

表 題 ラット実験モデルを用いた形態観察による
再膨張性肺水腫の発症機序解明

論文の区分 博士課程

著 者 名 大谷真一

担当指導教員氏名 遠藤俊輔 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系専攻
循環器・呼吸器疾患学分野
呼吸器外科学

2017年1月10日申請の学位論文

目次

緒言	2
材料と方法	4
結果	9
考察	24
結論	29
謝辞	30
参考文献	31

緒言

肺水腫の成因は肺静水圧性と肺血管透過性に分類される [1]。肺静水圧性肺水腫には、僧帽弁閉鎖不全症や心筋梗塞などの心疾患や、肺静脈狭窄症などが原因での肺血管内圧上昇によるもの、またはネフローゼ症候群や低栄養などが原因での血漿浸透圧低下によるものがある。一方、肺血管透過性肺水腫は、肺微小血管透過性の亢進が原因で起こる肺水腫である。原因として、感染症、急性呼吸促迫症候群、薬物、高地肺水腫、再灌流、神経原性などが挙げられる。肺血管透過性肺水腫のひとつに再膨張性肺水腫がある。

再膨張性肺水腫とは、長期間虚脱していた肺が急速に含気を回復して再膨張する際に発症する肺水腫であり、古くから大量胸水の排液後に発症することが知られている [2]。1959年に Carlson らは自然気胸に対する胸腔ドレナージ後に合併した肺水腫を初めて報告した [3]。現在では再膨張性肺水腫は、気胸、胸水貯留、肺嚢胞や腫瘍等の胸腔内占拠物の存在、腫瘍や肉芽等による気管支閉塞により、肺の虚脱が概ね 3 日間以上続いた後に、肺が含気を回復して再拡張した際に時折発症する一般的な疾患概念として知られている [4]。

Abunasser らは胸水貯留に対する胸腔穿刺後の再膨張性肺水腫発症率が 0.3% と報告し [5]、Taira らは気胸に対する胸腔ドレナージ後の再膨張性肺水腫発症率が 32.5% と報告している [6]。報告により発症率に差異があるが、対象疾患、肺虚脱率、肺膨張速度などの患者背景の違いによるものと推察される。現在でも再膨張性肺水腫の発症を確実に予防することはできず、重篤な呼吸不全に陥ることもあるため、再膨張性肺水腫の病態を理解することは重要である。

再膨張性肺水腫の発生機序として、サイトカインなどの化学伝達物質を介して炎症が肺微小血管に起こることで肺胞透過性が亢進するという説 [7] や、再膨張時に肺

胞が伸展されて物理的な損傷が起こるという説 [8] などが討議されている。しかしながら、現在に至るまで再膨張性肺水腫の発症機序が明確には解明されていない。

再膨張性肺水腫は、肺再拡張後より数分から数時間という短時間内に発症することが一つの特徴である [4]。これは、肺胞の物理的損傷・細胞組織障害が発症初期段階の主たる原因であることを示唆しているのではないかと筆者は考えた。そこで、それを実証するためにラット再膨張性肺水腫モデルを作成し、再膨張性肺水腫肺の形態学的特徴を捉えることで、発症の原因を推察しようとしたのが本研究である。

材料と方法

再膨張性肺水腫モデルラットおよびコントロールの作製

12週齢Wistar雄ラット(日本クレア、東京、日本)を自治医科大学実験医学センターに搬入し、1から4週間飼育した後に実験で使用した。実験時の体重は約280から330gであった。明期を12時間、暗期を12時間にして飼育を行った。飼料はペレット状のCE-2(日本クレア)を用い、餌と水は自由に摂取できるようにした。飼育室の室温は、 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ とした。自治医科大学動物実験指針を遵守してラットを取り扱った。

ラットにペントバルビタールナトリウム(Organon、Oss、Netherlands) 50 mg/kg 体重を腹腔内注射して麻酔をおこなった。麻酔の効果は2時間以上維持できた。ラットを手術台に背臥位に固定し、6フレンチ径のカテーテル(八光メディカル、長野、日本)を経口気管内挿管した。さらに右側臥位に固定し直して、人工呼吸器(Model 683、Harvard Apparatus、Natick、MA、USA)で換気(1回換気量6 ml/kg、呼吸回数80回/分、終末呼気陽圧5 cmH₂O)を行いながら、左側胸部に肋骨長軸方向に3 cmの皮膚切開をして第4肋間筋を切離して開胸した。再膨張性肺水腫を誘発させるラットに対して、前処置として左気管支周囲を剥離して左気管支をチタン製血管用クリップ(No. 11、河野製作所、千葉、日本)で遮断した。左肺が無気肺になったのを確認してから閉胸して覚醒させ、自発呼吸運動が十分に回復していることを確認した後に気管内挿管カテーテルを抜去した。一方、コントロールとして使用するラットは、左開胸を行った後、左気管支を遮断せずに、左肺が換気されていることを確認して閉胸する偽手術を施行した。

前述の前処置を行った3日後に、同様の腹腔麻酔下に背臥位で手術台に固定して頸部切開を行った。気管切開を行って6フレンチ径カテーテルを留置し、右外頸静脈

に 24 ゲージ径の留置針(テルモ、東京、日本)を挿入した。同ラットを右側臥位で観察台に固定し直し、前処置時と同様の人工呼吸器換気下で第 4 から第 8 肋骨を含めた胸壁切除をして左開胸を行った。再膨張群は左気管支を遮断していたクリップを外して左肺を膨張させることにより、再膨張性肺水腫を誘発させた。コントロール群は左肺が無気肺になっていないことを確認した。

生体蛍光顕微鏡を用いたライブイメージング

再膨張性肺水腫ラット肺の生体蛍光顕微鏡を用いたライブイメージング実験は Endo らの方法を改変して行った [9]。臭化パンクロニウム(三共、東京、日本)を 1 mg 単回静注し、以降は臭化パンクロニウムを 0.4 mg/時で持続静注した。10 mg の fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ウシアルブミン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 0.4 ml の蒸留水で溶解して静注した。静注は右外頸静脈の留置針から行った。再膨張群のラット (n=5) は左気管支の遮断を解除して再膨張性肺水腫を発症させた。左肺靱帯を切離して、左肺の可動域を広げた。肺を生体下で顕微鏡観察するために固定する吸引機能付きチャンバーを作製した。ラット観察台と接続するための軸の先端に、胸郭の形状に合わせた内寸が幅 14 mm、奥行き 20 mm、高さ 6 mm のステンレス製フレームが付き、フレーム内部を吸引するチューブが接続した構造で、フレームの観察面に 18×24 mm のカバーガラス(松浪硝子工業、大阪、日本)を接着した。左肺を胸郭外に誘導し、吸引チャンバーのガラスカバー側に左肺の横隔膜面を向けて留置して、-15 cmH₂O の圧でチャンバー内を吸引して胸腔内にある肺の状態を再現した。一方、コントロール群のラット (n=5) は左肺に含気があることを確認して、吸引チャンバーに留置した。チャンバーに留置した左肺の微小循環動態を、生体下に 435 nm 青色励起光を用いた落射型蛍光顕微鏡 (Optophot2、ニコン、東京、日本) で再膨張時から 2

時間観察し、モノクロ CCD カメラ (C7190、浜松ホトニクス、静岡、日本) で撮影し、HDD レコーダー (RD-XS41、東芝、東京、日本) で記録した。

光学顕微鏡での観察

再膨張群のラット左肺を再膨張させた約 1 分後に、コントロール群のラット左肺を再開胸した約 1 分後に摘出し、4°C の 10% formaldehyde 溶液 (0.1 M phosphate buffer、pH 7.4) 3 ml を 25 cmH₂O の圧で左気管支切除断端から注入した後に、同固定液で 24 時間の浸漬固定を行った。室温でエタノール系列による脱水さらにキシレン置換を行った後に、パラフィンに包埋した。ロータリーマイクローム (HM360、Carl Zeiss、Oberkochen、Germany) を用いて 5 μm 厚の切片を作製した。切片に Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、光学顕微鏡 (BX53、オリンパス、東京、日本) で観察し、CCD カメラ (DP80、オリンパス) で撮影した。

電子顕微鏡での観察

再膨張群 (n=3) およびコントロール群 (n=3) の各ラットの気管切開チューブから 4°C の 2% glutaraldehyde 溶液 (2% sucrose を含む 0.1 M cacodylate buffer、pH 7.4) 10 ml を 25 cmH₂O の圧で注入した。左肺を摘出し、5 mm 幅の厚さに切り分けて、同固定液に 120 分間浸漬固定した。固定した肺組織を 0.1 M cacodylate buffer で 30 分間の洗浄を 4 回繰り返し、3 mm 角以下の大きさに細切した。細切組織を 4°C の 1% OsO₄ 溶液 (0.1 M cacodylate buffer) に浸して 90 分間の後固定を行った。後固定した組織を蒸留水で濯いだ後に、室温で 50%、70%、80%、90%、95%、100% エタノール液に順に浸して脱水をした。室温でエタノールを段階的に酸化プロピレンで置換した。置換後に 2:1、1:1、

1:2 の順で酸化プロピレンと Epon 樹脂 (Quetol-812、日新 EM、東京、日本) の混合液に室温で組織を浸して、最後の 1:2 の混合液内に 12 時間静置した。組織を 100% Epon 樹脂に入れて、真空乾燥器 (DRV320DA、東洋製作所、千葉、日本) を用いて真空中で脱気して、樹脂を組織に浸透させた。新たな Epon 樹脂に組織を包埋し、60°C の恒温器内で 2 日間静置して、樹脂を重合させた。ウルトラマイクローム (Ultracut UCT、Leica、Wetzlar、Germany) で約 60 nm 厚の超薄切片を作製した。超薄切片は Cu メッシュ上で、pH 5.0 の 2% 酢酸ウラニル水溶液に室温で 5 分間浸漬させた、その後に、NaOH 結晶を隣に置いて周囲の CO₂ を吸着させながら、Reynolds のクエン酸鉛液 [10] に室温で 5 分間浸漬させて電子染色を行った。試料を透過型電子顕微鏡 (HT7700、日立、東京、日本) で観察した。

電子顕微鏡を用いた horseradish peroxidase (HRP) のトレーサー実験

本実験での HRP 投与方法は、Mabuchi らの方法 [11] に準じて行った。再膨張群 (n=3) のラットは、左気管支の遮断を解除して再膨張性肺水腫を発症させた直後に血漿成分のトレーサーとして、HRP (type VI、Sigma-Aldrich) 0.05 g を生食 0.5 ml で 10% に溶解した 4°C の液を 2 分間かけて大腿静脈から静注した。コントロール群 (n=3) のラットは、開胸後に再膨張群と同じ HRP 溶液を静注した。HRP 静注終了の 6 分後に前述した電子顕微鏡での肺の形態観察法と同様に気管内固定液を注入し、左肺を摘出した。摘出した左肺を 5 mm 幅の厚さに切り分けて、4°C の 2% glutaraldehyde 溶液 (2% sucrose を含む 0.1 M cacodylate buffer、pH 7.4) に 30 分間浸漬固定した。固定した肺組織を 0.1 M cacodylate buffer で 10 分間の洗浄を 4 回繰り返した後に、3 mm 角以下の大きさに細切した。細切組織を 10% sucrose を含む cacodylate buffer saline に 4°C で 10 分間浸した。組織を -20°C に冷却して、凍結マイクローム (リトラーム REM-700、

大和光機工業、埼玉、日本)で 40 μ m 厚の切片を作製した。凍結切片作製後に 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB、和光純薬工業、大阪、日本) 0.02 g を溶解した 0.05 M Tris-HCl 100 ml に 20 μ l の 30% H₂O₂ を DAB 溶液に加えて、それに同切片を室温で 30 分間浸して DAB 発色を起こさせた。その後に 4°C の 1% OsO₄ 溶液に浸して 90 分間の後固定を行った。さらに、前述同様に包埋および超薄切片を作製した。DAB 発色を明瞭にするために、電子染色は 2% 酢酸ウラニル水溶液への浸漬時間を 1 分間に短縮し、その後の、クエン酸鉛液への浸漬も 1 分間に短縮した。試料を前述同様に透過型電子顕微鏡で観察した。

結果

肉眼所見

前処置において左気管支遮断の処置を行わずに偽手術のみを施行したコントロール群ラットに対して、左再開胸時に左肺の肉眼的観察を行った。前処置での胸壁開胸創に接する左肺は一部が疎に癒着していたが、全例で左肺には良好に含気があり、無気肺は全く認められなかった。吸引チャンバー内に留置したコントロール群左肺(図 1a)が示すように、左肺は均一に桃色を呈していた。

一方、前処置として左気管支遮断を伴う開閉胸を行った再膨張群ラットでは、全例で左開胸時に左肺に含気が全く認められず、左肺全体が無気肺の状態であった。前処置での胸壁開胸創に接する左肺の癒着はごく一部で容易に剥離できた。陽圧人工呼吸下でも左肺には全く換気が認められなかった。虚脱した左肺は、再開胸をして陽圧人工呼吸を行っているコントロール群の左肺と比較して、約 10%以下の体積であった。左気管支遮断解除前の虚脱した左肺は暗赤色を呈していた。左気管支の遮断解除後に、約 10 から 40 秒間で左肺全体が含気されて、前処置前の正常な左肺とほぼ同じ大きさに再膨張した。左肺の再膨張と同時に肺の色調が暗赤色から桃色になり、再膨張直後から 10 秒以内に、図 1b が示すように斑状発赤が左肺全体に出現した。斑状発赤が認められた部位は再膨張性肺水腫での肺胞内出血が強く起こっている部位であると推察される。再膨張性肺水腫は虚脱した肺に含気が回復した後、きわめて短時間に発症することが肉眼的に判断できた。

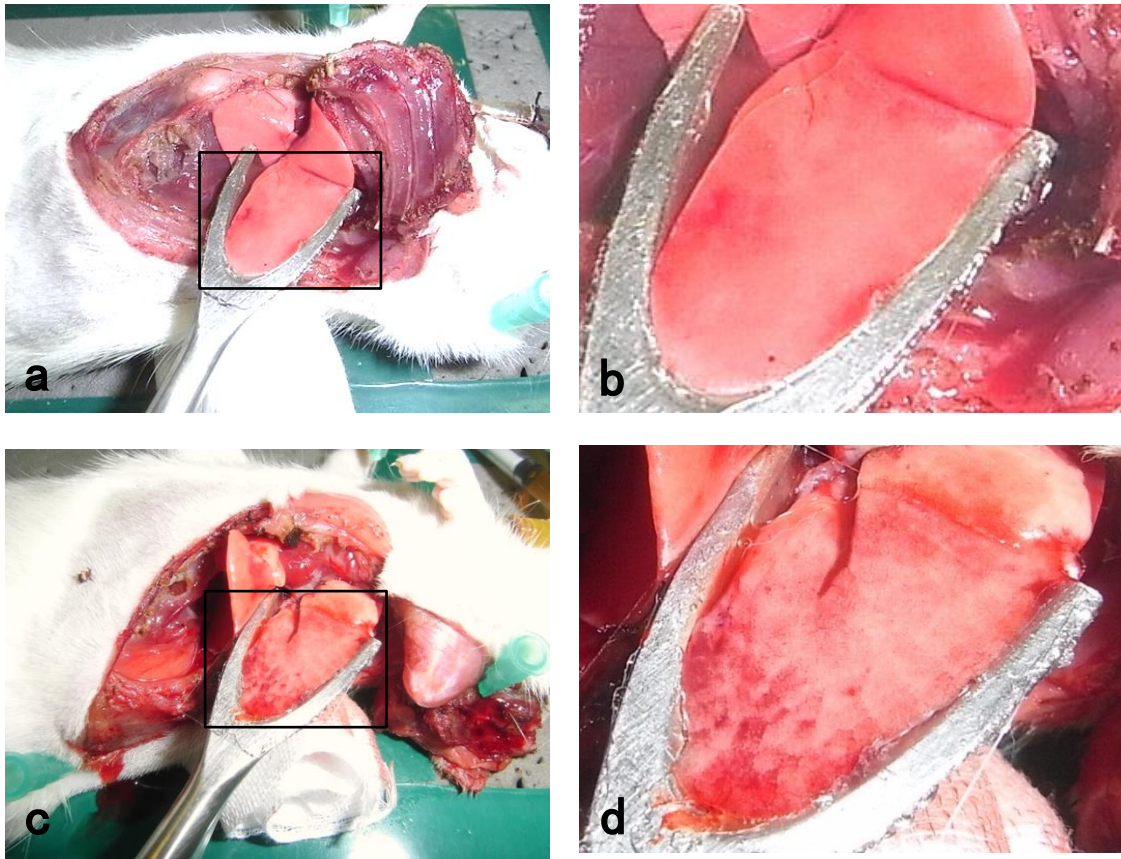


図1 吸引チャンバーに留置したラット左肺横隔膜面の写真

- (a) コントロール群の左肺を吸引チャンバー内に留置した写真
- (b) (a) の黒枠の拡大像で、コントロール群は正常肺と同様の桃色を呈している。
- (c) 再膨張群の左肺を吸引チャンバー内に留置した写真
- (d) (c) の黒枠の拡大像で、肺水腫群の虚脱していた左肺を再膨張させた後に吸引チャンバーに留置した状態の肺は、再膨張直後から斑状の発赤がみられる。

生体蛍光顕微鏡を用いたライブイメージング

肉眼的観察の後に、蛍光顕微鏡で生体下の肺微小循環動態を観察した。使用したカメラはモノクロであり、青色励起光を標本に照射すると、FITC 標識アルブミンが存在する部位は発光して白色に描出された。逆に、FITC 標識アルブミンが存在しない部位は黒色に描出された。

前処置で気管支遮断を行わなかったコントロール群では、黒色の類円形構造が数石状に多数認められ、蛍光発色の欠損像として肺胞が観察された。全ての肺胞は黒色に観察され、FITC 標識アルブミンが存在していない状態であった。肺胞を示す黒色構造物の径は吸気相で約 100 から 150 μm で、呼気相では吸気相より若干縮小していた。各々の肺胞の周囲には、白色に発光する網状構造物として肺毛細血管が観察された。観察した範囲の全ての毛細血管内は FITC アルブミンが存在している状態で、白色に発光していた。毛細血管径は約 10 μm で、呼吸に合わせて径が若干変化していた。白色を呈する毛細血管の内部に無数の微小な粒状蛍光陰性像として赤血球を認め、一定の方向に絶え間なく移動し続けていた。この粒状像を観察することにより、赤血球が肺毛細血管内を流れる様子を観察することができた。肺毛細血管の血流は停滞することなく流れていた。肺胞および毛細血管の状態は 2 時間の観察時間内で大きな変化は認められなかった。図 2a-c にコントロール群の生体蛍光顕微鏡のライブイメージング像から抽出した経時写真を示す。

左気管支の遮断解除を行った後の再膨張群では、約 80%の肺胞が白色に蛍光発色しており、多くの肺胞内へ FITC 標識アルブミンが漏出していることが確認された。2 時間後までの肺胞の状態は、ごく一部の肺胞でアルブミン漏出の増悪が認められたのみで、観察開始時と比べて変化はわずかであった。肺胞の径は、黒色の含気を保つ肺胞で吸気時に約 100 から 180 μm であり、コントロール群より若干大きい肺胞が認

められた。呼気時はコントロール群と同様に若干縮小する肺胞がある一方で、含気を保つ肺胞のうちおよそ半数の肺胞においては肺胞径の呼吸性変化が認められなかった。白色に描出される FITC 標識アルブミンが漏出した肺胞は、隣接する肺胞との境界が不明瞭なため、肺胞径の測定が困難であった。また、コントロール群では毛細血管の血流が停滞なく一定の方向に流れていたのに対して、再膨張群の毛細血管では血流速度低下が認められる部位と認められない部位が混在して、一部では血流が完全に停止したり、順行と逆行を繰り返したりする部位も認められ、全体としては血流が遅かった。再膨張から 2 時間後まで肺毛細血管を観察すると、観察開始時と比べて全体的にはやや血流速度が低下した。図 2d-f に再膨張群の生体蛍光顕微鏡像のライブイメージング像から抽出した経時写真を示す。

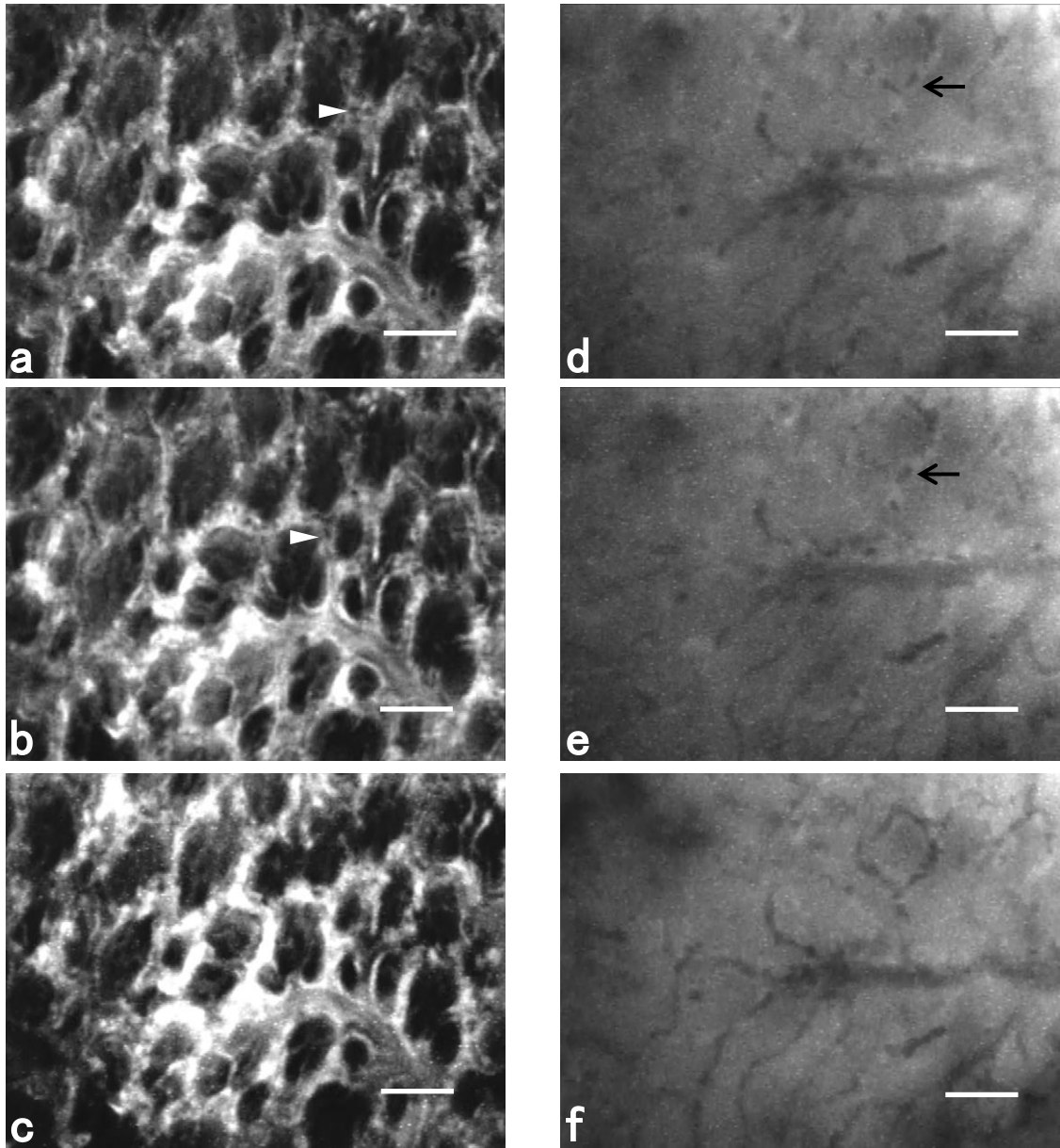


図2 肺の生体蛍光顕微鏡の経時像

- (a) コントロール群のライブイメージング像である。fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識アルブミンの存在する血管が白色に描出される。血管内の赤血球は黒点として描出される。全ての肺胞は黒色に描出され、アルブミンの漏出は認められない。
- (b) (a) の 0.23 秒後の像である。(a) および (b) の矢頭は同一の赤血球を示す。血流の停滞は認められない。
- (c) (a) の 2 時間後の像である。肺胞や血流に経時変化はない。
- (d) 再膨張群のライブイメージング像である。肺胞内には FITC アルブミンが漏出し、血管に加えて肺胞も白色に描出される。血管内の赤血球が黒点として描出される。
- (e) (d) の 0.23 秒後の像である。(d) および (e) の矢印は同一の赤血球を示し、コントロール群と比較して全般的に血流が遅い。
- (f) (d) の 2 時間後の像である。肺胞へのアルブミン漏出に経時変化はほとんどない。毛細血管内に停滞する赤血球数がやや増加した。

スケールバー: 100 μ m

光学顕微鏡での観察

左気管支遮断を行っていないコントロール群のラットの左胸部を再開胸し、直ちに含気が保たれている左肺を摘出して標本を作成した。HE 染色標本を光学顕微鏡で観察した。終末細気管支、肺胞管、肺胞嚢、肺胞を観察したが、正常肺の組織構造と違いが認められなかった。肺胞径は約 100 から 150 μm であった。肺胞中隔は薄く、中隔内に毛細血管が存在した。肺胞内にはごく少数の肺胞マクロファージが認められるのみで、赤血球は認められなかった。また、肺胞内に血漿の漏出は認められなかった(図 3a、b)。

再膨張群ラットの左気管支遮断解除を行って、左肺の含気を回復させた直後に作成した HE 染色標本を光学顕微鏡で観察した。終末細気管支、肺胞管、肺胞嚢、肺胞を観察した。肺胞径は約 80 から 150 μm で、コントロール群と比較して同レベルまたはやや小さい傾向にあった。終末細気管支、肺胞管、肺胞嚢も各々コントロール群と比較して径が同レベルまたは若干小さい傾向であった。ほとんどの肺胞内に血漿の漏出が認められた。漏出した血漿は、肺胞内が血漿成分で充満している部位と血漿成分と気体が混在して泡沫状を呈する部位が認められた。また、コントロール群と比較して、肺胞内に赤血球や肺胞マクロファージが多数認められた。肺胞中隔は、コントロール群と比較してやや肥厚していた(図 3c、d)。

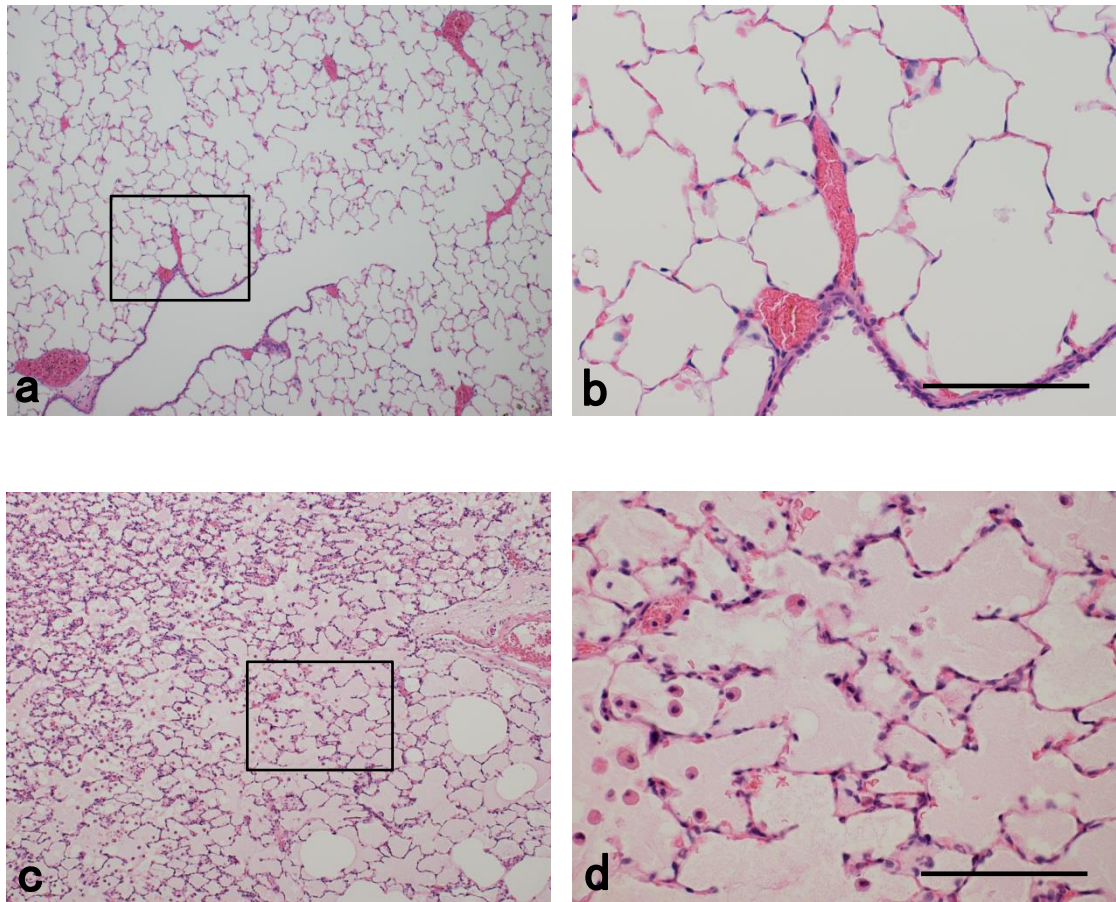


図3 ラット左肺の HE 染色標本の光学顕微鏡像

- (a) コントロール群の弱拡大像である。終末細気管支、肺胞管、肺胞囊、肺胞が観察されるが、正常の肺組織像を示している。肺胞内に血漿成分の浸潤は認められない。
- (b) (a) の黒枠の強拡大像である。肺胞内に肺胞マクロファージはほとんど認められない。肺胞出血像は認められない。
- (c) 肺を再膨張させてから 1 分後に摘出した再膨張群肺の弱拡大像である。大多数の肺胞内に血漿成分の浸潤が認められる。
- (d) (c) の黒枠の強拡大像である。肺胞マクロファージの増加および肺胞出血が観察される。

スケールバー:100 μ m (b、d)

電子顕微鏡での観察

前処置において左気管支遮断の処置を行わずに左開閉胸のみを行ったコントロール群肺における肺胞の内表面のほとんどは、扁平な I 型肺胞上皮細胞の細胞質で覆われていた。I 型肺胞上皮細胞の核が存在する領域は細胞質に厚みがあった。血液空気関門は、肺胞毛細血管、基底膜、そして菲薄な I 型肺胞上皮細胞の細胞質で形成されているが、その細胞質には多数の貪飲小胞が認められた。I 型肺胞上皮細胞どうしは閉鎖帯によって結合していた。肺胞の内表面の一部は立方形あるいは楕円形の II 型肺胞上皮細胞が存在していた。II 型肺胞上皮細胞の表面には微絨毛や細胞突起が存在し、細胞質には層板小体がみられた。

一般に大部分の肺胞隔壁は薄く、肺胞上皮間には毛細血管が観察される。一部の肺胞隔壁は厚みがあり、同部位には毛細血管の他に膠原線維や弾性線維などの結合組織成分、線維芽細胞などが存在していた。毛細血管は窓や孔がない内皮細胞で構成されている連続型毛細血管であり、細胞質には多数の貪飲小胞が存在していた。一部の貪飲小胞の膜は内皮細胞膜と連なり、小胞内が細胞膜外と交通していた。内皮細胞どうしは閉鎖帯で結合していた。毛細血管内には多数の赤血球と少数の白血球が存在し、血球は毛細血管内腔の形状に合わせて変形していた。肺胞上皮細胞と毛細血管内皮細胞の間には、薄く電子密度がやや高い基底膜の緻密層が存在していた(図 4a, b)。以上の電子顕微鏡観察による構造は、正常像であり前処置において偽手術のみを行った今回のコントロール群では、何らの変化は観察されなかった。

実験群である再膨張群の肺では、肺胞壁および肺胞壁を構成する細胞に微細構造上の変化が全例で観察された。肺胞壁の毛細血管は、一般に血球成分がやや多く観察され、さらに一部の血管内腔はやや拡張しているような様子を示していた。肺胞壁そのものに浮腫様の構造変化は原則として観察されなかった。肺胞壁の毛細血管

内皮細胞は正常と同様に菲薄な細胞質を提示することが大半であったが、血液空気関門部位の基底膜、そしてI型肺胞上皮細胞は微細構造上の変化を示した。図5aとbが示すように、基底膜は緻密層を挟むように存在する透明層と思われる部位、特に血管よりの層がやや拡張傾向を見せていた。I型肺胞上皮細胞は、胞体が若干肥厚しており、また、0.01から0.1 μm 径の小孔が多数形成されていた。さらに、同肺胞上皮細胞の一部が小さく欠損しているような像も観察された。肺胞上皮に小孔が形成されていた部分の血管内皮細胞には障害といえるような変化はなく閉鎖帯も密着したままの構造が保たれていた。このような変化は、すべての肺胞で観察されたわけではないが、比較的高い頻度で出現していた。さらに、血液空気関門を構成するI型肺胞上皮細胞・基底膜・血管内皮細胞が、層構造を保ったまま大きく裂け、その裂傷部から赤血球が肺胞内へ漏れているかのような像が時々観察された(図6)。

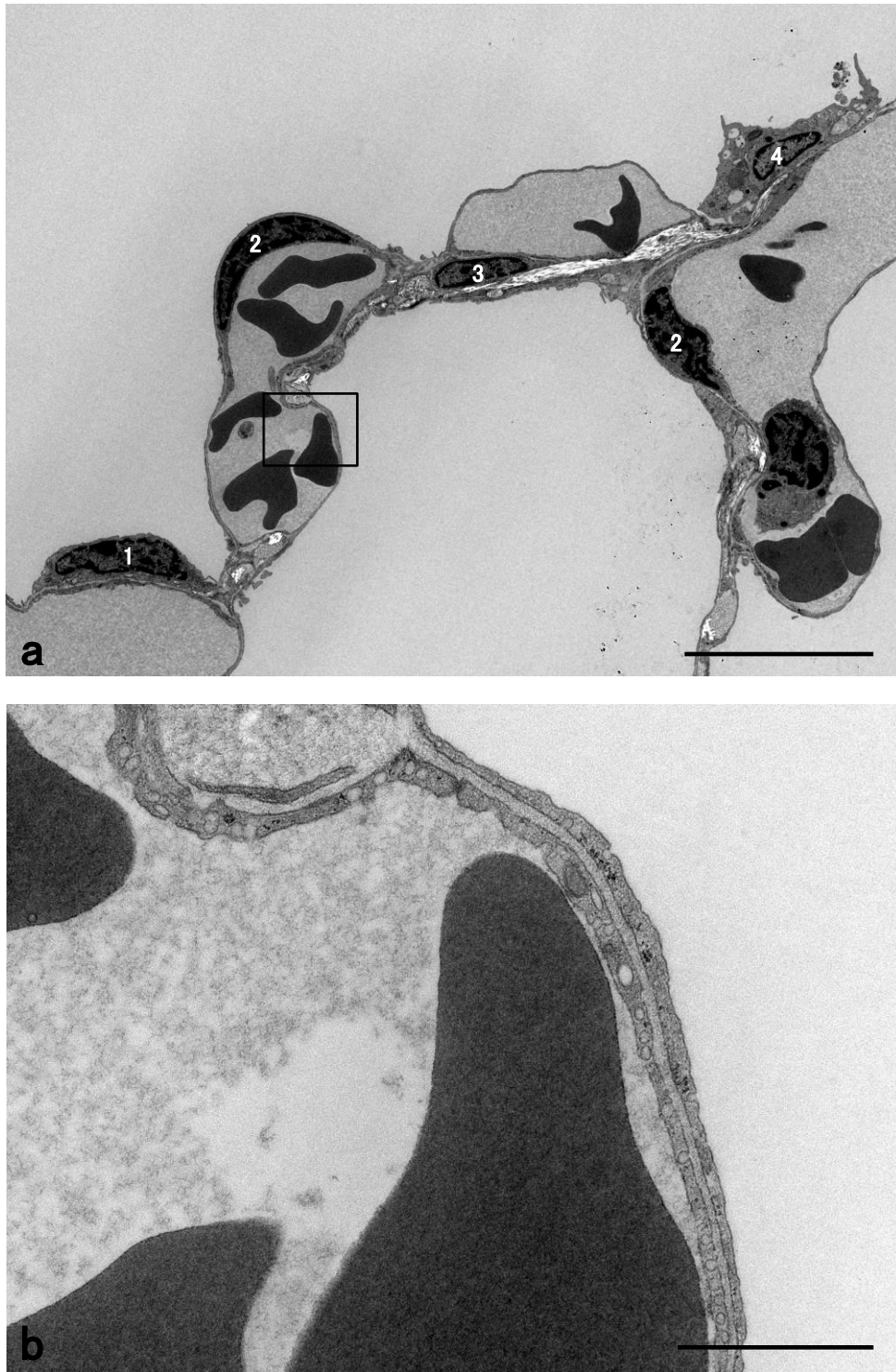


図4 コントロール群のラット肺の電子顕微鏡像

(a) コントロール群の肺胞構造は正常組織像を呈している。(1) はI型肺胞上皮細胞、(2) は線維芽細胞、(3) は血管内皮細胞、(4) はII型肺胞上皮細胞を各々示す。

(b) (a) の黒枠の拡大した像である。血液空気関門には血管内皮細胞、基底膜緻密層、I型肺胞上皮細胞が観察される。

スケールバー:10 μm (a)、1 μm (b)

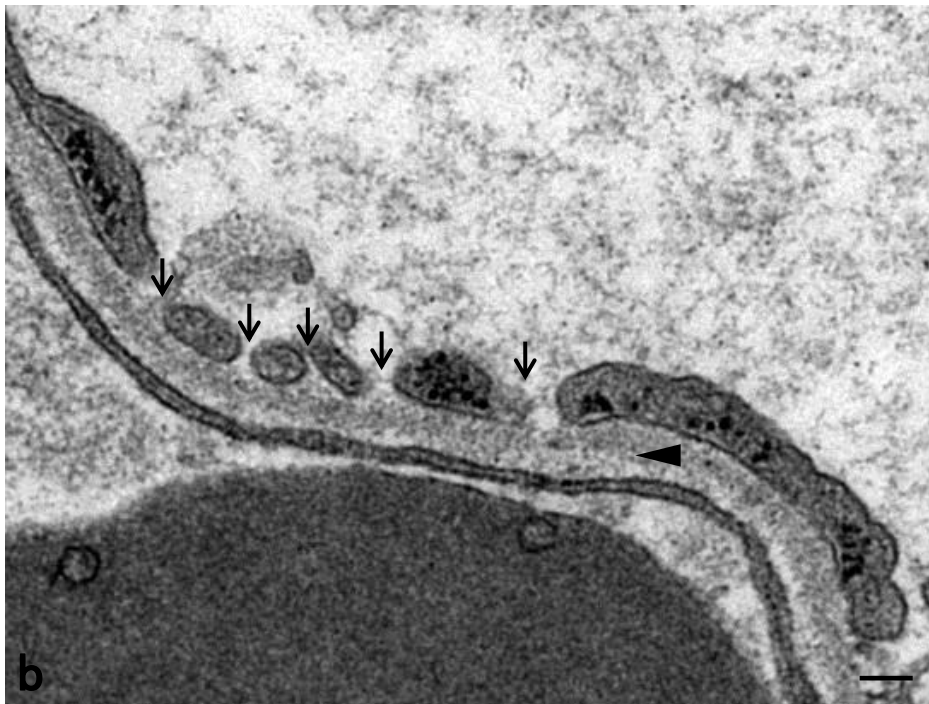
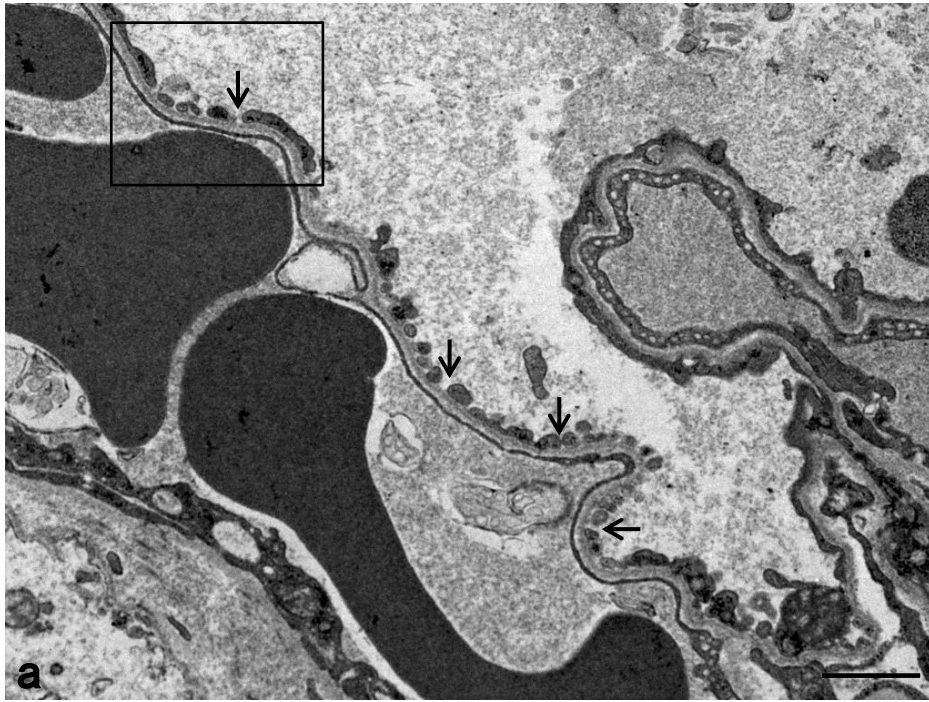


図5 再膨張群のラット肺の電子顕微鏡像

(a) 再膨張群の一部のI型肺胞上皮では、小孔(矢印)が多数形成されている。

(b) (a)の黒枠の拡大像である。0.01から0.1 μm 径の小孔(矢印)が認められた。I型肺胞上皮の胞体は軽度肥厚していた。血管内皮の形態はコントロール群と著変はない。矢頭が示す基底膜はやや肥厚する傾向を示している。

スケールバー:1 μm (a)、0.1 μm (b)

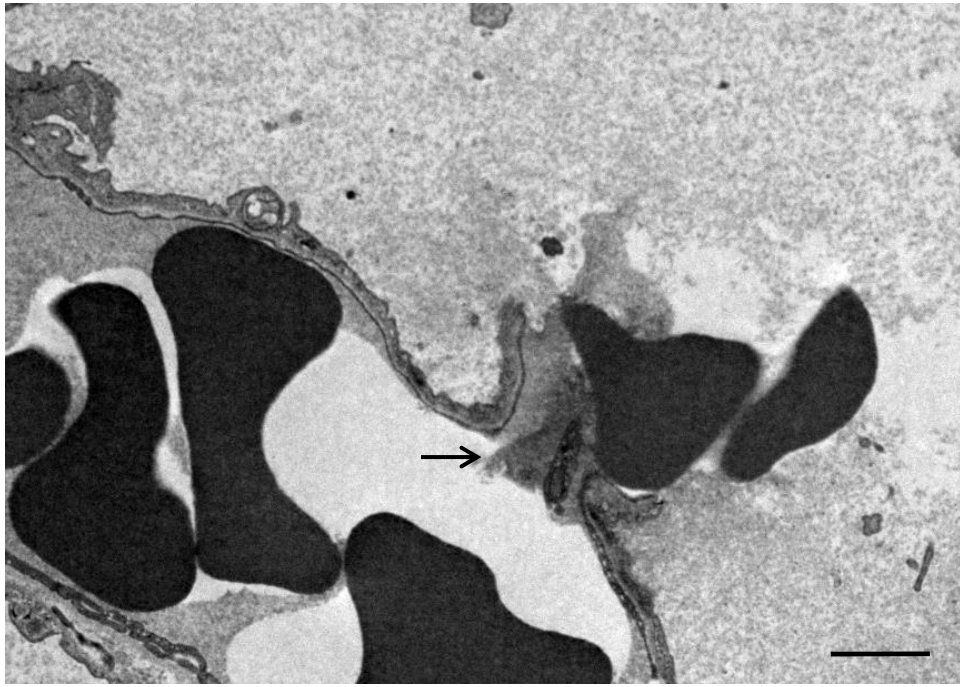


図6 再膨張群のラット肺の電子顕微鏡像
肺胞壁が血液空気関門を構成する層構造を保ったまま大きく裂けており、赤血球が肺胞に漏れているような像を呈している(矢印)。
スケールバー：1 μ m

電子顕微鏡を用いた HRP のトレーサー実験

コントロール群の毛細血管内腔には HRP の酵素反応により発生した DAB の反応産物が観察されたが、肺胞内腔には全く認められなかった(図 7a、b)。毛細血管内皮細胞間および肺胞上皮細胞間も結合の離開などはなく(図 7b)、血液空気関門を中心とする肺胞壁構造に異常は認められなかった。一方、図 7b が示すように血管内皮細胞には貪飲小胞が比較的頻繁に観察されたが、その内腔には DAB の反応産物が観察された。血液空気関門の基底膜は、透明層(血管内皮側)-緻密層-透明層(肺胞上皮側)の三層で構成されるが、そのうち両側の透明層ないしその外側と思われる部位(基底膜領域と呼ぶ)に DAB の反応産物が若干淡く観察された。しかし、I型肺胞上皮細胞の薄い細胞質内を詳しく観察すると、時として貪飲小胞が見られたが小胞内に DAB の反応産物が観察されることはなかった。

図 8a と b が示すように、再膨張群では全例で HRP の酵素反応により発生した DAB の反応産物が肺胞上皮の肺胞内表面の広い範囲に薄く付着していた。さらに血管内皮細胞の貪飲小胞内と基底膜ないし基底膜領域にも DAB の反応産物がみられた。コントロール群における基底膜領域での沈着と比較すると、その程度は高いものであった。主に毛細血管側と肺胞上皮細胞側の透明層と思われる部位に強く沈着しているようである。また、一部の肺胞では、I 型肺胞上皮に多数の小孔が形成されていたが、小孔部から肺胞内表面にかけて DAB の反応産物が存在していた。HRP を投与していない場合と同様に、肺胞上皮に小孔が形成されていた部分の血管内皮細胞には小孔は形成されていなかった。

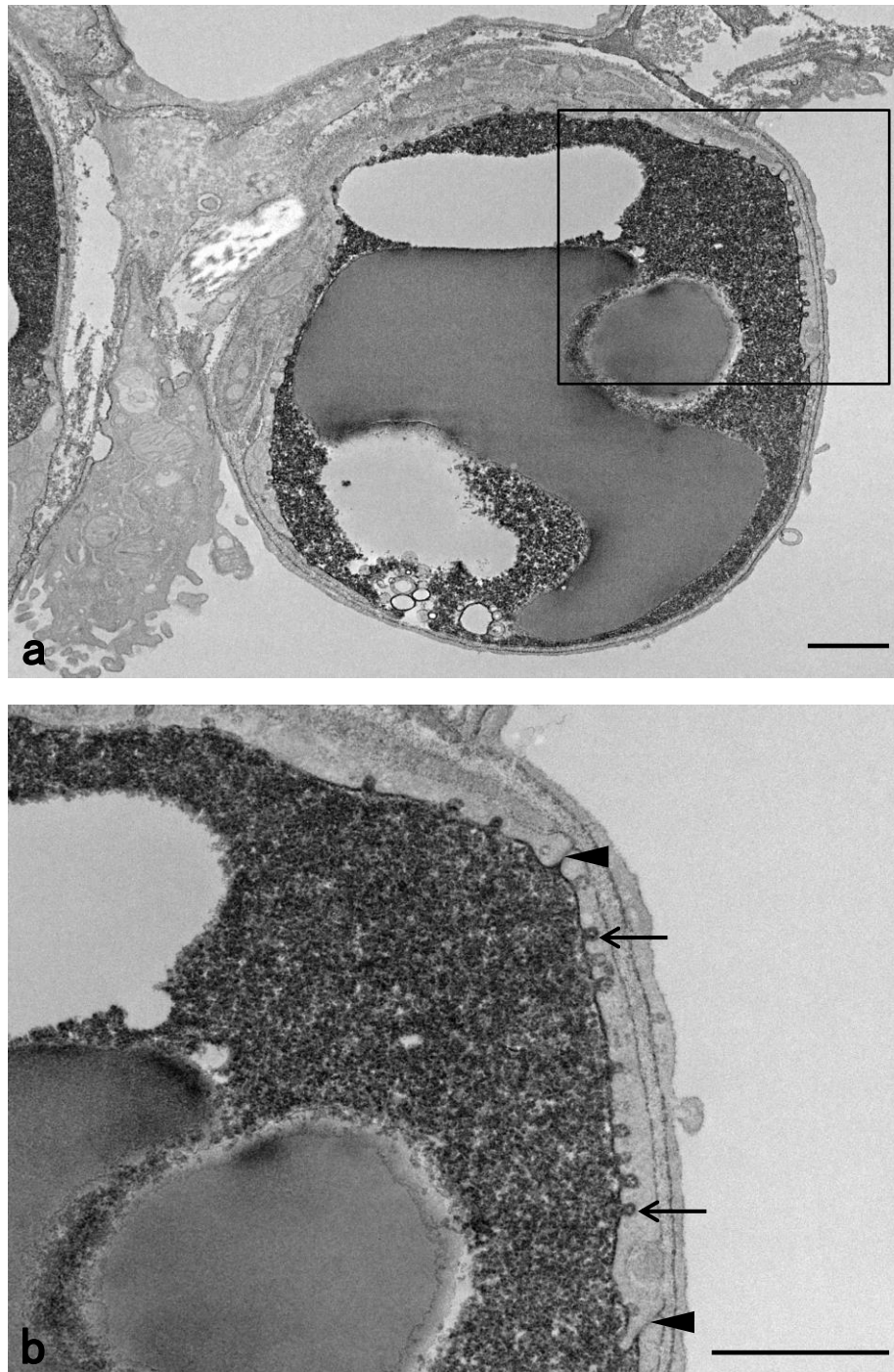


図7 horseradish peroxidase (HRP) を投与したコントロール群のラット肺の電子顕微鏡像

- (a) コントロール群では毛細血管内 DAB 反応産物が充満しているが、肺胞に DAB 反応産物は認められない。
- (b) (a) の黒枠の拡大像である。矢印が diaminobenzidine (DAB) 反応産物を取り込みつつある貪飲小胞で、矢頭が内皮細胞間の閉鎖帯を示している。DAB 反応産物が基底膜の透明層が存在すると思われる部位にも認められる。
- スケールバー:1 μ m(a, b)

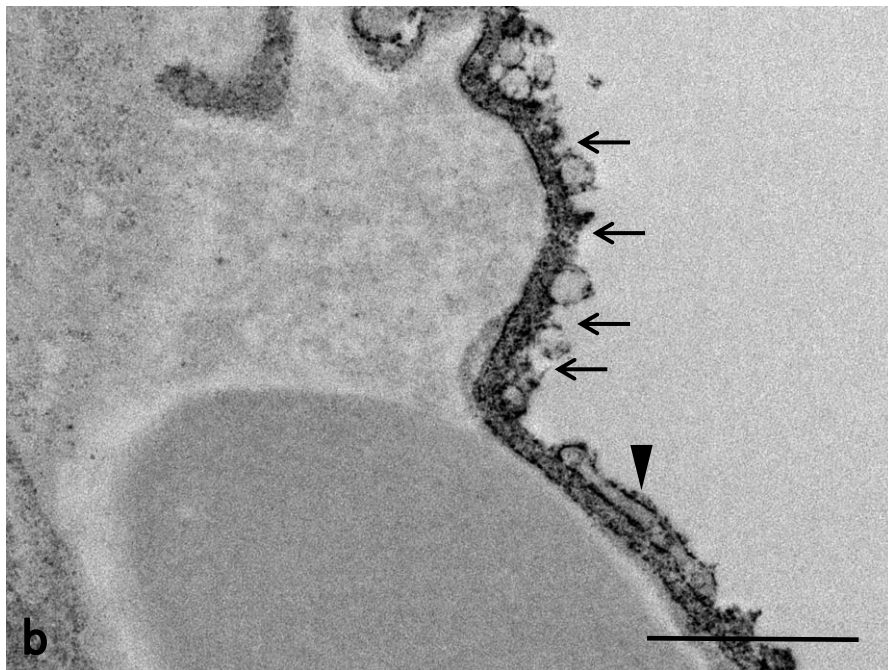
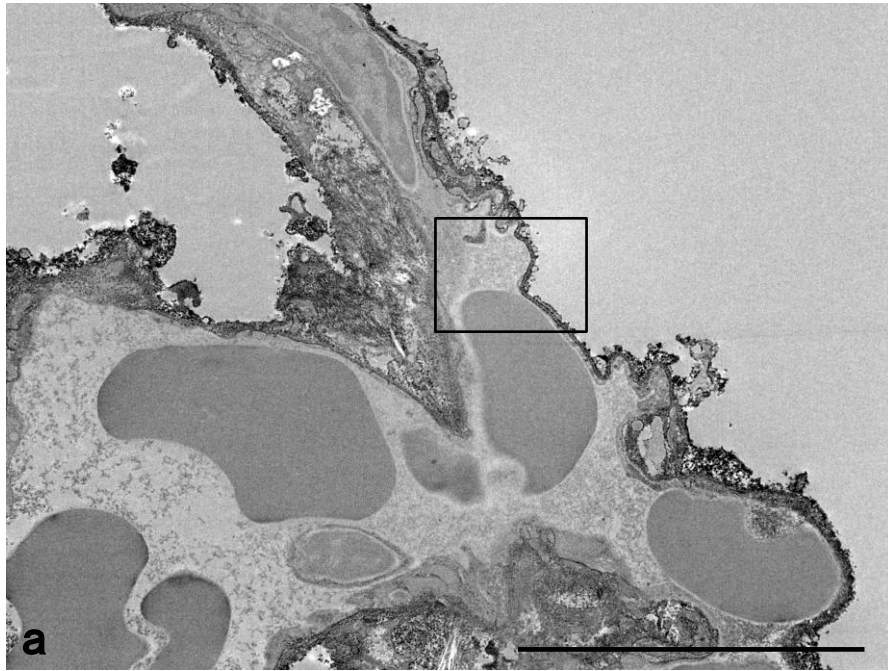


図 8 HRP を投与した再膨張群の肺の電子顕微鏡像

- (a) 再膨張群では DAB 反応産物が肺胞内表面に薄く広範に付着している。
- (b) (a) の黒枠の拡大像である。矢印が肺胞上皮に形成された多数の孔を示し、矢頭が肺胞内表面に認められる DAB 反応産物を示している。また、基底膜および基底膜領域に同反応産物が強く観察される。HRP の肺胞腔への漏出が多いためその過程で沈着しているものと思われる。

スケールバー: 10 μm (a)、1 μm (b)

考察

本研究において、ラット再膨張性肺水腫モデルを作成し、肺の肉眼観察、生体蛍光顕微鏡を用いたライブイメージング観察、光学顕微鏡観察を行い、再膨張性肺水腫が肺再膨張の直後に発症すること、肺毛細血管の血流に局所的な停滞等が認められることがわかった。また、電子顕微鏡観察、HRP 投与個体の電子顕微鏡観察を行い、I 型肺胞上皮に形成された小孔あるいは肺胞壁損傷部から肺胞へ血漿成分が漏出することがわかった。

再膨張性肺水腫は、肺虚脱が 3 日間以上継続して肺が再拡張した際に発症し、肺の再膨張後の比較的早期のうちに発症することが多いことが示唆されてきた [4]。原因は未だ不明であるが、少なくともある程度の肺虚脱期間がないと再膨張性肺水腫は起こらない。一方、本研究では図 1c、d の写真が示すように、肺の再膨張から 10 秒以内に肺再膨張肺に斑状発赤が出現しており、再膨張性肺水腫は想定されているよりもさらに短時間内に発症することが強く示唆された。

再膨張性肺水腫が起こる様子を経時的に観察するためには、疾患モデルを生体観察することが有用である。これまで様々な方法が肺微小循環の観察法として開発されてきた。1925年にHall [12] が透過照明を用いて肺血管の生体観察を行って以降、胸壁開窓部に接合したガラスからの観察法 [13]、呼吸性変動を減らす観察法 [14]が報告されてきたが、これらは可視光での観察であるため、赤血球動態に限定された観察であった。1965年にWitteは蛍光顕微鏡を用いることにより血漿成分の動態観察に成功した [15]。本実験での生体観察はEndoらの方法を改変して施行した [9]。この方法は、吸引器による陰圧を用いて観察肺を固定しており、常時陰圧である胸腔内の状態を良好に再現しつつ観察ができるという利点がある。また、肺表面の広範囲を観察できる点が優れており、これまで報告されている観察法よりはるかに優れた手法と思わ

れる。

Sohara らは再膨張性肺水腫の生体観察で、肺毛細血管では血流の低下あるいは停止が認められたと報告した [16]。本研究では図 2d、e の生体顕微鏡観察の経時写真が示したとおり、再膨張性肺水腫の肺毛細血管の血流は全体としては低下しており、流速低下を認めた血管の他に、流速が変わらない部位、血流が停止した部位、一過性の逆流を繰り返す部位も認められた。均一に肺水腫が起こっているようでも、個々の毛細血管の血流変化は一様ではないことがわかった。肺胞壁に多様な微小障害が起きていることが推察される。

蘇原らは再膨張性肺水腫ラット生体観察で、肺再膨張直後には約半数の肺胞内のみでアルブミン漏出が認められ、肺再膨張の 20 分後にかけてほとんどの肺胞内にアルブミンが漏出するようになったと報告した [17]。本研究では図 2d で示されたように、肺再膨張の直後から血漿成分が約 80%の肺胞へ漏出しており、肺水腫が肺再膨張直後から広範に起こることがわかった。肺水腫発症直後から 2 時間後まで肺胞への血漿漏出の状態にほぼ経時変化がなく、発症直後に肺水腫が概ね完成してしまったと考えられた。本研究では肺を再膨張させる際に終末呼気陽圧も併用した陽圧換気を行って虚脱肺全体が均一に再膨張するようにしており、換気条件の違いにより肺水腫発症時間の差異が生じた可能性がある。また、本研究の図 3c が示すように、肺の再膨張直後に肺胞への血漿漏出が認められ、肺水腫が起こったことが光学顕微鏡観察でもさらに確認できた。

一方、低酸素により活性化される低酸素誘導因子 (hypoxia-induced factor-1: HIF-1) は血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現を亢進させることが報告されている [18]。さらに VEGF は単球や肺胞マクロファージを遊走させる [19、20]。本研究の結果では、再膨張性肺水腫が発症した直後の肺胞内に既に肺胞マクロファージの増加が認められていた (図 3c、d)。このことは再膨張する以前

から虚脱した肺組織内において HIF-1、VEGF 系が動いていたことを示唆している。また、本研究の図 3d が示すように肺泡出血が認められた。肺泡壁透過性亢進だけでは多量の肺泡出血が起こることを説明できず、再膨張時に局所的な肺泡壁損傷が起こったことが併せて考えられる。

再膨張性肺水腫の原因を追究するために電子顕微鏡で観察した研究報告は少なく、Sohara の報告 [8]があるに過ぎない。一方、他の原因による肺水腫の電子顕微鏡観察ではいくつかの報告がなされている。Cottrell らは、①肺静水圧性肺水腫の電子顕微鏡像を観察し、肺泡壁の膠原線維組織が存在する部位に浮腫が認められるのみで、上皮・基底膜・内皮からなる血液空気関門には変化が認められなかった、②アロキサン誘発肺水腫電顕像では、上皮・内皮ともに細胞断裂が認められたが、肺泡間質の浮腫は認められなかったと報告している [21]。一方、神経原性肺水腫では毛細血管内皮細胞および I 型肺泡上皮細胞の膨化と胞体内貪飲小胞増加が認められている [22]。本研究の図 4,5 が示すように、再膨張群では血管内皮細胞の変形や胞体間隙の離解はほとんど認められず、肺泡上皮細胞に 0.01 から 0.1 μm 径の小孔形成が認められた。この肺泡上皮細胞の変化は過去に報告がない。さらに、肺泡壁が層構造を保ったまま損傷している像が確認された(図 6)。これらの微細組織構造上の変化は、上記の肺静水圧性肺水腫、アロキサン誘発肺水腫、神経原性肺水腫においてみられた所見とは全く異なるものである。同じ肺水腫であっても、その発症原因の違いにより異なる電子顕微鏡像を呈することが明らかとなった。

再膨張性肺水腫の発生機序には、サイトカインなどの化学伝達物質を起因として肺微小血管における肺泡透過性の変化が起こるという考え方と、再膨張時に肺泡が伸展されて物理的な損傷が起こることにより発生するという考え方がある。前者を支持する報告には、肺血流低下により肺泡に白血球が集積し： [23]、好中球エラスターゼが増加することにより肺泡が損傷して透過性が亢進するという報告 [24]、interleukin-8

および leukotriene B₄ が肺胞内で増加して血管透過性が亢進するという報告 [25]、その他に monocyte chemoattractant protein 1 増加 [26] やフリーラジカル発生 [27] が再膨張性肺水腫と関連するとの報告もある。再膨張性肺水腫は虚脱肺と反対側の肺も肺水腫になることが希にあると報告されている [28] ことより、再膨張性肺水腫は物理的な機序だけではなく、サイトカイン等の影響がある可能性は否定できない。しかしながら、本研究の図 5 で示した肺胞上皮細胞の小孔形成や図 6 で示した肺胞壁損傷は、肺が拡張される際に物理的作用で起こり、この事象が再膨張性肺水腫の初期段階を引き起こしたと考えられる。この発症機序を支持する研究もいくつか報告されている。Funakoshiらは炎症性サイトカイン上昇が必ずしも肺胞透過性亢進には関連しないことを指摘している [29]。また、Nakamura らは肺胞内の多形核白血球エラスターゼ上昇のピークが肺再膨張の 19 時間後と遅いタイミングであることを指摘しており [25]、サイトカインが原因とすることは、肺の再膨張直後から肺水腫が進行していた本研究の結果と矛盾する。Woodring は、無気肺部と含気部が混在した肺が再膨張すると、無気肺だった部位のみに肺水腫が発症する事象が低酸素性障害に起因すると述べている [30] が、本研究で示したような物理的機序でもこの事象には矛盾しないと考える。以上のように、本研究の結果はサイトカイン等による再膨張性肺水腫の発生機序を否定するものではないが、少なくとも発症初期の段階では、サイトカインによる機序ではなく、本研究が示唆するような物理的機序が主因であると考えられる。

Graham らは HRP をトレーサーとした実験法を開発した [31]。HRP の分子量が 44 kD、アルブミンの分子量が 66 kD であることより、アルブミン動態を観察するのに HRP をトレーサーとして利用することができる。Karnovsky は血管透過性の研究に HRP を用いることに成功し [32]、さらに Schneeberger-Keeley らは HRP を肺胞毛細管透過性の研究に応用した [33]。電子顕微鏡下に物質の移動を可視化できる方法であり、特に本研究の目的達成のためには最適な研究手法であると考えられる。肺胞内に投与された

HRP などの微細粒状物は、数分以内に肺胞から貪飲小胞を介して I 型肺胞上皮細胞を通過し、さらに基底膜を通過し、毛細血管内皮細胞の貪飲小胞を介して血管腔へ到達するが、逆に血管内からの HRP の移動は基底膜までに留まり、I 型肺胞上皮細胞内の貪飲小胞や肺胞腔への到達はきわめて少ないと報告されている [34]。また、Simionescu らは、毛細血管内小分子が血管内皮細胞の貪飲小胞を介して血管内から基底膜へ 45 秒間で到達すると報告している [35]。これらの過去の報告は今回のコントロール群における所見、つまり、HRP 反応産物が血管内皮内の貪飲小胞および肺胞上皮側の基底膜透明層と思われる部位まで取り込まれていたが、肺胞上皮内の貪飲小胞や肺胞腔には HRP 反応産物が認められなかった点とほぼ一致し、本研究の方法論としての妥当性を裏付けているものと考えられる。

心原性肺水腫では HRP が毛細血管ではなく、細動脈から細気管支へ漏れ [36]、エンドトキシン誘発肺損傷では HRP が毛細血管ではなく、細動脈および細静脈から肺胞へ漏れていた [37] という興味深い報告がある。一方、再膨張性肺水腫では肺胞上皮の小孔形成に伴って、HRP が基底膜から肺胞へ移動すること(図 8)が本研究で初めて解明され、前述の疾患とは全く異なる経路で血漿成分が移動していることがわかった。

以上のように、ラット再膨張性肺水腫モデルの形態観察実験を行うことにより、再膨張性肺水腫が肺再膨張の直後に発症することがわかり、さらに I 型肺胞上皮に形成された小孔あるいは肺胞壁損傷部から肺胞へ血漿成分が漏出することが判明した。この事象は再膨張性肺水腫の発症初期段階において特に重要な機序であると推察される。

本研究の実験モデルは、肺の情報が生体から直接的、経時的に得られる優れた方法であり、再膨張性肺水腫の予防法や治療法の開発などへの研究応用が可能であると考えられる。また、この実験手法を用いた他疾患の病態解析への応用も期待される。

結論

1. 再膨張性肺水腫の発症機序を解明するために、ラット再膨張性肺水腫モデルを作成して形態観察を行った。
2. 蛍光顕微鏡での生体観察を行い、再膨張性肺水腫が肺再膨張の直後に発症すること、肺毛細血管の血流に局所的な停滞が認められることが分かった。
3. 電子顕微鏡観察を行い、再膨張性肺水腫ではI型肺胞上皮に形成された小孔あるいは肺胞壁損傷部から肺胞へ血漿成分が漏出することが分かり、再膨張性肺水腫の発症初期段階の機序として重要な事象であると推察された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、自治医科大学大学院において多くのご援助を頂きましたことに御礼申し上げます。

解剖学講座機能細胞学の屋代隆教授には、研究の場をご提供頂き、研究立案から実験指導、本稿執筆に至るまで多岐にわたりご指導、ご助言を頂きました。同研究室の諸先生方には、データ処理から論文表記法まで、幅広く詳細にご指導頂き、誠にありがとうございました。特に幸喜富博士には電子顕微鏡観察用試料作成にご協力を頂き、感謝しております。

呼吸器外科医局の諸先生方および研究助手の皆様には、社会人大学院生である私を公私ともにご援助頂きました。特に、指導教官である外科学講座呼吸器外科学部門の遠藤教授には、研究のご指導、ご助言のみならず、臨床の場においても多岐にわたるご支援を頂きました。心より深謝いたします。

参考文献

1. Robin ED, Cross CE, Zelis R (1973) Pulmonary edema (second of two parts). *N Engl J Med* 288: 292-304.
2. Riesman D (1902) Albuminous expectoration following thoracocentesis. *Am J Med Sci* 123: 620-630.
3. Carlson RI, Classen KL, Gollan F, Gobbel WG Jr, Sherman DE, et al. (1958) Pulmonary edema following the rapid reexpansion of a totally collapsed lung due to a pneumothorax: a clinical and experimental study. *Surg Forum* 9: 367-371.
4. Mahfood S, Hix WR, Aaron BL, Blaes P, Watson DC (1998) Reexpansion pulmonary edema. *Ann Thorac Surg* 45: 340-345.
5. Abunasser J, Brown R (2010) Safety of large-volume thoracentesis. *Conn Med* 74: 23-26.
6. Taira N, Kawabata T, Ichi T, Yohena T, Kawasaki H, et al. (2014) An analysis of and new risk factors for reexpansion pulmonary edema following spontaneous pneumothorax. *J Thorac Dis* 6: 1187-1192.
7. Meeker JW, Jaeger AL, Tillis WP (2016) An uncommon complication of a common clinical scenario: exploring reexpansion pulmonary edema with a case report and literature review. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 6: 32257.
8. Sohara Y (2008) Reexpansion pulmonary edema. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 14: 205-209.
9. Endo S, Sohara Y, Murayama F, Yamaguchi T, Hasegawa T, et al. (2003) Real-time visualization of partial liquid ventilation in a model of acute lung injury. *Surgery* 133: 207-215.

10. Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212.
11. Mabuchi Y, Maruyama H, Yashiro T, Tanida S, Kurono C, et al. (1996) Sealing of the follicular lumen of the anterior pituitary gland of the male rat. *Tissue Cell* 28: 631-635.
12. Hall HL (1925) A study of the pulmonary circulation by the trans-illumination method. *Am J Physiol* 72: 446-457.
13. Terry RJ (1939) A thoracic window for observation of the lung in a living animal. *Science* 90: 43-44.
14. Irwin JW, Burrage WS, Aimar CE, Chesnut RW Jr. (1954) Microscopical observations of the pulmonary arterioles, capillaries, and venules of living guinea pigs and rabbits. *Anat Rec* 119: 391-407.
15. Witte S (1965) Investigations of transvascular plasma passage with fluorescent microscopic technique. *Bibl anat* 7: 218-222.
16. Sohara Y, Endo S, Sato Y, Hasegawa T, Tetsuka K, et al. (2006) Vital observation of pulmonary microcirculation. *J Jpn Soc Respir Endoscopy* 28: 20-31.
17. 蘇原泰則, 三井清文, 堀原一 (1986) 再膨張性肺水腫. *外科* 48: 237-244.
18. Semenza GL (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8: 588-594.
19. Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tijburg P, et al. (1993) Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood* 81: 2767-2773.
20. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, et al. (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is

mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87: 3336-3343.

21. Cottrell TS, Levine OR, Senior RM, Wiener J, Spiro D, et al. (1967) Electron microscopic alterations at the alveolar level in pulmonary edema. *Circ Res* 21: 783-797
22. 松浦覚, 佐々木正道 (1970) 気管支肺胞系末梢部の超微形態: 肺水腫. *日本胸部疾患学会雑誌* 8: 123-124.
23. Thommasen HV, Martin BA, Wiggs BR, Quiroga M, Baile EM, et al. (1984) Effect of pulmonary blood flow on leukocyte uptake and release by dog lung. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 56: 966-974.
24. Suzuki S, Tanita T, Koike K, Fujimura S (1992) Evidence of acute inflammatory response in reexpansion pulmonary edema. *Chest* 101: 275-276.
25. Nakamura H, Ishizaka A, Sawafuji M, Urano T, Fujishima S, et al. (1994) Elevated levels of interleukin-8 and leukotriene B4 in pulmonary edema fluid of a patient with reexpansion pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 1037-1040.
26. Sakao Y, Kajikawa O, Martin TR, Nakahara Y, Hadden WA 3rd, et al. (2001) Association of IL-8 and MCP-1 with the development of reexpansion pulmonary edema in rabbits. *Ann Thorac Surg* 71: 1825-1832.
27. Sivrikoz MC, Tunçözgür B, Cekmen M, Bakir K, Meram I, et al. (2002) The role of tissue reperfusion in the reexpansion injury of the lungs. *Eur J Cardiothorac Surg* 22: 721-727.
28. Heller BJ, Grathwohl MK (2000) Contralateral reexpansion pulmonary edema. *South Med J* 93: 828-831.
29. Funakoshi T, Ishibe Y, Okazaki N, Miura K, Liu R, et al. (2004) Effect of re-expansion after short-period lung collapse on pulmonary capillary permeability

- and pro-inflammatory cytokine gene expression in isolated rabbit lungs. *Br J Anaesth* 92: 558–563.
30. Woodring JH (1997) Focal reexpansion pulmonary edema after drainage of large pleural effusions: clinical evidence suggesting hypoxic injury to the lung as the cause of edema. *South Med J* 90: 1176–1182.
 31. Graham RC Jr, Karnovsky MJ (1966) The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 14: 291–302.
 32. Karnovsky MJ (1967) The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J Cell Biol* 35: 213–236.
 33. Schneeberger–Keeley EE, Karnovsky MJ (1968) The ultrastructural basis of alveolar–capillary membrane permeability to peroxidase used as a tracer. *J Cell Biol* 37: 781–793.
 34. Tsukune H, Ueda S, Hayashi K, Matsumoto S, Hayashida F, et al. (1973) Electron microscopic study on absorbability of airway wall. *Jpn J Clin Electron Microscopy* 6: 346–347.
 35. Simionescu N, Simionescu M, Palade GE (1973) Permeability of muscle capillaries to exogenous myoglobin. *J Cell Biol* 57: 424–452.
 36. Yoneda K (1980) Anatomic pathway of fluid leakage in fluid–overload pulmonary edema in mice. *Am J Pathol* 101: 7–16.
 37. Nagata N, Sueishi K, Tanaka K (1991) Anatomic pathway of pulmonary fluid leakage in endotoxemia induced in rats. The red blood cell packing method and its application. *Am J Pathol* 138: 183–193.