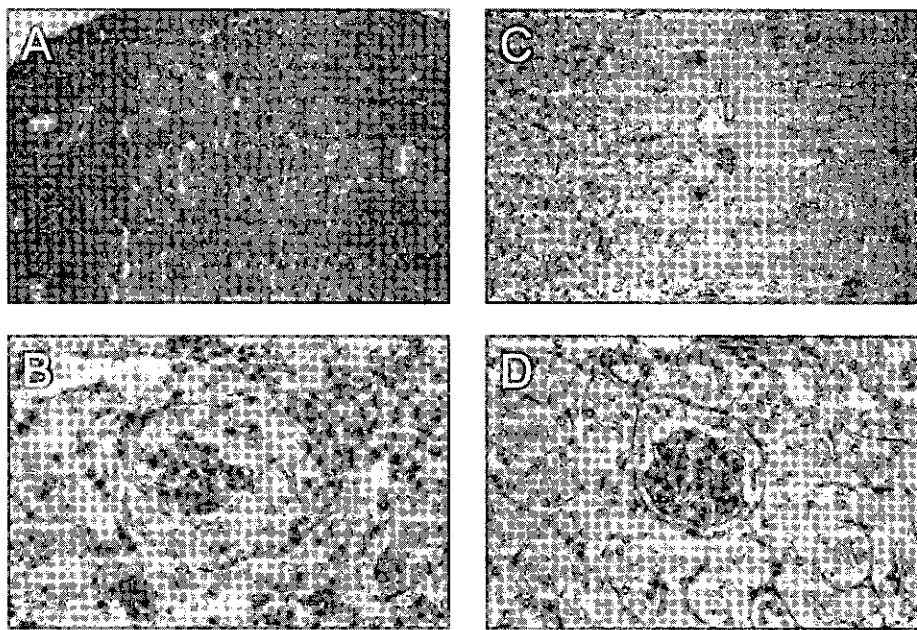


図2 Fc γ RIIB ノックアウトマウスおよび野生型マウスの腎病理組織標本
 A および B は Fc γ RIIB ノックアウトマウス, C および D は野生型マウスで, いずれも PAS 染色像 (A および C \times 25, B および D \times 100) である. Fc γ RIIB ノックアウトマウスで半月体形成糸球体腎炎を認めた.

Table1 Summary of The Mice Immunized by Type IV Collagen

Mice	Infiltration of Inflammatory Cells in Lung	Lung Hemorrhage	Tubulointerstitial Nephritis	Glomerulonephritis	cGN	Mortality Rate	BUN (mg/dl) mean \pm SD	Cr (mg/dl) mean \pm SD
Fc γ RIIB ^{-/-} (n=24)	22/22 (100%)	19/22 (86%)	22/22 (100%)	22/22 (100%)	0%	5/22(23%)	45.7 \pm 16.0*	0.15 \pm 0.06*
Wild Type (n=16)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0%	0/16 (0%)	23.3 \pm 8.6*	0.06 \pm 0.02*
FcR γ ^{-/-} (n=14)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0%	0/16 (0%)	23.4 \pm 8.6	0.07 \pm 0.03
C57BL/6 (n=7)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0%	0/16 (0%)	29.2 \pm 5.7	0.03 \pm 0.03

* Statistical analyses were performed using Student's t-test. P<0.01 between Fc γ RIIB^{-/-} and Wild Type mice.

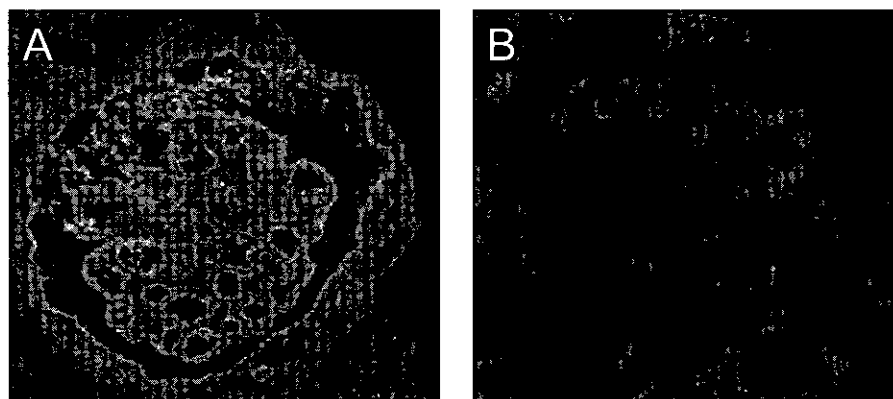


図3 Fc γ RIIB ノックアウトマウスおよび野生型マウスの蛍光免疫染色標本
 A は Fc γ RIIB ノックアウトマウス, B は野生型マウスの抗マウス IgG 抗体 (FITC 標識) による免疫染色標本である. Fc γ RIIB ノックアウトマウスにおいて糸球体および尿細管基底膜にそって IgG の沈着を認めた.

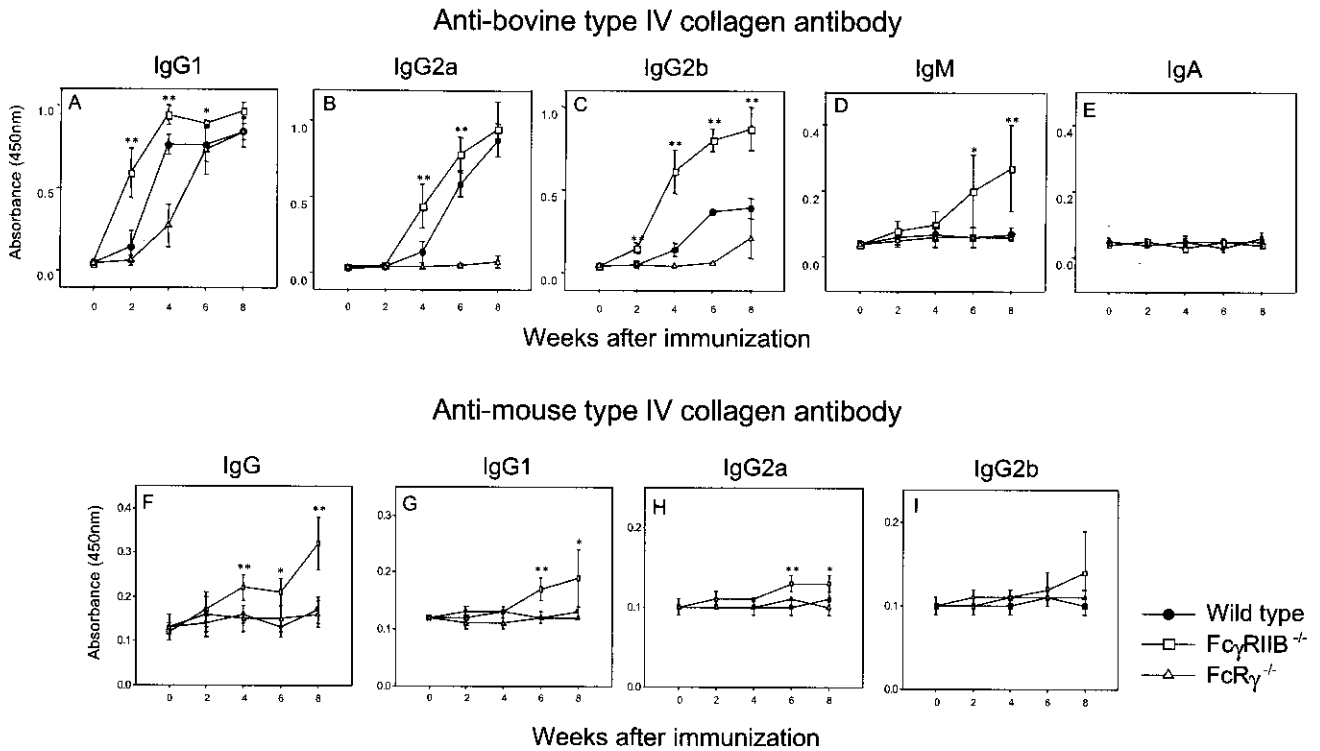


図4 抗ウシおよび抗マウスタイプIV型コラーゲン抗体価の測定

A-Eは抗ウシタイプIV型コラーゲン抗体価で、AはIgG1、BはIgG2a、CはIgG2b、DはIgM、EはIgA分画の抗体価である。F-Iは抗マウスタイプIV型コラーゲン抗体価で、FはIgG、GはIgG1、HはIgG2a、IはIgG2b分画の抗体価である。Fc γ RIIBノックアウトマウスは(□)、野生型マウスは(●)、FcR γ ノックアウトマウスは(△)で示している。Fc γ RIIBノックアウトマウスおよび野生型マウスの間でt-testによる統計学的解析を行い、*P<0.05および**P<0.01で有意差ありと判定した。Fc γ RIIBノックアウトマウスは、野生型マウスと比較して有意に抗ウシおよび抗マウスタイプIV型コラーゲン抗体価が上昇していた。

アウトマウスおよび野生型マウスの脾臓細胞を、免疫していないFc γ RIIBノックアウトマウスおよび野生型マウスに移入し、肺胞出血および糸球体腎炎といった病態の誘導を試みた。その結果、免疫したFc γ RIIBノックアウトマウスの脾臓細胞を、Fc γ RIIBノックアウトマウスに移入した場合にのみ、約半数のマウス(9匹中5匹)に肺胞出血および糸球体腎炎が発症した。そこで免疫したFc γ RIIBノックアウトマウスの脾臓細胞より、B細胞(B220陽性細胞)およびT細胞を中心としたB細胞以外の脾臓細胞成分(B220陰性細胞)に分離して、再びFc γ RIIBノックアウトマウスに移入したが、いずれの病変も誘導されなかった。

考 察

発症が単一の遺伝子ではなく、複雑な病態を呈する自己免疫疾患の研究上、疾患モデル動物を用いた研究は非常に重要である。Goodpasture症候群の特徴である肺胞出血と糸球体腎炎を満足する疾患モデル動物は、これまで存在していなかった。先に述べたように、代表的な疾患モデルとされる馬杉腎炎モデルでは、糸球体腎炎は発症するが、肺胞出血は誘導されない。また近年、抗原の一

つとして同定された、タイプIV型コラーゲンの α 3鎖NC1ドメインのリコンビナント蛋白を、マウスやラットに免疫しても、糸球体腎炎はよく誘導できるが、肺胞出血は極めて弱く、Goodpasture症候群の疾患モデル動物としては不十分なものであった^{16,17)}。一方、馬杉腎炎モデルを用いた実験系で、FcRが重要な役割を果たしていることが判明した⁶⁻⁸⁾。FcRは殆ど全ての免疫担当細胞上に発現し、抗体と細胞を網ぐ重要な分子群である。FcRはその機能上、活性化型と抑制型の二つに大きく分けることができるが、抑制型のFcRはFc γ RIIBの一つだけである。このFc γ RIIBは、IgGと結合する低親和性のFcRであり、B細胞や、マクロファージ、好中球、マスト細胞などに発現しており、Fc γ RIIBを欠損すると、各細胞の抗体を介したエフェクター機能が亢進することが知られている¹⁴⁾。またB細胞上にはFcRは、Fc γ RIIBしか発現しておらず、そのため各種免疫反応が亢進していることが知られている¹⁴⁾。そこで本研究は、Goodpasture症候群の新規モデルマウスの作製を、抑制性のFcRである、Fc γ RIIBを欠損したFc γ RIIBノックアウトマウスを用いて試みた。免疫には糸球体基底膜を構成する主要な蛋白であるタイプIV型コラーゲンを使用した。Fc γ RIIBノックアウトマウスにウシタイプIV型コラーゲンを免疫する

と、ほぼ全例において肺胞出血と糸球体腎炎を認めた (Fig. 1, 2 and Table 1). とりわけびまん性に認められる肺胞出血は著しく、ヒトの Goodpasture 症候群に相当する病変と考えられた。一方、本研究で免疫に用いたタイプ IV 型コラーゲンは、毛細血管の基底膜を構成する主成分である。臓器別には、眼球、肺および腎臓に多く分布している。そのため免疫した Fc γ R1IB ノックアウトマウスでは、肺や腎臓のみならず各臓器に異常所見が認められる可能性も考えられたが、実際の病変は肺および腎臓のみに認められ、眼球や心臓、肝臓といった他臓器に異常所見は認められなかった。ヒトの Goodpasture 症候群でも、Wegener 症候群との合併例を除き、病変は肺および腎臓に限定されている。これは肺胞は主として毛細血管および肺胞上皮で、腎糸球体は毛細血管で構成されているため、基底膜に対する自己抗体が病原性を発揮するためと考えられているが、その詳細は不明である。この血清中の抗糸球体基底膜抗体は、Goodpasture 症候群の病変と並ぶ特徴として良く知られているが、病理組織学的には腎糸球体基底膜に沿った免疫グロブリンの沈着として認められる。この沈着する抗糸球体基底膜抗体が、FcR を介して腎局所に浸潤してくる白血球やマクロファージといったエフェクター細胞の機能の活性化を惹起し、糸球体腎炎を引き起こすと考えられている⁷⁾。実際、発症した Fc γ R1IB ノックアウトマウスの腎皮質には、多数の多核白血球やマクロファージの浸潤を認め (Fig.2A), また糸球体基底膜に沿って IgG の沈着が認められた (Fig.3A)。この糸球体に沈着する免疫グロブリンは、ヒトの Goodpasture 症候群では、IgG のみならず、同時に IgM や補体 (C3) の沈着も伴う場合が多く¹⁸⁾、最近の報告では IgA の沈着も認められているが¹⁹⁾、本研究で誘導した Fc γ R1IB ノックアウトマウスでは IgG の沈着のみであった。一方、野生型マウスや FcR γ 鎖ノックアウトマウスでは、糸球体基底膜への IgG の沈着は認められなかった (Fig.3B)。次にタイプ IV 型コラーゲンに対する抗体の病変への影響を検討する目的で、実験経過中の血清抗体価を測定した (Fig.4)。はじめに、免疫に用いたウシのタイプ IV 型コラーゲンに対する抗体価を測定した (Fig. 4A-E)。Fc γ R1IB ノックアウトマウスにおいて、実験開始以降、他のマウスと比較して有意に上昇していた。しかしながら、IgG1 および IgG2a といった抗体価については、野生型マウスでも実験終了時には Fc γ R1IB ノックアウトマウスとはほぼ同程度の抗体価の上昇を、FcR γ 鎖ノックアウトマウスでも IgG1 分画で抗体価の上昇を認めた。そこでマウスのタイプ IV 型コラーゲンに対する抗体価、すなわちタイプ IV 型コラーゲンに対する自己抗体価を測定した (Fig.4F-I)。その結果、Fc γ R1IB ノックアウトマウスにおいてのみ自己抗体価は上昇しており、他のマウスでは上昇していなかった。これは抑制性の FcR である Fc γ R1IB

を欠損することにより、免疫したウシのタイプ IV 型コラーゲンに対する抗体産生の亢進のみならず、自己抗体までも誘導されたことを意味する。そしてこの自己抗体が関与し、Fc γ R1IB ノックアウトマウスは、Goodpasture 症候群様病変を発症したと考えられた。一方、Fc γ R1IB を欠損すると抗体産生の亢進に加えて、抗体を介したマクロファージなどのエフェクター細胞の機能も亢進することが知られている^{19,20)}。抗原である α 3 鎖 NC1 ドメインのリコンビナント蛋白を免疫しても、肺胞出血は極めて弱しか誘導できないのに対し、Fc γ R1IB ノックアウトマウスでは著しい肺胞出血が誘導されたのは、肺胞マクロファージや好中球などのエフェクター機能も亢進していたためと考えられる。実際、発症した Fc γ R1IB ノックアウトマウスの脾臓細胞を、野生型マウスに移入しても疾患は誘導されず、Fc γ R1IB ノックアウトマウスに移入した場合にのみ、約半数のマウスに病変が再現された。また、脾臓細胞のうち B 細胞成分あるいは B 細胞以外の脾臓細胞成分を、Fc γ R1IB ノックアウトマウスに移入しただけでは病変を再現できないため、発症には感作された T 細胞および B 細胞双方が必要と考えられた。以上本研究において、Fc γ R1IB ノックアウトマウスにタイプ IV 型コラーゲンを免役することにより誘導された Goodpasture 症候群様病態は、実際のヒトの Goodpasture 症候群の病態に相同する、従来までなかった適切な疾患モデル動物であり、本症候群の病態解析や治療薬開発に有用と考えられた。また、その発症には Fc γ R1IB による抑制作用が重要な役割を果たしていることが判明した。最近、C57BL/6 バックグラウンドに戻し交配された Fc γ R1IB ノックアウト C57BL/6 マウスでは、糸球体腎炎を自然発症することが報告され²¹⁾、本研究で誘導した Goodpasture 症候群を含め各種自己免疫疾患の発症に Fc γ R1IB が抑制的な役割を担っている可能性があると考えられた。

参考文献

- 1) Kelly PT, Haponik EF: Goodpasture's syndrome: molecular and Clinical advances. *Medicine (Baltimore)* 73: 171-185, 1994
- 2) Goodpasture, E.W.: The significance of certain pulmonary lesions in relation at the etiology of influenza. *Am. J. Med. Sci.* 158: 863-870. 1919
- 3) Stantom, M.C., and J.D.Tange.: Goodpasture's syndrome (pulmonary haemorrhage associated with glomerulonephritis). *Aust. Ann. Med.* 7: 132-144. 1958
- 4) Kalluri, R.: Goodpasture syndrome. *Kidney Int.* 55: 1120-1122. 1999
- 5) Masugi, M.: Über das Wesen der spezifischen Veränderungen der Niere und der Leber durch das

- Nephrotoxin bzw. das Hepatotoxin. Zugleich ein Beitrag zur Pathogenese der Glomerulonephritis und der eklamptischen Leber Erkrankung. *Beitr. path. Anat.* 91: 82-112. 1933
- 6) Park, S.Y., Ueda, S., Ohno, H., Hamano, Y., Tanaka, M., Shiratori, T., Yamazaki, T., Arase, H., Arase, N., Karasawa, A., Sato, S., Ledermann, B., Kondo, A., Okumura, K., Ra, C. and Saito, T.: Resistance of Fc receptor-deficient mice to fatal glomerulonephritis. *J. Clin. invest.* 102: 1229-1238. 1998
- 7) Suzuki, Y., Shirato, I., Okumura, K., Ravetch, J. V., Takai, T., Tomino, Y. and Ra, C., Distinct contribution of Fc receptors and angiotensin II-dependent pathways in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1998. 54: 1166 - 1174.
- 8) Wakayama, H., Hasagawa, Y., Kawabe, T., Hara, T., Matsuo, S., Mizuo, M., Takai, T., Kikutani, H. and Shimokawa, K. :Abolition of anti-glomerular basement membrane antibody-mediated glomerulonephritis in Fc γ -deficient mice. *Eur. J. immunol.* 30: 1182-1190. 2000
- 9) Clynes, R., C. Dumitru, and J. V. Ravetch: Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* 279: 1052-1054, 1998.
- 10) Yuasa, T., S. Kubo, T. Yoshino, A. Ujike, K. Matsumura, M. Ono, J. V. Ravetch, and T. Takai. : Deletion of Fc γ receptor IIB renders H-2^b mice susceptible to collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* 189: 187-194. 1999.
- 11) Saus, J., Wieslander, J., Langeveld, J. P. M., Quinones, S. and B. G. Hudson. Identification of the Goodpasture antigen as the $\alpha 3$ (IV) chain of collagen IV. *J. Biol. Chem.* 263: 13374-13380. 1988.
- 12) Gunwar, S. : Alveolar basement membrane: Molecular properties of the noncollagenous domain (hexamer) of collagen IV and its reactivity with Goodpasture autoantibodies. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5: 107-112. 1991.
- 13) Tuner, N., Mason, P. J., Brown, Fox, M., Povey, S., Rees, A and C. D. Pusey: Molecular cloning of the human goodpasture antigen demonstrates it to be $\alpha 3$ chain of type IV collagen. *J. Clin. Invest.* 89. 592-601. 1992.
- 14) Takai, T., M. Ono, M. Hikida, H. Ohmori, and J. V. Ravetch. :Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc γ RII-deficient mice. *Nature.* 379: 346-349. 1996.
- 15) Takai, T., M. Li, D. Sylvestre, R. Clynes, and J. V. Ravetch. :FcR γ chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell.* 76: 519-529. 1994.
- 16) Kalluri, R., T. M. Danoff, H. Okada, and E. G. Neilson. : Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease and Goodpasture syndrome is linked to MHC class II genes and the emergence of T-cell-mediated immunity in mice. *J. Clin. Invest.* 100: 2263-2275. 1997
- 17) Abate, M., R. Kalluri, D. Corona, N. Yamaguchi, R. T. McCluskey, B. G. Hudson, G. Andres, C. Zoja, and G. Remuzzi. : Experimental Goodpasture's syndrome in Wistar-Kyoto rats immunized with $\alpha 3$ (IV) chain of the type IV collagen. *Kidney Int.* 54: 1550-1561. 1998
- 18) Fraser, R. S., N. L. Muller, N. Colman and P. D. Pare. : Goodpasture's syndrome and idiopathic pulmonary hemorrhage. In *Diagnosis of Disease of the Chest*, 4th Ed. Vol. 3. Fraser, R. S., N. L. Muller, N. Colman and P. D. Pare, editors. W. B. Saunders Co., Philadelphia. 1757-1769. 1999
- 19) Fervenza, F. C., D. Terreros, A. Boutaud, B. G. Hudson, R. A. Williams Jr, J. V. Donadio Jr, and T. R. Schwab. : Recurrent Goodpasture's disease due to a monoclonal IgA-kappa circulating antibody. *Am. J. Kidney Dis.* 34: 549-555. 1999
- 20) Clynes, R., J. S. Maizes., R. Guinard, M. Ono., T. Takai and J. V. Ravetch. : Modulation of immune complexes-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J. Exp. Med.* 189: 179-186, 1999
- 21) Bolland, S. and J.V.Ravetch. :Spontaneous Autoimmune Disease in Fc γ RIIB-Deficient Mice Results from Strain-Specific Epistasis. *Immunity* 13: 277-285. 2000

6. 治療に関する研究

難病重点研究（再録）および治療関連 研究報告

Pirfenidone (S-7701) 無作為化臨床比較第 II 相試験の経過報告

工藤 翔二* 吾妻安良太**

共同研究者 (表 3)

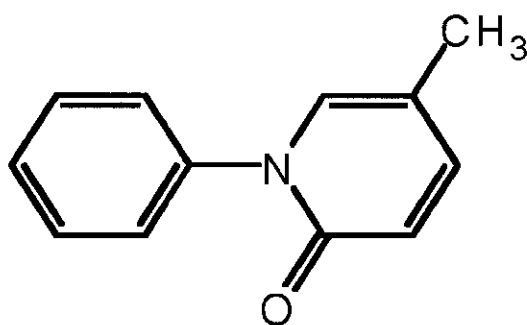
Pirfenidone (開発番号 S-7701) は米国マルナック社で開発された、分子量 185. 23 の化合物である (図 1)¹⁾。前臨床試験においては TNF- α をはじめとする複数の炎症性サイトカイン産生抑制作用を有し、さらに線維芽細胞のコラーゲン産生を抑制するとの報告がある (図 2)²⁾。米国において抗線維化剤として特発性肺線維症を対象とした臨床試験が日本に先行して進められた。54 例の特発性肺線維症患者を対象としたパイロット試験が実施され、肺機能の改善を指標として期待される成績が示された³⁾。日本においては塩野義製薬が第 I 相単回投与試験での安全性確認を終了し、医薬品機構との相談の結果、特発性間質性肺炎(慢性型)を対象に希少疾病用医薬品開発として班研究と連動しての第 II 相試験を計画することが承認された。研究班の主要メンバーに米国パイロット試験の責任者である Raghunath 教授 (ワシントン大学) を交えて協議を重ね、下記のとおりプラセボ対照の二重盲検比較試験を設定した。本年度はその症例登録までの経過を報告する。

A Placebo Control and Double Blind Phase II Clinical Study of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Japan

Shoji Kudoh, Arata Azuma

Forth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

Pirfenidone (S-7701) is a compound (MW 185. 23) originally produced by Marnac Inc. (US) (Figure 1) which has been demonstrated to have inhibitory effects on inflammatory cytokines such as TNF alpha and on collagen synthesis of fibroblasts (Figure 2) in pre-clinical investigation. Pilot study carried out in the US in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (n=54) showed the expected outcome of improvement from the evaluation of lung function parameters. In Japan, Shionogi & Co., Ltd. completed Phase I single dose and multiple dose studies to confirm the safety. Members of Ministry of Health and Welfare of Japan and the company then initiated a Phase II study of this compound as an orphan drug for the IPF indication. To prepare the protocol for this placebo-controlled DBT study, discussions were repeatedly held among the Study Group members including Professor Raghunath (Washington Univ.), who was a chief director of the US pilot study. Here we report the time course of our activity until the completion of patient enrollment.



S-7701 (pirfenidone) 構造式

図1 Pirfenidone の化学構造

A) 研究目的

慢性型の特発性間質性肺炎を対象として、プラセボを対照薬とする多施設共同二重盲検比較試験により有効性および安全性を検討する。

副作用の発現頻度および重症度の調査を行い、本療法の安全性を検討する。

また血漿中薬物濃度を測定し、患者での薬物動態の推定と副作用と Cmax との相関を検討する。

有効性評価の検出力を増強するために、トレッドミル運動負荷を用いて、本剤投与前後の末梢血酸素飽和度低下 (Δ SpO₂) を主要評価項目として検討する。

B) 研究方法

選択基準：

慢性型の特発性間質性肺炎で 20 歳以上 75 歳未満であり、登録前 1 ヶ月以内の安静時 PaO₂ が 70Torr 以上かつ労作時 SpO₂ が 90% 以下の患者を選択する。

除外基準：

6 ヶ月以上前に比較して病勢の改善が認められる患者、免疫抑制剤使用患者、プレドニン換算量として 10mg を超過するステロイド使用患者、有効性に影響を及ぼす疾患を合併している患者を除外する。

治験薬剤：

S-7701 群 (Pirfenidone 200mg 錠)、プラセボ群 (プラセボ 200mg 錠)

投与方法：

患者の薬剤に対する忍容性を上げるために 7 日間かけて増量し、維持量に到達させる。

・ 1 回 1 錠 (200mg) を 1 日 3 回投与 (600mg)、2 日間

日本医科大学 第四内科

* びまん性肺疾患研究班 重点主任研究者
 ** 〃 重点分担研究者

線維化のプロセスとPirfenidone作用機転

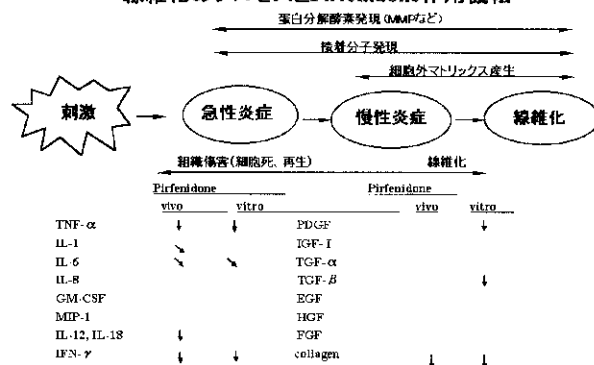


図2 Pirfenidone の作用機序

・ 1 回 2 錠 (400mg) を 1 日 3 回投与 (1200mg)、2 日間
 ・ 1 回 3 錠 (600mg) を 1 日 3 回投与 (1800mg)、3 日間
 但し、Grade 2 以上の胃腸症状、中枢神経症状、または皮疹 (光線過敏症) が発生した場合には用量を減量または中止し、患者毎に治療用量を選択する。

観察・検査項目：

服薬状況、臨床症状、自覚症状・他覚所見、臨床検査、肺機能検査、胸部 X 線検査、胸部高解造影度 CT (HRCT) 検査

有効性の評価項目：(表 1)

主要評価項目は、トレッドミルを用いた 6 分間歩行試験における SpO₂ の薬剤投与前後での比較とする。(3 ヶ月ごと施行する) (表 2)

副次的評価項目としては、安静時の PaO₂、肺機能検査値 (VC, TLC, DLCO)、マーカー (KL-6, SP-D)、画像所見 (胸部 X 線、高解造影 CT)、HR-QOL 指標および自他覚所見を設定する。

目標症例数：

S-7701 群 60 例、プラセボ群 30 例 合計 90 例

参加施設数：

25 施設 (表 3)

実施期間：

2000 年 6 月～ 2002 年 3 月

投与観察期間は 1 年とするが、プラセボ服用患者への倫理的配慮から中間解析を 6 ヶ月時点で行い、早期の有効性判断が出来るように配慮する。

C) 研究結果

本試験に適合する患者のスクリーニングを的確に行うため、研究班メンバーを中心にアンケート調査を行い各施設の患者把握状況を確認した。その結果、当初予定していた 10 施設程度では予定集積症例数の確保が難しいと考えられたため参加施設を 25 施設に設定した。

次に主要評価項目としては労作時 SpO₂ が本疾患の