

マウスのパラコート経鼻投与モデルにおける人工肺サーファクタント気道内投与の治療効果－病理組織学的検討

井上 貴博, 鈴木 幸一郎

川崎医科大学救急医学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 パラコート中毒に伴う肺障害は「パラコート肺」とも呼ばれており予後不良の徴候であるが、現在までのところ有効な治療方法は開発されていない。我々はパラコート肺の発生機序として、肺胞上皮細胞により血液中から能動的に取り込まれたパラコートによりサーファクタントを産生するⅡ型肺胞上皮細胞が傷害されることが原因ではないかとの仮説を立てた。この仮説を証明するためにマウスのパラコート肺モデルを作製し、人工肺サーファクタント（サーファクテン[®]、田辺三菱製薬株式会社、大阪）を気管切開下に片側肺へ投与して肺組織学的検討を行った。パラコート単独投与群では、パラコート投与2日後には肺胞内に多数の赤血球を認め、肺出血の所見であった。その後、次第に肺胞構造が破壊され、1ヶ月後には肺線維化が顕著となり、Masson trichrome 染色で線維化が確認できた。2ヶ月後には気腫状になっているものも認められた。サーファクタント片側肺投与群では、1ヶ月後の肺組織においては肺胞隔壁と思われる間質部分が肥厚し細胞成分の増加を認めたが、Masson trichrome 染色ではその部分に線維化の所見はなく肺胞構造も多く残存していた。また、サーファクタント注入側の肺は線維化の領域が明らかに減少していた。以上のことから、パラコート肺は、人工肺サーファクタントにより抑制できる可能性があることが明らかになった。今後は生命予後に及ぼす効果についての検討が必要であると考えられる。

(平成22年10月14日受理)

キーワード：パラコート肺, 肺線維化, 人工肺サーファクタント

緒言

除草剤である「パラコート」は、ヒトが服毒すると体内で活性酸素を生成して強い毒性を発揮することが知られている^{1,2)}。大量服毒では24～48時間以内にショックで死亡する。少量服毒では肝臓機能障害や腎臓機能障害が出現するが、多くの場合1～2週前後で軽快回復する。口腔粘膜はびらんをきたし、2～3週間続く³⁾。1週以降に肺障害が出現することがあるが、これは進行性の肺線維症となりしばしば致命的と

なる⁴⁾。このパラコート中毒に伴う肺障害は「パラコート肺」⁵⁾ともいわれており予後不良の徴候であるが、これまでのところ有効な治療法は開発されていない。

動物実験では、Ⅰ型及びⅡ型肺胞上皮細胞は血液中から能動的にパラコートイオンを取り込む。取り込まれたパラコートイオンはNADPH依存性に一電子還元されてパラコートラジカルになるが、同時に肺に豊富に存在する酸素分子から活性酸素が生成されて細胞壁脂質を過酸化

する⁶⁾。こうして肺胞上皮は繰り返し傷害され、肺胸腔内に線維芽細胞が遊走して線維化しパラコート肺特有の intra-alveolar fibrosis が出現するものと考えられている。

これらの知見から、我々はパラコート肺の発生机序として、サーファクタントを産生するⅡ型細胞が傷害されることが関与しているという仮説を立てた。そして仮説を証明するために、マウスのパラコート肺モデルを作製し人工肺サーファクタントを投与してその効果を病理組織学的に検討した。

対象と方法

パラコート肺モデル (マウス) の作製

Tomita らの方法⁷⁾ に準じて、ケタミン筋注 (75mg/kg) とキシラジン腹腔内投与 (10mg/kg) により麻酔を施した生後 6~8 週齢、体重 30~40 g のマウス C57BL/6J Jms Slc 系 (n=15) に対して、粉末パラコートを生理食塩水に溶解 (0.04mg/20 μ L) した溶液 20 μ L を経鼻的に投与した。

人工肺サーファクタントの投与方法

人工肺サーファクタント (サーファクテン[®], 田辺三菱製薬株式会社, 大阪) は水に溶解せず懸濁液となるため、パラコート溶液のような経鼻投与はできない。そこで気管内に直接投与するために人工肺サーファクタント (0.12mg/20 μ L) の懸濁液を作製、全身麻酔下 (ケタミンとキシラジンの腹腔内投与) のマウス C57BL/6J Jms Slc 系 (n=5) に気管切開を行い、透視下に気管カニユーラを片側気管支内に留置して気管内に懸濁液 20 μ L を投与した

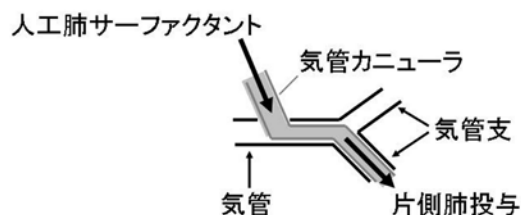


図1 サーファクタント片側気管内投与 (模式図)

(図1) (ヒトでは呼吸窮迫症候群に対して60~120mg/kg が気道内に投与されている)。サーファクタント投与後は気管カニユーラを抜去して皮膚を縫合し通常の飼育を行った。

パラコート肺の病理組織学的検討

パラコートを経鼻投与しただけの群 (n=15) と、パラコート経鼻投与 2 日後に気管切開下に上記方法で片側肺に人工肺サーファクタントを注入した群 (n=5) とにおいて、パラコート投与後 2 日目 (パラコート単独投与群 n=2), 1 ヶ月後 (パラコート単独投与群 n=4, サーファクタント片側肺投与群 n=2), 2 ヶ月後 (パラコート単独投与群 n=4) に肺を摘出して病理組織学的検討を行った。染色法としては通常の hematoxylin and eosin (H&E) 染色と、膠原線維を選択的に染色する Masson trichrome 染色の 2 種類を行った。

結果

パラコート単独投与群の肺組織では、パラコート投与 2 日後には肺胞内に多数の赤血球を認め、肺出血の所見であった。その後、次第に肺胞構造が破壊され、約 1 ヶ月後には線維化が広がっており、Masson trichrome 染色で線維化を確認できた。約 2 ヶ月後には気腫状になっているものも認められた (図 2)。

サーファクタント片側肺投与群の 1 ヶ月後の肺組織をみると、肺胞隔壁と思われる間質部分が肥厚し、細胞成分の上昇を認めた。ところが Masson trichrome 染色ではその部分に線維化と思われる所見はなく、肺胞構造も多く残存していた。また別の標本では正常な肺胞構造と、線維化とが混在している部分があり、サーファクタントが肺胞内に到達した部分と、そうでない部分の両方が混在している像と思われた (図 3)。注入側の肺は線維化の領域が明らかに減少していた (図 4)。

考察

パラコート経鼻投与により発生する肺障害

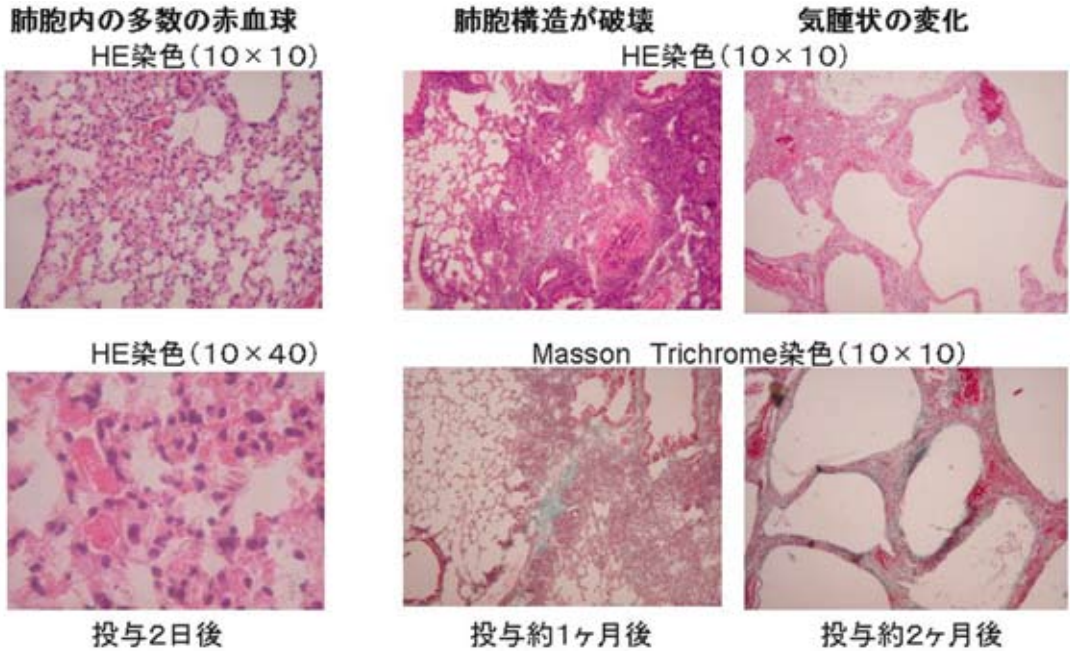


図2 パラコート投与後の組織学的変化

• 投与約1ヶ月後の肺組織(10×10)

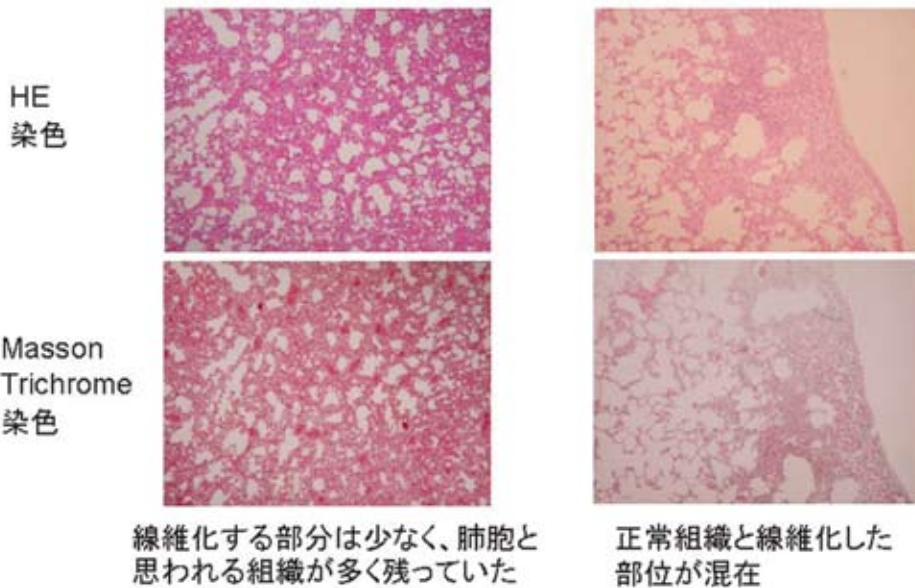


図3 パラコート+サーファクタント投与群での組織学的変化

(intra-alveolar fibrosis) は、人工肺サーファクタントを気管内投与することで抑制できることが明らかになった。しかし、肺線維化抑制機序

については明らかではない。

パラコート経鼻投与に伴う肺障害は、Tomitaら⁷⁾の報告によると6時間、24時間後では細

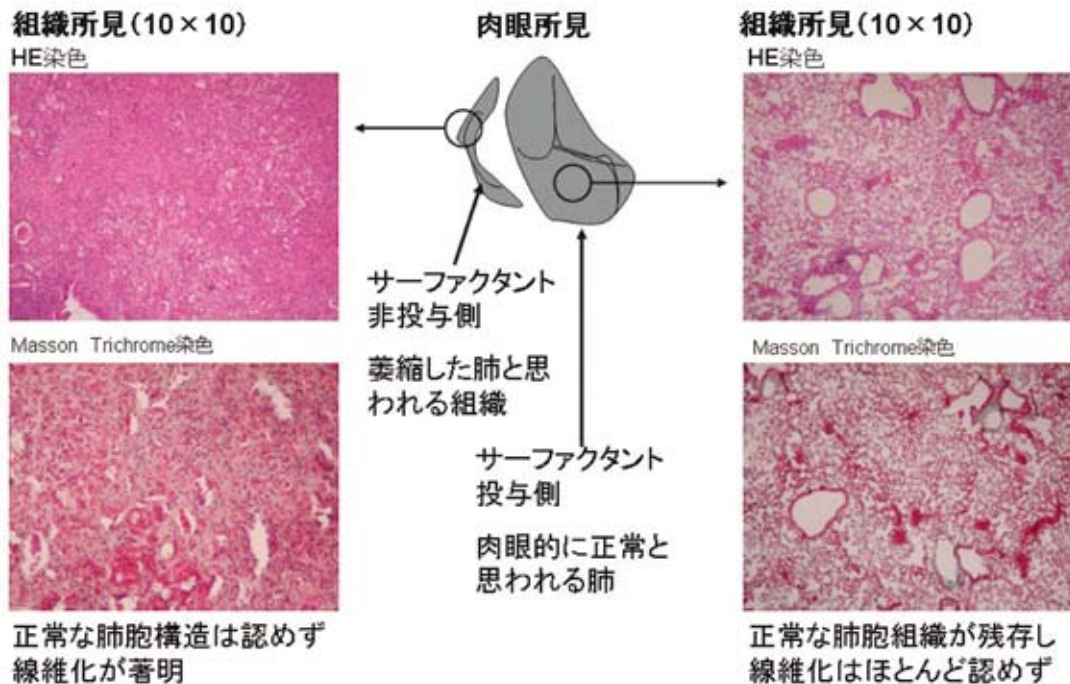


図4 サーファクタント片肺投与した個体での1カ月後の肉眼所見および組織学的変化

気管支に壊死組織片を認めるのみであり、5日目には肺組織の浮腫、炎症細胞浸潤、出血が著明であり、21日目になると Masson trichrome 染色からも肺線維化が顕著になるというものであるが、今回の我々の結果も同様の病理組織学的経過を示した。

ラットのパラコート腹腔内投与モデル⁸⁾では、24時間以内にI型及びII型肺胞上皮細胞の浮腫、細胞内小器官の膨化、液化変性が出現し、3日目までには肺胞上皮細胞は脱落する。しかし、肺胞毛細血管は傷害されない。この時期 (destructive phase) には肺胞腔は浮腫液で満たされるが、毛細血管は傷害されていないので血管透過性亢進以外の機序が働いて浮腫が発生している可能性がある。

II型肺胞上皮細胞は肺サーファクタントを産生・分泌することで肺胞の表面張力を低下させている。このII型細胞がパラコートにより傷害されてサーファクタントを産生できなくなると、肺胞腔内の表面張力が上昇して液体が滲出すると考えられる⁹⁾。経気道的にサーファク

タントが投与されることで肺胞虚脱が防がれて、その結果として肺胞浮腫が軽減する可能性はある。このように、肺サーファクタントの不足が浮腫発生に関与している可能性を指摘できるとしても、肺線維化 (intra-alveolar fibrosis) 出現との直接的な関連性は説明できていない。

ラットのパラコート腹腔内投与モデル¹⁰⁾では、パラコート投与後3日前後で肺胞内に単核細胞 (径6~10 μ m) が出現してくる。マクロファージに似ているが貪食作用はなく、パラコート投与後7日頃には肺胞腔を満たすようになり線維芽細胞に分化して肺線維化が起こる。この単核細胞の由来や遊走を促す機序は明らかになっていないが、経気道的に投与されたサーファクタントにはこの細胞の出現を何らかの機序で抑えることも考えられる。

内因性肺サーファクタントは少なくとも50種類の脂質と4つの特異的蛋白質 (surfactant protein (SP)-A, SP-B, SP-C, SP-D) からなり、呼気終末時の肺胞腔内表面張力を低下させて肺胞虚脱を防いでいる¹¹⁾。今回使用したサーファ

クテン[®]は親水性蛋白質である SP-A と SP-D は精製過程で除去されており, 脂質成分と疎水性蛋白質の SP-B と SP-C から成る. SP-A と SP-D は主として宿主防御に関与し¹²⁾, SP-B と SP-C は肺胞腔気相液相界面へのサーファクタント膜吸着に決定的役割を果たしていると言われて¹³⁾. これらのことから考えるとサーファクテン[®]投与の効果は, 免疫学的機序が働いた可能性よりも, 肺胞腔内の表面張力を低下させる作用による可能性が高いものと思われる.

結 語

Tomita らの方法によるマウスパラコート肺モデルを用いて人工肺サーファクタントを一側肺に投与して肺組織の経時的変化を検討した結果, サーファクタント投与側は反対側に比べて肺胞構造が維持され, 肺胞内線維化も抑制されることが明らかになった.

謝 辞

稿を終えるに当たり, ご指導とご高閲を賜りました医用中毒学教室の富田准教授に深甚なる謝意を表します. また研究の遂行に当たりご協力いただきました川崎医科大学救急医学実験室研究補助員の井手明子氏, 人工肺サーファクタントの提供を頂きました田辺三菱製薬株式会社に深く感謝いたします.

本研究は川崎医科大学医用実験センターの承認を得て実施されたものである.

尚本研究は, 川崎医科大学プロジェクト研究費 (20-4060) の援助により行われた.

引用文献

- 1) 鈴木幸一郎: パラコート. 急性中毒標準治療ガイド. 東京, じほう. 2008, pp159-165
- 2) Vanholder R, Colardyn F, De Reuck J, Praet M, Lameire N, Ringoir S: Diquat intoxication: Reports of two cases

and review of the literature. *Am J Med* 70: 1267-1271, 1981

- 3) 広川満良, 鈴木幸一郎, 高須伸克, 青木光広, 松本誠, 植田昭徳, 小濱啓次: パラコート中毒37剖検例の上部消化管病変: その病理組織学的検討. *日本救急医学会雑誌* 1: 583-591, 1997
- 4) 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
- 5) 名取博, 吉田薫, 吉良枝郎: パラコート肺. 呼吸と循環. 東京, 医学書院. 1977, pp409-412
- 6) Rose MS, Smith LL, Wyatt I: Evidence for energy-dependent accumulation of paraquat into rat lung. *Nature* 252: 314-315, 1974
- 7) Tomita M, Okuyama T, Katsuyama H, Miura Y, Nishimura Y, Hidaka K, Otsuki T, Ishikawa T: Mouse model of paraquat-poisoned lungs and its gene expression profile. *Toxicology* 231: 200-209, 2007
- 8) Smith P, Heath D: The ultrastructure and time sequence of the early stages of paraquat lung in rats. *J Pathol* 114: 177-184, 1974
- 9) Manktelow BW: The loss of pulmonary surfactant in paraquat poisoning: a model for the study of the respiratory distress syndrome. *Br J Exp Pathol* 48: 366-369, 1967
- 10) Smith P, Heath D, Kay JM: The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. *J Pathol* 114: 57-67, 1974
- 11) Chroneos ZC, Sever-Chroneos Z, Shepherd VL: Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cell Physiol Biochem* 25: 13-26, 2010
- 12) Wright JR: Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 5: 58-68, 2005
- 13) Whitsett JA, Weaver TE: Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med* 347: 2141-2148, 2002

Histopathological effects of intratracheal administration of artificial lung surfactant in a model of murine paraquat lung

Takahiro INOUE, Koichiro SUZUKI

*Department of Acute Medicine Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan*

ABSTRACT The pulmonary disorder with paraquat poisoning is called “paraquat lung”. It is an undesirable prognostic sign whose effective regimen has not been developed so far. We hypothesized that the type II alveolar cells producing surfactant were damaged by paraquat which was actively accumulated through the blood by alveolar epithelial cells. We made a model of murine paraquat lung to prove this hypothesis. We performed the examination of pulmonary histology : we gave an artificial lung surfactant (surfacten®, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Osaka) to one side of the lung using a tracheostomy tube. In the group of paraquat administration, we noticed a lot of red blood cells in alveolar spaces two days later, which was a sign of pulmonary hemorrhage. Then alveolar structures were gradually destroyed, intraalveolar fibrosis became remarkable one month later and fibrosis was confirmed in Masson trichrome stain afterwards. Honeycomb lung was also found two months later. In the group of surfactant administration, the lung parenchyma became thicken and was heavily infiltrated with cellular component. Masson trichrome stain has no fibrous tissues and many alveolar structures remained. Part of the fibrosis decreased clearly in the lung of surfactant administration.

(Accepted on October 14, 2010)

Key words : Paraquat lung, Intra-alveolar fibrosis, Artificial lung surfactant

Corresponding author

Takahiro Inoue

Department of Acute Medicine, Kawasaki Medical
School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 464 1044

E-mail : takapyro@yahoo.co.jp