

原 著

じん肺患者における膿性痰中の好中球エラスターゼ測定についての検討

植木 進一¹⁾, 河村 義雄²⁾, 猪又 崇志³⁾, 岡本 佳裕³⁾
五十嵐 毅³⁾, 木村 清延³⁾, 大塚 義紀³⁾

¹⁾独立行政法人労働者健康安全機構北海道中央労災病院中央検査部

²⁾独立行政法人労働者健康安全機構青森労災病院中央検査部

³⁾独立行政法人労働者健康安全機構北海道中央労災病院内科

(2021年2月21日受付)

要旨：じん肺の合併症の一つである続発性気管支炎の診断には、膿性痰の性状、起床後1時間痰量の記載が必要であり、それらを評価するための客観的な指標が求められる。好中球エラスターゼ（以下NE）にて膿性痰を定量的に測定可能か、またNEにてMiller&Jones分類による粘液痰と膿性痰の鑑別が可能かどうかを検討した。

【対象と方法】対象は、書面で同意の得られたじん肺男性患者291名。平均年齢79.7歳。方法は、喀痰のMiller&Jones分類を行った後、喀痰250 μ L~4mLを試験管に分注し、N-アセチル-L-システイン50mgを添加し4 $^{\circ}$ Cで一晩放置。分注した残りの喀痰は細胞診に回した。セルパックIIにて喀痰を5~500倍希釈して測定試料とした。計算盤ならびに自動分析装置で好中球数とNEを測定し、Miller&Jones分類や好中球数との相関を検討した。

【結果】好中球数を目視算定値と自動血球分析装置での測定値と比較してみたところ、相関係数 $r=0.988$ と良好な相関を示した。自動計測の好中球数とNEとの検討では、概ね良好な相関($r=0.492$)を示したが、調整以前の検体による細胞診で好中球数が2+から3+の一部の症例でNE値と好中球数との乖離がみられた。N-アセチル-L-システイン添加した検体で、好中球による凝固塊がみられたためと判明した。NE値は影響を受けなかった。そこでMiller&Jones分類による粘液痰、膿性痰に分類した両者をNE値と比較した。粘液痰、膿性痰の平均値はそれぞれ1,106ng/ml, 15,092ng/mlで有意差がみられた($p<0.05$)。ROC曲線による解析では、cut off値を1,625ng/mlとすると感度0.731、特異度0.803で膿性痰と粘液痰の両者を鑑別可能と考えられた。

【結論】NE値は膿性痰と粘液痰を鑑別する客観的指標となり得る可能性がある。

(日職災医誌, 69:231-237, 2021)

—キーワード—

続発性気管支炎, じん肺, Miller&Jones分類

1 はじめに

以前からじん肺症における合併症の一つである続発性気管支炎の労災認定については問題点が指摘されてきた。認定基準の重要な指標となる膿性痰の量および性状について診査をする側が申請内容の適否を客観的に判断することが困難であることが原因である。申請の際には、痰量については早朝1時間量を、痰の性状については膿性痰の割合をみるMiller&Jones分類を目視で行う。膿性痰の含まれないものをM1・M2、痰全体に占める膿性痰割合が3分の1以下のものをP1、3分の1から3分の2を占める膿性痰をP2、ほぼ全体が膿性部分で占められ

る痰をP3と分類し申請書にそれを記載する¹⁾。Miller&Jones分類は性状については目視による定性検査であり、さらに裏付ける資料添付の必要がないため客観性が乏しく、診査側ではそのままの記載を判断基準に合わせて判定するしかないという問題点があった。

現在に至るまで、現行の膿性痰の申請および判定が適性に行われていないことの問題点がいくつかの報告で提起されている。続発性気管支炎として申請された29例の鑑別診断を行った報告では、診断基準に相当する例は29例中7例(24%)にとどまっていた²⁾。また、診断基準を適正に運用した労災病院群における続発性気管支炎のじん肺合併症全体に対する割合6.7%に比較し実際に確定

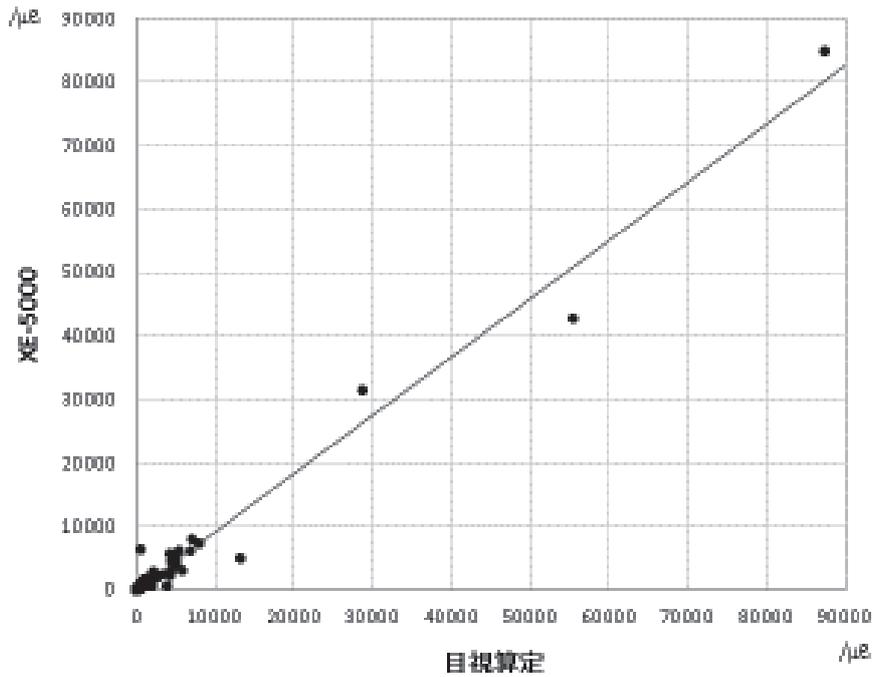


図1 好中球の目視算定による測定値と自動分析機による測定値との相関初期170名の略痰にて行った解析を示す。r=0.9881と良好な相関関係を示す。

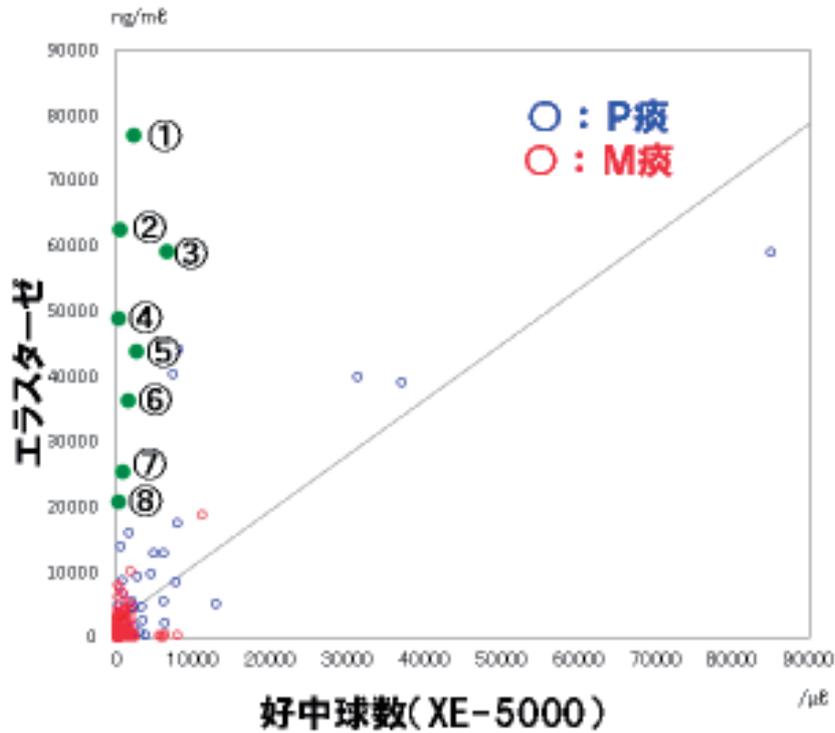


図2 好中球数と好中球エラスターゼ値の相関 n=291の検体で解析した好中球数とエラスターゼの相関を示す。数字で示したケースが、好中球が少ないのにエラスターゼが高値を示す群。細胞診の結果を青のP痰、赤のM痰で示す。数字で示したケースは、すべてMiiller & Jones分類でP痰であった。

されている本邦全体での続発性気管支炎の割合が76.1%と乖離することが報告されている³⁾。これらのことから膿性痰の判定には客観性、定量性が求められていることが

わかる。

好中球エラスターゼ (NE) は29-kDのセリンプロテアーゼであり、マクロファージによるマトリックスメタ

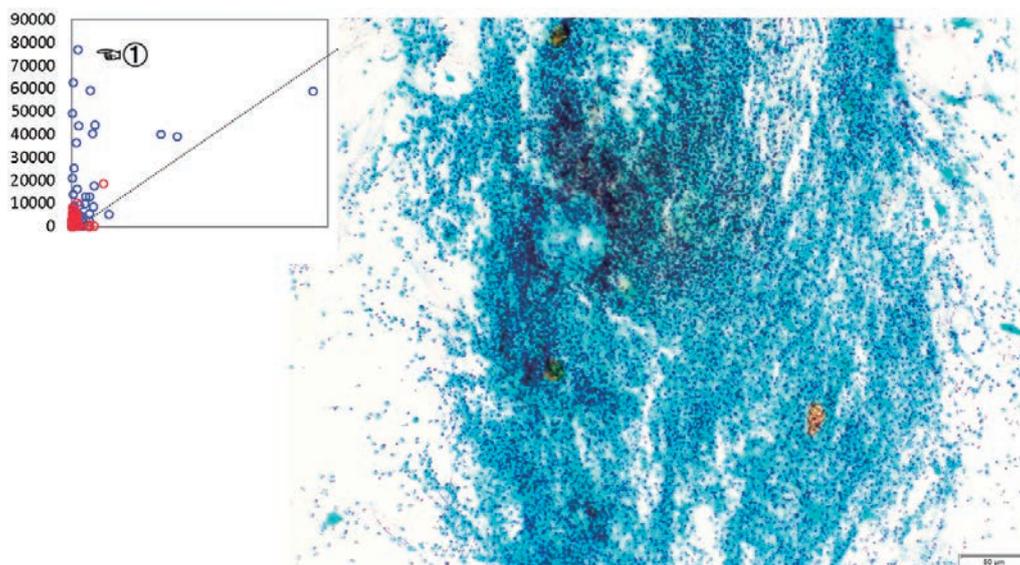


図3 乖離検体の細胞診所見

図2 ケース1では、好中球数がほとんど無いように図示されているが、同時に提出した細胞診では好中球が多数見られた。

表1 好中球数と好中球エラスターゼ値が乖離した細胞診所見

検体 No.	M & J 判定	好中球エラスターゼ (ng/ml)	好中球数 (/μl)	細胞診所見
①	P1	77,000	2,250	好中球 (3+) による炎症背景に類上皮細胞, 多核組織球を認める
②	P3	62,500	440	好中球 (3+), マクロファージ (+) を認める
③	P3	59,300	6,400	多数の好中球 (3+) からなる炎症像です
④	P1	49,050	230	好中球 (3+), マクロファージ (±) を認める
⑤	P1	43,900	2,510	好中球 (3+), マクロファージ (3+) を認める
⑥	P1	36,450	1,560	好中球 (2+), マクロファージ (±) からなる炎症像
⑦	P2	25,500	760	好中球 (2+), マクロファージ (±) を認める
⑧	P1	20,900	230	好中球 (2+), マクロファージ (+) からなる炎症像

検体 No : 図2 中のケース番号を示す

M & J 判定 : Miller & Jones 分類による判定

ロプロテアーゼと異なる⁴⁾。NE は好中球アズール顆粒に貯留され、細胞死や好中球細胞外トラップ形成時に放出される⁵⁾。気管支拡張症を含む好中球性肺疾患患者の痰中に高濃度で見いだされるとされ、さらに細菌感染量と好中球、さらにNEが関連することが報告されている⁶⁾。そのため、NEが膿性痰の客観的指標として使用できる可能性を考えNEを選択した。じん肺法で続発性気管支炎の判定基準としている膿性痰は、細菌による炎症を想定している。この場合には痰に多数の好中球が含まれるため、好中球数以外にNEの定量にて炎症の程度を測定することが可能と思われる。すでに臨床でも絨毛膜羊膜炎の診断に羊水中のエラスターゼキットによる定量測定が使用されている。そこで今回我々は、NEのキットを用いて喀痰中のNEが測定可能かどうか、さらに膿性痰の客観的な評価指標となり得るかどうかの検討を行った。

II 対象および方法

1. 対象

2018年12月から2021年10月まで北海道中央労災病院じん肺外来通院中のじん肺患者291名で書面による同意を得た患者を対象とした。性別はすべて男性で、平均年齢は79.7歳(54~94歳)であった。この研究は、労働者健康安全機構倫理委員会の承認(平成30年受付番号8)を得ている。

2. 方法

1) 測定試料作製

シャーレで提出された喀痰を250μL~4mL試験管に分注し、残った喀痰は細胞診検査部門にてMiller&Jones分類および細胞診検査を行った。試験管に分注した喀痰に粘液溶解作用のあるN-アセチル-L-システイン(和光純薬工業株式会社)を約50mg添加し、混和後喀痰を十分溶解させるため、4℃で一晩放置した。翌日再度試験管を

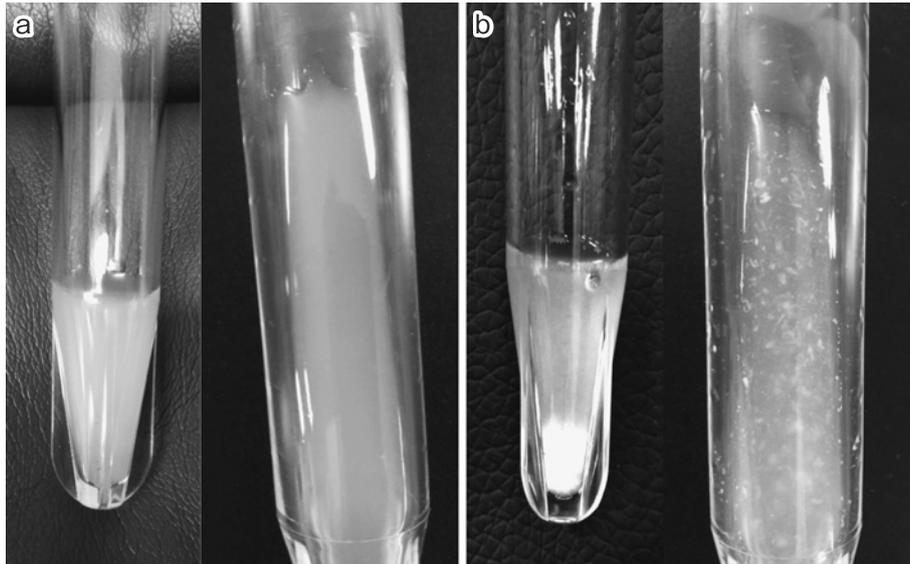


図4 N-アセチル-L-システイン添加一晚放置後、均質化された検体(a)と均質化不良の検体(b)多くの検体では、図aに示すように均質化が良好で、凝結した塊が存在しない。膿性痰の一部では、N-アセチル-L-システインを添加してincubationしても沈殿物が生じ、均質化不良な検体が存在し、特に膿性痰が多かった。この現象がおきてもエラスターゼ値は高値を示し膿性痰であることを反映していた。

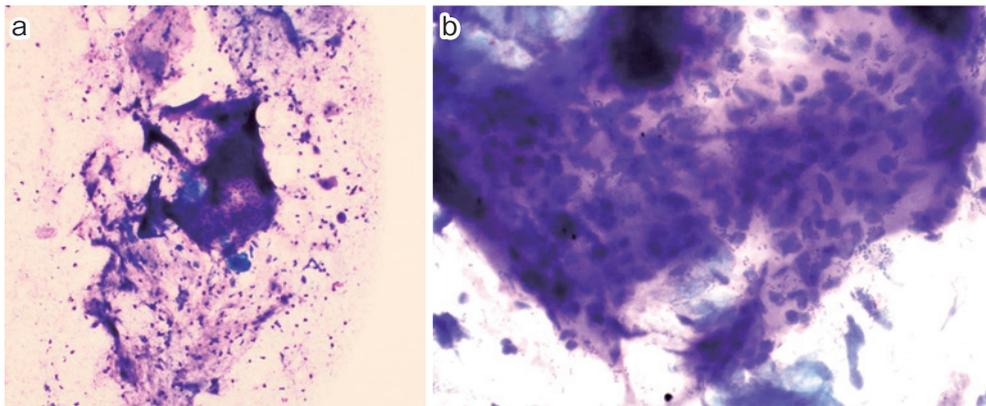


図5 喀痰にN-アセチル-L-システイン添加後のGiemza染色標本
膿性痰の一部は、N-アセチル-L-システインを添加して-4℃下一晩放置後集塊がみられ、染色すると好中球が多く見られた。
a. ×100 中央に濃染部分を認め、周囲に点状に好中球をみる。
b. ×400 a.の中央にある濃染部分の拡大。塊状に好中球が多数含まれている。

よく混和後、セルパックII(シスメックス株式会社)にて喀痰を5~500倍希釈して測定試料とした。

2) 好中球数・エラスターゼ測定

好中球数測定は多項目自動血球分析装置XE-5000(シスメックス株式会社)の体液モードで測定し、同時にノイバウエル改良型計算板(C-Chipノイバウエル改良型ディスプレイ血球計算板(エア・ブラウン株式会社))を用い顕微鏡にて目視算定した。また、細胞診における好中球数については、半定量の-を0、±を1、+を2、++を3としてP痰、M痰の両群で比較した。エラスターゼ測定は、試料を3,000rpm、5分間遠心分離した上

清を試薬として「イノテック・エラスターゼ」(三和化学研究所株式会社)を用いてcobas6000®(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)にて測定した。統計は、IBM SPSS advanced statistics package ver 24.0を使用し、 $p < 0.05$ を有意とした。

III 結 果

1. 好中球の目視算定と自動分析機との相関性

N-アセチル-L-システインにて喀痰を調製後、好中球数を目視算定値と自動血球分析装置XE-5000の測定値で比較したところ両者間に相関係数 $r=0.988$ と良好な

相関を示した (図 1).

2. 好中球数とエラスターゼの相関

N-アセチル-L-システインにて試料調製後の試料でエラスターゼ測定と自動分析装置による好中球数の測定を行い、両者間に概ね良好な相関 (r=0.492) を示した (図 2). しかしながら、一部乖離する検体がみられた (図 2 中番号を記したケース).

乖離したケースは、試料調製前に提出した細胞診の結果ではすべて膿性痰(P痰)であり、好中球数は2+~3+を示していた (図 3, 表 1). これらのケースは、計算板による好中球実測値でも低く、細胞診の好中球数と乖離がみられた.

3. 乖離検体の原因の検討

喀痰溶解のためにN-アセチル-L-システインを加えて、一晚放置後に完全に喀痰が溶解できているものは均質化されているが (図 4a), 十分に喀痰が溶解できていないものは小さな集塊が認められた (図 4b). 塗抹標本 (Gi-

emza 染色) では、この集塊の中に多くの好中球が含まれていた (図 5a, b).

4. M痰・P痰の細胞診における好中球所見

M痰とP痰の細胞診での半定量の好中球所見を比較すると、M痰では (-) から (1+) までの所見が80%以上、半定量スコアの平均値 1.51±0.91 であるのに対し、P痰では (2+) から (3+) の所見が約8割あり、スコアの平均値 2.98±1.04 と高く、明らかにM痰よりP痰の好中球数が多い所見であった (表 2, p<0.0001).

5. M痰・P痰のエラスターゼ分布と平均値

NEは作成試料にて測定可能であることを踏まえて、M痰とP痰のエラスターゼ値を比較した。M痰のエラスターゼ平均値は 1,106ng/ml, P痰のエラスターゼ平均値は 15,092ng/ml であった (図 6, 表 3). t検定の結果、

表 2 M痰, P痰における細胞診での好中球所見とその比率

M痰		P痰	
好中球所見	比率	好中球所見	比率
3+	3%	3+	36%
2+	13%	2+	40%
1+	24%	1+	12%
±	51%	±	10%
-	9%	-	2%

M痰: N=230 1.51±0.91
 P痰: N=50 2.98±1.04
 P<0.0001 で有意差あり

表 3 M痰およびP痰におけるエラスターゼ値

M & J 判定	N 数	エラスターゼ平均値
M痰全体	233	1,106
P痰全体	52	15,092
P1	32	14,286
P2	10	10,235
P3	10	23,356

M痰全体とP痰全体の比較では、両群間に有意差がみられたが、P痰の中では有意差は認めなかった。
 M & J 判定: Miller & Jones 分類による判定, N 数: 症例数
 N.S: not significant, *: p<0.05

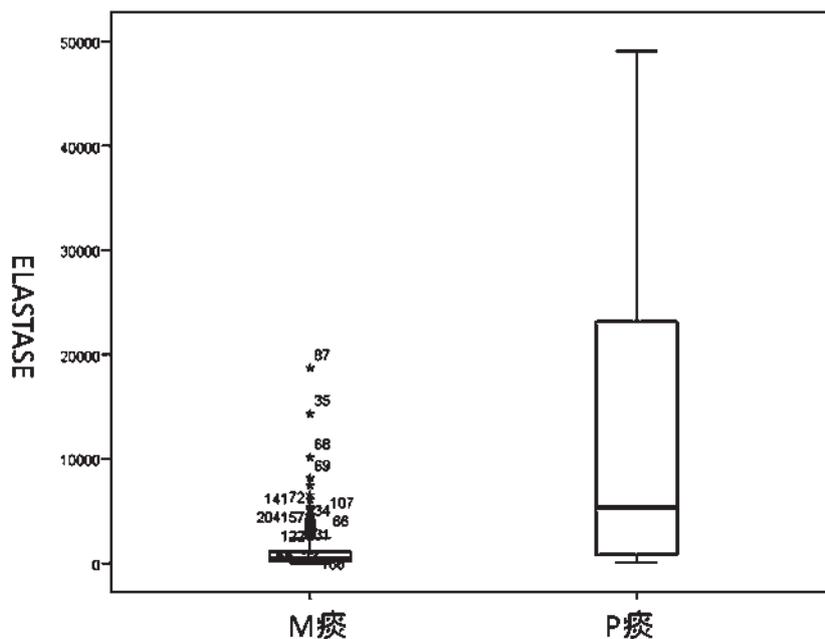


図 6 M痰, P痰における好中球エラスターゼ値の分布

P痰におけるエラスターゼの平均値は、有意にM痰のエラスターゼの平均値より高値であった (P<0.0001).

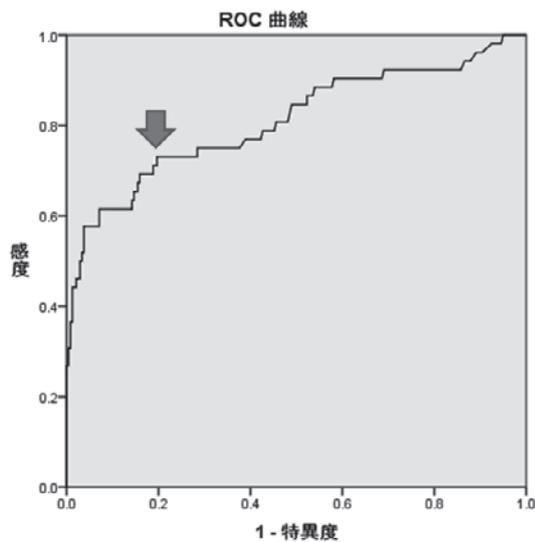


図7 ROC曲線による膿性痰と粘液痰の鑑別を解析
矢印で示した部分が左角に一番近く、このときのエラストラーゼ値は1.625ng/ml、これをP痰のカットオフ値とすると感度0.731、特異度0.803であった。

M痰とP痰の平均値に有意差があり、P痰で有意にNE値が高いことがわかった ($p < 0.05$)。P痰の中におけるP1, P2, P3の3者間での平均値には有意差は認められなかった(図6, 表3)。

6. ROC曲線による解析

P痰とM痰の鑑別を目的にROC曲線による解析を行った(図7)。ROC曲線を描かせてカットオフ値を求めた。エラストラーゼ値が1.625ng/mlの時に、感度0.731、特異度0.803でP痰を判定できることが明らかになった。

IV 考 察

今回我々は粉末のN-アセチル-L-システインを喀痰に使用して溶液化することにより、喀痰中のNEおよび好中球数の自動分析測定が可能になることを明らかにした。膿性痰のごく一部の症例では、50mgの添加したN-アセチル-L-システインにて溶解液の均一化は難しく、好中球が集塊を作る例も見られたが、集塊の有無にかかわらず細胞診所見でP痰とされた例ではNEが有意に高いことを明らかにした。さらに、cut off値として設定した1.625ng/mlの濃度でP痰とM痰を鑑別することができ、P痰を客観的に評価する根拠になることを示した。

喀痰を試料として調整する方法には、50,000gで90分間超遠心器に掛ける方法⁴⁾などもあるが、一般検査室レベルの装置で測定可能な方法として、喀痰に粉末のN-アセチル-L-システインを添加してNEキットによる測定する系を採用した。今回のN-アセチル-L-システインの粉末添加によって、喀痰量を変えることなく好中球数の自動分析装置による測定およびNEの測定が可能になった。ただし、N-アセチル-L-システイン50mgの添加では

喀痰の一部が微小集塊として残ってしまい好中球を測定できていない膿性痰症例もあったが、溶解液の均質性の有無にかかわらず、エラストラーゼは測定可能であり、細胞診の好中球所見を反映する結果であった。

現在のじん肺法における膿性痰を判定する基準は、Miller&Jones分類をもとに目視で評価しそれに基づき労災の適応が決定されている¹⁾。今回検討した喀痰中エラストラーゼ値は、客観的にP痰と判断した膿性痰の定量的資料になると考えられ、続発性気管支炎の診断および認定時の正確で迅速な評価に使用できる測定法と考えられた。

V ま と め

N-アセチル-L-システイン使用により、喀痰中のエラストラーゼ測定が可能になり、喀痰中の好中球数とエラストラーゼの間に相関がみられた。またM痰とP痰のエラストラーゼ値に有意差が見られたことから、両者の鑑別に有用であることが判明した。膿性痰の指標としてNE値が利用できる可能性がある。

謝辞：研究のきっかけとなるご意見をいただきました結核予防会理事長 工藤翔二先生、労働者健康安全機構本部研究監査 加藤賢朗先生に深謝申し上げます。

この研究は、労働者健康安全機構 労災疾病医学研究・開発「じん肺」による補助を受けた。

[COI開示] 本論文に関して開示すべきCOI状態はない

文 献

- 1) 労災病院じん肺研究グループ編集委員会編：よくわかるじん肺健康診断。東京、産業医学振興財団、2017, pp 28—29.
- 2) 木村清延, 中野郁夫, 内田善一, 他：じん肺合併症の続発性気管支炎に関する研究。日本職業・災害医学会誌 55：136—140, 2007.
- 3) 中野郁夫, 宇佐美郁治, 岸本卓巳, 他：労災病院におけるじん肺合併症の発生状況について。日本職業・災害医学会誌 61：236—242, 2013.
- 4) Chalmers JD, Smith MP, McHugh JD, et al: Short- and long-term antibiotic treatment reduces airway and systemic inflammation in non-cystic fibrosis bronchiectasis. Am J Crit Care Med 186: 657—665, 2012.
- 5) Yamada H, Damiano VV, Meranze DR, et al: Neutrophil degranulation in cadmium-chloride-induced acute lung inflammation. Am J Pathol 109: 145—156, 1982.
- 6) 三上正志：慢性気道疾患の喀痰における好中球エラストラーゼの意義とエリスロマイシンの作用機序に関する研究。日胸疾会誌 29：72—83, 1991.

別刷請求先 〒068-0004 岩見沢市四条東16—5
北海道中央労災病院中央検査部
植木 進一

Reprint request:

Shinichi Ueki

Department of Central Clinical Laboratory, Hokkaido Chuo
Rosai Hospital, 16-5, 4-jo Higashi, Iwamizawa, Hokkaido, 068-
0004, Japan**The Measurements of Neutrophil Elastase in Purulent Sputa in Pneumoconiosis Patients**Shinichi Ueki¹⁾, Yoshio Kawamura²⁾, Takashi Inomata³⁾, Yoshihiro Okamoto³⁾, Takeshi Igarashi³⁾,
Kiyonobu Kimura³⁾ and Yoshinori Ohtsuka³⁾¹⁾Department of Central Clinical Laboratory, Hokkaido Chuo Rosai Hospital²⁾Department of Central Clinical Laboratory, Aomori Rosai Hospital³⁾Department of Internal Medicine, Hokkaido Chuo Rosai Hospital

For the diagnosis of secondary bronchitis complicated with pneumoconiosis, certificates of health examination results need description of nature and amount of sputa being collected for an hour after waking up in the morning. In order to evaluate these description, objective indices are desirable. In this report, we examined whether neutrophil elastase (NE) could measure the degree of purulence in sputa, and NE could tell purulent sputa from mucous one.

[Subjects and Methods] Subjects were 291 pneumoconiosis male outpatients in our hospital with written permission to join this study. Mean age was 79.7 years old. After the nature of sputa were described according to the classification of Miller and Jones, from 250 μ L to 4mL of sputa are divided into tubes. Fifty mg of N-Acetyl-L-cysteine powder is added to liquefy sputa, and they are incubated under -4°C until next morning. The rest of sputa are processed to cytodiagnosis. After diluting incubated sputa from 5 times to 500 times by Cellpack II[®], the number of neutrophils are counted manually and automatically, then measured NE. The association among NE, the number of neutrophils, and the classification of Miller and Jones were analyzed.

[Results] After liquefied, the association between the number of neutrophils counted manually and automatically measured were excellent ($r = 0.998$). The association between NE and the automatically number of neutrophils was almost good ($r = 0.492$), while some purulent sputa samples by cytodiagnosis showed very low in the number of neutrophils and high in NE. Insoluble residues, clusters of neutrophils, were seen in some incubated purulent samples. NE measurements were not disturbed by insoluble residues. NE were compared between mucous sputa and purulent sputa classified by Miller and Jones classification. Mean NE of purulent sputa was 15,092 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was significantly elevated than that of mucous sputa 1,106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$). Concerning differentiation between purulent sputa from mucous sputa by NE, receiver operating characteristic curve analysis (ROC) revealed that sensitivity and specificity were 0.731 and 0.803 respectively. These results show that NE might be useful and objective indices of purulent sputa.

(JJOMT, 69: 231—237, 2021)

—Key words—

secondary bronchitis, pneumoconiosis, Miller and Jones classification