

オゾンの低濃度曝露による肺内酵素 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 遵至 渡辺 慶一
 (東海大学医学部) (東海大学医学部)

1. はじめに

昭和49年度から実施した光化学オキシダントの主成分であるオゾン(O₃)の有害性に関する動物実験は、オゾン曝露による、肺呼吸器系上皮の超微形態的観察を家兎を用いて行ない、それぞれの濃度で、また長短の曝露時間により、相応する病的変化が観察された。一方、これらオゾン曝露によりひきおこされる肺胞の病変発生機序の究明の一法として、オゾンにより肺胞領域に誘発される脂質過酸化に注目し、これをその生体内防御因子として重要な位置をしめるGlutathione peroxidase (GSH-PO)*の生化学的、および免疫学的局在変化の観察の面から追求しようと試みて来たが、現状ではGSH-POの免疫細胞化学的観察はラットについてのみ可能(抗ラットGSH-POのみが入手可能)であったため、止むなく家兎に対して行ったのと同様なオゾン曝露実験をラットで行って来たが、一般的にラット肺は、家兎のそれに比べ抵抗力が強く病変が起きにくかった¹⁾²⁾ことに低濃度オゾンに対しては抵抗性が強く、人体(ことにその肺)に対するオゾン汚染の影響を観察するには家兎の方がより良き実験モデルとなり得ることが予測された。そこで、本年度の当研究では家兎肝からそのGSH-POを抽出、精製し、それに対する抗体を山羊で作製し、この抗体を応用した酵素抗体法で家兎肺についてもそれに対するオゾン曝露の影響をGSH-POの変化→脂質過酸化制御の変化→肺の超微形態学的変化などの関連の面から検討することにした。なお、ラット肺におけるGSH-POの局在様式及びその変化との違いを知ることにより、家兎とラットのオゾンに対する抵抗性の差異、さらに同肺病変における脂質過酸化の意義がより一層浮き彫りにされるものと思われる。

* グルタチオンペルオキシダーゼ, GPO, GPXとも表示する。

2. 抗家兎GSH-PO抗体の作製

(1) 家兎肝GSH-POの精製

家兎(日本白色種, ♂, 2~3 kg) 20羽を一回の精製に用いた。家兎をネンブタール麻痺下で腹部大動脈より採血し、続いてPBSにて門脈より灌流し、脱血した後に肝を切除した。肝150 gを3 lの0.025M Tris-acetate buffer, pH 7.5, 0.7mM 2-mercaptoethanol (以後TM buffer) と共にPolytron blender (KINEMATICA社, スイス)にて4~5分間破碎した。破碎液を8000 gにて15分間遠心分離し、上清を得た(Homogenate)。このものに1M酢酸溶液を加えてpHを5.5に調整し、4℃に30分間放置し、生じた沈澱を遠心分離にて除去(8000 g 15分間)(Acid Treatment), 上清を1N NaOHにて再びpH 7.5に調整し、続いて固形硫酸を最終30%飽和になる様に加え、30分間よく攪拌した後遠心にて沈澱を取り除いた。上清に硫酸を再び加え、最終60%飽和とし、上記と同様に遠心して沈澱を回収した(硫酸分画)。沈澱を600 mlのTM bufferに溶解し、0.15 MのNaClを含むTM buffer (TMS)に一昼夜透析する。続いて、あらかじめTMSにて平衡化しておいたDEAE Sephadex A-50カラム(5.2×23 cm, 約500 ml)にapplyし、素通りしてきた分画を回収した。このものをPericel Labocasset (ミリポア社, membrane, 100,000を使用)にて濃縮し、濃縮液をTM bufferにて二昼夜透析した。続いてTM bufferにて平衡化しておいたDEAE Sepharose CL 6Bカラム(2.4×40 cm, 180 ml)にapplyし、約200 mlのTM bufferにてよく洗浄した後、0→0.3MのNaClを含むTM bufferの直線濃度勾配に溶出させた(図1)。GSH-POはNaCl濃度が0.1MのところではDEAE Sepharoseカラムより溶出され、前

後に小さな peak を伴っていた。中心の peak を回収し、硫酸分画と同様にして 5 ml にまで濃縮した。このものを、0.025M Tris-acetate buffer pH7.5, 1mM EDTA 溶液にて平衡化した Sephacryl S-200 カラム (2.5×95 cm, 460 ml) にてゲル濾過した (図 2)。活性の peak を回収し、直ちに同一 buffer にて平衡化しておいた Activated SH-Sepharose 4B カラム (2×5 cm, 15 ml) に apply し、buffer にてよく洗浄した後、10 mM cystein を含む同 buffer にて溶出する (図 3)。GSH-PO は、280 nm の吸収の peak, おそらく、SH-Sepharose に結合していた 2,2-ジピリジルジスルフィドに由来する peak に先んじて、カラムより溶出される。溶出される GSH-PO を Sephadex G100 カラム (2.5×90 cm, 450 ml, TM buffer) にてゲル濾過した (図 4)。以上の操作により、原液より約 1700 倍程度精製され、回収率は 85% であった。これは、写真 1 に示すように、SDS polyacrylamide gel electrophoresis³⁾ で単一 band を示し、ほぼ純品であることが確認された。以上の精製実験を 3 回反復し、約 20 mg の精製 GSH-PO が得られた。

(2) 抗体作製および酵素標識

精製した 20 mg の GSH-PO を抗原として、シバ山羊に免疫した。一回の感作には 1.5 mg の抗原を等量の Freund's Complete adjuvant (Difco 社製) と共に山羊皮内に 2 週から 3 週おきに 6 回免疫した。最終免疫より 2 週間後に屠殺、脱血し、抗血清を分離した。この抗血清の力価をオクタロー法⁴⁾ にて測定すると、写真 2 のように 16 倍希釈した抗血清とまで沈降線が形成され、充分な力価が得られた。

次に特異抗体のみ酵素標識を行うため、ラット GSH-PO を Sepharose に固定化した。GSH-PO 2.5 mg を 1M の 2-mercaptoethanol と 1 時間、4℃ にて incubate した後、0.1M Borate buffer pH 8.5, 0.5M NaCl に移し、2 昼夜透過して 2-mercaptoethanol を完全に取り除いた。この操作で本来 4 量体である GSH-PO が 4 つの Subunit に分離すると思われる。次に 1 枚の BrCN Sepharose 4B と室温で 2 時間反応させ、GSH-PO-bound sepharose 4B を作製した。なお、操作の詳細は、ファルマシア社のマニュアルに従った。

作製した抗血清 20 ml を 60℃ で 30 分間 incubate し

た後、飽和硫酸液を加えて 33% 飽和とさせ、沈澱した IgG 分画を、10 mM cystein, 1mM EDTA 存在下、1% パパインで 20 時間消化させた⁵⁾。ヨードアセトアミドを最終 20 mM になる様に加えてパパインの酵素活性を不活化した後 (4℃ 3 時間)、イオン交換水に対して透折して Fc 分画の大部分を沈澱せしめた。沈澱を 3000 回転、10 分間の遠心に除去し、上清に 1/10 量の 0.1M phosphate buffer pH7.5, 1.5M NaCl を加え、GSH-PO-bound sepharose 4B ゲル (2 ml) と室温で 2 時間、ゆっくりと攪拌しながら incubate した。ゲルをカラム管 (5 ml の注射筒に glass wool で栓をしたもの) につめて、ゲルに結合しない蛋白をよくとり除き、PBS でカラムを充分に洗浄した。その後、5 ml の 0.2M Glycine-HCl buffer pH 2.2 にて、抗 GSH-PO 活性を持つ IgG と Fab の混合物を溶出させた。このものを Sephadex G100 カラム (2.5×40 cm, 200 ml) にてゲル濾過し (図 5)、IgG と Fab とを分離した。

Horseradish peroxidase (Toyobo, type IC) 6 mg を 1 ml の蒸留水に溶解し、これに 0.15M の NaIO₄ 溶液 0.1 ml を加え、室温にて 20 分間攪拌しながら酸化する⁶⁾。酸化した Horseradish peroxidase (HRP) を 1mM acetate buffer に一晚透折し、残った NaIO₄ を取り除く。あらかじめ 0.02M Carbonate buffer pH9.5 に調整しておいた 2 mg/ml の Fab 溶液 2 ml に、透折した HRP を加え、室温で 2 時間、攪拌しながら結合させる。反応後、0.1 ml の 4 mg/ml NaBH₄ 溶液を加え、一晚 4℃ にて静置し、結合を安定化させた後、Sephadex G150 カラム (2.5×40 cm, 200 ml) にて分離する (図 6)。高度に重合した部分と結合していない Fab や HRP を除いた分画を集め、1% になるように Bovine Serum Albumine (BSA) を加えた後、分注して -80℃ に保存した。

作製した標識抗体の特異性を検定するため、肝、腎、肺の Homogenate を SDS 存在下 polyacrylamide gel electrophoresis (4-30% gradient gel, ファルマシア社製 PAA 4/30) にて泳動した後、nitrocellulose sheet 上に電氣的に転写した⁷⁾。転写した nitrocellulose sheet を 0.05% の Tween 20 を含む PBS (T-PBS) にてよく洗浄し、残る蛋白結合基を 3% BSA にて一晚、室温にて incubate することに

より除いてから、先に作製した抗GSH-POのFab-HRPと反応させた。室温で一時間反応させた後、T-PBSでよく洗浄し、HRP活性をdiamino benzidine溶液で発色させた(写真3)、写真に示す様に、この抗体は、肝、腎、肺の各々のHomogenateと一本の蛋白帯のみを染め出し、GSH-POに対する特異性が確認された。

(3) 精製における問題点

GSH-POの精製にはSH-Sepharoseの使用が不可欠である。ラットの場合は、特に問題がなく使用出来たが、家兎の肝にはこのSH-SepharoseにGSH-PO

が結合することを妨害する何らかの因子が含まれている。ラットGSH-POは66%EtOH存在下でも不活化されず、おそらく、この段階で妨害因子を取り除けていたと思われる。しかしながら、家兎GSH-POは、EtOHの処理で不活性化してしまい、EtOH処理が使用できなかった。そのために、SH-Sepharoseにかける前に、この妨害因子を取り除くために部分精製が必要であり、精製操作の段階が増し複雑となる原因となった。又、この妨害因子を除去する条件の決定にかなりの時間を要した。

表1 家兎の肝臓からのグルタチオンペルオキシダーゼの精製

Step	volume (ml)	u/ml	total unit	mg/ml	total protein	u/mg	purification
Homogenate	4500	13.5	60750	42	189 g	0.32	1
Acid treatment	4500	11.1	49900	24	108	0.46	1.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	750	44.1	33000	—	—	—	—
DEAE sephadex A-50	1800	14.5	26100	—	—	—	—
DEAE sepharose CL6B	115	134.7	15500	17.7	2035 mg	7.61	23.8
Sephacryl S-200	62	133.2	8260	8.4	520	15.86	49.6
Thiol-sepharose 4B	12	544.3	6530	—	—	—	—
Sephadex G-150	60	86.0	5160	0.153	9.2	562.1	1756.6

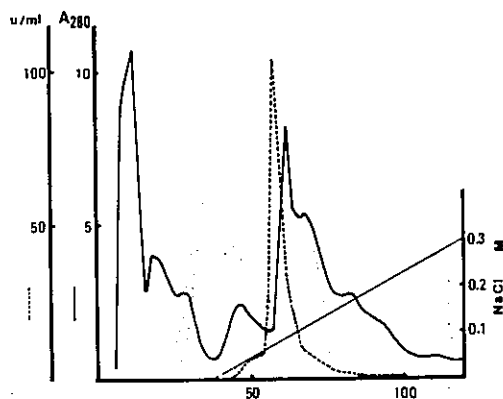


図1 DEAE Sepharose CL6BカラムによるGSH-POの溶出曲線

(実線は蛋白の吸収を、点線はGSH-PO)活性を示す。図2~4も同様

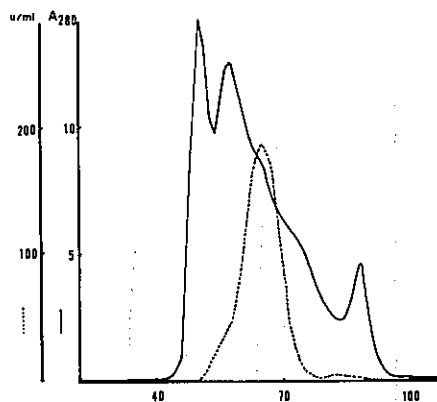


図2 Sephacryl S-200カラムによるGSH-POの溶出曲線

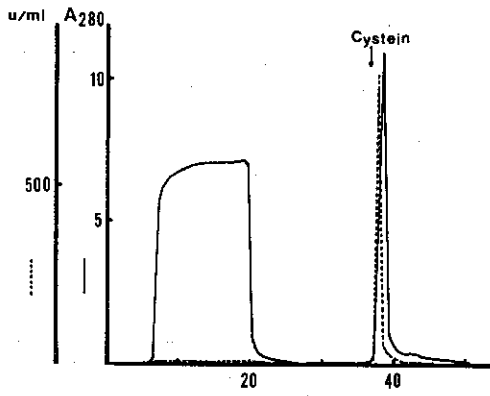


図3 Activated SH-Sepharose 4BカラムによるGSH-POの溶出曲線

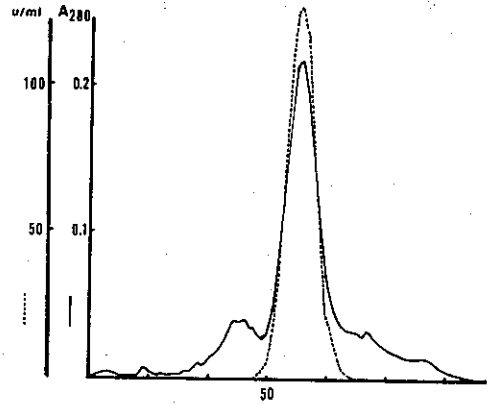


図4 Sephadex G100カラムによるGSH-POの溶出曲線

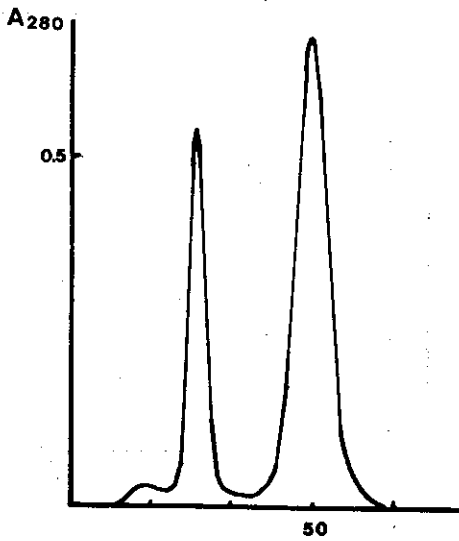


図5 Sephadex G100カラムによるIgGとFabの分離

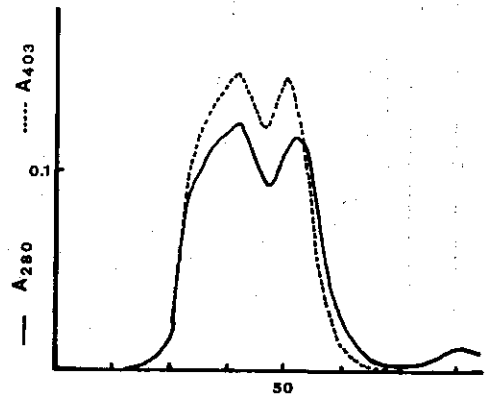


図6 Sephadex G100カラムによる標識抗体 (Fab-HRP) の分離

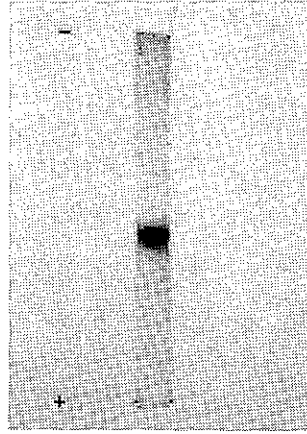


写真1 SDS polyacrylamide gel electrophoresis
による純度の確認
染色はCoomassie Brilliant Blue (CBB)
にて行なった。

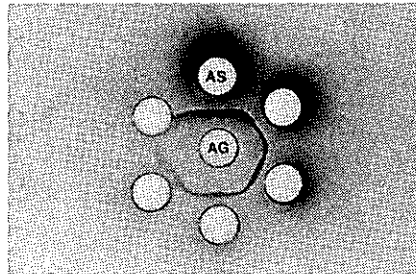


写真2 オクタロニー法による抗GSH-PO抗体の力価の検討

Ag: 精製したGSH-PO, 0.2 mg/ml 10 μ l

As: 抗GSH-PO, As が希釈していない血清, 以後
右廻りに2, 4, 8, 16, 32倍に希釈した血清を各
10 μ l ずつ添加, 室温で一晩 incubate した後,
PBSにて洗浄後CBBにて染色

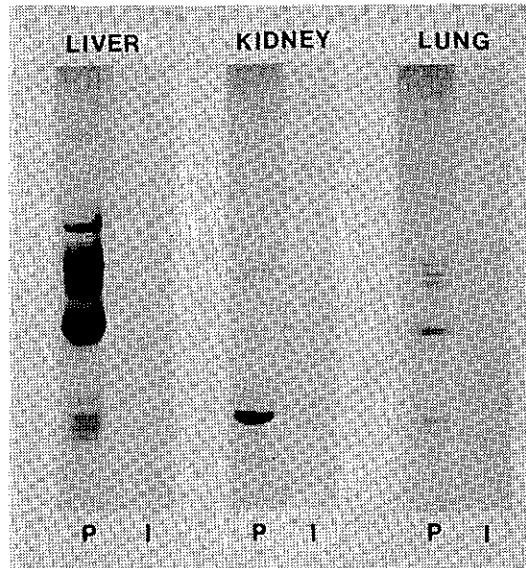


写真3 Enzyme-Linked Immunoelctrotranster
Blot Technique (EITB)による抗GSH-PO抗体の特異性の検討
P:蛋白, CBBにより染色したもの
I:酵素活性, HRP活性をDABにて染色したもの

3. 酵素抗体法による家兎肺におけるGSH-POの局在

無処置家兎と0.06 ppmのオゾンで曝露を受けた家兎について、表記の検討を行った。対象とした家兎の条件は次のとおりである。

- (ア) 無処置家兎肺におけるGSH-PO
 (イ) 0.06 ppm O₃ 曝露を受けた家兎肺におけるGSH-PO

- ① 24時間曝露
 ② 一週間曝露
 ③ 3ヶ月曝露
 ④ 11ヶ月曝露

(1) 家兎肝細胞におけるGSH-POの局在

本実験に用いた抗GSH-PO抗体は家兎肝より抽出、精製されたGSH-POで山羊を免疫して作製されたものである。そこで、まず家兎肝細胞中での同酵素の確認を試みた。写真1は家兎肝細胞中のGSH-POの電顕酵素抗体法による局在観察像であるが、肝細胞中のCytosol(細胞質可溶性部分)にのみほぼ満遍なく分布している。ミトコンドリア、小胞体などの細胞内小器官中にはその局在を認めない。この点、ラット肝GSH-POがCytosolのみならず粗面小胞体(rER)の槽内にも局在するのとは異っている。用いた抗家兎GSH-PO抗体はFabであり、細胞内小器官内への浸透は問題ない筈であり(事実、家兎副腎皮質細胞では、同抗体による酵素抗体法染色により、ミトコンドリアの内膜乃至はその基質が染色されている⁸⁾)、また、同抗体の特異性は図9のEITBにより確かめられている故、この局在性には真憑性があるものと思われる。そこで本抗体を家兎肺におけるGSH-PO局在観察に用いることにした。

(2) 無処置家兎肺におけるGSH-PO

GSH-POの主たる局在は、写真2、3に見られるようにII型の肺胞上皮細胞(II)に認められた。I型上皮細胞(I)にも局在するが、その染色性は弱く、ラット肺胞上皮の場合(主たるGSH-POはI型上皮細胞で、II型には殆んど認められない)、と好対照を示したのは興味を持たれる。また、写真3が示すように肺胞毛細血管内皮細胞(E)にも同酵素の強い局在が認められたが本実験系における他の家兎肺の通常電顕像で肺胞の水腫、膠原線維の増生などかなりの異常が認められたところから、本所見を正常家兎肺胞における平均的な局在様式な

のかどうかについては確言出来ない。写真4は肺胞マクロファージのGSH-PO局在を示すが、Cytosol中のびまん性局在の他にも矢印が示すようなphago-lysosom中の局在も認められる。この点ではラット肺胞マクロファージにおけるGSH-PO局在様式⁹⁾と類似している。

(3) 0.06 ppmのO₃ 曝露家兎肺胞におけるGSH-PO局在

0.06 ppmのO₃ 曝露では、いずれの曝露期間においても、非曝露対照群の肺との間に有意な差は認められなかった。写真5は、0.06 ppm O₃ 曝露11ヶ月の肺であるが、基本的に非曝露の肺と変りがなく、II型肺胞上皮細胞(II)を中心に、毛細血管内皮細胞(E)及びI型肺胞上皮細胞(I)にGSH-PO局在が認められ、O₃による影響は表現されていない。今回実験に用いた家兎は非曝露の家兎肺にも、光顕組織観察、通常透過及び走査電顕観察で水腫性の変化などかなりの異常が認められ、O₃による影響がカバーされてしまっている傾向が強い。GSH-PO局在に関するO₃ 曝露の影響を検討するには、比較的高濃度O₃ 曝露による際立った変化の観察を行うことが重要と思われる。

参考文献

- 1) 遠藤立一ほか：低濃度O₃ 曝露による有害性の検討(その2)、東京都公害研究所年報、229、(1984)。
- 2) Komatsu, N. et al : Immunocytochemical Study on Glutathioneperoxidase (GSH-PO) in Normal and Ozone Stimulated Rat Lungs, *J. Electron Microscopy*, 32(3), 270, (1983)。
- 3) Weber, K., M. Osborn : The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel Electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, 244, 4406, (1969)。
- 4) Ouchterlony, O., Nilson, L. A. : A Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis, *Handbook of Experimental Immunology*, Ed2, 1, 19.1, Blackwell Scientific Publications (1973)。

- 5) Porter, R. R. : The Hydrolysis of Rabbit -globulin and Antibodies with Crystalline papain, *Biochemical*, 5(73), 119, (1959).
- 6) Wilson, M. B., Nakane, P. K. : Recent Developments in the Periodate Method of Conjugating Horseradish Peroxidase (HRPO) to Antibodies, *Immunofluorescence and Related Techniques*, Press Amsterdam, 215, (1978).
- 7) Tsang, V. C. W., *et al* : Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Techniques (EITB) for Studying the Specificities of Antigens and Antibodies Separated by Gelelectrophoresis, *Method in Enzymology*, 92, 377, (1983).
- 8) Watanabe, K. *et al* : "Pre-embedding Method" Designed to Allow Steady Detection of Intramitochondrial Antigens, *Vllth International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Abstracts*, 478, (1984).
- 9) 小松達至ほか：オゾン曝露による肺胞内グルタチオンパーオキシダーゼ局在の変動，「毒性学における過酸化脂質」に関するシンポジウム予稿集，46，(1983)。

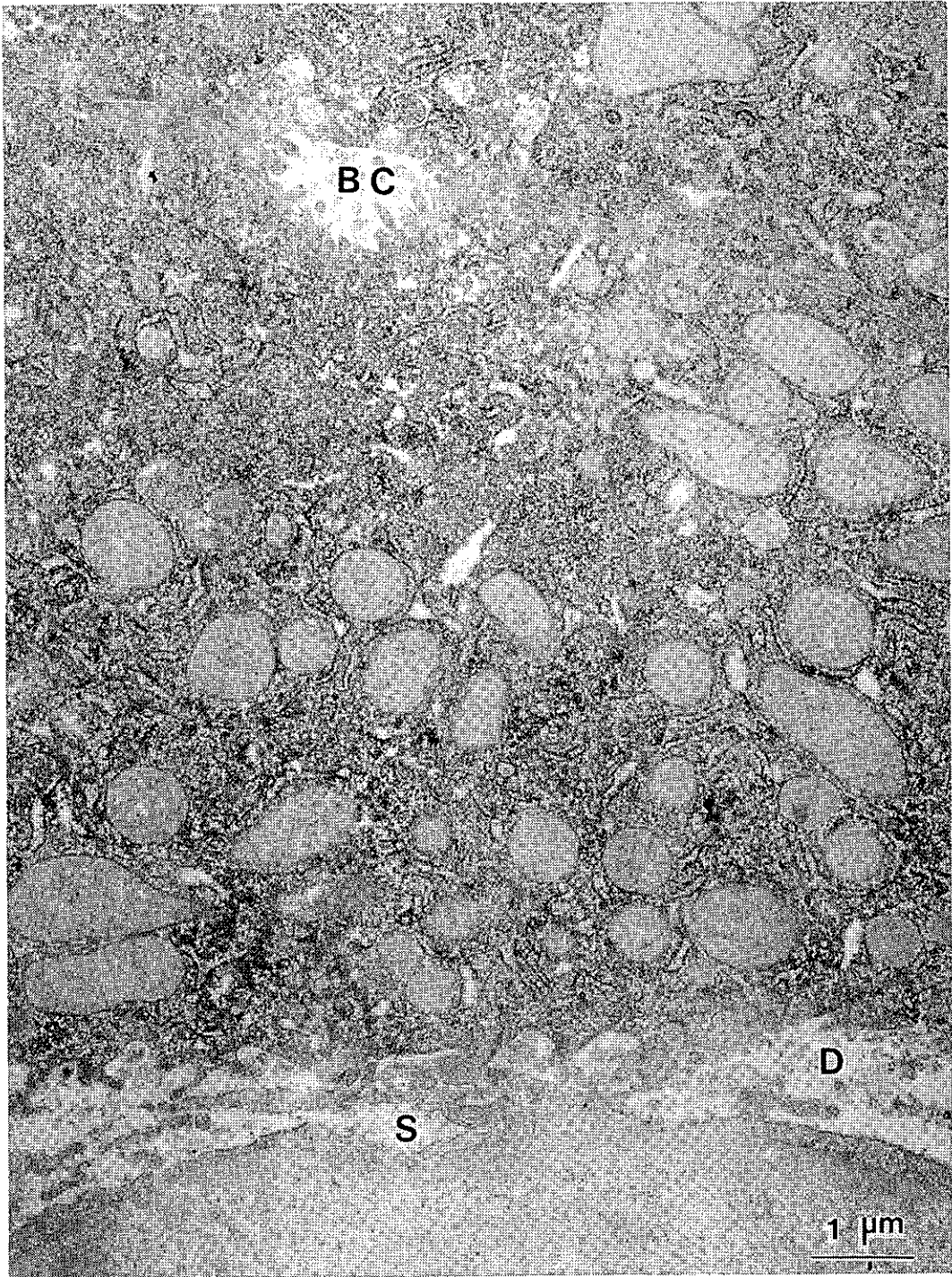


写真4 肝細胞中のGSH-POの局在

BC : 毛細胆管 S : 類洞 D : Disse 洞

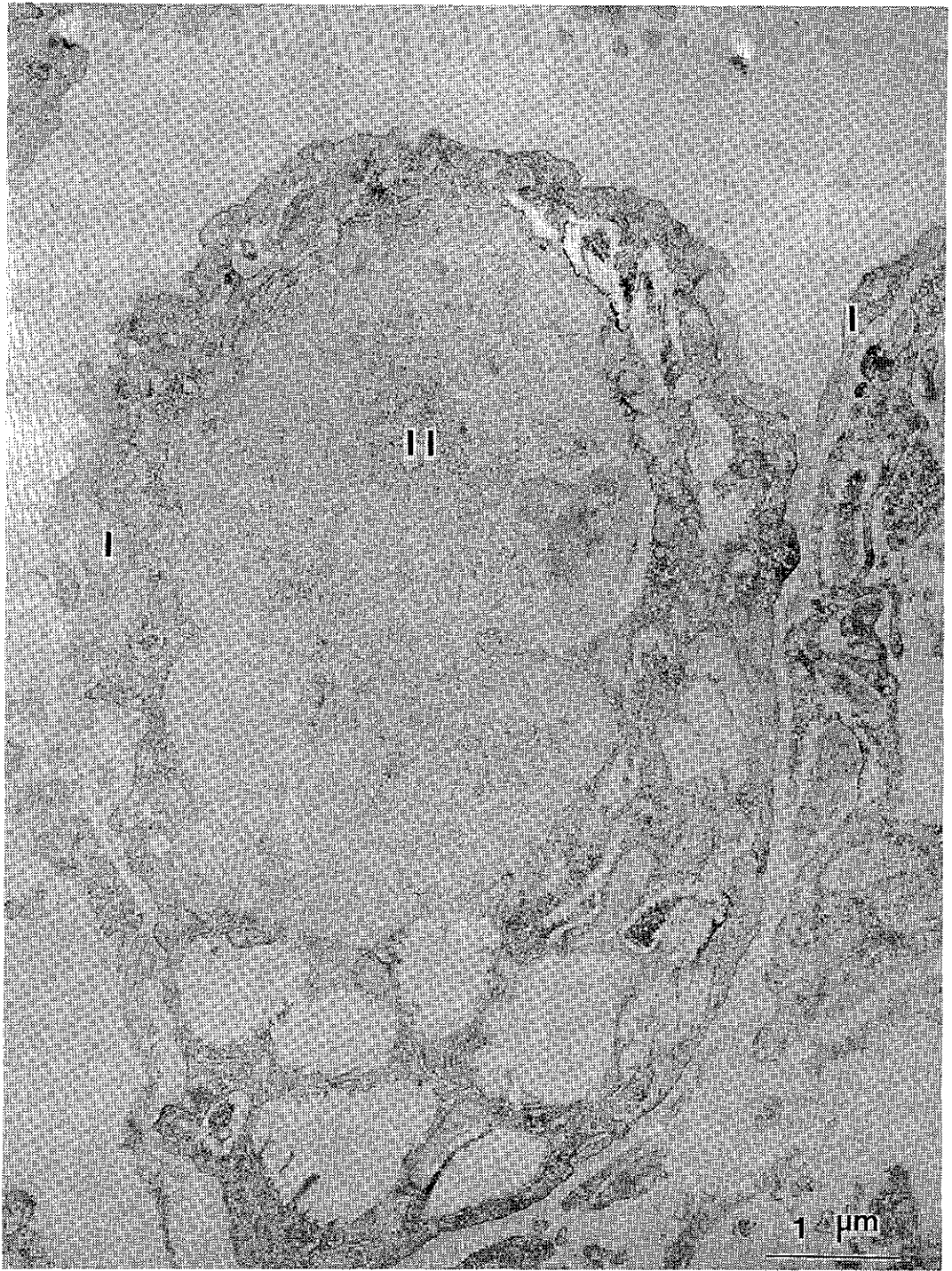


写真5 無処置肺におけるGSH-POの局在

I : I型肺胞上皮細胞 II : II型肺胞上皮細胞



写真6 無処置肺におけるGSH-POの局在

I : I型肺胞上皮細胞 II : II型肺胞上皮細胞 E : 肺胞手細血管内皮細胞

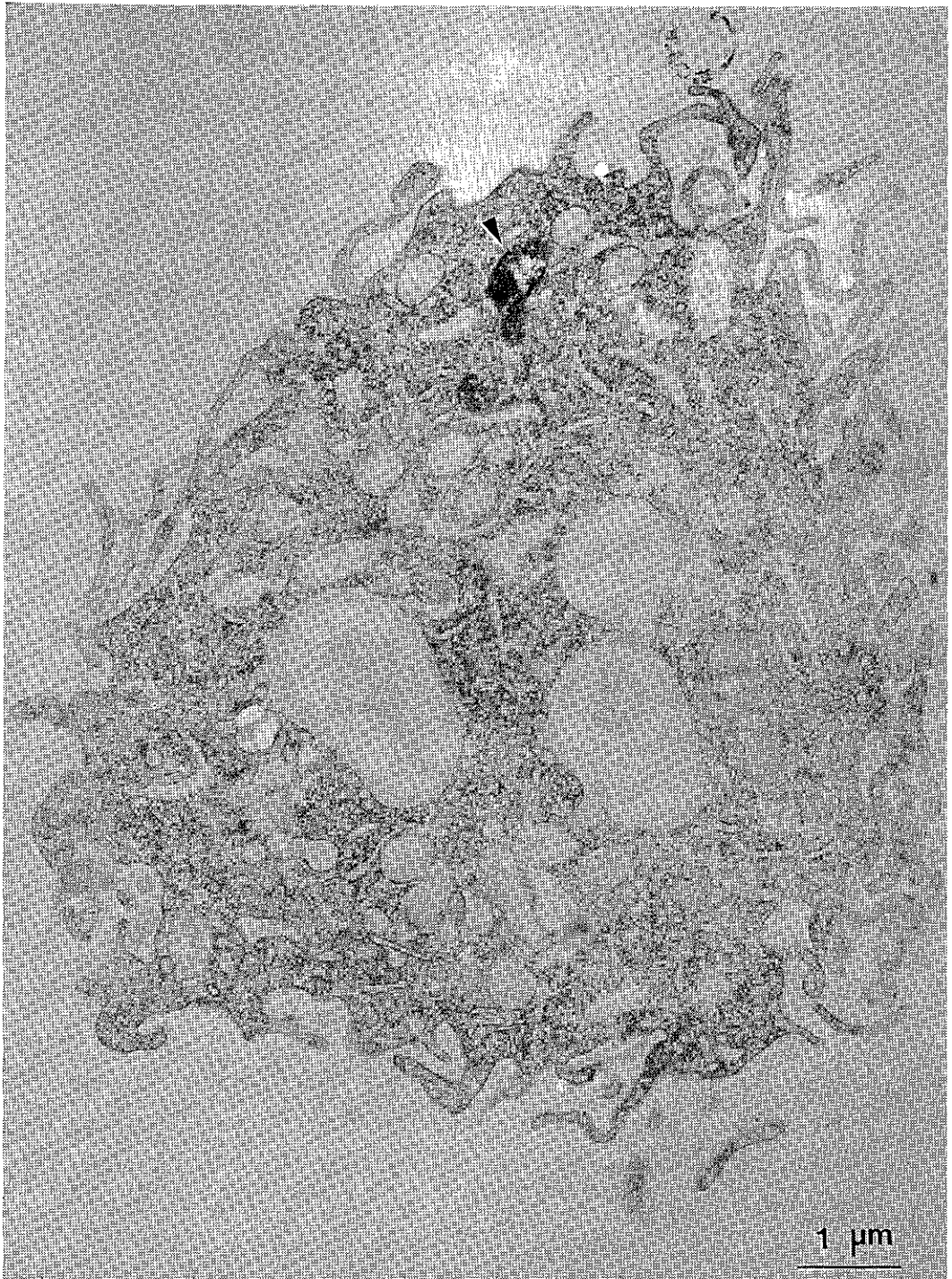


写真7 無処置肺の肺胞マクロファージにおけるGSH-POの局在

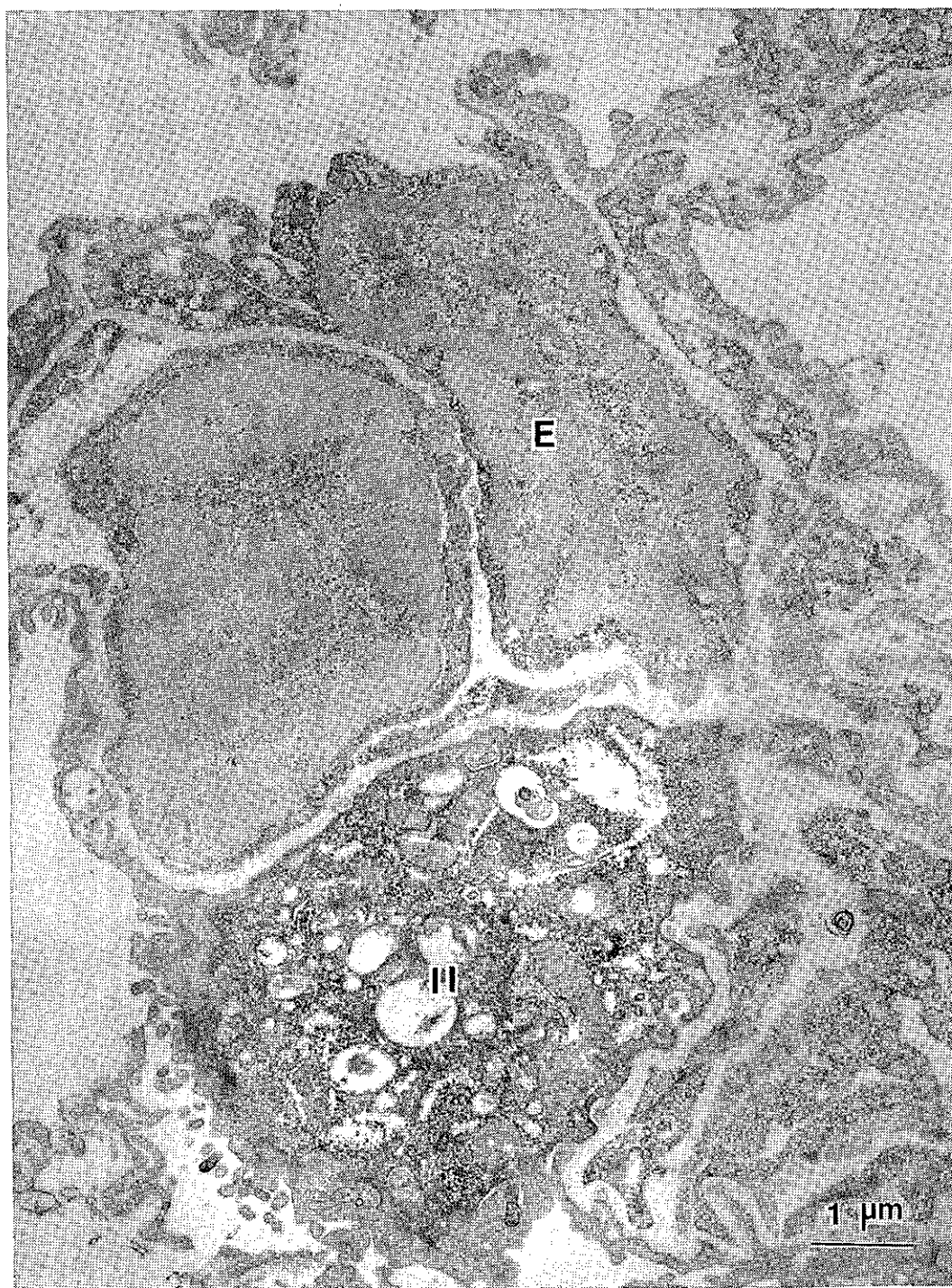


写真8 0.06 ppm O₃ 曝露11ヶ月の肺におけるGSH-POの局在

II : II型肺胞上皮細胞 E : 肺胞毛細血管内皮細胞