氏　　名	北楯祥子（きただてしょうこ）
学位論文題目	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

学位論文内容の要旨

研究目的

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有用な薬剤である。しかし，約５％の頻度で全身に及ぶ多彩な副作用が生じる。なかでも肺障害は，重症化や致死例も報告されており，臨床上最も重要な副作用である。アミオダロン肺障害では，肺胞マクロファージへのリン脂質の過剰蓄積を特徴とする。その機序として，アミオダロン分子の親水性・親油性両親媒性性質やアミオダロンによる肺胞マクロファージにおける lysosomal phospholipase A2 をはじめとするリン脂質分解系の抑制がこれまで報告されている。リン脂質は細胞膜の主成分であるとともに，表面張力の低下作用により肺胞虚脱を防ぐ肺組織特異的なサーファクタントの主成分でもある。サーファクタントは II 型肺胞上皮細胞から多量に合成・分泌され，肺胞表面で機能した後，肺胞マクロファージによる貪食あるいは II 型肺胞上皮細胞による再取り込みが行われる。アミオダロン肺障害におけるサーファクタントの代謝に注目した研究はこれまでなされていない。申請者は，アミオダロン肺障害の肺胞マクロファージへのリン脂質過剰沈着に，サーファクタント合成系の亢進が関与する可能性を明らかにすることを目的に研究を行った。

実験方法

雄性Fisher 344 系ラットを用い，アミオダロン 100 mg/kg/日４週と 200 mg/kg/日２週の経口胃管投与により２種のアミオダロン肺障害モデルを作製し（各々 n = 12, 6)，気管支肺胞洗浄液の回収，II型肺胞上皮細胞の単離と肺組織を採取した。対照群として溶媒のみを同量，４あるいは２週注入し，同様の検体を採取した（各々 n = 12, 6)。II型肺胞上皮細胞は，fluorocarbon-albumin乳剤貪食による肺胞腔内からのマクロファージの除去と肺組織の豚膵エラスターゼによる分解の後，密度勾配遠心法により単離・培養した。気管支肺胞洗浄液中の沈渣細胞の分画，細胞面積の光学顕微鏡的計測，貪食空胞の電子顕微鏡的観察と上清中のサーファクタント蛋白 A, B, D各成分のWestern blot法による定量を行った。単離Ⅱ型細胞を用い，電子顕微鏡による形態観察，細胞面積・層状封入体貯留空胞の形態計測に加え，培養液中への[^{3}H]塩化コリン添加後，脂質成分を Bligh-Dyer法で抽出し，液体シンチレーションカウンターによる放射活性の計測により単位細胞蛋白量当たりのホスファチジルコリン合成能を算定した。さらに，肺組織を用い，病理学的形態観察，サーファクタント蛋白と*de novo*・リモデリング両経路のリン脂質合成酵素群の real time RT-PCR法による遺伝子発現定量解析と総リン脂質ならびに二次元薄層クロマトグラフィー法を加えたホスファチジルコリン，リゾホスファチジルコリン，ホスファチジ

ルグリセロール各分画量を Bligh-Dyer法による脂質抽出と Bartlett法により定量した。

実験成績

アミオダロン 200 mg 投与群では，体重減少と２週目後半での呼吸促迫・自発体動の低下が観察された。非投与群と比較しアミオダロン投与群では，気管支肺胞洗浄液中の肺胞マクロファージ数は約 2.9 倍と有意に増加し，細胞質は泡沫化し，面積は 2.1 倍に拡大した。電子顕微鏡観察では，貪食空胞の拡大と増加を認めた。気管支肺胞洗浄液上清中のサーファクタント蛋白 A，D 成分の増加も検出された。アミオダロン投与群の単離Ⅱ型細胞は，非投与群の II 型細胞と比較し面積が約 1.4 倍に増大し，サーファクタント貯蔵層状封入体小胞構造が 1.8 倍に拡大するとともに，ホスファチジルコリン合成能が約 2.2 倍と有意に亢進していた。アミオダロン投与群の肺組織では，肺胞中隔への単核細胞浸潤・充血など間質性肺炎所見に加え，肺胞マクロファージの細胞質の泡沫化と II 型肺胞上皮細胞の細胞質の多空胞形成を伴う大型化が観察された。さらに，*de novo*・リモデリング両経路のホスファチジルコリン合成酵素遺伝子が，各々 1.6 倍，2.2 倍と発現亢進し，単位肺組織当たりの総リン脂質とホスファチジルコリン，リゾホスファチジルコリン，ホスファチジルグリセロール各成分が，各々 1.8 倍，2.0 倍，2.1 倍，3.1 倍と有意に増加していた。肺組織中のサーファクタント蛋白 A～D 遺伝子発現にはアミオダロン投与群と対照群の肺組織間で有意差は認めなかった。

総括および結論

気管支肺胞洗浄液ならびに肺組織で，肺胞マクロファージ細胞質の泡沫化と間質性肺炎所見，肺組織中の総リン脂質量の増加など，これまでヒトならびに実験動物におけるアミオダロン肺障害で報告されている所見が確認され，今回作製したラットモデルのアミオダロン肺障害モデルとしての妥当性が検証された。今回の検討では，アミオダロン投与 II 型肺胞上皮細胞におけるリン脂質，特にサーファクタントの主成分であるホスファチジルコリンの合成亢進が，単離 II 型肺胞上皮細胞を用いた合成能の解析，肺組織おけるホスファチジルコリン合成に関わる２経路の酵素遺伝子の発現定量解析とリン脂質分画の定量解析により明らかとなった。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分画の増加と単離及び肺組織中 II 型肺胞上皮細胞での貯留小胞構造の増大もアミオダロンによる II 型肺胞上皮細胞におけるサーファクタントリン脂質の産生亢進を支持する。サーファクタント蛋白に関して，疎水性アポ蛋白でリン脂質との親和性が高く，リン脂質と共に表面張力低下機能に関わるサーファクタント B の蛋白ならびに遺伝子レベルの発現亢進は認めなかった。以上の実験成績から，アミオダロン肺障害の発症には，従来報告されている肺胞マクロファージにおけるリン脂質分解系の抑制に加え，II 型肺胞上皮細胞におけるリン脂質合成系の亢進が関わっていることが示唆され，アミオダロン肺障害に対する新たな予防法や治療法の確立に繋がることが期待される。