

大気汚染物質の単一および複合汚染の生体
に対する影響に関する実験的研究

昭和52/53年度 研究報告

Studies on the biological effects of
single and combined exposure of
air pollutants
Research report in 1977-1978

NIES

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立公害研究所

国立公害研究所研究報告 第8号 (R-8-'79)

大気汚染物質の単一および複合汚染の
生体に対する影響に関する実験的研究

—昭和52/53年度 研究報告—

正 誤 表

頁	行	誤	正
29	上から13	(写真11,・12)	(写真11, 12)
37	写真6説明	白血救	白血球
52	上から7	Freemen	Freeman
53	下から4	pentobarbitai	pentobarbital
72	上から13	臓器生化学検査	臨床生化学検査
73	下から10	LDH	Gl u
84	上から1	LDH	Gl u
88	上から6	LDH, GPT	LDH, GOT, GPT
97	Fig. 4説明	sulhydrl	sulfhydrl
103	脚注最後	脱落	Sophia University, Faculty of Science and Technology
120	図11説明	内部標準	内部標準
121	図12註	●; NO ₂ ■; NO ₂	●; NO ₂ +O ₂ ■; NO ₂ +H ₂ O+O ₂
132	下から13	脂質酸化	脂質過酸化
132	下から11	脂質酸化	脂質過酸化
132	下から1	479-435	479-486
139	上から5	NC ₂	NO ₂
165	上から1	「二酸化窒素の	「二酸化窒素の
171	表7	Air changes	Ventilation
171	表7註	2,325 m ³	2.3 m ³
173	要旨2行目	7日間	7日間
198	図1	Lactic dehydrogenase のピーク : 左から V, M, III, II, I Alkaline phosphatase のピーク : 左から III, II	

序

この報告は国立公害研究所において実施されている大気汚染物質の健康影響に関する一連の基礎研究のうち、比較的高濃度の NO_2 含有空気が実験動物に与える急性ないし亜急性の影響の研究結果をとりまとめたものである。

大気汚染の問題はいわゆる公害現象のうちきわめて重要な部分を占めているが、その機作は大へん複雑かつ難解で、今後の研究により解明されるべき分野が大きい。当研究所ではスモッグチャンバーを用いその理化学的手法による解明をすすめているが、これと平行して諸種大気汚染ガスの生体への影響を観察する作業が久保田憲太郎環境生理部長をプロジェクト・リーダーとしてすすめられてきた。

まず大気汚染物質の中で特に重要な要素として注目されている NO_2 をとりあげ、それが単純な物質として動物に吸入されたさいの影響を研究員がそれぞれ手分けしていろいろの角度から検討を試みたものである。

この複雑難解な大気汚染の健康影響の問題を解明するには、いろんなアプローチが考えられるが、私たちはまず単一の物質について、その比較的高濃度における急性影響と、比較的低濃度にさらしたさいの慢性影響との研究を平行して開始することとした。こうして、根気よく、抜本的にデータを一つ一つ積み重ねていくことが窮極的にはその解明につながる確実な早道であると判断した、将来はさらに他の大気汚染物質をとりあげたり、あるいはオゾンと NO_2 の複合作用を観察したりする計画もすすめられている。また NO_2 の実験動物のライフスパンを通じての長期影響実験の成果も改めて報告される予定である。また、スモッグチャンバーで生成されたいろんな化合物の毒性の問題も逐次とりあげられていこう。

当研究所は創立後未だ日が浅いが、幸にもいろいろの分野を専門とする研究者が集められ、それらが緊密な連携をとりながら共同研究をすすめるというシステムがとられている。

また、この種の研究を目的とした実験動物施設についてもきわめて高い性能を持ったものが建設された。この意味で、大気汚染の健康影響についてもその研究成果は内外から期待されており、私共もその責任の重さを痛感しつつある。しかし、この研究所だけの小人数の研究者と限られた施設とではこのような大きな研究課題をすみやかに消化しえないのは当然のことであり、今後とも国内、国外の諸研究者の御協力を仰ぎ、御助力をいただいて研究をすすめていきたい。

1979年7月

国立公害研究所長

佐々学

目 次

序 (佐々 学)	
1. 研究の概要と今後の展望	1
久保田恵太郎 (プロジェクトリーダー)	
2. 二酸化窒素急性暴露におけるゴールデンハムスターの高感受性	7
竹中参二・堀内博人・清水不二雄	
3. ゴールデンハムスターの鼻腔に及ぼす二酸化窒素の影響	27
堀内博人・本多芳男・竹中参二	
4. 二酸化窒素暴露が呼吸数, 心拍数等に及ぼす影響について	51
鈴木 明・市瀬孝道	
5. 二酸化窒素の急性および亜急性暴露の免疫反応に及ぼす影響	61
藤巻秀和・清水不二雄	
6. ラットの血液性状に及ぼす二酸化窒素の影響	71
市瀬孝道・鈴木 明・高橋 弘	
7. ラットの肺SH化合物に及ぼす二酸化窒素の影響	91
河田明治	
8. 肺リン脂質に及ぼす二酸化窒素の影響——不飽和脂肪酸との反応並びに 急性暴露による肺リン脂質脂肪酸組成の変化	103
小林隆弘・野口 忠	
9. 致死濃度の二酸化窒素に暴露したラットの生存時間に対する酵素誘導薬物の影響	127
嵯峨井 勝	
10. 肺および赤血球の Peroxidative Metabolic Pathway に及ぼす 二酸化窒素の影響	135
嵯峨井 勝・白石不二雄・河田明治	
11. 血清および肺の脂質成分に及ぼす二酸化窒素の影響	149
嵯峨井 勝・有川由紀子	
12. 補 遺	165
嵯峨井 勝・有川由紀子・松本 茂	
13. ラットの赤血球膜に及ぼす二酸化窒素の影響	173
彼谷邦光・三浦 卓	
14. 薄層クロマトグラフィーによるリン脂質組成の直接定量法	187
彼谷邦光・三浦 卓	

15. ラットの血清アイソザイムパターンに及ぼす二酸化窒素の影響 195
市瀬孝道・鈴木 明・彼谷邦光・三浦 卓
16. ラットの性周期に及ぼす二酸化窒素低濃度連続暴露の影響 207
寺尾恵治・高橋 弘

CONTENTS

Preface

M. SASA

1. Outline of Performed Researches and Future Prospects 1
K. KUBOTA, Project Leader
2. Hypersensitivity of Golden Hamsters to Short-term
Nitrogen Dioxide Exposure 7
S. TAKENAKA, H. HORIUCHI and F. SHIMIZU
3. Effect of Nitrogen Dioxide Exposure on Nasal Cavity
of Golden Hamsters 27
H. HORIUCHI, Y. HONDA and S. TAKENAKA
4. Effect of Nitrogen Dioxide on Respiratory Rate, Heart Rate
and Pneumogram in Rats 51
A. SUZUKI and T. ICHINOSE
5. Effect of Acute and Subacute Exposure of Nitrogen Dioxide
on Primary Immune Response 61
H. FUJIMAKI and F. SHIMIZU
6. Effect of Nitrogen Dioxide on Blood of Rats 71
T. ICHINOSE, A. SUZUKI and H. TAKAHASHI
7. Effect of Nitrogen Dioxide on Sulfhydryl Group in Rat Lungs 91
M. KAWATA
8. Effect of Nitrogen Dioxide on Lung Phospholipids.
—Reaction with Unsaturated Fatty Acids and Change in the
Composition of Fatty Acids of Lung Phospholipids 103
T. KOBAYASHI and T. NOGUCHI
9. Effect of Enzyme-Inducing Agents on the Survival Times of Rats
Exposed to Lethal Levels of Nitrogen Dioxide 127
M. SAGAI
10. Effect of Nitrogen Dioxide on the Peroxidative Metabolic
Pathway in Lungs and Erythrocytes 135
M. SAGAI, F. SHIRAIISHI and M. KAWATA
11. Effect of Nitrogen Dioxide on Lipid Contents of Serum and Lungs 149
M. SAGAI and Y. ARIKAWA
12. Supplement 165
M. SAGAI, Y. ARIKAWA and S. MATSUMOTO
13. Effect of Nitrogen Dioxide on Red Blood Cell Membranes of Rats 173
K. KAYA and T. MIURA
14. Direct Densitometric Determination of Phospholipid
Composition on Thin-Layer Chromatogram 187
K. KAYA and T. MIURA
15. Effect of Nitrogen Dioxide on Isoenzyme Profiles of Rat Serum 195
T. ICHINOSE, A. SUZUKI, K. KAYA and T. MIURA
16. Effect of Continuous Exposure of Low Concentration
of Nitrogen Dioxide on Estrual Cycle of Rats 207
K. TERAOKA and H. TAKAHASHI

研究の概要と今後の展望

Outline of Performed Researches and Future Prospects

久保田憲太郎¹

Kentaro KUBOTA¹

はじめに

現在都市部における代表的な大気汚染物質としては、NO₂、SO₂、オゾン等の光化学反応生成物、エアロゾル等が知られており、これらによる大気汚染は、広域化、深刻化の傾向にある。したがって大気汚染物質の生体影響を解明することは、生活環境基準値の設定の基礎として必要であるとともに、生活環境に関する予防医学の基礎を確立するためにも重要である。

しかるに、大気汚染物質の生体影響は、これまで多くの研究が行われているにもかかわらず、いまだに十分な成果は得られていない。その原因は各種大気汚染物質による生体への相互作用については無論のこと、単一汚染物質についても、その作用機序を病理学、生理学、生化学等多方面から系統的かつ総合的に研究しなかったことにあると考える。したがって各専門領域の知識を総合化する研究体制を基にして、はじめて、各種大気汚染物質による複合汚染の解明、さらには現実の大気汚染の生体影響のシミュレーションも可能となる。

当研究所においては、大型施設の一つとして、大気汚染暴露実験を目的とした動物用環境調節施設（ズートロン）が昭和51年度に完成をみた。この施設を利用して、昭和52年度より本特別研究が開始された。

大気汚染物質中特に重要性が高いと考えられるNO₂を先ずとりあげた。研究体制としては二系列方式を考え、第一系列は、生理学、生化学、病理学、免疫学等それぞれ専門領域における特定テーマをもうけ、中・高濃度のガスを用い、生体影響の検索方法の開発を中心とした基礎研究を行い、第二系列としてはズートロン内に設置された低濃度慢性用大型チャンバーを用いて同一素材を各系統の専門分野から、長期かつ総合的に研究する計画を実施中である。また第一系列で確立した検索方法を第二系列に組み込んで行くシステムも進行中である。

本中間報告は、指標の検索と機序解明の糸口をつかむことを目的として、急性暴露実験と一部重

1. プロジェクトリーダー、Project Leader

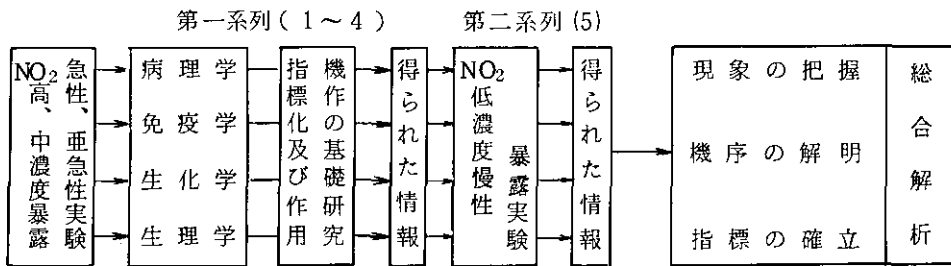
急性暴露実験を行った第一系列の成果について報告する

研究組織と研究テーマについて

上述のような研究体制の下で、環境生理部環境生理研究室、環境病理研究室、慢性影響研究室、急性影響研究室（昭和53年度開設）、ならびに技術部生物施設管理室が以下の研究課題を分担した。

- 1：NO₂の生体影響に関する病理学的研究 特にNO₂の各種動物の感受性について
- 2：NO₂の生体の免疫反応に及ぼす影響について 特に液性抗体産生能について
- 3：NO₂ガスの生体の生理性状に及ぼす影響について
- 4：NO₂の生体影響に関する生化学的研究
- 5：NO₂の低濃度長期暴露がラットに及ぼす影響について

研究課題1～4は第一系列に属し、研究課題5は第二系列に属するものである。



研究分担当者

環境生理部	52年度		53年度	
	環境生理研究室	高橋 弘	嵯峨井 勝	嵯峨井 勝
		有川 由紀子	市瀬 孝道	
環境病理研究室	清水 不二雄	清水 不二雄	清水 不二雄	清水 不二雄
	竹中 参二	竹中 参二	竹中 参二	竹中 参二
	藤巻 秀和	藤巻 秀和	藤巻 秀和	藤巻 秀和
慢性影響研究室	河田 明治	河田 明治	河田 明治	河田 明治
			小林 隆弘	

急性影響研究室

三浦卓
彼谷邦光

技 術 部

生物施設管理室

寺尾恵治

寺尾恵治
山元昭二
高橋弘

主任 研究官

研究協力者

5 2 年 度

5 3 年 度

大阪府立公衆衛生研究所
産業医学総合研究所
東京大学農学部
慈恵医科大学
実験動物中央研究所
東京大学医学部
国立予防衛生研究所
名古屋大学農学部
東京大学医科学研究所
東京大学医科学研究所
大阪大学蛋白質研究所
浜松医科大学

中島泰知
河合清之
沢崎坦
本多芳男
野村達次

中島泰知
河合清之
沢崎坦
本多芳男
山川民夫
山本昭夫
水島昭二
川村明義
藤原公策
佐藤了
長瀬光昌

これまでにえられた研究成果の概要

52年度は準備段階として、実験動物用ガス暴露装置の製作、及び第一系列の各専門分野での生体影響の指標化が、NO₂ガスの急性・亜急性（高中濃度）暴露実験による予備実験を経て、53年度へ進出した。

先づ、NO₂の生体影響を研究するためには、第一段階として高感受性の実験動物を選択し、影響の検索を行うことが重要である。各種動物の感受性を比較検討する研究が病理学的方法によって行われた。その結果、ゴールデンハムスターがモルモット、ラット、マウスにくらべて最も感受性の高いことが急性、亜急性暴露実験で証明された。今後他の専門領域からの研究によって高感受性が裏付けられることが望ましい。これと平行して、NO₂のラットへの影響を生理学あるいは生化学的方法によって検討する研究が行われた。急性暴露実験では、呼吸、循環機能への影響が示唆され、

血液、血清の成分について多様な変動がみられた。さらに、赤血球膜脂質蛋白質および肺SH化合物、脂質についても変動がみられた。また、以上とはことなる観点からの研究として、生体防御反応への影響が検討され、NO₂の急性、亜急性暴露がマウスの液性抗体産生能に影響を及ぼすことが観察された。

この第一系列の研究と併行して、第二系列の研究として、昭和52年7月5日より二年以上にわたる低濃度NO₂ガス慢性暴露の生体影響に関する研究が開始された。これは実験動物、すなわち、ラットのLife spanにわたる影響をとらえようとするものであり、9、18カ月暴露したラットについてNO₂暴露の検索が行なわれた。今後さらに第一系列の成果を加え再現性の確認をふまえた上で結果の総合解析を昭和54年度以降に行う予定である。

今後の展望

昭和53年度末に複合ガス暴露チャンバーの完成により、O₃暴露実験が可能となった。NO₂ガス単一暴露のみならず、O₃単一暴露実験を行い、また昭和54年度後半にはNO₂とO₃の複合暴露実験が開始される予定である。

昭和55年以降はNO₂とO₃の複合暴露実験を続行するとともに炭化水素の単一暴露の実験を予定している。これらの研究成果を総合し、現実の大気汚染のシュミレーションによる生体への影響機序を解明するための基礎資料を整備したい。

将来環境保健の発展に伴い、現在行っている対応的な生体影響への考察から脱却して、全環境の汚染が人の健康に及ぼす影響を総合的に考察することがのぞまれる。そのような総合的考察を行うための科学的根拠を整備するには、大気汚染物質についても上記のような広い専門分野を包含した多様な研究を体系的に行う必要が高まっている。

研究発表

(講演)

- 1) 竹中参二・堀内博人・河村涼子・寺尾恵治・清水不二雄・久保田憲太郎：NO₂高濃度暴露に対するラット、マウス、ハムスターおよびモルモットの感受性について。第1回国立公害研究所発表会、筑波。(53.4)
- 2) 竹中参二・堀内博人・河村涼子・寺尾恵治・清水不二雄・久保田憲太郎：NO₂高濃度暴露に対するラット、マウス、ハムスターおよびモルモットの感受性について。第48回日本衛生学会、前橋。(53.5)
- 3) 竹中参二・堀内博人・河村涼子・寺尾恵治・清水不二雄・久保田憲太郎：NO₂暴露に対するゴールデンハムスターの感受性 急性および亜急性影響について。第19回大気汚染学会、札幌。(53.9)

- 4) 嵯峨井勝・河田明治・白石不二雄・久保田憲太郎：二酸化窒素の肺および赤血球の Peroxidative Metabolic Pathway への影響。第18回大気汚染研究全国協議会大会，福岡。（52. 11）
- 5) 嵯峨井勝・有川由紀子・久保田憲太郎：二酸化窒素の肺および血清中の脂質代謝に及ぼす影響。第18回大気汚染研究全国協議会大会，福岡。（52. 11）
- 6) 高橋 弘・久保田憲太郎：NO₂ガス急性暴露によるマウス，ラットおよびハムスターの感受性。第47回日本衛生学会総会，東京。（52. 4）
- 7) 有川由紀子・高橋 弘：JCL[®]：SD系およびJCL[®]wistar系ラットの臨床生化学値について。日本実験動物研究会第12回研究発表会，西宮。（52. 8）
- 8) 高橋 弘・相賀一郎・松本 茂・寺島貞二郎・額田正己：国立公害研究所動物用長期ガス暴露チャンバーの構造と性能について。第15回日本生物環境調節学会総会，筑波。（52. 10）
- 9) 堀内博人（慈恵医大）・本多芳男（慈恵医大）・竹中参二・久保田憲太郎・ハムスター鼻腔粘膜に対するNO₂の影響 急性暴露後の経時観察。第17回日本副鼻腔学会，和歌山。（53.10）
- 10) Kobayashi, T., T. Noguchi (Sophia Univ.), M. Kikuno (Sophia Univ.) and K. Kubota: Reaction of nitrogen dioxide with lipids (II), the ACS/CSJ Chemical Congress, Honolulu. (1979).
- 11) 堀内博人（慈恵医大）・本多芳男（慈恵医大）・竹中参二・久保田憲太郎：NO₂のハムスター，ラット，マウスの鼻粘膜に及ぼす影響 5日連続暴露の病理変化。第80回日本耳鼻咽喉科学会，東京。（54. 5）
- 12) 久保田憲太郎：NO₂の実験動物に及ぼす影響。第2回国立公害研究所発表会，筑波。（54. 5）
（印刷）
- 1). Sagai, M (1978): The effect of enzyme - inducing agents on the survival times of rat exposed to the lethal levels of nitrogen dioxide. Toxicol. Appl. Pharmacol., 43, 169-174.

二酸化窒素急性暴露における
ゴールデンハムスターの高感受性*

Hypersensitivity of Golden Hamsters to Short-
term Nitrogen Dioxide Exposure*

竹中参二¹・堀内博人²・清水不二雄¹

Shinji TAKENAKA¹, Hirohito HORIUCHI² and Fujio SHIMIZU¹

要旨

16時間のNO₂高濃度暴露に対する6週令のラット・マウス・ハムスターおよびモルモットの感受性を比較した。マウスの系統間には明瞭な感受性の差が認められた。マウスを除いて、雄よりも雌のほうが感受性が高かった。特に注目されることとして、ゴールデンハムスターの感受性が高かった。17ppm 16時間のNO₂暴露に対してゴールデンハムスターでは重篤な肺病変がみられ、特に肺水腫の程度が著しかった。

5日間のNO₂暴露においても、ゴールデンハムスターではICRマウス、Wistarラットにくらべて感受性が高かった。

Abstract

Mortality and pulmonary changes of various animals exposed to NO₂ for 16 hours were compared. The animals used were mice (CF#1, C57BL, C3H, DBA, BALB/C, ddy, ICR, BDF1, CDF1), rats (Wistar, Fischer, SD, Donryu), Golden hamsters and Hartley guinea pigs, and all of them were 6 weeks old.

The most sensitive animals were Golden hamsters and LC₅₀ was 22 ppm and 28 ppm for female and male, respectively. The difference of LC₅₀ among strains of mice was very marked, where LC₅₀ for female CF#1 was 32 ppm and 67 ppm for female C57BL. LC₅₀ of four strains of rats was at

* 本論文の大意は英文にて投稿中

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O.
Yatabe, Ibaraki, 300-21.
2. 東京慈恵会医科大学
Jikei University, School of Medicine.

the range of 39 to 56 ppm. Hartley guinea pigs were less sensitive and their LC_{50} was 60 ppm and 55 ppm for male and female, respectively. Females of species used except for those of mice were more sensitive to NO_2 exposure than males.

Hypersensitivity of Golden hamsters was investigated in detail. Pulmonary changes caused by NO_2 exposure at the sublethal concentration were severer in Golden hamsters than in ICR mice and Wistar rats, and in particular, the edematous changes of the Golden hamsters were more remarkable than those of the others. This hypersensitivity of Golden hamsters was also shown in continuous exposure of NO_2 for 5 days.

はじめに

NO_2 毒性に関する研究には、多くの動物種が用いられてきた。とくに、 NO_2 の TLV (threshold limit value) を論議する場合、 NO_2 に暴露された動物の種・系統・性・年令等が考慮されなければならない。 NO_2 に対する動物種・系統による感受性の相違についていくつかの報告がある^{3,4,5,8,9,11,12,15})。しかしながら、それらの NO_2 暴露濃度は 1.00 ppm 前後、暴露時間は数時間であり、あまりに極端にすぎる。Hine ら⁹⁾ は、5種の動物(ラット・マウス・モルモット・ウサギ・イヌ)の NO_2 に対する感受性を比較した。そのなかで最も感受性が高い動物はモルモットであった。40 ppm 8時間の NO_2 暴露ではモルモットの死亡率は33.3%であった。Long-Evans ラット、Swiss-Webster マウスおよびウサギの死亡率は50 ppm 24時間の暴露ではそれぞれ30%、50%および0%であり、イヌではさらに NO_2 に対して低感受性であった。それぞれの種の系統による感受性の相違には言及していない。系統差をしらべた報告にはGoldsteinら⁸⁾ の報告がある。彼らはおもにオゾンに対するマウスの系統による感受性を比較したが、 NO_2 に関しても、CF#1 マウスとC57BL/6 マウスの感受性を比較している。92 ppmの NO_2 に暴露されると、CF#1 では33時間、C57BL/6 では6.5時間で半数のマウスが死亡した。

これらの数少ない情報のなかで、我々は NO_2 に対する動物種・系統による感受性の差について詳しい情報が必要であると考えた。この実験では次のような実験計画をたてた。1) 一般に市販されており、遺伝学的・微生物学的に十分満足される様々な動物の NO_2 に対する感受性を検討する。2) もし、これらの動物において感受性に明瞭な差が認められたならば、高感受性の動物について詳細に発病病理を検討する。

現在、マウスには多くの系統が確立しているので、この実験でも9系統のマウスが用いられた。汚染物質の毒性検索には多くラットが使用されるが、ここでは4系統のラットが用いられた。 NO_2 に対して、ハムスターがとくに有用とした報告は未だみられない^{5,10)} が、肺の発癌実験によく用いられるハムスターと、 NO_2 に対して高感受性とされる^{12,14)} モルモットを加え、4種・15系統の動物の NO_2 に対する感受性を比較検討した。

方法

1. 動物

おもに静岡実験動物農業協同組合から5週令動物を購入し、6週令に相当する週に各濃度のNO₂暴露をおこなった。

マウスについては、ICR, ddy(ともにクローズドコロニー生産), BALB/C Cr, C57BL/6 Cr, C3H/He, DBA/2 Cr(以上近交系), BDF₁(C57BL/6雌とDBA/2雄の交雑系), CDF₁(BALB/C雌とDBA/2雄の交雑系)およびCF#1(東大医科研から分与を受け、バリアーシステムで自家繁殖した近交系)のいずれもSPF動物を用いた。ラットについては、Fischer, Wistar, Sprague-Dawley(SD)およびDonryuのクローズドコロニー生産のSPF動物を用いた。ハムスターについてはGolden(以降GHとする), モルモットについてはHartleyのともにクローズドコロニー生産のコンベンショナル動物を用いた。いずれの動物についても、それぞれの飼育用飼料(日本クレアによる)と飲水が自由に与えられた。

2. 暴露

NO₂の暴露には、既報(高橋らおよび嵯峨井¹³⁾)のようなフィードバックシステムを備えたガラス・ステンレス製暴露チャンバー(チャンバー容積394ℓ, 換気回数毎時30回, 大気圧)が用いられた。NO₂濃度はNO₂ガス分析装置(モニターラボ社モデル8440H)によって測定された。全ての暴露においてフィードバックシステムが十分に作動したので、NO₂濃度は測定器による誤差範囲内(ゼロドリフト・スパンドリフトともに1日あたり1%)に保たれた。

3. LC₅₀(50%致死濃度)

1群8匹以上(1回の暴露はラット換算で最高24匹とした)の動物に対して、1匹も死亡しない濃度から100%死亡濃度までの各段階の濃度(公比1.2の等比級数)毎に、16時間のNO₂暴露をおこなった。

暴露終了直後の死亡匹数を数えた後、通常の飼育室に移し、毎日生死を観察し、1週間後の死亡率を求めた。LC₅₀の算定はBehrensの方法によった。別に、全ての系統に対して24ppm, 16時間の暴露をおこない、暴露終了1時間後に殺し、肺病変の程度を比較した。

4. 肺湿重量と肺含水量

体重測定後、ネブタール麻酔下、動物を放血死させ、肺湿重量と肺含水量を測定した。湿重量は体重あたりの重さ(%)であらわした。含水量はと殺直後の湿重量と95℃3日間放置後の乾燥重量から求め、湿重量あたりの水分(%)としてあらわした。

5. 16時間暴露の経時観察

17ppmのNO₂に16時間暴露されたGH雌について、暴露開始後8時間、終了直後、8時間、1日、2日、4日、7日に各々9匹ずつ殺し、肺湿重量と肺含水量の測定および病理組織学的検索をおこなった。

6. 5日間連続暴露の死亡率と経時観察

GH雌に対して12 ppmまたは14 ppm, ICRマウスおよびWistar ラットのいずれも雌に対して14 ppmまたは20 ppmのNO₂を5日間暴露した。暴露開始後毎日生死を観察し、暴露終了1週間後の死亡率を求めた。つぎに、GHに対して12 ppm, ICRマウスおよびWistar ラットに対して14 ppmのNO₂を5日間暴露し、GHとWistar ラットは5匹、ICRマウスは10匹の体重を毎日測定するとともに、同数の動物を毎日と殺し、肺湿重量の測定と病理組織学的検索をおこなった。

7. 病理組織学的検索

ネブタール麻酔下で肝門脈から放血し、主要臓器を10%中性PBSホルマリンで固定した。アルコール脱水-パラフィン包埋後、4~5 μの薄切標本を作製し、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色、Periodic acid-Schiff (PAS) 染色を施し、鏡検した。電子顕微鏡試料作成には、ネブタール麻酔下、Brodyら¹⁾の方法を改良した装置を用い、25cm水柱圧下で気管内に氷冷-25%グルタルアルデヒド(0.09 Mカコジレイト緩衝液 pH 7.2)を注入し、肺左葉肺門直下の横断切片を細切した。上記グルタルアルデヒドに25時間固定後、2%オスミウム酸(0.09 Mカコジレイト緩衝液 pH 7.2)で15時間再固定し、アルコール脱水-プロピレンオキシド透徹後、エボン包埋した。40℃12時間、50℃12時間、60℃2日の重合後、LKB III 8800で1 μ切片と超薄切片を作成し1 μ切片はトルイジブルー染色を施し、鏡検した。超薄切片はウラン・鉛の二重染色後、JEOL-100 C電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. 16時間暴露時のLC₅₀

16時間NO₂暴露時の各系統の雌雄別のLC₅₀を表1に示した。マウスでは各系統間で感受性の相違が明らかに認められた。最も感受性が高いマウスの系統はCF#1であった。雌のCF#1のLC₅₀が33 ppm, 雄のLC₅₀は36 ppmであった。次に感受性の高い系統はICRであり、雄のICRのLD₅₀が38 ppm, 雌のLC₅₀は40 ppmであった。一方、最も感受性の低い系統はC57BL/6であり、雌のC57BL/6のLC₅₀が67 ppm, 雄のLC₅₀は64 ppmであった。また、他の系統-DBA/2, ddy, BALB/C, C3H/He, CDF₁のLC₅₀は上記の順序で45 ppmから60 ppmの範囲にあった。マウスの雄と雌の間には特に感受性の差は認められなかった。ラットではDonryu雌のLC₅₀が39 ppmで最も感受性が高く、Fischer雄のLC₅₀が56 ppmで最も感受性が低かった。WistarとSDのLC₅₀は45 ppmから50 ppmの範囲にあった。マウスと異なり、ラットでは雄にくらべて明らかに雌の感受性が高かった。Donryuで8 ppm, Wistarで4 ppm, SDで3 ppm, Fischerで8 ppmいずれも雌のほうがLC₅₀が低かった。今回の実験に用いた動物のなかで、GHとくに雌の感受性が最も高かった。雌のGHのLC₅₀は22 ppm, 雄のそれが28 ppmであった。一方、Hartley モルモットはNO₂に対してとくに高感受性ではなかった。雌のHartley モルモットの

表1 16時間のNO₂暴露に対する各種系統のLC₅₀
 Table 1. LC₅₀ of various strains to NO₂ exposure for 16 hr

	Mice	Hamsters	Rats	Guinea pigs
LC ₅₀	C57BL/6-F* (67)			
ppm	C57BL/6-M (64)			
				Hartley-M (62)
60	BDF1-F (60)			
	CDF1-F (59)			
	C3H/He-M (57)			
	BDF1-M (56)		Fischer-M (56)	
	CDF1-M (56)			
	BALB/C-F (52)			
	DBA/2-M (52)			
	ddy-M (51)			
50	C3H/He-F (50)		SD-M (50)	Hartley-F (50)
	BALB/C-M (49)		Wistar-M (49)	
	ddy-F (48)		Fischer-F (48)	
			SD-F (47)	
			Donryu-M (47)	
	DBA/2-F (45)		Wistar-F (45)	
40	ICR-F (40)			
	ICR-M (38)		Donryu-F (39)	
	CF#1-M (36)			
	CF#1-F (33)			
30		Golden-M (28)		
		Golden-F (22)		
20				

* F: Female M: Male

LC₅₀ が50 ppm, 雄のそれが62 ppmであった。

別に, 24 ppm, 16時間のNO₂に暴露された総ての系統について, 暴露終了の翌日にと殺し, 病理組織学的検索をおこなった。LC₅₀の高低によく対応し, 感受性の高い系統では肺胞内水腫と肺胞壁細胞の壊死が著明に観察されたが, 感受性の低い系統では肺病変の程度は明らかに高感受性動物にくらべ弱かった。

2. 17 または 20 ppm 16 時間暴露後の肺湿重量と含水量

つぎに、GH、ICRマウスおよびWistarラットの雌雄に対して20 ppm（GH雌については、20 ppm暴露では死亡例がみられるので、17 ppm暴露とした）のNO₂を16時間暴露した。暴露終了後8時間にと殺し、肺湿重量と肺含水量を測定した。表2に示したように、GHの雌雄ともに、肺湿重量が体重あたり約1.5%に増加し、肺含水量も雌で84.2%、雄で82.7%に増加した。ICRマウスとWistarラットでは、肺湿重量の増加はみられたが、増加の程度はGHにおよばなかった。肺含水量の増加は顕著でなかった。

3. GH 雌の経時観察

17 ppmのNO₂に16時間暴露されたGH雌について経時観察をおこなった。図1に肺湿重量と肺含水量の変化を示した。両者ともに、暴露開始後8時間には増加がみられた。暴露終了直後と8時間後には増加の程度が最大であった。以降、1日、2日と減少し、4日には非暴露とくらべて、大きな差は認められなかった。病理組織学的検索では暴露開始後8時間にはすでに著しい肺胞内水腫がみられ、I型肺胞上皮細胞の変性・壊死もみられた（写真1～4）。この変化は暴露終了後1日まで続いた。暴露終了後2日には、II型肺胞上皮細胞の数が増加し、肺病変がbroncho-alveolar junctionに限局された（写真5～6）。4日・7日には肺病変はさらに限局され、程度も弱かった（写真7）。

表2 NO₂ 16 時間暴露終了後8 時間の肺湿重量と肺含水量

Table 2. Lung wet weight and lung water content of various strains 8 hr after NO₂ exposure for 16 hr

	Concentration of NO ₂ (ppm)	Lung wet weight (% of body wt.)	Water content (% of lung wet wt.)
GH-female	17	1.55 ± 0.117	84.2 ± 1.10
GH-male	20	1.47 ± 0.112	82.7 ± 0.32
ICR-female	20	0.75 ± 0.050	77.9 ± 0.34
ICR-male	20	0.82 ± 0.098	79.2 ± 0.53
Wistar-female	20	0.63 ± 0.011	79.8 ± 0.29
Wistar-male	20	0.59 ± 0.023	79.8 ± 0.66
GH-female	0	0.54 ± 0.011	78.6 ± 0.23
ICR-female	0	0.66 ± 0.036	78.7 ± 0.32
Wistar-female	0	0.53 ± 0.013	79.2 ± 0.43

Three to 10 animals were used for each group and each value is expressed as mean ± SD.

4. NO₂ 5日間連続暴露の観察

GH, ICRマウスおよびWistarラットのいずれも雌のNO₂ 5日間暴露における死亡率を表3に示した。14 ppm暴露においてGHでは66.7%が死亡したのに対して, ICRマウスとWistarラットではともに死亡例がみられなかった。GHでは12 ppm暴露でも14.9%が死亡した。ICRマウスとWistarラットでは20 ppm暴露で, ICRマウスが10%死亡し, Wistarラットが60%死亡した。上記の暴露濃度では, ほとんどの死亡例が暴露開始後1日から2日にかけてみられた。つぎに, GHに対して12 ppm, ICRマウスおよびWistarラットに対しては, GHにくらべ1.2倍濃度が高い14 ppmのNO₂を5日間暴露し, 経時観察をおこなった。図2に示したように, ICRマウスおよびWistarラットでは暴露開始後1日と2日には体重が減少したが, 3日以降ゆるやかな

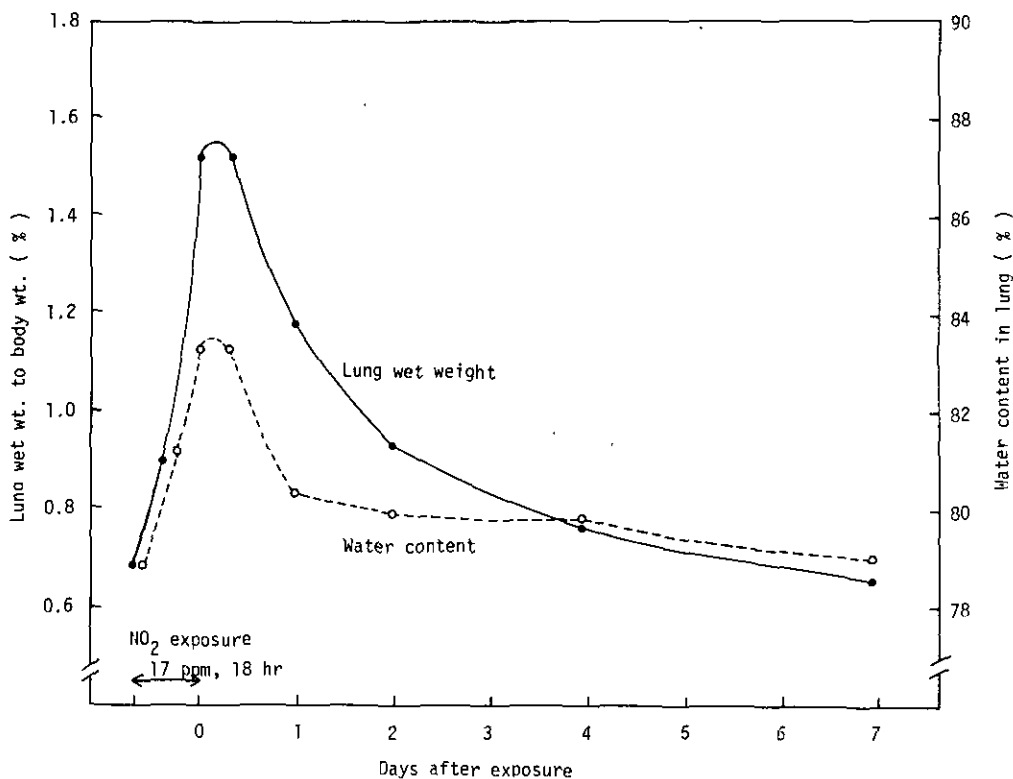


図1 17 ppm NO₂ 16時間暴露によるゴールデンハムスターの肺湿重量と肺含水量の変化

Fig. 1 Lung wet weight and lung water content of Golden hamster during and after 16 hr-NO₂ exposure

体重増加がみられた。一方、GHでは暴露開始後3日までは体重の著しい減少がみられ、暴露終了後はじめて体重増加がみられた。図3に肺湿重量の変化を示した。ICRマウスおよびWistarラットでは暴露開始後ゆるやかに増加し、3日後には体重あたり0.9~1.0%になった。暴露直後・暴露終了後1日でも同じレベルに保たれた。GHでは肺湿重量の増加が著しく、3日後には体重あたり1.5%に達した。それ以降減少傾向がみられたが、暴露終了後1日でも体重あたり1.2%であった。病理組織学的にも、GHでは暴露開始後2、3日には肺胞内水腫と肺胞壁細胞の変性・壊死がみられ、4日以降には終末細気管支上皮細胞の肥大・増殖およびその周辺の間質部における組織球を主とする顕著な細胞集簇がみられた(写真8)。ICRマウスおよびWistarラットでは、2

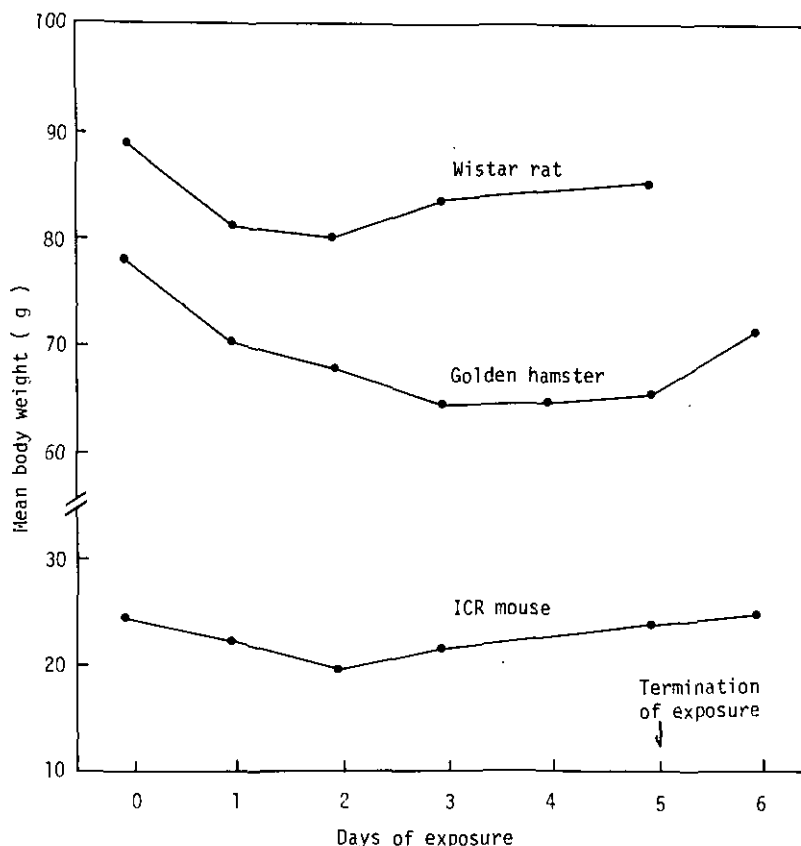


図2 NO₂ 5日間暴露のゴールデンハムスター、ICRマウスおよびWistarラットの体重に及ぼす影響

Fig. 2 Changes in body weight of Golden hamsters, ICR mice and Wistar rats exposed to NO₂ for 5 days. Mean body weight (g) of 5 Golden hamsters, 5 Wistar rats and 10 ICR mice.

表3 NO₂ 5日間暴露のゴールデンハムスター, ICRマウス, および Wistar ラットの死亡率

Table 3. Mortality of Golden hamsters, ICR mice and Wistar rats exposed to NO₂ for 5 days

	NO ₂ concentration		
	12 ppm	14 ppm	20 ppm
GH	*7/47 (15%)	8/12 (67%)	
ICR		0/12	2/20 (10%)
Wistar		0/12	12/20 (60%)

* No. dead/No. tested; 7 days after the end of exposure.

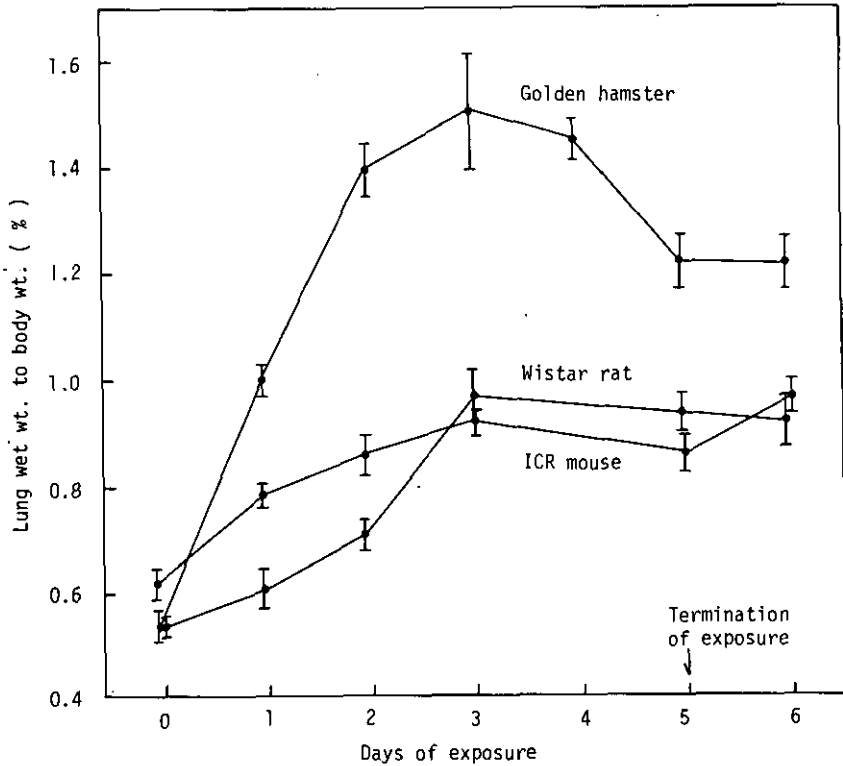


図3 NO₂ 5日間暴露したゴールデンハムスター, ICRマウス およびWistarラットの肺湿重量体重化(%)

Fig. 3 Lung wet weight of Golden hamsters, ICR mice and Wistar rats exposed to NO₂ for 5 days. Mean lung wet weight to body weight (%) ± SD.

日までは顕著な肺病変が認められなかったが、3日以降にはGHと同様に終末細気管支を中心に細胞集簇がみられた。

考 察

今回の実験では再現性と一般性を考慮し、遺伝学的に十分な統御を受け、清浄な環境下で繁殖・飼育され、一般に市販されている動物が用いられた。CF#1マウスについてはGoldsteinら⁸⁾によってNO₂とオゾンに対して高感受性であることが報告されているので、本研究所のバリアーシステムで自家繁殖し、使用した。

従来報告が高濃度・短時間のNO₂暴露による死亡率を求めたのに対し、今回我々は16時間暴露で致死濃度となるNO₂濃度で実験をおこなった。用いた濃度範囲ではほとんどの動物が暴露開始後12時間から暴露終了後1日にかけて死亡した。

16時間のNO₂暴露におけるLC₅₀を求めたところ、GHが最も高い感受性を示した。GH雌のLC₅₀が22ppm、雄のそれが28ppmであり、この値は、今回用いられた系統はもちろん、従来報告された他の動物にくらべても、GHがNO₂の短時間暴露に対し、高感受性であることを示している。16時間暴露だけでなく、5日間暴露の死亡率を比較した実験においても、GHがICRマウスとWistarラットにくらべ、高感受性であった。5日間暴露の場合、いずれの系統もほとんどの死亡例が暴露開始後1日から2日にかけてみられた。

高濃度NO₂による急性死は肺水腫に原因を求めることができる。GHのNO₂に対する高感受性についても、肺水腫との関連が当然考慮されなければならない。そこで、GHとICRマウス、Wistarラットに対する致死濃度以下のNO₂暴露後の肺含水量を比較した。GHでは他の2系統にくらべ暴露濃度が低いにもかかわらず、肺水腫の程度が著しく強かった。GHの肺水腫の発現は暴露開始後8時間にはすでに明らかに認められ、暴露終了直後と8時間後に最も著明にみられた。暴露終了後2日には肺の修復が始まり、broncho-alveolar junctionの細胞集簇とⅡ型肺胞上皮細胞の増数がみられた。これらのNO₂による肺の変化は他の報告⁶⁾と、病変の程度をのぞいてよく一致していた。これらの結果から、GHがNO₂短時間暴露に対して非常に高感受性であり、NO₂による典型的な肺病変が形成されることが明らかとなった。

別の興味点として、マウスの系統による明瞭な感受性の差がある。CF#1雌のLC₅₀-33ppmから、C57BL/6雌のLC₅₀-67ppmまで、約2倍のLC₅₀の差がみられた。Goldsteinら⁸⁾は、オゾンに対するマウスの系統による感受性の相違を比較している。オゾンに対する最も感受性の高い系統はCF#1であり、最も感受性の低い系統はC57BL/6であった。NO₂暴露における我々の結果も同様であった。

我々はNO₂に対する感受性の性差についても注目した。従来、性による感受性の相違を検討した報告はほとんどみられない。我々の実験では、マウスをのぞいてほとんどの系統において、雌の

ほうが雄にくらべて明らかに感受性が高かった。この結果は6週令動物に限られる。Cabral - Andersonら^{2,6)}はWistarラット雄の場合、加齢とともにNO₂に対する感受性が高まることを報告している。高週令動物における性差についても検討されなければならない。

今回、1つの繁殖場によって生産された動物が用いられた。同じ系統でも、別の繁殖場由来の動物では、LC₅₀の値が異なることがある(未発表)。このような繁殖場による感受性の相違は、SDラットとWistarラットで観察されたが、ICRマウスでは認められなかった(未発表)。とくに、クローズドコロニー生産の系統を実験に用いる場合、繁殖場による感受性の相違が考慮されなければならない。

従来、いずれの報告にも、GHが他の動物種にくらべて、とくに高感受性であるとは述べられていない。^{5, 10)}我々の実験結果との相違は、動物の由来(クローズドコロニーとして確立された過程または繁殖場)の相違にその根拠を求めることができるかも知れない。

謝 辞

今回の実験に際し、貴重な御助言を賜った産業医学総合研究所河合清之先生と技術的援助を賜った技術部および日本クレア㈱の方々に感謝致します。

引 用 文 献

- 1) Brody, A.R. and J.E. Craighead (1973): A simple perfusion apparatus for lung fixation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **143**, 388-390.
- 2) Cabral-Anderson, L.J., M.J. Evans and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats. I. Morphology. Exp. Mol. Pathol. **27**, 353-365.
- 3) Cooper, P. (1975): More details on nitrogen dioxide inhalation. Food Cosmet. Toxicol. **13**, 135-139.
- 4) Cooper, W.C. and I.R. Tabershaw (1966): Biologic effects of nitrogen dioxide in relation to air quality standards. Arch. Environ. Health, **12**, 522-530.
- 5) Ehrlich, R. (1966): Effects of nitrogen dioxide on resistance to respiratory infection. Bacteriol. Rev., **30**, 604-614.
- 6) Evans, M.J., L.J. Cabral-Anderson and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats. 2. Cell proliferation. Exp. Mol. Pathol., **27**, 366-376.
- 7) Freeman, G. and G.B. Haydon (1964): Emphysema after low-level exposure to NO₂. Arch. Environ. Health, **8**, 125-128.
- 8) Goldstein, B.D., L.Y. Lai, S.R. Ross and R. Cuzzi-Spanda (1973): Susceptibility of inbred mouse strains to ozone. Arch. Environ. Health, **27**, 412-413.
- 9) Hine, C.H., F.H. Meyers and R.W. Wright (1970): Pulmonary changes in animals exposed to nitrogen dioxide, effects of acute exposures. Toxicol. Appl. Pharmacol., **16**, 201-213.
- 10) Kleinerman, J. and C.R. Cowdrey (1968): The effects of continuous high level

nitrogen dioxide on hamsters. *Yale J. Biol. Med.*, **40**, 579-585.

- 11) La Towsky, L.W., E.L. Mac Quiddy and J.P. Tollman (1941): Toxicology of oxides of nitrogen: Toxic concentrations. *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, **23**, 129-133.
- 12) Morrow, P.E. (1975): An evaluation of recent NO_x toxicity data and an attempt to derive an ambient air standard for NO_x by established toxicological procedures. *Environ. Res.*, **10**, 92-112.
- 13) Sagai, M. (1978): The effects of enzyme-inducing agents on the survival times of rats exposed to lethal levels of nitrogen dioxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **43**, 169-174.
- 14) Sherwin, R.P. and D.A. Carlson (1973): Protein content of lung lavage fluid of guinea pigs exposed to 0.4 ppm nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **27**, 90-93.
- 15) Wagner, W.D., B.R. Duncan, P.G. Wright and H.E. Stokinger (1965): Experimental study of threshold limit of NO_2 . *Arch. Environ. Health*, **10**, 455-466.

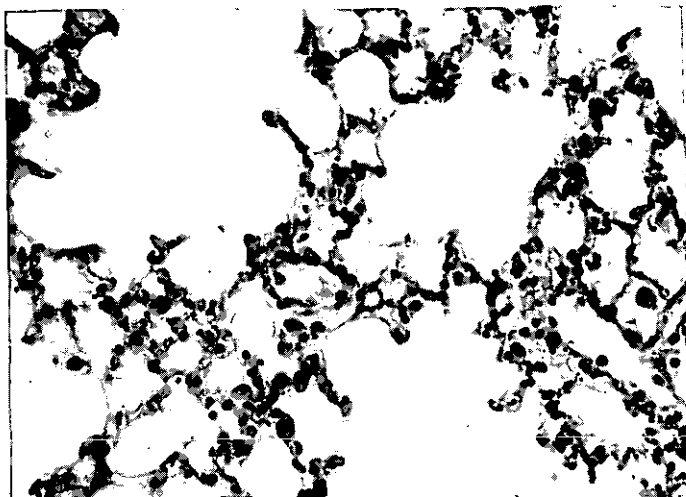


写真1 17 ppm NO₂ 暴露開始後8時間のゴールデンハムスターの肺.
肺胞腔内の水腫. HE (Hematoxylin-Eosin) 染色, × 1000

Plate 1 Edema in lung alveolar spaces from a Golden hamster 8 hr after the beginning of 17 ppm NO₂ exposure. HE (Hematoxylin-Eosin) stain, × 1000.



写真2 17 ppm NO₂ 暴露開始後8時間のゴールデンハムスターの肺.
I型肺胞上皮の変性. TEM (透過電顕像), × 12800

Plate 2 Degeneration of type I alveolar epithelium from a Golden hamster same as plate 1. TEM, × 12800.

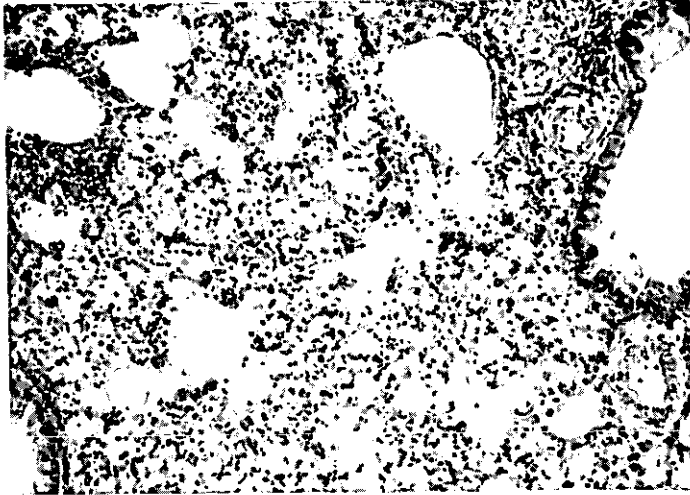


写真3 17 ppm NO₂ 16時間暴露直後のゴールデンハムスターの肺。
 顕著な肺胞腔内水腫と肺胞壁細胞の変性，壊死。HE染色，× 500

Plate 3 Marked edematous changes of lung alveoli
 and degeneration and necrosis of alveolar
 wall cells from a Golden hamster immediat-
 ely after 17 ppm NO₂ exposure for 16 hr. HE
 stain, × 500.

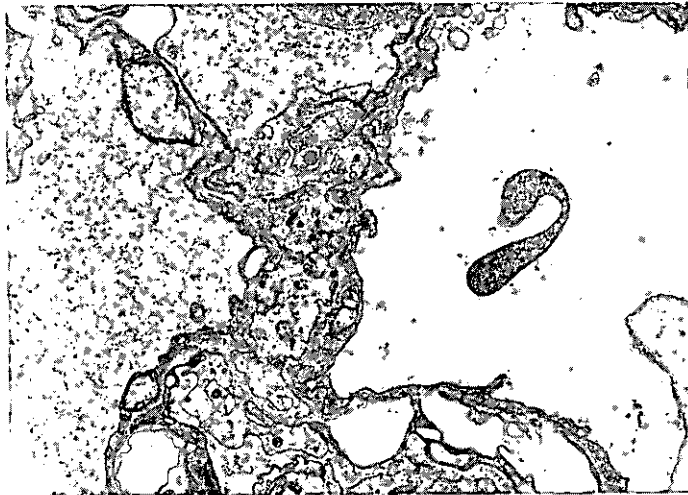


写真4 17 ppm NO₂ 16時間暴露直後のゴールデンハムスターの肺。
 I型肺胞上皮細胞の顕著な変性と肺胞内水腫。TEM，× 12,800

Plate 4 Degeneration of type I alveolar epithelium
 and edema in the alveolar space from a Golden
 hamster same as plate 3. TEM, × 12,800.

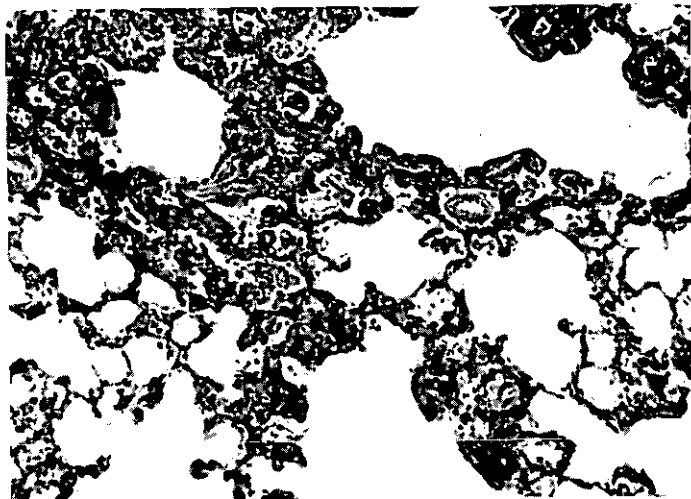


写真5 17 ppm NO₂ 16時間暴露終了後2日のゴールデンハムスターの肺. 肺胞壁細胞の修復. HE染色, × 500

Plate 5 Restoration of alveolar wall cells from a Golden hamster at 2 days after the end of 17 ppm NO₂ exposure for 16 hr. HE stain, × 500.



写真6 17 ppm NO₂ 16時間暴露終了後2日のゴールデンハムスターの肺, 隣接したⅡ型肺胞上皮. TEM, × 6,700

Plate 6 Two adjacent type II alveolar epithelia from a Golden hamster same as plate 5. TEM, × 6700.

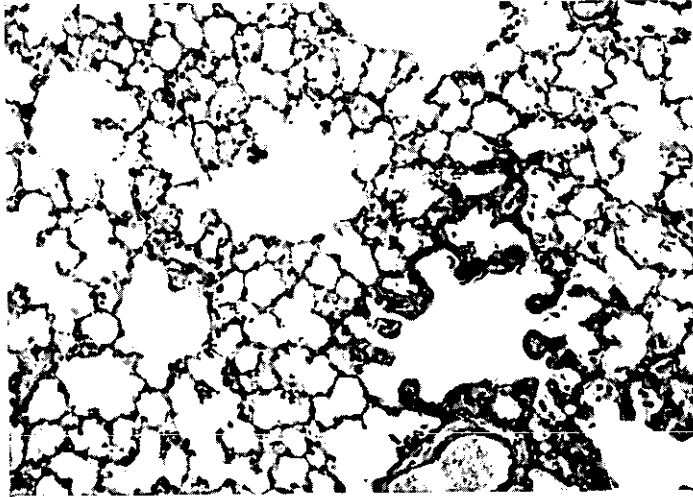


写真7 17 ppm NO₂ 16時間暴露終了後4日のゴールデンハムスターの肺.
broncho - alveolar junctionに局限した修復細胞. HE染色,
× 500

Plate 7 Restored cells limiting at the broncho-alveolar junction from a Golden hamster at 4 days after the end of 17 ppm NO₂ exposure for 16 hr. HE stain, × 500.

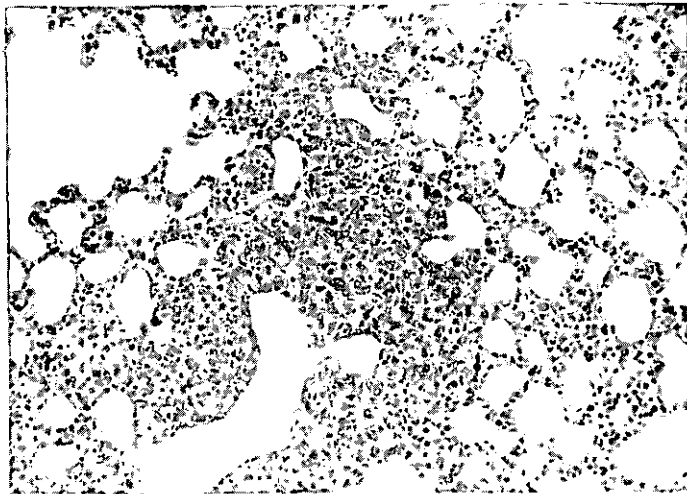


写真8 12 ppm NO₂ 暴露開始後4日のゴールデンハムスターの肺.
broncho- alveolar junctionに局限した細胞集簇.
HE染色, × 500

Plate 8 Cell nests at the broncho-alveolar junction from a Golden hamster at 4 days after the beginning of 12 ppm NO₂ exposure. HE stain, × 500.

ゴールデンハムスターの鼻腔に
及ぼす二酸化窒素の影響
Effect of Nitrogen Dioxide Exposure on Nasal Cavity
of Golden Hamsters

堀内博人¹・本多芳男¹・竹中参二²

Hirohito HORIUCHI¹, Yoshio HONDA¹
and Shinji TAKENAKA²

要 旨

NO₂ に暴露された6週令の雌のゴールデンハムスターの鼻腔を病理組織学的に検索した。17ppmのNO₂に16時間暴露されると、暴露終了直後の鼻中隔中央下部に最も激しい病理学的変化がみられた。暴露終了後8時間には修復が始まり、2日後には病変は弱かった。また、12ppmのNO₂に5日間連続暴露し、経時的に観察した。暴露開始後1日までは顕著な病変がみられたが、2日以降では、暴露中にもかかわらず、病変の軽減化が認められた。

Abstract

Nasal cavities of 6-week-old female Golden hamsters exposed to NO₂ were investigated histopathologically using light microscopy and scanning electron microscopy. Respiratory epithelia in the middle lower portion of nasal septum were severely damaged immediately after the end of exposure of 17 ppm NO₂ for 16 hr. Restoration of this area began after 8 hr and remarkable histopathological changes were not seen after 2 days. Golden hamsters exposed to 12 ppm NO₂ for 5 days were also examined histopathologically. Remarkable histopathological changes were observed 1 day after the commencement of exposure. Restoration began 2 days after the commencement of exposure in spite of continuous exposure.

1. 東京慈恵会医科大学
Jikei University, School of Medicine.
2. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O.
Yatabe, Ibaraki, 300-21.

はじめに

近年、大気汚染が大きな社会問題となっており、様々な研究がなされている。大気汚染物質の動物実験は、下気道を対象としたものがほとんどであり、上気道に対する影響についての研究は少ない。鼻粘膜に及ぼす影響については、亜硫酸ガス (SO_2) では、三吉¹⁾、飯泉ら²⁾、Giddens ら³⁾、依田⁴⁾、オゾン (O_3) では、池松ら⁵⁾、豊田⁶⁾、二酸化窒素 (NO_2) では、飯泉ら⁷⁾の報告がみられる。

竹中ら⁸⁾は、ラット、マウス、ハムスター、モルモットにおける NO_2 の高感受性動物の選択実験において、ゴールデン・ハムスターの雌が最も感受性が高い事を見い出している。今回、この高感受性動物を用いて、①16時間暴露における鼻・副鼻腔粘膜の障害の程度及び修復、②5日間連続暴露中の病理組織学的経時観察を行い、 NO_2 の鼻・副鼻腔粘膜に及ぼす影響について検討した。

方法

1. 実験動物

動物は、静岡実験動物農業協同組合から5週令のゴールデンハムスター（以下GHと略す）の雌を購入し、6週令に相当する週に暴露を行った。

2. 暴露装置

フィードバック・システムを備えたガラス製の暴露チャンバー（チャンバー容積：394 l、換気回数：30回/時間、大気圧）を用いた。又、暴露中濃度は一定値に保たれた。

3. 暴露方法

1) 16時間暴露

17 ppmで16時間の NO_2 暴露を行い、暴露開始8時間（以下8時間と略す）、終了直後、1日、2日、4日及び7日に、それぞれ6匹ずつ解剖した。

2) 5日間連続暴露

12 ppmで5日間連続暴露を行い、暴露12時間、1日、2日、3日、4日、5日、終了1日後、3日後にそれぞれ5～10匹ずつ解剖した。

4. 標本作成方法

ネンプター麻酔下で殺し、光学顕微鏡材料は、10%中性PBSホルマリン固定後、40%のEDTA脱灰液で脱灰し、鼻尖と内嘴角の間を3分割し、パラフィン切片を作製し、H-E、PAS、Alcian-Blue染色を行った。

又、走査電子顕微鏡材料は、25 cm水柱圧下で2.5%グルタル・アルデヒドの気管内注入固定を行い、鼻中隔を摘出し、カコディレート・バッファーで粘膜表面の洗浄を行い、2.5%グルタル・アルデヒド、2%オスミウム酸で二重固定し、臨界点乾燥、イオン・スパッタリング後、HH S2 R型走査電子顕微鏡（日立製作所）で観察した。

結 果

1. 16時間暴露

1) 鼻 腔

8時間では、鼻腔内に白血球を主体とした細胞浸潤を認めた(写真1)。この変化は、終了直後が最も著明で、8時間後ではかなり減少し、1日目では鼻腔後部にわずかに認めるのみとなり、2日目では全く消失していた。PAS陽性物質は、8時間後及び1日目では増加していたが、2日目ではほぼ対照群と同程度であった。

2) 呼吸部上皮

写真2に、新鮮空气中で飼育されたGHの鼻中隔呼吸上皮を示した。8時間では、鼻中隔中央下部で線毛の脱落癒着、線毛細胞の脱落等が認められた(写真3~5)。終了直後では更に脱落の範囲が拡大していた(写真6~9)。8時間後では、中央下部の上皮の一部が単層、扁平化しており、細胞配列の乱れも残存していた(写真10)。1日目では、障害部の基底細胞の肥大がみられ、上皮細胞も2~3層となっていた(写真11、12)。杯細胞は、8時間では著明に減少し、鼻腔前部及び鼻腔底にわずかに認められたのみで、直後では同部にもほとんど認められなかった。暴露終了後には杯細胞は再び観察され、8時間後では鼻腔前部及び鼻腔底部、1日後では更に鼻中隔中央下部にも認められた。2日目ではほぼ対照群と同程度であった(写真13)。

3) 呼吸部粘膜固有層

8時間では、鼻中隔中央下部、鼻甲介呼吸部の固有層の一部で、血管拡張、血管内の白血球増加、軽度細胞浸潤がみられた。終了直後では、上述の変化は更に増強され、間質の水腫も一部例では認められた。8時間後では、血管内の白血球増加及び固有層の細胞浸潤がみられたのみであり、1日でほとんど病変が認められなかった。

4) 嗅部上皮

全経過を通じて、上皮及び固有層に特記すべき変化は認められなかった。

5) 副鼻腔

貯留物、上皮の変化を認めなかった。

2. 5日間連続暴露

1) 鼻 腔

12時間では、鼻腔内に白血球を主体とした細胞浸潤が認められた。この変化は、1日目最も著明で、2日目にはやや軽減するが、3日目では浸潤細胞より脱落細胞の方が増加していた。この脱落細胞も4日以降では次第に減少し、終了3日後には両者とも消失していた。PAS陽性物質は12時間に著明に増加していたが、その後は対照群に比して著明な増加はみられなかった。

2) 呼吸部上皮

12時間では、鼻中隔中央下部及び鼻甲介呼吸上皮の上皮内細胞浸潤、固有層の血管内白血球の

増数及び細胞浸潤がみられた(写真14)。これらの病変は、1日では更に増悪し、上皮細胞の脱落も認められた(写真15・16)。2日には軽度となり(写真17)、3日、4日、5日では甲介に限局された病変がみられるのみとなった(写真18)。鼻腔中央部の鼻中隔中央下部に存在する杯細胞の数を計測したが、暴露12時間及び1日に著明な減少がみられ、その後徐々に増加した。

3) 嗅部上皮

暴露後半及び終了後の一部に、嗅線毛の脱落、嗅細胞の変性がみられたが、他のほとんどの例には異常が認められなかった。

4) 副鼻腔

腔内に分泌物が貯留しているものも一部あったが、上皮細胞の障害は認められなかった。

考 察

ゲッ歯類の鼻粘膜は、呼吸上皮と嗅上皮に大別される⁹⁾。呼吸上皮は、線毛細胞、無線毛細胞、杯細胞、基底細胞よりなり、基底膜を介して上皮下組織に接している。又、表面は、mucous blanketと呼ばれる粘漿液層により被覆されている。

嗅上皮は¹⁰⁾、嗅細胞、支持細胞、基底細胞からなり、基底膜を介して上皮下組織に接している。嗅細胞の末端は、丸い膨大部で終っており、嗅小胞と呼ばれている。嗅小胞からは、数本～十数本の嗅線毛が出ており、この線毛は嗅小胞から上皮にほぼ直角に出てすぐに上皮に平行して走行し、フェルト細工を形成している。嗅線毛の表面もmucous blanketで被覆されている。

SO₂の低濃度実験¹⁾(0.1 ppm, 3ヶ月)では、呼吸上皮の杯細胞の増加、杯細胞中のPAS陽性物質の増加、リンパ球を主とした上皮下細胞浸潤、腺組織の増生といった分泌機能の亢進所見が報告され、高濃度実験²⁾(4.0 ppm, 18日間)では、鼻腔内の著明な膿汁、呼吸上皮の上皮剝離、上皮内及び上皮下の好中球の浸潤、基底膜破壊、充血、腺分泌の亢進等の著明な急性炎症像が報告されている。一方、嗅上皮は低濃度では著変なく、高濃度でも上皮下の充血、腺分泌亢進が軽度のみであった。NO₂の低濃度実験⁷⁾(0.5～1.0 ppm, 5時間, 週5日, 3ヶ月)では、呼吸上皮及び嗅上皮の線毛脱落、上皮の扁平化、軽度増殖、上皮下細胞浸潤、充血等の病変が報告されている。

今回著者らの行った高濃度16時間暴露では、急性病変(線毛の脱落、上皮細胞の脱落、上皮内・上皮下細胞浸潤、充血など)が主であり、慢性病変(上皮細胞の増殖、杯細胞の増加など)はみられなかった。しかし、暴露後の経時観察では、障害の修復にしがたって杯細胞も増加した。又、嗅部及び副鼻腔には、著変を認めなかった。これは、嗅部はmucous blanket、フェルト細工様の嗅線毛、及び上皮下の豊富な腺組織によって保護されているので障害を受けにくかったと考える。副鼻腔に対しては、他のSO₂、O₃の短時間暴露と同様、NO₂が副鼻腔に到達しなかったものと思われる。

5日間の連続暴露においても、暴露開始1日までの呼吸部上皮の病変はほぼ同じであるが、暴露2日より病変の軽減化、限局化がみられ、NO₂に対する呼吸上皮の修復がみられた。一方、嗅上

皮は、暴露後半及び終了後に、一部例に嗅線毛の脱落、嗅細胞の変性がみられたが、全く正常例もあり、呼吸上皮と嗅上皮は、 NO_2 に対する反応態度に差があることが推測された。副鼻腔に関しては、一部分泌物の貯溜がみられたが、上皮の変化は認められなかった。

障害部位が扁平上皮化生を起すほど強烈な mustard gas¹¹⁾とは異なり、 NO_2 では、気管上皮の修復には、nonciliated cell (Clara cell) が大きな役割を果たしているようである。すなわち、Clara cell が増加し、これが無線毛細胞と線毛細胞に分化して、約4日で上皮の修復が行われるとされている¹²⁾。又、肺胞上皮の修復は、II型細胞が増加し、これがI型細胞に分化し、ほぼ2日で修復が行われる^{13, 14, 15)} ようである。

障害鼻粘膜の再生については、豊田は⁶⁾、暴露終了3日以降に、上皮層における核分裂像を観察し、これが再生修復機転の現われであると推察している。著者らも、16時間暴露後の障害上皮の再生を経時的に観察しているが、① NO_2 は難溶性で上気道を通しやすく、②鼻尖部は扁平上皮であるので刺激を受けにくい、③上皮表面は mucous blanket で保護されている、④鼻粘膜の上皮細胞の turn over time が短い、等の理由で、障害が基底膜に及ばないため、気管、気管支、肺胞上皮よりも修復が速く、ほぼ2日で正常に復したと考える。

謝 辞

今回の実験に際し、技術的援助を頂いた技術部と日本クレアの方々に感謝致します。

引 用 文 献

- 1) 三吉康郎(1969): 公害(大気汚染による)と上気道疾患. 日耳鼻, 72(補), 649-652.
- 2) 飯泉 修他(1971): 亜硫酸ガス(SO_2)暴露無菌飼育モルモットの鼻・副鼻腔の病理組織学的研究. 日耳鼻, 74, 1358-1362.
- 3) Giddens et al. (1972): Effects of sulfur dioxide on the nasal mucosa of mice. Arch. Environ., Health, 25, 166-173.
- 4) 依田弘史(1975): 低濃度亜硫酸ガス長期暴露のマウス呼吸器に及ぼす影響. その1, 光顕的観察を中心に. 日胸疾会誌, 13, 403-412.
- 5) 池松武臣他(1974): オゾン暴露の家兎鼻・副鼻腔粘膜に及ぼす影響について. 鼻副鼻腔学会誌(抄), 13, 41-42.
- 6) 豊田泰雄(1976): オゾン暴露ハツカネズミにおける上, 下部気道の病理組織学的研究および血液所見に関する研究. 阪市医誌, 25, 305-323.
- 7) 飯泉 修他(1977): NO_2 暴露マウスの鼻副鼻腔の病理組織学的研究. 日耳鼻, 80, 27-30.
- 8) 竹中参二他: NO_2 急性暴露におけるゴールデンハムスターの高感受性. 投稿中.
- 9) Adams, D.R. (1972): Olfactory and non-olfactory epithelia in the nasal cavity of the mouse, *Peromysius*. Am. J. Ant., 133, 37-50.
- 10) 神田 敬他(1974): モルモット及び人間の嗅上皮の走査電子顕微鏡に対する観察. 耳鼻臨床, 67, 527-539.

- 11) 原田康夫 (1977) : 気管粘膜の障害の観察. 耳鼻, 23, 660-665.
- 12) Evans et al. (1976): Renewal of the terminal bronchiolar epithelium in the rat following exposure to NO₂ or O₃. Lab. Invest., 35, 246-257.
- 13) Evans et al. (1972): Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of NO₂. Arch. Environ. Health, 24, 180-188.
- 14) Evans et al. (1973): Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. Am. J. Path., 70, 175-198.
- 15) Evans et al. (1975): Transformation of alveolar type 2 cell to type 1 cells following exposure to NO₂. Exp. Mol. Path., 22, 142-150.



写真1 17 ppm NO₂ 8時間暴露のゴールデンハムスター。鼻中隔及び鼻腔内の細胞浸潤。PAS (Periodic acid Schiff) 染色。
× 135

Plate 1 Cell infiltration into nasal cavity and nasal septum from a Golden hamster exposed to 17 ppm NO₂ for 8 hr. PAS (Periodic acid Schiff) stain. × 140.

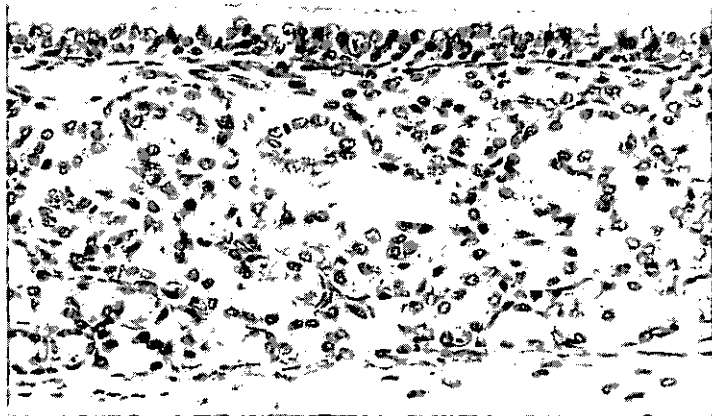


写真2 新鮮空気飼育のゴールデンハムスター。鼻中隔, 正常呼吸上皮。HE (Hematoxylin-Eosin) 染色。× 680

Plate 2 Normal respiratory epithelium at nasal septum from a Golden hamster maintained in clean air. HE (Hematoxylin-Eosin) stain. × 680.

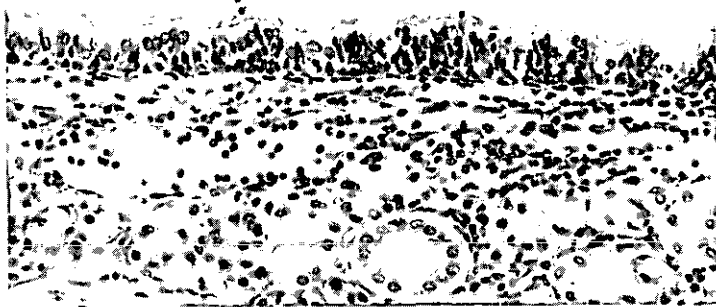


写真3 写真2と同じ。鼻中隔。呼吸上皮および上皮下組織の浸潤細胞。PAS染色。×680

Plate 3 Infiltrated cells in epithelia and subepithelia at nasal septum from a Golden hamster same as plate 2. PAS stain. × 680.

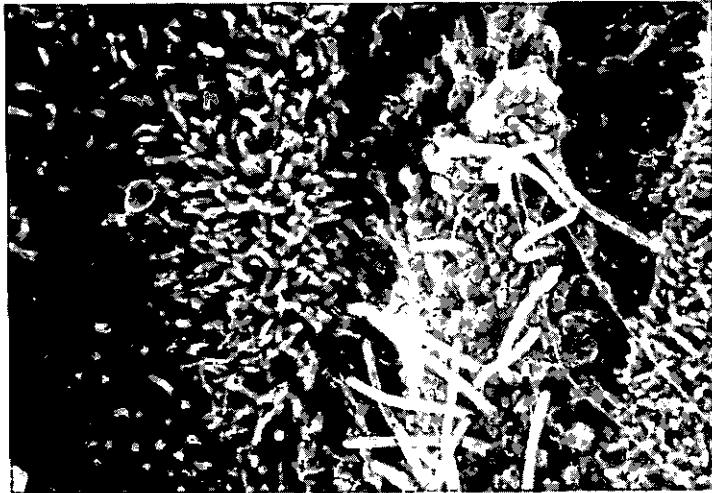


写真4 写真2と同じ。鼻中隔。上皮の線毛脱落。SEM(走査電顕像)。×8000

Plate 4 Desquamation of cilia at nasal cavity from a Golden hamster same as plate 2. SEM. × 8000.

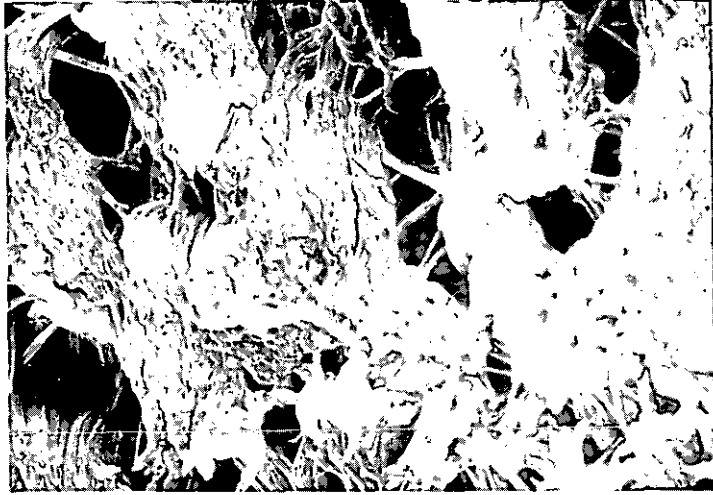


写真5 写真2と同じ。鼻中隔。上皮の線毛癒着。SEM。×4000
 Plate 5 Adhesion of cilia at nasal septum from a Golden hamster same as plate 2. SEM. ×4000.

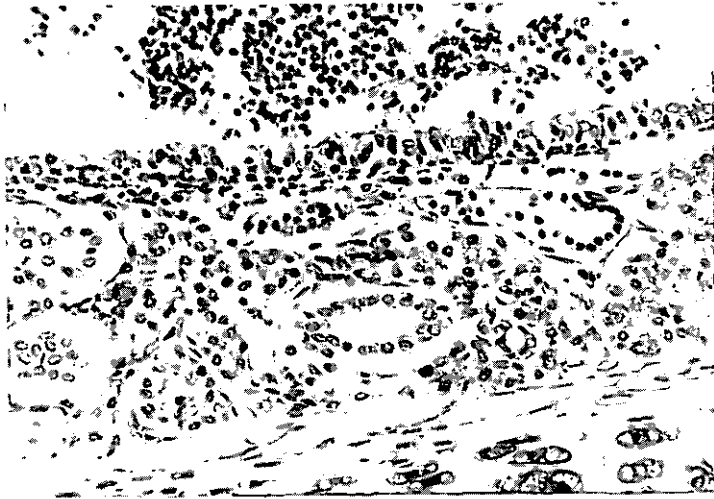


写真6 17 ppm NO₂ 16時間暴露のゴールデンハムスター。鼻腔内への細胞浸潤と鼻中隔上皮皮下組織の毛細血管内白血球増加。PAS染色。×680

Plate 6 Cell infiltration in the nasal cavity and increment of leucocyte in the capillary at nasal septum from a Golden hamster exposed to 17 ppm NO₂ for 16 hr. PAS stain. ×680.

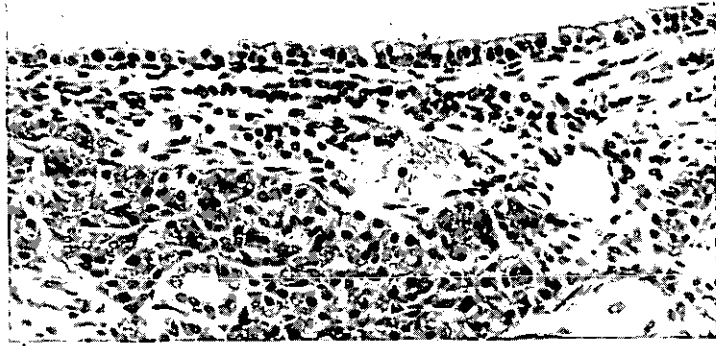


写真7 写真6と同じ。鼻中隔上皮細胞の剥離。PAS染色。×680

Plate 7 Desquamation of the epithelial cells at nasal septum from a Golden hamster same as plate 6. PAS stain. × 680.

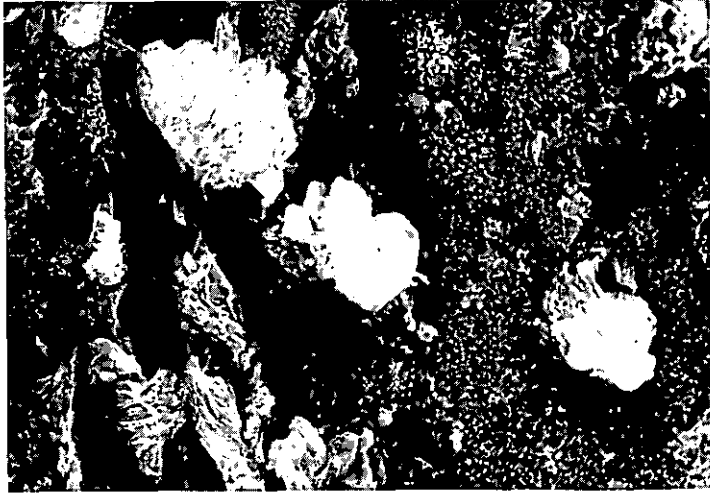


写真8 写真6と同じ。鼻中隔の線毛細胞の剥離。SEM。×4000

Plate 8 Desquamation of cilia at nasal septum from a Golden hamster same as plate 6. SEM. × 4000.

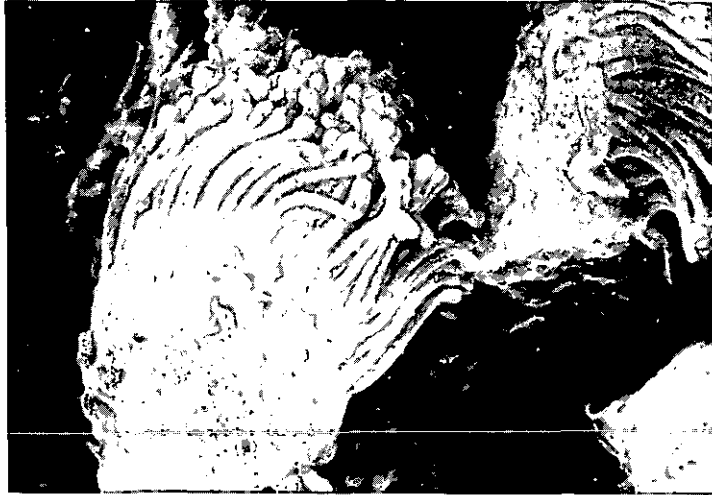


写真9 写真8の拡大。SEM。×8000

Plate 9 Enlargement of plate 8. SEM. × 8000.

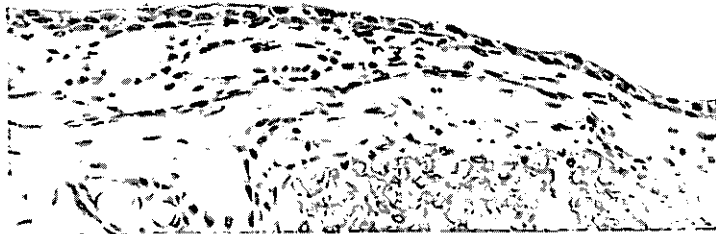


写真10 17 ppm NO₂ 16時間暴露終了後8時間のゴールデンハムスター。鼻中隔上皮細胞の扁平化。HE染色。×680

Plate 10 Flattening of epithelial cells at nasal septum from a Golden hamster at 8 hr after 17 ppm NO₂ exposure for 16 hr. HE stain. × 680.

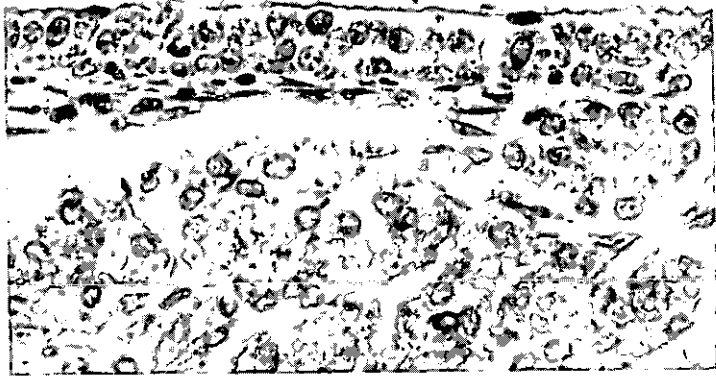


写真11 17 ppm NO₂ 16時間暴露終了後1日のゴールデンハムスター。
鼻中隔上皮細胞の肥大。HE染色。×1350

Plate 11 Hypertrophy of epithelial cells at nasal septum from a Golden hamster at 1 day after the end of exposure of 17 ppm NO₂ for 16 hr. HE stain. ×1350.



写真12 写真11と同じ。鼻中隔線毛細胞 SEM。×2000

Plate 12 Cilia at nasal septum from a Golden hamster same as plate 11. SEM. ×2000.

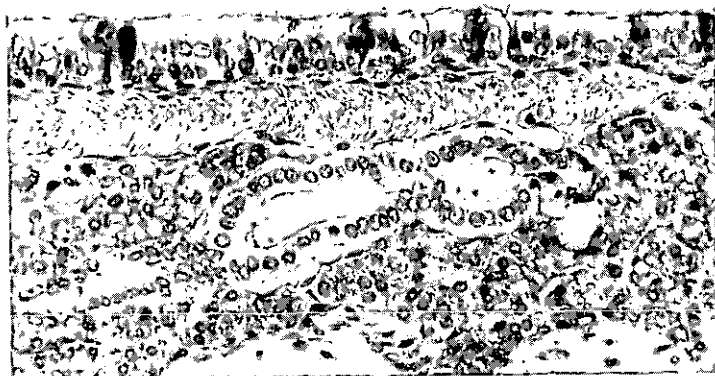


写真13 17 ppm NO₂ 16時間暴露終了後2日のゴールデンハムスター。
鼻中隔上皮細胞の修復。PAS染色。×680

Plate 13 Restoration of epithelial cells at nasal septum from a Golden hamster at 2 days after the end of exposure of 17 ppm NO₂ for 16 hr. PAS stain. ×680.



写真14 12 ppm NO₂ 12時間暴露のゴールデンハムスター。鼻中隔
上皮細胞の剥離。PAS染色。×680

Plate 14 Desquamation of the epithelial cells at nasal septum from a Golden hamster exposed to 12 ppm NO₂ for 12 hr. PAS stain. ×680.



写真15 12 ppm NO₂ 1日暴露のゴールデンハムスター。鼻甲介上皮細胞の剥離とリンパ球の浸潤。PAS染色。×680

Plate 15 Infiltration of lymphocyte and desquamation of epithelial cells at nasal turbinate from a Golden hamster exposed to 12 ppm NO₂ for 1 day. PAS stain. ×680.



写真16 写真15と同じ。鼻中隔線毛細胞の剥離と分泌亢進。SEM。×3500

Plate 16 Desquamation of ciliated cells and hypersecretion at nasal septum. SEM. ×3500.

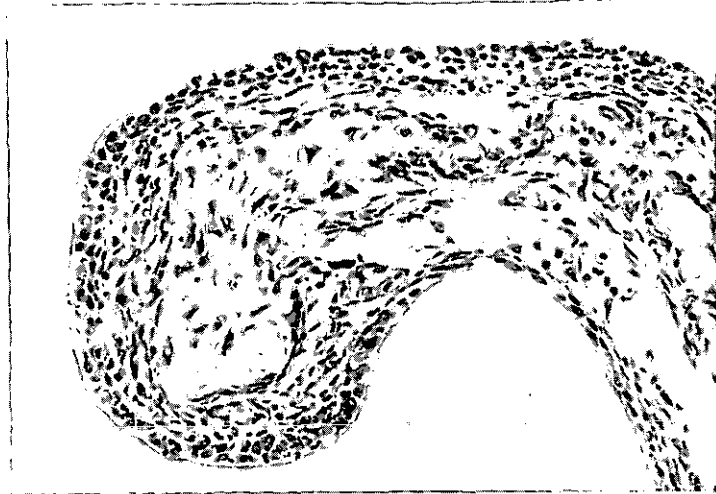


写真17 12 ppm NO₂ 2日暴露のゴールデンハムスター。鼻甲介上皮細胞の修復。HE染色。×340

Plate 17 Restoration of epithelial cells at nasal turbinate from a golden hamster exposed to 12 ppm NO₂ for 2 days. HE stain. ×680.

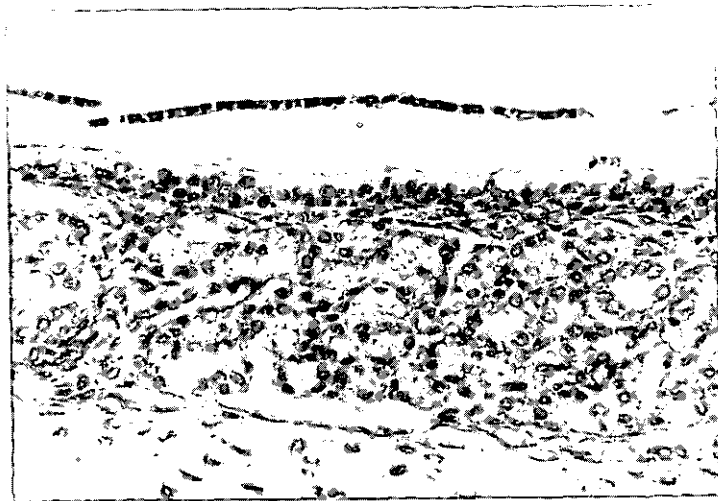


写真18 12 ppm NO₂ 5日暴露のゴールデンハムスター。正常な鼻中隔上皮。PAS染色。×680

Plate 18 Normal epithelia at nasal septum from a golden hamster exposed to 12 ppm NO₂ for 5 days. PAS stain. ×680.

二酸化窒素暴露が呼吸数、心拍数等に及ぼす
影響について

Effects of Nitrogen Dioxide on Respiratory Rate,
Heart Rate and Pneumogram in Rats

鈴木 明¹・市瀬孝道¹

Akira SUZUKI¹ and Takamichi ICHINOSE¹

要 旨

二酸化窒素の呼吸一循環機能への影響を解明するために、ラットに40 ppm, 60 ppm, 80 ppmの二酸化窒素を3時間暴露し、呼吸数、心拍数、呼吸曲線の変化について検討した。

暴露後の呼吸数の経時的変動は大きく、また暴露濃度と反応との間に一定の関係を認めなかった。心拍数の変動は呼吸数の変動より小さく、暴露濃度の変化に対応した反応を示した。心拍リズムの不整化する傾向が暴露30分後に観察された。暴露後数分～十数分内にいずれの濃度でも一時的な心拍数の減少と呼吸数の増加を認めた。呼吸曲線は暴露時間の延長に伴って変化した。

Abstract

Respiratory rate, heart rate and pneumogram were measured in unrestrained rats during the 3-hour exposure of NO₂ at the concentration of 40 ppm, 60 ppm and 80 ppm. Decrease of heart rate and increase of respiratory rate were observed at the beginning of exposure (4–15 minutes). Irregularity of heart rate at 30 minutes after exposure and the change of pneumogram with time course of exposure were observed. Respiratory rate of exposed rats was much varied and the change of respiratory rate of exposed rats could not be correlated with the exposure concentration of NO₂. The change of heart rate was dependent on the concentration of NO₂ and it was suggested that the heart rate could be used as a physiological indicator of NO₂ exposure.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O. Yatabe, Ibaraki, 300-21.

はじめに

二酸化窒素 (NO_2) は酸化性が高いうえ、吸入時における気道での摂取が二酸化硫黄やオゾンより少ないため、気道内末梢部まで到達し、その第一次侵襲点が呼吸器であると同時にその影響は呼吸器にとどまらないといわれている。したがって NO_2 の呼吸器への影響に関する動物実験報告は病理学的、生化学的知見を中心に多い。呼吸機能への影響に関して、Murphyら¹⁾ は 5.2 ppm 4時間暴露のモルモットで、また横山²⁾ は 18 ppm 2時間暴露のモルモットで、Henry は 15 ppm 2時間暴露³⁾ および 5 ppm 2ヶ月暴露⁴⁾ のサルで、Freemanらは 0.8 ppm 生涯期間暴露⁵⁾ と 2 ppm 2年間暴露⁶⁾ のラットで、いずれも呼吸数の増加を報告している。さらに Niewohnerら⁷⁾ は $30 \sim 35 \text{ ppm}$ 7～10日間暴露のハムスター摘出肺で Upstream Resistance の上昇を、Arnerら⁸⁾ は 2.9 ppm 週5日9ヶ月間暴露のラット摘出肺で肺コンプライアンスの低下を報告し、 NO_2 の影響は呼吸数および肺の換気力学に及ぶことが示された。一方、Antweilerら⁹⁾ は 5.3 ppm 週6日6ヶ月間暴露のモルモットで呼吸数および一回換気量の変化を認めず、また Freemanら⁶⁾、Wagnerら¹⁰⁾ は 2 ppm 2年間暴露のラットは肺気流抵抗および肺コンプライアンスに変化を示さないことを報告した。このように NO_2 の呼吸機能への影響については、呼吸数および肺換気力学的指標の変化を認める報告は多いが、それらの報告は多様で、未だ見解の一致を見るに至らず、現在のところ NO_2 の呼吸機能への影響について不明な点が多いといえる。

従来の成績の不一致の原因としては動物の感受性の差異、暴露条件が異なること等の種々の原因が考えられるが、多くの報告が数 ppm 以下の実験であるのに対し、呼吸数のように生体内の種々の因子によって統御されているために非常に変化しやすい指標を用いていることも一因と考えられる。そこで、生体側にとって厳しい条件、つまり NO_2 濃度を上昇させることによって、暴露条件、同一動物種内における感受性の差等の影響を少なくできるものと考え、ラットでの3時間 NO_2 暴露の LC_{50} といわれている 60 ppm を中心に 40 ppm 、 80 ppm の3暴露条件を設定した。また、 NO_2 は呼吸機能だけでなく、呼吸器と密接な関係を有する循環機能へも影響を及ぼすことが推測されるが、循環機能への影響に関する報告はほとんどない。

呼吸一循環機能への影響を検索するための指標としては、呼吸数等の呼吸生理学的、換気力学的指標および、心拍数、心電図、血圧、血中 O_2 、 CO_2 ガス分圧等の種々の指標があるが、今回は、 NO_2 の呼吸一循環機能への影響を解明するための一段階として、呼吸数、心拍数、呼吸曲線の変化について検討した。

方法

14～16週令のウィスター系雄ラット (Wistar: JCL) を一群6匹として計54匹使用した。 NO_2 の暴露は濃度 40 、 60 、 80 ppm で3時間、気積 240 l の台形チャンバー内で行い、換気回数は 20 回/h 、温度 $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ であった。 NO_2 ガスの供給および排気には暴露実験装置 (日本クレア

PT-300 A) を使用し、チャンバー内のガス濃度はNO_x 連続測定装置(ケミルミネッセンス法、モニター・ラボ社製ML-8440 H)で行った。

心拍数と心電図は必ずしも一致しないが、心電図上極端な異常がない場合には同一視することもできるので、心拍数は心電図の記録から算出した。心電図は、第1図の模式図に示すように、先端に直径約2 mmの銀球をつけた120 μのエナメル銅線を電極として一つは右側肩甲骨上端、他方は胸骨柄部、さらにアース電極を頸部の皮下に埋入し、いずれのリード線も皮下を通して背側頸部に誘導し絹糸にて縫合固定した。それぞれの出力側末端には円形の銅線リングを取りつけ、機器のインプットボックスから延びたクリップによって生体側リード線と機器側リード線を接続し、双極誘導法によって心電図を増幅・記録した。呼吸数は、心電図の誘導と同様な電極を左右胸部の皮下に埋入し、呼吸運動によるインピーダンスの変化の双極誘導法による記録から算出した。

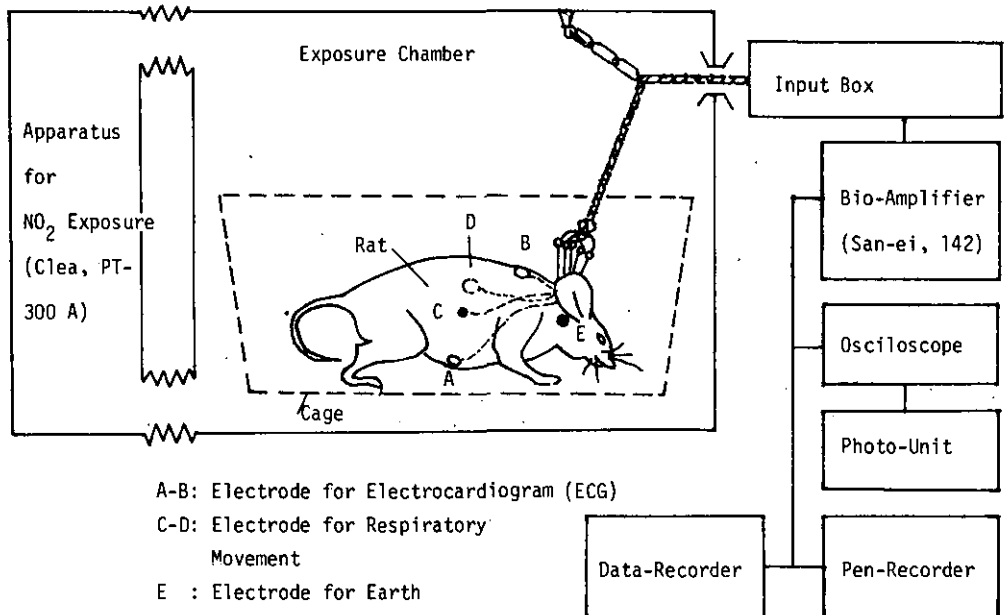


図1 実験装置と埋入電極の位置の模式図

Fig. 1 Schematic illustration of experimental apparatus and electrode site for ECG and respiratory movement

これらの電極を皮下に埋入する手術はNO₂の暴露日の2日前に pentobarbitai sodium (ネンブタール, 25 ~ 30 mg / 0.6 cc / head) 麻酔下で無菌的に行い、術後注意深く飼育管理し; 暴露直前に、反射機能テストによって、麻酔の影響が残存していないと考えられたラットについて実験を行った。電極の装着されたラットを飼育用ケージ(250 × 70 × 125 mm)に入れた。ラット

は無保定であったので、暴露中ケージ内で自由に動くことができた。ラットの心拍数および呼吸数を経時的にモニターし、心拍数と呼吸数の変動が安定して、ラットがチャンバー内の環境に慣れてきたと思われた時点で NO_2 をチャンバー内に導入した。またガス濃度が実験濃度に達する時間はいずれの濃度においても10分以内とした。

また NO_2 のような吸気性ガスは、鼻粘膜および気管に刺激物質として作用し、中枢および末梢神経系を介して呼吸数あるいは心拍数の変動をもたらすことが考えられるので、中枢神経系を抑制させる pentobarbital sodium (ネプタール, $25 \text{ mg} / 0.5 \text{ cc} / \text{head}$) を腹注し、無投与ラットの変化と比較検討した。

呼吸曲線図は、pentobarbital sodium 腹注後、第2図に示すように、ラット用マスクを用いて呼気、吸気に伴う圧力の変化を圧トランスジューサーに導き記録した。

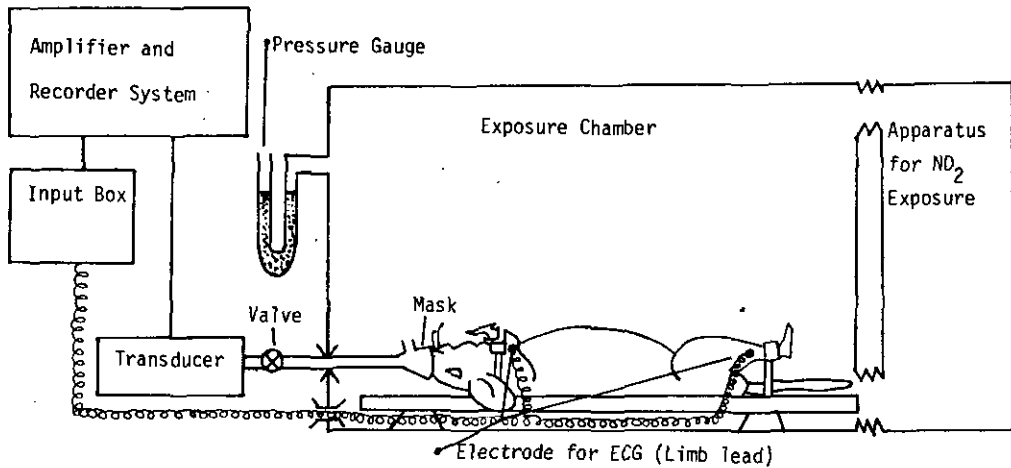


図2 呼吸曲線図測定方法の模式図

Fig. 2 Schematic illustration of recording method for pneumogram

呼吸、心電図、呼吸曲線の増幅、記録には第1図に示すように、生体増幅器(ポリグラフ、三菱測器142システム)とその記録システムを使用した。また一部の記録はデーターレコーダー(TEAC, 270A)に収録し、必要に応じて再現と解析を繰返した。

結果

40 ppm, 60 ppm, 80 ppmの NO_2 暴露による心拍数の変化を暴露前値に対するパーセントで第3図に示した。

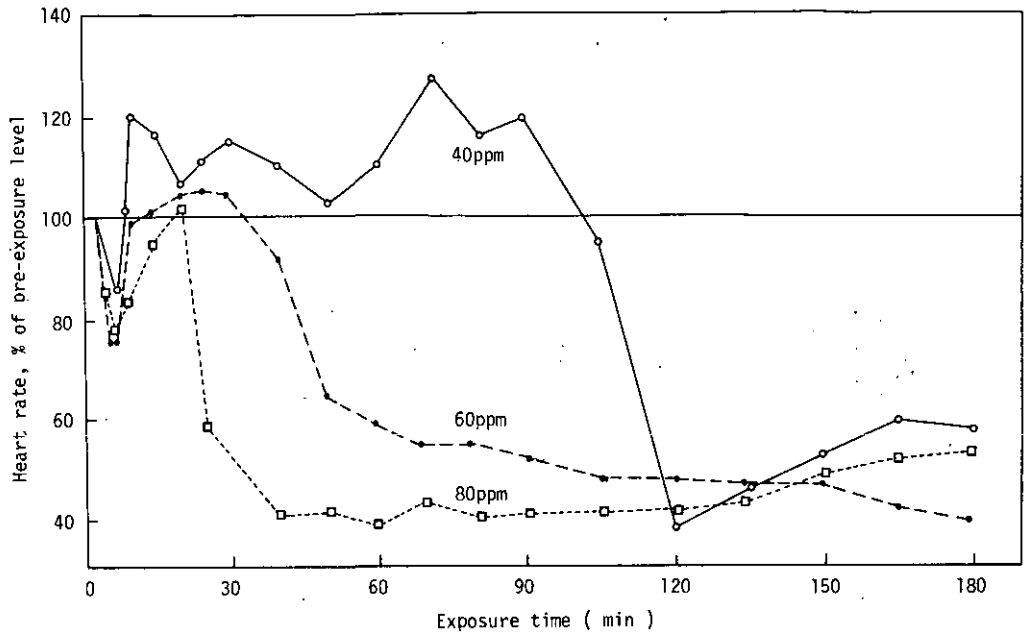


図3 NO₂ 暴露による心拍数の変化

Fig. 3 Changes of heart rate in rats exposed to NO₂

40 ppm 暴露時の心拍数は、暴露5～8分後に暴露前値の85%まで減少したが、10分後には120%と増加し、その後103～130%の緩慢な動揺を経て100分を過ぎると急速に減少し、120分後には37%、150分後には53%となり、以後55～65%で安定した。60 ppm 暴露時の心拍数は、40 ppm 暴露時と同様に暴露5～8分後に暴露前の74%に減少し、10～15分後には98～100%と暴露前値のレベルに戻り、その後103～105%と暴露前値よりやや高い値を示したが、30～35分を過ぎると減少し、40分後には91%、60分後には58%、90分後には52%、180分後には39%となった。80 ppm 暴露時の心拍数は、暴露4～5分後に暴露前値の76%に減少し、10分後には84%、15分後に96%、20分後に102%と暴露前のレベルに近づいたが、以後急速に減少し、25分後には58%、40分後には40%となり、その後このレベルがしばらくの間続いたが、150分を過ぎると48～58%となり死に至る経過をとる個体が多く観察された(4/6が死亡)。

次に40 ppm、60 ppm、80 ppmの二酸化窒素暴露による呼吸数の変化を暴露前値に対するパーセントで第4図に示した。40 ppm 暴露時の呼吸数は、暴露4～8分後に暴露前値の132%まで増加し、10～15分後には110～115%となり、その後大きな変動を示したが全体的には増加する傾向を示した。60 ppm 暴露時の呼吸数は、暴露5～7分後には137～146%と増加し、10～15分後

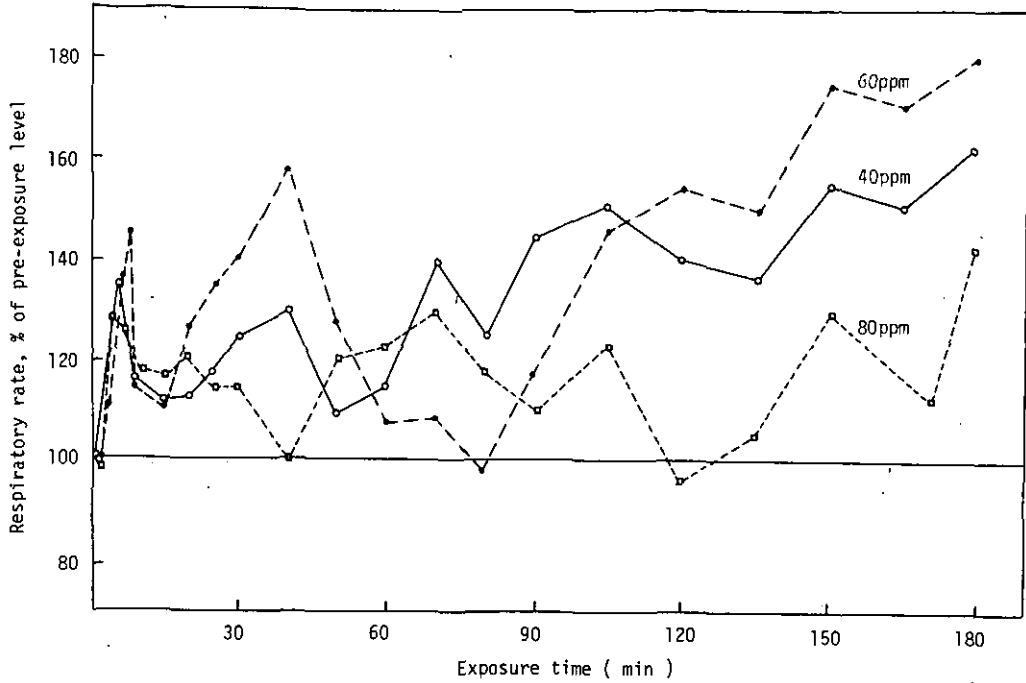


図4 NO₂ 暴露による呼吸数の変化

Fig. 4 Changes of respiratory rate in rats exposed to NO₂

には110~115%となり、40 ppm暴露時と同様な初期の変化を示した。以後図に示すように増減の変動が大きかったが、平均的経過としてみると、100分以後には増加する傾向を示した。80 ppm暴露時の呼吸数は、暴露2~3分後に暴露前値の96%であったが、4~8分後には125~128%、10~15分後には115~116%となり、その後大きな変動を経て130分以降増加する傾向を示した。

pentobarbital sodiumを腹注したラット(以下、処置ラットとする)と、無投与ラット(無処置ラットとする)の暴露下における呼吸数と心拍数の変化を10秒平均の実測値で第5図に示す。図に示すように、暴露前の処置ラットでは無処置ラットに比較して心拍数、呼吸数とも減少していた。また、処置ラットでは、無処置ラットで観察された暴露4~8分後の一時的な心拍数の減少および呼吸数の増加は認められず、また50~60分を過ぎると、処置ラットと無処置ラットの心拍数はほぼ同様な経過を示した。処置ラットの呼吸数は無処置ラットのそれと異なり大きな変動を示さなかった。

心拍数のリズムは上位中枢の神経系の調節機序の関与に負うところが多いといわれているので心拍間隔の性質について検討するために心電図上のR棘と次の波形のR棘の時間(R-R間隔)を連

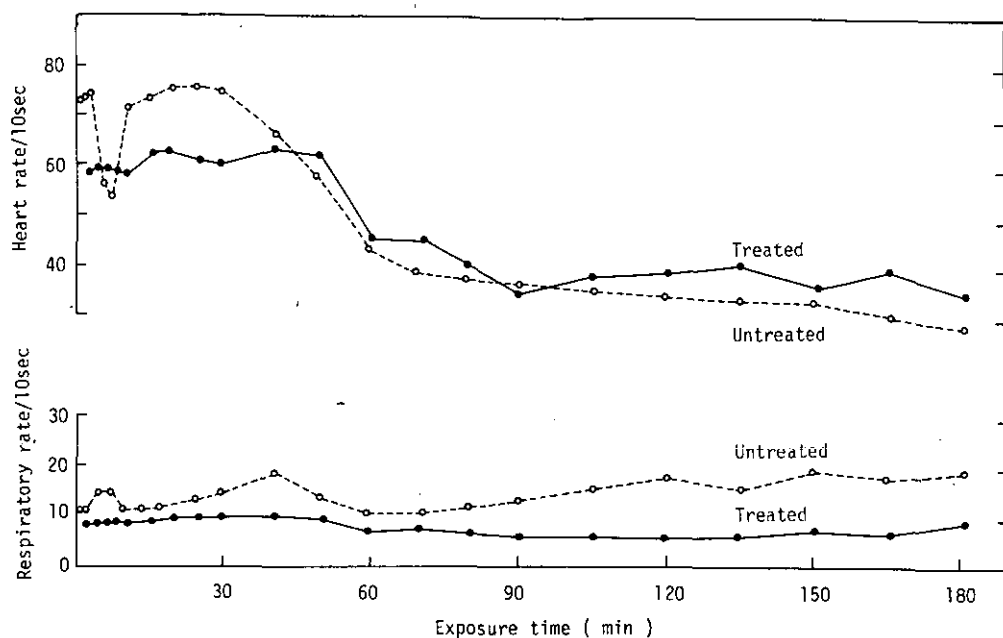


図5 NO₂ 60 ppm暴露における無処置ラットとPentobarbital投与ラットの呼吸数及び心拍数の変化

Fig. 5 Changes of respiratory rate and heart rate of 60 ppm exposed rats with and without pentobarbital administration

続する300個の心電図について測定し、そのR-R間隔のヒストグラムを第6図に示した。40 ppm, 60 ppm, 80 ppmの暴露でも同様な傾向が認められたので、ここでは60 ppm暴露時における無処置ラットの暴露前、暴露30分後および処置ラットの30分後のR-R間隔ヒストグラムを代表させた。無処置ラットでは、多くのR-R間隔計測値の分布は130~165 msecの範囲に分布し、そのピークはおよそ140 msecであった。30分後では、そのピークは140~145 msecで暴露前値と比較して大きな変化を示さなかったが、分布域は120~175 msecと広がった。

呼吸曲線図の変化は第7図に示した。技術上無処置では測定が困難であったので、pentobarbital麻酔下で検索し、図には60 ppm暴露前、暴露30分後、60分後の代表的パターンを示した。暴露前の呼吸曲線図は、呼気時の曲線上にわずかながらノイズが重なっているのが認められたが、吸気時(上方向き)と呼気時(下方向き)の接続が滑らかに移行していることが多かった。暴露30分後では呼気、吸気時の境界が不明瞭となり、呼吸曲線上に小さな波状の変化が認められ、暴露60分を過ぎると一呼吸ごとに分離する傾向が強くなり、曲線上に基線を示す部分が明瞭かつ多くなった。

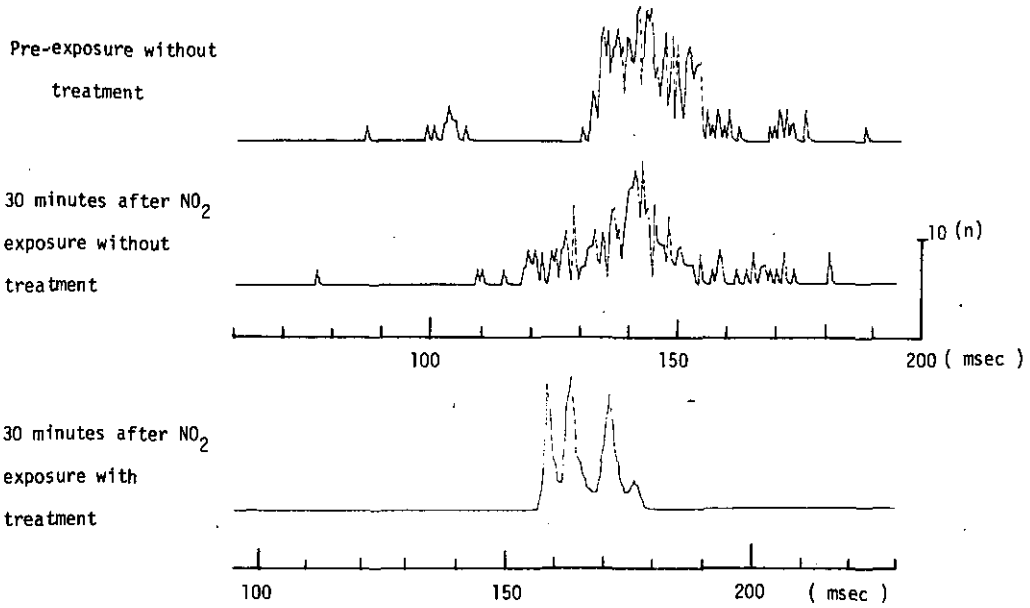


図6 NO₂ 暴露30分後における無処置ラットと処置ラットの心拍インターバルヒストグラム

Fig. 6 Interval histogram of heart rate in rats at 30 minutes after NO₂ exposure with and without treatment

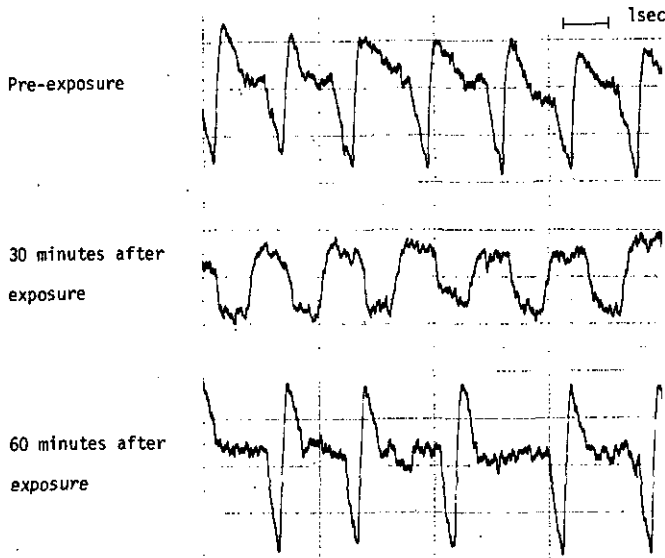


図7 NO₂ 60ppm暴露による呼吸曲線図の変化

Fig. 7 Change of pneumogram in anaesthetized rats exposed to 60 ppm NO₂

考 察

呼吸数の増加を観察した報告は多いが必ずしも一致した見解にいたっていない。この理由として動物の感受性、暴露条件等が異なることの他に、呼吸数が生体の複雑な因子によって統御されているために非常に変動しやすい指標であることも一因と考えられる。本実験における高濃度のNO₂暴露においても、経時的な呼吸数の変動は大きく、暴露濃度と反応との間に一定の関係を認めることは困難であった。横山²⁾は18 ppm, 42 ppm, 57 ppm 2時間暴露のモルモットで、濃度の増加に伴う呼吸数の増加を観察し、本実験の結果と相違する成績を報告したが、これは動物種および実験条件等が異なることも一因していると考えられた。呼吸数の変動に比較して心拍数の変動は小さく、さらに、心拍数が暴露開始直後の一時的な減少の後に再び減少して暴露前の70%レベルに達する時間は、80 ppm暴露で20分~30分、60 ppmで40~50分、40 ppmで110~120分であった。暴露濃度の低下に伴い心拍数の減少が遅延するということから心拍数の変化がNO₂暴露の指標として有用である可能性が示唆された。

山賀ら¹¹⁾は2~3 ppmで1日5時間、週6日間、85日間暴露したウサギでガス暴露中に心拍リズムの不整を認めたが、著者らも同様な知見を得たことから、高濃度のNO₂ガス暴露ラットでは短時間のうちに同様な所見が出現するものと考えた。

無処置ラットでは暴露開始数分から十数分以内に一時的な心拍数の減少と呼吸数の増加を認めたが、pentobarbital sodium 投与の処置ラットではこの変化は認められなかった。pentobarbital は中枢神経系の抑制作用をもち、特に大脳皮質、脳幹網様体の上行性賦活系に対して強く作用するといわれているので、処置ラットで変化しなかったのは、神経系を介しての反射性応答がpentobarbitalの投与によって遮断されたからであると考えられた。したがって無処置ラットでの暴露初期の変化は神経系を介しての応答と考えられ、その応答が早いことから、鼻粘膜、喉頭あるいは気管に分岐する求心性神経への刺激が推測された。

今回用いた呼吸曲線の測定方法は簡易なもので、呼吸運動に伴う気流変化を圧変化としてとらえるので、肺、胸腔とそれを囲む横隔膜、胸筋、腹筋の活動および外界と結ぶ上部気道の全体的な変化を表出しているとみなすこともでき、相対的な変化の追跡には便利であると考えられたが、複雑な呼吸運動へのNO₂の影響を解析するためには、今後の技術的改良も含めて換気力学的側面からの成績の充実が必要であろう。

NO₂の呼吸-循環機能への影響を解明するための一段階として高濃度暴露下での呼吸数、呼吸曲線の変化について検討してきたが、今後、呼吸数、心拍数の変動要因の解明、および低濃度暴露での影響について研究を進めていく予定である。

引用文献

- 1) Murphy, S.D., C.E. Ulrich, S.H. Frankowitz and C. Xintaras (1964): Altered function in animals inhaling low concentrations of ozone and nitrogen dioxide. *Am. Ind. Hyg. Ass. J.*, **25**, 246-253.
- 2) 横山栄二 (1968): SO_2 と NO_2 および O_3 の換気能に及ぼす影響の比較—モルモットにおける暴露実験. *産業医学*, **11**, 563-568.
- 3) Henry, M.C., J. Findlay, J. Sprangler and R. Ehrlich (1970): Chronic toxicity of NO_2 in squirrel monkey II, Effect on resistance to bacterial and viral infection, *Arch. Environ. Health*, **20**, 566-570.
- 4) Henry, M.C., R. Ehrlich and W.H. Blair (1969): Effect of nitrogen dioxide on resistance of squirrel monkeys to *Klebsiella pneumoniae* infection. *ibid.*, **18**, 580-587.
- 5) Freeman, G., N.J. Furiosi and G.B. Haydon (1966): Effects of continuous exposure of 0.8 ppm NO_2 on respiration of rats. *ibid.*, **13**, 454-456.
- 6) Freeman, G., R.J. Stephens, S.C. Crane and N.J. Furiosi (1968): Lesion of the lung in rats continuously exposed to two parts per million of nitrogen dioxide. *ibid.*, **17**, 181-192.
- 7) Niewohner, D.E. and J. Kleinerman (1973): Effect of experimental emphysema and bronchiolitis on lung mechanics and morphometry. *J. Appl. Physiol.*, **35**, 25-31.
- 8) Arner, E.C. and R.H. Rhoades (1973): Long-term nitrogen dioxide exposure. *Arch. Environ. Health*, **26**, 156-160.
- 9) Antweiler, H. and A. Brookhans (1976): Respiratory frequency flowrate and minute volume in nonanaesthetized guinea-pigs during prolonged exposure to low concentrations of SO_2 and NO_2 . *Ann. Occup. Hyg.*, **19**, 13-16.
- 10) Wagner, W.D., B.R. Duncan, P.G. Wright and H.E. Stokinger (1965): Experimental study of threshold limit of NO_2 . *Arch. Environ. Health*, **10**, 455-466.
- 11) 山賀岑朗・大森 薫・大屋敷萬幸・安倍和則・戸沢 隆・中野欣嗣・寺西文字 (1974): 低濃度二酸化窒素の反覆暴露の影響. *日本公衛誌*, **21**, 387-394.

二酸化窒素の急性および亜急性暴露
の免疫反応に及ぼす影響

Effect of Acute and Subacute Exposure to Nitrogen Dioxide
on Primary Immune Response

藤巻秀和¹・清水不二雄¹

Hidekazu FUJIMAKI¹ and Fujio SHIMIZU¹

要旨

二酸化窒素の急性、並びに亜急性暴露が、液性一次免疫反応に及ぼす影響について検討した。実験動物としては ICR マウス、BALB/C マウスを用い、羊赤血球に対する一次抗体産生能を、脾臓中の溶血斑形成細胞算定法 (PFC) と血清中の血球凝集素価 (HA) を測定することにより検索した。

5, 20, 40 ppm の NO₂ 各 12 時間の急性暴露の結果、5 ppm では抗体産生能に著変を認めなかったが、20, 40 ppm で有意に抗体産生能は低下した。また、雌雄差については、対照群に比し抗体産生能の低下する傾向が、雌より雄でより著明であった。また暴露の時期 (抗原静注 1 日, 2 日, 3 日後) による影響の差異を検討したところ、免疫 2 日後に暴露された群で最も著明な抑制が認められた。更に 20, 40 ppm 暴露により、胸線や脾臓の細胞数も減少することが明らかにされた。

0.4, 1.6, 6.4 ppm 各 4 週間の亜急性暴露実験においては、0.4, 1.6 ppm の濃度ではやや低下する傾向、逆に 6.4 ppm ではやや亢進する傾向が各々認められた。

Abstract

Effects of acute exposure to nitrogen dioxide on primary humoral antibody response in mice were studied. Mice were exposed to 5, 20 and 40 ppm of NO₂ for 12 hours. The exposure of 20 or 40 ppm resulted in the significant suppression of antibody responses, while 5 ppm did not affect it.

* 本文の要旨は第 20 回大気汚染学会に発表および英文にて投稿中

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O. Yatabe, Ibaraki, 300-21.

Such a tendency to the immunosuppression by the exposure to NO_2 was recognized more remarkably in male than in female. A time-factor relationship between NO_2 exposure and antigen injection was further investigated. The exposures to 20 ppm at various time intervals in relation to antigen injection revealed that the most remarkable suppression was observed in the group exposed two days after antigen injection. Not only the suppression of primary antibody response but also the decrease of the total cell number in the spleen and more strikingly in the thymus was also caused by the acute exposure of NO_2 .

Effects of subacute exposure on primary humoral antibody response in mice were also studied. Mice were exposed to 0.4, 1.6 and 6.4 ppm of NO_2 for 4 weeks. The exposure of 0.4 or 1.6 ppm resulted in the slight suppression of immune responses, while 6.4 ppm showed the tendency rather to stimulate slightly the antibody formation.

はじめに

大気汚染物質の一つである NO_2 の生体に及ぼす影響については、既に数多くの詳細な研究がなされている。とりわけ標的臓器としての肺を中心とした呼吸器系に関する報告が大半をしめている。

一方免疫反応は外界からの種々の因子に対する生体の防禦機構の代表として重要な役割を果たしており、その異常は、一般に感染症、癌、アレルギー疾患等の発症と密接に関連すると考えられている。大気汚染物質と、主として肺を場とした上記諸疾患との関連については、多大の関心が払われているが、その根底をなすと考えられる基礎的な免疫反応への影響に関する報告は、依然数少なく¹⁻³⁾、特に急性影響については、最近の Smith の報告⁴⁾ 以外にはほぼ皆無に等しい。免疫反応は液性免疫反応と細胞性免疫反応とに大別されるが、まず前者に及ぼす NO_2 の急性、亜急性影響について検討を加えた。更に、 NO_2 の影響機序を解明するために、急性暴露実験により、雌雄への影響の差や、暴露する時期（抗原静注，1日，2日又は3日後）による影響の差異について検討を加えた。

方法

6～9週令の ICR 雌マウス（日本クレア）並びに BALB/C マウス（日本チャールスリバー）を用いた。 NO_2 の暴露条件は急性実験として、Hine⁵⁾ を参考に、5, 20, 40 ppm 各 12 時間、亜急性実験としては、0.4, 1.6, 6.4 ppm 各 4 週間とした。急性暴露に対しては、容量 120 l の暴露チャンバーを使用した。チャンバー内温度は 22～25℃，換気回数は 20 回/時であった。 NO_2 濃度はケミルミネッセンス法による窒素酸化物連続測定器と自動制御装置により一定値に保たれた。亜急性暴露に対しては容量 18 m³ の平型チャンバーを用い、チャンバー内温度：24～26℃，湿度：50～60%，換気回数：60 回/時で、 NO_2 濃度の変動は設定濃度の 2% 以内の範囲であった。

清浄空気を用いた以外はすべて暴露群と同一条件としたものを対照群とした。暴露時の水と餌は自由に与えられた。

抗原投与は、急性実験においては、原則として暴露直前又は直後（各1時間以内）に行ない、両群について比較検討した。また別に抗原投与直前・直後、1日、2日、3日後に各々暴露して、抗体産生の種々の過程に及ぼす影響についても比較検討した。亜急性実験では暴露直後に抗原を静注した。

抗原としては羊赤血球（東洋血清燐）を用い、 5×10^7 / マウス 静注4日後にマウスを屠殺し、脾臓中の抗体産生細胞、即ち Plaque Forming Cell (PFC) の算定法と、血清中の血球凝集素価、即ち Hemagglutination (HA) による抗体価の測定により、その抗体産生能を検索した。PFCはCunninghamとSzenberg⁶⁾の変法を用い、又、HAはmicrotitration法により測定した。

急性実験では更に脾臓と胸線の細胞数をステンレスメッシュを使用して得た細胞浮遊液から、各々 Trypan Blue と Türk 液を用いて算定した。また免疫蛍光間接法により、胸線の θ -抗原陽性細胞の割合も検索した。即ち細胞数を 1×10^7 / ml に調整後、その 0.1 ml に抗 θ -抗血清 (1:8) 0.1 ml を加え、0℃ 30分放置後 0.01 M NaN_3 を加えた Balanced Salt Solution (BSS) で2回遠心洗浄し、FITC-抗ウサギ IgG ヤギ血清 (1:16) (栄研燐) を 0.1 ml 加え、37℃ 1時間反応後再び2回遠心洗浄して、落射式蛍光顕微鏡 (オリンパス, BH-RFL) にて観察、算定した。

なお、抗 θ -抗血清は、マウスの脳をフロイントの完全アジュバントと共にウサギに数回免疫後採血、その抗血清をマウスの肝と血球により吸収して作製した。

結 果

5および20 ppmの NO_2 、12時間暴露、ICR雌マウスによる結果を表1に示した。20 ppm暴露では、全脾細胞当りのPFCで見ると、抗原を静注後暴露した場合、および暴露後静注した場合の両者とも、暴露群の方が対照群に比べて低下する傾向がみられた。HAでも同様であった。5 ppm暴露では著変は認められなかった。

つぎにBALB/C雄マウスを用いて行った40 ppmも含めた同様の実験の結果を表2に示した。20、40 ppmで有意に抗体産生能が抑制された。

表3にBALB/Cマウスを用いて、雌雄への影響の差異を検索した結果をまとめた。表より明らかなように、雄の方が雌よりも、より強く抑制される傾向が認められた。

抗原投与と暴露の時間的關係をかえて、その影響を検討した結果を表4に示した。脾臓当りのPFCでは、三つの暴露群ですべて対照群に比べて有意な低下がみられたが、 10^6 生細胞当たりのPFCでは著しい低下のみられたのは、投与2日後に暴露された群のみであった。HAでは1日、

表1 NO₂急性暴露のICR雌マウスの一次抗体産生能に及ぼす影響

Table 1. Effect of acute exposure to NO₂ on primary antibody response of ICR female mice

NO ₂ ppm		One hour after#		One hour before##	
		Control	Exposed	Control	Exposed
5	PFC ^a	2.24 ± 0.23	2.37 ± 0.21	1.57 ± 0.20	1.89 ± 0.22
	HA ^b	5.7 ± 0.1	5.6 ± 0.2	7.1 ± 0.3	6.9 ± 0.2
20	PFC	1.97 ± 0.41	1.08 ± 0.20	1.33 ± 0.19	1.05 ± 0.10
	HA	6.3 ± 0.2	6.1 ± 0.3	5.7 ± 0.2	5.4 ± 0.2

a: × 10⁻⁵/spleen

b: log₂ titer (reciprocals)

#: Exposed within one hour after antigen injection

##: Exposed within one hour before antigen injection

Each value is expressed as mean ± SE of 5-7 mice.

表2 種々の濃度のNO₂がBALB/C雄マウスの一次抗体産生能に及ぼす影響

Table 2. Effect of various concentrations of NO₂ on primary antibody response of male BALB/C mice

NO ₂ ppm		One hour after#		One hour before##	
		Control	Exposed	Control	Exposed
5	PFC ^a	2.06 ± 0.12	2.05 ± 0.08	2.25 ± 0.28	2.48 ± 0.29
	HA ^b	6.7 ± 0.2	7.0 ± 0.1	6.3 ± 0.2	6.7 ± 0.1
20	PFC	1.41 ± 0.10	0.78 ± 0.17*	1.60 ± 0.19	0.64 ± 0.10**
	HA	4.9 ± 0.1	4.5 ± 0.1*	5.4 ± 0.2	4.4 ± 0.3*
40	PFC	1.65 ± 0.19	0.59 ± 0.07**	1.46 ± 0.12	0.48 ± 0.12**
	HA	5.2 ± 0.1	4.1 ± 0.1**	5.0 ± 0.3	3.6 ± 0.2**

*: p < 0.05

** : p < 0.01

a: × 10⁻⁵/spleen

b: log₂ titer (reciprocals)

#: Exposed within one hour after antigen injection

##: Exposed within one hour before antigen injection

Each value is expressed as mean ± SE of 5-7 mice.

表3 NO₂に暴露されたBALB/Cマウスの雄と雌との一次抗体
産生能への影響の比較

Table 3. Comparison of primary antibody response
in NO₂ exposed male and female BALB/C
mice #

NO ₂ ppm		Male		Female	
		Control	Exposed	Control	Exposed
5	PFC ^a	1.65 ± 0.16	1.63 ± 0.18	2.11 ± 0.23	2.04 ± 0.13
	HA ^b	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.5 ± 0.0
20	PFC	2.19 ± 0.28	1.20 ± 0.16*	2.31 ± 0.07	1.38 ± 0.26*
	HA	5.9 ± 0.1	5.1 ± 0.1**	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1
40	PFC	2.30 ± 0.21	0.40 ± 0.05**	2.07 ± 0.12	1.04 ± 0.16**
	HA	7.2 ± 0.2	5.7 ± 0.1**	7.1 ± 0.1	6.7 ± 0.2*

#: Exposed within one hour after antigen injection

*: p < 0.05

** : p < 0.01

a: × 10⁻⁵/spleen

b: log₂ titer (reciprocals)

Each value is expressed as mean ± SE of 5-7 mice.

2日後暴露群で対照群に比し有意な抑制がみられたが、3日後では、著差は認められなかった。

次に脾臓と胸線の細胞数に及ぼす影響について、図1に示した。20、40 ppm暴露により、脾臓の細胞数自体が著しく減少した。この傾向は、胸線においてより著明に認められた。抗原の投与時期に対して、暴露時期を変えた場合に、その数の減少や、θ-抗原陽性細胞数の割合がどう変化するかを検索した結果を表5に示した。いずれの暴露群でも著しく細胞数が減少していたが、抗原投与後に暴露した3群では、対照群に比べてその50%以下に減少した。θ-抗原陽性細胞は抗原投与直前直後、並びに1日後に暴露された群で減少の傾向が認められ、細胞自体への影響が示唆された。

亜急性実験の結果を表6に示した。0.4、1.6 ppmでは、対照群に比しやや抗体産生能が低下する傾向が認められた。逆に6.4 ppmでは、やや亢進がみられた。

表4 抗原静注後，暴露時期を変えた時の一次抗体産生能への影響

Table 4. Effect of exposure to 20 ppm NO₂ after antigen injection on primary antibody response

	One day after#		Two days after##		Three days after###	
	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed
PFC × 10 ⁻⁵ spleen	1.39±0.13	0.48±0.10**	1.96±0.13	0.70±0.09**	1.68±0.16	0.89±0.12**
PFC/10 ⁶ spleen cells	361±35	279±78	649±79	327±33**	610±82	518±41
HA	5.6±0.1	4.9±0.2*	6.4±0.2	5.7±0.1**	6.8±0.2	6.5±0.1

#: Exposed one day after antigen injection
 ##: Exposed two days after antigen injection
 ###: Exposed three days after antigen injection
 *: p < 0.05 **: p < 0.01

Each value is expressed as mean ± SE of 5-7 mice.

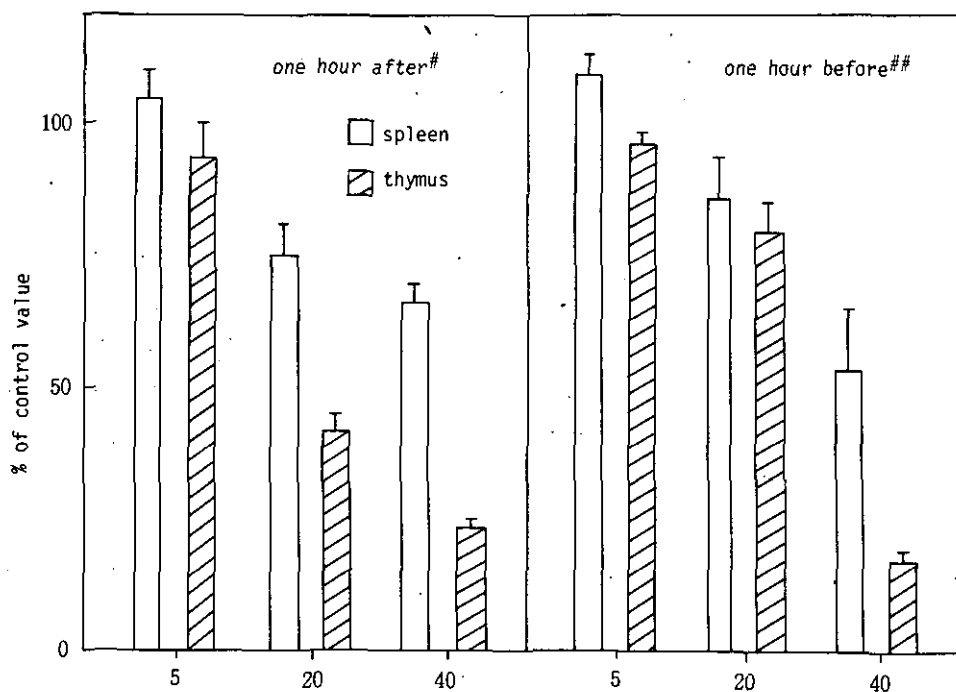


図1 NO₂暴露の脾臓と胸線の細胞数へ及ぼす影響

Fig. 1 Effect of exposure of NO₂ on the number of the spleen and thymus cells.

#: Exposed within one hour after antigen injection
 ##: Exposed within one hour before antigen injection

表5 20 ppm暴露の胸線細胞への影響

Table 5. Effect of exposure to 20 ppm NO₂ on the number of the thymus cells and θ -antigen positive cells

	One hour ^a before E/C(%)*	One hour ^b after E/C(%)	One day ^c after E/C(%)	Two days ^d after E/C(%)	Three days ^e after E/C(%)
No. of thymus cells	76.6 ± 6.4	41.1 ± 3.3	33.0 ± 2.6	44.4 ± 5.2	63.3 ± 8.1
θ -antigen positive cells	97.0 ± 0.6	94.3 ± 1.9	94.7 ± 0.4	99.2 ± 0.5	101.3 ± 0.7

a~e: See Table 1 and Table 3

*: Percentage of control value

Each value is expressed as mean ± SE of 3 experiments

表6 NO₂亜急性暴露の一次抗体産生能に及ぼす影響

Table 6. Effect of subacute exposure to NO₂ on primary antibody response

NO ₂ ppm		Control	Exposed
0.4	PFC ^a	2.28 ± 0.51	1.31 ± 0.37
	HA ^b	7.5 ± 0.4	6.7 ± 0.6
1.6	PFC	2.86 ± 0.51	1.30 ± 0.25*
	HA	6.1 ± 0.5	4.6 ± 0.2*
6.4	PFC(1)	0.50 ± 0.12	0.74 ± 0.10
	(2)	1.27 ± 0.31	3.12 ± 0.43**
	HA (1)	5.7 ± 0.5	6.7 ± 0.3
	(2)	4.6 ± 0.6	6.3 ± 0.3

*: p < 0.05

** : p < 0.01

a: × 10⁻⁵/spleen

b: log₂ titer (reciprocals)

Each value is expressed as mean ± SE of 9-10 mice.

考 察

NO₂の抗体産生能に及ぼす影響に関する報告では、主に長期実験で免疫能の低下が認められているものの、その作用機序についての検討は、殆んどなされていない。本実験により、免疫反応がNO₂の高濃度、短期暴露により、影響を受けることが明らかとなった。NO₂の生体への作用機序の解明をはかるためには、亜急性、慢性のみならず、急性も含めた種々の条件下での反応検索が必要であろう。

ICRとBALB/Cでは、BALB/Cにてより著明に抗体産生能の低下がみられ、NO₂に対する感受性の差が認められた。BALB/Cにおいてみられた雌雄による感受性の差も同様興味ある現象である。これは、Krzychら⁷⁾が estrous cycle により抗体産生能が変化すると指摘しているように、雄と雌とのホルモン系統の相違によりもたらされたことかも知れない。NO₂が一般に内分泌系に如何なる影響を与えるかについての報告も殆んど見当たらないので、この現象が内分泌系への影響を介してのことかどうかは現時点では未詳である。

抗原投与の時期に対して20 ppm暴露の時期を変えると、抗体産生能への影響の度合いが異ってくる事も明らかにされた。とりわけ投与2日後に暴露された群で一番著明な低下が認められた。これはT、B、両細胞群の分化増殖の過程にて、NO₂の影響を一番強く受けることを示唆しているとも考えられる。あるいは、免疫反応も含めて、一般に生体反応はNO₂の暴露2日後に一番強く影響される可能性も否定出来ない。又、暴露による脾臓の細胞数減少自体が、全脾臓当りのPFCの低下の一因となっていると考えられる。但し、10⁶生細胞当りのPFCでも低下の傾向が認められていることから、機能的にも明らかに影響を受けているものと思われる。特に胸線で細胞数が著減していることは、元来胸線が加齢、疾患等、種々の要因に敏感ではあるが、NO₂がT細胞に何らかの影響を及ぼしたと考えられよう。実際に胸線細胞が影響を受けることが明らかになれば、いまだ殆んどその影響について検索されていない細胞性免疫にも何らかの影響を及ぼす可能性は高いものと思われる。このような細胞レベルでの解析は、その重要性に拘らず、殆んどなされていない。最近ようやくMaigetterら⁸⁾が、0.5 ppm 3ヶ月暴露で、T、B細胞の mitogen に対する反応が低下するという報告を出した。

亜急性でみられたむしろ抗体産生能を亢進させるという現象の解明も含めて、*in vitro*の系での解析を主なる手段として、細胞レベルにおける影響について、現在、更に検討中である。

謝 辞

本研究で、HAの測定その他に御協力していただいた河村涼子博士に深く感謝致します。

引 用 文 献

- 1) Fenters, J.D., R. Ehrlich, J. Findlay, J. Spangler and V. Tolkacz (1971): Serologic response in squirrel monkeys exposed to nitrogen dioxide and influenza virus. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **104**, 448-451.
- 2) Ehrlich, R., E. Silverstein, R. Maigetter and J.D. Fenters (1975): Immunologic response in vaccinated mice during long-term exposure to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **10**, 217-223.
- 3) 中村清一・中山ユミ子・三浦武夫・森 和博(1971): 網内系細胞による生体防禦(VⅢ)抗体産生機能に及ぼす二酸化窒素の影響。大阪府立公衆衛生研究所研究報告, **9**, 20-22.
- 4) Smith, J.R. (1976): The effects of acute exposure to ozone, nitrogen dioxide, or sulfur dioxide on the induction of the primary humoral immune response to bacteriophage ϕ x-174. *Dissertation Abstracts International: B. Sciences and Engineering*. **36**, 6066-6172.
- 5) Hine, C.H., F.H. Meyers and R.W. Wright (1970): Pulmonary changes in animals exposed to nitrogen dioxide, effects of acute exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **16**, 201-213.
- 6) Cunningham, A.J. and A. Szenberg (1968): Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunol.*, **14**, 599-601.
- 7) Krzych, U., H.R. Strausser, J.P. Bressler and A.L. Goldstein (1978): Quantitative differences in immune responses during the various stages of the estrous cycle in female BALB/c mice. *J. Immunol.*, **121**, 1603-1605.
- 8) Maigetter, R.Z., J.D. Fenters, J.C. Findlay, R. Ehrlich and D.E. Gardner (1978): Effect of exposure to nitrogen dioxide on T and B cells in mouse spleen. *Toxicol. Letters*, **2**, 157-161.

ラットの血液性状に及ぼす二酸化窒素の影響

Effect of Nitrogen Dioxide on Blood of Rats

市瀬孝道¹・鈴木 明¹・高橋 弘²

Takamichi ICHINOSE¹, Akira SUZUKI¹ and Hiroshi TAKAHASHI²

要 旨

NO₂ ガス暴露の生体への影響を解明するため、第1段階として、頻繁に使用されている Wistar 系ラットと、SD 系ラットの臨床生化学的性質について比較検討し、その結果を基礎資料として、次に Wistar 系ラットを用い、5, 10, 20 ppm の NO₂ で24時間暴露と、4 ppm の NO₂ で7日間暴露を行い臨床生化学的検査値について検討した。

Wistar 系、SD 系ラットの臨床生化学的正常値の成績では、TCh, Glu, AIP, ChE, TP などの項目で、種別、週令、性別による特徴的傾向が認められた。又高濃度 NO₂ 暴露実験では、種々の項目で濃度に伴う臨床生化学値の変動と ChE, AIP, Bil などの項目で経時的変動が観察され、高濃度 NO₂ ガス暴露は、各種生体臓器に影響を与えている可能性が示唆された。

Abstract

The values of clinical examinations were determined using the sera of rats exposed to NO₂. When they were exposed to 5, 10 and 20 ppm NO₂ for 24 hours, many of these values showed remarkable changes. However, changes in these values were not significant at the concentration of 5 ppm. In the exposure of NO₂ at the concentration of 4.0 ppm for 7 days, values of cholinesterase, alkaline-phosphatase and bilirubin changed preferentially with the time of exposure.

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O. Yatabe, Ibaraki, 300-21.
 2. 国立公害研究所 技術部
The National Institute for Environmental Studies, Engineering Division.

はじめに

現在、NO₂ ガスが及ぼす生体への影響を知るために、様々な実験手技による広範な研究がなされている。すなわち、第一次標的と目される呼吸器系をはじめとして、各種の臓器ないし全身にかかわる影響について、病理学的、生理学的、免疫学的研究領域などからのアプローチが展開されてきている。また、光化学スモッグ被害者における白血球やアルカリフォスファターゼ活性値など臨床検査成績が報告されている^{1,2)}一方、オゾン暴露の動物実験においても同様な研究がなされている。^{3,4)} これらの研究報告は、オゾンと同様な酸化作用を有する⁵⁾ NO₂ ガスが、標的臓器といわれる肺だけでなく、他の生体臓器へも影響を及ぼす可能性を推測させるが、現在のところ肺以外への影響についての知見は乏しいといえる。

周知のように、各種の臨床検査は疾病の診断、治療および予防に役立てられ、健康時ないし疾病時を問わず、生体の諸変化を的確にとらえるものとして高く評価されている。とりわけ血液成分の臨床検査は、各種臓器の機能や代謝の変化を鋭敏に反映しうることから、主要臓器の病態等を知るうえで、有力な手法となっている。従って、NO₂ 暴露による臓器生化学検査を試みることは一つの重要な研究プロセスであると思われる。

ところで、実験動物においてもヒトと同様に正常値に関する基礎的資料を得なくてはならない。これらの値をもとにして、実験に適した動物種、系統、年齢、性を選別し、NO₂ ガス暴露の生体への影響を正しく評価することによって、ヒトへの外挿も可能になるとと思われる。

ここではまず、実験動物として頻繁に使用されている JCL : Wistar 系ラットおよび JCL : SD 系ラットに関する正常臨床生化学値を明らかにしたうえで、NO₂ ガス暴露を受けた動物について、各種検査値の量-反応関係ならびに経時変化の検討を行った。

方 法

1. 実験動物

臨床生化学的検査による正常値に関する実験では、実験動物として多用されている JCL : Wistar 系ラット及び JCL : SD 系ラット 2 系統の雌雄を供試動物として使用した。これらのラットは日本クレアより 4 週令で導入し、温度 22 ± 2℃、湿度 55 ± 10% の飼育室でブラケットケージに 1 ケージあたり 4 匹収容して飼育した。この間 120℃ 20 分間オートクレーピングした CE-2 固型飼料を自由摂食させ、水は蒸留した飲水を自動給水方式により給与した。これらのラットは採血前 16 時間絶食させた。

高濃度 NO₂ 24 時間暴露実験では、8 ~ 9 週令 JCL : Wistar 系ラット (日本クレア産) を用いて一群 6 匹とし、5 ppm 暴露群、10 ppm 暴露群、20 ppm 暴露群と対照群の 4 群 24 匹で一実験区として 2 回くり返し、総計 48 匹を使用した。臨床検査を行うに際し、空腹時を原則とするため暴露時間中は絶食をさせて行った。また NO₂ 暴露による飲食影響が推測されるため給餌した実験を同

様に1群6匹とし、3回行い計72匹を使用した。また4mm 1週間暴露実験では、8~9週令JCL : Wistar系ラット♂♀(日本クレア産)を用い、雄ケージ、雌ケージに分け一群6匹として、1日暴露群、3日暴露群、5日暴露群、7日暴露群計8群48匹と対照群の計8群48匹で一実験区とし、2回くり返し、総計192匹を使用した。

2. 暴露方法

高濃度24時間暴露では、NO₂高純度高濃度ボンベ(5000mm)から供給されたNO₂を急性暴露装置で、5mm、10mm、20mmに希釈し、容量120ℓのチャンパー内で24時間暴露した。チャンパー内温度は22~25℃、換気回数は1時間当たり20回であった。また同一条件でNO₂だけを供給しない清浄空気を用いた群を対照群とした。

4mm 7日間暴露では、チャンパー内の温度24~26℃、湿度50~60%、換気回数60回/時、NO₂設定濃度の2%以内の変動範囲に自動制御装置によりコントロールされる容量1.8m³チャンパーを使用し、4mm 7日間の暴露を行った。また同一条件でNO₂だけを供給しない清浄空気を用いたものを対照群とした。

3. 検査方法

正常値についての臨床化学検査は、5、10、15、及び20週令時に1群15匹について行い、又NO₂暴露実験では1群6匹として行った。これらのラットはエーテル麻酔下で頸動脈を切断し採血され、血清分離後は変化を防ぐために直ちに氷冷した。これらの血清を用いElectro-Nucleonic社の血清自動分析機GEMSAEC(スピーーン方式)を使用し、正常値の実験では全18項目のうちCre、Bilをのぞいた16項目、暴露実験ではLAP、Pi、Caをのぞいた15項目について所定の方法に従って測定を行った。検査項目、測定方法及び分析方法は表1に示した。

結 果

1. 正常値

JCL2系統の雌雄において、LDH~Caまでの計16項目について、図1~16で示す成績を得た。縦軸は測定値、横軸はラットの系統別に週令を示したもので、これらは各項目ごとに、平均値と標準偏差により示した。

系統間で比較した場合、今回の各項目中では、AIPにおいてはJCL:SD系が、JCL:Wistar系より常に高い値を示した。LDH、CPK、Pi、Caは、系統・性・週令別の傾向がつかみにくく、又LDHとCPKにおいては、各個体によるバラツキが多かった。

週令別にみれば、TCh、BUN、Glu、GPTは、週令の増加にともなって増加の傾向を示し、逆にLAP、AIPにおいては、週令の増加にともなって減少する傾向が認められた。

性別に見ると、両系統に共通した傾向として、Ald、AIP、TGが、またJCL:Wistar系におけるLDH、GOT、GPT、JCL:SD系におけるLAPでは、雄の方が雌よりもやや高

い値を示す傾向が認められた。逆に両系統に共通して、ChE, TP, Albが、又JCL:SD系のTChは、雌の方が雄よりも高い値を示す傾向が認められた。

表1 臨床生化学検査の測定項目及び略号と測定方法

Table 1. Clinical biochemical examinations.
Components, abbreviations and methods

Component	Abbreviation	Method
Glucose	Glu	Hexokinase
Aldorase	Ald	Bergmeyer
Lactic dehydrogenase	LDH	W-L-Henry
Creatine phosphokinase	CPK	Oliver
Total protein	TP	Biuret
Glutamic oxalacetic transaminase	GOT	Karmen-Henry
Glutamic pyruvic transaminase	GPT	W-L-Henry
Total cholesterol	TCh	CHOD/PHP
Albumin	Alb	BCG
Blood urea nitrogen	BUN	Urease UV
Total bilirubin	Bil	Evelyn-Malloy
Alkaline phosphatase	AlP	Bessy-Lowry
Cholinesterase	ChE	Ellman
Creatinine	Cre	Jaffe
Triglyceride	TG	Enzymatic UV
Leucine aminopeptidase	LAP	Nagel
Inorganic phosphorus	Pi	Molybdenum blue
Calcium	Ca	OCPC

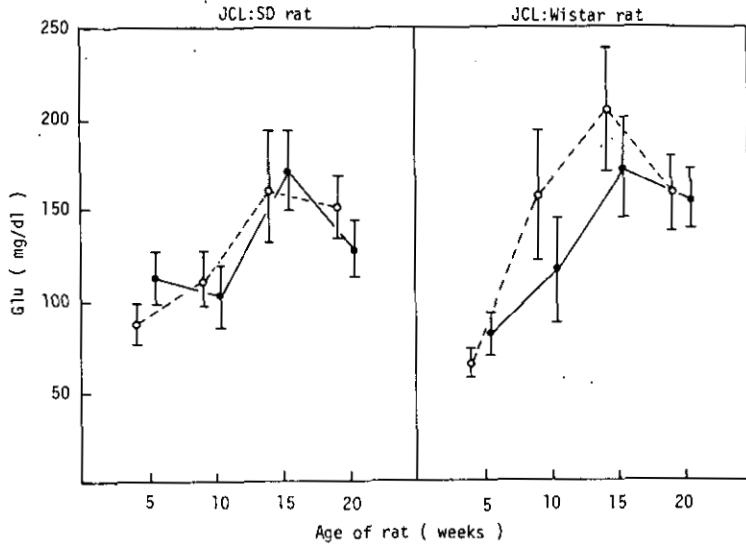


図1 雌雄におけるグルコース (Glu) の週令に伴う変化
 Fig. 1 Changes of glucose in male (○) and female (●) rats with age

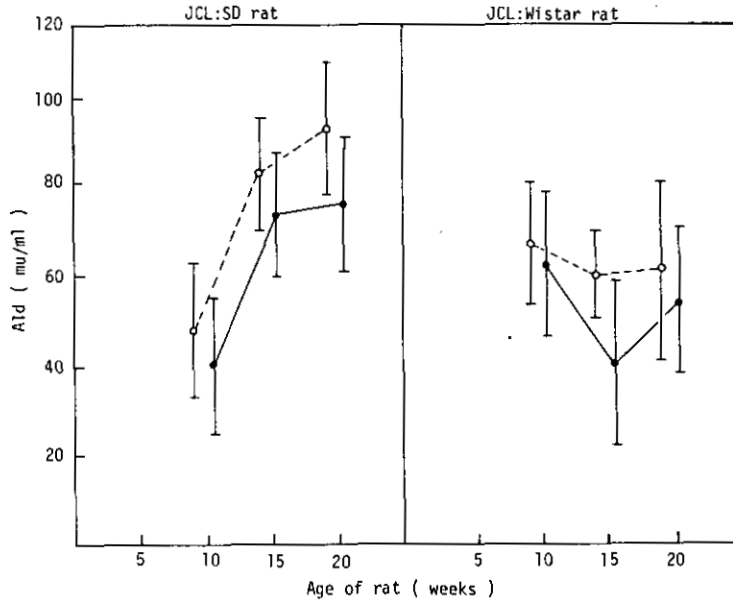


図2 雌雄におけるアルドラーゼ (Ald) の週令に伴う変化
 Fig. 2 Changes of aldorase in male (○) and female (●) rats with age

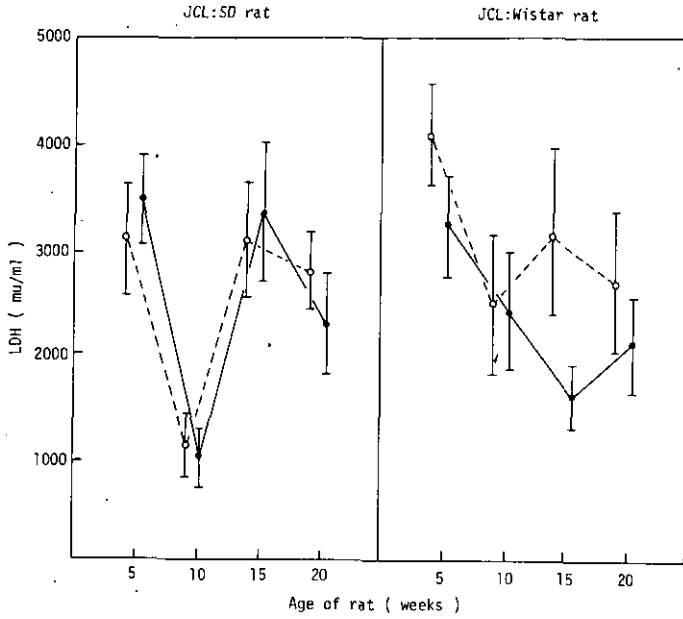


図3 雌雄における乳酸脱水素酵素 (LDH) の週令に伴う変化
 Fig. 3. Changes of lactic dehydrogenase in male (○) and female (●) rats with age

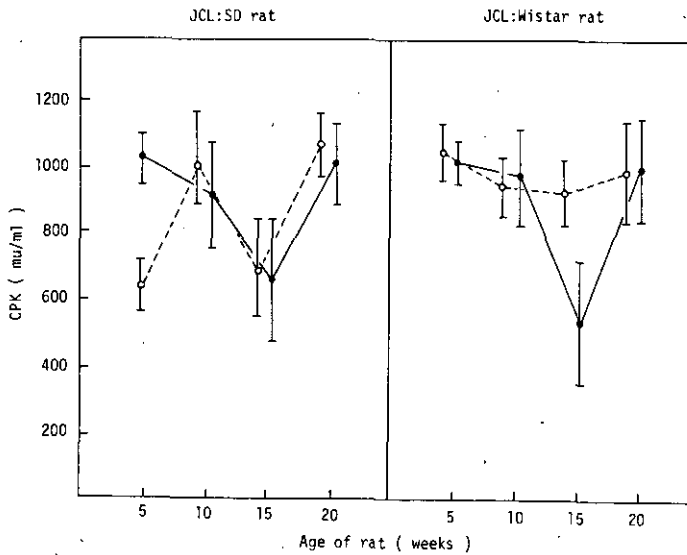


図4 雌雄におけるクレアチンホスホキナーゼ (CPK) の週令に伴う変化
 Fig. 4. Changes of creatine phosphokinase in male (○) and female (●) rats with age

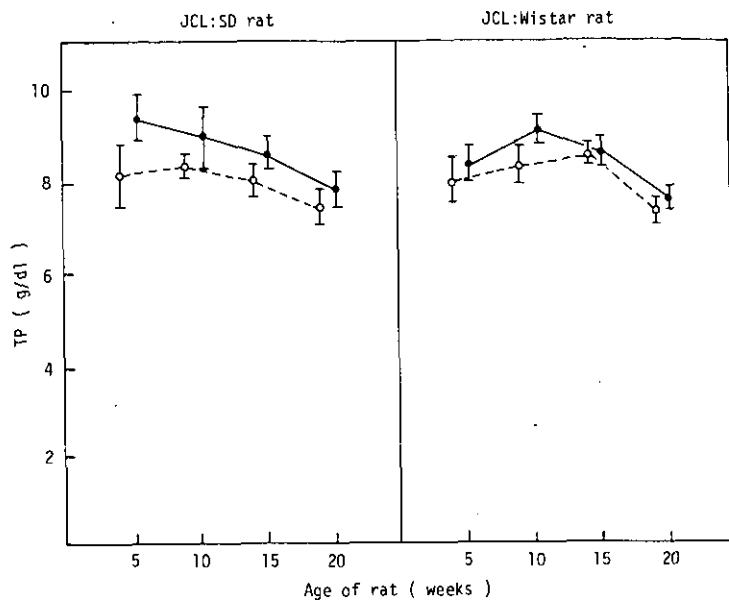


図5 雌雄における総蛋白 (TP) の週令に伴う変化

Fig. 5 Changes of total protein in male (○) and female (●) rats with age

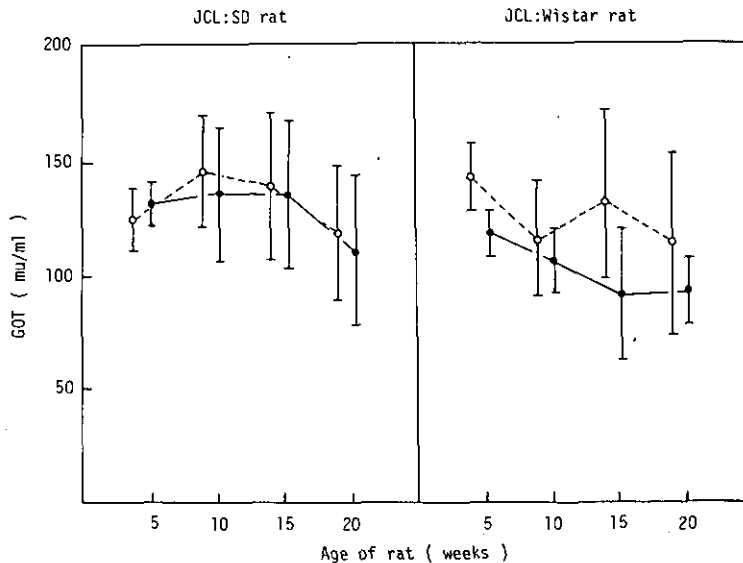


図6 雌雄におけるグルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) の週令に伴う変化

Fig. 6 Changes of glutamic oxalacetic transaminase in male (○) and female (●) rats with age

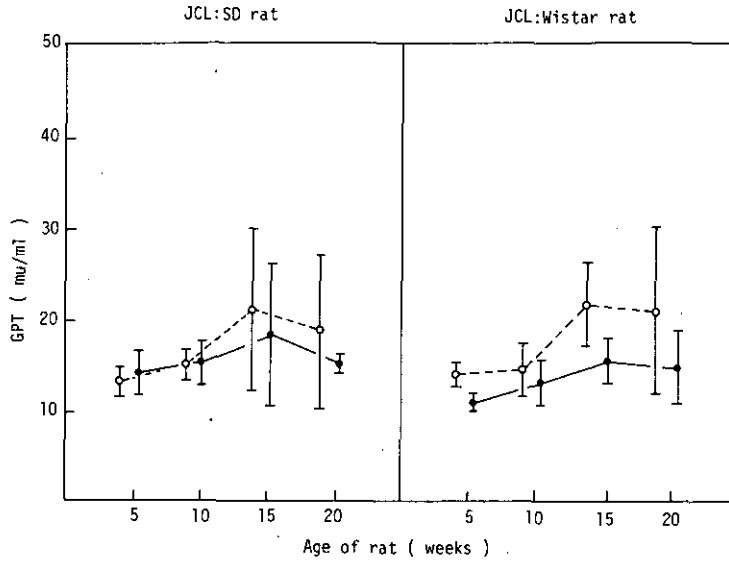


図7 雌雄におけるグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) の週令に伴う変化

Fig. 7 Changes of glutamic pyruvic transaminase in male (○) and female (●) rats with age

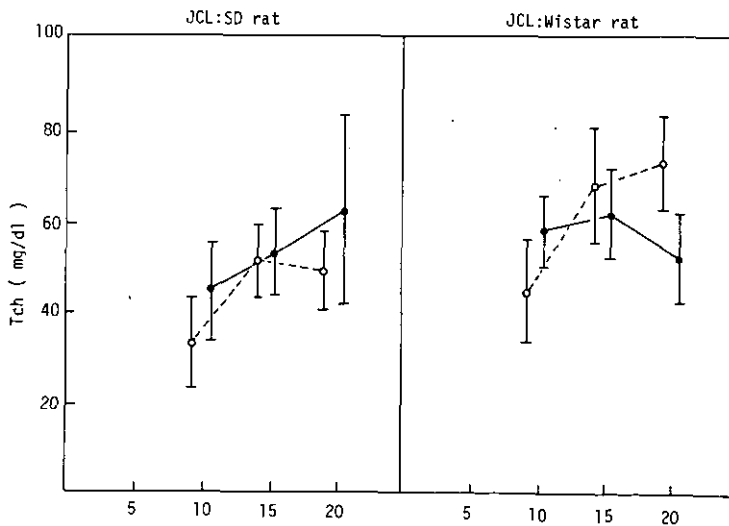


図8 雌雄における総コレステロール (TCh) の週令に伴う変化

Fig. 8 Changes of total cholesterol in male (○) and female (●) rats with age

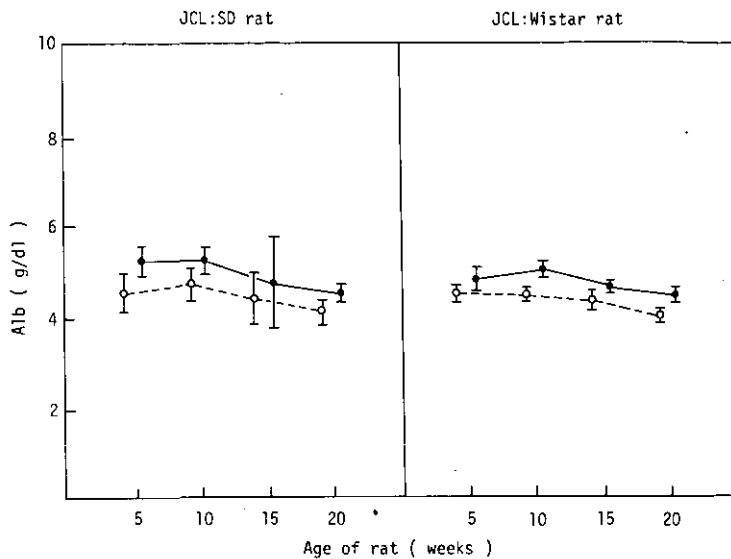


図9 雌雄におけるアルブミン (Alb) の週令に伴う変化

Fig. 9 Changes of albumin in male (○) and female (●) rats with age

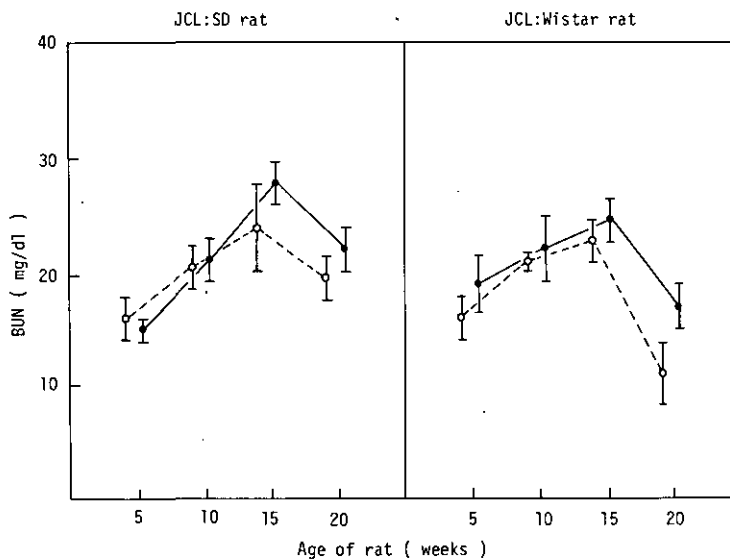


図10 雌雄における血液尿素窒素 (BUN) の週令に伴う変化

Fig. 10 Changes of blood urea nitrogen in male (○) and female (●) rats with age

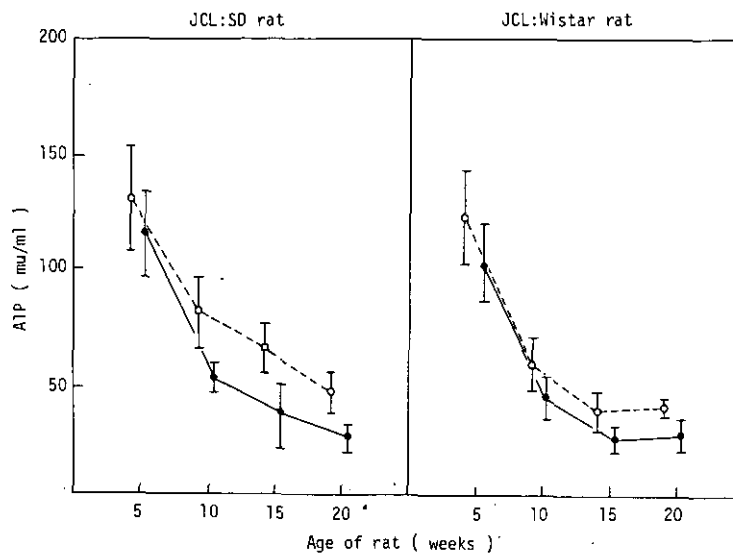


図 11 雌雄におけるアルカリフォスファターゼ (AIP) の週齢に伴う変化

Fig. 11 Changes of alkaline phosphatase in male (\circ) and female (\bullet) rats with age

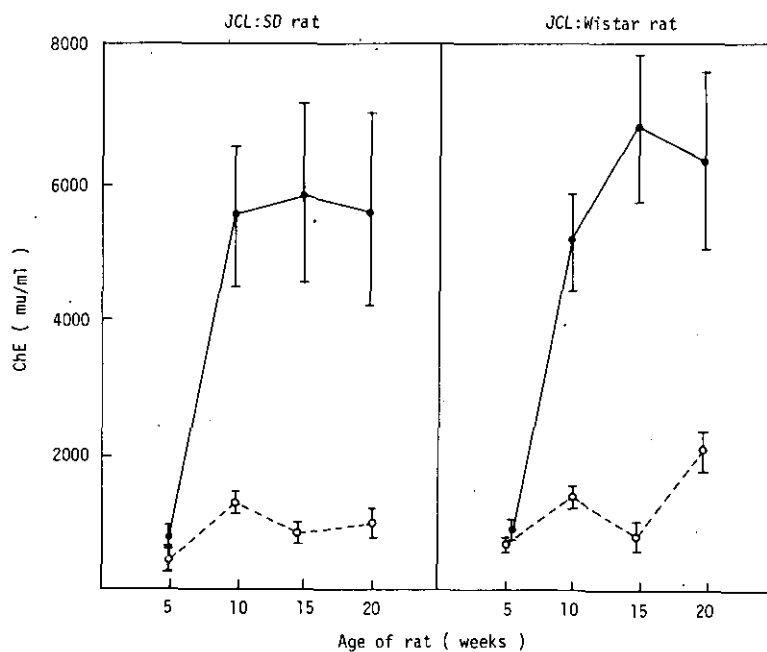


図 12 雌雄におけるコリンエステラーゼ (ChE) の週齢に伴う変化

Fig. 12 Changes of cholinesterase in male (\circ) and female (\bullet) rats with age

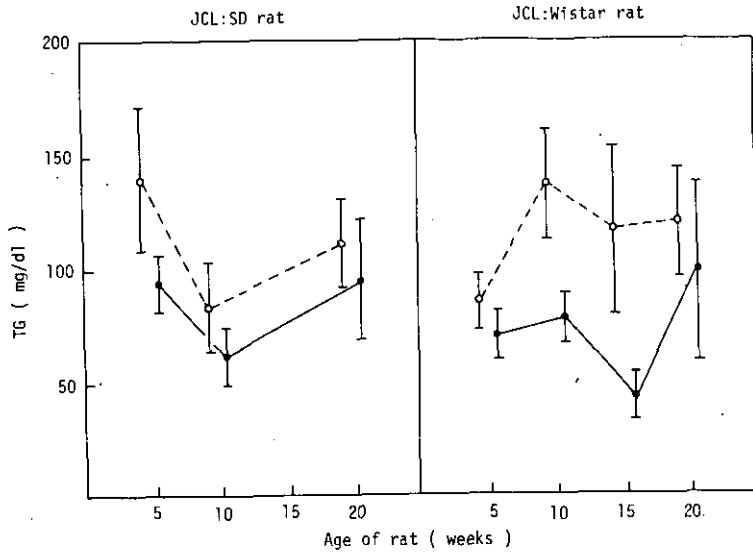


図 13 雌雄におけるトリグリセライド (TG) の週令に伴う変化
 Fig. 13 Changes of triglyceride in male (○) and female (●) rats with age

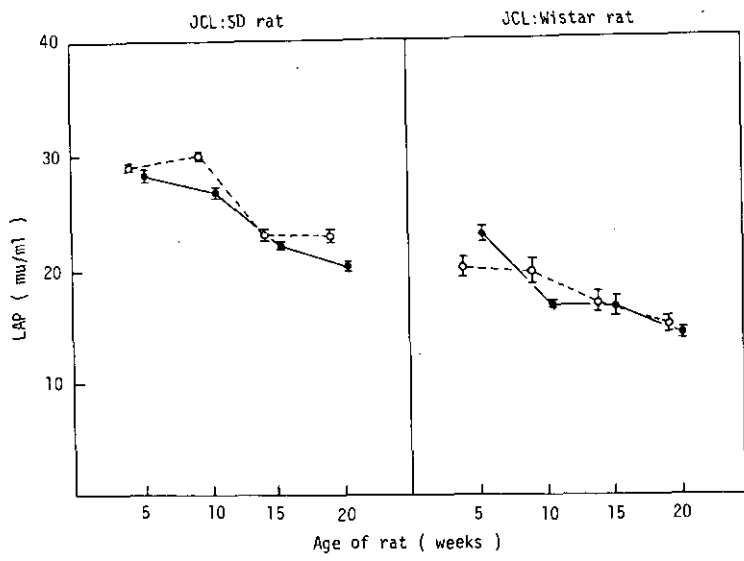


図 14 雌雄におけるロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) の週令に伴う変化
 Fig. 14 Changes of leucine aminopeptidase in male (○) and female (●) rats with age

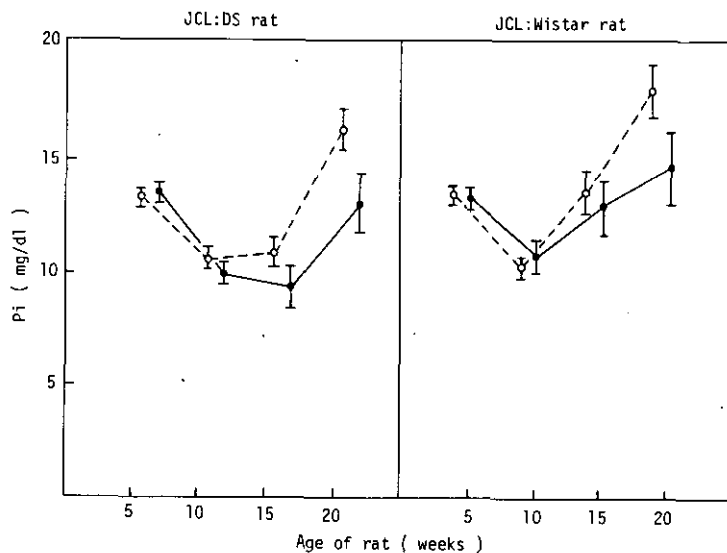


図 15 雌雄における無機リン (P i) の週令に伴う変化
 Fig. 15 Changes of inorganic phosphorus in male (○)
 and female (●) rats with age

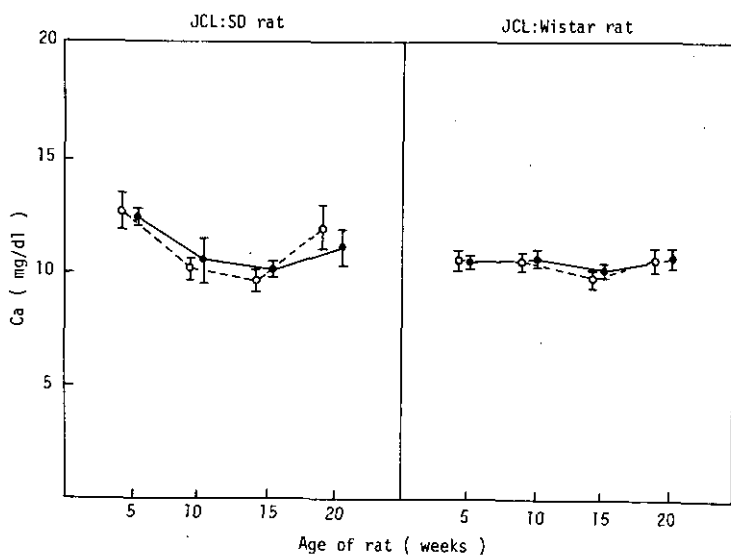


図 16 雌雄におけるカルシウム (C a) の週令に伴う変化
 Fig. 16 Changes of calcium in male (○) and female
 (●) rats with age

2. NO₂ 暴露

高濃度 NO₂ 24 時間暴露で絶食を行った実験では、検査項目中、暴露濃度に伴う変化が認められた Glu, LDH, CPK, GOT, GPT, BUN, Bil, AIP, ChE, Cre, TG について、平均値と標準偏差を表 2 に示し、また対照群を 100% とした場合の変化を図 17 に示した。

暴露群は対照群と比較して、Glu, TG, TCh は 5 ppm 以上で、BUN は 10 ppm 以上で増加し、TCh 以外は、濃度の上昇に伴い増加した。又 Glu は 20 ppm で、TG, BUN, TCh は 10 ppm 以上で有意に増加した。一方 LDH, AIP, GOT, GPT, Bil, CPK は、5 ppm 以上で減少し、CPK をのぞいては、すべて濃度の上昇に伴い減少し、GOT は 5 ppm 以上で、GPT, Bil は 10 ppm 以上で、CPK は 5 ppm, 20 ppm で有意に減少した。ChE は対照群に比べ、10 ppm で若干増加したが、濃度に依存しない一定の値が認められた。

表 2 NO₂ 24 時間暴露の臨床生化学値に及ぼす影響 (絶食群)

Table 2. Effect of NO₂ exposure for 24 hours on clinical biochemical examination of serum. (Starvation rats)

	Control	5 ppm	10 ppm	20 ppm
Glu (mg/100 ml)	187±45	201±22	241±38	303±24**
LDH (mu/ml)	1768±827	1209±239	1267±343	873±408
CPK (mu/ml)	1481±374	621±173**	1064±482	817±489*
GOT (mu/ml)	143.2±43.0	90.8±10.2*	89±21*	68±22**
GPT (mu/ml)	23.8±4.3	23.0±1.4	13.0±3.8**	15.5±5.7*
BUN (mg/100 ml)	15.0±1.4	14.4±1.2	19.2±2.0**	23.6±3.6**
Bil (mg/100 ml)	1.70±0.22	1.55±0.14	1.15±0.24**	0.39±0.20**
AIP (mu/ml)	67±16	59±5	59±7	55±8
ChE (mu/ml)	536±108	550±94	636±36**	552±38
Cre (mg/100 ml)	0.72±0.03	0.75±0.07	0.80±0	0.73±0.08
TG (mg/100 ml)	78±40	82±14	161±36**	164±36**

(m ± SD, n = 6, *: p < 0.05, **: p < 0.01)

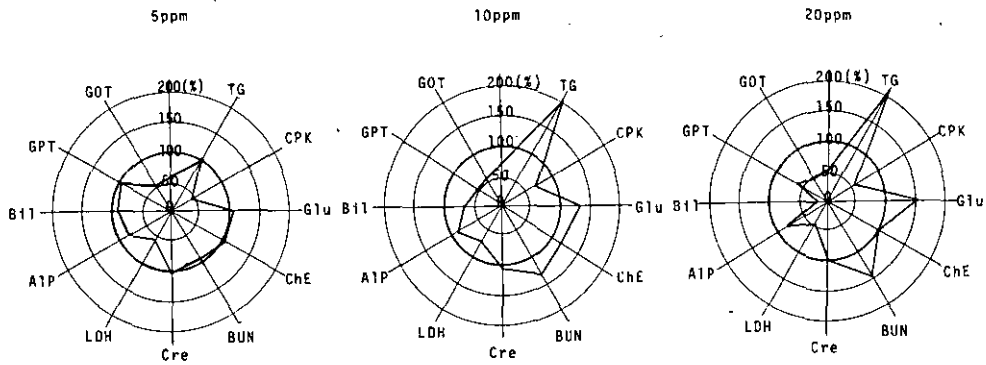


図 17 NO₂ 24時間暴露における絶食群の臨床検査値に及ぼす影響
 (対照群の平均値を100%とした時の暴露群の平均値の変化を示す)

Fig. 17 Effect of NO₂ exposure for 24 hours on clinical biochemical examination of starvation rats. Data are expressed as percent of control.

給餌した実験では、LDH~Creの計15項目について、暴露に伴う変化として表3に示し、又対照群を100%とした場合の変化を図18に示した。暴露群では対照群と比較して、Gluは5ppm、20ppmで、LDHは5ppm及び10ppmで、TPは10ppm、20ppmで有意に増加した。一方BilとChEは5ppm以上で、AlP、BUNおよびTGは10ppm以上でそれぞれ有意に減少した。TChは5ppmと10ppmで有意に増加し、20ppmでは逆に有意に減少した。Albは10ppm、GPTは20ppmのみで有意に減少した。Ald、CPK、GOTおよびCreは多少の増減を示したが有意な変化を示さなかった。4ppm7日間暴露における検査項目中、特異的变化が見られたChE、AlP、Bilについてその経時変化を図19~21に示した。ChEに関して、1日目では対照群に比し雄、雌ともにやや高い値を、3日目では雌は最も低い値を示した後、5、7日目では対照群より若干低い値をとった。雄では3日目では対照群よりわずかに低く、5日目では最低値を示したものの、7日目では対照群より若干高い値となった。しかしながら、これらの経時変化のいずれも対照群と比較して有意差といえるものではなかった。次にAlPに関しては、1日目で雄、雌とも対照群よりやや高く、雌は3日以降で対照群と差がなく、雄では5日目では有意に減少した後、7日目では対照群よりも高い値を示した。最後にBilでは雄、雌ともに全経過を通じて、対照群より低い値を示したが、有意な差ではなかった。

表3 NO₂ 24時間暴露の臨床生化学値に及ぼす影響(給餌群)

Table 3. Effect of NO₂ exposure for 24 hours on clinical biochemical examination of serum. (Feeding rats)

	Control	5 ppm	10 ppm	20 ppm
Glu (mg/100 ml)	126±23	176±40*	146±46	173±35*
Ald (mu/ml)	103±34	116±47	108±11	116±13
LDH (mu/ml)	982±165	1823±646*	1668±487*	1462±538
CPK (mu/ml)	1164±216	1491±636	1543±347	1426±301
TP (g/100 ml)	6.10±0.54	6.61±0.22	7.91±0.67**	7.43±0.40**
GOT (mu/ml)	93.0±12.3	110.0±22.5	98.2±14.8	92.8±16.6
GPT (mu/ml)	22.6±1.9	26.0±4.2	21.6±4.7	13.9±1.9**
TCh (mg/100 ml)	65±7	114±44	87±12**	52±6*
Alb (g/100 ml)	3.12±0.20	3.10±0.37	2.70±0.10**	2.96±0.73
BUN (mg/100 ml)	32.7±7.3	32.9±7.0	17.9±2.8**	23.5±3.04**
Bil (mg/100 ml)	1.54±0.24	1.18±0.10*	0.84±0.33**	1.04±0.10**
AIP (mu/ml)	107±7	104±23	33±9**	68±6**
ChE (mu/ml)	856±150	546±108**	526±90*	536±106**
Cre (mg/100 ml)	0.45±0.17	0.60±0.22	0.43±0.10	0.45±0.10
TG (mg/100 ml)	171±36	207±71	65±18**	95±35**

(m ± SD, n = 6, *: p<0.05, **: p<0.01)

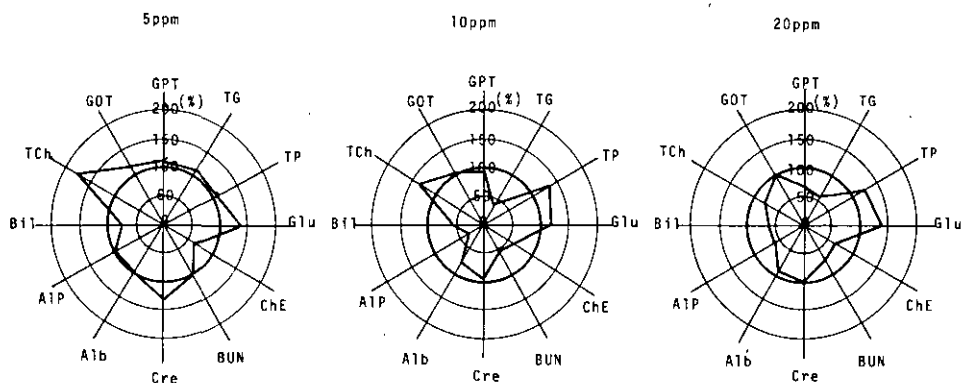


図18 NO₂ 24時間暴露における給餌群の臨床検査値に及ぼす影響(対照群の平均値を100%とした時の暴露群の平均値の変化を示す)

Fig. 18 Effect of NO₂ exposure for 24 hours on clinical biochemical examination of feeding rats. Data are expressed as percent of control.

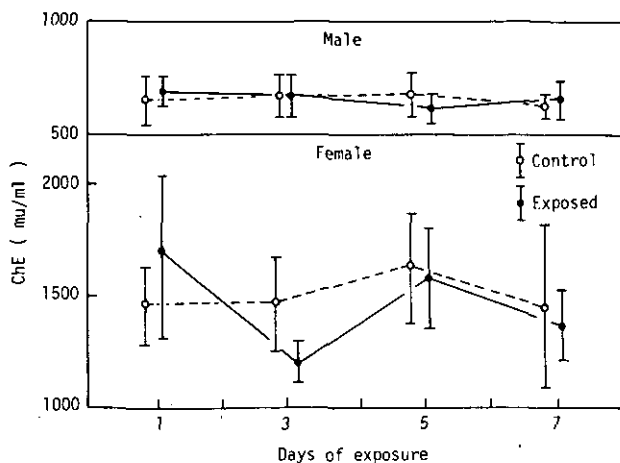


図 19 4 ppm NO₂ 7日間暴露における雌雄のコリンエステラーゼ (ChE) の経時変化

Fig. 19 Change of cholinesterase in male and female rats exposed to 4 ppm NO₂ for 7 days

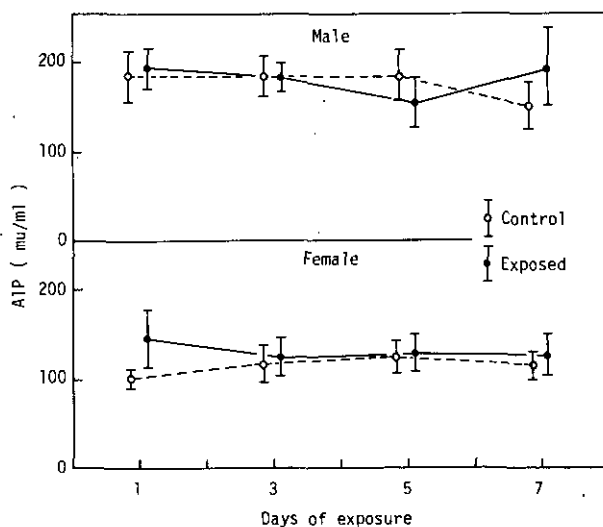


図 20 4 ppm NO₂ 7日間暴露における雌雄のアルカリホスファターゼ (ALP) の経時変化

Fig. 20 Change of alkaline phosphatase in male and female rats exposed to 4 ppm NO₂ for 7 days

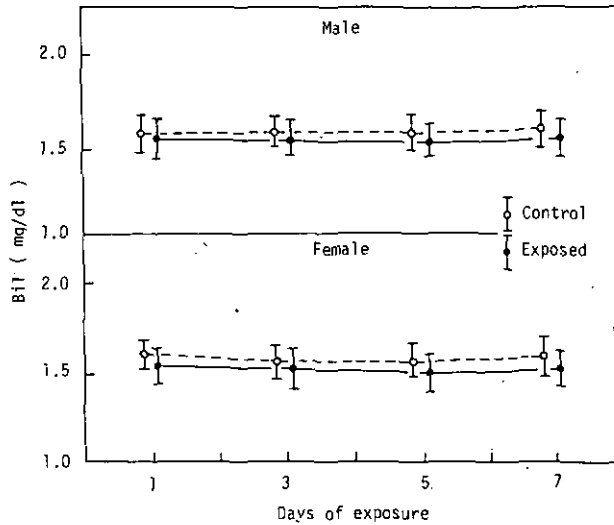


図 21 4 ppm NO₂ 7 日間暴露における雌雄のビリルビン (Bil) の経時変化

Fig. 21 Change of bilirubin in male and female rats exposed to 4 ppm NO₂ for 7 days

考 察

NO₂ 暴露による生体への影響を正しく評価するためには、実験動物の臨床化学的正常値についての基礎的資料を得なければならない。なぜなら実験動物の臨床検査値は、種々の条件により変動すると考えられ、たとえば動物種、系統、年齢別等の差異など、さらには実験動物の飼育時期、期間、その間の管理手技、及び温湿度、ケージ内の収容匹数等の近隣因子、さらにその検査手技や採血時間、その後の経過時間などの条件により影響があるからである。今回実験動物として頻繁に使用される JCL : Wistar 系ラットと、JCL : SD 系ラットを用いて、これらすべての条件を一定にして行った臨床化学的成績から、TCh, Glu, ALP, ChE, TP などいくつかの項目では、週令、性別による特徴的な傾向が認められた。又これらはすでに報告されている⁶⁾検査値と比較して、よく一致する項目が多かった。NO₂ 暴露実験を行うにあたっては、すでに知られている成績⁶⁾と本実験の結果から性別的に見て、性周期による変動が認められる雌ラットよりこれらのない安定した雄ラットを使用するのが望ましく、また週令的に見て、6~8 週令の変動が大きい若いラットより、15~17 週令の変動の少ないラットを用いるのが望ましいと考えられた。又生体への慢性影響をとらえるための長期暴露を行うにあたっては、加齢に伴って、疾病率の多いといわれる SD ラット⁶⁾より、Wistar ラットを用いるのが望ましいと考えられた。そこで NO₂ 暴露実験では高齢の Wistar ラットを用いるのが適当であると考えられる。次に NO₂ の生体臓器への影響を知るため血液性状の変動と、濃度との関係についての検索を試みた。絶食群と、給餌群について、濃

度との関係を見ると、絶食と給餌に関係なく同様の傾向を示した項目は、Glu, ALP, Bilであり、Gluは対照群に比べ濃度上昇に伴い増加する傾向が認められ、逆にALP, Bilは、減少傾向が認められた。また、LDH, GOT, GPT, およびChEの検査値についても、絶食群と給餌群との間で、量-反応関係は対照群を除いてほぼ同様の傾向が示されたといえる。しかしながら、この場合に、対照群の値が絶食群と給餌群で異なるために、対照群と比較した場合の各検査値の相対的な値は絶食群と給餌群とでは明瞭な差が生じる結果となった。すなわちLDH, GPTは濃度が上昇するに従って減少し、ChEは濃度上昇に無関係な一定の値が認められた。5 ppm以上の暴露で、絶食群と給餌群が相互に類似した量-反応関係を示した背景を一概に説明することは困難であるが、給餌群ではNO₂ガス暴露によって摂食量が著しく減少し、そのために結果として、絶食に近い状態を来している可能性も否定できない。一般に臨床生化学的検査を行うにあたっては、ヒトないし動物の摂食量を十分にコントロールした状態を前提にしている。従ってNO₂等のガス暴露による影響を調べる際には、動物の摂食状態をチェックしておく必要があるものと思われる。いずれにしても、5~20 ppmのNO₂ガス暴露によって、濃度変化に対応して、検査値の明瞭な変化が把握されたと考えられた。

ところで、4 ppm 7日間暴露による経時的变化に関する成績においては、各種の検査項目のうち、雌雄において特異的变化が認められたものとしては、給餌群でのChEおよび給餌、絶食両群でのALP, Bilのそれぞれの有意に減少した項目が挙げられよう。そして、Bilにおいては、雌雄同傾向の明瞭な変化が把握された。これまで述べてきた多くの検査項目は、臨床生化学検査として汎用され、その検査値の変動は、肝疾患、心疾患、腎疾患などの病的状況をよく反映するといわれている。⁷⁾しかしながら、ある検査値の変動が、ある一定の臓器の疾患をつねに特異的に反映するとは限らないことから、本研究で得られた各種検査値の変動を直ちに所定の臓器の異常を結びつけることは必ずしも容易ではない。しかしながら、NO₂ガス暴露によって、数多くの検査値に種々の変動がみられた事実を踏まえるならば、NO₂が第一次標的臓器である肺のみならず、全身の多系統にわたって、各種臓器の正常な機能を変動させている可能性が十分に示唆された。今後の研究課題としては、NO₂ガス暴露の影響として個々の臓器内における検査値の変動、およびより低濃度、より長期の暴露に伴う変化を検索することによって、各臓器への影響をさらに詳しく知るための一助としたい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始実験に御協力頂いた元国立公害研究所、環境生理部、環境生理研究室、有川由紀子氏に、衷心より感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 中島泰知, 藤井 徹他(1972):大阪府下における光化学スモッグによると考えられる大気汚染. 2. 人体影響(抄), 日本衛生学雑誌, 27, 81.
- 2) 常俊義三, 足立豊彦(1972):高石中学校等におけるいわゆる光化学スモッグ事件の臨床的知見. 光化学反応による大気汚染に関する学術講演会講演集, 日本公衆衛生協会, 143-155.
- 3) 楠本繁子, 他(1976):光化学オキシダントおよびオゾン短時間暴露のマウスに及ぼす影響. 大気汚染研究, 11, 70-80.
- 4) Jones, R.A., et al. (1970): Effects of long term continuous inhalation of ozone on experimental animal. Toxicol. Appl. Pharmacol., 17, 189-202.
- 5) 中島泰知(1977):窒素酸化物および光化学スモッグの生体影響に関する実験的研究. —WHOガイドラインまで—. 生活衛生, 21, 1-16.
- 6) 長瀬すみ, 田中寿子(1976):実験動物の臨床生化学データ-病理組織像との関連-. ソフトサイエンス, 9-68.
- 7) 柴田 進(1968):臨床生化学診断法(改訂第5版), 金芳堂, 343-501.

ラットの肺SH化合物に及ぼす二酸化窒素の影響

Effect of Nitrogen Dioxide on Sulfhydryl Group in Rat Lungs

河田明治¹

Meiji KAWATA¹

要 旨

NO₂をWistarラットに暴露し、肺の非タンパク性SH化合物(NPSH)、還元型グルタチオン(GSH)、酸化型グルタチオン(GSSG)に及ぼす影響について検討した。NPSH量はEllman試薬(DTNB)により測定し、GSHとGSSG量はDTNB、NADPH、グルタチオンレダクターゼを用いる酵素サイクリング法により求めた。5、10、20ppmのNO₂で、それぞれ24時間暴露した場合、5ppm暴露群ではNPSHとGSH量は対照群に比べて約10%の有意な増加を示したが、20ppm暴露群ではいずれも有意に減少した。GSSG量は暴露濃度とともに増加した。4.0と6.0ppmのNO₂で10日間暴露を行った場合、4.0ppm暴露群では、NPSHとGSH量は漸次増加し、5日後には各々の対照値の1.21倍に達し、10日後には各々1.08、1.09倍になった。6.0ppm暴露群では、NPSHとGSH量は7日後に各々の対照値の1.28および1.30倍になり、10日後には各々1.18、1.20倍となった。総グルタチオン量中に占めるGSSG量の割合は、4.0ppmで2~3%、6.0ppmで2~4%となり、いずれの場合も対照群に比べて差は見られなかった。

Abstract

The effects of NO₂ exposure on the levels of nonprotein sulfhydryl (NPSH), reduced glutathione (GSH), and oxidized glutathione (GSSG) in lungs of male Wistar rats were studied. When the rats were exposed for 24 hours, the levels of both NPSH and GSH increased approximately by 10% in 5 ppm NO₂ and decreased in 20 ppm NO₂. The increase in levels of GSSG was dependent on the concentration of NO₂. Rats were continuously exposed to 4.0 ppm or 6.0 ppm for 10 days. In the exposure to 4.0 ppm

1 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O.
Yatabe, Ibaraki, 300-21.

NO₂, the levels of NPSH and GSH increased to 121% after 5 days, and then attained 108 and 109% after 10 days. In the exposure to 6.0 ppm NO₂, the levels of NPSH and GSH increased to 128 and 130% after 7 days, and then attained 118 and 120% after 10 days. The levels of GSSG, which accounted for 2-4% of the total glutathione, remained unchanged throughout the exposure for 10 days.

はじめに

近年、動物を用いた暴露実験により、フリーラジカルが関与する反応や酸化反応による障害に対する生体の防御機構にグルタチオンが重要な役割を果たしていることが示唆される結果が得られており¹⁻⁴⁾、NO₂暴露においても肺に存在するグルタチオン量の変動が認められた⁵⁻⁷⁾。SH化合物であるグルタチオンは生体内に広く存在するので、オキシダントの還元機構に関する物質の中でも最もよく知られている。しかし、グルタチオンのみでなく、SH基をもったタンパクやグルタチオン以外の非タンパク性SH化合物も上記の還元反応に関与する可能性のあることが示唆された⁸⁾。

これまでに報告されたNO₂暴露が肺グルタチオン量に及ぼす影響に関する研究においては、非タンパク性SH化合物(NPSH)の全量を測定し、その値を還元型グルタチオン(GSH)量としている場合が多い。GSHは容易に酸化されて酸化型グルタチオン(GSSG)になる。両者は酸化還元反応により相互に移行し得るので、酸化性を有するNO₂による暴露実験において、生体内のグルタチオンの挙動を明らかにするためには総グルタチオン(GSH+GSSG)、GSH、GSSGの量的関係を把握する必要があると考えられる。最近、グルタチオン以外の非タンパク性SH化合物に関する研究が進められてきた⁹⁻¹¹⁾。しかし肺において、グルタチオン以外の低分子SH化合物がNO₂暴露により、どのような影響を受けるかについてはまだ明らかにされていない。以上のことからNO₂暴露が肺に及ぼす生化学的影響を解明することを目的として、NO₂を暴露したラット肺中のNPSH、GSH、GSSG量を測定し、NO₂の濃度と暴露時間がこれらの値に及ぼす影響について検討した。

方法

実験動物にはWistar雄ラットを用いた。NO₂ 5, 10, 20 ppm, 24時間暴露の場合には、8, 17, 18週令のものを使用し、NO₂ 4.0および6.0 ppmで10日間の連続暴露を行う場合には6週令のものを使用した。また実験にはすべてラット6匹を一群として暴露を行った。

24時間暴露に対しては、容量120ℓのチャンバーを使用し、チャンバー内温度は20~25℃、換気回数は20回/時であった。NO₂濃度はケミルネッセンス法による窒素酸化物連続測定機と自動制御装置により一定に保たれた。10日間の暴露に対しては、容量1.8 m³の平型チャンバーを

使用し、チャンパー内の温度、湿度および暴露濃度はすべて自動制御装置によりコントロールされた。チャンパー内温度は24～26℃、湿度は50～60%、換気回数は60回/時で、NO₂濃度の変動は設定濃度の2%以内であった。清浄空気を用いた以外はすべて暴露群と同一条件としたものを対照群とした。

ラット肺中のNPSH、GSH、GSSG量は次の方法により測定した。暴露したラットをエーテル麻酔し、頸動脈から採血したのち直ちに胸部を切開し、肺を採取した。分離した肺の重量を測定したのち超低温槽（-80℃）に保存した。左葉の後方約0.2gを試料とし、5%トリクロロ酢酸中で破碎したホモジネートを遠心分離した。得られた上清中に含まれるNPSHは5,5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）（DTNB）を用いる方法により測定した¹²⁻¹⁴。総グルタチオン、GSH、GSSG量はグルタチオンレダクターゼ、DTNB、NADPHを用いる酵素サイクリング法¹⁵により求めた。総グルタチオン量の測定にはNPSHを測定した残りのトリクロロ酢酸上清を水で稀釈したものを試料として用いた。GSSG量の測定にはトリクロロ酢酸上清にN-エチルマレイミドを加えたのち、pH 7.5のリン酸緩衝液を加えてpHを調節してGSHをS-（エチルスクシンイミド）-グルタチオンとし、過剰のN-エチルマレイミドをエーテル抽出によって除去したものを試料として用いた。GSHは総グルタチオン量からGSSG量を差し引くことにより求めた。

結 果

ラット肺中のNPSH、GSH、GSSG量に及ぼすNO₂の濃度の影響について検討を行うため、5、10、20 ppmの各濃度で24時間の暴露実験を行った。

実験1（8週令ラット）、実験2（17週令ラット）、実験3（18週令ラット、暴露中絶食）のすべての場合において、5 ppm暴露群では、NPSHとGSH量はともに対照群に比べて約10%の有意な増加を示した。これに対して10 ppm暴露群では、NPSHとGSH量は実験1において対照群に比べて高い値を示したが、実験2、3ではともに対照群とはほぼ等しい値となり、有意な差は見られなかった。20 ppm暴露群ではNPSHとGSH量は対照群より低い値となり、その減少率は実験1で5～10%、実験2、3ではそれぞれ約40%、20%であった。暴露濃度がNPSH、GSH量に及ぼす影響についての実験2の結果を図1に示した。

GSSG量はNO₂暴露濃度とともに増加した。総グルタチオン中のGSSG含有率は、実験1～3の対照群では、1.5～2.5%、5 ppm暴露群と10 ppm暴露群では2～4%であった。20 ppm暴露群では5～13%と高い値を示し、対照群に比べて有意に増加した。暴露濃度がGSSG量に及ぼす影響についての実験2の結果を図2に示した。

肺の湿重量に及ぼすNO₂の影響について調べた。肺の湿重量は5 ppm暴露群と10 ppm暴露群では、実験1～3において対照群に比べて有意な差は見られなかったが、20 ppm暴露群では実験1で133

%, 実験2で190%, 実験3で142%と著しく増加した。

5 ppm, 24時間暴露において, NPSH, GSH量の増加が認められたので, 更にNO₂暴露の時間的影響を調べるため, 5 ppmの上下に当る40 ppmと6.0 ppmでそれぞれ10日間の連続暴露実験を行い, 暴露開始1, 3, 5, 7, 10日後に肺のNPSH, GSH, GSSG量を測定した。

40 ppm暴露と6.0 ppm暴露におけるNPSHとGSH量の変化をそれぞれ図3および図4に示した。また40 ppm暴露と6.0 ppm暴露におけるNPSHとGSH量を対照群の値に対する割合(%)で表した結果をまとめて図5に示した。40 ppm暴露においては, NPSHとGSH量は暴露開始後漸次増加し, 5日後には各々の対照値の1.21倍に達した。その後減少し, 10日後には各々1.08, 1.09倍になった。6.0 ppm暴露においては, NPSHおよびGSH量は, 40 ppm暴露の場合よりも急激に増加し, 7日後には各々の対照値の1.28および1.30倍に達し, 10日後には1.18倍および1.20倍

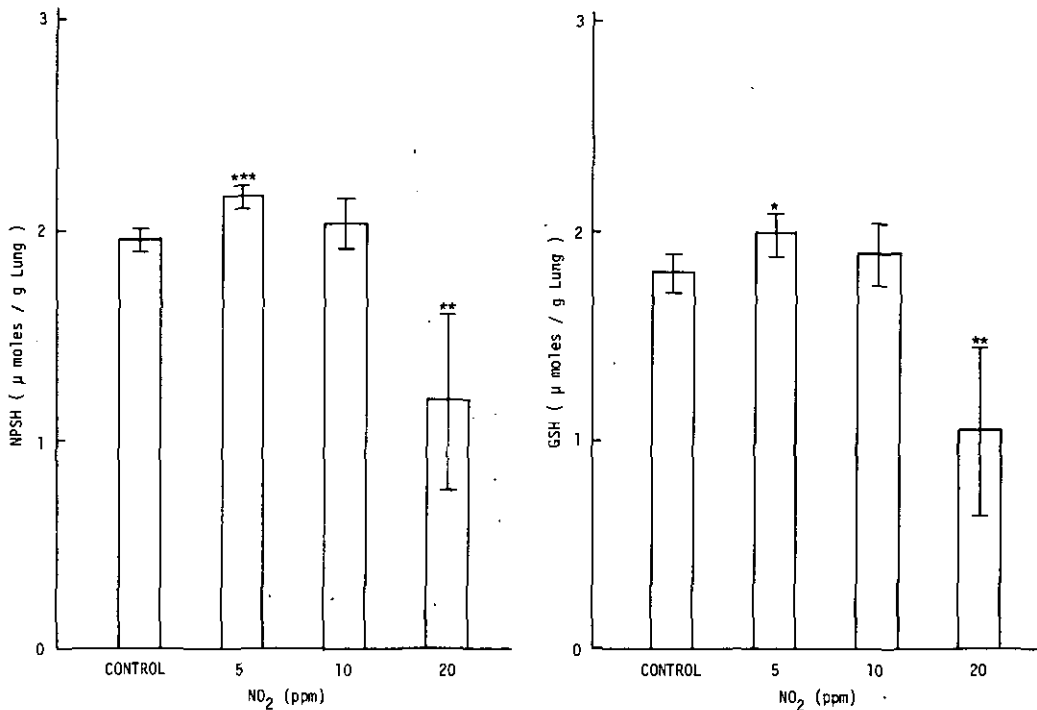


図1 NO₂暴露が肺非タンパク性SH化合物および還元型グルタチオン量に及ぼす影響

Fig. 1 Effect of varying concentrations of NO₂ exposure on nonprotein sulfhydryl (NPSH) and reduced glutathione (GSH) levels in lung tissue (m±SD, n=6, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001).

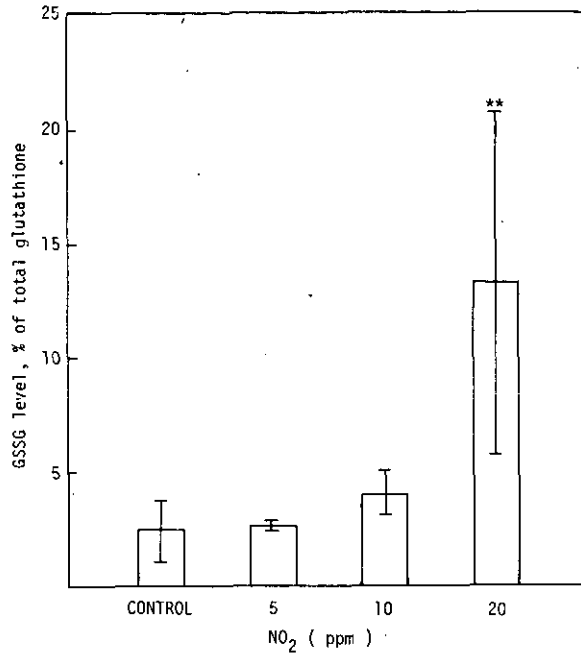


図2 NO₂ 暴露が肺総グルタチオン中の酸化型グルタチオン含有率に及ぼす影響

Fig. 2 Effect of varying concentrations of NO₂ exposure on oxidized glutathione (GSSG) level, (%) of total glutathione in lung tissue (m±SD, n=6, **: p < 0.01).

となった。

総グルタチオン量中に占めるGSSG量の割合は、10日間の暴露期間中一定で、図6に示すように4.0 ppm暴露の場合には2～3%、6.0 ppm暴露の場合には2～4%で、いずれの場合も対照群に比べて差は見られなかった。

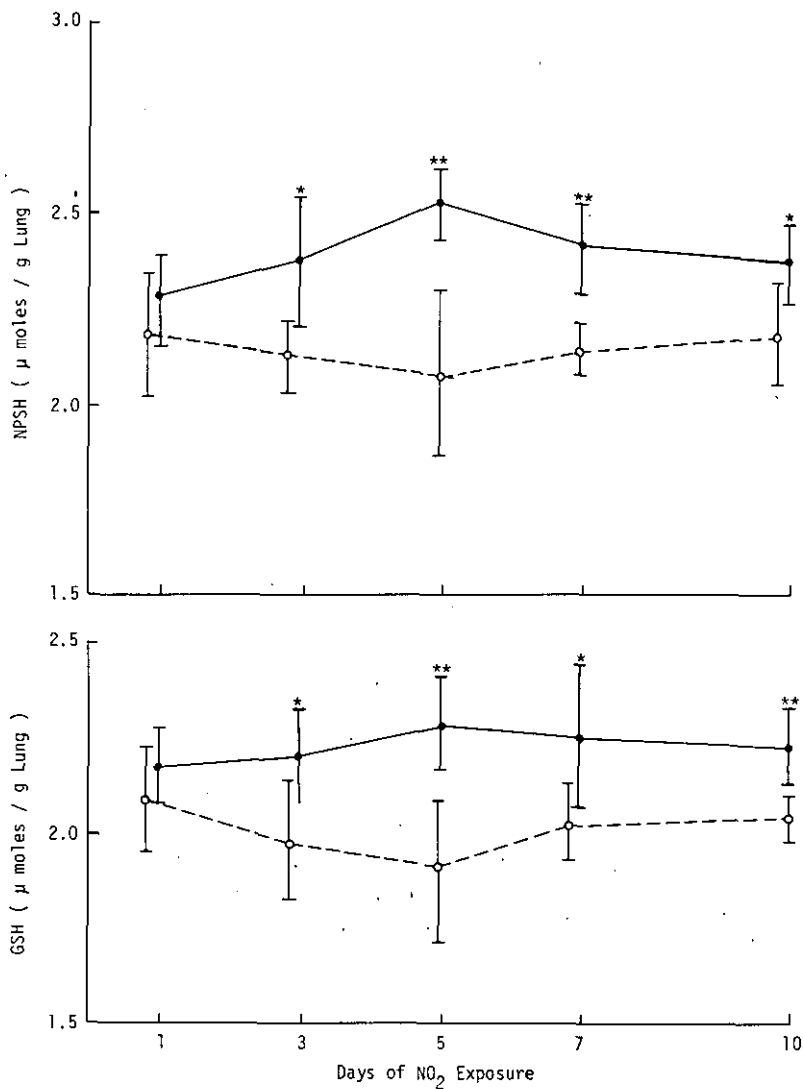


図3 4.0 ppm NO₂ 暴露が肺非タンパク性S H化合物および還元型グルタチオン量に及ぼす影響

●—●: 暴露群, ○----○: 対照群

Fig. 3 Effect of 4.0 ppm NO₂ exposure on non-protein sulphydryl (NPSH) and reduced glutathione (GSH) levels in lung tissue
●—●: Exposed, ○----○: Control
($m \pm SD$, $n=6$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

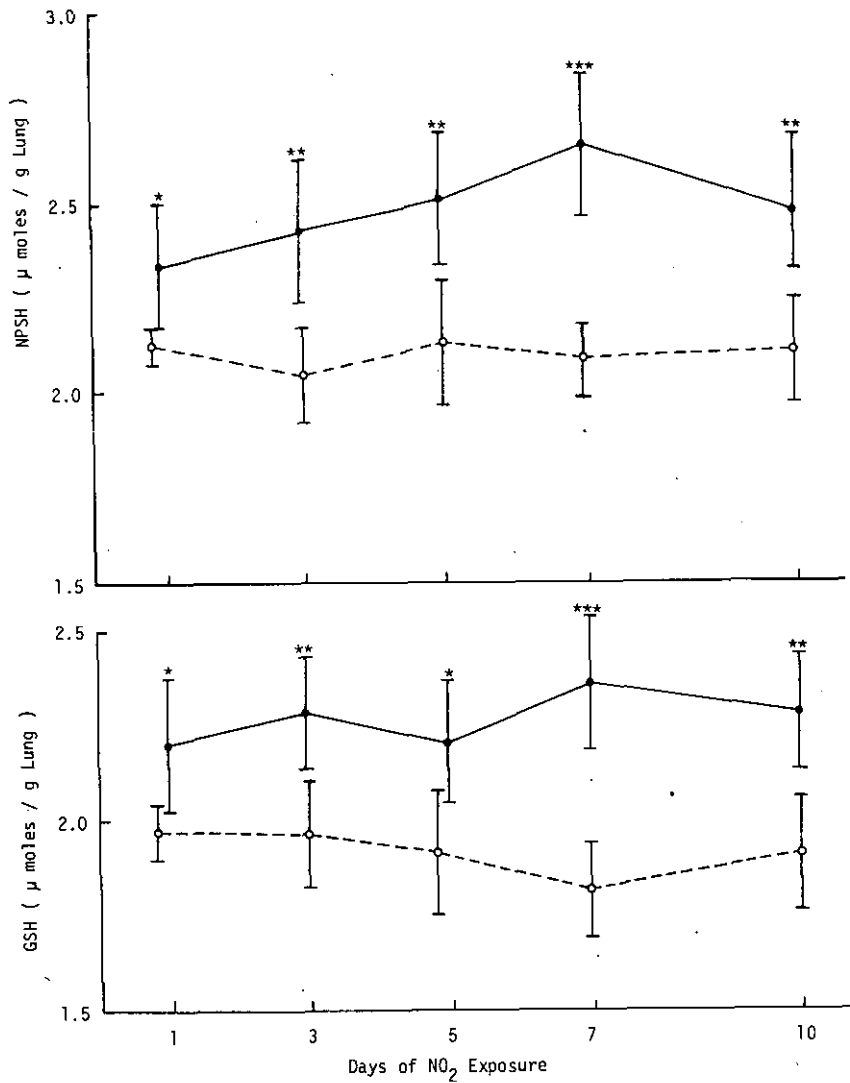


図4 6.0 ppm NO₂ 暴露が肺非タンパク性SH化合物および還元型グルタチオン量に及ぼす影響
 ●—●: 暴露群, ○-----○: 対照群

Fig. 4 Effect of 6.0 ppm NO₂ exposure on non-protein sulhydryl (NPSH) and reduced glutathione (GSH) levels in lung tissue
 ●—●: Exposed, ○-----○: Control
 (m±SD, n=6, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001).

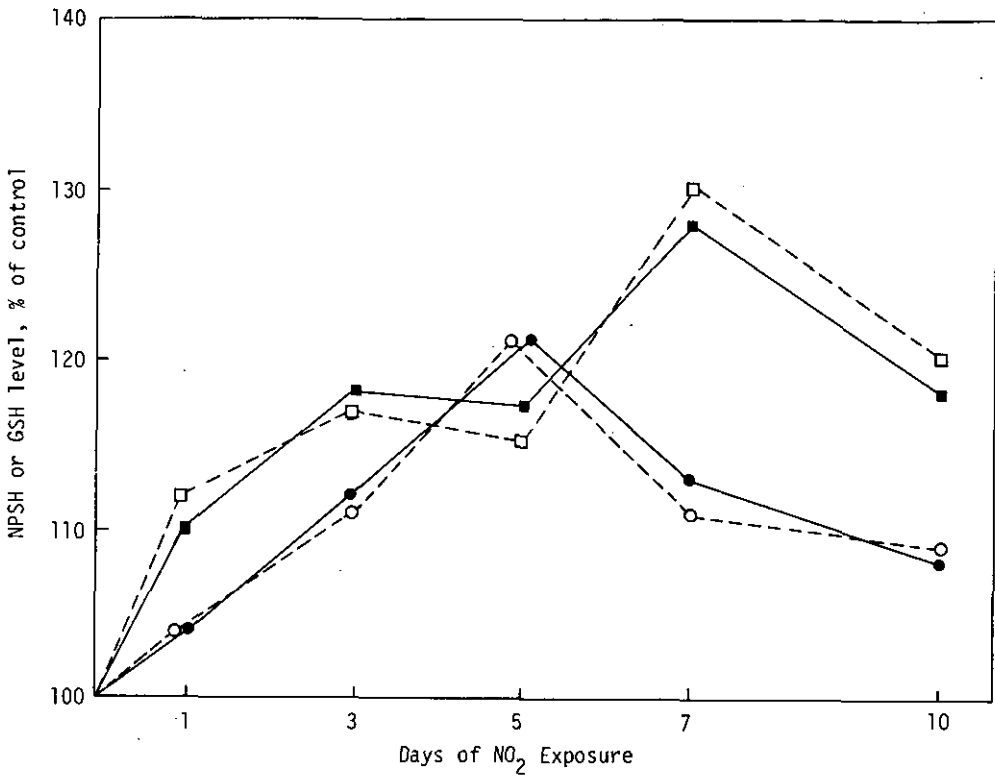


図5 NO₂ 暴露が肺非タンパク性SH化合物 (NPSH) および還元型グルタチオン (GSH) に及ぼす影響
 4.0 ppm NO₂ (●—●: NPSH, ○---○: GSH),
 6.0 ppm NO₂ (■—■: NPSH, □---□: GSH)

Fig. 5 Effect of NO₂ exposure on nonprotein sulfhydryl (NPSH) and reduced glutathione (GSH) levels, % of control in lung tissue
 4.0 ppm NO₂
 (●—●: NPSH, ○---○: GSH),
 6.0 ppm NO₂
 (■—■: NPSH, □---□: GSH).

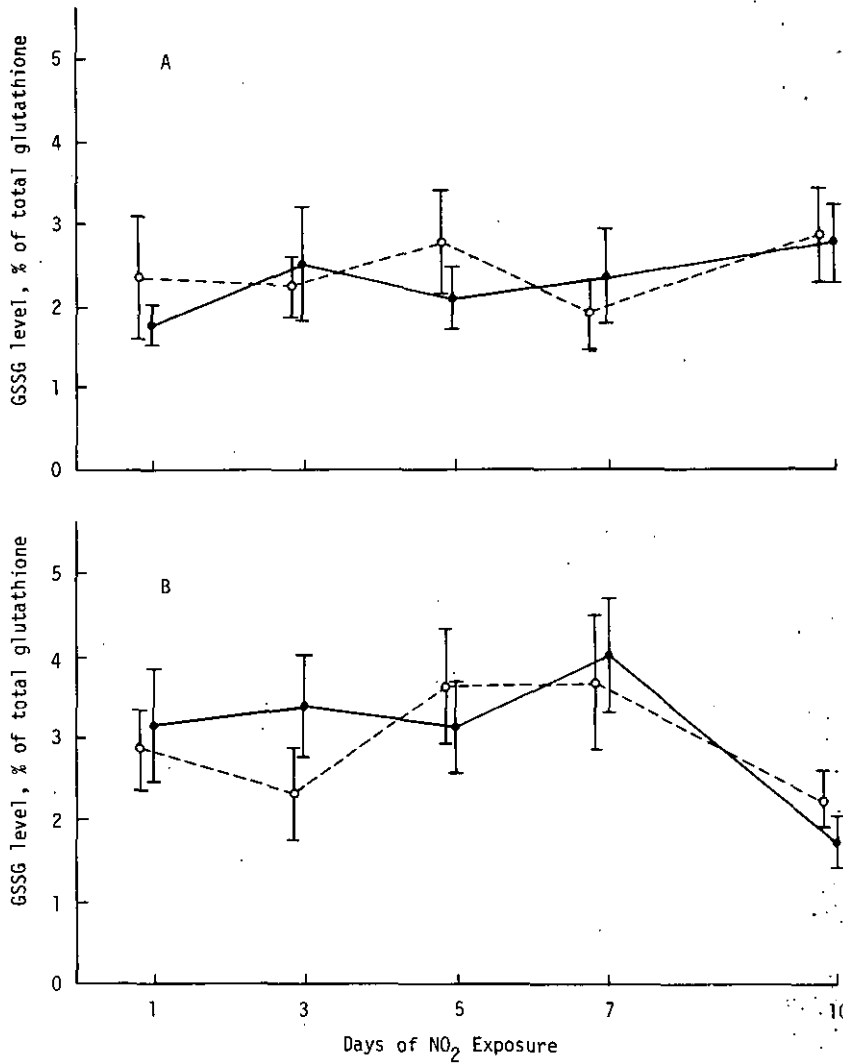


図6 NO₂暴露が肺総グルタチオン中の酸化型グルタチオン含有率に及ぼす影響
 A : 4.0 ppm NO₂ , B : 6.0 ppm NO₂ ,
 ●—● : 暴露群, ○---○ : 対照群

Fig. 6 Effect of NO₂ exposure on oxidized glutathione (GSSG) level, % of total glutathione in lung tissue
 A: 4.0 ppm NO₂ exposure, B: 6.0 ppm NO₂ exposure. ●—● : exposed, ○---○ : control.

考 察

NO₂ 20 ppm, 24時間暴露においては, 5および10 ppm暴露の場合に比べて, NPSHとGSH量の減少と, GSSG量と肺湿重量の増加は顕著であったが, これらの値には各個体間において著しいバラツキが見られた。GSSG量の測定結果より, 暴露濃度上昇に伴って, GSHからGSSGへの酸化反応が促進されることが示唆された。GSSG量は, NO₂ 5 ppmと10 ppmで各24時間暴露した場合および4.0 ppmと6.0 ppmで各々10日間暴露した場合のいずれにおいても対照群に比べて有意な差は見られなかったが, 20 ppm暴露では24時間で著しく増加した。この結果よりNO₂の急性暴露においては, GSSG量の変化にはNO₂の濃度が大きい影響を与えること, また酸化反応は20 ppmのような高濃度において急激に進行することが推定される。DeLucia等¹⁶⁾はオゾンによる急性暴露実験を行ない, 酸化過程においてGSHが肺組織中の他のSH基と結合し, 混合ジスルフィドが生成することを示唆する結果を得た。NO₂暴露においても同様のことが考えられ, このことは今後検討を要する問題と考えられる。

引 用 文 献

- 1) DeLucia, A.J., P.M. Hoque, M.G. Mustafa and C.E. Cross (1972): Ozone interaction with rodent lung. Effect on sulfhydryls and sulfhydryl-containing enzyme activities. *J. Lab. Clin. Med.*, **80**, 559-566.
- 2) Little, C. and P.J. O'Brien (1968): An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 145-1450.
- 3) Chow, C.K. and A.L. Tappel (1972): Enzymic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. *Lipids*, **7**, 518-524.
- 4) Chow, C.K. and A.L. Tappel (1973): Activities of pentose shunt and glycolytic enzymes in lungs of ozone-exposed rats. *Arch. Environ. Health*, **26**, 205-208.
- 5) 中島泰知 他(1968): NO₂短期連続暴露の Maus肺・還元型グルタチオン量に及ぼす影響。大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 労働衛生編, **6**, 17-21.
- 6) 中島泰知 他(1969): 二酸化窒素長期連続暴露の Maus肺の還元型グルタチオン量に及ぼす影響と病理組織学的変化, 付グルタチオン還元酵素に対する亜硝酸塩, 硝酸塩の作用。大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 労働衛生編, **7**, 35-41.
- 7) 深瀬 治・磯村公郎・渡辺 弘(1976): 窒素酸化物の Maus肺 Peroxidative Metabolismへの影響, 大気汚染研究, **11**, 65-69.
- 8) Mustafa, M.G. and D.F. Tierney (1978): Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide toxicity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **118**, 1061-1090.
- 9) Meister, A. (1973): On the enzymology of amino acid transport. *Science*, **180**, 33-39.

- 10) Sekura, R. and A. Meister (1974): Glutathione turnover in the kidney. Considerations relating to the γ -glutamyl cycle and the transport of amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2969-2972.
- 11) Thompson, G.A. and A. Meister (1975): Utilization of L-cystein by the γ -glutamyl transpeptidase- γ -glutamyl cyclotransferase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1985-1988.
- 12) Ellman, G.L. (1959): Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
- 13) Sedlak, J. and R.H. Lindsay (1968): Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* **25**, 192-205.
- 14) Beutler, E. (1975) "Red Cell Metabolism", 2nd Ed., Grune and Stratton, p.112.
- 15) Tietze, F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: *Anal. Biochem.*, **27**, 502-522.
- 16) DeLucia, A.J., M.G. Mustafa, M.Z. Hussain and C.E. Cross (1975): Ozone interaction with rodent lung. III. Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and nonprotein sulfhydryls. *J. Clin. Invest.*, **55**, 794-802.

肺リン脂質に及ぼす二酸化窒素の影響
——不飽和脂肪酸との反応並びに急性暴露による
肺リン脂質脂肪酸組成の変化——

Effect of Nitrogen Dioxide on Lung Phospholipids.
—Reaction with Unsaturated Fatty Acids and
Change in the Composition of Fatty Acids of Lung Phospholipids—

小林隆弘¹・野口 忠²

Takahiro KOBAYASHI¹ and Tadashi NOGUCHI²

要 旨

NO₂ とオレイン酸, リノール酸との反応でシス・トランスの異性化, ニトロ化がおきることが明らかになった。O₂ が共存するとシス・トランスの異性化はおさえられ, ニトロ化は促進された。H₂O は全体の反応をおさえた。H₂O と O₂ の両者の共存下ではシス・トランスの異性化がおさえられた。

またオレイン酸の二重結合へのNO₂ の付加反応生成物の解析を行ない, ニトロ置換したラジカル中間体にNO₂, O₂ が反応した生成物を得た。

一方NO₂ の急性暴露によって, ラットの肺組織のリン脂質の脂肪酸組成のうちパルミチン酸が増加することが明らかになった。

Abstract

The reaction of NO₂ with oleic acid and linoleic acid was investigated. NO₂ catalyzed the cis-trans isomerization of their double bonds. Nitro substituted radical, as an intermediate of cis-trans isomerization, was attacked by NO₂ resulting in nitro compounds. In oxygen rich conditions cis-trans isomerization was retarded, while nitro peroxygenation was accelerated. In the presence of H₂O, entire reaction was retarded probably due to the decrease in the available concentration of NO₂ caused by the reaction of NO₂

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O.
Yatabe, Ibaraki, 300-21.
 2. 上智大学 理工学部

with H₂O. Nitro compounds produced were analyzed and the possible formation mechanism were discussed.

In order to examine the effects of NO₂ on fatty acid species, phospholipid fraction was extracted from lungs of rats exposed to 20 ppm NO₂ for 20 and 40 hours, and fatty acid species in phospholipid fractions were analyzed using gas chromatography. Among fatty acid species in lung, contents of palmitic acid increased significantly. This increase in palmitic acid content was discussed in comparison with the similar result of sub-acute exposure of NO₂ and O₃ reported by other workers.

はじめに

NO₂ は動物の呼吸器系に入った場合、正常換気時には吸入量の81~87%が呼吸器系内に摂取される¹⁾。またその大部分は血液を介して肺外に出ていくことが観察されている²⁾。吸入されたNO₂ は大部分は肺外に出るがその間、肺炎、肺水腫などの障害を引きおこすことが知られている。この標的臓器としての肺の表面は表面活性物質としてリン脂質が重要な役割を演じている。そこでNO₂ の肺リン脂質に対する影響を次の二点について検討した。

まずNO₂ は反応性の高い物質であり水酸基³⁻⁶⁾、SH基⁷⁾、アミノ基^{8,9)}、二重結合^{10,11)}、ベンゼン環¹²⁾、等の種々の官能基と反応することが知られている。従って、化学的にはNO₂ が肺内に入った場合その一部は肺胞の表面にあるリン脂質の不飽和脂肪酸の二重結合と直接反応する可能性がある。この点に関してThomasらは*in vivo* の実験でNO₂ と肺のリン脂質の不飽和脂肪酸が直接反応することを示唆する報告をしている¹³⁾。一方、もし反応するとすれば不飽和脂肪酸の過酸化物やニトロ化物などができる可能性がある。Cortesi によると、オゾンあるいは酸素と不飽和脂肪酸との反応によって生じるオゾナイドやヒドロペルオキシドは肺のリン脂質の脂肪酸組成等に影響を与えし¹⁴⁾、またMenzelらはオゾナイドは赤血球にHeinz Bodyを作るなどの影響のあることを観察している¹⁵⁾。しかしNO₂ と不飽和脂肪酸との反応の生成物がどのようなものであり、それらが生体にどのような影響を与えるか、いまだ明らかにされていない。

そこでNO₂ の肺への影響をみる基礎データをうる目的で、リン脂質を構成する脂肪酸のうち不飽和脂肪酸とNO₂ がどのような反応をするかを検討した。

次にNO₂ と不飽和脂肪酸との反応を化学的に検討するのと並行して、ラットにNO₂ を暴露した場合、肺のリン脂質の脂肪酸組成がどのように変動するか検討した。

NO₂ 暴露による肺リン脂質の脂肪酸組成の変動に関する研究として、Roehm らは亜急性暴露(10 ppm 4週間)¹⁶⁾、Arner らは慢性暴露(2.9 ppm 1週間5日暴露9ヶ月間)¹⁷⁾を行っている。そこで今回は急性暴露による肺のリン脂質脂肪酸組成の変動に関する実験を試みた次第である。

方法

1. 試薬

シス-9-オクタデセン酸(オレイン酸)(1), シス-9, シス-12-オクタデカジエン酸(リノール酸)(2), トランス-9-オクタデセン酸(エライジン酸)(3), ジオレオイル-L- α -ホスファチジルコリン(4), ホスホリパーゼA₂(蛇毒), NO₂標準ガス(窒素中)は市販品を購入した。また8-ホルミルカプリル酸(アゼライン酸セミアルデヒド)はオレイン酸のオゾン分解により合成した。

2. 機器

赤外吸収スペクトルは日立赤外分光光度計285を, NMRはBrucker社製パルス核磁気共鳴装置SXP4-100を用いた。内部標準としてTMSを用いた。質量分析は日本電子社製JMS-100質量分析計を用いた。ガスクロマトグラフィーは島津GC-5Aガスクロマトグラフを用いた。カラムは30mおよび40mのスコット型内径0.3mmのガラスキャピラリーカラムを用いた。液相はSS-4(シアン変性させたメチルシリコン)を用いた。カラム温度は190℃で行った。

3. 反応および生成物の解析

1) シス-トランス異性化に対するNO₂濃度の影響

5070 ppm, 477 ppm, 44.4 ppmのNO₂をオレイン酸(500 mg)の四塩化炭素溶液(150 ml)に毎分40 ml導入した。溶媒留去後ジアゾメタンでメチル化し, ガスクロマトグラフィーにて分析した。(異性体のメチル化, ガスクロ分析は以下も同様に行った。)

2) シス-トランス異性化に対する温度の影響

オレイン酸(100 mg)の四塩化炭素溶液(100 ml)中に521 ppmのNO₂を14℃, 32℃, 44℃で毎分120 ml導入した。

3) シス-トランス異性化に対するH₂OおよびO₂の影響

① 攪拌下リノール酸(200 mg)の四塩化炭素溶液(200 ml)にNO₂(477 ppm)とN₂を毎分それぞれ120 mlと60 ml導入した。

② 攪拌下リノール酸(200 mg)の四塩化炭素溶液(200 ml)にH₂O(50 ml)の存在下(従って不均一層で反応を行った)NO₂(477 ppm)とN₂を毎分それぞれ120 mlと60 ml導入した。

③ 攪拌下リノール酸(200 mg)の四塩化炭素溶液(200 ml)にNO₂(477 ppm)とO₂を毎分それぞれ120 mlと60 ml導入した。

④ 攪拌下リノール酸(200 mg)の四塩化炭素溶液(200 ml)にH₂O(50 ml)の存在下NO₂(477 ppm)とO₂を毎分それぞれ120 mlと60 ml導入した。試料は20分, 60分, 140分, 5時間, 10時間20分後に採取した。オレイン酸の場合も上記のリノール酸の場合に準じて行った。

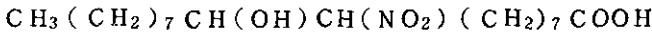
4) ニトロ化合物の分析

反応は以下の四つの条件のもとにオレイン酸(200 mg)の四塩化炭素溶液(100 ml)にNO₂

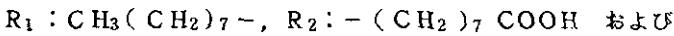
(5070 μm)を毎分50 ml 24時間導入した。

生成物の解析はNMR, IR, 反応を用いて行った。またニトロ化合物の生成比は, NMRのニトロ基, 水酸基またはナイトレイトのつけ根の水素の積分値を用いた。生成物はシリカゲルF₂のプレパラチーフ薄層クロマトグラフィーにより分離した。展開溶媒はエーテル/ベンゼン2対1を用いた。

生成物はオレイン酸の二重結合と反応し9位と10位に置換基が入ったものであるが, 9位と10位の置換基が相互に入れかわった,



のような物質はTLC的に分離できず, またNMR的にも同じ化学シフトを示すため区別できない。従ってこれらは簡略にするため, $\text{R}_1\text{CH}(\text{NO}_2)\text{CH}(\text{OH})\text{R}_2$ の形で表示する。ここで R_1, R_2 は



① 攪拌下, オレイン酸(200mg)の四塩化炭素溶液に NO_2 (5070 μm)を毎分50mlを導入した。

(生成物) $\text{R}_1\text{CH}(\text{NO}_2)\text{CH}(\text{OH})\text{R}_2$ (5) 収率43%, 油状物質, IR: ν_{OH} 3400, 1710, 1550 cm^{-1} , NMR: δ_{CDCl_3} 3.96(1H, m), 4.44(1H, m), 6.67(2H, broad s, D₂O添加で消失)。

$\text{R}_1\text{CH}(\text{NO}_2)\text{CH}(\text{NO}_2)\text{R}_2$ (6) 収率24%, 油状物質, IR: ν_{OH} 1700, 1540 cm^{-1} NMR: δ_{CDCl_3} 4.83(2H, m)

他に未同定のニトロ化合物が生成した。

② 攪拌下, オレイン酸(200mg)の四塩化炭素溶液(100ml)に水(100ml)の存在化 NO_2 (5070 μm)を毎分50ml導入した。この条件下では, トランス体のエライジン酸のピークがNMRでみられ, 水酸基, ニトロ基のつけ根のピークは観察されなかったが, IRスペクトルでは1550 cm^{-1} の小さなピークがみられ, ニトロ化合物が少量ではあるが生成していることがわかった。

③ 攪拌下, オレイン酸(200mg)の四塩化炭素溶液(100ml)に NO_2 (5070 μm)と O_2 を, それぞれ毎分50mlと30ml導入した。

(生成物) $\text{R}_1\text{C}(=\text{O})\text{CH}(\text{NO}_2)\text{R}_2$ (7) 収率55%, 無定形固体, IR: ν_{KB} 1720, 1700, 1555 cm^{-1} , NMR: δ_{CDCl_3} 2.57(2H, t, J=8), 5.10(1H, dd, J=10.5)

(5) 30%, (6) 15%

④ 攪拌下, オレイン酸(200mg)の四塩化炭素溶液(100ml)に水(100ml)の存在下 NO_2 (5070 μm)と O_2 をそれぞれ毎分50mlと30mlの割合で導入した。

〔生成物〕 $R_1CH(ONO_2)CH(NO_2)R_2$ (8) 収率60%, 油状物質, IR: ν_{OH} 1710, 1645, 1560, 1283, 850 cm^{-1} NMR: δ_{CDCl_3} 4.62 (1H, m), 5.37 (1H, m)

(7) 18%, (3) 11%, (5) 11%

(8)を aq NaOH (1N) にて室温処理すると脱硝酸がおこり, $R_1CH=C(NO_2)R_2$ 油状物質, IR: ν_{OH} 1705, 1505 cm^{-1} , NMR: δ_{CDCl_3} 7.05 (1H, td, $J=7,2$)が生成した。

5) ジオレオイル-L- α -ホスファチジルコリン(4)とNO₂との反応

ジオレオイル-L- α -ホスファチジルコリン(4) (140 mg) の四塩化炭素溶液 (150ml) 中にNO₂ (521 mm) とN₂を毎分それぞれ120 ml, 60 ml 導入した。試料は0.5N-NaOH (CH₃OH) で窒素中100℃で5分間メタノリシス。さらに14%BF₃ (CH₃OH) で100℃ 10分間メタノリシス¹⁸⁾ 水8 ccを加えn-ヘキサンで脂肪酸のメチルエステルを抽出した。

1位と2位の脂肪酸を分離する場合, 反応生成物2 mgを1 mlのエーテル/メタノール(98/2) に溶かし, 蛇毒のホスホリパーゼA₂ (0.1 mgを0.1 mlのグリセロールに溶かしたもの) および, 0.1M aq H₃BO₃ (pH 7.0~7.5) 1 ml (3.2 mgの酢酸カルシウムを含む) を加え, 2位の脂肪酸を加水分解した。レシチンが消失した時点で反応を止め, Folch の抽出を行い, ジアゾメタンで脂肪酸をメチル化し, n-ヘキサンで抽出した。混入したリゾレシチンはアセトンで沈殿させ分離した。リゾレシチンは上記の条件でメタノリシスし, n-ヘキサンで抽出した。

4. 動物暴露

160 l 暴露チャンバー (モデルPT-300A, 日本クレア社製) 内で換気流量40 l/min にて20 mm NO₂を7~8週令 Wistar 雌ラット (体重148~176 g) に暴露した。NO₂の濃度はNO_x分析計 (モデル8440-H, モニターラボラトリー社製) を用い, ケミルミ法により測定した。この濃度においてラットは摂食しないため対照群として絶食ラットを用いた。

対照群および暴露群の内訳は(1)40時間絶食 (対照) (2)20時間絶食後20時間暴露 (暴露中は水のみ与える) (3)40時間暴露 (暴露中は水のみ与える) である。

暴露直後, ラットは頸動脈からの放血によってごく短時間内に殺した。摘出した肺はメタノール, クロロホルム, 水 (2:1:0.3) の混合溶媒3.3 mlでホモジナイズし, Folch の方法で脂質を抽出した¹⁹⁾。総脂質はアセトン沈殿法にて, 中性脂質とリン脂質に分離した。リン脂質は3節の5) で述べたMorgan法¹⁸⁾によりメタノリシスした。得られた脂肪酸のメチルエステルはガスクロマトグラフィーを用いて分析した。

結果と考察

1. NO₂と不飽和脂肪酸との反応

オレイン酸とNO₂との反応の概要を赤外吸収スペクトルで見ると図1のごとくなる。反応が進

むにつれ、 1550 cm^{-1} と 960 cm^{-1} の吸収帯が顕著に増大し、 3010 cm^{-1} の吸収が消失した。
 960 cm^{-1} のトランス二重結合のCH変角振動の吸収があらわれ、シス二重結合のC-Hの伸縮振動にもとづく 3010 cm^{-1} の吸収がなくなることは、オレイン酸のシスの二重結合が NO_2 の触媒作用により異性化反応を行い、トランス体のエライジン酸になることを示している。また 1550 cm^{-1} のニトロ基の伸縮振動の吸収が大きくなることは、 NO_2 の二重結合への付加反応がおきていることを示している。これらの吸収の相対的な増減は O_2 や H_2O が共存することにより著しく変化する。すなわち、 O_2 が共存すると、 NO_2 だけの場合に比べ 1550 cm^{-1} のニトロ基の吸収が、 960 cm^{-1} のシス-トランスの異性化反応により生じるトランス二重結合の吸収に比べ著しく増大する。これはニトロ化合物の生成が O_2 の共存下で増大することを意味している。また H_2O が共存すると 1550 cm^{-1} および 960 cm^{-1} のいずれの吸収の増大も遅くなり、全体的に反応がおさえられていることがわかった。リノール酸の場合も傾向は同じである。そこで二重結合のシス-トランスの異性化反応および NO_2 の付加反応の2点についてより定量的に検討した。

1) 二重結合のシス-トランス異性化

① NO_2 濃度、温度の影響

図2は NO_2 濃度のシス-トランス異性化反応への影響を示している。 NO_2 濃度が高まるにつれ、シス-トランス異性化がすみやかにおこることを示している。同時に室温でシス-トランスの異性化はトランス体がほぼ85%の段階で平衡に達していることが判明した。

Pittsらはシス-2-ブテンと NO_2 との気相反応で、反応速度式はシス-トランスの異性化反応の初期の段階で

$$d[T]/dt = k[\text{NO}_2][C] \quad (1)$$

で表わされると報告した²⁰⁾。ここで、T、Cはそれぞれトランス体、シス体の濃度を表している。

図3は種々の温度でのオレイン酸のシス-トランスの異性化反応を表している。(1)式を適用し縦軸に $\ln(1/1-[T])$ 、横軸に時間をとると直線関係が成り立った。またこの図は温度が上昇するにつれ、反応が速くなることを示している。これはシス-トランスの異性化において、ニトロ置換したラジカル中間体のC-C単結合の回転が温度が上昇するにつれ容易になるためと考えられる。

② O_2 、 H_2O の影響

図4に、 O_2 や H_2O の共存下でのシス-トランスの異性化を示した。 O_2 や H_2O が存在すると異性化が抑制されることが明らかとなった。この結果は前述した赤外吸収スペクトルの結果と一致している。 O_2 が共存する場合にはシス-トランス異性化の中間体であるニトロ置換したラジカルに、基底状態が三重項の O_2 分子が反応し、異性化をおさえるためと考えられる。一方 H_2O が共存すると、 H_2O と NO_2 が反応するため異性化を触媒する NO_2 の濃度が減少するためと考えられる。

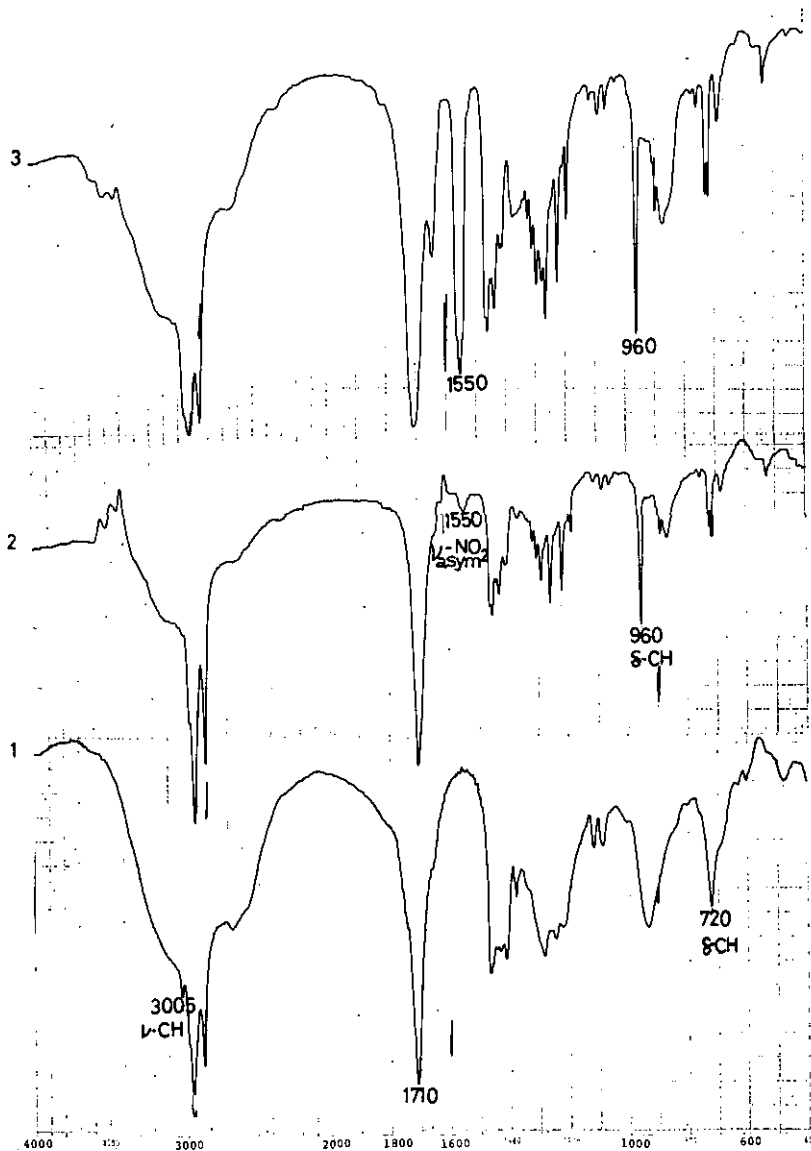


図1 NO₂ とオレイン酸(1)との反応生成物の赤外吸収スペクトル
 1; オレイン酸 2; 2時間後 3; 36.5時間後

Fig. 1 IR spectra of reaction products of oleic acid (1) with NO₂
 1; oleic acid, 2; after 2 hours, 3; after 36.5 hours.

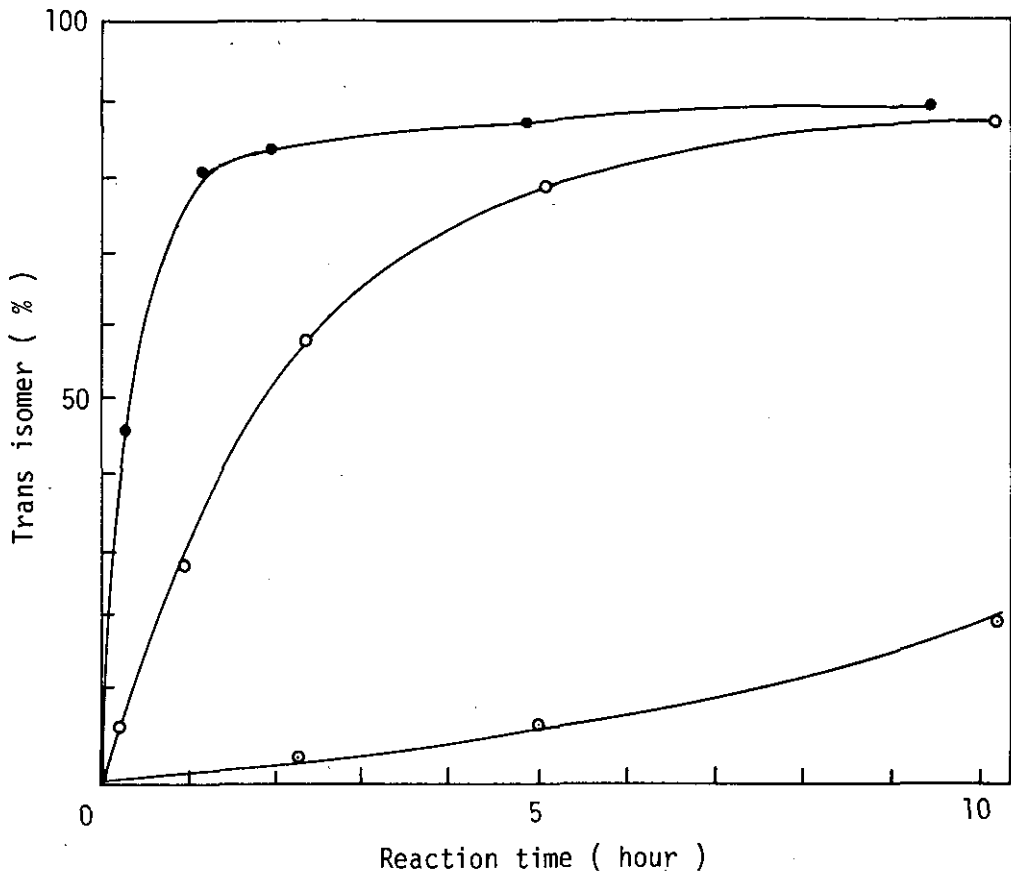


図2 オレイン酸(1)の NO_2 によるシス-トランス異性化の NO_2 濃度依存性

● ; 5070 ppm ○ ; 477 ppm ⊙ ; 44.4 ppm

Fig. 2 Cis-trans isomerization of oleic acid (1) catalyzed by three different concentrations of NO_2 . Plot of % of trans isomer vs. time

● ; 5070 ppm, ○ ; 477 ppm. ⊙ ; 44.4 ppm.

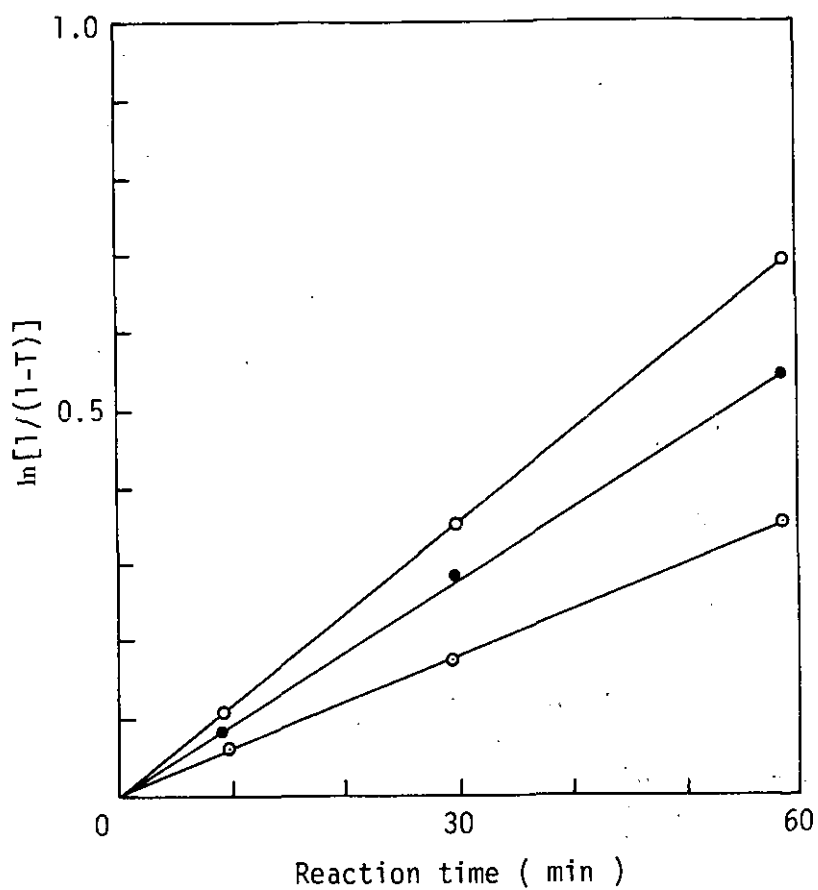


図3 オレイン酸のNO₂によるシス-トランス異性化の温度依存性
 ○; 287 °K ●; 304 °K ○; 317 °K

Fig. 3 Temperature dependence of cis-trans isomerization of oleic acid (1) catalyzed by NO₂. Plot of $\ln [1/(1-T)]$ vs. time. T denotes concentration of trans isomer.
 ○; 287°K, ●; 304°K, ○; 317°K.

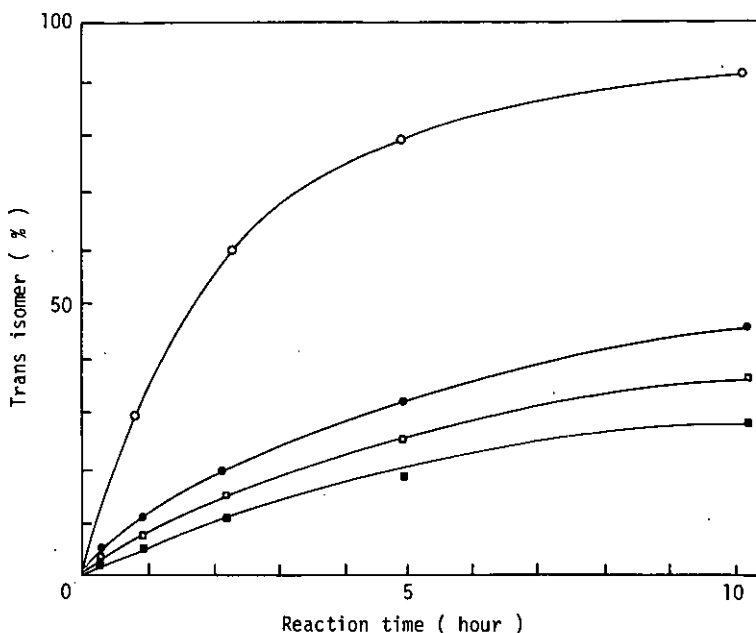


図4 オレイン酸の NO_2 によるシス→トランス異性化に対する O_2 , H_2O の影響

○; NO_2 ●; $\text{NO}_2 + \text{O}_2$ □; $\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ■; $\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Fig. 4 NO_2 catalyzed cis-trans isomerization of oleic acid (1) in the presence of O_2 and/or H_2O . Plot of % trans isomer vs. time

○; NO_2 , ●; $\text{NO}_2 + \text{O}_2$, □; $\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, ■; $\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

③ ジオレオイル-L- α -ホスファチジルコリンの場合

図5はジオレオイル-L- α -ホスファチジルコリンの1位と2位の脂肪酸部分全体のシス→トランス異性化の経過を示しているが、四塩化炭素中 NO_2 (521 mm)と反応すると10時間後に80%がトランス体に異性化していることがわかった。次に二つのオレイン酸の異性化反応が位置が異なることにより影響をうけるかどうか検討した。四塩化炭素中 NO_2 (521 mm)で5時間反応後ホスホリパーゼ A_2 で2位の脂肪酸のみを切り2位のオレイン酸を得た。また同時に生成するリゾレシチンをメタノリシスすることにより1位のオレイン酸メチルを得た。それぞれをガスクロマトグラフィーで分析するとトランス体が1位で71%, 2位で73%の割合で生成した。従って, 1位, 2位のオレイン酸の二重結合への NO_2 の攻撃が四塩化炭素中ではほぼ同じ確率で行われていることが明らかになった。

④ リノール酸の場合

リノール酸の場合9位と12位に二つの二重結合を有している。そこで四つの幾何異性体が考え

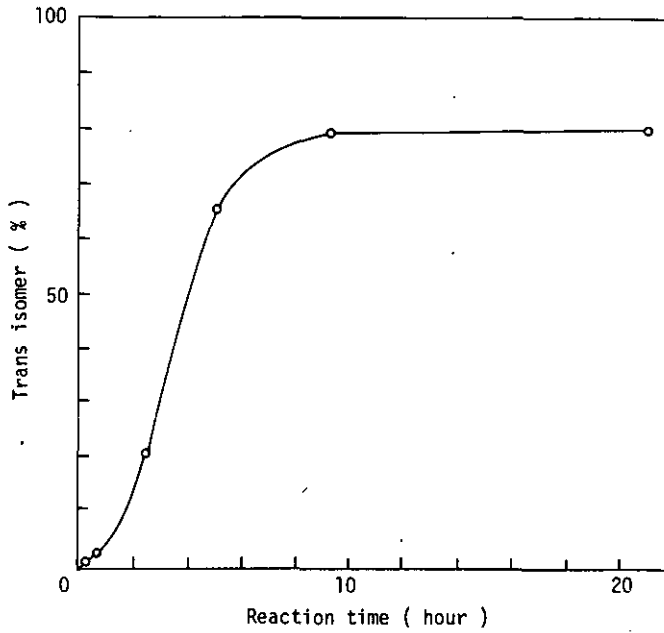


図5 ジオレオイル-L- α -ホスファチジルコリン(4)のオレイン酸部分の NO_2 によるシス→トランス異性化。メタノリシス後のトランス異性体の百分比で表わす。

Fig. 5 Cis-trans isomerization of acyl part of Dioleoyl-L- α -phosphatidyl choline (4) catalyzed by NO_2 (521 ppm). % trans isomer (after methanolysis) was plotted vs. time.

られる(図6)。すなわちシス→シス, シス→トランス, トランス→シス, トランス→トランス体である。図7は四塩化炭素中477 ppmの NO_2 を暴露した場合の四つの幾何異性体の割合の時間変化を表している。シス→トランスとトランス→シス異性体の割合はほぼ同じであり, NO_2 は9位と12位の二重結合にはほぼ同じ割合で攻撃することが判った。また図7は, シス→シス体からトランス→シスまたはシス→トランス体に異性化し続いてトランス→トランス体にと逐次に反応の進行することを示している。図8は NO_2 の異性化に対する O_2 と H_2O の影響を示した。逐次反応のため, シス→シス体の減少をもってシス→トランス異性化のおこり易さとした。 O_2 , H_2O ともオレイン酸の場合と同様, シス→トランス異性化反応を抑制することがわかった。

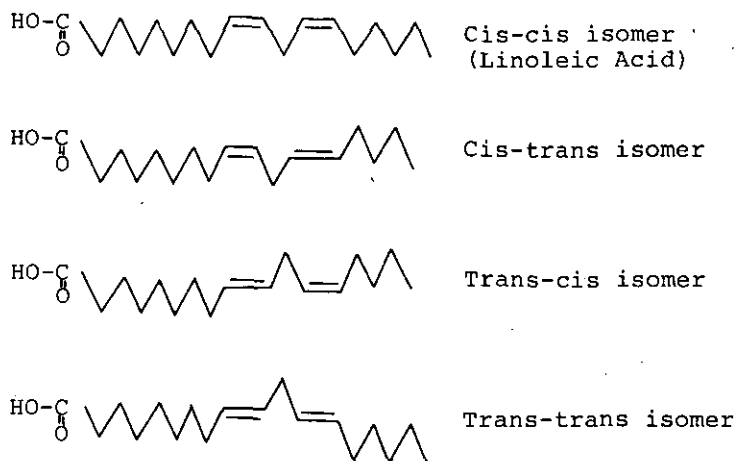


図6 リノール酸の幾何異性体

Fig. 6 Geometric isomers of linoleic acid.

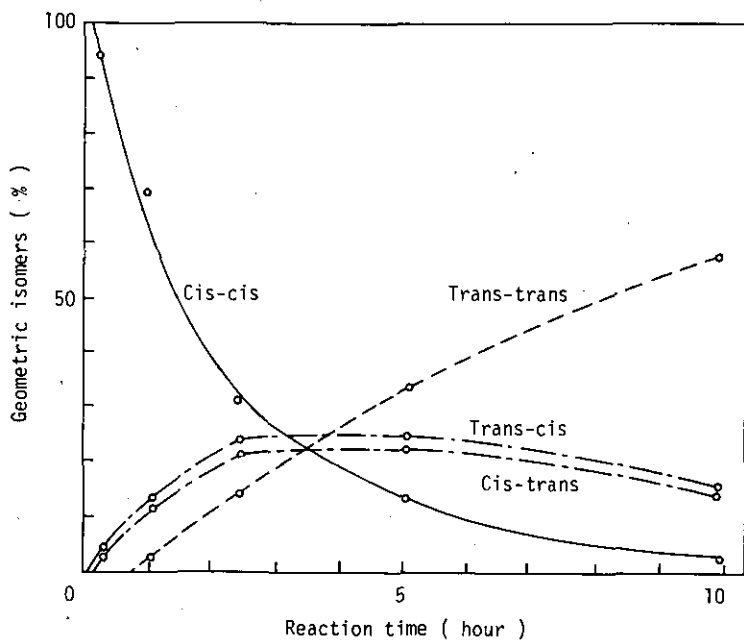


図7. リノール酸(2)の NO_2 (477 ppm)によるシストランス異性化, 幾何異性体の時間変化

Fig. 7 Cis-trans isomerization of linoleic acid (2) catalyzed by NO_2 (477 ppm) in CCl_4 . Plot of % geometric isomers.

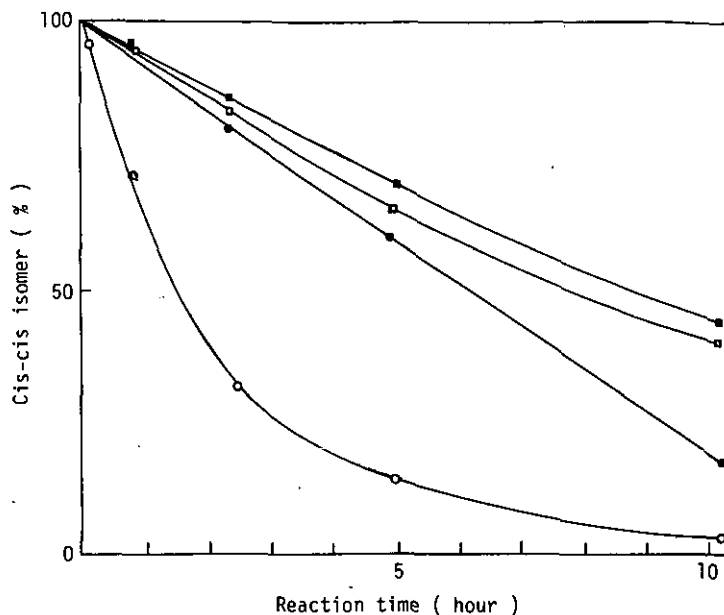


図8 リノール酸(2)のNO₂ (477 ppm)によるシス-トランス異性化に対するO₂, H₂Oの影響
 ○; NO₂+N₂ ●; NO₂+O₂ □; NO₂+H₂O+N₂ ■; NO₂+H₂O+O₂

Fig. 8 Cis-trans isomerization of linoleic acid (2) catalyzed by NO₂ (477 ppm) in the presence of O₂ and/or H₂O plot of % of linoleic acid vs. time

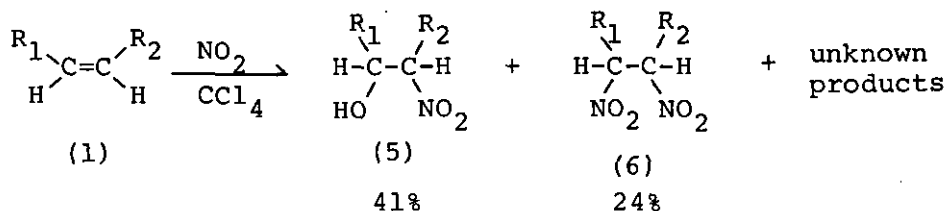
○; NO₂ + N₂, ●; NO₂ + O₂, □; NO₂ + H₂O + N₂, ■; NO₂ + H₂O + O₂.

2) NO₂ の付加反応

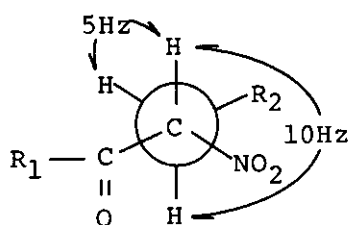
① オレイン酸反応生成物の解析

二重結合のシス-トランス異性化反応中間体であるニトロ置換したラジカルがさらに反応するとニトロ化合物が生成する。

NO₂ のみと反応した場合は、ニトロヒドロキシル体(5)とジニトロ体(6)が41%, 24%の割合で得られその他いくつかの未同定の物質が生成した。



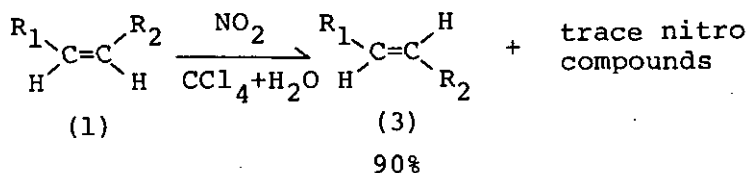
ニトロヒドロキシル体(5)はNMRで3.96 ppmおよび4.44 ppmにOH基 およびニトロ基のつけ根のプロトンのピークがあること、6.67 ppmにD₂Oを添加すると消失する2 H分のOHプロトン(1つはカルボン酸のもの)が存在すること、ならびにIRで1550 cm⁻¹にNO₂の吸収があることから構造を推定した。確認のためJones酸化を行うとDNP(+)となり、ケトン体が生成していることがわかった。この酸化生成物のIRは1720 cm⁻¹と1700 cm⁻¹に二つのC=O伸縮振動の吸収があり、カルボン酸とケトンができていたことがわかった。またNMRで2.57 ppmにケトンのα位のプロトンが2 H分あり、5.10 ppmにニトロ基のつけ根でケトンのα位のプロトンが下記のように隣接のプロトンと10 Hz, 5 Hzのカップリングをしていることから、この酸化生成物は、ニトロケトン体(7)であることが推定された。



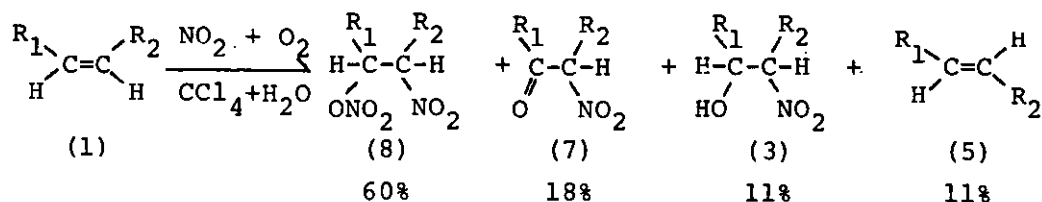
ジニトロ体はIRで1540 cm⁻¹に大きなニトロ基の吸収があること(ニトロヒドロキシル体(5)のようなニトロ基を1個有するものに比べ、カルボン酸のC=O吸収帯との相対的な大きさがジニトロ体の場合大きい)。NMRでニトロ基のつけ根のプロトンが4.83 ppmに2ヶ分あることより推定した。

この場合反応は図9に示されるように、ニトロ置換したラジカル中間体(9)にNO₂がOの部分あるいはNの部分で攻撃することでおこる。Oの部分で攻撃すると、ニトロナイトライト(10)が生成し、Nの部分で攻撃するとジニトロ体が得られる。ニトロナイトライト(10)は加水分解され(反応系に水はないが、シリカP TL C分離中、加水分解されたと考えられる)ニトロヒドロキシル体(5)が得られる。

NO₂とオレイン酸との反応にH₂Oが共存する場合NMRではエライジン酸の吸収だけが観察され、OH基、ニトロ基のつけ根のプロトンのピークは観察されなかったがIRではニトロ基にもとづく1550 cm⁻¹のピークがわずかにみられた。この場合NO₂はH₂Oと反応するため全体の反応がおさえられているものと考えられる。



この反応に H_2O と O_2 が共存する場合は、ニトロナイトレート(8)が主生成物(60%)として得られた。他にニトロケトン体(7)(18%)エライジン酸(3)(11%)、ニトロヒドロキシル体(5)(11%)が得られた。



ニトロナイトレート(8)はIRで 1560 cm^{-1} のニトロ基の吸収のほかにはナイトレートに特徴的な 1645 cm^{-1} (asym NO_2 伸縮振動), 1283 cm^{-1} (sym NO_2 伸縮振動), 850 cm^{-1} (N-Oの伸縮振動)の吸収があり, NMRでは $4.62 \mu\text{m}$ にニトロ基のつけ根のプロトン, $5.37 \mu\text{m}$ にナイトレートのつけ根のプロトンのピークがみられたことより推定した。ナイトレートを加水分解するために 1N-aq NaOH で処理すると脱硝酸がすみやかに起こり $\text{R}_1\text{CH}=\text{C}(\text{NO}_2)\text{R}_2$ が得られた。このIRは二重結合と共役し低波数シフトしたニトロ基の吸収が 1505 cm^{-1} にみられた。主生成物であるニトロナイトレートは O_2 と H_2O の両方がないと生成しない。従ってニトロケトン体(7)を生成する中間体であるニトロジオキシナイトレート(12)が水と反応して生じる亜硝酸とエステル交換しニトロナイトレートおよび硝酸を生じると推定されるがこの点に関してはさらに検討する必要がある。以上を整理し, 図9のようにまとめた。

② リノール酸の場合

リノール酸と NO_2 の反応でできるニトロ化合物は非常に複雑となり解析が難しい。一方用いたガスクロマトグラフィーの条件では, リノール酸およびその幾何異性体は流出するが, 二重結合への NO_2 付加反応による生成物は流出しない。そこで $(L-L')/L \times 100$ 式を用いて NO_2 付加反応による生成物の生成の割合とした。ここで L は反応前のリノール酸の量, L' は反応後のリノール酸およびその幾何異性体の量を示す。 L, L' は内部標準として入れたステアリン酸 (NO_2 と反応しない)との比により求めた。その結果を図10に示す。リノール酸は O_2 のみと10時間反応させても反応しない(この場合過酸化化物もガスクロカラムから流出しない)。 NO_2 だけが存在する場合は NO_2 付加生成物の割合は10時間後に25%, O_2 共存下, H_2O 共存下, O_2 および H_2O 共存下ではそれぞれ, 75%, 14%, 20%となった。従ってオレイン酸の場合と同様に O_2 は, シストランス異性化の中間体であるニトロ置換したラジカルを攻撃しニトロ付加物の生成を加速し, H_2O は NO_2 と反応し, 二重結合を攻撃する NO_2 濃度を下げ全体の反応をおさえると考えられる。 O_2 と H_2O 共存下の反応生成物の赤外吸収スペクトルは 1550 cm^{-1} ニトロ基の吸収のほかナイトレート特有の吸収が $1640, 1276, 850 \text{ cm}^{-1}$ にあり, オレイン酸の場合のニトロ化合物の赤外吸収と同じくナイトレートが生成していることを示唆した。

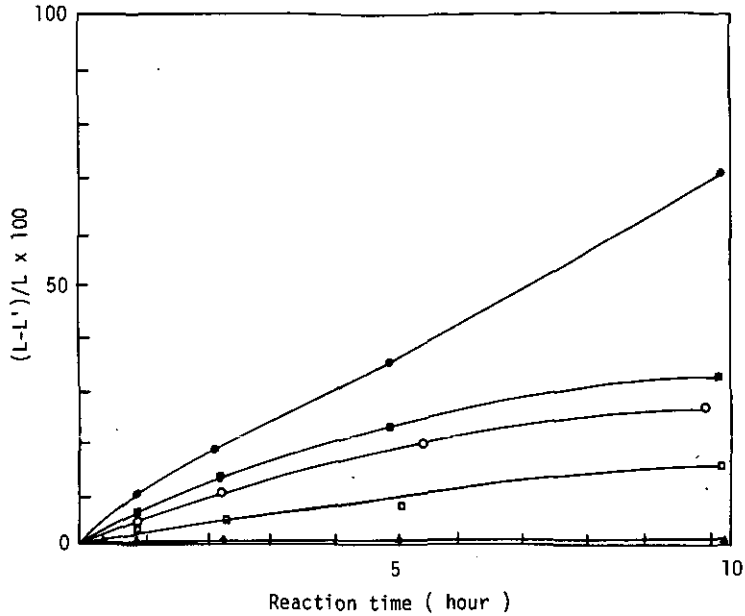


図10 リノール酸のニトロ化合物の生成の時間変化

L: 反応開始時のリノール酸含量

L': 下記条件下で反応後のリノール酸およびその異性体含量

▲; O₂ ○; NO₂ ●; NO₂ + O₂ □; NO₂ + H₂O

■; NO₂ + O₂ + H₂O

Fig. 10 Production of nitro compounds of linoleic acid vs. time

L: Initial content of linoleic acid

L': Content of linoleic acid and its geometric isomers after exposure to NO₂ (477 ppm) in the presence of O₂ and/or H₂O

▲; O₂, ○; NO₂, ●; NO₂ + O₂, □; NO₂ + H₂O, ■; NO₂ + O₂ + H₂O.

一方リノール酸が二重結合を二つ有している点でオレイン酸の場合には観察されなかった生成物がガスクロマトグラフィーで流出してくる。すなわちリノール酸の場合NO₂, O₂ 両者の共存下で反応を行うと反応が進むにつれ図11に示すピークが増加してくる(図12)。粗生成物の薄層クロマトグラフィー上にDNP(+)でR_f値が、オレイン酸のオゾン酸化により合成したアゼライン酸セミアルデヒド¹³と同じスポットが存在すること、¹³のメチルエステルとガスクロマトグラフィーの保持時間が全く一致すること、ガスマス分析で一致することより、このピークをアゼライン酸セミアルデヒドと同定した。このピークはオレイン酸の場合、同じ条件で反応を行っても観察されない。このことはNO₂とO₂の混合気体に室内の光があたることによりオゾンが生成し、それがリノール酸と反応して生成したものではないことがわかる。従って、1,4ジエンが関係していることが推

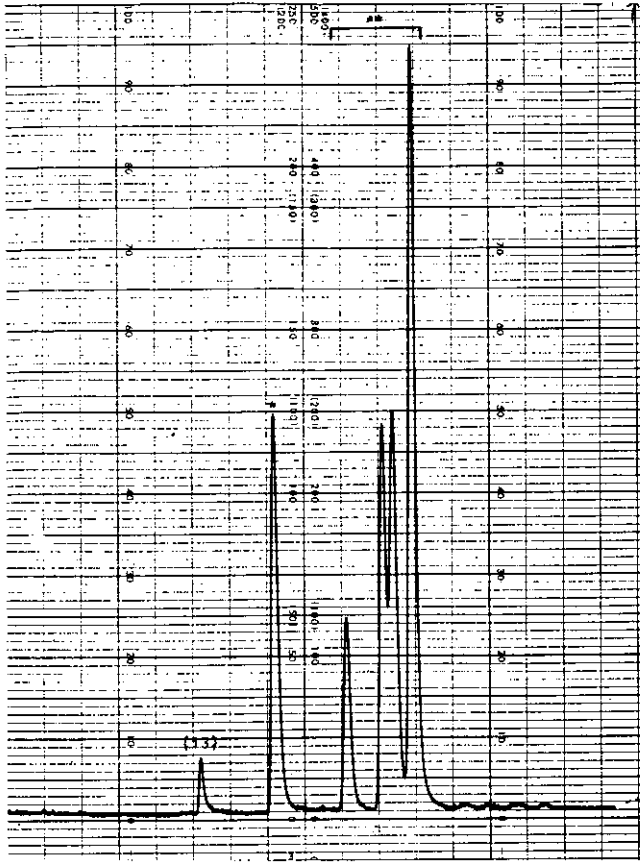


図11 O_2 存在下の NO_2 とリノール酸反応生成物(メチル化後)のガスクロマトグラム(10時間後)
 (13) アゼライン酸セミアルデヒド *ステアリン酸(内部辞準)
 **リノール酸の幾何異性体

Fig. 11 Gas chromatogram of reaction products of linoleic acid with NO_2 in the presence of O_2 . After 10 hours.
 (13) azelaic semialdehyde *; stearic acid, **; geometric isomers of linoleic acid.

定される。また NO_2 や O_2 単独で反応した場合も観察されない。そこで(13)の生成機構として図13のような機構を考えた。すなわち NO_2 が12位の二重結合を攻撃しニトロ置換したラジカルを生成する。それに O_2 が反応してできたペルオキシラジカルが9位の二重結合を攻撃しエンドペルオキシドとなりさらに O_2 , NO_2 が反応してできる生成物が脱硝酸する過程で(13)が生成する機構である。

以上、オレイン酸とリノール酸の NO_2 との反応でシーストランスの異性化がおきること、 O_2 が

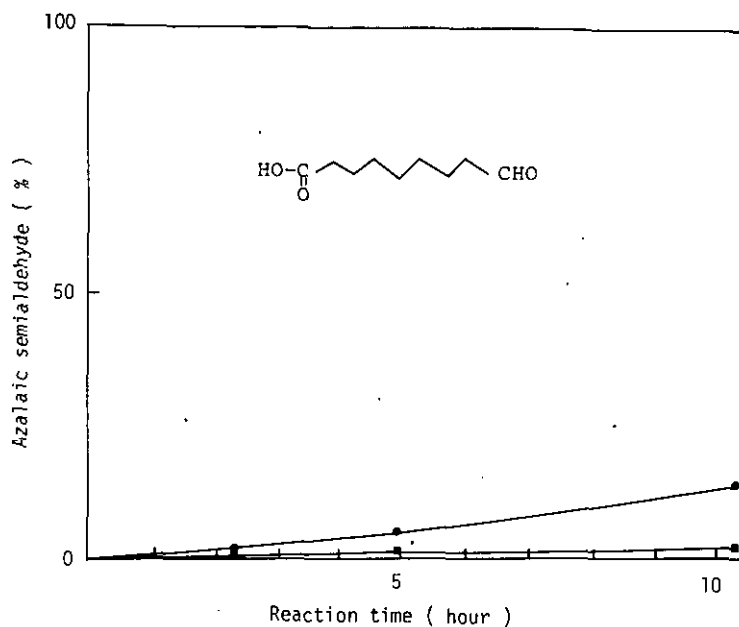


図 12 アゼライン酸セミアルデヒド生成の時間変化

●; NO₂ ■; NO₂

Fig. 12 Production of azelaic semialdehyde vs. time

◐; NO₂ + O₂ ◑; NO₂ + H₂O + O₂

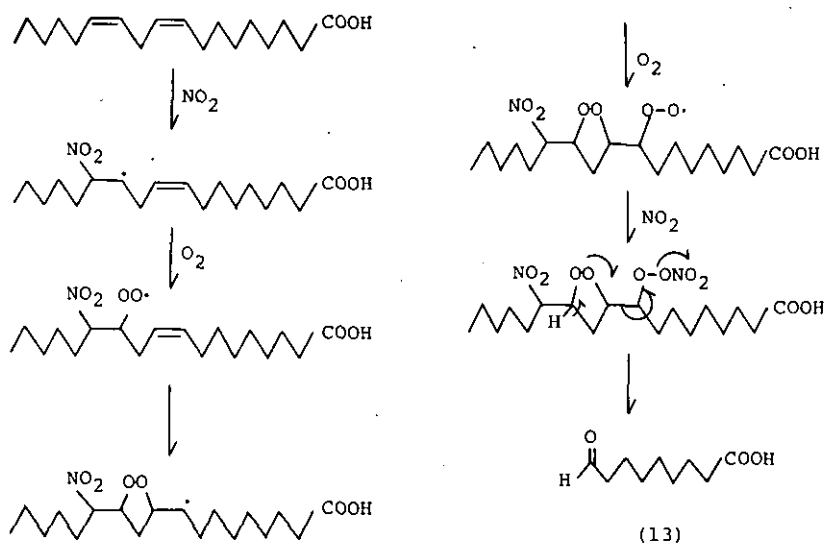


図 13 アゼライン酸セミアルデヒドの生成機構

Fig. 13 Possible mechanism for production of azelaic semialdehyde

共存すると異性化はおさえられ、ニトロ化は促進されること、またこの際ニトロ過酸化物が中間体
にできること、H₂Oが共存すると全体の反応がおさえられること、O₂とH₂Oの両者が共存する
と異性化はおさえられ、ニトロ化物としてニトロナイトレイトが主に得られるとの結果を得た。

2. NO₂ 急性暴露による肺リン脂質の脂肪酸組成の変化

Wistar 雌ラット(7~8週令, 体重148~176g)を20 ppm NO₂に20時間, 40時間暴露
した。この濃度でラットは摂食しないため対照群として絶食ラットを用いた。

表1に各臓器の湿重量ならびにそれらの体重比を示す。肺の湿重量は40時間暴露後顕著に増加
した。この湿重量の増加は肺水腫おこし含水量が増加したためと考えられる。一方肝はわずかに増
加しているが有意差はみられない。腎, 脾は湿重量でわずかに減少した。

肺における総脂質重量, ならびにリン脂質重量を表2に示す。肺では両者とも有意差はみられな
かった。

肺組織のリン脂質の脂肪酸組成は図14のようなガスクロマトグラムを与えるが, NO₂ 暴露に
より表3に示すように変動する。すなわち脂肪酸組成中含量の多いパルミチン酸は時間の経過と共に
3.7%から4.3%へと増加した。他の飽和脂肪酸ではミリスチン酸(4.6%→3.1%)ステアリ
ン酸(12.7%→11.6%)リグノセリン酸(3.3%→2.2%)は共に有意に減少した。また不飽和

表1 20 ppm NO₂ 暴露後の体重, 臓器湿重量および臓器湿重量の体重比

Table 1. Body weight and wet weight of organs and experimental data after 20 ppm NO₂ exposure

	Control N=6	NO ₂ exposure	
		20 hours N=8	40 hours N=7
Initial body wt. (I) g	158.2 ± 6.2	—	167.7 ± 4.7
Final body wt. (F) g	139.5 ± 5.8	148.5 ± 4.4	146.0 ± 8.9
F/I ^a	0.84	—	0.87
Lung wet wt. (Lu) g	0.764 ± 0.003	0.893 ± 0.005	1.615 ± 0.112 ^{b***}
Lu/F ^a	5.49 ± 0.47	6.02 ± 0.51	11.08 ± 2.39***
Liver wet wt. (Liv) g	4.676 ± 0.828	5.463 ± 0.462	5.399 ± 0.142
Liv/F ^a	33.67 ± 6.75	36.60 ± 2.33	37.05 ± 1.42
Kidney wet wt. (K) g	1.314 ± 0.311	1.399 ± 0.058	1.324 ± 0.056
K/F ^a	9.47 ± 2.46	9.02 ± 0.42	9.08 ± 0.48
Spleen wet wt. (S) g	0.385 ± 0.059	0.366 ± 0.033	0.343 ± 0.048
S/F ^a	2.77 ± 0.47	2.46 ± 0.22	2.35 ± 0.36

a: × 10³

b: T-test as compared with control ***: P < 0.001

表2 20 ppm NO₂ 暴露後のラット肺組織の全脂質およびリン脂質量

Table 2. Lung tissue lipids and phospholipids after exposure of rats to 20 ppm NO₂

	Control N=6	NO ₂ exposure	
		20 hours N=8	40 hours N=7
Total Lipids	15.2 ± 4.1 ^a	16.1 ± 4.3	15.6 ± 5.8
Total phospholipids	14.3 ± 3.5	14.8 ± 3.7	13.9 ± 4.3

a: Mean value ± S.D. (mg)

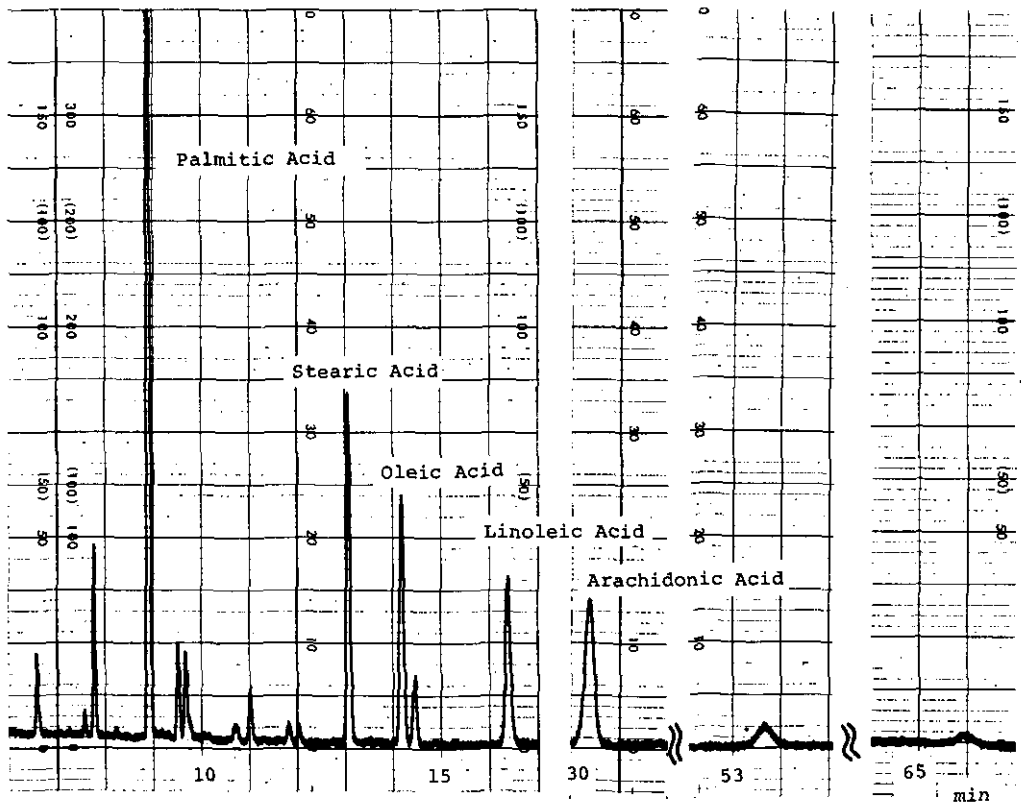


図14 ラット肺組織のリン脂質の脂肪酸メチルのガスクロマトグラム

Fig. 14 Gas chromatogram of the methylesters of the fatty acids associated with lung tissue phospholipids

脂肪酸ではオレイン酸(11.9%→9.9%)アラキドン酸(12.1%→11.4%)は共に有意に減少した。パルミトレイン酸は(2.3%→3.2%)有意に増加した。リノール酸は20時間暴露群では減少したが40時間暴露群では有意に増加した。その他未同定の脂肪酸では保持時間が261秒、558秒の脂肪酸が増加する傾向を示し1264秒のピークが減少する傾向を示した。

表3 20 ppm NO₂ 暴露後の肺組織リン脂質の脂肪酸組成の変動

Table 3. Change in the fatty acid composition of lung tissue phospholipids after exposure of rats to 20 ppm NO₂

	RT ^a	NO ₂ exposure		
		Control N = 6	20 hours N = 8	40 hours N = 6
	261	1.06±0.06 ^b	1.24±0.01**	1.46±0.06***
Myristic Acid	341	4.63±0.55	3.92±0.35*	3.09±0.32**
Palmitic Acid	411	37.26±1.21	40.25±1.54**	42.80±0.95***
Palmitoleic Acid	445	2.33±0.18	2.32±0.19	3.20±0.22***
	526	0.39±0.03	0.37±0.03	0.55±0.14*
	558	1.74±0.13	1.47±0.22*	1.27±0.10***
Stearic Acid	694	12.71±0.35	12.24±0.39	11.64±0.33***
Oleic Acid	763	11.88±0.50	11.77±0.44	9.89±0.59***
Linoleic Acid	915	6.78±0.38	6.41±0.14*	7.37±0.34*
Arachidonic Acid	2018 (633)	12.08±0.73	11.94±0.63	11.36±0.57
Lignoceric Acid	(1036)	3.26±0.44	2.67±0.33*	2.20±0.33**
	(1264)	2.47±0.37	2.16±0.33	2.02±0.29
Docosahexaenoic Acid	(1341)	3.23±0.18	3.22±0.23	3.32±0.63

a: Retention time (sec) at 160°C and at 190°C (in parenthesis)

b: Mean % value ± S.D.

*: p < 0.05

** : p < 0.01

***: p < 0.001

NO₂ を急性暴露することにより、肺組織のリン脂質の脂肪酸組成中パルミチン酸が有意に増加することを見出したが、これは Roehm らのラットに亜急性暴露(10 ppm, NO₂, 4週間)において3%弱増加した報告と同じ傾向である¹⁶⁾。その他の脂肪酸では、Roehm らはパルミトレイン酸が増加し、アラキドン酸がわずかに減少するという、今回の急性暴露実験と同じ傾向を報告している。またオレイン酸、リノール酸に関しては逆の傾向になることを報告している。一方 Arner らはラットへの慢性暴露(2.9 ppm NO₂, 1週間5日暴露9ヶ月間)¹⁷⁾の結果、レシチン中のパルミチン酸が5%強減少するという報告をしている。肺リン脂質中の40~50%以上をレシチンが

占めるため、レシチン中でのパルミチン酸組成の減少は、肺リン脂質中でのパルミチン酸の割合が減少することにつながる。従って急性、亜急性の実験結果と逆の傾向を示している。

これらの結果は肺リン脂質の脂肪酸組成が NO_2 の暴露濃度、暴露期間に依存して変動することを示している。

一方 NO_2 と同じく不飽和脂肪酸と反応をし過酸化物を生成する(過酸化物の種類は NO_2 の場合と異なる)オゾンをラットに暴露した場合の肺のリン脂質の変化は、市川、横山(5, 2.5, 1, 0.5 ppmの各濃度, 1日3ないし6時間暴露で4週間, 9週間, 6ヶ月間暴露)によると²¹⁾, レシチン中のパルミチン酸の占める割合はオゾンの濃度が高まるに伴い増加し, アラキドン酸の割合は減少する。また Roehmら(1 ppm O_3 9日間)もリン脂質中のパルミチン酸の割合が増加することを報告している¹⁶⁾。

従って今回の急性暴露の結果と併せると、肺リン脂質の脂肪酸部分の二重結合と何らかの反応をうける NO_2 や O_3 を暴露すると肺のリン脂質中にはそれらと反応しない飽和脂肪酸のうちパルミチン酸が増加することが明らかとなった。従ってこのパルミチン酸の増加により、 NO_2 や O_3 による肺リン脂質の脂肪酸がニトロ過酸化や過酸化をうける割合が少なくなり一つの酸化に対する防御と関連をもつ可能性がある。このようなパルミチン酸をリン脂質中に導入しようとする動きは、岡野らにより胎生末期の胎児の肺でも観察され、肺で呼吸をはじめの際の酸化防御機構の一つとして論じられている²²⁾。一方何がパルミチン酸の割合をふやす要因となるかに関してはまだ明らかでないが、Cortesiらの¹⁴⁾オゾナイド、過酸化物が肺の脂肪酸組成を変化させるとの報告にみられるように、1.で記述した NO_2 と不飽和脂肪酸との間でおこる反応生成物が、肺の脂肪酸組成に何らかの影響を及ぼす要因となりうる。このリン脂質の不飽和脂肪酸と NO_2 の反応生成物と NO_2 暴露による肺リン脂質の脂肪酸組成の変動との関係について現在検討中である。

謝 辞

この研究を遂行するにあたり、質量分析を行って頂いた計測技術部安原昭夫氏に深く感謝する。

引 用 文 献

- 1) Wagner, H. (1970): Absorption von NO and NO_2 in MIK- and MAK-Konzentrationen bei der Inhalation. Staub-Reinhalt. Luft, 30, 380-381.
- 2) Goldstein, E., N.F. Peck, N.J. Parks, H.H. Hines, E.P. Steffey and B. Tarkington (1977): Fate and distribution of inhaled nitrogen dioxide in Rhesus monkeys. Am. Rev. Resp. Dis., 115, 403.
- 3) Arvis, M. and L. Gilles (1970): Esterification of isopropanol by nitrous oxide and nitrosyl nitrate. J. Chim. Phys. Physicochim. Biol., 67, 1538-1543.
- 4) Silverwood, R. and J.H. Thomas (1967): Reaction between methanol and nitrogen dioxide. I. Low temperature reaction and thermodynamic constants

- of methyl nitrite. *Trans. Faraday Soc.*, **63**, 2476-2479.
- 5) Langenbeck, W. and M. Richter (1956): The mechanism of Maurer oxidation. *Chem. Ber.*, **89**, 202-208.
 - 6) Fairlie, A.M., Jr., J.J. Carberry and J.C. Treacy (1953): Kinetics of the reaction between NO_2 and alcohols. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 3786-3789.
 - 7) Mathes, R.A. and F.D. Stewart (1953): Heterocyclic sulfonic acids. *U.S.* **2**, 656, 354, Oct. 20.
 - 8) Olin Mathieson Chemical Corp. (1957): N-Nitrosodimethylamine. *Brit.*, **772**, 331, Apr. 10.
 - 9) White, E.H. (1955): N-Alkyl-N-nitrosoamides. I. Method of preparation. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6008-6010.
 - 10) Stevens, T.E. (1959): Addition of dinitrogen tetroxide to camphen and trans-stilbene; The effect of oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3593-3597.
 - 11) Vasil'ev, S.V. (1955): The action of nitrogen dioxide upon erucic acid. *Tr. Mosk. Inst. Tonkoi Khim. Tekhnol. im. M.V. Lomosova*, No. 5, 50-58.
 - 12) Hollingsworth, B.L. (1959): Reaction of nitrogen dioxide with some methyl-nitroanilines. *J. Chem. Soc.*, 2420-2425.
 - 13) Thomas, H.V., P.K. Mueller and R.L. Lyman (1968): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
 - 14) Cortesi, R. and O.S. Privett (1972): Toxicity of fatty ozonides and peroxides. *Lipids*, **7**, 715-721.
 - 15) Menzel, D.B., R.J. Slaughter, A.M. Bryant and H.O. Jaurequi (1975): Heinz bodies formed in erythrocytes by fatty acid ozonides and ozone. *Arch Environ. Health*, **30**, 296-301.
 - 16) Roehm, J.N., J.G. Hadley and D.B. Menzel (1971): Antioxidants vs lung disease. *Arch. Intern. Med.*, **128**, 88-93.
 - 17) Arner, E.C. and R.A. Rhoades (1973): Long-term nitrogen dioxide exposure. *Arch Environ. Health*, **26**, 156-160.
 - 18) Morgan, T.E., A.A. Schmitz and J.R. Pelka (1966): Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, **38**, 514-515.
 - 19) Folch, J., M. Lees and G.A.S. Stanley (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
 - 20) Pitts, J.N., Jr., J.L. Sprung and H. Akimoto (1971): Nitrogen dioxide catalyzed cis-trans isomerization of cis-2-butene. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 4358-4363.
 - 21) 市川 勇・横山栄二(1974): ラット肺リン脂質構成脂肪酸組成に対する O_3 の影響. *大気汚染研究*, **9**, 331.
 - 22) Okano, G. and T. Akino (1978): Changes in the structure and metabolic heterogeneity of phosphatidylcholines in the developing rat lung. *Biochim. Biophys. Acta.*, **528**, 373-384.

致死濃度の二酸化窒素に暴露したラットの
生存時間に対する酵素誘導薬物の影響*

Effect of Enzyme-Inducing Agents on the Survival
Times of Rats Exposed to Lethal Levels of Nitrogen Dioxide*

嵯峨井 勝¹

Masaru SAGAI¹

要 旨

大気汚染物質である NO₂ 暴露に対して、致死時間を延長させ動物を保護する作用のある化学薬物の影響について検討した。実験は致死レベルの NO₂ (平均 70 ppm) にラットを暴露し、死に到るまでの生存時間を測定し比較した。

70 ppm の NO₂ に暴露した雄ラットの場合、3-メチルコランスレン (3MC)、アリルイソプロピルアセトアミド (AIA)、フェノバルビタール (PB)、およびクロルプロマジン (CPZ) の前投与はラットの生存時間を有意に延長し、特に前二者は著しい延命効果を示した。同一濃度の NO₂ に暴露した雌ラットの場合は 3MC と PB がその生存時間を有意に延長し特に前者の効果が著しかった。一方 AIA は雌において逆にその生存時間を有意に低下させる効果を示した。CPZ では雌の生存時間には影響が見られなかった。一方雌雄の Control ラットを比較すると雌のラットが雄よりも約 20% 程度長い生存時間を示し NO₂ に対する感受性が低いことが示された。

次に 3MC の投与方法の違いによる生存時間を比較したところ、20 mg 3MC / Kg 体重 / 日の連続 4 日投与群のみが有意な生存時間の延長を示し、20 mg 3MC / Kg 体重の 1 回投与や、2 mg 3MC / Kg 体重 / 日の連続 4 日投与の場合は生存時間の延長は全く認められなかった。

これらの結果から吸入された NO₂ あるいはその代謝物と前投与薬物が直接反応することによって延命効果を示したのではなく、前投与薬物が生体内の酵素系やその他の代謝系等を活性化させたことによるものであると考えられた。

* 本論文は Toxicology and Applied Pharmacology
(1978年43巻169頁)に発表したものである。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O.
Yatabe, Ibaraki, 300-21.

Abstract

A number of chemical agents have been successfully employed in protecting animals against the lethal effects of NO_2 . It was observed that 3-methylcholanthrene (3MC), allylisopropylacetamide (AIA), phenobarbital, and chlorpromazine prolonged the mean survival times during NO_2 exposure (mean 70 ppm) in male rats; 3MC and AIA were especially effective. p-Aminobenzoic acid (PABA) did not prolong the survival time. 3MC and phenobarbital also prolonged the mean survival time in female rats; 3MC was particularly effective. On the other hand, a significant shortening of survival time in female rats injected with AIA prior to NO_2 exposure was observed. Chlorpromazine and PABA did not prolong the female survival time. In addition, a significantly longer survival time in control female rats compared with control males exposed to NO_2 was observed. Male and female rats injected with 20 mg/kg of 3MC for 4 days and exposed to 87 ppm of NO_2 on Day 5 had mean survival times of 266 and 303 min, respectively, while the mean survival times of uninjected control male and female rats were 144 and 187 min, respectively. A single injection of 20 mg/kg of 3MC and multiple injections of 2 mg/kg of 3MC produced no difference in mean survival times from the control groups in both sexes. These findings suggest that the mechanism by which 3MC protects against NO_2 induced lethal pulmonary edema is mediated by the induction of enzyme systems.

はじめに

二酸化窒素 (NO_2) は最も普通にみられる大気汚染物質の一つであり、肺に対して様々な病的障害を引き起こす。¹⁾²⁾これらの病理学的知見とそれに伴う代謝的障害は肺の酵素等に対する NO_2 の作用によって生じることがある。

最近、いくつかの酵素誘導薬物がオゾンの致死レベルの暴露から動物を保護する作用のあることが報告された。これらの薬物のうちには種々のキノン類³⁾、パラアミノ安息香酸⁴⁾ (PABA), CPZ, および AIA などがある。これら薬物による保護作用はオゾン暴露前に、それぞれ 3~4 回投与した場合にのみ有効であることが報告されている (AIA のみは単回投与で有効)。これらの結果から各種の薬物がオゾンやその代謝産物等と直接反応することによって保護作用を示すのではなく、むしろその保護作用は前投与した薬物が生体内の酵素や関連中間成分を誘導増加させることにより発現するのであろうと考えられている⁵⁾。 NO_2 とオゾンの毒性には質的な違いがあると思われるので、このような酵素誘導薬物の NO_2 暴露に対する保護作用を比較研究することは意義が高いものと考えられる。

本研究では NO_2 暴露によるラットの生存時間に対する酵素誘導薬物の影響を調べた結果、酵素誘導薬物が生体の酵素や関連中間成分を誘導増加させる機序によってその保護作用を示すという間接的事実が示されたほか、雌雄間で NO_2 の毒性の強さに差があるという興味ある知見も得られた。

方 法

被検動物として6~7週令ラットの雄(124~170g)と雌(105~152g)を用い、ステンレススチールとガラスで作製した405ℓの横型チャンパーの中でNO₂暴露を行った。チャンパー内の空気は1時間に22回換気し温度は平均23℃(22~25℃)に調節した。暴露に際して、窒素バランスの0.5%NO₂ガス(約5000ppm)を、活性炭と触媒フィルターで浄化した室内空気で所定の濃度に希釈して用いた。NO₂濃度はモニターラボ・窒素酸化物分析計(Model 8440-H型)によって測定し、著者が考案し日本クレア株式会社によって作製されたガス濃度自動調節装置によって連続的にフィードバックコントロールされた。ラットの生存時間はNO₂暴露開始からラットが死亡するまでの時間を観察し、データはその平均値±標準誤差で示した。すべての実験はラットが死亡するまで連続暴露し、生存時間を求めるためのNO₂暴露(平均70ppm, Max 73ppm-Min 69.5ppm)は雄と雌について各々3回づつくり返し行った。さらに3MCの投与方法が異なる実験の場合には平均87ppm(86~89ppm)の濃度で行い2度くり返し再現性を確認した。これらのNO₂暴露の間のNO濃度はごく短時間3ppmに上昇した場合を除いては0.5ppmであった。

薬物投与の対照群としてはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)かオリーブ油を腹腔内投与した。3MCはオリーブ油に溶かし、AIA, PB, CPZ, およびPABAはPBSに溶かして腹腔内投与した。投与量は3MCは20mg/kg, PBは60mg/kg, CPZは10mg/kgおよびPABAは30mg/kgで1日1回、連続4日間投与してから5日目にNO₂に暴露した。AIAのみは200mg/kg量をNO₂暴露の100分前に投与した。

結 果

致死レベルのNO₂に暴露された雄ラットの生存時間に対する酵素誘導薬物の影響を表1に示した。雄ラットのNO₂暴露においては3MC, AIA, PBおよびCPZが平均生存時間を延長する効果を示し、そのうち3MCとAIAは特に著しい延命効果を示し、各々対照群(100%)の183%と160%に相当した。一方PABAでは全く効果がなかった。雌ラットの成績は表2に示すように3MCとPBが延命効果を示し、特に3MCは対照群の154%に相当する著しい効果を示した。しかしながら、CPZとPABAでは効果がみられなかった。AIA投与の雌ラットの場合は雄ラットの場合と異なり逆に短命効果を示した。また雌雄の対照群を比較すると、雌ラットは雄ラットよりも約23%の生存時間の延長を示し、雌が雄よりもNO₂の致死レベル暴露に対して感受性が低いことを示した。

3MCの作用機作を検討する為に3MCの投与方法をかえた場合の雌雄の生存時間の結果を表3に示した。1日目から3日目まではオリーブ油を投与し4日目に20mg/kgの3MCを投与したB

表1 平均70 ppmのNO₂に暴露された雄ラットの生存時間に対する酵素誘導薬物投与の影響

Table 1. The effects of enzyme-inducing agents on the prolongation of survival times of male rats exposed to a mean level of 70 ppm of nitrogen dioxide

Injection regimen ^a	Mean survival time (min) ^b
Control	166 ± 32 (100) ^c
3-Methylcholanthrene, 20 mg/kg	303 ± 53 ^d (183)
Allylisopropylacetamide, 200 mg/kg	266 ± 54 ^d (160)
Phenobarbital, 60 mg/kg	212 ± 35 ^e (128)
Chlorpromazine, 10 mg/kg	202 ± 34 ^f (122)
p-Aminobenzoic acid, 30 mg/kg	184 ± 31 (111)

^a Fourteen rats were employed in all groups

^b Mean ± SD

^c Number in parentheses is percentage of control (100%)

^d Difference from control group significant at p < 0.001

^e Difference from control group significant at p < 0.01

^f Difference from control group significant at p < 0.05

表2 平均70 ppmのNO₂に暴露された雌ラットの生存時間に対する酵素誘導薬物投与の影響

Table 2. The effects of enzyme-inducing agents on the prolongation of survival times of female rats exposed to a mean level of 70 ppm of nitrogen dioxide

Injection regimen ^a	Mean survival time (min) ^b
Control	204 ± 37 (100) ^c
3-Methylcholanthrene, 20 mg/kg	314 ± 84 ^d (154)
Allylisopropylacetamide, 200 mg/kg	147 ± 16 ^d (72)
Phenobarbital, 60 mg/kg	245 ± 46 ^e (120)
Chlorpromazine, 10 mg/kg	206 ± 39 (101)
p-Aminobenzoic acid, 30 mg/kg	207 ± 54 (101)

^a Fourteen rats were employed in all groups

^b Mean ± SD

^c The number in parentheses is the percentage of control (100%)

^d Difference from control group significant at p < 0.001

^e Difference from control group significant at p < 0.05

表3 3-メチルコランスレンあるいはオリーブ油を4日間腹腔内投与したあと平均87 ppm NO₂に暴露された雌雄ラットの生存時間

Table 3. Time of death of rats exposed to 87 ppm of nitrogen dioxide after four daily intraperitoneal injections of 3-methylcholanthrene or olive oil

Injection regimen	Mean survival time (min) ^a	
	Male	Female
A. Olive oil, Days 1-4 (8) ^b	144 ± 35	187 ± 20 ^c
B. Olive oil, Days 1-3; 3-MC, 20 mg/kg, 4 days (8)	142 ± 32	209 ± 32
C. 3-MC, 2 mg/kg, Days 1-4 (6)	137 ± 36	194 ± 27
D. 3-MC, 20 mg/kg, Days 1-4 (8)	266 ± 47 ^d	303 ± 33 ^e

^a Mean ± SD

^b Numbers in parentheses indicate number of rats in each group

^c Significantly different from male group A; $p < 0.05$

^d Significantly different from male group A, B, or C; $p < 0.001$

^e Significantly different from female group A, B, or C; $p < 0.001$

群および1日目から4日目まで2 mg/kgの3MCを投与したC群は雌雄ともに対照群と殆んど差がなかった。これらの結果はNO₂暴露に対する3MCの保護作用の可能性として3MC投与による酵素誘導を示唆している。

考 察

本研究において酵素誘導薬物がNO₂致死暴露に対して動物を保護し、生存時間を延長させる効果があることを見だし、特に3MCは雌雄のラットに対して顕著な延命効果を示すことが判明した。

Goldstein と Balchum⁵⁾ は、3MCはオゾン暴露ラットの生存時間には何の効果も示さないと報告しているので3MCの生存時間延長効果はNO₂とオゾンでは異なるのかもしれない。松渡ら⁶⁾は3MCの投与はラットの肝臓において脂質過酸化を低下させ、かつCyt P-450を安定化することを報告している。それ故に3MCの生存時間延長効果はNO₂毒性の一つと考えられている脂質過酸化を抑制する作用とその脂質過酸化物を代謝する機能を持つといわれているCyt P-450の安定化に関連があるのかもしれない。3MCと同様、肝臓ミクロソームのmixed function oxidase系を誘導することが知られているPBもまたNO₂暴露ラットの生存時間を延長させた。Taylor と Tappel⁷⁾はPB投与はラット肝臓における脂質過酸化を抑制し、mixed

function oxidase 系を誘導することを報告している。このことから PB による生存時間の延長効果もまた脂質過酸化を低下させる作用や mixed function oxidase 系の誘導と関連があるものと考えられる。Cyt P-450 の選択的破壊剤として知られている AIA³⁾ も雄ラットにおいては NO₂ 暴露に対する生存時間の延長効果を示したが雌ラットの場合は逆に有意に生存時間を短縮する効果を示した。このことは NO₂ 暴露に対する AIA 投与の効果が雌雄間で何らかの異なる作用機作を有する可能性を示唆している。Cyt P-450 の誘導剤として知られている CPZ⁹⁾ も雄ラットの生存時間を延長させた。Oppelt ら¹⁰⁾ は CPZ がウサギの肺の Cyt P-450 を選択的に誘導することを報告している。さらに Spirtes and Guth¹¹⁾ と Cooper and Mishima¹²⁾ らは CPZ は free radical を mask して細胞膜を安定化する作用があることを報告した。そのようなことから CPZ はオゾンの場合と同様に、NO₂ 暴露によって生じた free radical 誘導性膜障害を阻止するのかもしれない。Goldstein と Balchum⁵⁾ はオゾン暴露に対して PABA が最も強い延命効果を示したことを報告しているが、今回の NO₂ 暴露の実験では PABA は全く効果がなかった。

一方、雌ラットは雄ラットよりも NO₂ 致死暴露に対して長い生存時間を示し、雌は致死レベル暴露に対してより感受性が低いことが示された。近年、Warren と Bellward¹³⁾ は肺の mixed function oxidase (aryl hydrocarbon hydroxylase) 活性が肝の場合とは逆に雌が雄よりも顕著に高いことを報告したがこの成績と関連があるのかもしれない。

以上に述べた如く mixed function oxidase 系に影響することが知られているいくつかの酵素誘導薬物の NO₂ 暴露に対する生存時間の実験ではかならずしも一定した結果を示していないが一般に脂質酸化を低下させたり、mixed function oxidase 系を誘導したり、あるいは free radical を mask する薬物が NO₂ の致死暴露から生体を保護する効果が高いといえる。NO₂ の毒性は Thomas ら¹⁴⁾ によって、少なくともその一部は脂質酸化によるものであることが報告され、更にこの脂質過酸化物が mixed function oxidase 系の一成分である Cyt P-450 を破壊するものであることも Tappel ら¹⁵⁾ や Schacter ら¹⁶⁾ によって報告されている。

NO₂ の主要標的臓器は肺であるが、ここで引用された酵素誘導薬物の作用機作は主に肝について調べられたものであるという点を強く指摘しておかなければならない。現在のところ肺の酵素誘導に関する知見は乏しくかつ肺の酵素活性は肝に比べて極めて低い^{10,17)} ことが知られている。今後肺における酵素誘導に関する各薬物の作用をより詳しく研究する必要がありそのような研究の蓄積が NO₂ 毒性のメカニズムの解明に役立つものと思われる。

引用文献

- 1) Gray, E. (1959): Oxides of nitrogen: Their occurrence, toxicity, and hazard. Arch. Ind. Health, 19, 479-486.

- 2) McAdams, A., Jr. (1955): Bronchiolitis obliterans. *Amer. J. Med.*, **19**, 314-322.
- 3) Pagnotto, L.D. and S.S. Epstein (1969): Protection by antioxidants against ozone toxicity in mice. *Experientia*, **25**, 703.
- 4) Goldstein, B.D., M.R. Levine, R. Cuzzi-Spada, R. Cardenas, R.D. Buckley and O.J. Balchum (1972): p-Aminobenzoic acid as a protective agent in ozone toxicity. *Arch. Environ. Health*, **24**, 243-247.
- 5) Goldstein, B.D. and O.J. Balchum (1974): Modification of the response of rats to lethal levels of ozone by enzyme-inducing agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **27**, 330-335.
- 6) Hiwata, A., Y. Ichikawa, T. Yamano, M. Ichikawa and S. Ishigami (1976): Presented at 49th Annual Meeting of The Japanese Biochemical Society, September 1976, Sapporo, Japan.
- 7) Taylor, S.L. and A.L. Tappel (1976): Effect of dietary antioxidants and phenobarbital pretreatment on microsomal lipid peroxidation and activation by carbon tetrachloride. *Life Sci.*, **19**, 1151-1160.
- 8) DeMatteis, F. (1971): Loss of heme in rat liver caused by the porphyrogenic agent 2-allyl-2-isopropylacetamide. *Biochem. J.*, **124**, 767-777.
- 9) Wattenberg, L.W. and J.L. Leong (1965): Effects of phenothiazines on protective systems against polycyclic hydrocarbons. *Cancer Res.*, **25**, 365-370.
- 10) Oppelt, W.W., M. Zange, W.E. Ross and H. Remmer (1970): Comparison of microsomal drug hydroxylation in lung and liver of various species. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **1**, 43-56.
- 11) Spirtes, M.A. and P.S. Guth (1963): Effects of chlorpromazine on biological membranes, I. Chlorpromazine-induced changes in liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 37-46.
- 12) Cooper, M. and Y. Mishima (1972): Increased in vitro radiosensitivity of malignant melanoma induced by the in vivo administration of chlorpromazine. *Brit. J. Dermatol.*, **86**, 491-494.
- 13) Warren, P.M. and Bellward, G.D. (1978): Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase by 3-methylcholanthrene in liver, lung and kidney of gonadectomized and shamoperated wister rats. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2537-2541.
- 14) Thomas, H.V., P.K. Mueller and R.L. Lyman (1968): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
- 15) Tappel, A.L. and H. Zalkin (1959): Lipid peroxidation in isolated mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 326-332.
- 16) Schacter, B.A., H.S. Marver and V.A. Meyer (1972): Hemoprotein catabolism during stimulation of microsomal lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Acta*, **279**, 221.
- 17) Hook, G.E.R., J.R. Bend, D. Hoel, J.R. Fouts and T.E. Gram (1972): Preparation of lung microsomes and a comparison on the distribution of enzymes between subcellular fractions of rabbit lung and liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **182**, 474-490.

肺および赤血球のPeroxidative Metabolic Pathwayに及ぼす
二酸化窒素の影響

Effect of Nitrogen Dioxide on the Peroxidative
Metabolic Pathway in Lungs and Erythrocytes

嵯峨井 勝¹・白石不二雄¹・河田明治¹

Masaru SAGAI¹, Fujio SHIRAIISHI¹ and Meiji KAWATA¹

要 旨

ラットに0.4ppm, 1.6ppmおよび6.4ppmのNO₂を3カ月間連続暴露して肺と赤血球のPeroxidative Metabolic Pathwayに対する影響を経時的に検討した。その結果、肺のPeroxidative Metabolic Pathway酵素のうちG6PDとGSH-Reductase活性は1.6ppm以上の暴露群では対照群に対して有意に増加したが、GSH-Peroxidase活性には明瞭な変化が見られなかった。またGSH含量も1.6ppm以上では有意な増加を示した。これらの増加は4週間暴露時に最も顕著でありその後も対照群に比べて増加していたが、その割合は徐々に小さくなって行った。NO₂暴露による脂質過酸化の指標としてのTBAは8週間暴露時にのみ増加を示した。

一方、赤血球中のPeroxidative Metabolic Pathway酵素のうちG6PDについて経時的に検討したがNO₂暴露時間によって極めて複雑な経時変化をたどった。13週目についてみると、G6PDが1.6と6.4ppm群で増加し、GSH-Reductaseは1.6ppm群のみで減少し、GSH-Peroxidaseには有意な変化がなかった。また赤血球中GSH量は13週間暴露時に0.4と1.6ppm群のみで有意な増加を示した。TBA値は2週目の0.4ppm群、4週目と8週目の全暴露群で有意に低下し、13週目では逆に全暴露群で増加したが有意差を示すにはいたらなかった。また赤血球のfragilityは8週間暴露時にのみ増加した。

以上の結果より肺および血清ともにG6PDとGSH含量の増加が特徴的であったが、これらは肺や赤血球がNADPHやGSHのような還元性物質を増加させ、NO₂暴露による酸化的障害から生体を防御しようとする機構によるものと考えられる。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O. Yatabe, Ibaraki, 300-21.

Abstract

The changes of the enzyme activities of the peroxidative metabolic pathway in lungs and erythrocytes of rats exposed to NO_2 at the concentrations of 0.4, 1.6 and 6.4 ppm were examined. Activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glutathione reductase (GR) and contents of reduced glutathione (GSH) in lungs increased significantly by the exposure of 1.6 and 6.4 ppm NO_2 . These increments were most remarkable at the 4th week. However, the activity of glutathione peroxidase (GPO) in lungs was not changed at any periods. TBA reactants in lungs as a index of lipid peroxidation by NO_2 exposure raised only at the 8th week.

In erythrocytes, the activity of G6PD fluctuated drastically during the exposure. At the 13th week of the exposure, the activity of G6PD increased at the concentration of 1.6 and 6.4 ppm NO_2 , GR decreased at 1.6 ppm, and GPO did not show a significant change. The concentration of GSH increased significantly by the exposure of 1.6 and 6.4 ppm NO_2 . TBA reactants were decreased significantly in all groups at the 4th and 8th week. Fragility of erythrocytes as a index of lipid peroxidation by NO_2 exposure raised only at the 8th week.

はじめに

大気汚染物質の一つである二酸化窒素 (NO_2) の主要な標的臓器は肺であり、肺に対する NO_2 の影響を検討した報告は多い。しかしながら赤血球に対する NO_2 の影響を記載した報告は少ない。赤血球も又肺胞のガス交換面で吸入された NO_2 に暴露されているので、肺と類似の影響を受けるものと推察される。それ故、赤血球に対する NO_2 の影響を検討してみることは極めて重要な意味を持つものと考えられる。

このような観点から著者らは、特に NO_2 の酸化性あるいはフリーラジカル誘起性にもとづく生体内での過酸化物の生成あるいはその代謝に関与する酵素系に注目して、その生体影響の検討を試みた。

一般に、動物の細胞内には諸種の酸化過程と関連して非常に多種類の過酸化物の存在が知られている。この過酸化物は組織あるいは細胞に対して著しい障害作用をおよぼす物質であり^{1,2,3}、更にこのような過酸化物は NO_2 ^{4,5} やオゾン (O_3)^{6,7} 等の吸入によっても生成されることが報告されている。一方、細胞内には、これら過酸化物を解毒代謝する為の Peroxidative Metabolic Pathway (PMP) が存在し⁸、その存在は赤血球をはじめとして肺、肝、腎、脾等ほとんどすべての臓器に及んでいる。

PMPに関与する酵素である Glutathione Peroxidase (GPO), Glutathione Reductase (GR) 及び Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) の活性は NO_2 や O_3 の連続あるいは間欠暴露等によって上昇することがラット^{9,10,11} 及びマウス^{12,13} につ

いて明らかにされている。又、多くの研究者の実験結果はPMPがNO₂及びO₃の生体影響を示す感度のよい指標となり得るものであることを指摘している。このような理由から、我々はPMPへの影響を指標として、NO₂に関するこれまでの報告より低濃度かつ長期暴露によるPMPへの影響を肺と赤血球について経時的に比較検討した。特にNO₂暴露で赤血球のPMPに及ぼす影響を検出するならば、その材料採取の容易さからヒトへの影響を検討する上で大きな意味を持つものと考えられる。

方法

動物は6週令、JCL-SD系の雄ラットを用い、NO₂暴露は最長3ヶ月間の連続暴露を行った。実験はコントロール群(C)、0.4 ppm NO₂暴露群(1)、1.6 ppm NO₂暴露群(2)及び6.4 ppm NO₂暴露群(3)の4群に分けて、各群75匹、合計300匹のラットを用いた。NO₂の暴露開始後、1週間目、2週間目、4週間目、8週間目及び13週間目に各群から15匹ずつ、合計60匹を前日から約20時間絶食後、(ただし4週間目は絶食をしなかった)暴露チャンバーから取り出し、大腿動静脈からの放血によりヘパリン添加試験管に血液を採取し、さらに肺を摘出した。赤血球は氷冷放置し3時間後に生理的食塩水で2回洗浄し、水中に保存し、翌朝溶血・遠心後測定材料とした。

肺は摘出後ただちに生理的食塩水で十分洗浄後、ろ紙で水滴を除いてからスクリーンに入れ充分な窒素ガス置換後用時まで-80℃に保存した。肺からの酵素の調製は50 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)を用い窒素気流下でhomogenizeし、20% homogenateを作り300×g、10,000×g及び105,000×gの遠心分離を行い、その上清を酵素標品とした。赤血球からの酵素の調製は30倍量の20 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)で溶血後、2,000×g遠心分離を行い、その上清を酵素標品とした。

酵素活性はすべてジェムサック血清自動分析装置を用いて測定した。G'SH量の測定はBeutlerの方法¹⁴⁾により非蛋白性SHを測定し、脂質過酸化反応の目安としてのTBA値の測定は肺の場合20% homogenateの300×g遠心上清を用いて、SDS可溶化処理を含む真杉らの方法¹⁵⁾によった。

なお測定検体は、赤血球については各群とも一匹ずつ、15検体の測定を行い、肺については3匹のラットから等重量の肺をまとめてhomogenizeし、一群5検体として測定を行った。表中の値はすべて平均値±SDを示し、平均値の有意差検定はStudentのt検定によった。

結果

NO₂を暴露した各時期の体重の変化を図1に、また肺の湿重量と肺湿重量/体重を表1に示した。体重は対照群と暴露群との間に有意な差は見られず、一方体重当りの肺湿重量は各群とも週令の増加につれて減少したが、同一時期暴露した群の間で比較すると暴露群は対照群より増加し、8週間及び13

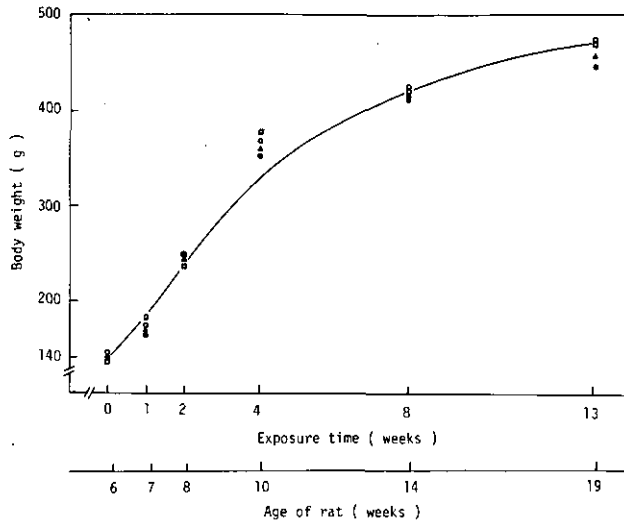


図1 NO₂ 暴露ラットの体重変化

□, 対照群; ●, 0.4 ppm 群; ○, 1.6 ppm 群; △, 6.4 ppm 群.

Fig. 1 The changes of body weight of rats exposed to nitrogen dioxide

□; Control, ●; 0.4 ppm, ○; 1.6 ppm, △; 6.4 ppm.

表1 NO₂ 暴露ラットの肺湿重量と肺湿重量/体重の変化

注. 1 各値の動物数はすべて 15 匹ずつである。

2 肺湿重量(A)は平均±SDで示した。

3 体重に対する肺湿重量比(B)は体重の平均値と肺湿重量の平均値から求めた。

4 カッコ内の数字は各暴露期間ごとの対照群を 100 とした相対比を示す

Table 1. Lung wet weight and the ratio of lung wet weight per body weight of rats exposed to NO₂

	1 w	2 w	4 w	8 w	13 w
Control	A 0.89±0.06(100) B 0.00495 (100)	1.00±0.07(100) 0.00437 (100)	1.26±0.12(100) 0.00337 (100)	1.15±0.07(100) 0.00284 (100)	1.22±0.11(100) 0.00264 (100)
0.4 ppm	A 0.91±0.06(102) B 0.00536 (108)	1.01±0.07(101) 0.00430 (98)	1.12±0.07(89) 0.00331 (98)	1.32±0.38(115) 0.00329 (116)	1.24±0.15(102) 0.00280 (106)
1.6 ppm	A 0.90±0.10(101) B 0.00517 (104)	1.02±0.07(102) 0.00434 (99)	1.16±0.06(92) 0.00320 (95)	1.24±0.12(108) 0.00304 (107)	1.33±0.13(109) 0.00285 (108)
6.4 ppm	A 0.97±0.08(109) B 0.00565 (114)	1.10±0.11(110) 0.00470 (108)	1.33±0.12(106) 0.00381 (113)	1.40±0.15(122) 0.00347 (122)	1.46±0.10(120) 0.00321 (122)

cf. 1. Sample numbers of each value are 15 (n=15).

2. Values of lung wet weight (A) are expressed as mean ± SD.

3. The ratio of lung wet weight per body weight (B) are accounted by the mean of lung wet weight and that of body weight.

4. Values in parentheses indicate the percent ratio of the control (100).

週間暴露群では、6.4 ppm群で対照群より22%増加し、肺の腫大化を示唆した。

次に肺のG6PD、GR及びGPO活性の変化を図2～4に示した。G6PD活性は2週間暴露の場合、0.4 ppm群で減少し、1.6 ppm及び6.4 ppm群では20～30%上昇した。このパターンは8週間及び13週間暴露の場合でも見られ、4週間暴露の場合はNO₂の濃度に依存して上昇するパターンを示した。GRの活性は2週間、4週間及び8週間暴露でNC₂の濃度に依存して上昇するパターンを示し、13週目ではNO₂暴露群の活性増加の割合は低下した。GPOの活性は8週間と13週間暴露の6.4 ppm群のみで有意な減少が見られたがその他では差が見られなかった。

次に肺のGSH量の変化を図5に示した。4週間暴露時のデータはないが、2週間と8週間暴露までは1.6 ppmと6.4 ppm群で著しい増加がみられ、更に13週間暴露では6.4 ppm群のみに有意な増加が観察されたが、その増加の割合は徐々に低下する傾向を示した。更に肺における解糖系の変化を調べる目的でAldolase(図6)と乳酸脱水素酵素(図7)の活性を経時的に調べたが、特に大きな変化はみられなかった。

肺での脂質過酸化反応の目安とする目的でTBA値を測定し、その結果を図8に示した。TBA値は2週と8週間暴露で0.4 ppm群と6.4 ppm群で有意な増加が見られたが、1.6 ppm群では差がなく、又13週間暴露では0.4 ppm群でのみ有意な増加を示した。しかし濃度依存性が明瞭でなく、脂質過酸化反応の上昇を明確に示すにはいたらなかった。更に脂質過酸化の指標として赤血球のFragility Testを行ったがTBA値を測定した場合と同様8週間暴露の場合でのみ差が見られた(図9)が、他の暴露時期には濃度依存性もなく明瞭な脂質過酸化の上昇を見ることは出来なかった。

次に赤血球のPMPに關与する酵素を中心とした13週間NO₂暴露の結果を表2に示した。表に示す如く、G6PDは1.6 ppm群と6.4 ppm群で小さいが有意な上昇を示した。一方、GRは肺の場合と異なり1.6 ppm群で減少変化を示したのみでGPOと同様全く変化はなかった。又赤血球中のGSH量は0.4 ppmと1.6 ppm群で有意な増加を示した。この時の血清中のTBA値は各群とも増加傾向を示したが有意差は認められなかった。

赤血球のPMP酵素の中ではG6PDのみが増加していたが、この変化は図10に示すごとく暴露時間によって減少する場合も見られ、一定の方向性をもった変化ではなかった。

最後に赤血球中のGSH量と血清中のTBA値の経時的变化を表3に示した。GSH含量は13週目でのみ、0.4と1.6 ppm群で増加したが6.4 ppm群では有意差はみられなかった。また血清中の、TBA値は4週目と8週目で0.4 ppmと1.6 ppm群で減少し6.4 ppmでは増加していた。なお、これら実験においてヘマトクリット値はいずれの場合も変化はなかった。

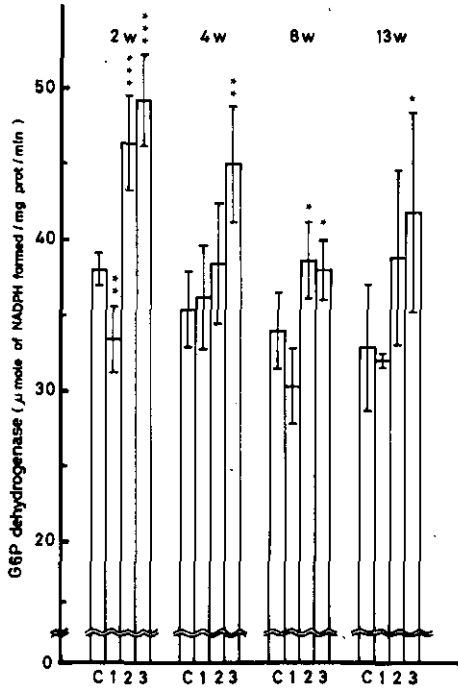


図 2

NO₂ 暴露ラットの肺グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD)活性の経時変化

C, 対照群; 1, 0.4 ppm 群; 2, 1.6 ppm 群;

3, 6.4 ppm 群.

*, P < 0.05, **, P < 0.01,

***, P < 0.001.

以下の図ではすべて同じ記号を用いる。

Fig. 2

Changes of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in lungs of rats exposed to nitrogen dioxide

C, control group (n=5); 1, 0.4 ppm group;

2, 1.6 ppm group (n=5); 3, 6.4 ppm group;

* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001;

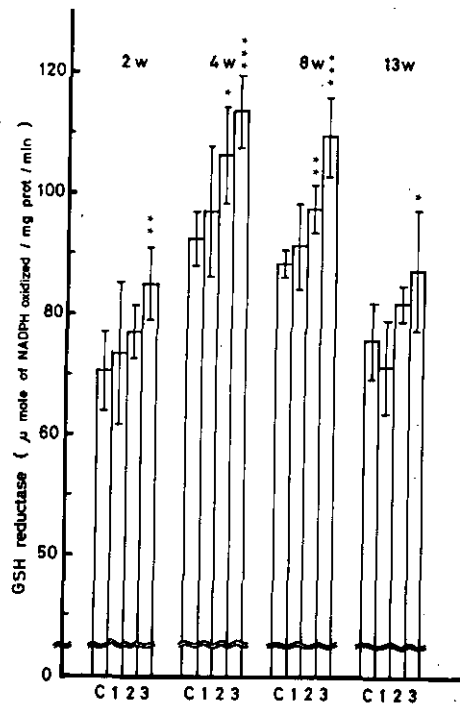
Same marks were used in all following figure.

図 3

NO₂ 暴露ラットの肺グルタチオン還元酵素(GR)活性の経時変化

Fig. 3

Changes of glutathione reductase activity in rats lung exposed to nitrogen dioxide



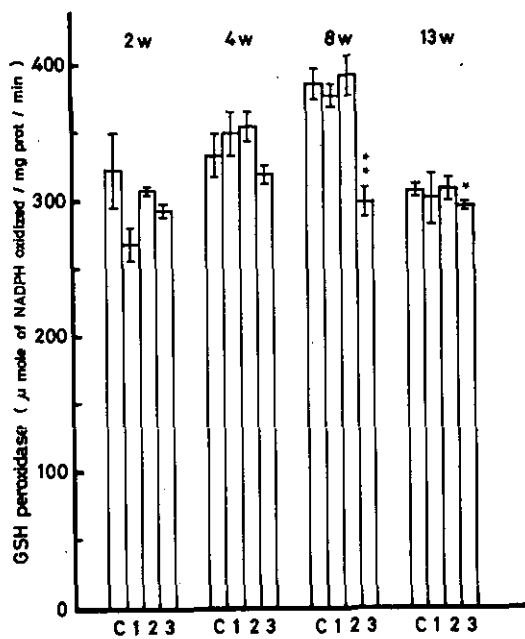


図 4

NO₂暴露ラットの肺グルタチオン・ペー
オキシダーゼ (GPO) 活性の経時変化

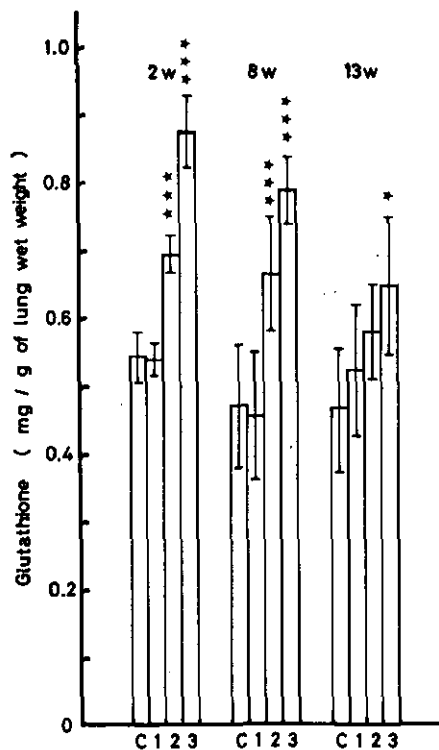
Fig. 4

Changes of glutathione peroxidase
activity in lungs of rats exposed to
nitrogen dioxide

図 5
NO₂暴露ラットの肺中還元型グルタチオン
量の経時変化

Fig. 5

Changes of reduced glutathione
concentrations in lungs of rats
exposed to nitrogen dioxide



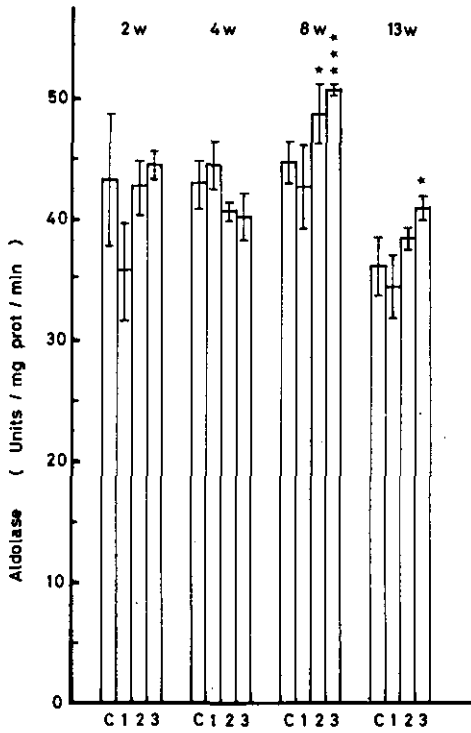
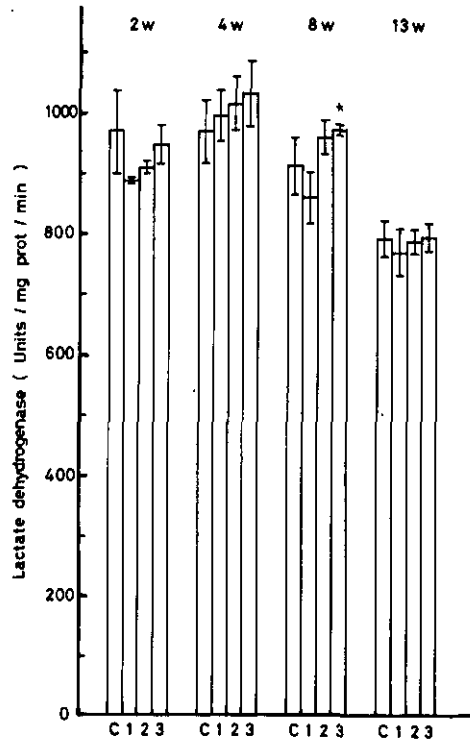


図6
 NO_2 暴露ラットの肺アルドラーゼ活性
 の経時変化

Fig. 6
 Changes of aldolase activity in lungs
 of rats exposed to nitrogen dioxide

図7
 NO_2 暴露ラットの肺乳酸脱水素酵素活性
 の経時変化

Fig. 7
 Changes of lactate dehydrogenase
 (LDH) activity in lungs of rats
 exposed to nitrogen dioxide



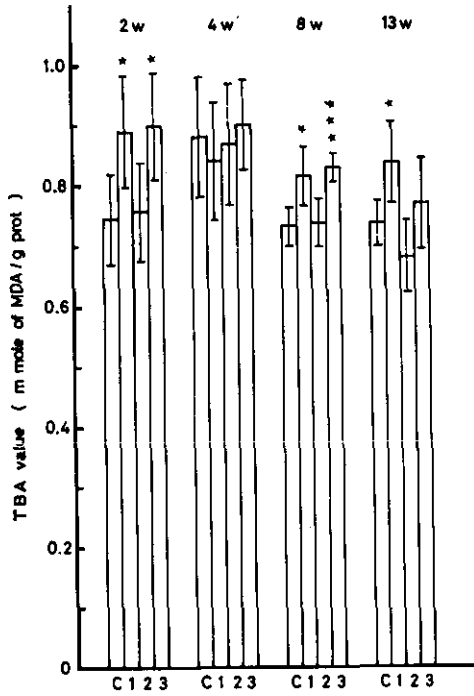


図 8

NO₂ 暴露ラットの肺中TBA値の経時変化

Fig. 8

Changes of thiobarbituric acid (TBA) values in lungs of rats exposed to nitrogen dioxide

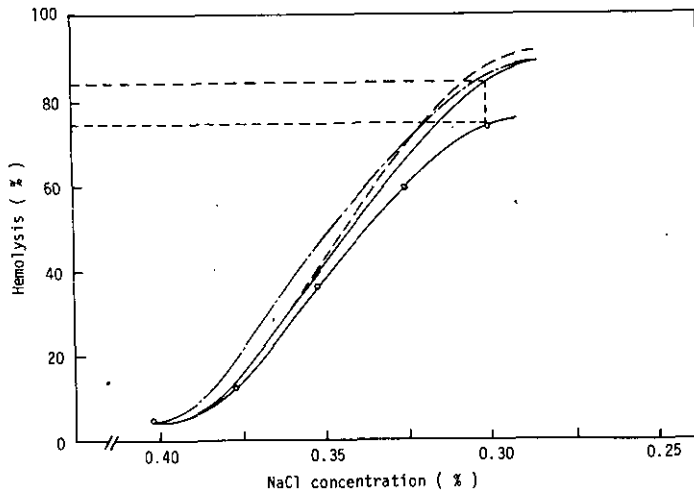


図 9 8週間NO₂暴露ラットの赤血球 fragility 曲線

—○—○—, 対照群; ——— 0.4 ppm 群; - - - - 1.6 ppm 群; - · - · 6.4 ppm 群.

Fig. 9 The changes on fragility of red blood cells of rats exposed to nitrogen dioxide for 8 weeks

—○—○— control; ——— 0.4 ppm;
- - - - 1.6 ppm; - · - · 6.4 ppm;

表2 13週間NO₂に暴露したラット赤血球中の Peroxidative metabolic pathway 関連酵素活性

* 対照群との間の有意差 (P < 0.05) を示す。

Table 2. The enzyme activities of the regarding to peroxidative metabolic pathway in erythrocytes of rats exposed to NO₂ for 13 weeks.

Items	Control	0.4 ppm.	1.6 ppm	6.4 ppm
G-6-P DH (U/mg·Hb/min)	19.97(100) ^{a)}	20.66(105)	21.79(109)*	21.62(108)*
GSH-Rase (")	2.41(100)	2.44(101)	1.93(80)*	2.22(92)
GSH-PO ase (")	416(100)	416(100)	425(102)	415(100)
LDH (")	242(100)	242(100)	252(104)	258(107)*

*: Significantly from non-exposed group, p < 0.05

a) Values in parentheses indicate the percent ratio of the control (100).

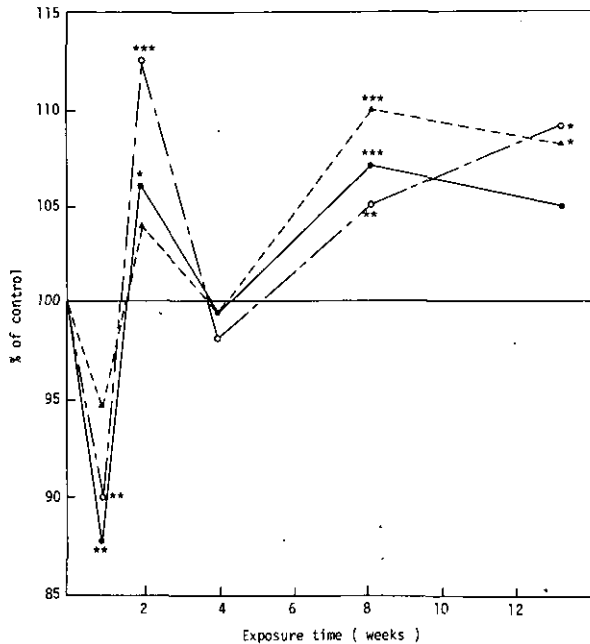


図10 NO₂ 暴露ラットの赤血球中グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 活性の経時変化
 ●— 0.4 ppm 群; ○— 1.6 ppm 群; △— 6.4 ppm 群.

Fig. 10 The changes of glucose-6-phosphate dehydrogenase in erythrocytes of rats exposed continuously to nitrogen dioxide (Enzyme activities were expressed with percent of control, 100.)
 ●— 0.4 ppm; ○— 1.6 ppm; △— 6.4 ppm:

表3 NO₂に暴露した各時期における還元型グルタチオン量とTBA値
* 対照群との間の有意差 (P < 0.05) を示す。

Table 3. GSH contents and TBA reactants in blood of rats exposed to NO₂ at various periods

	Exposure time	Control	0.4 ppm	1.6 ppm	6.4 ppm
GSH content**	2 wk	4.72 (100)	4.84 (103)	4.83 (103)	4.37 (93)
	4 wk	4.95 (100)	5.08 (103)	5.32 (107)	5.21 (105)
	8 wk	4.57 (100)	4.60 (101)	4.35 (95)	4.30 (94)
	13 wk	4.61 (100)	5.21 (116)*	5.25 (116)	4.48 (99)
TBA reactant***	2 wk	114 (100)	100 (88)*	109 (96)	121 (106)
	4 wk	115 (100)	99 (86)*	91 (79)	95 (83)*
	8 wk	121 (100)	109 (90)*	90 (74)	96 (79)*
	13 wk	111 (100)	126 (113)	136 (122)	125 (113)

*: Significantly from each non-exposed group, p < 0.05.

** : μg/g protein in blood

***: μ moles MDA/g protein in serum

考 察

生体内には諸種の酸化反応と関連して過酸化水素をはじめとする多くの過酸化物が生成されており、組織あるいは細胞に対して著しい障害を与えることが知らされている^{1,2,3)}。一方、NO₂もO₃と同様に過酸化反応(特に脂質の過酸化)を誘起するものであることがThomas⁴⁾やRoehm⁵⁾らによって報告されている。今回我々はこれまでの報告に比べてより低濃度でかつ長期のNO₂暴露により、特に肺と赤血球中のPMPに関与する酵素の活性、GSH量及び肺と血清中のTBA値の測定を通じてNO₂の亜急性影響の検討を行った。

肺のPMP及びGSH量についてはChowら¹¹⁾、あるいは深瀬ら¹³⁾の結果と同様、各暴露時期とも1.6 ppm以上の暴露群でG6PDとGRの活性の上昇及びGSH量の増加を観察した。一方、GPOの場合は8週目と13週目の6.4 ppm群の減少以外には変化はみられず、この減少も何を意味するものか現時点では不明である。

このようなことからNO₂の作用はO₃に比べて弱く、かつ各酵素活性上昇の程度もこれまでO₃について報告されている影響と比較して質的に異なっていることが認められた。更にこのことは

Chowら¹¹⁾が述べている如く、NO₂は生体内では主にGSHやNADPH等の還元性物質に作用していることを示すものかも知れない。又これらの酵素活性の上昇あるいはGSH量の増加はNO₂暴露による組織あるいは細胞障害の非常に敏感なindicatorであることも追認された。このように、PMPはNO₂暴露による *in vivo* での影響検討にとって優れたindicator であるためヒトへの応用にも役立つことが望まれる。しかしながらヒトへの応用の為には検体として血液のみに限定される困難がある。このような意味から今回赤血球中のPMP、GSH量及び血清中のTBA値の測定を行い、ヒトへの応用の可能性を検討した。その結果、赤血球中のG6PD活性とGSH量の有意な増加を認め、又8週目のように血清中の増加を認めることができた。これはPMPをindicatorとするならば血液でもNO₂の生体影響を知りうる可能性を示すものとして重要なものと考えられる。

一方これまで、赤血球についてPMPに関する変化を検討したものとしては、Chow¹⁶⁾らとBuckley¹⁷⁾らによるO₃による報告を見ることができる。Chowらは0.5 ppm、(8時間/日×7日)の条件でサルとラットについて検討し、両者共赤血球中ではPMP及びGSHの変化はなかったとして報告している(注:但し同じ論文中で肺のPMPとGSH量の上昇はラットで認めている)、一方Buckleyらは0.5 ppm O₃をヒットに2時間45分暴露してG6PDの上昇とGRの減少その他の結果を報告している。しかしながらこれまでNO₂暴露による赤血球PMPの変化を報告した例はみられていない。このような現状で今回NO₂暴露でPMPのG6PD活性とGSH量の増加を観察することができたことは大きな意味を持つものと考えられる。

謝 辞

本研究では環境生理部のすべての方々ならびに現技術部・高橋弘主任研究官らの数次にわたる御協力をいただき、特に実験動物の飼育管理については元技術部・動物専門官・寺尾恵治氏の、また3カ月にわたるNO₂ガス暴露のチャンバー運転のすべてを技術部ガス専門官・松本茂氏らの多大な御援助をいただきました。このことを記し、これらの方々から感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Slater, T.F. (1972): Free radical mechanisms in tissue injury. Pion Advanced Biochemistry Series, No. 1, Pion Limited, London, 75.
- 2) Tappel, A.L. (1975): Pathobiology of cell membranes. Ed. Trump, B.F. & Arstilia, A.U., Vol. 1, Acad. Press, New York, 145-170.
- 3) Fridovich, I. (1975): Superoxide dismutase. Annu. Rev. Biochem., 44, 147-159.
- 4) Thomas, H.V., P.K. Mueller and R.L. Lyman (1968): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. Science 159, 532-534.

- 5) Roehm, J.N., J.G. Hadley and D.B. Menzel (1971): Oxidation of unsaturated fatty acids by ozone and nitrogen dioxide: A common mechanism of action. *Arch. Environ. Health*, **23**, 142.
- 6) Goldstein, B.D. and O.J. Balchum (1967): Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **126**, 356-358.
- 7) Goldstein, B.D., C. Lodi, C. Collinson and O.J. Balchum (1969): Ozone and lipid peroxidation. *Arch. Environ. Health*, **18**, 631-635.
- 8) Gee, J.B.L., C.L. Vassallo, M.T. Voget, C. Thomas and R.E. Basford (1971): Peroxidative metabolism in alveolar macrophages. *Arch. Intern. Med.*, **127**, 1046.
- 9) Chow, C.K. and A.L. Tappel (1972): An enzyme protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone exposed rats. *Lipids*, **7**, 518-524.
- 10) Chow, C.K. and A.L. Tappel (1973): Activities of pentose shunt and glycolytic enzymes in lungs of ozone-exposed rats. *Arch. Environ. Health*, **26**, 205-208.
- 11) Chow, C.K., C.J. Dillard and A.L. Tappel (1974): Glutathione peroxidase system and lysozyme in rats exposed to ozone or nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **7**, 311.
- 12) 深瀬治, 磯村公郎, 渡辺弘 (1975) : オゾンの生体内グルタチオンに及ぼす影響。大気汚染研究, **10**, 58 - 62.
- 13) 深瀬 治・磯村公郎・渡辺 弘 (1976) : 窒素酸化物のマウス肺 Peroxidative Metabolism への影響。大気汚染研究, **11**, 65-69.
- 14) Beutler, E., M.J. Robson and E. Buttenwieser (1957): Glutathione instability of drugsensitive red cells, (a) new method for in vitro detection of drug sensitivity. *J. Lab. Clin. Med.*, **48**, 84-95.
- 15) 真杉文紀・中村哲也 (1976) : 生体膜中のマロンジアルデヒド前駆物質と加齢や薬物による変動。生化学, **48**, 420.
- 16) Chow, C.K., M.G. Mustafa, C.E. Cross and B.K. Tarkington (1975): Effects of ozone exposure on the lungs and the erythrocytes of rats and monkeys: Relative biochemical changes. *Environ. Physiol. Biochem.*, **5**, 142-146.
- 17) Buckley, R.D., J.D. Hackney, K. Clark and C. Posin (1975): Ozone and human blood. *Arch. Environ. Health*, **30**, 40-43.

血清および肺の脂質成分に及ぼす
二酸化窒素の影響
Effect of Nitrogen Dioxide on Lipid
Contents of Serum and Lungs

嵯峨井 勝¹・有川由紀子¹

Masaru SAGAI¹ and Yukiko ARIKAWA¹

要 旨

0.4ppm, 1.6ppmおよび6.4ppm NO₂ の3カ月間暴露による血清と肺の脂質成分の変化を経時的に比較検討した。その結果、血清の総脂質、トリグリセリド(TG)および総コレステロール量は1週目で増加し、2週から4週目にかけて減少し、さらに8週から13週目にかけて対照群に漸近あるいは対照群より増加する傾向を示した。特に、これらの成分のうち総コレステロールの変化が最も著しいものであった。遊離の脂肪酸とリン脂質は2~4週目にかけて急速な減少を示したが8週目から13週目にかけて対照群レベルへの復帰傾向を示した。

一方、肺の脂質成分は2週目では全体的に変化が少なく、4週目ではDose-Response関係が成り立つ明瞭な増加を示した。更に8週目では変化が小さくなり、13週目では逆に有意な減少を示した。これらの変化を経時的に比較すると血清と肺の変化はantiparallelな傾向を示しNO₂暴露は血清と肺の脂質代謝に何らかの関連ある変化を誘起することを示唆した。

以上のような結果から血清および肺の脂質成分はNO₂暴露によって単純な増加ないしは減少を示すのではなく、暴露期間の経過に伴って複雑な変化を示すものであることが判明した。このような事実によって、これまでDose-Response関係が逆転したり、相反するようにみえた従来の研究報告を統一的に理解することができる面があり、NO₂暴露の生体影響を研究する上で重要な示唆を得ることが出来た。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O. Yatabe, Ibaraki, 300-21.

Abstract

Lipid contents in lungs and sera of rats exposed continuously to NO_2 of 0.4, 1.6 and 6.4 ppm were examined during the exposure for 13 weeks. Total lipids (TL), triglyceride (TG) and total cholesterol (TCHL) in sera increased at the first week of exposure, and then decreased conversely at the second and the 4th week. Finally they gained steadily upon the control values at the 8th and the 13th week. The change of TCHL was most remarkable among them. Free fatty acids in sera decreased rapidly at the first and the second week, and then approached gradually to their control values at the 8th and the 13th week. Phospholipids changed similarly to free fatty acids at the first and the second week, and then they were kept at the lowest level.

Lipids in lungs showed small alterations at the second week of the exposure, and then increased with a clear dose-response relationship at the 4th week. The ratio of these increments were lowered at the 8th week, and then each lipid conversely decreased significantly at the 13th week. Compared the changes in sera with those in lungs during the exposure, the time courses in sera seemed to be antiparallel with that in lungs. These results suggest that the exposure of NO_2 may affect the lipid metabolism in sera and lungs.

はじめに

二酸化窒素 (NO_2) の吸入は生体内の各種の成分あるいは機能に対して様々な影響をおよぼすことが知られているが、本報告の中心である生体脂質成分やその代謝などにも様々な影響を及ぼすという報告がいくつか見られる。たとえば、1973年に Kosmider ら¹⁾ は 1 ppm の NO_2 を 1 日当り 8 時間、6 カ月間間歇暴露したモルモットの血清中の総脂質量と総コレステロール量、特にエステル型コレステロール量の増加が著しいことを報告している。一方同じ論文の中で Kosmider ら¹⁾ は 0.4 ~ 2.7 ppm の NO_2 を 1 日当り 6 ~ 8 時間、4 ~ 6 年間吸入し続けた労働者の疫学調査では血清中の総コレステロールとエステル型コレステロールの値は共に低下したという、モルモットとは逆の結果を報告している。しかし血清中の総脂質量に関してはモルモットと同様にヒトの場合も増加したという結果を得ている。また肺の総脂質量については Arner ら²⁾ がラットに 2.9 ppm の NO_2 を 9 カ月連続暴露した実験から約 8% 程度の減少を報告した。これらの結果は NO_2 暴露による脂質成分の変化は血清と肺では異なると同時に、モルモット、ラットあるいはヒトの間で、しかも NO_2 の暴露濃度と暴露期間の違いなどによって種々の異なる変化を示すものであることを示唆している。

一方、 NO_2 に暴露された肺の脂質代謝については Thomas Jr. ら³⁾ の 1970 年の報告をみるとが出来る。彼らは 5.1 ppm の NO_2 に 2 週間連続暴露したラットの肺でリン脂質中のレシチンへ

の ^{14}C -パルミチン酸の取り込みと turnover rate を測定し、 NO_2 暴露群の肺は、対照群の肺に比べて ^{14}C -パルミチン酸の取り込みが若干の増加を示すにすぎないが、turnover rate は対照群の12時間から約2倍の21時間へと顕著な遅れをみせたことを報告している。

もしこのように ^{14}C -パルミチン酸の取り込みによって示されたようにリン脂質の合成が若干増加し、turnover rate で示されたリン脂質の分解が顕著に遅れるのであれば、 NO_2 暴露によって肺の主要成分であるリン脂質の含量は著しく増加することが予想される。しかし Arner ら²⁾はむしろ総脂質量は若干低下すると報告していることから両者の間には少なからぬ矛盾があるように思われる。もしこの両者の成績が正しいとするならば肺の中のリン脂質以外のコレステロールやトリグリセライド等の主要成分のどれかが著しく減少して、総脂質としては若干減少していくという可能性が考えられる。しかし現在までそのような事実を積極的に証明する報告は見られていない。このようなことから両者の成績の違いは NO_2 の暴露濃度と暴露期間の違いによる差と考えるのが妥当のように思われる。

更にこのような矛盾した実験結果の一例としては Arner ら²⁾と Menzel ら⁴⁾の肺脂質中の脂肪酸組成に関する成績を見ることが出来る。Arner ら²⁾は前記のように2.9 ppm の NO_2 に9か月間連続暴露したラットの肺組織と肺胞洗浄液中のリン脂質の脂肪酸組成の分析の結果、いずれの場合もパルミチン酸($\text{C}_{16:0}$)やステアリン酸のような飽和脂肪酸が減少してオレイン酸($\text{C}_{18:1}$)やリノール酸($\text{C}_{18:2}$)のような不飽和脂肪酸が若干増加したと報告している。これに対して Menzel ら⁴⁾は1.0 ppm の NO_2 に1か月間連続暴露したラットの肺組織の脂肪酸組成の分析の結果から飽和脂肪酸は増加したのに対して不飽和脂肪酸は減少したという結果を報告している。

このように脂質成分に限ってみてもいまだ多くの矛盾した成績が見られている。このような成績の違いはむしろ先に述べた如く NO_2 の暴露濃度と暴露期間の違いによって生体は様々な複雑な変化を示すことによるものと考えるのが妥当かもしれない。このような観点に立てば各種の濃度の NO_2 について経時的にその影響がどのように変化するかを検討することは極めて重要と考えられる。今回は3種の異なる NO_2 濃度についてラットの血清および肺組織中の主要脂質成分の経時的变化を詳細に検討した。

方 法

動物は6週令のJCL-SD系雄ラットを用いた。 NO_2 暴露は最長3か月間の連続暴露を行い、実験は清浄空気を通気したControl群(C)、0.4 ppm NO_2 暴露群(1)、1.6 ppm NO_2 暴露群(2)及び6.4 ppm NO_2 暴露群(3)の4群に分け、各群75匹、合計300匹のラットを用いた。 NO_2 の暴露開始後、1週間目、2週間目、4週間目、8週間目および13週間目(3か月)の各群から15匹ずつ、4群の合計60匹を約20時間絶食後(ただし4週間目は絶食せず)、暴露チャンバーから取り出した。大腿動静脈からの放血により血液を採取した後1時間以内に遠心により血清を調製し

た。肺は血液採取後ただちに切除し生理食塩水で十分に洗浄後、ろ紙で水滴を除いてから保存用スクリービンに入れ十分な窒素ガス置換密封後使用時まで -80°C に保存した。肺組織の脂質成分測定には1群15匹のうち各3匹の肺を等量ずつ合せて5グループに分け、50 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)を用いて窒素気流下でテフロンホモジェナイザーでホモジェナイズし、20%ホモジェネートとし 500×10 分間の遠心分離を行いその上清を肺組織脂質成分測定用の試料とした。血清と肺のコレステロールとトリグリセライドはGemsac血清自動分析機により酵素法で測定した。血清の総脂質量(mg/dl)はTG, 総コレステロールおよびリン脂質量からCheek & Wease⁵⁾の計算式によって求めた。血清中のリン脂質量と遊離の脂肪酸量および肺のリン脂質量は和光テスト・キットにより用手法で測定した。

結果

血清中の総脂質量の経時変化を対照群を100とした相対比で図1に示した。図に示すように血清中総脂質量は NO_2 暴露後1週目では対照群に比べて8~15%の増加を示し、この増加は NO_2 の暴露濃度に依存した変化であった。2週目には各群とも逆に減少し6.4 ppm群で最も低く約30%の減少を示した、その後4週目も各群とも減少傾向をたどったが8週目および13週目では徐々に

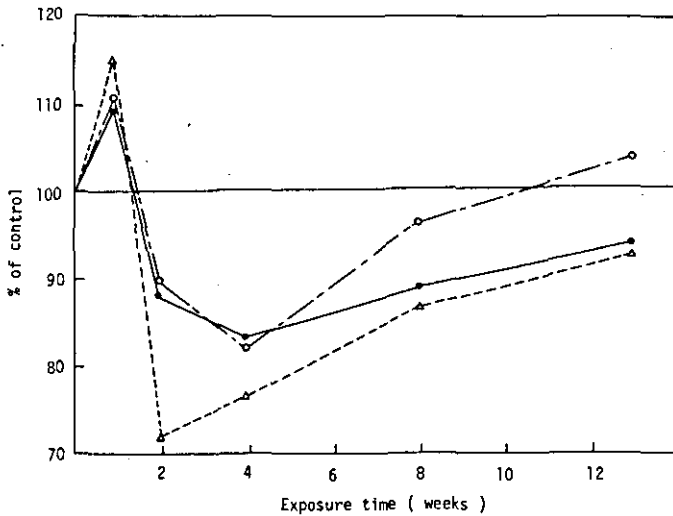


図1 NO_2 暴露ラットの血清中総脂質の経時変化
 ●, 0.4 ppm 群; ○, 1.6 ppm 群; △, 6.4 ppm 群
 図2~5も同じ記号を用いた。

Fig. 1 The changes of total lipid concentrations in serum of rats exposed to nitrogen dioxide
 ● 0.4 ppm; ○ 1.6 ppm; △ 6.4 ppm.
 Same marks were used in Fig. 2~5.

対照群に漸近あるいは増加する傾向を示した。

トリグリセライド (TG) の変化を図 2 に示したがこの変化は総脂質の変化と類似したものであった。1 週目では全く Dose - Response 関係のない増加傾向であったが 2 週目では逆に Dose - Response 関係にもとづく減少傾向を示した。4 週目では Dose - Response 関係はないが全体として減少状態を続けて、8 週目から 13 週目にかけて対照群に漸近するか 1.6 μm 群のようにさらに対照群より増加するような傾向を示した。次に血清中総コレステロールの変化は図 3 に示すように非常に大きく、1 週目では明瞭な Dose - Response 関係がみられ 1.6 および 6.4 μm 群では約 60 % の増加を示した。2 週目、4 週目では減少傾向を示し、8 週～13 週目では増加もしくは対照レベルへの漸近傾向を示した。血清中の遊離脂肪酸量の変化を図 4 に示した。2 週目から 4 週目にかけて著しい減少がみられ 8 週目から 13 週目にかけては対照値に近づいて行った。これらの変化はすべての週で明瞭な Dose - Response 関係が見られた。

リン脂質の経時変化を図 5 に示した。リン脂質の場合は 1 週目から 2 週目にかけて 10 % 前後の小さい変化であったが急速な減少を示し、その後 13 週目まで同じレベルの減少状態を保った。さ

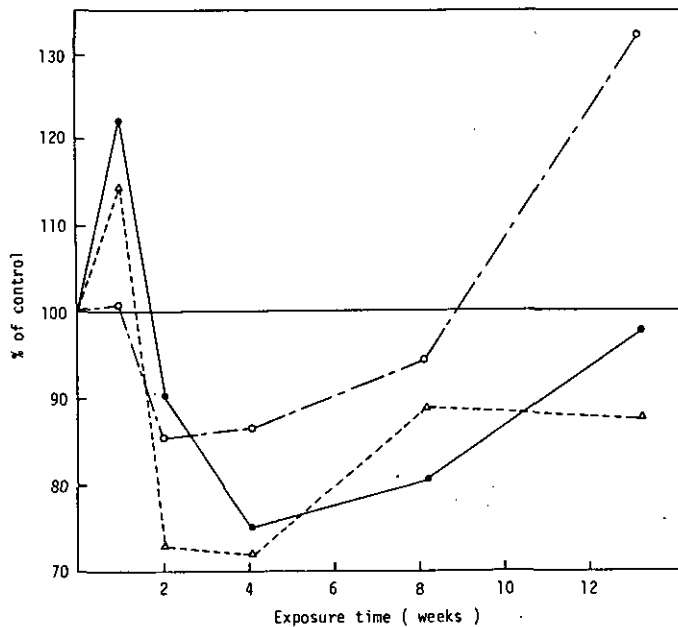


図 2 NO₂ 暴露ラットの血清中トリグリセライドの経時変化

Fig. 2 The changes of triglyceride concentrations in serum of rats exposed to nitrogen dioxide

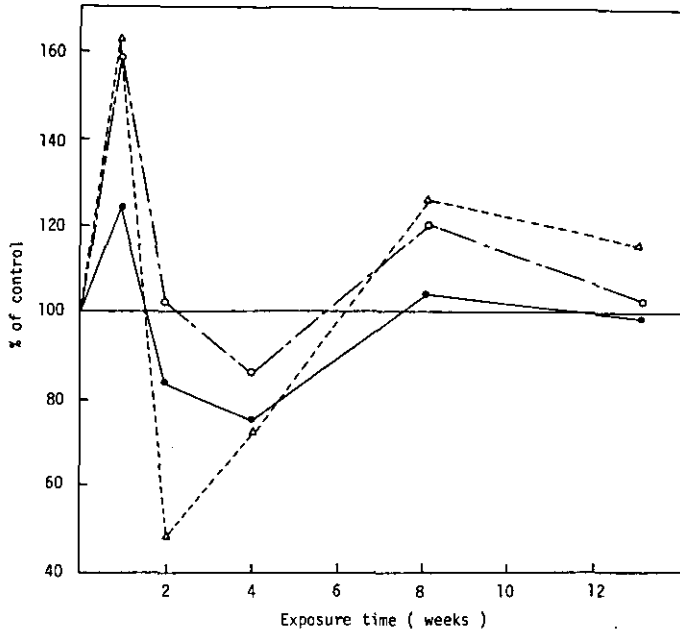


図3 NO₂ 暴露ラットの血清中総コレステロールの経時変化

Fig. 3 The changes of total cholesterol concentrations in serum of rats exposed to nitrogen dioxide

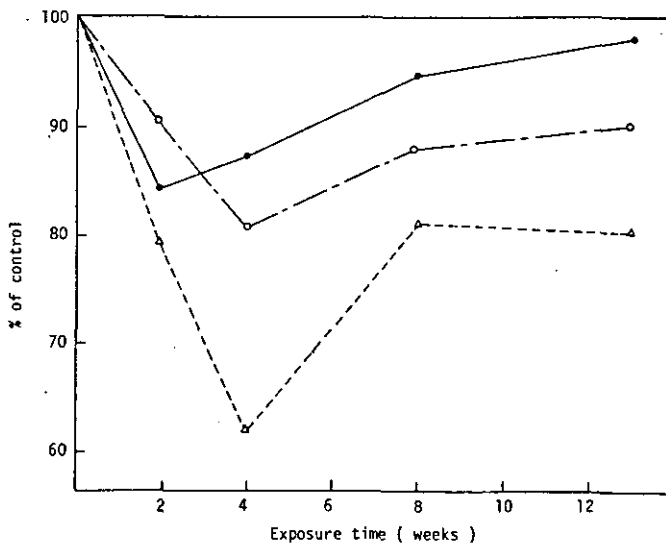


図4 NO₂ 暴露ラットの血清中遊離脂肪酸の経時変化

Fig. 4 The changes of non esterified fatty acid concentrations in serum of rats exposed to nitrogen dioxide

らにこの場合は遊離脂肪酸と同様1週目から13週目までのすべての期間で明瞭なDose-Response関係が成り立っていた。

次に肺組織のTG、総コレステロール、リン脂質およびこれら主要3成分を加算して得られた総脂質量の変化について述べる。まず肺の総脂質量の2週目以後の変化を図6に示した。2週目では6.4 ppm群が有意な増加を示したのみであるが4週目ではすべての暴露群でDose-Response関係の成り立つ増加傾向を示し、1.6 ppmおよび6.4 ppm群では有意な増加を示した。8週目になると逆に0.4 ppm群のみで有意な増加を示し、1.6 ppmおよび6.4 ppm群では対照群と同じレベルに戻った。これが13週目になると更に逆転して0.4 ppm群が対照レベルにもどり1.6 ppm群と6.4 ppm群で有意な減少を示す結果となった。またこの実験期間での対照群についてみると、ラットの週令の増加につれて総脂質量は減少してゆく傾向があり2週目(8週令)、8週目(14週令)および13週目(19週令)のラットの間にはかなり高い直線相関($r=0.651$ $P<0.05$)が存在していた。このことよりラットの肺組織の総脂質量は加齢につれて徐々にではあるが直線的に低下していくものであることを示している。TGの変化は図7のように2週目で1.6 ppm群が有意な減少を示した他は対照群との間に差は認められなかった。4週目ではすべての暴露群で増加傾向を示したが、有意な差が認められたのは6.4 ppm群のみであった。8週目では0.4 ppm群のみ有意な増加をつづけたが1.6 ppm群と6.4 ppm群ではむしろ減少傾向を示し、13週目では両群の

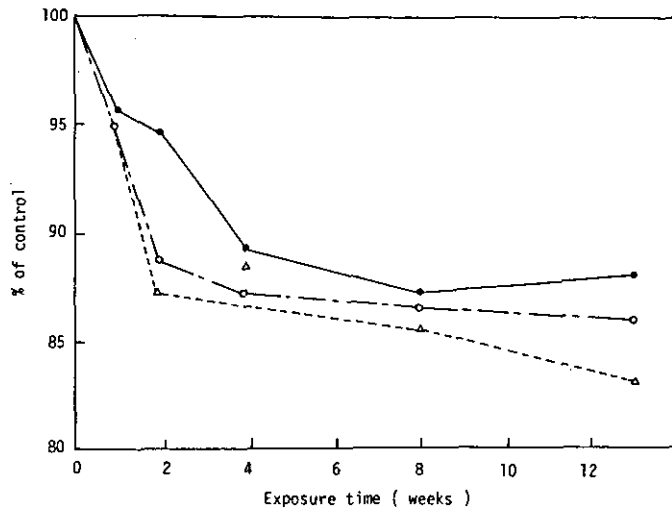


図5 NO₂暴露ラットの血清中リン脂質の経時変化

Fig. 5 The changes of phospholipid concentrations in serum of rats exposed to nitrogen dioxide

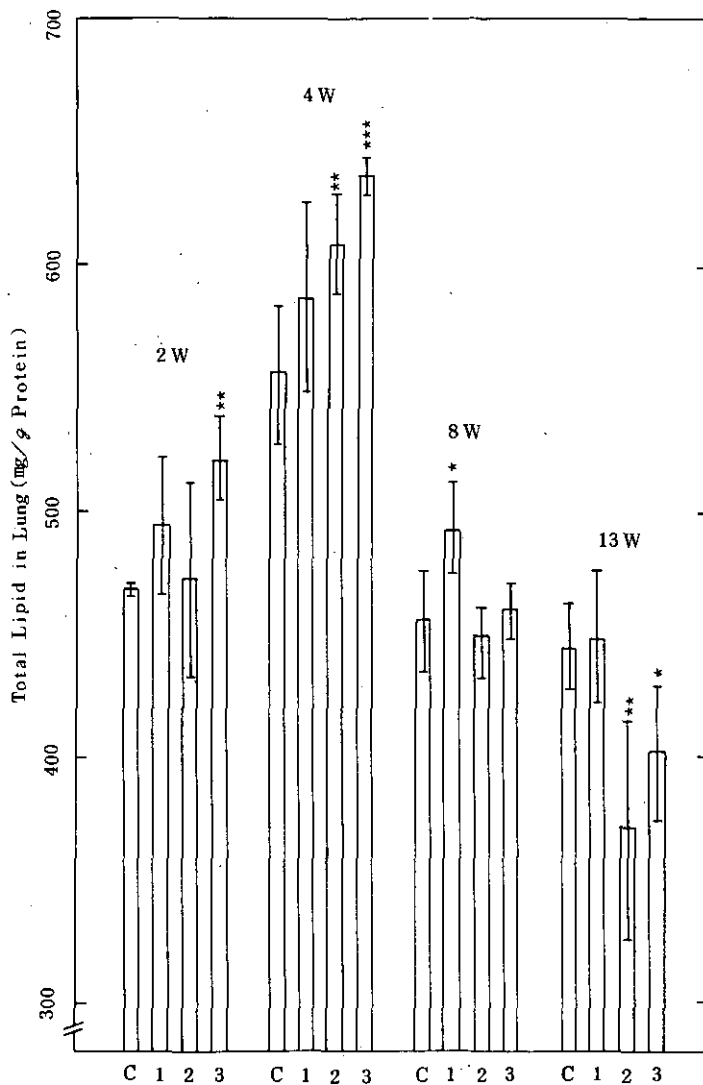


図6 NO₂ 暴露ラットの肺中総脂質の経時変化
 C, 対照群; 1. 0.4 ppm 群; 2. 1.6 ppm 群; 3. 6.4 ppm 群
 *, P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001

図7~9も同じ記号を用いた。

Fig. 6 The changes of total lipid concentrations in lungs of rats exposed to nitrogen dioxide
 C, control; 1, 0.4 ppm; 2, 1.6 ppm; 3, 6.4 ppm.
 * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.
 Same expressions were used in Fig. 7~9.

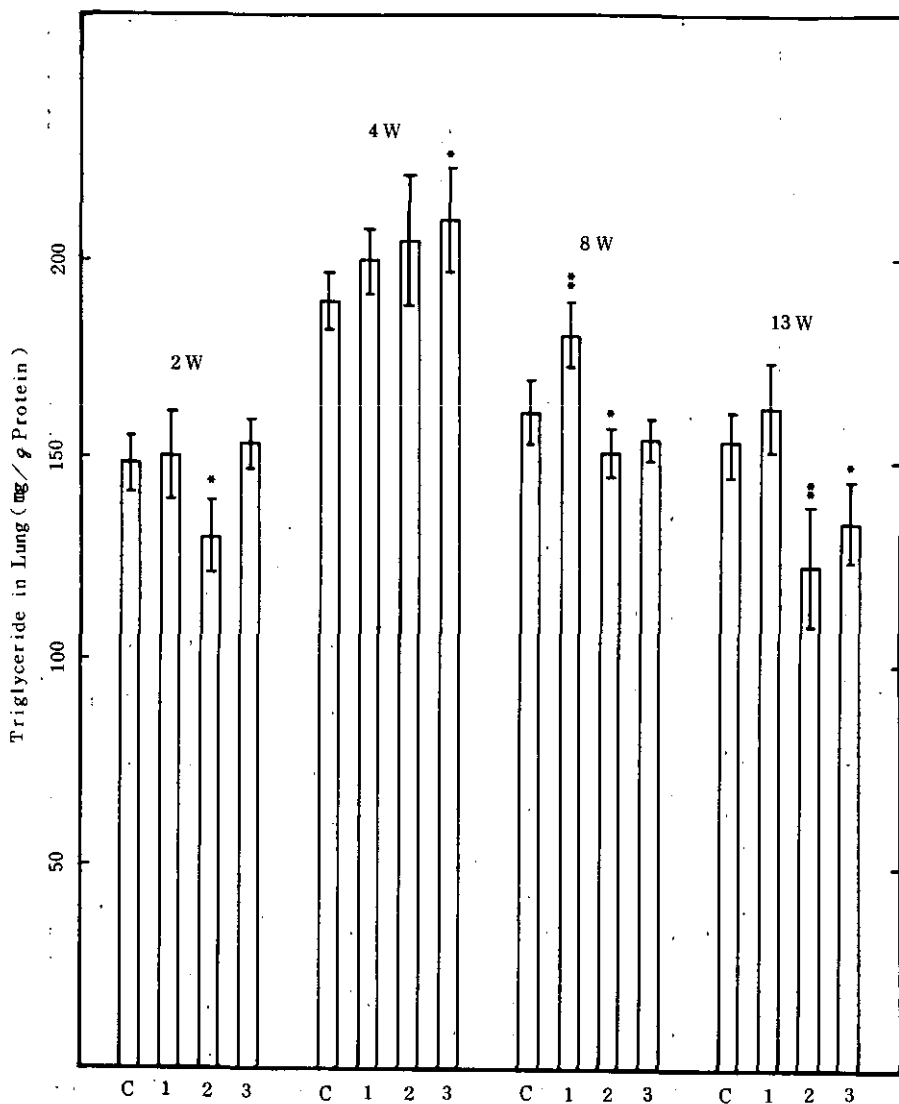


図7 NO₂ 暴露ラットの肺中トリグリセリドの経時変化

Fig. 7 The changes of triglyceride concentrations in lungs of rats exposed to nitrogen dioxide

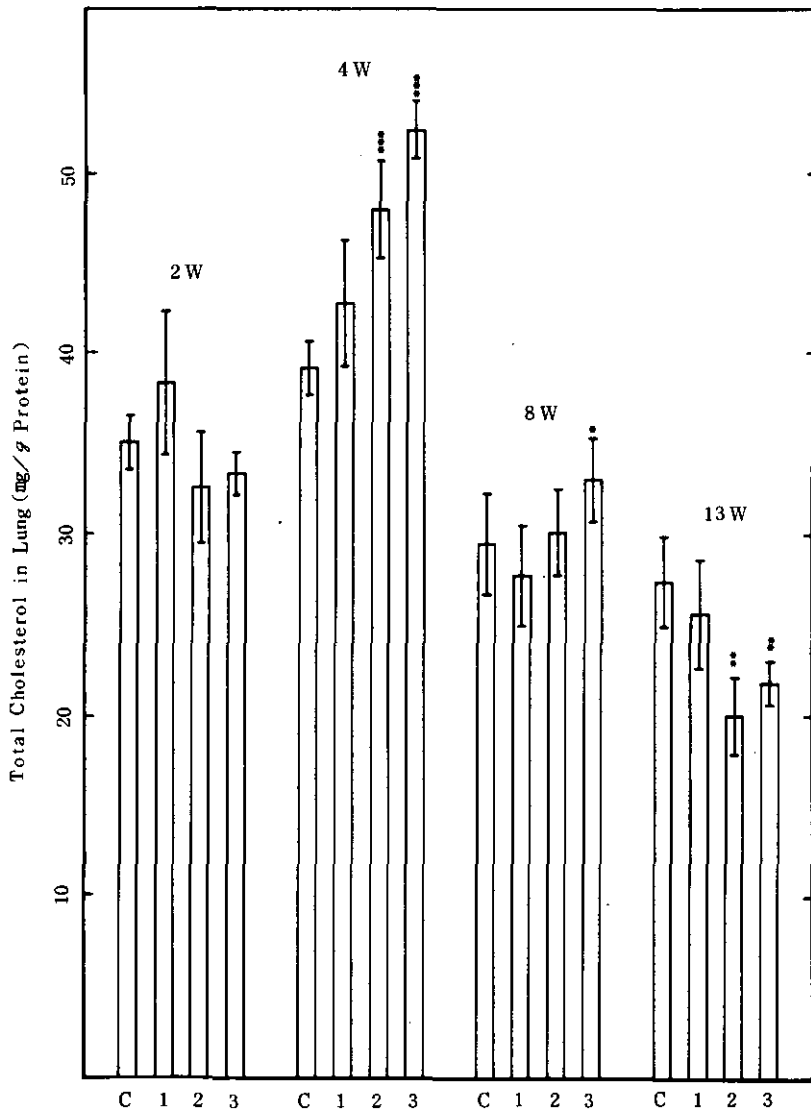


図8 NO₂暴露ラットの肺中総コレステロールの経時変化

Fig. 8 The changes of total cholesterol concentrations in lungs of rats exposed to nitrogen dioxide

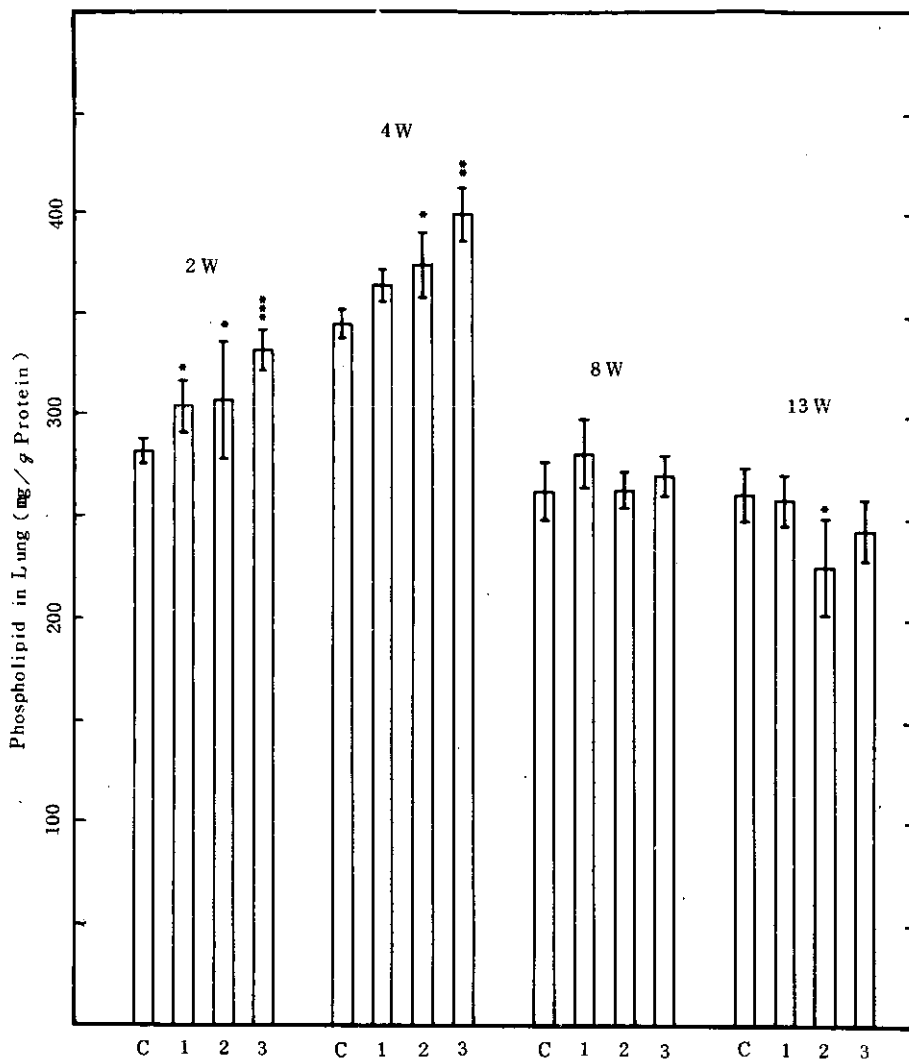


図9 NO₂暴露ラットの肺中リン脂質の経時変化

Fig. 9 The changes of phospholipid concentrations in lungs of rats exposed to nitrogen dioxide

減少は共に有意差を示すレベルに至った。肺の総コレステロール量の変化は、図 8 に示すように TG と同様に 2 週目では各群とも変化がなく、4 週目で明瞭な Dose - Response 関係のもとに増加し、1.6 ppm 群と 6.4 ppm 群では有意な増加が見られ、その増加は肺組織の脂質成分中で最も顕著なものであった。更に 8 週目ではこのような増加は 6.4 ppm 群のみで見られその増加の割合も極めて小さいものであった。その後 13 週目では各群とも逆に減少傾向を示し 1.6 ppm 群と 6.4 ppm 群では有意に減少していた。肺組織のリン脂質量の経時変化は図 9 に示したように、NO₂ 暴露後 2~4 週目では明瞭な Dose - Response 関係を持つ有意な増加傾向を示した。その後 8~13 週目では対照群と同じレベルに戻り、わずかに 13 週目の 1.6 ppm 群のみが有意な減少に転じた。

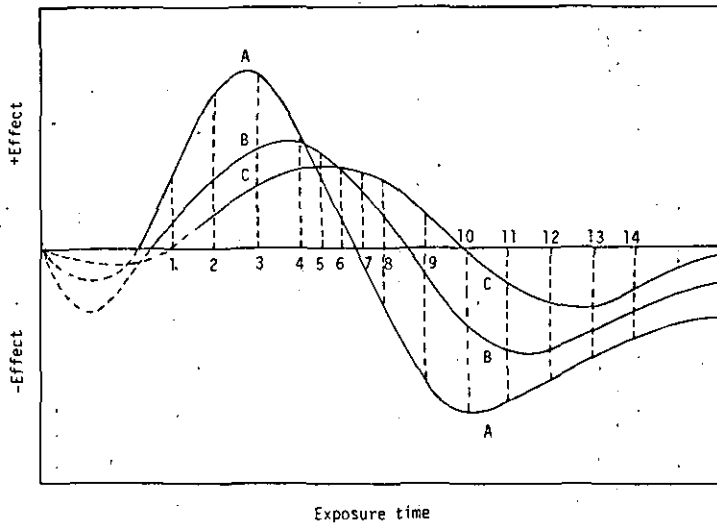


図 10 NO₂ 暴露による脂質成分の経時変化に関するモデル

A, 高濃度 NO₂; B, 中濃度 NO₂; C, 低濃度 NO₂

* 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13 と 14 ……暴露濃度と影響が量 — 効果関係が成り立っている期間。

** 5, 6, 7, 8, 9 ……暴露濃度と影響が量 — 効果関係が成り立たない期間。

Fig. 10 A model on the changes of lipid concentrations during the time of nitrogen dioxide exposure

A, high concentration; B, middle concentration; C, low concentration.

* 1, 2, 3, 4, 10, 11, 12, 13, 14 …… The regular changes on the dose-response relationship by the exposure of three doses-nitrogen dioxide

** 5, 6, 7, 8, 9 …… The irregular changes on the dose-response relationship by the expose of three doses-nitrogen dioxide.

考 察

NO₂ 暴露による生体脂質成分の変化やその代謝等に関しては既にいくつかの報告がなされているがそれらは異なったり相矛盾したりする成績であることがしばしばみられる。

今回の実験において、血清脂質成分のうち、総脂質量、TG および総コレステロールの変化はNO₂ 暴露の時間的経過にともない単純な一方向性の増加あるいは減少を示すものではなく複雑な経時変化を示すものであることが判明した。このことは生体が NO₂ 暴露という一種のストレスあるいは環境変化に適応していこうとする時の複雑な生体反応を反映しているものと考えることができる。このような理解に立つならば従来の相異なる実験成績も統一的に理解することが可能である。

Thomas Jr. らは 5.1 ppm の NO₂ を 2 週間暴露したラットで NO₂ 暴露群の肺のリン脂質合成が若干亢進し分解速度は大幅に遅れたことを報告している。このことは全体として肺のリン脂質の増加（蓄積）を引き起こすものと思われるが、今回の実験でも 2 週間 NO₂ 暴露の場合にリン脂質は全群とも対照群より有意に増加しており Thomas Jr. らの成績を支持している。

一方、Arner らは 2.9 ppm の NO₂ を 9 カ月間暴露した実験によって肺の総脂質は若干減少したと報告し、Thomas らの成績から推測される結果と矛盾しているように見えた。しかし今回の実験で肺の総脂質は 2 週目および 4 週目では増加するが、その後逆転して減少を示し 13 週目（3 カ月）では 1.6 ppm 群と 6.4 ppm 群で有意に低下することが判明した。このことから 1.6 ppm と 6.4 ppm の間にある 2.9 ppm 暴露の場合は 3 カ月以上では減少することが起こりうるので Thomas らの成績と矛盾なく説明出来よう。また 3 カ月以上の暴露ラットについて Thomas らと同様に脂質合成と分解速度を測定するならば、2 週間暴露で得られた成績とは逆の成績が得られる可能性が考えられるので興味を持たれる。

このように今回の実験から NO₂ 暴露によって生体の脂質成分は極めて複雑な経時変化を示すものであることが示唆されたことにより矛盾してみえた従来のいくつかの成績を統一的に理解することが可能となり NO₂ 暴露の生体影響を研究する上で重要な示唆を得ることが出来た。

血清中遊離脂肪酸は絶食などの場合には、糖類の供給減少に応じて貯蔵 TG からホルモン感受性リパーゼによる分解を受けて血清中に動員され著しい増加を示すことが知られている。NO₂ 暴露群ではすべての暴露時期で対照群よりもさらに減少していることから、絶食による効果とは異なる生理現象が起っていることが推察された。これは絶食とは逆に NO₂ 暴露による糖類の利用増大にともなう TG からの脂肪酸の遊離低下によるという可能性が考えられる。事実、糖類の利用増大は前報における肺の G 6 P D の上昇⁶⁾ やオゾン暴露時に解糖系あるいは五炭糖回路が活発になるという Chow と Tappel ら⁷⁾ の成績もあるのでその一つの可能性として考えられよう。これに対して血清中リン脂質量は一方向性の減少傾向を示した。しかしながら 10 ppm NO₂ 暴露の未発表実験⁸⁾ においては総脂質、トリグリセリド、総コレステロール等と極めて類似した経時変化を示したことと今回の変化はごくわずかなうえに、測定法も微妙な点がある為にこの成績は再検討する必要があると考え

られる。

肺は炭水化物代謝と同様に脂質代謝も極めて活発な組織であることが知られている。^{9) 10)} 従って NO₂ 暴露により肺の脂質成分や代謝などが相当の影響を受けることが予想される。¹¹⁾ 今回の NO₂ 暴露による肺の中の各脂質成分の経時的変化は2週目では少ないが4週目では各暴露群とも対照群に比べて増加し、8週目では再び変化がなくなり13週目に至ると逆に減少していくという極めて類似したパターンを示した。これらの結果は肺の脂質成分もまた NO₂ の暴露濃度と暴露期間によってその含有量が複雑に変化するものであることが判明した。概して、2週目以後の変化のプロセスは NO₂ 濃度が高い場合、早期(2~4週目)に増加して、後期(8~13週目)には逆に減少してゆき、低濃度暴露(0.4 ppm)の場合は変化のプロセスは同じようになるのかもしれないがその周期はやや遅れ、さらにその増減の振幅も小さいように見うけられた。このような周期変化が起こるために、時として高濃度暴露による変化が低濃度暴露による変化よりも小さかったり、Dose-Response 関係が不明瞭な成績が得られる理由であろう。このような周期変動により Dose-Response 関係が明瞭な場合と不明瞭な場合が起こることを図10にモデルとして示してみた。

今後この実験の再現性を確認すると共に、13週以後の変化をより明確にする為にさらに1~2カ月間延長した実験を行い、ライフスパンの慢性実験の成績の解釈に役立てるべき研究を進める予定である。

謝 辞

本研究では環境生理部のすべての方々、ならびに技術部・高橋弘主任研究官らの数次にわたる御協力をいただき、特に実験動物の飼育管理については元技術部・動物専門官の寺尾恵治氏の、また3カ月にわたる NO₂ ガス暴露のチャンバー運転のすべてを技術部ガス専門官の松本茂氏らの多大な御援助をいただいた。ここにこのことを記し、これらの方々から感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Kosmider, S. and A. Misiewicz (1973): Experimental and epidemiological investigations on the effect of nitrogen oxides on lipid metabolism. Intern. Arch. Arbeitsmed., **31**, 249-256.
- 2) Arner, E.C. and R.A. Rhoades (1973): Long-term nitrogen dioxide exposure. **26**, 156-160.
- 3) Thomas, T., Jr. and R.A. Rhoades (1970): ¹⁴C-1-palmitate incorporation by rat lung: effect of nitrogen dioxide. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **134**, 1181-1183.
- 4) Menzel, D.B., J.N. Roehm and S.D. Lee (1972): Vitamin E: The biological and environmental antioxidant. J. Agr. Food Chem., **20**, 481-486.

- 5) Cheek, C.S. and D.F. Wease (1969): A summation technic for serum total lipids: Comparison of methods: Clin. Chem. **15**, 102.
- 6) 嵯峨井 勝他, 本報告集 pp.135-147, 肺および赤血球のPeroxidative Metabolic Pathway に及ぼす二酸化窒素の影響.
- 7) Chow, C.K. and A.L. Tappel (1973): Activity of pentose shunt and glycolytic enzymes in lungs of ozone-exposed rats. Arch. Environ. Health, **26**, 205-208.
- 8) 嵯峨井 勝 (1979) 未発表
- 9) Felts, J.M. (1964): Biochemistry of the lung. Health physics, Pergamon Press. **10**, 973-979.
- 10) Felts, J.M. (1965): Carbohydrate and lipid metabolism of lung tissue. Med. Thorac., **22**, 89-99.
- 11) 嵯峨井 勝 (1976) : 窒素酸化物の生体への影響について, — 特に肺の脂質代謝への影響を中心として — . 公衆衛生, **40**, 483-489.

補 遺
Supplement

嵯峨井 勝¹・有川由紀子¹・松本 茂²

Masaru SAGAI¹ Yukiko ARIKAWA¹ and Shigeru MATSUMOTO²

「二酸化窒素の肺および赤血球の Peroxidative Metabolic Pathway への影響」と「二酸化窒素の血清および肺の脂質成分に及ぼす影響」の二報の実験は同時に行われたものである。この他にも同時に行った実験として次の 1.「二酸化窒素暴露の血清生化学検査成績」と 2.「二酸化窒素の肝臓および腎臓の脂質成分におよぼす影響」があるが、これらについてはそのデータのみを補遺としてここに記載した。更にこの実験の NO₂ 暴露の正確な条件を後の研究に役立てるために 3.「暴露チャンバー運転記録」を付記した。

1. 二酸化窒素を暴露したラットの血清生化学検査成績

嵯峨井 勝, 有川由紀子

一般に血清生化学検査成績は各種の疾病の場合にその障害の程度を判断する為の資料として用いられている。今回、3濃度の NO₂ 暴露実験に際して、一般的な血清生化学検査を行い本報告の結果との比較を試みた。

項目としては各種臓器や赤血球中でもみられる解糖系酵素の一種である乳酸脱水素酵素(LDH)と Aldolase, 肝臓障害の指標酵素として知られている sGOT, sGPT, 非特異的エステラーゼで各種の中毒時に変動することが知られているプソイドコリンエステラーゼおよび腎障害の場合に変動する尿素窒素について測定し、その変化を図1~6に示した。これらの変化は単純な方向性的変化ではなく暴露経過につれて極めて複雑なパターンを示した。しかし臨床的観点から見ると病的という程の変化ではなかった。

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O. Yatabe, Ibaraki, 300-21.
 2. 国立公害研究所 技術部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Engineering Division, P.O. Yatabe Ibaraki, 300-21.

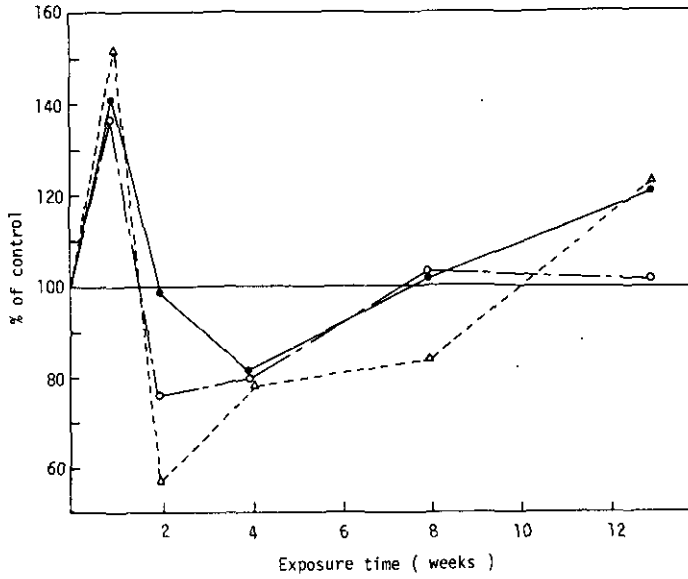


図1 NO₂ 暴露ラットの血清中 LDH 活性の変化

●; 0.4 ppm 群, ○; 1.6 ppm 群,
△; 6.4 ppm 群. 図2-6の記号も同様である。

Fig. 1 The changes of LDH activity in serum of rats exposed to NO₂

●; 0.4 ppm, ○; 1.6 ppm, △; 6.4 ppm

Same expressions were used in Fig. 2 ~ 6.

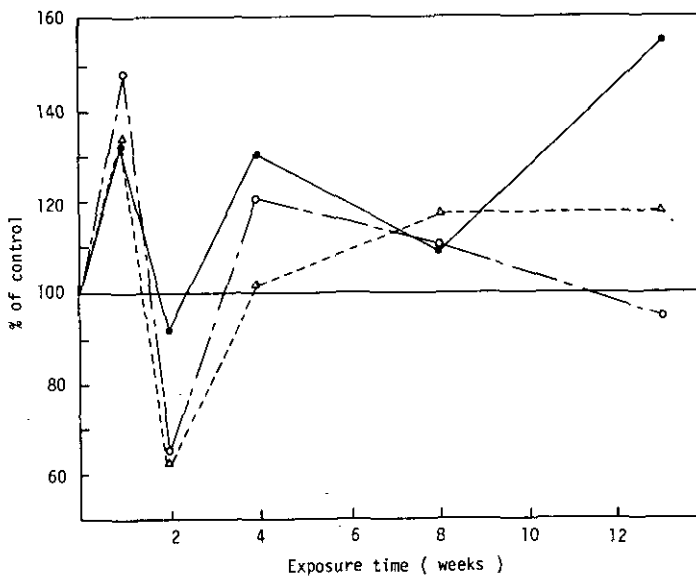


図2 NO₂ 暴露ラットの血清中 Aldolase 活性の変化

Fig. 2 The changes of Aldolase activity in serum of rats exposed to NO₂

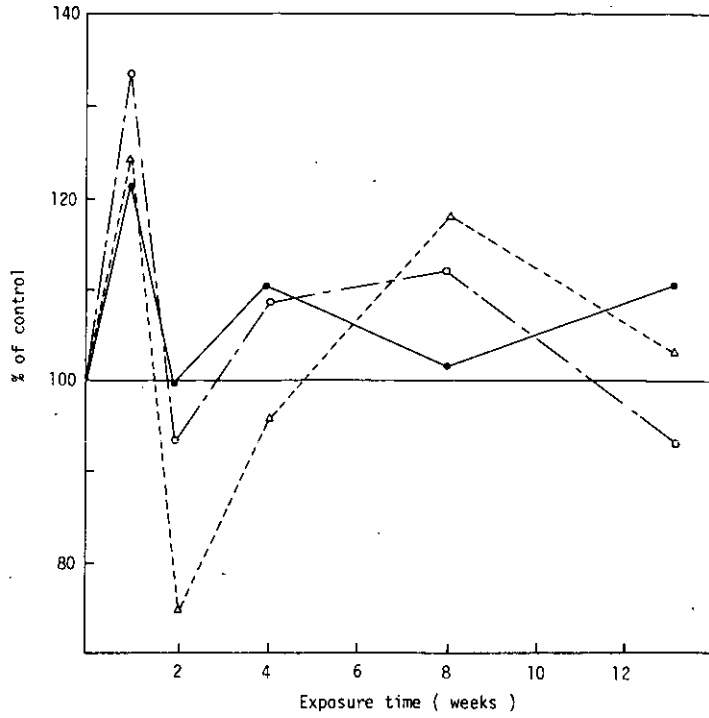


図3 NO₂ 暴露ラットの血清中 GOT 活性の変化

Fig. 3 The changes of GOT activity in serum of rats exposed to NO₂

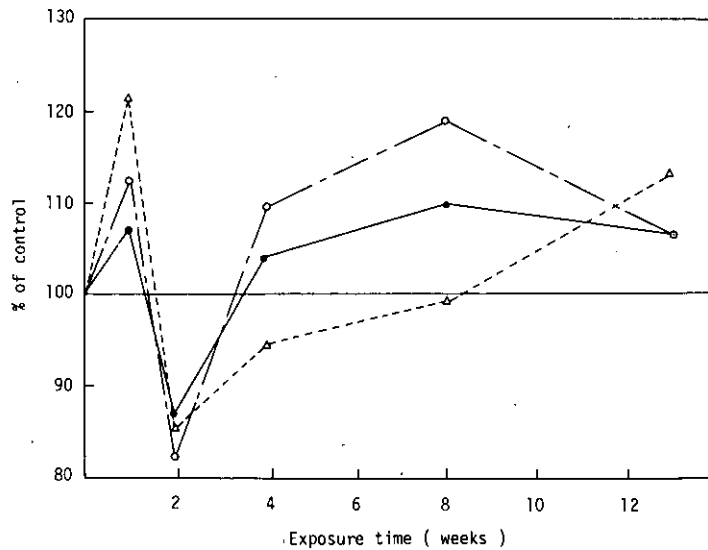


図4 NO₂ 暴露ラットの血清中 GPT 活性の変化

Fig. 4 The changes of GPT activity in serum of rats exposed to NO₂

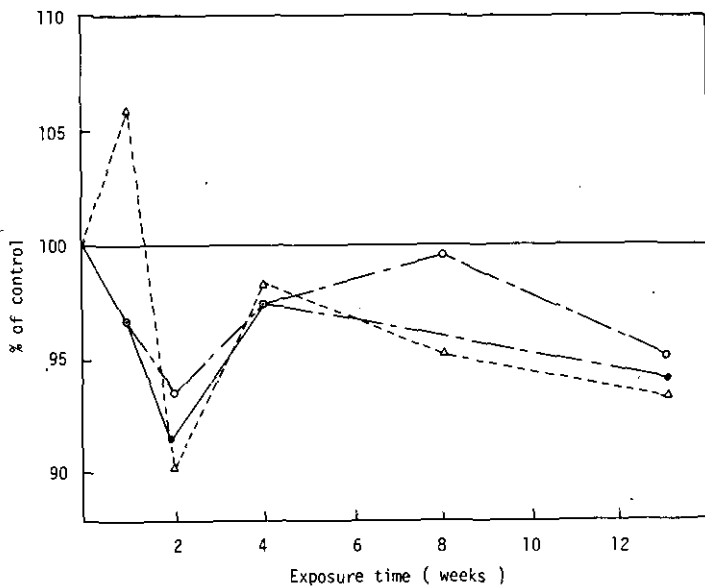


図5 NO₂ 暴露ラットの血清中 Pseudocholine Esterase 活性の変化

Fig. 5 The changes of Pseudocholine Esterase activity in serum of rats exposed to NO₂

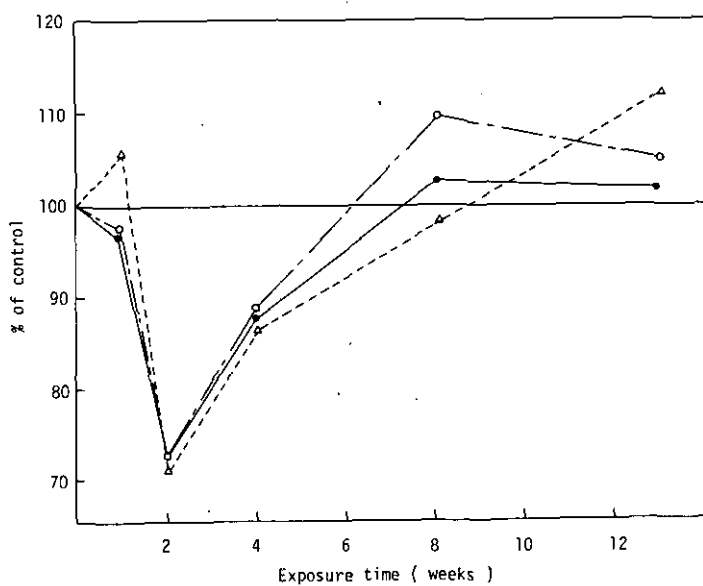


図6 NO₂ 暴露ラットの血清中尿素窒素の変化

Fig. 6 The changes of Blood Urea Nitrogen (BUN) contents in serum of rats exposed to NO₂

2. 二酸化窒素の肝臓および腎臓の脂質成分に及ぼす影響

嵯峨井 勝, 有川有紀子

この実験は先の「二酸化窒素の血清と肺の脂質成分におよぼす影響」と比較する為に実施された。その測定結果を表1～6に示した。肝臓は総コレステロール, トリグリセリド(TG), リン脂質ともに1週間暴露時にのみ1.6 ppm 群と6.4 ppm 群で有意な増加を示したがその他の暴露時には全く変化がなかった。腎臓の場合, 総コレステロールは8週目以外のすべての時期に0.4 ppm 群も含めて有意な増加を示した。TGは0.4 ppm, 6.4 ppm 群ともすべての暴露時期で有意な増加を示したが1.6 ppm 群は1週目以外では全く有意な差を示さなかった。リン脂質の場合も1週目の1.6 ppm 群以外には全く変化がみられなかった。以上の結果, NO₂ 暴露は肝よりも腎の脂質代謝に大きな影響を及ぼし, 特にコレステロールとTGでその影響が強かった。

表1 NO₂ 暴露による肝臓中総コレステロール量の変化
値は平均±SDで示した。表2～6も同じ。

Table 1. The changes of total cholesterol contents in liver of rats exposed to NO₂
The values were expressed as mean ±SD
Same expressions were used in Table 2 ~ Table 6

	1 wk	2 wk	8 wk	13 wk
Control	16.2±2.8 a)	11.5±3.5	13.6±3.4	20.3±4.3
0.4 ppm	15.1±1.2	11.9±0.5	14.2±1.2	18.7±1.2
1.6 ppm	17.5±1.6**	15.0±1.6	14.7±3.5	18.5±1.3
6.4 ppm	17.3±1.2**	14.4±2.5	13.6±3.4	18.4±2.0

a) mg/g protein, **: p < 0.01

表2 NO₂ 暴露による腎臓中総コレステロール量の変化

Table 2. The changes of total cholesterol contents in kidney of rats exposed to NO₂

	1 wk	2 wk	4 wk	8 wk	13 wk
Control	17.8±1.0 a)	24.2±0.3	16.2±1.7	29.0±1.2	24.6±2.5
0.4 ppm	16.5±4.1*	23.9±0.7	18.4±0.8*	29.3±1.4	25.9±0.6
1.6 ppm	21.2±1.5**	27.2±1.0***	19.6±0.6**	28.5±1.7	29.6±1.7**
6.4 ppm	20.6±1.1**	26.6±1.1**	18.3±2.2	27.6±0.9	28.1±1.9*

a) mg/g protein, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001

表3 NO₂ 暴露による肝臓中トリグリセリド (TG) 量の変化

Table 3. The changes of triglyceride contents in liver of rats exposed to NO₂

	1 wk	2 wk	4 wk	8 wk	13 wk
Control	91.3±4.8 a)	88.7±7.9	152±12	133±20	193±10
0.4 ppm	96.0±3.8	93.2±2.1	157±9	135±10	190±9
1.6 ppm	115.7±4.9***	82.8±3.0	142±10	107±9*	196±9
6.4 ppm	126.9±9.7***	88.0±2.6	158±8	115±5*	200±10

a) mg/g protein, *: p < 0.05, ***: p < 0.001

表4 NO₂ 暴露による腎臓中トリグリセリド (TG) 量の変化

Table 4. The changes of triglyceride contents in kidney of rats exposed to NO₂

	1 wk	4 wk	8 wk	13 wk
Control	164±11 a)	162±17	171±34	222±49
0.4 ppm	184±8*	220±3***	249±19***	322±11**
1.6 ppm	230±16***	121±42	218±33	203±37
6.4 ppm	235±14***	195±23*	272±8***	319±24**

a) mg/g protein, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001

表5 NO₂ 暴露による肝臓中リン脂質量の変化

Table 5. The changes of phospholipid contents in liver of rats exposed to NO₂

	1 wk	2 wk	4 wk	8 wk	13 wk
Control	244±10 a)	252±7	227±7	228±6	303±13
0.4 ppm	243±9	256±7	224±7	232±9	316±25
1.6 ppm	286±4***	253±9	219±9	236±12	305±9
6.4 ppm	286±11***	254±4	219±5	235±7	316±11

a) mg/g protein, ***: p < 0.001

表6 NO₂ 暴露による腎臓中リン脂質量の変化

Table 6. The changes of phospholipid contents in kidney of rats exposed to NO₂

	1 wk	2 wk	4 wk	8 wk	13 wk
Control	213±19 a)	236±6	201±14	206±11	233±11
0.4 ppm	209±26	236±4	212±8	202±10	246±4
1.6 ppm	256±12**	235±6	198±5	195±7	236±9
6.4 ppm	221±25	226±16	194±53	199±8	244±3

a) mg/g protein, **: p < 0.01

3. NO₂ 暴露チャンバー運転記録

技術部 松本 茂

本特研報告の「二酸化窒素の肺および赤血球の Peroxidative Metabolic Pathway への影響」, 「二酸化窒素の血清および肺の脂質成分に及ぼす影響」および補遺の1と2の NO₂ 暴露実験におけるガス暴露チャンバーの運転期間中の温度, 湿度, 換気回数およびチャンバー内平均風速を表7に示し, NO₂ 濃度記録と NO₂ 暴露の実施要領を図7に示した。

表7 動物施設 ASC, ASG 系暴露チャンバー運転記録

Table 7. The conditions of the chambers during NO₂ exposure

Name of Chamber*	NO ₂ (ppm)	Temperature (°C)	Humidity (%)	Air changes (times/hr)	Air flow (cm/sec)
ASC	Control	25.0±1.5	55± ⁸ / ₅	39	1.1
ASG-1	0.4	25.0±1.5	55± ⁸ / ₅	63	1.8
ASG-2	1.6	25.0±1.5	55± ⁸ / ₅	68	1.9
ASG-3	6.4	25.0±1.5	55± ⁸ / ₅	58	1.6

* Capacities of all chambers were 2,325 m³ and the flat squares were 2,325 m².

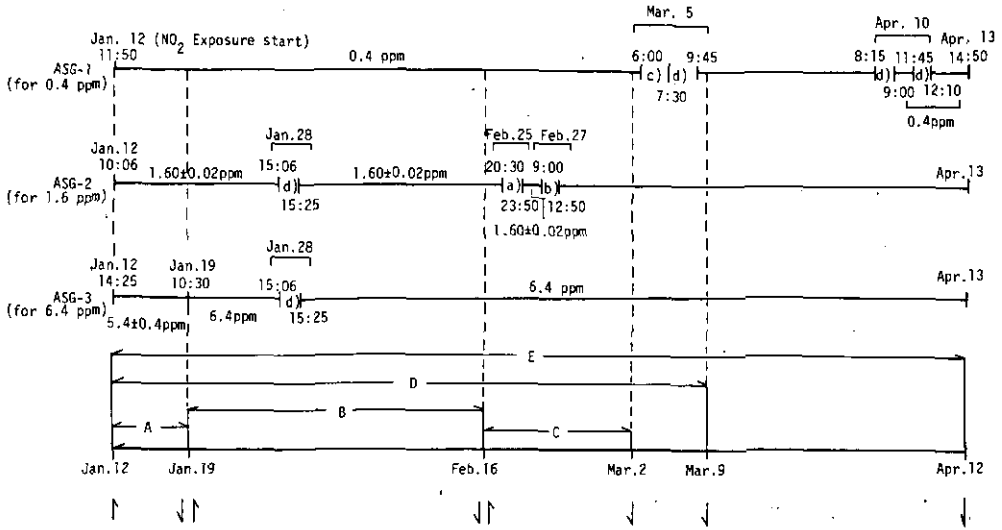


図7 NO₂ 濃度の記録

Fig. 7 Alteration of NO₂ concentration

- a) NO₂ concentration dropped slowly from 1.6 ppm to 1.0 ppm.
- b) NO₂ concentration raised slowly from 1.6 ppm to 2.4 ppm.
- c) NO₂ concentration raised slowly from 0.4 ppm to 0.55 ppm.
- d) NO₂ gas-flow stopped and it's concentration dropped to 0 ppm.
- A) The rats exposed to NO₂ for one week were holed in chamber within this period.
- B) The rats exposed to NO₂ for four weeks were holed in chamber within this period.
- C) The rats exposed to NO₂ for two weeks were holed in chamber within this period.
- D) The rats exposed to NO₂ for eight weeks were holed in chamber within this period.
- E) The rats exposed to NO₂ for thirteen weeks were holed in chamber within this period.

↑ mark shows rats chamber-in.

↓ mark shows rats chamber-out.

ラットの赤血球膜に及ぼす二酸化窒素の影響
Effect of Nitrogen Dioxide on Red Blood Cell
Membranes of Rats

彼谷邦光¹・三浦 卓¹

Kunimitsu KAYA¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

NO₂ 暴露によるラット赤血球膜構成成分の変化を調べた。4.0 ppm 10日間および107日間の暴露によって赤血球膜中のリン脂質およびコレステロール含量に著しい変化は認められなかったが、蛋白質含量は減少し、また、蛋白質組成に変化が認められた。脂質組成では Lysophosphatidylethanolamine および不飽和脂肪酸(オレイン酸, リノール酸, アラキドン酸)の増加が認められた。また中性糖脂質画分中のヘキソース含量の減少が観察された。

Abstract

Male Wistar rats were exposed to NO₂ at the concentration of 4.0 ppm for 10 days and 10 ppm for 7 days. Red blood cell membranes were prepared from red blood cells of rats exposed to NO₂. Remarkable changes were not found in the content of both phospholipids and cholesterol of red blood cell membranes during the time of exposure. On the other hand, protein content decreased with the time of exposure. Moreover, changes of protein composition were observed by employing SDS-gel electrophoreses when rats were exposed to 10 ppm NO₂. Although the amount of phospholipids did not alter, exposure of NO₂ above 10 ppm resulted in a marked increase in the contents of both lysophosphatidylethanolamine and unsaturated fatty acids by 24 hours. During the prolonged exposure of 4.0 ppm NO₂ a similar increase was detected, while a rapid decrease in hexose content was determined using the fraction of non-acidic glycolipids.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O.
Yatabe, Ibaraki, 300-21.

はじめに

種々の実験動物に数ppmの二酸化窒素(NO_2)を吸入させることによって肺に損傷が現れることが知られている^{1)~3)}。また、吸入した NO_2 の大部分は尿中に排泄されると考えられている⁴⁾。これらのことは、吸入された NO_2 が硝酸イオンまたは亜硝酸イオンの型で血液中に溶解し、尿中に排泄されていくことを示すものと考えられる。 NO_2 を暴露された動物の赤血球や血清成分に直接的であるのか間接的であるかは不明であるが、 NO_2 による影響が現れるという研究⁵⁾はこれらの考えを支持するものであろう。

このような考えをもとに我々は NO_2 を暴露したラットから赤血球膜を調製し、 NO_2 暴露が赤血球膜構成成分に与える影響を調べることによって、 NO_2 の毒性発現の機構と実験動物におよぼす NO_2 暴露の影響を生化学的に解明することを目的とした。

方 法

1. 暴露条件

Wistar JCLの雄ラット(8~14週令)を $10 \pm 0.5 \text{ ppm}$ または $4.0 \pm 0.88 \text{ ppm}$ の NO_2 で連続暴露した。対照群のラットは NO_2 暴露チャンバーと同型のチャンバーにフィルターを通した新鮮空気で暴露した。

2. 赤血球膜の調製

NO_2 暴露したラットの頸動脈から血液を採集した。採血に際してはヘパリンを用いて血液の凝固を防いだ。赤血球膜の調製はDodgeらの方法⁶⁾に順じて行った。すなわち、血液に5倍量の生理食塩水を加えて2回洗浄して赤血球を集め、これに20倍量の1mM塩化カルシウム(CaCl_2)を含んだ10mMトリスー塩酸緩衝液(pH 7.4)を加えて溶血させた。これを4℃で20,000g 20分間遠心してゴースト分画を分取し、溶血に用いた緩衝液と同じ緩衝液で3回洗浄して赤血球膜画分を得た。

3. 脂質の抽出および分析

脂質の抽出はFolchらの方法⁷⁾に従った。すなわち、赤血球膜画分に20倍量のクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)を加えて時々振とうしながら室温に3時間おいて脂質を抽出した。不溶物質を濾過し、これに1/5量の生理食塩水を加えて分配させた。二層に分離した後、下層を窒素気流下で乾固させてクロロホルムで一定量にし、リン脂質、脂肪酸およびコレステロールの分析に用いた。リン脂質組成は薄層クロマトグラフィーで分離したリン脂質を薄層クロマトグラフィープレートのまま直接デンスitomーターで測定する方法⁸⁾を用いた。

脂肪酸はガスクロマトグラフィーを用いて測定した。すなわち、脂肪酸を $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ を用いてメチルエステル⁹⁾とし、これをShimadzu GC-7AGガスクロマトグラフィーで分析した。ガスクロマトグラフィーの条件は、カラム; EX-5 (3mm×4m), カラム温度; 238℃, 試料注入口温

度；270℃，キャリアーガス；N₂，50 ml/min，検出器；FID，（H₂圧；6.0 Kg/cm²，Air；5.5 Kg/cm²）である。定量はガスクロマトグラムの各ピークの半値幅法によって行った。定性は標準品の脂肪酸メチルを用いて行った。標準品のない脂肪酸は保持時間と炭素数を片対数グラフにプロットして得られる直線から未同定脂肪酸を推定する方法，いわゆる Semi-log plot 法で推定した。

リン脂質は Harris らの方法¹⁰⁾でリンを定量した。すなわち，脂質を過塩素酸と1～2滴の硝酸を用いて分解し，これに5%のモリブデン酸アンモニウムを加えた。この溶液に亜硫酸水素ナトリウムと硫酸D-メチルアミノフェノールを加えて還元発色させてモリブデンブルーを得，これを700nmで比色定量した。

コレステロールは，Cookの方法¹¹⁾で定量した。すなわち，脂質抽出液（コレステロール0.3～0.8mgを含む）から溶媒を蒸散させ，アセトン-エタノール（1：1，v/v）混液1mlに再溶解し，50% KOH 1滴を加えて50℃，30分間ケン化した。10%酢酸で中和してからアセトン-エタノール（1：1）混液を加えて全量を2mlとし，0.1%ジギトニン溶液1mlを加え，1夜放置してステロール-ジギトニドを形成させた。ついで反応液を遠心し，沈澱を熱アセトン-水（1：1）2mlで2回遠心洗浄して過剰のジギトニンを除いた。乾燥した沈澱を2mlの水酢酸に溶解した。これにLiebermann-Burchard 試薬（無水酢酸：濃硫酸=20：1，v/v）4mlを加え，30分後に610nmの吸光度を測定した。コレステロールを基準物質として用い，これから標準線を求め，この標準線から試料中のコレステロール量を算出した。

4. 赤血球膜蛋白質のSDS-ゲル電気泳動

赤血球膜画分中の蛋白質含量はLowry法¹⁷⁾によって定量した。電気泳動は5～8mg/mlの蛋白質を含む赤血球膜標品50μlに等容の2% SDS，2%メルカプトエタノール，2mg% マラカイトグリーン，および8M尿素を含む20mMリン酸緩衝液（pH 7.25）を加え，45度で60分間インキュベーションを行い，30μg蛋白質相当量を用いてSDS-ゲル電気泳動¹⁸⁾を行った。ゲル濃度は5%を用い，15cmのガラス管で一本当たり6mAの電流を流し室温下6時間泳動を行った。泳動後，ゲルを試験管に移し，7%酢酸と9%メタノールを含む0.05%クーマシーブリアントブルーで一晩染色をした。染色後アト-製脱色槽で脱色し，ヘレナ研究所製クイックスキャンで750nmのフィルターを用い赤血球膜蛋白質の泳動像をえた。

5. 赤血球膜中性糖脂質画分の調製と糖含量の測定

赤血球膜標品2～3mlに20倍量のクロロホルム-メタノール（2：1，v/v）を加え，室温下で一夜抽出を行った。この脂質抽出液より残渣を除いた後，Ledeenらの方法¹²⁾によって中性糖脂質画分を調製した。すなわち，脂質抽出液にメタノールと蒸留水を加えてメタノール，クロロホルム，水の割合を60：30：8とし，予め同じ溶媒で平衡にしたDEAE-Sephadex A 25のカラム（1×7cm）に通した。さらに20mlの同じ溶媒で脂質を溶出した。得られた溶出液をロー

タリーエバポレーターで濃縮乾固した。乾固した脂質成分はアセトンで3回洗滌して中性脂質を除去した後、少量のクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)に溶解した。この脂質溶液をスクリーキャップ付試験管に移し、窒素ガス気流下で乾固後クロロホルム、水、メタノール性カ性ソーダを0.16, 0.13, 2.5 ml加え40°Cで2時間加水分解¹³⁾を行った。この溶液から脱塩するために2N塩酸で中和し、クロロホルムを1.5 ml加えてから Wuthier の方法¹⁴⁾によって Sephadex G25 のカラムにかけた。予めクロロホルム-メタノール-水(3:48:47, v/v)で平衡にした Sephadex G25 のカラムに上記の脂質溶液を添加し、70 mlのクロロホルム-メタノール-水(86:14:1, v/v)で溶出した。溶出液はロータリーエバポレーターで乾固し薄層クロマトグラフィーによる中性糖脂質の定性および糖の定量のために用いた。中性糖脂質画分中の糖含量は Sweeley & Kinsky の方法¹⁵⁾によってメタノリシスし、Roe のアンスロン法¹⁶⁾によってブドウ糖を基準として定量した。1~2 mlの赤血球膜標品から得た中性糖脂質画分を0.8 mlのクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)に溶解し、21 μlの濃塩酸を加えて60°C, 1.5時間加水分解を行った。加水分解液に0.16 mlの水を加えて Folch の分配¹⁷⁾を行って上層0.25 mlに2.5 mlのアンスロン試薬を加え630 nmの吸光度を測定して糖の量を求めた。

結果

1. 赤血球膜蛋白質組成の変化

10 ppmのNO₂を暴露したラットから調製した赤血球膜中の蛋白質、リン脂質およびコレステロールの含量を調べると図1に示したようになる。1.0 ppmのNO₂を7日間暴露した場合、リン

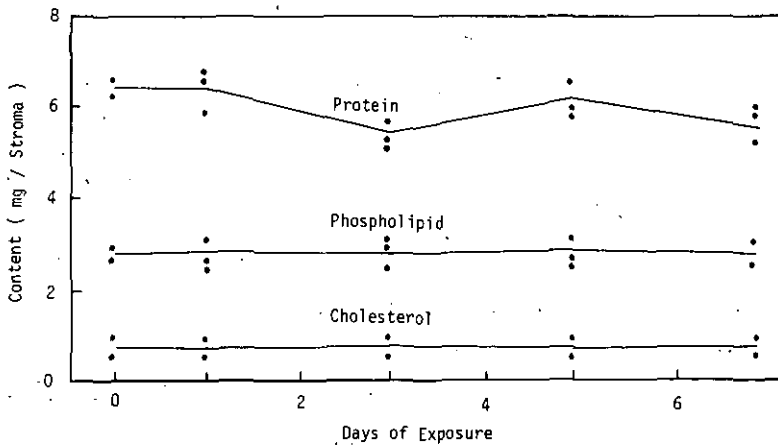


図1 赤血球膜成分におよぼす10 ppm NO₂暴露の影響

Fig. 1 Effects of 10 ppm-NO₂ exposure on components of red blood cell membranes

脂質およびコレステロールの含量は7日目まで一定の値を示していたが、蛋白質含量は3日目で減少することが認められた。以後5日目で3日目にくらべ増加の傾向を示し、7日目で再び3日目と同じレベルに減少すると云うパターンを示した。SDS-ゲル電気泳動で赤血球膜蛋白質の組成を調べると、3日目でその組成に変化が起こることが認められた。図2に示したようにバンド1、バンド3およびバンド11が顕著に減少しているのが認められた。これらの変化は7日目まで認められた。また、7日目にはバンド5が新に増加しているのが認められた。

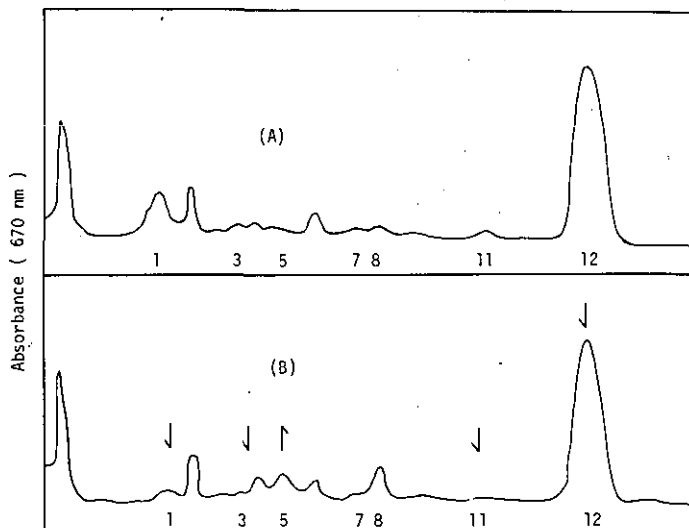


図2 赤血球膜蛋白質の SDS-ゲル電気泳動図
(A) 対照 (B) 10ppm NO₂ 7日間暴露

Fig. 2 Typical profiles of SDS-gel electrophoreses of red cell membrane proteins
(A); Control, (B); 10 ppm NO₂ for 7 days.

2. 赤血球膜のリン脂質組成の変化

薄層クロマトグラムから直接リン脂質組成を求める方法を用いてラットの赤血球膜中のリン脂質組成を調べると、ラットの赤血球膜中の主要リン脂質は Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylcholine (PC), Sphingomyeline (SPH), および Phosphatidylserine (PS) であり、その他少量の Lysophosphatidylethanolamine (LPE), Phosphatidic acid (PA) および Lysophosphatidylcholine (LPC) が存在していた。種々の濃度の NO₂ を 24 時間暴露したラットの赤血球膜では主要リン脂質である PE, PC, SPH および PS にあまり変化が認められなかったが、微量成分中の LPE は NO₂ の濃度の上昇に伴って増加することが認められた。対照群の

ラットの赤血球膜中にはLPEが全リン脂質の約1%含まれているが、NO₂の濃度を10および20ppmにして暴露するとLPEの値は3.3および4.0%に増加した(図3)。10ppm NO₂を7日間暴露した場合LPEの含量は1日目で増加し、3日目で一度減少した後7日目まで増加するというパターンを示した(図4)。7日目ではLPEの含量が対照群の3.9倍にまで達した。これと同様のパターンは4.0ppmのNO₂を10日間暴露した場合にも認められた(図5)。4.0ppmの場合には、1日目では対照群とほぼ同じ値を示し、3日目で対照群の値以下の0.3%という低い値を示した後、5日目に2.4%に達した。以後10日目まで2.4%前後の値を維持していた。

NO₂の24時間暴露では主要リン脂質の組成に大きな変化は認められなかったが、暴露時間を延長することによってPEの量に若干の変化が生ずることを認めた。10ppmのNO₂暴露の場合には3日目からPEが減少しはじめ、7日目まで減少が続いた。7日目では対照群にくらべて2.4%減少していた(図6)。一方、4.0ppmのNO₂暴露の場合には1日目から5日目まで対照群より低い値を示していたが、7日目からPEが増加し、10日目まで増加の傾向が認められた(図7)。このようにPEの量的変動は10ppmと4.0ppmとでは違った傾向を示していた。

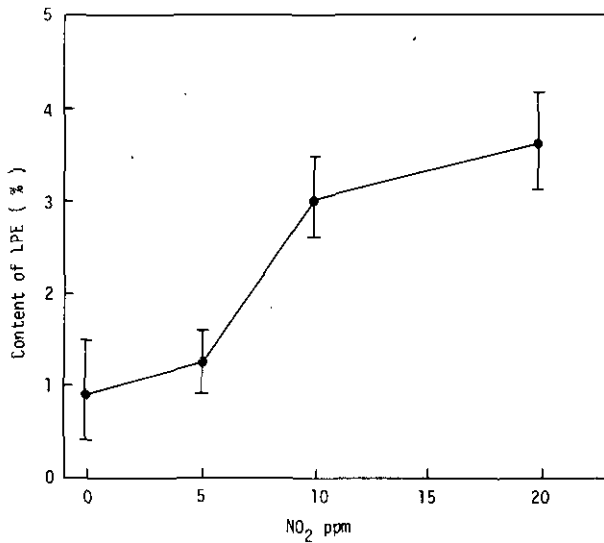


図3 NO₂暴露によるリゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)含量の変化

Fig. 3 Changes in content of lysophosphatidylethanolamine (LPE) during exposure of NO₂

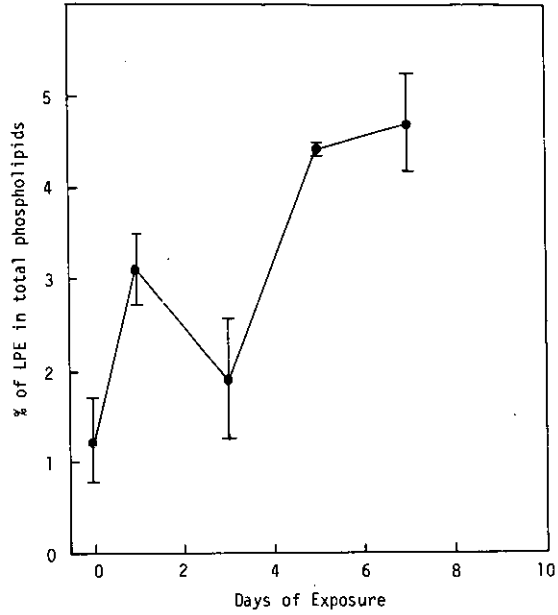


図4 10 ppm NO₂ 暴露によるリゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) 含量の変化

Fig. 4 Changes in content of lysophosphatidylethanolamine during exposure of 10 ppm NO₂

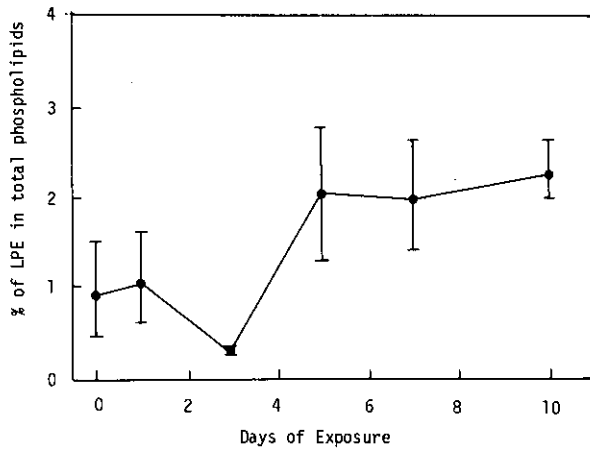


図5 4.0 ppm NO₂ 暴露によるリゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) 含量の変化

Fig. 5 Changes in content of lysophosphatidylethanolamine during exposure of 4.0 ppm NO₂

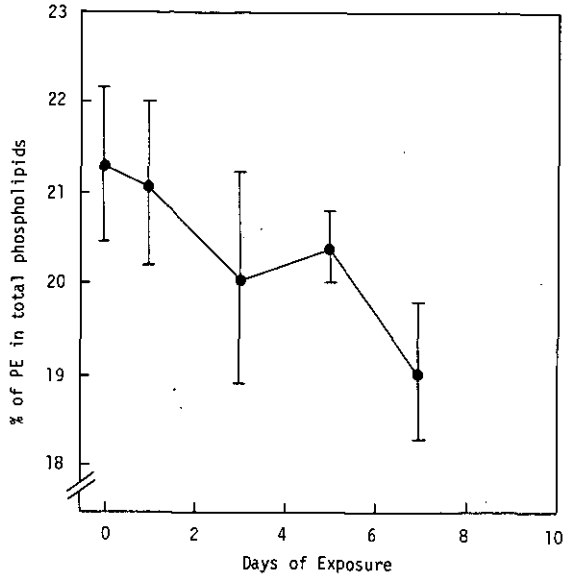


図6 10 ppm NO₂ 暴露によるホスファチジルエタノールアミン含量の変化

Fig. 6 Changes in content of phosphatidylethanolamine during exposure of 10 ppm NO₂

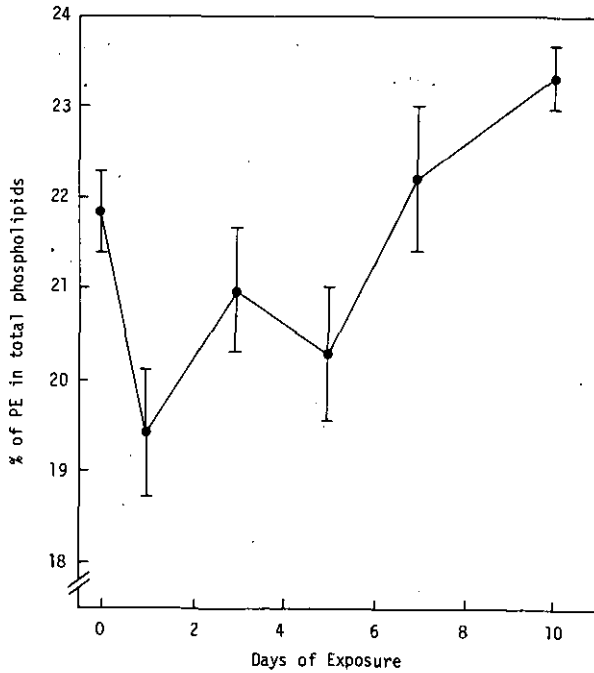


図7 4.0 ppm NO₂ 暴露によるホスファチジルエタノールアミン含量の変化

Fig. 7 Changes in content of phosphatidylethanolamine during exposure of 4.0 ppm NO₂

3. 脂肪酸組成の変化

赤血球膜の脂質を構成している脂肪酸を調べてみると、その組成に変化が起きていることが明らかとなった。図8に対照群の脂肪酸のガスクロマトグラムを図9に NO_2 を暴露したラットの赤血球膜の脂肪酸のガスクロマトグラムを示した。不飽和脂肪酸は全脂肪酸の約40%を占め、その分子種はオレイン酸(C_{18}^1)、リノール酸(C_{18}^2)およびアラキドン酸(C_{20}^4)が大部分であった。 NO_2 暴露によって全脂肪酸中で占める不飽和脂肪酸の割合に変化が生ずることを認めた。10ppm暴露の場合には3日目に極小値が出現し、以後しだいに増加し、7日目に対照群より3.2%の増加となった(図10)。4.0ppm暴露の場合には5日目に極小値が出現した後10日目まで増加し、10日目では対照群に比べ約7%の増加となった(図11)。極小値出現の時間は10ppmで3日目、4.0ppmで5日目であり、 NO_2 濃度との間に相関があるように思われる。

4. 中性糖脂質画分の糖含量の変化

NO_2 暴露による赤血球膜の中性糖脂質画分の糖含量の変化をしらべた。結果を図12に示した。4.0ppmの NO_2 暴露によって中性糖脂質画分中のヘキソース含量が暴露3日目で対照群の62%に減少し、10日目まで62%前後の値を示していた。

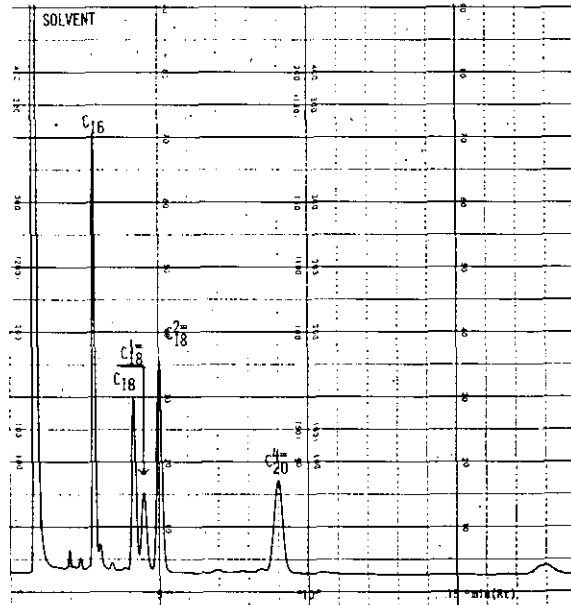


図8 ラット赤血球膜脂肪酸のガスクロマトグラム

Fig. 8 Gas chromatogram of fatty acids of red blood cell membrane of rats

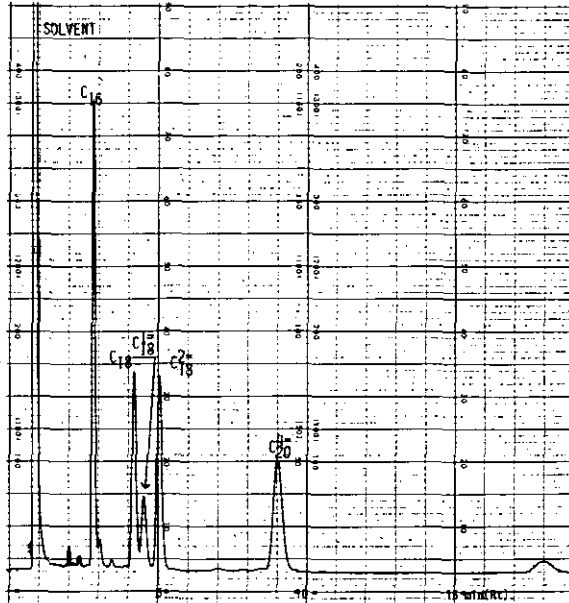


図9 NO₂ 暴露したラットの赤血球膜脂肪酸のガスクロマトグラム
NO₂ ; 4.0 ppm 7日間

Fig. 9 Gas chromatogram of fatty acids of red blood cell membrane of NO₂-exposed rats
NO₂ ; 4.0 ppm for 7 days.

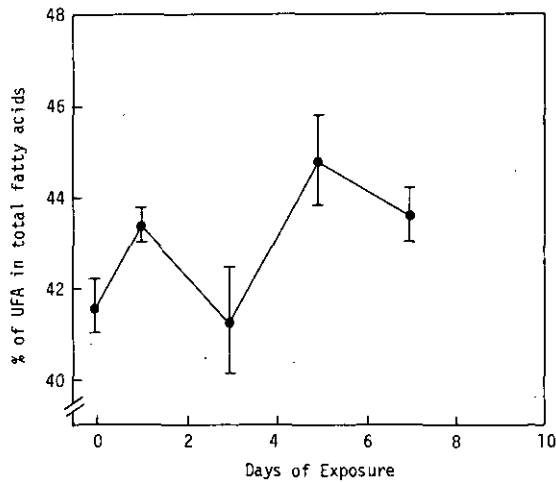


図10 10 ppm NO₂ 暴露による不飽和脂肪酸含量の変化

Fig. 10 Changes in content of unsaturated fatty acids during exposure of 10 ppm NO₂

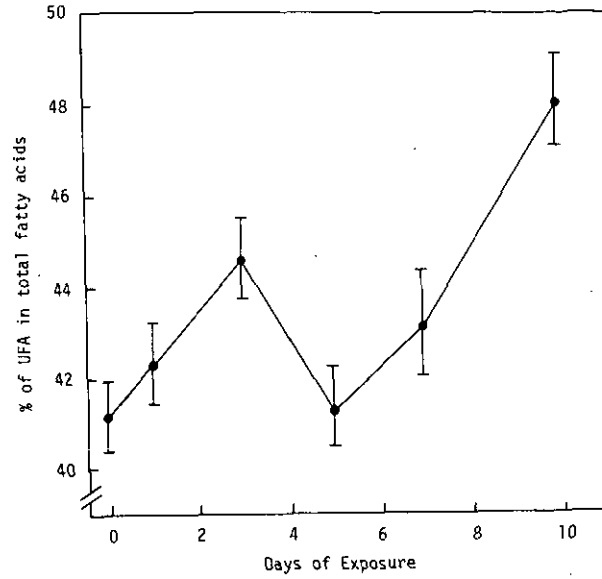


図 1 1 4.0 ppm NO₂ 暴露による不飽和脂肪酸含量の変化
 Fig. 11 Changes in content of unsaturated fatty acids during exposure of 4.0 ppm NO₂

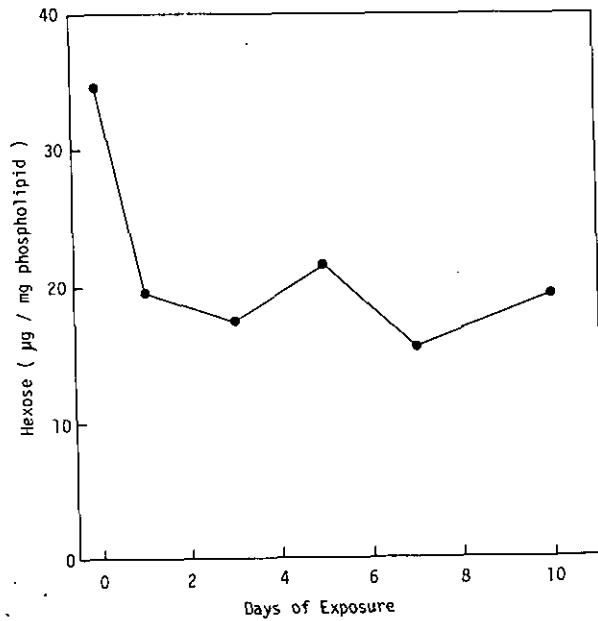


図 1 2 4.0 ppm NO₂ 暴露による中性糖脂質画分中の
 ヘキソース含量の変化
 Fig. 12 Changes in hexose content of non-acidic glycolipids during exposure of 4.0 ppm NO₂

考 察

NO₂ 暴露したラットの赤血球膜成分組成は暴露しないラットの赤血球膜成分の組成にくらべて多くの点で変化が生じていることが明らかとなった。10 ppm 暴露では第1日目にLPE および不飽和脂肪酸の増加と中性糖脂質画分のヘキソース含量の減少が観察された。また、蛋白質量および蛋白質組成にも変化が生じていた。このことはNO₂ 暴露によって受ける赤血球膜成分の変化が単純でないことを示すものであろう。さらに3日目ではこれらの成分の変化が一段と複雑となっている。これらの変化は4.0 ppm でも同様のパターンで観察されるが、LPE においては第1日目ではほとんど変化していなかった。4.0 ppm 暴露における各成分の極小値出現の時間を見るとLPE は第3日目、不飽和脂肪酸は第5日目、中性糖脂質画分のヘキソースは第7日目と各成分によって時間的なズレがあることがわかる。また10 ppm と4.0 ppm とをくらべた場合、LPE は両濃度とも3日目に極小値が出現するが、不飽和脂肪酸は10 ppm で3日目、4.0 ppm で5日目となり不飽和脂肪酸の極小値出現の時間がNO₂ の濃度に関連があるように見える。これらのことから、NO₂ の赤血球膜に対する作用は第一段階として脂質成分であり、第二段階として脂質成分と蛋白質成分であると考えることができる。

赤血球膜成分の組成の変化からNO₂ の作用を推測することは困難であるが、赤血球が肺でNO₂ ガスと直接接触する可能性や、NO₂ ガスが血液に溶解して生じた硝酸イオンや亜硝酸イオン等によって影響を受ける可能性が考えられる。また、NO₂ によって影響を受けた臓器、たとえば肝臓や腎臓等によって間接的に赤血球が影響を受けることも考慮する必要があるであろう。いずれにしても、今回得られた結果からNO₂ の赤血球膜に対する作用機作を解明する糸口は得られたといえるであろう。

引 用 文 献

- 1) Morrow, P.E. (1975): An evaluation of recent NO_x toxicity data and an attempt to derive an ambient air standard for NO_x by established toxicological procedures. *Environ. Res.*, **10**, 92-112.
- 2) Acton, J.D. and N. Quentin (1972): Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **24**, 48-52.
- 3) Sherwin, R.P. and L.J. Layfield (1976): Protein leakage in the lungs of mice exposed to 0.5 ppm nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **31**, 116-118.
- 4) Shvorcova, S. and V. Kant (1971): The artero-venous differences in the nitrite and nitrate ion concentrations after nitrogen oxides inhalation. *Cesh. Hyg.*, **16**, 71.
- 5) Oda, H., S. Kusumoto and T. Nakajima (1975): Nitrosyl-hemoglobin formation in the blood of animals exposed to nitric oxide. *Arch. Environ. Health*, **30**, 453-455.
- 6) Dodge, J.T., C. Mitchell and J. Hanahan (1963): Preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch. Bio-*

- chem. Biophys., **100**, 119-130.
- 7) Folch, J., M. Lees and G.H.S. Stanley (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
 - 8) Kaya, K. and T. Miura (1979): Direct densitometric determination of phospholipid composition on the thin-layer chromatogram. Submitted to *Anal. Biochem.*
 - 9) Metcalfe, L.D. and A.A. Schmitz (1961): Rapid preparation of fatty acids esters for gas-chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, **33**, 363-364.
 - 10) Harris, W.D. and P. Popat (1954): Determination of the phosphorus content of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 124-127.
 - 11) Cook, R.P. (1961): Reaction of steroids with acetic anhydride and sulfuric acid (the Liebermann-Burchard test). *Analyst*, **86**, 373-381.
 - 12) Ledeen, R.W., K.R. Yu and L.F. Eng (1973): Gangliosides of human myelin sialosylgalactosyl ceramide (G₇) as a major component. *J. Neurochem.*, **21**, 829-839.
 - 13) Dawson, R.M.C. (1969): Hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological sample. *Biochem. J.*, **75**, 45-53.
 - 14) Wuthier, R.E. (1966): Purification of lipids from nonlipid contaminations on Sephadex bead columns. *J. Lipid Res.*, **7**, 558-561.
 - 15) Sweeley, C.C. and B. Klinsky (1963): Fabry's disease. Classification as characterization of a novel glycolipid. *J. Biol. Chem.*, **238**, 3148-3150.
 - 16) Roe, J.H. (1954): The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **212**, 335-343.
 - 17) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough and A.L. Farr (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 - 18) Gordon, A.H. (1969): *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Ed. by Work, T.S. and E. Eork, 1, 7, North-Holland Publishing Company, London.

薄層クロマトグラフィーによる
リン脂質組成の直接定量法
Direct Densitometric Determination of Phospholipid
Composition on Thin-Layer Chromatogram

彼谷邦光¹・三浦 卓¹

Kunimitsu KAYA¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

薄層クロマトグラフィーで分離したリン脂質をデンストメーターを用いて直接定量し、リン脂質組成を求める方法を開発した。本法は従来の方法にくらべ、操作が簡単であること、迅速にできること、定性と同時に定量ができること、一度に多量の試料を分析できること等の長所を持っている。また、本法を用いてラットの赤血球膜のリン脂質組成を求めたところ、極めて良好な結果が得られた。

Abstract

Thin-layer chromatograms on HPTLC silica-gel plates of phospholipids were used for determination of phospholipid composition. Using a scanning densitometer, linear calibration curves was obtained for phospholipids, in addition to aminophospholipids, which can be employed for a rapid and simple quantitation of sample spots. A satisfactory application of the method to the determination of phospholipid composition of red blood cell membrane of rats is described.

はじめに

従来、リン脂質組成は二次元薄層クロマトグラフィーによって分離されたリン脂質の各スポットをかき取り、そこからリン脂質を抽出し、それを分解して生じるリン酸を定量することによって求

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O.
Yatabe, Ibaraki, 300-21.

められて来た^{1, 2, 3)}。しかしながら、この方法は本質的にリン定量の際の妨害物質であるシリカ(ケイ酸)の混入を防ぐことができないという欠点を持っている。また、操作が煩雑なために一度に多量の試料を分析することも困難である。そこで、我々はデンストメーターを用いて薄層クロマトグラムから直接リン脂質組成を求める方法を開発した。この方法を用いてラットの赤血球膜リン脂質組成を求めたところ、従来の方法とほぼ同一の結果が得られたことから、我々の開発した方法が生体試料のリン脂質組成決定に応用できることを明らかにした。またこの方法を用いることによって一度に多量の試料を分析することが可能となった。

方法

1. 試料

Dipalmitoyl phosphatidylcholine および Dipalmitoylphosphatidylethanolamine は Sigma Chemical Co. から購入した。動物臓器から調製された各種のリン脂質を Serdary Research Laboratories から購入した。シリカゲルプレートは E. Merk の HPTLC Fertigplatten Kiesel - Gel 60 (10×10 cm) を用いた。

2. 脂質の抽出

赤血球膜は Dodge ら⁴⁾の方法を用いて Wistar ラットの雄の新鮮血から調製した。脂質は Folch ら⁵⁾の方法に従って新鮮な赤血球膜に20倍量のクロロホルム-メタノール溶液(2:1, v/v)を加えて抽出した。Folch 分配によって得られた下層は40°C, 窒素気流下で濃縮した。脂質中のリン含有量は Harris ら⁶⁾の方法によって定量した。

3. 薄層クロマトグラフィー

HPTLC (High-performance Thin-layer Chromatography) シリカゲルプレートは120°C, 2時間加熱して活性化した後、デシケーター内で室温まで冷却した。このシリカゲルプレートに下端から、7mm, 幅3.5mmの帯状に5μlのリン脂質溶液(約2μgのリン脂質を含む)をスポットした。

展開溶媒は2種類を用いた。希釈 Dittmer 試薬噴霧用には A: クロロホルム-メタノール-28%アンモニア水-水(28:10:1:1)を用い、ニンヒドリン試薬噴霧用には B: クロロホルム-メタノール-酢酸-水(75:25:8:4)の展開溶媒を用いた。クロマトグラフィーは試料をスポットしたシリカゲルプレートを1.05×3.5×1.05 cmのガラスチャンバーに入れ、室温で約50分間展開して行った。展開後、プレートを約20分間温風で乾燥させた。リン脂質検出のために、プレートに希釈した Dittmer 試薬をプレートが半透明になるまで噴霧した。このプレートを20分間室温に放置した後、ガラス板でプレートを覆った。これをデンストメーターで測定した。アミノ基含有リン脂質の検出のために、ニンヒドリン試薬を展開の終わったプレートに噴霧した後、120°C, 5分間加熱して発色させた。

希釈 Dittmer 試薬は以下の方法で調製した。2.5 N 硫酸 100 ml に三酸化モリブデン 4.01 g を加え、静かに煮沸、溶解する (Dittmer A 溶液)。この溶液 50 ml に 0.18 g の粉末モリブデンを加え、15 分間静かに煮沸し、放冷後、上澄液をデカンテーションで分取する (Dittmer B 溶液)。この Dittmer A 溶液と Dittmer B 溶液の各 2.5 ml を混合し、これに 30 ml の蒸留水を加えて希釈 Dittmer 試薬とした。

ニンヒドリン試薬は 1 g のニンヒドリンを 300 ml のエタノールに溶解して調製した。

4. デンシトメーター

デンシトメーターは Helena Auto Scanner (Helena Laboratories, Beaumont, Texas, USA) を用いた。希釈 Dittmer 試薬を噴霧したプレートの場合は 645 nm, ニンヒドリン試薬を噴霧したプレートの場合には 545 nm の波長の透過光で測定した。スリット幅は 1.0 × 5.0 mm のものを用いた。各スポットの吸光度は得られたデンシトグラム上のピークの重量を測定して求めた。

A の展開溶媒を用いたプレートのデンシトグラムから Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylcholine (PC), Sphingomyelin (SPH), (Phosphatidylinositol (PI) + Lysophosphatidylethanolamine (LPE) + Phosphatidylserine (PS)) と (Phosphatidic acid (PA) + Lysophosphatidylcholine (LPC)) の 5 つのスポットの組成を求めることができる。ただし、SPH のピーク重量には 10/7 の係数を掛けて組成を求める。これは SPH の発色率がグリセロリン脂質の 70% であることに基づいた係数である。一方 B の展開溶媒を用いて展開し、ニンヒドリン試薬を噴霧したプレートのクロマトグラムからアミノ基含有リン脂質である PE, PS および LPE の組成比を求めることができる。これら 2 つの系のクロマトグラフィーから PE, PC, SPH, PI, PS, LPE および (PA + LPC) の 7 つの成分の組成を決めた。

結果と考察

1. 薄層クロマトグラフィー

本法において用いた薄層クロマトグラフィープレートは最近開発された HPTLC プレートである。HPTLC プレートはシリカゲル 60 の均一微粒子を一定の厚さにコーティングしたもので、従来の薄層クロマトグラフィー用シリカゲルにくらべ、極めて粒子が小さく、かつ均一な粒度のシリカゲルを用いている。これらのことがリン脂質混合物の分離にすぐれ、また、デンシトメーター用としてもすぐれている原因となっている。このプレートを用いてラットの赤血球膜のリン脂質を前述の A と B の展開溶媒で展開したものを図 1 に示した。図中の RBC がラット赤血球膜のリン脂質である。

薄層クロマトグラフィーによるリン脂質の混合物の分離はプレートだけでなく展開溶媒によっても左右される。そこで我々は種々の組成の展開溶媒を調製し、リン脂質の分離状態とデンシトメーターによる定量性を検討し、展開溶媒として A と B が本法を用いる場合の最も良い展開溶媒であるという結果を得た。薄層クロマトグラフィープレート上で展開されたリン脂質の検出には一般に

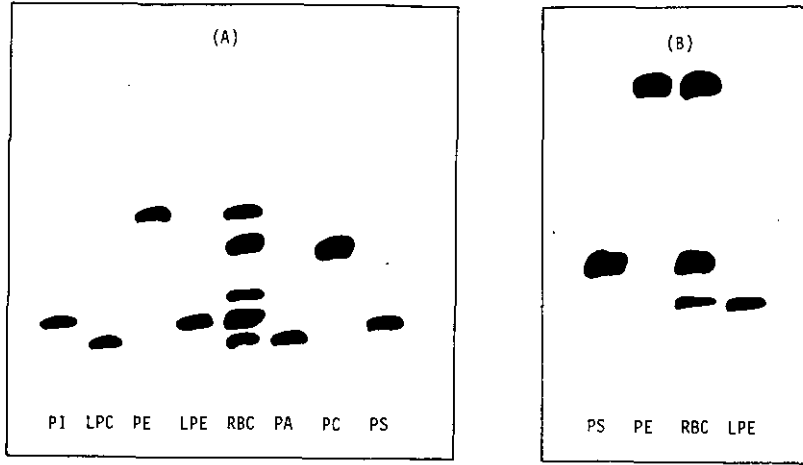


図1 リン脂質の薄層クロマトグラム

RBC; ラットの赤血球膜リン脂質

(A) 展開溶媒; クロロホルム — メタノール — 28%アンモニア水 — 水 (28:10:1:1)

発色試薬; 希釈 Dittmer 試薬

(B) 展開溶媒; クロロホルム — メタノール — 酢酸 — 水 (75:25:8:4)

発色試薬; ニンヒドリン試薬

Fig.1 Thin-layer chromatograms of phospholipids

RBC: Phospholipids of red blood cell membrane of rat.

(A): Developing solvent; chloroformmethanol-28% ammonia water-water (28:10:1:1).

Spraying reagent; the diluted dittmer reagent.

(B): Developing solvent; chloroformmethanol-acetic acid-water (75:25:8:4).

Spraying reagent; the ninhydrin reagent.

PI: Phosphatidylinositol,

LPC: Lysophosphatidylcholine,

PE: Phosphatidylethanolamine,

LPE: Lysophosphatidylethanolamine,

PA: Phosphatidic acid,

PC: Phosphatidylcholine,

PS: Phosphatidylserine.

Dittmer 試薬が用いられているが、プレートにデンシトメーターにかけてスポットの透過光を測定しようとする場合にはプレートが Dittmer 試薬のために不透明になって透過光を測定することができない。そこで、Dittmer 試薬を段階的に希釈してリン脂質の発色の度合とプレートの透明化との関係を調べ、本法においては前述の希釈 Dittmer 試薬が最も良い結果を与えることを見いだした。

2. デンシトメーターによる定量性

種々の濃度に調製した dipalmitoyl PE, dipalmitoyl PC および動物臓器から調製したリン脂質をプレートにスポットし、展開発色後、デンシトメーターを用いて各スポットの吸光度を求めた。各スポットの吸光度はデンシトグラム上のピーク重量によって表わすと、リン脂質中のリンの濃度とピーク重量との間に直線関係が認められ、全てのグリセロリン脂質中のリンが同じ濃度の場合にはデンシトグラム上のピーク重量も同じであった。しかし、SPHの場合は、グリセロリン脂質の70%のピーク重量であった。このことから、SPHのピーク重量に10/7の係数を掛けて、SPHのリン濃度をグリセロリン脂質のリン濃度に換算する必要がある。グリセロリン脂質の濃度がリンに換算して4.24~6.36 ngの間ではグリセロリン脂質濃度とピーク重量との間に直線関係がある。SPHの場合にはリン濃度に換算して4.24~8.48 ngの間でSPH濃度とピーク重量との間に直線関係が認められる。同様な直線関係は dipalmitoyl PE のアミノ基をニンヒドリン試薬で発色させた時にも認められた。また、動物臓器から調製したPE, PS, LPE等のアミノ基含有リン脂質を

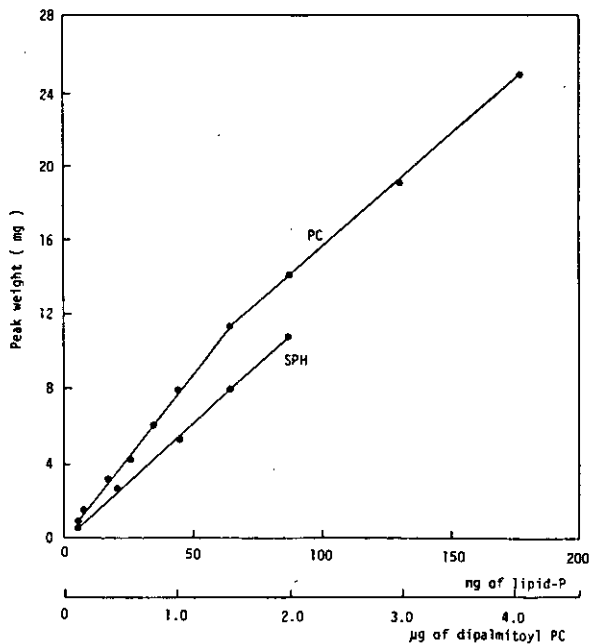


図2 リン脂質濃度とデンシトグラムのピーク重量との関係
発色試薬；希釈 Dittmer 試薬

Fig. 2 Relation between the concentration of phospholipids and the peak weight of the densitogram spraying reagent; the diluted dittmer reagent
PC: Phosphatidylcholine,
SPH: Sphingomyeline

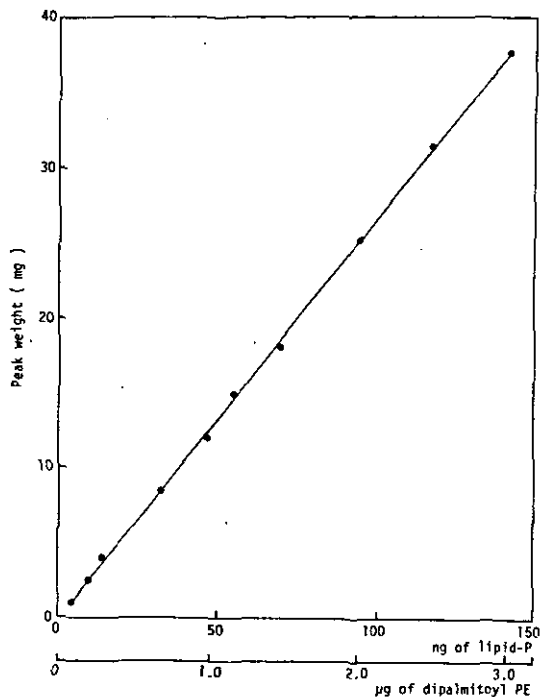


図3 ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンの濃度とデンシトグラムのピーク重量との関係
発色試薬；ニンヒドリン試薬

Fig. 3 Relation between the concentration of dipalmitoyl phosphatidylethanolamine and the peak weight of the densitogram Spraying reagent: Ninhydrin.

用いた場合でも dipalmitoyl PE と同じ濃度であれば、同じピーク重量を示した。アミノ基含有リン脂質濃度がリンに換算して 4.49 ~ 134.7 ng の間にある時にはアミノ基含有リン脂質濃度とピーク重量との間に直線関係があった。我々の開発した方法で測定したラット赤血球膜リン脂質のデンシトグラムを図4に示す。このデンシトグラムから測定したラット赤血球膜のリン脂質組成と Rouser らの方法³⁾で測定したリン脂質組成との比較を表1に示した。表1に示したように2つの方法で測定したリン脂質組成は極めてよく一致していた。このことはデンシトメーターを用いる方法がラット赤血球膜リン脂質組成決定のための有効な手段となることを示したものと見える。また、これらの結果は Nelson⁷⁾の示したラット赤血球膜リン脂質の組成 (PE ; 2.15%, PC ; 47.5%, SPH ; 12.8%, PI ; 3.5%, PS ; 10.8%, (PA + LPC) ; 3.8%) とよく一致していた。

リン脂質組成を決めるために従来用いられてきた2次元薄層クロマトグラフィー — 脂質分解 — リンの定量という方法にくらべ、我々の開発した方法は操作が簡単であること、迅速にできること、

定性と同時に定量ができること、一度に多量の試料を分析することができる等の長所を持っている。

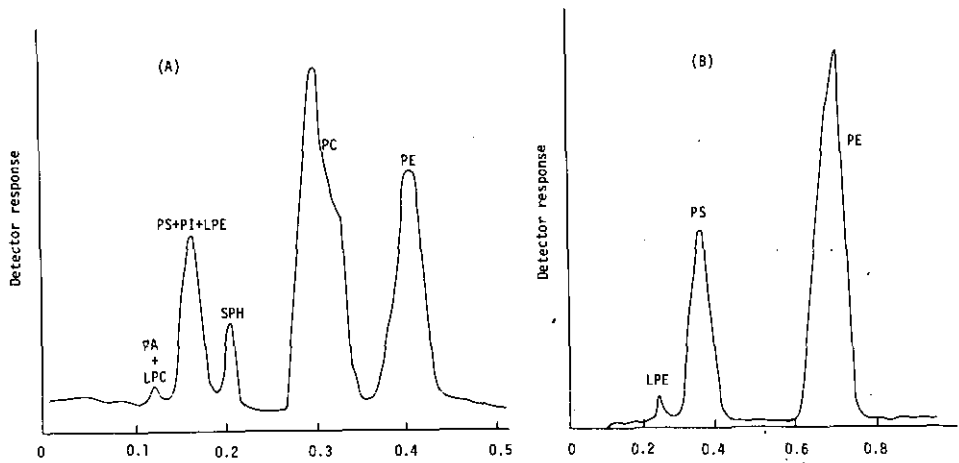


図4 HP TLC プレートによるラット赤血球膜リン脂質のデントグラム

(A) 展開溶媒; クロロホルム - メタノール - 28%アンモニア水 - 水 (28:10:1:1)

発色試薬; 希釈 Dittmer 試薬

(B) 展開溶媒; クロロホルム - メタノール - 酢酸 - 水 (75:25:8:4)

発色試薬; ニンヒドリン試薬

Fig.4 Densitograms of phospholipids of red blood cell membrane of rats on HPTLC plates

(A): Developing solvent; chloroformmethanol-28% ammonia water-water(28:10:1:1).

Spraying reagent; the diluted dittmer reagent.

(B): Developing solvent; chloroformmethanol-acetic acid-water (75:25:8:4).

Spraying reagent; the ninhydrin reagent.

PE: Phosphatidylethanolamine,

PC: Phosphatidylcholine,

SPH: Sphingomyeline,

LPE: Lysophosphatidylethanolamine,

PI: Phosphatidylinositol,

PS: Phosphatidylserine,

PA: Phosphatidic acid,

LPC: Lysophosphatidylcholine.

表1 ラット赤血球膜のリン脂質組成
SD; 標準偏差

Table 1. Phospholipid composition of red blood cell membrane of rats

	By Densitometry (%) \pm SD*	By the method of Rouser et al. (%)
Phosphatidylethanolamine	21.7 \pm 1.0	22.57
Phosphatidylcholine	53.5 \pm 1.0	51.59
Sphingomyeline	8.0 \pm 0.4	8.39
Phosphatidylinositol	4.5 \pm 0.4	5.95
Phosphatidylserine	10.4 \pm 0.7	9.15
Lysophosphatidylethanolamine	0.9 \pm 0.2	1.21
Phosphatidic acid and Lysophosphatidylcholine	1.0 \pm 0.1	1.15

*: SD; Standard deviation (N=6)

引用文献

- 1) Skipski, V.P., R.F. Peterson and M. Barclay (1964): Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. *Biochem. J.*, **90**, 374-378.
- 2) Abramson, D. and M. Blecher (1964): Quantitative two dimensional thin-layer chromatography of naturally occurring phospholipids. *J. Lipid Res.*, **5**, 628-631.
- 3) Rouser, G., S. Fleisher and A. Yamamoto (1970): Two dimensional thin-layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, **5**, 494-496.
- 4) Dodge, J.T., C. Mitchell and J. Hanahan (1963): Preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119-130.
- 5) Folch, J., M. Lees and G.H.S. Stanley (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 6) Harris, W.D. and P. Papat (1954): Determination of the phosphorus content of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 124-127.
- 7) Nelson, G.J. (1967): Lipid composition of erythrocytes in various mammalian species. *Biochem. Biophys. Acta*, **144**, 221-232.

ラットの血清アイソザイムパターンにおよぼす
二酸化窒素の影響
Effect of Nitrogen Dioxide on Isoenzyme Profiles
of Rat Serum

市瀬孝道¹・鈴木 明¹・彼谷邦光¹・三浦 卓¹

Takamichi ICHINOSE¹, Akira SUZUKI¹, Kunimitsu KAYA¹
and Takashi MIURA¹

要 旨

NO₂ 暴露の影響を調べるために、NO₂ を暴露したラットの血清アイソザイムパターンの分析を行った。5, 10 または 20 ppm NO₂ を 24 時間暴露したラットの血清ではⅡ型アルカリ性ホスファターゼ (ALP), I 型クレアチンホスホカイネース (CPK) およびⅡ型とⅢ型乳酸脱水素酵素 (LDH) の変動が認められた。特に、Ⅱ型 ALP の増加は NO₂ 暴露濃度に依存し、10 ppm 以上の NO₂ 濃度で対照に対して有意に増加した。さらに、4.0 ppm NO₂ を 7 日間暴露した結果Ⅱ型 ALP は 3 日目まで、I 型 CPK は 5 日目まで血清中に増加した。これら成分は各々 7 日目と 5 日目に対照に対して有意な差を示した。アイソザイムパターンの分析によって NO₂ 暴露の影響を受ける臓器を検索する可能性をたしかめるために、未暴露のラットの臓器可溶性画分のアイソザイムパターンを調べ、Ⅱ型 ALP および I 型 CPK の由来した臓器について検討した。

Abstract

In order to reveal the effect of NO₂ exposure on experimental animals, isoenzyme profiles were examined using fresh sera of Wistar male rats. When rats were exposed to NO₂ at the concentration of 5, 10 and 20 ppm for 24 hours, changes were found in Type II alkaline phosphatase (ALP), Type I creatine phosphokinase (CPK), and Type II and III lactic dehydrogenases (LDH) of sera. The increase in activity of Type II ALP was depend-

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, P.O.
Yatabe, Ibaraki, 300-21.

ent on the exposure concentration of NO_2 . Upon prolonged exposure of NO_2 at the concentration of 4.0 ppm, activities of Type II ALP and Type I CPK increased three and five days after the onset of NO_2 exposure, respectively. Isoenzyme profiles of various tissues in rats were also examined to identify the tissue which caused increases in isoenzyme components of serum. It seems possible that an increase in Type II ALP was due to any deteriorative process in liver, lung or heart.

はじめに

NO_2 暴露による生体影響に関する研究は数多くなされているが、その多くは第一次標的臓器である呼吸器系に関するものである¹⁾。一方、呼吸器系から生体内にとりこまれた NO_2 は血液をとおして尿中に排泄されることが報告されている^{2, 3)}。このことは血液中にとりこまれた NO_2 が循環器系を循環する過程で多くの臓器と接触を持ち直接間接の影響を及ぼす可能性を示唆している。

NO_2 の生体影響を総合的に解明するためには、影響の指標の確立とともに影響の及ぶ臓器の検索を行うことが重要であろう。

動物体内に存在する酵素には臓器に特異的なアイソザイムの存在することが多くの酵素について認められて来ており、最近では臨床酵素化学領域においても使用されはじめている^{4~6)}。ヒトの場合に血清中アイソザイムを検査することは病因病態の解明に利用されるのみならず、変動の起源となった臓器の追及もある程度可能となっている。そこで、ラットに NO_2 を暴露し血清中のアイソザイムパターンを測定することによって、 NO_2 の影響指標の確立とその起源となった臓器の検索を行うことを試みた。

方法

1. 暴露条件

Wistar - JCL の雄ラット (8 - 14 週令) を 20 ± 1.0 脚、 10 ± 0.5 脚および 5 ± 0.3 脚の NO_2 で 24 時間暴露、または 4.0 ± 0.08 脚の NO_2 で 7 日間連続暴露した。対照群のラットは NO_2 暴露チャンバーと同型のチャンバーにフィルターを通した新鮮空気で暴露した。

2. 血清の調製

NO_2 暴露したラットの頸動脈から血液を採集し $800 \times g$ 10 分間の遠心を行い上清を血清として直ちに使用した。

3. 臓器可溶性画分の調製

赤血球はラットの頸動脈からヘパリン存在下で採血し $800 \times g$ 10 分間の遠心で集めた。赤血球は 3 回 5 倍容の生理食塩水で洗滌した。脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓等の臓器は心臓より生理食塩水を灌流して洗滌した後分離し細片とした。これら赤血球および各種臓器は 2 倍容の 10mM

トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加えポリトロンホモジナイザーで氷冷下 30 秒間ホモジナイズし、105,000 × 9 60 分間の遠心を行った。この遠心上清を可溶性画分として用い、直ちにアイソザイムの分析に使用した。

4. アイソザイムの分析

血清および各臓器可溶性画分 0.3~0.9 μ g を予め電気泳動用緩衝液に浸したセルロースアセテート膜に塗布し 4°C で電気泳動を行った。電気泳動はアルカリ性ホスファターゼおよび乳酸脱水素酵素についてはイオン強度 0.07 のトリス-バルビタール緩衝液 (pH 8.8) 中で 180V, 5 mA/cm 60 分および 120 分を行った。クレアチンホスホカイネースは、イオン強度 0.028 の同じ緩衝液中で 350V 10 分間泳動を行った。電気泳動後アルカリ性ホスファターゼの活性染色は Fritsche らの方法⁷⁾ に準じて行った。乳酸脱水素酵素は Wilkinson の方法⁸⁾ により、クレアチンホスホカイネースは Hannie and Kontinen の方法⁹⁾ によって活性染色を行った。活性染色を行ったセルロースアセテート膜は風乾後ヘレナ製デンシトメーター (Helena Lab., Beaumont, Texas) により各アイソザイム成分の大きさを求めた。各成分の割合はピークを切り抜き重量を測定することによって求めた。

結 果

1. NO₂ 暴露濃度と血清アイソザイム

NO₂ 暴露濃度と血清アイソザイムパターンの変動との関係を求めるために、5, 10 および 20 ppm の NO₂ を Wistar ラットに暴露した。暴露後 24 時間目に頸動脈より採血し血清を調製した。調製後直ちに血清をセルロースアセテート膜に塗布し 4 度で電気泳動を行い、アルカリ性ホスファターゼ (ALP)、クレアチンホスホカイネース (CPK) および乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性染色を行った。未暴露ラットの血清アイソザイムパターンを図 1 に示した。血清 ALP は、速かに泳動する II 型成分と遅く泳動する III 型成分とからなっており、CPK は I 型成分と III 型成分とからなっていた。また、LDH は I, II, III, IV, および V 型成分よりなっており、V 型成分が全活性の約 2/3 を占めていた。図 2 に II 型 ALP の割合と NO₂ 暴露濃度との関係を示した。NO₂ 暴露濃度を 5, 10, 20 ppm と上昇させるにつれて、II 型成分の割合は対照の 28.4% から 31.5%, 40.8%, 63.4% と、NO₂ 暴露濃度に依存して増加した。II 型成分の割合は対照に対して 5 ppm NO₂ 暴露では有意な差が認められなかったが 10 および 20 ppm では有意に増加した。一方、I 型 CPK の割合は 5 ppm NO₂ 暴露によって対照の 4.1% から 6.0% にまで増加したが、さらに暴露濃度を上昇させるとむしろ減少し 20 ppm NO₂ 暴露では 2.3% になった (図 3)。I 型 CPK の場合 24 時間暴露ではいずれの暴露濃度でも対照に対して有意な差は認められなかった。図 4 に LDH の II~V 型成分の NO₂ 暴露濃度による変動を示した。NO₂ 暴露によって III 型成分の増加と IV 型成分の減少の傾向がみられたが、いずれの場合も対照に対して有意な差は認められなかった。

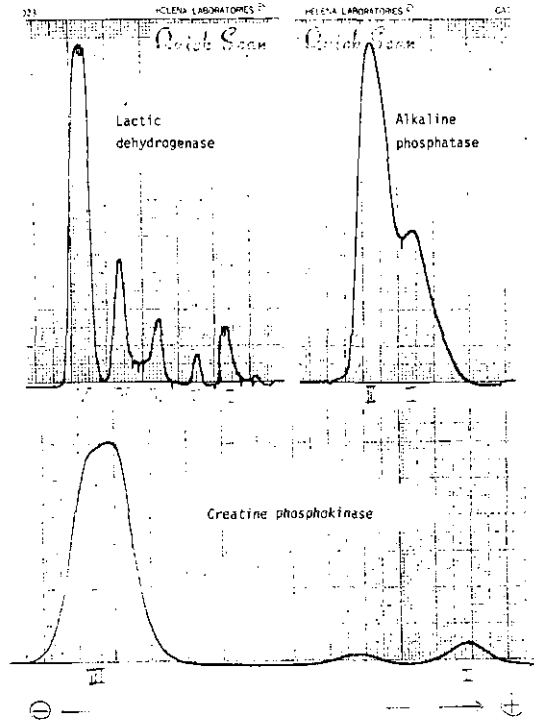


図1 ラット血清のアイソザイムパターン
 Fig. 1 Isoenzyme profiles of rat serum

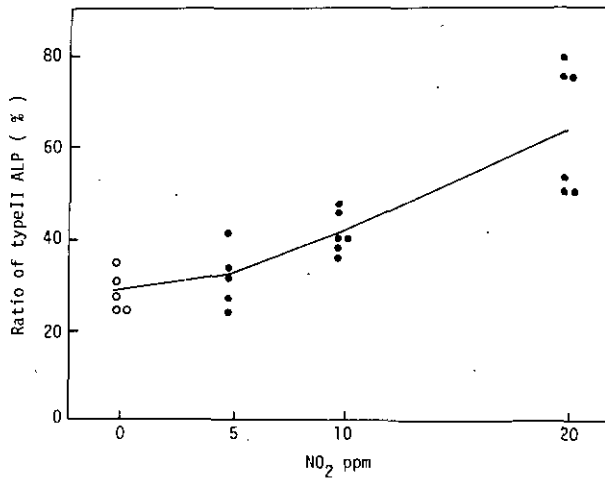


図2 NO₂ 暴露のⅡ型アルカリ性ホスファターズにおよぼす影響

Fig. 2 Effect of NO₂ exposure on type II alkaline phosphatase. Wistar rats (6 heads) were exposed to either 5, 10 or 20 ppm NO₂ for 24 hours

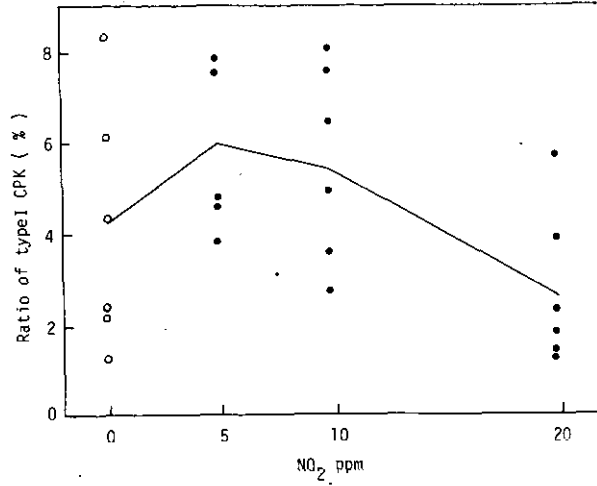


図3 NO₂ 暴露の I 型クレアチンホスホカイネースにおよぼす影響

Fig. 3 Effect of NO₂ exposure on type I creatine phosphokinase. Wistar rats (6 heads) were exposed to either 5, 10 or 20 ppm NO₂ for 24 hours

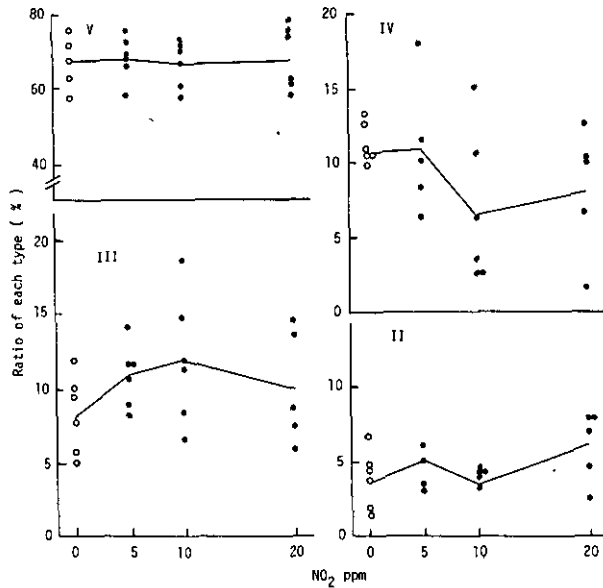


図4 NO₂ 暴露の乳酸脱水素酵素アイソザイムにおよぼす影響

Fig. 4 Effect of NO₂ exposure on lactic dehydrogenase isoenzymes. Wistar rats (6 heads) were exposed to either 5, 10 or 20 ppm NO₂ for 24 hours.

2. NO₂暴露の時間経過に伴う血清アイソザイムパターンの変動

5 ppm NO₂ を24時間暴露した場合、Ⅱ型ALP、Ⅰ型CPK、Ⅱ型およびⅢ型LDHの割合は有意な差は認められなかったが、増加する傾向を示した。このように血清中に酵素のアイソザイム成分が増加傾向を示す程度の濃度でNO₂を長時間暴露した場合、各アイソザイム成分が暴露時間の経過につれてどのように変化していくかについて次に明らかにすることを試みた。4.0 ppmのNO₂を7日間暴露し、1, 3, 5, 7日目に採血して上記のように各酵素のアイソザイムパターンを測定した。図5にⅡ型ALPの割合の暴露時間の経過に伴う変動を示した。暴露後対照より1日目で1.5%、3日目で7.2%の増加を示し以後7日目まで同程度のレベルを維持した。対照群においても1日目から3日目にかけて2.7%の増加が認められたが、以後一定となった。同様な増加の傾向はⅠ型CPKにおいても認められた(図6)。暴露後5日目まで増加を示し、対照より1日目で1.2%、5日目で8.2%の増加であった。5日目から7日目にかけては低下した。対照群は1日目から7日目にかけて1.0%減少した。図7にLDHのⅡ型~Ⅳ型成分の暴露時間の経過に伴う変動を示した。暴露時間の経過につれて各成分、特にⅢ型およびⅣ型成分の割合に変動が認められたが対照群も同程度の変動を示した。

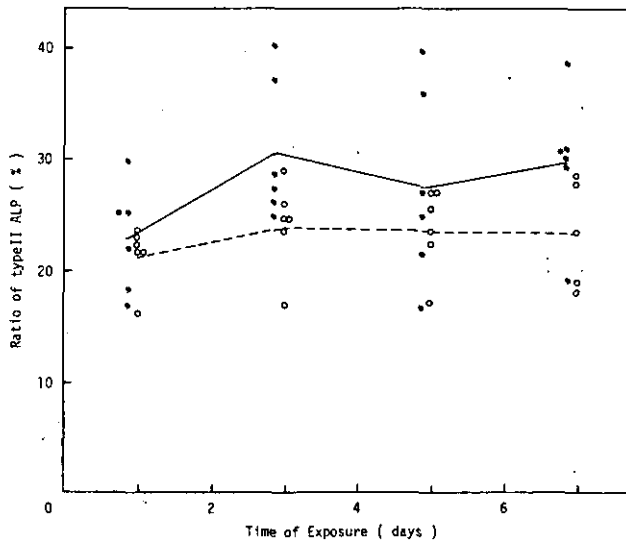


図5 4 ppm NO₂ 暴露のⅡ型アルカリ性ホスファターズにおよぼす影響
●, — : NO₂ 暴露群, ○, ---- : 対照群

Fig. 5 Effect of 4 ppm NO₂ exposure on type II alkaline phosphatase
●, — : NO₂ exposed, ○, ---- : Control.

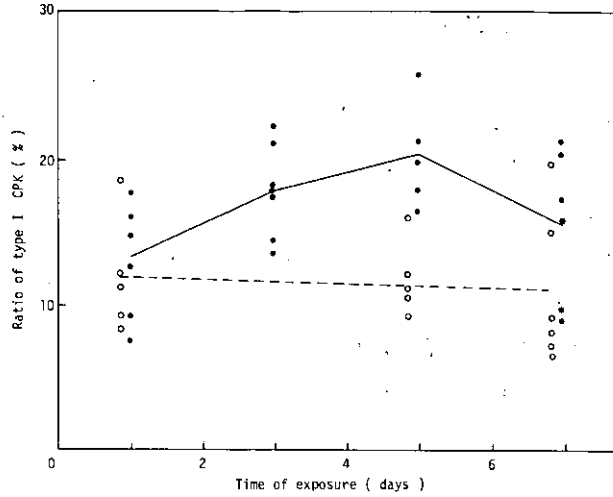


図6 4 ppm NO₂ 暴露の I 型クレアチンホスホカイネースにおよぼす影響

●, — : NO₂ 暴露群, ○, ---- : 対照群

Fig. 6 Effect of 4 ppm NO₂ exposure on type I creatine phosphokinase

●, — : NO₂ exposed, ○, ---- : Control.

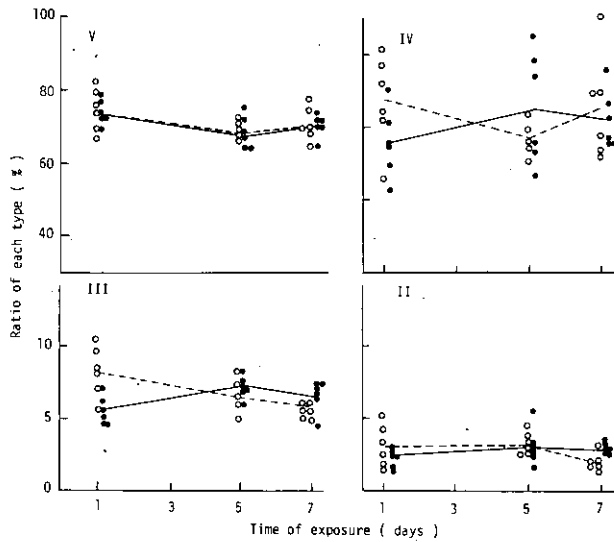


図7 4 ppm NO₂ 暴露の乳酸脱水素酵素アイソザイムにおよぼす影響

●, — : NO₂ 暴露群, ○, ---- : 対照群

Fig. 7 Effect of 4 ppm NO₂ exposure on lactic dehydrogenase isoenzymes

●, — : NO₂ exposed, ○, ---- : Control.

3. NO₂により影響を受ける臓器の検索

4. 0ppm NO₂の暴露によって血清中にⅡ型 ALP および I 型 CPK の割合が増加した。これらアイソザイム成分の増加の原因となった臓器を検索するために、ラットより脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓および赤血球を分離して等容の 10 mM トリス緩衝液を加えホモジネートを調製した。ホモジネートより 105,000 × g 1 時間の遠心を行ってえた可溶性画分はセルロースアセテート膜電気泳動法によってそのアイソザイムパターンを分析した。図 8 に各臓器可溶性画分中の ALP アイソザイムパターンを示した。肺、心臓、腎臓には小腸型(A)が存在し、心臓、腎臓の主要成分となっている。血清、肺には骨型(B)が存在し、肺の主要成分となっている。肝には肝型(D)が主要成分として存在している。これまでⅡ型 ALP と呼んだ画分はB型およびD型を含むものである。肝速動

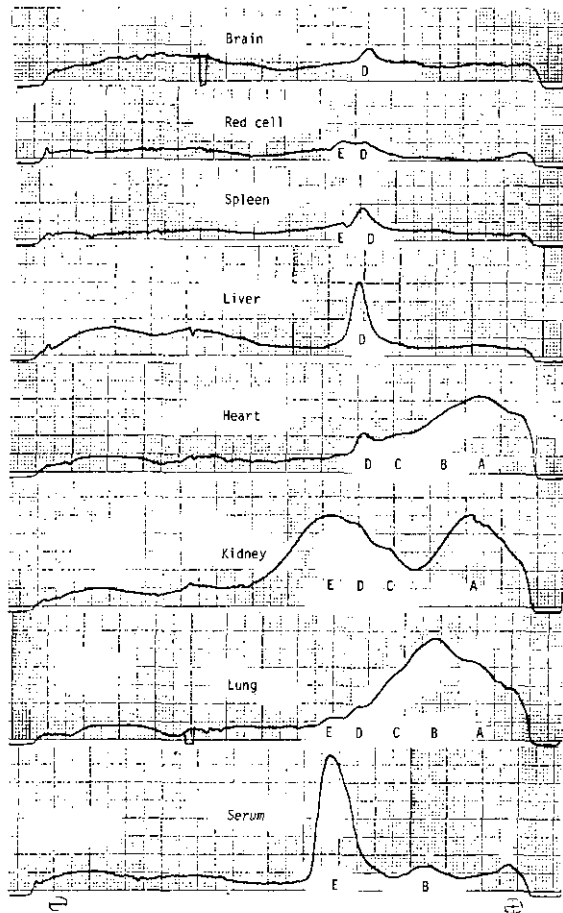


図 8 ラット臓器のアルカリ性ホスファテースアイソザイム
Fig. 8 Isoenzyme profiles of alkaline phosphatase
in rat tissues

型(E)と言われる成分は腎臓、血清の主要成分となっていた。脳、脾臓、赤血球ではD型とE型とからなっていたが、その活性は著しく低かった。NO₂暴露により増加するALP成分はB~Dであり、Dのみの増加なら肝臓、C、Bの増加の場合肺または心臓に由来することが示唆される。同様にCPKについても各臓器可溶性画分のアイソザイムパターンの分析を行った(図9)。CPKの場合その活性染色法が原因でCPK以外の酵素活性も染色される。基質を除去した対照実験から図9に示したようにCPK I、II型を同定した。またI型およびII型以外の染色された画分を考慮に入れると心臓、肝臓、腎臓が除かれる。したがって、NO₂暴露によりI型CPKが増加するのは脳、肺または脾臓に由来する可能性が考えられる。

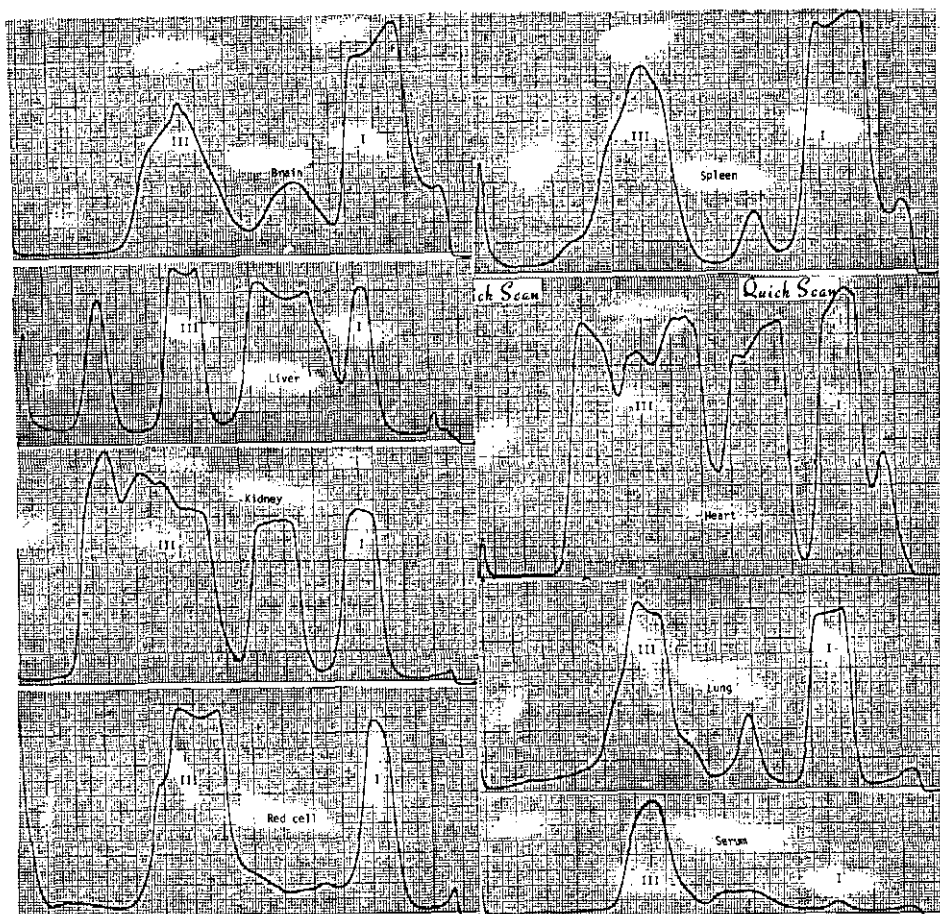


図9 ラット臓器のクレアチンホスホカイネースアイソザイム

Fig. 9 Isoenzyme profiles of creatine phosphokinase in rat tissues

考 察

4-20 ppmのNO₂をラットに暴露し血清中ALP, CPKおよびLDHアイソザイムパターンを測定した結果, これら酵素のアイソザイム成分に多様な変動の起ることが明らかとなった。24時間NO₂暴露ではⅡ型ALPの割合がNO₂濃度に依存して増加し, 10および20 ppmで対照に対して明らかに有意な差が認められた。24時間暴露ではⅡ型ALPが増加を示さなかった4 ppm NO₂を7日間暴露した場合, 3日目まで増加がみられ7日目では対照に対して有意な差が検出された。3日目および5日目でのⅡ型ALPの平均値の増加は暴露群6匹中2匹の値が著しく高いことに由来していた。このことは, 使用した実験動物中1/3はNO₂に高い感受性を持つことを示唆している。Ⅱ型ALPは肺, 心臓または肝臓に由来する可能性が示唆されたが, これらの臓器が実験動物中1/3ではNO₂暴露の影響を受けやすい状態にあるのかもしれない。

I型CPKはヒトの場合脳型(BB型)であることが明らかにされている¹⁰⁾。24時間NO₂暴露を行うと5, 10 ppmでは平均値としての増加を示したが20 ppmではむしろ減少した。血清中のI型CPKが脳, 肺または脾臓に由来するとすれば, これらの臓器が5および10 ppm NO₂暴露によって影響を受けている可能性が示唆される。4 ppm NO₂暴露によるI型CPKの血清中への流出は5日目まで続き, 5日目においては対照に対して有意な差が認められた。この事実は, Ⅱ型ALPの増加とI型CPKの増加とは異なる臓器に由来していることを示しているのかもしれない。また, 必ずしも有意な増加ではないが, アイソザイム成分の平均値としての増加が血清に起ることは, アイソザイム成分の起源となっている臓器で細胞の代謝回転が速まっている可能性が考えられる。

血清アイソザイムパターンを分析することによってNO₂暴露により影響を受ける臓器の検索を行うことを試みたが, 本研究に用いたLDH, ALPおよびCPKについて分析するのみでは臓器を特定することができなかった。さらに, パイルベートカイネースおよびアルドレーズの血清アイソザイム成分の分析を行えば肝臓, 腎臓, 脳への影響を区別することが可能であると考えられる。これまでに, NO₂暴露の肺または血清LDHアイソザイムパターンへの亜急性影響を調べる研究がBuckleyら¹¹⁾およびEhrlichら¹²⁾によって行われ, 好気性分画の減少と嫌気性分画の増加が報告されている。本研究において行ったNO₂急性暴露ではLDHアイソザイムパターンに有意な変動は起らなかった。しかしながら, 4 ppm NO₂暴露を数日間ラットに行うと血清中ALPおよびCPKアイソザイムパターンが有意に変動することを明らかにした。

引 用 文 献

- 1) Cooper, P. (1975): More details on nitrogen dioxide inhalation. Food and Cosmetics Toxicol., 13, 135-139.

- 2) Shvorcova, S. and V. Kant (1971): The arterovenous differences in the nitrite and nitrate ion concentrations after nitrogen oxides inhalation. *Cesh. Hyg.*, **16**, 71-76.
- 3) 吉田克己, 今井正文, 笠間一男, 北島正義 (1976) : 15 N による NO の生体内変化について. *大気汚染研究*, **11**, 212.
- 4) Galen, R.S. (1975): The enzyme diagnosis of myocardial infraction. *Human Pathol.*, **6**, 141-155.
- 5) Stolbach, L.L. (1969): Clinical application of alkaline phosphatase isoenzyme analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **166**, 760.
- 6) Roe, C.R., L.E. Limbird, G.S. Wagner and S.T. Nerengerg (1972): Combined isoenzyme analysis in the diagnosis of myocardial injury. *J. Lab. Clin. Med.*, **80**, 577-590.
- 7) Fritsche, H.A. and H.R. Adams-Park (1972): Cellulose acetate electrophoresis of alkaline phosphatase isoenzymes in human serum and tissue. *Clin. Chem.*, **18**, 417-421.
- 8) Wilkinson, J.H. (1970): Clinical application of isoenzymes. *Clin. Chem.*, **16**, 733-739.
- 9) Somer, H. and A. Konttinen (1972): Demonstration of serum creatine kinase isoenzymes by fluorescence technique. *Clin. Chim. Acta*, **40**, 133-138.
- 10) Madsen, A. (1972): Creatine phosphokinase isoenzymes in human tissue with special reference to brain extract. *Clin. Chim. Acta*, **36**, 17-25.
- 11) Buckley, R.D. and M.C. Henry (1967) : Effects of nitrogen dioxide on lactic dehydrogenase isoenzymes. *Arch. Environ. Health*, **14**, 424-428.
- 12) Ehrlich, R. and M.C. Henry (1968): Chronic toxicity of nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **17**, 860-865.

ラットの性周期に及ぼす二酸化窒素低濃度連続暴露の影響
Effect of Continuous Exposure of Low Concentration of Nitrogen
Dioxide on Estrual Cycle of Rats

寺尾恵治^{1,2}・高橋 弘¹

Keiji TERAQ^{1,2} and Hiroshi TAKAHASHI¹

要 旨

大気汚染物質の一成分である二酸化窒素の低濃度(0.04, 0.4および4ppm)連続暴露
が、ラットの性周期に及ぼす影響を知る目的で、約50日間にわたり観察を行った。

その結果、暴露開始直後に性周期のリズムが乱れ、発情休止期が持続する個体が認めら
れ、その出現頻度は暴露ガス濃度の上昇に伴って増加する傾向が認められた。しかしなが
ら、これらの個体も暴露後2~3週間を経てラットが環境に適応したと認められるに従っ
て、4~5日間隔の規則的な性周期に復帰した。

これらの結果から、今回暴露した程度の濃度のNO₂連続暴露はラットの性周期には著
明な影響を及ぼすことはないものと推察された。そして、暴露開始当初にみられた性周期
の変化は、ラットの繁殖機能に対するNO₂ガスの直接影響というよりは、むしろ暴露ガ
スをも含めた飼育環境の変動による一過性のものと考えられた。

Abstract

The estrual cycle of rats were observed for about 50 days under the
continuous exposure of NO₂ at the concentrations of 0.04, 0.4 and 4.0
ppm. In the beginning of exposure, a few animals showed the duration of

-
1. 国立公害研究所 技術部 〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
The National Institute for Environmental Studies, Engineering Division, P.O. Yatabe Ibaraki
300-21.
 2. 連絡先：国立予防衛生研究所筑波医学実験用霊長類センター
〒300-21 茨城県筑波郡谷田部町
National Institute of Health, Tsukuba Primate Center for Medical Science, P.O. Yatabe,
Ibaraki, 300-21.

the diestrus stage, and the frequency of the estrual cycle tended to decrease. These animals, however, showed a normal estrual cycle as they seemed to adapt to the environmental condition in the chamber. From these results, it seems probable that the continuous exposure of low concentration of NO_2 gives some effects on the estrual cycle of rats. However, the irregularities of estrual cycle in the beginning of NO_2 exposure might be also caused by the combined effects of environmental factors other than the direct effect of NO_2 on the reproductive function of rats.

はじめに

マウス、ラット等の実験小動物のいくつかは、通常4～5日間隔で規則的な性周期をくりかえし¹⁾、このような性周期のリズムは生物学的^{2,3)}、物理化学的¹⁾要因により変化することが知られている。

一方、実験小動物の繁殖機能に対する環境汚染物質の影響についてはいくつかの報告があるが^{4,5)}ガス環境の影響についての報告は少ない。

Shalamberidze⁶⁾は、低濃度の NO_2 および SO_2 の単一もしくは複合ガス暴露下でラットの性周期を観察し、ガス暴露によって性周期が遅延することを認め、さらにこのような性周期の変化が、暴露ガス濃度・暴露期間に依存することから、ラットの繁殖機能に対する暴露ガスの直接的影響であろうと考察している。しかしながら、これらの結果は1日12時間の間歇暴露下での実験結果であり、連続暴露による影響については明らかでない。

そこで今回、低濃度の NO_2 単一連続暴露がラットの性周期に及ぼす影響を検討したので報告する。

材料および方法

性周期の観察にはウィスターラットの雌で実験開始時に6週令のもの(体重210～235g)を用いた。ラットは $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 5\%$ の飼育環境で1週間予備飼育された後、ガス暴露チャンパー内に収容した。チャンパー内は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 5\%$ の環境に保たれ、照明は午前8時点燈の人工光による12時間照明とし、点燈時でのチャンパー内の平均照度は150 Luxであった。

性周期の観察は、毎日午前10時に綿棒により腔垢を採取し、ギムザ染色後腔垢内の出現細胞形態から、発情前期(Proestrus)、発情期(Estrus)、発情後期(Metestrus)、発情休止期(Diestrus)の4期にわけて判定した。

予備飼育期間中に性周期を調べ、正常な周期を示す個体50匹を各群10匹ずつに分け、ガス暴露群3、チャンパー内に収容するがガス暴露は行わないチャンパーコントロール群1、および予備飼育時から継続して同じ飼育室で飼育するルームコントロール群1の計5群とした。

これらのラットは $38(\text{W}) \times 29(\text{D}) \times 24(\text{H})$ cmのステンレス金網ケージに各5匹ずつ収容し、

市販の固型飼料および飲水を自由摂取させた。

チャンパー内にラットを収容，1週間の予備飼育を行った後に NO_2 ガスを暴露した。ガス濃度は，0.04 ppm (ASG-1)，0.4 ppm (ASG-2)，4 ppm (ASG-3) の3段階とし，43日間連続暴露した。

結果と考察

図1～5に各実験群での性周期の変化を個別別に示す。これによると，チャンパー内収容群は，対照群を含めすべての群で収容直後に性周期が変化する個体が数例認められた。すなわち，0.04 ppm 暴露群（以下0.04群）（図1）の1-E，2-A，0.4群（図2）の1-D，1-E，2-C，4群（図3）の2-B，2-E，および対照群（図4）の1-E，2-C，2-Eとチャンパーに収容しないで飼育したルームコントロール群（図5）の1-C，2-E等が指摘される。さらに，ガス暴露群では0.04群（図1）の2-BおよびC，0.4群（図2）の1-Cおよび2-A，4群（図3）の1-A・Bおよび2-D・Eのように暴露開始により発情休止期が持続する個体が

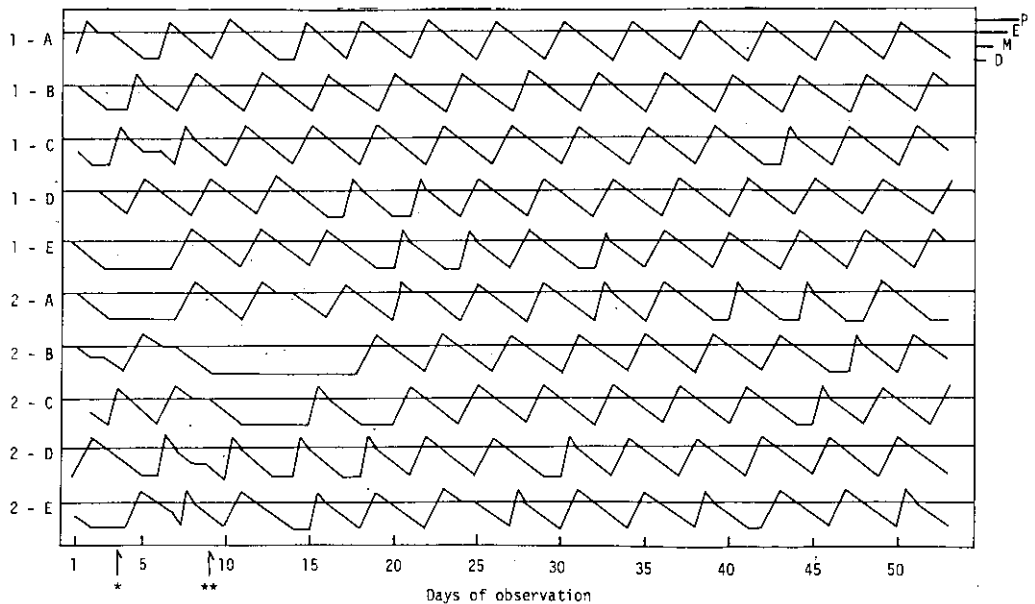


図1 ウィスターラットの性周期 (NO_2 0.04 ppm 暴露群)

Fig.1 Estrual cycle of wistar rats (Exposure group of 0.04 ppm NO_2)

*: accommodation to chamber.

** : onset of gas exposure.

P, E, M, D: level of proestrus (P), estrus (E), metestrus (M) and diestrus (D), respectively.

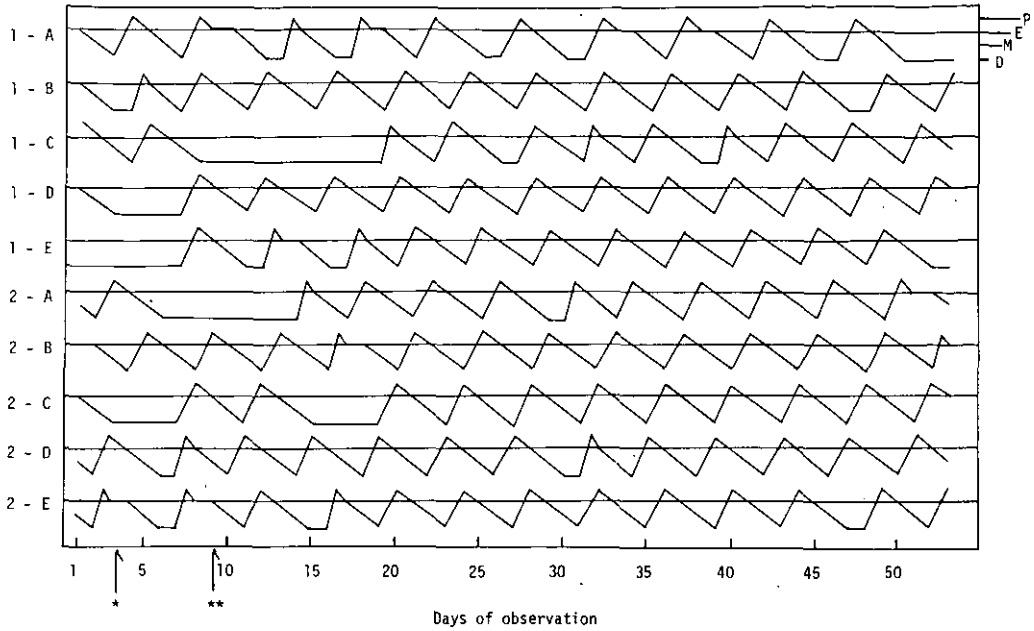


図2 ウィスターラットの性周期 (NO₂ 0.4 ppm 暴露群)

Fig. 2 Estrual cycle of wistar rats (Exposure group of 0.4 ppm NO₂)

Remarks: refer to Fig. 1.

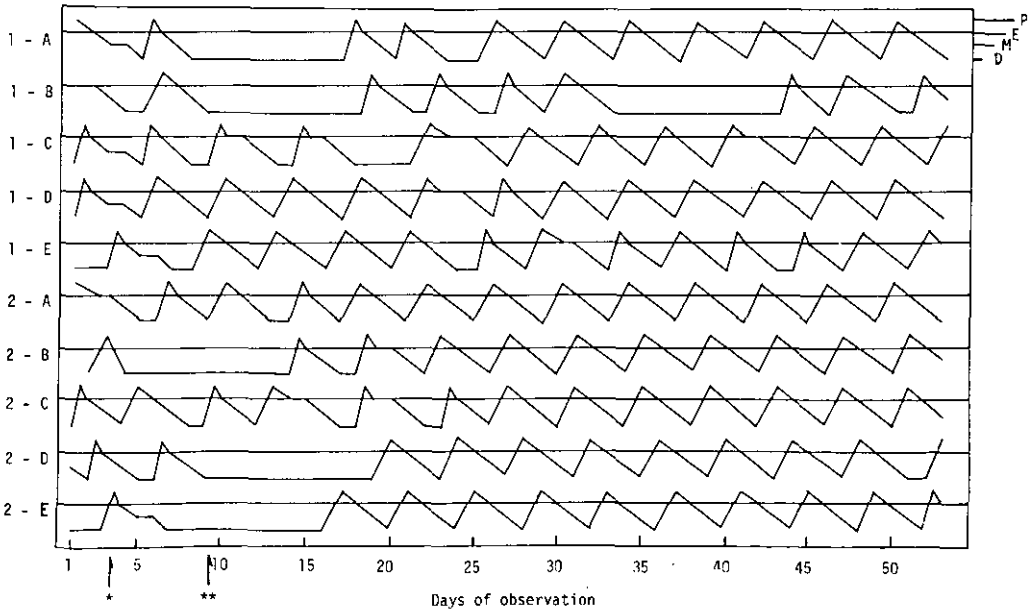


図3 ウィスターラットの性周期 (NO₂ 4.0 ppm 暴露群)

Fig. 3 Estrual cycle of wistar rats (Exposure group of 4.0 ppm NO₂)

Remarks: refer to Fig. 1

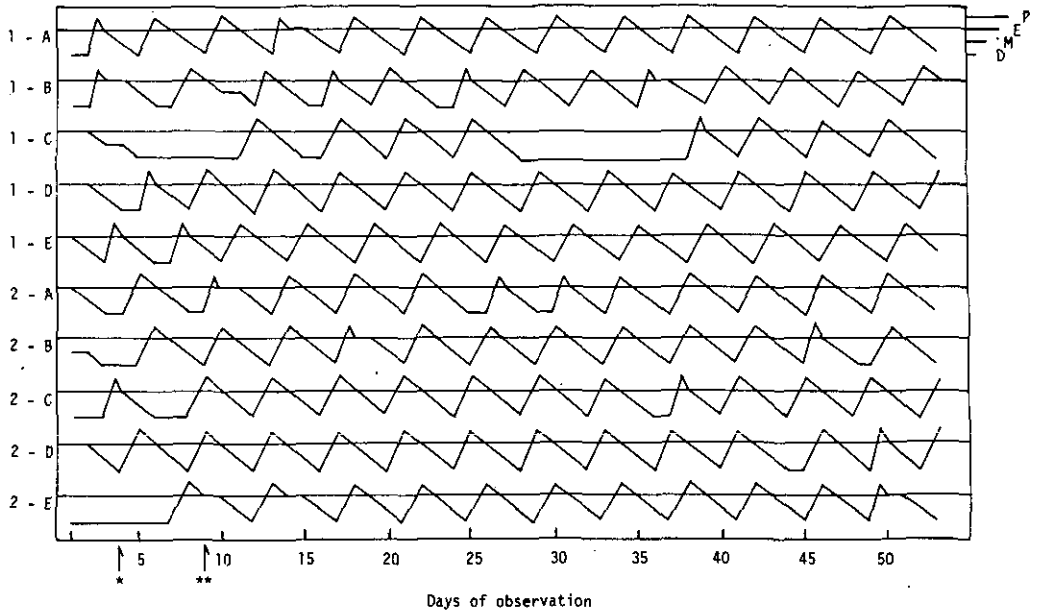


図4 ウィスターラットの性周期(チャンバー内飼育対照群)

Fig. 4 Estrual cycle of wistar rats (Control group in chamber)

Remarks: refer to Fig. 1.

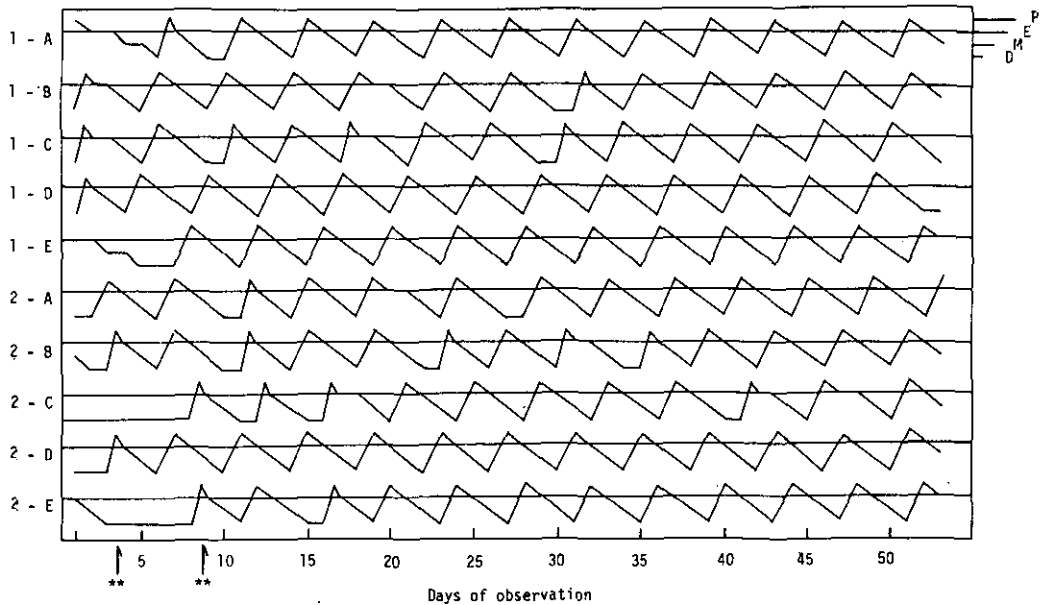


図5 ウィスターラットの性周期(飼育室内対照群)

Fig. 5 Estrual cycle of wistar rats (Control group in breeding room)

Remarks: refer to Fig. 1.

認められて、その出現頻度も暴露ガス濃度の上昇に伴って増加する傾向が認められた。しかしながら、これらの個体もチャンパー内で2～3週間を経過し環境に適応したとみられるころには、4～5日周期の正常な性周期に復帰し、ルームコントロール群およびチャンパーコントロール群との間に差異は認められなくなった。

Shalamberidze⁶⁾は、約1.26 ppm (2.36 mg/m³) および約0.07 ppm (0.126 mg/m³) の2種類の濃度のNO₂を1日12時間ずつ3か月間暴露したラットの性周期を観察し、1.26 ppm 暴露群では暴露期間中の性周期は、暴露前のそれと比べ平均周期日数および平均発情期期間の遅延が認められ、その為に1か月あたりの平均周期数および正常周期数が減少したと報告した。さらに、これらの変化が暴露期間の延長に伴って著明になることから、生殖器官の病理学的変化とあわせて、ガス暴露がラットの繁殖機能を低下させる可能性を示唆し、結果として産仔数および新生児体重の減少が生じることを報告している。また、NO₂ 0.64 ppm (1.2 mg/m³) とSO₂ 1.17 ppm (2.52 mg/m³) との複合暴露でも同様な影響が現われるが、一方、NO₂ 0.07 ppm (0.126 mg/m³) の単一暴露では影響がみられなかったことから、暴露ガスの種類および濃度が重要な要因になるとも考察している。

本実験で認められた性周期の変化は、その出現時期およびその後の回復状況からみて、チャンパー内収容による飼育形態ならびに飼育環境の変化が性周期に変化をもたらした主因であると考えられる。また、性周期の遅延も発情休止期の持続による結果生じたものであり、発情期期間が持続するというShalamberidze⁶⁾の報告とは質的に異なるもののように思われる。一方、本実験においても、ガス暴露開始により性周期が変化する個体の出現頻度は、暴露ガス濃度と相関を示すような傾向が認められたが、これについてはルームコントロール群においても若干の変化例が認められたことも考えると、暴露開始直後においても飼育環境中のガス環境がラットの性周期の乱れに直接作用したのではなく、他の環境要因の変化と複合した形で性周期に影響を与えたものと考察する方が妥当であると考えられる。

以上のように、本実験ではShalamberidze⁶⁾の報告とはやや異なる結果が得られたが、これは、間歇暴露と連続暴露の暴露方法の違いによるものかもしれない。いずれにしてもNO₂単一ガス暴露のラット繁殖機能に及ぼす影響については、今後より長期間の性周期観察とあわせて、暴露動物を用いた繁殖実験等を実施する必要があるものとする。

引用文献

- 1) 前川久太郎(1974): 光環境と哺乳動物の性の周期。環境と内分泌, 小林英司編集, 東大出版会, 東京, 163-194.
- 2) Bronson, F.H. and W.K. Whitten (1968): Oestrus-accelerating pheromone of mice: Assay androgen-dependency and presence in bladder urine. J. Reprod. Fert., 15, 131-134.

- 3) Champlin, A.K. (1971): Suppression of oestrus in grouped mice: The effects of various densities and the possible nature of the stimulus. *J. Reprod. Fert.*, **27**, 233-241.
- 4) 信永利馬, 佐藤洋, 鈴木継美 (1978): マウスの繁殖力に対するメチル水銀, セレンの作用。日衛誌, **33**, 132.
- 5) Wide, M. and O. Nilsson (1977): Differential susceptibility of the embryo to inorganic lead during periimplantation in mouse. *Teratology*, **16**, 273-276.
- 6) Shalamberidze, O.P. and N.T. Tsereteli (1971): Effect of low concentrations of sulfur and nitrogen dioxides on the estrual cycle and reproductive functions of experimental animals. *Hyg. Sanit.*, **36**, 178-182.

国立公害研究所特別研究成果報告

第1号 陸水域の富栄養化に関する総合研究——霞ヶ浦を対象域として。(1977)

第2号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究——昭和51/52年度 研究報告。(1978)

(改 称)

国立公害研究所研究報告

第3号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)

第4号 スモッグチャンバーによる炭化水素——窒素酸化物系光化学反応の研究——昭和52年度 中間報告。(1978)

第5号 芳香族炭化水素——窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究——昭和51/52年度 研究報告。(1978)

第6号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(II)——霞ヶ浦を中心として。(1979)

第7号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)

第8号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和52/53年度 研究報告。(1979)

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

No. 8

国立公害研究所研究報告 第8号

(R-8-'79)

昭和54年8月31日発行

編集・発行 国立公害研究所
茨城県筑波郡谷田郡町大字館野

印刷 日青工業株式会社
東京都港区西新橋2-5-10

Published by the National Institute for Environmental Studies

Tsukuba, Yatabe, Ibaraki 300-21, Japan.

August 1979