

気管支肺炎イヌの肺胞洗浄液 (BALF) 中微量元素動態

鈴木一由¹、世良耕一郎²

¹ 酪農学園大学獣医学群獣医学類
〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582

² 岩手医科大学サイクロトンセンター
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

1 はじめに

気管支鏡検査および肺胞洗浄液 (BALF) 検査は人医療のみならず伴侶動物医療¹⁻⁶⁾およびウマ医療^{7,8)}においても診断および研究目的で行われている。BALF 検査は患者にとって安全であり、肺組織において軽度の組織学的変化しか認められない³⁾。さらに、Rajamäki ら³⁾は 5-7 週間隔で BALF 検査を行っても肺組織学的変化が極めて小さいため、呼吸器疾患の治療効果を評価する上でも有用な検査法である。

急性および慢性肺疾患では組織の破壊とリモデリングが生じていることから、成人呼吸促迫症候群 (ARDS) 患者の BALF 中セリンプロテアーゼおよびマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の両者が有意に増加していることが報告されている⁹⁾。MMP は亜鉛依存性細胞外および細胞関連エンドペプチターゼ・ファミリーである^{10,11)}。人および動物における多くの慢性疾患では細胞外マトリックス代謝の修飾が生じており、これによって数種類の元素の蓄積および組織の線維化が生じる。よって、気管支肺炎と微量元素動態との関連性を明らかにすることは伴侶動物医療において重要である。しかし、イヌの BALF 中主成分および微量元素動態に関する比較研究は行われていない。従って、本研究ではイヌの気管支肺炎と BALF 中微量元素濃度との関連性を明らかにすることを目的とした。

2 材料および方法

17頭の健常および12頭の気管支肺炎イヌを供試した。健常イヌの健康状態は身体一般、血液生化学、気管支鏡および胸部レントゲン検査によって評価した。気管支肺炎イヌは日本大学生物資源科学部附属動物病院に診断目的の気管支鏡検査のために来院した症例であった。症例は5頭のミニチュアダックスフント、3頭のシーザー、その他ボーダーコリー、シェットランドシープドッグ、ホワイトハイランドテリア、およびビーグルが各1頭であった。症例の平均年齢は 5.4 ± 3.2 歳(1-11歳)であり、5頭が慢性気管支炎、2頭がびまん性汎細気管支炎、2頭が気管支肺炎、その他気管支虚脱、真菌性肺炎、および肺線維症が各1頭であった。

各BALFサンプルは気管支検査時において定法に従い採取した^{6,12)}。BALFは180×g、4°C、10分で遠心分離して細胞残渣を除去し、測定まで-20°Cで保存した。100μLのBALF浮遊液をマイ

ラー膜上に重層固化し、主成分および微量元素濃度を仁科祈念サイクロトンセンターにおいて particle induced X-ray emission (PIXE)法を用いて測定した¹³⁻¹⁶⁾。

データは平均値±標準偏差で示した。統計解析は市販のソフトウェアパッケージ (Stat View 日本語版、ver.5、ヒューリンクス・ジャパン、東京、日本) を用いて行った。対照群に対する気管支肺炎イヌの各種微量元素濃度の平均値の差の検定は、F 検定として一元配置部産分析法により分散を評価した後、対応のない Student's *t*-検定を用いた。受動者動作特性 (ROC) 曲線は気管支肺炎イヌに対する BALF 中微量元素濃度の感度および特異度の特性により求めた (Prism 4 for Windows, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)。有意水準 5%未満を有意とした ($p<0.05$)。

3 結果と考察

気管支肺炎イヌの BALF 中主成分および微量元素濃度の平均値を Table 1 に示した。のデータは平均値±標準偏差で示した。その結果、Ca、P および Zn を除いて BALF 中の元素レベルと気管支肺炎との間に有意な相関性は認められなかった。気管支肺炎イヌの BALF 中 Ca ($p<0.01$) および Zn ($p<0.01$) はそれぞれ健康イヌと比較して有意に高値を示した。一方、気管支肺炎イヌの BALF 中 P 濃度は気管支肺炎を罹患していないイヌのそれよりも有意に低値であった ($p<0.01$)。BALF 中 Ca、P および Zn の ROC 曲線下面積はそれぞれ 0.824 ($p<0.001$)、0.799 ($p<0.01$) および 0.892 ($p<0.001$) であった。従って、イヌの気管支肺炎とこれらの元素との間に有意な相関が存在することが示唆された。

カルシウムとリンは生体内において相互調節しているため、Ca/P はこれらの 2 つの元素動態の影響を反映している¹³⁻¹⁶⁾。気管支肺炎イヌの平均 BALF 中 Ca/P 値 (0.098 ± 0.047 , $p<0.01$) は対照群 (0.035 ± 0.036) よりも有意に高値を示した。Ca イオンは恐らく気道組織中の NO 濃度を減少させないために静脈内ヒスタミンおよびサブスタンス P に対する気道の過敏状態を生じさせる。このことは損傷した気道上皮および活性化した炎症細胞による NO 分解に依存している¹⁷⁾。よって、気管支肺炎イヌの BALF 中 Ca レベルと気道上皮の損傷の程度の間に関連があると推察できる。本研究では、正常イヌと比較して気管支肺炎イヌの BALF 中 Ca 濃度は高値を示した。

Table 1 Comparison of 11 Trace Elements Status Measured in Bronchoalveolar Lavage Fluid of the Dogs With or Without Bronchopneumonia

(g/ml)	Control (n=17)	Bronchopneumonia (n=12)	p value
Al	1.72±0.80	2.05±0.36	NS ^a
Br	0.622±0.348	0.615±0.384	NS
Ca	0.526±0.434	1.070±0.526	$p<0.01$
Cu	0.011±0.015	0.050±0.143	NS
Fe	0.199±0.196	0.092±0.061	NS
K	5.05±2.39	6.14±2.67	NS
Ni	0.005±0.004	0.010±0.010	NS
P	20.4±9.1	11.9±5.0	$p<0.01$
Si	3.53±1.92	2.52±2.13	NS
Sr	0.017±0.015	0.017±0.018	NS
Zn	0.144±0.076	0.402±0.274	$p<0.001$
Ca/P	0.035±0.036	0.098±0.047	$p<0.01$
Zn/Cu	17.6±14.1	58.9±47.4	$p<0.05$

^a Not significant

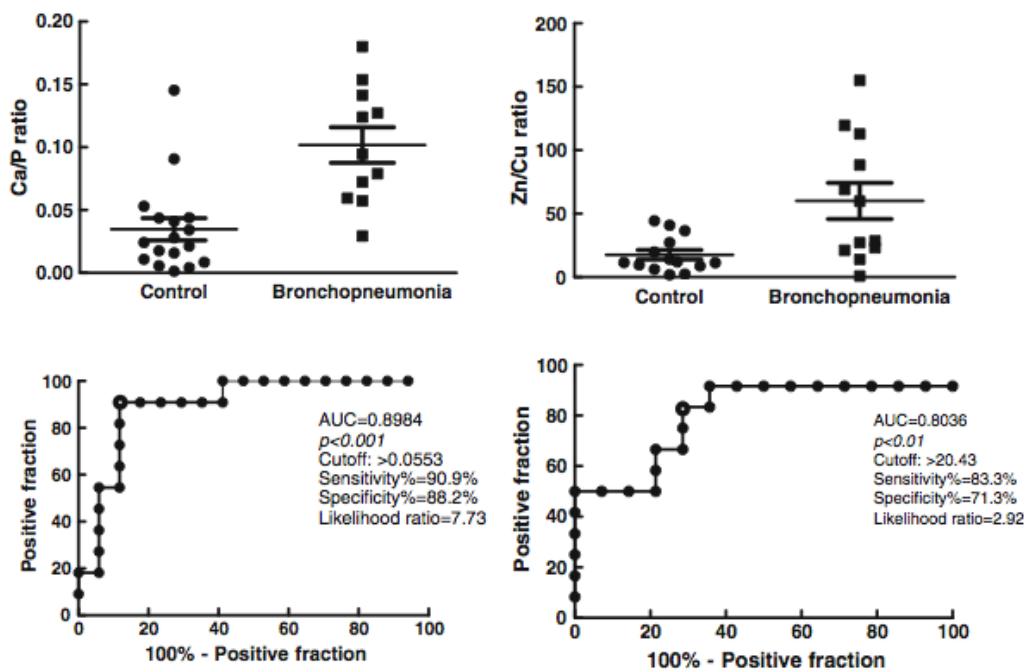


Fig. 1 Receiver operating characteristic (ROC) curves for Ca/P and Zn/Cu ratios in detecting bronchopneumonia in dogs. The mean area under the ROC curve (AUC) is shown for each ROC curve. True-positive fraction, sensitivity (%); false-positive fraction, 100 (specificity (%)). *Open circle* cutoff point

亜鉛と銅は生体内において相互調節しているため、Zn/Cuはこれらの2つの元素動態の影響を反映している^{13,16,18)}。本研究では、気管支肺炎イヌのBALF中Zn/Cu比は(58.9±47.4、 $p<0.05$)であり、健常イヌ(17.6±14.1)のそれより有意に高かった。Toriiら⁹⁾は成人呼吸窮迫症候群(ARDS)患者においてIV型コラーゲンMMP2およびMMP-9、そしてこれらのインヒビター(TIMP-2およびTIMP-1)の関与について調査を行った。ARDS患者のBALF中MMP-2およびMMP-9濃度、およびTIMP-1濃度は健常人と比較して有意に高値を示したことを報告している。

これらの知見は、肺におけるコラーゲンMMP濃度の上昇がARDSの病因に重要な役割を果たしていることを示唆している⁹⁾。Rajamäkiら⁵⁾は、BALF中の細胞数と分解したコラーゲンIの関連性を調査したところ、コラーゲンIの減少割合に対して好酸球、マクロファージ、リンパ球、肥満細胞数との間に有意な相関を認めた。MMP-8の主要な免疫反応は、マクロファージや上皮細胞で観察され、MMP-13の主要な免疫反応はマクロファージで観察された。これらの知見は、Zn依存性細胞外および細胞関連エンドペプチダーゼであるMMPにより膠原溶解性がアップレギュレーションし、最終的に肺組織の破壊に寄与していることを示している⁵⁾。気管支肺炎イヌのBALFにおいてMMPが健常イヌよりも高いレベルを示したかは明確ではないが、本研究ではBALF中のZn/Cuが気管支肺炎イヌで有意に高値であった。従って、今後はBALF中MMPおよびZn濃度が相関関係に有るか否かを調査する必要がある。

我々は実践的な診断能を考慮し、70%から90%の範囲内の感度および特異度で気管支肺炎に対するCa/PおよびZn/Cuのカットオフ値を求めた。ROC曲線分析に基づいて気管支肺炎を識別するためのBALF中のCa/PおよびZn/Cuによる診断カットオフ値は、それぞれ0.055と20.43であった(図1)。イヌの気管支肺炎を診断するためのBALF中Ca/P値のカットオフ値における感度および特異度はそれぞれ90.9%および88.2%であった。同様に、イヌの気管支肺炎を診断する

ための BALF 中 Zn/Cu 値のカットオフ値における感度および特異度はそれぞれ 83.3%および 71.3%であった。また、BALF 中の Ca/P および Zn/Cu における ROC 曲線下面積はそれぞれ 0.898 ($p<0.001$) および 0.804 ($p<0.01$) であった。本研究では BALF 中 Ca/P および Zn/Cu が気管支肺炎の罹患率に関係していることを示唆しており、病態の評価においても有用と思われる。

結論として、健常イヌと比較して気管支肺炎イヌでは BALF 中 Ca および Zn 濃度が高値であり、高 Ca/P および Zn/Cu を呈していた。今後は気管支肺炎動物の BALF 中 Ca および Zn レベルと重症度に相関関係があるかどうかを調査する必要がある。

謝辞

This study was supported by a grant-in-aid for Science Research from the Ministry of Education, Culture and Sciences of Japan (no.21580393) awarded to K. Suzuki, and by a Grant from Rakuno Gakuen University Research to K. Suzuki. We thank staff of Nishina Memorial Cyclotron Center (Japan Radioisotope Association) and Cyclotron Research Center (Iwate Medical University) for their help to this work.

参考文献

1. Hawkins EC, Rogala R, Large EE, Bradley JM, Grindem CB (2006) Cellular composition of bronchial brushings obtained from healthy dogs and dogs with chronic cough and cytologic composition of bronchoalveolar lavage fluid obtained from dogs with chronic cough. *Am J Vet Res* 67:160–167
2. Maden M, Altunok V, Birdane FM, Aslan V, Nizamlioglu M (2001) Specific enzyme activities in bronchoalveolar lavage fluid as an aid to diagnosis of tracheobronchitis and bronchopneumonia in dogs. *Res Vet Sci* 71:141–145
3. Rajamäki MM, Järvinen AK, Saari SA, Maisi PS (2001) Effect of repetitive bronchoalveolar lavage on cytologic findings in healthy dogs. *Am J Vet Res* 62:13–16
4. Rajamäki MM, Järvinen AK, Sorsa T, Maisi P (2002) Clinical findings, bronchoalveolar lavage fluid cytology and matrix metalloproteinase-2 and -9 in canine pulmonary eosinophilia. *Vet J* 163:168–181
5. Rajamäki MM, Järvinen AK, Sorsa T, Maisi P (2002) Collagenolytic activity in bronchoalveolar lavage fluid in canine pulmonary eosinophilia. *J Vet Intern Med* 16:658–664
6. Schuller S, Valentin S, Remy B et al (2006) Analytical, physiologic, and clinical validation of a radioimmunoassay for measurement of procollagen type III amino terminal propeptide in serum and bronchoalveolar lavage fluid obtained from dogs. *Am J Vet Res* 67:749–755
7. Hobo T, Yoshihara M, Oikawa M, Hones JH (2001) Surfactant proteins in bronchoalveolar lavage fluid of horses: assay technique and changes following road transport. *Vet Rec* 148:74–80
8. Raulo SM, Sorsa T, Tervahartiala T, Pirila E, Maisi P (2001) MMP-9 as a marker of inflammation in tracheal epithelial lining fluid (TELF) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of COPD horses. *Equine Vet J* 33:128–136
9. Torii K, Iida K, Miyazaki Y et al (1997) Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 155:43–46
10. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Birkedal-Hansen B, Decarlo A, Engler JM (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:197–250
11. Birkedal-Hansen H (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7:728–735
12. Clercx C, Peeters D, Snaps F et al (2000) Eosinophilic bronchopneumopathy in dogs. *J Vet Intern Med* 14:282–291

13. Asano K, Suzuki, K Chiba M et al (2005) The correlation between twenty-five element contents in mane hair in riding horses and atrioventricular block. *Biol Trace Elem Res* 108:127–136
14. Sera K, Futatsugawa S, Matsuda K (1999) Quantitative analysis of untreated bio-samples. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 150:226–233
15. Sera K, Futatsugawa S, Matsuda K, Miura K (1996) Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples. *Int J PIXE* 6:467–481
16. Suzuki K, Yamaya Y, Asano K et al (2007) Relationship between hair elements and severity of atrioventricular block in horses. *Biol Trace Elem Res* 115:255–263
17. Uno D, Tsukagoshi H, Hisada T, Iwamae S, Mori M (1997) Effects of the calcium ionophore A23187 on airway responsiveness to histamine and substance P in guinea pigs. *Inflamm Res* 46:108–113
18. Tang YR, Zhabg SQ, Xiong Y et al (2003) Studies of five microelement contents in human serum, hair, and fingernails correlated with aged hypertension and coronary heart disease. *Biol Trace Elem Res* 92:97–103

Trace and major elements status in bronchoalveolar lavage fluid in dogs with or without bronchopneumonia

K. Suzuki¹ and K. Sera²

¹School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University
582 Bunkyou-dai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

¹Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

Abstract

The aim of this study was to investigate the relationships between the bronchopneumonia and mean concentrations of those trace elements in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Twenty-nine dogs were included in this study (17 healthy dogs and 12 dogs with respiratory disease). Each BALF sample had been obtained during bronchoscope examination by use of a standardized method. The concentrations of Al, Br, Ca, Cu, Fe, K, Ni, P, Si, Sr and Zn in BALF were measured by the particle-induced X-ray emission method. We found no relationship between the bronchopneumonia and the levels of elements in the BALF, except Ca, P and Zn. The dogs with respiratory disease were found to have a large amount of Ca and Zn, and a high Ca/P and Zn/Cu ratios in BALF compared to those without respiratory disease.

Keywords : Bronchoalveolar lavage fluid, Bronchopneumonia, Dog, Element, Particle induced X-ray emission