

0.28 MPa 酸素曝露により生じた亜鉛欠乏ラットの肺組織障害

永木由佳¹⁾, 野寺 誠¹⁾, 宮崎正己²⁾

(1)埼玉医大・保健医療学部健康医療科学科*, (2)早稲田大・人間科学部**)

Changes in Lung Tissue of Zinc Deficiency Rats Following Exposure to 0.28 MPa Oxygen

Yuka EIKI¹⁾, Makoto NODERA¹⁾ and Masami MIYAZAKI²⁾¹⁾School of Medical Technology and Health, Faculty of Health and Medical Care, Saitama Medical University,²⁾Faculty of Human Sciences, Waseda University

Summary

In recent years, it has been suggested that Zinc deficiency causes alteration in the biological defense system. To examine the effects of hyperbaric oxygen therapy (HBO) on the lung tissues of zinc deficiency models, zinc deficient rats were investigated morphological changes and the expression of TNF- α , Cu/Zn SOD, ED₁ and iNOS in the lung tissues by immunohistochemically after exposure to high pressure using pure oxygen. In the present study, two special diets were prepared; a zinc deficient diet and a standard diet (0.05 % Zn). Seven weeks old SD strain rats were fed either on a Zn deficient (Zn-D, n=12) or a standard diets (Control, n=12) for 6 weeks. Six of ZnD and 6 of Control were exposed to 0.28 MPa using pure oxygen for 60 minutes in a hyperbaric chamber (ZnD-O₂ and Control-O₂). After decompression to surface, histopathological and immunohistochemical examination of lung tissues of rats in the 4 groups were carried out. Mild pathological changes such as congestion, destruction of alveoli and the appearance of inflammatory cells were seen in the ZnD-O₂. Expression of ED₁ and iNOS decreased in ZnD-O₂. Changes in the expression of TNF- α and Cu/Zn SOD did not seen in ZnD, Control-O₂, ZnD-O₂. These findings suggest that zinc deficiency reduces the threshold level of oxygen toxicity in lung tissues. These results also suggest that hyperbaric oxygen therapy causes the lung damage in patients under zinc deficiency condition. Moreover, the results in immunohistochemical study after oxygen exposure indicate that zinc deficiency causes alteration in the normal biological defense system.

亜鉛 (Zn) は、300 種類以上の酵素活性に関与するなど、生体にとって不可欠な微量元素である。亜鉛欠乏時には、成長障害や味覚異常、脱毛、皮膚炎、生殖能低下など多様な症候がみられることが知られている^{1,2)}。しかしながら、生体内における亜鉛の存在量は微量であり、しかも生体内に広く分布しているため、亜鉛の役割や欠乏時にみられる症候の機序に不明な点が多い。近年、亜鉛欠乏状態では感染に対する抵抗性が低下することが指摘されている^{3,4)}。ラットを亜鉛欠乏食で飼育すると、すみやかに胸腺の萎縮が始まる。この現象は、胸腺細胞で apoptosis の亢進が急速に起こることに起因する^{1,4)}。また、この現象と亜鉛欠乏時の易感染性など生体防御機構の変化との関連性についても、いまだ詳細は解明されるに至っていない。しかしながら、これらの報告は、亜鉛が生体防御機構にも深く関与する微量元素であり、その欠乏は感染など外的侵襲要因に対する抵抗性の減弱をもたらすことを裏付けるものと考え

られる。

慢性気管支炎や肺気腫などの慢性閉塞性呼吸器疾患 (COPD, chronic obstructive pulmonary disease) をはじめとする呼吸器疾患の重症例では高分圧酸素の吸入を長期間にわたり継続する必要がある⁵⁾。また、脳梗塞の陳旧例や一酸化炭素中毒など末梢循環障害が甚だしく、組織レベルで hypoxia が起こっている場合には、高気圧治療装置内で 100% 酸素を呼吸用ガスとして用いる高圧酸素療法 (HBO, hyperbaric oxygen therapy)^{6,7)} が行われる。これらの場合、治療方法の違いにより高圧酸素の曝露条件は異なるが、いずれの場合においても酸素中毒が起こらないような曝露条件が考慮されている。

前報で、著者らは亜鉛欠乏状態にあるラットでは血清中の SOD (superoxide dismutase) 活性が低下することを確認した⁸⁾。また、Zn 欠乏ラットを高圧酸素曝露した場合には、亜鉛欠乏でないラットに比べて肺に強い組織傷害がみ

*所在地：埼玉県日高市山根 1397-1 (〒350-1241)

**所在地：埼玉県所沢市三ヶ島 2-579-15 (〒359-1192)

られることも報告した。この結果は、亜鉛欠乏状態にある患者に HBO を行った場合、肺に対する影響はさらに増強する可能性を示唆するものである。本研究は、亜鉛欠乏モデルを作製し、亜鉛欠乏状態にあるラット肺組織に対する高分圧酸素曝露の影響を主としてマクロファージの存在を示す ED₁ および誘導型の NOS (nitric oxide synthase) である iNOS (inducible NOS) などの発現性を免疫組織学的に調べることにより、炎症性変化の観点から検討した。

実験方法

亜鉛欠乏食と標準食の2種類の特別食を用意した⁹⁾。標準食は亜鉛欠乏食 100 g 当たり 5 mg の亜鉛を添加したものであり、亜鉛含有量以外は同一成分とした。実験動物には体重 105~115 g の6週齢SD系雄ラットを使用した。飼料や飼育環境の変化に馴れ、ストレスの影響を少なくすることを目的に、これらを個別ケージに入れ、今回用意した特別食の一つである標準食で1週間飼育した。その後、標準食または亜鉛欠乏食で6週間飼育を継続した。飼育期間中、体重変化と皮膚症状発現の有無を観察した。飼料は1日1回、同じ量を与え、すべてのラットが同一カロリーを摂取するようにした。飲水には蒸留水を用い、自由摂取とした。亜鉛欠乏食で飼育したラットを亜鉛欠乏群 (ZnD)、標準食で飼育したラットをコントロール群 (Control) とし、それぞれ12匹ずつ飼育した。ZnD 12匹中の6匹と Control 12匹中の6匹は、動物用高圧タンクに入れ、0.28 MPa にて60分間、100% 酸素で加圧した (Fig. 1)。

0.28 MPa の酸素環境に滞在中、高圧タンク内の CO₂ 濃度が高くないように、常時、100% 酸素を送気しながら保圧した。高圧酸素曝露中は、四肢または全身の痙攣など酸素中毒の症状の有無を確認するため、ラットの動作を随時観察した。加圧開始から60分後、減圧時の肺損傷を予防するため、大気圧 (0.1 Mpa) まで総減圧時間に3分間かけて直線的に減圧した。減圧中および減圧終了から60分間、ラットの状態を観察し、鼻もしくは口からの血性泡沫の有無などの減圧障害がないことを確認した。

減圧終了から24時間空気環境に置いた。その後、エーテル麻酔下におき、下大動脈からPBS bufferで還流し肺を摘出した。同様に高圧曝露を行わない ZnD および Control についても肺を摘出した。

ZnD のうち高圧酸素曝露したものを ZnD-O₂ 群 (ZnD-O₂)、Control のうち高圧酸素曝露したものを Control-O₂ 群 (Control-O₂) とした。以上の合計4群について観察、検討した。

実験に供した ZnD および ZnD-O₂、Control、Control-O₂ の4群の各ラットから摘出した肺は、10% ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。病理組織学的観察には、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E染色) を行った。また、ED₁ (ED₁ Monoclonal Antibody, BMA 社) および iNOS (Polyclonal Rabbit Anti-iNOS/NOS Type II, BD Biosciences 社)、

Cu/Zn-SOD (Cu/Zn SOD Polyclonal Antibody, Stressgen 社)、TNF- α (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse TNF- α , Genzyme 社) について免疫組織染色を行い、それらの発現の有無と部位を調べた。免疫組織染色は、常法に従って脱パラフィン操作を行った組織標本を用いた。0.125% の Trypsin 処理 (37℃にて5から10分間) した後、0.3% 過酸化水素水で10分間の内因性 peroxidase の blocking および 20% Blocking 剤 (Blocking One, ナカライテスク社製) で20分間の抗体の非特異的吸着処理を行った。それぞれの1次抗体の反応条件は4℃にて over night (15~16時間) とし、LSAB2 System-HRP (Dako 社製) で反応、DAB 試薬 (Dako 社製) で発色し、顕微鏡的に観察した。

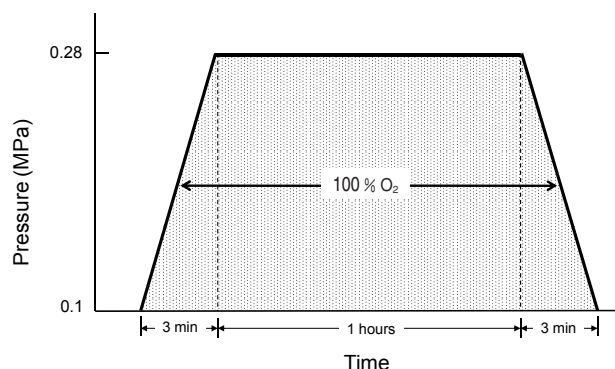


Fig. 1 Compression-Decompression Profile of Oxygen Exposure

結果

今回の飼育投与条件においても、Control では体重が増加したが、ZnD では、体重の増加が認められなかった。また、ZnD でごく軽度の脱毛傾向と思われるものが半数にみられた以外は、飼育期間中、いずれのラットにもとくに異常な所見は認められなかった。脱毛傾向がみられた ZnD についても、従来の実験で用いた Zn 欠乏モデルラット⁹⁾にみられたような四肢末端部および眼瞼周囲の皮膚炎などの強い炎症性変化を起こすには至らない状態であった。また、高圧酸素曝露を行った Control-O₂ および ZnD-O₂ のいずれのラットにも高圧曝露開始からエーテル麻酔をかけるまで、酸素中毒や肺過膨張症候群 (pulmonary overinflation syndrome)¹⁰⁾を伺わせるような異常な動作・兆候は認められなかった。

肺摘出時の肉眼所見では、いずれのラットにも異常所見は認められなかった。各群の肺の顕微鏡写真 (H-E 染色像) を Fig. 2 に示した。Fig. 2A が Control, Fig. 2B が ZnD, Fig. 2C が Control-O₂, Fig. 2D が ZnD-O₂ である。高圧酸素曝露により、ZnD-O₂ で肺胞壁の肥厚とうっ血を伺わせる所見が観察された (Fig. 2D)。

免疫組織学的観察において、Control では ED₁ 陽性細胞は主に細静脈周囲に存在し、全視野に十数個観察される程度であった。ZnD においてもその出現性に変化はなかった。また、Control-O₂ では、ZnD と同様に変化はないか若干出現数が増加する傾向が伺える程度であった。これに

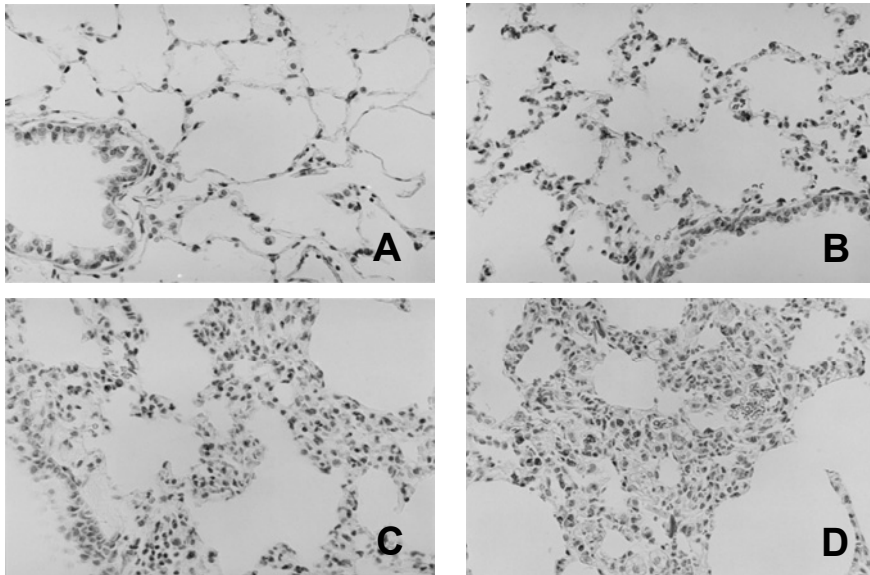


Fig. 2 Photomicrographs of lung of experiment animals. (Hematoxylin-Eosin Stain. $\times 200$)
 A: Control B: ZnD C: Control-O₂ D: ZnD-O₂

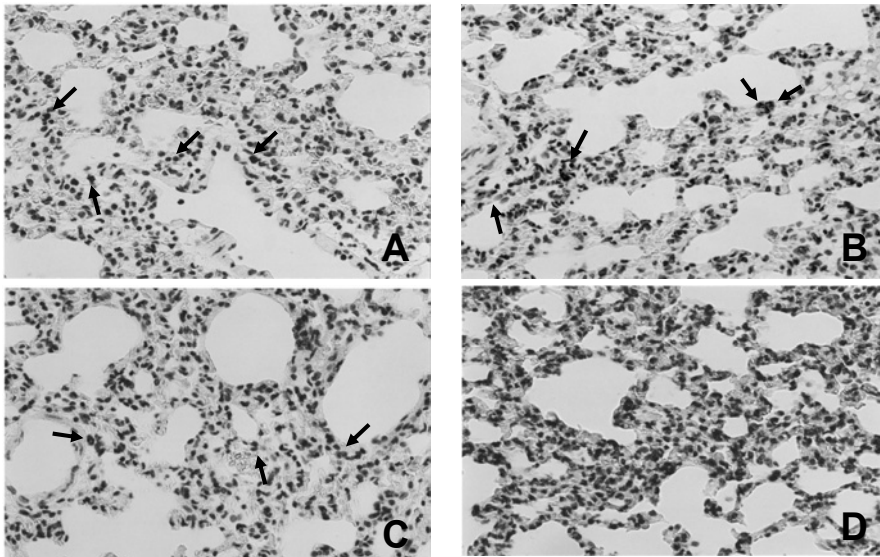


Fig. 3 Immuno-histochemical examination of ED₁ in lung of experiment animals. $\times 200$.
 A: Control B: ZnD C: Control-O₂ D: ZnD-O₂

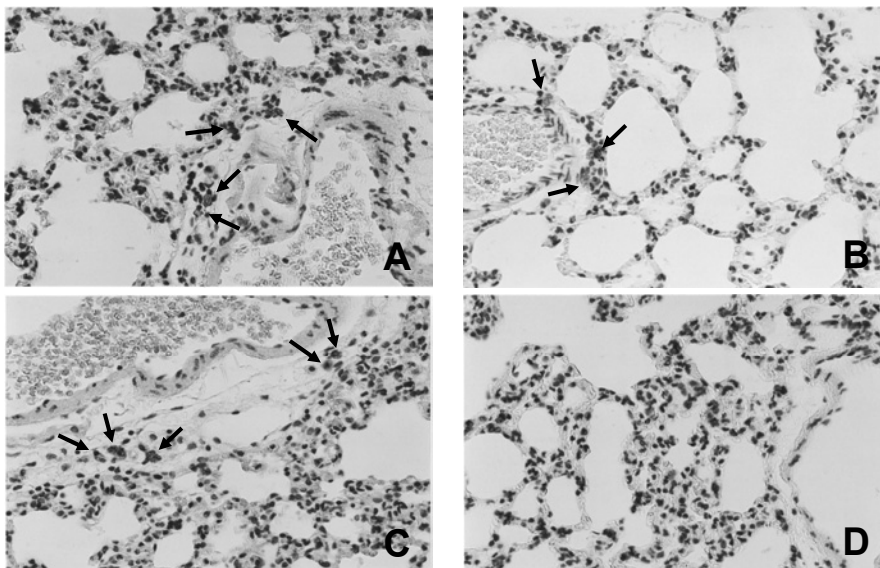


Fig. 4 Immuno-histochemical examination of iNOS in lung of experiment animals. $\times 200$.
 A: Control B: ZnD C: Control-O₂ D: ZnD-O₂

対して、ZnD-O₂では、肺胞壁の肥厚など組織学的な変化が見られたにもかかわらず、ED₁に反応する細胞は観察されなかった (Fig. 3D)。iNOSは、マクロファージと思われる細胞もしくはその周囲に発現が確認された (Fig. 4A-4C)。また、Fig. 4Cに示したごとく、ZnD-O₂ではiNOSの発現はほとんど確認されなかった。Cu/Zn SODは、ZnD-O₂で細動脈平滑筋と内皮細胞で発現性の減弱を伺わせる所見がみられた例もあったが、全群を通じて顕著な差は認められなかった。TNF- α の観察所見もCu/Zn SODの結果と同様であった。

考 察

著者らは前報で、亜鉛欠乏食で飼育したラットでは体重増加が停止し、亜鉛欠乏食で5週間の飼育を行ったラットでは、血清亜鉛値の低下と血清銅値の増加を確認した⁸⁾。本実験で用いた亜鉛欠乏モデルの作製方法についても前報に準じて行い、亜鉛欠乏モデルとしての妥当性を保持した。また前報では、亜鉛欠乏ラットにおける亜鉛酵素の一種であるSOD活性を生化学的に測定し、その低下を明らかにした。さらに、この亜鉛欠乏ラットを0.2 MPaにて5時間の100%酸素曝露を行うと、肺組織ではうっ血や肺胞の肥厚など、非常に強い組織傷害が起こることを報告した。この結果は、亜鉛欠乏状態における肺では、酸素曝露に対する抵抗性が減弱することを示唆する。高分圧酸素呼吸に対する抵抗性はヒトとラットなど種によって異なることが予想され、適当な酸素曝露条件を設定するためには曝露圧力、曝露時間、曝露回数などについて更なる検討が必要である。前報で用いた5時間の酸素曝露は、一般的な高分圧酸素療法に比べてきわめて長時間である。これに対して、曝露時間が60分である本実験では各実験条件に対する生体側の応答が非常に少なくなる可能性がある。しかしながら、本研究結果は臨床的にも重要な課題となる可能性もあることから、一般的な高分圧酸素療法で用いる圧曝露 profile に近い0.28 MPaにて60分間の条件を採用した。これは、従来行ってきた一連の実験条件と比べて mild な圧曝露条件となる。一方、著者らが開発、作製し従来の亜鉛欠乏モデルとして実験に用いてきた亜鉛欠乏ラットでは全身の脱毛、四肢末端部と眼瞼周囲を主とする非常に強い皮膚炎がみられた。さらに、全身性の皮膚炎や潰瘍性皮膚炎を起こす例もあったが、これらの激しい症状は亜鉛欠乏食投与開始後8週間以上経過してから顕著になる⁹⁾。本研究では、肺のみを観察部位としたが、炎症性変化を検討することが目的である。したがって、部位に関係なく酸素曝露以外の要因で炎症が発現するモデルは不適当と考えた。本実験で用いた亜鉛欠乏モデルでは、一部のラットに脱毛の傾向がみられる程度であり、他の症候はまったく認められなかった。これは、亜鉛欠乏食で飼育した期間を6週間にとどめたためである。本実験で用いたZnDおよびZnD-O₂は、亜鉛欠乏状態の面からも生体側の応答が減弱する可能性が高いが、本実験

の目的を考慮すると亜鉛欠乏モデルとして妥当性のあるものと考えている。

減圧症および減圧による air embolism の治療では再圧療法が唯一の治療法となる。この場合、酸素を併用した再圧療法を行うと治療効果は劇的に高まることが知られている⁷⁾。また、HBOは、一酸化炭素中毒、ガス壊疽などの嫌気性菌感染症や難治性の脳梗塞などでも有効な治療手段となる⁶⁾。呼吸・循環器の障害によって肺換気障害が強い患者は、常時 hypoxia の状態にあるため、酸素療法が行われる。この場合、大気圧下で長時間にわたる高分圧酸素吸入を行うことになる。高圧環境下あるいは大気圧環境下で長時間、酸素吸入を行った場合、酸素の毒性が発現し肺傷害が起こる。このため、酸素の毒性が発現するのを予防するために、呼吸用ガスの酸素分圧の調整あるいは酸素呼吸時間に注意が払われる。酸素中毒の機序は複雑であり、詳細については解明されていない点が多い。肺型の酸素中毒の場合、高分圧酸素呼吸による活性酸素 (ROS, reactive oxygen species) の増加が、肺毛細血管内皮細胞や肺胞内皮細胞に作用し、炎症性の変化として現れることが知られている¹⁰⁻¹²⁾。

本実験で用いた圧曝露 profile では、前報ならびに著者らのZn欠乏ラットを高圧酸素曝露した際に観察されたような強い肺組織傷害はみられなかった。これは、前述したように曝露圧力が比較的low、曝露時間が短い圧曝露 profile であったことと、亜鉛欠乏の程度が比較的、軽度のため亜鉛欠乏症には至らない、比較的現実的な実験条件としたためと考えられる。本実験は、実際の臨床例に近い条件で行った初めての実験であるが、亜鉛欠乏食を与えさらに高分圧酸素曝露を行ったZnD-O₂のみに軽度の肺胞壁の肥厚とうっ血が認められた。これは、肺の出血性傷害、肺胞壁の破壊の前段階の状態を呈したものと考えられる。さらにこの結果は、亜鉛欠乏が酸素曝露に対する抵抗性を減弱させることを一層裏付けるものである。

亜鉛酵素の一つであるSODは組織障害の原因となるROSを除去する作用を有し、生体防御面で重要な役割を担う酵素である。本実験結果が示すように免疫組織学的にはControlとZnD間に明確なCu/Zn SODの発現性の変化は認められなかった。また、酸素曝露を行ったZnD-O₂においてもほぼ同様であった。しかしながら、ZnDとZnD-O₂では血清中SOD活性が低下していることは前報より明らかである。このため、大量のROSが存在することが予測される環境下では、SOD活性の減弱したZnD-O₂がControl-O₂よりも強い影響を受けたものと考えられる。

前報では炎症性サイトカインの一つであるTNF- α mRNAの発現は、病理組織学的な変化が生じていたにもかかわらず、Zn欠乏や高分圧酸素曝露によって増強しなかった。むしろ、亜鉛欠乏状態で高分圧酸素曝露すると有意ではないが発現が減弱傾向にあった。今回、免疫組織学的には各群間で差は認めることは出来なかった。しかしながら、炎症反応が起こる前段階にあるZnD-O₂の肺組織では、TNF- α

の発現増強が予測されるのに反して、前回報告のように減弱する結果は認められなかったが、少なくとも TNF- α の発現が増強していない可能性があることが知られた。この観察結果は、TNF- α が発現すべき細胞に強い障害が起きた結果である可能性もあり、今後の検討課題として残された。

一方、ED₁ および iNOS は、Control と ZnD では差がなかった。これは、単に亜鉛欠乏であるというだけでは肺には炎症性変化などの影響を及ぼさないことを示唆する。また、Control に比べて Control-O₂ でも ZnD とほぼ同様の結果であった。しかしながら、肺に組織学的変化を起こすに至った ZnD-O₂ では、逆にほとんど発現性がなくなった。著者らは、亜鉛欠乏食を与えると、速やかに胸腺細胞が apoptosis を起こし、胸腺の萎縮が始まることを報告した⁴⁾。また、精巣においては精母細胞も同様の現象が起こり、不可逆的な精巣の萎縮が起こることも明らかにした。これらの現象は亜鉛欠乏に対してきわめて敏感な細胞が存在することを示すものである。本実験で確認された ED₁ および iNOS の発現の減弱は、マクロファージなども亜鉛欠乏に敏感な細胞である可能性を示唆する。その結果、高圧酸素曝露を行うと亜鉛欠乏では病理組織学的所見と炎症反応を示す指標の不一致が起こるのではないかと推察される。したがって、亜鉛欠乏によりマクロファージ自体あるいはその機能に関係する機構に何らかの影響が及び、TNF- α の結果と同様、通常の炎症反応が起きない状態に陥った可能性がある。

HBO の対象となる患者は、必ずしも栄養摂取状態が良いとは限らない。現代人の多くが亜鉛欠乏もしくは亜欠乏状態にあると言われている中で、酸素療法あるいは高気圧酸素療法を受ける患者の一部は亜鉛欠乏状態が進行、長期間に及んでいることが予測される。本研究で得られた結果のみでは ZnD-O₂ で観察された結果に関して詳細な機序は解明出来ない。また、亜鉛欠乏時の高分圧酸素の具体的な影響についても、今後、明らかにすべき点も多い。しかしながら、本研究の観察結果は、亜鉛欠乏にある患者に対して高分圧酸素呼吸を安易に行うとその副作用が強まる可能性を示すものである。今後、HBO や長期間にわたる高分圧酸素投与に当たっては、対象となる患者の亜鉛欠乏状態の把握と治療中の亜鉛投与の必要性も考慮すべき問題になりうる。

参考文献

- 1) National Research Council (1979) Subcommittee on Zinc. in Zinc. University Park Press, Baltimore: pp. 123-210.
- 2) Van Wouwe JP, Rossow KL, Biol (1995) Clinical and laboratory assessment of zinc deficiency in Dutch children. Trace Elem Res 49: 211-215.
- 3) Sunderman FW (1995) The influence of Zinc on Apoptosis. Annals of Clinical & Laboratory Science 25: 134-142.
- 4) Nodera M, Yanagisawa H, Wada O (2001) Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficiency rats. Life Sciences 69: 1639-1649.
- 5) 針宮豊城, 四ノ宮成祥, 鈴木正彦, 長坂 浩, 野寺 誠, 小林 浩 (2007) MG 研修テキスト. 日本産業・医療ガス協会: pp. 48-49.
- 6) Davis JC, Hunt TK (1977) Hyperbaric Oxygen Therapy. by the Undersea Medical Society, Inc. Maryland: pp. 3-10, 61-77.
- 7) Jefferson C, Davis MD (1981) HYPERBARIC & UNDERSEA MEDICINE™. by the Medical Seminars, Inc One Elm Place-Suite 204 11107 Wurzbach Road San Antonio Texas: Volume One/Number 17.
- 8) 永木由佳, 野寺 誠, 佐藤真喜子, 宮崎 孝, 荒木隆一郎, 富永信子, 柳澤裕之 (2007) 亜鉛欠乏ラットに対する 2 ATA 酸素曝露の影響. 微量栄養素研究 24: 133-138.
- 9) Nodera M, Yanagisawa H, Moridaira K, Shimoguchi Y, Wada O (1998) Reevaluation of Zinc Deficiency Models. Biomed Res Trace Elements 9: 19-24.
- 10) 池田知純 (1995) 潜水医学入門. 大修館書店, 東京: pp. 84-88.
- 11) Nodera M, Yanagisawa H, Wada O (2002) Effects of oxygen breathing at 2.8 ATA on Zinc deficiency rats. Biomed Res Trace Elements 13: 318-319.
- 12) 関 邦博, 坂本和義, 山崎晶廣 (1988) 高圧生理学. 朝倉書店, 東京: pp. 75-78.