

lung injury and fibrosis in mice. Am J Physiol (in press)

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)

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. 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

細気管支上皮細胞の機能と肺気腫発症のメカニズム

分担研究者 別役 智子
北海道大学大学院医学研究科呼吸器病態内科学 助手

研究要旨

細気管支領域は、喫煙等の外来吸入物質の主たる標的細胞であり、肺の防御機構として重要な役割を果たしているが、急性、慢性喫煙による遺伝子発現調節と肺気腫発症との関係については必ずしも明らかにはされていない。そこで、マウスに喫煙暴露後の細気管支上皮細胞における遺伝子発現を系統的、経時的に明らかにすることを目的とした。マウスに連日喫煙させ、1、4、28日、肺気腫を発症している6ヵ月後に屠殺し迅速に作成した凍結標本から Laser capture microdissection 法を用いて細気管支上皮のみを選択し RNA を抽出した。肺凍結標本から細気管支上皮を LCM 法にて採取し、分解のない RNA を抽出する方法を確立した。Genechip 上で、全肺では 5,734 個、細気管支上皮には 2,734 個の遺伝子が存在すると判定された。慢性喫煙暴露により、経時的に数重から数百の遺伝子が有意に変化することが示された。

A. 研究目的

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。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。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。しかし、数十種類の異なる細胞で構成される肺という臓器において、また集族する細胞の種類、数も

異なる病的状態においては、肺全体としてではなく、細胞特異的、局在的遺伝子発現の解析がさらに望まれている。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 Laser capture microdissection (LCM)法である。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を開く。しかし、微量 RNA を genechip に応用するためには均等に RNA を増幅方法を確立することが必須である。昨年度、我々は「T7-based RNA 均等増幅法」を用いて、同一 RNA サンプル増幅前後での比較を genechip 上で行い、本増幅法での各 mRNA 間での増幅効率の差異

は少ないことを示し、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た。今年度は、LCM 法で採取された RNA の質的向上を目的として、組織染色、RNA 抽出法の比較検討を行った。さらに、喫煙暴露から気腫化という病態への変化に伴って誘導、発現量の増加、減少する遺伝子群を同定することを目的として、これまでの基礎的技術を基盤とし、マウスに慢性喫煙暴露を行い、終末細気管支上皮細胞における mRNA の経時的体系的発現解析を行った。

B. 研究方法

マウス肺 RNA の品質の検証：

正常マウス肺の凍結切片を用いて、固定、染色法の違いによる RNA の回収量、RNA 分解程度について比較検討した。1) Nissl、2) ヘマトキシリン、3) エオシン、4) ヘマトキシリン&エオシンの 4 種類の染色法にて、それぞれエタノール、キシレンによる固定の長さを変化させた。さらに、現在市販されている微量 RNA 抽出キット 3 種類 1) Roche Diagnostics 社製 High Pure RNA Isolation Kit、2) STRATAGENE 社製 Micro RNA isolation kit、3) Qiagen 社製 RNeasy Mini kit について同様に比較した。RNA の定量と定性については、Agilent Technologies 社製アジレント 2100 バイオアナライザーを用いた。半導体加工技術を応用した LabChip™ 上で核酸の電気泳動による定性的確認と正確な定量を同時に行うことが可能である。サンプル量は 1 μ l と少量、感度は 1ng と高感度である。

慢性喫煙による細気管支上皮における遺伝子変化：

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。喫煙暴露による肺の遺伝子発現の経時的变化を検討する目的で、喫煙開始後 1 日、4 日、7 日、28 日、6 ヶ月後に各 6 匹ずつ屠殺した。月齢を合わせた室内気吸入マウスを 6 匹をコントロールとした。迅速に OCT compound 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、70% エタノールで瞬間固定した後、ヘマトキシリンを用いて染色した。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 30-40 mW 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た。一匹につき約 10,000 発のレーザー発射にて終末細気管支上皮細胞を採し、各群 6 匹ずつの細胞をプールした。各群毎に Qiagen 社製 RNeasy Mini kit を用いて total RNA を抽出した。抽出した極微量の RNA をアジレント 2100 バイオアナライザーで定量、定性を施行した後、10ng を用いて、昨年、我々が報告した T7-based RNA 均等増幅法に沿って、増幅し標識プローブを作成した。T7-based RNA 均等増幅法については、Luo らが報告した方法と、Ohyama らの方法を参考に修正を加えた。このビオチン標識した RNA を Affymetrix 社製マウス GeneChip Murine Genome U74 Set Version 2 の試料として用いた。今回用いた chip の特徴は、マウスの既知遺伝子 6,000 種、未知の EST clusters 6,000 種からなる。

(倫理面への配慮)

研究の実施前に、動物実験に関する

る倫理委員会の承諾を得た。

C. 研究結果

マウス肺 RNA の品質の検証：

凍結肺薄切標本を種々の固定、染色法にて RNA の回収量およびその品質をアジレント 2100 バイオアナライザーにより検証した。Electropherogram 上の 18S および 28S の peak、その比などにより総合的に判定し、染色法は、ヘマトキシリン単独、固定は冷却 70%エタノールおよび、キシレンに 5 分以上浸透するという方法で最良の RNA を得ることができた。RNA 抽出キットについては市販されている 3 種類を同一条件で比較した上で、Qiagen 社製 RNeasy Mini kit を用いることにした。

慢性喫煙による細気管支上皮における遺伝子変化：

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を行った。マウスは解剖学的に呼吸細気管支を欠くため、終末細気管支が直接肺胞道に連続する。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。一匹のマウス肺について、約 10,000 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各群 6 匹からの細胞をプールし RNA を抽出した。各群の RNA の定量と定性はアジレント 2100 バイオアナライザーにより行い、分解のない total RNA と確認した上で試料として用いた。コントロール全肺にお

いては、12,000 個の遺伝子中 5,376 個が存在すると判定された。コントロール肺における LCM 法にて採取した細気管支上皮細胞には 2,734 個の遺伝子が存在すると判定された。喫煙暴露により全肺においては、いくつの遺伝子に有意な変化が起こっていた。LCM 法にて採取した細気管支上皮細胞においても遺伝子変化が認められた。「Induce：誘導」された遺伝子とは、コントロール肺では検出されなかった遺伝子が喫煙暴露により発現したことを示す。「Increase：増加」は、コントロール肺においても存在し、喫煙後の全肺においては、定量的評価により 2.5 倍以上の増加が認められたものをさす。「Decrease：減少」は、コントロール肺において存在し、喫煙後の肺では 2.5 倍以上減少したものとす。Genbank accession number K02588; "Cytochrome P450, 1a1, aromatic compound induced"については 4、7、28 日目で有意に増加しており、中でも 7 日目に最大の約 11 倍の遺伝子発現増加を示す。6 ヶ月後には基準値に戻る。同群の遺伝子で X78445; Musculus Cyp1-b-1 mRNA for cytochrome P450"については同様に 4、7、28 日目で有意に増加しているが、増加のピークは 28 日目で約 30 倍の増加を示している。喫煙開始後 1 ヶ月以内では U27267; "small inducible cytokine B subfamily, member 5"が誘導され、Heat shocks proteins 等も有意に増加するということが確認された。細気管支上皮において、喫煙後 6 ヶ月後に有意な変化を示す遺伝子と 1 ヶ月以内に変化する遺伝子にオーバーラップは認められなかった。

D. 考察

肺という複雑な組織では、組織全

体を対象として各種病態における遺伝子変化を検討するにはその解釈に限界がある。そこで、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、bleomycin による線維化肺において終末細気管支上皮から肺胞領域にのびる bronchiolization に注目し、細気管支上皮細胞を LCM 法を用いて選択的に採取し、終末細気管支上皮の増殖、分化に関与すると思われる growth factors や growth factor receptors の発現を定量化してきた。

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。LCM 法で得られた細胞の RNA をアレイテクノロジーに応用し同時に大量の情報を得る試みは近年始まったばかりである。組織における DNA 異常の有無の検出するのと異なり、mRNA 発現を定量的に検討することは難しい。これは DNA に比べて mRNA が不安定で分解が早いことによる。genechip による発現解析実験に用いる蛍光標識プローブの作成には、高純度の mRNA を必要とする。純度の低い mRNA を使用すると、不純物により background が高くなったり、ribosomal RNA の混入や RNase による分解によって十分なハイブリダイゼーションシグナルが得られない。LCM 法を用いて採取した細胞からの微量 RNA を用いて genechip に応用する際には RNA 分解の有無やその程度に特に注意を払う必要がある。我々は、動物の処理法、組織の固定、染色、RNA 抽出法など様々な段階で

RNA の回収率を高め、分解を防ぐ方法を模索してきた。さらに、昨年度来の RNA 均等増幅法の確立と合わせると、本研究の目的である細気管支上皮のグローバルな遺伝子発現の検討に不可欠であるばかりでなく、今後他の疾患における幅広い応用が期待される。

今回の、肺気腫を発症するマウスモデルにおいては、細気管支上皮において、喫煙開始後、数日間で抗酸化機構に関する cytochrome P450 遺伝子群の増加を認めた。Cavarra らの報告によると、喫煙により肺気腫を発症するマウスとしないマウスを比較しその特徴を検討した。その結果、喫煙開始直後の抗酸化機構の程度に差がある。我々の今回の結果と合わせ、肺気腫の発症におけるオキシダント・アンチオキシダント不均衡という視点からも興味深い。さらに 28 日目には新たな CXC ケモカインである small inducible cytokine B subfamily, member 5 の誘導が認められ、細気管支周囲の炎症細胞集積に関与している可能性を示唆する。また、喫煙の全経過を通じ、全肺、および細気管支上皮ともに、様々な癌関連遺伝子の発現が有意に認められる点も特記すべき点である。

E. 結論

肺凍結標本から細気管支上皮を LCM 法にて採取し、分解のない RNA を抽出する方法を確立した。Genechip 上で、全肺では 5,734 個、細気管支上皮には 2,734 個の遺伝子が存在すると判定された。慢性喫煙暴露により、経時的に数重から数百の遺伝子が有意に変化する。今後は、Genechip データの再現性の確認と、有意な変化を示すいくつかの遺伝子については、

その発現変化の定量性について fluorogenic real time RT-PCR 法について検証する。さらに、経時的変化のパターンより個々の遺伝子、あるいは一群の遺伝子についてカテゴリー分類を行い、肺気腫発症における意義を検討する。

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 FEV₁ in community-based older volunteers with higher levels of neutrophil elastase in BAL fluid. *Respiration* 67: 261-267, 2000.

Betsuyaku, T., Griffin, GL., Watson, MA., Senior, RM. : Laser capture microdissection and real-time reverse transcriptase / polymerase chain reaction of bronchiolar epithelium after bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 278-284, 2001.

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

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)

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

2. 学会発表

Betsuyaku, T., Griffin, GL., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Senior, RM. : Expression of basigin in chronic inflammatory lung diseases. American Thoracic Society 2001.

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（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

原発性肺高血圧症患者の血行動態と右室リモデリング

分担研究者 白土 邦男

東北大学大学院医学研究科内科病態学講座循環器病態学分野 教授

研究要旨 【目的】 原発性肺高血圧症(PPH)患者の血行動態と右室形態変化について検討した。【方法】 安定期 PPH 患者 9 例でカテーテル検査を行った。同時期に電子ビーム CT を施行し、Simpson 法で各心室容量と心筋重量を求めた。

【結果】 安定期 PPH 患者では、右室拡張末期容積指数(RVEDVI)、右室心筋重量指数(RVMI)は症状出現からの期間と正の相関がみられた。9 例中 2 例は早期死亡し、7 例は生存中である。生存例において RVEDVI、RVMI は収縮期および平均肺動脈圧と正の相関がみられた。2 死亡例は症状出現からの期間が短く、かつ肺血管抵抗は高値であり、また肺動脈圧に対し RVEDVI、RVMI は比較的小さかった。【総括】 PPH 患者では圧負荷に応じた右室形態変化が認められたが、肺血管病変の進行に見合わない右室形態変化を呈する症例が存在する可能性が示唆された。

A. 研究目的

原発性肺高血圧症は診断後の平均生存期間が2年から5年と予後不良の疾患であるが、近年、急性負荷反応者に対するカルシウム拮抗剤内服治療や、belaprost 内服治療、PGI₂ 製剤である epoprostenol 持続点滴治療が導入されるようになり内科的治療による予後改善も報告されるようになった。また脳死移植法の施行により国内における肺移植治療も行われるようになり、治療に関する選択が拡がるとともに、移植待機患者の生命予後改善も内科的治療の目的の一つとなりつつある。epoprostenol の導入により予後改善とともに、患者の ADL も改善している実感があるが、症例によっては急速に病態の進行がみられる場合がある。予後予測に関する従来の血行動態指標をもちいた検討では、平均肺動脈圧の高値、右房圧の高値、低心係数、NYHA 分類など

が予後不良因子として報告されているが、圧負荷に対する右室形態に関する検討は、右室形態の複雑さなどにより、報告は少ない。本研究では Electron Beam CT (EBCT) を用いて心形態を評価し、カテーテル検査による血行動態指標とともに個々の症例の予後規定因子について検討した。

B. 研究方法

対象は1997年以降、筆者らの施設にて入院治療を行った原発性肺高血圧患者9例である。9症例中、症例2と6の2例が死亡例である。全例女性で、死亡例1例を含め3例で卵円孔開存がみられた。年齢は22歳から76歳（平均33.3歳）、自覚症状出現時から検査施行までの期間は0年から6年であった。症例2は前医において5か月前から epoprostenol が開始されていた。症例5は diltiazem、belaprost の内服を、症例7は belaprost

を、症例 8 は amlodipine をそれぞれ内服していた。NYHA は 2 度が 3 例、3 度が 6 例で、肺血管抵抗は死亡例で特に高値を示していたが、死亡例 2 例を含め、4 例で急性負荷による 20% 以上の肺血管抵抗の低下がみられた。

カテコラミン点滴などを要しない安定期に初回診断カテーテル検査、NO 吸入負荷試験、epoprostenol 急性負荷試験を施行し、その前後に Imatron 社製 C-150 を用い、EBCT を行った。EBCT は clockwise に table rotation を加え、心短軸像を得た。前腕皮静脈から造影剤を 50~60mL 注入し、40~50 秒の delay をおいて浅い吸気、呼吸停止下に心電図同期で 12 レベル、各レベル 50msec、連続 10 回の Cine mode 撮影を行った。右室心内膜面および心筋外側をトレースし Simpson 法でそれぞれ拡張末期及び収縮末期右室容積と右室心筋重量を求めた。また、心臓カテーテル検査で得られた血行動態指標と罹病期間の関係について検討した。

(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

生存例において平均肺動脈圧と EBCT による右室拡張末期容積係数、右室心筋重量係数は正の相関を認めしたが、早期死亡の 2 例では右室拡張末期容積係数、右室心筋重量係数とも比較的小さかった。死亡 2 例を含め、9 症例は、初発症状出現時からの期間と EBCT による右室拡張末期容積係数、右室心筋重量係数は有意な正の相関を示した。

D. 考察

epoprostenol 持続静注療法は原発性肺高血圧症の治療法としてその地位を確立されている。しかし、少数例ではあるが本療法が無効な症例が見られ事がある。本研究では EBCT を用い epoprostenol 投与中の血行動態指標と EBCT で得られる右室容積、右室心筋重量等の指標を比較検討した。

今回検討した比較的安定期の原発性肺高血圧症患者において、右室拡張末期容積係数、右室心筋重量係数は症状出現からの期間と正の相関がみられた。2 例で早期の死亡がみられ、7 例は現在 3 か月から 32 か月の間で生存中である。生存例において右室拡張末期容積係数、右室心筋重量係数は収縮期肺動脈圧、平均肺動脈圧と正の相関がみられた。

死亡例 2 例については、初発症状出現からの期間が短く、かつ肺血管抵抗は高値で、また NO 吸入負荷によりそれぞれ -20%、-24% の肺血管抵抗の低下がみられたが、肺動脈圧に対し右室拡張末期容積係数、右室心筋重量係数は比較的小さかった。

E. 結論

心臓カテーテルにより得られる心血行動態指標から原発性肺高血圧症患者の予後を予測する試みは報告されている。一方、EBCT による原発性肺高血圧患者の左室、右室機能指標についての報告もあるが、両者の比較検討により本症の予後について検討した報告は無い。本研究では少数例での検討であるが、原発性肺高血圧症患者の中に急速に肺血管病変が進展する症例があり、それらでは圧負荷に相応する 2 次的な右室肥大が不十分である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nie X, Hida W, Kikuchi Y, Kurosawa H, Tabata M, Kitamuro T, Adachi T, Ohno I, and Shirato K: Expression of Glut-4 and Glut-1 transporters in rat diaphragm muscle. *Tissue & Cell* 32: 107-115, 2000.

Tun Y, Hida W, Okabe S, Kikuchi Y, Kurosawa H, Tabata M, and Shirato K: Effects of nasal continuous positive airway pressure on awake ventilatory response to chemical stimuli in patients with obstructive sleep apnea. *Tohoku J Exp Med* 190: 157-168, 2000.

Tun Y, Hida W, Okabe S, Kikuchi Y, Kurosawa H, Tabata M, and Shirato K: Inspiratory effort sensation to added resistive loading in patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 118: 1332-1338, 2000.

Kumasaka N, Sakuma M, and Shirato K: Clinical features and predictors of in-hospital mortality in patients with acute and chronic pulmonary thromboembolism. *Internal Medicine* 39: 1038-1043, 2000.

Tabata M, Kurosawa H, Kikuchi Y, Hida W, Ogawa H, Okabe S, Tun Y, Hattori T, and Shirato K: Role of GABA within the nucleus tractus solitarius in the hypoxic ventilatory decline of awake rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 281: R1411-R1419, 2001.

佐久間聖仁、高橋徹、北向修、白土邦男：人口動態統計を用いた肺血栓塞栓症の疫学的検討. *脈管学* 41: 225-229, 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（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

呼吸不全の病態と治療に関する基礎的臨床的研究

分担研究者 白土 邦男

東北大学大学院医学研究科内科病態学講座循環器病態学分野 教授

研究要旨 基礎的研究として換気応答の遺伝的要因と低酸素に対する耐性を検討した。臨床的研究として肥満低換気症候群の QOL に及ぼす持続気道陽圧呼吸（CPAP）の効果を検討した。本研究より低酸素換気応答は高炭酸ガス換気応答よりも遺伝的要因による影響を受けやすく、低酸素換気応答の低下は低酸素に対する耐性に重要な役割を果たしていることと肥満低換気症候群において CPAP 治療により QOL が改善することが示された。

A. 研究目的

呼吸不全の主要な病態である低酸素血症に関連して低酸素血症に対する耐性の機序を明らかにすること、さらに肥満低換気症候群における CPAP 療法の高炭酸ガス血症と QOL に対する効果を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 換気応答の遺伝的要因と低酸素に対する耐性：

9 種類の近交系マウスを用いて、低酸素換気応答及び高炭酸ガス換気応答を求めた。次に低酸素換気応答の大きい種と小さい種の 2 種において 6%酸素を負荷し、5 秒以上の無呼吸が出現するまでの時間を測定した。

2) 肥満低換気症候群の QOL に及ぼす持続気道陽圧呼吸（CPAP）の効果：

肥満低換気症候群（BMI \geq 30）、年齢と体重がマッチした睡眠時無呼吸群（BMI \geq 30）及び BMI $<$ 30 の睡眠時無呼吸群の 3 群で CPAP 前及び治療開始 3 ヶ月後における ESS と SF-36 を前向き研究で比較検討した。

（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確に述べた。動物実験に関しては、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) 低酸素換気応答は SWR マウスで低く、AKR/N マウスでは高値だった。高炭酸ガス換気応答に有意な種差は認められなかった。SWR マウスで耐性時間が有意に短かった。また低酸素換気応答と耐性時間は有意に正の相関を示した。

2) ESS は治療前肥満低換気症候群は 14.6 と最も高く、睡眠時無呼吸群（BMI \geq 30）は 12.8、BMI $<$ 30 の睡眠時無呼吸群は 10.5 といずれも正常より高かった。CPAP 後いずれの群も正常値になり、傾眠傾向は改善した。SF-36 は治療前 3 群とも 8 つのドメインのうち Physical functioning は平均スコアは 80 以上であったが、他のドメインは低スコアであった。CPAP 治療により 3 群ともほとんどのドメインで

スコアが改善した。

D. 考察

低酸素換気応答は高炭酸ガス換気応答よりも遺伝的要因による影響を受けやすく、また低酸素換気応答の低下は低酸素に対する耐性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。肥満低換気症候群においてCPAP治療によりQOLが改善することが示された。

E. 結論

呼吸不全の病態と治療に関して基礎的に臨床的に多方面から研究をおこない、呼吸不全の病態と治療に関する新しい知見をえた。今後、更なる研究が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nie X, Hida W, Kikuchi Y, Kurosawa H, Tabata M, Kitamuro T, Adachi T, Ohno I, and Shirato K: Expression of Glut-4 and Glut-1 transporters in rat diaphragm muscle. *Tissue & Cell* 32: 107-115, 2000.

Tun Y, Hida W, Okabe S, Kikuchi Y, Kurosawa H, Tabata M, and Shirato K: Effects of nasal continous positive airway pressure on awake ventilatory response to chemical stimuli in patients with obstructive sleep apnea. *Tohoku J Exp Med* 190: 157-168, 2000.

Tun Y, Hida W, Okabe S, Kikuchi Y, Kurosawa H, Tabata M, and Shirato K: Inspiratory effort sensation to added resistive loading in patients with obstructive sleep apnea. *Chest* 118: 1332-1338, 2000.

Tabata M, Kurosawa H, Kikuchi Y, Hida W, Ogawa H, Okabe S, Tun Y, Hattori T, and Shirato K: Role of GABA within the nucleus tractus solitarii in the hypoxic ventilatory decline of awake rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 281: R1411-R1419, 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（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

慢性肺気腫発症におけるヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子多型性の関与

分担研究者 山谷 睦雄 東北大学医学部附属病院老人科講師

研究要旨 (1) 抗酸化作用を持つ酵素グルタチオン-S トランスフェラーゼ(GST)の遺伝子多型 GSTM1 と GSTT1 の欠損について解析した。GSTM1 および GSTT1 いずれの欠損の割合も肺気腫において、非肺気腫喫煙者に比較して有意の変化を認めなかった。(2) マクロライド抗生物質のライノウイルス感染抑制作用を、培養気道細胞を用いて調べた。マクロライド抗生物質は培養液ライノウイルス放出と接着物質 ICAM-1 および炎症性サイトカイン合成を抑制した。(3) マクロライド抗生物質の風邪防止効果を調べた。慢性閉塞性肺疾患患者において、マクロライド抗生物質を内服した群では風邪の回数、急性増悪の回数ともに減少した。

A. 研究目的

(1) 慢性肺気腫に代表される慢性閉塞性肺疾患 (COPD ; Chronic Obstructive Pulmonary Disease) は世界における主要死亡原因の1つであり罹患率・死亡率ともに増加している。喫煙は COPD 発症の最大の危険因子として認められているが、一方で喫煙者の10%前後のみに COPD が発症するとの報告があり、喫煙に対する感受性を含め、COPD の発症因子・発症機序は不明である。現在、慢性肺気腫の発症機序として2つの仮説、プロテアーゼ・抗プロテアーゼ説およびオキシダント・抗オキシダント説が提唱されている。オキシダント・抗オキシダント説はオキシダントの直接傷害および抗プロテアーゼ抑制作用による肺組織破壊が慢性肺気腫を惹起すると説明しているが、喫煙者の抗オキシダント産生機能と慢性肺気腫発症との関係は不明であった。ヘムオキシゲナーゼはヘムをビリベルジンと鉄に代謝し、一酸化炭素やビリルビン、フェリチンを産生する

酵素である。誘導型ヘムオキシゲナーゼはオキシダントや高酸素による細胞破壊を防御する抗オキシダント作用を持ち、生体におけるオキシダント物質とのバランスを保つ働きをしていると考えられている。ヘムオキシゲナーゼの誘導はヘムオキシゲナーゼ遺伝子上流に位置する GT 反復配列で制御され、長い GT 反復配列ほど抑制作用が強いことが最近報告された。これらの知見から、私たちは慢性肺気腫では喫煙中のオキシダントに対する防御能力が弱いのではないかと考え、慢性肺気腫における長い GT 反復配列の遺伝子多型性を報告してきた。しかし、慢性肺気腫においても GT 反復配列の長くない、HO-1 遺伝子多型性に該当しない患者も多い。今年度は慢性肺気腫の発症素因をさらに検討するため、別の抗酸化作用を持つ酵素グルタチオン-S トランスフェラーゼ (GST) の遺伝子多型 GSTM1 と GSTT1 の欠損について、肺気腫患者および非肺気腫喫煙男性を対象に解析した。

(2) 気管支喘息や COPD はウイルス感染が引き金になって急性増悪し、呼吸不全をきたすことが多い。ライノウイルス、インフルエンザウイルス、RS ウイルスなどが同定され、二次性の細菌感染が更に症状を悪化させる。ウイルス感染は気道上皮の剥離脱落や気道壁の浮腫を介して気道内腔を狭窄すると言われている。また、炎症性サイトカイン、ヒスタミンやキニンが気道炎症や気管支平滑筋収縮を生じて気流障害を促すと考えられている。これらの炎症性サイトカインや接着分子 ICAM-1 はマクロライド抗生物質で合成が低下するとの報告が最近なされている。ICAM-1 は風邪の主因であるライノウイルスの感染受容体であり、炎症性サイトカインはライノウイルスによる気道炎症に関係することを私たちは報告してきた。これをもとに、本年度は 1. マクロライド抗生物質のライノウイルス感染抑制作用について、培養ヒト気管上皮細胞を用いて検討した。また、2. エリスロマイシンを内服した COPD 患者の風邪の回数と急性増悪の回数について検討した。

(倫理面への配慮)

慢性肺気腫の遺伝子解析およびマクロライド抗生物質内服研究については東北大学医学部倫理委員会の承認と患者の同意を得て行なった。ヒト気管上皮細胞培養についても東北大学医学部倫理委員会の承認を得て行なった。

B. 研究方法

(1) 平成 11 年度に HO-1 遺伝子多型性研究で報告した年齢 50 歳以上の慢性肺気腫患者 101 名 (平均年齢 66.8 歳、平均 Brinkman's index 1006)、非慢性肺気腫 100 名 (平均年齢 67.1 歳、

平均 Brinkman's index 938) の喫煙男性を対象にグルタチオン-S トランスフェラーゼ (GST) の遺伝子多型 GSTM1 と GSTT1 の欠損について、解析した。慢性肺気腫の診断は原則的に、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息の診断と治療指針 (日本胸部疾患学会 1995 年) に従い、理学的所見、呼吸機能所見、胸部画像所見などを参考にした。以上の対象から血液を採取し DNA を抽出した。これを鋳型として PCR を行った。PCR は Arandらの方法を一部修正しておこなった。

(2) 1. ヒト気管上皮細胞を試験管に培養し、ライノウイルスを感染させた。エリスロマイシン 10 μ M をライノウイルス感染前から培養液に加え、ライノウイルスの培養液放出量、サイトカイン放出量、上皮細胞の ICAM-1 合成量を測定した。また、細胞を色素 LysoSensor Green DND-189 でラベルして蛍光顕微鏡を用いて細胞内酸性エンドゾームの数を調べた。

2. COPD 患者の風邪および急性増悪の回数に対するマクロライド抗生物質の効果調べた。COPD 患者 (慢性肺気腫あるいは慢性気管支炎) 109 名を 2 群に分け、エリスロマイシン内服群 55 名 (男性 47 名、女性 7 名、平均年齢 69.1 歳)、非内服群 54 名 (男性 44 名、女性 10 名、平均年齢 71.7 歳) を対象に 1997 年から 12 ヶ月に渡って調査した。患者の同意を得て、内服群はエリスロマイシン (200-400 mg/日) を、非内服群はリボフラビン (10 mg/日) を内服した。風邪の評価は、Jackson の方法に従って、発熱、咽頭痛などの症状をスコア化して 5 点以上とした。急性増悪は Rodrigues-Roisin の方法に従って、判定した。

C. 研究結果

(1) 解析はまだ途中にあり、慢性肺気腫 50 名 (平均年齢 66 歳)、非肺気腫喫煙男性 50 名 (平均年齢 64 歳) で行われた。グルタチオン-S トランスフェラーゼ (GST) の遺伝子多型のうち、GSTM1 欠損の割合は慢性肺気腫 54%、非肺気腫喫煙男性 72%と、慢性肺気腫において GSTM1 欠損の頻度は有意差がなかった。GSTT1 欠損の割合は慢性肺気腫 32%、非肺気腫喫煙男性 54%と、慢性肺気腫において GSTT1 欠損の頻度も有意差がなかった。

(2) 1. ヒト気管上皮細胞にライノウイルスを感染させると、培養液ライノウイルス量は時間とともに増加し、3 日後にピーク値になる。上皮細胞にエリスロマイシン 10 μ M を感染 3 日前から作用させると、培養液ライノウイルス量は 10%以下に明らかに減少する。さらに、ライノウイルス感染によって増加する培養液サイトカインおよび上皮細胞 ICAM-1 発現はエリスロマイシンで減少する。酸性エンドゾームの数もエリスロマイシンで減少する。2. 風邪をひく回数はエリスロマイシン内服群の COPD 患者で平均 1.2 回/年、非内服群の COPD 患者で平均 4.5 回/年と、明らかにエリスロマイシン内服群で減少した。また、風邪がもとで急性増悪した患者数もエリスロマイシン内服群の COPD 患者で平均 6 名/年 (11%)、非内服群の COPD 患者で平均 30 名/年 (56%) と、明らかにエリスロマイシン内服群で減少した。重症の急性増悪した患者は内服群で 0 名/年、非内服群で 10 名/年であった。エリスロマイシン内服群で一名のみ食欲低下、下痢症状があり、エリスロマイシンを中止したが、ほかの患者には副作用

用を認めなかった。

D. E. 考察、結論

(1) 従来、慢性肺気腫の発症原因としてプロテアーゼ・抗プロテアーゼの不均衡が提唱され、発症遺伝子として α 1-アンチトリプシン欠損症が明らかにされてきた。最近、これに加えて、オキシダント・抗オキシダントの不均衡が指摘されている。Smith らは抗オキシダント酵素である microsomal epoxide hydrolase 活性が慢性肺気腫で低下する遺伝子多型性を報告した。これまで、私たちは抗オキシダント作用を有する酵素である HO-1 の発現が慢性肺気腫で低下しているという仮説をたて、HO-1 遺伝子 GT 反復配列多型性と慢性肺気腫との関連について検討してきた。結果、高齢で発症する慢性肺気腫において 30 回以上の長い GT 反復配列を有する割合が有意に上昇した。また、反復回数 30 回以上の遺伝子を有する喫煙者が慢性肺気腫に罹患するリスクは 29 回以下の GT 反復配列を有する喫煙者の 2.4 倍であった。この結果、長い GT 反復配列をもつ喫煙者において、抗オキシダント作用を持つヘムオキシゲナーゼの誘導が抑制され、慢性肺気腫が発症するリスクが大きいと結論された。若年性肺気腫においても同様の結果が得られ、発症年齢に関係なく HO-1 遺伝子多型性が肺気腫発症に関係することが示唆された。しかし、肺気腫患者においても約 6 割において GT 反復配列は長くなく、このような個々の患者に関して考えると、発症素因が不明の状態にある。別の抗酸化作用を持つ酵素グルタチオン-S トランスフェラーゼ (GST) の遺伝子多型 GSTM1 欠損が慢性肺気腫あるいは COPD 発症に関

連するとの報告が Harrison によってなされている。しかし、本研究において、日本人肺気腫患者において GSTM1 遺伝子欠損の頻度が非肺気腫に比べて有意差がないことが示唆された。また、GSTT1 欠損の頻度も日本人の肺気腫において、非肺気腫に比べて有意差がないことが示唆された。したがって、GSTM1 および GSTT1 遺伝子欠損は日本人の肺気腫患者における発症素因でない可能性が考えられる。

(2) ライノウイルスは成人の風邪の主因であるばかりではなく、COPD などの急性増悪を引き起こすことが報告されており、予防法・治療法の開発が急がれていた。ライノウイルスは血清型が 100 種類以上と多く、有効なワクチン開発がなされていない。私たちは、最近ライノウイルスが気道上皮細胞に ICAM-1 あるいは低比重リポ蛋白(LDL)受容体を介して感染することを明らかにした。他方で、エリスロマイシンなどのマクロライド抗生物質が気道上皮の ICAM-1 合成低下をもたらすことが明らかにされている。私たちはこれらの背景から、マクロライド抗生物質がライノウイルス感染抑制効果を持つのではないかと考え、研究を進めた。その結果、エリスロマイシンが気管培養液のライノウイルス放出量を減少させることを見出した。さらに、炎症性サイトカインも減少したことより、エリスロマイシンがライノウイルスによる気道炎症抑制作用を持つことが示唆された。エリスロマイシンは上皮細胞の ICAM-1 を減少させたことより、ライノウイルス感染抑制にはライノウイルス感染受容体の減少が関与すると考えられる。さらに、ライノウイルス RNA は酸性エンドゾ

ームから RNA を細胞質に放出することが報告されている。今回の研究で、エリスロマイシンが気道上皮細胞の酸性エンドゾーム数を減少させたことから、ライノウイルス感染抑制に働いていた可能性が示唆される。さらに、臨床研究において、エリスロマイシンを内服した COPD 患者では風邪および急性増悪の回数が減少していた。したがって、エリスロマイシンは呼吸不全を引き起こすリスクのある COPD などの慢性炎症性肺疾患患者において、風邪の予防として有効である可能性があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki, T. Yamaya M, Kamanaka M, Jia YX, Nakayama K, Hosoda M, Yamada N, Nishimura H, Sekizawa K, Sasaki H: Type 2 rhinovirus infection of cultured human tracheal epithelial cells: role of low density lipoprotein receptor. *Am J Physiol.* 280: L409-L420, 2001.

Yamaya M, Hosoda M, Ishizuka S, Monma M, Matsui T, Suzuki T, Sekizawa K, Sasaki H: Relation between exhaled carbon monoxide levels and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy* 31: 417-422, 2001.

Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Hosoda M, Yamada N, Ishizuka S, Yanai M, Numazaki Y, Sasaki H: Bafilomycin A1 inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells: effects on endosomal pH and ICAM-1 production. *Am J Physiol* 280: L1115-L1127, 2001.

Horváth I, MacNee W, Kelly FJ, Dekhuijzen PNR, Phillips M, Döring G, Choi AMK, Yamaya M, Bach FH, Willis

D, Donnelly LE, Chung KF, Barnes PJ :
Heme oxygenase-1 induction and exhaled
markers of oxidative stress in lung
diseases. European Respiratory Society
Research Seminar Report. Eur Respir J
18: 420-430, 2001.

Suzuki T, Yanai M, Yamaya M, Satoh-
Nakagawa S, Sekizawa K, Sasaki H :
Erythromycin and common cold in
chronic obstructive pulmonary disease.
Chest 120: 730-733, 2001.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許申請中

発明の名称：慢性肺気腫の発症リス
クを予測する方法

発明者：佐々木英忠、沖永壮治、山
谷睦雄、中山勝敏

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

- (1) 重症 COPD 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
—全国多施設前向き共同研究—
(2) 喫煙曝露により誘導されるラット・マウス肺病変の検討

分担研究者 福地 義之助 順天堂大学医学部呼吸器内科 教授

研究要旨

- (1) 重症 COPD を対象に最大限の薬物療法、呼吸リハビリテーションを含む最大限の包括的内科治療の効果の検討を多施設前向き共同研究で行った。
(2) 実験小動物に慢性的に喫煙曝露させることによりヒト肺気腫モデルの作成を試みた。

A. 研究目的

- (1) COPD における包括的内科治療の効果と限界、特に薬物療法の最大効果を明らかにする。
(2) ラットに慢性的にタバコ煙に暴露させ、肺気腫を短期間で再現性よく作成する条件を検討する。

B. 研究方法

(1) FEV_{1.0} 1.0 L 以下または%FEV_{1.0} 35%以下の重症 COPD を対象とした。気道閉塞の可逆性試験陽性例などは除外した。治療は Term 1：禁煙、インフォームドコンセント、Term 2：抗コリン剤 (oxytropium bromide 2puff x 4：3 週間)、Term 3：最大限の気管支拡張薬およびステロイド（経口 prednisolone 0.5mg/kg/平成 13 年 4 月より Fluticasone propionate 800 μg）の投与および患者教育、呼吸理学療法・運動療法の施行（2 週間）であり、その前後で評価を行う。Term 4 ではその後 2 年間治療継続となるが、Term 3 有効例はステロイド投与を含む治療を継続、無効例はステロイド投与中止、無効・LVRS 適応/同意例は自施設または他施設へ紹介し LVRS を施行とする。既治療例は Term 2、3 より開始とした。従来よりの外来治療を変更せずに継続する重症 COPD 症

例をコントロールとした。

(2) 4 週齢のオスの Fawn-hooded rat (FHR) と Wister Kyoto rat (WKR) を使用し、柴田科学社製タバコ煙発生装置・曝露装置 SG-200 を用いて 12 週間タバコ煙に慢性的に吸入暴露させた。タバコは Kentucky 大学の研究用タバコ 1R1 を使用し、3%タバコ煙を 1 日 1 回 30 分、週 5 日間を 6 週間、その後、1 日 1 回 45 分、週 5 日間を 6 週間、暴露させた。ラットを屠殺し経気管支肺胞洗浄 (BAL) を行なった後、右肺を定圧還流固定装置を用いて 25 cm H₂O の圧力で 48 時間ホルマリン固定し、病理学的検討を行った。また、細胞外基質蛋白であるコラーゲン、エラスチン含量の変化を検討するため左肺を塩酸加水分解し、HPLC を用いて 4-hydroxyproline (4-HP)、desmosine (Des)、isodesmosine (Ides) を測定した。

(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確に述べた。動物実験に関しては、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ていることを明言した。

C. 研究結果

- (1) 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。平成 12 年 9 月より症例の登録を開始し、平成 13 年 4 月より Term 3 のステロイドを Fluticasone propionate 800 μ g の吸入に変更後も、登録継続の賛同を 16 施設より得た。プロトコル群 17 例、コントロール群 9 例を登録した。治療プロトコルは最短で約 25 ヶ月のためプロトコル治療終了症例は現時点ではなく、現在治療の継続、データの集積中にある。

(2) FHR、WKR とともに 10 匹を用いて開始したが喫煙曝露実験を完了できたのは FHR6 匹、WKR3 匹であった。BAL 液中の総細胞数は FHR $3.4 \pm 0.9 \times 10^6$ (平均 \pm SD、以下同様)、WKR $2.5 \pm 0.9 \times 10^6$ 、と増加していた。細胞分画では好中球 FHR $63.9 \pm 8.2\%$ vs WKR $74.0 \pm 21.5\%$ 、マクロファージ FHR $21.0 \pm 5.2\%$ vs WKR $22.0 \pm 20.0\%$ 、リンパ球 FHR $15.0 \pm 11.3\%$ vs WKR $4.0 \pm 2.2\%$ 、と好中球の増加が顕著であった。HE 染色による肺病理像の検討では FHR と WKR とともに気道上皮細胞の増生と炎症細胞浸潤、末梢肺実質の炎症巣形成を認めたが、明かな肺胞破壊は認めなかった。左肺塩酸加水分解物のアミノ酸分析では喫煙曝露後に 4-HP の有意な増加を FHR と WKR の両群で認めたが、Des と Ides は FHR でのみ有意な減少を検出した。

D. E. 考察および結論

(1) WHO と NHLBI の共同プロジェクトである GOLD (Global Initiative for chronic obstructive lung disease) による COPD のガイドラインが平成 13 年 4 月に発表された。Glucocorticosteroid reversibility testing に関して吸入ステロイドの使用が推奨されており、本研究の Term 3 におけるプロトコル

も経口 prednisolone より Fluticasone propionate 800 μ g の投与に同年 4 月より変更した。本勧告の背景には、大規模治験での経口ステロイドと吸入ステロイド有効例の不一致の報告や安価な経口ステロイドが世界で COPD に広く処方されてしまう可能性を配慮したものと推測される。Term 3 の呼吸リハビリテーションの展開が困難であった施設が半数を占め、COPD の包括的治療の展開に際してのわが国における改善されるべき問題点が示唆された。2001 年 12 月に日本呼吸管理学会/日本呼吸器学会より呼吸リハビリテーションに関するステートメントが発表されたが、今後、その実践に際してのマニュアル作成や、関連する専門職種の育成、診療報酬の改正が必要と思われる。

(2) FHR は肺発生異常により肺メカニクスと細胞外基質蛋白質組成に特徴を有するため、対照ラットである WKR より喫煙曝露により短期間で肺気腫を作成出来る可能性を考えたが、病理学的には有意な肺胞破壊は検出できなかった。しかし、喫煙曝露によると思われるコラーゲンの増加を FHR と WKR で、また、FHR でエラスチンの低下と架橋成分の変化を認めた。今後は喫煙曝露条件、実験動物種の選択を再検討し、肺気腫作成条件を確立をめざす。

F. 研究発表

1. 論文発表

Morio Y, Muramatsu M, Teramoto S, Oka T, Fukuchi Y. Distal Airspace Enlargement in the Fawn-Hooded Rat: Influences of Aging and Alveolar Wall Destruction. *Respiration* 68: 78-86, 2001.

Miyahara N, Seyama K, Sato T, Fukuchi Y, Eda R, Takeyama H, Harada M.

Compound Heterozygosity for Alpha-1-antitrypsin (Siiyama and QCclayton) in an Oriental Patient. *Internal Medicine*. 40: 336-340, 2001.

Takahashi H, Soma S, Muramatsu M, Oka M, Fukuchi Y. Upregulation of ET-1 and its receptors and remodeling in small pulmonary veins under hypoxic conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L1104-L1114, 2001.

Teramoto S, Fukuchi Y. Senile lung and animal models. *Recent Res Devel Resp Critical Care Med* 1: 13-18, 2001.

Nagaoka T, Muramatsu M, Sato K, I. McMurtry, Oka M, Fukuchi Y. Mild Hypoxia causes severe pulmonary hypertension in fawn-hooded but not in Tester Moriyama Rats. *Respiration Physiology* 127: 53-60, 2001.

Takahashi H, Soma S, Muramatsu M, Oka M, Ienaga H, Fukuchi Y. Discrepant distribution of big endothelin (ET)-1 and ET receptors in the pulmonary artery. *Eur Respir J* 18: 5-14, 2001.

Seyama K, Kira S, Takahashi H, Ohnishi M, Kodama Y, Dambara T, Kobayashi J, Kitamura S, Fukuchi Y. Longitudinal follow-up study of 11 patients with pulmonay lymphangiomyomatosis: diverse clinical course of LAM allow some patients to be treated without anti-hormone therapy. *Respirology* 6: 331-340, 2001.

福地義之助、木田厚瑞、工藤翔二、堀江孝至、原澤道美. 高齢者慢性閉塞性肺疾患に対する徐放性テオフィリン投与による臨床効果の検討-QOLの改善効果と安全性の検討を中心に- 呼吸 20: 523-533, 2001.

植木純、福地義之助. 慢性閉塞性肺疾患診療における QOL の評価. *臨床成人病* 31: 73-77, 2001.

植木純、福地義之. COPD の包括的呼吸リハビリテーション. *呼と循*. 49: 249-256, 2001.

植木純、福地義之助. COPD 患者の安定期治療. *今月の治療* 9: 31-37, 2001.

植木純、森貴紀、十合晋作、福地義之助. 包括的呼吸リハビリテーションプログラム—大学病院における検討—. *呼吸* 20: 100-106, 2001.

山口聖子、滝沢真季子、植木純、福地義之助. 包括的呼吸リハビリテーションプログラム—プログラムコーディネータの役割—. *日呼管誌* 11: 226-230, 2001.

2. 学会・研究会発表
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（特定疾患研究事業）
分担研究報告書

CYP2A6 全欠損型多型と喫煙習慣ならびに肺気腫進展との関連に関する研究

分担研究者 山口 佳寿博 慶應義塾大学医学部内科学教室 助教授

研究要旨 ニコチンはタバコ依存に深く関わり、主として CYP2A6 により代謝される。いくつかの CYP2A6 の遺伝子多型がこれまでに報告されているが、それらと喫煙習慣ならびに COPD の臨床所見との関連は十分には解明されていない。130 名の喫煙歴を有する（生涯喫煙量 ≥ 10 pack-years）軽症から重症の COPD 患者（喫煙群）に肺機能検査と胸部 CT 検査を施行した。123 名の健常非喫煙者を対照とした（非喫煙群）。CYP2A6 遺伝子型は喫煙群、非喫煙群の両群で決定した。CYP2A6 の全欠損型遺伝子多型（CYP2A6del）のアレル頻度は非喫煙群（0.189, n=122）に比べ軽喫煙者で高く（0.279, n=68, $\chi^2 = 4.2$, p=0.04, 生涯喫煙量 10-59 pack-years）、重喫煙者では低かった（0.089, n=62, $\chi^2 = 6.3$, p=0.01, 生涯喫煙量 ≥ 60 pack-years）。CYP2A6 del アレル頻度は気腫化スコア（LAA スコア）の高い喫煙者（0.120, n=46, LAA ≥ 8.0 ）ではスコアの低い喫煙者（0.263, n=40, LAA < 2.0, $\chi^2 = 5.8$, p=0.02）に比べ低かった。CYP2A6del アレルを持つ場合、重喫煙者にはなりにくい、むしろ軽喫煙者にはなりやすい傾向が見られた。CYP2A6 の全欠損型遺伝子多型は肺気腫の進展に対して防御的に働くことが示された。

A. 研究目的

ニコチンは主としてチトクローム P450 のひとつである CYP2A6 により代謝される。少なくとも 3 種類の CYP2A6 の遺伝子多型が報告されており、CYP2A6*2 はエクソン 3 の T to A transition, CYP2A6*3 は CYP2A6 と CYP2A7 の間でのエクソン 3, 6, 8 の conversion, そして CYP2A6del は全欠損型多型である。CYP2A6 の酵素活性は CYP2A6*2 または CYP2A6del アレルでは低下することが判明している。また、遺伝子型と喫煙習慣の関連も近年示唆された。これらの研究により、変異型アレルを持つことにより喫煙量が減少する可能性が示された。しかしながら、生涯喫煙量、1 日あたり喫煙本数、喫煙年数、禁煙の有無など、CYP2A6 遺伝子多型と喫煙習

慣の詳細な関連については十分には解明されていない。COPD は主として重喫煙者に発症しやすいので、血清ニコチン濃度により制御される喫煙習慣は COPD の進展に関連していると考えられる。また、ニコチン、癌原性物質など、CYP2A6 により代謝または活性化を受ける物質が COPD の病態に関連している可能性もある。しかしながら、これまでに CYP2A6 の遺伝子型と COPD の病態との関連を検討した報告は認められない。我々ははじめに CYP2A6del アレル頻度が高いと予想される日本人において遺伝子型と喫煙習慣の関係について解明することを目標とした。次に、CYP2A6 遺伝子型と COPD の病態との関連を検討することを試みた。