

呼吸器の感染防御機構に関する研究

第2篇 呼吸器感染防御因子としての Lysozyme に関する研究

京都大学胸部疾患研究所 内科第2

門 政 男

諸 言

呼吸器の感染防御因子の一つとして、気管支分泌液中の lysozyme が重要視されるようになってきた^{1,2)}。元来、気管支分泌液中の lysozyme は、肺胞 Macrophage 或は白血球由来のものと考えられていたが^{3,4)}、最近では、喀痰中の lysozyme と分泌型 IgA の関係を調べることに、気管支腺より lysozyme が分泌されるのではないかとの報告⁵⁾が見られ、また、気管支腺を螢光抗体法で観察した研究においても lysozyme の気管支腺分泌を強く示唆する成績が示されている^{6,7)}。また、著者はすでに慢性気管支感染症患者の気管支洗浄液中の lysozyme は正常人に比べて減少しているが、両者の血清 lysozyme 量には著明な差異を認めないことから、lysozyme が気道における局所免疫の重要な一因子であると考えられることを報告している。そこで、今回、ラットに卵白 lysozyme を投与して、ラット肺臓およびその他の臓器中の lysozyme 分布、血清中濃度、気管支洗浄液中濃度を測定し、気管支腺よりの lysozyme 分泌について検討した。ラット臓器内の lysozyme 分布については、さらに ¹²⁵I で標識した卵白 lysozyme を用いてオートラジオグラフを作製し、各臓器中の lysozyme 分布について研究した。また、ラットの気管支を刺激して、気管支腺分泌を高めた場合の気管支洗浄液中の lysozyme 量を測定して lysozyme の気管支腺分泌の可能性を検索し、気道における感染防御因子

としての lysozyme の動態とその役割について考察を加えたので、その成績を報告する。

研究材料および研究方法

Wistar 系雌ラット 150 g~200 g のものを使用して以下の実験を行なった。

1) 卵白 lysozyme 投与後のラット臓器内 lysozyme 分布

卵白 lysozyme (SIGMA, Lysozyme 3x Cryst. from Egg White, No. L-6876) 10 mg を生理的食塩水 0.1 ml に溶解し、ラット5匹を1群として尾静脈へ静注或は頸部に皮下注射し、それぞれ30分、1時間、2時間、4時間後に心臓穿刺を行なって採血した後、肺臓、腎臓、脾臓を摘出した。Klockars ら⁸⁾の方法に従って、摘出した各臓器に5倍量の 0.07 M phosphate buffer (pH 6.3) を加え、日本精機製作所製のマイクロモホジェネーターを用いてホモジェネートを作成した。これを -50°C で冷凍後融解し、この操作を5回繰り返したあと4°C、2000回転で10分間遠沈し、その上清中の lysozyme を測定した。

2) 卵白 lysozyme 投与後のラット気管支洗浄液中の lysozyme 濃度

ラット5匹を1群として、卵白 lysozyme 10 mg を尾静脈より静注し、30分、1時間、2時間、4時間後に心臓穿刺を行なって屠殺したのち気管支を剥離して、1のごとく、マイクロピペットのチップを利用した器具を用いて気管支を 2 ml の滅菌生理的食塩水で洗浄した。チ



図1 ラット気管支洗浄方法

気管支を剝離した後、マイクロピペットのチップを短かく切断したものを
用いて、気管支と注射器を接続し、滅菌生理的食塩水にて洗浄する。

ップに接続した注射器のピストンを5回往復させて洗浄し、得られた洗浄液（約1 ml）を4°C、1000回転で5分間遠沈し、その上清中の lysozyme および総蛋白量を測定した。

3) ^{125}I 標識卵白 lysozyme を用いたラット臓器内の lysozyme 分布

第一・ラジオアイソトープ研究所に依頼して、 ^{125}I 標識卵白 lysozyme を作製した（比放射能は1.2 mCi/mg）。この ^{125}I 標識卵白 lysozyme 40 μg (48 μCi) を 0.24 ml の 0.15 M NaCl に溶解して体重 200 g のラット大腿静脈より静注し、投与後30分、1時間、2時間、4時間にそれぞれアセトンドライアイスで急速冷凍した。その後、クリオスタットにて -13°C 下で厚さ 100 μ の全身切片を作製し、各切片はX線フィルム（富士、工業用、Type 150）に密着し、5日間暗所にて保存した。続いて現像、定着後、マクロオートラジオグラフを作製した。これとは別に、 ^{125}I 標識卵白 lysozyme 2 μCi をラット3匹（180 g）の大腿静脈より静注し、30分、2時間、4時間後に屠殺して、各臓器中の放射線量をガンマシンチレーションカウンター

（Packard, オートガンマシンチレーションカウンター）を用いて測定した。

4) ラット気管支刺激後の気管支洗浄液中 lysozyme 濃度

図2の如く 20 cm $\times$ 16 cm $\times$ 20 cm のガラス箱にラットを入れ、ガラス蓋を少しずらして窒息しない状態にしておき、このガラス箱内へ三方活栓で接続した注射器（50 cc）を使用してタ

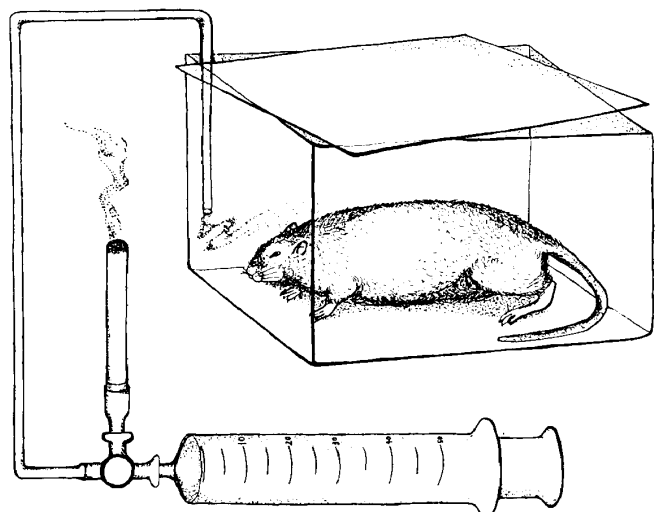


図2 ラット喫煙実験装置

バコ(両切ピース)の煙を吹き込んで充満させ、ラットの気管支を刺激した。一群を5匹として、5分、15分、1時間、2時間後に屠殺し、**図1**の装置を用いて前述の如くに気管支洗浄を行ない、遠沈後の上清中 lysozyme および総蛋白量を測定した。なお、1時間、2時間の群では、適宜タバコの煙を追加して煙が薄くならぬよう注意した。これとは別に、Bromhexine-HCl [N-cyclohexyl-N-methyl-(2-amino-3,5-dibrombenzyl)-amine hydrochloride] 注射液(4 mg/2 ml) 0.5 ml をラット頸部に皮下注射し、30分、1時間、2時間、3時間後に屠殺して、前述の如く気管支洗浄を行ない、得られた洗浄液中の lysozyme, 総蛋白量を測定した。いず

表1 卵白 Lysozyme 10 mg 静注後の臓器内 Lysozyme

	肺 $\mu\text{g/g}$	腎 $\mu\text{g/g}$	脾 $\mu\text{g/g}$	血 清 $\mu\text{g/ml}$
前	470 $\pm$ 16	375 $\pm$ 43	53 $\pm$ 16	4.0 $\pm$ 0.3
30分	548 $\pm$ 73	863 $\pm$ 32	95 $\pm$ 9	108 $\pm$ 12
1時間	534 $\pm$ 54	1260 $\pm$ 106	166 $\pm$ 17	107 $\pm$ 16
2時間	438 $\pm$ 11	1050 $\pm$ 49	86 $\pm$ 6	100 $\pm$ 9
4時間	450 $\pm$ 14	825 $\pm$ 39	78 $\pm$ 5	13 $\pm$ 2

れの場合でも、気管支洗浄液を遠沈後、管底にはっきりとした赤血球が認められるものは、血液が混入したものとして除外した。なお、lysozyme は Saltina lutea による生物学的方法を用いて測定し⁹⁾、総蛋白量は Lowry 法¹⁰⁾にて測定した。

成 績

1) 卵白 lysozyme 投与後のラット臓器内 lysozyme 分布

正常ラットの lysozyme 分布は、**表1**の如く血清 4.0 $\pm$ 0.3 $\mu\text{g/ml}$, 肺臓 470 $\pm$ 16 $\mu\text{g/g}$, 腎臓 375 $\pm$ 43 $\mu\text{g/g}$, 脾臓 53 $\pm$ 16 $\mu\text{g/g}$ で、血清中にはわずかに認められるのみであるが、肺臓、腎臓では多量に含まれていた。この正常ラットの各臓器内 lysozyme 量を投与前の値として、卵白 lysozyme 10 mg を静注後の血清および各臓器内 lysozyme 量の経時的変動を**表1**、**図3**に示す。血清中の lysozyme は、卵白 lysozyme 静注後2時間まで 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度を呈し、4時間後は 13 $\pm$ 2 $\mu\text{g/ml}$ で投与前値近くまで下降していた。肺臓では、30分後に 548 $\pm$ 73 $\mu\text{g/g}$, 1時間後に 534 $\pm$ 54 $\mu\text{g/g}$ で、投与前値に比べてわずかに上昇を認めたが、2時間後には投与前の値にもどっていた。この30分および1時間後の肺臓 lysozyme 量の増加は、肺血管内血液中の lysozyme による影響と考えられる。腎臓では、lysozyme 静注後次第に上昇し、1時間で 1260 $\pm$ 106 $\mu\text{g/g}$ のピークを示したあと漸減してゆくが、4時間後でも 825 $\pm$ 39 $\mu\text{g/g}$ で投与前値の2倍以上の値を認め

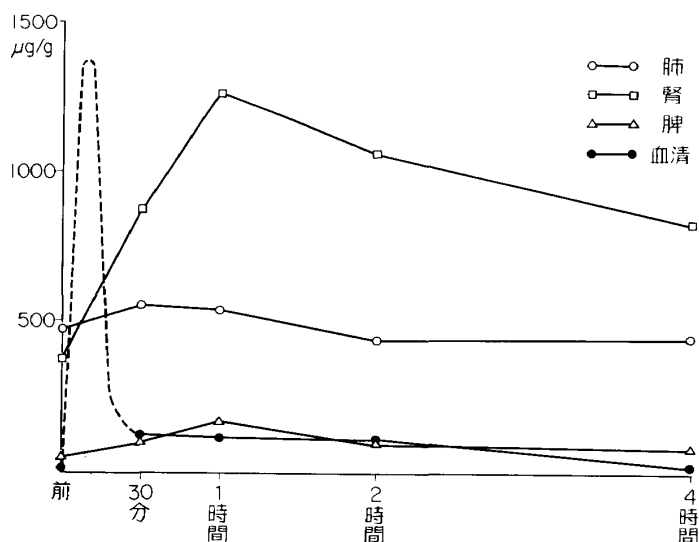


図3 卵白 Lysozyme 10 mg 静注後の臓器内 Lysozyme

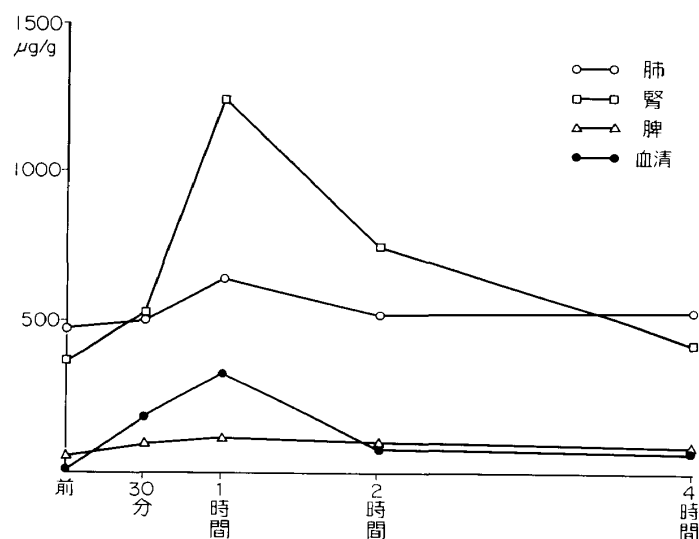


図4 卵白 Lysozyme 10 mg 皮下注後の臓器内 Lysozyme

表2 卵白 Lysozyme 10 mg 皮下注後の臓器内 Lysozyme

	肺 $\mu\text{g/g}$	腎 $\mu\text{g/g}$	脾 $\mu\text{g/g}$	血 清 $\mu\text{g/ml}$
前	470 $\pm$ 16	375 $\pm$ 43	53 $\pm$ 16	4.0 $\pm$ 0.3
30分	499 $\pm$ 54	513 $\pm$ 61	73 $\pm$ 2	213 $\pm$ 26
1時間	675 $\pm$ 22	1238 $\pm$ 31	101 $\pm$ 24	347 $\pm$ 14
2時間	515 $\pm$ 19	755 $\pm$ 33	83 $\pm$ 7	79 $\pm$ 9
4時間	587 $\pm$ 51	450 $\pm$ 34	71 $\pm$ 7	70 $\pm$ 8

た。これは肺臓における lysozyme の増加に比べて非常に多量であるため、投与された卵白 lysozyme は腎臓ですみやかに再吸収され尿細管などに集積されるものと考えられる。脾臓では、1時間後をピークとする lysozyme の増加を認め、最高値は $166\pm 17\ \mu\text{g/g}$ であった。次に、卵白 lysozyme 10 mg の皮下注射による各臓器内の lysozyme 量の経時的変動は、表2および図4で示すように、静注した場合とはほぼ同様の傾向を認めた。ただ、血清中の lysozyme 濃度のピークは、静注の場合と異なり注射後1時間目にみられ、肺臓の lysozyme 量も1時間目に最高値を示していた。この成績からも、肺 lysozyme 量の増加は肺血管内の血液中 lysozyme 増加によるものと考えられる。

2) 卵白 lysozyme 投与後のラット気管支洗浄液中 lysozyme 濃度

正常ラットに前述の方法で気管支洗浄を行ない、得られた洗浄液中の lysozyme および総蛋白量を測定し、卵白 lysozyme 投与前の値とした。ついで卵白 lysozyme 10 mg をラット尾静脈より静注し、経時的に気管支洗浄液中の

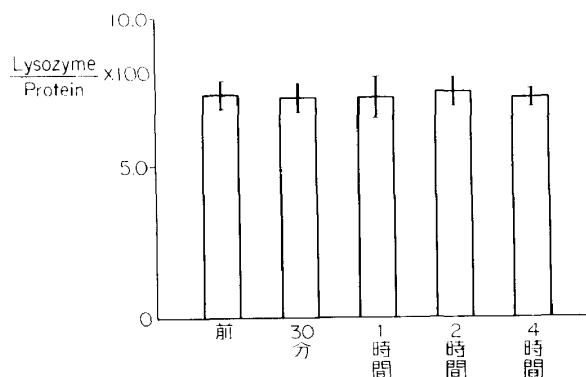


図5 卵白 Lysozyme 10 mg 静注後の気管支洗浄液中 Lysozyme 濃度

表3 卵白 Lysozyme 10 mg 静注後の気管支洗浄液中 Lysozyme 濃度

	Lysozyme $\mu\text{g/ml}$	Protein mg/dl	Lysozyme Protein $\times 100$
前	60.0 $\pm$ 1.8	82.3 $\pm$ 7.0	7.4 $\pm$ 0.5
30分	44.3 $\pm$ 4.3	63.3 $\pm$ 7.0	7.3 $\pm$ 0.5
1時間	51.3 $\pm$ 11.8	75.0 $\pm$ 21.2	7.3 $\pm$ 0.7
2時間	52.3 $\pm$ 4.4	70.0 $\pm$ 3.6	7.5 $\pm$ 0.5
4時間	47.5 $\pm$ 4.1	65.0 $\pm$ 5.4	7.3 $\pm$ 0.3

表4 ^{125}I -Lysozyme 静注後の各臓器への分布

	甲 状 腺	気 管 軟 骨	肺	心 臓	肋 軟 骨	肝	胃	脾	腎	膀 胱
30分	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
1時間	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2時間	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4時間	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

lysozyme と総蛋白量を測定した。この測定成績を表3および図5に示す。正常ラット即ち卵白 lysozyme 投与前の気管支洗浄液中の lysozyme は $60.0\pm 1.8\ \mu\text{g/ml}$ で総蛋白量は $82.3\pm 7.0\ \text{mg/dl}$ であり、lysozyme の総蛋白量に対する百分比は $7.4\pm 0.5\%$ であった。気管支洗浄液は回収される液量が不定で、lysozyme の濃度が一定しないために、lysozyme の総蛋白量に対する百分率を求め、これを指標として注射後の経時的変動を追跡すると、卵白 lysozyme 10 mg 静注後30分では $7.3\pm 0.5\%$ 、1時間では $7.3\pm 0.7\%$ 、2時間では $7.5\pm 0.5\%$ 、4時間では $7.3\pm 0.3\%$ でほとんど変動がなく、有意の増加は認められなかった。即ち、卵白 lysozyme を静注しても、気管支洗浄液中の lysozyme 量の増加は認められなかった。

3) ^{125}I 標識卵白 lysozyme を用いたラット臓器内 lysozyme 分布

オートラジオグラフ (図6) の感光度の程度により、わずかに黒く見えるものを +1 とし、真黒に感光したものを +5 として5段階に分けてスコアを求め各臓器内の分布を見た。生体内での ^{125}I 標識卵白 lysozyme の安定性は、注射後30分までと言われているため、1時間以降の

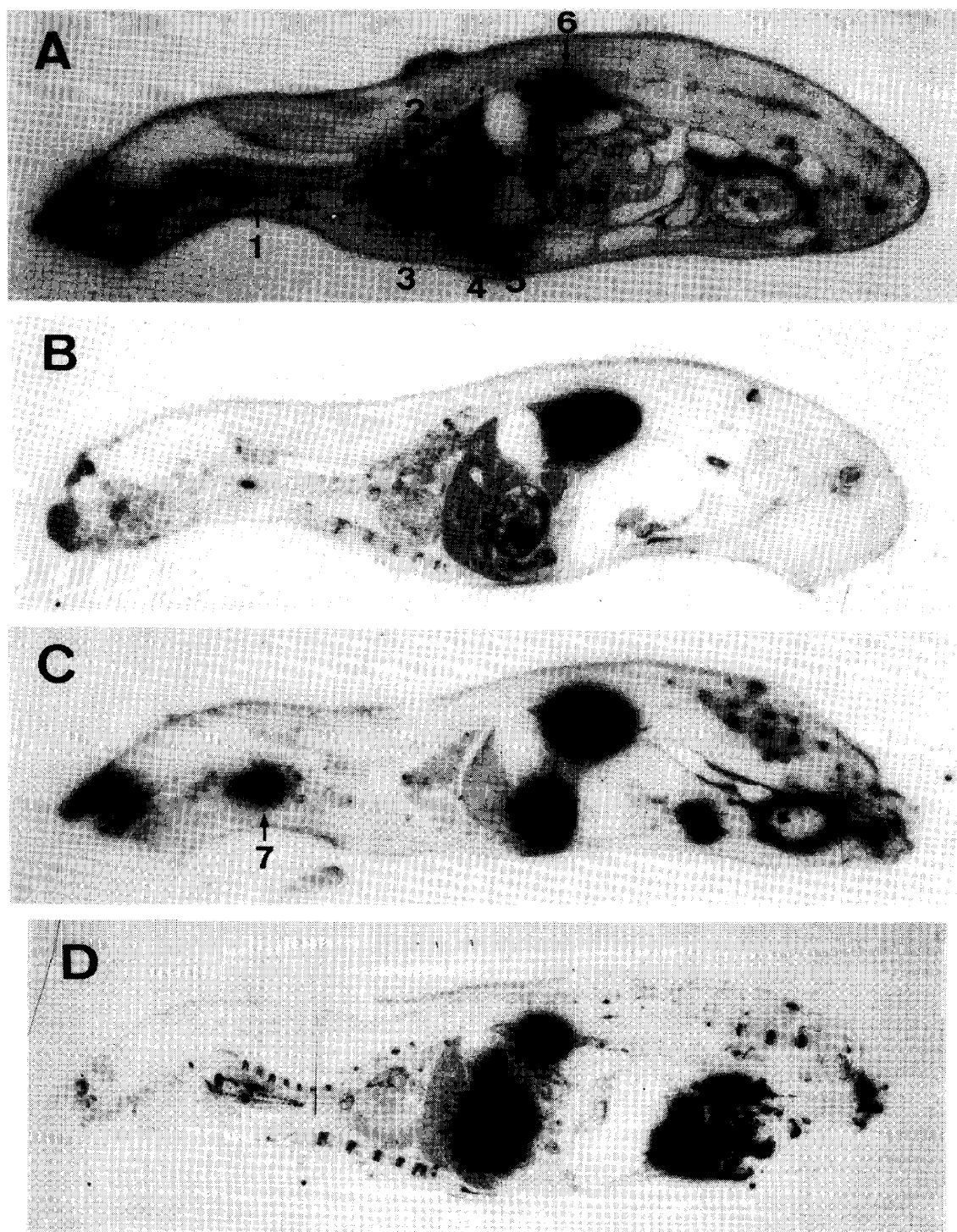


図6 ^{125}I 標識卵白 lysozyme 静注後のオートラジオグラフ

A : 30分後, B : 1時間後, C : 2時間後, D : 4時間後

(1 : 気管, 2 : 肺臓, 3 : 心臓, 4 : 肝臓, 5 : 胃, 6 : 腎臓, 7 : 甲状腺線)

成績は lysozyme よりもヨードの分布を見ている可能性が強いと思われるが, ^{125}I 放射活性については表4に示すような実験成績を得た。即ち, 肺臓では30分後に +4 で最高値を示し, 1時間および2時間後では +3 で, 4時間後には

+2 と漸減していた。気管については, 気管軟骨に集積を認め, 30分後から4時間後に至るまで +4 を示した。気管軟骨以外にも肋軟骨に +4 の集積を認め, その他の軟骨部にも強い集積がみられた。腎臓では30分後から +5 の集積を示

表5 Distribution of ^{125}I -lysozyme in organs of rats
(cpm/mg wet weight of organs)

	30 min	2 hrs	4 hrs
1. Liver	239.7 $\pm$ 10.6	121.9 $\pm$ 9.4	113.9 $\pm$ 2.0
2. Kidney	4991.0 $\pm$ 566	4317 $\pm$ 89	3107.0 $\pm$ 278.5
3. Spleen	237.7 $\pm$ 42.3	128.0 $\pm$ 2.1	106.3 $\pm$ 3.3
4. Small Intestine	90.1 $\pm$ 5.6	70.2 $\pm$ 6.4	78.1 $\pm$ 14.5
5. Cecum	132.2 $\pm$ 24.7	94.2 $\pm$ 3.5	86.4 $\pm$ 32.7
6. Large Intestine	124.9 $\pm$ 2.3	86.4 $\pm$ 9.0	58.3 $\pm$ 3.3
7. Lung	422.2 $\pm$ 29.4	263.3 $\pm$ 14.7	262.8 $\pm$ 14.8
8. Bronchus	420.3 $\pm$ 160.8	(2559, 309, 240)	(1358, 271, 538)
9. Heart	65.7 $\pm$ 5.5	40.4 $\pm$ 2.0	28.6 $\pm$ 0.7
10. Brain	5.0 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.0
11. Ovary	139.5 $\pm$ 14.7	120.5 $\pm$ 14.0	135.1 $\pm$ 9.3
12. Thyroid	423.3 $\pm$ 66.5	2132 $\pm$ 159	2593.2 $\pm$ 351.5
13. Fat	14.6 $\pm$ 2.9	11.3 $\pm$ 0.3	11.0 $\pm$ 0.2
14. Uterus	145.1 $\pm$ 18.0	150.9 $\pm$ 8.0	121.6 $\pm$ 3.0
15. Blood (0.1 ml)	11359 $\pm$ 861	8853 $\pm$ 395	7318 $\pm$ 401

Dose: 2 μCi (4.06×10^6 cpm)

Intravenous Injection

Wistar female, body weight 180 g

(average specific activity=22.5 cpm/mg body weight)

し、その後も4時間後まで継続して+5の集積が認められた。また、膀胱内にも30分後より+5の集積が認められ、 ^{125}I 標識卵白 lysozyme 由来の放射活性物質が腎臓からすみやかにかつ多量に排泄されることが示された。胃では30分後に+3、1時間後および2時間後に+4、4時間後に+5の集積を認め、さらに胃の内容物も+5であったため、胃腺より ^{125}I 標識卵白 lysozyme が多量に分泌される可能性が考えられた。甲状腺では、1時間後から4時間後まで+5の集積がみられた。肝臓および脾臓にも30分後既に著明な集積があり、 ^{125}I 標識卵白 lysozyme 由来の放射活性物質は図6に示したように全身の組織および臓器から検出された。

次に ^{125}I 標識卵白 lysozyme 2 μCi をラット大腿静脈より静注した後、各臓器の放射線量をガンマシンチレーションカウンターで測定した。

表5に示す如く、肺臓では30分後に422.2 $\pm$ 29.4 cpm/mg、2時間後に263.3 $\pm$ 14.7 cpm/mg、4時間後に262.8 $\pm$ 14.8 cpm/mgを示し、30分後に最高値を認めたあと漸減した。また、血液中では30分、1時間、2時間後にそれぞれ11359

$\pm$ 861 cpm/0.1 ml、8853 $\pm$ 395 cpm/0.1 ml、7318 $\pm$ 401 cpm/0.1 mlを計測しており、この様な血液の経時的变化は肺臓における変化に類似していた。気管では、2時間後の計測で3匹のうち一匹に2559 cpm/mgを認めたが、これは気管の上部に甲状腺の一部が付着していたためと思われる。4時間後でも1匹に1358 cpm/mgを認めたが、同様に解釈して除外すると、30分後、2時間後、4時間後の値は、それぞれ420.3 $\pm$ 160.8 cpm/mg、274.5 cpm/mg、404.5 cpm/mgであり、オートラジオグラフで見られた様に気管軟骨への取込みがあったためと思われた。腎臓、甲状腺については、オートラジオグラフと同じく高値を示していた。心臓、脳、脂肪組織では低い値であり、腸管、卵巣、子宮でも比較的低値であった。

4) ラット気管支刺激後の気管支洗浄液中 lysozyme 濃度

タバコ煙による気管支刺激後の、経時的な気管支洗浄液中の lysozyme 量、総蛋白量および lysozyme の総蛋白量に対する百分比を表6と図7に示した。既に述べたように、経時的な比

表6 タバコ煙刺激による気管支洗浄液中
Lysozyme 濃度

	Lysozyme $\mu\text{g/ml}$	Protein mg/dl	$\frac{\text{Lysozyme}}{\text{Protein}} \times 100$
前	60.0 ± 1.8	82.3 ± 7.0	7.4 ± 0.5
5分	59.4 ± 12.3	64.6 ± 11.0	9.0 ± 0.7 ($P < 0.1$)
15分	89.6 ± 8.6	77.5 ± 7.0	11.6 ± 0.5 ($P < 0.001$)
1時間	69.2 ± 8.5	80.7 ± 12.7	8.9 ± 0.6 ($P < 0.1$)
2時間	53.9 ± 3.8	67.4 ± 2.9	8.0 ± 0.4

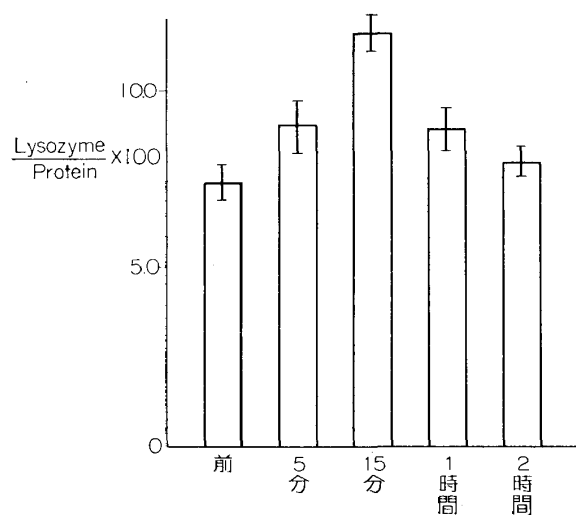


図7 タバコ煙刺激による気管支洗浄液中 Lysozyme 濃度

較には lysozyme の総蛋白量に対する百分比を用いたが、この百分比でみると刺激前 $7.4 \pm 0.5\%$ 、刺激5分後 $9.0 \pm 0.7\%$ ($p < 0.1$)、刺激15分後 $11.6 \pm 0.5\%$ ($p < 0.001$)と次第に増加し、以後は刺激1時間後 $8.9 \pm 0.6\%$ ($P < 0.1$)、刺激2時間後 $8.0 \pm 0.4\%$ と漸減してほぼ刺激前の値にもどっている。従って、タバコ煙によるラット気管支の刺激により、早期に気管支洗浄液中の lysozyme は増量し、15分後にピークに達したあとは刺激を継続しても次第に減少して、2時間後には刺激前値まで低下してゆくものと考えられる。lysozyme 量だけを見ても、刺激前の $60.0 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$ に対して刺激15分後では $89.6 \pm 8.6 \mu\text{g/ml}$ と増加していた。

気管支腺の分泌を促進させる薬剤である Bromhexine 1.0 mg をラット頸部に皮下注射

表7 Bromhexine 1.0 mg 皮下注射による気
管支洗浄液中 Lysozyme 濃度

	Lysozyme $\mu\text{g/ml}$	Protein mg/dl	$\frac{\text{Lysozyme}}{\text{Protein}} \times 100$
前	60.0 ± 1.8	82.3 ± 7.0	7.4 ± 0.5
30分	64.0 ± 3.0	82.8 ± 5.5	7.8 ± 0.3
1時間	70.5 ± 2.6	66.7 ± 3.6	10.8 ± 0.7 ($P < 0.005$)
2時間	98.3 ± 7.0	82.7 ± 9.1	12.3 ± 0.7 ($P < 0.001$)
3時間	74.0 ± 6.5	76.0 ± 6.1	9.8 ± 0.5 ($P < 0.005$)

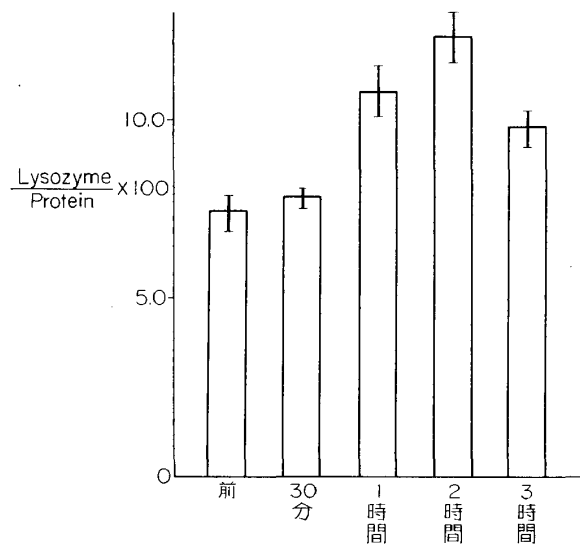


図8 Bromhexine 1.0 mg 皮下注射による気管支洗浄液中 Lysozyme 濃度

したあと、経時的に屠殺して測定した気管支洗浄液中の lysozyme, 総蛋白量, 百分比を表7および図8に示す。百分比で比較すると、Bromhexine 注射30分後が $7.8 \pm 0.3\%$ 、1時間後が $10.8 \pm 0.7\%$ ($P < 0.005$)、2時間後が $12.3 \pm 0.7\%$ ($p < 0.001$)、3時間後が $9.8 \pm 0.5\%$ ($P < 0.005$)であり、2時間後をピークとする凸形の変化を認めた。これは、タバコ煙による刺激に比べてピークに達する迄の時間が遅れてはいるものの、lysozyme 濃度の増減に関してはほぼ同様の傾向を示していた。対照として、生理的食塩水 0.5 ml をラット頸部に皮下注射し、2時間後に屠殺して気管支洗浄液中 lysozyme の総蛋白量に対する百分比を求めた結果、 $7.4 \pm 0.1\%$ で、卵白 lysozyme を投与していない正常ラットの気管支洗浄液中 lysozyme 濃度と変りがな

く、従って注射の刺激のみによって lysozyme は増加しないことが確かめられた。

考 案

lysozyme は1922年に Flemming¹¹⁾ によって発見された一種の溶菌酵素で、気管支分泌液、涙液、唾液などに高濃度で含まれており、局所の感染防御における重要な因子の一つと考えられている^{1,2)}。lysozyme は、単独では細菌細胞壁の構成成分であるムコ多糖体の加水分解により溶菌現象を引起し^{11,12)}、また、免疫グロブリン (IgA)、補体が加わればさらに一層強力な作用を発揮すると言われている^{13~16)}。著者はすでに健康人の気管支洗浄液中には IgA とともに多量の lysozyme が含まれていることを報告したが¹⁾、慢性気管支感染症患者では lysozyme 量が正常人に比較して著明に低値であるという事実を見出しており、気管支分泌液中の lysozyme が気道における感染防御に重要な役割を持つものと考えている。気管支分泌液中の lysozyme は、従来、主として肺胞 Macrophage や白血球に由来するものと考えられてきた^{3,4)}。しかし、寺井ら⁵⁾ は、喀痰上清中の IgA と lysozyme 濃度が密接な正の相関をもって変動していることより、喀痰中の lysozyme は乳汁や唾液中のものと同様に、分泌腺由来のものも少なくないと推定している。また、伊藤ら⁷⁾ は蛍光抗体法で観察したヒト気管支腺の漿液腺細胞内に lysozyme の局在を認めたと報告している。前述したように、lysozyme は気道の感染防御に重要な因子であるから、もし気管支分泌液中の lysozyme を増加させることが出来れば、呼吸器の感染をふせぐ上で非常に有効であろうと思われる。そこで著者は卵白 lysozyme を生体に投与した時の肺臓、気管支およびその他臓器への lysozyme 分布について調べるため、ラットを用いて実験した。まず、正常ラットの lysozyme 分布についての実験成績では、肺臓、腎臓に極めて多量の lysozyme が存在し、特に肺臓ではその濃度が他臓器に比較して最も高い値を示した。これは Lippman ら¹⁷⁾ および Kloc-

kars らは、肺臓より腎臓の方がわずかに lysozyme 量が多いと述べているが、ラットにおいて肺臓、腎臓ともに他の臓器よりはるかに lysozyme が高濃度に分布していることは著者の成績と同様である。肺組織に lysozyme が多い理由は、それが主として肺胞 Macrophage に由来するためと考えられ、腎組織に多い理由としては血清中の lysozyme が腎臓の糸球体でろ過され、近位尿細管で再吸収されて蓄積されるためと考えられている^{4,18,19)}。

卵白 lysozyme を静注或は皮下注射することにより得られた成績を対照と比較したところ、血液中の lysozyme が増加しても肺臓ではほとんど増加せず、気管支洗浄液中の lysozyme 量にも変化を認めなかった。これは、異種動物の lysozyme を投与して血液中の濃度を高めても、肺臓、気管支への分泌はほとんどおこらないことを示す成績であった。

腎臓では著るしい lysozyme の増加が認められたが、この現象については1963年に Perri²⁰⁾ が報告して以来いくつかの報告があり^{21~23)}、血中に増加した lysozyme は比較的早期に腎臓の近位尿細管細胞へ取込まれ、また、尿中に排泄されることにより、血液中の lysozyme 濃度をコントロールしていると考えられている。¹²⁵I 標識卵白 lysozyme を使用したオートラジオグラフおよびガンマシンチレーションカウンタによる計測についても、肺臓への集積は認められず、腎臓へのすみやかな大量集積がみられ、各臓器別に生物学的方法で測定した lysozyme の分布と同様の成績であったが、その他に、気管軟骨を含めた軟骨部および胃への集積が認められた。軟骨部への lysozyme 集積は、Yuzuriha²⁴⁾ らもラットを用いて証明しているが、軟骨には lysozyme が多量に含まれ、化骨形成をコントロールすると言われているため¹⁹⁾、特別な親和性を持っていることも推測される。

Ullberg ら²⁵⁾ は、ラットに ¹²⁵I または ¹³¹I を単独で静注したあと胃粘膜および胃内容物に強いアイソトープ活性を認めていることから、

著者の実験で ^{125}I 標識卵白 lysozyme 投与後に胃粘膜で高いカウント数が測定された理由としては、胃腺を介して lysozyme から遊離したヨードが分泌されたものであらうと思われる。

以上の実験成績より、異種動物の lysozyme 投与によって気道内の lysozyme 濃度が増加しないことが明らかとなったため、本来生体が有する lysozyme の産生或は分泌を高める方法について研究を行なった。即ち、タバコ煙吸入によりラットの気管支を刺激すると、すでに5分後に気管支洗浄液中の lysozyme 濃度が上昇して15分後にピークに到達し、2時間後にはほぼ刺激前値まで低下した。また、Bromhexine を投与して気管支分泌を促進させた場合にも、気管支洗浄液中の lysozyme は次第に増加し、2時間後をピークとして漸減するカーブを描いた。Bromhexine は気管支混合腺のうち、漿液腺の分泌を高める²⁶⁾といわれている薬剤であり、千葉⁶⁾および伊藤ら⁷⁾は漿液腺に lysozyme の存在を認めていることから、Bromhexine 投与による気管支洗浄液中の lysozyme 増加は気管支腺由来のものと考えられる。しかし、タバコ煙の刺激についてはその機作に不明な点が多く、気管支洗浄液中の lysozyme が増加した理由が単なる物理的刺激によるものか、その他の理由によるものかは不明である。ただ両者について、lysozyme 量がピークに達する迄の時間的相違を除けば、Bromhexine 投与と喫煙が同様の傾向を示したため、喫煙によって結果的には Bromhexine 投与の場合と同様に気管支腺分泌促進が起り、気管支洗浄液中の lysozyme が増加したものと考えられる。また、刺激を継続することによって、次第に気管支洗浄液中 lysozyme 濃度が減少してくるという成績は、漿液腺中の lysozyme の枯渇によるものと思われる。この考え方を支持する報告として、原田ら²⁷⁾はイヌに Bromhexine を静注したあと、走査型電子顕微鏡で気管粘膜および粘膜下の気管支腺の分泌活動について研究し、注射15分で分泌準備状態となり、30分で分泌増加がみられ、1時間後には粘膜下漿液腺の分泌が完了して腺腔内の漿液が放出され空になったという報

告をしているが、この成績はラットにおける著者の成績とよく一致している。なお、ラット気管支には気管支腺が比較的少ないので、ヒト気管支の様に気管支腺の多い場合には一層顕著な反応があるものと考えられる。但し、これは正常の気管支に急性刺激を加えた場合にみられる現象と思われ、慢性気管支炎等の様に気道の炎症が慢性化した生体の場合には気管支腺が破壊されているため、気管支分泌液中の lysozyme は減少し、それがまた感染を容易にするという悪循環をひきおこすものと考えられる¹⁾。

以上、ラット肺臓には高濃度の lysozyme が含まれているが、卵白 lysozyme を投与しても肺臓、気管支内の lysozyme は増加しないこと、喫煙或は Bromhexine 投与によって気管支腺の分泌を高めることにより、気管支洗浄液中の lysozyme が一時的に増加することを実験的に証明した。この成績から、気道感染時には、炎症によって一過性に気管支腺分泌が促進され、分泌液中 lysozyme 濃度が増加することにより、局所感染防御の役割を果たすものと考えられ、lysozyme が気道における感染防御機構の一端をになっていることを明らかにした。

結 語

1) 正常ラットの各臓器における lysozyme 分布は、血清 $4.0 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ 、肺臓 $470 \pm 16 \mu\text{g/g}$ 、腎臓 $375 \pm 43 \mu\text{g/g}$ 、脾臓 $53 \pm 16 \mu\text{g/g}$ で、肺臓および腎臓に多量に含まれていた。

2) ラットに卵白 lysozyme 10 mg を静注すると、血清、腎臓では lysozyme 濃度が上昇するが、気管支、肺臓では上昇せず、気管支洗浄液中にも lysozyme の増加を認めなかった。

3) ^{125}I 標識卵白 lysozyme をラット大腿静脈より静注後、各臓器のアイソトープ活性を測定したが、卵白 lysozyme 静注の場合とほぼ同様の成績を示した。また、軟骨部、胃粘膜に強い放射能活性の集積を認めた。

4) ラットにタバコ煙を吸入させて気管支刺激を加えたあと、経時的に気管支洗浄液中 lysozyme 濃度を測定し、15分後をピークとする

増加を認めた。(P<0.001)

5) ラットに気管支腺分泌を促進させる薬剤である Bromhexine 1.0 mg を皮下注射して、経時的に気管支洗浄液中の lysozyme 濃度を測定し、2 時間後をピークとする増加を認めた。(P<0.001)

6) 従って、異種の lysozyme を投与して血液中の lysozyme を増加させても、肺、気管支内の lysozyme は増加しないが、気管支腺分泌を亢進させることにより気管支分泌液中の lysozyme 濃度が上昇することから、気道内の lysozyme は独立した存在で、血液中の lysozyme 濃度が増加しても直ちに気道内の lysozyme が増加するのではないことを、ラットを用いて実験的に証明した。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました大島駿作教授に篤く御礼申し上げます。また、研究面で終始御指導を頂いた高橋権也博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) 門 政男：呼吸器における局所免疫（気管支洗浄液中の免疫グロブリンおよび lysozyme について），日本胸部臨床，35：893，1976.
- 2) Bürgi, H.: Endogenic defense against infectious disease in chronic bronchitis, *Respiration*, 28: 480, 1971.
- 3) Myrvik, Q. N., Leake, E. S., Fariss, B.: Lysozyme content of alveolar and peritoneal macrophages from the rabbit, *J. Immunol.*, 86: 133, 1961.
- 4) Hansen, N. E., Karle, H. and Andersen, V.: Lysozyme turnover in the rat, *J. Clin. Invest.*, 50: 1473, 1971.
- 5) 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.
- 6) 千葉博史：肺・気管支組織における免疫グロブリンの分布と局在に関する研究，日本胸部疾患学会雑誌，14：250，1976.
- 7) 伊藤元彦，長瀬千秋，光岡明夫，永田明義，原田孝之，森川茂：気管支腺の機能と構造に関する研究(Ⅰ)—感染防禦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.
- 8) Klockars, M.: Concentration and immunohistochemical localization of lysozyme in germ-free and conventionally reared rats, *Acta path. microbiol. scand. Sect. A*, 82: 675, 1974.
- 9) 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.
- 10) Lowry, O. H., et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- 11) Flemming, A.: On a remarkable bacterial element found in tissue and secretions, *Proc. Roy. Soc., London*, 93B: 306, 1922.
- 12) Myrvik, Q. N., Weiser, R. S. and Kelly, M. C.: Studies on the mode of action of lysozyme on mycobacteria, *Amer. Rev. Tuberc.* 68: 564, 1952.
- 13) Amano, T., et al.: Studies on the immune bacteriolysis, *Med. J. Osaka Univ.*, 4: 401, 1954.
- 14) Glynn, A. A., et al.: Lysozyme and immune bacteriolysis, *Nature*, 207: 1309; 1965.
- 15) Adinolfi, M., et al.: Serological properties of γ A antibodies to *Escherichia coli* present in human colostrum, *Immunology*, 10: 517, 1966.
- 16) Hill, I. R., et al.: Studies of bactericidal activity to *Escherichia coli* of porcine serum and colostrum immunoglobulins and the role of lysozyme with secretory IgA, *Immunology*, 26: 1239, 1974.
- 17) Lippman, M. E. and Finch, S. C.: A quantitative study of muramidase distribution in normal and nitrogen mustard-treated rats, *Yale J. Biol. Med.*, 45: 463, 1972.
- 18) Klockars, M. and Osserman, E. F.: Localization of lysozyme in normal rat tissues by an immunoperoxidase method, *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 139, 1974.
- 19) Keuttner, K. E., Eisenstein, E. and Sorgente, N.: Lysozyme of cartilage and other connective tissues. In *Lysozyme*, Ed. by Osserman, E. F., Canfield, R. E. and Beychok, S., Academic Press, New York and London, 1974, pp. 399.
- 20) Perri, G. C., et al.: Variations of the content of lysozyme in normal rats and in rats bearing Jensen sarcoma following surgery, *Cancer Research*, 23: 431, 1963.

- 21) Perri, G. C., et al.: Role of the kidney in accumulation of egg white muramidase in experimental animals, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 115: 189, 1964.
- 22) Maack, T.: Changes in the activity of acid hydrolases during renal reabsorption of lysozyme, *J. Cell Biol.* 35: 268, 1967.
- 23) Miller, T. E., Camerou, C. M. and North, J. D. K.: Distribution of lysozyme in the rat kidney and the role of this enzyme in experimental pyelonephritis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 128: 749, 1968.
- 24) Yuzuriha, T. et al.: Autoradiographic study on the distribution of ^{125}I -labeled lysozyme after intravenous injection in rats, *Chem. Pharm. Bull.*, 25: 836, 1977.
- 25) Ullberg, S. and Ewaldsson, B.: Distribution of radio-iodine studied by whole-body autoradiography, *Acta Radiologica*, 2: 24, 1964.
- 26) Giesecking, R., Baldamus, U.: Elektronenmikroskopische Befunde an der menschlichen Bronchialschleimhaut nach Behandlung mit Bisolvon, *Brit. Klin. Tuberk.*, 137; 1, 1968.
- 27) 原田康夫, 杉本嘉朗, 佐々木尚: 気管分泌機能に及ぼす Bisolvon 注射の効果 (走査電子顕微鏡的研究), *耳鼻臨床*, 69: 553, 1976.
- 28) 伊東信行: 実験動物組織図譜, 中外医学社, 東京, 1975, pp. 108.

STUDIES ON THE DEFENSE MECHANISMS IN THE RESPIRATORY SYSTEM

Report II. Studies on lysozyme as a defense factor against infection

Masao KADO

The Second Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University

It is well known that lysozyme is an anti-bacterial substance which has bacteriolysis activity.

The distribution of this enzyme was studied in normal rats and rats injected with egg-white lysozyme. The quantitative analysis of lysozyme was carried out by a biological method using *Saltina lutea* and radioisotopic methods using ^{125}I -lysozyme. The results were as follows:

1) The average lysozyme concentrations determined by the above biological method, in serum, lungs, kidneys and spleens of normal rats were $4.0 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$, $470 \pm 16 \mu\text{g/g}$, $375 \pm 43 \mu\text{g/g}$ and $53 \pm 16 \mu\text{g/g}$ respectively.

2) The lysozyme concentration increased remarkably in the kidneys of the rats after one injection (i.v. or i.m.) of 10 mg of egg-white lysozyme. However, the increased concentration was not seen in lungs or in bronchial washings.

3) The results obtained by both autoradiographies and scintillation countings of organs after the intravenous injection of ^{125}I -lysozyme were similar to the results obtained by the biological method.

4) The lysozyme concentration in the bronchial washings of rats showed significant increase after inhalation of cigarette smoke. The maximum value was seen 15 minutes after inhalation and decreased again into the normal range within 2 hours.

5) The increased amount of lysozyme in the bronchial washings was seen after the subcuta-

neous injection of 10 mg of Bromhexine. The maximum value was obtained 2 hours after the injection.

These results suggest that the concentration of lysozyme in the respiratory system increased temporarily after such stimulation as cigarette smoke inhalation or Bromhexine injection. However, these results also suggest that the supply of lysozyme is limited within the respiratory system and it seems to be independent from the lysozyme concentration in the serum.