

### Ⅲ. 結果

#### ① H. E. 染色

9～12ヶ月齢の個体では肺の形態にほとんど変化はみられなかった。しかし、9～12ヶ月齢と比較すると24ヶ月齢以降の個体では肺胞と肺胞管に明らかな拡張がみられた。24ヶ月齢以降、肺胞と肺胞管の拡張は加齢に伴って進行しているようであった (Fig. 2)。肺胞壁を構成する細胞に明らかな変化は認められず、肺胞壁の破壊や肥厚、菲薄化は見られなかった。

#### ② 肺胞断面積の計測

9～12ヶ月齢では、肺胞断面積の平均値は2000 $\mu$ m前後でほとんど差がなかった。しかし24ヶ月齢を過ぎると肺胞断面積が大きくなるものがみられ始め、その後月齢の増加とともに断面積も増加していた。この変化に性差はほとんどなかった (Fig. 3)。

Spearmanの順位相関係数は、雄で0.923、雌は0.753となり、5%の危険率で有意であった。つまり月齢と肺胞の断面積には正の相関があると言えた。

#### ③ Resorsin-Fuchsin 染色

弾性線維は気管支と細気管支の固有層や動脈壁内に管を囲んで太く豊富に見られた。また、肺胞壁内では、肺胞上皮と毛細血管の隙間の結合組織で観察された (Fig. 4a)。さらに、

肺胞管壁や肺胞口では太い線維がみられた。これら弾性線維の太さや量に月齢による違いはみられなかった (Fig. 4b)。

#### ④免疫組織化学

##### 1. collagen

各月齢で collagen type I は弾性線維の分布部位と同様で肺胞壁の結合組織、気管周囲や血管周囲の結合組織に認められた。また、collagen type III の分布も collagen type I に類似していた。しかし、これらの結合組織要素の陽性部位には、加齢に伴う増減は認められなかった。collagen type IV は、主に肺胞上皮と毛細血管の間の基底膜に沿って毛細血管を囲むように染色されていたが、30 か月齢以上の個体においても基底膜の肥厚や菲薄化は認められなかった (Fig. 5)。

##### 2. $\alpha$ - smooth muscle actin

$\alpha$  -smooth muscle actin 抗体では、血管平滑筋細胞、気管支平滑筋細胞、肺胞結合組織内の筋線維芽細胞が陽性であった。気管支の  $\alpha$  -smooth muscle actin 陽性平滑筋細胞は 22 ヶ月齢以上のラットで菲薄になり、平滑筋細胞の配列が不整になっていた。30 ヶ月齢を過ぎた個体の平滑筋細胞の配列はさらに不整になっており平滑筋層の菲薄化も見られた。(Fig. 6)。細気管支の平滑筋細胞も気管支平滑筋細胞と同様に加齢に伴って菲薄化していた (Fig. 9)。

また、31 か月齢以上のラットでは、肺胞口のに存在する  $\alpha$

-smooth muscle actin 陽性細胞の量が増加していた (Fig. 10)。

### 3. $\gamma$ - smooth muscle actin

$\gamma$  - smooth muscle actin 抗体では、血管平滑筋細胞と気管支平滑筋細胞内の  $\gamma$  - smooth muscle actin が陽性であった。一方、肺胞口には  $\gamma$  - smooth muscle actin 陽性細胞は見られなかった。

気管支と細気管支平滑筋の  $\gamma$  - smooth muscle actin の染色性は、9~12 ヶ月齢ではほとんど変化していなかったがその後加齢に伴って顕著に低下していた (Figs. 7, 9)。

### 4. desmin

desmin 抗体では血管平滑筋細胞と気管支平滑筋細胞が陽性であった。 $\gamma$  - smooth muscle actin と同様に葉気管支から呼吸細気管支にかけての気管支平滑筋における染色性が低下していた (Figs. 8, 9)。肺胞口に desmin の増加は見られなかった。

### 5. vimentin

vimentin に対する抗体では、血管平滑筋細胞が陽性であった。気管支および細気管支の平滑筋には月齢に関係なく陽性細胞は認められなかった。

## IV. 考察

今回の研究結果より、加齢に伴う肺の形態学的変化として、肺胞と肺胞管の拡張および気管支と細気管支平滑筋細胞の構成要素の変化や平滑筋細胞の菲薄化が生じることが明らかになった。

今回明らかとなった肺胞や肺胞管の拡張は肺気腫や線維増多症のような疾患によっても引き起こされるが、肺気腫は肺胞壁の破壊を伴い、線維増多症はコラーゲンの増加を伴う疾患である (Snider et al., 1985; Snider et al., 1986)。本研究の結果では肺胞壁の破壊もコラーゲンの増加も認められなかったため、肺胞と肺胞管の拡張はこれら疾患によるものではないと考えられた。また、今回用いたラットはバリアシステム内で飼育管理された SPF 動物であり、肺に影響を与える環境因子がほとんどない状態で飼育されていた。これらのことから、肺胞と肺胞管の拡張は疾患あるいは環境の影響によるものではなく加齢による変化であることが推測された。

形態計測の結果では、9~12ヶ月齢と20~22ヶ月齢のラットの肺胞断面積を比較してもほとんど変化はなく、24ヶ月齢のラットの中にも肺胞の拡張がごくわずかである個体があったことから、肺胞の拡張は22~24ヶ月齢頃に起こり始めることが推測された。F344/Nラットの生存率は15ヶ月齢頃までは100%、雄22ヶ月齢、雌25ヶ月齢で75%、雄28ヶ月齢、雌31ヶ月齢では25%であることがわかっている (Tanaka et al.,

2000)。つまり、生存率が 75%となる月齢頃から肺胞の拡張という加齢変化が起こり始めると考えられた。また、31ヶ月齢の雄と36ヶ月齢の雌の肺胞口では $\alpha$ -smooth muscle actin陽性細胞の増加が認められた。線維芽細胞は張力の増加により $\alpha$ -smooth muscle actinを持つ筋線維芽細胞に変化することが知られている(Kapanci et al., 1990)。つまり、肺胞口での $\alpha$ -smooth muscle actin陽性細胞の増加は、肺胞の拡張により長期にわたって過度の張力がかかったために生じた変化であると考えられた。金丸ら(2000)が本研究の材料と同一のラットを用いて行った生理学的研究では肺コンプライアンスの増加や一回換気量の低下は21~24ヶ月齢で起こり始めており、肺胞の拡張し始める時期と一致していた。このことから、肺胞では加齢に伴って肺組織が破壊されることなく弾性収縮力を失っていき、肺コンプライアンスの増加と換気量の低下をもたらすと考えられた。加齢に伴って起こる肺胞および肺胞管の拡張は、ヒト(D'Errico et al., 1989)やイヌ(Hyde et al., 1977; Robinson et al., 1973)では古くから報告されていた。また近年、SAMマウス(Kurozumi et al., 1994)、F344ラット(Mizuuchi et al., 1994)およびWistarラット(Juan et al., 1997)などのげっ歯類でもこれらの変化が報告されるようになってきており、今回の結果も含めて多くの哺乳類に共通の加齢変化であると考えられた。

本研究ではまた、気管支と細気管支平滑筋細胞の菲薄化や配列の不整化、平滑筋細胞内の $\gamma$ -smooth muscle actinおよ

び desmin の染色性の低下も加齢に伴って進行しており、気管支平滑筋層の構築とともに平滑筋細胞自体にも加齢による変化が起こっていると考えられた。この変化は 22 ヶ月齢ですで見られる個体もあり、変化が始まる明らかな月齢は判断できなかった。 $\alpha$ -smooth muscle actin および  $\gamma$ -smooth muscle actin は気管支平滑筋細胞内の収縮蛋白および細胞骨格を構成しており (Kabsch et al., 1992; Wong et al., 1998; Halayko et al., 1996)、desmin および vimentin はアクチンを支持する中間径フィラメントを構成している (Park et al., 1986)。気管支平滑細胞内の vimentin は肺の成熟とともに desmin に置換するといわれ、また創傷治癒過程では逆に desmin から vimentin に置換するといわれるが (Adler et al., 1989)、本研究ではどの月齢においても気管支と細気管支の平滑筋細胞に vimentin はみられなかったため、全ての月齢において中間径フィラメントの主体は desmin であると思われた。本研究で認められた気管支と細気管支の平滑筋の変化は、気道内の気圧や気流を調節するとともに、気道壁を強化して支持するという気管支平滑筋層の機能 (Otis, 1983) の低下を示唆している。

通常の呼吸では、呼出が終末に近づくと圧力差の関係から小気道が閉塞し、肺内にはいくらかの空気が残留する。加齢動物では、呼出の早い時期に気道閉塞が生じることによって肺内に残留する空気の量が増加するといわれ、これが加齢に伴う肺残気量の増加の一因となると考えられている。また、

末梢気道に病変が存在し、壁の支持力に変化を起こしても同様の変化があるという（福地， 1988）。つまり、本研究でみられた気道の支持力低下を示唆する気管支と細気管支平滑筋の変化が、残気量の増加の一因となっている可能性が高い。

今回の研究では、F344/Nラットにおいて加齢に伴う肺胞と肺胞管の拡張および気管支と細気管支平滑筋の構造変化や染色性の低下が観察されたが、それぞれ肺の弾性収縮力の低下と平滑筋の機能低下が生じていることが示唆された。つまり、これらの変化が加齢にともなう呼吸機能低下の形態学的基盤となっていると考えられた。

## V. 要約

一般的に加齢動物では一回換気量の低下や残気量の増加および肺コンプライアンスの増加といった呼吸機能の低下が起こるといわれている。しかし、呼吸機能の低下をもたらす肺の形態学的な変化については未だ明確にされていない。そこで本研究では、加齢に伴って起こる肺の形態学的変化を検索することを目的として、加齢に伴い肺機能の低下が起こることが予め証明されていた F344/N ラットを用いて肺の形態学的研究を行った。

方法は肺切片に H.E. 染色、Resorsin-Fuchsin 染色、免疫組織化学 (collagen type I, III, IV,  $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\gamma$ -smooth muscle actin, desmin, vimentin) を行い、肺の一般形態、肺結合組織内の弾性線維と膠原線維、気管支と細気管支平滑筋細胞を光学顕微鏡で観察した。また、H.E. 染色像から肺胞の断面積を測定して月齢ごとに比較した。

染色の結果、H.E. 染色では加齢に伴って肺胞および肺胞管が拡張していることが明らかであった。さらに肺胞断面積の測定の結果、月齢と断面積に正の相関があった。また、加齢に伴って気管支と細気管支の平滑筋細胞が菲薄化し、配列が不整になっていること、 $\gamma$ -smooth muscle actin および desmin の染色性が低下していることが明らかになった。しかし、結合組織を構成する弾性線維および膠原線維に量的な変化は認められず、肺胞壁を構成する細胞や毛細血管にも著明



な変化はみられなかった。

本研究では、F344/N ラットにおいて加齢に伴う肺胞と肺胞管の拡張および気管支と細気管支平滑筋の構造変化や染色性の低下が観察されたが、それぞれ肺の弾性収縮力の低下と平滑筋の機能低下が生じていることが示唆され、これらの変化が呼吸機能低下の形態学的基盤となっていると考えられた。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を通して御指導御鞭撻を頂き御校閲を賜りました鈴木義孝先生、阿閉泰郎先生、山本欣郎先生に心から感謝致します。また、F344/N ラットの提供および多くの助言をくださいました長寿医療研究センターの田中慎先生ならびに宮石理先生に心より感謝致します。さらに資料の提供および採材にご協力いただくとともに貴重なご意見を賜った東京大学農学生命科学研究科の局博一先生ならびに金丸新氏、鍋田信吾氏に謝意を表します。

## VI. 参考文献

- Adler. K, Low. R, Leslie. K, Mitchell. J, Evans. J. Biology of disease. Contractile cells in normal and fibrotic lung. *Lab. Invest.* 60(4): 473-485. 1989.
- D'Errico. A, Scaran. P. Change in the alveolar connective tissue of the ageing lung. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.* 415: 137-144. 1989.
- Edward. D, Carolyn. H. Geriatric respiratory medicine. *Chest.* 114: 1704-1733. 1998.
- Gabella. G. Ultrastructure of the tracheal muscle in developing, adult and ageing guineapigs. *Anat. Embryol.* 81: 290-305. 1991.
- Halayko. A, Salari.H, Stephens. N. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *Am. J. Physiol.* 270: L1040-L1051. 1996.
- 福地義之助. 'クロージングポリウム' 山田正篤ほか編 "老化指標データブック". 朝倉書店. 東京. 239-240. 1988.
- Hyde. D, Robinson. N, Gillespie. J, Tyler.W. Morphometry of the distal air space in lungs of aging dogs. *J. Appl. Physiol.* 43: 86-91.1977.
- Juan. D, Tejero. C. Architecture, elastic fiber, and collagen in the distal air portion of the lung of the 18-month-old rat. *Anat. Rec.* 248: 63-69. 1997

Kabsch. W, Vandekerckhove. J. Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 49-76.

1992

金丸新、田中慎、山本欣郎、石井圭司、桑原正貴、局博一.

F344/Nラットにおける肺機能の加齢性変化. 第130回日本獣医学会学術集会講演要旨集. 149. 2000.

Kapanci. Y, Burgan. S, Pietra .G, Conne. B, Gabbiani. G. Modulation of actin isoform expression in alveolar myofibroblasts (contractile interstitial cells)during pulmonary hypertension. *Am. J. Pathol.* Apr;136(4):881-9. 1990.

Kurozumi. M, Matsushita. T, Hosokawa. M, Takeda. M. Age-related change in lung structure and function in the senescence-accelerated mouse(SAM):SAM-P/1 as a new model of senile hyperinflation of lung. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 149: 776-782. 1994.

Mizuuchi. T, Kida. K, Fujino. Y. Morphological studies of growth and aging in the lungs of fischer 344 male rats. *Exp. Gerontol.* 29:553-567. 1994.

Otis. A. A perspective of respiratory mechanics. *J. Appl. Physiol.* 54: 1183-1187. 1983.

Pack. A, Millman. R. The lungs in later life. In: Fishman AP, ed. *Pulmonary diseases and disorders*. New York: McGraw-Hill. PP. 79-90. 1988.

- Park. S, Rasmussen. H, Carbachol- induced protein Phosphorylation change in bovine tracheal smooth muscle. J. Biol. Chem. 261: 15734-15739. 1986.
- Pinkerton. K, Brenda. B, O'Neil. J. Morphologic changes in the lung during the lifespan of Fischer 344 rats. Am. J. Anat. 164: 155-174. 1982.
- Robinson. N, Gillespi. J. Lung volume in aging beagle dogs. J. Appl. Physiol. 35: 317-321. 1973.
- Robinson. N, Gillespie . J. Morphologic features of the lungs of aging beagle dogs. Am. Rev. Respirat. Diseases. 108: 1192-1199. 1973.
- Sahebjami. H, Vassallo. C. Static volume-pressure relationship in normal rats at various stages of growth. Respir. Physiol. 36: 131-42. 1979.
- Snider. G, Kleinerman. J, Thurlbeck. W, Bengali. Z. The definition of emphysema: Report of a National Heart, Lung and Blood Institute, Division of Lung Diseases, Workshop. Am. Rev. Respir. 132: 182-185. 1985.
- Snider. G, Lucey. E, Faris. E, Stone. P, Franzblau. C. Cadmiumchloride-induce air-space enlargement with interstitial pulmonary fibrosis is not associated with destruction of lung elastin. Implications for the pathogenesis of human emphysema. Am. Rev. Respir. 137: 918-923. 1986.

- Tanaka. S, Segawa. T, Tamaya. N, Ohno. T. Establishment of an aging farm of F344/N rats and C57BL/6 mice at the National Institute for Longevity Sciences (NILS). Arch Gerontol Geriat. 30: 215-223. 2000.
- Turner. J, Mead. J, Wohl. M. Elasticity of human lungs in relation to age. J. Appl. Physiol. 25: 664-671. 1968.
- Wong. J, Woodcock. J. Smooth muscle actin and myosin expression in cultured airway smooth muscle cells. Am. J. Physiol. 274: L786-L792. 1998.

## VII. 図表および説明

Table. 1. 使用したラットの体重および例数

Age (Month)	Male (mean +/- SD g)	Female (mean +/- SD g)
9	373. 3±23. 0 (n=3)	214. 2±9. 0 (n=6)
11	415. 7±4. 0 (n=3)	—
12	416. 0±41. 4 (n=8)	243. 0±12. 9 (n=7)
20	? (n=1)	—
21	386. 7±11. 5 (n=3)	—
22	—	287. 6±47. 2 (n=2)
24	395. 8±31. 7 (n=8)	282. 6±38. 7 (n=7)
27	—	305. 3±25. 4 (n=3)
28	? (n=1)	—
29	409. 5 (n=1)	256. 0±12. 7 (n=2)
30	—	266. 5±9. 2 (n=2)
31	420. 1 (n=1)	—
35	346. 7±25. 7 (n=3)	259. 1±21. 3 (n=6)
36	—	243. 7 (n=1)

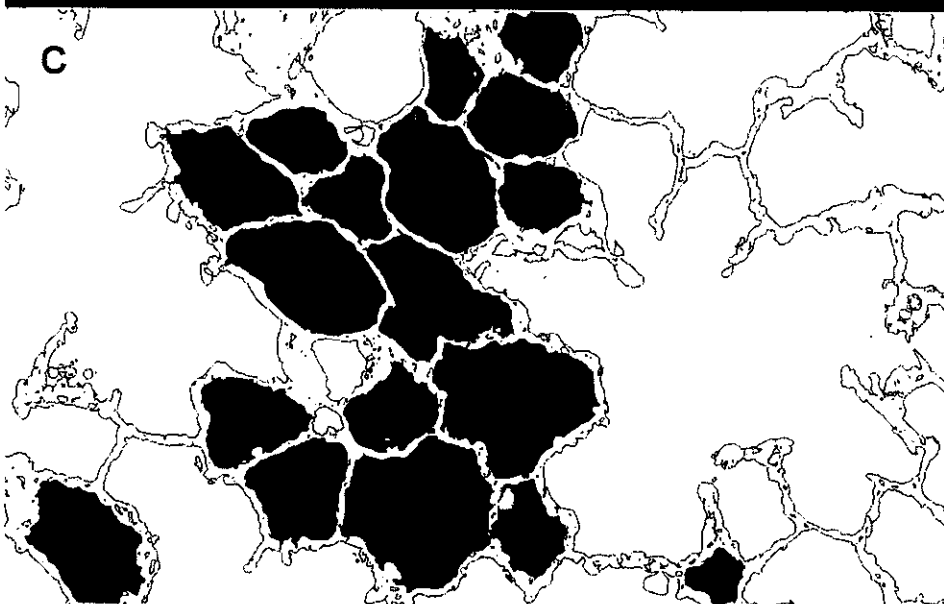
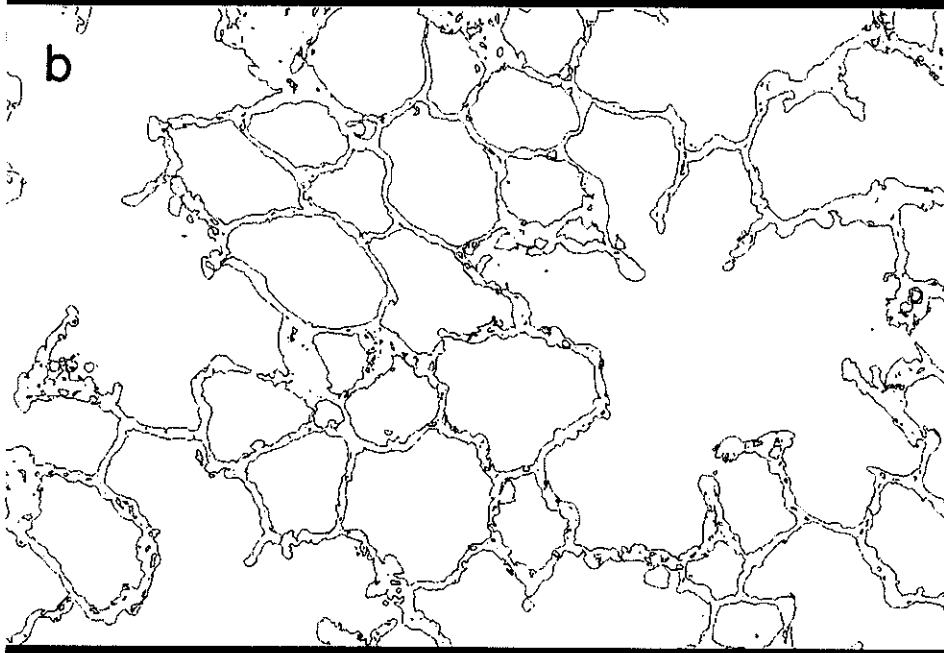
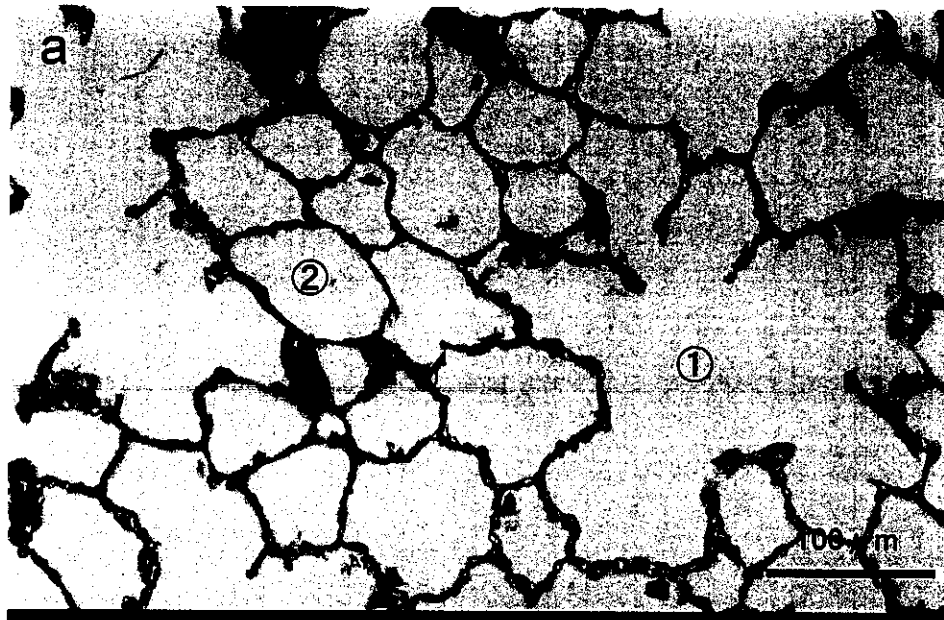


Table 2. 使用した特異抗体

Antibody against	Code no.	Host	Dilution	Source
$\alpha$ -smooth muscle actin	IA4	mouse	1:1,000	DAKO, Glostrup, Denmark
$\gamma$ -smooth muscle actin	B4	mouse	1:1,000	ICN Biomedicals, inc. Costa Mesa, CA, USA
desmin	03301	rabbit	1:500	MEDAC, Hamburg, Germany
vimentin	V9	mouse	1:1,000	DAKO, Glostrup, Denmark
collagen type I	031500101	rabbit	1:100	Quartett, Berlin, Germany
collagen typeIII	031500301	rabbit	1:100	Quartett, Berlin, Germany
collagen typeIV	031500401	rabbit	1:10	Quartett, Berlin, Germany

**Fig. 1. 肺胞断面積の計測方法**

- a. Photoshop への取り込んだ、H.E. 染色した肺切片の画像。
- b. 肺胞管①および肺胞②の輪郭をトレースした像。
- c. NIHimage により肺胞の断面積を計測した部分（赤色で示した部分）。



**Fig. 2 . 加齢に伴う肺胞と肺胞管の拡張（H.E.染色）**

12ヶ月齢、24ヶ月齢、31ヶ月齢と月齢が増すに連れて肺胞管（D）および肺胞が拡張していることが明らかである。肺胞壁に破壊はみられない。

T: 終末細気管支 V: 血管