

喀痰分析による大気汚染の人体影響の検討 (第1報)

今川 珍彦 長岡 滋
(東京医科歯科大学)

緒言

大気汚染の人体影響を、的確かつ鋭敏に把握するためには、従来の疫学的手法ならびに動物実験的手法に加えて、新しい方法の駆使が必要であり、方法論の展開も重要な意味を有するであろう。

痰は、気道の内面をおおっている粘液性分泌物に、炎症性産物や、崩壊脱落した細胞成分、血管からの漏出成分、外来の微小異物や唾液などが混在したものである。このような痰を、いろいろな観点から種々分析して、呼吸器系の異常を推察検討することは、臨床医学領域においては、かなり行われている。

上述したように、痰の組成はきわめて複雑であり、種々の成分の混合体であるが、その主体は、気道に対するいろいろな刺激によって、生理的限界をこえて過剰に生成された粘液性分泌物である。大気が比較的清浄な地域の住民に比較して、大気汚染地区には、慢性の痰(慢性気管支炎様症状)を呈する住民が、相対的に高率に認められるということは、国の内外を問わず数多く報告されており、また、大気汚染物質の、持続性もしくは反復性の吸入により、気道の粘液の分泌過剰が起りうることは、種々の動物実験で確認されている。

気管・気管支においては、健常状態においても、生理的な量の粘液性分泌物が存在しており、重要な生理学的役割を果している。外気とともに気道内に侵入した大気汚染物質は、気道の内面をおおっている粘液性分泌物に接することになるが、そのさい、直接もしくは間接的に、何らかの作用をおよぼす可能性が考えられる。しかし、大気汚染の人体影響の検討にさいして、痰を試料とする試みと努力は、現在までのところ、ほとんどなされていない。

もしも、このような試みが実用に供されるならば、大気汚染の人体影響、特に呼吸器に及ぼす影響の検討法として、大きく寄与することになるであろう。われわれは、種々の考察を行った結果、当主題について研究を行うことの意義を認めたので、本研究の開始にふみきった次第

である。

しかし、本研究課題は、未開の分野といえるものであるから、早急に結論的成果をあげることは至難であり、まず、本格的研究を推進するための基礎的研究を行うことが必要である。本年度(昭和48年度)の研究方法及その結果は、まさしく、そのアプローチに該当するものであるから、本年度の研究結果から結論をひき出すことは不可能であり、この結果をもとにして、次年度以降、さらに研究を継続、展開させ、成果の獲得をめざす所存である。

なお、本研究の一部は、当保健部が分担し、他は、痰もしくは気道分泌物に関するすぐれた業績を有する専門家に委託して行われたものである。

I 喀痰中のリゾチームについて

東京都公害研究所保健部 長岡 滋

1 研究目的

リゾチームは、ある種のムコ多糖類を加水分解する酵素で、人間においては、涙、唾液、喀痰、鼻汁などかなりの濃度で存在し、また白血球とくに好中球、単球、および組織内でのマクロファージに含まれている。

この酵素は、ムコ多糖類を有する細菌の細胞膜に作用し、溶菌作用を呈し、生体の防御機構の一つに考えられている。

光化学スモッグに曝露した人間では、涙液中のリゾチームの量の変動するという報告がアメリカで出されているので、大気汚染物質が呼吸器系を侵襲した場合に、痰中のリゾチーム量の変動するか否かを検討し、もしも有意の変動が認められたら、大気汚染の人体(呼吸器)に及ぼす影響調査の一つの指標たらしめることを、本研究の究極目的とした。

なお、本年度は、本格的な研究開始のアプローチとして、以下のことを目標とした。

- 1) 痰中リゾチーム定量法の確立
- 2) 痰が喀出されること自体が、呼吸器系、とくに気

管・気管支などの下気道に何らかの異常状態が存在することの表明であるので、痰中リゾチーム量が疾患別特異性があるか否か、さらに、同一症例においてどの程度の変動があるか否かということに対する検討

2 痰中リゾチームの定量法

1) 基質液の調整

M. lysodeikticus ATCC 4698の乾燥菌体約90mgを、M/15リン酸緩衝液 (pH6.2) 100mlに懸濁させ、比色計 (波長640m μ) で透過率 (T%) が10%になるように調節する (緩衝液か濃厚菌液を適宜加える)。

2) 試料の作成

喀痰を深いポリ容器に入れ、歯科用エンジンに木製の棒を連結し、毎分1,000回転で3分間回転し、均等にす

表1 痰中リゾチームおよびシアリン酸

Case	年齢、性	病名	測定年月日	痰中リゾチーム mg/ml	痰中シアリン酸 mg/ml
Y. K.	32, ♀	慢性気管支炎, 肺性心	48年10月30日	3.60	77.1
"			11月3日	4.85	78.6
"			11月4日	4.86	61.4
"			11月5日	4.68	68.1
"			11月21日	7.40	55.2
"			11月22日	10 以上	57.4
M. N.	62, ♀	慢性気管支炎	48年10月30日	4.55	102.0
"			10月31日	4.10	103.5
"			11月1日	5.10	110.7
"			11月3日	4.22	108.1
"			11月4日	3.02	91.6
"			11月5日	3.90	94.8
"			11月20日	4.20	98.3
"			11月21日	5.75	69.6
"			11月22日	6.75	42.9
S. I.	59, ♀	肺切除後, 気管支拡張症	11月6日	4.68	106.1
K. T.	62, ♂	慢性気管支炎	11月13日	1.83	19.5
K. Y.	53, ♂	肺気腫	11月13日	1.29	21.6
M. K.	58, ♀	気管支拡張症+肺線維症	11月13日	3.66	81.2
K. O.	60, ♀	慢性気管支炎+肺気腫	11月13日	1.09	22.6
E. Y.	50, ♂	アレルギー性鼻炎+気管支炎	11月20日	2.90	69.0
S. F.	52, ♀	慢性気管支炎+細気管支炎	12月5日	1.34	42.1
N. Y.	57, ♂	慢性気管支炎+肺性心	12月5日	1.90	41.5
Y. A.	45, ♂	慢性気管支炎+喘息	12月5日	0.56	29.6
F. N.	74, ♀	肺腫瘍	11月27日	2.06	19.0
"			11月28日	0.84	13.8
"			11月29日	3.50	25.2
S. Y.	60, ♂	気管支喘息+肺気腫	11月27日	5.60	59.8
"			11月28日	5.58	47.2
"			11月29日	4.44	51.2

る。これを0.5mlとり、ガラス管製のホモジナイザーに入れてよく磨砕し、M/15リン酸緩衝液を4.5ml加え、10倍稀釈液を作成する。これを、さらにリン酸緩衝液で1,000倍に稀釈し試料とした。

3) 測定方法 (比濁法)

基質液3mlを大試験管にとり、35°C±0.5の恒温槽に入れる。同時に、試料の中に3mlのホールピペットを入れて加温する。3分後、試料3mlをとり、基質液中に入れてよく攪拌する。試料を入れてから9分40秒後に恒温槽からとり出し、比色セルに入れ、10分後に640mμの波長で透過率を読みとる。試料のかわりにM/15リン酸緩衝液を用いて同様の操作を行い盲検とする。

4) 検量線の作成

0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0μg/mlのリゾチーム標準液をつくり、試料と同様の操作を行う。

3 研究成績

13例の慢性呼吸器疾患患者の喀痰について、延べ30回にわたり、痰中リゾチームの定量を行った結果は、表1に示すごとくであった。

痰中リゾチーム量は、最低0.56mg/mlから最高10mg/ml以上の値を示し、疾患別特異性はなく、同一症例においても、かなりの日差変動を示した。

4 考察および総括

今年度の基礎的研究の結果から、痰中リゾチームの定量法が、大気汚染の呼吸器に及ぼす影響調査の一手法たりうるとすることはできない。

しかし、測定法を、ほぼ完全に習得しえたので、次年度およびそれ以降においては、大気汚染地域と大気清浄地区において、いわゆる単純性慢性気管支炎 (simple chronic bronchitis) と呼ばれるような、気管支粘膜の変化が軽微かつ安定している症例群をえらび、痰中リゾチーム量の比較検討を行うことが必要である。

II 喀痰中のシアリン酸について

東京都公害研究所保健部長 岡 滋

1 研究目的

シアリン酸はノイラミン酸の誘導体の総称で、生体内に広く分布し、気道の粘液性分泌物中にも存在し、その主要な構成成分となっている。

慢性気管支炎患者の痰中のシアリン酸は、病態の進行悪化にともなって増加するという報告が出されており、

また、冬期においてスモッグが発生しやすい英国の報告によれば、痰中シアリン酸の量は季節的に変動し、冬期が最も多いことから、大気汚染の影響ではないかと推察されている。

はたして、大気汚染物質が気道に侵襲した場合に、その影響によって痰中シアリン酸の量が変動するかを検討し、もしも有意の変動が認められたら、大気汚染の呼吸器に及ぼす影響調査の一つの指標たらしめることを、本研究の究極の目的とした。

なお、リゾチームの場合と同様に、本年度は、本格的な研究開始のアプローチとして以下のことを目標とした。

- 1) 痰中シアリン酸定量法の確立
- 2) 痰中シアリン酸量に、疾患別特異性があるか否か、さらに、同一症例においてどの程度の日差変動があるか否かの検討

2 痰中シアリン酸の定量法

1) 試料の作成

喀痰をポリ容器に入れ、歯科用エンジンに木製の棒を連結し、毎分1,000回転で3分間回転し均等にす。これを0.5mlとり、ガラス管製のホモジナイザーに入れ、精製水4.5mlを加えながらよく磨砕し、10倍稀釈液をつくり、試料とした。

2) 測定方法 (Thiobarbitur 酸法)

上記の方法で得た試料0.5mlをとり、0.1N硫酸9.5mlを加え、よく混和したのち、80°Cの水浴中で60分間加水分解する。水冷後室温にし、0.2mlを共栓付遠心管にとり、0.2M過ヨード酸ナトリウム溶液0.1mlを加えてよく混和し、室温に20分間放置する。ついで10%亜硫酸ナトリウム溶液1.0mlを加え、黄褐色が消失するまでよく振盪する。つぎに、0.6%チオバルビツール酸溶液3.0mlを加えて、100°Cで15分間煮沸する。水冷5分後、シクロヘキサノン5.0mlを加え、栓をしてから30分間はげしく振盪し、3,000rpmで5分間遠沈する。シクロヘキサノン層を、550mμの波長で比色する。同時に精製水0.2mlをとり、同様に操作し盲検とする。

3) 検量線の作成

シアリン酸標準液 (10mg/dl) を、0.05, 0.10, 0.15, 0.20mlずつ共栓付遠心管にとり、水を加えて全量を0.20mlとし、0.2M過ヨード酸ナトリウム0.1mlを加え、以下検体同様の操作を行い、検量線を作成した。

3 研究成績

13例の慢性呼吸器疾患患者の喀痰について、延べ30回にわたり、痰中シアリン酸の定量を行った結果は、表1に示すごとくであった。

痰中シアリン酸量は、最低13.8mg/mlから最高108.1mg/mlの範囲内にあり、疾患別特異性はなく、同一症例においても、かなりの日差変動を示した。

4 考察および総括

今年度の基礎的研究の結果から、痰中シアリン酸の定量法が、大気汚染の呼吸器に及ぼす影響調査の一手法たりうるとすることはできない。

しかし、リゾチームの場合と同様に、測定法を、ほぼ完全に習得しえたので、次年度およびそれ以降においては、大気汚染地域と大気清浄地域において、いわゆる単純性慢性気管支炎 (simple chronic bronchitis) と呼ばれるような、気管支粘膜の変化が軽微かつ安定している症例群を選定し、痰中シアリン酸量の比較検討を行うことが必要であろう。

III 慢性閉塞性肺疾患、とくに慢性気管支炎と気管支喘息における喀痰の細胞診について

名古屋大学医学部第二内科 佐竹 辰夫
高木 健三
大垣市民病院呼吸器科 井上 広治
堀場 通明

1 研究目的

大気の汚染が一定の閾値を上回ると、慢性閉塞性肺疾患、とくに慢性気管支炎と気管支喘息とが多発することが知られている。しかも、最近では、汚染地区における慢性閉塞性肺疾患患者の喀痰が、非汚染地区のそれらにくらべて、粘度が高いのではないかという考察が行われている。このことは、汚染地区の慢性閉塞性肺疾患では、気道系の組織学的変化や代謝機構が、非汚染地区とは若干異なるのではなからうかということを示唆するものと考えられる。喀痰がある程度は気道の組織学的変化を反映するという考え方に立脚し、速染性のBuffered Crystal Violet 染色法を用いて非汚染地区の慢性閉塞性肺疾患患者の痰について細胞学的検討を行い、今後実施予定の汚染地区の患者の痰の検討と比較する基礎をつくり、大気汚染による気道系の異常発生のメカニズムの解明の方法論たらしめることを、研究目的とした。

2 研究方法

慢性気管支炎患者9例および気管支喘息患者14例を対象に、病像が比較的安定している時期において痰の検査を実施した。ただし、一部の例では、感染による増悪期や喘息発作時にも検査し、経時の変化をも追求した。

早朝時の痰を0.06% Buffered Crystal Violet 溶液で染色し、まず低倍率で検鏡して、重層扁平上皮が含まれていない適当な検体であることを確認し、ついで高倍率で検鏡し、細胞の性質別分布を求め、全細胞に対するパーセントで表記した。

3 研究成績

1) 慢性気管支炎と気管支喘息の喀痰における細胞の性質とその分布

表2に示すごとく、慢性気管支炎では好中球の比率が、また、気管支喘息では気管支上皮細胞、組織球、および好酸球の比率が、明らかな有意差をもって多かった。

2) 慢性気管支炎の急性増悪期における変化

1例の増悪例について、喀痰の細胞分布を観察した結果は表3のごとくであり、組織球の著減と好中球の増加が認められた。

3) 気管支喘息の発作期における変化

1例の気管支喘息患者の発作時の喀痰の細胞分布を、寛解期の成績と比較した結果は表4のごとくであり、組織球の著減、好中球と好酸球の増加がみられた。なお、喘息発作時の痰中好酸球の増加は、末梢血よりも早い時期にあらわれた。

4 考察および総括

1970年 Chodosh ら (Medici, T. C. & Chodosh, S.: Nonmalignant exfoliative sputum cytology, in: Sputum. compiled and edited by Dulfano, M. J., Charles C., Thomas Publisher, Springfield, Illinois, 1973, p. 332) は、気管支喘息では気管支上皮が剝離しやすいこと、慢性気管支炎では好中球の増加がみられることを発表しているが、今回の非汚染地区における私らの成績では、Chodosh らの成績に比し、両者とも気管支上皮の剝離が少く、また、組織球の占める比率が多かった。しかし、この組織球は、気道感染時はもちろん、喘息発作時でさえ著減していた。

一般に、組織球は、気道の粘液輸送系が障害されている慢性閉塞性肺疾患患者において、リゾチーム、エステラーゼ、免疫グロブリン、白血球などとともに免疫解毒機能に属し、肺の防御機構に重要な役割を演じている。

表2 喀痰における細胞の性質と分布(%)

	例数	気管支上皮細胞 (図1)	組織球 (図2)	好酸球	好中球	単球	リンパ球
慢性気管支炎	9	3.9±2.4	18.1±7.1	1.9±1.1	66.8±9.6	3.2±3.0	6.6±4.3
(有意差)		P<0.001	0.02<P<0.05	P<0.005	P<0.001	NS	P<0.005
気管支喘息	14	13.9±6.3	29.3±9.5	11.1±8.1	40.2±10.4	2.7±3.1	2.7±1.3

表3 経過表(1) 63歳男性CB

薬剤	CM	1.5g	1.0g
末梢血			
白血球	5,800	13,700	6,300
好酸球(%)	3	1	2
胸部ラ音	(+)	(+)	(+)

	1/2	1/2	1/2
喀痰細胞成分(%)			
気管支上皮	9	7	9
組織球	15	3	17
好酸球	2	1	2
好中球	67	79	65

表4 経過表(2) 37歳男性BA

薬剤	RD	4mg	2mg
末梢血			
白血球	8,300	9,900	8,000
好酸球(%)	1	10	7
胸部ラ音	(丰)	(+)	(-)

	1/10	1/17	1/4
喀痰細胞成分(%)			
気管支上皮	17	13	19
組織球	19	34	41
好酸球	12	5	9
好中球	41	27	24

その食機能は、細菌のみならず、粉塵、アレルギーなど、外界から侵入するすべての異物に及んでおり、しかも、その機能は、安定期よりも急性増悪期に亢進することが観察されている。

大気汚染地区における慢性閉塞性肺疾患では、非汚染地区のものに比較して難治性の傾向があると考えられているが、この理由の一つとして、汚染物質により、組織球が減少することを、われわれは推測している。したがって、今後、汚染地区における喀痰の細胞診を行うにあたっては、全細胞の種類と数の比率のほか、とくに組織球の性状と反応性を重点的に追求する必要があることが認められた。

IV 慢性閉塞性肺疾患患者の喀痰の粘度とムコ多糖類との関係および酸性ムコ多糖の固定

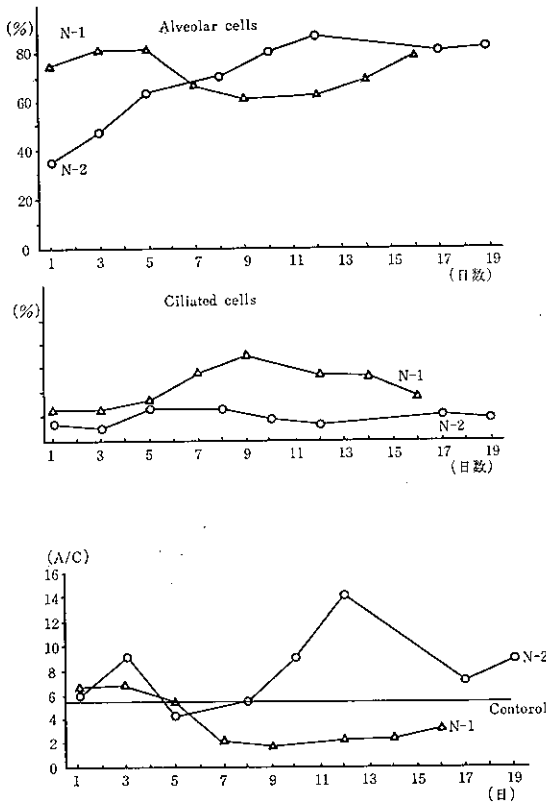
名古屋大学医学部第二内科 佐竹 辰夫
笠間 清士
龍岡 一男

1 研究目的

最近、大気汚染地区の慢性閉塞性肺疾患患者の喀痰は、非汚染地区に比較して、粘度が高い傾向を示すと推定されている。喀痰の主要成分は、気道の粘膜と壁内気管支腺から分泌されるので、喀痰は、ある程度、気道壁の代謝を反映しているものと考えられる。

われわれは、喀痰の生化学的分析を通じ、大気汚染が気道壁の代謝に及ぼす影響を検討することを究極目的として本研究を行った。今回は、まず、そのアプローチと

図 1



して、喀痰の粘度と化学的成分、とくにムコ多糖との関係を明らかにするとともに、その疾患別特徴を追究することとした。

2 研究方法の概要

慢性閉塞性肺疾患患者から採取した26検体の喀痰につき、ムコ多糖を種々の面から分析検討した。また、12の検体につき、とくに作った粘度計で測定した粘度および膿性度と粗ムコ多糖量との関係を検討した。

3 研究成績の概要 (表 5, 6 参照)

1) 喀痰の粘度と粗ムコ多糖量の間には、正の相関 ($r=0.598$, $P<0.05$) を認めた。

一方、精製ムコ多糖の量は、粗ムコ多糖量の2~20%で、全例26例の平均値は、オルシノール法では $10.1 \mu\text{mole/dl}$ 、オルシノール法では $10.1 \pm 6.9 \mu\text{mole/dl}$ 、カルバゾール法では $5.0 \pm 3.1 \mu\text{mole/dl}$ であったが、粘度との間には相関が認められなかった。

2) 精製ムコ多糖を電気泳動法で分析してみると、疾患により特徴あるパターンが認められた。

表 5

喀痰における粘膿性痰の分類 (Miller & Jones)

- M_1 : 膿をふくまぬ純粹の粘性痰
- M_2 : 多少膿性の感がある粘性痰
- P_1 : 膿性痰1度、うち膿が $\frac{1}{3}$ 以下
- P_2 : 膿性痰2度、膿が $\frac{1}{3}$ から $\frac{2}{3}$
- P_3 : 膿性痰3度、膿が $\frac{2}{3}$ 以上

慢性閉塞性肺疾患 (慢性気管支炎, 気管支喘息, 慢性肺気腫) における私らの診断, 鑑別診断, 重症度法定の方法。

- 1) 症状 (既往歴を含む)
- 2) 胸部X線による除外診断
- 3) 気管支造影と肺胞の拡大造影所見
- 4) ヒスタミン吸入による気道過敏性の有無と程度
- 5) アレルゲン皮内反応の有無と程度
- 6) 肺機能の変化とその経過

4 考察および総括

各内臓や組織においては、粗ムコ多糖をそのまま電気泳動や酵素反応に用いることができるが、喀痰の場合には、泳動では分離が不可能である。また、カルバゾール法による比色は強い褐色を呈し、定量は不能となる。したがって、精製する必要が認められた。

喀痰中における狭義のムコ多糖は、きわめて微量であり、その上、複雑な分離過程のため、回収率も不安定であり、新しい定量法の開発がのぞまれる。

喀痰の粘度と粗ムコ多糖量の間には、正の相関があったが、その主成分は糖蛋白であり、狭義のムコ多糖が関与する割合は、その濃度からみて少いと思われた。

痰中シアリン酸と痰の粘度の間には相関関係があるという報告があるが、このシアリン酸の大部分は、糖蛋白に由来するものと思われる。

表6 粘度および膿性度からみた喀痰の粗ムコ多糖

膿性度	粘度	喀痰量 (ml)	アセトン パウダー (g)	粗酸性ムコ多糖		Sephadoxカラムから得られたムコ多糖				
				mg/1.5g アセトン パウダー	mg/dl 喀痰	全 量 ウロン酸 (μ mole/dl)	ムコ多糖画分の%			
						0.5M	1.25M	1.5M	2.0M	
粘液性 (M)	I	181	1.76	146	95	14.0	88.3	8.5	3.1	混跡
	II	250	3.61	204	196	25.9	95.3	1.1	1.5	2.1
	III	165	2.06	273	227	38.0	94.2	2.7	1.1	2.0
	IV	65	2.23	170	389	75.3	92.8	0.7	6.5	混跡
粘膿性 (MP)	I	190	2.88	136	137	15.3	90.0	3.7	1.7	4.4
	II	173	2.39	157	145	29.6	79.8	15.4	3.5	1.3
	III	196	3.64	133	176	32.1	85.8	12.0	1.4	0.8
	IV	81	1.78	157	230	55.0	92.4	3.8	3.8	混跡
膿性 (P)	I	112	4.07	80	194	35.1	70.8	29.2	混跡	混跡
	II	115	4.61	50	134	35.5	93.8	4.7	1.1	0.5
	III	182	6.10	119	266	69.5	91.2	6.8	1.8	0.1
	IV	136	4.10	132	265	86.4	86.5	9.7	2.6	1.2

慢性気管支炎患者の痰には、コンドロイチン酸が多く含まれているが、気管支喘息では微量で、ほとんど認められない場合があった。コンドロイチン酸は、慢性副鼻腔炎の粘膜には、正常状態よりも5~10倍も多く含まれるとされており、病態の大きな特徴となっている。慢性気管支炎の気道では、粘液を産生する上皮の杯細胞が増加するほか、壁内の分泌腺も著しく肥大していることが認められている。これらの分泌液にコンドロイチン酸が多いということは、慢性副鼻腔炎に類似した病態をとっていることを表わしているものと推定される。

一方、気管支喘息の分泌液では硫酸化糖蛋白が多いので、慢性気管支炎と同じように分泌腺が肥大していても、その病態には若干の相違があることが示唆されたものといえよう。また、慢性肺気腫が両者の中間を示したことは、きわめて興味あることである。

現在、大気汚染地区における慢性閉塞性肺疾患、すなわち、気管支喘息、慢性肺気腫、気管支喘息の増加が報じられており、実験的にも大気汚染物質が気管支の分泌機構を肥大させることが認められている。しかし、今回の研究の結果、上記3疾患の間に、気道壁のムコ多糖代謝に相違があることが推定された。

同じような大気汚染の影響をうけても、発症するものとならないものがあり、また、発症しても病態がまちまちであることの原因究明に、本研究の推進は役に立つものと思われる。

V 高濃度 NO₂ 暴露によるラット呼吸器系病変に対する細胞学的、組織学的観察

東京医科歯科大学公衆衛生 浪江 健二
(研究協力者、

埼玉県立厚生専門学院) 久住 恵美子

1 研究目的

ガス状の大気汚染物質の呼吸器系に及ぼす影響を、細胞学的にどの程度推察しうるかを検討することを目的にして、ラットに対する高濃度 NO₂ の急性曝露実験を行い、その結果を、細胞学的および組織学的に検討した。

2 研究方法

水および固型飼料を自由に摂取させた5週令(90~110g)のウイスター系おすラットを対象動物とした。

第一の実験(N-1)は、50匹のラットに62ppmのNO₂を1時間曝露させ(死亡数0)、その後1ないし16日間にわたって摘出検体につき検討を行った。

表7 痰患別にみた精製ムコ多糖量

診断名	No.	膿 性 度	喀痰量 (ml)	粗ムコ多糖量 (mg)	C P C 可溶性成分 (mg)	精製ムコ多糖量 (ウロン酸)		
						カルバノール ($\mu\text{mole/dl}$)	オルシノール ($\mu\text{mole/dl}$)	%
気管支喘息	1	粘 液 性	18	42	30	2.0	9.7	0.27
	2	"	18	34	25	3.0	11.8	0.25
	3	"	56	97		10.7	39.2	0.27
	4	"	33			4.6	11.5	0.40
	5	"	88			2.3	5.3	0.44
	6	"	50			2.7	8.6	0.31
	7	"	48			2.9	6.9	0.42
	8	粘 膿 性	83	161	105	1.7	3.1	0.54
	9	"	57	190	127	1.4	4.9	0.29
	10	粘 液 性	44	160	107	2.2	6.1	0.37
慢性肺気腫	11	粘 膿 性	23	32		3.0	8.1	0.37
	12	粘 液 性	18	71	42	6.0	8.8	0.68
	13	粘 膿 性	24	56	35	4.0	7.5	0.53
	14	"	30	51	31	4.0	9.8	0.41
	15	粘 液 性	72	51		1.9	5.2	0.37
	16	粘 膿 性	50	60		6.3	9.8	0.64
慢性気管支炎	17	膿 性	28	36		10.7	19.0	0.56
	18	"	23	61	28	8.2	14.7	0.56
	19	"	26	51	24	10.4	10.6	0.98
	20	粘 膿 性	21	63	30	4.4	7.7	0.57
	21	"	14	60	34	11.7	18.6	0.63
	22	膿 性	17	90	51	6.8	7.1	0.96
	23	"	18	46	30	5.5	7.3	0.44
	24	"	73			7.5	8.5	0.89
	25	粘 膿 性	74	50		4.5	9.9	0.45
	26	"	94	250	195	3.0	4.4	0.67

第二の実験 (N-2) は, 57匹のラットに140ppmのNO₂を1時間曝露させ (死亡数44), その後1ないし19日間にわたって摘出検体につき検討を行った。

すなわち, ラットをラボナールで麻酔死させ, 気管・肺を, 咽喉頭部より連続して摘出し, 細胞学的ならびに組織学的検索に供した。また, 喉頭部より生理的食塩水4 mlを気管・肺内に注入し, 洗浄液を遠沈し, パパニコウ染色を実施して, 細胞学的検索に供した。

3 研究成績 (表7, 図1参照)

N-2群においては, 曝露後24時間以内に57匹中44匹が死亡した。生存例についての曝露後の経時の変化をみると, 1日後に多量 (49%) の多核白血球が出現し, 以後急激に減少し, 5日目にはほとんど消褪する。alveolar cellは経時的に増加し, 12日をピークとして, 以後停滞傾向を示す。ciliated cellについては, 5日目にやや高い出現率を示すが, 対照に比し, 特異的な傾向は認めにくい。

N-1群においては多核白血球の出現は少く, alveolar cellが3日, 5日をピークとして出現し, 12日以後再び増加の傾向を示す。ciliated cellは, 5日目以後増加傾向を示し, 9日目をピークとし, 以後減少傾向がみられる。

以上のようなalveolar cellとciliated cellの動きを明確にする方法論として, 両者の相対比 (alveolar cell/ciliated cell=A/C)を作成して観察してみると, 曝露後5日までは, 両群とも3日目をピークとするalveolar cellの高出現比を示すカーブの形成が認められた。

5日以後の傾向としては, N-2群では, 8日後よりalveolar cellの出現比が再び高くなり, 12日目をピークとする山をつくる。これに対しN-1群では, 9日目を小さな頂点とするciliated cellの出現比の増加傾向を示す。なお, 両群とも16日以後に再びalveolar cellの出現比の増加が示唆される動きがみられる。goblet cellおよびsquamous cellは, 対照群に比し著変は認められない。

組織学的に観察してみると, N-2群における死亡例は, 全例がきわめて高度の肺水腫を起していた。これに反し, 気管および気管支における変化は比較的軽度であった。N-1群では, 肺胞壁の破壊が全例に認められた。7日までの例では, 拡張した肺胞腔内に細胞の脱落が認められるが, 肺胞壁の破壊にともなう直接あるいは随伴変化によるものと考えられる。曝露後12日に至ると, 細

気管支上皮の増殖が明瞭に認められる。

4 総括および考察

N-1, N-2両群を比較するとN-2群における曝露後5日以内における多核白血球の消長は特徴的である。この変化は組織的に肺水腫の消長と一致し, また病理学的にも組織学的変化の反映として納得できる変化である。両実験群についてalveolar cellとciliated cellの出現を相対比 (A/C)を作成し検討してみると, 曝露後早期 (5日以内)では, いずれも3日をピークとするalveolar cell優位の相対比を示すカーブが見られる。この原因については両群とも肺胞壁の破壊が曝露直後より観察されること, および気管上皮の変化が3日目以前には明確でないことによると考えられる。さらに, この変化はN-2群において高度であるが, これは高濃度曝露例にては肺水腫が加算されているためと考えられる。いずれにしても, この曝露早期における変化はNO₂ガスの直接作用によるものと思われる。曝露後5日以後の変化は, 両群それぞれ様相に異にしている。すなわちN-2群では曝露後は12日をピークとしalveolar cellの出現増加を示すが, N-1群では9日を低い頂点としてciliated cellの相対比としての増加がみられる。この原因について, まず曝露後5日以後の両実験群の共通所見 (組織学的)をみると, (1)両群とも前期5日までの変化で示される肺胞壁破壊性変化 (肺気腫)は全例に認められる, (2)曝露後3日以後気管上皮の部分的剝離が全例に認められる, の2点をあげることができる。しかしながらN-2群にては初期の変化の主体をなす肺水腫に対する反応として肺肺炎, 肺胞隔炎 (3~7日)さらに細気管支上皮の増殖 (重層化) hyperplastic foci (12日以後)に至る一連の変化が気管上皮の変化を相殺し細胞学的観察結果としてalveolar cellの相対的増加を示すものと考えられる。一方, N-1群においては早期における曝露の影響がN-2群に比し弱いいためか, 以後の反応もまた比較的軽度で, 曝露3日以後より認められる気管上皮の変化がある程度, 細胞学的観察結果に反映しているものと推察される。このようにNO₂曝露濃度の差が初期の肺組織に対する損傷の程度に差を生じ, さらに以後の反応的变化に影響を及ぼし, それが細胞学的観察結果の差を生じたものと考えられる。

以上のことから単一ガス曝露においては, 痰の細胞学的観察により食道-肺胞系の組織学的変化をある程度推

表 8

(単位:%)

番号	病名等	塗抹標本内細胞分布					組織球分類					纖毛上皮分類				
		白血球			組織球	纖毛上皮	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
		好中球	好酸球	単球等												
1	K	88.7	0.5	2.5	6.1	2.2	48	32	6	5	9	31.7	46.7	10.0	10.7	11.0
2	K	87.5	0.2	9.7	2.5	—	40	41	10	3	6	1コ	1コ	—	—	—
3	N	89.6	—	9.3	1.3	—	41.1	34.6	9.4	15.0	—	3コ	1コ	—	—	—
4	N	72.2	0.3	26.6	0.8	—	31.9	34.3	20.8	10.0	4.2	—	—	—	—	—
5	N	83.1	0.3	6.8	1.1	8.7	25.8	37.6	20.8	10.9	5.0	14.3	63.4	18.1	5.2	2.4
6	K															
7	N	65.4		28.8	2.8	3.0	63.8	10.1	6.7	12.6	6.7	6コ	7コ	—	—	—
8	N	86.7		11.7	0.5	0.8	21.9	31.2	29.8	16.1	1.6	4.6	68.5	22.4	3.9	0.7
9	K	42.0	0.3	6.5	49.2	2.7	15.5	71.1	5.2	0.5	7.7		2コ	—	—	1コ
10	N	65.8	0.2	33.8	4.3	0.1	(53) 8コ	(33) 5コ	(13) 2コ	—	—	(2.3) 1コ	(63.8) 27コ	(64.8) 15コ	—	—
11	K	80.6	0.2	17.7	2.5	0.1	9.5	84.2	4.2	—	2.1	—	—	—	—	—
12	Y*	67.0	0.2	25.0	7.5	0.4	14.6	54.7	23.5	3.7	3.4	6.9	62.2	21.4	8.2	1.3
13	T	37.4	12.9	34.8	12.4	2.5	8.1	25.6	33.7	28.9	3.6	10.3	67.7	8.4	7.8	5.8
14	O*	32.0	38.6	35.0	20.6	0.7	38.0	11.9	3.9	3.3	42.6	17.9	57.9	25.2	—	—
15	K*	33.9	—	15.7	5.8	44.6	54.7	29.6	10.7	1.9	3.1	8.5	65.9	15.4	6.4	3.7
16	A	34.2	17.3	35.2	9.7	3.6	6.7	58.7	25.4	9.3	—	69.7	10.1	20.1	—	—
17	N ^{20本×20年}	39.2	0.4	21.7	14.7	26.0	11.9	29.7	18.8	25.8	10.9	3.4	60.0	30.0	1.7	5.1
18	Y	70.0	5.3	12.8	5.0	7.0	19.0	63.3	31.6	1.3	1.9	4.3	70.0	21.4	2.6	1.7
19	K	83.6	0.7	10.0	4.8	0.4	40.8	51.9	2.8	—	4.6	—	4コ	—	—	—
20	N	66.1	1.0	34.7	3.2	1.1	13.1	43.8	20.9	7.2	15.0	1コ	7コ	1コ	—	—
21	N	85.8	—	11.2	3.0	—	16.5	43.5	21.8	17.4	0.9	(4.3) 1コ	(47.8) 11コ	(47.8) 11コ	—	—
22	K	90.5	0.5	7.6	1.1	—	38.8	51.2	7.5	1.3	1.3	—	—	—	—	—
23	Y	81.4	—	11.2	3.6	4.8	40.2	28.6	21.3	9.8	—	13.5	63.0	12.4	11.2	—
24	N	88.9	—	9.2	1.9	0.2	(39.4) 15コ	(39.4) 15コ	(5.3) 2コ	—	(15.8) 6コ	3.8	77.3	13.2	18.9	3.8
25	Y	54.0	—	33.1	12.7	0.4	15.9	55.0	19.2	8.0	2.0	2.5	74.7	13.9	5.1	3.8
26	N	91.0	—	8.1	0.3	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
27	Y	80.7	—	11.5	7.5	0.4	15.5	41.8	28.2	14.5	—	2.5	59.9	21.6	15.4	0.6
28	N	91.5	—	8.4	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
29	F	90.0	0.3	8.1	1.4	—	46.8	25.7	11.0	4.6	11.9	—	—	—	—	—
30	Y	60.0	—	39.8	0.2	—	22.8	48.0	17.3	1.6	10.2	2コ	3コ	5コ	—	—
31	A	81.6	1.2	16.5	0.9	—	27.4	46.0	14.5	3.2	8.9	(4.8) 2コ	(63.3) 31コ	(32.6) 16コ	—	—
32	N ^{40本×13年}	82.3	0.3	12.7	1.1	3.6	(21.0) 4コ	(52.7) 10コ	(5.3) 1コ	(1.5) 2コ	(1.5) 2コ	9.9	47.5	35.4	2.8	4.4

※は nonsmoker

Mork class IV 腺型異型細胞

察することは可能であると考えられた。

VI 慢性閉塞性疾患における喀痰中の組織球の形態

杏林大学病院病理部 高橋 正宜

1 研究目的

汚染物質は多岐にわたり、都市における自動車の排気ガス、産業工場における刺激性物質、多種粉塵など経気道的に侵入するものが多い。汚染物質に長期間さらされることが、慢性閉塞性肺疾患に関連性のあることは認められており、塵肺症など形態的にとらえられるものについては病理解剖学的にも理解されている。

わが国のように人口密集の都市居住者については一般家庭からの粉塵も決してなおざりにはできない。臨床病理的の見地からすれば、形態学的にとらえうるもの、それが刺激性物質であれ、単なる粉塵であれ、肺胞内においては肺胞組織球の活動を促すことになる。

本研究の目的は喀痰中にみられ、肺胞組織球の動態を観察し、汚染と慢性閉塞性疾患との関係を検討することにある。

2 研究方法

細胞の判別にあたり、肺胞組織球線毛上皮細胞につき、それぞれの細胞を下記のごとく分類した。

3 研究成績

結果は表 8, 9のごとくであるが、判読した細胞は 1,000個とし、末梢血液像のように differential cell count を行い、いわゆるサイトグラムを作製した。

気管支上皮細胞、組織球は通常喀痰中に常在する口腔由来の扁平上皮細胞の多寡に左右されるので扁平上皮細胞は除外計測してある。好中球は主として気道内腔における滲出物の一部をなすので計測したが、数の変動も大きくサイトグラムにおける主要部をなすものである。したがって所見の整理には、組織球、線毛上皮細胞相互の百分率変動をみることが重要であることを知った。

なお、組織球については細胞質内に数個塵埃粒子を食食する B 型と、20 個位までを含む C 型とに細分類する意義はとくにないので、正常像 A、細胞質内に 20 個位まで食食するもの B+C、および細胞質が塵埃で充満する D 型に簡易化して比較してみた。かようなサイトグラム作製が意義があるかどうかとも試みられていないので同一症例について 3 回以上痰が提出された例を考察した。

各症例について各タイプの組織球に焦点を合せてみる

と、細胞質が塵埃粒子で充満する D 型は標準偏差も少く傾向として有意差を示すものである。同一回数検体の提出された 2 症例を考察すると、A, B+C, E はいずれも推計学的に有意差は認めなかったが、D は 1%水準

表 9
Case Y. K.

times	A	B + C	D	E
1	48	38	5	9
2	40	51	3	6
3	16	75	1	8
4	10	88	0	2
5	41	55	0	4
6	39	59	1	1
mean	32.3	61.0	1.67	5.0
SD	14.1	16.3	1.80	2.9

Case M. N.

1	41	44	15	0
2	26	58	11	5
3	64	17	12	7
4	15	48	26	11
5	13	64	8	15
6	17	65	18	10
mean	29.3	49.3	15.0	8.0
SD	18.1	16.4	5.8	4.8

Case S. Y.

1	40	50	10	0
2	16	74	8	2
3	16	70	14	0
mean	24.0	64.7	10.7	0.67
SD	11.3	10.5	(2.5)	0.94

で有意差を認め、つまり粉塵による汚染度が症例Ⅱでは高いことが理解される。

なお、今回の研究試料の中にたまたま肺腺癌細胞を確認した。この例についてはE型が、15.8%と表9に示した3例のそれよりも2倍以上の値を示しており特殊な細胞を考慮させる。脂質食細胞の推定がなされるが今回の検討では脂質染色を加えていないので推論の域を出ない。

線毛上皮細胞は出現頻度がまちまちなので喀痰を対象とした場合、変化のあるものの positive 所見を追究するのがよいと考えられた。

4 考察および総括

大気汚染の尺度の一つとして肺胞組織球、すなわち塵埃細胞はその貪食の程度からある程度推測が可能と思われる。空胞化組織球に関しては、それが変性空胞か、脂質食細胞か特殊染色をほどこすまで判別はつげがたい。昭和49年度の研究方向として、本研究班の集めた同一検体について肺胞組織球の形態分類を行うと同時に脂質の貪食について検討したい。

なお、気管支上皮の変化はその発生機序が一次的なものか、慢性炎に続発する二次的なものか判定できないし、むしろ二次的な変化と推測されるが刺激性物質の中には発癌との関連性もあるので検討したい。

図2 細胞分類基準

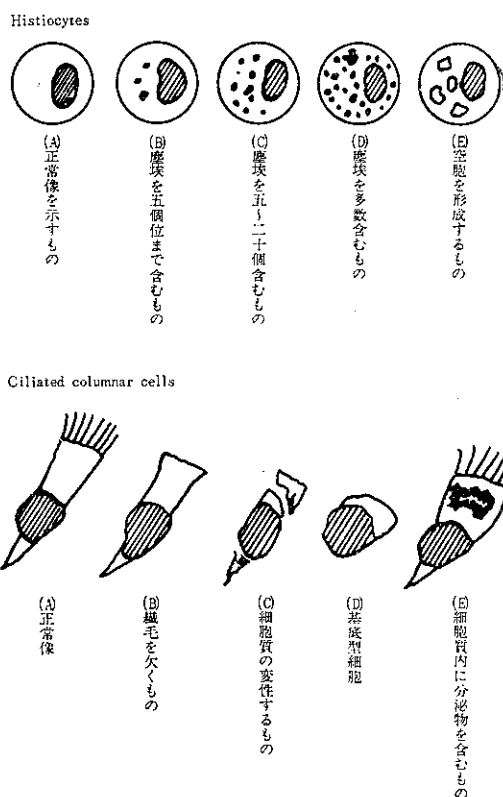


表10 喀痰中の phospholipids 分画

検体No.	疾患	Total Lipid mg/100g	phospholipids							
			1. L.L	2. S.M	3. P.C	4. P.S	5. P.I	6. P.E	7. 不明	8. Chole etc.
			%	%	%	%	%	%	%	%
1. M. Y	肺气腫	499.1	12.7	11.5	13.0	9.5	5.7	4.3	16.5	16.8
2. H. S*	肺結核	124.6	15.4	14.6	7.7	10.4	12.7	12.4	12.4	14.4
3. K. K	肺炎	180.0	11.0	11.5	11.5	12.6	13.7	14.5	12.6	12.6
4. M. T	肺癌	360.0	12.0	9.0	15.0	17.5	7.4	16.0	7.8	15.3
5. M. T	肺癌	158.6	10.4	13.5	13.0	13.0	13.0	13.6	11.0	12.5
6. T. H	肺癌	160.0	11.2	14.4	11.2	13.9	17.6	8.3	14.5	9.9
7. T. H	肺癌	180.0	10.8	11.0	14.5	14.0	18.0	12.0	14.5	5.2
8. F. W	肺癌	630.0	13.5	14.0	10.0	11.5	17.5	13.0	15.0	5.5
9. T. M*	heavy smoker	198.9	10.2	12.1	13.5	12.5	13.2	12.8	11.6	14.1

* 血痰

VII 喀痰中のリン脂質の分画について

杏林大学病院病理 高橋 正宜
聖ヨハネ桜町病院 三輪 和子

1 研究目的

最近 NO₂ などの大気汚染物質が肺の表面張力に影響を及ぼすといわれている。下部気道の Sursactant に関係の深いリン脂質さらには総脂質の喀痰中の脂質食細胞との関係を知る目的で予備実験として喀痰中の総脂質の定量および薄層クロマトグラフィーによるリン脂質の分画を行った。今回、検索例は肺癌、肺気腫、肺炎、肺結核および喫煙者の9例である。

2 研究方法

(1) 喀痰より脂質の抽出、喀痰の重量を測り、これに22倍容の Folch の溶媒(chloroform, methanol 2:1)を加え振盪これを稀硫酸で洗浄後静置し下層(chloroform 層)に脂質を移行させる。(2) 総脂質の定量, chloroform 層の一部をとり Bragdon の酸化法によって総脂質を定量する。方法は chloroform を 70°C で蒸発し残渣に重クロム酸カリ, 硫酸の混液を加え 100°C で30分間加熱し、生成したクロム明ばん K₂Cr₂(SO₄)₄ の暗緑色を 50mg/dl のバルミチン酸を標準として 580mm で比色する。(3) リン脂質の分画 chloroform 抽出液の残りに抗酸化剤 4-methyl 2, 6, di tert juthyl phenol を 0.05% 加え、80°C 以下で蒸発乾固する。この残渣を少量(約 50ml)の chloroform に再溶解し、シリカゲルプレート f 246 (メルク)に 1.5cm の間隔で約 20~30ml 塗布し展開溶媒 chloroform, methanol, water (65:35:4) で 90 分展開し風乾する。このときマーカーとして各リン脂質の chloroform 液を合一プレートに同時に展開する。塗布量は試料の濃度によるが過剰であるとテーリングや分離不良を起すので 40ml までが限度である。風乾したプレートはヨード蒸気に当て分離したスポットを検出する。(4) リン脂質の分離定量, 各スポットを別々の試験管にかき取り過ヨード酸で 190°C にて湿性灰化させ、モリブデン試薬で発色, 750mm で比色しえたリン量を レシテン(phosphatidyl chotin) に換算する。

3 研究成績

結果は表10のとおりである。

表10 の plrspholipod 分画内の略号はそれぞれ下記のとおりである。なお、不明というグループは cerebricide ではないかと思われたが、同定しえなかったため

不明としたものである。

Note: details of abbreviation in the table

LL……lysolecithin or lysophosphatidyl chalin
SM……sphingomyelin
PC……phosphatidyl serine
PI……phosphatidyl inasitole
PE……phosphatidyl ethanol amine or cepherine
TGChle……triglyceride and/or cholesterol

4 考察および総括

肺胞上皮の表面には、表面活性物質がありリン脂質を主成分とすると考えられているが、肺胞上皮のみならず細気管支上皮にも存在するといわれている (Cavagna, Stemmler, Machlem ら)、慢性閉塞性疾患、肺癌などの例では気管支上皮に扁平上皮化生のような上皮異常をみる例が少なくないが、その病変が果して表面活性物質に影響をもたらさしはしないか、また肺癌例では脂肪食細胞の出現が多いので喀痰中に脂肪の増加がありはしないか、2, 3の問題を念願において9例の検索を試みたが現在特別な成績は得ていない、49年度において症例を選択して検討を加えてみたい。

全体の総括および結語

喀痰を種々の観点から分析することを、大気汚染の人体影響検討のための一つの手法とするための研究のアプローチとして、研究初年度に相当する昭和48年度においては、大気汚染と関連が深いとみなされている慢性閉塞性肺疾患を主体にした呼吸器疾患患者の痰と、二酸化窒素に曝露させた実験動物の気道内粘液性分泌物とを対象に、細胞学および化学的分析を行った。

以上の結果、痰の細胞成分および化学的成分のうちのあるものは、疾病または病態に対して、ある程度特異的な分布を示すこと、また、二酸化窒素に曝露させた動物の気道内粘液の細胞学的組成が、経過の変移ともなっており、ほぼ一定したパターンを示すことが認められた。

このような本年度の研究成績をもって、大気汚染の影響との関係を結論づけることは不可能であるが、本年度において開拓した手法とその結果は、次年度以降に行う予定の、目的に直結した本格的研究の基盤として有意義であったと思われる。来年度においては大気汚染の人体影響の一つの指標としての痰の分析法を確立するためにさらに研究を進展させることを意図するものである。