

炭末粒子吸入曝露によるマウス肺内 heat shock protein 70 (HSP70) の発現について

宮里 肇

近畿大学医学部第3内科学教室

抄 録

近年、大気汚染物質による慢性閉塞性肺疾患が問題となっている。今回、急性細胞毒性ならびに抗原性がなく、生体に異物として働くと考えられる炭末粒子の肺への影響を検索する目的で、吸入曝露実験を行い形態学的変化と heat shock protein 70 (HSP70) の発現について検討した。実験動物は BALB/c マウス 6 週令を用いた。曝露群は炭末粒子 1 回 5 g を 1 日 2 回、フィルターを通した清浄空気を送り込んだチェンバー内に補給して、1 日 24 時間曝露可能とし、80 日間連続曝露を行った。対照群は清浄空気のみを曝露した。0, 7, 15, 30, 80 日目に動物を麻酔下に解剖し、形態学的変化と HSP70 については免疫染色と western blotting を行った。形態学的には炭末粒子による肺の反応は肺泡マクロファージの増加と II 型肺泡上皮の増生であり、好中球、リンパ球などの炎症細胞、線維芽細胞の反応は見られなかった。HSP70 の発現について、対照群では肺泡マクロファージと気管支上皮に観察され、成長に伴い HSP70 陽性細胞が増加する傾向が見られた。曝露群では対照群と同様 HSP70 の発現は肺泡マクロファージと気管支上皮にみられ、対照群と比べて早期に強い HSP70 の発現が観察された。HSP70 の western blotting による半定量では曝露群は対照群に比べ増加しており、対照群では成長により、発現量の増加をみた。以上の結果より、毒性物でなく単なる異物である炭末粒子曝露によっても、HSP70 の発現が増加することが示された。

Key words : HSP70, lung, carbon particle, inhalation exposure, morphological change, mouse

結 言

近年、大気汚染物質の中でも浮遊粒子状物質の、ヒトにおける慢性閉塞性肺疾患及び発癌への関与が問題となっている。浮遊粒子状物質の肺への影響を動物実験で明らかにするためには、大気中に含まれる粒子を直接動物に全身曝露をおこない、その肺への影響を検討する方法があるが、大気には多種類の粒子が含まれているので、個々の粒子の肺への影響を解明することは出来ない。

本実験では毒性、抗原性がなく、異物として働く粒子が肺にいかなる変化をもたらすかを組織形態的に検索するために炭末粒子曝露を行った。肺内に入った粒子は、最初に気管支上皮細胞に接する。そこで気管支のどの部分の上皮が反応するのか、そしてさらに粒子に曝露される時の heat shock protein (HSP)/stress protein の発現の有無にも注目した。

HSP は種々の細胞に正常状態でも発現し、蛋白合

成に関わっている。細胞が様々な刺激、ストレスを受けた場合も HSP が合成され、細胞の蛋白変性に対し抑制的に働くことによって細胞は環境に適応している。その中でも HSP70 family (HSP70) は最もよく研究されている HSP である¹⁻³。大気汚染物質 (O₃, 粒子) の吸入による細胞レベルのストレス反応として HSP70 を測定した報告があるが⁴⁻⁶、免疫組織学的方法により、どの細胞に発現しているかを検索した報告はない。今回、マウスを用いて炭末粒子の全身曝露による肺への影響を形態学的に検索し、加えて反応した細胞のいずれに HSP の発現が特に起こるのかを免疫組織学的に観察した。またその発現量を western blotting を用いて半定量的に測定した。

材料及び方法

実験動物

実験動物は 6 週齢、雄の BALB/c マウス (日本ク

レア株式会社) 60匹 (20-23 g) を用いて、チェンバー内で粒子曝露を行った。曝露期間は80日間でチェンバー内の湿度 $50 \pm 10\%$ 、温度 $21 \pm 3^\circ\text{C}$ 、昼夜を12時間サイクルの条件下で飼育し、試料は飼育繁殖用固形飼料 (CE-2, 日本クレア株式会社) と水道水を自由摂取させた。

粒子は活性炭粉末 (和光純薬工業株式会社) を用いた。炭末粒子は乾熱滅菌器で 120°C 、30分間、滅菌を行った後、炭末粒子1回5gを1日2回、フィルターを通した清浄空気を送り込んだチェンバー内に補給して、1日24時間曝露可能とし、80日間連続曝露を行った。対照群は清浄空気のみを曝露した。曝露チェンバー内で浮遊する粒子濃度は吸引ポンプ (SIP-32L, 柴田科学器械工業株式会社) とローボリュウムエアースンプラー (L20, 柴田科学器械工業株式会社) を導入して測定した。

曝露後0, 7, 15, 30, 80日目に、組織学的観察用の各群5匹のマウスに pentobarbital sodium 50 mg/kg を腹腔内投与して麻酔し、組織固定液注入のために気管を露出後、開胸、開腹を行った。横隔膜を剥離したあと、両側の肋骨を切断し、心臓より採血を行った。その後両肺を取り出した。対照群も各群5匹を同日に同様に解剖を行った。曝露後0日、対照群と曝露群の80日目には western blotting のために、さらに各5匹の解剖を行った。

光学顕微鏡的観察

曝露及び対照の各群の3匹を用いて、開胸後、左肺は10%ホルマリン溶液が入らないよう左気管支をクリップした後に取り出し重量を測定した。左肺以外は曝露群、対照群共に10%ホルマリン溶液を20 cm H_2O の圧で気管内に注入し固定を行った。固定後、肺を各葉に切り出し通常のパラフィン包埋を行い、 $4 \mu\text{m}$ に薄切し、hematoxylin-eosin (HE) 染色および抗 Heat Shock Protein 70 マウスモノクローナル抗体 (抗 HSP70 マウス抗体) (NOVO CAS-TRA 社) を一次抗体として用いた免疫組織化学染色を以下の様に行った。

heat shock protein 70 を用いた免疫組織化学染色 (HSP70 染色)

薄切切片を脱パラフィン後、水和し、マイクロウェーブ (株式会社東屋医科器械) を用いて熱電対温度 96°C 、連続照射時間20分、出力400 W で、0.01 M クエン酸バッファー (pH 6.0) を抗原賦活液として加熱処理による抗原賦活を行った。そして、0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.2) で洗浄後、さらにマイクロウェーブで赤外線温度 37°C 、間欠照

射時間3秒、出力250 W とし、以下の処理を行った。すなわち、1%過酸化水素加メタノールで3分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を抑えた後、PBS で洗浄し、10% normal goat serum (NGS) を滴下し3分間反応させ、二次抗体による非特異的反応を抑えるようにした。続いて一次抗体 (抗 HSP70 マウス抗体) を5% NGS で20倍希釈した液を切片上に滴下し、10分間反応させた。その後 PBS で洗浄し、二次抗体としてビオチン標識アフィニティー精製抗マウス IgM (μ -chain specific) ヤギ抗体 (Vector) を5% NGS で200倍に希釈したものを用い4分間反応させた。再び PBS で洗浄し、avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC, DAKO) (A : B : PBS = 1 : 1 : 100) を5分間反応させ PBS で洗浄、0.04%の DAB 反応液 (0.04% diaminobenzidine, 0.01%過酸化水素, 0.01 M PBS の溶液) で7分間反応させ発色させた。DAB との反応は各群の切片を同時に同時間反応させた。その後、水洗し、ヘマトキシリンにて核染を行い、再び水洗した後、脱水、透徹、封入を行った。

陰性対照は二次抗体のみで染色したもの、陽性対照はヒトの乳癌組織を用いて染色を行った。

電子顕微鏡的観察

走査電子顕微鏡による炭末粒子の観察

吸引ポンプ (SIP-32L, 柴田科学器械工業株式会社) とローボリュウムエアースンプラー (L20, 柴田科学器械工業株式会社) を用いてチェンバー内に浮遊する粒子をろ紙上に集めた。そのろ紙を一部切り取り50, 70, 100 (I), 100 (II) % と漸次濃度を高くしたアルコールを通して脱水した後、酢酸イソアミル液に40分間入れて脱水液を置換した。その後臨界点乾燥装置 (HCP-1, HITACHI) を用いて乾燥した。乾燥した試料片は真鍮製の試料台に銀ペーストを用いて固定し、金属蒸着後走査電子顕微鏡 (E-1030, HITACHI) を使用して性状を観察し、その粒子の短径をビデオマイクロメーター (VM30, Flovel Co. Ltd.) を用いて計測した。

透過型電子顕微鏡による観察

曝露群、対照群 (0, 7, 15, 30, 80日後) の各2匹について、左肺はクリップ後に摘出して重量を測定し、左肺以外は電顕用固定液 (2%グルタルアルデヒド+pH 7.4, 0.2 M カコシル酸緩衝液) を20 cm H_2O の圧で気管内に注入し固定を行った。固定後各葉を切り出し、マイクロスライサー (D. S. K 堂阪イーエム株式会社) で約 $100 \mu\text{m}$ の切片を作製し、2%グルタルアルデヒド液中で 4°C にて前固定を行

った後、0.1 M カコジル酸緩衝液で洗浄し、その後 1% OsO₄ 液中で 2 時間、後固定を行った。再び 0.1 M カコジル酸緩衝液で 20 分間洗浄し、アルコール脱水を行い、n-butyl glycidyl ether で 20 分間、2 回置換を行い、その後 n-butyl glycidyl ether と包埋剤エポキシ樹脂の混合液中で一晩振盪させた。そして、観察面を切り出し、シリコン平板を用い、エポキシ樹脂に包埋した。0.5~1.0 μm の厚さの切片を作成しトルイジンブルー染色後に光学顕微鏡で検索しエポキシ包埋材料をトリミングした。その後、エポキシブロックを Ultramicrotome (Porter 社) を用い、薄切し、超薄切片を作成した。超薄切片は電子染色 (酢酸ウラニル水溶液に 30 分、その後クエン酸鉛溶液に 5 分) を行った後、透過型電子顕微鏡 (H-800, HITACHI) で観察した。

Western blotting 法による heat shock protein 70 の発現

曝露群 80 日目と対照群 0、80 日目の各 5 匹について、両肺を摘出し、そのまま凍結保存した。各々の群で凍結保存された両肺は各々の重量の 9 倍容の PBS を加えてカミソリ刃で小片にし、超音波 homogenizer で破碎した後、10,000 G、10 分間、遠心分離し、上清を採取した後、Bio-Rad タンパク質定量キットを用いて Bradford 法によるタンパク質の定量を行い、各群の総蛋白量を 5 μg に調整した。

各群で採取されたタンパク質を Laemmli らの方法に従って sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて解析 (分離) した。

SDS-PAGE 後、ブロッティング装置 (ホライズプロット、アトー) を用い、Towbin の方法で、350 mA で 1 時間、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜に電気転写を行い、1% BSA/Tween-PBS (BSA : ウシ血清アルブミン, Tween-PBS : 最終濃度 NaCl 0.137 M, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Tween20 0.1%) で over night でブロッティングした後、Tween-PBS で軽く洗浄し、一次抗体として 1 : 100 希釈の抗 HSP70 マウス抗体 (NOVO CASTRA 社) を加え 1 時間反応させた。次に Tween-PBS で洗浄し、二次抗体として 1 : 2000 希釈のビオチン標識アフィニティー精製抗マウス IgM (μ-chain specific) ヤギ抗体 (VECTOR) を加え、1 時間室温で反応させ、Tween-PBS で洗浄後 avidin-biotinylate peroxidase complex (ABC, DAKO) (A : B : PBS = 1 : 1 : 50) を 1 時間反応させ PBS で洗浄、DAB 反応液 (0.2% diaminobenzidine, 0.01% 過酸化水素, 50 mM Tris-HCl, pH

7.4 溶液) で 1 分 30 秒発色させた。その後、PVDF 膜を乾燥させ、フラットヘッドスキャナ (GT6500, EPSON 社) で発色像をコンピュータ上に取り込み、画像解析ソフト (NIH image 1.61) にてバンドを半定量化した。

陰性対照は二次抗体のみで、陽性対照はヒトの乳癌組織を用いて western blotting を行った。

統計処理

左肺重量の計測で得られた成績についての有意差検定では Student's t-test を、HSP70 の発現バンド量の比の計測で得られた成績の有意差検定では一元一次分散分析法 (ANOVA LSD) を用いて p < 0.05 をもって有意とした。

成 績

曝露チェンバー内で浮遊する炭末粒子の走査電子顕微鏡像を図 1-a に示した。不規則な形状をとり、小さな粒子が融合した像を呈していた。それらの粒子径は平均 2.93 μm (最大 11.23 μm, 最小 0.47 μm) であった (図 1-b)。

図 2 は、チェンバー内で浮遊する炭末粒子の濃度の時間的変化を示す。浮遊粒子濃度は投与直後は 128 mg/m³ と高濃度であったが速やかに減少し、曝露 1 時間後で 33 mg/m³, 3 時間後に 20 mg/m³, 9 時間後に 10 mg/m³ となった。

左肺重量の変化を図 3 に示す。曝露後 7 日目までは対照群と差はみられなかったが、曝露後 15 日目から曝露群、対照群との重量に差が出て、曝露後 80 日では曝露群は対照群の約 2 倍の重量になった。曝露後 15 日目からは対照群との間に有意差が認められた。

光顕所見

HE 染色

曝露後 7 日 (図 4) では肺泡道近傍で炭末粒子を貪食した肺泡マクロファージが少数観察された。曝露後 15 日では肺泡道近傍で炭末粒子を貪食した肺泡マクロファージがみられ、肺泡上皮の増生が軽度で観察された。曝露後 30 日では肺泡道近傍で炭末粒子を貪食した肺泡マクロファージが集簇してみられ、その近傍で、肺泡上皮が増生していた (図 5)。上皮下の間質、血管周囲の間質には炭末粒子の沈着が観察された。気管周囲のリンパ節にも炭末粒子の沈着がみられた (図 6)。曝露後 80 日の肺マクロ写真を示す (図 7)。曝露群は対照群と比較し、黒色を呈しており、肺門のリンパ節は黒色を呈し、腫大がみられた。肺内には多量の炭末粒子が観察された。炭末粒子を貪食した肺泡マクロファージが肺胞内を埋め尽

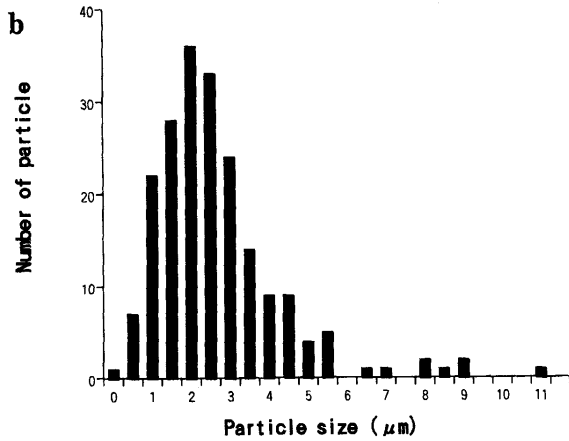
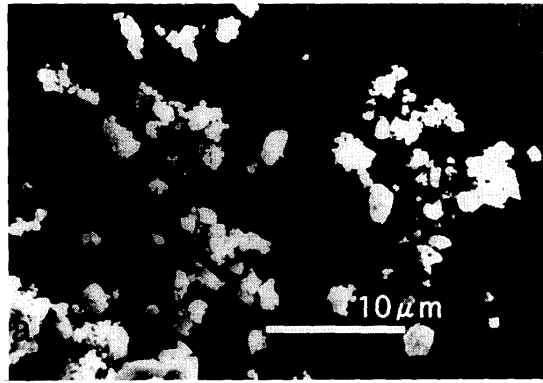


図1 a 曝露チェンバー内で浮遊する炭末粒子
b チェンバー内で浮遊する炭末粒子径の分布

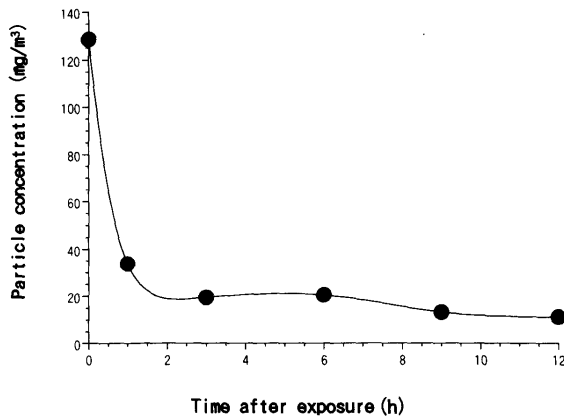


図2 粒子濃度の時間的变化

くす様に集簇したところがあった。肺胞道近傍では炭末粒子の沈着があり、その周辺の肺胞道では気腫様変化(図8-a)がみられた。また、肺胞上皮の過形成と肺内リンパ装置(図8-b)が目立って観察されるようになった。上皮下間質、血管周囲の間質には炭末粒子の沈着が多数みられた(図8-c)。

HSP70 による免疫組織化学所見

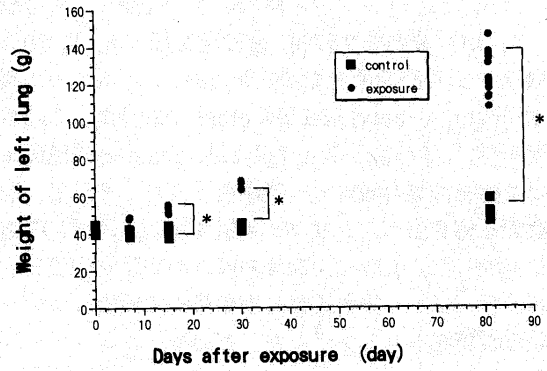


図3 左肺重量の変化
曝露0日：10匹，曝露後7日，15日，30日：
対照，曝露群共に各5匹，曝露後80日：対照，
曝露群共に各10匹の肺重量を示す。
星印(*)は各々の対照群との有意差を示す。
($p < 0.001$)

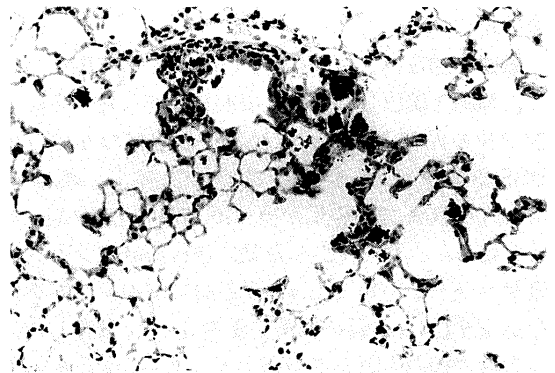


図4 曝露後7日，肺胞道近傍で炭末粒子を貪食した肺胞マクロファージが少数見られた。(HE×200)

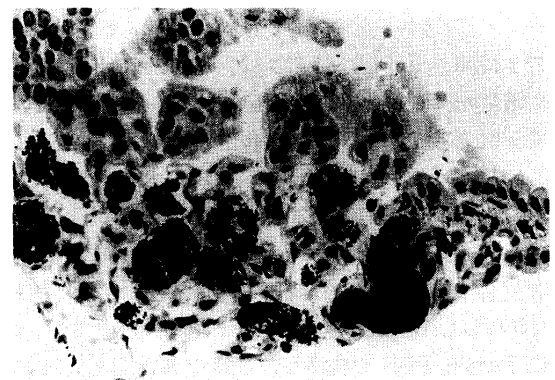


図5 曝露後30日，肺胞道近傍で炭末粒子を貪食した肺胞マクロファージが観察され，それを取り囲む様に肺胞上皮の増生が見られた。(HE×400)

対照群0日目の気管支上皮を示す。気管支上皮のクララ細胞中心にHSP70の発現がみられた(図9-

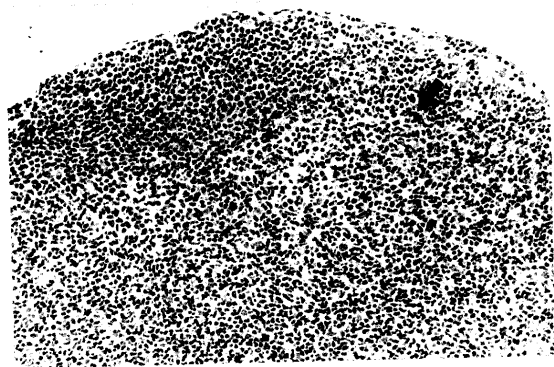


図6 曝露後30日、気管周囲のリンパ節に炭末粒子の沈着(矢印)が見られた。(HE×200)

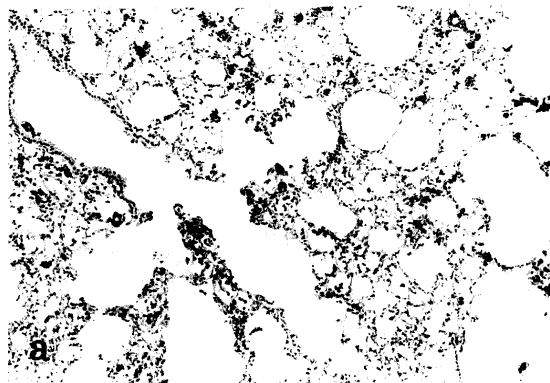
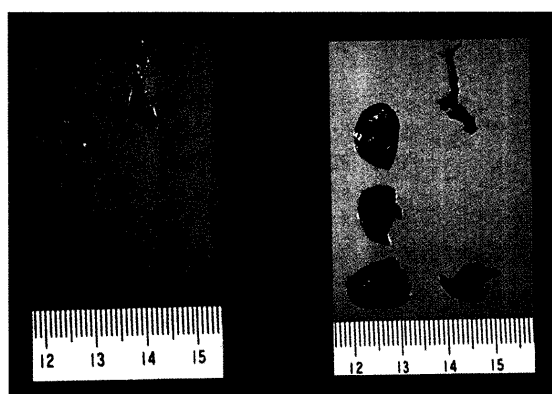


図8 a 曝露後80日、肺泡道領域で気腫様変化が観察された。(HE×100)



対照群

曝露群

図7 曝露後80日の肺

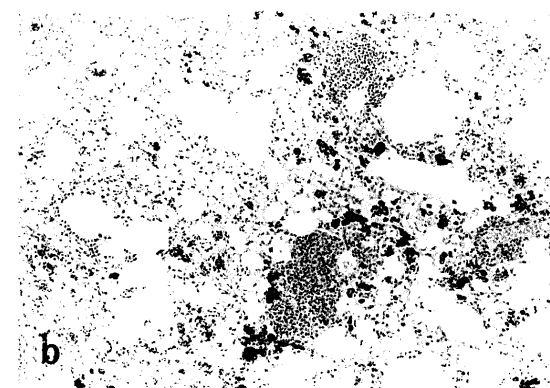


図8 b 曝露後80日、肺内のリンパ装置が目立って観察されるようになった。(HE×200)

a). 対照群7日目においても、ほぼ同様にクララ細胞を中心としたHSP70の発現がみられた(図9-b)。対照群15日目では、上皮にHSP陽性細胞の増加がみられ(図9-c)、対照群30日、80日では、成長するにしたがい気管支上皮のほとんどすべての細胞に発現が観察されるようになった(図9-d)。対照群に見られる肺泡マクロファージにもHSP70の発現はみられた。曝露群では曝露後7日で既に気管支上皮の多くの細胞でHSP70の発現がみられた。また、炭末粒子を貪食した肺泡マクロファージにもHSP70の発現がみられた(図10-a)。曝露後15、30日目も同様の発現が観察された(図10-b)。曝露後80日では、さらにII型肺泡上皮細胞への発現がみられた(図10-c)。

電顕所見

トルイジンブルー染色で観察した肺組織ではII型肺泡上皮の過形成がみられた(図11-a)。

曝露後80日では、肺泡腔内に炭末粒子を貪食した肺泡マクロファージが観察された(図11-b)。また、上皮下間質内に炭末粒子を貪食した肺泡マクロー

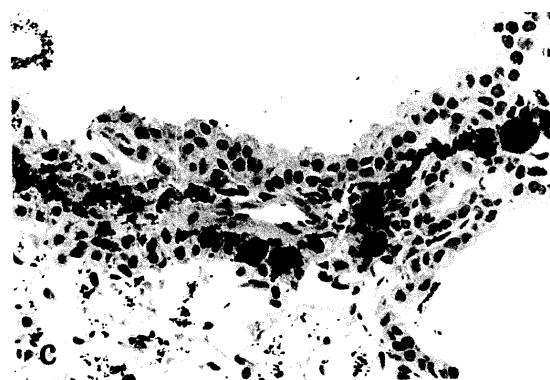


図8 c 曝露後80日、上皮下間質に炭末粒子の沈着が多数見られた。(HE×400)

ーが遊走しているところがみられた(図11-c)。

HSP70のwestern blottingによる半定量化

曝露群は対照群に比べてHSP70の発現が増加しており、対照群では成長により、発現量の増加をみた(図12-a, b)。

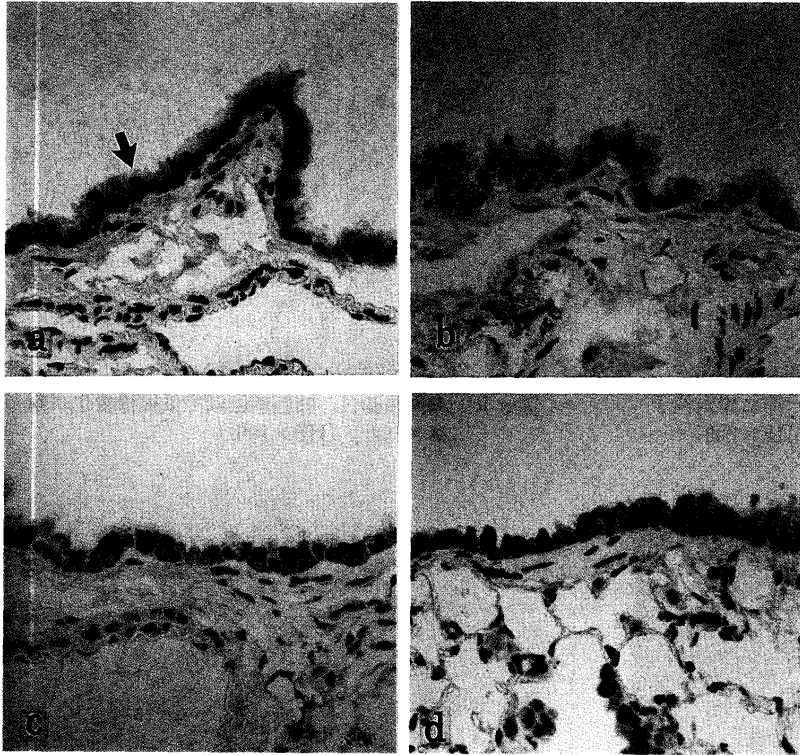


図9
HSP70での免疫組織化学染色(×200)
a: 対照群0日, b: 対照群7日, c: 対照群15日, d: 対照群80日
対照群ではHSP70の発現は肺胞マクロファージと気管支上皮に観察され, 成長が進むにつれHSP70陽性細胞が増加する傾向をみた。(aの矢印はクララ細胞を示す。)

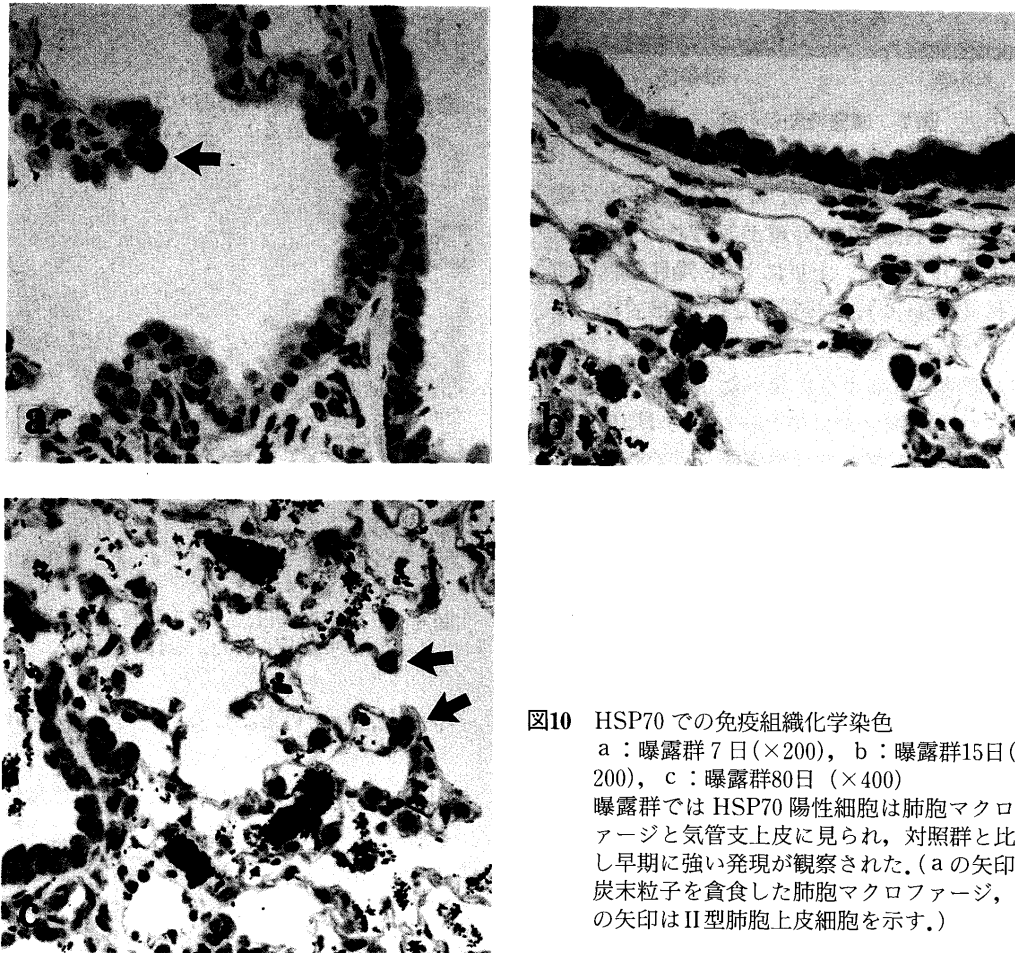


図10 HSP70での免疫組織化学染色
a: 曝露群7日(×200), b: 曝露群15日(×200), c: 曝露群80日(×400)
曝露群ではHSP70陽性細胞は肺胞マクロファージと気管支上皮に見られ, 対照群と比較し早期に強い発現が観察された。(aの矢印は炭末粒子を貪食した肺胞マクロファージ, cの矢印はII型肺胞上皮細胞を示す。)

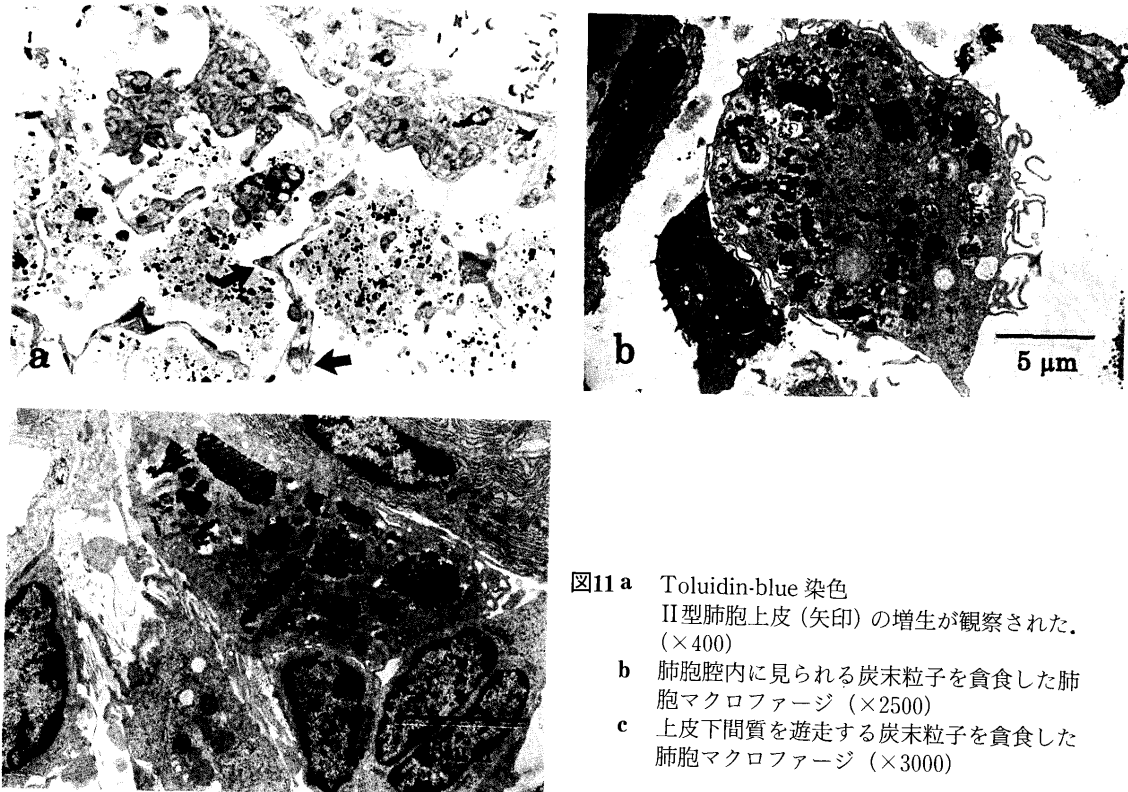


図11 a Toluidin-blue 染色
II型肺胞上皮(矢印)の増生が観察された。
(×400)
b 肺胞腔内に見られる炭末粒子を貪食した肺
胞マクロファージ(×2500)
c 上皮下間質を遊走する炭末粒子を貪食した
肺胞マクロファージ(×3000)

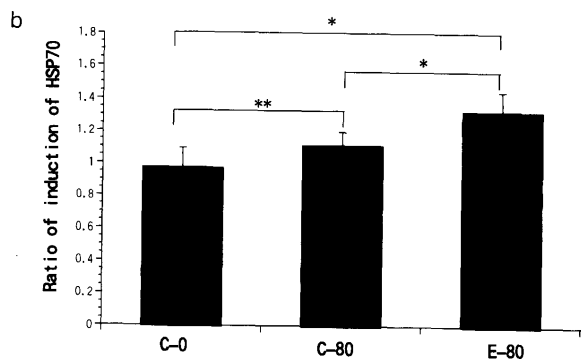
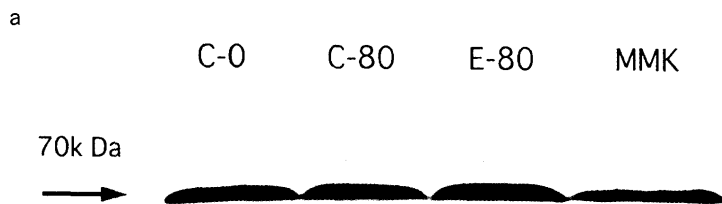


図12 a western blotting による HSP70 の発現
b HSP70 の半定量化
C-0: 対照群 0 日, C-80: 対照群 80 日, E-80: 曝露群 80 日
データは各 5 匹で means±SD で示す. 星印は ANOVA LSD による検定での有意差を示す.
* p<0.001, ** p<0.05

考 察

今まで肺への毒性物質の影響をみるために毒性物質を気管内注入する実験が多く行われており、全身

曝露実験の報告は少ない。今回、我々は異物吸入による肺への影響をみるために、毒性のないと考えられる炭末粒子の連続曝露実験装置を作製した。本実験装置で、曝露後80日で炭肺症を呈する像を得るこ

とができた。浮遊する粒子濃度を本装置で、高濃度に一定させることにより、さらに短期間でこのモデルを作製できると思われる。

本実験で、我々は炭末粒子の吸入曝露実験を行い、有害物ではなく異物としてのみ働く炭末粒子においても肺に HSP70 の発現が増加することを示した。現在までに肺と HSP70 family について、モルモットの O₃ 曝露による HSP72 の発現の増加⁴、ラットでの O₃、HNO₃ それぞれ単独の慢性曝露による HSP70 の発現の増加⁵、O₃ 単独曝露、公害大気と O₃ の複合曝露における HSP70 の発現の増加⁶、ラット肺の垂ヒ酸ナトリウム曝露による HSP72 の発現の増加⁷、気管支喘息における HSP70 の強い発現⁸、肺癌細胞における HSP72 の発現⁹ が報告されている。

本実験では対照群はフィルターを通した清浄空気で飼育し、0日、80日のいずれにおいても HSP70 の発現が認められた。刺激、ストレスのないモルモットの肺においても 72-kDa の HSP が低レベルに観察されると報告されている¹⁰。しかし、対照群80日目は対照群0日と比べると HSP70 の発現量が、多かった。免疫組織染色で、対照群0日は気管支上皮のクララ細胞と肺胞マクロファージに HSP70 の発現が限定されるのに対し、対照群80日では気管支上皮細胞の全域と肺胞マクロファージに観察された。すなわち、成長に伴い HSP70 陽性細胞が増加する傾向を示した。成長に伴う HSP70 陽性細胞の増加に関しては、今までに報告がない。ストレス状態下でないマウス肺について Blake ら¹¹ は HSP70 は肺にある細胞のホメオスタシスに重要な役割を果たしていると述べている。本来、正常状態で細胞内蛋白合成に関わる HSP70 が、成長につれてその量を増すとも思われる。一方 Su ら⁴ の指摘のごとく肺は外界と直接に相互作用しているために、生理学的に正常な状態であってもそれがストレスとなっているとも考えられる。その点で成長に伴う HSP70 陽性細胞の増加は、上皮細胞の吸入物質に対する防御能の発達ということも考えられる。また、若齢マウスでクララ細胞を中心に HSP70 陽性が観察されることに関しても、その理由は解明できていない。クララ細胞は終末細気管支、呼吸細気管支にあり、オキシダントガス (O₃, NO₂ 及び O₂) に対しては、最初に傷害を受けるところでもある。外的刺激に対し、鋭敏に反応する細胞とも考えられる。

本実験の曝露群では急性細胞毒性ならびに抗原性がなく、生体に異物として働くと考えられる炭末粒子の吸入曝露を行った。曝露期間中、好中球、リンパ球などの炎症細胞の浸潤は観察されず、肺胞マクロファージのみの浸潤が認められた。線維芽細胞の

増生も明らかではなかった。肺胞マクロファージは肺胞道近傍に多く観察され、炭末粒子を貪食していた。肺のこの部位における生体反応は他の吸入曝露による反応と同様である¹²⁻¹⁷。肺胞道近傍は吸入曝露における生体反応の場の中心で、その部分では血管、リンパ管が他の解剖学的部位よりも発達しているのではないかと考えられる。

肺胞マクロファージは、急性炎症の際、好中球、単球を炎症局所に動員して異物の排除にあたらせることのできる種々の走化性因子を産生していると報告されている¹⁸⁻²³。中でも *lypopolysaccharide* (LPS) は肺胞マクロファージを強く刺激し、産生される *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) は単球の、*macrophage inflammatory protein-1* (MIP-1) は単球、好中球の走化性を高めることがわかっている。本実験では肺胞マクロファージ以外の炎症細胞の浸潤は観察されず、今後、MCP-1、MIP-1 の関与についての検索も必要であると考えられる。また、本実験では肺胞腔内、上皮間質内で炭末粒子を貪食した肺胞マクロファージを観察している。これは単球の接着分子発現が高まり、細胞間マトリックスをすりぬけて肺胞腔内へ遊走したものと考えられる。*intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) は細胞間相互作用を仲介する接着分子であるが、Kang ら²⁴ は正常マウス肺では ICAM-1 は II 型肺胞上皮細胞よりも I 型肺胞上皮細胞に多く発現していることを示した。しかし、100%酸素吸入肺傷害では、さらに II 型肺胞上皮細胞表面での発現が増加し、血管内皮細胞は共に弱陽性であることを見いだしている。本実験では血管、リンパ管の発達していると考えられる終末気管支から肺胞道領域の上皮間より粒子が生体内に取り込まれたと考えられる。

II 型肺胞上皮細胞は、生理活性物質サーファクタントを合成、分泌し、さらに II 型肺胞上皮細胞は肺胞環境を保持し、I 型肺胞上皮細胞が傷害により、剝離されると、その部分を II 型肺胞上皮細胞が覆い、I 型肺胞上皮細胞に分化すると言われている²⁵。最近 II 型細胞の増殖因子として *transforming growth factor- α* (TGF- α)²⁶、*epidermal growth factor* (EGF)、インスリン、コレラトキシン、酸性及び塩基性 *fibroblast growth factor* (FGF) など数多くの報告がある。いずれも修復という観点からみての増殖因子であり²⁷、これらは、線維芽細胞増殖活性をも有している。しかし、肝細胞の増殖因子として知られる *hepatocyte growth factor* (HGF)²⁸ は肺では肺胞マクロファージや線維芽細胞から産生され、線維芽細胞増殖活性を有さず、II 型肺胞上皮細胞を

増殖させるサイトカインとしての報告もある。本実験においても II 型肺胞上皮細胞の増生がみられる。しかし、炎症細胞、線維芽細胞の反応が観察されていないため、修復過程による増殖ではなく、肺胞環境保持のための反応性増殖と考えられる。

今回の実験で、HSP70 について曝露群では対照群と同様 HSP70 陽性細胞は肺胞マクロファージと気管支上皮にみられ対照群と比べて早期に強い発現が観察された。HSP70 の western blotting による半定量では曝露群は対照群に比べ増加しており、曝露後 80 日では II 型肺胞上皮細胞にまで HSP70 が陽性であった。

炭末粒子に対して、肺は肺胞マクロファージの増加と II 型肺胞上皮の増生として反応を開始すると共に、毒性や起炎性のない、いわば機械的異物に対しても、HSP70 を強く発現させて反応を行っていることが明らかになった。

今後、炭末粒子に毒性物質や抗原性物質を吸着させて行う吸入曝露実験の結果を評価するための重要な指標になるものとする。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲賜りました第 3 内科学教室金丸昭久教授に深く感謝致します。終始懇切な御指導、御助言を賜りました本学第 2 病理学教室橋本重夫教授、並びに前倉俊治講師、蛭間真悟講師に心から感謝致します。また、本研究において絶大なる御協力を頂いた第 2 病理学教室諸兄姉に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. Subjeck JR, Shyy TT (1986) Stress protein systems of mammalian cells. *Am J Physiol* 250 (1 Pt 1): C1-C17
2. Welch WJ, Feramisco JR (1985) Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol Cell Biol* 5: 1229-1237
3. Ziemienowicz A, Zylisz M, Floth C, Hubscher U (1995) Calf thymus Hsc70 protein protects and reactivates prokaryotic and eukaryotic enzymes. *J Biol Chem* 270: 15479-15484
4. Su WY, Gordon T (1997) In vivo exposure to ozone produces an increase in a 72-kDa heat shock protein in guinea pigs. *J Appl Physiol* 83: 707-711
5. Wong CG, Bonakdar M, Mautz WJ, Kleinman MT (1996) Chronic inhalation exposure to ozone and nitric acid elevates stress-inducible heat shock protein 70 in the rat lung. *Toxicology* 107: 111-119
6. Wong CG, Bonakdar M, Mautz WJ, Kleinman MT, Chow J, Bhalla DK (1994) Elevation of stress-inducible heat shock protein 70 in the rat lung after exposure to ozone and particle-containing atmospheres. *Inhal Toxicol* 6: 501-514
7. Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD, Slutsky AS (1994) Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. *Crit Care Med* 22: 922-929
8. Vignola AM, Chanez P, Polla BS, Vic P, Godard P, Bousquet J (1995) Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13: 683-691
9. Bonay M, Soler P, Riquet M, Battesti JP, Hance AJ, Tazi A (1994) Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 453-461
10. Welch WJ, Suhan JP (1986) Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* 103: 2035-2052
11. Blake MJ, Gershon D, Fargnoli J, Holbrook NJ (1990) Discordant expression of heat shock protein mRNAs in tissues of heat-stressed rats. *J Biol Chem* 265: 15275-15279
12. Adamson IY, Bowden DH (1986) Crocidolite-induced pulmonary fibrosis in mice: cytokinetic and biochemical studies. *Am J Pathol* 122: 261-267
13. Filipenko D, Wright JL, Churg A (1985) Pathologic changes in the small airways of the guinea pig after amosite asbestos exposure. *Am J Pathol* 119: 273-278
14. Holt PF, Mills J, Young DK (1964) The early effects of chrysotile asbestos dust on the rat lung. *J Pathol Bacteriol* 87: 15-23
15. Lemaire I, Nadeau D, Dunnigan J, Masse S (1985) An assessment of the fibrogenic potential of very short 4T30 chrysotile by intratracheal instillation in rats. *Environ Res* 36: 314-326
16. Quinlan TR, Marsh JP, Janssen YM, Leslie KO, Hemenway D, Vacek P, Mossman BT (1994) Dose-responsive increases in pulmonary fibrosis after inhalation of asbestos. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 200-206
17. Driscoll KE, Maurer JK, Higgins J, Poynter J (1995) Alveolar macrophage cytokine and growth factor production in a rat model of crocidolite-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J Toxicol Environ Health* 46: 155-169
18. Driscoll KE (1994) Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Exp Lung Res* 20: 473-490
19. Driscoll KE, Hassenbein DG, Carter J, Poynter J, Asquith TN, Grant RA, Whitten J, Purdon MP, Takigiku R (1993) Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8: 311-318
20. Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM (1991) Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem* 266: 9912-9918
21. Driscoll KE, Lindenschmidt RC, Maurer JK, Higgins

- JM, Ridder G (1990) Pulmonary response to silica or titanium dioxide: inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2: 381-390
22. Driscoll KE, Lindenschmidt RC, Maurer JK, Perkins L, Perkins M, Higgins J (1991) Pulmonary response to inhaled silica or titanium dioxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 111: 201-210
23. Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A (1989) Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 612-616
24. Kang BH, Crapo JD, Wegner CD, Letts LG, Chang LY (1993) Intercellular adhesion molecule-1 expression on the alveolar epithelium and its modification by hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 350-355
25. Adamson IY, Bowden DH (1974) The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration: a cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* 30: 35-42
26. Kheradmand F, Folkesson HG, Shum L, Derynk R, Pytela R, Matthay MA (1994) Transforming growth factor-alpha enhances alveolar epithelial cell repair in a new in vitro model. *Am J Physiol* 267 (6 Pt 1): L728-L738
27. Shiratori M, Michalopoulos G, Shinozuka H, Singh G, Ogasawara H, Katyal SL (1995) Hepatocyte growth factor stimulates DNA synthesis in alveolar epithelial type II cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 171-180
28. Mason RJ, Leslie CC, McCormick-Shannon K, Deterding RR, Nakamura T, Rubin JS, Shannon JM (1994) Hepatocyte growth factor is a growth factor for rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 561-567