

低濃度 O₃ 曝露による有害性の検討 (その 2)

— 肺内グルタチオンペルオキシダーゼの局在に関する研究 —

遠藤 立一 佐々木 裕子 川井 利雄
 大山 謙一 仲 真 晶子 毛 受 優
 石 黒 辰 吉 小 松 道 至 渡 辺 慶 一
(東海大学医学部) (東海大学医学部)

1 はじめに

肺は脂質代謝の最も盛んな臓器の一つとして知られている。そのうえ、大気中の酸素やオキシダントと直接接触する機会の多いことから、細胞、組織代謝にとって有害な脂質過酸化物が産生され易い臓器であることもうなずけるところである。一方、脂質過酸化物を還元して再び代謝可能な脂肪酸にする酵素としてグルタチオンペルオキシダーゼ (以下GPX) が注目されている。これまで、オキシダントによる肺内GPX活性の変動が生化学的検索により測定されてきた。しかし、生化学的測定では、その変動が肺のどの部分の傷害に基くものか断定することは不可能で、形態学的な変化がどのような化学的变化によっているか感知することはできない。そこで、我々は、免疫細胞化学的技法により、GPXの局在部位でその変動を明確にすることによって、形態学および化学的变化をより直接的な関連のもとに検討することを試みた。

2 方 法

ウィスター系雄ラット7週令を用い、オゾン(O₃) 0.06 ppmを表のとおり曝露した。曝露後、肺を摘出し、適当な大きさの組織片とし、2%PLP(periodate lysin paraformaldehyde) 液で固

表 曝露期間および動物数

	曝 露 期 間					計
	曝露直前	48時間	1週	3ヶ月	4ヶ月	
O ₃ 曝露群	—	10	10	10	10	40
対 照 群	10	10	10	10	10	50
計	10	20	20	20	20	90

定した後、8 μの凍結切片を作製した。これについて、

光顕、電顕レベルにおける酵素抗体法染色を行い、GPXの局在を観察した。ここで酵素抗体法に用いた抗体はラット肝より精製した酵素を抗原として作製した抗ラット肝GPX抗体で、肺GPXと95%以上の交差反応があることを確認している。

3 結 果

O₃ に曝露されていない対照のラットでは、主にI型肺胞上皮細胞の細胞質にGPXの局在が認められ、一部、間質に軽微な局在が観察されたものもあった。

O₃ 曝露48時間では、間質のGPXの局在が増強が認められ、一部のI型肺胞上皮細胞に貧飲作用による間質中のGPXの細胞質中への取り込み像と、恐らくそれら小空胞の癒合に基づくと思われる大きな空胞の形成が観察される(写真1)。O₃ 曝露1週間では、上記48時間とほぼ同様の変化が認められるが、まだこの時期ではII型肺胞上皮細胞でのGPX局在は認められない(写真2)。

3~4ヶ月と曝露が長期に及ぶと増生する幼若なII型肺胞上皮細胞の細胞質中にGPXの局在が認められるようになる。さらに、この時期には、毛細血管内皮細胞の変性も顕著で、その細胞質中にGPXの局在が観察される(写真3, 4)。

4 4年間のまとめ

ラットを用いた、O₃曝露による肺内GPX局在証明に関する研究は、昭和54年度に始まり、本年度が最終年度であるため、4年間のまとめを以下に記す。

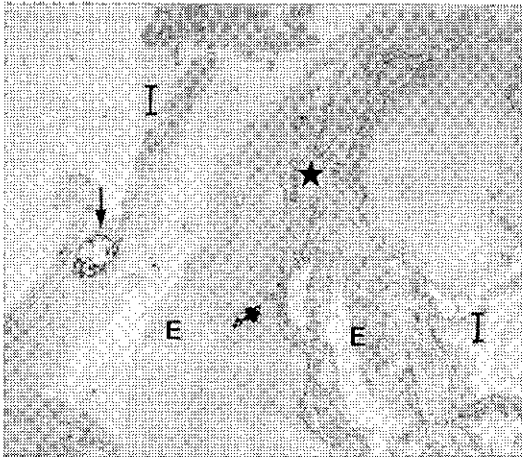
O₃ 濃度及び曝露期間は、1 ppm×6~120時間、0.5 ppm×24~96時間、0.2 ppm×48時間~1ヶ月、0.06 ppm×48時間~4ヶ月であった。

非曝露の対照群では、GPXは主としてⅠ型肺上皮細胞に局在していた。このGPXは、その位置的関係からガス交換して伴って起る脂質過酸化の防御に働いているものと思われた。

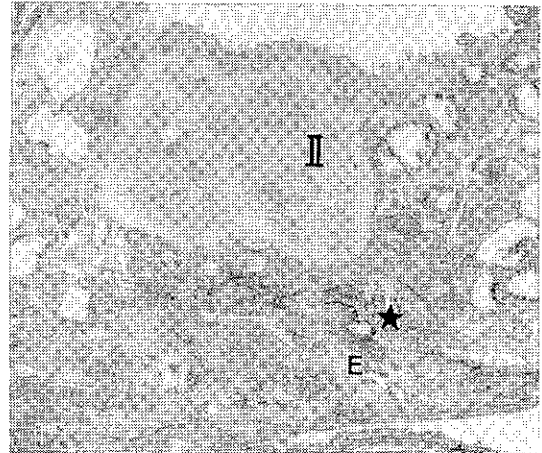
O₃ 1 ppm曝露では、24～48時間で、Ⅰ型肺上皮細胞中にGPXの明らかな増量が認められた。さらに、120時間では、Ⅱ型肺上皮細胞の顕著な増生、変性、崩壊が観察され、この細胞質中にGPXの局在が認められた。O₃ 0.5 ppmでも、曝露48時間で、Ⅰ型肺上皮細胞に変化がみられた。すなわち、細胞質の肥厚、表面のジグザグ化、大小の空胞の出現であり、明らかなGPX局在の増強が観察された。96時間曝露では、変化がさらに強まり、Ⅰ型とⅡ型の肺上皮細胞の中間型とも見られる細胞にも強いGPXの局在を認めた。しかし、この時期ですら、Ⅱ型肺上皮細胞には局在を認めなかった。曝露濃度が0.2 ppmに下がると、48時間までは局在の変化は認められず、1～2週では、Ⅰ型肺上皮細胞でのGPXはやや減少し

ていた。しかし、1ヶ月で元に復し、さらに、Ⅱ型肺上皮細胞の遊離表面に沈着した像が観察された。曝露濃度が0.06 ppmとなっても、3～4ヶ月持続すると、Ⅰ型肺上皮細胞でのGPX局在の軽度な増加傾向に加え、幼若なⅡ型肺上皮細胞にも局在を認めるようになった。さらに毛細血管内皮細胞の一部に局在を認めるものも存在していた。

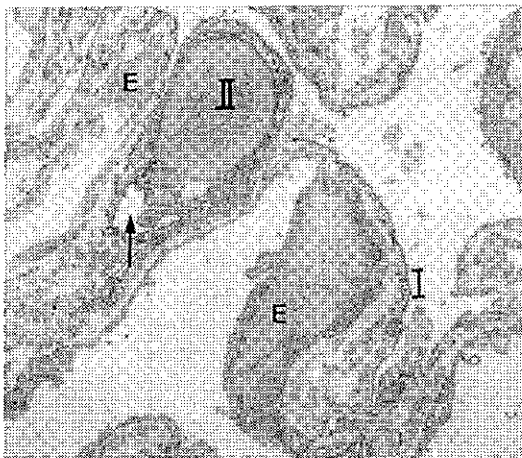
以上、O₃曝露によるラット肺内GPX局在の変動は、0.5～1 ppmという比較的高濃度曝露群では、Ⅰ型肺上皮細胞を中心にして、傷害部位において、24～48時間という、きわめて短時間に明らかな局在の増加を認めた。さらに、曝露が持続すると、Ⅱ型肺上皮細胞にまで変化が及び、局在が認められるようになった。一方、低濃度曝露下の肺胞の変化は、初期には高濃度曝露と比較して軽度であったが、3～4ヶ月という曝露期間で高濃度群に類似のGPXの局在性を示した。このことは、低濃度であっても、O₃刺激が持続している場合、肺上皮に対するO₃の集積効果があることがうかがわれた。



1 I型肺胞上皮細胞にGPXを含む小空胞が認められ、時に矢印が示すような比較的大きな空胞も観察される。48時間曝露群、×6,000



2 星印が示すように、肺胞隔壁内にGPX局在が認められる。II型肺胞上皮細胞にはGPXは認められない。1週曝露群、×6,000



3 比較的幼若なII型上皮細胞にGPXの局在を認める。毛細血管内皮細胞はやや厚みを増し、電子染色に強く染まっているが細胞質中に小空胞が少く、これにはGPX局在を認めない。

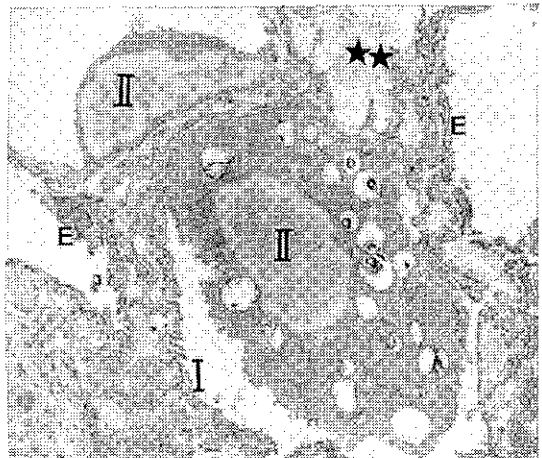
4ヶ月曝露群、×5,000

I：I型肺胞上皮細胞

II：II型肺胞上皮細胞

E：肺胞毛細血管内皮細胞

星印：肺胞隔壁間質内の水腫性変化



4 比較的幼若なII型上皮細胞(写真左上)にはGPXの局在が認められるが、成熟型のII型上皮細胞(写真中央)にはほとんど認められない。毛細血管内皮細胞にはGPXが強く染まっている。

二重星印で示される肺胞隔壁には膠原線維の増生を伴った水腫性変化がみられる。

4ヶ月曝露群、×4,300