



Title	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
Author(s)	久禮, 文雄
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1992, 52(1), p. 96-103
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/19244">https://hdl.handle.net/11094/19244</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 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

京都府立医科大学放射線医学教室（主任：村上晃一教授）

久 禮 文 雄

（平成3年9月6日受付特別掲載）

（平成3年11月11日最終原稿受付）

### The Radioprotective Effects of Methylprednisolone and Sho-Saikoto on Mouse Lung

Fumio Kure

Department of Radiology, Kyoto Prefectural University of Medicine  
(Director: Prof. Koichi Murakami)

Research Code No. : 404.3

Key Words : Lung fibrosis, Radiation pneumonia,  
Methylprednisolone, Sho-Saikoto

The radioprotective effects of methylprednisolone and Sho-Saikoto (a herbal medicine) on radiation damage to lung tissue were evaluated in four main groups of female Slc-ICR mice, one control group and three groups irradiated with single doses (6 Gy, 12 Gy, 18 Gy) of  $^{60}\text{Co}$  gamma rays. Subgroups were established with administration of methylprednisolone and Sho-Saikoto, alone and together.

Direct quantitative measurements of collagen accumulation in lung (lung fibrosis) were made by analysis of digitally processed microscopic images of Azan-Mallory stained sections 24 weeks after irradiation.

Administration of methylprednisolone suppressed the expected development of fibrotic lung tissue in each of the irradiated groups. In a further study, peplomycin, a lung fibrosis enhancing agent, was administered to all four groups in addition to methylprednisolone and Sho-Saikoto, alone and together. Methylprednisolone was demonstrated to be effective only in 12 Gy group. Overall, Sho-Saikoto showed a lesser degree of effect in the prevention of the fibrosis than methylprednisolone, but the administration of both was demonstrated to be more effective than either alone.

#### I. 緒 言

肺癌、食道癌、乳癌、縦隔腫瘍等の胸部領域の病巣に対する放射線治療の際、腫瘍の制御と共に問題になるのが照射野内に含まれる肺組織の障害である。

放射線肺障害は照射された肺組織の血管透過性の障害が基礎となって起こる<sup>1)~3)</sup>。急性障害として照射から数週間後に放射線肺炎が出現し、約6

カ月以降に慢性障害として肺纖維症に進展する<sup>4)</sup>。治療患者の多くは高齢であり、慢性的な呼吸器・循環器障害を持っていることも少なくない。また、放射線治療の際にしばしば併用される化学療法剤のいくつかは肺に対する副作用があり、照射によって増強されることがある<sup>5)</sup>。これらの場合は、高率かつ早期に放射線肺障害が起り易く、また照射野に含まれる肺組織が大きければ低線量

でも起こりうる<sup>4)</sup>。即ち、放射線治療患者は放射線肺障害に対して種々の危険因子をもつことが多い。放射線肺障害による諸症状は放射線治療の遂行に様々な困難をもたらす。そのため放射線に対する照射野内の正常肺組織の保護を如何に行うかが、放射線治療の遂行ひいては放射線治療の成績向上の大きな鍵となる。

放射線肺障害の改善・抑制目的で、メチルプレドニゾロンと生薬製剤でステロイド類似作用をもつ小柴胡湯をマウスに投与し、その効果を検討した。

ステロイドは抗炎症作用、抗浮腫作用があり、従来から放射線肺障害の治療・予防の目的で用いられてきており、実験的・臨床的に一定の効果が報告してきた<sup>5)~10)</sup>。しかしその評価方法は、スペイロメーター<sup>11)</sup>を用いたり、呼吸数の変化<sup>12)</sup>をみる生理学的な方法、X線CTで肺組織のdensity<sup>13)</sup>の変化を計測する物理的な方法、肺組織の主な構成成分であるヒドロキシプロリン<sup>14)</sup>を定量する生化学的な方法等であり、顕微鏡像で認められる肺組織の構成要素の変化、病理学的形態変化をそのまま反映したものではなかった。今回、顕微鏡像を画像解析処理<sup>15)~17)</sup>することで肺組織に対する線維組織の増生の変化を直接的に定量評価し、メチルプレドニゾロンと小柴胡湯の効果を判定することができたので報告する。

## II. 実験材料と方法

### 1) 実験動物

Slc/ICR系マウス、雌、7週齢(船橋農場、京都)を用いた。搬入後1週間観察飼育し8週齢に達した後、実験に供した。この時の平均体重は31gであった。総数は768匹である。4週、8週、16週、24週後屠殺の4群に分けた。各群192匹をペロマイシンの投与群96匹、非投与群96匹の2群に分割し、各々を更に照射単独群24匹、照射及びメチルプレドニゾロン投与群24匹、照射及び小柴胡湯投与群24匹、照射及びメチルプレドニゾロン・小柴胡湯投与群24匹に分けた。

### 2) 照射方法

ネンプタール(ペントバルビタールナトリウム、ダイナボット社、大阪)0.03mg/b.w.g.の腹腔内

投与による麻酔後、コバルト-60遠隔照射装置(RTGS60、島津製作所、京都)によるコバルト-60 $\gamma$ 線(線量率3.35Gy/min,  $\gamma$ -METER MODEL570, THE VICTOREEN INSTRUMENT DIV., USAで測定)を用い、マウス全肺を照射した。照射線量は6Gy, 12Gy, 18Gyである。

### 3) 投与薬剤

ペロマイシン(日本化薬、東京)は0.02mg/b.w.g.、メチルプレドニゾロン(日本アップジョン、東京)は0.03mg/b.w.g.、を各々照射直前に腹腔内に一回投与した。小柴胡湯(ツムラ、東京)は1日1回0.9mg/b.w.g.をフレキシブル経口ゾンデ(MZ-1、日本クレア、東京)を用い、照射当日から連続14日間の経口投与を行った。

### 4) 画像解析方法

照射後、4, 8, 16, 24週で屠殺し、両肺を標本固定した。染色にはAzan-Mallory染色を用い、膠原線維を青染して観察した。対象画像は400倍光学顕微鏡像とした。気管支及び動静脈は、それ自身の壁や周囲の支持組織に大量の膠原線維を有しており、照射による変化が強いので対象から除外し、肺胞組織で構成される視野を設定した。

得られた光学顕微鏡像を高解像度CCDカラービデオカメラ(ソニー、東京)で撮像し、画像解析処理装置:NEXUS6500(ネクサス社、東京)で画像処理した後、端末カラーCRT(ソニー、東京)に画像表示した。この装置に表示された画像は8ビット512×480ピクセルから構成されており、一つのピクセルの色はそれぞれ256階調に分解されたRed(R), Green(G), Blue(B)の3原色の合成として示される。即ちすべての色は、例えばColor Index(R, G, B)=(078, 117, 179)というように3原色の階調指定をされることになり、色調の似かよった色同士を弁別しうる。NEXUS6500は、その階調指定された色をもつピクセルをピックアップし、その数をカウントすることができるるので、ひとつの画像中の2つの色の占める面積比はピクセル数の比として表されることになる。

実際には先ず、NEXUS6500により解析処理された画像をCRTに表示した(Fig. 1)。次に、視

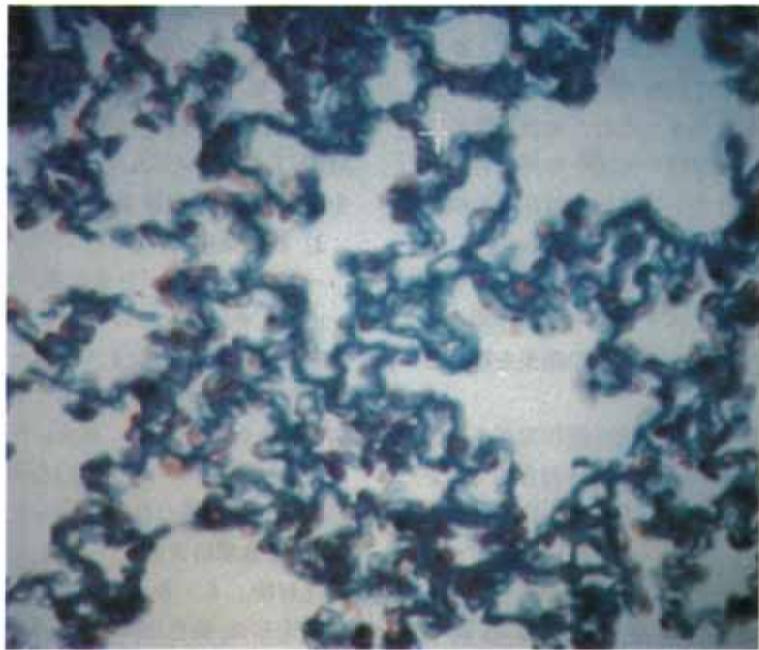


Fig. 1 Digitally processed microscopic image (Nexus 6500 Image Analyzer) of irradiated mouse lung (16 weeks after 6Gy irradiation with no agents administered).

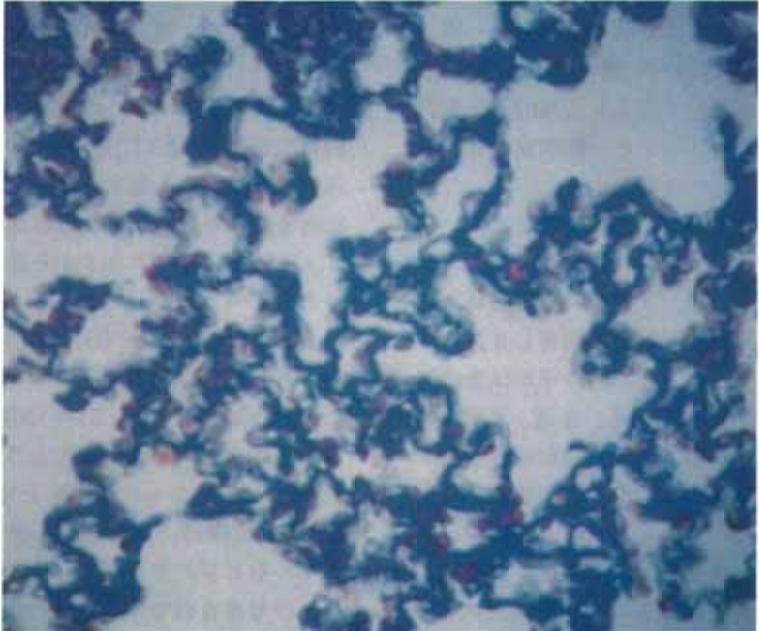


Fig. 2 First step of the image analysis, Fig. 1. The colors of the collagen fibers were all converted into pure blue, as indicated by the color index (0, 0, 256)

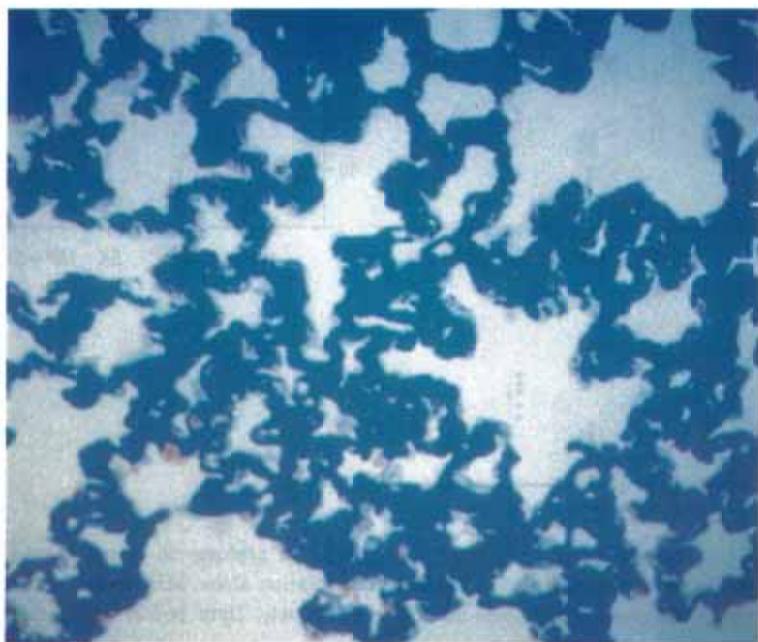


Fig. 3 Second step of the image analysis, Fig. 1. The colors of the whole lung tissue were converted into pure blue.

野内の膠原線維に相当する青色のピクセルをディジタイザで指定した。例えば(088, 119, 188), (091, 114, 179), (082, 121, 177)の3個のピクセルを選ぶと(082~091, 114~121, 177~188)に該当する全てのピクセルが拾い出される。つまり、指定された全てのピクセルのR, G, Bの各階調の幅のなかに含まれる色調のピクセルが拾い出されるのである。拾い出されたピクセル群はそのままでは未処理のピクセルと鑑別がつかないので、すべて(0, 0, 255)または(255, 0, 0)階調をもつ色に変換することで、解析処理装置に記憶される。これらの色は純青または純赤とでもいいくべきもので、現実には存在しないので他の色と混同されることはない。本論文では(0, 0, 255)を用いて処理した。同一視野内でも膠原線維は染色の程度により様々な色調の青で表現されるので、膠原線維と認められる部位についてはすべてこの操作を繰り返すことにより、膠原線維の色をすべて(0, 0, 255)のColor Indexをもつ色に変換し、そのピクセル数をカウントした(Fig.

2)。そして肺胞組織の残りの部分をすべて(0, 0, 255)の色に変換して、先の膠原線維の部分と併せれば肺胞組織全体が(0, 0, 255)の階調になる(Fig. 3)。このときの(0, 0, 255)の階調をもつピクセル数は肺胞組織全体を示しているので、前の膠原線維のピクセル数とこのピクセル数との比が、肺胞組織に対する膠原線維の面積比を表す。この面積比を線維組織占有率(Fibrous tissue occupation rate, FOR)とした。

ひとつのマウス肺について、肺上部・中部・下部の3カ所を選び、1カ所につき3つの視野を設定し各々につき画像解析を実施した。得られた9個の数値の単純平均をもって、1匹のマウスのデータとした。

各群間の線維組織占有率の有意差検定にはt-検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

### III. 結 果

#### 1) 線維組織占有率(24週群)

##### a) ベプロマイシン非投与(Fig. 4)

無投与群とメチルプレドニゾロン投与群の占有

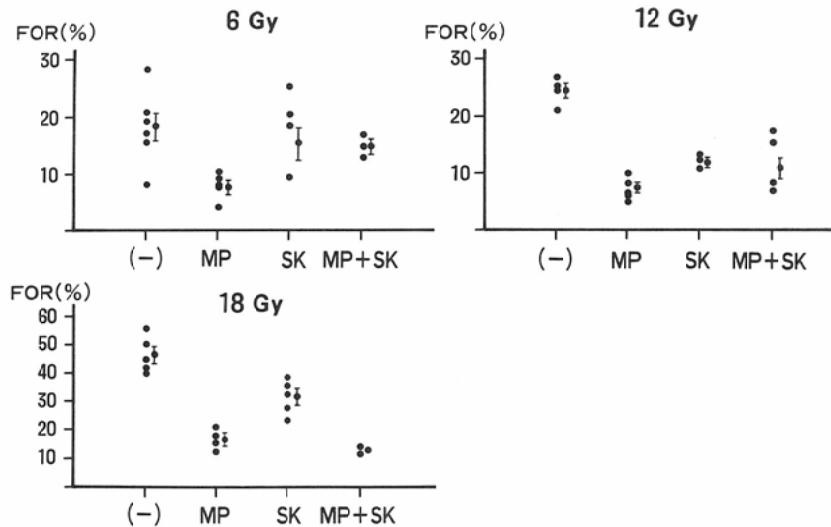


Fig. 4 Fibrous tissue occupation rate (FOR) in peplomycin free groups (24 weeks after irradiation). “-” indicates irradiation alone, MP and SK indicate methylprednisolone and Sho-Saikoto, respectively. Data points represent the mean $\pm$ SE.

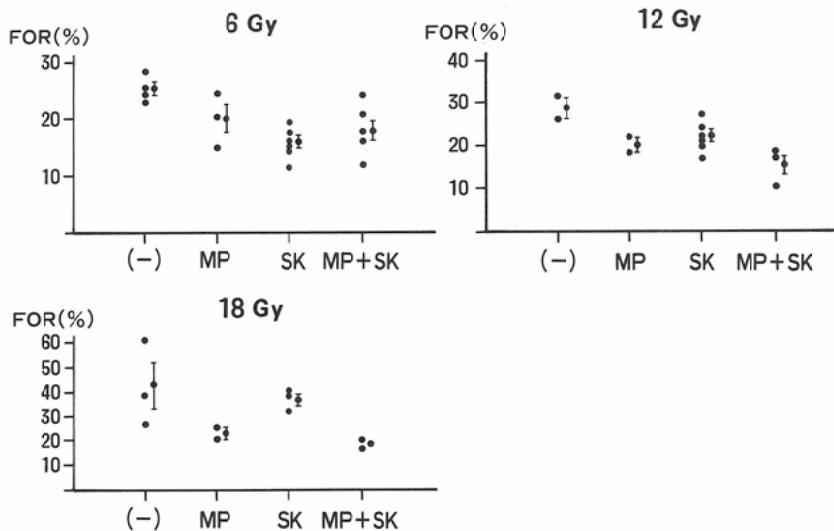


Fig. 5 Fibrous tissue occupation rate (FOR) in each of the groups with peplomycin administration (24 weeks after irradiation).

率は6Gyでは各々 $17.9\pm6.12\%$ (mean $\pm$ SE, 以下同じ),  $7.1\pm2.41\%$ , 12Gyでは $24.4\pm2.16\%$ ,  $7.4\pm1.49\%$ , 18Gyでは $46.4\pm5.55\%$ ,  $16.5\pm3.09\%$ であり、6Gy, 12Gy, 18Gyの3群とも有意差( $p<0.01$ )がみられた。無投与群と小柴胡湯投与群とでは12Gy群で有意差( $p<0.01$ )があり、

メチルプレドニゾロン投与群とメチルプレドニゾロン・小柴胡湯併用群とはほぼ同程度の占有率を示していた。

#### b) ベプロマイシン投与 (Fig. 5)

ベプロマイシン非投与・投与を比較すると、占有率は投与の場合に全体として明らかに高い。無

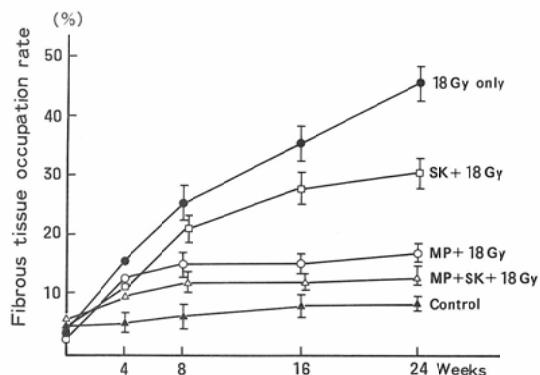


Fig. 6 Fibrous tissue occupation rate curve in peplomycin free groups.

投与群とメチルプレドニゾロン投与群の占有率は 6Gy では各々  $25.2 \pm 2.22\%$ ,  $19.7 \pm 3.81\%$ , 12Gy では  $28.7 \pm 2.60\%$ ,  $20.0 \pm 1.70\%$ , 18Gy では  $42.3 \pm 13.9\%$ ,  $23.2 \pm 2.50\%$  であり, 12Gy 群で有意差 ( $p < 0.01$ ) がみられる。無投与群と小柴胡湯投与群とでは後者の方が占有率は低いが、有意差はみられず、メチルプレドニゾロン投与群とメチルプレドニゾロン・小柴胡湯併用群との場合は、ペプロマイシン非投与と同じく、ほぼ同程度の占有率を示していた。

## 2) 線維組織占有率の経時的变化 (Fig. 6)

18Gy 照射単独群は 8 週以降やや鈍化するがほぼ一貫して増加したのに対し、小柴胡湯投与群は 8 週以後の占有率が照射単独群と比較して更に低かった。しかしメチルプレドニゾロン投与群及びメチルプレドニゾロン・小柴胡湯併用群とは、先の 2 者に比べ 4 週以後の占有率はほぼプラトーになり、コントロール群のグラフと平行になった。

## IV. 考 察

急性肺障害としての放射線肺障害は、放射線肺炎で発症する。肺毛細血管の透過性亢進による肺胞腔への血漿蛋白の漏出がその本態<sup>4)</sup>、ガス交換能及び肺コンプライアンスの低下による呼吸不全をもたらす<sup>7)</sup>。Loyd<sup>18)</sup>による羊を用いた実験では肺機能低下が照射数時間後に出現する。Evans<sup>6)19)</sup>によると、マウス照射肺の血管透過性亢進には二つの波があり、第 1 のピークは照射後 1 日目で、第 2 のピークは 3 週間目にある。照射後

19 日頃に血管内皮細胞の死滅が最大に達するからであり、第 2 のピークはより強くかつ長く続き、放射線肺炎に進展する。この時期のステロイドの役割について、Van den Brenk<sup>20)</sup>は膜透過性亢進の抑制に、Gross<sup>7)</sup>は肺サーファクタントの分泌刺激による肺コンプライアンスの維持に、Flower と Blackwell<sup>21)</sup>はプロスタグランдин生成の抑制にあるとし、いずれも放射線肺炎を改善すると考えた。

急性障害として放射線肺炎は可逆的であるが、約 6 カ月後に続発する慢性障害としての肺線維症は不可逆的である。Law<sup>14)</sup>は初期の血管透過性亢進によるフィブリノーゲンや凝固因子の血管外漏出が間質組織内へのイブリン沈着を起こし、それが線維芽細胞の集積とコラーゲン生成を招くとした。肺線維化の抑制には、急性障害の抑制が重要である。

従ってステロイド投与の方法、時期についてが問題となるが、照射直前に開始し、2~3 週間連続投与あるいは間欠的投与が効果的とする報告<sup>6)</sup>があり、障害の発生時に開始しても有効であるとの報告<sup>8)</sup>や、照射前 1 回投与でも効果があるとの報告<sup>10)</sup>もある。本実験では照射直前にメチルプレドニゾロンの一回投与をおこない、線維組織増生の抑制の効果が得られた。この効果の原因は、メチルプレドニゾロンの持続期間からみて、急性障害に対する薬理効果が主な働きをなしていると考えられる。投与開始時期は照射開始直前でも十分な効果が得られた。

線維組織の経時的变化に及ぼすメチルプレドニゾロンの影響をみると、加齢による生理的現象としての肺組織の線維化が問題となるが、Fig. 6 で示されているように 6 カ月の期間では加齢による線維化は軽微であり、本実験における照射群の線維組織占有率の増加は直接的に放射線の影響を表していると考えられた。18Gy 照射単独群が直線的に線維組織の増生を示し、24 週目に  $42.3 \pm 2.22\%$  に達したのに対し、18Gy+メチルプレドニゾロン投与群では占有率の変化は緩徐で 24 週目に  $23.2 \pm 2.5\%$  となつたにすぎなかった。また Fig. 4 で示されているように 24 週群をみると照射量

(6Gy, 12Gy, 18Gy)に拘らず、メチルプレドニゾロン投与群は非投与群に対し有意差を持って線維化の抑制がみられた。メチルプレドニゾロンは線維化の抑制に効果を示したと考えられる。

しかし必ずしも急性期の血管内皮細胞の障害や浸出性変化の抑制がステロイドの主な作用とは結論できない。照射後数カ月から6年にも及ぶ範囲で、ステロイド投与の中止に起因する放射線肺障害の発生がみられたとの報告<sup>8)</sup>や、照射後80~100日目から投与しても線維化抑制に有効との報告<sup>9)</sup>がみられるからである。ステロイドの作用機序にはまだ不明な点が多い。

シスプラチニン、ペプロマイシン、サイクロフォスファミドなどの化学療法剤やヒドララジン、メチルドーバなどの降圧剤、また金製剤などは従来から間質性肺炎、肺線維症を誘発することが知られており、とりわけ細胞毒性の強い化学療法剤には放射線肺障害を増強することがしばしばみられる<sup>5)</sup>。本実験ではペプロマイシン+照射群は照射単独群に比較して、6Gy群で有意差( $p < 0.05$ )をもって線維占有率が高く、12Gy群ではわずかに高いが有意差ではなく、18Gy群で逆に軽度低下していた。もともと線維組織の増生には線量依存性があるが、ある程度の高線量になると線維化の飽和がみられ、それ以上の線量では増生の増強に乏しくなる。6Gy, 12Gy, 18Gy照射時のペプロマイシン投与・非投与群の各々の線維占有率の差をみると、線量が多くなるに従い2群の間に差がみられなくなる傾向があり、化学療法剤の影響が放射線の影響の増加の中に埋没していくのがわかる。このような化学物質の肺毒性・放射線障害の増強に対してもメチルプレドニゾロンは概ね抑制改善作用がみられた。

小柴胡湯は柴胡、半夏、黄岑、大棗、人参、甘草、生姜から抽出された多様な成分からなる混合生薬である。人参、甘草にはそれぞれ単体で生体の放射線障害を防御、軽減する作用があり、人参抽出物(サポニン分画、非サポニン分画)、甘草成分(グリチルリチン)が主たる機能成分であることが報告<sup>22)23)</sup>されており、それらの合剤としての小柴胡湯にも同様の効果が考えられる。小柴胡湯

は臨床的に肝炎、体力涵養を目的に投与されており、抗炎症作用などを示すものとして知られている。大倉ら<sup>25)</sup>は、抗炎症作用の作用機序はマクロファージに対する phospholipase A2 (PLA2) 活性抑制物質(リポコルチニン)の類似物質の產生刺激にあるとした。PLA2は細胞膜透過性亢進作用をもつlysophospholipidとアラキドン酸を生成する酵素であり、炎症性反応を誘導するアラキドン酸カスケードの促進物質である。ステロイドの抗炎症作用がリポコルチニンの产生を介して行われることから小柴胡湯はステロイド類似作用をもち、併用することでステロイドの作用を増強するとされている<sup>26)27)</sup>。

本実験において、小柴胡湯投与群は非投与群に対し線維組織占有率は6Gy, 12Gy, 18Gyで常に低い傾向を示しているが有意差はみられなかった。この原因として、小柴胡湯は生薬であるため投与量に比べ有効成分の絶対量が少ないと、経口投与に頼らざるを得ないことから投与量には限界があることの2点が考えられる。しかし肺線維症の抑制がメチルプレドニゾロン投与に及ばないのに、メチルプレドニゾロンと小柴胡湯の併用群がメチルプレドニゾロン単独群に比べ12Gy, 18Gyで線維増生の抑制に良好な傾向を示した。これは小柴胡湯がメチルプレドニゾロンの1回投与の欠点を補って併用による相乗効果を示唆することが考えられる。

## V. 結 論

- 1) メチルプレドニゾロンは、放射線及びペプロマイシンによる肺線維組織増生の抑制に有効であった。
- 2) メチルプレドニゾロンと小柴胡湯との併用は、各々の単独投与により肺線維組織増生の抑制に有用な傾向がみられた。

## 文 献

- 1) Law MP: Vascular permeability in the ears of rats after X-irradiation. Br J Radiol 51: 895-904, 1978
- 2) Philips TL: Modification and cellular effects of ionizing radiation. Front Radiat Ther Oncol 6: 21-43, 1972
- 3) Gross NJ: The pathogenesis of radition-

- induced lung image. Lung 159 : 115—125, 1981
- 4) Gross NJ: Pulmonary effects of radiation therapy. Ann Int Med 86 : 81—92, 1977
  - 5) Phillips TL: Modification of radiation injury to normal tissue by chemotherapeutic agents. Cancer 35 : 1678—1684, 1975
  - 6) Evans ML: Use of steroids to suppress vascular response to radiation. Int J Rad Onc 13 : 563—567, 1987
  - 7) Gross NJ: Radiation pneumonitis in mice: Some effects of corticosteroids on mortality and pulmonary physiology. J Clin Invest 66 : 504—510, 1980
  - 8) Castellino PA: Latent radiation injury of lungs or heart activated by steroid withdrawal. Ann Int Med 80 : 593—599, 1974
  - 9) Moss WT: Some factors altering the severity of acute radiation pneumonitis: Variation with cortisone, heparine, and antibiotics. 45th Annual Meeting of RSNA, Chicago, p50—54, 1960
  - 10) Berdjis CC: Histopathology of effect of cortisone on the irradiated rat lung. Dis Chest 32 : 481—492, 1957
  - 11) Colis CH: Lung damage in mice from cyclophosphamide and thoracic irradiation: The effect of timing. Int J Rad Onc 9 : 685—689, 1983
  - 12) Travis EL: WR-2171 protection of Pneumonitis and fibrosis in mouse lung after single doses of X-rays. Int J Rad Onc 10 : 243—251, 1984
  - 13) El-Khatib E: The density of mouse lung in vivo following X-irradiation. Int J Rad Onc 9 : 853—858, 1983
  - 14) Law MP: Collagen content of lungs of mice after X-ray irradiation. Radiation Research 65 : 60—70, 1976
  - 15) Fujita S: The microcomputer-based color image analyzer and its application to histochemistry. J Histochem Cytochem 31 : 238—240, 1983
  - 16) Takamatsu T: Quantitative fluorescence image analysis. Acta Histochem Cytochem 19 : 61—71, 1986
  - 17) Walter RJ: Computer-enhanced video microscopy: Digitally processed microscope images can be produced in real time. Proc Natl Acad Sci USA 78 : 6927—6931, 1981
  - 18) Loyd JE: Corticosteroids prevent acute lung dysfunction caused by thoracic irradiation in unanesthetized sheep. Am Rev Respir Dis 138 : 1227—1233, 1988
  - 19) Evans ML: Changes in vascular permeability following thorax irradiation in the rat. Radiation Research 107 : 262—271, 1986
  - 20) Va den Brenk HAS: Radiation effects on the pulmonary system. Pathology of irradiation, C Berdjis (Ed), Baltimore, Williams & Wilkins, p561—569, 1971
  - 21) Flower RJ, Blackwell GJ: Antiinflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. Nature 278 : 456—459, 1979
  - 22) Yonezawa M: Restoration of radiation injury by intraperitoneal injection of ginseng extract. J Radiat Res 17 : 111—113, 1976
  - 23) Hosokawa Y, et al: Radioprotective effects of Anchusa and its constituents on survival of mice. Ann Rep Rad Ctr Osaka 25 : 59—62, 1984
  - 24) 細川 康, 他: 小柴胡湯によるマウスの放射線障害の防護, 和漢医薬学会雑誌 2 : 694—695, 1985
  - 25) 大倉靖史, 他: 小柴胡湯によるリボコルチニン様物質の産生について, 漢方医学, 11 : 20—23, 1987
  - 26) 前田利男, 他: 小柴胡湯によるコーキゾンの作用の増強作用機構の解析, 和漢医薬学会雑誌, 2 : 644—645, 1985
  - 27) 萩原幸夫, 他: 小柴胡湯とブレドニゾロンの併用効果の解, 和漢医薬学会雑誌, 2 : 460—463, 1985