

豚の気管支肺胞洗浄液中の細胞について

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	亘, 敏広 後飯塚, 僚 小山, 秀一
巻/号	42巻6号
掲載ページ	p. 417-420
発行年月	1989年6月

豚の気管支肺胞洗浄液中の細胞について

亘 敏広*¹⁾ 後飯塚 僚*²⁾ 小山秀一*¹⁾ 左向敏紀*¹⁾ 内野富弥*³⁾

長谷川篤彦*²⁾ 本好茂*¹⁾

(平成元年 3 月 17 日受理)

Analysis of Swine Bronchoalveolar Lavage Cells

TOSHIHIRO WATARI (Veterinary Internal Medicine, Nippon Veterinary
and Zootechnical College, Musashino, Tokyo 180)

RYO GOITSUKA, HIDEKAZU KOYAMA, TOSHINORI SAKO, TOMIYA UCHINO, ATSUHIKO HASEGAWA
and SHIGEKATSU MOTYOYOSHI

SUMMARY

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed on 16 healthy pigs using a fiberoptic bronchoscope. The total number of cells recovered by BAL was $6.5 \pm 1.89 \times 10^7$, consisting of macrophages ($83.6 \pm 8.7\%$) and lymphocytes ($14.8 \pm 8.3\%$). However, the proportions of neutrophils and eosinophils were negligible. The yeast particle phagocytic rate and nitroblue tetrazolium (NBT) reduction activity in BAL cells were $72.8 \pm 8.1\%$ and 0.051 ± 0.028 respectively.

The yeast particle phagocytic rate in BAL cells as well as the total number and type of cells recovered were not affected by BAL repeated every two days. However, NBT reduction activity in BAL cells was significantly increased after the 3rd treatment with BAL.

—————*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 42, 417~420 (1989).

要 約

豚の気道局所の防御能を解析するため、まず健康豚 16 頭について気管支ファイバースコープを用いて気管支肺胞洗浄 (BAL) を実施し、得られた細胞について検討した。

BAL により回収された細胞数は、 $6.5 \pm 1.89 \times 10^7$ 個であった。またこのときの細胞分画では、マクロファージが $83.6 \pm 8.69\%$ をしめ、リンパ球は $14.8 \pm 8.25\%$ で、好中球や好酸球の割合はきわめて少なかった。

回収した肺胞マクロファージのイースト粒子貪食率は $72.8 \pm 8.05\%$ であり、吸光度の差からみた NBT 還元能は 0.051 ± 0.028 であった。

また 2 日間隔で、BAL を繰り返し、これらの値の変化を検討したところ、細胞数や、細胞分画、イースト粒子貪食能において変化は認められなかったが、NBT 還元能は、3 回以後有意な上昇を示した。

近年豚の呼吸器疾患は、多発する傾向にあるが、これら疾患の多くは、宿主の免疫能の低下によるいわゆる日和見感染症の範疇のもので¹²⁾、その防除には気道内局所の免疫能を増強することが重要な課題と考えられている。

気管支肺胞洗浄法 (Bronchoalveolar lavage: BAL) は、REYNOLDS と NEWBALL⁹⁾ により開発され、気管支

や肺胞内に存在するマクロファージを主体とする細胞を生体より採取することが可能になった。またヒトでは BAL により集められた細胞 (BAL 細胞) の細胞分画が種々の疾患で異なることが報告されている^{7,13,14)}。また BAL により回収した肺胞マクロファージの機能を知ること、気道局所の免疫能を知る上で非常に有用であると考えられており、呼吸器疾患の診断等において重要な技法になりつつある。

しかしながら、動物における BAL の臨床応用はなく、屠殺後の肺を洗浄する方法でマクロファージを回収するなど基礎的検討が若干行われているに過ぎない^{12,16,17)}。

そこで豚の呼吸器疾患を解明するため、まず健康と思われる豚の気道局所の防御能を知る目的で BAL を実施

*¹⁾ 日本獣医畜産大学 (東京都武蔵野市境南町 1-7-1)

*²⁾ 東京大学農学部 (東京都文京区弥生 1-1-1)

*³⁾ 動物 ME 診断リサーチセンター (東京都西多摩郡五日市町伊奈 253)

Key Words: 豚, 気管支肺胞洗浄, 採取細胞

し、洗浄液の総細胞数、細胞分画や回収した肺胞マクロファージのイースト粒子貪食能、Nitroblue tetrazolium(NBT)還元能を測定するとともに、BALを繰り返すことによりこれらの値に与える影響を検討した。

1. 材料および方法

1) 供試豚

SPF豚(イワタニケンボロー:MD豚)雌、16頭、生後100~120日齢、体重32~47kgを、導入後通常飼育したものを使用した。1頭毎ケージに入れ、同一畜舎内で1週間以上予備飼育し元気、食欲、体温、呼吸数、心拍数に異常のないことを確認したものを供試した。

2) 気管支肺胞洗浄法

アザペロン5mg/kgを筋肉内に投与して鎮静し、ペントバルビタールナトリウム10mg/kgを静注し麻酔を確認した後、気管チューブを挿管した。つづいて気管ファイバースコープ(OLYMPUS社製、BF Type6C:外径6.1mm有効長595mm)を気管支より右肺前葉内に可能な限り奥まで進め、楔入した。

洗浄は、HARMSSENら⁴⁾の方法を参考に滅菌温生理食塩水(37°C)を用い、1回に20mlを注入し、その直後に洗浄液として回収した。1回の検査にはこれら洗浄を5回繰り返した。

16頭の豚についてBALを実施し、そのうち4頭については、1日おきに4回繰り返した。

3) BAL細胞

回収した洗浄液の容量を測定し、回収率(回収量/注入量)を求めた後、遠心チューブを用い4°C 500gで10分間遠沈し沈渣と上清に分離した。

さらに沈渣をEagle's MEM(日水製薬)に再浮遊させ、細胞の洗浄を行った後10%牛胎仔血清(FCS)加Eagle's MEM 10mlに再浮遊させた。計算板により、総細胞数を算定した後、塗抹標本を作成し、ギムザ染色を行った。油浸レンズで上皮細胞を除き200個の細胞を観察し、出現細胞の百分比を求めた。また一部のものについて非特異的エステラーゼ染色を行い¹⁶⁾、マクロファージを同定した。

4) イースト粒子貪食能試験

イースト粒子貪食能は、細胞浮遊液(5×10⁵ cells)とイースト粒子浮遊液(5×10⁶ particles)をLAB-TEK

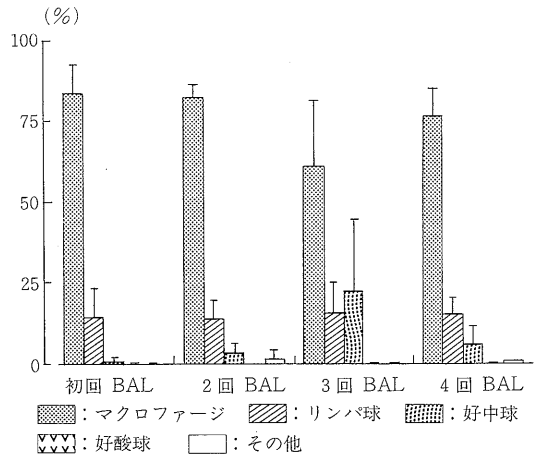


図1 洗浄液中の細胞分画

tissue culture chamber/slides(Miles Scientific)のチャンパー内に入れ、37°Cで30分間培養をした。上清を吸引除去後、チャンパー内を、加温Eagle's MEMで2~3回洗浄し、風乾、固定後、ギムザ染色を行った。

顕微鏡でイースト粒子貪食細胞と、非貪食細胞に分け貪食率を算定した。

5) NBT還元能試験

NBT還元試験は、村田らの方法⁹⁾に準じて行ったが、食作用賦活物質であるzymosan A(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)は、オプソニン化して用いた¹⁰⁾。細胞浮遊液(2.5×10⁶ cells/0.5 ml)に0.1% NBT(Sigma)溶液(0.4 ml)と1% zymosan A 浮遊液(0.1 ml)もしくは、Eagle's MEM(0.1 ml)を加え、37°Cで30分間培養をした。0.5Nの塩酸(1 ml)で反応を停止させた後、細胞内に生成されたホルマゼンをDMSO(3ml)で溶出させた。上清の呼光度を、565 nmで測定し、zymosanを添加した場合の吸光度と無添加の場合のそれとの差を算出し、NBT還元能とした。

2. 成績

1) BALにおける注入液の回収率と総細胞数

洗浄初回のBAL液の回収率は、74.8±9.37%であり、その時の総細胞数は、6.5±1.89×10⁷個だった(表1)。

また、回収率と総細胞数の間には相関は認められなかった。

初回の実施から2日後に、2回目のBALを行った。このときの回収率は、71.5±6.86%であり、総細胞数は7.9±2.79×10⁷個であった。また2回目から2日後に3回目のBALを行ったときの回

表1 豚における気管支肺胞洗浄回数と回収率ならびに総細胞数

	初回 BAL (n=16)	2回 BAL (n=4)	3回 BAL (n=4)	4回 BAL (n=4)
洗浄液の回収率(%)	74.8±9.37	71.5±6.86	74.5±9.71	74.8±7.09
総細胞数 (×10 ⁷)	6.5±1.89	7.9±2.79	6.6±2.96	9.2±2.11

平均値±標準偏差

収率と総細胞数は、それぞれ $74.5 \pm 9.71\%$ 、 $6.6 \pm 2.96 \times 10^7$ 個であった。さらに2日後に4回目のBALを行ったときの回収率、細胞数はそれぞれ $74.8 \pm 7.09\%$ 、 $9.2 \pm 2.11 \times 10^7$ 個であった。

初回、2回、3回、4回目のそれぞれのBALにおいて回収率、総細胞数に差は認められなかった。

2) 細胞分画

BALにおける細胞分画を図1に示した。初回マクロファージが $83.6 \pm 8.69\%$ と主体をなし、つづいてリンパ球が $14.8 \pm 8.25\%$ をしめ、好中球、好酸球はそれぞれ $1.1 \pm 0.90\%$ 、 $0.1 \pm 0.2\%$ ときわめて少ない割合をしめるに過ぎなかった。また2回、3回、4回目のBALにおけるマクロファージのしめる割合は、 $81.1 \pm 3.97\%$ 、 $61.1 \pm 20.14\%$ 、 $76.6 \pm 8.50\%$ で、いずれのものも初回と比較して有意な差は認められなかった。

3) イースト粒子貪食能

BALにより回収した肺胞マクロファージによるイースト粒子貪食能の結果を表2に示した。初回BALにおけるイースト粒子貪食率は、 $72.8 \pm 8.05\%$ を示していた。2回、3回、4回目のBAL細胞による貪食率は、各々 $73.5 \pm 6.52\%$ 、 $73.8 \pm 7.35\%$ 、 $70.5 \pm 4.81\%$ で、初回の値と比較し、有意な差は認められなかった。

4) NBT還元能

初回BALを行った16頭のうち、9頭について肺胞マクロファージの、NBT還元能を測定し、またこのうち2頭については4回目のBALまで肺胞マクロファージのNBT還元能を測定し表3に示した。

初回BALにおけるNBT還元能は、 0.051 ± 0.028 であった。また2回、3回、4回目では、それぞれ 0.063 ± 0.015 、 0.111 ± 0.013 、 0.148 ± 0.043 であり、初回と比較し3回目 ($p < 0.01$)、4回目 ($p < 0.05$) には有意差が認められた。

3. 考 察

ブタの気管支肺胞洗浄法は、NEUMANN⁸⁾による気管支ファイバースコープを用いた方法や、HARMSENN⁴⁾によるダブルルーメンカテーテルを用いた方法がある。

気管支ファイバースコープを用いた今回の成績でも回収率、総細胞数、細胞分画の点では、NEUMANNらの報告や、HARMSENNらの報告とほぼ同様な結果が得られた。ヒトやウサギでは、マクロファージが80%から95%をしめ^{7,13,14)}、健康人においてもマクロファージが約80%と、健康豚と同様な肺胞内の細胞組成を示すことを表している。ヒトでは間質性肺炎や、過敏性肺臓炎などの疾患時にマクロファージの割合が減少し、好中球や、リンパ球の割合が増加することが報告されている^{7,14,15)}。また喫煙の有無によってBAL細胞の総細胞

表2 豚における気管支肺胞洗浄回数と肺胞マクロファージのイースト粒子貪食率

	初回 BAL (n=16)	2回 BAL (n=4)	3回 BAL (n=4)	4回 BAL (n=4)
平均値(%)	72.8	73.5	73.8	70.5
標準偏差	8.05	6.52	7.35	4.81

表3 豚における気管支肺胞洗浄回数と肺胞マクロファージのNBT還元能

	初回 BAL (n=9)	2回 BAL (n=4)	3回 BAL (n=2)	4回 BAL (n=2)
平均値	0.051	0.063	0.111**	0.148*
標準偏差	0.028	0.015	0.013	0.043

** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$

数や、細胞分画に差があることも報告されているが⁹⁾、ブタにおいてもオガク豚豚舎とケージ飼いや飼育環境による差があるかどうか易感染性と関連して検討する必要があると考えられる。

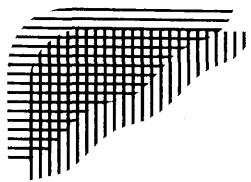
外来微生物に対する肺胞マクロファージの主要な役割は、肺胞内に侵入してきた異物を貪食し、さらにそれを殺菌することである。このような機能について BROWN¹⁾、FORMAN²⁾、FOX³⁾、MARKHAM⁵⁾は、ウシの肺胞マクロファージの種々の細菌などに対する貪食能を報告している。ZEIDLER⁶⁾らは屠殺後のブタの肺胞マクロファージの貪食能¹⁰⁾や殺菌能の指標である Superoxide anion(O_2^-)産生について報告している¹⁷⁾。今回BAL細胞についてマクロファージの機能検査であるイースト粒子に対する貪食試験および、NBT還元試験を行った。NBT還元試験は、貪食刺激によって生ずる O_2^- によりNBTが還元され、ホルマザン色素が生成されることを利用した殺菌能の間接的測定法である。これらの機能を測定し健康豚における正常範囲を示したことは、種々の疾患時における機能の変化や、免疫賦活剤等の薬剤投与による影響を検討するうえで非常に有用であると考えられる。

HARMSENN⁴⁾は初回BALの5日後に、2回目のBALを、さらに7日後に3回目のBALを実施して、繰り返しのBALによる影響を検討し、総細胞数や細胞分画は変化しないことを示している。今回のファイバースコープでの成績では、2日間隔でBALを実施しても総細胞数、細胞分画、イースト粒子貪食能には影響を与えないことを示した。このことから2日という短い間隔でのBAL細胞の細胞組成の変化を追跡することが可能であると考えられる。しかしながら、NBT還元能は3回目以後有意な上昇を示したことから、短い間隔でBALを実施し、肺胞マクロファージのNBT還元能の評価を行う場合、BALのみを繰り返す未処置対照群をおく必要があることを示唆している。

以上のように、豚の気管支肺胞洗浄法は、気道内に存在する細胞を直接洗浄により回収可能なことから、気道局所の防御能を知る上で有用な方法であり、豚の呼吸器疾患を解明するのに重要な検査法の一つとして利用することを検討する必要があるものと考えられた。

引用文献

- 1) BROWN, T. T. and ANANABA, G.: *Am J Vet Res*, 49, 1447~1451 (1988)
- 2) FORMAN, A. J., BOBIUK, L. A., BALDWIN, F., et al.: *Am J Vet Res*, 43, 1174~1179 (1982)
- 3) FOX, M. L.: *Can J Microbiol*, 19, 1207~1210 (1973)
- 4) HARMSSEN, A. G., BIRMINGHAM, J. R., ENGEN, R. L., et al.: *J Immunol Methods*, 27, 199~202 (1979)
- 5) MARKHAM, R. J. F. and WILKIE, B. N.: *Am J Vet Res*, 41, 18~22 (1980)
- 6) 村田英雄, 高橋秀之, 松本英人: 家畜衛試研究報告, 88, 17~24 (1985)
- 7) 中山 正, 森口博基, 安岡 勲: 気管支, 4, 137~145 (1982)
- 8) NEUMANN, R., LEONHARDT, W., BALLIN, A., et al.: *Arch exper Vet med*, 39, 525~534 (1985)
- 9) REYNOLDS, H. Y. and NEWBALL, H. H.: *J Lab Clin Med*, 84, 559~573 (1974)
- 10) ROTH J. A. and KAEBERLE, M. L.: *Vet Immunol Immunopathol*, 2, 157~174 (1981)
- 11) 佐藤利雄: 岡山医学会雑誌, 94, 115~129 (1982)
- 12) SCHIEFER, B. and GREENFIELD, J.: *Can J Comp Med*, 38, 105~110 (1974)
- 13) 杉本峰晴, 安藤正幸, 千場 博, ほか: 日胸疾会誌, 18, 780~786 (1980)
- 14) 竹山博泰: 岡山医学会雑誌, 93, 667~683 (1981)
- 15) 竹山博泰: 岡山医学会雑誌, 93, 685~700 (1981)
- 16) TUJIMOTO, H., HASEGAWA, A., and TOMODA, I.: *Jpn J Vet Sci*, 45, 373~382 (1983)
- 17) ZEIDLER, R. B. and KIM, H. D.: *J Leukocyte Biol*, 37, 29~43 (1985)
- 18) ZEIDLER, R. B., FLYNN, J. A., ARNOLD, J. C., et al.: *Inflammation*, 11, 371~379 (1987)



健保略称
強ミノC

慢性肝疾患の 肝機能異常を改善する…

健保適用

- 適応症 「慢性肝疾患における肝機能異常の改善」
- 用法・用量 1日1回, 40mlを静脈内に注射する。
年齢, 症状により適宜増減する。

■グリチルリチン製剤

強力ネオミノファーゲンシー

包装 20ml 10管・30管, 5ml 5管・50管, 2ml 10管・100管

▶使用上の注意などについては, 添付文書をご参照下さい。

株式会社 強ミノC ミノファーゲン製薬本舗 営業本部 〒107 東京都港区赤坂8-10-22 TEL(402)6201