

パラコート筋肉内投与マウスモデルにおける 人工肺サーファクタント気道内投与の効果

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 パラコート中毒に合併する「パラコート肺」は組織学的には intra-alveolar fibrosis を呈する予後不良の肺病変であるが、これまでのところ有効な治療法は開発されていない。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肺胞上皮 II 型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)を気管切開下に投与した後3日後にパラコートを投与して生命予後と残存健常肺容積に及ぼす影響, 並びに肺組織学的検討を行った。マウスは C57BL/6J 系と Balb/C 系を用いた。最初に, 両系におけるパラコート筋注時の LD₅₀ を検討すると, C57BL/6J 系では約28mg/kg, Balb/C 系では約9mg/kg であった。次に, 人工肺サーファクタントを事前投与した後にパラコート筋注を行った場合の死亡率を検討したところ, C57BL/6J 系と Balb/C 系の両系ともに有意に改善した。特に Balb/C 系ではパラコート20mg/kg 筋注によって, サーファクタント非投与群ではパラコート投与後7日以内に36匹が全て死亡したが, サーファクタント投与群では26匹中18匹が2ヶ月後も元気に生存していた。死亡するマウスでは, CT 画像から算出した健常肺体積が経日的に減少していった。肺組織学的検討では, パラコート投与後7日以内に死亡したものは肺胞出血の所見を認めるとともに, 時間経過とともに間質に細胞成分の増加を認めた。1ヶ月後に死亡したものでは, H & E 染色では細胞成分の上昇を認め, 正常な肺胞構造はほとんどなく, 蜂窩織肺と呼ばれる所見を認めた。Masson-Trichrome 染色では線維化も確認された。一方, 人工肺サーファクタントを事前投与した場合には, 7日以内死亡はもちろんそれ以降まで生存する場合にも肺組織に線維化を認めなかった。今回の結果から, 人工肺サーファクタント事前投与によりパラコート肺の出現が抑制されるとともに生存率も改善されることが明らかになった。今後は, 人工肺サーファクタント事前投与によりパラコート肺が抑制される機序の解明と臨床的応用についての検討が必要である。

(平成22年10月26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

パラコート中毒に合併する「パラコート肺」は生命予後不良の徴候であり, 組織学的には

intra-alveolar fibrosis を呈する¹⁾。パラコート大量服毒ではショックのために1両日で死亡するし, 少量服毒でも「パラコート肺」を合併して

別刷請求先
井上貴博
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学救急医学

電話: 086 (462) 1111
ファックス: 086 (464) 1044
Eメール: takapyro@yahoo.co.jp

死亡することが多く²⁾、パラコート中毒の治療法の開発は中毒治療に携わるものにとって長年の夢となっている。

我々は「パラコート肺」の発生機序としてサーファクタントを産生する肺胞上皮Ⅱ型細胞が障害されることが関与しているという仮説を立て、マウスのパラコート肺障害モデルを用いて人工肺サーファクタントを投与し組織学的検討を行った。その結果、人工肺サーファクタントは「パラコート肺」の治療法として可能性があることを報告した³⁾。今回は同様の作業仮説に基づき、人工肺サーファクタントの気管内投与が生命予後に及ぼす影響について検討した。

対象と方法

マウスは、近交系の C57BL/6J 系と Balb/C 系の 2 種類であり、生後 6～8 週齢の雄で体重 25～30g のものを 1 週間予備飼育して使用した。

前回の報告³⁾ではパラコート経鼻投与 2 日後に気管切開施行し人工肺サーファクタントを気道内に投与、肺病理組織学的検討にて人工肺サーファクタント投与にて「パラコート肺」が抑制されるという知見が得られた。しかしその後の検討にてこの方法ではマウスに対する侵襲が強く人工肺サーファクタントの生命予後改善効果は証明できなかった。

そこで今回の研究では、人工肺サーファクタントを事前に投与して、その後パラコートを投与する方法を選択した。

人工肺サーファクタントの気道内投与方法は以下の通りである。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、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) の懸濁液を作製し、全身麻酔下（ケタミンとキシラジンの腹腔内投与）に気管切開を行い、透視下に気管カニューラを留置して気管内に懸濁液 20 μ L を投与した³⁾。人工肺サーファクタント投与後は気管カニューラを抜去して皮膚を縫合し通常の飼育を行った。

人工肺サーファクタント投与 3 日後に、パラコートを生理食塩液に溶解して濃度を調整したものを、セボフルレンの少量吸入麻酔下にマウスの大腿部に筋肉注射した。パラコート投与後は通常飼育とした。既報³⁾にてパラコートの経鼻投与や人工肺サーファクタントのパラコート投与後の投与ではマウスに対する侵襲が強く十分な解析に至らなかったこともあり、上記のような方法で実施した。

測定項目は、パラコート投与後 2 ヶ月間の生死並びに肺組織学的検討（マウス死亡時摘出肺）であり、一部のマウスでは体重測定とパラコート投与後の肺 CT による肺容積の測定を行った。CT による肺容積の測定は、動物実験用 X 線 CT 装置（ALOKA ラシータ、LCT-200, Version 1.10, アロカ株式会社、三鷹）と付属の解析ソフトを使用した。

統計学的検討は、比率の差の検定、Kaplan-Meier 法（KaplanMaker1.01, みなと医療生協協立総合病院 消化器内科 高木篤氏、名古屋）、ロジスティック回帰分析を用いた。

結果

生存率に及ぼす影響

マウス C57BL/6J 系と Balb/C 系におけるパラコート単独投与（コントロール群）と人工肺サーファクタント投与（治療群）とを比較したのが表 1、表 2 である。

C57BL/6J 系のパラコート筋肉注射における LD₅₀は、表 1 からロジスティック回帰分析を行い約 28mg/kg 付近と考えられた。パラコート 35mg/kg 筋注では生存率は 0 に近いが、30mg/kg では 33.3% となり 24.5mg/kg 以下ではほぼ 90% 以上が生存するという結果であった。それに対して、人工肺サーファクタント投与群ではパラコート 35mg/kg 筋注に対してのみ治療効果が得られた。

Balb/C 系のパラコート筋肉注射における LD₅₀は、表 2 から約 9mg/kg 付近と考えられた。パラコート 20mg/kg 以上では生存率は 0 であり、以後 16.7mg/kg 筋注、10mg/kg 筋注では段

表1 マウス C57BL/6J 系におけるパラコート単独投与群(コントロール群)と人工肺サーファクタント投与群(治療群)の生存率

パラコート投与量 (mg)	コントロール群		治療群		P 値
	生存数 / 総数	生存率 (%)	生存数 / 総数	生存率 (%)	
1.5 (52.5mg/kg)	0 / 6	0	—	—	
1.0 (35mg/kg)	1 / 20	4.8	4 / 11	36.4	<0.011
0.9 (30mg/kg)	8 / 24	33.3	6 / 10	60.0	NS
0.8 (28mg/kg)	14 / 24	58.3	15 / 30	50.0	NS
0.7 (24.5mg/kg)	20 / 21	95.2	13 / 17	76.5	NS
0.5 (17.5mg/kg)	20 / 22	90.9	24 / 26	92.3	NS

表2 マウス Balb/C 系におけるパラコート単独投与群(コントロール群)と人工肺サーファクタント投与群(治療群)の生存率

パラコート投与量 (mg)	コントロール群		治療群		P 値
	生存数 / 総数	生存率 (%)	生存数 / 総数	生存率 (%)	
1.0 (35mg/kg)	0 / 10	0	—	—	
0.7 (24.5mg/kg)	0 / 12	0	—	—	
0.6 (20mg/kg)	0 / 36	0	18 / 26	69.2	<0.0001
0.5 (16.7mg/kg)	7 / 23	30.4	23 / 27	85.2	<0.0001
0.3 (10mg/kg)	11 / 23	47.8	29 / 34	85.3	<0.001

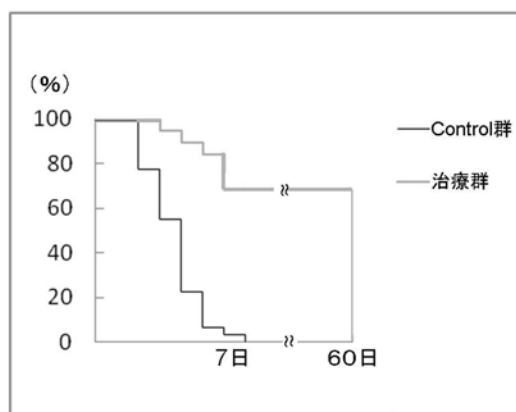


図1 Balb/C系マウスにおけるパラコート20mg/kg筋注に対する人工肺サーファクタント投与のKaplan-Meier法による生存曲線

階的に生存率が増えていった。人工肺サーファクタント投与群では、20mg/kg筋注、16.7mg/kg筋注、10mg/kg筋注のいずれにおいても有意に生存率の改善を認めた。

Balb/C系におけるパラコート20mg/kg筋注に対する人工肺サーファクタント投与の生存曲線は図1に示す通りであった。

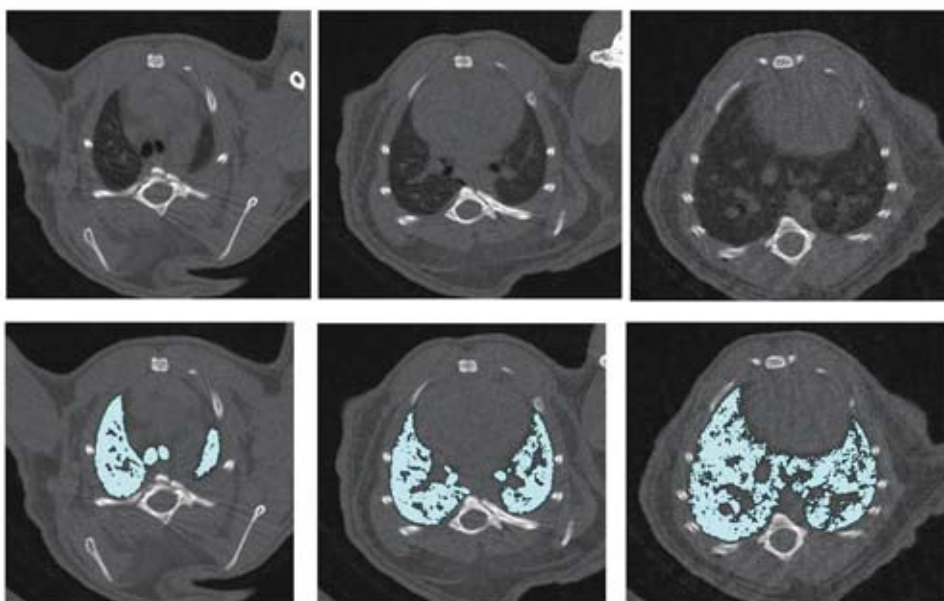
CTによる肺容積の測定

図2は、正常マウス(Balb/C系)の肺容積の測定方法を示した。上段は正常肺のCT画像

である。下段は解析ソフトを用いた解析結果である。CTのwindow wideとwindow levelを一定にした上で、気管と思われる部分を差し引いた含気のある肺(CT値を-1000~-400の範囲に設定)が水色で表示されており、この部分の面積×スライス間隔の積算値として体積が求められ、体積は $0.428\text{cm}^3 \pm 0.128$ (n=5)と計測された。

図3は、Balb/C系マウスに0.6mg(20mg/kg)のパラコートを筋注し、投与翌日から撮影したCT画像である。投与2日後には両側肺野に無気肺を伴う浸潤影を認め、ARDSのような病変を呈していた。CTのwindow wideとwindow levelを一定にし、気管と思われる部分を差し引いた肺(CT値を-1000~-400の範囲に設定)の体積を計算したところ、 $0.036\text{cm}^3 \pm 0.038$ (n=9)と明らかに低下していた。その後経時的にCTを撮影すると、正常な肺組織はほぼ認められなくなり死亡した。

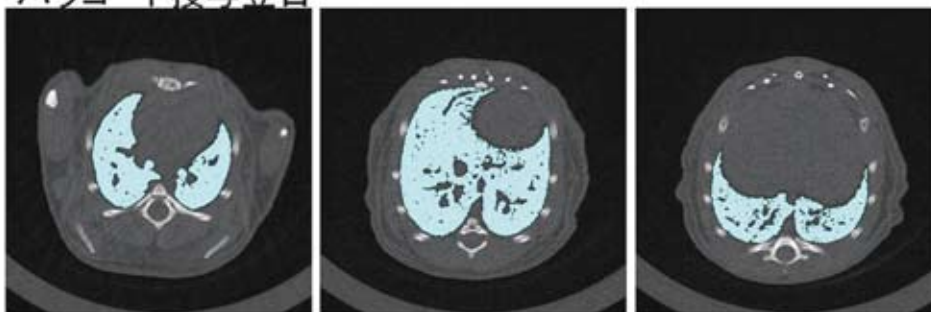
図4には、Balb/C系マウス(n=6)に0.6mg(20mg/kg)のパラコートを筋注し、投与後の体重と健常肺容積との経時的変化の代表例(2例)を示した。パラコート中毒が悪化するのに伴い、体重と健常肺容積とが減少した。他の4例においても同様の結果を示した。



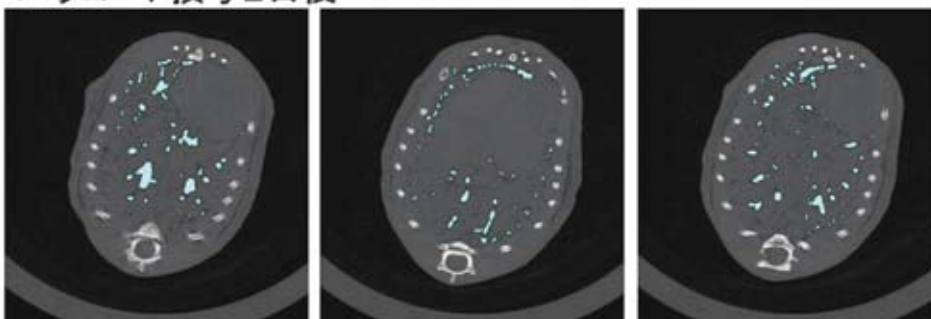
体積: $0.428\text{cm}^3 \pm 0.128$ (n=5) (CT値が $-1000 \sim -400$ の範囲)

図2 正常マウス (Balb/C) のCTによる肺の体積計測

パラコート投与翌日



パラコート投与2日後



体積 $0.036\text{cm}^3 \pm 0.038$ (n=9) (CT値が $-1000 \sim -400$ の範囲)

図3 パラコート投与後の健常肺体積の変化

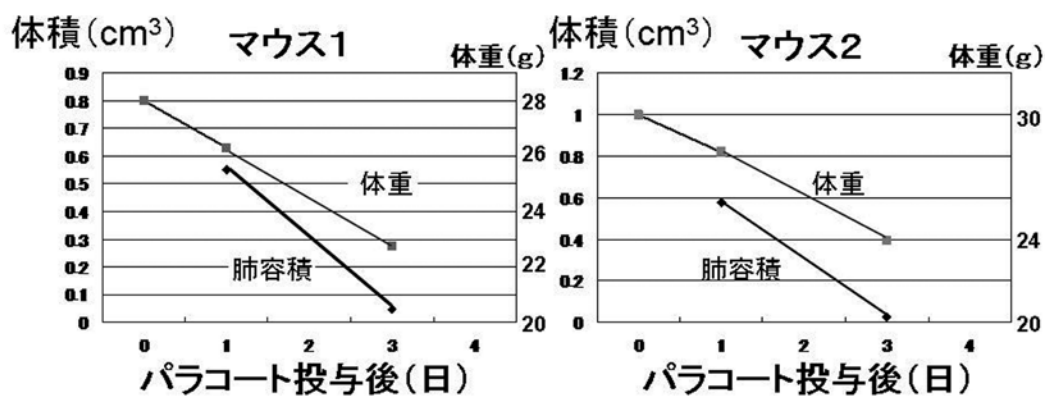


図4 パラコート投与後の体重と健常肺容積との経時的変化

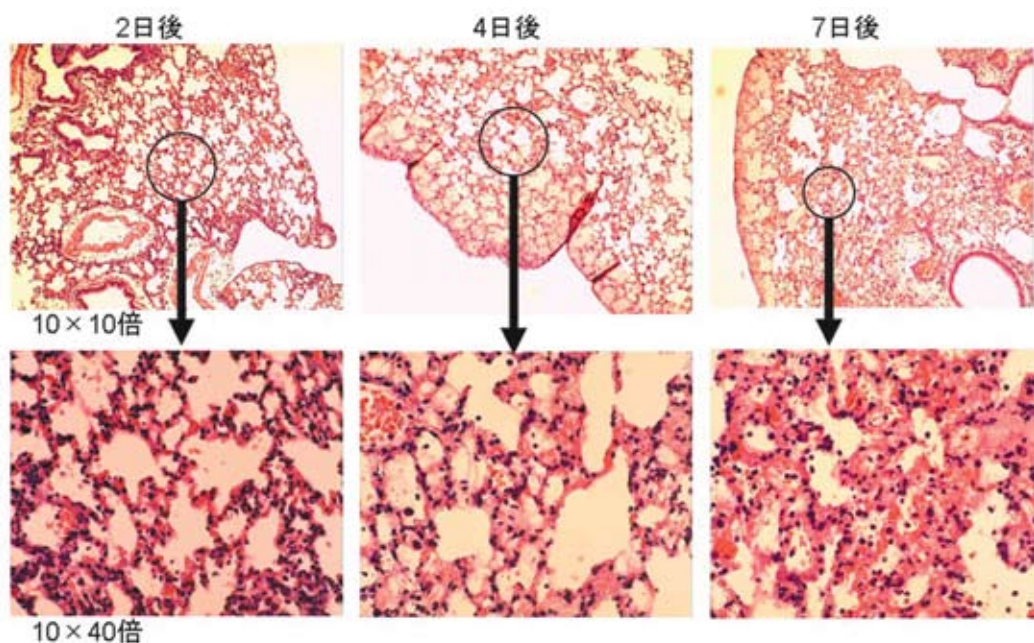


図5 パラコート 0.6mg 投与後のマウス (Balb/C 系) の肺組織の変化 (H&E 染色)

肺組織学的検討

図5から図10には組織学的組織学的変化の特徴的な所見を示したが、以下各群のマウスの匹数を n で表し、同じ群ではどのマウスでも同等の所見を観察した。

①パラコート0.6mg (20mg/kg) を Balb/C 系マウスに投与した場合

パラコート投与2, 4, 7日後のマウス肺組織を H&E 染色して検討した ($n=6$)。その結果、

肺胞出血の所見を認めるとともに、時間経過とともに間質に細胞成分の増加を認めた(図5)。

②パラコート0.8mg (28mg/kg) を C57BL/6J 系マウスに投与した場合

約1ヶ月後まで生存したマウスの肺で組織学的検索を行うと ($n=4$)、H & E 染色では細胞成分の上昇を認め、正常な肺胞構造はほとんどなく、蜂窩織肺と呼ばれる所見を認めた。

Masson-Trichrome 染色では線維化も確認された (図6)。

③人工肺サーファクタント投与3日後にパラコート0.6mgをBalb/C系マウスに投与した場合

パラコート投与3日後 (n=2), 4日後 (n=1) に死亡したマウスでは, 肺胞構造は保たれていたが, 間質に細胞成分の上昇を認め, 間質の肥厚を認めた。Masson-Trichrome 染色では線維化している部分は明らかでなかった (図7)。

パラコート投与6日後に死亡したマウス (n=4) では, 肺胞内にH&E染色で均一なピンク色に染まった貯留物のようなものを認めた。貯留物のない部位では多量の赤血球を肺胞内に認め, 肺胞出血の所見を認めた。Masson-Trichrome 染色では線維化は認められなかった (図8)。

④人工肺サーファクタント投与3日後にパラコートをC57BL/6J系及びBalb/C系マウスに投与し生存した場合

パラコート投与7, 9, 15日後の肺組織を調べると, 一部肺胞隔壁に細胞成分の上昇を認めた部分もあったが, ほとんどが正常な肺胞構造が保たれていた (図9)。Masson-Trichrome 染色では線維化は認められなかった (図10)。(パラコート0.5mg投与7日後C57BL/6J系マウス n=5, パラコート0.7mg投与9日後C57BL/6J系マウス n=4, パラコート0.3mg投与15日後Balb/C系マウス n=4)

考 察

今回の研究において我々は, 人工肺サーファクタントを事前に気管内投与することでマウスのパラコート中毒による死亡を減らすことを示した。ヒトにおけるパラコート中毒の決定的な治療法がない状況⁴⁾において, 臨床応用が期待できる方法である。

動物実験においては, パラコート投与により肺胞内のサーファクタントの減少が認められたという報告⁵⁾や, ラットの急性期パラコート中毒モデルにおいて人工肺サーファクタント投与を行い肺胞換気能が改善したという報告⁶⁾

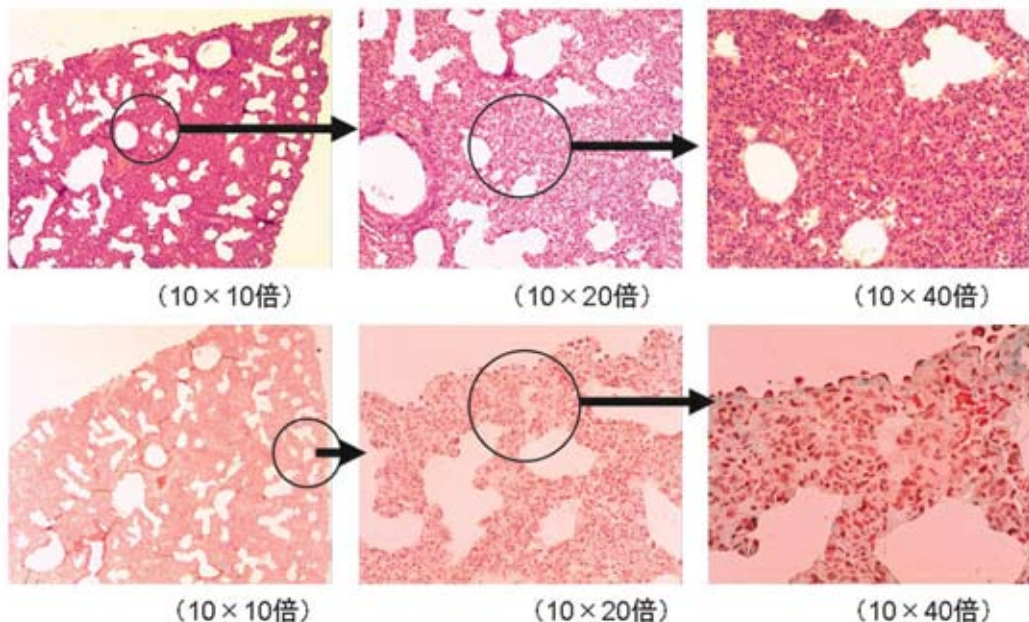


図6 パラコート0.8mg投与後のマウス (C57BL/6J系) の約1ヶ月後の肺組織 (上段: H&E染色, 下段: Masson-Trichrome染色)

はあるが, パラコート肺を改善したという報告や, 肺線維化抑制や生命予後を改善したとする

報告は動物実験でも臨床例でも発表されていない。

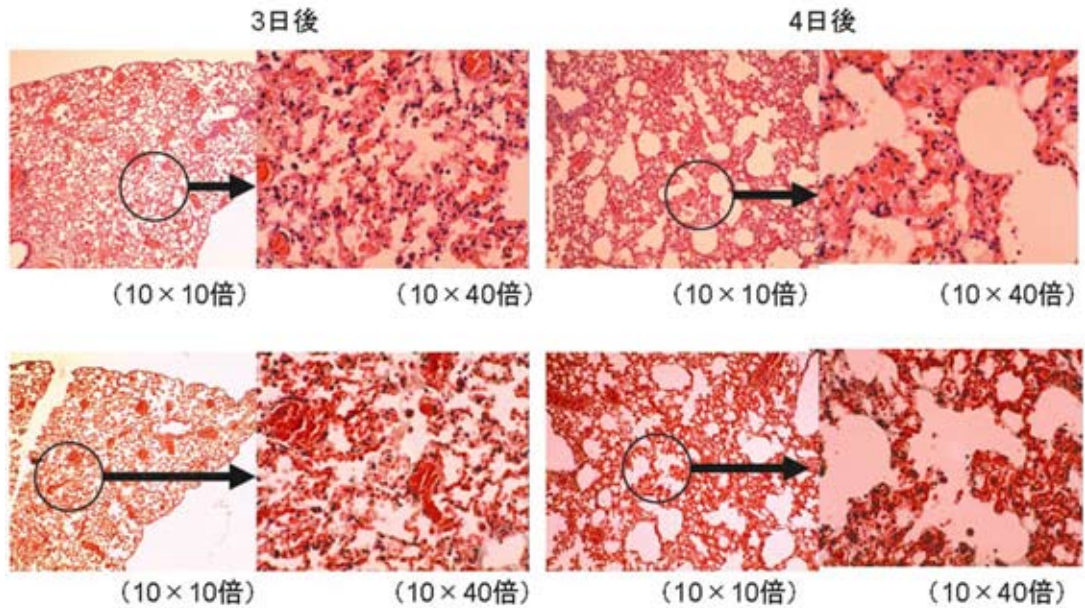


図7 サーファクタント+パラコート0.6mg投与後のマウス(Balb/c系)の肺組織(上段:H&E染色, 下段:Masson-Trichrome染色)

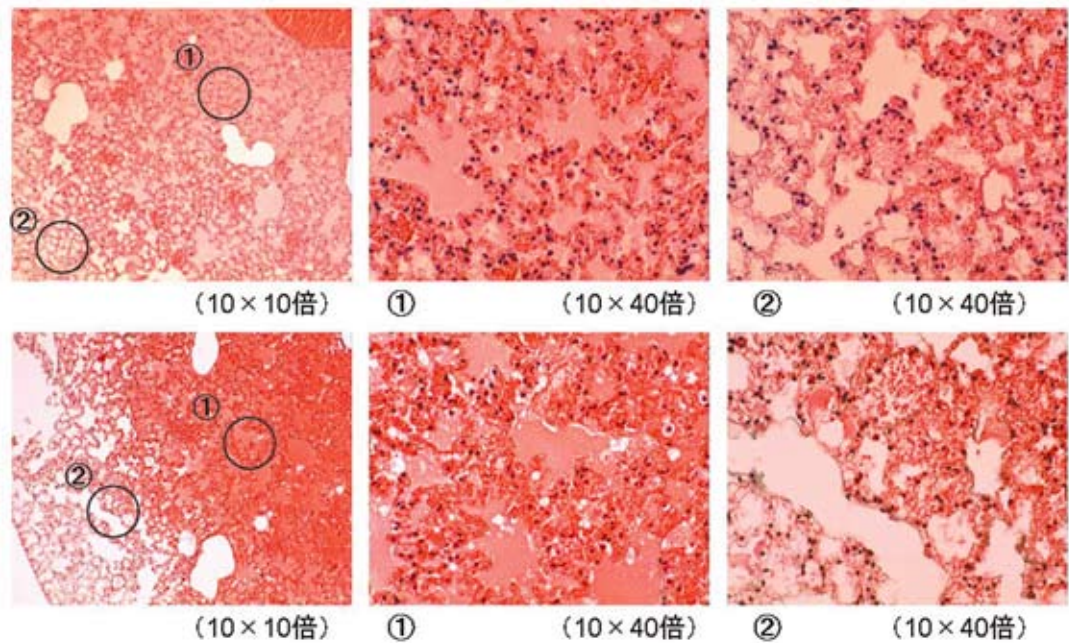


図8 サーファクタント+パラコート0.6mg投与6日後のマウス(Balb/c系)の肺組織(上段:H&E染色, 下段:Masson-Trichrome染色)

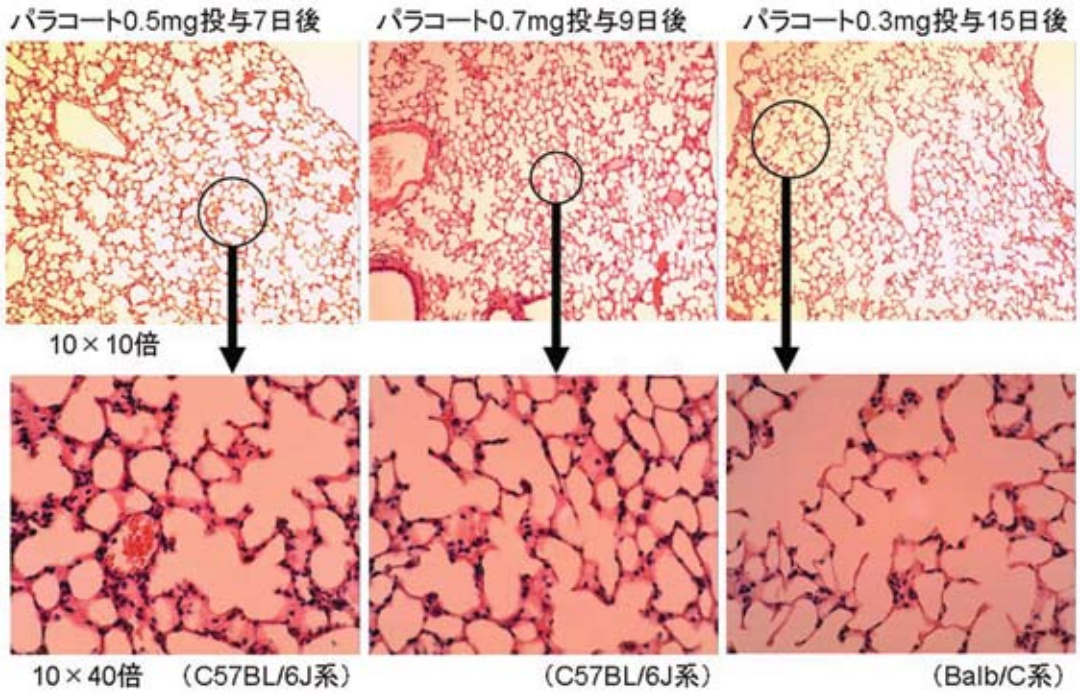


図9 サーファクタント+パラコート投与後のマウスの肺組織 (H&E 染色)

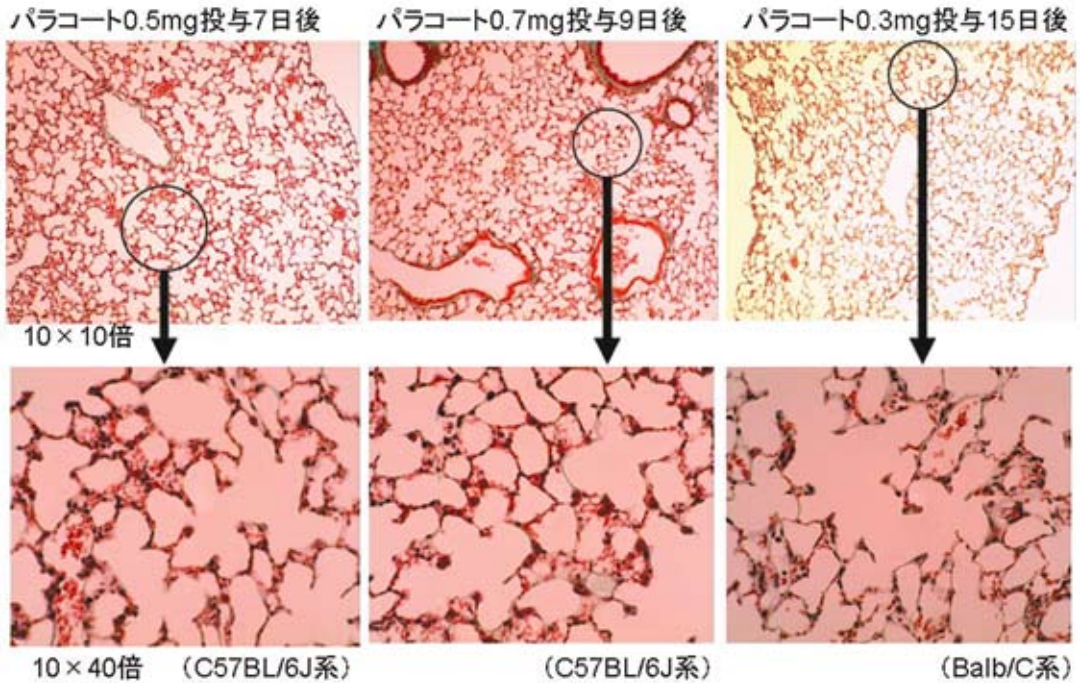


図10 サーファクタント+パラコート投与後のマウスの肺組織 (Masson-Trichrome 染色)

今回は人工肺サーファクタントを事前投与し, 3日後にパラコートを筋肉内投与する方法を用いた. 前回の報告³⁾では, パラコートを経鼻的に投与した2日後に気管切開して人工肺サーファクタントを気道内に投与したが, 動物に対する2回の気管内投与は侵襲が強すぎたのか, 人工肺サーファクタントの生命予後改善効果は証明できず, 肺病理組織学的検討において人工肺サーファクタント投与側に「パラコート肺」が抑制されるという知見が得られたのみであった.

人工肺サーファクタントの事前投与により, パラコート中毒の死亡率が改善された. 我々の作業仮説は, 「パラコート肺の発生機序として, サーファクタントを産生する肺胞上皮Ⅱ型細胞が傷害されることが関与している」であったことから, 事前投与した人工肺サーファクタントがパラコート投与3日後にも肺胞内に残存しており, その結果として肺胞上皮Ⅱ型細胞がパラコートにより傷害されても肺胞虚脱が起こらなかったと考えることができる. サーファクテン[®]の医薬品インタビューフォーム⁷⁾では, 本剤の主成分であるジパルミトイルホスファチジルコリンを¹⁴Cで標識して代謝を調べると, 肺では大部分が未変化のジパルミトイルホスファチジルコリンとして存在していること, コリン部位とパルミチン部位の一部は呼気CO₂となり他は全身に生体内基質として転移すると考えられている. 従って, 前投与であっても人工肺サーファクタントの効果が発揮されたのではないかと考えられた.

臨床的にはパラコート中毒に伴う肺障害の強さと生存期間は相関する. 肺障害の程度を肺酸化の指標である respiratory index (RI) で表わすと, 服毒後 RI が1.5を超えるまでの経過時間と服毒後生存時間の間には正の相関を認める⁸⁾. 従って, 肺障害が抑制されれば生存率も改善する可能性は大いにあるといえる. 今回の研究でも, 生存したマウスではパラコート投与後の健常肺容積は正常に保たれていたが, 逆に死亡したマウスでは経過中に健常肺容積が小さ

くなっていった.

本研究ではマウスのパラコート筋注モデルを使用した, 肺組織学的検討では初期には肺出血の所見を, 後期には肺線維症の所見を示しており, 臨床の「パラコート肺」のモデルとして, その肺病態の推移の観察や, 種々の薬剤などによるその抑制などの目的には, 適していると考えられた. ただし, 曝露経路が絶対的に異なる点からは, 今後は経口曝露によって, 今回の様な解析が可能なモデルの構築にも努力したい.

この研究では近交系マウスである C57BL/6J と Balb/C とを使用した, 両者では人工肺サーファクタントに対する感受性が異なるようで C57BL/6J は Balb/C に比べて人工肺サーファクタントの効果が不鮮明であるように思われた. この理由は明らかではないが, H2^b ハプロタイプである C57BL/6J は H2^d ハプロタイプの Balb/C よりもサイトカイン産生の面から免疫応答が劣るという報告⁹⁾があり, 人工肺サーファクタントには表面張力を低下させる作用以外にも免疫学的機序が関与する可能性は否定できない.

結 語

近交系マウスである C57BL/6J と Balb/C とを用いて人工肺サーファクタント前投与3日後にパラコートを筋注したところ, パラコート肺の出現が抑制されるとともに生存率が改善された. 今後は, 人工肺サーファクタント前投与によりパラコート肺が抑制される機序の解明と臨床的応用についての検討が必要である.

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) Smith P, Heath D, Kay JM : The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rat. *J Pathol* 114 : 57-67, 1974
- 2) 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
- 3) 井上貴博, 鈴木幸一郎: 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, 川崎医学会誌 36 : 295-300, 2010
- 4) Suzuki K, Takasu N, Okabe T, Ishimatsu S, Ueda A, Tanaka S, Fukuda A, Arita S, Kohama A: Effect of aggressive haemoperfusion on the clinical course of patients with paraquat poisoning. *Hum Exp Toxicol* 12: 323-327, 1993
- 5) 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
- 6) So KL, de Buijzzer E, Gommers D, Kaisers U, van Genderen PJ, Lachmann B: Surfactant therapy restores gas exchange in lung injury due to paraquat intoxication in rats. *Eur Respir J* 12:284-287, 1998
- 7) 医薬品インタビューフォーム: 新生児呼吸窮迫症候群治療剤サーファクテン® 気管中入用120mg, 2009年10月改訂 (第7版)
- 8) 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
- 9) Matthews VB, Christiansen FT, Price P: Lymphocytes from H2 mice produce lower levels of several cytokines than congenic H2 or H2 mice. *Immunol Cell Biol* 78: 247-253, 2000

The effect of intratracheal administration of a surfactant on mortality in a model of murine paraquat poisoning

Takahiro INOUE, Koichiro SUZUKI

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

ABSTRACT "Paraquat lung" which is complicated with paraquat poisoning has been a lethal pulmonary pathology presenting intra-alveolar fibrosis, but an effective therapy 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 out the blood by alveolar epithelial cells. To prove this hypothesis, we examined the effect of an intratracheal administration of an artificial lung surfactant (surfacten®, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Osaka) on mortality in a model of murine paraquat poisoning. Paraquat was given intramuscularly 3 days after the intratracheal surfactant administration. The mice used were C57BL/6J strain and Balb/C strain. The lethal dose, 50% (LD50), of paraquat was about 28 mg/kg in the C57BL/6J strain and about 9 mg/kg in the Balb/C strain, respectively. Mortalities of paraquat poisoning in both strains of mice improved significantly when the mice were pretreated with the intratracheal surfactant: all of the 36 Balb/C strain mice died less than

7 days after receiving the intramuscular paraquat (20 mg/kg im) , but 18 out of 26 were still healthy after 2 months when the surfactant was given before an administration of paraquat. In the group treated without surfactant, the healthy lungs volume that we calculated from a CT image decreased from day to day in the dying mice. A histopathological examination revealed alveolar hemorrhaging after 7 days. Intraalveolar fibrosis became remarkable after one month, and it was subsequently confirmed in a Masson trichrome stain. Honeycomb lung was also found. In the group treated with surfactant, intraalveolar fibrosis was not found even after two months. Therefore, we conclude that a pretreatment with artificial lung surfactant inhibits paraquat lung, and also improves the survival rate in paraquat poisoning. We should elucidate the mechanism in which paraquat lung is inhibited by artificial lung surfactant, and also examine the clinical application of the surfactant.

(Accepted on October 26, 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

