

分担研究報告書

ダイオキシン類によるマウス肺傷害モデルにおける surfactant protein についての検討

研究分担者 中西 洋一 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 教授
研究協力者 濱田 直樹 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 助教
坪内 和哉 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野

研究要旨 マウスに Benzo[a]pyrene を経気管的に投与することにより、気道分泌物が増加するマウスモデルを作成した。麻酔と投与法を改良し、以前より再現性が向上しており、ダイオキシン類による肺傷害の動物実験モデルとして有用と考えられた。同モデルにおいて surfactant protein の発現が亢進しており病態への関与が示唆された。

A . 研究目的

油症患者には、慢性的な咳、痰等の呼吸器症状が未だ認められるが、そのメカニズムはよくわかっていない。油症の主な原因物質と考えられている PCDFs をげっ歯類に投与すると、電子顕微鏡にて細気管支領域の Club(Clara)細胞に壊死が認められることから、Club 細胞の傷害が原因のひとつと考えられているが詳細は不明である。当科ではそのメカニズムを解明するために、まずは動物実験モデルの作成を目指して研究を進めてきた。これまでの検討で、マウスの肺に直接ダイオキシン類を投与することにより、気道分泌物の増加を示すモデルを作成することができたが、個体間によるばらつきが大きく、再現性が高い動物実験モデルができたとはいえなかった。よって、病態解析に使用可能なレベルの動物実験モデルを確立させることを目的とした。

肺サーファクタントは、肺胞表面を覆って肺胞の虚脱を防ぎ、呼吸を円滑に進行させている物質で、リン脂質と4種類の特異蛋白 Surfactant Protein(SP)-A、SP-B、SP-C、SP-D からなる。SP-B と SP-C は疎水性であるが、SP-A と SP-D は親水性であり、サーファクタントとしての役割の他に、気道-肺胞系における生体防御作用などの

機能も併せ持つ¹⁾²⁾。また実際の臨床においても、血中の SP-A、SP-D 値は間質性肺炎・肺線維症や肺胞蛋白症の病勢を反映するマーカーとして活用されており、近年は慢性閉塞性肺疾患や気管支喘息における役割についても研究が進んでいる³⁾⁴⁾。昨年、我々は油症患者血中の SP-A、SP-D の濃度を測定し、油症患者の呼吸器症状、ダイオキシン類の濃度との関連を統計学的に解析した結果、SP-D 濃度と咳嗽、喀痰といった症状、また SP-A 濃度と一部のダイオキシン類の濃度に有意な関連が認められたことを報告した⁵⁾。今回、この動物モデルにおける surfactant protein の発現について検討した。

B . 研究方法

マウスに塩酸ケタミン、塩酸キシラジンにて全身麻酔をかけ、経気管的に Benzo[a]pyrene (BaP)を投与し、投与5日後に肺組織を回収し解析した。

具体的には、C57BL/6 マウス、雌、8-10 週齢に、塩酸ケタミン 80mg/kg + 塩酸キシラジン 10mg/kg を腹腔内投与して、自発呼吸が持続する程度に全身麻酔をかけた。その後、マウスを仰臥位に固定して、頸部を小切開し、気管を露出させた。Tricaprylin で溶解した BaP を、1 匹あたり 500 µg(50 µl)を、24G

針にて経気管的に投与した。コントロール（対照）群にはTricaprylinを50 μ l投与した。投与5日後に肺組織を取り出して、HE染色、Alcian blue-PAS (AB-PAS)染色にて組織学的に評価した。またサーファクタントプロテイン（SP-A, SP-C, SP-D）について免疫組織学的に検討した。

（倫理面への配慮）

九州大学動物実験実施規則に従って実験を行った。

C . 研究結果

組織学的には、BaP 投与群ではコントロール群と比較して、HE 染色にて細気管支上皮細胞の増殖や細気管支の肥厚、周囲組織への炎症細胞の浸潤を認め、AB-PAS 染色では、やや太い気管支から細気管支の気道上皮細胞にPAS陽性細胞を認めた(図1)。

免疫組織学的には、BaP 投与群ではコントロール群と比較して、SP-Dは細気管支上皮細胞やⅡ型肺胞上皮細胞に高発現を認めた(図2)。SP-Aは主に増殖した細気管支上皮細胞で発現の亢進が認められた(図3)。SP-Cはコントロール群、BaP投与群とも細気管支上皮細胞での発現は認められなかったが、Ⅱ型肺胞上皮細胞での発現が認められ、BaP投与群では、Ⅱ型肺胞上皮細胞における発現の亢進が認められた(図4)。

D . 考察

油症患者の主な呼吸器症状は慢性気管支炎様の咳や痰であり、気道分泌物の増加に由来すると考えられている。今回の研究にてマウスにBaPを経気管的に投与することにより、AB-PAS染色陽性の気道上皮細胞の増加を認めたが、これらはムチン類の増加、すなわち気道分泌物の増加を表していると考えられ、このモデルは動物実験モデルとして有用と考えられる。ただこれまでの我々の検討では、動物疾患モデルとして確立するためには、個体間でのばらつ

きが大きいのが問題であった。この理由として、Tricaprylinで溶解したBaPは粘度が高く、マウスの気道に投与する際、または投与した後に容易に窒息すること、多数のマウスに同じ量を投与するのは、手技的に難度が高いことなどが挙げられていた。そこで今回、i) 麻酔薬を呼吸抑制が少ない薬剤に変更、ii) 投与量や麻酔時間を段階的に調整、iii) 投与経路を目視で確認しやすい気管切開後の経気管投与とする、等の改善を加え、徐々に病変の再現性が向上してきているところである。今後も更に再現性を高めるための取り組みと検討を行っていく必要があると考えている。

また、昨年、我々は油症患者血中のSP-A、SP-Dの濃度を測定し、油症患者の呼吸器症状、ダイオキシン類の濃度との関連を統計学的に解析した結果、SP-D濃度と咳嗽、喀痰といった症状、またSP-A濃度と一部のダイオキシン類の濃度に有意な関連が認められたことを報告した⁵⁾。そこで今回改めてこの動物実験モデルを用いて、免疫組織学的にsurfactant proteinの発現を検討したが、SP-D、SP-A、SP-Cともコントロール群と比べてBaP投与群で発現の亢進が認められた。近年、surfactant proteinと呼吸器疾患との関連が注目されており、喫煙者や慢性閉塞性肺疾患患者では、血中や喀痰中のSP-Aが有意に上昇していたという報告や⁶⁾、近年の慢性閉塞性肺疾患大規模コホート研究にて血中SP-D値の高い群は肺機能の低下が大きかったという報告がある⁸⁾。煙草は燃焼によりダイオキシン類が発生するが、喫煙は本邦における慢性閉塞性肺疾患の原因のほとんどを占めていることから、ダイオキシン類による肺傷害と油症患者における肺傷害、および喫煙による肺傷害には、同じようなプロセスが働いている可能性も考えられた。今後の非常に興味深い検討課題と考えている。

E . 結論

マウスに BaP を経気管的に投与することによって気道分泌物が増加するマウスモデルを作成した。同モデルでは肺組織における surfactant protein の発現が亢進しており、病態への関与が考えられた。

F . 研究発表

なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

H . 参考文献

- 1) Mason RJ, *et al.* Surfactant protein A and Sufactant protein D in health and disease. *Am J Physiol* 1998; 275:L1-L13.
- 2) Kishore U, *et al.* Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 2006; 43: 1293-1315.
- 3) Vestbo J, *et al.* Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points (ECLIPSE). *Eur Respir J* 2008; 31: 869-873.
- 4) Lomas DA, *et al.* Serum surfactant protein is steroid sensitive and associated with exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2009; 34: 95-102.
- 5) 中西洋一, 他. 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究 平成 25 年度総括・分担報告書: 81-86.
- 6) Nomori A, *et al.* Serum surfactant protein A levels in healthy individuals are increased in smokers. *Lung* 1998; 176: 355-361.
- 7) Mazur W, *et al.* Elevation of surfactant protein A in plasma and sputum in cigarette smokers. *Eur Respir J* 2011; 38: 277-284.
- 8) Coxson HO, *et al.* The presence and progression of emphysema in COPD as determined by CT scanning and biomarker expression: a prospective analysis from the ECLIPSE study. *Lancet Respir Med.* 2013; 1(2):129-36.
- 9) Wong PS, *et al.* Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(2):210-7.