— 原 著 —

Paraquat 投与時にみられる肺胞壁線維化病変の 発症機序に関する電子顕微鏡的研究

鈴木 紘之

日本医科大学第1病理学教室 (主任: 馬杉洋三教授
指導: 相原 薫助教授)

An ultrastructural study of the Paraquat induced intra-alveolar fibrosis of the lung

Hiroyuki Suzuki

The First Department of Pathology, Nippon Medical School

The author carried out an ultrastructural investigation into the causative mechanism of pulmonary fibrosing alveolitis induced by Paraquat administration to the rats on a chronological basis. An attempt was made to correlate the morphological changes with the surfactant activity which was measured by the modified Wilhelmy Balance (Nozaki).

The results obtained are as follows:

1) After Paraquat administration, swelling and degeneration of the type I epithelial cells were observed. The aggregate of fibrin and polymorphonuclear cells was also noted. Then the changes of the osmiophilic bodies of type II epithelial cells were discernible, followed by interstitial edema.

2) In a rather prolonged stage, activated fibroblasts and myofibroblasts increased in number while fibro-collagenous tissue proliferated in alveolar space. Activation of type II epithelial cells and alveolar macrophages was also striking. Intra-luminal narrowing of vasculature, microthrombus formation as well as perivascular fibrosis were also remarkable.

3) The tannic acid stain disclosed the elastic fiber component. The elastic fibers which were basically composed of elastin and elastic microfilaments were undergoing extensive degeneration which was clearly associated with the proliferation of the fibro-collagenous fibers. In this context, the alteration of the elastic component was closely associated with the causative mechanism of pulmonary fibrosis in this particular condition.

4) The alteration of the pulmonary surfactant which was measured by the modified Wilhelmy Balance (Nozaki) disclosed an intimate interrelation between disruption of the alveolar lining layer as well as degeneration and loss of the type II epithelial cells.

5) Thus it is concluded that the pulmonary fibrosing pathology induced by the Paraquat injection may offer a very versatile experimental model to clarify the initial and progressive stages of fibrosis of the lung.

Key words: Paraquat, pulmonary fibrosing alveolitis, pulmonary surfactant, alveolar lining layer, osmiophilic bodies

緒 言

Present address: The First Department of Pathology,
Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku,
Tokyo, 113 Japan

呼吸器系疾患としては従来結核菌,あるいはウイルス感染症がその大半を占め,今もその重要性は否定すべくもないが,世界保健機関(WHO)の統計によると

近年社会構造 (Infrastructure) の複雑化によって肺の線維症を最終病変とする原因不明の疾患は激増の一途をたどり、その病因の解明、進展の阻止、ならびに治療法の確立は焦眉の急務であるといえる¹⁾。臨床的には Hamman-Rich 症候群²⁾のような原因不明な肺疾患と大気汚染、重金属中毒、放射線照射制癌剤、ならびにその他の薬剤投与に続発したり、各種の抗原抗体反応の帰結として生じるアレルギー性肺炎に続発するものなどが報告されている。

わけても近年世界各国で広く有効な除草剤として使用されるに至っている Paraquat (Gramoxon, 1,1'-dimethyl-4,4'-dipyridium dichloride) は不可逆的な肺線維症を急速に生じさせる薬剤としてにわかに注目を集めるに至った³⁻⁶⁾。例えば、バプアニューギニア (Wohlfart^{7,8)})、マレーシア (Chester⁹⁾)、あるいはメキシコ産の marihuana から Paraquat の付着が検出されたとの報告がみられる (Zavala¹⁰⁾, Landrigan¹¹⁾)。これは本除草剤が比較的少量の経口噴霧、あるいは腹腔内投与により高率に肺の不可逆的な線維症を惹起することができるのみならず、社会的にみてその多用、乱用、あるいは誤用による死亡率や中毒例の急増によるその対策の確立が急務とされていることを示しているにほかならない (名取⁵⁾, 米山⁶⁾, Hunter¹²⁾)。その事由のいかに問わず、Paraquat の飲用に伴う肺線維症は世界各国で急増しており、本邦もその例外ではなく、その対策についてはもはや社会医学的な問題であるといえよう。同時に本剤を用いる肺線維症の発生、その進展機序の解明も活発に行われるに至っている。著者の研究室においても、肺の界面活性物質、あるいは肺胞被覆層についての超微形態学的研究を展開しているが¹³⁻¹⁵⁾、今回これらの肺胞構成要素と Paraquat がいかなるかわりあいをもつかについて主として電顕的に検索し、いささかの興味ある知見を得たのでここに報告する。

実験材料および方法

(1) 実験材料

体重 250~300 g の Wistar 系雄ラット 30 匹を実験に用いた。まず 3 匹ずつの 10 群に分け、生理的食塩水のみを腹腔内に注射した対照群、Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-dipyridium dichloride, Gramoxon, 日本農業提供, 25 mg/kg) を腹腔内に注射後、経時的に 1, 6 時間, 1, 2, 3, 4 日, 1, 3, 6 週間後にそれぞれ頸椎の亜脱臼により屠殺した。

(2) 実験方法

1) 形態学的検索

i. 光学顕微鏡的検索

開胸により得られた肺小葉の一部は 10% 中性ホルマリンにて固定、型のごとく系列アルコールにて脱水後、パラフィンに包埋、HE, Azan, PAP, PAM, PAS 染色を施して光学顕微鏡的に観察した。

ii. 電子顕微鏡的検索

肺の細切小片は直ちに 2.5% グルタルアルデヒドに前固定、緩衝液にて洗浄後 1% オスミウム酸で後固定した。その後系列アルコールにて脱水後、プロピレンオキシドにて置換、Epok 812 樹脂に包埋し、熱重合後 LKB-8800 超薄ミクロトームにて灰白色の干渉色を示す超薄切片を作成、Reynolds の方法¹⁶⁾に準じて酢酸ウラン、水酸化鉛染色を行い、日立電子顕微鏡 H-800 型を用い加速電圧 75 kV にて観察し、適宜 Durst 138 S 型引伸機を用いて観察した。また一部の超薄切片については弾性線維の動態を観察するために、Kajikawa らの方法¹⁷⁾に準じて 1% タンニン酸 (pH 6.4) 染色を用いて検索を行った。また一部の切片については PAM 染色を施した¹⁸⁾。

2) 肺表面活性物質の動態についての観察

肺表面活性物質の活性の変動と超微形態学的変化との相関を検討するため、4 時間, 3 日目, 14 日目に屠殺したラット肺を摘出後、mincing 法により粉碎したのち遠心分離を 3 回繰り返し White layer を抽出し、modified Wilhelmy Balance により野崎の方法¹⁹⁾に準じて surface-tension curve を描出せしめた。

観察結果

1. Paraquat 注射時の肺の光学顕微鏡的所見

Paraquat 注射後すでに 1~4 時間で毛細血管の充血、拡張がみられ、好中球浸潤さらには部分的ながら出血が認められた。注射後 1 日では基本的な肺胞の構築は保たれているが、肺胞壁間質の浮腫状肥厚が出現し、さらに 3 日では肺胞中隔における単核球浸潤と肺胞腔への蛋白性液の滲出が著明に認められた。また毛細血管の充血も少なからず認められた。6 日目になるとこれらの多彩な変化のために肺胞腔は線維化し、肥厚した間質にそって単核球の浸潤が著しく、肺隔炎の所見がみられるようになった。3~6 週間になるとこれらの変化はさらに顕著となり、Paraquat 注射後早期の階段より認められていた部分的肺気腫 (focal emphysema) の変化はさらに増強された。6 週間後にな

ると、び漫性の膠原線維ならびに弾性線維の増生により肺胞壁は著しく肥厚し、正常の肺胞構築のほぼ完全な改築 (remodeling) が認められるに至った。

2. Paraquat 注射時の肺胞構築の変化に関する電子顕微鏡的研究

Paraquat を腹腔内に注射してすでに 1 時間で軽度ではあるが注目すべき所見がみられた。すなわち I 型上皮細胞の浮腫状変化であった (Photo 1)。またこの時期において肺胞壁へフィブリンの析出が認められた (Photo 2, 矢印)。この時期にはエラスチンはすでに融解を始め (Photo 3, 矢印)、肺胞壁間質における支持結合組織の変性、消失傾向が認められた。反面、弾性微小線維は比較的良好に保存されていた。6 時間を経過すると肺胞腔内に蛋白性液の著しい貯留 (Photo 4) と細胞破壊産物 (cellular cluster) の析出が認められた。間質の中隔細胞の細胞質には lipid droplet の増加が認められた。またこの時期においてはタンニン酸染色でエラスチンの完全な融解、消失 (Photo 5, 矢印) が認められた。反面、弾性微小線維は残存する傾向を示した。Paraquat 注射後 1 日では I 型上皮細胞の腫大、浮腫状変化はむしろ減少する傾向を示し、II 型上皮細胞の腫大、変性が認められるようになった (Photo 6)。また osmiophilic body の減少、変性、層状構造の乱れが顕著に認められた。変性しつつある osmiophilic body は断裂した肺胞被覆層の一部、または離断、脱落した II 型上皮細胞の debris とともに肺胞腔内に析出する傾向が観察された (Photo 7)。一方 Paraquat 注射後 2 日ではエラスチンの減少が著しく、弾性微小線維のみが残存し肺気腫の発生を示唆する所見を認めた (Photo 8)。Paraquat 注射後 1 週間になると肺胞壁の正常構築の改変 (remodeling) が発生する。すなわち I 型上皮細胞は広範に剝離し、基底膜が肺胞腔へ露呈するに至っていた (Photo 9, 矢印)。改築過程にある肺胞壁には豊富な空胞、または粗面小胞体等を含む線維芽細胞 (fibroblast, F)、筋線維芽細胞 (myofibroblast, M)、およびび漫性の膠原線維束の増生を認めた。またこの時期においては変性、脱落した II 型上皮細胞とともに好中球、肺胞貪食細胞 (Alveolar macrophage, AL-M) 等の細胞成分が豊富に出現しており、これに伴ってび漫性に膠原線維の増生が認められた (Photo 10)。また I 型上皮細胞が剝離した部分では II 型上皮細胞が増殖し、毛細血管網を覆っていた。この細胞質にはミトコンドリア、粗面小

Table 1 Surface Tension Curve, drawn by modified Wilhelmy Balance

	r max*	r min*	S.I.**
Control	52.5	8.5	1.0
4 hours	38.5	15.0	0.9
3 days	34.5	19.5	0.6
14 days	31.5	21.8	0.6

*dyne cm, **S.I. Stability Index

胞体等の細胞内小器官の増生が著しかった (Photo 11)。また注目すべき所見としては、この時期においていったん消失していたエラスチンが再び観察されるようになったことであった (Photo 12)。Paraquat 注射後 6 週間になると、肺胞洞 (alveolar duct) に一致する部位では肺胞壁は I 型上皮細胞より II 型上皮細胞により被覆されるようになっていた。細胞質、および核内の空胞化、あるいは lipid droplet の沈着が認められた。間質は肥厚し、弾性線維 (E)、および膠原線維 (Co) が著しく増加していた (Photo 13)。また毛細血管についてみると内皮細胞の腫大、ミトコンドリアの膨化、稜の消失が認められた。管腔には血小板を中心とする微小血栓の形成が少なからず認められたのが特徴であった (Photo 14)。この時期においてはタンニン酸染色によりエラスチンが再び増量 (Photo 15, 矢印)、弾性微小線維とともに特異的に染色されるようになった。

3. 肺界面活性物質の動態

肺組織の mincing により得られた White layer について野崎の方法¹⁹⁾に基づいて Wilhelmy Balance を用い surface-tension curve を描出させたところ hysteresis curve は扁位を示し、Stability Index (SI) は 4 時間ですでに減少を始め、3 日で顕著な低下を示し、明らかに界面活性物質が減少していることを示した (Table 1)。この変化は上記の II 型上皮細胞の osmiophilic body の変性、消失の時間的な経過とほぼ一致しているものと考えられた。

考 察

以上、本研究において得られた観察結果をもとにして、Paraquat のもつ線維化性肺胞隔炎の発生機序についていささかの考察を加えてみたい。

すでに述べたように、社会環境の複雑化、たとえば大気汚染、工業化社会の発達に伴う各種化学物質によ

る汚染、農業による汚染等は単に労働衛生上の問題というよりも環境衛生上の各国共通の問題となっている¹⁾。これらにより種々の疾患が発症するが、それらのうち特に重要なものとしては肺に線維化をきたす疾患群が挙げられよう。

これには Hamman-Rich 症候群²⁾のような原因不明なものと、降圧剤、制癌剤のような薬剤により誘発されるものや放射線の過剰照射による続発性のものが挙げられる。分けても薬剤のうち最も注目を集めているものに Paraquat (Gramoxon, 1,1'-dimethyl-4,4'-dipyridium dichloride)がある。これは 1960 年代より広く有効な農薬として世界各国で用いられるようになったものである。これはきわめて有効な農薬であることは疑いをいれないが、反面、白色、無臭、かつきわめて微量で致死に至らしめる点多用、乱用、誤用による中毒事故が相次ぎ、救急医療の分野でその適正な使用法の確立が要請されている薬剤の一つである。1960 年代より 1970 年当初までには約 200 例程度の症例が世界において報告されているにすぎなかったが、近年その乱用、誤用、あるいは無差別な致命目的で使用されるなど本剤による臓器障害には無視できないものがある(名取⁵⁾、米山⁶⁾)、本剤においては心・肝・腎等の障害も報告されているが肺障害、特に肺線維化は最も重要な臓器障害であると理解されている(Sonoda²⁰⁾、Homma²¹⁾、Haškovcova²²⁾、Hunter¹²⁾、永瀬¹⁵⁾、Fukuda²³⁾、Schoenberger²⁴⁾、Thurlbeck²⁵⁾、Rayan²⁶⁾、Rossouw²⁷⁾、Greenberg²⁸⁾、Smith²⁹⁾ら)。本剤による中毒例は、バブアニューギニア(Wohlfart^{7,8)})、マレーシア(Chester⁹⁾)、米国(Zavala¹⁰⁾、Landrigan¹¹⁾)など広く世界にまたがっているのが特徴である。本邦においてもその例外ではない。Paraquat による細胞障害の機序はいまだ不明な点が少ないものの、生体内で還元されて Paraquat-radical となり、それが酸素と反応して superoxide イオンを形成し、この superoxide イオンが水素イオンと反応して過酸化水素を生じると理解されている(Nicotera³⁰⁾、Glass³¹⁾)。さらにこの過酸化水素と反応して水酸化 radical が生成され、これらの作用により細胞膜の障害がもたらされると考えられている(Thurlbeck²⁵⁾、Miyazaki³²⁾)。しかし本剤により特異的に肺線維症の発症機序がなぜ起きるのかの理論付けが十分されていない現状では、ステロイド剤、あるいはキレート剤による臨床的な治療もいまだ十分な効果を上げていないように思われる。

このような観点から、著者は肺胞壁を構成する各種細胞成分に対する本剤の影響について詳細な解析を試みたわけである。

1. Paraquat と肺胞被覆層(肺胞を被覆している層はリン脂質よりなる連続的な構造で、細胞膜のきわめて特異的な構造と考えられ肺胞被覆層といわれている)との関係

von Neergaard は 1929 年、肺から界面活性作用を有する物質を分泌していることを明らかにし、これが Dipalmytoyl-lecithin からなり osmiphilic body から産生されていると考えられるに至った。相原¹³⁾、勝野¹⁴⁾、上田³³⁾らは、肺胞被覆層の電顕的組織化学的検索より tubular myelin の形になった界面活性物質は Singer, Nicolson の流動モザイク説³⁴⁾により立証される肺胞被覆層に取り込まれることを報告している。永瀬¹⁵⁾、Manktelow³⁵⁾、Robertson³⁶⁾らは Paraquat 投与時に直接的に II 型上皮細胞体内の osmiphilic body の障害、および肺胞被覆層の断裂がみられることを報告している。著者の今回の実験でも Paraquat 投与により界面活性作用は著しく減少し(Table 1)、これは II 型上皮細胞の障害発生時の変化とほぼ一致している。その細胞障害発生機序はいまだ明らかではなく、Manktelow³⁵⁾は Paraquat を精製した界面活性物質に直接作用させたが特に活性の低下を認めていなかったと言っており、この事実からするとおそらくは II 型上皮細胞、あるいは肺胞壁を覆う肺胞被覆層の receptor に直接的に作用する可能性があり、この点については今後さらに詳細な検討を必要としよう。永瀬¹⁵⁾によると肺胞壁を覆う肺胞被覆層の特異的な染色法の一つとされる ruthenium red 染色で正常の状態では安定した染色性を示す本層が、Paraquat 投与時には不規則、かつ不均一な断裂性のある染色を示すことより本剤が直接的に肺胞被覆層に障害を与える可能性があるかもしれないとしているのは興味深い。

2. 肺胞上皮細胞(I型およびII型)と Paraquat とのかかわりあい

すでに述べたように Paraquat は I 型、および II 型上皮細胞に対して著明な細胞障害性作用を有することが明らかである。Hirai³⁷⁾、Rossouw²⁷⁾らはミトコンドリア、microsomal fraction にそれぞれ障害をきたすとしている。まず初期の障害は I 型上皮細胞に出現する。すなわち細胞質の著しい浮腫状膨化、小空胞の形

成、ミトコンドリア等の細胞内小器官の変性、消失であり、この部位の基底膜の膨化も著しい。この事実は細胞呼吸と密接に関係し、空気—血液関門の主要構成要素であるI型肺胞上皮細胞がParaquatに対して鋭敏に反応することを示している。永瀬¹⁵⁾はParaquat投与初期の段階よりKohn孔の開離とその周辺部における微細膠原線維束の発生を認め、空気—血液関門の機能ならびに構造的破綻をみている。このような幼若な膠原線維束の増生をKohn孔を介する交通に何らかの障害を与え、不可逆的な線維化へのtriggerとなる可能性を示唆している。次にやや遅れてII型上皮細胞障害が出現する(Reiser³⁸⁾, Skillrud³⁹⁾。II型上皮細胞のosmiophilic bodyの変性、消失(永瀬¹⁵⁾、ミトコンドリアの変性(Hirai³⁷⁾)、およびmicrosomal fractionの変性(Rossouw²⁷⁾)等が報告されている。著者の観察では細胞質にlipid dropletの増加が認められた。この事実をどのように理解するかは今後の検索を待たなければならないが、生化学的にParaquatが脂質の中間代謝に種々の障害がみられるとの報告があることより(Nicotera³⁰⁾, Glass³¹⁾)、これらの脂質代謝異常の一つの無視しえない形態学的表現である可能性もありえよう。Saitoら⁴⁰⁾は同様に、複雑な代謝過程を介して形成される界面活性物質の主成分であるDipalmytol lecithinの中間代謝過程の上での重大な障害因子として作用している可能性を示唆しているものも注目ししよう。同様な見解はKeeling⁴¹⁾およびMalmquist⁴²⁾らによっても支持されている。Wilhelmy Balanceを用いた界面活性の動態の検索でも4時間前後から活性の著しい低下を示し、透過型電顕(永瀬¹⁵⁾、Rayan²⁶⁾、Fukuda²³⁾、走査型電顕(Torre⁴³⁾)、形態計測学的検索(高橋⁴⁴⁾)らによって示されるII型上皮細胞の変性過程とはほぼ軌を一にすることから、界面活性物質の活性低下を含む肺機能の減少にParaquatが直接関与する可能性を考慮する必要がある。またWebb⁴⁵⁾は細気管支上皮からのParaquatの吸収機構の存在を想定しており、さらにWongら⁴⁶⁾はmacrophageにも直接障害を与えるといっているが、これらについてはさらに詳細な検討を要しよう。

3. 基底膜および間質とParaquatとのかかわりあい

基底膜は間葉系組織と上皮系組織とのあいだに介在する機能、および形態学的関門である。肺胞の毛細血管基底膜はI型上皮細胞のそれと融合し一層となつて

おり、ガス交換に直接関与するものと考えられている。反面、II型上皮細胞の基底膜は単独に存在し、毛細血管のそれとは融合せずその間に疎な弾性線維の交錯を認める若干の相違をみる。間葉系の中隔細胞もみられるがそれほど多くはない。この部位では主として電解質や各種必須アミノ酸等の物質交換がなされていると理解されている。本剤は比較的早期の段階より基底膜の浮腫状膨化を招来する。さらに遷延すると、結合組織内の微細膠原線維の増生をきたす。Tanakaら⁴⁷⁾はParaquatの投与により血管の透過性の亢進をきたすことを観察している。Pietraら⁴⁸⁾の古典的な観察によると¹²⁵Iをラベルして行った肺胞壁における透過性の検索において、標識物質は毛細血管から内皮細胞を通過し間質経路を介して上皮細胞体内に導入されている。Ody⁴⁹⁾、Fisher⁵⁰⁾らは培養系においてParaquatが直接的に障害を与えるとしている。Gillisら⁵¹⁾はParaquatがvasoactive substanceを活性化し、それによる血管障害を誘発するとしているのは興味深い。E. Coli endotoxinは一般に血管内皮障害を起こすことで知られているが、Hollinger⁵²⁾によると同endotoxinとParaquatを同時投与すると特に組織障害像が増強するとしているものも一考の価値があろう。著者の観察では血管の微小血栓形成像がみられた。これはFukudaら²³⁾によっても立証されている事実であり、Divertieら⁵³⁾はradioactiveな血小板とフィブリンノーゲンがこのような形で血栓内に取り込まれているのを見ている。Paraquatがいかなる形でこのようなmicro-angiopathyを生じるかについては今後の検討を待たなければならないが、肺線維化機序を考える上でこのようなvascular derangementを考慮することは不可欠であろう。また沢井⁵⁴⁾、Kokubo⁵⁵⁾らは本剤が肺高血圧症を生じうるとしている。Kapanci⁵⁶⁾、岡田⁵⁷⁾らは肺胞壁、特に間質において収縮機能を有する中隔細胞を特に収縮細胞(contractile cell)の存在を想定しており、本細胞が細胞体内に収縮蛋白を含むことから肺の線維化にも本細胞が密接にかかわりあっている可能性があり、今後の検討が望まれよう。

4. 膠原、弾性線維の動態とParaquatとのかかわりあいについて

膠原線維がParaquat投与により不可逆的に増加することは広く知られるに至っている。Nerlichら⁵⁸⁾はprocollagen peptideのアミノ酸側鎖が本症の場合特異であることを報告した。Engelbrechtら⁵⁹⁾は

radioactive proline がきわめて大量に本症の場合 protein と膠原線維に導入されていることを明らかにした。Paraquat 投与により線維芽細胞、筋線維芽細胞の粗面小胞体における proline 系アミノ酸の合成が活発化し細胞外基質に放出され重合し、微小フィラメント状物質を形成してさらに重合を重ね、ついには 64 nm の周期性を有する成熟膠原線維を形成するとされている (永瀬¹⁵⁾)。これには II 型上皮細胞、Alveolar macrophage、さらには mast cell (Kawanami⁶⁰⁾, Watanabe⁶¹⁾) も密接な関係を有するという報告も相次いでいるが、これらの interaction については今後の検索に待つところが大きい。単クローン抗体を中心とする分子生物学の著しい発展により膠原線維の亜型の特定も比較的容易に行いうるようになった (Fukuda²³⁾, Schoenberger²⁴⁾)。この膠原線維には主として I ~ IV 型に分かたれることが知られているが、Schoenberger ら²⁴⁾ は正常肺においては I 型が圧倒的に多く 60~65% を占めるが、病的な状態ではむしろ I 型と III 型の増量がみられるという。また動物実験では肺全体として膠原線維が増量するのに対して、ヒトにおける特発性肺線維症においては膠原線維の総量には必ずしも著変がないとしているが、これには膠原基質と膠原線維のそれぞれの構成を慎重に吟味した上で結論すべきであろうと考えられる。肺線維症における弾性線維の動態については十分な検索が行われてきたとは言いがたい。しかし近年詳細な Paraquat 肺の形態学的検索が行われるようになってきてみると、Paraquat 投与時においては初期の段階よりエラスチンが減少し、肺気腫がしばしばみられることが注目されるに至った (名取⁵⁾, 米山⁶⁾, Fukuda²³⁾, 永瀬¹⁵⁾)。肺気腫に最も深い関係のある構成成分は弾性線維であり、これはエラスチンと弾性細小線維とに大別される (Morris⁶²⁾, Kuhn^{63,64)})。Kajikawa ら¹⁷⁾ のタンニン酸染色を施してみると、エラスチンはきわめて初期の段階より消失 (elastolysis) を起こすことが明らかになった。これに対して弾性細小線維は比較的 Paraquat に対する侵襲に抵抗性を示し、安定した分布状態を示した。1 週間を過ぎると再びエラスチンと弾性細小線維が顕著に増加してくる傾向 (elasto fibrosis) を示した。したがって弾性細小線維と弾性線維が密接にかかわりあって肺の線維化を進展させるものと理解されよう。Greenberg²⁸⁾ は鍍銀法でこれらの線維性成分の framework を証明しているのもこの可能性を強く示唆している。Thompson ら⁶⁵⁾ はこれらの線維成分の増

加促進因子の介在を想定しており、これらの Initiating factor の多方面からの解明は単に本症のみに限らず広くその対応を迫られている肺線維症の発症機序、進展の阻止機構の解析、さらには抜本的な治療法の開発の上で重要な手がかりを与えうるものといえよう。

結 論

著者は近年、肺線維症を中心とする致命的な障害を起こすとされ誤用、乱用により社会医学的にも非常に重要視されるに至った Paraquat の肺胞障害の発症機序を解明するためにラットに本薬剤の腹腔内注射を行い、経時的にその超微形態学的観察を行うと同時に肺表面活性物質の動態も Wilhelmy Balance を用いて測定し、その相関についても検討を行った。得られた結果は次のごとくである。

1) Paraquat を腹腔内に注入した後、短時間ですでに I 型上皮細胞の浮腫状変化がみられ、毛細血管内腔には好中球、血小板、フィブリンの析出が顕著であった。また時間の経過にしたがって間質の浮腫状変化がみられるようになった。この時期においてはすでにエラスチンが部分的に消失しており、反面弾性細小線維が豊富に観察された。

2) さらに時間が経過すると、I 型上皮細胞の変性、剝離、脱落が顕著に認められるようになり、II 型上皮細胞の osmiophilic body の変性、消失が少なからず認められた。

3) 1 週間後においては肺胞腔を中心に線維化が出現するのが認められた。線維芽細胞、筋線維芽細胞が増生するとともに膠原線維が肺胞腔を中心に増加する傾向がみられた。また肺胞壁には貪食細胞の増加がみられ、同時に II 型上皮細胞の増生がみられた。

4) その後経過が遷延してくると、毛細血管内腔における微小血栓の形成、内腔の狭窄、血管周囲性の線維化等が顕著になった。

5) 弾性線維はエラスチンと微小弾性線維からなり、エラスチンは比較的初期の段階から消失し従来肺気腫の発生時に報告されている超微形態学的変化とはほぼ対応する変化を示した。その後タンニン酸染色で弾性線維は再び増加する傾向を示し、その動態は膠原線維束の増加とはほぼ比例して増加する傾向を示した。一過性にせよエラスチンが減少し肺気腫状変化がみられたことは、本変化が線維化の発症に少なからぬ関連を有する可能性を示唆するものと考えられた。

6) Wilhelmy Balance で測定した表面活性物質の

活性は初期の段階より急速に減少し、II型上皮細胞体内の osmiophilic body の変性、消失ときわめて密接な相関性があることが立証された。

7) 以上の検索結果より Paraquat 投与により生じる変化は、単に膠原線維成分のみの異常だけでなく弾性線維成分の動態の異常も伴っていることが明らかになった。また初期の段階よりみられた肺気腫の存在も、病変の進展に少なからぬ役割を果たしていることが示唆された。

8) 本実験系は肺線維症の病態解析の上できわめて有力な手がかりを与えることが立証され、今後多角的な分子生物学的な検索が期待されることが示唆された。

稿を終えるにあたり、終始懇切な御指導を賜った第1病理学教室矢島権八名誉教授、老人病研究所病理部主任大綱弘助教授に感謝いたします。また研究の遂行に御協力を頂いた第1病理学教室、中央電子顕微鏡研究施設の各位に感謝いたします。さらに電子顕微鏡の観察に終始御指導、御叱正頂いた佐藤茂博士に謝意を表します。

なお本論文の要旨は第15回日本界面医学会学術研究会(1982年11月)、および第14回日本臨床電子顕微鏡学会(1982年9月)においてそれぞれ発表した。

文 献

- WHO, Regional Office for the Western Pacific: Report of the Working Group on International Cooperation in technology transfer in the health field. p. 7, 1986.
- Hamman, L. and Rich, A.R.: Acute diffuse fibrosis of the lung. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 74, 177, 1944.
- Matsumori, H., Matsumoto, T. and Ishikawa, T.: Aute toxic effects of paraquat on ultrastructure of rat liver. *Acta Pathol. Jpn.*, 34, 507~518, 1984.
- Lakushko, V.E., Rodionov, G.A., Nadmaiteni, L. and Ovsiannikowa, L.M.: Biochemical and morphological changes in white rat lung and liver tissues in experimental paraquat poisoning. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 90, 146~149, 1980.
- 名取博: パラコート肺、呼吸と循環, 25, 409, 1977.
- 米山正人: 新除草剤グラモキシオンによる急性中毒死, 日医新報, No. 2374, 32, 1969.
- Wohlfart, D.J.: Paraquat poisoning in Papua New Guinea. *Papua New Guinea Med. J.*, 24, 164~168, 1981.
- Wohlfart, D.J.: Fatal paraquat poisonings after skin absorption. *Med. J. Aust.*, 12, 512~513, 1982.
- Chester, G. and Woollen, B.H.: Studies of the occupational exposure of Malaysian plantation workers to paraquat. *Br. J. Ind. Med.*, 39, 23~33, 1982.
- Zavala, D.C. and Phodes, M.L.: An effect of paraquat on the lungs of rabbits; Its implications in smoking contaminated Marihuana. *Chest*, 74, 418~420, 1978.
- Landrigan, P.J., Powell, K.E., James, L.M. and Taylor, P. R.: Paraquat and mariljuana; Epidemiologic risk assessment. *Am. J. Public. Health*, 73, 784~788, 1983.
- Hunter, G.S. and Prahlad, K.V.: The effects of paraquat on neonatal rat lung; A histological and biochemical study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 10, 151~158, 1981.
- 相原薫: 肺表面被覆層に関する研究の進歩: 形態学的立場より. 日界面医学会誌, 10, 6~19, 1979.
- 勝野浩: 肺胞被覆層の形成過程に関する電子顕微鏡的研究; ことに組織化学ならびに autoradiography による検索所見を中心に. 日界面医学会誌, 12, 90~105, 1981.
- 永瀬英雄: パラコートによる線維化性胞壁炎に関する実験的研究. 日界面医学会誌, 10, 112~136, 1979.
- Reynolds, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *JCB*, 17, 208~212, 1963.
- Kajikawa, K., Yamaguchi, T., Katsuda, S. and Miwa, A.: An improved electron stain for elastic fibers, using tannic acid. *J. Electron. Microsc.*, 24, 287, 1975.
- 矢島権八, 相原薫: Periodic Acid Methenamine Silver 染色. 医のあゆみ, 76, 328~338, 1966.
- 野崎正彦: 肺表面活性測定法について. 医学と界面活性, 1, 25, 1969.
- Sonoda, Y., Kuwahira, I., Kurata, T., Kobayashi, R., Kondo, T., Takasaki, Y., Shiova, S. and Yamabayashi, H.: Paraquat poisoning; A review of four cases. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 7, 489~496, 1982.
- Homma, Y.: Experimental models of lung disease and pulmonary fibrosis; Idiopathic Interstitial pneumonia. 日胸疾患会誌, 19, 813~819, 1981.
- Haškovcova, I. and Velenská, Z.: Lung changes after paraquat as an experimental model of the respiratory distress in the newborn and diffuse interstitial fibrosis of the lungs. *Sb. Lek.*, 83, 2~3, 1981.
- Fukuda, Y., Ferrans, V.J., Schoenberger, C.I., Rennard, S. I. and Crystal, R.G.: Patterns of pulmonary structure remodeling after experimental paraquat toxicity, the morphogenesis of intra-alveolar fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 118, 452~475, 1985.
- Schoenberger, C.I., Rennard, S.I., Bitterman, P.B., Fukuda, Y., Ferrans, V.J. and Crystal, R.G.: Paraquat induced pulmonary fibrosis; Role of the alveolitis in modulating the development of fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 129, 168~173, 1984.
- Thurlbeck, W.M. and Kay, S.M.: The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. *J. Pathol.*, 114, 177, 1974.
- Rayan, H., Monges, G., Jouve, M.P., Saux, M.A., Pellegrin, E. and Carbe, L.: Paraquat in toxication, an ultrastructural study of lung lesions in connection with a case study. *Arch. Anat. Cytol. Pathol.*, 30, 33~38, 1982.
- Rossouw, D.J., Chase, C.C. and Engelbrecht, F.M.: Experimental paraquat poisoning-histological, electron microscopic and auto radiographic changes in the lung. *S. Afr. Med. J.*, 66, 485~489, 1984.
- Greenberg, D.B., Reiser, K.M. and Last, J.A.: Correlation of biochemical and morphologic manifestations of acute pulmonary fibrosis in rats administered paraquat. *Chest*, 74, 421~425, 1978.
- Smith, P.D. and Health, D.: The ultrastructure and the time sequence of the early stages of paraquat lung in rats. *J. Pathol.*, 114, 177, 1974.
- Nicotera, T.M., Block, A.W., Gibas, Z. and Sandberg, A. A.: Induction of superoxide dismutase chromosomal

- aberrations and sister-chromatid exchanges by paraquat in chinese hamster fibroblast. *Mutat. Res.*, 151, 263~268, 1985.
- 31) Glass, M., Sutherland, M.W., Forman, H.J. and Fisher, A. B.: Selenium deficiency potentiates paraquat-induced lipid peroxidation in isolated perfused rat lung. *J. Appl. Physiol.*, 59, 619~622, 1985.
 - 32) Miyazaki, N., Takamoto, M., Kinjo, M. and Ishibashi, T.: Ultrastructural studies of elastase-induced experimental emphysema. *Jpn. J. Exp. Med.*, 49, 241~250, 1979.
 - 33) 上田真太郎: 肺の超微形態. *日界面学会誌*, 12, 1~26, 1981.
 - 34) Singer, S.J. and Nicolson, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of the cell membrane. *Science*, 175, 720~731, 1972.
 - 35) Manktelow, B.W.: The loss of pulmonary surfactant in paraquat poisoning; A model for the study of respiratory distress syndrome. *Br. J. Exp. Pathol.*, 48, 366~369, 1967.
 - 36) Robertson, B., Grasman, G. and Iremark, B.: The alveolar lining layer in experimental paraquat poisoning. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [A]*, 84, 40~46, 1976.
 - 37) Hirai, K., Witschi, H. and Cote, M.G.: Mitochondrial injury of pulmonary alveolar epithelial cells in acute paraquat in toxication. *Exp. Mol. Pathol.*, 43, 242~253, 1985.
 - 38) Reiser, K.M. and Last, J.A.: Pulmonary fibrosis in experimental acute respiratory disease. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 123, 58~63, 1981.
 - 39) Skillrud, D.H. and Martin, W.J.: Paraquat-induced injury of type II Alveolar Cells; An in vitro model of oxidant injury. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 129, 995~999, 1984.
 - 40) Saito, K., Parker, W.B. and Menzel, D.B.: Disruption of phospholipid metabolism by paraquat in cultured pneumocytes. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 527~534, 1982.
 - 41) Keeling, P.L., Smith, L.L. and Aldridge, W.N.: The formation of mixed disulphides in rat lung following paraquat administration; Correlation with changes in intermediary metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 716, 249~257, 1982.
 - 42) Malmquist, E.: The influence of paraquat on the in vivo incorporation of lecithin precursors in lung tissue and "alveolar lecithin". *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 40, 233~237, 1980.
 - 43) Torre, C., Varetto, L., Pavanelli, P.L. and Belliarao, F.: Lung morphology in experimental acute paraquat poisoning; SEM observations. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 5, 125~129, 1984.
 - 44) 高橋徹, 高橋良延, 和知栄子, 菅谷彪, 並木恒夫: パラコート肺における肺胞改変のモルフォメトリー. *呼吸と循環*, 33, 85~91, 1985.
 - 45) Webb, D.B.: The autoradiographic localization of paraquat in the lung. *Br. J. Exp. Pathol.*, 61, 217~221, 1980.
 - 46) Wong, R.C. and Stevens, J.B.: Paraquat in vitro. I. Pulmonary alveolar macrophage. *J. Toxicol. Environ. Health*, 15, 417~429, 1985.
 - 47) Tanaka, R., Fujisawa, S., Kawamura, K. and Harada, M.: Paraquat-induced enhancement of vascular permeability. *J. Toxicol. Sci.*, 8, 147~159, 1983.
 - 48) Pietra, G.G., Spagnoli, L.G., Capuzzi, D.M., Sparks, C.E., Fishman, A.P. and Marshi, T.B.: Metabolism of 125-labeled lipoprotein by the isolated rat lung. *J. Cell Biol.*, 70, 33~46, 1976.
 - 49) Ody, C. and Junod, A.F.: Direct effect of paraquat and oxygen on cultured endothelial cells. *Lab. Invest.*, 52, 77~84, 1985.
 - 50) Fisher, A.B. and Reicherter, J.: Pentose pathway of glucose metabolism in isolated granular pneumocytes; Metabolic regulation and stimulation by paraquat. *Biochem. Pharmacol.*, 33, 1349~1353, 1984.
 - 51) Gillis, C.N. and Catraves, J.D.: Altered removal of vasoactive substances in the injured lung; Detection of lung microvascular injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 384, 458~474, 1982.
 - 52) Hollinger, M.A.: Potentiation of paraquat lethality in mice by bacterial Lipopolysaccharide pretreatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 230, 292~294, 1984.
 - 53) Divertie, M.B., Owen, C.A., Jr., Barham, S.S. and Ludwig, J.: Accumulation of radionucleotide-labeled platelets and fibrogen in paraquat-damaged rat lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 125, 574~578, 1982.
 - 54) 沢井高志, 佐藤紀子, 藤山純一, 高橋良延, 高橋徹, 並木恒夫, 和知栄子: パラコート肺における肺高血圧症の発生様式について; 21剖検例での肺動脈系の組織計量, 呼吸と循環, 33, 441~446, 1985.
 - 55) Kokubo, T., Takahashi, M., Furukawa, F., Nagano, K. and Hayashi, Y.: Pathogenesis of paraquat-induced pulmonary hemorrhage in hamsters with special reference to arterial constriction. *Acta Pathol. Jpn.*, 34, 41~46, 1984.
 - 56) Kapanci, Y., Assimakopoulos, A., Irle, C., Zwahlen, A. and Gabbiani, G.: "Contractile interstitial cells" in pulmonary alveolar septa; A possible regulator of ventilation-perfusion ratio? Ultrastructural, immunofluorescence, and in vitro studies. *J. Cell Biol.*, 60, 375~392, 1974.
 - 57) 岡田慶夫, 中島真樹, 土屋和之: 肺血管床末梢部の微細構造. *日臨電顕会誌*, 13, 143~165, 1980.
 - 58) Nerlich, A.G., Nerlich, M.L., Langer, I. and Demling, R. H.: Release of amino-terminal procollagen peptides in paraquat-induced acute pulmonary fibrosis. *Exp. Mol. Pathol.*, 40, 311~319, 1984.
 - 59) Engebrecht, F.M., Windt, M.L., Maree, E. and Nienaber, M.W.: The effect of paraquat on the incorporation of radiolabelled proline into acid-extractable lung proteins and collagens. *S. Afr. Med. J.*, 62, 729~734, 1982.
 - 60) Kawanami, O., Ferrans, V.J. and Crystal, R.G.: Structure of alveolar epithelial cells in patients with fibrotic lung disorders. *Lab. Invest.*, 46, 39~53, 1982.
 - 61) Watanabe, S., Watanabe, K., Ohishi, T., Aiba, M. and Kageyama, K.: Mast cells in the rat alveolar septa undergoing fibrosis after ionizing irradiation; Ultrastructural and histochemical studies. *Lab. Invest.*, 31, 555~567, 1974.
 - 62) Morris, S.M., Stone, P.J., Snider, G.L., Albridget, J. and Frangblau, C.: Ultrastructural changes in hamster lung four hours to twenty-four days after exposure to elastase. *Anat. Rec.*, 201, 523~535, 1981.
 - 63) Kuhn, C. and Tavassoli, F.: The scanning electron microscopy of elastase-induced emphysema; A comparison with emphysema in man. *Lab. Invest.*, 34, 2~9, 1976.
 - 64) Kuhn, C., Chraplyuy, M., Linder, H.E. and Senior, R.H.: The induction of emphysema by elastase. II. Changes in

- connective tissue. Lab. Invest., 34, 372~380, 1976.
65) Thompson, W.D. and Patrick, R.S.: Collagen stimulating factors from lung in experimental paraquat poisoning demonstrated in vitro and in vivo. J. Clin. Pathol., 37, 537~541, 1984.

Legends

- Photo 1 The electron micrograph of the alveolar cell wall 1 hour after intra-peritoneal injection of Paraquat. The edematous swelling of the type I epithelial cell is very striking, however, disintegration of type II epithelial cell is rather less outspoken. In the capillary lumen, polymorphonuclear cell aggregate is noted. Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 4,100$
- Photo 2 The electron micrograph shows changes of the alveolar cell wall 1 hour after intra-peritoneal injection of the Paraquat. The accumulation of the fibrin in the alveolar space is very striking. Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 20,000$
- Photo 3 The electron micrograph shows changes in identical stage demonstrated by the Tannic Acid Stain. The elastin is focally disintegrated and disappeared (Arrow). However, abundant elastic fibers and microfilaments are clearly demonstrated by this technique. Tannic Acid Stain, $\times 4,500$
- Photo 4 The electron micrograph shows changes of the alveolar cell wall 6 hours after Paraquat inoculation. The exudation of serous component is very outspoken as well as interstitial edema. The disintegration of the endothelial cells of the capillary vessels remains to be a lesser extent. Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 5,500$
- Photo 5 The electron micrograph which demonstrates clearly the elastic fibers. The elastic fiber is focally disintegrated and disappeared as indicated by an arrow and remnant of the elastic microfilaments is only preserved. Tannic Acid Stain, $\times 5,500$
- Photo 6 The electron micrograph discloses the alveolar wall 24 hours after Paraquat injection. Marked swelling and disintegration of the type II epithelial cells are noted. The vascular stasis of the red blood cells is noted, however, the endothelial cells are essentially devoid of any degeneration of swelling. Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 5,500$
- Photo 7 The electron micrograph discloses the changes in identical stage. Disintegration and denudation of the type II epithelial cells are discernible. The myelin figures and osmiophilic bodies of the type II epithelial cells are undergoing disintegration and being liberated into the alveolar spaces. Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 20,000$
- Photo 8 Two days after Paraquat injection. The elastin is disappeared and only elastic microfilaments are fairly well preserved. Contrary, proliferation of the mature collagenous fibers, having periodicity of 640 nm is frequently observed. Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 41,400$
- Photo 9 The electron micrograph discloses the alveolar wall 1 week after injection of Paraquat. The alveolar wall is incorporated in rather vigorous fibrotic process and the type I alveolar epithelial cells are desquamated and the basement membrane proper is exposed to the alveolar spaces (Arrow). In the alveolar spaces, fibroblast (F), myofibroblasts (M) and collagenous fibers are dispersed. Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 4,800$
- Photo 10 The electron micrograph of the identical stage. In the alveolar spaces, accumulation of polymorphonuclear cells, alveolar macrophages (AL-M) and proliferated collagen fibers are abundantly observed. Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 4,800$
- Photo 11 The electron micrograph 1 week after the inoculation of Paraquat. The denudated type I epithelial cells and rather strikingly proliferated type II epithelial cells which tend to cover the alveolar walls are encountered. Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 4,100$
- Photo 12 The electron micrograph which shows changes 1 week after the Paraquat inoculation. The elastic fibers which are dispersed in the interstitium and run longitudinally are identified. Tannic Acid Stain, $\times 16,000$
- Photo 13 The electron micrograph 6 weeks after Paraquat inoculation discloses intensive proliferation of the collagenous fibers as well as elastic fibers. The collagen fibers (Co) are rather dispersed in the central portion of the interstitium, while electron translucent elastic fibers are aggregated beneath the epithelial cells (E). Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 8,300$
- Photo 14 The electron micrograph reveals changes 6 weeks after Paraquat injection. In the capillary vessels, prominent aggregates of platelets and red blood cells which constitute the formative process of the intra-vascular micro-thrombi. Education of the proteinous materials from the capillary vessels is also conspicuous, substantiating the ultrastructural evidence for increased vascular permeability. Uranyl Acetate and Lead Hydroxide Stain, $\times 8,300$
- Photo 15 The electron micrograph discloses changes of the alveolar wall 6 weeks after Paraquat injection. Proliferated elastic fibers (Arrow) is noted in a form of coarsely granular aggregate in deeply proliferated fibro-collagenous fiber bundles. Tannic Acid Stain, $\times 2,300$

(受付: 1986年11月8日)

Plate (1)

Plate (2)

Plate (3)

Plate (4)

Plate (5)

Plate (6)