

分担研究報告書

ダイオキシン類によるマウス肺障害の経時的变化に関する検討

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	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
	柳原 豊史	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 マウスに Benzo[a]pyrene を経気道的に投与することにより、マウス肺障害モデルを作成し、経時的变化を検討した。BaP 投与後 4-7 日後が解析に相当と考えられた。

A . 研究目的

油症の主な原因物質と考えられる PCDFs をげっ歯類に経気道的に投与すると、電子顕微鏡にて club 細胞(以前は clara 細胞と呼ばれていた)の壊死が認められると報告されており¹⁾、油症患者における肺病変の主座は club 細胞を中心とした細気管支領域と考えられている。ダイオキシン類は Aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介し CYP1A1 の経路を通じて細胞障害を引き起こすと考えられているが²⁾⁻⁴⁾、club 細胞は肺において AhR を発現している数少ない細胞のひとつであることもこの考えを支持する。これまで当科では、ダイオキシン類による肺障害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。マウスの肺に経気管的にダイオキシン類の一種である Benzo[a]pyren (BaP) を投与することにより検討し、気道分泌物の増加等を示すモデルを作成してきたが、個体差によるばらつきが大きく、また肺障害が起こる時期、持続する時間についての十分な検討はされていなかった。そこで今回我々はダイオキシン類投与後、マウス肺障害の経時的な変化を評価することを目的とした。

B . 研究方法

BaP をマウスに経気道的に投与し、経時的な組織学的評価を行った。

具体的には、C57BL/6 マウス雄、10 週齢に、corn oil + saline + Tween20 で溶解した BaP を 1 匹あたり 400 μ g (50 μ l)、3 日間連続で経鼻的に投与した¹⁾²⁾。対照群には溶媒のみを 50 μ l 投与した。投与 1 日後、4 日後、7 日後、10 日後に肺を取り出し、HE 染色にて病変を評価した。次に 7 日後に投与した肺を用いて Alcian blue-PAS (AB-PAS) 染色、Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)、Surfactant Protein (SP)-A、SP-D による免疫染色を施行した。また 7 日後には気管支肺泡洗浄 (BAL) を施行して細胞分画、蛋白濃度の解析を行った。
(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

3 日間連続で BaP 経鼻投与後、投与 1 日後、4 日後、7 日後、10 日後に肺を取り出して HE 染色にて検討した結果、どの時点においても細気管支上皮への炎症細胞の浸潤が認められた (Figure 1)。7 日後の炎症がやや強い印象があり、7 日後の肺について更に検討を加えた。AB-PAS 染色では BaP 投与群において PAS 陽性細胞が多く認められた (Figure 2)。CYP1A1 による免疫組織染色では細気管支上皮に多数の陽性細胞が認められたが BaP 投与群とコントロール群とに差を認めなかった。SP-A、

SP-D による免疫組織染色では BaP 群とコントロール群に有意な差を認めなかった。また BAL ではリンパ球分画の上昇傾向と蛋白濃度の上昇傾向を認めたが有意差は認めなかった(Figure 3)。

D . 考察

マウスに BaP を経気道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、つまり気道分泌物の増加を表していると考えられる⁴⁾。油症患者に喀痰の増加が認められる点からも、このモデルは動物実験モデルとして有用と思われる。

今回、投与するダイオキシン類の溶媒を Tricaprylin から corn oil + saline + Tween 溶液に変更した。ダイオキシン類は水に不溶性であり、粘度の高い溶媒に溶解させて経気道的に投与する必要があるため、窒息の危険性が高く肺障害モデル作成の再現性に難がある。近年マウス麻酔法を変更し、ケタラール + キシラジンに変更することで、以前より成績は改善してきているが、病変は末梢気道が主体であり肺胞領域への十分な病変ができたとはいえなかった。今回 corn oil に BaP を溶解した後、それを等倍の生理食塩水で薄め懸濁することで、窒息の危険性を低下させることと、末梢気道より先の肺胞領域へ病変を作成することを目的としたが、前者は上手くいったが、後者については十分な病変ができたとはいえなかった。さらに検討を加えたいと考えている。

次に BaP 投与後の経時的変化を検討したが、従来は3日間経鼻投与後、もしくは1回経気管的に BaP を投与後、24時間後のマウス肺を検討していた。しかし24時間後に肺胞洗浄を行うと、肺胞洗浄液中に油成分が浮かぶことがあり、油成分による影響を大きく受けている可能性が考えられていた。今回の研究の結果、BaP 投与群ではコントロール群と比較して、投与4-10

日後にも、病変が認められたことより、BaP を投与後4-10日後に評価することが妥当であると考えられた。

BAL 液の解析では、これまで好中球分画の上昇傾向が認められていたが、今回はリンパ球分画が上昇傾向を認めていた。これまでは BaP 投与後の比較的早期(1-4日後)に解析していたことが多かったが、BaP 投与後7日といった比較的後期では好中球性の炎症からリンパ球性の炎症に変化していく傾向があるのかもしれない。追試により確認しその意義について検討したいと考えている。

また、これまで我々は SP-A, SP-D についても評価してきたが、今回の免疫組織学的検討では明らかな所見を認めなかった。この原因としては、surfactant protein を更に詳細に評価すべく、免疫組織学染色法に免疫賦活化を期待してオートクレーブ処理を加えた影響が大きいと考えている。今後再検討を予定している。

E . 結論

マウスに BaP を経気道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の作成を試みており、徐々に改善が進んでいる。BaP 投与4-10日後の解析が適当と考えられた。

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) 中西洋一、他、(1985)。油症における呼吸器系ならびに免疫系の障害 経過ならびに発症機序について。福岡医誌。1985;76:196-203
- 2) Podechard N, et al. Interleukin-8 induction by the environmental

contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol Lett.* 2008;177(2):130-7

3) N' Diaye M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *J Biol Chem.* 2006;281(29):19906-15.

4) 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.