

オゾンによるタンパク変性効果, 特に 卵白アルブミンの抗原性獲得についての研究

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任教授: 緒方正名)

吉 良 尚 平・緒 方 正 名

(昭和62年9月11日受理)

Key Words : ozone, egg-albumin, denaturation, antigenicity, immunochemistry

緒 言

オゾンは自然界に0.1ppm程度存在し, 強力な酸化作用を有することが古くから知られている。一方大気汚染物質としてのオゾンは, オキシダントの重要な位置にある物質であり, 二酸化窒素と炭水化物が光化学反応によって生成すると言われている¹⁾。オゾンの生体への影響については多くの報告がみられる。その中でオゾンによってもたらされる呼吸器への影響は, 上気道刺激とともに, 上皮細胞障害と, 物理化学的刺激に対する感受性の亢進が, 気管支喘息の発作との関係²⁾において討議されている。一方, オゾンによる免疫機能への影響については, 細胞膜の脂質に対する過酸化反応と, それに続く様々な機能障害に関する研究は数多くの報告があるが³⁾, オゾンによる蛋白への修飾を抗原性の変化と関連付けた研究は多くはない。その中には, マウスをオゾンに暴露した際に I_gG₁, I_gG₂, I_gA が肺の浸出液中に出現することを示した Osebold 等⁴⁾の研究がある。また松村等⁵⁾はモルモットをオゾンに暴露させた後, 卵白アルブミンや牛血清アルブミンのエロゾルを吸入させると, アルブミンによって経気道的感作が誘起されることを報告している。更に Stokinger 等⁶⁾によって, オゾン暴露の家兎に自己免疫の生ずることが報告されている。本研究ではオゾン暴露によるタンパクの変性, 特にその構造変化にもとづくと思われる抗原性の変化に注目して, 卵白アルブミンをオゾンに暴露させ, 紫外部吸収の変化, 定量的免疫沈降反応, 免疫二重拡散法, 免疫電気泳

動法などの免疫化学的手法を用いて, オゾン暴露に特異的と考えられる抗原性の出現を検討した成績を報告する。

材 料 と 方 法

1) オゾン暴露

オゾン暴露はオゾン発生装置 (0-1-2型日本オゾン株式会社製) から2.65ppmのオゾンを発生させるように調製した。試料2mlを入れた小型インピンジャー中にオゾンを含む空気を導入し, bubbling させることによりオゾン暴露を行った。オゾン暴露は室温で1時間行った。

2) 紫外部吸収スペクトル

1 mg/ml卵白アルブミン溶液(結晶卵白アルブミン Sigma 製より調製) (NEa) を試料として, 前項の条件でオゾン暴露したものをオゾン暴露アルブミン (O₃Ea) 溶液とした。一方オゾン暴露を行わない卵白アルブミン溶液を対照とし, 両者について紫外領域での吸光度を分光光度計 (Model 100-60 Spectrophotometer 日立製) を用いて測定した。

3) 免疫化学的分析⁷⁾

(1) 抗原と抗体の作成: NEa, O₃Ea に加えて1 mg/ml卵白アルブミンを100°C, 5分加熱して得られる熱変性アルブミン (HEa) の3種類の蛋白を抗原として家兎に免疫した。免疫はこれらの3種類の抗原の生理食塩水溶液2mlと Freund complete adjuvant 2mlを混和したものを1回量として, 家兎の皮下に1週間おきに3~4回注射することによった。最終免疫の1~2週間後に全採血し, 遠心にて分離した血清

を、それぞれ抗未変性アルブミン抗体(anti-N)、抗熱変性アルブミン抗体(anti-H)、抗オゾン変性アルブミン抗体(anti-O₃)として使用した。

(2) 定量的免疫沈降反応⁷⁾

3種類の抗原(NEa, O₃Ea, HEa)の蛋白濃度を各々0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0及び2.0mg/mlに調整し、これらの0.2mlに対して、それぞれの抗原に対応するウサギ血清抗体(anti-N, anti-O₃, anti-H)を0.2mlを加えた。37℃で1時間反応させた後、4℃の冷室に16時間放置した後、4000rpmで20分間遠沈して沈降物を回収した。沈降物は冷生食水にて2回洗浄し、30% NaOHを添加して溶解後蛋白量を測定した。蛋白量の定量は、Itzhaki及びGillのマイクロビュレット法⁸⁾により、未変性卵白アルブミンを標準液として行った。沈降抗体量は、総沈降物量から各抗原の添加量を差し引いた値とした。

(3) 免疫二重拡散法⁷⁾

ペロナール緩衝液(イオン強度0.05, pH8.4)に溶解した1%寒天3mlをスライドグラス(2.6cm×7.5cm)のせ作成した。寒天板上に径5mmの抗体穴から4mm間隔の周囲に2mmの抗原穴をあけた。次でそれぞれの抗原穴にオゾン暴露、熱変性及び対照の卵白アルブミン溶液(1mg/ml)1μlを添加し、抗体穴には6~7μlの家兎抗血清を注入し、室温で24時間反応させた後沈降線を観察した。

(4) 免疫電気泳動⁷⁾

電気泳動用緩衝液は、イオン強度0.05のペロナール緩衝液pH8.4を使用し寒天板は免疫二重拡散法のものと同様に作成した。寒天板上に径2mmの抗体穴とそこから3mmの位置に幅2mmの抗原溝をあけた。抗原穴に先に述べた処理を行った卵白アルブミン溶液(0.5mg/ml)を1μl注入後、100Vで1時間泳動した。泳動したのち、抗体溝に抗体を注入し、室温で24時間反応させて沈降線を観察した。

結 果

1) 紫外外部吸入スペクトル

(図1)に示すようにオゾン暴露によって卵白アルブミンの250~280nm付近の吸光度が増大した。この現象は、熱変性によっても観察され

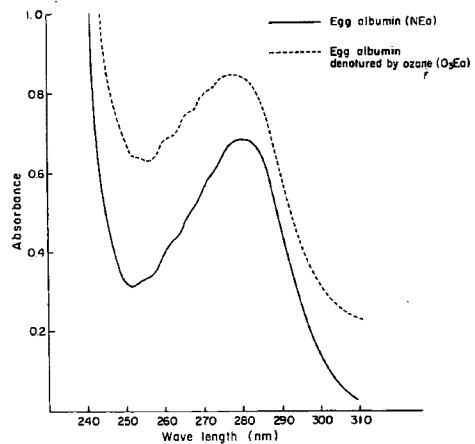


Fig. 1 Ultraviolet absorption of egg albumin and egg albumin denatured by ozone.

るものであり⁹⁾、オゾン暴露によって卵白アルブミンになんらかの構造上の変化が惹起されたことが示唆された。もしも構造上の変化が惹起されたのであれば、免疫化学的に検出される抗原性にも変化がおきている可能性があると考えられた。

2) 定量的免疫沈降反応による抗原性の検討

① 抗未変性卵白アルブミン抗体(anti-N)に対する各処理後抗原の沈降反応曲線を、(図2-A)に示す。各々の抗原に対する抗原至適濃度と、その時に得られる最大沈降量は、NEaでは

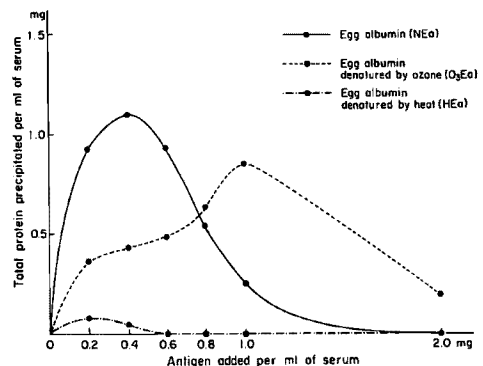


Fig. 2-A Quantitative precipitin reaction of egg albumin, egg albumin denatured by ozone, and egg albumin denatured by heat with anti egg albumin rabbit serum (anti-N).

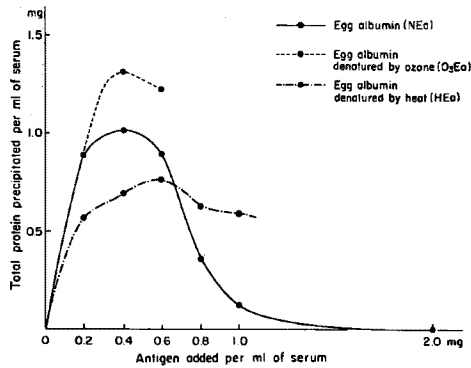


Fig. 2-B Quantitative precipitin reaction of egg albumin, denatured by ozone and egg albumin denatured by heat with anti egg albumin denatured by ozone rabbit serum (anti-O₃).

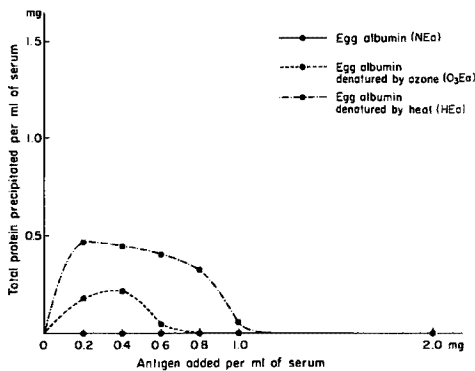


Fig. 2-C Quantitative precipitin reaction of egg albumin, denatured by ozone and egg albumin denatured by heat with anti heat denatured rabbit serum (anti-H).

0.4mg/mlにおいて1.1mg/mlであったが、O₃Eaでは、1.0mg/mlで至適となり、0.85mg/mlの最大沈降量が得られ、オゾン暴露によって抗原性が低下することが認められた。また、HEaでは反応性が著しく低下した。

② (図2-B)は抗オゾン変性抗体(anti-O₃)に対する反応を示す。HEaとの間には明解な反応は認められなかったが、NEa、O₃Ea共に、0.4mg/mlで至適濃度となり、最大沈降量は各々1.0mg/ml及び1.3mg/mlであった。

③ 抗熱変性卵白アルブミン抗体(anti-H)に対する反応を(図2-C)に示す。NEaは無反

応であったが、O₃Eaは、HEaに対するとはほぼ同等な、0.4mg/ml付近に至適濃度が認められた。両者の沈降量を比較すると、O₃EaはHEaの約1/2であった。

以上の結果から、オゾン変性による抗原性の変化は、未変性卵白アルブミンとは一部異なる抗原性を持ちながら共通部分を残し、かつ熱変性卵白アルブミンと共通する抗原性を獲得した可能性を示している。

3) オゾン変性により出現する抗原の、免疫二重拡散法と免疫電気泳動法による検討

① 定量的免疫沈降法で、オゾン変性アルブミンは、未変性アルブミンや熱変性アルブミンとは異なる抗原性が獲得されている可能性が示唆されたので、次に免疫二重拡散法でこれを確認する試みを行った。抗未変性アルブミン抗体(anti-N)、抗熱変性アルブミン抗体(anti-H)、抗オゾン変性アルブミン抗体(anti-O₃)をそれぞれ中央の抗体穴に注入して、それぞれの抗原との間に形成される沈降線を観察した。その結果を(図3)に示す。

①-1) 抗未変性アルブミン抗体(anti-N)との間ではO₃Eaとの沈降線と未変性アルブミンとの沈降線は融合するがわずかながら1部にスパーを形成した。(図3-A)

①-2) 抗熱変性アルブミン抗体(anti-H)はNEaとは反応なかったがO₃Eaによる沈降線はHEaによる沈降線とほぼ融合し、極一部にスパーを形成した。(図3-B)

①-3) 抗オゾン変性アルブミン抗体(anti-O₃)に対してO₃EaとNEaとの沈降線の間では、癒合するが一部にスパーを形成した。また、HEaに対しても、ほぼ癒合するがごく一部にスパーを形成する沈降線を認めた。以上の結果から、オゾン変性アルブミンは、未変性アルブミンと一部分に共通の抗原を有し、熱変性アルブミンとは大部分に共通の抗原性を有している可能性が示唆された。(図3-C)

② 免疫電気泳動法による検討結果を(図4)に示す。この方法によっても免疫二重拡散法で得られた結果と同様に、抗オゾン変性アルブミン抗体(anti-O₃)に対して、O₃EaとNEaとは共通の沈降線を形成するとともにO₃Eaに特異的

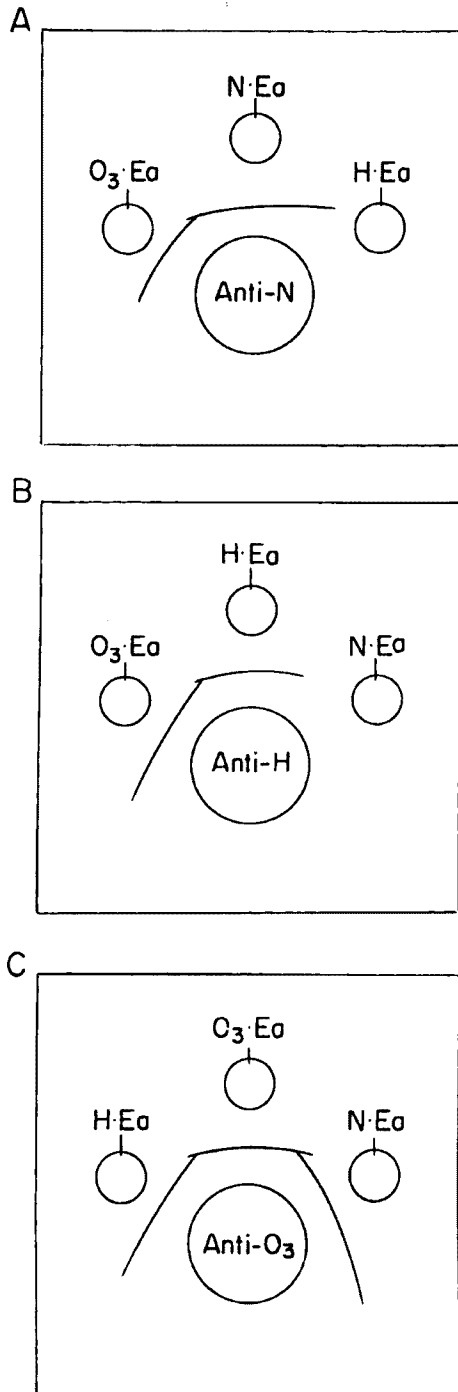


Fig. 3 Immunodiffusion pattern of native and denatured egg albumin by ozone and by heat with anti sera.

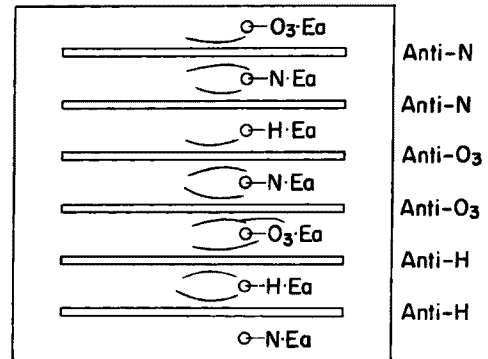


Fig. 4 Immunoelectrophoretic pattern of native egg albumin (NEa), egg albumin denatured by ozone (O₃Ea) and egg albumin denatured by heat (HEa) with anti egg albumin rabbit serum (anti-N), anti egg albumin denatured by ozone rabbit serum (anti-O₃) and anti egg albumin denatured by heat rabbit serum (anti-H).

な別の沈降線が認められた。この沈降線は共通する沈降線よりはわずかに遅い易動度を有する沈降線として観察された。

考 察

本研究では、オゾンの暴露により抗原性が変化することを、免疫化学的手法で検討してきたが、オゾン暴露によって、卵白アルブミンにどのようなタンパク構造上の変化がもたらされたかは、明らかにはできなかった。紫外部での吸収を調べた限りでは250 μ m付近の吸収が増加していたことや、Stokinger⁵⁾の報告から考えると、アルブミンの抗原性に関与するチロジンの水酸基の解離が起こった可能性が高い。また免疫電気泳動で新たな沈降線が認められた結果は、アルブミンの解離とともに、オゾンによる酸化的修飾が起こった可能性もある。また、抗熱変性卵白アルブミン抗体に対してオゾン変性卵白アルブミンは、免疫電気泳動法では、(図4)に示したO₃Eaとanti-O₃におけるような明確な沈降線は認められなかったが、沈降線の形成の傾向が認められた。この反応については、今後検討される必要がある。本研究で示されたオゾンによるアルブミンの構造変化が、新たな抗原性の

獲得と関連する抗原エピトープを生じさせた可能性は否定できない。一方オゾンの酸化作用は、R-SH 残基ことにシステイン、メチオニンなどのアミノ残基の酸化を促すと考えられることから、複数の R-SH 残基が抗原エピトープに近い場所に存在すれば、R-S-S-R 結合が増加し、新たな抗原性発現に関与していることも否定できない。オゾン暴露により獲得されたと思われる新たな抗原エピトープの、物理化学的な究明が望まれるところである。また、熱変性と共通して認められた、オゾン変性により発現する抗原性の変化は、酸化的修飾の可能性が強いため、暴露条件（濃度、時間）に依存しているか否かは、今後検討を要するところである。

本実験では、オゾン暴露の対象に、model compound として卵白アルブミンを用いたが、大気汚染物質としてのオゾンの生体影響を考えると、オゾンが生体の構成成分であるタンパクに、抗原性の変化をともなう構造上の変化の可能性が示された。生体構成成分タンパクの構造変化は、修飾された自己抗原の出現ともなりうるのである。一方では、オゾンによる気道上皮細胞の damage とともに化学物質及び機械刺激に対する感受性が増大し、吸入された異物に対するアレルギー反応を増強することが知られている。これらのことを考えると、オゾンによる蛋白質の変性と新たな抗原性の獲得について、抗原性決定基の修飾と関連させて、今後検討を加える必要がある。

結 論

大気汚染物質の1つであるオゾンの蛋白質変性にともなう抗原性の変化について、卵白アルブミンを model compound として、免疫化学的方法を用いて検討し、以下の結論を得た。

1. オゾン暴露により、卵白アルブミンの紫外部吸収は、250nm を中心に増強される。このことは、オゾンによって構造上の変化・変性が生じることが示された。
2. 定量的免疫沈降反応及び免疫二重拡散法により、オゾン変性卵白アルブミンは未変性のものとは共通する抗原性が残存し、熱変性アルブミンとも共通する抗原性を持つことが示された。
3. 免疫電気泳動による検討から、オゾン変性卵白アルブミンは、これによって免疫作成したウサギ抗オゾン変性卵白アルブミンとの間で反応し、未変性卵白アルブミンで作成したその抗体には反応しない、新たな沈降線が出現し、熱変性とは異なる抗原性が獲得された可能性が示された。

以上のことから、オゾンは蛋白質に作用し、抗原性を変化させる働きがあることが示された。

謝 辞

この研究を進めるにあたり論文の校正に援助を戴いた、本学臨床検査医学教室小出典男氏に感謝するものである。

文 献

1. 鈴木 伸：光化学反応による大気汚染の発生メカニズム，光化学反応による大気汚染，日本公衆衛生協会，東京，(1972) pp 3—34.
2. Odom JD and Taylor RW：Environmental variables and acute asthmatic attacks in children. J Pediatr Nurs (1986) 1, 335—341.
3. Mehlman MA and Borek C：Toxicity and priochemical mechanism of ozone. Environ Res (1987) 42, 36—53.
4. Osebold JW, Owens SL, Zee TC, Dotson WM and Labarre DD：Immunological alterations in the lungs of mice following ozone exposure：changes in immunoglobulin levels and antibody containing cells. Arch Environ Health (1979) 34, 258—265.
5. Matsumura Y：The effects of ozone, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide on the experimentally induced allergic respiratory disorder in guinea pigs. The effect on sensitization with albumin through

- the airway. *Am Rev Respir Dis* (1970) **120**, 430—437.
6. Stokinger HE and Scheel LD : Ozone toxicity : Immunochemical and tolerance-producing aspects, *Arch Environ Health* (1962) **4**, 327—334.
 7. 松橋 直, 中村 弘, 杉浦 勉, 北川常広, 石川栄治, 渡辺 武 : 抗体の調製, 続生化学実験講座 免疫生化学研究法, 日本生化学会編 5, 東京化学法人, 東京 (1986) pp38—50.
 8. 菅原 潔, 副島正美, 生物化学実験法 7, 蛋白質の定量法, 第 2 版 学会出版センター, 東京 (1977) pp88—94.
 9. 同上, pp133—146.

Effect of ozone on denaturation and antigenicity of egg albumin

Shohei KIRA and Masana OGATA

Department of Public Health,

Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

Crystalline egg albumin denatured by exposure to ozone was analyzed by ultraviolet spectrophotometry. Rabbits were injected with denatured egg albumin to induce specific antibody. Native egg albumin (NEa) and ozone denatured egg albumin (O_3 Ea) cross-reacted with anti-native egg albumin antibody (anti-N) and anti-ozone denatured egg albumin antibody (anti- O_3), respectively. Heat denatured egg albumin (HEa) and O_3 Ea cross-reacted with anti-heat denatured antibody (anti-H). The precipitin lines in immuno-double diffusion tests between NEa and anti-N and between O_3 Ea and anti-N were fused with spur formation. The precipitin lines of O_3 Ea with anti- O_3 and HEa with anti- O_3 were fused with slight spur formation. Two precipitin lines of O_3 Ea with anti- O_3 were observed by immunoelectrophoresis. The faster line had similar majority to the line of NEa and anti-N. The other line had a slightly slower mobility than the former line, indicating that this slower line was due to ozone specific antigen.