

令和元年 6月 11日

日本音声言語医学会

理事長 大森孝一様

会員番号 5211

申請者氏名 上羽 瑠美 印

## 助成研究実績報告書

令和元年 5月 30日付で助成金交付決定を受けた研究が完了したので、次のとおりその実績を報告します。

記

### 1 研究課題名

造影剤誤嚥による急性・慢性気道組織障害の組織学的・分子生物学的機序の解明—嚥下造影

検査で安全な造影剤は何？

2 交付決定助成金額 500,000 円

### 3 添付書類

- (1) 助成研究実績報告書（付表1）
- (2) 助成研究収支計算書（付表2）
- (3) その他参考資料

# 助成研究実績報告

申請者	上羽 瑠美
研究実施期間	平成30年7月1日—平成31年5月30日
研究課題名	造影剤誤嚥による急性・慢性気道組織障害の組織学的・分子生物学的機序の解明—嚥下造影検査で安全な造影剤は何？
目的	<ul style="list-style-type: none"> <li>「造影剤誤嚥」による急性及び慢性気道障害の背景機序を免疫組織学的・分子生物学的に解明すること。</li> <li>臨床で使用頻度の高い「硫酸バリウム (Ba)」と「イオン性ヨード系造影剤 (ICA)」, 「非イオン性ヨード系造影剤 (NICA)」による肺障害の程度を比較すること。</li> <li>気道障害の機序背景を検証することで、臨床（嚥下造影検査）における注意点や対策を考案すること。</li> </ul>
方法	<p>I. 動物モデルの作成</p> <p>Sprague Dawley ラット（以下ラット：8週齢・オス）を使用し、キシラジン・ケタミン腹腔投与後に喉頭内視鏡で喉頭を確認後、27G 注入器で造影剤（詳細下記）を気管内投与し、動物モデルを作成する。（ヒト：10ml/50Kg 相当）</p> <p>*造影剤濃度、投与グループ</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 空気：60 ul</li> <li>2. 生理食塩水（生食）：60 ul/rat</li> <li>3. 硫酸バリウム (Ba)：(60% w/v) 60 ul</li> <li>4. ICA(ガストログラフィン<sup>®</sup>)：ICA 60 ul</li> <li>5. NICA(オムニパーク<sup>®</sup>)：NICA 60 ul</li> </ol> <p>II. 解析：造影剤による気道組織障害機序の解明</p> <p>モデル作成2日（急性障害）、30日後（慢性障害）に実験解析を行う。組織解析用のものはホルマリン固定後にEDTAで脱灰処置し、パラフィン包埋または凍結して切片を作製する。遺伝子解析用のものは、気道組織（気管・肺）からRNAを抽出しcDNA合成する。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>A) 組織解析：HE染色による組織障害の確認</li> <li>B) 免疫組織染色：好中球、マクロファージ、CD3<sup>+</sup>T細胞</li> <li>C) 分子生物学的解析：qRT-PCR法で炎症性サイトカイン (<i>Tnf</i>, <i>Il1b</i>, <i>Ifng</i>) や線維化マーカー (<i>Tgfb1</i>, <i>Pdgfa</i>) の定量解析を行う。</li> </ol> <div data-bbox="646 1630 1158 1998" data-label="Diagram"> <p><b>動物モデル</b></p> <p>造影剤 (気管内投与)</p> <p>SD rats (8 week, ♂)</p> <p>Day 0 Day 2 Day 30</p> <p>組織採取 組織採取</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 組織学的検証             <ol style="list-style-type: none"> <li>a. HE染色：組織構造確認（気管、肺胞上皮など）</li> <li>b. 免疫組織染色：好中球、マクロファージ、CD3<sup>+</sup>T細胞</li> </ol> </li> <li>2. 分子生物学的検証             <ol style="list-style-type: none"> <li>a. 定量的RT-PCR                     <ul style="list-style-type: none"> <li>炎症性サイトカイン (<i>Tnf</i>, <i>Il1b</i>, <i>Ifng</i>)</li> <li>線維化マーカー (<i>Tgfb1</i>, <i>Pdgfa</i>)</li> </ul> </li> </ol> </li> </ol> </div> <p>III. 造影剤による気道組織障害機序をもとに、安全な造影剤使用方法を考案</p>

<p>結 果</p>	<p>I. 急性肺障害（投与2日目解析）</p> <p>① 組織変化  空気、生食、NICA 処置群では、明らかな組織障害を認めなかった。Ba 処置群では、Ba 細粒が肺全体に散らばり、肺胞壁や細気管支壁の肥厚および著明な炎症細胞浸潤を認めた。ICA 処置群では肺胞内に僅かな鬱血所見を認めたが肺水腫やその他明らかな組織変化を認めなかった（図1）。</p> <p>② 免疫染色による炎症細胞の同定  MPO<sup>+</sup>細胞（顆粒球、マクロファージ）と CD3<sup>+</sup>リンパ球は空気、生食、ICA、NICA 処置群ではほとんど認めなかった。一方、Ba 処置群では MPO<sup>+</sup>細胞が Ba 細粒の周囲を取り囲み、さらに肺胞壁や細気管支壁に浸潤していた。また、CD3<sup>+</sup>細胞がびまん性に細気管支壁に浸潤していた（図2）。</p> <p>③ 炎症性サイトカインの解析  Ba 処置群で炎症性サイトカイン（<i>Tnf</i>, <i>Il1b</i>, <i>Il6</i>）の有意な上昇を認めたが、その他の群では上昇を認めなかった。また線維化関連マーカーの <i>Tgfb1</i> は Ba 処置群と ICA 処置群で上昇していた（図3）。</p> <p>II. 慢性肺障害（投与30日目解析）</p> <p>① 組織変化  空気、生食、ICA、NICA 処置群では、明らかな組織障害を認めなかった。Ba 処置群では、Ba 細粒が肺全体に散在して残存し、肺胞壁や細気管支壁の軽度肥厚と軽度炎症細胞浸潤や肉芽形成を認めた（図4）。</p> <p>② 免疫染色による炎症細胞の同定  MPO<sup>+</sup>細胞（顆粒球またはマクロファージ）と CD3<sup>+</sup>リンパ球は空気、生食、ICA、NICA 処置群では確認ほとんど確認できなかった。Ba 処置群では主な炎症細胞は CD3<sup>+</sup>細胞で肺胞壁や細気管支壁に認めたが、MPO<sup>+</sup>細胞はわずかに肺胞周囲に認めるのみであった（図5）。</p> <p>③ 炎症性サイトカインの解析  Ba 処置群で炎症性サイトカインのうち <i>Tnf</i> のみで有意な上昇を認めたが、その他の群では上昇を認めなかった。また線維化関連マーカーはいずれの群でも上昇していなかった（図6）。</p>
<p>倫理的配慮</p>	<p>動物実験については、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の許可（医-P17-126）を得ており、実験計画に基づいて施行した。</p>
<p>考 察</p>	<p>本検討の結果、臨床で使用する量の造影剤の誤嚥（10ml/50Kg）においては、NICA が肺の組織障害を呈する可能性が低く、ICA は急性期に軽度鬱血を生じるものの、慢性的には炎症を示さず、Ba が最も肺障害性が強いことが明らかになった。Ba は非溶性であるため急性障害のみならず、肺組織に滞留し、慢性的な組織障害をきたすことも明らかになった。</p> <p>Ba による急性炎症の機序としては、Ba に対する異物反応が主な原因と推察した。Ba への異物応答としてマクロファージが Ba 周囲に集簇し、TNF や IL-1<math>\beta</math>、IL-6 を産生し、好中球やリンパ球の遊走を促進する。その後、好中球やリンパ球が集積し、IFN<math>\gamma</math> を産生することでさらにマクロファージを活性化させることで炎症が高まる。これらの刺激で TGF<math>\beta</math> や PDGF が産生され、組織の線維化につながる可能性が推測された（図7）。</p> <p>慢性的な肺障害を生じる造影剤も Ba のみであった。理由として Ba が非溶性であり、排出されない限り肺組織内にとどまるため、Ba 細粒に対する免疫寛容が生じ炎症反応が沈静化するまでは、炎症が持続すると考えらえる。</p> <p>臨床において、嚥下機能検査で使用する造影剤は、可能であれば NICA が最も肺障害性が低く安全である。肺機能が低下した患者は嚥下力が低く、Ba 誤嚥した際に肺に残存し易い為、Ba を極力使用しないか使用量を減らすべきであろう。</p>

図1. (論文1より転載)

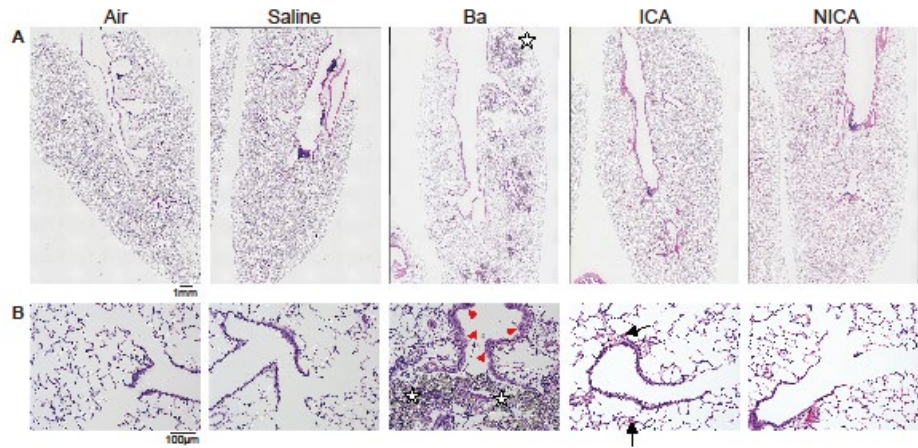


図2. (論文1より転載)

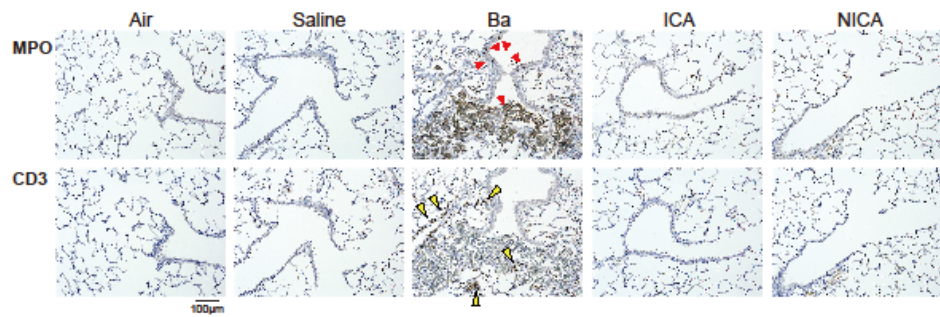


図3. (論文1より転載)

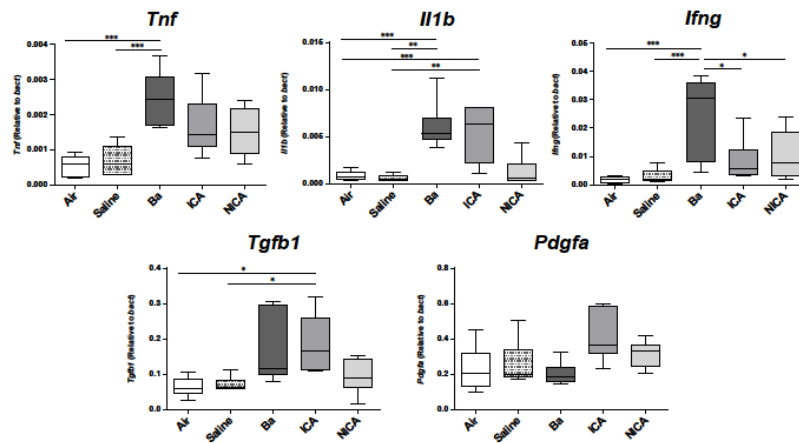


図4. (論文2より転載)

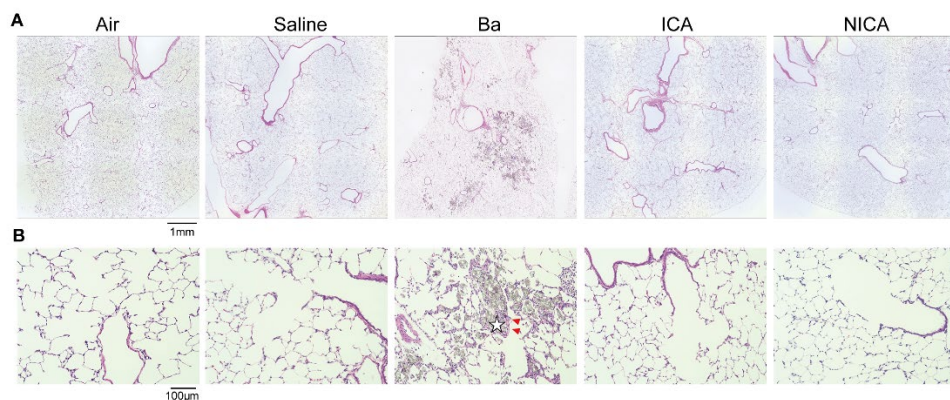


図5. (論文2より転載)

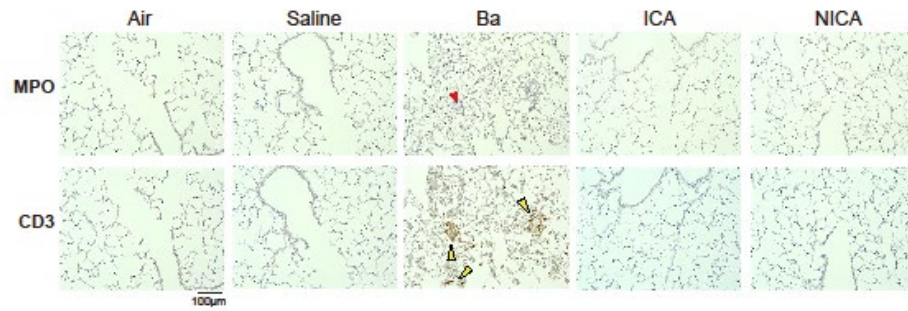


図6. (論文2より転載)

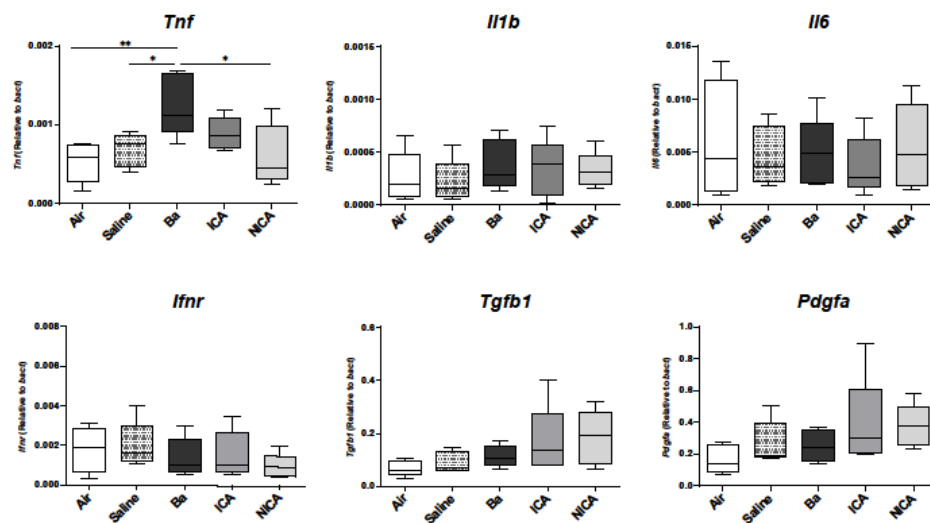
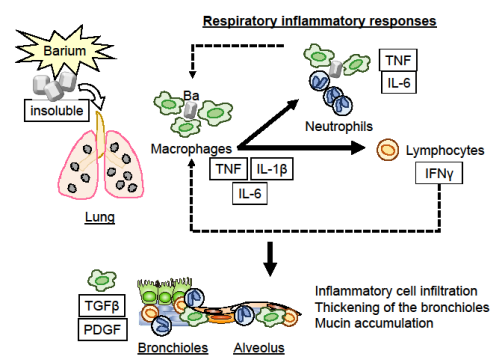


図7. (論文1より転載)



論文：

1. Ueha R, Zelter NN, Sato T, Goto T, Nito T, Belafsky CP, Yamasoba T. Acute inflammatory response to contrast agent aspiration and its mechanisms in the rat lung. *Laryngoscope*. 2018). <https://doi.org/10.1002/lary.27663>.
2. Ueha R, Zelter NN, Sato T, Goto T, Nito T, Tsunoda K, Belafsky CP, Yamasoba T. Chronic inflammatory response in the rat lung to commonly used contrast agents for videofluoroscopy. *Laryngoscope Investigative Otol*. 2019. <https://doi.org/10.1002/lio.2.269>