

肺気腫患者における喫煙とHRCTの関連

児玉 昌身 木村謙太郎* 石原 英樹 長谷川克子
田村 慶朗 相谷 雅一 川幡 誠一

目的

肺気腫患者におけるHRCTによるLAAの検出は早期診断に有用である。HRCTはCT値やvisual scoreによる形態的重症度分類法が確立し機能的重症度をあらわすFEV_{1.0}%や%DLCOとの関連も認められている。今回我々は肺気腫の最大の危険因子である喫煙がどのように形態学的変化に影響しているかをvisual score法との関連により検討した。

対象と方法

1997年より当科で作成している肺気腫患者データベースよりHRCTと精密呼吸機能検査を実施している患者で喫煙歴のある174名（男性133名、女性41名）を対象とした。喫煙のパターンとしては断煙の有無や断煙の時期、喫煙開始年齢を喫煙の程度として一日喫煙本数、喫煙期間、喫煙指数を用いVSとの関連について検討した。断煙の時期は発症前後に分けたが息切れや咳などの症状が出現した年齢を発症年齢とした。喫煙開始年齢は18歳前後に分けた。

HRCT検査はSIEMENS社Somatom PlusとSomatom Plus4を用いウインドーレベル-700HU、ウインドー幅

1200HU、ビーム幅1mm、120KV、200mAで行った。撮影は背臥位、深吸気の状態で行った。HRCTの評価はGoddardらによる5段階視覚的評価法を用いスコア化した。（左右上中下肺野について0点から4点の5段階にスコア化しその合計点数をvisual score (VS) とした。）VSは患者背景を知らない当科の医師2名により決定した。

VSと呼吸機能検査（FEV_{1.0}%とDLCO/VA）との相関を検討した。

喫煙パターンの肺気腫の重症度への影響を断煙によるVSの違いや断煙時期の差によるVSの違い、喫煙開始年齢によるVSの違いを検討する事により調べた。

喫煙の程度が肺気腫の重症度に影響するのかを検討するため1日喫煙本数、喫煙期間、喫煙指数とVSの相関を調べた。これらが断煙の有無や喫煙開始年齢などの喫煙パターンの影響を受けるかについても検討した。

喫煙パターンで分けた患者群に喫煙の程度の違いがあるかについても検討した。

初回から4～5年後にHRCTを再検されている23名についてはVS、FEV_{1.0}%、DLCO/VAの経年的変化を示した。また喫煙開始年齢の違いによるVSの経年変化の差を変化率で検討した。変化率は（4～5年後VS-初回

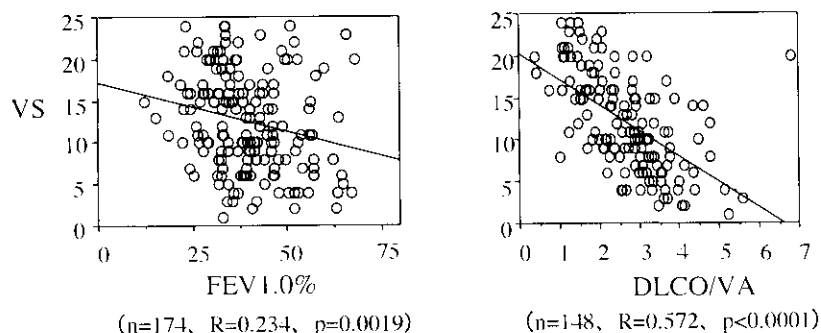


図1 FEV_{1.0}%、DLCO/VAとの相関

大阪府立羽曳野病院呼吸器科

*「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

VS) / 初回VSで算定した。

解析は、unpaired t-testをと単回帰分析を行い相関係数(R)とp値を算出した。p値は0.05以下を有意とした。

結果

1. VSと呼吸機能検査の相関 (図1)

昨年度の我々の報告と同様にFEV_{1.0}%は174名で検討したところR=0.234と低いがp値は0.0019と有意でDLCO/VAは148名で検討しR=0.572、P<0.0001と有意な相関を認めた。

2. 喫煙パターンとVSの関係 (図2)

断煙の有無の2群でVSを比較した。断煙ありは141名で断煙なしは33名であった。mean ± SDはそれぞれ12.482 ± 5.705、12.515 ± 6.190でp値は0.9766と有意差は認められなかった。次に断煙の時期を前後の2群に分け

検討した。発症前の断煙が29名で発症後が112名であった。mean ± SDはそれぞれ12.759 ± 6.081、12.411 ± 5.631でp値は0.7709と有意差を認めなかった。喫煙開始年齢を18歳以下(41名)と19歳以上(133名)の2群に分けて検討した。mean ± SDはそれぞれ14.390 ± 5.357、11.857 ± 5.753でp値は0.0132と有意差を認めた。

3. 喫煙の程度とVSの相関

対象患者全体174名で検討した。1日喫煙本数に対してはR=0.036、p値0.6407と相関を認めなかった。喫煙期間に対してはR=0.107、p値0.1616と相関はなかった。喫煙指数でもR=0.099、p値0.1959と相関はなかった。断煙の有無の2群でも検討した。141名の断煙あり患者のうち140名での検討では1日喫煙本数に対してはR=0.017、p値0.8382で喫煙期間に対してもR=0.081、p値0.3399、喫煙指数に対してもR=0.062、p値0.04658と相

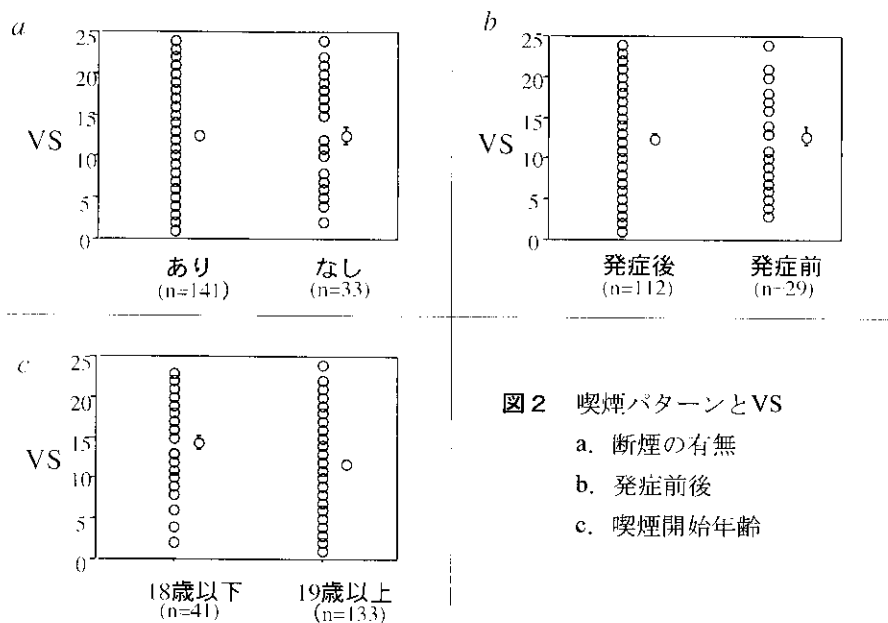


図2 喫煙パターンとVS

- a. 断煙の有無
- b. 発症前後
- c. 喫煙開始年齢

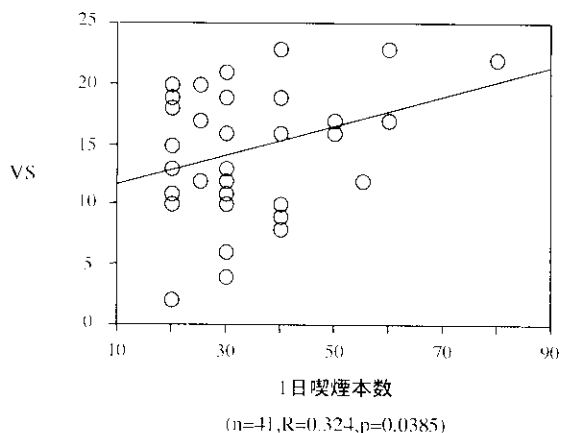


図3 喫煙開始が18歳以下の患者

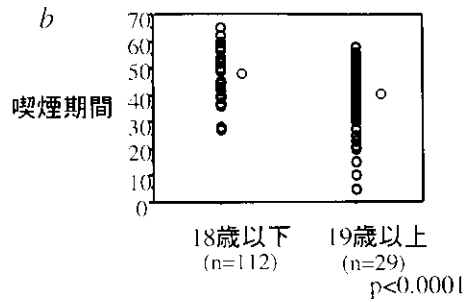
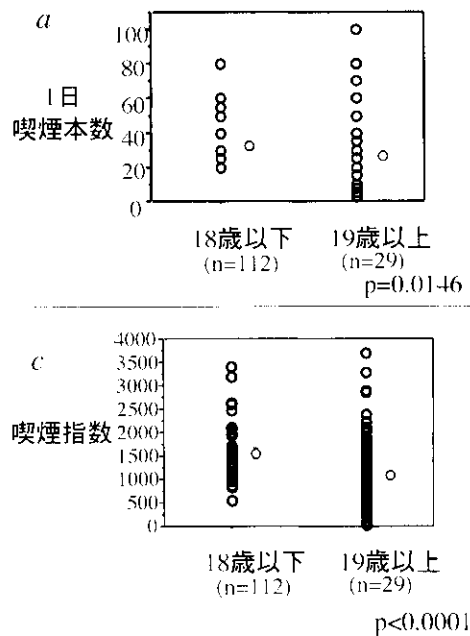


図4 喫煙開始年齢による喫煙の程度

- a. 1日喫煙本数
- b. 喫煙期間
- c. 喫煙指数

関は認められなかった。33名の断煙していない患者で検討した。1日喫煙本数に対しては $R=0.137$ 、 p 値 0.4475 で喫煙期間に対しては $R=0.220$ 、 p 値 0.2192 で喫煙指数に対しては $R=0.260$ 、 p 値 0.1445 と相関は認められなかった。VSに有意差を認めた喫煙開始年齢について174名で検討した。18歳以前に喫煙を開始した41名では1日喫煙本数に対して $R=0.324$ 、 p 値 0.0385 と若干の相関を認めた。(図3) 喫煙期間に対しては $R=0.028$ 、 p 値 0.8602 で喫煙指数に対しては $R=0.285$ 、 p 値 0.0705 と相関は認められなかった。19歳以後に喫煙を開始した133名では1日喫煙本数に対して $R=0.087$ 、 p 値 0.3180 で喫煙期間に対しては $R=0.069$ 、 p 値 0.4331 で喫煙指数に対しては $R=0.025$ 、 p 値 0.7786 と相関は認められなかった。

4. 喫煙パターンと喫煙の程度の間連

喫煙パターンでVSと有意差を認めた喫煙開始年齢について喫煙の程度との関連を検討した。1日喫煙本数は18歳以下 32.972 ± 14.360 、19歳以上 26.436 ± 14.847 (mean \pm SD)、 p 値 0.0146 と有意差を認めた。喫煙期間と喫煙指数でもそれぞれ18歳以下 48.049 ± 8.680 、19歳以上 40.323 ± 9.897 、 p 値 <0.0001 、18歳以下 1556.098 ± 657.189 、19歳以上 1080.376 ± 640.212 、 p 値 <0.0001 と有意差を認めた。(図4) 断煙の有無、断煙の時期と喫煙の程度では有意差は認められなかった。

5. 肺気腫患者の経年的変化

24名の肺気腫患者で4~5年後のVSの経過を見ることができた。(図5) 断煙ありが23名で発症前に断煙した

者は2名であった。1名は断煙していなかった。VSは有意に増加し、 $FEV_{10}\%$ と $DLCO/VA$ は有意に減少していた。(図6,7) VSの変化率を喫煙開始年齢(18歳以上が8名、19歳以上15名)で比較したが p 値 0.2208 と有意差は認められなかった。(図8,9)

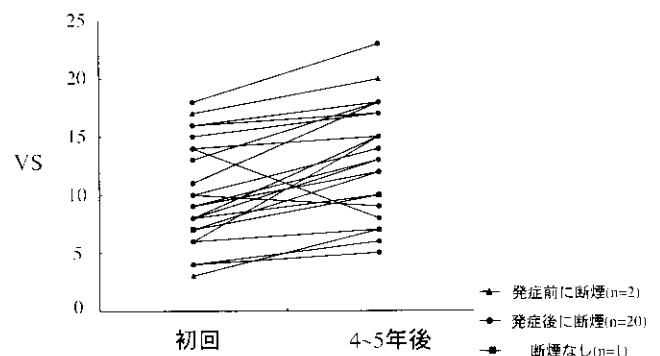


図5 VSの経年変化

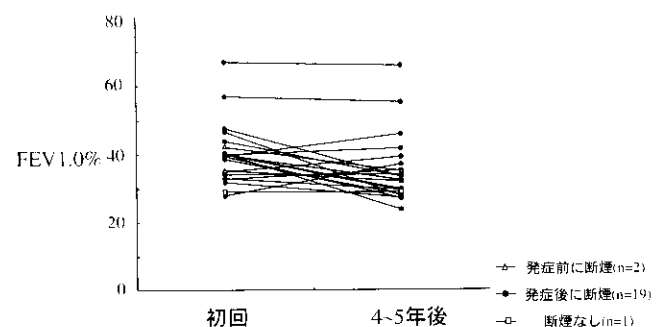


図6 $FEV_{10}\%$ の経年変化

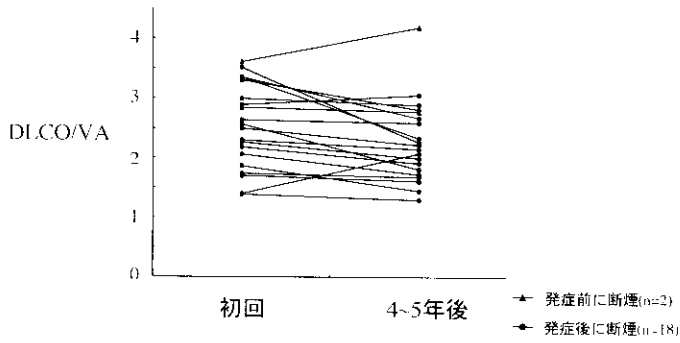


図7 DLCO/VAの経年変化

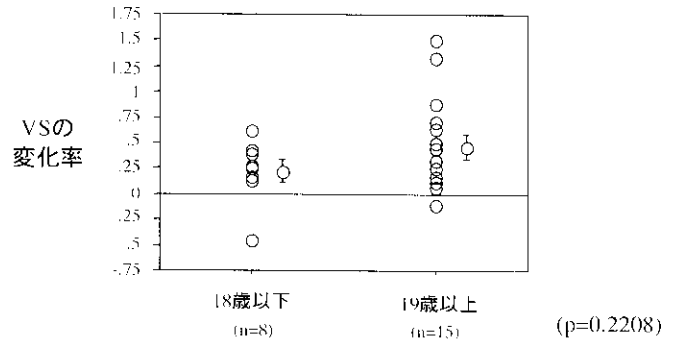


図9 VSの変化率

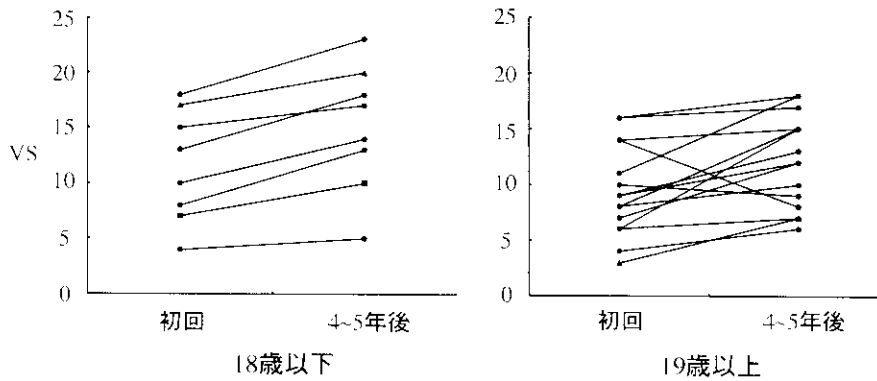


図8 喫煙開始年齢別のVS経年変化

考察

喫煙様式の違いとVisual scoreとの関連により肺気腫に対する喫煙の影響を検討した。FEV_{1.0}%とDLCO/VAとVSに有意な相関がみとめられた。断煙の有無や断煙時期の違いはVSに影響しなかったが喫煙開始年齢が18歳以前から開始している患者では19歳以降に喫煙を開始した患者より有意にVSが高かった。患者全体と断煙した患者、断煙していない患者と喫煙開始年齢で分けた患者で1日喫煙本数、喫煙期間、喫煙指数とVSに相関を検討したが18歳以前に喫煙を開始した患者では1日喫煙本数とVSに相関を認めたがその他では相関がなかった。喫煙パターンで分けた患者群で喫煙の程度に違いがあるかの検討では18歳以前に喫煙を開始した患者で有意に1日喫煙本数、喫煙期間、喫煙指数が高く強い喫煙の影響を受けていた。VSの経年的変化の観察ではVSは徐々に高くなり、FEV_{1.0}%、DLCO/VAは徐々に低下した。喫煙開始年齢別のVSの経年的変化の比較では有意差は認められなかった。

今回の検討方法では喫煙様式の肺気腫のVSを用いた形態学的重症度に対する影響は明らかにできなかった。しかし若年からの喫煙は有意にVSを上昇させ1日喫煙本数とVSと相関を認め、また若年からの喫煙を開始し

た患者は1日喫煙本数、喫煙期間、喫煙指数ともに有意に高く喫煙の影響を強く受けていると考えられる。このことより若年から喫煙の影響を受けることは肺の気腫化の進行に影響していると考えられた。

参考文献

- 1) Goddard PR, Nicholson EM, Laszo G, et al, Computed tomography in pulmonary emphysema. Clin Radiol 33: 379-387, 1992.
- 2) 栗山喬之、若年性肺気腫診断基準、総括報告、厚生省特定疾患呼吸不全調査研究班、平成10年研究報告書：1-5、1998.
- 3) 中野 博、檜田祐一、川村治子他：X線CTの肺気腫診断における有用性-肺気腫、SABとの対比 日胸疾会誌 26：602-611、1988.
- 4) 江田清一郎、久保恵嗣、小林俊夫他：肺気腫のヘリカルCT所見と肺機能の相関 厚生省特定疾患呼吸不全調査研究班、平成7年研究報告書：63-66、1995.
- 5) 当院の肺気腫患者の臨床的検討-HRCTの視覚的評価法を中心に 厚生省特定疾患呼吸不全調査研究班、平成11年研究報告書：43-45、1999.

COPD重症度と6分間歩行距離（6MD）および 運動時肺循環動態に対する酸素吸入効果

藤本 圭作 松沢 幸範 小泉 知展 宮原 隆成
山口 伸二 久保 恵嗣*

はじめに

慢性肺気腫では、運動時低酸素血症が軽度でありながら、労作時息切れのため日常生活が強く制限されることがしばしば経験される¹⁾²⁾。このような患者に在宅酸素療法（HOT）が適応基準外であっても導入される症例が増加しているのが現状である³⁾。しかし、HOT 適応外の COPD 患者に対する長期酸素療法の生命予後に対する改善効果については否定的な報告が多い⁴⁾⁵⁾。また、労作時息切れや運動耐容能に対する運動時酸素投与の有効性に関しても一様ではなく、どのような症例で効果があるかを予測することは困難とされている⁷⁾⁸⁾。

今回我々は、安静時PaO₂が60Torr以上のHOT適応外の慢性肺気腫で閉塞性障害を示す COPD 患者を対象として、運動耐容能および運動時肺循環動態に対する酸素吸入効果について検討し、どのような患者に有効であるのか解析することを目的とした。運動耐容能の指標として6分間歩行試験を用いた。

対象・方法

対象

安定期にある慢性肺気腫患者で、FEV₁%<70% の COPD 患者の内、安静時室内気吸入下動脈血ガス分析で PaO₂>60Torr を示した患者で、本研究の同意が得られた男性75名を対象とした。全例に胸部 HRCT および肺拡散能力、機能的残気量の測定を含む肺機能検査を施行し、COPD および肺気腫の診断は日本呼吸器病学会 COPD ガイドラインに従った。また、日本呼吸器病学会の COPD ガイドラインに従い、対象を重症度別に3病期、すなわち病期 I ~ III に分けると、病期 I（%FEV₁ ≥ 50%）が16名、病期 II（50% > %FEV₁ ≥ 35%）が25名、病期 III（%FEV₁ < 35%）が34名であった。（表 1）。運動負荷による肺

循環動態の評価は75名の内、同意が得られた44名を対象とした。（病期 I：6名、病期 II：16名、病期 III：22名）。

表 1 肺機能検査成績

	Stage I (n=16)	Stage II (n=25)	Stage III (n=34)
Age (yr)	70±2	69±1	66±1
%VC (%)	99.7±2.8	93.1±2.6	77.5±2.1*†
FEV ₁ (L)	1.40±0.06	0.95±0.03*	0.61±0.02*†
%FEV ₁ (%)	62.9±2.8	40.9±1.0*	25.0±1.1*†
FEV ₁ % (%)	47.5±1.8	35.8±0.9*	30.2±1.2*†
%RV (%)	208.9±12.8	263.3±17.0*	309.7±11.3*†
%Dlco (%)	64.4±2.7	48.0±4.1*	50.0±3.5*
PaO ₂ (Torr)	76.3±1.8	68.6±0.9*	70.6±1.0*
PaCO ₂ (Torr)	39.5±0.8	41.7±0.8	42.7±1.0*

* p<0.05 vs. Stage I、† p<0.05 vs. Stage II

方法

6分間歩行試験は病棟内の廊下を使い、二重盲検法を用い同日に、圧縮空気と酸素吸入の2条件（ともに2L/min）でおこない、歩行距離（6MD）を測定した。またパルスオキシメーターにより、歩行中の酸素飽和度（SpO₂）も連続測定した。運動負荷時肺循環動態評価のための運動負荷は、6分間歩行試験と別の日におこない、自転車エルゴメーターを用いて、臥位にて25W4分間の負荷を室内気吸入下および酸素2L/min吸入下両者でおこなった。肺循環動態は右内頸静脈よりスワングアンツカテーテルを挿入し測定をおこなった。また動脈血採取のため右橈骨動脈にカテーテルを留置した。運動負荷前および運動開始後3分より平均肺動脈圧（Ppa）、肺動脈楔入圧（Pcwp）および心拍出量（CO）を測定し、動脈血ガス分析のため動脈血を採取した。

結果

6分間歩行距離に対する酸素吸入効果

圧縮空気吸入下%6MD (6MDを予測値で割った値)は、病期の進行と共に有意な減少を示したが(病期I; $92.9 \pm 5.0\%$ (平均 \pm SEM)、病期II; $70.5 \pm 4.7\%$ 、病期III; $56.7 \pm 4.1\%$)、安静時室内気吸入下PaO₂や6分間歩行時のSpO₂の最低値(Lowest SpO₂)の程度とは相関せず($r=0.19$, $r=0.07$)、%FEV₁と有意な正の相関を示した($r=0.60$, $p<0.01$)。酸素吸入にて、いずれの病期においても6MDは有意な増加を示したが、その増加率は病期の進行とともに増加し、病期II ($9.7 \pm 3.4\%$)、III ($20.2 \pm 6.3\%$)では病期I ($2.6 \pm 0.8\%$)より有意に高値であった。また、Lowest SpO₂が88%以下まで低下したSpO₂低下群と89%以上に留まったSpO₂弱低下群の2群に分け、病期別に検討すると、SpO₂弱低下群のI期を除いて両群いずれの病期においても酸素吸入にて有意に6MDは増加し、その増加率はSpO₂低下群で多い傾向にあったが有意な差は無く、両群いずれも病期の進行と共に増加

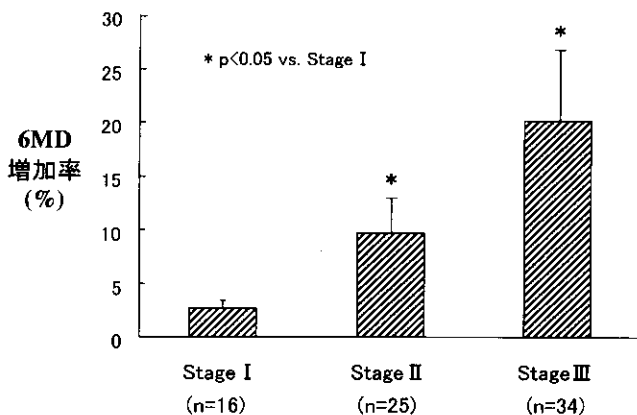


図1 COPDの重症度と酸素吸入による6分間歩行距離の増加率

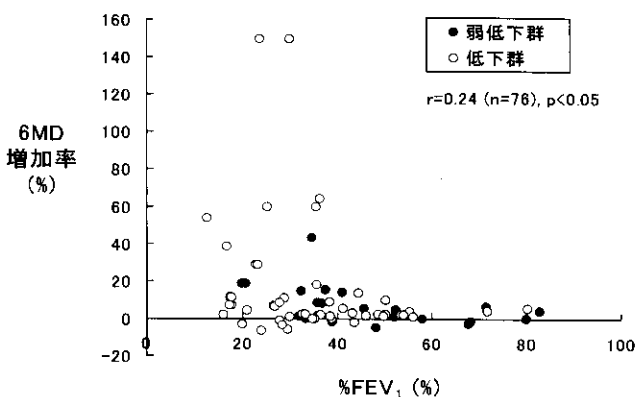


図2 酸素吸入による6分間歩行距離の増加率と%FEV₁との関係

を示した。酸素吸入による6MDの増加率は、安静時室内気吸入下PaO₂やLowest SpO₂とは有意な相関を示さず($r=0.04$, $r=0.03$)、%FEV₁と有意な負の相関を示した($r=0.24$, $p<0.05$)。(図2)

運動負荷時肺循環動態に対する酸素吸入効果

運動負荷前の肺循環動態には3病期間で有意な差はみられなかった。25W、4分間の運動負荷によりPpa、Pcwp、心拍出量はいずれの病期においても有意な増加を示し、肺血管抵抗(PVRI)は病期IIIで、全肺抵抗(Ppa/CI)は病期II、IIIで有意な増加を示した(表2)。また、運動時の心拍出量は病期間で差はなかったが、Ppa、Pcwpは病期IIIで他の病期に比し有意に高値を示し、PVRIおよびPpa/CIは病期Iに比し、II、IIIで有意に高値であった。2L/minの酸素吸入により、運動負荷による心拍出量の増加に対しては影響を及ぼさなかったが、Ppa、Pcwp、PVRIおよびPpa/CIの上昇に対しては、病期II、IIIの患者群において有意な抑制効果が認められた(図3)。次に室内気吸入下運動負荷によりPaO₂が55 Torr以下に低下した群と55 Torr以下にまで低下しなかった群に分けて検討した結果では、酸素吸入により両群ともに有意にPpa、Pcwp、PVRIおよびPpa/CIの上昇を軽減させた。しかしながら、これらの酸素吸入効果は安静時室内気吸入下PaO₂や運動負荷時の低下したPaO₂の程度との間には有意な相関はみられなかった。

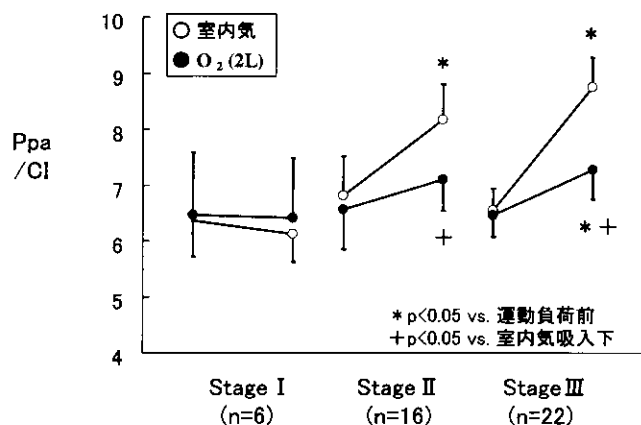


図3 COPDの重症度別に3群に分けたときの、運動負荷時全肺血管抵抗(Ppa/CI)上昇に対する酸素吸入効果

表2 運動負荷時肺循環動態に対する酸素吸入効果とCOPD重症度

		室内気		酸素 (2L/min)	
		負荷前	負荷後	負荷前	負荷後
Ppa (mmHg)	病期 I	21.5±2.7	32.7±3.2*	20.1±2.7	30.2±3.2*
	II	20.0±4.2	38.1±2.1*	18.9±1.2	32.0±1.8*†
	III	21.7±1.1	44.4±2.0*	21.0±1.2	37.8±1.9*†
Pcwp (mmHg)	病期 I	9.3±1.0	13.8±1.2*	7.8±1.4†	13.4±2.7*
	II	7.5±0.8	14.9±1.7*	6.4±0.8	12.7±1.4*†
	III	8.8±0.6	20.2±1.8*	8.4±0.6	17.6±1.2*†
CI (L/min/m ²)	病期 I	3.40±0.28	5.35±0.36*	3.26±0.37	4.89±0.38*
	II	3.11±0.15	5.01±0.26*	3.02±0.17	4.79±0.26*
	III	3.42±0.17	5.21±0.19*	3.32±0.15	5.41±0.23*
PVRI (mmHg/L/min/m ²)	病期 I	3.55±0.46	3.48±0.41	3.91±0.65	3.44±0.50
	病期 II	4.29±0.51	4.83±0.41	4.43±0.62	4.17±0.30†
	病期 III	3.92±0.29	4.75±0.29*	3.90±0.29	3.85±0.30†

* p<0.05 vs. 運動負荷前, † p<0.05 vs. 室内気

考 察

運動時低酸素血症が軽度の慢性肺気腫患者に対する酸素吸入の急性効果については、すでいくつかの報告で有効性が示唆されている⁷⁻⁹⁾。しかし、その有効性は一様ではなく、どのような症例で効果が高いかを予測することは困難とされる。Woodcock⁷⁾らによれば、酸素投与により6分間歩行距離が約12%増加し、呼吸困難度が16%改善したが、この改善度と安静時肺機能、血液ガス所見などとの間に相関を認めていない。今回の我々の検討においては、安静時PaO₂が60 Torr以上、FEV₁%が70%以下の慢性肺気腫患者を対象としたが、6分間歩行距離の改善率は弱いながら有意に閉塞性障害の指標である%FEV₁と負の相関を示した。また日本呼吸器病学会のCOPD重症度分類すなわち病期分類¹⁰⁾に従い3群に分けて検討すると、病期の進行すなわち閉塞性障害の進行とともに酸素吸入効果は顕著であり、閉塞性障害の顕著な例、すなわち重症～最重症に分類されるような肺気腫症例では、たとえ安静時あるいは運動時低酸素血症が軽度であっても酸素吸入の急性効果は大きいと考えられた。慢性肺気腫患者の運動耐容能の減少を規定させる因子としては、換気の制限、ガス交換障害、低酸素血症、肺循環障害および呼吸困難感等、多様な要因が考えられているが、閉塞性換気障害に基づく換気増大の制限が最も重要である²⁾。今回の検討においても6分間歩行距離は安静時動脈血酸素分圧やdesaturationの程度とは相関せず、閉塞性障害の程度すなわち%FEV₁と有意な相関を示し、低酸素血症が軽度の慢性肺気腫患者では換気制限が最も重要な運動制限因子と考えられた。

肺循環動態も運動制限因子として重要であるばかりでなく、肺性心、右心不全への進展、生命予後とも重要に

関与する要因である。運動負荷時の肺動脈圧上昇の成因としては、肺血管床の減少、低酸素性肺血管収縮および動的肺過膨張による肺胞内圧および左房圧の上昇により惹起されることが示唆されている^{11) 12)}。今回の検討ではこの運動負荷に伴う肺動脈圧の上昇および肺動脈楔入圧の上昇は病期の進行とともに、特に病期IIIの最重症群において顕著であり、閉塞性障害進行とも関連することが示唆された。この肺循環障害に対する酸素吸入の急性効果は重症～最重症の病期進行例で有意に顕著であり、安静時低酸素血症が軽度であっても病期進行例では肺循環動態に対して酸素吸入が有効であることが示された。この酸素吸入効果のメカニズムに関して、一つは低酸素性肺血管収縮の抑制である。これは酸素吸入によって肺血管抵抗 (PVRI) が病期IIからIIIにおいて有意に抑制されている点から明らかであるが、もう一つの要因として肺動脈楔入圧も有意に病期II～IIIにおいて軽減されており、これも肺動脈圧の減少に寄与している。この肺動脈楔入圧の上昇は動的肺過膨張を反映しているものと考えられる。今回の結果では示していないが、病期II～IIIの患者19名において運動負荷前後で換気量を測定すると、室内気吸入下では運動負荷によって10.7±0.4から22.3±1.5L/minと換気量は増大を示すが、酸素吸入下では9.2±0.6から19.6±0.9L/minと換気量増大反応は有意に抑制されており、この換気量増大反応の抑制によって動的肺過膨張が軽減され肺動脈楔入圧の減少に繋がったのではないかと推測された。以上のことから低酸素血症が軽度で在宅酸素療法の適応外であっても、閉塞性障害の強い病期II、IIIの慢性肺気腫患者に対する運動時酸素吸入は運動能力の向上や肺動脈圧上昇を軽減させる点において有用であると考えられた。

しかし、この急性効果に比べ、ポーランドからの報告⁴⁾

にみられるように、PaO₂が55Torr以上の症例に対する長期酸素療法の効果は生存率からは否定的である。しかし、彼らはFEV₁が予後規定因子であったことも報告しており、閉塞性障害の強い症例に対する酸素の長期効果については検討を続けるべき課題である。

結 論

安静時PaO₂>60 Torrの在宅酸素療法適応外のCOPD肺気腫タイプにおいては、運動能力および運動負荷時の肺高血圧に対する酸素吸入効果は閉塞性障害の程度と関連し、病期進行例に対する労作時酸素吸入の有効性が示唆された。

文 献

- 1) 松沢幸範、篠崎史郎、久保恵嗣、他：慢性呼吸器疾患患者における労作時息切れの評価－10分間歩行距離による検討－。厚生省特定疾患「呼吸不全」調査研究班平成2年度研究報告書 p94-99、1991.
- 2) 高橋宏子、藤本圭作、吉川佐和子、他：肺気腫患者における10分間歩行距離と安静時肺機能および運動負荷時肺循環反応との関係。日胸疾患会誌 1996;34: 671-677.
- 3) 合田 晶、宮本顕二、西村正治、他：PaO₂ 60 Torr以上で在宅酸素療法が開始された症例に関する全国調査。厚生省特定疾患「呼吸不全」調査研究班平成6年度研究報告書 p58-61、1995
- 4) Gorecka D, Gorzelak K, Sliwinski P, et al.: Effect of long term oxygen therapy on survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease with moderate hypoxaemia. *Thorax* 1997;52:674-679.
- 5) Veale D, Chailleux E, Taitard A, et al.: Characteristics and survival of patients prescribed long-term oxygen therapy outside prescription guidelines. *Eur Respir J* 1998;12: 780-784.
- 6) 松沢幸範、藤本圭作、久保恵嗣、他：適応基準外症例における在宅酸素療法をどう考えるか。日胸臨 2000;59:741-750.
- 7) Woodcock AA, Gross ER, Geddes DM. : Oxygen relieves breathlessness in “pink puffers” .*Lancet* 1981;1:907-909.
- 8) Dean NC, Brown JK, Himelman RB, et al. : Oxygen may improve dyspnea and endurance in patients with chronic obstructive pulmonary disease and only mild hypoxemia. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:941-945.
- 9) 松沢幸範、久保恵嗣、藤本圭作、他：運動時低酸素血症が軽度の肺気腫患者における運動時酸素吸入の効果。日呼吸会誌 2000;38:831-835.
- 10) 日本呼吸器学会COPDガイドライン作成委員会：COPD（慢性閉塞性肺疾患）診断と治療のためのガイドライン。メディカルレビューシャ 1999
- 11) Butler J: The heart is not always in good hands. *Chest* 1990;97:453-460.
- 12) Matthay RA, Arroliga AC, Wiedemann HP, et al.: Right ventricular function at rest and during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 1992;101: 255S-262S.

重症肺気腫への最大限の包括的内科治療、

特に薬物療法の効果と限界

—全国19施設前向き共同研究の現状—

植木 純 鈴木 勉 森 貴紀 塩田 智美
高橋 伸宜 福地義之助*

はじめに

LVRS (Lung volume reduction surgery) が急速に普及し¹⁾、重症肺気腫の治療に対する考え方が大きく変貌した。安定期の重症肺気腫の治療に際しては、禁煙、薬物療法、呼吸リハビリテーション、呼吸不全への長期酸素吸入療法、栄養管理などの治療モダリティーが包括的に全症例で最大限に試みられ、その効果が判定される必要がある。また、これらの治療が行われても高度の呼吸困難感が継続し、不均一な肺気腫の存在によりtarget areaが特定できる症例において外科療法 (LVRS) の適応が考慮される必要がある。

重症肺気腫への包括的内科治療の効果と限界、特に内科治療における薬物療法の最大効果を明らかにすることを目的に本共同研究を立案した。以下に治療プロトコルおよび共同研究の進捗状況を報告する。

対象と方法

対象は、FEV_{1.0} 1L以下 または%FEV_{1.0} 35%以下 (診断基準：日本呼吸器学会COPDガイドライン)²⁾ の重症肺気腫である。PaCO₂ 上昇例、在宅酸素療法施行例も含み、年齢および喀痰量による制限はない。除外症例は、a) 気道閉塞の可逆性試験 (β₂ 刺激剤) 陽性例 (詳細は下記)、b) 現在治療中の糖尿病例、c) 消化性潰瘍例、d) 降圧剤投与下で不安定な高血圧例、e) 胸郭成形術後例、f) 主要臓器手術後3ヶ月以内、g) 重症不整脈例、h) 急性心筋梗塞発症3ヶ月以内、i) 高度の骨粗鬆例 (脊柱側面写真で椎体骨折または著明な骨梁減少例)、j) コンプライアンス不良例である。経口ステロイド投与の同意が得られなかった症例や Term 3 入院加療が困難な症例な

ど、従来の外来治療を継続する肺気腫例を対照とする。

評価方法は、

A. 必須項目：

I. 一般的検査、

- 1) 身長、体重
- 2) 胸部X線写真 (正面、側面)
- 3) 心電図
- 4) 血液検査：血算、白血球分画、肝機能、TP、Alb、BUN、Cr、Tchol、血糖、IgE、ECP、α 1-AT (初回のみ)、尿蛋白糖定性、便潜血
- 5) 動脈血液ガス分析
- 6) 呼吸機能検査：
 - i) スパイロメトリー
 - ii) フローボリューム曲線
 - iii) 肺気量分画 (希釈法)
 - iv) DLco
- 7) BRI (初回のみ)：ベネトリン0.5mL + 生食2mLをアストールネブライザーまたは超音波ネブライザーで吸入、吸入終了15分後のFEV_{1.0}の増加が200mL未滿または15%未滿を陰性とする
- 8) 運動負荷：6分間歩行試験 (歩行距離、歩行前後で呼吸困難感(VAS)、PR、SpO₂、recovery time)

II. QOL、日誌、PEF monitor

- 1) QOL：SGRQ、VAS
- 2) 日誌：呼吸困難感はBorg scale、PEF meterはmini Wright (ATS目盛り)を使用。

B. 付加的項目は、

- 1) 呼吸機能検査：肺気量分画 (Body box)
- 2) 呼吸筋力：Pimax (RV)、PEmax (TLC)
- 3) 運動負荷：エルゴメーター (呼吸不全班による負荷法³⁾)
- 4) 夜間SpO₂ monitor
- 5) 胸部HRCT (条件は日本呼吸器学会COPDガイドラ

順天堂大学医学部呼吸器内科

* 「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

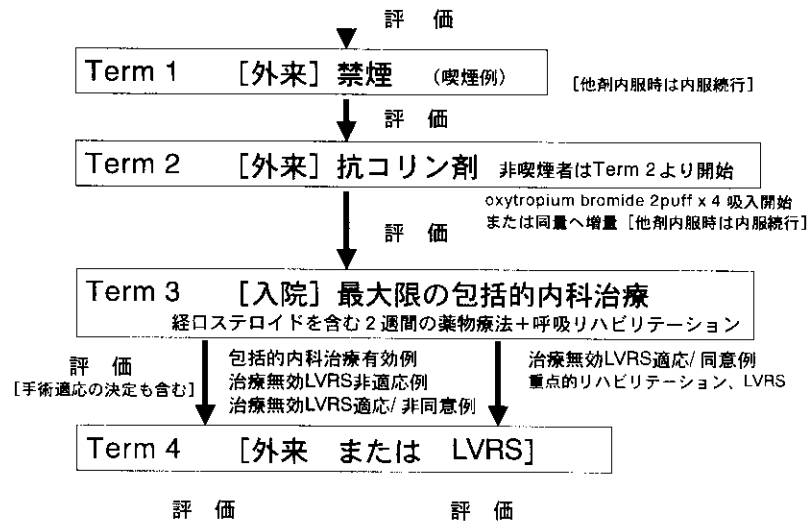


図1 治療プロトコールのフローチャート

イン²⁾)

6) 心エコー

7) 換気・血流シンチ、〔5)~7)は診断上あるいはLVRsの評価上必要な症例に施行]

8) 胃内視鏡検査 (症例により施行: 胃十二指腸潰瘍既往例、消化器症状を有する症例) である。

治療のフローチャートを図1に示した。

Term 1 ([外来] 禁煙) では、初診時、喫煙者は禁煙指導を行い最低2週間は禁煙した後に **Term 2** へ、すでに吸入、内服など他の薬物療法施行例は同治療を継続とする。

Term 2 ([外来] 3週間) では抗コリン剤の定期吸入 (oxytropium bromide 2 puff x 4 with spacer) を施行する。禁煙をしている症例はTerm 2より開始とする。すでに吸入、内服など他の薬物療法施行例は同治療を継続する。2 puff x 4に満たないoxytropium bromide吸入を施行中の症例は2 puff x 4 with spacerに増量とする。

Term 3 ([入院] 2週間) では、最大限の薬物療法および理学・運動療法、患者教育を施行する。すでにoxytropium bromide 2 puff x 4 with spacer吸入を施行中の症例はTerm 3より開始とする。

薬物療法として、気管支拡張薬は、外来よりの抗コリン剤定期吸入 (oxytropium bromide 2 puff x 4 with spacer) に加え、 β_2 刺激剤定期吸入 (procaterol hydrochloride 1-2 puff x 2 with spacer)、キサンチン製剤 (SR theophylline [Unifil] 1 Tab (400mg) 1 x 夕食後、原則として血中濃度10 μ gを越えない範囲) を開始または従来の内服薬より変更とする。経口ステロイド薬として、プレドニゾン (PSL) 0.5mg/kg/日を投与する。吸入ステロイド使用時は中止とし、抗潰瘍剤、胃粘膜保護剤などを併用とす

る。喀痰を有する症例では、5)去痰剤: ムコソルバン3T 3xを併用する。

理学・運動療法は、

- 1) 呼吸時の姿勢・運動パターンの改善、リラクゼーション
- 2) 呼吸訓練 [安静時・歩行時]
- 3) 四肢体幹筋力訓練 [可能であれば上肢は負荷挙上]
- 4) 呼吸筋訓練
 - a) 吸気筋トレーニング: Threshold (Healthscan社/Chest社): 25% P_{imax} 15min x 2 ((朝、夕) /dayより開始、可能であれば30% P_{imax} 以上で継続、初回はトレーニング時のBorg scale、SpO₂をモニター
 - b) 呼気筋トレーニング: Triflow II (Argyl社/日本シャープウッド社) Triflow IIを逆さにしてボールが宙に浮遊している呼気の状態を出来るだけ維持する、10回 x 2 (朝、夕) /dayより開始
- 5) 歩行訓練 [持久力]: 万歩計で歩数管理 (目標5000歩/日以上)
- 6) 排痰法が必要な症例では、体位ドレナージまたはFlutter (VarioRaw社/Chest社)、5 min/回 3回/日による排痰を行う。

患者教育・指導では、

- 1) 肺、心臓、呼吸筋など解剖・生理
- 2) 肺気腫、慢性呼吸不全の病態について
- 3) 栄養指導
- 4) 薬剤指導、吸入指導
- 5) 禁煙、再喫煙の予防
- 6) パニックコントロール、気道浄化法・排痰法
- 7) 身体所見の観察法、日常あらわれやすい症状と対

応

- 8) 検査（呼吸機能、胸部X線・CT、血液など）の意味
- 9) 社会的支援、
- 10) 在宅酸素療法、外出や旅行
- 11) 感染予防、ワクチン、日常生活、住まいの工夫
- 12) 肺容量減少手術 [LVRS] に関して配布教材を中心とした教育・指導を施行とする。

効果判定は、原則として FEV_{1.0} 200mL 以上増加時は Term 3 治療有効とし、決定に際し PEF、6MWD など他の肺生理学的指標も考慮する。

Term 4 [外来 or VRS] では、気管支拡張薬、呼吸リハビリテーションは継続とし、経口ステロイドに関しては：

- 1) 入院包括的治療有効例：PSL は 5～10mg/week づつ減量（10mg 以下は 2.5mg/week）、FEV_{1.0} が維持できる範囲の量まで（7.5mg～5mg/day 程度が target）減量する。PSL 減量後も PSL の効果が維持できている症例は、Fluticasone propionate 800μg の吸入に切り替える。Fluticasone propionate 800μg の吸入の効果が維持できない症例は、PSL（変更前の投与量）を再投与とする。
- 2) 入院包括的治療無効・LVRS 非適応例または適応/非同意例：PSL 投与は中止
- 3) 入院包括的治療無効・LVRS 適応/同意例：PSL を急速に taper し、自施設または多施設へ紹介し LVRS を施行とする。

退院直後は 1～2週に 1回、安定後は 4週に 1回の外来受診とする。Term 4 における評価の期間は、

- i) スパイロメトリー：Term 3 終了後より 1M、3M、6M、12M、18M、24M（PSL 減量中は必要に応じて追加する）
- ii) 肺気量分画、DLco、6 分間歩行試験（3M はなし）、QOL：Term 3 終了後より 3M、6M、12M、18M、24M

対照例の評価期間：

- i) スパイロメトリー：観察開始後より 2W（0,5）、3,5、6,5、12,5、18,5、24,5M
- ii) 肺気量分画、DLco、6 分間歩行試験（3,5M はなし）、QOL：観察開始後より 3,5、6,5、12,5、18,5、24,5M とする。

結果

呼吸不全研究班関連施設を中心に共同研究として全国 19 施設の賛同を得た。共同研究施設は、筑波大学医学部

呼吸器内科、千葉大学医学部呼吸器内科、慶応義塾大学医学部内科、東京女子医科大学第一内科、日本大学医学部第一内科、国家公務員共済虎の門病院呼吸器内科、国立療養所東京病院呼吸器科、公立昭和病院呼吸器科・感染症科、越谷市立病院内科、順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院呼吸器内科、江東病院内科、昭和大学藤が丘病院内科、横浜市立大学医学部附属市民医療センター呼吸器内科、信州大学医学部第一内科、金沢医科大学呼吸器内科、大阪府立羽曳野病院呼吸器科、奈良県立医科大学第二内科、福岡大学医学部呼吸器内科、順天堂大学医学部呼吸器内科である。平成 12 年 9 月より症例の登録を開始し、現在症例を集積中にある。

考案・結論

すべての安定期の重症肺気腫例において最大限の包括的内科治療が施行され、その効果が明らかにされる必要がある。呈示したプロトコールは、日本呼吸器学会 COPD ガイドライン²⁾ に示された内科的治療を包括的に比較的短期間にステップアップして最大限に施行するものである。当院で施行した重症肺気腫を対象としたステロイドトライアルを含む 2 週間の薬物療法および呼吸リハビリテーションプログラム（n = 15、FEV_{1.0} 0.79 ± 0.18 [SD] ml）では、FEV_{1.0} の 222 mL、6 分間歩行距離の 56m の増加、および QOL の改善が得られている⁴⁾。今回の 19 施設前向き共同研究により最大限の包括的内科治療の短期および長期的な治療効果が明らかにされることが期待される。平成 12 年 9 月より症例の登録を開始したが、呼吸リハビリテーション体制の整備など準備に時間を要した施設が多くを占めた。次年度も引き続き登録の継続を予定する。

参考文献

- 1) 植木 純、町田和子、福地義之助、他：本邦における重症肺気腫の肺容量減少手術（LVRS）、薬物療法、呼吸リハビリテーションの現状—全国アンケート調査のまとめ—厚生省特定疾患呼吸器系疾患調査研究班編、平成 10 年度報告書：pp39-42, 1999
- 2) 日本呼吸器学会 COPD ガイドライン作成委員会：日本呼吸器学会 COPD ガイドライン：COPD（慢性閉塞性肺疾患）診断と治療のためのガイドライン、メディカルレビュー社、東京、1999
- 3) 赤紫恒人、堀江孝至：運動負荷検査、厚生省特定疾患「呼吸不全」調査研究班（編）：呼吸不全—診断と治療のためのガイドライン、メディカルレビュー社、東京、pp16-23, 1996

- 4) 植木 純, 高橋英気, 福地義之助, 他 : 大学病院における COPD の包括的内科治療プログラム. 日呼管誌10: 346-351, 2000

肺気腫に対するLVRSの長期成績

岩崎 昭憲 吉永 康照 白日 高歩*

【はじめに】

呼吸不全における外科手術、特に慢性肺気腫における Lung Volume Reduction (LVRS) は安全性や効果についても明らかになってきた^{1,2)}。しかし肺気腫に対する外科治療としてLVRSを実施してきた症例の中には好成績を維持できる群、維持できない群があることがわかってきた。これら長期成績を解析することで新たな手術適応を決め、長期成績をさらに向上できる可能性がある。今回これらについて検討をおこなった。

【対象、方法】

手術適応は呼吸器内科で慢性肺気腫の確定診断を得た患者のなかで十分な内科治療を行った後、それ以上の改善が得られない重症症例を対象とした。これら症例のなかで以前より述べてきた適応基準³⁾を満たした2000年3月までに実施したLVRS75例(片側胸腔鏡手術33例、両側胸腔鏡手術21例、胸骨正中21例)を対象とした。精密呼吸機能検査、血液ガス分析、その他を術前、術後3、6、12、24、36、48ヶ月におこなった。生存率は Kaplan Meier法で計算した。患者背景因子として喫煙指数、術前肺機能、早期呼吸機能改善度について解析し長期予後と比較した。

【結果】

手術関連死亡は1例で1.3%であった。術後経時的なFEV_{1.0}の推移は片側手術でそれぞれ、術前、術後3、6、12、24、36、48ヶ月で763.8、1008.6、1099.0、1014.0、961.3、917.5、710mlで3年までに術前値に近づいた。両側手術ではそれぞれ、733.1、1208.6、1200.8、1084.4、953.3、1018.5、900mlと4年でも術前値より優っていた。これを図1に示した。喫煙との関連では、喫煙指数(以下BI)を1000未満、以上の群の2群に分けるとBIが高い症例ほど低い症例に比べ術後呼吸機能の改善維持が不良であった。これを図2に示したが、両側手術をおこなっ

た群でもBIが低い群は長期に機能維持が可能であった。しかし両側例でもBIが高い群は低い群に比べ長期機能維持が劣っていた。片側手術でも同様の傾向が認められた。術後生存率では片側手術の場合それぞれ36月、48月で75.6、56.7%、両側手術ではそれぞれ89.2、63.7%であった。手術効果と患者予後の関連を両側手術例における術後3-6ヶ月のFEV_{1.0}の改善度で検討した。その結果術後早期にFEV_{1.0}が30%以上改善した群の生存率は48ヶ月で85.8%であった。一方30%以下の改善群では48ヶ月で33%であった。すなわち高改善群が低改善群より生存率が良好であった。

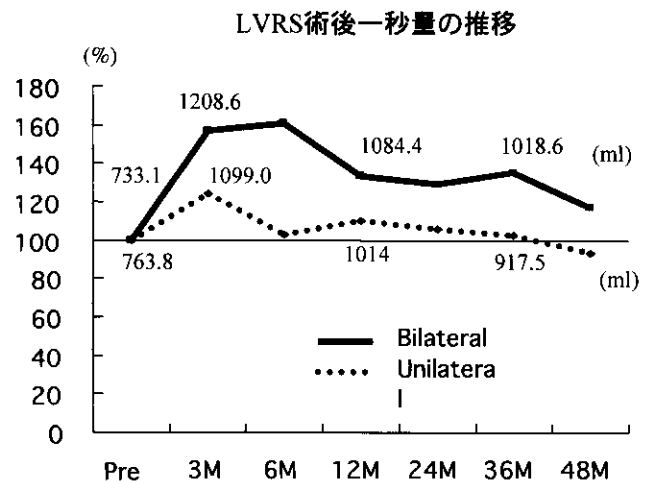


図1 LVRs各手術における長期成績：一秒量の経過

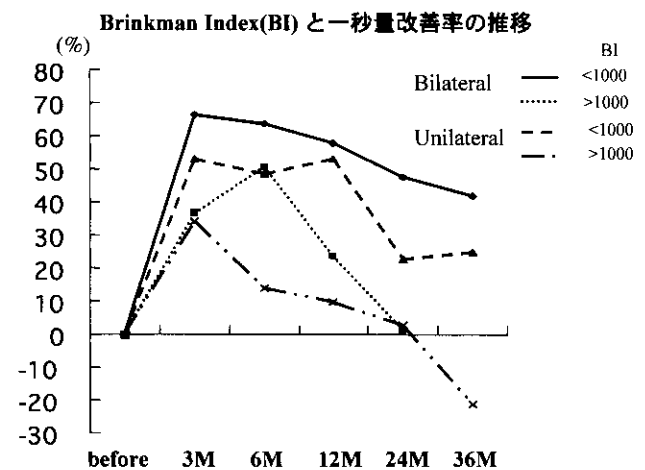


図2 LVRsと喫煙における術後成績の関係

福岡大学医学部 第2外科

*「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

【考案、結論】

LVRV術後で呼吸機能を長期に維持できるかについては現在までのところ、4年までは可能であると考えられる。最近の文献でもほぼこれを指示すると思われる⁹⁾。しかしこれらの経過に必ずしも一致しない患者も存在する。我々の長期成績では両側手術例が機能改善維持に優れ生存も良好な傾向を示した。生命予後については手術方法別による差は認められなかった。文献的な報告でも多くはこれと一致した結果である⁹⁾が一部では両側手術が有意な生存を示すとの報告も見られる⁶⁾。また最も注目されるのは、非LVRV患者と比較し、LVRVを行うことが生命予後を延長できるかどうかである。結果で示したように術後高機能改善が選ばれた群の方が低改善群より4年生存率で優れていたことより、これらもある程度推測される。コントロールとして厳密な非手術群対象を選択することは困難であるが、今後LVRVの役割が期待される場所である⁷⁾。手術時期についてもかなり進行するまで待って施行するかどうか今後の検討が必要である。すなわち手術による危険性が増加するばかりでなく予後の点で不利となる。今回示さなかったが我々のデータでも超低肺機能患者群は不良であった。そのような時期になる以前に手術にふみきることによってLVRVの効果をさらに向上できる可能性があると思われる。肺組織破壊の進行と喫煙程度の関連が手術後の成績に関連があると推測される。すなわち手術後の残存肺組織の進行程度も術後呼吸機能成績に関連しているのではないかと考えられる。手術適応を考える上で、術前短期間に肺機能が低下している患者や、今回結果で示したような重喫煙者などでは肺破壊の進行は早い。術後に改善のピークが得られた後に術前に近い低下速度で悪化していくことも十分推測できる。今後は、これらも手術適応を考える上で重要と考えられる。また片側手術は手術適応を決める時点でtarget areaが片側に限局しているわけであるが、術後に対側や非手術部の気腫化が進行して両側同時手術例より早く機能低下に移行するのも一因と思われる。新たなtarget areaが出現した場合、二期的に再手術が可能であれば両側同時と同じ機能維持が可能となることもある。当初手術適応を決め、これに準じて行われたLVRV手術例の中で予測に反し比較的早期に機能低下に転じた群や良好な改善が得られなかった患者についてさらに解析を行うことが重要である。これら不良な患者を除外することが可能となれば、より良い手術成績とそれにより得られた良好な機能を長期にわたり維持できる。LVRVをさらに評価の高いものにできる可能性がある。

文 献

- 1) Cooper JD, Trulock EP, Triantafillou AN, et al.: Bilateral pneumonectomy (volume reduction) for chronic obstructive pulmonary disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:106-116.
- 2) McKenna RJ, Brenner M, Fischel RJ, et al.: Should lung volume reduction surgery unilateral or bilateral? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:1331-1339.
- 3) Yoshinaga Y, Iwasaki A, Kawahara K, Shirakusa T: Lung volume reduction surgery results in pulmonary emphysema. Changes in pulmonary function. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Sep;47(9):445-51
- 4) Gelb AF, McKenna RJ Jr, Brenner M, Schein MJ, Zamel N, Fischel R: Lung function 4 years after lung volume reduction surgery for emphysema. *Chest* 1999 Dec;116(6):1608-15
- 5) Hazelrigg SR, Boley TM, Magee MJ, Lawyer CH, Henkle JQ: Comparison of staged thoracoscopy and median sternotomy for lung volume reduction. *Ann Thorac Surg* 1998 Oct;66(4):1134-9
- 6) Serna DL, Brenner M, Osann KE, McKenna RJ Jr, Chen JC, Fischel RJ, Jones BU, Gelb AF, Wilson AF: Survival after unilateral versus bilateral lung volume reduction surgery for emphysema. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Dec;118(6):1101-9
- 7) Rationale and design of the national emphysema treatment trial. A prospective randomized trial of lung volume reduction surgery. The national emphysema treatment trial research group. *J Cardiopulm Rehabil* 2000 Jan-Feb;20(1):24-36
- 8) Rationale and design of The National Emphysema Treatment Trial: a prospective randomized trial of lung volume reduction surgery. The National Emphysema Treatment Trial Research Group. *Chest* 1999 Dec;116(6):1750-61

肺上皮細胞の機能と肺気腫発症のメカニズム

別役 智子^{1)*} 西村 正治^{1)**} 谷野美智枝¹⁾ 長井 桂¹⁾
黒木 由夫²⁾ 伊藤 善久³⁾
Robert M. Senior⁴⁾ Steven D. Shapiro⁴⁾ Mark A. Watson⁴⁾

はじめに

我々はこれまで、何故、喫煙者の一部だけが肺気腫を発症するかという命題をテーマとしてきた。中高年者の中で、肺高分解能CTで検出された早期あるいは軽度肺気腫患者と、同程度に喫煙歴がありながら肺気腫病変が全く認められない同年齢対象者に気管支肺胞洗浄 (BAL) を施行し比較すると、BAL液中の好中球数に差異がないにも関わらず、前者では好中球特異的な顆粒蛋白や好中球遊走因子 (IL-8) の増加が認められ、早期の肺気腫形成過程における好中球の集積や活性化を示唆する所見が得られた^{1) 2)}。末梢気道上皮および肺胞上皮は喫煙等の外来吸入物質の主たる標的細胞であり、肺の防御機構に重要な役割を果たしている。上皮細胞は、慢性喫煙により形態学的に、機能的に変化していることは知られているが、肺気腫発症との因果関係は必ずしも明らかにはされていない。IL-8 の産生、放出を調節する等の機序により、上皮細胞が炎症細胞の誘導をコントロールする役割を担っている可能性がある。一方、集積した好中球は放出する顆粒蛋白や活性酸素により、上皮細胞を刺激、障害することが知られている³⁾。我々は、研究1) 中高年喫煙者のBAL液中における上皮特異的マーカーの分析から気道、肺胞上皮機能と肺気腫発症の個体差との関係を検討する、研究2) マウス喫煙肺気腫モデルを用い、終末細気管支上皮細胞におけるmRNAの発現解析をgene chipを用いて行う、という二つのアプローチから肺気腫発症のメカニズムにおける上皮機能の調節系の役割を明らかにしたい。

対象と方法

研究1) 32歳から80歳の自覚症状のない中高年非喫煙者、喫煙者68名 (平均年齢56.3 ± 11SD 歳) を対象に、Sequential BAL (50 ccの生理的食塩水で4回繰り返し洗浄し、初回の回収液を気道成分 (bronchial lavage fluid; BLF)、2~4回目の回収液を肺胞成分 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) として別個に処理する方法) を施行した。喫煙者を高分解能CTにより検出される早期気腫病変の有無により二群に分類した。CTにより気腫病変が無いことを確認した健常非喫煙者 (少なくとも一年以上禁煙している) をコントロール群とした。それぞれの成分から遠沈により細胞成分を分離し、総細胞数、分画を算出し、液性成分を-70°Cにて保存した。気道、肺胞上皮から産生され放出される上皮特異的マーカー (Clara cell specific protein; CCSP, surfactant protein-A; SP-A, surfactant protein-D; SP-D, cytokeratin-19 fragment; CK-19) を測定した。CCSP, SP-A, SP-D については、それぞれ従来報告されている確立したELISA法により測定した^{4) 5) 6)}。CK-19についてはロシュダイアグノスティクス社製ECLIAキットを用いた。上記の各群の結果はすべて平均値 ± 標準誤差で示した。統計は3群間の検定にはANOVAを用い、有意差がある場合の検定にはFisherの方法を用いた。CCSPについては、BALF中の存在様式を確認する目的で、15倍に濃縮したBALFを Non-reduced conditionにおいて、ELISAに用いた抗体を一次抗体として用いWestern blotを施行した。喫煙者の中で高分解能CTにより検出される早期気腫病変の有無と、気管支肺胞洗浄液中の上皮特異的マーカーとの関係を検討した。

研究2) 成熟マウス (C57/B6) を用い、Hautamaki らの方法に基づき一日2本、週6日間の喫煙を6ヶ月間継続させることにより、肺胞壁の破壊を伴う肺気腫モデルを作成した (n=6)⁷⁾。月齢を合わせた室内気吸入マウスをコントロールとした (n=6)。屠殺後、迅速にOCTcompoundに包埋し肺凍結組織標本を作成した。7ミクロンの厚さに薄切し、100% エタノールで瞬間固定した後、0.5% Nissl

1) 北海道大学医学部第一内科

2) 札幌医科大学第一生化学講座

3) 旭川医科大学臨床検査医学講座

4) Washington University School of Medicine

* 「呼吸不全」調査研究班 難病特別研究員

** 「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

(cresyl violet acetate) を用いて染色した。内因性RNaseの活性を抑えるため、スライドの染色後は常時乾燥状態を保った。Laser capture microdissection (LCM)(Arcturus Engineering 社製 PixCell II system)を用い、直径15ミクロン、パルス幅1.5ms、振幅30-40mWの条件でレーザー光を発生し、顕微鏡下に終末細気管支上皮細胞を同定し、選択的に採取した。LCMにて採取された終末細気管支上皮細胞は、各動物毎に Boehringer Mannheim 社製 High Pure RNA Isolation Kitを用いてtotal RNAを抽出した。Genomic DNAの混入については、DNase Iで処理し、-70°Cで保存した。抽出した極微量のRNAを標識プローブとして高密度オリゴヌクレオチドアレイ (Affymetrix 社製)を用い、約11,000種類のマウス遺伝子発現を非喫煙マウス、喫煙マウス間で比較解析することを最終的目標とするが、LCM 法で採取された細胞から抽出された極微量のRNAを試料とするためには、total RNAを均等に増幅することが必須である。本年度は、基礎的段階として、T7-RNA polymeraseを用いて、極微量total RNAを標識プローブとする技術を確立した。T7-based RNA 均等増幅法については、Luo らが報告した方法⁸⁾と、Ohyama らの方法⁹⁾を参考に修正を加えた。第一段階として、RNA からcDNA を合成する際に、そのプライマーに T7-RNA polymerase の認識配列に相当する T7-promoter (Genset 社製T7dT24) を組み入れた。二本鎖cDNAを鋳型にT7-RNA polymerase (Ambion社製MEGAscript) を作用させることにより約100~200倍のRNAの増幅が期待できる。第二段階として、増幅されたRNAを一旦Random primerを用いてcDNAを作成した後に、T7-promoterを組み入れ、二本鎖cDNAの鋳型を作成する。そこでビオチン標識をさせT7-RNA polymerase を作用させた (Enzo 社製 Bioarray high yield RNA transcription kit) 。第二段階ではさらに約10~

20倍の増幅が期待できる。このビオチン標識したRNAをAffymetrix 社製マウス genechip (MullK subA) の試料として用いた。

結果

研究1) CCSPは気道上皮由来であることを反映し、BLF中で、BALF中よりも高い (Fig. 1)。BLF中では、気腫病変の有無に関わらず、喫煙者では、コントロール群に比べ低下する傾向を示した (Fig. 1a)。BALF中では、統計学的には有意差は認められなかったが、気腫病変を有する喫煙者の中で2名が異常な高値を示した (6326.1 and 7518.5 ng/ml)。この2名のBALFについて、ELISAに使用した抗体を用いて Western blotting を施行した結果、他の検体と同様に15kDaの単一バンドとして泳動され、別の蛋白との結合体、あるいは分解産物を認識しているという所見は得られなかった (Fig. 5)。BALF中のSP-Aは気腫病変のある喫煙者では、気腫病変のない喫煙者や、コントロール群に比べ有意に低下していた (Fig. 2)。一方、BALF中のSP-Dは、コントロール群に比べ、気腫病変のない喫煙者で有意に低下していたが、気腫病変の有無では差がなかった (Fig. 3)。BALF中のCK-19は、他の上皮マーカーとは異なり、気腫病変のある喫煙者では、ない喫煙者に比べ有意に上昇していた (Fig. 4)。

研究2) 1日2本、週6日間の喫煙を6ヶ月間継続させることにより、マウスの肺気腫モデルを作成した。25cmH₂Oの一定圧でホルマリン固定したパラフィン標本では、室内吸入によるコントロールマウスと比較し、終末細気管支から連続する肺胞道の拡張を伴う肺胞壁の破壊が認められる (Fig. 6)。Laser capture microdissection (LCM) 法によるマウス細気管支上皮細胞の選択的採取の例を示す (Fig. 7)。マウスは解剖学的に呼吸細気管支を欠いた

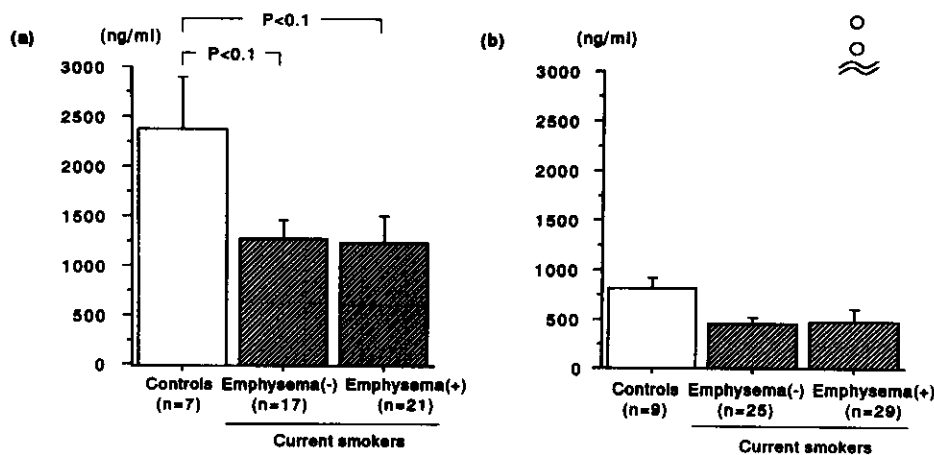


Fig.1 CCSP in BLF (a) and BALF (b)

め、終末細気管支が直接肺胞道に連続する (Fig. 7a)。終末細気管支上皮細胞の採取は、末梢側はその接合部、中枢側は接合部から250ミクロンまでの範囲で行った。直径15ミクロンのレーザー光を用いることにより、単一層の上皮細胞をその下層の結合組織や肺胞上皮を含むことなく選択的に採取することが可能であった (Fig. 7b)。その特異的選択はLCM後の組織がintactに残存していることから証明される (Fig. 7c)。一匹のマウス肺について、約20,000~40,000回のレーザー光発火により、終末細気管支上皮細胞を採取しRNAを抽出した。RNA均等増幅法の確立を目的とする実験において、正常マウスの全肺

から抽出したtotal RNAを用いた。既知の濃度のtotal RNAを1000倍に希釈したもの (10ng) を均等増幅させ、希釈前のRNA (10 μ g) とgene chip上でmRNAの発現を比較することにより、その均等性を証明した (Fig. 8)。本chip上の6569種geneのうち、全肺から抽出した non-amplified total RNAでは3535種 (53.8%) が検出され、amplified RNAでは3194種 (48.6%) が検出された。RNA増幅前後での比較において、6569種中5319種 (81%) は不変と判定され、各mRNA間での増幅効率の差異は極めて少ないことが明らかとなりその均等性を証明しえた。

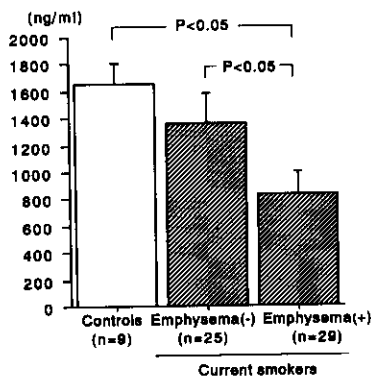


Fig. 2 SP-A in BALF

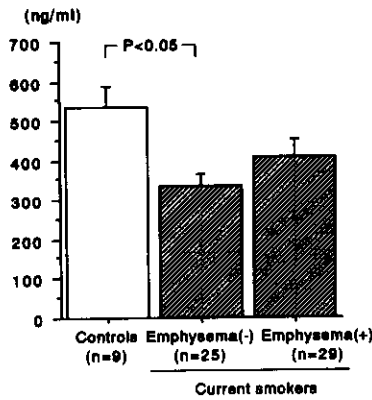


Fig. 3 SP-D in BALF

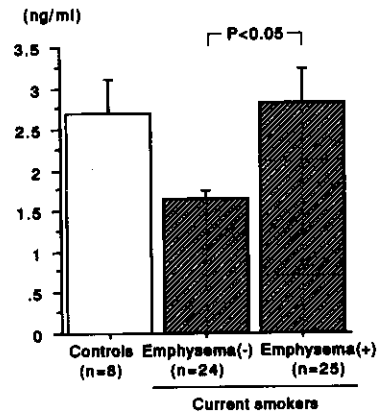


Fig. 4 CK-19 in BALF

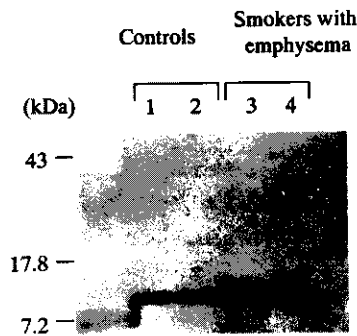


Fig. 5 Western blot for CCSP

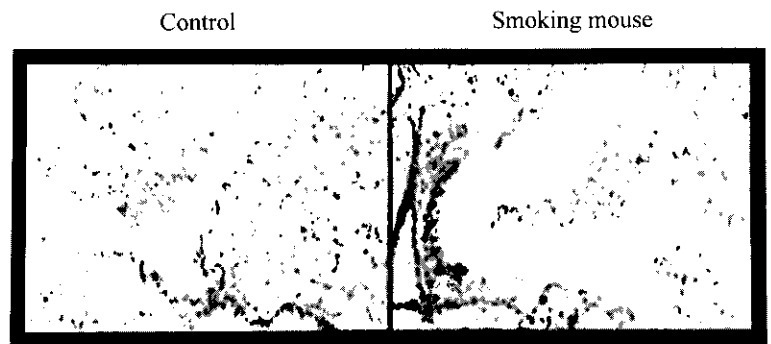


Fig. 6 Comparison of the lungs between control and smoking mouse

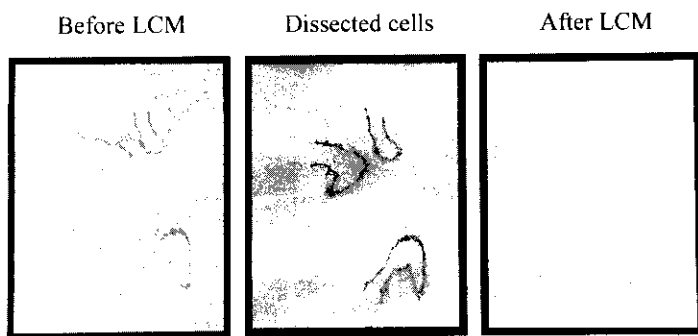


Fig. 7 Laser capture microdissection (LCM) of terminal bronchiolar epithelium

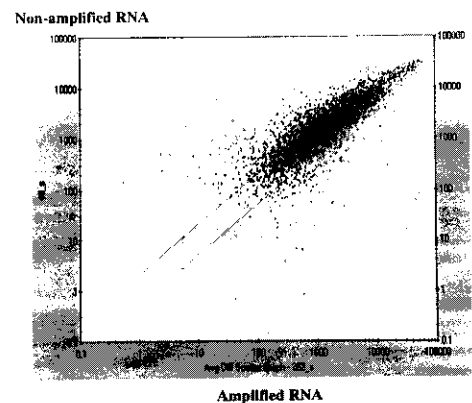


Fig. 8 Correlation of gene profiles between amplified and non-amplified RNA

考案

研究1) クララ細胞は、増殖能が高く気道上皮の再生修復に重要な幹細胞的な役割を持つと考えられており¹⁰⁾、CCSPはクララ細胞から特異的に産生放出される約15kDaの蛋白である。コントロール群に比べて、気腫病変のない喫煙者では、BLF中でCCSPが低下する傾向を示した今回の結果は、慢性喫煙により、上皮機能が低下していることを示唆するという過去の報告と一致する^{11) 12)}。今回の結果では、気腫病変のない喫煙者とある喫煙者の間では差を認めなかった。しかし、気腫病変のある喫煙者の中で2名について異常高値を認めた。肺腺癌細胞にCCSP陽性例があることや、肺線維化巣に見られる気道化上皮 (bronchiolization) にCCSPが陽性であることなどから、この2名におけるCCSP高値の意義については、今後の検討を要する。肺サーファクタントに特異的なアポ蛋白として報告されている4種類のうち親水性であるSP-AとSP-DはともにC型レクチンに属しており、特に感染防御の面から注目されている¹³⁾。今回の結果では、SP-Aは、健常の喫煙者では低下をきたさないが、軽度の肺胞破壊、気腫化の進行により肺胞II型細胞が変調を来していることを鋭敏に反映している指標ともいえる。また、SP-Aの低下の結果、ウイルス感染の潜在化、あるいは炎症の遷延などを介し肺気腫の病態を修飾している可能性もある。今回、BAL液中SP-Dについてはコントロール群に比べて、気腫病変のない喫煙者で有意に低下していることは、慢性喫煙刺激により、これらの分泌蛋白を産生、放出する上皮機能が低下していることを示唆する。しかし、SP-Aとは異なり、喫煙者の中で、気腫化の有無による差は認められなかった。両者ともに、気道非繊毛上皮、肺胞II型上皮から産生されるが、その分布の違い¹⁴⁾、あるいは分泌機構の違いによるものと推測される。Hondaらは、健常喫煙者は、非喫煙者に比べ、BAL液中のSP-A、SP-Dが共に低下していることを報告している¹⁵⁾。彼らの報告では、健常喫煙者のBAL液中SP-A、SP-D値は、今回の結果とほぼ同様であるのに対し、健常非喫煙者のSP-A、SP-D値が、我々のコントロール群の約2倍の平均値を示している。彼らの対象が20歳前後の若年者であるのに対し、本研究のコントロール群は平均年齢66歳で過去に喫煙経験を有しているという相違点があり、加齢と上皮機能という点を考慮すると非常に興味深い結果である。Cytokeratinは単層上皮系の細胞のみに存在する細胞骨格蛋白で上皮の分化度の指標になる。CK-19は主に気道細胞から産生されるとされその血清中の値は上皮由来の肺癌腫瘍マーカーとして汎用されている¹⁶⁾。

Nakamuraらは、好中球エラスターゼが培養気道上皮細胞を刺激するとCK-19を放出することに注目し、BAL液中のCK-19レベルが、好中球優位炎症における気道上皮細胞の障害を反映すると報告している¹⁷⁾。我々の結果は肺気腫の発症初期において好中球が活性化し、上皮細胞を刺激していることを間接的に支持する結果である。気腫病変のある喫煙者でSP-AとCK-19が対照的な挙動を示していることはその調節系を異にする可能性がある。このような肺の上皮細胞の機能的変化が、肺気腫の形成のメカニズムにどのように関与しているのかは今後の検討が必要である。

研究2) 近年、gene chipテクノロジーの革新により数万個単位の遺伝子を同時に定量することが可能となり、様々な病態における遺伝子発現の変化を追跡することによって、病因となる遺伝子群を見つける試みが始まっている。Sheppardらは、全肺から抽出したRNAを用いて、肺へのbleomycin投与前後でのgenechipによる遺伝子プロフィールの解析を報告した¹⁸⁾。しかし、肺の線維化というような集簇する細胞の種類、数も異なる病態においては、細胞特異的、局在的遺伝子発現の解析がさらに今後望まれる。複雑な組織から目的とする細胞集団だけを顕微鏡下に取り出し、in vivoでの発現情報を得ることを可能にしたのがLCM法である。我々は、マウスのbleomycin線維化モデルを用いて、bronchiolizationの形成には、終末細気管支上皮細胞局所におけるmatrix metalloproteinase-9 (gelatinase B)の発現が必須であることを証明し¹⁹⁾、LCM法を用いて、bleomycin肺において終末細気管支上皮に特異的な数種類のgrowth factorsやgrowth factor receptorsの発現を定量化した²⁰⁾。LCM法で採取される特異的細胞群から抽出されたRNAを用いてgenechipによる数万個単位の遺伝子解析に応用することで、直接病態に関与する未知の遺伝子群の発見につながる可能性もある。しかしそのためにはバイアスのかからない微量RNAの増幅方法を確立することが必須である。今回我々が試みたT7-based RNA均等増幅法は、同一RNAサンプル増幅の有無での比較において、6569種のうち5319種(81%)は不変と判定され、各mRNA間での増幅効率の差異は極めて少ないことが明らかとなった。つまり、増幅がmRNA分子の存在比に及ぼす影響は非常に小さいと結論づけることができる。呼吸細気管支領域における炎症はほとんどの喫煙者に認められる病理学的所見であり、小葉中心性肺気腫発症に先行する²¹⁾という報告があるが、喫煙が末梢気道上皮細胞に及ぼす影響と、肺胞破壊との因果関係については未だ不明な点が多い。今年度確立した基礎的技術を基盤とした上で、マウスの肺の終末細気管支上皮細胞から得

たmRNAの体系的発現解析を行うことにより、気腫化という病態の変化に伴って発現量の変化する一群の遺伝子候補を同定することができるものと期待される。

結語・今後の予定

1) 早期肺気腫病変を有する喫煙者は、気腫病変を有さない喫煙者に比べ、BAL液中SP-Aは有意に低下し、逆にCK-19は増加していた。この事実は、肺気腫形成過程における上皮細胞機能の変化を反映している。今後は、上皮機能に及ぼす加齢の影響、アデノウイルスの潜伏感染による影響という面から上皮細胞機能の変化の要因を追求する。

2) 慢性喫煙による肺気腫マウスを作成し、細気管支上皮細胞からLCM法にてRNAを抽出しえた。今年度はT7-RNA増幅法を用いて、微量RNAを約1000倍に均等に増幅する技術を確立した。今後は、慢性喫煙による肺気腫マウスとコントロールマウスの細気管支上皮細胞から採取したRNAを用いて、本方法に基づき増幅を行い、遺伝子発現プロファイルを経時的にgene chip上にて解析する。

参考文献

- 1) Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A et al: Elastin-derived peptides and neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 720-724.
- 2) Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K et al: Neutrophil granule proteins in BAL fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1985-1991.
- 3) Hiemstra PS, van Wetering S, Stolk J. Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 1998; 12: 1200-08.
- 4) Yamaguchi T, Itoh Y, Yamada T et al; Development of a sensitive enzyme immunoassay for protein 1/Clara cell 10 kDa protein using monoclonal antibodies. *Rinsho Byori* 1999; 47: 467-472.
- 5) Shimizu H, Hosoda K, Mizumoto M et al ; Improved immunoassay for the determination of surfactant protein A (SP-A) in human amniotic fluid. *Tohoku J Exp Med* 1989 ;157:269-278.
- 6) Inoue T, Matsuura E, Nagata A et al ; Enzyme-linked immunosorbent assay for human pulmonary surfactant protein D. *J Immunol Methods*. 1994; 173: 157-164.
- 7) Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM et al ;

Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997; 277: 2002-2004.

- 8) Luo L, Salunga RC, Guo H et al; Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat Med* 1999; 5: 117-122.
- 9) Ohyama H, Zhang X, Kohno Y et al ; Laser capture microdissection-generated target sample for high-density oligonucleotide array hybridization. *Biotechniques* 2000; 29: 530-536.
- 10) Boers JE, Amberg AW; Clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1585-1591.
- 11) Bernard A, Marchandise FX, Depelchin S et al; Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 1992; 5: 1231-1238.
- 12) Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T et al; Serum and BAL Clara cell 10 kDa protein (CC10) levels and CC10-positive bronchiolar cells are decreased in smokers. *Eur Respir J* 1997; 10:1108-1114.
- 13) Crouch EC; Collectins and pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998; 19: 177-201.
- 14) Voorhout WF, Veenendaal T, Kuroki Y et al ; Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1589-1597.
- 15) Honda Y, Takahashi H, Kuroki Y et al; Decreased contents of surfactant proteins A and D in BAL fluids of healthy smokers. *Chest* 1996; 109: 1006-1009.
- 16) Stieber P, Hasholzner U, Bodenmuller H et al; CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer. *Cancer* 1993 ;72: 707-713.
- 17) Nakamura H, Abe S, Shibata Y et al; Elevated levels of cytokeratin 19 in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic airway inflammatory diseases-a specific marker for bronchial epithelial injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1217-1221.
- 18) Kaminski N, Allard JD, Pittet JF et al; Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 1778-1783.
- 19) Betsuyaku T, Fukuda Y, Parks WC et al; Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am J Pathol* 2000; 157: 525-535.

20) Betsuyaku T, Shipley JM, Watson MA et al; Use Of laser capture microdissection for mRNA analysis of terminal bronchiolar epithelium after intratracheal bleomycin. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: A149.

21) Cosio MG, Hale KA, Niewoehner DE; Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways. Am Rev Respir Dis 1980; 122: 265-321.