

パラコート肺の発生機序に関する実験的研究

奥村 徹

パラコート中毒では未だにその病態生理は不明な点が多く、特にパラコート肺は、急性期、慢性期を通して、生命予後に大きく関与する病変である。このことから、肺胞洗浄液中の活性酸素の変動を測定し、パラコート肺の発生機序に関して検討した。活性酸素の測定においては、MCLA (ウミホタルルシフェリン誘導体、2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-di-hydroimidazo [1,2- α] pyrazin-3-one) を用いて行った。実験は、12週令のSD系ラットの雌を用い、体重当たり120 mg/kg (高暴露群, LD₅₀量の4倍量), 60mg/kg (中暴露群群, LD₅₀量の2倍量), 30 mg/kg (低暴露群群, LD₅₀量) のパラコートを腹腔内投与し、それぞれの群の肺胞洗浄液中の活性酸素を測定した。その結果、肺胞洗浄液中の活性酸素の生成量はいずれの群においても、有意に増加していた。特に低暴露群においては、投与2日後に加え、投与6日後において有意に増加した。この低暴露群における所見は、従来、報告されていなかったものである。また、その増加は、Superoxide dismutase (SOD) を添加することにより完全に抑制された。病理組織学的には活性酸素の生成量が増加していた時期を同じくして、好中球の肺胞への浸潤、肺胞洗浄液中の好中球の出現を見た。これらのことより、肺胞洗浄液を用いた活性酸素の測定は、パラコート肺の病変を知るのに有用な方法であり、肺病変の出現に活性酸素、特に superoxide が大きく関与していることが判明した。低暴露6日後にも活性酸素の有意な増加を認めたことは、低暴露の場合に見られる intraalveolar fibrosis (パラコート肺) の成因にも活性酸素、特に superoxide が大きく関与していることを推測させた。病理組織学的所見もあわせて考えると、少なくとも暴露後一週間までは、活性酸素 (superoxide) および好中球機能を抑制することが、本中毒の治療として重要であることが示唆された。

(平成12年10月25日受理)

Experimental Study of the Etiology of Paraquat Lung

Tetsu OKUMURA

The actual mechanism which paraquat damages the lung is unknown, and effective treatment has not yet been established. In this study, levels in activated oxygen in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of paraquat-treated rats were measured using 2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo (1,2- α) pyrazin-3-one (MCLA), a chemiluminescent probe.

Paraquat-treated rats were divided into three groups; a high exposure group (120 mg/kg ip.), a moderate exposure group (60 mg/kg ip.), and a low exposure group (30 mg/kg ip.). The

results of arterial blood gas analysis, and hematological findings, and pathological findings were also considered.

Result showed that the activated oxygen significantly increased in every group, and that these increases were completely suppressed with superoxide dismutase (SOD). In the low exposure group in particular, a significant increase was noticed on day 6 after exposure.

Such a finding has never been made before. Pathologically, polymorpho-nuclear leukocytes (PMNs) infiltrated the pulmonary alveolar interstitium and appeared in BAL fluid simultaneously with the increase in activated oxygen.

These results indicate that superoxide anion plays a significant role in the formation of paraquat lung, especially in low exposure groups. Superoxide anion continued to participate in the formation of paraquat lung for at least one week. Considering the pathological findings, the suppression of PMNs function for at least a week after exposure would be necessary for the effective treatment of paraquat lung. (Accepted on October 25, 2000) *Kawasaki Igakkaishi* 27(1): 31-40, 2001

Key Words ① Paraquat poisoning ② MCLA [2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3]
③ 7-dihydroimidazo(1,2- α)pyrazin-3-one
④ Superoxide ⑤ Activated oxygen

はじめに

パラコート (1, -1'- dimethyl-4, 4'-bipyridylum) は、強力な除草作用をもつ農薬として広く使用されている。パラコートによる中毒は極めて死亡率が高く、その治療法はまだ確立していない。特に肺における病変は、早期に見られる肺水腫と肺出血を合併した病変や、暴露後約一週間前後から出現する進行性の肺線維症が知られ、これらは、パラコート肺ともいわれ、呼吸不全で死亡する原因となっている¹⁾。パラコート肺の発症には、活性酸素が関与していると考えられているが²⁾、活性酸素の測定が困難なため、活性酸素産生の結果引き起こされるスカベンジャーの減少や脂質過酸化生成物を測定して間接的に検討されてきた。このことは、パラコート中毒における病態解明を不十分にしてきたきらいがある。従って、今回の研究においては化学発光によって高感度に活性酸素を測定できる MCLA を用いて直接的に活性酸素の測定を行った。測定試料としては、肺胞における活性酸素の動きを最も反映していると思われる肺胞洗浄液を用いて測定し、パラコート肺の発

生機序における活性酸素の関与について検討した。併せて、今回の研究においては、パラコート肺の病態に関係すると考えられる動脈血ガス分析、血清電解質、肺病理組織所見についても検討した。

材料と方法

12週令、体重240~260 g の SD 系ラットの雌を用い実験を行った。パラコート標準品 (Dimethyl viologen 米国 Sigma 社製) は、6 ml/kg の生理的食塩水に溶解して腹腔内投与した。無処置のものを無処置群、パラコート標準品 120 mg/kg を腹腔内投与 (LD₅₀量の4倍量) したものを高暴露群、同 60 mg/kg (LD₅₀量の2倍量) を投与したものを中暴露群、同 30 mg/kg (LD₅₀量) を投与したものを低暴露群とした。

高暴露群では投与3, 6時間後に、中暴露群では、6, 12, 18, 24時間後に、低暴露群では、1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、7日後にそれぞれフローセン麻酔下に屠殺して (それぞれ7頭ずつ)、HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) 5 ml で肺胞洗浄を行い、洗浄液を活性酸素測定のため回収した。屠殺ま

では、室温25℃の Room Air 下に固形飼料と飲料水を自由に飲食させた。屠殺前に、採血を行い、動脈血ガス分析、血清電解質の測定、血漿乳酸値の測定等を行った。屠殺までに死亡したラットは、検討から除外したが、それぞれの群の経時的な生存率を求めて、グラフとした。肺の病理組織は屠殺、肺胞洗浄後、型通りに標本を作成し病理組織学的検討を行った。また、低量暴露群では、病理組織学的検討のため、暴露後10日後、14日後にも屠殺し、肺組織を採取した。動脈血ガス分析、血清電解質の測定にあたっては、Instrumentation Laboratory 社（米国）製の BGElectrolytes[®]を使用した。また、血漿乳酸値測定は、YSI 社（米国）製の2300 STAT PLUS を用いた。

肺活性酸素の測定は、Day らの方法³⁾に準じ、炭酸水素ナトリウムで pH 7.4 に調製した HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution: カルシウム、マグネシウム、フェニルレッドを含まないもの、米国 Cambrex 社製) 5 ml で肺胞洗浄を行い、その液を直ちに 800 g で15分間遠心分離した。その上清に、Nakano らの方法⁴⁾に準じ、最終濃度が 0.5 μM となるように MCLA を添加して総量を 2 ml とした。その後、保温・攪拌機能を持つ液体フォトカウンター、ルミカウンター2500[®]（マイクロテック日音社製）にて化学発光量を36℃で10分間測定した。その積分値を体重で除したものを活性酸素量とした。なお、遠沈後測定開始までの時間は2分間とした。

その際、活性酸素と MCLA による発光量(10分間積分値)との直線的な比例関係を確認するために、Xanthine (米国 Sigma 社製) 各濃度と十分量の Xanthine Oxidase (1 IU/mL) (和光純薬製) を反応させ、superoxide を発生させて、その関係を見た。

また、測定されたものが、superoxide であることを確認するために、同様にして得られた上清に、ヒト遺伝子組み替え体で、Cu, Zn を含有した Superoxide Dismutase (SOD: 和光純薬) を濃度を変えて添加し、4分間36℃でプレインキュベート後、最終濃度が 0.5 μM となるよう

に MCLA を添加して総量を 2 ml とし、ルミカウンター2500にて化学発光量を36℃で10分間測定して、その積分値を体重で除して活性酸素量の抑制をみた。この場合も、上清分離後 SOD 添加までの時間は2分間とした。

遠沈した細胞成分は、簡易ライト・ギムザ染色 (Diff-Quick[®], 国際試薬) で染色後、観察した。肺の病理組織は、10%緩衝ホルマリンにて経気管支的に固定後、パラフィン包埋した組織を4 μm 薄切連続切片とし、HE 染色後、検鏡した。

統計処理は、STAT VIEW 5.0 J[®] を使って、一元配置分散分析 (ANOVA) と post hoc 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

なお、本研究における実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け、(99-079, 00-009) 川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施された。

結 果

1. 各群の経時的生存率

各群の時間経過におけるラットの生存率は、**Figure 1** に示すように、低暴露群、中暴露群、高暴露群の順に高かった。

2. 活性酸素の産生量

Xanthine / Xanthine Oxidase 系による superoxide 産生量 (加えた Xanthine 量) と MCLA による発光量の関係を見たところ、直線的な比例関係が見られ (**Fig. 2**)、本研究における発光量はその範囲に含まれていた。

高暴露群における活性酸素の産生量を **Figure 3** に、中暴露群のそれを **Figure 4** に、低暴露群のそれを **Figure 5** に各々示す。高暴露群では、3, 6時間後に、中暴露群では6, 12時間後に、低暴露群では2日後と6日後に活性酸素の産生量が有意に増加していた。

3. SOD を肺胞洗浄液に添加した場合の効果

前述した活性酸素測定の結果、有意な活性酸素産生の増加がみられた高暴露群のうちの3時間後 (**Fig. 6**) と中暴露群のうちの6時間後 (**Fig.**

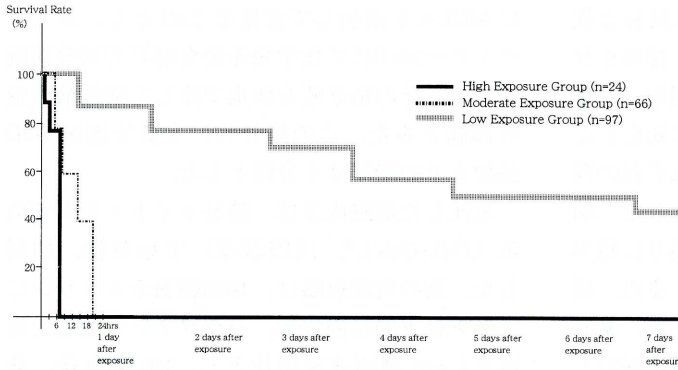


Fig. 1. Survival Curve

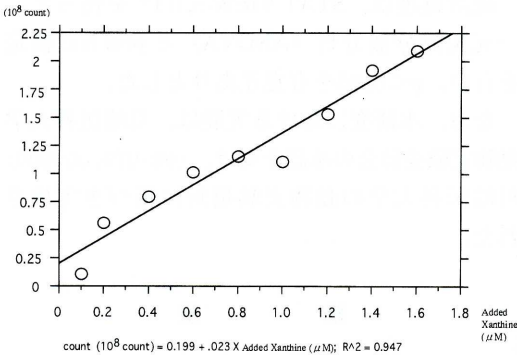


Fig. 2. The Relationship between the Luminescent Amount and Superoxide

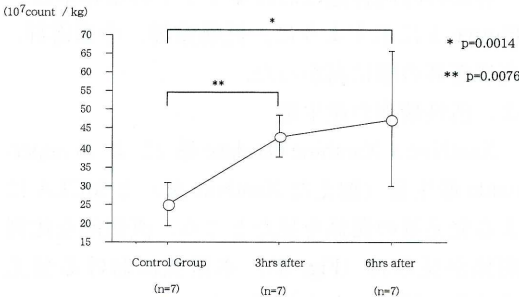


Fig. 3. Product Amount of the Activated Oxygen (High Exposure Group)

7), 12時間後 (Fig. 8), 低暴露群のうちの2日後 (Fig. 9) と6日後 (Fig. 10) の肺胞洗浄液についてSODを添加した。いずれの場合も, SOD 7000 U/mlを添加すると無処置群の発光量と同レベルになり, 完全に抑制された。

4. 血液検査所見

高暴露群, 中暴露群, 低暴露群の血液検査所見をそれぞれ Table 1, Table 2, Table 3 に

示す。動脈血ガス分析では, 高暴露群においては, 重炭酸イオンと Base Excess が時間経過とともに有意に低下した。低暴露群の7日後には有意な動脈血酸素分圧の低下がみられた。その他の群では pH, 動脈血酸素分圧, 二酸化炭素分圧に有意な変化を認めなかった。全血ナトリウムは高暴露群, 中暴露群の両群において時間経過

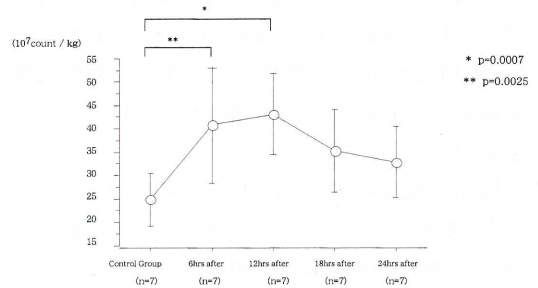


Fig. 4. Product Amount of the Activated Oxygen (Moderate Exposure Group)

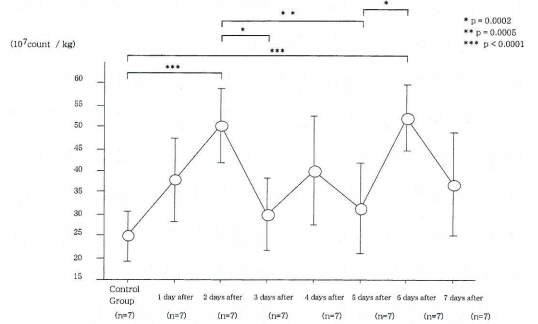


Fig. 5. Product Amount of the Activated Oxygen (Low Exposure Group)

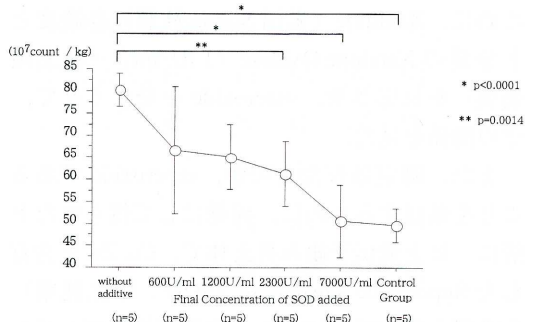


Fig. 6. Suppression of Luminescent Amount by SOD (High Exposure Group 3hrs after)

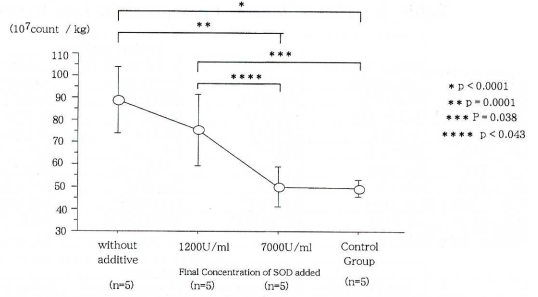
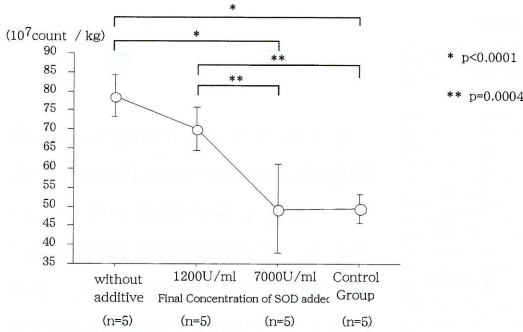


Fig. 9. Suppression of Luminescent Amount by SOD (Low Exposure Group 2 days after)

Fig. 7. Suppression of Luminescent Amount by SOD (Moderate Exposure Group 6 hrs after)

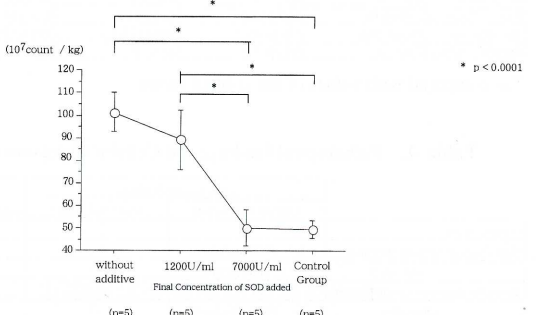
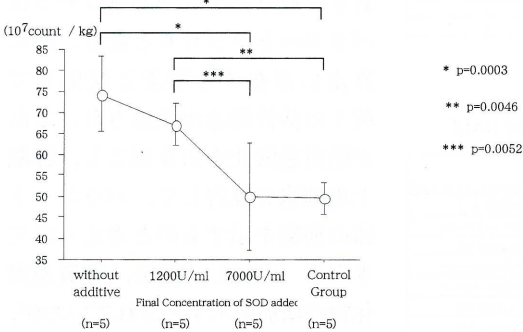


Fig. 10. Suppression of Luminescent Amount by SOD (Low Exposure Group 6 days after)

Fig. 8. Suppression of Luminescent Amount by SOD (Moderate Exposure Group 12 hrs after)

Table 1. Hematological Findings of the High Exposure Group

	High Exposure Group			p values
	Control Group (n=7)	3hrs after (n=7)	6hrs after (n=7)	
pH	7.501±0.069	7.476±0.026	7.466±0.051	
PaCO ₂ (Torr)	33.74±7.75	29.16±3.22	27.79±4.49	
PaO ₂ (Torr)	95.43±24.56	100.43±10.28	93.43±9.27	
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	26.2±2.5	21.7±2.0*	20.2±2.9**	*p=0.0031, **p=0.0002
BE (mEq/L)	4.06±2.30	-0.19±1.72*	-1.44±2.70**	*p=0.026, **p=0.0003
Na (mEq/L)	141.4±2.3	136.0±1.4*	136.0±2.1*	*p<0.0001
K (mEq/L)	4.0±0.3	3.8±0.6	3.7±0.3	
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	1.30±0.04	1.15±0.04*	1.08±0.08**	*p=0.0001, **p<0.0001
BS (mg/dl)	180.0±18.1	338.0±45.8*	294.7±35.3*	*p<0.0001
Lactate (mEq/L)	3.0±1.6	3.5±2.6	2.6±0.6	

*, ** as compared with values of the control group

Table 2. Hematological Findings of the Moderate Exposure Group as compared with values of the control group

	Control Group (n=7)	Moderate Exposure Group			
		6hrs after (n=7)	12hrs after (n=7)	18hrs after (n=7)	24hrs after (n=7)
pH	7.501±0.069	7.524±0.042	7.505±0.064	7.474±0.052	7.529±0.045
PaCO ₂ (Torr)	33.74±7.75	29.10±6.47	35.33±6.67	35.97±2.89	34.33±4.56
PaO ₂ (Torr)	95.43±24.56	89.86±12.71	75.00±16.61	78.14±14.00	85.71±14.41
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	26.2±2.5	23.0±4.0	27.8±1.9	26.74±3.2	28.89±4.0
BE (mEq/L)	4.06±2.30	2.69±2.96	5.23±1.96	3.86±3.50	6.79±3.61
Na (mEq/L)	141.4±2.3	137.0±2.3	133.7±2.9*	133.7±3.9**	134.1±3.7**
K (mEq/L)	4.0±0.3	3.8±0.7	3.9±0.7	4.3±0.9	5.1±3.6
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	1.30±0.04	1.14±0.10*	1.15±0.08**	1.15±0.06***	1.13±0.06****
BS (mg/dl)	180.0±18.1	297.6±59.6*	288.1±66.5**	279.7±58.1***	292.1±35.5****
Lactate (mEq/L)	3.0±1.6	2.8±1.1	2.6±0.5	4.5±1.8	4.2±0.8

a * p<0.0001 ** p = 0.0003 *** p = 0.0001
 b * p = 0.0004 ** p = 0.001 *** p = 0.0006 **** p = 0.0002
 c * p = 0.0002 ** p = 0.0004 *** p = 0.0009 **** p = 0.0003

とともに有意に減少した。全血カリウムは高暴露群、中暴露群では時間経過で変化しなかったが、低暴露群では、2日後に有意な低下を見た。イオン化カルシウムは、高暴露群、中暴露群では時間経過とともに低下し、低暴露群では、2日後に有意な低下を見た。血糖値は、高暴露群、中暴露群では、時間経過とともに上昇し、低暴露群では、1日後に有意に上昇した。血漿乳酸値にはいずれの群においても有意な変化が認められなかった。

5. 病理組織学所見

各群における病理組織所見を Table 4 に示す。高暴露群では、3時間後に、中暴露群では、12時間後に、低暴露群では6日後に、

Table 3. Hematological Findings of the Low Exposure Group

	Control Group (n=7)	Low Exposure Group			p values
		1 day after (n=7)	2 days after (n=7)	3 days after (n=7)	
pH	7.501±0.069	7.564±0.045	7.535±0.043	7.491±0.042	
PaCO ₂ (Torr)	33.74±7.75	29.64±1.91	32.73±4.61	36.85±6.37	
PaO ₂ (Torr)	95.43±24.56	88.14±5.61	82.29±8.06	77.57±15.12	
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	26.2±2.5	27.1±2.7	27.8±2.3	28.7±2.2	
BE (mEq/L)	4.06±2.30	6.23±3.10	6.07±1.80	5.96±1.64	
Na (mEq/L)	141.4±2.3	137.9±2.9	138.7±2.6	139.1±2.5	
K (mEq/L)	4.0±0.3	3.7±0.4	3.5±0.5*	3.6±0.4	*p=0.028
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	1.30±0.04	1.20±0.05	1.19±0.08*	1.25±0.06	*p=0.0017
BS (mg/dl)	180.0±18.1	221.1±30.6*	197.9±14.33	183.4±31.2	*p=0.0013
Lactate (mEq/L)	3.0±1.6	3.2±1.2	2.9±1.1	3.8±1.8	

考 察

ヒトのパラコート中毒に特有の肺病変は intraalveolar fibrosis であり⁵⁾, 肺胞上皮の障害が主なものである。この肺線維症は進行性に悪化するのが特徴であるが、その原因として肺胞上皮細胞がパラコートを選択的かつ能動的に取り込む性質を有すること⁶⁾と関連がある。取り込まれたパラコートはパラコートラジカルとなり、肺に豊富に存在する酸素と反応して種々の活性酸素が生成され、これが脂質過酸化を引き起こし、肺胞上皮細胞を障害して、パラコート肺の病態を示すものと考えられてきた⁷⁾。しかし、従来、脂質過酸化物の増加を示すとされていたが、その後の研究において脂質過酸化物は増加していないとの報告も相次ぎ、十分に実証されたとは言い難い⁸⁾。

今回の研究では、活性酸素の産生量は、高暴露群と中暴露群、低暴露群の全ての群で増加しており、いずれも SOD 添加により無処置

	Control Group (n=7)	Low Exposure Group			p values
		4 days after (n=7)	5 days after (n=7)	7 days after (n=7)	
pH	7.506±0.047	7.535±0.043	7.507±0.066	7.518±0.063	
PaCO ₂ (Torr)	36.33±5.95	35.11±8.14	35.24±7.85	33.43±5.11	
PaO ₂ (Torr)	85.71±10.48	79.86±16.70	83.14±21.86	80.43±10.86*	*p=0.0009
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	28.8±2.9	28.8±4.1	27.8±2.1	27.1±2.7	
BE (mEq/L)	6.24±2.37	6.45±3.13	5.31±1.75	5.07±2.87	
Na (mEq/L)	139.9±2.2	140.3±2.1	141.4±2.1	140.7±2.2	
K (mEq/L)	3.8±0.3	4.1±0.4	3.8±0.4	4.0±0.7	
Ca ⁺⁺ (mmol/L)	1.26±0.06	1.27±0.05	1.25±0.08	1.27±0.04	
BS (mg/dl)	180.1±16.2	178.0±24.7	186.1±14.2	195.0±22.8	
Lactate (mEq/L)	2.9±0.5	3.4±0.9	3.1±1.0	2.9±0.9	

*as compared with values of the control group

Table 4. Pathological Findings and Cellular Component of the BALF

	Pathological Findings		Cellular Component of the BALF
	Cellular Infiltration	Interstitial Edema	
Control Group	(-)	(-)	(+) mainly Mφ
High Exposure Group 3hrs after	(+) PMN prominent	(++)	(++) PMN prominent
6hrs after	(++) mainly Mφ	(++)	(++) mainly Mφ
Moderate Exposure Group 6hrs after	(-)	(-)	(++) PMN prominent
12hrs after	(+) PMN prominent	(-)	(++) PMN prominent
18hrs after	(++) mainly Mφ	(±)	(++) mainly Mφ
24hrs after	(+) mainly Mφ	(-)	(++) mainly Mφ
Low Exposure Group 1 day after	(+) mainly Mφ	(±)	(+) mainly Mφ
2 days after	(+) mainly Mφ	(±)	(++) PMN prominent
3 days after	(+) mainly Mφ	(±)	(+) mainly Mφ
4 days after	(++) mainly Mφ	(±)	(+) mainly Mφ
5 days after	(++) mainly Mφ	(±)	(+) mainly Mφ
6 days after	(+) PMN prominent	(±)	(++) PMN prominent
7 days after	(+) mainly Mφ	(±)	(+) mainly Mφ
10 days after	(++) mainly Mφ	(+)	(+) mainly Mφ
14 days after	(++) mainly Mφ	(++)	(+) mainly Mφ

PMN: polymorphonuclear neutrophil leukocyte Mφ: macrophage

(-) no findings (±) slightly findings (+) apparent findings

好中球浸潤が強く出現した。また、肺胞洗浄液を遠沈した細胞成分は、大部分が肺胞マクロファージであったが、高暴露群では3時間後に、中暴露群では6時間後、12時間後に、低暴露群では2日後と6日後に好中球の出現が目立った。

Figure 11には、無処置群の肺病理組織像を示す。Figure 12は低暴露群6日後の肺病理組織像で、好中球浸潤の所見が著明に見られる。Figure 13には、低暴露群10日後の肺病理組織像を示す。マクロファージを主体としたさらに強い細胞浸潤が見られる。

群と同レベルに発光量が抑制された。このことは、発生した活性酸素は、superoxideであることを示している。一般的に、水溶液中の superoxideは秒単位以下の非常に短い時間しか存在出来ないといわれており、本研究では採取後の細胞が活性酸素産生に及ぼす影響を回避するために、回収した肺胞洗浄液を遠心分離して細胞成分を除去しているので、今回の上清中の superoxideの由来が問題になる。これについては、上清中の非細胞成分が superoxideを生成し続けている可能性と、superoxideの分解が遅延した可能性とが考えられる。上清中の非細胞成分が superoxideを生成し続けていけば、SOD

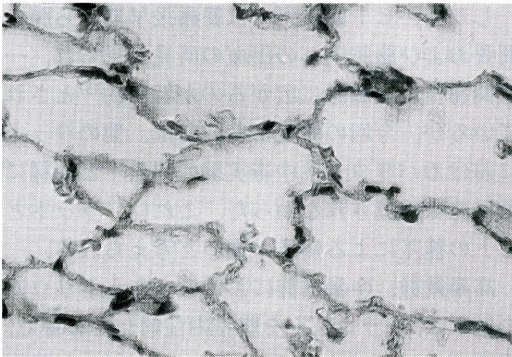


Fig. 11. Pathological Finding of the Control Group
HE stain 400X

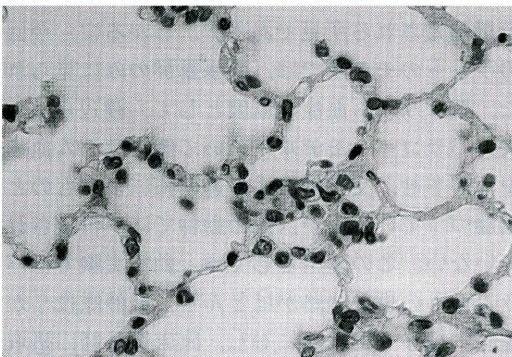


Fig. 12. Pathological Finding of the Low Exposure Group
(6 days after)
HE stain 400X PMNs' infiltration was prominent.

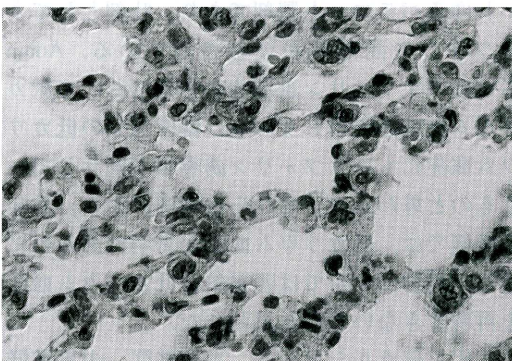


Fig. 13. Pathological Finding of the Low Exposure Group
(10 days after)
HE stain 400X Prominent finding of cell infiltration
mainly by Macropages was noted.

いか、もしくはその活性が著しく低い状態にあると考えると、superoxideの寿命が延長した可能性も考えられる。一酸化窒素(NO)産生系においては、NO消去系が存在しない液体中ではNOの寿命が100倍以上延長することが指摘されている⁹⁾。いずれにしても、本研究における細胞成分を伴わないsuperoxideの存在に関してはさらに検討が必要であると思われる。

superoxideの産生量は、高暴露群では、3時間後、6時間後と時間経過とともに増加しており、中暴露群では12時間後をピークに、18時間後、24時間後には減少していった。低暴露群では、2日後、6日後に有意に増加していた。この低暴露群における、長期間に及ぶ活性酸素産生は、従来、報告されていなかったものである。このことは、従来考えられていたよりも、長期間にわたって活性酸素がパラコート肺に影響を与えていることを示している。また、superoxide産生量の増加に一致して、肺病理学的所見では、好中球浸潤の増加がみられ、肺胞洗浄液中の細胞成分にも同様に好中球の増加が認められた。これらのことから、パラコート肺を引き起こす原因には、肺に浸潤した好中球が関係している可能性がある。同様のことは、Addoら¹⁰⁾もパラコート中毒患者の治療結果から疑っている。彼らは、パラコート中毒患者にサイクロフォスファミドを投与して、好中球数を減らす治療により生存率が改善したことから、パラコート中毒における活性酸素の産生には好中球が関与しているのではないかと述べている。

従来、パラコート中毒動物実験モデルにおいては測定感度が低いため、高用量暴露下、しかも、暴露後早期においてしか活性酸素産生が証明されていなかった。このことから、活性酸素の活動を抑制し続ける必要性が疑問視されていたが、今回、低暴露6日後においても活性酸素の産生が実証されたことにより、活性酸素の活動を長期にわたって抑制しなければならないことが示唆された。また、好中球が活性酸素の産生に関与しているならば、好中球機能を抑制し、

を経気道的に投与すれば、細胞外に存在するsuperoxide産生系を抑える可能性も示唆される。一方、上清中ではsuperoxide消去系が存在しな

superoxide 産生を抑えることもパラコート肺の治療に有効であると思われた。

近年、活性酸素の測定は、CLA (2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo [1, 2- α] pyrazin-3-one) や MCLA による化学発光によって高感度に測定できるようになってきた。しかし、CLA を用いた測定においても、測定感度の問題から、パラコートの大量投与が必要となり、しかも、観察期間が数時間から一日までに限られているため、最も肺の障害が予後を左右する中等度の障害を示す動物実験モデルには活性酸素の測定方法として利用できなかった。このことが、ヒトの中等度の中毒症例において活性酸素がどの時期までパラコート肺の成立に関与しているのかを不明にし、各種治療の方法、時期を不明瞭にしていた。一方、MCLA は Nakano らによって合成された物質⁴⁾で、活性酸素 (superoxide および 1 重項酸素) と特異的に反応して化学発光をおこし、しかも、同じウミホタルシフエリン誘導体である CLA と比べて MCLA の発光強度は4.5倍にもなる。このことから、今回の研究においては活性酸素量の測定をより高感度で測定しえると考えられる MCLA を用いて、活性酸素を測定した。

血液ガス分析の結果では、高暴露群、中暴露群では有意な低酸素血症は出現しなかった。また、乳酸値も有意な変化を見なかった。しかし、重炭酸イオンや Base Excess が有意に減少していることは、パラコート中毒においては乳酸以外のケトン体、有機酸等の増加があることが推察される。しかし、PaCO₂の低下により pH に変化がみられていないことは、さほど大きな酸の産生はないと推測できる。血液ガス分析の結果では、高暴露群、中暴露群ともに低酸素血症は出現しなかった。これは、今回の肺病理学所見とも一致する。実際、これまでの報告でも肺の初期病変は間質の水腫とうっ血であり^{5), 11)}、免疫組織学的検討¹²⁾でも、20時間後頃より肺胞上皮障害が出現し始め、52時間後頃になると肺胞上皮の剥離、消失が起こるといい、今回の病理組織学的所見と一致する。

しかし、ヒト臨床例では暴露後早期から肺の間質および胸腔内への出血の所見が見られ、一週間前後で全肺野に広がるのが特徴的¹³⁾とされているが、今回の研究においては、他のラットにおけるパラコート中毒実験の報告¹⁴⁾と同様に肺出血は確認されなかった。これは、ラットとヒトの種差による病像の違いと考えられる。

高暴露群、中暴露群における全血ナトリウムの低下は、パラコートを腹腔内注射した影響で、腹腔内をはじめとする third space に Na が漏出したものと思われた。低カリウム血症は、パラコート中毒の臨床例においては、特に重症例に特徴的とされる所見である¹⁴⁾。しかるに、今回のラットのモデルでは、低暴露群のみに見られた。低カリウム血症の原因として、渡辺らは、犬のパラコートモデルにおいて低カリウム血症を再現させ、交感神経系の過緊張によるものと結論づけている¹⁵⁾が、他の動物では、再現されていない。この理由としては、動物実験ではパラコートの投与経路がほとんど、経静脈投与か腹腔内投与であるのに対し、臨床例は経口摂取であり、重症臨床例では、激しい嘔吐や下痢が必発となるため、低カリウム血症となるものと思われる。さらに臨床中毒例で摂取されたのは、いわゆるパラコート製剤であり、吐剤としてネオフィリン誘導体が添加されている。Adam ら¹⁶⁾はネオフィリン誘導体の中毒において低カリウム血症を観察しており、臨床例での低カリウム血症にもネオフィリン誘導体が関与しているものと思われる。それらの理由により、重症臨床例では、低カリウム血症が著明であるのに対し、動物モデルでは普遍的に低カリウム血症を再現できないものと思われた。

イオン化カルシウムは、高暴露群、中暴露群では時間経過とともに低下し、低暴露群では、2日後に有意な低下を見た。この所見は、臨床中毒例では確認されていないが、臨床現場で測定されているカルシウムの多くは、血清カルシウムの総量であり、臨床現場でイオン化カルシウムを測定している施設が少ないことにも拠るものと思われる。パラコート中毒では、細胞内

へのパラコートラジカルの取り込みにカルシウムイオンが関連していると言われている。Yoshimuraら¹⁷⁾は、ラットの脳室にパラコートを投与し、脳細胞内のカルシウムレベルの上昇が、パラコートによる神経障害に関連していると指摘し、Barnardら¹⁸⁾はラットの肺細胞を使った実験で、細胞外のカルシウムイオンの低下がパラコートの肺障害に関係しているとしている。今後、臨床中毒例でのイオン化カルシウムの変動についての検討が望まれる。

結 語

ラットのパラコート中毒モデルを用いて、肺胞洗浄液中の活性酸素を測定し、以下の結果を得た。

1. MCLA を用いた肺胞洗浄液中の活性酸素の測定は、パラコート肺における活性酸素の測定をより高感度に、より直接的に測定できた。
2. 高暴露、中暴露、低暴露いづれの群においても、肺胞洗浄液中の活性酸素は増加した。
3. 臨床上肺障害が問題となる低暴露の中毒モデルにおいて投与2日後に加え、6日後にも活性酸素が増加した。
4. パラコートによる活性酸素の増加はSODの添加によってほぼ完全に抑制され、活性酸素の増加はsuperoxideによることが明らかになった。

5. 病理組織学的には活性酸素の生成量が増加していた時期に、好中球の肺胞への浸潤、肺胞洗浄液中の好中球の出現を見た。

6. このことは活性酸素、superoxideが高暴露、中暴露における早期の肺病変のみならず、低暴露におけるintraalveolar fibrosisにも関与していることが示唆され、活性酸素の活動を長期にわたって抑制しなければならないものと思われた。また、好中球機能を抑制し、superoxide産生を抑えることがパラコート肺の治療に有効であると思われた。

7. 動脈血ガス分析、血清電解質の測定、病理組織所見に関してヒト臨床例と異なった結果が一部見られたが、ラットとヒトの種による違いも考えられた。

謝 辞

本研究にあたって、直接御指導いただいた、川崎医科大学救急医学教室助教授、鈴木幸一郎先生と川崎医療短期大学臨床工学科助教授、望月精一先生に深く感謝致します。また、肺の病理組織所見を御指導いただいた川崎医科大学病理学教室教授、真鍋俊明先生と活性酸素について御指導頂いた同薬理学教授大熊誠太郎先生に感謝申し上げます。最後に、本研究の御指導と論文の御高閲をいただいた、同救急医学教室教授、小濱啓次先生に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Suzuki K, Takasu N, Arita S, Maenosono A, Ishimatsu S, Nishina M, Tanaka S, Kohama A: A new method for predicting the outcome and survival period in paraquat poisoning. *Hum Toxicol* 8: 33-38, 1989
- 2) Brackett DJ, McCay PB: Free radicals in the pathophysiology of pulmonary injury and disease *In* Free radicals in Diagnostic Medicine. New York Armstrong D (ed) Plenum Press. 1994, pp 147-163
- 3) Day BJ, Hatch A, Carstens DD, Carpo JD: An easy and economical method to prepare cells for cytologic analysis. *J Phamacol Toxicol Methods* 34: 57-62, 1995
- 4) Nishida A, Kimura H, Nakano M, Goto T: A sensitive and specific chemi-luminescence method for estimating the ability of human granulocytes and monocytes to generate O₂⁻. *Clinica Chimica Acta* 179: 177-182, 1989
- 5) Copland GM, Kolin A, Schulman HS: Fatal pulmonary intra-alveolar fibrosis after paraquat ingestion. *N Engl J Med* 291: 290-292, 1974
- 6) Rose MS, Smith LL, Wyatt I: Evidence for energy-dependent accumulation of paraquat into rat lung. *Nature* 252:

314-315, 1974

- 7) Bus JS, Aust SD, Gibson JE : Superoxide and sinlet oxygen catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 58 : 749-755, 1974
- 8) Ballantyne B, Marrs T, Syversen T : Systemic Pulmonary Toxicity - paraquat *In General and Applied Toxicology* vol II, 2000
- 9) 藤嶋美奈子, 一守康史, 中澤博江 : NO の代謝と測定法. 「NO ラジカルの医学」(大柳善彦編). 東京羊土社, 1996
- 10) Addo E, Poon-King T : Leukocyte suppression in treatment of 72 patients with paraquat poisoning. *Lancet* 17 [1(8490)] : 1117-1120, 1986
- 11) ニノ村信正 : パラコート中毒症40剖検例の肺病変についての検討. *日胸疾会誌* 24 : 437-446, 1986
- 12) 原 宏紀, 森谷卓也, 真鍋俊明 : パラコート中毒症における肺胞上皮の免疫組織学的検討. *日胸疾会誌* 26 : 499-506, 1988
- 13) 鈴木幸一郎, 奥村 徹, 青木光広 : パラコート中毒. *救急医学* 22 : 1414-1423, 1998
- 14) Li S, Li H, Zheng Z, Dong H : Pathologic characteristics of diffuse alveolar damage induced by Paraquat in rat lungs. *華西医科大学学報* 25 : 337-340, 1994
- 15) 渡辺誠治, 水谷太郎, 近藤陽一, 中村絃一, 山下 衛, 横山孝一, 内藤裕史 : パラコート中毒と低カリウム血症. *救急医学* 10 : 871-879, 1986
- 16) Adam RD, Robertson C, Jarvie DR : Clinical and metabolic features overdose with AMSEC. *Scott Med J* 24 : 246, 1979
- 17) Yoshimura Y, Watanabe Y, Shibuya T : Inhibitory Effects of Calcium Channel Antagonists on Motor Dysfunction Induced by Intracerebroventricular Administration of Paraquat. *Pharmacology and Toxicology* 72 : 4-5, 229-235, 1993
- 18) Barnard JW, Womack WA, Smith SM, Engerson TD, Taylor AE : Lung Protection against Paraquat is Calcium Dependent. *Journal of Applied Physiology* 72 (2) : 498-504, 1992