

## 分担研究報告書

### ダイオキシン類によるマウス肺障害における surfactant protein の発現に関する検討

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 瀧田 直樹 九州大学大学院医学研究院呼吸器内科学分野 助教

**研究要旨** ダイオキシン類によって肺障害が引き起こされるメカニズムの解明を目的に、動物実験モデルの作成を目指している。ダイオキシン類をマウスに経気管的に投与すると気道分泌物増加を認めるモデルができつつあり、その肺組織では surfactant protein の発現亢進を認めている。

#### A . 研究目的

油症発症から既に 47 年が経過したが、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。当科ではそのメカニズムを解明するために、動物実験モデルの作成を目指して研究を進めてきた。まずダイオキシン類をマウスに全身投与して肺組織の検討を行ったが、明らかな肺損傷を引き起こすことはできなかった。そこでマウスの肺に直接ダイオキシン類を投与して検討し、気道分泌物の増加を示すモデルができつつあるが、肺損傷の程度、再現性に課題があり、信頼度の高い動物実験モデルの確立を目的とした。

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。なかでも SP-A と SP-D は気道-肺胞系における生体防御作用などの機能も持ち<sup>1)2)</sup>、注目されている。実際の臨床においても、血中の SP-A、SP-D 値は間質性肺炎・肺線維症の活動性のマーカーとして用いられている<sup>3)4)</sup>。以前我々は、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や、血中ダイオキシン類の濃度との関連を統計学的に解析し、SP-D 濃度と咳嗽、喀痰といった症状との間、また SP-A 濃度と一部のダイオキシン類濃度との間に、有意な関連が

認められたことを報告した<sup>5)</sup>。surfactant protein がダイオキシン類による肺傷害において果たす役割に注目し解析した。

#### 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 4 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 80 mg/kg + 塩酸キシラジン 10 mg/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。トリカプリリンで溶解した BaP、1 匹あたり 500  $\mu$ g (50  $\mu$ l) を、24G 針にて経気管的に投与した。コントロール (対照) 群にはトリカプリリンを 50  $\mu$ l 投与した。投与 4 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 SP-A、SP-C、SP-D について免疫組織学的に検討した。また取り出した肺をホモジネートしてウェスタンブロット法により SP-A、SP-C、SP-D について解析した。

(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

BaP 投与群ではコントロール群と比較して、細気管支への炎症細胞の浸潤と細気管支壁の肥厚が認められ、やや太い気管支から細気管支の気道上皮には AB-PAS 陽性細胞の増加を認めた。また、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、SP-A は細気管支上皮細胞で発現の亢進が認められた。SP-Ⅰは 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。肺組織のウェスタンブロット解析では SP-A、SP-D、SP-C の発現に一定の所見を得ることができなかつた。

## 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嗽や喀痰であり、気道分泌物の増加に由来すると考えられている。マウスに BaP を経気管的に投与することで、AB-PAS 染色陽性の気道上皮細胞の増加を認め、ムチン類の増加、すなわち気道分泌物の増加を表すモデルを作成したが、個体間でのばらつきが大きいのが課題であった。この理由として、トリカプリリンで溶解した 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ため、手技的に難度が高いことが原因と考えられる。そのため、まず複数の溶媒に変更して検討したが上手くいかなかった。また投与時期、投与量、投与期間などの条件を変更して様々な検討を行い、現時点では、麻酔薬を呼吸抑制が少ない薬剤に変更し、投与経路を目視で確認しやすい経気管投与法にすることが有効であったと考えている。今後も更に再現性を高めるための検討を行っていく必要がある。

また、油症患者の血中 SP-A、SP-D 濃度と、油症患者の呼吸器症状や、ダイオキシン類の濃度との統計学的な有意な関連があることから<sup>5)</sup>、ダイオキシン類による肺

損傷において surfactant protein が果たす役割に着目して、マウスモデルにおいて解析を行い、上記の如く BaP 投与群において肺組織中の surfactant protein 発現の亢進が認められた。しかしウェスタンブロット法による解析では現時点では有意な結果が出ておらず、今後も解析を進めていく予定である。また気管支肺胞洗浄液中の surfactant protein 値についても解析、検討したいと考えている。

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<sup>6)</sup>、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<sup>8)</sup>。喫煙による肺障害の一部はタバコ燃焼によるダイオキシン類が関与している可能性があり、油症患者における肺障害との同一性が認められる可能性も考慮しつつ、今後も検討を進めていきたいと考えている。

## 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、そのマウス肺組織においては 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

1) 濱田直樹, 徳永章二, 横山哲也, 鈴木邦裕, 緒方彩子, 坪内和哉, 有村雅子, 中西洋一. 油症患者における肺サーファクタントプロテインに関する検討 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 平成 27 年 4 月 17-19 日

## 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.