

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08899

研究課題名(和文) 誤嚥による肺の異物反応が嚥下性肺疾患や炎症性肺疾患に及ぼす病態上の意義

研究課題名(英文) Significance of foreign body reaction in the pathogenesis of aspiration pneumonia and other inflammatory respiratory diseases

研究代表者

山口 泰弘 (Yamaguchi, Yasuhiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60376473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肺内の食塊に対する異物反応は、嚥下性肺炎の病理学的診断の根拠であるが、病態生理上の意義は明らかでない。我々は、0.1mg/g BWあるいは0.01mg/gBWのセルロースを経気管的にマウス肺内に投与することで新しい誤嚥マウスモデルを作製した。気管支肺胞洗浄液では24時間後に顆粒球の上昇がみられ、7日後には消退した。組織学的にも、7日後には浸潤細胞はマクロファージが中心となっていた。サイトカイン動態を検討したところ、特にMIP1alphaやIL-6の発現が急性期に顕著に上昇していた。本モデルに黄色ブドウ球菌性肺炎を惹起させたところ、高濃度のセルロース投与群では細菌感染の有意な増悪がみられた。

研究成果の概要(英文)：Although pathological diagnosis of aspiration pneumonia depends on the presence of foreign body reactions to food in lungs, the pathogenic significances of these foreign body reactions have not been evaluated. We produced a novel mouse model of aspiration pneumonia by instilling intratracheally 0.1mg/g BW or 0.01mg/g BW cellulose. The bronchoalveolar lavage fluids revealed the accumulation of polymorphonuclear leukocytes in 24 hours, but its inflammation almost disappeared in 7 days. Histologically, macrophages were the dominant cell population in infiltrates around the foreign bodies in 7 days. The expressions of MIP1alpha and IL-6 increased remarkably in the acute phase of this foreign body reaction model. Staphylococcus aureus pneumonia worsened significantly by the complication with massive foreign body reactions.

研究分野：肺炎

キーワード：異物反応

1. 研究開始当初の背景

肺炎は、本邦の死因の第3位であり、その多くが高齢者の嚥下性肺炎である。さらに、肺炎を契機にADLの低下する症例も多く、超高齢社会における健康寿命の延長のためにも、ADL低下の原因となるような肺炎をいかに防ぐかが、今後の最重要の課題の一つである。

嚥下性肺炎では、抗生剤投与にいったん反応しても、その後、軽度の炎症所見の持続するケースがしばしばみられる。そのような症例を中心に、肺炎治療後も大量の気道分泌物が続き、喀痰の喀出が困難なために在宅生活の継続が困難になったり、嚥下障害が進行して経口摂取が再開できかたりする症例も多い。一方で、同じような背景疾患であっても、ほとんどADL低下をきたすことなく、一定期間の抗生剤投与のみで治癒する肺炎の症例も多くある。

嚥下機能障害の患者の炎症の持続は、免疫機能の低下や、不顕性誤嚥の繰り返しによると説明されることが多い。しかし、なにゆえ、ひとつの肺炎を契機に、炎症や気道症状が持続するようになる症例とそうでない症例があるのか、必ずしも十分に明らかでない。嚥下性肺炎の治療経過には、さまざまな未知の因子が関与していると予想される。

嚥下性肺炎の臨床的診断の多くは、嚥下障害を背景にもつ患者に発症した肺炎をもって判断される。一方、その病理学的診断は、肺内の食塊に対する異物反応をもって診断され、衰弱した高齢者の剖検肺に、しばしばみられる所見である(Mukhopadhyay S et al. *Am J Surg Pathol.* 2007. 31:752-759)。しかし、このような異物反応が肺の病態や全身性炎症、衰弱にどのような影響を及ぼしているのかは、これまで全く検討されていない。本研究では、食塊や消化液の誤嚥による肺内での異物反応の病態上の意義に注目した。我々は、嚥下性肺炎の一部で、全身の炎症や気道症状が遷延する新たな原因のひとつに、持続する異物反応が関与していると考えている。

ヒトの誤嚥では、異物の侵入と同時に細菌感染を合併するうえ、誤嚥が繰り返し起こるため、その病態は複合的であり、異物の侵入や異物反応の影響を単独でみることは不可能である。そのため、今回、我々は、動物モデルを用いて食塊の誤嚥による異物反応の影響を評価する。

2. 研究の目的

(1) 食塊の代表的な異物としてセルロースを用いた新しい誤嚥のマウスモデルを確立する

(2) 肺内の異物反応とその全身への影響を各種サイトカインレベルで明らかにする。

(3) この新規モデルでの細菌感染防御能への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肺での異物反応モデルの作成

我々は、食塊の代表的な異物としてセルロースを用いて肺での異物反応モデルマウスを作製した。具体的には、粒子径 0.02mm のセルロースパウダーを PBS に 100mg/ml および 10mg/ml になるように懸濁し、オートクレーブ滅菌したものを用意した。ケタミンとキシラジンの腹腔内投与にて深麻酔したマウスの気管切開を施行し、0.1mg/g BW および 0.01mg/g BW のセルロースを経気管的に C57BL/6J マウス肺内 (生後 2 か月、オス) に投与した。

肺内に沈着したセルロースはファンギローラ Y 染色により確認した。

(2) 肺異物反応モデルにおける炎症細胞浸潤の評価

前記のとおりセルロースを経気管的に投与した肺異物反応モデルマウスとコントロールとして PBS のみを投与したマウスについて、投与 5 時間後、24 時間後、7 日後に気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、その細胞数と細胞分画を評価した。なお、BALF は、気管切開を施行した後、PBS 1ml を 3 回、計 3ml を全肺に注入回収して採取した。回収率は 80% 以上であった。

続いて摘出したマウス肺を Iba-1 免疫染色、および naphthol AS-D chloroacetate を用いたエラスターゼ染色を実施し、異物反応周囲に浸潤しているマクロファージおよび顆粒球を同定した。

(3) 肺異物反応モデルにおけるサイトカイン発現の評価

前記のとおりセルロースを経気管的に投与した肺異物反応モデルマウスとコントロールとして PBS のみを投与したマウスについて、投与 5 時間後、24 時間後、7 日後に脱血後の全肺を摘出し、ホモジナイズした後、RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出した。続いて、MIP1 α 、TNF α 、MCP1、IL6、IL13、IFN γ の発現を real-time PCR を用いて評価した。

(4) 黄色ブドウ球菌懸濁液の調整

プレート培養した黄色ブドウ球菌の 1 コロニーを 3 ml の Tryptic Soy Broth (TSB) 培地で一晚培養後、同菌液 1ml を 100ml の TSB 液培地に希釈し、OD660 0.4-0.6 になるまで培養し、うち 40ml を遠心し菌を沈殿させたのち、PBS にて洗浄後、1.2ml PBS に懸濁した。本黄色ブドウ球菌懸濁液は、0.03ml におよそ 1×10^8 CFU の菌液となる。

(5) 異物反応と細菌感染の合併モデル作成

前記のとおりセルロースを経気管的に投与した肺異物反応モデルマウスとコントロールとして PBS のみを投与したマウスについて、同日 (day 0) あるいは 1 日後に、PBS に懸

濁した黄色ブドウ球菌もしくは PBS のみ 0.01ml を経鼻的に気管内投与し細菌性肺炎を惹起させ、24 時間後にマウス肺を摘出した。摘出した肺をホモジナイズし、プレート上に播いて、肺内に残存する黄色ブドウ球菌の生菌数を評価した。

4. 研究成果

(1) 肺での異物反応モデル

0.01mg/g BW のセルロース投与マウスでは、ファンギローラ Y 染色においてセルロースの肺内沈着が確認されたが、BALF での炎症細胞の浸潤は軽微であった (図 2)。一方、0.1mg/g BW のセルロース投与マウスでは、day 1 をピークに多形核白血球を中心とする炎症細胞

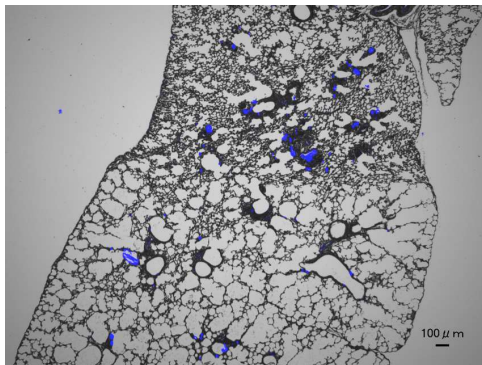


図1 0.01mg/g BWのセルロース投与マウス1日後のファンギローラY染色

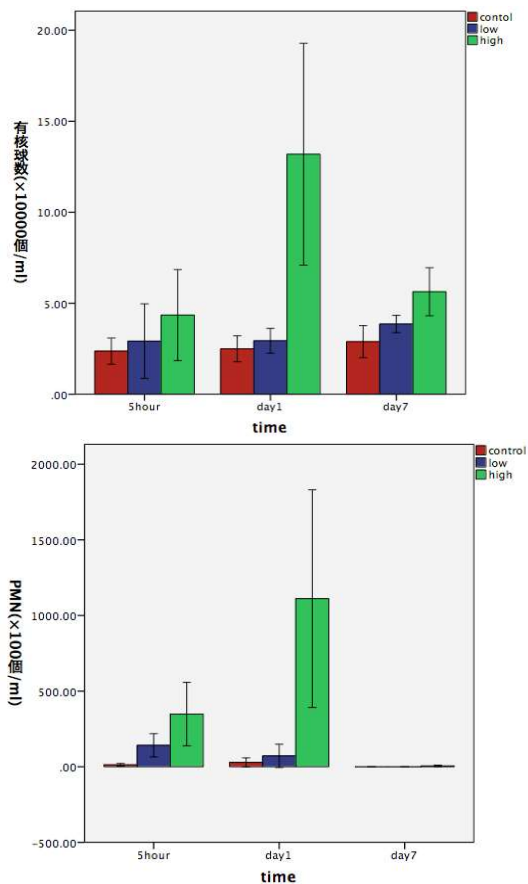


図2. コントロール(赤)、0.01mg/g BWのセルロース(青)、0.01mg/g BWのセルロース(緑)投与マウスBALF。バーは標準誤差。

の浸潤が BALF でもみられた。さらに、HE 染色では、器質化肺炎の所見を確認できた (図 3)。

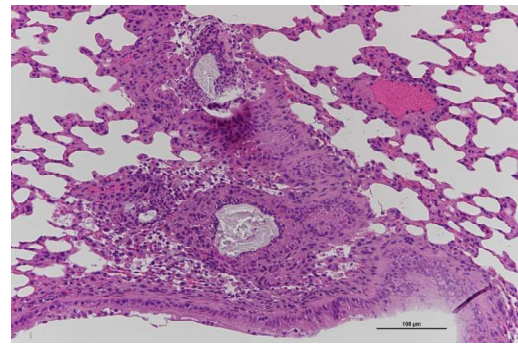


図3セルロース投与1週間後の器質化肺炎像

異物反応局所に浸潤している細胞を Iba-1 免疫染色および naphthol AS-D chloroacetate を用いたエラスターゼ染色により評価した。Iba-1 免疫染色陽性細胞はマクロファージ、エラスターゼ染色陽性細胞は顆粒球に相当すると考えられる。day 1 や day 2 では、セルロース周囲に、マクロファージ以外の細胞の浸潤も多くみられたが、day 7 では、セルロース周囲の細胞浸潤はマクロファージが中心であった (図 4)。これらの所見は BALF 所見の経過とも合致すると考えられた。

(2) 異物反応モデルでのサイトカイン発現

肺での異物反応モデルでのサイトカイン発現を real-time PCR にて評価した結果を以下の表に示す。特に MIP1α や IL-6 は、セルロース投与量の少ないモデルでも顕著に発現が上昇していた。

(3) 異物反応に合併する細菌感染症の評価

異物反応の存在が細菌感染の増悪に寄与するかを評価した。図 5 のように、強い炎症を伴う高濃度のセルロース投与群では、同時

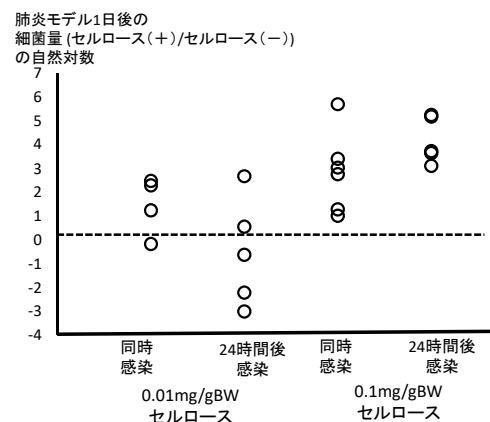


図5. 異物反応に合併する細菌感染症の評価黄色ブドウ球菌による肺炎モデル作成 24 時間後に肺に残存する黄色ブドウ球菌の生菌数。

あるいは 24 時間後の細菌感染の有意な増悪がみられたが ($p < 0.01$)、低濃度のセルロース投与群での増悪は統計学的 (t 検定) にも有意でなかった。

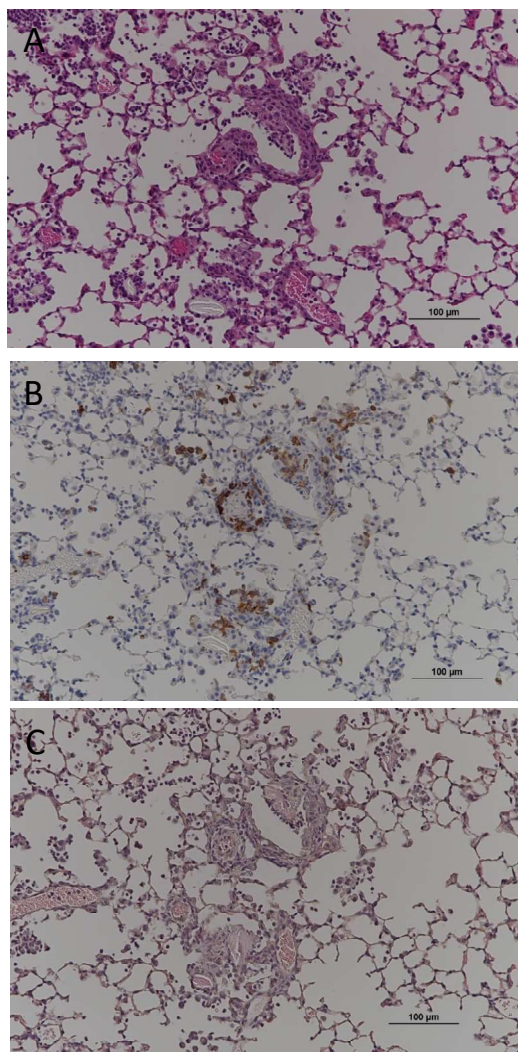


図4. セルロース投与1週間後のHE染色(A)とIba-1免疫染色(B)、naphthol AS-D chloroacetateを用いたエラスターゼ染色(C)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Hanaoka Y, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Ishii M, Nagase T, Kurihara H, Akishita M, Ouchi Y. In Vitro and In Vivo Anticancer Activity of Human β -Defensin-3 and Its Mouse Homolog. *Anticancer Res.* 2016;36:5999-6004
- 2) Ishii M, Yamaguchi Y, Isumi K, Ogawa S, Akishita M. Transgenic Mice Overexpressing Vitamin D Receptor (VDR) Show Anti-Inflammatory Effects in Lung Tissues. *Inflammation.* 2017;40:2012-2019.

MIP1 α の発現量 (コントロールマウスとの比)

	5 hours	24 hours	7 days
0.01mg/g BW セルロース	0.328853	9.492825	1.994798
0.1mg/g BW セルロース	10.06646	8.562189	1.75782

TNF α の発現量 (コントロールマウスとの比)

	5 hours	24 hours	7 days
0.01mg/g BW セルロース	1.3545	1.420307	0.652345
0.1mg/g BW セルロース	1.857746	0.645331	1.206955

MCP1 の発現量 (コントロールマウスとの比)

	5 hours	24 hours	7 days
0.01mg/g BW セルロース	1.87169	1.668593	0.626333
0.1mg/g BW セルロース	6.94244	0.865272	1.909657

IL6 の発現量 (コントロールマウスとの比)

	5 hours	24 hours	7 days
0.01mg/g BW セルロース	2.887624	9.292095	
0.1mg/g BW セルロース	87.16867	14.21374	

IL13 の発現量 (コントロールマウスとの比)

	5 hours	24 hours	7 days
0.01mg/g BW セルロース	1.459243	1.383644	
0.1mg/g BW セルロース	2.806535	0.692994	

IFN γ の発現量 (コントロールマウスとの比)

	5 hours	24 hours	7 days
0.01mg/g BW セルロース	0.617191	0.500391	
0.1mg/g BW セルロース	2.661109	0.307136	

表 1

[学会発表] (計 1 件)

Masaki Ishii, Yasuhiro Yamaguchi, Tomomi Nakamura, Masahiro Akishita The vitamin D receptors may function as anti-inflammatory effects in patients with COPD . CHEST Annual meeting, 2015.10.24-28. Montréal, Québec, Canada.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 泰弘 (YAMAGUCHI, Yasuhiro)
 東京大学・医学附属病院・講師
 研究者番号：60376473

(2) 研究分担者

栗原 由紀子 (KURIHARA, Yukiko)
 東京大学・大学院医学系研究科 (医学部)・
 講師
 研究者番号：80345040