

抗ラット肺クララ細胞分泌物質抗体の作製

川崎医科大学 人体病理 II

池田 弘美, 真鍋 俊明
森谷 卓也, 山下 貢司

(昭和62年4月1日受理)

Production of the Antibody against the Secretory Products of Rat Clara Cells

Hiromi Ikeda, Toshiaki Manabe
Takuya Moriya and Koshi Yamashita

Department of Human Pathology II
Kawasaki Medical School

(Accepted on April 1, 1987)

ラットの肺洗浄液内蛋白を抗原としてウサギを免疫した。吸収操作を行って得られた抗体を使って、ホルマリン固定・パラフィン包埋されたラットの肺組織を酵素抗体法で免疫組織化学的に検索すると、形態的にクララ細胞と思われる細胞に特異的な反応を示していた。B-5 固定材料ではクララ細胞のほかに細気管支上皮上の **mucus blanket** にも反応物質が存在した。プロテイン A・ゴールドを用い電顕レベルで反応物質の局在を調べるとクララ細胞内の高電子密度の分泌顆粒に集中していた。これらの所見は抗原がクララ細胞と考えられる細胞で産生され、末梢気道に分泌されていることを示唆している。また、この抗体はラットのほかにマウスのクララ細胞と交差反応を示したが、他の種（ハムスター、モルモット、ウサギ、犬、猫、猿、人）のそれとは反応しなかった。本報告では本抗体の作製方法について詳述した。

By immunizing rabbits with the proteins in the rat lung lavage fluid, we have succeeded in producing antibodies against secretory products of the rat Clara cells. Immunohistochemically, these antibodies were demonstrated to specifically react with secretory products in the mucus blanket as well as Clara cells in B-5 fixed materials, and only with the latter in formalin-fixed materials. Immuno-electron-microscopic study using protein-A-gold showed that the reaction products were accumulated in the electron dense granules of the Clara cells. These findings were considered to indicate that antigens we used were indeed produced in the Clara cells and were secreted into the airway. The antibodies were also reacted with those of the mice, but not with hamsters, guinea pigs, rabbits, dogs, cats, monkeys or the human. In this communication, our preparatory method of producing antibodies is described in detail.

Key Words ① Clara cell ② Immunohistochemistry ③ Lung

緒 言

クララ細胞つまり細気管支無繊毛細胞は、肺の末梢気道、特に終末細気管支から呼吸細気管支にかけて存在する。^{1),2)} この細胞は繊毛上皮細胞の間に介在し、繊毛を持たない低円柱ないし立方形の上皮細胞で核上部細胞質がドーム状に突出した形態を示すことで特徴づけられている。しかし、この細胞はその機能状態によりその形態を異にするため、顕微鏡レベルでは上記の特徴のないものについては同定の方法はない。クララ細胞の機能はいまだに明らかでなく、(1) 細気管支、肺上皮細胞に対して母細胞として働き得る、(2) サーフアクタント産性能を持つ、(3) チトクローム P-450 を介して解毒機能を持つ、などが推定されているにすぎない。^{3),4)} 一方この細胞にはアポクリン分泌細胞様の突起がみられることや、電顕レベルでの観察で細胞質内に電子密度の高い顆粒がみられ、いわゆる mucus blanket 層にも同様の density を示す物質が存在することから、この細胞が分泌に関係していることも推測されている。^{5),6)}

今回われわれは、この細胞を同定する、あるいはその機能を調べる手段を得る目的で、この細胞に対する抗体を作製するいくつかの実験を計画した。そのうち気道内に分泌された物質を利用する方法でうまく抗クララ細胞抗体といえる抗体を作製することに成功した。本抗体についての臓器特異性、細胞特異性、種特異性、および抗原の局在についてはすでに他紙に報告した⁷⁾ ので、ここではその作製方法について詳しく報告したい。

材 料 と 方 法

1. 抗原の採取および精製

動物は成体 Sprague-Dawley Rat (以下 SD ラット; 体重平均 250 g; 雌) を使用した。ラットは体重 100 g あたり 0.17 ml のネブタールと 200 単位のヘパリンの混合液の腹腔内注射にて麻酔した。板上に固定した後、気管切開部より挿入したカニューレを通して換気を行

いながら開胸し、右心室より生理食塩水を灌流すると同時に腹部大動脈を切断した。肺が白くなった時点で灌流を中止し、肺を 7~8 ml の 0.25 mM フッ化メチルスルホニド (PMSF) 加冷生理食塩水で 4~5 回洗浄して、これをラット肺洗浄原液とした。洗浄原液は最初 500 × g で 5 分間遠心した後、さらに 19,500 × g で 30 分間遠心し沈渣 (surfactant pellet) を取り除いた。⁸⁾ 次に上清を PM 10 Amicon 膜を取り付けた限外ろ過機で濃縮後、ミリポアフィルター (孔径 0.2 μ) を通した。濃縮原液は混入している血清成分を取り除くため、Sephrose 4B のゲルにリガンドとして、ウサギ抗ラット全血清抗体を結合させ作ったカラムを通過させた。⁹⁾ この操作は通過後肺洗浄液と抗ラット血清抗体との間にオクタロニー法で沈降線がみられなくなるまで繰り返し、最後のものを免疫用抗原とした。

2. 免 疫

抗体作製のためには、New Zealand White rabbit (NZW ウサギ) (3~3.5 kg; 雌) を使用した。免疫用抗原液はフロイドの完全アジュバントと等量混合し最終濃度が約 100 μg/ml になるようにした。これをウサギ 1 頭あたり蛋白量約 100 μg、つまり 1 ml を背部の多数の場所に注射した。2 週間後に、その後は 1 週間おきに追加免疫を行った。試験採血を行い、オクタロニー法で抗体価の上昇を確認した後、頸動脈より全採血を行い、遠心して血清を分離した。

3. 抗体の精製

作製された抗体はウサギ血清から硫酸塩析法により γ-グロブリン分画として取り出した。さらに非特異的な成分を取り除くため Sephrose 4B のゲルにラット肝を Brinkman Polyttron でホモジナイズし 19,500 × g 30 分間遠心したものの上清と、ラットの血清とをリガンドとして結合させて作ったカラム内を通過させた。この抗体が濃縮抗原原液と反応するか否かはオクタロニー法で調べた。

4. 免疫組織化学的観察

SD ラットから得た肺を 10% 緩衝ホルマリンおよび B-5 固定液でそれぞれ浸透固定，気管からの注入固定を行い，通常の方法でパラフィン包埋材料を作製した。4 μ m の厚さで薄切した切片は，キシレンで十分パラフィンを除去した後，作製した抗体を第 1 次抗体として PAP (peroxidase-anti peroxidase) 法により染色した。われわれの使用した免疫染色の方法はすでに別紙に詳しく報告してあるが，¹⁰⁾ 簡単に書くと，まず 10% H₂O₂ 加メタノール 30 分にて内因性 peroxidase の block を行い，次に作製した 1 次抗体原液を 1:1 から 1:2,000 にまで希釈したものを作り，それぞれ室温で 30 分作用させた。1% 卵白アルブミンで洗浄後，抗ウサギ豚血清 (DAKO; 1:30) を 30 分間作用させた。その後 peroxidase 抗 peroxidase 免疫複合体ウサギ血清 (DAKO; 1:250) を 30 分作用させ，0.02% DAB(3-3'-diaminobenzidine; シグマ社) で 5 分間発色させた。核染はヘマトキシリンで行った。DAB の褐色反応産物を陽性とした。染色手順のうち第 1 次抗体や第 2 次抗体を除いたものをコントロールとした。臓器特異性をみるため，同様に SD ラットの肺，気管，唾液腺，食道，胃，小腸，大腸，肝臓，膵臓，脾臓，腎臓，副腎，膀胱，尿道球腺，卵巣，子宮，陰，精巣，前立腺，心筋のホルマリン固定，パラフィン包埋標本作製し，種特異性をみるためにはマウス，ハムスター，モルモット，ウサギ，犬，猫，猿，人の標本作製した。これらも上記のごとく，PAP 法にて染色した。

5. 抗体の再精製

臓器特異性の検索で，50 倍以下の希釈倍率のものにのみ唾液腺細胞に微弱な反応を認めたため，SD ラット唾液腺 20 g より臓器粉末を作製し，抗血清を 4 倍希釈したものに乾燥粉末を 100 mg/ml の割合で加え吸収を行った。また肺胞 II 型上皮細胞との分離をはっきりさせるために，山成らの報告した方法¹¹⁾ で得た単離 II 型上皮細胞 (7 \times 10⁸ 個/ml，純度 80%) をソニケーターで破碎し，オクタロニー法で抗体との

反応を調べるとともに，吸収操作を行った。これら 2 つの吸収操作後の抗血清を最終抗体として 1:200 の希釈濃度で免疫組織学的検索を繰り返した。

6. 免疫電子顕微鏡的観察

抗原の細胞内局在を調べるために，プロテイン A・ゴールド(PAG)法を用いて電子顕微鏡レベルでの観察を試みた。SD ラット肺をカーソンのホルマリン固定液¹²⁾ で気管注入しさらに細切して固定し，リンス後，通常の方法で脱水してエポン 812 に包埋した。金銀色に超薄切した切片をニッケル・グリッドに載せて内田の方法¹³⁾により染色した。エッチングは行わず，2% 牛胎児血清(FCS)を含む phosphate-buffered saline (PBS) に 30 分間浸した後，2% FCS を含む PBS で 200 倍に希釈した作製抗体に室温で 3 時間作用させた。洗浄後切片は PAG (ジャンセン; 20nm) を 2% FCS/PBS で 40 倍に希釈したものに 50 分間浸した。2% FCS/PBS で同様に洗浄したのち，さらに蒸留水で洗浄し，乾燥させた。電子染色は 2% 酢酸ウラニル 20 分，クエン酸鉛 (Reynolds') 1 分で行った。電子顕微鏡的観察には Hitachi HS-9 電子顕微鏡を用いた。

結 果

1. 免疫組織化学的検索の結果

抗体原液を 100 倍以上に希釈したものでは，いずれも形態学的にクララ細胞に一致する細胞のみに陽性像がみられた (Fig. 1) が，200 倍程度のものが一番染色性が良いと考えられた。織毛細胞，マクロファージ，肺胞 II 型上皮細胞等はいずれも陰性であった。B-5 固定材料では細胞のほか上皮細胞直上，つまり mucus blanket に一致して陽性像がみられた (Fig. 2)。この所見はホルマリン固定材料では認められなかった。オクタロニー法では沈降反応を認めなかったが，50 倍希釈までのものでは気管支腺の腺細胞と唾液腺組織に微弱な染まりがみられた。唾液腺粉末と肺胞 II 型上皮細胞で吸収を行った後の抗血清ではこの反応は全く消失していた。

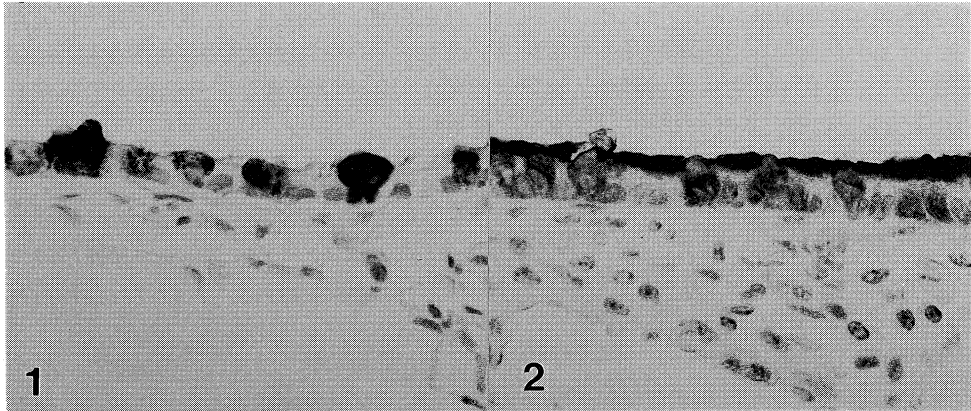


Fig. 1. Rat bronchiolar epithelial cells stained with antisera against Clara cell secretory products. Notice that only Clara cells are immunoreactive (Buffered formalin, Immunoperoxidase, $\times 400$).

Fig. 2. B-5 fixed rat lung tissue. Immunoreactivities are observed not only in the Clara cells but also along the mucus blanket of the bronchioles (B-5 fixation, Immunoperoxidase, $\times 400$).



Fig. 3. Mouse lung in which Clara cells are strongly immunoreactive (Buffered formalin, Immunoperoxidase, $\times 100$).

その他の組織はいずれも陰性であった。種特異性に関してはマウスにのみ交差反応がみられた (**Fig. 3**).

2. 免疫電子顕微鏡的検索の結果

カーソンのホルマリン単独固定標本では組織の保存状態があまり良くなく、微細構造を理解することは困難であるが、通常のグルタールア

ルデヒド、四酸化オスミウム固定標本と比較観察すると、その局在の把握は容易となる。本抗体を使用したカーソンのホルマリン固定標本ではクララ細胞内の顆粒に一致して金コロイド粒子の集中がみられた (**Fig. 4a, b**). 繊毛細胞には金粒子の集中はみられず、また肺胞II型上皮細胞の分泌顆粒にも金粒子は集中していなかった (**Fig. 5**).

考 察

ある特定の細胞に特異的な蛋白には、その細胞の膜成分についた型で、あるいは細胞質内にフリーの型で存在するが、決して細胞外に分泌されないものと、細胞内で産生され細胞外に分泌されるものがある。このいずれもが細胞特異抗原として、その細胞の同定、分化程度、機能を認識するのに役立つ。リンパ球を例にとれば、T細胞のマーカーとなるOKT3, OKT4, OKT8等は前者の例であり、B細胞のマーカーとなるIgG, A, M, λ , κ 等の免疫グロブリンは後者の例である。肺内細胞の同定の一段として免疫組織化学的手法を用いる場合にも同じようにアプローチできよう。

最近われわれは、ラットおよびモルモットのクララ細胞について、純形態学的ならびに組織

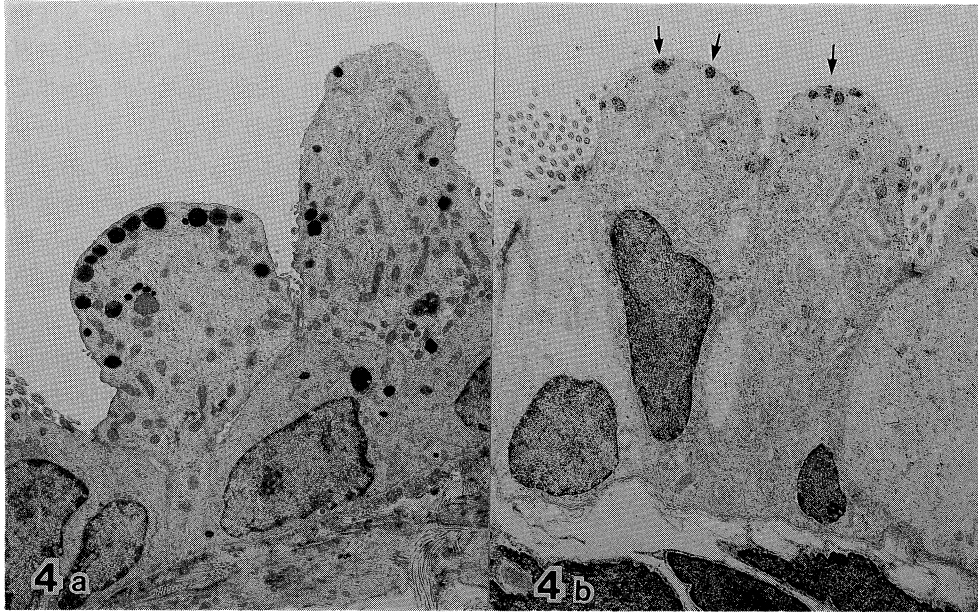


Fig. 4. Electron micrograph of Clara cells.

- a:** Clara cells seen in routinely processed materials. Note that dense granules are seen abluaminally (2.5% glutaraldehyde 1% OsO₄, Uranyl acetate, Lead citrate, ×4,100).
- b:** Immunoelectron micrograph. Gold particles are aggregated mainly in the secretory granules of the Clara cell (Carson's formalin fixative, P. A. G., ×4,100).



Fig. 5. Immunoelectron micrograph of type II cells. No gold particles are observable within or above the type II cells (Carson's formalin fixative, P. A. G., ×5,700).

するものである。われわれの研究によれば、クララ細胞の分泌顆粒には少量のリン脂質、糖が存在するがその主体は蛋白であると考えられた。また、Petrik & Collet,¹⁴⁾ Cutz & Conen¹⁵⁾もすでにクララ細胞がリン脂質よりもむしろ蛋白の合成分泌に関与していることを報告している。Kuhnら^{5),6)}は電子顕微鏡的にクララ細胞と上皮細胞上の液層を比較しクララ細胞顆粒と同じ電子密度を持った物質が後者の液層に存在することからクララ細胞内顆粒が分泌されていることを示唆した。

以上のような事実を背景として、もしクララ細胞特異抗体を作るとすれば、(1)クララ細胞を十分量単離し、これから抗原を抽出するか、(2)分泌された蛋白を抗原とする方法が考えられる。われわれは以前に肺組織より肺胞II型上皮細胞を約80%の純度で単離する方法を確立したが、¹¹⁾クララ細胞を単離することは実質的に不可能であった。1982年、Devereuxら¹⁶⁾は約70%の純度でクララ細胞の単離に成功し

化学的に研究をすすめてきた。本研究はその一環をなすもので、クララ細胞をより正確に同定する手段、その機能を調べる一手段を得ようと

たことを報告した。この方法が確立されれば細胞質内蛋白を利用してその抗体を作り、その中からクララ細胞に特異的なものを見つけ出すことも可能であろう。ただこの方法を利用するには、多数の動物と多くの付帯機器、装置等が必要である。一方、目を転じて、分泌物質を利用するならば、意外に簡単な方法でこれを得ることができそうである。その場合、考えられる限り混入蛋白を除去してやる必要がある。

われわれが本研究に取りかかった頃、Singh & Katyal¹⁷⁾ が全く同様の着眼点から行った研究結果を報告した。いずれの方法にも共通する点は、抗原を気道一肺洗浄液中の蛋白を利用したところで、この意味から抗原はクララ細胞分泌物質である。われわれが作製した抗体をクララ細胞分泌物質抗体とした理由もここにある。彼らの方法とわれわれのものと違う点がある。一つは作製された抗体を彼らはラットの肝臓ホモジナイズ上清と血清で吸着後使用しているのに反して、われわれはこれをさらにラット唾液腺粉末と単離肺胞II型細胞で吸着した後に利用した点である。いずれの抗血清もラットクララ細胞にはほぼ特異的である。また、種特異性に関しては、彼らの報告ではマウス、ハムスターに交差反応があるが、^{17), 18)} われわれのものでは、マウスとは交差するがハムスターのものとは反応しなかった。同じ動物を使った実験でありながらなぜこのような差がでたのか不明である。各種の動物のクララ細胞の電顕レベルでの観察から Plopper³⁾ は、クララ細胞の形態には種間でかなりの差がみられ、機能にも差があるかもしれないと考えている。われわれの作った抗体がハムスターのものと反応しなかったのは、種間の微妙差とともに、Singh & Katyal の作製方法との間のわずかの手技の差が招いたものかもしれない。

われわれが利用した抗原の局在については別紙に報告したとおりである。⁷⁾ ホルマリン固定、B-5 固定材料を比較検討してみると、本抗原がクララ細胞内で産生され分泌された後 bron-

chiolar lining layer に存在している様相が明らかである。B-5 固定液はある種の抗原蛋白をうまく保持し、免疫組織化学的検索等に適用していることが知られている。^{19), 20)} 今回の研究でも分泌物質抗原の保持には最適であったと考えられた。しかし通常のホルマリン固定・パラフィン材料でも細胞質内の抗原はよく保存され、細胞同定のマーカーとして十分利用できることが示された。これはある病変におけるクララ細胞の関与を調べる等、クララ細胞の認識、同定を目的とする場合には retrospective に本抗体が利用できることを意味しており、重要な検索手段を提供するものである。この抗原が確かにクララ細胞の顆粒内に存在することが、今回の免疫電子顕微鏡的観察から証明できた。この事実は、この蛋白がクララ細胞内で産生されていることをより強く示唆するものである。逆に、II型上皮細胞に存在しなかった事実は、両細胞の機能の差を強く示すものであろう。ここで免疫電顕という手技^{19), 21)} に関して一言述べておかなければならない。免疫学的手段を電子顕微鏡のレベルで利用する場合、まだまだ種々の問題が残されている。つまり、一つには抗原の保持の良い固定液と、微細構造の保持の良い、観察を容易にさせる固定液とは二律背反のようで、両者を共に満足させるものはないことである。われわれは今回、抗原性の失活を招くというオスミウム固定は行わず、カーソンのホルマリン単独固定を試みた。しかしこの固定法では微細構造を確認しながら、しかも免疫反応の存在を認識することは非常に困難で、前者の目的を果たすためには、同時に行ったグルタルアルデヒド・四酸化オスミウム固定標本と比較し、その構造を推測する以外にない。したがって、その構造確認は完全なものとは言いきれない点是否めない。

クララ細胞の分泌物質が末梢気道においてどのような機能を果たしているか、今のところ明らかでない。この細胞については、分泌能を有することのほかに、チトクロームP-450を介しての細胞内解毒機構の存在が指摘されてい

る。一方、発癌との関連でも重要な問題点を提起している。⁴⁾

分泌物質抗体が作製できたことにより、これらの問題点を解明する一つの手がかりが得られる可能性も大いにあろう。今後さらに抗原となったクララ細胞分泌物質の成分の分析を行うとともに、より特異性の高い抗体を作製していくことも必要と考えている。

謝 辞

以下の方々に大変御世話になりました。川崎医療短期大学臨床検査科学生 弥久末美重子氏、田中久子氏、生化学教室 原野恵子先生、解剖学教室 三島 昇先生、生化学教室 崔 哲洵先生には技術的な御指導や御助言を頂きました。ここに深謝いたします。

文 献

- 1) Clara, M.: Zur Histologie des Bronchial epithels. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 41 : 321—347, 1937
- 2) Weiss, L. and Greep, R. D.: Histology. 4th ed. New York, McGraw-Hill Book Co. 1977, pp. 792—799
- 3) Plopper, C. G.: Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells: the Clara cell. Am. Rev. respir. Dis. 128 (Suppl.): 37—41, 1983
- 4) 木村雄二: 肺クララ細胞の形態と機能. 日胸 44 : 8—16, 1985
- 5) Kuhn, C. III, Callaway, L. A. and Askin, F. B.: The formation of granules in the bronchiolar Clara cells of the rat. 1. Electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 49 : 387—400, 1974
- 6) Kuhn, C. III and Callaway, L. A.: The formation of granules in the bronchiolar Clara cells of the rat. 2. Enzyme cytochemistry. J. Ultrastruct. Res. 53 : 66—76, 1975
- 7) Manabe, T., Ikeda, H., Moriya, T. and Yamashita, K.: Immunohistochemical localization of the secretory products of rat Clara cells. Anat. Rec. 217 : 164—171, 1987
- 8) Katyal, S. L., Estes, L. W. and Lombardi, B.: Method for the isolation of surfactant from homogenates and lavages of lung of adult, newborn, and fatal rats. Lab. Invest. 36 : 585—592, 1977
- 9) 小出武比古: タンパク質の分離精製法 (2) アフィニティクロマト法. 日本免疫学会編: 免疫実験操作法. (XI). 東京, 日本免疫学会. 1981, pp. 3427—3446
- 10) Manabe, T., Adachi, M. and Hirao, K.: Human chorionic gonadotropin in normal, inflammatory, and carcinomatous gastric tissue. Gastroenterology 89 : 1319—1325, 1985
- 11) 山成憲子, 小林博久, 真鍋俊明, 山下貢司: ラット肺からの type II cell の単離法. 川崎医会誌 8 : 101—107, 1982
- 12) Carson, F. L., Martin, J. H. and Lynn, J. A.: Formalin fixation for electron microscopy: A re-evaluation. Am. J. clin. Pathol. 59 : 365—373, 1973
- 13) 内田 隆: ホルモン産生細胞のためのプロテインA・金コロイド法について. 細胞 16 : 52—59, 1984
- 14) Petrik, P. and Collet, A. J.: Quantitative electron microscopic autoradiography of in vivo incorporation of ³H-choline ³H-leucine ³H-acetate and ³H-galactose in non-ciliated bronchiolar (Clara) cells of mice. Am. J. Anat. 139 : 519—534, 1974
- 15) Cutz, E. and Conen, D. E.: Ultrastructure and cytochemistry of Clara cells. Am. J. Pathol. 62 : 127—142, 1971
- 16) Devereux, T. R., Jones, K. G., Bend, J. R., Fouts, J. R., Statham, C. N. and Boyd, M. R.: In vitro metabolic activation of the pulmonary toxin, 4-ipomeanol, in non-ciliated bronchiolar epithelial (Clara) and alveolar type II cells isolated from rabbit. J. Pharmacol. exp. Ther. 220 : 223—227, 1982

- 17) Singh, G. and Katyal, S. L.: An immunologic study of the secretory products of rat Clara cells. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 49—54, 1984
- 18) Singh, G., Katyal, S. L., Ward, J. M., Gottron, S. A., Wong Chong, M. and Riley, E. J.: Secretory proteins of the lung in rodents.: Immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 564—568, 1985
- 19) Mukai, K. and Rosai, J.: Applications of immunoperoxidase technique in surgical pathology. *In Progress in surgical pathology, Vol. 1, eds. by Fenoglio, C. M. and Wolff, M. New York, Masson Publishing. 1980, pp. 15—49*
- 20) Mukai, K.: Immunohistochemistry using paraffin embedded materials. *Pathol. Clin. Med.* 2: 1475—1478, 1984
- 21) 久野節二, 安達 透, 大黒成夫: 免疫電顕における抗原同定のためのプロテインA・金法. *生体の科学* 34: 233—238, 1983