2. 生 化 学 的 立 場 か ら

*内山 照雄, 石渡 智章

Symposium : Correlation between the Upper and Lower Respiratory Tracts

2. Biochemical Aspects

Teruo Uchiyama, M.D. and Tomoaki Ishiwatari, M.D.

The First Department of Internal Medicine,
Nihon University, School of Medicine, Tokyo

The correlation between the upper and lower airways was investigated from biochemical aspects. The materials used in this study were the nasal septal mucosa of the rabbit as a representative structure of the upper airway (UA) and the tracheal epithelium for the lower airway (LA). The biochemical change and defence mechanism against ozone (O_3) exposure in the two different structures were compared. The results obtained were as follows:

1. The TBA value as an indication of lipid peroxidation decreased in LA, while it stayed unchanged in UA after O_3 exposure of 5~10 ppm.
2. Na-K, ATPase and glucose-6-phosphatase activities in microsomal fraction decreased after O_3 exposure both in UA and LA. These findings indicated the damage in the cell membrane caused by lipid peroxidation.
3. The activities of glutathione peroxidase and glucose-6-phosphatase, both of which metabolize lipid peroxide, remained unchanged in LA, while reduced in UA. Superoxide dismutase activity increased in both UA and LA. These findings would suggest that lipid peroxides were removed enzymatically in LA.

In conclusion, the biochemical defence mechanism against lipid peroxidation was considered to be more prominent in LA.

I. はじめに

呼吸器系は機能の面から気道と気腔に分けられ、気道はさらに上気道と下気道に分けられる。上気道は正常な状態において種々の細菌が存在しているが、下気道は気道の防禦機構により健常例では無菌であることが認められている。呼吸器系の防禦機構は気流による濾過作用と線毛上皮の運動による物理的機構、神経反射

による神経学的機構、マクロファージや分泌型 IgA などを中心とする免疫学的機構などがあるが、生化学的防禦機構についての検討は少ない。本論文では生化学的立場から上気道、下気道の動態を検討するもので、上、下気道の組織の生化学的な差異や刺激に対する反応性の相違について、特に細胞膜を中心に述べる。

細胞の機能が正常に営まれるためには細胞膜が健全でなければならない。細胞膜の障害は生化学的には膜における脂質の過酸化によること

*日本大学医学部第1内科

が一般に認められ、その結果、膜の蛋白質や酵素蛋白の変性を惹起するために細胞の機能が障害されると考えられている。われわれは O_3 曝露により肺組織の過酸化脂質の増加することをすでに認めており、同時にその防禦機構についても検討し発表してきた。

今回は実験動物としてウサギを用い、上気道として鼻中隔粘膜、下気道として気管粘膜上皮細胞を研究対象とした。病的状態として O_3 曝露時の変化を検討して O_3 による反応の上、下気道の相異について健常例と対比するとともに、肺組織での成績とも比較した。

II. 研究方法

まず最初に脂質過酸化の経路について述べる。過酸化脂質は多価不飽和脂肪酸の過酸化により生成される。酸素分子に電子が1つついた superoxide は singlet oxygen, H_2O_2 , OH radical などの活性酸素に変り、これらが不飽和脂肪酸を過酸化し、過酸化脂質が生成される。細胞膜は脂質と蛋白質の二重構造を示しているが、細胞膜の脂質には不飽和脂肪酸が多く含まれており、この過酸化により生成された過酸化脂質は蛋白質を変性させ、細胞膜の構造の変化や機能の障害をきたす。この脂質過酸化反応を抑制する機構として、まず superoxide を分解する superoxide dismutase があり、次に脂質過酸化の抑制剤として vitamin E がある。生成された過酸化脂質は glutathion peroxidase により分解される。今回は鼻中隔粘膜と気管粘膜上皮細胞の過酸化脂質の生成について述べ、その結果生ずる細胞膜の障害を膜に存在する酵素である Na^+-K^+ , ATPase や、glucose-6-phosphatase 活性 (以下 G-6-Pase と略す)、さらに遊出する lysozyme などを指標として検討した。次に脂質過酸化の防禦機構として superoxide dismutase 活性 (以下 SOD と略す)、過酸化脂質の分解に作用する glutathion peroxidase 活性 (以下 GSHpex と略す) および glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性 (以下 G-6-PDH と略す) について順に述べ

図 1

Effect of O_3 exposure on TBA value of septal mucosa, tracheal epithelial cell and lung tissue in rabbits. (N=5)

る。

実験動物は3～4 kgの雄性ウサギを用い、 O_3 曝露には O_3 発生装置 (日本オゾン製 0-1-3 型) を用い、発生する一定量の O_3 を動物を入れたプラスチック容器に連結して、2時間曝露した。ウサギを脱血屠殺後、直ちに肺と気管と鼻中隔粘膜を摘出し、肺組織は生食水で肺動脈より灌流し、血液を十分に除去した後に生食水で homogenate を作成した。気管粘膜上皮細胞は摘出した気管の後壁の正中線に切開を加え、コルク板上にピンで固定し、気管粘膜面を生食水で十分に洗滌し表面を被う分泌液を除去した後に spencer の方法で粘膜上皮を毛筆で剝離して実験に供した。又、剝離した細胞が気管粘膜上皮細胞で、十分に剝離されていることを光顕像ならびに電顕像で確認した。

鼻中隔粘膜は鼻中隔と一緒に取り出し、その粘膜を剝離して使用した。

III. 研究成績

1. O_3 曝露の病理形態学的変化をみると、 O_3 10 ppm 2時間曝露のウサギの気管内面の走査電顕像では、特に線毛上皮の脱落過程が著明で、その脱落部が穴様にみられ、線毛自体は不ぞろいとなり、先端部の細小化および球状膨化を示し、このため微絨毛が著明になる。一方、鼻中隔粘膜の走査電顕像は、 O_3 曝露により中隔の中部では分泌細胞の膨隆および分泌像を認め、中、後部にかけての線毛は不ぞろいと

なり, O_3 の影響は見られるが, 下気道に比べその影響は少ないように思われた。これに対して, O_3 10 ppm 2時間曝露による肺組織の形態学的変化は, 肺は水腫様外観を呈し, 重量を増加し肉眼的肺断面所見上, Jordan I ~ II度の肺水腫を呈し, 組織学的には胞隔炎の像を示した。

2. 過酸化脂質は八木法に準じ, TBA に基づく微量蛍光法により測定した (図1)。 O_3 10 ppm, 2時間曝露群で非曝露対照群に比較して鼻中隔粘膜即ち上気道では, 過酸化脂質にはほとんど変動はみられなかったが, これに対して, 気管粘膜上皮細胞即ち上気道では 76.8 % と減少した。又, 肺組織では 120 % と増加した。即ち, 上気道・下気道での過酸化脂質量の差異を認めた。 O_3 曝露により上・下気道は異なった反応を示したため, 次に両気道の in vitro における脂質過酸化反応を検討した。

脂質はアスコルビン酸あるいは鉄イオンにより非酵素的に過酸化を受けるため, アスコルビン酸, 鉄イオンを加えて 30 分間 incubate 後, 過酸化脂質を測定した。その結果, いずれも in vitro における過酸化脂質の増加が認められ, 上, 下気道ともに脂質は過酸化をうけることを確認した。 O_3 による過酸化脂質の変動の相異は, 気道壁における過酸化脂質の生成と分解の機構の差によるものと考えられ, この点については後述する。

3. 脂質過酸化による膜の障害を実証する目的で膜に局在する酵素の変化について検討した。細胞膜の能動輸送を司る Na^+-K^+ , ATPase 活性を検討する目的で total ATPase を中尾らの方法により測定した (図2)。 O_3 曝露により, 特に Na^+-K^+ , ATPase

図 2

Na^+-K^+ , ATPase activity of microsomal fraction of septal mucosa, tracheal epithelial cell and lung tissue in rabbits. (N=5)

図 3

Glutathione peroxidase activity of septal mucosa, tracheal epithelial cell and lung tissue in rabbits. (N=5)

図 4

G-6-PDH activity of microsomal fraction of septa mucosa and tracheal epithelial cell in rabbits. (N=5)

活性の最も高い microsome 分画では, 上気道では 21.4 % から 10.6 % と, 下気道では 22.5 % から 12.3 % と, 肺組織では 26.0 % から 7.2 % と明らかに, Na^+-K^+ , ATPase 活性は低下し, O_3 による上・下気道および肺組織の細胞

膜の障害が十分に示唆された。

膜に局在する G-6-Pase 活性を Bergmeyer の方法で測定した。Microsome 分画に最も多く含まれ、気道粘膜では O_3 曝露により 2.15 から 1.04, 肺組織では 1.29 から 0.79 と O_3 曝露群で低値を示した。このことより O_3 曝露による Na^+-K^+ , ATPase および G-6-Pase 活性の低下は細胞膜の障害を示すものであ

るが、上・下気道での差異はみられなかった。

細胞膜の障害により lysozyme より遊離する lysozyme 活性は 100,000×g 遠沈後の上清分画を用い、micrococcus lysodeikticus を基質として比濁法により測定した。その結果、上・下気道および肺組織ともに曝露により上昇した。これも O_3 による細胞膜の障害を示す所見と考える。

以上のことより O_3 曝露による過酸化脂質の変動の上・下気道の相異は、細胞膜の障害のみでは解明されず、次に上・下気道における過酸化脂質の分解機構について検討した。

4. 過酸化脂質は GSHex により分解され、相当する alcohol になり、更に β -酸化により分解は進み、この際に GSH は酸化され GSSG となり、GSSG は還元されて GSH となるが、この反応には GSH reductase および G-6-PDH が共役的に働いている。そこで次に GSHpex および G-6-PDH 活性について検討した。

GSHpex は cumene peroxide を基質として、Little らの方法により測定した (図3)。 O_3 曝露により上気道では 61.5 から 48.7 と減少するが、下気道では 24.7 から 26.1 とほとんど変化なかった。又、肺組織では 88.0 から 101.2 と増加した。

G-6-PDH 活性 (図4) は、上気道では O_3 曝露により 26.7 から 19.7 と減少するのに対し、下気道では 47.5 から 58.7 と増加した。この2つの成績から下気道では GSHpex および G-6-PDH 活性は保存されているため、過酸化脂質を分解する機構が働いていることを示し、 O_3

図 5

Superoxide dismutase activity of septal mucosa and tracheal epithelial cell in rabbits. (N=5)

曝露後の過酸化脂質の減少が裏づけられる。上気道においては、GSHpex および G-6-PDH 活性がいずれも低下するために、過酸化脂質の分解能は低下し、従って過酸化脂質の減少はおこりにくいと推定される。この両酵素の活性の低下は O_3 曝露による酵素の破壊によるものか、過酸化脂質の分解機構の充進にもとづく消費によるものか、解明を要する問題と思うが今後、更に検討を要する。

5. Superoxide は酸素の活性型で、反応性にとんだ酸素として脂質過酸化機構への関与が最近、明らかにされ、SOD は脂質過酸化を初期の段階で抑制することが知られている。SOD 活性は pyrogallol を基質とする Marklund の方法により測定した。 O_3 曝露により、図5のように上・下気道の SOD 活性の上昇をみたが、これは活性酸素の作用を未然に防ぐことにより、脂質過酸化を抑制する一つの機構であると考ええる。

VI. 総括ならびに結論

O_3 曝露により上気道では過酸化脂質の変化はみられないが、下気道では減少した。これは下気道で GSHpex および G-6-PDH 活性が保存されているために過酸化脂質の分解排除の機構があるのに対して、上気道では GSHpex および G-6-PDH 活性がともに低下するため、過酸化脂質の分解過程が障害をうけているものと考ええる。

刺激性ガスの気道への作用は、水溶性の度合や作用部位により異なる。 O_3 のように水に不

溶性のガスは、気道の深部や肺胞系を障害するが、気道系への影響は少ないと言われていた。われわれの研究でも O_3 曝露による変化は、肺で最も強かったが、上・下気道にも障害を与えることが明らかになり、しかも上気道と下気道の間では生化学的反應の差異がみられ、過酸化脂質の分解に働く酵素は上気道の方が下気道より障害が強く現われていた。

O_3 曝露により肺組織での GSH の減少がみられ、 O_3 の毒性は GSH 投与により阻止された、との報告があり、本研究でも上気道において、おそらく GSH の消費があると推定される。

下気道では GSHpex や G-6-PDH 活性が増えないし、保存されているが、これは下気道の方が O_3 による障害が強いためにその防禦機構が働いているのか、あるいは単に上気道と下気道という部位的な差異によるためなのか、明らかでないが、細胞膜の障害は上・下気道ともに均等にみられ、 O_3 に対する反応性の差異によるものとも考えられる。しかし、形態学的には上・下気道ともに変化がみられ、下気道の方が変化が強い印象から両者への刺激の強さの差異はあるかもしれない。今回の研究のみでは結論は出せないが、今後の検討を要する課題と考える。本シンポジウムのテーマである「上気道と下気道の相関」という面から、本研究を考えると、 O_3 曝露という刺激に対する生化学的反應に差異をみたが、これが本質的な差異であるか、極めて重要な問題である。今後、生化学的検討は気道における防禦機構と関連して追求すべきであり、物理的防禦機構や免疫学的防禦機構と合せて検討しなければならないと考える。

終りに本シンポジウムの機会を与えて下さった武田一雄会長、座長の斉藤英雄教授に感謝いたします。合せて長年にわたって御指導を頂いた恩師、故萩原忠文教授に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 内山照雄：過酸化脂質を中心とした肺の代謝と疾患，日胸疾会誌，15：468，1977.
- 2) Ishiwatari, T.: Studies on biochemical influence of ozone exposure on lung tissue and tracheo-bronchial system. Nihon Univ. J. Med., 18: 169, 1976.
- 3) 森脇紀夫：非呼吸性肺機能に関する研究，とくに O_3 の肺組織 Na-K, ATPase および脂質におよぼす影響について，日胸疾会誌，11：406，1973.
- 4) Tappel, A.L.: Lipid peroxidation damage to cell component. Federation Proceeding, 32: 1870, 1973.
- 5) Bergmeyer, H.U.: Methods of enzymatic analysis. Academic Press Inc. New York, 788, 1963.
- 6) Little, C., Olinescu, R., Reid, K.G. and O' Brein, P.J.: Properties and regulation of glutathione peroxidase. J. Biol. Chem., 245: 3632, 1970.
- 7) Marklund, S. and Marklund, G.: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. J. Biochem., 47: 469, 1974.
- 8) Colowick, S.P. and Kaplan, Eds. N. O.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase from erythrocytes. Methods in Enzymology, Academic press. New York, 9: 126, 1966.
- 9) Spencer, B.: A cytological basis for the biochemical study of bronchial epithelium. J. Histochem. 6: 105, 1958.

(別刷請求：〒173 東京都板橋区大谷口上町 30)
日本大学医学部第 1 内科
内 山 照 雄