

健常マウスと喘息モデルマウスの肺コンプライアンスの違い

世良 俊博^{*#}, 上杉 健太郎^{*}, 八木 直人^{*}

^{*} 財団法人 高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門

兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

e-mail: {sera, ueken, yagi}@spring8.or.jp

[#] 独立行政法人 理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット

埼玉県和光市広沢 2-1

要旨 喘息患者の肺は、気道組織のリモデリングにより気管支壁が厚くなり、コンプライアンスが低下することが知られている。しかし、従来は臓器レベルの巨視的な計測しか行われておらず、ガス交換に重要な末梢細気管支に特化した計測・比較は行われていない。そこで本研究では、SPRING-8 放射光 CT を用いて健常マウスと喘息モデルマウスの末梢細気管支コンプライアンス（直径 150~500 μm ）を比較した。健常マウス・喘息モデルマウス共に末梢細気管支ほどコンプライアンスが大きく、肺全体の肺コンプライアンスより大きかった。喘息モデルマウスの末梢細気管支コンプライアンスは、健常マウスと比較すると、直径 500 μm 以上の気管支では 70 %、直径 200 μm 以下では 57 %と、末梢細気管支ほど末梢細気管支コンプライアンスの差が大きかった。最近、呼吸に伴う気管支壁の変形が末梢部位でのガス交換を促進していることが示唆されており、本実験結果は喘息患者が呼吸困難になる原因のひとつであるかもしれない。

1. 始めに

肺でのガス交換は、吸気時は胸郭が広がることによって受動的に肺は広がり、逆に呼気時は肺自身の弾性力によって能動的に収縮することによって行われる。肺のやわらかさは肺機能の重要な指標であり、特に肺機能検査では単位圧力あたりの肺容量の変化量を表す肺コンプライアンス (dV/dP) が用いられる。

喘息患者の肺は、気道組織のリモデリングにより気管支壁が厚くなり、コンプライアンスが低下することが知られている⁽¹⁾。しかし従来は、臓器レベルの巨視的な計測しか行われておらず、ガス交換に重要な末梢細気管支に特化した計測は行われていない。近年、我々は SPRING-8 放射光を利用してマウス肺の微細構造を化学処理を施さない状態で可視化可能な高速高空間分解能 CT システムを開発し、擬似吸気下での末梢細気管支コンプライアンスの測定方法を確立した⁽²⁾。本研究では、SPRING-8 放射光を用いて健常マウスと喘息モデルマウスの末梢細気管支コンプライアンス（直径 150~500 μm ）を比較した。

2. 実験方法

1) 実験試料

実験試料には、健常・喘息モデルマウス（A/J, オス, 15 weeks, $n = 7/\text{group}$ ）を用いた。喘息モデルマウスは、5 週令の健常マウスに OVA (1 mg/ml) を鼻から投与 (10 weeks, 3 times/week) することによって作成した⁽³⁾。

2) 実験装置

実験は、大型放射光施設 SPring-8 の医学・イメージングビームライン BL20B2 実験ハッチ 3 で行った。偏向電磁石によって取り出された放射光は、2 結晶分光器 (Si(111)) によって分光され実験ハッチ内に輸送される。特に、BL20B2 は発光点から 215 m 離れた場所に実験ハッチがあり、横幅 300 mm 縦幅 15 mm 以上の広いビーム幅となり 3 次元 CT に適している⁽⁴⁾。本研究で用いた検出器は、可視光変換型高分解能 2 次元検出器 (AA60+ORCA II-HR, 浜松フォトニクス株式会社) を用いた。本検出器の空間分解能は、1 pixel = 11.8 μm (2×2binnig 時: 画素数: 2000(H)×1312(V) pixel) である。蛍光体に厚さ 20 μm の粉末 P43 ($\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Tb}$) を用いた。X 線エネルギーを 20 keV とし、露光時間を 250 ms/projection とした。

3) 実験手順

測定プロトコルを Fig. 1 示す。両グループとも、IgE 検査を行うために脱血処理により安楽死させた。安楽死直後に、外部から強制的に空気を送り込む擬似吸気を模擬するために気道内にポリエステルチューブを挿入し、まず圧容積曲線を測定した。その後、肺体積をステップ的に変化させながら CT 撮影を行った。肺体積は、安楽死の状態を機能的残気量 (FRC) を定義し、一回換気量後 (VT: $\text{FRC} + 200 \mu\text{m}$)、最大肺容量 (TLC: $\text{FRC} + 800 \mu\text{m}$) と変化させて撮影した。FRC の撮影は、死後硬直によるモーションアーチファクトを避けるために安楽死後 1 時間後に行い、VT や TLC の撮影は、肺の粘弾性の影響によるモーションアーチファクトを避けるため擬似吸気後後 1 時間後に行った。全測定時間は 4 時間以内である。

CT 撮影は、オフセット補正およびゲイン補正用に X 線 off 時の画像とサンプルのない X 線放射時の画像を各 30 枚取得後、1500 枚/180°の投影像を取得した。スキャン時間は約 20 分である。CT 画像の再構成には Convolution Back Projection 法を用いた。

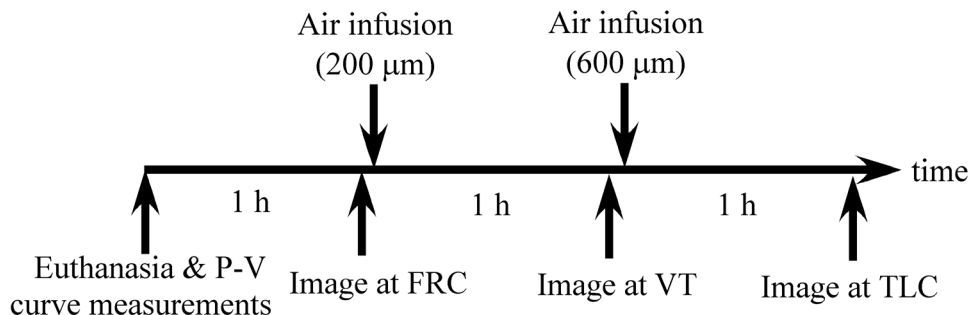


Fig. 1 Experimental protocol.

4) 画像処理

細気管支ネットワークの形態を解析するために、まず閾値処理で気管支内腔領域を抽出し、その後3次元細線化処理⁽⁵⁾によって骨格線・分岐点を抽出した。近年、CT画像のような医療画像から血管などの注目部位を自動抽出する方法が、本プロジェクトを含め盛んに研究が行われている。しかし、細気管支や肺胞部分では複雑な分岐を繰り返しているだけでなくピクセルノイズの影響を大きく受けるため、自動抽出では困難である。本研究では、各CT画像において手動で抽出する気管支を選び、閾値を変化させながら気管支内部を抽出した⁽⁶⁾。

気管支を円柱と仮定し、各肺体積時における気管支の長さ (L)、直径 (D)、体積 (V) を算出し、以下のように長さや直径の変化率 (δ_L , δ_D , δ_V) を定義した。添え字は各肺体積時の値を表している。末梢細気管支コンプライアンス($sCaw$)と肺コンプライアンス(sC_{lung})は、以下のように定義した。

$$sCaw = \frac{D_{VT}^2 \cdot L_{VT} - D_{FRC}^2 \cdot L_{FRC}}{(P_{VT} - P_{FRC}) \cdot D_{FRC}^2 \cdot L_{FRC}}, \quad sC_{lung} = \frac{VT - FRC}{(P_{VT} - P_{FRC}) \cdot FRC}$$

5) 統計処理

本研究では、FRC 時の気管支の大きさによって5グループ (~200 μ m, 200 μ m ~300 μ m, 300 μ m ~400 μ m, 400 μ m ~500 μ m, 500 μ m ~) に分けた。各グループ間の比較には、ノンパラメトリック多重比較(Steel-Dwass test)を用いた。

3. 実験結果

Table 1 に実験に用いたマウスの身体特徴を示す。特に、全血清中のIgE量は、喘息モデルマウスのほうが優位に高かった。

Fig. 2 に健常・喘息モデルマウスの同一細気管支に関するCT画像を、Fig. 3 に1回換気量後の末梢部位の3次元ボリューム画像を示す。喘息患者特有のモザイク模様だけでなく、気管支壁の肥厚も見られる。Fig. 2 で矢印で示された気管支壁は、健常マウスは35.6 μ m に対し、喘息モデルマウスは48.2 μ m と優位に高かった。

Tables 2&3 に健常・喘息モデルマウスの δ_L , δ_D , δ_V 、Fig. 4 に末梢細気管支コンプライアンスを示す。健常・喘息モデルマウスともに肺全体を評価した巨視的なコンプライアンス (健常: 0.10, 喘息: 0.08) に比べてはるかに大きい。さらに、末梢細気管支ほどコンプライアンスが高く柔らかく、呼吸に伴う壁変形が大きい。また、健常マウスと喘息モデルマウスを比較すると、全グループにおいて喘息モデルマウスのほうが優位に高く、その差は末梢細気管支ほど大きかった。本研究結果は、比較的直径の大きい誘導気管支のコンプライアンスを比較した研究結果と一致する⁽⁷⁾。

Table 1 Clinical Characteristics.
Data are given as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

	n	Weeks	Weight (g)	Pressure at VT (cmH ₂ O)	IgE (ng/ml)
Healthy mice	7	15	28.63 $\pm$ 2.02	5.81 $\pm$ 0.38	1.78 $\pm$ 0.16
Asthmatic mice	7	15	25.23 $\pm$ 1.21***	6.82 $\pm$ 1.02*	69.7 $\pm$ 11.86***

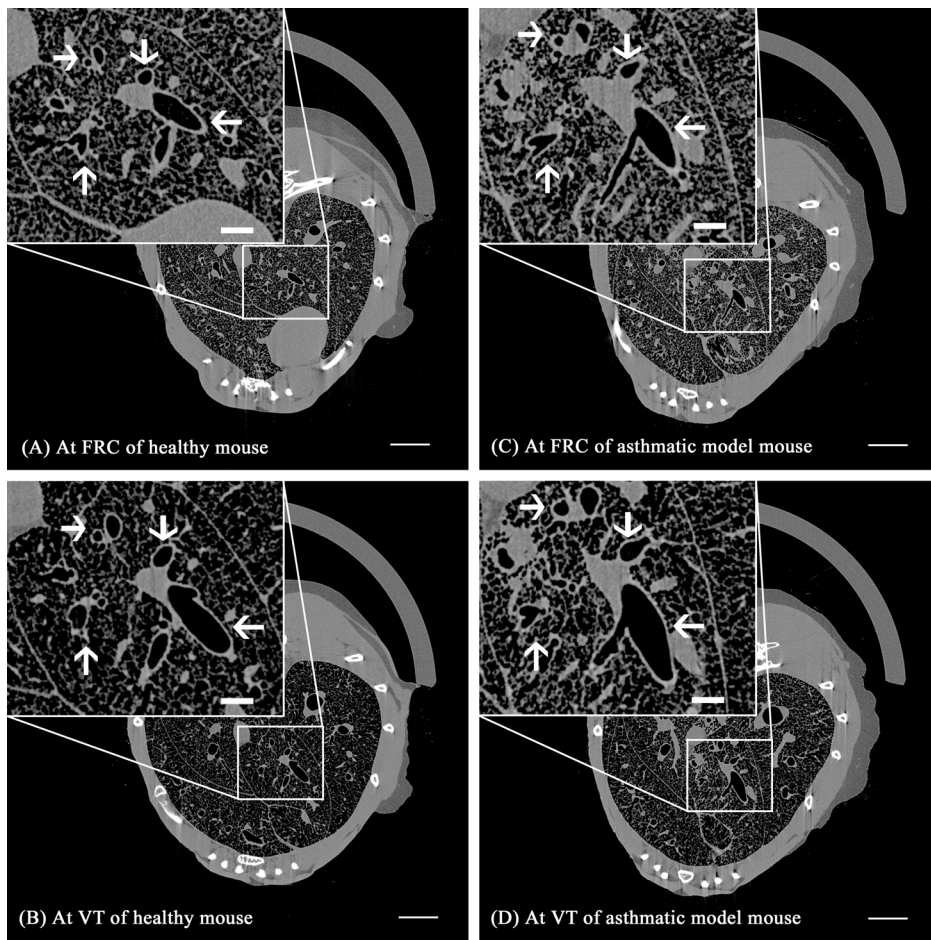


Fig. 2 Representative CT Images at VT of healthy mouse (left panel, (A): at FRC, (B): at VT) and asthmatic model mouse (right panel, (C): at FRC, (D): at VT). Arrows with same directions indicate identical airways. Bars in normal images are 2 mm and in zoomed images are 500 μ m.

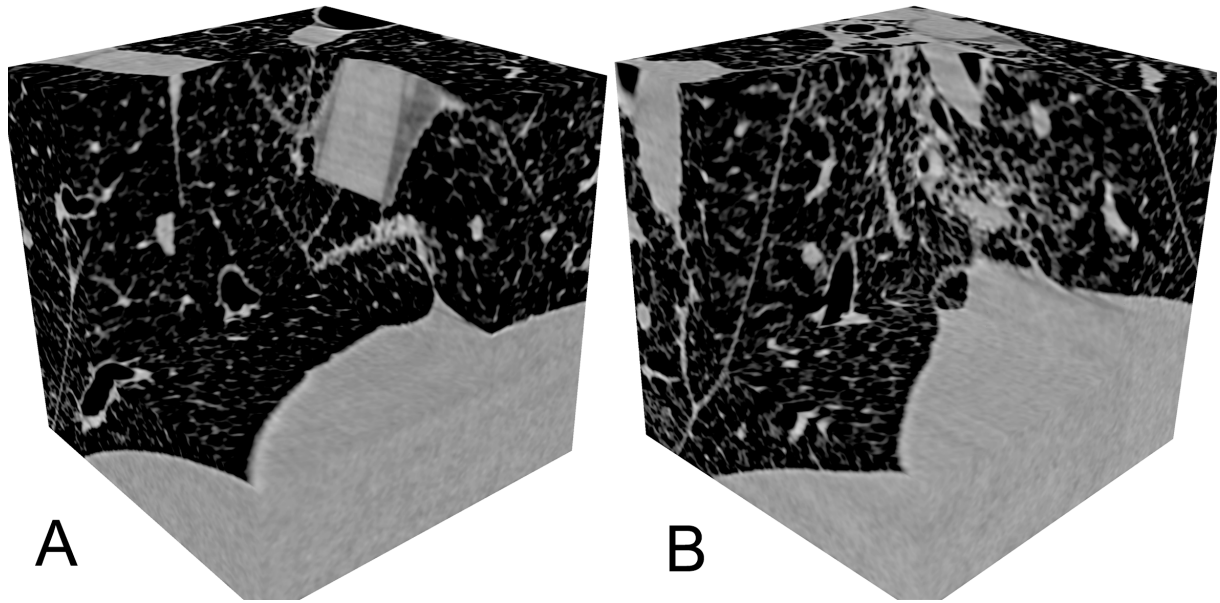


Fig. 3 Representative volumes ($3.5 \times 3.5 \times 3.5$ mm) at VT of healthy mouse (A) and asthmatic model mouse (B). Airway wall thickening and mosaic pattern of attenuation of lung tissue can be observed.

Table 2 Normal airway behaviors. Data are given as mean $\pm$ SEM. N means the number of airway segments in each airway group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, versus airway group 5 with diameter more than $500 \mu\text{m}$ at FRC.

Normal airway group		1 (n=126)	2 (n=124)	3 (n=58)	4 (n=31)	5 (n=23)
δ_D	VT	0.478 ± 0.011 ***	0.353 ± 0.009 ***	0.280 ± 0.009 **	0.261 ± 0.014	0.227 ± 0.013
	TLC	0.784 ± 0.018 ***	0.541 ± 0.011 ***	0.401 ± 0.014 ***	0.335 ± 0.017 *	0.283 ± 0.015
δ_L	VT	0.133 ± 0.011 *	0.116 ± 0.009	0.124 ± 0.019	0.072 ± 0.014	0.083 ± 0.018
	TLC	0.318 ± 0.018	0.308 ± 0.018	0.419 ± 0.041	0.367 ± 0.048	0.340 ± 0.056
δ_V	VT	1.491 ± 0.044 ***	1.054 ± 0.031 ***	0.840 ± 0.034 **	0.713 ± 0.049	0.631 ± 0.040
	TLC	3.241 ± 0.112 ***	2.134 ± 0.067 ***	1.816 ± 0.110 **	1.466 ± 0.119	1.208 ± 0.098

Table 3 Asthmatic airway behaviors. Data are given as mean $\pm$ SEM. N means the number of airway segments in each airway group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, versus airway group 5 with diameter more than 500 μm at FRC. $^{\dagger}p < 0.05$; $^{\dagger\dagger}p < 0.01$; $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$, versus same size group of healthy mice in Table 2.

Asthmatic Airway group		1 (n=158)	2 (n=131)	3 (n=50)	4 (n=35)	5 (n=23)
δ_D	VT	$0.358 \pm 0.009^{***, \dagger}$	$0.295 \pm 0.008^{***, \dagger}$	$0.248 \pm 0.011^*$	0.216 ± 0.013	0.204 ± 0.014
	TLC	$0.749 \pm 0.015^{***}$	$0.514 \pm 0.011^{***}$	$0.400 \pm 0.016^{***}$	0.292 ± 0.015	0.265 ± 0.017
δ_L	VT	$0.098 \pm 0.010^{\dagger}$	0.105 ± 0.009	0.083 ± 0.012	0.059 ± 0.012	0.069 ± 0.013
	TLC	$0.271 \pm 0.014^{\dagger}$	$0.344 \pm 0.021^*$	$0.284 \pm 0.025^{\dagger}$	0.238 ± 0.026	0.227 ± 0.035
δ_V	VT	$1.030 \pm 0.030^{***, \dagger\dagger\dagger}$	$0.859 \pm 0.026^{***, \dagger\dagger\dagger}$	$0.695 \pm 0.035^{***, \dagger}$	$0.571 \pm 0.035^{\dagger}$	0.553 ± 0.038
	TLC	$2.908 \pm 0.085^{***, \dagger\dagger}$	$2.104 \pm 0.067^{***}$	$1.515 \pm 0.073^{***}$	1.081 ± 0.071	0.972 ± 0.076

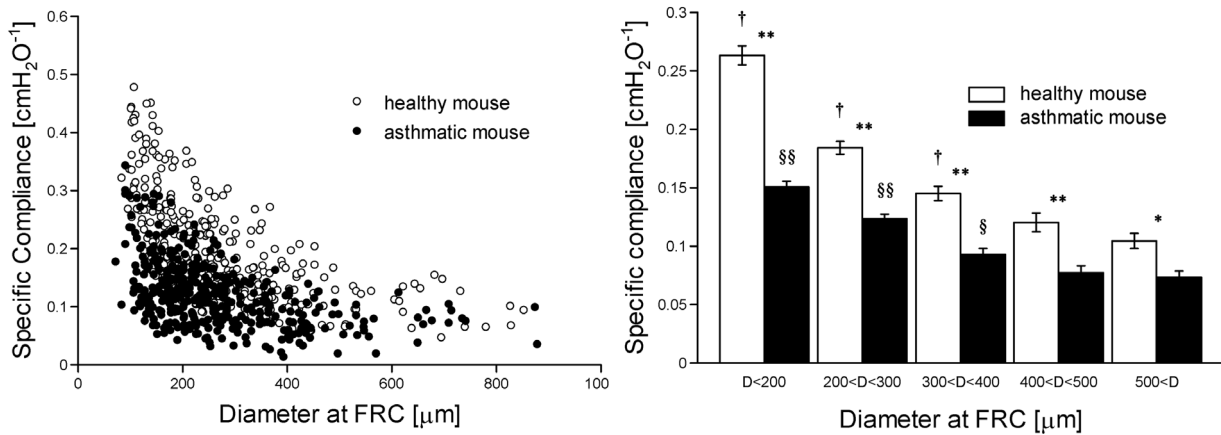


Fig. 4 Small airway compliance in the healthy and asthmatic model mice. (left): scatter diagram and (right): histogram of airway groups. Data are given as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$, same size group of the healthy and asthmatic model mice. § $p < 0.05$; §§ $p < 0.001$, versus asthmatic airway group with diameter more than 500 μm at FRC. $^{\dagger}p < 0.001$, versus healthy airway group with diameter more than 500 μm at FRC.

4. 考察

本研究では、放射光 CT を用いることによって軟組織の状態での肺微細構造を観察することが可能となり、健常・喘息モデルマウスの直径 100 μm 以上の末梢細気管支の

局所コンプライアンスを評価した。従来、高分解能 CT (HRCT) を用いて気管支の変形能に関する実験が多数行われているが、大部分が 2 次元 CT 画像から評価している。それに対し、本研究で用いた放射光 CT は 3D-CT であり、さらには HRCT やさらに高分解能であるマイクロ CT よりはるかにコントラスト分解能が高い。その結果、末梢細気管支の変形を 3 次元連続スライス画像から解析することが可能となった。

従来から喘息患者は肺コンプライアンスが低下し硬くなることが知られていたが、本研究結果より末梢細気管支ほどコンプライアンスの差が大きいことが分かった。Brown らは、独自に開発したプローブを健常者と喘息患者の気管支内に設置し、比較的直径の大きい気管支 (断面積: $0.65\sim 1.02\text{ cm}^2$) のコンプライアンスを比較した。結果は、本研究結果と同じように、末梢側ほど健常者と喘息患者の差が大きく、最も口に近い気管では有意な差が無かった。その原因として気管支壁の肥厚⁽⁸⁾だけでなく壁の構造変化⁽⁹⁾が挙げられる。Okazawa らは HRCT を用いて気管支壁の割合 (wall area/(wall area+lumen area)) に関して喘息患者と健常者と比較したところ、末梢気管支において有意な差があったと報告している⁽⁸⁾。本研究でも喘息モデルマウスの気管支は肥厚していた(Figs. 2&3)。一方で、Bousquet らは、喘息患者の気管支壁を電子顕微鏡で観察し弾性繊維が破壊されていることを報告しており、その結果コンプライアンスが低下するのではないと推測している⁽⁹⁾。

呼吸に伴う気管支の変形は、肺全体で一様ではない。例えば、FRC から TLC で比較すると、肺全体の体積は約 2 倍 (FRC: $400\mu\text{l}$, TLC: $1200\mu\text{l}$) 増加しているが、末梢細気管支のほうが太い気管支より大きく変形している (Table 2)。また同様に、末梢細気管支コンプライアンスも末梢細気管支のほうが大きかった。このような傾向は従来研究⁽²⁾でも報告されており、肺機能の不均一性の原因の 1 つとして考えられている。

従来、末梢細気管支部位はレイノルズ数が低いため、ガス交換メカニズムは主に拡散が寄与していると考えられてきた。それに対し、呼吸に伴う壁変形に生じる複雑な断面内流れがガス交換を増強するという新しいメカニズムが近年提案されている⁽¹⁰⁾。末梢細気管支でのガス交換が単純な分子拡散のみであるとすると、健常者と喘息患者のガス交換効率は理論的には同じはずであるが、しかし実際は喘息患者の病状として呼吸困難が挙げられる。喘息患者の細気管支コンプライアンスは末梢気管支ほど小さく硬いため、ガス交換効率が減少し呼吸困難が引き起こされるかもしれない。今後は、数値計算の手法を用いて、本研究結果を考慮した気管支モデル内のガス交換効率に関する研究を行う予定である。

また、本研究で用いた放射光 CT は、安楽死させたマウスの末梢細気管支のイメージングは可能であるが、生きた状態では無理である。その理由は、マウスの呼吸回数が 1 分間に 90 回と高速であるのに対し、露光時間が 250ms と比較的長いことと投影像の解像度が $2000(\text{H})\times 650(\text{V})$ と大きいため CCD のリードアウトに時間がかかるためである。さらには、1 分間に 300 回以上の心拍数も挙げられる。マウスの心臓の場合心拍あたり約 2mm 動くと言われており⁽¹¹⁾、高分解能ほどモーションアーチファクトの影響は大きい。最近、生きた小動物を CT だけでなく MRI や PET 撮影を行うために呼吸と心拍同期を取りながら撮影を行う方法^(11, 12)が提案されており、今後は放射光 CT にも応用を考えている。

5. 謝辞

本研究は、SPRING-8 実験課題 (Proposal Number: 2004B0387-NL3-np)のもとに実施した。

6. 文献

- (1) Roche WR., (1998): 'Inflammatory and structural changes in the small airways in bronchial asthma', *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 157, pp. S191-S194
- (2) Sera T., Uesugi K., Yagi N., (2005): 'Localized morphometric deformations of small airways and alveoli in intact mouse lungs under quasi-static inflation', *Resp. Physiol. Neurobi.*, 147, pp. 51-63
- (3) Shinagawa K., Kojima M., (2003): 'Mouse model of airway remodeling: strain differences', *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 168, pp. 959-967
- (4) SPRING-8, Internet site address: <http://www.spring8.or.jp>
- (5) Toriwaki J., Mori K., (2001): 'Distance transformation and skeletonization of 3D pictures and their applications to medical images', in Bertrand G, Imiya A., Klette R., (Eds): 'Digital and Image Geometry', (Springer;Tokyo), pp. 412-428
- (6) Sera T., Fujioka H., Yokota H., Makinouchi A., Himeno R., Schroter R., Tanishita K., (2003): 'Three-dimensional visualization and morphometry of small airways from microfocal X-ray computed tomography', *J. Biomech.*, 36, pp. 1587-1594
- (7) Brackel H.J., Pedersen O.F., Mulder P.G., Overbeek S.E., Kerrebijn K.F., Bogaard J.M., (2000): 'Central airways behave more stiffly during forced expiration in patients with asthma', *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 162, pp.896-904
- (8) Okazawa M., Muller N., McNamara A.E., Child S., Verburgt L., Pare P.D., (1996): 'Human airway narrowing measured using high resolution computed tomography', *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 154, pp. 1557-1562
- (9) Bousquet J., Lacoste J.Y., Chanez P., Vic P., Godard P., Michel F., (1996): 'Bronchial elastic fibers in normal subjects and asthmatic patients', *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 153, pp.1648-1654
- (10) Tsuda A., Rogers R.A., Hydon P.E., (2002): 'Chaotic mixing deep in the lung', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, pp. 10173-1017
- (11) Badea CT, Hedlund LW, Johnson GA., (2005): 'Micro-CT with respiratory and cardiac gating', *Mol Imaging. Med. Phys.*, 31(12), pp. 110-6
- (12) Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, Kurie J, Travis EL, Cody DD., (2004): 'In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models', *Mol. Imaging.*, 3(1), pp. 55-62