

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590592

研究課題名（和文） アスベスト肺に対する常在細菌の急性増悪作用に関する研究

研究課題名（英文） Study on the acute inflammatory effect of indigenous bacterium on lung asbestosis.

研究代表者

日吉 孝子 (HIYOSHI KYOKO)

静岡県立大学・看護学部・講師

研究者番号：90405580

研究成果の概要：アスベストの長期曝露によっておこる慢性呼吸器障害に対する細菌感染による影響を明らかにするために青石綿および茶石綿を用いて調べた。アスベスト投与によって二次的に肺線維症モデルを作製し日和見感染菌を曝露した。その結果、アスベストを継続的に曝露すると肺の線維化と共に好中球性の炎症が起こるが、肺炎桿菌に感染すると炎症が悪化する。その炎症は、青石綿より茶石綿併用投与群においてより強いことが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,500,000	0	1,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	480,000	3,050,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：アスベスト

1. 研究開始当初の背景

長期間アスベスト繊維を吸入すると肺の炎症を起こした後、線維増殖性変化によって塵肺を生じる。塵肺にいったん罹患すると治癒は困難で、職場を離れても15年から20年をかけて徐々に進行し、がん・中皮腫の発生、肺の線維化を来し、重症化すると呼吸機能が低下する。医療の現場は、病院から在宅ケアへと多様化し、それによる新たに易感染状態が深刻化している。特に慢性呼吸器疾患患者の気道感染による急性増悪は病状の進行悪化を来す。肺線維症もまた感染症を契機に急性増悪するため、生命予後に重大な影響

を及ぼす。特に、高齢で疾病や治療によって免疫力が低下した慢性呼吸不全の患者が黄色ブドウ球菌をはじめとした日和見細菌に感染すると、肺機能の低下に伴う症状の急性悪化を来し、患者の死亡率や入院率が上昇し、患者のQOLが著しく損なわれることが推測される。

2. 研究の目的

(1) 肺線維症による慢性呼吸障害の病態モデルとしてアスベスト肺のマウスを作製し、経時的変化を観察する。

(2) アスベスト肺に対する常在細菌の急性病態増悪作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肺線維症による慢性呼吸障害の病態モデルの作製

①動物は、5週齢で導入したICR雄性マウスに、クロシドライト (crocidolite: CR)、アモサイト (amosite: AM) を5%ハロタンの麻酔下で気管内投与して、投与後より6ヶ月の飼育を行いながら、経時的にマウス肺線維化に関する病理学的変化を中心に観察した。

②次に、モデル動物の肺線維化を経時的に観察するために、肺線維症マウスの病態形成について呼吸同調エックス線マイクロコンピュータ断層撮影 (micro-CT) 装置を用いて経時的に撮影して検討した。実験群は、対照群、アスベスト群 (0.4 mg/mouse) とし、アスベストの投与から半年間SPF環境下で飼育しながらマウス胸部CT撮影を経時的に行った。CT撮影は、アスベスト投与から3週、6週、12週および24週に行った。最終撮影の終了後に屠殺し、肺の病理組織標本作製した。

なお、この実験で使用したアスベストは、すべて国際標準品のものを用いた。

(2) アスベスト肺に対する常在細菌の影響

アスベスト投与によって誘発した肺線維化モデルマウスに対する常在細菌曝露による急性影響を検討するために、2種細菌を用いて検討した。5週齢で導入したICR雄性マウスに、CR、AMを5%ハロタンの麻酔下で2週間おきに計4回曝露して二次的に低肺モデルを作成した。アスベストの最終投与の翌週に日和見病原菌であるグラム陽性球菌 (黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: SA)) とグラム陰性菌 (肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*: KP)) の2種を経気道的に曝露し、気管支肺胞洗浄 (BAL) 中の炎症細胞数および病理組織変化を調べた。実験群は、対象群 (生理食塩水投与)、細菌群 (SA、KP)、アスベスト群 (CR、AM) 0.2 mg/body および細菌+アスベスト群 (CR+SA、CR+KP、AM+SA、AM+KP) とした。

(3) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の細胞数の測定

BALFの採取は、マウスをソムノペンチル腹腔内麻酔にて屠殺・心採血後、気管上部より18Gの留置針を挿入し、テルモシリンジにて37°Cに加温した生理食塩水0.8 mlを気管内に注入し採取した。この作業を2回繰り返

し、注入総量(1.6 ml)の約90%以上のBALFを回収した。回収量は実験群間に差を認めなかった。回収した洗浄液は4°Cに冷却し1500回転にて10分間遠心し、上清と沈渣に分離した。沈渣に生理食塩水を加えて懸濁し、細胞数をビルケル・チュルク血球測定盤にて測定した。残りの沈渣溶液を総細胞数が10万個になるように調整し、これを自動細胞収集装置 (CF-12D、サクラ精機株式会社、東京) にて塗沫標本作成した。これらの標本をDiff-Quick (国際試薬株式会社、神戸) 染色した。BALF中に含まれる各細胞数は、1標本あたり250個の細胞を数え、そのなかに含まれているマクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球数を各細胞の百分率から算出し、これらを総細胞数に乗じて求めた。

(4) 肺の病理標本作製

肺は気管より10%中性緩衝ホルマリン液を注入して固定した。各肺葉を幅約2mm切片に切り出し、定法に従ってパラフィン包埋後、3μmの薄切り標本作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色とPAS染色を行った。これらの組織標本は、光学顕微鏡 (BH-2、オリンパス、東京) を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) アスベスト投与による肺線維化の誘発

マウスCT撮影の経時的変化としては、アスベスト投与群では、12週を過ぎるころから肺に異常陰影が認められるようになり、CR群の24週目では右肺上部に管状の陰影が観察された。24週目の病理観察では、呼吸細気管支壁やそれに続く肺胞壁が線維化によって肥厚しており、このような病巣が肺内に点在していた。一方、AM群では、主として右肺上部への陰影を認め、病理学的変化としては細気管支壁や肺胞壁の結合組織が線維化によって肥厚しており、CRに比較するとその病巣は広範囲であった。また、気管支管腔や肺胞にはアスベストを貪食した肥大化したマクロファージが散在していた (図1、2、3、4、5)。

以上より、気管支末梢から肺胞にかけての線維化病巣の程度は、CR群に比べAM群の方が強くみられ、このような病巣部がCT陰影として反映されているものと思われた。

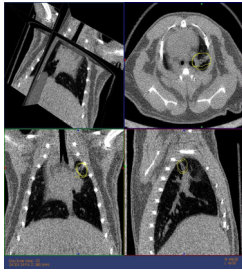


図1 CR投与肺のCT陰影

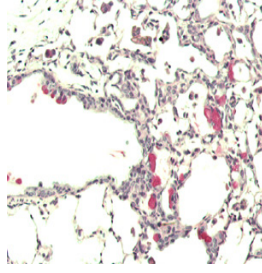


図2 CR投与の気管支肺接合部 (PAS染色 X100)



図3 AM投与肺のCT陰影

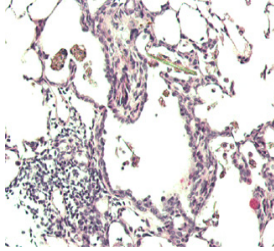


図4 AM投与肺の気管支肺接合部 (PAS染色 X100)

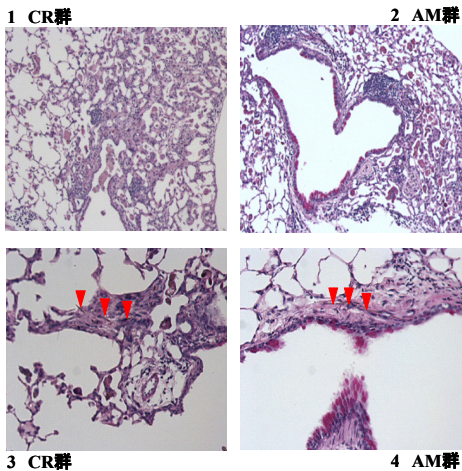


図5 アスベスト投与後の病理学的組織変化
Original magnification, x50

(2) アスベスト肺に対する常在細菌の急性影響

①BALF中の炎症細胞数について

BALF中の総細胞数では、対照群に比べ、CR、AMの順に増加したがほとんど差はみられなかった。また、細菌群では、SAに対しKPは有意に増加していた。アスベスト群にSAを曝露すると、SA単独投与群に比較してSA+CR群、SA+AM群では有意に増加していた。一方、アスベスト群にKPを曝露すると、炎症細胞数は増加したが有意差はなかった(図6)。

BALF中の好中球は、対照群、アスベスト群、細菌群ともにほとんど変化なかった。KP群の好中球数は、対照群、SA群とKP+AM

群に対して有意に増加していた(図7)。一方、BALF中のマクロファージ数は、SA単独群あるいはアスベスト単独群に比べてSA+CR群とSA+AM群では有意に増加していたが、KP投与群での差はあまりなかった。(図8)。また、BALF中のリンパ球数は、アスベスト単独群やSA+アスベスト群と比較するとKP併用投与群では有意に増加していた(図9)。

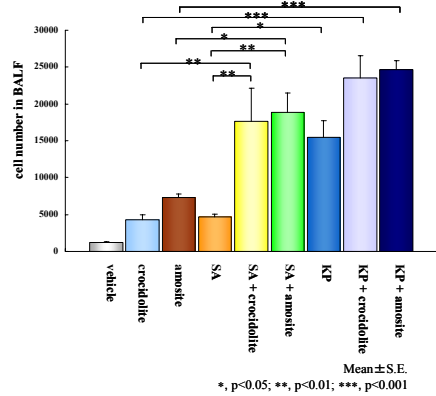


図6 BALF中の総細胞数

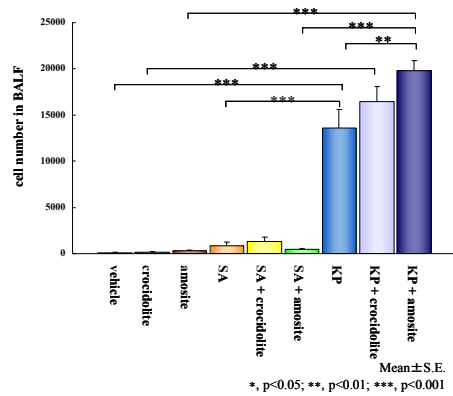


図7 BALF中の好中球数

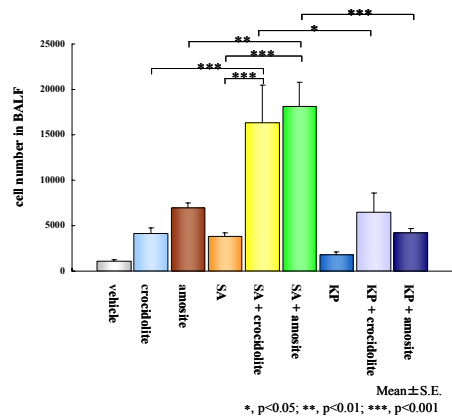


図8 BALF中のマクロファージ数

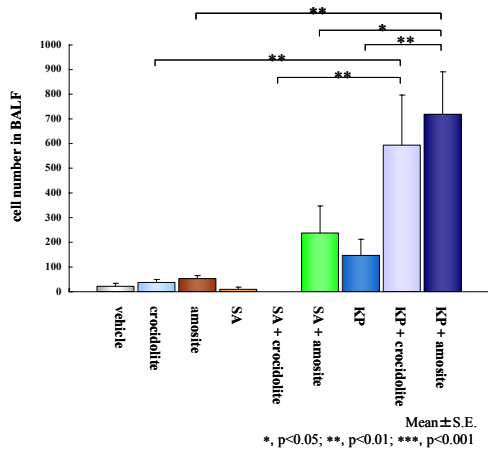


図9 BALF中のリンパ球数

②病理組織所見

対照群の肺組織像は、正常な肺胞と気管支が観察された (図 10-a)。

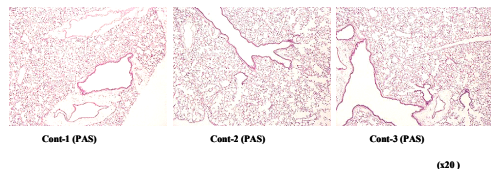


図10-a 病理学的組織変化

細菌曝露群の影響 (図 10-b)

SA 群では、非常に軽度のびまん性肺炎 (SA-1) と気管支肺胞結合部 (SA-3)に気管支肺炎 (サークル部) が観察された。一方、KP 投与群は、SA 投与群よりも若干強いびまん性肺炎が観察され (KP-1)、気道粘膜下、血管周囲にリンパ球の集積巣 (矢印) が観察された (KP-2, KP-3)。

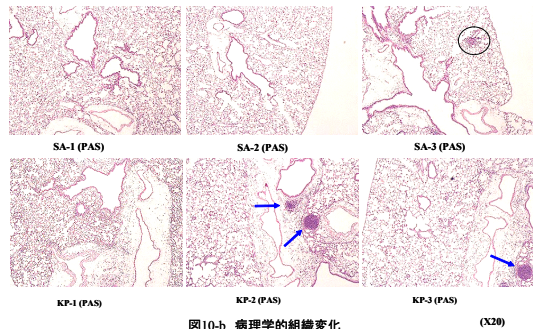


図10-b 病理学的組織変化

アスベスト単独群への影響 (図 10-c)

CR 投与群のグラニューマ様病巣は、気管支と気管支肺胞接合に見られた。気管支上皮はどの写真も著しい粘液細胞化が見られ、気管支内には炎症細胞や上皮組織の脱落細胞 (CR-2) が見られた。気管支肺胞接合部にはグラニューマ様 (肉芽組織形成) の変化 (サークル部) が見られた。CR-3 は気管支周囲の炎症 (気管支炎) と肺胞にも炎症がおよび肺胞壁の肥厚が見られた。AM 投与群は、CR 投与群の変化と同様であるが、気管支肺胞接合部のグラニューマ様変化は CR 投与群より AM 投与群の方が強い傾向にあった (MA-1: サークル部)。

細胞 (CR-2) が見られた。気管支肺胞接合部にはグラニューマ様 (肉芽組織形成) の変化 (サークル部) が見られた。CR-3 は気管支周囲の炎症 (気管支炎) と肺胞にも炎症がおよび肺胞壁の肥厚が見られた。AM 投与群は、CR 投与群の変化と同様であるが、気管支肺胞接合部のグラニューマ様変化は CR 投与群より AM 投与群の方が強い傾向にあった (MA-1: サークル部)。

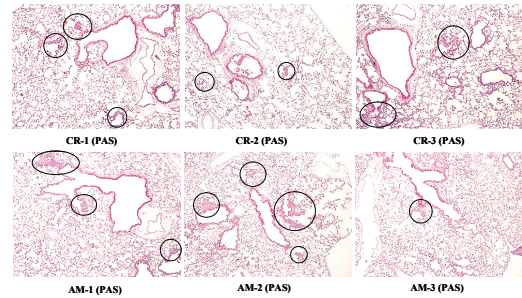


図10-c 病理学的組織変化

クロシドライトに対する細菌曝露の影響 (図 10-d)

CR+SA 群の病巣は CR 投与群に見られた気管支や気管支肺胞接合に見られた病巣より強く、気管支上皮は著しい粘液細胞化が見られ、気管支壁の肥厚とグラニューマ様の変化 (サークル部)、気管支内には炎症細胞や上皮組織の脱落細胞 (CR+SA-1, CR+SA-2) が見られた。また SA 単独群では見られなかった気管支周囲にリンパ球の集積巣が見られた (矢印)。一方、CR+KP 群では、グラニューマ (サークル部) はおおよそ CR 単独投与群と変わらないが、CR+SA 群に比較すると更に強い炎症生変化が肺胞、気管支に見られた。リンパ球の集積巣も更に大きなものになっていた (矢印)。

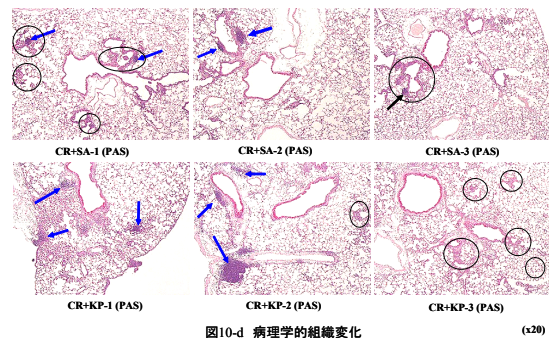


図10-d 病理学的組織変化

アモサイトに対する細菌曝露の影響 (図 10-e)

AM+SA 群では、気管支や気管支肺胞接合に見られた病巣 (粘液細胞化、グラニューマ) は AM 投与群と変わらないが、肺胞の炎症は SA 単独群より強くびまん性に起こって

いた。また肺胞接合部にリンパ球の集積巣が見られた(矢印)。一方、AM+KP 群では、肺炎や気管支炎、グラニューマ(サークル部)、気管支上皮の粘液細胞化は他のどの群より強く起こっていた。気管支周囲にリンパ球の集積病巣は見られてないが、全体的に強い炎症が肺胞領域に及んでいた。

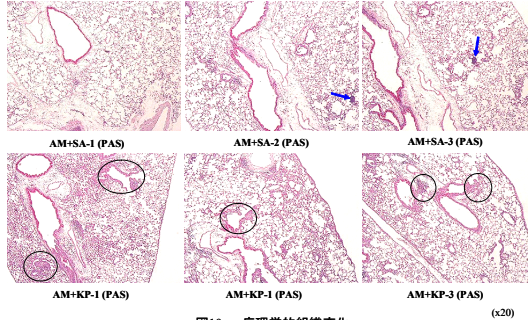


図10-e 病理学的組織変化

図 10-f は各投与群の HE 染色の 100 倍像である。SA 投与群の血管周囲に炎症性変化と肺胞に軽度の炎症が見られた。KP 投与群では気管支上皮の増生と気管支肺胞接合部に軽度の炎症が見られた。CR と AM 投与群の細気管支末端部ではアスベストを囲んで、グラニューマ形成(サークル部)が見られた。また、気管支壁の肥厚も見られた。CR+SA 群ではグラニューマの形成と共に細気管支下にリンパ球の集積巣が見られた(矢印)。

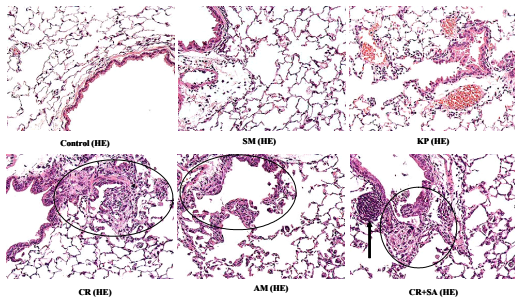


図10-f 病理学的組織変化

同じく HE 染色の 100 倍像を図 10-g に示した。CR+KP 群の気管支末梢部にグラニューマの形成が見られる。同内にはアスベスト繊維が観察された。矢印は気管支下に見られるリンパ球の集積巣である。血管周囲に炎症細胞の浸潤(矢頭)が見られる。AM+KP 群では気管支内に突出してグラニューマの形成(サークル部)が見られる。気管支粘膜下に SA の感染巣が見られる。AM+KP 群では気管支粘膜下に著しいリンパ球の集積巣を認める。気管支上皮は著しい粘液細胞に変わっていた。

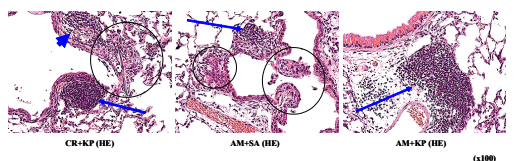


図10-g 病理学的組織変化

以上、アスベストを継続的に曝露すると肺の線維化と共に好中球性の炎症が起こるが、アスベスト肺に対して肺炎桿菌を曝露すると炎症が著しく悪化することがわかった。その病態は、アモサイト併用投与群においてより強いことが明らかとなった。

これらの結果は、アスベストに長期曝露された慢性閉塞性肺疾患患者や高齢で疾病や治療によって免疫力の低下した慢性呼吸不全の患者が、肺炎桿菌のような日和見細菌に感染すると、気道感染を契機に病状の急性悪化を来す可能性があることを示している。患者の QOL を維持していくためにも、アスベストに曝露しないための長期的な環境対策とともに、アスベスト曝露による呼吸器疾患モデルに対するより詳細な検証が今後必要であると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

① 日吉孝子、市瀬孝道、吉田成一、山元昭二、高須賀信夫、堀優作、若林敬二、アモサイトとクロシドライトの Maus 肺への影響、第 49 回大気環境学会、2008 年 9 月 17 日、金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日吉 孝子 (HIYOSHI KYOKO)
静岡県立大学・看護学部・講師
研究者番号：90405580

(2) 研究分担者

市瀬 孝道 (ICHINOSE TAKAMICHI)
大分県立看護科学大学・看護学部・教授
研究者番号：50124334
山元 昭二 (YAMAMOTO SHOJI)
独立行政法人国立環境研究所・環境リスクセンター・主任研究員
研究者番号：40230552

(3) 研究協力者

高須賀 信夫 (TAKASUKA NOBUO)
国立がんセンター
研究者番号：なし