金医大誌(J Kanazawa Med Univ)40：27－35，2015

アミオダロン肺障害発症への肺サーファクタントリン脂質合成亢進の関与

北　楯　祥　子

要　約：[目的] アミオダロン肺障害は，肺へのリン脂質過剰蓄積を特徴とする。今回，リン脂質を主成分とする肺サーファクタント合成系のアミオダロン肺障害への関与を明らかにする。**[対象と方法]** 雄性Fisher 344系ラットを用いアミオダロンの経口胃管投与による肺障害モデルを作製し，気管支肺胞洗浄液，単離Ⅱ型肺胞上皮細胞と肺組織を採取した。気管支肺胞洗浄液中の細胞の分画と形態計測，サーファクタント蛋白のWestern blot法による定量，単離Ⅱ型細胞の電子顕微鏡による形態計測とアイソトープを用いたホスファチジルコリン合成能の測定，肺組織病理の形態観察，サーファクタント蛋白とリン脂質合成酵素群の遺伝子発現解析とリン脂質の分画・定量を行った。**[結果]** アミオダロン投与群では，非投与群と比較し，気管支肺胞洗浄液中のマクロファージ数の増加と面積の拡大，サーファクタント蛋白A, Dの増加に加え，単離Ⅱ型細胞の面積増大とサーファクタント貯蔵小胞の拡大，リン脂質合成能の亢進を認めた。肺組織では，ホスファチジルコリン合成酵素群の発現亢進，総リン脂質，特にホスファチジルコリン成分の増加を認めた。**[結論]** アミオダロン肺障害における肺組織へのリン脂質過剰蓄積には，従来報告されている肺胞マクロファージにおける分解系の抑制に加え，Ⅱ型細胞における肺サーファクタントの合成亢進の関与が示唆された。

キーワード： アミオダロン肺障害，　ラット，　リン脂質過剰蓄積，　サーファクタント合成，　Ⅱ型肺胞上皮細胞

緒　　言

アミオダロンは第Ⅲ群抗不整脈薬に属し，難治性の頻脈性不整脈に対し極めて有用な薬剤である。しかし，約5%の頻度で副作用が生じる (1-3)。主な副作用として，甲状腺機能異常 (全副作用の 18.5%)，不整脈 (15.1%)，血液毒性 (12.2%)，肺障害 (10.7%)，皮膚症状 (9.8%)，肝機能障害 (9.2%)，心不全 (1～5%)，低血圧 (1～5%) や眼症状 (1～5%) が報告されている。肺障害は重症化や致死例も報告されており，臨床上，特に重大な副作用である (4)。

アミオダロン肺障害の臨床像は多彩で，リポイド肺炎型間質性肺炎，好酸球性肺炎，急性滲出性器質化肺炎，慢性器質化肺炎，小結節・腫瘤性病変，剥離性間質性肺炎，非特異的間質性肺炎，特発性肺線維症様間質性肺炎，急性肺損傷・急性呼吸窮迫症候群や肺胞出血などが報告されている (3)。これらの多彩な病像は単一の機序では説明し難く，アミオダロンによる細胞代謝異常，直接的細胞傷害や免疫系の修飾など複数の機序がこれまで提唱されている (5-7)。

金沢医科大学大学院医学研究科呼吸機能治療学
石川県河北郡内灘町大学1-1
平成27年2月23日受理

アミオダロンはヨードを含む分子量681.77のbenzofuran誘導体であり，リン脂質過剰症を生じる薬物に共通してみられる親水性・親油性両親媒性を有している (2, 4)。アミオダロン肺障害における病理学的特徴は，気管支肺胞洗浄液や肺組織中における泡沫細胞の出現である。泡沫細胞は，マクロファージ内へ脂肪成分が過剰貯留した状態で，アミオダロン肺障害のみに特異的な所見ではないが，アミオダロン肺障害では高率にみられる特徴的所見である (8)。泡沫細胞出現の機序として，アミオダロンによるマクロファージのlysosomal phospholipase A_2活性の低下と，それによるリン脂質分解抑制が報告された (9)。

リン脂質は細胞膜の主要構成成分であり，肺サーファクタントの主成分でもある。肺はサーファクタントを多量に合成・分泌する特徴的臓器である。肺サーファクタントは，Ⅱ型肺胞上皮細胞 (Ⅱ型細胞) で合成・貯蔵されたのち肺胞腔へ分泌され，肺胞の表面張力を低下させ虚脱を防ぐ (10)。肺サーファクタントは，分泌後，肺胞マクロファージによる貪食あるいはⅡ型細胞への再取り込みが行われる (11)。アミオダロン肺障害においては，肺胞マクロファージでのリン脂質分解抑制が報告されている (9, 12)。しかし，アミオダロンのⅡ型細胞におけるサーファクタント合成系への影響は不明である。本研究では，ラットを用いアミオダロン肺障害モデルを作製し，アミオダロン肺障害におけるⅡ型細胞のサーファクタント合成について検討した。

実 験 方 法

1. 対象動物とアミオダロン肺障害モデルの作製

8～9週齢の雄性, 体重140～160 gのFischer 344系ラット (日本エスエルシー，浜松) を使用し，特定病原体不在環境下で飼育した。本研究の遂行に際し，金沢医科大学動物実験委員会の許可を得るとともに，動物実験指針を遵守した。

Amiodarone hydrochloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) を，0.5%に調整したcarboxymethyl cellulose sodium salt (Wako純薬，大阪) 2 mlに懸濁し，胃ゾンデを用い用手的に1日に1回経口投与した (13)。Reasonらの方法 (14) に従い，100 mg/kg/day 4週間投与群 (n = 12) と200 mg/kg/day 2週間投与群 (n = 6) の2つの実験群を作製した。対象群として，0.5% carboxymethyl cellulose sodium salt 2 ml単独投与を2週間 (n = 6) と4週間行った (n = 12)。

2. 気管支肺胞洗浄液の回収と解析

1) 気管支肺胞洗浄液の回収

100 mg投与群 (n = 6)，200 mg投与群 (n = 6) と各々に対する対照群 (各n = 6) に対し，ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔下に開腹し，大動脈からの放血後に開胸し，肺と心臓を露出した。気管腹側を小切開し18ゲージのサーフロー針外筒 (テルモ，東京) を挿管し固定した。右主気管支を結紮した後，左肺へ0.9% NaCl/10 mM Hepes (pH 7.4) を 2.5 mlずつ用いて，気管支肺胞洗浄を5回施行した。回収液の総細胞数をBurker-Turk血球計算盤 (富士理研工業，大阪) を用い計測した後，200 Gで15分間遠心し，細胞成分と上清に分離した。細胞成分はphosphate-buffered saline (PBS) で 0.3×10^6 個/mlに懸濁した。

2) 気管支肺胞洗浄液の細胞分画と形態計測

200 mg投与群 (n = 6) と同数の対照群を対象にした。細胞懸濁液を用い乾燥固定塗抹スライドを作製し，メイ・ギムザ染色を施した。各サンプルあたり500個の細胞を観察し，細胞分画を算出した。大型細胞として容易に同定される肺胞マクロファージに関し，光学顕微鏡400倍を用いて形態観察を行い，さらに面積計測ソフト (Area Manager Professional Lite，ビジョナリー社，神戸) を用いて，50個の細胞の面積を測定した。

3) 電子顕微鏡による観察

100 mg投与群 (n = 6) と同数の対照群より採取した細胞懸濁液をアガロースゲル中に包埋し，2.5%グルタールアルデヒド固定後，1%四酸化オスミウムで後固定した。エポキシ樹脂により包埋後，薄切し，ウラニール・鉛で二重染色し，透過型電子顕微鏡 H7650 (日立ハイテクノロジーズ，茨城) で検鏡した。

4) サーファクタント蛋白の Western blot法による定量解析

200 mg投与群 (n = 6) と同数の対照群の気管支肺胞洗浄液の上清蛋白を Bradford法で定量した後，各サンプル10 μg相当をPre-cast Gel 4-12% (Novex Biotech, Salt Lake, UT, USA) を用い電気泳動し，タンク型，K槽でニトロセルロース膜に転写した。一次抗体として，マウス抗ラットsurfactant protein (SP)-A抗体 (clone 1D6, National Jewish Health, Denver, Co, USAのVoelker教授より供与を受けた) (15)，ウサギ抗ヒツジSP-B抗体及びウサギ抗マウスSP-D抗体 (Chemicon, Temecula, CA, USA) を，二次抗体にはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体あるいはヤギ抗ウサギIgG抗体 (Bio Rad, Hercules, CA, USA) を用いた。Chemiluminescent基質 (SuperSignal West Pico substrate, テルモ) を用い化学発光増感した後，Image Quant LAS 4000 mini (GEヘルスケア・ジャパン，東京) で測定した。

SP-BとSP-Dでは単一バンドだが，SP-Aは糖鎖修飾量に対応する28，32と38 kilodaltonの各バンドの総計を計算した。対照群での発現の平均値を1とし，アミオダロン投与群での発現量の比を求め比較検討した。

3. Ⅱ型細胞の単離と解析

1) Ⅱ型細胞の単離，培養と純度の算定

100 mg投与群 (n = 6) と同数の対照群を対象にした。開胸・気管カニューレ挿管後に肺を摘出し，生理食塩水で気道と肺胞腔を洗浄した。肺胞マクロファージに貪食させ細胞比重を上げることを目的にfluorocarbon-albumin乳剤 (Wako) をカニューレから肺内へ注入し，37℃，15分間温浴した後，再度気管支肺胞洗浄を行い可及的に肺胞マクロファージを除いた。豚膵エラスターゼ 172 Unit (Worthington社，Lakewood, NJ, USA) をカニューレから注入し，37℃，20分間温浴した後，肺組織を細切した。牛血清によりエラスターゼ活性を中和した後，ガーゼ濾過により細胞懸濁液を得た。イオパミドール (コスモバイオ社，東京) を用い高比重1.088～95，低比重1.038～45のグラディエントチューブを作製し，懸濁液の密度勾配遠心を行った。低比重・高比重境界層に分離されたⅡ型細胞を吸引し，PBS液で洗浄し，10% fetal bovine serum (FBS) を添加したDulbecco's modified Eagle's mediumを培地として，5% CO_2下，37℃で培養した。24時間培養後の単離細胞を改変パパニコロウ法で染色し，層状封入体に相当する青紫の粗大顆粒を指標にⅡ型細胞を同定し，単離細胞の純度を算定した。

2) 電子顕微鏡による観察

単離Ⅱ型細胞 2×10^6 個をアガロースゲル中に包埋し，2. 3) と同様な方法で処理し，電子顕微鏡で検鏡した。倍率500倍で撮影し，細胞小器官の観察と面積計測ソフト (Area Manager Professional Lite) を使用してⅡ型細胞の細胞質と層状封入体空胞部の面積を計測した。

3) ホスファチジルコリン合成能の計測

Ⅱ型細胞は肺組織中の他の細胞とは異なり，細胞膜だけではなく肺サーファクタントを合成するため，水溶性コリンから脂溶性ホスファチジルコリンへの合成を旺盛に行う。そこで，単離Ⅱ型細胞 2×10^6 個/35 mm 培養皿の培養液中に[^{3}H]塩化コリンを0.5 μCi/mlの濃度になるよう添加し培養した後，細胞からBligh-Dyer脂質抽出法 (16) にて脂質成分を抽出し，[^{3}H] 放射性活性を液体シンチレーションにて測定し，50 μg細胞蛋白当たりのホスファチジルコリンの合成能を算出した (11)。

4. 肺組織の採取と解析

1) 肺組織の採取

100 mg投与群と対照群，各々 n = 6に対し，気管支肺胞洗浄後の左肺を遺伝子発現解析用にRNAlater (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) によるRNAの安定化を行った後に凍結・保存した。

200 mg投与群，対照群，各々 n = 6に対して，右肺中・下葉をリン脂質定量用に凍結・保存した。右上葉は，光学顕微鏡的形態観察用に10%中性緩衝ホルマリンによる25 cmH_2O圧での注入固定を行った。

2) 光学顕微鏡的形態観察

200 mg投与群 (n = 6) と同数の対照群のホルマリン固定肺組織を，パラフィン包埋後に薄切切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色を施し，光学顕微鏡で観察した。

3) サーファクタント蛋白及びリン脂質合成酵素群の遺伝子発現解析

RNAlater処理後に冷凍・保存していた肺組織100 μgをホモジナイズし，RNeasy mini spin column (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いtotal RNAを抽出した。各サンプルのtotal RNA 1 μgからcDNAを作成し (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)，Taqman法によりApplied Biosystems 7900HTを用いreal time reverse transcription polymerase chain reactionによる遺伝子発現解析を行った。Phosphate cytidylyltransferase1A (PCYT1A) (*de novo*経路合成酵素，図1) 遺伝子，lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) (リモデリング経路，図1) 遺伝子，SP-A, B, C, D遺伝子各々のプローブとプライマーは Applied Biosystem社から購入した(TaqMan Gene Expression on Demand)。標準化にはglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase遺伝子発現を用いた (プローブとプライマーはTaqMan Gene Expression on Demand, Applied Biosystem社)。相対定量解析法の比較Ct法により相対的mRNA発現量を算出した。

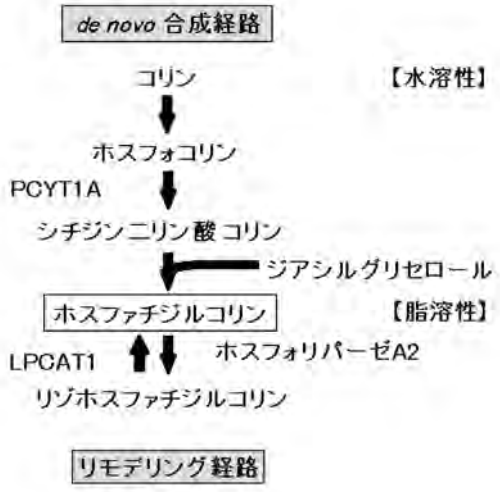

図1. ホスファチジルコリン合成経路
ホスファチジルコリンは律速酵素phosphate cytidylyltransferase 1 alpha (PCYT1A) による*de novo*合成経路とlysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) によるリモデリング経路により合成される。

4) リン脂質の定量

200 mg投与群 (n = 6) と同数の対照群の肺組織0.3 gをホモジナイズし，Bligh-Dyer脂質抽出法 (16) にて脂質成分を抽出し，Bartlett法 (17) にて総リン脂質量を測定した。その後，ホウ酸添加シリカゲルGによる二次元薄層クロマトグラフィーを行い，各リン脂質成分を掻きとり，同様にBartlett法にて定量した。

5. 統計解析

統計解析にはStudent's t-testを使用し，P値0.05以下を有意とした。

結　　果

1. アミオダロン肺障害モデル

アミオダロン100 mg投与群 (n = 12) では，体重は対照群と比較し低く推移したが，運動量の低下や呼吸促迫の出現は見なかった。200 mg投与群は当初n = 10で実験を開始したが，投薬開始3日目に1匹，7日目に2匹，13日目に1匹が死亡した。生存した6匹は，体重が2週間にわたり低下し続け，3匹は13日目に呼吸促迫が出現し臥位状態となった。対照群では有害事象は認めなかった。

2. 気管支肺胞洗浄液中の細胞総数，各分画の細胞数，形態とサーファクタント蛋白の発現

1) 気管支肺胞洗浄液

気管支肺胞洗浄液の回収量は約11 mlで，各群間で差異はなかった。

2) 気管支肺胞洗浄液中の細胞分画と形態変化

対照群では，正常ラットと同様，95%以上が肺胞マクロファージであった (図2)。総細胞数とマクロファージ数は，コントロール群vsアミオダロン投与群で各々，1.9 ± 0.3 *vs* 4.9 ± 1.3 × 10^5/ml，1.8 ± 0.3 *vs* 4.0 ± 1.4 × 10^5/ml (いずれも $p < 0.01$) と総細胞数は3.8倍，マクロファージ数は2.9倍に増加した。好中球は対照群ではほとんど認めないが，アミオダロン投与群では0.8 ± 0.4 × 10^5/ml出現した (図2)。リンパ球や好酸球の増加は見なかった。

アミオダロン投与群においては対照群と比較し，肺胞マクロファージの細胞質が泡沫状を呈し，細胞面積が766 ± 290 *vs* 374 ± 99 × 10^{-4}/mm^2 ($p < 0.05$) と2.1倍に増加した (図3A～C)。アミオダロン投与群ではマクロファージの細胞質における貪食空胞の著明な拡大と増加が電子顕微鏡で観察された (図3D, E)。

3) サーファクタント蛋白の発現量

対照群のWestern blot法によるサーファクタント蛋白分画発現量の平均値を1とするとSP-Bは100 mg投与群と差はみないが，SP-Aは2.3 ± 0.6，SP-Dは2.3 ± 0.5 (各々 $p < 0.05$) と有意な増加が示された (図4)。

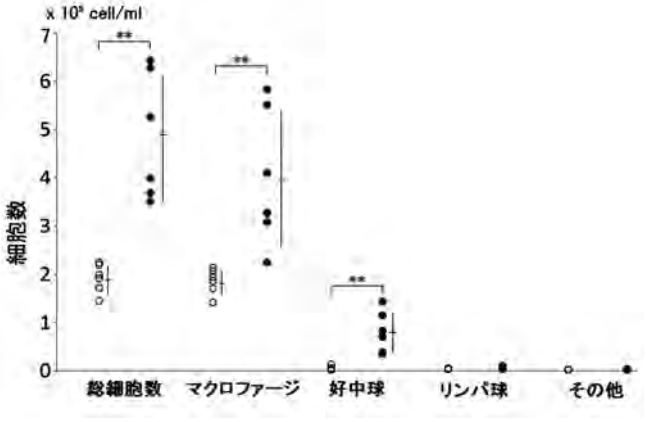

図2. 気管支肺胞洗浄液中の細胞総数と各分画の細胞数
アミオダロン投与群では総細胞数，マクロファージと好中球数の有意な増加を認める。
○対照群，●アミオダロン200mg投与群，**p < 0.01，バーはmean ± SD

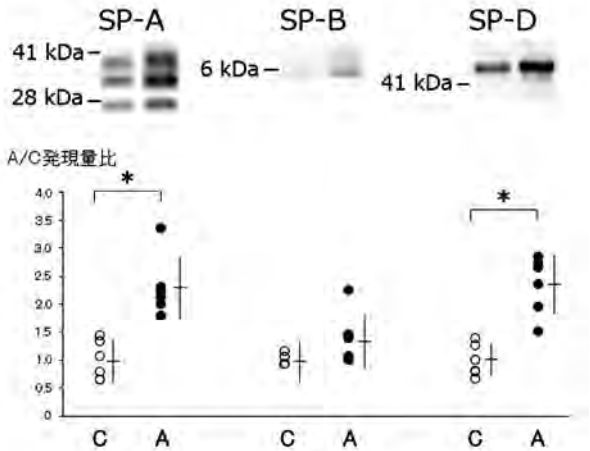

図4. 気管支肺胞洗浄液中のサーファクタント蛋白成分の発現
アミオダロン投与ではSP-AとSP-D量が有意に増加する。
SP, surfactant protein; kDa, kilodalton; C, control; A, amiodarone.
*p < 0.05，バーはmean ± SD

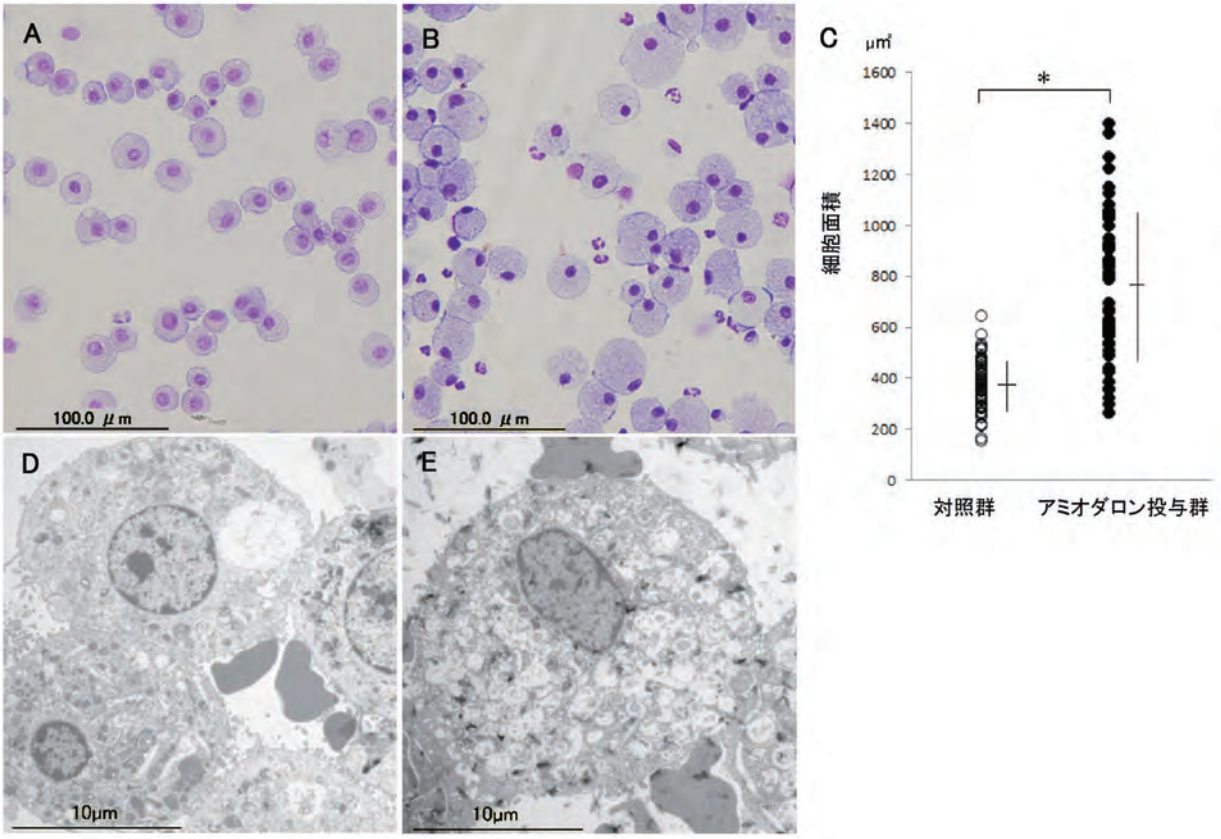

図3. 肺胞マクロファージの細胞面積と超微形態
A, Bは肺胞マクロファージの光学顕微鏡像，D, Eは電子顕微鏡像。
A, Dは対照群，B, Eはアミオダロン投与群。Cは対照群とアミオダロン投与群各々の肺胞マクロファージの細胞面積を示す。
アミオダロン投与群の肺胞マクロファージは，細胞質の貪食空胞拡大による泡沫化と細胞面積の有意な増大を認める。

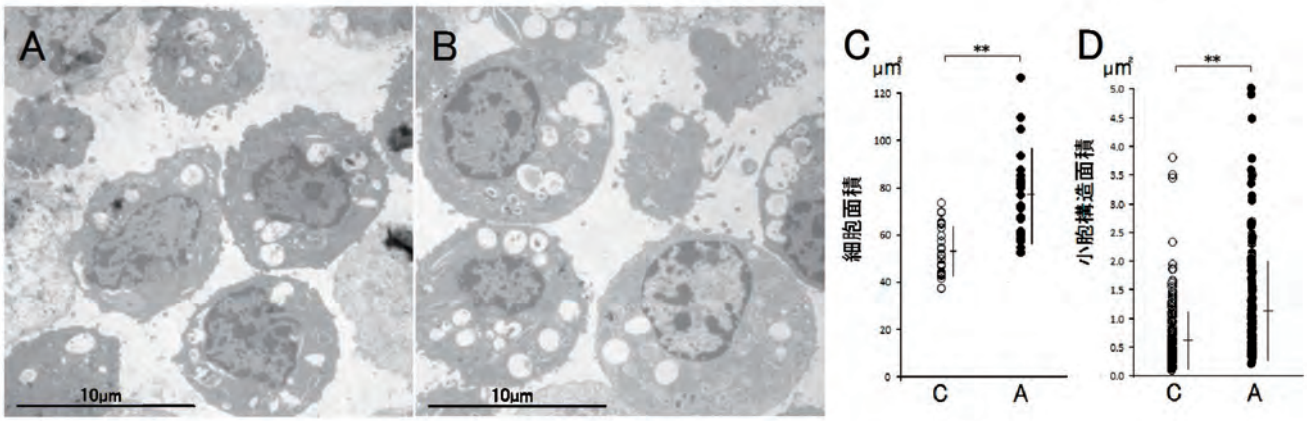

図5. 単離肺胞上皮細胞形態，細胞質面積と層状封入体空胞面積
A, 対照群，B, アミオダロン投与群。
アミオダロン投与群では細胞質面積の増加と層状封入体空胞構造の球状化を認める (A, B)。
C, D はⅡ型細胞の形態計測を示す。
C, 対照群，A, アミオダロン投与群。
アミオダロン投与群では細胞面積と層状封入体にあたる小胞構造面積の有意な拡大を認める。
**p < 0.01，バーは mean ± SD

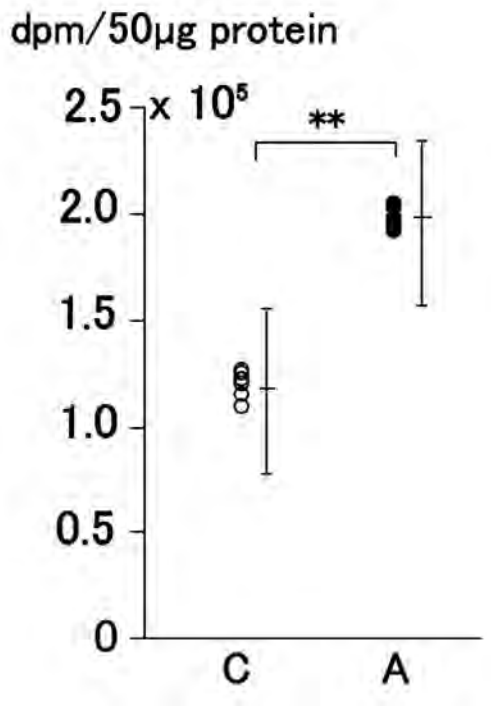

図6. 単離Ⅱ型肺胞上皮細胞でのホスファチジルコリン合成能
C, 対照群，A, アミオダロン投与群。
アミオダロン投与群において単位細胞あたりの [³H] 塩化コリン取り込みの有意な増加を認める。
**p < 0.01，バーは mean ± SD

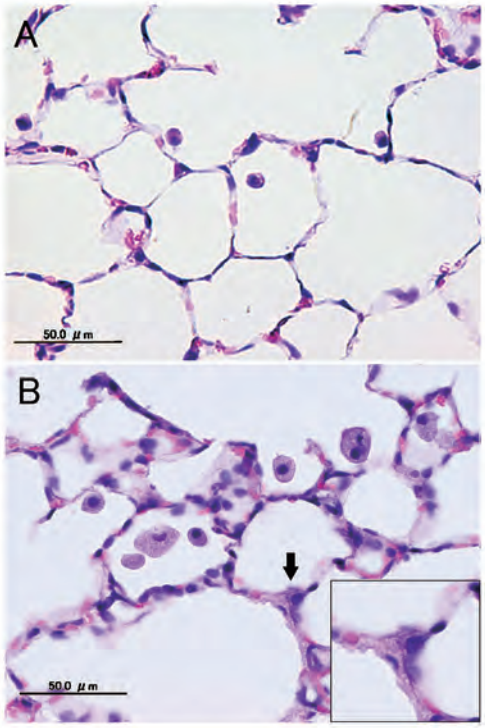

図7. アミオダロン肺障害の病理組織像
A, 対照群，B, アミオダロン 200mg 投与群。
アミオダロン投与群では泡沫化肺胞マクロファージの増加と肺胞中隔への単核細胞の浸潤を認める。
インレットは 7B 矢印部の強拡大を示す。Ⅱ型細胞の細胞質の空胞形成と肥大を認める。

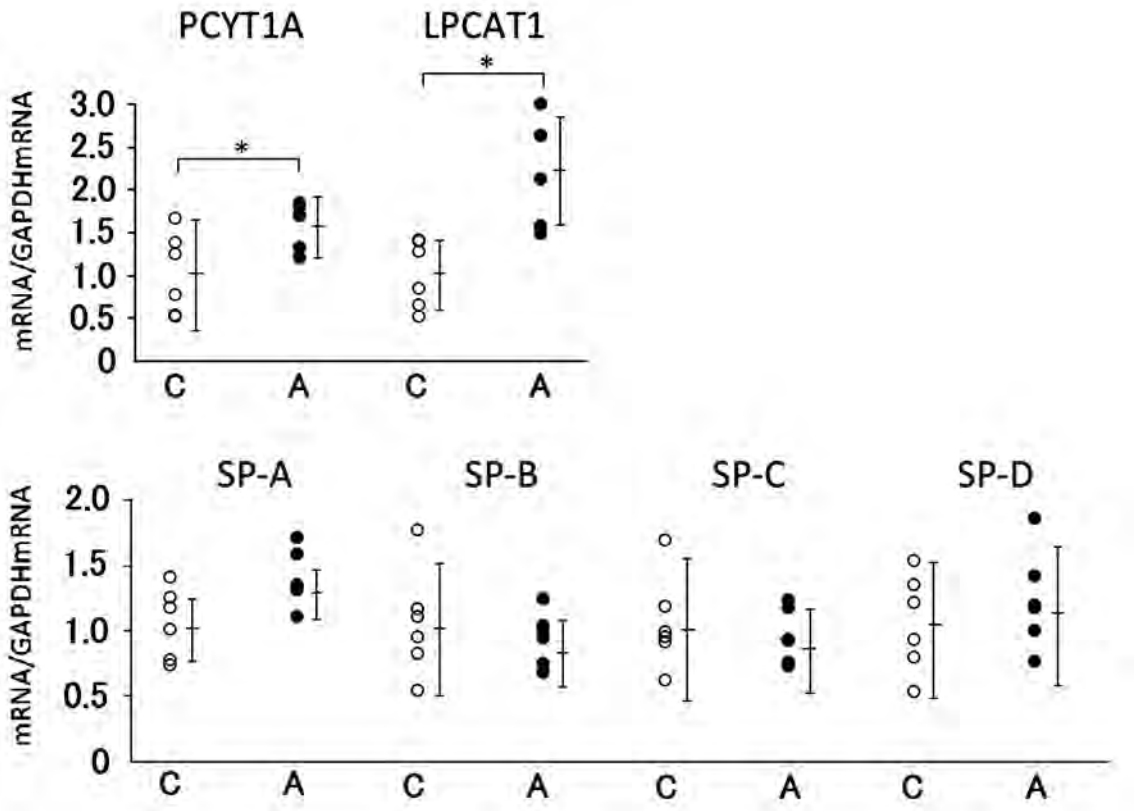

図8. 肺組織中のホスファチジルコリンとサーファクタント蛋白合成酵素の遺伝子発現
C, 対照群，A, アミオダロン投与群。
de novo 合成経路及びリモデリング経路のホスファチジルコリン合成酵素遺伝子の有意な発現は亢進を認める。サーファクタント蛋白合成遺伝子には発現差は認めない。
GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PCYT1A, phosphate cytidylyltransferase 1 alpha; LPCAT1, lysophosphatidylcholine acyltransferase; SP, surfactant protein
＊$p < 0.05$，バーは mean ± SD

3. 単離Ⅱ型細胞の純度，超微形態とホスファチジルコリン合成能

1）純度と超微形態

単離細胞の24時間培養後の改変パパニコロウ染色による計測では，単離細胞の96％がⅡ型細胞であった。電子顕微鏡による観察で，アミオダロン投与群では細胞ならびに層状封入体に一致する空胞構造の増大を認めた (図5A, B)。定量的形態計測により，対照群と比較しアミオダロン投与群では，細胞質面積，空胞構造面積，各々，53.0 ± 10.6 *vs* 76.3 ± 20.3 μm^2, 0.62 ± 0.51 *vs* 1.14 ± 0.87 μm^2 と有意な増大が確認された ($p < 0.01$) (図5C, D)。

2）ホスファチジルコリン合成能

ホスファチジルコリン合成能のラジオアイソトープを用いた解析では，対照群と比較しアミオダロン投与群では $1.1 \pm 0.6 \times 10^6$ *vs* $1.9 \pm 0.5 \times 10^6$ dpm/ 50 μg protein と，単位細胞蛋白あたりの [^{3}H] 塩化コリンの [^{3}H] ホスファチジルコリンへの取り込みは有意に増加し ($p < 0.01$)，リン脂質合成の亢進が示された (図6)。

4. 肺組織の病理所見，サーファクタント蛋白及びリン脂質合成酵素群の遺伝子発現とリン脂質量

1）肺組織の病理所見

アミオダロン200 mg投与群では，単核細胞の拡大と軽度充血による肺胞中隔の肥厚を認めた。肺胞マクロファージの細胞質の泡沫化と大型化に加え，Ⅱ型細胞と考えられる corner cell が対照群と比較し細胞質の空胞化を伴い膨大を呈した (図7A, B)。

2）サーファクタント蛋白及びリン脂質合成酵素群の遺伝子発現

アミオダロン 100 mg投与群では，リン脂質 *de novo* 経路合成酵素PCYT1A遺伝子とリモデリング経路合成酵素LPCAT1遺伝子が，対照群と比較し，各々 1.6倍，2.2倍に増加していた (図8上段)。一方，サーファクタント蛋白 SP-A～D遺伝子発現には両群間に有意な差異は認めなかった (図8下段)。

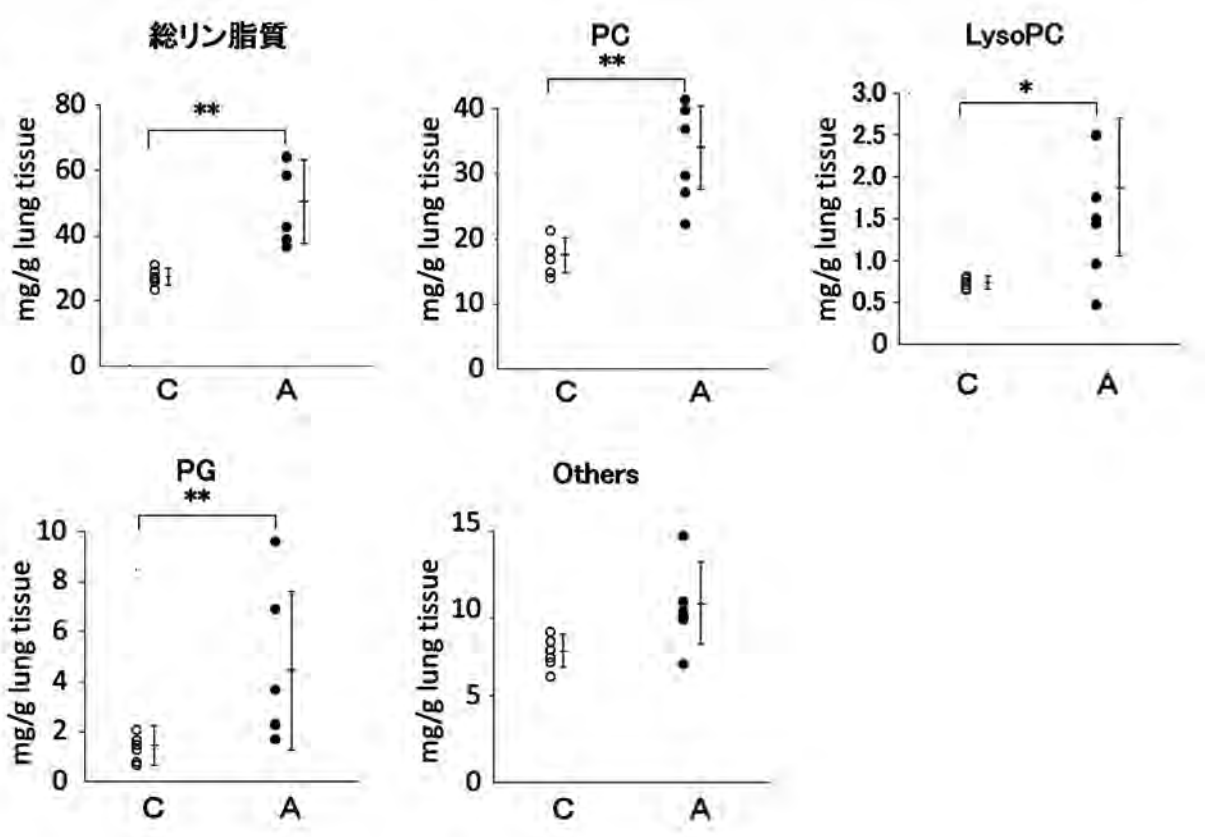

図9. 肺組織中のリン脂質量
C, 対照群, A, アミオダロン投与群。
単位肺組織質量あたりの総リン脂質，ホスファチジルコリンとホスファチジルグリセロールの有意な増加を認める。
PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol
＊p < 0.05, ＊＊p < 0.01, バーはmean ± SD

3) リン脂質の定量

アミオダロン 200 mg投与群では，各々の対照群と比較し，総リン脂質 27.3 ± 2.56 *vs* 50.2 ± 12.8 mg/g tissue，ホスファチジルコリン17.4 ± 2.63 *vs* 33.9 ± 3.18 mg/g tissue, リゾホスファチジルコリン0.89 ± 0.08 *vs* 1.88 ± 0.57 mg/g tissue，ホスファチジルグリセロール1.45 ± 0.79 *vs* 4.43 ± 8.39 mg/g tissueといずれも有意な増加を認めた (p < 0.05) (図9)。

考　　察

アミオダロン肺障害の発症における肺組織へのリン脂質過剰貯留に関わる肺サーファクタント合成系の関与を，ラットを用いたアミオダロン肺障害モデルを作製し検討した。これまで知られているアミオダロン投与による肺胞マクロファージの泡沫化と肺組織でのリン脂質の増加を検証するとともに，単離Ⅱ型細胞におけるリン脂質合成と合成・貯蔵空胞の拡大，肺組織における*de novo*ホスファチジルコリン合成及びリモデリング両経路の亢進が各合成酵素遺伝子の発現ならびに各脂質成分の定量により示された。アミオダロン肺障害におけるⅡ型細胞による肺サーファクタント脂質成分の合成亢進が明らかとなった。

アミオダロン肺障害ラットモデルとして 100 mg/kg/day 4週間と200 mg/kg/day 2週間の2つの実験群を用いた。これは，これまでの研究で用いられているアミオダロン投与量の範囲内に属する (1, 2)。100 mg投与群では，気管支肺胞洗浄中の肺胞マクロファージの泡沫化を認めた。200 mg投与群では，肺胞マクロファージの泡沫化に加え，間質性肺炎様所見が組織学的に観察された。さらに，半数 (3/6匹) のラットで，低酸素血症によると考えられる呼吸促迫と自発体動の低下が出現した。アミオダロンの副作用の一つである心不全の可能性も危惧されたが，組織学的には肺水腫などうっ血性心不全を示唆する所見は認められなかった。以上の結果より，今回作成した動物モデルはアミオダロン肺障害の既存の報告 (12) と一致し，同肺障害の機序を検討するに適したモデルと考えられる。

アミオダロン肺障害動物モデルの気管支肺胞洗浄液や肺組織では，肺胞マクロファージの泡沫化に加え，リン脂質の増加がこれまで示されている (12)。アミオダロンの親水性・親油性両親媒性性質 (2) や肺胞マクロファージの lysosomal phospholipase A2 活性の低下によるリン脂質分解抑制がリン脂質の過剰蓄積による泡沫化の機序として報告されている (12)。今回の検討では，肺組織におけるリン脂質量の増加に加え，肺サーファクタントリン脂質の主成分であるホスファチジルコリン *de novo* 合成及びリモデリング両経路の遺伝子発現の亢進が示された。さらに，単離Ⅱ型細胞におけるリン脂質合成能の亢進が，生化学的アッセイに加え超微形態観察と計測でも示された。肺組織におけるリン脂質分画の定量で，ホスファチジルコリンに加え，リモデリング系のリゾホスファチジルコリンが増加していることも，ホスファチジルコリン合成能の亢進を支持する。また，肺サーファクタントに特異的なホスファチジルグリセロールが有意な増加をしており，これはホスファチジルコリン合成亢進が肺サーファクタントの成分として起きていることを支持する (10)。

ブレオマイシンはがん治療において重要な抗癌剤の一つであり，主要な副作用である肺障害作用の検討がこれまで精力的になされてきた。ブレオマイシン肺障害でも泡沫細胞が出現するが，Ⅱ型細胞におけるサーファクタントリン脂質の合成は低下する (18)。今回の検討で明らかとなったアミオダロン肺障害におけるⅡ型細胞でのサーファクタントリン脂質の合成亢進は，薬物傷害作用に対する肺の一般的な反応ではなく，アミオダロン肺障害に特徴的な現象と考えられる。

アミオダロン肺障害におけるサーファクタント蛋白の変化も今回明らかとなった。気管支肺胞洗浄液中では SP-B には変化は認めないが，SP-A，SP-D が2倍以上に増加していた。SP-B は疎水性アポ蛋白であるのに対して，SP-A，SP-D は親水性アポ蛋白である (10)。SP-B はリン脂質との結合親和性が高く，合成後にリン脂質とともに層状封入体に貯蔵されて，分泌刺激を受けてエキソサイトーシスされ，肺胞表面へのリン脂質の吸着に重要な役割を演じる。一方，SP-A，SP-D は合成された後，層状封入体へは貯蔵されず，恒常的に細胞外へ分泌される。表面張力低下作用にはほとんど関与せず，肺における自然免疫に重要な役割を演じると考えられている (10)。肺組織における SP-A，SP-D の遺伝子発現にはアミオダロン投与群と対照群間に有意な差異は得られなかったが，アミオダロン肺障害における SP-A，SP-D 増加の意義は今後の興味深い研究課題である。

今回の研究では，アミオダロン肺障害の同定は，気管支肺胞洗浄液中の細胞と肺組織の形態学的観察のみで，臨床で行われる動脈血ガスの変化，血清 KL6，SP-D の測定や放射線画像解析はなされなかった。今後の治療法・予防法の開発に向けた臨床研究のためには，これらの解析も加え，より臨床現場に則した微細な変化の検出を可能にする必要がある。

今回，アミオダロン肺障害における肺組織のリン脂質過剰蓄積には，これまで報告されていた肺胞マクロファージでのリン脂質分解抑制に加え，Ⅱ型細胞におけるサーファクタントリン脂質の合成亢進が関与している可能性が示された。解決すべき課題は多いが，サーファクタントリン脂質合成の抑制がアミオダロン肺障害予防の方略の一つになる可能性が示唆された。

利益相反の開示

本論文に関する著者の利益相反はない。

本稿を終えるにあたり，御指導・御高閲賜りました金沢医科大学呼吸器内科　栂　博久教授，実際に研究デザイン・実験計画・論文作成の御指導を賜りました長内和弘教授に深謝申し上げます。また，標本作製・電顕的観察に御協力頂いた総合医学研究所　二宮英明氏と本研究の遂行にあたり御協力頂きました金沢医科大学呼吸器内科学講座の諸先生方に心より感謝申し上げます。

文　　献

1. Kodavanti UP, Mehendale HM: Amiodarone- and desethylamiodarone-induced pulmonary phospholipidosis, inhibition of phospholipases in vivo, and alteration of [^{14}C] amiodarone uptake by perfused lung. Am J Respir Cell Mol Biol 1991; **4:** 369-78.
2. Pitcher WD: Amiodarone pulmonary toxicity. Am J Med Sci 1992; **303:** 206-12.
3. Papiris SA, Triantafillidou C, Kolilekas L et al: Amiodarone: review of pulmonary effects and toxicity. Drug Saf 2010; **33:** 539-58.
4. Ernawati DK, Stafford L, Hughes JD: Amiodarone-induced pulmonary toxicity. Br J Clin Pharmacol 2008; **66:** 82-7.
5. Martin WJ 2nd: Mechanisms of amiodarone pulmonary toxicity. Clin Chest Med 1990; **11:** 131-8.
6. Kuruma T, Maruyama T, Hiramatsu S et al: Relationship between amiodarone-induced subclinical lung toxicity and Th1/Th2 balance. Int J Cardiol 2009; **134:** 224-30.
7. Nikaido A, Tada T, Nakamura K et al: Clinical features and effects of angiotensin system antagonists on amiodarone-induced pulmonary toxicity. Int J Cardiol 2010; **140:** 328-35.
8. Bedrossian CW, Warren CJ, Ohar J et al: Amiodarone pulmonary toxicity: cytopathology, ultrastructure, and immunocytochemistry. Ann Diagn Pathol 1997; **1:** 47-56.
9. Hostetler KY, Reasor MJ, Walker ER et al: Role of phospholipase A inhibition in amiodarone pulmonary toxicity in rats. Biochim Biophys Acta 1986; **875:** 400-5.
10. Osanai K, Tsuchihara C, Hatta R et al: Pulmonary surfactant transport in alveolar type II cells. Respirology 2006; **11:** S70-3.
11. Hawgood S, Clements JA: Pulmonary surfactant and its apoproteins. J Clin Invest 1990; **86:** 1-6.
12. Heath MF, Costa-Jussà FR, Jacobs JM et al: The induction of pulmonary phospholipidosis and the inhibition of lysosomal phospholipases by amiodarone. Br J Exp Pathol 1985; **66:** 391-7.
13. Diehl KH, Hull R, Morton D et al: A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol 2001; **21:** 15-23.
14. Reasor MJ, Ogle CL, Walker ER et al: Amiodarone-induced phospholipidosis in rat alveolar macrophages. Am Rev Respir Dis 1988; **137:** 510-8.
15. Kuroki Y, McCormack FX, Ogasawara Y et al: Epitope mapping for monoclonal antibodies identifies functional domains of pulmonary surfactant protein A that interact with lipids. J Biol Chem 1994; **269:** 29793-800.
16. Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 1959; **37:** 911-7.
17. Bartlett GR: Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem 1959; **234:** 466-8.
18. Osanai K, Takahashi K, Sato S et al: Changes of lung surfactant and pressure-volume curve in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. J Appl Physiol 1991; **70:** 1300-8.

Role of Increased Synthesis of Lung Surfactant Phospholipids in Amiodarone-induced Pulmonary Toxicity in Rats

Shoko Kitadate

Department of Respirology, Kanazawa Medical University Graduate School of Medical Science, Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan

[Purpose] Amiodarone-induced pulmonary toxicity is characterized by phospholipidosis in lung tissue. The present study aimed to investigate the effects of amiodarone on the synthesis of surfactant, of which phospholipids are the major component. **[Materials and Methods]** Using male Fisher 344 rats, an amiodarone-induced lung disorder model was prepared by daily oral administration of amiodarone. Bronchoalveolar lavage fluids, isolated alveolar type II cells, and lung tissue were collected from these rats. The following steps were performed: cell profiling and morphometry of bronchoalveolar lavage cells, quantitative evaluation of surfactant proteins by Western blot, electron-microscopic analysis with quantitative morphometry and phoshatidylcholine-synthesis analysis with radioisotope in type II cells, histological analysis of lung tissues, gene-expression analysis of surfactant proteins and phospholipid-synthesis enzymes, and quantitative evaluation of phospholipids and their subspecies. **[Results]** Compared with the control groups, amiodarone-administered groups showed an increased number and size of alveolar macrophages, and increased amount of surfactant protein-A and -D in bronchoalveolar lavage fluids. They also showed a gain in cell size and intercellular surfactant-storage organelles, and an enhanced synthesis of phospholipids in isolated alveolar type II cells. Elevated gene expression of phosphatidylcholine-synthesis enzymes, and amounts of phospholipids, especially phosphatidylcholine, were observed in the lung tissues. **[Conclusion]** In addition to previously reported inhibition of phospholipid catabolism in alveolar macrophages, increased synthesis of lung surfactant in alveolar type II cells appears to be implicated in the mechanism of lung phospholipidosis in amiodarone-induced pulmonary toxicity.

Key Words: amiodarone-induced pulmonary toxicity, rat, phospholipidosis, surfactant protein, type II alveolar epithelial cell