<原 著>

塩酸微量反復注入動物モデルによるびまん性 嚥下性細気管支炎に関する実験的検討

須藤 英一 福地義之助 石田 喜義 松瀬 健
長瀬 隆英 寺本 信嗣 徐 中宇 松井 弘稔
東本 有司 岡 輝明* 折茂 肇

<要 約> 高齢者において嚥下性肺炎は特に頻度が高く、その発症要因として微量誤嚥の持つ重要性が指摘されている。本研究では反復微量誤嚥により肺内に生じる生化学的、形態学的反応を動物モデルにより検討した。対象は8～10週齢、体重200～250gのSD系、SPFラットを用いた。予め予備実験により最適であることを確認したpH 1.4、0.4ml/kgの塩酸(H群)または同量の生理食塩水(S群)を隔日に2週間計7回気管内に経口注入した。最終回注入1時間後に気管切開し気管支肺胞洗浄(Bronchoalveolar-Lavage: BAL)を施行した。気管支肺胞洗浄液(BALF)中細胞の組成、BALF細胞によるTNF α 産生能を測定した。またBALF中のエラスターゼ様活性、アルブミン値を測定した。別に同様に処置した動物の肺を切除し25cmH₂Oの定圧灌流法によりホルマリン固定しH-E染色に供した。測定したBALF中の総細胞数、TNF α 産生能、アルブミン値はS群、H群の両群間に有意差はなかった。エラスターゼ様活性は両群とも検出限界以下であった。病理所見ではH群の一部の症例においてBALT (bronchial-associated lymphoid tissue)様のリンパ組織の発達や、ヘモジデリンを貪食する肺胞マクロファージの増加像が塩酸単回注入後の所見に比較し増強していた。さらに一部に細気管支周囲に限局した細胞浸潤が観察され、肺胞の炎症を伴わない細気管支炎が形成された。この細気管支炎はびまん性に分布することが観察された。

Key words : 塩酸微量反復注入, TNF α 産生能, エラスターゼ様活性, アルブミン, びまん性嚥下性細気管支炎

緒 言

老年者では肺炎の頻度が高く、中でも嚥下性肺炎の比率が高いことが特徴である^{1)~3)}。嚥下性肺炎は一度罹患すると重篤となりやすく临床上重要な問題である⁴⁾⁵⁾。我々は老年者の剖検肺において通常の嚥下性肺炎の他にびまん性嚥下性細気管支炎(Diffuse Aspiration Bronchiolitis: DAB)が全例の1%にみられることを報告した^{6)~8)}。DABの成因は不明であるが、反復性の微量誤嚥がその成立に関与しているものと思われる。しかしながら反復性の微量誤嚥が肺内へ及ぼす影響については詳細な検討は少ない。このため今回我々

は微量反復誤嚥モデルを作成し誤嚥に伴い肺内に生じる生化学的ならびに形態学的変化を検討した。

対象と方法

1. 対象および実験方法

8～10週齢、体重200～250gのSD系、SPF(specific pathogen free)ラットを用いた。対象動物を2群に分け、塩酸微量注入(H)群(n=9)と生理食塩水注入(S)群(n=7)とした。注入方法は、ネンブタール(50mg/kg腹腔内投与)にて麻酔をした後、先端が気管入口部に固定できるように特殊に曲げたカテーテルを経口的に挿入し、その先よりH群には予め予備実験により致死率が約10%であることを確認したpH 1.4、0.4ml/kgの塩酸を隔日に2週間計7回気管内に経口注入した。S群には同量の生理食塩水を注入した。最終回注入1時間後ネンブタールの過量投与にてラットを屠殺し、気管支肺胞洗浄(Bronchoalveolar-Lavage: BAL)

E. Sudo, Y. Fukuchi, K. Ishida, T. Matsuse, T. Nagase, S. Teramoto, C. Jo, H. Matsui, Y. Higashimoto, H. Orimo: 東京大学老年病学教室

* T. Oka: 同 病理学教室

受付日: 1993. 11. 16, 採用日: 1994. 3. 17

を施行した。BALは清潔操作で気管を露出後、19ゲージカニューレを挿入し経気管的に5mlの生理食塩水を注入、30秒間放置後同一注射器に回収する操作を5回反復した。

得られた洗浄液を1,200rpmで5分間遠心し、上清と細胞成分に分けた。細胞成分についてはハンクス液(HBSS, Gibco, UK)2mlにて攪拌した。血算盤にて総細胞数を求め、ディフ・クイック染色を行い細胞分画を算定した。

また、両群の肺組織を観察するため、別に同様に処置した動物の肺を切除してホルマリン固定後ヘマトキシリン・エオジン染色に供した(両群それぞれn=6)。

2. 観察項目および測定方法

(1) TNF α 産生能測定

回収液を遠沈し(250g, 10分間, 4℃)上清をデカントした。沈澱した細胞成分にメディウム(RPMI 1640, 5%FBS含, ペントシリン100U/ml含)を加えて、細胞浮遊させた。細胞数と生存率をトリパンブルー法でカウントし、スライドを作成して肺胞細胞の細胞分画を測定した。細胞の生存率はいずれも90%以上であった。

4×10⁴Cell/100 μ lメディウムを96穴カルチャープレートにプラントし37℃, 5%CO₂, 95%エアーの条件で1時間培養した。次に、細胞を新しいメディウムで洗浄し、LPS (lipopolysaccharide; E. coliの菌体成分) 100 μ g/mlをふくむメディウムで15時間培養し、培養上清を採取してTNF α 活性を測定した。

TNF α 活性の測定はRuffらの方法⁹⁾で測定した。本法は、L929細胞(ATCC, USA)を利用したBio-Assay法である。L929細胞(8×10⁴)をMEMメディウムにサスペンションして96穴のカルチャープレートにプラントし、37℃で3時間培養したのち、サンプルカスタンダードのTNF α (Human Recombinant TNF α)を入れ、さらに、感度をよくするために、Actinomycin-D (1 μ g/ml)を加えた。

18時間培養後メディウムを捨て、洗浄後Crystal Violet溶液を加えた。10分間室温に放置後、蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させた。0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを加え吸光度を測定した。L929細胞に対する障害活性は抗TNF α 抗体で完全に中和された。測定の感度は10⁻²U/mlであった。

(2) 好中球エラスターゼ様活性測定

合成基質を用いて酵素アッセイ法により測定した。スタンダードはヒトエラスターゼ (Elastin Product

Company, Inc.)を用いた。

(3) アルブミン測定

アルブミンの測定はDoumasによるBCG法¹⁰⁾に従って測定した。BAL上清20 μ lとアルブミン発色試液(和光純薬, 75mMコハク酸緩衝液にBCG(ブロムクレゾールグリーン)を0.15mmol/lと、混濁防止のため界面活性剤としてBrij-35 (30%)を4ml/lの割合に溶解したpH 4.20±0.05の呈色液) 5,000 μ lを混合し、室温に10分間放置した。標準血清20 μ lとアルブミン発色試液5,000 μ lを対照として、分光光度計630nmを用い、吸光度を測定し比色定量により測定した。

3. 組織所見

切除肺は10%ホルマリン固定液を25cmH₂Oにて注入し、48時間以上定圧灌流固定した後、両側肺より各肺葉の5切片(右肺より3切片、左肺より2切片)を得、顕微鏡観察用に5 μ mのヘマトキシリン・エオジン染色切片を作製した。

4. 統計解析

2群間比較はStudentのt検定にて行った。

成 績

(1) 洗浄液細胞数並びに細胞分画

肺胞洗浄液の回収率にはH, S両群間に差はなかった。肺胞洗浄液中の細胞数並びに細胞分画はそれぞれ図1, 図2に示した。細胞数は、S群5.4×10⁵/ml, H群6.6×10⁵/mlと有意差はみられなかった。細胞分画はS群で好中球1.7%, リンパ球0.2%, マクロファージ98.1%, H群で好中球2.4%, リンパ球1.2%, マクロファージ96.4%と両群に差を認めなかった。

(2) TNF α 産生能

図1 生理食塩水注入(S)群と塩酸注入(H)群の肺胞洗浄液中の細胞数を表す。棒グラフはMean±SEを示す(N.S.=no significant difference)。

図2 両群の細胞分画を表す。

図3 生理食塩水注入 (S) 群と塩酸注入 (H) 群を $\text{TNF}\alpha$ 産生能の spontaneous と $\text{LPS } 100\mu\text{g}$ で刺激した際との比率で比較したものである。棒グラフは $\text{Mean} \pm \text{SE}$ を示す (N.S.=no significant difference)。

先ず $\text{TNF}\alpha$ 産生能を無刺激時に S 群, H 群で比較したところ S 群は $0.2 \pm 0.07 \text{ Units/ml}$, H 群 $1.1 \pm 0.43 \text{ Units/ml}$ と H 群が高い傾向を示したが有意差はみられなかった。次に肺胞マクロファージの $\text{TNF}\alpha$ 産生能を無刺激時と $\text{LPS } 100\mu\text{g}$ で刺激した際の比率で両群を比較したところ (図3), S 群 233 ± 129 , H 群 308 ± 99 と有意差は認められなかった。

(3) 好中球エラスターゼ様活性

好中球エラスターゼ様活性は両群とも検出限界以下であった。

(4) アルブミン値

図4に示すが, S 群 0.029 ± 0.006 , H 群 0.028 ± 0.008 と両群に差は認められなかった。

(5) 病理組織所見

S 群 (n=6) には肺胞腔や隔壁に変化を認めなかった (図5)。H 群 (n=6) の中で2匹にヘモジデリンを食

図4 両群のアルブミン値の比較 ($\text{Mean} \pm \text{SE}$) (N.S.=no significant difference)。

図5 生理食塩水注入後の肺病理組織像 (H.E. 染色)。

図6 塩酸注入群に認められたヘモジデリンを貪食する肺胞マクロファージの増加像 (H.E. 染色)。

食する肺胞マクロファージの増加像がみられた (図6)。その2匹に右上中下, 左上下の5肺葉で作製した各切片において細気管支周囲に局限した細胞浸潤が1

図7 塩酸注入後細気管支周囲に局限して観察された細胞浸潤 (H.E. 染色)。

つの切片につき2～3カ所観察された(図7)。

考 察

老化に伴い呼吸器疾患の頻度は増加し、老年者の肺炎は最も重要な直接死因の一つとなっている^{1)~3)}。しかしその早期診断は必ずしも容易ではなく、至適治療法の確立には多くの問題が山積しているのが現状である。老年者の肺炎の特徴としては、臨床症状や血液学的検査所見が非定型的であることや嚥下性肺炎の頻度が高く、その予後が不良であることが挙げられる⁴⁾⁵⁾。

嚥下性肺炎患には細気管支炎がびまん性に観察される一群があり、山中ら⁶⁾はその剖検所見が肉眼的にも組織学的にもびまん性汎細気管支炎(DPB)と極めて類似することを報告した。その後散発的に誤嚥性DPBの名称の下に症例報告が行われている。しかしDPBを臨床的疾患単位とする考え方⁷⁾が提唱されるにおよんで、原因不明のDPBと成因が明らかな誤嚥性DPBの関係は疾患理解の上で無理を生じる可能性が生じてきた。そこで我々は自験例の検討に基づいてこのような誤嚥性細気管支炎を誤嚥性DPBとするよりは、びまん性嚥下性細気管支炎(DAB)として検討すべきことを提唱した⁸⁾¹¹⁾¹²⁾。

嚥下性肺炎患の成立機序を検討するにあたり塩酸の気道内投与が動物を用いたモデル実験において用いられてきた^{13)~26)}。これはMendelsonが、0.1N塩酸をウサギの気管内に投与して、嚥下性肺炎と組織学上区別つかない重篤な出血性肺炎と肺水腫を生じさせたことより始まる¹³⁾。その後、塩酸はウサギ¹⁴⁾¹⁵⁾、イヌ¹⁶⁾¹⁷⁾をはじめとしてラット^{18)~23)}、ヒツジ²⁴⁾²⁵⁾、ヤギ²⁶⁾などでも同様の肺障害を起こすことが分かってきた。

しかしこれまでの報告はいずれも実験的に急性肺障

害を引き越したものである。本研究ではこれらの研究と異なり、8～10週齢のラット(人間のyoung-adultに相当する)を用い反復微量誤嚥による嚥下性肺炎モデルを作成し、肺内に生じる生化学的及び形態学的変化を検討した。肺胞洗浄液中の細胞数は、生理食塩水注入群 $5.4 \times 10^5/\text{ml}$ 、塩酸注入群 $6.6 \times 10^5/\text{ml}$ と有意差はみられず、細胞分画も両群に差を認めなかった。肺胞マクロファージのTNF α 産生能を無刺激時とLPS 100 μg で刺激した際との比率で両群を比較すると両群に差は認められなかった。好中球エラスターゼ様活性は両群とも検出限界以下であった。

病理組織所見では塩酸注入群の6匹中2匹にBALT(bronchial-associated lymphoid tissue)様のリンパ組織の発達や、ヘモジデリンを貪食する肺胞マクロファージの増加像を認め、その2匹の各切片において、気管支、肺胞に変化を生じず、細気管支周囲に局限した細胞浸潤がびまん性に観察され、形態学的にDABと考えられるモデルが観察された。

今回用いたよりも強力なpH 1.0, 2.0ml/kgの塩酸注入によって生じる生理学的変化は、主として肺血管内皮細胞の障害と肺血管透過性亢進による肺水腫であり、さらにこれは肺血管収縮により修飾される¹⁴⁾²⁶⁾。障害の発生機序についてはまだ明らかにされていないが、障害の初期には病理学的変化に乏しいものの、4時間後には肺間質内に好中球の集積がみられる²⁷⁾ことから、好中球から放出されるエイコサノイド(LTB $_4$)、オキシゲンフリーラジカル、プロテアーゼが組織の障害に働くものと考えられている。即ち塩酸注入により肺胞マクロファージが活性化され、補体、LTB $_4$ 、血小板活性化因子(PAF)、トロンボキサンA $_2$ (TxA $_2$)などを産生・放出する¹⁸⁾²¹⁾²²⁾。そしてこれらが肺血管系に作用して好中球を肺血管床に動員し、血管壁に付着させる。ラットを用いた報告では塩酸注入30分後にBALF中白血球数が、1.5時間後に蛋白、2時間後に好中球数が増加している²²⁾。好中球はオキシゲンフリーラジカル、LTB $_4$ 、PAF、エラスターゼを放出し血管壁さらに細胞組織などを破壊すると考えられる。

今回の我々の塩酸微量反復注入実験において肺胞洗浄液中の細胞数、サイトカイン、好中球プロテアーゼ、アルブミンなど生化学的所見には、我々が報告した単回刺激²³⁾のような有意な変化を生ずることがなくても、反復する刺激により形態学的にびまん性細気管支炎が生じることが観察された。なお、我々はpH 1.4, 0.7ml/kgの塩酸単独注入1時間後に屠殺し病理所見

を検討した（未発表データ）が、投与1時間後では本研究でみられたような病理所見（肺出血等）は認められなかった。よって今回の病理所見は、最終投与日の塩酸注入による急性の影響ではなく、微量反復注入による変化と考えられた。このようにDABの成立に関与する因子として塩酸の反復微量誤嚥が関与していることが示された。今回の実験でびまん性細気管支炎は、同様の刺激を与えた動物の中の33%（6匹中2匹）にみられたが、臨床的にはDABが剖検例の1%にみられるにすぎないことを考慮すると、宿主側に細気管支炎の成立を左右する要因が存在するものと思われる。今回の実験では有意差がみられないサイトカイン、好中球プロテアーゼ、アルブミンなどの因子は否定的であるが、その他の種類のサイトカイン、プロテアーゼなどの因子については今後の検討が必要である。また、今回の病理所見では、临床上実際にみられる少量異物反復誤嚥による病変に特徴的な異物巨細胞はみられなかった。今後は少量の異物と塩酸の気管内同時反復注入により、临床上認められる微量誤嚥モデルの検討も加えるべきであろう。

文 献

- 1) 福島保喜, 福地義之助: 老人肺と呼吸器疾患. 日胸疾会誌 1974; 12: 741—745.
- 2) 原沢道美: “老人肺の臨床”. 日内会誌 1984; 73: 1565—1582.
- 3) 福島保喜: 高齢者の肺炎. 臨床と研究 1985; 62: 2794—2799.
- 4) 矢野清隆, 福地義之助, 原沢道美: 老年者肺炎の特徴. 呼吸 1985; 4: 915—919.
- 5) 福地義之助, 矢野清隆, 蘇 寛泰, 原沢道美: 救急医療を要する呼吸器感染症の診断—高齢者一. 総合臨床 1981; 30: 2882—2886.
- 6) 山中 晃, 斉木茂樹, 岡本賢三: 呼吸細気管支領域の特殊性とその病変の成立. 日本臨床 1978; 36: 2427—2433.
- 7) Homma H, Yamanaka A, Tanimoto S, Tamura M, Chijimatsu Y, Kira S, Izumi T: Diffuse panbronchiolitis. Chest 1983; 83: 63—69.
- 8) 福地義之助: 老年者の嚥下性肺炎とびまん性嚥下性細気管支炎. 臨床と研究 1988; 65: 1092—1095.
- 9) Ruff MR, Gifford GE: Tumor necrosis factor. Lymphokines 1981; 2: 235—272.
- 10) Dumas BT, Watson WA, Biggs HG: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chim Acta 1971; 31: 87—96.
- 11) 福地義之助, 松瀬 健, 木田厚瑞: びまん性嚥下性細気管支炎の臨床. 日胸疾会誌 1987; 27: 571—577.
- 12) 松瀬 健, 福地義之助, 石田喜義: 誤嚥性細気管支炎の病理学的検討. 日胸疾会誌(増) 1987; 25: 244—248.
- 13) Mendelson CL: The aspiration of stomach contents into the lungs during obstetric anesthesia. Am J Obstet Gynecol 1946; 52: 191—205.
- 14) Jones JG, Berry M, Hulands GH, Crawley JCW: The time course and degree of change in alveolar-capillary membrane permeability induced by aspiration of hydrochloric acid and hypotonic saline. Am Rev Respir Dis 1978; 118: 1007—1013.
- 15) Lamm WJE, Albert RK: Surfactant replacement improves lung recoil in rabbit lungs after acid aspiration. Am Rev Respir Dis 1990; 142: 1279—1283.
- 16) Utsunomiya T, Krausz MM, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB: Treatment of aspiration pneumonia with ibuprofen and prostacyclin (PGI₂). Surgery 1981; 90: 170—176.
- 17) Utsunomiya T, Krausz MM, Dunham B, Valeri CR, Levine L, Shepro D, Hechtman HB: Modification of inflammatory response to aspiration with ibuprofen. Am J Physiol 1982; 243: 903—910.
- 18) Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Patterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB: Localized acid aspiration leads to thromboxane dependent generalized pulmonary edema. Surg Forum 1989; 40: 258—260.
- 19) Kennedy TP, Johnson KJ, Kunkel RG, Ward PA, Knight PR, Finch JS: Acute acid aspiration lung injury in the rat: Biphasic pathogenesis. Anesth Analg 1989; 69: 87—92.
- 20) Goldman G, Welbourn R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB: Tumor necrosis factor- α mediates acid aspiration induced systemic organ injury. Ann Surg 1990; 212: 513—519.
- 21) Goldman G, Welbourn R, Kobzik L, Valeri CR,

- Shepro D, Hechtman HB: Activated neutrophils mediate acid aspiration induced multiorgan injury. *Surg Forum* 1990 ; 41 : 51—54.
- 22) Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB : Neutrophil accumulations due to pulmonary thromboxane synthesis mediate acid aspiration injury. *J Appl Physiol* 1991 ; 70 : 1511—1517.
- 23) 須藤英一, 福地義之助, 石田喜義, 松瀬 健, 長瀬隆英, 寺本信嗣, 東本有司, 徐 中宇, 松井弘稔, 岡 輝明, 折茂 肇: 急性気道損傷動物モデルによる嚥下性肺炎に関する実験的研究. *日老医誌* 1993 ; 30 : 1032—1038.
- 24) Kobayashi H, Kobayashi T, Fukushima M : Effects of dibutyl cAMP on pulmonary air embolism-induced lung injury in awake sheep. *J Appl Physiol* 1987 ; 63 : 2201—2207.
- 25) Stothert JC, Basadre JO, Gbaanador GBM, Flynn J, Traber L, Herndon DN, Traber DL : Airway aspiration of hydrochloric acid in sheep. *Circ Shock* 1990 ; 30 : 237—254.
- 26) Winn R, Stothert J, Nadir B, Hildebrandt J : Lung fluid balance, vascular permeability, and gas exchange after acid aspiration in awake goats. *J Appl Physiol* 1984 ; 56 : 979—985.
- 27) Wynne JW : Aspiration pneumonitis. Correlation of experimental models with clinical disease. *Clin Chest Med* 1982 ; 3 : 25—34.

Abstract

Diffuse Aspiration Bronchiolitis (DAB) Produced in Animals by Repeated HCl Microaspiration

Eiichi Sudo*, Yoshinosuke Fukuchi*, Kiyoshi Ishida*, Takeshi Matsuse*, Takahide Nagase*, Shinnji Teramoto*, Chuu Jo*, Hirotoshi Matsui*, Yuji Higashimoto*, Teruaki Oka** and Hajime Orimo*

We recently reported that diffuse aspiration bronchiolitis (DAB) was detected in 1% of autopsied lungs of aged cases of pneumonia. We hypothesized whether repeated HCl micro-aspiration (RHMA) is involved in DAB and established an animal model by administering HCl intratracheally to rats every two days for 2 weeks. Saline was given to control animals in the same fashion. Then, we performed bronchio-alveolar lavage (BAL) or

excised lungs for histologic examination. There was no difference in BAL cell counts, TNF α -production, elastase-like activity or albumin levels between the HCl and control groups. Histologically, DAB-like findings were observed in the HCl-treated animals. These data suggest that RHMA might be involved in DAB, while neither TNF α -production nor elastase-like activity may play a significant role in inducing DAB.

Key words: *Chronic microaspiration, HCl, TNF α -production, Elastase-like activity, Albumin, Diffuse aspiration bronchiolitis*

(*Jpn J Geriatr* 1994; 31: 435—440.)

* Department of Geriatrics, Faculty of Medicine, University of Tokyo

** Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Tokyo