

気道アレルギーモルモットにおける呼吸器組織中 クロモグラニン A 免疫活性の検討

獨協医科大学第一小児科

福田典正 吉原重美 市村登寿

静岡県立大学薬学部

矢内原昇

モルモットの呼吸器組織における CGA-IR を CGA の N 末端359-389を認識する抗体 R-0763を用いて検討した。OA を反復吸入して作製した感作モルモットを、生食吸入と OA 暴露の2群に分けて、呼吸抵抗、および気管、大気管支、下肺における CGA-IR の変動を検討した。

生理的食塩水吸入モルモットの呼吸器組織中の CGA-IR は、組織湿重量1g 当たり0.4~2pmolであった。部位による差を下肺>気管>大気管支の順に認めた。OA 吸入暴露により気道の即時型反応を誘発させたモルモットでは、呼吸抵抗の上昇に一致して気管、大気管支の CGA-IR が有意 ($p<0.01$) に増加した。下肺では増加傾向を認めたが有意差はなかった。

上記の成績は、モルモット気道の I 型アレルギー反応が交感神経系にストレスとして作用する可能性を示唆している。

Key words: chromogranin A — guinea pig airways — immediate type allergic reaction
— radioimmunoassay — sympathetic nerves

緒言

クロモグラニン A (CGA) は、1967年にウシの副腎髄質より分離、同定され¹⁾、命名された²⁾酸性糖タンパク質である。すでにヒト³⁾、ブタ⁴⁾、ウシ⁵⁾、マウス⁶⁾、ラット⁷⁾においてそのアミノ酸配列が確定されている。CGA は近年、当初より指摘されている chromaffin granule¹⁾²⁾のみならず、ヒトの肺、気管支を含む広範囲な神経内分泌組織中に存在することが確認されつつある⁸⁾⁹⁾。

一方、CGA は、noradrenaline (NA), adrenaline (Adr) と共に交感神経節後線維より放出され¹⁰⁾¹¹⁾、再吸収されない¹¹⁾ことから、起立運動負荷試験後のヒト

の血漿中 NA の急増と同様に、交感神経系の活性化の指標として利用できる可能性が指摘されつつある^{12)~14)}。

本研究では、OA 吸入感作によるモルモット実験喘息モデルを作製し、OA 吸入暴露を行った群(OA 暴露群)と、吸入させた OA の溶媒である生理的食塩水を吸入させた群(対照群)に分けて、OA 暴露により誘発された I 型アレルギー反応における rat CGA359-389-like immunoreactivity (CGA-IR) の変動を、気道の部位別に検討した。本研究には CGA を fmol/tube まで測定可能な N 末端特異的 RIA 系を開発し、実験を行った。

Received: September 14, 1993

Accepted: November 24, 1993

Abbreviations: Adr adrenaline; B/F antibody-bound/antibody-free antigen; CGA chromogranin A; CGA-IR rat chromogranin A-like immunoreactivity; fmol femtomol; IAR immediate asthmatic reaction; NA noradrenaline; OA ovalbumin; PCA passive cutaneous anaphylaxis; pmol picomol; RIA radioimmunoassay

実験材料及び方法

1. ペプチド

本研究に用いられた CGA のフラグメントペプチドである CGA359-389は、大島・矢内原¹⁵⁾によって固相法により合成されたものを逆相 HPLC により高純度に精製し、標準抗原として用いた。

2. RIA

1) 抗血清

免疫法は大島らの方法¹⁵⁾に基づいて行った。すなわち、合成 CGA359-389 を 50% polyvinylpyrrolidone に混和吸着させ、Freund's complete adjuvant を加えて乳化させ、体重約 2.5kg の Japanese white rabbit の両側腹部に皮内注射し、さらに 2 週毎に CGA359-389 を同様に追加免疫して抗血清を作製した。これにより、最終希釈倍率 14000 倍にて RIA に使用可能な抗体 R0763 を得た。

2) 標識抗原

CGA359-389 をクロラミン T 法¹⁶⁾によりヨード化して得た ¹²⁵I-CGA359-389 を用いた。

3) 標準希釈度

0.01M リン酸緩衝液, pH 7.4 [0.14M NaCl (和光純薬製), 0.025M EDTA 2Na(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) (和光純薬製), 0.5% BSA (bovine serum albumin) (Sigma 社製)を含む]を使用した。

4) CGA359-389 特異 RIA

Fig. 1 に CGA359-389 の特異 RIA 系を示した。前記の合成 CGA359-389, 標準希釈液, 標準抗原, 抗血清 R-0763 を用いた。antibody-bound/antibody-free

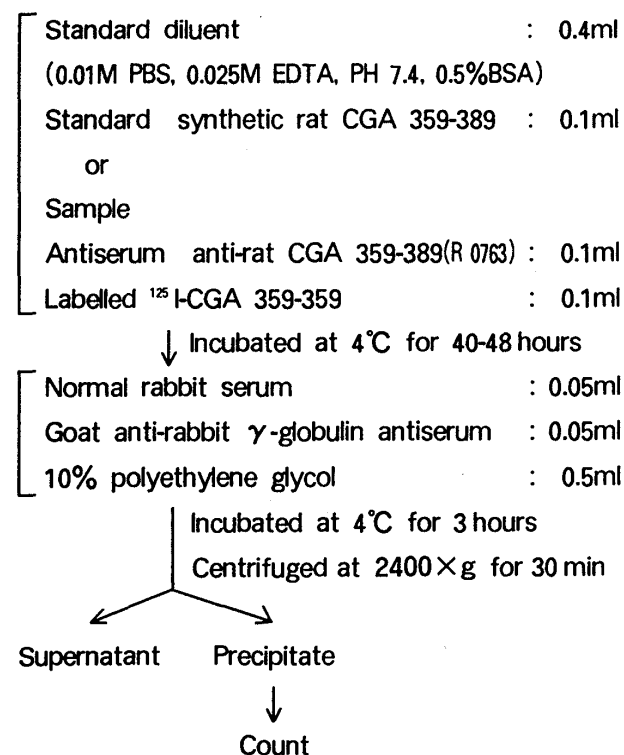


Fig. 1. Radioimmunoassay procedure for rat CGA359-389.

antigen 分離 (以下 B/F 分離と略) は、2 抗体-ポリエチレングリコール法により行った。試薬は、正常家兔血清 (第一ラジオアイソトープ研究所製), 家兔 γ-グロブリン抗血清 (第一ラジオアイソトープ研究所製), ポリエチレングリコール 6000 (和光純薬製) を用いた。本 RIA 系の標準曲線は logit-log スケール上で直線を示し、最小検出限界は 4.0~5.0fmol/tube であった。

3. 呼吸器組織の抽出

Hartley 系雄モルモット (体重約 400g 前後) を用い、吉原らの方法¹⁷⁾に従い、気管、大気管支、下肺 (ヒト下葉に相当するモルモットの後葉) を摘出し、-30°C に凍結保存した。

組織は秤量後氷冷下で各組織に対して 5~10 倍量の Tris-HCl 緩衝液 [0.05M Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) (和光純薬製), 0.15M NaCl, 0.02M EDTA 2Na, 1mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) (和光純薬製, pH 8.0 (を含む) を使用し、氷冷下 Polytron (Kinematica GmbH, Switzerland) にてホモジナイズした。これを沸騰水浴中で 10 分間加熱後、氷水中で冷却し、4°C, 2400×g にて 30 分間遠心分離を行い、上清を RIA 用検体として使用した (Fig. 2)。

4. 感作モルモットの作製

モルモットの吸入感作は寺師らの方法¹⁸⁾に準じて行った。すなわち、10 匹を同時にかつほぼ均一に抗原吸入暴露を行い得るプラスチック製抗原吸入装置にモルモットを入れ、10mg/ml に調整した ovalbumin (OA) (Sigma 社製, grade V) 液を、超音波ネブライザー (NE-U11B, Omron 社製) を用いてエアロゾル化

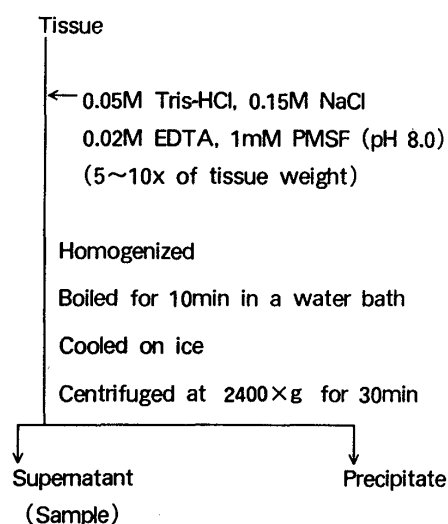


Fig. 2. Procedure of Tris-HCl extraction.

して送り、1日10時間、連続10日間吸入暴露を行い感作を成立させた。モルモットは吸入暴露終了7日後より実験に用いた。なお、感作の成立はOvaryの方法¹⁹⁾に従い、PCA反応を行った。すなわち、感作モルモット血清の希釈系列を体重約250gのモルモット背部皮膚に各0.1ml皮内注射し、それぞれの感作期間後にOA 500 μ gと1% Evans blue液を静注した。20分後に直径8mm以上の皮膚の青色化反応を見たものを陽性と判定した。

5. 抗原吸入暴露による呼吸変化と処理

抗原吸入暴露後の呼吸抵抗の変化は、吉原の報告¹⁷⁾に従って記録した。すなわち抗原吸入にはDevilbiss 646ネブライザーを用い、5mg/mlに調整したOA液を6l/minの気流量で1分間吸入暴露を行った(OA暴露群)。この際に生じる呼吸抵抗の変化は、Meadらのオンレーション法²⁰⁾を一部改変した装置¹⁷⁾を用いて測定し、記録した。

また、対照として、同一の条件で感作を成立させたモルモットの中から無作為に選別し、同一器具を使用し、同一条件でOA液の溶媒である生理的食塩水を1分間吸入させた群(対照群)を作製し、実験に用いた。

気道抵抗は、それぞれ暴露後3分で測定し、暴露5分後に組織の摘出を行った。

6. 統計

実験成績は全てmean $\pm$ SEで表わした。使用したモルモットは、各群N=8である。有意差検定はStudent-t検定を用い、P valueは<0.05を有意とした。

7. 単位

呼吸器組織抽出物中のCGA-IRの単位は、全て組織湿重量1g当たりのpicomol (pmol/g wet weight of tissue)で表現した。また、呼吸抵抗の単位はcmH₂O/ml/secで表した。

結 果

1. rat CGA359-389特異RIA系におけるモルモット呼吸器組織抽出物中の用量反応曲線

特異抗血清R-0763を使用したRIA系を用いて対照群のモルモット(N=8)の下肺、気管、大気管支中のCGA-IRを測定し、それらの用量反応曲線をFig. 3に示した。logit-logスケール上に直線を示したCGA359-389の標準曲線に対し、いずれの組織の抽出物も平行性を示し、各抽出物中のCGA-IRとも標準の合成

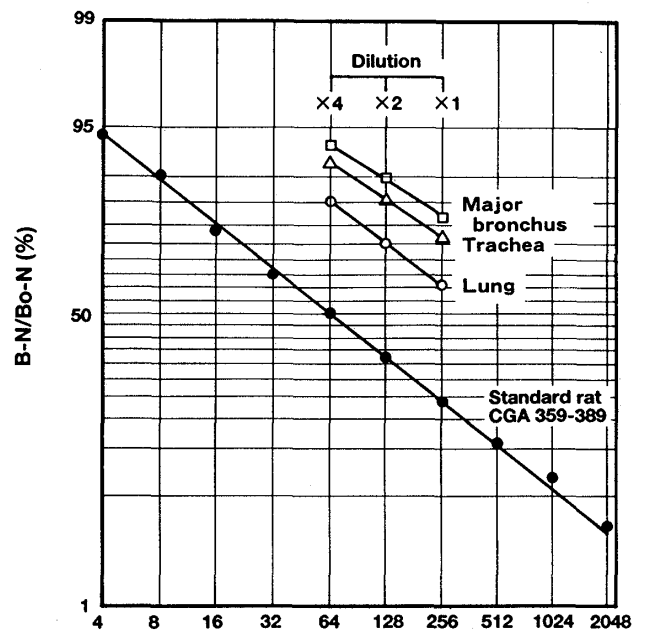


Fig. 3. Dilution curves of rat CGA359-389 like immunoreactivity in guinea pig respiratory tissues.

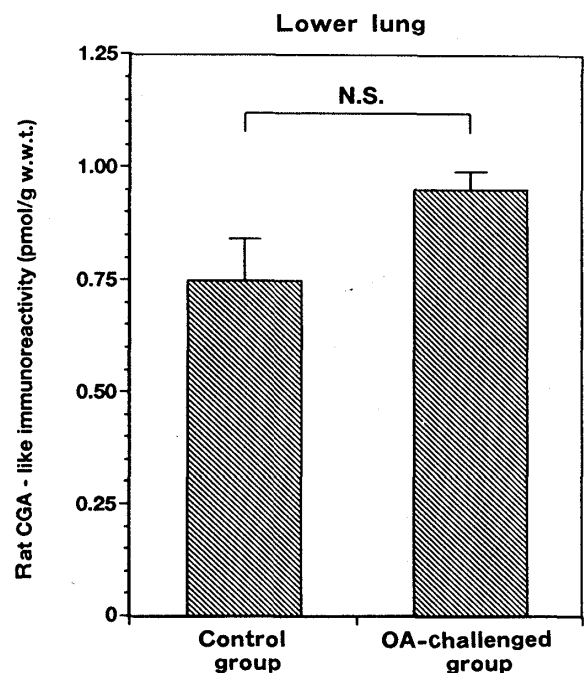


Fig. 4. Rat CGA359-389 like immunoreactivity of lower lung parenchyma of guinea pigs actively immunized by OA-inhalation.

CGA359-389と免疫学的に差のないことが証明された。

2. 対照群モルモット呼吸器組織中のCGA-IRの分布
対照群モルモット呼吸器組織中のCGA-IRの分布を検討した。下肺は 0.751 ± 0.088 、気管 0.708 ± 0.038 、

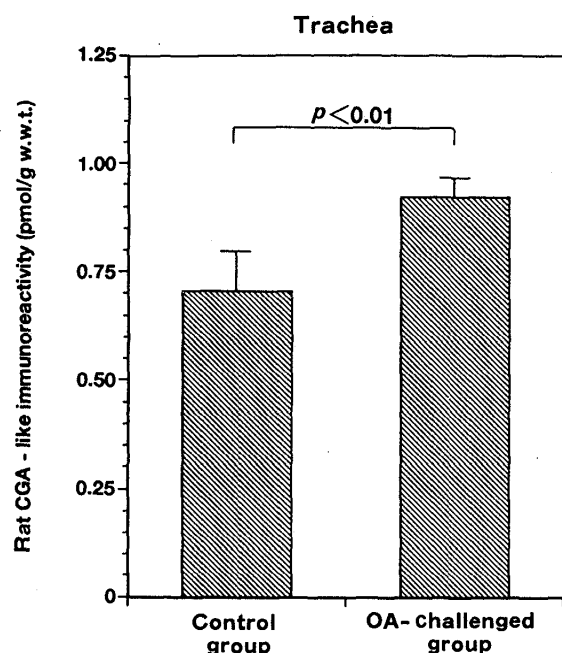


Fig. 5. Rat CGA359-389 like immunoreactivity of trachea of guinea pigs actively immunized by OA-inhalation.

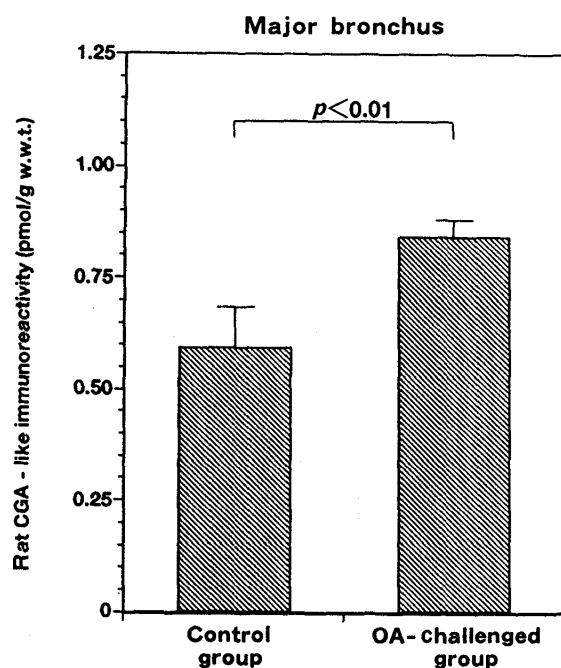


Fig. 6. Rat CGA359-389 like immunoreactivity of major bronchus of guinea pigs activity immunized by OA-inhalation.

大気管支 0.591 ± 0.051 であり、下肺が最も高濃度であった。また、生理的食塩水吸入前の呼吸抵抗値は 0.404 ± 0.043 、吸入後が 0.437 ± 0.030 であり、統計学的な有意差は認められなかった。

3. OA 暴露群モルモットにおける呼吸抵抗および CGA-IR の変動

1) 抗原暴露前後の呼吸抵抗の変化

OA 吸入暴露後 3 分で前値に比べて 3 倍以上の呼吸抵抗の上昇を示したモルモット (N=8) を用いて検討を行った。OA 暴露前の呼吸抵抗値は 0.446 ± 0.035 であり、対照群と差を認めなかった。暴露後の呼吸抵抗は 1.919 ± 0.118 であり、前値に比べて有意 ($p < 0.01$) に上昇した。

2) 抗原暴露後の CGA-IR は、下肺 0.954 ± 0.038 、気管 0.925 ± 0.038 、大気管支 0.840 ± 0.028 であり、対照群の各組織中 CGA-IR と比較すると、気管および気管支中の CGA-IR が有意 ($p < 0.01$) に上昇していた (Fig. 5, Fig. 6)。下肺でも有意差は認められなかったものの、増加傾向が認められた (Fig. 4)。

考 察

1967年の Blascho らの報告¹⁾以来、CGA は多くの動物種と臓器でその存在が確認され¹⁰⁾、その測定の生理的な意義や疾患との関連¹²⁾⁻¹⁴⁾が主にヒトにおいて明らかにされつつある。一方、動物実験モデルにおける検討はいまだ少なく、今回実験に用いたモルモットについては食道²¹⁾、膵²²⁾の内分泌腺において免疫組織学的な検討がされているものの、呼吸器組織中の CGA に対する検討は未だない。今回、我々は N 端特異抗血清を用いた高精度の特異 RIA 系を開発し、OA 吸入によって惹起される I 型アレルギー(即時型)反応(IAR)の有無による呼吸器組織中の CGA-IR の変化を検討した。

まず対照群では、CGA-IR の含量が部位によって明らかに異なることが確認された。モルモット気道の adrenergic fiber の分布を免疫組織学的手法で調べた O'Donnel²³⁾や力丸ら²⁴⁾の報告によれば、adrenergic fiber は気道平滑筋においては上部気道に多く細気管支以下ではほとんど見出されず、むしろ血管周囲に多く認められたという。対照群での部位差には気管平滑筋、血管周囲への adrenergic fiber の含有量の差が影響した可能性が示唆される。また、モルモットの他の内分泌腺に CGA が存在し²¹⁾²²⁾、またヒト、ブタ、サルにおいては気道粘液腺にも CGA 陽性細胞を認めたとする報告⁸⁾もあることから、モルモット気道の粘液腺に CGA が存在する可能性もあり、今後、組織化学的

に検討を進める予定である。

ついで、OA 暴露群の検討では、明らかな IAR により気管、大気管支において有意な ($p < 0.01$) CGA-IR の上昇を認めた。CGA は副腎髄質¹²⁾や交感神経末端⁹⁾¹³⁾より分泌されることから、気道の IAR に対して局所の自律神経系とくに交感神経系が反応して活性化され、CGA が分泌された可能性が強い。また、CGA が新規合成され放出されるためには少なくとも30分はかかるといわれ²⁵⁾、誘発後5分で組織抽出を行った本実験では、このCGAの上昇は、呼吸器組織中に遊離されたCGAを抽出測定した可能性に加え、血流等により他組織に由来したCGAも測定している可能性があると考えられる。

現在のところ、CGA の生理的作用には不明な点が多い。CGA はカテコールアミンとともに放出され¹⁰⁾¹¹⁾²⁶⁾、再吸収されない¹¹⁾ことから交感神経系の活性化の指標となることが示唆されつつある¹³⁾¹⁴⁾。一方、CGA にはカルシウムイオン吸着作用があることから、局所でのカルシウムイオンの動態に関与する可能性^{26)~28)}や、CGA そのものがホルモンの precursor として作用する可能性²⁹⁾³⁰⁾も示唆されている。古くて新しい問題といわれる喘息と自律神経系との関連³¹⁾³²⁾において、CGA についての研究が新たな側面を見出す可能性があり、今後の更なる検討が必要と考えられる。

結 語

OA 吸入感作モルモットを作製し、抗原 (OA) 吸入暴露による I 型アレルギー反応の有無による各呼吸器組織中の CGA-IR の含量の差を検討した。

1. モルモット呼吸器組織中において、CGA-IR は測定可能であった。

2. 生食吸入暴露群 (対照群) での CGA-IR は紙組織湿重量当たり $0.4 \sim 2 \text{ pmol}$ であった。

3. OA 吸入暴露群 (OA 暴露群) では対照群に比べて気管、大気管支の CGA-IR が有意に上昇した ($p < 0.01$)。

4. モルモット実験喘息モデルの I 型アレルギー反応において、CGA が気道反応に関与する可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、RIA について御指導いただきました

た井口和明、高塚直樹先生をはじめ静岡県立大学薬学部生物薬品化学教室の皆様に感謝いたします。

なお、本研究の一部は森永奉仕会研究奨励金によるものである。

文 献

- 1) Blascho, H., Comline, R.S., Schneider, F.H., Silver, M. and Smith, A.D.: Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature* 215, 58-59, 1967.
- 2) Schneider, F.H., Smith, A.D. and Winkler, H.: Secretion from adrenal medulla; biochemical evidence for exocytosis. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 31, 94-104, 1967.
- 3) Konecki, D.S., Benedum, U.M., Gerdes, H.H. and Huttner, W.B.: The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. *J. Biol. Chem.* 262, 17026-17030, 1987.
- 4) Iacangelo, A., Fischer-Colbrie, R., Koller, K.J., Brownstein, M.J. and Eiden, L.E.: The sequence of porcine chromogranin A messenger RNA demonstrates chromogranin A can serve as the precursor for the biologically active hormone, pancreastatin. *Endocrinology* 122, 2339-2341, 1988.
- 5) Iacangelo, A., Affolter, H.U., Eiden, L.E., Herbert, E. and Grimes, M.: Bovine chromogranin A: Its sequence and distribution of its messenger RNA in endocrine tissues. *Nature* 323, 82-86, 1986.
- 6) Wu, H.J., Rozansky, D.J., Parmer, R.J., Gill, B. M. and O'Connor, D.T.: Structure and function of the chromogranin A gene clues to evolution and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 266, 13130-13134, 1991.
- 7) Parmer, R.J., Koop, A.H., Handa, M.T. and O'Connor, D.T.: Molecular cloning of chromogranin A from rat pheochromocytoma cells. *Hypertension* 14, 435-444, 1989.
- 8) Lauweryns, J.M., Ranst, L.V., Lloyd, R.V. and O'Connor, D.T.: Chromogranin in bronchopulmonary neuroendocrine cells. Immunocytochemical detection in human, monkey, and pig respiratory mucosa. *J. Histochem. Cytochem.* 35, 113-118, 1987.
- 9) Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R.: The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 49, 497-528,

- 1992.
- 10) Eiden, L.E., Iacangelo, A., Hsu, C.-M., Hotchkiss, A.J., Badar, M.-F. and Aunis, D.: Chromogranin A synthesis and secretion in chromaffin cells. *J. Neurochem.* 49, 65-74, 1987.
- 11) Takiyuddin, M.A., Cervenka, J.K., Hsiao, R.J., Barbosa, J.A., Parmer, R.J. and O'Connor, D.T.: Chromogranin A storage and release in hypertension. *Hypertension* 15, 237-246, 1990.
- 12) O'Connor, D.T. and Bernstein, K.V.: Radioimmunoassay of chromogranin A as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N. Engl. J. Med.* 311, 764-770, 1984.
- 13) Cryer, P.E., Wortsman, J., Shah, S.D., Nowak, R.M. and Deftos, L.J.: Plasma chromogranin A as a marker of sympathochromaffin activity in humans. *Am. J. Physiol.* 260, E243-246, 1991.
- 14) Dimsdale, J.E. and Ziegler, M.G.: What do plasma and urinary measures of catecholamines tell us about human response to stressors? *Circulation* 83, 1136-42, 1991.
- 15) Ohshima, K., Nagasawa, S., Nishikawa, Y., Sakai, Y., Iguchi, K., et al.: Synthesis of rat chromogranin A fragments and their immunological properties. *Peptide Chemistry 1991*, Protein Research Foundation, pp.157-162, 1992.
- 16) Hunter, W.M. and Greenwood, F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194, 495-496, 1962.
- 17) 吉原重美: 正常及び気道アレルギーモルモットにおける呼吸器組織中サブスタンス P 免疫活性の検討. *アレルギー* 37, 1161-1168, 1988.
- 18) 寺師義典, 湯川龍雄, 福田 健, 牧野荘平: モルモット気道アレルギーにおける遅発型反応の出現とその発症因子に関する基礎的研究 1. 同種抗体受身感作モデルおよび抗原反復吸入能動感作モデルの比較検討. *アレルギー* 37, 980-991, 1988.
- 19) Ovary, Z.: *Passive cutaneous anaphylaxis*. In "Immunological Methods" 1st ed. (ed. by J.D. Ackryd). Blackwell Scientific Publications, Oxford pp.259-283, 1964.
- 20) Mead, J.: Control of respiratory frequency. *J. Appl. Physiol.* 15, 325-336, 1960.
- 21) Heym, C. and Kummer, W.: Morphology and immunocytochemistry of two endocrine cell types in the guinea-pig esophageal epithelium. *Cell Tissue Res.* 256, 635-643, 1989.
- 22) Cetin Y. and Grube, D.: Immunoreactivities for chromogranin A and B, and secretogranin II in the guinea-pig endocrine pancreas. *Histochemistry* 94, 479-984, 1990.
- 23) O'Donnell, S.R., Saar, N. and Wood, L.J.: The density of adrenergic nerves at various levels in the guinea-pig lung. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 5, 325-332, 1978.
- 24) 力丸 暁, 須藤睦子: モルモット気管平滑筋の神経支配. *日平滑誌* 7, 35-44, 1971.
- 25) Winkler, H., Hortnagl, H., Schopf, J.A.L. and Nedden, G. zur: Bovine adrenal medulla; synthesis and secretion of radioactively labelled catecholamines and chromogranins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 271, 193-203, 1971.
- 26) Westermann, R., Stogbauer, F., Unsicker, K. and Lietzke, R.: Calcium-dependence of chromogranin A-catecholamine interaction. *FEBS Lett.* 239, 203-206, 1988.
- 27) Reiffen, F.U. and Gratzl, M.: Ca^{2+} binding to chromaffin vesicle matrix proteins; effects of pH, Mg^{2+} , and ionic strength. *Biochemistry* 25, 4402-4406, 1986.
- 28) Bulenda, D. and Gratzl, M.: Matrix free Ca^{2+} in isolated chromaffin vesicle. *Biochemistry* 24, 7760-7765, 1985.
- 29) Settleman, J., Fonseca, R., Nolan, J. and Angeletti, R.H.: Relationship of multiple forms of chromogranin. *J. Biol. Chem.* 260, 1645-1651, 1985.
- 30) Tatemoto, K., Efendic, S., Mutt, V., Makk, G., Feistner, G.J. and Barchas, J.D.: Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* 324, 476-478, 1986.
- 31) Szentivanyi, A.: The beta adrenergic theory of the atopic abnormality in bronchial asthma. *J. Allergy* 42, 203-232, 1968.
- 32) 市村登寿: 気道過敏性の成立機序. *日小呼誌* 3, 6-11, 1992.

CHROMOGRANIN A LIKE IMMUNOREACTIVITY IN RESPIRATORY TISSUES OF OVALBUMIN-SENSITIZED GUINEA PIGS

Norimasa Fukuda, Shigemi Yoshihara and Tohju Ichimura
First Department of Pediatrics, Dokkyo University School of Medicine

Noboru Yanaihara
Laboratory of Bioorganic Chemistry, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences

Chromogranin A like immunoreactivity (CGA-IR) was measured by a specific radioimmunoassay using N-terminal specific antiserum R-0763 in respiratory tissues of guinea pigs. All guinea pig were actively immunized by recurrent Ovalbumin (OA)-inhalation and divided into two groups; one was challenged by OA, and the other inhaled saline as a control. These groups were studied for respiratory resistance and sacrificed for measurement of CGA-IR concentrations in the trachea, major bronchus and lower lung. In the control group, CGA-IR level was 0.4-2 pmol/g wet weight of tissue, and its distribution order was lower lung>trachea> major bronchus. In the OA-challenged group, provocation clearly induced significant elevation of CGA-IR in the trachea and main bronchus coinciding with elevation of respiratory resistance. In the lower lung, on the other hand, the increase in CGA-IR was not significant. These results suggest that experimental immediate asthmatic response (IAR) possibly acts as a stressor to the sympathetic nervous systems in guinea pig air-ways.
