

# Web-based アンケート調査システムの構築

調査用紙を用いたアンケート (Paper-based 調査) に対して、インターネットを利用した CyA および NAC のアンケート調査 (Web-based 調査) システムを構築する上で、特に留意した点として、

- 1) セキュリティの確保
  - 2) 事前のシステム仕様の確定
  - 3) 入力者にとってフレンドリーなシステム
  - 4) データ集計のための考慮
  - 5) 上記条件に柔軟に対応できるソフトウェアの利用
- があげられる。

## 1. セキュリティの確保について

インターネットを利用して患者情報を入力するため、セキュリティに関しては、第三者が不正に情報を搾取できない仕組みが要求される。また、万一に備え、たとえ不正アクセスにより情報が露営しても患者を特定するような情報は必要最小限にする必要がある。

Web-based 調査システムの利用に関しては、セキュリティの確保のために以下の運用とした。

- ① firewall により第三者からの不正アクセスを防御されたサーバーを利用
- ② 事前に登録されたアンケート調査協力施設の医師に対して発行された ID とパスワードを利用
- ③ 各自が入力した患者以外の情報はブラウザ不可能
- ④ システム管理者が定期的にデータをバックアップ

## 今後のセキュリティの強化

今回の Web-based 調査システムには、運用期間に制限があり、SSL (Secure Sockets Layer) による暗号化通信のための環境設定が間に合わなかったが、今後の臨床研究およびアンケート調査のための Web-based システムにおいては、セキュリティの強化のために、SSL 証明書の取得とサーバー環境下で運用できる体制を準備した。

## 2. 事前のシステム仕様とプログラム開発について

急性増悪および慢性期の 2 つのアンケート調査システムが必要であり、また、入力者用と全てのデータをブラウザのみできる管理者用の計 4 本のプログラムを、CyA および NAC のそれぞれに準備する必要があった。

これらの Web-based 調査システムを構築する上で、事前にデータ入力、検索、修正などのフローを決め、システムの仕様を検討し、プログラム開発を行ったつもりであったが、実際には項目の追加や入力方法の変更などが生じ、また、より簡便に入力するためのシステム仕様の変更が何度か発生した。このため、短期間にデータベースの変更、プログラム修正およびテストのための負荷が大きかった。しかしながら、作成されたアンケート画面を見ていただき、on-demand に対応することによって、結果的に要求仕様を満足したシステムに最短でたどりついたものと思われる。

## 今後のプログラム開発の効率化

Web-based 調査システムには、一般の臨床研究に比べアンケート調査項目数は非常に少ないため、簡易なデータベースと HTML プログラミングで対応した。しかしながら、追加・修正が予想以上に多く発生し、プログラム開発工数が多く必要となってしまった可能性があるが、短期間で柔軟に対応することができたものとする。

将来的に、臨床試験データマネジメントのために開発された汎用的システムに、さらに Web-based の入力フォームを作成できる機能追加を行い、より効率的なプログラム開発ができる体制準備を行う予定である。

## 3. 入力者にとってフレンドリーなシステムについて

施設名、入力者名を初回に入力すれば記録されるので、次回以降は簡略化できる機能を取り入れた。また、生年月日や診断時期などの数値入力ミスを回避するために、プルダウンメニューでの入力形式とした。

必須項目については、多い方がデータの精度が上がるが、多すぎると入力しずらかったり、データが集まらない可能性が高く、入力必須項目の選択が難しかった。実際的には、必須項目は最小限にし、後から情報の追加を可能とするほうが、入力者にとってはよりフレンドリーであると思われた。

CyA の血中濃度測定値や副作用名の入力については、フリーなコメント入力方式としたが、入力者により表現が異なるケースが多くなってしまった。頻度が多いと予測されるものは、チェック方式とし、その他の場合にフリー入力とすべきと思われた。

## 4. データ集計のための考慮について

生年月日、診断時期、発症時期などの年月日の入力に関しては、西暦と和暦の混在や数値入力のミスによる集計不能例を最小限にするために、プルダウンメニューでの入力形式とした。

急性憎悪の発症時期や予後（生存・死亡）等の情報が未入力のため、集計の対象とできない患者が多かった。また、CyA の血中濃度の入力様式がフリーであったために、入力ミスと思われるものも散見された。入力者にとってフレンドリーであり、かつ、後のデータ集計を考慮し、事前にイレギュラーなデータによる十分テストを行い、可能な限り多くの患者情報を利用できる準備が必要である。

## おわりに

データ入力と後の集計上の観点からは、Paper-based 調査と比較し Web-based 調査による労力と時間の節約のメリットは非常に大きい。しかしながら、調査項目と入力様式、システム開発などの調査を開始するまでの準備は、計画的で効率的に行わなければ、システムの追加・修正のために時間と労力が予想以上にかかり、なかなか調査が開始できなかつたり、意図する情報が得られない状況に陥ったり、あるいは、システムのコストが無視できなくなる可能性がある。

また、効率的にするために汎用システムを利用すべきであるが、一方で汎用性が優先されていることにより柔軟な対応ができない可能性もあるため、必要最小限の調査項目、チェック方式などによる入力の簡略化、フリー入力の減少などは、考慮すべき重要なポイントである。

以上

# 研 究 報 告

## N-acetylcysteine を中心とした新規吸入デバイスの開発に向けて

根井 貴仁<sup>1</sup> 吾妻安良太<sup>1</sup> 松本 亜紀<sup>1</sup> 齊藤 好信<sup>1</sup>  
阿部 信二<sup>1</sup> 榎本 達治<sup>1</sup> 白杵 二郎<sup>1</sup> 工藤 翔二<sup>1</sup>  
吉山 友二<sup>2</sup> 朝井 慶<sup>3</sup>

特発性間質性肺炎 (Idiopathic interstitial pneumonias, IIPs) の治療は予想以上に困難である。推奨される使用薬剤はステロイドをはじめ、cyclophosphamide, azathiopurine などがあり、今後も新薬に大きな期待がかけられている。呼吸器疾患に対する N-acetylcysteine (NAC) の効果は急性肺傷害や慢性呼吸不全に対する効果が報告され、特発性間質性肺炎の進行抑制効果が期待される薬剤となった。

ところがこれまでに実際に NAC 吸入療法が有効であったとするデータはなく、エロゾル化した NAC の物性や肺組織へ delivery も一切不明である

今回我々はエロゾル化した NAC の有効性を研究、更に IIP 患者に適したデバイスの開発を進めてゆきたいと考えている。

特発性間質性肺炎 (Idiopathic interstitial pneumonias, IIPs) は 2000 年に米国胸部疾患学会 (American thoracic society, ATS) とヨーロッパ呼吸器学会 (European respiratory society) の合同協議にて間質性肺炎の診断・治療ガイドラインが提唱されてから、基本となる治療の枠組みができたようにみえたが、実際に治療は予想以上に困難である場合が多い。現在において推奨される使用薬剤はステロイドをはじめ、cyclophosphamide, azathiopurine などがあり、今後も cyclosporine や pirfenidon の臨床応用に大きな期待がかけられている。しかしながらこれらの薬剤は副作用の問題が依然解決されておらず、患者すべてに対する治療とならないのが現状である。

呼吸器疾患に対する N-acetylcysteine (NAC) の効果は 1985 年の oxidant 障害肺に対する研究報告から始まった<sup>1)</sup>。その後、急性肺傷害における IL-1 由来の好中球賦活抑制<sup>2)</sup>や、慢性呼吸不全に伴う肺への oxidative stress を NAC で抑制できる<sup>3)</sup>などの様々な肺傷害に対する NAC の効果が報告されてきた。現在は特発性間質性肺炎の進行抑制効果の期待と慢性閉塞性肺疾患の急性悪化の抑制<sup>4)</sup>などが期待される薬剤に位置づけされた (慢性閉塞性肺疾患においては現在 phase III trial が進行中である<sup>5)</sup>。

ところがこれまでに報告されている NAC の投与は全て全身投与によるものであり、NAC の吸入による効果を問うたものはなかった。1999 年 Hagiwara らは bleomycin 肺傷害マウスに NAC をエロゾル化し吸入させたところ有意な肺線維化の抑制を認めた<sup>6)</sup>。現在、実地臨床において特発性間質性肺炎 (IIP) 患者に NAC の吸入療法は多施設にて行われているが、実際にヒトにおいて NAC 吸入療法が有効であったとするデータはない。また、NAC をエロゾル化したものが実際に肺への到達可能の是非も不詳である。

今回我々は NAC の吸入療法の有効性を証明すべく、エロゾル化した NAC の有効性を研究、更に IIP 患者に適したデバイスの開発を進めてゆきたいと考えている。

現在日本の医療機関で行われている吸入療法はコンプレッサー式 (圧力式)、超音波二槽構造式、メッシュ型超音波式の 3 つに分類される。それぞれの長所、短所を表 1 に示した。コンプレッサー式は従来行われていた吸入デバイスであり、low cost であるがエロゾル化された粒子の径が統一不可能である。エロゾル化した粒子を到達させたい部位が限られた場合は理論的には不向きなデバイスである。超音波式はキャビテーション効果を応用しているデバイスである。キャビテーション効果とは超音波が液体中に加える張力によって、液体が引きちぎられ、空洞を生じる現象であり、空洞を発生することにより液体のエロゾル化が現れるものと考えられている。

二槽構造式超音波ネブライザーは初期の段階で製品化されたデバイスである。前述したキャビテーション効果を用いて薬液をエロゾル化させる。具体的には、超音波振動子から発生した超音波振動エネルギーが冷却水を通して薬液表面に集中し、振動の作用 (キャビテーション効果) で薬液がエロゾル化される。更にこの超音波振動のエネルギーの大きさを変えることで、霧化量も設定可能である。噴霧された薬液はファンからの送風とともにマウスピースへ運ばれる仕組みになっている (図 1)。

メッシュ型超音波ネブライザーは二槽構造の超音波式ネブライザーとは大きく構造が異なる。噴霧部は振動の発生するホーン振動子と多数の微細孔をもつメッシュで構成されており、ホーン振動

## ネブライザー

- ◆ 現在専ら医療用に使用できるネブライザー機器は2槽構造超音波式・メッシュ型超音波式・コンプレッサー式の3種類がある。
- ◆ それぞれのタイプでの長所・短所を示した。

	2槽構造型 超音波式	メッシュ型 超音波式	コンプレッサー式
長所		機具がコンパクトにまとめられる	
短所		高価な機具になることが多い	機具が大きくなる ことが多く、使用 法がやや煩雑化 する

図 1

1 日本医科大学付属病院・内科学第 4 講座  
 2 共立薬科大学・臨床薬学講座  
 3 (株)オムロン医療機器事業部

## 超音波式ネブライザー(2槽構造式)

- ◆ 2槽構造の超音波式ネブライザーは、超音波のキャビテーション効果を用いて薬液を霧化させる。具体的には、超音波振動子から発生した超音波振動エネルギーが冷却水を通して薬液表面に集中し、振動の作用(キャビテーション効果)で薬液が霧化される。この超音波振動のエネルギーの大きさを変えることで、霧化量も設定可能である。噴霧された薬液はファンからの送風とともにマウスピースへ運ばれる仕組みになっている。

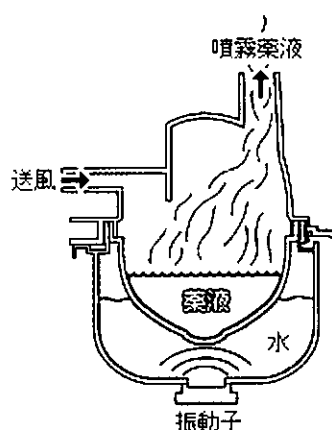


図 1

## メッシュ式ネブライザー

- ◆ メッシュ式ネブライザーは超音波振動を応用しているがキャビテーション効果を用いる二槽構造の超音波式ネブライザーとは大きく構造が異なる。噴霧部は振動の発生するホーン振動子と多数の微細孔をもつメッシュで構成されており、ホーン振動子の振動する部分とメッシュの隙間にある薬液が、即時にホーン振動子の振動によりメッシュの穴から押し出され、薬液が霧化される仕組みになっている。

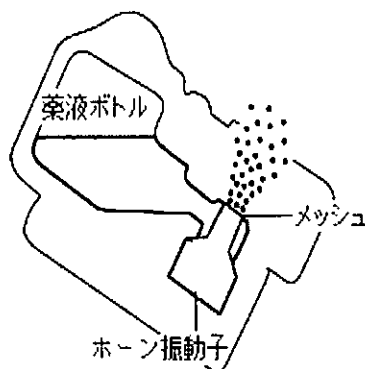


図 2

子の振動する部分とメッシュの隙間にある薬液が、即時にホーン振動子の振動によりメッシュの穴から押し出され、薬液がエロゾル化される仕組みになっている(図2)。

まず最初に在宅使用で大きなシェアを占める超音波式ネブライザーについて実際にNACをエロゾル化し、単位時間噴霧量・粒子径の測定とNACの有効含有量の測定を行う。使用デバイスは(株)オムロンより市場販売されているNE-U22(メッシュ型)、NE-U07(二槽構造式)を用いる。単位時間噴霧量は粒子径についてはNE-U22は2ml量、NE-U07は10ml量の試料を各ボトルに入れ、3分間噴霧前後の重量差から1分間あたりの噴霧量を算出。それぞれ3回繰り返し測定した。また粒子径についてはレーザー散乱光法(英国マルバーン社製マスターサイ

ザを使用)を用いて計測した。結果を表2に示した。

更にそれぞれのエロゾル化粒子内のNAC有効含有量を計測しキャビテーション効果に伴う物理的なダメージがNACに影響を与えないかを検討する。これはカスケードインパクト法を用い(図3)、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)法で定量する(現在定量中)。

今後の研究展開としてNACの有効含有量を元に適正な粒子径の決定、及びそれに対応した吸入デバイスの開発を目標としてゆく。尚、NACのエロゾル化に伴う硫化水素の発生についても検討してゆきたい。

### 参考文献

- 1) Simon, L. M. and N. Suttrop(1985). "Lung cell oxidant injury: decrease in oxidant mediated cytotoxicity by N-acetylcysteine." *Eur J Respir Dis Suppl* 139: 132-5.
- 2) Leff, J. A., C. P. Wilke, *et al.* (1993). "Postinsult treatment with N-acetyl-L-cysteine decreases IL-1-induced neutrophil influx and lung leak in rats." *Am J Physiol* 265 (51) : L501-6.
- 3) Hoshikawa, Y., S. Ono, *et al.* (1995). "[Contribution of oxidative stress to pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia]. " *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 33 (11) : 1168-73.
- 4) Pela, R., A. M. Calcagni, *et al.* (1999). "N-acetylcysteine reduces the exacerbation rate in patients with moderate to severe COPD." *Respiration* 66 (6) : 495-500.
- 5) Decramer, M., P. N. Dekhuijzen, *et al.* (2001). "The Bronchitis Randomized On NAC Cost-Utility Study (BRONCUS) : hypothesis and design. BRONCUS-trial Committee." *Eur Respir J* 17 (3) : 329-36.
- 6) Hagiwara, S. I., Y. Ishii, *et al.* (2000).

## NAC噴霧時における粒子径

単位時間噴霧量[g/min]	NE-U22			NE-U07		
	1回目	2回目	3回目	1回目	2回目	3回目
生食	0.42	0.42	0.40	1.04	1.02	1.05
アセチン原液	0.20	0.28	0.31	0.06	0.05	0.05
アセチン1/4倍希釈	0.45	0.47	0.44	0.68	0.71	0.68

平均粒子径[ $\mu m$ ]	NE-U22			NE-U07		
	1回目	2回目	3回目	1回目	2回目	3回目
生食	4.27	4.25	4.22	4.46	4.46	4.44
アセチン原液	4.92	4.94	4.94	霧化量少のため測定不可		
アセチン1/4倍希釈	4.96	4.01	4.91	4.71	4.62	4.81

表 1

"Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. " Am J Respir Crit Care Med 162 (1) : 225-31.

# 特発性間質性肺炎群 (IIPs) における N- アセチルシステイン (NAC) 吸入療法施行例に関する全国アンケート調査

本間 栄<sup>1</sup> 宮本 篤<sup>1</sup> 坂本 晋<sup>1</sup> 川畑 雅照<sup>1</sup>  
岸 一馬<sup>1</sup> 坪井 永保<sup>1</sup> 吉村 邦彦<sup>1</sup> 中田紘一郎<sup>2</sup>  
工藤 翔二<sup>3</sup>

特発性間質性肺炎群 (IIPs) における N- アセチルシステイン (NAC) 吸入療法の有用性を明らかにする目的で、アンケート方式により今迄の症例の実態を全国的に調査した。回答の得られた7施設、慢性進行例48例の内訳はIPF/UIP:38例(男性29例, 女性9例, 平均年齢71.9歳), IIPs/non-UIP:10例(男性6例, 女性4例, 平均年齢74.0歳)であった。IPF/UIPではNAC単独吸入群の13%が改善, 62%が不変, 25%が悪化し, NACとステロイド併用群の全例が悪化した。IIPs/non-UIPではNAC単独吸入群, NACとステロイド併用群の2群共に全例不変であった。今後IPF/UIPの初期例を対象として, NAC吸入療法の進行防止に対する有効性を非投与群との比較において検討する予定である。

## An assessment of clinical efficacy of inhaled N-Acetylcysteine in idiopathic interstitial pneumonias in Japan

Sakae Homma<sup>1</sup>, Atsushi Miyamoto<sup>1</sup>, Susumu Sakamoto<sup>1</sup>, Masateru Kawabata<sup>1</sup>  
Kazuma Kishi<sup>1</sup>, Eiyasu Tsuboi<sup>1</sup>, Kunihiko Yoshimura<sup>1</sup>, Koichiro Nakata<sup>2</sup>  
Shoji Kudoh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Respiratory Medicine, Respiratory Center, Toranomon Hospital.  
<sup>2</sup> Department of Respiratory Medicine, Toho University School of Medicine.  
<sup>3</sup> Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School.

To assess the efficacy of inhaled N-acetylcysteine (NAC) therapy in idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) in Japan, we analyzed questionnaires collected from seven medical institutions during the period from January through June in 2004.

There were 48 patients (35 males and 13 females with a mean age of 72.5 yrs) with progressive IIPs. All patients were treated with inhaled 352.4mg of NAC two or three times daily with mean duration of 6.3 to 7.1 months. Before and after NAC therapy, subjective symptoms such as dyspnea, pulmonary function tests, blood gas analysis, chest CT images and serum inflammatory parameters including KL-6 were evaluated. According to the classification of IIPs, among 48 patients with IIPs, 38 patients had IPF/UIP and 10 had IIPs/non-UIP, respectively.

The outcome after the treatment with NAC was improved in 13%, unchanged in 62%, and deteriorated in 25% of cases with IPF/UIP, and unchanged in all cases with IIPs/non-UIP, respectively. Further studies are required to determine the long-term outcome with this treatment.



## 緒 言

アンチオキシダント活性を有する N-アセチルシステイン (NAC) はサイトカインや接着分子の発現も抑制する。近年、特発性間質性肺炎 (IIPs) に対する NAC 吸入の有効例が散見されるが、その実態は殆ど不明である。そこで今後、厚生労働科学研究「特発性間質性肺炎の画期的治療法に関する臨床研究」班を中心に、IIPs の慢性期および急性増悪に対する NAC の治療効果の前向き研究を計画している。それに先立ち、今回アンケート方式により今迄の症例の実態を全国的に調査した。

## 対象と方法

対象は NAC 吸入を施行した IIPs の慢性期および急性増悪症例で、IIPs の診断は第 4 次改訂に、また急性増悪の診断は平成 6 年度の班会議での定義に基づいた。厚生労働省びまん性肺疾患調査研究班の分担研究者および研究協力者の所属施設の中で NAC 吸入を実施した 19 施設に依頼した。調査期間は平成 16 年 1 月より 6 月 21 日迄、設問内容は (1) IIPs の診断名、外科的肺生検・剖検の有無、診断時期・急性増悪の発症時期、予後・死因、(2) NAC 吸入理由 (当初から・ステロイド効果不十分・ステロイド減量後悪化・ステロイド減量後悪化予防・その他)、NAC 吸入期間・吸入法・投与量・効果 (指標：呼吸困難、胸部 CT、呼吸機能、血清 KL-6 値)・副作用、(3) ステロイド投与の有無、ステロイドパルス療法の有無、プレドニゾン投与の有無・投与量・期間・効果・副作用、(4) その他の治療の有無などで IIPs の急性増悪例と慢性進行例のそれぞれについて WEB 入力で回答を得た。

## 結 果

回答施設数は 7/19 施設 (36.8%) で回答症例数は急性増悪例 3 例、慢性進行例 48 例であった。

(1) 急性増悪例 3 例 (IPF/UIP：男性 2 例、女性 1

- 1 虎の門病院呼吸器センター内科
- 2 東邦大学医学部呼吸器内科
- 3 日本医科大学内科学第四講座

例) については NAC 効果に関する情報は記載されていなかった。

(2) 慢性進行例 48 例

a) 診断名・患者背景。

IPF/UIP：38 例 (男性 29 例、女性 9 例、平均年齢 71.9 歳)、IIPs/non-UIP：10 例 (男性 6 例、女性 4 例、平均年齢 74.0 歳) で外科的肺生検あるいは剖検は IPF/UIP の 15 例、IIPs/non-UIP の 1 例で施行されていた (表 1)。

b) NAC 吸入理由。

初期治療として選択が最も多く、次にステロイド減量後の悪化予防であった (表 2)。

c) NAC 吸入法・投与量・副作用。

超音波ネブライザー (平均粒子径：1-5 $\mu$ m) で 1A (352.4mg)  $\times$  2 回/日が多かった (表 3)。副作用は不明の 9 例を除き無かった。

d) NAC の効果。

NAC の効果判定可能例は IPF/UIP が 28 例、IIPs/non-UIP が 4 例であった。なお吸入開始後判定までの期間は IPF/UIP が 7.1  $\pm$  3.7 ヶ月、IIPs/non-UIP が 6.3  $\pm$  5.2 ヶ月であった。

呼吸困難については IPF/UIP では NAC 単独吸入群の 25% が改善、37.5% が不変、37.5% が悪化し、

表 1 患者背景

	計 (%)	IPF/UIP	IIPs/non-UIP
	48	38	10
性別			
男	35 (73%)	29	6
女	13 (27%)	9	4
平均年齢 (歳)	72.5	71.9	74.0
外科的肺生検			
無		33	10
有		5	0
剖検			
無		28	9
有		10	1

表 2 NAC 吸入理由

	計 (%)	IPF/UIP	IIPs/non-UIP
	48	38	10
初期治療として	38 (79%)	32 (84%)	6 (60%)
ステロイド減量後の悪化予防	5 (10%)	2 (5%)	3 (30%)
ステロイド効果不十分	2 (4%)	1 (3%)	1 (10%)
その他	2 (4%)	2 (5%)	0
不明	1 (3%)	1 (3%)	0

NACとステロイド併用群の全例が悪化した。IIPs/non-UIPでは呼吸困難はNAC単独吸入群で改善、不変、悪化がそれぞれ33.3%ずつで、NACとステロイド併用群の1例は不変であった(表4)。

胸部CT所見はIPF/UIPではNAC単独吸入群の13%が改善、57%が不変、30%が悪化し、NACとステロイド併用群の全例が悪化した。IIPs/non-UIPではNAC単独吸入群の全例が不変、NACとステロイド併用群の1例は改善した(表5)。

呼吸機能検査所見の効果判定は1) VC 200 mlあるいは10%, 2) DLco 15%あるいは3 ml/min/mmHg, 3) PaO<sub>2</sub> 10 mmHgの3項目中1項目以上改善した場合を改善、悪化した場合を悪化、それ以外を不変として判定した。IPF/UIPではNAC単独吸入群の11%が改善、68%が不変、21%が悪化し、NACとステロイド併用群の全例が悪化した。IIPs/non-UIPではNAC単独吸入群の1例が不変であった。なお治療前% VCおよびPaO<sub>2</sub>の平均値はIPF/UIPのNAC単独吸入群がそれぞれ70.7%, 78.1 mmHg, NACとステロイド併用群が81.5%, 62.3 mmHgであった(表6)。

血清KL-6値は治療前後20%の変動率で判定した。IPF/UIPではNAC単独吸入群の36%が改善、28%が不変、36%が悪化し、NACとステロイド併用群の50%ずつが改善と悪化を示した。IIPs/non-UIPではNAC単独吸入群の50%ずつが改善と不変で、NACとステロイド併用群の1例は不変であった(表7)。

最後に1)呼吸困難、2)胸部CT所見、3)呼吸機能検査所見の3項目中2項目以上改善した場合を改善、2項目以上悪化した場合を悪化、それ以外を不変としてNACの効果を経合評価した。IPF/UIPではNAC単独吸入群の13%が改善、62%が不変、25%が悪化し、NACとステロイド併用群の全例が悪化した。IIPs/non-UIPではNAC単独吸入群、NACとステロイド併用群の2群共に全例不変であった(表8)。

e) ステロイドの併用。

ステロイドはIPF/UIP, IIPs/non-UIPともに60%で併用されていた。初期投与量は30 mg/日が29%と最も多く、維持量は15 mg/日が35%, 30 mg/日が29%と多かった。主治医の判断に基づいたステロイドの効果はIPF/UIPでは35%が改善、9%が不変、

表3 NAC吸入機種・粒子径・量・回数

	計 (%)	IPF/UIP	IIPs/non-UIP	
	48	38	10	
使用機種	新鋭工業 COMFORT2000	17 (35%)	14	3
	オムロン NEC-16	7 (15%)	7	0
	超音波 ネブライザー	4 (8%)	4	0
	不明	20 (42%)	13	7
平均粒子径	1 μm	3 (6%)	3	0
	1~5 μm	17 (36%)	14	3
	不明	28 (58%)	21	7

□: NAC 1/2 ~ 1A (352.4 mg) 1Ax3回/日: 1 1Ax2回/日: 10  
+生食 or 水 3~20 ml 1Ax2回/日: 30  
1/2Ax2回/日: 7

表4 NACの効果(呼吸困難)

計 (%)	IPF/UIP(28)		IIPs/non-UIP(4)	
	NAC	NAC+PSL	NAC	NAC+PSL
32	24	4	3	1
改善 7 (22%)	6 (25%)	0	1 (33.3%)	0
不変 11 (34%)	9 (37.5%)	0	1 (33.3%)	1 (100%)
悪化 14 (44%)	9 (37.5%)	4 (100%)	1 (33.3%)	0

表5 NACの効果(胸部CT)

計 (%)	IPF/UIP(27)		IIPs/non-UIP(3)	
	NAC	NAC+PSL	NAC	NAC+PSL
30	23	4	2	1
改善 4 (13%)	3 (13%)	0	0	1 (100%)
不変 15 (50%)	13 (57%)	0	2 (100%)	0
悪化 11 (37%)	7 (30%)	4 (100%)	0	0

表6 NACの効果(呼吸機能)

計 (%)	IPF/UIP(22)		IIPs/non-UIP(1)	
	NAC	NAC+PSL	NAC	NAC+PSL
23	19	3	1	0
改善 2 (9%)	2 (11%)	0	0	0
不変 14 (61%)	13 (68%)	0	1 (100%)	0
悪化 7 (30%)	4 (21%)	3 (100%)	0	0
前値 (mean±SD)	VC (L)	2.2 ± 0.69	2.2 ± 0.54	3.06
	%VC (%)	70.7 ± 18.3	81.5 ± 2.5	96
	%DLco (%)	61.5 ± 18.4	98.5 ± 10.5	59
	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	78.1 ± 13.1	62.3 ± 10.3	69.0

効果判定: 1) VC: 200 ml or 10%, 2) DLco: 15% or 3 ml/min/mmHg, 3) PaO<sub>2</sub>: 10 mmHgの1項目以上の変動

表7 NACの効果 (KL-6)

計 (%)	IPF/UIP(16)		IIPs/non-UIP(3)	
	NAC	NAC+PSL	NAC	NAC+PSL
19	14	2	2	1
改善 7(37%)	5(36%)	1(50%)	1(50%)	0
不変 6(31.5%)	4(28%)	0	1(50%)	1(100%)
悪化 6(31.5%)	5(36%)	1(50%)	0	0
前値(U/mL) (mean±SD)	1362 ± 841	2935 ± 912	847 ± 67.9	765

治療前後20%の変動率で判定

表8 NACの効果 (総合評価)

計 (%)	IPF/UIP(28)		IIPs/non-UIP(4)	
	NAC	NAC+PSL	NAC	NAC+PSL
32	24	4	3	1
改善 3(9%)	3(13%)	0	0	0
不変 19(59%)	15(62%)	0	3(100%)	1(100%)
悪化 10(32%)	6(25%)	4(100%)	0	0
NAC吸入後判定期間(月)	7.1±3.7		6.3±5.2	

効果判定基準：1) 呼吸困難 2) 胸部HRCT所見 3) 呼吸機能検査  
改善：3項目中2項目以上改善、悪化：3項目中2項目以上悪化、不変：それ以外

39%が悪化し、17%が不明であった。IIPs/non-UIPでは改善と不明が50%ずつであった。

f) その他の治療。

IPF/UIPの9/38例およびIIPs/non-UIPの1/10例でサイクロフオスファミドあるいはシクロスポリンが併用投与されていた。

g) 予後・死因・生存率。

診断後の観察期間はIPF/UIPが39.7 ± 24.5ヶ月、IIPs/non-UIPが36.9 ± 32.8ヶ月であった。

IPF/UIPでは21/38例(55%)が死亡し、死因は11/21例(52%)が間質性肺炎の増悪で、その内5例が急性増悪であった。IIPs/non-UIPでは4/10例(40%)が死亡し、死因は間質性肺炎の増悪が1/4例(25%)のみであった(表9)。なおNAC単独吸入群およびNACとステロイド併用群の2群における生存率を比較するとIPF/UIPではNAC単独吸入群の方が有意に良好であったが(図1)、IIPs/non-UIPでは差がなかった。これはIPF/UIPにおけるNACとステロイド併用群はNAC単独吸入群に比し重症例が多いためと考えられた。

考 察

間質性肺炎においてNACの臨床的有効性が認められたとする報告が1996年以來海外からなされている<sup>1,2)</sup>。しかしその投与方法は大容量の経口薬投与で吸入による有効性は石井らのIIPを対象として61%の改善を認めたという報告<sup>3,4)</sup>と、著者らのIPF/UIPを対象として33.3%の改善を認めたという報告<sup>5,6)</sup>以外にはない。

今回の全国調査の結果からも短期効果ではあるがその有効性がある程度期待される成績が得られたので、今後IPF/UIPの初期例を対象として海外の臨床試験とは投与経路が異なるNAC吸入療法の疾患の進行防止に対する有効性を非投与群との比較において検討する予定である。

表9 予後・死因

	計 (%)	IPF/UIP	IIPs/non-UIP
	48	38	10
予後			
生存	22 (46%)	16 (42%)	6 (60%)
死亡	25 (52%)	21 (55%)	4 (40%)
不明	1 (2%)	1 (3%)	0
死因			
間質性肺炎増悪 (急性増悪)	11 (52%) (5)	11 (52%) (5)	1 (25%) (0)
その他	9 (43%)	9 (43%)	3 (75%)
不明	1 (5%)	1 (5%)	0
観察期間(月)		39.7 ± 24.5	36.9 ± 32.8

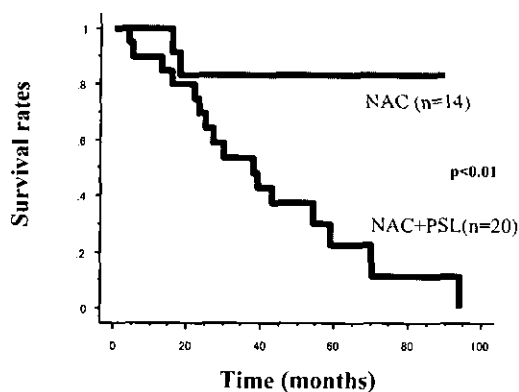


図1 IPF/UIPにおけるNAC単独吸入群およびNACとステロイド併用群の生存率。

## 謝 辞

アンケートに回答を頂いた以下の施設の方々に  
深謝する。

神奈川県立循環器呼吸器病センター，九州大学大  
学院胸部疾患研究施設，西神戸医療センター，日  
本医科大学内科学第4講座，東京大学呼吸器内科，  
浜松医科大学第2内科，虎の門病院呼吸器センター  
内科

## 参考文献

- 1) Behr J, Maier K, Degenkolb B, Krombach F, Vogelmeier C : Antioxidative and clinical effects of high-dose N-Acetylcysteine in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1897-1901.
- 2) Meyer A, Buhl R, Magnussen H: The effect of oral N-Acetylcysteine on lung glutathione levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 1994; 7: 431-436.
- 3) 石井芳樹, 川口一男, 北村 諭: 特発性間質性肺炎 (IIP) に対する N-アセチルシステイン (NAC) 吸入療法の試み. 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成7年度研究報告書 1996; 121-123.
- 4) 石井芳樹, 北村 諭: 間質性肺炎に対する N-アセチルシステイン (NAC) 吸入療法. *分子呼吸器病* 1998; 2: 451-453.
- 5) 本間 栄, 川畑雅照, 岸 一馬, 坪井永保, 成井浩司, 中谷龍王, 中田紘一郎: 間質性肺炎増悪症例に対する N-acetylcysteine (NAC) 吸入療法の有用性に関する臨床的検討. 厚生科学研究特定疾患対策研究事業びまん性肺疾患研究班, 平成11年度研究報告書, 2000; 86-89.
- 6) Homma S, Kawabata M, Kishi K, Tsuboi E, Narui K, Nakatani T, Nakata K: An assessment of clinical effectiveness of inhaled N-acetylcysteine in progressive pulmonary fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med* 2001; 163 (5) : A41.

# ブレオマイシン誘発肺線維症モデルにおける分子標的治療薬 Imatinib (Gleevec) の抗線維化効果

西岡 安彦<sup>1</sup> 青野 純典<sup>1</sup> 上原 久典<sup>2</sup> 泉 啓介<sup>2</sup>  
曾根 三郎<sup>2</sup>

Imatinib は CML の治療薬として知られているが、PDGFR リン酸化阻害作用を有し、肺線維芽細胞増殖抑制による抗線維化作用が期待できる。ブレオマイシン肺線維症モデルを用いてその抗線維化作用について検討した。ブレオマイシンを持続注入用ポンプを用いて C57/BL6 マウスに持続皮下投与を行い、BLM 投与開始日より連日 imatinib を腹腔内投与し 28 日後に sacrifice した。Sircol Collagen Assay による肺のコラーゲン定量と Ashcroft score を用いた肺線維化の定量化を行った。また、マウス肺線維芽細胞を用い imatinib の増殖抑制効果を <sup>3</sup>H-TdR 取り込み試験を用いて測定し、さらに PDGFR のリン酸化阻害を immunoblot により検討した。imatinib は PDGF による肺線維芽細胞の増殖反応及び PDGFR のリン酸化を濃度依存性に抑制した。BLM 肺線維症モデルによる組織学的検討から imatinib 投与は BLM 投与により誘発される肺線維化を有意に抑制した。以上より肺線維症に対する抗線維化薬として imatinib の臨床応用の可能性が示唆された。

## Anti-fibrotic effects of imatinib on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice

Yasuhiko Nishioka<sup>1</sup>, Yoshinori Aono<sup>1</sup>, Hisanori Uehara<sup>2</sup>, Keisuke Izumi<sup>2</sup>  
and Saburo Sone<sup>1</sup>

*Departments of Internal Medicine and Molecular Therapeutics<sup>1</sup>, and Molecular and Environmental Pathology<sup>2</sup>, Course of Medical Oncology, University of Tokushima School of Medicine.*

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and lethal pulmonary disorder. We examined the anti-fibrotic effects of imatinib using a bleomycin-induced lung fibrosis model in mice because imatinib is a specific inhibitor of tyrosine kinase in platelet-derived growth factor receptors (PDGFR). Imatinib significantly inhibited the growth of primary murine lung fibroblasts and the autophosphorylation of PDGFR- $\beta$  induced by PDGF. Administration of imatinib prevented bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Analysis of bronchoalveolar lavage cells demonstrated that imatinib did not suppress early inflammation on day 7 and 14 caused by bleomycin, but clearly ameliorated subsequent fibrosis in the late stages. These results suggest that PDGF could be a critical growth factor in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, and that imatinib might be useful for the treatment of pulmonary fibrosis in humans.

はじめに

特発性肺線維症 (IPF) は、線維芽細胞の増殖と細胞外マトリックスの沈着によって特徴づけられる予後不良の慢性進行性肺疾患である。ステロイド、免疫抑制剤等にて治療が試みられているが、未だ生命予後を延長する治療法が確立されていないのが現状である。Imatinib (Gleevec) は bcr-abl と c-kit に対する特異的なチロシンキナーゼインヒビターであり、CML, GIST に対する有効性が確立しているが、PDGF レセプターのリン酸化も特異的に阻害することが報告されている<sup>1)</sup>。一方、PDGF は肺線維症の病態において重要な役割を果たしている増殖因子の一つであり<sup>2)</sup>、PDGF の阻害は肺線維症の治療のターゲットとしての可能性を秘めている。以上より我々はプレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける imatinib の抗線維化効果について検討した。

## 方法

肺線維症モデルは 8 週齢の C57BL/6 マウスにプレオマイシン (BLM) 125mg/kg を 200 $\mu$ l の生理食塩水に溶解し Alzet mini-osmotic pump を用いて約 7 日間かけて持続皮下投与することにより作成した。コントロール群として同様に 200 $\mu$ l の生理食塩水を pump にて持続皮下投与を行った。Imatinib は、BLM 投与開始日から 25, 50mg/kg/day を 200 $\mu$ l の蒸留水に溶解し腹腔内投与した。コントロールとして 200 $\mu$ l の蒸留水を腹腔内投与した。28 日後にマウスを sacrifice し、右肺を Sircol Collagen Assay Kit を用いて肺コラーゲン含量の定量し、左肺組織切片の HE 染色による組織学的な線維化の評価を Ashcroft score を用いて 2 人の病理医により行った。さらに day7, 14, 28 にて sacrifice したマウスに対し BAL を施行し、総細胞数および細胞分画をカウントした。また、C57BL/6 マウス肺より樹立した線維芽細胞株を用いて、PDGF による増殖反応を imatinib が濃度依存性に抑制するか <sup>3</sup>H-TdR 取り込み試験を用いて測定した。さらに immunoblot によ

り PDGFR- $\beta$  のチロシン自己リン酸化を imatinib が濃度依存性に抑制するか検討した。

## 結果

Imatinib は、PDGF-AA および PDGF-BB 刺激による肺線維芽細胞株の増殖反応を濃度依存性に抑制した (図 1)。その効果は 0.1 $\mu$ M からみられた。また、肺線維芽細胞株において PDGF-BB 刺激による PDGF- $\beta$  の自己リン酸化を増殖反応と同様に濃度依存性に抑制した (図 2)。

BLM 肺線維症モデルの Ashcroft score による組織学的検討から、imatinib の 50 mg/kg/day の投与は

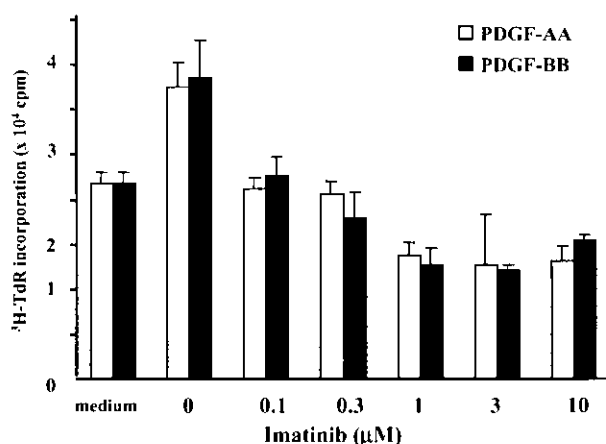


図 1 PDGF 刺激マウス肺線維芽細胞に対する imatinib の増殖抑制効果

C57BL/6 マウスより作成した肺線維芽細胞を用いて、PDGF-AA あるいは BB (10 ng/ml) で 72 時間刺激後 <sup>3</sup>H-TdR (1 $\mu$ Ci/well) を 18 時間パルスし、増殖能を測定した。培養開始時より種々の濃度の imatinib を添加し抑制効果を検討した。

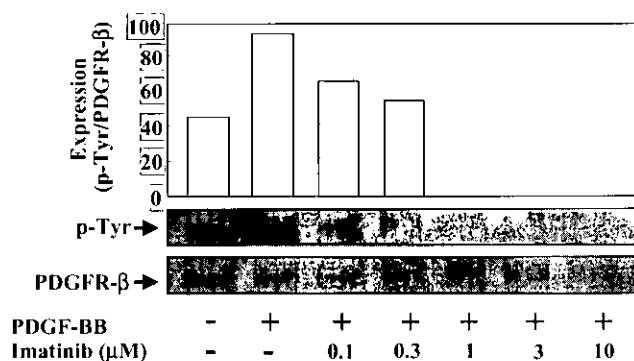


図 2 PDGF 刺激マウス肺線維芽細胞に対する imatinib の PDGFR- $\beta$  リン酸化抑制効果

PDGF-BB (10 ng/ml) で 10 分間刺激したマウス肺線維芽細胞株より lysate を作成し、抗 PDGFR- $\beta$  抗体で免疫沈降後、抗 PDGFR- $\beta$  抗体および抗リン酸化チロシン抗体で western blotting を行った。PDGF-BB 刺激と同時に種々の濃度の imatinib を添加しリン酸化抑制効果を検討した。NIH image program にてリン酸化の程度を定量化した。

- 1 徳島大学医学部分子制御内科学
- 2 同 環境病理学

BLMにより誘発される肺線維化を有意に抑制することが明らかとなったが、25 mg/kg/dayの投与では有意な効果は得られなかった(図3)。一方、コントロール群マウスに対する imatinib の単独投与では組織学的に著明な変化はみられなかった。また、BLM投与後28日目の肺コラーゲン含有は、imatinibの50 mg/kg/day投与群と同様に有意に減少した(図4)。肺コラーゲン定量では、その他の群も組織学的検討と同様の結果であった。Imatinibの前半2週

間(day0~14)投与群と後半2週間(day15~28)投与群で検討したところ、前半2週間投与群は4週間連続投与群と同様に有意に線維化を抑制した(図5)。一方、後半2週間投与群においては有意な効果は得られなかった。

BLMによる炎症細胞浸潤に対する imatinib の影響を検討するためにBALを行ったが、BLMの投与はday7, 14, 28において炎症細胞浸潤を誘発した

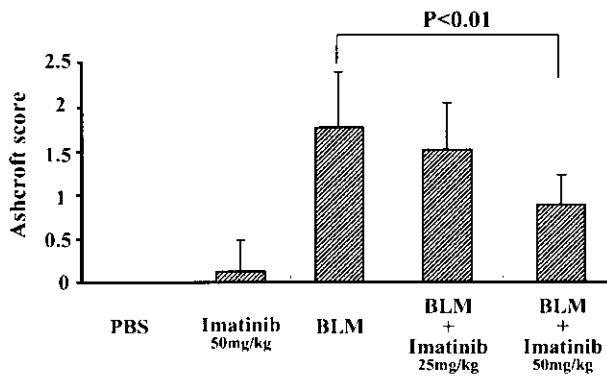


図3 BLM誘発肺線維症モデルにおける imatinib の抗線維化効果—組織学的検討—

C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125mg/kg の BLM を持続皮下投与した。同時に imatinib を連日腹腔内へ投与し、28日後の左肺を組織学的な Ashcroft score により線維化の程度を定量化した。

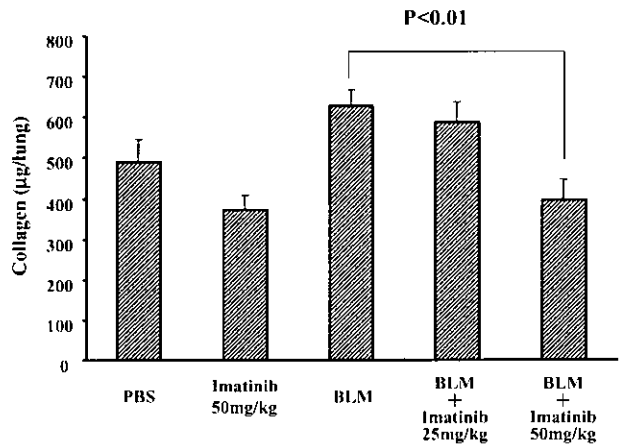


図4 BLM誘発肺線維症モデルにおける imatinib の抗線維化効果—肺コラーゲン量に及ぼす影響—

C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125mg/kg の BLM を持続皮下投与した。同時に imatinib を連日腹腔内へ投与し、28日後の右肺を用いてコラーゲン量を Sircol assay kit により定量化した。

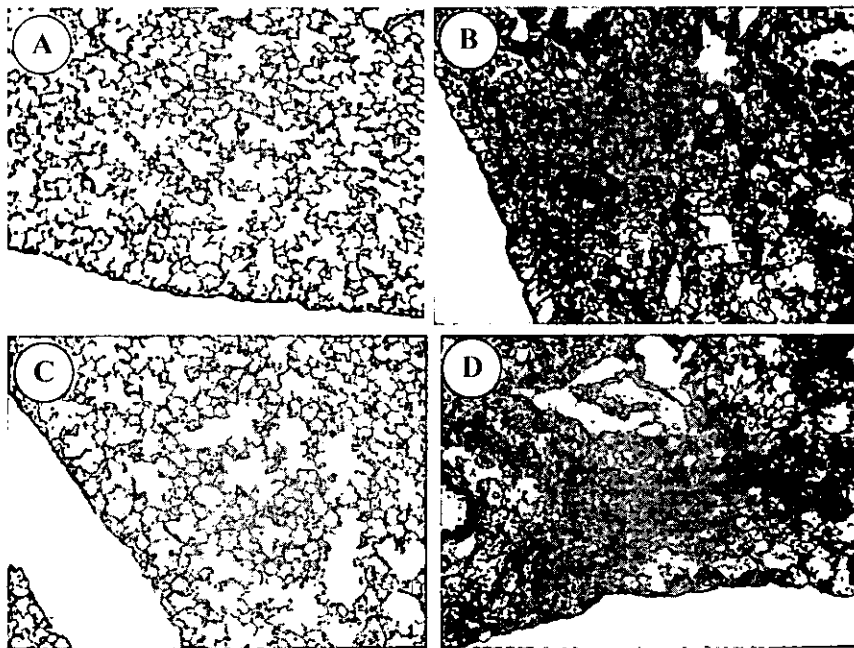


図5 ImatinibのBLM誘発肺線維症抑制効果に及ぼす imatinib投与時期の検討

C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125mg/kg の BLM を持続皮下投与し、28日後に組織学的(ヘマトキシリン&エオジン染色)に肺線維化を評価した。

A: 生理食塩水投与群, B: BLM投与群, C: BLMと imatinib (50mg/kg/day)を1~14日に投与群, D: BLMと imatinib (50mg/kg/day)を14~28日に投与群。

が、day7, 14 においては imatinib を投与しても炎症細胞浸潤の抑制はみられなかった。Day28 においては imatinib 投与によりリンパ球数の減少がみられた。

## 考 察

我々は、*in vitro* において imatinib が PDGFR の自己リン酸化を阻害することを介して肺線維芽細胞の増殖を抑制することを示した。さらにマウスにおける BLM 誘発肺線維化を imatinib が抑制することを示した。1999 年、Rice らは PDGFR の阻害剤を用いて、V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> による肺線維症抑制効果を報告した<sup>3)</sup>。しかしながら、彼らの報告で用いられた薬剤は単に試薬としての PDGFR 阻害剤であり、薬剤の特異性も十分に検索されておらず、もちろん直ちに臨床で使用可能な薬剤ではない。また、肺線維症モデルとして用いた BLM 肺線維症は Rice らの用いたモデルに比較してより一般的なモデルであり、PDGFR 阻害効果の与えるインパクトは大きい。

Imatinib の作用メカニズムを検討するため、imatinib の投与を前半と後半に分けた場合、前半投与群では肺線維化を抑制したのに対し後半投与群では抑制しなかった。一方、BAL の結果を合わせて考えると、imatinib の抗線維化効果は前半の炎症

細胞浸潤を抑制しているのではなく、day0 ~ 14 において開始される肺線維芽細胞の増殖反応抑制によると考えられた。

今後、IPF に対する抗線維化薬として imatinib の臨床応用の可能性が示唆される。

## 参考文献

- 1) Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N. B. 1996. Effects of a selective inhibitor of the abl tyrosine kinase on the growth of bcr-abl positive cells. *Nature Med.* 2:561-566.
- 2) Selman, M., King, T. E. Jr., and Pardo, A. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* 134:136-151.
- 3) Rice, A. B., Moomaw, C. R., Morgan, D. L., and Bonner, J. C. 1999. Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. *Am. J. Pathol.* 55:213-221.



# 特発性肺線維症に対するグリベック療法

曾根 三郎

近年、癌に対する新しい治療薬として種々の分子標的治療薬の開発が進み一部の薬剤においては劇的な臨床効果が確認され治療薬として承認されている(表1)。一方、このような分子標的治療の概念は癌にとどまらず、有効な治療法がない難治性疾患の治療としても応用が期待される。しかしながら癌と比較した場合、一般的に難病とされる疾患の罹患患者数は少なく、残念ながら企業にとって積極的な薬剤開発の対象となりにくい現状がある。そこで、これまでに開発された多くの癌に対する分子標的薬が、癌以外の難治性疾患に対しても応用可能か否かを検討することは、臨床的に重要な検討課題である。

特発性肺線維症はこのように有効な治療法がない難病の代表的疾患である。癌分子標的治療薬のターゲット分子を肺線維化に関与する分子標的とオーバーラップさせると、両者に共通の標的分子の一つとしてPDGF (platelet-derived growth factor) レセプターがあげられる。特に、慢性骨髄性白血病や消化管間質性腫瘍で高い臨床効果が証明されているグリベックは、PDGFR に特異的なチロシンリン酸化阻害剤でもある(表2)。すでに、PDGF レセプターをターゲットにした特発性好酸球増多症に対しても有効性が報告されていることから、臨床的にPDGF レセプターは格好の標的分子となりうる。PDGF は線維芽細胞の強力な遊走・増殖活性を持ち、肺線維症においても重要な役割を演じている。このような観点から我々はグリベックに注目し、プレオマイシン肺線維症モデルを用いて preclinical study を開始した。

その結果、グリベックはプレオマイシンモデルにおいて強力な抗線維化効果を示したことから、厚生労働科学研究「特発性間質性肺炎の画期的治療法に関する臨床研究」工藤班において特発性肺線維症を対象とした臨床試験への展開を検討することとなった。臨床試験においては、グリベック

表1 がん分子標的治療

1) 血管新生阻害薬・転移抑制薬 MMP阻害薬、VEGF阻害薬、抗VEGF抗体、PDGF阻害薬、angiostatin, endostatin, thalidomide
2) シグナル伝達阻害薬 EGF receptor tyrosine kinase阻害薬、抗HER2/Neu抗体、BCR-Abl, c-KIT receptor tyrosine kinase阻害薬、farnesyltransferase阻害薬
3) 細胞周期調節薬 cycline dependent kinase (CDK)阻害薬、protein kinase C(PKC)阻害薬
4) 癌ワクチン・免疫療法 T細胞認識抗原・癌抗原ペプチド、抗原蛋白 樹状細胞療法 抗体療法・癌抗原
5) 遺伝子治療 Ad-p53 GM-CSF遺伝子導入癌細胞

(第15回日本臨床腫瘍研究会より)

表2 Profile of inhibition of protein kinase by STI571

Protein kinase	substrate phosphorylation IC50 value (uM)	Cellular tyrosine phosphorylation IC50 value (uM)
v-abl	0.038	0.25
Bcr-abl	0.025	0.25
c-abl	0.025	
EGFR-ICD	>100	>100
Her-2/neu		>100
Insulin receptor		>100
IGF-1R		>100
PDGFR		0.3
c-Kit		0.1
c-Src	>100	
v-Src		>100
c-Fgr	>100	
c-Lyn	>100	
v-Fms		>100
TPK-IIIB	>100	
PKA	>500	
PPK	>100	
PKC α, β1, β2, γ, ε, δ, ζ, η	>100	
Casein kinase-1 and 2	>100	
Cdc/cyclin	>100	

(Nature Med. 2:561,1996)

表3 ILD related to Gleevec (n=24)

Disease	CML:20 cases, Others:4 cases	
Sex	M:12	F:12
Age	65 ± 11 y.o.	
Dose of Gleevec	371 ± 123 mg/day	
Onset from the treatment	79 ± 78 days	
Prognosis	Cured/Improved	18 cases
	Unimproved	1
	Late effect	1
	Death	2
Other Complication	Skin rash	10
	Thrombocytopenia	6
	Edema	6
Eosinophilia	8 cases in 14 cases	
Therapy for ILD	Steroid Pulse Therapy	16
	Antibiotics	4
Re-treatment by Gleevec	7 cases (relapsed 1 case)	

(工藤班長より)

を開発したノバルティス株式会社の協力が必要であり、ノバルティス側担当者との交渉を開始した。時を同じくして、米国において特発性肺線維症を対象としたグリベックの臨床試験が平成15年8月より開始されたという情報を得た。また、同時にグリベックによる間質性肺炎の副作用報告があり、非小細胞肺癌に対する治療薬であるイレッサによる重篤な間質性肺炎の経験から、新たにグリベックによる間質性肺炎等の合併症に関して呼吸器専門家による実態調査の必要性が浮上した。このような中、平成16年1月15日、グリベック療法に関するノバルティス代表者と工藤班との正式な会合がノバルティス本社にて開催された。その結果以下の事項が確認された。

- 1) Preclinical studyでのグリベックの抗線維化効果は確かなものである。
- 2) ノバルティスサイドは、米国での特発性間質性肺炎に対するグリベックの医師主導の臨床試験が進行中であり、その結果を待ちたいという方針であった。
- 3) ゲフィチニブの場合、欧米人と日本人とで有効性が異なったことから、日本でのグリベック臨床試験の必要性を強調した。
- 4) 慢性骨髄性白血病症例を対象としたグリベック治療に合併した間質性肺炎症例は24例との報告があり、皮疹や好酸球増多を伴うことから、アレルギー機所による可能性が推測された(表3)。ステロイド治療により大部分の症例が改善しており、ゲフィチニブによる間質性肺炎とはかなり臨床所見が異なる可能性が示唆された。
- 5) ゲフィチニブによる肺毒性発症は、欧米人に比較して日本人で約6倍高いことから、グリベックによる間質性肺炎症例の詳細な実態調査が本邦での臨床試験実施の前に行われるべきであると結論した。また調査に際しては厚生労働省工藤班に所属する専門家を交えて検討していくことが了承された。

以上から、まずグリベックによる間質性肺炎の調査を優先し、その後米国の臨床試験の経過を見ながら日本独自の臨床試験実施に向けて前臨床試験を含めた検討を進めていくこととなった。

# Pirfenidone の線維化抑制機序に関する検討 —特に HSP47 発現に及ぼす効果について—

角川 智之<sup>1</sup> 迎 寛<sup>1</sup> 石井 寛<sup>1</sup> 中山 聖子<sup>1</sup>  
坂本 憲穂<sup>1</sup> 吉岡寿麻子<sup>1</sup> 杉山 奏子<sup>1</sup> 林 徳真吉<sup>2</sup>  
門田 淳一<sup>3</sup> 河野 茂<sup>1</sup>

Heat shock protein (HSP) 47 は線維化進展に密接に関与している蛋白である。今回我々は、ブレオマイシン肺線維症モデルの肺局所における HSP47 発現亢進が Pirfenidone 投与による治療により減弱することを明らかにした。

## Pirfenidone Attenuates Expression of HSP47 in Murine Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis

Tomoyuki Kakugawa<sup>1</sup>, Hiroshi Mukae<sup>1</sup>, Hiroshi Ishii<sup>1</sup>, Seiko Nakayama<sup>1</sup>,  
Noriho Sakamoto<sup>1</sup>, Sumako Yoshioka<sup>1</sup>, Kanako Sugiyama<sup>1</sup>, Tomayoshi Hayashi<sup>2</sup>  
Jun-ichi Kadota<sup>3</sup> and Shigeru Kohno<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine

<sup>2</sup> Department of Pathology, Nagasaki University Hospital

<sup>3</sup> Second Department of Internal Medicine, Oita University

Heatshock protein (HSP) 47, a collagen-specific molecular chaperone, is involved in the processing and/or secretion of procollagen. This study was undertaken to investigate whether treatment with the antifibrotic drug pirfenidone attenuates the bleomycin (BL)-induced overexpression of HSP47 in the lungs. Male ICR mice were intravenously injected with BL or saline (SA). Pirfenidone or control drug (CD) was administered 14 days after commencement of BL or SA, and continued throughout the course of the experiment. The mice were randomly divided into three experimental groups; 1) SA-treated with CD (SA group), 2) BL-treated with CD (BL group), 3) BL-treated with pirfenidone (pirfenidone group). Lungs of the pirfenidone group showed marked reduction of fibrotic lesions compared with the corresponding BL group. Immunohistochemical studies showed that BL treatment significantly increased the number of macrophages, myofibroblasts, HSP47-positive type II pneumocytes and HSP47-positive interstitial spindle-shaped cells. Treatment with pirfenidone significantly reduced the number of these cells compared with the corresponding BL group. Furthermore, treatment with pirfenidone significantly suppressed BL-induced increase of the positive ratio of HSP47 and  $\alpha$ -smooth muscle actin to interstitial spindle-shaped cells. Our results showed that pirfenidone inhibited HSP47-positive cells and myofibroblasts, the principal cells responsible for the accumulation and deposition of extracellular matrix seen in pulmonary fibrosis.

## はじめに

Heat shock protein (HSP) 47 は、小胞体内に存在するコラーゲン特異的分子シャペロンであり、小胞体内でのプロコラーゲンの生合成とゴルジ装置への輸送過程において、フォールディング、凝集および分解阻害、品質管理、輸送の各所で働いていると考えられている<sup>1)</sup>。肝硬変、腎硬化症、腹膜硬化症など、さまざまな線維化疾患の進展に HSP47 が密接に関与していることが報告されており<sup>2,3)</sup>、近年、肺線維症の進展過程においても、HSP47 が重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある<sup>4)</sup>。肺線維症の主要な病態は、細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) の過剰な蓄積であり、ECM の大部分はコラーゲンである。従って、コラーゲン産生に欠かせない HSP47 が線維化進展のキーファクターとなることが想定されてきた<sup>1-4)</sup>。

Pirfenidone は抗線維化作用を有することが知られており、各種線維化疾患モデル動物において線維化を抑制することが報告されてきた<sup>5)</sup>。また、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) 患者を対象とした臨床試験においてもその有効性が示されている<sup>6)</sup>。しかし、その作用機序については未だ十分に明らかにされたとは言い難い。そこで今回、pirfenidone が HSP47 の発現や筋線維芽細胞、マクロファージの浸潤増殖に及ぼす影響について検討した。

## 方 法

ICR マウスにブレオマイシン 10mg/kg/day を 5 日間連続尾静脈投与し、肺線維症モデルを作成した。ブレオマイシン投与 2 週後より 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) に溶解した pirfenidone (400mg/kg/day) を、また control drug として同量の 0.5% CMC を連日経口投与した。マウスは 1) 生理食塩水を静注し、control drug を投与したコントロール群、2) ブレオマイシンを静注し、

control drug を投与したブレオマイシン肺線維症群、3) ブレオマイシンを静注し pirfenidone を投与した治療群の 3 群に分けた。ブレオマイシン投与 2 週、5 週、7 週後に各群の線維化の程度を組織学的に評価した。また、肺組織中のヒドロキシプロリン量を測定し、線維化の程度を生化学的に評価した。免疫染色により HSP 47 の発現程度を病理学的に評価した。筋線維芽細胞を同定するために  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)、II 型肺胞上皮細胞を同定するために surfactant protein (SP)-A、マクロファージを同定するために F4/80 の免疫染色を行った。

## 結 果

コントロール群と比較して、ブレオマイシン肺線維症群では組織学的な線維化スコア、ヒドロキシプロリン量ともに有意に高値を示した。一方、pirfenidone による治療群ではブレオマイシン肺線維症群と比較して線維化は有意に抑制されていた。また、免疫染色による検討にて、ブレオマイシン肺線維症群では線維化の進展とともに HSP47 陽性細胞数は増加していった。これらの細胞は SP-A 陽性の II 型肺胞上皮細胞、 $\alpha$ -SMA 陽性の筋線維芽細胞であった。また、ブレオマイシン肺線維症群では、 $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞、F4/80 陽性マクロファージの著明な浸潤を認め、線維化の進展とともに増加していった。一方、治療群ではブレオマイシン肺線維症群と比較してそれぞれの細胞の浸潤程度は有意に抑制されていた。

## 考 察

HSP 47 陽性線維芽細胞、 $\alpha$ -SMA 陽性筋線維芽細胞は活発なコラーゲン産生能を有し、各種線維化疾患の進展に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>1-4,7)</sup>。これまで、肺線維症の進展過程において、筋線維芽細胞が主要なコラーゲン産生細胞と考えられていた。今回我々は、II 型肺胞上皮細胞における HSP47 の発現を明らかにした。これは、II 型肺胞上皮細胞も HSP47 産生を通してコラーゲン産生能を獲得し、肺線維化進展に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものと考えられた。

HSP47 はコラーゲン合成に必須の分子シャペロ

- 
- 1 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
感染分子病態学 (第 2 内科)
  - 2 長崎大学医学部附属病院病理部
  - 3 大分大学感染分子病態制御講座 (第 2 内科)