

表1 主要評価項目ならびに副次的評価項目

S-7701の特発性肺線維症患者を対象とした第Ⅱ相臨床試験

S-7701投与群及びプラセボ投与群の有効性を検討し、S-7701投与群の有効性がプラセボ投与群に優ること(優越性)を証明する。

1) 主要評価項目

- ① 6分間歩行試験における労作時SpO₂の投与前からの変化量を指標とした比較

2) 副次的評価項目

- ① 安静時PaO₂の投与前からの変化量を指標とした比較
- ② 肺機能検査値(VC, TLC, DLCO)の投与前からの変化量を指標とした比較
- ③ マーカー(KL-6, SP-D)の投与前からの変化量を用いた比較
- ④ 画像所見(胸部X線像, 高解像CT像)の投与前からの変化を用いた比較
- ⑤ Chronic Respiratory Disease Questionnaireスコア(HR-QOL指標)の投与前からの変化を用いた比較
- ⑥ 自覚症状・他覚所見(咳嗽, 喀痰, 呼吸困難の程度)の変化を用いた比較

表2 トレッドミル6分間歩行試験手順

6分間歩行試験手順書

- トレッドミルを用いて歩行試験を実施する。
- 試験開始前の測定では、手順書をもとに被験者毎に適切な速度を設定する。以後同様の速度で測定を行う。
- 歩行速度は60m/minを標準とし、40、50、60、70、80m/minのいずれかの速度で実施する。
- 測定は、10秒ごとのSpO₂経時変化を記録して行うことが望ましい。
- 安全性を鑑み、SpO₂が30秒間連続して85%以下になった場合、また急速にSpO₂が低下し、80%を下回った場合には測定を中止する。

表3 試験参加施設および責任医師一覧

	医療機関名	科名	責任医師
1	札幌医科大学医学部附属病院	第三内科	高橋 弘毅
2	東北大学医学部附属病院	遺伝子・呼吸器内科	海老名雅仁
3	新潟大学医学部附属病院	第二内科	鈴木 栄一
4	自治医科大学附属病院	呼吸器内科	杉山幸比古
5	虎の門病院	呼吸器科	中田紘一郎
6	日本医科大学付属病院	第四内科	吾妻安良太
7	東京医科歯科大学医学部附属病院	呼吸器科	吉澤 靖之
8	帝京大学医学部附属病院	内科	大田 健
9	順天堂大学医学部附属順天堂醫院	呼吸器内科	福地義之助
10	東京女子医科大学病院	第一内科	永井 厚志
11	公立昭和病院	呼吸器科	松岡 緑郎
12	日本赤十字社医療センター	第一呼吸器科	折津 愈
13	埼玉県立循環器・呼吸器病センター	呼吸器内科	金澤 實
14	天理よろづ相談所病院	呼吸器内科	山口 善夫
15	京都大学医学部附属病院	呼吸器内科	長井 苑子
16	公立陶生病院	呼吸器・アレルギー内科	谷口 博之
17	浜松医科大学附属病院	第二内科	千田 金吾
18	神戸市立中央市民病院	呼吸器内科	片上 信之
19	国立療養所近畿中央病院	内科	井上 義一
20	国立姫路病院	内科	望月 吉郎
21	広島大学医学部附属病院	第二内科	石岡 伸一
22	愛媛大学医学部附属病院	第二内科	濱田 泰伸
23	熊本大学医学部附属病院	第一内科	菅守 隆
24	長崎大学医学部附属病院	第二内科	門山 淳一
25	大分医科大学附属病院	第三内科	津田 富康

QOLを最も反映すると考えられるが、従来の6分間歩行試験は自由歩行を基本としているため患者の歩行速度の調節が原因でSpO₂の値が不安定となることが判明した。従って今回の試験では、トレッドミルを用いた一定速度の6分間歩行試験を計画した。トレッドミル歩行試験を採用した結果SpO₂の下がり方は一定となったが、予測以上にSpO₂の下がり方が激しい例があり、患者毎の最適歩行速度設定に一考を要する必要があると思われる。しかし薬剤使用前後でのSpO₂値の比較において、労作条件のブレによる解析上の問題回避のためには歩行速度を一定にすることが大きな武器になるため、個別に指摘歩行速度(60m毎分、あるいは50m毎分、40m毎分(減速基準)、70m毎分、80m毎分(加速基準)など個別に指摘負荷運動量を設定)を設定して、治療前後で、同一運動負荷によるSpO₂の低下を比較検討した。中間集計を順当に行うためには短期間での症例集積が必要であったが、各試験施設での登録状況把握とその問題点解明に努めた結果、登録開始後2ヶ月で113症例の集積を得、そのうち109症例に投薬を開始できた。

D) 考察

試験遂行中であり、平成13年9月に中間解析を予定する。

参考文献

- 1) Margolin, S. B. and Lefkowitz, S: A novel pharmacologic agent for prevention and resolution (removal) of lung fibrosis. FASEB J. 8 (4):A382. 1994.
- 2) Shimizu T, Fukagawa M, Kuroda T, Hata S, Iwasaki Y, Nemoto M, Shirai K, Yamauchi S, Margolin SB, Shimizu F, Kurokawa K: Pirfenidone prevents collagen accumulation in the remnant kidney in rats with partial nephrectomy. Kidney International 63; S239-243, 1997.
- 3) Raghu G, Johnson WC, Lockhart D, Mageto Y. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone ? Results of prospective, open-label phase II study -. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: 1061-1069.

特発性間質性肺炎の急性増悪に対する シクロスポリン使用例の全国調査

稲瀬 直彦 大谷 義夫 角 勇樹 海野 剛
澤田めぐみ 三宅 修司 吉澤 靖之*

特発性間質性肺炎（IIP）は慢性に進行する予後不良の疾患であり，なかでも急性増悪は特に治療抵抗性の病態である．急性増悪に対してはステロイド投与が試みられているが，その有効性は不明である．IIPの急性増悪に対するシクロスポリン（CYA）の治療効果についてアンケート調査を行い，10施設20例の臨床経過を検討した．20例中15例（75%）が急性増悪で死亡し，急性増悪から死亡までの期間は1から28週で平均9.9週であった．4例は生存中であった．当院においてはCYA使用により約半数の生存例を認めており，今回の対象と比較してCYAの投与開始時期や用量などに差異があることが予想された．CYAの有効性の判定には多施設による前向き研究が必要と考えられた．

Cyclosporin A in the Treatment of Acute Exacerbation of Idiopathic Interstitial Pneumonia

Naohiko Inase, Yoshio Ohtani, Yuki Sumi, Takeshi Umino,
Megumi Sawada, Shuji Miyake and Yasuyuki Yoshizawa

The Pulmonary Medicine, Tokyo Medical and Dental University.

Idiopathic interstitial pneumonia (IIP) is a slowly progressive disease with a poor prognosis. During the clinical course of IIP, acute exacerbation is the worst condition as it is unresponsive to most conventional therapies leading to the death. The effectiveness of corticosteroids is very limited although corticosteroids have been tried in acute exacerbation. To examine the effect of cyclosporin A (CYA) on acute exacerbation of IIP, we reviewed 20 patients who were treated with CYA in the ten major hospitals. Of these patients treated with CYA, 15 patient (75%) have died in one to 28 weeks (mean: 9.9 weeks), and 4 patients (20%) have survived. In the previous study, we reported that more than half patients with acute exacerbation of IIP have survived after the immediate therapy with CYA. Prospective studies in the multi-center are required to evaluate the effect of CYA on acute exacerbation of IIP.

はじめに

シクロスポリン[®] (CYA)は各種臓器移植やパーチェット病、乾癬、再生不良性貧血、ネフローゼ症候群などの疾患に使用されており、近年では膠原病肺においても使用例が報告されている^{2,4)}。慢性型の特発性間質性肺炎 (IIP) は予後不良の疾患であり、なかでも急性増悪は特に治療抵抗性の病態である。現在のところ経験的にステロイドパルス療法などが試みられており、また少数ながらCYA使用の報告もあるが^{5,7)}、その有効性は不明である。

当院ではこれまで、IIPの急性増悪にCYAの投与を行い有効性を示唆する成績を認めたため、びまん性肺疾患研究班の重点研究事業として報告した⁸⁾。今回、IIPの急性増悪に対するCYAの有効性を検討するために、アンケート方式により症例を集積し、全国的な実態調査を行った。

対象と方法

対象は厚生省特定疾患びまん性肺疾患研究班員の所属する施設を含む全国主要32施設とした。アンケート用紙を郵送し回答を得た。設問は、(1) IIPの診断時期、急性増悪の発症時期、予後について、(2) ステロイドパルス療法の有無、プレドニゾロンの投与の有無・投与量、ステロイドの効果、ステロイドの副作用について、(3) CYAの投与方法、CYAの血中濃度、CYAの効果、CYAの副作用について、(4) CYA以外の免疫抑制剤の使用の有無、その他の治療についてであった。

結 果

アンケートへの回答があったのは32中25施設(78%)であった。このうち急性増悪にCYAを使用したのは10施設20症例(表1)であり、15施設においては使用例がなかった。

(1) 予後について

20例中15例(75%)が急性増悪で死亡しており、急性増悪から死亡までの期間は1から28週で平均9.9週であった。4例は生存中であり1例は40週後に他病死亡した。

(2) ステロイドについて

20例全例に対してプレドニゾロンが投与され、18例に対してステロイドパルス療法が行われた。ステロイドの効果は有効

が2例、一時的が13例、無効が3例、不明が2例であった。また、ステロイドの副作用は7例に出現し、2例に感染症、2例に糖尿病、2例に感染症と糖尿病、1例に腰椎圧迫骨折を認めた。

(3) CYAについて

開始時のCYAの1日投与量は、50mgが1例、75mgが3例、100mgが5例、150mgが8例、175mgが1例、200mgが2例であった。CYAの目標血中濃度は施設により異なっていたが、トラフ値として100 ng/ml前後が1施設、100から150が4施設、50から200が1施設、100から200が2施設、150から200が1施設、100から300ないし400が1施設であった。次に、CYAの効果については、有効は4例(20%)にとどまり、一時的が3例(15%)、無効が11例(55%)、不明が2例であった。また、CYAの副作用は4例(20%)に出現し、2例に腎機能障害を、2例に感染症(アスペルギルス症とサイトメガロウイルス肺炎)を認めた。尚、副作用を認めた4例全例において、ステロイドとシクロホスファミドが併用されていた。

(4) CYA以外の免疫抑制剤の使用の有無、その他の治療について

その他の免疫抑制剤については、20例中10例に対してシクロホスファミド(CPA)が投与され、1例にはシクロホスファミドとアザチオプリン(AZP)が併用された。シクロホスファミドが投与された11例のうち、5例においてはパルス療法が行われた。

表1 患者背景と経過

症例	年齢/性別	予後	急性増悪からの期間(週)	ステロイドの効果	CYA		副作用	その他の治療
					投与量(mg)	効果		
1	75/F	死亡	3	無効	150	無効	尿管障害	
2	49/M	死亡	9	一時的	75	無効		
3	64/M	死亡	10	有効	50	無効		CPAパルス
4	64/M	死亡	8	一時的	100	無効		
5	74/F	死亡	12	一時的	75	無効		CPA
6	59/F	死亡	4	無効	175	無効		CPA
7	74/M	死亡	1	一時的	150	不明	腎機能	
8	54/M	死亡	17	一時的	75	無効		CPA
9	74/M	死亡	4	無効	100	無効		CPAパルス
10	70/M	他病死	40	有効	150	有効		
11	66/F	死亡	6	一時的	150	一時的	感染症	CPA
12	59/M	死亡	6	一時的	150	一時的		CPA+AZP
13	58/M	生存		不明	200	有効		
14	71/F	生存		不明	150	有効		
15	75/M	死亡	15	一時的	100	無効	感染症	CPAパルス
16	69/M	死亡	10	一時的	200	無効	腎機能	CPA
17	77/M	死亡	16	一時的	150	無効		CPAパルス
18	62/M	生存		一時的	100	有効		
19	69/M	生存		一時的	100	一時的		
20	68/F	死亡	28	一時的	150	不明		CPAパルス

東京医科歯科大学呼吸器科

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

考察・結論

今回の調査では、CYA 使用例においても IIP の急性増悪の予後は極めて不良であり、IIP の急性増悪における CYA の有効性を示唆する結果は得られなかった。これまでの当院における治療成績では、CYA 使用により IIP の急性増悪において約半数の生存例を認めており⁸⁾、今回の対象と比較して CYA の投与開始時期や用量などに差異があることが予想された。

今後さらに症例の集積・検討をすすめる予定であるが、CYA の有効性の判定には多施設による前向き研究が必要と考えられた。

謝 辞

アンケートに回答をいただいた施設名を記し、謝辞とさせていただきます。

日本医科大学第四内科、自治医科大学呼吸器内科、大阪大学医学部第三内科、熊本大学医学部第一内科、東京大学医学部附属病院検査部、天理よろず相談所病院、同愛記念病院、東京慈恵会医科大学呼吸器科、横須賀共済病院、東京通信病院、札幌医科大学第三内科、東北大学加齢医学研究所、大分医科大学第三内科、浜松医科大学第二内科、広島大学医学部第二内科、国立療養所天竜病院、関東中央病院、東京都立駒込病院、青梅市立病院、横浜赤十字病院、平塚共済病院、南一条病院、国立姫路病院、国立療養所近畿中央病院、国立国際医療センター

参考文献

- 1) Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H: Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; 6: 468-475.
- 2) Ando S, Kobayashi S, Yamanaka K, Takasaki Y, Hashimoto H: Successful combination therapy of cyclosporine and steroids in two cases with interstitial pneumonitis associated with polymyositis. *Ryumachi* 1995; 35: 95-99. (in Japanese with English Abstract)
- 3) Gruhn WB, Diaz BJ: Cyclosporine treatment of steroid resistant interstitial pneumonitis associated with dermatomyositis/polymyositis. *J Rheumatol* 1987; 14: 1045-1047.
- 4) Alegre J, Teran J, Alvarez B, Viejo JL: Successful use of cyclosporine for the treatment of aggressive pulmonary fibrosis in a patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1594-1596.
- 5) Venuta F, Rendina EA, Ciriaco P, De Giacomo T, Pompeo E, Bachetoni A, Ricci C: Efficacy of cyclosporine to reduce steroids in patients with idiopathic pulmonary fibrosis before lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12: 909-14.
- 6) Moolman JA, Bardin PG, Rossouw DJ, Joubert JR: Cyclosporin as a treatment for interstitial lung disease of unknown aetiology. *Thorax* 1991; 46: 592-595.
- 7) Alton EW, Johnson M, Turner WM: Advanced cryptogenic fibrosing alveolitis: preliminary report on treatment with cyclosporin A. *Respir Med* 1989; 83: 277-279.
- 8) 澤田めぐみ, 大谷義夫, 海野剛, 稲瀬直彦, 三宅修司, 吉澤靖之: 特発性間質性肺炎急性増悪に対する Cyclosporin A, 副腎皮質ステロイド併用療法の試み. 厚生省特定疾患呼吸器系疾患調査研究班びまん性肺疾患分科会 平成 11 年度研究報告書: 104-107.

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 —オープン臨床試験における有効症例の解析—

石井芳樹¹ 北村 諭² 杉山幸比古^{3*}

28例の特発性間質性肺炎 (IIP) 症例に対して抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) 吸入療法を施行し、使用3か月後の短期効果では53.6%に症状の改善を認めた。また、1年以上の長期使用症例18例において使用前と比較して、臨床症状について27.8%で改善を認め、44.5%の症例で有用性ありと判断された。さらに、NAC吸入がどのような症例に有効であるか知るため、有効症例と無効症例の背景因子を検討した。今回、経過観察中最終の呼吸機能の改善の有無でグループを分けた。経過中急性悪化を来した群では導入時の%VCが改善例や不変例に比し、有意に低値であったが、拡散能、PaO₂値、KL-6値には有意差を認めなかった。画像上改善を認めた症例では、改善した部分はスリガラス状陰影の部分であり蜂窩肺の部分は変化がなかった。蜂窩肺が完成し、%VCの低下が進んだ症例では、NACによる画像所見や呼吸機能検査所見の改善効果は十分でないものと考えられた。しかし、慢性進行性のIIPにおいては進行の抑制が得られれば有用性があると考えられるので、進行症例においてもNACの有用性が否定されるものではないと思われる。

N-ACETYLCYSTEINE INHALATION THERAPY FOR IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS (IPF)-An analysis of effective cases-

Yoshiki Ishii¹, Satoshi Kitamura², Yukihiko Sugiyama³

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

We have reported that N-acetylcysteine (NAC) inhalation therapy was clinically effective in 53.6% of patients with idiopathic pulmonary fibrosis enrolled in the open clinical trial. In order to know what case NAC inhalation is effective in, the background factors of effective cases and ineffective cases were analyzed. In this study, evaluation was done based on the final result of pulmonary function test during observation. In the group showed acute exacerbation, %VC at introduction was low value significantly as compared with the improved group or the unchanged group. However, a significant difference was not found in DLco, PaO₂ value, and KL-6 value. The portion improved on CT film was the portion of ground glass opacity but not the portion of honeycomb. In cases with completed honeycomb lesion and severe fall of %VC, NAC inhalation is considered to be not sufficient. However, if chronic advance nature is taken into the account, the suppression of disease progression but not the improvement is considered to be enough as a treatment of IPF. Therefore, the results obtained in this study do not indicate the uselessness of NAC therapy for advance cases of IPF.

はじめに

特発性間質性肺炎 (IIP) 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- κ 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り、そこで慢性型 IIP 症例の治療として NAC 吸入のオープン臨床試験を行った²⁾。その結果、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%) の症例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 年以上経過した症例における長期効果は、18 例中 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。今回、NAC 吸入がどのような症例に有効であるか知るため、有効症例と無効症例の背景因子を解析した。

対象と方法

対象は 28 例の慢性型 IIP 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。また、線維化のマーカーとして血清 KL-6 値を測定した。

今回の解析では、前回報告した臨床症状も加味した判定ではなく、観察期間中最後の呼吸機能所見 (%VC, %DLCO) の 10% 以上の変動によって改善、不変、および悪化に分類した。急性悪化症例については呼吸機能検査は施行不能のため悪化症例とは別にわけて扱った。各群毎に治療前の %VC, %DLCO, PaO₂, KL-6 値との関連を解析した。

- 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
- * びまん性肺疾患研究班 分担研究者

結 果

観察期間最終の呼吸機能検査による判定では改善群 5 例、不変群 12 例、悪化群 7 例、急性悪化群 4 例であり、各群について各パラメーターとの関連を検討した。

1) %VC との関連

急性悪化を来した症例では、治療開始前の %VC が 56.1% で改善群 97.9% および不変群 85.2% と比較して有意に低値であった (図 1)。

2) %DLco との関連

%DLco は各群とも 30-40% と低値であり群間で有意差を認めなかった (図 2)。

3) PaO₂ との関連

各群の治療前 PaO₂ 値は平均値が 67.6-79.6Torr 程度であり、群間で有意差を認めなかった (図 3)。

4) 血清 KL-6 値との関連

治療前の血清 KL-6 値は 1684-2587U/ml であり、各群間に有意差を認めなかった (図 4)。

5) CT 所見の改善を認めた症例

CT 所見の改善を認めた症例は、3 症例あり、これらの症例はいずれも VATS にて UIP と診断されたが、CT 所見では、完成された蜂窩肺だけでなく ground glass

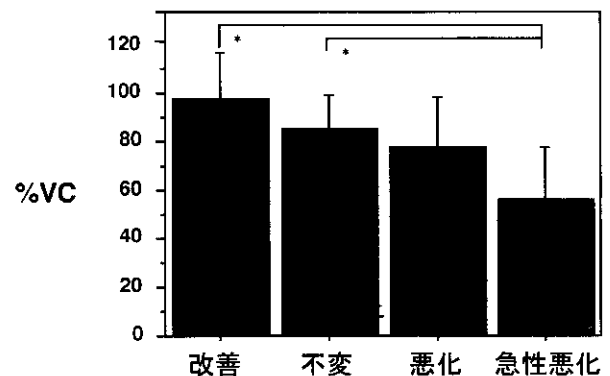


図 1 NAC 吸入療法の呼吸機能改善効果と治療前 %VC との関連 (*p<0.01).

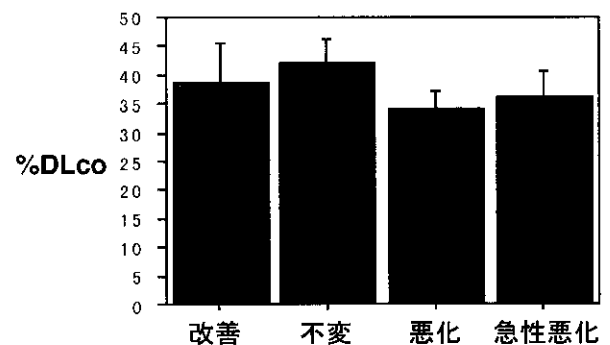


図 2 NAC 吸入療法の呼吸機能改善効果と治療前 %DLco との関連

opacity (GGO)の部分を伴っており,改善したのは GGO の部分であった. 代表する 1 例の CT 所見を提示した (図 5).

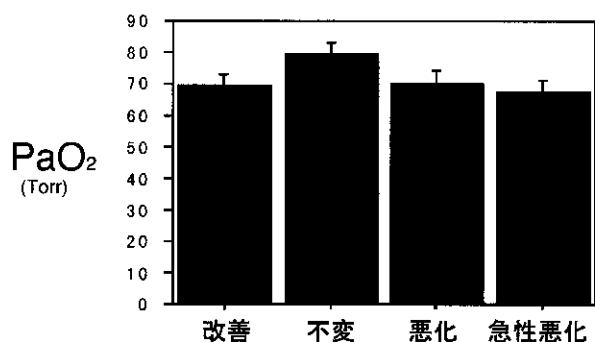


図3 NAC吸入療法の呼吸機能改善効果と治療前PaO₂との関連

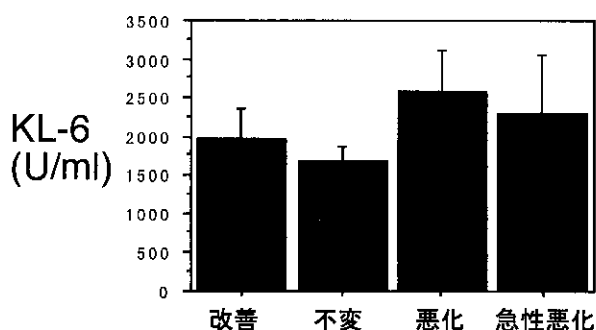


図4 NAC吸入療法の呼吸機能改善効果と治療前KL-6値との関連

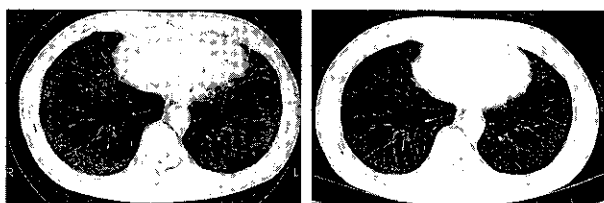


図5 CT所見改善症例

考 察

IIP 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い,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. また,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. 今回,どのような症例に対してNAC吸入が有効であるかを知るため,有効症例と無効症例における背景因子についてい

くつかのパラメータを比較検討した. 今回の解析では,臨床症状は考慮せず呼吸機能の改善のみから有効性を評価した.

呼吸器機能検査では,%VCの低い線維化の進行した症例では優位に急性悪化を起こしやすく,また,治療効果が乏しい傾向が認められた.%DLcoについては,低値の症例が多く各群間で有意差を認めなかった.PaO₂やKL-6についても治療反応性との関連を認めなかった.CT所見が著明に改善を示した症例ではGGOの部分の改善が主体であった.これらの所見からNAC吸入療法によって画像所見や呼吸機能検査所見に改善が認められるのは,まだ,蜂窩肺が完成し肺活量が高度に低下していない症例でありと考えられた.しかしながら,慢性進行性のIIPにおいては,画像所見や呼吸機能検査所見が改善することをむしろまれであり,進行が抑制されれば治療効果があると考えてもよいと思われるので進行症例であってもNAC吸入療法の効果が否定されるものではないだろう.多くの症例では,画像や呼吸機能に変化がないものの自覚症状の改善がみられ,NAC吸入療法の有用性はあると考えられる.今後,QOLの改善,急性悪化の減少,長期的進行の軽減といった面から薬剤の有用性を再検討する必要がある.

参考文献

- 1) 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.
- 2) 石井芳樹, 北村 諭, 杉山幸比古: 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—オープン臨床試験の成績—厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業). 特発性間質性肺炎の細胞分子病態に基づく疾病の病態に応じた治療法の研究開発. 平成11年度研究報告書. pp35-38, 2000.

びまん性肺疾患における生体部分肺移植に関する研究

清水 信義* 青江 基 伊達 洋至

脳死提供者の少ない我が国の現状では、当面生体部分肺移植と脳死肺移植は並行して進めるべき救命手段と考える。びまん性肺疾患患者に対しての生体部分肺移植症例を経験し、その有用性について検討した。

Living-related Lung Transplantation for Diffuse Pulmonary Diseases

Nobuyoshi Shimizu, Motoi Aoe, Hiroshi Date

Department of Surgery II, Medical School Okayama University, JAPAN

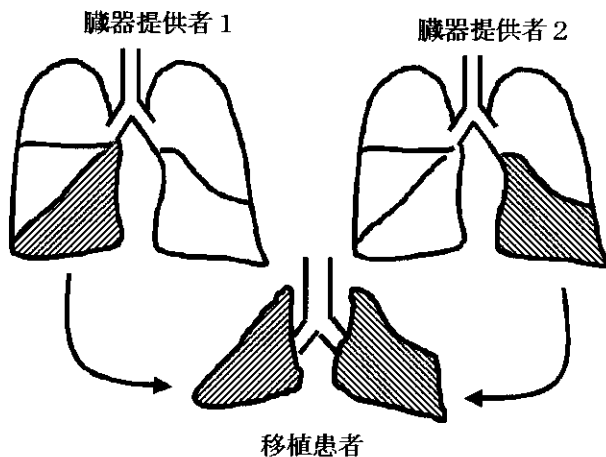
We examined the clinical usefulness of living-related lung transplantation for diffuse pulmonary diseases through our recent experience. We can conclude that living-related lung transplantation should be promoted as well as lung transplantation from brain-dead people to rescue the patients suffering from diffuse pulmonary diseases.

はじめに

生体部分肺移植の歴史

生体部分肺移植は、当初ドナー不足に対する対策として、VA Starnes が健常ドナー 2 人の右あるいは左下葉を移植する生体部分肺移植を積極的に行い、良好な成績を報告したのが始まりである¹⁾。具体的には、一人目のドナーから右下葉を、二人目のドナーから左下葉を摘出し、それぞれをレシピエントの右肺、左肺として移植する術式である(図 1)。

図 1 両側生体部分肺移植の手術術式



南カリフォルニア大学に移った Starnes はその後、さらに適応疾患、症例数を増やし²⁾、99 例を 2000 年 9 月までに施行している。2001 年 1 月に行われた彼らの報告によれば、大人 70 例、小児 29 例の生体部分肺移植を施行し、その対象疾患は嚢胞性肺線維症が大半を占めている。また、肺移植における慢性拒絶反応の一種と考えられている bronchiolitis obliterans (BO) が、大人において 7.1%、小児においては 3.4% にしか発生しておらず、BO 発生率が低い原因として、虚血時間の短縮が示唆されている³⁾。予後に関しては、大人症例の 3 年生存率は 60% と、脳死者からの肺移植とほぼ同等であると報告している。一方、小児症例の 5 年生存率は 75% であると報告しているが、小児症例の予後が良好な理由は特定されていない。また、現在までに提供者に死亡例は報告されていない^{4,5)}。

生体部分肺移植の特徴

生体部分肺移植の利点は、①比較的待機手術として行いうること、②肺の虚血時間が短いこと、③近親者からの臓器提供は拒絶反応が少ない可能性があること、④脳死ドナーにしばしば見られるような誤嚥・感染・人工呼

吸器による肺損傷がないこと、などがあげられる。一方、生体部分肺移植の最大の欠点は健常ドナー 2 人の肺葉切除が必要であることである。この点に関して特に肺は肝臓と違って再生しないためドナーの肺機能は一般的に 17-18% 低下すると報告されているが、この程度の呼吸機能低下は日常生活を行う上で大きな障害とはならないと考えられている。しかし、ドナーには、気管支瘻、出血、気管支狭窄、心膜炎などの合併症が報告されており^{4,5)}、健常なドナー患者にこのようなリスクを負担させることは、たとえドナーの自発的な臓器提供申し出が基本となる生体肺移植といえども、十分なインフォームド・コンセントを行うとともに慎重な適応決定が望まれる。

生体部分肺移植の適応

適応疾患については、脳死肺移植となら変わる点はない。しかし、生体部分肺移植を受けたレシピエントは移植直後からそのガス交換を完全に移植肺に頼ることになるため、レシピエントに十分なガス交換能を提供するだけのドナー肺を移植する必要がある。このため、レシピエントの年齢、身長、性別より予想される予測肺活量に対してどの程度の肺容量がドナーより提供されれば充分かは、生体肺移植の手術適応を決定する上で非常に重要である。しかしながら、現在生体部分肺移植の経験の最も多い南カリフォルニア大学においても、どの程度ドナーより肺容量がレシピエントに提供されれば充分かの一定の基準はない。岡山大学第二外科では移植された肺の予測肺活量の和は、レシピエントの予測肺活量の 45% 以上であることが必要であり、理想的には 50% 以上として、手術適応基準の一つとしてもちいている。

対象と方法

自験例

岡山大学では、1998 年 10 月から、2001 年 9 月までに、10 例の両側生体部分肺移植を施行した。年齢は、10 歳から 53 歳までで、2 例の小児男性例と、8 例の大人女性症例、原疾患の診断は、原発性肺高血圧症 3 例、閉塞性細気管支炎 2 例、特発性間質性肺炎 2 例、気管支拡張症 2 例、肺リンパ脈管筋腫症 1 例であった。小児症例は、原発性肺高血圧症と閉塞性細気管支炎 (Stevens-Johnson 症候群後) の各 1 例であった。術前状態としては、1 例が人工呼吸器管理下の状態で、のこり 9 例はいずれも Hugh-Jones 分類の IV 度以上の十度呼吸不全状態にあった。右片肺移植の原発性肺高血圧症の小児症例 1 例を除き、9 例においては、二親等以内の血縁者ふたりのドナーより、右下葉、左下葉の提供を受け両側肺葉移植が行われた。また、すべての症例で術中人工心肺が使用された。移植後の拒絶反応のコントロールは、シクロスポリン、アザ

岡山大学医学部第二外科

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

チオプリン、ステロイドの3剤、もしくはタクロリムス、ミコフェノール酸、ステロイドの3剤を使用している。現在までに、すべての症例の臓器提供者に術後重篤な合併症を認めておらず、全員日常生活に復帰している。また、移植患者も経過は良好で、全例において現在までに酸素吸入より離脱できており、症例8まではすでに退院しており、日常生活に支障のない程度まで回復している。

結 果

ここでは、我々が平成12年10月までに実施した生体肺移植の3症例について以下に概説する。

第1例：患者 24歳 女性。

診断名：気管支拡張症。

主 訴：呼吸困難。

現病歴：幼少時から肺炎を繰り返し、6歳の時気管支拡張症の診断を受け、12歳の時に気管支生検で primary ciliary dyskinesia と診断された。以後たびたび呼吸器感染を繰り返し19歳の時から酸素吸入を必要とするようになった。1998年8月肺炎のため入院し、一時右心不全症状も出現し、同年9月には某大学附属病院内科に入院した。10月13日呼吸不全となり人工呼吸器管理となり、10月16日には気管切開を受けた。症状が増悪し保存的治療の限界と判断され、肺移植の適応とされ、同年10月23日岡山大学附属病院に搬入された。

入院時現症：人工呼吸器管理下であるが意識は清明で、体温36.7℃、血圧106/62mmHg、脈拍102/分で整、呼吸は人工呼吸管理(28回/分、FiO₂ 0.6、SIMV TV 380ml、PEEP 3 cmH₂O)である。胸部聴診で吸気音は全肺領域に湿性ラ音を聴取した。

胸部X線写真で全肺野に網状、輪状影を認めた。胸部CT写真でも：両上肺野優位に著明な気管支拡張像を認め、一部には粘液様物質の貯溜を認める部分がある。

生体部分肺移植には健常なドナーが2名必要であるが、この症例では母親と妹が血液型が一致し体格も合致したのでドナーとなることが出来た。二人のドナーのそれぞれ右下葉と左下葉を摘出し、レシピエントの右肺、左肺として移植した。

手術終了時より移植肺は良好に機能し、100%酸素換気下でPO₂は500mmHgであった。術後一過性の肺水腫が出現したが、一酸化窒素の吸入などで改善し、術後3週目にはICUから退出、その後順調に経過し術後2ヶ月目に退院した。レシピエントの呼吸機能の改善はめざましく、術後2ヶ月目の退院時には1500ml、術後6ヶ月で1770ml、術後1年では2160mlと予測肺活量の70%以上となる顕著な改善を示し、術後2年目の胸部X線写真も良好である。

第2例：患者 29歳 女性。

診断名：骨髄移植後慢性GVHDに起因する閉塞性細気管支炎。

既往歴：平成7年再生不良性貧血。

家族歴：特記すべき事はない。

現病歴：生来健康であったが、平成7年1月皮下出血斑が出現し、次第に悪化してきた。

同年5月再生不良性貧血と診断され、同年12月8日HLA型(血清型)一致、赤血球型不一致(ドナーはA型、当患者移植前の血液型はB型)の非血縁ドナーより提供を受け骨髄移植を施行された。移植後は順調に経過し、平成8年3月退院し免疫抑制剤の投与を受けていた。同年9月になって咳嗽と共に労作時呼吸困難出現、慢性GVHDと診断された。平成10年頃より咳嗽、労作時呼吸困難が増悪、骨髄移植後の慢性GVHDによる閉塞性細気管支炎と診断され、平成11年7月より在宅酸素療法が開始された。同年10月左肺の気胸が発生し11月開胸下ブランチ切除術施行された。12月再び発熱、咳嗽があり、胸部X線左気胸再発を認め、労作時呼吸困難も次第に増悪してきたことより肺移植の適応検討のため当科入院となった。

現症：身長149cm、体重33.5kg。顔面・四肢に浮腫を認めず、ばち状指やチアノーゼはない。胸部聴診上呼吸音は左側で減弱、ラ音は聴取しない。血液検査所見では白血球増多や貧血はない。生化学検査でも異常はない。血液ガス分析PO₂ 63.1mmHg、PCO₂ 50.0mmHg、HCO₃ 28.5mmHg、BE 2.3、SaO₂ 91.4。呼吸機能検査:VC 0.67ml、%VC 23.8%、FEV 1.0 470ml、FEV1.0% 54%。

胸部X線写真では肺は過膨張で気腫化し、左肺上葉は繰り返した気胸のため拡張が不十分である。胸部CT写真でも同様の所見があり、左肺は拡張不全があり、両肺とも末梢の透過性亢進している。

平成12年5月10日に第1例目と同様に人工心肺下に弟の右下葉、母親の左下葉をそれぞれレシピエントの右肺および左肺として移植した。手術時間は7時間44分であった。

移植を完了した直後から、血液ガスが改善せず人工心肺からの離脱が遅延したがNO投与と分離換気で血液ガスを維持しICUに収容した。その後ステロイドと利尿剤の投与などで血液ガスは次第に改善した。術直後の胸部X線写真では両肺に淡い浸潤影が出現し肺水腫の所見を呈していたが、術後1日目には著明に改善した。これとともに血液ガスも改善した。その後の経過は順調で、術後40日目に退院した。

第3例：患者 23歳 女性

診断名：肺リンパ脈管筋腫症。

生来健康で高校時代は体育の授業も普通に受けていた。

平成10年夏から軽度の呼吸困難があり、その後徐々に増

悪し、平成 11 年夏には他の人について行けなくなり平成 12 年 3 月には約 100 メートル位しか歩行できなくなった。平成 12 年 3 月 5 日左気胸を発症しついで右気胸も発症した。同年 4 月 17 日右肺の胸腔鏡下生検を行い上記の診断を受けた。当科入院までに左 5 回、右 4 回の気胸を起こしてドレナージと胸膜癒着療法を受けている。入院時両胸腔に胸腔ドレーンが入っており 5l/分の酸素吸入下で起座呼吸の状態であった。

身長 148cm, 体重 39kg, 血液型 A 型。

血液生化学検査では異常はなく、肺移植に必要な血清学的検査、ウイルス検査でも異常を認めなかった。

胸部 X 線検査及び胸部 CT 検査で、両肺に無数の薄壁嚢胞があり、両側の気胸を発生しており右中葉の無気肺を認める。

呼吸機能では肺活量 0.71L, 努力性肺活量 0.71 L, FEV1.0. 22 L, FEV1.0% 31.0% であった。

血液ガス分析では、酸素 5L 吸入下で PaO₂ 80.7mmHg, PCO₂ 76.0mmHg, pH 7.387 であった。

平成 12 年 10 月 18 日母親の左下葉, 兄の右下葉の提供を受け両側部分肺移植を実施した。術後 3 日目には人工呼吸器から離脱し術後リハビリテーション中であるが経過は良好である。

考案・結論

欧米では臓器移植は一般的な医療となり、それに伴い適応疾患も拡大され待機患者も増加しているが、その一方で提供者数は頭打ちで登録後待機中に死亡する患者が増加している。脳死肺移植は肝臓の 7 分の 1, 心臓の 3 分の 1 程度の頻度で実施されておらず、脳死者からの肺は提供を受けることが難しい臓器であり、また提供を受けても両肺移植の成績が良いことから一人の提供者から救命できる患者は限られているのが現状である。

南カルフォルニア大学の Starnes らのグループは、2000 年 4 月までに 100 例の生体肺移植を実施しており、その術後生存率は成人では脳死肺移植と同程度、小児では 5 年生存率 80% と良好なことを報告している。その理由として血縁者からの生体肺移植は拒絶反応が少ない可能性があること、移植肺の状態が良く、阻血時間が短いこと、小児レシビエントでは肺以外の臓器が良好なことが良い結果となっていることなどをあげている^{3,6)}。脳死提供者の少ない我が国の現状では、当面生体肺移植と脳死肺移植は並行して進めるべき救命手段と考える。

参考文献

- 1) Starnes VA, Barr ML, Cohen RG. Lobar transplantation. Indications, technique, and outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108:403-10, 1994
- 2) Starnes VA, Barr ML, Schenkel FA, *et al.* Experience with living-donor lobar transplantation for indications other than cystic fibrosis. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 114: 917-21, 1997
- 3) Starnes VA, Woo MS, MacLaughlin EF, *et al.* Comparison of outcomes between living donor and cadaveric lung transplantation in children. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 2279-84, 1999
- 4) Barr ML, Schenkel FA, Cohen RG, *et al.* Recipient and donor outcomes in living related and unrelated lobar transplantation. *Transplant Proc* 30: 2261-3, 1998
- 5) Battafarano RJ, Anderson RC, Meyers BF, *et al.* Perioperative complications after living donor lobectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120:909-15, 2000
- 6) Cohen RG, Barr ML, Schenkel FA. Living-related donor lobectomy for bilateral lobar transplantation in patients with cystic fibrosis. *Ann Thorac Surg* 57:1423-1428, 1994.

間質性肺炎の病理形態からみた治療への提言

福田 悠

間質性肺炎の中で、治る間質性肺炎 (BOOP, NSIP) と治らない間質性肺炎 (UIP), さらに AIP の早期の活動性線維化病巣に注目して、共通点、相違点を明らかにした。BOOP, NSIP では UIP に比べ、肺胞上皮細胞の傷害が軽く、再生が良好であり、線維化を構成する間質細胞は筋線維芽細胞としての性格が弱い。BOOP, NSIP では、本来の上皮基底膜は線維化に埋没して消失するが、再生肺胞上皮下に速やかに基底膜が新生され、線維化巣への毛細血管新生が顕著である。AIP は、UIP の活動巣と類似しているが、傷害期を乗り越えた症例では、NSIP 類似の治癒機転を示す。UIP は不可逆的な線維化を示すが、早期の活動性病巣のみは治療反応性が示唆される。治療の方向性としては、肺胞上皮細胞の傷害を抑え再生と分化を促すこと、間質細胞の筋線維芽細胞化を阻止し細胞外基質の吸収を促すこと、毛細血管新生を促すことが必要であろう。

Proposals from the patho-morphological characteristics of interstitial pneumonia to the therapy

Yuh Fukuda

Department of Pathology, Nippon Medical School

We analyzed the mechanism of pulmonary structural remodeling in AIP, UIP, BOOP and NSIP, especially in the process and the characteristics of their early fibrotic lesions. In UIP, BOOP and NSIP, early fibroses were exclusively formed in intraalveolar spaces. UIP showed the mural incorporation-type intraalveolar fibrosis. α SMA positive myofibroblasts were TIMP-2-predominant and showed rarely the figure of collagen phagocytosis. Regenerating epithelial cells covering intraalveolar fibrosis in UIP showed the tendency to detach from the mesenchyme. In UIP, alveolar structures were finally lost and replaced by the bronchiolar epithelial cells with smooth muscle hyperplasia, called as "true bronchiolization". UIP is TIMP-2 predominant progressive and irreversible disease. AIP showed myofibroblast proliferation in both interstitium and intraalveolar space. In AIP, unknown big insult for alveoli might be important in the beginning of the disease, but the later stage of regeneration seems to be similar to NSIP. This may be the reason why some cases of AIP recover. Both BOOP and NSIP were lymphocyte dominant interstitial pneumonia, and showed MMP-predominant fibroblasts in intraalveolar fibrosis, which were less positive for α SMA. Neovascularization in intraalveolar fibrosis was conspicuous. Ultrastructurally phagocytosed collagen fibrils were predominant in fibroblasts in BOOP and NSIP. Regenerating epithelial cells covering on intraalveolar fibrosis were mainly alveolar epithelial cells and showed good adhesion to mesenchyme. BOOP and NSIP are MMP predominant, reversible and similar disease each other. BOOP is bud dominant interstitial pneumonia (BIP) and NSIP is mural incorporation dominant interstitial pneumonia (MIP). Only early fibrotic lesions of UIP might react to the therapy. The proposed direction of therapy is as follows: 1) to suppress the damage of alveolar epithelial cells and enhance their regeneration, 2) to suppress the myofibroblastogenesis of mesenchymal cells and enhance the absorption of extracellular matrices, and 3) to enhance the neovascularization in fibrotic lesions.

はじめに

間質性肺炎のなかで、特に線維化が重要で、特発性のものが含まれるのは、1)急性型(acute interstitial pneumonia, AIP)、2)通常型(usual interstitial pneumonia, UIP)、3)器質化肺炎型(bronchiolitis obliterans organizing pneumonia, BOOP)、4)非特異型(nonspecific interstitial pneumonia, NSIP)の4疾患単位である。病理学的な間質性肺炎の診断は、生検時に出来上がった全体の特徴から行われている^{1,2)}。しかし、早期線維化巣自体にも、疾患の特異性が潜んでいるものと考えられる³⁾。また、早期の線維化巣は活動性の病巣であることから、治療のターゲットになり得るものと期待される⁴⁻⁶⁾。間質性肺炎の初期像である「早期線維化巣」に注目して、疾患特異性を明らかにする。また、明らかにされた特異性の中から、UIPの不可逆性、予後因子として重要と考えられるものを抽出し、治療への応用の可能性を提示する。

対象と方法

対象は、開胸肺生検、胸腔鏡下肺生検で得られた各種間質性肺炎組織、すなわちUIP、AIP、BOOP、NSIPである。パラフィン切片において、HE, elastica-Masson, Alcian-blue PAS染色にて検討する。免疫組織化学的に、フィブロネクチン、細胞性フィブロネクチン、I-, III-, IV-コラーゲン、ラミニン、エラスチン、 α 平滑筋アクチン、ケラチン、フィブロネクチンレセプター(FnR, integrin $\alpha 5 \beta 1$)、ピンクリン、matrix metalloproteinase (MMP)-1, -2, -9, 膜型のMMP (MT1-MMP)、それらのインヒビター(TIMP)-1, -2を検討した。透過電顕にて、一般の二重染色に加えて、基底膜構造、膠原細線維、弾性線維の同定のためにタンニン酸、PAM染色標本を検索した。MMPsについて、in situ hybridization, Gelatin zymography, Western blottingなどを用いて解析した。特に、UIPと他の予後良好な線維化との分岐点を明らかにする^{3,7)}。また、同時に検索しているブレオマイシン肺線維症モデル^{8,9)}、胎生肺¹⁰⁾で得られたデータと対比、検討する。

結 果

表1は、共通点、相違点をまとめたものである⁷⁾。

1) すべての間質性肺炎で、活動性の早期線維化巣は主に肺胞腔内に形成されていた。すなわち、肺胞領域の炎症に伴い肺胞上皮細胞の障害、上皮基底膜の断裂、肺胞壁由来の間質細胞の肺胞腔内への侵入、細胞外基質の産生が確認された。

表1 文献7より引用

Summary of the Results

Clinical	Temporality	Intra Alveolar Fibrosis				Fibroblast				
		Mural Inc	Bud	Coll. Gl.	Capillary	α SMA	MMP/TIMP	Coll.	Phago	
AIP	acute	homo	+++ *	-	-	-	+++	-	#	-
AIP	"	"	+++ *	-	-	-	+++	-	-	ND
UIP	chronic	hetero	++	-	-	+	++	-	-	+
UIP	"	"	+	+	-	-	+	-	-	+
UIP	"	"	++	++	-	++	++	-	-	-
UIP	"	"	+++	-	-	+	++	-	-	-
BOOP	subacute	homo	-	+++	+++	++	-	+	#	++
BOOP	"	"	+	+++	++	++	+-	+	+	++
BOOP	"	"	+	+++	++	++	+	+	+	++
NSIP, Gl	subacute	homo	++	+	+	++	+	+	+	++
NSIP, GII	"	"	+	+	+	+	-	+	+	+
NSIP, GII	"	"	+++	+	+	++	++	+-	-	+++
NSIP, GIII	"	"	++	+	+	++	-	+	+	ND

Mural Inc: Mural incorporation, Coll. Gl.: Collagen globules, Coll. Phago: Collagen phagocytosis
 homo: homogeneous, hetero: heterogeneous
 *: interstitial fibrosis is also predominant
 #: - means TIMP predominant, + means MMP predominant

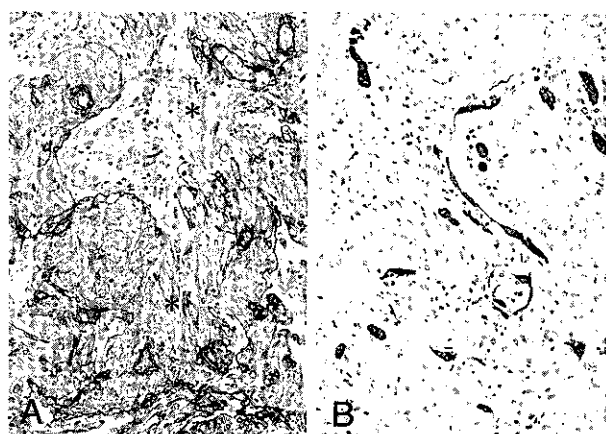


図1 Acute interstitial pneumonia (AIP)
 A:IV型コラーゲン陽性の上皮基底膜の分布から、早期の線維化が肺胞壁と肺胞腔内(*)の両者にあることが分かる。
 B:ケラチン陽性の上皮細胞は傷害が強く、線維化部を不連続に被うのみである。(免疫組織化学)

- 2) AIPでは、肺胞腔内線維化と同時に、肺胞壁にも線維化が認められた(図1A)。すなわち、活性化された間質細胞である筋線維芽細胞の増生が腔内のみならず肺胞間質を含め広汎に認められ、細胞外基質の産生が確認された。AIPでは、線維化はびまん性に一斉蜂起的に出現し、急速に肺胞構造は改染された。肺胞上皮細胞は、高度に傷害され、肺胞上皮細胞の剥離所見が広汎に認められた(図1B)。しかし、この時期を乗り越えた症例は治療に向かい、線維化も減少することが知られている。
- 3) BOOPとNSIPは、ともに細胞傷害性T細胞であるCD8優位の間質性肺炎であるといえる(図2A)。BOOPとNSIPの早期線維化巣は、類似の形態的、免疫組織化学的特徴を示した。すなわち、被覆上皮は肺胞上皮細胞が主体で再生が良好であり(図2B)、フィブロネクチンレセプターを介した間質との接着も良好であった(図2C)。また、再生肺胞上皮細胞下には、基底膜の

新生所見が明らかに認められた (図 2D)。また、早期線維化巣に出現する間質細胞は、 α 平滑筋アクチンの少ない筋線維芽細胞で、MMP が TIMP に比べ優位であり、電顕的にコラーゲンの貪食像が顕著であった (図 3)。細胞外には、膠原線維の他に、弾性線維の沈着も目立ち、血管の新生も認められた。

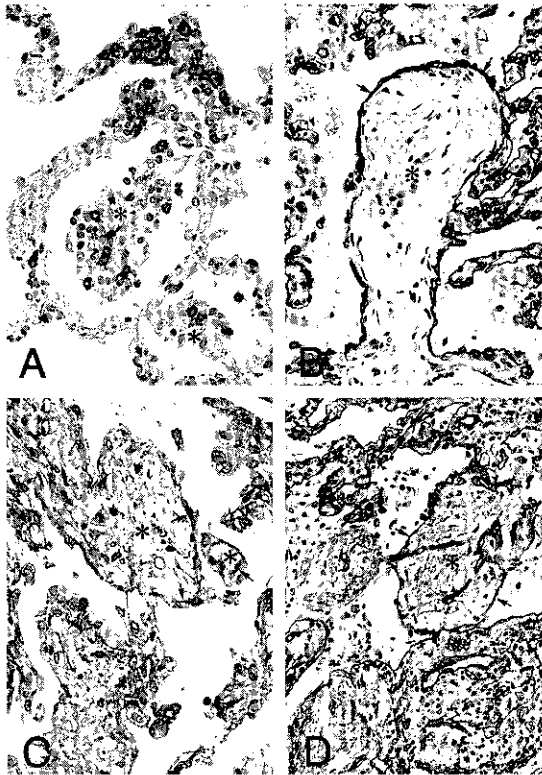


図 2 Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP)
 A: CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞は、肺胞腔内 (*) と肺胞壁に浸潤が目立つ。B: ケラチン陽性の再生肺胞上皮 (矢印) はポリープ型の腔内線維化 (*) を良く被覆している。C: フィブロンectinリセプター (矢印) は腔内線維化部 (*) を被う上皮細胞基底側に陽性である。D: ポリープ型の腔内線維化 (*) を被う上皮細胞直下には、IV 型コラーゲン (矢印) 陽性の基底膜が新生されている。(免疫組織化学)

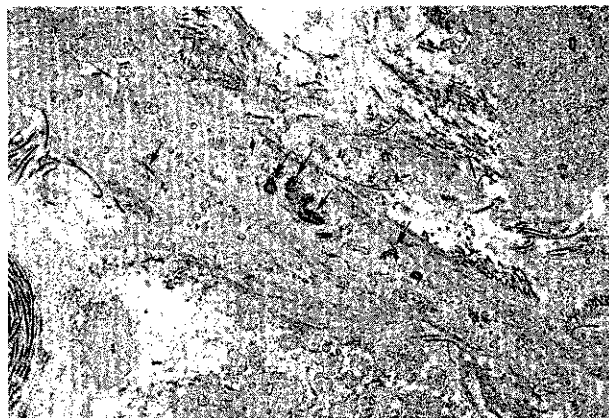


図 3 Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) の電顕像
 腔内線維化を構成する間質細胞には、著明なコラーゲンの貪食像をみる。線維化の吸収過程を示している。

4) BOOP と NSIP の違いは、早期肺胞腔内線維化巣の型が、BOOP では bud 型 主体で、NSIP では、 mural incorporation 型主体である点であった。その理由は、NSIP では肺胞上皮細胞の傷害が BOOP より強く、BOOP ではその再生がより良好であることが示唆された。

5) UIP の末期像である蜂巢肺は、肺胞構造の消失と細気管支上皮細胞の出現、壁の平滑筋増生が特徴であり、全層にわたる真の肺胞の細気管支化 (true bronchiolization) であった (図 4)。時に見られる NSIP の蜂巢肺 (microscopic cyst) は、上皮のみの細気管支化 (epithelial bronchiolization) であり、壁には、平滑筋の増生は認められなかった (図 5)。

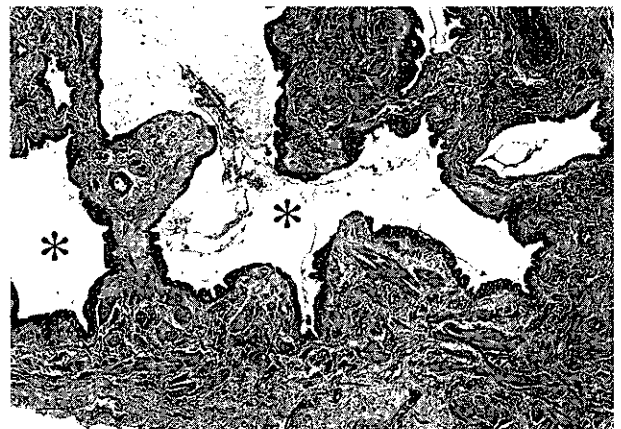


図 4 Usual interstitial pneumonia (UIP) の蜂巢肺
 蜂巢肺構造 (*) の内面は細気管支上皮に被われ、その壁には、平滑筋の増生をみる。肺胞領域の真の細気管支化 (true bronchiolization) を示している。



図 5 Nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) の蜂巢肺
 蜂巢肺構造 (*) の内面は細気管支上皮に被われるが、その壁には、平滑筋の増生を認めない。上皮のみの細気管支化 (epithelial bronchiolization) を示している。

6) UIPでは、蜂巢肺領域はもはや焼け跡であり、活動性の場合は早期線維化巣のみであった。UIPの早期線維化巣にみられた再生上皮は、末梢気道由来の扁平上皮化生細胞、硝子体保有細胞、大型立方上皮細胞であり、剥離傾向が強かった(図6A)。再生上皮下の基底膜新生は乏しく、早期線維化巣下の本来の肺胞上皮基底膜はBOOP, NSIPに比べ、逆に良く保存されていた(図6B)。早期線維化巣には、 α 平滑筋アクチンの多い筋線維芽細胞が出現し、TIMP-2がMMPに比べ優位であった。電顕的にもコラーゲンの貪食のまれな筋線維芽細胞であった(図7)。腔内線維化巣には、弾性線維形成、血管の進入は乏しかった。

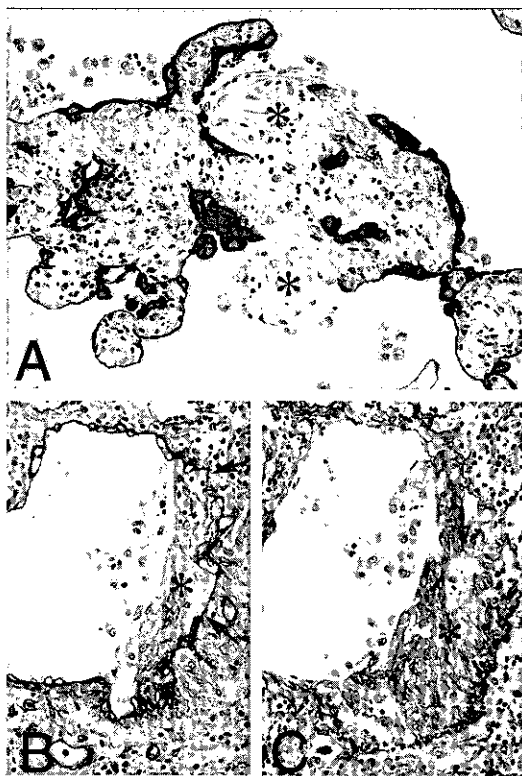


図6 Usual interstitial pneumonia (UIP)の早期線維化巣
A: ケラチン陽性の上皮細胞は、腔内線維化(*)を被うことが出来ずに、球状化、大型化を示している。B: IV型コラーゲン陽性の基底膜(矢印)は、腔内線維化の下に埋没しているが、良く保存されている。C: Bの連切標本で、III型コラーゲン陽性の膠原線維が、腔内線維化部に沈着していることを示す。(免疫組織化学)

7) BOOP, NSIPの線維化形成過程の特徴は、プレオマイシン肺線維症にみられたものと類似していた。すなわち、可逆性の線維化であった。ただし、プレオマイシンでは腔内線維化の型は、壁在型優位であり、その意味では、NSIPの線維症モデルといえる。

8) BOOP, NSIPの早期線維化巣での肺胞の再構築過程は、胎生後期の肺胞形成過程と類似していた。すなわち、間質の菲薄化、II型肺胞上皮細胞からI型への分

化が共通して観察された。その過程には、MMP-2の増加とその活性型の出現、MMP-2の活性化に関するMT1-MMPの再生増加が共通して観察された。



図7 Usual interstitial pneumonia (UIP)の早期線維化巣の電顕像
肺胞上皮細胞(左下)の剥離した上皮基底膜(矢印)には、腔内から、大型の筋線維芽細胞が付着している。UIPの筋線維芽細胞には、コラーゲンの貪食像はほとんど認められない。

考案・結論

1) AIPの活動期は、UIPの早期線維化巣に類似した傷害・線維化が広汎に起こっているとも考えられる。しかし、急性期、増殖期病変を乗り越えた症例は、UIPと異なり、一見するとNSIPと同様に肺胞の再構築、治癒へと向かう^{11,12)}。治療の観点からは、急性期、増殖期病変をいかに抑え、回復期に持っていけるかが重要であるといえよう。

2) BOOP, NSIPは、類似の病態であり、臨床的にも経過を追って移行する症例が報告されている。病態としては、CD8の関与、病理形態的には、傷害の質、線維化巣に出現する上皮、間質細胞、血管にも多くの共通点が認められる。異なるのは傷害の程度に原因する腔内線維化の型の違いである^{7,8,13)}。肺胞腔内線維化の特徴からは、BOOPはポリープ型優位の間質性肺炎 bud predominant IP (BIP)、NSIPは壁在型優位の間質性肺炎 mural incorporation predominant IP (MIP)といえる⁷⁾。

BOOP, NSIPでは、治療に反応すると考えられる活動性の所見は、肺胞領域に広汎に認められる^{14,15)}。またその線維化は、可逆的な一般の創傷治癒過程にみられる肉芽・線維化の所見に一致している。無治療で治癒する症例があるのはそのためであろう。しかし、NSIPの重症型では、治療として、行き過ぎた炎症を抑えること、上皮細胞の再生を促すこと、間質細胞の増生を抑えること、

細胞外基質の産生沈着を抑えること、細胞外基質の消化・吸収を促すことが必要であろう。

3) UIPのみが、真に不可逆的な間質性肺炎であると言える。そのため現時点では、UIPの進行例には、移植以外に根本的な治療法はないということになる。

UIPの病変のなかで治療の対象となり得る部分は活動性の早期線維化巣である。しかし、その分布は疾患の活動性を反映して、落ちついた症例では皮肉にも巣状に認められるにすぎない。しかしながら、その進行を止める方法が開発されれば、早期に発見して維持療法という選択肢も可能となるであろう。

UIPの早期線維化巣の特徴は、BOOP、NSIPとは異なる不可逆的な線維化である。このことは、全く新たな治療法の実現が必要であることを示している。治療法開発の方向性としては、(1)肺胞上皮細胞の障害を防ぎ、再生を促すこと。(2)筋線維芽細胞の性格を一般の肉芽の間質細胞に変えること。(3)TIMP優位の環境をMMP優位なものとする。こと。(4)線維化巣に血管の侵入を促すことであろう。細気管支上皮化、扁平上皮化は、肺胞が失われたための二次的な変化なので治療のターゲットにはならないであろう^{16,17)}。蜂巣肺領域自体から肺胞を再生することは無理としても、将来的には、周囲の正常肺胞領域から肺胞を新たに再生させることが可能性としては残ると考えられる。

参考文献

- 1) Colby TV, Carrington CB: Interstitial lung disease. In Pathology of the Lung. Second edition. edited by Thurlbeck WM *et al.* Thieme Medical Publishers, Inc., New York, 1995, p589-737
- 2) Kuhn C, West WW, Craighead JE, Gobbs AR: Lungs. In Anderson's Pathology. vol.1. Third edition. edited by Damjanov I and Linder J, Mosby, St. Luis, 1996, p1470-1559
- 3) 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* 1998, 78: 687-698
- 4) Katzenstein AA: Pathogenesis of "fibrosis" in interstitial pneumonia. *Hum Pathol* 1985, 16: 1015-1024
- 5) Fukuda Y, Ferrans VJ, Schoenberger CI, Rennard SI, Crystal RG: Patterns of pulmonary structural remodeling following experimental paraquat toxicity: The morphogenesis of intraalveolar fibrosis. *Am J Pathol* 1985, 118: 452-475
- 6) Kuhn C, and McDonald JA: The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis.

- Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 1991, 138: 1257-1265
- 7) Fukuda Y, Mochimaru H, Kawamoto M, Terasaki Y, Kudo S: Pulmonary structural remodeling in pulmonary fibrosis. *Chest* in press
- 8) Usuki J, Fukuda Y: Evolution of three patterns of intraalveolar fibrosis produced by bleomycin in rats. *Pathol Intern* 1995, 45: 552-564
- 9) Yaguchi T, Fukuda Y, Ishizaki M, Yamanaka N: Immunohistochemical and gelatin zymography studies for matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Pathol Intern* 1998, 48: 954-963
- 10) Fukuda Y, Ishizaki M, Okada Y, Seiki M, Yamanaka N: Localization of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in developing fetal rabbit lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 279: L555-L561
- 11) Katzenstein AA, Myers JL, Mazur MT: Acute interstitial pneumonia. A clinicopathologic, ultrastructural, and cell kinetic study. *Am J Surg Pathol*, 1986, 10: 256-267
- 12) Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, Masugi Y: The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* 1987, 126: 171-182
- 13) Basset F, Ferrans VJ, Soler P, Takemura T, Fukuda Y, Crystal RG: Intraluminal fibrosis in interstitial lung disorders. *Am J Pathol* 1986, 122: 443-461
- 14) Epler GR, Colby TV, McLoud TC, Carrington CB, and Gaensler EA: Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *New Engl J Med* 1985, 312: 152-158
- 15) Katzenstein AA, Fiorelli RF: Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. *Am J Surg Pathol* 1994, 18: 136-147
- 16) Fukuda Y, Takemura T, Ferrans VJ: Evaluation of metaplastic squamous cells of alveolar walls in pulmonary fibrosis produced by paraquat: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Virchows Arch [B]* 1989, 58: 27-43
- 17) Betsuyaku T, Fukuda Y, Parks WC, Shipley JM, Senior RM: Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am J Pathol* 2000, 157: 525-535

HGFによる肺線維症遺伝子治療の臨床応用

三木 誠 秋山 健一 海老名雅仁 渡辺 正之
鯉沼代 造 萩原 弘一 中村 晃 貫和 敏博*

特発性間質性肺炎に対する hepatocyte growth factor (HGF) を用いた遺伝子治療法の確立と臨床応用を目的とし、その前段階としてマウス肺臓炎モデルにて方法論および有効性を検討した。

HGF 発現アデノウイルスベクター (Ad-HGF) を経気道的、経血管的、経腹腔的に投与し、HGF 蛋白の肺内発現を ELISA 法で確認した。経気道的投与は、少ないベクター量 (4×10^7 pfu) で高容量 (312.5 ± 63.4 ng/g tissue, day 3) の HGF を発現させたにも関わらず、ウイルスベクターが炎症を遷延させてしまい、肺臓炎を軽快させるに至らなかった。Ad-HGF の経腹腔的投与 (6×10^8 pfu) では、HGF を肝臓で発現させ、血行性に肺に到達し (231.3 ng/g tissue, day 3)、マウス肺臓炎モデルにて有意にヒドロキシプロリン量を減少させ ($177 \pm 9\%$ vs. $128 \pm 5\%$, $p < 0.005$)、線維化を改善した。さらに、HGF は肺胞上皮細胞のアポトーシスを抑制 ($35 \pm 4\%$ vs. $13 \pm 1\%$, $p < 0.05$) して肺の傷害を防ぎ、また TGF- β を減弱して線維化を抑制することも判明した。経血管的投与では、約 1/10 のウイルスベクター投与量で経腹腔的投与と同様の結果が得られた。また、naked plasmid DNA や macro-aggregated albumin (MAA) 結合 plasmid DNA を用いて、肺での HGF 発現に成功し、より安全性の高い遺伝子治療法を検討している。

本研究は、HGF による遺伝子治療のベクター開発、実効的投与経路を確立、その有効性を実証し、臨床応用への可能性を示唆した。

Clinical application of gene therapy with HGF for idiopathic pulmonary fibrosis

M. Miki, K. Akiyama, M. Ebina, M. Watanabe,
D. Koinuma, K. Hagiwara, A. Nakamura, T. Nakamura and T. Nukiwa

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

Hepatocyte growth factor (HGF) is a humoral mediator of epithelial-mesenchymal interactions, acting on a variety of epithelial cells as mitogen, motogen, and morphogen. Exogenous HGF acts as a hepatotrophic factor and an organotrophic factor during experimental injury. We have already reported that exogenous HGF protein acts as a pulmotrophic factor *in vivo* and prevents the progression of bleomycin (BLM)-induced lung injury when administered in either a simultaneous or delayed fashion. HGF is a potent candidate to prevent or treat lung fibrosis.

On the basis of these findings and in order to step up for the clinical application of HGF in the field of respiratory diseases, we examined the adenoviral mediated HGF treatment. While the direct intratracheal administration of adenoviral vector expressing rat HGF (Ad-HGF) (4×10^7 pfu) yielded high transient HGF expression in the lung (312.5 ± 63.4 ng/g tissue, day 3), adenovirus caused neutrophil alveolitis and extended the duration of BLM-induced inflammation. In spite of indirect intraperitoneal (i. p.) administration of Ad-HGF (6×10^8 pfu) to C57BL/6 mice with BLM-induced lung fibrosis expressing 231.3 ng/g of rat HGF in lung tissue at day 3, the significantly reduced hydroxyproline content ($128 \pm 5\%$) was resulted, comparing with the mice treated by adenovirus without cDNA insertion (Ad-Null, $177 \pm 9\%$, $p < 0.005$). Furthermore, the ratio of apoptotic cells per total alveolar cells in BLM-induced lung injury was reduced by the i. p. administration of Ad-HGF ($35 \pm 4\%$ vs. $13 \pm 1\%$, $p < 0.05$). Ad-HGF also reduced the expression of TGF β mRNA induced by BLM in the lung. Intravenous administration of Ad-HGF (4×10^7 pfu) ameliorated BLM-induced lung fibrosis as well as i.p. (6×10^8 pfu). These results indicate the potential therapeutic effect of Ad-HGF for lung fibrosis, and the necessity to establish a route of a vector administration avoiding additional infection to diseased lung.

We also have established the safer method using plasmid vector conjugated with macro-aggregated albumin (MAA) for expressing HGF specifically in the lung thorough lung vessels. We concluded that the gene therapy using HGF is promising field for lung fibrosis.

はじめに

肺線維症は、肺実質が慢性進行性に炎症および線維化、すなわち肺胞の虚脱、間質への膠原線維の蓄積など肺胞構造のリモデリングをきたし、ひいては呼吸不全に至る予後不良な疾患である¹⁾。感染症や膠原病に伴い二次性に起こることもあるが、主として病因不明の特発性間質性肺炎 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) に代表される。我々は IPF にも家族性集積が認められることを報告してきた²⁾が、現時点では IPF に特異的な遺伝子異常は解明されていない。一方 IPF に対して現在まで確立された治療法はなく、通常ステロイドやサイクロフォスファミドなどの免疫抑制剤が用いられているが、反応は不良であることから、新規薬剤の開発が待たれている^{3,4)}。

我々は、特発性間質性肺炎患者肺組織における HGF の発現とその重要性を示し^{5,6)}、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) のリコンビナントタンパクを用いて、実験的肺線維症の制御を試みてきた。その結果、肺傷害モデル完成後の HGF 投与によっても線維化は有意に抑制される事実を報告し、HGF が肺においても器官再生因子として機能することを明らかにした⁹⁾。しかし臨床応用を想定した場合、十分量の HGF タンパクが入手困難と思われる。そこで本研究では HGF 発現アデノウイルスベクター (Ad-HGF) を用い、遺伝子導入による外因性 HGF 発現が HGF リコンビナントタンパク投与と同様に肺線維化を抑制するかについて、さらには安全で有効なベクターと投与経路の探求により遺伝子治療の確立を目的とし、ヒトへの臨床応用する前段階として、HGF 発現アデノウイルスベクターおよび HGF 発現プラスミドベクターを開発し、とマウス肺臓炎モデルにおける有効性を検討した。

方 法

1) HGF 発現アデノウイルスベクター (Ad-HGF) と HGF 発現プラスミドベクター (pUC-SR α -HGF) の作製

Graham らの方法¹⁰⁾に従って作製された CAG プロモーターを含むラット HGF 発現アデノウイルスベクター (Adex1CAHHGF: Ad-HGF) を札幌医科大学浜田先生より供与された (図 1)。ウイルス液の力価は、293 細胞を使用したプラーク・アッセイにて測定し、pfu (plaque forming units) にて表示した。Ad-HGF の DNA を抽出し、E1A 領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行い、同領域の混入が無いことを確認した。対照としては、外来性の挿入遺伝子を組み込んでいない非増殖型アデノウ

東北大学加齢医学研究所腫瘍制御部門呼吸器腫瘍研究分野

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

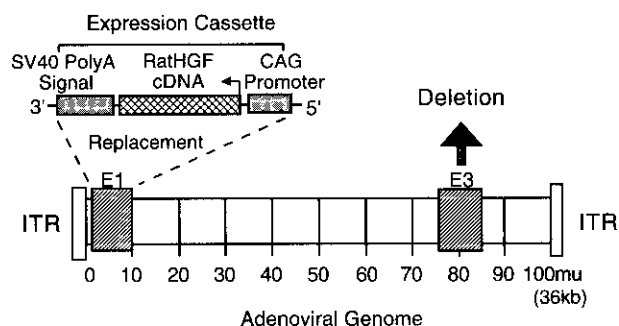


図 1 Structure of recombinant adenovirus vector containing rat HGF cDNA.

The recombinant vector (Adex1CAHHGF:Ad-HGF) is constructed from Ad5-derived virus that has a deletion of E1a, E1b and a portion of E3 regions.

ルスベクター Ad-Null) を使用した。

HGF 発現プラスミドベクターは、ヒト HGF cDNA および SR α プロモーターを pUC- プラスミドに組み込み作製した (pUC-SR α -HGF)。また、肺特異的発現のため、Orson らの方法¹¹⁾に従い、凝集マクロアルブミン (macroaggregated albumin: MAA) を結合した pUC-SR α -HGF を作製し、経血管的に投与して肺での発現を調べた。

2) Northern blotting

Ad-HGF を A549 細胞や C57BL/6 マウスに感染させ *in vitro* および *in vivo* での発現を Northern blotting 法にて確認した。また、Ad-HGF を投与後、day3 の肺のホモジネートから Acid guanidine phenol chloroform (AGPC) 法にて total RNA を抽出し、ラット HGF および線維化の中心的役割を担っている TGF- β の mRNA 発現量を Northern blotting 法にて定量した。対照として、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) プローブを用いた。

3) Enzymed-linked immunosorbent assay (ELISA)

Ad-HGF を C57BL/6 マウスに感染させた後の発現量の経時的変化を ELISA 法にて定量した。Ad-HGF を投与後、day0, 3, 7, 14 の肺のホモジネートを遠心後、上清を rat HGF ELISA キット (Institute of immunology, Tokyo, Japan) を用いて、蛋白量を測定した。pUC-SR α -HGF による HGF 蛋白発現の定量には、human HGF ELISA キット (Institute of immunology, Tokyo, Japan) を用いた。

4) *in situ* hybridization (ISH)

経気道的に投与した際の発現部位を同定するため、ISH を行った。Ad-HGF を C57BL/6 マウスに感染させ、day3 の肺の凍結切片を作製し、digoxigenin (DIG) 標識 HGF リボプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体を反応させ、酵素触媒による発色反応を行い、検鏡した。

5) マウスブレオマイシン肺臓炎モデル

C57BL/6 マウス (メス, 8 週齢) に bleomycin chlorate 0.75mg を隔日 4 回 (day 1, 3, 5, 7) 腹腔内投与して肺の線維化を惹起した。ブレオマイシン投与開始 28 日後にマウスを屠殺し, 気管より 4% パラホルムアルデヒドを注入し伸展後に肺を摘出し, 固定した。左肺はハイドロキシプロリン含量の測定に用い, 右肺はパラフィン包埋後, 5 μ m に薄切し, 病理形態学的評価のために Hematoxylin-Eosin (HE) および Elastica-Masson (EM) 染色標本を作製して, 線維化の程度を判定した。

実効的投与経路の探索を目的として, Ad-HGF を day0 に経気道的, 経腹腔的, 経血管的に投与し, 正常なマウスにおける経時的な HGF 蛋白の肺内分布量を ELISA 法で定量した。また, 上記モデルに投与して, 治療効果を判定した。対照群として PBS および Ad-Null を同様の方法で投与した。

6) ハイドロキシプロリン・アッセイ

Woessner らの方法¹²⁾に準じて行った。すなわち, マウス右肺を乾燥粉碎後, 6N 塩酸にて 110 $^{\circ}$ C で 16 時間加水分解し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC: high performance liquid chromatography) にてハイドロキシプロリン含量を測定した。

7) 気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF)

炎症の程度を評価するため, day3 の BALF を解析した。気管支肺胞洗浄は生理食塩水 1ml で計 8 回行い, 約 90% を回収した。1500rpm で 5 分間遠心後, 沈殿した細胞成分を RPMI 液に再浮遊させ細胞数と細胞分画を調べた。

8) Tunel 法

Ad-HGF 投与後, day7 の肺のパラフィン切片を作製し, *In situ* Apoptosis detection kit (Takara, Tokyo, Japan) を用い, 肺胞上皮細胞のアポトーシス評価を Tunel 法で解析した。

9) 統計学的検討

統計学的解析には, 異なる 2 群のデータを対応のない Student's t-test を用いて検定し, 危険率 5% 以下を有意差ありとした。

結 果

Ad-HGF によるラットの HGF の発現

Ad-HGF を肺胞上皮細胞由来の癌細胞である A549 細胞に感染させ, ラットの HGF mRNA の発現を Northern blotting 法で, 培養液中への HGF 蛋白の分泌を ELISA 法

にて確認した(データ呈示せず)。In vivo でも, C57BL/6 マウスに 3 経路 (経気道的, 経腹腔的, 経血管的) より感染させ, 実際に発現し肺内に分布することを Northern blotting 法と ELISA 法にて確認した (図 2, 4, 8)。

実効的投与経路の決定

Ad-HGF を経気道的, 経腹腔的, 経血管的に投与し, 臨床応用する際の実効的な投与経路を探索した。Ad-HGF (4×10^7 pfu) を経気道的に投与した結果, 気道上皮細胞 (図 3a), 肺胞マクロファージ, 肺胞上皮細胞 (図 3b) で HGF を過剰発現させることに成功した。投与 3 日後には 312.5 ± 63.4 ng/g tissue の HGF 蛋白が発現し, 7 日後にピーク (350.9 ± 10.4) となり, その後漸減した。しかし, 経気道的投与は, 高容量の HGF を発現させたにもかかわらず, アデノウイルス (ベクター) が BALF 中の炎症細胞数を増加させて炎症を遷延させてしまい (図 5), プレオ

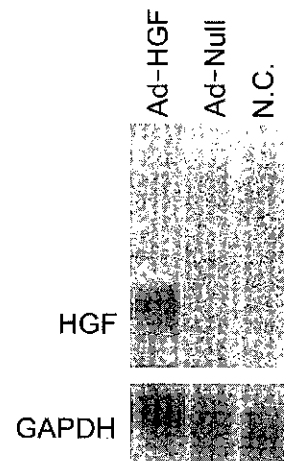


図 2 Expression of the rat HGF transcripts in the mice lung transfected with Ad-HGF.

Shown are autoradiograms of Northern blot analysis of HGF mRNA from the lung 3 days after intratracheal administration of Ad-HGF. Total RNA (20 μ g) from Ad-HGF-treated, Ad-Null-treated, and control mice at day 3 were electrophoresed in 1% agarose, blotted, and hybridized with 32 P labeled rat HGF cDNA. The HGF mRNA from the transgene was indicated at 2.6 Kb.

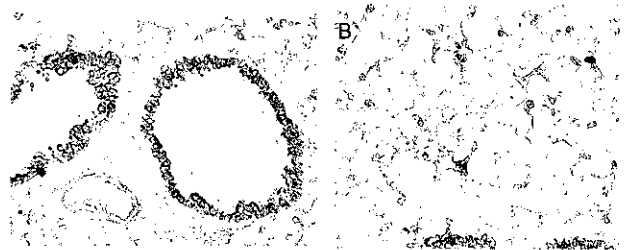


図 3 Localization of the rat HGF mRNA in the mice lung transfected with Ad-HGF.

In situ hybridization (ISH) with HGF antisense probe showed that the bronchial cells (A), alveolar epithelial cells (B) and alveolar macrophages (B) expressed rat HGF mRNA.

マイシン投与開始 28 日後のマウス肺標本所見にて、肺臓炎を軽快させるに至らなかった (図 6)。ハイドロキシプロリン量もコントロール群と有意差を認めなかった (図 7)。

経腹腔的投与では、経気道的投与の 15 倍量の 6×10^6 pfu を投与し、肝臓で発現させ、血液を介して、肺に 231.3 ng/g tissue (day3) の HGF 蛋白を分布させた (図 8)。ブレオマイシン投与開始 28 日後のマウス肺標本所見では、Ad-HGF 投与群において明らかな線維化像を認めず (図 9)、ハイドロキシプロリン量もコントロール群と比

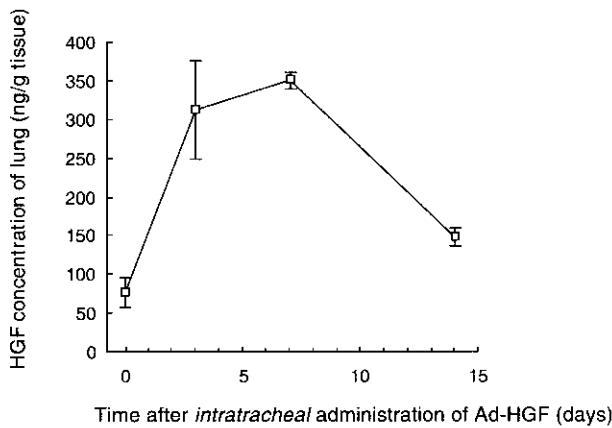


図 4 Quantitative analysis of HGF transgene expression in the lungs of mice after intratracheal administration of Ad-HGF. The time course of the HGF mRNA expression was examined by ELISA 0, 3, 7, and 14 days after administration of Ad-HGF (4×10^6 pfu) (n=3 each). The expression levels reached maximum level between day 3 (312.6 ± 63.4 ng/g tissue) and day 7 (351.0 ± 10.4 ng/g tissue), and gradually decreased until day 14 (149.1 ± 11.4 ng/g tissue).

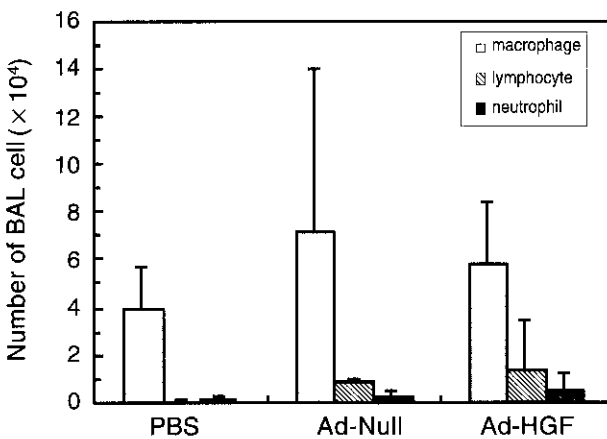


図 5 Distribution of BAL cell types in mice after intratracheal administration of adenoviral vectors. Mice were administered intratracheally with Ad-Null, Ad-HGF, or PBS as control, and bronchoalveolar lavage (BAL) was performed to determine leukocyte cell number and composition. Increased pulmonary accumulation of leukocytes, especially lymphocytes and neutrophils, were detected at day 3 after administration of adenoviral vectors, Ad-HGF as well as Ad-Null.

較し、有意に減少させた ($177 \pm 9\%$ vs. $128 \pm 5\%$, $p < 0.005$) (図 10)。

経静脈的投与 (4×10^7 pfu) でも、Ad-HGF 投与群において明らかな線維化像を認めず (データ呈示せず)、ハイドロキシプロリン量もコントロール群と比較し、有意に減少させた ($149.4 \pm 24.0\%$ vs. $127.6 \pm 14.9\%$, $p < 0.05$) (図 11)。

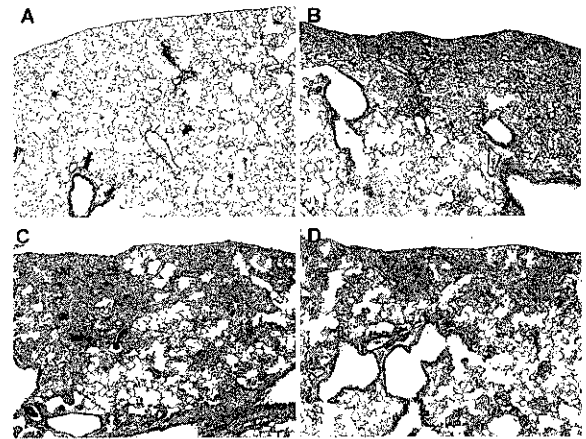


図 6 Histopathology of bleomycin-injured lungs and adenoviral vector-treated lungs.

Adenoviral vectors were administered intratracheally at day 0, and then BLM instillation intraperitoneally at day 1, 3, 5 and 7. Mice were sacrificed at day 28 for histopathological study, and the lung sections were evaluated by H & E staining (data not shown) and Elastica-Masson staining (A to D). Mice treated with Ad-HGF (4×10^6 pfu) (C) did not improve the fibrotic changes induced by BLM infusion, and showed the similar histopathological findings to BLM only (B) and BLM with Ad-Null treated mice (D) ($\times 40$). A was negative control without BLM and adenoviral vector.

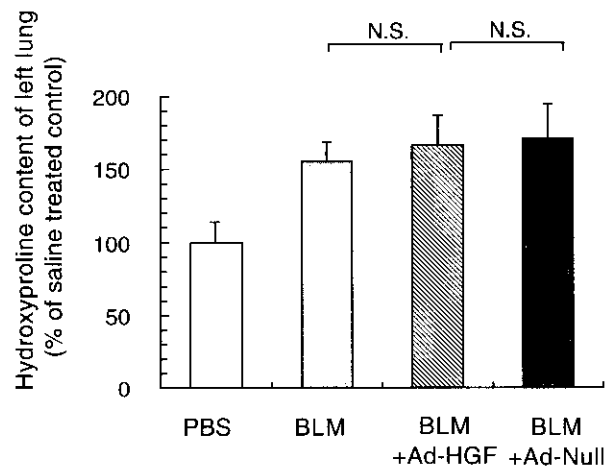


図 7 Analysis of lung collagen content quantitated by hydroxyproline assay. Whole collagen content was evaluated by determining hydroxyproline content of left lung at day 28, and the values were shown as % of saline treated control. Intratracheal administration of Ad-HGF (▨) did not affect lung hydroxyproline content in BLM-injured mice, and has significant difference from Ad-Null (■) (n=5 in each group).