

- International Forum on Medical Imaging in Asia 2009 (2009.01.19-21 Taipei).*
3. Nakai J, Saita S, Kubo M, Kawata Y, Niki N, Nakano Y, Ohmatsu H, Tominaga K, Eguchi K, Moriyama N. A Computer-aided Diagnosis System for Pulmonary Emphysema. *International Forum on Medical Imaging in Asia 2009 (2009.01.19-21 Taipei).*
 4. Sasada H, Matsuhira M, Saita S, Kubo M, Kawata Y, Niki N, Nakano Y, Oguma T, Matsumoto H, Niimi A, Nishitani H, Ohmatsu H, Eguchi K, Kaneko M, Moriyama N. Classification algorithm lobe for multi-slice CT images. *International Forum on Medical Imaging in Asia 2009 (2009.01.19-21 Taipei).*
 5. Akashi K, Saita S, Kubo M, Kawata Y, Niki N, Nakano Y, Nishitani H, Ohmatsu H, Eguchi K, Kaneko M, Moriyama N. Bronchial Wall Regions Extraction Algorithm using Multi Slice CT Images. *SPIE Medical Imaging (2009.02.08-12 Florida).*
 6. Nakano Y. Quantitative CT analysis of lung diseases. Invited Lecture -University of Medicine and Pharmacy at Hochiminh City' Conference-. (2009.08.01 Ho chi minh (Vietnam)).
 7. Seto R, Wada H, Sakashita T, Masuda G, Kanda R, Sakaguchi C, Yamada H, Osawa M, Nagao T, Nakano Y. Williams-Campbell syndrome treated by the combination of a long term home oxygen therapy and a noninvasive positive pressure ventilation. *14th Congress of The Asian Pacific Society of Respiriology. (2009.11.14-18 Seoul).*
 8. 中野恭幸. キーノートレクチャー: CT による COPD の定性及び定量診断. 第1回呼吸機能イメージング研究会学術集会 (2009.01.30-31 京都).
 9. 松廣幹雄, 財田伸介, 久保満, 河田佳樹, 仁木登, 中野恭幸, 高橋雅士, 西谷弘, 大松広伸, 江口研二, 金子昌弘, 森山紀之. マルチスライス CT 画像の肺葉・肺区域分割法. 第1回呼吸機能イメージング研究会学術集会 (2009.01.30-31 京都).
 10. 明石健吾, 尾崎勇, 財田伸介, 久保満, 河田佳樹, 仁木登, 中野恭幸, 富永慶晤, 大松広伸, 江口研二, 森山紀之. マルチスライス CT 画像を用いた気管支壁の定量的解析法 -気管支壁と呼吸器疾患との関連の定量的評価. 第1回呼吸機能イメージング研究会学術集会 (2009.01.30-31 京都).
 11. 中井潤, 財田伸介, 久保満, 河田佳樹, 仁木登, 中野恭幸, 大松広伸, 富永慶晤, 江口研二, 森山紀之. マルチスライス CT 画像を用いた肺葉別気腫性病変の定量化と肺機能検査の比較評価. 第1回呼吸機能イメージング研究会学術集会 (2009.01.30-31 京都).
 12. 松廣幹雄, 財田伸介, 久保満, 河田佳樹, 仁木登, 中野恭幸, 高橋雅士, 西谷弘, 大松広伸, 江口研二, 金子昌弘, 森山紀之. マルチスライス CT 画像の肺葉・肺区域分割法. 第16回日本 CT 検診学会学術集会 (2009.02.13-14 横浜).
 13. 永谷幸裕, 新田哲久, 大谷秀司, 村上陽子, 高橋雅士, 村田喜代史, 手塚則明, 中野恭幸. 多発性筋炎の経過中に発生した多発空洞性陰影の一例. 第49回胸部画像検討会 (2009.02.21 大阪).
 14. 財田伸介, 高橋英治, 河田佳樹, 仁木登, 大松広伸, 富永慶晤, 江口研二, 金子昌弘, 森山紀之, 中野恭幸, 三嶋理晃. 肺癌・肺気

- 腫検出システム. 第 4 回京滋呼吸器リサーチフォーラム (2009.04.11 京都).
15. 大澤真,長尾大志,中野恭幸,土井健司.結核の疾患活動性に影響を与える因子の検討. 第 48 回日本公衆衛生学会近畿地方会 (2009.05.19 堺).
16. 松廣幹雄, 財田伸介, 河田佳樹, 仁木登, 中野恭幸, 高橋雅士, 西谷弘, 大松広伸, 江口研二, 金子昌弘, 森山紀之. 肺がん CT 検診のための画像選別法. 電子情報通信学会. (2009.5.28 岐阜).
17. 松廣幹雄, 財田伸介, 河田佳樹, 仁木登, 中野恭幸, 高橋雅士, 西谷弘, 大松広伸, 江口研二, 金子昌弘, 森山紀之. マルチスライス CT 画像の肺葉・肺区域分割法. 電子情報通信学会. (2009.07.10 徳島).
18. 中野恭幸. 進化する COPD 診療. 日本呼吸器学会中国四国支部. (2009.07.18 松江).
19. 中野恭幸. COPD の診断と治療～update2009～. 近江八幡東近江 COPD 臨床談話会. (2009.07.30 近江八幡).
20. 松廣幹雄, 財田伸介, 河田佳樹, 仁木登, 中野恭幸, 高橋雅士, 西谷弘, 大松広伸, 江口研二, 金子昌弘, 森山紀之. マルチスライス CT 画像の肺葉・肺区域分割法. 日本医用画像工学会大会. (2009.08.04-05 名古屋).
21. 財田伸介, 高橋英治, 河田佳樹, 仁木登, 大松広伸, 江口研二, 土田敬明, 金子昌弘, 森山紀之, 中野恭幸, 三嶋理晃. 肺がん CT 検診のコンピュータ診断支援システム. 第 9 回日本 VR 医学会学術大会. (2009.8.29 東京).
22. 中野恭幸. 肺の解剖生理、機能. 第 5 回滋賀 COPD 管理講習会. (2009.10.25 大津).
23. 中野恭幸. COPD 新ガイドラインにおける薬物療法. 第 19 回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会【ランチョンセミナー】. (2009.10.31 東京).
24. 松廣幹雄, 財田伸介, 河田佳樹, 仁木登, 中野恭幸, 高橋雅士, 西谷弘, 大松広伸, 江口研二, 金子昌弘, 森山紀之. マルチスライス CT 画像の葉間裂抽出法. 電子情報通信学会. (2009.11.11 大阪).
25. 梶田元, 瀬戸瑠里子, 神田理恵, 和田広, 坂口才, 大澤真, 長尾大志, 中野恭幸. 多発性骨髄腫に合併した AL アミロイドーシスの一例. 第 74 回日本呼吸器学会近畿地方会. (2009.12.12 大阪).
26. 瀬戸瑠里子, 梶田元, 神田理恵, 和田広, 坂口才, 山田英人, 長尾大志, 中野恭幸. Bevacizumab 硝子体内注射に伴い肺胞出血を来した一例. 第 74 回日本呼吸器学会近畿地方会. (2009.12.12 大阪).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきことなし

特発性肺動脈性肺高血圧に関する研究

研究協力者 草野研吾、赤木 達、中村一文、伊藤 浩

研究要旨 高容量エポプロステノールは肺動脈平滑筋細胞のアポトーシスを誘導し、肺高血圧の肺動脈圧低下に関与する。

A. 研究目的

特発性肺動脈高血圧症 (IPAH) に対するエポプロステノールの臨床的容量は 25~40ng/kg/min とされているが至適容量は未だ不明である。そこで、高容量エポプロステノールが IPAH 患者の血行動態に及ぼす影響と、肺組織のアポトーシスに及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

16 人の IPAH 患者（女性 11 名、男性 5 名、平均エポプロステノール 100.7±35.4 ng/kg/min）において、血行動態を右心カテーテルで評価し、肺移植時の摘出肺から分離した肺組織を用い、TUNEL assay を用いてアポトーシスに及ぼす影響を評価した。さらに、in vitro で IPAH 患者から得られた肺動脈平滑筋細胞の培養系を用い、エポプロステノールのアポトーシスに及ぼす影響を TUNEL, caspase3, 7 assay を用いて検討しさらに survivin の発現も検討した。

（倫理面への配慮）

当大学の倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

エポプロステノール投与前に比べ、平均肺動脈圧は-26%、肺動脈血管抵抗は-66%と著明な改善を認めた。肺組織では、アポトーシス細胞を高容量エポプロステノールが投与された IPAH 患者に多く認め、in vitro の肺動脈平滑筋細胞の培養系では、高容量エポプロステノールにおいて、TUNEL 陽性細胞、活性化 caspase-3, 7 細

胞をより多く認め、さらにエポプロステノールは survivin の発現を抑制していた。

D. 考察

従来、エポプロステノール治療効果は PG12 の直接作用である血管拡張作用と血小板凝集抑制作用が考えられていたが、今回の検討により、上記に加え高容量では肺動脈平滑筋のアポトーシス誘導が血管の negative remodeling を引き起こし、肺動脈圧低下に強く結び付いていることが示唆された。

E. 結論

高容量エポプロステノールは肺動脈平滑筋細胞のアポトーシスを誘導し、肺高血圧改善に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 赤木達、草野研吾：肺動脈性肺高血圧 抗凝固療法. 日本臨床 66:2174-2178,2008.
2. Ikeda T, Nakamura K, Akagi S, Kusano KF, Matsubara H, Fujio H, Ogawa A, Miura A, Miura D, Oto T, Yamanaka R, Otsuka F, Date H, Ohe T, Ito H. Inhibitory Effects of Simvastatin on Platelet-derived Growth Factor Signaling in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension.

J Cardiovasc Pharmacol. 2009.

3. Aokage K, Date H, Okazaki M, Sano Y, Oto T, Kusano K, Goto K, Sano S, Miyoshi S. Living-donor lobar lung transplantation and closure of atrial septal defect for adult Eisenmenger's syndrome. *J Heart Lung Transplant.*, 28(10):1107-1109, 2009
4. Toyooka S, Kusano KF, Goto K, Masaomi Y, Oto T, Sano Y, Fuke S, Okazaki M, Ohe T, Kasahara S, Sano S, Date H. Right but not left ventricular function recovers early after living-donor lobar lung transplantation in patients with pulmonary arterial hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 138(1):222-226, 2009.
5. Toyooka, S., Sano, Y., Yamane, M., Oto, T., Okazaki, M., Kusano, K. F., and Date, H. : Long-term follow-up of living-donor single lobe transplantation for idiopathic pulmonary arterial hypertension in a child. *J Thorac Cardiovasc Surg,* 135 (2), 451-2, 2008

2. 学会発表

American Heart Association Scientific Session 2008, New Orleans, US (Circulation 118; suppl 2: S1074, 2008

The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka, 2009 (Circulation J 73; suppl 1: 202, 2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他 特記事項なし

研究報告

COPD の発症機序に関する研究

東京女子医科大学 第一内科学 青柴和徹、周方、永井厚志

はじめに

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は加齢とともに増加する疾患である¹⁾。近年の COPD 患者の増加は、高齢者人口の増大を背景としていることから、加齢による COPD の発症促進機序を解明することは厚生労働行政ならびに社会医学的にみても重要な課題である。さらに近年では COPD の病変が肺に限局性ではなく、全身性炎症を背景としたさまざまな全身性疾患を併存し、生命予後に悪影響を与えることが知られている²⁾。しかしながら全身性炎症が COPD の結果だけではなく、COPD の原因になるかについては不明である。そこで私どもは、COPD の発症機序における肺の老化および全身性炎症の役割について検討した。過去の私どもの研究から、COPD 患者の肺組織には老化した肺胞上皮細胞が蓄積していることが知られていたが³⁾、今年度の研究では気道上皮細胞の老化が気道の再生障害と炎症の原因になることが知られた。

対象と方法

1. COPD における気道の老化についての研究

動物実験（東京女子医科大学実験動物倫理委員会 09-45 にて許可）においては、クララ細胞の老化を誘導するために、雄 C57/BL6 マウスに 3 週間連続して、週 1 回クララ細胞を傷害するナフタレン（200 mg/kg）または溶媒を腹腔内に注射した。薬剤投与の翌日から 3 日間老化を誘導させるために Bromodeoxyuridine (BrdU、200 mg/kg) または溶媒を腹腔内に投与した⁴⁾。薬剤の最終投与から 1 週間後（実験開始から 4 週後）に肺を摘出した。凍結およびパラフィン固定の肺組織切片を作製して

senescence-associated (SA) β -galactosidase 活性および免疫組織染色 [抗 CC10、抗 CD45、抗 CD90.2、抗 phospho-p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) 抗体] を行い、末梢気道のクララ細胞の老化と気道炎症の関係について検討した。一部のマウスについては BrdU を投与する直前に毎回 p38-MAPK 阻害薬 (SB202190) を腹腔内に注射した。

細胞実験においては、クララ細胞様 (NCI-H441) 細胞を、テロメラーゼ阻害薬 (2,6-bis(3-(N-pipendino)propionamido)anthracene-9,10-dione、1 μ M) または BrdU (25 μ m) を添加して 3 週間継代培養し、細胞老化を誘導した。その後上清を回収し、ELISA 法によりサイトカイン濃度を測定した。細胞成分については SA β -galactosidase 染色を行うとともに、ウエスタンブロッッキング法を用いて p38-MAPK の活性化を測定した。

2. COPD における全身性炎症についての研究

持続性の軽度の全身性炎症が COPD の肺病変の原因になるかについて マウスを用いた研究を行った。雄 C57/BL6 マウスの頸部皮下組織にリポポリサッカライド (LPS) ペレット (LPS from E. coli 0127:B8、0.4mg、Innovative Research of America) を埋入し、低用量の LPS を長期間 (3 か月間) 放出させることにより軽度の全身性炎症を持続させた⁵⁾。1 か月および 3 か月後に肺を摘出して組織学的検索を行った。

結果

1. COPD の気道の老化についての研究

ナフタレンと BrdU を 3 週間反復して腹腔内に注射したマウスでは、ナフタレンのみを腹腔内注射したマウスに比べて、末梢気道のクララ

細胞が老化し (SA β -galactosidase が陽性)、クララ細胞 (CC10 陽性細胞) の再生が抑制されていた (図 1)。さらにクララ細胞が老化した気道周囲には白血球 (CD45 陽性細胞) や T リンパ球 (CD90.2 陽性細胞) の浸潤が観察された (図 2)。またナフタレンと BrdU を腹腔内注射したマウスではクララ細胞の p38-MAPK のリン酸化が観察された。そこで p38-MAPK 阻害薬を腹腔内注射したところ、クララ細胞の再生は改善しなかったが、ナフタレンと BrdU の腹腔内注射により誘導された白血球の浸潤が抑制されていた (図 3)。

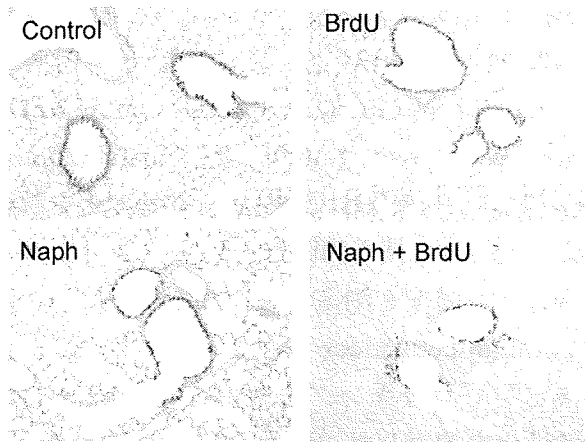


図 1 マウス肺組織の抗 CC10 免疫染色。ナフタレンと BrdU を腹腔内に反復投与されたマウスでは、ナフタレンの傷害開始から 1 か月経過後もクララ細胞が再生していない。

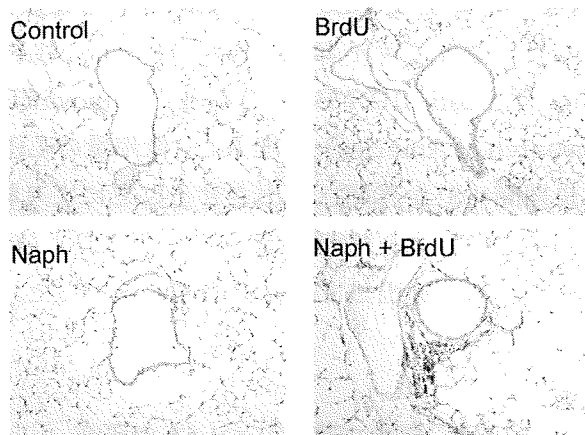


図 2 マウス肺組織の抗 CD90.20 免疫染色。ナフタレンと BrdU を腹腔内に反復投与されたマウスでは、ナフタレンの傷害開始から 1 か月経過後も気道周囲に T リンパ球の浸潤が持続している。

テロメラーゼ阻害薬または BrdU を 3 週間添加培養した NCI-H441 細胞では、細胞増殖率 (population doubling) が低下し、senescence-associated β -galactosidase の高度発現がみられ、細胞老化が誘導された。ELISA 法で培養上清中の炎症性サイトカイン濃度を測定したところ、老化細胞では非老化細胞に比べて IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF α 、GM-CSF の産生量が有意に増加していた (図 4)。同時に老化細胞では p38-MAPK のリン酸化も観察された (図 5)

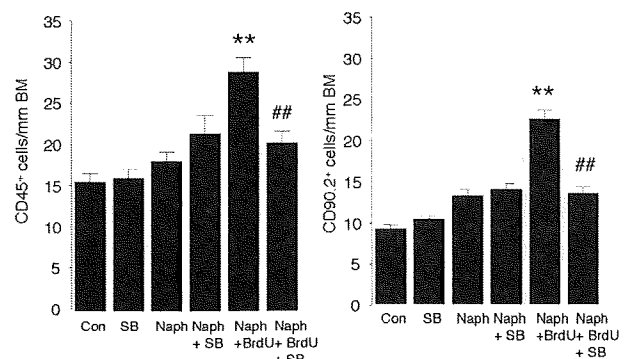


図 3 p38-MAPK 阻害薬 (SB202190) の投与によるナフタレンと BrdU 注射後の気道炎症の抑制。**P<0.01 vs control 群。##P<0.01 vs naphthalene + BrdU 群。

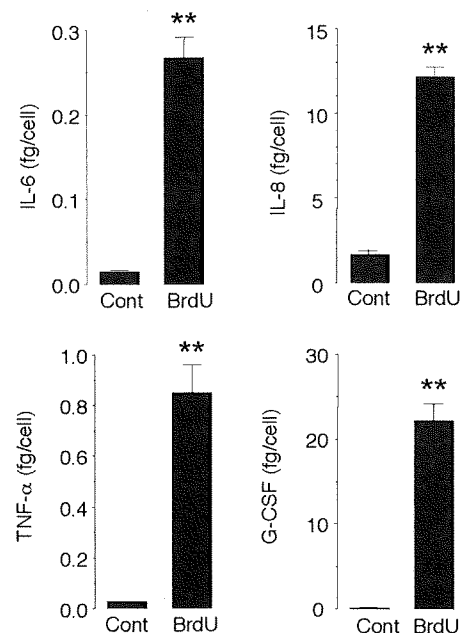


図 4 BrdU の添加培養により老化したクララ細胞からの炎症性サイトカインの産生増加。**P<0.01 vs control。

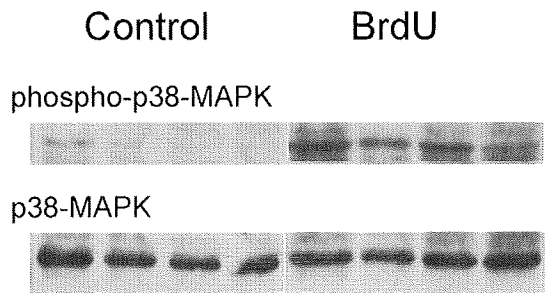


図 5 BrdU の添加培養により老化したクララ細胞様 (NCI-H441) 細胞における p38-MAPK のリン酸化。

2. COPD における全身性炎症についての研究
LPS ペレット (0.4mg) を頸部皮下に埋入して 3 か月間低用量の LPS に全身曝露したマウスでは、気道や肺胞領域の病変は観察できず、平均肺胞壁間距離 (Lm) も対照マウスと比べて変化しなかった。現在、LPS 量を 3mg に増量したペレットを用いて再度実験を行っている。

考察

2007 年度の研究において、COPD 患者の末梢気道ではクララ細胞の p16 陽性率が増加しており、非喫煙者に比べて細胞の老化が進行していることが示された。そこで今年度の研究では、COPD の発症機序におけるクララ細胞の役割を検討するために、マウスや培養細胞を用いた実験を行った。その結果、1) クララ細胞が老化したマウスでは気道上皮傷害後の再生が抑制されること；2) クララ細胞が老化した気道周囲には炎症細胞の浸潤がみられること；3) 老化したクララ細胞では p38-MAPK が活性化しており、p38-MAPK 阻害薬の投与により気道周囲の炎症が改善することが示された。以上の成績から、COPD 患者におけるクララ細胞の老化は、気道の修復反応を抑制するとともに p38-MAPK を活性化して持続性の気道炎症の原因になることが示唆された⁶⁾。

近年では COPD の病変は肺に局限性ではなく、

全身性炎症を介して動脈硬化や虚血性心疾患、骨粗鬆症、抑うつ、貧血などの原因となることが知られている²⁾。私どもは全身性炎症が COPD の結果だけではなく、COPD の肺病変の原因になる可能性を検討するためにマウスに少量の LPS を 3 か月間全身曝露した。しかしながら第 1 回目の実験 (曝露量 0.4mg LPS) では気道や肺胞領域に病変は認められなかった。現在、曝露量を増加して再実験を行っている。

結論

COPD 患者ではクララ細胞の老化が進行しているが、細胞老化が気道の慢性炎症を引き起こす原因となることが示された。私どもの研究成績は、高齢者に COPD 患者が好発する原因の一部を説明しうる可能性があると考えられた。

参考文献

1. MacNee W. Accelerated lung aging: a novel pathogenic mechanism of chronic obstructive lung disease. *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 819-823.
2. Barnes PJ, Cell BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009; 33: 1165-1185.
3. Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A. Alveolar cell senescence in pulmonary emphysema patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 886-893.
4. Suzuki T, Minagawa S, Michishita E, Ogino H, Fujii M, Mitsui Y, Ayusawa D. Induction of senescence-associated genes by 5-bromodeoxyuridine in HeLa cells. *Exp Gerontol* 2001; 36: 465-474.
5. Smith BJ, Lightfoot SA, Lerner MR, Denson KD, Morgan DL, Hanas JS, Bronze MS, Postier RG, Brackett DJ. Induction of cardiovascular pathology in a novel model

of low-grade chronic inflammation.
Cardiovasc Pathol 2008; 18: 1-10.

6. Aoshiba K, Nagai A. Senescence hypothesis
for the pathogenetic mechanism of COPD.
Proc Am Thorac Soc 2009; 6:596-601.

SMP30 ノックアウトマウスにおけるビタミン C の肺気腫予防効果の検討

順天堂大学呼吸器内科¹、東京都老人総合研究所・老化制御²

小池建吾¹、関谷充晃¹、吉見格¹、児玉裕三¹、高橋和久¹、瀬山邦明¹

近藤義高²、石神昭人²、丸山直記²

はじめに

慢性閉塞性疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD)は、中高年以上に発症が多く見られ、発症には加齢と酸化ストレスが重要な役割を担っている¹。2005年の世界死因では第4位となり、COPDの罹患率の高さや医療経済における負担の大きさから世界的に研究が進められている。大気汚染や高齢化社会の進行により更に罹患が増加することが予想されるが、禁煙以外には有効な予防あるいは治療方法がないのが現状である。強力な抗酸化物質であるビタミン C (VC) は、酸化ストレスを軽減し、肺を酸化ストレスによる障害から保護する可能性がある。呼吸機能の低下とVCの摂取量には負の相関があり²、慢性喫煙により血清中のVC濃度が低下する³と報告されている。COPDは有害ガスに長期間曝露することにより発症する慢性疾患であり、日々の生活の中で安全に摂取可能なVCの研究は非常に重要である。しかし、人では膨大な年月を要するという難点があり、またマウスやラットでは体内でVCを生合成するためVCの研究には有用ではないという問題がある。

加齢指標蛋白 Senescence Marker Protein 30 (SMP30)はマウスの諸臓器に発現され、性差の影響を受けずに加齢により減少する事が報告された新しい蛋白質である⁴。SMP30の機能を解析する為に、我々は野生型マウス (C57BL/6)を遺伝的背景にSMP30が欠損したマウス(SMP30 KO マウス)を開発した。そして、SMP30はVC合成酵素のグルコノラクトナーゼである事を発見し、SMP30 KO マウスはVCが合成できず、VCを食餌により補充しなければ壊血病になることを明らかにした⁵。さらに、我々は通常食餌下ではSMP30 KO マウスはVC

欠乏状態となり、2ヶ月間という短期間の喫煙で肺気腫が生じる事も報告している⁶。

肺とVCについての既報告から、VC不足状態はCOPD発症のリスクとなりうる事が予想される。そこで本研究では、SMP30 KO マウスに対するVC投与量を調節し、VCの肺気腫発生に対する予防効果を検討した。

対象と方法

動物:SMP30 KO マウス。

餌・飲料水:離乳 (1ヶ月齢)までは通常食で飼育し、その後はVC欠乏食餌であるCL-2 (日本クレア株式会社)に変更した。VC水は、アスコルビン酸を超純水製造装置 (Milli-Q)から得られた超純水で10 μ M EDTA (pH8.0)液を調整し、これにVC濃度が1.5g/Lとなるように希釈し、濾過滅菌 (0.45 μ m filter)を行った。

飼育・喫煙方法:SMP30 KO マウスをA~D (n = 6)の4群に設定し、3ヶ月齢まで十分量のVCを摂取させた (1.5g/L VC水)。その後、AとB群のみVC欠乏状態 (壊血病予防量の0.0375g/L VC水)に変更して飼育した (以下、AとB群、VC少量投与群; CとD群、VC十分量投与群)。さらに、4ヶ月齢~6ヶ月齢の8週間にわたって新鮮大気 (AとC群)あるいはタバコ煙 (BとD群)に曝露させた。具体的には、喫煙曝露装置 SG-200[®] (柴田科学社)を使用して、希釈濃度 2.0~2.5%のタバコ煙で、1日30分、週5回の喫煙を行った。そして、喫煙曝露終了後に解剖を行った。

解剖方法および評価項目:マウスをネンブタールで麻酔後に開腹・開胸し、心臓より採血して脱血死させる。そして、右心室より肺動脈にカニューレ

を挿入し、肺を灌流・脱血する。主気管支にカニューレを挿入し、気管支肺胞洗浄液を回収後に、肺を摘出した。肺組織中の酸化ストレス評価として、VC 濃度、活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS), 過酸化脂質(thiobarbituric acid reactive substances:TBARS), 抗酸化酵素(glutathione peroxidase:GSH-Px)を測定した。また、肺組織の形態計測として、肺胞壁間平均直線距離 (mean liner intercepts:MLI), 肺胞破壊指標 (destructive index:DI)を測定した。

結果

肺組織中の VC 濃度 (Figure 1): VC 少量投与群 (A と B 群) は、VC 十分量投与群 (C と D 群) と比較して、有意に肺組織中の VC 濃度が低値であった。また、2 ヶ月間の喫煙負荷では VC 濃度の有意な変化は認めなかった。

気管支肺胞洗浄液中の総細胞数 (Table 1): VC

少量投与群と十分量投与群の両群で、喫煙負荷によって、有意な気管支肺胞洗浄液中の総細胞数の増加を認めた。細胞分画に関しては、全 4 群間で有意な差はなく、90%以上がマクロファージで占められていた。

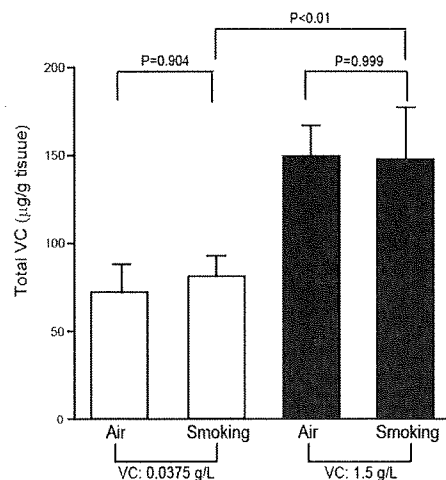


Figure 1. 肺組織中の VC 濃度

Table 1. 気管支肺胞洗浄液中の総細胞数

	Total cell count ($\times 10^5$)	%Macrophages	%Lymphocytes	%Neutrophils
<u>VC 0.0375 g/L</u>				
Air	1.2 \pm 0.3	92.4 \pm 1.3	4.8 \pm 1.0	1.5 \pm 0.6
Smoking	1.8 \pm 0.3*	93.5 \pm 2.0	4.5 \pm 1.3	1.8 \pm 0.5
<u>VC 1.5 g/L</u>				
Air	1.0 \pm 0.1	92.8 \pm 1.9	5.3 \pm 1.1	1.7 \pm 0.9
Smoking	1.4 \pm 0.1†	94.5 \pm 1.6	3.5 \pm 0.6	1.8 \pm 0.5

Values are expressed as mean \pm SD of six animals.

* p < 0.05 when compared with Air (VC 0.0375 g/L).

† p < 0.05 when compared with Air (VC 1.5 g/L).

肺の形態学的変化 (Figure 2, 3, 4):

VC 少量投与群において、喫煙負荷によって有意な MLI・DI の増大を認めた。DI 値が 10%以上は有意な破壊とされ⁷, VC 少量投与状態では、2 ヶ月間の喫煙で SMP30 KO マウスに肺気腫が生じた事を示している。一方、VC 十分量投与群においては、

喫煙負荷によって有意な MLI の増大を認めたが、VC 少量投与群と比較すると MLI の変化は軽度であった。そして、DI も 10%未満であり、VC を十分量投与することによって、喫煙による肺気腫発生は予防された。

肺組織中の ROS・TBARS (Figure 5, 6) :

ROS ならびに酸化ストレス障害マーカーである TBARS を測定した結果, VC 少量投与群では喫煙負荷によって有意な肺組織中の ROS・TBARS の増加を認めた. 一方, VC 十分量投与群では, 喫煙負荷を行っても有意な ROS・TBARS の増加は認め

ず, 十分量の VC を投与することによって, 喫煙による酸化ストレスの亢進も抑えられた.

肺組織中の GSH-Px (Figure 7) :

全 4 群間で肺組織中の GSH-Px に有意な差は認めず, VC の投与量や喫煙負荷によって, GSH-Px は影響を受けなかった.

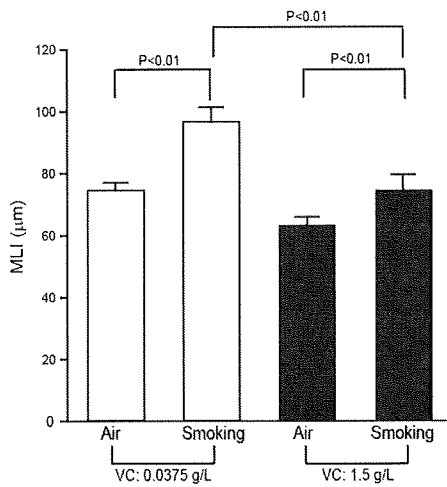


Figure 2. MLI

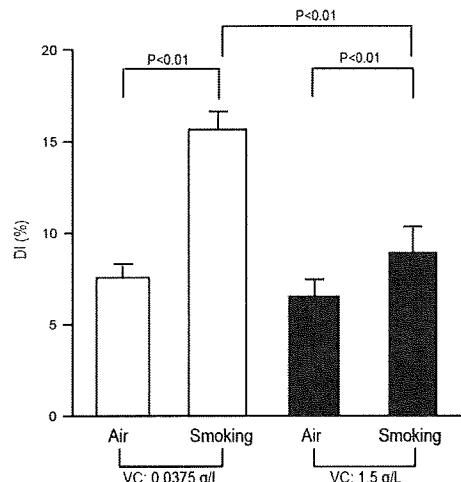


Figure 3. DI

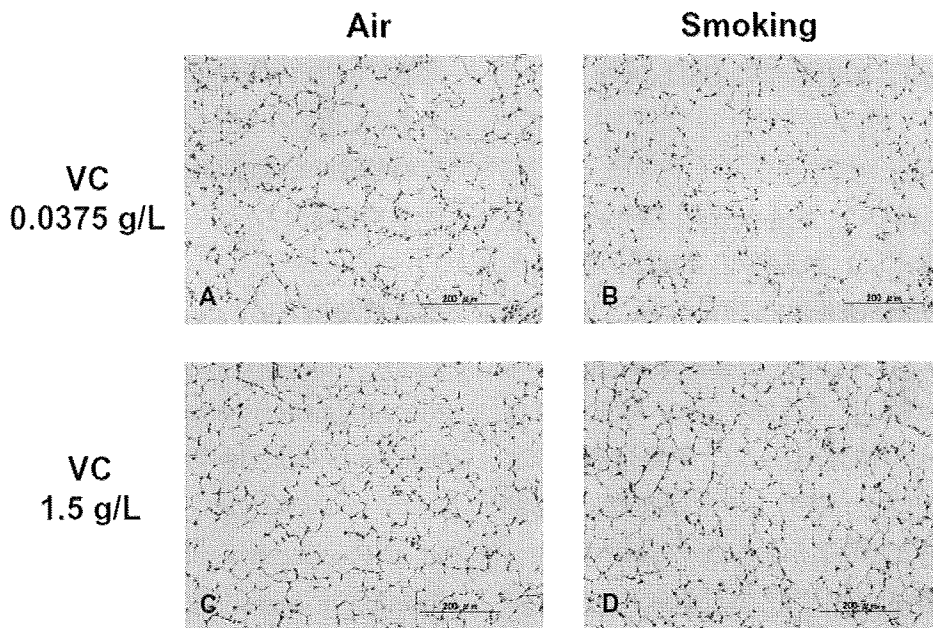


Figure 4. 肺病理像
{hematoxyline-eosin (HE) 染色}

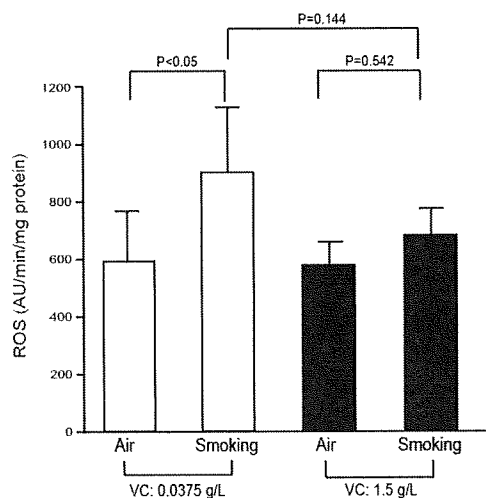


Figure 5. 肺組織中の ROS

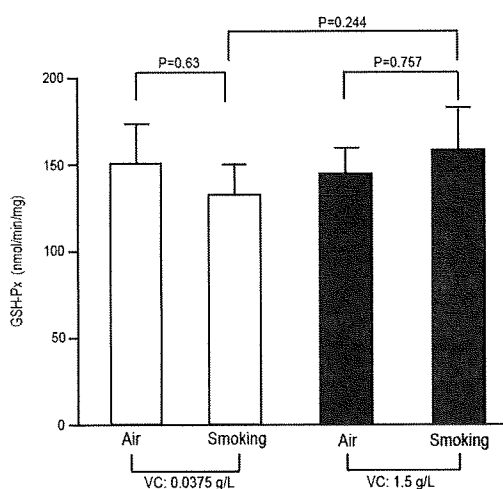


Figure 7. 肺組織中の GSH-Px

考察

VC 少量投与群では、一般に野生型マウスに必要とされる期間の 1/3 である 2 ヶ月間の喫煙で、SMP30 KO マウスに酸化ストレスの亢進による肺気腫が生じた。そして、VC を十分量投与することによって、酸化ストレスの亢進は抑えられ、肺気腫は生じなかった。以上の結果から、VC 不足は喫煙による肺気腫発症のリスクであり、VC には喫煙による肺気腫発生を予防する効果があることが示唆された。

本研究では、酸化ストレスに焦点をあてて評価を行った。しかしながら、COPD 発症には、加齢、炎症、酸化ストレス、プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡、vascular endothelial growth factor

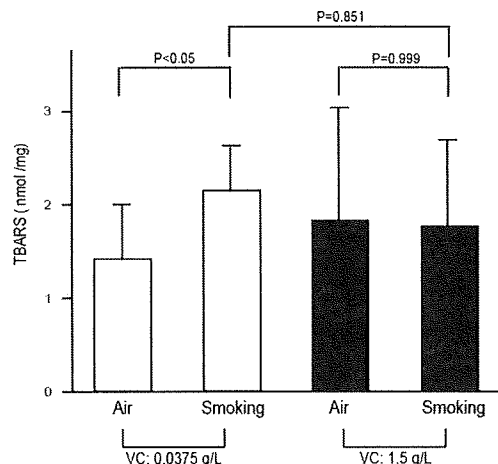


Figure 6. 肺組織中の TBARS

(VEGF)の活性阻害、アポトーシス等の様々な因子の関与が考えられている¹。これまでに、我々は VC 欠乏状態の SMP30 KO マウスに喫煙負荷を行うと、酸化ストレスの亢進以外にアポトーシスが誘導されることを確認している⁶。VC の肺保護作用のメカニズム解明のためには、今後は酸化ストレスやアポトーシス以外の因子についても評価することが必要である。

SMP30 KO マウスは、ヒトと同様に VC 合成能を欠き、短期間の喫煙で肺気腫を再現できる COPD モデル動物である。臨床像が数十年を経て顕在化する COPD の研究は容易ではないが、SMP30 KO マウスを用いることにより、タバコ煙による COPD 発症機構や VC の COPD 治療効果を解明できる可能性が期待される。

参考文献

- 1 MacNee W, Tuder RM. New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease I. *Proc Am Thorac Soc.* 2009; 6: 527-31.
- 2 McKeever TM, Scrivener S, Broadfield E, *et al.* Prospective study of diet and decline in lung function in a general population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 1299-303.
- 3 Smith JL, Hodges RE. Serum levels of vitamin C in relation to dietary and supplemental

intake of vitamin C in smokers and nonsmokers. *Ann N Y Acad Sci.* 1987; 498: 144-52.

4 Fujita T, Uchida K, Maruyama N. Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1116: 122-8.

5 Kondo Y, Inai Y, Sato Y, *et al.* Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 5723-8.

6 Sato T, Seyama K, Sato Y, *et al.* Senescence marker protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging, and smoking. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174: 530-7.

7 Teramoto S, Fukuchi Y, Uejima Y, *et al.* A novel model of senile lung: senescence-accelerated mouse (SAM). *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150: 238-44.

COPD 患者における血中アクロレイン濃度の検討

信州大学医学部内科学第一講座¹

信州大学保健学科検査技術科専攻生態情報検査学講座²

○伊東 理子¹ 花岡 正幸¹ 北口 良晃¹ 藤本 圭作² 久保 恵嗣¹

はじめに

アクロレインはタバコ煙中に含まれる毒性が強いアルデヒドで、アクロレインの吸入もしくは、腹腔内投与した動物で（ラット、イヌ、サル）で肺気腫・慢性気管支炎の報告があることから、COPDの原因物質の一つと考えられている¹⁾。

<アクロレインの毒性発現機序>

アクロレインは極めて反応性が高く、暴露部位においてグルタチオン抱合などによる細胞防御機構が飽和し、過剰のアクロレインがタンパク質やペプチドのSH基と結合することによって毒性が生じると考えられている。肺胞マクロファージへのアクロレインの暴露実験では、濃度依存性にネクロシス、アポトーシスを来とし、細胞障害性、選択的なストレス反応ならびに機能障害性があると報告されている²⁾。

この他にもアクロレインは、NF- κ B pathwayを抑制することによって、免疫応答を低下させることや、DNA障害性も報告され、COPDにおける感染症や喫煙による癌化の機序にも関与している可能性がある³⁾。

<アクロレインの代謝について>

アクロレインの代謝経路は肝臓や腎臓におけるグルタチオン抱合に続く経路と、腎臓におけるシスチン抱合に続く経路と考えられている。ラットへ経口投与した場合、24時間以内に78.5%が代謝物として排泄され、吸入暴露では21.5%が代謝物(3-hydroxypropyl mercapturic acid)として尿中に排泄されたとの報告がある⁴⁾⁵⁾。ヒトでは、喫煙者は非喫煙者と比較し、尿中へのアクロレイン代謝物の排泄が2倍で、禁

煙4週間で尿中への代謝産物の排泄は78%低下したとの報告があり⁶⁾、一部は吸収されると考えられるが、吸入暴露では、基本的には気道に停留し、全身循環への影響は少ないと考えられている。

以上より、喫煙によるアクロレインは気道に停留し全身への影響は低いと考えられるが、アクロレインとCOPDの関連を検討するため、まずCOPD患者と喫煙歴のある対象者間で血中のアクロレイン値を比較した。

対象と方法

COPD群 : 125名

信州大学医学部附属病院に受診し、喫煙歴を有する患者で、① 気管支拡張薬投与後FEV1.0/FVC < 70% or FEV1.0/FVC < 70%かつ%FEV1.0 < 60% ② COPDの以外の気流制限を呈する疾患を除外

コントロール群 : 64名

健康診断・人間ドック目的で当科の関連病院を受診し、① 50歳以上、10pack years以上の喫煙歴のある健康人 ② FEV1.0/FVC > 70%、%FVC > 80%

方法

①COPD群(n=125)と喫煙歴のあるコントロール群(n=64)の血漿中のアクロレイン濃度(アクロレインがリジン残基に付加して生じたアクロレイン付加体)をELISA法にて測定し両群間で比較した。

②COPD群、コントロール群の中で、喫煙によるアクロレインの影響がないEx-smoker(禁煙後2年以上経過している者)について、アクロレ

イン濃度を比較した。

③COPD 群とコントロール群の血漿中の酸化ストレスを BAP テスト (Biological Anti-oxidant Potential : 抗酸化力分析) と、d-ROM テスト (Reactive Oxygen Metabolites : 酸化ストレス度分析) にて評価し、両群の酸化ストレスを比較。COPD 群、コントロール群の Ex-smoker 間で、酸化ストレスを比較した。

COPD 群で重症度と Acrolein 濃度、酸化ストレスの関連を比較した。

結果

Table 1 に COPD 群、コントロール群、両群の患者背景を示す。両群間で、年齢、喫煙歴に有意差を認めた。

Table 1 COPD 群 コントロール群 背景

	COPD 群	コントロール群	COPD 群 Ex smoker	コントロール群 Ex smoker
Number	125	64	66	25
年齢	70.9±7.5	63.0±6.6 *	73.6±6.2	63.8±7.2 *
性別 (M/F)	121 / 4	62 / 2	65 / 1	25 / 0
喫煙歴 (pack years)	56.2±28.3	39.1±12.6 *	57.8±28.6	39.4±11.8 *
FEV ₁ (L)	1.68±0.62	2.57±0.41 *	1.61±0.65	2.58±0.37 *
FEV ₁ % predict	61.8±21.1	85.1±10.2 *	61.4±23.6	86.8±9.3 *
FEV ₁ /FVC (%)	53.4±11.4	78.6±5.1 *	53.1±11.5	80.0±4.2 *

Values are mean ± SD. * compared with COPD p<0.01

両群の血中のアクロレイン濃度について Fig1 に示す。COPD 群で、平均 172.1 ±75.9nmol/ml Control 群 で平均 143.1±56.0 nmol/ml であり、COPD 群で有意に血中アクロレイン濃度は高かった (p=0.003)。次に、血中アクロレイン濃度

を禁煙後 2 年以上経過した禁煙群について両群で比較したところ (Fig 2)、COPD 群で平均 175.8 ± 79.5nmol/ml、 コントロール群で 135.6 ± 42.8nmol/ml であり、やはり COPD 群で有意に血中アクロレイン濃度が高かった (p=0.003)。

Fig 1 Acrolein concentration of COPD and control subjects

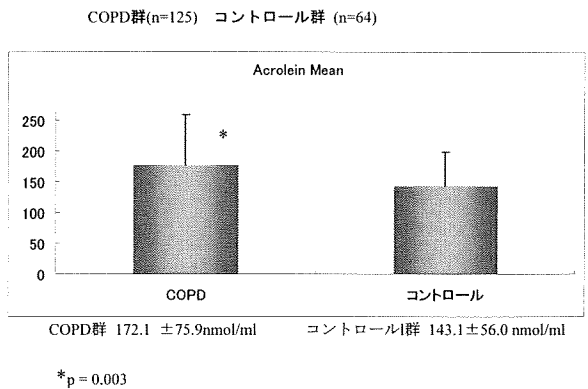
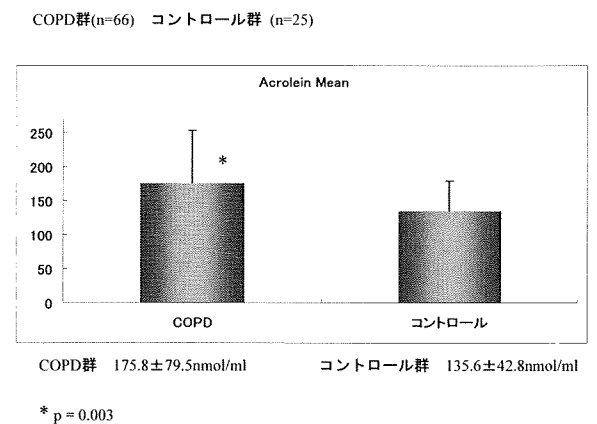


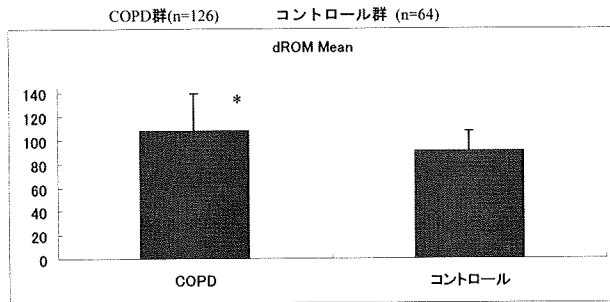
Fig 2 Acrolein concentration in Ex-smokers (禁煙後2年以上)



以上から、喫煙によるアクロレインの吸収以外の機序で COPD 群の血中アクロレイン濃度がコントロール群より高い可能性が考えられた。アクロレインは、酸化ストレス下では、酸化ストレスや炎症下では、Threonine や Polyamine から内因性にも産生されると報告されていることから、両群での血中の酸化ストレスについて、検討した。

Fig 3, 4 に両群の酸化ストレスの結果を示す。

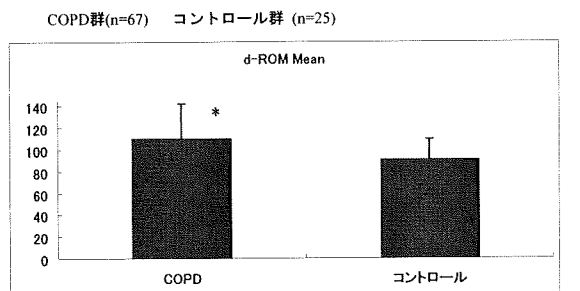
Fig 3 Oxidative stress of COPD and control subjects



COPD群 108.6±30.6 U.CARR コントロール群 90.8 ±16.4 U.CARR,

* p<0.0001

Fig 4 Oxidative stress of Ex-smokers (禁煙後2年以上)

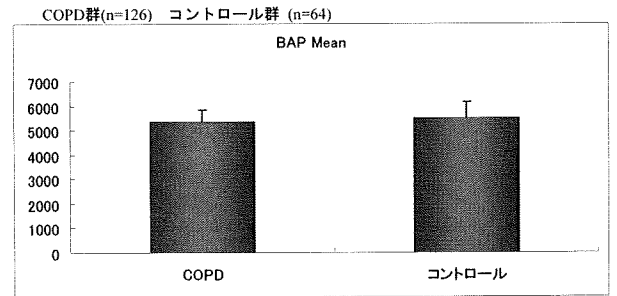


COPD群 110.8±31.5 U.CARR コントロール群 90.8±18.5 U.CARR

*p = 0.0004

血中の酸化ストレスは、COPD 群で 108.6 ± 30.6 U.CARR、コントロール群で 90.8 ± 16.4 U.CARR であり、COPD 群で有意に高く ($p < 0.0001$)、禁煙後 2 年以上経過した禁煙群についても、COPD 群で 110.8 ± 31.5 U.CARR、コントロール群で 90.8 ± 18.5 U.CARR であり、COPD 群で有意に酸化ストレスが高かった ($p = 0.0004$)。COPD 群で酸化ストレスが高い原因として、抗酸化能の違いが影響している可能性が考えられたため、抗酸化能について両群で評価した。結果を Fig 5, 6 に示す。両群間で、抗酸化能については、有意差を認めなかった。禁煙群においても、有意差を認めなかった。以上から、血中アクロレイン濃度が COPD 群で高い原因の 1 つとして、酸化ストレス下で産生される内因性のアクロレインの影響が考えられた。

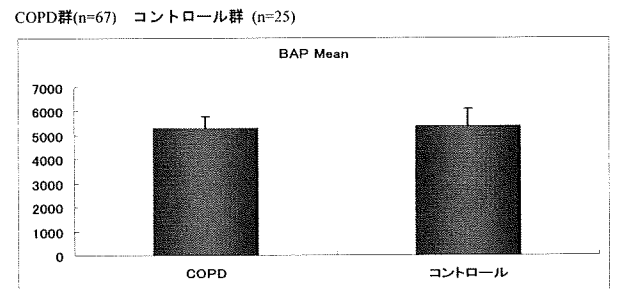
Fig 5 Biological Anti-oxidant Potential of COPD and control subject



COPD群 5398.3±456.2 μM コントロール群 5531.9±635.8 μM

p>0.5

Fig 6 Biological Anti-oxidant Potential of Ex-smokers

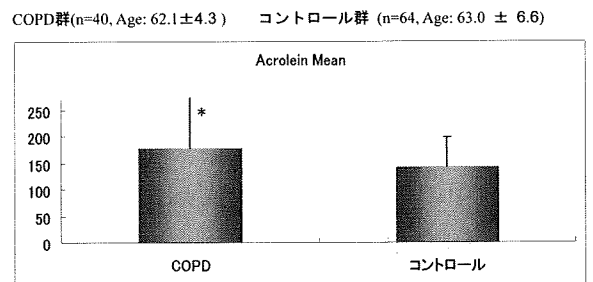


COPD群 5322.7±477.7 μM コントロール群 5373.0±733.3 μM

p>0.5

ここで、血中アクロレイン濃度、酸化ストレスを比較する際に、COPD 群とコントロール群で年齢に有意差を認めていたことから、加齢による影響も考えられた。そこで、両群の年齢をマッチさせた群で両群のアクロレイン濃度、酸化ストレスを比較した。結果を Fig 7, 8 に示す。

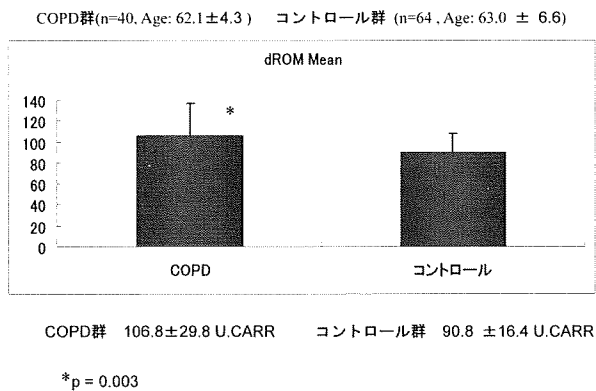
Fig 7 Age matched Acrolein concentration



COPD群 178.3±98.0 nmol/ml コントロール群 143.1±56.0 nmol/ml

*p = 0.04

Fig 8 Age matched oxidative stress



年齢をマッチさせた群での比較においても、COPD 群で有意に血中アクロレイン濃度が高く、酸化ストレスも高いという結果であった。

考案

今回の検討で、COPD 患者では、禁煙後も循環血液中のアクロレインおよび酸化ストレスがコントロール群より高く、血中アクロレインは、COPD 患者の全身性の酸化ストレスを反映している可能性が考えられた。アクロレインは、酸化ストレス下で好中球の Myeloperoxidase により Threonine から産生されることが知られている。マウスの急性心筋虚血モデルでは、wild-type マウスは、Myeloperoxidase-null マウスと比較し、虚血心筋でアクロレインの著増を認め、虚血 24 時間後の心筋障害が有意に重症であったことが報告されており⁹⁾、内因性のアクロレイン産生により組織障害が起きていることが示唆される。すなわち、喫煙による外因性のアクロレインは、肺組織の細胞障害、機能障害の原因の 1 つと考えられ、COPD 患者の呼気濃縮液中や誘発喀痰中には、コントロール群と比較して、有意にアクロレイン値が高いと報告されている⁸⁾が、炎症に伴う酸化ストレスを反映して産生される内因性のアクロレインも組織障害の一因となっている可能性が考えられる。COPD 患者において、酸化ストレスが高まっていることや、禁煙後も病状が進行すること、心血管系の障害を来しや

すいことはよく知られているが、COPD のこの禁煙後も進行する病態や、全身性障害の原因の一端を酸化ストレス下に産生される内因性のアクロレインが担っている可能性が考えられる。

内因性アクロレインの産生には MPO が関与していることは、前記したが、MPO 遺伝子についてはいくつかの多型が報告されており、喫煙者の肺癌に関与する多型の報告もある。以上から、COPD の発症や喫煙による障害に MPO 遺伝子多型が関与している可能性を考え、現在 MPO 遺伝子多型と COPD の病態についての関連について検討中である。MPO 遺伝子の SNP について、COPD 群 49 症例、コントロール群 40 症例で検討したところ、COPD 群では A allele の頻度が 12.2%であったのに対し、コントロール群では 20%と高値であった。現在の症例数では両群間で有意差を認めないが、報告されている日本人の A allele 頻度が 9%、アジア人では 8.7%であることからすると、コントロール群で有意に A allele 頻度が高い可能性がある。今後、症例数を増やして検討するとともに、血中のアクロレイン値との関連を検討する予定である。

結論

COPD の発症や進行に内因性のアクロレイン産生が関与している可能性が考えられる。

参考文献

1. Lyon JP, Jenkins LJ Jr, Jones RA, Coon RA, Siegel J. Repeated and continuous exposure of laboratory animals to acrolein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1970 Nov;17(3):726-32.
2. Li L, Hamilton RF Jr, Taylor DE, Holian A. Acrolein-induced cell death in human alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997 Aug;145(2):331-9.

3. Lambert C, McCue J, Portas M, Ouyang Y, Li J, Rosano TG, Lazis A, Freed BM. Acrolein in cigarette smoke inhibits T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Oct;116(4):916-22. Epub 2005 Aug 1.
4. Sanduja R, Ansari GA, Boor PJ. 3-Hydroxypropylmercapturic acid: a biologic marker of exposure to allylic and related compounds. *J Appl Toxicol*. 1989 Aug;9(4):235-8.
5. Linhart I, Frantík E, Vodicková L, Vosmanská M, Smejkal J, Mitera J. Biotransformation of acrolein in rat: excretion of mercapturic acids after inhalation and intraperitoneal injection. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996 Jan;136(1):155-60.
6. Carmella SG, Chen M, Zhang Y, Zhang S, Hatsukami DK, Hecht SS. Quantitation of acrolein-derived (3-hydroxypropyl)mercapturic acid in human urine by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: effects of cigarette smoking. *Chem Res Toxicol*. 2007 Jul;20(7):986-90. Epub 2007 Jun 9.
7. Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J Clin Invest*. 1997 Feb 1;99(3):424-32.
8. Corradi M, Pignatti P, Manini P, Andreoli R, Goldoni M, Poppa M, Moscato G, Balbi B, Mutti A. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Respir J*. 2004 Dec;24(6):1011-7.
9. Vasilyev N, Williams T, Brennan ML, Unzek S, Zhou X, Heinecke JW, Spitz DR, Topol EJ, Hazen SL, Penn MS. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation*. 2005 Nov 1;112(18):2812-20.

喫煙曝露による肺気腫モデルマウスにおける 禁煙後の病態生理に関する研究

京都大学大学院医学研究科呼吸器内科学

丸毛 聡、星野勇馬、田辺直也、佐藤篤靖、小川恵美子、室 繁郎、平井豊博、三嶋理晃

はじめに

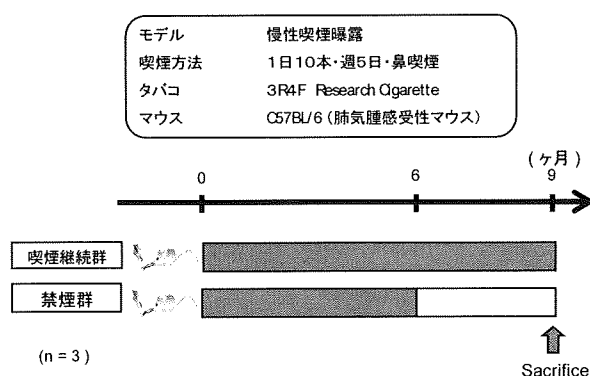
慢性閉塞性肺疾患（COPD）において禁煙は全ての患者に薦められる重要な治療である。実際禁煙により呼吸器症状・肺機能低下率・死亡率などが改善することが証明されている。一方で禁煙後も気道炎症が遷延し、肺機能低下は非喫煙者と同程度にまでは回復せず、CTで評価した Low Attenuation Area (LAA)の割合の経年変化は禁煙後も喫煙継続者と変わらないことも知られている。このように禁煙後の COPD 患者の病態生理に関しては、何らかの炎症の遷延が病気の進行に関与している可能性があり、アデノウイルス感染や自己免疫やアポトーシスの持続などがその機序として考えられてはいるが、詳細は不明である。

ヒトの検体を用いた禁煙後の病態生理の研究には倫理的な制約が多く、今回我々は肺気腫モデルマウスを用いた検討を行った。

対象と方法

慢性喫煙曝露への肺気腫感受性のある C57BL/6 マウスのオスを用いて12週令より6ヶ月間喫煙曝露を行い、肺気腫を作成した。その後更なる3ヶ月間を禁煙する群と喫煙続行する群の2群に分け検討した（図1）。なお、本実験は京都大学動物実験施設の倫理委員会によって承認された。

対象と方法



喫煙装置は SG-200（柴田科学株式会社、東京、日本）を用い、タバコは 3R4F（ケンタッキー大学、レキシントン市、ケンタッキー州）を用い、1日10本・週5日間の喫煙曝露を行った。喫煙は鼻喫煙で行われ、total particle matter (TPM)は445.3mg/m³、血中 CO-Hb レベルは約15%であった。

マウスの解剖はペントバルビタール 70mg/kg の腹腔内投与によって麻酔し行われた。左肺を25cmH₂O の10%ホルマリンで伸展固定した後、4μmの厚さでパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、平均肺胞腔間距離（mean liner intercept; Lm）と肺野の破壊指標（Destructive Index; DI）を調べた。Lm と DI の測定のためには、各マウスにおいて4枚以上の組織スライドを評価した。

統計処理は Student の t 検定による2群の比較を行い、P<0.05 を有意とした。結果の値は、mean ±SD で記載した。