

NO₂, SO₂混合暴露による有害性の検討

川井利雄 遠藤立一 大山謙一
 仲真晶子 京田三恵 佐々木裕子
 川原浩 小松遵至 渡辺慶一
 (東海大学) (東海大学)

1 はじめに

大気汚染物質の生体影響の研究において、汚染物質単体について研究を進めてきたが、より都市域の実態に近づける意味で汚染物質の混合暴露実験を60年度より開始した。当初2年はNO₂, O₃, 62年度よりNO₂, SO₂の混合暴露の研究に移った。今回の報告は、62, 63年度の検討を、取りまとめたものである。

2 実験の方法

(1) 暴露物質及び暴露条件

暴露物質は、NO₂, SO₂であり、濃度は62年度NO₂ 0.5 ppm, SO₂ 0.1 ppm, 63年度NO₂ 0.1 ppm, SO₂ 0.06 ppmとした。暴露濃度の設定は、NO₂, SO₂それぞれ単独に濃度設定を行い、その後、設定量を混合してチャンバ内に導入した。濃度モニターは、NDIR式濃度計(富士電機製)を用いた。

暴露装置は、1981年年報で報告したものと同様で各種エアフィルターを用い、粉じん、有害ガス、細菌等を含まない空気を供給し、温度、湿度、換気回数を一定になるように制御して実験を行った。

(2) 供試動物及び暴露期間

実験に用いた動物は、いずれも、2ヶ月齢、日本白色種の清浄家兎で、すべて雄を用いた。1群6羽、合計72羽を暴露群、対照群に分け、3日、1週、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1ヶ年の期間、それぞれ、連続暴露を行った。

(表1参照)

(3) 検討方法

検討方法は、光学及び電子顕微鏡(走査型・SEM、透過型・TEM)による組織形態学、免疫細胞化学を主とする病理学的方法と血清、組織中の過酸化脂質量、各種酵素活性の変動を検索する生化学的方法を用いた。

(4) 採材

表1 暴露期間及び動物数

		暴 露 期 間						計
		3日	1週	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	1ヶ年	
昭和62年度	暴露群	6	6	6	6	6	6	36
	対照群	6	6	6	6	6	6	36
	計	12	12	12	12	12	12	72
昭和63年度	暴露群	6	6	6	6	6	6	36
	対照群	6	6	6	6	6	6	36
	計	12	12	12	12	12	12	72

各期間暴露終了後、動物をペントバルビタール麻酔下で開腹、後大静脈から採血後、生理食塩水で灌流放血し、主要臓器及びリンパ系を剔出、重量測定の後、目的に応じて分割し、処理を行った。

3 病理学的検討

(1) 光学顕微鏡による観察

ア 検討方法

常法に従い、H・E染色また、PAS染色、AZAN染色を行い鏡検に供した。対象臓器は、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、心臓及び呼吸器系の肺臓、鼻粘膜、喉頭、気管、気管支であった。

イ 結果

全臓器中病変が見出されたのは、呼吸器系(鼻、気管、気管支、肺臓)のみであった。そこで、呼吸器系の変化のみを記載する。

62年度暴露群に認められた主な変化は、気管支及び葉気管支と、終末細気管支上皮細胞の線毛の減少、消失ならびに無線毛細胞の増加であり、この変化は、3日暴露から始まり、1, 3ヶ月で最も強く、6ヶ月、1ヶ年群では、希になっている。対照群(清浄空気飼育群)では

これらの所見は観察されなかった。

63年度については、暴露群、対照群の間に有意な差は認められなかった。

(2) 電子顕微鏡による観察

ア 検討方法

電子顕微鏡の観察に用いた家兎は、暴露群、対照群とも1群6羽中4羽で、2年度分で96羽であった。検討した臓器は、TEMで鼻粘膜、扁桃、喉頭、肺臓、気管で、SEMでは、鼻粘膜、扁桃、喉頭、気管であった。

各臓器は、冷2%グルタルアルデヒド溶液中で、3時間浸潤固定を行った後、前報と同様の方法で試料とし観察に供した。

イ 結果

62年度の結果について述べると、TEMにおいては、肺胞領域での変化はほとんど認められなかったが、SEMにおいて主に気管で、3日暴露群以降線毛細胞を中心とする変化が見られた。

気管で、3日暴露群で無線毛細胞（微絨毛、あるいは顆粒状微小突起を有する細胞）が増加し、1週暴露群では全例に無線毛細胞の挙上（無線毛細胞が腔内へ、せり上がるように突出する像）、膨隆現象が観察され、1、3ヶ月暴露群ではこれらの変化にあわせて、線毛の短縮、消失が広範囲に観察された。

しかしながら、6ヶ月、1ヶ年暴露群では、変化は希なものとなっている。

また、葉気管支及び細気管支においても、同様の変化が見出された。この所見は光学顕微鏡による観察とも一致している。

63年度実験群においては、62年度に比べ更に変化は、軽微なものとなっている。しかし、終末細気管支ないし呼吸細気管支では、暴露3日群ですでに、線毛細胞の線毛の短小化、脱落、無線毛細胞化とそれに伴う細胞頂部の挙上、突出、その結果としての“クララ細胞（無線毛で内腔へ膨隆し、ある種の分泌をいとなむとみられる細胞）”化が認められた。また、これらの変化は、1ヶ月暴露群では、更に、強調されていた。また、同様な変化は6ヶ月、1年暴露群でも認められた。

以上のように、62年度の変化は、3日、1週、1ヶ月で線毛の消失に基づく、無線毛細胞のかなり顕著な増加が認められるが、3ヶ月以降では軽減していた。これに対し、63年度では、全体的変化はかなり軽度になったが、

3ヶ月以降でも、病変が持続していた。

(3) 免疫組織化学的検討

ア 検討方法

免疫組織化学による細胞、組織の観察は、呼吸器上皮系（主に、気管、気管支、細気管支、肺胞の各上皮）のグルタチオンペルオキシダーゼ（GSH-PO）の局在及びチュプリンの重合と脱重合が、暴露とどのように対応しているかを、光学顕微鏡、電子顕微鏡を併用して行った。

各臓器は、4%PLP（過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデヒド）溶液中に浸漬固定した後、6 μ の凍結切片とした。酵素抗体法染色反応は、抗ウサギGSH-PO、抗 α -チュプリンのIgGにホースラディッシュペルオキシダーゼを標識したものをを用いた。反応停止後4%パラホルムアルデヒドで再固定し、標識酵素の組織化学的発色（Graham-Karnovsky法）を行った。

TEM観察は、2%四酸化オスmium溶液で固定後、エポキシ樹脂に包埋し超薄切片を作製し観察に供した。

イ 結果（写真参照）

62年度の結果については、1、3ヶ月暴露群で終末細気管支の線毛上皮中 α -チュプリン染色性の減弱と、マイクロチュブルの減少が観察された。これらの変化は、6ヶ月、1ヶ年暴露群にも見出せた。

マイクロチュブルの減少した細気管支腔内に挙上した細胞（形態学的観察の項参照）中では、GSH-POの増加が示され、特に、1、3ヶ月暴露群で有意であるが、6ヶ月暴露群にも同様の変化は持続していた。

肺胞領域におけるGSH-POの局在観察においては、1週暴露群よりGSH-PO染色性の強いI型II型上皮細胞の中間型の細胞の増加が観察され、特記すべき変化としては、II型上皮細胞のミトコンドリア内での、GSH-PO局在が認められたことである。

63年度については、終末細気管支上皮において、 α -チュプリン陰性の“クララ細胞”様細胞が、3日暴露群以降3ヶ月暴露群まで漸増する形で増加していた。この変化は、6ヶ月まで続いたが、1年ではやや軽微となっていた。

TEMによる観察では、通常、線毛細胞の細胞質中にびまん性に存在し、かつ、マイクロチュブルに濃縮して存在する α -チュプリンが、暴露により、細胞中で減少するだけでなく、粒状ないし棍棒状に凝縮する形で局

在するようになった。このような変化は、主として線毛の脱落、減少した線毛細胞に見られ、無線毛化し、更に細胞の頂部が腔内に突出し、クララ細胞様となったものではこの傾向はより強かった。

GSH-POの局在については、線毛の脱落、減少した線毛細胞中に強い染色性を認め、かつ、クララ細胞様の細胞中の突出した部分にも局在が認められた。これらの変化は、3ヶ月暴露群まで漸増し、1年まで続いた。

肺泡領域でのⅡ型上皮細胞ミトコンドリア内での、GSH-POの局在については、62年度と異なり、6ヶ月暴露群で1例に見られたのみであった。

(4) 考察

細胞骨格 (cytoskeleton) のひとつであるマイクロチューブル (微小管) は、細胞の骨格、形態を保持し、高等動物の細胞においては、膜タンパク、分泌タンパクの細胞内輸送の方向付け (orientation) とその援助をしている。

また、気道系の上皮や卵管の上皮細胞のように線毛を有する細胞では、集合してその線毛を形成していること、また、このマイクロチューブルは、細胞質内でチューブリンが重合して形成されていることは衆知の事実である。したがって、正常の細気管支上皮の大部分をしめる線毛上皮細胞では、写真1が示すように大量の α -チューブリン局在が、線毛の部分のみならず、細胞質中にも認められる。

これら α -チューブリンの免疫染色は比較的低濃度のNO₂ (0.1-0.5ppm)、SO₂ (0.06-0.1ppm) の暴露により、かなり顕著に減少し、また同時に、これらの細胞では線毛の短小化ないし減少、消失、さらに円蓋状の細胞質頂部の細気管支腔内への突出 (クララ細胞化) が確認された (写真2, 4)。この線毛の変化と、細胞頂部の突出、挙上現象は、走査電顕の観察によっても認められた (写真12, 13, 14)。

以上の観察から、NO₂、SO₂の暴露により、チューブリンのマイクロチューブルへの重合が阻害されること。その結果として、線毛の形成不全、消失がもたらされ、さらに、細胞の骨格、形態維持も損なわれ、細胞の自由表面 (細気管支腔に面した表面) への突出 (走査電顕による表面の立体観察では、細胞頂部の挙上現象) となって現れたものと理解される。

この重合阻害について考えてみると、非暴露対照群の

家兎の細気管支上皮では、ほとんどの細胞が比較的微弱でびまん性のGSH-PO免疫染色性を示すにすぎないのに対して (写真5, 7)、NO₂、SO₂暴露によって増加した無線毛の“クララ細胞”様細胞 (腔内に突出した細胞) の細胞質には顕著なGSH-POの免疫染色性の増強が認められた (写真6, 8)。ラットの肝細胞やマクロファージでは、これらの細胞に脂質過酸化の増強がもたらされると、それを除去する作用を持つGSH-POの合成が促進されることが証明されており、この事実を考慮に入れると、NO₂、SO₂暴露により細気管支上皮の線毛細胞では、その細胞膜や小胞体の膜を中心としてラジカル発生から、それに次ぎ脂質過酸化の増強が起こっていることが想定される。事実、家兎肺でも、O₃や⁴⁾NO₂、⁵⁾SO₂暴露などで過酸化脂質 (TBA値) の増量が認められている。

こうして膜に発生した脂質過酸化は、ligand-gate channelによって行われるCa²⁺イオンの細胞内流入の調節を阻害し、Ca²⁺イオンの流入を促進し、その結果細胞内で濃度を増したCa²⁺イオンによりマイクロチューブルの重合阻害が起こることが想定される。本実験で観察された同一細胞 (“クララ細胞”様細胞) におけるGSH-POの増強と、 α -チューブリンのマイクロチューブルへの重合低下は上記の想定を正当づける事実と思われる。

以上の変化は、NO₂、SO₂暴露の濃度を下げることによって、やや軽微になった (主として、この様な変化を起こす細気管支上皮細胞の数、頻度の減少) ことから、用量依存性があることがほぼ、証明されたものと思われる。また、暴露期間を6ヶ月、1ケ年と長期にすることによって、上記の変化が逆に軽微になったことは、本実験のような低濃度の暴露では、その初期に変化の根元をなす細気管支上皮細胞に、脂質過酸化の防御系として重要な意義を持つGSH-POが増強することにより、防御系の強化がもたらされたためと考えられる。

NO₂、SO₂暴露による気道系上皮細胞における線毛の短小化、消失は、本実験に用いられたSPF (Specific Pathogen Free) の条件のように、清浄な空気の下では細菌感染などの心配は、まず無いものと考えられるが、通常では、これらの変化がもたらす感染抵抗能力の低下は大きな問題となろう。

肺泡領域の変化について考えると、過酸化脂質の生体内スカベンジャーであるGSH-POは、I及びⅡ型肺泡

上皮細胞、肺胞毛細血管内皮細胞、隔壁細胞のいずれにも、弱いし中程度のGSH-PO免疫染色性が示されたが、暴露によりもっとも直接的な作用をうけるI、II型肺胞上皮細胞に、もっとも強い傷害性影響が認められ、濃度の高い場合には、GSH-PO免疫染色性が一段と強化されたI、II型の中間型の細胞の増加が観察された(写真10)。したがって、この肺胞領域でも、NO₂、SO₂暴露により、ラジカル発生、脂質過酸化増強というような細胞傷害性の変化が認められたものと考えられる。

ことに、特色ある変化として、暴露濃度の高い場合にはII型肺胞上皮細胞に初期(1週間)から、そのミトコンドリア内GSH-PO局在を認めるようになったことである(写真11)。ラット肺におけるパラコートの急性毒性実験で、Hiraiらは、II型肺胞上皮細胞のミトコンドリアにまず超微形態学的変化が出現すると報告している⁸⁾、また、我々が行った同様の実験でも、ミトコンドリア内にGSH-PO局在が出現することが確認されている⁹⁾。ミトコンドリア内へのGSH-PO出現は、4-APP(amino-pyrazolopyrimidine)を投与したラット肺細胞や、阻血-再疎通をほどこした心筋細胞、アドリアマイシン(ラジカル、脂質過酸化をもたらす)急性毒性を示す心筋細胞でも認められており、ミトコンドリアにおいて、脂質過酸化増強を来しているものと考えられる。

4 生化学的検討

(1) 方法

検討を行ったのは、血清と、臓器では、肺臓、肝臓で、採材部位は肺臓で左肺の後葉、肝臓は辺縁の部分を用いた。

肺臓、肝臓については、50mMリン酸緩衝液(pH7.0、含5mMEDTA)を用い20%ホモジネートとなるようにポッター型ホモジナイザーで調製し、過酸化脂質量、非タンパク性SH測定用としてはそのまま、酵素活性測定用としては、4℃、9,000×gで30分遠心し上清を試料とした。

検討した項目は、血清、肺臓、肝臓についてTBA法による過酸化脂質量(TBA値)、過酸化水素を基質とするGSH-PO活性、肺臓、肝臓においては、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)活性、マレートデヒドロゲナーゼ(Malic enzyme: ME)活性、非タンパク性SH(NPSH)量及び、GSH-POの補完的役割をする

とされている、セレンを含有しない、過酸化クメンを基質とするGSH-PO活性(GSH-PO-C)について測定を行った。

それぞれの測定は、順に、Ohkawa¹²⁾、Paglia¹³⁾、Kornberg¹⁴⁾、Ochoa¹⁵⁾、Sedlak¹⁶⁾の方法によった。なお、TBA値については、1、1、3、3、一テトラエトキシプロパンを標準として、NPSH量は、すべてを還元型グルタチオン(GSH)として算出した。

(2) 結果(図1, 2参照)

62年度の結果について述べると、血清については、対照群と暴露群との差は認められなかった。過酸化脂質量については、6ヶ月暴露群の肺で高い値を示したが、個体差が大きかった。また、肝臓では、3日暴露群で低い値を示した。

各防御系酵素の変動を見ると、肝臓で、GSH-PO活性が暴露3日でやや低下して、1カ月、3ヶ月でもとのレベルに戻り、6ヶ月で有意に低下するが、1年暴露群でまた、対照群と同レベルに戻る変化を示した。

これに先だち、NADPH⁺産生系酵素のG6PD、MEが、3日で上昇を始め、1週でかなり高い値を示し、1ヶ月、3ヶ月で低下し、6ヶ月で少し上昇するが、1年暴露群で対照と同じレベルになる変化を示した。

肝NPSH量については、上記のG6PD、ME活性と連関して1週目で高い値を示し、1、3ヶ月で低くなり1年暴露群で有意に低下した。

肺については、ME活性が、暴露3ヶ月、6ヶ月で低い値を示したが、他の酵素活性は、対照群とほとんど同じレベルであった。

肺NPSH量は、1週目で暴露群がやや高い値を示したが、他の期間については対照群との差は見られなかった。

63年度についての結果は、血清については、差は見られなかった。

過酸化脂質量については、肝臓で1週暴露群で有意に高い値を示した。

各酵素については、肺で、3日暴露群で低い値を示し、以降対照群との有意な差は見られなかった。

肝臓では、各防御系酵素が3日で低下し、1週で上昇、6ヶ月でGSH-PO、GSH-PO-C共やや高く、G6PD、MEが、低い傾向で、1年で共に低下する傾向が見られた。

肺NPSH量は、3日暴露群で有意に低く、1週で高く

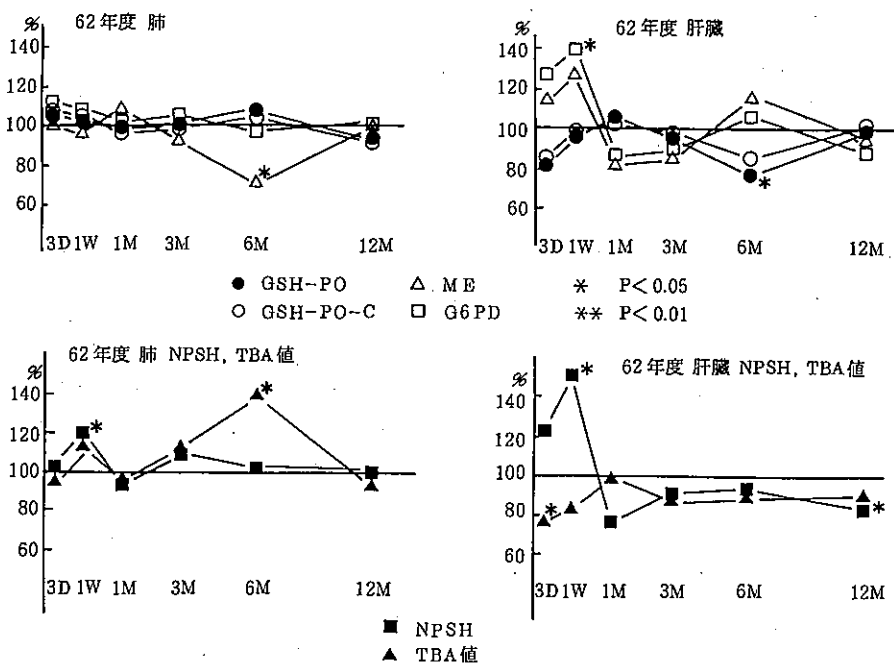


図1 62年度結果

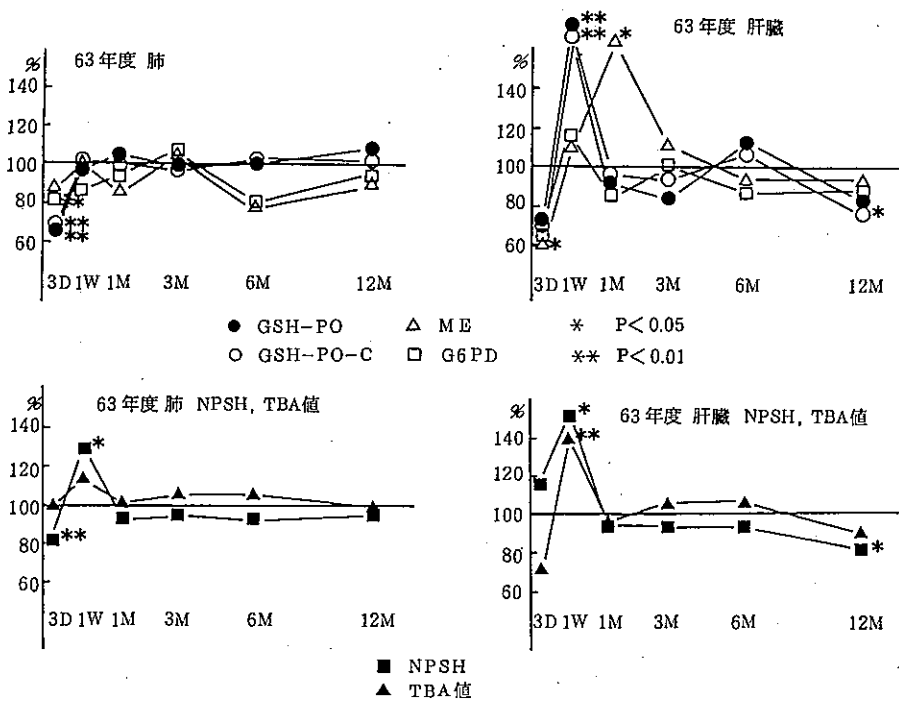


図2 63年度結果

なり、以降対照群と同様の値を示した。肝臓では、1週暴露群で、高い値を示し、以降は対照と同じレベルで、1年暴露群で、有意に低い値を示した。

*ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソ酸還元型

(3) 考察

NO₂、SO₂は共に、酸化性のガスと考えられ、生体内の還元ポテンシャルを下げるとされている。我々は、特に、脂質過酸化の面からその影響を検討してきた。これら酸化性のガスは、生体膜の不飽和脂肪酸の二重結合を攻撃し、細胞に傷害を与えるとされている。しかし、その傷害から生体を防御する酵素系があり、特に、過酸化脂質を直接代謝して無害化する酵素としてGSH-POが知られている。¹⁷⁾

また、GSH-POにH⁺を供給する系としては、NADPH産生系としてのG6PD、MEがあげられる。

今回の結果から、これらの酵素系の変動を見ると、暴露初期(1週目)において、肺のTBA値の上昇に伴って、特に、肝臓においてG6PD、ME活性の上昇が見られた。またこれに引続くように、GSH-PO、GSH-PO-C活性の上昇傾向がみられた。

これに対し、肺においては、ほとんどこれらの酵素系の変動は見られなかった。しかしながら、NPSH量が高い値を示しており、過酸化のストレスに対して、肺を防御する反応と考えられる。

暴露後期を見ると、G6PD、ME活性について若干の変動はあるものの、1ケ年で対照群と同レベルとなっている。しかし、この時の肝NPSH量を見ると、対照に比して有意に低い値を示した。特に、63年度の結果では、GSH-PO-C活性も有意(p<0.05)に低い値となり、防御能力の低下を示唆している。これは、NO₂、O₃の交互暴露実験で得られた結果と同様であり、過酸化の高進を示すものと考えられる。¹⁸⁾

ここで、GSH-PO-Cを見ると、GSH-POと全く同じ動きをしており、差は認められなかった。これは、飼料中のセレン含有量が十分であったため、セレンを活性中心に持つGSH-POの合成が、制約されなかったためとも考えられる。¹⁹⁾

以上より、全体として肺については、低濃度の暴露では、ガスによる酸化的ストレスに対して、ある程度の防御能力が維持されていると考えられるが、肝臓について見

ると、暴露直後、過酸化の状態が現れ、これを修復する方向でNADPH産生系の酵素活性が高まり、引続いてGSH-PO活性が上昇したと考えられる。やがて、これら防御因子も暴露が長期に及ぶと、活性低下を示す傾向が認められた。特に、GSHは、その主要なプールが、肝臓であり、GSHの構成成分であるシステインもほとんどが、肝臓で合成される。また、Dausonらは、血しょうから肺への、GSHの取込を示唆している。²⁰⁾ これらからも、肺の防御能力が、全体的なかかわりの中で機能していることが強く示唆される。

このことを考えると肺も、更に長期の暴露を受ければ、いずれ、不可逆的な傷害が起こることも予想される。

5 ま と め

(1) 病理学的検討において、細気管支上皮で線毛上皮細胞の線毛の短小化、消失また、クララ細胞様細胞の増加が認められた。

(2) 上記の変化を来した細胞中では、チュブリンの重合阻害、GSH-POの局在の増強が認められた。

(3) 肺胞領域でのI、II型肺胞上皮細胞の中間型細胞の増加、及びミトコンドリア内のGSH-POの増強が観察された。

(4) 細気管支の線毛上皮細胞の消失から、異物排除能の低下が示唆された。

(5) 生化学的検討において、初期の脂質過酸化に対する防御因子の増強と、長期の暴露による防御能力の低下傾向が認められた。

以上、2年度にわたりNO₂、SO₂の混合暴露による有害性の検討を行ってきたが、汚染物質の混合という観点から見ると、確実に言えることは、その影響は、汚染物質単体による暴露の影響の相加的なものであった、ということである。しかしながら、現実の大気汚染状況は、多種汚染物質が共存する状態であり、今後、さらに、このような観点で検討を加えてゆく必要がある。

本研究において、長期にわたり、実験動物の飼育管理を担当していただいた岡アニマル・ケアの山元達哉氏に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 遠藤立一他：低濃度O₃暴露による有害性の検討—家兎の0.08ppmオゾン暴露実験第1報—, 東京都公害研究所年報, 245, (1981).
- 2) 渡辺慶一：脂質過酸化と細胞傷害：その調節機構としてのグルタチオンペルオキシダーゼの意義, 日病会誌, 76, 39, (1986).
- 3) Watanabe, K. and M. Murakoshi : Lipid Peroxidation and Arachidonate Cascade in Macrophages with a special reference to the Changes of Glutathione Peroxidase, Lipid Peroxide Scavenger, Tokai J. Exp. Clin. Med., 11, 105, (1986).
- 4) 遠藤立一他：低濃度O₃暴露による有害性の検討—家兎の0.08ppmオゾン暴露実験 第3報—, 東京都公害研究所年報1983, 253, (1983).
- 5) 川井利雄他：NO₂, SO₂混合暴露による有害性の検討—家兎のNO₂0.5ppm, SO₂0.1ppm混合暴露実験—, 東京都環境科学研究所年報1989, 231, (1989).
- 6) Kretsinger R. H. : Mechanisms of Selective Signaling by Calcium, Neurosci. Res. Program Bull., 19, 213, (1981).
- 7) Schliwa, M. et al : Calcium Lability of Cytoplasmic Microtubules and its Modulation by Microtubule-associated Proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1037, (1981).
- 8) Hirai K. et al : Mitochondrial Injury of Pulmonary Alveolar Epithelial Cells in Acute Paraquat Intoxication, Exp. Mol. Pathol., 43, 242, (1985).
- 9) 小松遵至, 渡辺慶一 : 未発表データ
- 10) 小松遵至, 渡辺慶一 : 未発表データ
- 11) 渡辺慶一, 覚道健一他 : 未発表データ
- 12) Ohkawa, H. et al. : Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbitric acid reaction, Anal. Chem., 95, 351, (1979).
- 13) Paglia, D.E. and W.N. Valentine, : Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, J. Lab. and Clin. Med., 70, 158, (1967).
- 14) Kornberg, A. et al : Methods in Enzymology I, Academic Press, N. Y., (1955).
- 15) Ochoa, S. : "Malic Enzyme" Methods in Enzymology Ed. by S.P. Colowich and N.O. Kaplan, Academic Press, N. Y., (1955).
- 16) Sedlak, J. and R.H. Lindsay : Estimation of Total Protein-bound and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Elleman's Reagent, Anal. Biochem., 25, 192, (1968).
- 17) Chow, C.K. and A.L. Tappel : An Enzymatic Protective Mechanism against Lipid Peroxidation Damage to Lungs of Ozone-Exposed Rats, Lipids, 7(8), 518, (1972).
- 18) 川井利雄他：NO₂, O₃交互暴露による有害性の検討—家兎のNO₂0.06ppm, O₃0.06ppm交互暴露実験—, 東京都環境科学研究所年報1988, 181, (1988).
- 19) Lawrence, R. A. and R.S. Burk : Glutathione Peroxidase Activity in Slenium-deficient Rat Liver, Biochem. Biophys. Res. Commun., 71, 952, (1976).
- 20) Dauson, J.R. et al. : Glutathione Conjugation by Isolated Lung Cells and the Isolated, Perfused Lung, Effect of extracellular glutathione, Eur. J. Biochem., 138, 439, (1984).

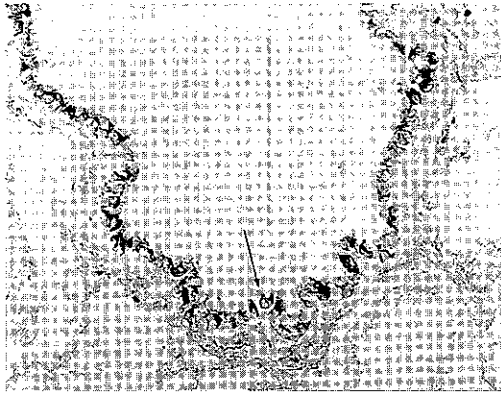


写真1 : 非暴露対照群家兎の終末細気管支上皮における α -tubulinの局在 : 線毛細胞の線毛と細胞質に顕著なその局在を認めるが“クララ細胞”様の細胞(矢印)には、殆どその局在を認めない。(×170)

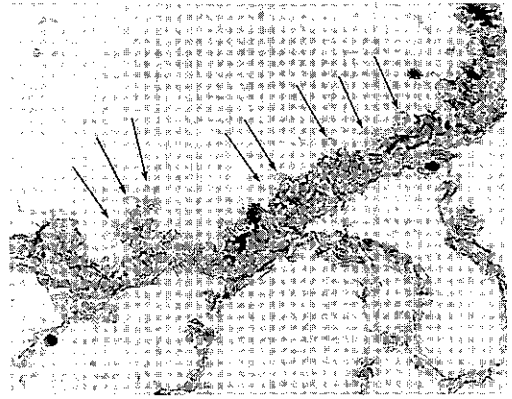


写真2 : NO_2 , SO_2 (0.5, 0.1ppm) 混合暴露1ヶ月の終末細気管支上皮における α -tubulin (α -T)の局在 : 矢印が示すように α -Tの免疫染色性の著しく低下した“クララ細胞”様の細胞が増加している。(×350)



写真3 : 非暴露対照群家兎の終末細気管支上皮細胞における α -tubulin局在を示す免疫電顕像 : 線毛中のmicrotubule(微細管)と細胞質中にrandomな方向を示すmicrotubuleに顕著な局在を示すと共にmicrotubule周囲の細胞質中にもその局在が認められる。

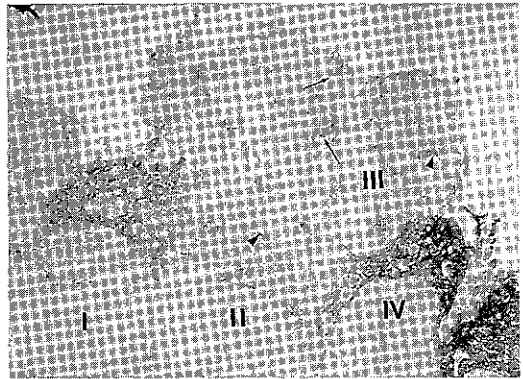


写真4 : NO_2 , SO_2 (0.1, 0.06ppm) 混合暴露3ヶ月の家兎終末細気管支上皮細胞における α -tubulin局在を示す免疫電顕像 : 左右両端の線毛細胞(I, IV)中にはびまん性に強い α -Tの免疫染色を認めるが、中央の“クララ細胞”様細胞(II, III)には、痕跡状の α -Tが散在するに過ぎない。細胞IIには線毛の残存像(矢印)が認められる。(×3,200)

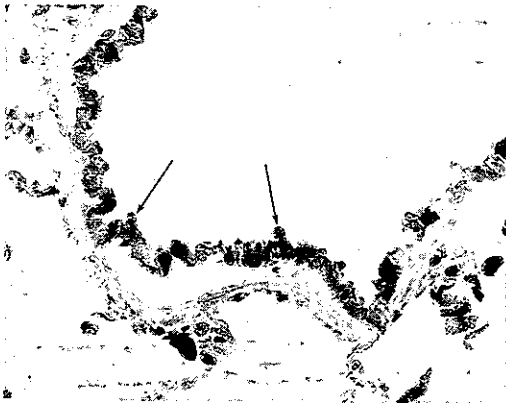


写真5：非暴露対照群家兎の終末細気管支上皮におけるGSH-POの局在：上皮の大部分をしめる絨毛上皮細胞の細胞質にびまん性の比較的弱いGSH-POの免疫染色が認められるが、所々に散見される“クララ細胞”様細胞にはより強い染色が認められる。(×230)

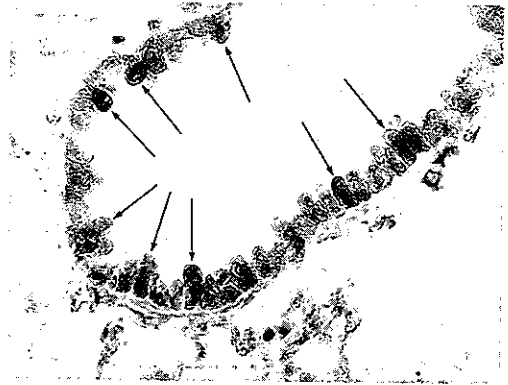


写真6：NO₂, SO₂ (0.5, 0.1ppm) 暴露3ヶ月の家兎終末細気管支上皮におけるGSH-POの局在：写真1で僅かに認められたGSH-POの強い免疫染色を示す“クララ細胞”様細胞が格段と数を増している(矢印)。(×350)

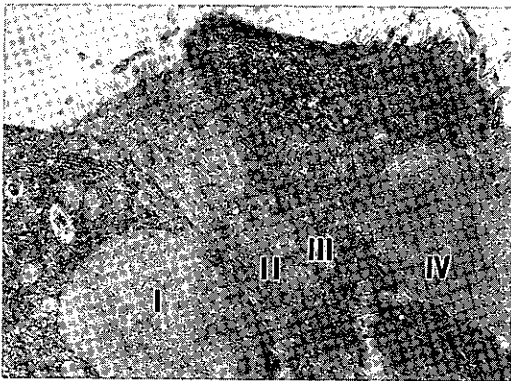


写真7：非暴露対照群家兎の終末細気管支上皮細胞におけるGSH-PO局在の免疫電顕像：絨毛上皮細胞(II, IV)では、細胞質(cytosol)中に微弱なGSH-POの免疫染色が認められるに過ぎないが、無絨毛細胞(I, III)の細胞質(cytosol)にはかなり強い染色が認められる。(×3,600)



写真10：NO₂, SO₂ (0.5, 0.1ppm) 混合暴露1週間の家兎肺胞領域におけるGSH-PO局在の免疫電顕像：I, II型肺胞上皮細胞(I, II), 肺胞毛細血管内皮細胞(E)と非暴露対照群のそれと大差ないが、顕著な相違点はI型とII型肺胞上皮細胞との中間型と思える細胞(IM)がかなり頻繁に出現し、これには強いGSH-POの免疫染色を認める。

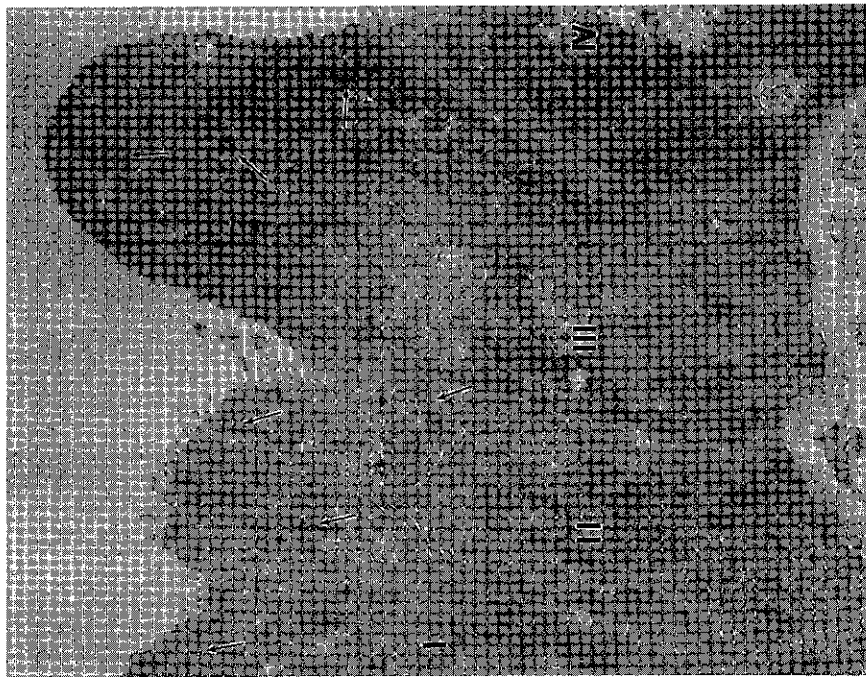


写真8 : NO₂, SO₂ (0.1, 0.06ppm) 混合暴露1年の家兔終末細気管支上皮細胞におけるGSH-PO局在の免疫電顕像 : “クララ細胞”様細胞(III)が増し, これらには強いGSH-POの免疫染色を認める。両隣に見られる線毛細胞(II, IV)では, 線毛の脱落が目立ち, これらの細胞では正常のものよりGSH-POの染色が増強している。矢印はGSH-PO局在(免疫染色陽性)を示す。(×8,600)

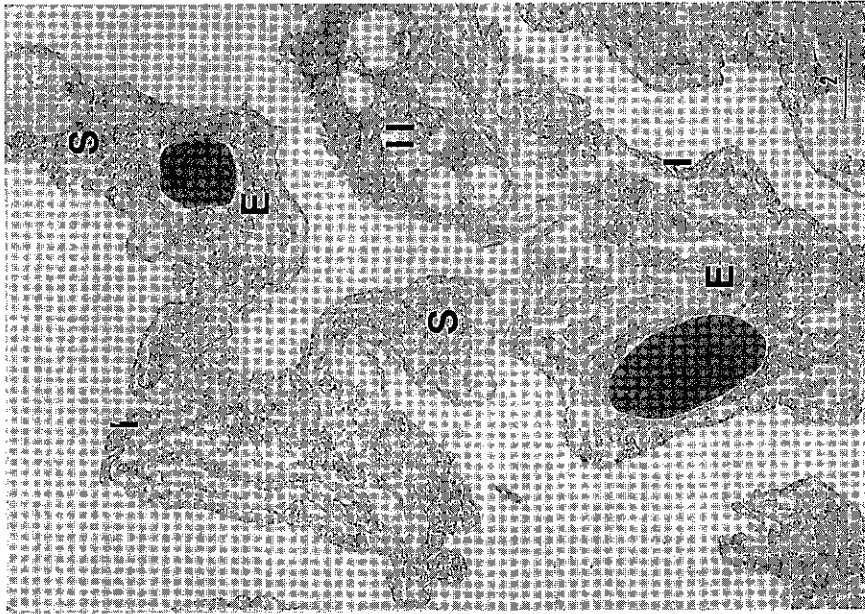


写真9 : 非暴露对照群家兔の肺胞領域におけるGSH-PO局在変化の免疫電顕像 : I型肺上皮細胞(I), II型肺上皮細胞(II), 肺毛細血管内皮細胞(E), 肺泡隔腫細胞(S)の細胞質(cytoplasm)にびまん性と同じ様な強さで免疫染色が認められる。



写真11：写真10と同じくNO₂,SO₂ (0.5, 0.1ppm) 暴露後1週間の家兎肺領域のGSH-POの免疫電顕像：中央のII型肺胞上皮細胞は、そのcytosolのみならずミトコンドリア内部にもGSH-POの局在を認める。



写真12：非暴露対照群家兎の細気管支の走査電顕像 (SEM)：長い線毛を持った線毛上皮細胞の間に、細胞の頂部が円蓋状に挙上した“クララ細胞”様細胞が散見される。

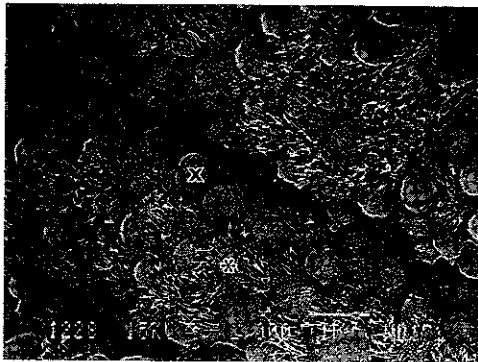


写真13：NO₂, SO₂ (0.1, 0.06ppm) 暴露3日の家兎細気管支のSEM像：線毛が短小化ないし過疎化した細胞 (*印), さらに消失 (×印) した細胞が増加している。



写真14：写真13の強拡大像であり、線毛が短小化したり、過疎化したり、また消失した細胞は、その頂部が円蓋状に挙上しており、“クララ細胞”様となっている。