〈原 著〉

肺での LacZ 遺伝子発現によって誤嚥の機序を 検討する嚥下性肺炎の動物モデル

寺本 信嗣¹⁾ 井藤 英喜²⁾ 松瀬 健¹⁾ 松井 弘稔¹⁾
大賀栄次郎¹⁾ 片山 弘文¹⁾ 岡 輝明³⁾ 大内 尉義¹⁾

〈要 約〉 嚥下性肺炎は老年者に頻度が高く、死因としても重要であるが、病態を解析するための動物モデルはあまり検討されていない。我々は、C57black mouse に対して遺伝子導入の評価に用いられる E1 遺伝子領域を除いて E. coli LacZ 遺伝子を組み込んだ Adenovirus vector (Ad-CMV-LacZ) を麻酔下と無麻酔下に分けて経鼻的に投与し、LacZ 遺伝子の発現を X gal 染色によって検討した。その結果、無麻酔下のマウスに対する Ad vector 経鼻投与では、投与した鼻腔には LacZ 遺伝子発現を認めたが、気管、両肺には、遺伝子発現は 1 例もなかった。一方、麻酔下に Ad vector を経鼻投与した群では、全例で肺に LacZ 遺伝子発現がみられ、半数のマウスで気管にも遺伝子発現がみられた。したがって、麻酔下のように意識や嚥下反射が障害された状態では、口腔、鼻腔内の微生物や口腔内容物を高率に誤嚥する可能性があり、この誤嚥の機序や誤嚥内容物の肺内分布の検討に麻酔下での Ad-CMV-LacZ 経鼻投与動物モデルは有用と考えられる。

Key words: 嚥下性肺炎, アデノウイルスベクター, LacZ 遺伝子, 経鼻投与, 麻酔, 誤嚥

(日老医誌 1998; 35: 303—306)

はじめに

老年者の嚥下性肺炎は、症候が非定型的で診断が困難な一方で予後が不良であり、老年者の実地臨床における重要性が高い。近年、嚥下機能や上気道反射に関する研究が進歩し、加齢にともなう上気道反射の変化や、誤嚥や嚥下障害の病的意義が明らかになってきている^{1)~7)}。しかし、嚥下障害と嚥下性肺炎との関連をウイルスや細菌などの病原体を用いてヒトで研究することは倫理的に不可能である。そこで、動物モデルによる検討が有用と考えられるが、このような目的にかなう適切な動物モデルは示されていない。

今回われわれは、遺伝子治療の遺伝子導入効率を判定するために用いられる LacZ 遺伝子を組み込んだ Adenovirus vector⁸⁾を麻酔下に経鼻的に投与することで、気管や肺内に遺伝子発現を検出し、誤嚥による嚥下性肺炎の解析に役立つ新しい動物モデルとなると考えられたので報告する。

対象と方法

東京都老人医療センターの動物実験施設において繁

殖、飼育された 6 カ月例の雄性 C57 black (C57BL) mouse (体重 30~35g) 30 匹を用いた。

Adenovirus (Ad) vector は野生型 adenovirus type 5 を基本骨格とし、全 E1 遺伝子領域と殆どの E3 遺伝子領域を除き、代わりに CMV promoter, E. coli LacZ 遺伝子を組み込んだものを用いた^{9)~11)}。このベクター (10^{12-13} pfu/ml) を燐酸緩衝液 (PBS) 20 μ l 中に 10^{10} pfu 含まれるように調整し、マウスに右鼻腔より全量を 4 回に分けて投与した。対照マウスには、右鼻腔より PBS のみを 20 μ l 全量を 4 回に分けて投与した。この操作をネンプタル麻酔下 (ペントバルビタール 10mg/kg)、無麻酔の 2 つの状態でおこなった。1 例も死亡例はなく、2 日後に麻酔下に脱血後、鼻腔粘膜、気管、両肺を摘出し、0.5% glutaraldehyde で固定後、X gal 染色によって LacZ 遺伝子発現を検出して評価した。V gal 染色は、1mM MgCl₂ を含む PBS で 2 回洗浄したのち、直前に調整した X-gal (Sigma Co.) 1mg/ml を含む 5mM K₃ Fe (CN)₆, 5mM K₄ Fe (CN)₆ 溶液で 4 時間染色した^{9)~11)}。

なお、ベクターの細胞に感染させる際の基準単位として、細胞 1 個あたりの plaque forming unit (pfu) を multiplicity of infection (moi) として計算すると、今回使用したベクターの pfu/moi 比は 20—50 であった。

結 果

C57BL マウスについて無麻酔条件と麻酔下での Ad vector 経鼻投与後の組織所見を示す (図 1, 2)。投与し

1) S. Teramoto, T. Matsuse, H. Matsui, E. Ohga, H. Katayama, Y. Ouchi: 東京大学医学部老年病学教室

2) T. Oka: 東京都老人医療センター内分泌科

3) H. Ito: 同 病理学教室

受付日: 1997. 11. 26, 採用日: 1997. 12. 8

図1 C57BL マウスに無麻酔条件 (麻酔 (-))と麻酔下 (麻酔 (+))で Ad vector 経鼻投与後の鼻粘膜と気管の組織所見。投与した鼻腔には無麻酔下と麻酔下ともに青色に染まる LacZ 遺伝子発現を認めたが、気管は、麻酔下でのみ LacZ 遺伝子発現を認めた。

た鼻腔には無麻酔でも麻酔下でも、ともに LacZ 遺伝子発現を認めたが、無麻酔条件では気管、両肺には、遺伝子発現はみられていない。一方、麻酔下に Ad vector を経鼻投与した場合、鼻腔のほかに気管、両肺にも、遺伝子発現を認めている。

これらの遺伝子発現の有無についてのまとめを表1に示す。無麻酔群では、投与した鼻腔にのみ LacZ 遺伝子発現を認めたが、気管、両肺での遺伝子発現は1例もなかった。麻酔下では、いずれの場合も、投与した鼻腔にのみならず、全例で肺に LacZ 遺伝子の発現がみられ、半数のマウスで気管にも遺伝子発現がみられた。

PBS を鼻腔に投与したマウスについては、1例も LacZ 遺伝子発現みられなかった。

考 察

嚥下性肺炎は、老年者の死亡原因として重要なものの一つである。老年者では、高頻度に不顕性の誤嚥が生ずるが、誤嚥の結果生ずる肺炎の分布や炎症の広がりを定量的に測定することは容易ではない。

意識や悪い患者や日常生活動作の低下した症例における口腔内容物の誤嚥の臨床的重要性は、イソジンによる口腔内清拭の徹底により、発熱期間を有意に抑制したという報告によって間接的に証明されている¹²⁾。また、嚥下に対する中枢機能の重要性は、嚥下を行う筋肉群に関

図2 C57BL マウスに無麻酔条件 (麻酔 (-))と麻酔下 (麻酔 (+))で Bd vector 経鼻投与後の肺の組織所見。無麻酔マウスでは肺には青色に染まる LacZ 遺伝子発現はみられないが、麻酔下のマウスでは細気管支領域を中心に LacZ 遺伝子発現を認めた。

表1 LacZ 遺伝子の発現の頻度

麻酔	(+)	(-)	(+)
投与内容	PBC	Ad vector	Ad vector
鼻粘膜	0/10(0%)	10/10(100%)	10/10(100%)
気管	0/10(0%)	0/10(0%)	5/10(50%)
肺	0/10(0%)	0/10(0%)	10/10(100%)

麻酔、ネンブタール麻酔；PBS, phosphate buffer solution；Ad vector, Ad-CMV lacZ vector。

わる大脳皮質領域の存在や脳幹部の中核プログラム発生器からの刺激による嚥下筋群の収縮などによって実証されている¹³⁾¹⁴⁾。さらに、Nakagawa ら¹⁵⁾は、大脳基底核の脳梗塞患者で嚥下性肺炎の頻度が高いことを報告しており、脳病変にともなう嚥下障害が嚥下性肺炎と深く関わっていることが示唆される。

すでに、咽喉頭の麻酔によって嚥下反射が低下することは知られていたが^{16)~18)}、意識レベルの低下や嚥下反射の低下によって惹起される誤嚥が、どのように肺内に分布し、炎症を惹起するかについて定性的、定量的に解析し得る有用な動物モデルは報告されていない。ヒトでは放射線同位元素を用いて口腔内容物を肺内へ誤嚥することが証明されているが¹⁹⁾、そのことが口腔内容物が気管上皮細胞傷害や気道感染を惹起したかどうかまでは検討できない。

今回、LacZ 遺伝子を組み込んだ Adenovirus vector

(Ad-CMV-LacZ) を麻酔下に経鼻的にマウスに投与することで、気管上皮細胞や肺内細胞に遺伝子発現を検出した。無麻酔の状態では、鼻腔上皮には遺伝子発現を認めなかった。このことは、意識下では嚥下反射が維持され、誤嚥がないために、通常は気管内まで鼻腔内容物が到達しないことを示唆している。他方、麻酔下の動物では全例で鼻腔、肺に遺伝子発現を検出した。したがって、意識が低下し、嚥下反射が抑制された条件では、高率に誤嚥が生じ、鼻腔や口腔の内容物が容易に下気道にまで到達し、気道感染を生ずることが示唆された。このように本モデル動物では、鼻腔に投与した液体が肺内に到達し、肺細胞内にまで侵入することを視覚的に確認でき、その分布も検討できる点で有用と考えられる。今後は、これらの検討に加え、Ad-CMV-LacZ とともにリポポリサッカライドなどの菌体成分を同時投与した場合の病変の広がりなどについても検討すべきと考える。いずれにしても、従来にはなかった、嚥下性肺炎の解析に役立つ新しい動物モデルとなると考えられたので報告した。

文 献

- 1) Horner J, Massey E: Silent aspiration following stroke. *Neurology* 1988; 38: 317—319.
- 2) 西野 卓: 上気道反射と呼吸化学調節系の相互作用。呼吸と循環 1987; 35: 501—508.
- 3) Marumo K, Honma S, Fukuchi Y: Postgastrectomy aspiration pneumonia. *Chest* 1995; 107: 453—456.
- 4) Matsuse T, Oka T, Kida K, Fukuchi Y: Importance of diffuse aspiration bronchiolitis caused by chronic occult aspiration in the elderly. *Chest* 1996; 110: 1289—1293.
- 5) Feinberg MJ, Knebl J, Tully J, Segall L: Aspiration and the elderly. *Dysphagia* 1990; 5: 1289—1293.
- 6) Katsumata U, Sekizawa K, Ebihara T, Sasaki H: Aging effects on cough reflex. *Chest* 1995; 107: 290—291.
- 7) Feinberg MJ, Knebl J, Tully J, Segall L: Prandial aspiration and pneumonia in an elderly population followed over 3 years. *Dysphagia* 1996; 11: 104—109.
- 8) Wilson JM: adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med* 1996; 334: 1185—1187.
- 9) 寺本信嗣, 松瀬 健, 長瀬隆英, 斎藤恵理香, 和田裕雄, 大賀栄次郎, 片山弘文ほか: 2種類の DNA virus vector による培養ヒト気道上皮細胞への遺伝子導入の特徴。日胸疾会誌 1997; 35: 761—765.
- 10) Teramoto S, Johnson LG, Huang W, Leigh M, Boucher RC: Effect of adenoviral vector infection on cell proliferation in cultured human primary airway epithelial cells. *Hum Gene Ther*, 1995; 6: 1045—1053.
- 11) Teramoto S, Matsuse T, Ohga E, Nagase T, Fukuchi Y, Ouchi Y: Kinetics of adenovirus-mediated gene transfer to human lung fibroblasts. *Life Sci* 1997; 61: 891—897.
- 12) 佐々木英忠: 老年者慢性気道疾患の病態と治療。日胸疾会誌 1991; 29: 1227—1233.
- 13) Hamdy S, Aziz Q, Rothwell JC, et al: The cortical topography of human swallowing musculature in health and disease. *Nature Med* 1996; 2: 1217—1224.
- 14) Dimant NE. Firing up the swallowing mechanism. *Nature Med* 1996; 2: 1190—1191.
- 15) Nakagawa T, Sekizawa K, Arai H, et al: High incidence of pneumonia in elderly patients with basal ganglia infarction. *Arch Intern Med* 1997; 157: 321—324.
- 16) Olsson GL, Hallen B, Hanmbræus-Jonzon K: Aspiration during anesthesia: a computer-aided study of 185, 358 anesthetics. *Acta Anaesthesiol Scand* 1986; 30: 84—92.
- 17) Nishino T, Takizawa K, Yokokawa N, Hiraga K: Depression of the swallowing reflex during sedation and/or relative analgesia produced by inhalation of 50% N₂O in oxygen. *Anesthesiology* 1987; 67: 995—998.
- 18) Isono S, Ide T, Kochi T, Nishino T: Effects of partial paralysis on the swallowing reflex in conscious humans. *Anesthesiology* 1991; 75: 980—984.
- 19) Kikuchi R, Watabe N, Konno T, Mishina N, Sekizawa K, Sasaki H: High incidence of silent aspiration in elderly patients with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med Respir Dis* 1994; 150: 251—253.

Abstract

**An Animal Model of Aspiration and Aspiration Pneumonia using
LacZ Gene Expression in Lungs by Adenoviral vectors**

Shinji Teramoto¹⁾, Hideki Ito²⁾, Takeshi Matsuse¹⁾, Hirotoshi Mastui¹⁾,
Eijiro Ohga¹⁾, Hirofumi Katayama¹⁾, Teruaki Oka³⁾ and Yasuyoshi Ouchi¹⁾

To examine the relationship between disturbed upper airway reflexes and aspiration pneumonia, we administered a total volume of 20μl of Ad-CMV-lacZ (Ad vector) or 20μl of phosphate buffer solution (PBS) intranasal to C57 black mice. In nostrils, the lacZ gene expression was investigated in each mouse with or without anesthesia. Under anesthesia, the lacZ gene expression was detected by Xgal staining in the lungs of every mouse given the Ad vector. However, no gene expression was measured in the lungs of those given the Ad vector without anesthesia. In mice treated with PBS, there was no lacZ gene expression in the nostrils, trachea, or lungs, irrespective of anesthesia. These results suggest that unconsciousness or disturbed upper airway reflexes caused by anesthesia caused aspiration, resulting in an intranasal bolus that can reach the lower airways. This process can be analyzed in mice treated with adenovirus vectors carrying the E. coli LacZ gene. Mice given Ad-CMV-lacZ transnasally can be used to study aspiration pneumonia in relation to unconsciousness.

Key words : *aspiration pneumonia, adenovirus vector, LacZ gene, intranasal administration, anesthesia, aspiration*
(Jpn J Geriatr 1998 ; 35 : 303—306)

1) Department of Geriatrics

2) Department of Endocrinology, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital

3) Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, 7—3—1 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655