慢性逆流性食道炎モデルラットにおける咽喉頭の形態学的変化

島 津 倫太郎・草 野 謙一郎・倉 富 勇一郎・井之口 昭

The Histological Changes of the Pharynx and Larynx in Rats with Chronic Acid Reflux Esophagitis

Rintaro Shimazu, Kenichiro Kusano, Yuichiro Kuratomi and Akira Inokuchi

Objective : To clarify the pathological mechanism of LPRD by studying the histological changes of the pharynxes and the larynxes in rats with chronic acid reflux esophagitis.

Methods : An experimental rat model of chronic acid reflux esophagitis was surgically created. The pharynxes, larynxes, tracheas, lungs and esophagi of these rats were observed histologically every 2 weeks until 20 weeks after their operations.

Results : At 8 weeks after the operation, mucosal thickening and inflammatory cell infiltration was observed in the hypopharynx of the rat model. Moreover, chronic inflammation with proliferation of fibroblasts, deposition of collagen fibers and proliferation and dilatation of the capillaries was found as time progressed. However, little macroscopic change was observed in the hypopharyngeal mucosa. In addition, at 16 weeks post-operation, inflammatory cell infiltration was identified in the nerve cells around the thoracic esophagus, the arytenoid region, and the lungs.

Conclusions : The histological changes of the pharynx and the larynx associated with surgically induced chronic acid reflux esophagitis were observed in rats. Chronic inflammatory change due to gastric acid reflux was found in the pharynx and larynx microscopically. This finding indicated that inflammatory changes due to gastric acid reflux are associated with the pathogenesis of laryngopharyngeal reflux disease (LPRD).

Key words : GERD, モデルラット, 咽喉頭異常感, 喉頭肉芽腫, 慢性咳嗽

はじめに

咽喉頭異常感および喉頭肉芽腫は耳鼻咽喉科の日常臨床にて遭遇する機会が多い疾患の一つであり、胃酸逆流がその誘因の一つであることは広く認識されている。胃酸逆流による咽喉頭病変 (LPRD) の発生機序として、直接障害説と反射説がある^{1, 2, 8)} が、胃酸逆流の程度と咽喉頭病変との関連については不明な点が多い。LPRD の発生機序や病態を理解するには、実際に胃酸逆流によって咽喉頭粘膜にどのような病的変化が生じるのかを観察することが重要であるが、患者を対象とした臨床研究では限界がある。そこで今回われわれはヒトの慢性逆流性食道炎の病態に近い GERD モデルラットを作成し、その咽喉頭における形態学的変化を経時的に観察し検討した。

対象および方法

8 週齢の Wister 系雄性ラット (体重250g) を対象とし、1999年に Omura³⁾ が発表した方法に従い、GERD モデルラットを作成した。胃液の十二指腸への慢性的な排出障害を起こすため、胃幽門輪近傍の十二指腸を18Fr ネラト

ンカテーテルにて被覆し、さらに食道への胃酸逆流を促すため前胃・腺胃境界部を結紮した (図1)。コントロールは手術手技として開腹操作のみを行った。

術後2週より20週まで1週おきに3匹ずつから、咽喉頭・気管・肺・食道・胃噴門部をエーテル麻酔下に摘出した。まず摘出後直ちに、下部食道および下咽頭に試験紙 (Whatman HP Full Range pH1~14) を挿入し、食道

図1 慢性逆流性食道炎モデルラットの作成方法 (Omura N et al, 1999³⁾ より引用)

および下咽頭の pH を測定した．また摘出した臓器は肉眼所見を確認し，その後10%ホルマリンにて24時間固定し，パラフィン包埋処理した．薄切切片を作成し，Hematoxylin-Eosin 染色により組織学的変化を観察した．

結 果

摘出標本を比較すると GERD モデルラットでは食道の拡張が著明であり，実際に下咽頭まで逆流した胃酸と思われる液体が透見可能であった．また食道および下咽頭の pH は，コントロール群と比較し，術後2週以上経過した

GERD モデルラットでは有意に低下しており，GERD モデルラットでは胃酸が食道から下咽頭まで逆流していることが確認された．

つづいて形態学的変化を観察した．まず術後2週を経過したコントロール群では，肉眼的（図2a）および組織学的（図2b）に食道および下咽頭に病的所見は認めなかった．

術後2週の GERD モデルラットでは肉眼的に下部食道に限局する粘膜不整を認め（図3a），組織学的には粘膜欠損があり，潰瘍形成が確認された．また潰瘍部には好中球

図2 コントロール群の食道粘膜
A. 肉眼像 B. 組織像

図3 術後2週の GERD モデルラットにおける形態学的変化
A. 下部食道 B. 食道潰瘍部
C. 咽喉頭（破裂軟骨レベル） D. 下咽頭後壁（c.のbox部分）

図4 術後8週のGERDモデルラットにおける形態学的変化

A. 下部食道 B. 食道潰瘍部 C. 潰瘍周囲の食道粘膜 D. 咽喉頭
E. 咽喉頭（披裂軟骨レベル） F. 下咽頭後壁（e.のbox部分）

を中心とした急性炎症像が観察された（図3b）。しかしこの時点では、咽喉頭粘膜に形態学的変化は認めなかった（図3c, d）。

術後8週になるとGERDモデルラットの食道粘膜には、肉眼でも明瞭な潰瘍形成を認め（図4a）、組織学的には潰瘍部にマクロファージを中心とした慢性炎症が筋層下まで浸潤していた（図4b）。また潰瘍周囲の広範囲の食道粘膜に上皮肥厚と粘膜層の乳頭化を認めた（図4c）。一方、下咽頭に肉眼像では変化は認めなかったが（図4d）、組織学的に観察すると、下咽頭後壁に炎症細胞浸潤を伴った粘膜肥厚を認め、線維芽細胞と膠原線維の増殖を伴っていた

（図4e, f）。

術後12週になるとGERDモデルラットの下咽頭後壁粘膜では、さらに粘膜肥厚が増大しており（図5a）、炎症浸潤が筋層下まで及んでいるのを認めた（図5b）。

続いて術後16週になると、胸部食道においても筋層下まで炎症浸潤を伴う潰瘍形成を認めた（図6a）。またこの筋層下に及ぶ炎症細胞浸潤が、食道周囲に局在する迷走神経と思われる神経細胞へ波及している像が観察された（図6b）。

さらに術後18週GERDモデルラットの下咽頭粘膜では、広範囲に粘膜層の乳頭化が著明に観察され、毛細血管の増

図5 術後12週の GERD モデルラットにおける咽喉頭粘膜
a. 咽喉頭 (披裂軟骨レベル) b. 下咽頭後壁 (a.の box 部分)

図6 術後16週の GERD モデルラットにおける胸部食道の形態学的変化
A. 胸部食道 (気管分岐部レベル). 潰瘍形成が認められる.
B. 迷走神経周囲 (a.の box 部分). 矢印は迷走神経細胞.

生・拡張を伴った炎症細胞の浸潤を粘膜下の深部まで認めた (図 7a). 注目すべき結果の一つとして, 下咽頭粘膜において組織学的に粘膜層の乳頭化と粘膜下の炎症細胞浸潤が認められるこの時点であっても, 肉眼的変化は観察できなかった. また披裂軟骨周囲の粘膜にも下咽頭粘膜と同様の粘膜肥厚と毛細血管の増生・拡張を伴った炎症細胞の浸

潤を認め, 喉頭にも胃酸逆流による炎症が進展しており, 喉頭肉芽腫の好発部位である披裂部に最も早期に病的変化が生じていることが確認できた (図 7b). このモデルにおいて下気道を組織学的に観察すると, 異物巨細胞を中心とした炎症細胞浸潤を認め, 下気道に生じた異物, すなわち誤嚥が生じていることが示唆された (図 7c).

図7 術後18週の GERD モデルラットにおける組織像
A. 下咽頭 B. 喉頭披裂部 C. 肺実質
下段は上段の box 部の強拡大.

表1 臓器別組織学的変化

	食 道	下咽頭	喉 頭	下気道
2 週	●潰瘍形成 ●急性炎症			
8 週 ～	●慢性炎症 ●粘膜肥厚	●粘膜肥厚 ●線維芽細胞と 膠原線維の増生		
12週	●粘膜層の乳頭化	●炎症細胞の浸潤		
16週	●神経細胞へ の炎症浸潤			
18週		●粘膜層の乳頭化 ●毛細血管の 増生・拡大	●粘膜肥厚 ●毛細血管の 増生・拡張	●異物巨細胞 の出現

考 察

これまでも犬やウサギなどの動物を用いて胃酸逆流と咽喉頭病変の関連性を明らかにしようとした試みがいくつか報告⁴⁻⁶⁾されているが、それらは胃酸に近い酸性溶液を咽頭から散布および直接塗布する方法を採っており、今回のように GERD モデル動物を用いて咽喉頭を観察した報告は初めてである。また今回我々が作成した GERD モデルラットは食道胃接合部に手術的操作を加えていないため

生理的逆流防止機構を温存しており、生体に非常に近いモデルである。この2つの点から今回の結果は、臨床的な胃酸逆流の病態に、より類似したモデルにおいて観察されたものと考えている。

表1に本研究で得られた組織学的変化を臓器別に示す。このように術後経過とともに胃酸逆流による組織学的変化が広範囲に生じており、胃酸逆流が咽喉頭における種々の症状の原因であると考えられた。そこで今回の結果から、胃酸逆流と咽喉頭症状の病態生理について考察してみた。

術後8週前後より下咽頭に粘膜肥厚と炎症細胞の浸潤を認め、その後の経過とともに線維芽細胞と膠原線維の増殖や毛細血管の増生・拡張などの慢性炎症像を呈していた。しかし肉眼的には下咽頭粘膜に大きな形態変化を認めなかった。このことは肉眼的には形態学的変化を認めなくても咽喉頭粘膜には組織学的炎症が生じていることを示すものであり、これが粘膜下の知覚神経に影響を与え、咽喉頭異常感の病態に寄与している可能性が示唆された。

また術後18週には喉頭披裂部粘膜において胃酸逆流による慢性炎症性変化を認めた。毛細血管の増生・拡張が著明であり、ヒト喉頭肉芽腫に非常に近い病理像を呈していた⁷⁾。すなわち胃酸逆流により慢性炎症をきたした喉頭披裂部粘膜には喉頭肉芽腫と同様な組織学的変化が生じていることが示された。さらに、こうした粘膜下の慢性炎症に加えて気管内挿管や咳嗽などの機械的刺激による上皮欠損が生じた披裂部前内方に、喉頭肉芽腫が形成されるのではないかと推測された。

これまで食道下部の酸刺激によって咳嗽が誘発されたり、気道過敏性が上昇すること、その上昇がアトロピンによって抑制されることから、胃酸逆流による咳嗽は、胃酸が下部食道粘膜に存在する迷走神経を介する神経反射によって生じると考えられている（反射説）。術後16週に胃酸逆流によって、胸部食道の粘膜下に迷走神経細胞への炎症浸潤が生じていた事実は、この反射説を補強するものである。また術後18週には、下気道において慢性的 microaspiration を認めたが、この所見は、咳嗽が咽喉頭まで逆流した胃酸の microaspiration によって気管・気管支粘膜が直接刺激されることにより生じるとした直接障害説を支持するものと考えられる。このことから今回認められた2つの組織学的所見は、胃酸逆流が咳嗽を生じるにあたって、迷走神経を介する経路と直接気管支を刺激する経路の両方が関与していることを示している。

LPRD 患者の約半数にのみ逆流性食道炎が認められることや⁹⁾、食道内視鏡所見と LPRD の重症度は比例しないとの報告¹⁰⁾があり、LPRD と胃酸逆流の関連については不明な点が多い。また LPRD は胃酸逆流ではなく上部食道括約筋圧が関与する病態であるとする説^{11, 12)}も提唱されている。実際に今回のモデルラットの中には著明な食道病変が存在するにもかかわらず、咽喉頭病変に乏しかったり、反対に食道病変が軽微でも microaspiration を認めたりと、食道病変と咽喉頭病変の重症度が一致しない結果も得られた。この結果からも咽喉頭における組織学的変化は胃酸逆流の程度のみが原因ではなく、上部食道括約筋の何らかの機能異常が関与している可能性が示唆された。

今回用いた GERD モデルラットにおける食道病変は、抗潰瘍剤や PPI（プロトンポンプ・インヒビター）により有意に抑制されることが報告されている^{3, 13-15)}。よって胃酸逆流が病態に強く関与すると考えられた咽喉頭異常感、喉頭肉芽腫、慢性咳嗽の3つの咽喉頭疾患も同様に、PPI 投与等によってその発現が抑制されることが推察され、実

際にこれらの薬剤が GERD モデルラットの咽喉頭粘膜においてどのような影響をもたらすかは、今後の検討が必要である。

ま と め

今回われわれはヒトの慢性逆流性食道炎の病態に近い GERD モデルラットを作成し、その咽喉頭における形態学的変化を検討した。その結果、術後8週より胃酸逆流による下咽頭粘膜の上皮に肥厚と炎症細胞の浸潤を認めた。そして経過とともに慢性炎症が進行し、さらに胸部食道周囲の神経細胞、喉頭披裂部、肺にも炎症浸潤を認めた。このことから咽喉頭異常感、喉頭肉芽腫、慢性咳嗽の病態のひとつとして胃酸逆流による炎症性変化が考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究における慢性逆流性食道炎モデルラットの作成に際し、御指導いただきました東京慈恵会医科大学医学部外科学講座：矢永勝彦教授および小村伸朗先生に深く感謝申し上げます。また組織標本作製においてご協力いただきました佐賀大学医学部病理学教室：青木茂久先生に深く感謝申し上げます。

本論文の要旨は第20回日本喉頭科学会シンポジウム 2「胃酸逆流による咽喉頭症状の現状と病態生理」（2008年3月、佐賀）において口演した。

参 考 文 献

- 1) 渡邊雄介：逆流性食道炎と咽喉頭逆流症。JOHNS 20(7)：955～959, 2004.
- 2) Tauber S, Gross M, Issing WJ：Association of laryngopharyngeal symptoms with gastroesophageal reflux disease. Laryngoscope 112：879～886, 2002.
- 3) Omura N, Kashiwagi H, Chen G et al：Establishment of surgically induced chronic reflux esophagitis in rats. Scand J Gastroenterol 34：948～953, 1999.
- 4) Delahunty JE, Cherry J：Experimental produced vocal cord granulomas. Laryngoscope 78：1941～1947, 1968.
- 5) Gaynor EB：Gastroesophageal reflux as an etiologic factor in laryngeal complications of intubation. Laryngoscope 98：972～979, 1988.
- 6) Roh JL, Yoon YH：Effect of acid and pepsin on glottic wound healing. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 132：995～1000, 2008.
- 7) Hoffman HT, Overholt E, Karnell M et al：Vocal process granuloma. Head Neck 23：1061～1074, 2001.
- 8) Ing AJ, Ngu MC：Cough and gastroesophageal

- reflux. *Lancet* 353 : 944~946, 1999.
- 9) Tokashiki R, Yamaguchi H, Nakamura K et al : Globus sensation caused by gastro esophageal reflux disease. *Auris Nasus Larynx* 29 : 347~351, 2002.
- 10) Tokashiki R, Yamaguchi H, Nakamura K et al : The laryngeal and hypopharyngeal findings and signs caused by gastroesophageal reflux disease. *Larynx Jpn* 9 : 162~166, 1997.
- 11) Corso MJ, Pursnani KG, Mohiuddin MA : Globus sensation is associated with hypertensive upper esophageal sphincter but not with gastroesophageal reflux. *Digest Dis Sci* 43 : 1513~1517, 1998.
- 12) Wilson JA, Heading RC, Maran AD : Globus sensation is not due to gastroesophageal reflux. *Clin Otolaryngol* 12 : 271~275, 1987.
- 13) Omura N, Kashiwagi H, Chen G et al : Effects of ecabet sodium on experimentally induced reflux esophagitis. *J Gastroenterol* 35 : 504~509, 2000.
- 14) 鵜川英樹, 森田 仁, 堀 裕子ほか : 慢性逆流性食道炎モデルに対するニザチジンの有効性. *Ulcer Research* 28(2) : 144~146, 2001.
- 15) 鵜川英樹, 堀 裕子, 森田 仁ほか : ラットおよびイヌを用いた逆流性食道炎モデルの薬効評価. *Ulcer Research* 32(1) : 37~40, 2005.
-

別刷請求先 〒849-8501 佐賀市鍋島 5-1-1

佐賀大学医学部

耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座 島津倫太郎