

放射線肺炎発症過程に伴う肺サーファクタント蛋白質A代謝の変調とその診断的意義

今井良成 高橋弘毅

札幌医科大学医学部内科学第3講座 (主任 阿部庄作 教授)

Alterations in Pulmonary Surfactant Protein A Metabolism and Its Diagnostic Value in Onset of Radiation Pneumonitis

Yoshinari IMAI and Hiroki TAKAHASHI

*The Third Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief : Prof. S. ABE)*

ABSTRACT Radiation pneumonitis (RP) is a serious disorder caused by radiation therapy, for the detection of which there exists no simple and sensitive clinical examination. In this study, we examined whether the measurement of serum pulmonary surfactant protein A (SP-A) levels could be effective for detecting the onset of RP. Of the 18 patients included in the study, 9 suffered RP complication after radiation therapy. Serum SP-A levels in patients with RP (64.1 ± 6.5 ng/ml) were 1.82 times as high as those of pre-radiation (36.2 ± 4.0 ng/ml). The difference between them was significant ($p=0.0003$), while the SP-A value in patients without RP after radiation therapy was almost the same as the pre-radiation level. To study the mechanisms of these elevations, we developed a model of whole lung irradiation (20Gy) in adult rats. Prior to alveolitis, which was a histological change seen at day 28, levels of SP-A in lung tissue homogenates and bronchoalveolar lavage fluid had become elevated by day 21. Serum SP-A levels in the irradiated rats were significantly elevated by day 21, peaking at day 35, and then declined. Hydroxyproline contents in lung tissues were elevated by day 42 and remained so through day 56. Therefore, the increase in serum SP-A level may be reflected by alveolitis but not fibrosis. In conclusion, determination of serum SP-A could be helpful in detecting the onset of RP.

(Received November 26, 1999 and accepted December 13, 1999)

Key words: Radiation pneumonitis, Surfactant protein A, Serum marker, Bronchoalveolar lavage

1 緒 言

肺悪性腫瘍の放射線治療に伴う放射線肺炎の合併は、その予後を左右する重要な因子である。その病理像は、初期には間質の浮腫、肺胞腔内への炎症細胞浸潤、血管内膜の肥厚に始まり、経過と共に間質の線維化へと移行する^{1,2)}。放射線肺炎を発症した際には、しばしば副腎皮質ホルモン薬が投与されるが、進行例ではその効果に乏しい^{3,4)}。したがって、本疾患の治療成績を向上させるためには、発症初期での発見と迅速な治療の

導入が重要な鍵をにぎっている。現在、放射線肺炎発症を検出する検査として、胸部単純X線検査、血清LDH活性の測定および動脈血ガス分析が繁用されているが、発症初期の段階で異常を検出する精度を必ずしも兼ね備えてはいない。したがって、放射線肺炎検出のための簡便かつ鋭敏な血清マーカーが求められている。

肺サーファクタント蛋白質A (SP-A) は、C型レクチンのコレクチン・サブグループに属する親水性糖蛋白質である⁵⁾。肺においては、主な産生細胞である肺胞

II型上皮細胞の他にクララ細胞にも発現する⁹⁾。我々は、SP-Aが血中にも存在し、特発性間質性肺炎、膠原病合併間質性肺炎で高値を示すこと⁷⁻¹⁰⁾、特発性間質性肺炎の急性増悪時に、血清SP-A値が著しく上昇することを報告した⁸⁾。これらの研究成果を踏まえ、本研究では、放射線治療中の肺癌患者における血清SP-A値を経時的に測定し、その臨床的有用性について検討した。また、血清SP-A濃度が間質性肺炎患者で上昇する機序を究明するため、ラットに軟X線単回照射を施行し、放射線肺炎の動物実験モデルを作成し、肺局所および血液中SP-Aの変動とその病態的意義について検討した。

2 方 法

2.1 肺癌患者における臨床的検討

2.1.1 対象と方法

1995年から1997年までに、放射線治療が施行された肺癌患者のうち、特発性間質性肺炎、膠原病肺、塵肺等の血清SP-A値に影響を与えうる基礎疾患合併例を除外した18名(男15例、女3例、平均年齢64.8歳)を対象とした。放射線照射開始時、照射終了時および照射終了2週後の胸部正面単純X線撮影(胸部X-ray)、胸部high resolution computed tomography (HRCT)、血清SP-A値、血清lactate dehydrogenase (LDH)活性、肺泡気一動脈血酸素分圧格差(A-aDO₂)を検討した。放射線肺炎の確定診断は照射終了時のHRCT所見で行った。また、以上の検査は、放射線照射開始から終了後の2カ月間、適宜追加施行された。

2.1.2 血清SP-A値の測定

血清SP-A値の測定は、ヒトSP-A特異的単クローン抗体PC6、PE10¹¹⁾を用いたsandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)¹²⁾を改良し作製されたヒトSP-A測定キット(帝人k.k.製、東京)¹³⁾を使用し施行した。測定は2検体で行い、その平均をSP-A濃度とした。また、照射前後での血清SP-A濃度の照射開始前値に対する照射終了時値の比をRelative ratio(照射終了時値(ng/ml)/照射開始前値(ng/ml))として算出した。

2.1.3 その他

血清LDH活性は、紫外外部吸光光度分析法にて測定した。またA-aDO₂は、室内気動脈血ガス分析結果から算出した。

2.2 動物モデルにおける実験的検討

2.2.1 放射線肺傷害ラットの作成

軟X線照射装置(Softex M-150WE, Softex 社)を用い、Sprague-Dawley種ラット(8週齢、雄)の胸郭に、20 gray (Gy)を単回照射した。なお、照射はペントバルビタール腹腔投与による浅麻酔下に、胸郭以外の部位を5 mm厚の鉛板で遮蔽した状態で施行された。

2.2.2 組織形態学的検討

放射線照射後56日まで、7日毎にペントバルビタール浅麻酔下に腹部大動脈を切断、脱血屠殺した。摘出肺を10%ホルマリン溶液で20 cmH₂O圧下に伸展固定した。パラフィン包埋切片をキシロールで脱パラフィンし、ヘマトキシリン・エオシン(H-E)染色、Elastic-Van Gieson染色により、経時的に組織学的変化を光学的顕微鏡下で観察した。

2.2.3 血液、気管支肺胞洗浄液の採取

放射線照射ラットを照射後7日から56日まで7日毎に(n=6)、ペントバルビタール浅麻酔下に下大静脈より採血した後、迅速に腹部大動脈を切断し脱血屠殺した。未処置ラットをコントロール群とし、照射ラットと同じ手順によって屠殺した。生理食塩水で肺動脈を灌流、気管内にカニューレを挿入し、生理食塩水7 mlを用い気管支肺胞洗浄(BAL)を5回繰り返し施行した。回収液を遠心分離(200×g, 5分間)して上清と沈渣を得た。また、BAL後の肺組織を細切したのち、1.0Mシロ糖液でホモジナイズ、遠心分離(200×g, 5分間)でホモジネート上清を得た。また、BALの洗浄効果についての基礎的検討のために、未処置ラット(n=3)に上記の手順に従って気管内カニューレを挿入後、7 mlの生理食塩水を用い10回繰り返し洗浄した。各回収液から個々の上清を得て、総蛋白質濃度を測定した。

2.2.4 Hydroxyprolineの定量

肺組織ホモジネート上清中のhydroxyprolineをProckop et al.¹⁴⁾の方法に従って定量した。0-80 μg/mlのhydroxyproline水溶液を標準として用い、試料には、濃塩酸を加えて110°Cで一昼夜加水分解した後、その上清を水酸化ナトリウムで中和した。次にホウ酸-アラニン緩衝液を加えた後、塩化カリウムで飽和。0.2 MクロラミンTを加え室温で40分間酸化した後、3.6 MNa₂S₂O₃で酸化を停止した。さらにEhrlich's Reagentを加え、30分後に560 nmで吸光度を測定した。

2.2.5 SP-Aの定量

BAL液、肺組織ホモジネート上清、血清に含まれるSP-Aの定量を、Shimizu et al.¹⁵⁾の方法に基づき、

sandwich ELISA 法により行った。Dethloff et al.¹⁶⁾の方法でラット気管内に silica を投与し、28 日目に Hawgood et al.¹⁷⁾の方法で肺サーファクタントを分離した。この肺サーファクタント分画から、Kuroki et al.¹⁸⁾の方法で、SP-A を Mannose-Sepharose 6B カラムを用いて分離した。ラット SP-A を同容量の Freund's complete adjuvant と混合し emulsion を作製、これを New Zealand White 種家兎に免疫し、抗血清を得た。この抗血清から Protein A-Sepharose CL 4B カラムを用いて IgG を精製した。抗 SP-A-IgG を 37°C で一夜吸着させた micro ELISA plate (Immulon, Dynatec 社) を、2% (W/V) スキムミルク、1% Triton X-100 を含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.4 (SM/TX/PBS) で 1 時間処理した後、標準 SP-A、種々の濃度に希釈された血清、BAL 液、肺組織ホモジネート上清を加えて 37°C、2 時間反応させた。充分量の SM/TX/PBS で 3 回洗浄した後、2 次抗体として、horseradish peroxidase で標識した抗 SP-A-IgG を 37°C、2 時間反応させた。充分量の TX/PBS で 3 回洗浄後、さらに o-phenylenediamine 溶液を加え、室温暗所で 20 分間の呈色反応を行った。最後に 2 N 硫酸で反応を停止し、492 nm で吸光度を測定した。

2・2・6 Western blotting 法

未処理ラット血清 25 ml を等量の 20 mM Tris buffer (pH 7.4)/2.5 M NaCl/40 mM CaCl₂ と混和し、4°C、2 時間キンキュベート後、10,000×g、10 分間遠心した。その上清を mannose Sepharose 6B column に吸着後、20 mM Tris (pH 7.4)/1.25 M NaCl/2 mM EDTA で溶出し、溶出液を 20 mM Tris (pH 7.4)/0.15 M NaCl で透析した。透析後の検体を Laemmli¹⁹⁾の方法に準じ、メルカプトエタノールで加熱処理後、13% ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。次に Towbin et al.²⁰⁾の方法に準じて PVDF 膜にトランスブロットした。転写後の膜を SM/TX/PBS で 1 時間処理後、抗 SP-A-IgG 溶液 (10 µg/ml) を膜上にマウントし、室温、90 分間反応させた。膜を SM/TX/PBS で洗浄後、horseradish peroxidase 標識抗 SP-A-IgG を室温で 30 分間反応させ、immunoreactive band を enhanced chemiluminescence 法により Kodak X-omat film 上で感光、検出した。

2・2・7 その他の分析法

蛋白質の定量はウシ血清アルブミン (Sigma) を標準として Lowry et al.²¹⁾の方法を用いて行った。

2・2・8 統計処理

測定値は、平均±標準偏差で表した。測定値の有意

差検定は、臨床例における血清 SP-A 値については Paired t-test を、Relative ratio、動物実験モデルにおける各種測定値については、Mann Whiteny U-test を用いた。p 値 0.05 未満を統計的有意差ありと判定した。

3 成績

3・1 肺癌患者における臨床的検討

3・1・1 胸部 HRCT 所見による放射線肺炎発症例、非発症例の判定

対象患者 18 例の胸部 HRCT 所見による判定結果を Table 1 に示す。18 例中 9 例に、照射終了時の胸部 HRCT 所見上、照射野にほぼ一致した淡い肺野濃度上昇 (ground glass attenuation) が認められ、「発症群」とした。その代表例を Fig. 1 に示す。発症群 9 例のうち、2 例に胸部 X-ray 像上、肺炎による異常影を指摘できたが、残りの 7 例は HRCT でのみ検出可能な軽症例であった。「発症群」のうち、発熱、咳嗽等の症状が強かった 4 例で副腎皮質ホルモン薬が投与された。2 週後の HRCT では、発症群 9 例共、ground glass attenuation は消褪傾向を示したが、5 例では線維化傾向を認めた。一方、照射終了時の胸部 HRCT 所見上、ground glass attenuation が認められなかった「非発症群」9 例は、その後の観察期間を通して、放射線肺炎を合併しなかった。両群の背景因子としては、性、年齢、臨床病期、喫煙歴等には差は見られなかったが、腺癌が発症群に多い傾向が見られた。

3・1・2 血清 SP-A の変化

「発症群」における血清 SP-A の平均値は、照射開始前 (36.2 ± 4.0 ng/ml) に比べ照射終了時 (64.1 ± 6.5 ng/ml) に有意 ($p=0.0003$) に上昇した。また、照射終了 2 週後の血清 SP-A 値は、 42.6 ± 4.7 ng/ml と照射終了時に比べ有意 ($p=0.0089$) に低下した。「非発症群」においては、血清 SP-A 値は、照射開始前 (28.9 ± 3.3 ng/ml) に比し照射終了時 (36.8 ± 8.4 ng/ml) で、高い傾向が見られたが、有意な変化ではなかった。照射終了 2 週後の血清 SP-A 値 (40.4 ± 4.7 ng/ml) は、照射開始前値および照射終了時値と比べ、いずれとも有意差は認めなかった (Table 2)。なお健常者 108 例の血清 SP-A 値 (26.7 ± 8.5 ng/ml) に比べ、照射開始前値は、「発症群」では有意に高く ($p=0.0024$)、「非発症群」では有意差はなかったが高い傾向がみられた。

症例毎に照射前後の血清 SP-A 値を比較した場合、「発症群」の全例 (100%) で、照射開始前値より照射

Table 1 Characteristics of the patients

Patient No.	Sex	Age (yrs)	Histologic Type of Lung Cancer	Clinical Stage	B.I.	Irradiated Dose	Radiation X ray	Pneumonitis CT	Glucocorticoid Therapy
1.	M	64	Small cell Carcinoma	IIIb	1025	51Gy/27fr.	(-)	(+)	(+)
2.	F	72	Small cell carcinoma	IV	0	50Gy/31fr.	(-)	(+)	(-)
3.	F	59	Squamous cell carcinoma	IIIb	760	50Gy/25fr.	(-)	(+)	(+)
4.	M	76	Squamous cell carcinoma	IIIa	500	60Gy/31fr.	(-)	(+)	(-)
5.	M	54	Adenocarcinoma	IIIb	640	58Gy/29fr.	(-)	(+)	(+)
6.	M	71	Adenocarcinoma	IIIb	0	58Gy/28fr.	(+)	(+)	(-)
7.	M	43	Adenocarcinoma	IIIa	920	56Gy/28fr.	(-)	(+)	(-)
8.	M	83	Adenocarcinoma	IIIa	0	56Gy/28fr.	(+)	(+)	(+)
9.	M	78	Adenocarcinoma	I	1180	68Gy/25fr.	(-)	(+)	(-)
10.	M	80	Squamous cell carcinoma	I	0	40Gy/20fr.	(-)	(-)	(-)
11.	F	53	Squamous cell carcinoma	IIIb	360	54Gy/27fr.	(-)	(-)	(-)
12.	M	47	Squamous cell carcinoma	IIIb	560	54Gy/36fr.	(-)	(-)	(-)
13.	M	63	Squamous cell carcinoma	IV	990	54Gy/ 9fr.	(-)	(-)	(-)
14.	M	71	Squamous cell carcinoma	IIIa	900	58Gy/29fr.	(-)	(-)	(-)
15.	M	58	Squamous cell carcinoma	IIIa	0	52Gy/16fr.	(-)	(-)	(-)
16.	M	47	Adenocarcinoma	IV	540	51Gy/17fr.	(-)	(-)	(-)
17.	M	76	Adenocarcinoma	I	250	50Gy/25fr.	(-)	(-)	(-)
18.	M	72	Adenocarcinoma	IIIa	0	60Gy/30fr.	(-)	(-)	(-)

M: male, F: female, B.I.: Brinkman smoking index

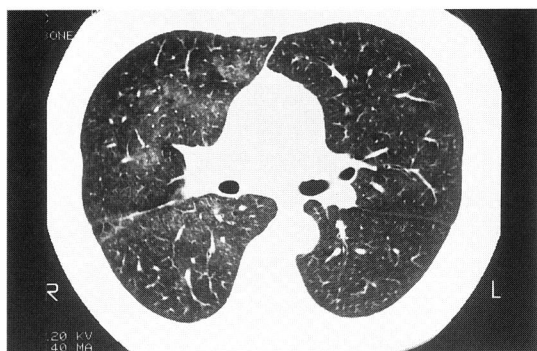


Fig. 1 Representative chest HRCT showing radiation pneumonitis.
Ground glass attenuation is seen in the right middle lung field.

終了時値が上昇したのに対し、「非発症群」では9例中6例(67%)で照射終了時値が高かった。照射開始前値に対する照射終了時値の比(Relative ratio)をFig. 2に示す。その平均値は、「発症群」では 1.82 ± 0.12 、「非発症群」では 1.21 ± 0.15 であり、両群間に有意差($p=0.005$)がみられた。Relative ratioのカットオフ値を1.6に設定し、それ以上を「陽性」、それ未満を「陰性」とした。その結果、「発症群」は9例中8例が陽性であったのに対し、「非発症群」は9例中僅か1例が陽

性であった。言い換えると、SP-Aが1.6倍以上に上昇した9例中8例が放射線肺炎を発症し、1.6倍未満の9例中8例は放射線肺炎を発症しなかった。

「発症群」のうち副腎皮質ホルモン薬使用例と未使用例との比較をFig. 3に示す。副腎皮質ホルモン薬使用例、未使用例とも血清SP-A値は、照射開始前に比べ照射終了時に有意に上昇し、照射終了2週後には、照射終了時に比べ有意に低下した。照射前値に対する照射終了時値のRelative ratioは、副腎皮質ホルモン薬使用例では (1.99 ± 0.19) 、未使用例 (1.68 ± 0.14) に比べ大きかったがその差は有意ではなかった。しかし、照射終了時値に対する照射終了2週後値のRelative ratioは、使用例 0.54 ± 0.02 、未使用例 0.83 ± 0.02 で、有意差($p=0.02$)が認められた。したがって、使用例でより低下は顕著であった。

3・1・3 血清LDH活性、A-aDO₂の変化(Table 2)

血清LDH活性を照射前と照射終了時で比較した場合、「発症群」9例の照射前値(285.2 ± 37.8 IU/L)と照射終了時値(276.1 ± 25.4 IU/L)との間には、有意差を認めなかった。

「発症群」9例のA-aDO₂は、照射前(18.15 ± 2.17 Torr)に比べ照射終了時(23.37 ± 4.39 Torr)にやや増加したが、有意差を認めなかった。

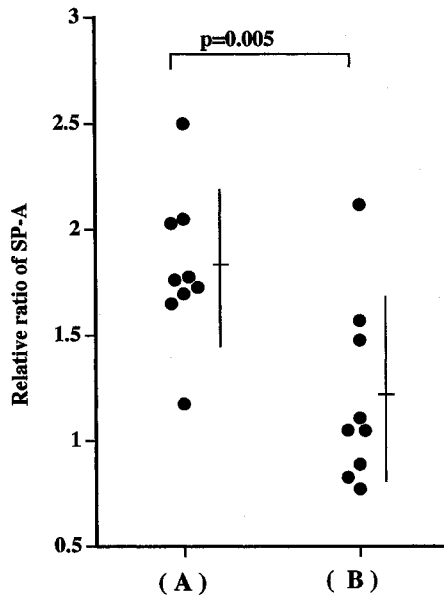
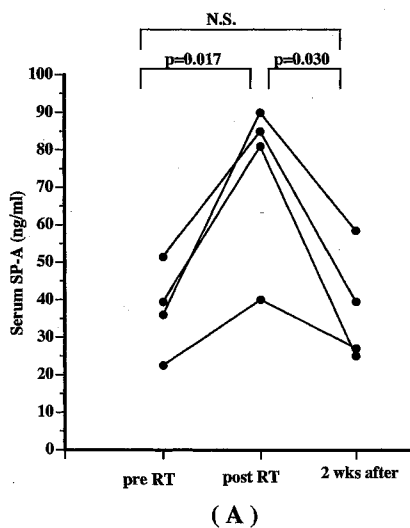


Fig. 2 Relative ratios of SP-A. The ratios were expressed as a ratio of serum SP-A levels at the completion of radiation therapy to those before radiation therapy (see the Method). Patients presenting pneumonitis (A) and lacking pneumonitis (B) at the completion of radiation therapy. Bars indicate mean \pm SD, and statistical comparison was performed by the Mann-Whitney U test.



3.2 動物実験モデル

3.2.1 組織形態学的所見

H-E 染色の典型像を Fig. 4 に示す。照射後 21 日までの肺組織には、照射前と比べて形態学的変化はみられなかったが、照射後 28 日には、肺胞間質の浮腫性肥厚、肺胞腔および肺胞間質への単核球主体の炎症細胞浸潤を認め、胞隔炎像を呈した。この変化は、照射後 35 日に最も顕著となったが、それ以降は軽減した。照射後 56 日には炎症細胞浸潤はほぼ消失したが、肺胞間質の肥厚が認められた。Elastica Van Gieson 染色所見上、肺胞間質肥厚部位に膠原線維の軽度増加が認められた。

3.2.2 肺組織中 hydroxyproline 量の変化

膠原線維の主構成アミノ酸である hydroxyproline の定量を行った (Fig. 5)。肺組織ホモジネート上清に含まれる hydroxyproline 量は、照射前値 (2.31 ± 0.40 mg/g 肺湿重量) に比べ照射後 35 日までは有意な変化はみられなかった。しかし、照射後 42 日で 4.93 ± 0.52 mg/g 肺湿重量と有意 ($p=0.004$) に上昇し、照射後 56 日までの全観察期間を通して高値が持続した。

3.2.3 BAL 液の回収率と洗浄効果

BAL の洗浄効果についての基礎的データを Fig. 6 に示す。未処置ラット肺を 7 ml の生理食塩水を用い 10 回繰り返して洗浄した。回収液を順にフラクション 1~10 とした。フラクション 1~5 の総回収率は 3 頭いずれも 100% であった。総蛋白質濃度は、フラクション 1 で

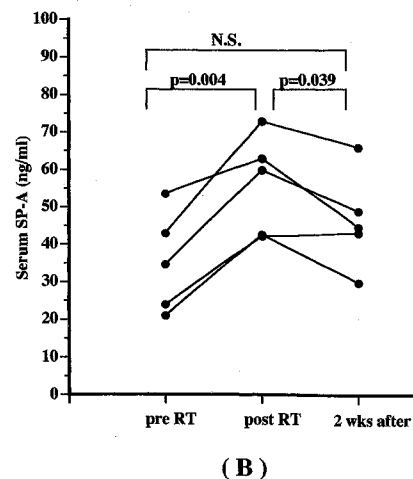


Fig. 3 Effect of glucocorticoid therapy on serum SP-A levels in patients with radiation pneumonitis. Patients who received glucocorticoid therapy (A) and who did not received glucocorticoid therapy (B) when occurred radiation pneumonitis. Statistical comparison were performed by paired-t test. post RT: at the completion of irradiation, 2 wks after: 2 weeks after the completion of irradiation

Table 2 Changes in serum SP-A, LDH, and A-aDO₂.

	SP-A (ng/ml)	LDH (IU/L)	A-aDO ₂ (mmHg)
Patients with RP			
pre-irradiation	36.21±4.02	285.2±37.8	18.15±2.17
at the completion of irradiation	64.13±6.46*	276.1±25.4	23.37±4.39
2 weeks after the completion	42.55±4.67**	280.7±29.3	21.53±4.69
Patients without RP			
pre-irradiation	28.85±3.29	297.6±19.8	14.17±2.52
at the completion of irradiation	36.81±8.40	292.1±23.6	14.11±2.11
2 weeks after the completion	40.41±5.82	289.8±19.2	14.88±2.68

Each value represents mean±SD.

RP: radiation pneumonitis

*: $p=0.0003$ v.s. pre-irradiation

** : $p=0.0089$ v.s. at the completion of irradiation

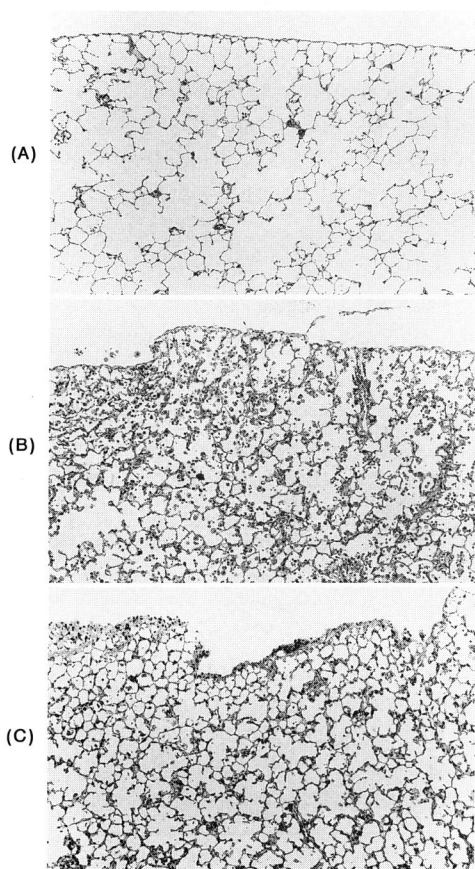


Fig. 4 Representative lung histology of untreated rats (A), and irradiated rats at day 35 (B) and day 56 (C) after single dose of 20 Gy. Lungs were stained with hematoxylin and eosin. Magnification is approximately $\times 100$.

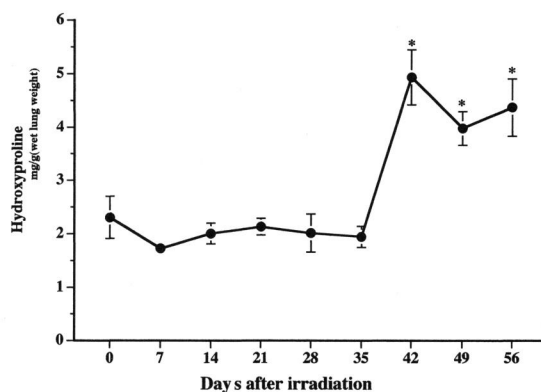


Fig. 5 Hydroxyproline contents in supernatants of lung tissue homogenates from irradiated rats. Values present mean \pm SD ($n=6$). *Significant difference from untreated rats (day 0): $p < 0.05$.

最も高く、洗浄を繰り返す毎に漸減した。フラクション5では、3頭すべてにおいて総蛋白質は検出感度以下であった。したがって、7 ml, 5回の洗浄法によって肺胞腔の内容物はほぼ完全に洗い出されることが示された。

3・2・4 Western blotting 法による血清 SP-A の検出

未処理ラット血清を抗 SP-A-IgG 抗体を用い Western blotting 法で検討した。その結果、ラット SP-A モノマー¹⁸⁾に一致する分子量 32–38 kDa が血清中に存在することが確認された (Fig. 7)。なお、62–64 kDa と 94 kDa 付近にも免疫染色性がみられた。これらは、非還元状態の SP-A 重合体が一部混在したためによるものと考えられた。

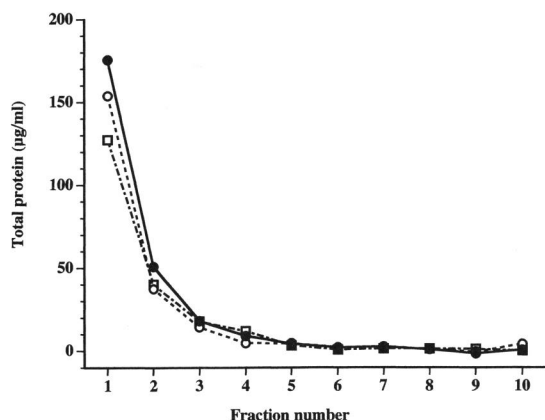


Fig. 6 The rat lungs were washed with 7 ml of saline 10 times. The BAL fluid fractions recovered were separately collected and centrifuged, and then resultant supernatants were stored at -40°C . Total protein concentrations in the supernatants were measured according to the method by Lowry et al. The concentration of each fraction from 3 rats was plotted.

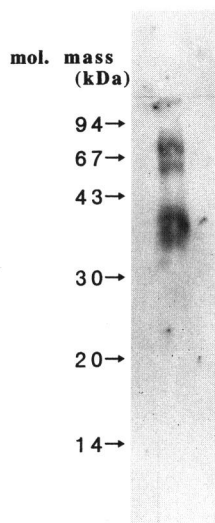


Fig. 7 Western blotting analysis of anti-rat-SP-A IgG. Rat serum sample was applied on a mannose-Sepharose column and then the collected sample was subjected to Western blotting analysis. Under a reduced condition, 32–38 kDa which corresponds to a SP-A monomer was recognized.

3・2・5 肺ホモジネート上清, BAL 液, 血清の SP-A 量の経時的変化

肺組織ホモジネート上清と BAL 液とに含まれる SP-A 量の経時的変化を Table 3 と Fig. 8 に示す. 肺組織ホモジネート上清中 SP-A 量は, 照射後 21 日 ($3.10 \pm 0.63 \text{ mg/rat}$) に急激に増加し, 組織形態学的に顕著な胞隔炎を示す照射後 35 日まで高値を持続した. しかし, 照射後 42 日には, 胞隔炎の改善傾向および線維化の進行と共に照射前値に向かって漸減した. BAL 液上清中 SP-A 量は照射前 ($46.47 \pm 6.02 \text{ µg/rat}$) に比べ, 照射後 14 日 ($68.75 \pm 8.46 \text{ µg/rat}$) で上昇傾向を示したが, 以後徐々に低下し, 胞隔炎が顕著となる照射後 35 日には照射前よりも低値 ($40.38 \pm 4.04 \text{ µg/rat}$) となった. さらに hydroxyproline の上昇する照射後 42 日以降は, 有意差をもって低値を示した. BAL 液沈渣に含有される SP-A 量は, 照射前値 ($2.58 \pm 0.44 \text{ µg/rat}$) に比べ, 照射後 21 日から上昇し始め, 28 日で最高値 ($6.64 \pm 1.01 \text{ µg/rat}$) を示した. 42 日以降では逆に低値となった.

次に血清 SP-A 値の経時的変化を Table 3 と Fig. 9 に示す. 照射前ラットの血清 SP-A は, $7.30 \pm 0.55 \text{ ng/ml}$ であった. 照射後 7 日より上昇し始め, 照射後 21 日でその上昇は有意となり ($p=0.008$), 照射後 35

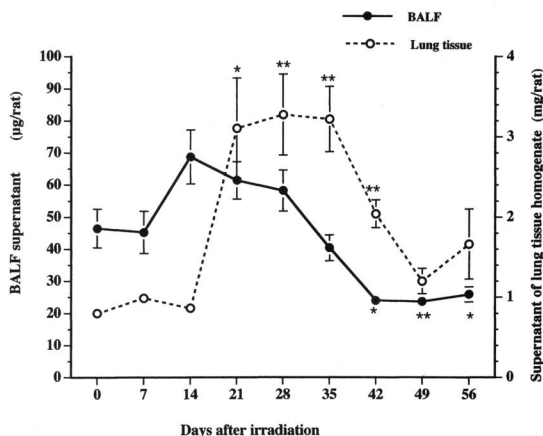


Fig. 8 SP-A contents in lung tissues and BAL fluids. SP-A concentrations in supernatants of lung tissue homogenates and supernatants of BAL fluids from irradiated rats were measured according to the method of Shimizu et al. Total amounts of SP-A per rat lung were calculated from the concentrations measured. Values present mean \pm SD ($n=6$). Significant difference from untreated rats (day 0): * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Table 3 SP-A concentration in supernatant of lung tissue homogenate, BALF-subfractions, and serum

	day 0	day 7	day 14	day 21	day 28	day 35	day 42	day 49	day 56
supernatant of lung tissue homogenate (mg/rat)	0.80±0.07	0.99±0.04	0.96±0.08	3.10±0.63*	3.28±0.50**	3.22±0.41**	2.64±0.17**	1.20±0.16	1.66±0.44
BALF-subfractions									
supernatant (μg/rat)	46.5±6.0	45.3±6.6	68.8±8.5	61.5±5.8	58.3±6.4	40.4±4.0	24.0±2.2*	23.7±2.0**	25.9±2.4*
cell-pellet (μg/rat)	2.58±0.44	2.69±0.27	2.36±0.61	5.51±1.54	6.64±1.01**	2.81±0.26	1.41±0.15*	1.05±0.34*	1.94±0.40
serum (ng/ml)	7.30±0.55	8.24±0.52	8.85±1.10	10.36±0.74**	12.59±0.93***	15.07±1.57***	12.59±0.80***	10.28±0.73**	10.20±0.70**

Each value represents mean±SD. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. day 0

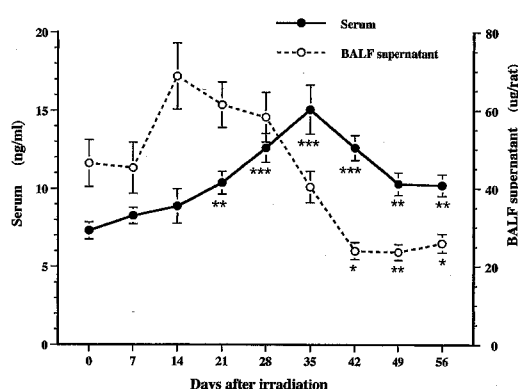


Fig. 9 SP-A concentrations in sera from irradiated rats. The concentrations were measured according to the method of Shimizu et al. To compare SP-A contents in sera to those in alveolar space, SP-A amounts in supernatants of BAL fluids were also plotted. Values present mean±SD (n=6). Significant difference from untreated rats (day 0): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

日 (15.07 ± 1.57 ng/ml, $p = 0.0007$) で最高値となった。照射後 42 日以降は照射前値に向かって低下傾向を示した。

4 考 察

放射線肺炎を検出するための指標として血清 LDH 活性, A-aDO₂ が臨床応用されている。しかし今回の検討では、これらの指標には発症時の有意な増加は認められなかった。その理由は、放射線肺炎を発症した症例の多くが軽症であったことによると考えられる。にもかかわらず、放射線肺炎を発症した全例において、放射線照射前に比し、発症時に血清 SP-A 値が有意に上昇した。血清 SP-A は血清 LDH 活性, A-aDO₂ に比

し、放射線肺炎をより鋭敏に反映することを示した。「発症群」では 9 例中 5 例で前治療として化学療法が施行されているが、「非発症群」に化学療法が施行されている例はなかった。「発症群」で照射開始前の血清 SP-A 値がすでに高いのは、化学療法施行例が多かったことに起因すると考えられ、化学療法による潜在的な細胞障害が起きていると考えた。HRCT で「非発症群」と判定した 9 例中 6 例で、照射前に比べ照射終了時の血清 SP-A 値が上昇する傾向がみられた。この理由として、このような症例では、HRCT で検出できない微細な肺傷害が既に生じていて、それが血清 SP-A 値に鋭敏に反映されるとも考えられる。したがって、このような不顕性肺傷害と臨床診断上の放射線肺炎との判別は、血清 SP-A の実測値からは困難である。そのため、Relative ratio, すなわち照射前値に対する照射終了時の比を算出し、この比が大きいほど発症している可能性が高いかどうかを検討した。その結果、Relative ratio が 1.6 倍以上であった 9 例中 8 例が放射線肺炎を発症し、1.6 倍未満であった 9 例中 8 例は発症していなかった。したがって、Relative ratio : 1.6 を基準とし、放射線肺炎発症を推定できると思われる。照射終了 2 週後の血清 SP-A 値は、照射終了時に比し、発症例 9 例中 8 例で低下し、副腎皮質ホルモン薬使用例で有意に低下した。このことから、血清 SP-A 値の低下は、副腎皮質ホルモン薬の治療効果判定に有用と考える。

血清 LDH 活性, A-aDO₂ は疾患特異性に乏しく、肺癌患者においては、腫瘍組織の増大やそれに随伴する細菌感染症を反映し上昇することがある。また、血清 LDH 活性は肝臓疾患や血液疾患など肺外臓器病変を合併している場合にも上昇しうる。これに対し、血清 SP-A 値は、肺外病変には影響を受けず、細菌性肺炎での上昇は、あっても軽度である⁷⁾。また、原発性肺

腺癌の約半数例で免疫組織学的に SP-A が発現する²²⁾が、血清 SP-A 値が高値を示す肺腺癌例は極く少数で、有意差も認めなかった。したがって、血清 SP-A 値は、臓器特異性および疾患特異性において、肺癌患者の放射線肺炎発症の診断マーカーとして有用であると考えられる。

今回の検討症例では、ground glass attenuation が存在する場合に血清 SP-A 値が上昇したが、病変部位が線維化した場合には、血清 SP-A 値は上昇しなかった。したがって、胞隔炎から線維化に至る放射線肺炎の病理組織学的変化のなかで、血清 SP-A 値は、特に胞隔炎の程度を鋭敏に反映すると推定される。それを証明するために、ラット胸郭へ放射線照射を行い間質性肺炎を惹起し、組織形態学的変化と血清 SP-A 値との関係を検討した。この動物モデルでは、放射線単回照射後 35 日に顕著な胞隔炎像を、42 日以降に軽度の線維化像を呈した。血清 SP-A 値は、顕著な胞隔炎像を呈した照射後 35 日をピークに有意な上昇を示した。一方、線維化傾向が出現する 42 日以降には、血清 SP-A 値は漸減し、肺組織ホモジネート上清中の hydroxyproline 量は有意な増加を示した。以上の結果は、上記の臨床的検討結果と良く合致しており、放射線肺炎における血清 SP-A 値上昇の機序に、胞隔炎の存在が密接に関与することを示唆するものである。

胞隔炎を生じた肺組織内では、肺胞上皮細胞、血管内皮細胞、炎症細胞および線維芽細胞から種々のサイトカインやケミカルメディエーターが産生分泌され、それらが複雑な情報伝達のネットワークを形成し、病態の進展と修復に関わっている。SP-A の主な産生細胞である肺胞 II 型上皮細胞もまた、このネットワークに組み込まれ、SP-A の産生、分泌、代謝の変調を来すと考えられる。事実、SP-A およびその mRNA の発現は、胞隔炎の進展と線維化およびその修復に関わる種々の因子²³⁻²⁸⁾によって変調を受ける。動物モデルで検討しえなかったが、肺組織ホモジネート上清に含まれる SP-A は照射後 21 日で急激に増加し、照射後 42 日まで高値を維持した (Fig. 8)。したがって、組織形態学的変化の出現に先立って、肺胞 II 型上皮細胞での SP-A 産生亢進が生じ、胞隔炎が存在する間、それが持続すると考えられる。

胞隔炎が最も顕在化した照射後 35 日において、SP-A 量は血清と肺組織ホモジネート上清で増加したが、BAL 液沈渣では変化なく、BAL 液上清ではむしろ減少傾向を示した。肺組織ホモジネート上清は肺胞 II 型上皮細胞および肺間質に存在する SP-A 量を、BAL 液

においては肺胞腔の内容物、特にその上清は細胞外 SP-A を、沈渣は肺胞マクロファージに貪食された SP-A を反映すると考えられる。放射線肺炎傷害における血清 SP-A 値上昇の機序として、産生の亢進、循環血液への漏出亢進が関与していると考えられる。臨床的検討からも、BAL 液中 SP-A 濃度は、放射線照射後 4 週²⁹⁾で、また特発性間質性肺炎患者^{30,31)}でも減少することが報告されており、その変動は血清 SP-A 値と鏡面的関係にある。Harrison et al.³²⁾は、間質性肺炎の肺生検材料において、光学的顕微鏡下では正常にみえる部位にさえ、電子顕微鏡下では既に肺胞基底膜の傷害が観察されると述べており、循環血液への漏出亢進は、肺胞上皮/血管内皮バリアの破綻により生じる可能性が考えられる。

ラットでは、組織形態学的変化の出現前(照射後 7-21 日)に血清 SP-A が漸増し、変化の出現(照射後 28 日)と同時にその上昇は有意となった。したがって、血清 SP-A 値は、胞隔炎の出現に対し極めて鋭敏に対応し変動すると考えられる。臨床的検討において、胸部 X-ray で検出されない放射線肺炎の全例、および胸部 HRCT 上「非発症群」と判定された 67%の症例において、照射終了時の血清 SP-A 値が上昇した。この現象は動物実験で示された血清 SP-A の鋭敏性に拠る可能性がある。

SP-A は、肺胞マクロファージとの結合能を有し³³⁾、肺胞マクロファージの貪食能とスーパーオキシド産生を促す作用³⁴⁾がある。また、グラム陰性桿菌細胞壁に存在する lipopolysaccharide (LPS) と直接結合し³⁵⁾、特に smooth LPS によるマクロファージからの TNF- α 産生を抑制する作用³⁶⁾を介して、炎症の拡大を防止する作用があると考えられている。また、SP-A 遺伝子欠損マウスでは、アデノウイルス感染による肺炎像が野生種に比べ顕著であり、TNF- α 、IL-1、IL-6、monocyte chemotactic protein-1 など炎症性サイトカインの発現が増加する³⁷⁾。したがって、放射線肺炎患者は、肺胞腔内 SP-A の減少に基づく易感染状態にあることが示唆される。また、放射線肺炎にみられる胞隔炎の進展に TNF- α 、IL-1 が直接関与しており^{38,39)}、肺胞腔内 SP-A の減少は放射線肺炎それ自体の炎症反応を遷延化させる可能性がある。現在、治療薬として使用されている副腎皮質ホルモン薬は、多様な機序を介する抗炎症作用に加えて、肺胞 II 型上皮細胞での SP-A 産生亢進作用を有している⁴⁰⁾。今後、薬剤としての SP-A の開発と放射線肺炎の予防および早期治療への応用が待たれる。

5 結 論

1. 放射線肺炎発症患者において血清 SP-A 値は、放射線照射前に比べ有意な上昇を示し、この変動は、血清 LDH 活性、A-aDO₂ に比べ明らかに鋭敏であった。胸部 CT でのみ検出可能な「発症例」においても、血清 SP-A 値が上昇した。血清 SP-A の照射終了時値/照射前値比は、「非発症例」に比し「発症例」で有意に高値であった。血清 SP-A 値は、放射線肺炎検出の血清マーカーとして有用であることが示唆された。
2. 「発症例」の血清 SP-A 値は、HRCT 所見上 ground glass attenuation の出現する時期、病理組織学的には胞隔炎発症時に上昇した。その後の経過において、改善例および線維化例のいずれにおいても、血清 SP-A 値は低下傾向を示した。放射線肺傷害の動物実験モデルにおいても、血清 SP-A 値は、組織形態学的に胞隔炎の所見が顕著な時期に上昇し、線維化の時期には低下した。放射線肺炎に伴う血清 SP-A 値上昇は、放射線肺傷害による胞隔炎を反映する現象であることが示された。
3. 動物実験モデルにおいて、SP-A 値は、組織形態学的に胞隔炎の顕著な時期に血中で上昇し、BAL 液では低下する傾向が見られた。また、肺組織中 SP-A 値は、組織形態学的変化に先行して上昇した。血清 SP-A 値の上昇は、肺胞 II 型上皮細胞での産生亢進と循環血液への漏出亢進が関与していることが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、御協力頂きました本学放射線医学講座 晴山雅人教授、大内敦先生、NTT 東日本札幌病院呼吸器内科 本田泰人先生、本学内科学第 3 講座 藤嶋卓哉先生、千葉弘文先生、貴重な御助言、御指導を頂いた本学学生化学第一講座 黒木由夫教授に深謝いたします。

参考文献

1. Fraser RG, Peter Pare JA, Pare PD, Fraser RS, Genereux GP. Diseases of the thorax caused by external physical agents. In: *Diagnosis of diseases of the chest*. Philadelphia, W. B. Saunders, 1991, 2551-2571.
2. Rosenow EC III, Martin WJ II. 6 induced interstitial lung disease. In: Schwartz MI, King TE Jr, editors. *Interstitial Lung Disease*. St. Lois, Mosby, 1993, 255-270.
3. Smith JC. Radiation pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1963, 87: 647-655.
4. Stone DJ, Schwartz MJ, Green RA. Fatal pulmonary insufficiency due to radiation effect upon the lung. *Am J Med* 1956, 21: 211-226.
5. Day AJ. The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily. *Biochem Soc Trans* 1994, 22: 83-88.
6. Walker SR, Williams MC, Benson B. Immunocytochemical localization of the major surfactant apoprotein in type II cells, Clara cells and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1986, 34: 1137-1148.
7. Kuroki Y, Tsutahara S, Shijubo N, Takahashi H, Shiratori M, Hattori A, Honda Y, Abe S, Akino T. Elevated levels of lung surfactant protein A in sera from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary alveolar proteinosis. *Am Rev Respir Dis* 1993, 147: 723-729.
8. Honda Y, Kuroki Y, Shijubo N, Fujishima T, Takahashi H, Hosoda K, Akino T, Abe S. Aberrant appearance of lung surfactant protein A in sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and its clinical significance. *Respiration* 1995, 62: 64-69.
9. Takahashi H, Honda Y, Kuroki Y, Imai K, Akino T, Abe S. Pulmonary surfactant protein A: a serum markers of pulmonary fibrosis in patients with collagen vascular diseases. *Clin Chim Acta* 1995, 239: 213-215.
10. 阿部庄作, 本田泰人, 安藤正幸, 税田直樹, 木田厚瑞, 神野悟, 近藤有好, 黒木由夫, 秋野豊明. 各種肺疾患における血清肺サーファクタント蛋白質-A の臨床的意義. *日胸疾会誌* 1995, 33: 1219-1225.
11. Kuroki Y, Fukada Y, Takahashi H, Akino T. Monoclonal antibodies against human pulmonary surfactant apoproteins: specificity and application in immunoassay. *Biochim Biophys Acta* 1985, 836: 201-209.
12. Shimizu H, Hosoda K, Mizumoto M, Kuroki Y, Sato H, Kataoka K, Hagiwara M, Fujimoto S, Akino T. Improved immunoassay for the determination of surfactant protein A (SP-A). *Tohoku J Exp Med* 1989, 157: 269-278.
13. 日野修一郎, 伊藤和彦, 長谷川一. 高感度ヒト肺サーファクタント蛋白A測定キットの開発. *医学と薬学* 1994, 32: 827-836.
14. Prockop DJ, Kivirikko KI, Laitinen O. Modifications of a specific assay for hydroxyproline

- in urine. *Anal Biochem* 1967, 19: 249-255.
15. Shimizu M, Miyamura K, Kuroki Y. Appearance of surfactant proteins, SP-A and SP-B, in developing rat lung and the effect of in vivo dexamethasone treatment. *Biochem Biophys Acta* 1991, 1081: 53-60.
 16. Dethloff LA, Gilmore LB, Brody A, Hook GER. Induction of intra- and extra-cellular phospholipids in the lungs of rats exposed to silica. *Biochem J* 1986, 233: 111-118.
 17. Hawgood S, Benson B, Hamilton RJ. Effects of a surfactant-associated protein and calcium ions on the structure and surface activity of lung surfactant lipids. *Biochemistry* 1985, 24: 184-190.
 18. Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR. Chemical modification of surfactant protein A alters high affinity binding to rat alveolar type II cells and regulation of phospholipid secretion. *J Biochem* 1988, 263: 17596-17602.
 19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-685.
 20. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76: 4350-4353.
 21. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 132: 265-275.
 22. Mizutani Y, Nakajima T, Morinaga S. Immunohistochemical localization of pulmonary surfactant apoproteins in various lung tumors; Special reference to nonmucous oroducing lung adenocarcinomas. *Cancer* 1988, 61: 532-537.
 23. Whitsett JA, Clark JC, Wispe JR, Pryhuber GS. Effects of TNF-alpha and phorbol ester on human surfactant protein and MnSOD gene transcription in vitro. *Am J Physiol* 1992, 262: L688-693.
 24. Dhar V, Hallman M, Lappalainen U, Bry K. Interleukin-1 alpha upregulates the expression of surfactant protein-A in rabbit lung explants. *Biol Neonate* 1997, 71: 46-52.
 25. Ballard PL, Liley HG, Gonzales LW, Odom MW, Ammann AJ, Benson B, White RT, Williams MC. Interferon-gamma and synthesis of surfactant components by cultured human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, 2: 137-143.
 26. Whitsett JA, Budden A, Hull WM, Clark JC, O'Reilly MA. Transforming growth factor-beta inhibits surfactant protein A expression in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1992, 12; 1123: 257-262.
 27. Sugahara K, Rubin JS, Mason RJ, Aronsen EL, Shannon JM. Keratinocyte growth factor increases mRNAs for SP-A and SP-B in adult rat alveolar type II cells in culture. *Am J Physiol* 1995, 269: L344-350.
 28. Whitsett JA, Weaver TE, Lieberman MA, Clark JC, Daugherty C. Differential effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta on synthesis of Mr = 35,000 surfactant-associated protein in fetal lung. *J Biol Chem* 1987, 262: 7908-7913.
 29. Hallman M, Maasilta P, Kivisaari L, Mattson K. Changes in surfactant in bronchoalveolar lavage fluid after hemithorax irradiation in patients with mesothelioma. *Am Rev Respir Dis* 1990, 141: 998-1005.
 30. McCormack FX, King TE Jr, Voelker DR, Robinson PC, Mason RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A. *Am Rev Respir Dis*. 1991, 144: 160-166.
 31. 本田泰人, 藤嶋卓哉, 今井良成, 高橋弘毅, 黒木由夫, 秋野豊明, 阿部庄作. 特発性間質性肺炎における気管支肺胞洗浄中サーファクタント蛋白質A値の検討. *日胸疾会誌* 1995, 34: 1326-1330.
 32. Harrison NK, Myers AR, Corrin B, Soosay G, Dewar A, Black CM, DuBois RM, Turner-Warwick M. Structural features of interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Am Rev Respir Dis* 1991, 144: 706-713.
 33. Pison U, Wright JR, Hawgood S. Specific binding of surfactant apoprotein SP-A to rat alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1992, 262: L412-417.
 34. van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LM. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, 2: 91-98.
 35. van Iwaarden JF, Pikaar JC, Storm J, Brouwer E, Verhoef J, Oosting RS, van Golde LM, van Strijp JA. Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem J* 1994, 303: 407-411.
 36. Sano H, Sohma H, Muta T, Nomura S, Voelker DR, Kuroki Y. Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14. *J Immunol* 1999, 163: 387-95.
 37. Harrod KS, Trapnell BC, Otake K, Korfhagen TR, Whitsett JA. SP-A enhances viral clearance

- and inhibits inflammation after pulmonary adenoviral infection. *Am J Physiol* 1999, 277: L580-588.
38. Epperly MW, Travis EL, Sikora C, Greenberger JS. Magnesium superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposome pulmonary radioprotective gene therapy: modulation of irradiation-induced mRNA for IL-I, TNF-alpha, and TGF-beta correlates with delay of organizing alveolitis/fibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999, 5: 204-214.
39. Franko AJ, Sharplin J, Ghahary A, Barcellos-Hoff MH. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha in the lungs of fibrosis-prone and "non-fibrosing" mice during the latent period and early phase after irradiation. *Radiat Res* 1997, 147: 245-56.
40. Young SL, Ho YS, Silbajoris RA. Surfactant apoprotein in adult rat lung compartment is increased by dexamethasone. *Am J Physiol* 1991, 260: L161-167.

別刷請求先:

(〒060-8556) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第3講座 今井良成