

〔原 著〕

実験的BLM肺線維症に関する放射線の研究

前田 静一

東日本学園大学歯学部歯科放射線学講座

(指導：金子昌幸教授)

Experimental BLM Fibrosis of Lungs: Radiologic study

Seiichi MAEDA

Department of Dental Radiology, School of Dentistry,
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Director: Prof. Masayuki KANEKO)

Abstract

The process of experimental bleomycin (BLM) fibrosis of lungs was examined by means of lung scintigraphy in rats, and the agreement with histologic or microangiographic features were evaluated. Rats were administered 15mg/kg BLM 3 times a week, individually, and examinations were performed. Lung scintigraphy was taken after ^{99m}Tc labeled macroaggregated albumin (^{99m}Tc -MMA) was given in the vein and equilibrium was attained.

Histologically, at 6 week after administration of BLM, collagen fiber formation was observed around vessels and bronchial tubes of the lungs and diaphragmatic pleura, and subsequently fibrosis progressed with the total amount of BLM administered. The microangiographic findings, extension and/or stenosis of vessels was observed, and the capillary network was reduced, while decreased ^{99m}Tc -MMA uptake was observed as peripheral lesions of the lungs in scintigram, especially at the bottom of the lungs. Both sets of findings were similar with the total amount of BLM administration.

In conclusion, it was suggested that the process of experimental BLM fibrosis of lungs could be evaluated by lung scintigraphy in rats and that the findings would be parallel to histologic and microangiographic features.

本論文の要旨は第8回東日本学園大学歯学会学術大会(平成2年2月24日), 第9回東日本学園大学歯学会学術大会(平成3年2月16日)において発表した。

受付：平成5年3月19日

I. 緒 言

肺線維症という概念は元来、肺間質を病変の場とする肺炎を間質性肺炎といい、本症は進行すれば肺間質の線維化をもたらすため、肺線維症ともいわれる¹⁾。間質性肺炎または肺線維症は線維化をきたす呼吸疾患の総称として用いられている¹⁾。胸部X線写真では、び漫性の蜂巣状陰影や肺の萎縮が著しく、肺機能検査では、拘束性換気障害、拡散障害、低酸素血症を認める²⁾。本症の発生原因としては、塵肺や放射線照射あるいはブレオマイシン (Bleomycin, 以下BLMと略す) など、種々の原因が挙げられる³⁾。これらの原因の中でBLMは頭頸部悪性腫瘍の治療にも用いられることから、歯科領域にも密接な関係を有するといえる。BLMは、1962年梅沢⁴⁾によって発見されたglycopeptide系の抗癌剤であり、1965年に市川⁵⁾によって臨床報告が行われた。1967年には佐藤⁶⁾による口腔癌への応用が報告されている。これらの報告から、BLMはとりわけ頭頸部扁平上皮癌に優れた効果を発揮することが確認された。BLMは単独でも抗癌効果を有するとともに、血液毒性を示すことが少ないという優れた特徴を持つので、本邦のみならず欧米でも広く用いられるようになった。しかし、BLMは脱毛、炎症、腎毒性あるいは肺線維症などの副作用を伴うことが多く⁷⁾、それらの防止は治療継続上、極めて重要な課題であった。肺線維症の発現については、Dose-limiting factorであることが知られ、総投与量の制限がなされるに至り、投与方法の工夫や多剤との併用療法の検討が行われてきた。また油性BLM、固形BLM、およびスポンゼルBLMなどの剤型の工夫やPeploleomycinなどのBLM誘導体の開発も行われた⁸⁾。しかし、BLMによる肺線維症の発生は、依然として完全に防止されるに至っていないのが現状である。

以上に述べたBLMの副作用、特に肺線維症の

発生という問題を解決するために、種々の研究が古くから行われてきた⁽⁹⁻²⁰⁾。それらの中には肺線維症の発生機序や進行過程に関する研究が含まれているのは当然である。発生機序や進行過程についての臨床例研究としては、人体例を用いた影山⁹⁾、影山ら¹⁰⁾、金子¹¹⁾、下里ら¹²⁾¹³⁾、基礎的研究としては、動物実験による市橋¹⁴⁾、岡本¹⁵⁾、松田¹⁶⁾、田村¹⁷⁾、大和田¹⁸⁾の組織学的研究の報告がある。それらに共通した所見は各研究者によって多少の相違はあるが、まず最初に、炎症性の細胞浸潤、浮腫、肺血管の拡張などの変化が胸膜直下に現れ、徐々に進行するという所見であった。また天野¹⁹⁾はマイクロアンジオグラフィでBLM投与後の血管系の経時的変化を観察し、Marom²⁰⁾は生化学的観点からの研究を行った。これらの種々の研究で、肺線維症の発生機序や進行過程についてはほぼ解明されたと言える。

以上に述べた動物実験による研究のほとんどは、別群の個体を用い、屠殺後に検索したものである。従って、生存状態における変化の観察は不可能であったといえる。生存状態の観察には、X線検査を用いることが、最も簡便であるが、単純撮影による解像力は不十分であり、病変の進行過程を把握することは困難と思われる。これに対して、肺血流シンチグラフィは臨床的に広く用いられ、血管分布の状態を知る上で極めて有用である事が知られている²¹⁾。しかし、肺血流シンチグラフィは臨床的利用に限られてきたのが現状であり、ラットなどの小型実験動物を用いた実験的肺線維症の進行過程の観察に本法が用いられたとの研究はほとんどなく、小動物に作成した実験的肺線維症の肺血流シンチグラム所見を組織学的所見やマイクロアンジオグラム所見と比較検討したとの報告もほとんどみられない。ラットなどの小動物では、肺そのものが小さすぎ、従来のガンマカメラやスキャナでは、病変の部位や病変の変化を描出

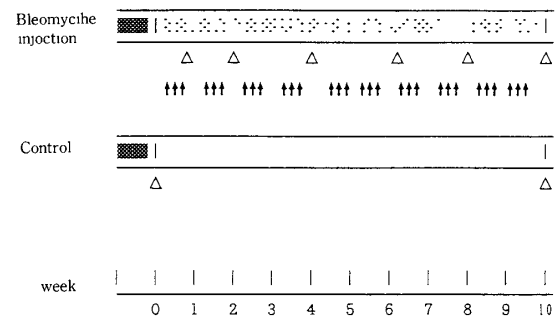
することが不可能であったため、やむを得ないことである。しかし、近年になり、金子ら²²⁾²³⁾、金子²⁴⁾、高野ら²⁵⁾²⁶⁾が人体用ピンホールコリメータに簡単な改良を加え、小動物用ピンホールコリメータを開発し、ラットやマウスの顎骨シンチグラフィや甲状腺シンチグラフィが可能になったと報告し、小動物を用いた研究に各種シンチグラフィが充分に使用しうるのであろうと述べている。

そこで今回著者は、ラットを用いて実験的BLM肺線維症の進行過程を、小動物用ピンホールコリメータによる肺血流シンチグラフィで経時的に観察し、診断できるか否かを、また可能であれば、得られた肺血流シンチグラム所見が組織学的所見やマイクロアンジオグラム所見に裏付けされるか否かを検討することを目的とし、以下の実験を行い、小動物用ピンホールコリメータによる肺シンチグラフィの有用性を確認したので報告する。

II. 実験材料および方法

1. 実験動物

実験動物としては、体重約200g（7週齢）の雄性Wistar系ラットを70匹使用した。ラットは、実験開始に先立ち、一定条件の飼育室で1週間の予備飼育を行った。実験開始後の飼育条件は、予備飼育と同様にクリーン下で一定とし、オリエンタル社製固形飼料（オリエンタルMF）と水道水を自由に摂取させた。ラットは、非投与群とBLM投与群の2群に分け、投与群は投与開始後、1週目、2週目、4週目、6週目、8週目、および10週目の各観察日に10匹ずつを用いることとした。10匹のラットを用いたが途中で死亡した例もあったため3匹を肺シンチグラフィとマイクロアンジオグラフィに使用し、残りの各3匹を組織学的検索に使用することとした。なお、BLMの投与量の決定は、大和田ら¹⁸⁾が、体重1kgあたりの総投与量120mg以上で結



Experimental methods

Animals (Wister rats weighing about 200g)

The rats were obtained one week before the experiments for adaptation to the environment.

Bleomycine injection (three times a week, every two days) Duration of injections

Shintigrams were taken before angiograms

Fig. 1. Outline of the Experiments

合繊維の増加が認められ、200mg以上ではほぼ全例に線維化が認められたと報告しているので、ラットの匹数を可及的に少なくし、各々3匹ずつを使用するにとどめた。

2. BLMの投与方法

ラットの腹腔内に1回量15mg/kgのBLMを週3回の割合で各観察日まで投与した。BLMの投与スケジュールはFig 1のごとくである。各観察日までの総投与量は、それぞれ1週間で45mg/kg、2週間で90mg/kg、4週間で180mg/kg、6週間で270mg/kg、8週間で360mg/kg、10週間で450mg/kg、である。使用したBLMは、日本化薬社製の油性ブレオマイシンである。

3. 体重変化の観察

実験動物の体重変化の観察は、週1回の割合で生存しているラットを測定して平均値を算出した。

4. 肺血流シンチグラフィ

肺血流シンチグラフィは、各観察日に達したBLM投与ラットに、尾静脈より第1アイソトープ研究所製^{99m}Tc標識大凝集ヒト血清アルブミン（以下^{99m}Tc-MAAと略す）を74MBq投与し、平衡状態となった段階で撮像を行った。撮像は

LFOV型ガンマカメラと当教室で改良した小動物用ピンホールコリメータを用いて行った。撮像条件は距離3cm, カウント300kC, 露出150とし, 仰臥位で撮像することとした (Fig 2)。なお用いたピンホールコリメータの構造はFig 3の模式図に示すごとくであり, 改良部分の材質は鉛である。

5. マイクロアンジオグラフィ

肺のマイクロアンジオグラフィは, 各観察日

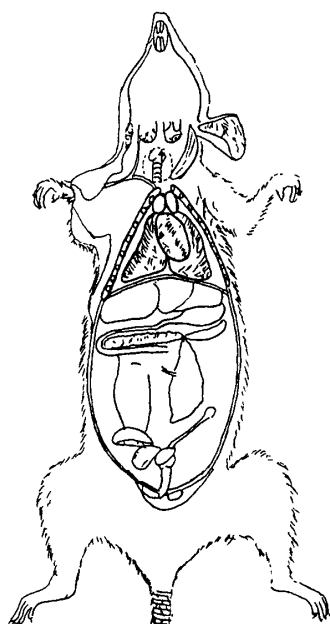


Fig. 2. Plan of the visceral organ of rats.

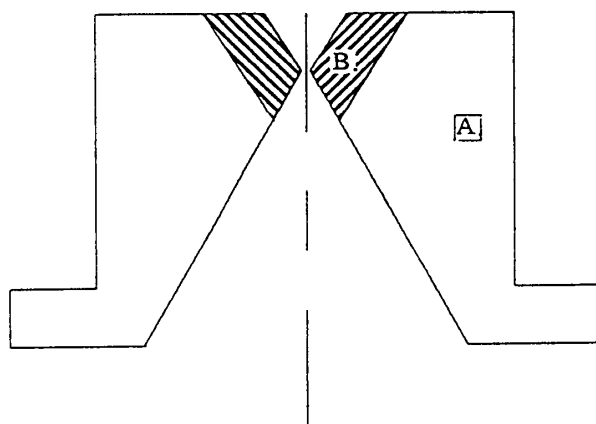


Fig. 3. Diagram of the improved pinhole collimator.

- A. human pinhole collimator of 8mm aperture.
- B. improved port of 1.5mm aperture made of lead.

に肺血流シンチグラフィを行ったラットと同一個体を使用することとした。マイクロアンジオグラフィ用試料の作成は, 北村²⁷⁾, 向井²⁸⁾の方法に従った。すなわちラットを固定台に仰臥位に固定後, 頸部から腹部へ正中切開を加えて胸部を開き, 心臓と左右総頸静脈を露出し, 下行大動脈を結紮した後に, 左右総頸静脈に駆血用の切開を加え, 左心室より動脈内持続注入ポンプ (シャープinfusion pump MP-25) を用いて一定圧下でおこなった (Fig 4)。造影剤注入に先だち駆血洗浄を行うため, ヘパリン添加生理食塩水で十分に洗浄還流を行い血液を一掃した。造影剤は, バルギンSゾル3号 (共成製薬社製, 硫酸バリウム100W/V%) を用い, 肺が十分蒼白になったところで注入完了とした。注入終了後肺組織を摘出し, 10%中性ホルマリン溶液で固定後, 通法に従ってセロイジン包埋をおこなった。マイクロアンジオグラムを作成は, セロイジン包埋を施した組織を厚さ約200 μ mの切片とし, 日本ソフテックス社製軟X線発生装置 (Softex CMR型) にて, 焦点被写体間距離7.0cm, 管電圧10.0kVp, 管電流4.5mA, 照射時間10minの条件で行った。

6. 組織学的検索

組織学的変化の観察は, 各観察日に達したBLM投与群のラットを用いて行った。肺組織を



Fig. 4. Photograph showing the angiogram technique injecting catheter to the ventriculus sinister.

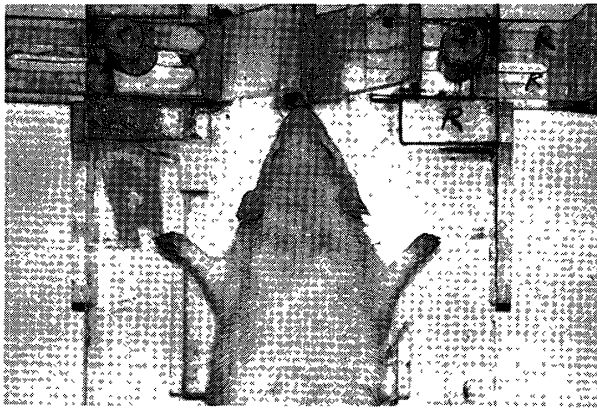


Fig. 5. Changes in the body weight of the rats.

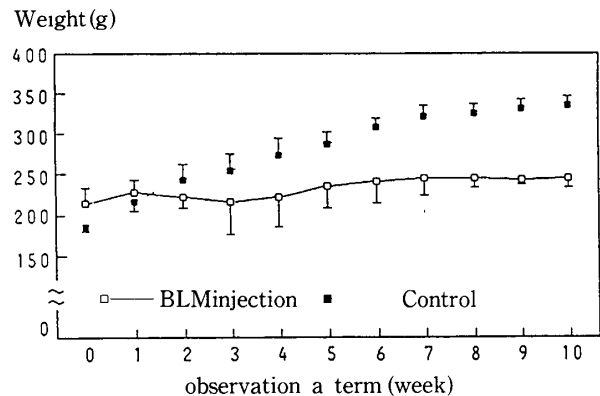


Fig. 6. Photograph geipilation, a side effect.

Table 1. Change in the body weight in the rats. (anerage ± SD)

BLM - Week	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BLM injection	215 ± 15	227 ± 14	223 ± 12	217 ± 34	223 ± 33	235 ± 27	241 ± 20	245 ± 16	247 ± 11	241 ± 2	246 ± 10
control	185 ± 3	214 ± 7	242 ± 15	256 ± 16	274 ± 16	284 ± 14	309 ± 10	320 ± 13	324 ± 10	330 ± 11	336 ± 11

摘出し、10%中性ホルマリン液で固定後、通法に従ってパラフィン包埋を行った。得られたブロックから厚さ約5 μ mの薄切切片を作成し、Hematoxylin-eosin染色、(以下H・E染色と略す)、Azan-Mallory染色、Van Gieson染色、PAS-Alcianblue染色、Toluidine blue染色(以下TB染色と略す)、Weigertの弾性線維染色を施し、検鏡に供した。肺の組織学的変化の観察は胸膜、肺胞壁、肺胞腔、血管周囲組織、細気管支の変化を中心として行った。

III. 結 果

1. BLMの毒性について

1) 体重変化

BLM非投与例は10週目までに死亡した個体は認められなかったが、BLM投与例では60匹のうち5週目までに8匹が、10週目までに17匹が死亡したので実際には43匹について各観察日に測定した。非投与例では、経時的な体重の増加が認められたが、BLM投与例では非投与例に比較して体重増加が低率であった。投与後10週目では、非投与例の体重平均値とBLM投与群の

体重平均値では約80gの差が認められた(Fig 5, Table 1)。

2) 肉眼的所見

非投与群では、体格や毛並みはともに正常の発育状態を示し、異常と思われる変化は認められなかった。BLM投与群では、2週目から局所的脱毛(Fig 6)が著明となった。以後、脱毛はさらに広範囲となり、回復の傾向は認められなかった。また解剖学的には、1週目ではラット全例に肺にうっ血がみられ、6週目のラット全例の肺が幾分硬度を増し、暗赤色を呈していた。またこのことはBLMが極めて毒性の強いことを示唆した。

2. 肺病変について(放射線学的ならびに組織学的所見)

1) BLM非投与群

(1) 肺血流シンチグラム所見

BLM非投与群では、3匹のラット全例ともに左右の肺に均一な 99m Tc-MAAの取り込みが認められる。両側ともに肺の底部はほぼ同等の高さにあり、それらの辺縁は明瞭でかつ平滑である(Fig 7-a)。

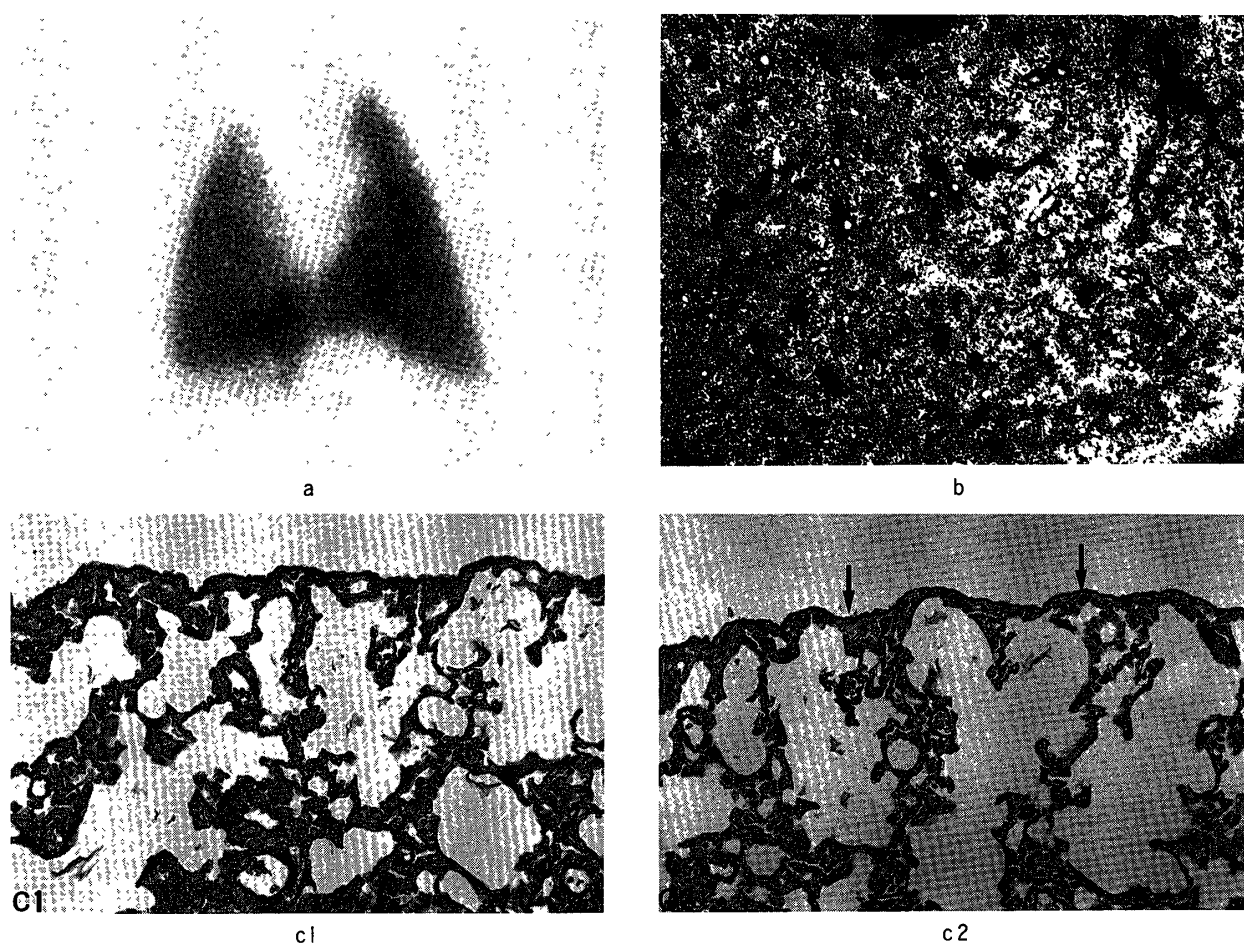


Fig. 7. Control

a: ^{99m}Tc -MA scintigram of lungs showing accumulation in both lungs.

b: Microangiogram of lungs showing a regular and net-like appearance of the vascular pattern. X10.

c: Histology of normal lungs in rats.

1. Auan-Mallory staining, X170.

2. Elastica Weigert staining, X170

(2) マイクロアンジオグラム所見

前述のごとく肺血流シンチグラフィ使用例にマイクロアンジオグラフィ、マイクロアンジオグラムを施行したが、3匹のラット全例ともに血管の分布は規則正しい網状構造を呈している。血管の蛇行や拡張は認められず、造影剤の分布も均一である (Fig 7-b)。

(3) 組織学的所見

3匹のラットは組織学的に肺は、正常で気管支は多列線毛ないし単層線毛円柱上皮細胞で被われ、上皮細胞直下には少量の結合組織がみられる。その外側には気管支をとりまく平滑筋層があり、気管支組織の一部にはリンパ装置が認め

られる。気管支周囲には少量の結合組織がみられる。気管支壁の弾性線維は粘膜上皮細胞直下の結合組織および筋層の部分にみられる。気管支と並行する血管の外膜結合組織には少量の結合組織が認められるが、その他の血管の外膜結合組織は極めて少量である。それらの血管壁には比較的微細な弾性線維が認められる。肺胞壁は薄く膠原線維は極めて少量であり、肺胞壁には微細な弾性線維が規則的に認められる。臓側胸膜は平滑で一層の中皮が覆っており、その下には肺胞壁と同様少量の結合組織がみられる (Fig 7-c1)。胸膜にはやや太い弾性線維が一層みられる (Fig 7-c2)。Alcianblueに強染する、またTB染色で

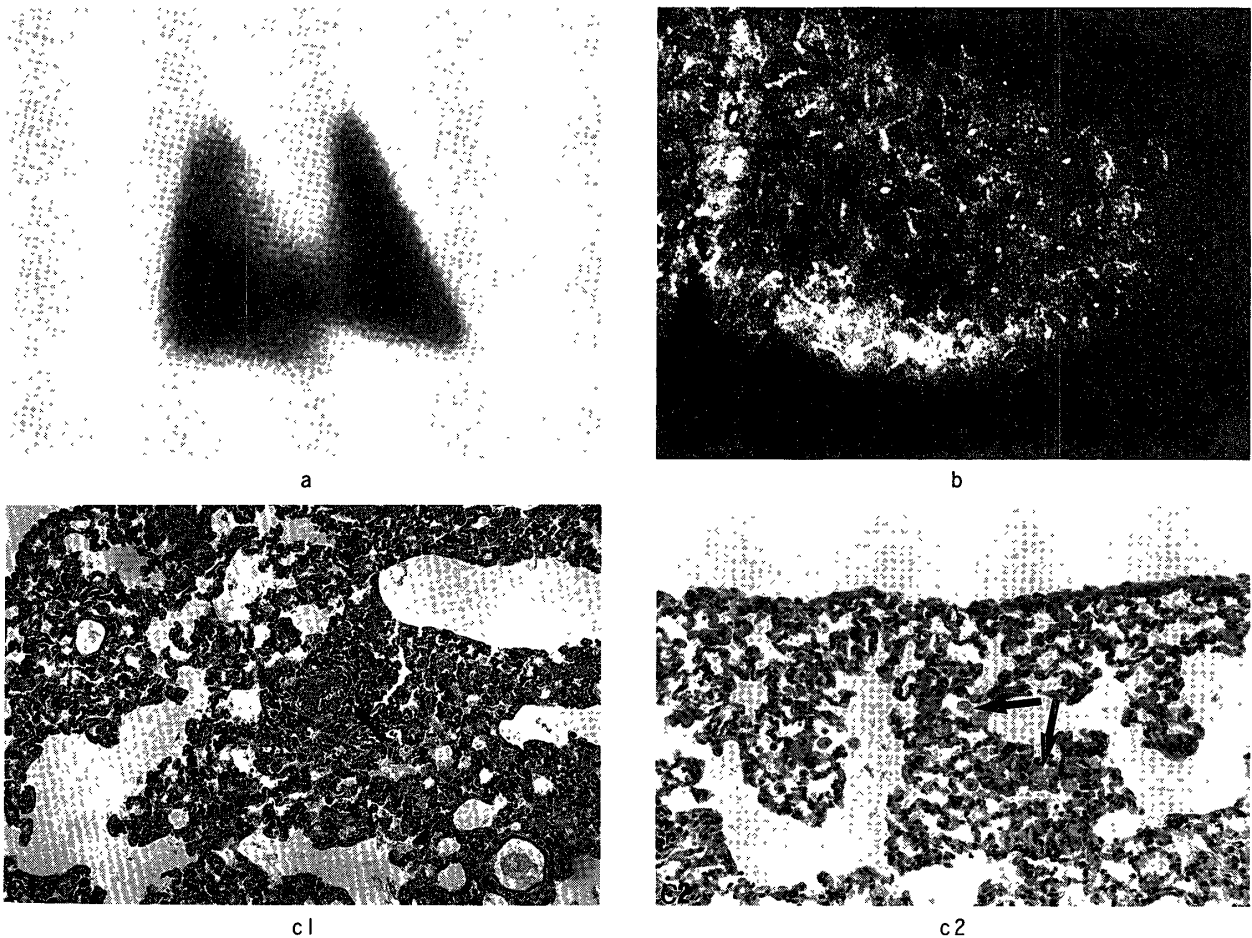


Fig. 8. Lungs one week after BLM injection.

a: Scintigram showing the same accumulation as the control.

b: Microangiogram showing no abnormal changes in the vascular pattern, X10.

c: Histological findings.

1. The infiltration of inflammatory cells in the perivascular area (arrows) and exudate into the alveolar cavity (arrows) are noticed. H&E, X170.

2. A few fat granule cells with foamy appearance. H&E, X170.

異染性を示す肥満細胞が胸膜に散見される。

2) BLM投与開始後 1 週目 (総投与量 45mg/kg)

(1) 肺血流シンチグラム所見

3 匹のラット全例に^{99m}Tc-MAAの肺への集積は、左右ともに、非投与群とほぼ同様の所見を示す (Fig 8-a)。

(2) マイクロアンジオグラム所見

3 匹のラット全例ともに造影剤の分布は、非投与群に比べれば一部でやや不均一であるが、血管の狭窄や拡張ならびに蛇行は認められない (Fig 8-b)。

(3) 組織学的所見

3 匹のラット全例ともに血管周囲の炎症細胞浸潤、肺胞内に滲出物が認められる (Fig 8-c1)。胸膜下に泡沫状の脂肪顆粒細胞の出現を見る (Fig 8-c2)。

3) BLM投与開始後 2 週目 (総投与量 90mg/kg)

(1) 肺血流シンチグラム所見

3 匹のラット全例ともに^{99m}Tc-MAAの肺への集積は、左右ともに、非投与群とほぼ同様の分布状態を呈する (Fig 9-a)。

(2) マイクロアンジオグラム所見

3 匹のラット全例とも造影剤の分布は比較的均一である。しかし、1 週目に比較すれば、極

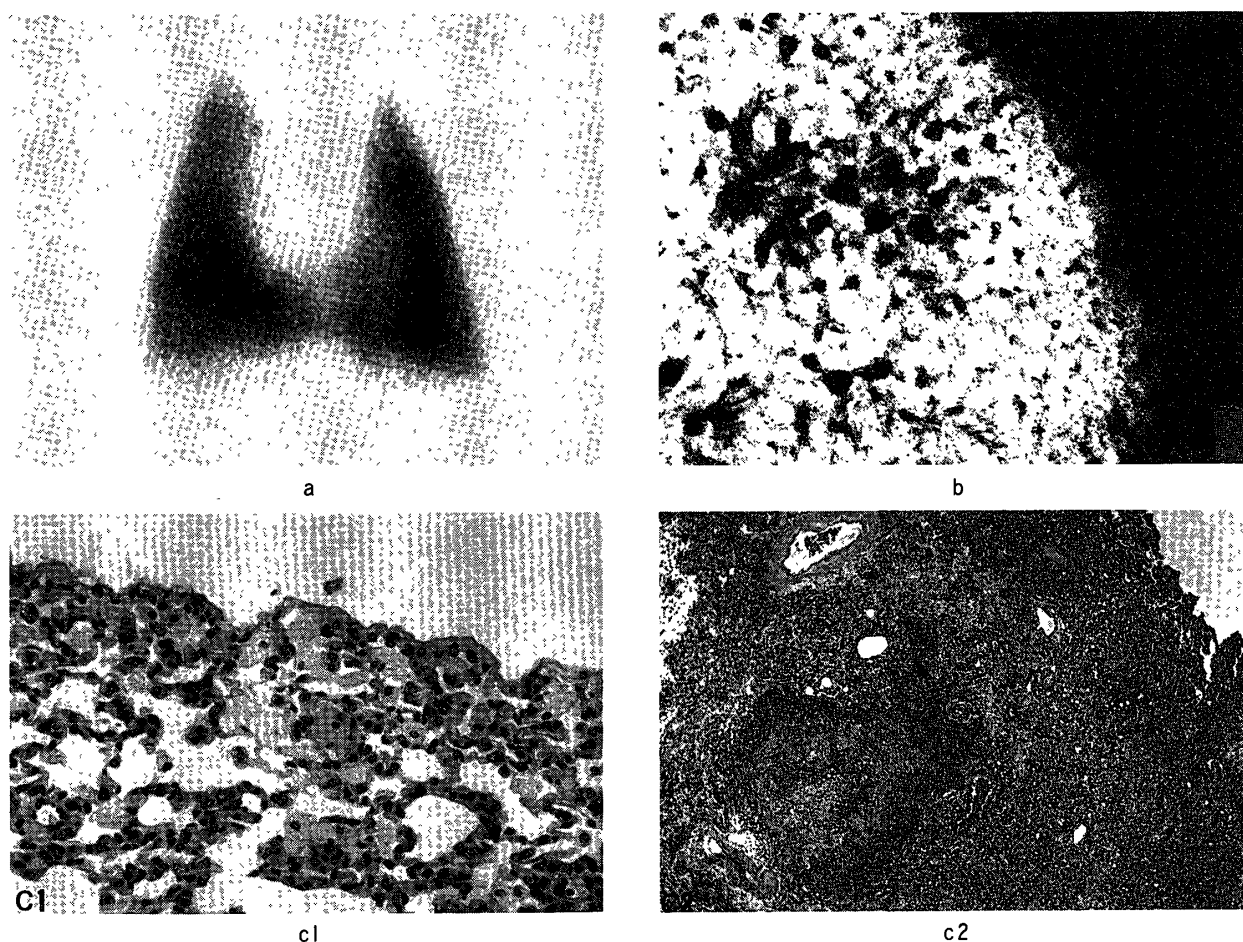


Fig. 9. Lungs two weeks after BLM injection.

a: Schintigram similar to the controls.

b: Microangiogram showing areas of various changes, X10.

c: Histological findings.

1. Abundant foamy and fat granule cells just beneath the pleura (arrows). H&E, X170.

2. Many leukocytes infiltrate into the adjacent peribronchial tissue, showing bronchitis. H&E, X340.

めて軽度であるものの斑紋状の欠損像が認められる。血管の拡張もより著明となり、毛細血管網の分布はより低密度かつ不規則な傾向を示している (Fig 9-b)。

(3)組織学的所見

胸膜直下に多数の泡沫状の脂肪顆粒細胞の出現が認められるが、(Fig 9-c1) 未だ線維化は認められない。3匹全例に上記所見が認められた。また3匹中1匹に気管支肺炎の組織像が見られた (Fig 9-c2)。

4) BLM投与開始後4週目 (総投与量180mg/kg)

(1)肺血流シンチグラム所見

3匹ラット全例ともに ^{99m}Tc -MAAの肺への集積は、左右ともに、非投与群とほぼ同様分布状態を呈する。しかし両肺の辺縁が、わずかに不明瞭となり軽度のび慢性所見として認められる (Fig 10-a)。

(2)マイクロアンジオグラム所見

3匹のラット全例とも造影剤の分布は、2週目までに比べ、さらに不均一かつ分布密度の低下した斑紋状所見を呈する。血管の拡張や蛇行もさらに著明となり、毛細血管網の消失も認められる (Fig 10-b)。

(3)組織学的所見

3匹のラット全例とも散在性にAlcianblueに

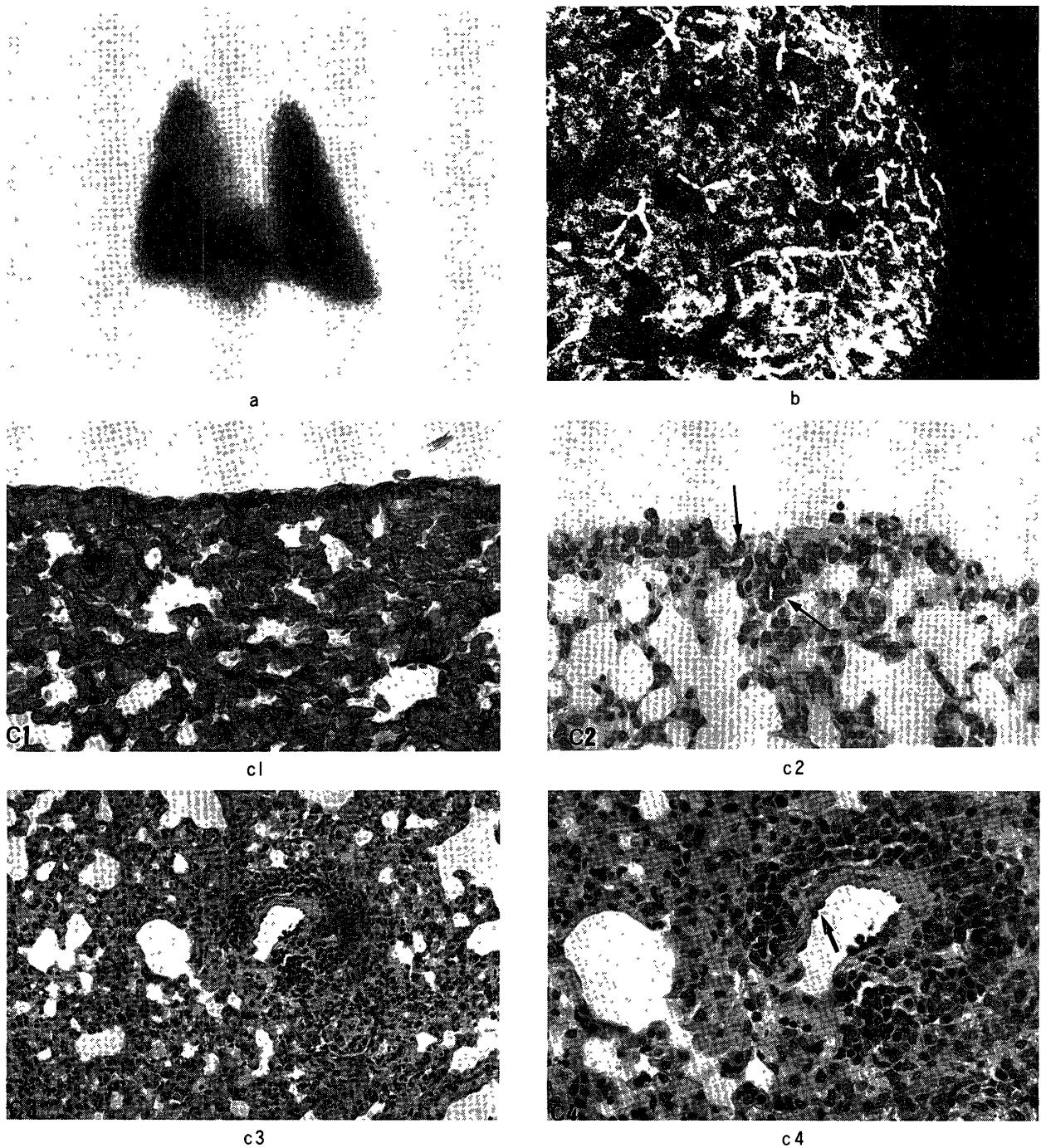


Fig. 10. Lungs four weeks after BLM injection.

a: Schintigram showing an ill-defined area at the margin of the lungs.

b: Microangiogram showing marked dilated and tortuous vessels, X10.

c: Histological findings.

1. A prominent increase in collagen fibers in the diaphragmatic pleura. Azan-Mallory, X340.

2. Mast cells showing metachromasia as reddish purple (arrows).

Toluidine blue, X170.

3. Infiltration of inflammatory cells in the perivascular areas and foamy and fat granule cells. H&E, X170.

4. Higher magnification of the same section as c 3 showing the enlarged vascular endothelial cells (arrow). H&E, X340.

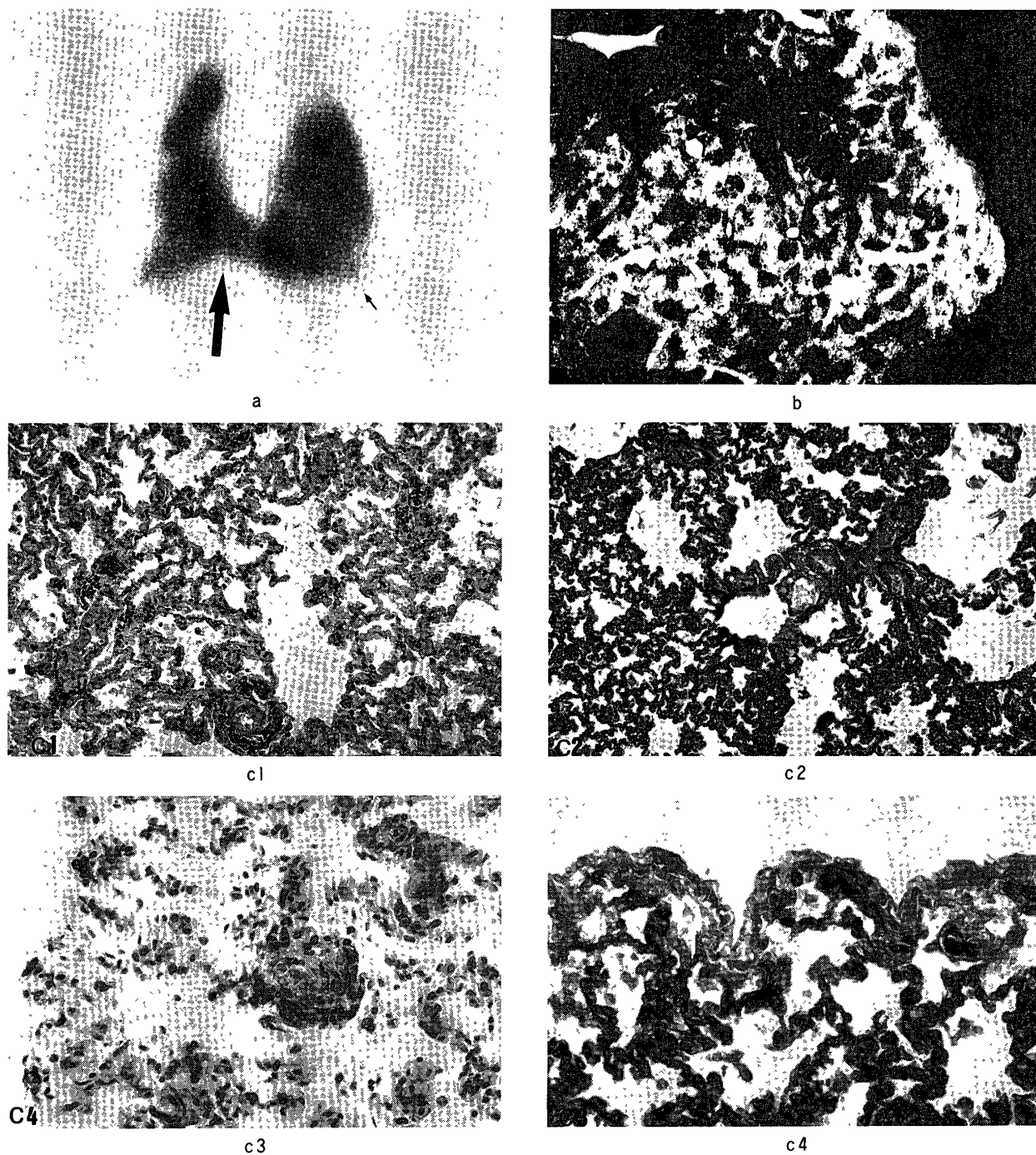


Fig. 11. Lungs six weeks after BLM injection.

- a: Scintigram showing the elevation of accumulation line at the lower border of the lungs (arrow) and the obtuse angle at the lateral corner of the pleura (arrow).
- b: Microangiogram showing decreases in density in the distribution of contrast media, X10.
- c: Histological findings.
 1. Infiltration of inflammation cells in the perivascular areas. H&E, X85.
 2. Increase of collagen fibers in the perivascular and peribronchial tissues. Azan-Mallory, X85.
 3. Abundant collagen fibers in the diaphragmatic pleura, involving the alveolar walls. Azan-Mallory, X340.
 4. Mast cells are numerous in the perivascular tissue. Toluidine blue, X340.

染まり、TB染色で異染性を示す肥満細胞が胸膜直下に多数認められる (Fig 10-c1)。胸膜直下に泡沫状の脂肪顆粒細胞が著明に認められ、臓側胸膜には軽度の膠原線維の増生が認められる (Fig 10-c2)。血管周囲性に炎症細胞浸潤、肺胞内小血管の内皮細胞の腫大、外膜組織の粗鬆化が認められる (Fig 10-c3, c4)。

5)BLM投与開始後 6 週目 (総投与量270mg/kg)

(1)肺血流シンチグラム所見

3 匹のラット全例ともに^{99m}Tc-MAAの肺への集積は、非投与群と比較すると特に両肺の下肺野に著しい集積の低下が見られ、臓側胸膜部に一致した肺底部の高さの変化および胸膜外側隅角部の鈍角化を認める。また全体的に斑紋状を呈する。両肺の内側縁及び外側縁はともに凹凸不整であり、不明瞭な辺縁として認められる (Fig 11-a)。

(2)マイクロアンジオグラム所見

3 匹のラット全例ともに造影剤の分布は、4 週目までにくらべ極めて不均一となり、造影剤の流入を全く認めない部分も存在する。血管の拡張や蛇行がより顕著となり、毛細血管は僅かに分布するのみである (Fig 11-b)。

(3)組織学的所見

3 匹のラット全例ともに血管周囲性に炎症細胞浸潤が目立ち、血管周囲、気管支周囲に膠原線維の増生が認められる (Fig 11-c1, c2)。臓側胸膜に膠原線維の増生が認められ、かつ肺胞壁に移行している (Fig 11-c3)。胸膜下、血管周囲性に肥満細胞が著明に増加している (Fig 11-c4)。

6)BLM投与開始後 8 週目 (総投与量360mg/kg)

(1)肺シンチグラム所見

3 匹のラット全例ともに^{99m}Tc-MAAの肺への集積は、6 週目に比べてさらに低下し、より強い斑紋状所見を呈する。両肺の内側縁及び外

側縁は、さらに強い凹凸不整を呈する。また、右側臓側胸膜部は非投与群に比較して高位に存在する (Fig 12-a)。

(2)マイクロアンジオグラム所見

3 匹のラット全例ともに造影剤の分布密度はさらに低下し、著しい斑紋状所見を呈する。血管系は萎縮傾向を示し、毛細血管網のほとんどが消失した所見を呈する (Fig 12-b)。

(3)組織学的所見

3 匹のラット全例ともに臓側胸膜の膠原線維の増生がさらに著明となり、帯状の線維化を呈し、その線維化は胸膜下の肺胞壁におよんでいる (Fig 12-c1, c2)。胸膜下の太い弾性線維の断裂、消失、分裂が認められる (Fig 12-c3)。肺胞中隔の肥厚が目立ち、肺胞の狭小化が認められる。血管周囲性、気管周囲性に線維化がさらに目立つようになり、同様に血管周囲性に肥満細胞の数が著しく増加している (Fig 12-c4)。

7)BLM投与開始後10週目 (総投与量450mg/kg)

(1)肺血流シンチグラム所見

3 匹のラット全例ともに^{99m}Tc-MAAの肺への集積は、8 週目に比べてさらに著しく低下し、斑紋状の欠損像として認められる。臓側胸膜部は8 週目に比べさらに高位に認められる (Fig 13-a)。

(2)マイクロアンジオグラム所見

3 匹のラット全例ともに造影剤の分布は極めて不均一であり、大きな欠損像を呈する。毛細血管も僅かに認められる程度であり、毛細血管網はほとんど認められない (Fig 13-b)。

(3)組織学的所見

3 匹のラットともに8 週に比し線維化などの所見がさらに著しく、臓側胸膜はほぼ全域にわたって線維性に肥厚し、部分的に、とくに著明な肥厚を呈するところもある (Fig 13-c1)。それらの線維化巣は、胸膜下の肺胞壁におよび範囲も広がっている。肺胞中隔の肥厚が目立ち、

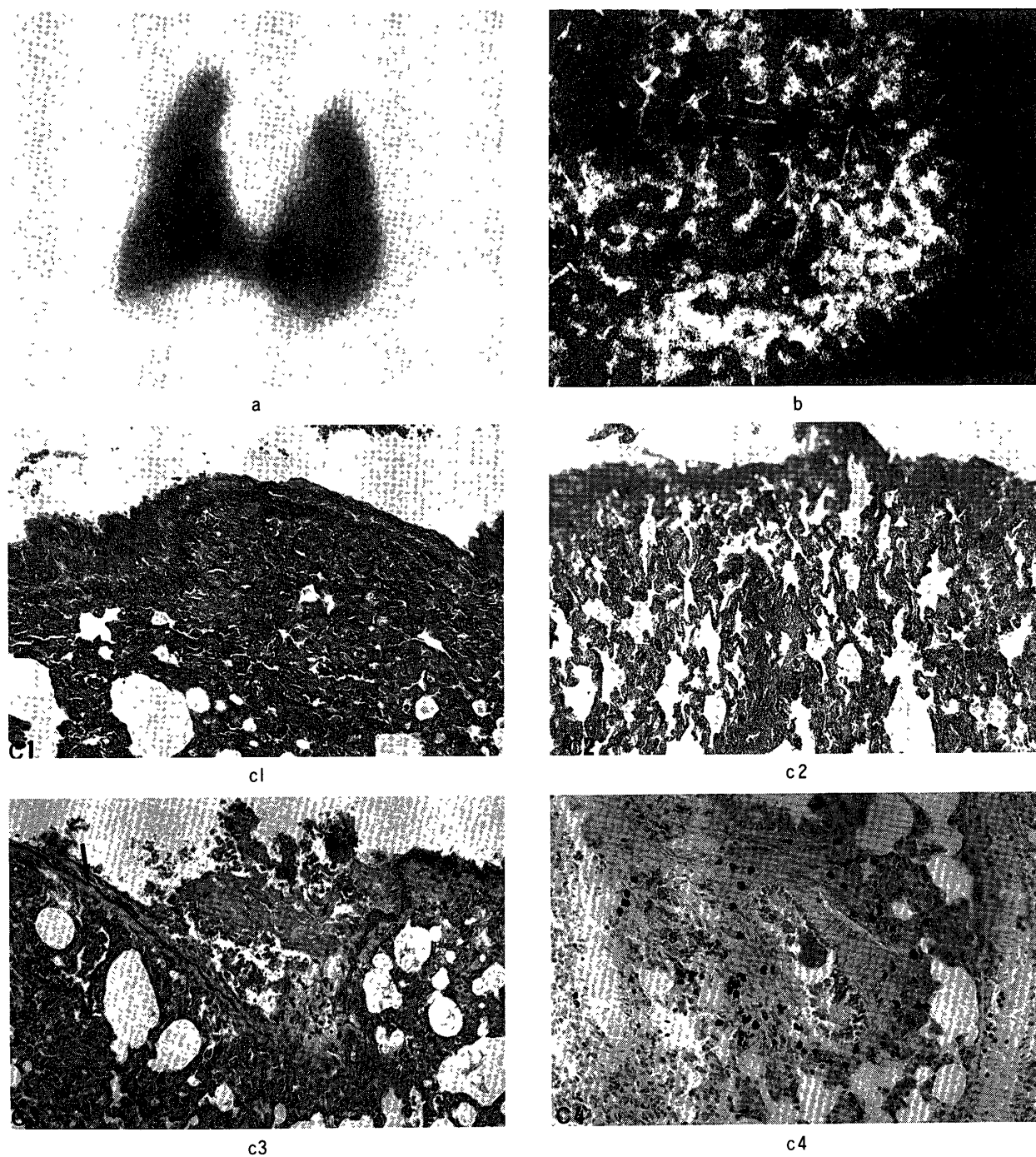


Fig. 12. Lungs eight weeks after BLM injection.

a: Shintigram showing irregularity of the margins of both lungs.

b: Microangiogram showing appreciable vascular atrophy.

c: Histological findings.

1. Collagen fibers in a band just beneath the pleura. Azan-Mallory, X170.

2. Increase of collagen fibers in the alveolar walls. Azan-Mallory, X170.

3. Elastic fibers of the largest caliber in the pleura are broken. Weigert, X340.

4. Mast cells in the perivascular tissue. Toluidine blue, X340.

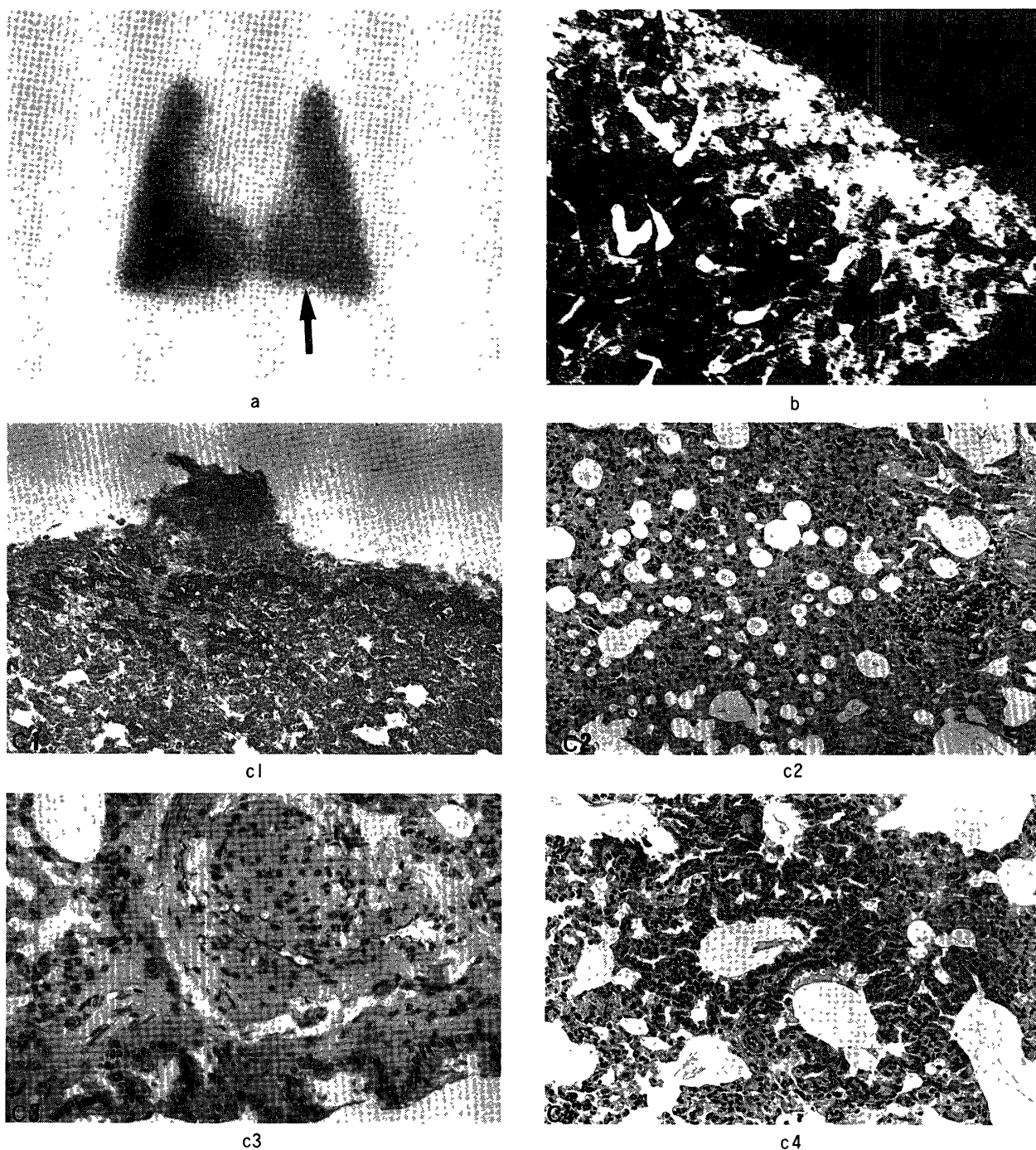


Fig. 13. Lungs ten weeks after BLM injection.

- a: Shintigram showing a prominent decrease of accumulation. The elevation of accumulation line on the lower border of the lungs as also present.
- b: Microangiogram showing decreased density in distribution of contrast media, X10.
- c: Histological findings.
 - 1. Collagen fibers in a band beneath the pleura. Van Gieson, X340.
 - 2. Thickening of the alveolar septa and narrowing of the alveoli. H&E, X170.
 - 3. Degenerated smooth muscle cells in the vessels. H&E, X340.
 - 4. Enlarged alveolar epithelial cells are. H&E, X170.

肺胞の狭小化が著しくなり肺線維症の所見を呈していた (Fig 13-c2)。血管壁の平滑筋細胞の変性, 外膜の粗鬆化もさらに目立ち, 肺胞上皮細胞の腫大, 大型化が認められる (Fig 13-c3, c4)。

IV. 考 察

頭頸部に発生する悪性腫瘍, 特に扁平上皮癌の治療には, BLMが有効であり, 多くの症例に用いられている。しかし, BLMは肺線維症を惹起することが多く, 癌治療の予後に重大な影響を及ぼすことがある。日常の臨床では, 肺線維症の進行過程は, 胸部X線検査や呼吸のガス分散の測定などで診断されてきた¹⁾²⁾。しかしX線検査のみでは診断が困難であり, 近年では, 従来の検査法に加えて, CTや肺シンチグラフィが応用されるようになり, 肺線維症の診断が容易になった²⁹⁾³⁰⁾。しかし, これらの検査法の利用は臨床分野に限られてきたのが実情である。

実験的BLM肺線維症は, 種々の動物モデルが開発され, これらを用いた基礎的研究も古くから行われている。それらの研究の中には, BLM肺線維症の発現機序に関する研究やその進行過程に関する研究が含まれているのは当然のことである。しかしそれらの実験的肺線維症に関する研究の多くは, 病理組織学的¹⁵⁾¹⁸⁾³¹⁾³²⁾, 生理学的³³⁾³⁴⁾, 生化学的²⁰⁾あるいは免疫学的検索³⁵⁾によって行われたものであり, 肺血流シンチグラフィを利用した核医学検索が行われたとの報告はほとんど見られない。近年まで, 小型実験動物の肺を明瞭に描出できる撮像装置が開発されていなかったことが最大の原因として挙げられる。しかし, その後, 金子ら²²⁾²³⁾, 金子²⁴⁾が人体用ピンホールコリメータに簡単な改良を加えるのみで小型実験動物の顎骨シンチグラフィや甲状腺シンチグラフィが行えることを報告した。また高野ら²⁵⁾²⁶⁾は改良型ピンホールコリメータを用いて, 小型実験動物の種々の臓器イメージ

を明確に描出している。そこで今回著者は, 小動物用ピンホールコリメータを用いることによってラットにおける実験的BLM肺線維症の進行過程を, 肺血流シンチグラフィで経時的に観察できるか否かを検討した。また, 得られた肺血流シンチグラム所見が組織学的所見やマイクロアンジオグラム所見に裏付けられるか否かも検討し, 前述の結果を得た。なおラットは肺血流シンチグラフィおよび組織学的検索に各3匹づつ用いたが, 線維化の程度の差こそあれ, 膠原線維の増量が認められ, ほぼ各ラットとも組織学的に同様であり, 10週目では3匹とも肺線維症の所見を呈していた。

(1)組織学的所見について

BLM肺線維症の発生機構については, 種々の動物を用いての実験的肺線維症で多くの報告¹⁵⁾¹⁸⁾³⁷⁾³⁸⁾がなされているが, 動物の種差やBLMの投与方法あるいは飼育方法の違いにより微妙な相違をみせ, 統一の見解には至っていないのが実情であり, 現在それぞれの研究者によっていく通りかの発生機構の仮説がだされている¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。BLM投与による剖検症例の肺組織の組織学的特徴として, 金子¹¹⁾は, 完成された肺線維症は①肺胞中隔の炎症細胞浸潤, 肥厚, 線維化, ②肺胞の狭小化, 肺胞内の硝子膜形成, 泡沫状の脂肪顆粒細胞の出現, ③肺胞上皮細胞の大型化や異型化, ④気管支炎または気管支肺炎, ⑤気管支上皮の増殖および扁平上皮化生, ⑥血管壁の変性などをあげ, BLMによる肺変化は肺胞中隔の血管障害に始まり, これに対する反応として線維芽細胞の増殖がおこって終に線維症となると報告している。また下里ら¹⁴⁾¹⁵⁾は, 同様に剖検症例によるBLMの肺変化として, ①胞隔の血管の拡張と浮腫, 小葉間結合組織の浮腫, 肋膜下に散在する, あるいはびまん性の胞隔の小円型細胞浸潤・線維芽細胞の出現・線維化, ②肺胞上皮細胞の腫大・変性・異型化ならびに肺胞腔内への脱落, 泡沫細胞の出現, ③蛋白成

分、線維素に富む肺水腫、硝子膜形成、滲出物の器質化による肺腔内の線維化、④細気管支上皮の増生と異型化、という特徴をまとめ、肺線維症は肋膜下で著しいと報告している。また岡村³⁷⁾は、肺線維症はBLMによるChemical pneumonitisで、血管を介して直接肺胞壁を障害し、その結果肺腔内に漿液成分を主体とする滲出をおこすとともに肺胞上皮や細気管支上皮を障害し、線維症となると報告している。

また動物実験ではラット、マウス、を用いた報告があり¹⁵⁾¹⁸⁾³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾、金子¹¹⁾はBLMをマウスの腹腔内に注射し、経時的に肺を検索し、最も注意を引いたのが肺胞内泡沫細胞の出現で、BLMの総投与量の増加に従い、この泡沫細胞が多く、また泡沫細胞の出現するのは胸膜に近い部位に多く、BLMによる肺変化の最初はマウスにおいて、肺胞内泡沫細胞の出現であると報告している。浴本ら³⁷⁾³⁸⁾はマウスを用い腹腔内投与による全身投与法と経気管局所投与を行い、両方を比較検討し、肺線維症は、腹腔内投与では肺葉辺縁に発現し、経気管投与では肺葉細気管支中心に発現したと報告している。

本研究ではラットを用い、1回BLM15mg/kgで週3回、10週までの投与実施したが、総投与量は極めて多いが、肺線維症を確実に形成させるために必要な量を用いた。投与開始1週目(総投与量45mg/kg)に胸膜下に泡沫状の脂肪顆粒細胞の出現、血管周囲の炎症細胞浸潤、肺胞内に滲出物がみられ、経時的に肥満細胞が胸膜下および胸膜下の血管周囲性に目立つようになる。また血管内皮細胞の腫大、血管壁の変性が認められるようになり、6週目(総投与量270mg/kg)より臓側胸膜の膠原線維の増生が目立ち始め、BLMの投与量が増加するにつれ肺胞中隔の肥厚、血管周囲の線維化が目立つようになる。8週目(総投与量360mg/kg)以降では臓側胸膜に帯状の線維化が認められ、肺胞壁の線維化もさらに広い範囲におよび肺胞上皮細胞の腫

大が認められる。組織学的には、ラットを用いた大和田ら¹⁸⁾の報告やマウスを用いた松田ら⁸⁾の実験、竹原³⁹⁾の実験と、ほぼ類似の組織学的所見を報告している。肺間質に明らかに肥満細胞の増加が認められ、肺線維症の一要因として肥満細胞の存在を推測している¹⁸⁾。本研究でも、泡沫細胞の出現、増加、肥満細胞の増加が認められ、同様のことが推測される。金子¹¹⁾のマウスにおける実験、大和田ら¹⁸⁾のラットにおける実験と本研究も同様にヒトの肺変化と異なる点は、フィブリンの析出、気管支の扁平上皮化生の欠如が主なものである。金子¹¹⁾、下里ら¹²⁾¹³⁾の人体剖検の結果の考察から、本研究でも血管内皮細胞の腫大、血管壁の変化の所見は、マイクロアンジオグラムにより比較的早期に毛細血管網の消失が認められることにより、興味深い変化である。また、これらの組織学的所見は肺血流シンチグラム所見の変化時期とほぼ一致するものであった。

(2)マイクロアンジオグラム所見について

実験的BLM肺線維症の進行過程の観察に、マイクロアンジオグラフィを用いる意義としては、肺血管系の形態的变化を詳細に観察できることが挙げられ、すなわち、BLMそのものによる血管系の障害や肺組織の線維化によって消失した血管が欠損像として描出されることを利用したものである。天野¹⁹⁾によれば、マウスに60mg/kgのBLMを投与した場合、血管造影所見として、小血管の拡張や蛇行および毛細血管の萎縮という血管壁の変化が認められたと報告している。しかし今回の著者の実験結果は、天野¹⁹⁾の結果と異なり、BLM投与量が60mg/kg、すなわち投与開始後2週目でのマイクロアンジオグラムでは、血管の拡張や狭窄、あるいは毛細血管網の消失および造影剤の分布密度の低下などは極めて軽度であった。これはマウスがラットよりBLMによる肺毒性発現に種差があることやこれらの差が腹腔内投与法において顕著であ

ることが考えられた。しかしマイクロアンジオグラム上の変化は、投与開始後4週目から血管の拡張や狭窄、そして血管の閉塞や毛細血管の消失による造影剤の分布密度の低下などの明らかな変化を認め始め、以後それらの変化は、BLMの投与量が増加するにつれ経時的に顕著となった。マイクロアンジオグラフィによる血管系の変化および造影剤の分布密度の低下については、BLMによる血管への形態的あるいは機能的障害により血管内皮細胞障害をおこし微小血栓を形成し、この微小血栓が肺微小循環のうっ滞を招来し、血管の透過性の亢進によって発生する肺水腫病変により血管の拡張、狭窄あるいは閉塞を引き起こし、その後の肺胞内線維化の進展により造影剤の分布密度の低下を引き起こすと考えられた。マイクロアンジオグラム所見による血管系の変化は肺血流シンチグラム所見や組織学的所見と時期的にほぼ並行であり、以上の結果は肺血流シンチグラムの欠損所見を裏付けるものと考えられた。

(3)肺血流シンチグラム所見について

肺血流シンチグラフィの利点としては個体の肺疾患の観察を生存状態のまま行えること、放射性医薬品の静脈注射のみで観察が可能であること、したがって、検査そのものが極めて簡便であること、などがあげられる。これらの利点から放射線被曝の問題や微細な形態的構造の観察が不可能という欠点を有しながらも、実験的BLM肺線維症の経時的観察に、極めて有用であろうと考えられてきた。しかし近年まで、ラットなどの小型実験動物では、各臓器の形態を明瞭に描出できる撮像装置が存在しなかったため、実験的BLM肺線維症の研究は、組織学的検索¹⁵⁾¹⁸⁾³¹⁾³²⁾³⁸⁾³⁹⁾や血管造影による検索あるいは生理学的³³⁾³⁴⁾、生化学的²⁰⁾、免疫学的検索³⁵⁾に頼らざるを得なかったのが現状である。近年、それらの問題は、前述の改良した小動物用ピンホールコリメータを用いることによって解決さ

れたので、著者も同装置を利用して、実験的肺線維症の進行過程に関する観察を、肺血流シンチグラフィで試みた。

肺血流シンチグラフィの原理は以下のごとくである。すなわち肺毛細血管の口径よりやや大きめのRI標識物質(粒子径10~50 μ)を経静脈的に投与すると、肺動脈血流にのって肺末梢血管に至る。その際、^{99m}Tc-MAA粒子が血管内径よりやや大きいので、血管床に一時的に補足され、一過性の微小塞栓を生じることとなる。その分布は、肺動脈血流の分布と一致するので、この分布像を体外から撮像することにより肺血流の状態を知ることが可能となる。肺線維症における肺血流シンチグラムの欠損像は、狭窄あるいは閉塞した血管を欠損像として観察するものである。著者が行った実験においても、肺血流シンチグラフィの原理は同様である。今回の実験で得られた肺血流シンチグラムは極めて明瞭であり、小動物における実験的BLM肺線維症の進行過程を経時的に観察することが可能であった。すなわち、BLM投与開始後2週目までは、対照とほぼ同様に、^{99m}Tc-MAAの均一な分布が認められることから、肺血流の状態に変化がないことが推測された。これらの所見は組織学的に胸膜および血管周囲性に膠原線維の出現や血管造影像では、血管の蛇行、拡張、狭窄および萎縮などの血管系の変化などの所見によっても裏付けられ、線維化の開始は6週目以後に始まると考えられ、BLM投与開始後6週目に得られた肺血流シンチグラムでは、両側下肺野に斑紋状の欠損像を認めるとともに、辺縁はび慢性の凹凸不整となり、組織学的にも線維化が認められ始めていることが確認された。またマイクロアンジオグラム所見で血管系の変化が著明に認められている。その後、投与開始後8週目と10週目では、臓側胸膜の高さの変化および胸膜外側隅部の鈍角化および肺野の斑紋状所見は、徐々に強くなり、この時期の組織学的所見

は臓側胸膜の線維性肥厚が著明となり、その線維化は胸膜下の肺胞壁におよび、範囲も拡大傾向を認め、またマイクロアンジオグラム所見で血管系の著明な萎縮と毛細血管の消失した所見を認めている。肺血流シンチグラム所見と組織学的所見、マイクロアンジオグラム所見は、ほぼ時期的に並行関係にあり、肺血流シンチグラム所見を裏付けるものである。これらの所見より、小型実験動物を用いた実験的BLM肺線維症の進行過程の観察に肺血流シンチグラフィが有効であることが確認された。すなわち、1) 観察操作が簡単で非侵襲的に肺血管系の変化を知ることができる、2) 個体の実験的肺線維症の進行過程を生存形態のまま観察を行えること、3) 画像も明瞭でラットの肺病変を十分に描出できることなどが、確認された。肺血流シンチグラフィを行うことによる放射線被曝の影響についても Monroe⁴⁰⁾によれば37MBqの投与であっても、ヒトの肺で620mGy、と極めて少なく、今回のラットを用いた実験でもほとんど影響はないものと考えられる。

以上に述べた結果から、当教室の改良型ピンホールコリメータを使用した^{99m}Tc-MAAによる肺血流シンチグラフィは、BLM肺線維症の実験的研究に有用であることが確認され、他の小型実験動物の肺疾患の検索にも応用が期待できるものと考えられた。しかし、さらに微細な形態的变化の把握には多くの改良が必要と考えられた。

また、このような小動物肺血流シンチグラム所見での経時的観察と組織学的所見、マイクロアンジオグラム所見との比較検討した報告は、文献を渉猟した限り、欧米および本邦における初めての報告である。

V. 結 論

著者はラットの実験的BLM肺線維症の進行過程を肺血流シンチグラフィによって経時的に

観察できるか否かを検討し、得られた所見の裏付けを組織学的検索とマイクロアンジオグラフィで行い、以下の結論を得た。

- (1)組織学的所見では、血管周囲の炎症細胞浸潤、血管内皮細胞の腫大、血管平滑筋細胞の変性、外膜の粗鬆化などの血管の変化および胸膜直下の線維化が著しく、BLM投与量の増加とともに線維化が肺胞壁におよび、範囲が拡大していた。これらの所見は肺血流シンチグラム所見による肺葉辺縁に変化が最初におこり、経時的に変化が増強している所見と一致するものであった。
- (2)マイクロアンジオグラム所見では、BLM投与後1週目から血管系の変化が認められ始めた。肺血管の分布密度の低下や造影剤の分布密度の低下は、投与開始後6週目から著明となった。肺血流シンチグラム所見による経時的変化と、時期的に一致するものであった。
- (3)ラット実験的BLM肺線維症の進行過程は、小動物用ピンホールコリメータを使用することにより、肺血流シンチグラフィで観察することが可能であった。得られたイメージは病変の経時変化を明瞭に描出できることが確認された。

以上の結果から、ラットの実験的BLM肺線維症の進行過程は、肺血流シンチグラフィで観察できることが確認された。得られた各時期の肺血流シンチグラム所見は、組織学的所見やマイクロアンジオグラム所見に裏付けされるものであり、検査法の相違があってもほぼ並行関係にあることが確認された。肺血流シンチグラフィは小動物を用いる他の実験的肺疾患の観察にも、さらに広い応用が期待できるものであった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究の機会を与えて下さり、終始ご懇篤なるご指導ならびにご校閲を賜りました、東日本学園大学歯学部歯科放射線学講座金子昌幸教授

に深甚なる感謝の意を表しますとともに、研究にご協力していただきました東日本学園大学歯学部放射線部の皆様、東日本学園大学医科歯科クリニック放射線部技師の田岡賢二氏、池田博人氏に心から深謝致します。

文 献

1. 佐々木英忠, 滝島 任: 治療としての線維症 病因, 診断, 治療の問題点, 呼吸器疾患, 最新医学42: 2057-2080, 1987.
2. 吉良枝郎: 呼吸器疾患 必修内科学第4版, 南江堂, 東京, 1990, 115-219頁.
3. 山中 晃, 野辺地篤郎: 間質性肺炎から肺線維症に到る病像の変化, 臨床科学14: 359-371, 1978.
4. 梅沢浜夫: プレオマイシンに関する研究 (基礎の部), 日癌治5: 3-7, 1970.
5. 市川篤二, 中野 厳, 広橋 彬: 新制癌剤抗生物質プレオマイシンの臨床的研究について (抄), 日癌誌1: 92-93, 1966.
6. 佐藤伊吉, 五十嵐盛志: 顎口腔領域腫瘍 (特に扁平上皮癌) に対する抗腫瘍剤Bleomycinの臨床的応用, 日口外誌14: 69-77, 1968.
7. 市川篤二: プレオマイシン副作用の統計的観察 第6回日本癌治療学会シンポジウム報告 医歯薬出版 東京: 1960.
8. Matsuda, A., Yoshioka, O., Yamashita, T., Ebihara, K., Umezawa, H., Miura, T., Katayama, K., Yokohama, M. and Nagai, S.: Fundamental and clinical studies on new bleomycin analog, Recent Results Cancer Res 63: 191-210, 1978.
9. 影山圭三: 肺線維化の成り立ちと進展, 日病会誌62: 3-39, 1973.
10. 影山圭三, 薬丸一洋: 線維化の機序, クリニカ1: 25-29, 1974.
11. 金子 仁: 剖検例からみた薬物の副作用—とくにプレオマイシンについて—, 臨婦産 22: 449-456, 1971.
12. 下里幸雄, 馬場謙介, 渡辺 漸: 抗癌剤による肺の病変—剖検症例の検討—, 癌の臨床 17: 21-34, 1971.
13. 下里幸雄, 馬場謙介, 薬丸一洋, 森川征彦: 肺線維症の病像, 呼吸と循環19: 888-896, 1971.
14. 市橋正光, 新海 宏, 武井美保子: Bleomycinによる線維化の機序の解析, 皮膚 14: 217-226, 1971.
15. 岡本 堯, 天野富薫, 和田達雄, 原田昌興, 田中俊夫: 実験的プレオマイシン 肺線維症, 医学と生物学 80: 299-301, 1970.
16. 松田 明: プレオマイシンによる実験的肺線維症に対するオーデス (CDP-choline) 日本化薬K. K. 研究開発内報: 1, 1972.
17. 田村静雄, 望月博之: プレオマイシン投与例の病理解剖学的検討, 総合臨床21: 371-375, 1972.
18. 大和田英美, 香月秀雄, 林 豊: Bleomycin投与による実験的肺線維症の病理組織学的研究, 肺癌 10: 170-177, 1970.
19. 天野雅章: プレオマイシンの微細血管に及ぼす影響について—Microangiographyによる肺臓の観察—, 歯学 62: 497-503, 1974.
20. Marom, Z., Weinberg, K. S. and Fanburg, B. L.: Effect of bleomycin on collageolytic activity of the rat alveolar macrophage, Am Rev Resp Dis. 121: 859-867, 1980.
21. 井沢豊春: 呼吸器, 核医学大系 (第6巻) 御園生圭輔, 飯尾正宏編, 実業公報社, 東京, 1981, 121-262頁.
22. 金子昌幸, 高野英明, 細川洋一郎, 大西 隆, 金子和子: 人体用ガンマカメラを用いた小動物シンチグラフィ—ラット 顎骨シンチグラフィの検討, Radio-isotopes 34: 493-496, 1985.
23. 金子昌幸, 小林光道, 高野英明, 内海治, 金田英生, 菊地文利: ^{99m}Tc 標識リン酸化合物によるマウス顎骨シンチグラフィに関する検討, Radio-isotopes 35: 77-79, 1986.
24. 金子昌幸: マウス唾液線シンチグラフィに関する実験的研究, 東日本歯誌 5: 169-174, 1986.
25. 高野英明, 郭 東英, 佐野友昭, 前田静一, 後藤邦彦, 金子昌幸: 改良型ピンホールコリメータの性能試験と小動物応用, Radioisotopes 37: 456-459, 1988.
26. 高野英明, 金子昌幸: ^{99m}Tc 標識製剤を用いたラットにおける臓器の正常シンチグラム, Radio-isotopes 39: 110-113, 1990.
27. 北村信安: 実験的ハムスター舌癌における放射線とプレオマイシンの併用効果に関する基礎的研究, 歯学 66: 21-36, 1979.
28. 向井博邦: 顎骨内埋入金属の周囲組織への影響に関する実験的研究, 歯学 64: 996-1014, 1977.
29. 新宅敬夫: 肺疾患における血流および換気障害のSPECTによる評価, 日本医放会誌 45: 06-621, 1985.
30. 藤堂義郎, 村田喜代史, 伊藤春海, 鳥塚莞爾: び

- まん性肺病変のCT像, 日本医放会誌 46, 1281-1295, 1986.
31. Sikic, B. I., Young, D. M. Mimnaugh, E. G. and Gram, T. E., : Quantification of bleomycin toxicity in mice by changes in lung hydroxyproline content and morphometric histopathology, *Cancer Res* 38:787-792, 1978.
32. Aso, Y., Yoneda, K, and Kikkawa, Y: Morphologic and biochemical study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice, *Lab Invest* 35:558-568, 1976.
33. Goldstein, R. H., Lucky, E. C., Franzblau, C. and Shider, G. L.: Failure of mechanical properties to parallel changes in lung connective tissue composition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters, *Am Rev Resp Dis* 120:67-73, 1979.
34. 荒木高明: プレオマイシン肺臓炎早期発見の指標としての肺機能検査, 癌と化学療法 5:573-584, 1979.
35. Molteni, A., Mullis, K. B., Zakheim, R. M. and Mattioli, L.: The effect of anti-lymphocyte globulin on the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat, *Am Rev Resp Dis* 119:83, 1979.
36. 岡村明治: プレオマイシンの治療効果とその副作用である肺病変の病理組織学的研究—第2編プレオマイシン肺炎—, 日胸疾会誌 11:325-345, 1973.
37. 浴本久雄, 高橋克俊, 松田 明, 梅沢浜男: プレオマイシン類の投与法の違いによる抗腫瘍効果ならびに肺線維症発現の実験的研究, 癌と化学療法 11:853-857, 1984.
38. 浴本久雄, 高橋克俊, 松田 明, 梅沢浜男: プレオマイシン肺毒性の動物評価系—腹腔内投与法と経気管投与法との相互比較—, 癌と臨床 10:2550-2557, 1983.
39. 竹原督之輔: プレオマイシン肺線維症の抑制に関する研究, 第1報実験的肺線維症の形成とリジロキシダーゼ活性について, 日口外誌 25:8-14, 1979.
40. Monroe, L. A., Thompson, W. L., Anderton, N. S. and Burdine, J. A.: Evaluation of an improved ^{99m}Tc -stannous aggregated albumin preparation for lung imaging, *J Nucl Med* 15:192-194, 1973.