

## 高濃度酸素暴露下におけるマウスの 実験的肺カンジダ感染

成家 庄 二  
信州大学医学部第2病理学教室  
(指導: 発地 雅夫教授)

### An Experimental Pulmonary *Candida* Infection of Mice Exposed to High Concentration of Oxygen

Shoji NARIYA  
Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine  
(Director: Prof. Masao HOTCHI)

Adult respiratory distress syndrome (ARDS) has many causes including oxygen toxicity. In patients with ARDS, the lung shows a characteristic appearance which is called diffuse alveolar damage (DAD). DAD mainly consists of alveolar capillary congestion, intra-alveolar edema, hyaline membrane formation, and proliferation of type II alveolar epithelial cells. In this situation, fungal infections are frequently seen in the lungs of autopsy cases.

To determine the effect of oxygen on pulmonary *Candida* infection, an intratracheal inoculation of  $2 \times 10^8$  live spores of *Candida albicans* was performed in mice under exposure to 85% oxygen. The animals were continuously exposed to 85% oxygen from 3 days before the inoculation to the time of sacrifice. The animals were sacrificed 12 hrs, 1, 2, 3, 5, and 7 days after the inoculation and their lungs were subjected to histopathological examination; colony forming units of *C. albicans* in the lung were also counted.

Histopathological examination revealed that the sequence of pathological changes in the lungs of the oxygen-exposed animals was almost the same as in controls except for marked exudates and organization in the lesions of the former. No proliferation of the fungus was observed in the animals of both groups. However, the elimination of the fungus was significantly decreased in the oxygen-exposed animals.

Consequently, it was suggested that the defense mechanisms against *C. albicans* in the lung are impaired by exposure to high concentrations of oxygen. *Shinshu Med. J.*, 38: 47-61, 1990

(Received for publication September 30, 1989)

---

**Key words:** experimental candidiasis, *Candida albicans*, oxygen toxicity, diffuse alveolar damage, adult respiratory distress syndrome

実験的カンジダ症, *Candida albicans*, 酸素中毒, びまん性肺胞傷害, 成人呼吸促迫症候群

---

## I 緒 言

Adult respiratory distress syndrome (ARDS) は、様々な原因によっておこる続発性の肺障害であり<sup>1)-3)</sup>、重症例では酸素療法に不応な進行性の呼吸困難をきたす。死亡例の肺は重量を増し、暗赤色、肉様充実性で、組織学的には、肺胞内および間質の水腫、毛細血管のうっ血、肺胞壁における硝子膜の出現、II型肺胞上皮細胞の増殖などが認められる<sup>1)</sup>。経過の遷延した例では、肺胞内や間質に線維化を生ずることもある。このような肺病変に対し、Katzensteinらは、diffuse alveolar damage (DAD) という名称を与え<sup>4)</sup>、これが今日広く用いられている。

ところで、ARDSには気管支肺炎が比較的高頻度に合併するということが知られているが<sup>1)</sup>、真菌感染という観点から検討した報告は見当たらない。ところが、日常の剖検例において、DADを示す肺には、しばしば真菌症の合併が認められる。剖検時に認められる肺真菌症の原因菌としては、カンジダ、アスペルギルス、クリプトコックス、ムーコルなどがあり、いずれも日和見感染としての性格が強い。また、重篤な呼吸不全をきたした状態では、当然のことながら誤嚥などによってこれらの真菌が肺内に到達する機会が増すと考えられる。しかし、免疫不全や誤嚥などのほかに、ARDSの病態そのものに肺真菌症を促進する因子が存在する可能性も否定できない。

ARDSの動物実験モデルとしては、オレイン酸やエンドトキソンの静注による肺水腫をはじめとして多数のものがあるが<sup>5)</sup>、高濃度酸素暴露もその一つである<sup>6)</sup>。また臨床的にも、ARDSで死亡した患者の多くは、末期に酸素療法を受けており、これがかえって肺病変を増強することがあるという指摘もある<sup>4)</sup>。

このような観点から、高濃度酸素に暴露したマウスを用い、*Candida albicans*による感染実験を行って若干の知見を得たので報告する。

## II 材料と方法

## A 材 料

## 1 実験動物

体重25~30g、6~7週齢の雄性ICRマウス(静岡県実験動物農業協同組合)を使用した。

## 2 使用菌株と生菌浮遊液

*C. albicans* IFO-0579株をSabouraud寒天培地で37°C、3日間培養した後胞子を集め、滅菌生食液

に $4 \times 10^7$ /mlになるように生菌浮遊液を作製した。

## B 実験方法

## 1 高濃度酸素暴露

アクリル製のチャンパー(180×80×80cm)内に最高40匹までのマウスを4箱のアルミニウム製のケージに分けて、ケージごと入れた後、チャンパーを閉鎖して純酸素を10 l/minの流量で送入手し、酸素濃度を85%とした。この後、0.2~0.5 ml/minの流量で純酸素を灌流し、随時流量を調節して酸素濃度が $85 \pm 2\%$ になるようにした。マウスの呼吸によって生ずる二酸化炭素を除去するため、ソーダライムをチャンパー内に敷きつめ、3日おきに交換した。二酸化炭素濃度は、ガステック(ガステック社製)により随時測定し、0.1%以下に保った。マウスを容れたケージの出し入れの操作時、および純酸素の灌流を除き、チャンパーは閉鎖系とし、1回の実験が終了するごとにチャンパー内の清掃および換気を行った。チャンパーは空調設備を有する信州大学医学部中央動物実験室内に設置した。

上記の方法により、酸素暴露開始後1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10日と、経目的に屠殺して、肺の組織像を観察するとともに、途中で死亡したマウスについても組織像を観察した。肺組織標本および電顕試料の作製は以下の方法で行った。

Pentobarbital sodium 40mg/kgを腹腔内に投与した後、開腹、開胸を行い、気管より21ゲージの注射針を挿入して、リン酸緩衝2.5%グルタルアルデヒドを20cm水柱圧で注入し、縫合糸にて気管を結紮した。肺と心臓を一塊として取り出した後、右肺上葉を切り離し、1mm角のブロックに細切し、シリジ内で用手的に減圧して、同濃度のグルタルアルデヒドにて2時間固定した。8.5%ショ糖加里リン酸緩衝液にて洗浄後、1%四酸化オスミウムにて4°C、1時間後固定を行い、Quetol 812(日新EM, 東京)に包埋した。LKB-4800型超マイクロトームで、ダイヤモンドナイフ(DIATOME Ltd., Switzerland)を使用し、干渉色シルバー・ゴールド(800~1000Å)の厚さに切られた超薄切片を、銅グリッド(Veco, Netherlands)にのせ、1%酢酸ウランおよびReynolds法クエン酸鉛による二重染色を施行後、カーボンを蒸着し、日立HS-9型透過型電子顕微鏡(75kV)で観察した。右上葉を切り離した残りの肺はリン酸緩衝10%中性ホルマリン液に再固定し、光顕的検索を行った。

2 *C. albicans*の接種と肺内生菌数の算定  
動物を以下の2群に分けた。

(1) 暴露群：前記の方法にて85%酸素に3日間暴露したもの (n=40)

(2) 非暴露群：無処置のもの (n=35)

#### a 肺内生菌数の算定

暴露群および非暴露群のマウスをそれぞれエーテル麻酔下で前頸部を正中切開し、 $2 \times 10^6/0.05\text{ml}$  の *C. albicans* の生菌浮遊液を、27ゲージの注射針を用いて気管より肺内に達するように接種した。暴露群は接種後ただちに85%酸素中に戻した。接種のためにチャンパーより大気中に出した時間は1時間以内であった。菌接種後12時間および1, 2, 3, 5, 7日目の肺内生菌数を算定し、その値を暴露群と非暴露群とで比較した。生菌数の算定は、全肺を無菌的に摘出した後、5mlの滅菌生理食塩水でホモジネートし、その0.1ml (12時間目および1~3日目) ないし0.5ml (5, 7日目) を Sabouraud 寒天平板培地に塗布し、3日後にコロニー数を計測することにより行った。

#### b *C. albicans* 接種による肺病変の観察

暴露群、非暴露群に上記と同様の生菌液を接種した後、同様の日程で経時的に屠殺した。固定はリン酸緩衝10%中性ホルマリン液を用いて同様の方法で行い、光顕標本を作製した。光顕標本に関してはHE染色のほかPAS染色、Grocott染色および、当教室で作製した抗*C. albicans*抗体<sup>6)</sup>を用いて酵素抗体間接法による免疫染色も行った。

なお、これらの実験に先立ち、12匹のマウスについて、暴露群と同じ日程で酸素暴露を行い、*C. albicans*の菌液のかわりに同量の滅菌生食液を同様の方法で肺内に注入し、これらを対照群として同じ日程で2匹ずつ屠殺し、肺の組織像を観察した。

### III 結 果

#### A 高濃度酸素暴露による肺病変

##### 1 全身状態および肺の肉眼所見

85%酸素暴露開始後3日目まではマウスの全身状態に著変はなかった。4日目頃より食餌の摂取量が減少し、ういそうが進行するとともに、努力性呼吸や軽度のチアノーゼが出現し、活動性も低下した。40匹のマウスのうち、2匹が暴露後5日目に、1匹が6日目に死亡した(死亡群)。死亡したマウスの肺は暗赤色を呈し、含気に乏しく、固定液の注入に対する抵抗が増加しており、人体例におけるDADの肉眼像と一致した。死亡を免れたマウス(生存群)では、様々な程度に肺のうっ血が認められたが、DADに相当する肉眼

像を呈したものはなかった。

##### 2 光顕所見

死亡群の肺では、光顕的に、呼吸細気管支や肺胞管、および肺胞内の硝子膜の形成(Fig. 1)、毛細血管内あるいは肺胞中隔における多形核白血球(PMN)の集簇、血管周囲腔の水腫性拡張、毛細血管のうっ血などが認められた。II型肺胞上皮細胞の増生や、肺胞内および間質の線維化などは認められなかった。

生存群では、光顕的には暴露後4日目以降に毛細血管のうっ血や血管周囲腔の水腫性拡張が様々な程度に認められ、肺胞中隔への軽度のPMNの集簇が認められるものもあった。

いずれの群でも気管支粘膜には著変は認められなかった。

##### 3 電顕所見

生存群では、暴露4日以降のものに、局所的な肺胞中隔の毛細血管内皮の空胞化や間質の浮腫を認めた(Fig. 2)。浮腫は主としていわゆるthick sideに著明であった。一部に毛細血管内皮細胞の細胞質の腫大も軽度に認められた。I型およびII型の肺胞上皮細胞には著変は認められなかった。

死亡群では、毛細血管内皮には、上記の所見に加えて毛細血管内皮の基底膜からの剝離が認められた。さらにI型肺胞上皮細胞の壊死や剝離もみられた。肺胞腔内には、光顕像における硝子膜に相当する、フィブリンや細胞破砕物の混合した物質が認められた。また毛細血管の一部には内腔に著明なPMNの集簇がみられた(Fig. 3, 4)。

いずれの群においても線維芽細胞の増殖は認められなかった。

#### B 高濃度酸素暴露の*Candida*感染への影響

##### 1 肺内生菌数の算定

暴露群と非暴露群における、*C. albicans*接種後の肺内生菌数の算定の結果をTable 1に示す。また、接種後各日における平均値の推移をFig. 5に示す。暴露群では非暴露群に比べて菌の排除が遅延し、接種後7日を経ても、少数ながら肺内に生菌が残存した。

##### 2 肺病変の経時的变化

###### a 非暴露群

接種後12時間では、*C. albicans*の菌体は気道粘膜面および肺胞内に認められ、その周囲にはPMNを主体とした炎症性細胞浸潤があり、これらの病巣中には破壊された菌体も認められた。マクロファージ(Mφ)と考えられる単核細胞による菌体の貪食像も散見された。

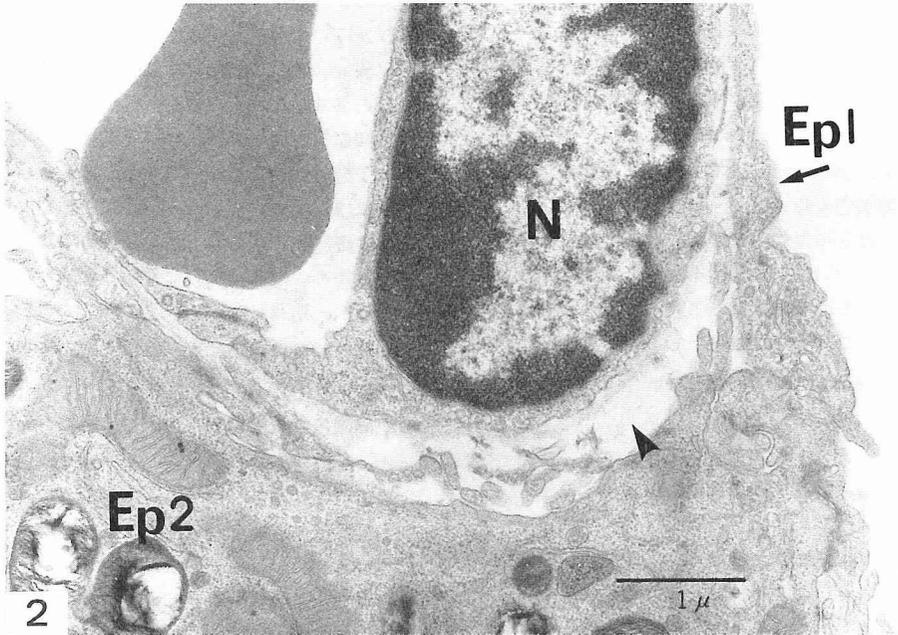
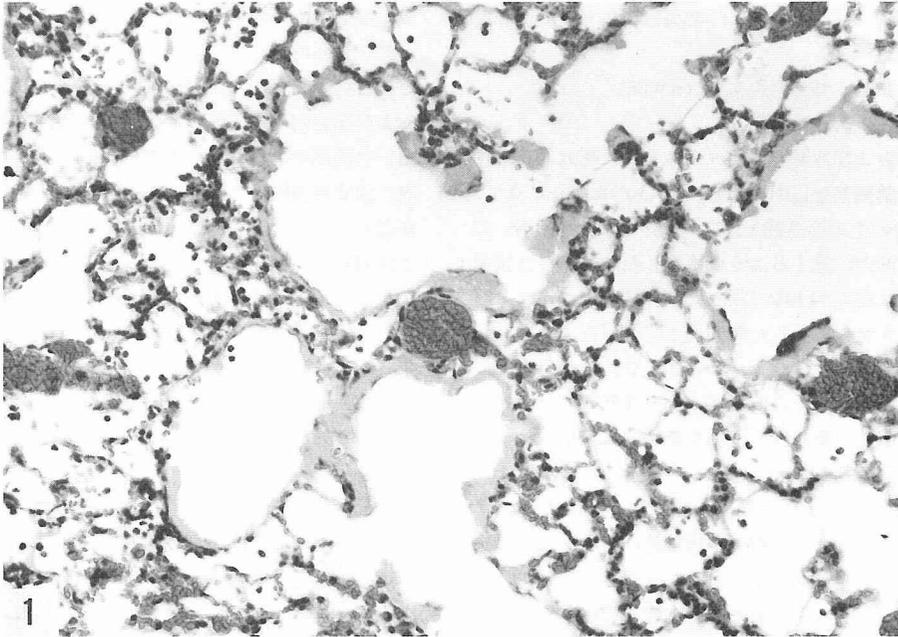


Fig. 1 Pulmonary finding in mouse which died after exposure to 85% oxygen. Note hyaline membranes lining alveolar ducts and alveoli, and capillary congestion. (HE,  $\times 260$ )

Fig. 2 Electron microscopic finding in the lung of mouse sacrificed 6 days after exposure to 85% oxygen. Note interstitial edema (arrowhead). N: nucleus of capillary endothelial cell, Ep1: cytoplasm of type I epithelial cell, Ep2: cytoplasm of type II epithelial cell.

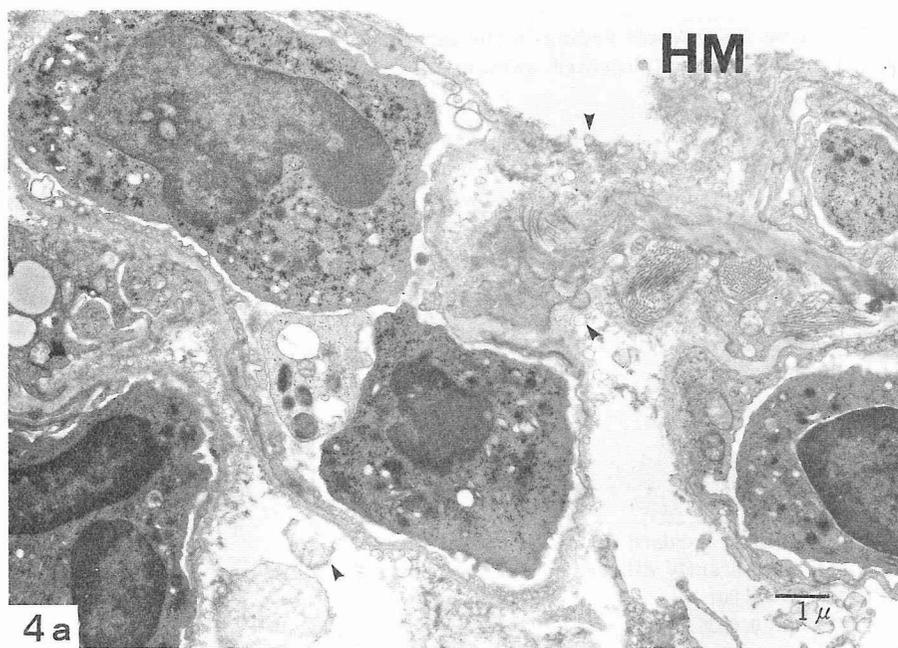
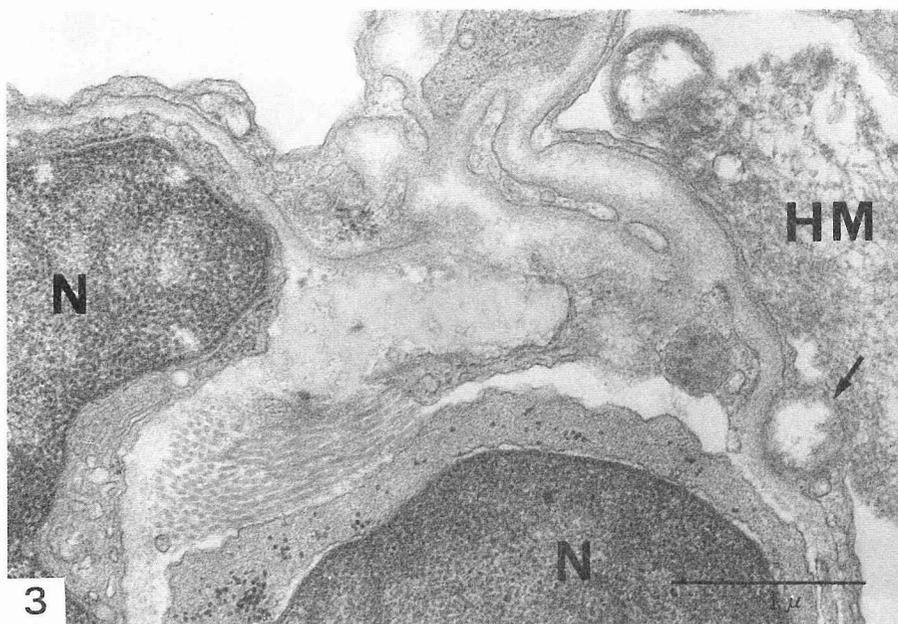


Fig. 3 Electron microscopic finding in the lung of mouse which died 6 days after exposure to 85% oxygen. Note destruction of type I epithelial cell (arrow), marked interstitial edema, and hyaline membrane in alveolar lumen, HM : hyaline membrane, and N : nucleus of capillary endothelial cells.

Fig. 4a Electron microscopic finding in the lung of mouse which died 6 days after exposure to 85% oxygen. Note marked accumulation of platelets and PMNs in capillary lumen, and destruction of alveolar structure. Arrowheads : cell debris and HM : hyaline membrane.



Fig. 4b Electron microscopic finding in the same lung as Figure 4a. Note denuded base-ment membrane and localized swelling of endothelial cell (arrow). HM : hyaline membrane.

Table 1 Counts of colony forming unit of *C. albicans* yielded from whole lung tissues

Times after inoculation	Counts of colony forming unit	
	Control animals	85% O <sub>2</sub> exposed animals
12 hrs.	9305±5700* (n=5)	12860±3180 (n=5)
1 day	1005±683 (n=5)	3369±1059** (n=5)
2 days	50±40 (n=5)	650±343** (n=5)
3 days	0 (n=4)	55±9*** (n=5)
5 days	0 (n=5)	4±5**** (n=5)
7 days	0 (n=5)	4±5**** (n=5)

\* mean±standard deviation  
 \*\* significantly different from the control,  $p < 0.025$   
 \*\*\*  $p < 0.001$   
 \*\*\*\*  $p < 0.0025$

接種後1日では、菌体の破壊が進んだ以外は、接種後12時間の組織像と同様であった。

接種後2日では、病巣の炎症細胞の多くはPMNであるが、一部は豊富な好酸性の胞体を有するMφが多くなった。これらのMφの一部では、胞体内に抗カンジダ抗体陽性の顆粒状物質が認められた。明瞭な輪

郭を有する菌体成分は、ほとんど認められなかった。

接種後3日では、病巣の炎症細胞はほとんどMφのみとなり (Fig. 6)、菌体成分はほとんど認められなかった。

接種後5日目および7日目では (Fig. 7)、病巣は次第に吸収され、一部線維芽細胞が出現して肉芽形成に

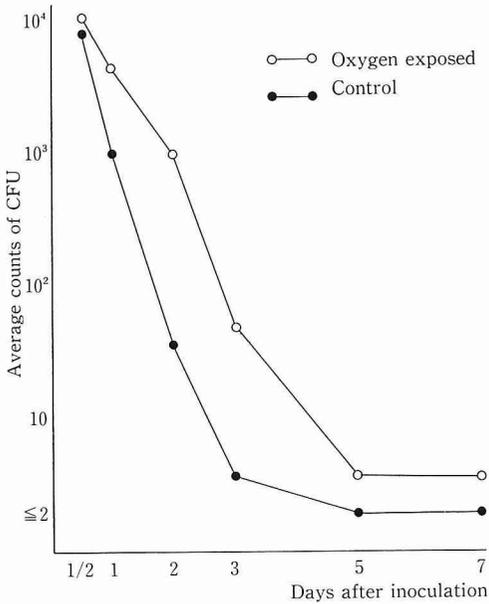


Fig. 5 Average counts of colony forming units (CFU) in whole lung tissues.

向かった。

b 暴露群

接種後12時間および1日では、病巣の組織像は非暴露群との間に大差はなかった (Fig. 8, 9)。しかし、2日および3日目では、非暴露群と比べて、食細胞に貪食された菌体の輪郭が比較的よく保たれていた。また、病巣への浸潤細胞がMφに置き換わる傾向が認められたが、その数は非暴露群に比べて少なく、多数のPMNが残存した。また、滲出液の吸収が遅延する傾向が認められた (Fig. 10)。

接種後5日および7日では、病巣の浸潤細胞がMφに置き換わるとともに、一部に線維芽細胞が出現し、肉芽形成に向かった (Fig. 11)。肉芽形成の程度は非暴露群に比べて強かった。菌体成分はほとんど認められなかった。

なお、生菌浮遊液のかわりに生理食塩水を肺内に注入した対照群では、光顯的には明らかな炎症性細胞反応は認められなかった。

以上の組織像の推移を Table 2 に示す。

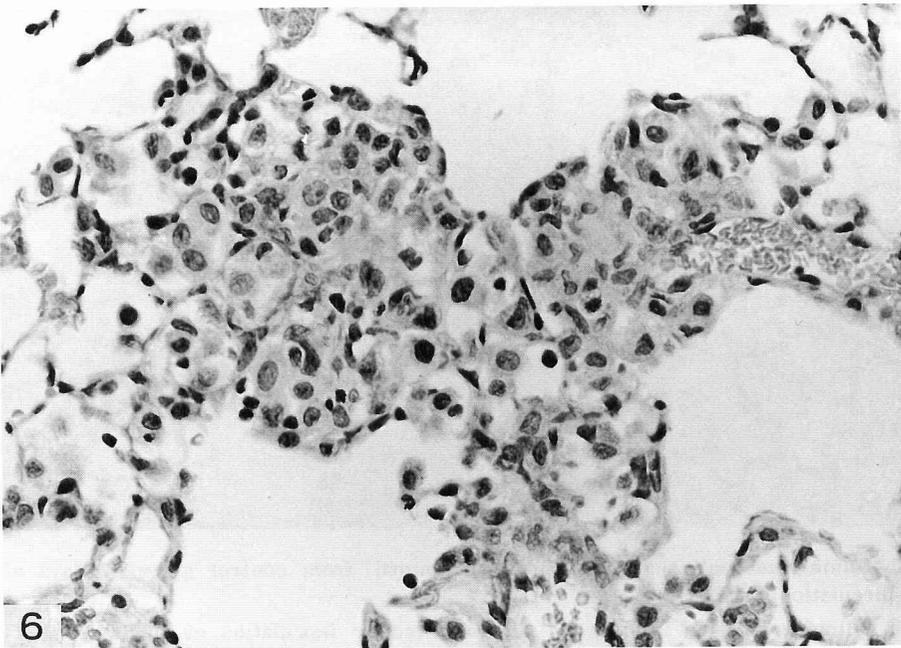


Fig. 6 Pulmonary lesion induced by *C. albicans* (control group, 3 days after inoculation). The lesion consists of an infiltrate of macrophages. (HE, ×420)

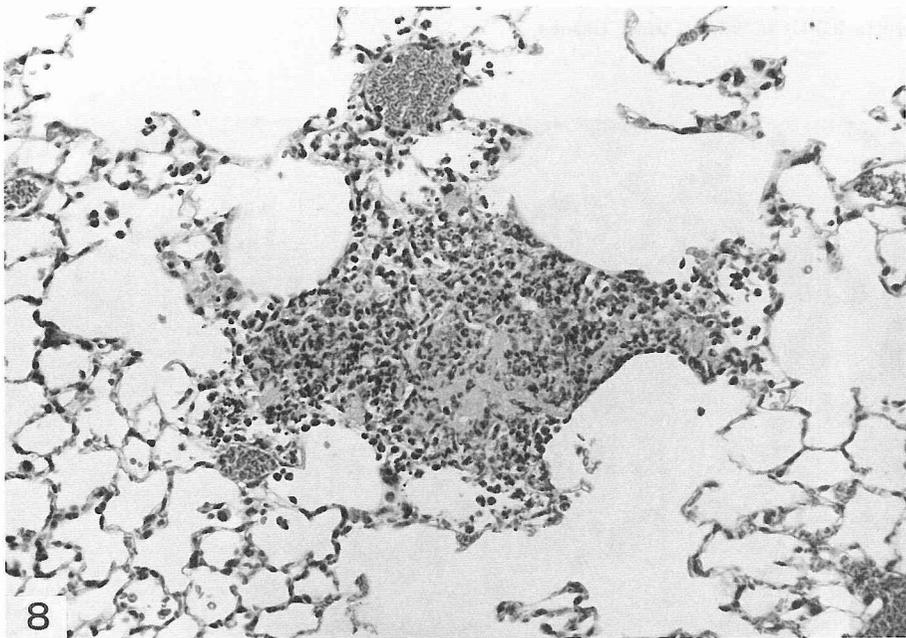
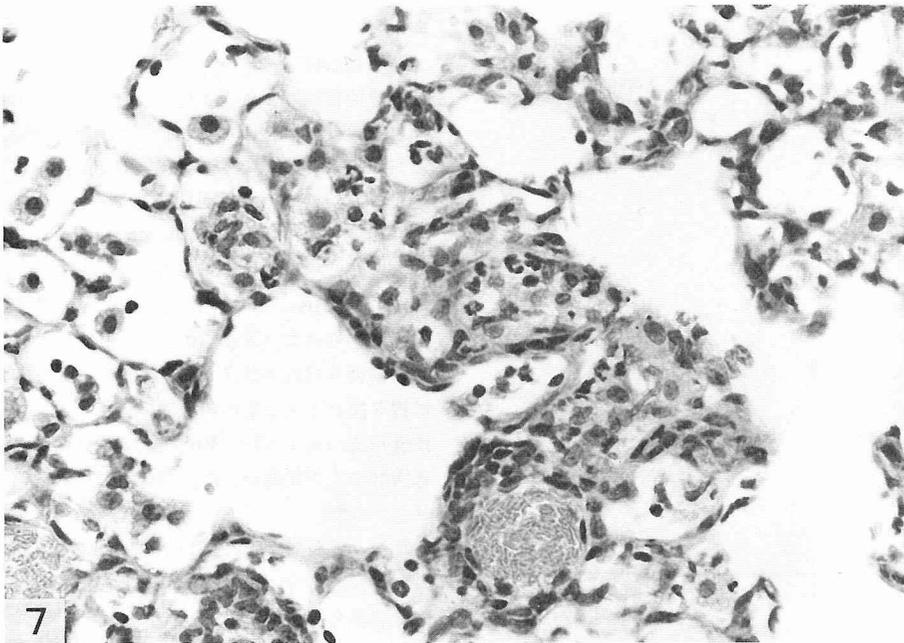


Fig. 7 Diminished pulmonary lesion in an animal from control group (7 days after inoculation). (HE,  $\times 420$ )

Fig. 8 Pulmonary lesion induced by the intratracheal inoculation of viable cells of *C. albicans* ( $O_2$ -exposed group, 12 hours after inoculation). The lesion consists of an infiltrate of PMNs. (HE,  $\times 200$ )

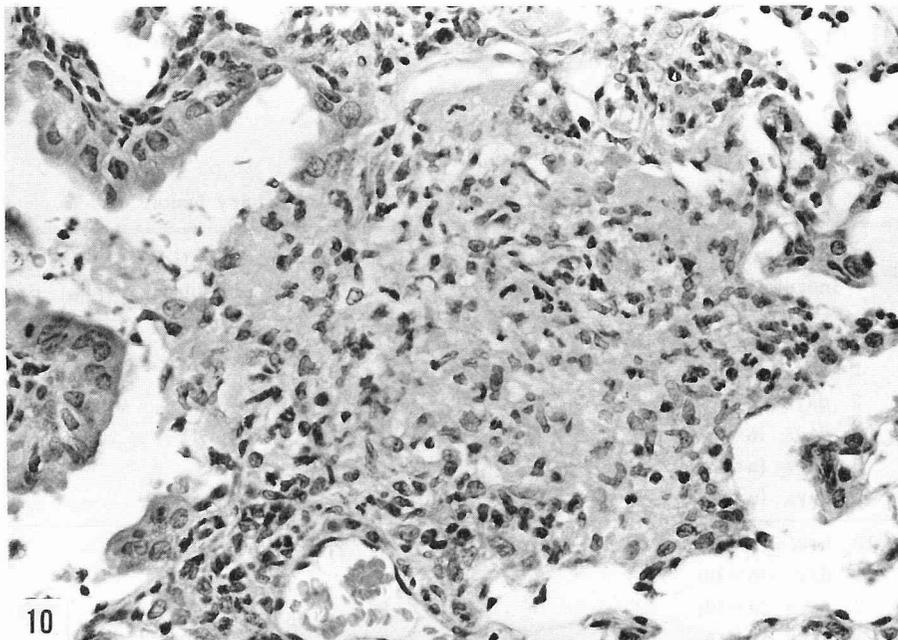


Fig. 9 The same lesion as Fig. 6. Spores of *C. albicans* are present (arrows). (Grocott's stain,  $\times 800$ )

Fig. 10 Pulmonary lesion induced by *C. albicans* (85%  $O_2$ -exposed group, 3 days after inoculation). Considerable numbers of PMNs and inflammatory exudate are seen. (HE,  $\times 420$ )

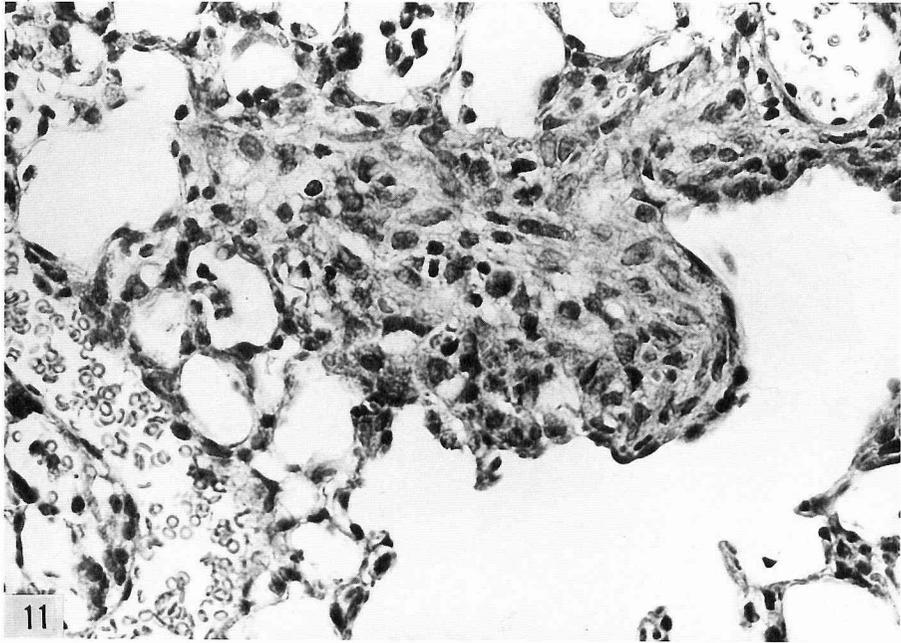


Fig. 11 Organized pulmonary lesion (85% O<sub>2</sub>-exposed group, 7 days after inoculation). (HE, ×420)

Table 2 Histopathological findings of pulmonary lesion

Animals	Times after inoculation	Reaction of PMN	Reaction of Mφ	Inflammatory edema	Proliferation of fibroblast	Fungal elements	
						Intact	Fragmented
Control	12 hrs. (n=5)	##	+	++	-	++	+
	1 day (n=5)	##	+	++	-	+	+
	2 days (n=5)	+	++	-	-	-	+
	3 days (n=5)	-	++	-	+	-	+
	5 days (n=5)	-	+	-	+	-	-
	7 days (n=5)	-	+	-	+	-	-
85% O <sub>2</sub> -exposed	12 hrs. (n=10)	##	+	++	-	++	+
	1 day (n=10)	##	+	++	-	++	+
	2 days (n=10)	++	+	+	-	+	+
	3 days (n=10)	++	+	+	-	+	+
	5 days (n=8)	+	+	+	+	-	+
	7 days (n=8)	+	+	-	++	-	+

## : marked, ++ : moderate, + : mild, - : absent

## IV 考 察

## A 高濃度酸素暴露による肺病変

高濃度酸素による障害 (oxygen toxicity) は、3.0 気圧以上の高圧では主として中枢神経系に、また 3.0 気圧以下の高濃度では主として肺に出現することが知られている<sup>7)</sup>。1.0 気圧以下の常圧における高濃度酸素による肺障害 normobaric oxygen toxicity of the lung に関する実験的研究は様々な動物を用いて行われており<sup>8)</sup>、酸素に対する耐性に種差が存在することも明らかにされている<sup>9)</sup>。しかし、形態学的研究は主としてラットおよびマウスを用いて行われてきた。

本実験で初めて肺に病変が認められたのは、85%酸素暴露 4 日目であり、毛細血管内皮の細胞質における空胞形成や間質の浮腫が局所的に認められた。この時点では肺胞上皮には著変は認められなかった。このように高濃度酸素暴露による初期病変が肺胞上皮よりも毛細血管内皮に出現した点は、Kistler ら<sup>10)</sup>、Adamson ら<sup>11)</sup> および Bowden ら<sup>12)</sup> の結果と一致した。毛細血管内皮細胞の形態学的な変化に関して、Crapo ら<sup>13)14)</sup> および Mastin ら<sup>15)</sup> は、成熟ラットを用いた実験で、リボゾームやミトコンドリアおよび小胞体といった organelle の増加と、その結果としての細胞質の腫大を強調し、高濃度酸素暴露に対する適応現象としての意義づけを行っているが、本実験では明らかではなかった。このことは、成熟マウスを用いた実験であることから、種差の影響が考えられる。

上記の初期病変にひきつづき、るいそうや食餌摂取の減少、活動性の低下、努力性呼吸、さらにはチアノーゼが認められた。これに対応して肺では光顕的に血管周囲の水腫や毛細血管のうっ血が認められた。このような所見は、Katzenstein ら<sup>4)</sup> が人体例で観察した DAD の初期病変に概ね相当する。この時点では肺胞上皮細胞の障害や肺胞腔内の水腫は認められないが、チアノーゼの存在は換気不全のあることを示している。この点に関し、Crapo ら<sup>13)14)</sup> は 85% の酸素に暴露した成熟ラットの肺について形態計測を行い、毛細血管床の減少、毛細血管内腔の狭小化、および毛細血管内におけるヘマトクリットの低下を認め、これらが換気不全の原因であることを推測している。しかし、この点に関しては気道の平滑筋の収縮の問題<sup>16)</sup> や血流と換気の分布の問題など、機能的な検討が必要と考えられる。

肺硝子膜の形成は、本実験では 85% の酸素に暴露した 40 匹のマウスのうち、5 日目および 6 日目に死亡した 2 匹にのみ認められた。これらのマウスの肺には光顕的に硝子膜の形成とともに毛細血管の著しいうっ血や肺胞中隔への PMN の集簇、および血管周囲の浮腫が認められた。電顕的には毛細血管内皮細胞の変性像や間質の浮腫に加えて、I 型肺胞上皮細胞の変性や剝離が著明に認められた。以上から、Adamson ら<sup>11)</sup> も指摘するように、I 型肺胞上皮細胞の障害が硝子膜の形成に深いかかわりがあることが示唆された。また、肺胞中隔への PMN の集簇が顕著であることより、Crapo<sup>17)</sup> の主張する、PMN の肺障害増強作用の存在が支持された。

高濃度酸素暴露による気道上皮の病変に関しては、Obara ら<sup>18)</sup> が 95~100% の酸素に暴露した成熟マウスの気道上皮を走査電顕を用いて観察し、クララ細胞の変形、線毛細胞における線毛の減少や短縮などを認めている。しかし、Bowden ら<sup>12)</sup> および Adamson ら<sup>11)</sup> は、7 日間の 90% 酸素暴露ではマウスの気道上皮に著変を認めないと述べており、本実験でも、10 日間の 85% 酸素暴露で気道上皮に病変を認めなかった。Obara ら<sup>18)</sup> の実験では用いている酸素濃度が高いことが一因と考えられる。

B 高濃度酸素暴露の *Candida* 感染への影響

*C. albicans* は、健康な成人の口腔内、咽頭および腸管の常在菌であり、通常はほとんど病原性を有しないが、感染に対する防御能の障害された宿主では、組織内に侵入して様々な病変を形成する<sup>19)</sup>。菌の侵襲に抵抗する宿主側の因子としては、皮膚や粘膜などの上皮および気道におけるサーファクタントなどの機械的障壁、常在微生物フローラ、抗カンジダ液性成分、食細胞による食食作用、液性免疫、細胞性免疫などがある<sup>20)</sup>。肺においては、*Candida* に対する感染防御には PMN による非特異的な菌の食食および殺菌作用が最も重要であり<sup>21)</sup>、cyclophosphamide などの抗癌剤やステロイド剤によって末梢血中の PMN の減少や機能低下がおこると、容易に *Candida* による感染が成立する<sup>19)22)</sup>。

本実験では、85% の酸素暴露により、肺での菌の処理が遅延することが示されたが、このことから、高濃度酸素暴露によって何らかの感染防御能の低下がおこっていることが推測される。

PMN に関しては、本実験では抗癌剤やステロイド剤による処置を行っていないので、全身的な数の減

少や機能の低下はない。したがって肺局所における *Candida* に対する PMN の遊走や殺菌が高濃度酸素暴露によっていかに影響を受けるかが問題となる。高濃度酸素暴露下では肺胞中隔に PMN の集簇がみられることは前述したが、これは高濃度酸素暴露による毛細血管内皮障害<sup>17)</sup>や、肺胞 マクロファージによる PMN に対する chemotaxin の放出<sup>23)</sup>の結果と考えられている。しかし、このようにして肺胞中隔に集簇した PMN が、新たに加えられる微生物に対してどのような態度をとるかという点については現在のところほとんど検討されていない。一方、高濃度酸素暴露による肺の毛細血管床の著明な減少<sup>13)14)</sup>は、PMN の流血中から病原体への到達には不利に働くと考えられる。本実験では、*Candida* に対する PMN の反応は組織学的に暴露群でも非暴露群と同程度に認められた。したがって、少なくとも本実験系においては、PMN の菌への遊走に対しては、高濃度酸素暴露の影響は少ないものと考えられた。PMN は食作用にともなって respiratory burst<sup>24)</sup>をおこし、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) や過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの活性酸素を産生する<sup>25)</sup>。Rister と Baehner<sup>26)</sup> はモルモットの PMN を *in vitro* で 85% の酸素に暴露し、 $O_2^-$  および  $H_2O_2$  の産生が有意に増加することを見出しており、高濃度酸素暴露下では過剰な活性酸素が PMN の細胞質内や細胞膜に存在することが予想される。Halliwell と Gutteridge<sup>27)</sup> は、このような過剰な活性酸素はかえって PMN の不活化を早める可能性のあることを指摘している。したがって、本実験でも PMN の殺菌能が肺において低下している可能性が考えられる。

本実験では、*Candida* 接種の初期より菌に対する  $M\phi$  の応答がみられ、PMN による菌の破壊に引き続いて、病巣に集簇する  $M\phi$  の数が著明に増加した。これらの  $M\phi$  のうち、初期に病変部に出現した  $M\phi$  はいわゆる resident  $M\phi$  と考えられ、PMN の浸潤に引き続いて出現した  $M\phi$  は血中の単球由来の  $M\phi$  と考えられる。これらの  $M\phi$  の形態学的および機能的差異については、肺の感染防御機構を論じる上で興味深い問題であるが、これら  $M\phi$  のサブセットの分類においては未だ解決していない問題も多く<sup>28)</sup>、ここでは一括して肺胞  $M\phi$  として扱った。

肺胞  $M\phi$  は、*Staphylococcus aureus* に対して高い殺菌能を有する<sup>29)</sup>が、Huber と LaForce<sup>30)</sup> は *S. aureus* を用いて、100% 酸素暴露によるマウス肺の bactericidal activity の低下を *in vivo* で証明し、

これが高濃度酸素暴露による肺胞  $M\phi$  の障害に基づくものであると述べている。さらに Suttorp と Simon<sup>31)</sup> は肺胞  $M\phi$  の *S. aureus* に対する殺菌能が高濃度酸素暴露によって低下することを *in vitro* で示し、この原因は肺胞  $M\phi$  による  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  などの活性酸素の産生が、高濃度酸素暴露によって低下することにあると結論している。

以上は細菌を用いた研究であり、*C. albicans* に関する同様な報告は見当たらないが、肺胞  $M\phi$  の胞体内に貪食された *C. albicans* の殺菌も、*S. aureus* などの細菌と同様に酸素依存性殺菌機序によるものであるといわれており<sup>32)</sup>、前記と同様の理由から、高濃度酸素暴露によって肺胞  $M\phi$  の *Candida* 殺菌能が低下することが予想される。

また、高濃度酸素暴露によって肺胞  $M\phi$  の遊走能の低下<sup>33)</sup>や、貪食の抑制がおこること<sup>34)35)</sup>も報告されており、これらが *Candida* 殺菌能の抑制に関与している可能性も否定できない。

本実験において、暴露群では接種後 7 日を経た後にもなお、わずかではあるが *C. albicans* が肺内で生存していることが示された。*C. albicans* はわずかながら細胞内寄生性を有しており<sup>36)</sup>、これを貪食した肺胞  $M\phi$  の胞体内で *C. albicans* が生存し続けている可能性が考えられる。

前述のごとく、本実験では気道上皮に形態学的変化は認められなかった。しかし、気管および気管支線毛運動の速度への影響に焦点を当てた生理学的な研究は、イヌ<sup>37)</sup>、ネコ<sup>38)</sup>、ヒト<sup>39)40)</sup>を用いたものが行われているが、若干の例外を除いて<sup>41)</sup>、いずれも 50~100% の酸素暴露において、暴露開始後数時間のうちに線毛運動の抑制がおこるという結果が出されており、*Candida* に対する排除能力の低下の一因となることが推測される。

また、暴露群では、非暴露群に比して *Candida* による病巣が吸収されにくく肉芽組織におきかわる率が高い。*Candida* による病巣の組織像の経時的変化は、本実験では①菌の侵入、②PMN の遊走と菌の破壊、③肺胞  $M\phi$  による菌体破砕物の処理の順でおこった。また、これらの過程に伴って周辺肺組織は多少とも破壊され、その後完全な修復ないしは瘢痕化に向かった。高濃度酸素暴露下では、肺組織の修復の障害<sup>42)</sup>や、本実験で明らかにされたごとく、血管内皮細胞の障害および間質の浮腫などに伴って血管外滲出液の吸収の障害<sup>43)</sup>がおこる。また、前述したように、過剰な活性酸

素が組織の破壊を増強する可能性もある。さらに、肺胞 Mφ の機能の低下や mucociliary system の障害により菌体破砕物の処理が遅延する可能性もある。これらが、病巣における炎症の持続、線維芽細胞の増殖などを促進し、肉芽形成に向かうものと考えられる。

以上述べたごとく、高濃度酸素暴露による DAD では、肺の *C. albicans* に対する防御能が低下し、また肺の病巣の縮小と組織の修復が障害されることが明らかにされた。

## V 結 語

肺カンジダ感染に対する高濃度酸素暴露の影響を調べるため、マウスを85%の酸素に暴露して、*C. albicans* の生菌を肺内に接種した結果以下の結論を得た。

1 85%酸素暴露による肺の初期病変は、毛細血管内皮細胞の空胞化や間質の浮腫であり、これに引き続いて毛細血管のうっ血や血管周囲の水腫が認められた。これらの所見は DAD の初期像に相当する。

2 一部のマウスは、85%酸素暴露により死亡し、肺に硝子膜の形成を認めた。硝子膜の形成はI型肺胞上皮細胞の破壊と深い関係があることが示唆された。

3 85%酸素暴露下では、気管から肺に接種された *C. albicans* の孢子の処理が遅延した。このことから、高濃度酸素暴露により *Candida* に対する肺の防御能が低下することが示唆された。

4 85%酸素暴露下では、*Candida* による肺の病巣の肉芽形成が増強され、修復が障害された。

本論文の要旨は、第78回日本病理学会総会（1989年4月、京都）および第33回日本医真菌学会（1989年9月、那覇）において発表した。

稿を終わるにあたり、終始懇篤なる御指導を賜りました恩師発地雅夫教授に深甚なる謝意を表します。同時に本研究に際し、御教示御指導下さいました阿部章彦助教、伊藤 誠博士を始めとする第2病理学教室の諸先生方に深謝致します。さらに論文作成に御協力いただいた市川寿恵氏、また、標本作成に御協力いただいた今井文衛、香山哲子、羽山正義、滝沢淳子、亀谷清和、丸山敦子の各氏、実験装置の設置にあたり、ご理解ご協力を下さいました信州大学医学部中央動物実験室の職員の皆様にご心から感謝します。

## 文 献

- 1) Hasleton, P.S. : Adult respiratory distress syndrome : a review. *Histopathology*, 7 : 307-332, 1983
- 2) 吉矢生人 : ARDS の臨床像. *最新医*, 40 : 1111-1116, 1985
- 3) Ashbaugh, D.G., Bigelow, D.B., Petty, T.L. and Levine, B.E. : Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, 2 : 319-323, 1967
- 4) Katzenstein, A.A., Bloor, C.M. and Liebow, A.A. : Diffuse alveolar damage : the role of oxygen, shock and related factors. *Am J Pathol*, 85 : 210-222, 1976
- 5) 長野政雄 : ARDS の実験モデル. *最新医*, 40 : 1169-1175, 1985
- 6) Kobayashi, K., Hayama, M. and Hotchi, M. : The application of immunoperoxidase staining for the detection of causative fungi in tissue specimens of mycosis I. *Mycopathologia*, 102 : 107-113, 1988
- 7) 関 保雄 : Pulmonary O<sub>2</sub> toxicity. *抗研誌*, 27 : 41-50, 1975
- 8) Clark, J.M. and Lambertsen, C.J. : Pulmonary oxygen toxicity : a review. *Pharmacol Rev*, 23 : 37-133, 1971
- 9) Frank, L., Bucher, J.R. and Roverts, R.J. : Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl Physiol*, 45 : 699-704, 1978
- 10) Kistler, G.S., Caldwell, P.R.B. and Weibel, E.R. : Development of fine structural damage to alveolar and capillary lining cells in oxygen-poisoned rat lungs. *J Cell Biol*, 32 : 605-628, 1967
- 11) Adamson, I.Y.R., Bowden, D.H. and Wyatt, J.P. : Oxygen poisoning in mice. *Arch Path*, 90 : 463-472, 1970
- 12) Bowden, D.H., Adamson, I.Y.R. and Wyatt, J.P. : Reaction of the lung cells to a high concentration of oxygen. *Arch Path*, 86 : 671-675, 1968

- 13) Crapo, J.D., Barry, B.E., Foscue, H.A. and Shelburne, J. : Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis*, 122 : 123-143, 1980
- 14) Crapo, J.D., Peters-Golden, M., Marsh-Salin, J. and Shelburne, J.S. : Pathologic changes in the lungs of oxygen-adapted rats. *Lab Invest*, 39 : 640-653, 1978
- 15) Mastin, J.P., Shelburne, J.D. and Thet, L.A. : Subcellular changes in capillary endothelial cells during repair of hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol*, 64 : 689-696, 1988
- 16) Porte, A., Mantz, J., Hindelang, C., Asmarats, L., Viragh, Sz. and Stoeckel, M.E. : Early bronchopulmonary lesions in rat lung after normobaric 100% oxygen exposure and their evolution. *Virchows Arch [A]*, 414 : 135-145, 1989
- 17) Crapo, J.D. : Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu Rev Physiol*, 48 : 721-731, 1986
- 18) Obara, H., Sekimoto, M. and Iwai, S. : Alteration to the bronchial and bronchiolar surfaces of adult mice after exposure to high concentrations of oxygen. *Thorax*, 34 : 479-485, 1979
- 19) 発地雅夫 : カンジダ感染症の組織学的同定と病理学的所見. 螺良英郎(編), *Candidiasis*, 第1版, pp.13-23, 協和企画通信, 東京, 1988
- 20) 山口英世 : カンジダ症 : その病原性, 宿主抵抗性, 易感染因子. 螺良英郎(編), *Candidiasis*, 第1版, pp. 24-28, 協和企画通信, 東京, 1988
- 21) Lal, S., Mitsuyama, M., Miyata, M., Ogata, N., Amako, K. and Nomoto, K. : Pulmonary defence mechanism in mice : a comparative role of alveolar macrophages and polymorphonuclear cells against infection with *Candida albicans*. *J Clin Lab Immunol*, 19 : 127-133, 1986
- 22) Nakamura, T. : Experimental pulmonary candidiasis in modified rabbits. *Mycopathologia*, 85 : 129-144, 1984
- 23) Harada, R.H., Vatter, A.E. and Repine, J.E. : Macrophage effector function in pulmonary oxygen toxicity : Hyperoxia damages and stimulates alveolar macrophages to make and release chemotaxins for polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol*, 35 : 373-383, 1984
- 24) Babior, B.M. : The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest*, 73 : 599-601, 1984
- 25) 笹田昌孝 : 食細胞での活性酸素による殺菌作用. 蛋・核・酵, 33 : 372-378, 1988
- 26) Rister, M. and Baehner, R.L. : Effect of hyperoxia on superoxide anion and hydrogen peroxide production of polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages. *Br J Haematol*, 36 : 241-248, 1977
- 27) 松尾光芳, 嗟峨井勝, 吉川敏一(訳) : フリーラジカルと生体 (Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 著). 第1版, p.278, 学会出版センター, 東京, 1988
- 28) 菅 守隆, 安藤正幸, 東 賢次 : 肺胞マクロファージのサブセットとその意義—モノクローナル標識抗体を用いた解析—. *呼吸*, 8 : 298-302, 1989
- 29) 安岡 勲, 螺良英郎 : 肺胞マクロファージ. *医のあゆみ*, 117 : 625-630, 1981
- 30) Huber, G.L. and LaForce, F.M. : Comparative effects of ozone and oxygen on pulmonary antibacterial defense mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*, 10 : 129-136, 1970
- 31) Suttorp, N. and Simon, L.M. : Decreased bactericidal function and impaired respiratory burst in lung macrophages after sustained *in vitro* hyperoxia. *Am Rev Respir Dis*, 128 : 486-490, 1983
- 32) Sasada, M. and Johnston, R.B. : Macrophage microbicidal activity : correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. *J Exp Med*, 152 : 85-98, 1980
- 33) Bowles, A.L., Dauber, J.H. and Daniele, R.P. : The effect of hyperoxia on migration of alveolar macrophages *in vitro*. *Am Rev Respir Dis*, 120 : 541-545, 1979
- 34) Simon, L.M., Axline, S.G. and Robin, E.D. : The effect of hyperoxia on phagocytosis and pinocytosis in isolated pulmonary macrophages. *Lab Invest*, 39 : 541-546, 1978

- 35) Raffin, T. A., Simon, L. M., Braun, D., Theodore, J. and Robin, E. D. : Impairment of phagocytosis by moderate hyperoxia (40 to 60 percent oxygen) in lung macrophages. *Lab Invest*, 42 : 622-626, 1980
- 36) 深沢義村 : 真菌免疫機構に関する最近の知見. *真菌誌*, 18 : 325-332, 1977
- 37) Sackner, M. A., Hirsh, J. A., Epstein, S. and Rywlin, A. M. : Effect of oxygen in graded concentrations upon tracheal mucous velocity. *Chest*, 69 : 164-167, 1976
- 38) Laurenzi, G. A., Yin, S. and Guarneri, J. J. : Adverse effect of oxygen on tracheal mucous flow. *N Engl J Med*, 279 : 333-339, 1968
- 39) Boat, T. F., Kleinerman, J. L., Fanaroff, A. A. and Matthews, L. W. : Toxic effects of oxygen on cultured human neonatal respiratory epithelium. *Pediatr Res*, 7 : 607-615, 1973
- 40) Sackner, M. A., Land, J., Hirsh, J. and Zapata, A. : Pulmonary effect of oxygen breathing. *Ann Intern Med*, 82 : 40-43, 1975
- 41) Marin, M. G. and Morrow, P. E. : Effect of changing inspired O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> levels on tracheal mucociliary transport rate. *J Appl Physiol*, 27 : 385-388, 1969
- 42) 天野 勝, 吉矢生人 : ARDS における酸素中毒. *呼吸と循環*, 31 : 947-952, 1983
- 43) Torikata, C. : Pathological studies on experimental pulmonary fibrosis induced by soluble immune-complex : especially on its electron microscopic observations. *Acta Pathol Jpn*, 24 : 371-386, 1974

(1. 9. 30 受稿)

---