

Effect of the Administration of Interleukin-1 in Vivo on Bleomycin-Induced Pneumonitis in Mice

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8543

マウスブレオマイシン肺臓炎モデルにおける インターロイキン-1 投与の影響

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

安 井 正 英

臨床的な肺線維症のモデルとして頻用されるブレオマイシン (bleomycin, BLM) 肺臓炎モデルにおいては、これまで気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) を用いてインターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1) が測定され、肺臓炎形成の初期においてその活性が増加していることが報告されている。しかし、IL-1 を生体内に投与した実験はなく、検出された IL-1 生理的意義については今だ不明である。そこで、BLM の単回静脈内投与による肺臓炎動物モデルを開発し、組換えヒト IL-1 β 投与の影響を検討した。BLM 投与後、7日目より28日目まで肺湿重量および肺/体重比の有意な増加を認めた。病理組織学的には、14日目には間質性肺炎が生じ、28日目には肺の線維化が見られた。BLM 投与後28日目の病理組織学的スコアは、BLM の投与量依存的に有意な増加を認めた。IL-1 (1 μ g/個体) を BLM 投与の0.5時間および6時間前に腹腔内投与することによって、14日目および28日目の肺湿重量と肺/体重比の増加は有意に抑制された。同様に、28日目の肺における病理組織学的スコアも有意に抑制された。したがって、IL-1 は時間依存的に BLM 肺臓炎を抑制することが判明した。BLM 投与後7日目から28日目において、BALF 中の細胞数およびリンパ球比率は有意に増加した。IL-1 を BLM 投与の6時間前に投与した場合、この BALF 所見は有意に抑制された。28日目の肺湿重量、肺/体重比および肺ヒドロキシプロリン量は、IL-1 前投与の用量依存的に抑制された。さらに肺湿重量および肺/体重比は、肺ヒドロキシプロリン量と有意な正の相関関係を認めた。IL-1 を BLM 投与後1, 3, 7日目に 1 μ g/個体投与した場合と、IL-1 を BLM 投与後1日目より連日7日間投与した場合では、BLM 肺臓炎に対する影響はみられなかった。IL-1 前投与は、BLM のエールリッヒ癌細胞への抗腫瘍活性効果に対して影響を及ぼさなかった。この所見は、IL-1 が BLM の代謝経路に影響しないことを示している。インドメサシン (indomethacin, IDM) は、IL-1 の BLM 肺臓炎抑制効果に対し影響しなかった。以上の成績より、IL-1 の前投与は用量および時間依存的に BLM 肺臓炎を抑制するが、IL-1 の後投与は影響を認めないことが示された。これらの所見は、BLM 肺臓炎における内因性の IL-1 が、防御因子として作用している可能性を示唆している。

Key words bleomycin, pneumonitis, interleukin-1, mouse

間質性肺炎は、種々の刺激により肺間質に生ずる炎症の総称であり、その中には極めて様々な疾患が含まれ、今だ原因不明のものも多くを占めている。しかし、原因は何であれ慢性化したものでは、その終末像においては肺の線維化に至る¹⁾。したがって、肺の線維化に関する研究は、臨床的に広範な疾患に関わる重要な分野である。近年、サイトカインに関する研究が盛んになり、臨床的な各種間質性肺炎や肺線維症においても、インターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1) を始めとする様々なサイトカインが測定され、その病態との関連性が推測されている^{2,3)}。すなわち、IL-1 はマクロファージやリンパ球をはじめとして各種細胞を活性化し、炎症反応の介在物質として作用することから、間質性肺炎や肺線維症において検出された IL-1 は、炎症の増悪因子として作用していると考えられている。ブレオマイシン (bleomycin, BLM) は、扁平上皮癌や悪性リンパ腫等に広く使われている優れた抗腫瘍剤である⁴⁾が、その副作用としてヒト⁵⁻⁸⁾や動物^{9,10)}に肺線維症を起こすことが知られている。

それゆえ、簡便に肺の線維化が作成され、その病変がヒトでの間質性肺炎や肺線維症に類似していることから、ヒトの肺線維症の研究目的に BLM 投与の動物モデルが盛んに用いられている¹¹⁾。この BLM 肺臓炎モデルにおいても、肺胞マクロファージからの IL-1 産生能が亢進し、肺障害の進展・拡大に IL-1 が関連していることが推測されている¹²⁻¹⁴⁾。ある種の介在物質の病態に関する意義を検討する場合、その物質の検出 (第一段階)、その物質の投与実験 (第二段階)、その物質の阻害実験 (第三段階) を行う必要がある。したがって、これまでの IL-1 に関する研究は第一段階しか行われておらず、IL-1 の間質性肺炎および肺線維症における意義はいまだ不明といえる。近年、細菌感染モデル¹⁵⁻¹⁷⁾、放射線照射モデル¹⁸⁻²⁰⁾、化学療法剤投与モデル^{21,22)}、高濃度酸素投与モデル²³⁾ および心筋虚血/再灌流モデル²⁴⁾ において、IL-1 前投与による致死作用軽減効果が報告されてきている。これらのモデルにおける効果および障害には、各種の活性酸素が関与している。BLM の抗腫瘍効果の機序も活

平成5年12月6日受付, 平成6年2月14日受理

Abbreviations: BLM, bleomycin; BAL, bronchoalveolar lavage; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; IDM, indomethacin; IFN- γ , interferon- γ ; IL-1, interleukin-1; PGE₂, prostaglandin E₂; SOD, superoxide dismutase; TNF, tumor necrosis factor

性酸素が主体であること²⁵⁾²⁶⁾から、BLM 肺臓炎モデルにおいても、IL-1 前投与により肺臓炎が抑制される可能性がある。しかし、これまで BLM 肺臓炎モデルに対しては、第二段階にあたる IL-1 の生体投与実験は検討されておらず、IL-1 を投与した場合いかなる修飾をうけるかは不明である。以上のことより、本研究の目的は、炎症性サイトカインとされる IL-1 投与が、BLM 肺臓炎モデルをいかに修飾するかを明らかにすることであり、肺線維化における IL-1 産生の意義に関して考察する。

対象および方法

I. 対 象

10から12週齢の体重35から40gのICR系雄性マウス(日本クレーア, 東京)を金沢大学動物実験施設内の空調飼育室(室温23±2℃, 湿度55±5%)で一週間以上飼育し, 肉眼的観察により健康な動物を実験に用いた。

II. BLM 単回静脈内投与による肺臓炎モデルの作製

1. 肺湿重量および体重の測定

1) 生理食塩水単独投与群, 生理食塩水0.2mlのみ静脈内投与した群, 2) IL-1 単独投与群, 遺伝子組替えヒトIL-1 β (大塚製薬, 徳島)²⁷⁾²⁸⁾1 μ g/個体を1Mリン酸緩衝食水(pH7.4)0.2mlに溶解し腹腔内投与した群, 3) BLM(日本化薬, 東京)100mg/kg投与群, 4) BLM150mg/kg投与群; 以上の4群を50匹ずつ作製した。

BLMは, 生理食塩水0.2mlに溶解し, 尾静脈より一回静脈内投与した。投与後1, 3, 7, 14および28日目に, 各群10匹ずつマウスをペントバルビタールで麻酔後, ただちに体重を測定し, 続いて腹部大動脈を切開し脱血死させた後, 肺を摘出し肺湿重量を測定した。肺湿重量を体重で除し, 百分率を算出して肺/体重比とした。

2. 病理組織学的評価

上記4群において, 投与後14日目および28日目に摘出した肺を用いた。また, 肺線維化形成におけるBLMの用量依存性を確認する目的で, BLM50mg/kg投与群10匹も作製し28日目のみ検討した。摘出した肺を直ちにホルマリン固定後, パラフィン切片標本を作成し, ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン・マロリー染色を施したものを光学顕微鏡で観察し, 病理組織学的に評価した。肺線維化の程度(grade)は, (一)から(卅)の5段階に分類し, それぞれ(一)=0, (±)=1, (+)=2, (++)=4, (卅)=6と点数表示する浴本らの方法²⁹⁾に従い, マウス一匹での合計得点を肺葉数で除し, 肺葉あたりのスコアを算出

した。また, 線維化の発生頻度(incidence)は, マウスごとに1点以上を示した肺葉数を総肺葉数で除し, 肺葉あたりの発生頻度の百分率を算出した(表1)。

III. BLM 肺臓炎に対する IL-1 前投与の影響

1. 肺湿重量および体重の測定

BLM150mg/kg投与の0.5, 6, 12および24時間前にIL-11 μ g/個体を腹腔内投与した群を各20匹ずつ作製した。対象として, BLM150mg/kg単独投与群20匹も作製した。BLM投与後14日目および28日目に, 各群10匹ずつ前述の方法で肺湿重量および体重を測定し, 肺/体重比を算出した。

2. 病理組織学的評価

各群の28日目の摘出肺を用いて, 前述の方法で病理組織学的に評価した。

3. 気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)細胞所見

1) IL-1 単独投与群, IL-11 μ g/個体のみ腹腔内投与した群, 2) BLM 単独投与群, BLM150mg/kgのみ静脈内投与した, 3) BLM+IL-1 前投与群, BLM150mg/kg投与の6時間前にIL-11 μ g/個体を腹腔内投与した群を各40匹ずつ作製した。投与後3, 7, 14, 28日目に各群10匹ずつ以下の方法で気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage, BAL)を施行した。すなわち, マウスをペントバルビタールで麻酔後, 腹部大血管を切開し脱血死させ, 気管内チューブを挿入固定し, 1mlの生理食塩水を注入・吸引する操作を計6回行い, 得られた液をBALFとした。BALFは試験管(2070 tube, Falcon, Lincoln Park, U.S.A.)に回収し, 1200rpmで10分間遠心した。その沈査を細胞成分とし, 100U/mlのペニシリンと100 μ g/mlのストレプトマイシンを含んだRPMI1640培養液(GIBCO, Grand Island, U.S.A.)1mlに浮遊させ細胞数を算定後, RPMI1640培養液に 2×10^5 細胞/mlの濃度に再浮遊し, その細胞浮遊液100 μ lをサイトスピン2(Shandont, Sewickleyo, U.S.A.)を用いて800rpmで10分間遠心し, 遠心スライド標本を作成した。作成した標本にMay-Giemsa染色を施し, 光学顕微鏡で細胞を300個観察して細胞分画を評価した。

4. 肺ヒドロキシプロリン量の測定

BLM肺臓炎に対するIL-1前投与の影響の用量依存性について, 肺湿重量および肺/体重比と, 肺線維化の一般的な生化学的指標とされる肺ヒドロキシプロリン量を測定して検討した。

1) IL-1 単独投与群, IL-110 μ g/個体を腹腔内投与した群, 2) BLM 単独投与群, BLM150mg/kgのみを静脈内投与した

Table 1. The criteria for morphological evaluation of pulmonary fibrosis induced by BLM in mice

Criteria

- (0) Absence of fibrosis
- ± (1) Areas with questionable fibrosis in alveolar septa
- + (2) A few foci of fibrosis, often in subpleural area
- ++ (4) Scattered foci of fibrosis
- +++ (6) Diffuse fibrosis

$$\text{Grade (point)} = \frac{\text{Total score of specimens in one mouse}}{\text{Number of specimens in the same mouse}}$$

$$\text{Incidence (\%)} = \frac{\text{Number of specimens with fibrosis in one mouse}}{\text{Number of specimens in the same mouse}} \times 100$$

群, 3) BLM+IL-1 前投与群, BLM 150mg/kg 投与の6時間前に, IL-1 0.1, 1 および 10 μ g/個体を腹腔内投与した群を各群10匹ずつ作製し, 投与後28日目に前述の方法で肺湿重量と体重を測定した. 摘出した肺をただちに液体窒素中で急速凍結し, 測定まで-80 $^{\circ}$ Cにて保存した. 肺ヒドロキプロリン量の測定は, Prockop らの方法³⁰⁾に従い測定した. 各肺ごとに蒸留水を加え, 肺湿重量 10mg/ml の濃度に調整し, ガラスホモジナイザー (パイレックス 10ml) 中で均一な液とした. この溶液より 1ml を遠沈管 (パイレックス 10ml スクリューキャップ付き) に加え, さらに蒸留水 1ml および 6N 塩酸 2ml を加え混合した. この溶液を110 $^{\circ}$ Cの油浴中で20時間加水分解した. 加水分解後20分間流水で冷却し, 蒸留水 4ml を加え混合した. L-ヒドロキプロリンに蒸留水を加えて, 1.563, 3.125, 6.25, 12.5 および 25 μ g/ml の5段階に調整した標準検量線溶液と検体溶液より各々 2ml をガラス試験管にとり, 1% フェノールフタレインエタノール溶液 0.2ml を加えて混合し, 1N および 10N 水酸化カリウムにて pH7-8 に調整し, 蒸留水を加えて総量 4ml とした. この溶液に 0.22M ホウ酸緩衝液 1ml (ホウ酸 10g を蒸留水 80ml に溶解し, 10N 水酸化カリウムを加えて pH8.7 に調整し, さらに蒸留水を加えて総量 100ml とした), 10% アラニン溶液 0.5ml (β アラニン 10g を蒸留水 80ml に溶解し, 10N 水酸化カリウムを加えて pH8.7 に調整し, さらに蒸留水を加えて総量 100ml とした) およびクロラミン T 溶液 1ml (クロラミン T 5.6g をメチルセルソルブに溶解し 100ml とした) を加えて混合し室温で20分間放置した. この溶液に 3.6M チオ硫酸ナトリウム 2.5ml (チオ硫酸ナトリウム 89.1g を蒸留水に溶解し 100ml とした) およびトルエン 5ml を加えて混合し, 上清を除去した. 試験管をアルミホイルで密閉し, この溶液を 95 $^{\circ}$ Cの油浴中で30分間加熱した後, 流水にて10分間冷却した. この溶液にトルエン 5ml を加えよく振盪後, 上清を遠沈管 (パイレックス 10ml スクリューキャップ付き) に取り 3000rpm にて10分間遠心分離した. 遠心分離した上清 2.5ml を蓋付試験管に取り, エーリッヒ試薬 1ml (50 $^{\circ}$ Cの水浴中で, 無水エタノール 20ml に p-ジメチルベンズアルデヒド 12g を加えて溶解し, この溶液に無水エタノール 20ml と硫酸 2.74ml の混合液を少量ずつ加えた) を加え混合し室温で10分間放置した後, 分光光度計 UV-210A 型 (島津製作所, 京都) にて 560nm における吸光度を測定した. 標準溶液の値から検量線を作成し, 検体溶液の吸光度よりヒドロキプロリン量を求め, さらに肺全重量に換算し肺ヒドロキプロリン量とした. 尚, 用いた試薬はすべて和光純薬工業 (大阪) 特級品を用いた.

IV. BLM 肺臓炎に体する IL-1 後投与の影響

1) IL-1 単独投与群, IL-1 1 μ g/個体/日のみ連日7日間腹腔内投与した群 2) BLM 単独投与群, BLM 150mg/kg のみ静脈内投与した群 3) BLM+IL-1 投与群, BLM 150mg/kg 投与後, 1, 3, 7日目に IL-1 1 μ g/個体を腹腔内投与したものと, IL-1 1 μ g/個体/日を1日目より連日7日間投与した群をそれぞれ10匹ずつ作製した. 投与開始より28日目に前述の方法で肺湿重量と体重を測定し, 肺/体重比を算出した.

V. BLM のエールリッヒ癌細胞への抗腫瘍効果に対する IL-1 前投与の影響

エールリッヒ癌細胞 (微生物化学研究所 竹内富雄所長より供与) は, ICR 系雌性マウスの腹腔内に投与し1週間以上増殖させた後, 腹腔内より注射器にて採取し, ただちに RPMI1640

培養液を用いて細胞数が 2×10^7 個/ml になる様に調整した. 作製した溶液 0.1ml を ICR 系雌性マウスの背部皮下に注入し, 1) 癌細胞単独群 2) 癌細胞+BLM 投与群, 移植24時間後に BLM 150mg/kg を静脈内投与した群 3) 癌細胞+BLM+IL-1 前投与群, 移植18時間後に IL-1 1 μ g/個体腹腔内投与し, さらに6時間後 BLM 150mg/kg を静脈内投与した群をそれぞれ10匹ずつ作製した. 移植後15日目に, マウスをペントバルビタールで麻酔後, 腫瘍を摘出し湿重量を測定した.

VI. IL-1 前投与の BLM 肺臓炎抑制効果に対するインドメサシン (indomethacin, IDM) の影響

1) 生理食塩水単独投与群, 生理食塩水 0.2ml のみ静脈内投与した群 2) BLM 単独投与群, BLM 150mg/kg のみ静脈内投与した群 3) BLM+IL-1 投与群, BLM 150mg/kg 静脈内投与の6時間前に IL-1 1 μ g/個体を腹腔内投与した群の3群に対し, IDM (Sigma, St. Louis, U.S.A.) 4mg/kg を生理食塩水 0.2ml に溶解し, BLM 投与前1週間および投与後2週間の計3週間連日腹腔内投与した群を作製した. すなわち 4) 生理食塩水+

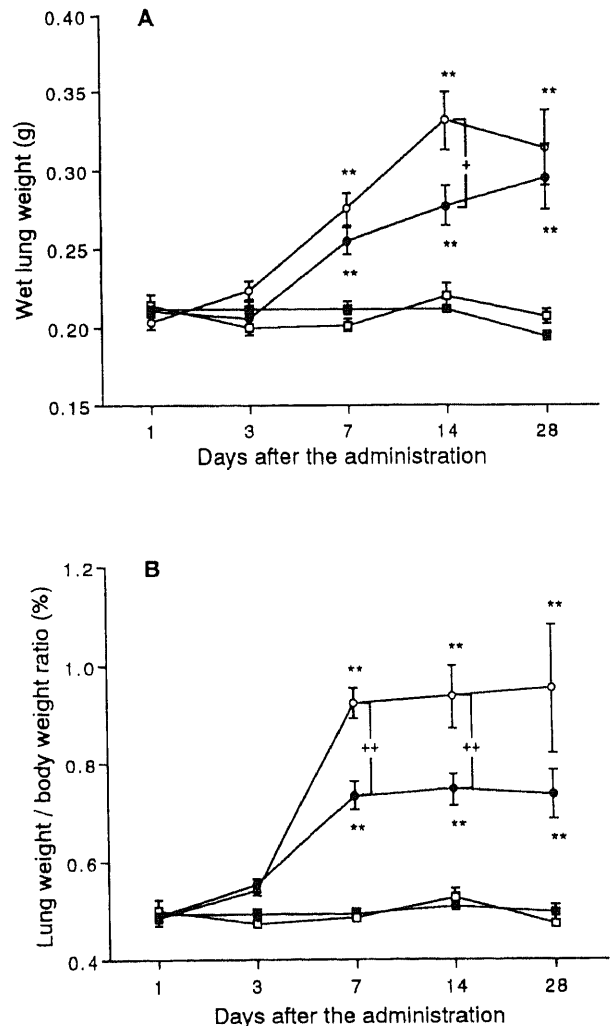


Fig. 1. Change of wet lung weight (A) and lung weight-to-body weight ratio (B) after the administration of BLM in mice. Each point represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to those of saline or IL-1-treated mice. ■, saline; □, IL-1; ●, BLM 100 mg/kg; ○, BLM 150 mg/kg; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$.

IDM 投与群 5) BLM+IDM 投与群, 6) BLM+IL-1+IDM 投与群をくわえた計 6 群を各 10 匹ずつ作製し, 投与後 28 日目に肺湿重量と体重を前述の方法で測定し, 肺/体重比を算出した。

Ⅶ. 統計計算

得られた計測値は, すべて平均値±標準誤差で示した。得られた計測値の比較には, Wilcoxon の順位和検定を使用し, 両側検定で危険率 5% 以下をもって有意差ありと判定した。

成 績

1. BLM 単回静脈内投与法による肺臓炎モデルの作製

1. 肺湿重量および肺/体重比 (図 1)

肺湿重量では, 生理食塩水単独投与群と IL-1 単独投与群では, それぞれ 1 日目から 28 日目まで全く変化が認められず, 両群間に有意差も認められなかった (生理食塩水単独投与群, $0.20 \pm 0.01g$; IL-1 単独投与群, $0.21 \pm 0.01g$)。同様に肺/体重比においても, 生理食塩水単独投与群と IL-1 単独投与群では, それぞれ 1 日目から 28 日目まで全く変化が認められず, 両群間に有意差も認められなかった (生理食塩水単独投与群, $0.50 \pm 0.01\%$; IL-1 単独投与群, $0.50 \pm 0.03\%$) (N は両群とも各日ごとに 10)。BLM 100mg/kg 投与群では, (以下肺湿重量, 肺/体重比の順に示す) 1 日目 ($0.21 \pm 0.00g, 0.49 \pm 0.01\%$) (N=10), 3 日目

($0.21 \pm 0.00g, 0.55 \pm 0.01\%$) (N=10), 7 日目 ($0.26 \pm 0.01g, 0.73 \pm 0.03\%$) (N=10), 14 日目 ($0.28 \pm 0.01g, 0.75 \pm 0.03\%$) (N=10), 28 日目 ($0.30 \pm 0.02g, 0.74 \pm 0.05\%$) (N=10) であった。BLM 150mg/kg 投与群では, (以下肺湿重量, 肺/体重比の順に示す) 1 日目 ($0.20 \pm 0.00g, 0.49 \pm 0.02\%$) (N=10), 3 日目 ($0.22 \pm 0.01g, 0.54 \pm 0.01\%$) (N=10), 7 日目 ($0.28 \pm 0.01g, 0.92 \pm 0.03\%$) (N=10), 14 日目 ($0.33 \pm 0.02g, 0.94 \pm 0.06\%$) (N=10), 28 日目 ($0.31 \pm 0.03g, 0.94 \pm 0.06\%$) (N=9) であった。肺湿重量においては, BLM 100mg/kg 投与群および 150mg/kg 投与群とも生理食塩水単独投与群および IL-1 単独投与群に比し, 7 日目から 28 日目において有意な増加を認めた。また, BLM 100mg/kg 投与群と 150mg/kg 投与群の間にも, 14 日目において有意差を認めた。肺/体重比においては, BLM

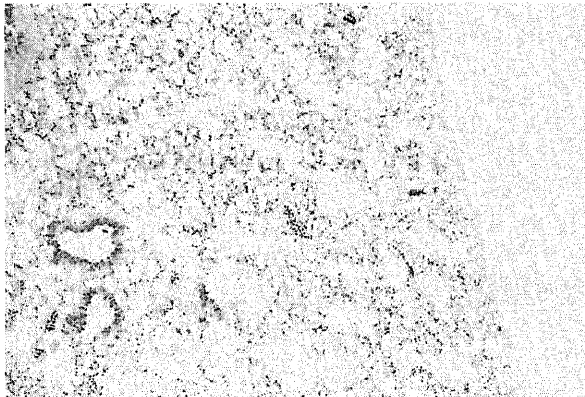


Fig. 2. The microscopic view of the lung of mice at 28 days after the administration of IL-1 in mice. Azan-Mallory stain ($\times 200$).

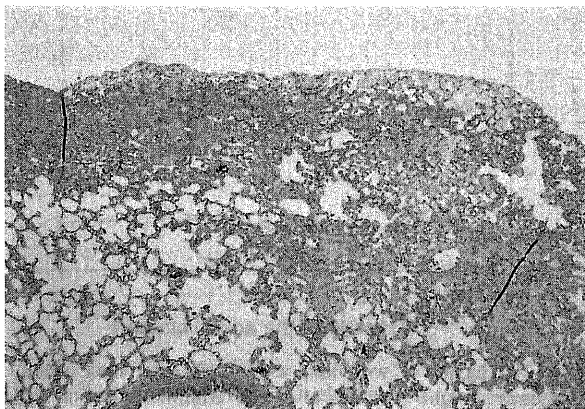


Fig. 3. The microscopic view of the lung of mice at 28 days after the administration of BLM showing fibrotic change in subpleural area. Azan-Mallory stain ($\times 200$).

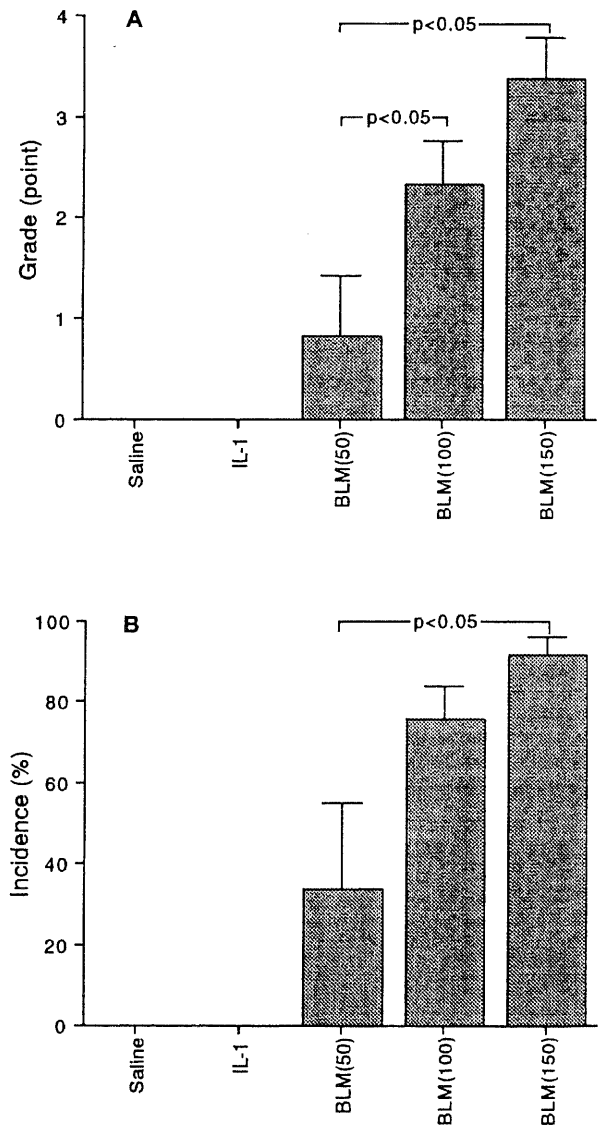


Fig. 4. Grade (A) and Incidence (B) of pulmonary fibrosis at 28 days after the administration of BLM in mice. Mice were treated with saline (N=10), IL-1 (N=10) or each dose of BLM (50, 100, 150 mg/kg body weight) (N=10 for each dose). At 28 days after the administration, lungs were fixed and stained and their histopathological scored were obtained after Ekimoto et al²⁰ as shown in Fig. 1.

100mg/kg 投与群および 150mg/kg 投与群とも生理食塩水単独投与群および IL-1 単独投与群に比し、7日目から28日目まで有意な増加を認めた。また、BLM 100mg/kg 投与群と 150mg/kg 投与群の間にも、7日目と14日目において有意差を認めた。BLM 投与を行った場合、肺湿重量および肺/体重比においては、3日目まで変化せず、7日目より増加し、14日目以降ピークをとる経過を示した。

2. 病理組織学的評価 (図2, 図3, 図4)

生理食塩水単独投与群では、14日目および28日目とも炎症細胞浸潤や線維化病変は認められず、正常マウス肺と同様であ

た。また、IL-1 単独投与群においても、14日目および28日目とも全く正常肺と変わらぬ所見であった。一方、BLM 100mg/kg 投与群および 150mg/kg 投与群では、14日目において胸膜側を主体に単核球細胞浸潤と肺泡隔壁の浮腫性肥厚が見られ、肺胞腔内には泡沫マクロファージも出現し、間質性肺炎の所見が認められた。しかし、アザン・マロリー染色では、線維化の所見はほとんど認められなかった。28日目においては、胸膜下より線維化の所見が見られ、単核球細胞浸潤を主体とする間質性肺炎の所見も依然として強く認められた。アザン・マロリー染色でも線維化の所見が強く出現していた。14日目においては、4群とも線維化の所見が認められないことより、スコアは程度および発生頻度とも0となった(データ図示せず)。28日目においては、生理食塩水単独投与群 (N=10) と IL-1 単独投与群 (N=10) では両群とも程度0点、発生頻度0%であったが、BLM 50mg/kg 投与群では程度0.8±0.6、発生頻度 34±24%

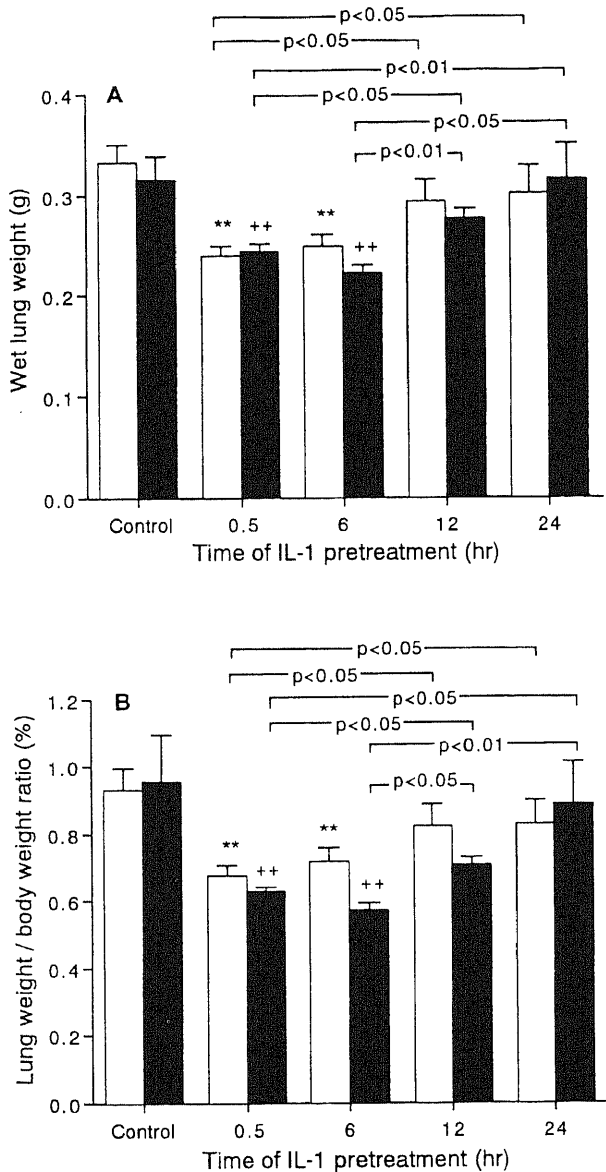


Fig. 5. Effect of IL-1 pretreatment on wet lung weight (A) and lung weight-to-body weight ratio (B) of mice treated with BLM. Mice were pretreated with IL-1 (1 μg/mouse) at various times (hr) before the administration of BLM (150 mg/kg body weight) as shown on the abscissa. Each bar represents the mean±SEM. □ bar shows values at 14 days, and ■ bar shows values at 28 days after administration of BLM. *p<0.05, **p<0.01 as compared to those values of the control group administered with BLM alone.

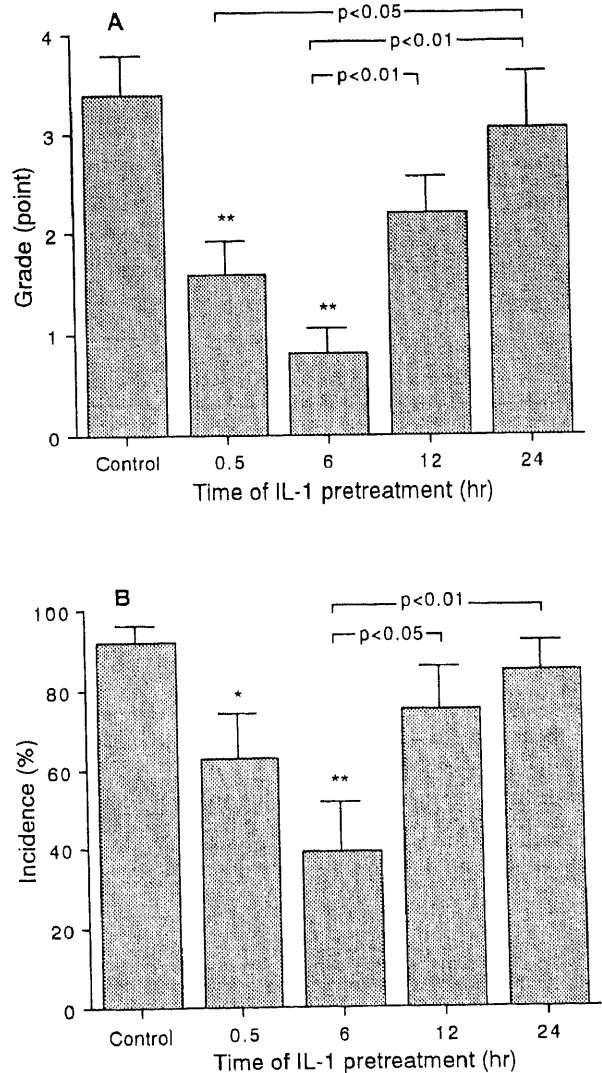


Fig. 6. Effect of IL-1 pretreatment on Grade (A) and Incidence (B) of BLM-induced pulmonary fibrosis in mice. Mice were pretreated with IL-1 (1 μg/mouse) at various times (hr) before the administration of BLM (150 mg/kg body weight) as shown on the abscissa. Each bar represents the mean±SEM. *p<0.05, **p<0.01 as compared to those values of the control group administered BLM alone.

(N=10), BLM 100mg/kg 投与群では程度 2.3 ± 0.4 点, 発生頻度 $76 \pm 8\%$ (N=10), BLM 150mg/kg 投与群では程度 3.4 ± 0.4 点, 発生頻度 $92 \pm 4\%$ (N=9) とスコア上も著明な線維化が認められた。また, BLM 投与群間では, BLM 50mg/kg 投与群に比し, BLM 100mg/kg 投与群と 150mg/kg 投与群の程度および発生頻度が有意に増加し, 肺線維化の形成が BLM 用量依存的事実であることが確認された。

II. BLM 肺臓炎に対する IL-1 前投与の影響

1. 肺湿重量と肺/体重比 (図 5)

14日目での肺湿重量と肺/体重比は, (以下肺湿重量, 肺/体重比の順に示す) BLM 単独投与群 (0.33 ± 0.02 g, $0.94 \pm 0.06\%$) (N=10), IL-1 0.5時間前投与群 (0.24 ± 0.01 g, $0.68 \pm 0.03\%$) (N=10), IL-1 6時間前投与群 (0.25 ± 0.01 g, $0.72 \pm 0.04\%$) (N=10), IL-1 12時間前投与群 (0.29 ± 0.02 g, $0.82 \pm 0.06\%$) (N=9), IL-1 24時間前投与群 (0.30 ± 0.03 g, $0.83 \pm 0.07\%$) (N=10) であった。BLM 単独投与群に比し, IL-1 0.5時間前投与群と 6時間前投与群において, 肺湿重量および肺/体重比の有意な低下が認められた。BLM+IL-1 前投与群間の比較では, IL-1 12時間前投与群および24時間前投与群に対し, 0.5時間前投与群における肺湿重量および肺/体重比の有意な低下が認められた。28日目での肺湿重量と肺/体重比は, BLM 単独投与群

(0.31 ± 0.03 g, $0.95 \pm 0.13\%$) (N=9), IL-1 0.5時間前投与群 (0.24 ± 0.01 g, $0.63 \pm 0.02\%$) (N=10), IL-1 6時間前投与群 (0.22 ± 0.01 g, $0.57 \pm 0.03\%$) (N=10), IL-1 12時間前投与群 (0.28 ± 0.01 g, $0.71 \pm 0.03\%$) (N=9), IL-1 24時間前投与群 (0.31 ± 0.04 g, $0.89 \pm 0.13\%$) (N=9) であった。14日目と同様に, BLM 単独投与群に比し, IL-1 0.5時間前投与群と 6時間前投与群において, 肺湿重量および肺/体重比の有意な低下が認められた。BLM+IL-1 前投与群間の比較では, IL-1 12時間前投与群および24時間前投与群に対し, 0.5時間前投与群および6時間前投与群における肺湿重量および肺/体重比の有意な低下が認められた。

2. 病理組織学的評価 (図 6)

28日目での病理組織学的スコアは, (以下程度, 発生頻度の順に示す) BLM 単独投与群 (3.4 ± 0.4 点, $92 \pm 4\%$) (N=9), IL-1 0.5時間前投与群 (1.6 ± 0.3 点, $63 \pm 11\%$) (N=10), IL-1 6時間前投与群 (0.8 ± 0.3 点, $39 \pm 13\%$) (N=10), IL-1 12時間前投与群 (2.2 ± 0.37 点, $75 \pm 11\%$) (N=9), IL-1 24時間前投与群 (3.1 ± 0.55 点, $85 \pm 7\%$) (N=9) であった。BLM 単独投与群に比し, IL-1 0.5時間前投与群と 6時間前投与群において, 程度および発生頻度の有意な低下が認められた。BLM+IL-1 前投与群間の比較では, 程度において, IL-1 12時間前投与群に対し6時間

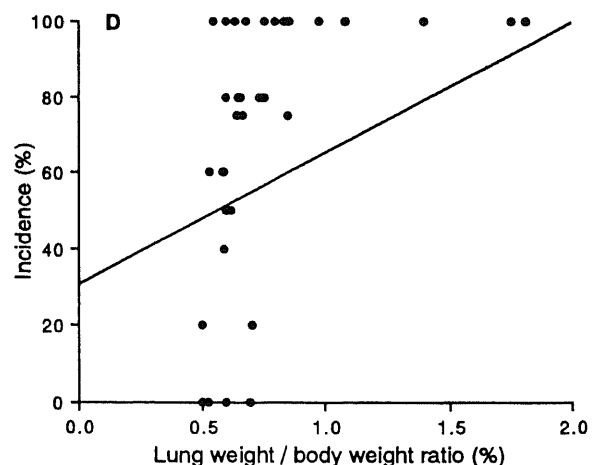
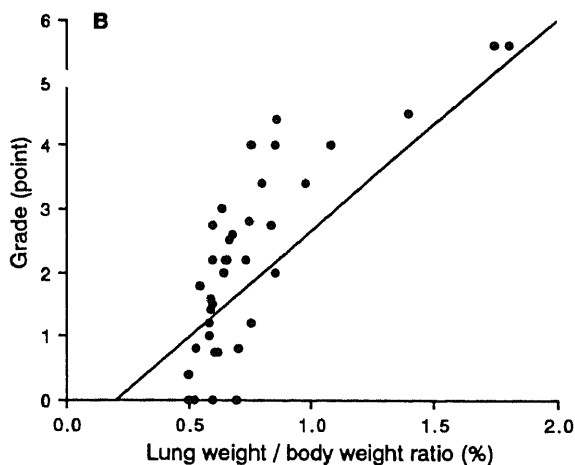
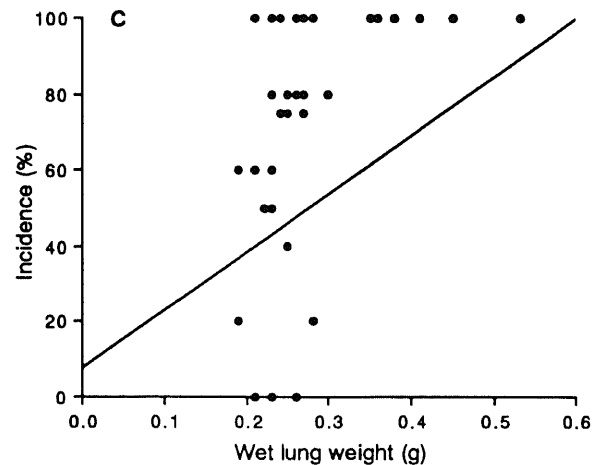
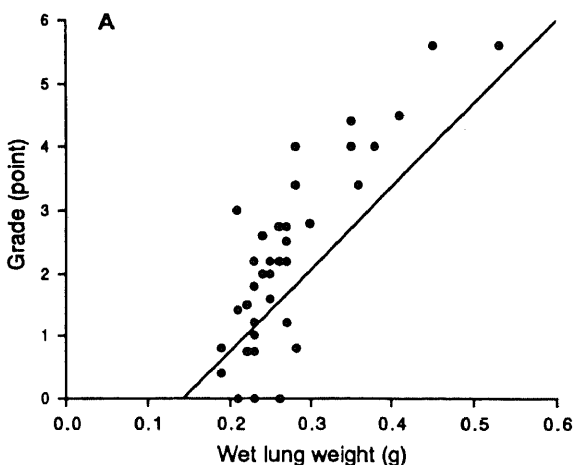


Fig. 7. Correlation between histopathological score, and wet lung weight (A, C) or lung weight-to-body weight ratio (B, D). A: $y=17.033x-2.452$, $n=37$, $r=0.689$, $p<0.001$, B: $y=226.590x+7.742$, $n=37$, $r=0.503$, $p<0.01$, C: $y=3.972x-0.808$, $n=37$, $r=0.791$, $p<0.001$, D: $y=51.524x-30.606$, $n=37$, $r=0.467$, $p<0.01$.

前投与群が有意に低下し、IL-1 24時間前投与群に対し0.5時間前投与群および6時間前投与群が有意な低下を認めた。また、発生頻度において、IL-1 12時間前投与群および24時間前投与群に対し、6時間前投与群が有意な低下を認めた。

3. 肺湿重量および肺/体重比と病理組織学的評価の相関 (図7)

病理組織学的評価に用いた肺における肺湿重量および肺/体重比と程度および発生頻度との相関を検討すると、いずれも有意な正の相関関係を認めた。

4. BALF 細胞所見 (図8)

IL-1 単独投与群では、3日目から28日目までほとんど変化が認められず、いずれも正常マウスと全く差がないものであった (細胞数 $0.27 \pm 0.01 \times 10^5$ cells/ml, マクロファージ 96.6 \pm 0.02%, リンパ球 2.3 \pm 0.1%, 好中球 0.9 \pm 0.1%) (N数は各日とも10)。BLM 単独投与群においては、細胞数 (細胞数/ml) は3日目 ($0.7 \pm 0.0 \times 10^5$) (N=10), 7日目 ($3.6 \pm 0.4 \times 10^5$) (N=7),

14日目 ($2.1 \pm 0.3 \times 10^5$) (N=8), 28日目 ($1.4 \pm 0.1 \times 10^5$) (N=9), (以下N数は、日ごとに細胞数のものと同じであり略す) マクロファージ比率は3日目 (96.1 \pm 0.7%), 7日目 (76.5 \pm 4.4%), 14日目 (80.5 \pm 1.6%), 28日目 (91.2 \pm 0.7%), リンパ球比率は3日目 (2.9 \pm 0.8%), 7日目 (18.0 \pm 3.2%), 14日目 (17.2 \pm 1.4%), 28日目 (8.5 \pm 1.3%), 好中球比率は3日目 (1.0 \pm 0.1%), 7日目 (5.5 \pm 1.8%), 14日目 (2.4 \pm 0.5%), 28日目 (0.3 \pm 0.2%) であった。IL-1 単独投与群に対し、BLM 単独投与群の BALF 細胞所見を比較すると、細胞数は3日目から28日目までいずれも有意な増加が認められた。マクロファージ比率は、7日目と14日目で有意な低下を認めた。リンパ球比率は、7日目から28日目まで有意な増加を認めた。好中球比率は、7日目のみ有意な増加を認めた。BLM 単独投与群では、いずれの所見も7日目をほぼピークとし28日目には正常化へ向かう変化を示した。BLM+IL-1 前投与群においては、細胞数 (細胞数/ml) は3日目 ($1.0 \pm 0.2 \times 10^5$) (N=10), 7日目 ($1.7 \pm 0.2 \times 10^5$) (N=10), 14日目

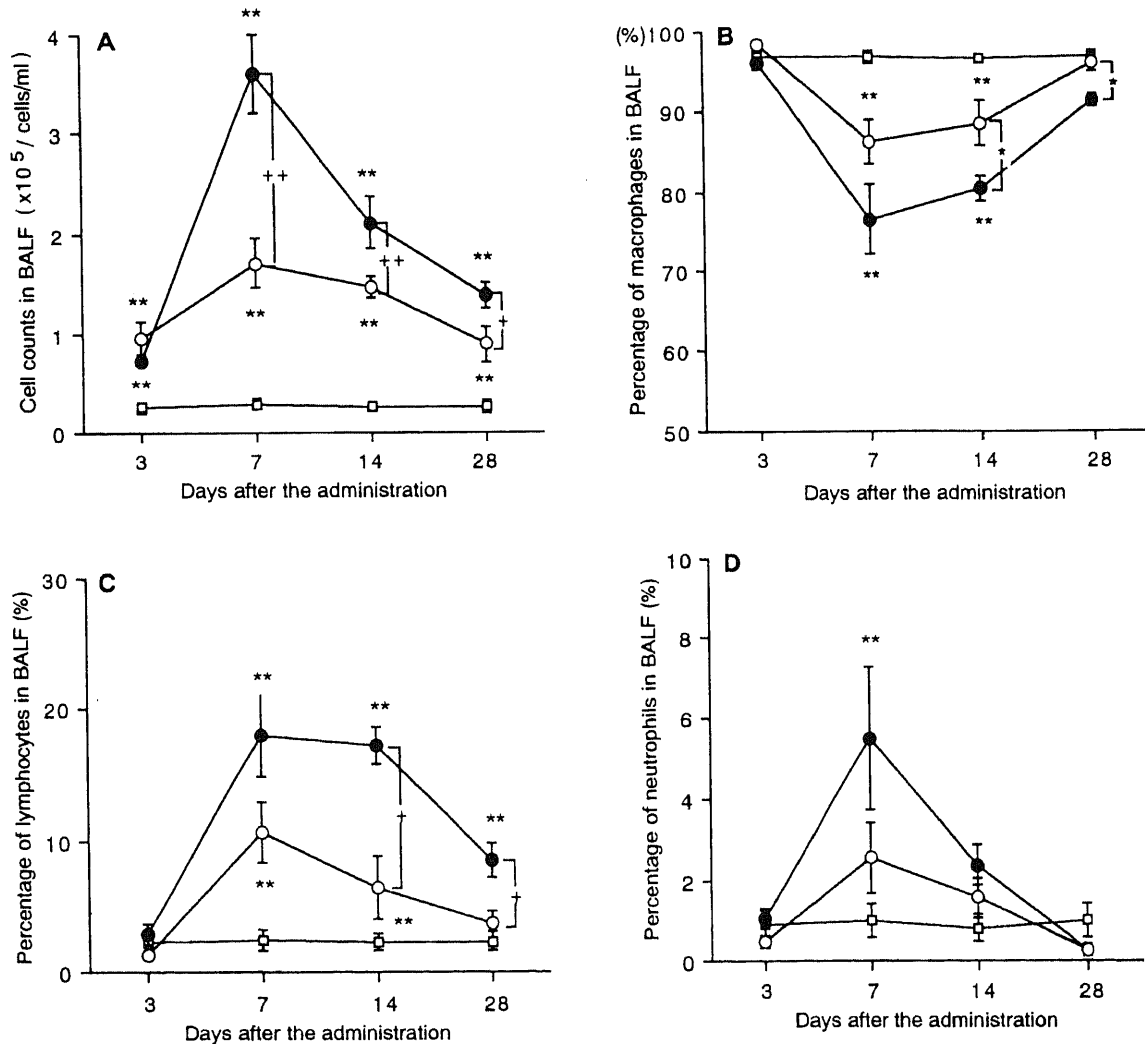


Fig. 8. Effect of IL-1 pretreatment on BALF cell findings of mice treated with BLM. Mice were pretreated with IL-1 ($1 \mu\text{g}/\text{mouse}$) at 6 hr before the administration of BLM ($150 \text{ mg}/\text{kg}$ body weight), and sacrificed at various times (day) after the administration of BLM as shown on the abscissa. Bronchoalveolar lavage of each mouse was performed with the infusion of 6 ml of sterile saline. The total cell number (A) and population (B, C, D) of BALF cells were evaluated. Each point represents the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ as compared to those values of the control group treated with IL-1 alone. \square , IL-1; \bullet , BLM $150 \text{ mg}/\text{kg}$ body weight; \circ , BLM $150 \text{ mg}/\text{kg}$ body weight with IL-1 ($1 \mu\text{g}/\text{mouse}$) pretreatment at 6 hr before the administration of BLM. * $p < 0.05$; + $p < 0.01$.

($1.5 \pm 0.1 \times 10^6$) (N=8), 28日目 ($0.9 \pm 0.2 \times 10^6$) (N=10), (以下N数は, 日ごとに細胞数のものと同じであり略する) マクロファージ比率は3日目 ($98.3 \pm 0.04\%$), 7日目 ($86.2 \pm 2.6\%$), 14日目 ($88.4 \pm 2.7\%$), 28日目 ($96.0 \pm 1.1\%$), リンパ球比率は3日目 ($1.2 \pm 0.4\%$), 7日目 ($10.6 \pm 2.2\%$), 14日目 ($6.4 \pm 2.4\%$), 28日目 ($3.6 \pm 1.1\%$), 好中球比率は3日目 ($0.5 \pm 0.2\%$), 7日目 ($3.2 \pm 0.9\%$), 14日目 ($1.6 \pm 0.5\%$), 28日目 ($0.3 \pm 0.2\%$) であった. IL-1 単独投与群に対し, BLM+IL-1 前投与群を比較すると BLM 単独投与群とほぼ同様の有意差を認めた. BLM 単独投与群に対し, BLM+IL-1 前投与群を比較すると, 細胞数は7

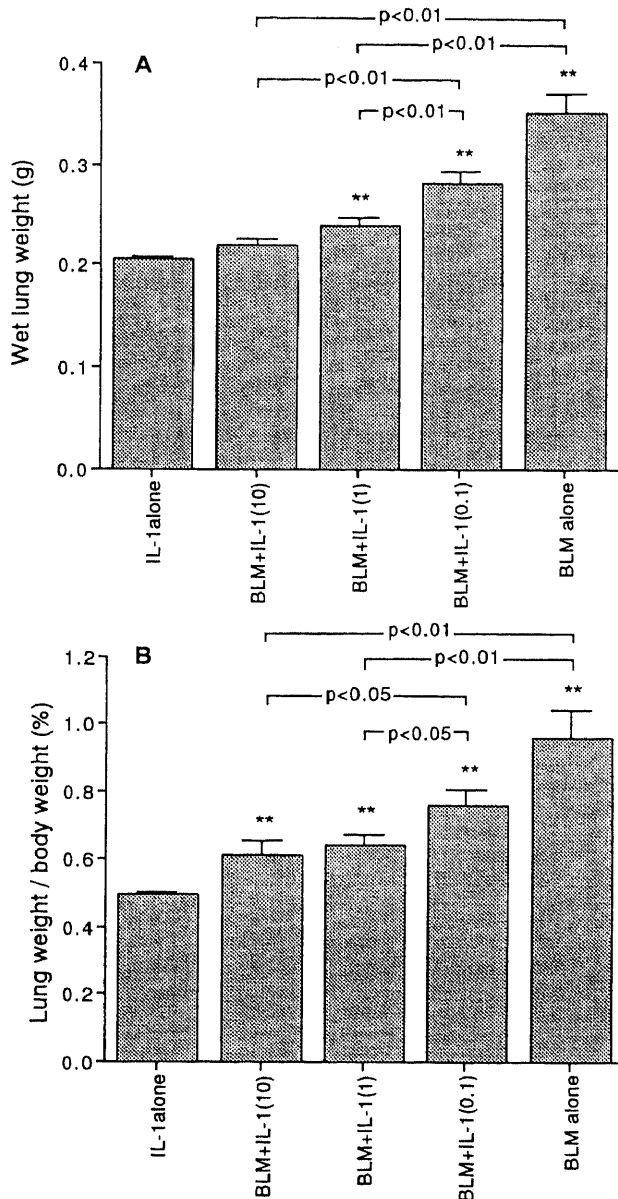


Fig. 9. Dose-dependent effect of IL-1 pretreatment on wet lung weight (A) and lung weight-to-body weight ratio (B) of mice treated with BLM. Mice were pretreated with various doses ($\mu\text{g}/\text{mouse}$) of IL-1 as indicated in parentheses at 6 hr before the administration of BLM ($150 \text{ mg}/\text{kg}$ body weight). The animals were sacrificed at 28 days after the BLM treatment. Each bar represents the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ as compared to those values of the control group administrated with IL-1 alone.

日目から28日目まで有意に低下し, マクロファージ比率は14日目と28日目で有意に増加し, リンパ球比率は14日目と28日目で有意に低下していた. 好中球比率には有意差は認められなかった.

5. BLM 肺臓炎に対する IL-1 抑制効果の用量依存性

1) 肺湿重量と肺/体重比 (図9)

肺ヒドロキシプロリン量の測定に用いた肺の肺湿重量と肺/体重比は, (以下肺湿重量, 肺/体重比の順に示す) IL-1 単独投与群 ($0.21 \pm 0.00\text{g}$, $0.50 \pm 0.01\%$) (N=9), BLM 単独投与群 ($0.33 \pm 0.02\text{g}$, $0.96 \pm 0.08\%$) (N=9), BLM+IL-1 ($0.1 \mu\text{g}$) 前投与群 ($0.28 \pm 0.01\text{g}$, $0.76 \pm 0.05\%$) (N=9), BLM+IL-1 ($1 \mu\text{g}$) 前投与群 ($0.24 \pm 0.01\text{g}$, $0.64 \pm 0.03\%$) (N=10), BLM+IL-1 ($10 \mu\text{g}$) 前投与群 ($0.22 \pm 0.01\text{g}$, $0.61 \pm 0.04\%$) (N=9) であった. IL-1 単独投与群に比較すると, BLM 単独投与群および BLM+IL-1 前投与群はいずれも有意に肺湿重量および肺/体重比の増加を認めた. BLM 単独投与群に対し, BLM+IL-1 前投与群を比較すると, BLM+IL-1 ($1 \mu\text{g}$) 前投与群と BLM+IL-1 ($10 \mu\text{g}$) 前投与群では肺湿重量および肺/体重比の有意な低下を認めた. BLM+IL-1 前投与群間で比較すると, BLM+IL-1 ($0.1 \mu\text{g}$) 前投与群に比し, BLM+IL-1 ($1 \mu\text{g}$) 前投与群と BLM+IL-1 ($10 \mu\text{g}$) 前投与群は, 肺湿重量および肺/体重比の有意な低下を認め, 平均値は IL-1 用量依存的に低下した.

2) 肺ヒドロキシプロリン量 (図10)

肺ヒドロキシプロリン量は, IL-1 単独投与群に ($402.9 \pm 16.5 \mu\text{g}$) (N=9), BLM 単独投与群 ($637.8 \pm 17.9 \mu\text{g}$) (N=9), BLM+IL-1 ($0.1 \mu\text{g}$) 前投与群 ($526.4 \pm 23.7 \mu\text{g}$) (N=9), BLM+

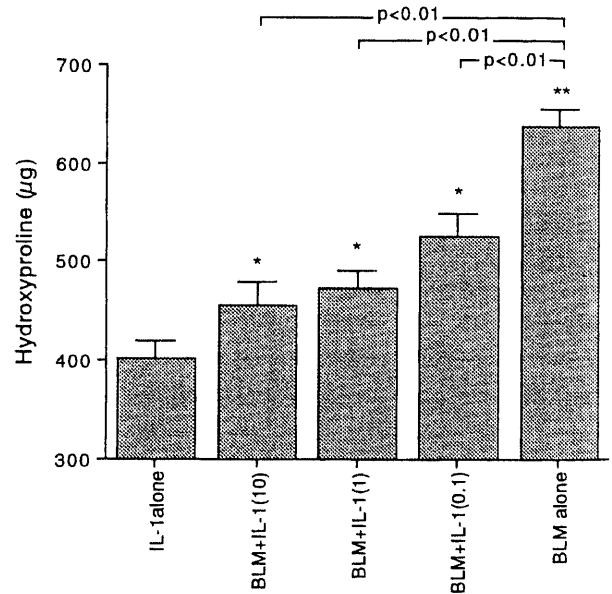


Fig. 10. Dose-dependent effect of IL-1 pretreatment on hydroxyproline content in the lung of mice treated with BLM. Mice were pretreated with various doses ($\mu\text{g}/\text{mouse}$) of IL-1 as indicated in parentheses at 6 hr before the administration of BLM ($150 \text{ mg}/\text{kg}$ body weight). The animals were sacrificed at 28 days after the BLM treatment. The hydroxyproline content in their lung were measured by the methods of Prockop et al²⁰. Each bar represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to those values of the control group administrated with IL-1 alone.

IL-1 (1 μ g) 前投与群 (474.5 \pm 17.6 μ g) (N=10), BLM+IL-1 (10 μ g) 前投与群 (457.2 \pm 22.8 μ g) (N=9) であった。IL-1 単独投与群と比較すると, BLM 単独投与群および BLM+IL-1 前投与群はいずれも有意に肺ヒドロキシプロリン量の増加を認めた。BLM 単独投与群に対し, BLM+IL-1 前投与群を比較すると, いずれも有意な低下を認めた。BLM+IL-1 前投与群間での比較では, 有意差は認められなかったが, 平均値は IL-1 用量依存的に低下した。

3) 肺湿重量および肺/体重比と肺ヒドロキシプロリン量の相関 (図11)

肺湿重量および肺/体重比と肺ヒドロキシプロリン量の相関をみると, いずれも極めて有意な正の相関関係を認めた。

IV. BLM 肺臓炎に対する IL-1 後投与の影響 (図12)

肺湿重量および肺/体重比は, (以下肺湿重量, 肺/体重比の順に示す) IL-1 単独投与群 (0.21 \pm 0.00g, 0.47 \pm 0.00%) (N=10), BLM 単独投与群 (0.30 \pm 0.02g, 0.74 \pm 0.05%) (N=10), BLM+IL-1 (1日目) 後投与群 (0.28 \pm 0.01g, 0.68 \pm 0.02%) (N=10), BLM+IL-1 (3日目) 後投与群 (0.27 \pm 0.01g, 0.67 \pm 0.02%) (N=10), BLM+IL-1 (7日目) 後投与群 (0.29 \pm 0.01g,

0.71 \pm 0.05%) (N=9), BLM+IL-1 (1日目-7日目) 後投与群 (0.27 \pm 0.01g, 0.70 \pm 0.04%) (N=9) であった。IL-1 単独投与群に比し, BLM 単独投与群および BLM+IL-1 後投与群はいずれも有意な増加を認めた。しかし, BLM 単独投与群と BLM+IL-1 後投与群の間には, いずれも有意差は認められなかった。

V. BLM のエーリッヒ癌細胞への抗腫瘍効果に対する IL-1 前投与の影響 (図13)

癌細胞湿重量は, 癌細胞単独群 (0.72 \pm 0.20g) (N=8), 癌細胞+BLM 投与群 (0.14 \pm 0.04g) (N=9), 癌細胞+BLM+IL-1 前投与群 (0.14 \pm 0.03g) (N=7) であった。癌細胞単独群に比し, 癌細胞+BLM 投与群および癌細胞+BLM+IL-1 前投与群は有意な

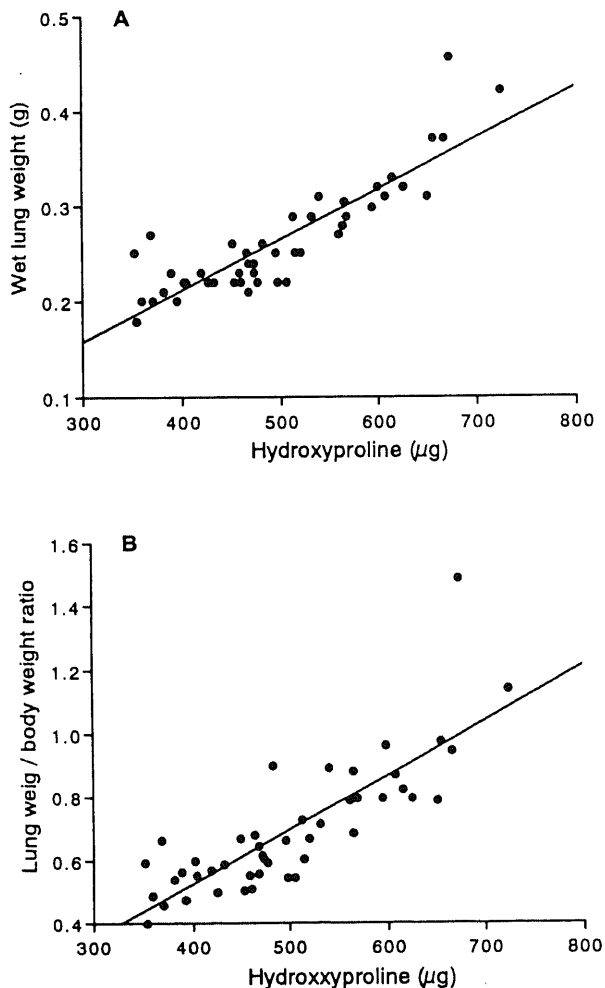


Fig. 11. Correlation between hydroxyproline content and wet lung weight (A) or lung weight-to-body weight ratio (B). A: $y=0.0005x-0.0013$, $n=46$, $r=0.873$, $p<0.001$, B: $y=0.0017x-0.1654$, $n=46$, $r=0.820$, $p<0.01$.

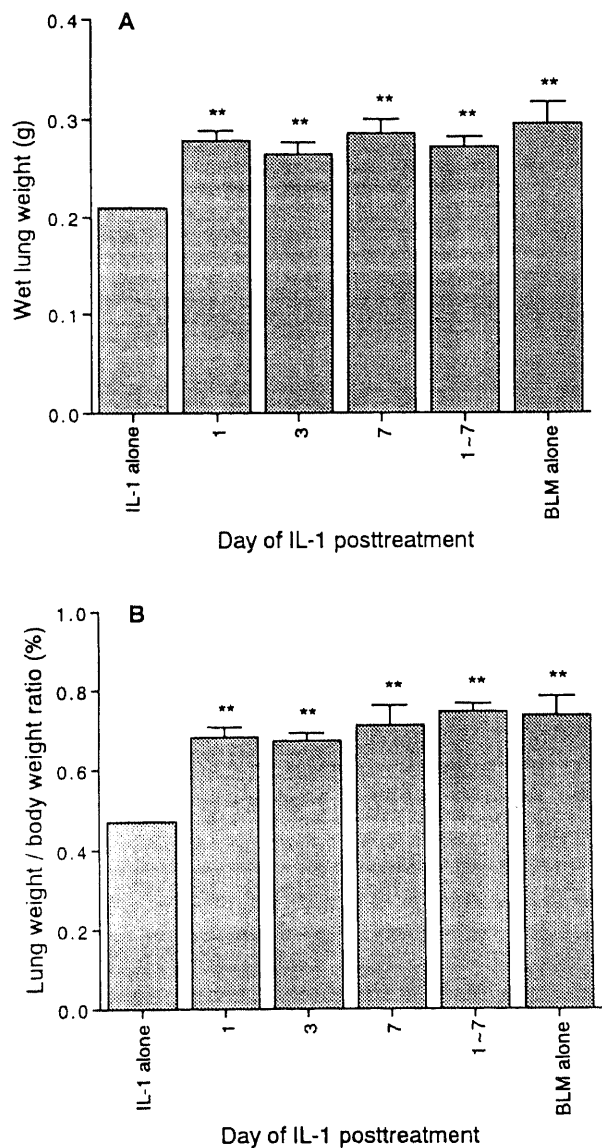


Fig. 12. Effect of IL-1 posttreatment after the BLM administration on wet lung weight (A) and lung weight-to-body weight ratio (B) in mice. Mice were posttreated with IL-1 (1 μ g/mouse) at 1, 3, or 7 day, or every day for 7 days after the administration of BLM (150 mg/kg body weight) as shown on the abscissa. Each bar represents the mean \pm SEM. ** $p<0.01$ as compared to control group administrated IL-1 alone.

癌湿重量の低下を認めた。癌細胞+BLM 投与群と癌細胞+BLM+IL-1 前投与群の間には全く有意差は認められなかった。

VI. IL-1 前投与の BLM 肺臓炎抑制効果に対する IDM の影響 (図14)

肺湿重量および肺/体重比は、(以下肺湿重量, 肺/体重比の順に示す) 生理食塩水単独投与群 ($0.21 \pm 0.00g$, $0.50 \pm 0.01\%$) ($N=10$), 生理食塩水+IDM 投与群 ($0.21 \pm 0.01g$, $0.49 \pm 0.01\%$) ($N=10$), BLM 単独投与群 ($0.33 \pm 0.02g$, $0.96 \pm 0.08\%$), BLM+IDM 投与群 ($0.31 \pm 0.02g$, $0.90 \pm 0.08\%$) ($N=10$), BLM+IL-1 投与群 ($0.23 \pm 0.01g$, $0.60 \pm 0.03\%$) ($N=10$), BLM+IL-1+IDM 投与群 ($0.23 \pm 0.01g$, $0.65 \pm 0.03\%$) ($N=10$) であった。生理食塩水単独投与群と生理食塩水+IDM 投与群間, BLM 単独投与群と BLM+IDM 投与群間および BLM IL-1 投与群と BLM+IL-1+IDM 投与群間における肺湿重量と肺/体重比には、いずれも有意差を認めなかった。生理食塩水+IDM 投与群に比し、BLM+IDM 投与群および BLM+IL-1+IDM 投与群は、有意な肺湿重量および肺/体重比の増加を認めた。BLM+IDM 投与群に対して、BLM+IL-1+IDM 投与群は、肺湿重量と肺/体重比の有意な低下を認めた。

考 察

IL-1 は、T, B リンパ球の活性化・分化・増殖を促し、炎症反応の介在物質として種々の反応を発現し、線維芽細胞、血管内皮細胞の増殖や神経、代謝、内分泌系への作用など極めて広範な生物活性を有している。故に、BLM 肺臓炎モデルにおける

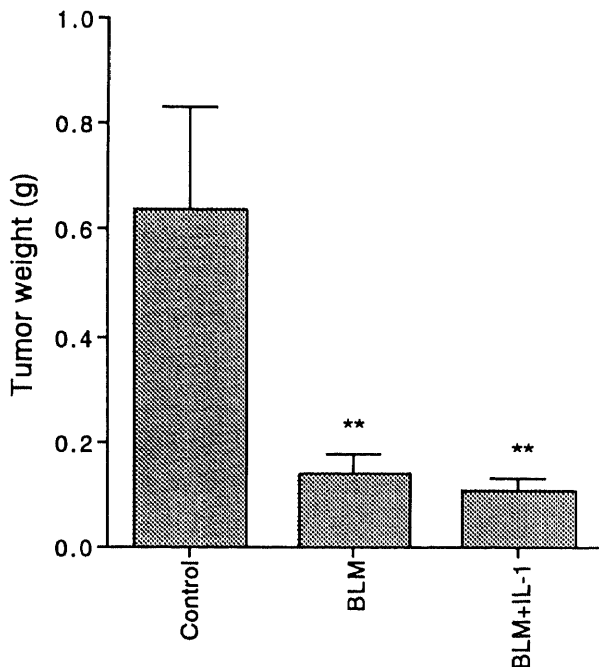


Fig.13. Effect of IL-1 pretreatment on the antitumor activity of BLM against Ehrlich solid carcinoma in mice. After subcutaneous injection of Ehrlich solid carcinoma cells, mice received IL-1 ($1 \mu g/mouse$) at 18 hr, and BLM ($150 mg/kg$ body weight) at 24 hr. The tumor was removed at 28 days and weight of the removed tumor was measured. Each bar represents the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ as compared to the values of the control group administrated with saline alone.

肺マクロファージからの IL-1 産生能の亢進も、肺障害を生じさせる炎症性因子として作用していることが推測されている。一方、近年 IL-1 の大量生産が可能となり、悪性腫瘍を中心とした臨床応用の段階を踏まえ、各種データが集積されつつある。細菌感染モデル¹⁵⁻¹⁷、放射線照射モデル¹⁸⁻²⁰ および化学療法剤投与モデル^{21,22} などにおける IL-1 前投与の致死作用軽減効果もその一つである。これらのモデルにおける IL-1 の作用機

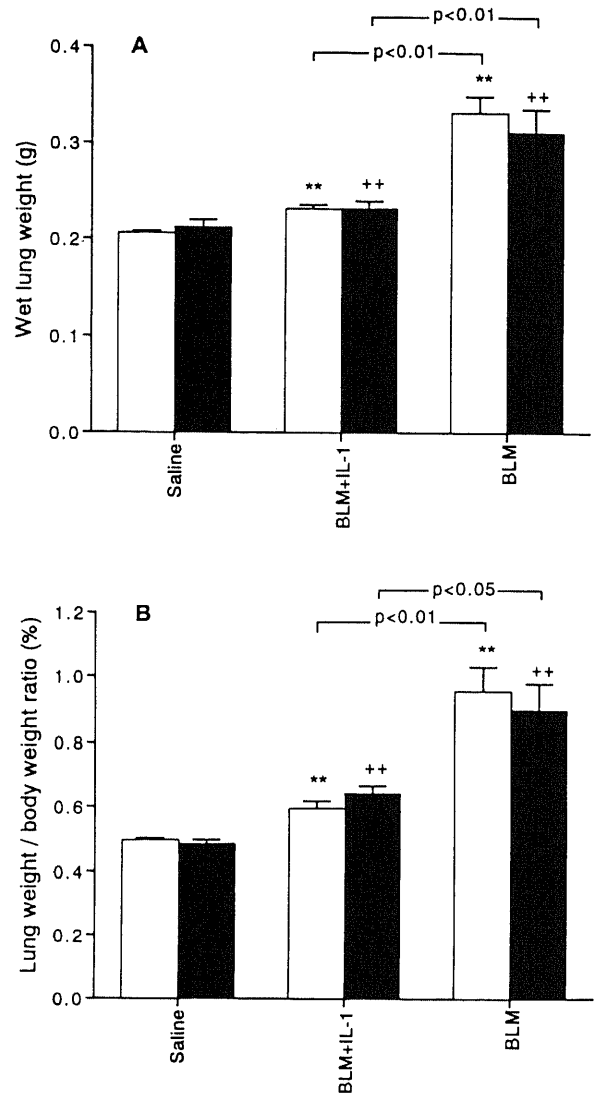


Fig.14. Effect of indomethacin on the protection of BLM-induced pneumonitis by IL-1. Mice received daily indomethacin ($4 mg/kg$ body weight/day) for 7 days before and 14 days after the administration of BLM ($150 mg/kg$ body weight), and were pretreated with IL-1 ($1 \mu g/mouse$) 6 hr before the BLM administration. They were sacrificed at 28 days after the BLM administration, and wet lung weight (A) and lung weight-to-body weight ratio (B) were measured. Each bar represents the mean \pm SEM. □ bar shows values of the group without administration of indomethacin, and ■ bar shows data of the group with administration of indomethacin. ** $p < 0.01$ as compared to those values of the control group administrated with saline alone. * $p < 0.01$ as compared to those values of the control group administrated with saline and indomethacin.

序としては、多核白血球の減少に伴う生存率の低下に対し、IL-1 を投与することで造血幹細胞の分化と成熟を促進させ好中球の回復を早めることで致死作用を軽減している^{19,21,31}と考えられている。また、高濃度酸素投与²⁹および心筋虚血/再灌流モデル²⁰における IL-1 前投与の防御効果には、活性酸素の関与が推測されている。さらに、IL-1 の投与により様々な細胞および組織中にマンガン型のスーパーオキシドディスムターゼ (manganese superoxide dismutase, Mn-SOD) が誘導され、これにより活性酸素による障害を減少させている^{32,33}とする説が、最近有力視されてきている。BLM も活性酸素との複合体生成により腫瘍細胞を障害するが、BLM を肺組織に作用させると肺組織の細胞障害がみられ、この障害が SOD やカタラーゼによりある程度抑制されること、動物で低酸素により BLM の肺障害が防止できることなどから、BLM の肺障害にも活性酸素が関与していると考えられている³⁴。従って、活性酸素が関与する病態において IL-1 が防御作用を発揮するとするならば、BLM 肺臓炎モデルにおいても、IL-1 の投与による保護作用が期待される。しかし、これまで BLM 肺臓炎モデルに対する IL-1 の投与実験は行われておらず、IL-1 投与により肺臓炎の形成がいかに修飾されるかは全く不明であった。そこで今回、BLM 肺臓炎モデルにおける IL-1 投与実験を検討することで、BLM 肺臓炎に対する防御効果の検討のみならず、BLM 肺臓炎における内因性の IL-1 産生の意義についても考察を行うことを目的とし実験を行った。

これまでの BLM 肺臓炎モデルとしては、BLM が少量でしかも簡便に肺臓炎が形成できることから、BLM をラットやモルモットに気管内投与するものが主流であった。しかし、気管内投与は非生理的投与経路であるばかりでなく、気管支を中心とした炎症反応を生じ、肺の線維化も気管支周囲に形成される²⁹。肺間質を主病変とする臨床的な BLM 肺臓炎と異なるばかりでなく、胸膜直下より肺の線維化が進行していく特発性肺線維症の研究のモデルとする場合でも、かなり隔たりがあると考えられる。気管内投与モデル以外では、静脈内に数日間連続投与しているものもある³⁵。このモデルは、生理的投与経路であり、肺臓炎および肺線維化は胸膜直下より形成されることから、臨床的 BLM 肺臓炎あるいは特発性肺線維症のモデルとしては、気管内投与モデルより適当なものであると考える。しかし、マウスの尾静脈に数日間連続して静脈内投与することは、技術的にかなり困難な面がある。また、今回の目的としては IL-1 投与の抑制効果を主に検討することであり、すでに報告されている他の IL-1 投与による致死作用軽減効果モデルにおいて、IL-1 を前投与する時間の重要性が指摘されている。したがって、IL-1 投与の時間依存性まで含めた検討のためには、BLM の単回静脈内投与モデルを確立する必要がある。まずモデルの作成から取り組んだ。マウスの種により BLM 肺臓炎の形成に差がみられ、ICR 系雌性マウスが最も適していること³⁶が報告されていることから、これを対象動物とした。さらに、週齢がすすむほど BLM 肺臓炎が形成しやすいこと²⁹も報告されており、10-12週齢のものを用いた。予備実験の段階で、BLM 50mg/kg, 100mg/kg, 150mg/kg および 200mg/kg 投与群を作成し、BLM 50mg/kg 投与群では肺線維化の形成が弱く、BLM 200mg/kg 投与群では死亡するマウスが多かったことから、BLM 100mg/kg 投与群と 150mg/kg 投与群を用いて検討を行うこととした。病理組織学的指標としては、浴本らが

考案した病理学的スコアが肺ヒドロキシプロリン量とよく対応すること²⁹が報告されておりこれを採用した。本モデルでは、病理組織学的に BLM 投与後14日目には間質性肺炎像が強く生じているがまだ線維化は認められず、28日目には胸膜直下より肺線維化が生じていることが判明した。また、この線維化は、スコアリングの結果より BLM 投与量依存的であることが確認された。したがって、先に述べた目的に合致するモデルが作成できたと判断される。次に、簡便な指標として肺湿重量と肺/体重比を用いた検討では、これらの指標は BLM 投与後7日目から増加し、14日目に降にピークを示した。肺/体重比では、7日目よりすでに最大値に到達しているものも見られたが、これは BLM 投与後の体重の推移を見ると、投与後一週間は体重の減少が続き、以後体重の回復が認められていることから、7日目では体重減少が大きいことにより肺/体重比が高値になったものと考えられる。7日目までは、餌もあまり減っていないことより、消化器症状により食欲低下が生じたため、体重が減少していることが推測された。14日目と28日目においては、肺湿重量および肺/体重比に差が認められていないが、14日目と28日目での増加した機序はそれぞれ異なっている。組織学的に、14日目では間質性肺炎像を呈し、いわば肺の水腫様変化に基づく肺湿重量の増加であると考えられる。一方、28日目においては、肺の線維化が著明に出現している事から、肺湿重量の増加は肺の線維化に基づくものであると考えられる。BLM は Reynolds ら³⁷により開発された検査法であり、得られた BALF は主として肺間質の炎症性変化を反映するとされている。本モデルでも BALF の検討を行ったが、BALF 細胞所見の変化は7日目から14日目をピークとした細胞数およびリンパ球比率の増加を認め、28日目には変化が正常化に向かっていった。したがって、本モデルでの間質性肺炎病変は、7日目から14日目にかけて最大となっていることが推測される。また、気管内投与モデルにおける BALF 中では、BLM 投与初期には好中球が主体をなしている¹⁹が、本モデルでは好中球はわずかに認められるのみであり、BALF 細胞所見上でも BLM の投与経路による差異が認められた。本モデルにおいては、BLM 投与後3日目までは変化は見られず、7日目から14日目までは間質性肺炎を生じ、28日目には間質性肺炎が収束することに変わって肺線維化を形成する経過を辿っているものと考えられた。そして、肺湿重量および肺/体重比は、14日目のものは間質性肺炎を反映し、28日目のものは肺線維化を反映する指標であると考えられた。また、肺線維化を確実に形成するには、BLM 150mg/kg 投与が適していると考えられ、以後この投与量を用いて検討することとした。

以上のような BLM 肺臓炎モデルを確立した上で、まず IL-1 前投与による影響を検討した。IL-1 単独投与群では、肺湿重量、肺/体重比、病理組織学的評価および BALF 細胞所見において、生理食塩水単独投与群とまったく差を認めなかった。したがって、IL-1 単独では肺組織に変化を生じさせないことが結論された。Gillespie ら³⁸は、ラットに IL-1 を静脈内投与し、3時間後には肺水腫が出現するが24時間後には吸収されることを示している。今回の実験では、IL-1 投与後24時間以降の長期的変化を検討しており、24時間以内の急性期に関しては不明であるが、IL-1 投与による初期変化はあるにせよ一過性のものであり、何ら後遺症を残さないと考えられた。

次に、IL-1 を前投与する実験では、他のモデルにおける

IL-1 前投与の効果が時間依存性であることが示されていた¹⁵²⁾ため、IL-1 前投与の時間依存性も合わせて検討すべく実験プロトコルを立てた。肺湿重量、肺/体重比および病理組織学的評価より、IL-1 の0.5および6時間前投与により、本モデルでの間質性肺炎および肺線維化が抑制されることが示された。したがって、BLM 肺臓炎に対し IL-1 前投与は抑制効果があるのみならず、時間依存性もあることが判明した。そこで以後の実験では、BLM 肺臓炎に対する IL-1 の抑制効果を検討する目的で、IL-1 は6時間前投与を行うこととした。

IL-1 前投与による間質性肺炎の抑制効果を、より定量的に裏づける目的のため、BALF 細胞所見における効果を検討してみたが、明らかな抑制を示す結果がえられた。次に、この IL-1 前投与の抑制効果に関して、IL-1 の用量依存性を検討することによって確認してみた。BLM 投与後28日目の肺湿重量および肺/体重比の検討から、IL-1 の用量依存的な効果が示された。また、肺線維化の程度の生化学パラメーターとしては、通常コラーゲン蛋白に特異的な構成アミノ酸であるヒドロキシプロリン含量が用いられている³⁹⁾が、IL-1 の肺線維化抑制効果の用量依存性を検討するばかりでなく、本モデルにおける肺線維化形成の生化学的指標による確認と、BLM 投与後28日目における肺湿重量および肺/湿重量の線維化の指標としての有用性を合わせて検討する目的で、肺ヒドロキシプロリン量の検討を行った。結果は、肺ヒドロキシプロリン量においても IL-1 用量依存的な抑制効果が確認された。さらに、肺湿重量および肺/体重比と肺ヒドロキシプロリン量に有意な正の相関関係が認められた。肺湿重量および肺/体重比は、肺線維化の程度および発生頻度と有意な正の相関関係を示したことと合わせ、本モデルにおける BLM 投与後28日目の肺湿重量および肺/体重比は、病理組織学的および生化学的肺線維化を示す簡便な指標として使用可能と考えた。したがって、以後の実験においては、BLM 投与後28日目における肺湿重量と肺/体重比のみで十分肺線維化の検討はできると判断した。以上の IL-1 前投与に関する検討からは、BLM 投与による各指標における変化をすべて初期より IL-1 前投与が抑制していたことより、IL-1 の抑制効果は BLM が肺組織に作用する極めて初期に生じることで、BLM による以後の一連の反応を全て抑制していることが推測された。

次に、IL-1 の後投与が BLM 肺臓炎に対していかなる影響を生じるか検討してみた。当科の西¹⁴⁾がラットの BLM 気管内投与モデルにおいて、BALF 中肺泡マクロファージからの IL-1 産生が亢進していることを報告しているが、IL-1 産生の亢進は間質性肺炎形成の早期のみ検出されている。本モデルにおいては、IL-1 の産生に関する検討は行っていないが、恐らく間質性肺炎形成の初期反応において、内因性の IL-1 が関与していることが推測される。前述の検討結果より、BLM 投与後7日目においてすでに間質性肺炎出現が認められ、この時点までの炎症反応により以後の間質性肺炎の広がりや程度、さらには肺線維化の形成度合いが規定されていると考えられる。したがって、BLM 投与後7日目までの様々な時期に IL-1 後投与を行って見ることとした。BLM 肺臓炎において検出される IL-1 は、何らかのメッセージを含んでいるはずであり、外因性の IL-1 を投与することでそのメッセージが増大し、肺臓炎が増悪あるいは軽減することが期待されたが、結果は IL-1 後投与は BLM 肺臓炎の形成には何ら影響を及ぼさなかった。したがっ

て、本実験結果からは内因性の IL-1 の意義については考察できず、今後 IL-1 阻害物質や IL-1 受容体拮抗剤の投与による研究結果が待たれるところである。

次に、IL-1 前投与の抑制効果発現機序に関する検討を行った。まず、BLM は体内で Fe イオンおよび活性酸素と複合体を形成することで抗腫瘍効果や細胞障害作用を発現する²⁵⁾²⁶⁾が、その代謝過程において IL-1 が作用することにより、BLM 肺臓炎の初期反応を抑制している可能性が考えられた。そこで、BLM のエールリッヒ癌細胞に対する抗腫瘍効果への IL-1 前投与の影響をみることで、間接的にこの点を検討した。すなわち、IL-1 が BLM の代謝経路に作用することによって肺臓炎を抑制しているならば、BLM の抗腫瘍効果も抑制するはずである。結果は、BLM の抗腫瘍効果に対し、IL-1 前投与は全く影響を示さなかった。従って、IL-1 が BLM の代謝経路に作用している可能性は少ないと考えられた。最近抗腫瘍剤に IL-1 を併用することで抗腫瘍効果の増強が認められることが報告されている⁴¹⁾⁴²⁾。当教室の中積ら⁴³⁾によれば、IL-1 が単独ではエールリッヒ癌細胞に対する直接的な抗腫瘍効果は認められないが、BLM に IL-1 を併用することによって抗腫瘍効果が増強作用されることも期待された。しかし、今回の成績では IL-1 の併用は BLM 単独と全く差を認めず、この点は否定的結果となった。今回の結果からは、少なくとも IL-1 が BLM の抗腫瘍効果を減ずることなく、BLM の肺障害を軽減させる作用をもつことが認められ、臨床的に IL-1 を BLM に併用する癌治療法の有用性が示唆される。

次に、IL-1 前投与の抑制効果に対するシクロオキシゲナーゼ阻害剤(今回は IDM を使用した)の影響を検討してみた。IL-1 は、マクロファージや線維芽細胞などのホスホリパーゼ A₂ を活性化してプロスタグランジン E₂(prostaglandin E₂, PGE₂) 産生を促進する⁴⁴⁾ことや、PGE₂ はマクロファージの IL-1 活性を抑制し、IL-1 が T リンパ球に及ぼす効果をも抑制し、マクロファージの Ia 抗原の発現を抑制することが報告されている⁴⁵⁾。BLM 肺臓炎モデルにおいては、インターフェロン(interferon, IFN)- γ の連日筋注は肺臓炎を抑制し、この抑制効果はシクロオキシゲナーゼ阻害剤の併用により減弱することにより、IFN- γ の BLM 肺臓炎抑制効果にはアラキドン酸代謝産物が関与していることが推測されている⁴⁶⁾。さらに、酸素投与モデルにおいて、IL-1 と腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor, TNF) 併用による延命効果は、シクロオキシゲナーゼ阻害剤により減弱すること⁴⁷⁾が報告されている。従って、BLM 肺臓炎モデルにおける IL-1 前投与の効果にも、シクロオキシゲナーゼ代謝産物が関与していることも考えられ検討を行った。IDM は、2mg/kg の投与で内因性のプロスタグランジン産生を抑制すること⁴⁸⁾が知られており、今回完全にプロスタグランジンの産生を抑える目的で、BLM 投与の一週間前より投与後2週間まで IDM 4mg/kg/日を投与し続けた。結果は、IDM は BLM 肺臓炎の形成に影響を与えず、さらに BLM 肺臓炎に対する IL-1 前投与の抑制効果に対しても全く影響をしなかった。したがって、BLM 肺臓炎の形成および IL-1 前投与の抑制効果発現機序に関するシクロオキシゲナーゼ代謝産物の関与は少ないものと考えられた。BLM 肺臓炎の形成に関するシクロオキシゲナーゼ阻害剤の結果は、BLM 気管内投与モデルにおけるもの¹²⁾と一致するものであった。また、細菌感染モデルにおいては、IL-1 と TNF による延命効果がシクロオキシゲナーゼ阻

害剤によって減弱しない⁴⁰と報告されており、今回の結果と一致するが、IL-1 の効果に対するシクロオキシゲナーゼ阻害剤の影響は、モデルにより異なるようである。これは、もともとモデルにより、アラキドン酸代謝産物の関わり合いが異なることによるのかも知れない。しかし、シクロオキシゲナーゼ阻害剤を使用した場合、その下流の代謝産物であるプロスタグランジンやトロンボキサンなどをすべて抑制してしまうことから、それぞれの作用が相殺された結果をみている可能性も考えられる。近年様々なアラキドン酸代謝産物に対する特異的拮抗剤が開発されており、これらを用いたさらなる検討が必要であると考える。IL-1 の臨床応用を考えると、ヒト IL-1 を投与した際発熱の副作用であり⁵⁰、シクロオキシゲナーゼ阻害剤の投与を余儀なくされるのが、IL-1 の BLM 肺臓炎抑制効果を IDM が減弱させないことは、臨床的には有利な結果であると考えられる。

以上より、今回 BLM 肺臓炎に対する IL-1 前投与の抑制効果は明らかであるが、その作用機序を解明するには至らなかった。IL-1 が直接的に BLM に作用していないことから、やはり何等かの防御因子の発現に関与していることが推測される。現在のところ有力視されている防御因子としては、ミトコンドリアに存在する Mn-SOD があげられる。Wong ら³⁹は、TNF- α によりマウスの胸腺、腎、骨髄、脾臓中に Mn-SOD が誘導されることを示し、培養細胞株においては IL-1 にも Mn-SOD 誘導作用があることを示している。また、Visner ら⁵¹は、IL-1 により肺胞上皮における Mn-SOD の mRNA レベルが増加するが、銅/亜鉛型の SOD (copper/zinc superoxide dismutase, Cu-Zu SOD) の mRNA には影響しないことを示している。したがって、本モデルにおける IL-1 の抑制作用も Mn-SOD の誘導による可能性も考えられる。しかし、細菌感染、放射線照射あるいは化学療法剤投与モデルにおける IL-1 致死作用軽減効果は、IL-1 の 6 時間未満の前投与では効果は認められず、およそ 6 から 20 時間前投与で効果を認めているのに対し、本モデルでは BLM 投与の 0.5 および 6 時間投与のみに抑制効果を認め、効果を発現する前投与の時間帯が他のモデルと異なっている。さらに、培養細胞株における Mn-SOD の誘導は、1 時間で誘導され 24 時間から 96 時間まで高い値をとること³⁹より、一度誘導された Mn-SOD がその後長時間保たれることを考え合わせると、本モデルにおける IL-1 の抑制効果が Mn-SOD のみでは説明できないこととなる。しかし、培養細胞の種類によって Mn-SOD が誘導されるものとされないものがあること³⁹も示されており、臓器ごとに Mn-SOD の誘導時間および誘導量が異なる可能性を考えれば、Mn-SOD による可能性も否定できないこととなる。さらに、モデルにより障害される臓器および障害発現までの時間も異なることを考え合わせれば、IL-1 前投与の時間的ずれも説明できうる可能性がある。また、IL-1 を肺線維芽細胞に投与し、長時間培養すれば Cu-Zn SOD 活性が増加すること⁵²も示され、今後本モデルにおける IL-1 の抑制効果に関し、SOD 点からも検討する必要があると思われる。

従来より、BLM 肺臓炎モデルで認められている IL-1 産生亢進は、IL-1 が広範な生物活性をもつことにより、肺障害の進展・拡大に関与していると推測されてきた。しかしながら、今回の BLM 肺臓炎モデルに対する IL-1 投与実験の結果から、少なくとも IL-1 は抑制効果を示したが、増悪効果は全く認められなかったことより、IL-1 は炎症の増悪因子として作用しているのみならず、生体の合目的な防御因子として作用している可

能性が考えられる。BLM 肺臓炎モデルにおいても、肺ヒドロキシプロリン量の増加に先立ち SOD 活性が増加し、以後肺ヒドロキシプロリン量が低下するまで SOD 活性の増加が継続している⁵³。したがって、SOD の点から考えれば、BLM による障害に対し、内因性の IL-1 産生が亢進し、IL-1 により自己の各細胞中に SOD を誘導することで、BLM あるいは好中球由来の活性酸素に対し細胞障害を減少させていることも推測できる。これまでの研究結果から、IL-1 が炎症の増悪因子として作用している点是否定することができないが、今回の実験からは、BLM 肺臓炎における内因性の IL-1 の意義に関して、今後防御因子としての面からも検討を行っていく必要があると思われる。

結 論

マウスの BLM 単回静脈内投与による肺臓炎モデルを作製し、IL-1 の生体投与による影響を検討し、以下の知見を得た。

1. BLM 単回静脈内投与後、肺湿重量、肺/体重比および病理組織学的評価を検討し、BLM 投与量依存的に、7 日目より間質性肺炎が生じ、28 日目には肺線維化が形成された。
 2. IL-1 を前投与した場合、肺湿重量、肺/体重比および病理組織学的評価において、BLM 肺臓炎は有意に抑制され、しかも IL-1 の前投与時間依存性が示された。
 3. BALF 細胞所見において、BLM 投与により生じる細胞数およびリンパ球比率の増加と、マクロファージ比率の低下に対し、IL-1 前投与は有意な抑制効果を示した。
 4. BLM 肺臓炎に対する IL-1 前投与の抑制効果は、28 日目の肺湿重量、肺/体重比および肺ヒドロキシプロリン量において、IL-1 投与量依存性を認めた。また、BLM 投与後 28 日目の肺湿重量および肺/体重比は、肺ヒドロキシプロリン量と良好な正の相関関係を認め、肺線維化の有用な指標となることが示された。
 5. IL-1 後投与は、BLM 肺臓炎に対し影響を及ぼさなかった。
 6. エールリッヒ癌細胞移植モデルにおける BLM の抗腫瘍効果に対し、IL-1 前投与は全く影響を及ぼさず、IL-1 前投与の BLM 肺臓炎抑制効果は、BLM 代謝経路の修飾によるものではないと考えられた。
 7. IDM は、IL-1 前投与の BLM 肺臓炎抑制効果に対し全く影響を及ぼさず、IL-1 の抑制効果の機序にシクロオキシゲナーゼ代謝産物の関与は少ないものと考えられた。
- 以上より、BLM 肺臓炎は IL-1 前投与により、その量および時間依存的に抑制されることが判明したが、少なくとも IL-1 の生体内投与により BLM 肺臓炎を悪化させる作用は認められなかった。したがって、BLM 肺臓炎に認められる内因性の IL-1 産生増加は、防御因子として作用している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました金沢大学医学部内科学第三講座松田 保教授ならびに藤村政樹講師に深謝致します。また、実験に多大なるご協力をいただいた富山県立中央病院吉田 喬先生ならびに金沢大学内科学第三講座呼吸器グループの諸先生に深謝致します。御指導、御助言を賜りました日本化薬総合研究所浴本久雄博士に深謝いたします。本研究のために、貴重な薬品を提供いただきました大塚製薬株式会社および日本化薬株式会社に深謝いたします。

尚, 本論文の要旨の一部は, 第37回 FLD シンポジウム (1991年), 第31回日本胸部疾患学会総会 (1991年) において発表した。

文 献

- 1) Crystal, R. G., Gadek, J. E., Ferrans, V. J., Fulmer, J. D., Line, B. R. & Hunninghake, G. W.: Interstitial lung disease: Current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am. J. Med.*, **70**, 542-568 (1981).
- 2) Kelley, J.: Cytokines of the lung. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **141**, 765-788 (1990).
- 3) 長井苑子, 三尾直士, 泉 孝英: 肺の線維化とサイトカイン. *代謝*, **27**, 787-795 (1990).
- 4) Crooke, S. T. & Brandnar, W. T.: Bleomycin, a review. *J. Med.*, **7**, 333-428 (1976).
- 5) Blum, R. H., Carter, S. K. & Agre, K.: A clinical review of bleomycin. A new antineoplastic agent. *Cancer*, **31**, 903-914 (1973).
- 6) DeLena, M., Guzzon, A., Monfardini, S. & Bonadonna, G.: Clinical, radiologic, and histopathologic studies on pulmonary toxicity induced by treatment with bleomycin (NSC125066). *Cancer Chemother. Res.*, **56**, 343-356 (1972).
- 7) Rudders, R. A. & Hensley, G. T.: Bleomycin pulmonary toxicity. *Chest*, **63**, 626-628 (1973).
- 8) Catane, R., Schwade, J. G., Turrisi, A. T., Webber, B. L. & Muggia, F. M.: Pulmonary toxicity after radiation therapy and bleomycin; a review. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **5**, 1513-1518 (1979).
- 9) Adamson, I. Y. R. & Bowden, D. H.: The pathogenesis of bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Pathol.*, **77**, 185-198 (1974).
- 10) Snider, G. L., Celli, B. R., Goldstein, R. H., O'Brein, J. J. & Lucey, E. C.: Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced by hamsters by endotracheal bleomycin. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **117**, 289-297 (1978).
- 11) Bowden, D. H.: Unraveling pulmonary fibrosis: The bleomycin model. *Lab. invest.*, **50**, 487-488 (1984).
- 12) Jordana, M., Richards, C., Irving, L. B. & Gaudia, J.: Spontaneous in vitro release of alveolar macrophage cytokines after the intratracheal instillation of bleomycin in rats. Characterization and kinetic studies. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **137**, 1135-1140 (1988).
- 13) Suwabe, A., Takahashi, K., Yasui, S., Arai, S. & Sendo, F.: Bleomycin-stimulated hamster alveolar macrophages release interleukin-1. *Am. J. Pathol.*, **132**, 512-520 (1988).
- 14) 西 耕一: ラットのブレオマイシン肺炎における気管支肺胞洗浄液細胞成分の分析および肺胞マクロファージ由来のインターロイキン-1 活性の測定. *十全医会誌*, **3**, 731-745 (1989).
- 15) Ozaki, Y., Ohashi, T., Minami, A. & Nakamura, S.: Enhanced resistance of mice to bacterial infection induced by recombinant human interleukin-1 α . *Infec. Immun.*, **55**, 1436-1440 (1987).
- 16) Czuprynski, C. J., Brown, J. F., Yonug, K. M., Cooley, A. J. & Kurtz, R. S.: Effects of murine recombinant interleukin-1 α on the host response to bacterial infection. *J. Immunol.*, **140**, 962-968 (1988).
- 17) van der Meer, J. W. M., Brarza, M., Wolff, S. M. & Dinarello, C. A.: A low dose of recombinant interleukin 1 protects granulocytopenic mice from lethal Gram-negative infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1620-1623 (1988).
- 18) Neta, R., Douches, & Oppenheim, J. J.: Interleukin-1 is a radioprotector. *J. Immunol.*, **136**, 2483-2485 (1986).
- 19) Neta, R., Vogel, S. N., Oppenheim, J. J. & Douches, S. D.: Cytokines in radioprotection. Comparison of the radioprotective effects of IL-1 to IL-2, GM-CSF and IFN γ . *Lymphokine Res.*, **5**, S105-S110 (1986).
- 20) Constine, L. S., Harwell, S., Keng, P., Lee, F., Rubin, P. & Siemann, D.: Interleukin 1 alpha stimulates hemopoiesis but not tumor cell proliferation and protects mice from lethal total body irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **20**, 447-456 (1991).
- 21) Castelli, M. P., Black, P. L., Schneider, M., Pennington, R., Abe, F. & Talmadge, J. E.: Protective, restorative, and therapeutic properties of recombinant human IL-1 in rodent models. *J. Immunol.*, **140**, 3830-3837 (1988).
- 22) Futami, H., Jansen, R., Macphee, M. J., Keller, J., McCormick, K., Longo, D. L., Oppenheim, J. J., Ruscetti, F. W. & Wiltrott, R. H.: Chemoprotective effects of recombinant human IL-1 α in cyclophosphamide-treated normal and tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, **145**, 4121-4130 (1990).
- 23) White, C. W., Ghezzi, P., Dinarello, C. A., Caldwell, S. A., McMurty, I. F. & Repine, J. E.: Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 pretreatment decreases lung oxidized glutathione accumulation, lung injury and mortality in rats exposed to hyperoxia. *J. Clin. Invest.*, **79**, 1868-1873 (1987).
- 24) Brown, J. M., White, C. W., Terada, L. S., Grosso, M. A., Shanley, P. F., Mulvin, D. W., Banerjee, A., Whitman, G. J. R. & Haken, A. H.: Interleukin 1 pretreatment decreases ischemia/reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5026-5030 (1990).
- 25) Sugiura, Y.: The production of hydroxy radical from copper (I) complex system of bleomycin and tallysomylin: comparison with copper (II) and iron (II) systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 375-383 (1979).
- 26) Sausville, E. A., Stein, R. W., Peisach, J. & Horowitz, S. B.: Properties and products of degradation DNA by bleomycin and iron (II). *Biochemistry*, **17**, 2746-2754 (1978).
- 27) Nisida, T., Nishino, N., Takano, M., Kawai, K., Masui, Y., Nakai, S. & Hirai, Y.: cDNA cloning of IL-1 alpha and IL-1 beta from mRNA of U937 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 345-352 (1987).
- 28) Kikumoto, Y., Hong, Y. M., Nishida, T., Nakai, S., Masui, Y. & Hirai, Y.: Purification and characterization of recombinant human interleukin-1 beta produced in Escheri-

- chia coli., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 315-321 (1987).
- 29) 浴本久雄, 高橋克俊, 松田 明, 梅沢浜夫: プレオマイシン肺毒性の動物評価系. *癌と化学療法*, **10**, 2550-2557 (1983).
- 30) Prockop, D. J. & Udenfriend, S.: A specific method for the analysis hydroxyproline in tissues and urine. *Anal. Biochem.*, **1**, 228-239 (1960).
- 31) Fibbe, W. E., van der Meer, J. W. M., Falkenbug, J. H. F., Hamilton, M. S., Kluin, P. M. & Dinarello, C. A.: A single dose of human recombinant interleukin 1 accelerates the recovery of neutrophils in mice with cyclophosphamide-induced neutropenia. *Exp. Hematol.*, **17**, 805-808 (1989).
- 32) Masuda, A., Longo, D. L., Kobayashi, Y., Appella, E., Oppenheim, J. J. & Matsushima, K.: Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *FASEB J.*, **2**, 3087-3091 (1988).
- 33) Wong, G. H. W. & Goeddel, D.: Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science*, **242**, 941-944 (1988).
- 34) Cooper, J. A. D., White, D. A. & Matthay, R. A.: Drug-induced pulmonary disease. *Cytotoxic drugs. Am. Rev. Respir. Dis.*, **133**, 321-340 (1986).
- 35) 浴本久雄, 高橋克俊, 松田 明, 梅沢浜夫: プレオマイシン類の投与方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).
- 36) Ekimoto, H., Takada, K., Ohnuki, T., Takahashi, K., Matsuda, A., Takita, T. & Umezawa, H.: Different sensitivity to bleomycin-induced pulmonary fibrosis among various strains of mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **2**, 25-31 (1987).
- 37) Reynolds, H. Y. & Newball, H. H.: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J. Lab. Clin. Med.*, **84**, 559-573 (1974).
- 38) Gillespie, M. N. Olson, J. W., Henning, B., Choen, D. A., McClain, C. J. & Goldblum, S. E.: Monokine-induced lung injury in rats: Similarities to monocrotaline-induced pneumotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **98**, 134-143 (1989).
- 39) Phan, S. J., Thrall, R. S. & Williams, C.: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis: effects of steroids on lung collagen metabolism. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **124**, 428-434 (1981).
- 40) Hesterberg, T. W., Gerriets, J. E., Reiser, K. M., Jackson, A. C., Cross, C. E. & Last, J. A.: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis: correlation of biochemical physiological and histological changes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **60**, 360-367 (1981).
- 41) Nakamura, S., Kashimoto, S., Kajikawa, F. & Nakata, K.: Combination effect of recombinant human interleukin 1 α with antitumor drugs on syngenic tumors in mice. *Cancer Res.*, **51**, 215-221 (1991).
- 42) Braunschweiger, P. G., Jones, S. A., Johnson, C. S. & Furmanski, P.: Potentiation of mitomycin c and porfiromycin antitumor activity in solid tumor models by recombinant human interleukin 1 α . *Cancer Res.*, **51**, 5454-5460 (1991).
- 43) 中積泰人, 吉田 喬, 柴田和彦, 安井正英, 奥村廣和, 藤村正樹, 中村 忍, 松田 保: IL-1 β の制癌剤の抗腫瘍効果に及ぼす影響の検討. 第51回日本癌学会総会 (抄録), 409 (1992).
- 44) Chang, J.: Interleukin 1 activates phospholipase A₂ in rabbit chondrocytes: A possible signal for IL-1 action. *J. Immunol.*, **136**, 1283-1287 (1986).
- 45) Monick, M., Glazier, J. & Hunninghake, G. W.: Human alveolar macrophages suppress interleukin 1 (IL-1) activity via the secretion of prostaglandin E₂. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135**, 72-77 (1987).
- 46) Mark, G. S.: In vivo effects of interferon- γ and indomethacin on murine alveolar macrophage activity. *Cell. Immunol.*, **123**, 83-95 (1989).
- 47) White, C. W. & Ghezzi, P.: Protection against pulmonary oxygen toxicity by interleukin-1 and tumor necrosis factor: Role of antioxidant enzymes and effect of cyclooxygenase inhibitors. *Biotherapy*, **1**, 361-367 (1989).
- 48) Flower, J.: Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. *Pharmacol. Rev.*, **26**, 33-67 (1974).
- 49) van der Meer, J. W. M.: The effects of recombinant interleukin-1 and recombinant tumor necrosis factor on non-specific resistance to infection. *Biotherapy*, **1**, 19-25 (1988).
- 50) 平井嘉勝: IL-1. *最新医学*, **48**, 680-686 (1993).
- 51) Visner, G. A., Dougall, W. C., Wilson, J. M., Burr, I. A. & Nick, H. S.: Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.*, **265**, 2856-2864 (1990).
- 52) Disivestro, R. A., David, E. A. & Collignon, C.: Interleukin 1 slowly increases lung fibroblast Cu-Zn superoxide dismutase activity levels. *P.S.E.B.M.*, **197**, 197-200 (1991).
- 53) Giri, S. N., Misra, H. P., Chandler, D. B. & Chen, Z.: Increase in lung prolyl hydroxylase and superoxide dismutase activities during bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters. *Exp. Mol. Pathol.*, **39**, 317-326 (1983).

Effect of the Administration of Interleukin-1 *in Vivo* on Bleomycin-Induced Pneumonitis in Mice Masahide Yasui Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *J. J. J. Soc.*, 103, 425—440 (1994)

Key words bleomycin, pneumonitis, interleukin-1, mouse

Abstract

The author developed an animal model of pneumonitis by means of one shot intravenous administration of bleomycin (BLM), and studied the effects of recombinant human interleukin-1 (IL-1) beta treatment on the BLM-induced pneumonitis in mice. Significant increases of wet lung weight and lung weight-to-body weight ratio were observed 7 days to 28 days after the administration of BLM. Histopathologically, interstitial pneumonia was observed at 14 days and pulmonary fibrosis was observed at 28 days. The histopathological score at 28 days after the administration of BLM significantly increased in a BLM-dose-dependent manner. When mice were pretreated with IL-1 (1 μg/mouse i.p.) at 0.5hr or 6hr before the administration of BLM, increases in wet lung weight and lung weight-to-body weight ratio were significantly reduced at 14 days and 28 days. Likewise, the histopathological score at 28 days in the same groups significantly decreased. Therefore, it was indicated that IL-1 suppresses BLM-induced pneumonitis in a time-dependent manner. Significant increases of total cell counts and the percentage of lymphocytes in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) occurred 7 days to 28 days after the administration of BLM. When mice were pretreated with IL-1 at 6hr before the administration of BLM, these findings in BALF were significantly suppressed. Wet lung weight, lung weight-to-body weight ratio and hydroxyproline content at 28 days were suppressed by IL-1 pretreatment in a dose-dependent manner. Furthermore, there was a significant positive correlation between each pair of wet lung weight, lung weight-to-body weight ratio and hydroxyproline content. IL-1 posttreatment did not affect BLM-induced pneumonitis. IL-1 pretreatment had no effect on the antitumor activity of BLM against Ehrlich solid carcinoma in mice. This finding indicates that IL-1 did not affect the metabolic pathway of BLM. Indomethacin (IDM) did not modify the inhibitory effect of IL-1 on BLM-induced pneumonitis. The results indicate that IL-1 pretreatment protects mice from BLM-induced pneumonitis in a dose and time dependent manner, and IL-1 posttreatment has no effect on BLM-induced pneumonitis. Furthermore, these findings suggest the possibility that intrinsic IL-1 play a role as a protective factor against BLM-induced pneumonitis.