

●原 著

実験的 Endotoxin shock 時における肺傷害

——活性酸素の意義とOHPの及ぼす効果について・第2報——

小島 範子* 宮下 正夫* 松田 健* 小泉信一郎*
 清水 康仁* 吉行 俊郎* 横井 公良* 松倉 則夫*
 金 徳栄* 安倍 智* 滝沢 隆雄* 吉安 正行*
 徳永 昭* 田中 宣威* 森山 雄吉* 恩田 昌彦*

Endotoxin 投与時の肺傷害に対する OHP 療法の効果の mechanism を明らかにするために、モルモットを用いて活性酸素の代謝と病理形態学的変化を検索した。

endotoxin 投与により右房血中白血球数の減少、肺組織中の SOD 活性値や catalase 活性値の低下さらに MDA 値の上昇がみられた。これに対し OHP 療法を施行すると、これらの変化が軽減された。さらに組織形態学的にも、II 型肺胞上皮細胞の変性、肺胞毛細血管及び間質の浮腫も軽減されたことより、OHP 療法は、endotoxin shock 時の活性酸素の代謝を改善し、肺傷害を軽減させるのに有効であることが示唆された。

キーワード：高圧酸素療法，エンドトキシン，肺傷害，活性酸素，酸素中毒

Endotoxin-induced lung injury—Role of active oxygen and the effect of OHP therapy

Noriko Kojima, Masao Miyashita, Takeshi Matsuda, Shin-ichirou Koizumi, Yasuhito Shimizu, Toshiro Yoshiyuki, Kimiyoshi Yokoi, Norio Matsukura, Deog Young Kim, Satoru Abe, Takao Takizawa, Masayuki Yoshiyasu, Akira Tokunaga, Noritake Tanaka, Yukichi Moriyama and Masahiko Onda
 The First Department of Surgery, Nippon Medical School, Tokyo.

To elucidate the mechanism of the effect of OHP upon endotoxin-induced lung injury, biochemical effects of oxidant upon metabolism and also the morphological changes of lung tissue were studied using guinea pigs.

After administration of endotoxin, remarkable decrease of leucocytes in right atrium, decrease of SOD activity and elevation of MDA in lung tissue were observed. Degeneration of type II alveolar cells and alveolar capillaries, edema in stroma were noted microscopically in endotoxin treated

lung. Contrary to these findings, these changes were not observed in OHP treated animals.

From these results, it is suggested that OHP is effective to reduce lung injury by improving oxidant metabolism in endotoxin shock.

(author's abstract)

Keywords :

High pressure oxygen therapy
 Endotoxin
 Shock lung
 Active oxygen
 Oxygen toxicity

緒 言

高圧酸素療法は、血液中の溶解酸素を著しく増量させ、ひいては組織中の酸素分圧を上昇させることにより、各種の低酸素症の改善に幅広く適応される治療法である。ところで組織の低酸素状態がその病態の本質であるショックに対する本療法の有効性についてはさまざまな方面から検討されてきている。とくにグラム陰性桿菌由来の endotoxin による septic shock では、しばしばいわ

*日本医科大学 第1外科

ゆるショック肺を招くとされ、多方面から研究がなされているが、その治療に関しては依然として難渋を極めることが少なくない。私どもの教室でも endotoxin shock に対する治療の一つとして高圧酸素療法の有効性につき一連の研究を行い、本学会においても報告してきた。教室の星野¹⁾は、本療法は endotoxin shock 時の肺の形態学的変化、並びに血管透過性亢進を軽減させるとし、また金²⁾は肺胞被覆層及び肺表面活性物質が極めて良く保存され、さらに肺微小血管系にみられる播種性血管内凝固が比較的良好に阻止されることを報告した。しかしながら、高圧酸素環境下にあまり長時間おくと肺傷害が生じることに留意すべきであるとも指摘している。そこで endotoxin shock 時の、高圧酸素療法の肺に及ぼす影響をさらに詳細に検討する目的で、肺組織中の活性酸素の代謝について、主に生化学的側面から superoxide dismutase (SOD), catalase, malonaldehyde (MDA) の測定ならびに血液中の白血球数の測定を行い、その成績を報告してきた⁴⁾。今回は肺組織の形態学的変化を電顕を用いてあわせ検討したので報告する。

材料及び方法

実験動物に体重200~250g, 雄モルモット117匹を用い、以下の5群に分けた。第I群: 高圧酸素(OHP)処置群(27匹), 第II群: endotoxin 投与群(44匹), 第III群: endotoxin 投与 OHP 処置群(27匹), 第IV群: 大気圧下無処置群(14匹), 第V群: 3ATA 屠殺群(5匹) 第I群は3ATA下のcage内で純酸素を吸入させた。第II群はE.coli O₁₁₁ (Difco製), endotoxin 0.7mg/kg(LD₅₀)をモルモットの腹腔内に投与した。第III群は第I群と同様にして、3ATAに達した時点で第II群と同量のendotoxinを腹腔内投与した。各群ともそれぞれ30分, 1時間, 3時間と経時的に以下の検索を行った。

なお、第IV群大気圧下無処置の値を正常値とし、第V群 3ATA屠殺群の値をOHP群の対照値とした。

1. 白血球数の測定

ネプタール麻酔下で気管切開を行い気管カニューレを挿入した後、ただちに小動物用人工呼吸器(夏目製作所)を装着し呼吸を維持しながら、

胸骨正中切開にて開胸を行い、ただちに右房より採血し白血球数を測定した。

2. SOD及びCatalase活性の測定

上述の方法で開胸摘出した肺組織1gを水中で細切し、これに0.01M 燐酸緩衝液(pH7.2)10mlを加え氷冷下にテフロンホモジェナイザーで十分ホモジェナイズした後、30,000×gで30分間遠心し、上清を試料として用いた。SOD活性はMarklundら⁵⁾の方法に準じ、420nmで比色定量し、catalase活性はAebi⁶⁾の方法に従って240nmで、それぞれBeckman Model 34C Spectrophotometerを用いて測定した。

3. MDAの測定

肺組織0.5gに0.01M 燐酸緩衝液(pH7.2) 2.5mlを加え上記と同様に作製した肺ホモジェネートに10%トリクロル酢酸2.5mlを加え、遠心後その上清を試料とした。チオバルビツール酸と反応させ530nmの吸光度を測定し、これをMDAのモル数に換算した⁷⁾。

4. 肺組織の電顕的検索

気管切開後、カニューレを挿入しglutarを注入して、摘出した肺組織を1mm角に細切し、4℃にてpH7.4, 0.17M cacodylate buffer液により緩衝した2.5% glutaraldehyde液で2時間固定後、同buffer液で洗浄し、1% osmiumtetroxideで2時間固定した。同bufferで洗浄後エタノールの濃度上昇系列(50, 70, 80, 95, 100; 2回)で脱水し、propylene oxideにより置換後、Epon 812で包埋、35℃下12時間、45℃下12時間、60℃下48時間熱重合し、組織ブロックを重合硬化させた。超薄切片作製後、Reynoldsの方法に準じ酢酸ウラン、クエン酸鉛による二重染色を施し、日立電子顕微鏡HU-12型にて観察した。

結 果

1. 右房血中の白血球数

各群における右房血中の白血球数の変動は図1に示したごとく、正常値は $4030 \pm 631/\text{mm}^3$ であるのに対し、3ATAへ昇圧した圧暴露のみで $1100 \pm 100/\text{mm}^3$ となり、正常値の約27%に減少した。第I群では、30分後は $1500 \pm 194/\text{mm}^3$ 、1時間後は $1740 \pm 327/\text{mm}^3$ 、3時間後は $1920 \pm 208/\text{mm}^3$ と時間の経過とともに上昇した。第II群では、30分後には急激な白血球数の減少を来し、 $1050 \pm 194/$

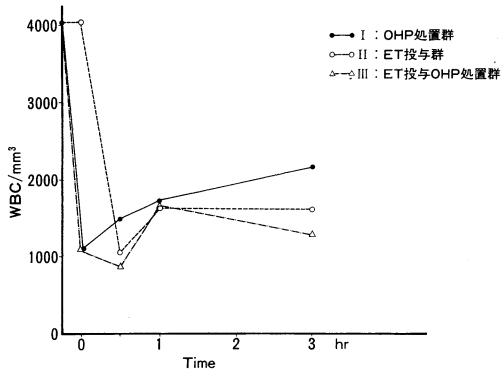


図1 右房血中の白血球数

mm³, 1時間後は1663±387/mm³と30分値よりやや回復し, 3時間後では1620±636/mm³と1時間値とほぼ同様の値を維持した。第III群は第II群と類似した推移をたどり, 30分後は3ATA昇圧時よりやや減少し, 880±104/mm³と3群中白血球数減少が最も著明であった ($p < 0.01$)。1時間後になるとかなり回復し, 1675±108/mm³, 3時間後は1280±281/mm³であった。

2. 組織中のSOD活性

肺組織に含まれるSOD活性は図2に示したように, 正常値は4.9±0.56u/mg prot.であり, 3ATAへ昇圧した圧暴露のみで, 第I群及び第III群のSOD活性値は3.13±0.56u/mg prot.へ低下した。第I群は30分後で3.65±0.30u/mg prot.と3ATA昇圧時よりやや上昇したが, 1時間後は2.89±0.16u/mg prot., 3時間後は1.25±0.08u/mg prot.とほぼ時間の経過とともに減少した ($p < 0.01$)。第II群は30分後で2.5±0.24u/mg prot., 1時間後で2.2±0.19u/mg prot.と減少したが, 3時間後は3.48±0.55u/mg prot.とやや回復の傾向を示した。第III群は30分後まで減少しつづき, 1.10±0.02u/mg prot.と最も低く ($p < 0.01$), 1時間後は2.54±0.11u/mg prot.と正常値のはほぼ1/2の活性値まで回復し ($p < 0.05$), 3時間後でも2.52±0.03u/mg prot.とほぼ同様の値を保った ($p < 0.02$)。

3. 肺組織中のCatalase活性

肺組織中のcatalase活性値は, 正常値が0.76±0.10K'/mg prot.で, 3ATAへ昇圧した圧暴露のみで, 第I群と第III群は, 0.58±0.07K'/mg prot.

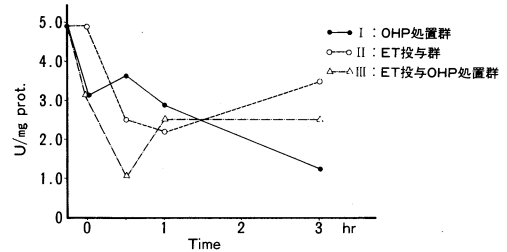


図2 肺組織中のSOD活性

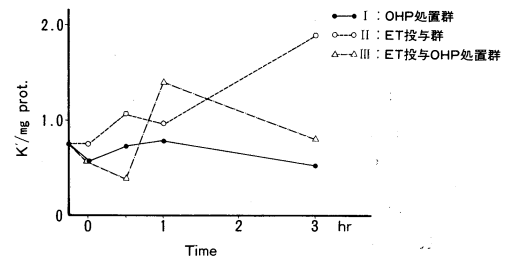


図3 肺組織中のCatalase活性

に低下した。第I群は30分後は0.73±0.08K'/mg prot., 1時間後は0.79±0.08K'/mg prot.と正常値とほぼ同様の値に復したが, 3時間後は0.53±0.10K'/mg prot.と再び3ATA昇圧時と同様な値にまで減少した。これに対し第II群は30分後は1.07±0.02K'/mg prot., 1時間後は0.97±0.02K'/mg prot., 3時間後は1.89±0.22K'/mg prot.と有意に増加傾向を示した ($p < 0.01$)。また第III群は30分後は0.39±0.02K'/mg prot.と減少し ($p < 0.05$), 1時間後では逆に1.41±0.32K'/mg prot.と増加を来し, 3時間後は0.81±0.24K'/mg prot.と, 正常値とほぼ同値を示した (図3)。

4. 肺組織中のMDA値

肺組織中のMDA正常値は0.31±0.01nmol/mlで, 3ATAへ昇圧した圧暴露のみ第I群, 第III群では0.79±0.09nmol/mlと有意 ($p < 0.01$)に上昇した。30分後は0.22±0.04nmol/mlと正常値よりやや低下し, 1時間後は0.31±0.01nmol/ml, 3時間後は0.45±0.04nmol/mlとわずかながらの上昇傾向を示した。これに対し第II群のMDA値は, 30分後では0.47±0.05nmol/ml ($p < 0.05$), 1時間後は0.95±0.05nmol/mlと正常値の約3倍値を示したが ($p < 0.01$), 3時間後では0.32±0.02nmol/mlと有意に減少し ($p < 0.01$), 正常値

に近い値に復した。また第III群は30分後は $0.53 \pm 0.06 \text{ nmol/ml}$ と3ATA昇圧時より減少し、1時間後は $0.80 \pm 0.01 \text{ nmol/ml}$ と再び増加した。しかし3時間後は $0.47 \pm 0.11 \text{ nmol/ml}$ と有意に減少し($p < 0.01$)、ほぼ正常値に近い値に復した(図4)。

5. 肺組織の電顕的検索

電顕を用いた形態学的検索を第II群と第III群とを対比しながら検討した。30分後は第II群は第III群に比し肺泡毛細血管の萎縮像と血管周囲の軽度の浮腫がみられ、II型肺胞上皮細胞の膨化が認められた(図5)。1時間後には第II群で肺泡毛細血管に多核白血球の出現と間質の浮腫が見られ、II型上皮細胞の変性と高度の膨化が認められた。これに対し第III群では、血管周囲や間質の浮腫も軽度におさえられていた(図6)。さらに3時間後では、第II群は肺泡毛細血管の基底膜の破壊、間質の浮腫が著しく、肺泡組織全体の破壊が認められた。一方第III群では肺泡毛細血管周囲の浮腫も軽度で、II型上皮細胞の構築も比較的良好に保たれていた(図7)。

次にOHP単独の第I群の30分後と3時間後と

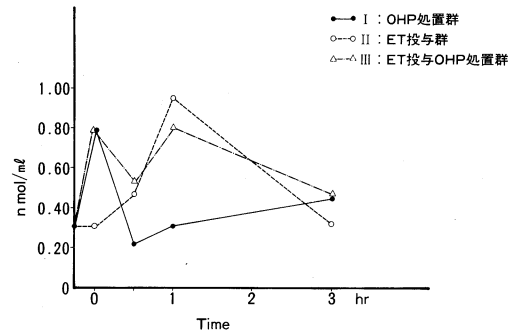


図4 肺組織中のMDA値

を対比した。30分後ではほぼ正常な微細小構造を保つのに対し、3時間後ではII型上皮細胞の変性が認められた(図8)。

考 察

OHP療法は高気圧による物理的効果に応用して減圧症の治療や、酸素の毒性を利用したガス壊疽や悪性腫瘍の治療、さらに各種の低酸素症の改善などさまざまな疾患に幅広く適応される治療法である。それらの適応症の一つにショックがあげ

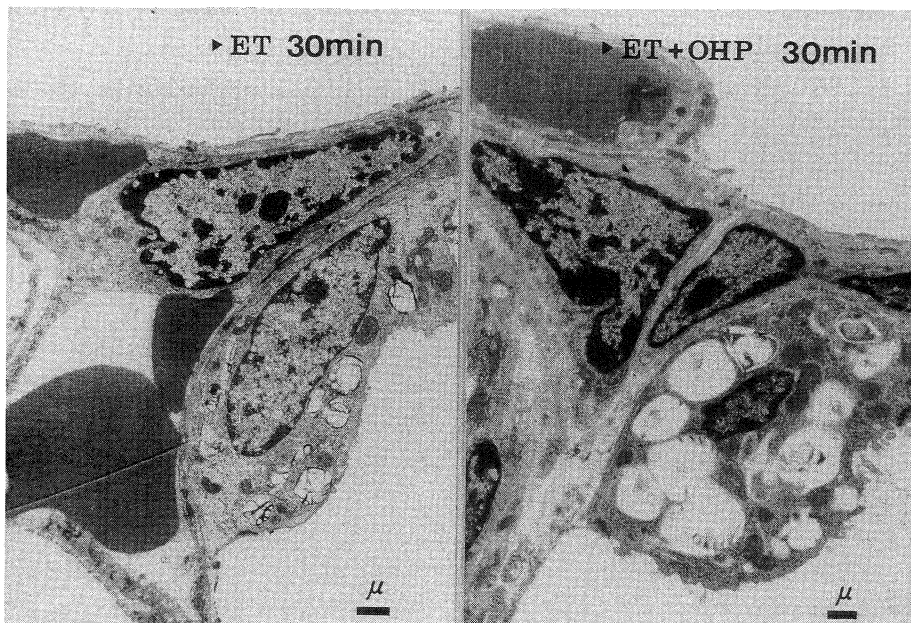


図5 Endotoxin投与群(左)では肺泡毛細血管の軽度の萎縮と血管周囲の浮腫ならびにII型肺胞上皮細胞の膨化が認められる。これに対しEndotoxin投与OHP処置群(右)ではそれらの変化はほとんどみられない。

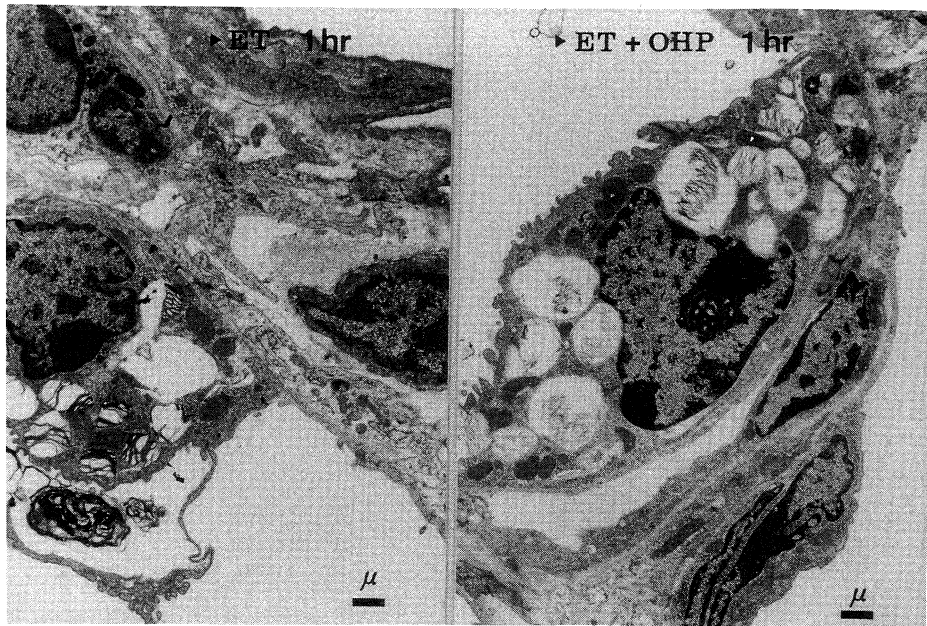


図6 Endotoxin 投与群(左)では肺泡毛細血管に多核白血球の出現と間質の浮腫, II型肺胞上皮の変性と高度の膨化が認められる。これに対し Endotoxin 投与 OHP 処置群(右)では血管周囲や間質の浮腫も軽度である。

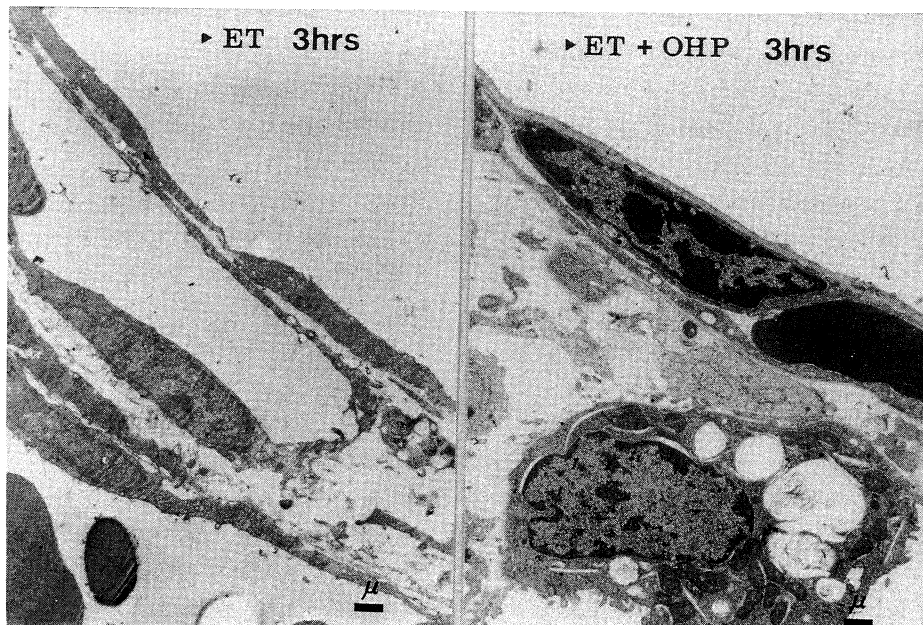


図7 Endotoxin 投与群(左)では肺泡毛細血管基底膜の破壊, 間質の浮腫が著しく, 肺胞組織全体の破壊が認められるが Endotoxin 投与 OHP 処置群(右)では血管周囲の浮腫も軽度でII型肺胞上皮細胞の構築も比較的良好に保たれている。

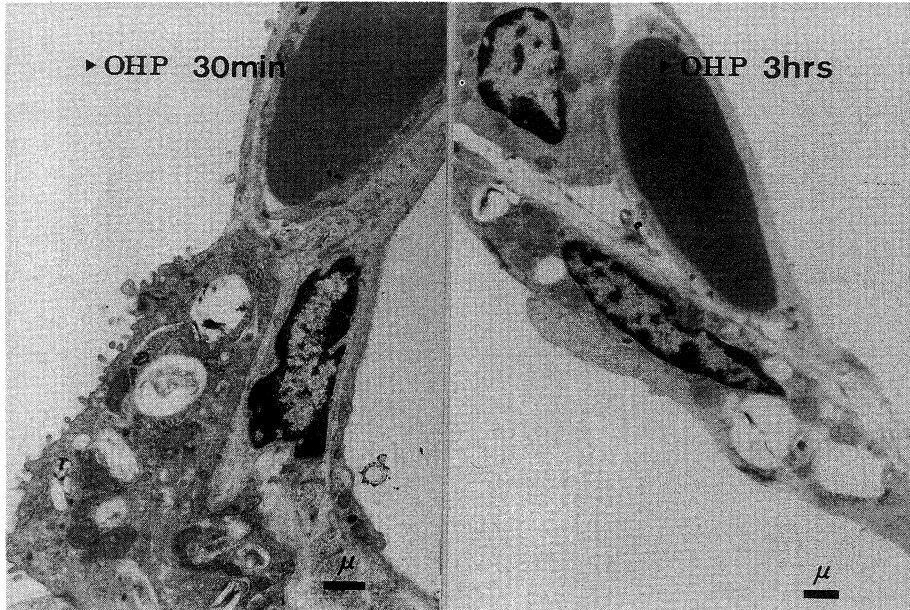


図8 OHP 処置 30分後では(左)肺胞壁はほぼ正常な微細構造を保つものに対して, 3時間後では(右)II型肺胞上皮細胞変性が認められる。

られているが, 教室の恩田ら⁸⁾は, イレウスあるいは腹膜炎に起因する細菌性ショックの治療にOHP療法が有効であることを報告した。さらに小川ら⁹⁾は, endotoxin shock に対しOHP療法はライゾブーム膜の安定化をはかりライゾブーム酵素の一つである β -glucuronidaseの血中遊離を抑制し, 生存率を改善すると報告している。

ところでendotoxin shockの際みられるショック肺の病態メカニズムについて, 肺に集結した白血球より放出される活性酸素との関係が論じられてきている¹⁰⁾。そこでendotoxin shock時の高圧酸素療法の肺に及ぼす影響を検討する上で, 肺組織中の活性酸素の代謝に注目し, 生化学的な方面からさらには肺組織の形態学的変化を対比して検討した。

右房血中の白血球の変動をみると, endotoxin投与した群では両群とも30分後に急激な減少を来しているが, これは, endotoxin投与により白血球が肺や肝などへ動員されるというCoalsonら¹¹⁾の報告にも一致しており, さらにendotoxin投与後の肺傷害の発生に白血球由来の活性酸素が関与しているという教室の宮下ら¹²⁾の成績もよく裏づけているものと思われる。一方, 3ATAに加圧し

た直後に急激な末梢白血球数の減少がみられたこと, さらにendotoxin投与後OHP療法を施行した際にも, 他の群に比し, 白血球の減少が最も著しかったことなどから, OHP自体, 血中の白血球を肺組織内へ動員させるものであることが示唆された。次に活性酸素を処理するscavengerである肺組織中のSOD活性値並びにcatalase活性値の消長をみるとSOD活性値はendotoxin投与群及びendotoxin投与, OHP処置群でははじめ急激に低下したが, 時間とともに徐々に上昇傾向を示した。

一方Catalase活性値はendotoxin投与群では経時的に上昇傾向を示したのに対し, endotoxin投与, OHP処置群では, はじめ下降してから上昇し, 3時間後にはほぼ正常に近い値に復している。したがってscavengerに関しては一定の傾向はみられず, この解釈については今後さらに検討を要するものと思われる。

これに対し, 活性酸素によって生じる脂質の過酸化反応の最終産物であるMDA値はendotoxin投与群では30分より上昇し, 1時間後では正常値の約3倍を示し, 3時間後に正常値に近い値に復した。一方, endotoxin投与OHP処置群で

は30分で endotoxin 投与群とはほぼ同様の値を示したが1時間値ではその上昇は多少おさえられていた。すなわち活性酸素が増加した結果MDA値が増加を来し、しかもSOD活性値の低下に引き続いてMDA値が組織傷害の指標となる⁷⁾と考え併せて意味あるものと思われる。

ところでOHP処置群では時間の経過とともに右房血中の白血球は上昇し、一方SOD活性値は減少し、そしてMDA値は30分後から上昇傾向を示した。また病理組織学的にも3時間後では、軽度ながら好中球浸潤と間質の浮腫性変化が認められたことを考えあわせ、長時間に及ぶOHP療法は生体に酸素毒性を与える可能性を否定しえず、今後さらに検討を要するものと思われる。

次に形態学的検索では、endotoxin投与群では30分後ですでに肺泡毛細血管周囲、並びに間質の浮腫が認められ、3時間後には多核白血球の出現、II型上皮細胞の変化などが認められたが、これらの変化はTillら¹³⁾が報告するように、endotoxinを貪食する好中球の食作用のプロセスの一つとして細胞内でのoxygen metabolismによるものと考えられる。これに対しendotoxin投与OHP処置群では、これらの変化は明らかに軽減されていた。以上の結果により活性酸素の生化学的面からの検索ではOHP療法の効果を裏付けることは難しいが、電顕による微細構造の所見からは明らかにendotoxin shock時の肺傷害に対しOHP療法が有効であることを示したものとする。

結 語

endotoxin投与時の肺傷害に対するOHP療法の効果について、活性酸素の面から検索を加えるために、endotoxinを用い、これを第I群：OHP処置群、第II群：endotoxin群、第III群：endotoxin投与OHP処置群、第IV群：大気圧下無処置群、第V群：3ATA屠殺群の5群に分ち、比較検討した。

1) endotoxin投与群では投与後30分から右房血中白血球数の減少、SOD活性値の低下、さらに3時間後ではMDA値の上昇がみられ、また微細構造上でもすでに30分後に、肺泡毛細血管の萎縮像と血管周囲の浮腫がみられた。

2) endotoxin投与OHP処置群では、endotoxin群に比し右房血中白血球数、SOD活性値、

Catalase活性値、並びにMDA値の変動に明らかな差は認められなかったが、微細構造上では、endotoxin群にみられた血管周囲や間質の浮腫はおさえられた。3時間後でも肺泡毛細血管周囲の浮腫も軽度でII型上皮細胞の構築も比較的保たれていた。

3) OHP処置群では時間とともに右房血中白血球数の増加、SOD活性値の低下、MDA値の上昇傾向がみられ、3時間後になると軽度の好中球浸潤と間質の浮腫がみられた。

〔参 考 文 献〕

- 1) 星野正純, 大久保健治, 森山雄吉, 梁 正彦, 池田広重, 羽根邦彦, 金 徳栄, 諸富武彦, 岸本晃旺, 小沢真広, 足立憲治, 宮下正雄, 恩田昌彦, 吉岡正智, 藤島義一, 大川共一, 三樹 勝, 代田明郎, 浅野伍郎: Endotoxin Shock時の肺に及ぼす高圧酸素療法の影響. 日本高気圧環境医学会雑誌, 10: 61-62, 1975
- 2) 金 徳栄, 星野正純, 滝沢隆雄, 吉安正行, 徳永昭, 関谷宗則, 田中宣威, 江上 格, 森山雄吉, 山下精彦, 柴 積, 吉岡正智, 恩田昌彦, 大川共一, 三樹 勝, 代田明郎, 鈴木克哉, 相原 薫, 矢島権八: Endotoxin Shock時の肺に及ぼす高圧酸素療法の影響—第II報—ことに肺泡被覆層の変化、及び肺表面活性物質の動態を中心に. 日本高気圧環境医学会雑誌, 11: 84-86, 1976
- 3) 金 徳栄, 横井公良, 笹本良信, 星野正純, 滝沢隆雄, 吉安正行, 徳永 昭, 田中宣威, 江上 格, 足立憲治, 森山雄吉, 山下精彦, 柴 積, 吉岡正智, 恩田昌彦, 大川共一, 三樹 勝, 代田明郎: Endotoxin shock時の肺に及ぼす高圧酸素療法の影響 第三報 肺泡血管における幡種性血管内凝固(DIC)を中心に. 日本高気圧環境医学会雑誌, 12: 82-83, 1977
- 4) 小島範子, 宮下正夫, 松田 健, 山本達也, 金 徳栄, 安倍 智, 千葉和雄, 滝沢隆雄, 吉安正行, 徳永 昭, 田中宣威, 森山雄吉, 恩田昌彦, 代田明郎, 阿部靖子: 実験的Endotoxin shock時における肺傷害—活性酸素の意義とOHPの及ぼす効果について—. 日本高気圧環境医学会雑誌, 20: 237-243, 1985
- 5) Marklund. S. and Marklund. G.: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47: 469-474, 1974
- 6) Aebi, H.: Catalase. Edited by Bergmeyer, H. U., Methods Enzymatic Analysis, I, New York and London, Academic Press, 1974, 673-678

7) Tappel, A.L. and Zalkin, H.: Lipide peroxidation in isolated mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 80 : 326-332, 1959

8) 恩田昌彦: ショックに対する高圧酸素療法. 日本高気圧環境医学会雑誌, 11, 23-24, 1976.

9) 小川 龍, 今井孝祐, 藤田達士, 古田昭一: ショックに対する高圧酸素療法の有効性の機序. 日本高気圧環境医学会雑誌, 10 : 5-7, 1975

10) Wong, C., Flynn, J., Demling, R.H.: Role of oxygen radicals in endotoxin-induced lung injury. Arch. Surg., 119 : 77-82, 1984

11) Coalson, J.J., Benjamin, B.A., Archer, L.T., Beller, B.K., Spaet, R.H., and Hinshaw, L.B.: A pathologic study of escherichia coli shock in the baboon and the response to adrenocorticosteroid treatment. Surg. Gynecol. and Obstet., 147 : 726-735, 1978

12) 宮下正夫, 松田 健, 山本達也, 小島範子, 金 徳栄, 森山雄吉, 恩田昌彦, 代田明郎, 川並汪一, 阿部靖子: 実験的 Endotoxin Shock 時における肺傷害—白血球の関与と活性酸素の意義について—, 救急医学, 臨時増刊号 : 375, 1985

13) Till, G.O., Johnson, K.J., Kunkel, R., and Ward, P.A.: Intravascular activation of complement and acute lung injury-dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. J. Clin. Invest., 69 : 1126-1135, 1982

生理的なL-乳酸ナトリウムを配合

L-乳酸ナトリウムの特性

- 生理的な中間代謝産物であるため、体内利用率が高い。
- アシドーシスは正効果が優れている。
- L体に対する生体の代謝能力が高い。
- 代謝酵素系の未熟な乳児でも代謝されやすい。

輸液用電解質液

ソリター[®]-T
「シミズ」
SOLITA[®]-T

電解質濃度 (mEq/L)・ブドウ糖濃度 (‰)

販売名 \ 電解質	Na	K	Cl	L-Lactate	Phosphate	Glucose
ソリター-T 1号	90		70	20		2.6
ソリター-T 2号	34	20	66	20	18	3.2
ソリター-T 3号	35	20	35	20		4.3
ソリター-T 3号G						7.5
ソリター-T 4号	30		20	10		4.3

「用法・用量」、「効能・効果」、「使用上の注意」は添付文書をご覧ください。



製造 **清水製薬株式会社**
静岡県清水市宮加三235番地



販売 **武田薬品工業株式会社**
大阪市東区道修町2丁目27番地

8410C