
原 著

ブレオマイシン肺線維症マウスモデルにおける イルベサルタンの有効性の検討

田 中 淳 一

新潟大学医歯学総合研究科呼吸器内科学分野（第二内科）

（主任：成田一衛教授）

Preventive Effect of Irbesartan on Bleomycin - induced Lung Injury in Mice

Jun - ichi TANAKA

*Division of Respiratory Medicine Niigata University Graduate School of Medical and
Dental Sciences (Department of Second Internal Medicine)*

(Director: Prof. Ichiei NARITA)

要 旨

特発性肺線維症は、慢性かつ進行性の経過をとり、高度の線維化と肺胞構築の改変から不可逆的な蜂巣肺形成に進行する原因不明の疾患である。現在まで有効な治療法は確立されておらず、自覚症状出現後の生存期間は平均約3年とされる難治性肺疾患である。これまでの報告では、間質性肺炎・肺線維症での肺局所でレニン・アンギオテンシン系の活性化が起きていることが確認され、アンギオテンシン受容体拮抗薬による肺線維症モデルの改善効果が認められている。一方で近年、アンギオテンシン受容体拮抗薬において、受容体非依存性の新たな作用を呈するドラッグエフェクトが注目されている。イルベサルタンにおいては、PPAR γ の部分活性を有することも報告されている。これまでもPPAR γ リガンドによる肺線維症モデルの改善効果が報告されていることから、レニン・アンギオテンシン系に対する作用に加えPPAR γ 部分活性作用を持つイルベサルタンの肺線維化抑制効果について検討した。8週齢のICRマウスにブレオマイシンを気管内に単回投与し、ブレオマイシン肺線維症モデルを作成した。イルベサルタンはBLM投与の5日前から連日、BLM投与14日後まで胃ゾンデによる経口投与を行い、GW9662はイルベサルタン投与の1時間前に連日腹腔内投与した。14日目に、気管支肺胞洗浄・肺組織を含めたサンプリングを行った。イルベサルタン投与群、およびイルベサルタンにPPAR γ アンタゴニストであるGW9662を加えた群を、ブレオマイシン単独投与群と比較した。

Reprint requests to: Jun - ichi TANAKA
Division of Respiratory Medicine
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学医歯学総合研究科呼吸器内科学分野

田 中 淳 一

イルベサルタンの前投与により、プレオマイシン投与後14日目の体重減少、肺湿乾重量差の増加、ハイドロキシプロリン量の増加、肺組織所見における肺線維化スコアが全て有意に抑制された。またBALF中の総細胞数、マクロファージ数の増加、TGF- β 1、MCP-1濃度の上昇が有意に抑制された。PPAR γ アンタゴニストGW9662は、上記の結果に対して部分的に抑制効果の減弱を示した。以上より、イルベサルタンはアンジオテンシン受容体拮抗薬としての作用だけでなく、PPAR γ 活性化作用を介して、プレオマイシンによる肺線維化を抑制する可能性が示唆された。

キーワード：肺線維症、アンジオテンシン受容体、PPAR γ 、MCP-1

緒 言

難治性間質性肺炎の代表的な疾患の一つとして、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) が挙げられる。IPFは慢性かつ進行性の経過をとり、高度の線維化と肺胞構築の改変を呈し、不可逆的な蜂巣肺を形成する。罹患率は10万人に対して、14.0～42.7人程度と報告される¹⁾。原因は不明で、有効な治療法は乏しく、自覚症状出現後の生存期間は平均3年と言われている²⁾。また慢性経過中に急速に呼吸不全が進行する病態は急性増悪と呼ばれ、治療抵抗性で死亡率は極めて高い³⁾⁴⁾。

これまでの報告では、間質性肺炎・肺線維症の肺局所でレニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system; RAS) の活性化が起きていることが確認されている^{5)–7)}。アンジオテンシンII (angiotensin II; ANG-II) は強力な昇圧作用をもち、体内の血圧調節、体液調整を司るペプチドである。ANG-IIのレセプターは現在のところ、I型(AT1)とII型(AT2)の2つがクローニングされ、AT1、AT2はともに広く全身に存在しており、肺においても発現が確認されている⁸⁾⁹⁾。ANG-IIは、AT1を介して従来の血圧調節作用のほかに線維化促進作用をもつことが循環器領域において明らかにされている¹⁰⁾。また肺においてもIPFの気管支肺胞洗浄液のACE活性亢進、放射線肺線維症モデルでの肺組織中のACE活性の亢進、ANG-IIの増加、またBLM (bleomycin) 肺線維症モデルにおいてAT1発現が顕著に増加する

という報告などから、RASを介する線維化促進機構が存在するものと考えられている^{5)–7)}。またアンジオテンシン受容体拮抗薬 (angiotensin receptor blocker; ARB) による肺線維症モデルの改善効果が報告されている^{11)–16)}。一方で近年、ARBにおいて、AT1受容体非依存性の新たな作用を呈するドラッグエフェクトが注目されている。イルベサルタンにおいては、炎症細胞浸潤や活性化に重要な monocyte chemoattractant protein (MCP)-1の分泌を抑制し¹⁷⁾、さらにその受容体であるCCR2bにも結合し、その活性化を抑制している可能性が指摘されている¹⁸⁾。また、NF- κ B (nuclear factor- κ B) の活性抑制作用を有しており¹⁹⁾、インスリン抵抗性改善作用を示すPPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) の部分活性を有することも指摘されている²⁰⁾。これまで肺線維症モデルにおいて、PPAR γ リガンドによる改善効果が報告されている²¹⁾。そのため、イルベサルタンにおいて、ARBとしてのAT1受容体拮抗作用に加え、ドラッグエフェクトとしての効果が、相加的に線維化の抑制効果を示すか否か、特にPPAR γ 部分活性による相加効果についてBLM肺線維症モデルを用いて検討した。

研究対象、方法

1. 動物

8週齢、ICR雄マウスは日本SLCから購入した。平均体重は40gで、無作為に各群に割り当てた。この研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を

得て行った。

2. 薬剤

BLM (日本化薬株式会社製) は生理食塩水 (生食) に溶解し、2mg/kg になるように調整した。10% ペントバルビタール (Abbott 社製) 100 μ l/g を腹腔内投与にて麻酔をかけ、気管切開下に 50 μ l を気管内に単回投与した。イルベサルタンは大日本住友製薬より原末の提供を受けた。イルベサルタン 20 mg/kg (0.1ml/mouse に調整) をゾンデにて 1日1回連日強制経口投与した。また PPAR γ アンタゴニストである GW9662 (Sigma 社製) は、DMSO 原液 (Sigma 社製) に溶解し、2mg/kg (0.1ml/mouse に調整) を腹腔内投与した。

3. BLM 肺線維症モデル作製投与スケジュール

コントロール群、GW9662 単独群、BLM 群、イルベサルタン併用群 (BLM + イルベサルタン) 群、イルベサルタン + GW9662 併用群 (BLM + イルベサルタン + GW9662) の 5 群に対し、Day 0 に、コントロール群では生食、他の群では BLM を経気道的に単回投与した。BLM 投与前 5 日 (Day -5) から犠牲死までに、コントロール群と BLM 単独群では生理食塩水を、イルベサルタン投与群でイルベサルタン懸濁液をそれぞれ 1日1回連日経口投与した。また、イルベサルタン + GW9662 併用群には GW9662 懸濁液を、それを除く全ての群に DMSO 原液を、1日1回イルベサルタン投与 1 時間前に 0.1ml 腹腔内投与を行った。

4. 実験プロセス

BLM 投与後 14 日目に体重測定の上、麻酔下にて脱血犠牲死させた。左肺主気管支結紮後に左肺組織を取り出し、-80°C にて保存し、肺重量、ハイドロキシプロリン量の測定に使用した (株式会社 SRL へ外部委託)。その後、右肺で気管支肺胞洗浄 (BAL: bronchoalveolar lavage) を行った。回収した気管支肺胞洗浄液 (BALF: bronchoalveolar lavage fluid) の総細胞数は、血球計算板でカウントし、細胞分画はサイトスピン法で作製した

細胞標本にギムザ染色を行い、算定した。各群の BALF 上清液を用い、ELISA kit を用いて BALF 中の TGF- β 1 (R & D 社) と MCP-1 (R & D 社) 濃度を検討した。各群において、同様の実験を 3 回繰り返して行った。また、別検体を病理組織学的検査用として 10% 中性緩衝ホルマリンで拡張固定後、パラフィン包埋し、3~4 μ m の厚さに薄切した。肺組織切片から HE (hematoxylin-eosin) 染色標本を作製した。肺線維化の程度は、Ashcroft らの方法²²⁾ を一部改変した Ralf-Harto Hübner らの方法²³⁾ で、2 人の病理医と 1 人の臨床医によってスコア化した。

5. BAL

マウス右主気管支内に 18G カテーテルを留置固定し、洗浄液として生食 0.5 ml を注入後回収する作業を 4 回行った。回収率は 80-90% の範囲で、各群で差はなかった。

6. 統計学的解析

BLM 投与 14 日後のマウス体重、肺湿乾重量差、ハイドロキシプロリン量、肺線維化スコア、および BALF 中の細胞数・サイトカインについては各群で平均値および標準誤差で示した。なお統計解析は JMP8.0.2 を用いて行い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定し、Tukey-Kramer 試験により有意差検定を行った。

結 果

1. マウスの体重変化、肺湿乾重量差および肺組織中のハイドロキシプロリンの定量 (表 1)

BLM 投与 14 日目でのマウス体重は、BLM 群でコントロール群と比較して有意に低下した。しかし、イルベサルタン併用投与を行うことで、コントロール群と比較して有意差は生じず、BLM 群と比較して、有意に体重減少が抑制された。しかし PPAR γ アンタゴニスト GW9662 投与することで、その効果は消失した。また BLM により炎症反応が惹起され肺水腫をきたすため、肺湿乾重量差は炎症反応の程度を示す指標である。コント

表1 BLM投与14日目のマウス体重, 肺重量, ハイドロキシプロリンの比較

	体重(g)	肺湿乾重量差 (mg)	ハイドロキシプロリン量 (μ g/左肺)
コントロール群	43.6 \pm 1.51	48.8 \pm 4.04	85.5 \pm 7.00
GW9662 単独群	44.2 \pm 0.95	51.2 \pm 3.90	90.4 \pm 9.67
BLM 単独群	36.6 \pm 4.70	92.0 \pm 17.8	126.4 \pm 16.8
BLM+イルベサルタン群	41.0 \pm 3.31**	68.9 \pm 7.21*	99.4 \pm 12.1**
BLM+イルベサルタン+GW9662 群	37.4 \pm 4.16	77.7 \pm 11.4*	116.7 \pm 7.60

*P<0.05、**P<0.01 BLM 単独投与群との比較

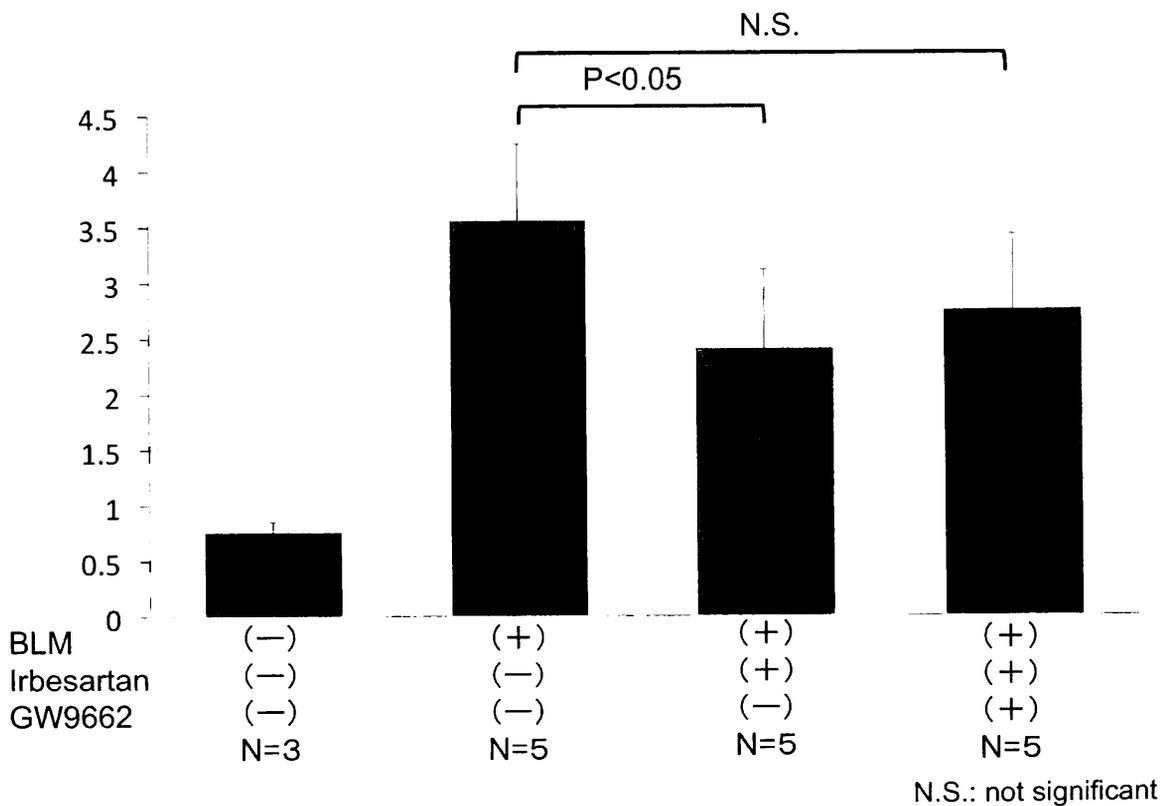


図1 BLM投与14日目の線維化スコアの比較

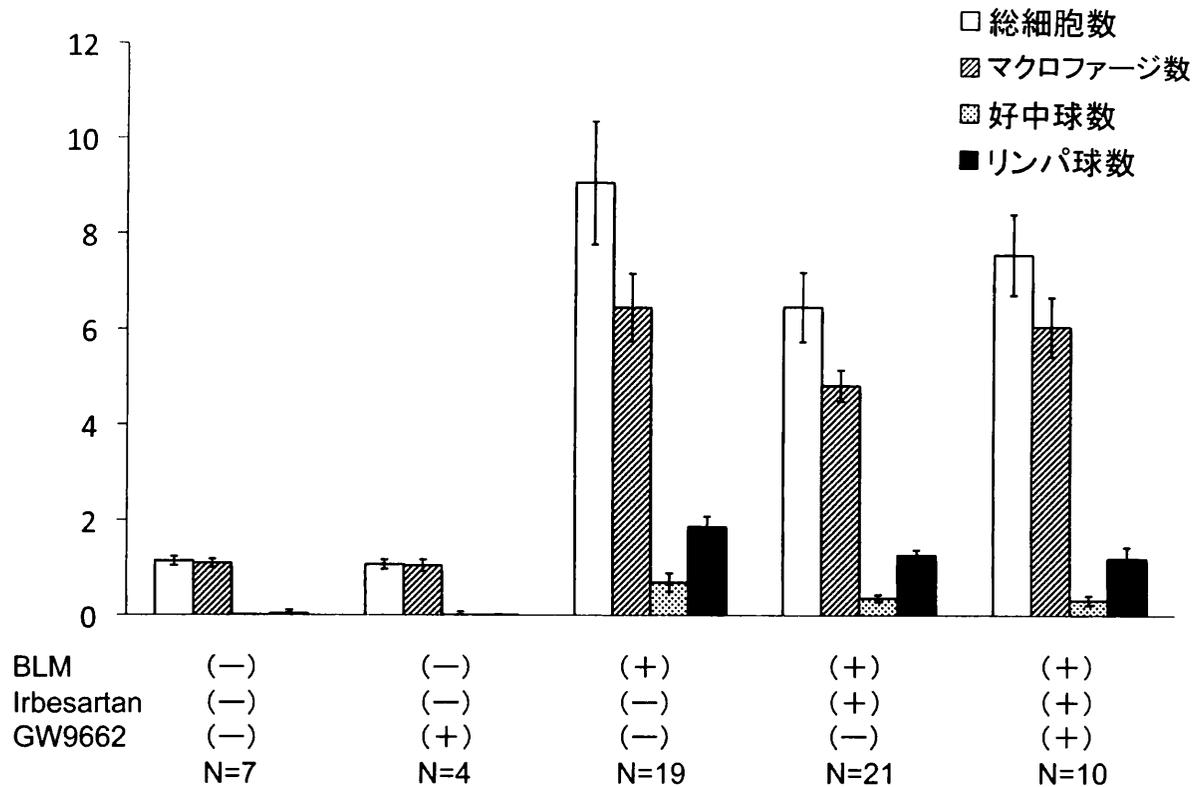


図2 BLM投与14日目のBALF中の総細胞数および細胞分画の比較

ロール群と比較してBLM群で有意に高値を示したが、BLM群と比較してイルベサルタン群では有意に低下し、GW9662投与によっても影響はなかった。また肺の線維化の指標にあたる左肺のハイドロキシプロリン量を比較では、イルベサルタン群において改善効果が認められた。しかしGW9662の追加により、その効果は減弱した。

2. 線維化スコア (図1)

HE所見では、BLM投与後14日目で肺胞構造の破壊を伴う著明な細胞浸潤を伴う胞隔炎、また一部に線維化の出現、気腔の消失、および蜂窩肺様の所見も認められた。一方でイルベサルタン併用群では、細胞浸潤の所見を一部に呈しているが、大部分で正常構造を残していた。線維化スコアでは、イルベサルタン併用群は、BLM群より有意に低値を示したが、イルベサルタン+GW9662併用群では有意差は認められなかった。

3. BALFの検討 (図2, 図3)

BALF中ではBLM投与群において総細胞数の増加が認められたが、イルベサルタン併用群では総細胞数の増加が有意に抑制された。同様に、マクロファージ数の増加が有意に抑制された(図2)。しかし、イルベサルタン+GW9662を併用投与したことにより、BLM群と比較して有意差が認められず、抑制効果が消失される傾向が認められた。また、TGF- β 1、MCP-1の濃度を検討したところ、BLM投与により、有意に上昇していた。イルベサルタン併用群は、TGF- β 1、MCP-1ともに濃度上昇を抑制していたが、イルベサルタン+GW9662併用群では有意差は認められなかった(図3)。

考 察

BLM肺線維症モデルにおけるイルベサルタン

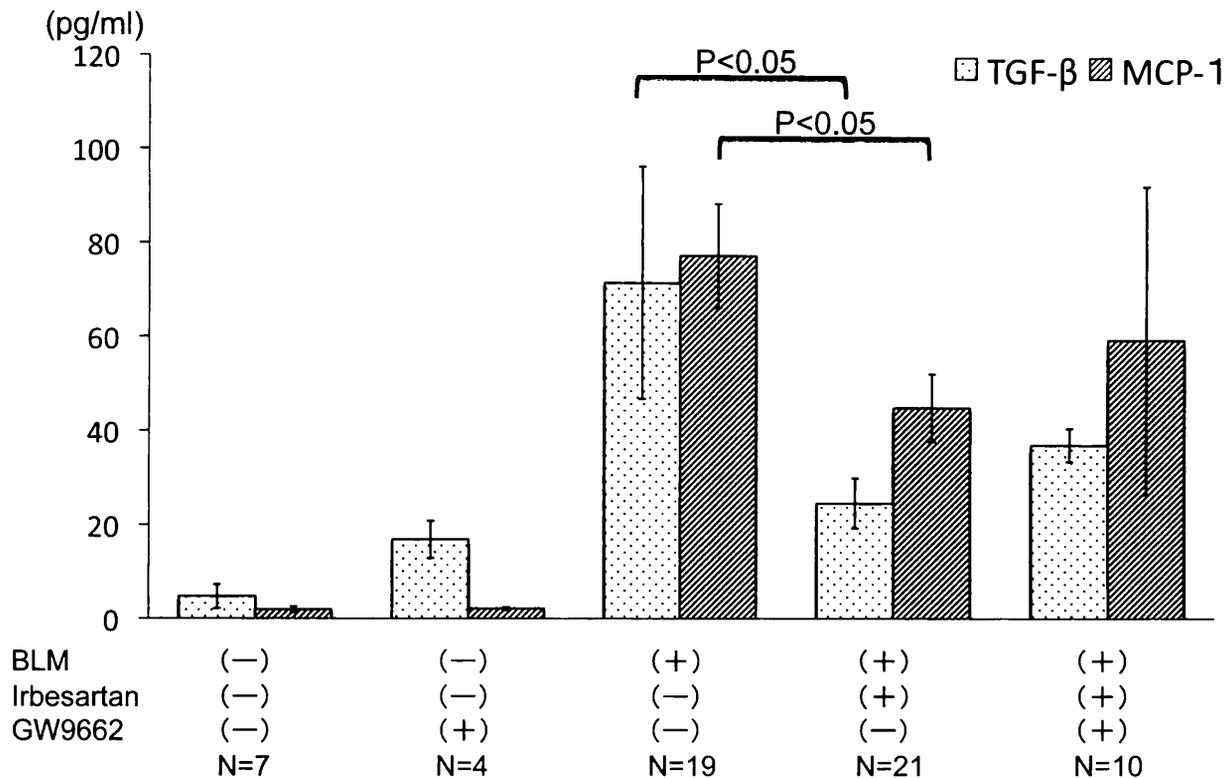


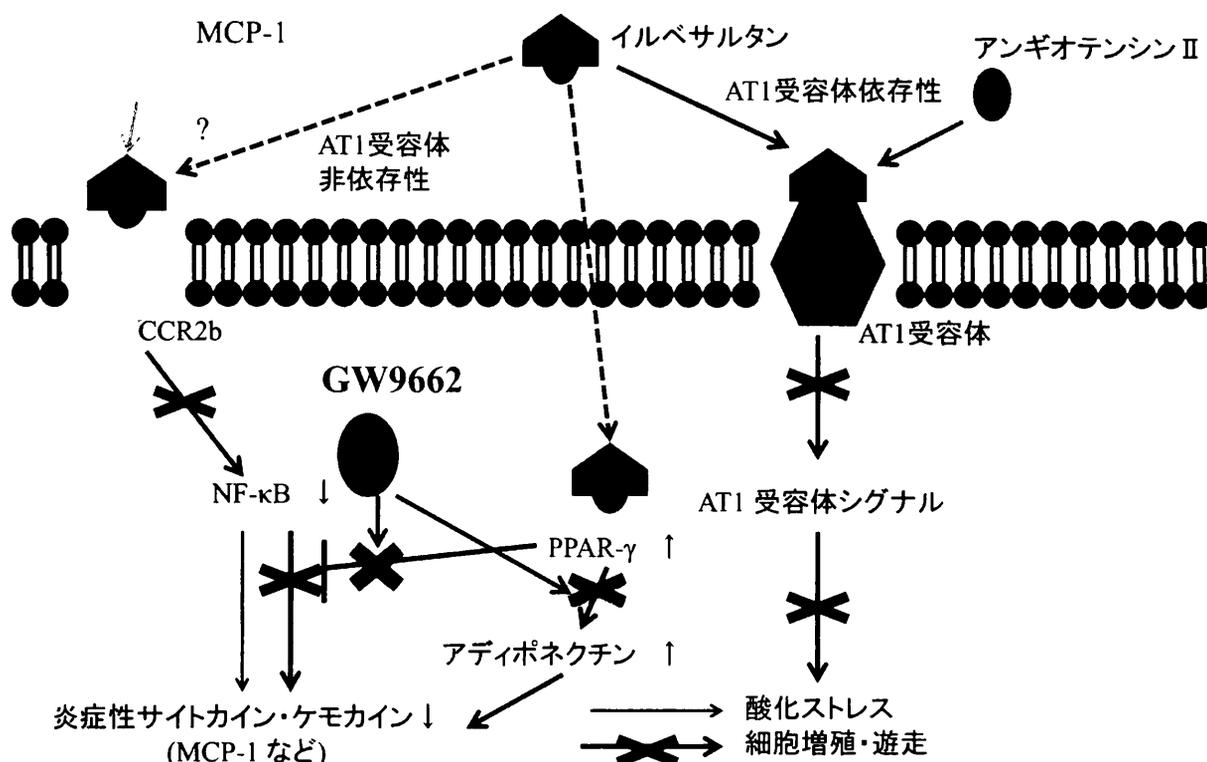
図3 BLM投与14日目のBALF中サイトカインの比較

の効果を検討した。BLM肺線維症モデルにおいて、BLMによって産生される活性酸素が肺胞上皮に傷害を与え、それに引き続き炎症細胞浸潤や組織学的に肺水腫を生じ、遷延化することで肺の線維化に至ると考えられている²⁴⁾。本モデルにおいて、炎症期は7日目が極期とされ、また線維化期は14日目から出現し、21-28日目が極期とされている。今回、その両者に対する薬剤の効果をみるため、炎症期と線維化期が重なるBLM投与後14日目に評価を行った。

BLM投与後14日目において、AT1拮抗薬であるイルベサルタンの経口投与によって、体重減少、炎症に伴う肺水腫の指標としての肺湿乾重量差の増加、ヒドロキシプロリン量の上昇、肺線維化スコアは有意に軽減された。またBALF中の総細胞数、マクロファージ数の増加、TGF-β1、MCP-1濃度の上昇が有意に抑制された。PPAR γ アンタゴニストGW9662は、肺湿乾重量差増加

を除く上記項目に対して抑制効果の減弱を示した。これらの結果より、ARBであるイルベサルタン投与により、肺水腫の程度やBALF中に含まれる炎症性細胞の増加を抑制する効果を認めるとともに、線維化を促進するTGF-β1を抑制する効果が認められ、結果として肺組織において線維化抑制効果が認められた。したがって、これまでの既報の他のAT1拮抗薬と同様の結果¹¹⁾⁻¹⁶⁾が確認されて、ANG-IIは肺線維化において重要な役割をきたす因子であることを明確に示した結果と考えられた。

一方でイルベサルタンは、AT1受容体遮断作用の他に、PPAR γ の部分活性作用、CCR2bへの親和性が強く、MCP-1によるシグナル伝達を抑制し、濃度依存性に単球からのMCP-1分泌を抑制する作用が報告されている(図4)。PPAR γ が活性化すると、NF- κ BやAP-1(activator protein-1)などの他の転写因子機能を阻害し、サイ



Fujino M, et al. Hypertension research 2010;33:1044-52.¹⁷⁾より 図改変

図4 イルベサルタンの作用メカニズム (仮説)

トカインの発現誘導などを抑制することで抗炎症作用を示すことが知られている²⁵⁾。今回、イルベサルタンに PPAR γ の拮抗薬である GW9662 を加えることにより、BLM 肺線維化モデルの改善効果の一部減弱させることが明らかになった。さらに PPAR γ 作用を有するピオグリタゾンにおいては、培養平滑筋細胞で AT1 受容体の発現を抑制し、GW9662 を投与することでその効果が阻害され、RAS 系を介した経路に関する抗炎症作用にも相加されると報告されている²⁶⁾。これまでの報告では PPAR γ 作用を持たない ARB でも肺傷害の抑制効果が認められていたが、今回 GW9662 を加えたことで肺湿乾重量差を除いて肺傷害の改善効果が認められなくなった。このことは、図 4 で示すように PPAR γ 作用を抑制すると同時に、RAS 系を含めた抗炎症作用が抑制されたことが考えられ、イルベサルタンにおいて、ARB としての効果だけではなく、ドラッグエフェクトである

PPAR γ 活性化作用が線維化抑制には重要な役割を担っていることが示唆された。

またこれまで線維化を促進する中心的な因子として TGF- β 1 が考えられていたが、IPF の病態において、MCP-1 が注目されている。これまでの報告では、IPF 患者での肺組織中での気管上皮細胞における MCP-1 の強い発現²⁷⁾、BALF 中の MCP-1 の上昇²⁸⁾ が指摘されており、また MCP-1 は線維芽細胞を活性化することも報告されており、これには MCP-1 受容体である CCR2b が重要と考えられている²⁹⁾。イルベサルタンは、CCR2b への親和性が強く、MCP-1 によるシグナル伝達を抑制し、濃度依存性に単球からの MCP-1 分泌を抑制することが報告されている³⁰⁾。今回の検討では、BLM 投与による BALF 中の MCP-1 の上昇が、イルベサルタン投与により抑制された。GW9662 投与で、BALF 中のマクロファージ数、MCP-1 上昇の抑制効果の阻害を

認め、PPAR γ がMCP-1産生に関連している可能性が示唆される一方、MCP-1産生の抑制効果、また肺炎症・線維化の改善効果も一部に留まったものとする。以上よりMCP-1が炎症細胞を通じて、肺傷害を来し、肺線維化を抑制している重要な因子であることが示唆された。近年、急性肺障害に関与していると考えられているHMGB-1 (high-mobility group protein 1) とMCP-1との関与も報告されており³¹⁾、今回の結果に矛盾しないものと考えられた。

今回の検討より、肺線維化の過程で、ANG-IIが肺線維化において重要な因子であることが再確認された。さらに、最近報告されているドラッグエフェクトで示されているように、ARBでも作用に差異があり、炎症性疾患である病態においては、PPAR γ 作用、MCP-1阻害作用を有するイルベサルタンの効果が強く期待できるものと考えられた。すでに降圧薬として頻用されているイルベサルタンによる間質性肺炎・肺線維症の進行の予防や治療への寄与が期待される。

結 語

BLM肺線維症マウスモデルにおけるイルベサルタンの有効性の検討を行った。イルベサルタンの投与によりBLMによる肺線維化が抑制されたが、PPAR γ アンタゴニストであるGW9662の投与によって、その効果は減弱した。またMCP-1の抑制効果も認められた。このことより、イルベサルタンはARBとしての作用だけでなく、PPAR γ 活性化作用、MCP-1抑制作用を介して、BLMによる肺線維化を抑制する可能性が示唆された。

謝 辞

今回の研究にあたり、ご指導いただきました新潟大学医学部第二内科学教室 高田俊範准教授、森山寛史助教、朝川勝明先生、および済生会新潟第二病院 田島俊児先生に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bouros D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schönemann HJ; ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 788-824, 2011.
- 2) Kim DS, Collard HR and King TE Jr: Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc* 3: 285-292, 2006.
- 3) Kim DS, Park JH, Park BK, Lee JS, Nicholson AG and Colby T: Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: frequency and clinical features. *Eur Respir J* 27: 143-150, 2006.
- 4) Kubo H, Nakayama K, Yanai M, Suzuki T, Yamaya M, Watanabe M and Sasaki H: Anti-coagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 128: 1475-1482, 2005.
- 5) Specks U, Martin WJ and 2nd Rohrbach MS: Bronchoalveolar lavage fluid angiotensin-converting enzyme in interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 141: 117-123, 1990.
- 6) Song L, Wang D, Cui X, Shi Z and Yang H: Kinetic alterations of angiotensin-II and nitric oxide in radiation pulmonary fibrosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 17: 141-150, 1998.
- 7) Otsuka M, Takahashi H, Shiratori M, Chiba H and Abe S: Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 receptor antagonist. *Thorax* 59: 31-38, 2004.
- 8) Matsubara H: Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* 83: 1182-1191,

- 1998.
- 9) Hunyady L, Gaborik Z, Shah BH, Jagadeesh G, Clark AJ and Catt KJ: Structural determinants of agonist - induced signaling and regulation of the angiotensin AT1 receptor. *Mol Cell Endocrinol* 217: 89 - 100, 2004.
 - 10) Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S and Yamakawa T: Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 544 - 549, 1999.
 - 11) Mancini GB and Khalil N: Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits pulmonary injury. *Clin Invest Med* 28: 118 - 126, 2005.
 - 12) Keogh KA, Standing J, Kane GC, Terzic A and Limper AH: Angiotensin II antagonism fails to ameliorate bleomycin - induced pulmonary fibrosis in mice. *Eur Respir J* 25: 708 - 714, 2005.
 - 13) Molina - Molina M, Serrano - Mollar A, Bulbena O, Fernandez - Zabalegui L, Closa D, Marin - Arguedas A, Torrego A, Mullol J, Picado C and Xaubet A: Losartan attenuates bleomycin induced lung fibrosis by increasing prostaglandin E2 synthesis. *Thorax* 61: 604 - 610, 2006.
 - 14) Yao HW, Zhu JP, Zhao MH and Lu Y: Losartan attenuates bleomycin - induced pulmonary fibrosis in rats. *Respiration* 73: 236 - 242, 2006.
 - 15) Chen FP, Gong LK, Zhang L, Wang H, Qi XM, Wu XF, Xiao Y, Cai Y, Liu LL, Li XH and Ren J: Early lung injury contributes to lung fibrosis via AT1 receptor in rats. *Acta Pharmacol Sin* 28: 227 - 237, 2007.
 - 16) Waseda Y, Yasui M, Nishizawa Y, Inuzuka K, Takato H, Ichikawa Y, Tagami A, Fujimura M and Nakao S: Angiotensin II type 2 receptor antagonist reduces bleomycin - induced pulmonary fibrosis in mice. *Respir Res* 9: 43, 2008.
 - 17) Fujino M, Miura S, Kiya Y, Tominaga Y, Matsuo Y, Karnik SS and Saku K: A small difference in the molecular structure of angiotensin II receptor blockers induces AT (1) receptor - dependent and - independent beneficial effects. *Hypertens Res* 33: 1044 - 1052, 2010.
 - 18) Marshall TG, Lee RE and Marshall FE: Common angiotensin receptor blockers may directly modulate the immune system via VDR, PPAR and CCR2b. *Theor Biol Med Model* 3: 1, 2006.
 - 19) Zhang M, Zhou SH, Zhao SP, Liu QM, Li XP and Shen XQ: Irbesartan attenuates Ang II - induced BMP - 2 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Vasc Med* 13: 239 - 245, 2008.
 - 20) Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T and Kintscher U: Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator - activated receptor - gamma activity. *Circulation* 109: 2054 - 2057, 2004.
 - 21) Aoki Y, Maeno T, Aoyagi K, Ueno M, Aoki F, Aoki N, Nakagawa J, Sando Y, Shimizu Y, Suga T, Arai M and Kurabayashi M: Pioglitazone, a peroxisome proliferator - activated receptor gamma ligand, suppresses bleomycin - induced acute lung injury and fibrosis. *Respiration* 77: 311 - 319, 2009.
 - 22) Ashcroft T, Simpson JM and Timbrell V: Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 41: 467 - 470, 1988.
 - 23) Hübner RH, Gitter W, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolte H, Freitag - Wolf S and Bewig B: Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques* 44: 507 - 511, 14 - 17, 2008.
 - 24) Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW and Breuer R: Time course of bleomycin - induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 83: 111 - 119, 2002.
 - 25) Wang N, Verna L, Chen NG, Chen J, Li H, Forman BM and Stemerman MB: Constitutive activation of peroxisome proliferator - activated receptor - gamma suppresses pro - inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 34176 - 34181, 2002.
 - 26) Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H and Takeshita A: Peroxisome proliferator - activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 102: 1834 - 1839, 2000.
 - 27) Iyonaga K, Takeya M, Saita N, Sakamoto O,

- Yoshimura T, Ando M and Takahashi K: Monocyte chemoattractant protein - 1 in idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung diseases. *Hum Pathol* 25: 455 - 463, 1994.
- 28) Suga M, Iyonaga K, Ichiyasu H, Saita N, Yamasaki H and Ando M: Clinical significance of MCP - 1 levels in BALF and serum in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 14: 376 - 382, 1999.
- 29) Gharaee - Kermani M, Denholm EM and Phan SH: Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein - 1 via specific receptors. *J Biol Chem* 271: 17779 - 17784, 1996.
- 30) Proudfoot JM, Croft KD, Puddey IB and Beilin LJ: Angiotensin II type 1 receptor antagonists inhibit basal as well as low - density lipoprotein and platelet - activating factor - stimulated human monocyte chemoattractant protein - 1. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 846 - 853, 2003.
- 31) Ebina M, Taniguchi H, Miyasho T, Yamada S, Shibata N, Ohta H, Hisata S, Ohkouchi S, Tamada T, Nishimura H, Ishizaka A, Maruyama I, Okada Y, Takashi K and Nukiwa T: Gradual increase of high mobility group protein b1 in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Med* 2011: 916486, 2011.

(平成24年10月17日受付)
