

あるがまだ左右シャント有意で低酸素血症が顕著でない患者がsPAH群に多く含まれていたためと思われる。いずれにしてもTM濃度の低下は肺動脈性肺高血圧に特徴的であり、血管内皮細胞表面におけるTM発現の低下および血管内皮の抗血栓作用の低下を反映するものと考えた。

今回の検討では血漿中のP-selectin濃度は対照群とPVH群の間には有意差を認めなかったのに対しsPAH群およびPPH群では高値であった。この結果は血漿P-selectinの上昇は肺動脈性肺高血圧における肺血管内皮細胞障害あるいは血小板活性化による微小血栓形成促進を反映する可能性があると考えた。

PPH群においては血漿中のP-selectin濃度の上昇およびTM濃度の低下が肺血行動態の重症度と相関する傾向があったのに対し、sPAH群では相関が見られなかった。この原因は不明であるがsPAH群では肺動脈圧の上昇には肺血管内皮障害あるいは微小血栓による肺細小動脈抵抗の増大だけでなく、心内シャントによる肺血流量の増加あるいは低酸素血症が大きく寄与するためTM、P-selectin等の血液学的指標と肺血行動態との間に有意な相関が生じなかったと考察した。

PGI₂による治療効果発現機序としてPGI₂に平滑筋増殖や血管壁リモデリングに対する抑制作用や血小板凝集抑制作用など血管拡張作用以外の作用が推定されているが明らかではない¹⁶⁾。本検討で示されたPGI₂による血漿P-selectinの改善は同薬による血小板凝集抑制作用により肺循環のみならず体循環での血小板活性化の抑制さらには微小血栓形成が抑制された機序が原因の一つと考えられる¹⁷⁾。しかし血漿中TMの改善はそれのみでは説明できずPGI₂に血管内皮機能とくに抗血栓活性を改善する効果が期待できると考えられる。実際近年PGI₂の誘導体であるBeraprost sodiumが培養血管内皮細胞のTM発現を改善させた報告がある¹⁸⁾。またPGI₂による肺血管拡張による肺血行動態の改善が血管壁にかかる壁ストレス (Shear-stress) を改善し、血管内皮細胞の機能改善に結びついてい可能性も考えられる^{5) 19)}。

結 論

慢性PH症例における微小血栓の関与を検討するために血管内皮障害と血小板活性化、凝固線溶異常の指標となる血中TM、P-selectin他の凝固線溶系指標を測定した。

(1) 血漿中TM濃度はPPH、sPAHの2群において低値を示したが、PPH群のTM濃度はsPAH群よりさらに低値であった。血漿中P-selectin濃度はPPH、sPAHの2群で高値を示した。PPH群ではTM濃度の低下とP-selectin濃度の上昇は肺血行動態の重症度と相関があった。

(2) PGI₂治療前後で主として PPH 群における可溶性 P-selectin の増加、TM の減少は改善する傾向を示した。これらの指標の改善は同剤の血管拡張作用以外の血小板凝集抑制や内皮機能の改善等の抗血栓効果を示唆すると考えた。

参考文献

- 1) Rubin LJ : Current Concepts ; Primary pulmonary hypertension. N Engl J Med 1997;336: 111-117.
- 2) Rubin LJ (Chairman) : ACCP Consensus Statement ; Primary Pulmonary Hypertension. CHEST 1993; 104:236-250.
- 3) Rich S, Kaufmann E, Levy PS: The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. N Engl J Med 1992; 327:76-81.
- 4) 丸山征郎 : 血管機能とその検査. 日内会誌1991; 80:839-843.
- 5) Hassell KL : Altered hemostasis in pulmonary hypertension. Blood Coag Fibrinol 1998;9:107-117.
- 6) Welsh CH, Hassell KL, Badesch DB, et al : Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. CHEST 1996;110:710-717.
- 7) Dittman WA, Majerus PW : Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. Blood 1990; 75:329-336.
- 8) Stenberg PE, Mcever RP, Shuman MA, et al : A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. J Cell Biol 1985;11:880-886.
- 9) Sakamaki F, Ishizaka A, Handa M, et al : Plasma P-selectin is elevated in acute lung injury. Am J Resp Crit Care Med 1995;151:1821-1826.
- 10) Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, et al : Primary pulmonary hypertension: a national prospective study. Ann Intern Med 1987;107:216-223.
- 11) Kodama S, Uchijima M, Nagai K, et al : One-step sandwich immunoassay for soluble human thrombomodulin using monoclonal antibodies. Clin Chim Acta 1990;192: 191-200.
- 12) Katayama M, Handa M, Ambo Y, et al : A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for human GMP-140/P-selectin. J Immunol Methods 1992;153:41-48.
- 13) Cacoub P, Karmochkine M, Dorent R, et al : Plasma levels of thrombomodulin in pulmonary hypertension. Am J

- Med 1996;101:160-164.
- 14) Ravinovich M, Andrew M, Thom H, et al :Abnormal endothelial factor VIII associated with pulmonary hypertension and congenital heart defects. *Circulation* 1987;76:1043-1052.
 - 15) Geggel RL, Carvalho CA, Hoyer LW, et al : von Willebrand factor abnormalities in primary pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:294-299.
 - 16) Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, et al : A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1996;334:296-301.
 - 17) Friedman R, Mears JM, Barst RJ:Continuous infusion of prostacyclin normalizes plasma markers on endothelial cell injury and platelet aggregation in primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1997;96:2782-2784.
 - 18) Kainoh M, Maruyama I, Nishio S, et al:Enhancement by beraprost sodium, stable analogue of prostacyclin, in the thrombomodulin expression on membrane surface of cultured endothelial cells via increase in cyclic AMP level. *Biochem Pharmac* 1991;41:1135-1140.
 - 19) Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, et al:Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 2000;102:2720-2725.

ラット肺動脈平滑筋細胞のプロスタサイクリン 産生に対するMIFの影響

西村 正治¹⁾ 伊藤 昭英¹⁾ 牧田比呂仁¹⁾ 西平 順²⁾
宮本 顕二³⁾ 山口 悦郎¹⁾

はじめに

原発性肺高血圧症 (PPH) に代表されるような原因不明の肺高血圧症において、組織構築の改変が進行するメカニズムは不明な点が多い。関与する因子の1つと考えられているのがトロンボキサン、プロスタサイクリン (PGI₂) などのアラキドン酸代謝産物である¹⁾。PGI₂は血管拡張、血栓形成阻害、平滑筋細胞増殖抑制などの作用を有し、既に PPH の治療にも用いられている。また最近、肺高血圧症の動物モデルにおいて、PGI₂ 合成酵素 (PGIS) の遺伝子を人工的に肺で発現させることによって進行を抑えることができることが明らかにされ注目されている^{2) 3)}。

一方、PPHを含む種々の肺高血圧症患者において、IL-1β、IL-6などサイトカインの血中濃度が高いことが報告されており⁴⁾、なんらかの炎症反応およびそれに伴って放出されるサイトカインが肺高血圧症の進行に関係している可能性が考えられている。

Macrophage migration inhibitory factor (MIF)は、ステロイドの作用に拮抗し、組織障害や修復過程に関与すると考えられているサイトカインである。我々はこれまでに、PPHのモデルとしてよく用いられるモノクロタリン投与によるラット肺高血圧症において、肥厚した肺動脈中膜にMIFが出現すること、また、抗MIF抗体の投与によって肺動脈平滑筋の肥厚が抑制されることを見出している⁵⁾。今回は、この機序にPGI₂が関与するかに注目したが、今のところこれに関する報告はない。そこで、培養ラット肺動脈平滑筋細胞 (PASMC) を用いて以下の実験を行った。

1) 肺動脈中膜でMIFが産生されている可能性の検討。

2) 中膜平滑筋細胞の培養液にリコンビナント MIF (rMIF) を加えた時の、細胞数ならびに PGI₂ 産生の変化。

対象と方法

対象：動物は、specific pathogen freeにて飼育された6週齢のSprague-Dawleyラットを用いた。

方法：

1. 細胞培養

フェノバルビタールにて深麻酔したラットを脱血死させ、幹から両肺門部までの肺動脈を摘出した。これをコラゲナーゼAとエラスターゼで処理してから実体顕微鏡下に外膜を除き、さらに同じ酵素処理を続けて平滑筋細胞を遊離させた。これを塩類溶液で洗った後、10%ウシ胎児血清加DMEMで培養した⁶⁾。実験は全て継代4代目までに行った。いずれの実験も、細胞が直径6cmのプラスチックディッシュで60~70%になったところで、新鮮な培養液および種々の因子を加えて行った。

2. 中膜平滑筋細胞のMIF産生能

中膜平滑筋細胞がMIFを産生するか否かを検討する目的で、培養液中に TNF-α (0.2-20 ng/ml)または IL-1 β (0.1-10 ng/ml)を加えた。24時間後の培養上清中のMIFをELISAにて測定した。

3. 中膜平滑筋細胞に対するrMIFの影響

rMIFは上記と同様に1-10,000 ng/mlの濃度で添加し、かつ、今回はPGI₂産生へのフォスホオリパーゼA₂誘導の影響を除外するため、アラキドン酸(Sigma)を最終濃度10μMとなるように加えた。24時間後に細胞数をMTTアッセイで評価するとともに⁷⁾、PGI₂産生能の評価として以下の2つを行った。

1) ノーザンブロッティング：PGISおよび、アラキドン

1) 北海道大学第一内科

2) 同中央研究部

3) 北海道大学医療技術短期大学部

酸代謝経路においてその上流に位置するcyclooxygenase-2 (COX-2)のmRNAレベルを、TRIzol (Life Technologies)にて抽出したトータルRNAによるノーザンブロッティングで評価した。ハイブリダイゼーションのシグナルはBAS 2000イメージアナライザー (富士フィルム) にて定量した。プローブは、GenBankに登録されたラットの酵素の塩基配列に基づき、RT-PCRで増幅したものをクローニングして用いた。

2) 上清中6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$)量の測定: PGI $_2$ の安定した代謝産物である6-keto-PGF $_{1\alpha}$ を、RIAキット(NEN Dupont)にて測定した。

4. 統計処理

初代培養で得たPASMCはバッチ間で増殖の速度やPGI $_2$ 産生量が少しずつ異なったため、各バッチ毎に無刺激のコントロールを置き、データはコントロールに対する%として表示した。統計にはANOVAを用い、各群とコントロールの比較にはTukey法を用いた。

結果

培養PASMCの性状

今回用いた細胞は、顕微鏡的に"hill and valley appearance"を示し、かつ、95%以上が抗 α 平滑筋アクチン抗体(1A4, DAKO)による免疫染色で陽性であった (図省略)。したがって、高純度の肺動脈平滑筋細胞であると考えた。

PASMCのMIF産生 (Table 1A) :

無刺激 PASMC の培養上清中には、微量のMIF (1.22 ± 0.46 [SD] ng/ml) が検出された。しかし、TNF- α (0.2-20ng/ml)または IL-1 β (0.1-10 ng/ml)による刺激では、上清中MIFは有意な変動を示さなかった。

rMIF添加時のPASMC増殖能 (Table 1B)

MTTアッセイで評価した細胞数には、1-10,000 ng/mlのrMIF添加によって有意な変動はなかった。

PASMCのRNAによるノーザンブロッティング(Fig. 1)および培養上清中6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 量の測定(Fig. 2) :

ノーザンブロッティングでは、PGIS、COX-2とも無刺激でmRNAが発現されており、PGISmRNAは1 ng/mlでわずかに上昇した他は濃度依存的に低下した。逆に、COX-2mRNAは濃度依存的に誘導された。Fig. 1には代表的な結果を示すが、BAS 2000で測定したシグナル量は、PGISでは10 μ g/ml のMIF添加時にコントロールの73%、COX-2は同じく272%であった。培養上清では、アラキドン酸のみを加えた場合、バッチによって1900-4100pg/mlと高濃度の6-keto-PGF $_{1\alpha}$ が検出され、アラキドン酸代謝が活発であることが窺われた。添加するrMIFの濃度を上げ

Table 1 A. MIF production by cytokine-stimulated rat pulmonary artery SMC.

		MIF (ng/ml, mean \pm SD)
control		1.22 \pm 0.46
TNF- α (ng/ml)	0.2	1.36 \pm 0.37
	2	1.09 \pm 0.47
	20	1.17 \pm 1.01
IL-1 β (ng/ml)	0.1	1.31 \pm 0.54
	1	0.97 \pm 0.58
	10	1.08 \pm 0.54

B. Proliferation of PASMC treated with rMIF.

rMIF (ng/ml)	cell number* (% control, mean \pm SD)
1	104.5 \pm 0.4
10	93.1 \pm 8.7
100	99.1 \pm 12.2
1000	101.5 \pm 4.1
10000	97.4 \pm 5.4

*estimated by absorbance of blue formazan formed from MTT in living cells.

Table 1A. サイトカインで刺激したPASMCの上清中MIF濃度
B. rMIFを加えたときのPASMC増殖能

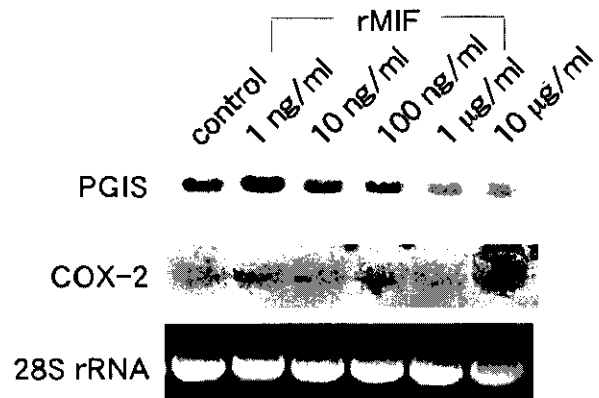


Fig 1 rMIF 添加による PASMC の PGIS および COX-2 mRNA 発現の変化 (ノーザンブロッティング) 最下段は28SrRNAをエチジウムブロマイドで染色したもので、RNAのローディングが均一であることを示す。

るに従って、上清中6-keto-PGF $_{1\alpha}$ は増加する傾向を示し、10 μ g/ml では141.4 \pm 26.6(SD)%となってコントロール群との間に有意差を認めた。

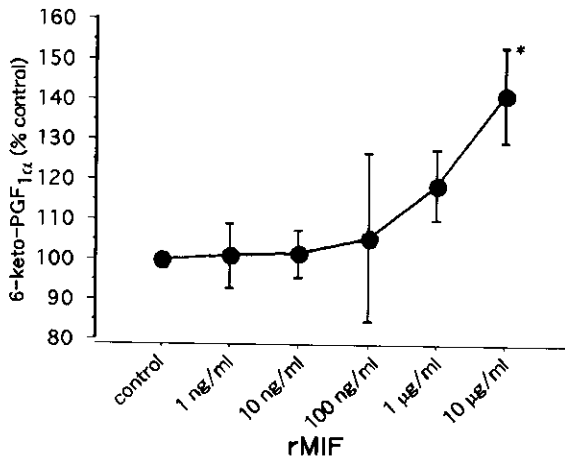


Fig 2 rMIF添加によるPASMC培養上清中6-keto-PGF_{1α}濃度の変化
*はコントロールに対して有意差があることを示す。

考案・結論

今回の研究では、モノクローリンによるラット肺高血圧症モデルで得られた知見を元に、培養細胞を用いた *in vitro* の実験でMIFの産生および作用について検討した。今回用いた高純度のPASMCの培養上清からELISAにてMIFが検出されたことは、PASMCがMIF産生能を有することを強く支持する。その産生量は微量ではあるが、脂肪細胞⁹⁾、マクロファージ¹⁰⁾などと同じオーダーである。IL-1βは上述モデルの病態に関わっていることが報告されているが¹⁰⁾、今回の実験でMIF産生を誘導しなかったことは、中膜平滑筋が上述モデルで正常より多量のMIFを産生しているとしても、IL-1βを介するものではないことを示唆する。これはTNF-αについても当てはまる。また、上述モデルでは他の細胞が産生したMIFが中膜に結合している可能性も今のところ否定し得ず、今後 *in situ* hybridizationや介在する因子の解明が必要である。

MIFのPASMCに対する作用の検討では、まずMTTアッセイで評価した増殖能には明らかな影響は認めなかった。今回の実験は6-keto-PGF_{1α}産生を最大にするため実験中にはほぼconfluentになるような条件で行ったので、対数増殖期での影響は今後検討しなければならないが、6-keto-PGF_{1α}産生への影響は細胞数を反映したものではないことを意味している。

次にPGISmRNAレベルへの影響を検討した。この酵素そのものは生体内では内皮細胞に豊富に存在するがmRNAは平滑筋細胞に多く¹¹⁾¹²⁾、かつ、冠動脈平滑筋細胞ではPGIS遺伝子をトランスフェクションで発現させることによって増殖が抑制されることが示されている¹³⁾。モノクローリンモデルでMIFが中膜に出現することを考え

たとき平滑筋自身のPGISmRNA発現への影響は興味あるものと考えた。結果として、PGISmRNAレベルはrMIFにより抑制された。したがって、上述したように抗MIF抗体が肺動脈平滑筋の肥厚を抑制する機序の一端となり得るものと考えられる。

ただし、PGI₂産生を反映する上清中6-keto-PGF_{1α}はrMIF添加により増加し、mRNAの変動と一見矛盾していた。そこでアラキドン酸カスケードの上流にあり、炎症性サイトカインで誘導されることが知られているCOX-2についても同様の実験を行ったところ、rMIFによる誘導が認められた。これから考えられることは、MIFはアラキドン酸代謝全体を亢進させ、中間代謝産物の合成が増加するので、PGISは抑制しても最終結果としてはPGI₂産生を増加させるという可能性である。これは同時に、PGI₂以外の経路の産物、即ちトロンボキサン、プロスタグランジンE、イソプロスタノールなどの産生が増加する可能性を意味している。トロンボキサンやイソプロスタノールは炎症の増幅や血栓形成に働く可能性がある。また、プロスタグランジンEは一般的には平滑筋細胞増殖に抑制的に作用することが知られているが、肺動脈平滑筋細胞に関しては増殖を促進するとする報告があることは注目される¹⁴⁾。したがって、MIFのアラキドン酸代謝への影響の総和は肺高血圧症の進展に促進的である可能性が考えられる。

動脈硬化症においてはCOX-1および2の誘導によってPGI₂産生が増加するとされ炎症の関与が推定されているが¹⁵⁾、炎症性サイトカインによってPGISが抑制されることを示したのは本研究が初めてである。我々はTNF-αもMIFと同様PGISmRNAを抑制するが、IL-1βは逆に誘導することを見出しており(未発表)、サイトカインの新しい作用点として興味深いものと考えられる。

要約すると、①PASMCはMIF産生能を有する、②rMIFはPASMCのPGISmRNAレベルを抑制する、③しかしrMIFはCOX-2誘導を介してPASMCのPGI₂産生を増加させる。モノクローリンによる肺高血圧モデルで抗MIF抗体が防御的に働いた機序の一つに②があったことが推定されるが、アラキドン酸代謝全体への影響は、本研究だけでは結論できず、*in vivo*で個々の因子を制御するような手法が必要になると考える。

参考文献

- 1) Christman BW, Charles D, McPherson MD, et al: An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 70-75.

- 2) Geraci MW, Gao B, Shepherd DC, et al : Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1999; 103: 1509-1515.
- 3) Nagaya N, Yokoyama C, Kyotani S, et al: Gene transfer of human prostacyclin synthase ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* 2000; 102: 2002-2010.
- 4) Humbert M, Monti G, Brenot F, et al : Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1628-1631.
- 5) 西村正治、牧田比呂仁、辻野一三、他：モノクロタリン(MCT)肺高血圧症ラットにおける抗マクロファージ遊走阻止因子(MIF)抗体の効果に関する研究. 厚生省特定疾患調査研究重点研究事業 特定疾患に伴う肺高血圧症の発症機序の解明と内科的治療指針確立を目指す診療科横断的研究 平成11年度研究報告書 2000; 157-161.
- 6) Morita T, Perella MA, Lee ME, et al: Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1475-1479.
- 7) Hirst SJ, Barnes PJ, Twort CH: Quantifying proliferation of cultured human and rabbit airway smooth muscle cells in response to serum and platelet-derived growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 574-581.
- 8) Hirokawa J, Sakaue S, Tagami S, et al: Identification of macrophage migration inhibitory factor in adipose tissue and its induction by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 235: 94-98.
- 9) Lind M, Trindade MC, Schurman DJ, et al : Monocyte migration inhibitory factor synthesis and gene expression in particle-activated macrophages. *Cytokine* 2000; 12: 909-913.
- 10) Voelkel NF, Tudor RM, Bridges J, et al : Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 664-675.
- 11) Tudor RM, Cool CD, Geraci MW, et al : Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1925-1932.
- 12) Tone Y, Inoue H, Hara S, et al: The regional distribution and cellular localization of m R N A encoding rat prostacyclin synthase. *Eur J Cell Biol* 1997; 72: 268-277.
- 13) Hara S, Morishita R, Tone Y, et al : Overexpression of prostacyclin synthase inhibits growth of vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 216: 862-867.
- 14) Pasricha PJ, Hassoun PM, Teufel E, et al: Prostaglandins E1 and E2 stimulate the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Prostaglandins* 1992; 43: 5-19.
- 15) Belton O, Byrne D, Kearney D, et al: Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102: 840-845.

慢性肺血栓塞栓症（肺高血圧型）における肺血管リモデリング —手術検体を用いた免疫組織学的検討—

田中 良弘¹⁾ 松熊 晋²⁾ 大鹿 芳郎¹⁾ 加瀬 勝一¹⁾
岡田 修³⁾ 木村 弘³⁾ 栗山 喬之³⁾

はじめに

原発性肺高血圧症（以下PPH）等の重症肺高血圧症患者の肺動脈は新内膜過形成（neointimal hyperplasia）により特徴づけられるが、その病因は未だ不明である。このneointima部分では活発な細胞外マトリックス産生が起こっており、TGF- β 等の細胞増殖因子が肺動脈のリモデリングに関与していることが報告されている^{1)~4)}。

また慢性肺血栓塞栓症（肺高血圧型）（以下CTEPH）では肺動脈の血栓塞栓子が器質化し、その器質化血栓により肺血流が肺動脈中隔の毛細管に流入できなくなり肺血管床の減少が起こる事で肺動脈圧の上昇いわゆる肺高血圧が誘発される。CTEPHにおいても重症肺高血圧症例では環流領域肺実質にPPHに類似したneointima形成が起こることが報告されている⁵⁾。このCTEPHの末梢肺動脈リモデリングの原因として肺動脈圧上昇によって血管傷害が誘発されて生じる可能性と、中枢肺動脈に存在する内膜血栓や肥厚した肺動脈壁に浸潤する炎症細胞等から産生されるケモカイン・増殖因子等が肺血管リモデリングをさらに増悪させneointimaを誘発している可能性がある。しかし大部分の急性肺血栓塞栓子は慢性期に移行した場合に血栓が融解するか器質化して肺高血圧に至らずに安定化することから、こういったタイプの肺血栓塞栓症がより重症な肺高血圧型であるCTEPHに移行するののかという詳細な病態メカニズムは未だ明らかにされていないのが現状である。

本研究の目的は中枢型CTEPH（以下マクロCTEPH）の患者に対する肺動脈内膜血栓除去術の際に得られる病理検体を用いて、CTEPHの肺血管リモデリングの病態メカニズムを免疫組織学的に検討する事である。

対象・方法

1998年11月より2000年4月までの間、千葉大学医学部付属病院において心臓カテーテル検査と肺動脈内膜血栓除去術を受けた計6名のマクロCTEPHの患者より得られた病理組織検体を用いて、肺動脈内膜血栓と末梢肺動脈のリモデリングを病理学的に検討した。

病理組織検体のうち肺動脈器質化内膜血栓は肺動脈内膜血栓除去術の際に、末梢肺組織は右中葉から開胸肺生検によりそれぞれ採取し、採取直後に10%中性緩衝ホルマリンに入れて18時間固定した後、50%と70%エタノール中でそれぞれ15分間ずつ2回脱水し、パラフィンブロック中に包埋した。肺血管リモデリングの評価はhematoxylin-eosin (HE) およびelastica van-Gieson (EVG) 染色により行い、細胞外マトリックスの一つであるI型procollagen mRNAの局所発現は、*in situ* hybridizationにより判定した。またCTEPHの肺血管リモデリングにおける病態メカニズム、特にケモカイン・増殖因子の関与を探るため、免疫組織学的検討を試みた。まずマクロファージの遊走を促すCCケモカインであるmacrophage/monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、組織の線維化を促す細胞増殖因子であるbasic fibroblast growth factor (bFGF)、血管内皮増殖と血管新生を誘導するvascular endothelial growth factor (VEGF)、細胞分裂のDNA合成(S)期に合成酵素の補助蛋白として働くproliferative cellular nuclear antigen (PCNA)の4種の蛋白質に対するモノクローナルあるいはポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行った。リモデリング血管を構成する細胞成分の同定は抗- α smooth muscle actin (α -SMA) 抗体と抗ヒトマクロファージ抗体 (HAM56) による免疫組織染色により行った。

また剥離した器質化内膜血栓の構成細胞のアポトーシスの有無をDNA fragmentationを検出するTdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色を用いて判定

1) 自衛隊中央病院 胸部外科

2) 同 研究検査部病理

3) 千葉大学医学部 呼吸器内科

した。またアポトーシス誘導蛋白である caspase 3 の免疫染色でそれを裏付けた。

なお本研究は平成12年度の自衛隊中央病院と千葉大学医学部の医学倫理委員会の承認をそれぞれ受けた後に、肺動脈内膜血栓除去術を施行される患者個人の承諾 (informed consent) を得てから行われた。

結 果

(1) 対象患者の内訳と肺血行動態

6名の年齢と術前の肺血行動態、血液ガス分析値を(表1)に示す。患者は38歳から69歳までで平均年齢は53.3歳、男女比は1:5であった。患者の収縮期肺動脈圧 (sPAP) と平均肺動脈圧 (mPAP) はそれぞれ 81.7 ± 8.2 、 46.7 ± 10.5 mmHg と重症肺高血圧症を呈していた。肺動脈血管抵抗

(PAR) は 826.8 ± 199.0 dynes/cm⁵ · kg と異常高値を示し、血液ガス分析値も PaO₂ 56.7 ± 3.6 mmHg、PaO₂ 34.3 ± 5.9 mmHg と低酸素血症を認めた。

(2) 器質化内膜血栓の病理

マクロCTEPH患者の器質化内膜血栓のEVG染色では、多くの検体で collagen と elastin の束が何層にも層状に重なって壁肥厚を示しており、特に外側の膠原線維層に血管新生 (angiogenesis) あるいは血管再疎通 (recanalization) と思われる像が多数認められた (図1)。

In situ hybridizationではI型procollagenのmRNA発現が器質化内膜血栓のcollagen層に一致して強く見られ、特に新生血管周辺に強く認められた (図2)。これらの結果よりCTEPHの器質化内膜血栓内にもI型collagenの

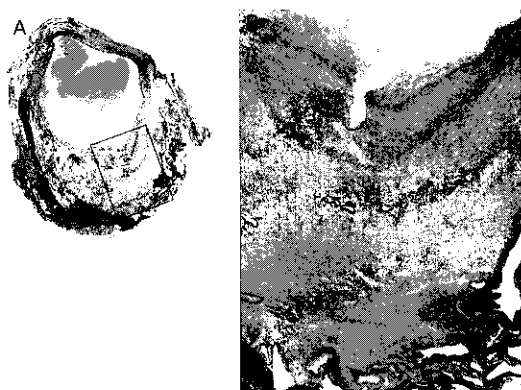


図1 摘出された慢性肺血栓塞栓症 (肺高血圧型) の器質化内膜血栓 (区域枝レベル)

EVG染色 (A: $\times 4$ 、B: $\times 20$) ではCollagen (赤色調) とElastin (黒色調) の層が層状に重なって肥厚を示しており、内膜血栓の外側には蜂巣状に多数の血管新生 (angiogenesis) と血管再疎通 (recanalization) の所見が認められる。

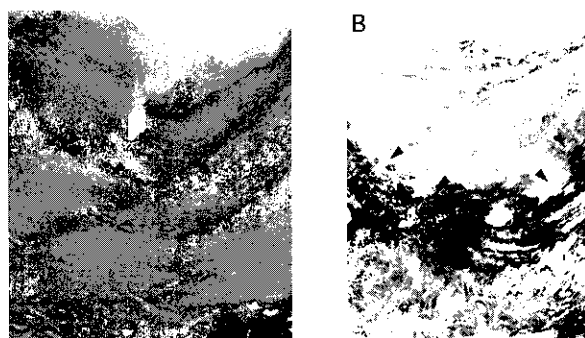


図2 慢性肺血栓塞栓症 (肺高血圧型) における器質化内膜血栓の*in situ* hybridization

A: EVG染色 ($\times 20$)、B: I型procollagenの*in situ* hybridization ($\times 20$)

EVG染色のcollagen層に一致してI型procollagenのmRNAが強く発現している。矢印▼はcollagen層の内側を示しており、新生血管周囲に特に強いシグナルが見られる。

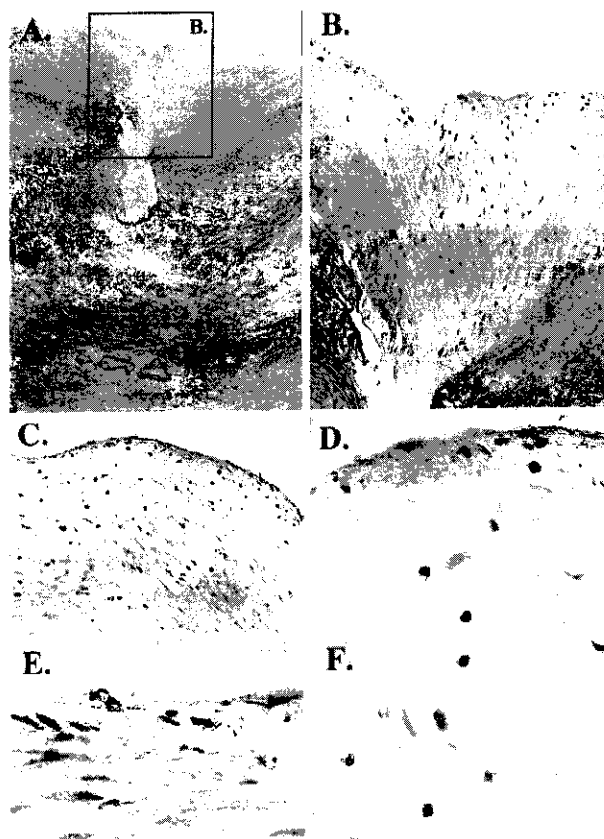


図3 慢性肺血栓塞栓症 (肺高血圧型) における器質化内膜血栓の免疫組織染色

A, B: EVG染色 (A: $\times 20$ 、B: $\times 200$)、C, D, E: MCP-1免疫染色 (C: $\times 100$ 、D: $\times 200$ 、E: $\times 200$)、F: マクロファージ免疫染色 ($\times 400$)

mRNA発現が見られ、血管新生と活発な細胞外マトリックス産生を伴う新たな器質化あるいは血栓内リモデリングが生じている事が示唆された。

免疫組織染色はその事実を更に裏付ける結果となった。MCP-1の蛋白産生は器質化内膜血栓の内腔側の血管内皮・血管平滑筋細胞・マクロファージに認められ(図3)、特に器質化内膜血栓の外側に再疎通した新生血管の内皮に強く認められた(図4)。またVEGFもMCP-1と同様、器質化血栓内に再疎通した新生血管の内皮に強く認められていた(病理提示せず)。またPCNAとbFGFの免疫組織染色では器質化血栓外側に存在する新生あるいは再疎通血管の内皮と周辺の血管平滑筋細胞・マクロファージに陽性所見を認めた(図5、図6)。

TUNEL染色では一部の内腔側の血管内皮と再疎通血管内皮およびその周辺細胞で核陽性像が認められ(図

7)、アポトーシス誘導蛋白であるcaspase 3の産生も同部位に一致して認められた(病理提示せず)。以上の結果より器質化内膜血栓を構成する組織では、活発な血管リモデリングと同時に、一部に細胞死が混在して器質化が進んでいく可能性が示唆された。

(3) 末梢肺組織の病理：開胸肺生検で得られた右中葉の肺組織のEVG染色では、6例中4例(66.7%)に細小動脈のneointima形成が認められた(図8)。他の2例では生検組織内に明らかなリモデリング肺血管は確認されなかった。現在までのところリモデリングを生じた末梢肺動脈の免疫組織染色・TUNEL染色では陽性像が得られておらず、引き続き免疫組織学的検討を行っているところである。

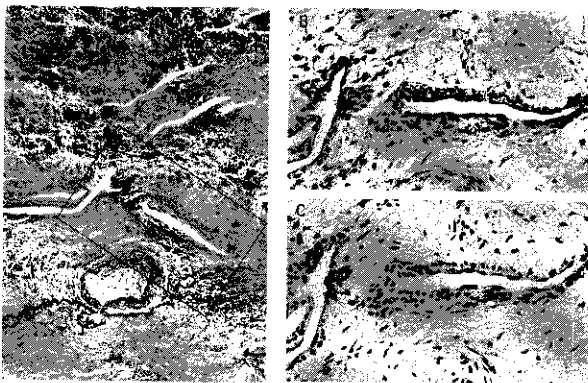


図4 器質化内膜血栓(外側)のMCP-1免疫組織染色
A: EVG染色×40、B: MCP-1染色×200、C: Negative Control ×200、MCP-1は新生血管や再疎通血管の内皮に特に強く認められ、周辺のマクロファージの一部にもMCP-1陽性所見が見られる。

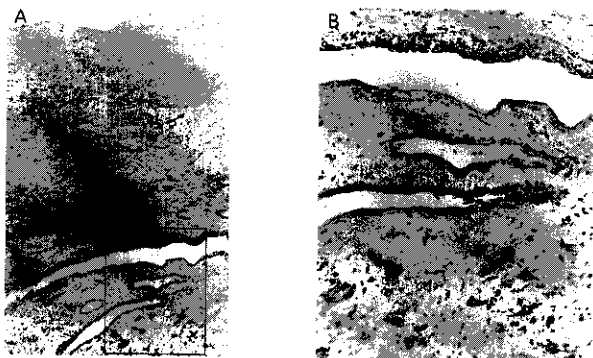


図5 慢性肺血栓塞栓症(肺高血圧型)の器質化内膜血栓におけるPCNA免疫組織染色
抗ヒトPCNA抗体による免疫組織染色(A: ×20、B: ×100)では、外側の新生血管あるいは再疎通血管の内皮と周辺の血管平滑筋細胞、マクロファージに強い染色が認められる。

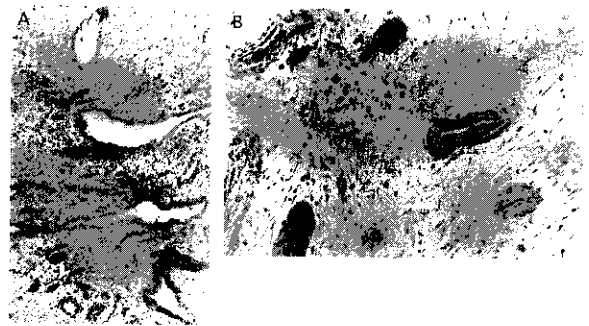


図6 慢性肺血栓塞栓症(肺高血圧型)における器質化内膜血栓のbFGF免疫組織染色
抗ヒトbFGF抗体による免疫組織染色(A: ×40、B: ×200)ではPCNAと同様、内膜血栓外側の新生血管あるいは再疎通血管の内皮と周辺の血管平滑筋細胞、マクロファージに強い染色が認められる。

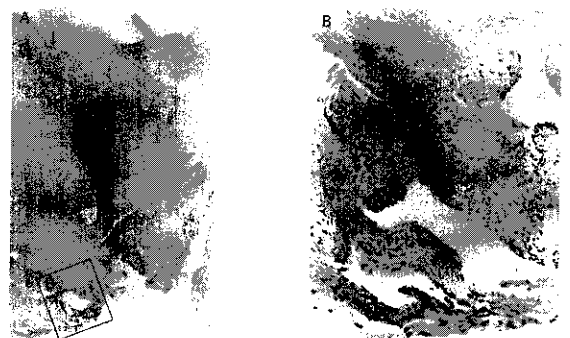


図7 慢性肺血栓塞栓症(肺高血圧型)における器質化内膜血栓のTUNEL染色
器質化内膜のTUNEL染色(A: ×20、B: ×200)では外側の再疎通血管内皮および周辺細胞の核に陽性像が見られる。また内腔側血管内皮の一部にも陽性像が見られ(↓)、器質化血栓内での細胞死の存在が疑われる。

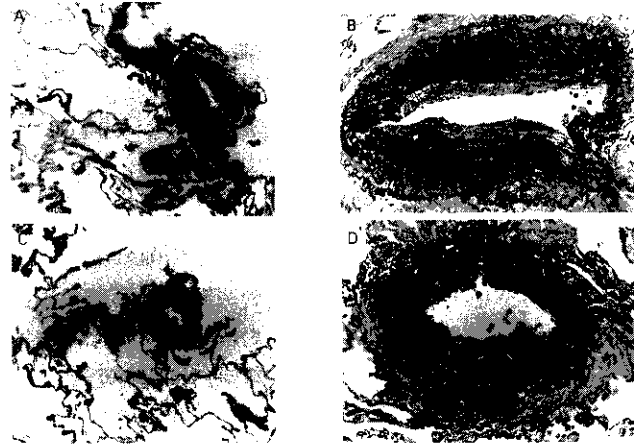


図8 開胸肺生検で得られた症例5 (A, B)と症例6 (C, D)の右中葉肺組織のEVG染色
末梢肺細小動脈の中・外膜肥厚と共に neointima 形成が認められる (A, C : ×20、B, D : ×200)。

考 察

PPH 患者の肺動脈リモデリングでしばしば認められる neointima 形成は末梢肺動脈と中枢肺動脈でその成因を異にしていると考えられている。すなわち末梢肺動脈では TGF- β 等の増殖因子の産生が中膜平滑筋で認められるのに対し、中枢の弾性肺動脈では neointima 内に浸潤したマクロファージで TGF- β の産生が認められ、周辺に遊走した合成型の血管平滑筋細胞による細胞外マトリックス産生を促すという全身の動脈系で見られる動脈硬化に類似した組織変化が生じていると思われる^{1) 4)}。すなわち PPH の末梢と中枢の肺動脈ではそれぞれ異なった機序でリモデリングが生じている可能性がある。

一方、マクロCTEPHでは血栓塞栓子によって末梢肺実質の血管床の減少から起因する肺血管抵抗の上昇が起こり、肺高血圧が誘発され、重症例では灌流領域の肺実質に neointima 形成が生じるとされる⁹⁾。しかし我が国の報告例ではマクロCTEPHの基礎疾患として深部静脈血栓が検出された頻度は少なく17% (11/16) であり、剖検でも7例中6例で塞栓源が不明であった^{6,7)}。またCTEPH患者で既往に急性肺動脈血栓塞栓症を必ずしも反復しているとは限らない事実を考慮すると、何らかの factor が非塞栓部 (灌流領域) の末梢肺動脈のリモデリングを誘発している可能性がある。器質化血栓より産生されるケモカイン・増殖因子が remote factor として関与する可能性も否定できない。

我々は以前にCTEPHの患者の血漿中でケモカインの一つである MCP-1 レベルが上昇し、末梢肺血管抵抗と正の

相関を示す事を報告した⁹⁾。そこで慢性期に産生されるケモカイン・増殖因子が局所のみならず、末梢肺動脈の neointima 形成にも影響を及ぼしているのではないかと推測し、同時に免疫組織学的検討を試みたが現在までは末梢肺動脈の陽性像は得られていない。器質化内膜血栓では、細胞外マトリックスの不規則な層状配列を伴っており、*in situ hybridization* では活発な血管リモデリングが生じている事が判明した。またケモカインである MCP-1 と増殖因子である bFGF、VEGF 等の蛋白産生が新生あるいは再疎通した血管内皮と周辺の血管平滑筋に証明された。これらの増殖因子は血栓の器質化を促進し血栓内リモデリングを助長していると思われる。

開胸肺生検で得られた肺組織のEVG染色では6例中4例 (66.7%) に (図8) の様な細小肺動脈の neointima 形成が認められた。neointima が検体中に認められなかった2例では生検組織の大きさが不十分で病的血管が含まれていなかった可能性があるものの、neointima が見られた4例はいずれも肺動脈圧と肺血管抵抗が高い症例に多い傾向にあり傾向にあり (表1)、今後は血行動態とリモデリングの相関を検討していきたいと考える。また今回の検討では検体数が少なく、中枢の器質化血栓部で産生されたケモカイン・増殖因子の末梢肺動脈への remote effect に関しては明らかな相関は見られなかった。

また PCNA と Caspase 3 の免疫組織染色と TUNEL 染色により器質化血栓においては DNA 合成亢進が起こっている反面、一部の細胞では細胞死が同時に起こっているという相反する矛盾した結果を示した。冠状動脈や全身の動脈硬化巣においてもアテロームプラーク内に新生血管に

表 1 慢性肺血栓塞栓症(肺高血圧型)を有する6症例の血行動態と血液ガス分析値

case	age	sex	sSAP	sPAP	mPAP	mPAP(O ₂)	CO	CI	PAR	PaO ₂	PaCO ₂
1*	54	F	160	106	65	64	4.3	2.93	1097	54	28.9
2	45	F	119	69	40	36	5.3	2.88	555	58	31.4
3	47	F	100	60	36	33	2.8	1.86	840	59	28.4
4*	69	F	160	96	50	40	5.1	3.49	723	53	37.5
5*	38	M	116	90	49	40	4.2	2.29	739	62	36.0
6*	67	F	98	69	40	33	2.8	2.24	1007	54	43.8

sSAP : systolic arterial pressure, mPAP : mean pulmonary arterial pressure, mPAP (O₂): mPAP during 100% O₂ inhalation, CO: cardiac output, CI: cardiac index, PAR: pulmonary arterial resistance (dynes/cm⁵·kg), *末梢肺生検でneointimaが認められた症例

よる細胞増殖が起こっている反面、プラーク内に浸潤したマクロファージや血管平滑筋の一部にアポトーシスが見られ、これがアテロームプラークの不安定性 (plaque instability) を生じさせて、プラークの破綻や出血の原因となっているという報告⁸⁾が増えている。本研究の中枢肺動脈器質化血栓においてもα-smooth muscle actin陽性のmyofibroblastの増生とマトリックス蛋白の産生亢進による器質化の促進が生じる反面、一部の血管内皮のアポトーシスが更なる血栓反復を誘発している可能性も示唆される。

今後、更に症例数、手術検体数を増やしてCTEPHの病態メカニズムについて詳細な検討を行いたいと考える。

結 語

1. マクロCTEPH患者から得られた中枢肺動脈の器質化内膜血栓において、活発な血管リモデリングと共に一部で構成細胞のアポトーシスが認められた。
2. MCP-1、bFGF、VEGF等のケモカイン・増殖因子が血管リモデリングに関与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Botney, M. D., Kaiser, L. R., Cooper, J. D. et al.: Extracellular matrix protein gene expression in atherosclerotic pulmonary arteries. *Am. J. Pathol.* 140: 357-364, 1992
- 2) Botney, M. D., Liptay, M. J., Kaiser, L. R. et al.: Active collagen synthesis by pulmonary arteries in human primary pulmonary hypertension. *Am. J. Pathol.* 143: 121-129, 1993
- 3) Botney, M. D., Bahadori, L., Gold, L. I.: Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension: potential role for transforming growth factor-β. *Am. J. Pathol.* 144: 286-295, 1994
- 4) Bahadori, L., Milder, J., Gold, L. I. et al.: Active macrophage-associated TGF-β colocalizes with type I procollagen gene expression in atherosclerotic human hypertensive pulmonary arteries. *Am. J. Pathol.* 146: 1140-1149, 1995
- 5) Wagenvoort, C.: Pathology of Thromboembolism. *Chest.* 107 Suppl. 10S-16S, 1995
- 6) Kimura, H., Okada, O., Tanabe, N. et al.: Plasma MCP-1 and pulmonary vascular resistance in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am. J. Resp. Critic. Care Med.* 2001 (in press)
- 7) Yutani C., Histopathological aspects of pulmonary thromboembolic hypertension. *J Jap. Coll of Angiol.* 36, 417-420, 1996.
- 8) Bauriedal G, Hutter R, Welsch U, Luderitz B. Apoptosis in human atherosclerosis. *Apoptosis in Cardiac Biology.* Kluwer Academic Publishers, 2000.

原発性肺高血圧症重症例に対するepoprostenol

持続静注療法における血漿BNP値の推移

渡辺 絵里 志賀 剛 若海 美智 松田 直樹
木村 暢孝 笠貫 宏

はじめに

原発性肺高血圧症 (PPH) に対する prostacyclin (epoprostenol) 持続静注療法の有用性が示されている¹⁾。Epoprostenol 持続静注療法の効果判定として、現在のところ6分間歩行などの運動耐容能が一般的に用いられる。しかし、重症 PPH では頻回に運動負荷試験を行うことは困難であり、治療効果判定として非侵襲的な指標を加え、総合的に判断することが望まれる。PPH では肺血管抵抗が上昇し、右室後負荷が上昇するため右心機能が低下する。このような肺高血圧に伴う右心機能低下例では血漿 brain natriuretic peptide (BNP) 値の上昇が報告されている²⁾。今回、重症 PPH 患者に対する epoprostenol 持続静注療法中の運動耐容能などの諸症状、諸検査値とともに血漿 BNP 値の推移を観察し評価した。

対象と方法

NYHA IV 度の重症 PPH 患者 4 例 (女性、18~52 歳) を対象に epoprostenol の導入を行い、経過中血漿 atrial natriuretic peptide (ANP) 値、BNP 値、endothelin-1 (ET-1) 値、血清尿酸値とドップラー心エコー図により推定した右室収縮期圧 (RVSP) 値の推移を観察した。

結果

全症例とも epoprostenol 導入により自覚症状の改善 (NYHA 心機能分類 II~III 度) を認めた。さらに血漿 ANP 値、BNP 値、血清尿酸値と RVSP 値は低下した。しかし、血漿 ET-1 値は epoprostenol 前後で目立った変動は認められなかった。(表) そのなかで個人内の変動として病状の変化を最も鋭敏に反応したのは血漿 BNP 値であった。(図)

考察・結論

PPH は進行性で致死性の疾患である。近年、進行性の PPH に対する epoprostenol 持続静注療法の有用性が示されている¹⁾。その機序として血小板に作用する抗血栓作用と全身および肺動脈に対する強力な血管拡張作用が考えられている³⁾。PPH の epoprostenol 持続静注療法は患者の quality of life は著明に改善させるが肺動脈圧の変化は小さく、epoprostenol 持続静注療法による効果を鋭敏に反映する指標が少ない。

PPH では肺血管抵抗が上昇し、右室後負荷が上昇するために右心機能が低下する⁴⁾。そのなかで、肺高血圧に伴う右心室機能低下例では plasma BNP 値が上昇していることが報告されている²⁾。肺高血圧での BNP 値の上昇の機序

表 epoprostenol 持続静注療法前後での各指標の変化

	発症から導入までの期間	NYHA	RVSP	ET-1	BNP
症例 1	12ヶ月	IV → II _m	120 → 81	1.69 → 2.75	1069 → 67
症例 2	7ヶ月	IV → II _s	91 → 69	1.73 → 2.51	136 → 9
症例 3	75ヶ月	IV → III	145 → 135	3.17 → 3.39	647 → 196
症例 4	63ヶ月	IV → III	125 → 108	7.25 → 2.60	985 → 134

(mmHg) (pg/ml) (pg/ml)

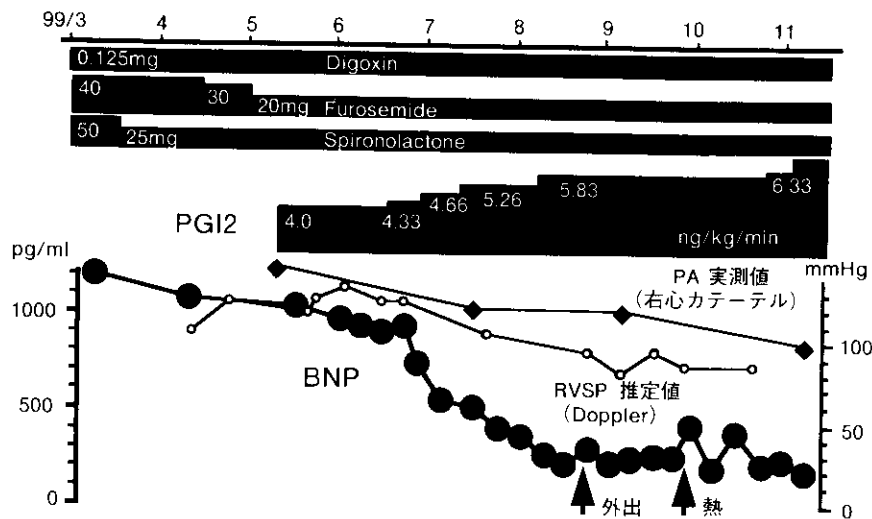


図 epoprostenol持続静注療法中のBNP値の推移 (症例1)

Change of plasma brain natriuretic peptide (BNP) level during continuous intravenous infusion of epoprostenol. Solid circles, plasma BNP level; open circles, estimated right ventricular systolic pressure (RVSP) using Doppler echocardiography.

としては以下のことが考えられる。(1) 肺高血圧症では肺血管抵抗が上昇し、右室後負荷が上昇することで右心機能が低下するため血漿BNP値が上昇する。(2) 肺高血圧症患者ではET-1値が上昇しているという報告⁹⁾や、肺高血圧症患者の肺動脈内皮での endothelin-1の messenger ribonucleic acid (RNA)発現が増強していること¹⁰⁾が示されている。本研究の対象患者における血漿ET-1値は変動を示さなかったが局所における ET-1の変化は否定できず、ET-1がBNPを発現させる因子であること¹¹⁾から血漿BNP値上昇に一部関与している可能性はある。

肺動脈圧などの血行動態の指標よりもBNP値の方がより患者の病状の改善を鋭敏に反応していた理由としてBNPは心室筋細胞より constitutive pathwayを介して分泌され⁸⁾、さらに心室への overload に即座に反応しBNPの messenger RNAが発現すること¹²⁾などから右心室への負荷の変化や神経内分泌系の変化を反映しやすいことが考えられる。経過を提示した例も全体として改善傾向を示しているなか、労作や感染の合併による症状の一時的な悪化を反映して血漿BNP値が再上昇を示していた。

PPHに対するepoprostenol持続静注療法の効果は血行動態や運動負荷試験で評価されるのが一般的である¹³⁾。しかし、NYHAIV度の状態では頻回に6分間歩行などの運動負荷試験や右心カテーテル検査を行うことはriskが高いと思われる。また心臓エコー検査も計測のために一定の体位を保持しておくことが患者の苦痛を伴い、微妙な変化を観察するには限界がある。よって重症PPHの患者に対して採血を行い血漿BNP値を測定することは、簡便で患

者の肉体的苦痛を最小限にできるという利点がある¹⁴⁾。

重症PPH患者に対するepoprostenol持続静注療法の効果を評価する一つの指標としてBNP値の測定は簡便で有用かもしれない。今後、さらなる臨床例での検討が期待される。

参考文献

- 1) Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, et al: A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension: The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 296-302.
- 2) Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, et al: Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:202-8.
- 3) Vane JR, Botting RM: Pharmacodynamics profile of prostacyclin. *Am J Cardiol* 1995;75: 3A-10A.
- 4) Gaine SP, Rubin LJ: Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1998;352:719-725.
- 5) Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, et al: Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 1991;114:464-469.
- 6) Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al: Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328: 1732-1739.
- 7) Horio T, Kohno M, Takeda T: Cosecretion of atrial and

brain natriuretic peptides stimulated by endothelin-I from cultured rat atrial and ventricular cardiocytes. *Metabolism* 1993; 42: 94-6.

- 8) Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, et al: Brain natriuretic peptide(BNP) as a novel cardiac hormone in humans: evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, ANP and BNP. *J Clin Invest* 1991;87:1402-1412
- 9) Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, et al : Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 1995;96: 1280-7.
- 10) Wax D, Garofano R, Barst RJ: Effects of long-term infusion of prostacyclin on exercise performance in patients with primary pulmonary hypertension. *Chest* 1999;116;914-920.
- 11) Wakaumi M, Shiga T, Nozaki K, et al : Plasma brain natriuretic peptide as a parameter to assess efficacy of continuous intravenous infusion of prostacyclin (epoprostenol) to treat severe primary pulmonary hypertension: A case report. *Heart Vessels* 2000;15:144-146.

静注用Ca拮抗薬による急性血管拡張試験の有用性の検討

宮地 克維 松原 広己 大江 透

はじめに

原発性肺高血圧症 (PPH) の治療として、近年 prostacyclin 長期持続点滴の有効性が示され^{1)~3)}、本邦でも治療が行われた。それにより prostacyclin の有効性が示され⁴⁾、1999年よりその投与が、さらに2000年より在宅治療が保険適応となった。しかし、持続静注用カテーテル由来の感染症と、薬剤が高額であることなどが問題となっている。

一方、Ca拮抗薬が有効なPPH症例の存在が報告され⁵⁾、その有用性が示された^{6)~7)}。臨床的にCa拮抗薬が有効な症例 (responder) を経験することは少なく、30%以下とされている⁷⁾。しかしそのような症例に対して適切な治療を行うことは患者の生活の質や生存率の向上だけでなく、医療行政上も利点が多く積極的に行うべきと考える。その判別のための各種急性血管拡張試験^{7)~11)}は、ショックなどの重篤な合併症の危険性などから本邦の医療機関において広く行われているとは言い難い。

当施設では、安全に施行可能な急性血管拡張反応を求めて、低用量の静注用Ca拮抗薬の使用を試みている。本研究ではその結果を踏まえ、低用量静注用Ca拮抗薬による急性血管拡張試験の有用性を検討するとともに、急性血管拡張試験の判定基準における肺動脈圧の重要性を再確認し、さらにCa拮抗薬内服治療の重要性について検討した。

対象と方法

1999年4月から2001年1月までに入院した肺高血圧症患者11例 (平均年齢29.7歳 (16-58歳)、男性2例 女性9例。PPH6例、二次性肺高血圧症 (SPH) 5例) に対してCa拮抗薬による急性血管拡張試験を行った。急性血管拡張試験を行う時点で全例 prostacyclin 製剤を使用しており、うち女性2例は prostacyclin 静注製剤を使用していた (経口用 prostacyclin 製剤60-120 μ g/日、静注用 prostacyclin 製剤9ng/kg/分)。Swan-Ganz カテーテルによる肺動脈圧と、観血的もしくはカフによる末梢動脈圧を持続的にモ

ニタリングしながら、Nicardipine 5 μ g/kgを5分間かけて静注し、自覚症状、血行動態を評価した。心拍出量はFick法により算出した。20%以上の総肺血管抵抗 (TPR) の低下を認めた場合Responderと判定した¹¹⁾。responderと判定されないもの、試験中収縮期血圧70mmHg以下、50/分以上の心拍数の増加もしくは減少、その他全身症状 (低拍出状態など) 等投与継続が危険と考えられる所見が認められた場合、試験を中止し、non-responder と判定することとした。

Responder症例に対しては高用量Ca拮抗薬の内服投与を行った。(Nifedipine60-80mg)。Non-responder の PPH 症例に対してはprostacyclin持続静注療法を開始もしくは増量を行った。SPH症例に対しては経口用 prostacyclin 製剤を増量 (最高180 μ g/日) した。PPH6症例に対しては治療開始2カ月目に、再度Swan-Ganzカテーテルによる右心カテーテル検査を行い、血行動態の評価を行った。

結果

急性血管拡張試験では11症例中3例で responder と判定した (うち PPH2例) (図1 a)。試験中止となった症例は認めなかった。Responderのうち PPHの1症例では肺動脈平均圧 (mPAP) の著明な低下を伴うTPRの減少を認めた (図2 a b)。他の2例では心係数 (CI) 上昇に伴うTPRの減少を認めた (図2 a b)。これら responder に対しては試験後からCa拮抗薬を開始した。Non-responderでは静注によりCIの増加する症例を認めるも mPAPの低下は来さず、TPR 減少は20%未満であった。一方、本試験で non-responder と判定した PPH 症例に対しては Prostacyclin 持続静注を開始した。開始後2ヶ月目において全症例で自覚症状の改善を認めた。Responderのうち、急性血管拡張試験で mPAPの著明な低下をとともなうTPRの低下を認めた症例では、Ca拮抗薬内服にてCIの78%増加と、mPAPは42%、TPRは68%の低下を示した (図1 b)。急性血管拡張試験でCI増加に伴うTPRの減少を認めた症例ではCIの31%増加に伴うTPRの22%減少を認めるも、mPAPは不変であった。一方、non-responder では、急性血管拡張試験時に mPAP103mmHg と著明な肺高血圧を示した症例で、慢性期mPAPは71mmHgと30%のmPAPの低下を認め

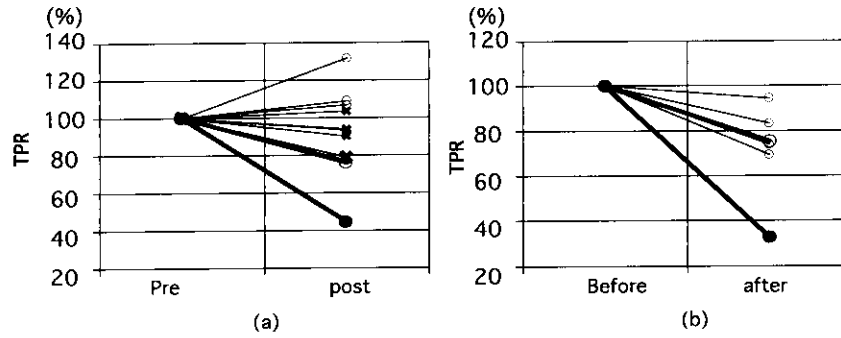


図1 急性血管拡張試験前後(a)、及び慢性治療前後(b)のTPRの変化

太線は急性血管拡張試験でresponderと、細線はnon-responderと判定した症例を示す。また●はCa拮抗薬responderを、○はCa拮抗薬non-responderを示す。

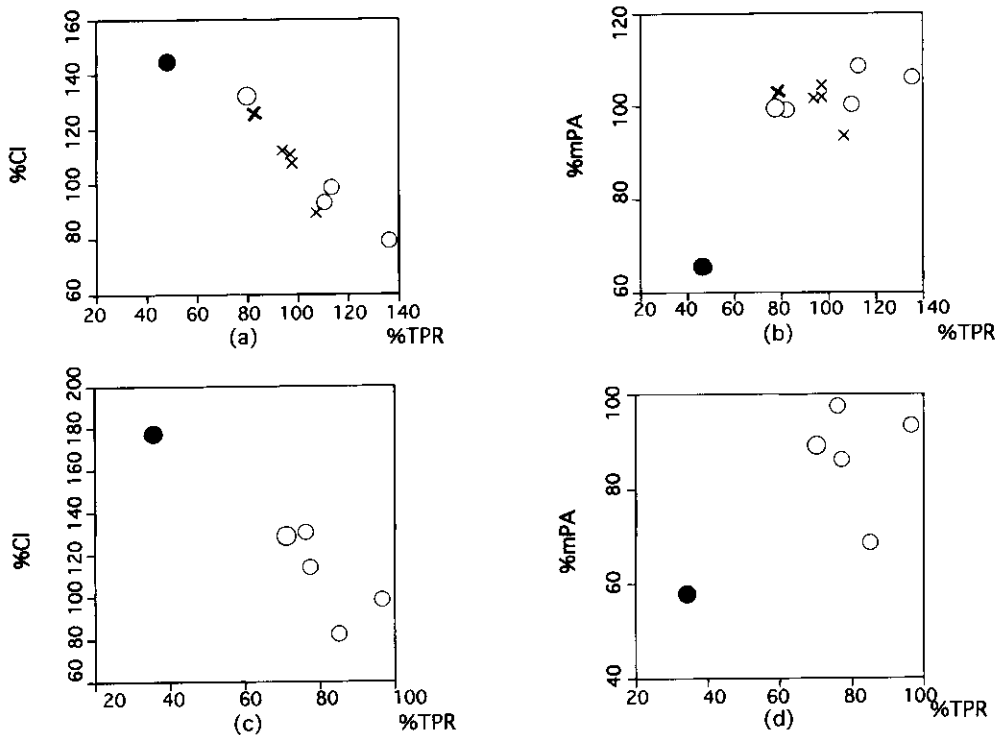


図2 急性血管拡張試験時(a、b)と慢性治療期(c、d)のTPRの変化率とCI(a、c)及びmPA(b、d)の変化率との関係

たが、他の症例ではmPAPの低下は10%以内にとどまり、TPR低下は30%以内であった(図2 c d)。以上の結果からCa拮抗薬による急性血管拡張試験によってresponderの判定が可能であると考えた。

考案・結論

急性血管拡張試験に用いる薬剤としては入手が容易であること、代謝・分解が早いこと、投与量の調節が容易であること、さらに体血圧の低下を来さないことが望ましい。これまでに、経口Ca拮抗薬⁷⁾, prostacyclin⁸⁾, nitric oxide^{9) 10)}, adenosine¹¹⁾による急性血管拡張試験が報告され

ており、その反応によって経口Ca拮抗薬療法の慢性効果の予測が可能とされている。Richらの原法¹¹⁾であるCa拮抗薬内服は代謝・分解が遅く、投与量の調節も困難であり、何よりも過度の体血圧低下を来すおそれがある。海外で用いられているadenosineは我が国においては入手が困難であり、nitric oxideは大がかりな装置が必要となり煩雑である。最近我が国においても使用可能となったProstacyclin静注製剤においては、使用初期には体血圧低下が優位であることが知られており、やはりこの目的には適さない。

一方我々の施設で使用している Nicardipine 静注製剤

は、国内での入手が容易で、 α 半減期が2.7分と代謝も早く、少量持続静注することにより投与量の調節も容易である。

さらに血管拡張剤の急性効果を調べる目的が、治療の手段としてCa拮抗薬等の血管拡張薬の有効性を判定することであるならば、今回我々の施設で行った静注用Ca拮抗薬による急性血管拡張試験によるresponderの判定は他の方法よりも論理的であるともいえる。静注用Ca拮抗薬による急性血管拡張反応の評価は従来の方法よりも安価であり、手間もかからず、同様の効果と安全性が期待できることが示唆され、有用性が高いと考える。

PPHに対する経口血管拡張薬としては、現在Ca拮抗薬の他、Beraprost sodiumが用いられている。これは本邦で開発された経口Prostacyclin製剤であり、PPH症例に対しても有効とされている¹²⁾¹⁴⁾。また、その作用機序として、血管拡張のみならず、血管病変を退縮させる作用も示唆されている。昨年度の研究報告によると¹⁵⁾急性血管拡張試験で responder と判定された症例に対して Beraprost sodiumの投与は示されているが、Ca拮抗薬投与については言及されていない。今回当院で経験した症例はBeraprost sodium120 μ g/日が投与されていたにもかかわらず、Ca拮抗薬に対して血管拡張反応を示した。このことはBeraprost sodiumとCa拮抗薬では血管拡張における作用機序が異なるためと考えられる。そのためCa拮抗薬responderはBeraprost sodium responderに必ずしも包含されないことを認識して、治療戦略を練る必要がある。

また、急性血管拡張試験の判定において、昨年度の研究報告書では明確な基準が示されていない。RichらがCa拮抗薬大量療法を提唱した際には肺血管抵抗 (PVR) とmPAPの20%以上の低下をもって responder としていたが、後の報告ではPVRの20%以上の低下のみをresponderとしている。当院で経験したresponderのうちCa拮抗薬が著効した症例はmPAPの著明な低下を示した。一方Ca拮抗薬が無効であった症例ではmPAPは不変であったことから、responderの定義としてはやはり当初Richらが提唱していたとおり、PVR (もしくはTPR) とmPAPの低下を来す場合とすべきと考える。

今回、検査時に肺動脈圧高値の症例については適切に判定することができなかった。これはその症例において血管収縮が高度であり、今回用いた極微量のNicardipineでは血管収縮を緩和するには至らなかったことが予想される。このような誤判定を防ぐには一回投与量の増量や中止基準を満たすまで漸増するなどを図る必要が生じる。しかし、血管拡張試験はあくまでも試験であり、安全に行われることが大前提であるため困難である。ま

た、responderと判定し、Ca拮抗薬が有効であった症例が1症例のみであることから、この結果のみからすべてを論ずることは危険である。

今後、さらなる症例の蓄積によって、Nicardipineの投与方法の検討、SPHに対するCa拮抗薬による急性血管拡張試験の有用性の検討等を目指す予定である。

参考文献

- 1) Jones DK, Higenbottam TW, Wallwork J. Treatment of primary pulmonary hypertension intravenous epoprostenol (prostacyclin). *Br Heart J.* 1987; 57: 270-278.
- 2) Rubin LJ, Mendoza J, Hood M, et al. Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous epoprosterol (prostacyclin). Result of a randomized trial. *Ann Intern Med.* 1990; 112: 485-491.
- 3) Barst RJ, Rubin LJ, Mcgoon MD, et al. Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. *Ann Intern Med.* 1994;121: 409-415.
- 4) 国枝武義、河合忠一、白土邦男、他. 原発性肺高血圧症に対するエポプロステノールナトリウムの臨床評価. *臨床医薬* 1998; 14: 1091-1119.
- 5) Saito D, Haraoka S, Yoshida H, et al. Primary pulmonary hypertension improved by long-term oral administration of nifedipine. *Am Heart J.* 1983; 105: 1041-1042.
- 6) Rich S, Brundage BH. High dose calcium channel blocking therapy for primary pulmonary hypertension: evidence for long-term reduction in pulmonary artery pressure and regression of right ventricular hypertrophy. *Circulation* 1987; 76: 135-141.
- 7) Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high dose calcium channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 76-81.
- 8) Rubin LJ, Groves BM, Reeves JT, et al. Prostacyclin-induced acute pulmonary vasodilation in primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1982; 66: 334-338.
- 9) Pepke-Zaba J, Higgenbottum W, Tuan Ding-Xuan A, et al. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilation in primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; 338: 1173-1174.
- 10) Ricciardi MJ, Knight BP, Marzinez FJ, et al. Inhaled nitric oxide in primary pulmonary hypertension. A safe and effective agent for predicting response to nifedipine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; 32: 1068-1073.

- 11) Schrader B. Inbar S. Kaufmann E, et al. Comparison of the effects of adenosine and nifedipine in primary pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1992;19: 1060-1064.
- 12) Okano Y. Yoshioka T. Shimouchi A. et al. Orally active prostacyclin in primary pulmonary hypertension. *Lancet* 1997; 349: 1365.
- 13) 岡野嘉明、吉岡公夫、下内章人他. 原発性肺高血圧症重症例におけるベラプロストナトリウムの急性効果と慢性効果. 厚生省特定疾患調査研究重点研究事業：特定疾患に伴う肺高血圧症の発症機序の解明と内科的治療指針確立を目指す診療科横断的研究 平成10年度研究報告書 1999; 23-26.
- 14) Nagaya N. Uematsu M. Okano Y. et al. Effect of orally active prostacyclin analogue on survival of outpatients with primary pulmonary hypertension. *J. Am Coll Cardiol.* 1999; 34:1188-92.
- 15) 岡田修、田辺信宏、國井玲子、他. 原発性肺高血圧症新規登録状況. 厚生省特定疾患調査研究重点研究事業「特定疾患に伴う肺高血圧症の発症機序の解明と内科的治療指針確立を目指す診療科横断的研究」平成11年度研究報告書 2000; 205-209.

左室収縮性が保持されている症例における左室充満圧の評価

山本 一博

はじめに

肺高血圧症例において、左心不全に伴なう2次的な肺高血圧であるか、左心不全を伴わず肺血管における異常から生じることか、まず鑑別しなくてはならない。非侵襲的鑑別には心エコー・ドプラ法が広く用いられており、拡張型心筋症や陳旧性心筋梗塞のように左室駆出率で評価される左室収縮機能障害が認められる、あるいは僧房弁閉鎖不全や僧房弁狭窄症が認められれば、左心不全による肺高血圧を強く疑い、僧房弁疾患がなく、左室収縮性が保持されていれば、肺血管床における異常から生じる肺高血圧症と診断されることが多かった。しかしながら、近年の疫学調査より、左心不全症例の約60%は左室収縮障害を認めるものの、40%の症例には収縮機能障害を認めないことが明らかとされた¹⁾。このような症例は左室拡張機能障害により左室充満圧が上昇するとされている。しかし収縮機能が保持され、左室拡大も認めないことから、ルーチンの心エコー・ドプラ検査ではこのような拡張不全の存在が見逃されてきた。

パルス・ドプラ法を用いて記録される左室流入血流速度波形の急速流入期ピーク血流速度と心房収縮期ピーク血流速度の比 (E/A) の上昇、急速流入期血流速度の deceleration time (DT) 短縮は左房圧あるいは左室拡張末期圧の上昇を鋭敏に反映することが示されている^{2) 3)}。しかしながら、Nishimuraらは、左室駆出率が保持されている肥大型心筋症例では、これらの指標が左房圧と全く相関しないことを明かした⁴⁾。したがって、E/AやDTを用いた左室充満圧の評価は左室収縮機能障害を有する症例のみに用いるものであり、拡張不全例では用いることができないと考えられる。

Rossvoll らは、左室流入血流速度波形の心房収縮期流入血流速度波形の幅と、肺静脈血流速度波形の心房収縮期血流速度波形の幅の差 (Δd) が左室充満圧評価に有用であることを示したが⁵⁾、拡張不全症例にもあてはまるか否かは不明である。

本研究では、この指標が左室収縮機能障害の有無にか

かわらず、左室充満圧の評価に、用いるか否かを検討することを目的とする。

対象と方法

対象は冠動脈疾患が疑われ心臓カテーテル検査を受けた83例。全症例とも洞調律で、中等度以上の僧房弁疾患、大動脈弁疾患例やacute coronary syndromeの症例は除外した。

心臓カテーテル検査を受ける3時間以内に、経胸壁心エコー・ドプラ検査を施行した。左室流入血流速度波形は、僧房弁弁尖部にサンプルボリュームを置き、肺静脈血流速度波形は、右上肺静脈が左房に開口する部位より0~1cm肺静脈内の部位にサンプルボリュームを置き、パルスドプラ法により記録した(図1)^{6) 7)}。この記録より、E/A、DT、 Δd を求めた⁸⁾。左室駆出率 (EF) は、心エコー法により記録した左室内径を用いて、 $EF(\%) = (\text{左室拡張末期径}^3 - \text{左室収縮末期径}^3) / \text{左室拡張末期径}^3 \times 100$ として求めた⁹⁾。

心臓カテーテル検査の際に、左室圧を記録し、左室拡張

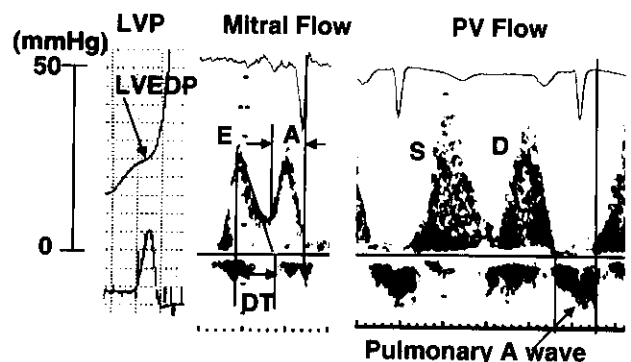


図1 74歳男性で、EFが62%と保持されている症例における、左室圧、左室流入血流速度波形 (Mitral Flow)、肺静脈血流速度波形 (PV Flow) の記録。左室拡張末期圧 (LVEDP) は25 mmHgと上昇しているが、DTの短縮やE/Aの増高は認められない。一方、心房収縮期左室流入血流速度の方が、肺静脈血流速度波形の心房収縮期血流速度よりも早く流速0となっている、つまり、肺静脈血流速度波形の心房収縮期血流速度の幅が心房収縮期左室流入血流速度の幅よりも大である。

張末期圧を求めた。

ドブラ指標については、intraobserver および interobserver variability を連続11症例において求めたところ、急速流入期ピーク血流速は各々 0.04 ± 0.03 m/s および 0.04 ± 0.04 m/s、心房収縮期ピーク血流速は 0.03 ± 0.03 m/s および 0.02 ± 0.01 m/s、心房収縮期左室流入血流速の幅は 6.5 ± 3.4 msec および 6.9 ± 5.1 msec、肺静脈血流速波形の心房収縮期血流速の幅は 11.5 ± 5.6 msec および 10.0 ± 8.4 msec であった。

データはmean \pm SDにて示す。ドブラ指標と左室拡張末期圧の相関はsimple least-squares linear regression analysisにて評価した。左室収縮性による影響を検討するために、対象をEF \leq 50%とEF > 50%にわけ、相関を検討した。両群間における種々の指標の差異はunpaired t testにて検定した。さらに Δd による左室拡張末期圧15 mmHg および 20 mmHg 検出能を receiver operating characteristic (ROC) analysisにて検討した。 Δd が左室拡張末期圧 15 mmHg および 20 mmHg 検出に有用であるか否かは

Wilcoxon rank-sum statisticsにて検討した。p < 0.05にて有意であると判定した。

結果

1例はカテーテル施行時と心エコー・ドブラ検査施行時に収縮期血圧が40 mmHg以上違っていたため、対象から除外し、他の82例（男性55例、女性27例、平均64歳）において検討を行った。これら82例では、カテーテル施行時と心エコー・ドブラ検査施行時における収縮期および拡張期血圧、心拍数の差異は 6 ± 19 mmHg、 -2 ± 11 mmHg、 1 ± 7 beats/min であった。これら対象のうち、14%の症例において、解析可能な肺静脈血流速波形の記録を得ることができなかった。EF \leq 50%とEF > 50%の症例の群間比較を表1に示す。EF \leq 50%の群において、左室および左房が有意に拡大していた。

ドブラ指標と左室拡張末期圧との相関を検討したところ、DT は EF \leq 50%群では有意な相関を示したが ($r = -0.85$, $p < 0.01$)、EF > 50%の群では相関を認めなかつ

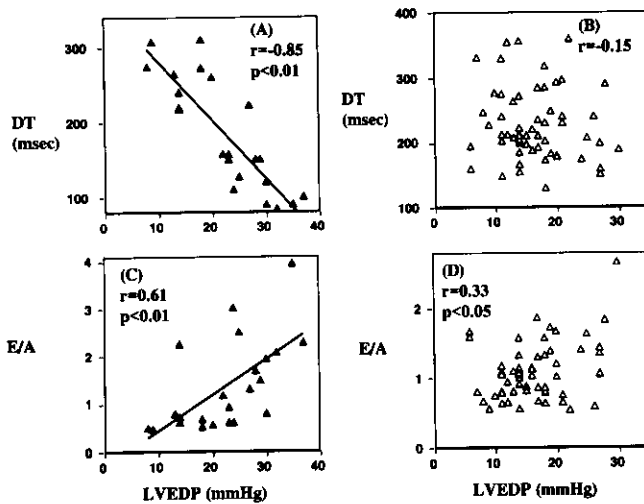


図2 DTおよびE/Aと左室拡張末期圧(LVEDP)の相関をEF \leq 50% (A, C) とEF > 50% (B, D)の症例群において示した。

表1 EF \leq 50%とEF > 50%の症例間の臨床像の比較

	EF \leq 50%	EF > 50%
症例数	23	59
年齢(歳)	64 \pm 10	65 \pm 10
左室駆出率(%)	32 \pm 10	61 \pm 6*
左室拡張末期径(mm)	61 \pm 9	50 \pm 5*
左房径(mm)	45 \pm 9	40 \pm 5*

mean \pm SD, *p < 0.05 vs EF \leq 50%

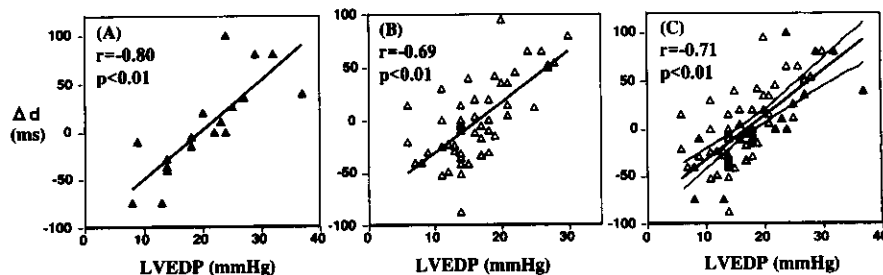


図3 Δd と左室拡張末期圧(LVEDP)の相関をEF \leq 50% (A), EF > 50% (B)の症例群、および全症例(C)において示した。図Cにおける点線は95% confidence intervalを示す。