

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21591621
研究課題名（和文）	好中球エラスターゼ阻害剤による致死放射線肺障害の防止に関する実験的研究
研究課題名（英文）	Effects of Sivelestat Sodium Hydrate on the prevention of lethal radiation induced lung damage
研究代表者	
	猪俣 泰典 (Inomata Taisuke)
	大阪医科大学・医学部・教授
	研究者番号： 90176462

研究成果の概要（和文）：C57BL/6J（12週齢雌）マウスの全肺に20Gy照射直前、照射後1+3+6時間目に好中球エラスターゼ阻害剤（シベレスタットナトリウム水和剤）を反復投与することにより、最も重篤化して問題となる急性肺障害の発症を防止・低減し生存率の改善に寄与しただけでなく、引き続いて起こる晩期障害である肺の線維化を軽減することも病理組織学的に明らかにし得た。好中球エラスターゼ阻害剤は放射線治療に伴う放射線肺障害を防止に期待が持てる。

研究成果の概要（英文）：Twelve-week-old female C57BL/6J mice were used. Neutrophil elastase inhibitor (Sivelestat Sodium Hydrate) was administered just before irradiation and 1 hr., 3 hrs., and 6 hrs. after delivering a dose of 20 Gy to the whole lung in a single fraction. Neutrophil elastase inhibitor prevented and reduced severe acute lung damage which sometimes jeopardize the patient's life and improved the survival rate. Histopathological study proved that it also reduced the lung fibrosis followed by the acute lung damage. Neutrophil elastase inhibitor has promising effects on the reduction of the lung injury caused by radiation therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：好中球エラスターゼ阻害剤、シベレスタットナトリウム水和剤、放射線肺臓炎、肺線維症

1. 研究開始当初の背景

肺癌を代表とする胸部に対する放射線治療の結果生ずる急性肺障害の多くは照射範

囲に一致して照射後平均6週頃に生じ、一過性で特に臨床上問題となることは少ない。しかし、急性肺障害の中には照射範囲を超えて

広がって重篤化する場合があります、治療を完遂するための大きな障害となるのみならず致死性的となることがあり大きな問題となっている(Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. Vol.65 No.3 pp.640-645, 2006)。

急性放射線肺障害の原因には放射線による物理的な障害を契機として高サイトカイン血症を生じている可能性が考えられている。実際、放射線を肺に照射すると、TNF- α 、IL-1 α 、IL-6などのサイトカインが一過性に上昇することはすでに実験的に証明されている。しかし、最終的に致死的な急性肺障害がどのようにしてもたらされるかについては未だ明らかにされていない。

生体に対する様々なストレスがもたらす臓器不全には好中球エラスターゼが深く関わっていることが知られている。TNF- α 、IL-1 α 、IL-6などのサイトカインの上昇が好中球を活性化し、活性化した好中球の肺への集積、エラスターゼの放出、肺血管内皮障害、肺血管上皮障害を順に引き起こして放射線肺障害をも起こしている可能性がある。

2. 研究の目的

好中球エラスターゼ活性の上昇が最終的に急性放射線肺障害の直接の原因となっているのであれば、好中球エラスターゼ阻害剤(シベレスタットナトリウム水和剤)の投与により重篤な肺障害を未然に防止することが可能となる。そこで今回、実験的に C57BL/6 マウスを用いて肺に照射し、好中球エラスターゼ阻害剤の投与による致死的な肺障害の防止効果を血中好中球エラスターゼ活性の測定、肺組織浸潤好中球のエラスターゼ顆粒の免疫組織による定量分析を行い、これらと肺障害およびマウスの生存率との関係を明らかにする。なお、今回の実験で使用する C57BL/6 マウスは肺の放射線感受性が高く、12-14 Gy 以上で強い肺障害を生ずることが判明しており、放射線肺障害の model として最適である。

急性期に見られる致死放射線肺障害に対する治療法はステロイドパルス療法以外には行われていないのが現状である。好中球エラスターゼ阻害剤が放射線肺障害に対して有効であることが明らかにされれば、肺癌を代表とする胸部に対する放射線治療をより安全に施行することが可能となる。肺癌に対する放射線治療は肺障害のために治療が限界にきており、有害事象の軽減・防止に対して有効な薬剤の使用はより優れた治療効果を得るのに資することが大いに期待される。

3. 研究の方法

材料

C57BL/6J マウス(8週齢雌)

放射線の照射

線源は 250KV X 線を使用し、専用の jig を作成の上、頭部と腹部はブロックし、ネンブター麻酔下にて両側肺に照射した。最適な線量を決定するために 12 Gy-24 Gy を 1 回で投与した。

薬剤の投与

好中球エラスターゼ阻害剤としてシベレスタットナトリウム水和剤 30 mg/kg を最適な投与回数を決定するために照射直前のみ、照射直前+照射 1 時間後、照射直前+照射 1 時間後+3 時間後、照射直前+照射 1 時間後+3 時間後+6 時間後に腹腔内に 1 回投与した。コントロール群として照射のみの群と PBS 投与群もこれとは別に用意した。各群は 10 匹を割り当てた。

肺障害防止効果の評価

好中球エラスターゼ活性を放射線の照射 24 時間後および 48 時間後に測定した。またマウスを屠殺して肺を摘出し、4%緩衝ホルマリンにて保存した。摘出した肺は後に HE および抗好中球エラスターゼ抗体による免疫染色を行った。好中球エラスターゼによる肺障害の抑制効果を明らかにした上で、実験群を吟味し生存率と肺障害の状態をさらに経時的に病理組織学的に検討した。

さらに致死的な急性肺障害を免れて長期生存したマウスの肺組織を病理組織学的に検討し、肺線維化の状態を検討した。

本実験系における最適な線量は 20Gy の 1 回照射であることを明らかにした。また、シベレスタットナトリウム水和剤 30 mg/kg の投与時期と回数は照射前後に集中的に行うのが効果的であることが判明した。

4. 研究成果

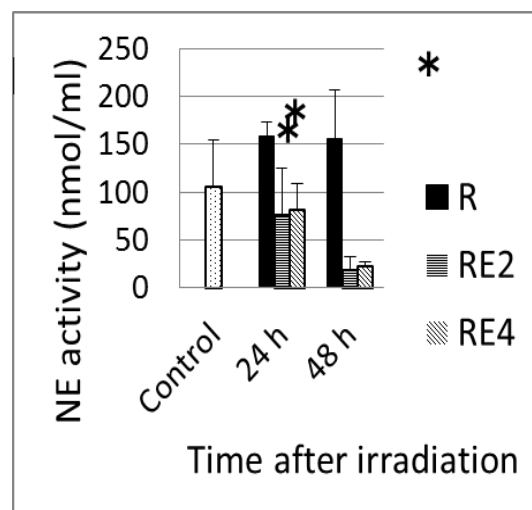


図 1

図1に好中球エラスターゼ活性を放射線の照射24時間後および48時間後に測定した結果を示す。Rは照射のみ、RE2はシベレスタットナトリウム水和剤を照射直前+照射1時間後に投与、RE4は照射直前+照射1時間後+3時間後+6時間後に投与した群である。放射線の照射により好中球エラスターゼ活性は上昇し、シベレスタットナトリウム水和剤の投与により照射後24時間、48時間における好中球エラスターゼ活性は有意に抑制された。

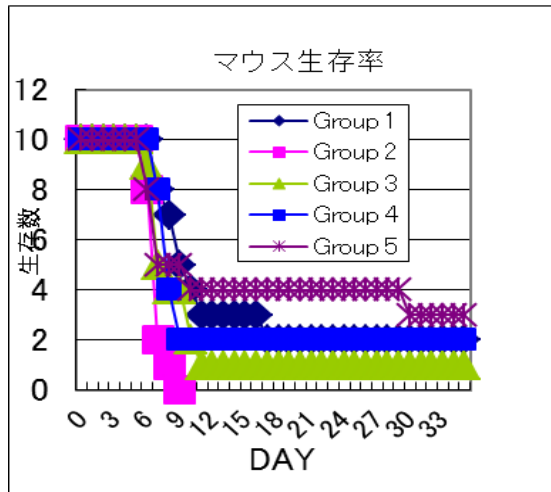
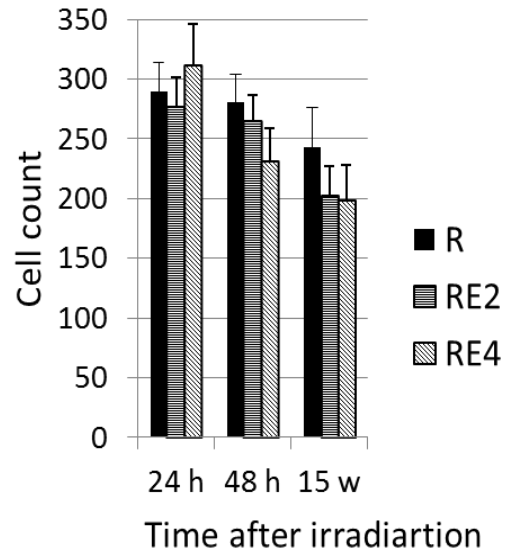


図2

図2にシベレスタットナトリウム水和剤の投与回数と照射後の生存率を示す。Group 2は投与回数1回、Group 5は投与回数4回における生存率である。投与回数が増えるほど生存率は改善しており、好中球エラスターゼ活性の抑制が肺障害による致死率を低下させていることが推定される。

シベレスタットナトリウム水和剤の投与によって好中球エラスターゼ活性が有意に抑制されたが、照射後24時間、48時間では肺の組織学的変化は照射された肺では小さい無気肺や血管内血栓を散見するものの大部分の肺はコントロール群と同様に見えた。従ってシベレスタットナトリウム水和剤の投与による組織学的肺障害の抑制効果は照射後24時間、48時間ではまだ肺障害が顕在化する時期ではなかったものと考えられた。

図3に照射後24時間、48時間におけるII型肺胞上皮細胞数を示す。II型肺胞上皮細胞は肺障害の修復過程でみられるので間接的に肺障害の程度を表している。いずれの群も経時的に細胞数は減少しており、シベレスタットナトリウム水和剤の投与により減少の程度はより大きかった。すなわち障害の程度がより小さかったことを示している。

図3

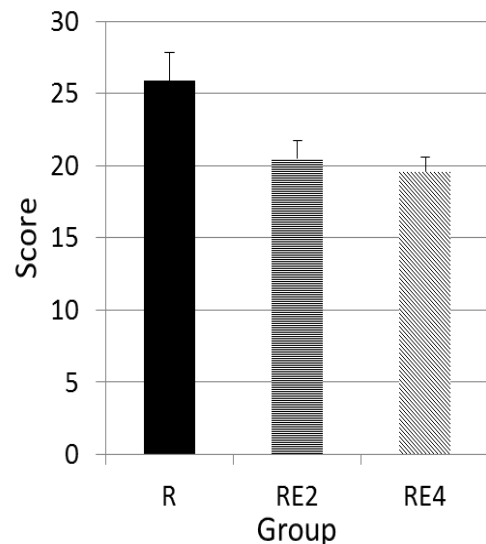


図4

図4に照射後15週における肺障害をスコア化した結果を示す。

各群15週時点での鍍銀染色標本からランダムに10視野選択し、肺障害の度合いをスコア化した。基底膜の断裂/肥厚、間質の肥厚、胚胞構造の乱れを観察し、軽度(1点)、中等度(2点)、高度(3点)と点数をつけた。シベレスタットナトリウム水和剤の投与により有意に照射後15週目での肺障害は軽減していることが病理組織学的に示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪俣 泰典 (Inomata Taisuke)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：90176462

(2) 研究分担者

高橋 正嗣 (Takahashi Masatsugu)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：00330077