

放射線肺障害に対するアルガトロバンの
有用性についての病理組織学的検討

杉 本 三 夫

①

放射線肺障害に対するアルガトロバンの
有用性についての病理組織学的検討

多 湖 正 夫

研究の背景

悪性腫瘍に対する治療法としては、外科的切除、化学療法、放射線治療が三本柱となっている。それぞれの悪性疾患に対し、どのような治療を行うかは、組織型や進展度などにより異なり、患者の状態や自身の希望なども踏まえ最終的には症例ごとに検討されるものの、早期胃癌に対する胃亜全摘術と領域リンパ節郭清、早期喉頭癌に対する喉頭局所への照射、早期乳癌に対する乳房温存術と術後照射のように、とくに早期例において標準的治療法が存在し、良好な腫瘍制御率、生存率を残している疾患も多数存在する。しかしながら、進行例を中心として、いまだ満足いく結果を見ていない悪性疾患も数多くあり、基礎臨床両面での今後のさらなる研究が待たれるところである。

ところで、放射線治療が良好な結果を残せない場合の理由の一つとして、正常組織の障害があげられる。臨床では臓器の晩期障害がdose limiting factorで、すなわち腫瘍制御を向上させるため投与線量を増加させるにつれ、逆に腫瘍周囲の正常組織では重篤な不可逆性障害が認められるようになり、場合によっては生命を脅かす。現時点では、腫瘍組織周囲の正常組織にまったく放射線を照射せずに、真の意味で腫瘍組織、腫瘍細胞のみに限局した照射は不可能であり、また今後達成される見込みも極めて低いため、照射技術がいかに進歩しようとも、放射線治療を行う以上正常組織に対する線量を常に意識せざるを得ない。放射線治療成績向上のためには、この正常組織の障害の問題を解決していくことが必要となる。

そのためには、大きくわけて二つの方法が考えられ、その一つが空間的線量分布の改善である。放射線治療の多くを占める外照射について簡単に述べることにするが、以前は技術的には一門照射や対向二門照射が主体で、した

がって腫瘍組織と正常組織との線量はほぼ同等であった。その後、多くの研究により、空間的線量分布の改善が図られ、原体照射、ノンコプラナー照射、intensity modulated radiotherapy, stereotactic radiosurgery, 陽子線や重イオン線のようなブラッグ・ピークを持つ放射線の利用など、現在実際の放射線治療において用いられている様々な照射技術は、長年におよぶ研究の成果で、十分な発展をみせ、この分野の今後も期待が持たれている。

正常組織の放射線障害を解決するもう一つの方法として、腫瘍組織と正常組織の放射線に対する感受性の差を広げることが考えられる。これにもいくつかの方法があるが、この点に関しては、本論文と関係が深いので概説する。1日に数回照射を行う多分割照射は、1980年代に入り盛んに行われるようになったが、これは従来から用いられている1日1回2Gyで計50~60Gy照射する通常の照射法と比較し、1回線量を1.2~1.5Gyと小さくするため、放射線の晩期障害を軽減することが可能である一方で、腫瘍に対する効果は大きく変化しないため、結果として総線量を増やすことができ、制御率向上に結びつく。現在でもさまざまな臨床研究が行われており、報告が後を絶たない^{11,12)}。また、温熱療法と放射線治療を併用した場合に増感効果が認められることもよく知られており、臨床的には、放射線単独では制御困難と予想される大きな腫瘍や、放射線治療後の再発腫瘍に対して用いられることが多い。これまで、放射線治療単独と比較し完全奏効率、局所制御率のいずれにおいても有意に改善するとの報告がほとんどである^{13,14)}。但し、表在性腫瘍では比較的良好な結果が得られているのに対し、深在性腫瘍の大部分では、放射線治療単独よりは効果が認められるとはいえず、いまだ満足な結果とは言えないのが現状である^{15,16)}。

一方、薬剤による放射線効果の修飾という観点からは、放射線増感剤と放射線防護剤があげられる。放射線増感剤とは、この場合低酸素性細胞増感剤を意味するが、その研究は1960年代より始まり、1970年代前半には臨床レベルでrandomized trialが行われるようになった。これまで臨床的有用性が報告された薬剤は唯一nimorazoleのみと言えるが^{1,21-22}、この薬剤も世界で広く使われているわけではない。現在は、基礎レベルではhypoxic cytotoxinが注目されており、また臨床試験としては、第2世代以降のいくつかの薬剤で第I、II相試験の結果が報告されだした段階で^{1,21,22}、今後はより多角的なアプローチが必要と考えられている。最近では、少量シスプラチンを照射と連日同時併用する放射線化学療法が、頭頸部腫瘍、肺癌、食道癌などでさかんに行われ良好な結果を示しているが、これはシスプラチンの放射線増感作用を利用したもので、その意味では現在唯一広く使用されている放射線増感剤といえよう^{2,21,25}。

放射線防護剤については、1948年に初めて防護効果を持つ化合物cysteineが発見されており、増感剤より古い歴史を持つ^{2,61}。cysteineはSH基(水硫基)を持つ化合物で、主にラジカルスカベンジャーとして放射線防護作用を示す。その後、cysteineと同様なSH化合物は精力的に調べられ、またそのうちのいくつかは臨床的に試みられた。しかし、動物実験で得られた放射線防護効果を現すのに必要な薬剤量を臨床的に投与することは、その毒性の点から不可能な場合が多く、結局有用性が示唆される報告は散見されるのみで^{2,71,20}、十分な防護効果を示しているとは言えず、残念ながら臨床的に広く使用されるには現時点では至っていない。とくに、WR-2721については臨床報告も多いが、低血圧の副作用のため、投与量が制限されるという結果であった。また、

SH化合物以外にも、superoxide dismutase (SOD) など放射線防護効果を持つ化合物は存在するが、生体内で投与後早期に不活化するため、有効な投与方法が見あたらず臨床的な応用は行われていない。

このように放射線治療の現状を鑑みると、今後は放射線感受性を修飾する薬剤の研究、とくに基礎面よりも臨床的結果を得られる研究が重要と考えられる。

一方、肺癌という疾患についてみると、近年多くの国で肺癌による死亡は増加しておりわが国も例外ではない。1993年に日本人男性の肺癌死亡者数が胃癌死亡者数を上回り、現時点では肺癌が男性癌死亡の第1位、女性では第2位で、ますます重要な疾患となってきている。肺癌の治療は、その生物学的特性の違いにより、非小細胞肺癌と小細胞肺癌に分けて論じられるが、根治が期待できるのは非小細胞肺癌のⅠ期、Ⅱ期に対し手術療法を行ったときのみで、肺癌全体から見れば4分の1程度にすぎず、依然として治療困難な疾患である。現時点での肺癌に対する標準的治療方針は、もちろん組織型と病期に応じて変わってくるが、その中で放射線治療の役割を見てみると、非小細胞肺癌Ⅰ期、Ⅱ期で手術適応外の症例、非小細胞肺癌Ⅲ期症例、限局型小細胞肺癌症例において、根治を目指した照射が行われている。近年では、肺癌における分子生物学的研究も盛んに行われているが、臨床レベルで標準的に使用されるようになるにはまだまだ多くの時間を必要とする。今後は、全体的な肺癌罹患率の増加に加え、高齢者の増加が目立つこと、癌治療全般においてQOL (quality of life) の意識が高まっていること、脳転移や骨転移にもよく用いられることなども考えれば、放射線治療の役割はますます重要となっていくと予想される。

胸部へ照射する場合のcritical organとしては、腫瘍周囲の正常肺、脊髄、心臓などが考えられるが、後二者は上述したような照射技術の進歩に伴い、耐容線量以下に抑えることが可能となった。しかしながら、腫瘍周囲の正常肺組織は放射線感受性が高いことに加えて、腫瘍との距離が近いいため、腫瘍と同程度の線量が照射されることは避けられず、また、呼吸運動や根治性を考えると照射野もある程度大きくならざるを得ないため、結局肺障害がdose limiting factorとなる。正常肺の耐容線量については、照射容積のみならず、年齢、体格、呼吸機能、肺のなかでの照射部位などによって影響されるため、臨床的に一概に述べることは難しいが、現在通常使用されている照射技術においては、原発性肺癌の照射野として一般的な、原発巣と患側肺門および縦隔という照射野で治療を開始した場合（肺野については片肺の3分の1～2分の1程度、面積で100cm²～200cm²程度）、1日1回2Gyで計70Gy程度まで照射されることが多い。

放射線肺障害に関しては、1922年のGrooverらの報告³¹⁾以降研究が盛んとなり、臨床的、組織学的、生理学的、生化学的、分子生物学的側面など、さまざまな視点から多くの研究が行われてきた。もちろん、臨床例や人の剖検例などは貴重な情報をもたらすが、日常臨床においては、患者個々の状態は異なり、長期にわたって多くの検査（とくに侵襲的なもの）を経時的に行うことは実際上不可能で、また原疾患や合併症、他の治療法（例えば化学療法）など放射線以外の影響も見られることが多く、放射線治療においても総線量、一回線量、分割回数、照射容積などがさまざまで、さらに報告者によって評価基準や結果の解釈なども異なってくるため、放射線による生物学的影響、その経時的変化、線量や照射容積との関係などを、正確に評価するのはきわ

めて困難である。したがって、おもに動物実験による検討で、多くの事実が明らかとなってきた。動物実験の結果をそのまま人間に応用することはできないが、臨床例と比較検討してみると基本的には一致する部分が多い。

臨床的に放射線肺障害は、照射終了後1~3ヶ月で認められる放射線肺炎と、6ヶ月以降に認められる放射線肺線維症に大別される。これらの機序を解明するにあたり、当初病理組織学的変化の観察がすすめられ、光学顕微鏡所見、電子顕微鏡所見、肺の特定の組織や細胞に着目した変化など、すでに多くの報告がある³⁷¹⁻³⁸¹。これらを見てみると、実験動物の種類や年齢、放射線の総線量、一回線量、線量率、分割回数、また組織学的所見に対する解釈の違いなどもあるため、すべて一致した結果となっているわけではないが、概して以下のようにまとめられる。まず臨床とは異なり、病理組織学的には大きく3期にわけて考えられている^{321, 380, 421, 540, 1361}。つまり、放射線肺炎が出現する以前の早期、放射線肺炎の時期の中間期、肺線維症の時期の晩期であるが、いずれの時期においても、約40種類ある³⁸¹⁻³⁹¹と言われている肺組織の細胞の多くに異常所見を見いだせる。しかしながら、主な所見としては、早期においては、II型肺胞上皮細胞と血管内皮細胞の異常に集約される。II型肺胞上皮細胞については、照射後1時間でサーファクタントを含有する層板小体の数の減少が認められ¹⁷¹、遅くとも24時間後には肺胞内サーファクタント濃度の上昇が確認されている¹⁸¹。その後、肺胞上皮細胞の脱落^{321, 421, 451}、肺胞内への蛋白様物質やdebrisの浸潤が認められる^{381, 1371, 341, 461}。一方、血管内皮細胞については、照射後数日で、細胞質内の空胞形成、基底膜からの脱落とそれに伴う血管内腔の閉塞、鬱血、血管透過性亢進、間質浮腫などを認めたとする報告が多い^{321-341, 381, 391, 441, 421, 441, 1361}。なかには、照射後3時間で、内皮

細胞の形態変化と間質浮腫を認めたとする報告もある³⁴⁾。中間期は放射線肺炎が顕在化する時期であり、滲出性病変を主体とした変化となる。この時期は依然として血管や肺胞上皮の透過性が亢進しており³⁵⁾、肺胞隔壁の細胞数増加と肥厚^{32), 34), 37), 39), 40), 42), 44), 46), 50)}、肺胞内への血漿蛋白浸潤^{38), 40), 42), 44), 46)}を主体とするが、その一方で毛細血管の閉塞も認められる^{32), 37), 38), 44), 46)}。また、この時期から肺胞隔壁へのコラーゲンの沈着が見られるようになる^{32), 33), 40), 42), 50)}。照射後6ヶ月以上経過した晩期では、炎症機転も終息に向かい^{32), 37), 39), 46)}、血管透過性亢進も軽減し^{38), 40)}、よく知られているように、コラーゲン産生の亢進と沈着による線維化が顕著になる^{32), 33), 37), 42), 44), 46)}。結果として毛細血管床^{32), 34), 37), 39), 44), 46)}および含気が減少する^{39), 40), 42), 44), 46)}。

このような、経時的な病理組織学的変化は、古典的には一連のものと考えられてきた。すなわち、放射線による細胞死および炎症性病変と、その修復過程としての線維化である。しかしながら、15年ほど前からは、放射線肺炎と放射線肺線維症の発症が必ずしも一致しないため、この二つの現象はお互いに関連がないと考えられ始め⁴²⁾、放射線肺障害の機序に対して生化学的側面からの研究も行われるようになった。放射線肺障害は血管内皮細胞と密接に関連していると考えられたことより、Wardらのグループはラットを用いた実験で、プロスタサイクリン、アンギオテンシン変換酵素、プラスミノゲンアクチベータとの関係について報告している^{41), 43)}。プロスタサイクリンは照射翌日には正常の約半分に減少するが、6ヶ月後には正常の2~3倍まで上昇していたと報告されており⁴¹⁾、アンギテンシン変換酵素については、照射1ヶ月後より減少を認め、3ヶ月後以降は正常の20%以下で一定したとしてい

る⁵³⁾。また、プラスミノゲンアクチベータの活性は、照射3ヶ月後の時点で有意に減少していたと報告されている⁵³⁾。さらに、Wardらは、マウスの種により放射線に対する反応が異なるとして、肺線維化を認めた種のマウスが本来持っているアンギオテンシン変換酵素活性とプラスミノゲンアクチベータ活性は、線維化を認めなかった種のマウスと比べ約半分であったことより、血管内皮細胞と肺線維症との関連を主張している^{43), 54)}。

ところが最近では、サイトカインや遺伝子に関して論じられるようになってきた。Rubinらは1992年に、照射直後から始まるサイトカインのカスケードが放射線肺線維症の機序であると初めて提唱した⁵⁵⁾。このなかで、彼らはウサギの片肺に照射し、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; 以下BALF) 中の肺胞マクロファージによる線維芽細胞増殖促進活性 (fibroblast growth-stimulating activity; 以下FGA) とtransforming growth factor (以下TGF)、とくにTGF- β の増加を示し、放射線肺障害における肺胞マクロファージとTGF- β の重要性について言及している。また、Rodemannらは、照射されたII型肺胞上皮細胞によるTGF- β の増加を主張している⁵⁶⁾。最近では、TGF- β のなかでも、TGF- β 1が最も重要であるとの報告がある⁵⁷⁾。TGF- β はコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質蛋白質の産生を促進することが知られているが^{58), 59)}、これは肺線維芽細胞に対しても同様で⁶⁰⁾、プレオマイシンやシクロフォスファミドによる化学療法後、特発性間質性肺炎、進行乳癌に対する骨髄移植後の間質性肺炎合併症例においてもTGF- β の増加が報告されている⁶¹⁾⁻⁶⁵⁾。また、臨床的、実験的放射線肺炎⁶⁷⁾⁻⁶⁹⁾や放射線肝障害⁷⁰⁾でも同様である。照射後のカスケードは、細胞では肺胞マクロファージとII型肺胞上皮細胞、サイトカインではTGF- β 1

が重要であるものの、基本的には多くの細胞と多くのサイトカインが関与した反応系で、mRNAレベルで見ると、照射後1日ですでに変化を認め、また照射26週後でも変化が見られているように⁷¹⁾⁷²⁾、照射直後から始まり臨床的放射線肺線維症の時期まで絶えず変化を続ける。現在では、早期障害と晩期障害のいずれに対してもこのカスケードが重要視されており、Rubin⁷²⁾らやRodemann⁵⁶⁾らはカスケードのモデルを提唱している(図1)。最近では、照射によって肺胞マクロファージ上にintercellular adhesion molecule-1(以下ICAM-1)とlymphocyte function-associated antigen-1(以下LFA-1)の発現が認められるとの報告もあり⁷³⁾⁷⁴⁾、サイトカイン、接着分子、遺伝子などの立場から機序の解明が今後さらにすすむと思われる。

このような機序解明の研究の進歩に対し、実際の臨床における放射線肺障害の治療は相変わらず貧弱である。放射線肺炎に対して唯一用いられている薬剤は副腎皮質ステロイドで、80%程度に効果が認められると言われており⁷⁵⁾、また経験的にも有効性を実感できるが、肺線維症の段階では他に方法がないため結局ステロイドを投与するものの効果はほとんど見られない。このステロイド投与に関するclinical randomized studyは行われておらず、有用性に関する定量的評価、最適な投与方法や投与量など未解決の問題も多い。一方、動物実験では、ステロイドの有効性について多くの報告が認められる⁷⁶⁾⁷⁷⁾。これらの報告では、評価方法として生存率、組織学的所見、肺コンプライアンス、LD50値(mean lethal dose; 中間致死線量)、血管透過性、II型肺胞上皮の増殖活性、肺動脈酸素分圧、BALF細胞数、肺胞マクロファージ表面のLFA-1発現率、コラーゲン量などさまざまなパラメーターを用いているが、ほとんどが放射線肺炎の抑制に関する報告であり、肺線維症に言及

しているものは少ない。久禮はアザン・マロリー染色での青染部分（後述するように膠原線維に相当）の画像解析を行い、照射24週後の線維組織占有率がステロイド投与群で有意に減少していたとしている⁸¹¹。しかしながら、Brownの組織学的評価⁷⁵⁴や、Wardらのコラーゲン量での評価⁸⁵¹では、ステロイドによる肺線維症の抑制は認められなかったとしており、この考え方が現在一般的である。副腎皮質ステロイド以外にも、薬剤による放射線肺障害の治療、予防に関する動物実験は多数行われており、検索した範囲内でもここ40年ほどで30種類以上のさまざまな薬剤が試され^{781, 871, 881, 891-1231}、最近では遺伝子治療も行われている¹¹⁹¹。ステロイドの場合同様、各々の報告における評価方法はさまざまで、放射線肺炎に対する実験も、放射線肺線維症に対する実験もあるが、トリヨードサイロニン（甲状腺ホルモン）⁸⁷¹、デキストラン硫酸（抗高脂血症薬）⁹¹¹、D-ペニシラミン（抗リウマチ薬）^{921, 971}、WR-2721（放射線防護薬）^{881, 1001}、ペントキシフィリン（脳微小循環改善薬として脳梗塞後に使用）¹¹⁶¹で晩期障害の軽減が認められたと報告されている。これらの薬剤は、WR-2721を除きいずれも他疾患に対して臨床的に用いられているが、放射線肺線維症に対して効果を見るためには大量投与が必要で、実際には副作用のため使用することができない。WR-2721についても、低血圧の問題があるのは上述した通りである。なお、抗凝固剤を用いた動物実験^{751, 861}や症例報告^{1241, 1251}もあるが、早期障害に対する有用性は報告されているものの^{861, 1241}、晩期障害に関する検討は行われていない。

このように、放射線肺障害に関するこれまでの多数の研究にもかかわらず、放射線肺線維症の治療、予防という観点からは、放射線防護剤全体と同様に、臨床的に有用な薬剤は存在しないのが現状で、今後の肺癌治療における放射

線治療の重要性を考えた場合、このような薬剤を発見することは急務といっ
ても過言ではない。

研究の目的

放射線肺障害の機序において、毛細血管、すなわち血管内皮細胞が密接に関与していることは明らかである。放射線による血管内皮細胞障害が認められる以上、その局所において血液凝固カスケードが活性化（含トロンビン活性上昇）されており、放射線肺障害に対して凝固系が一定の役割を持っているであろうことは容易に予想できる。血液凝固系におけるさまざまな酵素のうち、トロンビンは中心的役割を果たしているのみならず、その他にも多彩な生理活性を有している。その一つとして、*in vitro*で線維芽細胞に対する増殖促進活性や遊走促進活性を持っていることが知られている^{126,127}。また、肺線維症の副作用が有名な抗癌剤であるプレオマイシンの動物モデル^{128,129}や、肺線維症を合併することがよく知られている全身性硬化症患者^{130,131}において、BALF中のトロンビン活性および肺線維芽細胞増殖促進活性（lung fibroblast growth-stimulating activity; 以下LFGA）の上昇が報告されている。さらに、*in vitro*においても*in vivo*においても選択的抗トロンビン剤であるアルガトロバンによるLFGAの抑制が示されている^{132,133,137}。これらの事実より、放射線肺線維症においても、凝固系とくにトロンビンが関与した機序が、TGF- β を中心としたサイトカインカスケードの他に、または関連して存在する可能性が高いと考えた。そこで、プレオマイシンを用いた実験結果も参考にして、アルガトロバンに注目し、放射線肺障害に対する防護剤としての有用性について検討したので報告する。

なお、後述する本実験に至る前段階として、2度の実験を行っており、まずこれらについて概説する。

予備実験 I

実験開始当初は、放射線肺線維症に対してアルガトロバンを臨床応用したときに（この予備実験時点では、閉塞性血栓性血管炎（バージャー病）や閉塞性動脈硬化症などの慢性動脈閉塞症に対して、すでに保険適応となっていた）、実際の患者における肺線維症の評価が可能のように、画像的に評価することを主眼とし（主にCT値を用いた定量的評価）、病理組織学的に対比して確認する方向で実験計画をたてた。

実験方法

実験に用いたラットはSPF（specific-pathogen-free）処理を施したWister系雄ラット60匹で、7週齢、体重178～206g（平均194.0g）であった。コントロール群およびアルガトロバン群30匹ずつ、さらにそれぞれを10Gy、15Gy、20Gy照射する群に分け、各群10匹ずつの計6群にて実験を行った。ペントバルビタール45～50mg/kgにて腹腔内麻酔後、プラスチック製平板に仰臥位に固定し、シミュレーションにて照射野を決定した後、三菱電機製ML-20Mにて照射を行った。1500万電子ボルトの電子線を、5mmボーラスを含めて20mmの深さ（胸部表面からは15mm）に対し、腹側よりそれぞれ10Gy、15Gy、20Gyを一回で照射した。照射野は右肺全体を含むように縦4cm×横3cmとした（図2）。照射終了後、アルガトロバン群では約pH2のアルガトロバン溶解液30mg/mlを注入したアルザ浸透圧ポンプを、コントロール群では約pH2の塩酸溶液を注入したアルザ浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込んだ。この浸透圧ポンプは、1ヶ月間の持続投与が可能なものであった。照射後はそのまま経過観察したが、照射4週後、8週後、12週後の

時点でCT撮影と浸透圧ポンプの腹腔内再埋め込みを行った。CT撮影機種は高津社製CTS-10で、肺野全体をスライス厚2mmで2~3mmごとに撮影した。照射16週後の時点では、4~12週後の時点と同様にCT撮影したが、その後開胸シカニューレを左心室に挿入、生理食塩水、10%中性緩衝ホルマリン液にて灌流固定した後に、ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン・マロリー染色にて病理組織標本を作成した。

放射線肺障害の評価方法としては、CT値、CT所見、病理組織学的所見、組織中コラーゲン量を用いた。CT値を算出する際、まずCT画像をCT撮影装置からパーソナルコンピューターに転送し、パーソナルコンピューター上で、各スライスごとに左右別々に肺野全体を囲むように関心領域を設定したうえで(図3)、各ラットの左右肺野の平均CT値を算出した。CT所見の評価には、所見なし、軽度、重度の3段階分類を用いた(図4)。病理組織学的観察は、線維化、泡沫マクロファージ浸潤、マクロファージ浸潤、リンパ球浸潤、鬱血の5項目に対して、所見なし、軽度、中等度、重度の4段階分類を用いた。組織中コラーゲン量の定量には、各ラット当たり2パラフィン切片を作成し、Lopezらの方法を用いて測定した¹³⁾。

有意差検定は、CT値と組織中コラーゲン量の比較にはWelch t検定を、CT所見と病理組織学的所見の比較にはArmitage χ^2 検定を用い、いずれも危険率5%未満を有意差ありと判定した。

結果

16週間の経過観察中に、コントロール群のうち10Gy照射群の2匹が、またアルガトロバン群のうち10Gy照射群の8匹、15Gy照射群の2匹、20Gy照

射群の5匹が死亡した。さらに、最後のCT撮影から屠殺に至る間に、コントロール群の15 Gy照射群とアルガトロバン群の15 Gy照射群からそれぞれ1匹ずつ死亡した。したがって、CT値とCT所見においては、コントロール群28匹、アルガトロバン群15匹の計43匹を、また病理組織学的所見と組織中コラーゲン量においてはコントロール群27匹、アルガトロバン群14匹の計41匹を評価の対象とした。屠殺前に死亡したラットの数は、アルガトロバン群で有意に多かった ($P < 0.001$, Armitage χ^2 検定)。

CT値とCT所見については、4回の撮影のうち肺障害が最も進展した照射16週後のものについて評価したが、3つの線量群のすべてにおいて、コントロール群とアルガトロバン群の間で両評価方法による有意差は認められなかった (図5, 表1)。病理組織学的評価では、いずれの線量においても、アルガトロバンにより有意に抑制されている所見は認められなかった (表2)。また、組織中コラーゲン量においても、いずれの線量でも有意差は認めなかった (図6)。

小考察

今回の実験では、60匹のうち19匹 (31.7%) のラットが屠殺前に死亡した。薬剤別にみると、コントロール群が3匹 (10.0%) であったのに対し、アルガトロバン群では16匹 (53.3%) と、有意に死亡ラット数が多かった。アルガトロバン群で有意にラットの死亡が多かった原因として、薬剤投与方法が考えられる。すなわち、およそ1ヶ月に1回のペースでアルザ浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込んだが、アルガトロバンは抗凝固剤であるため、出血傾向の副作用があり、頻回の侵襲的手技に基づく出血が主な死因と考えられた。

事実、浸透圧ポンプの再埋め込み時に、大量の血性腹水を伴うアルガトロバン群のラットが存在した。

実験結果からは、当初臨床応用を念頭において考えたCT値やCT所見による線維化の評価は困難であると思われ、またすべての評価方法において、アルガトロバンが放射線肺障害を抑制するという有意な結果は得られなかった。しかしながら、15 Gy照射群の病理組織学的評価で、ラット数がもう少し多ければ線維化や泡沫マクロファージ浸潤において有意差が生じるということもわかった。そこで、評価方法を病理組織学的評価に限定し、線量も15 Gyのみとしたうえで、一群あたりのラット数を増やして次の実験を行った。

予備実験Ⅱ

実験方法

予備実験Ⅰとはほぼ同じ実験方法であるため詳述はしない。SPF処理を施したWister系雄ラット30匹を、コントロール群およびアルガトロバン群15匹ずつに分け、それぞれのラットに対して1500万電子ボルトの電子線にて、5mmポアラスを含めて20mmの深さに、15Gyを一回で照射した。照射野は右肺全体を含むように縦4cm×横3cmとした(図2)。照射終了後、予備実験Ⅰと同様に、コントロール群およびアルガトロバン群のそれぞれのラットに対して、アルザ浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込んだ。照射後はそのまま経過観察したが、照射4週後、8週後、12週後の時点で浸透圧ポンプの腹腔内再埋め込みを行った。照射16週後の時点で屠殺し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン・マロリー染色にて病理組織標本を作成した。病理組織学的には、線維化、泡沫マクロファージ浸潤、白血球浸潤、浮腫、出血、鬱血の6項目を中心に観察した。なお、有意差検定にはArmitage χ^2 検定を用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

結果

16週間の経過観察中に、コントロール群およびアルガトロバン群のラットそれぞれ4匹ずつが死亡したため、コントロール群11匹、アルガトロバン群11匹の計22匹を評価の対象とした。

結果を表3に示す。全体として、予備実験Ⅰで認められたほどには肺の組織学的変化が進展しておらず、またコントロール群とアルガトロバン群との間で、いずれの所見に対しても有意差は認められなかった。

小考察

今回の実験方法は予備実験 I と基本的には同じであったにもかかわらず、前回示唆されたほどの組織学的変化の進展が認められず、動物実験モデルとしては不十分であった。また、アルガトロバンによる抑制効果も認められなかった。同じ線量ながら組織学的変化が乏しかった原因は明らかではないが、ラットが本学の医学部動物実験施設に搬入されてから照射されるまでの期間が前回と今回では異なっており（前は搬入当日の照射であったのに対し、今回は搬入1週間後の照射）、ラットの全身状態に違いがあったことは十分考えられる。この点を除けば、実験方法に差異は見られない。なお、放射線照射装置の線量校正は、2回とも照射直前に行っている。

また、薬剤投与に使用したアルザ浸透圧ポンプであるが、37℃にて1時間あたり2.5 μ lの投与となっているため、ラット1匹について1時間あたり75 μ gのアルガトロバンを腹腔内持続投与できることになり、血中濃度としては他疾患に対して臨床で用いられているのとほぼ同等な0.15 μ M程度が予想された。しかし、実際に測定したところ、埋め込み24時間後ではある程度の血中濃度（検出限界以下から0.411 μ M、平均0.15 μ M程度）が認められるものの、2週後、4週後ではほとんど検出限界以下で、アルガトロバンの肺線維化抑制効果が認められなかった原因の一つと思われた。この低濃度の原因も明らかではないが、ラット自身の腹圧や腹腔内埋め込み操作による癒着などがその一端と考えられた。

以上、予備実験 I、IIの結果より、アルガトロバンが放射線肺線維症抑制効果を持っていることは期待できるが、実験方法の問題により、良好な結果が得られなかったと考え、放射線の線量を15 Gyからやや増やし、薬剤投与

方法を変え、さらにラットの死亡に対応できるよう動物数も増やして、以下の本実験を行った。

実験方法

本実験の簡単なプロトコールを図7に示す。

使用動物

本実験においては、SPF処理を施したWister系雄ラット40匹を用いた。これらのラットは（株）日本医科学動物資材研究所より入手した。ラットは本学到着後、医学部動物実験施設のSPFラット用の部屋にて飼育され、ガンマ線滅菌後の飼料と消毒後の水を自由に摂取できる状態であった。ラット飼育用の部屋は、全体が2-3mmH₂Oの陽圧に調節されており、かつ紫外線による殺菌が施されていた。放射線照射は本学到着4日後に行われたが、照射時の日齢は52-54日、体重は187-217g（平均 203.7g）であった。放射線照射時に、これら40匹のラットは、コントロール群とアルガトロバン群に任意に割り振られ、各群20匹ずつとした。両群の背景因子に有意差は認められなかった。

放射線照射

放射線照射装置には、三菱電機製 ML-20Mを用いた。各ラットにペントバルビタール45mg/kgにて腹腔内麻酔後、プラスチック製の平板に四肢および前歯を紐で拘束した状態で仰臥位に固定し、シミュレーションにて照射野を決定した後、照射を行った。照射には1500万電子ボルトの電子線を用い、5mmポーチを含めて20mmの深さ（胸部表面からは15mm）での吸収線量が17Gyとなるように一回で照射した。胸部表面から15mmという深さは、胸部皮膚面と背部皮膚面のほぼ中間点であった。照射野の大きさは縦4cm×横

3cmとし、右肺全体が照射野に完全に含まれるようにした(図2)。

薬剤投与

アルガトロバンは三菱化学株式会社からの提供によった。アルガトロバン群のラット20匹に対しては、投与間隔6時間以上で1日2回アルガトロバン溶解液(約pH2)を皮下注射で投与し、照射日から4週間続けた。第1回目の投与は全身麻酔下にある照射直前に行った。アルガトロバンは他疾患に対してはすでに臨床応用されているが、使用上の注意として、4週ンを越えて投与した経験は少ないため、投与期間は4週間以内をめどとすることとあり、本実験における投与期間もこれに従った。アルガトロバンの投与量は、1回につき10mg/kg(1日につき20mg/kg)とした。なお、ラットの成長に伴い体重が増加するが、薬剤投与量は毎週月曜日午前中の体重をもって、その1週間の投与量とした。コントロール群のラット20匹に対しては、アルガトロバン群と同様の方法で、相当量の塩酸溶液(約pH2)を皮下注射した。

屠殺

照射および4週間におよぶ薬剤投与後、そのまま経過観察していたが、照射134日後(第135日目)に全てのラットを屠殺した。照射時同様にペントバルビタールにて腹腔内麻酔後、開腹開胸し、両肺と気管・気管支を一塊に摘出した。10%中性緩衝ホルマリン液を摘出後の気管内に注入し固定後、やはり10%中性緩衝ホルマリン液にて標本全体を浸漬固定した。

なお、本実験においては、線維化の進展を確認する目的で、実験対象とした40匹以外に12匹のラットに同様な方法で照射したが(但し、薬剤投与は

行っていない) , およそ照射120日後に確認用ラット3匹を屠殺して調べたところ、線維化の進展が十分と判断されたため、この時期での屠殺となった。

組織学的観察

摘出され、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定された肺を、矢状断にて切り出し、パラフィン浸透包埋した後、染色法としてヘマトキシリン・エオジン、アザン・マロリーを用いて組織標本を作成した。組織学的観察項目は、線維化、泡沫マクロファージ浸潤、白血球浸潤、浮腫、気管支肺胞上皮の肥厚、色素貪食細胞浸潤、鬱血の7項目とし、評価方法として、所見なし、軽度、中等度、重度の4段階分類を用いた。図8-10に組織学的所見の例を示す。

線維組織占有率

膠原線維はアザン・マロリー染色にて特異的に青染されることから、組織標本を顕微鏡下に撮影した写真をコンピューター処理し、青染部分の組織標本全体に対する面積比率を算出した。アザン・マロリー染色による組織標本において、一標本につき任意に5部位を選び、144倍の拡大率で写真撮影したのに対して、ハードウェアとしてMacintosh、ソフトウェアにはSCOPE ver 2.0を用い、カラーモードはRGBとしたうえで、顕微鏡下で境界を確認しながら青染部分の範囲を決定し、5部位全体の合計から青染部分の面積比率を算出した。

統計学的処理

組織学的に観察した7項目について、各段階のラット数を、アルガトロバン群とコントロール群との間で比較した。有意差検定にはArmitage χ^2 検定を用いた。また、線維組織占有率についても、両群間で比較したが、こちらの有意差検定にはWelch t 検定を用いた。いずれも、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

結 果

照射日を含めた135日間の経過観察中に、コントロール群のラット2匹が死亡した。アルガトロバン群では死亡したラットは見られなかった。したがって、コントロール群18匹、アルガトロバン群20匹の計38匹を評価の対象とした。

組織学的所見の結果を表4および図11に示す。

線維化に関しては、コントロール群で、軽度、中等度、重度がそれぞれ5匹、10匹、3匹であったのに対し、アルガトロバン群では、軽度、中等度、重度がそれぞれ17匹、3匹、0匹で、アルガトロバン群において、有意に線維化の抑制が認められた ($P < 0.001$)。泡沫マクロファージ浸潤に関しては、コントロール群で、軽度、中等度、重度がそれぞれ7匹、10匹、1匹であったのに対し、アルガトロバン群では、所見なし、軽度、中等度、重度がそれぞれ1匹、16匹、3匹、0匹で、アルガトロバン群において、有意に泡沫マクロファージ浸潤の抑制が認められた ($P < 0.01$)。色素貪食細胞浸潤に関しては、コントロール群で、軽度、中等度がそれぞれ11匹、7匹であったのに対し、アルガトロバン群では、所見なし、軽度、中等度がそれぞれ4匹、14匹、2匹で、アルガトロバン群において、有意に色素貪食細胞浸潤の抑制が認められた ($P < 0.01$)。その他の組織学的観察項目であった白血球浸潤、浮腫、気管支肺胞上皮の肥厚、鬱血の4項目に関しては、両群間に有意差は認められなかった。

また、コンピューター処理に基づき線維組織占有率においては、青染部分がコントロール群では $62.42 \pm 9.88\%$ 、アルガトロバン群では $42.73 \pm 5.30\%$ で、アルガトロバン群で有意に青染部分の面積比率が低下していた (P

$\langle 0.0001 \rangle$ (图12) .

考 察

今回、選択的抗トロンピン剤であるアルガトロパンを、放射線肺障害に対する予防目的で使用したが、病理組織学的に肺線維化、泡沫マクロファージ浸潤、色素貪食細胞浸潤が有意に抑制されていた。肺線維化については、アザン・マロリー染色において膠原線維を表す青染部分も、アルガトロパン投与群で有意に減少しており、主観的要素が完全には避けられない組織学的評価方法に対して、客観的な指標となった。トロンピンは、血液凝固系における役割以外にも、多彩な生理活性を有している。その一つとして、*in vitro*で線維芽細胞に対する増殖促進活性や遊走促進活性を持っていることが報告されており¹³⁶⁾¹³⁹⁾、さらに上田らはアルガトロパンによるトロンピン活性とLFGAの阻害を報告している¹³⁷⁾。一方、*in vivo*においてもトロンピンのFGAが報告されている。すなわち、谷らはプレオマイシンを経気管的に投与したラットのBALF中のトロンピン活性およびLFGAの上昇、さらにアルガトロパンによるLFGAの抑制を示し、その機序において、少なくとも一部分でトロンピンが肺線維化に関与していると結論している¹³⁸⁾¹³⁴⁾。菅間らも、プレオマイシン静注マウスモデルを用いて、肺障害におけるトロンピンの関与とアルガトロパンによる障害の抑制を報告している¹³⁹⁾。さらに谷らは、トロンピンがマクロファージからの血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor; 以下PDGF) の放出を刺激し、トロンピンの直接作用以外にもPDGFを介したFGAの上昇もあることを報告しているが¹⁴⁰⁾、これまでも血管内皮細胞や血管平滑筋細胞からのトロンピンによるPDGF放出について多くの報告がある¹⁴¹⁾¹⁴⁶⁾。臨床報告に目を向ければ、Ohba¹³⁸⁾らやHernández-Rodríguez¹³⁶⁾らは、肺線維症を合併することがよく知られてい

る全身性硬化症患者のBALFにおいて、やはりトロンビン活性とLFGAの上昇を認めたとしている。

このような、これまでの報告から推測すると、今回放射線肺障害に対してアルガトロバンが有用であった機序として、放射線によるトロンビン活性の上昇を介して、直接的または間接的に促進したLFGAが、アルガトロバンにより抑制されたと考えられる。沢田は、家兎を用いた実験で、肺に放射線を照射することにより、BALF中のマクロファージ数の増加と、肺胞でのprocoagulant activityが照射2週目から高値となったことを報告しているが¹¹⁷⁾、トロンビンに対するアプローチは行っていない。本論文のように、間接的ながら放射線肺線維症におけるトロンビンの関与を示唆した報告、および抗凝固剤による放射線肺線維症の抑制を示した報告は初めてである。なお、トロンビン活性の上昇については、肺胞マクロファージから放出されるprocoagulant activityによるとも考えられるが¹¹⁷⁾、血管破綻時の速やかな血液凝固カスケードの活性化と同様、放射線により障害された血管内皮細胞に対する反応とも考えられる。RubinらやRodemannらが提唱したTGF- β を中心としたサイトカインのカスケード(図1)にはトロンビンは示されていないが、トロンビンによって刺激された線維肉腫細胞や血管平滑筋細胞がTGF- β 1を放出するとの報告がある^{118),119)}。また、トロンビンが血管内皮細胞上に、ICAM-1やP-セレクチンなどの接着分子の発現を増強することも知られており^{120),121)}、さまざまなサイトカインとの関与を示唆する。まず、放射線肺障害におけるトロンビン関与の直接所見を示し、その後カスケードに対するトロンビンの役割や他の線維芽細胞増殖因子との関係などを解明していくことが今後の課題である。あわせて、TGF- β をはじめとしたサイトカ

インやICAM-1などの接着分子が、アルガトロバンによりどのように変化するのかを測定する必要がある。

肺線維症以外に、泡沫マクロファージ浸潤もアルガトロバンにより抑制されたが、トロンビンの生理活性の一つに、マクロファージに対する増殖作用、走化作用があり^{152),153)}、これらの機能に対する抑制効果と思われる。従来からの病理組織学的観察においても、照射後6ヶ月前後の時期におけるマクロファージの増加や出現の報告は多いが^{21),37),38),40),45)}、兎の肺胞マクロファージから照射後にTGF- β が放出されること⁵⁵⁾、患者の肺胞マクロファージから照射によりPDGFが放出されること⁵⁶⁾、また照射によりラットの肺胞マクロファージ上へ接着分子が発現すること⁷⁰⁾などが報告されており、マクロファージは放射線肺障害においてサイトカイン放出細胞として重要な役割を担っていると認識できる。また、色素貪食細胞は、マクロファージがヘモジデリンを貪食したもので、出血の存在を示すとともに、放射線肺線維症との関係においては、泡沫マクロファージと同様の意義と思われる。

なお、図13に放射線肺線維症に対するトロンビンが関与するカスケードのモデルを提唱してみた。ここでは、これまでの報告で明らかとなっているか、または事実である可能性が高い、各種サイトカインの機能を組み合わせるにとどめたが、実際には非常に複雑であることは疑いない。

アルガトロバンのように、選択的抗トロンビン作用という機序の抗凝固剤は他には見られない、この薬剤は世界で初めてわが国で開発されたもので、現時点で使用されている国も日本に限られているが、慢性動脈閉塞症（閉塞性血栓性血管炎（バージャー病）、閉塞性動脈硬化症）、脳血栓症急性期、アンチトロンビンⅢ低下を伴う血液透析において使用されている^{106),107)}。ま

た、最近では、HITTS (heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis syndrome) における有用性や¹⁵⁹⁾、放射線被爆事故による手掌の障害に対する報告もある¹⁶⁰⁾。その点では、今後の臨床応用を視野に入れた場合、安全性に対する検討がほぼ不要と考えられ、臨床導入しやすい状態にあると言えるが、放射線肺障害に対する薬理機序以外にも、いくつか実際的な問題点が残っており、それぞれに対して動物実験で確認する必要がある。以後、これらの問題点について考察する。

理想的な放射線防護剤とは、極端な高線量域や低線量域は別として、臨床で用いられるような一定の線量幅のなかでは、どの線量に対しても防護効果を半永久的に持つような薬剤であろう。今回のアルガトロパンの場合、予備実験 I、II および本実験の結果から考えれば、17Gy 前後の狭い幅のなかでのみ効果が現れると予想され、決して理想的な放射線防護剤とは言えない。ところで、放射線治療の臨床では、腫瘍組織周囲の critical organ の耐容線量まで照射することが通常である。一回 17Gy が、通常分割照射 (1日1回 2Gy) でどの程度の線量に相当するのかは肺の α/β 値によるが、報告では 2.1~4.3 となっており¹⁶¹⁾、これに基づいて計算すると 57.5~79.2Gy ($\alpha/\beta=3.0$ では 68.0Gy) となり、通常原発性肺癌で用いられている線量とほぼ等しい。すなわち、薬理学的に理想的ではないとはいえ、臨床応用してみる価値があると考えられる。

通常、放射線肺線維症は照射後 6ヶ月頃より認められるようになるため、今回の照射後約 4.5ヶ月という屠殺時期は、放射線肺炎と肺線維症の移行期で、どちらかと言えばむしろ放射線肺炎の時期 (病理学的には中間期) と言える。しかしながら、コントロール群の所見として、線維化やマクロファ-

ジ浸潤が優位な所見で、放射線肺炎の時期に優位となるべき白血球浸潤、浮腫、鬱血などは軽度であり、またこれまでの放射線肺障害の治療、予防に関する動物実験の報告の多くで、照射3ヶ月後から6ヶ月後にかけて病理組織学的線維化が進行するものの、4~5ヶ月後の時点でほぼ進行は止まるとの結果となっている^{8,11,15,18,21,22,25,29}。すなわち、今回の実験における屠殺時期は、放射線肺線維症の段階であると考えて矛盾しない。ところで、肺線維症が抑制されていたアルガトロパン群において、線維化がこの後さらに進行してくるということも考えられる。現在、放射線肺線維症に至るサイトカインカスケード(図1)は照射直後から動き始めると考えられているが、トロンビンの関与した反応も同様に照射直後から始まると考えるべきで、照射直前から4週間にわたってトロンビンを抑制したことにより、今回の屠殺時期以降の肺線維症の進行を認めないであろうとの考えも成り立つ。但し、TGF- β 、PDGF、コラーゲンのmRNAレベルが、照射2週後に上昇した後、16週後には正常範囲まで漸減し、26週後には再び上昇に転じるとの報告もある^{7,21}。

本実験で用いた投与量と皮下投与によるアルガトロパンの最高血中濃度は3.0~4.0 μ Mであり、臨床で有効に用いられている0.2~0.4 μ Mの約10倍になっていた。アルガトロパンは分子量526.66の小分子化合物で、トロンビンの活性部位にすっぽりと収まる形で結合することにより、抗トロンビン作用を表すとされ、したがって、トロンビンの持つ複数の機能を同時に阻害すると考えられる。また、アルガトロパンのヒトトロンビンに対する酵素活性阻害濃度は0.039 μ Mで^{16,21}、さらに、血中半減期が α 相15分、 β 相30分と短いため^{16,21}、実際の使用においては数時間かけてゆっくりと点滴静注することで、有効血中濃度をなるべく長時間維持することが適切な使用方法となっ

ている。つまり、現在臨床で用いられている濃度にて十分抗トロンビン作用を発揮でき、放射線肺線維症抑制に対してもその効果を期待できると考えられる。なお、現在臨床応用されている疾患のなかでも用法・用量は異なっており、上述した血中濃度の問題や、今回は他疾患に追隨した投与期間の問題も含め、最適な投与方法を模索する姿勢も忘れてはならない。

放射線防護剤の使用において、最も問題となるのは薬剤が腫瘍も防護するのではないかということである。トロンビンと放射線の抗腫瘍効果との間には、これまで明らかな関連は報告されていないが、この点に注目した研究そのものが皆無であるため、今後の実験が望まれる。

以上、さまざまな検討事項が残されているが、今後アルガトロバンの肺線維症抑制効果を期待して積極的に臨床応用を行い、肺癌に対する放射線治療の成績向上に寄与できれば幸いである。

結 語

1. 選択的抗トロンピン剤であるアルガトロバンの放射線肺障害に対する有用性について、ラットを用いた動物実験にて、おもに病理組織学的に検討した。
2. 線維化，泡沫マクロファージ浸潤，色素貪食細胞浸潤においては，アルガトロバン群で有意に抑制されていた（それぞれ $P < 0.001$ ， $P < 0.01$ ， $P < 0.01$ ）。
3. また，コンピューターを用いた線維組織占有率においても，アルガトロバン群で有意に低下していた（ $P < 0.0001$ ）。
4. 放射線肺障害にトロンピンが関与している可能性が示唆された。アルガトロバンは，放射線によるトロンピン活性の上昇を介した，直接のおよび間接的な肺線維芽細胞増殖促進活性を抑制することにより，放射線肺障害を抑制したと考えられた。
5. 抗凝固剤による放射線肺線維症の抑制，および，間接的ではあるが，放射線肺障害へのトロンピンの関与を示唆した報告は，本論文が初めてである。
6. 今後は，分子生物学的な機序の解明が必要であるが，同時に，臨床で応用しその有用性に期待したい。

謝 辞

本論文の要旨は第39回ASTRO (American Society for Therapeutic Radiology and Oncology) annual meetingにおいて発表した。

本研究を行うにあたり、御指導御校閲を賜りました東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻放射線医学講座放射線治療学の青木幸昌助教授、中川恵一講師に深甚なる謝意を表します。また、本研究での病理組織学的評価に多大な御協力をいただきました三菱化学株式会社横浜総合研究所安全性研究所の杉本次郎博士、ならびに研究全般に協力していただいた放射線技師、医局員の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) Horiot JC, Bontemps P, van den Bogaert W et al: Accelerated Fractionation (AF) Compared to Conventional Fractionation (CF) Improves Loco-Regional Control in the Radiotherapy of Advanced Head and Neck Cancers: Results of the EORTC 22851 Randomized Trial. *Radiother Oncol* 44: 111-121, 1997
- 2) Dische S, Saunders M, Barrett A et al: A Randomized Multicentre Trial of CHART versus Conventional Radiotherapy in Head and Neck Cancer. *Radiother Oncol* 44: 123-136, 1997
- 3) Murray KJ, Scott C, Greenberg HM et al: A Randomized Phase III Study of Accelerated Hyperfractionation versus Standard in Patients with Unresectable Brain Metastases: A Report of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 9104. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39: 571-574, 1997
- 4) Bonner JA, McGinnis WL, Stella PJ et al: The Possible Advantage of Hyperfractionated Thoracic Radiotherapy in the Treatment of Locally Advanced Nonsmall Cell Lung Carcinoma. Results of a North Central Cancer Treatment Group Phase III Study. *Cancer* 82: 1037-1048, 1998
- 5) Overgaard J: The Current and Potential Role of Hyperthermia in Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16: 535-549, 1989
- 6) Petrovich Z, Langholz B, Gibbs FA et al: Regional Hyperthermia for Advanced Tumors: A Clinical Study of 353 Patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16: 601-607, 1989
- 7) Perez CA, Pajak T, Emami B et al: Randomized Phase III Study Comparing Irradiation and Hyperthermia with Irradiation Alone in Superficial Measurable Tumors. Final Report by the Radiation Therapy Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 14: 133-141, 1991
- 8) Valdagni R, Amichetti M: Report of Long-Term Follow-up in a Randomized Trial Comparing Radiation Therapy and Radiation Therapy plus Hyperthermia to Metastatic Lymphnodes in Stage IV Head and Neck Patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 28: 163-169, 1994
- 9) Overgaard J, Gonzalez D, Hulshof MCCM et al: RANdomized Trial of Hyperthermia as Adjuvant to Radiotherapy for Recurrent or Metastatic Malignant Melanoma. *Lancet* 345: 540-

- 10) Vernon CC, Hand JW, Field SB et al: Radiotherapy with or without Hyperthermia in the Treatment of Superficial Localized Breast Cancer: Results from Five Randomized Controlled Trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35: 731-744, 1996
- 11) Hiraoka M, Jo S, Dodo Y et al: Clinical Results of Radiofrequency Hyperthermia Combined with Radiation in the Treatment of Radioresistant Cancers. *Cancer* 54: 2898-2904, 1984
- 12) Myerson RJ, Scott CB, Emami B et al: A Phase I/II Study to Evaluate Radiation Therapy and Hyperthermia for Deep-Seated Tumours: A Report of RTOG 89-08. *Int J Hyperthermia* 12: 449-459, 1996
- 13) Urtasun R, Band P, Chapman JD et al: Radiation and High-Dose Metronidazole in Supratentorial Glioblastomas. *N Engl J Med* 294: 1363-1367, 1976
- 14) Overgaard J, Hansen HS, Andersen AP et al: Misonidazole Combined with Split-Course Radiotherapy in the Treatment of Invasive Carcinoma of Larynx and Pharynx: Report from the DAHANCA 2 Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16: 1065-1068, 1989
- 15) Dische S, Chassagne D, Hope-Stone HF et al: A Trial of Ro 03-8799 (Pimonidazole) in Carcinoma of the Uterine Cervix: An Interim Report from the Medical Research Council Working Party on Advanced Carcinoma of the Cervix. *Radiother Oncol* 26: 93-103, 1993
- 16) Lee DJ, Cosmatos D, Marcial VA et al: Results of an RTOG Phase III Trial (RTOG 85-27) Comparing Radiotherapy plus Etanidazole with Radiotherapy Alone for Locally Advanced Head and Neck Carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32: 567-576, 1995
- 17) Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M et al: A Randomized Double-Blind Phase III Study of Nimorazole as a Hypoxic Radiosensitizer of Primary Radiotherapy in Supraglottic Larynx and Pharynx Carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85. *Radiother Oncol* 46: 135-146, 1998
- 18) Doherty N, Hancock SL, Kaye S et al: Muscle Cramping in Phase I Clinical Trials of Tirapazamine (SR 4233) with and without Radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29: 379-382, 1994
- 19) Huilgol NG, Chatterjee N, Mehta AR: An Overview of the Initial Experience with AK-2123 as

- a Hypoxic Cell Sensitizer with Radiation in the Treatment of Advanced Head and Neck Cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34: 1121-1124, 1996
- 20) Shibamoto Y, Ohshio G, Hosotani R et al: A Phase I/II Study of a Hypoxic Cell Radiosensitizer KU-2285 in Combination with Intraoperative Radiotherapy. *Br J Cancer* 76: 1474-1479, 1997
- 21) Saunders MI, Hoskin P, Pigott K et al: Accelerated Radiotherapy, Carbon and Nicotiamide (ARCON) in Locally Advanced Head and Neck Cancer: A Feasibility Study. *Radiother Oncol* 45: 159-166, 1997
- 22) Milano G, Troger V, Courdi A et al: Pharmacokinetics of Cisplatin Given at a Daily Low Dose as a Radiosensitizer. *Cancer Chemother Pharmacol* 27: 55-59, 1990
- 23) Schaake-Koning C, Maat B, van Houtte P et al: Radiotherapy Combined with Low-Dose Cis-Diammine Dichloroplatinum (II) (CDDP) in Inoperable Nonmetastatic Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Randomized Three Arm Phase II Study of the EORTC Lung Cancer and Radiotherapy Cooperative Groups. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19: 967-972, 1990
- 24) Trovó MG, Minatel E, Franchin G et al: Radiotherapy versus Radiotherapy Enhanced by Cisplatin in Stage III Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 24: 11-15, 1992
- 25) Jeremic B, Shibamoto Y, Stanisavljevic B et al: Radiation Therapy Alone or with Concurrent Low-Dose Daily Either Cisplatin or Carboplatin in Locally Advanced Unresectable Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Prospective Randomized Trial. *Radiother Oncol* 43: 29-37, 1997
- 26) Patt HM, Tyree EB, Straube RL et al: Cysteine Protection against X Irradiation. *Science* 110: 213-218, 1949
- 27) Utley JF, Marlowe C, Waddell WJ: Distribution of ³⁵S-Labeled WR-2721 in Normal and Malignant Tissues of the Mouse. *Radiat Res* 68: 284-291, 1976
- 28) 大島敏美, 築山 巖, 三尾明彦ほか: 二重盲検法による放射線治療の副作用に対するチス테인製剤の臨床的研究. *日本医放会誌* 37: 444-462, 1977

- 29) Kligerman MM, Liu T, Liu Y et al: Interim Analysis of a Randomized Trial of Radiation Therapy of Rectal Cancer with/without WR-2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22: 799-802, 1992
- 30) McDonald S, Meyerowitz C, Smudzin T et al: Preliminary Results of a Pilot Study Using WR-2721 before Fractionated Irradiation of the Head and Neck to Reduce Salivary Gland Dysfunction. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29: 747-754, 1994
- 31) Groover TA, Christie AC, Merritt EA: Observations on the Use of the Copper Filter in the Roentgen Treatment of Deep-Seated Malignancies. *South Med J* 15: 440-444, 1922
- 32) Movsas B, Raffin TA, Epstein AH et al: Pulmonary Radiation Injury. *Chest* 111: 1061-1076, 1997
- 33) Jennings FL, Arden A: Development of Experimental Radiation Pneumonitis. *Arch Pathol* 71: 437-446, 1961
- 34) Phillips TL: An Ultrastructural Study of the Development of Radiation Injury in the Lung. *Radiology* 87: 49-54, 1966
- 35) Leroy EP, Liebner EJ, Jensik RJ: The Ultrastructure of Canine Alveoli after Supervoltage Irradiation of the Thorax. I. Lesions of the Latent Period. *Lab Invest* 15: 1544-1558, 1966
- 36) Adamson IYR, Bowden DH, Wyatt JP: A Pathway to Pulmonary Fibrosis: An Ultrastructural Study of Mouse and Rat Following Radiation to the Whole Body and Hemithorax. *Am J Pathol* 58: 481-498, 1970
- 37) Phillips TL, Margolis L: Radiation Pathology and the Clinical Response of Lung and Esophagus. *Front Radiat Ther Oncol* 6: 254-273, 1972
- 38) Maisin JR: The Influence of Radiation on Blood Vessels and Circulation. Chapter III. Ultrastructure of the Vessel Wall. *Curr Top Radiat Res Q* 10: 29-57, 1974
- 39) Gross NJ: Pulmonary Effects of Radiation Therapy. *Ann Intern Med* 86: 81-92, 1977
- 40) Travis EL, Harley RA, Fenn JO et al: Pathologic Changes in the Lung Following Single and Multi-Fraction Irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2: 475-490, 1977
- 41) Gross NJ: The Pathogenesis of Radiation-Induced Lung Damage. *Lung* 159: 115-125, 1981

- 42) Penney DP, Siemann DW, Rubin P et al: Morphologic Changes Reflecting Early and Late Effects of Irradiation of the Distal Lung of the Mouse: A Review. *Scan Electron Microsc I*: 413-425, 1982
- 43) Sharplin J, Franko AJ: A Quantitative Histological Study of Strain-Dependent Differences in the Effects of Irradiation on Mouse Lung during the Intermediate and Late Phases. *Radiat Res* 119: 15-31, 1989
- 44) Morgan GW, Pharm B, Breit SN: Radiation and the Lung: A Reevaluation of the Mechanisms Mediating Pulmonary Injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 361-369, 1995
- 45) McDonald S, Rubin P, Phillips TL et al: Injury to the Lung from Cancer Therapy: Clinical Syndromes, Measurable Endpoints, and Potential Scoring Systems. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 1187-1203, 1995
- 46) Nonn RA, Gross NJ: Effects of Radiation on the Lung. *Curr Opin Pulm Med* 2: 390-395, 1996
- 47) Penney DP, Rubin P: Specific Early Fine Structural Changes in the Lung Following Irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2: 1123-1132, 1977
- 48) Rubin P, Shapiro DL, Finkelstein JN et al: The Early Release of Surfactant Following Lung Irradiation of Alveolar Type II Cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6: 75-77, 1980
- 49) Gross NJ: Experimental Radiation Pneumonitis. IV. Leakage of Circulatory Proteins onto the Alveolar Surface. *J Lab Clin Med* 95: 19-31, 1980
- 50) Penney DP, Shapiro DL, Rubin P et al: Effects of Radiation on the Mouse Lung and Potential Induction of Radiation Pneumonitis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 37: 327-336, 1981
- 51) Ts'ao CH, Ward WF, Port CD: Radiation Injury in Rat Lung. I. Prostacyclin (PGI₂) Production, Arterial Perfusion, and Ultrastructure. *Radiat Res* 96: 284-293, 1983
- 52) Ward WF, Solliday NH, Molteni A et al: Radiation Injury in Rat Lung. II. Angiotensin-Converting Enzyme Activity. *Radiat Res* 96: 294-300, 1983
- 53) Ts'ao CH, Ward WF, Port CD: Radiation Injury in Rat Lung. III. Plasminogen Activator and

Fibrinolytic Inhibitor Activities. *Radiat Res* 96: 301-308, 1983

- 54) Ward WF, Sharplin J, Franko AJ et al: Radiation-Induced Pulmonary Endothelial Dysfunction and Hydroxyproline Accumulation in Four Strains of Mice. *Radiat Res* 120: 113-120, 1989
- 55) Rubin P, Finkelstein J, Shapiro D: Molecular Biology Mechanisms in the Radiation Induction of Pulmonary Injury Syndromes: Interrelationship between the Alveolar Macrophage and the Septal Fibroblast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 24: 93-101, 1992
- 56) Rödemann HP, Bamberg M: Cellular Basis of Radiation-Induced Fibrosis. *Radiother Oncol* 35: 83-90, 1995
- 57) Burger A, Löffler H, Bamberg M et al: Molecular and Cellular Basis of Radiation Fibrosis. *Int J Radiat Biol* 73: 401-408, 1998
- 58) Ignatz RA, Endo T, Massague J: Regulation of Fibronectin and Type I Collagen mRNA Levels by Transforming Growth Factor- β . *J Biol Chem* 262: 6443-6446, 1987
- 59) Ignatz RA, Massague J: Transforming Growth Factor- β Stimulates the Expression of Fibronectin and Collagen and Their Incorporation into the Extracellular Matrix. *J Biol Chem* 261: 4337-4345, 1986
- 60) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK et al: Transforming Growth Factor Type β : Rapid Induction of Fibrosis and Angiogenesis *in Vivo* and Stimulation of Collagen Formation *in Vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4167-4171, 1986
- 61) Fine A, Goldstein RH: The Effect of Transforming Growth Factor- β on Cell Proliferation and Collagen Formation by Lung Fibroblasts. *J Biol Chem* 262: 3897-3902, 1987
- 62) Hoyt DG, Lazo JS: Alterations in Pulmonary mRNA Encoding Procollagens, Fibronectin and Transforming Growth Factor- β Precede Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 246: 765-771, 1988
- 63) Ancher MS, Peters WP, Reisenbichler H et al: Transforming Growth Factor β as a Predictor of Liver and Lung Fibrosis after Autologous Bone Marrow Transplantation for Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 328: 1592-1598, 1993
- 64) Hoyt DG, Lazo JS: Early Increases in Pulmonary mRNA Encoding Procollagens Transforming

Growth Factor- β in Mice Sensitive to Cyclophosphamide-Induced Pulmonary Fibrosis.

J Pharmacol Exp Ther 249: 38-43, 1989

- 65) Khalil N, Bereznay O, Sporn M et al: Macrophage Production of Transforming Growth Factor Beta and Fibroblast Collagen Synthesis in Chronic Pulmonary Inflammation. J Exp Med 170: 727-737, 1989
- 66) Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV et al: Transforming Growth Factor β 1 Is Present at Sites of Extracellular Matrix Gene Expression in Human Pulmonary Fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA 88: 6642-6646, 1991
- 67) Anscher MS, Murase T, Prescott DM et al: Changes in Plasma TGF β Levels during Pulmonary Radiotherapy as a Predictor of the Risk of Developing Radiation Pneumonitis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 30: 671-676, 1994
- 68) Anscher MS, Kong FM, Marks LB et al: Changes in Plasma Transforming Growth Factor Beta during Radiotherapy and the Risk of Symptomatic Radiation-Induced Pneumonitis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 37: 253-258, 1997
- 69) Bai YH, Wang DW, Cui XM et al: Expression of Transforming Growth Factor β in Radiation Interstitial Pneumonitis. J Environ Pathol Toxicol Oncol 16: 15-20, 1997
- 70) Anscher MS, Crocker IR, Jirtle RL: Transforming Growth Factor- β 1 Expression in Irradiated Liver. Radiat Res 122: 77-85, 1990
- 71) Finkelstein JN, Johnston CJ, Baggs R et al: Early Alterations in Extracellular Matrix and Transforming Growth Factor β Gene Expression in Mouse Lung Indicative of Late Radiation Fibrosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 28: 621-631, 1994
- 72) Rubin P, Johnston CJ, Williams JP et al: A Perpetual Cascade of Cytokines Postirradiation Leads to Pulmonary Fibrosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 33: 99-109, 1995
- 73) Kawana A, Shioya S, Katoh H et al: Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 and Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 on Alveolar Macrophages in the Acute Stage of Radiation-Induced Lung Injury in Rats. Radiat Res 147: 431-436, 1997

- 74) 加藤博一, 川名明彦, 塩谷寿美恵ほか: 放射線肺傷害急性期におけるメチルプレドニゾロンの効果—接着分子LFA-1の検討—. 日胸疾会誌 34: 275-279, 1996
- 75) Brown RF: Effect of Cortisone on the Radiation Reaction of the Rat Lung. *Am J Roentgenol* 75: 796-806, 1956
- 76) Moss WT, Haddy FJ, Sweany SK: Some Factors Altering the Severity of Acute Radiation Pneumonitis: Variation with Cortisone, Heparin, and Antibiotics. *Radiology* 75: 50-54, 1960
- 77) Phillips TL, Wharam MD, Margolis LW: Modification of Radiation Injury to Normal Tissues by Chemotherapeutic Agents. *Cancer* 35: 1678-1684, 1975
- 78) Evans ML, Graham MM, Mahler PA et al: Use of Steroids to Suppress Vascular Response to Radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13: 563-567, 1987
- 79) Gross NJ, Narine KR, Wade R: Protective Effect of Corticosteroids on Radiation Pneumonitis in Mice. *Radiat Res* 113: 112-119, 1988
- 80) Gross NJ, Narine KR: Experimental Radiation Pneumonitis. Corticosteroids Increase the Replicative Activity of Alveolar Type 2 Cells. *Radiat Res* 115: 543-549, 1988
- 81) Loyd JE, Bolds JM, Wickersham N et al: Corticosteroids Prevent Acute Lung Dysfunction Caused by Thoracic Irradiation in Unanesthetized Sheep. *Am Rev Respir Dis* 138: 1227-1233, 1988
- 82) Wesselius LJ, Floreani AA, Kimler BF et al: Effect of Corticosteroid Treatment on Cell Recovery by Lung Lavage in Acute Radiation-Induced Lung Injury. *Radiat Res* 120: 313-322, 1989
- 83) Graham MM, Evans ML, Dahlen DD et al: Pharmacological Alteration of the Lung Vascular Response to Radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19: 329-339, 1990
- 84) 久禮文雄: 放射線肺障害に対するメチルプレドニゾロンと小柴胡湯の抑制効果の研究. 日本医放会誌 52: 96-103, 1992
- 85) Ward HE, Kemsley L, Davies L et al: The Effect of Steroids on Radiation-Induced Lung Disease in the Rat. *Radiat Res* 136: 22-28, 1993
- 86) Boys F, Harris ID: The Effect of Heparinization on Experimental Post-Irradiation Tissue

Changes in the Lung. *Am J Roentgenol Radium Ther* 50: 1-8, 1943

- 87) Tyree EB, Glicksman AS, Nickson JJ: Effect of L-Triiodothyronine on Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis in Dogs. *Radiat Res* 28: 30-36, 1966
- 88) Percarpio B, Fischer JJ: Beta-Aminopropionitrile as a Radiation Reaction Preventive Agent. *Radiology* 121: 737-740, 1976
- 89) Dubrawsky C, Dubrawsky NB, Withers HR: The Effect of Colchicine on the Accumulation of Hydroxyproline and on Lung Compliance after Irradiation. *Radiat Res* 73: 111-120, 1978
- 90) 大野正人, 松浦啓一, 中川英二ほか: デキストラン硫酸の放射線肺障害に対する効果について—臨床及び実験病理学的検討—. *日胸疾会誌* 16: 756-763, 1978
- 91) 大野正人: デキストラン硫酸経口投与による放射線肺障害の軽減に関する実験的検討. *福岡医学誌* 75: 575-593, 1984
- 92) Ward WF, Shih-Hoellwarth A, Port CD et al: Modification of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats. *Radiology* 131: 751-758, 1979
- 93) Ward WF: Radiation-Induced Pulmonary Arterial Perfusion Defects: Modification by D-Penicillamine. *Radiology* 139: 201-204, 1981
- 94) Ward WF, Shih-Hoellwarth A, Pearlman HG et al: Whole-Thorax Radiation Lethality in Penicillamine-Treated Mice. *Radiat Res* 90: 321-329, 1982
- 95) Port CD, Ward WF: The Ultrastructure of Radiation Injury in Rat Lung: Modification by D-Penicillamine. *Radiat Res* 92: 61-82, 1982
- 96) Ward WF, Shih-Hoellwarth A, Tuttle RD: Collagen Accumulation in Irradiated Rat Lung: Modification by D-Penicillamine. *Radiology* 146: 533-537, 1983
- 97) Ward WF, Molteni A, Ts'ao CH et al: Functional Responses of the Pulmonary Endothelium to Thoracic Irradiation in Rats: Differential Modification by D-Penicillamine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13: 1505-1513, 1987
- 98) Travis EL, Parkins CS, Holmes SJ et al: WR-2721 Protection of Pneumonitis and Fibrosis in Mouse Lung after Single Doses of X Rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 243-251, 1984
- 99) Travis EL, Meistrich ML, Finch-Neimeyer MV et al: Late Functional and Biochemical Changes

- in Mouse Lung after Irradiation: Differential Effects of WR-2721. *Radiat Res* 103: 219-231, 1985
- 100) Travis EL, De Luca AM: Protection of Mouse Lung by WR-2721 after Fractionated Doses of Irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11: 521-526, 1985
- 101) Travis EL, Newman RA, Helbing SJ: WR 2721 Modification of Type II Cell and Endothelial Cell Function in Mouse Lung after Single Doses of Radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13: 1355-1359, 1987
- 102) Shimizu F, Okawa T, Inomata T et al: Protective Effect of Nimustine Hydrochloride against Radiation-Induced Pulmonary Injury in Mice. *Jpn J Cancer Res* 78: 1420-1425, 1987
- 103) Ward WF, Kim YT, Molteni A et al: Radiation-Induced Pulmonary Endothelial Dysfunction in Rats: Modification by an Inhibitor of Angiotensin Converting Enzyme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 15: 135-140, 1988
- 104) Ward WF, Molteni A, Ts'ao CH: Radiation-Induced Endothelial Dysfunction and Fibrosis in Rat Lung: Modification by the Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor CL242817. *Radiat Res* 117: 342-350, 1989
- 105) Ward WF, Molteni A, Ts'ao CH et al: Captopril Reduces Collagen and Mast Cell Accumulation in Irradiated Rat Lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19: 1405-1409, 1990
- 106) Ward WF, Molteni A, Ts'ao CH et al: Radiation Pneumotoxicity in Rats: Modification by Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22: 623-625, 1992
- 107) Malaker K, Das RM: Effect of Superoxide Dismutase on Early Radiation Injury of Lungs in the Rat. *Mol Cell Biochem* 84: 141-145, 1988
- 108) Malaker K, Das RM: The Effect of Superoxide Dismutase on the Pathogenesis of Radiation-Induced Pulmonary Damage in the Rat. *Pharmacol Ther* 39: 327-330, 1988
- 109) Breuer R, Töchner Z, Conner MW et al: Superoxide Dismutase Inhibits Radiation-Induced Lung Injury in Hamsters. *Lung* 170: 19-29, 1992
- 110) Epperly M, Bray J, Kraeger S et al: Prevention of Late Effects of Irradiation Lung Damage by Manganese Superoxide Dismutase Gene Therapy. *Gene Ther* 5: 196-208, 1998

- 111) Shen Y, Yang XY, Zhan QM et al: The Use of Chinese Herb Medicine in Experimental Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16: 347-352, 1989
- 112) 橋村孝久, 河野通雄, 今城吉成: 放射線肺臓炎の発症機序並びに予防に関する実験的研究—とくに脂質過酸化反応を中心として—. *日本医放会誌* 49: 335-343, 1989
- 113) Gross NJ, Holloway NO, Narine KR: Effects of Some Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agents on Experimental Radiation Pneumonitis. *Radiat Res* 127: 317-324, 1991
- 114) Orfanos SE, Chen XL, Burch SE et al: Radiation-Induced Early Pulmonary Endothelial Ectoenzyme Dysfunction *in Vivo*: Effect of Indomethacin. *Toxicol Appl Pharmacol* 124: 112-122, 1994
- 115) Ward WF, Kim YT, Molteni A et al: Pentoxifylline Does Not Spare Acute Radiation Reactions in Rat Lung and Skin. *Radiat Res* 129: 107-111, 1992
- 116) Koh WJ, Stelzer KJ, Peterson LM et al: Effect of Pentoxifylline on Radiation-Induced Lung and Skin Toxicity in Rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 71-77, 1995
- 117) Bjermer L, Cai Y, Nilsson K et al: Tobacco Smoke Exposure Suppresses Radiation-Induced Inflammation in the Lung: A Study of Bronchoalveolar Lavage and Ultrastructural Morphology in the Rat. *Eur Respir J* 6: 1173-1180, 1993
- 118) Rosiello RA, Merrill WW, Rockwell S et al: Radiation Pneumonitis. Bronchoalveolar Lavage Assessment and Modulation by a Recombinant Cytokine. *Am Rev Respir Dis* 148: 1671-1676, 1993
- 119) Fuks Z, Persaud RS, Alfieri A et al: Basic Fibroblast Growth Factor Protects Endothelial Cells against Radiation-Induced Programmed Cell Death *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Res* 54: 2582-2590, 1994
- 120) Tee PG, Travis EL: Basic Fibroblast Growth Factor Does Not Protect against Classical Radiation Pneumonitis in Two Strains of Mice. *Cancer Res* 55: 298-302, 1995
- 121) Thresiamma KC, George J, Kuttan R: Protective Effect of Curcumin, Ellagic Acid and Bixin on Radiation Induced Toxicity. *Indian J Exp Biol* 34: 845-847, 1996
- 122) Yi ES, Williams ST, Lee H et al: Keratinocyte Growth Factor Ameliorates Radiation- and

- Bleomycin-Induced Lung Injury and Mortality. *Am J Pathol* 149: 1963-1970, 1996
- 123) Bai Y, Wang D, Cui X et al: Preventive Effects of Selenium-Enriched Spiruline (SESP) on Radiation Pneumonitis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 17: 159-163, 1998
- 124) Macht SH, Perlberg H Jr: Use of Anticoagulant (Dicumarol) in Preventing Post-Irradiation Tissue Changes in the Human Lung. *Am J Roentgenol Radium Ther* 63: 335-341, 1950
- 125) Whitfield AGW, Bond WH: The Prevention of Radiation Lung Damage. *Clin Radiol* 10: 181-185, 1959
- 126) Chen LB, Buchanan JM: Mitogenic Activity of Blood Components. I. Thrombin and Prothrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 131-135, 1975
- 127) Pohjanpelto P: Proteases Stimulate Proliferation of Human Fibroblasts. *J Cell Physiol* 91: 387-392, 1977
- 128) Carney DH, Glenn KC, Cunningham DD: Conditions Which Affect Initiation of Animal Cell Division by Trypsin and Thrombin. *J Cell Physiol* 95: 13-22, 1978
- 129) Pohjanpelto P: Stimulation of DNA Synthesis in Human Fibroblasts by Thrombin. *J Cell Physiol* 95: 189-194, 1978
- 130) Hendey B, Mamrack MD: Differential Response of Normal Human Fibroblasts to Bombesin Versus Thrombin. *J Cell Physiol* 136: 486-492, 1988
- 131) Gray AJ, Reeves JT, Harrison NK et al: Growth Factors for Human Fibroblasts in the Solute Remaining after Clot Formation. *J Cell Sci* 96: 271-274, 1990
- 132) Dawes KE, Gray AJ, Laurent GJ: Thrombin Stimulates Fibroblast Chemotaxis and Replication. *Eur J Cell Biol* 61: 126-130, 1993
- 133) Tani K, Yasuoka S, Ogushi F et al: Thrombin Enhances Lung Fibroblast Proliferation in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 34-40, 1991
- 134) 谷 憲治, 安岡 劭, 大串文隆ほか: プレオマイシン肺障害—肺線維化におけるトロンビンの意義について—線維芽細胞増殖因子として—. *日胸疾会誌* 29: 211-219, 1991
- 135) Ohba T, McDonald JK, Silver RM et al: Scleroderma Bronchoalveolar Lavage Fluid Contains Thrombin, a Mediator of Human Lung Fibroblast Proliferation via Induction of Platelet-Derived

Growth Factor α -Receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 405-412, 1994

- 136) Hernández-Rodríguez NA, Cambrey AD, Harrison NK et al: Role of Thrombin in Pulmonary Fibrosis. *Lancet* 346: 1071-1073, 1995
- 137) 上田祐二, 安岡 勲, 小倉 剛: セリンプロテアーゼの肺線維芽細胞増殖促進作用. *日胸疾会誌* 31: 1279-1284, 1993
- 138) Lopez-De Leon A, Rojkind M: A Simple Micromethod for Collagen and Total Protein Determination in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Sections. *J Histochem Cytochem* 33: 737-743, 1985
- 139) 菅間康夫, 北村 諭: プレオマイシン静注肺障害におけるアルファトロンビンの関与—マウスを用いた実験的研究—. *日本臨床生理学雑誌* 26: 381-387, 1996
- 140) Taní K, Ogushi F, Takahashi H et al: Thrombin Stimulates Platelet-Derived Growth Factor Release by Alveolar Macrophages in Rats—Significance in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis—. *J Med Invest* 44: 59-65, 1997
- 141) Harlan JM, Thompson PJ, Ross RR et al: α -Thrombin Induces Release of Platelet-Derived Growth Factor-Like Molecule(s) by Cultured Human Endothelial Cells. *J Cell Biol* 103: 1129-1133, 1986
- 142) Okazaki H, Majesky MW, Harker LA et al: Regulation of Platelet-Derived Growth Factor Ligand and Receptor Gene Expression by α -Thrombin in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 71: 1285-1293, 1992
- 143) Kanthou C, Parry G, Wijelath E et al: Thrombin-Induced Proliferation and Expression of Platelet-Derived Growth Factor-A Chain Gene in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *FEBS Lett* 314: 143-148, 1992
- 144) Shankar R, de la Motte CA, DiCorleto PE: Thrombin Stimulates PDGF Production and Monocyte Adhesion Through Distinct Intracellular Pathways in Human Endothelial Cells. *Am J Physiol* 262: C199-206, 1992
- 145) Soyombo AA, DiCorleto PE: Stable Expression of Human Platelet-Derived Growth Factor B

Chain by Bovine Aortic Endothelial Cells. J Biol Chem 269: 17734-17740, 1994

- 146) Bydlowski SP, Pares MM, Soares RP et al: Stimulation of Human Smooth Muscle Cell Proliferation by Thrombin Involves Increased Synthesis of Platelet-Derived Growth Factor. Chest 114: 236-240, 1998
- 147) 沢田みどり:放射線照射後の家兎肺における気管支肺胞洗浄液中の凝固線溶系の検討. 日胸疾会誌 31: 1515-1521, 1993
- 148) Taipale J, Koli K, Keski-Oja J: Release of Transforming Growth Factor- β 1 from the Pericellular Matrix of Cultured Fibroblasts and Fibrosarcoma Cells by Plasmin and Thrombin. J Biol Chem 267: 25378-25384, 1992
- 149) Bachhuber BG, Sarembock IJ, Gimble LW et al: α -Thrombin Induces Transforming Growth Factor- β 1 mRNA and Protein in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells via a Proteolytically Activated Receptor. J Vasc Res 34: 41-48, 1997
- 150) Sugama Y, Tiruppathi C, Offakidevi K et al: Thrombin-Induced Expression of Endothelial P-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1: A Mechanism for Stabilizing Neutrophil Adhesion. J Cell Biol 119: 935-944, 1992
- 151) Kaplanski G, Marin V, Fabrigoule M et al: Thrombin-Activated Human Endothelial Cells Support Monocyte Adhesion *in Vitro* Following Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1; CD 54) and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1; CD 106). Blood 92: 1259-1267, 1998
- 152) Bar-Shavit R, Kahn A, Fenton JW et al: Receptor-Mediated Chemotactic Response of a Macrophage Cell Line (J774) to Thrombin. Lab Invest 49: 702-707, 1983
- 153) Bar-Shavit R, Kahn AJ, Mann KG et al: Identification of a Thrombin Sequence with Growth Activity on Macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 83: 976-980, 1986
- 154) Bar-Shavit R, Kahn A, Mann KG et al: Growth-Promoting Effects of Esterolytically Inactive Thrombin on Macrophages. J Cell Biochem 32: 261-272, 1986
- 155) Thornton SC, Walsh BJ, Bennett S et al: Both *in Vitro* and *in Vivo* Irradiation Are Associated with Induction of Macrophage-Derived Fibroblast Growth Factors. Clin Exp Immunol 103:

67-73, 1996

- 156) 出辺達三, 安田慶秀, 三島好雄ほか: 慢性動脈閉塞症に対する抗トロンビン薬argipidine (MD-805) の治療成績—Ticlopidineとの二重盲検比較試験—. 循環器科 22: 185-202, 1987
- 157) 田崎義昭, 小林祥泰, 東儀英夫ほか: 脳血栓症急性期に対する抗トロンビン薬MD-805 の臨床的有用性. プラセボを対照とした多施設二重盲検群間比較試験. 医学のあゆみ 161: 887-907, 1992
- 158) 太田和夫, 越川昭三, 平沢由平ほか: アンチトロンビンⅢ欠乏症の血液透析者に対する MD-805 (アルガトロバン) の臨床的有用性に関する検討. 新薬と臨床 41: 971-983, 1992
- 159) Lewis BE, Iaffaldano R, McKiernan TL et al: Report of Successful Use of Argatroban as an Alternative Anticoagulant during Coronary Stent Implantation in a Patient with Heparin-Induced Thrombocytopenia and Thrombosis Syndrome. Cathet Cardiovasc Diagn 38: 206-209, 1996
- 160) Nakagawa K, Aoki Y, Kozuka T et al: Argatroban in the Treatment of Radiation Injury of the Hand: A Case Report. Curr Ther Res 58: 323-329, 1997
- 161) 鈴木紀夫: 放射線分割照射法の基礎 b. LQモデル理論と分割照射法. 大川智彦 (編) : 癌・放射線療法, 150-158, 1995
- 162) Kikumoto R, Tamao Y, Tezuka T et al: Selective Inhibition of Thrombin by (2R, 4R)-4-Methyl-1-[N²-[(3-methyl)-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinoliny] sulfonyl]-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic Acid. Biochemistry 23: 85-90, 1984
- 163) 長沢 洋, 福武勝幸, 羽田雅夫ほか: 合成抗トロンビン剤MD-805の第一相試験—単回および連続投与試験—. 臨床薬理 12: 359-375, 1981

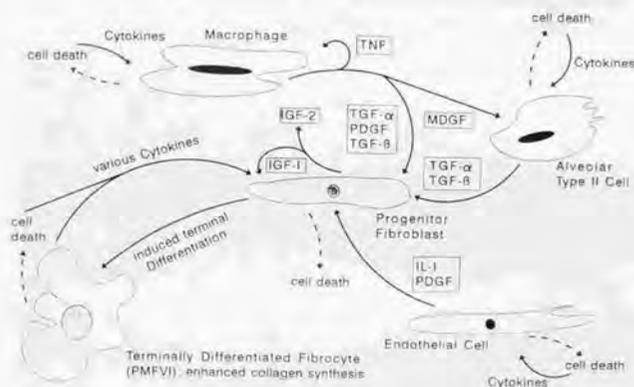
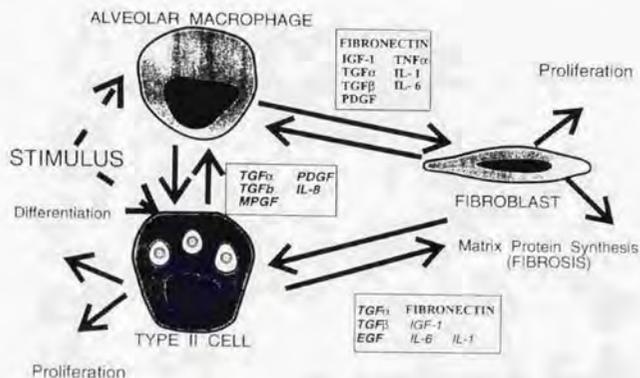


図1 細胞間のサイトカインモデル

上段：Rubinらの提唱したモデル（文献72より引用）

下段：Rodemannらの提唱したモデル（文献56より引用）



図2 ラットの照射野
右肺全体を含むような縦4cm×横3cmの
照射野で、15MeV電子線を用いて、1回で
10～20Gyを照射した。

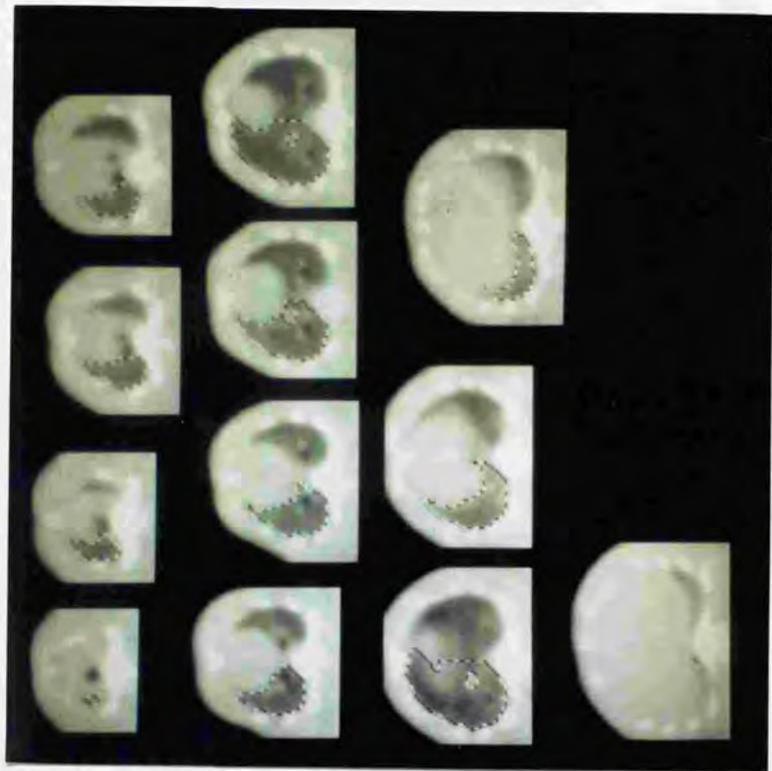
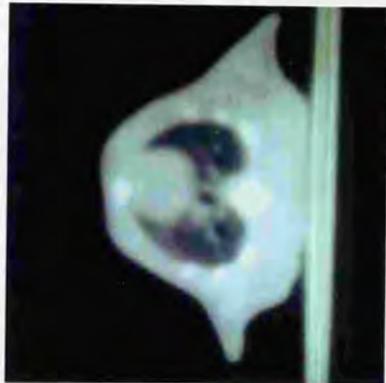


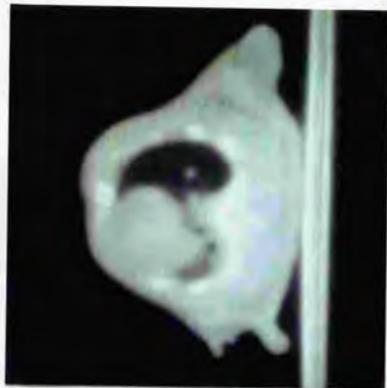
図3 CT値算出のための関心領域の設定
この例では右肺全体に関心領域を設定している.



所見なし



軽度



重度

図4 CT所見の分類

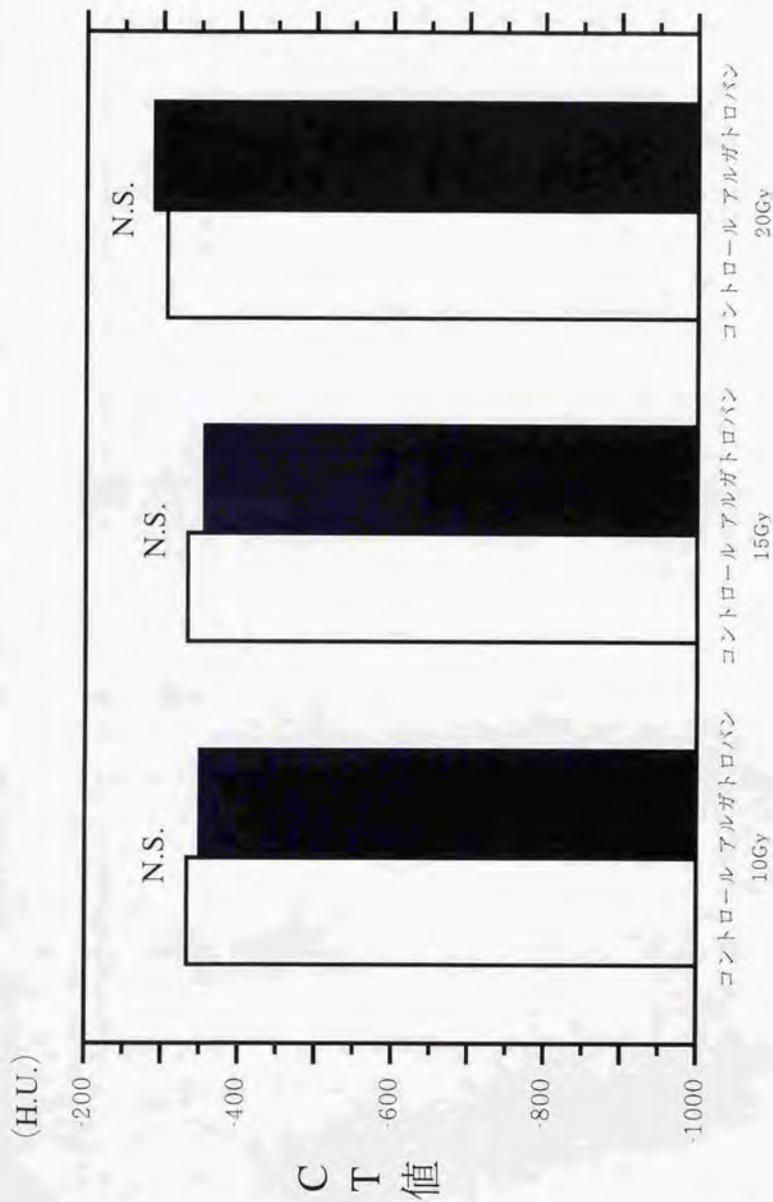


図5 CT 値の計測結果
 いずれの線量においても、有意差は認めなかった。

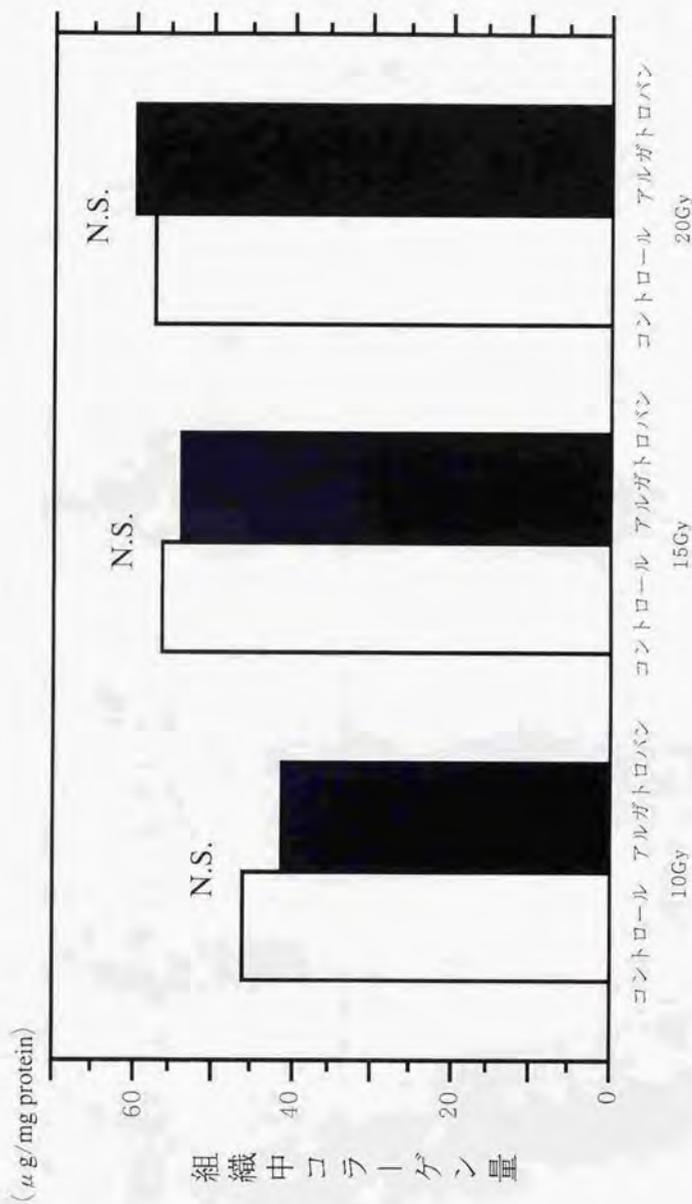


図6 組織中コラーゲン量の測定結果

いずれの線量においても、アルガトロボパンによる有意な抑制は認めなかった。

アルガトロバン

経過観察

第1日目 第28日目

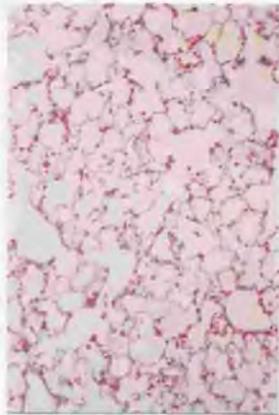
第135日目



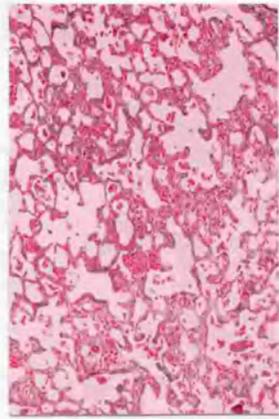
照射

屠殺

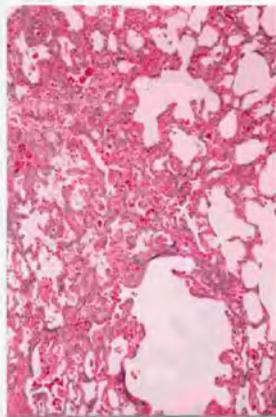
図7 本実験のプロトコール
照射後4週間にわたりアルガトロバンを投与した。
その後、経過観察していたが、照射134日後に屠殺した。



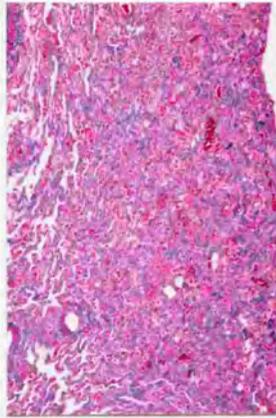
所見なし



軽度

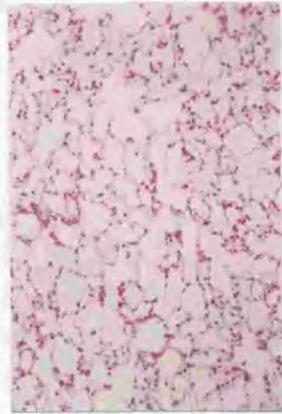


中等度

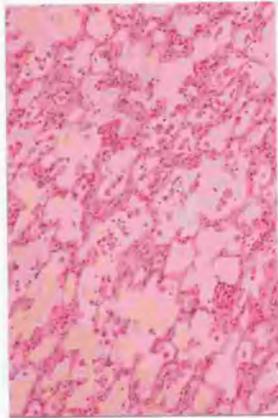


重度

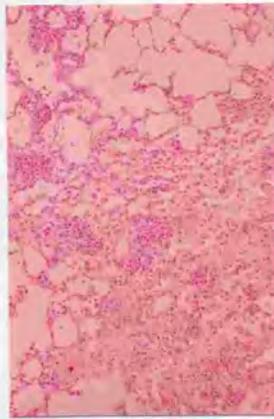
図8 線維化の組織学的所見
(アザン・マロリ一染色, $\times 144$)



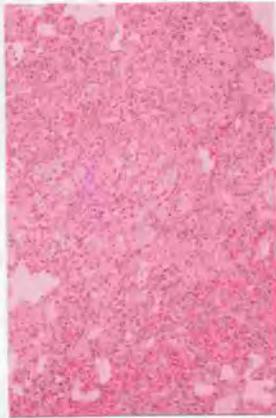
所見なし



軽度



中等度

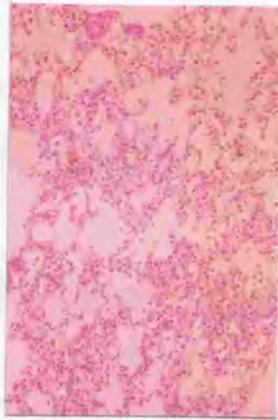


重度

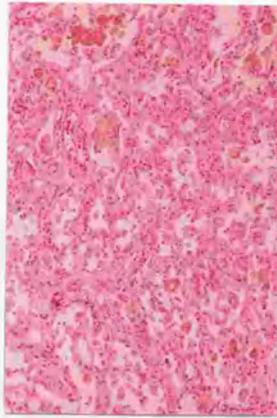
図9 泡沫マクロファージ浸潤の組織学的所見
(ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 144$)



所見なし

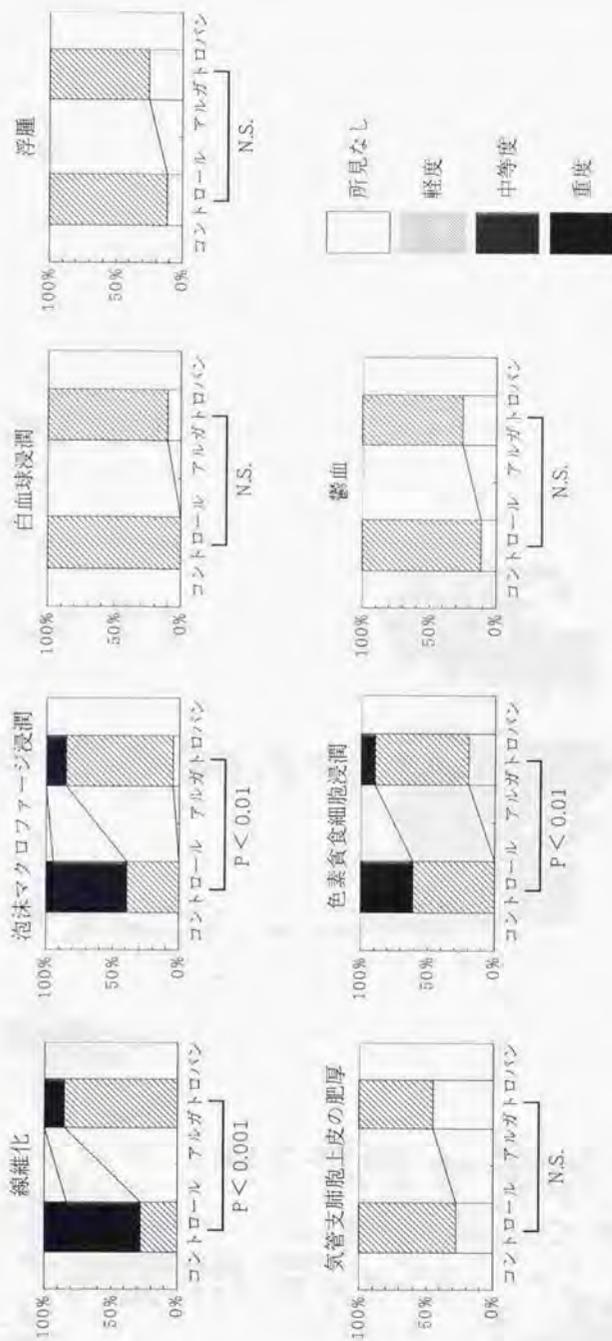


軽度



中等度

図10 色素貪食細胞浸潤の組織学的所見
(ヘマトキシリン・エオジン染色, $\times 144$)



N.S.: not significant
有意差なし

図 11 本実験の組織学的所見の結果

線維化, 泡沫マクロファージ浸潤, 色素貪食細胞浸潤において, アルガトロバン群は有意に抑制されていた。

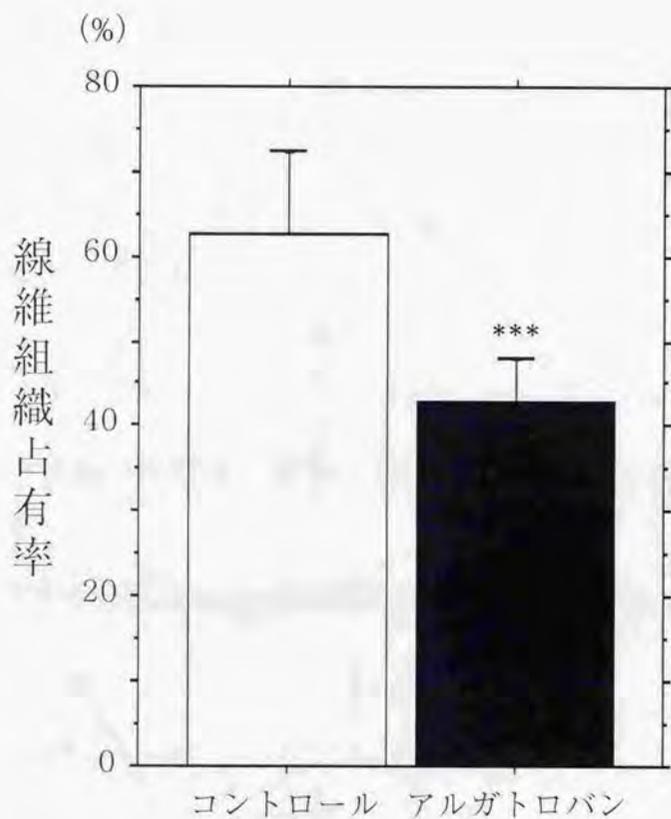


図 12 線維組織占有率の計測結果
膠原線維を表すアザン・マロリー染色での青染部分は、
アルガトロバン群にて有意に減少していた。
*** : $P < 0.0001$

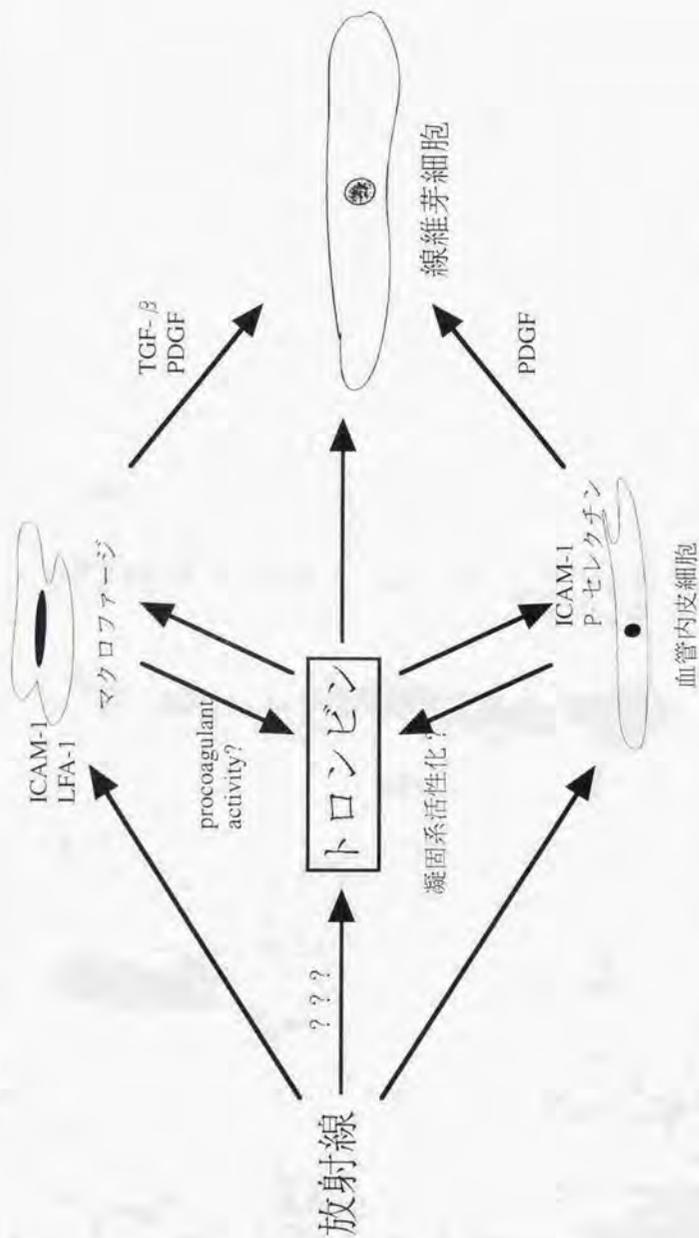


図13 放射線肺線維症に対するトロンビンが関与するカスケードのモデル
 ここでは明らかとなっている機能を組み合わせるにとどめたが、実際には非常に複雑であることは疑いない。

	10Gy		15Gy		20Gy	
	C	A	C	A	C	A
所見なし	7	2	7	6	1	2
軽度	1	0	3	2	4	1
重度	0	0	0	0	5	2
	(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)	

C: コントロール
A: アルガトロバン
N.S.: not significant
有意差なし

表1 予備実験 I のCT所見の結果

いずれの線量においても、有意な所見の変化は認めなかった。

10Gy	線維化		泡沫マクロ ファージ浸潤		マクロファージ 浸潤		リンパ球浸潤		鬱血	
	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A
所見なし	8	2	8	2	2	0	3	0	2	0
軽度	0	0	0	0	5	2	5	2	4	1
中等度	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1
重度	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)	
16Gy	線維化		泡沫マクロ ファージ浸潤		マクロファージ 浸潤		リンパ球浸潤		鬱血	
	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A
所見なし	5	6	0	1	5	5	0	1	1	3
軽度	4	1	7	6	3	1	7	6	4	1
中等度	0	0	2	0	1	1	2	0	1	3
重度	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
	(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)	
20Gy	線維化		泡沫マクロ ファージ浸潤		マクロファージ 浸潤		リンパ球浸潤		鬱血	
	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A
所見なし	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
軽度	7	0	6	4	9	3	9	5	3	3
中等度	3	4	4	1	1	2	1	0	1	2
重度	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
	(P<0.05)		(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)	

C:コントロール
A:アルガトロバン
N.S.: not significant
有意差なし

表2 予備実験 I の病理組織学的所見の結果
いずれの線量においても、アルガトロバン群で有意に抑制されている所見は認めなかった。

	線維化		泡沫マクロ ファージ浸潤		白血球浸潤		浮腫		出血		鬱血	
	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A
所見なし	6	8	8	8	4	6	11	6	11	7	6	6
軽度	5	3	3	3	7	5	0	5	0	4	5	4
中等度	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
重度	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)		(N.S.)	

C:コントロール
A:アルガトロパン
N.S.: not significant
有意差なし

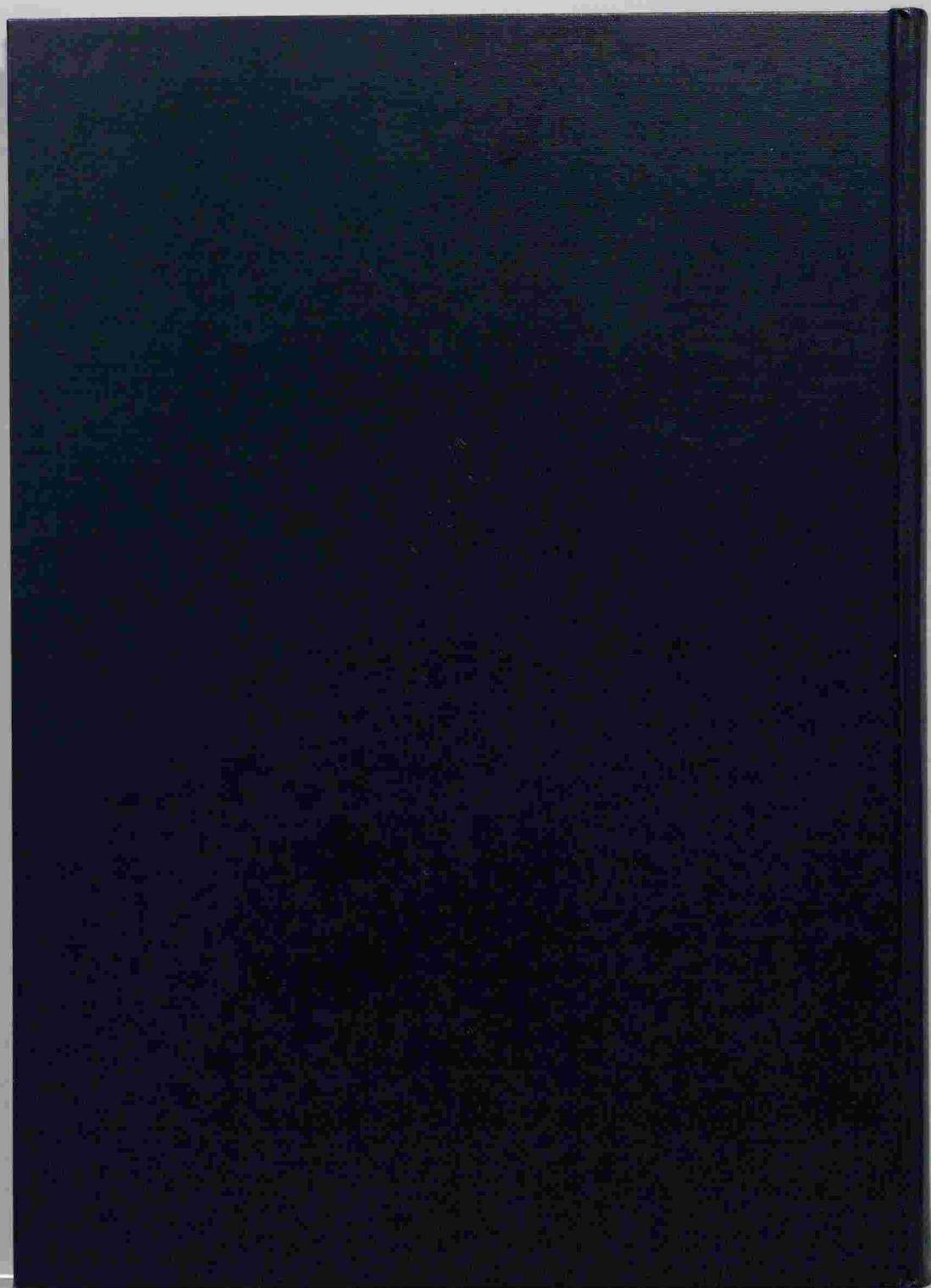
表3 予備実験IIの病理組織学的所見の結果
組織学的変化はいずれも軽度で、有意差も認められなかった。

	線維化		泡沫マクロ ファージ浸潤		白血球浸潤		浮腫	
	C	A	C	A	C	A	C	A
所見なし	0	0	0	1	0	2	2	5
軽度	5	17	7	16	18	18	16	15
中等度	10	3	10	3	0	0	0	0
重度	3	0	1	0	0	0	0	0
	(P<0.001)		(P<0.01)		(N.S.)		(N.S.)	

	気管支肺胞 上皮の肥厚		色素食 細胞浸潤		蓄血	
	C	A	C	A	C	A
所見なし	5	9	0	4	18	19
軽度	13	11	11	14	0	1
中等度	0	0	7	2	0	0
重度	0	0	0	0	0	0
	(N.S.)		(P<0.01)		(N.S.)	

C: コントロール
A: アルガトロパン
N.S.: not significant
有意差なし

表4 本実験の病理組織学的所見の結果
線維化、泡沫マクロファージ浸潤、色素食細胞浸潤において、アルガトロパン群は有意に抑制されていた。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

C Y M

© Kodak, 2007 TM, Kodak