

モルモット TDI 喘息モデルにみられた発作死の検討

東レ安全性試験室

田中 健一, 岡本 豊, 長屋 佳子, 花田 哲

(昭和61年3月15日受付)

緒 言

職業性喘息の起因物質として知られている toluene diisocyanate (TDI) を、この物質と反応せず揮発性の高い有機溶剤である酢酸エチルに溶解させ、これをモルモット鼻腔内に反復塗布するという簡易な操作によって、動物に人の喘息を simulate できるモデルの得られることについてすでに報告した¹⁻³⁾。このモデルには従来よく用いられているモルモット喘息モデルにみられないいくつかの特徴が存在するが、その一つとして呼吸困難発作により動物がほとんど死亡することがないという点をあげることができる。発作が reversible であるということは、それ自体が定義であるといつてよい喘息の病態によく合致しており、同時に慢性経過をとる喘息の病態解明に便宜的な条件をみだすものといえよう。しかしこのように死の転帰をとることの少ない実験系においてもなお、誘発による死亡が皆無ではないことを最近我々は経験した。

死はいうまでもなく喘息発作にとってもっとも不幸な転帰といえるが、モデル動物についての発作死についていろいろな知見を得ておくことは、人喘息死の病態解明、更にひいてはその予防に貢献しうる可能性にもつながるものと考えられる。1例にすぎないが最近我々が経験した TDI 喘息モデル発作死亡例について、主として病理学的立場から検索を試みると同時に、既存の蓄積データとの対比を試みた。

方 法

動物 生後約3週令の時点において、静岡実験動物センターから購入したハートレー系雄モルモットで、2, 4-TDI による同一の感作、誘発

処置をうけ、誘発直後に死亡した1群9匹中の1匹(動物番号A-1)を検査対象とした。動物はすべて嚴重な検疫をうけた上、生後6週令で試験に供せられたが、A-1には試験に供せられるまで、外見上残りの動物に比し著変が認められなかった。

A-1はこの群他動物と共に、感作処置として1日1回、10%2, 4-TDI(半井化学)酢酸エチル溶液の耳鼻科用綿棒による両側鼻前庭部塗布(1側5 μ l, 計10 μ l)をうけ、その後3週間の無処置期間をおいた上で週1回、5%TDI溶液による同じ塗布方法での誘発処置をうけた。他動物と比較した、誘発時における呼吸困難の程度は表1に示す通りである。誘発時以外には、

表1 剖検例を含むモルモット呼吸困難の程度と転帰

動物番号	誘 発 回 数											転 帰
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A-1	I	0	0	II	II	III	III	III	III	II	III	死亡
A-2	0	0	0	0	0	0	0	0	I	0	0	生存
A-3	II	0	I	I	0	0	0	0	0	0	0	生存
A-4	II	0	0	0	I	II	II	II	II	I	II	生存
A-5	I	0	I	II	II	II	II	II	II	II	II	生存
A-6	0	0	I	0	0	0	0	II	II	I	II	生存
A-7	I	0	0	0	0	0	II	II	II	II	II	生存
A-8	0	0	I	II	II	II	II	II	II	II	II	生存
A-9	0	I	0	0	0	II	II	II	II	II	0	生存

呼吸困難の程度

- 0: 外観上呼吸困難の認められないもの
- I: 通常の状態よりやや大型の腹式呼吸が示されるもの
- II: 大型の腹式呼吸を示し、かなり強い呼吸困難が観察されるが転倒にいたらないもの
- III: チアノーゼを来し転倒、呼吸困難と共に痙攣、失禁、脱糞等、アナフィラキシー様の症状を呈するもの

A-1に他の動物と比較して変化が認められなかったが、初回誘発時より約3ヶ月後、第11回の誘発直後にチアノーゼを来して転倒、呼気延長をとまなう大型腹式呼吸を数分間示し、ついで下顎呼吸を呈し死亡した。

病理組織学的検討 死亡後ただちにA-1の開胸、開頭を行い、肺、および鼻粘膜について以下の方法による組織学的検討を試みた。なお同群他動物については剖検を実施しなかった。

肺：

摘出左右肺をカルノフスキー固定液に4°Cで約1時間浸漬固定後、固定液の交換を1日おきに2回試み、計48時間の固定を行った。その後肺組織からエポキシ樹脂包埋標本と、パラフィン包埋標本とをそれぞれ作成し、組織学的検索に供した。エポキシ樹脂包埋標本の作成は、肺のいろいろな部位から得られた数個の細切組織片を、0.2 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で一晩洗滌した後 1.5 mm 角に細切、カコジル酸緩衝液で再び洗滌、2%オスミウム酸で再固定を行った上、エタノールで脱水、エポキシ樹脂 (Epon 812, 半井化学) に包埋、1 μ 切片を作成し、トルイジンブルー染色を試みた。パラフィン包埋標本はエポキシ樹脂包埋標本に供した残りの肺組織を用いてこれを作成した。すなわ

ちカルノフスキー固定液に浸漬した残りの肺組織を、10%中性ホルマリンで固定した上パラフィンに包埋、4 μ 切片を作成しヘマトキシリン・エオジン重染色、もしくはアルシアンブルー (pH 2.5), PAS, ヘマトキシリンによる3重染色を試み組織学的検索に供した。

鼻粘膜：

エポキシ樹脂包埋標本のみを用い、組織学的検索を行った。発作死後、A-1の頭部から上顎骨をはずし、横行縫合にそって垂直方向に切断、更に鼻骨間縫合にそって切断し鼻腔側壁甲介を露出させた。ついで腹鼻甲介を剔出、甲介ごとカルノフスキー固定液による48時間の固定を試みた。この後甲介表面から鼻粘膜を剝離、肺切片と同様、カコジル酸緩衝液での洗滌、オスミウム酸での再固定、エタノール脱水を行った上、Epon 812 へ包埋、1 μ 切片にトルイジンブルー染色を施し光顕観察に供した。

結 果

肺、鼻粘膜の組織学的変化はそれぞれ以下のものであった。

肺：

肉眼的所見として肺表面は灰白色を呈し、いちじるしい容積の増加が観察された。

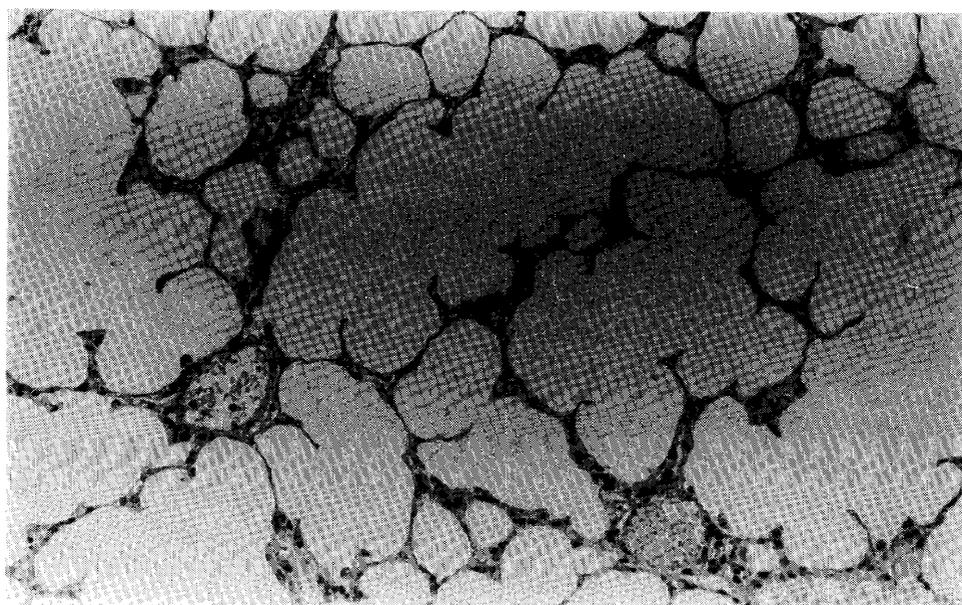


図1 発作死肺に観察された肺気腫像：肺胞腔の拡張と共に肺胞壁には断裂像も観察される。
ヘマトキシリン・エオジン染色 ×50

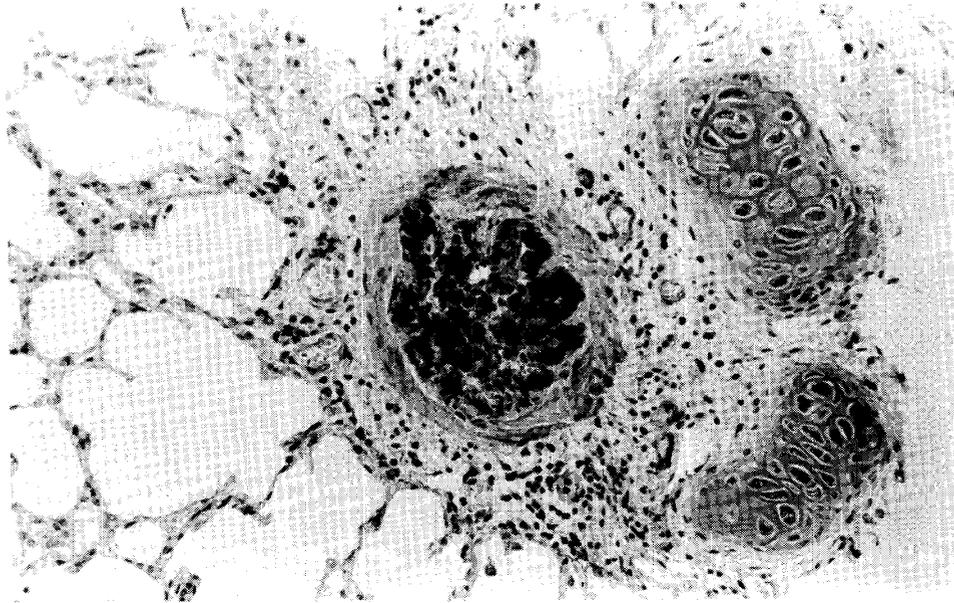


図2 杯細胞の著明な増生をともなう小葉間気管支：周囲間質組織に浮腫，血管，リンパ管の拡張と並んで好酸球浸潤を認める。アルシアンブルー・PAS・ヘマトキシリン染色 ×50

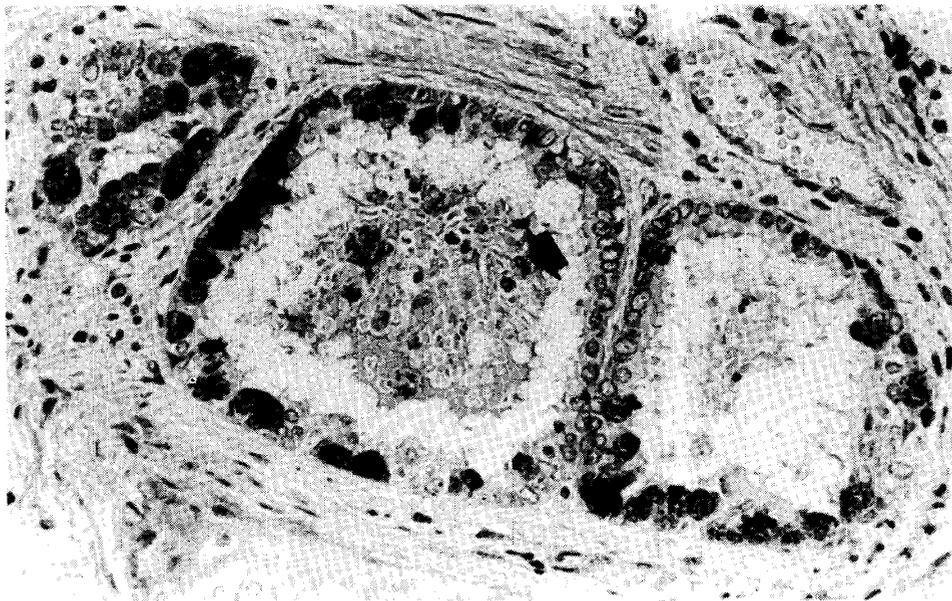


図3 気管支腔内にみいだされた漿液性分泌物：この中に好酸球（矢印）がみいだされる。周囲結合組織の浮腫，細胞浸潤は軽度である。アルシアンブルー・PAS・ヘマトキシリン染色 ×50

組織変化ではまずパラフィン包埋標本による肺胞の変化として、前記肉眼的変化に対応する著明な気腫が、左右肺の全葉にわたって観察された。図1にみられるように肺胞腔はいちじろしく拡張し、肺胞壁はうすくなり断裂をとまっている箇所も認められた。

気管支系の変化として、著明な粘液産生亢進像のあることが注目された。すなわち気管支粘

膜上皮には杯細胞のいちじろしい増生が認められ、管腔のほとんどが閉塞しているように見える像が観察された(図2)。一方杯細胞の増生がそれほど顕著でない気管支も観察されたが、そのような例においても管腔に、粘液、漿液貯溜のあることが示された(図3)。粘膜基底膜には肥厚がみられなかったが、気管支平滑筋には強い収縮像が観察された(図4)。平滑筋には太い

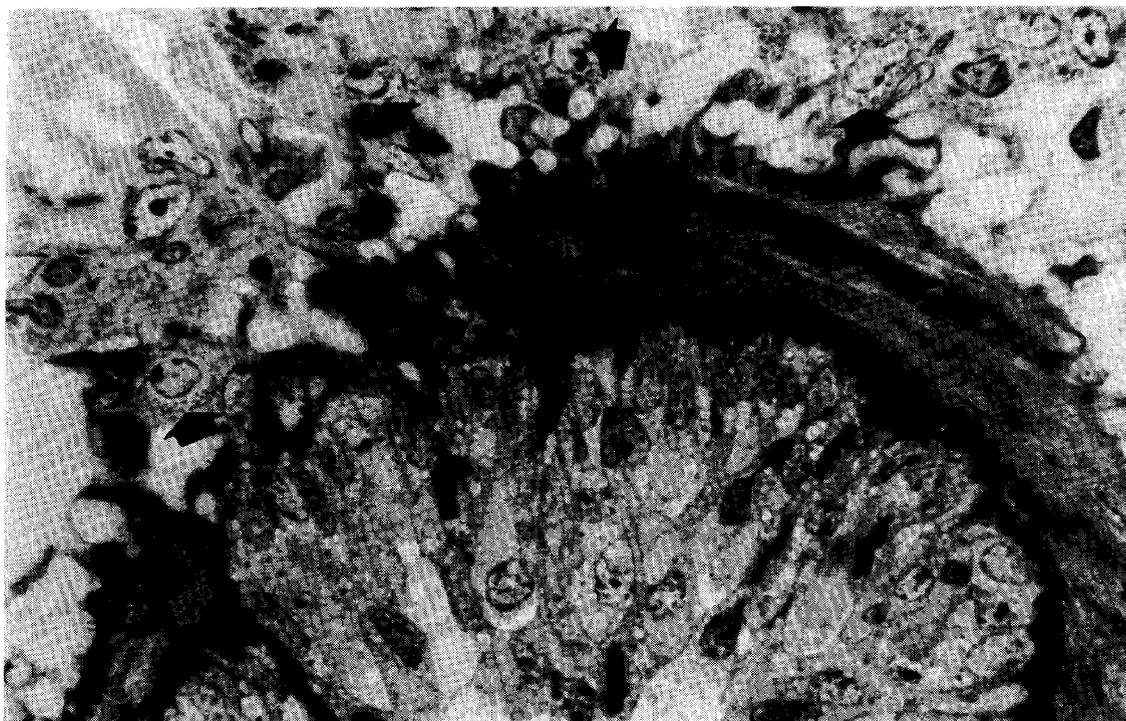


図4 平滑筋収縮による気管支腔の狭窄：いちじるしい顆粒数の減少をともなう肥満細胞（矢印）が周囲に観察される。基底膜には肥厚が認められない。トルイジンブルー染色 ×250

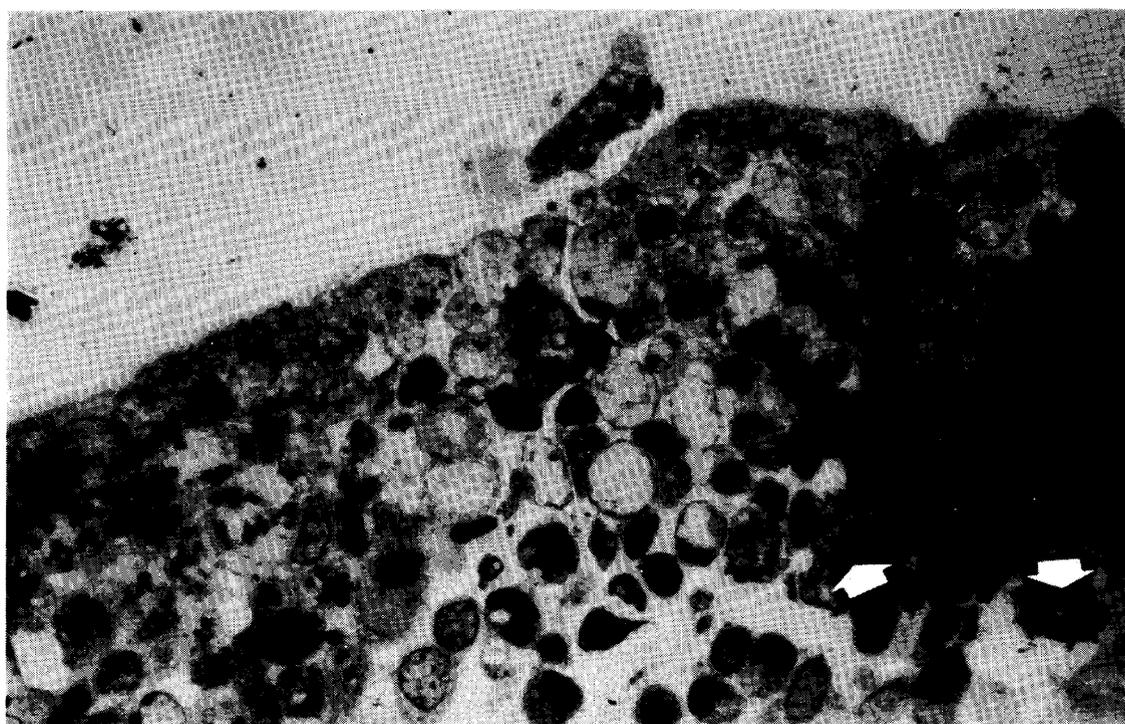


図5 鼻粘膜上皮にみられた強い浮腫：繊毛細胞に脱落があり、杯細胞の重なりあうような増生と共に、その周囲に顆粒数の減少した肥満細胞（白矢印）が認められる。分泌物放出後の杯細胞（黒矢印）は印環状の形態を示す。トルイジン・ブルー染色 ×250



図6 鼻粘膜上皮の他の部分：杯細胞に増生はみられるが、図5に観察されたような重なりはない。染色性に差異のある肥満細胞が上皮内に観察される他、好酸球（矢印）も認められる。トルイジンブルー染色 ×250

束状を呈するものが多かったが、くびれを呈する像もみられた。

細胞浸潤では注目すべき所見として、好酸球の浸潤が観察された。好酸球浸潤は気管支粘膜、肺胞壁のみならず、気管支腔分泌物中にも観察された。この他間質結合組織では、好酸球以外に若干の好中球、リンパ球等のみられることがあったが、全肺野を通じいちじるしい炎症細胞浸潤は観察されなかった。

エポキシ樹脂包埋標本においては、パラフィン包埋標本において観察された、前述の所見がそのまま確認された他、トルイジンブルーに異染色性を示す好塩基性細胞の多く存在することが認められた。好塩基性細胞はそのほとんどが肥満細胞であり、間質結合組織のみならず、気管支粘膜上皮内にもこれが認められた。肥満細胞の中には正常肥満細胞に比し、いちじるしく特殊顆粒数の減少しているものが認められた（図4）。

鼻粘膜：

正常モルモットにみられることの少ない鼻粘膜の組織変化として、1) 繊毛細胞の脱落、2) 循環障害、特にいちじるしい上皮内浮腫、3) 杯細胞のいちじるしい増生、4) 肥満細胞数の増加、が注目された。

繊毛細胞には上皮のすべてにわたってではないが、脱落が観察された。粘膜浮腫は結合織部分にも認められたが、特に上皮層にいちじるしかった。杯細胞の増生には重なりあうように顕著な増生を示す部分と比較的疎な部分とがあり、また分泌物を放出した後印環状の形態を示すものも認められた（図5）。肥満細胞は結合織部分、特に基底膜周囲にもっとも多く観察されたが、上皮内にも好酸球と共に数多くこれを認めた。上皮内にみられた肥満細胞は結合織のそれに比しやや小型であり、核胞体比に大きい傾向がみられた。注目すべきは上皮内肥満細胞の顆粒数、および染色性が多様性にとむ点であって、いちじるしく特殊顆粒数に低下のみられるもの、また異染色性の低下していた肥満細胞が観察された（図6）。

考 察

動物を用いた喘息モデルとしてモルモットの使われる機会はきわめて多い。通常異種蛋白の吸入や注射による感作にひきつづいて誘発が試みられた場合に観察される、アナフィラキシー様の呼吸困難が、喘息発作を表現するものとしてよく利用されている。このようなモデルでは、死そのものがありふれた現象として観察される。

これに対して我々のモデルでは、死そのものが非常におこりにくい現象であるので、同じく稀有な現象である人の発作死を、よく simulate しているかどうか興味をもたれた。

まず TDI モデル喘息発作死そのものの発生頻度について、東レ安全性試験室における未発表データをもととして考察を加えてみると、本報告において試みられた方法と同一、あるいは類似した条件下で感作、誘発を行って3ヶ月以上経過を観察した120匹の動物の中で、発作直後に死亡した動物はA-1のみであった。そこでこのような稀有発作死をまねいた個体側の素因に興味をもたれた。

これまで TDI 喘息モデルにおいては、呼吸困難をきたす動物の発生頻度や症状の程度に、供給源や供給先の飼育環境のよるかなりの変動があることを報告した⁴⁾。A-1と同時に試験に供された動物はこの意味で同条件下にあったが、表1からA-1は少なくともA-2, A-3に比し、死にいたるまでの発作程度が、誘発を重ねるごとに顕著化したことが明らかである。誘発後呼吸困難が回復した後での状態においては動物間に差ががみいだされなかったこと、またA-1で喘息以外に特記すべき合併症が観察されなかったこと、等を考慮すると、個体別に存在する何らかの要因が、死を含めた重症度に深いかかわりをもつことが、モデル動物において示唆されているということができよう。

そこで喘息において標的臓器である肺の所見に、A-1と、同じ処置をうけた他動物との間で、どのような異同があるかに関心が注がれた。

A-1に観察された肺の形態所見を、これまで我々が誘発直後に脱血致死させて得た動物肺組織所見と対比してみると、その間に共通する項目と非共通項目のあることが明らかとなった。共通的な所見としてあげられるのは高度の気腫、気管支平滑筋の収縮像、好酸球浸潤であるが、その中の前二者は通常のもルモットアナフィラキシー像にもよくみられる所見である。これに対し好酸球浸潤は、発作を何度もくりかえした TDI 喘息モデルにみられる像であって、我々の実験系に I 型アレルギー反応の関与のあるこ

とを示す一つの所見として、これまで注目してきたものであったが^{2,3)}、A-1にもこの所見がみいだされている。

これまで行った発作直後の屠殺剖検例にはみいだされず、A-1のみに観察された肺の特徴的所見は、気道におけるいちじるしい粘液産生亢進像と、それにもとづく気道の狭窄所見とであった。

そこでA-1に観察された組織所見が、人で稀有とされている喘息発作死肺のそれとどう対応するかに興味をもたれた。人喘息死についての文献^{5~9)}を渉猟すると、気腫、平滑筋収縮、基底膜の肥厚、分泌物による気道の閉塞、好酸球の浸潤、等の知見があげられている。この中では基底膜の肥厚のみがA-1に限らず TDI 喘息モデルにはみいだされていず、人剖検所見との相違点として注目された。おそらくこれは種差にもとづく相違点であろう。人にみられる前記所見の中で、直接死因としてあげられているのは分泌物による気道の閉塞である。この意味でA-1に観察された分泌亢進像と気道の狭窄所見はきわめ興味深く、A-1が直接死因においてもまた、人喘息死を simulate しているものと考えられた。

では何故にA-1のみに TDI で発作死がひきおこされたのであろうか。たまたま偶発的事故として観察された1匹の形態所見のみで、この問に答えることは困難としかいいようがない。しかしここでは我々が、過去100例以上実施してきた TDI 処理動物の鼻粘膜形態観察上、これまでみいだされることのなかった所見がA-1に合併して観察されたという実験事実を記載し、後日の検討に資したいと考える。

人でしばしば喘息と鼻アレルギーが共存することはよく知られた事実であるが、我々はもともと喘息モデルとして開発された TDI による実験系が、同時に鼻アレルギーモデルとしても有効に利用できることを示した¹⁰⁾。A-1で肺と並んで鼻粘膜の形態観察を行った理由も、A-1と他動物と比較して特異的に相違する鼻アレルギー臨床症状を観察したからではなく、A-1における鼻粘膜形態所見の、蓄積データへの追加

を単に意図したからに他ならない。

これまで TDI 処理動物に観察された鼻粘膜の形態変化として、好酸球浸潤や杯細胞増生と共に、肥満細胞が上皮層に認められること等について示した¹¹⁾。しかし A-1 にみられたような繊毛細胞の破壊脱落やいちじるしい上皮内浮腫は、これまで認められなかったところのものである。換言すれば本症例においては、従来にない強い鼻粘膜の形態変化が観察されたことを意味している。

鼻アレルギーと喘息発作死との関連について真正面からとりあげた文献は我々の知るかぎりにおいてみられず、また人喘息死の剖検所見の中に鼻粘膜の形態を詳述した論文もみあたらない今日、本症例からひき出すことのできる推論にはおのずと大きな制約がある。しかし経気道異物侵入に対する第一の関門である上気道の drastic な変化が、下気道に強い影響をおよぼすことは十分あり得てよいことのように思われ、おそらく今後の興味深い検討課題を構成するものと考えている。

次に病理に主眼をおいた実験結果の考察という視点からはややそれるが、TDI 喘息モデルで死亡がおこりにくいという実験事実と関連し、同じく死に直結することのない人 TDI 喘息とこのモデルが、どう対応するかについて一瞥しておくことも意義のないことではないであろう。

職業性呼吸器疾患の一つとして、TDI の vapor 暴露より喘息罹患者が発生することについては1951年の Fuchs ら¹²⁾の報告以来、おびただしい数の発表が行われている。しかしその発症機序については今日なお、十分明確にされているとはいえない。TDI 特異的な抗体の存在という見地から、近年注目すべき問題提起が、Karol ら^{13,14)}による、TDI 喘息罹患者血清中の tolyl-specific IgE 抗体が高値を示すという報告としてなされた。これに対する追試には賛否両論があり、大きな議論をよびおこしたが、今日 TDI による呼吸器症状の発現に何らかの免疫学的機序が介在することは、多数の認めるところとなっている¹⁵⁾。

我々の実験モデルは、有機溶剤に溶解させた

TDI をモルモット鼻腔にぬりつけるという、一見労働環境ではあり得ぬような感作、誘発法をとってはいるが、TDI による vapor 暴露という意味では、作業者の被暴状況と本質的に矛盾するものでないと考えている。この意味で TDI 特異性を有する抗体が、この実験系にどう関与しているかに興味もたれた。その結果、TDI 結合モルモット血清アルブミンを惹起抗原とする同種 PCA において、検出頻度、並びに抗体価は必ずしも高いといえないが、IgG のみならず IgE タイプの抗体を血清中に検出できることを認めている¹⁰⁾。

最近我々¹⁶⁾はこの実験系で、誘発を行う3日前に cyclophosphamide をモルモット腹腔内に投与することにより、IgG、IgE のいずれをも高頻度に検出すること、またこの処置により、きわめて強い呼吸困難を示す動物が出現することを経験している。本報告においては A-1 における抗体の検索を実施し得なかったが、抗体と症状との関連は今後の興味ある検討課題であろう。

動物モデルを用いた症病の研究はいうまでもなく、人の疾病発生の背後にある複雑な要因を除去し、一定数以上の動物において普遍性のある知見を獲得することをその目的としている。1例報告にすぎず、未発表資料にもとづく推論をまじえている点で、本報告には意にみえない点も少なくない。しかし喘息死に対する関心がたかまっている今日、モデル動物にみられたこの種の知見を公表しておくことは、決して意義の少ないことではないと考えられたため以上の記載を行ったことを付記し、この稿をおえることにしたいと思う。

結 論

発作そのものによる死亡がきわめてまれである、TDI によるモルモット喘息モデルにたまたま観察された発作死亡例の肺、および鼻粘膜について、病理組織学的検索を試み以下の結論を得た。

1. これまでの発作後屠殺死亡例、並びに人喘息発作死肺にみられる所見と一致する、気腫、

平滑筋収縮, 好酸球浸潤等の所見を認めた。

2. これまでの屠殺剖検例にみられなかった所見として, 気管支粘膜杯細胞のいちじるしい増生と気道の狭窄が認められ, この所見の直接死因にかかわることが示唆された。

3. 同じ動物の鼻粘膜に, 1) 繊毛細胞の脱落, 2) 上皮内浮腫, 3) 杯細胞の増生, 4) 肥満細胞の増加が観察された。特に前2者はこれまでのTDI喘息・鼻アレルギーモデルにみられなかったものであり, 鼻粘膜のいちじるしい形態変化として注目された。

文 献

- 1) Tanaka, K., Yamazaki, A., Kanno, T., Kawai, M. and Maekawa, N.: On the induction of asthma in guinea pigs by toluene diisocyanate. In Workshop—Occupational Asthma, XI International congress of allergology and clinical immunology, 1982.
- 2) 田中健一, 川合 満, 前川暢夫: Toluene Diisocyanate (TDI) によるモルモット喘息惹起の試みについて, アレルギー, 31, 1004-1007, 1982.
- 3) Tanaka, K., Kawai, M. and Maekawa, N.: Experimental model of asthma by toluene diisocyanate (TDI). Bull. Chest Dis. Res. Inst., Kyoto Univ., 16, 1-9, 1983.
- 4) 田中健一: TDI による鼻アレルギーモデル (第35回日本アレルギー学会パネルディスカッション). アレルギー, 34, 571-572, 1985.
- 5) 無江昭子: 気管支喘息の病理学的研究—気管支喘息の病理形態像—. アレルギー, 20, 885-902, 1971.
- 6) Hayes, J. A.: The pathology of bronchial asthma, In Bronchial asthma, Ed. by Weiss, E. B. and Segal, M. S., Little Brown and Co., Boston, 1976, pp. 347.
- 7) Spencer, H.: Pulmonary diseases of uncertain aetiology, In Pathology of the lung, Ed. by Pergamon Press, Oxford, 1977.
- 8) Lopez-Vidriero, M. T. and Reid, L.: Pathological changes in asthma, In Asthma, Ed. by Clark, T. J. H. and Godfrey, S., Chapman and Hall Ltd., London, 1983, pp. 79.
- 9) 無江季次, 無江昭子: 喘息死の病態と病理. アレルギーの臨床, 5, 879-884,
- 10) 田中健一, 岡本 豊, 竹岡明美, 井野隆光, 河野茂勝, 大幡勝也, 川合 満, 前川暢夫: Toluene Diisocyanate (TDI) による喘息モデルに観察された鼻アレルギー, アレルギー, 33, 199-206, 1984.
- 11) 田中健一, 岡本 豊, 奥泉仁一, 張 寛正, 杉山正夫: TDI 喘息モデルに観察された鼻粘膜の形態学的変化について. 日本鼻科学会会誌, 23, 61-62, 1984.
- 12) Fuchs, S. and Valade, P.: Etude clinique et expérimental sur quelques cas d'intoxication par le DesmodurT (diisocyanate de toluene 1-2-4 et 1-2-6). Arch. Mal. Profess., 12, 191-196, 1951.
- 13) Karol, M. H., Ioset, H. H. and Alarie, Y. C.: Toly-specific IgE antibodies in workers with hypersensitivity to toluene diisocyanate. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 39, 454-458, 1978.
- 14) Karol, M. H., Sandberg, T., Riley, E. J. and Alarie, Y.: Longitudinal study of tolyl-reactive IgE antibodies in workers hypersensitive to TDI. J. Occup. Med., 21, 354-358, 1979.
- 15) Bernstein, L. B.: Isocyanate-induced pulmonary diseases: a current perspective. J. Allergy Clin. Immunol., 70, 24-31, 1982.
- 16) 田中健一他: 未発表資料

A CASE REPORT ON DEATH DUE TO AN ASTHMATIC ATTACK OBSERVED IN A GUINEA PIG WITH TDI-INDUCED ASTHMA

Death due to an asthmatic attack observed in a guinea pig

The present paper is a case report on death due to an asthmatic attack found in an experimental model of asthma. The model was developed in guinea pigs by intranasal application of toluene diisocyanate (TDI) for both sensitization and provocation. Among 120 animals with TDI-induced asthma, only one (A-1) died of the attack provoked by the application of TDI. Histopathology of the lungs and the nasal mucosa of A-1 was studied on paraffin-embedded

and/or Epon 812-embedded tissue sections. The results were compared with our previous data in other test animals which were sacrificed immediately after the provocations. While there were some changes common in the lungs of all the test animals including A-1, other changes were seen in only A-1. The former included emphysema, bronchoconstriction, and eosinophilic infiltration, which were similar to pathological changes in asthmatic patients. The latter included narrowing of the airway with hyperplasia of goblet cells, indicative of the cause of A-1's death. The following changes were observed in the nasal mucosa of A-1: destruction and falling of ciliated cells, intraepithelial edema, hyperplasia of goblet cells, and increase of mast cells. In particular, the former two changes drew our attention, because they had never before been observed in our TDI-induced asthma/nasal allergy model.