

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

慢性低酸素ラットに対する IGF-1 投与の影響

主任研究者 栗山 喬之

千葉大学大学院医学研究院加齢呼吸器病態制御学 教授

研究要旨

1) 慢性低酸素血症は COPD 患者が栄養不良となる原因の一つと推測されている。IGF-1 は同化作用を促進すると考えられているが、一方では血管平滑筋を増殖させるメディエーターの一つとされている。そこで、低酸素環境下で飼育したラットを用い、栄養状態や肺高血圧に対する IGF-1 投与の効果を検討した。IGF-1 投与は体重増加に寄与し、血清総蛋白・アルブミン値の上昇をもたらした。しかし、IGF-1 投与による肺高血圧の程度には影響がなかった。以上より、肺血管系への影響なしに、慢性低酸素血症下での栄養状態を、IGF-1 が改善できる可能性が示唆された。

2) 低酸素血症を伴う COPD の急性増悪は、異化反応を誘導するが、低酸素血症は異化反応の主要な要因の一つと考える。そこで、低酸素暴露ラットを使用し、蛋白異化反応に対する IGF-1 の効果を評価した。低酸素暴露に起因する体重増加の減少は、尿中窒素排泄の増加として観察される負の窒素バランスを伴っていた。低酸素暴露期間での体重増加に対しては、IGF-1 投与による効果は認めなかったが、尿中窒素排泄の減少効果を認めた。IGF-1 は低酸素状態で観察される蛋白異化反応の改善に効果が期待できることが示唆された。

A. 研究目的

1) 低酸素暴露のラットを用い、IGF-1 投与が栄養状態改善に効果があるか、さらに低酸素性肺高血圧への IGF-1 投与の影響を検討する。

2) TPN にて管理したラットを用い、急性低酸素暴露時の IGF-1 投与の窒素バランスへの効果を検討する。

実験 2: rhIGF-1 の血中動態: 5 匹づつのコントロールラットに 3.2mg/kg の rhIGF-1 を皮下注射し、3、6、12、24 時間で IGF-1 血中濃度を計測した。

実験 3: IGF-1 の体重増加および肺循環系への影響

160~170g の雄 SD ラットを 10 匹づつ、Nomoxic group (N 群) と Hypoxic group (H 群) に無作為にわけた。実験 1 で決定した 3.2mg/kg の rhIGF-1 を N 群、H 群から無作為に 5 匹づつ選択し、3 週間連日皮下注射投与を行い体重変化、餌摂取量を計測した。摂食、摂食水は自由とした。低酸素環境は O<sub>2</sub> 10%、CO<sub>2</sub> 0.04% 以下に維持した。21 日目に麻酔下で体動脈と肺

B. 研究方法

1) 実験 1: rhIGF-1 投与量の決定

200~220g の雄の SD ラットを用いて無作為に 3 群に分類し、低酸素環境下で飼育。それぞれに 1.6mg/kg、3.2mg/kg、6.4mg/kg の rhIGF-1 を一週間連日皮下注射投与した。摂食、摂食水は自由とし、体重変化を観察した。

動脈圧を測定。その後採血し、pH、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>、Hb、血中IGF-1濃度、TP、Albを測定した。安楽死させた後、心、肺、気管を取り出しホルマリン固定後エラスチンにて染色した。肺動脈のremodelingの程度を、筋性動脈(50から100 μmの外径)の壁厚を計測して評価した。取り出した心臓にて右室(RV)重量と左室(LV)+中隔(S)重量を測定して、右室肥大の指標としてRV/LV+Sを用いた。

2) 200~220gのオスのSDラットを7日間の予備飼育後、麻酔下でカテーテルを外科的に頸静脈から挿入し上大静脈に留置した。手術後3日間は回復期間としてラットには自由摂食させた。

回復期間の後、ラットはTPNの持続注入のみで飼育、最後の6日間で計測した。ラットは無作為にN群とH群に分類、ベースラインとして3日間Normoxiaで測定した後、H群は3日間、10%の低酸素環境の下で飼育した。N群は同室内で飼育され、酸素濃度以外の条件は可能な限り同一とした。体重測定と採尿は連日施行した。後半の3日間、N群、H群ともそれぞれ無作為に2群に分け、一方には4 mg/kg/dayのrhIGF-1を持続投与した。

6日間の計測後、血清総蛋白、血清アルブミン測定のための採血後安楽死させ、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、肺、胃、小腸、回盲部、大腸、腓腹筋を取出し重量を測定。それぞれの臓器の蛋白濃度を後日測定した。尿中窒素量、臓器蛋白濃度測定はマイクロケールダール法で測定した。

TPNの組成: TPNは市販の高カロリー用製剤を用いて作成した。投与量は60 ml/day、投与カロリーは63.5 Kcal/day。

(倫理面への配慮) 研究の実施前に、動物実験に関する倫理委員会の承諾を得た。

### C. 研究結果

1) H群の体重増加はrhIGF-1投与により有意な改善がみられた。rhIGF-1投与の有無で食餌摂取量に有意差はなかった。rhIGF-1投与によりH群、N群共、血清総蛋白、血清アルブミン値が有意に増加した。肺動脈圧、右室肥大、肺動脈中膜肥厚の程度にrhIGF-1投与による影響は認めなかった。

2) 低酸素暴露により窒素バランスは、負の方向に動くが、rhIGF-1投与により改善した。rhIGF-1投与による窒素バランスの改善はN群でも認められた。rhIGF-1投与により腎、胃、小腸、大腸に有意な重量増加を認めた。

### D. 考察

1) COPDの予後因子である低体重は、低酸素血症が促進する異化反応が要因の一つと考えられ、COPD患者の体重減少にも関与していると思われる。H群ラットでは低酸素暴露の初期と後期にIGF-1投与群での体重増加量が有意に多かった。しかしながら、N群ラットではrhIGF-1投与による体重増加量の差は、はっきりしなかった。加えてH群ラットでは、血清総蛋白、血清アルブミンで示される栄養状態の改善効果をIGF-1投与群で認めた。またIGF-1は慢性肺高血圧のremodelingに関与している可能性が指摘されているにもかかわらず、この実験では肺高血圧に対しての有害な影響は認めなかった。今回の結果から、rhIGF-1投与により、摂取カロリーが低下してしまうよう

な慢性低酸素状態で、肺高血圧を悪化させることなく同化作用を改善する可能性が示された。

2) 急性低酸素暴露では、尿中窒素量の増加で示される蛋白異化の亢進が認められ、rhIGF-1 の投与により改善することが認められた。COPD 患者の多くに安静時代謝の亢進が存在する。要因は単一でなく栄養補給のみでの改善は不十分とされている。低酸素血症伴う急性増悪時はさらに異化反応が亢進する。rhIGF-1 の投与でこの異化亢進を改善できる可能性が示された。体重変化に関しては有意差を認めなかったが、観察期間の短かったためかもしれない。rhIGF-1 投与による各臓器への影響では主に消化管での増加が有意であった。

#### E. 結論

1) 慢性低酸素暴露ラットにおいて、rhIGF-1 は肺動脈への影響なしに同化作用を改善することから、低酸素血症を伴う慢性呼吸不全患者の栄養状

態改善に臨床応用しうる可能性がある。

2) TPN で管理した急性低酸素暴露のラットに rhIGF-1 を投与すると、窒素バランスの改善が認められた。このことから、低酸素血症を伴った慢性呼吸不全の急性増悪症例に、rhIGF-1 を投与することで、窒素バランスを改善できる可能性がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Y Iioka, K Tatsumi, K Sugito, T Moriya, T Kuriyama : Effects of insulin-like growth factor on weight gain in chronic hypoxic rats. J Cardiovasc Pharmacol. (in press) 2002.

##### 2. 学会発表

特になし

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

睡眠時無呼吸モデル動物としてのマウスの有用性について

主任研究者 栗山 喬之

千葉大学大学院医学研究院加齢呼吸器病態制御学 教授

**研究要旨** 無麻酔無拘束条件にて野生型正常マウスの脳波と頸筋筋電図、及び whole body plethysmography による呼吸測定とを同時に行い、睡眠パターンと無呼吸の出現頻度を観察した。ヒトと同様な post-sigh apnea、spontaneous apnea の 2 種類の睡眠時無呼吸が観察された。前者は SWS 期に、後者は REM 睡眠期に主に認められた。post-sigh apnea の頻度は、純酸素環境下では減少、低酸素（15% O<sub>2</sub>）環境下で増加、高二酸化炭素（5% CO<sub>2</sub>-21% O<sub>2</sub>）環境下で減少した。睡眠時無呼吸に関与する遺伝子研究をする際に、本法は有力な手段になり得ると結論された。

A. 研究目的

マウスを用いた睡眠時無呼吸の研究ができるような実験系を確立し、さらにその手法を用いてマウスにおける睡眠時無呼吸の機序を検討する事とした。

B. 研究方法

遺伝子改変実験に多用される系統である 129/Sv マウスを用いた。あらかじめ脳波と筋電図を測定できるように頭蓋骨、頸筋にそれぞれ電極埋め込み手術を行い、手術後 7 日間以上経過した後、昼間 6 時間（夜行性動物であるマウスが最もよく眠る時間）の呼吸をボディープレチスモ法で測定した。脳波と筋電図とから睡眠段階（覚醒/slow wave sleep (SWS) /rapid eye movement (REM) sleep) を判定し、呼吸曲線から無呼吸を判定し以下を行った。

1) 睡眠時無呼吸の測定

室内気吸入下で上述の方法で測定し、無呼吸の回数を算出し、睡眠ス

テージと無呼吸との関連を調べた。

2) 睡眠時の呼吸調節反射の測定

純酸素、低酸素（15% O<sub>2</sub>-0% CO<sub>2</sub>）、または高二酸化炭素環境（5% CO<sub>2</sub>-21% O<sub>2</sub>）で同様の実験を行い、通常大気環境下と比較して、睡眠時無呼吸の回数が増減するかどうかを調べた。

無呼吸は、ヒトの場合に準じて、「安定した呼吸 2 周期分以上の欠如」、また sigh は「安定した呼吸の 25% 以上の tidal volume の増加が認められた augmented breath」、とそれぞれ定義した。

（倫理面への配慮）研究の実施前に、動物実験に関する倫理委員会の承諾を得た。

C. 研究結果

Sigh が先行してその直後あるいは数呼吸後に無呼吸が認められる post-sigh apnea と、sigh が先行せず無呼吸だけが出現する spontaneous apnea との 2 種類の睡眠時無呼吸が観察され

た。前者は SWS 期に、後者は REM 睡眠期に主に認められた。post-sigh apnea の頻度は、室内気条件 ( $7.5 \pm 3.5$  回/hr) と比較して、純酸素環境下では減少 ( $3.1 \pm 3.1$  回/hr)、低酸素環境下で増加 ( $14.0 \pm 5.2$  回/hr)、高二酸化炭素環境下で減少 ( $2.8 \pm 0.9$  回/hr) した。spontaneous apnea の出現頻度については吸入ガスの違いによる有意な影響は認められなかった。

#### D. 考察

昨今、睡眠自体のメカニズムが遺伝子レベルで解明されてきている。これらの知見を睡眠時無呼吸の研究に生かすために、遺伝子操作の可能であるマウスが睡眠時無呼吸の研究対象として適切か否かを検討した。

まずはじめに、正常マウスの無呼吸が正常なヒトの無呼吸と類似しているかどうかを検討した。その結果、マウスとヒトの間には 2 つの側面から類似点があることが明らかになった。すなわち、post-sigh apnea、spontaneous apnea という 2 種類の睡眠時無呼吸が観察されたこと、そしてこれらの無呼吸の出現は睡眠段階と強い関連が認められたことである。これらの点において、マウスは正常なヒトにおける睡眠時無呼吸のモデル動物として有用であり、ノックアウトマウスを用いて睡眠時無呼吸に関与する遺伝子の探索をする際に、本法はひとつの手段になり得ると考えられた。

さらに、マウスの睡眠時無呼吸の機序の一端を明らかにすべく、吸入ガスの酸素濃度、二酸化炭素濃度と、睡眠時無呼吸頻度との関連を調べた。その結果から、マウスの場合、低酸素による末梢化学受容器からの入力は無呼吸を引き起こし、高二酸化炭

素による中枢化学受容器からの入力は逆に無呼吸を抑制する方向に作用するものと考えられた。また、重要な知見として、マウスにおいては高二酸化炭素環境下、すなわち血液中の hypercapnia が予想される状況においても post-sigh apnea が出現することが見出された。従来ヒトの post-sigh apnea では、sigh (augmented breath) 後の hypocapnia が無呼吸を生じさせるという説 (chemoreceptor 説) と、sigh (augmented breath) による mechanoreceptor 刺激によるという説 (vagal memory 説) とがあるが、マウスの post-sigh apnea では少なくとも chemoreceptor 説だけでは説明がつかないことが明らかになった。

睡眠研究の進展によって、睡眠が神経活動の低下した状態であるという従来の理解を改めることが要求されている。同様に睡眠時無呼吸も、呼吸障害 (低下) と言うよりは、覚醒/睡眠のリズムと呼吸の協調関係の障害による、積極的呼吸抑制機構の異常発現と考えた方が良いのかもしれない。この仮説の検証には今後の更なる研究が必要であるが、このような睡眠時無呼吸の機序の研究にも、遺伝子レベルと個体システムレベルとの両面から研究が可能なマウスは有用な実験動物足り得ると考えられた。

#### E. 結論

睡眠関連の呼吸調節異常に関与する分子メカニズムの研究をする際に、本法は有力な手段になり得ると結論された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

A. Nakamura, Y. Fukuda, T. Kuriyama,

M. Yanagisawa, T. Kuwaki : Ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in mutant mice deficient in endothelin-3. *FASEB J* 13: A494, 1999.

T. Kuwaki, GY. Ling, M. Onodera, T. Ishii, A. Nakamura, KH. Ju, WH. Cao, M. Kumada, H. Kurihara, Y. Kurihara, Y. Yazaki, T. Ohuchi, M. Yanagisawa, Y. Fukuda : Endothelin in the central control of cardiovascular and respiratory functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 989-994, 1999.

A. Nakamura, Y. Fukuda, T. Kuriyama, M. Yanagisawa, T. Kuwaki : Normal ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in mutant mice deficient in endothelin-3. *Jpn J Physiol* 49: S85, 1999.

A. Nakamura, T. Kuwaki, T. Kuriyama, M. Yanagisawa, Y. Fukuda : Normal ventilation and ventilatory responses to

chemical stimuli in juvenile mutant mice deficient in endothelin-3. *Resp Physiol* 124: 1-9, 2000.

A. Nakamura, T. Kuwaki, T. Kuriyama, Y. Fukuda : Sleep apnea in the mice. *Jpn J Physiol*. 50: S81, 2000.

A. Nakamura, N. Kasamatsu, I. Hashizume, T. Shirai, S. Hanzawa, S. Momiki, K. Sasaki, M. Kinoshita, O. Okada, K. Tatsumi, T. Kuriyama : Effects of hemoglobin on pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular resistance in patients with chronic emphysema. *Respiration* 67: 502-506, 2000.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

プロスタサイクリン合成酵素プロモーター領域遺伝子多型と  
肺高血圧症の関連について

主任研究者 栗山 喬之  
千葉大学大学院医学研究院加齢呼吸器病態制御学 教授

研究要旨 肺高血圧症 (PH) において肺血管におけるプロスタサイクリン合成酵素 (PGIS) の発現低下およびプロスタサイクリンの産生低下が報告されている。PGIS 遺伝子の 5' 上流のプロモーター領域の解析により、Sp1 site の繰り返し配列 (Variable Number of Tandem Repeat: VNTR) に 3 から 7 個までの多型が発見され、本態性高血圧および脳梗塞発症との関連が明らかになった。そこで我々はこの PGIS 遺伝子の VNTR 多型と肺高血圧症の関連について検討した。対象は PH 群 76 名および健康成人群 144 名である。各対象群の末梢血より genomic DNA を抽出し、VNTR を含む領域について PCR 法にて解析した。その結果、PH 群と健康成人群の変異対立遺伝子の頻度分布に差はなかった。即ち、PGIS 遺伝子プロモーター領域 VNTR 多型と PH に関連は認められなかった。

A. 研究目的

プロスタサイクリン (以下 PGI<sub>2</sub>) はアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ経路を介して主に血管内皮細胞において産生される強力な血管拡張および血小板凝集抑制物質である。肺高血圧患者において血管収縮物質であるトロンボキサン A<sub>2</sub> の産生増加および PGI<sub>2</sub> の産生低下が見られることが報告された。(N Engl J Med 1992; 327:70-75.)。またプロスタサイクリン合成酵素 (以下 PGIS) は PGI<sub>2</sub> 産生経路における最終酵素であり、重症肺高血圧患者の肺前毛細血管において PGIS mRNA および蛋白の発現低下が認められた (Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: 1925-1932.)。

PGIS は血管内皮細胞および平滑筋細胞に広く分布し、近年 PGIS 遺伝子の 5' 上流の解析により、転写因子 AP-2、SP-

1 の binding site を含む 9 塩基 (CCGCCAGCC) より成る繰り返し配列 (Variable Number of Tandem Repeat: VNTR) に 3 から 7 個までの多型が存在し、この繰り返し数が短いものほどプロモーター活性が低いことが見いだされた。さらに日本人を対象とした相関解析の結果、本態性高血圧および脳梗塞発症との関連が明らかになった (Circulation 1999; 100: 2331-2336., Am J Hypertens 2000; 13: 1263-1267.)。そこで我々は PGIS 遺伝子プロモーター領域の VNTR 多型と肺高血圧症の関連、即ち反復配列の長短により PGIS の発現量、さらにプロスタサイクリン産生能に差が生じ、その結果肺高血圧の発症あるいは病態の進展に関与しているとの仮説をたて、これを検証した。

## B. 研究方法

患者群（以下PH群）は千葉大学付属病院呼吸器内科に通院し、慢性の肺血管原性肺高血圧を有する76名である。PH群は(1)原発性肺高血圧症（以下PPH）（n=7）および膠原病関連肺高血圧症（以下CoPH）（n=15）、(2)慢性肺血栓塞栓性肺高血圧症（以下CTEPH）

（n=54）の2グループに分類した。コントロール群として健常者144名の解析を行った。各対象群の末梢血より genomic DNA を抽出し、VNTR を含む領域を polymerase chain reaction (PCR) にて増幅し、遺伝子型を決定した。また健常人27名および肺高血圧患者48名の末梢静脈血を採取し、PGI<sub>2</sub>の安定代謝産物である6-keto-PGF<sub>1α</sub>を radioimmuno assay (RIA)により測定した。患者群はすべて安定期に右心カテーテル検査を施行し、得られた肺循環動態は血中6-keto-PGF<sub>1α</sub>値とともに遺伝子型との関連を比較検討した。

（倫理面への配慮）臨床の患者情報を個別に公開することはしないことを明言した。

## C. 研究結果

PH群およびコントロール群において繰り返し数3から7までの変異対立遺伝子が認められた。PPH+CoPH群、CTEPH群、コントロール群の3群間において変異対立遺伝子の出現頻度に差は認められなかった。また繰り返し数7、6、5の対立遺伝子をL、3、4をSと分類し、血中6-keto-PGF<sub>1α</sub>値および肺循環動態との相関を検討したところ、PH群のLLとLS遺伝子型の間には有意差は認められなかった。PH群にSS遺伝子型は認められなかった。

## D. 考察

PGISの発現低下とPGI<sub>2</sub>の産生低下は、PPHおよび重症の二次性肺高血圧症で認められる肺血管内皮細胞の機能不全と異常な増殖、リモデリングを説明している重要な因子であるが、その原因はわかっていない。何らかの遺伝的要因が存在する可能性があり、今回我々は健常人と肺高血圧症患者群でPGIS遺伝子プロモーター領域に存在するVNTR変異対立遺伝子の出現頻度を検証した。しかしこれまでPGIS遺伝子VNTR多型との関連が報告されている高血圧および脳梗塞と異なり、肺高血圧との関係は認められなかった。またこれまでPGIS遺伝子多型とPGI<sub>2</sub>産生量の関係は検討されていないが、今回の肺高血圧患者における血中6-keto-PGF<sub>1α</sub>レベルの検討ではその関連は認められなかった。しかしPH群にはSS genotypeが存在しなかったため（コントロール群は146人中2名）、明確な結論には至っていない。PGIS遺伝子には他の変異も知られており、その機能的役割の解明と疾患との関連性の検討は今後の課題である。

## E. 結論

PGIS遺伝子プロモーター領域VNTR多型と肺高血圧に関連は認められなかった。

## F. 研究発表

なし

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし



厚生科学研究補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

慢性血栓塞栓性肺高血圧症の長期予後及び QOL について  
-末梢および中枢血栓例の比較-

主任研究者 栗山 喬之  
千葉大学大学院医学研究院加齢呼吸器病態制御学 教授

研究要旨

慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）に対する肺血栓内膜摘除術（PTE）は、症状、血行動態の著明な改善をもたらす。また、QOL が改善するとの報告もみられ、われわれも、平成 11 年度本研究班で手術例が内科治療重症例よりその予後および長期経過観察時の QOL が良好であることを報告した。しかし、末梢血栓例の手術適応については明らかでなく、その予後をみた報告もない。今回われわれは、手術例および手術不適とされた内科治療例の予後及び QOL について、とくに本幹または葉動脈に血栓が存在する中枢血栓例と区域または亜区域に血栓が存在する末梢血栓例に分けて検討し、両群における PTE の意義を明らかにした。本研究では、中枢血栓例において、手術例の予後は内科治療重症例より極めて良好であったが、末梢血栓例においては、中枢血栓例より手術による肺血管抵抗の改善率、術後の H-J が不良で、内科治療重症例とその予後に差は認められなかった。

A. 研究目的

慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）に対する肺血栓内膜摘除術（PTE）は、症状、血行動態の著明な改善をもたらすとされる。また、QOL が改善するとの報告もみられ、われわれも、平成 11 年度本研究班で手術例が内科治療重症例よりその予後および長期経過観察時の QOL が良好であることを報告した。しかしながら、末梢血栓例の手術適応については明らかでなく、その予後をみた報告もない。今回われわれは、手術例および手術不適とされた内科治療例の予後及び QOL について、とくに本幹または葉動脈に血栓が存在する中枢血栓例と区域または亜区域に血栓が存在する末梢血栓例に分けて検討し、両群における PTE の意義を明

らかにすることを目指した。

B. 研究方法

対象は、1986 年 4 月から 1998 年 12 月までに当科に入院した自験 CTEPH57 例（男 16 例、女 41 例 年齢  $52 \pm 12$  [SD] 歳）で、手術例 34 例および内科治療軽症例 10 例（H-J  $\leq 2$  度または平均肺動脈圧（mPpa） $< 30$  mmHg）と内科治療重症例（H-J  $\geq 3$  度かつ mPpa  $\geq 30$  mmHg）13 例である。本幹または葉動脈に血栓が存在する中枢血栓例と区域または亜区域に血栓が存在する末梢血栓例の 2 群に分けて、両群間の呼吸循環諸量、手術による改善度、Kaplan-Meier 法による生存曲線（内科治療例は診断日を、手術例は手術日を起点とした）、長期経過観察時である 1999 年 12 月

現在の QOL (SF-36, baseline dyspnea index:BDI) について比較検討した。

手術適応は、従来われわれが報告しているように、UCSD (University of California at San Diego) の適応に準じ、1) mPpa 30 mmHg 以上または肺血管抵抗 (PVR)  $300 \text{ dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^5$  以上、2) 原則として H-J III 度以上、3) 血栓の中核側が区域枝またはより近位にあり、外科的にアプローチ可能であること、4) 他の重要臓器に合併症がないこと、5) 本人および家族の強い希望、の 5 つの基準をもって適応とした。

(倫理面への配慮) 臨床の患者情報を個別に公開することはしないことを明言した。

### C. 研究結果

手術例と内科治療例の背景因子の比較では、内科治療軽症例は、重症例に比して、有意に発症から診断までの期間が短く、また、手術例、内科治療重症例に比して、平均肺動脈圧、肺血管抵抗、H-J が良好であった。しかしながら、内科治療重症例と手術例間では、背景因子に有意差は認められなかった。

血栓部位による、背景因子の比較では、通常良く用いられる呼吸循環諸量の指標においては、両群間に差は認められなかったが、肺動脈の Pulsatility の指標とされる肺動脈圧の脈圧を平均肺動脈圧で除した fractional pulse pressure (PPf) は、その差は小さいものの有意に末梢例で低値であった。

手術例における中枢血栓例と末梢血栓例の術前および術後の因子について比較すると、中枢血栓例では、手術によって肺血行動態の各指標、H-J が有意に改善したが、末梢血栓例

では、平均肺動脈圧と H-J のみが有意に改善した。また、末梢血栓例は、中枢血栓例に比して、手術による肺血管抵抗の改善率 ( $\% \Delta \text{PVR}$ ) が小さく、術後の H-J も不良であった。

平成 11 年度本研究班で報告したように、手術関連死は 17.6% であった。また、手術例と内科治療例の Kaplan-Meier 法による生存曲線を比較すると、手術例の 5 年生存率は、78.6% で、内科治療重症例の 34.2% に比して有意に ( $p=0.034$ ) 予後が良好であった。また、内科治療軽症例に死亡例は認められなかった。

症例の中から手術例と内科治療重症例について、血栓部位による生存曲線について検討すると、中枢血栓例において、手術例は、内科治療重症例に比して有意に ( $p=0.002$ ) 生存曲線が良好であった。すなわち、中枢血栓をもちながら、手術のリスクなどから本人が手術を希望されなかった 5 例ならびに合併症から手術不適とされた 2 例、計 7 例の予後は極めて不良であった。しかしながら、末梢血栓例においては、内科治療重症例と手術例に有意差は認められなかった。

手術例では、手術関連死が 6 例認められ、その内訳は、不十分な血栓摘除による右心不全が 6 例 (中枢例 3、末梢例 1)、肺炎 1 例、心タンポナーデ 1 例であった。また術後長期の突然死が 2 例 (中枢例 1 例、末梢例 1 例)、右心不全例が 1 例 (末梢例 1 例) に認められた。内科治療重症例 7 例が死亡し、6 例が右心不全 (中枢例 5 例、末梢例 1 例) で死亡し、残り 1 例 (中枢例) は、抗カルジオリピン抗体症候群にともなう血小板減少症、多臓器不全で死亡した。

手術例と内科治療例の長期経過観

察時における SF36 および BDI の比較では、全体的健康感 (GH) と精神状態の変化による役割制限 (RE)、では有意差は無かったものの、他の 6 項目-身体機能 (PF)、身体機能不全による役割制限 (RP)、体の痛み (BP)、活力 (VT)、健康状態の変化による社会機能の制限 (SF)、精神状態 (MH) -では、手術例が有意に良好であった。BDI の比較においても、手術例の息切れの程度は、内科治療重症例に比して有意に ( $P<0.01$ ) 軽度であった。しかしながら、手術例と内科治療軽症例間の SF36 の各項目、BDI に差は認められなかった。

末梢血栓例においては、手術例と内科治療重症例の生存曲線に差が認められなかったため、長期経過観察時の QOL について、両群間で比較したところ、症例は少ないものの、VT、SF の 2 項目において、手術例は、内科治療重症例より有意に良好で、他の項目も良好な傾向を示した。

#### D. E. 考察・結論

本研究では、中枢血栓例において、手術例の予後は内科治療重症例より極めて良好であったが、末梢血栓例においては、中枢血栓例より手術による肺血管抵抗の改善率、術後の H-J が不良で、内科治療重症例とその予後に差は認められなかった。

特に中枢血栓を有する内科治療重症例の予後が不良であった点については、合併症を有する 2 症例が含まれていた要因も考えられるが、患者が手術を希望しなかった 5 例の予後

も不良であった。この結果は、Lewczukらの報告と一致する。彼らの末梢型の定義は、亜区域レベルの血栓例としていたが、49 例 (中枢型 37 例、末梢型 12 例) の内科治療例において 16 例が死亡し 14 例が中枢型、2 例のみが末梢型であった。ともに、中枢血栓例を有する重症例における手術の必要性を示唆する成績と考えられる。

末梢血栓例においては、手術例と内科治療重症例間でその予後に差は認められなかったが、長期経過観察時の QOL は手術例が良好な傾向を示した。重症末梢血栓例の手術適応については、今後、術前後の QOL の変化や内科治療例の QOL の変化についてプロスペクティブな検討が必要と考えられた。

また、諸家の報告と同様、内科治療軽症例の予後は良好で、さらに重症例に比して、症状から診断までの期間が短かったことから、本症の早期診断の重要性を示唆するものと考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tanabe N, Kuriyama T : The influence of fractional pulse pressure to the outcome of pulmonary thromboendarterectomy. Eur Respir J 2001; 17: 653-659.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

厚生科学研究費補助金（特定疾患研究事業）  
分担研究報告書

肺内好中球活性化と肺胞マクロファージ機能における加齢と慢性喫煙の影響

分担研究者 西村 正治  
北海道大学大学院医学研究科呼吸器病態内科学 教授

研究要旨

我々は中高年喫煙者の中で、早期肺気腫患者では健常喫煙者と比べて気管支肺胞洗浄（BAL）液中に好中球活性化の所見が認められると報告してきた。今回はこの特徴が若年喫煙者でも個体差として存在する可能性を検討した。健常若年者 42 名（平均 22 歳、内訳：喫煙者 25 名）と中高年生涯非喫煙者 7 名を対象に BAL を施行し、同液中の好中球エラストラーゼ量、好中球遊走因子 interleukin-8 (IL-8) 量、マクロファージからの IL-8 放出能を測定した。過去のデータと併せて検討すると、BAL 液中の好中球活性化の指標については、若年者では非喫煙、喫煙者間で有意差はなく、個体差も小さかった。一方、肺胞マクロファージの IL-8 放出能は若年者では中高年者より有意に高いが、中高年者と同様に喫煙者では、非喫煙者よりもむしろ低下していた。以上の結果より、喫煙による好中球活性化の個体差は、経年喫煙によって顕在化することが示唆された。

A. 研究目的

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好中球エラストラーゼや好中球特異的顆粒蛋白の増加が認められた。さらに代表的な好中球遊走因子である Interleukin-8 (IL-8) の増加が同液中の好中球エラストラーゼとも正の相関を示し、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。これらの所見から、喫煙者の中で見

られる BAL 液中の IL-8 量の個体差が、長年の経年喫煙の後、中高年になり肺気腫病変の出現とともに顕在化するものか、喫煙による生体側の反応の個体差として、喫煙を開始して数年以内の、若年者のうちから顕在しているものなのか、二つの可能性を考えることが可能である。近年、IL-8 の転写開始領域における遺伝子多型が小児 RS ウイルス感染症患者の BAL 液中 IL-8 の増加、好中球集積に関与するという報告があり、一部の喫煙者に見られる肺内 IL-8 の多寡が遺伝的素因に基づく可能性を示唆するものである。一方、肺胞マクロファージは、肺内における IL-8 の重要な産生放出細胞の一つであるが、中高年を対象とした研究では、喫煙者のマクロファージは非喫煙者のマクロファージと比較して、IL-8 の放出能が

有意に低下していることが明らかになった。

そこで、我々は以下の二点を本研究の目的とした。1) 若年の喫煙者と非喫煙者の間で BAL 液中 IL-8 の量や好中球エラストラーゼ量に差があるか、喫煙者の中に個体差が存在するか否かを検討する。2) 肺胞マクロファージからの IL-8 放出能とその喫煙による影響が年齢により異なるか否かを検討する。

## B. 研究方法

対象は健常若年男性 42 人 (平均年齢 22 歳)。喫煙者については、少なくとも 2 年以上一日 20 本以上の喫煙歴を持つことを条件とした。問診、身体所見、炎症所見や肝機能、 $\alpha$ 1-アンチトリプシンなどの採血、呼吸機能検査により明らかな肺疾患や他の内科疾患を除外した。本研究では、今回の対象である若年者と、これまでの我々の研究対象であった中高年男性 49 名のデータを比較して報告する。中高年者は、呼吸器自覚症状がない、生涯非喫煙者 7 名と現在喫煙者 42 名を含む。中高年喫煙者は肺高分解能 CT 検査で気腫病変の有無を呼吸器科内科医 3 名で判定した。これまで報告した方法に基づき、気管支肺胞洗浄は sequential BAL 法を用いた。急性喫煙の影響を除外するため気管支肺胞洗浄検査前 12 時間は禁煙とした。右中葉枝より生理食塩水を 50ml づつ 4 回に分けて注入し、最初の 50ml からの回収液は太い気道から得られた成分を比較的反映している分画として今回の測定には用いず、残り 150ml からの回収液を肺胞領域の成分を反映しているとして以下の解析に用いた。遠心分離の後、細胞成分について細胞数、細胞分画を算出し、

細胞接着法により肺胞マクロファージを抽出し、無血清培地で 24 時間培養を行った ( $1 \times 10^6$  個/ml RPMI-1640)。15 倍に濃縮した気管支肺胞洗浄液上清と肺胞マクロファージ 24 時間培養上清中の IL-8 を R&D 社の ELISA キットを用いて測定した。気管支肺胞洗浄液上清は IL-8 の測定後濃縮前の濃度に換算して求めた。好中球エラストラーゼは Yoshioka らの方法で測定した。肺胞マクロファージからの total RNA 抽出は Nippon Gene 社の Isogen を用いた。細胞成分が少ない一部の非喫煙者に関しては Boehringer Mannheim 社の High Pure RNA Isolation kit を用いて抽出した。その後 mRNA の発現量 fluorogenic RT-PCR 法を用いて定量化した。統計学的処理については、若年者の非喫煙、喫煙者間の二群の比較と、非喫煙若年者、非喫煙中高年者の比較には対応のない t 検定、中高年者の非喫煙者、気腫病変のない喫煙者、気腫病変のある喫煙者の 3 群間の比較には ANOVA を用いた。

(倫理面への配慮)

臨床の患者情報を個別に公開することはしないことを明言した。

## C. 研究結果

BAL 液中の総細胞数は若年者間では喫煙者で非喫煙者に比べ有意な増加は見られ、中高年者でも同様に喫煙者で増加した。BAL 液中のマクロファージ数は若年者間では喫煙者で非喫煙者に比べ有意な増加は見られ、中高年者でも同様に喫煙者で増加した。中高年者の気腫病変の有無で肺胞マクロファージの数に有意差は見られなかった。喫煙指数と肺胞マクロファージ数との間には正の相関が見られた。好中球の割合はすべての

群で有意差は見られなかった。

好中球エラストアーゼは、若年者では、喫煙の有無では有意差はなく、若年喫煙者の間でもばらつきはほとんど見られなかった。中高年者については、気腫病変のない喫煙者では、非喫煙者に比べむしろ有意に低下しており、喫煙者の中で、気腫病変のあるものはないものに比べ、有意に高値を示していた。BAL 液中 IL-8 濃度は若年者、中高年者とも喫煙の有無で有意差は見られず、中高年者のなかで気腫病変のあるものが気腫病変のない喫煙者に比べ有意に高値であった。

肺胞マクロファージ培養上清中の IL-8 は若年者中、喫煙者は非喫煙者に対し有意に低下していたが、これは中高年者においても同様の結果であった。肺胞マクロファージ中の IL-8 mRNA 量については、中高年の非喫煙者では、若年の非喫煙者に比べ有意に低下していた。

#### D. 考察

我々はこれまで、自覚症状のない中高年喫煙者の中から肺 CT 検査によって早期あるいは軽度の気腫病変を有する喫煙者を抽出した。過去の報告にあるように喫煙歴がほぼ同様な気腫病変のない喫煙者と比較検討することによって喫煙者の中で肺気腫を発症する個体の特徴を明らかにすることが可能と考えたからである。一方で、長期喫煙によっても気腫病変を有さない群は喫煙という外的刺激に対し、生体の防御機構が上回る、いわゆる喫煙抵抗群とも考えることができる。また、喫煙開始後数年の若年者喫煙者では肺気腫を発症することは極めてまれで、喫煙に対する何らかの防御機構が働いていると考

えられる。若年と中高年者の非喫煙者同士の比較により純粋な加齢による差異を、若年非喫煙者・喫煙者および中高年非喫煙者・気腫なし喫煙者それぞれの差異を比較することにより年齢による喫煙の影響の違いを見ることができると考えた。我々はすでに早期肺気腫病変形成における好中球の関与を示唆する所見として BAL 液中好中球エラストアーゼが高値であること、好中球遊走因子である IL-8 が高値であることを報告しているが、今回の結果を合わせて考えると、好中球エラストアーゼは加齢や喫煙のみでは上昇せず、気腫病変形成過程で有意に上昇する。しかも注目すべきは、中高年において、健常喫煙者では非喫煙者に比べ有意に低い値を示していることである。これは、この中高年健常喫煙者群は、先に述べた「喫煙抵抗群」であるとする考えに一致するものである。BAL 液中の IL-8 は、若年者中の非喫煙者、喫煙者間で差はなく、喫煙者の中でもばらつきは認められなかった。Mayerらは高齢者の BAL 液中の好中球、IL-8、NE- $\alpha$ 1 antiprotease complex が高値と報告しているが対照群の選択が厳密ではなく、BAL の方法として気道成分をを区別していないことなどが、我々の結果と一致していない原因のひとつと考えられる。

マクロファージ培養上清中の IL-8 は BAL 液中とは逆に若年非喫煙群が高値を示した。Ohta らは肺胞マクロファージの放出能は喫煙者で低下していることを報告しているが、我々は今回喫煙だけではなく加齢のみによっても肺胞マクロファージの機能が変化することを示した。しかし肺胞マクロファージの IL-8 mRNA 発現レベルは加齢によっては有意に低下

していたが、喫煙による差は認めなかった。培養上清中に検出される IL-8 の蛋白量が必ずしも mRNA レベルで見た IL-8 産生能を反映するものではないことを示唆する。今回の結果では BAL 液中の IL-8 レベルと肺胞マクロファージからの IL-8 放出能には相関が見られていない。これは BAL 液中 IL-8 の主な産生細胞は肺胞マクロファージ以外の細胞、おそらく気道上皮細胞であることを間接的に支持する。

#### E. 結論

若年者では BAL 液中に喫煙による好中球活性化は認められない。BAL 液で見られる喫煙感受性の個体差は、長年にわたる喫煙を経て顕著となる。慢性喫煙とともに加齢も肺胞マクロファージからの IL-8 放出能に影響を及ぼす。今後は、各種の防御因子についても加齢と喫煙による影響を比較検討する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Betsuyaku, T., Nishimura, M., Takeyabu, K., Tanino, M., Miyamoto, K., and Kawakami, Y. : Decline of FEV<sub>1</sub> in community-based older volunteers with higher levels of neutrophil elastase in BAL fluid. *Respiration* 67: 261-267, 2000.

Takeyabu, K., Yamaguchi, E., Suzuki, I., Nishimura, M., Hizawa, N., and Kawakami, Y. : Gene polymorphism for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema in Japanese. *Eur Respir J* 15: 891-894, 2000.

Tsujino, I., Nishimura, M., Kamachi, A., Makita, H., Munakata, M., Miyamoto, K., and Kawakami, Y. : Exhaled nitric

oxide - Is it really a good marker of airway inflammation in bronchial asthma? *Respiration* 67: 645-651, 2000.

Kamachi, A., Munakata, M., Nasuhara Y., Nishimura, M., Ohtsuka, Y., Takahashi, T., Homma, Y., and Kawakami, Y. : Enhancement of goblet cell hyperplasia and airway hyperresponsiveness by salbutamol in a rat model of atopic asthma. *Thorax* 56:19-24, 2001.

Kamachi, A., Nasuhara, Y., Nishimura, M., Takahashi, T., Homma, Y., Ohtsuka, Y., Munakata, M.: Dissociation of non-specific airway hyperresponsiveness from antigen-specific airway hyperresponsiveness in repeatedly challenged Brown-Norway rats. *Eur Resp J* (in press), 2001.

Tanino, M., Betsuyaku, T., Takeyabu, K., Tanino, Y., Yamaguchi, E., Miyamoto, K., Nishimura, M.: Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers to pulmonary emphysema. *Thorax* (in press), 2002.

Tanino, Y., Makita, H., Miyamoto, K., Betsuyaku, T., Nishihira, J., Nishimura, M.: Role of MIF in bleomycin-induced lung injury and fibrosis in mice. *Am J Physiol* (in press), 2002.

Betsuyaku, T., Takeyabu, K., Tanino, M., Nishimura, M.: Role of secretory leukocyte protease inhibitor in the development of subclinical emphysema. *Eur Respir J* (in press), 2002.

##### 2. 学会発表

Takeyabu K, Nishimura M, Betsuyaku T, Tanino M, Nagai K, Miyamoto K, Kawakami Y. Increased level of SLPI in alveolar macrophages from subjects with subclinical emphysema. American thoracic society, International conference

2000.

Tanino M , Nishimura M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, Kawakami Y. Chemotactic factors in BAL-fluid from subjects with subclinical emphysema. American thoracic society, International conference 2000.

谷野美智枝、別役智子、長井桂、宮本顕二、西村正治. 肺気腫におけるアデノウィルス潜伏感染の関与. 第 41

回日本呼吸器学会総会. 2001.

別役智子. 早期肺気腫病変発症のメカニズム—気管支肺胞洗浄によるアプローチ第 41 回日本呼吸器学会総会. 呼吸器学会総会シンポジウム. 2001.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし



厚生科学研究費補助金（特定疾患研究事業）  
分担研究報告書

肺気腫におけるアデノウイルス、Epstein-Barr (EB) ウィルス  
潜伏・潜在感染の関与

分担研究者 西村 正治  
北海道大学大学院医学研究科呼吸器病態内科学 教授

研究要旨

我々は、アデノウイルスあるいは Epstein-Barr ウィルス (EBV) の肺内潜伏感染と肺気腫の発症、進行との関連について着目した。nested PCR, fluorogenic real time PCR 法を用いて、喫煙者、肺気腫患者のいずれの肺においてもアデノウイルス E1A DNA、EBV DNA が検出された。この判定方法ではアデノウイルスの存在頻度と肺気腫との関係を証明できなかった。今回の研究対象として用いた肺組織はすべて末梢肺組織であるが、同一肺葉から採取した異なる肺組織標本で陽性と陰性のものがあり、過去の報告と併せて、いずれのウィルスも肺内で不均一に存在していると考えられた。また、同一患者におけるアデノウイルスの検出率と EB ウィルスの検出率に相関は認めなかった。結果としての感染なのか病因としての感染なのか、現在のところまだ明確ではない。今後、重症な肺気腫患者を含め対象を増やし検討する予定である。

A. 研究目的

我々は同年齢の早期肺気腫病変をもつ中高年者と健常喫煙者を対象に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、前者では BAL 液中の好中球エラスターゼ、好中球リポカリン、Matrix metalloproteinase (MMP) -8、MMP-9 が多いことを報告した。さらに単球遊走活性化因子である Macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1)・Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) と好中球遊走活性化因子である Interleukin-8 (IL-8)・Leukotriene B4 (LTB4) 濃度を測定した結果、BAL 液中の好中球数には差がないにも関わらず、IL-8 のみが早期肺気腫病変群で健常喫煙者に比べて上昇しており、しかも好中球エラスターゼ値と有意に相関するという結果を得た。これらの結果は IL-8 を

介した好中球の活性化が、早期肺気腫発症のメカニズムに関与していることを推測させる。JC Hogg らは肺気腫が重症なほど、肺内の炎症細胞およびアデノウイルス E1A 蛋白発現上皮細胞数、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 発現の増加が見られるということ最近報告し、過去の一連の研究と併せてアデノウイルス潜伏感染が喫煙者の一部にのみ COPD が発症することを説明するひとつの要因ではないかという仮説を立てている。Epstein-Barr ウィルス (EBV) は、約 172kb のヘルペスウィルス科 DNA ウィルスであり、アフリカにおいてパーキットリンバ腫患者のリンパ球より検出された最初のヒト癌ウィルスである。EBV は大部分のヒトにおいて、潜伏感染という感染形式により、終生無害な共存関

係を維持すると考えられている。その一方で、EBV はバーキットリンパ腫をはじめ、上咽頭癌、胃癌などいくつかの癌との関連性が明らかにされている。肺疾患との関係では、気道洗浄液中で高頻度に EBV の DNA が検出されること、EBV 慢性活動性感染患者の経気管支鏡下生検では EBV が肺胞隔壁に不均一に検出されること、LIP 患者では EBV latent membrane protein (LMP1) が IPF 患者と比べて有意に多く肺胞上皮細胞で検出されること、EBV latent membrane protein (LMP1) 陽性 IPF 患者では病期が早く進行することなどが報告され、EBV が上皮細胞に感染し、疾患の発症や進展に関与していることが示唆されている。また、慢性関節リウマチの病因としての EBV 感染、EBV 潜伏感染 B 細胞が増殖・炎症性サイトカインの一つである IL-6 を産生していることなども報告されており、慢性炎症性疾患の原因としての EBV の関与も報告されている。肺気腫との関連については、血清学的な検討で健常者と比較して EBVCAIgG の力価が高いと報告されているのみで、それ以外の報告はない。そこで、今回我々は、アデノウイルスあるいは EBV の肺内潜伏感染と肺気腫の発症、進行との関連について着目した。

## B. 研究方法

当大学付属病院にて肺癌のため肺葉切除術を施行された患者 12 名を対象とした。対象は全員男性であり喫煙指数 (Brinkman index) が 450 以上の重喫煙者である。術前に施行した胸部 CT 検査にて low attenuation area の有無を判定し、肺気腫病変のない喫煙者 7 名と肺気腫病変のある喫煙者 5 名にわけた。病変部位の肺気腫

の程度は low attenuation area の範囲が 5~50%程度のものであった。術前の呼吸機能検査では FEV<sub>1</sub>/FVC が前者に比べて後者では有意に低下していた。切除された肺葉のうち非癌部分の中樞気管支を含まない部分について、一患者についてランダムに 6 ブロックのパラフィン包埋標本を作成した。各ブロックから 8 $\mu$ m の厚さの切片を切り出し DNeasy Tissue kit (Qiagen, Germany) を用いて DNA を抽出した。50 ng の DNA を用い、すでに報告されているアデノウイルス 5 型の DNA sequence から E1A 部分を検出する outer primer (5'-CTGCCACGGAGGTGTTATTACC-3', 5'-CTCAGTTCAGACACAGGACCT-3') を用い PCR を施行した。その PCR 産物に対して inner primer (5'-GAACCACCTACCCTTCACGAACTG-3', 5'-GTGGCAGGTAAGATCGATCACCTC-3') を用いて、2 回目の PCR を施行した (nested PCR)。両 PCR の条件は 93°C : 1 分、63°C : 1 分、72°C : 2 分を 40 サイクルで行った。PCR 産物をエチジウムブロマイド入りのアガロースゲルで電気泳動し、紫外線下でアデノウイルス E1A DNA の存在を 241bp のバンドの有無で判定した。陰性コントロールは反応液の調整に用いた蒸留水をサンプル DNA の代わりに用いた。また、陽性コントロールとして Graham293 細胞 (embryonic kidney cell line transfected with adenovirus 5) から抽出した DNA を用いた。肺組織中のアデノウイルス E1A DNA の有無については抽出した DNA について nested PCR を 3 回繰り返して行い 3 回中 1 回以上検出されたものについては陽性と判定した。EBV については、7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems) を用いて

fluorogenic real time PCR 法を施行し、EBV DNA の有無を検討した。PCR の primer はウイルス DNA polymerase をコードしている BALF5 遺伝子の部分を検出する、5'-CGGAAGCCCTCTGG ACTTC-3' と 5'-CCCTGTTTATCCGAT GGAATG-3' であり、probe は 5'-TGTAC ACGCACGAGAAATGCGCC-3' である。パラフィン肺組織から抽出した 500ng の DNA と TaqMan PCR mixture (PE Applied Biosystems) を用いて PCR を施行した。95°C 10 分で AmpliTaq Gold を活性化したのち 95°C : 15 秒、62°C : 1 分を 60 サイクル施行した。陽性コントロールとしては、pGEM-T vector に BALF5 を含んだプラスミドである pGEM BALF5 を用い、陰性コントロールとして蒸留水を用いた。Ct 値 (threshold cycle) が 50 サイクル以上を陰性、以下を陽性と判定した。

(倫理面への配慮)

臨床の患者情報を個別に公開することはしないことを明言した。

### C. 研究結果

1. アデノウイルス E1A DNA の検出  
喫煙者では 7 名中 7 名 (42 ブロック中 20 ブロック : 48%)、肺気腫患者では 5 名中 5 名 (30 ブロック中 12 ブロック : 40%) にアデノウイルス E1A DNA を検出した。同一患者の 6 ブロック中 E1A が検出されるものは 1 ~ 5 ブロックでありウイルスが不均一に分布していると考えられた。

### 2. EBVDNA の検出

喫煙者では 7 名中 7 名 (42 ブロック中 17 ブロック : 41%)、肺気腫患者では 5 名中 5 名 (30 ブロック中 9 ブロック : 30%) に EBVDNA を検出した。アデノウイルスと同様、同一患者の 6 ブロック中 EBVDNA が検出されるものは 1 ~ 6 検体であり、

ウイルスが不均一に分布していると考えられた。また、Ct 値はほとんどの検体が 40 cycle 以上であり EBVDNA は非常に微量であると考えられた。

### D. 考察

今回の結果より、nested PCR、fluorogenic real time PCR 法を用いて、喫煙者、肺気腫患者のいずれの肺においてもアデノウイルス E1A DNA、EBV DNA が検出され、また、同一肺葉内では不均一に分布していることがわかった。アデノウイルスに対する nested PCR 法においては、陰性コントロールである蒸留水では常にアデノウイルスは検出されず、陽性コントロールである G293 細胞では常にアデノウイルス E1A DNA は検出されることが確認されるにも関わらず、実際の肺検体では PCR の再現性が必ずしも良好に得られないため、nested PCR を 3 回繰り返して行い最低 1 回でも検出されれば陽性と判定した。この解釈はアデノウイルスが存在はしているにもかかわらずごく微量でありことによるのではないかと考えた。この判定方法ではアデノウイルスの存在頻度と肺気腫との関係を証明できなかった。Hogg らは喫煙者、軽度の肺気腫患者、重症肺気腫患者の 3 群でアデノウイルス E1A 蛋白陽性肺胞上皮細胞の数を検討し、喫煙者に比べて、軽度の肺気腫患者では 5 倍、重症肺気腫患者では 40 倍多くの陽性細胞が存在していると報告している。今回の我々の対象は肺癌手術肺を用いていることから、呼吸機能や CT での肺気腫病変の程度からみても軽度の肺気腫に分類され、その差を今回の方法では検出できなかったのかもしれない。EBV についても肺に存在し、不均一に分布していることを確認し

たが、肺気腫との関係を証明できなかった。血清学的な検討では、EBV VCAIgG が健常人やサルコイドーシスと比べて肺気腫患者で有意に高いと報告しているが、前2者に比べて、後者では年齢も高く、年齢による影響も関与しているのかもしれない。アデノウイルスについては in situ hybridization や免疫染色を用いた研究から、気管支上皮細胞、気管支腺細胞、肺胞上皮細胞に存在しているが、同一ブロックにおいても切片の違いにより陽性か陰性に違いがあることが報告されている。EB ウィルスについても、免疫染色を用いた研究から肺内の B リンパ球と II 型肺胞上皮細胞に存在することが報告されている。今回の我々の研究対象として用いた肺組織はすべて末梢肺組織であり、細胞の組成にはほとんど偏りはないことを HE 標本で確認しているが、ブロックごとに陽性と陰性のものがあり、過去の報告と併せて、いずれのウィルスも肺内で不均一に存在していると考えられた。また、同一患者におけるアデノウイルスの検出率と EB ウィルスの検出率に相関は認めなかった。結果としての感染なのか病因としての感染なのか、現在のところまだ明確ではない。今後、重症な肺気腫患者を含め対象を増やし検討する予定である。

## E. 結論

アデノウイルスと EB ウィルスは肺内で高率にかつ不均一に存在しているが、肺気腫病変の有無とは関係しない。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Betsuyaku, T., Nishimura, M., Takeyabu,

K., Tanino, M., Miyamoto, K., and Kawakami, Y. : Decline of FEV<sub>1</sub> in community-based older volunteers with higher levels of neutrophil elastase in BAL fluid. *Respiration* 67: 261-267, 2000.

Takeyabu, K., Yamaguchi, E., Suzuki, I., Nishimura, M., Hizawa, N., and Kawakami, Y. : Gene polymorphism for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema in Japanese. *Eur Respir J* 15: 891-894, 2000.

Tsujino, I., Nishimura, M., Kamachi, A., Makita, H., Munakata, M., Miyamoto, K., and Kawakami, Y. : Exhaled nitric oxide - Is it really a good marker of airway inflammation in bronchial asthma? *Respiration* 67: 645-651, 2000.

Kamachi, A., Munakata, M., Nasuhara Y., Nishimura, M., Ohtsuka, Y., Takahashi, T., Homma, Y., and Kawakami, Y. : Enhancement of goblet cell hyperplasia and airway hyperresponsiveness by salbutamol in a rat model of atopic asthma. *Thorax* 56:19-24, 2001.

Kamachi, A., Nasuhara, Y., Nishimura, M., Takahashi, T., Homma, Y., Ohtsuka, Y., Munakata, M.: Dissociation of non-specific airway hyperresponsiveness from antigen-specific airway hyperresponsiveness in repeatedly challenged Brown-Norway rats. *Eur Resp J* (in press)

Tanino, M., Betsuyaku, T., Takeyabu, K., Tanino, Y., Yamaguchi, E., Miyamoto, K., Nishimura, M.: Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers to pulmonary emphysema. *Thorax* (in press)

Tanino, Y., Makita, H., Miyamoto, K., Betsuyaku, T., Nishihira, J., Nishimura, M.: Role of MIF in bleomycin-induced