

酸化亜鉛による好中球活性化作用： 亜鉛熱の発症機序に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9419

酸化亜鉛による好中球活性化作用：亜鉛熱の発症機序に関する研究

金沢大学医学部医学科公衆衛生学講座（主任：萩野景規教授）

稲垣美智子

産業職場で問題となっている亜鉛熱症候群の発症機序を解明する目的で、酸化亜鉛 (ZnO) のラット好中球活性化作用を化学発光法で検討した。その結果、酸化亜鉛により好中球のルミノール依存性化学発光は増大し、グルタチオンの添加で化学発光はさらに増大した。酸化亜鉛の化学発光はスーパーオキシド (O_2^-) 消去剤であるスーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase) で抑制されたが酸化亜鉛とグルタチオン同時添加による化学発光は抑制されなかった。モノアミンオキシダーゼ阻害剤であるクロジリンは酸化亜鉛の化学発光よりもむしろ酸化亜鉛とグルタチオン同時添加の化学発光を抑制した。カタラーゼ (過酸化水素消去剤)、アジ化ナトリウム (ミエロパーオキシダーゼ阻害剤)、タイロン (スーパーオキシド消去剤)、ジフェニールイオドニウム (NADPH オキシダーゼ阻害剤)、ネオプテリン (NADPH オキシダーゼ阻害剤)、インドメタシン (シクロオキシゲナーゼ阻害剤) などは、酸化亜鉛や酸化亜鉛とグルタチオン同時添加した化学発光をどちらも抑制した。一酸化窒素合成酵素阻害剤 N-モメチル-L-アルギニンは、酸化亜鉛による化学発光を抑制したが、酸化亜鉛とグルタチオン同時添加した化学発光には影響を与えなかった。好中球ホモジネートを用いた NADPH 依存性ルシゲニン化学発光は、L-アルギニンで増大し、スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、N-ニトロアルギニン (一酸化窒素合成酵素の阻害剤) で抑制された。酸化亜鉛は、好中球の一酸化窒素 (NO) 産生を刺激した。以上より、酸化亜鉛は好中球を活性化しルミノール化学発光を増大させると考えられる。酸化亜鉛による化学発光は、NADPH オキシダーゼや一酸化窒素合成酵素 (NOS) などのフラビン含有酵素から由来するスーパーオキシド、過酸化水素、一酸化窒素などから発生するミエロペルオキシダーゼ・過酸化水素反応や過酸化亜硝酸イオン ($ONOO^-$) 又はミエロペルオキシダーゼ・過酸化水素反応系を介した二酸化窒素などが主体であるのに対し、酸化亜鉛とグルタチオン同時添加した化学発光はグルタチオンの添加による貪食の促進や、NADPH オキシダーゼや一酸化窒素合成酵素とは別のスーパーオキシド又は過酸化水素発生源を刺激し増大したミエロペルオキシダーゼ・過酸化水素反応系によるものが主体であることが示唆された。以上より酸化亜鉛フェームによる亜鉛熱症候群の発症機序として、体内因子であるグルタチオンの関与と好中球などの貪食細胞の活性化の関与が示唆された。

Key words Zinc oxide, neutrophils, superoxide, nitric oxide, glutathione, myeloperoxidase

種々の粒子状又は可溶性物質は、好中球を刺激しスーパーオキシド (superoxide, O_2^-) や過酸化水素 (H_2O_2) や次亜塩素酸 (HOCl) などの活性酸素種を産生する^{1)~3)}。活性酸素種は、好中球などの殺菌作用に必要であるが、時として他の細胞に対して毒性を示すことがある⁴⁾。好中球やマクロファージは、細胞膜に NADPH オキシダーゼを有し細胞外空間で O_2 から O_2^- を産生することが知られてきた。

また細胞内の O_2^- 産生は血管内皮細胞において、シクロオキシゲナーゼ、キサンチンオキシダーゼ、NADPH 酸化還元酵素などが関与し⁴⁾、神経細胞ではいくつかのフラビン含有酵素やキサンチンオキシダーゼ、NADPH オキシダーゼ、カテコールアミン類の自動酸化などが関与している⁵⁾といわれている。さらに神経細胞、血管内皮細胞、マクロファージなどの一酸化窒素合成酵素 (NOS) は細胞質に局在し、NADPH、フラビン-

アデニン-ジヌクレオチド (FAD)、テトラヒドロピオプテリン (BH_4) を補酵素として NO を合成し、 O_2^- をも産生する^{6)~8)}といわれている。そして好中球の NOS はマクロファージの誘導型 NOS (iNOS) と同じ種類であり、L-アルギニンが枯渇した時に O_2^- を産生することが示唆されるが、 O_2^- と NO を同時に産生する直接的証明は未だなされていない。

酸化亜鉛 (ZnO) は、産業職場において、ZnO フェーム吸入後、4~12時間後に発熱、悪寒、白血球増多、呼吸器症状などを伴う亜鉛熱と呼ばれる症候群を惹起させることが知られている⁹⁾。この症候群では、肺の炎症細胞反応に特徴がみられ^{10)~11)}、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 、インターロイキン (interleukin, IL)-8、IL-6 などのサイトカインの産生が密接に関与している¹²⁾。細胞内で発生した O_2^- や H_2O_2 などの活性酸素種が TNF- α の遺伝子発現に関与したり¹³⁾、転写因子カッパー

平成10年9月30日受付，平成10年11月5日受理

Abbreviations : BAPTA-AM, (o,o'-bis(2-aminophenyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester; BH_4 , tetrahydrobiopterin; CO, cyclooxygenase; DPI, diphenyliodonium; FAD, flavin-adenine dinucleotide; GSH, glutathione; HBSS, Hanks' balanced salt solution; iNOS, inducible type nitric oxide synthase; IL, interleukin; L-NAME,

B (nuclear factor kappa B, NF κ B) を活性化することが知られている¹⁴⁾。しかしながら、ZnOによるマクロファージや好中球からのサイトカイン産生の機序は不明である。ZnOと化学的に類似した水酸化亜鉛 [(Zn(OH)₂] はラット肺マクロファージや腹腔内誘導好中球からのO₂⁻の産生を刺激し、その機序に細胞膜受容体やCa²⁺依存性情報伝達機構が関与している^{15) 16)}。Zn(OH)₂のラット気管支内注入後の肺の病理組織学的変化は、ZnOによるモルモットの病理組織学的変化に類似している¹⁷⁾。

本研究において、ZnO又はZnOにグルタチオン (glutathione, GSH) を添加することによって好中球が活性化され、その機序に細胞内活性酸素種や反応性窒素種の産生がどの様に関与しているかを化学発光法により検討した。

材料および方法

I. 好中球の分離とホモジネートの作成

好中球は、ラット腹腔内カゼイン投与後の浸出液より分離した¹⁸⁾。加熱生理食塩水に溶解した12%カゼインをウイスター系雄性ラット (Kiwa Laboratory Animals, 和歌山) 体重250 g (8週令) の腹腔内に投与し、12時間後に腹腔浸出液を採取した。滅菌ガーゼで濾過し200 x gで5分間遠沈した後、沈殿物をリン酸緩衝生理食塩水 (日本製薬) で2回洗浄した。混入赤血球を低張溶血した後、0.1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin) (Sigma, St. Louis, USA) 含有、Ca²⁺およびMg²⁺無添加のハンクス液 (Hanks' balanced salt solution, HBSS) (Bio Whittaker, Maryland, USA) に0.8mMのMgSO₄を添加した液 (以後Ca²⁺無添加HBSSと表現) に懸濁し、その4mlをマウスリンパ球比重分離液 (d=1.099) (日本抗体研究所, 高崎) 4mlに重層し、1000 x gで30分間遠沈した。沈殿細胞を2回洗浄、遠沈を行いCa²⁺無添加のHBSSに懸濁した。ホモジネートの作成は、洗浄沈殿細胞を、1mM フェニールメチルスルフォニルフルオリド (和光純薬), 1 μ g/ml ロイペプチン (Sigma), 1 μ g/ml アプロチニン (Sigma), 0.25M スクロース含有20mM 3-(N-モルフォリノ) プロパンスルホン酸 (和光純薬)-KOH 緩衝液 (pH 7.4) に懸濁後、超音波破碎によりホモジネートとした⁹⁾。分離細胞の鑑別は、ギムザライト染色で行い、生存率はトリパンブルー染色で算出した。

II. 化学発光

1. 好中球の化学発光

化学発光は、増感剤としてルミノール (和光純薬) を用い37°C 恒温、攪拌機能を有したルミネッセンスリーダー (アロカ, 東京) で1分間当たりの光子量を経時的に測定し、最大発光量を比較した²²⁾。細胞を用いた反応液は、1 \times 10⁶ 細胞、50 μ M ルミノール、ZnO (和光純薬) 又はZnOと還元型グルタチオン (和光純薬) 同時添加したものを最終液量1mlとなるようにCa²⁺添加HBSS又はCa²⁺無添加HBSSで調節した。好中球ルミノール依存性化学発光の最大刺激ZnO濃度を決定するため、ZnO濃度を0~3.0 mMと変化させ、発光量を観察した。ZnO濃度を1mMに固定し、GSH濃度を0~5 mMで変化させ、ZnO刺激に対するGSHの影響を検討した。1mM ZnO又は1mM ZnOと1mM

GSH併用刺激による好中球ルミノール依存性化学発光におけるO₂⁻やH₂O₂の発生源を検討するため、10 μ g スーパーオキシドデイズムターゼ (superoxide dismutase, SOD) (和光純薬), 10 μ g カタラーゼ (Boehringer Mannheim, Germany), 0.1mM タウリン (和光純薬), 10mM タイロン (Dojindo, 熊本) などの活性酸素種消去剤や、0.1mM アジ化ナトリウム (NaN₃), 1 μ M 塩化ジフェニールヨードニウム (diphenyliodonium chloride, DPI) (Sigma), 0.1mM ネオプテリン (Schircks Laboratory, Switzerland), 10 μ M インドメタシン (和光純薬), 0.1mM アロプリノール (和光純薬), 0.1mM クロジリン (N-methyl-N-propargyl 3 (2,4 dichlorophenoxy) propylamine, cloglyline) (Sigma), 0.1mM パージリン (N-methyl-N-propargylbenzylamine, pargyline) (Sigma) などの活性酸素種発生酵素の阻害剤を添加した。ZnO 又はZnOとGSHを併用した刺激における細胞内Ca²⁺の関与を調べるために、細胞内Ca²⁺キレート剤o,o'-ビス(2-アミノフェニル)エチレングリコール四酢酸四アセトキシメチルエステル (o,o'-bis(2-aminophenyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester, BAPTA-AM) (Dojindo, 熊本) を25 μ M, 50 μ M添加し化学発光に対する影響をCa²⁺無添加HBSSで観察した。ZnO 又はZnOとGSH同時添加によるルミノール依存性化学発光におけるNOとそのNOSの影響をみるために、それぞれの発光に対してNOSの基質である1mM L-アルギニン (和光純薬) と阻害剤である1mM N-モノメチル-L-アルギニン (N-monomethyl-L-arginine, L-NMMA) (Sigma) や1mM ニトロソグルタチオン (Sigma) などを添加した。

2. 好中球ホモジネートの化学発光

ホモジネート (蛋白質量350 μ g) を0.25mM ルシゲニン (Sigma) を発光基質とし、最終反応液量1mlのCa²⁺無添加HBSS中で、100 μ M NADPH又は100 μ M NADHを添加し、化学発光に対する種々の活性酸素消去剤、NOSの基質L-アルギニン、NOSの阻害剤N-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) (和光純薬) や活性酸素発生酵素阻害剤などの影響を検討した。1分間当たりの発光量を経時的に観察した。蛋白濃度はBio-Rat社製の蛋白濃度測定キットを用いた。

3. ミエロパーオキシダーゼの化学発光

精製ミエロパーオキシダーゼ (myeloperoxidase, MPO) (Sigma) とH₂O₂による無細胞系ルミノール依存性化学発光に対して、タイロンとGSHの影響を検討した。すなわち、50 μ M ルミノール, 0.1 μ g MPO, 10 μ M H₂O₂に1mM ZnO 又は1mM ZnOと1mM GSH同時添加、又は10 μ M タイロンをCa²⁺無添加HBSS中に添加し、最終反応液量1mlで1分間当たりの最大発光量を比較した。

III. NOの遊離

好中球からのNOの産生は、亜硝酸イオン(NO₂⁻)としてグリース試薬で測定した²⁰⁾。3 \times 10⁶細胞, 1.0mM L-アルギニン又は1.0mM L-NMMA又は1.0mM L-アルギニンと1.0mM L-NMMA同時添加, 1mM ZnO 又は1mM ZnOと1mM GSH同時添加をそれぞれの組み合わせで調整し、最終反応液量0.5mlの

N-nitro-L-arginine-methyl ester; L-NMMA, N-monomethyl-L-arginine; MAO, monoamine oxidase; MPO, myeloperoxidase; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; O₂⁻, superoxide; ONOO⁻, peroxynitrite; PMA, phorbol myristate acetate; SOD, Superoxide dismutase; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; TXB₂, thromboxane B₂; ZnO, zinc oxide.

Ca²⁺無添加HBSS中で、37℃で1時間反応させた後、冷却遠沈して上清をグリース試薬と反応させ、540nmの吸光度で測定した。NO₂⁻の濃度は、Ca²⁺無添加HBSSで希釈した亜硝酸ナトリウムを標準液として算出した。なおグリース試薬は、2%リン酸液に1%スルファニルアミド(和光純薬)と0.1%ナフチルエチレンジアミン(和光純薬)を溶解させ作成した。

IV. 統計学的処理

繰り返し行われた実験の観察データは、平均 ± 標準偏差 (\bar{x} ± SD) で表した。対照との差や群間の差の統計学的有意性は、一元配置分散分析の後、Bonferroniの方法で多重比較を行い、いずれも危険率5%未満を統計的有意差ありとした。

成 績

I. 好中球の分離

カゼイン投与後、ラット腹腔内浸出液から分離された細胞の好中球としての特異性は99%であり、生存率は97%であった。

II. 化学発光

1. 好中球の化学発光

好中球ルミノール依存性化学発光とZnO濃度の関係を検討す

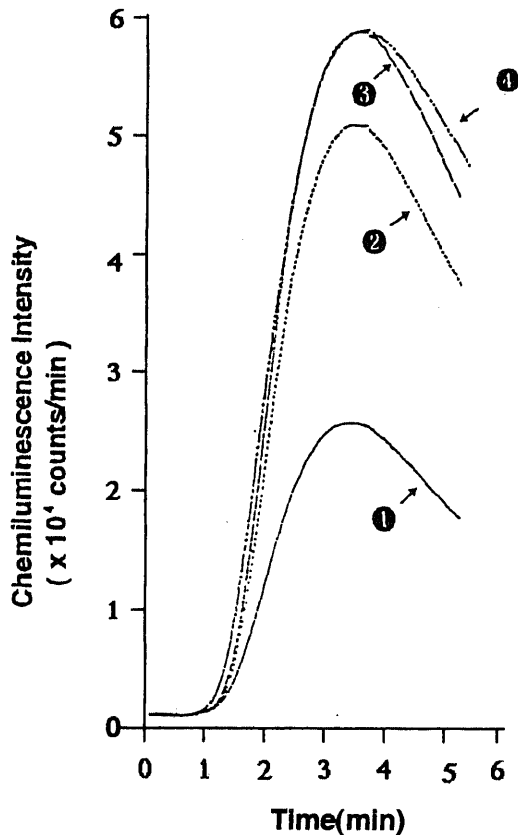


Fig. 1. Luminol-dependent chemiluminescence of neutrophils induced by zinc oxide. The reaction mixture contained 1×10^6 cells, $50 \mu\text{M}$ luminol, zinc oxide (ZnO) and Ca²⁺(-)Hanks balanced salt solution (HBSS) in a total volume of 1ml. Preparations 1, 2, 3 and 4 contained 0.1, 0.5, 1.0, and 3.0mM of zinc oxide, respectively. The tracings are representative of three experiments using different cell preparations.

ると、1mMから3mMで最大発光を示した(図1)。ZnOを1mMに固定し、ZnOによる好中球ルミノール依存性化学発光に対するGSH添加の影響を検討すると、発光量はGSH 0.1mMと1.0mMの添加で有意に増加したが、0.1mM GSHの発光量と1.0mM GSHの発光量の間には有意な差は見られなかった(図2)。GSHによるZnO刺激好中球ルミノール依存性化学発光の増強作用は、細胞外液のCa²⁺濃度にはほとんど関係なかった(図3)。

活性酸素種消去剤の影響を検討すると、O₂⁻消去剤であるSODはZnOによる化学発光を38.2%抑制するのに対し、ZnOとGSH同時添加による化学発光はほとんど抑制されなかった。低分子O₂⁻消去剤であるタイロンは、ZnOによる化学発光を80%、ZnOとGSH同時添加による化学発光を94%抑制した。H₂O₂消去剤であるカタラーゼは、ZnOによる化学発光を60%、ZnOとGSH同時添加による化学発光を38%抑制した。HOClの消去剤であるタウリンには、ZnO、ZnOとGSH同時添加のどちらの発光にも抑制作用は見られなかった(図4)。

活性酸素種発生酵素の阻害剤の影響を検討すると、MPOの阻害剤であるNaN₃は、ZnOとZnOとGSH同時添加による化学発光をそれぞれ75%、85%抑制した。NADPHオキシダーゼ阻害剤であるDPIは、ZnOとZnOとGSHと併用による化学発光をそれぞれ95%、96%抑制したが、別のNADPHオキシダーゼ阻害剤ネオプテリンは、45%、49%とDPIに比べ抑制率が低かった。シクロオキシゲナーゼ阻害剤インドメタシンは、ZnOとZnOとGSH同時添加による化学発光に対して抑制率はそれぞれ79%、62%とZnOに対する抑制が高かった。キサンチンオキシダーゼ阻害剤アロプリノールは、ZnOとGSH同時添加の化学発光をわずか27%抑制するのみで、ZnOの化学発光に対しては抑制効果は認められなかった。モノアミンオキシダーゼ(monoamine oxidase, MAO)-A阻害剤クロジリンは、ZnOと

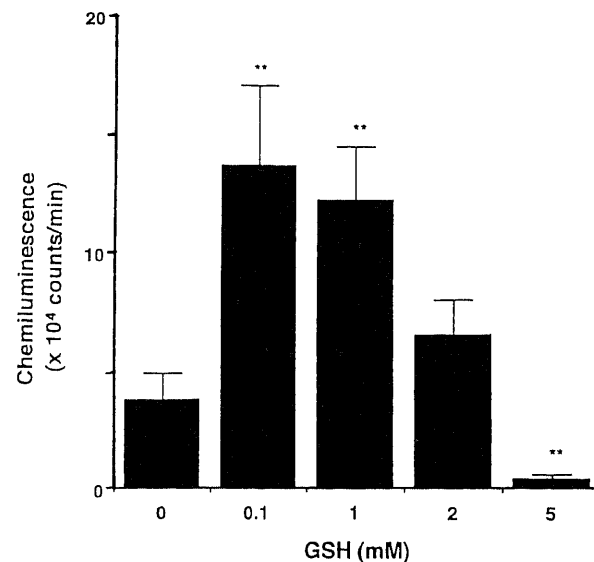


Fig. 2. Effect of glutathione (GSH) on zinc oxide-induced chemiluminescence. The reaction mixture contained 1mM zinc oxide and glutathione (GSH) with the same reagents as described in Fig. 1. Each value represents \bar{x} ± SD of four or five experiments using the same cell preparation. ** p < 0.01, * p < 0.05 vs control.

GSH同時添加による化学発光を90%抑制したが、ZnOによる化学発光はほとんど抑制しなかった。MAO-B阻害剤パーージリンは、ZnOとZnOとGSH同時添加のどちらの化学発光も抑制しなかった(表1)。

ZnO及びZnOとGSH同時添加による化学発光における細胞内Ca²⁺の関与を検討するため、細胞内Ca²⁺キレート剤BAPTA-AM 25 μMを添加すると、ほぼ完全に化学発光を抑制した(表

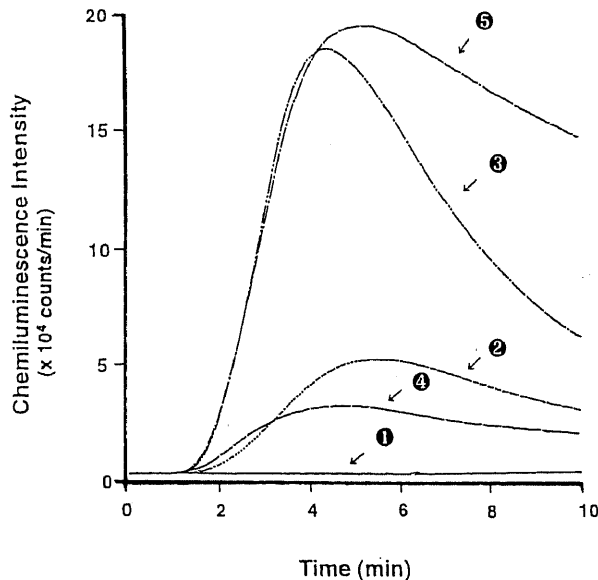


Fig.3. Effect of Ca²⁺ on zinc oxide-induced or zinc oxide (ZnO) plus GSH-induced chemiluminescence. The reaction mixture contained 1 × 10⁶ cells, 50 μM luminol and Ca²⁺ (+) HBSS in a total volume of 1ml (preparation 1). Zinc oxide at 1mM was added to the contents of preparation 1 (preparation 2), and 1mM zinc oxide (ZnO) plus 1mM GSH was added to the contents of preparation 1 (preparation 3). The reaction mixture contained 1 × 10⁶ cells, 50 μM luminol, 1mM zinc oxide (preparation 4) or 1mM zinc oxide plus 1mM GSH (preparation 5) in 1ml of Ca²⁺ (-) HBSS. The tracings are representative of three experiments using different cell preparations.

Table 1. Effect of inhibitors of active oxygen species-generating enzymes on zinc oxide-induced or zinc oxide plus glutathione (GSH)-induced chemiluminescence

Supplements (μM)	Chemiluminescence (% of control, $\bar{x} \pm SD$)	
	ZnO	ZnO+GSH
NaN ₃ (100 μM)	25.0 ± 0.6**	14.5 ± 1.1**
DPI ^{a)} (1 μM)	5.1 ± 0.3**	4.4 ± 0.1**
Neopterin ^{b)} (100 μM)	55.2 ± 2.7*	51.6 ± 9.0*
Indomethacin ^{a)} (10 μM)	21.0 ± 3.1**	37.8 ± 5.7**
Allopurinol ^{b)} (100 μM)	105.0 ± 11.8	72.7 ± 2.4*
Clorgyline (100 μM)	86.9 ± 8.0	11.3 ± 0.5**
Pargyline (100 μM)	95.9 ± 10.2	84.7 ± 2.2

^{a)} Compared to 2 μl of dimethyl sulfoxide (DMSO) vehicle,

^{b)} Compared to 20 μl of 0.1N NaOH vehicle.

** p < 0.01, * p < 0.05 vs control.

2).

ZnO及びZnOとGSH同時添加による化学発光におけるNOの関与を検討するため、NOSの基質アルギニンと阻害剤L-NMMAを添加した。1mMアルギニンは、ZnOによる化学発光を80%、ZnOとGSH同時添加による化学発光を50%抑制した。1mM L-NMMAは、ZnOによる化学発光を82%抑制したが、ZnOとGSH同時添加による化学発光はほとんど抑制しなかった。アルギニンとL-NMMAを同時に添加すると、単独の時よりもZnOとZnOとGSH同時添加どちらの化学発光も著明に抑

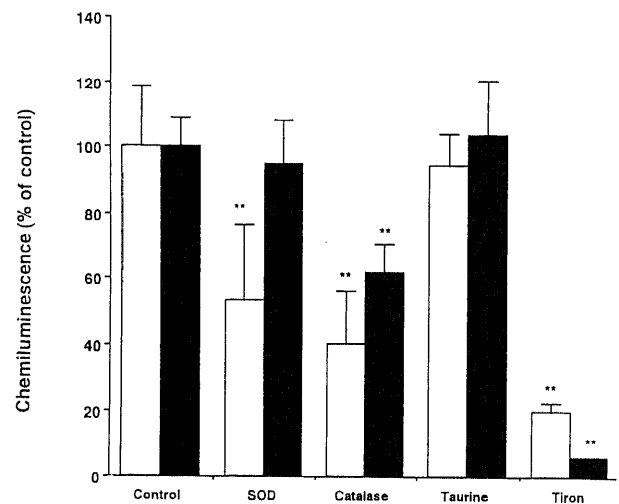


Fig.4. Effects of scavengers of active oxygen species on zinc oxide-induced or zinc oxide plus GSH-induced chemiluminescence. The control reaction mixture contained 1 × 10⁶ cells, 50 μM luminol, 1mM zinc oxide or 1mM zinc oxide plus 1mM GSH, and Ca²⁺ (-) HBSS in a total volume of 1ml. Superoxide dismutase (SOD) at 10 μg, catalase at 10 μg, Tiron at 0.1mM and taurine at 0.1mM were each added to the control reaction mixture. The chemiluminescence intensity induced by zinc oxide and by zinc oxide plus GSH was 68650 ± 12718 counts/min and 213600 ± 12591 counts/min, respectively. Each value represents $\bar{x} \pm SD$ of five experiments using the same cell preparation. □, zinc oxide (ZnO)-induced; ■, zinc oxide (ZnO) plus glutathione (GSH)-induced. ** p < 0.01 vs control.

Table 2. Effect of the intracellular calcium chelator BAPTA on zinc oxide (ZnO)-induced or ZnO plus GSH-induced chemiluminescence of rat neutrophils in Ca²⁺ (-) Hanks' balanced salt solution (HBSS)

Supplements	Chemiluminescence (counts per min, $\bar{x} \pm SD$)	Inhibition (%)
ZnO	26,980 ± 2,222	
+BAPTA 25 μM	124 ± 14*	99.6
+BAPTA 50 μM	116 ± 10**	99.6
ZnO+GSH	140,600 ± 61,264	
+BAPTA 25 μM	13,440 ± 12,738**	90.4
+BAPTA 50 μM	7,032 ± 5,262**	95.0

ZnO, zinc oxide; GSH, glutathione; BAPTA, o, o'-bis (2-aminophenyl) ethyleneglycol-N, N, N' N'-tetraacetic acid.

** p < 0.01, * p < 0.05 vs control.

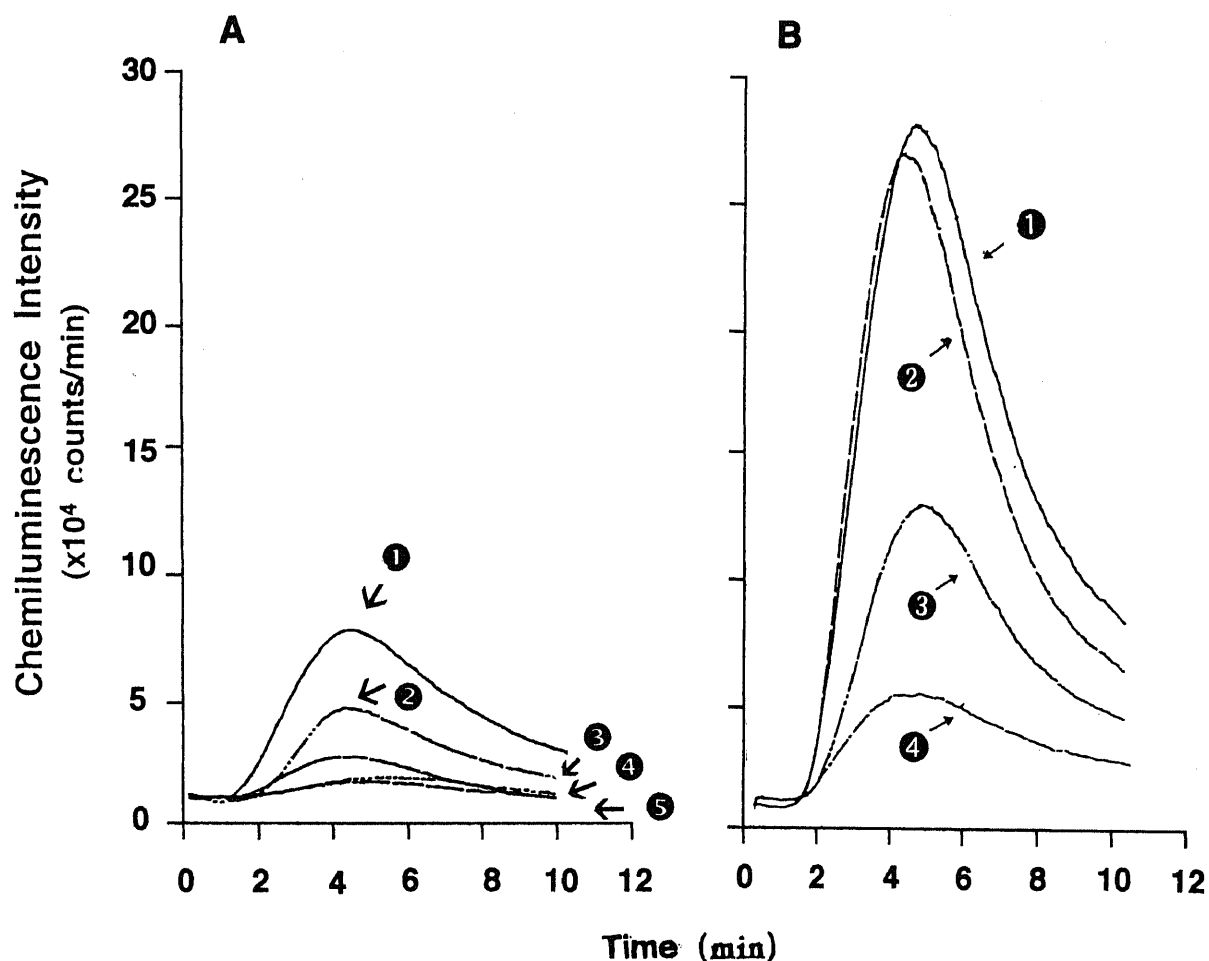


Fig. 5. Effect of L-arginine, L-NMMA and nitrosoglutathione on zinc oxide-induced (A) or zinc oxide plus GSH-induced (B) chemiluminescence. (A), The reaction mixture contained 1×10^6 cells, $1.0 \mu\text{M}$ zinc oxide, $50 \mu\text{M}$ luminol and Ca^{2+} (-) HBSS in a total volume of 1ml (preparation 1). Preparation 2-5 were recorded under conditions identical to those for preparation 1 except for the addition of 1mM nitrosoglutathione, 1 mM N-methyl-L-arginine, 1mM L-arginine, and 1mM N-methyl-L-arginine plus 1mM L-arginine in preparation 2, 3, 4 and 5, respectively. (B) The reaction mixture contained 1mM zinc oxide plus 1mM GSH (preparation 1) with the same reagents as described in A. Preparation 2-4 were recorded under conditions identical to those for preparation 1 except for the addition of 1mM N-methyl-L-arginine, 1mM L-arginine, and 1mM N-methyl-L-arginine plus 1mM L-arginine in preparation 2, 3 and 4, respectively. The tracings in (A) and (B) are representative of three experiments using different cell preparations.

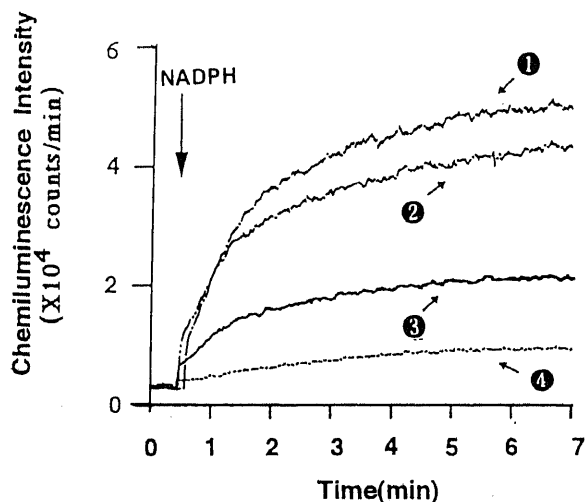


Fig. 6. Effect of superoxide dismutase, catalase and Tiron on lucigenin-dependent chemiluminescence by NADPH in neutrophils homogenate. The reaction mixture contained homogenate ($350 \mu\text{g}$ protein), $250 \mu\text{M}$ lucigenin, $100 \mu\text{M}$ NADPH and Ca^{2+} (-) HBSS in a total volume of 1ml (preparation 1). Preparations 2-4 were recorded under conditions identical to those for preparation 1 except for the addition of $10 \mu\text{g}$ catalase, $10 \mu\text{g}$ superoxide dismutase, and $10 \mu\text{M}$ Tiron in preparation 2, 3 and 4, respectively. The tracings are representative of three different experiments.

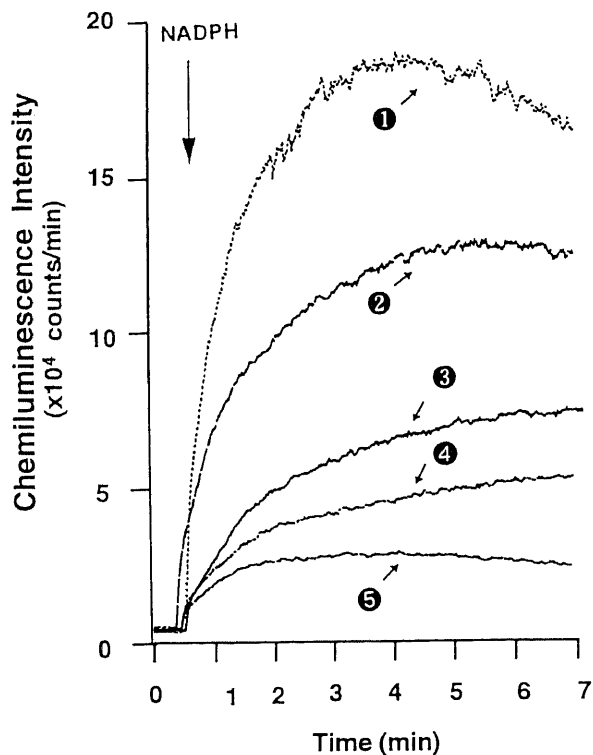


Fig.7. Effect of L-arginine, N-nitro-L-arginine, L-arginine plus N-nitro-L-arginine and L-arginine plus superoxide dismutase on lucigenin-dependent chemiluminescence by NADPH in neutrophil homogenate. The reaction mixture contained the same reagents as described in Fig. 6 (preparation 3). Preparations 1, 2, 4 and 5 were recorded under conditions identical to those for preparation 3 except for the addition of 1mM L-arginine, 1mM L-arginine plus 1mM N-nitro-L-arginine, 1mM N-nitro-L-arginine and 1mM L-arginine plus 10 μ g superoxide dismutase in preparations 1, 2, 4 and 5, respectively. The tracings were representative of three different experiments.

制した。また、1mM ニトロソグルタチオンは、ZnOの化学発光を40%抑制した(図5 A, B)。

2. 好中球ホモジネートの化学発光

ルシゲニンを用いた化学発光で、好中球ホモジネートにNADPHを添加することにより化学発光の増強が認められた。NADPHによる化学発光は、10 μ gカタラーゼで15%、10 μ g SODで60%、10 μ M タイロンで85%抑制された(図6)。NADPHによる化学発光に1mM アルギニンを添加すると162%の化学発光の増加が認められ、その増加はアルギニンに、さらに1mM L-NAMEを加えることにより30%抑制され、10 μ g SODを加えることにより89%抑制された。1mM L-NAMEはNADPHによる化学発光を30%抑制した(図7)。NADHによる化学発光に対して、2 μ g SODは56%抑制を示したが、10 μ gカタラーゼでは抑制されなかった。

3. ミエロパーオキシダーゼの化学発光

MPOとH₂O₂による無細胞系ルミノール依存性化学発光に対して、1mM ZnOはほとんど影響がないのに対して、1mM ZnOと1mM GSH同時添加や10 μ M タイロンは顕著な抑制作用を示した(図8)。

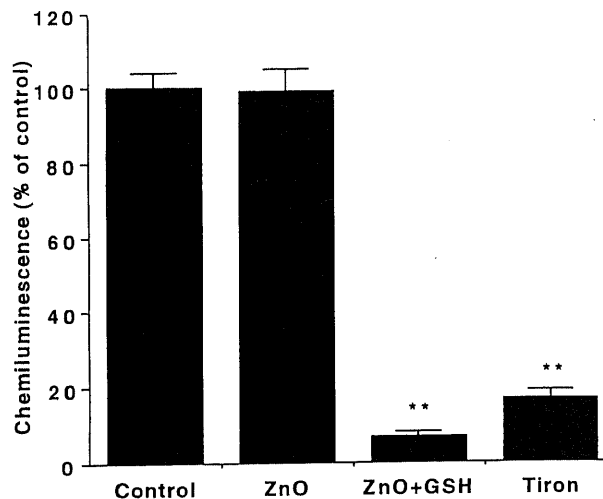


Fig.8. Effect of zinc oxide, GSH and Tiron on luminol-dependent chemiluminescence induced by myeloperoxidase (MPO) and H₂O₂ in a cell-free system. The control reaction mixture contained 0.1 μ g MPO, 10 μ M H₂O₂, 50 μ M luminol, and Ca²⁺(-)-HBSS in a total volume of 1ml. Zinc oxide at 1mM, zinc oxide at 1mM plus GSH at 1mM and Tiron at 10 μ M were each added to the control reaction mixture. The chemiluminescent intensity induced by MPO and H₂O₂ was 123800 \pm 4604 counts/min. Each value represents $\bar{x} \pm$ SD of five samples. **p < 0.01 vs control.

Table 3. Effect of zinc oxide, glutathion, and N-methyl-L-arginine on the release of nitrite (NO₂⁻) by neutrophils

Supplements	Nitrite (NO ₂ ⁻) release (value, $\bar{x} \pm$ SD)	
None	1.03 \pm 0.32	
NMMA	0.61 \pm 0.10	*
ZnO	1.59 \pm 0.07	**
ZnO+NMMA	0.57 \pm 0.08	**
ZnO+GSH	1.67 \pm 0.11	**
ZnO+GSH+NMMA	0.72 \pm 0.14	**
ZnO+Arg	2.17 \pm 0.29	**
ZnO+Arg+NMMA	0.95 \pm 0.05	**
ZnO+GSH+Arg	2.47 \pm 0.08	**
ZnO+GSH+Arg+NMMA	1.67 \pm 0.07	**

The reaction mixture contained 3×10^6 neutrophils and Ca²⁺(-) HBSS, and where indicated 1mM zinc oxide (ZnO), glutathion (GSH), 1 mM L-arginin (Arg), and 1mM N-methyl-L-arginin (NMMA) in a final volume of 1ml. Each value represents $\bar{x} \pm$ SD of five samples. ** p < 0.01, * p < 0.05.

III. NOの遊離

好中球からのNOの産生は、ZnO添加により有意に増大したが、GSHはNO産生に何ら影響しなかった。L-アルギニン添加により、すべての群でNO産生は有意に増大し、L-NMMA添加は、L-アルギニンにより増大したNO量のみならず無添加の細胞からのNOの産生も抑制した(表3)。

考 察

今回の研究で、ZnOが無Ca²⁺細胞外液中でもラット好中球のルミノール依存性化学発光を増大させ、そしてGSHの添加がさらにZnOによる化学発光を増大させることを証明した。ZnOは、不溶性の結晶粒子であり、それゆえ、好中球やマクロファージのような貪食細胞に認識される。貪食細胞が不溶性粒子を異物として貪食するために必要な認識機構として、オプソニン化を必要とするものとそうでないものに分かれる。前者には、主にFcγ受容体 (FcγR) と補体受容体1,3 (CR1,CR3) があり、後者には、主にCR3が広く知られている²¹⁾。ZnOによる好中球の刺激はオプソニン化を必要としないので、認識機構としてCR3が最も考えられる。CR3による貪食は、FcγRによる貪食とよく似て、F-アクチンの集合、フォスファチジルイノシトール3キナーゼやフォスホリパーゼCの活性化などを伴うが²²⁾²³⁾、O₂⁻の産生は促進しない²⁴⁾。活性酸素種の産生促進には、直接ではないがFcγRを介した情報伝達が関与しているといわれている²¹⁾。その意味において、ZnOにGSHを添加することにより、CR3にFcγRの情報伝達が加わった可能性がある。GSHがZnOによる好中球刺激をさらに増強させる現象は、いわゆる“ブライミング現象”²⁵⁾によく似ているが、その詳細は不明である。

好中球からのO₂⁻産生を検出する場合、チトクロームCの還元を利用する方法が一般的であるが、GSHがチトクロームCを直接還元するため化学発光法を用いた。好中球のルミノール依存性化学発光を反映する酸化物は、MPO・H₂O₂またはH₂O₂・HOCl反応系から発生するとされている²⁶⁾²⁷⁾。ZnOと、ZnOとGSH同時添加によるルミノール依存性化学発光は、HOClの消去剤であるタウリンで抑制されず、MPOの阻害剤であるNaN₃で顕著に抑制されることからMPOとH₂O₂の反応によるものと思われる。しかしながら、細胞外へ放出されたMPOが関与するのであれば、無細胞系実験におけるMPO・H₂O₂反応系によるルミノール依存性化学発光をGSHの添加が抑制していることから、ZnOとGSH同時添加による化学発光の顕著な増強は説明できない。また、ZnOによる化学発光は、SODにより抑制されるにもかかわらず、ZnOとGSH同時添加による化学発光はSODによりほとんど抑制されないことや、カタラーゼがどちらの化学発光も中等度抑制していることなどから、ZnOとGSH同時添加による化学発光はMPO・H₂O₂反応系によるルミノール反応がファゴゾーム内で発生している可能性が高く、貪食が促進されていることが示唆される。さらに、H₂O₂がすべて細胞膜に存在するNADPHオキシダーゼから発生するO₂⁻ではなく、別の起源も考えられる。このことは、低分子O₂⁻消去剤であるタイロンやNADPHオキシダーゼ阻害剤であるDPIなどの顕著なZnOと、ZnOとGSH同時添加による化学発光の抑制結果と一見矛盾するようであるが、タイロンはO₂⁻の消去以外にMPO・H₂O₂反応系による化学発光を抑制する作用があることが今回の研究で証明されたことや、DPIはFADに作用してNADPHオキシダーゼを阻害することから²⁸⁾、他のフラビン含有オキシダーゼを阻害する可能性があることなどから理解できる。MAO-A阻害剤クロジリンのZnOとGSH併用による化学発光の特異的抑制は、MAOがFADを補酵素としてアミンを代謝する酵素でありH₂O₂を産生することから、ZnOとGSH同時添加による化学発光の増強にMAOからの

H₂O₂が関与している可能性を示唆する。クロジリンには、MAO-B阻害剤のパーズリンのようなFADに対する作用は報告されておらず、またMAOは、ベンジルアミンやドーパミンの代謝を促進することにより酸化的ストレスに関与しているという報告²⁹⁾³⁰⁾がある。このことは別の観点からするとアミンの代謝によって発生するH₂O₂が酸化的ストレスに関与しているとも考えられる。

ヒト白血球にオプソニン化ザイモザンを添加するとアラキドン酸生成物のトロンボキサンB₂ (thromboxane, TXB₂)の生成量が増え、同時にO₂⁻生成も上昇するが、インドメタシンはこの両者の生成を抑制し、O₂⁻生成がTXB₂の生成に関与すると報告されている³¹⁾。インドメタシンは、ラット好中球ザイモザン刺激ルミノール化学発光を、0.1mMで約60%抑制し³²⁾、我々の結果とはほぼ一致する。その機序として、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase, CO)の代謝物がO₂⁻産生刺激に関与しているといわれているが³³⁾、インドメタシンは、分化誘導したHL-60のCOの代謝物であるTXB₂の産生を抑制したにもかかわらず、フォルボルミリステートアセテート (phorbol myristate acetate, PMA)によるO₂⁻産生を抑制しないという報告もあり³⁴⁾一致を見ない。

活性化マクロファージや好中球は、NOを産生すると言われている¹⁹⁾³⁵⁾。NOはNOSによってL-アルギニンやO₂から産生され、容易にO₂⁻と反応し過酸化亜硝酸イオン (peroxynitrite, ONOO⁻)になる³⁶⁾。O₂⁻、ヘム蛋白、チオール基と反応しなかったNOは、亜硝酸イオン (NO₂⁻)に変わる。NO₂⁻は、MPO・H₂O₂系で酸化されNO₂になる³⁷⁾。この反応は、MPO・H₂O₂反応系よりはるかに顕著なルミノール化学発光を認める(未発表)。ONOO⁻も、ルミノールでの化学発光が認められている³⁸⁾³⁹⁾が、NOはルミノールによる化学発光を示さない³⁸⁾。NOSの阻害剤であるL-NMMAはZnOによる化学発光を抑制したが、ZnOとGSH同時添加による化学発光を抑制しないことや、ZnO刺激によりNOの産生が促進されたことから、ZnOによる化学発光にはZnOとGSH同時添加による化学発光に比較しONOO⁻又はMPOとH₂O₂によるNO₂⁻からNO₂産生が考えられる。PMA刺激ヒト好中球やオプソニン化ザイモザン刺激ラット炎症性好中球などが、ONOO⁻を産生することは既に知られている³⁹⁾⁴⁰⁾。しかし、マクロファージのiNOSは、L-アルギニンが存在する場合はNOを産生し、L-アルギニンが存在しない場合はO₂⁻を産生する。すなわちL-アルギニンの濃度によってONOO⁻の産生が調整されていることが報告されている⁷⁾。このiNOSからのO₂⁻の産生はL-NAME、L-NMMAによって抑制される⁷⁾。しかしながら、血管内皮細胞性由来のNOSからのO₂⁻の産生はL-アルギニンよりもむしろBH₄によって調整されている⁸⁾。

また、NOSの基質であるL-アルギニンがZnOと、ZnOとGSH同時添加の化学発光をどちらもかなり抑制している。L-アルギニンは、ラット炎症性好中球のO₂⁻産生を抑制する傾向が指摘されており⁴⁰⁾、ZnO又はZnOとGSH同時添加における化学発光において、NOSからのO₂⁻やH₂O₂が抑制されることに加えて、O₂⁻産生を何らかの機序で抑制していることが考えられる。

好中球のルシゲニン依存性化学発光には、O₂⁻とH₂O₂が関与するとされている⁴¹⁾⁴²⁾。好中球ホモジネートを使用した実験から、NADPHに依存する化学発光に、O₂⁻とH₂O₂の他に

ONOO⁻の関与が示唆される。ONOO⁻はルシゲニンによる化学発光が認められている³⁸⁾。NADPHのルシゲニン依存性化学発光に対してアルギニンが発光を増大させることや、NOSの阻害剤であるL-NAMEにより発光が抑制されることから、この実験系にはNADPH オキシダーゼ以外にNADPHを必要とするNOSが関与していると考えられる。

吸入されたZnO フュームが、亜鉛熱と呼ばれる上部気道に関連する症候群を引き起こす。その機序は現在でも不明とされている。ヒトにおいて症状が発現するZnOの気中の8時間暴露濃度は5mg/m³と言われており⁴³⁾、この値が産業衛生的な指標となっている。ヒトのボランティアを対象としたZnO暴露実験からZnOフューム吸入後の肺胞洗浄液中にTNF- α やIL-8、好中球などが増加するといわれている^{42,44)}。またラットを用いた実験から、気中の濃度4.3mg/m³のZnOを3時間吸入させた後の肺組織中のZnOの蓄積量は、34.0 μ g/g肺組織と報告されている⁴³⁾ことから、筆者の計算によると肺組織のZnO濃度は0.52mMと計算される。この値は本研究におけるZnOのルミノール依存性の化学発光の最終刺激濃度と一致している。さらにヒト肺胞液中のGSH濃度は、0.3mMから0.76mMとの報告があり^{45,46)}、ZnOによる好中球の化学発光増強作用を引き起こすGSH濃度とほぼ一致している。また、マウスマクロファージ様細胞株であるRAW264.7で、ZnOにGSHを添加することによる細胞の活性化とZnO粒子の消失を観察している(未発表)。それ故、ZnOフュームによる亜鉛熱の発症機序に肺胞液のGSHが関与していることが示唆される。

以上より、本研究はZnOフュームによる亜鉛熱の発症機序の一つに、生体内因子としてのGSHの関与と、好中球を始めとする貪食細胞の活性化が起こっている可能性が示唆され、金属熱以外にも塵肺や珪肺などの病態の解明だけでなく、予防、治療に展望が開かれる可能性を示唆している。

結 論

ZnOフュームによる亜鉛熱症候群の発症機序を解明する目的で、ZnO又はZnOとGSH同時添加することにより、ラット好中球が活性化される機序を活性酸素種という面から化学発光を用いて検討した結果、以下のような結論を得た。

1. ZnOにより好中球のルミノール依存性化学発光は増大し、ZnOとGSH同時添加することにより化学発光はさらに著しく増大した。

2. 種々の活性酸素種消去剤や種々の活性酸素種発酵素阻害剤による抑制実験からZnOによる化学発光は、NADPH オキシダーゼやその他のフラビン含有酵素からのO₂⁻やH₂O₂からのMPO・H₂O₂反応系が関与し、ZnOとGSH同時添加による化学発光は、貪食が促進されファゴゾーム内でのMPO・H₂O₂反応系が主体となり、H₂O₂の起源としてMAOが関与している可能性が示唆された。

3. NOSの基質や阻害剤を用いた好中球又は好中球ホモジネートの化学発光やNO産生の検討から、ZnOによる化学発光には、ZnOとGSH同時添加による化学発光に比しONOO⁻やMPO・H₂O₂反応系を介したNO₂⁻から酸化されたNO₂などが強く関与していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導と後校閲を賜りました金沢大学医学部公

衆衛生学講座萩野景規教授ならびに中村裕之助教授に深甚なる謝辞を表します。また本研究の遂行に終始多大な御協力と御支援を賜った金沢大学医学部公衆衛生学教室員の方々、ならびに金沢大学医学部保健学科の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Babior BM, Kipnes RS, Curnette JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52: 741-744, 1973
- 2) Iyle GYN, Islam DMF, Quastel JH. Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* 192: 535-541, 1961
- 3) Klebanoff SJ. Antimicrobial activity of catalase at acidic pH. *Proc Soc Exp Biol Med* 132: 571-574, 1969
- 4) Mohazzab-H KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 266: H2568-2572, 1994
- 5) Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 77: 817-827, 1994
- 6) Pou S, Pow WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267: 24173-24176, 1992
- 7) Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6954-6958, 1997
- 8) Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Maesters BSS, Karourih, Tord P, Pritchard Jr KA. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9220-9225, 1997
- 9) Noel NE, Ruthman JC. Elevated serum zinc levels in metal fume fever. *Am J Emerg Med* 6: 609-610, 1988
- 10) Blanc P, Boushey HA. The lung in metal fume fever. *Semin Respir Med* 14: 212-225, 1993
- 11) Gordon T, Fine JM. Metal fume fever. *Occup Med* 8: 504-517, 1993
- 12) Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Early pulmonary cytokine responses to zinc oxide fume inhalation. *Environ Res* 75: 7-11, 1997
- 13) Simonova PP, Luster MI. Iron and reactive oxygen species in the asbestos-induced tumor necrosis factor- α response from alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 676-683, 1995
- 14) Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber M G, Packer L. Redox regulation of NF- κ B activation. *Free Radic Biol Med* 22: 1115-1126, 1997
- 15) Ogino K, Izumi Y, Ishiyama H, Murata T, Kobayashi H, Houbara T. Zinc hydroxide stimulates superoxide production by rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 1115-1121, 1992
- 16) Ogino K, Izumi Y, Segawa H, Takeyama Y, Ishiyama H, Houbara T, Uda T, Yamashita S. Zinc hydroxide induced respiratory burst in rat neutrophils. *Eur J Pharmacol (Environmental Toxicology and Pharmacology Section)* 270: 73-78, 1994

- 17) Ishiyama H, Ogino K, Sato M, Ogura M, Dan S, Hobara T. Histopathological changes induced by zinc hydroxide in rat lungs. *Exp Toxic Pathol* 49: 261-266, 1997
- 18) Hibbs JB, Tanitor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94, 1988
- 19) Ogino K, Houbara T, Ishiyama H, Yamasaki K, Kobayashi H, Izumi Y, Oka, S. Antiulcer mechanism of action of rebamipide, a novel antiulcer compound, on diethyldithiocarbamate-induced antral gastric ulcers in rats. *Eur J Pharmacol* 212: 9-13, 1992
- 20) Gross SS, Jaffe EA, Levi R, Kilbourn RG. Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 823-829, 1991
- 21) Greengerg S. Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol* 5: 93-99, 1995
- 22) Lofgren R, NG SJ, Sjolander A, Andersson T. Beta 2 integrin engagement triggers actin polymerization and phosphatidylinositol triphosphate formation in non-adherent human neutrophils. *J Cell Biol* 123: 1597-1605, 1993
- 23) Della Bianca V, Grzeskowiak M, Rossi F. Studies on molecular regulation of phagocytosis and activation of the NADPH oxidase in neutrophils. IgG- and C3b-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phospholipid turnover and Ca²⁺ transients. *J Immunol* 144: 1411-1417, 1990
- 24) Wright SD, Silverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med* 158: 2016-2023, 1983
- 25) Bender JG, van Epps DE. Stimulus interactions in release of superoxide anion from human neutrophils. *Inflammation* 9: 67-79, 1985
- 26) Dechatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas Mj, Henderson FW, Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J Immunol* 129: 1589-1593, 1982
- 27) Brestel EP. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 482-488, 1985
- 28) Cross AR. Inhibitors of the leukocyte superoxide generating oxidase: Mechanisms of action and methods for their elucidation. *Free Radic Biol Med* 8: 71-93, 1990
- 29) Werner P, Cohen G. Intramitochondrial formation of oxidized glutathione during the oxidation of benzylamine by monoamine oxidase *FEBS Lett* 280: 44-46, 1991
- 30) Lai CT, Yu PH. R(-)-Deprenyl potentiates dopamine-induced cytotoxicity toward catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 142: 186-191, 1997
- 31) Goldstein IM, Malmsten CL, Kaplan HB, Jindah H, Samuelson B, Weissman G. Thromboxane generation by stimulated human granulocytes. Inhibition by glucocorticoids and superoxide dismutase. *Clin Res* 25: 518A, 1977
- 32) Bird J, Giroud JP. An appraisal of the technique of polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence as a means to detect compounds with antiinflammatory activity. *J Pharmacol Toxicol Methods* 14: 305-312, 1985
- 33) Lin LK, Hunt NH, Weideman MJ. Reactive oxygen production, arachidonate metabolism and cyclic AMP in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 114: 549-555, 1983
- 34) Mayer AMS, Brenic S, Glaser KB. Pharmacological targeting of signal pathway in protein kinase C-stimulated superoxide generation in neutrophil-like HL-60 cells: Effect of phorbol ester, arachidonic acid and inhibitors of kinase(s), phosphatase(s) and phospholipase A2. *J Pharmacol Exp Ther* 279: 633-644, 1996
- 35) McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RJM, Whittle BJ, Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 261: 293-296, 1989
- 36) Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-1437, 1996
- 37) Eiserich JP, Hirstova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Villet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391: 393-397, 1998
- 38) Radi R, Cosgrove TP, Beckman JS, Freeman BA. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem J* 290: 51-57, 1993
- 39) Kooy NW, Royall JA. Agonist-induced peroxynitrite production from endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 310: 352-359, 1994
- 40) Catz SD, Carreras MC, Poderso JJ. Nitric oxide synthase inhibitors decrease human polymorphonuclear leukocyte luminol-dependent chemiluminescence. *Free Radic Biol Med* 6: 741-748, 1995
- 41) Rodenas J, Mitjavila M, Carbonell T. Simultaneous generation of nitric oxide and superoxide by inflammatory cells in rats. *Free Radic Biol Med* 5: 867-875, 1995
- 42) Nakagawa A, Carl F, Nathan, Zanvil, A. Hydrogen peroxidase metabolism in Human monocytes during differentiation in vitro. *J Clin Invest* 68: 1243-1252, 1981
- 43) Gordon T, Chen LC, Schlesinger RB, Su WY, Kimmel TA, Amdur MO. Pulmonary effects of inhaled zinc oxide in human subjects, guinea pigs, rats, and rabbits. *Am Ind Hyg Assoc J* 53: 503-509, 1992
- 44) Knschner WG, D'Alessandro A, Wintermeyer SF, Wong H, Boushey HA, Blanc PD. Pulmonary responses to purified zinc oxide fume. *J Invest Med* 43: 371-378, 1995
- 45) Baz MA, Tapson VF, Roggli VL, Van-Trigt P, Piantadosi CA. Glutathione depletion in epithelial lining fluid of lung allograft patients. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 742-746, 1996
- 46) Pacht ER, Diaz P, Clanton T, Hart J, Gadek JE. Alveolar fluid glutathione decrease in asymptomatic HIV-seropositive subjects over time. *Chest* 112: 785-788, 1997

Zinc Oxide Enhancement of the Chemiluminescence by Rat Neutrophils: Etiological Studies in Zinc Fume Fever

Michiko Inagaki: Department of Public Health, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. J. J. Med Soc., **108**, 273 — 282 (1999)

Key words zinc oxide, neutrophils, superoxide·nitric oxide, glutathione, myeloperoxidase

Abstract

The effect of zinc oxide (ZnO) on the chemiluminescence by rat neutrophils was investigated to clarify the etiological mechanism of zinc fume fever in an industrial setting. ZnO enhanced the luminol-dependent chemiluminescence, which was further augmented by glutathione (GSH). Superoxide dismutase (SOD), a scavenger of O_2^- , inhibited the ZnO-induced chemiluminescence but not that induced by ZnO plus glutathione (GSH). Clorgyline, an inhibitor of monoamine oxidase, inhibited the ZnO plus GSH-induced chemiluminescence rather than the ZnO-induced chemiluminescence. Catalase (a scavenger of H_2O_2), sodium azide (an inhibitor of myeloperoxidase, MPO), 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid disodium salt (Tiron, a scavenger of O_2^-), diphenyliodonium (DPI, an inhibitor of NADPH oxidase), neopterin (an inhibitor of NADPH oxidase), and indomethacin (an inhibitor of cyclooxygenase) inhibited both the ZnO-induced and ZnO plus GSH-induced chemiluminescence. An inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), N-methyl-L-arginine, inhibited the ZnO-induced chemiluminescence but did not inhibit ZnO plus GSH-induced chemiluminescence. Lucigenin-dependent chemiluminescence induced by NADPH in neutrophil homogenate was augmented by L-arginine but inhibited by SOD, catalase, and N-nitro-L-arginine (an inhibitor of NOS). ZnO stimulated NO release from neutrophils. These results indicate that ZnO activates neutrophils and augmented the chemiluminescence, suggesting that the augmented chemiluminescence by ZnO is dependent on the MPO/ H_2O_2 system, peroxynitrite, and nitrogen dioxide from the oxidation of nitrite by MPO/ H_2O_2 produced by O_2^- , H_2O_2 , and NO via NADPH oxidase and flavin-containing enzymes such as NOS. Moreover, the findings indicate that the augmented chemiluminescence by ZnO plus GSH is dependent on the elevated level of MPO/ H_2O_2 by the promotion of phagocytosis or the stimulation of another origin of O_2^- or H_2O_2 than NADPH oxidase and NOS. These results suggest that the activation of phagocytes such as neutrophils and an intrinsic factor glutathione are associated with the etiological mechanism of zinc fume fever by zinc oxide fume.