

Ruthenium Red 염색으로 본 석면증 폐포벽의 폐포피복층의 변화

경북대학교 의과대학 병리학교실

박재복·정재명·손태중

서론

석면의 섬유를 흡입하여 폐나 늑막에 섬유성 변화가 일어난 현상을 석면증이라 한다. 이것은 제 2차 세계 대전후 석면의 생산 및 소비가 급속히 증가함에 따라 이와 평행하여 폐암과 중피종(mesothelioma)의 발생도 증가함으로써 이 양자의 상관관계에 주목하게 되었으며 중요한 산업병의 하나로 등장하게 되었다.

석면체는 석면광산의 광부나 이것을 취급하는 각종의 직종, 예를들면 석면방직 스티파이프, 용광로의 절연체, 적선의 절연체, 지붕에 사용되는 널판지, 타일, 자동차의 브레이크 및 크랏치의 라이닝, 합성수지등의 생산에 종사하는 사람에서 많이 발생하는 직업성 질환이라 생각하여 왔다. 그러나 근년에 미국을 위시한 선진국에서 일반도시 거주자의 부검체내에서도 석면섬유나 이로부터 유래된 asbestos body, 더 정확하게는 ferruginous body가 높은 빈도로 나타난다는 보고가 있음에 따라 대기오염과의 관계를 의심하여 이에 대한 관심이 점차 높아져 가고 있다¹⁾. 저자의 교실에서는 이에대한 관심을 가지고 chrysotile asbestos를 투여하여 이미 기초적 연구를 한 바 있다^{2,3)}. 이번에는 실험동물에 야기시킨 석면증체에 alveolar lining layer를 형성하는 물질들에 어떠한 변화가 있는지를 Luft ruthenium red 법으로 관찰해 보기 위하여 이 실험을 계획하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 체중 170~250 gm 내외의 잡종 흰쥐를 일정한 기간 사육한후 그 건강이 양호하다고 인정된 것을

접 수 : 1983년 12월 5일

골라 실험에 제공하였다.

실험방법 : Chrysotile asbestos(일본 구베야제) 1 gm을 0.1 ml의 생리식염수와 혼합하여 다음에 기술하는 杉山등⁴⁾이 고안한 경구적 기관내 삽관법을 이용하여 기관내에 흡입시켰다. 즉 1) 동물을 양와위로 고정하되 견갑하부에 낮은 베개를 놓아 약간 높이고 전경부를 전방으로 돌출시켜 경추 및 흉추를 가급적 일직선으로 한다. 2) Nembutal 0.6 ml 정도를 복강내에 주입하여 마취시킨다. 3) 기관내 삽관용 튜브에는 외경 1.40 mm, 길이 80 mm이고 주사기와 접속 가능한 금속관을 사용한다. 관강의 용적은 0.1 ml이다. 4) 그리고난 후 후두경을 인두까지 삽입하여 삽관여부를 확인한후 미리 준비된 asbestos를 한꺼번에 주입한다. 이렇게하여 주입이 끝난 동물은 3일, 5일, 7일째에 각각 5마리씩 도살하여 광학 및 전자현미경으로 검색하였다. 광학현미경적 자료는 조직을 10% 중성 formalin에 고정하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 하여 검경하였다. Ruthenium red 염색을 위해서는 적출된 폐조직을 pH 7.4인 0.1 M의 cacodylate-buffer로 완충된 2.5% glutaraldehyde액에 2시간 고정하였다. 그후 cacodylate-buffer로 약 2시간 수세한 다음 다시 3,000 ppm의 ruthenium red를 함유한 1% O₂O₂용액에 2시간 고정하였다. 그다음 다시같은 buffer로 수세한 다음 계열알콜로 탈수를 하고 propylene oxide로 치환을 한 다음 epon 812로 포매하여 열증합을 하여 Reichert OMU-II형 및 Porter-Blum MT-2B Ultramicrotome으로서 초박절을 하여 절편을 작성한 후 uranyl acetate로 단염색을 하여 Hitachi HU-12A 및 HU-11C형 전자현미경으로 관찰하였다⁵⁾.

성적 및 고찰

폐포의 최내층 즉 상피세포의 상층에 지방산, amine,



Fig. 1. Lung, rat, 3 days after intratracheal installation of chrysotile asbestos fibers. Darkly stained ruthenium red positive material coats type II pneumocyte (Ep II) cell membrane to alveolar space. Lamellar structure (La) is seen in the alveolar space. ($\times 6,000$)

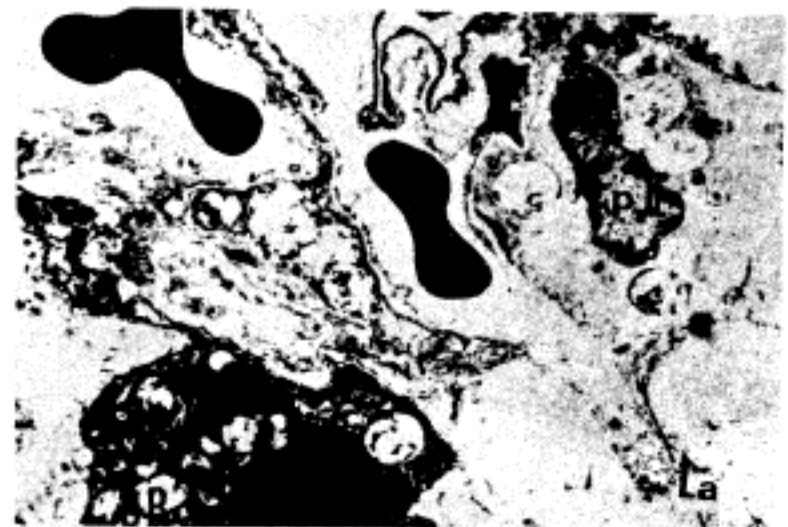


Fig. 2. Lung, rat, 5 days after intratracheal installation of chrysotile asbestos fibers. Type II pneumocyte (Ep II) shows ruthenium red positive material on cell membrane to alveolar space. It is attenuated compared with Fig. 1. Lamellar body (arrow) is present in the alveolar space. ($\times 6,000$)

비누등 표면장력을 현저히 저하시키는 물질이 있다는 것을 처음으로 지적한 것은 Von Neergard⁶⁾이다.

이 물질이 바로 surface active substance 혹은 surfactant이다. 그리고 이 물질의 생화학적 조성은 Klaus 등⁷⁾에 의해서 밝혀졌고 그 생산장소와 구조와의 상관관계를 전자현미경으로 분명히한 것은 Kikkawa 등⁸⁾이다. 일반적인 전자현미경적 관찰방법 즉 glutaraldehyde와 O_2O_4 로 고정하여 uranyl acetate와 lead nitrate의 electron double stain을 하여 관찰했을 때는 이 surfactant가 있는 층은 관찰되지 아니하고 다만 그 하층에 있는 폐포상피세포의 층만 관찰된다. 이것은 이 층이 비세포성층이며 또한 특수한 다른 방법을 쓰지 않으면 관찰할 수 없다는 것을 뜻한다. 그리하여 이에대한 각종 방법이 시도되고 있으나 아직 안전하고 확실한 방법은 없다⁹⁾. 지금 시도되고 있는 방법으로는 Luft의 ruthenium red 염색법⁵⁾과 Dormer의 tricomplex 법¹⁰⁾이 있다. 이들 두 방법은 다같이 폐포피복층을 이루고 있는 생화학적 성분에 기초를 두고 있다. 즉 세포피복층의 주성분은 dipalmitoyl lecithin (DPL)을 주체로 하는 인지질과 그 밖에 단백질 및 당질로 되어있다¹¹⁾. 전자 즉 Dormer의 tricomplex 법은 인지질의 증명법이고, 후자 즉 Luft의 ruthenium red 법은 접액 다당질의 증명법이다. 이들 염색법으로서 폐포표면 활성물질이란 일정 기능을 가진 물질과 폐포피복층이란 형태상과 동일시하기에는 아직도 문제점이 있으나 전자는 불안정한 폐포피복층이고 후자는 비교적 균일하게 연속적으로 피복되어 있다. 그렇기 때문

에 전자에서는 과립상이고 불연속성이며 후자에서는 균일하고 연속성이다. 한편, 병리학적으로 보아서는 폐포영역에 발생한 염증의 수복기^{11,12)} ⁶⁰Co 조사¹³⁾ 그리고 urethan 투여¹⁴⁾시에는 surfactant의 생산모세포인 II형 상피세포의 증식이 일어나고 폐의 세동맥 수축으로 인한 산소공급의 부족¹⁵⁾ 및 미주신경절단¹⁶⁾ 그리고 virus성 폐염, 속폐, 지방색전, 산소중독등의 조건하에서 볼수 있는 소위 성인에 있어서의 호흡궁박증후군 (RDS)에서 폐포표면 활성물질의 저하를 나타낸다고 한다¹⁷⁾. 그밖에 폐에 기질적변화 특히 II형상피세포의 파괴를 가져오는 기질 병변이 있을 때에는 이 물질은 감소할 것으로 생각할 수 있다. 본 실험성적을 요약하면 실험 제 3일째에 있어서는 RR 양성물질이 폐포상피세포의 표면 특히 II형상피세포 표면에서 대조군에 비해서 감소하였고((Fig. 1 참조), 이때 II형상피세포의 소기관을 보면 osmiophilic body의 층상구조의 부분적인 단열, 그수의 감소와 더불어 때로는 공포화도 관찰되었다. 또 이때 단백질합성 장소인 rough surfaced endoplasmic reticulum(RER)의 수도 감소하고 mitochondria도 위축되어 있었다. Chrysotile asbestos를 흡입시킨 후 5일째에 있어서는 RR 양성물질의 감소가 II형상피세포의 상부뿐만이 아니라 I형상피세포의 표면에서도 감소되었다(Fig. 2참조). 이때 II형상피세포에 있어서는 osmiophilic body의 변성, 소실등이 더욱 현저하고 세포표면의 microvilli도 소실되었다. Chrysotile asbestos 흡입후 7일째에 있어서는 5일째에 비하

여 현저히 감소되어 II형 및 I형상피세포의 표면에 흔적으로 관찰된 뿐이었다. 이때 II형상피세포의 세포질에는 osmiophilic body의 변성이 더욱 현저하였다.

이와같은 성적으로 미루어보아 세포표면 활성물질과 폐포피복층을 완전히 동일시 할수는 없지만 적절한 염색법이 시행되었다고 볼 때 이 성적은 의의가 있는 것이 아닌가 생각된다. 뿐만 아니라 상기와 같은 RR 염색으로 인한 소견은 이 물질을 생산하는 세포라고 생각하고 있는 II형폐포상피세포의 형태적 변화와도 부합되는 소견이다. 즉 RR 양성물질의 감소에 비례하여 II형폐포상피세포에 있어서의 변성성변화가 더 심하여 졌다는 것이다. 더우기 그 생산장소인 osmiophilic body에서의 변성이 현저하였다. 이상으로 볼때 II형 폐포상피세포의 퇴행성 변화의 정도와 폐포피복층의 RR 염색 양성물질은 거의 평행하며 이 물질의 다과는 이 물질의 생산세포의 기능과 밀접한 관계를 가지는 것이 아닌가 생각한다.

요 약

저자들은 chrysotile asbestos를 흡입시킨후 원쥐의 기관점막을 Ruthenium red로 하여 보고 얻은 성적을 요약하면 다음과 같다.

1) Chrysotile asbestos 흡입후 3일째에는 II형상피세포의 표면에 주로 RR 양성물질이 감소하였고 5일째에 있어서는 II형상피세포의 표면은 물론, I형상피세포의 표면에서도 감소되었으며 7일째에 있어서는 이 두가지 세포의 표면에서 다같이 감소되었다. 이때 II형상피세포질에 있는 osmiophilic body의 변성도 5일째에는 경하였으나 그후 점차 변성이 심하였다.

2) 이상의 성적으로 보아 RR 염색 양성물과 II형상피세포의 퇴행성 변화의 정도가 거의 평행한 것으로 보아 이 물질의 다과는 이 물질의 생산세포의 기능과 밀접한 관계를 가진다고 할 수 있다.

REFERENCES

1) Robbins SL and Cotran RS: *Pathologic basis of disease, 2nd ed.* WBS saunders Co., Philadelphia, U.S.A., 1976, p 527

2) 이창수, 박희명, 손태중: *Asbestos fiber에 의한 폐포벽의 미세형태학적 변화.* 경북의대잡지 18 (2):145, 1977

3) 박성대, 손태중, 박정식: *PAM 염색으로본 석면중 폐포벽의 alveolar lining layer.* 경북의대잡지 21

(1):141, 1980

4) 杉山誠, 堤晴朗, 小林昭夫, 金子仁: 원쥐의 經口的氣管内 挿管法(日文). *醫學のめしめ* 98(8): 550, 1976

5) Luft JH: *Electron microscopy of the cell extraneous costras revealed by ruthenium red staining.* *J Cell Biol* 23:544, 1964

6) Von Neergaard K: *Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Autommechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen.* *Z Ges Exp Med* 66:373, 1929

7) Klaus MH, Clements JA and Havel RJ: *Composition of surface active material isolated from beef lung.* *Proc Natl Acad Sci* 1958, 1961

8) Kikkawa, Y, Motoyama, EK and Cook CD: *The ultrastructure of the lungs of lambes: The relation of osmiophilic inclusions and alveolar lining layer to fetal maturation and experimentally produced respiratory distress.* *Am J Pathol* 47:877, 1965

9) 中村隆, 吉川清, 吉田清一 佐竹辰夫: *肺表面活性 그 基礎와 臨床一.* 眞興交易醫書出版部, 東京, 日本, 1976, p 226

10) Dermer GB: *The firation of pulmonary surfactant for electron microscopy. I. The alveolar surface lining layer.* *J Ultrastr Res* 27:88, 1969

11) Kisch B: *A quantitative method to produce pneumonia for electron microscopic research.* *Exptl Med Surg* 18:243, 1960

12) Kisch B: *Electron microscopy of the lungs in acute pneumonia.* *Exptl Med Surg* 18:273, 1960

13) 岡田慶夫: *人肺肺胞上皮細胞의 腺腫樣過形成의 組織學的 및 電子顯微鏡的 觀察(日文).* *日結會誌* 16 :48, 1965

14) Klärner P und Giesecking R: *Zur Ultrastructure des Lungentumors der Maus.* *Z Krebsforsch* 64 :7, 1960, Cited from²⁰⁾

15) Kato M and Staub NC: *Response of small pulmonary arteries to unilobular hypoxia and hypercapnea.* *Circ Res* 19:426, 1966

16) Klaus MH, Reiss OK, Tooley WH, Piel C and

Clements JA: *Alveolar epithelial cell mitochondria as source of the surface active lung lining.* *Science* 137:750, 1962

- 17) 中村隆, 吉川清, 吉田清一, 佐竹辰夫: 肺表面活性—그 基礎와 臨床—(日文), 眞興交易醫書出版部, 東京, 1976, p 180

— Abstract —

The Changes of Alveolar Layer in Experimental Asbestosis Observed by Ruthenium Red Stain

**Jae Bok Park, M.D., Jae Myung Chung, M.D.
and Tae Joong Sohn, M.D.**

*Department of Pathology, School of Medicine,
Kyungpook National University, Taegu, Korea*

Authors had intratracheally installed asbestos

fiber to albino rats and, observed alveolar lining layers with ruthenium red stain. The results were as follows.

1) On the third day after installation of chrysotile asbestos, ruthenium red positive material on surface of type II pneumocytes was decreased in amount. On the fifth day that of type I pneumocytes was also decreased. On the seventh day ruthenium red positive material was significantly decreased in both type I and type II pneumocytes. Degeneration of osmiophilic inclusion body appeared on the fifth day and later it more pronounced.

2) From the above results, positivity of ruthenium red stain is parallel with degree of type II pneumocyte degradation. So the amount of ruthenium red positive material is closely depended upon functional activity of cells producing ruthenium red positive material.