

呼吸器の感染防御機構に関する研究

第3篇 呼吸器感染防御因子としての気管支 洗浄液中液性成分に関する研究

京都大学結核胸部疾患研究所 内科第二部門

門 政 男

(昭和57年3月2日受付)

1. 緒 言

呼吸器系における細菌感染に対する防御機構として、全身性免疫の他にいわゆる分泌型IgAに代表される局所免疫の存在が認められている¹⁾。また、一種の溶菌物質である lysozyme も気管支分泌物中に多量に含まれており、感染防御機構の一端をになっているものと考えられている²⁾。気管支分泌物中のこれらの IgA, lysozyme は、感染などによって気道刺激が加わると、気管支腺より分泌されるものと推定される³⁾ ため、ラットを用いてタバコ喫煙により気管支を刺激した時の気管支分泌物中の免疫グロブリン, lysozyme 量の変動をみる目的で研究を行なった。また、喫煙による気管支分泌物中のアンチトリプシン活性の変動についても検討を加えた。

2. 研究材料および研究方法

Wistar 系雌ラット (体重 150~200 g) に空気: 煙=420ml: 35ml に調整した Hamburg II 型ラット喫煙装置 (図1) を用いてハイライト煙を10分, 20分, 30分, 40分間喫煙させ、屠殺したのち、第2篇で報告した方法³⁾ を用いて滅菌生理的食塩水 2 ml で気管支を洗浄した。これとは別に1日15分, 2週間連日喫煙させたラットを最終日のみ20分間喫煙させたあと屠殺し、同様の方法で気管支を洗浄した。総ての実験はラット5匹を1群として行なった。気管支洗浄

液は約 1 ml 回収され、直ちに 4°C, 1500回転で15分間遠沈したのち、上清を分離して以下の測定を行なった。

1) IgA, IgG の測定

富士臓器株式会社に依頼して、ラット抗 IgA および抗 IgG 血清を用いて immunoplate を作製し、ラット気管支洗浄液中の IgA, IgG を測定した。標準血清には、正常ラット5匹の血清を混合したものを使用し、この混和した血清中の IgA 量を 0.13 mg/ml, IgG 量を 16.0 mg/ml とした⁴⁾。

2) lysozyme および総蛋白量の測定

Saltina lutea を使用した比濁法⁵⁾ により、気管支洗浄液中の lysozyme 量を測定し、総蛋白量は Lowry 法を用いて測定した。

3) アンチトリプシン活性の測定

James 法⁶⁾ に準じて、アンチトリプシン活性を測定した。すなわち、0.01M CaCl₂ を含む Trisbuffer (pH 8.1, 0.05M) を用いて bovine pancreas trypsin (Boehringer Mannheim 社) を溶解し、0.025, 0.020, 0.0175, 0.015, 0.0125, 0.010, 0.0075 mg/ml の濃度のトリプシン溶液を作成する。各濃度の溶液 50 μ l ずつを試験管にとり、気管支洗浄液をそれぞれ 50 μ l 宛加えて混合し、10分間室温に放置する。ついで各試験管よりピペットで混合液 50 μ l をとり、感光した富士医療用 X線フィルム (KX, TAC ベース) の膜面上に滴下してゆく。試料を全部

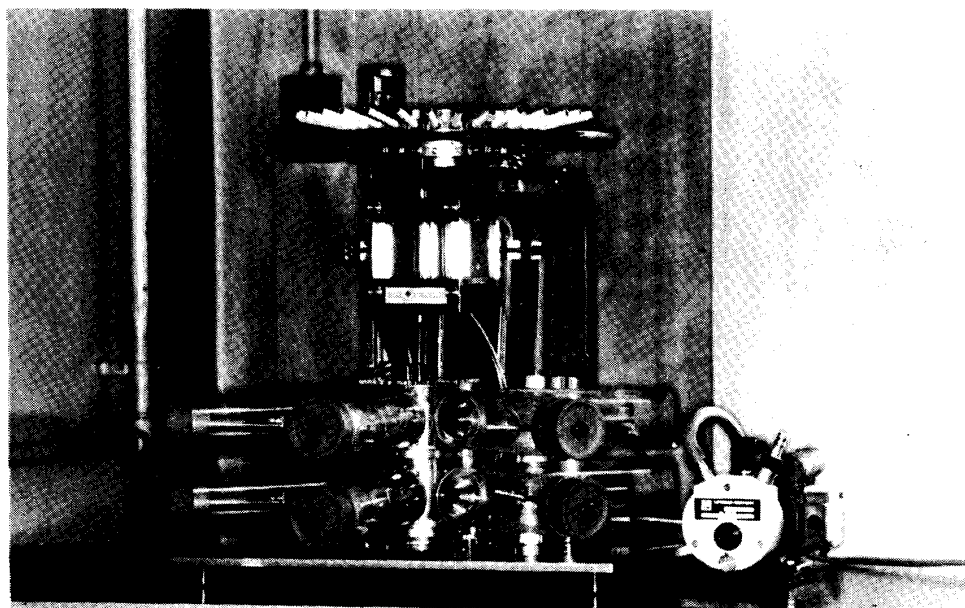


図1 Hamburg II型ラット喫煙装置

滴下し終わったらフィルムを大型のシャーレに入れ、2時間室温に放置する。その後フィルムを水道水で洗浄し、ゼラチンの分解した部分を洗い去ると、溶解している部分は透明となる（図2）。透明化した最低のトリプシン濃度と透明化しない最高のトリプシン濃度の算術平均をもっ

て測定値とした。

3. 研究成績

喫煙前の正常ラット、喫煙10分、20分、30分、40分後のラット気管支洗浄液中のIgA, IgG, lysozyme, 総蛋白量を表1および図3に示す。lysozymeは喫煙前が $52.0 \pm 4.4 \mu\text{g/ml}$ 、10分が $82.0 \pm 6.0 \mu\text{g/ml}$ 、20分が $95.0 \pm 4.5 \mu\text{g/ml}$ と次第に増加したが、30分および40分では $80 \mu\text{g/ml}$ 以下に低下した。IgAは喫煙前が $0.9 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ で、10分、20分、30分がそれぞれ $1.4 \pm 0.4 \text{ mg/dl}$ 、 $2.0 \pm 0.2 \text{ mg/dl}$ 、 $2.1 \pm 0.2 \text{ mg/dl}$ と徐々に増加し、40分では $5.3 \pm 0.4 \text{ mg/dl}$ と一挙に2倍以上の増加をみた。IgGは喫煙前から30分まで大きな変動はみられなかったが、40分では $62.4 \pm 5.1 \text{ mg/dl}$ で、喫煙前の5倍近い増加を認めた。総蛋白量もIgGと同じ傾向を

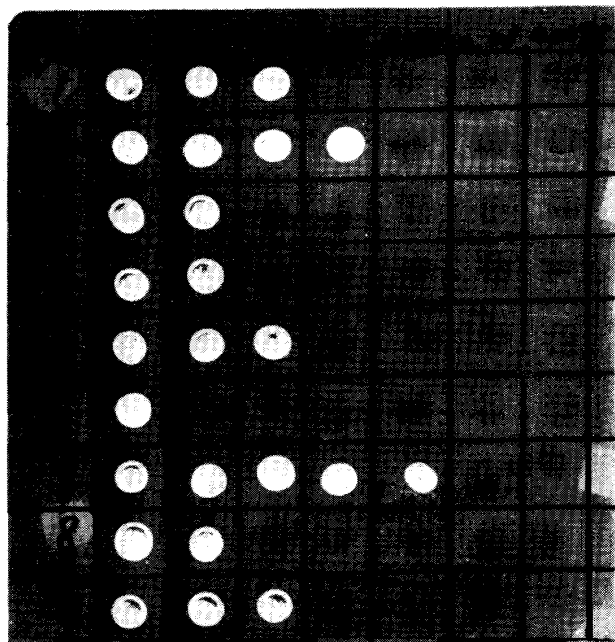


図2 アンチトリプシン活性の測定

感光した医療用X線フィルムの膜面上のゼラチンが溶解して透明となる。透明化した最低のトリプシン濃度と透明化しない最高のトリプシン濃度の算術平均をとって測定値とした。

表1 タバコ煙刺激による気管支洗浄液中Lysozyme, IgA, IgGおよび総蛋白量

	Lysozyme $\mu\text{g/ml}$	IgA mg/dl	IgG mg/dl	総蛋白量 mg/dl
前	52.0 ± 4.4	0.9 ± 0.3	12.6 ± 1.7	76.4 ± 8.4
10分	82.0 ± 6.0	1.4 ± 0.4	9.2 ± 2.0	70.0 ± 6.6
20分	95.0 ± 4.5	2.0 ± 0.2	13.2 ± 2.6	77.4 ± 3.3
30分	70.6 ± 6.5	2.1 ± 0.2	14.0 ± 3.7	95.0 ± 15.2
40分	76.0 ± 4.0	5.3 ± 0.4	62.4 ± 5.1	227.4 ± 16.3

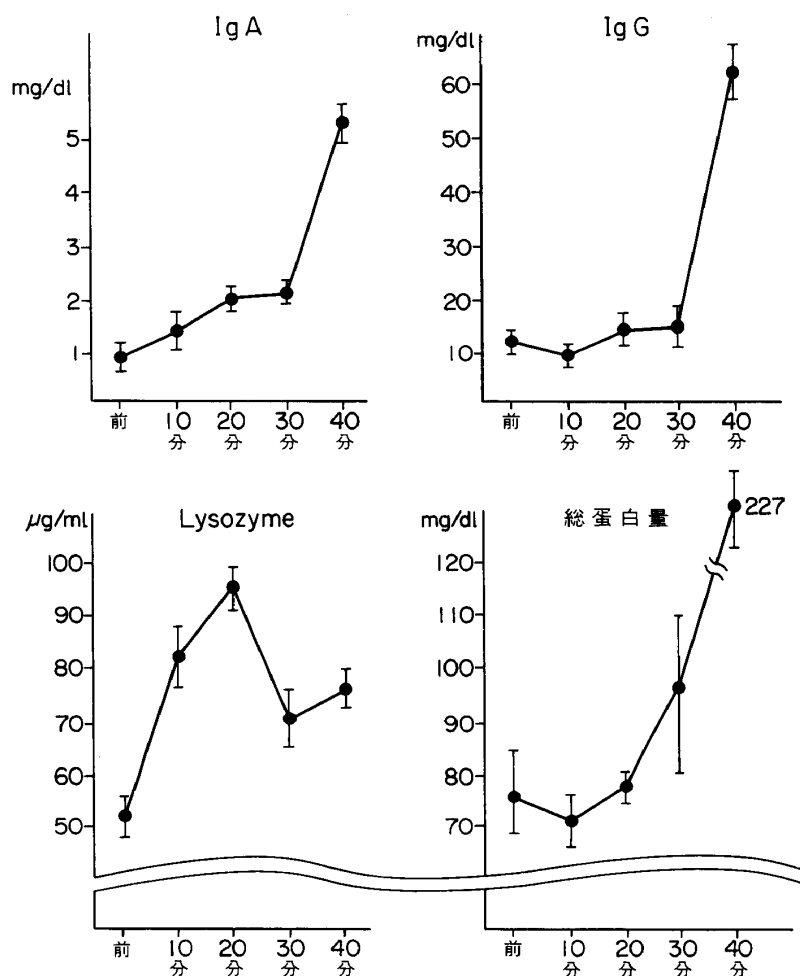


図3 タバコ煙刺激による気管支洗浄液中 Lysozyme, IgA, IgG および総蛋白量の経時的変動

示し、40分で $227.4 \pm 16.3 \text{ mg/dl}$ と喫煙前の値に比べて大幅に増加していた。

気管支洗浄液は洗浄法により、どうしても濃淡ができるため、総蛋白量との比を求めて経時的変動の比較を行なった。表2および図4で示すように、lysozymeは喫煙前の $6.9 \pm 0.2\%$ か

表2 タバコ煙刺激による気管支洗浄液中 Lysozyme, IgA, IgG の総蛋白量に対する比率

	Lysozyme 総蛋白量 $\times 100$	IgA 総蛋白量 $\times 100$	IgG 総蛋白量 $\times 100$
前	6.9 ± 0.2	1.2 ± 0.6	16.7 ± 1.9
10分	11.9 ± 0.9 ($P < 0.001$)	1.6 ± 0.7	14.0 ± 3.8
20分	12.3 ± 0.4 ($P < 0.001$)	2.7 ± 0.4 ($P < 0.1$)	16.8 ± 2.8
30分	7.9 ± 1.0	2.4 ± 0.4	15.6 ± 3.5
40分	3.4 ± 0.2 ($P < 0.001$)	2.3 ± 0.2	27.8 ± 2.6 ($P < 0.01$)

ら10分で $11.9 \pm 0.9\%$ ($P < 0.001$), 20分で $12.3 \pm 0.4\%$ ($P < 0.001$)と上昇し、30分では $7.9 \pm 1.0\%$, 40分では $3.4 \pm 0.2\%$ ($P < 0.001$)と減少した。IgAはlysozymeと同様の変動を示し、喫煙前が $1.2 \pm 0.6\%$ で10分が $1.6 \pm 0.7\%$, 20分が $2.7 \pm 0.4\%$ ($P < 0.1$)と上昇し、30分, 40分ではそれぞれ $2.4 \pm 0.4\%$, $2.3 \pm 0.2\%$ と減少した。IgGは喫煙前, 10分, 20分, 30分がそれぞれ $16.7 \pm 1.9\%$, $14.0 \pm 3.8\%$, $16.8 \pm 2.8\%$, $15.6 \pm 3.5\%$ でほとんど変動せず、40分で $27.8 \pm 2.6\%$ ($P < 0.01$)と急激な上昇を示した。

1日15分ずつ2週間連日喫煙させ、最終日のみ20分間の喫煙をさせたラットの気管支洗浄液中 lysozyme は $61.0 \pm 3.7 \mu\text{g/ml}$, IgA は $1.4 \pm 0.6 \text{ mg/dl}$, IgG は $22.6 \pm 4.2 \text{ mg/dl}$, 総蛋白量は $129.0 \pm 12.3 \text{ mg/dl}$ であり、総蛋白量に対する百分比は表3に示すように、lysozyme 4.8

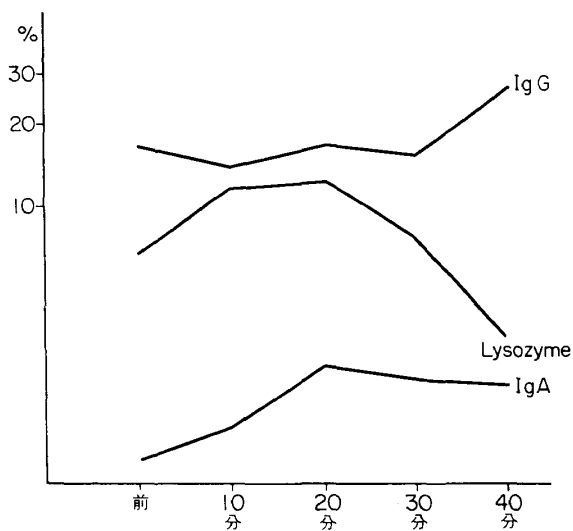


図4 タバコ煙刺激による気管支洗浄液中 Lysozyme, IgA, IgG の総蛋白量に対する百分比

$\pm 0.3\%$, IgA $1.0 \pm 0.3\%$, IgG $17.0 \pm 1.6\%$ であった。20分間喫煙1回のみラットに比べて, lysozyme, IgA は減少したが, IgG, 総蛋白量は増加しており, 総蛋白量との百分比でみると lysozyme, IgA は減少し, IgG はほぼ同じ値であった。

気管支洗浄液中のアンチトリプシン活性は, 表4に示すように喫煙前が 1.025 ± 0.100 mg/dl, 20分が 1.585 ± 0.189 mg/dl, 40分が 2.075 ± 0.179 mg/dl で次第に増加していたが, 総蛋白量との百分比でみると, 喫煙前の $1.4 \pm 0.1\%$ に比べて20分が $1.9 \pm 0.2\%$ ($P < 0.01$) で軽度増加していたが, 40分では $0.9 \pm 0.1\%$ ($P < 0.05$) で喫煙前値よりも低下していた。1日15分, 2週間連日喫煙させたラットでは, 1回20

表3 タバコ煙刺激による気管支洗浄液中 Lysozyme, IgA, IgG の総蛋白量に対する比率

	Lysozyme 総蛋白量 $\times 100$	IgA 総蛋白量 $\times 100$	IgG 総蛋白量 $\times 100$
前	6.9 ± 0.2	1.2 ± 0.6	16.7 ± 1.9
20分	12.3 ± 0.4 ($P < 0.001$)	2.7 ± 0.4 ($P < 0.1$)	16.8 ± 2.8
40分	3.4 ± 0.2 ($P < 0.001$)	2.3 ± 0.2	27.8 ± 2.6 ($P < 0.01$)
* 連日喫煙 20分	4.8 ± 0.3	1.0 ± 0.3	17.0 ± 1.6

* 1日15分, 2週間連日喫煙

表4 タバコ煙刺激による気管支洗浄液中のアンチトリプシン活性

	AT 活性* mg/dl	総蛋白量 mg/dl	AT 総蛋白量 $\times 100$
前	1.025 ± 0.100	76.4 ± 8.4	1.4 ± 0.1
20分	1.585 ± 0.189	77.4 ± 3.3	1.9 ± 0.2 ($P < 0.01$)
40分	2.075 ± 0.179	227.4 ± 16.3	0.9 ± 0.1 ($P < 0.005$)
** 連日喫煙 20分	1.575 ± 0.146	129.0 ± 12.3	1.3 ± 0.1

* アンチトリプシン活性

** 1日15分, 2週間連日喫煙

分喫煙ラットに比べてアンチトリプシン活性に差はみられなかったが総蛋白量に対する百分比では $1.3 \pm 0.1\%$ で喫煙前値と略同程度に迄低下していた。

4. 考 案

気道局所の感染防御機構の一つとして, IgA, IgG などの免疫グロブリンが重要視されている。このうち, IgA は分泌型 IgA として知られており¹⁾, 気管支腺(漿液腺)より分泌されて主として中枢気管支の感染防御に働かし, 一方, IgG は肺泡領域に多量に存在して末梢肺の感染防御の役割を演ずると言われている。また, 溶菌物質の一種である lysozyme は, 気管支分泌物中に多量に含まれており, 慢性気管支感染症患者では減少していることから, 気道の感染防御に役立っているものと考えられる²⁾。lysozyme は肺泡 macrophage, 白血球に多量に含有されているため, 従来より, それらの細胞の破壊により産生されるものと思われていたが, 気管支分泌物中の IgA と lysozyme が正の相関関係を持つことより, lysozyme も気管支腺より分泌されるのではないかと推定されるようになってきた³⁾。そこで今回, ラットを用いてタバコ喫煙により気管支を刺激し, 気管支腺分泌を促進した時の気管支分泌物中の IgA, IgG, lysozyme を測定し, 経時的変動を検討した。また, ラットに1日15分, 2週間連日喫煙させた場合の気管支分泌物についても検討を加えた。

まず、喫煙によって気管支に刺激を加えた場合の気管支洗浄液中成分の経時的変動を表1、図3に示すが、IgA は30分まで漸増し、40分で2倍以上の大幅な増加を認め、IgG は30分まではほとんど変動せず、40分で5倍近い増加を示した。総蛋白量については、IgG と同じ傾向を認め、40分で急激な増加をみた。lysozyme は20分値が最高で、30分および40分では減少していた。従って喫煙により、30分までは血液成分の影響は少ないが、40分をこえると急速に血液成分の気管支分泌物中への移行が増大するものと考えられた。

気管支洗浄液は、回収される洗浄液に濃淡があり、一定の濃度の液が得られないため、経時的な変動をみるためには、各々の成分の総蛋白量に対する百分比を求めて比較しなければならない。そこで、表2、図4より、総蛋白量との百分比でみてみると、lysozyme, IgA とともに20分をピークとする上方に凸の曲線を描き、IgG は30分まで変動がなく、40分で急激な増加を示した。血液中の lysozyme は極微量であり、IgA も IgG に比べて微量（約1/100）であるため、以上の研究成績より、喫煙によって気管支に刺激を加えると、まず気管支腺より lysozyme, IgA が分泌され、ついで血液成分の気管支内への移行がはじまって、IgG, 総蛋白量が増加するものと考えられた。lysozyme については、気管支の漿液腺に多量に含まれているという報告があり⁹⁾、著者はすでにラットに漿液腺の分泌を亢進させる薬剤である Bromhexine を投与して、気管支洗浄液中の lysozyme 量が増加したことを確認している³⁾。従って、今回の成績は、気管支の刺激により気管支漿液腺から lysozyme が分泌されるという考えの裏付となるものと思われる。

1日15分、2週間連日喫煙させたラットでは、20分間のタバコ刺激後の気管支洗浄液中 lysozyme, IgA とともに、20分1回喫煙のみのラットに比べて減少しており、総蛋白量に対する百分比も低下していたが、IgG, 総蛋白量は反対に増加していた。これは、2週間連日の喫煙により気管支腺よりの lysozyme, IgA の分泌が低下

し、また、血液成分の気管支内移行が炎症により促進されたためであろうと思われる。従って、炎症が長期間存在すれば、気管支分泌物中の lysozyme, IgA が減少し、それがまた気道の感染を容易にさせるという悪循環をひきおこすものと考えられる。

α_1 アンチトリプシンについては、その欠損が肺気腫の原因の一つであると考えられており¹⁰⁾、ヒト血清中の値については大島らの報告がある¹¹⁾。しかし、気管支洗浄液中の α_1 アンチトリプシンについてはまだ不明であり、今回は一つの試みとして、ラット気管支洗浄液中の濃度をアンチトリプシン活性として測定してみた。気管支洗浄液中のアンチトリプシン活性は、喫煙20分、40分で喫煙前のそれぞれ1.5倍、2倍に増加しており、総蛋白量との百分比で比較すると、20分では $1.9 \pm 0.2\%$ の最高値をとり、40分では $0.9 \pm 0.1\%$ で低下していた。また、2週間連日喫煙のラットでは、喫煙20分が $1.3 \pm 0.1\%$ であり、1回喫煙20分のラットに比べて低下していたため、これらの成績からは、アンチトリプシン活性を有する物質が、lysozyme, IgA と同じく気管支腺より分泌されている可能性も考えられる。しかし、血液中のアンチトリプシン活性が極微量であることを考えれば、アンチトリプシン活性を総蛋白量との百分比であらわすことは、流入した血液成分中の総蛋白量の影響を大きく受けるものと思われるため、今後一層の検討が必要である。

5. 結 語

Wistar 系雌ラットに Hamburg II 型喫煙装置を用いて、ハイライト煙を10分、20分、30分、40分間喫煙させ、屠殺したのち滅菌生食水2ml で気管支を洗浄し、洗浄液中の lysozyme, IgA, IgG, アンチトリプシン活性、総蛋白量を測定した。また、1日15分、2週間連日喫煙させたラットについても同様の方法で洗浄を行ない、洗浄液中の成分を測定した。洗浄液中の各成分の総蛋白量との百分比を求めて経時的に比較すると、lysozyme は喫煙前の $6.9 \pm 0.2\%$ から10分で $11.9 \pm 0.9\%$ ($P < 0.001$)、20分で $12.3 \pm 0.$

4%($P<0.001$)と上昇し、30分では $7.9\pm1.0\%$ 、40分では $3.4\pm0.2\%$ と減少した。IgA は lysozyme と同様の変動を示し、喫煙前が $1.2\pm0.6\%$ で10分が $1.6\pm0.7\%$ 、20分が $2.7\pm0.4\%$ ($P<0.1$)と上昇し、30分、40分ではそれぞれ $2.4\pm0.4\%$ 、 $2.3\pm0.2\%$ と減少した。IgG は喫煙前、10分、20分、30分がそれぞれ $16.7\pm1.9\%$ 、 $14.0\pm3.8\%$ 、 $16.8\pm2.8\%$ 、 $15.6\pm3.5\%$ ではほとんど変動せず、40分で $27.8\pm2.6\%$ ($P<0.01$)と急激な上昇を示した。2週間連日喫煙させたラットでは、喫煙20分の lysozyme が $4.8\pm0.3\%$ 、IgA が $1.0\pm0.3\%$ 、IgG が $17.0\pm1.6\%$ であり、喫煙20分1回のみのラットに比べて lysozyme, IgA は低下しており、IgG はほぼ同じ値であった。

従って、喫煙によって気管支に刺激を加えると、気管支腺より lysozyme, IgA が分泌されて増加するが、連日喫煙により炎症が長期間継続すると、これらの分泌が減少するものと考えられる。IgG は10分から30分まで変動がなく、40分で急激に上昇しており、また、連日喫煙による変化は認められなかったため、30分以後に血液中より気管支内への移行が急速におこなわれたと考えられる。

アンチトリプシン活性については、喫煙前が $1.4\pm0.1\%$ であり、20分で $1.9\pm0.2\%$ の最高値をとったあと、40分で $0.9\pm0.1\%$ と低下していた。また、2週間連日喫煙をさせたラットでは、喫煙20分が $1.3\pm0.1\%$ であり、1回喫煙20分のラットに比べて低下していたため、アンチトリプシン活性を有する物質が、lysozyme, IgA と同様に気管支腺より分泌される可能性が考えられた。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜わりま

した大島駿作教授に篤く御礼申し上げます。また、研究の御手伝を頂いた満安清孝先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) Tomasi, T. B.: Secretory immunoglobulins, New Engl. J. Med., 287: 500, 1972.
- 2) Lorenz, T. H. et al.: A quantitative method of lysozyme determination. An investigation of bronchial lysozyme, J. Lab. & Clin. Med., 49: 145, 1957.
- 3) 門 政男: 呼吸器の感染防御機構に関する研究, 京都大学結核研究所紀要, 13: 32, 1980.
- 4) Henry, J. B. et al.: The Laboratory Rat, Academic Press, New York, 188, 1980.
- 5) 大島駿作他: 感作家兎肺滲出細胞抽出液中の抗結核菌性物質リゾチームに関する研究, 京都大学結核研究所紀要, 9: 154, 1961.
- 6) James, K. et al.: A semiquantitative procedure for estimating serum antitrypsin levels, J. Lab. & Clin. Med., 67: 528, 1966.
- 7) Bürgi, H.: Endogenic defense against infectious disease in chronic bronchitis, Respiration, 28: 480, 1971.
- 8) 寺井継男: 喀痰上澄中の IgA とリゾチーム, 日本胸部臨床, 35: 46, 1976.
- 9) 伊藤元彦他: 気管支腺の機能と構造に関する研究 (I) —感染防御機構としての気管支腺の意義について—, 日本胸部疾患学会雑誌, 15: 186, 1977.
- 10) Eriksson, S.: Studies in α_1 -antitrypsin deficiency, Acta Med. Scandinav., Supple, 432: 1, 1965.
- 11) 大島駿作他: 閉塞性肺疾患と喫煙との関係に及ぼす内的素因の影響に関する研究, 昭和54年度喫煙と健康に関する委託研究報告概要 (II), 134, 1980.

STUDIES ON THE DEFENCE MECHANISMS IN THE RESPIRATORY SYSTEM

Report III. Effect of Inhalating Cigarette Smoke on the Levels of Immunoglobulins,
Lysozyme and Antitrypsin in Bronchial Lavage Fluid**Masao KADO, M. D.***The Second Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University*

Amounts of immunoglobulins, lysozyme and antitrypsin in bronchial lavage fluid were measured by using rats (Wistar strain, female) in order to examine an effect of cigarette-smoking. Each group of rat was inhaled a certain amount of cigarette-smoke by a smoking apparatus (Hamburg type II) for 10, 20, 30 and 40 min, respectively. In another experiment, a group of rat was exposed to the smoke for 15 min daily for two weeks. After the inhalation, the bronchus was lavaged with 2 ml of sterile saline and the supernatant was collected individually. IgA and IgG were measured by immunodiffusion technique. Lysozyme was determined by a biological method. Antitrypsin activity was measured by James' method.

The results were summarized as follows:

- 1) Lysozyme level increased 10 min after the start of the inhalation and reached to the peak at 20 min. The level decreased into normal range within 40 min.
- 2) A pattern of IgA was similar to that of lysozyme. The maximum peak of IgA level was found at 20 min and decreased later.
- 3) IgG showed a different pattern from IgA and lysozyme. The level remained in the normal range for 30 min after the start of the inhalation and remarkably increased at 40 min.
- 4) A pattern of antitrypsin activity increased at 20 min after the start and decreased into normal range later.
- 5) A group exposed to cigarette smoke for 15 min daily for 2 weeks showed lower levels of lysozyme, IgA and antitrypsin than those of the groups exposed to single dose of smoke for 20 min. On the other hand, IgG levels were nearly the same for both groups.

It was suggested that the secretion of lysozyme, IgA and antitrypsin in tracheo-bronchial tree were stimulated by the inhalation of cigarette smoking. However, the hypersecretion was seen in a short time and, after that, the secretion returned to the normal level, as if those special supplies were limited in the tracheo-bronchial tree.