

基礎的治療研究

ラットのブレオマイシン誘導肺障害モデルにおける PMX 療法の白血球吸着に関する検討

瀬尾 宜嗣 阿部 信二 松田久仁子 服部久弥子
臼杵 二郎 吾妻安良太** 工藤 翔二*

【はじめに】近年、間質性肺炎急性増悪症例に対して PMX 療法が行われ、一定の効果を認めている。そのメカニズムは不明であるが、我々は本研究会で PMX カラムにおける白血球やサイトカインの吸着効果について報告してきた。今回我々はラットのブレオマイシン誘導肺損傷モデルに対して PMX 療法を行い、白血球の吸着効果の検討を行った。また抗凝固剤を heparin (H 群) と nafamostat mesilate (N 群) の 2 種類を使用し検討した。

【方法】10～12 週齢の SD ラットにブレオマイシン (3.5mg/kg) を気管内投与 (day0) し、day1 に麻酔下で両側の大腿静脈をブラッドアクセスとし実験用 PMX ミニカラムまたは空カラムを用いて体外循環を行った。抗凝固剤としてヘパリンまたは、ナファモスタットを使用した。治療前後で末梢血の白血球数を測定した。

【結果】白血球数は H 群では PMX 前後で変化なかったが、N 群では前後で減少が認められた。

【結語】PMX 療法の白血球吸着に関して、nafamostat mesilate の関与が示唆された。

The effect of direct hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber column (PMX-DHP) on leukocytes adsorption in bleomycin-induced lung injury of rats.

Yoshitsugu Seo, Shinji Abe, Kuniko Matsuda, Kumiko Hattori
Jiro Usuki, Arata Azuma and Shoji Kudoh

Department of Internal Medicine (Divisions of Pulmonary Medicine, Infectious Diseases, and Oncology)

BACKGROUND: The beneficial effect of direct hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber column (PMX) for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) has been reported. The precise mechanism of PMX remains unclear, however PMX has been reported to absorb neutrophils and might contribute to improve pulmonary oxygenation in acute exacerbation of IPF. The aim of the present study was to evaluate the effect of direct haemoperfusion with PMX on the leukocyte of the bleomycin-induced lung injury in rats and to examine the difference in the effects of heparin compared with nafamostat mesilate (NM) used as an anticoagulant. **METHODS:** All experiments were performed with 350-420 g male SD rats. Rats were given a single intratracheal instillation of bleomycin (3.5mg/kg) at day 0. Hemoperfusion was performed for 45 min at a flow rate of 2ml/min at day1. Heparin (50 IU/h) or NM (0.8 mg/h) was used as the anticoagulant. **RESULTS:** Circulating leukocytes were decreased after PMX with NM but not heparin. **CONCLUSION:** These findings suggest that NM contribute to leukocyte adsorption by PMX.

研究目的

特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonias: IIPs) は原因不明の間質性肺炎の総称であるが、その中で特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) はもっとも頻度が多く進行性であり、予後不良の疾患である。また IPF 患者の一部は急性増悪と呼ばれる病態が出現することがあり、病理学的にびまん性肺胞障害を呈し重症呼吸不全に陥り、死亡率も高い。

PMX 療法は、ポリミキシン固定化カラムを用いた血液浄化療法である。グラム陰性菌由来のエンドトキシンを除去することで、敗血症患者における高エンドトキシン血症を治療するために開発されたが、ALI/ARDS の血行動態の安定や酸素化能の改善などの報告がある。我々は IPF 急性増悪に対するエンドトキシン吸着療法 (PMX-DHP) について検討し、酸素化能の改善などの臨床効果について報告した¹⁾。

PMX 療法の様々な効果のメカニズムについての検討として、白血球の吸着による効果についての研究があり、我々も白血球の吸着効果について報告している。

今回我々はラットのブレオマイシン誘導肺損傷モデルに対して PMX 療法を行い、白血球の吸着効果について検討したのでここに報告する。

研究方法

10 ～ 12 週齢の SD ラットを用い、ネンブタール (50mg/kg) 麻酔下にて頸部を正中切開し、気管を露出させ、ブレオマイシン (3.5mg/kg) を気管内単回投与した (day0)。翌日 (day1) ネンブタール (50mg/kg) 麻酔科で両側の大腿静脈に 23G サーフロー留置針を挿入しブラッドアクセスとし、動物用の PMX ミニカラムを用いた体外循環による血液浄化療法を行った。血流速度は 2ml/min で行い、抗凝固剤としてヘパリン (50IU/hr) あるいはナファモスタット (0.8mg/hr) を用いた。血液浄化療法開始時と終了時に末梢血をサンプリングし白血球数の変化について検討した。

研究結果

白血球数の推移を図 1 に示した。血液浄化療法前の白血球数にばらつきはあるものの、ヘパリン使用時には前後で変化はなかったが、ナファモスタット使用時には全例で白血球数が低下した。

考 察

間質性肺炎に対する PMX 療法の効果については、現在さまざまな検討が行われてきている。

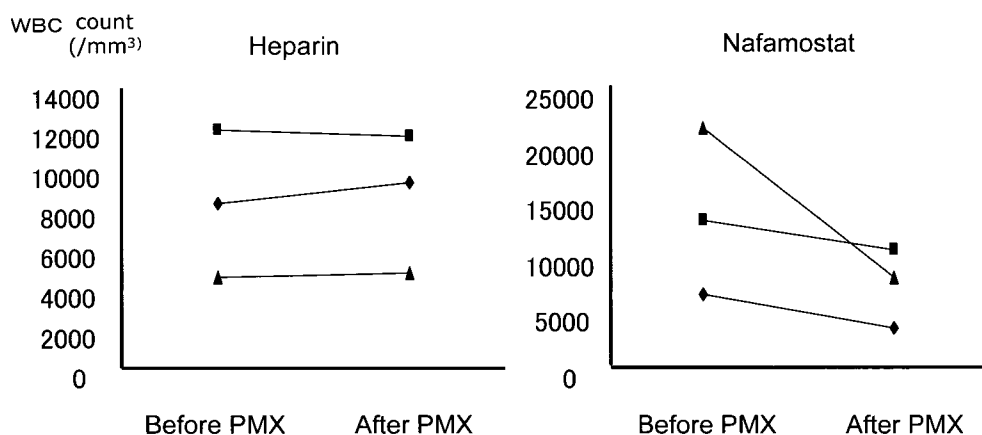


図 1 ブレオマイシン誘導肺障害ラットの PMX-DHP 前後の白血球の推移

我々は、特発性肺線維症 (IPF) の急性増悪に対してステロイドパルス療法が無効であった 6 症例に対して PMX 療法を施行し、6 症例のうち 5 例で酸素化能の改善がみられ、4 例で人工呼吸器からの離脱が可能であったと報告した。またその後の検討で、IPF 患者に使用した吸着カラム繊維を電子顕微鏡で観察したところ、吸着細胞のほとんどが好中球であることがわかった。現在の間質性肺炎の治療ターゲットは主にリンパ球であり、炎症のパターンがリンパ球主体である場合は薬物治療の効果が期待できる。しかし好中球主体の炎症である場合は薬物治療の効果が少なく、予後不良である。PMX 療法が好中球の炎症をコントロールするのか、間質性肺炎に効果があるのは不明である。

今回の実験ではラットのブレオマイシン肺障害モデルを用い、PMX 療法時の白血球の推移を検討した。末梢血中の白血球はナファモスタットを使用した群で減少した。末梢血中の白血球の低下が肺障害を改善するかどうかは今後の検討課題ではあるが、LPS 誘発モルモットイレウスモデルを使った実験で、PMX を行うときにヘパリン使用時

よりもナファモスタット使用時の方が効果が増大した²⁾との報告があり興味深い。

結 論

ラットのブレオマイシン誘導肺損傷モデルに対して PMX 療法を行い、ナファモスタット使用時に末梢血の白血球の減少を認めた。

参考文献

- 1) Seo Y, Abe S, Kurahara M, *et al*: Beneficial effect of polymyxin B-immobilized fiber column (PMX) hemoperfusion treatment on acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Intern Med. 2006;45 (18) :1033-8. Epub 2006 Oct 16.
- 2) Nakanowatari Y, Nemoto K, *et al*: Effects of haemoperfusion through fibres immobilizing polymyxin B and nafamostat mesilate on endotoxaemia in conscious Guinea-pigs. Clin Exp Pharmacol Physiol 2008 Jan;35 (1) :17-22

マウス Lipopolysaccharide (LPS) 誘起性急性肺損傷モデルにおける Montelukast および Pioglitazone による抑制効果の検討

田島 俊児¹ 富士盛文夫¹ 島岡 雄一¹ 森山 寛史¹
寺田 正樹¹ 高田 俊範¹ 下条 文武¹ 鈴木 栄一^{2*}

選択的 cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLT1) 拮抗薬：Montelukast とペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ リガンド：Pioglitazone により急性肺損傷 (ALI) を抑制することが可能性かどうか、マウス Lipopolysaccharide (LPS) 誘起性 ALI モデルを用いて検討した。Montelukast と Pioglitazone は、肺組織における炎症細胞浸潤と肺水腫の程度 ($p < 0.01$) を軽減し、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の総細胞 ($p < 0.05$) と好中球数 ($p < 0.01$) を有意に抑制した。さらに BAL 液中の MIP-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α 濃度の上昇も有意に抑制した ($p < 0.05$)。以上より Montelukast と Pioglitazone は、ALI を軽減する可能性が示唆された。

Preventive Effect of Montelukast and Pioglitazone on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice

Shunji Tajima¹, Fumio Fujimori¹, Yuichi Shimaoka¹, Hiroshi Moriyama¹
Masaki Terada¹, Toshinori Takada¹, Eiichi Suzuki², Fumitake Gejyo¹

¹ Division of Respiratory Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata, Japan

² Department of General Medicine, Niigata University Medical and Dental Hospital, Niigata, Japan

Rationale: Cysteinyl leukotrienes (cysLTs) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) may play an important role in the pathogenesis of acute lung injury (ALI). We hypothesized that montelukast, a selective cysLT receptor 1 antagonist, or pioglitazone, a PPAR- γ ligand, was able to attenuate lipopolysaccharide (LPS)-induced ALI in mice.

Methods: ALI was induced in female BALB/c mice by intranasal instillation of 100 μ g/kg of LPS. The mice were divided into three groups of normal saline, 50 mg/kg of montelukast, or 25 mg/kg of pioglitazone injected intraperitoneally at 24 and 1 h prior to and 8 h after LPS challenge. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected and the accumulation of water in the lung was calculated 24 h after LPS challenge. Histological examinations were also carried out at the same time point.

Results: Administration of montelukast or pioglitazone significantly reduced the: 1) histological evidence of lung injury, 2) edema formation (the fluid content in the lung), 3) infiltration of the lung with inflammatory cells (the number of total cells and neutrophils in BALF). It also markedly reduced the BALF level of macrophage inflammatory protein-2, interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α .

Conclusions: Montelukast and pioglitazone could prevent LPS-induced ALI via the repression of proinflammatory cytokine production.

背景・目的

急性肺損傷／急性呼吸促迫症候群 (acute lung injury/acute respiratory distress syndrome, 以下 ALI/ARDS) とは、種々の原因により肺胞マクロファージが活性化され, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 等の Cytokine の発現が亢進することにより肺組織へ活性化した好中球が浸潤し, 肺の組織障害を惹起し, 非心原性急性肺水腫を呈する疾患である。死亡率は約 40% と高率であるが, 生存率を有意に改善する薬剤はないのが現状である¹⁾。

ARDS 患者の気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, 以下 BALF) 中の cysteinyl leukotriene (cysLT) 濃度は増加しており²⁾, cysLT receptor 1 (CysLT1) antagonist である ICI98615³⁾ と MK571⁴⁾ は, ARDS モデルを改善する。しかし両薬剤は, ともにヒトへの臨床応用はされていない。

ペルオキシソーム増殖剤応答性レセプター (peroxisome proliferator-activated receptor, 以下 PPAR) は核内 receptor super-family に属し, ligand 依存的に標的遺伝子の転写を制御している。3 種類のサブタイプ遺伝子 (α , β/δ , γ) が単離されており, 9cis レチノイン酸を受容するレチノイド X レセプターとヘテロ二量体を形成して標的 DNA 配列に結合することにより転写を制御している。PPAR γ ligand のひとつである Pioglitazone は, ラット LPS 誘起性肝障害モデルにおいて, TNF- α の産生を抑制し, 肝障害を軽減させるとの報告があるが⁵⁾, 急性肺損傷についての検討は, なされていない。

今回我々は, 気管支喘息治療薬である CysLT1 antagonist (Montelukast; シングレア®) および糖尿病治療薬である PPAR γ ligand (Pioglitazone; アクトス®) の急性肺損傷に対する有効性について, 動物疾患モデルを用いて検証することとした。

対象・方法

1) マウス LPS 誘起性急性肺損傷モデルの作成

BALB/c マウス 10 週齢 (雄性) を腹腔内麻酔後に大腸菌由来の LPS (Sigma, St. Louis, MO) 100 μ g/kg を生理食塩水 60 μ l で溶解して 20 μ l のピペットで点鼻投与することにより, 誤嚥を引き起こすことでマウス LPS 誘起性急性肺損傷モデルを作成した⁶⁻⁸⁾。

2) 薬剤の調整と投与方法, 投与期間

各薬剤は, LPS 投与の 7 日前より開始し, LPS 投与の当日は, 15 分前, 8 時間後に投与した。Montelukast (Merck & Co., Inc. NJ, USA) 群 (50 mg/kg: 腹腔内投与), Pioglitazone (Takeda Pharm. Co., Ltd. Osaka, Japan) 群 (25 mg/kg: 腹腔内投与), Control 群 (生理食塩水: 腹腔内投与) の 3 群に対して LPS の点鼻を行った。

3) BALF および肺組織の採取

LPS 投与の 24 時間後に, 右肺の BAL と左肺の採取を行った。左肺は結紮し, 肺水腫の程度 (湿重量と乾重量の差) の測定に用いた。右肺は BAL または肺の組織学的検討に用いた。BAL は, 生理食塩水 0.5 ml \times 4 回行い, 細胞数, 細胞分画の測定後, 上清を -80 $^{\circ}$ C で保存した。肺組織は 18G サーフロー針にて右肺に 10% 緩衝ホルマリン液を注入後に摘出した。パラフィン包埋処理を行い, 薄切り切片を作成し, Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。

4) BALF 中の cysLT および proinflammatory cytokine の測定

BALF 中の cysLT, TNF- α , IL-1 β , IL-6, macrophage inflammatory protein (MIP)-2 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。

5) 統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で記した。多群間の検定は Fisher protected least-significant differences method による多重比較検定を行った。p<0.05 を統計学的に有意とした。

1: 新潟大学大学院医歯学総合研究科

内部環境医学講座 (第二内科)

2: 同 医歯学総合病院 総合診療部

* 分担研究者

6) 倫理面等への配慮

本学の動物実験倫理委員会から許可を得たうえで本検討を行った。

結 果

1) BALF 中の cysLT 濃度

我々の用いた急性肺損傷モデルにおいても ARDS 患者と同様に、BALF 中の cysLT 濃度の有意な上昇を認めた (図 1)。尚、Montelukast の投与による BALF 中の cysLT 濃度の有意な変化は認めなかった (図 1)。

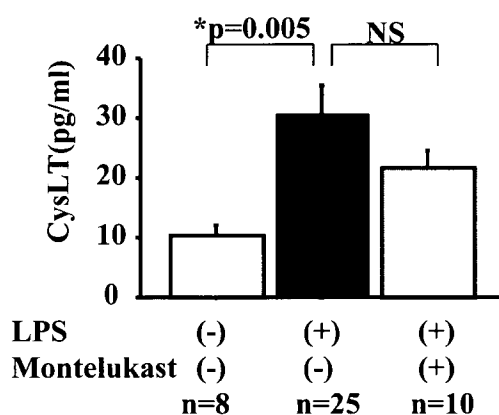


図 1 LPS 誘発性急性肺損傷モデルにおける BALF 中の cysLT 濃度

2) 肺の組織所見および肺水腫の評価

LPS 投与 24 時間後における肺の組織所見では、Montelukast または Pioglitazone により肺胞および胞隔への炎症細胞浸潤の抑制を認めた (図 2)。さらに Montelukast と Pioglitazone は、肺水腫の程度を有意に抑制した (図 3)。

3) BALF 所見および BALF 中の proinflammatory cytokine 濃度

LPS 投与 24 時間後における BALF 中の総細胞数および好中球数は Montelukast および Pioglitazone の投与より有意に抑制された (図 4, 5)。BALF 中の各種 proinflammatory cytokine を ELISA 法にて測定したところ、Montelukast と Pioglitazone は、BALF 中の TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MIP-2 濃度の上昇を全て有意に抑制した (図 6)。

考 察

急性肺損傷は、呼吸器領域では未だに有効な治療法の確立がなされていないため、死亡率が高い難治性の肺疾患である。本研究の目的は、既に臨床使用されている薬剤の中で、実際に臨床応用が可能なものがあるか否かについて、動物疾患モデルを用いて検討することであった。今回我々は、

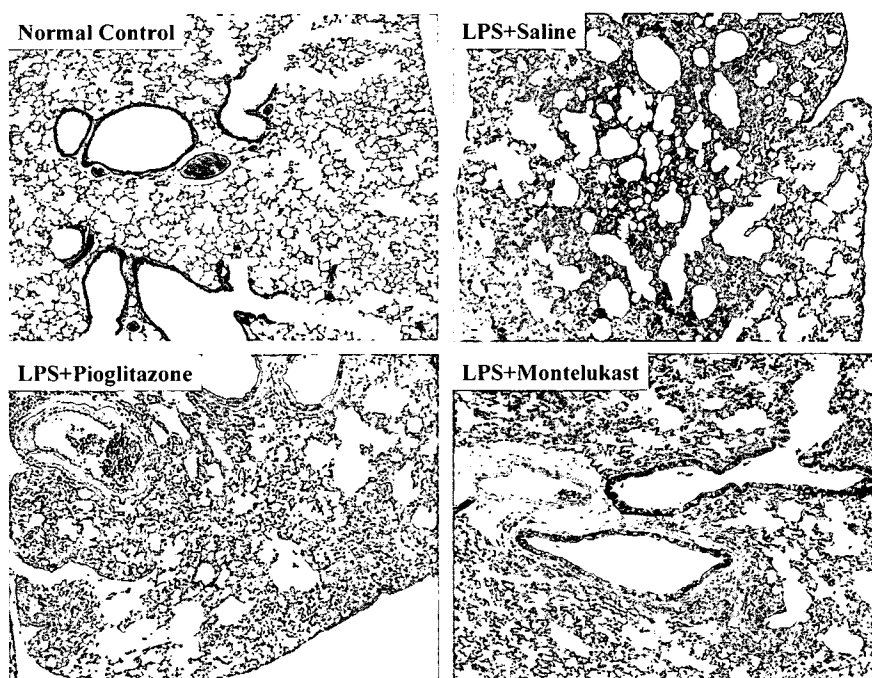


図 2 LPS 誘発性急性肺損傷モデルにおける肺の組織所見 (HE 染色 x 100)

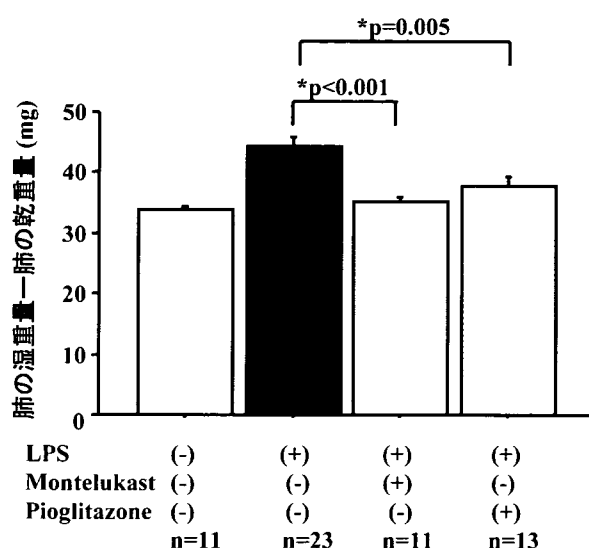


図3 LPS 誘発性急性肺損傷モデルにおける肺水腫の評価

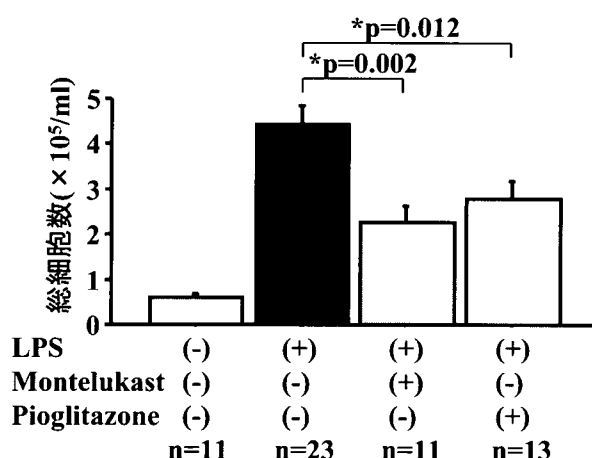


図4 LPS 誘発性急性肺損傷モデルのBALF中の総細胞数

気管支喘息および糖尿病の治療薬としてそれぞれ既に幅広く臨床使用されている Montelukast および Pioglitazone の効果についてマウス LPS 誘発性急性肺損傷モデルを用いて検討した。Montelukast または Pioglitazone の予防投与により、1) 肺組織への炎症細胞浸潤および肺水腫の程度の抑制、2) BALF 中の総細胞数、好中球数の低下、3) BALF 中の MIP-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6 濃度の低下等の LPS 投与による急性肺損傷の抑制効果を認めた。

ヒツジに cysLT を投与すると、急性肺水腫を呈し⁹⁾、LTC₄ 合成酵素欠損マウス¹⁰⁾と CysLT1 欠損マウス¹¹⁾では、急性炎症時の血管透過性亢進が抑制されることが報告されており、ALI/ARDS の病態において、cysLT-CysLT1 の経路は極めて重要であ

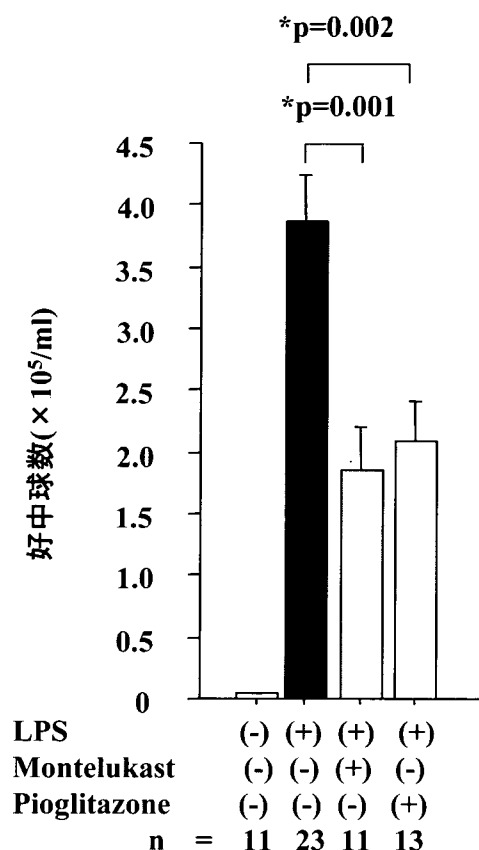


図5 LPS 誘発性急性肺損傷モデルのBALF中の好中球数

ると考えられている。今回の我々の検討では、CysLT1 antagonist である Montelukast の投与による BALF 中の cysLT 濃度変化は認めなかったが、種々の proinflammatory cytokine 濃度は有意に低下した。定常状態での肺での CysLT1 の主な発現細胞は肺胞マクロファージと平滑筋と報告されており¹²⁾、『マクロファージの活性化→proinflammatory cytokine の産生→好中球の遊走と活性化→cysLT を含む各種 chemical mediator 産生→マクロファージの更なる活性化』という急性肺損傷における炎症波及の悪循環を Montelukast が断ち切れる可能性が示唆された。今後我々のモデルにおける CysLT1 の発現細胞について、免疫染色および *in-situ* hybridization による検討を加える予定である。

PPAR ligand は、核内転写因子である Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) や activator protein-1 (AP-1) の活性化を抑制する事により、マクロファージ等からの proinflammatory cytokine の産生を制御していると考えられている¹³⁾。今回の我々の検討でも PPAR γ ligand である Pioglitazone の投与により、proinflammatory cytokine である MIP-2, IL-1 β , TNF-

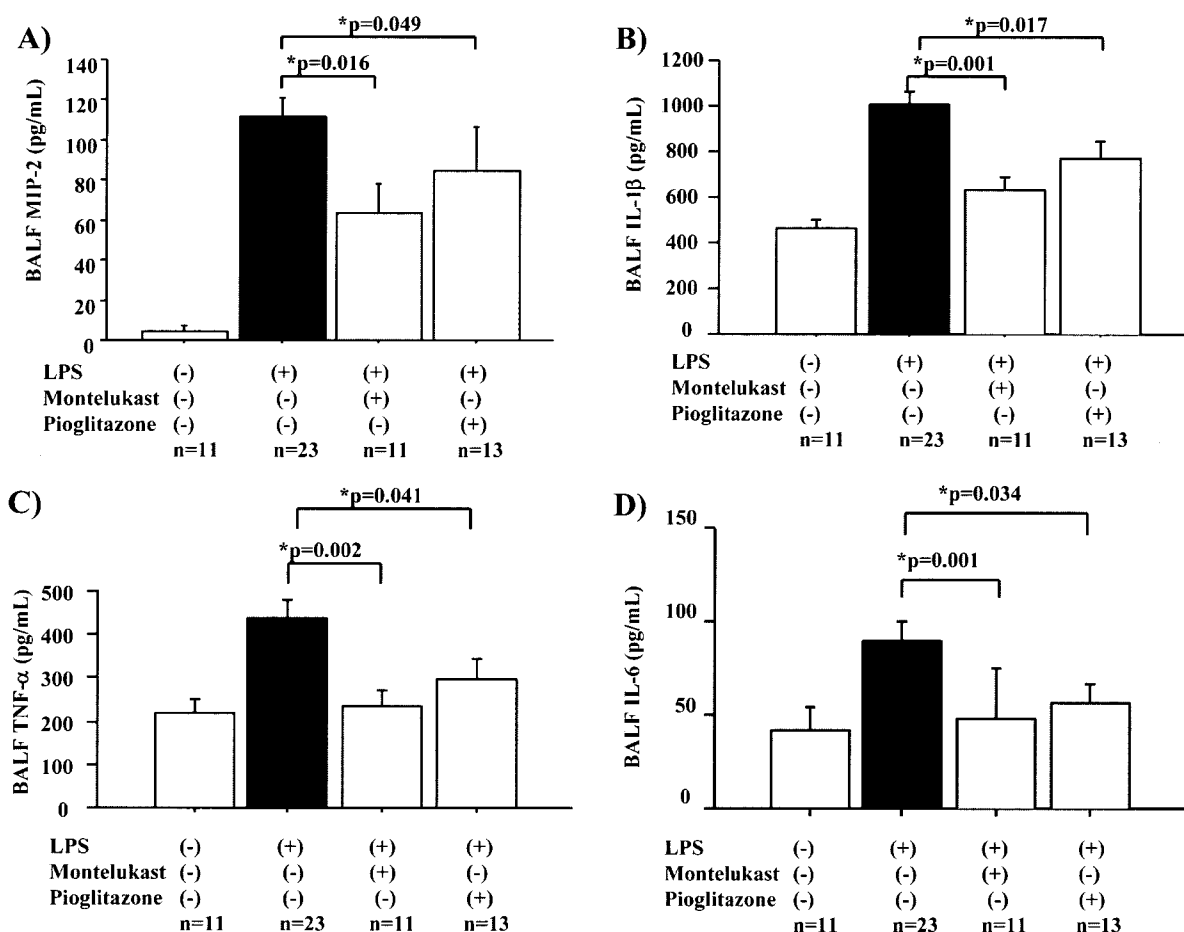


図6 LPS誘発性急性肺損傷モデルのBALF中のproinflammatory cytokine濃度

α , IL-6等の産生抑制効果を認めた。今後、肺組織中のNF- κ BおよびAP-1活性化抑制の有無の検討と今回の結果が真にPPARを介したものであるかどうか、PPAR γ の特異的 antagonistの同時投与の検討を行う予定である。

他のPPAR γ ligandについてはRosiglitazoneを用いた報告が散見される。Rosiglitazoneは、ラットおよびマウスのLPS誘起性肺損傷モデル^{14,15)}およびBleomycin誘起性肺線維症モデル¹⁶⁾を改善すると報告されているが、本邦未承認薬という問題点がある。しかし、近年PPARの有する抗炎症作用については実に様々なligandの検討がなされており、炎症性肺疾患への応用も強く期待されている分野と考えられる¹⁷⁾。

MontelukastもPioglitazoneも既に広く臨床使用されているが、今回の動物モデルでの検討は予防投与で尚かつ投与量もヒトの数十倍(ヒトでは、Montelukast:約0.2 mg/kg, Pioglitazone:約1 mg/kg)

と高用量を用いているため、投与の経路・時期・期間を含め、臨床応用には更なる検討が必要と考えている。

結 論

既存の薬剤であるMontelukastおよびPioglitazoneにより、LPSによる急性肺損傷が軽減される可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. N Engl J Med. 2005; 353: 1685-93.
- 2) Stephenson AH, Lonigro AJ, Hyers TM, Webster RO, Fowler AA. Increased concentrations of

- leukotrienes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS or at risk for ARDS. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 138: 714-9.
- 3) Schützer KM, Larsson A, Risberg B, Falk A. Leukotriene receptor antagonism prevents lung protein leakage and hypoxaemia in a septic cat model. *Eur Respir J.* 1994; 7: 1131-7.
- 4) Ichinose F, Zapol WM, Sapirstein A, Ullrich R, Tager AM, Coggins K, Jones R, Bloch KD. Attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction by endotoxemia requires 5-lipoxygenase in mice. *Circ Res.* 2001; 88: 832-8.
- 5) Enomoto N, Takei Y, Yamashima S, Ikejima K, Kitamura T, Sato N. Protective effect of pioglitazone against endotoxin-induced liver injury through prevention of Kupffer cell sensitization. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005; 29: 216S-9S.
- 6) Szarka RJ, Wang N, Gordon L, Nation PN, Smith RH. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. *J Immunol Methods.* 1997; 202: 49-57.
- 7) Tajima S, Bando M, Yamasawa H, Ohno S, Moriyama H, Takada T, Suzuki E, Gejyo F, Sugiyama Y. Preventive Effect of Hochu-ekki-to on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in BALB/c Mice. *Lung.* 2006; 184: 318-23.
- 8) Tajima S, Soda M, Bando M, Enomoto M, Yamasawa H, Ohno S, Takada T, Suzuki E, Gejyo F, Sugiyama Y. Preventive effects of edaravone, a free radical scavenger, on lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Respirology.* 2008; in press.
- 9) Noonan TC, Kern DF, Malik AB. Pulmonary microcirculatory responses to leukotrienes B₄, C₄, D₄ in sheep. *Prostaglandins.* 1985; 30: 419-34.
- 10) Kanaoka Y, Maekawa A, Penrose JF, Austen KF, Lam BK. Attenuated zymosan-induced peritoneal vascular permeability and IgE-dependent passive cutaneous anaphylaxis in mice lacking leukotriene C₄ synthase. *J Biol Chem.* 2001; 276: 22608-13.
- 11) Maekawa A, Austen KF, Kanaoka Y. Targeted gene disruption reveals the role of cysteinyl leukotriene 1 receptor in the enhanced vascular permeability of mice undergoing acute inflammatory responses. *J Biol Chem.* 2002; 277: 20820-4.
- 12) Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateauneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT₁ receptor. *Nature.* 1999; 399: 789-93.
- 13) Asada K, Sasaki S, Suda T, Chica K, Nakamura H. Antiinflammatory roles of peroxisome proliferator-activated receptor in human alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 195-200.
- 14) Birrell MA, Patel HJ, McCluskie K, Wong S, Leonard T, Yacoub MH, Belvisi MG PPAR-γ agonists as therapy for diseases involving airway neutrophilia. *Eur Respir J* 2004; 24: 18-23.
- 15) Liu D, Zeng BX, Zhang SH, Yao SL. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces pulmonary inflammatory response in a rat model of endotoxemia. *Inflamm Res.* 2005; 54: 464-70.
- 16) Genovese T, Cuzzocrea S, Di Paola R, Mazzon E, Mastruzzo C, Catalano P, Sortino M, Crimi N, Caputi AP, Thiemermann C, Vancheri C. Effect of rosiglitazone and 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ on bleomycin-induced lung injury. *Eur Respir J.* 2005; 25: 225-34.
- 17) Becker J, Delayre-Orthez C, Frossard N, Pons F. Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases? *Fundam Clin Pharmacol.* 2006; 20: 429-47.

抗線維化作用を有する薬剤探索の試み —ブレオマイシン肺線維症に対するトラニラスト (リザベン®) 及びアンブロキシソール (ムコソルバン®) の効果の検証—

服部 登 妹尾 直 風呂中 誠 谷本 琢也
河瀬 成穂 河野 修興*

【目的】現在、肺線維症に対して確実に有効である治療法は存在していない。線維化部位を完全に治癒させることは困難であっても、線維化過程を遅延しうる薬剤が見出せれば、臨床上有用である可能性は高いと想像される。既に市場で使用されている薬剤の中から、そのような効果を持つ薬剤が見出せれば、臨床応用する上での障壁は新薬に比べてより少ないであろう。このコンセプトを基に、過去に抗線維化作用があると報告されたことのある薬剤を用いて、ブレオマイシン肺線維症モデルに対する抗線維化作用を検証する実験を行った。今回使用する薬剤として、抗アレルギー薬、抗ケロイド薬として使用されているトラニラスト (リザベン®) と、去痰薬として使用されるアンブロキシソール (ムコソルバン®) を選んだ。

【方法】ブレオマイシンの経気管内投与を行ったマウスに対して、トラニラストの連日経胃投与、また、アンブロキシソールの連日腹腔内投与を行った。ブレオマイシン投与後 14 日あるいは 21 日目に気管支肺胞洗浄及び肺の摘出を行った。肺内のコラーゲン量を hydroxyproline assay あるいは Sircol collagen assay により評価し、肺線維症の程度を定量化した。同時に、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の検討も行った。

【結果】今回の検討では、トラニラスト、アンブロキシソール共に、ブレオマイシン経気管投与後の肺内コラーゲン量の増加を、有意差を持って抑制することはできなかった。ただ、トラニラスト投与群において、肺内コラーゲン量、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、リンパ球分画が、コントロール群に比して低い傾向にあった。トラニラストは難水溶性であることから、経胃投与量が一定でなかった可能性がある。

【結論】ブレオマイシン肺線維症に対するトラニラスト及びアンブロキシソールの抗線維化作用を検討したが、それぞれには顕著な抗線維化作用は確認されなかった。ただ、トラニラスト投与群において、肺線維症の程度が低い傾向にあり、トラニラスト投与量が一定していなかった可能性も示唆されるため、トラニラストの抗線維化作用については今後さらなる検討を要すると思われる。

はじめに

肺線維症は、肺傷害に引き続いて生じる過剰な組織修復により、線維芽細胞の集積をきたし、コラーゲンの異常な沈着を認める状態である。この線維化の過程には、図1に示すようないろいろな要素が関与していることが明らかにされてきているが、治療手段としては、ステロイド薬や免疫抑制薬が使用されることが一般的であり、依然、線維化を抑制しえることが証明された方法は存在していない。この線維化過程を完全に治癒させることは困難であるとしても、少なくとも遷延させることが出来れば、その臨床的有用性は高いと想像される。

既に市販されていて、安全性が担保されている薬剤の中から、抗線維化作用を有する可能性のある薬剤について着目し、今回は、トラニラスト（リザベン®）及びアンブロキシール（ムコソルバン®）を選択した。これらの薬剤は、過去に抗線維化作用のある可能性が報告^{1,2)}されていることから、その抗線維化作用がブレオマイシン肺線維症モデルにおいて再現されるのかを検証した。

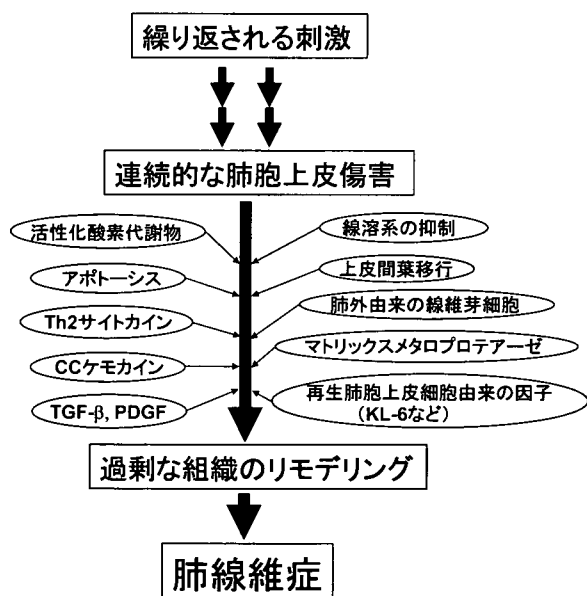


図1 肺線維症の発症にかかわる因子

方 法

1) ブレオマイシンの投与

C57BL/6 マウスに対して、ブレオマイシンを1.5mg/kgの投与量として、経気管投与を行った。

2) トラニラスト（リザベン®）投与実験

トラニラストは難水溶性のため、カルボキシメチルセルロース Na;CMC に懸濁して使用した。トラニラストは100mg/kgの1日1回胃内への投与とし、ブレオマイシン投与の翌日から20日まで投与する群、ブレオマイシン投与後7日目から20日まで投与する群を作った。対照群は、CMCのみを投与する群とした。ブレオマイシン投与後21日目にはBALを行うとともに両肺を切除し、hydroxyproline assayにより、肺内コラーゲン量を測定した。また、BAL中の細胞数、細胞分画についても検討を加えた。

3) アンブロキシール（ムコソルバン®）投与実験

アンブロキシールは、1日2回の腹腔内投与とし、1日量が10mg/kgと30mg/kgとなる2群を作った。対照群は、生理食塩水のみ腹腔内投与する群とした。ブレオマイシン投与後14日目に屠殺し、肺コラーゲン量をSircol collagen assay kit（Biocolor, Newtownabbey, UK）用いて評価し、BALF炎症細胞数・分画の測定を行った。

結 果

1) トラニラスト（リザベン®）投与実験

図2に示すように、肺内コラーゲン量は、ブレオマイシン投与後翌日及び7日後よりトラニラストを投与した両群とも、CMCのみを投与した群に比して低い傾向にはあったが、統計学的な有意差を認めなかった。また、図3に示すように、BAL液中の総細胞数もトラニラスト投与群で低い傾向にあり、図4に示す通り、その細胞分画ではリンパ球比率が低い傾向にあったが、いずれも統計学的な有意差を認めなかった。

2) アンブロキシール（ムコソルバン®）投与実験

図5に示すように、アンブロキシールの腹腔内投与により、ブレオマイシン肺線維症モデルにおける肺内コラーゲン量の増加を抑制する効果は認められなかった。表に示すように、BAL液中の細胞

数、細胞分画にも影響を与えることはないことがわかった。

考 察

既に市販されている薬剤の中から、過去に抗線維化作用があると報告されたトラニラスト（リザベン®）及びアンプロキシール（ムコソルバン®）を選択し、ブレオマイシン肺線維症モデルに対して抗線維化効果を認めるかを検証する研究を行った。残念ながら今回の検討では、両薬ともに顕著な抗線維化作用を認めるには至らなかった。

トラニラストは、効能・効果として、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、ケロイド・肥厚性瘢痕が挙げられている薬剤であるが、様々なケミカルメデエーターの抑制効果に加え、サイトカイン産生・遊離の抑制効果があることが知られている。さらに、TGF- β を抑制する効果が*in vitro*で示されており、これが皮膚のケロイド及び肥厚性瘢痕由来の線維芽細胞のコラーゲン産生を抑制する中心的な機序と考えられている。これらの作用から、皮膚以外の心、血管、腎を含む各種臓器における線維増殖性変化への応用^{3,5)}が検討されている。先行研究¹⁾として、ブレオマイシン肺線維症の抑制効果を示した報告があることから、今回我々が再検を行った次第であるが、同様の結果が得ることはできなかった。ただ、トラニラスト投与群において、肺コラーゲン沈着量、BAL液中の炎症細胞数が低い傾向があり、今後さらなる検討を要すると考える。トラニラストは難水溶性であり、本研究では、カルボキシメチルセルロースNaに懸濁して投与したことから、投与量が一定ではなかった可能性がある。この点を再検討して実験を行う予定である。

アンプロキシールは、効能・効果として、気管支喘息、気管支炎、気管支拡張症などにおける去痰、慢性副鼻腔炎における排膿、が挙げられている薬剤であり、腺細胞の粘液分泌を調節し、サーファクタント蛋白の分泌促進させる作用がある。さらに、肺泡マクロファージやリンパ球、内皮細胞、気道上皮細胞から分泌されるIL-1、IL-4、IL-13、TNF- α 、IL-2、IFN- γ などの産生を抑制する作用とともに、強い抗酸化作用があることも知られてい

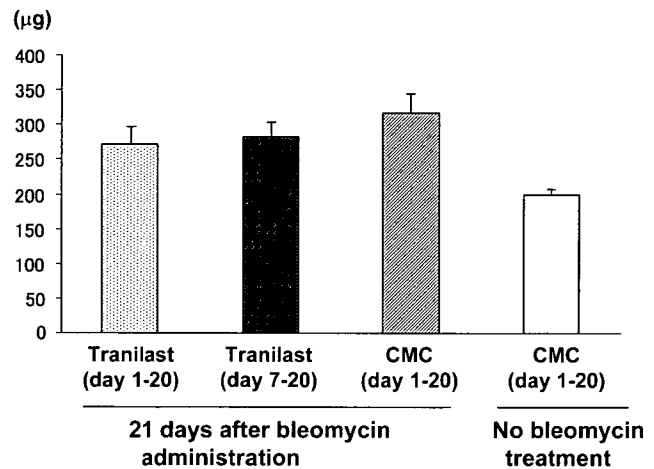


図2 トラニラスト投与による肺コラーゲン量（Hydroxyproline assay）への影響

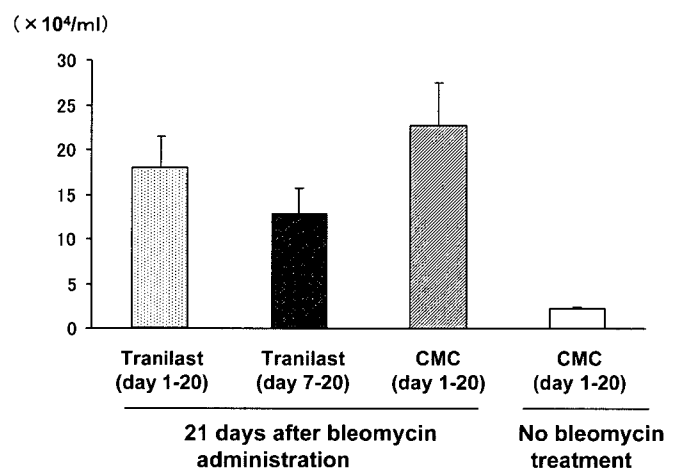


図3 トラニラスト投与によるBAL液中の総細胞数への影響

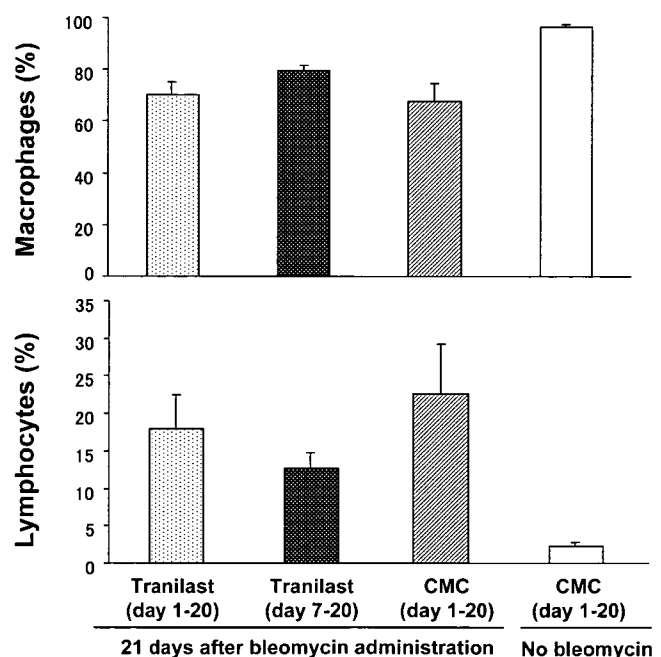


図4 トラニラスト投与によるBAL液中の細胞分画への影響

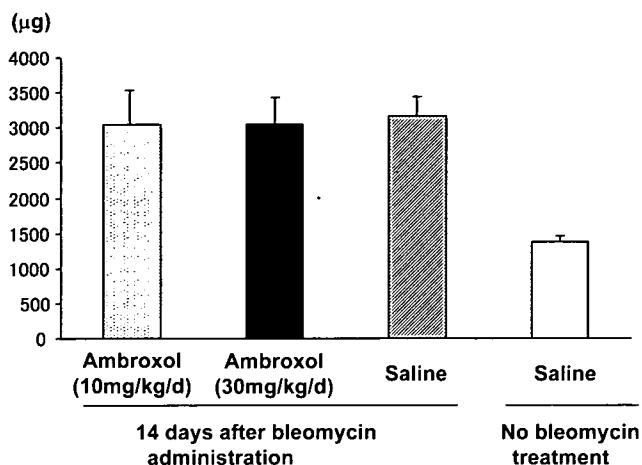


図5 アンブロキシール投与による肺コラーゲン量 (Sircol collagen assay) への影響

表 アンブロキシール投与による BAL 回収細胞への影響

	Cells ($\times 10^6/\text{ml}$)	Differential cell count (%)		
		AM	Ly	Neu
Group A	2.1 \pm 1.5	55.6 \pm 11.7	44.1 \pm 11.5	0.3 \pm 0.6
Group B	2.3 \pm 1.5	54.9 \pm 17.5	45.1 \pm 17.5	0.0 \pm 5.3
Group C	2.4 \pm 0.7	47.4 \pm 10.7	52.1 \pm 10.7	0.5 \pm 0.7
Group D	0.2 \pm 0.2	97.3 \pm 4.6	2.2 \pm 3.8	0.4 \pm 0.8

Group A: BLM treated mice

Group B: BLM and ambroxol(10mg/kg/day) treated mice

Group C: BLM and ambroxol(30mg/kg/day) treated mice

Group D: normal saline treated mice

る⁶⁾。この抗酸化作用は、1) Hydroxy radical ($\cdot\text{OH}$) や Hypochlorous acid (HOCl) の直接的な scavenger として働く、2) Hydroxy radical, Hydrogen peroxide (H_2O_2) などによる脂質過酸化を抑制することなどから証明されており、N-acetylcysteine (NAC) に匹敵する可能性もある。最近、NAC 投与によるブレオマイシン肺線維症の抑制⁷⁾、さらに特発性肺線維症の進行抑制効果⁸⁾ が報告されており、アンブロキシールによる同様の抗線維化作用を期待したが、本研究においてその作用は証明されなかった。NAC と同様の作用を示す可能性は低いものと結論付けられる。

結 語

ブレオマイシン肺線維症に対するトラニラスト及びアンブロキシールの抗線維化作用を検討したが、両薬ともに顕著な抗線維化作用は確認されなかった。ただ、トラニラスト投与群において、肺線維症の程度が低い傾向にあり、トラニラスト投与量が一定していなかった可能性も示唆されるため、トラニラストの抗線維化作用については今後さらなる検討を要すると思われる。

参考文献

- 1) Mori H, Kawada K, Zhang P, Uesugi Y, Sakamoto O, Koda A. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in genetically mast cell-deficient WBB6F1-W/W^v mice and mechanism of the suppressive effect of tranilast, an antiallergic drug inhibiting mediator release from mast cells, on fibrosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 95: 195-201.
- 2) Pozzi E, Salmons M, Masturzo P, Genghini M, Scelsi M, Spialtini L, Luisetti M. Role of alveolar phospholipids in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Respiration* 1987; 51 Suppl 1: 23-32.
- 3) Ishiwata S, Verheye S, Robinson KA, Salame MY, de Leon H, King SB 3rd, Chronos NA. Inhibition of neointima formation by tranilast in pig coronary arteries after balloon angioplasty and stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1331-7.
- 4) Kagitani S, Ueno H, Hirade S, Takahashi T, Takata M, Inoue H. Tranilast attenuates myocardial fibrosis in association with suppression of monocyte/macrophage infiltration in DOCA/salt-hypertensive rats. *J Hypertens* 2004; 22: 1007-15.
- 5) Kelly DJ, Zhang Y, Gow R, Gilbert RE. Tranilast attenuates structural and functional aspects of renal injury in the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 2619-29.
- 6) Gillissen A, Schärting B, Jaworska M, Bartling A, Rasche K, Schultze-Werninghaus G. Oxidant scavenger function of ambroxol in vitro: a

comparison with N-acetylcysteine. *Res Exp Med* (Berl) 1997; 196: 389-98.

7) Shahzeidi S, Sarnstrand B, Jeffery PK, McAnulty RJ, Laurent GJ. Oral N-acetylcysteine reduces bleomycin-induced collagen deposition in the lungs of mice. *Eur Respir J* 1991; 4: 845-52.

8) Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, MacNee W, Thomeer M, Wallaert B, Laurent F, Nicholson AG, Verbeken EK, Verschakelen J, Flower CD, Capron F, Petruzzelli S, De Vuyst P, van den Bosch JM, Rodriguez-Becerra E, Corvasce G, Lankhorst I, Sardina M, Montanari M; IFIGENIA Study Group. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2229-42.

臨床診断研究

特発性間質性肺炎における咳の臨床的検討

大林 王司¹ 幸山 正² 山内 康宏² 滝澤 始^{1*}

【背景と目的】特発性間質性肺炎（IIPs）は原因不明の慢性進行性呼吸器疾患で、予後を改善する明確な薬剤のない疾患である。本疾患の臨床経過中しばしば咳が激しく日常生活の障害をきたす例が少なくない。従来は特発性間質性肺炎の1症状であるとの認識から詳細な検査も行われないことも多い。そこで、本疾患での咳の実態を調査し、患者のQOL改善に益することを目的とした。

【対象と方法】当院受診中のIIPsを対象として、咳を主訴とする群とそうでない群に分け、病状、重症度、画像、呼吸機能などのデータを比較した。次に、咳に対する治療とその成績を後ろ向きに検討した。

【結果と考察】臨床症状や重症度には明らかな差はなく、咳あり群には喘息や咳喘息類似の病態の合併が疑われる症例が認められた。治療薬では鎮咳薬の効果は少なく、気管支拡張薬やステロイド吸入薬が有効な症例が多かった。現在、前向きの調査検討を開始中である。

研究目的

本疾患での咳の実態を調査し、患者の QOL 改善に益することを目的とした。

研究方法

当院受診中の IIPs を対象とした。診断は厚生労働省特定疾患調査研究班第 4 次改定基準に準じた。

咳を主訴とする群とそうでない群に分け、診療録で 2 回以上「せき」を訴える症例、「せき」に対する処方が 2 回以上されている症例につき検討した。

そして病状、重症度、画像、呼吸機能などのデータを比較し、咳に対する治療とその成績を後ろ向きに検討した。

結 果

呼吸機能検査では %VC せきのある群 75.6 ± 7.65 となし群 66.9 ± 3.59 となり、 $p=0.546$ で有意差はなかった。

FEV1.0% はある群 84.3 ± 3.22 に対し、 86.8 ± 2.58 で $p=0.546$ となり有意差は認めなかった。%DLco は 70.43 ± 12.5 に対し 65.75 ± 10.1 で $P=0.780$ となり有意差は認めなかった。年齢はなし群が 72.9 ± 1.65 、あり群が 77.4 ± 1.41 、 $P=0.068$ で有意差を認めなかった。喫煙歴のなし群は 11 例中 8 例で、あり群は 12 例中 6 例に重喫煙歴を認めた。吸入粉塵歴は 1 例のみ認めた。血清 KL-6 値の平均は 1515 を示した。最大値が 3835 で最小値が 316 を示した。1000 以上の高値症例が 13 例、あり群が 1912.6 ± 435.3 、なし群は 1158 で $p=0.118$ となり有意差は認めなかった。

咳あり群の中で、咳に対する治療薬剤を処方された（のべ人数）は PSL 経口が 1 例、PSL + NAC 吸入が 1 例、鎮咳薬のみが 1 例、LABA（吸入）が 3 例* LABA（貼付）が 4 例* 長時間作用型吸入抗コリン薬 が 5 例* 吸入ステロイド（ICS）が 2 例*、テオフィリン薬 が 1 例* であった。全例が鎮咳薬では無効であった群であった。

咳に対する治療効果は、咳あり群が $n=12$ （重症度 2.6）軽度 4 例（著効 1 例、やや有効が 3 例）、中等度 6 例（著効 2 例、やや有効 2 例、死亡 2 例）、高度 2 例（著効 2 例）であった。

以上より、死亡例を除くと全例で治療効果が認められる。適切に治療薬を選択すれば咳症状を有効にコントロールできる可能性があることが分かった。

また HRCT で検討した、画像上の間質性肺炎の重症度は必ずしも咳の重症度は一致していなかった。

考 察

従来、間質性肺炎に合併する咳は有効な治療薬剤につき十分に検討されていなかった可能性がある。

高率に肺気腫・慢性気管支炎、咳喘息、逆流性食道炎（これは間質性肺炎の原因ともされる報告あり）などを合併することが知られている。これら合併疾患に対する治療が咳の有効なコントロールにつながり、患者の QOL に貢献すると予想される。IP 症例で一部 IgE 高値を呈する症例があり、ICS が咳に有効である症例が認められる。好酸球性気道炎症疾患（eosinophilic airway disorder; EAD）が咳の一因と考えられる。

喫煙暴露が IgE を誘導したり、気道過敏性を誘導することは良く知られている。また IP に肺気腫やアレルギー性鼻炎を高率に合併することが知られ、喘息・アトピー性皮膚炎を持たない群で遺伝的な発症素因についても指摘されている。

間質性肺炎の成因に誤嚥・胃酸逆流の存在が示唆される報告もある。CVA のみならず IP の咳症状を呈する原因疾患をよく鑑別する必要がある。そしてそれに対する適切な治療法を選択する必要がある。

有効性に関連する因子（喘息的・COPD など）も検討を要する。今後は例えば、患者の安静時の呼吸回数などを検討することや、極細気管支鏡などを使用することで、古典的に咳の原因として従来より指摘されている咳の原因である末梢気道レベルでの伸展レセプターの問題を検討することが可能となれば検討を行いたい。

1：帝京大学溝口病院第四内科

2：東京大学呼吸器内科

* 分担研究者

結論と今後の展開

以上から、今後は我々は特発性間質性肺炎における以下のような咳の臨床的検討（前向き調査）を予定している。

目 的：

1. 本研究は、特発性間質性肺炎で慢性に〈1ヶ月以上〉咳を訴える症例を対象
2. 慢性咳患者で検討されるべき系統的な臨床検査を実施して、より有効かつ適正な治療が行えるよう、前向きに臨床病態の把握とそれに伴う治療を行い、その有効性を比較検討するものである。

方法対象の選択として、本施設に外来または入院にて加療中の特発性間質性肺炎患者を対象とし、以下の条件を満たす方とする。

臨床診断基準（日本呼吸器学会びまん性肺疾患診断・治療ガイドライン作成委員会）に従い、特発性間質性肺炎と診断された症例

1. 1ヶ月以上咳が持続する症例
2. 20歳以上75歳以下
3. 吸入ステロイド薬、ベータ2選択的刺激薬、

抗コリン薬を使用中でないこと

4. 本試験の内容と趣旨について十分な説明を受け、理解かつ同意が得られること
5. 明確な呼吸器感染症、重篤な心疾患、肝疾患、腎疾患などが無く、主治医が試験実施上の問題がないと認めること

すでに院内承認済みで平成19年11月から開始している。

臨床検査項目：呼吸器問診表（IPAG診断・治療ハンドブック日本語版に準じたもの）、生活の質に関する問診表：SF-36、呼吸機能検査：スパイロメトリおよびフローボリューム曲線、肺気量分画、肺拡散能、ピークフローメータによるピークフロー測定、喀痰、末梢血中の好酸球数、血中総IgE値、血中特異的アレルゲンIgE抗体、百日咳抗体価、マイコプラズマ抗体、肺炎クラミジア抗体、耳鼻咽喉科検査、上部消化管内視鏡検査（必要時）とする。

薬剤の有効性に関連する因子（喘息・COPDなど）も検討を要する。今後は例えば、患者の安静時の呼吸回数などを検討することや、極細気管支鏡などを使用することで、古典的に咳の原因として従来より指摘されている咳の原因である末梢気道レベルでの伸展レセプターの問題を検討することが可能となれば検討を行いたい。

気腫化を伴う間質性肺炎の臨床的・画像的特徴

中畑亜希子¹ 酒井 文和² 臼井 裕¹ 小林 国彦¹
永田 真¹ 萩原 弘一¹ 金澤 實¹

今回我々は気腫化を伴った間質性肺炎の、臨床的・画像的特徴と喫煙の関与について検討した。胸部 HRCT 所見より、肺気腫 (PE) 群、小葉中心性肺気腫を伴わない特発性肺線維症 (IPF) 群、小葉中心性肺気腫を伴う間質性肺炎 (SRIPE) 群の 3 群を設定し、蜂巣肺、小葉中心性肺気腫、壁の厚い嚢胞 (thick-walled large cyst: TWLC) の拡がりを各スライスでスコア化した。喫煙歴は、PE 群 100%、IPF 群 67%、SRIPE 群 100% に認められ、平均喫煙指数は 79, 32, 67 pack-years であった。TWLC スコアは 8.8, 22.2, 95.0 で、SRIPE 群で有意に高値であった。

Clinical and Radiographic Features of the Patients with Interstitial Pneumonia with Pulmonary Emphysema

Akiko Nakahata¹, Fumikazu Sakai², Yutaka Usui¹, Kunihiro Kobayashi¹
Makoto Nagata¹, Koichi Hagiwara¹, Minoru Kanazawa¹

1) Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical University

2) Department of Radiology, Saitama Medical University International Center

The aim of this study is to explore clinical and radiographic features of the patients with interstitial pneumonia with pulmonary emphysema. Possible influence of smoking on their features were also evaluated. The subjects consisted of 19 patients with pulmonary emphysema without IP (PE), 18 patients with IPF without obvious centrilobular emphysema (IPF), and 22 patients with smoking-related interstitial pneumonia with pulmonary emphysema (SRIPE). The percentage of smoking history was 100% in the PE group, 67% in IPF, and 100% in the SRIPE group. The mean smoking index was 79, 32, and 68 pack-years, respectively. We assessed the presence, extent, and the distribution of honeycombing, emphysema, and thick-walled large cyst (TWLC). TWLC was more frequently seen in the IPF group as well as in the SRIPE group, compared with the PE group. TWLC extent score was 8.8, 22.2, and 95.0 in each group and was significantly higher in the SRIPE group. These data suggests that smoking may be relevant to the development of TWLC in the patients having IPF.