

R-40-'83

大気汚染物質の単一及び複合汚染の生物

に対する影響に関する実験的研究

昭和56年度 特別研究報告

Studies on the biological effects of
single and combined exposure of
air pollutants
Research report in 1981

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40号 (R-40-'83)

大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体
に対する影響に関する実験的研究

—昭和56年度 特別研究報告—

正 誤 表

頁	行	誤	正
iv	10	呼吸流速	呼吸流量
9	33	<u>71</u> —179	<u>171</u> —179
195	脚注4	〒213	〒214
"	" 5	Industrial Halth	Industrial Health
"	" "	Tamaku, <u>Kanagawa</u> , 213	Tamaku, <u>Kawasaki</u> 214
"	" 6	<u>decided</u>	<u>deseased</u>
199	文献6	<u>Low-level</u>	<u>low-level</u>
"	" 16	<u>122</u> —141	<u>121</u> —141
"	" 26	<u>Ultranrural</u>	<u>Ultrastructural</u>
200	2	<u>Drózdź</u>	<u>Drózdź</u>
201	Fig.10	thickening _____	thickening (<u>arrow</u>)
202	図14	0.11 ppm	0.12 ppm
"	図19	0.04 ppm <u>66</u> 月	0.04 ppm <u>6</u> か月
"	図21	epithelium _____	epithelium (<u>arrows</u>)
203	図27	腔面,	腔面,
240	図の説明Fig. 2	□, 9months;○,18months:	○,9months;□,18months:

序

特別研究、「大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究」は、昭和52年より5か年計画をもって実施し、57年3月に終了した。この研究の過程において得られた知見は、国立公害研究所研究報告第8号、同第15号、同第31号として既に公にしている。

現在特に都市域において、窒素酸化物、一酸化炭素、オゾン、エアロゾルなどによる大気汚染の健康影響が注目されている。当研究所では環境生理部長、久保田憲太郎医学博士をプロジェクトリーダーとして5年間研究を続けてきた。その方法は、動物実験棟（ズートロン）の中にあるガス暴露チャンバーを用い、ここで長期間二酸化窒素やオゾンを一定濃度に保ちながらラットやマウスに暴露し、その経過を観察すると同時に、一定期間の暴露をした後、生理学的、病理学的、生化学的、免疫学的な検索を行って、基礎的な知見を積み重ねてきた。

今回の報告書は、この5か年の特別研究の最終報告ではあるが、上記のごとく既に3回にわたって中間的報告を行ってあるので重複を避けて記述を行った。前回の報文にあわせて読んで載ければ幸いと考える。なお昭和57年度よりは、この特別研究の延長として、新しく「複合ガス状大気汚染物質の生体影響に関する実験的研究」を再び5か年計画をもって開始している。

さて、この報告は目次に示すとおり三つの部分に分かれている。第I部は、二酸化窒素、オゾンの急性、亜急性暴露の影響に関するもので、これらの汚染ガスの単一または複合暴露による生体影響を実験的に調べてその結果をまとめたものである。一部を除いてラットに対する影響が中心である。第II部は、二酸化窒素の長期暴露のラットに及ぼす影響と題し、いわゆる低濃度長期間暴露による慢性影響の実験結果である。このような実験は国立公害研究所研究報告第15号および第31号にも述べたが、実施が極めて困難であるが、その結果をこのようにまとめて発表することができたことは関係者として甚だ喜ばしいところである。最後に第III部は総説としてこの特別研究の過程で得られた知見を総合的にまとめ、それによってむしろ今後の研究に対する展望や課題を明らかにしてある。この課題の環境行政に関する重要性にかんがみ、このような研究は今後も引き続き行われなければならないが、第1期の特別研究が一応成果を収めたことは我々の深く満足するところである。しかし、大気汚染の人体に及ぼす健康影響については、当研究所の一つのテーマとして今後も総力をあげて重点的に研究を続継しなければならないと考えている。

この問題には単に医学、生物学の方面だけでなく、広く大勢の方が深く関心を持っておられることをよく承知しているが、これらの方々からご批判を賜り今後の研究の指針を受けることができれば甚だ幸いとするとところである。

1982年11月

国立公害研究所

所長 近藤次郎

目 次

研究の概要とその意義	1
久保田憲太郎	
I. 二酸化窒素, オゾンの急性・亜急性暴露の影響	
1. 二酸化窒素のラット赤血球への影響	13
——10 ppm NO ₂ 暴露による赤血球膜ホスファチジルエタノールアミンの脂肪酸組成の変動と赤血球 population——	
国本 学・彼谷邦光・持立克身・三浦 卓	
2. 二酸化窒素のラット赤血球への影響	21
——4 ppm NO ₂ による赤血球膜構成成分と赤血球 population の変動——	
国本 学・持立克身・彼谷邦光・三浦 卓	
3. 赤血球の解糖系に及ぼす二酸化窒素の影響	29
——赤血球の老化促進と若い赤血球の増加——	
持立克身・三浦 卓・彼谷邦光・国本 学	
4. 硝酸イオンによるラット赤血球膜ホスファチジルセリンの脂肪酸組成の選択的变化	47
彼谷邦光・三浦 卓	
5. 二酸化窒素のラット赤血球膜成分に及ぼす影響	59
——硝酸イオン及び亜硝酸イオンの効果——	
辻井直樹・国本 学・三浦 卓・彼谷邦光・持立克身・下條信弘	
6. 二酸化窒素の生体内における作用形態	69
——硝酸イオン及び亜硝酸イオンの効果——	
国本 学・局 博一・三浦 卓・彼谷邦光・持立克身	
7. 二酸化窒素を暴露したマウスの肺におけるガス交換の変化とその回復過程	79
鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎	
8. 二酸化窒素暴露に対する肺の抗酸化性防御機構の動物種差に関する研究	89
鈴木誠一・市瀬孝道・鈴木 明・嵯峨井勝	
9. 高濃度二酸化窒素暴露によるラットの生存時間と肺の Arylhydrocarbon Hydroxylase 活性の相関について	113
嵯峨井勝・鈴木誠一・市瀬孝道	
10. 二酸化窒素のラット臓器内膜成分に及ぼす影響	121
高橋勇二・三浦 卓・持立克身・大住拓美	
11. 二酸化窒素の肝ミクロソーム成分に及ぼす影響	131

——硝酸ナトリウムの効果——

持立克身・国本 学・三浦 卓・彼谷邦光

12. オゾン急性暴露に対する各種動物の感受性…………… 139

——NO₂暴露との比較——

竹中参二・堀内博人・今井 透・清水不二雄・村上正孝

13. オゾン急性暴露のラット肺及び血液中のSH化合物に及ぼす影響…………… 147

河田明治

14. オゾン亜急性暴露の免疫応答に及ぼす影響…………… 157

藤巻秀和・小澤 仁・今井 透・村上正孝

15. 実験小動物のための呼吸流速・流速測定用リニアライザーの開発…………… 163

清水 明・鈴木 明・局 博一

II. 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響

1. 第2回目実験の暴露チャンバーの環境制御…………… 171

清水 明・松本 茂・藤田和伸・木村英雄・高橋 弘

2. 第2回目実験の供試動物の飼育経過…………… 181

高橋 弘・高橋慎司・山元昭二・伊藤勇三

3. 病理形態学的所見…………… 195

京野洋子・三枝順三・故 河合清之・山田靖子・久保田憲太郎

4. 酸素消費量の変化について…………… 221

鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝

5. 低酸素血症について…………… 229

鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝

6. 呼気中エタン産生による脂質過酸化…………… 237

嵯峨井勝・市瀬孝道・小林隆弘

III. 総 説

1. 大気汚染物質の吸入が神経系機能に及ぼす影響に関する考察…………… 245

局 博一

2. 二酸化窒素の急性、亜急性及び慢性暴露による脂質過酸化と抗酸化性防御機構の
変化について…………… 255

市瀬孝道・嵯峨井勝

3. 二酸化窒素暴露による生体膜系の損傷とその修復について…………… 279

三浦 卓

4. 大気汚染物質暴露による細胞の嫌氣的代謝こう進に関する考察…………… 299
嵯峨井勝
5. 二酸化窒素またはオゾン暴露のラット肺及び血液中の SH 化合物に及ぼす影響 …… 319
河田明治

Contents

Outline and Significance of Performed Researches	1
K. KUBOTA (Project Leader)	
I. Effects of Short-Term Exposure to Nitrogen Dioxide or Ozone on Experimental Animals	
1. Effects of Nitrogen Dioxide on Red Blood Cells of Rats : Alteration of Fatty Acid Composition of Phosphatidylethanolamine and Populational Changes of Red Blood Cells during <i>In Vivo</i> Exposure to 10 ppm NO ₂	13
M. KUNIMOTO, K. KAYA, K. MOCHITATE and T. MIURA	
2. Effects of Nitrogen Dioxide on Red Blood Cells of Rats : Alterations of Cell Membrane Components and Populational Changes of Red Blood Cells During <i>In Vivo</i> Exposure to NO ₂	21
M. KUNIMOTO, K. MOCHITATE, K. KAYA and T. MIURA	
3. Effect of Nitrogen Dioxide on Activities of Glycolytic Enzymes : Enhancement of Aging of Red Blood Cells and Subsequent Replacement by Young Red Cells	29
K. MOCHITATE, T. MIURA, K. KAYA and M. KUNIMOTO	
4. Selective Changes in Fatty Acid Composition of Phosphatidylserine in Rat Erythrocyte Membrane Induced by Nitrate	47
K. KAYA and T. MIURA	
5. Effects of Nitrogen Dioxide on Components of Red Cell Membranes of Rat : Effects of Sodium Nitrate and Sodium Nitrite	59
N. TSUJII, M. KUNIMOTO, T. MIURA, K. KAYA, K. MOCHITATE and N. SHIMOJYO	
6. Effects of Intravenous Injection of Nitrate and Nitrite Ions on Red Blood Cells and Liver Microsomes of Rats	69
M. KUNIMOTO, H. TSUBONE, T. MIURA, K. KAYA and K. MOCHITATE	
7. Changes of Gaseous Exchange in the Lung of Mice Exposed to Nitrogen Dioxide and Their Recovery Process	79
A. K. SUZUKI, H. TSUBONE, M. SAGAI and K. KUBOTA	
8. Studies on Species Difference in Antioxidative Protective Systems in Lungs of Animals Exposed to Nitrogen Dioxide	89
S. SUZUKI, T. ICHINOSE, A. K. SUZUKI, and M. SAGAI	
9. Relationship between Survival Time of Rats Exposed to High Level of Nitrogen	

	Dioxide and Arylhydrocarbon Hydroxylase Activity in Lungs.	113
	M. SAGAI, S. SUZUKI and T. ICHINOSE	
10.	Effects of Nitrogen Dioxide on Membranous Constituents of Rat Tissues	121
	Y. TAKAHASHI, T. MIURA, K. MOCHITATE and T. OSUMI	
11.	Effects of Nitrogen Dioxide on Components of Liver Microsomes: Effect of Sodium Nitrate	131
	K. MOCHITATE, M. KUNIMOTO, T. MIURA and K. KAYA	
12.	Comparative Studies of Susceptibility of Various Animals to Short-Term Exposure to Ozone or NO ₂	139
	S. TAKENAKA, H. HORIUCHI, T. IMAI, F. SHIMIZU and M. MURAKAMI	
13.	Effect of Acute Exposure to Ozone on Sulfhydryls in Lung and Blood of Rats	147
	M. KAWATA	
14.	Effect of Subacute Exposure to Ozone on Antibody Response	157
	H. FUJIMAKI, M. OZAWA, T. IMAI and M. MURAKAMI	
15.	A Linearlyzer for Measurements of Respiratory Velocity and Flow Rate of Experimental Small Animals	163
	A. SHIMIZU, A. K. SUZUKI and H. TSUBONE	
 II. Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide on Rats		
1.	Results of Environmental Control in the 2nd Experiment	171
	A. SHIMIZU, S. MATSUMOTO, K. FUJITA, H. KIMURA and H. TAKAHASHI	
2.	Experimental Animals Supplied to the 2nd Experiment	181
	H. TAKAHASHI, S. TAKAHASHI, S. YAMAMOTO and Y. ITO	
3.	Morphological Observations	195
	H. KYONO, J. SAEGUSA, late K. KAWAI, Y. YAMADA and K. KUBOTA	
4.	O ₂ Consumption	221
	A. K. SUZUKI, H. TSUBONE and M. SAGAI	
5.	Hypoxemia of Rats Exposed to Nitrogen Dioxide	229
	A. K. SUZUKI, H. TSUBONE and M. SAGAI	
6.	Lipid Peroxidation as Measured by Ethane Evolution in Breath Gases	237
	M. SAGAI, T. ICHINOSE and T. KOBAYASHI	
 III. Review Articles		
1.	Functional Alterations of Nervous System Following Inhalation to Air Pollutants	245

H. TSUBONE

2. Changes of Lipid Peroxidation and Antioxidative Protective Systems in Lungs
of Rats Exposed Acutely, Subacutely and Chronically to Nitrogen Dioxide 255
T. ICHINOSE and M. SAGAI
3. Degradation and Repair of Biological Membrane upon Nitrogen-Dioxide Inhalation ... 279
T. MIURA
4. On Stimulation of Anaerobic Metabolism in Cells by Air Pollutant Exposure 299
M. SAGAI
5. Effect of Exposure to Nitrogen Dioxide or Ozone on Sulfhydryls in Lung and Blood
of Rats 319
M. KAWATA

研究の概要とその意義

Outline and Significance of Performed Researches

久保田憲太郎¹

Kentaro KUBOTA¹

特別研究の目的

特別研究「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」は、昭和52年度より5か年にわたって行われ昭和57年3月に終了した。本特別研究は、ガス状大気汚染物質の生体影響を解明することを目的としたが、その内容は二つに大別できる。第一は、代表的な汚染物質であるNO₂とO₃について急性・亜急性吸入暴露実験を行い、これらの単一又は複合による生体影響検索のための新たな指標を確立すること、及びこれらガスによる影響の差異と作用機序を明らかにすることであった。第二は、NO₂の影響指標として確立されている項目と新たに影響指標となる可能性が認められた項目について慢性影響における量・効果関係を検討し、大気汚染物質に係る環境基準等の検討に際しての基礎資料とすることであった。この目的のために、これまで試みられていない低濃度でのNO₂慢性吸入暴露実験を行い、急性・亜急性影響と慢性影響との質的差異を比較検討した。

本号の内容の概要

本特別研究の研究成果は、国立公害研究所研究報告(Rシリーズ)(第8号,第15号,第31号)として過去3回にわたって刊行して来たが、本号をもって終了する。本号の内容は、NO₂及びO₃についての急性・亜急性吸入暴露実験の成果15編(第I部)と、動物実験棟に設置されたNO₂長期暴露用チャンバーを用いて0.4ppmを上限としたNO₂低濃度領域で行われた18か月間の吸入暴露実験の研究成果6編(第II部)を中心としている。これらに過去5年間の研究の総括又は今後の研究の方向について考察した綜説5編(第III部)を加えたものが本報告書である。以上の研究成果の内容を次に概説する。

1. プロジェクトリーダー, 国立公害研究所 環境生理部長 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Project Leader, The National Institute for Environmental Studies, Director, Basic Medical Sciences
Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

第 I 部：NO₂及び O₃の急性・亜急性吸入暴露実験の成果

(1) 実験動物の感受性について

大気汚染物質の生体影響を研究する際に、実験動物の感受性に留意することが必要である。今回は O₃の感受性の問題をとりあげ NO₂の感受性と比較した。O₃に対してはマウス雄 C₃H/He と雌 C₅₇BL/6J の間に LC₅₀で 4.8 倍の差があり、ラットの LC₅₀は 3.1~4.3 ppm の間にあった。ゴールデンハムスターは NO₂に対して高感受性であったが O₃に対して中程度であった。3 種 15 系統、雌雄における O₃による LC₅₀と NO₂の LC₅₀に $r=0.52$ の相関が示され、NO₂LC₅₀/O₃LC₅₀は 9.8 であった [I-12] *。

NO₂に関する竹中らの感受性に関する実験に対応して、種差及び性差の観点から生化学的に調べることが試みられた。過酸化脂質量、抗酸化性防禦系の酵素活性、抗酸化性物質量の暴露群/対照群の比率では LC₅₀と正の相関を示すものが多かったが、モルモットでは例外的変化が認められた。特に低感受性動物であるモルモットのミクロソーム画分中の Arylhydrocarbon Hydroxylase (AHH) 活性は極端に高い値を示し、Cytochrome P₁-450 関連酵素がその感受性と深い関連があると推論された [I-8]。また、薬物代謝系酵素誘導剤 (3-メチルコランソレン) を前投与すると致死濃度の NO₂の暴露に対して延命効果が認められるが、この機序と雌雄間の生存時間の相違の原因を調べ、3MC の前投与による生存時間と肺のミクロソーム系酵素活性との間に高い相関が認められた。AHH 活性の増加は雌で顕著であり、量-効果関係も雌雄間に相違があることが判明した。従って Cytochrome P₁-450 系は NO₂に対する何らかの防禦作用を持っている可能性が示唆された [I-9]。

(2) 呼吸器等の臓器に対する影響

NO₂急性暴露が肺の生理機能に及ぼす影響を明らかにするために、マウスに頭部密閉法を用いて呼吸中の O₂と CO₂濃度、Paco₂と Pao₂及び肺水分含量を測定し、肺のガス交換能について検討した。20 ppm NO₂ 24 時間暴露により肺におけるガス交換は、暴露開始 3 時間後から抑制され暴露終了後 3 日目で対照群のレベルにまで回復することが判明した [I-7]。次に、実験動物及び暴露動物の生理 (代謝) 的变化を検索するために、ラット小動物の呼気量及び吸気量を呼吸流速曲線から求めるため、リニアライザー装置を製作した。この新しい装置を用いて、一回換気量、分時換気量及び呼吸数を麻酔ラットで検討し、他の研究者の結果と比較した結果本装置がラットの呼吸機能及び代謝の変化を検討するのに有効であることが証明された [I-15]。

NO₂暴露によって臓器生体膜成分が受ける損傷と修復過程を生化学的に明らかにするために、4.0 ppm、1.2 ppm 及び 0.4 ppm の NO₂をラットに 4 週間暴露した。肺のミトコンドリア (Mt) とミクロソーム (Ms) の電子伝達系成分は増加→減少→増加のサイクルを辿り変動することが明らかとなった。一方、肝 Ms の電子伝達系成分の場合、減少→増加→減少のサイクルを示し、NO₂による損傷は

* () 内は論文番号

薬物代謝系の成分に特異性が高いことが明らかになった [I-10]。次に、NO₂が肝 Ms 成分に作用する際の化学形態を明らかにすることを試みた。硝酸イオンと亜硝酸イオンをラットに静脈注射し肝 Ms 成分に及ぼす影響を調べた。その結果、硝酸ナトリウムの静脈注射は 4 ppm NO₂ 暴露の場合と同様の变化を肝 Ms 電子伝達系成分に及ぼすことが判明した。一方、亜硝酸ナトリウムは Cytochrome P-450 含量を特異的に低下させ、NO₂ 暴露の場合と異っていた [I-6]。そこで、硝酸イオンの肝 Ms 成分への作用を調べるために、ラット肝より調製した Ms を硝酸ナトリウムとインキュベーションし Ms 電子伝達系成分の変化を調べた。その結果、薬物代謝系成分は硝酸ナトリウムの添加濃度に依存して低下した。以上の結果から、NO₂ 暴露による肝 Ms 成分の低下は、NO₂ 暴露によって血液中に増加する硝酸ナトリウムによって起こる可能性が支持された [I-11]。

O₃ 暴露がラットの肺及び血液のSH化合物量に及ぼす影響について検討した。肺では、0.8 ppm O₃ 暴露によってGSHとNPSHは1日目に低下し3日目に最高値を示し以後一定の値に維持された。2 ppm および 4 ppm O₃ 暴露では GSH, NPSH 共に減少し、PSH も有意に減少した。この際、血液中の SH 化合物は有意な変化を示さなかった [I-13]。

(3) 赤血球に対する影響

NO₂の赤血球に対する影響について検討し、10 ppm 5 日間暴露したラットの赤血球膜リン脂質中ホスファチジルエタノールアミン (PE) のアラキドン酸含量の増加とパルミチン酸含量の減少が認められた。赤血球を比重の違いにより 4 画分にわけて調べた結果、分画しない全赤血球の PE のアラキドン酸の増加は比重の小さい若い赤血球画分の割合の増加により引き起こされている可能性が示唆された [I-1]。次いで、4 ppm NO₂ 暴露による赤血球膜構成成分の変動と赤血球の population の変動との関連について調べた。その結果、暴露 1~4 日目で比重の小さい若い赤血球画分は対照群より上昇するが 7 日目で対照群のレベル以下に低下した。この低下に伴い比重の大きい赤血球画分の割合が上昇した。比重の小さい赤血球画分の割合の変動とほぼ平行して、Na⁺, K⁺-ATPase 活性、シアル酸含量の変動がみられ、これらの変動は赤血球の population の変動が原因になっていると結論した [I-2]。一方、赤血球の解糖系酵素活性への影響を調べた結果、フォスフォフルクトキナーゼ (PFK) とパイルベイトキナーゼ (PK) 活性は対照群の活性に対して、4 ppm NO₂ 暴露 5~7 日目で 20% 増加していた。赤血球を比重の違いにより 4 分画し各画分の酵素活性を測定したところ、PFK, PK の活性増加は、これらの酵素活性を高く保持した状態で赤血球の老化が促進されたことが原因である可能性が示された [I-3]。

NO₂が硝酸イオンと亜硝酸イオンの形で赤血球に作用する可能性を検討するために、ラットの血液を亜硝酸ナトリウム又は硝酸ナトリウムとインキュベーションし赤血球膜成分量の変化を調べた。その結果、亜硝酸ナトリウムによってヘキソース含量が低下し硝酸ナトリウムによって Ca⁺, Mg²⁺-ATPase 活性の低下することが明らかになった。4 ppm NO₂ 暴露によって血液中に若い赤血球の割合が増加したために起こったシアル酸含量と Na⁺, K⁺-ATPase 活性の増加は、これらイオンに

よってほとんど影響を受けなかった〔I-5〕。更に NO₂ 暴露による赤血球膜の Ca²⁺、Mg²⁺-ATPase 活性の低下が NO₂ 暴露によって血液中に増加する硝酸イオンによって起こる可能性を確かめるために、硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムをラットに静脈注射し赤血球膜の ATPase 活性を調べ、Ca²⁺、Mg²⁺-ATPase 活性は硝酸ナトリウムの注入によって低下することが明らかになった。以上の結果から、NO₂ は吸入されると硝酸イオン、亜硝酸イオンとして赤血球に移行し、赤血球膜成分の低下を引き起こすことが明らかとなった〔I-6〕。硝酸イオンの赤血球膜への作用機序を解明する試みもなされ、このイオンが赤血球膜の膜構造を乱すカオトロピック作用をもつこととカルシウムイオンの赤血球内への流入促進を起こす可能性が明らかにされた〔I-4〕。

(4) 免疫応答に対する影響

0.4 ppm 及び 0.8 ppm O₃ の 4 週間暴露による BALB/c 雄マウスの抗体産生能に及ぼす影響について検討した。In vivo の系では 0.8 ppm 2 週間暴露で抗 SRBC 抗体産生が抑制されたが、4 週間で対照群にくらべて亢進する傾向が認められた。0.4 ppm では対照群と差が認められなかった。In vitro 系では 0.8 ppm 2 週間暴露で抗 SRBC、抗 DNP 抗体産生の抑制がみられたが 4 週間では抗体産生の抑制はみられなかった。この結果より 0.8 ppm O₃ 2 週間暴露はマウス免疫応答を著明に抑制することが示唆された〔I-14〕。

第 II 部：低濃度 NO₂ の慢性吸入暴露実験の成果

本特別研究では第 I 部の急性・亜急性実験と平行して NO₂ の低濃度領域における慢性暴露実験を 3 回にわたって行った。以下の項は第 3 回目の実験の研究成果をまとめたものである。

(1) ガス濃度制御と供試動物の経過

第 3 回目の NO₂ 低濃度慢性暴露実験は昭和 55 年 5 月より昭和 56 年 12 月までの間に 18 か月にわたり連続暴露を行った。暴露チャンパー内の温度と湿度は各々 25°C と 55% に設定し、温度は ±1°C、湿度は ±10% の範囲内に全暴露期間の 94% 以上の時間が含まれた。NO₂ 暴露濃度は、0.04 ppm、0.12 ppm 及び 0.4 ppm の 3 濃度に設定され、設定濃度の ±10% の範囲内で全運転時間の 0.4 ppm は 97% 以上、0.12 ppm 及び 0.04 ppm は 73% 以上の時間が制御された。27 か月と 18 か月の前 2 回の実験の場合と同様、ほぼ満足すべき環境制御下で研究を遂行することが出来た〔II-1〕。供試動物についても、導入された 576 匹中 555 匹が実験に供され、18 か月の間自然発生腫瘍等による自然死以外に感染をうたがうような例はなく、体重の変化も各チャンパー間に差が認められなかった〔II-2〕。

(2) 呼吸器の病理形態学的観察

NO₂ を 3、6、9、18 か月連続暴露したが、このうち 0.04、0.4 ppm の 9、18 か月暴露は第 1 回慢性

暴露実験の再実験として行われた。光学顕微鏡による観察では、最高濃度 0.4 ppm で 3 か月から 18 か月の暴露期間中、軽微な局所的変化、すなわち末梢気道と肺胞道近傍の気管支上皮の軽度の肥大や肺胞道への気道上皮の増殖性延長を認めた。また、肺胞道の壁も軽度の結合織増加による肥厚等の頻度がやや増加し、全体としては疑陽性であった。0.4 ppm 以下の濃度の NO_2 を 18 か月まで暴露した場合には光顕レベルで十分確定出来る程の定型的肺病変の出現は認められず、第 1 回 (27 か月) 暴露実験の結果が支持された (II-3)。

(3) 生理機能への影響

呼吸器における生理機能の変化を明らかにするために、 NO_2 を 3~18 か月間暴露し呼吸生理学的指標について検討した。ペントバルビタール麻酔下の分時換気量 (\dot{V}_E) 及び呼吸数 (RR) は、0.04 ppm NO_2 暴露群で対照群にくらべ各々 10~23% 及び 7~18% の増加を示した。このように低濃度長期暴露によって RR の増加だけでなく、 \dot{V}_E も増加していることは注目に値する現象である。一方、酸素消費量も 3 か月目で 0.04 ppm 及び 0.12 ppm NO_2 暴露群で対照群と比較しておよそ 23~38% 増加するが、暴露期間の延長に伴って少なくなる傾向がみられた (II-4)。一方、無麻酔下の動脈血の pH_a 、 Paco_2 、 Pao_2 への影響を調べたところ、心拍数 (HR)、血液ヘモグロビン (Hb) は対照群と暴露群との間に大きな変化はなかったが、0.4 ppm NO_2 暴露群の Pao_2 は 9、18 か月目で有意に低下することが判明した。以上の如く血中酸素量が暴露期間の延長と共に低下することは今後、換気能の変動との関連から詳細に検討する必要がある (II-5)。

(4) 脂質過酸化

NO_2 を 6、9、18 か月間暴露した後、脂質過酸化の指標になると考えられるラットの呼気中低級炭化水素を分析した。エタンは 6 か月目では 0.4 ppm 群で有意に増加し、9 か月、18 か月では、0.04 ppm、0.12 ppm 及び 0.4 ppm NO_2 いずれの暴露濃度においても有意に増加し、暴露濃度の上昇と暴露期間の延長につれて増加することが判明し、第 1 回 (27 か月) の慢性暴露実験の結果の再現性を確認することが出来た。しかしながら、加齢 (老化) 動物において、特に、過酸化脂質産生率が高くなるという結果は認められなかった。また、飼料の過酸化は NO_2 暴露濃度に依存して上昇し、0.4 ppm NO_2 暴露チャンバー内の飼料の過酸化脂質量は対照チャンバー内のに比較して 50% 増加していた。この過酸化された飼料でラットを飼育しても呼気中のエタン産生に影響は認められなかった (II-6)。

第 III 部には、過去 5 か年の本特別研究で得られた研究成果を基本とした綜説を収録した。 NO_2 の急性・亜急性及び慢性暴露による脂質過酸化と抗酸化性防御機構に関するもの (III-2)、 NO_2 暴露による生体膜系の損傷と修復に関するもの (III-3)、 NO_2 及び O_3 暴露による生体内 SH 化合物に関するもの (III-5) である。

今後の研究の方向を考察したものとしては大気汚染物質の神経系機能に対する影響に関するもの〔III-1〕と、大気汚染物質が細胞レベルで嫌気性代謝を亢進する可能性に関するもの〔III-4〕である。

本特別研究の成果と意義

NO₂の実験動物に及ぼす影響に関する研究は、本特別研究が発足した昭和52年の段階ですでに内外の多数の研究者により呼吸器への影響を中心として研究が行われていた。従って、当初我々はNO₂の影響指標として既に確立された項目またはその可能性がある項目について、当研究所に新設されたNO₂ガス暴露装置を用い再検討した。4 ppm以上の濃度のNO₂急性・亜急性暴露によって、呼吸器の病理的变化、呼吸器の生理機能の変化、血液の臨床生化学値の変化及び肺、血液の抗酸化性物質質量の変化等を確認し、その後の研究を進める上での基礎資料とした。

大気汚染物質の生体影響に関する研究の最終目標の一つは、人間活動によってもたらされる環境の変化がヒトを含む生物系に与える結果を予測することである。このような社会的要請にこたえるためには、環境条件の変化による生体影響に関する研究に新しい方向と方法を求め、基礎に重点をおいた学際的研究が必要であろう。このような観点にたって本特別研究では、実験動物学、病理学、生理学、生化学、毒物学、免疫学の専門領域に所属する研究者が、各自の専門分野からNO₂の実験動物に及ぼす影響について検索し新たな影響指標を確立し、ついで各々の専門分野を超えて環境汚染物質の生体影響を総合的に把握することを目指した。本特別研究の期間内において、主として研究者の充足が遅れたことが原因となり、十分満足すべき段階にまでは到達しえなかったが、全体としては参加した研究者が考える項目をほぼ検討し、一部については作用機序の解明も試みられた。その結果急性・亜急性暴露実験において新たにNO₂の影響として見出されたものは以下の項目である。

肺については、(1)O₂、CO₂交換能の低下、(2)抗酸化性物質質量及び抗酸化性防禦系酵素活性の暴露初期での低下とその後の増加、(3)ミクロソーム電子伝達系成分の周期的な低下であった。

血液については、(4)血清脂肪酸組成の変化、(5)赤血球解糖系酵素活性の増加、(6)赤血球膜成分の変動であった。

肝臓においては、(7)薬物代謝系が特異的に低下することが見出された。

脾臓においては、(8)液性抗体産生能の低下が見出された。

さらに、本特別研究において新たに見出されたNO₂の影響指標について、O₃の単一又はNO₂との複合での影響も検討した。そして、研究者が各自の専門分野ごとに行った研究を相互に関連づける試みもなされた。

本特別研究の第二の目的であるNO₂の低濃度での慢性吸入暴露実験では、従来からの指標と新たに見出した影響指標とについて検討し、生体の広範囲な変化を把握することを目指した。ラットを用いた特記すべき主要な成果は以下のとおりである。

- (1) 呼吸器の病理形態学的観察によって 4 ppm 9 か月暴露では気管支上皮の肥大・過形成と肺胞壁の肥厚という定型的病変が現れ、27 か月目には線維化と上皮増殖の進行が認められた。0.4 ppm 暴露では 18 か月まで病変を確定し得ないが、27 か月目では軽度の病変が観察された。形態計測法を導入して肺胞壁の厚さを定量的に算出した結果、4 ppm では 18 か月目、0.4 ppm では 27 か月目に有意に壁の肥厚が認められた。0.04 ppm では全期間対照群との間に有意な差はみられなかったが、27 か月目には増加傾向が現れた。
- (2) 動脈血酸素分圧は 0.4 ppm 暴露では 9 か月目で有意に低下した。
- (3) 呼気中の O₂、CO₂ 量を測定し 0.12 ppm 暴露 3 か月で酸素消費量が有意に増加した。
- (4) 生体内の脂質過酸化の指標になると考えられる呼気中の低級炭化水素濃度を測定した結果、エタン排出の割合が 0.04 ppm 暴露 9 か月目で有意に増加した。
- (5) 肺におけるグルタチオン量は 4 ppm 暴露 1 か月目から有意に増加し、27 か月目まで高いレベルを維持した。
- (6) 抗酸化性防禦系酵素活性は 0.4 ppm から 4 ppm の暴露 18 か月目で対照群のレベルより低下することが観察された。

以上のように、本特別研究では、新たに確立した影響指標を中心として多くの検索項目について NO₂ の低濃度での慢性影響を明確にした。これらの実験は環境基準に関する基礎資料の一部として役立つものと考えられる。しかしながら、NO₂ の吸入による生体影響は、前述したように単に呼吸器に留まることなく生体の広い範囲にわたっており、この事実を踏まえるならば、低濃度での慢性影響を正しく評価するためには各専門分野からの知見を質・量ともに向上させるとともに NO₂ の作用機序を詳細に検討することが必要であろう。このような研究の進展に伴い各専門分野を超えて NO₂ の生体影響を総合的に把握することが可能になると考える。また、同時にこれまでに見出されている NO₂ の影響指標について、健康に及ぼす影響という観点から評価する研究が重要である。このような研究は単に正常な生体に対する NO₂ 単独での影響を調べる研究に留まらず、NO₂ の影響を増幅させる内的要因ならびに外的要因について検討することが必要であろう。これらの研究の発展に伴って大気汚染物質がヒトを含む生物系に与える結果を予測する道も開けてくるものと期待される。

本特別研究を終了するにあたり、故大山先生をはじめ、佐々、近藤、高桑の諸先生、客員研究員の諸先生の御指導、御鞭達をいただいたことに対して深甚なる謝意を表します。又共同研究員の諸兄諸姉に対しても御礼申し上げます。

特に昭和 52 年以来客員研究員として病理形態学の御指導を賜った故河合清之先生、昭和 53 年以来評議委員会専門別評議員として種々御指導をいただいた故山本正先生ならびに本研究所設立準備委員会（茅委員会）のメンバーとして本研究所設立に尽力をいただいた恩師故柳沢謙先生の御霊に対して謹んで御礼申し上げます。

その他特別研究に有形無形の援助をいただいた所内、特に研究企画官、総務部、技術部、さらに本研究の基礎を支えていただいたエネルギー管理・動物管理等の委託職員の皆様に厚く御礼申し上げます。

誌 上 発 表

1. 久保田憲太郎(1981)：研究の概要及び今後の展望。国立公害研究所研究報告，第 31 号，1—9.
2. 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一 (1981)：二酸化窒素急性暴露のマウスの肺機能に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告，第 31 号，11—19.
3. 清水 明・局 博一・鈴木 明 (1981)：ラットの呼気・吸気分離装置について——装置の機能とその応用。国立公害研究所研究報告，第 31 号，21—29.
4. 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一 (1981)：二酸化窒素吸入時のイヌの呼吸気道内二酸化窒素濃度の変化。国立公害研究所研究報告，第 31 号，31—43.
5. 織田 肇・永澤節子・局 博一・鈴木 明 (1981)：一酸化窒素および二酸化窒素の生体内挙動。国立公害研究所研究報告，第 31 号，45—58.
6. 局 博一・鈴木 明・永澤節子・織田 肇 (1981)：二酸化窒素の急性暴露によるラットの心電異常。国立公害研究所研究報告，第 31 号，59—65.
7. 嵯峨井勝・市瀬孝道 (1981)：二酸化窒素急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化。国立公害研究所研究報告，第 31 号，67—79.
8. 市瀬孝道・嵯峨井勝 (1981)：二酸化窒素亜急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化防御機構の変化。国立公害研究所研究報告，第 31 号，81—93.
9. 嵯峨井勝・市瀬孝道 (1981)：二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化。国立公害研究所研究報告，第 31 号，95—108.
10. 河田明治 (1981)：二酸化窒素亜急性暴露のラット肺 SH 化合物に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告，第 31 号，109—115.
11. 小林隆弘 (1981)：二酸化窒素と肺の表面を構成する物質との反応——コレステロールとの反応。国立公害研究所研究報告，第 31 号，117—123.
12. 小林隆弘 (1981)：二酸化窒素と不飽和脂肪酸の反応生成物のラット肺リン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告，第 31 号，125—131.
13. 小林隆弘 (1981)：二酸化窒素と不飽和脂肪酸の反応生成物の肺プロスタサイクリン合成に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告，第 31 号，133—139.
14. 小林隆弘・森田育男・室田誠逸 (1981)：二酸化窒素急性暴露の肺プロスタサイクリン合成に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告，第 31 号，141—145.
15. 三浦 卓・持立克身・彼谷邦光・国本 学 (1981)：二酸化窒素暴露ラットの臓器内膜成分に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告，第 31 号，147—161.
16. 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光 (1981)：二酸化窒素の肺の解糖系および呼吸系に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告，第 31 号，163—167.
17. 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光・国本 学 (1981)：二酸化窒素またはオゾンの赤血球解糖系に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告，第 31 号，169—174.

18. 彼谷邦光・三浦 卓 (1981) : 二酸化窒素のラット肝臓・血清および赤血球膜の脂肪酸組成に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第 31 号, 175—185.
19. 彼谷邦光・国本 学・三浦 卓・持立克身 (1981) : 二酸化窒素またはオゾンの間歇暴露による赤血球膜成分の変動. 国立公害研究所研究報告, 第 31 号, 187—193.
20. 藤巻秀和 (1981) : 二酸化窒素亜急性暴露のリンパ球に及ぼす影響——*In vivo* 系での検索. 国立公害研究所研究報告, 第 31 号, 195—200.
21. Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153—164.
22. Sagai, M., T. Ichinose, and K. Kubota (1983): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. IV. Changes of lipid peroxidation and the antioxidative protective systems in rat lungs upon life span exposure to low levels of NO₂. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (in press)
23. 嵯峨井勝 (1982) : 大気汚染物質と脂質過酸化. 変異原と毒性, **5**, 233—242.
24. 嵯峨井勝 (1982) : 栄養と脂質過酸化. 変異原と毒性, **5**, 223—235.
25. 嵯峨井勝 (1982) : 生体内過酸化脂質の測定法——呼気分析——. 過酸化脂質実験法. 金田, 植田編 (医歯薬出版) .
26. Ichinose, T., A. K. Suzuki, H. Tsubone and M. Sagai (1982) : Biochemical studies on strain differences of mice in the susceptibility to nitrogen dioxide. *Life Sciences*, **18**, 1963—1972.
27. Ichinose, T. and M. Sagai (1982) : Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. III. Changes of the antioxidative protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by chronic exposure. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **65**, 1—8.
28. 市瀬孝道・嵯峨井勝 (1982) : 老齡ラットの脂質過酸化と脂質成分の相関性について. 過酸化脂質研究, **4**, 印刷中.
29. 市瀬孝道・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1983) : 二酸化窒素の急性, 亜急性および慢性暴露による脂質過酸化と抗酸化性防御機構の変化について. 大気汚染学会誌, **18**, 131—145.
30. Suzuki, A. K., H. Tsubone and K. Kubota (1981) : Changes of gaseous exchange in the lung of mice acutely exposed to nitrogen dioxide. *Toxicol. Lett.*, **10**, 327—335.
31. Suzuki, A. K., T. Ichinose, H. Tsubone, H. Oda and K. Kubota (1982) : Effects of acute nitrogen dioxide exposure on swimming performance of mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 165—172.
32. Suzuki, A. K., H. Tsubone, M. Sagai and K. Kubota (1982) : Changes of gaseous exchange in the lungs of mice exposed to nitrogen dioxide and their recovery process. *Toxicol. Lett.*, **13**, 71—179.
33. Tsubone, H., H. Oda, A. K. Suzuki and K. Kubota (1982) : Electrocardiographic abnormali-

- ties in rats by acute exposure of nitrogen dioxide. *Toxicol. Lett.*, **12**, 125—129.
34. Kaya, K. and T. Miura (1982): Effects of nitrogen dioxide on fatty acid compositions of red cell membranes, sera and livers in rats. *Environ. Res.*, **27**, 24—35.
 35. Kaya, K. and T. Miura (1982): Selective changes in fatty acid composition of phosphatidylserine in rat erythrocyte membrane induced by nitrate. *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 305—315.
 36. Kunimoto, M., K. Mochitate, K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1983): Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: Alterations of cell membrane components and populational changes of red blood cells during *in vivo* exposure to NO₂. *Environ. Res.*, in press.
 37. Mochitate, K., K. Kaya and T. Mirura (1983): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, in press.
 38. Fujimaki, H., F. Shimizu and K. Kubota (1981): Suppression of antibody response in mice by acute exposure to nitrogen dioxide: *In vitro* study. *Environ. Res.*, **26**, 490—496.
 39. Maitani, T. and K. T. Suzuki (1981): Metal content ratio sensitive indicator of pulmonary edema. *Toxicol. Lett.*, **9**, 295—300.

学 会 発 表

1. 高橋 弘・松本 茂・久保田憲太郎 (1980): NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響, 実験環境の設定・維持と供試動物の飼育経過. 第21回大気汚染学会 (浦和)
2. 高橋 弘・清水 明・寺尾恵治・小田 保 (1981): 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. 第72回日本畜産学会大会 (福岡)
3. 市瀬孝道・鈴木 明・局 博一 (1981): 二酸化窒素暴露ラットの血液性状に及ぼす影響——1 高濃度 NO₂暴露——. 第92回日本獣医学会 (十和田)
4. 市瀬孝道・鈴木 明・局 博一 (1981): 二酸化窒素暴露ラットの血液性状に及ぼす影響——2 低濃度 NO₂長期暴露——. 第92回日本獣医学会 (十和田)
5. 市瀬孝道・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1981): 低濃度 NO₂亜急性暴露ラットの脂質過酸化と肺における抗酸化性防御系の変化. 第22回大気汚染学会 (秋田)
6. 彼谷邦光・三浦 卓・国本 学 (1981): ラット赤血球膜リン脂質の脂肪酸組成におよぼす二酸化窒素の影響. 日本生化学会大会第54回年会 (仙台)
7. 河田明治 (1981): NO₂亜急性暴露がラット肺のSH化合物に及ぼす影響. 日本薬学会第101回年会 (熊本)
8. 嵯峨井勝・市瀬孝道・織田 肇・久保田憲太郎 (1981): NO₂暴露による脂質過酸化と防御系の変化. 日本衛生学会 (札幌)
9. 今井 透・清水不二雄・白石不二雄・藤巻秀和・久保田憲太郎 (1981): オゾン・NO₂急性暴露によるマウス IgE 抗体産生の増強. 第22回大気汚染学会 (秋田)

10. 白石不二雄・坂東 博・秋元 肇・久保田憲太郎・黒木登志夫 (1981) : 光化学二次汚染物質の培養細胞への暴露方式について. 第 22 回大気汚染学会 (秋田)
11. 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・久保田憲太郎 (1981) : NO₂ 暴露に対するマウス系統間の感受性の相違と血液 pH/ガス分圧. 第 22 回大気汚染学会 (秋田)
12. 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・清水 明 (1981) : ラットにおける呼気・吸気分離の試み II. 呼気・吸気分離による一回換気量と分離換気量. 第 91 回日本獣医学会 (東京)
13. 山崎英世・局 博一・鈴木 明 (1981) : イヌの麻酔時の脳波について III. パワースペクトルを用いた帯域区分の検討. 第 91 回日本獣医学会 (東京)
14. 局 博一・織田 肇・鈴木 明・久保田憲太郎 (1981) : 高濃度 NO₂ 暴露でみられる心機能異常の発見要因について. 第 22 回大気汚染学会 (秋田)
15. 藤巻秀和・久保田憲太郎・清水不二雄 (1981) : NO₂ 亜急性暴露の抗体産生能に及ぼす影響——*In vitro* 系での検索——. 第 51 回日本衛生学会 (札幌)
16. 三浦 卓・彼谷邦光・持立克身 (1981) : ラット肝ミクロソームの電子伝達系に及ぼす二酸化窒素 (NO₂) の影響. 日本生化学大会第 54 回年会 (仙台)
17. 国本 学・局 博一・辻直井樹・三浦 卓・彼谷邦光・持立克身・久保田憲太郎 (1982) : NO₂ 暴露のラット赤血球に及ぼす影響——硝酸イオンと膜 ATPase 活性との関係——. 第 52 回日本衛生学会総会 (東京)
18. 持立克身・局 博一・国本 学・彼谷邦光・三浦 卓・久保田憲太郎 (1982) : 二酸化窒素のラット肝ミクロソーム成分に及ぼす影響: 硝酸ナトリウムとミクロソーム成分との関係. 第 52 回日本衛生学会総会 (東京)
19. 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1982) : 二酸化窒素動物暴露用フロータイプ光化学チャンバーについて. 第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
20. 局 博一・鈴木 明・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1982) : 大気汚染物質が気道反射機構に及ぼす影響に関する研究 I 肺伸展受容器について. 第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
21. 局 博一・鈴木 明・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1982) : NO₂ 暴露による心電図異常——とくに呼吸運動との関連性について. 第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
22. 鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1982) : NO₂ および O₃ の単一あるいは複合暴露がラットの呼吸機能に及ぼす影響. 第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
23. 藤巻秀和・小澤 仁・村上正孝・久保田憲太郎 (1982) : O₃ 亜急性暴露のマウス抗体産生に及ぼす影響 I IgM 抗体産生について. 第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
24. 小澤 仁・今井 透・本多芳男・藤巻秀和・白石不二雄・村上正孝・久保田憲太郎 (1982) : O₃ 亜急性暴露のマウス抗体産生に及ぼす影響 II IgE 抗体産生について. 第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
25. 市瀬孝道・鈴木誠一・鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1982) : 二酸化窒素暴

- 露に対する肺の抗酸化性防御機能の動物種差に関する研究。第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
26. 市瀬孝道・鈴木誠一・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1982) : 高濃度二酸化窒素暴露によるラットの生存時間と肺 Arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性の相関について。第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
 27. 高橋勇二・三浦 卓・持立克身・久保田憲太郎・大住拓美 (1982) : NO₂暴露のラット肺の生体膜成分に及ぼす影響。第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
 28. 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光・国本 学・久保田憲太郎 (1982) : 赤血球の解糖系に及ぼす二酸化窒素の影響。第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
 29. 辻井直樹・国本 学・彼谷邦光・三浦 卓・久保田憲太郎 (1982) : NO₂暴露ラット赤血球膜 ATPase に及ぼす影響。第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
 30. 竹中参二・久保田憲太郎 (1982) : NO₂亜急性暴露マウスにおける耐性の持続と消失。第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
 31. 高橋 弘・高橋慎二・山元昭二・伊藤勇三・久保田憲太郎 (1982) : NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響。第 7 報 供試動物の飼育経過(2)。第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
 32. 清水 明・松本 茂・藤田和伸・木村英雄・高橋 弘・久保田憲太郎 (1982) : NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響 第 8 報 実験環境の設定と維持(2) 第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
 33. 鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1982) : NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響 第 9 報 血液 pH/ガスおよび呼気ガス(O₂, CO₂)の変化について。第 23 回大気汚染学会(宮崎)
 34. 嵯峨井勝・市瀬孝道・小林隆弘・久保田憲太郎 (1982) : NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響 第 10 報 呼気中炭化水素分析による脂質過酸化について。第 23 回大気汚染学会 (宮崎)
 35. 国本 学・彼谷邦光・三浦 卓 (1982) : ラット赤血球の老化に伴う脂質組成, 脂質代謝の変化。第 24 回脂質生化学研究会 (仙台)

そ の 他

大気汚染物質の生体影響に関するシンポジウム：昭和 57 年 3 月 12-13 日 (国立公害研)

I-1

二酸化窒素のラット赤血球への影響
——10 ppm NO₂暴露による赤血球膜ホスファチジルエタノールアミンの
脂肪酸組成の変動と赤血球 population——

Effects of Nitrogen Dioxide on Red Blood Cells of Rats:
Alteration of Fatty Acid Composition of Phosphatidylethanolamine and Populational
Changes of Red Blood Cells during *In Vivo* Exposure to 10 ppm NO₂.

国本 学¹・彼谷邦光¹・持立克身¹・三浦 卓¹

Manabu KUNIMOTO¹, Kunimitsu KAYA¹, Katsumi MOCHITATE¹
and Takashi MIURA¹

要 旨

10 ppm NO₂暴露5日目で、ラット赤血球膜の主要リン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) のアラキドン酸含量の増加とパルミチン酸含量の減少が認められた。また同時に赤血球を比重差により4画分に分画した際、暴露群において比重の小さな画分の割合の増加も認められた。比重の小さな画分の赤血球は、血流中に放出されて間もない赤血球、即ち若い赤血球であり、PEの脂肪酸組成では、比重の大きい画分に比べ、アラキドン酸、パルミチン酸含量が高く、オレイン酸リノール酸含量が低かった。従ってNO₂暴露により認められた。PEのアラキドン酸含量の増加は、比重の小さい若い赤血球画分の割合の増加により引き起こされている可能性が示唆された。

Abstract

When male Wistar rats were exposed to NO₂ at the concentration of 10 ppm for 5 days, an increase in the relative amount of arachidonic acid and a decrease in the relative amount of palmitic acid in phosphatidylethanolamine (PE) of erythrocyte membranes were observed. In order to examine changes in erythrocyte population, red blood cells were fractionated into four fractions according to their densities using dextran density centrifugation. Increases in the percentages of lower density cells were observed 5 days after exposure to 10 ppm NO₂. PE in lower-density cells contains more arachidonic acid and palmitic acid than that in higher-density cells dose.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Based on these results, it is concluded that an increase in the relative amount of arachidonic acid in PE, occurred by exposure to 10 ppm NO₂ for 5 days, was caused by an increase in the percentages of lower density cells in erythrocyte population.

はじめに

大気汚染物質の一種である二酸化窒素 (NO₂) の吸入によるラット赤血球膜脂質の変動について報告してきた¹⁾²⁾。ラットの赤血球はヒトを含めた他の哺乳動物の赤血球と同様に、細胞内に核、あるいはミトコンドリア、小胞体等の細胞内小器官を持たず、膜脂質の調節に関しても、*de novo* の生合成系、あるいは脂肪酸の鎖長、不飽和度を変える系を持たない³⁾。このようなラット赤血球の膜脂質組成変動のメカニズム解明の一助として、ラット赤血球を比重差により分画することを試み、各画分の赤血球膜脂質の分析を行い、NO₂暴露による赤血球の画分の変動の影響について検討を行った。

方 法

1. 暴露条件

6匹を一群とした Jcl : Wistar 系雄ラット (14 週齢) を 10±0.5 ppm の NO₂ で 5 日間連続暴露した。対照群も 6匹一群の同一ロットのラットを用い、NO₂ 暴露の場合と同型の暴露チャンバーに入れ、NO₂ のかわりに、フィルターを通した新鮮空気を通気した。

2. 赤血球の調製

NO₂ 暴露群及び対照群のラットの頸動脈からヘパリン存在下で採血した。全血 7.5 ml に等張の 50% デキストラン T40 溶液 2.5 ml を加えよく混ぜたのち Abraham らの方法⁴⁾ により調製した、デキストラン T40 の段階的密度勾配 (図 1) の上に重層し、4°C で 90,000×g, 90 分間遠心を行った。各濃度のデキストラン溶液の層の界面に赤血球が回収され、比重の大きい方から順に、画分 I~IV とした。各画分の赤血球は、デキストランを除くため、生理食塩水で 3 回洗滌した。赤血球膜は Dodge らの方法⁵⁾ に準じ、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で溶血させ、遠心することにより調製した。

3. 赤血球膜脂質の分析

赤血球膜脂質の抽出は以下のように行った。赤血球膜画分に 20 倍容のクロロホルム-メタノール (1:1, v/v) を加えよく振とうした後、不溶物質を遠心で除き、上清を濃縮乾固し少量のクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) に溶解した。PE の分離は、シリカゲル 60 の薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム: メタノール: 28% アンモニア水: 水=73:27:2:3) により行った。分離した PE は BF₃-MeOH を用いてその脂肪酸をメチルエステルとし、ガスクロマトグラフィー (装置: Shimadzu GC-7AG, カラム: 5% Shinchrom E-71 (4.1 m×0.5 m, ガラスカラム), カ

NO₂暴露による赤血球の膜脂質組成と比重の変動

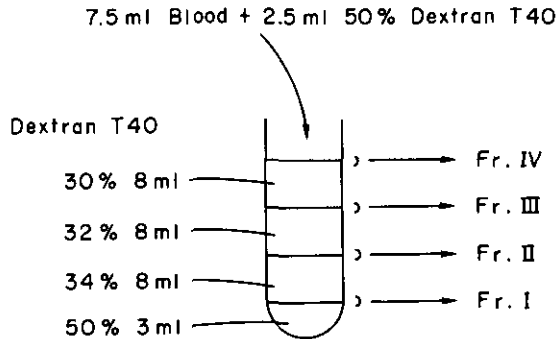


図 1 デキストラン段階的密度勾配遠心法を用いたラット赤血球の比重差による分画

Fig. 1 Separation of red blood cells according to their densities. Centrifugation was performed at $90,000 \times g$ for 9 min at 4°C.

ラム温度；230°C，検出器；FID）で分析した。

4. 赤血球膜 PE の 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 標識

アミノ基に対する反応性が高く、生体膜を通過しない試薬である TNBS による赤血球膜 PE の標識は Marinetti らの方法⁶⁾の変法で行った。1 ml の洗條赤血球に、15 mM TNBS を含む 120 mM, NaHCO₃ (pH 8.5) (40 mM NaCl, 5.5 mM グルコース, 0.5%デキストラン T70 を含む) 50 ml を加え、20°C で 3 時間反応させた。前記の方法で赤血球膜画分を得、膜脂質を抽出した。TNBS で標識された PE (TNP-PE) と未反応の PE (Unreacted PE) はシリカゲル 60 の薄層クロマトグラフィで分離し、それらの脂肪酸組成の分析は前記の方法で行った。

結 果

1. 10 ppm NO₂ 5 日間暴露での赤血球膜 PE の脂肪酸組成の変化

表 1 に 10 ppm NO₂ を 5 日間暴露したラットの赤血球膜 PE と、対照群の赤血球膜 PE の脂肪酸組成を示した。暴露群で、アラキドン酸 (20:4) の含量が高く、パルミチン酸+パルミトレイン酸 (16) の含量が低かった。他の脂肪酸の相対的含量には有意な変化は認められなかった。

2. 10 ppm NO₂ 5 日間暴露での赤血球膜 TNP-PE と Unreacted-PE の脂肪酸組成の変化

TNBS は生体膜を通過しないとされており⁶⁾外から加えた TNBS は、無傷の赤血球の膜の外層 (Outer leaflet) に存在する PE とのみ反応することができる。従って TNP-PE は赤血球膜の

表 1 10 ppm NO₂を5日間暴露したラットの赤血球膜ホスファチジルエタノールアミンの脂肪酸組成

Table 1 Fatty acid composition of phosphatidylethanolamine in red blood cells of rats exposed to 10 ppm NO₂ for 5 days

Fatty acids	16	18:0	18:1	18:2	20:4
Control	28.9±0.3	3.3±0	10.5±0.1	6.6±0.1	32.7±0.2(%)
Exposed	27.7±0.5*	3.2±0.1	10.1±0.5	5.9±0.1**	34.7±0.3**

*p<0.05, **p<0.01

(n=3, mean±S. D.)

outer leaflet に, Unreacted PE は, 内層 (inner leaflet) に存在する PE を反映していると考えられる。表 2 に, 10 ppm NO₂を5日間暴露したラット及び対照群のラットの赤血球膜の TNP-PE, Unreacted PE の脂肪酸組成を示した。アラキドン酸 (20:4) とパルミチル酸+パルミトレイン酸 (16) の変化は, whole PE の変化と平行して, TNP-PE, Unreacted PE でも観察されており, TNP-PE, あるいは Unreacted PE に特異的な変化は認められなかった。

表 2 10 ppm NO₂を5日間暴露したラットの赤血球膜の TNBS で標識された PE (TNP-PE) と標識されない PE (Unreacted PE) の脂肪酸組成

Table 2 Fatty acid composition of TNBS-labelled and unlabelled phosphatidylethanolamine in red cells of rats exposed to 10 ppm NO₂ for 5 days

Fatty acid		16	18:0	18:1	18:2	20:4
Control	Whole PE	28.9	3.3	10.5	6.6	32.7 (%)
	TNP-PE	26.9	3.2	10.1	6.2	34.3
	Unreacted PE	29.3	4.1	10.3	6.5	32.0
Exposed	Whole PE	27.6	3.2	10.1	5.9	34.7
	TNP-PE	26.8	3.1	10.3	6.0	36.5
	Unreacted PE	30.2	4.6	9.4	5.6	33.9

3. 10 ppm NO₂ 5 日間暴露での赤血球 population の変化

表 3 に, 10 ppm NO₂を5日間暴露したラット及び対照群のラットの赤血球をデキストラン T40 の段階的密度勾配遠心で分画した際の各画分の割合を示した。この値は, 生理食塩水で洗滌してデキストランを除いた後, 2000rpm, 10 分間遠心した際の赤血球湿容量に基づいて計算したものである。比重の小さい2つの画分の割合が増加しており, 比重の大きい2つの画分の割合は減少していた。

4. デキストランの段階的密度勾配遠心で分画した赤血球の PE の脂肪酸組成

デキストラン T40 の段階的密度勾配遠心で4画分したラット赤血球の PE の脂肪酸組成を表 4

NO₂暴露による赤血球の膜脂質組成と比重の変動

表 3 10 ppm NO₂を5日間暴露したラットの赤血球, population の変動
Table 3 Percentage of each subfraction of rat red blood cells exposed to 10 ppm NO₂ for 5 days

Fraction	IV (Top)	III	II	I (Bottom)
Control	29.2±15.2	35.0±7.3	23.9±12.0	11.9±7.5
Exposed	38.0±14.1	38.7±2.6	19.7±10.5	3.6±2.6

(n=6, mean±S. D.)

に示した。赤血球の比重が大きくなるに従って、即ち血流中での老化に伴ってアラキドン酸 (20:4), パルミチン酸+パルミトレイン酸 (16) の相対的含量の減少とステアリン酸 (18:0), オレイン酸 (18:1), リノール酸 (18:2) の相対的含量の増加が認められた。表には画分IVとIしか示し

表 4 比重差で分画したラット赤血球のホスファチジルエタノールアミンの脂肪酸組成
Table 4 Fatty acid composition of PE in density separated red cells

Fatty acids	Whole cells	Fraction IV	Fraction I	
16	27.7±0.7	29.0±0.5	25.5±0.9***	(%)
18:0	3.8±0.2	3.3±0.1	4.3±0.5**	
18:1	10.8±0.2	9.1±0.6	13.6±0.6***	
18:2	6.1±0.3	4.0±0.4	9.2±1.0***	
20:4	34.9±0.6	36.7±1.2	31.9±1.5***	

The percentage of each fatty acid in fraction I was compared to that in fraction IV: **p<0.01, ***p<0.001 (n=6, mean±S. D.)

ていないが、この変化は画分IV, III, II, I間でほぼ直線的であった。

考 察

10 ppm NO₂を5日間暴露することにより、ラットの赤血球膜主要リン脂質の一つであるホスファチジルエタノールアミン (PE) の脂肪酸組成において、対照群に比し、アラキドン酸の相対的含量が増加し、パルミチン酸+パルミトレイン酸の相対的含量が低下することが認められた (表1)。成熟したラットの赤血球は、ヒトをはじめ他の哺乳動物の赤血球と同様に *de novo* のリン脂質合成系あるいは脂肪酸の鎖長、不飽和度を変える系を持たず、リン脂質の代謝系としては、血漿リン脂質との交換反応あるいは、リン脂質の脂肪酸の加水分解、再エステル化反応 (deacylation-reacylation) に限定されている。このようなラット赤血球で表1に示したような脂肪酸組成の変動が起こるメカニズムとしては、1) deacylation-reacylation 系の特異性の変化、2) 血漿の遊離脂肪酸、リン脂質の脂肪酸組成の変化の反映、3) 異種の脂肪酸組成 (アラキドン酸に富む、等) を持つ赤血球の出現、等が考えられる。

まず1) の可能性であるが、ラット赤血球膜の主要リン脂質であるホスファチジルコリン (PC)

への血漿からの脂肪酸取り込みは、膜の inner leaflet に存在する PC に特異性が高いことが報告されている⁷⁾。一方ヒト赤血球膜の PE への脂肪酸取り込みは、いくつかの脂肪酸種において膜の outer leaflet に存在する PE に特異性が高いことが報告されており⁸⁾、類似の現象をラットにおいても我々は観察している。そこでラット赤血球膜の PE を TNBS により outer leaflet に存在するもの (TNP-PE)、inner leaflet に存在するもの (Unreated PE) を識別し 10 ppm NO₂ 5 日間暴露の脂肪酸組成への影響を調べたが (表 2)、TNP-PE あるいは Unreated PE に特異的な変化は認められなかった。また、ラット赤血球の deacylation-reacylation 系の PE に対する処理能力は、~3 m mole Fatty acid/mole Phospholipid/day 程度であり、5 日間程度では大きな変化は起こしにくいと考えられる。

次に 2) の可能性であるが、血漿リン脂質との交換反応は、ラット血漿に PE が微量にしか存在しないことなどから、赤血球膜 PE への影響は少ないと考えられる。また、遊離脂肪酸の組成は、10 ppm NO₂ で多少の変動が認められているが、1) の可能性の項で述べたようにこの変動が直ちに赤血球膜 PE の脂肪酸組成に反映される可能性は少ないと考えられる。

3) の可能性であるが、10 ppm NO₂ 5 日間暴露で、赤血球 population に変動が認められ、比重の小さな 2 つの画分の割合が減少することが明らかになった (表 3)。また、この比重の小さな画分の赤血球の PE の脂肪酸組成では、比重の大きな画分のものに比べ、アラキドン酸とパルミチン酸+パルミトレイン酸含量が高く、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸含量が低かった (表 4)。この 2 つの結果、即ちアラキドン酸含量の高い画分 IV の割合が 10 ppm NO₂ 5 日間暴露で増加することから、全赤血球の PE の脂肪酸組成においてみかけ上アラキドン酸とパルミチン酸+パルミトレイン酸含量が高く、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸含量が低くなることが予測されるが、パルミチン酸+パルミトレイン酸を除き、実際の結果 (表 1) とよく一致している。パルミチン酸+パルミトレイン酸の矛盾した変化については、他の可能性の関与を考えなくてはならないが、現在のところ十分な解答は得られていない。

引用文献

- 1) 彼谷邦光・三浦 卓 (1980): 二酸化窒素暴露によるラット赤血球膜リン脂質の脂肪酸組成の変動。国立公害研究所報告, 第15号, 117-124.
- 2) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980); Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: changes in components of red cell membranes during *in vivo* exposure to NO₂. Environ. Res., **23**, 397-409.
- 3) Shohet, S. B. (1977): in Lipid Metabolism in Mammals 1. (ed. by Snyder, F.), pp. 189-208, Plenum Press, New York.
- 4) Abraham, E. C., D. Walker, M. Gravely and T. H. J. Huisman (1975): Major hemoglobins in sickle cell anemia, β -thalassemia, and related conditions: a study of red cell fractions isolated by density gradient centrifugation. Biochem. Med., **13**, 56-77.

NO₂暴露による赤血球の膜脂質組成と比重の変動

- 5) Dodge, J. T., C. Mitchell and D. J. Hanahan (1963): Preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119-130.
- 6) Gordesky, S. E. and G. V. Marinetti (1973): The asymmetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 1027-1031.
- 7) Renooij, W., L. M. G. van Golde, R. F. A. Zwaal and L. L. M. van Deenen (1976): Topological asymmetry of phospholipid metabolism in rat erythrocyte membranes. *Eur. J. Biochem.*, **61**, 53-58.
- 8) Marinetti, G. V. and K. Cattieu (1982): Asymmetric metabolism of phosphatidylethanolamine in the human red cell membrane. *J. Biol. Chem.*, **257**, 245-248.

I - 2

二酸化窒素のラット赤血球への影響

— 4 ppm NO₂による赤血球膜構成成分と赤血球 population の変動* —

Effects of Nitrogen Dioxide on Red Blood Cells of Rats: Alterations of Cell Membrane Components and Populational Changes of Red Blood Cells During *in Vivo* Exposure to NO₂

国本 学¹・持立克身¹・彼谷邦光¹・三浦 卓¹

Manabu KUNIMOTO¹, Katsumi MOCHITATE¹, Kunimitsu KAYA¹
and Takashi MIURA¹

要 旨

Wistar系の雄ラットに4 ppm NO₂を連続暴露した際の、赤血球膜構成成分、膜結合性酵素活性の変動と赤血球 population の変動との関連性について検討した。赤血球 population はデキストランの段階的密度勾配遠心により、比重の大きい方からI, II, III, IVの四つの画分に分画し検討した。4 ppm NO₂暴露1日目、4日目で画分IVの割合が対照群の1.43, 1.68倍と高く7日目で対照群のレベル以下まで低下し、この低下に伴い比重の大きい画分I, IIの赤血球の割合は上昇した。この画分IVの割合の変動とほぼ平行して、Na⁺, K⁺-ATPase 活性及びシアル酸含量の変動が観察された。また、画分IVの赤血球は、他の3画分に比べNa⁺, K⁺-ATPase 活性, Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性及びシアル酸の含量が高かった。従って、4 ppm NO₂暴露に伴うNa⁺, K⁺-ATPase 活性, シアル酸含量の変動は説明されるが、Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性の変動は説明されない。また、暴露1日目の赤血球を分画して検討した結果、同一画分を比較した際、暴露群と対照群で差が認められており、赤血球 population の変動以外の因子の関与も考える必要がある。

Abstract

Male Wistar rats were exposed to 4 ppm nitrogen dioxide (NO₂) for 10 days in order to examine the relationship between the changes in components of red cell membranes and alterations of erythrocyte population. Na⁺, K⁺-ATPase activity of red cell membranes of exposed animals showed a significantly higher value than that of the control at the first and fourth day of exposure and then decreased to under the control value at the 7th day. In order

* 本論文の原著は、Environmental Research に印刷中である。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

to examine changes in erythrocyte population, red blood cells were fractionated into four fractions according to their density using the Dextran-density centrifugation. The alteration of the percentage of lowest-density cells (fraction IV) of exposed animals was completely consistent with that of Na^+ , K^+ -ATPase activity in addition to that of the sialic acid content as described in the previous report. The percentage of fraction IV was 1.43- ($p < 0.05$) and 1.68-fold ($p < 0.01$) those of the control at the first and fourth day of exposure and, then, decreased to under the control value at the 7th day. This decrease accompanied increases in the percentages of higher-density cells (fractions I and II). Examination on subfractions of red blood cells showed that Na^+ , K^+ -ATPase activity and the sialic acid content of three fractions with lower-densities have higher values in exposed animals than in the control 1 day after exposure to NO_2 . Based on these results, it is concluded that increases in Na^+ , K^+ -ATPase activity and the sialic acid content occurred by 1 day exposure to 4 ppm NO_2 were caused by elevated levels of these components in three fractions with lower-densities as well as by an increase in the percentage of lowest-density cells in erythrocyte population. It was also suggested that NO_2 inhalation accelerated aging of erythrocytes with respect to density.

The change in Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity was different from those in the sialic acid content and Na^+ , K^+ -ATPase activity. Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of exposed animals showed slightly reduced value 1 day after exposure to NO_2 . In all subfractions of red blood cells these values were slightly lower in exposed animals than in the control. Therefore, reduction in Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity is not due to changes in erythrocyte population.

はじめに

大気汚染物質の一種である二酸化窒素 (NO_2) の暴露による赤血球膜構成成分の変動について既に報告してきた¹⁾⁻³⁾。成熟したラットの赤血球はヒトをはじめ他の哺乳動物の赤血球と同様に核をはじめミトコンドリア、小胞体等の細胞内小器官を持たず、タンパク質合成能を持たない。従って、このようなラット赤血球で観察された 4 ppm NO_2 暴露に伴う ATPase 活性シアル酸含量の変動は、合成能の変動では説明できない。また、ラット赤血球は平均寿命が 60 日程度で、絶えず新生、破壊が繰り返されている。そこで、赤血球膜構成成分の変動の原因として赤血球 population の変動に着目した。既に比重差で分画した赤血球を用いて種々の検討が加えられているが、比重の小さな赤血球は若い赤血球であり、シアル酸含量⁴⁾、ATPase 活性が高いことも報告されている⁵⁾。今回、ラット赤血球をデキストランの段階的密度勾配遠心で四つの画分に分画し、 NO_2 暴露に伴う各画分の割合の変動と、赤血球膜構成成分の変動の関連性、及び NO_2 暴露により赤血球の新生が促進されている可能性について検討した。

方 法

1. 暴露条件

6 匹を一群とした Jcl: Wistar の雄ラット (13~26 週令) を 4 ± 0.08 ppm の NO_2 で連続暴露した。対照群も 6 匹一群の同一ロットのラットを用い、 NO_2 暴露の場合と同型の暴露チャンバーに入れ、

NO₂のかわりにフィルターを通した新鮮空気を通気した。

2. 赤血球の調整

前報⁶⁾と同様に行った。

3. ATPase 活性の測定

赤血球膜の ATPase 活性の測定は 3 mM ATP, 68.5 mM NaCl, 28 mM KCl, 3.1 mM MgCl₂, 0.18 mM CaCl₂, 69 mM Histidine (pH 7.5) を含む反応液 0.5 ml 中で行い, 37°C, 30 分間のインキュベーションの後, 30% トリクロル酢酸 0.1 ml を加え反応を終了した。Na⁺, K⁺-ATPase 活性の測定は, 反応液に最終濃度 1.5 mM の EGTA を加え, KCl を除いたものを対照とした。Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は, EGTA を加えたものを対照として決定した。遊離した無機リンの定量は Chen らの方法⁷⁾によった。赤血球膜リン脂質の定量は Harris らの方法⁸⁾によった。

4. シアル酸含量の測定

シアル酸の定量は, 赤血球膜標品を 0.5 N H₂SO₄ で 80°C, 60 分間加水分解し, 遊離したシアル酸について Aminoff の方法⁹⁾に従って行った。

結 果

1. ATPase 活性の変動

4 ppm NO₂ の暴露によりラット赤血球膜の Na⁺, K⁺-ATPase 活性は, 暴露 1 日目で対照群の 1.28 倍の値を示し, その後減少してゆき, 7 日目では対照群のレベル以下となった (図 1)。一方, Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は暴露 1 日目と 10 日目で対照群の 0.77, 0.84 倍であり, 4 日目, 7 日目では対照群よりやや高い値を示した (図 2)。

2. 赤血球 population の変動

暴露群, 対照群のラットの赤血球をデキストランの段階的密度勾配遠心で分画し, 各画分の割合をヘモグロビン量で算出した結果を図 3 に示した。暴露 1 日目と 4 日目で最も比重の小さな画分 IV の割合が, 対照群の 1.43, 1.68 倍と有意に高い値を示し, その後対照群と同程度の値となった。これに対し, 比重の大きな画分 II と I の割合は, 4 日目まで対照群より低く, 7 日目では対照群よりやや高くなった。なおヘマトクリット値は, 暴露群, 対照群とも, 暴露期間中を通じてほぼ一定であった。

3. 比重差で分画した赤血球各画分の ATPase 活性

表 1 に赤血球各画分の Na⁺, K⁺-ATPase 活性を示したが, 画分 IV で最も高く, 画分 I で最も低

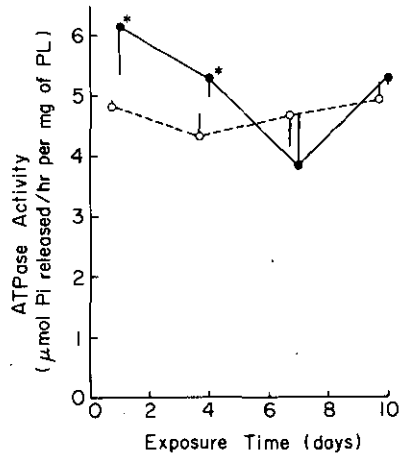


図 1 4 ppm NO₂ 暴露によるラット赤血球膜 Na⁺, K⁺-ATPase 活性の変動
 Fig. 1 Changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity of red cell membranes during exposure to NO₂

Rats are exposed to 4 ppm NO₂ and six of them are killed at days indicated to collect blood samples. Preparation of red cell membranes and determination of ATPase activity are performed as described under Materials and Methods. Closed symbols represent activity for exposed animals and open ones for the control counterparts. Each point is the mean of six rats. Error bars represent ±SD. The significance between control and exposed values is shown: **p* < 0.05.

FIG12

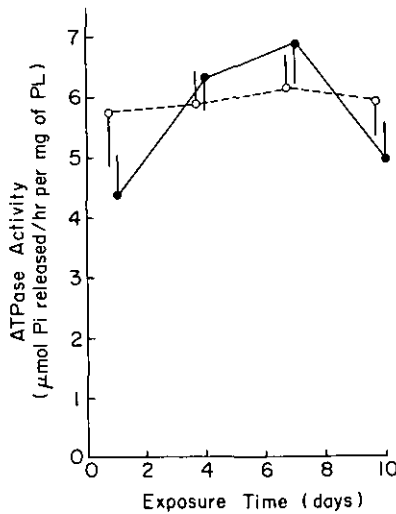


図 2 4 ppm NO₂ 暴露によるラット赤血球膜 Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性の変動
 Fig. 2 Changes in Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase activity of red cell membranes during exposure to NO₂

Experimental conditions are the same as in Fig. 1. Closed symbols represent activity for exposed animals and open ones for the control counterparts. Each point is the mean of six rats. Error bars represent ±SD.

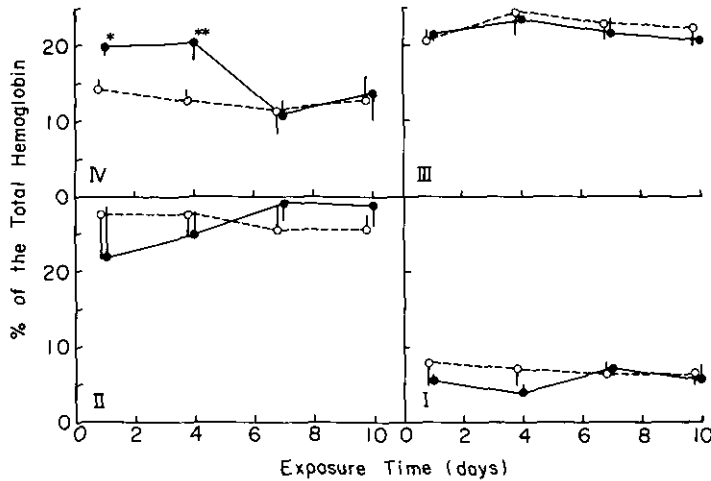


図 3 4 ppm NO₂暴露によるラット赤血球各画分の割合の変動

Fig. 3 Changes in the percentage of subfractions of red blood cells during exposure to NO₂

Rats are exposed to 4 ppm NO₂ and six of them are killed at days indicated. Immediately after sampling, the blood is mixed with 0.25 vol. of 50% Dextran solution and is layered on the Dextran discontinuous density-gradient. After centrifugation at 25,000 rpm for 90 min, four discrete zones of red blood cells are visible between gradients. Red blood cells of each zone are designated as fractions I, II, III and IV from the bottom and collected. The percentage of each fraction is calculated from the ratio of hemoglobin content in each fraction to that in the applied blood. Details see "Materials and Methods". Closed symbols represent the percentages for exposed animals and open ones for the control counterparts. Each point is the mean of six rats. Error bars represent \pm SD. The significance between control and exposed values is shown: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

かった。4 ppm NO₂暴露1日目のラットの末分画の赤血球では、対照群の1.25倍のNa⁺, K⁺-ATPase活性を示したが、分画した赤血球では画分IVとIIIが対照群の1.28, 1.24倍の活性だったのに対し、画分Iは0.79倍であった。4 ppm NO₂暴露1日目で観察されたラット赤血球のNa⁺, K⁺-ATPase活性の上昇は活性の高い画分IVの割合の増加とともに、画分IV, IIIの活性自体が上昇していることによることが明らかになった。

表2には、赤血球各画分のCa²⁺, Mg²⁺-ATPase活性を示したが、比重が大きくなるに従い、即ち画分IVからIとなるに従い、著しい活性の低下が認められた。また4 ppm NO₂暴露1日目で、4画分ともに対照群に比べて、暴露群の本活性が低下しており、これが末分画赤血球での本活性の低下を引き起こしているものと考えられる。

4. 比重差で分画した赤血球各画分のシアル酸含量

4 ppm NO₂暴露1日目で、ラット赤血球膜シアル酸含量が増加することを既に報告したが、表3に対照群及び4 ppm NO₂暴露1日目のラットの赤血球を分画しそのシアル酸含量を測定した結果

表 1 4 ppm NO₂ を 1 日間暴露したラットの赤血球各画分の Na⁺, K⁺-ATPase 活性

Table 1 Na⁺, K⁺-ATPase Activities in Subfractions of Red Blood Cells One Day after Exposure to 4 ppm NO₂

	Whole Cells	Fractions			
		IV	III	II	I
Control	5.72±0.86	5.98±0.82	5.16±0.98	5.08±0.22	4.76±0.64
4 ppm NO ₂	7.14±0.45	7.65±0.68	6.38±0.26	6.22±0.44	3.78±0.28
NO ₂ /Control	1.25	1.28	1.24	1.22	0.79

Experimental conditions are the same as described in Fig. 1. Fractionation of red blood cells see the legend of Fig. 3. Na⁺, K⁺-ATPase activity is expressed as μmol Pi released/hr per mg of phospholipid. Values are mean±SD.

表 2 4 ppm NO₂ を 1 日間暴露したラットの赤血球各画分の Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性

Table 2 Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase Activities in Subfractions of Red Blood Cells One Day after Exposure to 4 ppm NO₂

	Whole Cells	Fractions			
		IV	III	II	I
Control	6.20±0.38	4.12±0.30	3.38±0.46	2.66±0.54	1.60±0.16
4 ppm NO ₂	5.40±0.24	3.58±0.12	2.98±0.41	2.18±0.92	1.28±0.76
NO ₂ /Control	0.87	0.87	0.88	0.82	0.80

Experimental conditions are the same as described in Fig. 2. Fractionation of red blood cells see the legend of Fig. 3. Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase activity is expressed as μmol Pi released/hr per mg of phospholipid. Values are mean±SD.

表 3 4 ppm NO₂ を 1 日間暴露したラットの赤血球各画分のシアル酸含量

Table 3 The Sialic Acid Contents in Subfractions of Red Blood Cells One Day after Exposure to 4 ppm NO₂

	Whole Cells	Fractions			
		IV	III	II	I
Control	12.4±1.2	11.9±2.5	12.7±3.2	12.1±1.9	9.9±3.1
4 ppm NO ₂	17.2±2.3	17.4±3.4	18.3±3.5	13.7±1.7	11.5±2.9
NO ₂ /Control	1.39	1.46	1.44	1.13	1.16

Rats are exposed to 4 ppm NO₂ as indicated. Preparation of red cell membranes and determination of the sialic acid content are performed as described under Materials and Methods. Fractionation of red blood cells see the legend of Fig. 3. The sialic acid content is expressed as μg per mg of phospholipid. Values are mean ± SD.

を示した。対照群では最も比重の大きい画分 I で最も含量が低かった。一方暴露群では、画分 II と I で含量が低くなっていたが、同一画分を比較すると、4画分ともに対照群の 1.13 から 1.46 倍の値となっており、これが未分画赤血球でのシアル酸含量の増加を引き起こしているものと考えられる。

考 察

デキストランの段階的密度勾配遠心でラット赤血球を比重差で分画することを試み、各画分の割合が 4 ppm NO₂ 暴露で変動することが明らかになった(図 3)。特に最も比重の小さな画分 IV の割合の変動は、Na⁺, K⁺-ATPase 活性、シアル酸含量の変動とほぼ平行して起こっていた(図 1, 3)。また、比重差で分画した赤血球を分析した結果、Na⁺, K⁺-ATPase 活性及びシアル酸含量は、4 ppm NO₂ 1 日間暴露群、対照群いずれでも、比重が大きくなるにつれ即ち画分 IV から I にいくに従い、著明な低下あるいは低下傾向が認められた。同一画分を暴露群、対照群で比較すると、いずれも暴露群で高い値を示していた(表 1, 3)。従って、Na⁺, K⁺-ATPase 活性及びシアル酸含量の 4 ppm NO₂ 暴露に伴う変動は、活性あるいは含量の高い画分 IV の割合の増減によりもたらされ、特に暴露 1 日目での活性あるいは含量の上昇には全画分を通じて暴露群で上昇していることの寄与も大きいと考えられる。

しかし、Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性の 4 ppm NO₂ 暴露に伴う変動は、赤血球 population の変動とは一致していなかった(図 2, 3)。比重差で分画した赤血球の分析によれば、Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は、4 ppm NO₂ 1 日間暴露群、対照群いずれでも画分 IV から I にいくに従い著しく低下しており、同一画分を、暴露群と対照群で比較すると全画分を通じて暴露群で低い活性を示していた(表 2)。従って、4 ppm NO₂ 暴露 1 日目で観察された Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性の低下は、活性の高い画分 IV の割合の増加の影響よりも、暴露群全画分で観察された活性低下の影響が大きいと考えられる。

NO₂ ガスは、体液に溶解すると NO₂⁻, NO₃⁻ となることが知られており、これらの因子の赤血球への直接作用の可能性について *in vitro* の実験を含め更に検討中である。

Na⁺, K⁺-ATPase, Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase はいずれも赤血球膜に存在し、赤血球内の陽イオン濃度を至適状態に保つ働きをしており、赤血球機能の発現に重要な役割を果たしている。しかしながら、NO₂ 暴露に対しては異なった変化を示しており、両酵素の赤血球膜での存在形態の違いと考えあわせると興味深い。

また、NO₂ 暴露により赤血球の老化及び老化赤血球の血流からの除去が促進され、これに伴い赤血球の新生(あるいは、貯留されていた赤血球の放出)が促されている可能性も示唆され、この点について検討中である。

引 用 文 献

- 1) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980): Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: changes in

- components of red cell membranes during *in vivo* exposure to NO_2 . *Environ. Res.*, **23**, 397-409.
- 2) 彼谷邦光・三浦 卓(1979): ラットの赤血球膜に及ぼす二酸化窒素の影響。国立公害研究所研究報告, 第8号, 173-185。
 - 3) 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光(1980): 二酸化窒素の赤血球酵素および糖脂質に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告, 第15号, 125-132。
 - 4) Seaman, G. V. F., R. J. Knox, F. J. Nordt and D. H. Regan (1977): Red cell aging. I. surface charge, density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes. *Blood*, **50**, 1001-1011.
 - 5) Hanahan, D. J. and J. E. Ekholm (1978): The expression of optimum ATPase activities in human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 170-179.
 - 6) 国本 学・彼谷邦光・持立克身・三浦 卓(1982): 10 ppm NO_2 暴露のラット赤血球への影響: 赤血球膜ホスファチジルエタノールアミンの脂肪酸組成の変動と赤血球 population。国立公害研究所研究報告, 第40号。
 - 7) Chen, P. S., Jr., T. Y. Toribata and H. Warner (1957): Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, **128**, 1756-1758.
 - 8) Harris, W. D. and P. Potat (1954): Determination of the phosphorus content of lipids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **31**, 124-127.
 - 9) Aminoff, D. (1961): Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.*, **81**, 384-292.

I-3

赤血球の解糖系に及ぼす二酸化窒素の影響
— 赤血球の老化促進と若い赤血球の増加 —

**Effect of Nitrogen Dioxide on Activities of Glycolytic Enzymes :
Enhancement of Aging of Red Blood Cells and Subsequent Replacement
by Young Red Cells**

持立克身¹・三浦 卓¹・彼谷邦光¹・国本 学¹

Katsumi MOCHITATE¹, Takashi MIURA¹, Kunimitsu KAYA¹
and Manabu KUNIMOTO¹

要 旨

NO₂による赤血球のエネルギー生産系への影響を検索するため、ラットに4 ppm NO₂を10日間暴露し、解糖系酵素の活性変化を経時的に調べた。その結果、解糖系の律速段階を触媒するホスホフルクトキナーゼ (PFK)、及びピルビン酸キナーゼ (PK) 活性は、暴露開始後次第に増加し5～7日目には対照群の活性の最大1.20倍に達した。これよりNO₂暴露は赤血球のATP生産を昂進している可能性が示唆された。

赤血球には *de novo* のタンパク質生合成系が無いことから、PFK及びPK活性増加の原因を明らかにすることを試みた。その結果、NO₂暴露によって赤血球の比重は増加し、この点で赤血球の老化が促進されたこと、そして老化した赤血球にかわってPFK及びPK活性の高い赤血球の割合が血液中に増加したため、これら酵素の活性増加が起こったことが示唆された。

Abstract

Male Wistar rats were exposed to 4 ppm NO₂ for 10 days in order to examine the effect of NO₂ on the enzyme activities of glycolytic pathway of red blood cells. The activities of phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK) increased gradually up to 1.20-fold against the control five to seven days after exposure. This increment seems to support ATP production.

In order to clarify the reason why these enzyme activities increase in spite of absence in *de novo* synthesis of enzyme proteins in red blood cells, red blood cells were fractionated into young and old cells by the Dextran density-gradient centrifugation. The increment of

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田町小野川 16 番 2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

the enzyme activities was ascribed as follows; NO₂ caused an increase in the density of red blood cell, that is, acceleration of red cell aging. Subsequently, aged cells were replaced by younger ones with higher activities of PFK and PK.

はじめに

赤血球は生体の各組織に酸素を供給する重要な機能を果たしている。我々はこれまで、NO₂暴露によって赤血球が受ける影響について検索してきた^{1,2)}。その結果、赤血球膜の脂肪酸組成³⁾、シアル酸量⁴⁾やヘキソース含量⁵⁾、及びNa⁺, K⁺-ATPase⁶⁾やCa²⁺, Mg²⁺-ATPase活性⁷⁾は多様な変化を示すことを明らかにした。ATPは、これらの膜酵素が細胞内のNa⁺, K⁺およびCa²⁺イオン⁸⁾を至適濃度に保つのに必要であり、また赤血球の形態維持⁹⁾にも使われている。NO₂暴露によってヘモグロビンはメトヘモグロビンに変化するが^{7,8)}、これを還元するのに必要なNADHは解糖系を通して生産されている⁹⁾。しかしながらこれまで、赤血球のエネルギー生産系がNO₂暴露によってどのような変化を受けるのかについてはあまり研究が進められていない¹⁰⁾。そこで我々は4 ppm NO₂をラットに暴露し、赤血球の解糖系酵素及び抗酸化性代謝系酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性変化を経時的に調べた。

次に、赤血球を比重の差で幾つかに分画し、各分画のPFK, PK及び他の解糖系酵素の比活性を調べた。PFK及びPK活性は赤血球の比重が増加(老化)するに伴って低下したが、他の酵素活性はほとんど変化しなかった。そこでNO₂暴露による各分画の赤血球の増減と比活性の変化を調べた。赤血球は暴露開始数時間後には、比重の大きな画分では増加し比重の小さな画分では減少すること、即ち比重に関しては老化が促進されることが明らかになった。そしてフェニルヒドラジンを投与したラットを用いた実験から、赤血球の比重がある程度増すと、老化した赤血球に代わって若い赤血球が血液中に増加することが認められた。NO₂暴露によって赤血球の比重が増加し見かけ上の老化が促進されてもPFKやPK活性はほとんど影響を受けないため、比重の最も小さい画分のみならずすべての画分に亘って両酵素の比活性の増加が認められた。以上のことからNO₂暴露は、PFKやPK等の酵素活性にはほとんど影響を与えず赤血球の比重を増加させる。即ち赤血球の見かけ上の老化(pseudo-aging)を促進させたこと、そしてこの老化した赤血球はその後若い赤血球にとって代わられたこと、及びこの若い赤血球の増加が赤血球全体のPFK及びPK活性を上昇させたことが明らかになった。

方 法

1. 暴露方法及び試料の調製

6匹を一群としたJcl: Wistar系雄ラット(16—20週令)に4.0 ppm NO₂を10日間連続暴露した。暴露期間中経時的に頸動脈よりヘパリン存在下で採血した。赤血球を生理的食塩水で洗浄した後、15倍量の10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)を添加して溶血させ、それを15,000 rpm × 20分

遠心して上清を得た。その上清に 1.0 mM 塩化マグネシウム、及び 0.2 mM エチレンジアミンテトラ酢酸ナトリウム (EDTA) を添加して酵素活性測定用の試料とした。

2. 塩酸フェニルヒドラジンの投与方法

塩酸フェニルヒドラジンを生理的食塩水に溶かし (30 mg/ml)、メンブレンフィルター (ミリポア社、ポアサイズ: 0.45 μm) でろ過滅菌した後、0.5 ml ずつ 3 日間ラットに皮下注射した。この時ヘマトクリット値は、投与開始 6 日目には対照として生理的食塩水のみを投与したラットの値の 66% にまで低下したが、その後次第に上昇し 11 日目には 91% にまで回復した。フェニルヒドラジンを投与したラットに NO₂ を暴露する場合は、採血日がフェニルヒドラジン投与開始日から数えて約 14 日目になる様にした。

3. デキストラン T 40 密度勾配遠心

採血したヘパリン血を 1/3 容の 50% デキストラン溶液と混合した後、Abraham の方法¹¹⁾ に従い、等張の 24~50% デキストラン溶液を重層した上にのせ、25,000 rpm × 90 分遠心した。この遠心操作によって、赤血球は比重の違いにより各デキストラン溶液の界面に集束した (図 1)。この様にして分画された赤血球を比重の大きい方から順に画分 I~V と名付けた。分画した赤血球は、生理的食塩水で十分洗浄した後以下の実験に用いた。

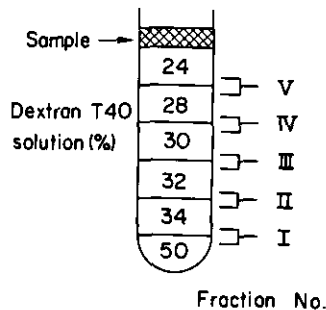


図 1 デキストラン密度勾配遠心による赤血球の分画

Fig. 1 Fractionation of red blood cells by the density-gradient centrifugation
A discontinuous Dextran T40 gradient was formed by layering 34%, 32%, 30%, 28% and 24% solutions on 50% Dextran solution. After centrifugation at 25,000 rpm for 90 min, red blood cells were located onto the interfaces of each Dextran solution. Fractionated cells were designated as fractions I, II, III, IV and V from the bottom layer.

4. 酵素活性及びヘモグロビン量の測定

低 km 型ヘキソキナーゼ (HK)^{13,14)}、ホスホフルトキナーゼ (PFK)^{13,14)}、グルセルアルデヒド

-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH)¹⁵⁾, 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)¹⁶⁾, ピルビン酸キナーゼ (PK)¹⁷⁻¹⁹⁾, 乳酸脱水素酵素 (LDH)¹⁹⁾, 及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH)¹⁹⁾ 活性は, 30°C 至適 pH において定法に従い NADH または NADPH の増加減少より測定した。PFK 活性の測定溶液の組成は 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.1) - 2 mM フルクトース-6-リン酸 - 1 mM ATP - 0.13 mM NADH - 5 mM MgCl₂ - 0.2 mM EDTA - 10 mM ジチオスレイトール - 5 mM (NH₄)₂SO₄ - 12 unit/ml アルドラーゼ - 18 unit/ml グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 - 52 unit/ml トリオースリン酸イソメラーゼ, PK の活性測定溶液は 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.4) - 2 mM ホスホエノールピルビン酸 - 4 mM ADP - 0.2 mM フルクトース-1, 6-ビスリン酸 - 0.13 mM NADH - 100 mM KCl - 10 mM MgCl₂ - 30 unit/ml 乳酸脱水素酵素である。活性測定の際は両酵素をそれぞれアロステリック活性化剤 (硫酸アンモニウム, 及びフルクトース-1, 6-ビスリン酸) の添加によってミカエリス・メンテン型酵素に転換させた。

ヘモグロビン量はシアンメトヘモグロビンとして定量した²⁰⁾。

結 果

1. 4.0 ppm NO₂ 暴露による赤血球の解糖系酵素の活性変化

図2及び図3に、4 ppm NO₂をラットに10日間連続暴露した際に赤血球の解糖系酵素が受ける影響を示した。NO₂の暴露期間中、解糖系酵素の中でもHK, PGK, LDH活性及びペントースリン酸回路の第一段階を触媒するG6PDH活性には対照群の活性に対して有意な変化は認められなかった(図2)。また、GAPDH活性は4日目にはわずかながら有意に低下したが7日目には対照群の値にまで回復した。しかしながらもう一方では解糖系の律速段階を触媒するPFK¹⁶⁾及びPK¹⁸⁾の活性は、暴露開始後次第に上昇し5～7日目には対照群の約1.2倍にまで有意に増加したが、その後減少し10日目には対照群の値にまで戻った(図3)。

2. 亜硝酸イオンによる PFK 及び PK 活性の変化 (In Vitro)

吸収されたNO₂は亜硝酸イオンと硝酸イオンとして血液中に溶解する²¹⁾。そこでPFK及びPK活性に対する亜硝酸イオンの影響を調べるため、ヘパリン血または生理的食塩水で洗浄した赤血球懸濁液(ヘマトクリット値:約50%)を等量の中尾の培地²²⁾と混合し、これに亜硝酸ナトリウムを0～2.5 mM添加して37°C1時間インキュベーションした。インキュベーションしなかった亜硝酸イオン未処理赤血球に対する各赤血球のPFK及びPK活性の値を表1に示した。ヘパリン血を用いた場合インキュベーションによる活性化が認められるが、亜硝酸イオンによるPFK及びPK活性の増減はほとんど起こらなかった。また表には示さなかったが、0.5 mM亜硝酸イオンとヘパリン血または洗浄した赤血球を3時間インキュベーションした時にも、PFK, PK活性及び他の解糖系酵素やG6PDHの活性に変化は認められなかった。

NO₂の赤血球解糖系に及ぼす影響

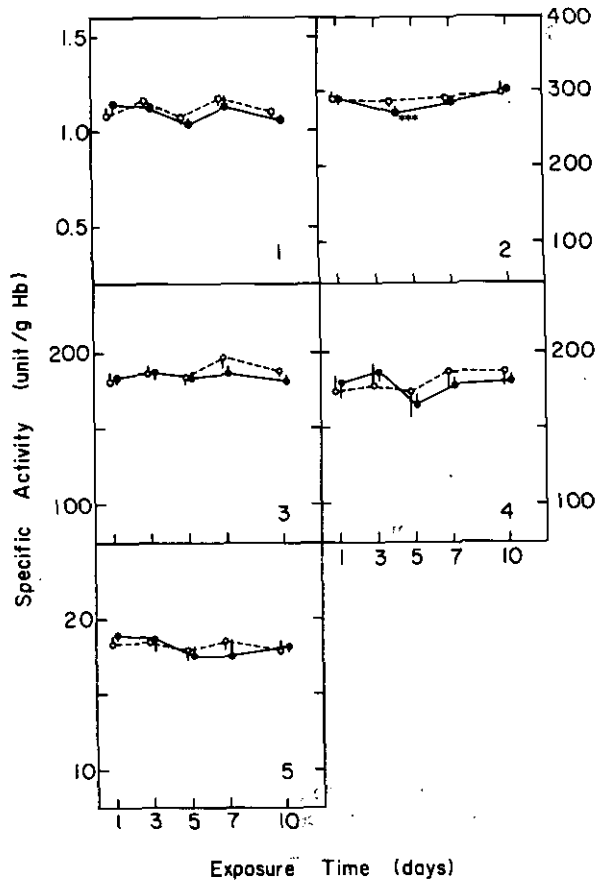


図 2 NO₂暴露によるラット赤血球の解糖系酵素(HK, GAPDH, PGK及びLDH)及びG6PDH活性への影響

Fig. 2 Effect of NO₂ exposure on the activities of glycolytic enzymes (HK, GAPDH, PGK and LDH) and G6PDH of red blood cells
Rats were exposed to 4 ppm NO₂ for 10 days as indicated. (1), hexokinase (HK); (2), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); 3-phosphoglycerate kinase (PGK); (4), lactate dehydrogenase (LDH) and (5), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). -----○-----, control; —●—, exposed (mean ± SD).

3. デキストラン T 40 密度勾配による赤血球の分画

比重の違いによって解糖系の各酵素活性がどの様に異なるかを調べるため、赤血球をデキストラン T 40 密度勾配遠心により比重の最も大きな画分 I から最も小さな画分 IV+V まで四つの画分に分画した (図 4)。

NO₂暴露によって活性が増加する PFK 及び PK の比活性は、赤血球の比重が増加するのに伴って大きく減少し、画分 I の比活性は画分 IV+V の値のそれぞれ約 70%、及び約 50%であった。また NO₂暴露期間中活性変化をほとんど示さなかった GAPDH, PGK 及び LDH 活性には、画分の違

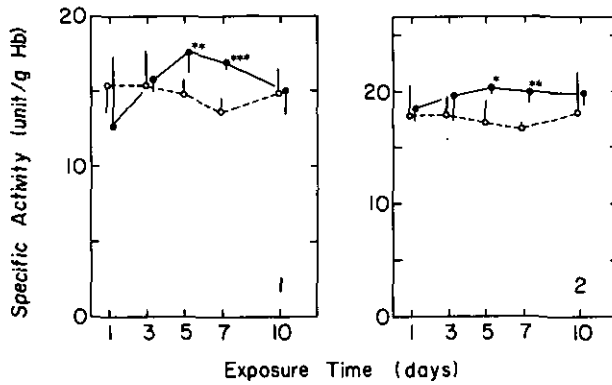


図 3 NO₂暴露によるラット赤血球のホスホフルクトキナーゼ及びピルビン酸キナーゼ活性への影響

Fig. 3 Effect of NO₂ exposure on the activities of phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK) of red blood cells
Rats were exposed to 4 ppm NO₂ as described in Fig. 2. (1), PFK and (2), PK. -----○-----, control; —●—, exposed (mean±SD). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

表 1 亜硝酸イオンによる赤血球のホスホフルクトキナーゼ及びピルビン酸キナーゼ活性の変化

Table 1 *In vitro* effect of sodium nitrite on the activities of phosphofructokinase and pyruvate kinase in red blood cells

	NaNO ₂ (mM)					
	0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.5
PFK	131 (102)	122 (102)	124 (106)	136 (102)	125 (102)	127 (104)
PK	117 (101)	108 (99)	109 (104)	117 (99)	111 (102)	113 (105)

Bloods were diluted with an equal volume of incubation medium (6) containing various concentrations of sodium nitrite. After incubation at 37°C for 1 hr, red blood cells were collected by centrifugation, washed with saline and used for determination of activities. Values were expressed as the percentage of the activities of red blood cells stayed on ice without supplement of sodium nitrite. Isolated red blood cells were also incubated with sodium nitrite and values were shown in parentheses.

PFK, phosphofructokinase; PK, pyruvate kinase.

いによる比活性の差異は認められなかった。

HK 及び G6PDH 活性は、PK と同様に赤血球の比重増加とともに減少したが、その程度は PK の場合より小さかった。以上の結果から、赤血球の老化に伴い比活性が著しく低下したのとして PFK 及び PK、そして低下の程度も小さく NO₂ 暴露によって活性上昇を示さなかったのとして G6PDH を選び以下の実験を行った。

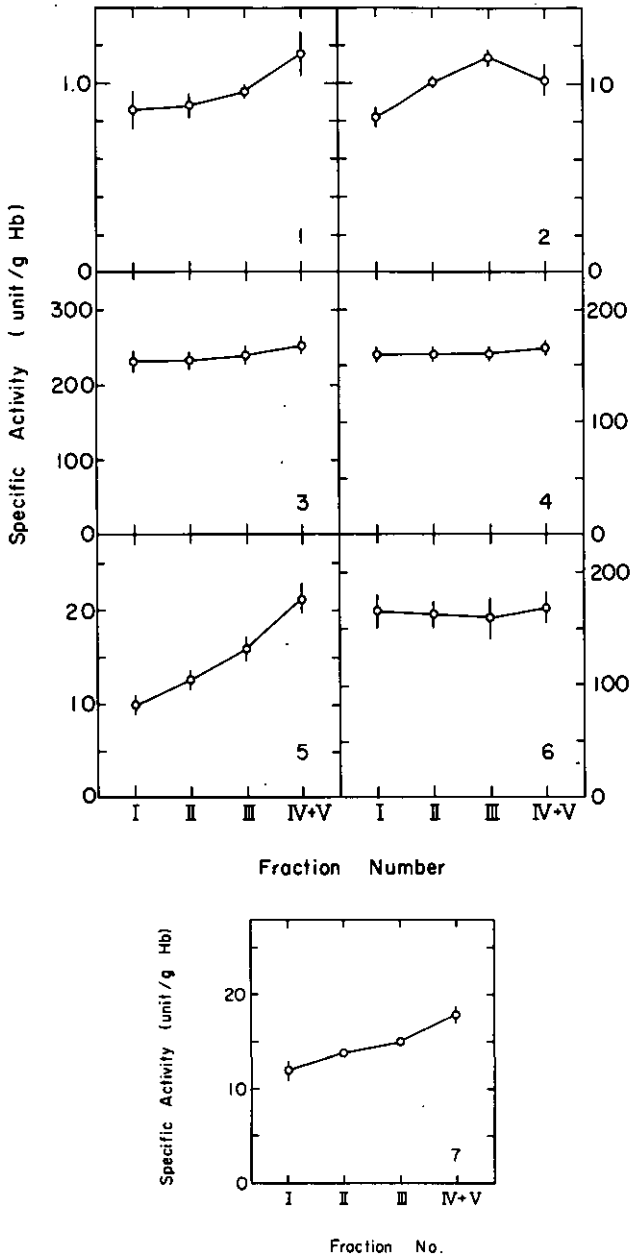


図 4 分画した赤血球の解糖系酵素及びG6PDHの比活性
 Fig. 4 Differences of the activities of the glycolytic enzymes and G6PDH between the fractionated red blood cells
 Red blood cells were fractionated by the Dextran T40 density-gradient centrifugation at 25,000 rpm for 90 min. Fractions I and IV+V are the cells of the highest and the lowest densities, respectively.
 (1), HK; (2), PFK; (3), GAPDH; (4), PGK; (5), PK; (6), LDH and (7), G6PDH. Abbreviations are the same as described in the legends of Figs. 2 and 3.

4. 4.0 ppm NO₂ 7日間暴露による赤血球各画分の PFK 及び PK 活性への影響

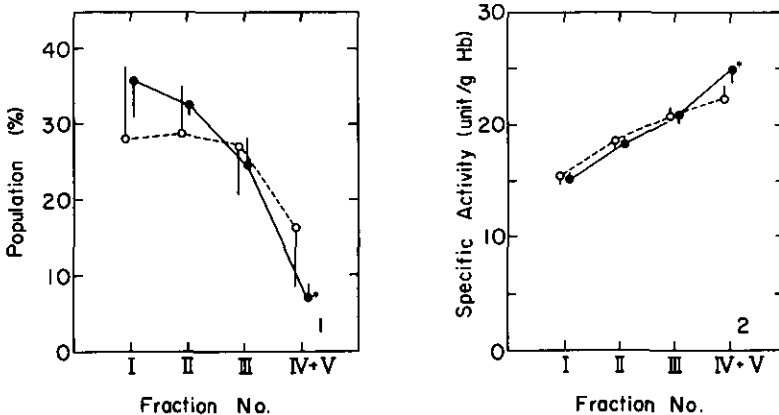
4 ppm NO₂ 7日間暴露によって PFK 及び PK の比活性はそれぞれ 12%、及び 19%増加した。この時ヘパリン血 6ml をデキストラン密度勾配遠心にかけ画分 I ~IV+V の 4 画分に分画すると、各画分の Hb 含量で表した赤血球量は画分IV+Vでは NO₂暴露によって対照群の 43%にまで減少し、画分 I、及びIIではそれぞれ 28%、及び 14%増加した (図 5-1)。これらの結果より、4 ppm NO₂ 7日間暴露によって比重の小さな赤血球の割合が減少し、比重の大きな赤血球の割合が増加することが示された。この時ヘマトクリット値に差異は認められなかった。

PFK 活性は、NO₂暴露によって画分IV+Vでは対照群の 37%にまで減少したが、画分 I、及びIIでは反対にそれぞれ 63%、及び 36%増加した (図 5-3a)。PK 活性も画分IV+Vでは 63%に減少し、画分 I、及びIIではそれぞれ 40%、及び 33%増加した (図 5-4a)。

この様に、比重の大きな画分 I 及びIIにおける赤血球の割合が増加し比重の小さな画分IV+Vの割合が減少したのに伴って、PFK 及び PK 活性量は画分 I 及びIIで増加し、画分IV+Vで減少した。

PFK 及び PK の活性量が NO₂暴露によって各画分で増加もしくは減少したのとは異なり、両酵素の比活性は全画分に亘って増加した。PK の比活性の増加は、比重の最も小さな画分IV+Vで 48%増と最も大きく、次いで画分III, II, I と比重が増すに従って 22%~12%増加した (図 5-4b)。PFK の比活性は、画分IV+Vではほとんど変化せず、他の画分III~I で 11~18%増加した (図 5-3b)。この様に PK 及び PFK の比活性は、網状赤血球が存在しないのものにもかかわらず画分 I ~IIIにおいてともに有意の増加を示した。網状赤血球が存在する最も若い赤血球画分であると考えられる画分IV+Vにおいて、PK の比活性増加の割合は最も著しかった。画分IV+Vにおける PFK の比活性増加が認められなかった理由は不明であるが、PFK は網状赤血球で合成されても活性発現するにはその後プロテインキナーゼによるリン酸化を受けて活性化される^{23,24)} 必要があることと関係するのかもしれない。

赤血球の比重が増すのに伴って比活性が減少する酵素として PFK 及び PK 以外に G6PDH がある。この酵素の比活性は NO₂暴露によって画分IV+Vにのみ有意に 12%増加したが、他の画分では全く変化が認められなかった (図 5-2)。



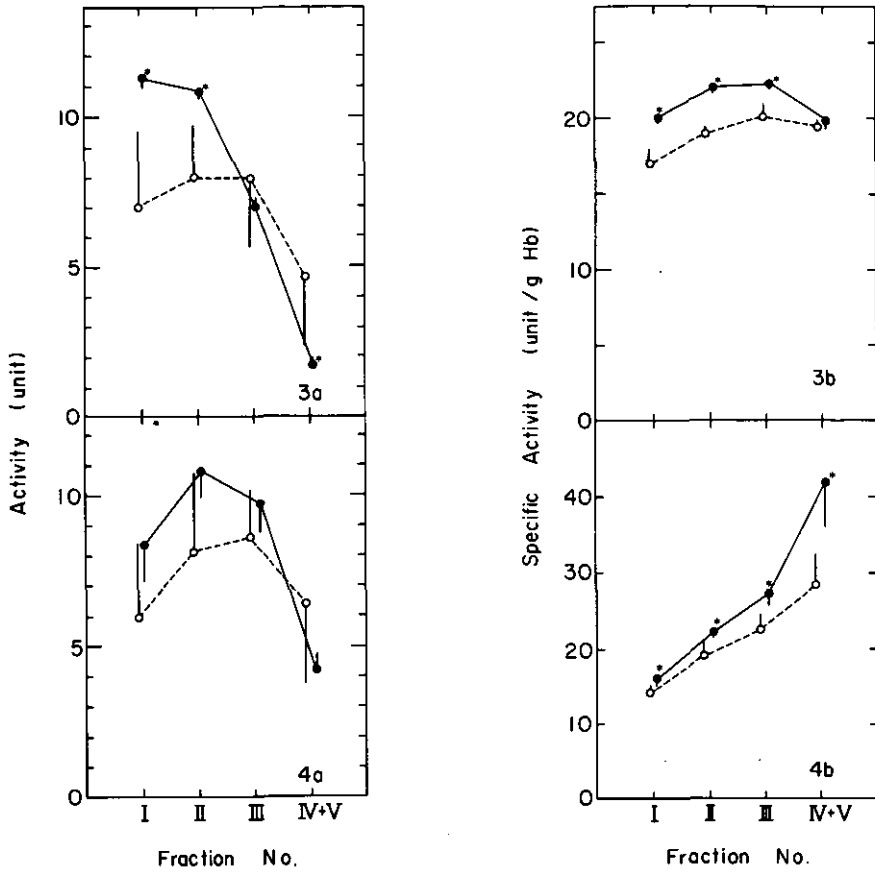


図 5 4 ppm NO₂ 7 日間暴露による赤血球比重及びホスホフルトキナーゼとピルビン酸キナーゼ活性への影響

Fig. 5 Effects of NO₂ exposure on the distribution of red blood cells and the activities of phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK) of the fractionated cells

Rats were exposed to 4 ppm NO₂ for 7 days. After exposure, red blood cells were fractionated as described in Fig. 4. (1), distribution of red blood cells. Each fraction is shown as the hemoglobin content. (3a) and (4a) are the recovered activities of PFK and PK, respectively. (2), (3b) and (4b) are the specific activities of G6PDH, PFK and PK, respectively. -----○-----, control; —●—, exposed (mean ± SD). *, P < 0.05.

5. NO₂急性暴露による赤血球比重の変化

前節で認められた NO₂ 暴露による赤血球全体としての比重増加が暴露開始後どの程度の時間内に生ずるのかを調べた。4 ppm NO₂ をラットに急性暴露すると 4 時間後には画分 I, II における赤血球の増加, 及び画分 III, IV+V での減少が認められ (図 6), 8 時間後には上述の赤血球の分布は対照群にほぼ等しくなった。しかし 16 時間後には再び 4 時間暴露の場合と同様の変化が認められた。ヘマトクリット値には, いずれの場合にも差異は認められなかった。

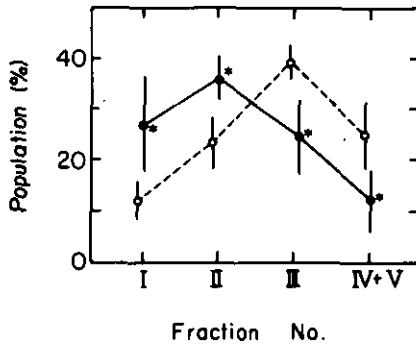


図 6 4 ppm NO₂ 4 時間暴露による赤血球比重の変化

Fig. 6 Effect of acute exposure to NO₂ on the distribution of red blood cells. Rats were exposed to 4 ppm NO₂ for 4 hrs. After exposure, red blood cells were fractionated by the density-gradient centrifugation. Each fraction is represented as the hemoglobin content. -----○-----, control; —●—, exposed (mean ± SD). *, P < 0.05.

6. フェニルヒドラジン投与ラットの赤血球に対する NO₂ 暴露の影響

NO₂ 暴露による赤血球比重の増加, そして PFK 及び PK 活性の増加の過程を解析するため, 塩酸フェニルヒドラジンで一時的に虚血状態にすることによって赤血球の新生を促し²⁵⁾, 体内の赤血球をほぼ新しい赤血球で置きかえたラットを用いて NO₂ 暴露を試みた。

塩酸フェニルヒドラジンを 3 日間連続してラットに皮下投与 (合計 45 mg) すると, ヘマトクリット値は投与開始 6 日目には対照として生理的食塩水を投与した場合の約 66% に低下するが, その後次第に増加し 11 日目には約 90%, 17 日目には 106% にまで回復した。網状赤血球の場合は, 投与開始 8 日目には血液全体で 1% 以下から 21% に, 画分 IV+V に濃縮した場合には 4% から 40% に増加した。このフェニルヒドラジン投与ラットの赤血球の比重分布は, 投与開始 16 日目では画分 IV が 43%, 次いで画分 III が 36% と, 比重の小さな画分大半を占めた (図 7)。しかし投与開始後 27 日目になると, 画分 IV の割合は 14% にまで低下し, 画分 I と II の合計の割合は 10% から 35% にまで増加し, 時間の経過に伴い赤血球の比重は全体として増加した。

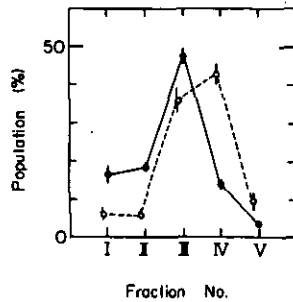


図 7 フェニルヒドラジンを投与したラット赤血球の経時変化

Fig. 7 Change in the distribution of red blood cells of rats treated with the subcutaneous injection of phenylhydrazine
Phenylhydrazine solutions (15 mg×3) were injected subcutaneously for three consecutive days. -----○----- and —●—, the distributions of red blood cells of the 16th and 27th days of the beginning of injection, respectively.

6.1 赤血球の比重への影響

フェニルヒドラジン投与ラットに 4 ppm NO₂を暴露し、赤血球の比重の変化を経時的に調べた(図8)。赤血球比重の変化は、画分IIIとIVの増減に代表された。画分IIIの赤血球は、暴露開始後次第に増加し、5日目で最大(E/C^{*a)}:1.46)となったが、7日目には著しく減少し(E/C:0.55)10日目も低下した状態(E/C:0.61)が続いた(図8)。これとは正反対に、画分IVの赤血球は暴露開始後漸次減少し5日目には最低(E/C:0.71)になったが、7日目には著しく増加し(E/C:1.41)10日目も高い値(E/C:1.66)を維持した(図8)。この様に画分IIIとIVの赤血球は鏡面对照的に増加減少した。画分IとII、及びVの赤血球は、それぞれ画分III、及びIVの赤血球と類似の挙動を示した(図8)。

これらの結果は、NO₂暴露によって赤血球の比重は次第に増加すること(暴露開始後5日目まで)、及び比重増加がある程度進行すると、比重の大きな赤血球にとってかわり比重の小さな赤血球の割合が増加すること(7~10日目)を示した。

6.2 PFK 及び PK 活性への影響

フェニルヒドラジン投与したラット赤血球の比重が前述の変化を示すとき、PFK、及びPK活性がどのような影響を受けるかを次に調べた(図9)。PFK活性は、暴露開始後1~5日目の期間は対照群より高い傾向を示したが、7日目には対照群の72%にまで急激に低下し10日目も低い値を示した。PK活性は暴露後半に低下する傾向を示したが、既して大きな変動は示さなかった。またG6PDH活性は全く変化を示さなかった。これらの結果は、NO₂暴露によって赤血球の比重が増加し

* a: Exposed/Control

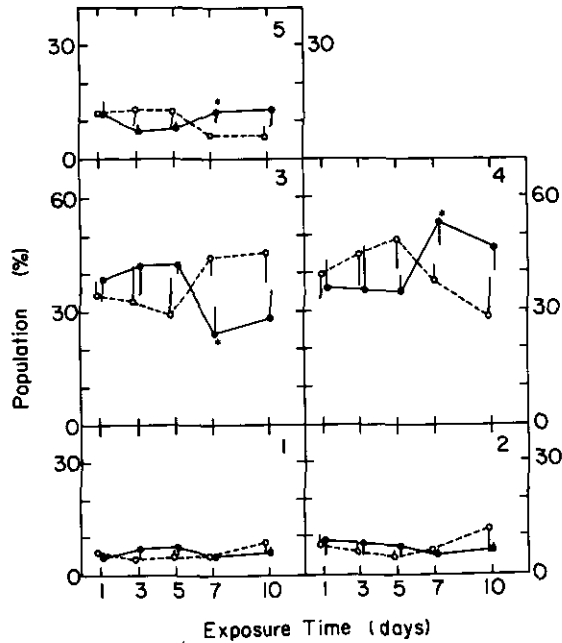


図 8 フェニルヒドラジンを投与したラット赤血球の比重に及ぼす 4 ppm NO₂ 暴露の影響

Fig. 8 Effect of NO₂ exposure on the distribution of red blood cells of rats treated with phenylhydrazine

Rats were treated with the subcutaneous injection of phenylhydrazine (see the legend of Fig. 7) and exposed to 4 ppm NO₂. Sampling of bloods was carried out on the 14th day of the beginning of injection. (1), (2), (3), (4) and (5) represent the changes of fractions I, II, III, IV and V, respectively, during exposure. Each fraction is expressed as the percentage of the total hemoglobin. -----○-----, control; —●—, exposed (mean ± SD). *, P < 0.05.

ても、PFK 及び PK の比活性は低下しないこと、及び比重の大きな赤血球が小さな赤血球に置きかえられても、両酵素活性は増加しないことを示した。

6.3 .4 ppm NO₂ 10 日間暴露による各画分の PFK 及び PK 活性への影響

比重の小さな画分の赤血球が増加したにもかかわらず、PFK の比活性は著しく低下し、PK の比活性もわずかながら低下した時、各画分での両酵素の比活性変化を検索した。ヘパリン血 6 ml をデキストラン密度勾配遠心にかけ、赤血球を画分 I + II, III 及び IV + V の 3 画分に分画した。各画分の赤血球量は、画分 I + II で著しく減少し (Hb 量で E/C : 0.47), 画分 IV + V で大きく増加した (E/C : 3.45) (図 10-1)。この時、PFK 及び PK の活性量は赤血球の増減と平行して、画分 IV + V ではそれぞれ対照群 3.2 倍及び 2.4 倍にまで増加したが、画分 III でそれぞれ対照群の 58 % 及び 65 % に、画分 IV + V で 31 % 及び 37 % に減少したため、全体としてはそれぞれ 77 % 及び 91 % に減少した (図

NO₂の赤血球解糖系に及ぼす影響

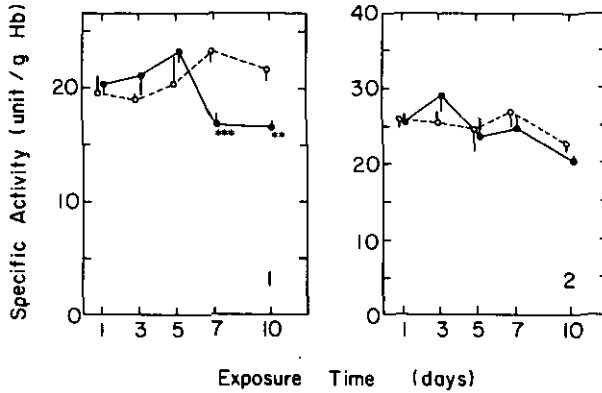


図 9 フェニルヒドラジンを投与したラット赤血球のホスホフルトキナーゼ及びピルビン酸キナーゼ活性に及ぼす 4 ppm NO₂暴露の影響

Fig. 9 Effect of NO₂ exposure on the activities of phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK) of red blood cells of rats treated with phenylhydrazine. The details of the exposure are described in the legend of Fig. 8. (1) and (2) are the specific activities of PFK and PK, respectively. -----○-----, control; —●—, exposed (mean±SD). **, P<0.01; ***, P<0.001.

10-3a, 4a)。PKの比活性はNO₂暴露の結果、全画分に亘って71～77%に減少した(図10-4b)。PFKの比活性は画分IV+Vを除いて、66～70%減少した(図10-3b)。以上の結果から、フェニルヒドラジンを用いて体内の赤血球を新しい赤血球で置きかえたラットにNO₂暴露をした場合は、暴露によって若い赤血球が増加しても、PFK及びPKの比活性は増加せず、むしろ各画分において低下することが示された。G6PDHの比活性は有意な変化を示さなかった(図10-2)。

考 察

赤血球において、解糖系から作られるATPは細胞内の種々のイオンを至的濃度に保つ^{4),5)}ためや、形態を維持するため⁶⁾に必要である。従って、NO₂暴露によって解糖系に支障が生じるならば、それは赤血球の死につながる重大な障害と考えられる、そこで我々は赤血球の機能維持に重要な解糖系の働きがNO₂暴露によって影響を受けるかどうかを検索した。

ラット赤血球の解糖系酵素には、NO₂暴露による活性低下が全く認められなかった。更に予想に反して、解糖系の律速段階を触媒するホスホフルトキナーゼ(PFK)、及びピルビン酸キナーゼ(PK)活性は、暴露開始後5～7日目に約20%増加し、解糖系の物質代謝が昂進している可能性が唆された。赤血球には*de novo*のタンパク質生合成系が無いことから、この理由としては以下の二つの理由が考えられる。

- ① PFK及びPK活性は、NO₂の直接作用により活性化を受けたため。
- ② PFK及びPK活性の高い赤血球の割合が増加し、両活性の低い赤血球の割合は減少したため。

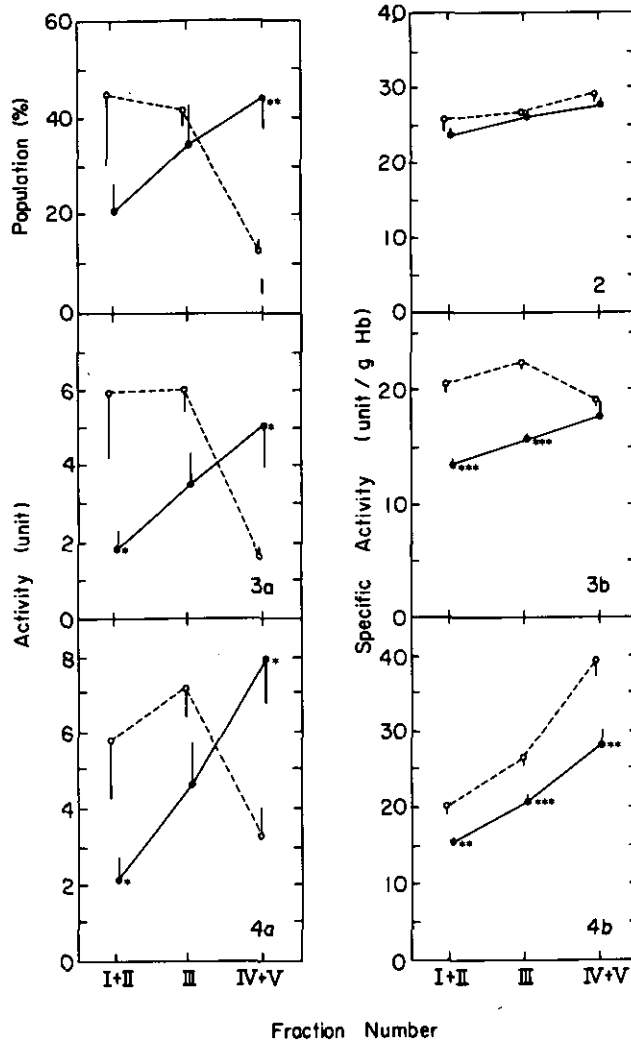


図 10 フェニルヒドラジンを投与したラット赤血球の比重及びホスホフルクトキナーゼとピルビン酸キナーゼ活性に及ぼす 4 ppm NO₂ 10 日間暴露の影響

Fig. 10 Effect of NO₂ exposure on the distribution of red blood cells and the specific activities of phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK) of the fractionated cells after the treatment with phenylhydrazine

Rats were treated with phenylhydrazine before exposure to 4 ppm NO₂ for 10 days (see the legend of Fig. 8). (1), distribution of red blood cells. Each fraction is represented as the hemoglobin content. (3a) and (4a) are the recovered activities of PFK and PK, respectively. (2), (3b) and (4b) are the specific activities of G6PDH, PFK and PK, respectively. ---○---, control; —●—, exposed (mean ± SD). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

始めに①の可能性について検討するため、赤血球を種々の濃度の亜硝酸イオンと1~3時間インキュベーションした。NO₂は体内に取り込まれると血液中では亜硝酸イオンと硝酸イオンとして存在する²¹⁾ことが知られており、その濃度は4 ppm NO₂暴露の場合でそれぞれ約140μM、及び7μMである²¹⁾。そして亜硝酸イオンは速やかに硝酸イオンに変化する²⁹⁾ことが報告されている。そこで*in vitro*で最大NO₂暴露の場合の340倍の亜硝酸イオンと赤血球をインキュベーションしたが、PFK及びPK活性、そして他の解糖系酵素活性に影響は認められなかった。従って、①の可能性は低いと考えられる。

次に②の可能性について検討した。赤血球をデキストラン密度勾配遠心によって分画した結果、比重の大きな(老化が進行した)画分程、PFKおよびPKの比活性は低下することが確認された(図4)。しかしPFK及びPK活性が増加した際、比活性の高い画分IV+Vにおいて赤血球の割合はむしろ減少し比活性の低い画分I及びIIにおいて赤血球の割合は増加した。さらに4 ppm NO₂7日間暴露によって、画分IV+Vのみならず画分I~IIIでもPFK及びPKの比活性増加(図5-3b, 4b)が認められた。このことはNO₂暴露による両酵素の比活性の増加が単純に比活性の高い画分IV+Vにおける赤血球の増加と、比活性の低い画分I, IIにおける赤血球の減少としては理解できないことを示唆している。そこでNO₂暴露によって赤血球の比重が増加し、その結果IV+V以外の画分でも両酵素の比活性が増加したのかどうかについて検討した。

4 ppm NO₂を暴露すると数時間以内に比重の小さな赤血球の割合は減少し、比重の大きな赤血球の割合は増加し、赤血球全体として比重は増加した。即ち比重の点では、NO₂暴露によって赤血球の老化が促進された。この見かけ上の老化によって、画分IV+V以外の画分I~IIIでもPFK及びPKの比活性が上昇したのであろう。

上述の可能性についてフェニルヒドラジンを投与したラットを用いて更に検討した。フェニルヒドラジンは一時的に虚血状態にすることによって赤血球の新生を促し、体内の赤血球を新しいものと置きかえることが知られている。NO₂暴露する前にラットにフェニルヒドラジンを投与した理由は以下の3点に要約される。

- ① 赤血球の比重を小さく、かつほぼ均一に揃えることにより、NO₂暴露による比重増加の過程を追跡し易くする。
- ② 赤血球の比重がある程度増加すると、比重の小さな若い赤血球で置きかえられるかどうかを確認する。
- ③ 赤血球をほとんど新しくすることにより各酵素活性を最大に増加させ、NO₂暴露による赤血球の老化促進とそれに引き続く新しい赤血球の増加が起こっても、直接的には各酵素活性の増加につながらないことを明らかにする。そしてこのことは、NO₂による直接的作用によりPFK、及びPK活性が増加したのではないことをも示すと考えられる。

フェニルヒドラジンを投与したラットに4 ppm NO₂を暴露すると、暴露開始後1~5日目までは赤血球の比重は次第に増加し、比重に関しては老化の促進が認められた。7日目には比重の大きな赤

血球は急激に減少し、かわって比重の小さな赤血球が著しく増加した。このことは、赤血球の老化がある程度に達するとその赤血球は血液中から除かれ、そして赤血球の新生が促されて新しい赤血球が血液中に増加したことを示唆する。しかしながら、PFK 及び PK 活性は暴露期間中全く活性は増加せず、各画分の比活性はむしろ減少した。これらの結果から①～③が確認された。

NO₂暴露を続行すると 10 日目には、暴露群の PFK 及び PK 活性は対照群の値とほぼ等しくなるまで低下する。この理由は不明だが、フェニルヒドラジン投与ラットの場合各画分で両酵素の比活性が低下したことから、NO₂暴露によって徐々にではあるが両酵素の活性が低下したためであろうと考えられる。

以上の結果をまとめると、4 ppm NO₂暴露によって赤血球の細胞内の各酵素活性にほとんど影響はないが、比重は増加した。この見かけ上の老化促進によって、老化した赤血球は血液中から除かれ、最終的に新しい赤血球の割合が増加した。この過程で、赤血球の老化に伴い比活性が低下する PFK 及び PK にのみ比活性の上昇が認められた。

赤血球はその柔軟性や変形能が弱まるに伴い細網内皮系で貪食されやすくなり、その結果すみやかに血流中から除かれる^{26,27)}が知られている。NO₂暴露による老化促進によって、赤血球のどのような特性が影響を受けその結果血液中から除去され易くなったのを明らかにすることは今後の課題の一つであろう。

引用文献

- 1) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980): Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: Changes in components of red cells membranes during *in vivo* exposure to NO₂. *Environ. Res.*, **23**, 397-409.
- 2) Kaya, K. and T. Miura (1982): Effects of nitrogen dioxide on fatty acid compositions of red cell membranes, sera, and livers in rats. *Environ. Res.*, **27**, 24-35.
- 3) 辻井直樹・国本 学・彼谷邦光・三浦 卓・久保田憲太郎 (1982): NO₂暴露のラット赤血球膜 ATPase に及ぼす影響。第 23 回大気汚染学会発表予定。
- 4) Albers, R. W. (1976): The (sodium plus potassium)-transport ATPase. In "The Enzymes of Biological Membranes" (Anthony Martonosi, ed), Vol. 3, 283-314, Plenum, New York/London.
- 5) Schatzmann, H. J. and F. F. Vincenzi (1969): Calcium movements across the membrane of human red cells. *J. Physiol.*, **201**, 369-395.
- 6) Nakao, M., T. Nakao, S. Yamazoe and H. Yoshikawa (1961): Adenosine triphosphate (ATP) and shape of erythrocytes. *J. Biochem.*, **49**, 487-492.
- 7) Case, G. D., J. S. Dixon and J. C. Schooley (1979): Interactions of blood metalloproteins with nitrogen oxides and oxidant air pollutants. *Environ. Res.*, **20**, 43-65.
- 8) Kosaka, H., K. Imaizumi, K. Imai and I. Tyuma (1979): Stoichiometry of the reaction of oxyhemoglobin with nitrite. *Biochem. Biophys. Acta*, **581**, 184-188.
- 9) Harris, J. W. and R. W. Kellermeyer (1974): Red cell metabolism and methemoglobinemia in "The Red Cell", 447-513, Harvard University Press, Cambridge.
- 10) Cassan, M. and D. H. Simmons (1975): Nitrogen dioxide and the erythrocytic redox state. *Arch. Environ. Health*, **30**, 502-506.
- 11) Abraham, E. C., D. Walker, M. Gravely and T. H. J. Huisman (1975): Major hemoglobins in sickle cell anemia,

- β -thalassemia, and related conditions: A study of red cell fractions isolated by density gradient centrifugation. *Biochem. Med.*, **13**, 56-77.
- 12) 石橋貞彦・村上幸子 (1977): 動物のヘキソナーゼ。蛋白質核酸酵素, **22**, 1510-1514, 1781-1785.
 - 13) 河野典夫 (1977): ホスホフルクトキナーゼ。蛋白質核酸酵素, **22**, 1562-1568.
 - 14) Nagata, K., K. Suzuki and K. Imahori (1979): Analysis of Allosteric properties of rabbit muscle phosphofructokinase by means of affinity labelling with a reactive ATP analog. *J. Biochem.*, **86**, 1179-1189.
 - 15) 鈴木絃一 (1977): グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素。蛋白質核酸酵素, **23**, 1614-1620.
 - 16) 鈴木絃一 (1977): ホスホグリセリン酸キナーゼ。蛋白質核酸酵素, **22**, 1631-1640.
 - 17) Bergmeyer, H. U., K. Gawehn and M. Grassl (1974): Enzymes as biochemical reagent in "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H. U. ed.). Vol. **1**, 458, 574-579, 636-643, 774-778, Academic Press, New York.
 - 18) 田中武彦 (1977): ビルビン酸キナーゼ。蛋白質核酸酵素, **22**, 1680-1685.
 - 19) 今村喜一 (1977): ビルビン酸キナーゼアイソザイム。蛋白質核酸酵素, **22**, 1799-1804.
 - 20) 松原高賢 (1966): 臨床病理, **14**, 29-34.
 - 21) 織田 肇・永澤節子・局 博一・鈴木 明 (1981): 一酸化窒素及び二酸化窒素の生体内挙動。国立公害研究所報告, 第31号, 45-58.
 - 22) Nakao, M., Y. Fujii, Y. Hara, T. Nomura, T. Nakao and Y. Komatsu (1980): Membrane protein phosphorylation in intact normal and hereditary spherocytic human erythrocytes. *J. Biochem.*, **88**, 327-335.
 - 23) Hofer, H. W. and M. Füst (1976): Isolation of a phosphorylated form of phosphofructokinase from skeletal muscle. *FEBS Letters*, **62**, 118-122.
 - 24) Brand, I. A., M. K. Müller, C. Unger and H. D. Söling (1976): In vivo and in vitro interconversions of active and inactive forms of phosphofructokinase in rat liver. *FEBS Letters*, **68**, 271-274.
 - 25) Hirata, F., W. J. Strittmatter and J. Axelrod (1979): β -Adrenergic receptor agonists increase phospholipid methylation, membrane fluidity, and β -adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 368-372.
 - 26) Cooper, R. A. and S. J. Shattil (1971): Mechanisms of hemolysis-The minimal red cell defect. *New Engl. J. Med.*, **285**, 1514-1520.
 - 27) Walter, H., and E. I. Krob (1978): Surface properties of rat reticulocytes during maturation as measured by partition: membrane charge-associated changes discerned prior to membrane lipid-related changes. *Br. J. Haematol.*, **38**, 43-55.

I-4

硝酸イオンによるラット赤血球膜ホスファチジルセリンの脂肪酸組成の選択的变化*

Selective Changes in Fatty Acid Composition of Phosphatidylserine
in Rat Erythrocyte Membrane Induced by Nitrate

彼谷邦光¹・三浦 卓¹

Kunimitsu KAYA¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

大気汚染物質である NO₂ が体内に吸入されて生じる硝酸イオンによってラット赤血球膜ホスファチジルセリンの脂肪酸代謝に変化が起ることを見出した。

赤血球を脂肪酸と 37°C, 1 時間インキュベートすると, [1-¹⁴C]アラキドン酸と (9, 10-³H)パルミチン酸のホスファチジルセリンへの取り込み速度はホスファチジルエタノールアミンへの取り込み速度のそれぞれ 15% (80 pmol/h per μ mol lipid-P) 及び 20% (2 pmol/h per μ mol lipid-P) であった。ホスファチジルエタノールアミンへのアラキドン酸とパルミチン酸の取り込み速度は共に 1.0 mM 硝酸イオンまたは 0.5 μ M のイオノホア A23187 の添加によって 1.45 倍に促進された。一方, パルミチン酸のホスファチジルセリンへの取り込みはほとんど影響を受けなかったが, アラキドン酸のホスファチジルセリンへの取り込みは 1.35 倍に促進された。

ホスファチジルセリンのアラキドン酸含量の増加は硝酸イオンでも A23187 でも観察された。このアラキドン酸含量の増加は細胞外カルシウムイオン濃度に依存していた。また, 硝酸以外のカオトロピックイオンの添加によっても起こった。これらの現象は硝酸イオンによって赤血球膜へのカルシウムの取り込みが促進されたことを示すものと考えられる。細胞内カルシウム濃度の増加は赤血球膜に存在する Acyl-CoA: Lysophospholipid Acyl-transferase やホスホリパーゼ A₂ の活性促進を引き起こすと考えられる。

Abstract

The relationship between nitrate which is formed from inhaled nitrogen dioxide, a common air pollutant, and changes in fatty acid metabolism of phosphatidylserine in rat erythrocytes has been examined. When erythrocytes were incubated at 37°C for 60 min with

*本論文の原著は, *Biochimica et Biophysica Acta* に印刷中である。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

fatty acid, the incorporation rate of [$1-^{14}\text{C}$]arachidonic acid and [$9,10-^3\text{H}$]palmitic acid into phosphatidylserine was 15% (80 $\mu\text{mol/h}/\mu\text{mol}$ of lipid phosphorus) and 20% (12 $\mu\text{mol/h}/\mu\text{mol}$ of lipid phosphorus) of those into phosphatidylethanolamine, respectively. By the addition of 1.0 mM sodium nitrate or 0.5 μM A23186 to the incubation mixture, the rate of incorporation of both arachidonic acid and palmitic acid into phosphatidylethanolamine was stimulated to 1.45-fold. On the other hand, the incorporation of palmitic acid into phosphatidylserine was little affected, while that of arachidonic acid was stimulated to 1.35-fold. An increase in arachidonic acid of phosphatidylserine was also found by the addition of nitrate or A23187. This increase was dependent on the concentration of extracellular calcium and observed by the addition of other chaotropic anions in the order $\text{SCN}^- > \text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^-$. It seems likely therefore that nitrate causes changes in erythrocyte membranes to facilitate calcium uptake. Increasing concentration of intracellular calcium may cause stimulation of acylCoA: lysophospholipid acyltransferase and/or endogenous phospholipase A_2 .

はじめに

大気汚染物質である NO_2 は呼吸器に傷害を与えることが知られている¹⁾。吸入された NO_2 は硝酸イオンまたは亜硝酸イオンになって血液および尿中に現れることが確かめられている^{2,3)}。また、血液中の亜硝酸は赤血球のヘモグロビンによって硝酸に変えられ、血液中の硝酸濃度が対照群の数倍に増加することが報告されている⁴⁾。最近、我々は NO_2 暴露によって赤血球膜のリン脂質組成及びその脂肪酸組成に変化が起こることを明らかにした^{5,6)}。これらのことから、赤血球膜リン脂質脂肪酸代謝に及ぼす硝酸イオンの影響に注目している。

赤血球リン脂質の脂肪酸組成は2つの系で制御されている。一つは血清中のホスファチジルコリン(PC)、スフィンゴミエリン(SPH)及びリゾホスファチジルコリン(Lyso-PC)分子と赤血球中のこれらの分子との交換であり^{7,8)}、他の一つは細胞内のリゾリン脂質と細胞膜脂肪酸のアシル化反応によるものである。脂肪酸組成の制御が二つの系のみで行われているのは、赤血球には脂肪酸合成系及び不飽和化の系が存在しないからである⁹⁻¹¹⁾。

Rasmussenら¹¹⁾はヒト赤血球を用いて膜リン脂質の脂肪酸代謝回転を調べ、細胞外の脂肪酸が膜内に取り込まれ、アシル-コエンザイムA-チオエステルをへてリゾリン脂質へ移されることを明らかにした。この研究によって細胞外脂肪酸がホスファチジルエタノールアミン(PE)及びPCに取り込まれることが証明された。しかし、赤血球に存在するホスファチジルセリン(PS)の脂肪酸代謝のメカニズムや制御についての研究はほとんど行われていない。本論文は赤血球リン脂質の脂肪酸代謝に及ぼす硝酸イオンの影響を調べ、硝酸イオンによって赤血球膜PSのアラキドン酸(20:4)含量の増加が起こること、細胞外のパルミチン酸(16:0)及び20:4のPEへの取り込みが促進されること、PSでは20:4の取り込みだけが促進されること等を明らかにしたものである。

実験方法

1. 赤血球の調製

Jcl: Wistar 系雄ラットの頸動脈よりヘパリン血を採取し、遠心によって血漿を除いて赤血球を得た¹²⁾。この赤血球をインキュベーションメEDIUMで3回洗滌して実験に用いた。インキュベーションメEDIUMは Nakao らの方法¹³⁾によって調製した。メEDIUM組成は 100 mM クエン酸三ナトリウム, 4 mM NaH₂PO₄, 10 mM Glucose, 2 mM アデニン, 20 mM イノシン, pH7.5 である。

2. 赤血球のインキュベーションと脂肪酸の取り込み

放射性脂肪酸, 4 mM CaCl₂及び硝酸ナトリウムを加えた3倍量のメEDIUMに赤血球を分散させた。[1-¹⁴C]20 : 4 (55.8 mCi/mmol, New England Nuclear) 及び [9, 10-³H]16 : 0 (11.8 Ci/mmol, New England Nuclear) は牛血清アルブミンと複合体を作ってインキュベーションメEDIUMに加えた。インキュベーションは 37°C, 60 分間行った。

3. 赤血球膜脂質の抽出

インキュベーション後, 10 倍量の 0.9% NaCl で赤血球を洗い, 15 倍量の 10 mM Tris (pH 7.4) で赤血球を溶血させた。溶血液を 28,000×g, 20 分間遠心して赤血球膜を分取し, 同一緩衝液で2回赤血球膜を洗った。赤血球膜からの脂質の抽出は Ways と Hanahan の方法¹⁵⁾で行った。

4. PS の精製

赤血球膜のリン脂質と中性脂質は HPTLC シリカゲルプレート (E. Merck) を用いてジエチルエーテル-酢酸 (100 : 1) の展開溶媒で分離した。このプレートをさらにクロロホルム-メタノール-酢酸-水 (67 : 33 : 4 : 2) の展開溶媒で多重展開してリン脂質を PE, PC, SPH 及び PS+ホスファチジルイノシトール (PI) の4つの画分に分画した。PS+PI の画分を薄層からかき取り, クロロホルム-メタノール (1 : 4) で PS 及び PI を抽出した。抽出液中の PS をクロロホルム-メタノール-15%重炭酸ナトリウム (1 : 4 : 0.25)¹⁶⁾ 中で 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを反応させた。反応後, クロロホルムを加えて2層分配して下層を分取した。2,4,6-トリニトロフェニル-PS と PI とを分離するために下層を濃縮し, シリカゲル薄層にスポットしてクロロホルム-メタノール-アンモニア水-水 (70 : 30 : 2.5 : 2.5) の展開溶媒で展開した。2,4,6-トリニトロフェニル-PS の収量は 85%であった。

5. 2,4,6-トリニトロフェニル-PS の酵素分解

2.5 mg の butylated hydroxytoluene¹⁷⁾ を含んだ 2 ml のジエチルエーテルに 0.6 μmol の 2,4,6-トリニトロフェニル-PS を溶解し, この溶液に 0.1 ml の蛇毒ホスホリパーゼ A₂ (1 mg/ml in 0.2 M

Tris-HCl, pH 8.0) と 50 μ l の 0.2 M CaCl₂ 及び 0.24 mg のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド¹⁸⁾ を加えて 6 時間インキュベートした。インキュベーション後, 反応液を N₂ 下で乾固し, HPTLC シリカゲルプレートで脂肪酸, 2,4,6-トリニトロフェニル-LysoPS 及び未分解の 2,4,6-トリニトロフェニル-PS を分離した。用いた展開溶媒はクロロホルム-メタノール-アンモニア水-水 (67: 33: 2.5: 2.5) である。

9. 脂肪酸組成の測定

脂肪酸組成は脂肪酸を BF₃-メタノールを用いてメチルエステル¹⁹⁾ とし, ガスクロマトグラムより求めた。

7. 脂肪酸取り込みの測定

放射活性はトルエンシンチレーターを用いて液体シンチレーションカウンターで測定した。計数効率 は外部標準法で求めた。

リン脂質量は Harris 法²⁰⁾ で測定した。カルシウムイオン濃度はカルシウム電極を用いて測定した。

結 果

1. 赤血球膜リン脂質の脂肪酸組成に及ぼす硝酸イオンの影響

ラット赤血球膜の主要リン脂質は PC, PE, PS 及び SPH であり, 20: 4 は PE 及び PS 構成脂肪酸の中で最も多い脂肪酸である²²⁾。ラット赤血球を 1.0 mM 硝酸イオンとインキュベートすると, 赤血球膜 PS の脂肪酸組成が有意に変化した(表 1)。最も変化の大きい脂肪酸は 20: 4 であり, 対照群より 4.5 % 増加した。一方, 16: 0 及び 18: 0 は対照群よりそれぞれ 2.6 % 及び 2.5 % 減少した。PE 及び PC の脂肪酸組成は硝酸イオンによって変化しなかった。PS の 20: 4 の増加は硝酸イオン濃度の増加につれて起こり, 16: 0+18: 0 は逆に減少した。図 1 にこれらの関係を示した。

2. PS の 1 位及び 2 位の脂肪酸組成

PS の脂肪酸代謝に及ぼす硝酸イオンの影響を明らかにするために, PS の 1 位及び 2 位の脂肪酸組成の変化を調べた。表 2 に硝酸イオン処理及び対照群の赤血球膜 PS の 1 位と 2 位の脂肪酸組成を示した。硝酸イオン処理によって, 2 位の 16: 0 の減少と 20: 4 の増加が有意に起こることが確認された。一方, 1 位では硝酸イオン処理と対照群との間に有意な差は認められなかった。

3. 赤血球膜リン脂質への脂肪酸の取り込みに及ぼす硝酸イオンの影響

(1-¹⁴C)20: 4 と赤血球とをインキュベートした場合, [1-¹⁴C]20: 4 は PE, PC 及び PS に取り込

NO₃⁻による赤血球膜脂質組成の選択的変化

表 1 硝酸イオン処理ラット赤血球のホスファチジルセリン, ホスファチジルエタノールアミン及びホスファチジルコリンの脂肪酸組成

Table 1 Fatty acid compositions of phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine of rat erythrocytes incubated with nitrate

	Phosphatidylserine		Phosphatidylethanolamine		Phosphatidylcholine	
	Control	NaNO ₃	Control	NaNO ₃	Control	NaNO ₃
16:0	6.0±0.1	3.4±0.1***	29.5±0.2	29.7±0.2	44.8±0.6	45.8±0.6
18:0	23.9±0.3	21.4±0.4**	0.3±0.2	2.8±0.1	16.3±0.2	16.5±0.2
18:1	5.1±0.2	5.6±0.3	8.0±0.1	7.9±0.1	7.7±0.1	7.9±0.1
18:2	5.9±0.1	5.8±0.2	4.4±0.1	4.3±0.1	14.6±0.1	14.2±0.2
20:4	52.6±0.1	57.1±0.4***	38.1±0.2	38.0±0.2	14.5±0.2	14.2±0.2
20:5	0.6±0.1	0.6±0.2	0.8±0.1	0.8±0.1	—	—
22:4	—	—	4.1±0.1	4.2±0.1	—	—
22:5	—	—	6.8±0.1	6.9±0.1	—	—
22:6	5.8±0.1	6.1±0.2	5.3±0.2	5.4±0.2	—	—

Rat erythrocytes were incubated with 1.0 mM sodium nitrate in the incubation medium containing 4 mM CaCl₂ at 37° for 60min. Purification of phospholipids and determination of their fatty acid compositions were performed as described under "Experimental Procedures". Values were expressed as percentages (mean±SD, n=3) of the total fatty acid recovered. The significance of the difference between control and nitrate-treated values was shown: **p<0.01; ***p<0.001.

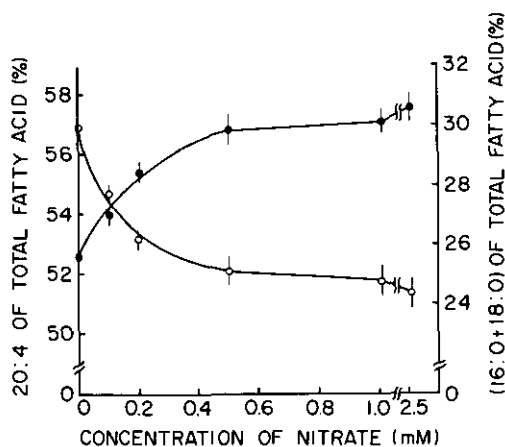


図 1 赤血球膜ホスファチジルセリンの脂肪酸組成に及ぼす硝酸イオンの影響

Fig. 1 Effect of nitrate on fatty acid composition of phosphatidylserine(PS) in erythrocyte membranes

The incubation media contained 100 mM trisodium citrate, 4 mM NaH₂PO₄, 2 mM adenine, 20 mM inosine, 10 mM glucose, pH7.5. The media were supplemented with 4 mM CaCl₂ and sodium nitrate in the concentrations indicated. The incubation was performed at 37°C. 60 min after incubation, erythrocyte were washed with 0.9% NaCl and erythrocyte membranes were prepared. Purification of PS and determination of fatty acid composition were performed as described in "Experimental Procedures". ●, arachidonic acid(20:4); ○, palmitic acid (16:0) plus stearic acid(18:0). Each point was the mean of three samples and error bars represented ±SD.

表 2 硝酸イオン処理ラット赤血球中のホスファチジルセリンの1位及び2位の脂肪酸組成

Table 2 Fatty acid compositions of 1- and 2-positions of phosphatidylserine in rat erythrocytes incubated with nitrate

	Control			NaNO ₃		
	whole ^a	1-position ^b	2-position ^c	whole ^a	1-position ^b	2-position ^c
16: 0	6.2±0.1	5.0±1.2	7.3±1.3	3.2±0.1***	5.1±1.5	2.2±1.7*
18: 0	24.0±0.3	41.0±1.9	8.4±1.7	20.9±0.4***	38.7±1.0	6.2±1.7
18: 1	5.0±0.2	8.0±0.4	2.3±0.2	5.3±0.3	9.5±0.9	1.9±0.1
18: 2	5.9±0.1	3.8±0.2	7.9±0.3	5.8±0.2	4.8±0.4	6.7±0.5
20: 4	52.3±0.1	37.5±1.7	65.9±1.5	57.4±0.4***	36.2±1.7	75.7±2.7**
20: 5	0.6±0.1	—	1.0±0.4	0.6±0.2	—	0.9±0.4
22: 6	6.0±0.1	4.6±0.2	7.3±0.3	6.6±0.2	5.8±0.4	6.4±0.5

^aFatty acid composition of untreated TNP-PS

^bFatty acid composition of TNP-lysoPS.

^cFatty acid composition of free fatty acid.

Rat erythrocytes were incubated with 1.0 mM sodium nitrate. Incubation, purification of PS and fatty acid analyses were performed as described in Table 1 and under "Experimental Procedures". PS was purified as a form of 2,4,6-trinitrophenyl-PS and 2,4,6-trinitrophenyl-PS was treated with snake venom phospholipase A₂. Resulting products, 2,4,6-trinitrophenyl-lysoPS and free fatty acid, were separated by TLC. Fatty acid compositions of 2,4,6-trinitrophenyl-lysoPS and free fatty acid were expressed as those of 1- and 2-positions, respectively. Values were expressed as percentages (mean±SD, n=3) of the total fatty acid recovered. The significance of the difference between control and nitrate-treated values was shown: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

まれ、その取り込み速度はそれぞれ 530, 350 及び 80 pmol/h per μmol リン脂質であった (図2)。1.0 mM の硝酸イオンを添加した場合、PE 及び PS への取り込みはそれぞれ 1.45 及び 1.35 倍に増加した。一方、PC への取り込みは硝酸イオンの添加によって変化しなかった。図3は (9,10-³H) 16: 0 の取り込みを示したものである。PE, PC 及び PS への取り込み速度はそれぞれ 61, 58 及び 12 pmol/h per μmol リン脂質であった。1.0 mM の硝酸イオンを添加した場合、PE への取り込みは 1.45 倍に増加したが、PS の取り込みは対照群とほとんど変わらなかった。また、PC への取り込みは対照群と同じであった。これらの結果は硝酸イオンによって PS へ 20: 4 が取り込まれ易くなったことを示唆しているものと考えられる。PS に取り込まれた 20: 4 の位置を調べるために (1-¹⁴C) 20: 4 を取り込ませた PS を蛇毒ホスホリパーゼ A₂ で分解して、分解物中の ¹⁴C を調べた結果、取り込まれた (1-¹⁴C) 20: 4 の 90% は 2 位に検出された。

4. PS の 20: 4 含量の増加に及ぼす陰イオンの影響

硝酸イオンは生体膜を不安定化させるカオトロピックイオンの一つであることが知られている^{23,24}。硝酸イオンによる PE と PS への脂肪酸取り込みの増加及び PS の 20: 4 の含量の増加は硝酸イオンのカオトロピック効果によることが考えられる。このことを確かめるために赤血球を 1.0 mM の SCN⁻, ClO₄⁻ 及び NO₃⁻ とインキュベートし、その影響を調べた。表3はこれらカオトロ

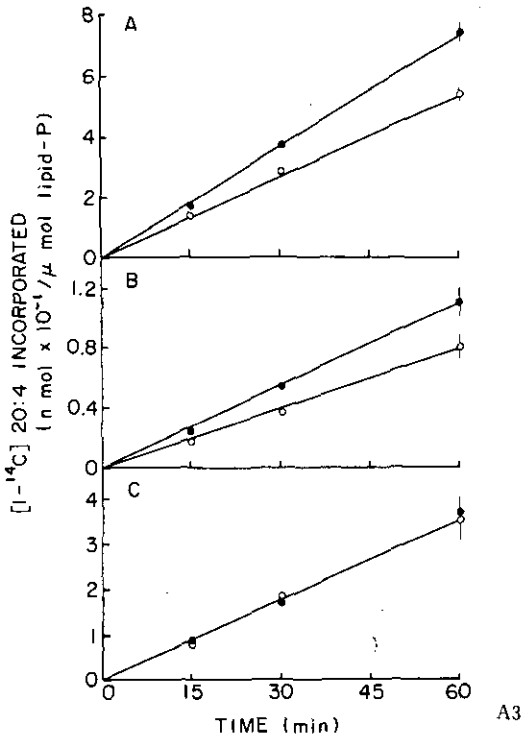


図 2 赤血球膜リン脂質への [1-¹⁴C]アラキドン酸の取り込みに及ぼす硝酸イオンの影響

Fig. 2 Effect of nitrate on incorporation of [1-¹⁴C] arachidonic acid(20: 4) into phosphatidylethanolamine (A), phosphatidylserine (B) and phosphatidylcholine (C) of erythrocyte membranes

Erythrocytes were incubated with 1.0 mM sodium nitrate in the incubation media supplemented with 4 mM CaCl₂ and [1-¹⁴C] 20: 4 (3.6 μCi) complexed to BSA. For the incubation condition see the legend of Fig.1. Purification of each phospholipid and determination of radioactivity incorporated into phospholipid were performed as described in "Experimental Procedures". —○—, —nitrate; —●—, +nitrate. Each point was the mean of three samples and error bars represented ±SD.

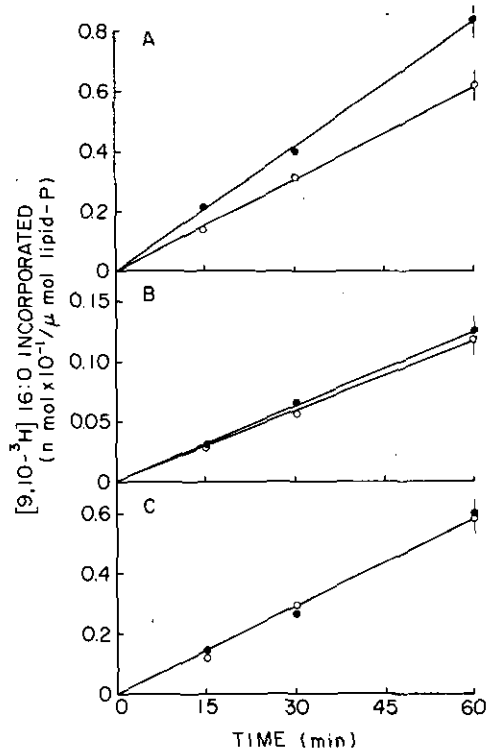


図 3 赤血球膜リン脂質への [9,10-³H]パルミチン酸の取り込みに及ぼす硝酸イオンの影響

Fig. 3 Effect of nitrate on incorporation of [9,10-³H] palmitic acid(16: 0) into phosphatidylethanolamine (A), phosphatidylserine (B) and phosphatidylcholine (C) of erythrocyte membranes

The media were supplemented with 4 mM CaCl₂ and [9,10-³H]16: 0 (3.6 μM/27 μCi) complexed to BSA. Other conditions were the same as in Fig.2. Each point was the mean of three samples and error bars represented ±SD.

表 3 ホスファチジルセリンのアラキドン酸含量の増加に及ぼす陰イオンの影響
Table 3 Effect of anions on increase in arachidonic acid content of phosphatidylserine

Addition	Arachidonic acid content of PS	% of control
none	52.4±0.1%	(100)
Na ₂ SO ₄	52.8±0.2	101
NaHCO ₃	53.1±0.3	101
CH ₃ COONa	53.8±0.2***	103
NaNO ₃	57.3±0.4***	109
NaClO ₄	58.1±0.4***	111
NaSCN ^a	59.2±0.7***	113

^achaotropic ions

Rat erythrocytes were incubated at 37° for 60 min with sodium thiocyanate, sodium perchlorate, sodium nitrate, sodium acetate, sodium bicarbonate or sodium sulfate at the final concentration of 1.0 mM in the incubation medium containing 4.0 mM CaCl₂. 20:4 content of PS in erythrocyte membranes was determined as described in Fig.1. Values were expressed as percentage (mean±SD, n=3) of the total fatty acid recovered. The significance of the difference between control and anion treated values was shown: ***p<0.001

ピックイオンによる PS の 20:4 含量に及ぼす影響を調べたものである。表 3 に示したように、PS の 20:4 含量の増加に及ぼす影響の強さは SCN⁻>ClO₄⁻>NO₃⁻の順であった。また、他のイオンの影響はわずかであった。

4. PS の 20:4 含量の増加及び 20:4 の取り込みに及ぼすその他の要因

2 価陽イオンイオノホアである A23187 でヒト赤血球を処理すると PE への脂肪酸の取り込みが選択的に促進されることが知られている。また、このイオノホアによって細胞内カルシウム濃度の増加とカリウム濃度の減少が起こることが確かめられている²⁶⁾。そこで、2 価金属イオンによる PS の 20:4 含量の増加に及ぼす影響を調べた。図 4 はカルシウム及びマグネシウムイオンの PS の 20:4 の含量に及ぼす影響を調べたものである。メディウムに 1.4 及び 8 mM の CaCl₂を加えた場合、メディウム中のカルシウムイオン濃度はそれぞれ 4.1, 16.5 および 33.0 μM であり、カルシウムイオン濃度の増加につれて PS の 20:4 含量が増加した。一方、マグネシウム及び EGTA を添加した場合は PS の 20:4 の含量に影響を与えなかった。

PS の 20:4 含量および取り込みに及ぼすカリウムの影響を調べるために、メディウム中のクエン酸三ナトリウムをクエン酸三カリウムに置換したメディウムを調製してその影響を調べた。表 4 に示したようにカリウムメディウムによって PE への 20:4 の取り込みがおさえられ、対照群と同じ値を示したが、PS の 20:4 含量及び 20:4 の取り込みはカリウム濃度の増加によって影響を受けなかった。ラット赤血球と A23187 をインキュベートすると硝酸イオンの場合と同じ影響が観察された (表 5)。

表 4 硝酸イオン処理によるホスファチジルセリンのアラキドン酸含量増加とアラキドン酸取り込みの増加に及ぼす細胞外ナトリウム及びカリウム濃度の影響

Table 4 Effects of extracellular potassium and sodium on increase in arachidonic acid content of phosphatidylserine and stimulation of [¹⁻¹⁴C] arachidonic acid incorporation into phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine induced by incubation with nitrate

		Extracellular monovalent cation	
		Sodium medium	Potassium medium
Arachidonic acid content in PS ^a	Control	53.0±0.1	52.7±0.1
	NaNO ₃	57.1±0.4***	57.3±0.3***
	NaNO ₃ /Control	1.08	1.09
20:4 incorporation into PS ^b	Control	0.82±0.09	0.83±0.08
	NaNO ₃	1.10±0.10	1.12±0.10*
	NaNO ₃ /Control	1.34	1.35
20:4 incorporation into PE ^b	Control	5.3±0.4	5.1±0.3
	NaNO ₃	7.4±0.6*	5.3±0.6
	NaNO ₃ /Control	1.40	1.04

^a% of the total fatty acid

^bnmol of 20:4 incorporated X10⁻¹/μmol of lipid phosphorus/h

Rat erythrocytes were incubated with 1.0 mM sodium nitrate in the potassium (100 mM tripotassium citrate) or sodium medium (100 mM trisodium citrate) containing 4.0 mM CaCl₂ and 20:4 content of PS was determined as described in Fig.1. In experiment on [¹⁻¹⁴C] 20:4 incorporation into PE and PS, erythrocytes were incubated with [¹⁻¹⁴C] 20:4 complexed to BSA in the presence of 1.0 mM sodium nitrate. Purification of PE and PS, and determination of radioactivity incorporated into PE and PS were performed as described under "Experimental Procedures" and in Fig. 2. The significance between control and nitrate-treated values was shown: *p<0.05; ***p<0.001. (mean±SD, n=3).

考 察

赤血球膜 PS の脂肪酸代謝に及ぼす硝酸イオンの影響を調べ以下のような結果を得た。

赤血球と硝酸イオンをインキュベートすることによって PS の脂肪酸組成に変化が起り、20:4 の増加と 16:0+18:0 の減少が観察された。また、これらの変化は硝酸イオン濃度に依存していた。さらに、これらの現象は硝酸イオンにかぎらず他のカオトロピックイオンであるチオシアンイオン (SCN⁻) や過塩素酸イオン (ClO₄⁻) によっても観察された。このことは、PS の 20:4 含量の増加や 20:4 の取り込みの増加が硝酸イオンのカオトロピック効果によって引き起こされたことを示している。

はじめに述べたように、硝酸イオンは大気汚染物質である NO₂ の吸入によって体内で生じる可能性がある。Oda ら⁹は 5 ppm の NO₂ を 30 分間マウスに暴露した場合に血液中の硝酸イオン濃度が対照群の 4 倍に相当する 0.1 mM に達することを報告している。従って、ここで示した PS の脂肪酸組成の変化は日常的に起こりうる可能性があると考えられる。

表 5 ホスファチジルセリンのアラキドン酸含量と [1-¹⁴C]アラキドン酸及び [9, 10-³H]パルミチン酸の取り込みは速度に及ぼす A23187 の影響

Table 5 Effects of A23187 on arachidonic acid content of PS and rates of [1-¹⁴C] arachidonic acid and [9,10-³H]palmitic acid into PE and PS

	control ^a	A23187 ^b	A23187/control
Arachidonic acid content in PS^c			
Sodium Medium	52.4±0.1	55.2±0.4	1.05
Potassium Medium	52.2±0.1	55.4±0.5***	1.06
Arachidonic acid incorporation into PS^d			
Sodium Medium	0.82±0.08	1.07±0.09*	1.30
Potassium Medium	0.83±0.08	1.09±0.09*	1.31
Palmitic acid incorporation into PS^d			
Sodium Medium	0.12±0.01	0.13±0.01	1.08
Potassium Medium	0.12±0.01	0.12±0.01	1.00
Arachidonic acid incorporation into PE^d			
Sodium Medium	5.3±0.4	7.7±0.6*	1.45
Potassium Medium	5.1±0.3	5.2±0.6	1.02
Palmitic acid incorporation into PE^d			
Sodium Medium	0.61±0.05	0.88±0.06***	1.44
Potassium Medium	0.61±0.05	0.60±0.06	0.98

^aControl incubation mixture received ethanol (0.5%)

^bA23187 (0.5 μM) in ethanol (0.5%)

^c% of the total fatty acid in PS

^dnmol fatty acid incorporated 10⁻¹/μmol of lipid phosphorus/h

Rat erythrocytes were incubated at 37° for 60 min with A23187 in potassium or sodium medium containing 4.0 mM CaCl₂. 20:4 content of PS in erythrocyte membranes was determined as described in Fig.1. In order to examine fatty acid incorporation into PE and PS, incubation was performed in the presence either of [1-¹⁴C] arachidonic acid or [9,10-³H] palmitic acid complexed to bovine serum albumin. Incorporation of radioactive fatty acid into PE and PS was determined as described in Figs. 2 and 3. The significance between control and nitrate-treated values was shown: *p<0.05; ***p<0.001. (mean±SD, n=3).

哺乳動物の赤血球の脂肪酸代謝について多くの研究がなされてきた^{7,8,11}。しかし PS の脂肪酸代謝に関する研究はほとんど行われていない。硝酸イオンによる赤血球膜 PS の 20:4 含量の増加は 16:0 と 20:4 の PS への取り込み速度の違いによって起こるものと考えられる。また、20:4 含量の増加につれて 16:0 が減少することから、PS の 2 位の 16:0 が 20:4 と置換するものと考えられる。

最近、膜リン脂質への脂肪酸の取り込みは膜の細胞質側でリゾリン脂質がアシル化されることによって起こることが明らかにされた^{26,27}。従って、硝酸イオンによる PS の 20:4 の取り込みの促進はアシルトランスフェラーゼやホスホリパーゼの活性の促進によって起こるものと考えられる。細胞内ホスホリパーゼの活性の発現にはカルシウムが必要であり²⁸、膜リン脂質代謝の制御に重要な役割を果たしている²⁹。PS の 20:4 含量の増加にはカルシウムイオンが必要であることが図 4 及びイオノホア A23187 を用いた実験から明らかにされた。イオノホア A23187 はカルシウムを選択

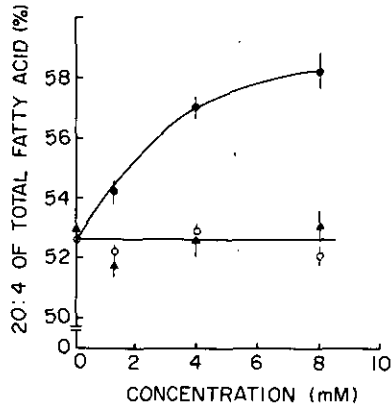


図 4 赤血球膜ホスファチジルセリンのアラキドン酸含量の増加に及ぼすカルシウムとマグネシウムの影響

Fig. 4 Effects of calcium and magnesium on increase in arachidonic acid (20:4) of phosphatidylserine of erythrocyte membranes

The incubation media were supplemented with 1.0 mM sodium nitrate and CaCl₂ or MgCl₂ or MgCl₂ in the concentrations indicated. For other experimental conditions see the legend of Fig. 1. ●, +calcium; ▲, +calcium +9 mM EGTA; ○, +magnesium. Each point was the mean of three samples and error bars represented ±SD.

的に透過させることが知られている²⁹⁾。Paysant ら³⁰⁾はヒト赤血球にホスホリパーゼ活性があることを示唆している。さらに、Dise ら¹¹⁾はヒト赤血球の脂肪酸代謝にホスホリパーゼが関与していることを示した。Waku と Lands³¹⁾はラットの赤血球膜にホスホリパーゼ活性が存在することを示唆した。これらの事実は硝酸イオンによって起こる PS の 20:4 含量の増加がカルシウムによるホスホリパーゼの活性化と関係があることを示すものと考えられる。20:4 の取り込みが PS の 2 位で選択的に起こっている事実はラット赤血球膜にホスホリパーゼ A₂ が存在することを示すものであろう。

硝酸イオンのラット赤血球膜の PE 及び PS の脂肪酸代謝に及ぼす影響はイオノホアである A23187 の場合と極めて類似していた。Waissman ら³²⁾はヒト赤血球膜におけるカルシウムポンプの機構に陰イオンが関与していることを示している。このことは硝酸イオンとカルシウムイオンとの間に密接な関係があることを示すものと考えられる。

引用文献

- 1) Morrow, P. E. (1975): *Environ. Res.*, **10**, 92-112.
- 2) Shvorcova, S. and V. Kant (1971): *Cesk. Hyg.*, **17**, 71.
- 3) Goldstein, E., N. F. Peek, N. J. Parjs, H. H. Hines, G.P. Steffey and B. Tarkington (1977): *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **115**, 403-411.
- 4) Oda, H., H. Tsubone, A. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): *Environ. Res.*, **25**, 294-301.

- 5) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980): *Environ. Res.*, **23**, 397-409.
- 6) Kaya, K. and T. Miura (1982): *Environ. Res.*, **27**, 24-35.
- 7) Reed, C.F. (1968): *J. Clin. Invest.*, **47**, 749-760.
- 8) Shohet, S.B. (197): *J. Clin.*, **49**, 1668-1678.
- 9) Shohet, S. B., D. G. Nathan, and M. L. Karnousky (1968): *J. Clin0 Invest.*, **47**, 1096-1108.
- 10) Mulder, E. and L. L. M. Van Deenen (1965): *Biochim. Biophys. Acta.*, **106**, 106-118.
- 11) Dise, C. A., D. B. P. Goodman and H. Rasmussen (1980): *J. Lipid Res.*, **21**, 292-300.
- 12) Allan, D., R. Watts and R. H. Michell (1976): *Biochem. J.*, **156**, 225-232.
- 13) Nakao, M., Y. Fujii, Y. Hara, T. Nomura, T. Nakao and Y. Komatsu (1980): *J. Biochem.*, **88**, 327-335.
- 14) Dodge, J. T., C. Mitchell and D. J. Hanahan (1963): *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119-130.
- 15) Ways, P. and D. J. Hanahan (1964): *J. Lipid Res.*, **5**, 318-328.
- 16) Gordesky, S. E. and G. V. Marinetti (1973): *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **50**, 1027-1031.
- 17) Ferber, E., G. G. De Pasquale and K. Resch (1975): *Biochim0 Biophys. Acta*, **398**, 364-3760
- 18) Saito, K. and K. Sato (1968): *J. Biochem.*, **64**, 293-300.
- 19) Metcalfe, L. D. and A. A. Schmitz (1961): *Anal. Chem.*, **33**, 363-364.
- 20) Harris, W. D. and P. Papat (1954): *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 124-127.
- 21) Nelson, G. J. (1967): *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 221-232.
- 22) Rao, G. A., K. Siler and E. C. Larkin (1979): *Lipids* **14**, 30-38.
- 23) Hamaguchi, K. and E. P. Guduschek (1962): *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1329-1338.
- 24) Davis, K. A. and Y. Hatefi (1969): *Biochemistry* **8**, 3355-3361.
- 25) Dise, C. A., D. B. P. Goodman and H. Rasmussen (1980): *J. Biol. Chem.*, **255**, 5201-5207.
- 26) Renooij, W., L. M. G. Van Golde, R. F. A. Zwaal, B. Roelofsen and L. L. M. Van Deenan (1974): *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 287-297.
- 27) Renooij, W., L. M. G. Van Golde, R., F. A. Zaal and L. L. M. Van Deenan (1976): *Eur. J. Biochem.*, **61**, 53-58.
- 28) Shier, W. T. (1979): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 195-199.
- 29) Dise, C. A., W. C. Lake, D. B. P Goodman and H. Rasmussen (1976): *J. Biol. Chem.*, **251**, 4162-4164.
- 30) Paysant, M., R. Bitran, R. Wald and Polonouski (1970): *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **52**, 1259-1269.
- 31) Waku, K. and W. E. M. Lands (1968): *J. Lipid Res.*, **9**, 12-18.
- 32) Waisman, D. M., J. M. Gimble, D. B. P. Goodman and H. Rasmussen (1981): *J. Biol. Chem.*, **256**, 420-424.

I-5

二酸化窒素のラット赤血球膜成分に及ぼす影響
—— 硝酸イオン及び亜硝酸イオンの効果 ——

Effects of Nitrogen Dioxide on Components of Red Cell Membranes
of Rat: Effects of Sodium Nitrate and Sodium Nitrite

辻井直樹²・国本 学¹・三浦 卓¹・彼谷邦光¹
持立克身¹・下條信弘²

Naoki TSUJII², Manabu KUNIMOTO¹, Takashi MIURA¹, Kunimitsu KAYA¹,
Katsmi MOCHITATE¹ and Nobuhiro SHIMOJYO²

要 旨

二酸化窒素 (NO₂) 暴露による赤血球膜成分の変動の原因を明らかにするために、NO₂ 暴露によって血液中に増加する硝酸イオン・亜硝酸イオンが赤血球膜成分に及ぼす効果をラット血液を用いて検討した。血液に最終濃度 0.1~1.0 mM の亜硝酸ナトリウムを添加し 37 度で 1 時間インキュベーションすると、赤血球膜のシアル酸含量はほとんど変化しないがヘキソース含量は低下し、0.1 mM 亜硝酸ナトリウム添加によって対照値の 77% となった。逆に硝酸ナトリウムの添加によって赤血球膜のヘキソース含量は変化しないがシアル酸含量は低下した。

硝酸ナトリウムの添加によって赤血球膜の Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は添加濃度に依存して減少し 0.2 mM で対照値の 79% になった。亜硝酸ナトリウムも同様の効果を示したがその作用は硝酸ナトリウムよりも小さかった。赤血球膜の Na⁺, K⁺-ATPase 活性は両イオンの添加により増減が認められたが変動中は微弱であった。

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 昭和 56, 57 年度国立公害研究所共同研究員
(筑波大学環境科学科 〒305 茨城県新治郡桜村)
The University of Tsukuba, Graduate School of Environmental Sciences, Sakura-mura, Niihari, Ibaraki 305, Japan
 3. 昭和 57 年度国立公害研究所客員研究員
(筑波大学環境科学科 〒305 茨城県新治郡桜村)
The University of Tsukuba, Graduate School of Environmental Sciences, Sakura-mura, Niihari, Ibaraki 305, Japan.

以上の結果から、NO₂暴露によって認められた赤血球膜のヘキソース含量とCa²⁺、Mg²⁺ ATPase活性の低下は各々NO₂暴露によって血液中に増加する亜硝酸イオンと硝酸イオンの作用によることが支持された。また、NO₂暴露で観察された赤血球膜シアル酸含量とNa⁺、K⁺-ATPase活性の増加には硝酸イオンと亜硝酸イオンがほとんど関与していないことが明らかとなった。

Abstract

In order to clarify the chemical forms of NO₂ producing alterations of components of red cell membranes, rat bloods were incubated with nitrate and nitrite ions, possible products of inhaled NO₂, and changes in components of red cell membranes were examined. Sixty minutes after incubation at 37°C, the hexose content of red cell membranes was decreased to 77% of the control by 0.1 mM sodium nitrite and the sialic acid content decreased slightly at the concentrations ranging from 0.1 to 1.0 mM. By contrast, addition of sodium nitrate resulted in a marked decrease in the sialic acid content and in a slight reduction in the hexose contents. Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase activity of red cell membranes also showed a rapid decrease dependent on the nitrate concentration up to 0.2mM followed by a slight decrease. Addition of sodium nitrite caused a decrease in Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase activity similar to that of sodium nitrate but the effect of the former was less significant. The Na⁺, K⁺-ATPase activity altered slightly upon incubation with these ions.

These results support that the hexose content and the Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase activity of red cell membranes are decreased by elevated levels of nitrite and nitrate ions, respectively, in the blood upon exposure to NO₂, but increases in the Na⁺, K⁺-ATPase activity and in the sialic acid content are not due to these ions.

はじめに

NO₂暴露によって血液成分は多様な変化を受けることが報告されている。血清中のアセルコリンエステラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやカタラーゼ等の酵素活性が変化する外に赤血球ヘモグロビンのメト化が明らかにされている¹⁾²⁾。我々はこれまでにNO₂暴露が赤血球成分に及ぼす影響について、検索し、赤血球解糖系酵素活性と赤血球膜成分の変化を明らかにしてきた³⁻⁵⁾。4 ppm NO₂の急性暴露によって赤血球の解糖系酵素活性と赤血球膜のNa⁺、K⁺-ATPase活性及びシアル酸含量の増加が起こるが、これらの増加はNO₂暴露によって赤血球の老化が促進され次いで若く高い活性を持つ赤血球の割合が血液中に増加することに起因している可能性を明らかにした⁶⁾。しかしながらNO₂暴露によって観察された赤血球膜のCa²⁺、Mg²⁺-ATPase活性とヘキソース含量の減少は赤血球のポピュレーションの変化としては説明できない。

吸入されたNO₂ガスは肺胞において硝酸イオンと亜硝酸イオンの形で血液中に入り、体内を循環した後尿中に排泄されることが知られている⁷⁾⁸⁾。従って、赤血球は肺胞においてNO₂ガスと直接接触する可能性があるほかに、血流中において硝酸イオンと亜硝酸イオンに暴露されていることになる。NO₂が中性で水分子と反応すると等モルの硝酸と亜硝酸ができる⁹⁾。亜硝酸イオンは速やかに赤血球内に取り込まれ、ヘモグロビンをメト化し硝酸イオンとなる¹⁰⁾。4 ppm程度のNO₂をラットに

暴露した場合血液中の硝酸イオン濃度は数時間以内で定常状態となり、その際の硝酸イオン濃度は0.1~0.2mMと対照値の数倍に達しNO₂暴露を続ける限り血液中の濃度は高いレベルに維持される¹¹⁾。血液中の亜硝酸イオン濃度を正確に測定することは困難であるが、4 ppm NO₂暴露の場合5~10mM以上になっていると考えられる。

以上述べた事実から明らかのように、NO₂暴露の赤血球に対する作用機作を解明しようと試みる場合硝酸イオン及び亜硝酸イオンの効果について検討することが必要になってくる。本研究では、4ppm NO₂暴露によって変動する赤血球膜のヘキソース及びシアル酸含量とCa²⁺、Mg²⁺-ATPase活性が硝酸イオンと亜硝酸イオンによってどのように変化するかについて検討した結果を記した。

方 法

1. 血液の採取とインキュベーション

実験にはJcl : Wistar系雄ラット(13-24週令)を使用し、エーテル麻酔を行い頸動脈からヘパリン存在下で血液を採集した。採集した血液はただちに遠心により血漿と赤血球と分離した。血漿に硝酸ナトリウムあるいは亜硝酸ナトリウム溶液を1/20容加えた後等容の赤血球と混合し37度でインキュベーションした。インキュベーション後遠心によって赤血球を分離し0.95%NaCl溶液で3回洗滌した。洗滌した赤血球からDodgeらの方法¹²⁾によって赤血球膜を調製し試料として分析に供した。

2. 亜硝酸イオンと硝酸イオンの定量

亜硝酸ナトリウムは硝酸ナトリウムを添加した赤血球懸濁液から経時的に試料を採取しOdaらの方法¹³⁾で硝酸イオンと亜硝酸イオン量を定量した。

3. ヘキソース及びシアル酸の定量

赤血球膜画分のシアル酸含量はAminoffのTBA法¹⁴⁾で行った。ヘキソース含量の測定は、赤血球膜画分を4N塩酸中で85度4時間加水分解した後、クロロホルム-メタノール(2:1)で2回洗滌した上層を濃縮しRoeのアンスロン法¹⁵⁾で行った。

4. ATPase活性の測定

赤血球画分のATPase活性はLuthra & Kimの方法¹⁶⁾により測定した。Na⁺、K⁺-ATPase活性は-KClを対照とし、Ca²⁺、Mg²⁺-ATPase活性は+EGTAを対照として求めた。

赤血球膜画分のリン脂質量はHarrisらの方法¹⁷⁾で定量した。

結 果

1. 赤血球膜のシアル酸とヘキソース含量に及ぼす硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムの効果

4 ppm NO₂をラットに1日間暴露すると赤血球膜成分は多様な変化を示す。これらの変化を表1に要約した。シアル酸含量と Na⁺, K⁺-ATPase 活性は共に増加し、ヘキソース含量と Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は減少した。これら赤血球膜成分の変動と硝酸イオン, 亜硝酸イオンの関連を明らかにするために、血漿に硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムを添加し等容の赤血球と混合し 37 度でインキュベーションした。図1に亜硝酸ナトリウムを最終濃度 0.1 mM 及び 0.5 mM になるように添加した場合の亜硝酸イオンの変化を示した。37 度でのインキュベーションによっていずれの場合も亜硝酸イオン量は 20 分以下の半減期で減少した。60 分目の亜硝酸イオン量は 0.1 mM 及び 0.5 mM の添加で各々 0.03 mM と 0.08 mM であった。最終濃度 0.5 mM でのインキュベーションを行うとヘモグロビンのメト化が肉眼的にも観察された。また減少した亜硝酸イオンが硝酸イオンとなっていることも確認された。

図2に、0.1~0.5 mM の亜硝酸ナトリウムが赤血球膜のヘキソース含量に及ぼす効果について示

表 1 4 ppm NO₂1 日間暴露が赤血球膜成分に及ぼす影響

Table 1 Effects of one-day exposure to NO₂ on components of red cell membranes

Components	Control	4 ppm NO ₂	NO ₂ /Cont
Sialic Acid ¹	12.4±1.2	17.2±2.3*	1.39
Hexose ¹	55.1±4.9	43.0±3.3*	0.78
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase ²	4.8±0.1	6.1±0.7*	1.27
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATPase ²	5.7±0.8	4.3±0.7	0.75

¹µg/mg of cell membrane phospholipid.

²µmol Pi released/hr per mg of cell membrane phospholipid.

*p<0.05

(mean±SD)

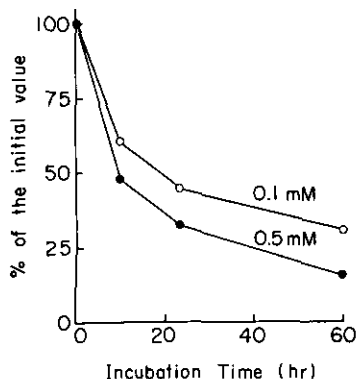


図 1 血液中に添加した亜硝酸イオンの経時変化

Fig. 1 Changes in the nitrite concentration in the blood during incubation
Addition of sodium nitrite: ○, 0.1 mM; ●, 0.5 mM.

NO_xの赤血球膜成分に及ぼす影響

した。ヘキソース含量は亜硝酸ナトリウムとインキュベーションすると0.1 mMで1時間目には無添加の70%にまで減少した。1時間目よりもわずかに減少を続けたが無添加の場合も同程度の減少を示し、赤血球膜のヘキソース含量の低下は1時間以内で完了すると考えられる。図3に0.1~1.0 mM

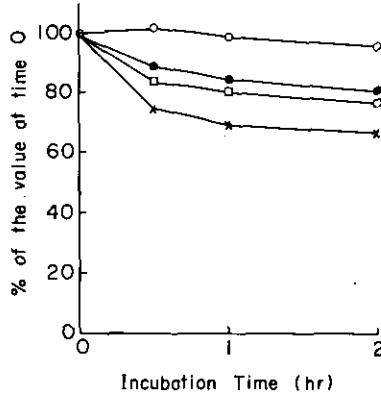


図 2 亜硝酸ナトリウム添加による赤血球ヘキソース含量の経時変化
 Fig. 2 Changes in the hexose content of red cell membranes during incubation of red blood cells with sodium nitrite
 Addition of sodium nitrite: ○, no addition; x, 0.1mM; ■, 0.2mM; ●, 0.5mM.

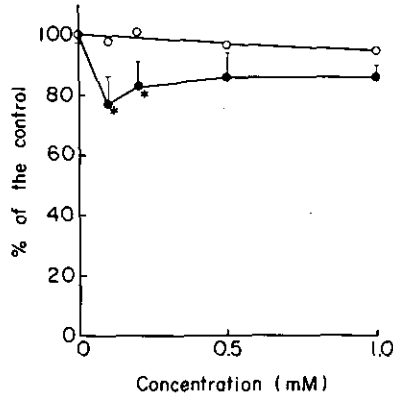


図 3 硝酸ナトリウム及び亜硝酸ナトリウムの赤血球膜ヘキソース含量に及ぼす効果
 Fig. 3 Effects of sodium nitrate and sodium nitrite on the hexose content of red cell membranes
 ○, sodium nitrate; ●, sodium nitrite. (mean ± SD) **p* < 0.05.

の硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムと 37 度で 1 時間インキュベーションした結果を示した。赤血球膜のヘキソース含量は 0.1 mM 亜硝酸ナトリウムの添加によって 77% にまで減少したが、亜硝酸ナトリウムの濃度を上げていくとヘキソース含量の減少の度合いはむしろ低下した。0.5~1.0 mM では無添加の場合の 86% であった。一方、硝酸ナトリウムの添加による赤血球膜ヘキソース含量の減少は微弱であった。

図 4 に、硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムが赤血球膜のシアル酸含量に及ぼす効果を示した。ヘキソール含量の場合と異なりシアル酸含量は 0.1 mM から 0.5 mM と硝酸ナトリウムの添加量に

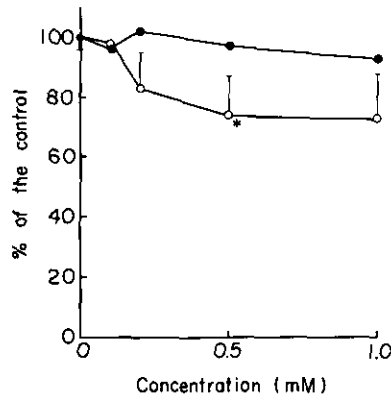


図 4 硝酸ナトリウム及び亜硝酸ナトリウムの赤血球膜シアル酸含量に及ぼす効果

Fig. 4 Effects of sodium nitrate and sodium nitrite on the sialic acid content of red cell membranes

○, sodium nitrate; ●, sodium nitrite. (mean ± SD) **p* < 0.05.

低下し、0.5 mM 硝酸ナトリウムで対照値の 74% になった。亜硝酸ナトリウムの添加によっても赤血球膜のシアル酸含量は低下したがその効果は硝酸ナトリウムに比べ著しく小さく 1.0 mM で対照値の 94% であった。

2. 赤血球膜の ATPase 活性に及ぼす硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムの効果

図 5 に、硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムが赤血球膜の Na^+ , K^+ -ATPase に及ぼす影響を示した。0.1 mM の硝酸ナトリウムでは Na^+ , K^+ -ATPase 活性は対照値の 91% に減少したが、0.2 mM では 102% となり更に添加濃度を上げると活性は徐々に減少していった。亜硝酸ナトリウムの効果は硝酸ナトリウムと同様のパターンを示したが 0.2 mM で Na^+ , K^+ -ATPase は 105% とわずかに対照値を上回り以後添加濃度の上昇につれ低下した。 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性は硝酸ナトリウムの添加によって Na^+ , K^+ -ATPase 活性よりも顕著に変化した(図 6)。0.2 mM までは添加濃度に依存して減少し対照値の 79% となった。その後も徐々に減少し 1.0 mM 硝酸ナトリウム添加では対照値の 75% になった。亜硝酸ナトリウムも硝酸ナトリウムと同様に Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性を

NO₂の赤血球膜成分に及ぼす影響

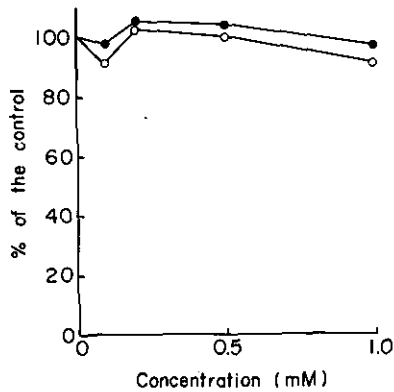


図 5 硝酸ナトリウム及び亜硝酸ナトリウムの赤血球膜 Na⁺, K⁺-ATPase 活性に及ぼす効果

Fig. 5 Effects of sodium nitrate and sodium nitrite on the Na⁺, K⁺-ATPase activity of red cell membranes
○,sodium nitrate; ●,sodium nitrite.

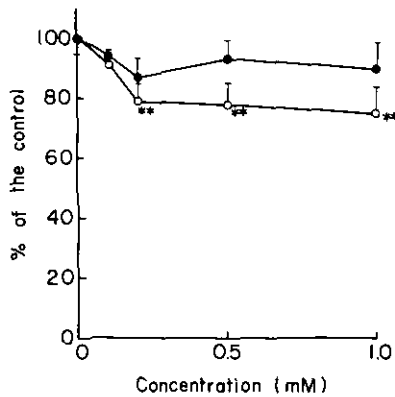


図 6 硝酸ナトリウム及び亜硝酸ナトリウムの赤血球膜 Ca²⁺,Mg²⁺ATPase 活性に及ぼす効果

Fig. 6 Effects of sodium nitrate and sodium nitrite on the Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase activity of red cell membranes
○,sodium nitrate; ●,sodium nitrite.
(mean ± SD)**p < 0.01.

減少させたが添加濃度 0.2 mM で対照値の 87% と硝酸ナトリウムよりも効果は小さかった。更に添加濃度を上げてても減少効果は変わらなかった。

考 察

これまでに 4 ppm NO₂ 暴露によってラット赤血球の形質膜成分が多様に変化することを明らかにして来た^{4,5)}。ラット赤血球は約 70 日の寿命を持ち、血流中で老化していく間に膜 ATPase 活性の

減少やシアル酸含量の低下が起こることが知られている¹⁸⁾¹⁹⁾。従って、NO₂暴露によりNa⁺、K⁺-ATPase活性とシアル酸含量は増加することは血液中で赤血球の若返りが起こっている可能性を考えさせる。この仮説に基づいて若い赤血球と老化した赤血球を分画した結果、NO₂暴露初期に若い赤血球が増加することを見出した⁶⁾。しかしながら、赤血球膜のヘキソース含量とCa²⁺、Mg²⁺-ATPase活性の減少については原因が明らかではなかった。本研究は、NO₂暴露によって血液中に硝酸イオンと亜硝酸イオン濃度が増加することに着目し、これらイオンが赤血球膜成分に及ぼす影響を明らかにするために行われた。

赤血球膜のヘキソース含量は0.1mMの亜硝酸イオンによって特異的に減少した(図3)。また、シアル酸含量は0.2mMの硝酸イオン濃度で83%に減少したが亜硝酸イオンの効果は微弱であり増加は認められなかった(図4)。これらの結果から、NO₂暴露によって血液中の硝酸イオン亜硝酸イオンが0.1~0.2mMに上昇すれば1時間でヘキソース含量とシアル酸含量の低下が起こる可能性が明らかになった。

硝酸イオンと亜硝酸イオンがNa⁺、K⁺-ATPase活性に及ぼす効果は微弱であった(図5)。亜硝酸イオンの添加により0.2~0.5mMの濃度範囲で活性はわずかに上昇したが4ppm NO₂暴露で観察された有意な増加に比較すると著しく小さい(表1)。一方、Ca²⁺、Mg²⁺-ATPase活性は両イオンの添加濃度に依存して減少した(図6)。亜硝酸イオンの低下効果は同濃度の硝酸イオンに比べて小さかった。従って、亜硝酸イオンがCa²⁺、Mg²⁺-ATPase活性を低下させる効果はインキュベーション中に亜硝酸イオンから転換した硝酸イオンの効果によると考えられることも可能である(図1)。このように硝酸イオンと亜硝酸イオンが赤血球膜の両ATPase活性を低下させる効果を持ち、血液中に硝酸イオン濃度が増加すればCa²⁺、Mg²⁺-ATPase活性が減少することは、ラットにこれらイオンを静注した実験でも支持された²⁰⁾。

以上の結果を基にして、4ppm NO₂暴露によって観察された赤血球膜のヘキソース含量の減少は亜硝酸イオンの作用であり、Ca²⁺、Mg²⁺-ATPase活性の低下は硝酸イオンの作用であるという仮説が支持された。NO₂暴露とインキュベーションによる影響発現の時間差については今後検討しなければならない。

引用文献

- 1) Misiakiewicz, A., G. Szulkinska, A. Chyba, and E. Czyz (1974): Effect of nitrogen dioxide polluted air on experimental animals under conditions of long-term continuous exposure. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.*, **25**, 245-254.
- 2) Case, G. D., J. S. Dixon, and J. C. Schooldy. (1979): Interactions of blood metalloproteins with nitrogen oxides and oxidant in air pollutants. *Environ. Res.*, **20**, 43-65.
- 3) 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光(1980): 二酸化窒素の赤血球酵素および糖脂質に存する影響。国立公害研究報告書, 第15号, 125-132.
- 4) Kaya, K., T. Miura, K. Kubota (1980): Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: Changes in components of red cell membranes during *in vivo* exposure to NO₂. *Environ. Res.*, **23**, 397-409.
- 5) Kaya, K., and T. Miura (1982): Effects of nitrogen dioxide on fatty acid compositions of red cell membranes, sera

- and livers in rats. *Environ. Res.*, **27**, 24-35.
- 6) 国本 学・三浦 卓・彼谷邦光・持立克身・久保田憲太郎(1981): 二酸化窒素暴露によるラット赤血球膜の変化。日本衛生学雑誌, **36**,403.
 - 7) Shvorcova, S. and V. Kant (1971): The artero-venous differences in the nitrite and nitrate ion concentrations after nitrofen oxides inhalation. *Cesk. Hyg.*, **17**, 71.
 - 8) Goldstein, E., N. F. Peek, N. J. Oarks, H. H. Hines, G. P. Steffer and B. Tarkington (1977): Fate and distribution of inhaled nitrogen dioxide in Rhesus monkeys. *Amr. Rev. Resp. Dis.*, **115**, 403-411.
 - 9) 織田 肇・局 博一・鈴木 明・市瀬孝道(1980): 二酸化窒素を暴露したマウスの血液中亜硝酸・硝酸イオン量の変動。国立公害研究所研究報告, 第15号, 43-54.
 - 10) Case, G. D., J. S. Dixon and J. C. Schooley (1979): Interactions of blood metalloproteins with nitrogen oxidant air pollutants. *Environ. Res.*, **20**, 43-65.
 - 11) 織田 卓・永沢節子・鈴木 明(1981): 一酸化窒素および二酸化窒素の生体内挙動。国立公害研究所報告, 第31号,59-66.
 - 12) 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.
 - 13) Oda, H., H. Tsubone, A. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alteration so nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **25**, 294-301.
 - 14) Aminoff, D. (1961): Methods for the quantitative estimation of Nacetyk-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.*, **81**, 384-392.
 - 15) Roe, J. H. (1954): The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **212**, 335-343.
 - 16) Luthra, M. G0, and H. D. Kim (1980): Effects of calcium and soluble cytoplasmic activator protein (calmodulin) on various states of (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity in isolated membranes of human red cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **600**, 467-479.
 - 17) Harris, W. D., and P. Popat (1954): Determination of the phosphorus content of lipids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **31**, 124-127.
 - 18) Prankred, T. A. J. (1958): The aging of red cells. *J. Physiol.*, **143**, 325-331.
 - 19) Hanahan, D. J., and J. E. Ekholm (1978): The expression of optimum ATPase activities in human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 170-179.
 - 20) 国本 学・局 博一・辻井直樹・三浦 卓・彼谷邦光・持立克身・久保田憲太郎(1982): NO₂暴露のラット赤血球に及ぼす影響-硝酸イオンと膜 ATPase の関係, 日本衛生学雑誌, **37**, 289.

二酸化窒素の生体内における作用形態
— 硝酸イオンと亜硝酸イオンの静注による影響 —

Effects of Intravenous Injection of Nitrate and Nitrite Ions
on Red Blood Cells and Liver Microsomes of Rats

国本 学¹・局 博一¹・三浦 卓¹・
彼谷邦光¹・持立克身¹

Manabu KUNIMOTO¹, Hirokazu TSUBONE¹, Takashi MIURA¹,
Kunimitsu KAYA¹ and Katsumi MOCHITATE¹

要 旨

二酸化窒素 (NO₂) の生体内での作用形態を明らかにするために、ラットに硝酸イオンと亜硝酸イオンを経時的に静注して赤血球膜成分と肝ミクロソーム成分の変化を調べた。ラットに 50, 100 及び 200 mM 硝酸ナトリウムを 1 時間毎に 5 回静注すると、5 時間目には血液中の硝酸イオン濃度が各々 0.16, 0.30 及び 0.70 mM となった。亜硝酸ナトリウムの静注でも同程度の硝酸イオン濃度が検出された。硝酸ナトリウム及び亜硝酸ナトリウムの静注はともに赤血球膜の Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase と Na⁺, K⁺-ATPase 活性を低下させたが、硝酸ナトリウムの方が低下効果は大きかった。また Na⁺, K⁺-ATPase よりも Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性の低下の度合は大きく、50 及び 100 mM 硝酸ナトリウムによって各々対照値の 68% (*p* < 0.05) と 69% (*p* < 0.05) にまで減少した。

硝酸ナトリウムの静注は肝ミクロソーム成分を低下させる傾向を示した。その効果は NO₂ 暴露の場合と同様にチトクローム P-450 および NADPH-チトクローム c 還元酵素に特異性が高かった。亜硝酸ナトリウムの静注はチトクローム P-450 に高い特異性を示し NO₂ 暴露とは異なる効果を示した。

これらの結果から、NO₂ 暴露によって観察された赤血球膜 Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性と肝ミクロソーム薬物代謝系成分の低下は血液中に硝酸イオン濃度が増加すれば起こることが明らかになった。

Abstract

In order to clarify the reactive form of NO₂ in blood and tissues, sodium nitrate and sodium nitrite, possible products of inhaled NO₂, were injected intravenously into rats and

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波群谷田部小野川 16 番 2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

alterations in cell membrane components of red blood cells and in components of microsomal electron-transport systems of livers were examined. Five-times injection of sodium nitrate at 1-hour interval resulted in elevated levels of blood nitrate; 0.16, 0.30 and 0.70 mM upon 0.4-ml injection of 50, 100 and 200 mM sodium nitrate. Similar levels of blood nitrate were found by injection of sodium nitrite. Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of red cell membranes decreased by sodium nitrate and reached 68% ($p < 0.05$) and 69% ($p < 0.05$) at the injection concentrations of 50 and 100 mM, respectively. Sodium nitrate also resulted in a slight decrease in Na^{+} , K^{+} -ATPase activity. These ATPase activities also decreased by injection of sodium nitrite and the magnitude of reduction was smaller than that by sodium nitrate. Components of electron-transport systems of liver microsomes were decreased by injection of sodium nitrate and showed an alteration profile similar to that by NO_2 inhalation. On the other hand, the effect of sodium nitrate was specifically deteriorative to cytochrome P-450.

These results support that elevated levels of nitrate ion in the blood cause reduction in Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity and in components of drug-metabolizing system in liver microsomes.

はじめに

我々はこれまでに NO_2 の吸入実験を行い血液成分と臓器の生体膜系成分に及ぼす影響を検索して来た。その結果、赤血球膜ではヘキソース含量の減少と Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性が低下することを見出した。また、肺、肝、腎等臓器のミクロソーム電子伝達系成分が減少することも明らかにした¹⁾。

NO_2 ガスは呼吸器に吸入されると肺胞において硝酸イオンと亜硝酸イオンの形で血液中に入り体内を循環する²⁾。従って、 NO_2 の直接的な作用は呼吸器では NO_2 の形態で行われるが、血液成分及び呼吸器以外の臓器に対しては硝酸イオンと亜硝酸イオンの形態で作用する可能性が考えられる。そこで我々は、ラットの肝臓からミクロソームを分離し硝酸イオン及び亜硝酸イオンとインキュベーションしてミクロソーム成分の変動について検討した。その結果、分離したミクロソームの成分に及ぼす硝酸イオンの効果は、変化する酵素とチトクロームの種類及び変化の度合いという点で NO_2 暴露が肝ミクロソーム成分に及ぼす効果とよく一致していた。また、同様にラットより血液を分離し硝酸イオンと亜硝酸イオンが赤血球膜成分に及ぼす影響を検討した結果、4 ppm NO_2 暴露によって起こるヘキソース含量の低下は亜硝酸イオンによって起こり Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性の減少は硝酸イオンによっている可能性が見出された。

本研究は、 NO_2 暴露によっておこる生体膜成分の減少が、 NO_2 暴露によって血液中に増加する硝酸イオンと亜硝酸イオンの直接又は間接的に作用した結果であることを確かめるために行った。ラットに硝酸ナトリウムあるいは亜硝酸ナトリウムを静注し赤血球膜成分と肝ミクロソーム成分が受ける影響を検討した。

方 法

1. 硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムのラットへの静注

Jcl: Wistar の雄ラットの外頸静脈にカテーテルを通し固定した。末端は頸背部に出した。手術後 2 日目にカテーテルを通して 0.4 ml の硝酸ナトリウム溶液又は亜硝酸ナトリウム溶液を注入し, 更にヘパリン (500 単位/ml) を添加した 0.95 % NaCl 溶液 0.2 ml を注入後密閉した。対照群のラットには硝酸ナトリウム, 亜硝酸ナトリウムの代わりに 0.95 % NaCl 溶液を 0.4 ml を注入した。1 時間毎に 5 回注入し最後の注入から 1 時間目に頸動脈から採血し屠殺した。血液中の硝酸イオンと亜硝酸イオンの測定は, これらイオンの注入前後にカテーテルより 0.2 ml 採血し行った。採血屠殺後肝臓を分離し 0.95 % NaCl 溶液で灌流し血液を除去した。

2. 試料の調整

赤血球は採血後ただちに血液より遠心により分離し 5 倍容の 0.95 % NaCl 溶液で 3 回洗滌後 15 倍容の 10 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し溶血させた。溶血後 Dodge らの方法³⁾ で赤血球膜を調製し, ATPase 活性の測定に供した。灌流した肝臓は 10 mM トリス緩衝液を含む 0.15 M KCl 溶液中で細片化し, ポッター型テフロンホモジナイザーでホモジェネートとした。ホモジェネートは $10,000 \times g$ 15 分間の遠心後, 遠心上清を $105,000 \times g$ 60 分間遠心しミクロソーム画分を調製した。

3. 酵素活性及びチトクローム含量の測定

赤血球膜 ATPase の活性は Luthra & Kim の方法⁴⁾ により測定した。ミクロソームの NADH-チトクローム *c* 還元酵素及び NADPH-チトクローム *c* 還元酵素の両活性は Omur & Takesue の方法⁵⁾ により測定し, チトクローム P-450 及びチトクローム *b_h* 含量は Omura & Sato の方法⁶⁾ で定量した。

肝ホモジェネートのタンパク質量は Lowry 法⁷⁾ により定量し, 赤血球膜のリン脂質量は Harris らの方法⁸⁾ により求めた。

血液中の硝酸イオンと亜硝酸イオン濃度の測定は Oda らの方法⁹⁾ により行った。

結 果

1. 硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムの静注による血液中硝酸イオンと亜硝酸イオン濃度の変化

ラットに 100 mM 硝酸ナトリウムを 0.4 ml ずつ静注すると血液中の硝酸イオン濃度は 4 時間目にほぼ一定の値を示すようになった (図 1)。この際血液中硝酸イオン濃度は 0.30 mM と対照値の約 6 倍に上昇していた。100 mM の亜硝酸ナトリウムを静注した場合, 破線で示した亜硝酸イオン濃度は注入後 1 時間目には約 0.05 mM にまで減少し注入回数の増加による血液中の亜硝酸イオン濃度

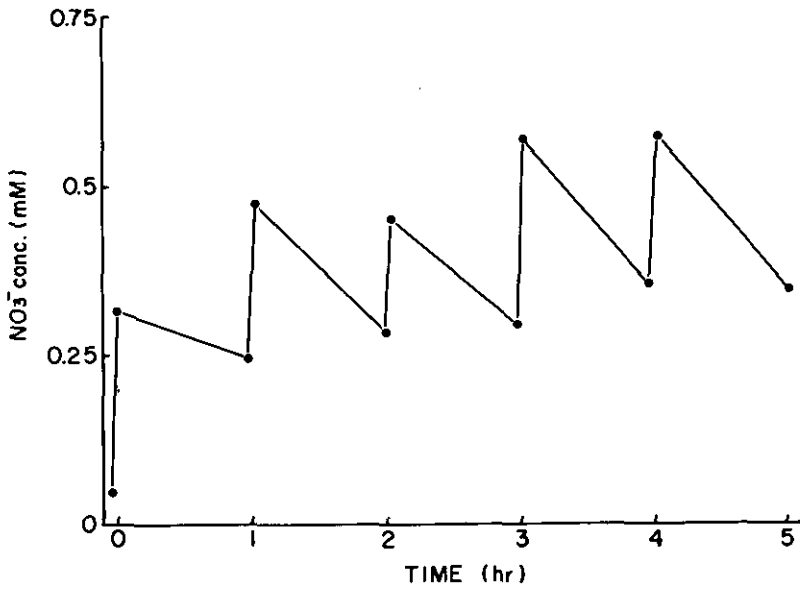


図 1. 100 mM 硝酸ナトリウムの静注によるラット血液中の硝酸イオン濃度の変化
 Fig. 1 Changes in nitrate concentration of rat blood upon intravenous injection of 100 mM sodium nitrate

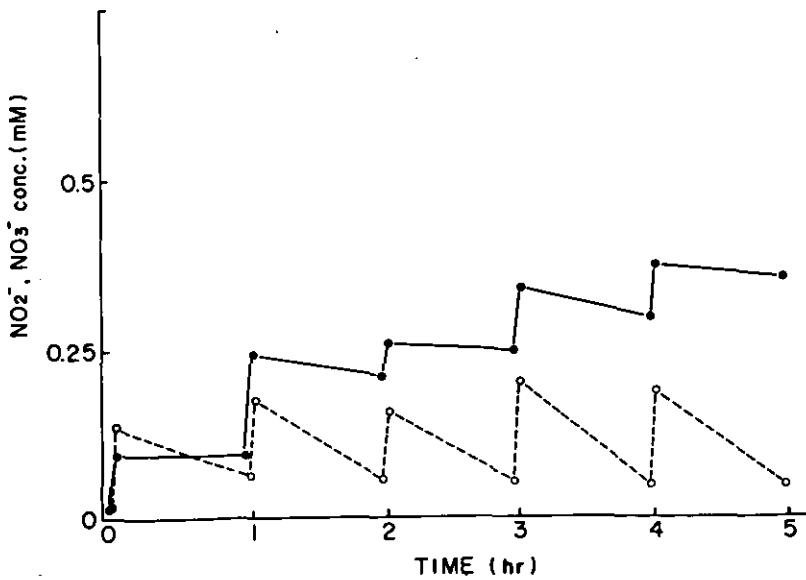


図 2 100 mM 亜硝酸ナトリウムの静注によるラット血液中の亜硝酸、硝酸イオン濃度の変化
 Fig. 2 Changes in nitrite and nitrate concentrations of rat blood upon intravenous injection of 100 mM sodium nitrate
 ○, nitrite ion ; ●, nitrate ion

硝酸塩, 亜硝酸塩静注による赤血球膜酵素活性の変化

の上昇は認められなかった(図2)。一方, 亜硝酸ナトリウムの静注により血液中の硝酸イオン濃度は注入回数の増加に伴い上昇し5時間目には0.23 mMとなった。硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムの静注濃度を50 mM, 200 mMとした場合も同様の傾向が観察された。表1に, 硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムを1時間毎に5回静注したラットの5時間目における血液中硝酸イオン濃度を示した。血液中の硝酸イオン濃度は注入に用いた硝酸ナトリウムの濃度に依存して上昇し, 50, 100, 200 mMで各々0.16, 0.30, 0.70 mMであった。同様に亜硝酸ナトリウムを注入した場合も亜硝酸ナトリウム濃度50, 100, 200 mMに対して血液中の硝酸イオン濃度は0.17, 0.23, 0.55 mMとなった。

表 1 NaNO₃ 又は NaNO₂ の静注による血液中の NO₃⁻ 濃度
Table 1 NO₃⁻ concentration in blood of rats at 5 hr

Injection	Concentration of NO ₃ ⁻ (mM)	
	NaNO ₃	NaNO ₂
Control	< 0.05	< 0.05
50 mM	0.16	0.17
100 mM	0.30	0.23
200 mM	0.70	0.55

2. 硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムの静注が赤血球膜 ATPase 活性に及ぼす影響

表4に4 ppm NO₂を1日間暴露したラットの赤血球膜 ATPase 活性を示した。カルシウムイオンの赤血球内濃度を制御している Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は NO₂ 暴露によって対照群の 87% ($p < 0.05$) と有意に低下した。また, 赤血球からナトリウムイオンの汲み出しを行っている Na⁺, K⁺-ATPase は対照群の 1.25 倍と増加する傾向が認められた。硝酸ナトリウムを静注した場合, 50 mM 及び 100 mM の濃度で Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は各々対照群の 68% ($p < 0.05$), 69% ($p < 0.05$) と有意に減少した(表3)。Na⁺, K⁺-ATPase 活性も注入した硝酸ナトリウムの濃度に依存して減少する傾向を示した。亜硝酸ナトリウムを静注した場合, Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は対照群の 20% ~ 27% の減少傾向を示した(表4)。また, Na⁺, K⁺-ATPase 活性も同程度の減少傾向が認められた。

表 2 4 ppm NO₂ 1 日間暴露による赤血球膜 ATPase の変化
Table 2 Effect of one day exposure to NO₂ on the ATPase activities of rat red cells

	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATPase ¹	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase ¹
Control	6.20 ± 0.38	5.72 ± 0.86
Exposed	5.40 ± 0.24*	7.14 ± 0.45

¹ μ mol Pi released/hr/mg of phospholipid * $p < 0.05$ (mean ± SD., n = 6)

表 3 赤血球膜 ATPase に及ぼす NaNO₃ 静注の効果

Table 3 Effect of NaNO₃ injection on the ATPase activities of rat red cells

NaNO ₃ conc.	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATPase ¹	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase ¹
Control	5.44 ± 1.04 (100)	5.56 ± 1.26 (100)
50 mM	3.72 ± 0.28* (68)	5.42 ± 0.53 (97)
100 mM	3.78 ± 0.14* (69)	5.06 ± 0.42 (91)
200 mM	4.30 ± 0.90 (79)	4.84 ± 0.62 (87)

¹ μmol Pi released/hr/mg of phospholipid

(mean ± SD., n = 4)

表 4 赤血球膜 ATPase に及ぼす NaNO₂ 静注の効果

Table 4 Effect of NaNO₂ injection on the ATPase activities of rat red cells

NaNO ₂ conc.	Ca ⁺ , Mg ⁺ -ATPase ¹	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase ¹
Control	5.43 ± 0.45 (100)	5.87 ± 0.24 (100)
50 mM	4.29 ± 0.68 (79)	4.70 ± 0.35 (80)
100 mM	4.40 ± 1.07 (80)	4.87 ± 1.10 (83)
200 mM	3.96 ± 1.20 (73)	5.92 ± 0.66 (101)

¹ μmol Pi released/hr/mg of phospholipid

(mean ± SD., n = 4)

3. 硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムの静注が肝ミクロソーム成分に及ぼす影響

表5に4 ppm NO₂を4日間暴露したラットの肝ミクロソーム成分の変動を示した。ミクロソーム電子伝達系成分中チトクローム P-450 含量は対照群の84%と有意に低下し、NADH-チトクローム c 還元酵素及び NADPH-チトクローム c 還元酵素活性は各々対照群の89%及び85%と減少する傾向を示した。表6に硝酸ナトリウムの静注が肝ミクロソーム電子伝達系成分に及ぼす影響を検討した結果を示した。いずれの電子伝達系成分も注入した硝酸ナトリウムの濃度に依存して減少する傾向を示した。減少の程度は、チトクローム P-450 含量が最も大きく次いで NADPH-チトクローム c 還元酵素活性であった。表7に亜硝酸ナトリウムの静注が肝ミクロソーム電子伝達系成分に及ぼす影響を検討した結果を示した。硝酸ナトリウムの場合と異なり、亜硝酸ナトリウムの静注はチトクローム P-450 含量を特異的に低下させた。50, 100, 200 mM の亜硝酸ナトリウムの注入によってチトクローム P-450 含量は、各々対照群の59% ($p < 0.01$), 67% ($p < 0.01$), 26% ($p < 0.001$)と有意に低下した。50 mM と 100 mM の亜硝酸ナトリウムの場合、チトクローム P-450 以外の電子伝達系成分に及ぼす効果は同濃度の硝酸ナトリウムの効果よりも小さい。

考 察

ラットの頸静脈に硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムを注入し血液中の硝酸イオン濃度を上昇させると、比較的短時間で赤血球膜の ATPase 活性と肝ミクロソームの電子伝達系成分が減少する

硝酸塩、亜硝酸塩静注による赤血球膜酵素活性の変化

表 5 NO₂ 暴露が肝ミクロソーム成分におよぼす効果

Table 5 Effects of NO₂-exposure and NaNO₃-treatment on components of liver microsomes

Components	4 ppm NO ₂ (4 days) ¹		
	Control	Exposed	%
NADPH-cyt. <i>c</i> reductase	19.0 ± 0.8	16.2 ± 1.5	85
Cytochrome P-450	96 ± 5	81 ± 6	84*
NADH-cyt. <i>c</i> reductase	458 ± 29	407 ± 22	89
Cytochrome <i>b</i> ₅	67 ± 4	65 ± 2	97
Arylsulfatase	10.1 ± 1.2	9.6 ± 1.0	95

¹ unit per mg of homogenate protein.

(mean ± SD).

* *p* < 0.05.

表 6 肝ミクロソーム成分に及ぼす NaNO₃ 静注の効果

Table 6 Effect of NaNO₃ injection on microsomal components of rat liver

NaNO ₃ (mM)	NADH-cyt. <i>c</i> reductase ¹	NADPH-cyt. <i>c</i> reductase ¹	Cytochrome P-450 ²	Cytochrome <i>b</i> ₅ ²
	%	%	%	%
0	263 ± 17 (100)	19.1 ± 3.3 (100)	71 ± 6 (100)	100 ± 18 (100)
50	261 ± 22 (99)	18.1 ± 2.3 (95)	61 ± 8 (86)	95 ± 3 (95)
100	259 ± 50 (99)	16.2 ± 3.5 (85)	57 ± 16 (80)*	95 ± 6 (95)
200	244 ± 21 (93)	15.3 ± 1.9 (80)	53 ± 26 (75)	83 ± 3 (83)

¹ nmol/min/mg protein ² pmol/mg protein.

(mean ± SD).

表 7 肝ミクロソーム成分に及ぼす NaNO₂ 静注の効果

Table 7 Effect of NaNO₂ injection on microsomal components of rat liver

NaNO ₂ (mM)	NADH-cyt. <i>c</i> reductase ¹		NADPH-cyt. <i>c</i> reductase ¹		Cytochrome P-450 ²	Cytochrome <i>b</i> ₅ ²	
	%	%	%	%	%	%	%
0	261 ± 26 (100)	20.5 ± 0.8 (100)	79 ± 10 (100)	94 ± 2 (100)			
50	250 ± 19 (96)	20.2 ± 2.0 (99)	47 ± 10** (59)	92 ± 6 (98)			
100	248 ± 45 (95)	19.7 ± 0.5 (96)	53 ± 2** (67)	92 ± 4 (98)			
200	225 ± 14 (86)	18.9 ± 0.9 (92)	20 ± 5*** (26)	89 ± 4 (95)			

¹ nmol/min/mg protein, ² pmol/mg protein, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001.

(mean ± SD).

ことを本研究では明らかにした。

4 ppm NO₂暴露 1 日目赤血球膜の Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は有意に減少した (表 2)。4 ppm NO₂暴露によってラットの血液中硝酸イオン濃度は 0.1~0.2 mM にまで上昇する¹⁰⁾。50 mM 硝酸ナトリウムを 1 時間毎に 5 回注入した場合、血液中硝酸イオン濃度は 4 時間目にはほぼ一定の値となり 0.16 mM になった。従って 4 ppm NO₂暴露の場合とほぼ同様に血液中の硝酸イオン濃度を増加させると、赤血球膜の Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は減少したことになる (表 3)。この結果は NO₂が肺胞において硝酸イオンの形で血液中に溶解した赤血球膜の Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性を低下させることを強く支持している。有意差は認められなかったが亜硝酸ナトリウムの静注によっても Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性は低下する傾向を示した (表 4)。血液に入った亜硝酸イオンは速やかに赤血球に取り込まれてヘモグロビンをメト化し硝酸イオンとなる¹¹⁾。従って亜硝酸ナトリウムの静注による Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase 活性の低下は硝酸イオンの効果である可能性が考えられる。硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウムの静注はまた Na⁺, K⁺-ATPase 活性の減少傾向をもたらし (表 3, 4)。4 ppm NO₂暴露では 1 日目で Na⁺, K⁺-ATPase 活性が増加した (表 2)。NO₂暴露による Na⁺, K⁺-ATPase 活性の増加は、NO₂暴露によって血液中の赤血球が若返る結果であることを明らかにした¹²⁾。本実験に使用した硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムの濃度と処理時間では赤血球の若返りは起こっていないと考えられる。血液中に増加した硝酸イオンは先ず Na⁺, K⁺-ATPase の活性を低下させるように作用する可能性を本研究では明らかにした。

硝酸ナトリウムの静注によって肝ミクロソームの電子伝達系成分は用いた硝酸ナトリウムの濃度に依存して減少した (表 6)。減少の程度はチトクローム P-450 含量が最も大きく、次いで NADPH-チトクローム c 還元酵素活性であった。この硝酸ナトリウムのミクロソーム電子伝達系に及ぼす影響のパターンと度合いとは、4 ppm NO₂暴露 4 日目の肝ミクロソーム電子伝達系成分の変化とよく一致していた。従って NO₂暴露によって血液中の硝酸イオン濃度が 10⁻⁴ M 以上になれば、肝ミクロソーム成分の減少が起こることが強く支持された。亜硝酸ナトリウムの静注は肝ミクロソーム成分中チトクローム P-450 含量を特異的に低下させたが、NADPH-チトクローム c 還元酵素活性に対しては同濃度の硝酸ナトリウムよりも効果は小さかった (表 7)。NO₂暴露ではこのようにチトクローム P-450 含量の特異的な低下は観察されていない¹³⁾。従って、NO₂暴露による肝ミクロソーム成分の減少は血液中に増加した硝酸イオンが原因となっている可能性が高い。現在の所硝酸イオンが直接肝臓内に入りミクロソームに作用しているのか否かについては不明である。

引用文献

- 1) 三浦卓・持立克身・彼谷邦光・国本学(1981): 二酸化窒素暴露ラット臓器内臓成分に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告, 第 31 号, 147-162.
- 2) Goldstein, E., N. F. Peek, N. J. Parks, H. H. Hines, G. P. Steffey and B. Tarkington (1977): Fate and distribution of inhaled nitrogen dioxide in Rhesus monkeys. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **115**, 403-411.
- 3) Dodge, J. T., C. Mitchell, and D. J. Hanahan (1963): Preparation and chemical characteristics of hemoglobin-

硝酸塩、亜硝酸塩静注による赤血球膜酵素活性の変化

- free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119-130.
- 4) Luthra, M. G., and H. D. Kim (1980): Effects of calcium and soluble cytoplasmic activator protein (calmodulin) on various states of $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase activity in isolated membranes of human red cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **600**, 467-479.
 - 5) Omura, T. and S. Takesue (1970): New method for simultaneous purification of cytochrome b_5 and NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. *J. Biochem.*, **67**, 249-257.
 - 6) Omura, T. and R. Sato (1964): Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
 - 7) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough and A. L. Farr (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 - 8) Harris, W. D., and P. Popat (1954): Determination of the phosphorus content of lipids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **31**, 124-127.
 - 9) Oda, H., H. Tsubone, A. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **25**, 294-301.
 - 10) 織田肇・永沢節子・局博一・鈴木明 (1981): 一酸化窒素及び二酸化窒素の生体内挙動。国立公害研究所研究報告, 第 31 号, 59-66.
 - 11) 織田肇・局博一・鈴木明・市瀬孝道 (1981): 二酸化窒素を暴露したマウスの血液中亜硝酸・硝酸イオン量の変動。国立公害研究所研究報告, 第 15 号, 43-54.
 - 12) 国本学・三浦卓・彼谷邦光・持立克身・久保田憲太郎 (1981): 二酸化窒素暴露によるラット赤血球膜の変化。日本衛生学雑誌, **36**, 403.

I-7

二酸化窒素を暴露したマウスの肺における
ガス交換の変化とその回復過程*

Changes of Gaseous Exchange in the Lung of Mice Exposed
to Nitrogen Dioxide and Their Recovery Process

鈴木 明¹・局 博一¹・嵯峨井勝¹・久保田憲太郎¹

Akira K. SUZUKI¹, Hirokazu TSUBONE¹, Masaru SAGAI¹
and Kentaro KUBOTA¹

要 旨

暴露中及び暴露後のマウス肺におけるガス交換に及ぼす NO₂ の急性影響を明らかにするために、頭部密閉法を用いて容器中の O₂ と CO₂ 濃度及び呼吸数を測定した。さらに、動脈血 pH_a, P_aCO₂, P_aO₂, 肺湿重量及び肺水分含量も検討した。本研究の結果は、20 ppm の NO₂ に暴露したマウスの肺のガス交換は、3～24 時間暴露で急速に抑制されるが、NO₂ 暴露後 3 日目には、対照のレベルまで機能的に回復することを示した。

Abstract

To elucidate the acute effects of NO₂ on gaseous exchange in the lung of mice during and after NO₂ exposure, O₂ and CO₂ concentrations in the respiratory gas and respiratory rate were measured using the head enclosed method, and arterial blood pH_a, P_aCO₂ and P_aO₂, lung wet weight and lung water content were also examined. The results of the present study indicate that the gaseous exchange in the lung of mice exposed to 20 ppm NO₂ was acutely inhibited during NO₂ exposure from the 3rd to 24th hour, but it recovered functionally to the control level on the 3rd day after NO₂ exposure.

はじめに

二酸化窒素 (NO₂) は刺激性ガスであり、内燃機関及びその他の発生源に由来し、広範囲に分布している一つの大気汚染物質である。NO₂ の肺に対する毒性学的影響はヒト及び数種の動物で広く研究されてきた。多くの研究者が、NO₂ 暴露によるその毒性、肺の形態学的変化及び機能不全につ

* 本論文は、Toxicology Letters に印刷中である。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田町小野川 16 番 2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba Ibaraki 305, Japan.

いて、よく特徴づけてきたが、暴露中及び暴露後における動物の肺内におけるガス交換に及ぼす NO_2 の影響に関する実験的研究は比較的少ない。

一方、動脈血の低酸素が、8～12 ppm の NO_2 を3～4カ月暴露したウサギで Davidson ら¹⁾ によって、15 ppm の NO_2 を生涯暴露したラットで Freeman ら²⁾ によって、そして、4 ppm の NO_2 を3カ月間暴露したラット³⁾ 及び0.4 ppm と4 ppm の NO_2 を9カ月間暴露したラット⁴⁾ で鈴木らによって、それぞれ報告された。

近年、鈴木ら⁵⁾ は、肺のガス交換及び生体の O_2 と CO_2 の代謝が5 ppm の NO_2 を24時間暴露したマウスで亢進すること、そして肺のガス交換が、10 ppm および20 ppm の NO_2 を24時間暴露したマウスで阻害され、呼吸代謝に変化をもたらすことを報告した。

これらの知見は NO_2 の影響が肺機能に及び肺のガス交換を変化させる可能性を示唆している。本研究では、マウス肺のガス交換に対する NO_2 の急性影響とその回復過程を明らかにするために、頭部密封法による呼吸ガス中の O_2 と CO_2 及び呼吸数の変化、動脈血 pH/ガス分圧 (Paco_2 , Pao_2), 肺湿重量及び肺水分含量について検索した。

材料と方法

1. 動物と NO_2 暴露

15～16週令の Jcl : ICR 雄マウスを使用した。それらは、暴露期間中を除くと、市販の餌と水を自由に与えられて飼育された。マウスは20 ppm の NO_2 に、毎時20回換気の120リットルのチャンパー内で、3、6、12及び24時間暴露された。 NO_2 を5,000 ppm の NO_2 のシリンダーから供給し、チャンパー内に入れる前に動物暴露システム（日本クレア、PT-300 A、東京）によって浄化空气中で希釈した。対照群の動物も NO_2 暴露と同様に浄化空気だけで暴露した。チャンパー内の NO_2 濃度をケミルミネッセンス方式の窒素酸化物分析器（Monitor Lab. ML-8440H, San Diego）で連続的にモニターし、その濃度は±5%以内に維持し、その時の温度は $22 \pm 1^\circ\text{C}$ であった

2. O_2 , CO_2 , ΔO_2 及び ΔCO_2 の測定

マウスのような小動物では、呼吸ガスから呼気ガスを分離することは技術的問題（例えば、マウスの呼吸数がとても早く、その一回換気量は非常に小さい^{6,7)}）のために困難である。それ故、著者らは頭部密封法⁸⁾ を使用した。マウスの頭部容積は、目盛付シリンダーフラスコを使用して、実験の最終段階で測定された。対照と NO_2 暴露群との間で頭部容積に有意な差はなかった。それ故、対照と NO_2 暴露群の間で、密封容器内の頭部容積を除いた残余量に有意な差がないと仮定した。容器内の O_2 と CO_2 濃度を呼気ガス分析器 (San'ei-sokki, 1 H21, 東京) によって測定し、その時の ΔO_2 濃度を純粋空気 (20.9% O_2 , 0.0% CO_2 , 79.1% N_2) と容器内の呼出 O_2 ガス濃度の差から計算した。純粋空気は CO_2 を全く含まないので、 ΔCO_2 は容器内の CO_2 濃度に等しいとみなすことができる。

図1は、容器内の ΔO_2 と ΔCO_2 の測定の典型的パターンを示す。両方の濃度は、波形の先端と基線

NO₂暴露マウスのガス交換の変化と回復過程

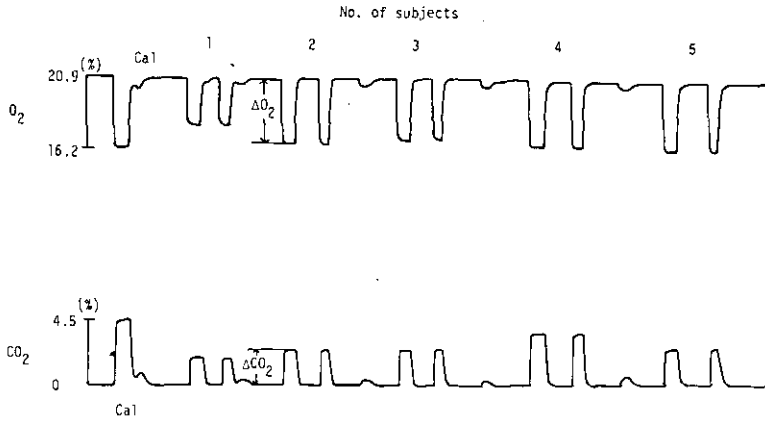


図 1 容器中の O₂, CO₂測定の典型的パターン

Fig. 1 Typical patterns of measurements of O₂ and CO₂ in the container. Δ O₂ and Δ CO₂ concentrations were determined by the height from the base line to the top of the wave form. Calibrations were done using standard gas (16.2% O₂ and 4.5% CO₂ gas).

との間の高さによって決定された。測定を各々の動物で2回ずつ行い、そして図1に示すように各々の動物の2回測定の高さはほとんど等しかった。呼気ガス分析器の較正は標準ガス（16.2% O₂, 4.5% CO₂及びN₂バランス）を使用して行われた。

容器内の O₂と CO₂濃度は NO₂暴露中3, 6, 12及び24時間目と, NO₂暴露後1及び3日目, そして1及び3週目に測定した。

3. 呼吸数 (RR)

呼吸数は圧トランスジューサー法を使用して呼吸図から計算した。

4. 動脈血 pHa, 炭酸ガス分圧 (Paco₂) 及び酸素分圧 (Pao₂)

ガス分析後, 血液採取をクロロホルム (Dai-ichi, CO, 東京) 浅麻酔下でマウスの腹大動脈から行い, 動脈血 pHa, Paco₂及び Pao₂を血液 pH/ガス分析器 (CORNING 168, Medfield) を使用して測定した。

5. 肺湿重量及び肺水分含量

本実験の最後に, 肺湿重量と肺水分含量を定法 (105°C, 10時間) に従って測定した。

結 果

1. Δ O₂と Δ CO₂の変化

図2は, NO₂暴露中と暴露後の Δ O₂と Δ CO₂濃度の相対的变化 (% of control, 各時点での対照

値に対する割合をパーセンテージで示した。)を示す。20 ppm の NO₂ に 24 時間暴露したマウスの ΔO₂ は、6～12 時間に、わずかに対照群のレベルに近づく傾向を示したが、暴露期間中及び暴露後 1 日目まで対照群のマウスより低かった。その後、その ΔO₂ レベルは NO₂ 暴露後 3 日目には対照群のレベルに回復した。NO₂ に暴露したマウスの ΔCO₂ レベルは常に対照のレベルより有意に低かったが、暴露後 3 日目以後対照群と暴露群マウスとの間に有意な差がなかった。

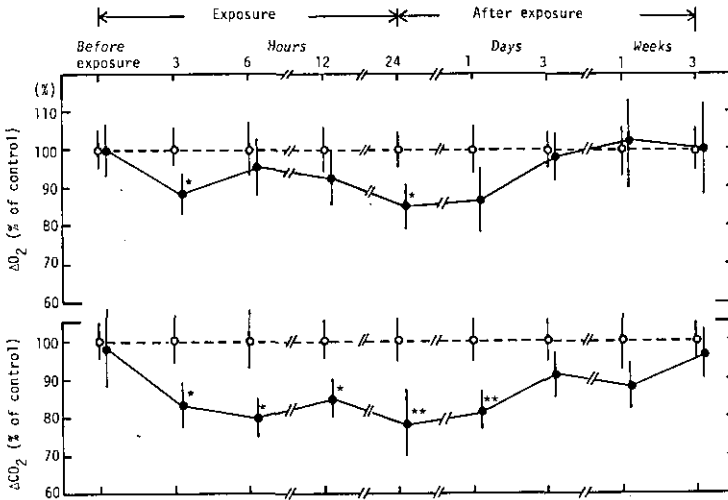


図 2 容器中の ΔO₂, ΔCO₂ 濃度の変化

Fig. 2 Changes of ΔO₂ and ΔCO₂ concentration in the container

Plot with bars represents mean ± SD of five subjects. (○) control, (●) exposed mice, **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

2. 呼吸数 (RR)

ΔO₂ と ΔCO₂ の変化は、一定時間内の呼吸数によって変化するかも知れない。それ故、対照群と暴露群マウスの呼吸数を測定した。図 3 は RR の相対的变化を示す (% of control), 暴露群マウスの RR は顕著に増加し、その増加は、NO₂ 暴露時間に依存していた。その後 RR は暴露後 3 日目には対照群のレベルにまで徐々に戻った。

3. ΔO₂/RR と ΔCO₂/RR の変化

RR と ΔO₂ あるいは ΔCO₂ との間に一定の関係があることは明確である。それ故、マウスの一呼吸当りの ΔO₂ と ΔCO₂ の変化を検索するために、ΔO₂ と ΔCO₂ は RR で除され、それらは図 4 に ΔO₂/RR, ΔCO₂/RR で示された。NO₂ に暴露したマウスのこれらのパラメーターは、暴露中 3 時間から暴露後 1 日目まで対照群のマウスより有意に低かったが、暴露後 3 日目には対照群のレベルに近づき、暴露後 3 週間目には完全に回復した。

NO₂暴露マウスのガス交換の変化と回復過程

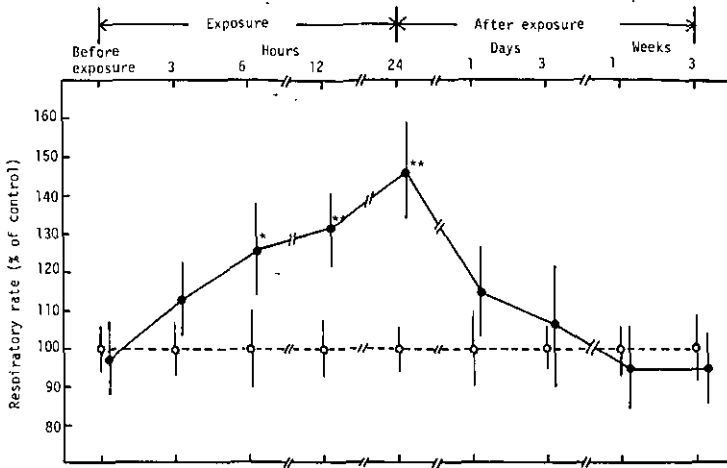


図 3 20 ppmのNO₂を24時間暴露したマウス呼吸数の変化
 Fig. 3 Changes of respiratory rate of mice exposed to 20 ppm NO₂ for 24 hours. Plot with bars represents mean ± SD of five subjects. (○) control, (●) exposed mice. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

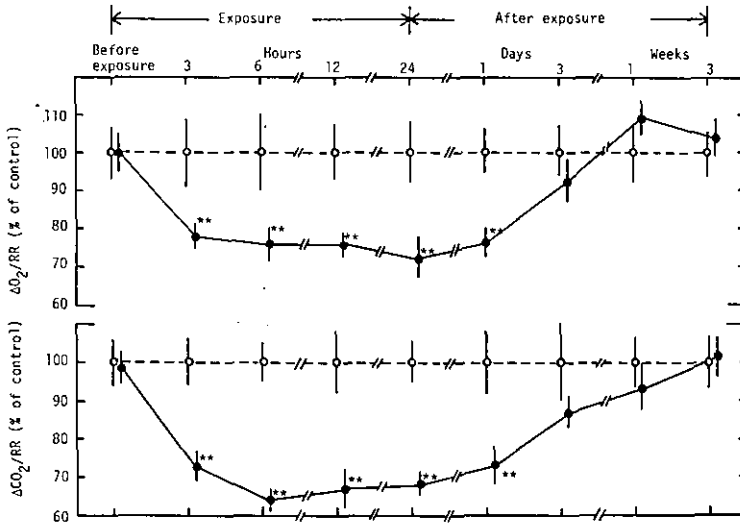


図 4 ΔO₂/RR と ΔCO₂/RR 濃度の変化
 Fig. 4 Changes of ΔO₂/RR and ΔCO₂/RR concentration in the container. Plot with bars represents mean ± SD of five subjects. (○) control, (●) exposed mice, ***p* < 0.01.

4. 動脈血 pH_a, P_aCO₂及び P_aO₂の変化

図5は20 ppm NO₂の24時間暴露直後と暴露後のマウスの動脈血 pH_a, P_aCO₂, P_aO₂の相対的変

化を示す。その pHa と $Paco_2$ は 20 ppm 24 時間暴露でわずかに増加したが、対照と比較して有意ではなく、その後対照群のレベルに戻った。暴露マウスの Pao_2 は、20 ppm 24 時間暴露から暴露後 1 日目まで有意に低下していた。そして暴露後 3 日目には対照群のレベルまで回復した。

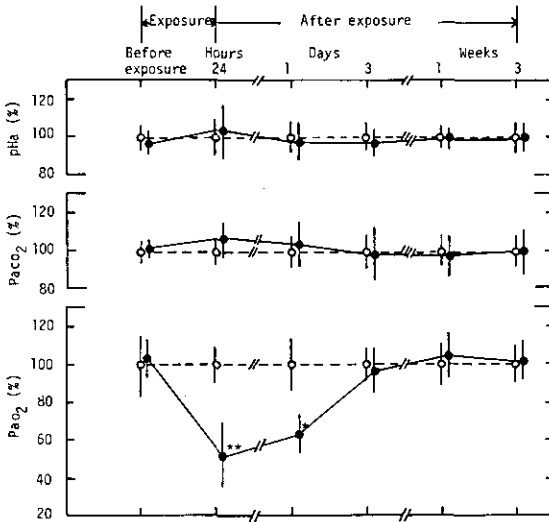


図 5 動脈血 pHa, $Paco_2$ と Pao_2 の変化

Fig. 5 Changes of arterial blood pHa, $Paco_2$ and Pao_2 .

Plot with bars represents mean \pm SD of five subjects. (○) control, (●) exposed mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5. 肺湿重量と肺水分含量

対照群と暴露群マウスの肺湿重量と肺水分含量の相対的变化は図 6 に示した。暴露マウスでは両方とも暴露 3 時間目に対照群の値より増加した。その後、それらの値は、徐々に増加し、暴露 12 ~ 24 時間及び暴露後 1 ~ 3 日目まで有意に高い値を示した。その後、これらの値は、暴露後 1 ~ 3 週目には対照群のレベルまで減少した。

考 察

肺に対する NO_2 の毒性学的影響はヒトと動物で広範に研究されてきたが、マウス肺におけるガス交換に及ぼす影響に関する実験的研究は少ない。それ故著者らは、マウスの肺におけるガス交換に対する NO_2 の急性影響及びその機能の回復過程を頭部密封法を使用して検索した。その方法の詳細は我々の前の報告⁵⁾で述べてある。その報告の中で、我々は 20 ppm の NO_2 24 時間暴露したマウス肺のガス交換及び O_2 と CO_2 の代謝が阻止され NO_2 暴露が呼吸代謝を変化させることを報告した。その結果は、 NO_2 を暴露したマウス肺のガス交換は 24 時間暴露より、より短時間でその機能を変化

NO₂暴露マウスのガス交換の変化と回復過程

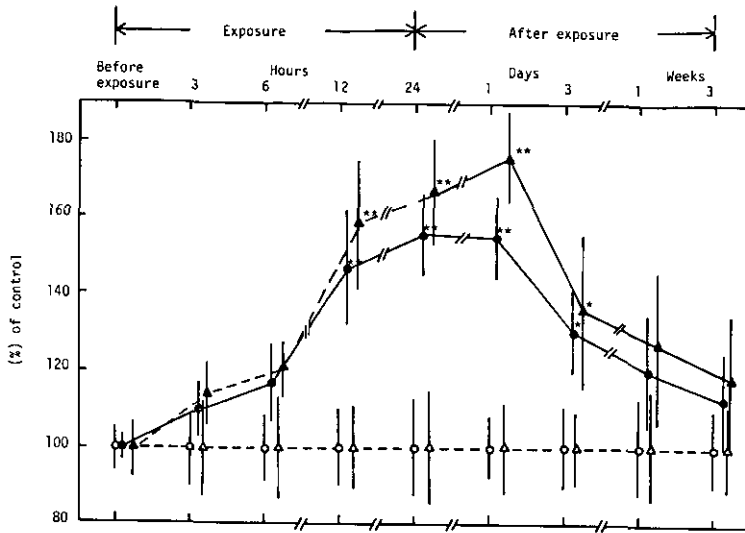


図 6 肺湿重量と肺水分含量の変化

Fig. 6 Changes of lung wet weight (○, ●) and lung water content (△, ▲)
Plot with bars represents mean ± SD of five subjects. (○, △) control, (●, ▲) exposed mice. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

させる可能性を示唆した。それ故、20 ppm の NO₂ を 3, 6, 12 そして 24 時間暴露し、暴露中、後のマウス肺のガス交換の変化について検索した。というのも NO₂ 暴露中から NO₂ 暴露後の回復過程が明らかにされるかもしれないからである。

容器内の ΔO₂ の増加は生体への O₂ 摂取の増加を示し、一方 ΔO₂ の減少は生体への O₂ 摂取の減少を示す。また、ΔCO₂ の増加は、生体からの CO₂ 呼出の増加を示し、ΔCO₂ の減少は、CO₂ 呼出の減少を示す。それ故、ΔO₂ と ΔCO₂ 濃度は生体内の O₂ と CO₂ の代謝と密接な関係をもっている。

20 ppm の NO₂ 3 時間暴露時の ΔO₂ と ΔCO₂ の有意な減少は、呼吸機能不全⁸⁾ と心機能異常^{9,10)} が急速に起ったことを示唆している。なぜなら肺湿重量と肺水分含量の増加はわずかであるからである。これらの事実はまた、20 ppm の NO₂ を暴露した肺のガス交換の抑制が暴露 3 時間以内で起こる可能性があることを示している。

NO₂ 暴露中のマウスの RR は、除々に増加し、その最大回数は 24 時間暴露時で起り暴露後 1 日目には元に戻った。その時、暴露マウスの ΔO₂/RR と ΔCO₂/RR の有意な減少が、3 時間暴露から暴露後 1 日目まで観察され、暴露後 3 日目には対照群のレベルまで戻った。これらの事実は、生体の一呼吸当たりの O₂ 摂取と CO₂ 呼出は常に一定であるとは限らず、その生体の呼吸様式が NO₂ 暴露によって変化したことを示唆している。

24 時間暴露から暴露後 1 日目まで動脈血 Pao₂ は有意に低下していた。このことは、O₂ 摂取が 24 時間目と暴露後 1 日目に減少した事実と一致し、肺における O₂ のガス交換が抑制されていることを

示している。

24時間暴露からNO₂暴露後1日目までの低 ΔO_2 、低 ΔCO_2 、低 $\Delta O_2/RR$ 、低 $\Delta CO_2/RR$ そして低Pao₂は、肺でのO₂とCO₂のガス交換が抑制され、肺でのその抑制は、肺の水腫及び肺機能の変化^{1,8,11)}、生化学的变化^{12,13)}、病理学的変化^{2,14,15)}、そして心機能の変化^{9,10)}のような要因のために、暴露後1日目まで続くことを示す。しかしながら、そのガス交換は暴露後3日目には機能的に回復するのかもしれない。なぜなら ΔO_2 、 ΔCO_2 、 $\Delta O_2/RR$ 、 $\Delta CO_2/RR$ そしてPao₂は対照レベルまで戻ったからである。

これらの知見から、20 ppmのNO₂に暴露したマウスの肺におけるO₂とCO₂のガス交換は、暴露3時間以内に急速に抑制されること、そして20 ppmのNO₂を24時間暴露したマウスの肺のガス交換の機能的回復は、暴露後3日目に起こること、さらに対照群レベルへの完全な機能的回復はNO₂暴露後1～3週間目に起こると結論された。

引用文献

- 1) Davidson, J. T., G. A. Lilington, G. B. Haydon and K. Wasserman (1967): Physiologic changes in the lungs of rabbits continuously exposed to nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **95**, 790-796.
- 2) Freeman, G., S. C. Crane, N. J. Furiosi, R. J. Stephens, M. J. Evans and W. D. Moore (1972): Covert reduction in ventilatory surface in rats during prolonged exposure to subacute nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **106**, 563-579.
- 3) 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・織田 肇・久保田憲太郎 (1981): 二酸化窒素亜急性暴露がラットの動脈血 pH_a, Paco₂, Pao₂に及ぼす影響。日本衛生学雑誌, **36**, 816-823.
- 4) 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇・久保田憲太郎 (1980): NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響。2。血液性状の変化。第21回大気汚染学会(浦和), 要旨集 442。
- 5) Suzuki, A. K., H. Tsubone and K. Kubota (1982): Changes of gaseous exchange in the lung of mice acutely exposed to nitrogen dioxide. *Toxicol. Lett.*, **10**, 327-335.
- 6) Crosfill, M. L. and J. G. Widdicombe (1961): Physical characteristics of the chest and lungs and the work of breathing in different mammalian species. *J. Physiol.*, **158**, 1-14.
- 7) 清水 明・鈴木 明・局 博一・市瀬孝道 (1981): ラットにおける呼気・吸気分離の試み。I. 装置の概要, 第91回日本獣医学会講演要旨集, 46 (東京)。
- 8) 鈴木 明・市瀬孝道 (1979): NO₂ガス暴露とマウスの肺機能について。第88回日本獣医学会講演要旨集, 236 (札幌)。
- 9) 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇・久保田憲太郎 (1980): NO₂暴露ラットにおける心拍数・呼吸数の変動について。日本衛生学会 (大阪) **35**, 127。
- 10) 局 博一・鈴木 明・市瀬孝道・嵯峨井 勝・織田 肇・久保田憲太郎 (1981): 二酸化窒素の急性暴露によるラット心機能の変化。日本衛生学雑誌, **36**, 550-559。
- 11) Arner, E. C. and R. H. Rhoades (1973): Long-term nitrogen dioxide exposure. *Arch. Environ. Health*, **26**, 156-160.
- 12) Buckley, R. D. and C. G. Loosli (1969): Effects of nitrogen dioxide inhalation on germ-free mouse lung. *Arch. Environ. Health*, **18**, 588-595.
- 13) Mustafa, M. G., J. J. Ospital and A. D. Hacker (1976): Effect of ozone and nitrogen dioxide exposure on lung metabolism. *Environ. Health Pers.*, **16**, 184.

NO₂暴露マウスのガス交換の変化と回復過程

- 14) 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. Arch. Environ. Health, **17**, 181-192.
- 15) Stephens, R. J., G. Freeman and M. J. Evance (1972): Early response of lungs to low level of nitrogen dioxide. light and electron microscopy, Arch. Environ. Health, **24**, 160-179.

I-8

二酸化窒素暴露に対する肺の抗酸化性防御機構の動物種差に関する研究

**Studies on Species Difference in Antioxidative Protective Systems
in Lungs of Four Animals Exposed to Nitrogen Dioxide**

鈴木誠一²・市瀬孝道¹・鈴木 明¹・嵯峨井勝¹

Seiichi SUZUKI², Takamichi ICHINOSE¹, Akira K. SUZUKI¹
and Masaru SAGAI¹

要 旨

Golden系ハムスター、ICR系マウス、Wistar系ラット及びHartley系モルモットの4種の動物の雄を用い、20 ppm NO₂ 16時間暴露を行い、各動物における肺の過酸化脂質量、防御系酵素活性及び抗酸化性物質量を測定し、これらの結果とNO₂ 16時間暴露で得られた動物種間のLC₅₀値との関連性を検討した。

4動物種間では暴露前、暴露後ともに肺の過酸化脂質量、防御系酵素活性及び抗酸化性物質量等にLC₅₀値と相関性を示したものはなかった。しかし暴露前と暴露後の結果を比較した場合の割合(Exposed/Control)ではLC₅₀値と相関性を示すものがいくつか認められた。その様なものとしては α -tocopherol, total lipidsとマイクロソームTBA値があった。またGSH-Px, GSH-R, aralkyl S-transferase, epoxy S-transferaseとマイクロソームAHH活性は、モルモット以外の3動物種間で同様の関係が認められた。これらの結果は対照レベルからの逸脱度合の大きい動物ほど感受性が高い傾向にあることを示している。しかし、対照レベルからの逸脱度合で比較すると、低感受性動物であるモルモットは多くのパラメーターにおいてその傾向から外れてマイクロソーム中のAHH活性は極端に高い値を示していた。これらのことからマイクロソーム画分のCytochrome P₁-450関連酵素がモ

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 昭和56年度国立公害研究所共同研究員(東邦大学理学部化学科環境化学教室, 〒274, 千葉県船橋市三山2-2-1)
The Toho University, Dept. Chemistry, Miyama-Cho 2-2-1, Funabashi, Chiba 274, Japan.

ルモットの感受性と高い関連を持っている可能性が示唆された。

さらに4種の動物間では肺のTBA値とビタミンE量が負の相関性を示し、逆にTBA値とGSH-Px, GSH S-transferase活性は正の相関性を示した。この結果から、これら防御酵素や抗酸化性物質が動物種の違いを超えて過酸化脂質生成に対して重要な防御機能を果たしている可能性が示された。

以上の結果から過酸化脂質量や抗酸化性防御機能がNO₂に対する動物種間の感受性を決定する重要な要因である可能性が示された。

Abstract

Species difference of animals in their susceptibility to nitrogen dioxide (NO₂) were examined by measuring lipid peroxides, the activities of antioxidative protective enzymes, and the amounts of antioxidants such as reduced glutathione and vitamin E in lungs. Four species of animals (Golden hamster, ICR mouse, Wistar rat and Hartley guinea pig) were used in this study and these animals were exposed to 20 ppm NO₂ for 16 hrs.

The activities of antioxidative protective enzymes and the amounts of antioxidants in lungs of the four species of animals in control and exposed groups did not show any correlation to the magnitude of LC₅₀ in four species of animals determined previously (14) by 16 hrs exposure to NO₂. On the other hand, the ratios of the control animals to NO₂-exposed animals in the amounts of α -tocopherol, total lipid and microsomal TBA reactants were antiparallel to the magnitude of LC₅₀. Similar relationships were observed between the magnitude of LC₅₀ and the ratios in glutathione peroxidase, glutathione reductase of four species of animals and in aralkyl S-transferase, epoxy S-transferase, arylhydrocarbon hydroxylase of three species of animals except for those of guinea pig. These results suggest that the animals having larger ratios of deviation from the control level are more susceptible to NO₂. However, compared with the ratio of deviation from the control level, the ratio of many protective enzymes in lung of guinea pig did not correspond to the order of LC₅₀. On the other hand, evidence that the activities of arylhydrocarbon hydroxylase in lung microsomes of guinea pig is extremely high was observed. It seems likely that cytochrome P₁-450 related-enzymes in lung microsomes may play any role on protecting cells from oxidative stress.

A significant relationship between some parameters in lungs was observed in this experiment. TBA reactants showed an inverse relationship with vitamin E, and it showed positive relationship with glutathione peroxidase and NADPH-cytochrome c reductase in both of the control and the NO₂-exposed groups. Glutathione peroxidase was related inversely with non-protein sulfhydryls.

These results suggest that lipid peroxides, antioxidative protective enzymes and antioxidants are important factors for determining the susceptibility of the animals.

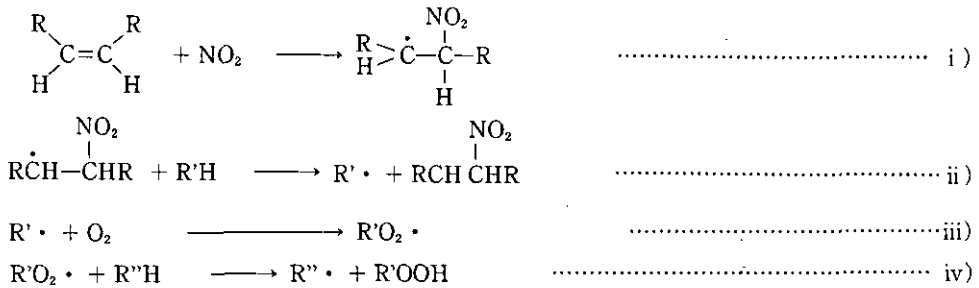
はじめに

我々の生活環境中には大気汚染物質としての呼吸器系刺激ガスが広く存在していることがよく知られており、二酸化窒素 (NO₂) はその代表的なものであるとみなされている。

このNO₂を吸入すると肺のうっ血, 浮腫, 細気管支炎, 肺胞壁細胞の変化や肺胞壁の肥厚化, 気

道線毛の退縮，気管狭窄，肺胞の拡大やコラーゲン線維の増加などを起こし，ひいては気管支ぜん息や肺線維症あるいは肺気腫等を引き起こすことが病理学的に詳しく調べられている。

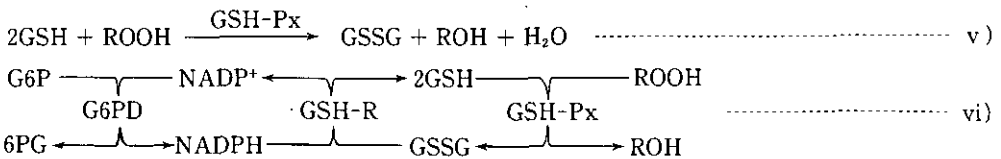
NO₂は非常に酸化性の強いガスであるため，生体影響としては酸化反応が最も注目される。このような生体成分の酸化反応に関しては，まず不飽和脂肪酸と NO₂との反応によってフリーラジカル生成を経る脂質過酸化反応があげられ，事実 Thomas ら¹⁾や Sagai ら²⁾は NO₂暴露により肺に脂質過酸化反応が起こることを報告した。NO₂による脂質過酸化は下に示した式のように不飽和脂肪酸の二重結合に NO₂が付加し，ラジカルを形成し(式 i)，それがさらに他の脂肪酸 (R'H) をラジカル化させたあと，生体内の酸素と反応してパーオキシ・ラジカル (ROO·) を生成する。このパーオキシラジカルは再び他の脂肪酸 (R''H) から水素を引きぬき，自からは過酸化脂質 (R'OOH) となり，一方の R''H をラジカル化 (R''·) させ，連鎖的にラジカル反応を起こす³⁾ (式 ii ~ iv)。



この反応(式 iii, iv)によって生じた過酸化脂質 (ROO·, ROOH) は生体にとってきわめて有害な物質であり，細胞膜，酵素など多くの生体構成成分に作用して細胞変性や機能障害を起すことが知られている^{4,5)}。

一方，細胞内には過酸化脂質やフリーラジカルから生体を防御するための生化学的な防御機構が存在することが知られている。Chow ら⁶⁾は NO₂やオゾンの暴露によって生じる過酸化脂質の解毒代謝に関与する Glutathione peroxidase (GSH·Px) 系酵素の防御的役割について報告している。GSH·Px は式 vi に示すように Glutathione reductase (GSH·R) と共役して NADPH の供給を受けるサイクル反応によって活性を表わす。

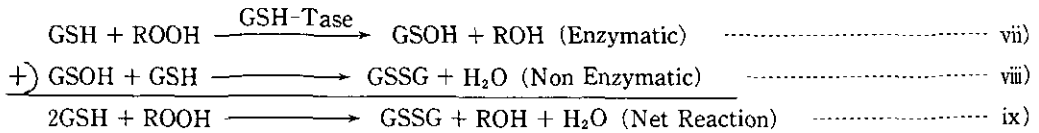
GSH-peroxidase as a member in peroxidative metabolic pathway



また，GSH·Px と同じ反応を行うものとして Glutathione S-transferase (GSH-Tase) の存在が知られている⁷⁾。GSH-Tase の触媒作用は酵素的反応(式 vii)とこれにつづく非酵素的反応(式 viii)の2つからなり，両反応の Net Reaction (式 ix) は GSH·Px と全く同じ反応(式 v)を触媒し，

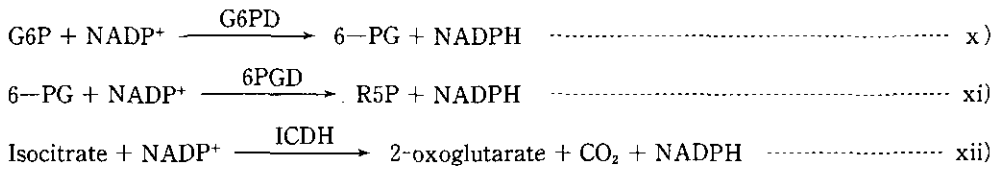
過酸化物を代謝する。

Glutathione S-transferase as a peroxidase



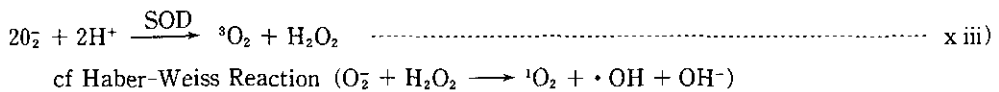
NADH や NADPH は生体の還元ポテンシャルを維持し、酸化ストレスから生体を防御するうえで重要な役割を果たしている。このような NADPH を供給する主な酵素としては Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) あるいは Isocitrate dehydrogenase (ICDH) などがある (式 x ~ x ii)。

Enzymes for maintenance of reducing potential (NADPH formation)



また、Xanthine oxidase や Amino acid oxidase 等の各種の生体内酸化反応によって生成される活性酸素の一つである Superoxide radical (O_2^-) の酸化的障害から細胞を保護する作用を持つ Superoxide dismutase (SOD) は広く生体内に分布し抗酸化的役割を果たしている⁹⁾ (式 x iii)。

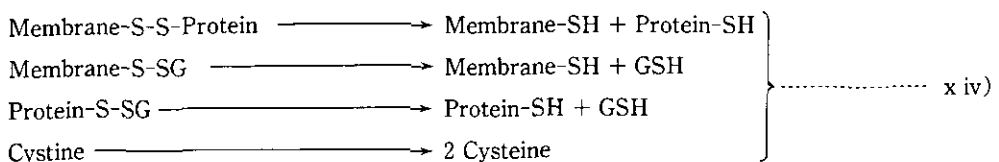
Superoxide dismutase (SOD)



DeLucia ら⁹⁾はオゾン暴露によって生体内の還元型 Glutathione (GSH) が酸化型 Glutathione (GSSG) になるよりむしろタンパク質や膜内 SH 基と反応して mixed disulfide を形成することを報告した。また Lee ら¹⁰⁾はオゾン暴露によって生じたこのような Disulfide を還元する Disulfide reductase (DSR) の誘導を見出し防御系酵素の一つであることを示した (式 x iv)。

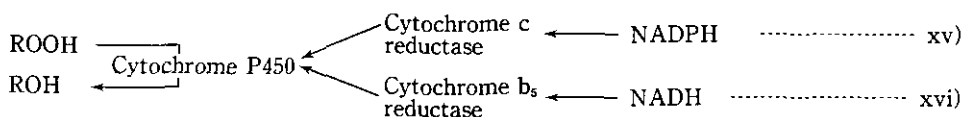
Disulfide reductase for maintenance of SH group

(Exchange of inter and/or intra molecular disulfide)



さらに細胞中のミクロソームにおいても Cytochrome P-450 により種々の過酸化脂質を代謝する能力があることが Hrycay ら¹¹⁾によって報告されている。この反応は NADPH を必要とする系 (NADPH-cytochrome C reductase) と NADH を必要とする系 (NADH-cytochrome b₅ reductase) の 2 種類がある (式 xv, xvi)。

Cytochrome P-450 in peroxidative metabolic pathway



以上のごとく、NO₂ やオゾンのような大気汚染物質から生体を防御する酵素的防御系の役割は極めて大きい。その他、抗酸化的防御系の一つとして、ビタミン E¹²⁾ やグルタチオン⁹⁾ のような抗酸化性物質 (Antioxidant) も重要な役割を果たしていることが知られている。

一方、Goldstein ら¹³⁾ は、系統の異なるマウス (Indred mice) にオゾンを暴露し、その 50% 致死濃度 (LC₅₀) の違いから系統間に感受性の相違があることを示し、また竹中ら¹⁴⁾ は NO₂ 暴露においても、動物種および系統間に 50% 致死濃度 (LC₅₀) と呼吸器系の病理学的所見から感受性に相違があることを示した。さらに市瀬ら¹⁵⁾ は NO₂ 暴露に対して、系統の異なるマウスの LC₅₀ 値と肺の過酸化脂質量及び抗酸化性防御機能との間に高い相関性があることを見だし、マウスの系統間での感受性の相違を生化学的な面から報告した。

本研究は Golden 系ハムスター、ICR 系マウス、Wistar 系ラット及び Hartley 系モルモットの雄を用い、市瀬らと同様に 20 ppm NO₂ を 16 時間暴露し、竹中らによって、すでに報告されている各動物の LC₅₀ 値と肺の過酸化脂質量、抗酸化性防御系酵素活性及びビタミン E や GSH のような Antioxidants 量との相関を調べ NO₂ に対する感受性との関係を比較検討した。また、エーテル及びペントバルビタールによる睡眠時間を測定し比較の参考とした。

材料と方法

1. 動物

竹中ら¹⁴⁾ による動物種間の感受性 (LC₅₀: NO₂ 16 時間暴露によって 50% の動物が死亡する NO₂ の濃度) の相違に関する報告の中から、動物はハムスター (Golden 系: LC₅₀: 28 ppm), マウス (ICR 系: LC₅₀=38 ppm), ラット (Wistar 系: LC₅₀=49 ppm) 及びモルモット (Hartley 系: LC₅₀=62 ppm) の雄の 4 種を用いた。ともに静岡実験動物農業協同組合より 8 週令で購入し、10 週令で実験に供した。マウスは対照群、暴露群ともに 48 匹ずつ、ハムスターは 12 匹ずつ、ラットとモルモットは 6 匹ずつの動物を用いた。なお、分析試料はマウスは 8 匹の肺をまとめて 1 サンプルとし、ハムスターは 2 匹の肺で 1 サンプル、ラットとモルモットは 1 匹の肺で 1 サンプルとした。サンプル数は各群 6 サンプル (n = 6) とした。

2. NO₂暴露

NO₂暴露は国立公害研究所実験動物飼育施設内の六錐形 AC 系チャンパー (1.68 m³) を使用し、20 ppm 16 時間暴露を行った。動物はチャンパー内に順応させるために暴露する前日からチャンパー内に入れた。なお NO₂暴露中 (16 時間) は絶食、絶水状態に置いた。

3. 試料

暴露終了後、動物をエーテル深麻酔状態で開胸し心臓と肺を共に摘出し、右心室より生理食塩水を注入し肺が白色になるまで灌流を行った。そして、その肺を心臓より分離し、水分を除き試料ビンに入れ窒素ガス置換後、使用時まで -80°C に保存した。

4. 試料調製及び測定

肺は、減圧脱気後窒素を十分バブリングして嫌氣的にした 50 mM Phosphate buffer (pH 7.5) を用いてテフロンホモジナイザーにより窒素気流下で磨砕し、10% ホモジネートを調製した。このホモジネートを 200 × g 5 分間の遠心を行い上清を得た。この上清は非タンパク性 SH (NPSH) 量、過酸化脂質量 (TBA 値)、 α -Tocopherol 量および総脂質量の測定に用いた。また、この上清の一部をさらに 10,000 × g 20 分間および 105,000 × g 60 分間の遠心分離を行った。この超遠心上清を Glutathione peroxidase (GSH · Px), Glutathione reductase (GSH · R), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), Isocitrate dehydrogenase (ICDH), 及び Glutathione S-transferase (aryl-, aralkyl- and epoxy-) の活性測定用酵素標品とした。さらに、105,000 × g の上清の一部を 0.1 mM EDTA を含む 50 mM Phosphate buffer (pH 7.5) で一夜透析後 Superoxide dismutase (SOD) と Disulfide reductase (DSR) 活性の測定に用いた。一方、105,000 × g の沈殿部分のミクロソーム画分を 0.25 M Phosphate buffer (pH 7.25) - 30% Glycerol によりホモジナイズし、アリルヒドロカーボンヒドロキシラーゼ (AHH) 活性、NADPH cytochrome c reductase 活性及びミクロソームの過酸化脂質量 (TBA 値) の測定標品とした。なお、DSR 及び AHH 以外の酵素活性はすべて遠心方式によるジェムサック自動分析装置を用いて測定し、その他は 101 型日立分光光度計及び 650 型日立けい光光度計によって測定した。

(1) Glutathione peroxidase (GSH · Px) 活性の測定

GSH · Px 活性の測定は Little ら¹⁶⁾の方法に従った。反応液は 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 380 μ l, 2 mM NADPH (Oriental Yeast Co. Ltd) 60 μ l, 5 mM GSH (和光純薬) 60 μ l, 10 mM Cumene hydroperoxide 60 μ l, GSH · R (1.2 units, Oriental Yeast Co. Ltd.) 20 μ l をこの順に加えて合計 580 μ l とし、これに酵素試料 20 μ l を加えて 30°C で反応を開始した。反応速度は NADPH の 340 nm の減少から求めた。非酵素的反応の補正の為に酵素試料の代わりに Buffer を加えた場合の反応を同時に行い、この値を酵素試料添加反応の値から差し引いて補正した。なお

NADPH と GSH は 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) に溶かし, Cumene hydroperoxide はエタノールに溶かしたあと同じ buffer で 9.2 倍希釈したものを用いた。また, 測定は反応開始 20 秒後から 15 秒おきに 10 回の読み取りで行った。

また, 基質として Cumene hydroperoxide のかわりに H₂O₂ を用いた場合 (GSH・Px-H₂O₂) の測定も行った。

(2) Glutathione reductase (GSH・R) 活性の測定

GSH・R 活性の測定は Bergmeyer の記述¹⁷⁾ に準拠した。反応液組成は 1 mM EDTA・Na₂ を含む 0.1 M Tris・HCl buffer (pH 8.0) 460 μl, 2 mM NADPH 60 μl, 10 mM GSSG (PL Biochemical In.) 60 μl の合計 580 μl からなり反応はこれに 20 μl の試料を加えて 30°C で行った。なお, NADPH 及び GSSG は 1 mM EDTA・Na₂ を含む 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) に溶かしたのものを用いた。測定条件は GSH・Px と同じである。

(3) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 活性の測定

G6PD 活性の測定は Wilhelm ら¹⁸⁾ の方法に従った。反応組成は 10 mM MgCl₂ を含む 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 460 μl, 4 mM NADP⁺ (Oriental Yeast Co. Ltd.) 60 μl, 12 mM Glucose-6-phosphate・Na₂ (Sigma) 60 μl の合計 580 μl からなり反応はこれに試料 20 μl を加えて 30°C で行った。なお NADP⁺ および Glucose-6-phosphate は本反応に用いた buffer に溶かして用いた。測定は 340 nm における NADPH の増加を反応開始 60 秒後から 30 秒おきに 10 回読み取りで行った。

(4) 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) 活性の測定

6PGD 活性の測定は G6PD の場合の buffer を 20 mM MgCl₂ と 6.5 mM Cystein を含む 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5) に, G6P を 6-Phosphogluconate に代えて行った。

(5) Isocitrate dehydrogenase (ICDH) 活性の測定

ICDH 活性の測定は Bernt らの方法¹⁹⁾ を修飾して行った。反応液組成は 42 mM NaCl を含む 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 400 μl, 10 mM NADP⁺, 55 mM d,l-isocitrate (和光純薬:特級) 各々 40 μl, 110 mM MnSO₄ 100 μl の合計 580 μl からなり, 反応はこれに 105,000×g 遠心上清の 5 倍希釈酵素試料 20 μl を加え 30°C で行った。なお NADP⁺, Isocitrate 及び MnSO₄ は 42 mM NaCl を含む上記の buffer に溶かした。測定条件は GSH・Px と同様である。

(6) Glutathione S-transferase (GSH・Tase) 活性の測定

GSH・Tase 活性の測定は Kaplowitz らの方法²⁰⁾ に従った。Aryl S-transferase 活性は 0.143 M Phosphate buffer (pH 8.0) 8.4 ml, 100 mM GSH 1.2 ml と 30 mM の 3,4-Dichloronitrobenzene (和光純薬:特級) 0.4 ml を合わせて 10 ml とした試薬液 500 μl に 100 μl の試料を加えて 30°C で反応を開始した。なお 3,4-Dichloronitrobenzene は 57.6 mg を 5 ml のエタノールに溶かした後 5 ml の蒸留水を加えて 10 ml とした溶液 (30 mM) を用いた。測定は 345 nm の吸光度変化を反応開始 30 秒後から 15 秒おきに 10 回の読み取りによって行った。酵素活性の計算の為の分子吸光係数 (ε) は

8.5 ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を用いた。Aralkyl S-transferase は buffer を pH 6.5 に、基質を p-Nitrobenzylchloride (和光純薬：一級) の 15mM 溶液に代え、Aryl S-transferase の場合と同様に測定した。なお測定波長は 340 nm を用い、分子吸光係数 (ϵ) は 0.63 を用いた。また Epoxy S-transferase は buffer の pH を 7.5 に、基質を 1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy) -propane (Eastman Chem.) の 26 mM 溶液にかえて Aryl S-transfrase と同様に測定した。なお測定波長は 460 nm で分子吸光係数 (ϵ) は 0.5 を用いた。

(7) Superoxide dismutase (SOD) 活性の測定

SOD 活性の測定は McCord と Fridovich による Ferricytochrome c 還元法⁹⁾に従った。反応は 10^{-4} M EDTA \cdot Na₂ を含む 50 mM Na, K-Phosphate buffer (pH 7.8) 80 μ l, 25×10^{-5} M Xanthine (和光純薬：特級) 120 μ l, 1×10^{-5} M ferricytochrome c (Sigma, Horse heart 由来 Type III) 100 μ l の合計 400 μ l の試薬溶液に試料 200 μ l を加えて 30°C で行った。なお Xanthine 及び ferricytochrome c は 10^{-4} M EDTA を含む 50 mM Na, K-Phosphate buffer に溶かして用いた。測定波長は 550 nm を用い測定条件は GSH \cdot Tase と同様であった。また SOD が存在しない状態での還元型 Ferricytochrome c 生成の反応速度 (V) は SOD 酵素のかわりに Buffer を用いて同時に測定した。SOD 活性 (Units) の計算は SOD 存在による還元型 ferricytochrome c 生成速度 (v) と上記 V とから $(V-v)/v$ によって求めた。

(8) Disulfide reductase (DSR) 活性の測定

DSR 活性の測定は Tietze の方法²¹⁾に準拠した。酵素反応は 10 mM EDTA \cdot Na₂ を含む 50 mM Na, K-Phosphate buffer (pH 7.5) 100 μ l, 2 mM NADPH 100 μ l 沸騰水浴中で加熱溶解した飽和 Cystine 液の 2 倍希釈液 100 μ l の合計 300 μ l の試薬液に酵素試料 200 μ l を加えて 37°C で 1 時間インキュベーションした。なお, DSR の反応は NADPH 依存性であるので非特異的反応を補正する為に上記反応組成から NADPH を除いた反応も同時に行った。酵素反応速度の測定は反応終了時に上記反応液 (0.5 ml) に 5 mM EDTA \cdot Na₂ 溶液 0.5 ml と 10% TCA 液 1.0 ml を加え 3,500 rpm, 10 分間の遠心によってタンパク質を除いた上清中の Cysteine 量の定量によって NADPH 添加の場合から無添加の値を差し引いて求めた。酵素反応によって生じた Cysteine の定量は後に述べる非タンパク性 SH 定量法²²⁾によって行った。

(9) Arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性の測定

AHH 活性の測定は Warren と Bellward の方法²³⁾で行った。反応液は 10.8 mM NADPH と 10.8 mM NADH (Oriental Yeast Co. Ltd) の混合液 0.1 ml, MgCl₂ \cdot 6H₂O 138 mg の水溶液 0.1 ml に牛血清アルブミン 1.8 mg を含む溶液 0.1 ml, 0.05 mM Benzo(a)pyrene (和光純薬：特級) 0.05 ml (アセトン溶媒), 126 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 0.2 ml を加え, 37°C で 15 分インキュベーションしたあと, 冷 Hexane-Acetone (3.25 : 1.00) 4.25 ml を加え反応を止めた。10 分間振とう後遠心し有機溶剤層 1 ml を取り, これに 1 N-NaOH 3 ml を加え, 10 分間振とうした。3,000 rpm 10 分間遠心し, アルカリ層をけい光光度計 (Excitation 396 nm, Emission 522 nm) で測定した。

(10) NADPH-cytochrome c reductase 活性の測定

NADPH-cytochrome c reductase 活性の測定は Strobel らの方法²⁴⁾に従った。反応液組成は 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.5) 340 μ l, 0.2 mM cytochrome c 40 μ l, 1 mM NADPH 40 μ l の合計 580 μ l からなり、これに 20 μ l の試料を加えて、30°C で反応を行った。測定波長は 550 nm を用い、測定条件は SOD 活性と同様であった。

(11) 過酸化脂質 (TBA 値) の定量

TBA 反応は SDS 可溶化を含む大川らの方法²⁵⁾によって行い、けい光分光光度計 (Excitation 515 nm, Emission 553 nm) を用いて測定した。

(12) Glutathione (GSH) 含量の定量

GSH は Sedlak-Lindsay らの方法を修飾した DeLucia らの方法²²⁾により、試料は 0.5 ml を用いて、非タンパク性 SH (NPSH) として測定し、これを GSH 量とした。

(13) 総脂質量 (Total lipids) の定量

総脂質量は Frings-Dunn による方法²⁶⁾ (Sulfo-Phospho-Vanillin 反応) により、試料 0.2 ml を用いて測定した。

(14) α -Tocopherol はホモジネートの 200 \times g 遠心上清から n-Hexane で抽出した脂質画分を乾燥したあとエタノールに溶かしてから阿部らの高速液体クロマトグラフィーを用いる方法²⁷⁾で測定した。

(15) タンパク質の定量

タンパク質の定量は牛血清アルブミンを標準として Lowry ら²⁸⁾の方法によった。

5. エーテルとペントバルビタールによる睡眠時間の測定

NO₂ は経気道的に吸入されて肺に障害を起こすものであることから、動物によっては NO₂ の気道通過様式が異なるために感受性が異なる可能性がある。このような違いがあるかどうかを調べる為に、初歩的な指標としてエーテルによる睡眠時間を調べた。10 l のデシケーターに 8 ml のエチルエーテルを気化充満させてから 4 種の動物を 1 匹ずつ同時に入れ睡眠にいたるまでの時間を各動物 20 匹ずつについて測定した。一方、睡眠は神経系や脳の働きが複雑に関連して起こるものであるため、比較の為に 30 mg, 40 mg 及び 50 mg/kg \cdot 体重のペントバルビタール (大日本製薬) 腹腔内投与によって睡眠に入ってから目ざめるまでのいわゆる Sleeping Time も測定した。

6. 統計処理

表中の値はすべて平均 \pm 標準偏差で示し、平均値の有意差検定は Student の *t* 検定によった。

結 果

1. 体重, 肺の TBA 値, α -tocopherol, 非タンパク性 SH (NPSH) 及び Total Lipids 量について

体重及び肺の TBA 値, α -tocopherol 量, 非タンパク性 SH (NPSH) 量と Total lipids 量を LC₅₀ 値の小さい動物の順に並べた (表 1)。

表 1 動物種間における NO₂ 暴露群と対照群の体重と肺の TBA 値, α -トコフェロール, 非タンパク性 SH 及び総脂質量

Table 1 Body weight and the contents of TBA reactants, α -tocopherol, non-protein sulfhydryls (NPSH) and total lipids in lungs of four species

Enzymes	Animals	Control Group			Exposed Group			Exposed/Control	
		M \pm SD	% ^{a)}	p ^{b)}	M \pm SD	% ^{a)}	p ^{b)}	% ^{c)}	p ^{d)}
Body Weight (g)	Hamster	107.7 \pm 9.3	100	—	110.1 \pm 10.6	100	—	102	non
	Mouse	32.1 \pm 1.9	30	p<0.001	34.2 \pm 1.9	31	p<0.001	106	non
	Rat	191.8 \pm 2.4	178	p<0.001	205.8 \pm 3.9	187	p<0.001	107	non
	Guinea P.	407.7 \pm 10.9	378	p<0.001	403.1 \pm 15.5	366	p<0.001	98	non
TBA (n moles/g Lung)	Hamster	11.6 \pm 1.4	100	—	22.5 \pm 4.1	100	—	194	p<0.001
	Mouse	36.8 \pm 3.8	317	p<0.001	35.6 \pm 7.1	158	p<0.01	97	non
	Rat	18.3 \pm 1.6	158	p<0.001	16.7 \pm 2.1	74	p<0.05	91	non
	Guinea P.	17.3 \pm 2.6	149	p<0.01	24.2 \pm 3.5	108	non	140	p<0.01
α -Tocopherol (μ g/g lung)	Hamster	6.92 \pm 2.40	100	—	12.99 \pm 1.12	100	—	188	p<0.001
	Mouse	4.35 \pm 0.58	63	p<0.05	5.64 \pm 1.20	43	p<0.001	130	non
	Rat	15.44 \pm 1.75	223	p<0.001	15.56 \pm 1.88	120	p<0.01	101	non
	Guinea P.	9.63 \pm 0.96	139	p<0.05	8.71 \pm 2.69	67	p<0.01	94	non
NPSH (μ moles/g Lung)	Hamster	1.02 \pm 0.22	100	—	1.08 \pm 0.27	100	—	106	non
	Mouse	0.76 \pm 0.12	75	p<0.05	0.16 \pm 0.05	15	p<0.001	21	p<0.001
	Rat	1.11 \pm 0.05	109	non	0.85 \pm 0.27	79	non	77	p<0.001
	Guinea P.	2.48 \pm 0.12	243	p<0.001	2.30 \pm 0.15	213	p<0.001	93	non
Total lipids (mg/g Lung)	Hamster	25.7 \pm 5.4	100	—	46.6 \pm 7.4	100	—	181	p<0.01
	Mouse	47.4 \pm 7.3	184	p<0.001	64.4 \pm 9.5	138	p<0.01	136	p<0.01
	Rat	46.3 \pm 4.2	180	p<0.001	63.4 \pm 16.5	136	non	137	p<0.05
	Guinea P.	54.5 \pm 3.5	212	p<0.001	66.0 \pm 6.2	142	p<0.01	121	p<0.01

a) The value shows percent ratio against the value of Golden Hamster (100%).

b) The probability shows the significant level against Golden Hamster.

c) The value shows percent ratio of the values (n = 6) of the control group to those (n = 6) of the NO₂-exposed group.

d) The probability shows the significant level against the control group.

体重は対照群に比べて NO₂ 暴露群において有意な変化を示したものはなかった。

対照群における肺の TBA 値はハムスターに比べて他の 3 種の動物が有意に高い値を示し, α -tocopherol 量はマウスでハムスターより低かったがラットとモルモットでは, 高い値を示した。NPSH はマウスがハムスターより低くモルモットが著しく高い値を示していた。Total lipids 量はハムスターに比べ 3 種の動物で高値を示し, かつ NO₂ に対する感受性 (LC₅₀) と比較的良好に対応していた。

暴露群についてみると TBA 値はマウスで高く, ラットで低く, α -tocopherol と全く逆の関係を

示していた。NPSH はマウスで顕著に低く、モルモットは対照群と同様に著しく高い値を示していた。

また、対照群に対する暴露群の割合 ((Exposed/Control) をみると、TBA 値はハムスターとモルモットで有意に増加していた。これに対し、 α -tocopherol の比率は NO₂ に対する感受性 (LC₅₀) とよく対応していた。NPSH の比はマウスとラットで有意な低下を示していた。これに対し Total lipids の比率は 4 種の動物すべてで増加し、その比率は LC₅₀ とよく対応していた。

4 種の動物について、TBA 値と α -tocopherol 量との間の相関を調べ、その結果を図 1 に示した。

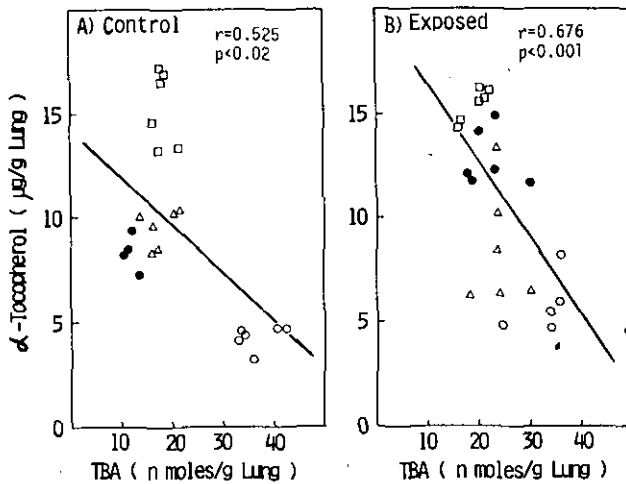


図 1 対照群と NO₂ 暴露群の動物種間における肺の過酸化脂質 (TBA 値) と α -トコフェロール量との相関

Fig. 1 Relationship between TBA reactants (TBA) and α -tocopherol in lungs of the four species of animals in control group (A) and NO₂ exposed group (B)
●, Hamster; ○, Mouse; □, Rat; △, Guinea Pig.

対照群と暴露群で共に負の相関を示し、 α -tocopherol 量が高いと TBA 値が低く、 α -tocopherol 量が低いと TBA 値が高く、 α -tocopherol の Antioxidant としての作用が明瞭に示された。

2. タンパク質量, Glutathione peroxidase (GSH·Px), Glutathione reductase (GSH·R), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) 及び Isocitrate dehydrogenase (ICDH) 活性について

タンパク質量, Glutathione peroxidase 系酵素 (GSH·Px-Cumene, GSH·Px-H₂O₂, GSH·R) 活性, NADPH を産生して還元ポテンシャルの維持に働く G6PD, 6PGD 及び ICDH 活性の測定結果を表 2 に示した。

表 2 NO₂ 暴露群と対照群の動物種間における肺の GSH-P_x, GSH-R, G 6 PD, 6 PGD, ICDH の活性値Table 2 The contents of total proteins and the activities of glutathione peroxidase (GSH-P_x), glutathione reductase (GSH-R), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) and isocitrate dehydrogenase (ICDH) in lungs of four species of animals

Enzymes	Animals	Control Group			Exposed Group			Exposed/Control	
		M ± SD	%	p	M ± SD	%	p	%	p
Protein 200 xg (mg/g·Lung)	Hamster	48.2 ± 4.1	100	—	48.8 ± 7.7	100	—	100	non
	Mouse	48.9 ± 8.5	101	non	43.4 ± 6.2	89	non	89	non
	Rat	52.0 ± 7.2	108	non	51.9 ± 7.0	106	non	100	non
	Guinea P.	82.3 ± 28.1	170	p < 0.05	66.1 ± 10.2	135	p < 0.05	80	non
a) GSH·Px- Cumene	Hamster	59.5 ± 5.6	100	—	40.2 ± 5.3	100	—	68	p < 0.001
	Mouse	163.3 ± 22.5	274	p < 0.001	136.5 ± 10.3	340	p < 0.001	84	p < 0.05
	Rat	74. ± 8.7	125	p < 0.01	82.3 ± 15.4	205	p < 0.001	111	non
	Guinea P.	30.6 ± 6.4	51	p < 0.001	21.3 ± 2.1	53	p < 0.001	70	p < 0.05
a) GSH·Px- H ₂ O ₂	Hamster	33.9 ± 5.1	100	—	12.3 ± 3.1	100	—	36	p < 0.001
	Mouse	117.6 ± 14.4	347	p < 0.001	83.9 ± 5.2	682	p < 0.001	71	p < 0.001
	Rat	54.4 ± 8.0	160	p < 0.001	59.9 ± 10.3	487	p < 0.001	110	non
	Guinea P.	—	—	—	—	—	—	—	—
a) GSH·R	Hamster	221.7 ± 12.7	100	—	130.4 ± 19.2	100	—	62	p < 0.001
	Mouse	262.7 ± 50.1	118	non	207.0 ± 24.7	148	p < 0.001	79	p < 0.05
	Rat	150.4 ± 17.3	68	p < 0.001	141.1 ± 15.1	101	non	94	non
	Guinea P.	252.3 ± 44.6	117	non	177.1 ± 18.6	127	p < 0.05	68	p < 0.01
a) G 6 PD	Hamster	132.8 ± 8.9	100	—	166.4 ± 29.0	100	—	125	p < 0.05
	Mouse	188.7 ± 16.4	142	p < 0.001	140.9 ± 11.5	85	non	75	p < 0.001
	Rat	142.8 ± 18.8	108	non	145.5 ± 15.5	87	non	102	non
	Guinea P.	176.2 ± 31.0	133	p < 0.05	158.9 ± 11.6	95	non	90	non
a) 6 PGD	Hamster	80.3 ± 7.4	100	—	101.5 ± 20.6	100	—	126	non
	Mouse	56.8 ± 7.2	70	p < 0.001	38.4 ± 5.8	38	p < 0.001	68	p < 0.01
	Rat	37.8 ± 5.6	47	p < 0.001	34.4 ± 5.2	34	p < 0.001	91	non
	Guinea P.	61.2 ± 16.5	76	p < 0.05	50.1 ± 6.9	49	p < 0.001	82	non
a) ICDH	Hamster	191.1 ± 16.5	100	—	108.4 ± 26.6	100	—	57	p < 0.001
	Mouse	252.7 ± 33.7	132	p < 0.01	203.1 ± 18.6	187	p < 0.001	80	p < 0.05
	Rat	194.5 ± 62.3	102	non	153.5 ± 17.1	142	p < 0.01	79	p < 0.05
	Guinea P.	207.2 ± 59.5	108	non	101.6 ± 14.7	94	non	49	p < 0.01

a) The values are expressed as mean ± SD (n = 6) of moles NADP⁺ or NADPH formed/mg protein/min.

対照群において、タンパク質量はモルモットだけが有意に高い値を示していた。Cumene hydroperoxide を基質とした Glutathione peroxidase (GSH·Px-Cumene) 活性はハムスターに比べマウス及びラットが有意に高く、モルモットでは低値を示した。H₂O₂ を基質とした Glutathione peroxidase (GSH·Px-H₂O₂) 活性は GSH·Px-Cumene の場合と同様にマウスとラットで高く、モルモットでは活性を示さなかった。

NO₂ 暴露による脂質過酸化の動物種差

GSH・R はハムスターに比べラットが有意に低く, G6PD はハムスターに比べマウス及びモルモットが有意に高い値を示した。6PGD はハムスターに比べ他の3種の動物が有意に低く, ICDH はマウスでのみ高値を示し他の動物はハムスターと変わりなかった。

暴露群においてはタンパク質量は対照群の場合と同様にモルモットでのみ高値を示した。GSH・Px-Cumene と GSH・Px-H₂O₂ 活性も対照群の場合と同様にマウスとラットで著しく高く, モルモットでは逆に著しく低いか活性を示さなかった。G6PD 活性は4種の動物の間で有意な差はなかったが, 6PGD 活性はハムスターに比べ他の3種ではすべて有意に低値を示し, ICDH 活性はマウスとラットで高い値を示しモルモットはハムスターと変わりなかった。

次に対照群に対する暴露群の比でみると, タンパク質量は4種の動物とも有意な差は認められなかった。GSH・Px 活性は2種類ともハムスター, マウス及びモルモットで NO₂ 暴露によって有意に低下していた。GSH・R 活性はラット以外では低下しており, G6PD 活性はハムスターで増加し, マウスで低下していた。6PGD 活性はマウスでのみ有意に低下し, ICDH 活性はすべての動物で低下していた。この暴露群に対する対照群の比を LC₅₀ 値と比較すると GSH・Px の2種類の酵素と GSH・R は比較的 LC₅₀ に対応していたがモルモットの場合はその傾向から著しく外れていた。図2に TBA 値と GSH・Px-Cumene 活性の相関を示した。対照群と暴露群で共に正の相関性が認められ, TBA 値が高い動物ではそれを代謝する為に GSH・Px 活性も高く, TBA 値が低い動物では

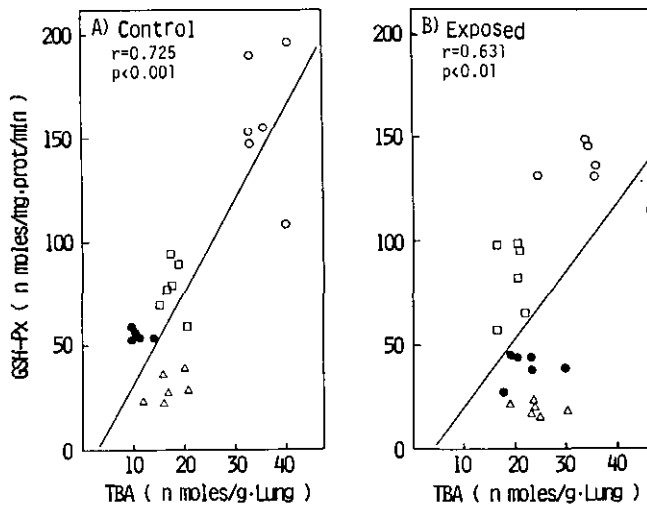


図 2 対照群と NO₂ 暴露群の動物種間における肺の過酸化脂質 (TBA 値) とグルタチオンパーオキシダーゼ活性との相関

Fig. 2 Relationship between TBA reactants (TBA) and glutathione peroxidase activity in lungs of the four species of animals in control group (A) and NO₂ exposed group (B)

●, Hamster; ○, Mouse; □, Rat; △, Guinea Pig.

GSH・Px 活性が低くなっており、GSH・Px が抗酸化性酵素として重要な防御機能を果たしていることが示された。

また、図3にNPSH量とGSH・Px-Cumene活性を示した。対照群と暴露群で共に負の相関性が認められ、NPSH量が高い動物はGSH・Px活性が低く、NPSH量が高い動物はGSH・Px活性が高くなっており、Antioxidantと抗酸化性酵素とが相互的に補い合って防御機能を果たしていることが示された。

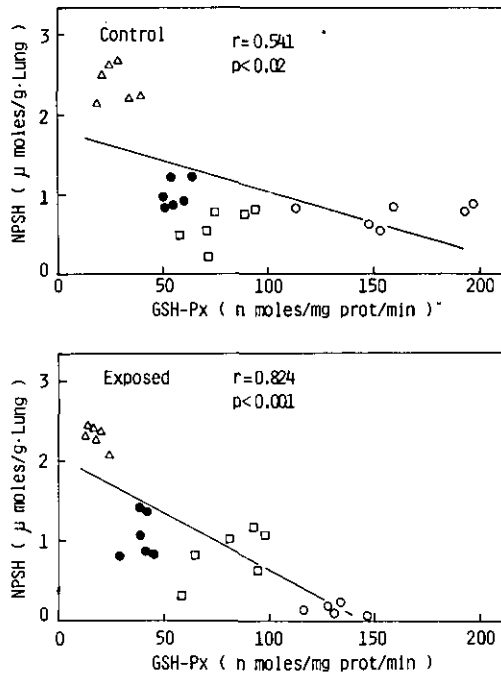


図 3 動物種間における対照群とNO₂暴露群の肺のグルタチオンペロキシダーゼ活性と非タンパク性SH (NPSH) 量との相関

Fig. 3 Relationship between glutathione peroxidase (GSHPx) activity and non-protein sulfhydryl (NPSH) contents in lungs of the four species of animals in control group (A) and NO₂ exposed group (B)
●, Hamster; ○, Mouse; □, Rat; △, Guinea Pig.

3. Glutathione S-transferase (Aryl-, Aralkyl-及び Epoxy S-transferase) 活性について

GSH・Px と同一の過酸化物代謝を行う Glutathione S-transferase 活性の測定結果を表3に示した。対照群において、aryl S-transferase はハムスターに比べマウスが極端に高い値を示し、モルモットも比較的高い値を示した。aralkyl S-transferase と epoxy S-transferase 活性は共にハムスターに比べ他の3種の動物が有意に高い値を示し、特にマウスとモルモットが顕著であった。

NO₂ 暴露による脂質過酸化の動物種差

表 3 NO₂ 暴露群と対照群の動物種間における肺の GSH S-transferase (aryl-, aralkyl, epoxy) の活性値

Table 3 The activities of glutathione S-transferase (aryl-, aralkyl- and epoxy S-transferase) in lungs of four species of animals

Enzymes	Animals	Control Group			Exposed Group			Exposed/Control	
		M ± SD	%	p	M ± SD	%	p	%	p
Aryl S-trans-ferase	Hamster	4.81 ± 1.72	100	—	3.02 ± 1.02	106	—	63	p < 0.001
	Mouse	42.0 ± 3.2	873	p < 0.001	32.2 ± 2.2	1064	p < 0.001	77	p < 0.001
	Rat	4.08 ± 0.31	85	non	2.38 ± 0.26	79	non	58	p < 0.001
	Guinea P.	6.86 ± 1.36	143	non	3.38 ± 0.36	112	non	49	p < 0.001
Aralkyl S-trans-ferase	Hamster	31.9 ± 6.1	100	—	14.18 ± 4.4	100	—	46	p < 0.001
	Mouse	146.6 ± 11.4	460	p < 0.001	107.5 ± 8.4	726	p < 0.001	73	p < 0.001
	Rat	59.8 ± 4.4	187	p < 0.001	52.1 ± 5.9	452	p < 0.001	87	p < 0.05
	Guinea P.	205.6 ± 42.7	645	p < 0.001	108.7 ± 21.4	734	p < 0.001	53	p < 0.001
Epoxy S-trans-ferase	Hamster	1.57 ± 0.44	100	—	0.63 ± 0.26	100	—	40	p < 0.01
	Mouse	9.03 ± 0.76	575	p < 0.001	7.12 ± 0.27	1130	p < 0.001	79	p < 0.001
	Rat	3.77 ± 0.49	240	p < 0.001	3.23 ± 0.35	513	p < 0.001	86	non
	Guinea P.	6.78 ± 1.12	432	p < 0.001	3.71 ± 0.48	589	p < 0.001	55	p < 0.001

* Units are expressed as n moles of metabolite formed/mg-protein/min.

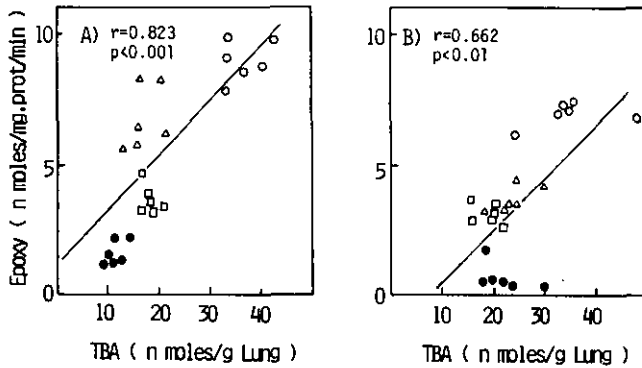


図 4 動物種間における対照群とNO₂暴露群の肺の過酸化脂質 (TBA値) とエポキシS-トランスフェラーゼ活性との相関

Fig. 4 Relationship between TBA reactants (TBA) and epoxy S-transferase activity in lungs of the four species of animals in control group, (A) and NO₂ exposed group (B).

●, Hamster; ○, Mouse; □, Rat; △, Guinea Pig.

一方, 暴露群においては aryl S-transferase 活性がマウスで著しく高かったが, ラットとモルモットはハムスターに比べ有意な差がなかった。aralkyl S-transferase と epoxy S-transferase 活性は共にいずれの動物種もハムスターより著しく高い活性を示していた。

一方、対照群に対する暴露群の比率で見ると NO₂ 暴露によって 3 種の GSH S-transferase 活性はすべての動物種で低下していた。また, aralkyl S-transferase と epoxy S-transferase 活性は LC₅₀ 値の順序と比較的よく対応していたが, GSH・Px の場合と同様にモルモットはその傾向から外れていた。GSH S-transferase 活性と TBA 値の間の相関性についてみると, aralkyl S-transferase 活性と TBA 値は暴露群で正の相関を示し, aryl 及び epoxy S-transferase 活性と TBA 値との相関は対照群と暴露群の両方で共に正の相関を示していた。図 4 には epoxy S-transferase 活性と TBA 値の間の相関性を示した。これらの結果も GSH・Px の場合と同様に TBA 値が高い動物ではそれを代謝する為に GSH S-transferase 活性も高く, TBA 値が低い動物では GSH S-transferase 活性が低くなっており, GSH S-transferase も GSH・Px と同様に抗酸化性酵素として重要な防御機能を果たしていることが示された。

4. Superoxide dismutase (SOD) と Disulfide reductase (DSR) について

Superoxide anion radical を異性化する SOD, 及び Disulfide 化合物を SH 化合物に還元する DSR 活性の測定結果を表 4 に示した。

表 4 NO₂ 暴露群と対照群の動物種間における肺の SOD と DSR 活性値
Table 4 The activities of superoxide dismutase (SOD) and disulfide reductase (DSR) in lungs of four species of animals

Enzymes	Animals	Control Group			Exposed Group			Exposed/Control	
		M ± SD	%	p	M ± SD	%	p	%	p
a) SOD	Hamster	42.2 ± 3.8	100	—	21.1 ± 2.6	100	—	50	p < 0.001
	Mouse	54.9 ± 7.3	130	p < 0.01	42.8 ± 4.7	203	p < 0.001	78	p < 0.05
	Rat	42.5 ± 3.8	101	non	29.2 ± 1.7	138	p < 0.001	69	p < 0.001
	Guinea P.	63.8 ± 9.0	151	p < 0.001	30.1 ± 3.4	143	p < 0.001	47	p < 0.001
b) DSR	Hamster	148.0 ± 9.0	100	—	101.4 ± 14.8	100	—	69	p < 0.001
	Mouse	105.6 ± 17.9	71	p < 0.001	69.2 ± 10.7	68	p < 0.01	66	p < 0.01
	Rat	123.2 ± 26.2	83	non	110.1 ± 31.5	109	non	89	non
	Guinea P.	86.0 ± 9.3	58	p < 0.001	61.0 ± 13.7	60	p < 0.01	71	p < 0.01

a) The values are expressed as units/mg-protein/min.

b) The values are expressed as n moles of cysteine formed/mg-protein/min.

対照群において, SOD 活性はハムスターと比マウス及びモルモットが有意に高い値を示したのに対し, DSR 活性では逆にマウスとモルモットが有意に低い値を示した。一方, 暴露群において, SOD 活性はハムスターに比べて他の 3 種の動物ですべて活性が有意に高く, DSR 活性はマウスとモルモットで有意に低い値を示していた。対照群に対する暴露群の比率で見ると SOD, DSR ともすべての動物で低下していた。LC₅₀ との対応は SOD 及び DSR とともに認められなかった。

5. ミクロソーム画分における TBA 値, Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性および NADPH-cytochrome c reductase 活性について

ミクロソーム画分における TBA 値, AHH 活性及び NADPH-cytochrome c reductase 活性の測定結果を表 5 に示した。対照群において, ミクロソームの TBA 値はハムスターに比べマウスが有意に高い値を示した。AHH 活性はハムスターに比べマウス及びモルモットが有意に高く, 特にモルモットが極端に高い値を示した。NADPH-cytochrome c reductase 活性はハムスターに比べマウスが有意に高く, ラットが有意に低い値を示した。

表 5 NO₂ 暴露群と対照群の動物種間における肺のミクロソーム中の TBA 値と AHH, NADPH-cytochrome c 還元酵素の活性値

Table 5 The contents of TBA reactants and the activities of aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) and NADPH-cytochrome c reductase in microsomes of lungs from four species of animals

Enzymes	Animals	Control Group			Exposed Group			Exposed/Control	
		M ± SD	%	p	M ± SD	%	p	%	p
TBA (n moles/ mg* protein)	Hamster	0.23±0.03	100	—	0.27 ±0.05	100	—	117	non
	Mouse	0.46±0.08	200	p<0.001	0.55±0.16	204	p<0.01	120	non
	Rat	0.28±0.06	122	non	0.34 ±0.02	126	non	121	non
	Guinea P.	0.23±0.03	100	non	0.30 ±0.04	111	non	130	p<0.05
AHH ^{a)}	Hamster	0.69±0.79	100	—	2.66 ±0.53	100	—	386	p<0.001
	Mouse	6.64±2.94	962	p<0.01	10.12 ±3.35	380	p<0.001	152	non
	Rat	2.93±2.17	425	non	3.63 ±0.79	136	p<0.05	124	non
	Guinea P.	25.54±9.22	3701	p<0.001	35.27 ±9.16	1326	p<0.001	138	non
NADPH) cyt. c reductase ^{b)}	Hamster	0.099±0.017	100	—	0.052±0.010	100	—	53	p<0.001
	Mouse	0.191±0.016	193	p<0.001	0.143±0.036	275	p<0.001	75	p<0.05
	Rat	0.062±0.008	63	p<0.01	0.039±0.005	75	non	63	p<0.05
	Guinea P.	0.112±0.018	113	non	0.052±0.014	100	non	46	p<0.001

a) Units are expressed as relative intensity/mg. protein/15 min.

b) The values are expressed as μ moles NADPH formed/mg. protein/min.

また, 暴露群において, TBA 値はハムスターに比べてマウスが有意に高く, 200×g 上清の場合と同じ結果を示した。AHH 活性はハムスターに比べ他の 3 種が共に有意に高い値を示し, 特にモルモットが顕著であった。NADPH-cytochrome c reductase 活性はマウスの場合のみ高い値を示した。一方, 対照群に対する暴露群の比率でみると NO₂ 暴露によって TBA 値の比は LC₅₀ に対応し増加の傾向を示し, モルモットが有意差を示した。AHH 活性は逆に LC₅₀ の増加につれて低下する傾向を示し, ハムスターが有意差を示していた。NADPH-cytochrome c reductase 活性は逆にすべての動物種で有意に低下していた。また図 5 に 200×g 上清の TBA 値と NADPH-cytochrome c reductase 活性との相関を示した。対照群及び暴露群の両方で共に正の相関を示した。

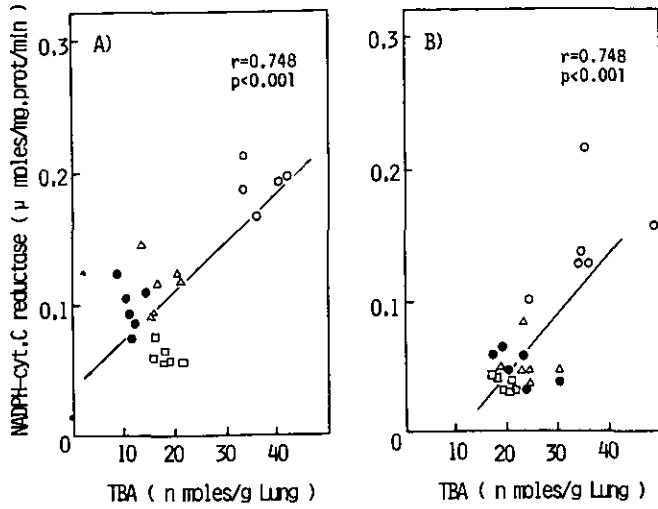


図 5 動物種間における対照群と NO₂ 暴露群の肺の過酸化脂質 (TBA 値) と NADPH-チトクローム c 還元酵素活性との相関

Fig. Relationship between TBA reactants (TBA) and NADPH cytochrome c reductase activity in lungs of the four species of animals in control group (A) and NO₂ exposed group (B).

●, Hamster; ○, Mouse; □, Rat; △, Guinea Pig.

6. エーテルとペントバルビタールによる睡眠時間について

ペントバルビタール及びエーテルによる睡眠時間の測定結果を図 6 に示した。エーテルによる睡眠に至るまでの時間は、その時間の短いものから、マウス、ハムスター、モルモット、ラットという順序を示した。これは吸入したエーテルが肺胞にまで到達する時間が異なることを示していた。

ペントバルビタールによる睡眠時間は、モルモットが顕著に長い時間を示した。この睡眠時間は、AHH 活性及び LC₅₀ 値の増加に対応していた。

考 察

市瀬ら¹⁵⁾はマウスの 4 系統間で NO₂ に対する感受性 (LC₅₀) と肺の過酸化脂質量 (TBA 値)、抗酸化性防御系酵素活性や抗酸化性物質 (Antioxidants) 等との間に高い相関性があることを報告した。

本研究は動物種が異なる場合でもこのような相関性が成立するかどうかを調べるためにハムスター、マウス、ラット及びモルモットを用いて検討した。

本実験において、動物種間では対照群、暴露群とも過酸化脂質量及び防御系酵素活性や抗酸化性物質 (Antioxidants) 量等の単一項目では、マウスの系統差の結果のように、LC₅₀ と明瞭な相関性を示したものはなかった。しかし、対照群に対する暴露群の割合 (Exposed/Control) でみると、

NO₂ 暴露による脂質過酸化の動物種差

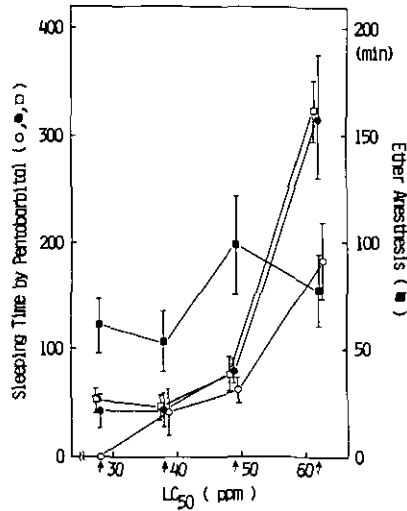


図 6 NO₂ 暴露による動物種間の LC₅₀ 値と各動物のペントバルビタール及びエーテルによる睡眠時間との相関

Fig. 6 The relationship between LC₅₀ and sleepingtime in the control animals from the four species of animal (Hamster LC₅₀=28 ppm; Mouse LC₅₀=38 ppm; Rat LC₅₀=49 ppm; Guinea Pig LC₅₀=62 ppm)
The sleeping times were measured by ethyl ether (■) and pentobarbital (○, 30 mg/kg; ●, 40 mg/kg, and □, 50 mg/kg,).

α -tocopherol, Total lipids, GSH·Px と GSH·R (モルモットは除く), aralkyl S-transferase と epoxy S-transferase (モルモットは除く), ミクロソーム TBA 値, AHH 活性 (モルモットは除く)などが LC₅₀の増加の順に並び, LC₅₀値と相関性を示していた。このような結果から NO₂暴露に対する感受性を決める要因の一つは, 生体の対照値からの逸脱の度合と関連があり, NO₂暴露によって防御系酵素活性や Antioxidant 量が大きく変動する動物ほど感受性が高いことが示された。

なお, 多くの項目についてモルモットが LC₅₀値は高いにもかかわらず防御系酵素活性では対照群に対する暴露群の割合がラットより低下しており, LC₅₀との対応から外れていた。しかしながら, モルモットのミクロソーム中の AHH 活性は極端に高い値を示していたところから, このことが高い LC₅₀値を示すことに強く寄与しているのかもしれない。AHH 活性に関与している cytochrome P-450 は緒言の式 xv と xiv に示したように過酸化物を代謝する作用があることからその可能性が考えられる。この結果はペントバルビタールによる睡眠時間が各動物の LC₅₀と対応していたが, 特にモルモットで著しく長かったこと(図6)とも関連しており, 今後, ミクロソーム画分の酵素類の詳細な比較を行うことによって動物種間の感受性の違いを説明しうる可能性があり興味ある課題である。また, このような推測は, Sagai²⁹⁾がラットに AHH 活性誘導薬物の 3-メチルコランズレンを投与した場合に, 致死濃度 NO₂暴露に対して著しい延命効果があることを認めたこととも対応す

る。これらの結果はミクロソーム画分の酵素活性の増加が NO_2 に対する感受性と何らかの関連を持っていることを示唆しているものと考えられ興味深い。

α -Tocopherol は天然の Antioxidant としてよく知られており、生体内で α -tocopherol 含量が高いと過酸化脂質の生成は抑制され、 α -tocopherol 含量が少ないと過酸化脂質が増加するという事は多くの研究者によって報告されている。たとえば、Fletcher と Tappel³⁰⁾ はビタミン E 含量の異なる飼料を摂取したラットを 0.7 ppm オゾンに 5 日間暴露したところ、飼料中のビタミン E が低い群では肺の TBA 値が高く、かつこの TBA 値と飼料中の α -tocopherol 含量の対数値は負の相関を示したことを報告している。

今回、著者らは飼料中のビタミン E 量は肺のビタミン E 量と相関するという仮説に立って、肺の TBA 値と α -tocopherol 量との相関性について調べてみた。その結果、Fletcher と Tappel の報告³⁰⁾と同様に肺の TBA 値と α -tocopherol 量との間には負の相関性 (図 1) が存在し、肺内の α -tocopherol 含量が高い場合は過酸化脂質量が低く、逆に α -tocopherol 含量が低い場合は過酸化脂質量が高いということが、動物種の違いを越えて成り立つことが示された。この結果は、 NO_2 のヒトへの影響を外挿する上で重要な意味を持っているものと考えられる。

また、図 2 に示したように、肺の TBA 値と GSH·Px 活性との間は正の相関性が認められ動物種の違いを越えて過酸化脂質量とその代謝酵素活性が密接な関連を持っている可能性が明らかにされた。

また、NPSH はマウスの系統差の結果のように LC_{50} 値の高い系統で肺の NPSH 量が高く、Antioxidant として重要なものであることがよく知られている。しかし、今回の実験では NPSH 量が種の違う動物の LC_{50} と相関しているという結果は得られなかったが、図 3 に示すように GSH·Px 活性の低い動物では NPSH 含量が高く、GSH·Px 活性の高い動物では NPSH 含量が低くなっており、NPSH 量は GSH·Px 活性と相補的な関係にあることが明らかになった。

以上のように今回の実験では 4 種の動物の LC_{50} は過酸化脂質量、抗酸化性防御系酵素活性及び Antioxidant との間に直接の相関はなく、防御系酵素や Antioxidant などが複雑に作用し合って感受性が決まるものである可能性を明らかにした。そこで、著者らはマウス同志の場合と違って動物の種間では、呼吸器の解剖学的相違によって同じ濃度の NO_2 を吸入しても気道を通って肺胞に達するまでに濃度差が生ずる可能性があると考え、エーテルによる睡眠時間を調べた。その結果、睡眠時間の指標としての MAC (50%の動物が睡眠にいたるのに必要とする minimum alveolar concentration) は動物種間では変わらない³¹⁾と報告されているが、今回の実験では、一定条件のエーテル麻酔で睡眠時間が違うという結果を得た。このことは同一濃度の NO_2 を吸入してもそれが肺胞にまで到達するのに動物種間に違いがあることを示しているものと考えられる。

以上のことから、動物種間の感受性の間係については、今回調べたような生化学的相違の他に、呼吸器系の生理学的、解剖学的相違等をも考慮して、さらに詳細に検討する必要があると考えられる。

なお、今回の実験は再現性を確認する為に2回の実験を行い、極めて高い再現性が得られた。本報告は2回目の結果を集録したものであることを付記する。

結 論

1. 動物種間における NO₂ に対する感受性は肺の過酸化脂質量、抗酸化性防御系酵素活性及び Antioxidant 量などが複雑に関連し合い決定させている可能性が明らかになった。
2. さらに、動物種間における NO₂ に対する感受性は対照群に対する暴露群の割合、すなわち、NO₂ 暴露による対照値からの逸脱度合の大きい動物ほど感受性が高い傾向にあることが示された。
3. この対照値からの逸脱度合で比較するとモルモットが多くのパラメーターにおいて、その傾向から外れていた。モルモットの場合は AHH 活性で示されたように cytochrome P-450 関連酵素活性が他の3種動物より極端に高いことと、cytochrome P-450 が過酸化脂質を代謝する作用を持っていることから、cytochrome P-450 関連酵素がモルモットの感受性に強い関係を持っていることが示唆された。
4. 肺の TBA 値と α -tocopherol 量は4種の動物間で負の相関を示し、逆に TBA 値と GSH · Px, GSH S-transferase, NADPH cytochrome c reductase 活性は正の相関を示し、Antioxidant, 抗酸化性酵素活性と過酸化脂質との相関が動物の種の違いをこえても成立することが示された。
5. 動物種間における NO₂ に対する感受性の違いは、エーテル麻醉実験の結果から呼吸器の生理学的、解剖学的相違も考慮すべきであることが示された。

引 用 文 献

- 1) Thomas, H.V., P.K. Mueller and P.L. Lyman (1967): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
- 2) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. I. Lipid peroxidation as measured by ethane exhalation of rats exposed to nitrogen dioxide. *Lipids*, **16**, 64-67.
- 3) Menzel, D.B. (1976): The role of free radicals in the toxicity of air pollutants (Nitrogen oxides and Ozone). In "Free Radicals in Biology", (ed. Pryor, A.W.) **2**, 181-200.
- 4) Tappel, A.L. (1975): Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. In "Pathobiology of Cell Membranes". Acad. Press, N.Y., **1**, 145-170.
- 5) Goldstein, B.D., C. Lodi, C. Collinson and O.J. Balchum (1969): Ozone and lipid peroxidation. *Arch. Environ. Health*, **18**, 631-635.
- 6) 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**, 311-317.
- 7) Habig, W.H., M.J. Pabst and W.B. Jakoby (1974): Glutathione S-transferase: The first enzymic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
- 8) McCord, J.M. and I. Fridovich (1969): Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.
- 9) DeLucia, A.J., P.H. Hoque, M.G. Mustafa and C.E. Cross (1972): Ozone interaction with rodent lung: Effect on sulphydryls and sulphydryl containing enzyme activities. *J. Lab. Clin. Med.*, **80**, 559-566.

- 10) Lee, S.D. and B. Peirano (1977) : Biochemical effects of environmental pollutants. Ann. Arbor Science, Publishers Inc., 59-96.
- 11) Hrycay, E.C. and P.J. O'Brien. (1973) : Cytochrome P-450 as a microsomal peroxidase in steroid hydroperoxide reduction. Arch. Biochem. Biophys., **157**, 7-22.
- 12) Witting, A (1980) : Vitamin E and Lipid Antioxidants in Free Radical-Initiated Reactions. In "Free Radicals in Biology" (ed. by W. A. Pryor) Acad. Press., **4**, 295-319.
- 13) Goldstein, B.D., L.Y. Lai, S.R. Ross and R. Cuzzi-Spada (1973) : Susceptibility of inbred mouse strains to ozone. Arch. Environ. Health., **27**, 412-413.
- 14) 竹中参二・堀内博人・清水不二雄 (1979) : 二酸化窒素急性暴露によるゴールデンハムスターの高感受性. 国立公害研究所研究報告, 第8号, 7-49.
- 15) Ichinose, T., A.K. Suzuki, H. Tsubone and M. Sagai (1982) : Biochemical studies on strain differences of mice in the susceptibility to nitrogen dioxide. Life Sciences, **31**, 1963-1972.
- 16) Little, C. and P.J. O'Brien (1970) : Properties and regulation of glutathione peroxidase. J. Biol. Chem., **245**, 3632-3639.
- 17) Bergmeyer, H.U. (1974) : Reagents for enzymatic analysis: Glutathione reductase. In "Methods of Enzymatic Analysis". (ed. by Bergmeyer, H.U.), Acad. Press, N.Y. **2**, 465-466.
- 18) Wilhelm, L.G. and H.D. Waller (1974) : Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In "Methods of Enzymatic Analysis". (ed. by Bergmeyer, H.U.) Acad. Press. N.Y., **2**, 636-643.
- 19) Bernt, E. and H.U. Bergmeyer (1974) : Isocitrate dehydrogenase. In "Methods of Enzymatic Analysis." (ed. by Bergmeyer, H.U.) Acad. Press, N.Y., **2**, 624-631.
- 20) Kaplowitz, N., J. Kuhlenkamp and G. Glifton (1975) : Drug induction of hepatic glutathione S-transferase in male and female rats. Biochem. J. **146**, 351-356.
- 21) Tietze, F. (1970) : Disulfide reduction in rats liver : Evidence for the presence of nonspecific nucleotide dependent disulfide reductase and glutathione disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. Arch. Biochem. Biophys. **138**, 177-188.
- 22) 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. Inv., **55**, 794-802.
- 23) Warren, P.M. and G.D. Bellward (1978) : Induction of arylhydrocarbon hydroxylase by 3-methylcholanthrene in liver, lung and kidney of gonadectomized and sham-operated Wistar rats. Biochem. Pharmacol., **27**, 2537-2541.
- 24) Strobel, W. and J.D. Dignam (1978) : Purification and properties of NADPH-cytochrome P 450 reductase. In "Method in Enzymology", (ed. by Fleischer, S. and L. Packer), **52**, 89-96.
- 25) Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979) : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., **95**, 351-358.
- 26) Frings, C.S., and R.T. Dunn (1970) : A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. Am. J. Clin. Path., **53**, 89-91.
- 27) K. Abe, M. Ohmae and G. Katsui (1976) : Rapid and micro-method for the determination of tocopherols in liver. Vitamins., **50**, 453-357.(In Japanese)
- 28) Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) : Protein measurement with the Folinphenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
- 29) 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.
- 30) Fletcher, B.L. and A.L. Tappel (1973) : Protective effects of dietary α -tocopherol in rats exposed to toxic levels of O₃ and NO₂. Environ. Res. **6**, 165-175.

NO₂ 暴露による脂質過酸化の動物種差

- 31) Quasha, A.L., E.I. Eger and J.H. Tinker (1980): Determination and applications of MAC. *Anesthesiology.*, **53**, 315-334.

I-9

高濃度二酸化窒素暴露によるラットの生存時間と肺の
Arylhydrocarbon Hydroxylase 活性の相関について

Relationship between Survival Time of Rats Exposed to
High Level of Nitrogen Dioxide and Arylhydrocarbon
Hydroxylase Activity in Lungs

嵯峨井勝¹・鈴木誠^{1,2}・市瀬孝道¹

Masaru SAGAI¹, Seiichi SUZUKI² and Takamichi ICHINOSE¹

要 旨

先に、SD系ラットに種々の薬物代謝酵素誘導剤を前投与すると致死濃度のNO₂暴露に対して生存時間が著しく延長されることを見出し、かつ雌の生存時間が雄よりも長いことを報告した。

今回、Wistar系ラットに30~60 ppmのNO₂を8時間暴露し、雌雄の死亡率曲線を求め、雌のLC₅₀が45 ppmであるのに対して雄は39 ppmであったことから雌が雄よりも強い耐性を示すことを再確認した。更に、薬物代謝酵素誘導剤のNO₂に対する延命効果の機序と雌雄間の生存時間の相違の原因を調べる為に、3-メチルコランソレンの前投与による生存時間と肺のミクロソーム系酵素活性との相関を検討した。その結果、一般に3 MC投与量の増加に伴ってNO₂暴露ラットの生存時間は延長し、かつミクロソームのArylhydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性も増加しており、両者の間に高い相関性が認められた。また、3 MC前投与による生存時間の延長とAHH活性の増加は雌で顕著であり、量-効果関係も雌雄間に相違があることが認められた。一方、肺ミクロソームのNADPH-チトクロムc還元酵素活性は3 MC投与量をかえても変化しなかったことよりNO₂暴露による生存時間の延長効果とNADPH-チトクロムc還元酵素活性との間には関連が無いことが示唆された。

これらの結果から、肺ミクロソームのcytochrome P₁-450系はNO₂に対する何らかの防御作用を示す可能性が示唆された。

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 昭和56年度国立公害研究所共同研究員(東邦大学理学部化学科環境化学教室, 〒274 千葉県船橋市三山2-2-1)
The Toho University, Dept. Chemistry, Miyama-Cho 2-2-1, Funabashi, Chiba 274, Japan

Abstract

In a previous paper, it was reported that survival times of rats administered drug metabolizing enzyme-inducing agents prior to NO₂ exposure were prolonged against NO₂ exposure of lethal level, and that the survival times of female rats were longer than those of male rats.

To investigate a mechanism of prolongation of survival times by administration of drug metabolizing enzyme-inducing agents and of sex difference, a relationship between survival times and microsomal enzyme activity in lungs of rats administered enzyme-inducing agents prior to NO₂ exposure was examined. The survival times of rats exposed to NO₂ were prolonged generally with increase of 3 MC doses, and aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activities in lungs of rats were arised with increase of 3 MC doses. A significant correlation between the survival time and AHH activity was observed. Induction of AHH activity by administration of 3 MC in female rats was higher than that in male rat. NADPH-cytochrome *c* reductase activity in lungs of rats did not change with 3 MC administration, and a significant relationship between the survival times and NADPH-cytochrome *c* reductase activities was not observed.

These results suggest that cytochrome P₁-450 system in lung microsomes may have any protective action against NO₂ exposure.

はじめに

我々は先に、各種の薬物代謝酵素誘導剤を前投与したラットは NO₂ の致死濃度暴露に対して生存時間が著しく延長されることを見出し、かつ雌の生存時間が雄よりも長いことを報告した¹⁾。

これまで、肝臓の薬物代謝酵素の誘導に関する研究は極めて多く、最近では肝臓以外の臓器の酵素誘導に関する報告も増加している。

このうち、NO₂ のような大気汚染物質の影響を最も強く受ける肺に関しても Law ら²⁾ がモルモットについて、Burk と Prough³⁾ がハムスターについて、また Seifried ら⁴⁾ がマウスについて報告している。これら誘導実験の多くは 3-メチルコランスレン (3 MC) について行われており、この 3 MC による薬物代謝酵素の誘導は各種臓器によって異なることが知られている。この薬物代謝酵素のうち Arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性は Cyt P₁-450 系の誘導を調べるのに極めて有効な手段として用いられてきている。最近、Warren と Bellward⁵⁾ は肺、肝及び腎について各々 3 MC 濃度と AHH 活性の dose-response 関係について詳しく報告し、臓器特異性に関する貴重な結果を報告している。

今回、著者らはこの薬物代謝酵素誘導剤の NO₂ に対する延命効果の機序と雌雄間の生存時間の相違の原因を調べる為に、酵素誘導剤のうち延命効果が最も高かった 3 MC を用いて、その投与量をかえ、その時の Cyt P₁-450 系の酵素である AHH 活性とラットの生存時間の相関性について検討した。

方 法

動物は8週令のJcl: Wistar系ラットを用いた。死亡率曲線は30, 35, 40, 45, 50, 55及び60 ppmのNO₂を各々8時間暴露してから3日以内に死亡した数から求めた。ラットへのNO₂暴露は各濃度群とも雌雄各20匹ずつ同時に行った。なお、NO₂の暴露方法は先の報告¹⁾に準じた。3-メチルコランスレン(3 MC)は東京化成工業KKより購入したものをオリーブ油に溶かして1日1回、4日間連続腹腔内投与した。3 MCの投与量は2.5, 5, 10, 20及び40 mg/kg B.W.とし、すべてkg体重当たりの該当量を2 mlのオリーブ油に溶かして注射し、対照群はオリーブ油だけを注射した。NO₂暴露は5日目に行い、ミクロソーム酵素の活性測定も3 MC投与開始後5日目のラットを用いて行った。

肺の灌流は右心室より冷生理食塩水を注入して行い、白色になった肺は、減圧脱気後窒素を十分バブリングして嫌氣的にした50 mM Phosphate buffer (pH 7.5)を用いてテフロンホモジナイザーにより窒素気流下で磨碎し、10%ホモジネートに調製した。このホモジネートを200 × g 5分間の遠心分離を行い上清をさらに10,000 × g 20分間遠心分離した。この遠心上清を105,000 × gの超遠心分離を行い、そのペレットを30%のグリセロールを含む0.25 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)にサスペンドしてミクロソーム酵素試料とした。AHH活性の測定はWarrenとBellward⁵⁾の記載に従い、NADPH-cyt. *c* reductase活性の測定はStrobelら⁶⁾の方法に従った。

結 果

先に、SD系ラットが高濃度NO₂暴露に対して、雌雄間に感受性の違いがあることを報告した¹⁾が、今回使用したWistar系ラットでも同じ傾向を示すかどうかを調べる為に、30, 35, 40, 45, 50, 55および60 ppmのNO₂に各々8時間暴露し、3日以内の死亡率から雌雄のNO₂に対する感受性の違

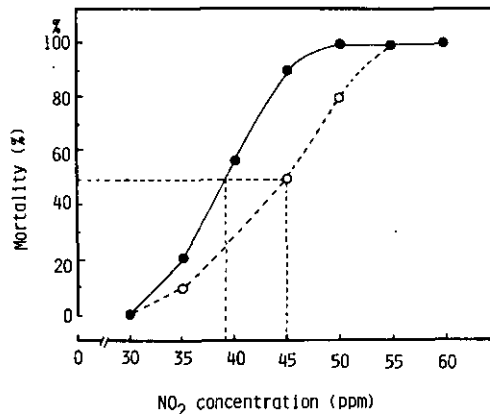


図 1 高濃度NO₂暴露に対するラットの死亡率曲線
Fig. 1 Mortality curves of rats upon NO₂ exposure of high levels.
●, Male rats; ○, Female rats.

いを検討した(図1)。雌雄とも 30 ppm の NO₂ 暴露では死亡例は認められなかったが、100%死亡する濃度は雄で 50 ppm であり、雌では 55 ppm であった。さらに、この死亡率曲線から LC₅₀ 値を求めると、雄は 39 ppm であったのに対して、雌は 45 ppm となり、Wistar 系ラットでも雄が雌より若干感受性が高いことが判明した。

次に、先の実験¹⁾で最も延命効果が高かった 3 MC について、その投与量を 2.5, 5, 10, 20 および 40 mg/kg B.W. と変えて注射してから 65 ppm NO₂ 暴露による生存時間の変化を雌雄の Wistar 系ラットについて検討した(図2)。雄ラットの生存時間は 3 MC 投与量が 10 mg/kg B.W. までは直線的に延長したが 20 mg/kg B.W. あるいは 40 mg/kg B.W. と投与量を増やすと逆に生存時間は短縮した。一方、雌ラットでは雄ラットとは異なり 3 MC の投与量の増加に伴って生存時間は 40 mg/kg B.W. レベルまで直線的に延長した。この結果から、3 MC 投与量と生存時間との量-効果関係は雌雄間で様式が異なるが、3 MC で薬物代謝酵素を誘導しておくこと、NO₂ 暴露によって死亡するまでの時間を延長する作用を示すことが強く示唆された。

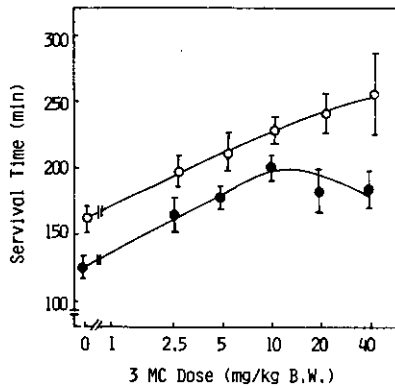


図 2 3-メチルコランスレン (3 MC) 投与量と 65 ppm NO₂ 暴露による生存時間の関係

Fig. 2 Relationship between 3-methylcholanthrene doses and survival times by 65 ppm NO₂ exposure

●, Male rats; ○, Female rats. M±SE

この 3 MC 投与による酵素誘導は 3 MC の投与量とどのような量-効果関係を示すかを調べる為にチトクローム P-450 系の誘導の検索に極めて有効な手段として用いられている Arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性の変化を調べた。図3には肺ミクロソーム中の AHH 活性と 3 MC 投与量の量-効果関係を示した。雄の対照群の AHH 活性は 0.25 Units/mg・prot/min で雌の 0.78 Units/mg・prot/min に比べて低いうえに、3 MC 投与による活性増加も雌に比べて著しく低く、かつ生存時間の場合と同様に 10 mg/kg B.W. 以上の 3 MC 投与ではむしろ AHH 活性は低下していた。一方、雌の場合は生存時間の場合と同様に 40 mg/kg B.W. まで 3 MC の投与量の増加につれて AHH 活性は増加していた。

NO₂暴露による生存時間とAHH活性

図2と図3の結果から、65 ppm NO₂暴露による生存時間と3 MC投与ラットの肺のAHH活性の相関性を調べ図4に示した。図から理解されるように相関係数 (r) は0.9288 ($p < 0.001$) となり雌雄の違いにかかわらずNO₂暴露に対する生存時間と肺のAHH活性との間には高い相関性が存在していた。

次に、肺のミクロソーム中でチトクロームP-450に電子を供給する酵素であるNADPH-Cyt *c* reductase活性がNO₂感受性と相関があるかどうかを調べる為に3 MCの投与量を変えた場合の雌

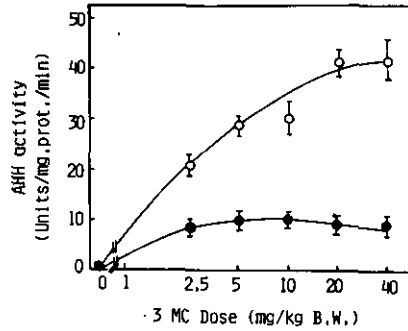


図 3 3-メチルコランスレン (3 MC) 投与量と肺ミクロソームのarylhydrocarbon hydroxylase 活性の関係
 Fig. 3 Relationship between 3-methylcholanthrene doses and aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity in lung microsomes
 ●, Male rats ; ○, Female rats. $M \pm SE$

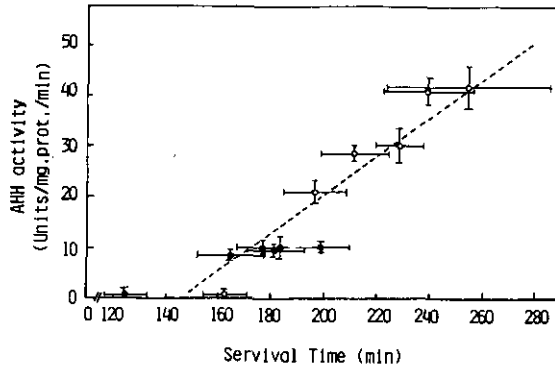


図 4 65 ppm NO₂暴露による生存時間と肺ミクロソームのaryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性の相関性
 Fig. 4 Relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase activity in lung microsomes and survival times by 65 ppm NO₂ exposure
 ●, Male rats ; ○, Female rats. $M \pm SE$, $r = 0.9288$ ($p < 0.001$)

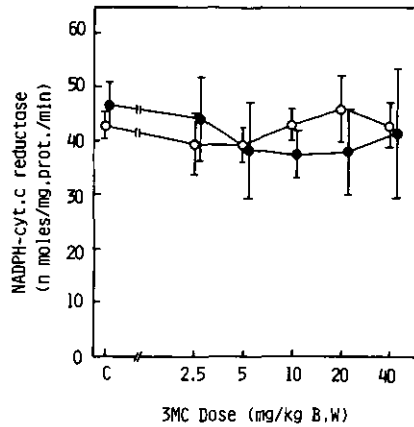


図 5 3-メチルコランスレン (3 MC) 投与量と肺ミクロソームのNADPH-cytochrome *c* 還元酵素活性の関係

Fig. 5 Relationship between 3-methylcholanthrene doses and NADPH-cytochrome *c* reductase activity in lung microsomes

●, Male rats; ○, Female rats. M ± SE

雄ラットの量一効果関係を調べ図5に示した。この結果、肺のNADPH-Cyt *c* reductaseは3MC投与量の変化によってほとんど変化しなかった。この結果は当然のことながらNO₂暴露の生存時間との間にも何らの相関性も示さなかった。

考 察

高濃度NO₂暴露に対する生存時間は3MC投与量の増加につれて延長し、かつこの生存時間は肺ミクロソームのAHH活性との間に高い相関があることを明らかにした。さらに、ラットの雌雄間では雌の生存時間が長く、AHH活性も対照群あるいは各3MC投与群とも雌で高かった。これまで、肺ミクロソームのAHH活性の雌雄の違いについてはNebertとGelboin⁷⁾が6系統のマウスについて調べ、雌が雄より数倍高いと報告したが、GurtooとParker⁸⁾及びChhabraとFouts⁹⁾らは雌雄差はないと報告している。一方、ラットについては、WarrenとBellward⁹⁾がAHH活性は雌のほうが高く、かつ3-MC投与によるAHH活性の誘導も雌で顕著であることを報告した。我々の結果はWarrenとBellwardの結果と良く一致している。またWarrenとBellwardは3MCによる肝と腎のAHH活性の誘導も調べ、両者は3-MC 5 mg/kgまではほとんど誘導されず肺のAHH活性誘導の量一効果関係とは異なることを報告している。この結果はNO₂暴露に対する生存時間は肝、腎のAHH活性とは相関していないということを示唆している。これらのことから、高濃度NO₂暴露に対する生存時間は肝、腎のAHH活性とではなく肺のAHH活性と相関していることが示された。しかしながら、肺のAHH酵素がそれ自身で直接に生存時間の延長を起こすと考えることは難かしい。

一方、NO₂暴露による AHH 活性の変化に関して、Palmer ら¹⁰⁾はウサギに 5, 20 及び 40 ppm NO₂ を 3 時間暴露し、AHH 活性に変化がないことを報告し、Husain と Dehnen¹¹⁾はラットに 14.7 ppm NO₂を連続 4 週間暴露し AHH 活性が約 1.5~4 倍に増加したことを報告している。これらの報告より、AHH 活性は短時間暴露では相当の高濃度でもあまり変化が認められないが、1 か月程の長期暴露では活性が著しく増加することを示している。我々は先に、ラットを 0.4, 1.2 及び 4 ppm NO₂に暴露した場合、抗酸化性防御機能は 1 か月目頃が最も高い時期で、また細胞にとって有害な過酸化脂質生成は逆に最も低下している時期であることを報告した¹²⁾。このようなことから、肺の可溶性画分の抗酸化性防御機能に対応して AHH 酵素の本体である cytochrome P₁-450 (系) にも NO₂に対する何らかの防御機能が存在しているのかもしれない。Reddy ら¹³⁾は最近ミクロソームに結合している Glutathione peroxidase の存在を報告した。このような酵素の他にも防御機能が存在している可能性があるので、今後各種の cyt P-450 誘導剤についてその酵素誘導能と生存時間の関係を検討する予定である。

引用文献

- 1) Sagai, M. (1978): Effect of enzyme-inducing agents on the survival times of rats exposed to lethal levels of nitrogen dioxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **43**, 169-174.
- 2) Law, F.C.Q.- J.C. Drach and J.E. Sinsheimer (1975): Effects of nitrogen dioxide and 3-methylcholanthrene on pulmonary enzymes. *J. Pharm. Sci.*, **64**, 1421-1422.
- 3) Burke, M.D. and R.A. Prough (1976): Some characteristics of hamster liver and lung microsomal arylhydrocarbon (biphenyl and benzo(a)pyrene) hydroxylation reactions. *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2187-2195.
- 4) Seifried, H.E., D.U. Birkett, W. Levin, A.Y.H. Lu, A.H. Conney and D.M. Jrrina (1977): Metabolism of benzo [a] pyrene. Effect of 3-methylcholanthrene pretreatment on metabolism by microsomes from lungs of genetically "respective" and "nonrespective" mice. *Archs. Biochem. Biophys.*, **178**, 256-263.
- 5) Warren, P.M. and G.D. Bellward (1978): Induction of arylhydrocarbon hydroxylase by 3-methylcholanthrene in liver, lung and kidney of gonadectomized and sham-operated Wistar rats. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2537-2541.
- 6) Strobel, H.W. and J.D. Dignam (1978): Purification and properties of NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Method in Enzymology*, (ed. by Fleischer, S. and L. Packer), **52**, 89-96.
- 7) Nebert, D.W. and H.V. Gelboin (1969): The in vivo and in vitro induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissues, strains, and developmental and hormonal states. *Archs. Biochem. Biophys.*, **134**, 76-89.
- 8) Gurtoo, H.L. and N.B. Parker (1976): Organ specificity of the sex dependent regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) in rats. *Biochem. Biophys. Res. Comun.*, **72**, 216-222.
- 9) Chhabra, R.S. and J.R. Fouts (1974): Sex differences in the metabolism of xenobiotics by extrahepatic tissue in rats. *Drug Metabolism and Disposition.*, **2**, 375-379.
- 10) Palmer, M.S., R.W. Exley and D.L. Coffin (1972): Influence of pollutant gases on benzpyrene hydroxylase activity. *Arch. Environ. Health*, **26**, 430-442.
- 11) Husain, M.M. and W. Dehnen (1978): Effect of NO₂ and SO₂ inhalation on benzo(a)pyrene metabolism in rat lung. *Arch. Toxicol.*, **40**, 207-210.
- 12) Ichinose, T. and M. Sagai (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide III. Change of antioxidative protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by chronic exposure. *Toxicol. Appl. Pharm.* **66**, 1~8.

- 13) Reddy, C.C., C-P. D. Tu J.R. Burgess, C-Y. Ho, R.W. Scholz and E.J. Massaro (1981): Evidence for the occurrence of selenium-independent glutathione peroxidase activity in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 970-978.

I-10

二酸化窒素のラット臓器内膜成分に及ぼす影響

Effects of Nitrogen Dioxide on Membranous Constituents of Rat Tissues

高橋勇二¹・三浦 卓¹・持立克身¹・大住拓美²

Yuji TAKAHASHI¹, Takashi MIURA¹, Katsumi MOCHITATE¹
and Takumi OSUMI²

要 旨

二酸化窒素 (NO₂) による臓器の損傷と修復過程を明らかにするためにラットに 4.0 ppm, 1.2 ppm 及び 0.4 ppm の NO₂ を 4 週間暴露し, 肺および肝臓の生体膜系成分の変動を経時的に調べた。

肺のミトコンドリアとミクロソームの電子伝達系成分は 1 週目までは対照群よりも高い値を示し, 以後減少し 2 週目には対照群よりも低い値となった。4.0 ppm 及び 1.2 ppm NO₂ 暴露では 2 週目以降再び増加し 4 週目には対照群より高い値を示したが, 0.4 ppm NO₂ 暴露では 2 週目以降の増加が起らなかった。NO₂ による電子伝達系成分の減少はミクロソームのチトクロム P-450 に特異性が高く, 4.0 ppm, 1.2 ppm NO₂ 暴露によって対照群の各々に 57% ($p < 0.05$), 62% ($p < 0.05$) 及び 54% ($p < 0.01$) にまで低下した。

肝ミクロソームの電子伝達系成分は 1 週目までは低下し対照群の値よりも低くなるがその後増加し 2 週目には対照群よりも高くなった。2 週目より再び低下し, 4.0 ppm 及び 1.2 ppm の NO₂ 暴露では 4 週目には対照群の値よりも低くなった。NO₂ 暴露の影響は薬物代謝系に特異性が高く, チトクロム P-450 含量は 4.0 ppm 及び 0.4 ppm NO₂ 暴露の 1 週目で各々対照群の 75% ($p < 0.01$) 及び 69% ($p < 0.001$) にまで低下した。また, NADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性も有意に低下した。

以上の結果から, NO₂ 暴露によって肺及び肝の生体膜系は損傷→修復→損傷というサイクルを辿っていることが明らかとなった。

Abstract

In order to clarify responses of rat tissues to NO₂ inhalation, Wistar rats were exposed to 4.0, 1.2 and 0.4 ppm NO₂ for 4 weeks and alterations were observed in components of electron-transport systems in mitochondria and microsomes of lung and liver.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田町小野川 16 番 2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 昭和56, 57年度国立公害研究所共同研究員(日本女子大学家政学部 〒112 東京都文京区目白台 2 丁目 8 番 1)
Japan Women's University, Mejirodai 2-8-1, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

Components of electron-transport systems of lung mitochondria and microsomes were increased by NO_2 inhalation until the first week and, then, reduced to below the control level at the second week. Subsequently, exposure to 4.0 and 1.2 ppm NO_2 caused an increase in these components and reached above the control level at the fourth week. On the other hand, exposure to 0.4 ppm NO_2 did not cause an increase and these components were retained at below the control level. The effect of NO_2 inhalation on components of electron-transport systems was preferentially deteriorative to cytochrome P-450.

Components of electron-transport systems of liver microsomes decreased by the first week and, then, increased to the control level at the second week. At the fourth week these components showed reduced values at the exposure concentrations of 4.0 and 0.4 ppm. The effect of NO_2 inhalation was more specific for components of drug-metabolizing system.

Based on these results, it is concluded that processes of degradation and repair are periodically developed in components of mitochondria and microsomes of lung and liver upon exposure to NO_2 .

はじめに

NO_2 の生体影響については呼吸器系を中心として多くの研究が行われて来た¹⁾。15 ppm程度の NO_2 をラットに暴露すると、肺の上皮細胞が傷害を受け脱落した後修復されることが明らかにされている^{2,3)}。この際、肺組織において過酸化物代謝系が一担減少した後昂進することが報告されている⁴⁾。これらの現象は、酸化性のガスに対して動物の肺組織が適応する反応と考えられる。我々は前報において4 ppm NO_2 急性暴露によっても肺ミトコンドリアの呼吸系酵素活性、ミクロソーム電子伝達系成分及び解糖系酵素活性が昂進することを報告した^{5,6)}。更に肝臓においては、4 ppm NO_2 急性暴露によってミクロソーム電子伝達系成分が有意に減少することを見出した。

動物は通常4 ppm以下の低濃度の NO_2 に対して傷害を受けても容易に修復し適応していると考えられる。我々は、動物の NO_2 に対する適応機構を解明する第一段階として、4~0.4 ppm NO_2 をラットに亜急性暴露し、肺及び肝の生体膜成分が受ける損傷と修復過程とを明らかにすることを試みた。本報告には、ミトコンドリアとミクロソームの電子伝達系成分が1か月の暴露期間に NO_2 の暴露濃度に対応して損傷と修復のサイクルをたどることを記した。

方 法

1. 暴露条件及び試料の採集

Jcl: Wistar 系雄ラット (26 週令) を 4.0 ± 0.08 ppm, 1.2 ± 0.06 ppm 及び 0.4 ± 0.02 ppm NO_2 に暴露し、1 週間毎に一群 6 匹のラットを取り出しエーテル麻酔下で頸動脈から採血して屠殺した。屠殺後心臓より 0.95% NaCl 溶液を灌流して臓器から血液を除いた。肺及び肝臓は 4 倍容の 10 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.15 M KCl 溶液中でポッター・エルベジェム型テフロンホモジェナイザーでホモジェナイズした。このホモジェネートを用いてコハク酸 β -チトクロム c 還元酵素活性を測定した。ミクロソーム画分は、肺及び肝臓のホモジェネートを $10,000 \times g$ 15 分間遠心し、遠心

上清を 105,000×g60 分間遠心して調製した。

2. 酵素活性及びチトクロム含量の測定法

コハク酸—チトクロム *c* 還元酵素活性は Sottocasa らの方法⁷⁾ により測定した。NADH—チトクロム *c* 還元酵素及び NADPH—チトクロム *c* 還元酵素の活性は Omura & Takesue の方法⁸⁾ により測定した。チトクロム *b*₅ とチトクロム P-450 含量は Omura & Sato の方法⁹⁾ で測定し、分子吸光係数を各々 91 cm⁻¹ mM⁻¹ 及び 185 cm⁻¹ mM⁻¹ として含量を計算した。蛋白質量は Lowry の方法¹⁰⁾ により測定した。酵素活性及びチトクロム含量はホモジェネートタンパク質当たりで表した。

結 果

1. 肺のミトコンドリアおよびマイクロソーム成分の変動

図1に NO₂ 暴露による肺ホモジェネートのタンパク質量の変化を示した。4.0 ppm NO₂ 暴露によってタンパク質量は 4 日目と 14 日目をピークにして対照群の 114% ($p < 0.05$) と 122% ($p < 0.001$) と有意に高に値を示した後減少し、28 日目には対照群の 92% となった。1.2 ppm NO₂ 暴露の場合、タンパク質量の変化は 4.0 ppm NO₂ 暴露の場合とほぼ同じであったが変動幅はより小さく対照群に対して有意差は認められなかった。一方、0.4 ppm NO₂ 暴露では 7 日目から 28 日目までほぼ直線的に増加し、28 日目には対照群の 107% ($p < 0.05$) と有意に高いタンパク質量を示した。この過程でミトコンドリアのコハク酸—チトクロム *c* 還元酵素活性は 7 日目から 14 日目にかけて NO₂ の暴露濃度に依存して減少した (図2)。14 日目の活性は 4.0 ppm, 1.2 ppm 及び 0.4 ppm NO₂ 暴露

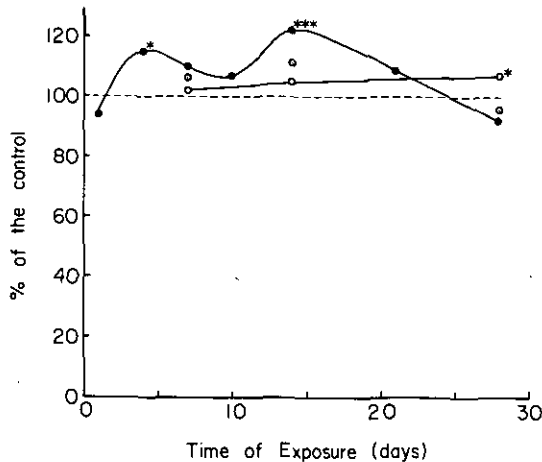


図 1 NO₂ 暴露による肺ホモジェネートタンパク質量の変化

Fig. 1 Changes in the protein content of lung homogenates during NO₂ inhalation

○, 0.4 ppm NO₂; ⊙, 1.2 ppm NO₂; ●, 4.0 ppm NO₂

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

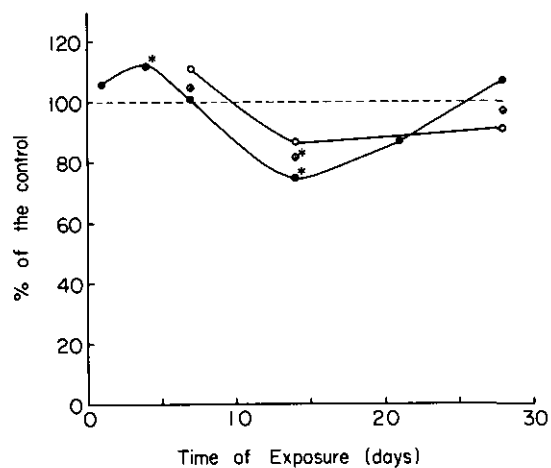


図 2 NO₂暴露による肺ホモジェネートのコハク酸-チトクロム *c* 還元酵素活性の変化

Fig. 2 Changes in the succinate-cytochrome *c* reductase activity of lung homogenates during NO₂ inhalation
 ○, 0.4 ppm NO₂; ⊙, 1.2 ppm NO₂; ●, 4.0 ppm NO₂
 * $p < 0.05$

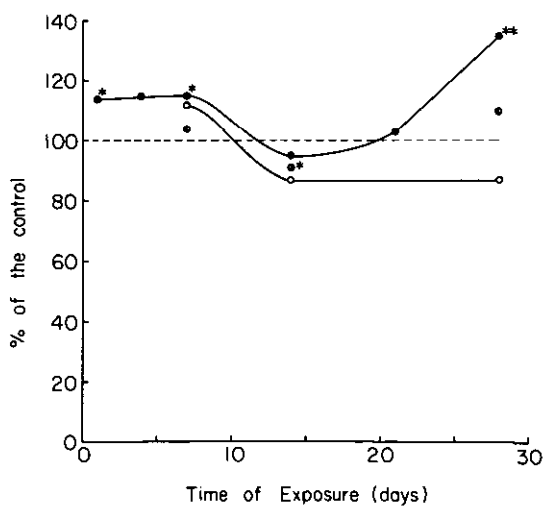


図 3 NO₂暴露による肺ミクロソームのNADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性の変化

Fig. 3 Changes in the NADPH-cytochrome *c* reductase activity of lung microsomes during NO₂ inhalation
 ○, 0.4 ppm NO₂; ⊙, 1.2 ppm NO₂; ●, 4.0 ppm NO₂
 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

NO₂暴露の臓器内膜成分に及ぼす影響

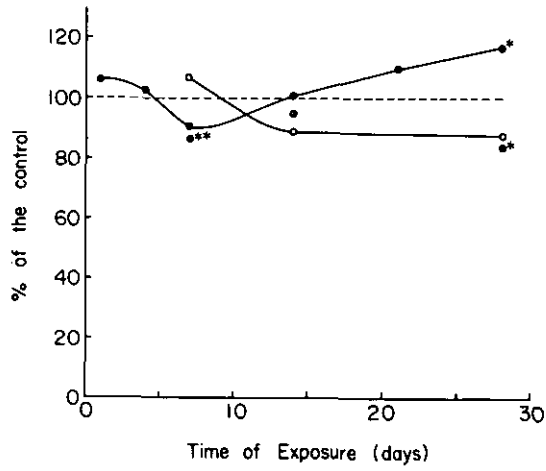


図 4 NO₂暴露による肺ミクロソームNADH-チトクロム *c* 還元酵素活性の変化
 Fig. 4 Changes in the NADH-cytochrome *c* reductase activity of lung microsomes during NO₂ inhalation
 ○, 0.4 ppm NO₂; ◐, 1.2 ppm NO₂; ●, 4.0 ppm NO₂
 ** $p < 0.01$

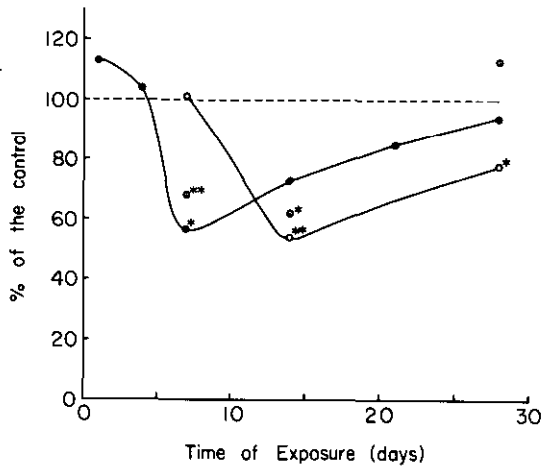


図 5 NO₂暴露による肺ミクロソームのチトクロム P-450 含量の変化
 Fig. 5 Changes in the cytochrome P-450 content of lung microsomes during NO₂ inhalation
 ○, 0.4 ppm NO₂; ◐, 1.2 ppm NO₂; ●, 4.0 ppm NO₂
 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

で75% ($p < 0.05$), 82% ($p < 0.05$) 及び87%であった。その後4.0 ppm 及び1.2 ppm NO₂暴露では対照群のレベルにまで回復していったが、0.4 ppm NO₂暴露では14日目と同様に低い活性を維持した。

ミクロソームの電子伝達系成分中 NADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性は、ミトコンドリアのコハク酸-チトクロム *c* 還元酵素活性と類似の変化を示した(図3)。つまり、4.0 ppm 及び1.2 ppm NO₂ 暴露では7日目から14日目にかけて減少した後再び増加したが、0.4 ppm NO₂ 暴露では増加が起こらず28日目まで低い活性が維持された。一方、NADH-チトクロム *c* 還元酵素活性は4.0 ppm 及び1.2 ppm NO₂ 暴露によって7日目には対照群の各々91%と88% ($p < 0.01$) とに減少した(図4)。その後4.0 ppm NO₂ では経時的に増加し28日目には対照群の117% ($p < 0.05$) に達した。1.2 ppm NO₂ では対照群よりも低い活性が維持され28日目では対照群の84% ($p < 0.05$) であった。0.4 ppm NO₂ 暴露ではNADPH-チトクロム *c* 還元酵素と同様の変化を示した。肺ミクロソームのチトクロム P-450 含量はNO₂ 暴露によって最も顕著に減少した(図5)。4.0 ppm 及び1.2 ppm NO₂ 暴露によって7日目には対照群の各々58% ($p < 0.05$) 及び68% ($p < 0.01$) に減少しその後対照群のレベルにまで回復した。一方、0.4 ppm NO₂ 暴露ではチトクロム P-450 含量の減少は7日目から14日目にかけて起こりその後増加したが、28日目においても対照群の78% ($p < 0.05$) と有意に低い含量を示した。

2. 肝ミクロソーム成分の変動

肝ミクロソームには二つの主要な電子伝達系が存在する。一つはNADH依存性であり、NADH-チトクロム *b₅* 還元酵素とチトクロム *b₅* よりなり、脂胞酸の不飽和化等を行っている¹¹⁾。もう一つの電子伝達系はNADPH依存性であり、NADPH-チトクロム P-450 還元酵素とチトクロム P-450 からなり薬物代謝等を行っている¹²⁾。本研究ではこれら還元酵素の活性をチトクロム *c* を電子受容体として測定した。図6に肝ミクロソームのNADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性がNO₂ 暴露によって受ける変化を示した。4.0 ppm NO₂ 暴露によって1日目から2日目まで減少を続け、7日目には4.0 ppm 及び0.4 ppm の暴露濃度で79% ($p < 0.05$) 及び77% ($p < 0.001$) と有意に低い活性となった。その後14日目には対照群のレベルにまで回復するが再び減少した。4.0 ppm NO₂ 暴露の場合、28日目の活性は対照群の81% ($p < 0.001$) となった。NO₂ 暴露によるチトクロム P-450 含量の変化はNADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性の変化と同様のパターンを示した(図7)。4.0 ppm 暴露によって1日目から減少を続け、7日目には対照群の75% ($p < 0.01$) となった。0.4 ppm 及び1.2 ppm NO₂ 暴露でも対照群の各々69% ($p < 0.01$) 及び84%であった。その後増加し14日目には1.2 ppm 及び0.4 ppm NO₂ 暴露で対照群の各々112% ($p < 0.05$) 及び110%と対照群よりも高い含量を示した。4.0 ppm NO₂ 暴露では対照群の93% ($p < 0.05$) と低い値に留った。チトクロム P-450 含量は14日目以降再び減少し、4.0 ppm 及び0.4 ppm NO₂ 暴露で28日目には対照群の各々70% ($p < 0.05$) 及び73%となった。

NO₂暴露の臓器内膜成分に及ぼす影響

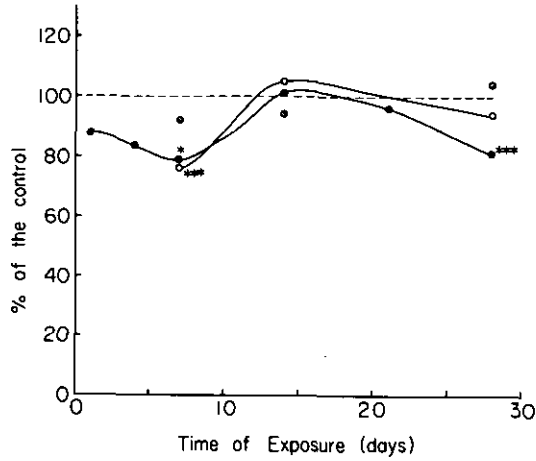


図 6 NO₂ 暴露による肝ミクロソームのNADPH-チトクロム c 還元酵素活性の変化

Fig. 6 Changes in the NADPH-cytochrome c reductase activity of liver microsomes during NO₂ inhalation.

○, 0.4 ppm NO₂; ◐, 1.2 ppm NO₂; ●, 4.0 ppm NO₂
 * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

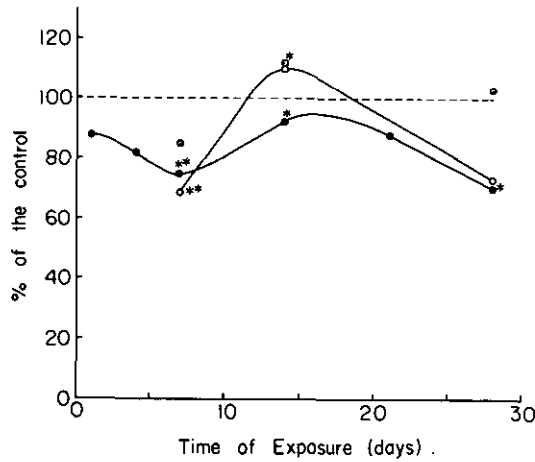


図 7 NO₂ 暴露による肝ミクロソームのチトクロム P-450 含量の変化

Fig. 7 Changes in the cytochrome P-450 content of liver microsomes during NO₂ inhalation

○, 0.4 ppm NO₂; ◐, 1.2 ppm NO₂; ●, 4.0 ppm NO₂
 * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

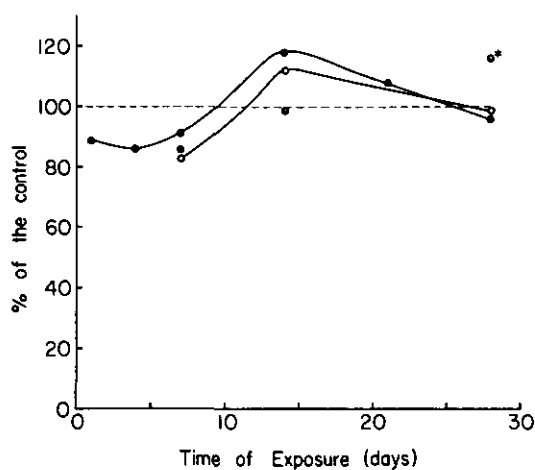


図 8 NO₂ 暴露による肝ミクロソームのNADH-チトクロム *c* 還元酵素活性の変化

Fig. 8 Changes in the NADH-cytochrome *c* reductase activity of liver microsomes during NO₂ inhalation

○, 0.4 ppm NO₂; ⊙, 1.2 ppm NO₂; ●, 4.0 ppm NO₂
* $p < 0.05$

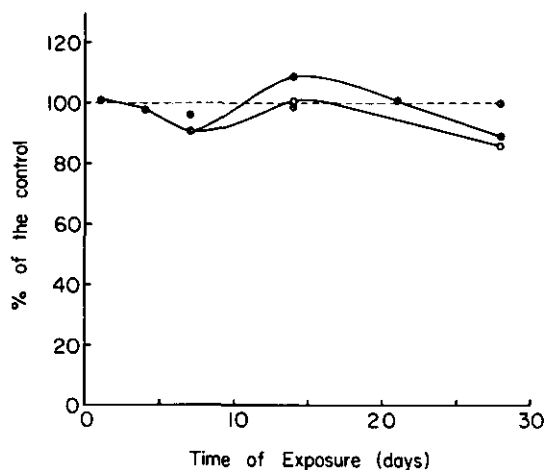


図 9 NO₂ 暴露による肝ミクロソームのチトクロム *b*₅ 含量の変化

Fig. 9 Changes in the cytochrome *b*₅ content of liver microsomes during NO₂ inhalation

○, 0.4 ppm NO₂; ⊙, 1.2 ppm NO₂; ●, 4.0 ppm NO₂

図 8 と図 9 に NO₂ 暴露による NADH-チトクロム *c* 還元酵素活性とチトクロム *b*₅ 含量の変化を示した。これら両成分の変化は NADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性の変化と同様のパターンを示

したが変動は対照群に対して有意ではなかった。

考 察

本研究の結果から、NO₂暴露によって肺のミトコンドリアとミクロソームの電子伝達系成分は損傷を受けその後修復されるという過程を辿る可能性が明らかになった。ミトコンドリアのコハク酸-チトクロム *c* 還元酵素とミクロソームの NADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性は同様な変動を示した(図 2, 3)。NO₂暴露の 7 日目までは対照群よりも高い活性を示し、以後減少し 14 日目には対照群よりも低い活性となった。14 日目以降活性は増加し 28 日目には対照群よりも高い活性となった。このような活性の増加→減少→増加のサイクルは 4.0 ppm 及び 1.2 ppm NO₂暴露で観察された。ミトコンドリア及ミクロソームの電子伝達系成分の活性が共に増加することは、1.2 ppm~4.0 ppm の NO₂暴露によって代謝系の昂進のみならず細胞数の増加が起こることを示唆しているのかもしれない。0.4 ppm NO₂暴露ではコハク酸-チトクロム *c* 還元酵素と NADPH-チトクロム *c* 還元酵素の活性はともに 2 回目の増加が起らなかった。これら二つの還元酵素活性と異なり、NADH-チトクロム *c* 還元酵素活性とチトクロム P-450 含量は 4.0 ppm 及び 1.2 ppm NO₂暴露によって 7 日目には最低値にまで減少しその後増加した。0.4 ppm NO₂暴露では 7 日目には対照群のレベルに留まり 14 日目に最低値にまで減少した。その後チトクロム P-450 含量は増加したが、両者ともに暴露期間中対照群よりも低い値に留った。従って肺ミクロソーム成分の中でも NADH-チトクロム *c* 還元酵素とチトクロム P-450 は、1.2~4.0 ppm NO₂暴露において NO₂により他の成分よりもより速やかに傷害を受けるものと考えられる。また、肺ミクロソーム電子伝達系成分の中でもチトクロム P-450 含量は最も顕著に減少し、NO₂暴露の 7 日目または 14 日目において 0.4 ppm~4.0 ppm の暴露濃度で有意な減少が認められた。このようにチトクロム P-450 に特異性が高いことは、肺に対して NO₂が亜硝酸イオン又は NO₂ ガスの形で作用する可能性を示唆しているのかもしれない^{13,14)}。

肝臓のミクロソーム電子伝達系成分は NO₂暴露に対して肺とは異なる挙動を示した。NO₂暴露 1 日目から減少し全ての成分が 7 日目には最低値を示した(図 6-9)。その後 14 日目には対照群のレベルあるいはそれ以上にまで増加するがその後再び減少した。従って肝ミクロソーム成分の場合減少→増加→減少のサイクルを辿り肺ミクのソーム成分の変動とは時間的なずれが認められた。更に肺ミクロソーム成分において観察された NO₂の暴露濃度による変動幅と変動の時間的ずれが、肺ミクロソーム成分では認められなかった。肺ミクロソーム成分に対しては NO₂暴露の影響がチトクロム P-450 に特異性が高かったが肝ミクロソーム成分では NADPH-チトクロム *c* 還元酵素とチトクロム P-450 により特異的であり、NO₂暴露によって選択的に薬物代謝系が損傷を受けると考えられる。我々は先に NO₂暴露によって血清及び肝上清中の不飽和脂肪酸含量が増加することを報告した¹⁵⁾。Kamatagi らはラット肝ミクロソームの脂肪酸不飽和化の系をシアンにより阻害すると薬物代謝活性が増加することを明らかにしている¹⁶⁾。このことは、NO₂暴露によって選択的に薬物代謝系が損傷を受け結果として脂肪酸の不飽和化が進行し、肝上清及び血清の不飽和脂肪酸含量が増加す

る可能性を示唆するのかもしれない。

NO₂暴露による肝ミクロソーム成分の損傷と修復は0.4~4.0 ppmの暴露濃度で同調的に起こっておりミクロソーム成分の変質と生合成の促進として説明できると考える。しかしながらミクロソーム成分の減少にはNO₂の暴露濃度に対する依存性が明確でなかった。現在この現象を説明することは出来ないが、NO₂の肝ミクロソームに対する作用形態が肺に対する場合と異っているのが原因ではないかと考える。

引用文献

- 1) 和田 攻・奥田典夫ほか訳(1979): 窒素酸化物。環境汚染物質の生体への影響, 9巻, pp. 208-214.
- 2) Evans, M. J., R. J. Stephens, L. J. Cabral and G. Freeman (1972): Cell renewal in the lungs of rats exposed to nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **24**, 180-118.
- 3) Stephens, R. J., G. Freeman and M. J. Evans (1972): Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **24**, 52-59.
- 4) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. *Lipids*, **16**, 64-67.
- 5) 三浦 卓・持立克身・彼谷邦光・国本 学(1981): 二酸化窒素暴露のラット臓器内膜成分に及ぼす影響, 国立公害研究所研究報告, 第31号, 147-162.
- 6) 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光(1981): 二酸化窒素の肺の解糖系および呼吸系に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告, 第31号, 163-168.
- 7) Sottocasa, G. L., B. Kuylenstierna, L. Ernster and J. Bergstrans (1967): An electron-transport pathway associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell Biol.*, **32**, 415-423.
- 8) Omura, T. and S. Takesue (1970): New method for simultaneous purification of cytochrome b₅ and NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. *J. Biochem.*, **67**, 249-257.
- 9) Omura, T. and R. Sato (1964): Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- 10) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 11) Mathews, F. S. and E. W. Czerwinski (1976): Cytochrome b₅ and cytochrome b₅ reductase from a chemical and X-ray diffraction viewpoint. In "The Enzymes of Biological Membranes" (A. Martonosi, Ed.) Plenum, Vol. 4, pp. 143-198.
- 12) Dus, K. (1976): On the structure and function of cytochrome P-450. In "The Enzymes of Biological Membranes" (A. Martonosi, Ed), Plenum, Vol. 4. pp. 199-238.
- 13) Cotton, A. F., and G. Wilkerson (1966): *Advanced Inorganic chemistry*. New York, Interscience, pp. 341-353.
- 14) Craven, P. A. and F. R. De Rubertis (1978): Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and heme proteins. *J. Biol. Chem.*, **253**, 8433-8443.
- 15) Kaya, K., and T. Miura (1982). Effects of nitrogen dioxide on fatty acid compositions of red cell membranes, sera and livers in rats. *Environ. Res.*, **27**, 24-35.
- 16) Kamataki, T., M. Kitada, K. Chiba, H. Kitagawa, Y. Imai and R. Sato (1980): Enhancement by cyanide of aniline *p*-hydroxylation activity in rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1141-1146.

二酸化窒素の肝ミクロソーム成分に及ぼす影響
——硝酸ナトリウムの効果——

Effects of Nitrogen Dioxide on Components of Liver Microsomes:
Effect of Sodium Nitrate

持立克身¹・国本 学¹・三浦 卓¹・彼谷邦光¹

Katsumi MOCHITATE¹, Manabu KUNIMOTO¹, Takashi MIURA¹
and Kunimitsu KAYA¹

要 旨

二酸化窒素 (NO₂) 暴露がラット臓器のミクロソーム電子伝達系成分に及ぼす影響の原因を明らかにするために、NO₂暴露によって血液中に増加する硝酸イオンと亜硝酸イオンの効果を肝ミクロソームを用いて検討した。ラット肝臓より調製したミクロソームを最終濃度 0.05~1.0 mM の硝酸ナトリウムと 37°C で 1 時間インキュベートすると、ミクロソーム画分に回収される電子伝達系成分は硝酸ナトリウムの添加濃度に依存して減少し 0.1 mM で最低となった。亜硝酸ナトリウムは同濃度の硝酸ナトリウムよりもチトクローム P-450 含量を除けば減少効果は小さかった。0.1 mM 硝酸ナトリウムの添加によるミクロソーム成分の変化は、低下する酵素及びチトクロムの種類と低下の度合において 4 ppm NO₂ 暴露によるミクロソーム成分の変化と一致した。また、NO₂ 暴露と硝酸ナトリウム処理によりミクロソーム成分が減少するのは共に比重が小さいミクロソーム画分であることが明らかとなった。

これらの結果から NO₂ 暴露によって血液中の硝酸イオン濃度が増加し肝臓内にも反映されれば、ミクロソーム成分は硝酸イオンによって低下することが支持された。

Abstract

In order to determine the chemical form of NO₂ producing alterations of microsomal components, microsomal fractions of rat liver were incubated with sodium nitrate and sodium nitrite at the concentration ranging from 0.05 to 1.0 mM. Sixty minutes after incubation at 37°C, microsomes were recovered by centrifugation and values of components of electron-transport systems were determined. Incubation with sodium nitrate resulted in a rapid decrease in activities of NADH- and NADPH-cytochrome *c* reductases up to 0.1 mM

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田町小野川 16 番 2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

and leveled off. The effect of sodium nitrite were less significant than that of sodium nitrate except for the cytochrome P-450. Both ions did not affect the arylsulfatase activity and the cytochrome b_5 content. These results are completely consistent with alterations obtained by NO_2 exposure. In addition, addition of sodium nitrate and NO_2 exposure lowered microsomal subfraction with lowest density.

These results support that microsomal components are decreased by nitrate ion during NO_2 inhalation, if the nitrate concentration of the liver is elevated to the similar level to that in the blood.

はじめに

NO_2 の呼吸器系への影響については過去20年以上にわたり多くの研究が行われて来た。しかしながら、吹呼吸器以外の臓器に及ぼす NO_2 の影響については余り関心が払われて来なかった。先に我々は4 ppm NO_2 暴露によって肝ミクロソームの電子伝達系成分が有意に減少することを見出し報告した¹⁾。

NO_2 ガスは呼吸器に吸入されると肺胞において硝酸イオンと亜硝酸イオンの形で血液中に入り、体内を循環した後尿中に排出されることが報告されている^{2,3)}。従って吸入された NO_2 は硝酸イオンと亜硝酸イオンの形態をとって体内の臓器に影響を及ぼす可能性が考えられる。亜硝酸イオンは血液中で速やかに赤血球内に取り込まれヘモグロビンをメトヘモグロビンとし、その際自身は硝酸イオンとなることが明らかにされている⁴⁾。血液中の硝酸イオン濃度は NO_2 の暴露濃度に依存して増加し、4 ppm NO_2 を暴露した場合0.1~0.2mMと対照値の数倍になっている⁵⁾。そこで NO_2 暴露による肝ミクロソーム成分の減少の原因を明らかにするために、肝臓よりミクロソーム画分を調製し、硝酸イオンと亜硝酸イオンがミクロソーム成分に及ぼす影響について検討した。

方 法

1. ミクロソーム画分の調製及び硝酸イオン・亜硝酸イオン処理

JcL: Wistar 系雄ラットより肝臓を採集し、0.9% NaCl 溶液で灌流し、血液を除去した。肝臓は4倍容の10 mM トリス緩衝液を添加した0.15 M KCl 溶液中でポッター型ホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした。ホモジェネートを10,000×g 15分間遠心し、その上清を105,000×g 60分間遠心して得られた沈殿を同じ溶液に懸濁してミクロソーム画分とした。

ミクロソーム画分は、硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムを添加したインキュベーション培地に約10 mg/ml になるように懸濁し、37°Cでインキュベーションした。インキュベーション培地は最終濃度がグリセロール20%、トリス緩衝液(pH 7.4) 10 mM、KCl 0.15 M になるように調製した。

2. ミクロソーム画分のシヨ糖密度勾配遠心

4 ppm NO_2 暴露したラットの肝ミクロソーム及び硝酸イオンで処理したミクロソーム画分をシヨ糖密度勾配遠心により細分画した。シヨ糖溶液は、2 M、1.23 M 及び0.9 M 溶液を10 mM トリ

ス緩衝液 (pH 7.4) と 0.15 M KCl を添加して調製した。ベックマン SW 40 Ti 用超遠心チューブに 1.5 ml 2 M ショ糖溶液, 次いで 0.5 ml 1.23 M ショ糖溶液を加え, その上に 1.2 M~0.9 M ショ糖溶液の連続的密度勾配を作成した。このショ糖溶液勾配に 2 ml のミクロソーム懸濁液を重層し 40,000 rpm 10~14 時間遠心した。遠心後遠心チューブの底から試料を分取した。

3. 酵素活性及びチトクロム含量の測定法

NADH-チトクロム *c* 還元酵素及び NADPH-チトクロム *c* 還元酵素の両活性は Omura & Takesue の方法⁶⁾ により測定した。チトクロム *b*₅ とチトクロム P-450 含量は Omura & Sato の方法⁷⁾ で測定し, 分子吸光係数を各々 91 cm⁻¹ mM⁻¹ 及び 185 cm⁻¹ mM⁻¹ として含量を計算した。アリルサルファターゼ活性は French らの方法⁸⁾ により測定した。

タンパク質量は Lowry 法⁹⁾ により求めた。

結 果

1. ミクロソーム電子伝達系成分に及ぼす硝酸イオンと亜硝酸イオンの影響

4 ppm NO₂ をラットに暴露すると血液中の硝酸イオン濃度は 0.1~0.2 mM になる。この程度の濃度の硝酸イオンと亜硝酸イオンがミクロソームの電子伝達系成分に及ぼす影響を検討するため, 肝

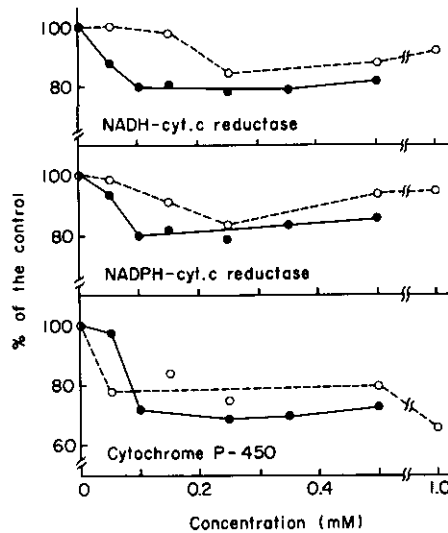


図 1 硝酸ナトリウム及び亜硝酸ナトリウムの肝ミクロソーム電子伝達系成分に及ぼす

Fig. 1 Effects of sodium nitrate and sodium nitrite on components of electron-transport systems of liver microsomes

○, sodium nitrite; ●, sodium nitrate.

臓よりミクロソーム画分を調製しこれらイオンと 37°C で 1 時間インキュベーション後遠心によりミクロソームを回収した。図 1 に硝酸イオンと亜硝酸イオンがミクロソーム電子伝達系成分に及ぼす効果を示した。NADH-チトクロム *c* 還元酵素及び NADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性は硝酸ナトリウムの添加濃度に依存して低下し、0.1 mM で共に 80 % 以下にまで減少した。添加する硝酸ナトリウムの濃度を 0.2 mM 以上にしても活性低下は進行しなかった。亜硝酸ナトリウムの場合、同濃度の硝酸ナトリウムよりもこれら還元酵素の活性に及ぼす効果は小さかった。しかしながら、チトクロム P-450 に対しては硝酸ナトリウムよりも低濃度で低下効果が認められた。

表 1 肝ミクロソーム成分に及ぼす NO₂ 暴露と硝酸ナトリウム処理の効果

Table 1 Effects of NO₂ exposure and NaNO₃-treatment on components of liver microsomes

Components	4 ppm NO ₂ (4 days) ¹			0.1 mM NaNO ₃ (1 hr) ²		
	Control	Exposed	%	Control	Exposed	%
NADPH-cyt. <i>c</i> reductase	19.0±0.8	16.2±1.5	85	684	568	83
Cytochrome P-450	96±5	81±6	84*	298	212	71
NADH-cyt. <i>c</i> reductase	458±29	407±22	89	16488	13355	81
Cytochrome b ₅	67±4	65±2	97	2148	2070	97
Arylsulfatase	10.1±1.2	9.6±1.0	95	388	347	98

¹unit per mg of homogenate protein.

²unit per liver.

**p*<0.05.

表 1 に、4 ppm NO₂ を 4 日間暴露したラットの肝ミクロソーム成分の変化とミクロソーム画分を 0.1 mM 硝酸ナトリウムで処理した場合の変化とを示した。4 ppm NO₂ 暴露によってチトクロム P-450 含量は 84 % (*P*<0.05) に減少し、NADH-及び NADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性も各々対照群の 85 % と減少する傾向を示した。一方、チトクロム b₅ 含量とアシルサルファターゼ活性はほとんど変化しなかった。ミクロソーム画分を 0.1 mM 硝酸ナトリウムで処理した場合、チトクロム P-450 量は対照群の 71 % に低下し NADH-及び NADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性は各々 81 % 及び 83 % に低下した。チトクロム b₅ 含量とアシルサルファターゼ活性はほとんど変化しなかった。従って 4 ppm NO₂ 暴露によるミクロソーム電子伝達系成分の低下は、ミクロソームを 0.1 mM 硝酸イオンで処理した結果と類似していた。

2. NO₂ 暴露と硝酸ナトリウム処理がミクロソームの細画分に及ぼす影響

ミクロソームは比重及び酵素の局在性という点で異質成分からなっている。NO₂ 暴露及び硝酸ナトリウム処理に対して感受性の高いミクロソーム画分が存在する可能性を明らかにするために、

NO_xの肝ミクロソーム成分に及ぼす影響

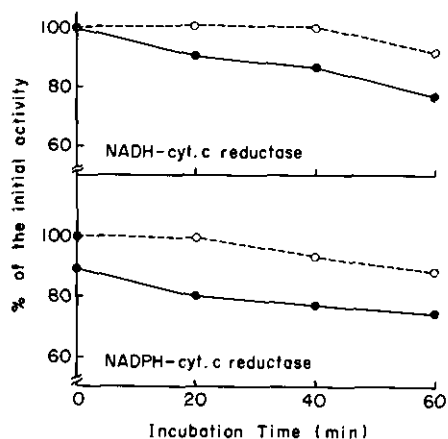


図 2 0.1 mM 硝酸ナトリウム添加による肝ミクロソーム NADH-及び NADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性の経時変化
 Fig. 2 Changes in the activities of NADH- and NADPH-cytochrome *c* reductases of liver microsomes during incubation with 0.1 mM sodium nitrate
 ○, control; ●, addition.

NO₂暴露したラットの肝ミクロソーム及び未暴露ラットから調製したミクロソームを 0.1 mM 硝酸ナトリウムで処理したものをシヨ糖密度勾配遠心により細分画することを試みた。図 2 にミクロソーム画分を 0.1 mM 硝酸ナトリウムと 37°C でインキュベートした際に起こる酵素活性の時間変化を示した。NADH-チトクロム *c* 還元酵素と NADPH-チトクロム *c* 還元酵素活性は 40 分間は硝

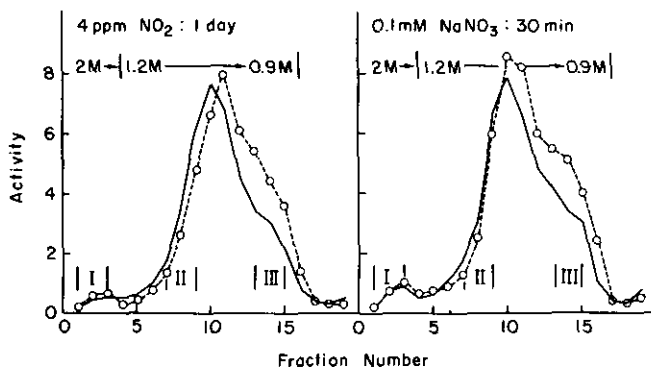


図 3 NO₂暴露ラットの肝ミクロソーム及び硝酸ナトリウム処理ミクロソームのシヨ糖密度勾配遠心法による細分画
 Fig. 3 Subfractionation of liver microsomes prepared from NO₂-exposed rat and incubated with sodium nitrate by density-gradient centrifugations of sucrose
 ○-----○, control; ●-----●, exposed.

酸ナトリウム添加による減少が進行し、40分目以降は無添加の対照群でも両酵素の活性が減少した。そこで0.1 mM 硝酸ナトリウムと37°Cで1時間インキュベーションしたマイクロソーム画分についてシヨ糖密度勾配遠心を行った。

図3にマイクロソーム画分のシヨ糖密度勾配遠心パターンを示した。シヨ糖密度勾配遠心によって破線で示した対照群のマイクロソーム画分はほぼ三つの画分に分かれた(I~III)。4 ppm NO₂暴露群の場合、NADH-チトクロム c 還元酵素活性は最も比重が小さいIIIで著しい活性低下が起こっている。

表 2 ミクロソーム細分画画分の NADH-および NADPH-チトクロム c 還元酵素活性
Table 2 Activities of reductases in microsomal subfractions

		I			II			III		
		Cont	Expo	E/C	Cont	Expo	E/C	Cont	Expo	E/C
NADH-cyt. c reductase (μ mol/min)	TA*	0.92	1.08	1.17	4.04	4.13	1.02	6.21	4.68	0.75
	4 ppm NO ₂									
	SA**	2.88	3.04	1.06	7.62	7.68	1.01	6.06	4.98	0.82
	0.1 mM NO ₃ ⁻									
	TA*	1.43	1.55	1.08	4.80	5.43	1.13	7.55	5.40	0.72
	SA**	2.98	3.04	1.02	6.58	7.05	1.07	5.76	4.26	0.74
NADH-cyt. c reductase (nmol/min)	TA*	44	44	1.10	162	168	1.04	245	158	0.64
	4 ppm NO ₂									
	SA**	136	156	1.15	215	219	1.02	192	134	0.70
	0.1 mM NO ₃ ⁻									
	TA*	49	59	1.20	164	180	1.10	236	170	0.72
	SA**	102	116	1.14	225	234	1.04	180	123	0.68

*Total activity (per ml of fraction); **Specific activity (per mg of protein).

ることが明らかとなった。同様に0.1 mM 硝酸ナトリウム処理を行ったマイクロソームでもNADH-チトクロム c 還元酵素活性の減少は最も比重の小さいIII画分で起こっていた。表2にI, II, III画分のNADH-チトクロム c 還元酵素及びNADPH-チトクロム c 還元酵素の活性が4 ppm NO₂暴露又は0.1 mM 硝酸ナトリウム処理によって受ける変化を示した。比重が大きな画分I及びIIでは4 ppm NO₂暴露, 0.1 mM 硝酸ナトリウム処理いずれの場合でも対照群よりむしろ高い活性を示した。比重の小さな画分IIIは、両酵素とも対照群より低下していた。

考 察

前報においてラットにNO₂を暴露すると肺, 肝, 腎等臓器のマイクロソーム成分が減少することを

報告した¹⁾。本研究ではNO₂がミクロソームに作用する化学形態について明らかにすることを試みた。NO₂は肺胞において硝酸イオンと亜硝酸イオンとなり血液中に溶解する³⁾。これらイオンは体内を循環する過程で一部は臓器内にとりこまれると考えられる¹⁰⁾。4 ppm程度のNO₂をラットに暴露すると血液中の硝酸イオン濃度は数時間後にほぼ定常値となり0.1~0.2 mMの濃度になる⁵⁾。亜硝酸イオンは速かに赤血球に取り込まれヘモグロビンをメト化し硝酸イオンとなる¹¹⁾。従ってNO₂の生体への作用機作を解明しようとする場合、呼吸器以外の臓器では硝酸イオンと亜硝酸イオンとしての作用についても考慮しなければならない。本研究では肝臓よりミクロソーム画分を分離しこれらイオンが電子伝達系成分に及ぼす影響について検討した。その結果、ミクロソーム電子伝達系成分を低下させる効果は、チトクロムP-450を除いて硝酸イオンの方が高いことが明らかとなった(図1)。硝酸イオンは4 ppm NO₂暴露によって血液中に増加する程度の濃度で有効であった。また、NO₂暴露によって影響を受けるのはミクロソーム成分中チトクロムP-450, NADH-チトクロムc還元酵素とNADPH-チトクロムc還元酵素であり、チトクロムb₅とアリルサルファターゼはほとんど影響を受けなかった(表1)。硝酸ナトリウム処理による影響はこれとよく一致しており、更に影響の度合いもほぼ同じであった。NO₂暴露によって比重が小さいミクロソーム画分が特異的にこわれることが明らかとなった(図3)。硝酸ナトリウムの作用も同様に比重が小さいミクロソーム画分に特異的に起った。これらの結果から、NO₂暴露によって血液中に増加する硝酸イオンが肝臓内にも同程度の濃度になると仮定すれば、ミクロソーム電子伝達系成分は硝酸イオンによって減少する可能性を明らかにした。

引用文献

- 1) 三浦 卓・持立克身・彼谷邦光・国本 学(1981): 二酸化窒素暴露のラット臓器内膜成分に及ぼす影響。国立公害研究所報告, 第31号, 147-162.
- 2) Shvorcova, S. and V. Kant (1971): The artero-venous differences in the nitrite and nitrate ion concentrations after nitrogen oxides inhalation. *Cesk. Hyg.*, **17**, 71.
- 3) Goldstein, E., N. F. Peek, N. J. Parks, H. H. Hines, G. P. Steffey and B. Tarkington (1977): Fate and distribution of inhaled nitrogen dioxide in Rhesus monkeys. *Amr. Rev. Resp. Dis.*, **115**, 403-411.
- 4) Case, G. D., J. S. Dixon and J. C. Schooley (1979): Interactions of blood metalloproteins with nitrogen oxides and oxidant air pollutants. *Environ. Res. Dis.*, **20**, 43-65.
- 5) 織田 肇・永澤節子・局 博一・鈴木 明(1981): 一酸化窒素および二酸化窒素の生体内挙動。国立公害研究所研究報告, 第31号, 59-66.
- 6) Omura, T. and S. Takesue (1970): New method for simultaneous purification of cytochrome b₅ and NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. *J. Biochem.*, **67**, 249-257.
- 7) Omura, T. and R. Sato (1964): Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- 8) French, A. P. and J. C. Warren (1967): Properties of steroid sulfatase and arylsulfatase activities of human placenta. *Biochem. J.*, **105**, 233-241.
- 9) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough and A. L. Farr (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

持立克身ら

- 10) 太田庸紀子・山田 理・脇坂一郎(1980): 重窒素二酸化窒素の生体内動的観察。産業衛生学会, 仙台, 707-708。
- 11) Case, G. D., J. S. Dixon and J. C. Schooley (1979): Interactions of blood metalloproteins with nitrogen oxidant air pollutants. *Environ. Res.*, **20**, 43-65.

I-12

オゾン急性暴露に対する各種動物の感受性
——NO₂暴露との比較——

Comparative Studies of Susceptibility of Various Animals to
Short-Term Exposure to Ozone or NO₂

竹中参二¹・堀内博人²・今井 透²
清水不二雄¹・村上正孝¹

Shinji TAKENAKA¹, Hirohito HORIUCHI², Tooru IMAI²,
Fujio SHIMIZU¹ and Masataka MURAKAMI¹

要 旨

オゾン急性暴露に対する各種実験動物の感受性を、NO₂暴露の場合と比較しつつ検討した。この実験に用いられた動物は9系統のマウス、4系統のラット、ゴールデンハムスター、ハートレーモルモットである。

マウスの系統間にはオゾンとNO₂のいずれに対しても顕著な感受性の差が認められた。オゾンに対しては、雄C₃Hと雌C₅₇BLの間に4.8倍のLC₅₀の差があり、NO₂に対しては雌CF₁と雌C₅₇BLの間に2.1倍の差があった。ラットの全ての系統でLC₅₀は、オゾンに対して3.1~4.3 ppm、NO₂に対して39~56 ppmの範囲にあった。ゴールデンハムスターはNO₂に対し高感受性(雌のLC₅₀が22 ppm、雄のLC₅₀が28 ppm)であったが、オゾンに対しては中程度の感受性を示した。30群(15系統の動物のそれぞれ雌雄)におけるオゾンによるLC₅₀とNO₂によるLC₅₀には相関関係が成立し、(相関係数0.52, $p < 0.01$)、LC₅₀の比率の平均値(NO₂によるLC₅₀/オゾンによるLC₅₀)は9.8であった。LC₅₀と肺の変化(肺湿重量と含水量の増加及び形態学的変化)にもよく相関が認められた。

Abstract

Mortality rates of various animals exposed to ozone or NO₂ for 16 hours were compared,

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川116番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 昭和55, 56年度国立公害研究所共同研究員
(東京慈恵会医科大学 〒105 東京都港区西新橋3丁目25番8)
Jikei University, School of Medicine, 3-25-8, Nishishinbashi, Minatoku, Tokyo 105, Japan.

and pulmonary changes caused by 12 hour exposure to 2.6 ppm ozone were examined. 9 strains of mice, 4 strains of rats, Golden hamsters and Hartley guinea pigs were used in this experiment.

The LC_{50} values of mice showed the marked differences among strains, reaching up to the factors 4.8 and 2.1 after to ozone and NO_2 , respectively. All strains of rats examined were moderately susceptible to both air pollutants. Golden hamsters, compared with the other species examined, were highly susceptible to NO_2 , whereas their susceptibility to ozone was moderate. Hartley guinea pigs showed low sensitivity to both ozone and NO_2 .

There was a correlation in the LC_{50} values between of ozone and of NO_2 (correlation coefficient: 0.52, $p < 0.01$) in 30 groups of animals (15 strains of both sexes). The mean of all LC_{50} ratios (LC_{50} to NO_2 exposure/ LC_{50} to ozone exposure) was 9.8. After exposure to ozone, pulmonary changes were well correlated to the LC_{50} values.

はじめに

疫学研究とともに動物を用いた実験的研究が環境基準値を設定する上で有益である。ところが、各種汚染物質に対して実験動物の種または系統による感受性の相違が予想され、ヒトへの外挿の大きな問題とされている。代表的大気汚染物質であるオゾンと NO_2 においても同様の問題があり、すでにいくつかの報告もある^{2,3,4,6,8,10,14})。Hine ら⁵) は 5 種の実験動物の NO_2 に対する感受性の差を明らかにしたが、系統差に関しての言及はない。Goldstein ら⁶) はオゾンに対するマウスの系統による感受性の差を明らかにした。今回、大気汚染におけるオゾンと NO_2 の重要性に鑑み、両者に対する各種実験動物の感受性の相違を詳しく検討することにした。すでに NO_2 に対する感受性の差については、前報¹⁵) で報告したので、ここではオゾン影響を中心に、両者を比較しつつ報告する。

実験材料と方法

1. 実験動物と暴露方法

既報¹⁵) の NO_2 急性暴露実験と同様の動物が使われた。使用動物と匹数の詳細を表 1~3 に示した。同じく NO_2 暴露装置も既報に示した。オゾン暴露には、 NO_2 暴露チャンバーを共用し、オゾン発生器 (三菱オゾンナイザー OS-4 型) で発生したオゾンを、オゾン連続測定器 (モニターラボ製 Model 8410) でモニターし、PID 制御器を用いてフィードバックコントロールした。

2. LC_{50} (50%致死濃度)

1 群 8 匹以上の動物に対して、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 (オゾン暴露では公比 1.4, NO_2 暴露では公比 1.2 の等比級数) 毎に、16 時間の NO_2 暴露を行なった。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 週間の死亡率を求めた。 LC_{50} の算定は Behrens の方法によった。

3. 肺湿重量、肺含水量及び病理組織学的検索

O₃に対する各種動物の感受性

各群6匹の動物に対し2.6 ppmのオゾンを経験後12時間暴露した。暴露直後にネブタール麻酔下腹大動脈から出血死させた。肺湿重量を測定後、病理組織学検査用の左肺を除き、95°Cで5日間乾燥し、乾燥重量を求めた。肺左葉は10%緩衝ホルマリンで固定され、常法に従って病理組織標本作製した。

結 果

表1に、オゾンとNO₂それぞれに対する種々の動物のLC₅₀を示した。

オゾン暴露：マウスの系統差が著しく、感受性が最も高い雄C₃HマウスのLC₅₀が2.3 ppmに対して、感受性の最も低い雌C₅₇BLマウスのLC₅₀は11.1 ppmであった。両者の間には4.8倍の開きがあった。ラットの全ての系統及びゴールデンハムスターは中程度の感受性を示した。ハートレーモルモットは低感受性であった。

NO₂暴露：ゴールデンハムスターが非常に高感受性を示し、雌のLC₅₀は22 ppm、雄のLC₅₀は28 ppmであった。マウスではオゾン暴露と同様に明らかに系統差がみられた。雌のCF₁マウスのLC₅₀が33 ppmに対し雌のC₅₇BLマウスのそれが67 ppmであった。4系統のラットはいずれも中程度の感受性を示した。ハートレーモルモットはオゾン暴露と同様、NO₂に対しても低感受性であった。**オゾン暴露とNO₂暴露の比較：**全ての動物(15系統の雌雄)のオゾンとNO₂暴露に対するLC₅₀には相関が認められた(相関係数0.52, $p < 0.01$)。LC₅₀の比率の平均値(NO₂によるLC₅₀/オゾンによるLC₅₀)は9.8であった。C₃Hマウスでは例外的に、オゾンに対して、高感受性であったが、NO₂に対しては低感受性を示した。ゴールデンハムスターにおいても、NO₂に対して高感受性、オゾンに対して中程度の感受性を示し、逆の傾向であった。

表2に示したように、C₃Hマウスとゴールデンハムスターでは、オゾンとNO₂に対し相反する感受性が明らかに認められた。

オゾン暴露による肺湿重量と肺含水量の変化：表3に、2.6 ppmオゾン12時間暴露後の各動物の肺湿重量と肺含水量を示した。

図1に示したように、両者には密接な相関関係がみられた(9系統のマウス雌雄の相関係数は0.93)。LC₅₀と肺含水量の関係を比較すると、図2に示したように、有意の相関関係が成立していた(9系統のマウス雌雄における相関係数は0.62, $p < 0.01$)。

オゾンに暴露された動物の肺には、肺胞腔内水腫、肺胞壁細胞の壊死性変化そして間質中の多形核白血球の浸潤が著明にみられた。高感受性動物(低LC₅₀値)では、これらの変化が明らかに強く、低感受性動物(高LC₅₀値)では弱かった。

考 察

先に行われたNO₂に対する各種実験動物の感受性実験¹⁵⁾に続いて、オゾンに対する同様の実験をまとめたのが本報告である。特に、オゾンとNO₂との比較に重点がおかれた。先の実験と全く同様

表 1 各種動物のオゾンと NO₂それぞれ 16 時間暴露における LC₅₀値
 Table 1 LC₅₀ of various animals exposed to ozone or NO₂ for 16 hours

		Ozone		NO ₂	
Mice					
C57BL	female	11.1*	(76)**	67*	(40)**
	male	8.8	(96)	64	(40)
BDF1	female	9.1	(76)	60	(24)
	male	7.0	(86)	56	(24)
CDF1	female	6.4	(77)	59	(40)
	male	5.8	(77)	56	(40)
BALB/C	female	5.8	(46)	52	(40)
	male	5.8	(46)	49	(40)
DBA	female	3.7	(36)	45	(48)
	male	4.3	(46)	52	(48)
ddy	female	3.5	(86)	51	(32)
	male	3.5	(107)	48	(40)
ICR	female	3.5	(97)	40	(32)
	male	3.5	(87)	38	(40)
CF # 1	female	2.9	(43)	33	(62)
	male	2.7	(43)	36	(40)
C3H	feamale	2.4	(60)	50	(40)
	male	2.3	(70)	57	(40)
Rats					
Wistar	female	4.3	(39)	45	(48)
	male	4.1	(39)	49	(48)
Fischer	female	4.2	(30)	48	(40)
	male	3.3	(30)	56	(40)
SD	female	3.4	(30)	47	(48)
	male	3.1	(30)	50	(48)
Donryu	female	3.2	(59)	39	(60)
	male	3.1	(79)	47	(60)
Hamster					
Golden	female	4.9	(51)	22	(85)
	male	5.5	(48)	28	(72)
Guinea pig					
Hartley	female	10.3	(40)	50	(56)
	male	8.5	(50)	62	(56)

* 50% lethal concentration according to Behrens method, ppm.

** Number of animals used for the calculation of LC₅₀.

O₃に対する各種動物の感受性

表 2 オゾンまたは NO₂ 16 時間暴露に付する C₃H マウスとゴールデンハムスターの死亡率

Table 2 MORTALITY OF C3H MICE AND GOLDEN HAMSTERS EXPOSED TO NO₂ OR OZONE FOR 16 HOURS

	29 ppm NO ₂	3.6 ppm ozone
Male C3H mice	0/10*	10/10
Female Golden hamsters	7/10	0/10

This experiment was done two-continuous days using the same group of animals.

* NO. dead/NO. tested

に、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。従来報告が高濃度、短時間の暴露による生存時間あるいは死亡率を求めたのに対し、今回の実験では、オゾンと NO₂ ともに 16 時間暴露で致死量となる濃度で暴露された。用いた濃度範囲ではほとんどの動物が実験開始後 12 時間から暴露終了後 1 日にかけて死亡した。

今回のオゾンと NO₂ の比較研究から次の点が明らかになった。

1. マウスにおける系統差は両者でともに顕著である。
2. ラットの系統間には特に大きな感受性の差はみられず、いずれも中程度の感受性である。
3. ゴールデンハムスターは NO₂ に対して高感受性、オゾンに対して中程度の感受性である。
4. ハートレーモルモットは両者に低感受性である。
5. LC₅₀ と肺水腫（肺含水量）にはよく相関がみられる。
6. オゾンと NO₂ に対する各動物の感受性は並行する。ただし、例外として、C₃H マウスとゴールデンハムスターでは相反する結果が観察される。

オゾン及び NO₂ 暴露による急性死は重篤な肺水腫によると考えられる。Gregory⁷⁾ は肺水腫の受容器の存在を提案している。その根拠として、系統発生的変異（系統差による感受性の相違）と個体発生的変異（年齢による感受性の相違）をあげている。受容器の概念は未だ不明確ながら、検討を加えるべき課題であろう。我々の実験では、オゾンと NO₂ のいずれにも、マウスで著しい系統差が認められたが、動物種と感受性には相関がみられなかった。特に、大きさまたは体重との関連はみられなかった。動物種間の肺の解剖学的差異が報告されている¹³⁾ が、感受性には大きな役割を果たしていないかもしれない。むしろ、他の因子、例えば肺胞壁の透過性¹²⁾、肺胞壁細胞の抵抗性^{9,11)} にその原因を求めるべきかもしれない。

我々はこの実験で 6 週令動物のみを使用した。Cabral-Anderson¹⁾ 及び Evans ら⁵⁾ が明らかにしたように、年齢によって感受性に差がみられることが知られている。高週齢動物における感受性も検討されなければならない。

C₃H マウスとゴールデンハムスターがオゾンと NO₂ に対して相反する感受性を示した。オゾン毒

表 3 2.6ppm12時間のオゾン暴露に対する各種動物の肺湿重量と肺含水量
 Table 3 Lung wet weight and lung water content of various animals exposed to 2.6 ppm ozone for 12 hours

		Wet weight	Water content
Mice			
C57BL	female	0.90*±0.06	81.9**±0.81
	male	0.89 ±0.04	81.6 ±0.44
BDF1	female	0.84 ±0.04	82.2 ±0.57
	male	0.88 ±0.10	82.8 ±0.88
CDF1	female	1.08 ±0.16	83.7 ±1.35
	male	0.88 ±0.11	82.1 ±1.09
BALB/C	female	0.95 ±0.06	83.6 ±0.82
	male	1.11 ±0.15	84.4 ±1.06
DBA	female	1.12 ±0.16	84.3 ±1.84
	male	1.08 ±0.12	83.9 ±2.09
ddy	female	1.16 ±0.29	83.1 ±1.45
	male	1.42 ±0.35	85.2 ±1.75
ICR	female	1.03 ±0.20	83.2 ±1.92
	male	1.19 ±0.22	84.6 ±1.62
CF # 1	female	1.17 ±0.24	83.8 ±2.26
	male	0.92 ±0.18	82.1 ±2.10
C3H	female	1.61 ±0.08	88.9 ±0.51
	male	1.44 ±0.07	87.7 ±0.56
Rats			
Wistar	female	0.81 ±0.05	82.4 ±0.68
	male	0.81 ±0.08	81.8 ±0.77
Fischer	female	0.74 ±0.04	81.2 ±0.59
	male	0.80 ±0.05	81.6 ±0.39
SD	female	0.78 ±0.09	81.9 ±1.19
	male	0.84 ±0.16	82.5 ±1.07
Donryu	female	1.02 ±0.24	80.7 ±1.25
	male	0.94 ±0.18	81.7 ±0.77
Hamsters			
Golden	female	1.02 ±0.15	84.0 ±1.20
	male	0.95 ±0.16	82.8 ±1.30
Guinea pigs			
Hartley	female	0.93 ±0.04	82.5 ±0.24
	male	0.90 ±0.07	83.1 ±0.59

* % of body weight

** % of lung wet weight

All values are mean ± SD, with n=6.

O₃に対する各種動物の感受性

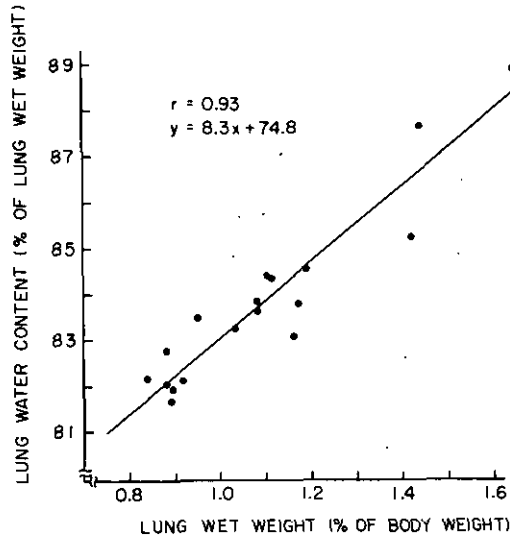


図 1 肺含水量と肺湿重量の相関性

Fig 1 Correlation between lung water content and lung wet weight of mice (9 strains and both sexes)exposed to 2.6 ppm ozone for 12 hours.

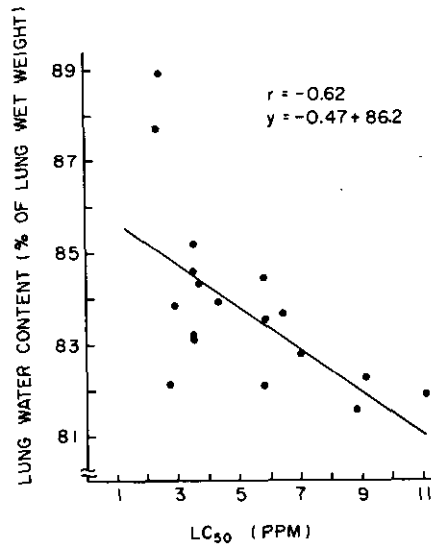


図 2 LC₅₀と肺含水量の相関性

Fig 2 Correlation between LC50 and lung water content of mice (9 strains and both sexes)exposed to ozone.

性と NO₂毒性が全く同一ではないことを示す点で興味深い。

引用文献

- 1) Cabral-Anderson, L. J., M. J. Evans and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats. 1. Morphology. *Exp. Mol. Pathol.*, **27**: 353-365.
- 2) Committee on medical and biological effects of environmental pollutions. (1977): Ozone and other photochemical oxidants. Washington, D. C.: U. S. National Academy of Sciences.
- 3) Cooper, P. (1975): More details on nitrogen dioxide inhalation. *Food Cosmet. Toxicol.*, **13**: 135-139.
- 4) Ehrlich, R. (1966): Effect of nitrogen dioxide on resistance to respiratory infection. *Bacteriol. Rev.*, **30**: 604-614.
- 5) 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**: 336-376.
- 6) 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.
- 7) Gregory, A. R. (1970): Inhalation toxicology and lung edema receptor sites. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **31**: 454-459.
- 8) 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.
- 9) Kato, R. (1977): Comparative biology of detoxication mechanism. *Taisha in Japanese*, **14**: 323-337.
- 10) Morry, 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.
- 11) Oesch, F., D. Raphael, H. Schwind and H. R. Glatt (1977): Species differences in activating and inactivating enzymes related to the control of mutagenic metabolites. *Arch. Toxicol.*, **39**: 97-108.
- 12) Szidon, J. P., G. G. Pietra and A. P. Fishman (1972): The alveolar-capillary membrane and pulmonary edema. *New Engl. J. Med.*, **286**: 1200-1204.
- 13) Tyler, W. S., R. F. Mclaughlin and A. R. Canada (1967): Structural analogues of the respiratory system. *Arch. Environ. Health*, **14**: 62-69.
- 14) Wagner, W. D., B. R. Duncan P. G. Wright and H. E. Stokinger (1965): Experimental study of threshold limit of NO₂. *Arch. Environ. Health*, **10**: 455-466.
- 15) 竹中参二・堀内博人・清水不二雄(1979):二酸化窒素暴露におけるゴールデンハムスターの高感受性。国立公害研究所研究報告, 第8号, 7-25.

I-13

オゾン急性暴露のラット肺及び血液中の
SH化合物に及ぼす影響

Effect of Acute Exposure to Ozone on Sulfhydryls in
Lung and Blood of Rats

河田明治¹

Meiji KAWATA¹

要 旨

0.8, 2, 4 ppm O₃をそれぞれ、7日間、12, 6時間ラットに暴露し、肺に存在する還元型グルタチオン (GSH)、酸化型グルタチオン (GSSG)、非タンパク性SH (NPSH)、タンパク性SH (PSH) 量を測定した。肺の湿重量は、0.8 ppm O₃ 5, 7日間暴露群及び2 ppmと4 ppmのすべての暴露群において有意に増加した。肺のGSHとNPSHは、0.8 ppm暴露群では暴露開始1日目に対照群より低い値を示したが、それ以後急速に増加して3日目には最高値に達し、7日目まで高い値に維持された。2 ppm及び4 ppm群では、GSH、NPSHともに暴露時間とともに著しく減少した。GSH量とNPSH量との間には、いずれの暴露群においても有意な差が見られなかった。肺のPSH量は0.8 ppm群では変化が見られないうが、2 ppm及び4 ppm群で有意に減少した。血液中のGSH量とNPSH量はすべての暴露群で有意な変化が見られなかった。GSSG量は、0.8, 2, 4 ppmの各群で、肺では有意に増加したが、血液では減少の傾向を示した。

Abstract

The levels of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), nonprotein sulfhydryl (NPSH), and protein sulfhydryl (PSH) were examined in the lung and blood after short-term exposure of rats to O₃. Rats were exposed to O₃ at the concentrations of 0.8 ppm, 2 ppm, and 4 ppm for 7 days, 12 h, and 6 h, respectively. The wet weight of lungs increased in the groups exposed to 0.8 ppm O₃ at the 5th and 7th day, and in the groups exposed to 2 ppm and 4 ppm O₃. In the case of 0.8 ppm O₃ exposure, the levels of GSH and NPSH in lungs decreased slightly after 1 day, increased the highest level at the 3rd day, and the elevated levels were maintained thereafter. Exposure to 2 ppm and 4 ppm O₃ resulted in a significant

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

decrease in GSH, NPSH, and PSH levels in lungs depending on the concentrations of O_3 and on the exposure period. There was no significant difference in levels between of GSH and of NPSH in the lungs of both control and exposed rats. Exposure to 0.8-4 ppm O_3 resulted in a significant but small increase in the GSSG level of lungs. Exposure to O_3 did not cause significant changes in GSH and NPSH levels of whole blood, while the GSSG level decreased slightly.

はじめに

大気汚染物質の一つであるオゾン (O_3) は生体に対して酸化的障害を起すことが知られている^{1,2)}。 O_3 は強い酸化性を有し、多くの生体構成成分と反応するが、中でも脂質との反応は過酸化脂質生成の観点から多くの研究が行われている^{3,4,5)}。また SH 化合物は特に酸化に対して不安定な物質であり、酵素や補酵素など生体にとって重要な機能を営むものが多いことから^{6,7)}、 O_3 暴露と生体内 SH 化合物との関係について検討した研究も多い^{2,8)}。しかし、 O_3 暴露において肺に存在する低分子 SH 化合物の代表物質である還元型グルタチオン (GSH) やタンパク性 SH が減少する現象^{2,9,10,11)}を SH 基の酸化によると推定している報告¹¹⁾があるにもかかわらず、酸化体の生成についての研究は少なく不明な点が多い。また比較的低濃度の O_3 暴露では、肺の低分子 SH 化合物が増加するが^{12,13,14)}、GSH 以外の低分子 SH 化合物も増加すると考えられる報告もあり^{2,8)}、 O_3 暴露が GSH 以外の SH 化合物や、これに関連する化合物にどのような影響を及ぼすかについても明らかにされていない。血液中の GSH 又は非タンパク性 SH 化合物 (NPSH) に及ぼす O_3 の影響については、0.5~0.8 ppm の低濃度暴露でもこれらの値が低下することを認めた報告^{15,16)}や、これに対し 0.5 ppm¹⁷⁾、高濃度の 8 ppm 暴露¹⁸⁾でも有意な変化が認められなかった例もあり、いまだ明確な結論が得られていない。

このような O_3 暴露が生体内 SH 化合物に及ぼす影響に関する不明な点を明らかにすることを目的として、ラットに O_3 を暴露し、肺および血液中に存在する GSH、酸化型グルタチオン (GSSG)、NPSH、及び肺のタンパク性 SH (PSH) 量の変動を O_3 濃度と暴露時間との関連において検討した。

方 法

実験には 10~12 週令の Jcl: Wistar 系雄ラットを用い、 O_3 を 0.8 ppm で 1, 3, 5, 7 日間、2 ppm で 4, 8, 12 時間、4 ppm で 2, 4, 6 時間暴露した。ラットをエーテルにより麻酔し、頸動脈から採血したのち直ちに胸部を切開し、肺を採取して -80°C で保存した。ヘパリン処理した血液中の非タンパク性 SH (NPSH) はメタリン酸により除タンパクした後、5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) を用いる方法¹⁹⁾により測定し、還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) は血液を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で溶血、希釈した後、グルタチオンレダクターゼ、DTNB、NADPH を用いる Tietze²⁰⁾の方法により求めた。

肺の NPSH は、約 0.2 g の肺を 5 ml の 5% トリクロロ酢酸 (TCA) 中で破砕し、ホモジネートを

0₃暴露の肺および血液中のSH化合物に及ぼす影響

2,300gで20分間遠心して得た上清を用い、Beutlerの方法¹⁹⁾を応用したDTNB法²¹⁾により求めた。肺のGSHとGSSGはTCA上清を用いてTietzeの方法²⁰⁾により、肺の総SH(TSH)とタンパク性SH(PSH)は、Sedlakらの方法²²⁾に従って以下のように測定した。約0.2gの肺を5mlの0.02M EDTA中でホモジネートとし、pH 8.2のトリス緩衝液、メタノール、DTNBを加えて発色させ、遠心して得られる上清の412nmにおける吸光度よりTSH量を求め、この値から肺のTCAホモジネート上清を用いて求めたNPSH量を差し引くことによりPSH量を求めた。

結 果

肺の湿重量に及ぼす0₃暴露の影響を表1に示した。0.8ppm群では1日目に対照群に対して減少傾向、3日目には増加傾向を示し、これ以外の0.8ppm群および2ppmと4ppm群のすべての暴露期間で肺の湿重量は有意に増加した。

総グルタチオン(GSH+GSSG)と酸化型グルタチオン(GSSG)量を測定し、これらの値から還元型グルタチオン(GSH)量を求めた結果を表2に示した。肺のGSHは0.8ppm群では1日目に対照群より低い値を示したが、3日目には最高値に達し、それ以後ほぼ一定の高い値に維持された。2ppm及び4ppmの高濃度暴露群では、肺のGSHは有意に減少し、暴露濃度、暴露時間に依存して減少する傾向を示した。

肺の総SH(TSH)量と非タンパク性SH(NPSH)量の測定値よりタンパク性SH(PSH)量を求めた結果を表3に示した。TSHは0.8ppm群では対照群との差が見られないが、2ppm及び4ppm群ではすべての暴露群で有意に減少した。NPSHは、0.8ppm群において1日目に減少し、3日

表 1 ラットの肺湿重量に及ぼす0₃暴露の影響
Table 1 Effect of O₃ exposure on wet weight of rat lungs

O ₃ Concentration	Exposure Period	Lung wet weight (g)	
		Control	Exposed
0.8ppm	1day	1.22±0.11	1.15±0.08
	3	1.34±0.20	1.41±0.14
	5	1.27±0.06	1.38±0.05**
	7	1.34±0.12	1.63±0.13**
2ppm	4hour	1.21±0.06	1.46±0.10**
	8		1.69±0.22***
	12	1.18±0.09	2.28±0.22***
4ppm	2hour	1.18±0.08	1.48±0.14***
	4		2.68±0.38***
	6		3.16±0.42***

Values are mean ± SD, n=6.
** : p<0.01, *** : p<0.001

表 2 ラットの肺総グルタチオン(GSH+GSSG), 酸化型グルタチオン(GSSG), 及び還元型グルタチオン(GSH)量に及ぼす O₃ 暴露の影響Table 2 Effect of O₃ exposure on total glutathione (GSH+GSSG), oxidized glutathione (GSSG), and reduced glutathione (GSH) levels in rat lungs

O ₃	Exposure period	A	B	A-2B ^{b)}	$\frac{2B}{A} \times 100$ (%)	
		GSH+GSSG ^{a)}	GSSG (%)	GSH (%)	GSSG in total glutathione	
0.8ppm	Control	1day	1.62±0.14	0.036±0.007 (100)	1.55±0.13 (100)	4.4
		3	1.60±0.14	0.041±0.008 (100)	1.52±0.15 (100)	5.1
		5	1.65±0.18	0.029±0.003 (100)	1.59±0.18 (100)	3.5
		7	1.67±0.10	0.038±0.004 (100)	1.56±0.07 (100)	4.6
	Exposed	1	1.50±0.12	0.048±0.009* (133)	1.46±0.08 (94)	6.4
		3	1.98±0.22*	0.058±0.005*** (141)	1.87±0.22* (123)	5.9
		5	1.96±0.15*	0.047±0.007*** (162)	1.86±0.15* (117)	4.8
		7	2.05±0.21*	0.056±0.007*** (147)	1.88±0.22* (121)	5.5
2ppm	Control	4hour	1.74±0.09	0.035±0.008 (100)	1.69±0.15 (100)	4.0
		12	1.69±0.05	0.040±0.010 (100)	1.61±0.05 (100)	4.7
	Exposed	4	1.24±0.10***	0.055±0.008** (157)	1.13±0.11*** (67)	8.9
		8	1.03±0.23***	0.052±0.008** (149)	0.92±0.23*** (54)	10.1
		12	0.74±0.19***	0.049±0.011 (123)	0.65±0.17*** (40)	13.2
4ppm	Control	2hour	1.72±0.16	0.042±0.006 (100)	1.64±0.15 (100)	4.9
		Exposed	2	1.15±0.08***	0.062±0.004*** (148)	1.02±0.08*** (62)
	Exposed	4	0.55±0.08***	0.054±0.010* (129)	0.44±0.10*** (27)	19.6
		6	0.45±0.09***	0.056±0.007** (133)	0.34±0.09*** (21)	24.9

a): GSSG in total glutathione (GSH+GSSG) is calculated in terms of reduced glutathione (GSH).

b): One mole of GSSG corresponds to two moles of GSH.

Total glutathione (GSH+GSSG), GSSG, and GSH levels are expressed as μ moles / g lung.

Values are mean \pm SD, n=6.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (The value at 8h exposure to 2 ppm O₃ was compared to the control value at 4h.)

目に最高値に達したのちほぼ一定の高い値を示したが、2 ppm 及び 4 ppm 群では暴露時間とともに有意に減少した。PSH 量は 0.8 ppm 群では 5 日目以後に減少傾向、2 ppm 群では 4 時間目に減少傾向を示したのち有意に減少し、4 ppm 群ではすべての暴露群で有意に減少した。

肺の酸化型グルタチオン (GSSG) の測定結果を表 2 に示した。肺の総グルタチオン中に含まれる GSSG 含有率は対照群で 2~5% となり文献値^{20,21)} とよく一致した。0.8, 2, 4 ppm の各暴露群で GSSG 量は有意に増加したにもかかわらず、すべて低い値を示しており、暴露時間とともに増加する傾向は見られなかった。従って 2 ppm 及び 4 ppm 群で肺の総グルタチオン中に含まれる GSSG 含有率が時間に依存して増加する傾向を示すのは GSSG 量の増加ではなく、GSH 量の減少によるためと考えられる。表 2 と 3 の GSSG, GSH, TSH, NPSH, PSH 量は μ moles/g lung の単位で表

0₃暴露の肺および血液中のSH化合物に及ぼす影響

されており、2 ppm 及び 4 ppm 群では暴露濃度と暴露時間に依存して GSH, NPSH, PSH は減少するが、肺の湿重量は増加する。このことから肺湿重量の変化と各 SH 量の変動との関連性を明らかにするため GSH と GSSG を肺の総湿重量当りの値 ($\mu\text{moles/lung}$) で表した結果を図 1 に示した。その結果、GSH は肺の単位湿重量当り、また肺の総湿重量当りのいずれを用いても、GSH の暴露時間に対する変動傾向は表 2 と図 1 とで同一の結果となるが、GSSG は図 1 の如く肺の総湿重量当りで表した場合は表 2 と異なり、暴露濃度と暴露時間に依存して増加する傾向を示した。

血液中に存在する総グルタチオン、GSSG, GSH, NPSH 量に及ぼす 0₃暴露の影響の結果を表 4 に示した。GSSG はそれぞれの暴露群で減少傾向を示したが、GSH, NPSH とともに暴露濃度と暴露時間に依存した減少または増加傾向は見られなかった。

表 3 ラットの肺総 SH (TSH), 非タンパク性 SH (NPSH), 及びタンパク性 SH (PSH) 量に及ぼす 0₃暴露の影響

Table 3 Effect of O₃ exposure on total sulfhydryl (TSH), nonprotein sulfhydryl (NPSH), and protein sulfhydryl (PSH) levels in rat lungs

O ₃	Exposure period	A	B	A-B	
		TSH	NPSH (%)	PSH (%)	
0.8ppm	Control	1day	12.9±0.7	1.61±0.14 (100)	11.3±0.7 (100)
		3	12.1±1.2	1.51±0.18 (100)	10.6±1.0 (100)
		5	12.9±0.9	1.69±0.12 (100)	11.2±0.9 (100)
		7	1.28±1.1	1.61±0.19 (100)	11.2±0.9 (100)
	Exposed	1	13.4±0.8	1.51±0.08 (94)	11.9±0.7 (105)
		3	12.6±0.6	1.85±0.16** (123)	10.8±0.7 (102)
		5	12.6±0.7	1.92±0.17* (114)	10.7±0.6 (96)
		7	12.2±1.5	1.88±0.16* (117)	10.4±1.4 (93)
2ppm	Control	4hour	11.5±0.8	1.64±0.03 (100)	9.9±0.7 (100)
		12	11.5±0.7	1.70±0.10 (100)	9.7±0.7 (100)
	Exposed	4	9.9±0.1*	1.23±0.09*** (75)	8.7±0.9 (88)
		8	9.0±1.7*	0.90±0.20*** (55)	7.6±1.1** (77)
		12	7.1±1.1***	0.71±0.21*** (42)	6.4±0.9*** (66)
4ppm	Control	2hour	11.4±0.9	1.67±0.07 (100)	9.7±0.9 (110)
	Exposed	2	9.4±0.8**	1.13±0.08*** (68)	8.3±0.7* (86)
		4	5.6±0.8***	0.49±0.10*** (29)	5.1±0.7*** (53)
		6	5.3±0.5***	0.43±0.12*** (26)	4.8±0.4*** (49)

TSH, NPSH, and PSH levels are expressed as μ moles/g lung.

Values are mean \pm SD, n=6.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (The value at 8h exposure to 2 ppm O₃ was compared to the control value at 4h.)

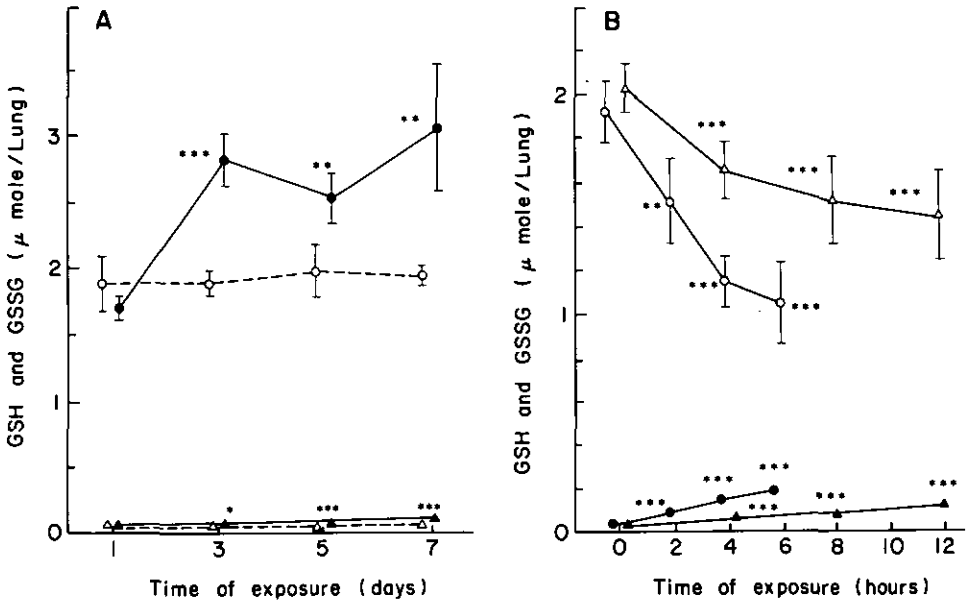


図 1 ラット肺中の還元型および酸化型グルタチオン含量に及ぼす 0.8, 2, 4 ppm O₃ 暴露の影響

Fig. 1 Effects of 0.8, 2, and 4 ppm O₃ exposure on reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) contents in rat lungs

A: 0.8 ppm O₃ exposure

GSH (○: control, ●: exposed)

GSSG (△: control, ▲: exposed)

B: 2 and 4 ppm O₃ exposure

GSH (△: 2 ppm O₃, ○: 4 ppm O₃)

GSSG (▲: 2 ppm O₃, ●: 4 ppm O₃)

GSH and GSSG levels are expressed as μ moles/lung.

Values are mean ± SD, n=6. The values at zero hour of 2 and 4 ppm O₃ exposure are the control values at 4 and 2h, respectively.

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

考 察

還元型グルタチオン (GSH) は SH 基を有する他の化合物の同様に, *in vitro* では容易に酸化され⁶⁾, 特に強い酸化力をもつ O₃との反応では酸化型グルタチオン (GSSG) にとどまらず, 更に酸化の進んだ化合物を生成する²³⁾. グルタチオンは多くの生体組織に存在し, その大部分は還元型をとっており, 酸化型の GSSG 量は総グルタチオン (GSH+GSSG) の 1~5% に過ぎない^{20,24,25)}. Delucia ら¹¹⁾ はラットに高濃度の 4 ppm O₃ を 6 時間暴露した場合でも, *in vitro* の場合と異なり, 肺の GSSG 量は対照群に対して有意な増加を示さないと報告している。また本実験では表 2, 図 1 の如く 0.8, 2, 4 ppm O₃ の各暴露群で肺の GSSG 量は有意に増加したにもかかわらず, すべての暴露群で低い値にとどまった。Mustafa ら⁸⁾ は 0.8 ppm O₃ 暴露において, SH 化合物の酸化体の還元に関する酵素を調べたところ, グルタチオンレダクターゼ, ジスルフィドレダクターゼ, グルタチオン

O₃暴露の肺および血液中のSH化合物に及ぼす影響

表 4 ラット血液中に存在する総グルタチオン(GSH+GSSG), 酸化型グルタチオン(GSSG), 還元型グルタチオン(GSH), 及び非タンパク性SH (NPSH)量に及ぼすO₃暴露の影響

Table 4 Effect of O₃ exposure on total glutathione (GSH+GSSG), oxidized glutathione (GSSG), reduced glutathione (GSH), and nonprotein sulfhydryl (NPSH) levels in blood of rats.

O ₃	Exposure period	A	B	A-2B ^{b)}		
		GSH+GSSG ^{a)}	GSSG (%)	GSH (%)	NPSH (%)	
0.8ppm	Control	1day	1.13±0.10	0.013±0.004(100)	1.10±0.11(100)	1.22±0.07(100)
		3	1.24±0.09	0.011±0.002(100)	1.22±0.08(100)	1.26±0.09(100)
		5	1.35±0.12	0.012±0.004(100)	1.32±0.12(100)	1.29±0.05(100)
		7	1.30±0.06	0.014±0.005(100)	1.27±0.06(100)	1.25±0.05(100)
	Exposed	1	1.18±0.11	0.008±0.002*(62)	1.17±0.11(106)	1.25±0.07(102)
		3	1.18±0.13	0.009±0.002(82)	1.16±0.14(95)	1.20±0.07(95)
		5	1.36±0.07	0.011±0.002(92)	1.33±0.07(101)	1.27±0.06(98)
		7	1.21±0.08	0.011±0.002(79)	1.19±0.08(94)	1.18±0.06(94)
2ppm	Control	4hour	1.15±0.09	0.010±0.002 (100)	1.13±0.11(100)	1.20±0.06(100)
		12	1.19±0.07	0.011±0.003 (100)	1.17±0.06(100)	1.19±0.05(100)
	Exposed	4	1.11±0.10	0.009±0.002 (90)	1.09±0.10(96)	1.19±0.11(99)
		8	1.11±0.13	0.010±0.002 (100)	1.09±0.13(96)	1.24±0.11(103)
		12	1.28±0.08	0.010±0.002 (91)	1.23±0.04(105)	1.22±0.06(103)
		Control	2hour	1.18±0.11	0.012±0.003 (100)	1.15±0.10(100)
Exposed	2	1.06±0.12	0.010±0.003 (83)	1.04±0.12(90)	1.10±0.08*(87)	
	4	1.22±0.08	0.010±0.001 (83)	1.20±0.08(104)	1.25±0.05(98)	
	6	1.30±0.13	0.009±0.002 (75)	1.28±0.13(111)	1.40±0.06(110)	

a): GSSG in total glutathione (GSH+GSSG) is calculated in terms of reduced glutathione (GSH).

b): One mole of GSSG corresponds to two moles of GSH.

Total glutathione (GSH+GSSG), GSSG, GSH, and NPSH levels are expressed as μ moles/ml blood. Values are mean \pm SD, n=6.

*: $p < 0.05$

ジスルフィドトランスヒドロゲナーゼの活性が著しく上昇しており、これらは肺の酸化的障害に対する防御機構であると説明している。従って本実験の結果についても、これらの防御機構によりGSSG量が低い値に抑えられている可能性が考えられる。

Mustafaら^{2,8)}は0.8 ppm O₃を7日間ラットに暴露すると、肺の非タンパク性SH (NPSH)と還元型グルタチオン(GSH)が暴露開始3日目に最大値に達し、対照群に対してNPSHで40%、GSHで30%増加し、その後はそれぞれの値がほぼ一定に維持されると報告している。本実験では表2及び3に示す如く0.8 ppm O₃7日間暴露において、肺のNPSHとGSHはMustafaら^{2,8)}の結果と同

様に3日目に最大値に達したのちその値は維持されたが、いずれも対照群の14~23%の増加範囲内にあり、NPSH値とGSH値との間に有意な差は認められなかった。このことは、O₃の比較的濃度暴露により肺の低分子SH化合物は増加するが、その大部分はGSHであることを示している。このような低濃度O₃暴露による肺のGSH増加についての要因を追求するためには、NO₂暴露実験²¹⁾の場合に指摘した如く、暴露群のGSSG値が著しく低いことから、SH化合物の酸化体の還元に関与する酵素だけでなく、GSHの合成と分解に関係ある酵素系^{26,27)}の活性についても検討する必要がある。

酸化的条件下では生体中に混合ジスルフィドの生成することが知られている^{28,29)}。Dewciaら¹¹⁾は高濃度のO₃暴露で肺のGSHが減少するにもかかわらず、GSSGの増加が認められないことはGSHとPSHとの間に混合ジスルフィドが生成するためと説明している。しかしその証明のために種々検討を行っているが、いまだ明確な結果は得られていない。表2及び表3に示す如く、2ppmと4ppm暴露群では肺に含まれる総グルタチオン量よりも多い量のPSHが減少することはタンパク性SH間におけるジスルフィド生成の可能性を示唆しており、O₃の肺に対する酸化的障害を解明するためには、GSHが混合ジスルフィド以外の物質へ変化する経路についても検討する必要がある。

Buckleyら¹⁵⁾はヒトに対して0.5ppm O₃ 2.75時間暴露で、Chowら³⁰⁾はビタミンE欠乏食で飼育されたラットの0.8ppm O₃暴露で赤血球中のGSHが有意に減少することを認めたが、これに対してChowら¹⁷⁾は0.5ppm O₃ 7日間(1日8時間)暴露したラット及びサルで、Goldsteinら¹⁸⁾は8ppm O₃ 4時間暴露したマウスで赤血球中のGSHは有意な減少を示さないと報告している。本実験では表4に示す如く、0.8, 2, 4ppmの各暴露群で血液中のGSSGは減少傾向を示したが、GSH及びNPSHには有意な変化が見られなかった。したがって、O₃暴露は標的臓器である肺とことなり、赤血球に対してSH化合物を再現性よく変動させるほどの酸化的障害を及ぼさないと考えるべきなのかも知れない。ラットの血漿中のGSH量は3~5 μmoles/l^{20,31)}と著しく低く、血液中のGSHの大部分は赤血球中に存在する。上記のO₃暴露実験^{15,17,18,30)}において、赤血球中のグルタチオンペルオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ等の酵素活性が測定されているが、これらの酵素活性とO₃の暴露濃度、暴露時間との関連性は示されていない。本実験で、高濃度O₃暴露においても血液中のGSSGが低く、GSHが有意な変化を示さなかった要因を明らかにするためには、肺の場合と同様に⁸⁾、赤血球中に存在するSH化合物の酸化体の還元に関与する酵素の活性についても検討する必要があると考えられる。

引用文献

- 1) Lee, S. D. ed. (1977): Biochemical Effects of Environmental Pollutants. Ann Arbor Science, Mich.
- 2) Mustafa, M. G. and D. F. Tierney (1978): Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide toxicity. Amer. Rev. Resp. Dis., **118**, 1061-1090.
- 3) Chow, C. K. and A. L. Tappel (1972): An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. Lipids, **7**, 518-524.

0₃暴露の肺および血液中のSH化合物に及ぼす影響

- 4) 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**, 311-319.
- 5) 嵯峨井勝・白石不二雄・河田明治(1979): 肺および赤血球の peroxidative metabolic pathway に及ぼす二酸化窒素の影響。国立公害研究所研究報告, 第8号, 137-147.
- 6) Jocelyn, P. C. (1972): *Biochemistry of the SH Group*. Academic Press, New York.
- 7) Greenberg, D. M. ed. (1975): *Metabolism of sulfur Compounds, Metabolic Pathways*, Vol. II, Academic Press, New York.
- 8) Mustafa, M. G., A. D. Hacker, J. J. Ospital, M. Z. Hussain and S. D. Lee (1977): Biochemical effects of environmental oxidant pollutants in animal lungs. in *Biochemical Effect of Environmental Pollutants*, S. D. Lee ed., Ann Arbor Science, Mich., 78-81.
- 9) Mountain, J. T. (1963): Detecting hypersusceptibility to toxic substance. *Arch. Environ. Health*, **6**, 357-365.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Dixon, J. R., W. D. Wagner, T. D. Martin, R. G. Keenan and H. E. Stokiner (1966): Metal Shifts as early indicators of response from low-grade pulmonary irritation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **9**, 225-233.
- 13) 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.
- 14) Fukase, O. (1980): The effects of gaseous air pollutants on peroxidative metabolism in mouse lung. *日本衛生学雑誌*, **34**, 777-792.
- 15) Buckley, R. D., J. D. Hackney, K. Clark and C. Posim (1975): Ozone and human blood. *Arch. Environ. Health*, **30**, 40-43.
- 16) Clark, K. W., C. I. Posim and R. D. Buckley (1978): Biochemical response of squirrel monkeys to ozone. *J. Toxicol. Environ. Health*, **4**, 741-753.
- 17) Chow, C. K., M. G. Mustafa, C. E. Cross and B. K. Tarkington (1975): Effect of ozone exposure on the lungs and the erythrocytes of rats and monkeys: relative biochemical changes. *Environ. Physiol. Biochem.*, **5**, 142-146.
- 18) Goldstein, B. D., B. Pearson, C. Lodi, R. D. Buckley and O. J. Balchum (1968): The effect of ozone on mouse blood in vivo. *Arch. Environ. Health*, **16**, 648-650.
- 19) Beutler, E. (1975): *Red Cell Metabolism*. 2nd Ed., Grune and Stratton, p. 112.
- 20) Tietze, F. (1968): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.*, **27**, 502-522.
- 21) 河田明治(1981): 二酸化窒素亜急性暴露のラット肺SH化合物に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告第31号, 109-115.
- 22) 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.
- 23) Menzel, D. B. (1971): Oxidation of biologically active reducing substances by ozone. *Arch. Environ. Health*, **23**, 149-153.
- 24) Srivastava, S. K. and E. Beutler (1968): Accurate measurement of glutathione content of human, rabbit, and rat red blood cell and tissues. *Anal. Biochem.*, **25**, 70-76.
- 25) Harrap, K. R., R. C. Jackson, C. A. Smith and B. T. Hill (1973): The occurrence of protein-bound mixed disulfides in rat tissues. *Biochem. Biophys. Acta*, **310**, 104-110.
- 26) Meister, A. (1973): On the enzymology of amino acid transport. *Science*, **180**, 33-39.
- 27) Meister, A. (産賀敏彦訳) (1976): r-グルタミル残基の酵素と機能。生化学, **48**, 155-166.
- 28) Mannervik, B. and S. A. Eriksson (1974): Enzymatic reduction of mixed disulfides and thiosulfate esters. in

Glutathione, L. Flohé, H. C. Benöhr, H. Sies, H. D. Waller, and A. Wendel ed., Academic Press, New York, 120-132.

- 29) Menzel, D. B., R. J. Slaughter, A. M. Bryant and H. O. Jauregui (1975): Heinz bodies formed in erythrocyts by fatty acid ozonides and ozone. *Arch. Environ. Health*, **30**, 296-301.
- 30) Chow, C. K. and J. J. Kaneko (1979): Influence of dietary vitamin E on the red cells of ozone-exposed rats. *Environ. Res.*, **19**, 49-55.
- 31) Hänberle, D., A. Wahlläder and H. Sies (1979): Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathione concentration and redox state in anaesthetized rats. *FEBS Lett.*, **108**, 335-340.

オゾン亜急性暴露の免疫応答に及ぼす影響

Effect of Subacute Exposure to Ozone on Antibody Response

藤巻秀和¹・小澤 仁²・今井 透²・村上正孝¹

Hidekazu FUJIMAKI¹, Masashi OZAWA², Toru IMAI²
and Masataka MURAKAMI¹

要 旨

0.4 ppm 及び 0.8 ppm オゾン (O₃) の 4 週間暴露による BALB/C 雄マウスの抗体産生能に及ぼす影響について検討した。

In vivo での抗 SRBC 抗体産生は、0.8 ppm O₃ 2 週間暴露により抑制されたが、4 週間暴露では逆に、対照群に比べ亢進する傾向がみられた。0.4 ppm O₃ 暴露では、対照群との間に差はみられなかった。

In vitro 系では、0.8 ppm O₃ 2 週間暴露により抗 SRBC PFC, 抗 DNP PFC 応答の抑制が観察された。4 週間暴露では、抗体産生の抑制はみられなかった。

これらの結果は、O₃ 2 週間暴露は、マウスの免疫応答を著明に抑制することを示唆している。

Abstract

To evaluate the systemic effect of ozone(O₃) exposure on antibody response, this experiment was performed. BALB/c mice were continuously exposed to 0.4 ppm and 0.8 ppm O₃ for 4 weeks. *In vivo* primary antibody response to SRBC in exposed mice was suppressed by 0.8 ppm O₃ exposure for 2 weeks compared to that in control mice. However, the antibody response in mice exposed for 4 weeks at 0.8 ppm was slightly enhanced. *In vitro* primary antibody response to SRBC and DNP-Ficoll in exposed mice was significantly suppressed by exposure to 0.8 ppm O₃ for 2 weeks, but the antibody response of mice exposed for 4 weeks remained at normal levels. Any detectable effect of 0.4 ppm O₃ was not found

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 昭和 56, 57 年度国立公害研究所共同研究員
(東京慈恵会医科大学 〒105 東京都港区西新橋 3 丁目 25 番 8)
Jikei University, School of Medicine, 3-25-8, Nishishinbashi, Minatoku, Tokyo 105, Japan.

in antibody response to SRBC.

はじめに

O₃暴露により、肺胞マクロファージの数やその貪食能が低下し、感染に対する抵抗性が低下することを示唆する報告がある (Coffin ら¹⁾, Dowell ら²⁾, Goldstein ら³⁾, 磯村ら⁴⁾。更に, Campbell と Hilsenroth⁵⁾ は, 0.59 ppm の O₃ に暴露されたマウスでは, トキシドで免疫したあと, トキシンを投与されると, 対照群に比べ, 致死率や疾病率が増すことを報告している。0.5 ppm 及び 2 ppm O₃ 急性暴露による一次免疫応答の抑制も報告されている (瀬戸⁶⁾)。

これらのことから, O₃ 暴露により免疫応答が影響をうけることを推定できるが, 実験報告が少なく, 詳細は不明である。

我々は, これまでに, NO₂ の亜急性暴露により一次免疫応答の抑制がみられることを報告した⁷⁻⁹⁾。本研究では, O₃ 亜急性暴露による一次免疫応答に及ぼす影響を調べるとともに, NO₂ 暴露実験の結果と比較検討することを目的として, 以下の実験を行った。

方 法

実験動物として, 6週令の CRJ: BALB/c 雄マウスを用いた。

O₃ 暴露条件は, 0.4 ppm と 0.8 ppm の濃度で各 4 週間とした。暴露チャンバーは, 容量 1.8 m³ のものを用い, チャンバー内温度は, 24~26°C, 湿度は, 50~60% であった。対照群として, O₃ を含まない清浄空気, 暴露群と同一条件で暴露したものを用いた。暴露時の餌は, 新しいものと毎日交換し, 水は, 一日おきに交換した。

免疫応答の検索には, 抗原として羊血球 (SRBC: 5×10⁷/mouse) と DNP-Ficoll (0.25 µg/mouse) を用い, 暴露後静注した。4~5 日後に既報の方法⁷⁾ で, 脾臓中の抗体産生細胞数 (PFC) の算定と, 血清中の血球凝集素価 (HA) の測定とを行って抗体産生能を調べた。

In vitro 系での検索は, 以下のように行った。暴露後, マウスを屠殺し, 脾臓をとりだし細胞浮遊液にして, 細胞数を調整した。それに, 抗原として SRBC (1×10⁷/well), あるいは, DNP-Ficoll (0.025 µg/well) を加えて培養した。培養は, すでに報告⁹⁾ した条件で行った。3~5 日後に, 各 well 当たりの PFC の数を算定した。

暴露後の脾臓中の T 細胞・B 細胞の比率を調べるため, 抗 Thy1 抗血清と, FITC-ヤギ抗ウサギ IgG 抗血清とを用いた間接法と, FITC-ウサギ抗マウス IgG 抗血清を用いた直接法とによる免疫蛍光法での検索を行った。

結 果

O₃ 4 週間暴露で, 体重の増加には, 対照群と暴露群との間に変化はみられなかった。

2 週間と 4 週間暴露による脾臓, 胸腺の湿重量の変動を表 1 に示した。脾臓重量は, 0.8 ppm O₃

O₃暴露の免疫応答に及ぼす影響

2週間、4週間の両暴露で、対照群に比べ増加の傾向を示した。4週間暴露後、脾臓中のT、B細胞の比率を求めると、対照群に比べ、T細胞で11.1%、B細胞で20.9%の増加がみられた。胸腺重量は、2週間暴露では減少がみられたが、4週間暴露では、逆に増加傾向が認められた。0.4 ppm O₃暴露では、ほとんど差はみられなかった。

表 1 O₃暴露の脾臓と胸腺重量に及ぼす影響

Table 1 Effects of subacute exposure to O₃ on spleen and thymus of exposed mice

	O ₃ concentrations (ppm)	spleen weight (mg) ^a		thymus weight (mg)	
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
2weeks	control	83±1	99±7	43±2	45±2
	0.4	99±3**	105±2	44±2	47±1
	0.8	117±4**	101±3	34±3*	32±1**
4weeks	control	132±5	140±5	54±2	52±4
	0.4	137±5	151±5	58±1	61±2
	0.8	145±3	172±11*	63±2*	65±4

p*<0.05, *p*<0.01, Parameters differing from control levels by Student's *t* test, ^a Each value represents the mean ± SE of five mice.

*In vivo*での抗SRBC PFC 応答は、0.8 ppm O₃ 2週間暴露では抑制されたが、4週間暴露では、対照群に比べ増加の傾向が認められた(表2)。血清中でのSRBCとDNPに対する抗体価に、2週間、4週間(表3)のO₃暴露で有意な差はみられなかった。

*In vitro*系における一次免疫応答へのO₃の影響を表4に示した。0.8 ppm 2週間暴露では、抗SRBC PFC、抗DNP PFC 応答で共に抑制がみられたが、0.4 ppm O₃ 2週間暴露では、ほとんど差はみられなかった。4週間暴露では、抗SRBC PFC、抗DNP PFC 応答で、対照群と暴露群との間に有意な差はみられなかった。

表 2 O₃暴露の抗SRBC PFC 応答に及ぼす影響

Table 2 Effect of subacute exposure to O₃ on *in vivo* anti-SRBC antibody response

O ₃ concentrations (ppm)	No. of PFC ^a	
	2weeks	4weeks
control	3.04±0.27 ^b	1.31±0.07
0.4	2.30±0.29	1.54±0.10
0.8	2.28±0.18*	1.67±0.09*

^a X 10⁻⁵ per spleen,

^b Each value represents the mean ± SE of five mice.

* *p*<0.05, Parameters differing from control levels by Student's *t* test.

表 3 O₃暴露のHA反応に及ぼす影響
Table 3 Effect of subacute exposure to O₃ on HA responses

O ₃ concentrations (ppm)	anti-SRBC antibody	HA titer ^a	anti-DNP antibody
control	8.0±0.0 ^b		9.1±0.3
0.4	8.3±0.1		9.7±0.6
0.8	8.4±0.2		9.4±0.2

^a log₂ titer (reciprocals).

^b Each value represents the mean ± SE of five mice which were exposed for 4weeks.

表 4 O₃暴露の *in vitro* 一次免疫応答に及ぼす影響
Table 4 Effects of subacute exposure to O₃ on *in vitro* primary antibody responses

O ₃ concentrations (ppm)		2weeks		4weeks	
		Day3	Day5	Day3	Day5
A, anti-SRBC PFC ^a	control	298±41 ^b	2955±98	118±13	790±85
	0.4	233±16	2710±111	133±19	593±47
	0.8	130±18	755±96**	100±14	545±76
B, anti-DNP PFC	control	170±25	303±36	73±5	215±35
	0.4	150±20	225±35	75±6	195±16
	0.8	83±11	93±9**	69±6	200±5

^a PFC responses were assayed on Day 3 and Day 5 of the culture.

^b Each value represents the mean ± SE of four to five wells.

***p*<0.01, Parameters differing from control levels by Student's *t* test.

考 察

今回の実験で、0.8 ppm O₃2週間暴露により一次免疫応答の抑制が観察された。同時に、胸腺重量も対照群に比べ有意に減少していた。0.4 ppm O₃暴露では、ほとんど影響はみられなかった。

ところで、暴露を更に2週間延長し、4週間連続暴露にすると、一次免疫応答は亢進する傾向にあった。胸腺重量も、同様に、対照群に比べ増加する傾向にあり、一次免疫応答の抑制、亢進と、胸腺重量の減少、増加が平行してみられた。これらの結果から、一次免疫応答の変動が、T細胞へのO₃暴露による影響に起因する可能性が示唆された。一方、*in vitro*での結果は、2週間暴露で、抗DNP PFC応答の抑制を示しているので、B細胞の活性も低下していることが示唆された。

本研究で観察されたO₃2週間暴露による免疫反応の抑制は、これまでに報告されているCoffinら¹⁾や瀬戸⁶⁾の急性暴露の結果及びCampbellとHilsenroth⁵⁾の亜急性暴露の結果と一致するものである。

Oseboldら¹⁰⁾は、0.8 ppm O₃暴露により肺に及ぼされる障害のピークは、暴露4日目頃であるこ

とを示唆している。従って、O₃暴露の免疫応答への影響は、短期暴露に現れて、長期の暴露になると、Dungworthら¹¹⁾が報告しているように、細胞レベルや酵素レベルでの変動により影響が回復するのかもしれない。今回の結果でも、4週間暴露で、暴露群の一次免疫応答が対照群に比べて上昇する傾向にあったことと、脾臓の重量が増加したことは、その現象が起こっていることを示しているのかもしれない。

ところで、これまで、我々は、NO₂の免疫応答への影響について検索してきた。その結果と、今回のO₃暴露の結果とを比較すると、O₃暴露による脾臓・胸腺重量の増加と一次免疫応答の亢進傾向などは、NO₂暴露では観察できなかった現象である。Goldsteinら¹²⁾も、肺胞マクロファージのコンカナバリンAに対する反応が、O₃暴露とNO₂暴露とでは異なることを報告している。O₃とNO₂共に強い酸化力をもつ物質ではあるが、生体に及ぼす影響については、このように著明に作用を異にする点があるようである。

現在、IgE抗体産生に及ぼすO₃暴露の影響について検索中である。

引用文献

- 1) Coffin, D. L., D. E. Gardner, R. S. Holzman and Wolock, F. J. (1981): Influence of ozone on pulmonary cells. *Arch. Environ. Health*, **16**, 633-636.
- 2) Dowell, A. R., C. L. A. Lohrbauer, D. Hurst and Lee Si Duc. (1970): Rabbit alveolar macrophage damage caused by *in vivo* ozone inhalation. *Arch. Environ. Health*, **21**, 121-127.
- 3) Goldstein, E., W. S. Tyler, P. D. Hoepflich and C. Eagle (1971): Ozone and the anti-bacterial defense mechanisms of the murine lung. *Arch. Intern. Med.*, **127**, 1099-1102.
- 4) 磯村公郎・深瀬 治・渡辺 弘 (1976): オゾンの肺胞マクロファージ増殖能への影響。大気汚染研究, **11**, 39-43.
- 5) Campbell, K. I. and R. H. Hilsenroth (1976): Impaired resistance to toxin in toxoid-immunized mice exposed to ozone or nitrogen dioxide. *Clinic. Toxicol.*, **9**, 943-954.
- 6) 瀬戸 博(1975): オゾンによる液性免疫機構への影響。医学のあゆみ, **94**, 250-251.
- 7) 藤巻秀和・清水不二雄(1979): 二酸化窒素の急性及び亜急性暴露の免疫反応に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告第8号, 61-70.
- 8) 藤巻秀和(1981): 二酸化窒素亜急性暴露のリンパ球に及ぼす影響。In vitro系での検索。国立公害研究所研究報告, 第31号, 195-200.
- 9) Fujimaki, H., F. Shimizu and K. Kubota (1982): Effect of subacute exposure to NO₂ on lymphocytes required for antibody responses. *Environ. Res.*, **29**, 280-287.
- 10) Osebold, J. W., S. L. Owens, Y. C. Zee, W. M. Dotson and D.D. La Barre (1979): Immunological alterations in the lungs of mice following ozone exposure: changes in immunoglobulin levels and antibody-containing cells. *Arch. Environ. Health*, **34**, 258-265.
- 11) Dungworth, D. L., W. L. Castleman, C. K. Chow, P. W. Mellick, M. G. Mustafa, B. Tarkington and W. S. Tyler (1975): Effect of ambient levels of ozone on monkeys. *Fed. Proc.*, **34**, 1670-1674.
- 12) Goldstein, B. D., S. J. Hamburger, G. W. Falk and M. A. Amoroso (1977): Effect of ozone and nitrogen dioxide on the agglutination of rat alveolar macrophages by concanavalin A. *Life Sci.*, **21**, 1637-1644.

I-15

実験小動物のための呼吸流速・流量測定用リニアライザーの開発

**A Linearizer for Measurements of Respiratory Velocity and Flow-
Volume for Experimental Small Animals**

清水 明²・鈴木 明¹・局 博一¹

Akira SHIMIZU,² Akira K. SUZUKI¹ and Hirokazu TSUBONE¹

要 旨

本報告はラットの吸気量あるいは呼気量を呼吸流速曲線から求める装置について述べている。この装置は実験小動物の呼吸生理及び有害ガスを暴露した動物の生理学（代謝学）的变化の検索のために計画され、製作され、改良されてきた。この装置の機能、一回換気量、分時換気量及び呼吸数がこの新しい装置を用いて、麻酔ラットで検討され、他の研究者の結果と比較された。これらの結果から本装置は、ラットの呼吸生理学及び代謝に関する研究に使用できると結論された。

Abstract

The present report describes an apparatus for measurements of inspired volume and expired volume using integration method of respiratory velocity. This apparatus was designed, fabricated and improved for the study of respiratory physiology of experimental small animal and of physiological (metabolic) changes in animal exposed to noxious gases. A study was made on the function of this apparatus and also on the tidal volume, minute volume and respiratory rate of anesthetized rats using this new apparatus in comparison with results obtained by other investigators. It is concluded from these results that the present apparatus can be satisfactorily used in study on respiratory physiology and metabolism of rats.

はじめに

近年、Diamond and O'Donnel⁷⁾、Holub and Frank¹¹⁾、Koshら¹²⁾そして Sinetら²²⁾は、実験

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Engineering Division, Yatabe-machi, Tsukuba Ibaraki 305, Japan

小動物における肺機能の一般的換気力学指標を測定する新しい改良した方法を報告した。そしてこれらの報告は種々の動物の換気力学の指標をよく特徴づけている。しかしながら、上述した方法の大部分は spirometry あるいは body pletysmography であるため、これらの方法によって呼吸流速及び呼吸流量を容易にかつ正確に測定することは困難であった。呼吸流速及び換気量のより正確な測定は、ともに生体の呼吸機能及び代謝状態を知る上で非常に重要な手法である。家兎やイヌのような中型の実験動物では、呼吸流速が早く換気量が多いため比較的容易に測定することができる。しかしながら、ラットやマウスのような小動物では、呼吸量が小さいため2点間の差圧による流量測定は困難であった。その第一の問題点は、2点間で測定する差圧が必ずしも流速と直線比例関係にあるとは限らず、多くの場合、図1に示すように曲線になるためである。このことは、実際の気体の流れは層流だけでなく層流と渦流が混合しているために2点間の差圧が一次回帰式をとらないためである。2点間の差圧 (Δp) とガス流量との関係は層流の場合 Poiseuille の法則によって次式で規定される。

$$\Delta p = \frac{8\mu}{\pi r^4} \times \dot{V} \quad (1)$$

ここで μ : ガス粘性 (単位ポイズ)

l : 導管の長さ

r : 導管の半径

ρ : レイノルズ数

V : 流量

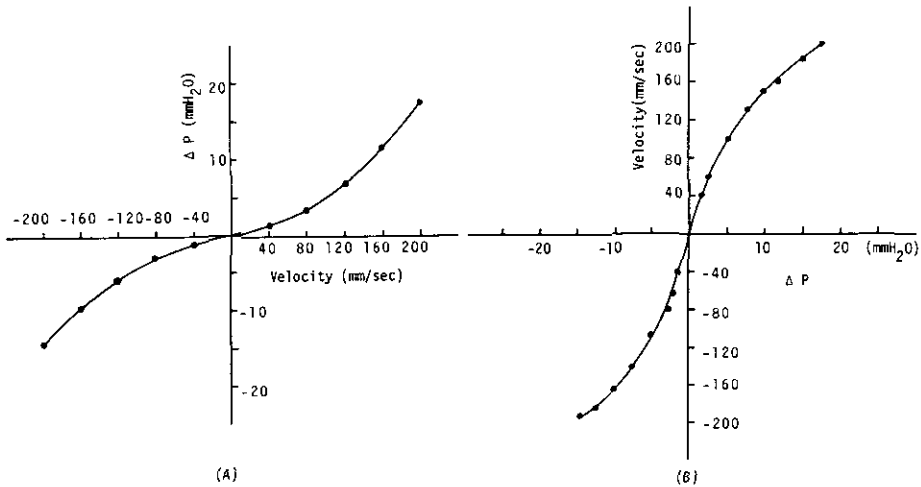


図 1 流速と二点間の差圧 (Δp) との関係
A: 補正前の曲線, B: 補正後の曲線

Fig. 1 Relationship between difference pressure (Δp) and flow velocity
A: real curve, B: Calibrated curve

この場合 Δp はガス流の一次式で表せるが、乱流が生じている場合は

$$\Delta p = \frac{\rho}{4\pi^2 r^3} \times \dot{V}^2 \quad (2)$$

で Δp はガス流量に関して二次式で表される。實際上、理想気体を想定できないので、ガスの流れ方は層流と乱流成分との混合と考えられる。すなわち

$$\Delta p = K_1 \dot{V} + K_2 \dot{V}^2 \quad (3)$$

ここで K_1 及び K_2 はそれぞれ層流と乱流抵抗である。上述の曲線を較正して、直線化し、正確な流速を測定し、流速の積分によってガス流量を求めるために本装置が開発された。

本報告では、本装置の機能について述べるとともに、本装置を使用して、麻酔下のラットにおける一回換気量 (V_T)、分時換気量 (\dot{V}_E)、呼吸数 (RR) が測定され、他の研究者の結果と比較された。なお本装置では、流速用差圧トランスジューサーからの出力の非直線性を補正して圧力と比例関係に規正する折線近似方式による関数発生器（以下リニアライザーと呼ぶ）と、入力電圧をインパルス数に変換してそのパルスをカウントする積分器を組合わせて、従来の解析手法を一度に行える装置にした。

材料と方法

1. 装置の機能

図2は、本装置のブロックダイアグラムを示す。差圧トランスジューサー（トヨタ、DD-102 S-0, 1 F）からの信号は、リニアライザー部に入り、圧力とリニアライザー出力が比例関係になる様に処理される。次の絶対値回路は、V/F コンバータ（入力電圧に比例した周波数のパルスを発生させる電圧対周波数変換器）の入力特性が片極性であるため、リニアライザー出力の負極性の信号を、正

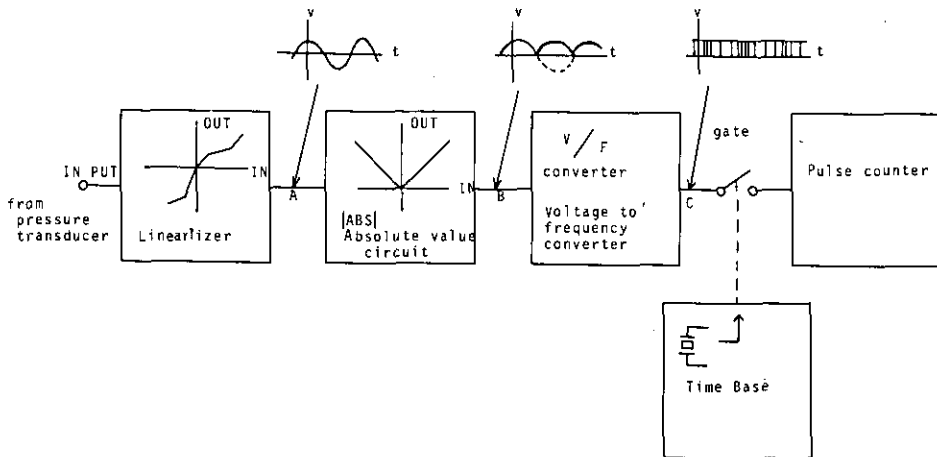


図 2 本装置のブロックダイアグラム
Fig. 2 A scheme of system block diagram

極側へ折り返す働きをするいわゆる全波整流回路である。絶対値回路からの信号は、V/Fコンバーターに入り入力電圧に比例した周波数のパルスに変換される。このパルス出力を、必要とする時間（例えば、15秒、30秒、1分）だけデジタルカウンターで計数するようにゲートをコントロールすれば、カウンターの値から、差圧力の平均値及び積算値を求めることができる。

2. ラットにおける実験例

20週令と40週令のWistar系ラットを使用した。ラットは市販の餌と上水で飼育された。ペントバルビタール・ソディウム (30 mg/kg B.W.) 静注後、気管を露出させ、流速測定器のついた気管カニューレを気管に接続させ自発呼吸時の流速の変化を上述の装置に電気シグナルとして出力し、上述の装置で処理させ、一回換気量 (V_T)、分時換気量 (\dot{V}_E)、呼吸数 (RR) を測定した。

結 果

図3は、本装置に三角波を入力した場合の各部の波形を示す。図3(A)は、入力(上の波形)に対するリニアライザーの出力(下の波形)を比較したものであり、図2に於けるA点の波形である。この時リニアライザーは、入力電圧が±2V以内の時は入力をそのまま出力し、入力電圧が+2Vを越えると若干増幅し、入力電圧が-2Vを越えると若干減衰する様に入出力特性を調整してある。すなわち、入力電圧の正負2Vの位置に折点を持つ入出力特性になっている。

図3(B)は、リニアライザーからの波形(上の波形)を絶対値回路に通した時の出力波形(下の波形)を比較したものであり、図2に於けるA及びB点の波形にあたる。ここでは入力波形の負極性の部分が極性のみ反転されて出力されている。

図3(C)はV/Fコンバーターの入出力波形を示す(図2のB及びC点に相当する)。入力電圧(上の波形)が高いほど出力パルス(下の波形)の頻度が多くなっている。

図4は、各種の入力波形に対する本装置の周波数特性を示す。横軸は周波数、縦軸はカウンターの読みを相対値で示す。この中で特に方形波の特性が悪化しているのは、内部に使用されているOPアンプのスルーレートの影響と考えられるが、実際の呼吸波形は方形波ではないので、この周波数特性は測定上あまり問題とならない。また本装置が使用されるのは、数Hz~7Hz程度であるので周波数特性としては十分である。

次に、麻酔下ラットにおける呼吸流速積分法で測定した一回換気量 (V_T)、分時換気量 (\dot{V}_E) 及び呼吸数を表1に示した。また表1には他の研究者の結果も載せてある。10週令と20週令の体重は、他の研究者の使用動物より重く、 V_T もまた大きい傾向を示した。10週令のラットの \dot{V}_E は Paleček の結果よりわずかに小さかったが、20週令のラットのそれは Crosfill and Widdicombe の結果とほぼ一致していた。本実験例における V_T と \dot{V}_E は週令差が明瞭で、両者のパラメーターはラットの年齢に依存していた。

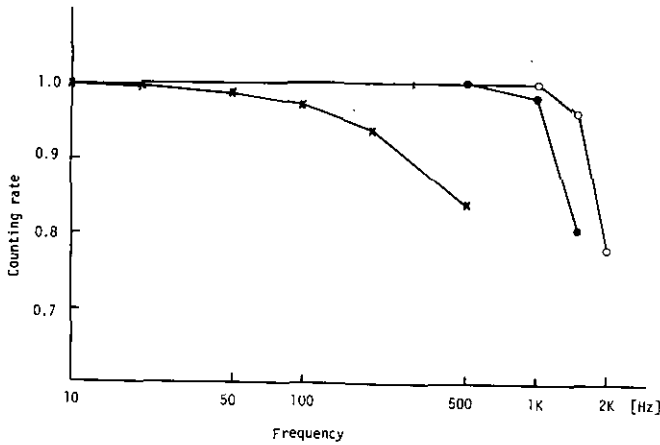


図 4 各種波形に対する周波数特性

Fig. 4 Frequency responses to sine wave, triangular wave and rectangular wave

- × : Rectangular wave
- : Sine wave
- : Triangular wave

表 1 本実験と他の研究者による体重，一回換気量，分時換気量及び呼吸数

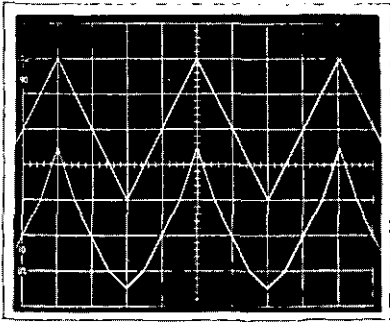
Table 1 Body weight, tidal volume, minute volume and frequency of the present study and those of other authors.

Authors	No. of Subjects	Body weight (g)	Tidal Volume (ml)	Minute Volume (ml)	frequency (breath/min)	
Crosfill and Widdicombe	[5]	4	250 (190-320) ^a	1.55 (1.03-2.13) ^a	160 (90-270) ^a	97 (84-126) ^a
Diamond and O'Donnell	[7]	32	233±32	1.4±0.25	—	115±21
Drorbaugh	[8]	9	203	1.3	104	80
Guyton A. C.	[9]	35	113 (63-152) ^a	0.87 (0.65-1.25) ^a	73 (50-101) ^a	86 (66-114) ^a
Paleček and Rochová Mikulásková	[19]	67	206±5	0.96±0.14	86±8	86.6±6.2
Paleček	[20]	10	220±3 ^a	1.30±0.6 ^a	132±19 ^a	104±11 ^a
Present data (Suzuki et al.)						
	10 weeks	9	329±23	1.83±0.21	123±8	67.2±6.3
	20 weeks	9	506±24	2.17±0.16	152±12	70.0±8.2

Data are expressed as Mean±SD, *M±SE; [No.] coincides with reference number, a is mean (min.-max.).

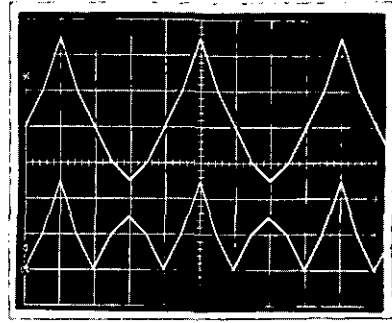
考 察

Amudur and Mead³⁾，及び Mead¹⁶⁾ は一つの画期的方法を報告した。その報告では，body-plethysmograph 法と胸腔内圧カテーテルが使用され，intact な無麻酔モルモットの呼吸のメカニズムを研究するのに適していた。その後，多くの研究者が，モルモットで^{3,17,24)}，フェレットで⁴⁾，ラットで^{7,9,13,19,20)}，ラビットで^{6,26)}，ネコで^{18,25)}サルで^{2,12)}，小動物で^{10,11,14)}，そして種々の哺乳類



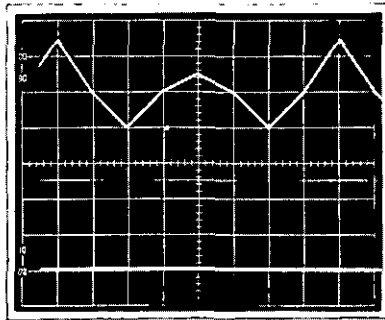
(a)

(A): Linearizer block
 Upper wave: Input 2 [V/div]
 Lower wave: Output 2 [V/div]
 Sweep time: 2 [msec/div]
 Input frequency: 125 [Hz]



(b)

(B): Absolute value circuit
 Upper wave: Input 2 [V/div]
 Lower wave: Output 2 [V/div]
 Sweep time: 2 [msec/div]



(c)

(C): Voltage to frequency converter
 Upper wave: Input 2 [V/div]
 Lower wave: Output 2 [V/div]
 Sweep time: 1 [msec/div]

図 3 三角波入力に対する各部の波形
 (A): リニアライザ部, 上の波形: 入力波形 下の波形: 出力波形
 (B): 絶対値回路部, 上の波形: 入力波形 下の波形: 出力波形
 (C): V/F コンバーター部, 上の波形: 入力波形 下の波形: 出力波形

Fig. 3 Responses to triangular wave form

で^{5,6)}、呼吸機能を測定するために、その方法を改良してきた。

これらの方法は、種々の動物の換気力学的パラメーターを検索するにはよい方法であったが、実験小動物においては必ずしも満足できるものではなかった。それらの種々の要因の中でも特に、呼吸流速測定用の差圧変換方式は、その直線性について議論的であった。著者らは、種々の条件下においてその直線性を検討したが、2点間を流れるガスを層流にできないことが判明したので、2点間の差圧は曲線であるということを前提に直線化させようと考え、本装置を作製したのである。本実験結果が示すように、本装置は、周波数特性、極性の変換等が問題なく行われ、比較的満足できる装置と考えている。

しかしながら、本装置のリニアライザー部は、個々の差圧トランスジューサーの特性に適合させるための較正手順が複雑であり、最大10点までの折線近似しか出来ない。

今後の課題としては、より簡単に較正ができて、もっと平滑な近似特性が得られる様な改良が必要であろう。それには、高次多項式回路を構成するアナログ回路に、そのパラメーターをマイコン等で計算しセット出来るような部分を組み合わせる方式が考えられる。

しかしながら、本装置における10点間補正は、正・負側どちら側にも較正出来るので、ラット及びマウスのような V_T が小さい場合には、その補間性は十分であると考えられる。

従って、本装置は実験小動物の呼吸生理学的研究及び代謝等の研究に有用であると考えられた。

本装置の製作にあたり、岡村迪夫著 (OP アンプの回路設計; P 177-179), National Semiconductor Linear Data Book (P 383-388) 及び Teledyne Philbrick Product Guide (P 56-57) を参考にした。

謝 辞

著者らは、本研究において終始有用な御助言および激励して下さった嵯峨井 勝環境生理研究室室長と高橋 弘動物施設管理室室長に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Agostoni, E., F. F. Thimm and W. O. Fenn (1959): Comparative features of the mechanics of breathing. *J. Appl. Physiol.*, **14**: 679-683.
- 2) Alalie, Y., C. E. Ulrich, R. H. Haddock, H. J. Jennings and E. F. Davis (1970): Respiratory system flow resistance with digital computer techniques measured in cynomolgus monkeys and guinea pigs. *Arch. Environ. Health.*, **21**: 483-491.
- 3) Amder, M. O. and J. Mead (1958): Mechanics of respiration in unanesthetized guinea pigs. *Am. J. Physiol.*, **192**: 364-368.
- 4) Boyd, R. L. and J. A. Mangos (1981): Pulmonary mechanics of the normal ferret. *J. Appl. Physiol.*, **50**: 799-804.
- 5) Crosfill, M. L. and J. G. Widdicombe (1961): Physical characteristics of the chest and lungs and the work of breathing in different mammalian species. *J. Appl. Physiol.*, **158**: 1-14.

- 6) Davidson, J. T., K. Wasserman, G. A. Lillington and R. W. Schmidt (1966): Pulmonary function testing in the rabbit. *J. Appl. Physiol.*, **21**: 1094-1098.
- 7) Diamond, L. and M. O'Donnell (1977): Pulmonary mechanics in normal rats. *J. Appl. Physiol.*, **43**: 942-948.
- 8) Drorbauch, J. E. (1960): Pulmonary function in different animals. *J. Appl. Physiol.*, **15**: 1069-1072.
- 9) Guyton, A. C. (1947): Measurement of respiratory volumes of laboratory animals. *Am. J. Physiol.*, **150**: 70-77.
- 10) Holub, D. and R. Frank (1979): A system for rapid measurement of lung function in small animals. *J. Appl. Physiol.*, **46**: 394-398.
- 11) Johanson, W. G. Jr. and A. K. Pierce (1971): A noninvasive technique for measurement of air way conductance in small animals. *J. Appl. Physiol.*, **30**: 146-150.
- 12) Kosch, P. C., J. R. Gillespie and J. D. Berry (1979): Flow-volume curves and total pulmonary resistance in normal bonnet and rhesus monkeys. *J. Appl. Physiol.*, **46**: 176-183.
- 13) King, T. K. C. (1966): Mechanical properties of the lung in the rat. *J. Appl. Physiol.*, **21**: 259-264.
- 14) Koen, P. A., G. D. Moskowitz and T. H. Shaffer (1977): Instrumentation for measuring functional residual capacity in small animals. *J. Appl. Physiol.*, **43**: 755-758.
- 15) Linear Data Book, National Semiconductor Corporation, Santa Clara, California, (1)-145 p-(3)-82 p, 1980.
- 16) Mead, J. (1960): Control of respiratory frequency. *J. Appl. Physiol.*, **15**: 325-336.
- 17) Murphy, S. D. and C. E. Ulrich (1964): Multi-animal test system for measuring effect of irritant gases and vapors on respiratory function of guinea pigs. *Industri. Hyg. J.*, **25**: 28-36.
- 18) Nisell, O. I. and A. B. Dubois (1954): Relationship between compliance and FRC of the lungs in cats, and measurement of resistance to breathing. *Am. J. Physiol.*, **178**: 206-210.
- 19) Paleček, F. and J. Rochová-Mikulášková (1968): Experimental emphysema in rats: An attempt to influence its production by gestagen administration. *Physiol. Bohemoslov.*, **17**: 445-454.
- 20) Paleček, F. (1969): Measurement of ventilatory mechanics in the the rat. *J. Appl. Physiol.*, **27**: 149-156.
- 21) Shimizu, A., A. K. Suzuki, H. Tsubone and T. Ichinose (1981): A method for isolating inspiratory and expiratory gas of rats. 1. Function of apparatus. The 91 th Meeting of the Jph. Soc. Vet. Sci., P. 46.
- 22) Sinnett, E. E., A. C. Jackson, D. E. Leith and J. P. Butler (1981): Fast integrated flow plethysmograph for small mammals. *J. Appl. Physiol.*, **50**: 1104-1110.
- 23) Suzuki, A. K., H. Tsubone, T. Ichinose and A. Shimizu (1981): A method for isolating inspiratory and expiratory gas of rats. 2. Measurement of tidal volume and expiratory volume. The 91 th Meeting of the Jph. Soc. Vet. Sci., P. 47.
- 24) Swann, H. E. Jr., D. Brunol and O. J. Balchum (1965): Pulmonary resistance measurements of guinea pigs. *Arch. Environ. Health.*, **10**: 24-32.
- 25) Watanabe, S. and R. Frank (1975): Lung volumes, mechanics, and single-breath diffusing capacity in anesthetized cats. *J. Appl. Physiol.*, **38**: 1148-1152.
- 26) Yokoyama, E. Flow-volume curves of excised right and left rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.*, **46**: 463-466.

II-1

二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響
——第2回目実験の暴露チャンバーの環境制御——

Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide on Rats
——Results of Environmental Control in the 2nd Experiment——

清水 明¹・松本 茂¹・藤田和伸¹・木村英雄¹・高橋 弘¹

Akira SHIMIZU¹, Shigeru MATSUMOTO¹, Kazunobu FUJITA¹
Hideo KIMURA¹ and Hiroshi TAKAHASHI¹

要 旨

特別研究の一環として、二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響についての第2回目実験を18か月間にわたって実施した。

本報では、この実験期間中の各暴露チャンバーの温・湿度及び二酸化窒素濃度の設定条件と、制御結果をまとめた。これら各環境因子の制御結果は、設定条件と比較して満足できるものであった。

Abstract

This report was described on the basic data of regulation and monitoring of nitrogen dioxide (NO₂) concentration, temperature and humidity in chambers at the second experiment to examine the effects of long-term exposure to nitrogen dioxide on rats.

The concentration of NO₂ were 0.0357±0.007, 0.122±0.015 and 0.396±0.031 ppm throughout the whole exposure period of 18 months against the setting concentration at 0.04, 0.12 and 0.4 ppm respectively. These results were sufficient as compared with each setting levels.

はじめに

本特別研究における二酸化窒素のラットに及ぼす影響に関する第1回目実験は、1977年7月から1979年10月までの27か月間にわたって実施され、その結果は、国立公害研究所報告第15号(1979年)に報告された。

今回は、その第2回目実験として、1980年5月より1981年11月までの18か月間にわたり、二酸化窒素の暴露濃度は一部変更したが、それ以外の温湿度環境条件は前回と同一とし、供試ラットも

1. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Engineering Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

前回と同じウィスター系雄とした。

本報告は、各種実験に供試されたラットに共通した実験飼育環境の設定条件とその制御結果を一括して示し、各種実験に関する共通の基盤を掲示するとともに、当施設の小動物用慢性ガス暴露チャンバーを2回にわたり長期運転した結果判明した運転上の問題についても併せて報告する。

方 法

1. ガス暴露チャンバーのシステム構成

本暴露実験に使用したチャンバーは、前回と同様、当研究所動物実験施設の4階に設置されている「小動物用慢性ガス暴露チャンバー」(ASC及びASG-1・2・3と呼称している)4台である。したがって、ここにはチャンバーのブロックダイアグラムを図1に示すにとどめる。取入外気のフィルター処理、空調及び二酸化窒素(以下NO₂ガスと記す)の添加調整、排気浄化処理及び各環境因子の測定・制御システム等についての詳細は前回の報告を参照されたい¹⁾。

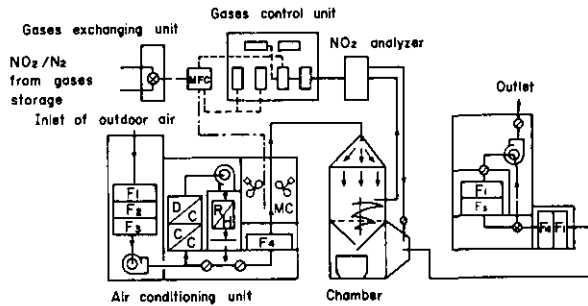


図 1 チャンバー系統ブロック図

Fig. 1 Block diagram of chamber system

- F₁: disposal filter
- F₂: catalyst-bearing filter (MnOx)
- F₃: active carbon filter
- F₄: absolute filter
- F₅: Matsuclean filter (K₂CO₄ + Ca(OH)₂)
- MC: mixing chamber
- MFC: mass flow controller
- C/C: cooling coil
- D/C: dehumidifying coil
- R/H: heater

NO₂濃度制御用測定器としては、大気モニター用ケルミネッセンス方式のサーモエレクトロン社製Model-14D型NO_x分析計を使用した。又、NO₂ガスを添加しない対照群チャンバーASC(以下コントロールチャンバーと記す)内のNO₂濃度についても、夏期と冬期の2回にわたり測定を

行った。その際使用した測定器は、ケミルミネッセンス方式のモニターラボ社製 Model-8440 型 NO_x 分析計である。

分析計の校正は 50 ppm, 500 ppm, 2500 ppm の NO₂ 標準ガスをゼロガスで希釈し分析計に導入して行った。校正用のガスは製鉄化学工業製の NO₂/N₂ 標準ガス及びゼロガス (Air) を使用した。希釈装置は製鉄化学工業製 SDS-201 型とスタンダードテクノロジー社製 SGGU-14 型希釈装置を使用した。なお希釈ガス発生方式は、前者が質量流量比混合方式、後者が流量比混合方式で方式が異なるが、両者間に問題となるような発生濃度の差異は認められなかった。

暴露用ガスは、250 ppm 及び 1000 ppm の NO₂/N₂ ガスを容器に充填し、ボンベ庫からチャンバー室に集中配管で供給した。供給ガスは、前回と同じ仕様のもを使用した。

今回は各種環境条件の測定結果の整理にあたっては、各記録紙から読み取ったデータを SORD M 223 MK-V コンピュータシステムを使用して処理した。

2. ガス暴露チャンバーの運転条件

今回の実験 (第 2 回目) での暴露期間は、1980 年 5 月 27 日から 1981 年 11 月 30 日 (一部は 12 月 11 日) までの約 18 か月間である²⁾。

この期間中の各チャンバーの NO₂ 濃度、温度及び湿度の設定条件を表 1 に示す。

表 1 チャンバー設定条件
Table 1 Environmental Condition set in chambers

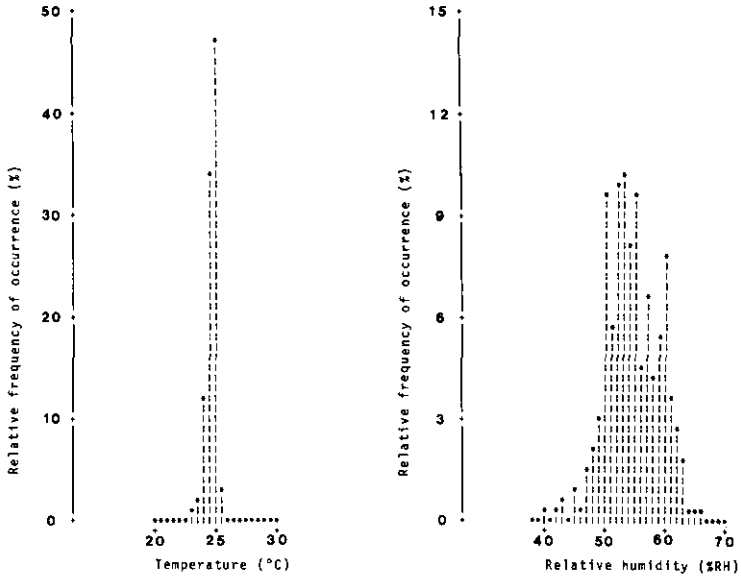
Chamber	Concentration of NO ₂ (ppm)	Temperature (°C)	Humidity (%)	Concentration of supplied gases (ppm)
ASC	Fresh air	25±2	55±10	
ASG-1	0.04	25±2	55±10	250 NO ₂ /N ₂
ASG-2	0.12	25±2	55±10	250 NO ₂ /N ₂
ASG-3	0.4	25±2	55±10	1000 NO ₂ /N ₂

温・湿度の設定条件は前回実験と同一であるが、NO₂ 濃度については前回の実験結果をふまえて、0.04, 0.12, 0.4 ppm の 3 濃度と対照群の 4 群を設定している。

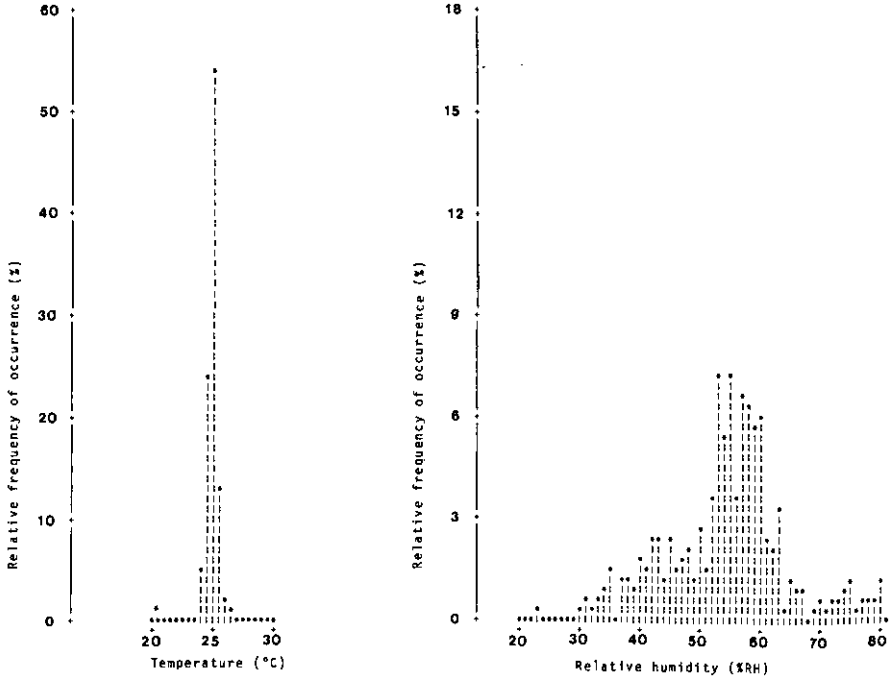
又、各チャンバーの換気量は 50 回/h に設定した。

結 果

各チャンバー内の温度及び湿度の制御結果を図 2 の(a)~(d)に示した。これらの結果は実験の全期間の測定値を各記録紙から 1 時間単位で読み取り、全暴露期間 (18 か月間) 当たりの出現頻度としてまとめたものである。

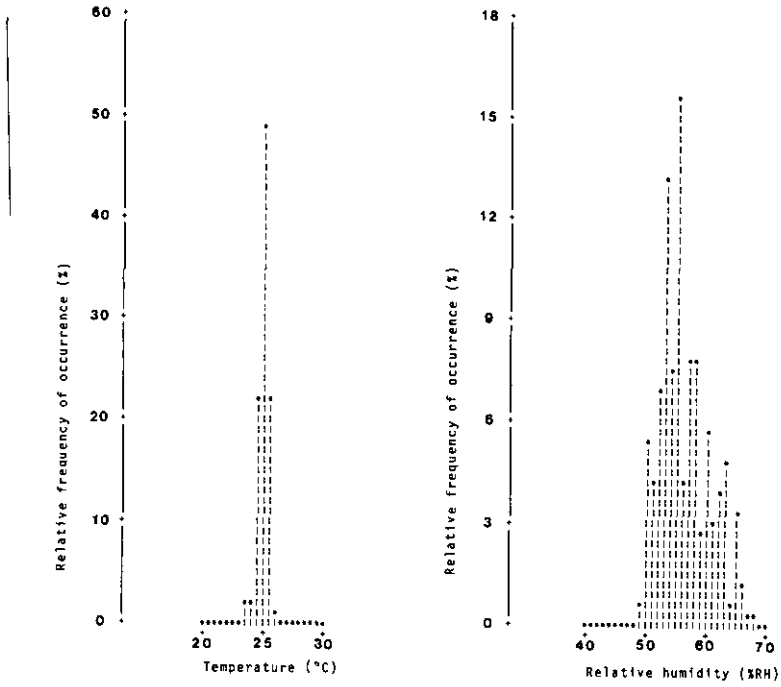


(a) ASC

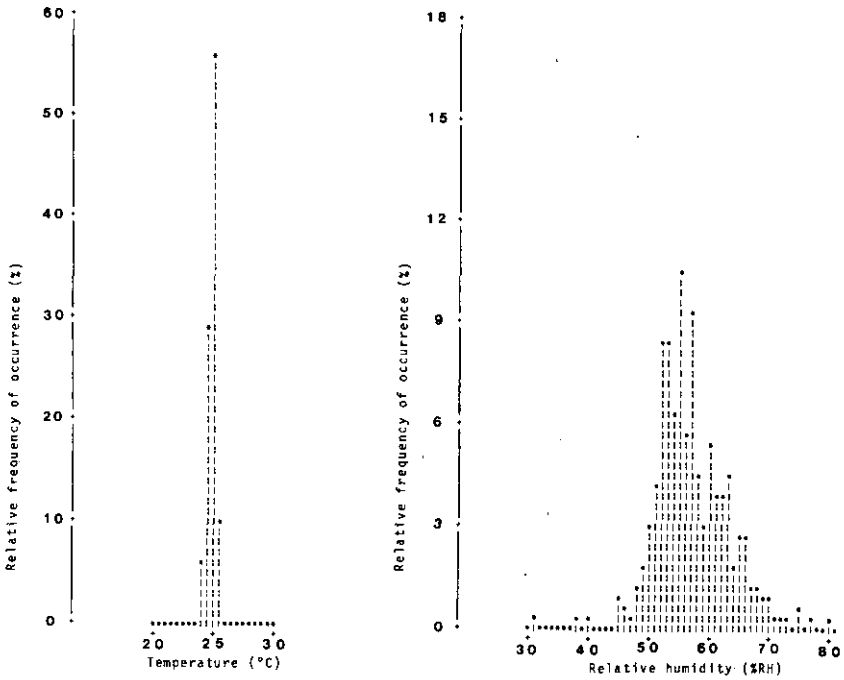


(b) ASG-1

長期暴露用チャンバーの環境制御



(c) ASG-2



(d) ASG-3

☒ 2 チャンバー温湿度制御結果
Fig. 2 Control of temperature and humidity in chambers

各チャンバーの温度及び湿度の制御結果の平均値と標準偏差を表2にまとめた。更に各チャンパー内のNO₂濃度の制御結果を図3に示し、その平均値と標準偏差を表2に示した。0.04 ppm, 0.12 ppm及び0.4 ppm NO₂ 設定チャンパー内の平均値±標準偏差はそれぞれ0.0357±0.007 ppm, 0.122±0.015 ppm及び0.396±0.031 ppmであった。

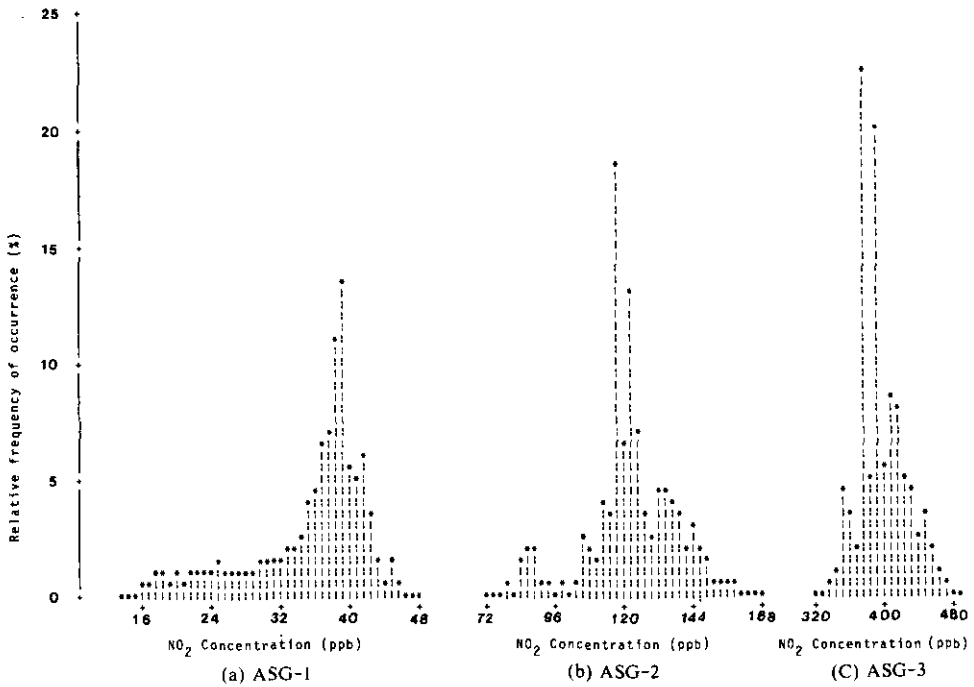


図 3 NO₂濃度制御結果
Fig. 3 Control of NO₂ concentration in gas exposure chambers

表 2 チャンバー制御結果
Table 2 Results of environmental condition in chambers

Chamber	Concentration (ppb)			Temperature (°C)			Relative humidity (%)		
	M	±	SD	M	±	SD	M	±	SD
ASC				24.7	±	0.5	54.4	±	4.9
ASG-1	35.7	±	7.0	24.9	±	0.5	54.3	±	9.8
ASG-2	122	±	15	25.0	±	0.5	56.1	±	4.6
ASG-3	396	±	31	24.8	±	0.4	57.0	±	6.2

これらの制御結果は設定条件に対してほぼ満足できる結果であった。

本実験におけるコントロールチャンバー (ASC) 内の NO₂濃度を全実験期間を通じて測定することは出来なかった。この為、本研究所敷地内で計測技術部分析室が実施している大気環境モニタリングデータ³⁾の解析を行ない参考とした。これによると本実験中の一年間の外気 NO₂濃度の平均値は約 12 ppb となり、その度数分布は、95%が 25 ppb 以内に、99%が 36 ppb 以下の範囲にあった。このことから、本実験中の期間を通じて、コントロールチャンバー内の NO₂濃度が 40 ppb を超えた割合は、1%以下であったと考えられた。更に、当地において外気 NO₂が上昇する冬期の一時期とその他の時期について、実際のコントロールチャンバー内の NO₂濃度の状態を確認するために、各々 1 か月間ずつ測定した結果を図 4 に示した。

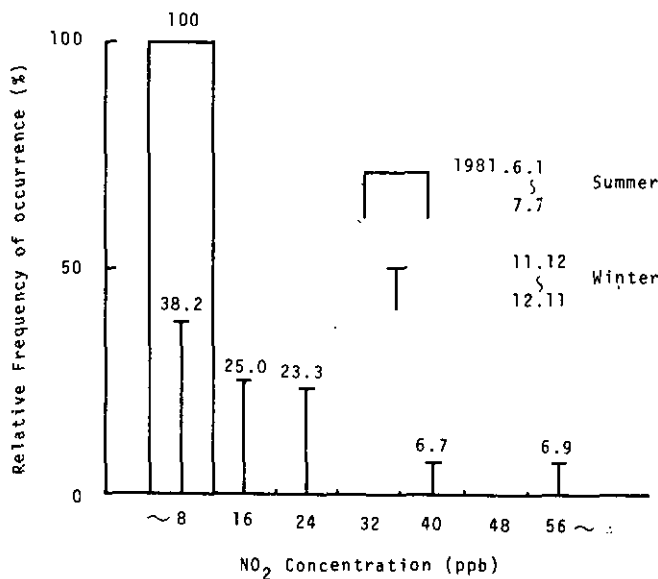


図 4 コントロールチャンバー内の NO₂濃度
Fig. 4 Concentration of NO₂ in ASC chamber

実験期間中の各チャンバーの換気量は 40~60 回/h であった。飼育部の風速に換算すると 1.1~1.7cm/s であった。なお換気量の設定は、実験飼育部の風速・動物由来のアンモニアガスの濃度・NO₂ガス濃度分布・温湿度及びガス濃度コントロールシステムの制御系の安定度や供給ガスの使用量等を検討して設定した。

考 察

今回行われた一連の実験 (前回の 27 か月暴露実験も含む) でのチャンバーシステム運転上の困難の多くは、これらチャンバーの内部に供試実験動物が SPF 状態で飼育されており、かつ 4 チャン

バーが1組となって1.5~2年を超える長期間の連続運転が必要とされる事から生じて来る。すなわち、長期連続運転を行う事からシステム構成機器の故障は避けられず、これを修理する場合、感染事故は実験に致命的な打撃を与えるので、実験飼育部を汚染しないように十分な配慮が必要である。

その上、故障期間が長くなる事は、他の正常な運転を続けているチャンバーとの実験成績の比較に問題を生じる可能性を含むため、常に迅速な対応が要求される。これらの事から、今後同様な長期連続運転を行う場合は、システム構成機器の予備機や予備部品を予め用意する以外に、連続運転開始後の修理を考慮した装置の構造や修理手順の検討が重要な課題であると考えられた。

図3の各チャンバーのNO₂濃度制御結果において、低濃度設定のチャンバーほど目標値からはずれた測定値が多く観察された。中でも0.04 ppm設定のASG-1ではその傾向が強い。

この原因としては、現用分析計の限界レンジである0.05 ppmレンジの使用によるS/Nの低下と、設定濃度が外気NO_xのバックグラウンドに近づくために、その急激な変動による制御系への外乱が考えられる。特に冬期において、一時的にはあるが給気浄化システムの能力以上に外気NO_xの濃度が上昇し(図4, 図5), NO₂操作量がゼロになる・分析計のNO_x側の増幅器が飽和する等によりNO₂濃度の自動制御が不可能な場合があった。今後この様な極低濃度NO₂長期暴露実験の濃度制御精度を更に向上させるには、NO_x分析計の低レンジでのS/Nの改善・ダイナミックレンジの拡大・信頼性の向上等分析計自体の性能向上と、給気浄化システム(図1参照)の再検討が必要であ

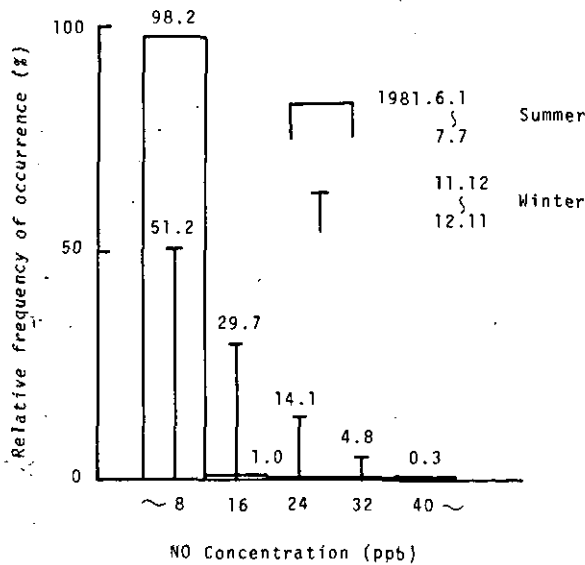


図 5 ASG-1 チャンバー内の NO 濃度

Fig. 5 Concentration of NO in ASG-1 chamber

ると考えられた。

又、コントロールチャンバーについては、全運転期間にわたる目的成分(今回は NO₂)のモニターが必要であると同時に、その目的機能の確認と向上のためには、ASG-1と同様に分析計と給気浄化システムの検討が必要であると考えられた。

附 記

本報告をまとめるにあたり、大気環境モニタリングデータの使用については計測技術部分析室室長 溝口次夫氏、解析については環境生理部環境生理研究室室長 嵯峨井勝氏並びに同室 鈴木明氏に全面的な御援助と御助言を頂いた。更に本暴露チャンバーの運転や故障時の修理対応等に関し、小糸工業株式会社・製鉄化学工業株式会社・裕生工業株式会社の各位、基礎データの処理作業に関しては、日本クレア株式会社の各位の御協力を頂いた。ここに記して謝意を表する次第である。

引 用 文 献

- 1) 松本 茂・藤田和伸・清水 明・木村英雄・高橋 弘 (1979) : 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——暴露チャンバーの環境制御。国立公害研究報告, 第15号, 149-158.
- 2) 高橋 弘・高橋慎司・山元昭二・伊藤勇三 (1982) : 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——第2回目実験の供試動物の飼育経過。国立公害研究所報告, 第40号, 181-193.
- 3) 溝口次夫・功刀正行・植弘澄子: 大気環境モニタリングデータ (未発表資料)。

II-2

二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響
—第2回目実験の供試動物の飼育経過—
Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide on Rats
—Experimental Animals Supplied to the 2nd Experiment—

高橋 弘¹・高橋慎司¹・山元昭二¹・伊藤勇三¹

Hiroshi TAKAHASHI¹, Shinzi TAKAHASHI¹, Shyozzi YAMAMOTO¹
and Yuzo ITO¹

要 旨

大気汚染物質の1つであるNO₂が生体に及ぼす影響を明らかにするために、低濃度のNO₂ (0.04, 0.12, 0.4 ppm) をラットに最大18カ月間暴露した。

その結果、暴露したラット576匹のうち555匹は予定通り搬出され、各実験に供試することが出来た。残りの21匹は暴露途中で死亡したが、NO₂の影響によるものではなく下垂体腫瘍等による自然死と考えられた。また暴露期間中の体重の推移についても、NO₂の影響と考えられるような変化は認められなかった。

以上の結果より、今回設定したような低濃度のNO₂暴露に対しては、ラットの寿命及び体重に何ら影響を受けることがないことが示唆された。

Abstract

To clarify the biological effects of air pollutants, nitrogen dioxide (NO₂) was exposed to male Wistar rats at the concentration of 0.04, 0.12 and 0.4 ppm for maximum 18 months.

555 rats out of 576 were supplied to planned experiments and residual 21 rats died of spontaneous tumor and other reasons but not of the effect of NO₂. And there was no difference in the body weight between NO₂ exposed and control groups throughout these experiments.

It was suggested that exposure to NO₂ at low concentration (0.04, 0.12, 0.4 ppm) did not affect the life span of rats and their body weights.

1. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies. Engineering Division. Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki
305, Japan.

はじめに

大気汚染物質の一つである二酸化窒素 (NO₂) の生体に及ぼす影響研究として、国立公害研究所動物実験施設(以下、当施設と略)では、ラットを用いて NO₂ 単一の長期暴露実験を実施してきた。第1回目の NO₂ 長期暴露実験は 1977 年 7 月から 1979 年 10 月まで最大 27 か月間行われ、その結果は国立公害研究所研究報告第 15 号にまとめられている¹⁾。

本研究は第2回目の NO₂ 長期暴露実験として、1980 年 5 月から 1981 年 11 月までの 18 か月の日程で実施され、NO₂ 低濃度の長期暴露がラットに及ぼす影響について更に詳細に調査したものである。

本報告は、当施設で調査分担した供試動物の飼育経過、途中死亡例及び体重推移について一括してとりまとめ、以下の各研究報告の基礎資料とするものである。

表 1 材料及び方法
Table 1 Materials and Methods

Exp. Group	No. Animals (Sex)	Date of Birth	Date of Arrival at NIES (Age)	Date of Housing in Chamber (Age)	Period of NO ₂ Exposure
A	288 (♂)*	'80. 3.31 - 4. 2	'80. 5.20 (7 wk)	'80. 5.27 (8 wk)	6 mos 9 mos 18 mos
B	96 (♂)	'80.10. 2 -10. 4	'80.11.18 (7 wk)	'80.11.29 (8 wk)	3 mos
C	96 (♂)*	'80. 3.31 - 4. 2	'80. 5.20 (7 wk)	'81. 3.10 (49 wk)	3 mos
D	96 (♂)*	'80. 3.31 - 4. 2	'80. 5.20 (7 wk)	'81. 5.29 (60 wk)	6 mos
Cont	100 (♂)*	'80. 3.31 - 4. 2	'80. 5.20 (7 wk)	Rearing in the Barrier ('80. 5.27 - '81.12.11)	

* Same Lot of Jcl: Wistar Rats.

材料及び方法

1. 供試動物

Jcl®: Wistar 系♂ラットの計 576 匹 (144 匹×4 チャンバー) を暴露用として使用した。なお、ルームコントロール群として 100 匹を供試し、バリアー内で飼育した (表-1 参照)。

2. 実験飼育期間

ガス暴露期間及び動物の導入時期の別によって、(1) A 群、(2) B 群、(3) C 群及び(4) D 群に大別した。このうち、A・C・D 群は同じロットの動物である。なお、各群のガス暴露期間は、(1) A 群; 6・9・18 か月 (暴露開始時 8 週令)、(2) B 群; 3 か月 (暴露開始時 8 週令)、(3) C 群; 3 か月 (暴露開始

時49週令)、(4)D群;6か月(暴露開始60週令)であった(図-1参照)。

3. NO₂暴露群構成

これまでに当施設内でなされた暴露実験の成績^{1),2),3)}から総合的に判断して、(1)NO₂の0.04ppm暴露群(ASG-1群)、(2)NO₂の0.12ppm暴露群(ASG-2群)、(3)NO₂の0.4ppm暴露群(ASG-3群)及び(4)NO₂を添加しない対照群(ASC群)の4群構成とした。なお、本実験に使用したガス暴露チャンバーの性能・仕様については既報の通りである。

4. 実験飼育方法

ラットの収容ケージはステンレス網製特注型(365W×280D×220Hmm)で1ケージ当り収容匹数は8週令から49週令までは6匹、それ以降は4匹を原則とした。飼料はオートクレープで滅菌したマウス・ラット用固型飼料を自由摂食させ、飲水は滅菌蒸留水を自由に飲ませた。なお、飼料・水等のチャンバー内への搬入に際しては、パスボックス内でアルコール噴霧消毒を行って清浄度を維持した。

5. 動物搬入出方法

実験動物のチャンバー搬出に際しては、SPFレベルを保持させるように配慮した。すなわち、SPFラット導入後、当施設のバリアー内検疫室にて常法により1週間検疫し、検疫に合格したラットのみをフィルターキャップ付滅菌ケージに収容し、パスボックス内で5%ヒビテン・アルコール噴霧消毒(3分間)してチャンバー内へ搬入した。また、搬出時には暴露ケージごとパスボックスを通して取り出し、動物の異常の有無を肉眼所見し実験に供した。なお、動物が異常の場合は、速やかにチャンバーから取り出し、剖検した。

6. 体重測定方法

ラット体重測定は1か月に1回の割合で全個体について実施した。すなわち、各ケージ別に動物個体名(1・2・3・4・5・6)を付け個体識別をしながら、実験飼育期間中の各個体の体重の増減を月毎に調査した。なお、体重測定の結果は各実験群別にまとめ、平均値と標準偏差(Mean±SD)で示した。

結果及び考察

1. 実験飼育期間中の飼育経過と途中死亡数

A・B・C・D群において実験飼育したラットの匹数の推移を、各チャンバー別にして図2-1~2-4及び表2に示した。

A群では、'80年5月27日に各チャンバー72匹の計288匹が8週令で搬入され、6か月間のガス

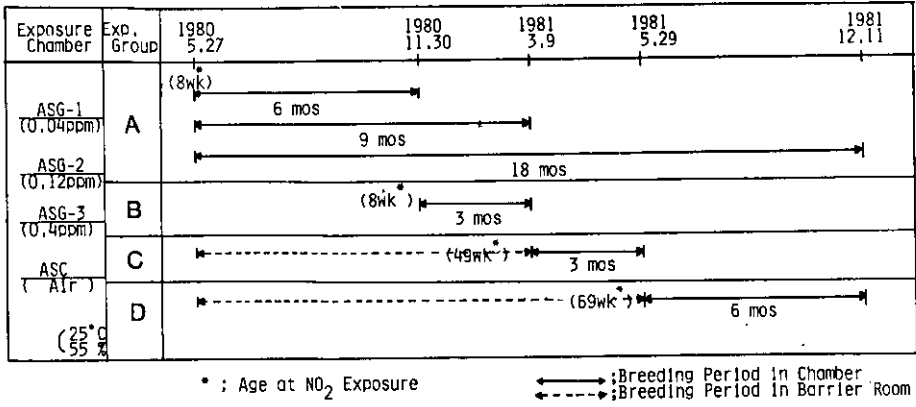


図 1 NO₂ガス暴露タイムスケジュール
 Fig. 1 Time Schedule of NO₂ Exposure

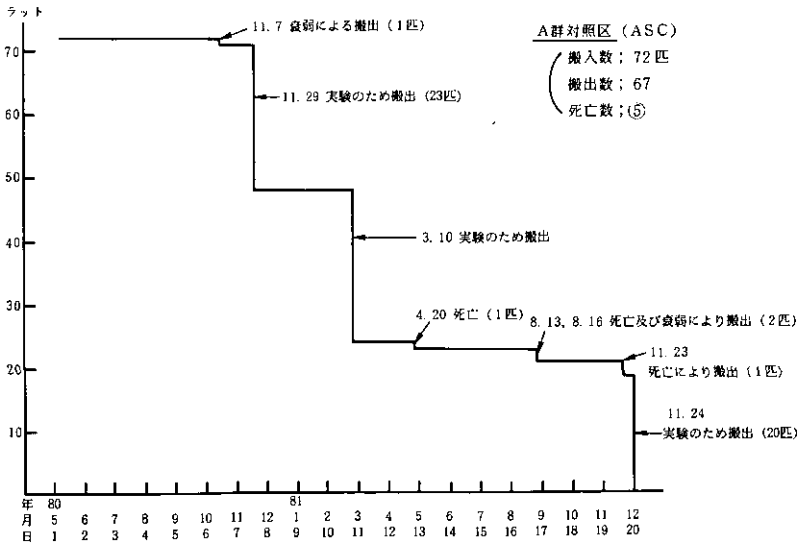


図 2-1 ASC対照群での動物飼育数の推移
 Fig. 2-1 Changes of the Number of Rats Maintained in ASC Chamber (Cont. Exp. A)

長期暴露実験の供試動物の飼育経過

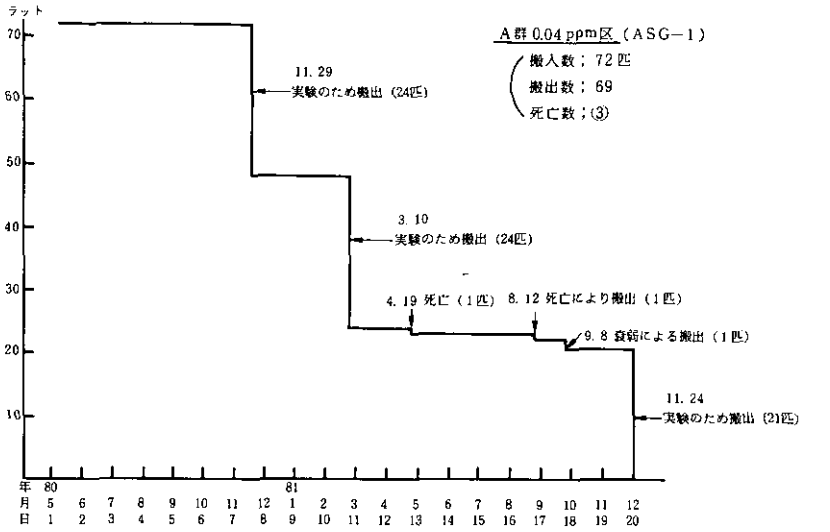


図 2-2 ASG-1 暴露群での動物飼育数の推移

Fig. 2-2 Changes of the Number of Rats Maintained in ASG-1 Chamber (NO_2 ; 0.04ppm, Exp. A)

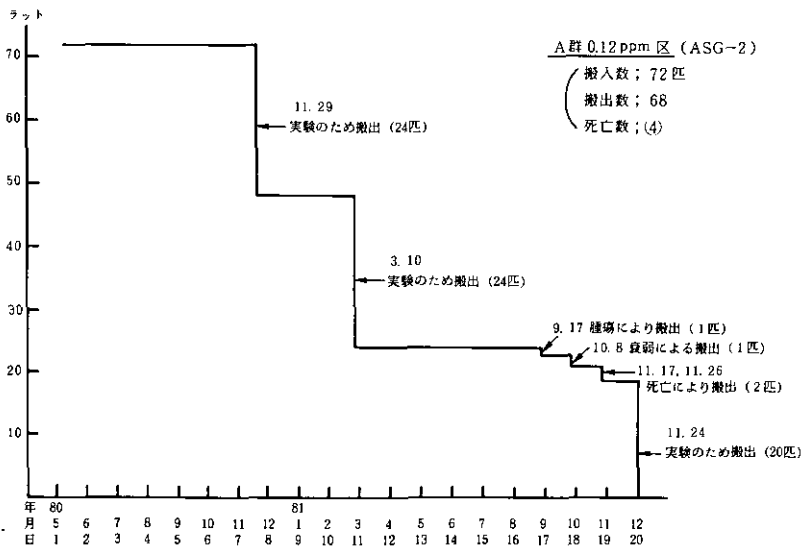


図 2-3 ASG-2 暴露群での動物飼育数の推移

Fig. 2-3 Changes of the Number of Rats Maintained in ASG-2 Chamber (NO_2 ; 12ppm, Exp. A)

暴露後に各チャンバー24匹の計95匹（但しASCは23匹）が搬出された（'80年11月24日～30日）。また、9か月間のガス暴露後に各チャンバー24匹の計96匹が搬出された（'81年2月23日～3月9日）。さらに、18か月間のガス暴露後にASC；20・ASG-1；21・ASG-2；20・ASG-3；22匹の計83匹が搬出され実験が終了した（'81年11月24日～12月11日）。なお、A群の当初のチャンバー収容匹数288匹から6か月暴露群95匹と9か月暴露群96匹及び18か月暴露群83匹を差し引いた残り14匹は、実験飼育期間の途中で死亡した例数となる。

B群では、'80年11月29日に各チャンバー24匹の計96匹が8週令で搬入され、3か月間のガス暴露後に96匹の全てが搬出された（'81年2月23日～3月9日）。

C群では、'81年3月10日に各チャンバー24匹の計96匹が搬入され（搬入時49週令、A群と同じ導入ロットの動物をこれまでバリアー内で飼育）、3か月間のガス暴露後に96匹の全てが搬出された（'81年5月25日～29日）。

D群では、'81年5月29日に各チャンバー24匹の計96匹が搬入され（搬入時60週令、C群と同様にバリアー内で飼育）、6か月間のガス暴露後にASC；21・ASG-1；22・ASG-2；23・ASG-3；23匹の計89匹が搬出され実験が終了した（'81年11月24日～12月11日）。なお、D群の当初のチャンバー収容匹数96匹から6か月暴露群89匹を差し引いた残り7匹は、実験飼育期間の途中で死亡した例数となる。

ところで、今回のような長期ガス暴露実験においては、途中死亡の時期や死因が実験の性格のうえで重要な意味を持つものと考えられる。そこで、今回の実験飼育期間中に死亡したA群とD群において、途中死亡の時期と死因（剖検所見）を表3に示した。

ガス暴露期間中の途中死亡数は、A群；14匹・D群；7匹の計21匹であり、総暴露匹数576匹（A群；288・B群；96・C群；96・D群；96）に対して占める割合は4%である。

また途中死亡の時期は、A群では暴露開始後11か月までに14匹中4匹が死亡し、残りの10匹は暴露開始後15～18か月で死亡した。一方、D群では暴露開始後3～6か月で7匹が死亡した。

次に、死因別では自然発生腫瘍が21例中11例（52%）と最も多く、そのうち9例は脳下垂体腫瘍であった。衰弱による切迫屠殺は3例（14%）で残り7例（33%）の直接的な死因は不明であるが、経過からみて感染性が原因でないことは明らかである。

上記のように、今回のガス暴露期間中に死亡したラットは計21匹であり、前回の18か月までの死亡数は計28匹（衰弱死；23・腫瘍；5）であったりことより、死亡ラットは前回より7匹少ない結果であった。

NO₂濃度と死亡数との関連をみるために、チャンバー間で比較すると、ASC（対照群）；8（38%）、ASG-1（0.04 ppm 暴露群）；5（24%）、ASG-2（0.12 ppm 暴露群）；5（24%）、ASG-3（0.4 ppm 暴露群）；3（14%）となり、暴露群より対照群での死亡数が多いという結果が得られた。しかしながら、各チャンバー間での死亡匹数には何ら有意な差は認められず、今回のNO₂暴露濃度の設定では、ラットの死亡匹数の増減までには反映しなかったと考えられよう。

表 3 A・D実験群での途中死亡数の推移
Table 3 Number of the Dead Rats in each Chamber through Experimental Periods

* Chamber Name	Gas Concentration	NO ₂ Exposure Period (mos)												Total (○,▲,●)	
		Exp. A	0-5	6	7-8	9	10	11	12-14	15	16	17	18		
		Exp.D	(Age)	(2-7)	(8)	(9-10)	(11)	(12)	(13)	(14-16)	(17)	(18)	(19)		(20)
01 ASC	Air (Cont.)	A		○				●		▲●			▲	5(1,2,2)	
		D									○▲		▲	3(1,2,0)	
* ASG-1	NO ₂ (0.04ppm)	A						●		●	●			3(0,0,3)	
		D								▲		▲		2(0,2,0)	
02 ASG-2	NO ₂ (0.12ppm)	A										▲	○	▲▲	4(1,3,0)
		D												▲	1(0,1,0)
* ASG-3	NO ₂ (0.4ppm)	A					●							▲	2(0,1,1)
		D											●		1(0,0,1)
03 Total		A	0	1	0	1	0	2	0	3	2	1	4	14(2,6,6)	
		D								0	1	2	2	2	7(1,5,1)
All Total			0	1	0	1	0	2	0	4	4	3	6	21(3,11,7)	

* ○; Sacrificed for Weakness, ▲; Spontaneous Tumor, ●; Other Reason.

なお、当施設ではラットの搬出時(①'80年11月24~30日, ②'81年11月24日~12月11日)に感染症検査を実験動物中央研究所に依頼したが、抗体検査(ネズミコリネ菌, ネズミチフス菌, ティザー菌, マイコプラズマ, マウスアデノウイルス, MHV, HVJ)の結果, 全例(16例×2回)とも陰性という報告が得られている。

また、全実験飼育期間を通して、ラットに感染症が疑われるような事例は、皆無であった。

2. 体重の推移

ASC, ASG-1・2・3の4台のチャンパー内で飼育したA・B・C・D群ラットの体重及びバリアー内で飼育した対照群(ルームコントロール群)ラットの体重を一括して表4に示した。また、A群及びB・C・D群でのラットの平均体重の推移をそれぞれ図3-1と図3-2に示した。

A群では、ASC(チャンパーコントロール)ラットと比較して、ASG-1・2・3のガス暴露群ラットの平均体重はやや重く推移したが、しかしながら、いずれの測定時期においても各チャンパー間で体重に有意な差は認められなかった。チャンパー内で飼育したA群ラットの体重とバリアー内で飼育したラット(ルームコントロール群)の体重を比較すると、ASC群も含めてチャンパー内飼育ラットはルームコントロール群よりも暴露開始後6か月目まで体重が有意に軽く推移した。しかしながら、チャンパー内飼育群ラットの体重はWistarラットの標準値の範囲内に入っている⁵⁾ことより、成長は特に問題がなかったと考えられる。

表 4 A・B・C・D群での実験飼育期間中の平均体重の推移 (ASC, ASG-1・2・3チャンパー別)
 Table 4 Changes of the body weight of male Wistar rat maintained in the chamber (ASC, ASG-1. 2. 3) for 3, 6, 9 and 18 months

Chamber group	Experimental Date (Age: mth)																			
	'80	5/27 (2)	6/25 (3)	7/30 (4)	8/27 (5)	9/24 (6)	10/30 (7)	11/28 (8)	12/25 (9)	1/27 (10)	2/23 (11)	3/31 (12)	4/30 (13)	6/1 (14)	7/1 (15)	7/29 (16)	8/26 (17)	9/30 (18)	10/28 (19)	11/24 (20)
A	211*	349	429	462	481	505	532	541	564	578	592	609	619	634	636	627	639	635	640	
	±85(72)	±25(72)	±32(72)	±35(72)	±37(72)	±45(72)	±48(71)	±49(48)	±53(48)	±57(48)	±57(24)	±59(23)	±60(23)	±66(23)	±71(23)	±72(21)	±76(21)	±91(21)	±91(21)	
A								376	450											
B								±19(24)	±20(24)											
C										628	640	664								
										±64(24)	±68(24)	±70(24)								
D													667	685	704	696	724	711	701	
													±64(27)	±64(27)	±68(27)	±83(27)	±80(23)	±85(22)	±100(21)	
A	223	355	436	462	487	510	529	547	574	590	623	647	658	672	664	696	673	692	656	
	±22(72)	±29(72)	±42(72)	±48(72)	±54(72)	±57(72)	±70(72)	±79(48)	±82(48)	±92(48)	±112(24)	±119(23)	±126(23)	±129(23)	±124(23)	±112(22)	±97(21)	±117(21)	±109(21)	
A								361	420											
B								±25(24)	±27(24)											
C										633	650	660								
										±51(24)	±58(24)	±43(24)								
D													671	671	684	718	706	741	702	
													±64(24)	±73(24)	±72(24)	±94(23)	±111(23)	±124(22)	±103(22)	
A	248	357	437	469	506	518	547	563	580	591	611	621	640	666	668	696	670	656	657	
	±11(72)	±28(72)	±40(72)	±39(72)	±41(72)	±46(72)	±50(72)	±54(48)	±59(48)	±65(24)	±79(24)	±77(24)	±86(24)	±95(24)	±94(24)	±84(24)	±105(23)	±112(22)	±128(22)	
A								369	441											
B								±24(24)	±35(24)											
C										642	649	655								
										±42(24)	±42(24)	±51(24)								
D													647	652	670	690	687	682	674	
													±73(24)	±76(24)	±76(24)	±76(24)	±88(24)	±90(24)	±98(23)	
A	247	351	428	466	488	510	522	542	560	579	599	606	619	625	623	628	639	647	624	
	±11(72)	±28(72)	±33(72)	±37(72)	±42(72)	±42(72)	±47(72)	±50(48)	±55(48)	±59(48)	±65(23)	±71(23)	±68(23)	±65(23)	±70(23)	±74(23)	±75(23)	±77(23)	±81(22)	
A								362	443											
B								±18(24)	±24(24)											
C										635	641	667								
										±52(24)	±50(24)	±53(24)								
D													664	672	685	683	702	712	678	
													±56(24)	±53(24)	±58(24)	±58(24)	±61(24)	±62(23)	±74(23)	
Room Cont.	253	377	442	485	512	538	566	585	604	622	633	641	655	650	645	650	653	652	651	
	±12	±25	±34	±39	±40	±45	±48	±51	±55	±59	±64	±67	±69	±73	±74	±73	±79	±75	±77	
	(339)	(339)	(339)	(339)	(339)	(339)	(338)	(338)	(336)	(322)	(211)	(210)	(208)	(112)	(102)	(112)	(96)	(94)	(89)	

* ; Mean ± S.D (N) ; Body Weight (gram)

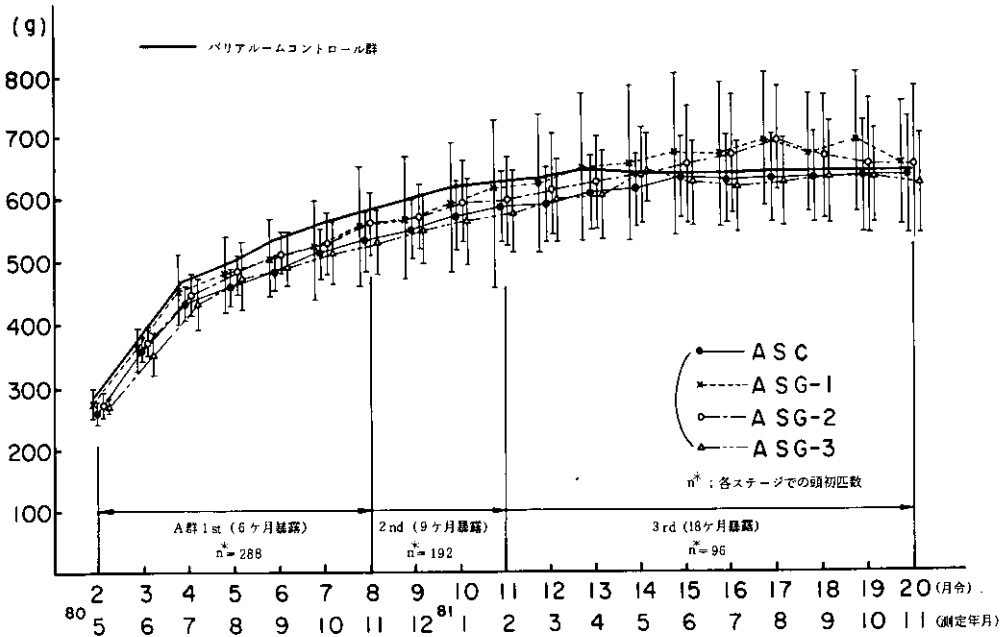


図 3-2 A 実験群での雄ラットの体重の推移
 Fig. 3-2 Changes of the Body Weight of Male Wistar Rats in Experiment B, C and D

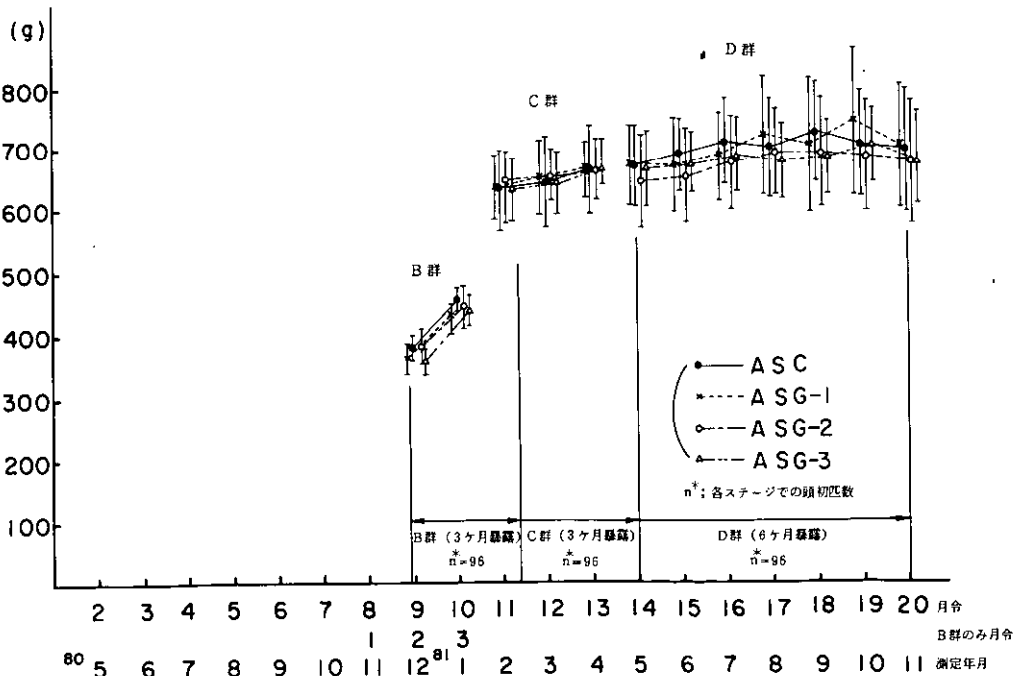


図 3-1 B・C・D 実験群での雄ラットの体重の推移
 Fig. 3-1 Changes of the Body Weight of Male Wistar Rats in Experimental A

表 5 A群・D群での実験飼育期間中死亡ラットの体重の推移
 Table 5 Changes of the body weight of dead rats (Exp. A & D) during the experiment

↓ : Down under Ave. B. W. ○ : Sacrificed for weakness
 △ : Death of spontaneous tumor ● : Death of other reason

Chamber	Exp. group (No)	Experimental date																			
		'80								'81											
		5/20 Age (mth)	5/27 (2)	6/25 (3)	7/30 (4)	8/27 (5)	9/24 (6)	10/30 (7)	11/28 (8)	12/25 (9)	1/27 (10)	2/23 (11)	3/31 (12)	4/30 (13)	6/1 (14)	7/1 (15)	7/29 (16)	8/26 (17)	9/30 (18)	10/28 (19)	11/24 (20)
A S C	A (1)	193	204	340	430	465	485	495 ↓	(11/4; ○)												
	A (2)	209	222	370	440	470	500	530	545	560	590	610	570 ↓	(4/20; ●)							
	A (3)	185	198	348	420	445	460	505	545	580	610	630	660	680	685	650	560 ↓	8/13; △)			
	A (4)	207	225	380	470	425	525	575	590	610	620	660	660	690	650	715	700	(8/16; ●)			
	A (5)	199	207	370	440	465	500	555	675	610	620	660	660	690	700	730	730	580	560	420 ↓	(11/27; △)
	D (6)														679	680	700	710	(9/2; △)		
	D (7)														643	660	630	520 ↓	(9/15; ○)		
	D (8)														728	760	790	800	655	600 ↓	(11/23; △)
A S G 1	A (1)	192	247	350	420	450	465	475	505	510	525	570	550 ↓	(4/19; ●)							
	A (2)	195	234	330	410	430	450	460	495	510	530	560	570	630	600	600	580 ↓	(8/12; ●)			
	A (3)	181	266	470	620	700	785	810	895	950	1000	1050	1040	1100	1130	1130	1020	970	(9/8; ●)		
	D (4)														654	600	600 ↓	(8/22; △)			
	D (5)														840	890	870	1050	550 ↓	(10/19; △)	
A S G 2	A (1)	200	256	370	470	465	500	480	540	540	555	540	555	540	600	605	630	680 ↓	(9/17; △)		
	A (2)	197	247	345	410	510	565	605	680	630	705	730	760	750	820	840	840	750	(10/8; ○)		
	A (3)	195	261	390	480	510	595	590	595	600	620	615	640	660	670	680	690	710	700	490 ↓	(11/26; △)
	A (4)	200	253	370	450	480	505	500	550	550	560	670	595	610	620	650	670	710	710	640 ↓	(11/17; △)
	D (5)														701	720	750	790	790	760	(12/3; △)
A S G 3	A (1)	204	253	390	435	570	480	530	505	550	470	(1/27; ●)									
	A (2)	193	244	330	420	440	480	500	510	550	570	590	610	630	650	660	670	690	710	720	(11/14; △)
	D (3)														758	770	780	790	805	(10/22; ●)	

長期暴露実験の供試動物の飼育経過

次に、C及びD群では、A群と同様にいずれの測定時期においても各チャンパー間で体重に有意な差は認められなかった。しかし、A群と比較するとC及びD群の体重は搬入時から重く推移する傾向が各チャンパーとも認められた。なお、導入時週令の異なるB群についても、各チャンパー間で有意な差は認められなかった。

上記のように、各チャンパー間で体重の推移に有意な差異が認められないことは、第1回目のガス暴露でも報告されており¹⁾、今回のNO₂濃度の設定条件では、前回と同様、ラットの体重に与える影響はなかったと考察される。

3. 途中死亡個体についての考察

チャンパー内で実験飼育中に死亡した個体について、チャンパー搬入時から死亡するまでの体重の推移を表5に示した。

途中死亡個体21例のうち、死亡する前月に体重が減少した個体は15例あり、74%が体重に異常が認められたと考えられる。次に、各チャンパーの体重平均値と比較すると、ASCでは8例中6例、ASG-1では5例中4例、ASG-2では5例中3例、ASG-3では3例中1例と21例中15例(74%)が平均値以下の体重となっている。また、体重が平均値以下でしかも前月より減少した個体は21例中10例(47%)あり、体重の減少は何らかの病的徴候を示していると考えられる。

そこで、体重が減少して死亡した10個体について死因別に調査すると、下垂体腫瘍：6・衰弱：1・症状不明：3となり、この種の長期実験では体重の減少と下垂体腫瘍の関連が深いことが示唆された。なお、今回の下垂体腫瘍による死亡率は1.6%(9/576)であったが、これは文献²⁾と比較して少ない出現率であった。

以上、途中死亡個体について体重の推移より考察し、体重の減少が動物の異常の目安となることが示され、この種の長期実験では不可欠な測定項目であることが確認された。

謝 辞

本実験の実施に当たり、18か月間にわたる動物の飼育管理には日本クレア動物飼育管理部各位の協力を得た。ここに記して謝意を表する。

引用文献

- 1) 国立公害研究所(1980)：大気汚染物質の単一及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54年度研究報告，国立公害研究所研究報告，第15号。
- 2) 高橋 弘・相賀一郎・松本 茂・寺島貞二郎・額田正己(1977)：国立公害研究所動物用長期ガス暴露チャンパーの構造と性能について。日本生物環境調節学会第15回大会講演要旨集，35-36。
- 3) 小林雄一・高橋 弘・寺尾恵治・大政謙次(1980)：空調設備空調方式事例集一国立公害研究所動物実験用環境調節施設。経営開発センター出版部，364-393。
- 4) 国立公害研究所(1979)：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/

長期暴露実験の供試動物の飼育経過

53年度研究報告, 国立公害研究所研究報告, 第8号.

5) 今道友則 監修 (1979): 実験動物の飼育管理と手技, ソフトサイエンス社, 252.

6) 河合清之 代表 (1980): ラット長期飼育ワーキンググループ報告, *Exp. Anim.*, **29** (2), 181-23.

II-3

二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響
—病的形態学所見—

Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rats
—Morphological Observations—

京野洋子²・三枝順三・故 河合清之^{2,3}・山田靖子^{1,4}・久保田憲太郎¹

Hiroko KYONO², Jyunzo SAEGUSA², late Kiyoyuki KAWAI^{2,3},
Yasuko YAMADA^{1,4} and Kentaro KUBOTA¹

要 旨

Wistar系雄ラットに、NO₂を0.04, 0.12, 0.4 ppmの濃度で、3, 6, 9, 18か月連続暴露し、肺の病理形態学的観察を行った。このうち、0.04, 0.4 ppmへの9, 18か月暴露は再実験として行われた。顕微鏡観察のかぎりでは0.4 ppmレベルで3か月から18か月の暴露期間中、局所的に軽微な変化を認める頻度がやや増加し、全体としては疑陽性であった。0.4 ppm以下の低濃度のNO₂への連続暴露によって、18か月までの期間の範囲では顕微鏡レベルで十分確定出来る程の定型的肺病変の出現には至らないという第一実験の結果がほぼ支持された。

Abstract

Lungs of Jcl: Wistar male rats exposed to NO₂ at the concentration of 0.04, 0.12 and 0.4 ppm for 3, 6, 9 and 18 months continuously were submitted to lightmicroscopic observation. Exposure to 0.04 and 0.4 ppm NO₂ for 9 and 18 months was planned as a part of repeating experiment for the former report.

The lungs at the 0.4 ppm level showed ambiguous features with increased occurrences of local and minute changes during the exposure periods through 3 to 18 months. No definite and typical morphological alterations of the lung became evident throughout the whole

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 産業医学総合研究所 〒213 川崎市多摩区長尾6-21-1
National Institute of Industrial Health, Nagao 6-21-1, Tamaku, Kanagawa 213, Japan.
 3. 昭和57年1月18日逝去 (decided 18th January 1982)
 4. 現在 国立予防衛生研究所 〒190-12 武蔵村山市学園4-7-1
National Institute of Health, Gakuen 4-7-1, Musashimurayama, Tokyo 190-12, Japan.

exposure period as long as 18 months even at the concentration of 0.4 ppm NO₂ so far as lightmicroscopic observations, supporting the results of the former experiment.

はじめに

比較的低濃度領域の NO₂ への長期暴露による呼吸器病変の形態学的検索の知見が蓄積し、定型性病変の像に一致した見解が得られるようになった^{1,2,3)}。しかし、低濃度の長期暴露実験において、量・影響関係と暴露期間の関連を系統的に解折した研究は、前報を含め、きわめて少ない^{4,5)}。さらに十分整備された実験条件下において、長期暴露の再現性を検討した例はほとんどなく、本研究は用いた動物のロット、実験を行った季節、施設間の差などの附加的諸条件が、NO₂ の濃度・暴露期間等の主因子にどの程度修飾的に作用するのかを検討する上にも有意義であろう。

本報告は電顕検索が未了であり、光顕観察の範囲に限って判定した。

方 法

既報^{6,7)}の暴露条件に従って、8週令の JcL: Wistar 系雄ラットを用い、0.04 ppm, 0.12 ppm 及び 0.4 ppm NO₂ を連続 3 か月、6 か月、9 か月及び 18 か月の長期暴露を行った。検索した動物頭数は、1 群 6 匹で、6 か月の対照群及び 18 か月の全濃度群は 1 群 5 匹であった。

ラットは Na-ペントバルビタール (0.6 ml/animal) を腹腔内注射し、深麻酔下に頸動脈切断により約 6ml を採血した。続いて気管・肺を露出し、右肺肺門部を鉗子により結紮後離断し生化学的検索に用いた。残る左肺に冷したグルタルアルデヒド固定液 (1.5% glutaraldehyde in 0.088M cacodylate buffer, pH 7.4, 330 mOs) を 20 cm の高さより滴下し気管注入により再拡張固定した。グルタルアルデヒド中で一晚固定後中性フォルマリンで固定し、通常のパラフィン包埋切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン、アザン、エラストイカ・ワンギーソン各染色標本を用い光顕観察を行った。

結 果

1. 0.4 ppm 暴露群所見

0.4 ppm 18 か月の全暴露期間を通じて光顕的には著変を認めず、群全体としては確定的な定型病変が成立しているとは判定出来なかった。しかし気管支・末梢気道には部分的ながらごく軽微な病変も見られ、その出現頻度は他の濃度群より多かった。

3 か月暴露後、中等大気管支の非線毛上皮細胞が局所的にやや肥大し数個以上まとまって出現する (図 1) が、この部分でも塊状の増殖には至らず、線毛上皮の線毛には変化が見られない。しかし細気管支では対照群 (図 8) にくらべ明らかに非線毛細胞の突出が減少し滑らかな気管支腔面にはマクロファージの遊出像 (図 5) もしばしば見出す。末梢気道と肺胞道近傍では、気道上皮の軽度の肥大や肺胞道への気道上皮の増殖性延長を認め、又肺胞道の壁も軽度の結合織増加による肥厚を見る

(図9) 頻度がやや増す。その結果低拡大の光顕観察でも対照群肺(図16)にくらべ肺胞道部の存在が目につくことが多い(図13)。これらの変化はNO₂による定型的病変のごく初期に相当するものと判断されるが、動物の個体と肺部位によってわずかな差があり、部分的には陽性もあるが、群全体としては疑陽性の域にとどまっていた。

暴露6か月後には、全体として3か月暴露より変化はむしろ目立たなくなる。中等大気管支上皮では対照群と差異を見出さず、3か月で見られた局所の上皮の肥大も消失していた。細気管支から気道末端では上皮の突出減少は認めるが、肺胞道壁の肥厚性変化の増強はない(図17)。

暴露9か月でも6か月群と変わらず、終末気管支上皮の突出減少とごく軽微な肥大を認めることはあるが(図21)、対照群と差のない気道末端像も多い。

18か月後、中等大気管支では対照群と差を認めず(図25, 26)細気管支では(図27)3か月暴露でも認めた細胞の突出減少が同様に続いていた。末梢気道と肺胞道近傍でも3か月群とほぼ同程度のごく軽度な変化が全個体に、部分的ながら現れていた。しかしより強い病変への進展は示さず(図29)、全体としては疑陽性の段階を越えない。

2. 0.12 ppm 暴露群所見

中等大から細気管支上皮の反応は、18か月までの全暴露期間中対照群との差は確定出来ない(図2, 図6)。末梢気道と肺胞道近傍では、3か月, 18か月暴露群で、0.4 ppmと同様の、さらに軽い変化を局所的に見る(図10, 14, 30)が、6か月, 9か月群では対照群との差は明らかでない(図18, 図22)。

3. 0.04 ppm 暴露群所見

全暴露期間を通じ、対照群との差異を認めない(図3, 7, 11, 15, 19, 23, 31)。

考 察

0.04~0.4 ppm濃度のNO₂に3~18か月連続暴露されたラットの呼吸器病変は、全暴露期間を通じごく軽微であり、光顕観察の限りでは、NO₂による定型的肺病変の成立は見られず、結果は疑陽性にとどまっていた。しかし、0.4 ppmでは全観察時点で末梢気道上皮の突出減少と軽度の肥大を認める頻度が高く、3, 18か月暴露では、6, 9か月暴露よりやや強い印象があった。又0.12 ppmでも0.4 ppm群と似た像を、3, 18か月暴露群で局所的に見ることはあったが、6, 9か月暴露では対照群との差異は見出せず、0.04 ppmでは全期間中変化は認められなかった。

上記の結果は、前報第一実験の結果を支持するが、全体として本実験の病変がやや強く現れている印象があった。検索した動物頭数は第2実験の方が多く、動物の個体差についても注意したが、軽度の変化と判定される出現頻度にわずかな差はあるものの、変化そのものが全暴露期間を通じてかろうじて認められる以上の強さには達していない為に、個体差までは判定出来なかった。

光顕観察に限っての情報は十分とは云えないが、第一実験の 0.4 ppm 群で、9 か月では著変を認めず、18 か月で軽微な、27 か月で軽度の定型的病変を認めており、少なくとも 0.4 ppm 水準以上の暴露が長期にわたれば病変が発生すると考えられた⁴⁾。一方中島ら⁹⁾による 0.5~0.8 ppm 濃度の 1~1.5 か月連続暴露実験 (マウス)、三吉ら⁹⁾による 0.55~1.6 ppm、5 週間連続暴露実験 (マウス) で見られた比較的早期の末梢気管支上皮の増殖等を含む陽性結果にくらべ著しく緩徐に進展した印象を与える第一実験の結果は、9 か月以前に生じたごく軽度の反応の消退と、老齢期へ向かって再び徐々に病変の蓄積する可能性を示唆していた。

最近寺田ら⁹⁾は NO₂ 濃度 0.5~8 ppm への 1~4 週連続暴露及び 0.3~1.0 ppm への 3~18 か月暴露実験 (ラット) を行い、中等大気管支では、8, 4 ppm 群で 1 週後、2 ppm 群で 3 週後、0.5 ppm で 4 週後から病変が見出され、又暴露時間の経過と共に病変の領域が気道末梢方向へ拡大すると報告している。0.3~1.0 ppm 濃度への長期連続暴露では、0.5 ppm 18 か月暴露後に、中等大以下の気管支上皮に軽度の定型的変化が出現し、0.3 ppm 群では 3, 18 か月で疑陽性であるが全体として確定的ではなく、6, 12 か月では 0.3 ppm 3 か月群にみられた変化はむしろ弱まったと述べている。本実験の結果は寺田らの長期暴露の結果と基本的に一致を示すと考えられる。

京野ら¹⁰⁾は、0.1~10 ppm 濃度の NO₂ に生後、1, 3, 12, 21 か月齢のラットを各 1 か月連続暴露し、肺泡道を除く肺胞壁に関しての電顕形態計測を行い、暴露開始時の動物の月齢により同濃度の NO₂ に対する反応性あるいは感受性に差があり、若年期に比べ 12 か月齢の反応性が低く、21 か月齢で再び反応性が上昇すると述べており、又肺胞壁の組織量、肺胞腔と毛細血管内腔の合計表面積等の指標は、12 か月齢を除き、0.1~0.5 ppm の濃度でも対照群と有意差のあることを報告した。

Cabral-Anderson¹¹⁾、Evans¹²⁾等により、ラットの加齢と NO₂ による肺障害の進展の関係が追求され、加齢により初期障害に対する修復開始時期が遅れるため、障害の程度は大きくなるが、修復開始後は若いラットと同様に NO₂ 耐性が成立すると報告された。彼らのデータ中、25 か月齢の老ラットでは、11, 19 か月齢よりむしろ 1 か月齢の若いラットに近い結果が得られていることは、中年期での全般的反応性の低下と老齢期での反応性再上昇を示唆するものとも考えられる。

上記の報告と本実験を比較し、0.4 ppm 濃度の連続暴露により、3 か月以前に中等大気管支上皮にはごく軽度の線毛異常や肥大等が生じた可能性はあるが、一時的な反応として消退し、末梢気道上皮にのみ軽微な反応が、18 か月の暴露期間を通じ保たれていたと考えられる。この反応は 1~2 ppm 程度の低濃度 NO₂ への長期暴露により成立する、主として末梢気道上皮細胞の線毛消失、細胞質の突出減少と軽度の肥大による終末~呼吸気管支腔表面の平坦化等の定型病変と質的に同じであるが、出現部位が局所にとどまっている点で、反応はより弱く、結果は疑陽性と判定される。第一実験で示されたように暴露期間がさらに延長した時、0.4 ppm 水準の変化が増強される可能性は十分であるが、少なくとも 18 か月までの暴露期間では、期間の延長に伴う反応性の増強は光顕レベルで判定出来ない。3 か月暴露後に見られた反応は、6, 9 か月暴露後にやや弱まった印象もあり、この期間については、呼吸器病変の強さが、濃度×時間=全暴露量と相関を示さない。むしろ NO₂ 濃度

水準と、動物の加齢に伴う反応性に、より相関する病変が出現し、低濃度連続暴露下における耐性の獲得と関連して一定の変化をある期間持続していたと考えられた。

0.4 ppm での病変も疑陽性程度であり、0.04, 0.12 ppm 間の差は顕微鏡観察で当然確定は出来ないが、3, 18 か月暴露群では量・影響関係が成立していると思われた。第一、第二実験の結果は共に、寺田等の 0.5 ppm 18 か月の反応より明らかに弱い、0.3 ppm の反応とは区別出来ず、動物のロット差、季節・施設間差などの諸要素は、十分な管理下においては著しい差異をもたらさず、病変の発現は主として NO₂ 濃度水準により定まると考えられた。

第一実験でも示されたように、低濃度域の NO₂ による病変の進展が、加齢が進む 18 か月齢以後、生体側の反応性の変化と共に強まるか或いは質的に変わることは十分予想され得る。特に肺胞間質の加齢に伴う肥厚^{10,13}) に対し、線維化等の変化を低濃度の NO₂ 暴露がどの程度加速し得るかの問題は、2 ppm 生涯暴露により肺胞腔の大きさに不整を生ずる²⁾ ことと、肺の弾性系の変化^{14,15)} との関連、さらに生命の長い動物にとっては軽度の肺気腫への進展¹⁶⁾ との関連を検討する上で十分解明されてはならず、今後電子顕微鏡レベルで追求すべき課題として残されている。

引用文献

- 1) Freeman, G., N. J. Furioli and G. B. Hydon (1966): Effects of continuous exposure of 0.8 ppm NO₂ on respiration of rats: Arch. Environ. Health, **13**, 454-456.
- 2) Freeman, G., R. J. Stephens, S. C. Cane and N. J. Furioli (1968): Lesion of the lung in rats continuously exposed to two parts per million of nitrogen dioxide: Arch. Environ. Health, **7**, 181-192.
- 3) Stephens, R. J., G. Freeman, S. C. Cane and N. J. Furioli (1971): Ultrastructural changes in the terminal bronchiole of the rat during continuous, low-level exposure to nitrogen dioxide: Expl. Mol. Pathol., **14**, 1-19.
- 4) 竹中参二・清水不二雄・山田靖子・堀内博人・今井 透・原田隆彦・京野洋子・河合清之: 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響—病理形態学的所見. 国立公害研究所研究報告, R-15-'80, p 171-227.
- 5) 寺田伸枝・鈴木孝人・大沢誠喜・福田雅夫・溝口 勲・河合清之 (1981): NO₂ 暴露によるラットの肺の病理形態学的変化. 都立衛研年報, **32-1**, 250-256
- 6) 松本 茂・藤田和伸・清水 明・木村英雄・高橋 弘: 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響—暴露チャンバーの環境制御. 国立公害研究所研究報告, R-15-'80, p 149-158.
- 7) 高橋 弘・山元昭二・石村俊治・高橋慎司・寺尾恵治: 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響—供試動物の飼育経過. 国立公害研究所研究報告, R-15-'80, p 159-169.
- 8) Nakajima, T., H. Oda, S. Kusumoto and H. Nogami (1980): Biological effects of nitrogen dioxide and nitric oxide, in Nitrogen Oxides, S. D. Lee ed. Michigan: Ann Arbor science, 122-141.
- 9) 三吉康郎・井土ふさ・中野東右・新山宏二・若林致雄 (1980): SO₂ ならびに NO₂ 暴露後のマウス気管粘膜上皮の走査電子顕微鏡的観察. 日本気管食道科学会会報, **24** (1) 1-8.
- 10) Kyono, H. and K. Kawai (1982): Morphometric study on age-dependent pulmonary lesions in rats exposed to nitrogen dioxide. Ind. Health, **20** (2), 73-99.
- 11) Cabral-Anderson, L. J., M. J. Evans and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats I Morphology: Exp. and Mol. Pathol., **27**, 353-365.
- 12) Evans, M. J., L. J. Cabral-Anderson and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats II Cell proliferation. Exp. Mol. Pathol., **27**, 366-376.
- 13) 上田慎太郎・石井信義・林 和宏・松本章一 (1980): 肺の加齢変化. 細胞, **12** (13) 52-55.
- 14) Stephens, R. J., G. Freeman and M. J. Evans (1971): Ultrastructural changes in connective tissue in lungs of rats

exposed to NO₂: Arch. Intern. Med.. **127**, 873-883.

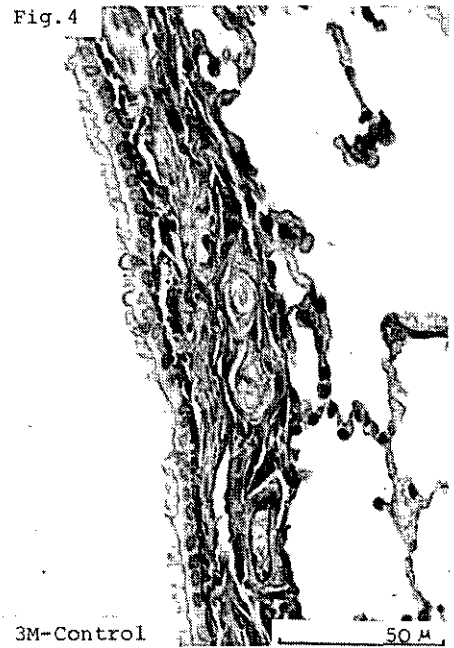
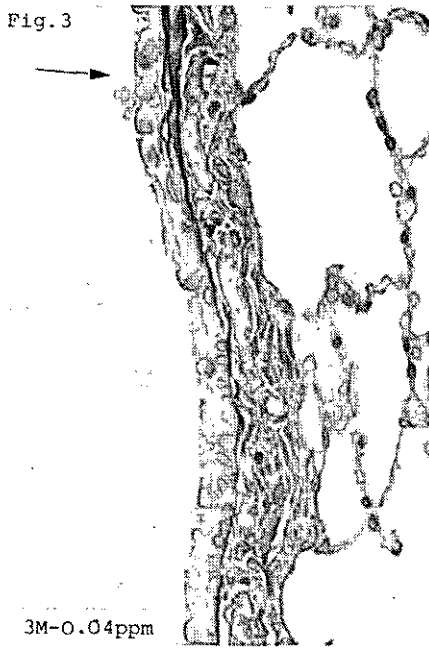
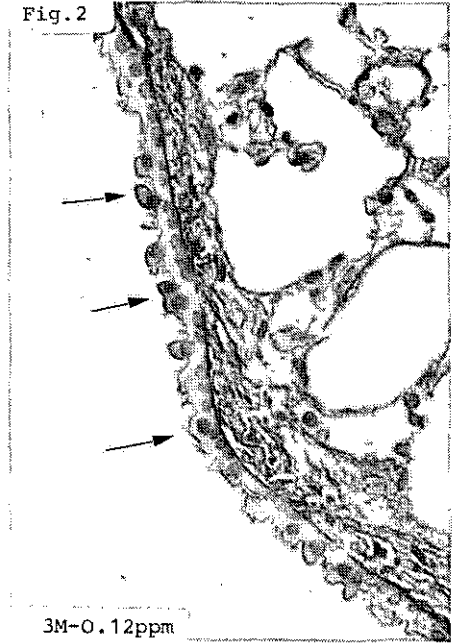
- 15) Drózd, M. E. Kucharz and J. Szyja (1977): Effect of chronic exposure to nitrogen dioxide on collagen content in lung and skin of guinea pigs: Environ. Res., **13**, 369-377.
- 16) Hyde, D. J. Orthofer, D. Dungworth, E. Tyler, R. Carter and H. Lum (1978): Morphometric and morphologic evaluation of pulmonary lesions in beagle dogs chronically exposed to high ambient levels of air pollutants: Lab. Invest., **38**, 455-469.

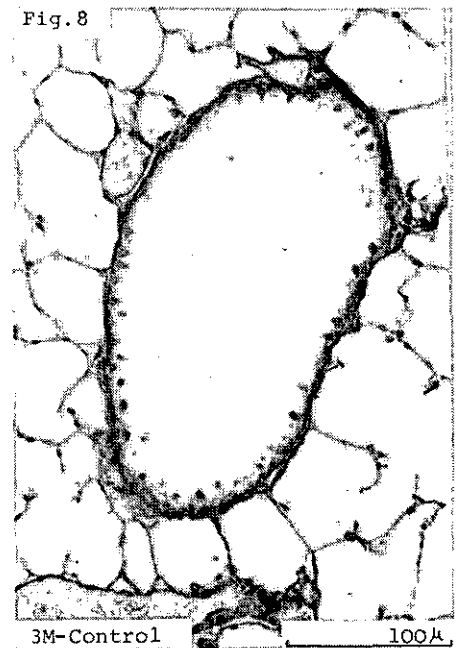
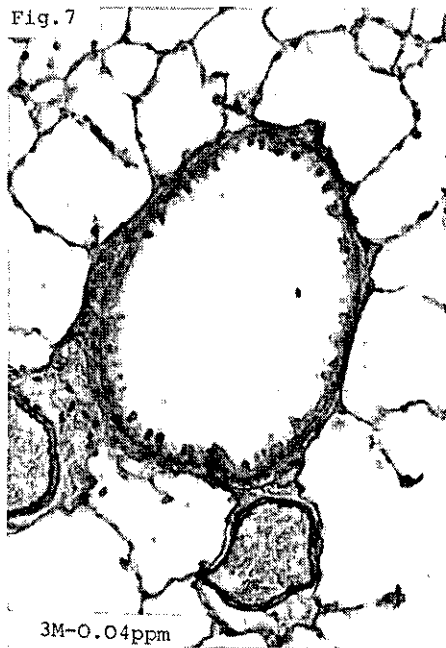
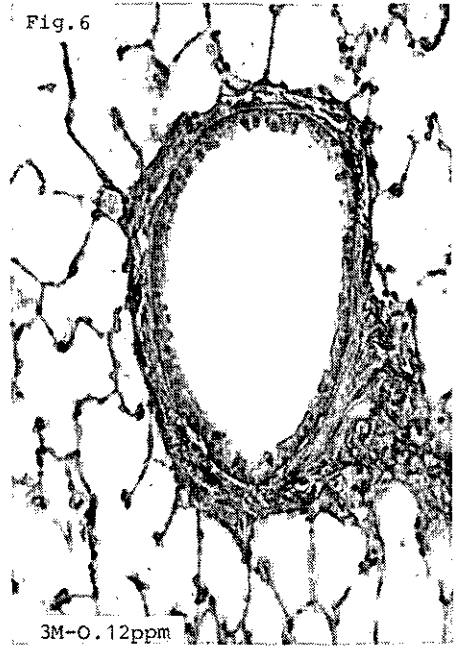
写 真 説 明

- 図 1 0.4 ppm 3か月気管支上皮：非線毛上皮の局所的増殖と軽度の肥大（矢印）
エラスチカ・ワンギーソン染色
- Fig. 1 0.4 ppm 3M Bronchial epithelium: A partial proliferation and a minute hypertrophy of non-ciliated epithelium (arrows).
All the figures are from the preparations stained with Elastica van-Gieson.
- 図 2 0.12 ppm 3か月気管支上皮：非線毛上皮（矢印）の突出と数の増加
- Fig. 2 0.12 ppm 3M Bronchial epithelium: Extrusion and a slight increase in the number of non-ciliated epithelium (arrows).
- 図 3 0.04 ppm 3か月気管支上皮：非線毛上皮の軽度の肥大がまれに出現する
- Fig. 3 0.04 ppm 3M Bronchial epithelium: A rare occurrence of slightly hypertrophic foci of non-ciliated epithelium.
- 図 4 対照群3か月気管支上皮
- Fig. 4 Control 3M Bronchial epithelium.
- 図 5 0.4 ppm 3か月細気管支上皮：上皮細胞突出が減少し腔面が滑らかとなる
線毛の消失、又は短縮、肺胞喰細胞の附着がしばしば見られる
- Fig. 5 0.4 ppm 3M Bronchiolar epithelium: Smooth surface of the bronchiolar lumen without extrusion of non-ciliated epithelium.
Loss or shortening of cilia and attachment of alveolar macrophages are frequently encountered.
- 図 6 0.12 ppm 3か月細気管支上皮：部分的に細胞の突出消失
- Fig. 6 0.12 ppm 3M Bronchiolar epithelium: Cellular extrusions disappear in part.
- 図 7 0.04 ppm 3か月細気管支上皮：対照群と差を認めない
- Fig. 7 0.04 ppm 3M Bronchiolar epithelium: No definite change.
- 図 8 対照群3か月細気管支：非線毛上皮の規則的な突出
- Fig. 8 Control 3M Bronchiolar epithelium: A regular arrangement for extruded non-ciliated cells.
- 図 9 0.4 ppm 3か月末梢気道：末梢気道上皮の軽度の肥大と肺胞道への増殖性
延長、軽度の肺胞道壁肥厚（矢印）
- Fig. 9 0.4 ppm 3M Terminal airway: Mild hypertrophy of the epithelium of terminal airway and proliferative extrusion into the alveolar duct.
Slightly thickened wall of the alveolar duct (arrows).
- 図 10 0.12 ppm 3 か月末梢気道：肺胞道壁の軽度の肥厚（矢印）
- Fig. 10 0.12 ppm 3M Terminal airway: A part of the wall of alveolar duct with a trace of thickening.

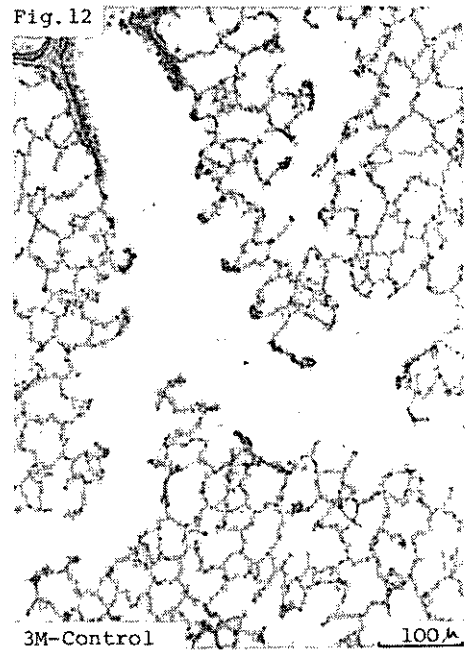
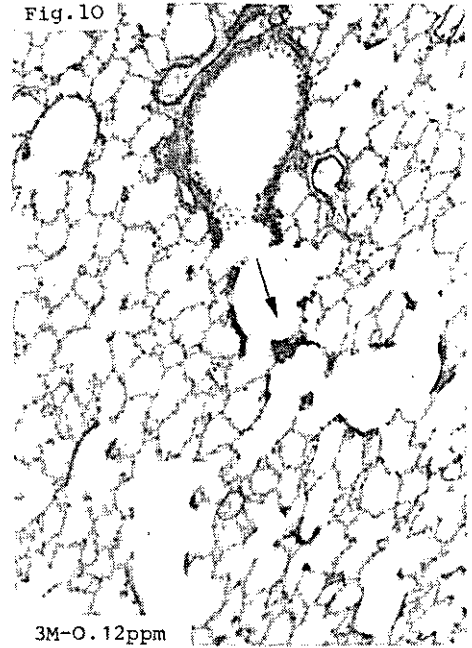
- 図 11 0.04 ppm 3 か月末梢気道：対照群との差を認めない
Fig. 11 0.04 ppm 3M Terminal airway: No definite difference to the control.
- 図 12 対照群3か月末梢気道
Fig. 12 Control 3M Terminal airway
- 図 13 0.4 ppm 3か月肺胞：一部の肺胞道で軽度の肥厚が見られる（矢印）
Fig. 13 0.4 ppm 3M Alveoli: Some of the alveolar ducts show a trace of thickening (arrows)
- 図 14 0.11 ppm 3か月肺胞：0.4 ppmと似た像が見られる
Fig. 14 0.12 ppm 3M Alveoli: A similar appearance to the 0.4 ppm figure.
- 図 15 0.04 ppm 3か月肺胞：変化は認められない
Fig. 15 0.04 ppm 3M Alveoli: No remarkable change.
- 図 16 対照群3か月肺胞
Fig. 16 Control 3M Alveoli.
- 図 17 0.4 ppm 6か月末梢気道：肺胞道に軽度の肥厚を認めることがある
Fig. 17 0.4 ppm 6M Terminal airway: A minute thickening of alveolar duct.
- 図 18 0.12 ppm 6か月末梢気道：特記すべき所見を認めない
Fig. 18 0.12 ppm 6M Terminal airway: No definite change.
- 図 19 0.04 ppm 6 6 月末梢気道：特記すべき所見を認めない
Fig. 19 0.04 ppm 6M Terminal airway: No definite change.
- 図 20 対照群 6 か月末梢気道：特記すべき所見を認めない
Fig. 20 Control 6M Terminal airway: No definite change.
- 図 21 0.4 ppm 9か月末梢気道：末梢気道上皮の軽度の肥大（矢印）
肺胞道の肥厚は必ずしも明らかでない。
Fig. 21 0.4 ppm 9M Terminal airway: Slightly hypertrophic bronchiolar epithelium.
Thickening of the walls of alveolar duct is not clear.
- 図 22 0.12 ppm 9か月末梢気道：特記すべき所見を認めなか
Fig. 22 0.12 ppm 9M Terminal airway: No definite change.
- 図 23 0.04 ppm 9か月末梢気道：特記すべき所見を認めなか
Fig. 23 0.04 ppm 9M Terminal airway: No definite change.
- 図 24 対照群9か月末梢気道：特記すべき所見を認めない
Fig. 24 Control 9M Terminal airway: No definite change.

- 図 25 0.4 ppm 18 か月気管支上皮：特記すべき所見を認めない
Fig. 25 0.4 ppm 18M Bronchial epithelium : No remarkable alteration.
- 図 26 対照群18か月気管支上皮
Fig. 26 Control 18M Bronchial epithelium.
- 図 27 0.4 ppm 18か月細気管支上皮：非線毛上皮細胞の突出消失による滑らかな腔面，粘膜下結合織への細胞浸潤は認めない
Fig. 27 0.4 ppm 18M Bronchiolar epithelium : Smoothing of bronchiolar lumen due to the loss of cytoplasmic extrusion of non-ciliated epithelia. No cellular infiltration into the submucosal layer.
- 図 28 対照群18か月細気管支上皮
Fig. 28 Control 18M Bronchiolar epithelium.
- 図 29 0.4 ppm 18か月末梢気道：気道上皮の軽度の肥大と肺胞道への延長（矢印）
Fig. 29 0.4 ppm 18M Terminal airway : A minute hypertrophy of epithelium and proliferative extrusion into the alveolar duct (arrow).
- 図 30 0.12 ppm 18か月末梢気道：気道上皮の軽度の肥大
Fig. 30 0.12 ppm 18M Terminal airway : A slightly hypertrophic epithelia at the terminal airways are seen sporadically.
- 図 31 0.04 ppm 18か月末梢気道：変化は確定出来ない
Fig. 31 0.04 ppm 18M Terminal airway : No definite change.
- 図 32 対照群18か月末梢気道：変化は確定出来ない
Fig. 32 Control 18M Terminal airway : No definite change.





NO₂ 長期暴露ラットの病理形態学的所見



NO₂ 長期暴露ラットの病理形態学的所見

Fig. 13

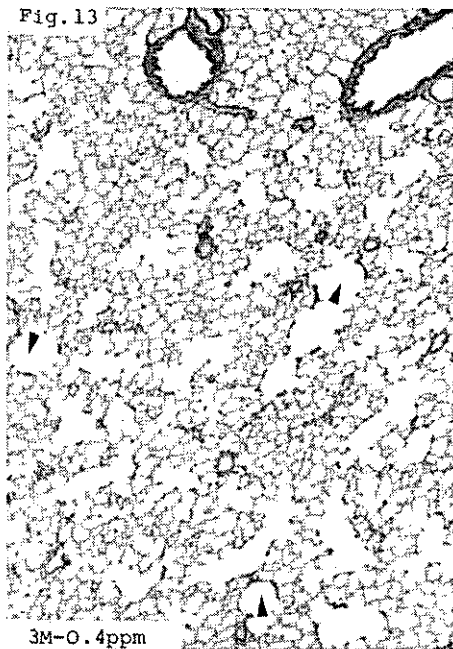


Fig. 14

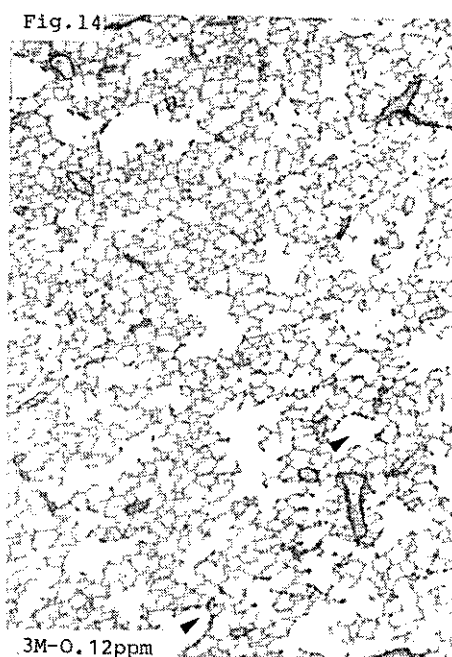
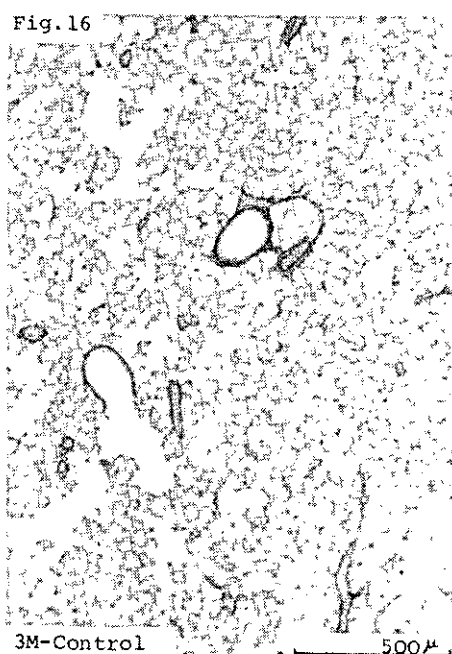


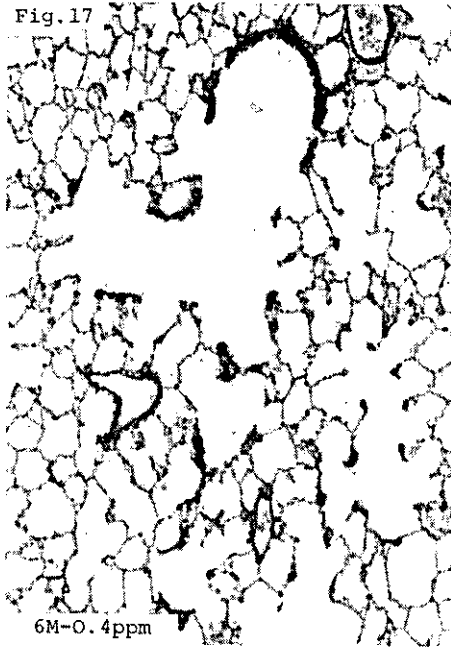
Fig. 15

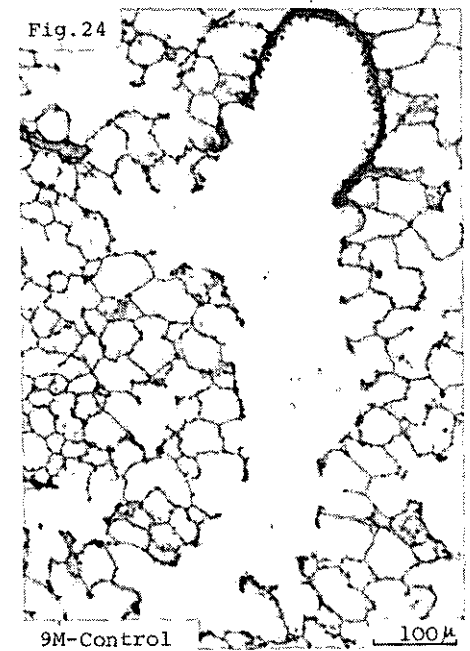
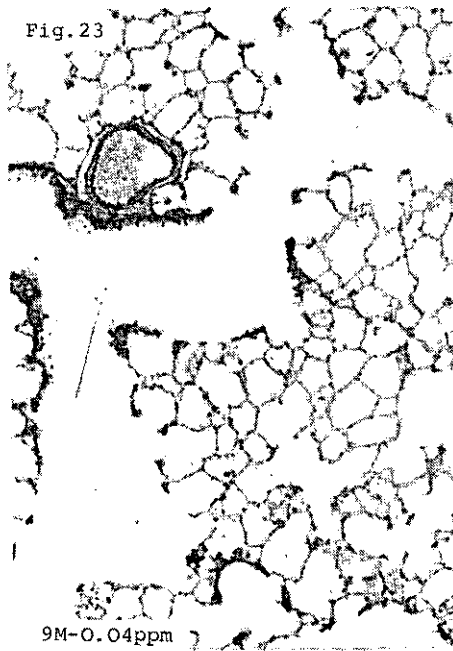
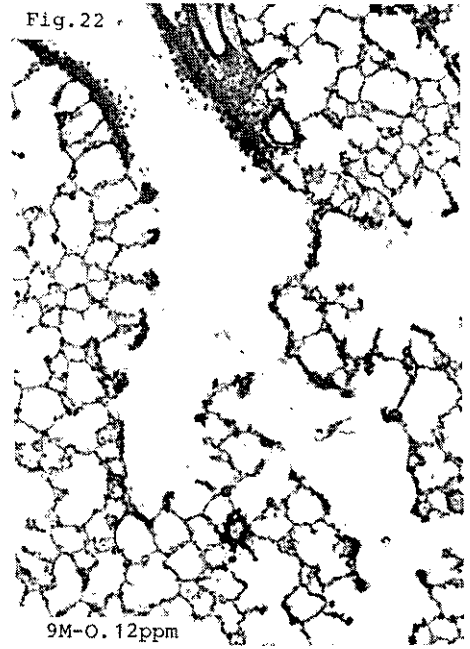
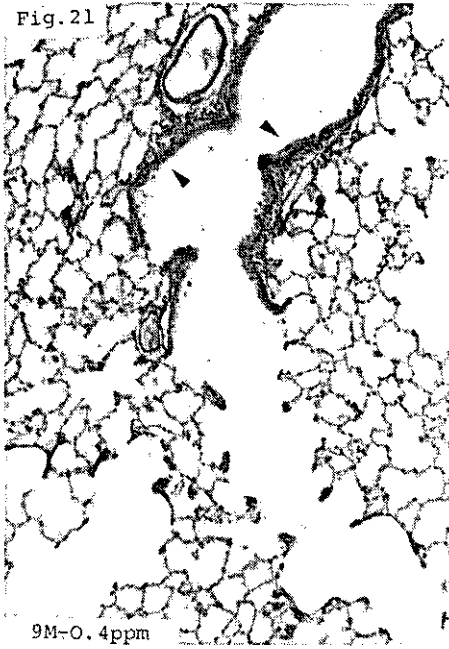


Fig. 16

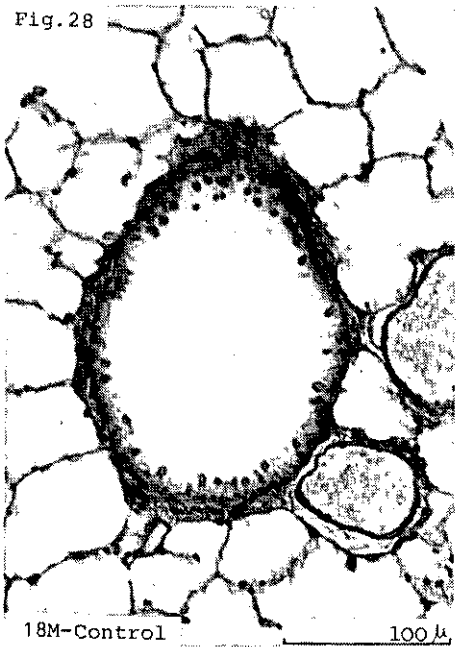
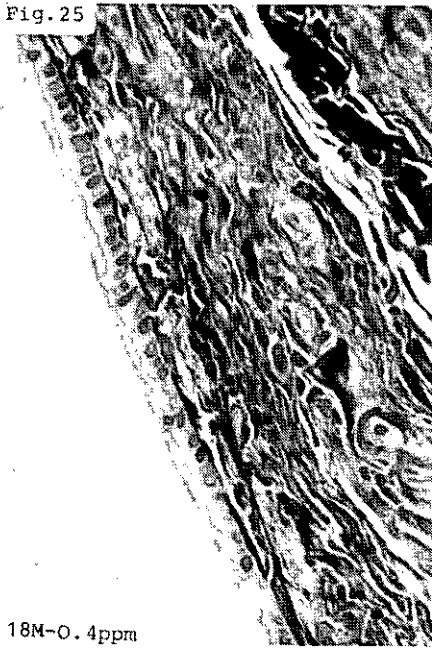


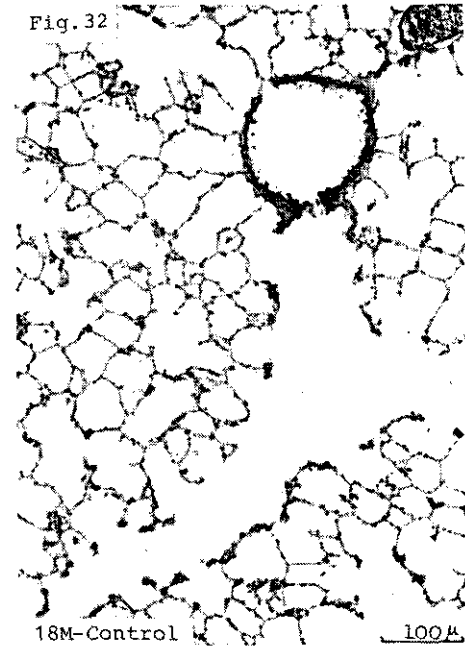
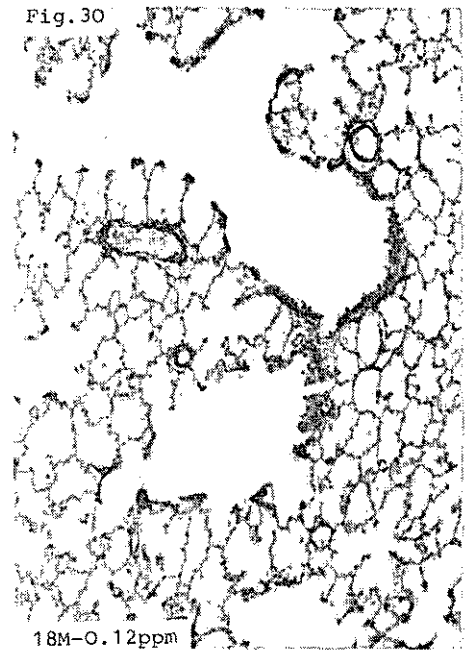
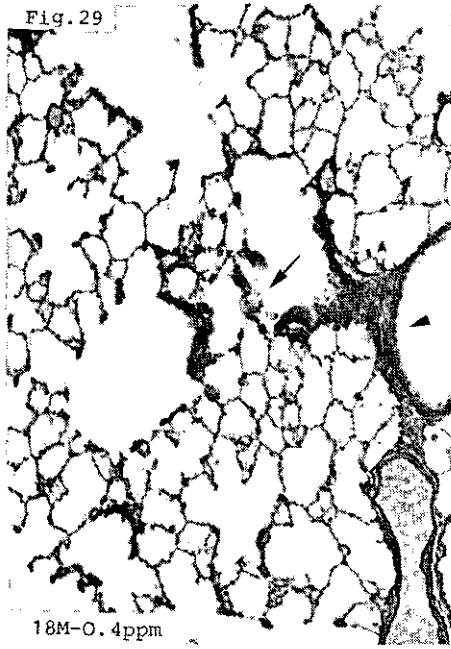
NO₂ 長期暴露ラットの病理形態学的所見





NO₂ 長期暴露ラットの病理形態学的所見





II-4

二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響

—酸素消費量の変化について—

Effects of Long Term Exposure to Nitrogen Dioxide on Rats

—O₂ Consumption —

鈴木 明¹・局 博一¹・嵯峨井 勝¹

Akira K. SUZUKI¹, Hirokazu TSUBONE¹ and Masaru SAGAI¹

要 旨

NO₂の低濃度長期暴露がラットの呼吸代謝及び、ガス代謝に及ぼす影響を検索するために、低濃度の0.04, 0.12ないし0.4 ppmのNO₂をラットに3, 6, 9か月間暴露し、分時換気量(\dot{V}_E)、呼吸数(RR)、一回換気量(V_T)、収集した呼気ガス(O₂, CO₂)について分析した。0.04 ppm NO₂暴露群で分時換気量(\dot{V}_E)は、対照群の10-23%の増加を示し、RRもまた7-18%の増加を示し、低濃度長期間暴露ラットではRRの増加だけでなく換気量も増加していることが明らかとなった。また呼気ガスを分析した結果、酸素消費量は0.04 ppm及び0.12 ppm暴露群で対照群の23~38%の増加を示した。その増加率は3, 6, 9か月間暴露というように暴露期間の延長に伴って小さくなる傾向がみとめられた。低濃度NO₂暴露における酸素消費量の増加については、呼吸生理学的立場からより詳細な検討を加える必要があると考えられた。

Abstract

To elucidate the chronic effects of NO₂ exposure on gaseous exchange or metabolism in the lung and whole body, rats were exposed to NO₂ at concentrations of 0.04, 0.12 and 0.40 ppm for 3, 6 and 9 months, respiratory rate (RR), minute ventilation volume (\dot{V}_E), tidal volume (V_T) and collected expired gas tensions (O₂, CO₂) were examined for exposed and control. \dot{V}_E of rats exposed to 0.04 ppm was increased to 110-123% of the control. RR of the rats was also increased to 107-118% of the control. These findings show that low concentration of NO₂ affect not only an increase of RR but also an increase of ventilatory volume. O₂ consumption of rats exposed to 0.04 ppm and 0.12 ppm NO₂ for 3, 6, 9 months was increased to 123-138% of the control and the longer the exposure period was, the smaller the value of O₂ consumption was.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

はじめに

二酸化窒素 (NO_2) は、主として内燃機関等から排出され空気中に広く分布し、光化学オキシダントの生成に関与する物質として注目され、その生体影響に関する研究が進められている。近年になり、 ^{15}N のような安定同位元素を使用した実験¹⁾、あるいは血中の硝酸及び亜硝酸を測定した実験²⁾ によって、 NO_2 は比較적すみやかに体内に分布することが確認されている。したがって NO_2 は呼吸器系ばかりではなく他の各種組織に影響を与えることが推測される。一方、数 ppm 以上の NO_2 は肺内末梢部まで入り、呼吸器に形態学的変化^{3,4)} あるいは機能的変化^{5,6)} を引き起こすことが知られている。したがって NO_2 暴露による呼吸器障害としては、肺におけるガス交換機能が変化し^{7,8)}、動脈血酸素分圧の低下を起こす^{9,10)} ことが報告されている。これらの事実は、生体内での呼吸ガスに係わる代謝にも影響が及ぶ可能性があることを示唆している。

そこで、 NO_2 の低濃度長期暴露の影響を検索する一手段として、肺に顕著な形態学的変化を引き起こさないで¹¹⁾、かつ実際の大気濃度レベルと考えられる 0.04 ppm を最低濃度として、 NO_2 をラットに暴露し、収集した呼気ガスについて分析を試みた。

材料及び方法

8週令の Jcl: Wistar 系雄ラットを使用し、暴露期間中滅菌した市販の餌と滅菌水を自由飽食させた。 NO_2 はボンベから供給され、暴露チャンバーに入る前に、動物暴露装置 (小糸工業) によって清浄空気、0.04, 0.12, 0.4 ppm の NO_2 濃度に希釈された。ラットは毎時 50 回換気の角錐型チャンバー (気積約 2.3 m³) 内で 3, 6, 9 か月間 NO_2 に暴露された。対照群の動物は、 NO_2 暴露と同じ方式で、清浄空気だけで暴露された。チャンバー内の NO_2 濃度はケミルミネッセンス方式の窒素酸化物分析器 (Thermoelectron NO_x analyzer と Monitor Lab., ML 8440 ES) で連続的にモニターされ、また温度は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 以内に、そして相対湿度は $50 \pm 10\%$ 以内に維持された。

O_2 , CO_2 分析用呼気ガスは、Pentobarbital sodium (25mg/kg. B.W., iv) 麻酔下で呼気・吸気分離装置¹²⁾ を用いて収集された。 O_2 , CO_2 濃度は、 O_2 , CO_2 分析器 (三栄測器 1H21) によって、ガス分圧及び含有率を測定した。また分時換気量 (\dot{V}_E) を呼気収集量から、また一回換気量 (V_T) を \dot{V}_E を呼吸数で除算して求めた。この場合は、呼気量が分時換気量に近似していると仮定した。呼吸数は呼気・吸気分離装置から出力される信号から算出した。 O_2 , CO_2 分析器は標準ガス (O_2 : 16.2%, CO_2 : 4.9%, N_2 バランス) によって較正された。呼気ガス収集量及び O_2 , CO_2 ガス分析値は、すべて BTPS (Body Temperature and Pressure with Saturated Water) に換算した。したがって本報告における対照群と暴露群との相対的比較は、BTPS で算出した値について二次的処理をしている。

結 果

1. 呼吸数 (RR), 分時換気量 (\dot{V}_E), 一回換気量 (V_T) の変化

3, 6, 9 か月間 NO₂ 暴露時の RR, \dot{V}_E , V_T の対照群に対する相対的变化を図 1 に示した。いずれの暴露期間においても 0.04 ppm 群で \dot{V}_E は対照群の 10-23 % の増加を示し, RR もまた 7-18 % の増加を示した。また, RR は 3 か月間暴露及び 6 か月間暴露ではいずれの濃度においても 7-20 % の増加を示したが, 9 か月間暴露の 0.12 ppm 及び 0.4 ppm 暴露群では対照とほとんど差がなかった。3 か月間暴露の 0.12 ppm 群および 0.4 ppm 群では \dot{V}_E , V_T ともに対照群より減少した。9 か月間暴露の V_T はいずれの暴露濃度においても対照群とほとんど差がなかった。

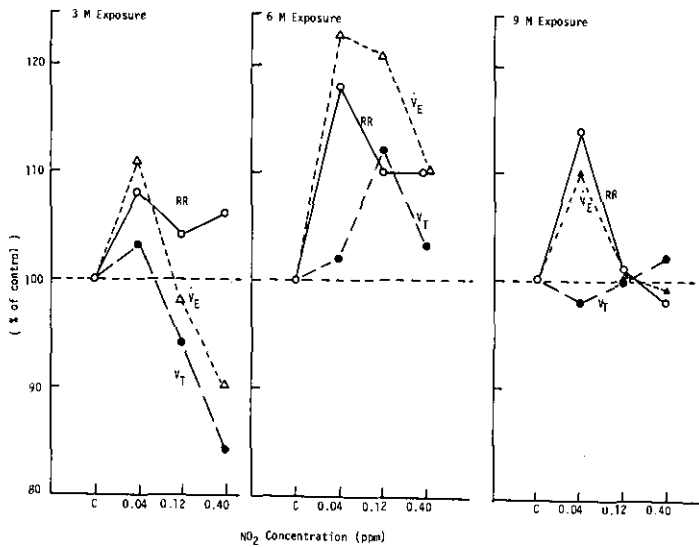


図 1 呼吸数(RR) 分時換気量(\dot{V}_E) 一回換気量(V_T)の変化

Fig. 1 Changes of respiratory rate(RR), minute ventilation volume(\dot{V}_E) and tidal volume(V_T) in rats exposed to NO₂ at concentrations of 0.04, 0.12 and 0.40 ppm for 3, 6 and 9 months. Values show relative change(% of control).

2. 呼気ガス中の O₂, CO₂ 濃度の変化

収集した呼気ガス中の O₂, CO₂ 濃度を求め, O₂ については純粋空気(O₂: 20.9%, CO₂: 0.0%, N₂ バランス) との差を ΔO_2 とし, CO₂ 濃度を ΔCO_2 として対照群と比較して相対的变化を図 2 に示した。3 か月間暴露では ΔO_2 , ΔCO_2 は 0.04 ないし 0.12 ppm で対照群と比較して増加を示すが, 0.4 ppm 暴露群では逆に減少を示した。また, 6 か月間及び 9 か月間暴露では, 絶対量が大きいとは必ずしもいえないが, いずれの濃度においても ΔO_2 より ΔCO_2 の方が大きい事を示した。しかしな

がら、その変化の様相は6か月間暴露と9か月間暴露では顕著に異なった、すなわち、6か月間暴露では ΔCO_2 が0.04, 0.12 ppm 暴露群で増加傾向を示し、0.40 ppm 暴露では ΔO_2 とともに減少したのに対し、9か月間暴露では0.04 ppm 群で ΔCO_2 , ΔO_2 ともにわずかに減少し、0.40 ppm 暴露群では ΔCO_2 , ΔO_2 ともに増加を示した。

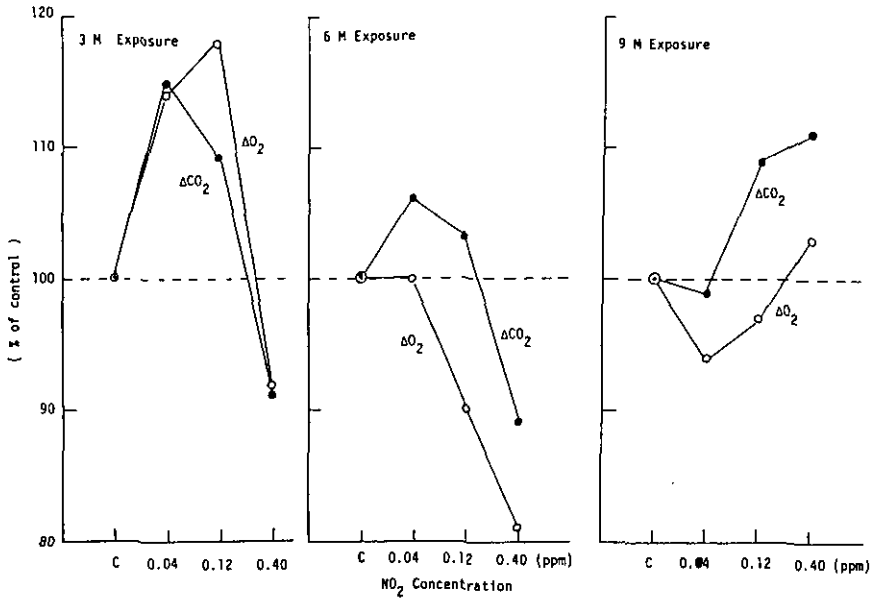


図 2 ΔO_2 と ΔCO_2 の変化

Fig. 2 Changes of ΔO_2 and ΔCO_2 in rats exposed to NO_2 at concentrations of 0.04, 0.12 and 0.40 ppm for 3, 6 and 9 months, Values show relative change (% of control).

3. 酸素消費量

定法に従い BTPS の O_2 消費量を計算し、対照群を 100% として相対的变化を示したのが図 3 である。3 か月間暴露の 0.04 及び 0.12 ppm 群では対照群と比較して高い値 (23~38%) を示したが、0.40 ppm 暴露では対照群の約 85% と低い値を示した。また、 O_2 消費量は、3, 6, 9 か月間暴露というように暴露期間の延長に伴って小さくなる傾向があったが、0.04 ppm 及び 0.12 ppm 群では対照群より大きい傾向を示し、0.40 ppm では 3 か月間暴露とほぼ同じ値を示した。

考 察

肺組織における酸素消費量は 0.8 ppm のオゾン 7 日間暴露において対照群より増加するという報告^{13,14)}がある。また NO_2 暴露したマウス肺切片において、酸素消費が増加したという報告¹⁵⁾もある。しかしこれらの報告はいずれも比較的高濃度での結果である。今回の報告のように現実的な濃

NO₂ 長期暴露ラットの酸素消費量の変化

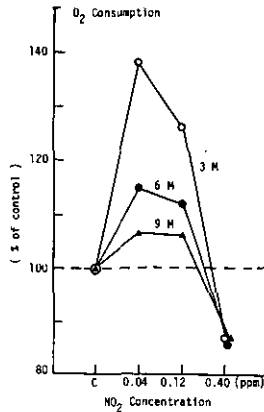


図 3 酸素消費量の変化

Fig. 3 Changes of O₂ consumption in rats exposed to NO₂ at concentrations of 0.04, 0.12 and 0.40 ppm for 3, 6 and 9 months, Values show relative change (% of control).

度である 0.04 ppm 3, 6 及び 9 か月間暴露において酸素消費量が増加するという報告はなされていない。また、本実験結果は、組織片というより whole body としての酸素摂取から計算したものであるから、NO₂ 暴露による肺障害という要因を除けば生体 1 個体内の変化を示していると考えられる。ところで、0.04 ppm 9 か月間暴露では、病理学的な顕著な変化はいまのところ認められていない¹¹⁾。したがって、0.04 ppm 9 か月間暴露の変化については肺の形態学的障害といった肺性要因をとり除いて考えることができよう。しかしながら本実験結果のように最高で対照の 38% という増加は、呼吸代謝の点から考えると大きすぎる値であるとも考えることもできる。即ち、この O₂ がすべて生体内の代謝に使用されたと考えるとかなり多くの酸素を必要とする運動や労働をしている¹⁶⁾ことになる。一方、血中の酸素は、組織内での呼吸代謝だけに使用されるとは限らず、血中での細胞膜での附着及び脂質の過酸化反応を起し¹⁷⁾たりしている可能性が推測され、今後組織で実際に呼吸代謝として消費される酸素量を求めることが必要であると考えられる。また、酸素消費量の増加率が、3, 6 及び 9 か月間暴露というように暴露期間の延長に伴って減少した。ヒトでは、酸素消費量は老齢者より若齢者の方が呼吸量が大きく¹⁸⁾さらに酸素消費量が大きい¹⁹⁾といわれている。したがって、本実験結果は、NO₂ 暴露による応答の差ばかりではなく、年齢による差をも考慮することが必要であることを示している。

また、0.4 ppm 9 か月間暴露では、暴露群の酸素消費量は対照群と比較して低下した。しかしこの時の呼気中の ΔO₂ 及び ΔCO₂ は増加の傾向を示し、換気量は対照群のレベルと同程度であった。これらの事は、0.4 ppm の NO₂ 9 か月間暴露ラットでの動脈血中 PaO₂ の有意な低下¹⁰⁾、及び、竹中ら¹¹⁾、河野と林⁹⁾らの病理学的知見を考慮すると、形態学的肺壁性要因も加わって、肺における PAO₂

低下に伴うガス交換が低下し、いわゆるハイポキセミアになったためにみかけ上の低酸素消費になったのかもしれない。

いずれにしても、NO₂ 暴露と酸素消費の関係は複雑な関係であるといわざるをえず、今後組織レベルあるいは器官レベルでのより詳細な検討が必要であると考えられる。ここに提示した成績は今後の解決すべき問題の一つとして重要であると考えた。

引用文献

- 1) Ohta, Y., M. Yamada, Y. Yoneyama, A. K. Suzuki and I. Wakisaka (1982): Dynamic study on animal experiments using ¹⁵N-labeled nitrogen dioxide, in *Stable Isotope*, H. L. Schmidt et al ed. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 557 — 561.
- 2) Oda, H., H. Tsubone, A. K. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide, *Environ. Res.*, **25**, 294-301.
- 3) 河野俊彦・林 豊(1981): 二酸化窒素の呼吸器に及ぼす影響に関する実験的研究——ことに肺胞における病理組織学的変化, *大気汚染学会誌*, **16**, 313-327.
- 4) Freeman, G., S. C. Crane, N. J. Furioli, R. J. Stephens, M. J. Evans and W. D. Moore (1972): Covert reduction in ventilatory surface in rats during prolonged exposure to subacute nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **106**, 563-579.
- 5) 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.
- 6) Arner, E. C and R. A. Rhoades (1973): Long-term nitrogen dioxide exposure-effects on lung lipids and mechanical properties. *Arch. Environ. Health*, **26**, 156-160.
- 7) Suzuki, A. K., H. Tsubone and K. Kubota (1982): Changes of gaseous exchange in the lung of mice acutely exposed to nitrogen dioxide. *Toxicol. Letters*, **10**, 327-335.
- 8) Suzuki, A. K., H. Tsubone, M. Sagai and K. Kubota (1982): Changes of gaseous exchange in the lung of mice exposed to nitrogen dioxide and their recovery process. *Toxicol. Letters*, **13**, 71-79.
- 9) 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・織田 肇・久保田憲太郎(1981): 二酸化窒素亜急性暴露がラットの動脈血 pH_a, P_aCO₂, P_aO₂ に及ぼす影響。日本衛生学雑誌, **36**, 816-823.
- 10) 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇・久保田憲太郎(1980): NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響——血液性状の変化——。第 21 回大気汚染学会講演要旨集, **702**.
- 11) 竹中参二・河合清之・清水不二雄・山田靖子・堀内博人・今井 透・原田隆彦・京野洋子・久保田憲太郎(1980): NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響, **3**, 病理形態学的変化。第 21 回大気汚染学会講演要旨集, **703**.
- 12) 清水 明・局 博一・鈴木 明(1981): ラットの呼気・吸気分離装置について——装置の機能とその応用——。国公研研究報告, **31**, 21-29.
- 13) Mustafa, M. G., A. D. Hacker, J. J. Ospital, M. Z. Hussain and S. D. Lee (1977): Biochemical effects of environmental oxidants pollutants in animal lungs, in *Biochemical Effects of Environmental pollutants*, S. D. Lee ed. Ann. Arbor Science Publishers, Mich, p59.
- 14) Mustafa, M. G., J. J. Ospital and A. D. Hacker (1976): Effects of ozone and nitrogen dioxide exposure on lung metabolism. *Environ. Health Perspectives*, **16**, 184.
- 15) Buckley, R. D. and C. G. Loosli (1969): Effects of nitrogen dioxide inhalation on germfree mouse lung, *Arch. Environ. Health*, **18**, 588-595.
- 16) Cotes, J. E. (1979): *Lung function, assessment and application in medicine*, 4th ed. Blackwell Scientific Publication.

NO₂ 長期暴露ラットの酸素消費量の変化

- 17) Mudd, J. B. and B. A. Freeman (1977): Reaction of ozon with biochemical membranes, in Biochemical effects of Environmental Pollutants, Lee ed. Ann Arbor Science Publishers, Mich, p97.
- 18) 西田修実・有田浩之(1982): \dot{V}_{O_2} , \dot{V}_{CO_2} , \dot{V}_A , 呼と循。30, 476-478.
- 19) 船津雄三(1955): 日本人の肺機能に関する標準値。日本医事新報, 1642, 23-26.

II-5

二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響
—低酸素血症について—

Hypoxemia of Rats Exposed to Nitrogen Dioxide

鈴木 明¹・局 博一¹・嵯峨井 勝¹

Akira K. SUZUKI¹, Hirokazu TSUBONE¹ and Masaru SAGAI¹

要 旨

二酸化窒素(NO₂)慢性暴露の動脈血 pHa, Paco₂ 及び Pao₂ に及ぼす影響を明らかにするために、ラットに0.04, 0.12, 0.4 ppmのNO₂を3, 6, 9, 18か月間連続的に暴露した。心拍数(HR), 呼吸数(RR), 血液ヘモグロビン(Hb), 動脈血 pHa, Paco₂ 及び Pao₂ を、暴露動物と対照動物について測定した。Hbは暴露群と対照群との間に大きな変化は認められなかった。0.4 ppm暴露群のRRは対照群の4~6%とわずかに増加したが有意な差ではなかった。HRは、0.12 ppm, 6か月間暴露のラットで有意に減少したが、0.4 ppmのNO₂ 18か月間暴露では有意に増加した。0.4 ppmのNO₂に9-18か月間暴露したラットの動脈血 Pao₂は対照群より有意に低下した。

Abstract

To clarify the effects of chronic exposure to nitrogen dioxide (NO₂) on arterial blood pHa, Paco₂ and Pao₂, rats were exposed continuously to NO₂ at concentration of 0.04, 0.12 and 0.4 ppm for 3, 6, 9 and 18 months. Heart rate(HR), respiratory rate (RR), blood hemoglobin (Hb), arterial blood pHa, Paco₂ and Pao₂ were measured for exposed and control. HR of rats exposed to 0.12 ppm for 6 months was significantly lower than that of control but HR of rats exposed to 0.4 ppm NO₂ for 18 months was significantly increased. RR of rats exposed to 0.4 ppm was increased to 104-106 % of the control without significant difference. Blood Hb also did not show significant difference between exposed and control rats. On the other hand, arterial blood Pao₂ was significantly lower in rats exposed to 0.4 ppm for 9 and 18 months than in the control rats.

はじめに

近年、ステーブルアイソトープである¹⁵Nを使用した実験によって、吸入された二酸化窒素

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba.
Ibaraki 305, Japan.

(NO₂, 11.1-59.9 ppm) はラットの血漿, 尿, その他の器官にすみやかに分布し, 比較的早い時間に排出されることが明らかにされた^{1,2)}。織田ら³⁾は, 40 ppmのNO₂をマウスに2時間暴露させた血中のNO₂⁻とNO₃⁻が増加することを観察した。鈴木ら⁴⁾と局ら⁵⁾は, 20-40 ppmのNO₂を1-2時間暴露したラットの異常心電図所見を基に, NO₂暴露はラットの心臓脈管系に自律神経を介して影響する可能性を示唆した。Kayaら⁶⁾は4, 10あるいは20 ppmのNO₂を1~10日間暴露したラットの赤血球膜の構成が変化することを報告した。

これらの知見は, 吸入されたNO₂が体内に広範にすみやかに分布し, 呼吸器に直接的あるいは間接的影響を与えているだけではなく, 他の組織へも影響を及ぼしていることを示している。

一方, NO₂の第一次標的臓器が呼吸器でありNO₂は呼吸器系に形態学的変化^{7,8)}及び機能的変化をもたらす^{9,10)}ことは周知の通りである。鈴木ら¹¹⁾は, 5 ppmのNO₂を24時間暴露したマウス肺でのガス交換の変化並びにO₂とCO₂の代謝が亢進したこと, 及び10-20 ppmのNO₂を24時間暴露したマウスの肺でのガス交換の抑制と呼吸代謝の変化を報告した。これらの事実は, NO₂の影響が血液pH/ガス分圧(Paco₂, Pao₂)に及ぶ可能性を示している。

本研究においては, 低濃度レベルのNO₂長期暴露が動脈血pH/ガス分圧(Paco₂, Pao₂)に及ぼす影響について検索するために, 0.04, 0.12, 0.4 ppmのNO₂を3, 6, 9及び18か月間暴露したラットの心拍数(HR), 呼吸数(RR), 血液ヘモグロビン(Hb), 動脈血pHa, Paco₂及びPao₂について検討した。

材料と方法

雄の2ヶ月令のJcl: Wistar ラットが本実験で使用され, 暴露中滅菌した市販の餌と滅菌水を自由に与えた。ラットを, 毎時50回換気の角錐型のチャンバー内(容積2.3 m³)で0.04, 0.12, 0.4 ppmのNO₂に3, 6, 9及び18か月間暴露した。NO₂はシリンダーボンベから供給され, チャンバーに入る前に動物暴露装置(小糸工業, 東京)によって清浄空気で希釈された。対照群の動物は, NO₂暴露と同じ方法で, 清浄空気だけで暴露された。チャンバー内のNO₂濃度を, ケミルミネッセンス方式の窒素酸化物分析器(Thermoelectron NO_x analyzerとMonitorLab, ML-8440 ES)で連続的にモニターした。また温度を25±1°C以内にそして相対湿度を50±10%以内に維持した。

動脈血の採血は, キシロカイン(Lidcain hydrochloride, 藤沢薬品)局所麻酔下でヘパリン(和光純薬)静注後(400 unit/0.2 ml/head), 大腿動脈から1 mlのディスプレイ注射器で行われ, 動脈血pHa, Paco₂及びPao₂を血液pH/ガス分析器(Corning 168, Medfield)ですみやかに測定した。血液ヘモグロビン量は国際標準法(CN-MetHb)により, ヘモグロビンテストキット(和光純薬)を使用して測定した。

心拍数(HR)は標準肢II誘導法による心電図から計算した。

呼吸数(RR)は庄トランスジューサー(TOYODA, PD-104-0.1F, TOYOTA)法を使用して呼吸気流曲線から計算した。

NO₂ 長期暴露ラットの低酸素血症

暴露群と対照群の平均値の差の統計的有意性はスチューデントの *t* テストによって検定され、*p* 値が 0.05 より大の場合有意ではないと判断した。

結 果

1. 心拍数 (HR/10 秒) の変化

心電図から計算した 10 秒間当たりの HR の変化を表 1 に示した。この表に示したように、心拍数は対照群と比較して、0.12 ppm 6 か月間暴露で有意な減少を示し、逆に 0.4 ppm 18 か月間暴露で有意な増加を示した。

表 1 心拍数の変化
Table 1 Change of heart rate (HR/10 sec)

Exposed period (Month)	NO ₂ concentration			
	Control	0.04	0.12	0.40
3	83.7±1.8	82.8±2.0	83.0±2.5	86.2±3.9
6	83.0±2.1	81.3±2.2	80.0±2.1*	80.0±3.3
9	79.8±2.3	78.8±1.1	78.7±1.7	82.0±1.0
18	76.4±1.0	72.2±5.8	79.4±2.9	80.2±1.8**

Data are expressed as mean ± SD of 6 subjects, **p*<0.05, ***p*<0.01

2. 呼吸数 (RR/10 秒) の変化

呼吸気流曲線から算出した 10 秒間当たりの RR の変化を表 2 に示した。RR は、0.4 ppm 暴露群では対照群と比較して 4~6% の増加傾向を示したが有意な変化ではなかった。また、0.04 ppm と 0.

表 2 呼吸数の変化
Table 2 Change of respiratory rate (RR/10 sec)

Exposed period (Month)	NO ₂ concentration			
	Control	0.04	0.12	0.40
3	15.5±0.5	15.8±2.0	15.8±1.8	16.5±0.8
6	20.7±0.9	19.5±1.5	20.0±1.2	21.5±2.8
9	14.4±2.3	14.8±2.0	14.7±1.5	15.1±2.7
18	14.8±1.6	14.6±2.3	14.5±2.3	15.7±2.9

Data are expressed as mean ± SD of 6 subjects.

12 ppm 暴露群では 2~5% の増減を示したが、いずれの暴露期間においても有意な差を認めなかった。

3. 血中ヘモグロビン (Hb) の変化

生体内における主たる酸素の運搬体である Hb の変化を表 3 に示した。Hb は、対照群と比較して 2~5% の増減を示したが、いずれの暴露期間においても有意差は認められなかった。

表 3 血中ヘモグロビンの変化
Table 3 Change of blood hemoglobin

Exposed period (Month)	NO ₂ concentration			
	control	0.04	0.12	0.40
3	15.8±0.8	15.2±0.5	16.1±0.9	16.1±0.6
6	15.7±0.4	15.1±0.3	16.2±0.4	16.3±0.3
9	15.7±0.4	15.1±0.3	16.2±0.4	16.1±0.3
18	14.6±2.3	15.4±0.8	14.8±0.13	14.6±3.2

Data are expressed as mean ± SD of 6 subjects, gm/100 ml.

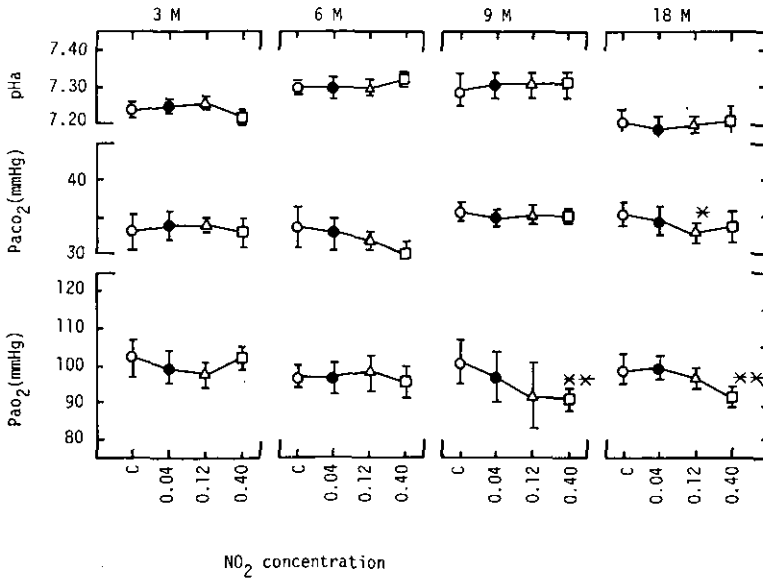


図 1 NO₂ 暴露による動脈血 pHa, Paco₂ と Pao₂ の変化
Fig. 1 Changes of arterial blood pHa, Paco₂ and Pao₂ in rat exposed to nitrogen dioxide
Plot with bars represent mean ± SD of 5-6 subjects, * p < 0.05, ** p < 0.01.

4. 動脈血 pH, Paco₂及び Pao₂ の変化

動脈血 pH/ガス分圧 (Paco₂, Pao₂) の変化を図 1 に示した。3 か月間, 6 か月間暴露では, 対照群と比較して 3~5% の増減を認めたがいずれの暴露群においても有意な差はなかった。しかし, Pao₂ は, 9 か月間暴露の 0.4 ppm 暴露群及び 18 か月間暴露の 0.4 ppm 群で対照の約 90% に低下し有意な差を示した。また, 18 か月間暴露の 0.12 ppm 群では Paco₂ の有意な低下が認められた。pHa はいずれの暴露期間及び暴露濃度においても大きな変化を示さなかった。

考 察

大気汚染ガスの一種である NO₂ の動物暴露実験から, NO₂ が呼吸系に対し, 形態学的変化および機能的変化を引き起こすことが報告されている。呼吸器が障害を受けた場合, 肺でのガス交換が障害¹¹⁾され, 生体は酸素不足を引き起こし, さらに炭酸ガス (CO₂) の蓄積によっていわゆる呼吸不全になる¹²⁾ことが知られている。そして, その程度は血液ガスの分析によって推測でき¹³⁾, 特に Pao₂ の変化は肺栓塞, 無気肺, 肺炎などの障害を鋭敏に反映する¹⁴⁾といわれている。NO₂ の第一次標的臓器が呼吸器であり, 高濃度の NO₂ 暴露は呼吸器の器質的, 機能的変化を引き起こすことは明らかであり, NO₂ 暴露が動脈血酸素分圧を低下させることは, すでに, Nieding ら^{15,16)} (ヒト, 5 ppm, 15 分間暴露), Freeman ら⁷⁾ (ラット, 平均 15 ppm, 生涯暴露), Davidson ら¹⁷⁾ (ウサギ, 8-12 ppm, 3-4 か月間暴露), 鈴木ら (ラット, 4 ppm, 3 か月間暴露¹⁸⁾, ラット, 0.4 ppm, 9 か月間暴露¹⁹⁾) によって報告されている。今回, 著者らはより低濃度, 長期間の NO₂ 暴露における, 動脈血 pH/ガス分圧について検討した訳であるが, 本実験結果からも明らかなように, Pao₂ は, 0.4 ppm の NO₂ 暴露 9 および 18 か月間暴露とともに対照群と比較して有意に低い値を示した。しかしながら, 0.12 ppm 群の Pao₂ は対照と比較して 18 か月間暴露しても有意に低下することはなかった。このことは, NO₂ 暴露における Pao₂ を低下させる閾値は 0.4 ppm と 0.12 ppm の間にあることが明確となった。さらに鈴木¹⁸⁾らの報告を考慮すると, NO₂ 暴露による Pao₂ の低下は, 3 か月間暴露では 4 ppm 以上, 9-18 か月間暴露では 0.4 ppm 以上の暴露濃度で起こることが示された。また, 6-9 か月間に, Pao₂ を低下させる 0.4-4 ppm の NO₂ 濃度があることが示唆された。

ところで, Pao₂ を減少させる要因として, 肺疾患, 塩基過剰によるアルカリ血症, 甲状腺機能低下, 中枢神経疾患等が考えられる¹⁴⁾が, NO₂ 暴露の場合, Pao₂ の低下の主因を肺疾患及び組織での呼吸代謝に求めることができるのかもしれない。山林¹²⁾は, 動脈血 Pao₂ の低下 (hypoxemia, 低酸素血症) の原因として 1) 肺胞気酸素分圧 (Pao₂) の低下, 2) 肺胞気酸素分圧は正常で hypoxemia のみられるものに大別し, 2) をさらに, a) 右→左シャント, b) 拡散障害に分け, 肺拡散能力を左右する因子として ①肺胞膜, 肺毛細管壁の透過性, ②ガス交換面積, ③肺血管容量, ④血液のヘモグロビン濃度を挙げている。本実験において, 血液循環の一指標となる心拍数は対照群と比較して 0.4 ppm, 18 か月間暴露で有意な増加を示した。また, 肺換気量と密接な関係をもつ呼吸数は 0.4 ppm 群で対照群と比較してわずかに増加傾向を示した。このことは Pao₂ の有意な低下あるいは低下傾向

が生体内の化学受容器等を刺激して肺換気量を増加させるために呼吸数を増加させている可能性を示している。また、体内を循環して肺と組織間の酸素の担体である Hb は、本実験においては、いずれの暴露期間、暴露濃度においても大きな変化は認められず、さらに、NO₂ 暴露における MetHb 及び NOHb の生成²⁰⁾ は、全体の Hb 量からすると無視できるほど少ないので、Pao₂ の低下原因とは考えられない。いずれにしても、上述した HR, RR, Hb の変化からは本実験での Pao₂ の低下の原因となるような直接的要因を見出すことは困難である。

一方、高濃度あるいは長期間の暴露実験において、ラットで肺胞ガス交換面積の減少⁷⁾、肺胞壁の再被覆と空気-血液バリアーの肥厚²¹⁾ 及び細気管支内腔狭窄化²²⁾ が、またサルで細気管支上皮の肥大²³⁾ が病理形態学的に確認されている。最近、河野と林⁸⁾ は 0.5 ppm の NO₂ をラットに暴露し、電顕的に 2-19 か月間暴露群で II 型細胞の腫大と増大した層状封入体を観察した。また、2 か月後に、毛細血管内皮細胞の pinocytotic vesicles の著明な像と、4 か月後には軽度の浮腫を、6 か月後には高度の浮腫と内皮細胞と基底膜との間の空隙を認め、これらの変化は 19 か月後も持続していることを、報告した。また、竹中ら²⁴⁾ は、0.4 ppm の NO₂ を 9 か月間暴露したラットで、光顕的には著変を認めず、電顕的にも変化を確定するに至らないこと、及び 18 か月間暴露では光顕的に著変を認めないが、電顕的には、所によって肺胞壁の間質の拡大と II 型上皮細胞のラメラ体の腫大など軽度の変化を認めた。さらに、電顕形態計測結果から、0.4 ppm 群 18 か月間暴露において平均肺胞壁厚の増加傾向を観察した。河野と林⁸⁾、及び竹中ら²⁴⁾ の所見を考慮すれば、拡散障害、ガス交換面積の減少、肺毛細管壁の透過性の変化といった肺胞壁性の要因を本実験における Pao₂ の低下の一因と考えることもできよう。

また、NO₂ と同様な酸化性を有するオゾン暴露において肺組織での酸素消費量の増加に関する報告²⁵⁾ があり、NO₂ 高濃度暴露においても同様の報告²⁶⁾ があるので、組織で酸素消費が増加する可能性もありえる。今後、組織あるいは器官での酸素消費をも検討していく必要があると考える。

引用文献

- 1) 太田庸起子, 脇坂一郎(1979): 安定同位体二酸化窒素の生体内移行, 産業医学, 21, 707-708.
- 2) Ohta, Y., M. Yamada, Y. Yoneyama, A. K. Suzuki and I. Wakisaka (1982): Dynamic study on animal experiments using ¹⁵N-labeled nitrogen dioxide, in Stable Isotope edited by H. L. Schmidt, H. Förstel and K. Heinzinger. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- 3) Oda, H., H. Tsubone, A. K. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide, *Environ. Res.*, 25, 294-301.
- 4) 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇・久保田憲太郎(1980): NO₂ 暴露ラットにおける心拍数・呼吸数の変動について, 日本衛生学雑誌, 35, 128.
- 5) 局 博一・鈴木 明・市瀬孝道・嵯峨井 勝・織田 肇・久保田憲太郎(1981): 二酸化窒素の急性暴露によるラット心機能の変化. 日本衛生学雑誌, 36, 550-559.
- 6) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980): Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: Changes in components of red cell membranes during in Vivo exposure to NO₂, 23, 397-409.
- 7) Freeman, G., S. C. Crane, N. J. Furiosi, R. J. Stephens, M. J. Evans, W. D. Moore (1972): Covert reduction in

NO₂長期暴露ラットの低酸素血症

- ventilatory surface in rats during prolonged exposure to subacute nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **106**, 563-579.
- 8) 河野俊彦・林 豊(1981): 二酸化窒素の呼吸器に及ぼす影響に関する実験的研究——ことに肺胞における病理組織学的変化。大気汚染学会誌, **16**, 313-327.
 - 9) Arner, E. C. and R. A. Rhoades (1973): Long-term nitrogen dioxide exposure-effects on lung lipids and mechanical properties. *Arch. Environ. Health*, **26**, 156-160.
 - 10) 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.
 - 11) Suzuki, A. K., H. Tsubone and K. Kubota (1982): Changes of gaseous exchange in the lung of mice acutely exposed to nitrogen dioxide. *Toxicol. Letters*, **10**, 327-335.
 - 12) 山林 一(1979): ハイポキシアとその成因。代謝, **16**, 2019-2025.
 - 13) 白石 透・宮沢正治(1979): 血液ガス分析, 臨床検査, **23**, 464-470.
 - 14) 大塚洋久(1979): 低O₂血症, 血液ガスわかりやすい基礎知識と臨床応用, 山林 一ら編, 医学書院, 東京, 61-71.
 - 15) Nieding, G. von, H. Krekeler, U. Smidt und K. Muysen (1970): Akute Wirkung von 5 ppm NO₂ auf die Lungen- und Kreislauf-funktion des gesunden Menschen. *Int. Arch. Arbeitmed.*, **27**, 234-243.
 - 16) Nieding, G. von and H. M. Wagner (1977): Experimental studies on the short-term effect of air pollutants on pulmonary function in man: two-hour exposure to NO₂, O₃ and SO₂ alone and in combination, 4th Int. Clean Air Congress, 5-8.
 - 17) Davidson, J. T., G. A. Lilington, G.B. Haydon and K. Wasserman (1967): Physiologic changes in lungs of rabbits continuously exposed to nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **95**, 790-796.
 - 18) 鈴木 明, 局 博一・市瀬孝道・織田 肇・久保田憲太郎(1981): 二酸化窒素亜急性暴露がラットの動脈血 pH_a, P_aCO₂, P_aO₂ に及ぼす影響。日本衛生学雑誌, **36**, 816-823.
 - 19) 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇・久保田憲太郎(1980): NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響——血液性状の変化——, 第21回大気汚染学会講演要旨集, 702.
 - 20) Oda, H., H. Nogami and T. Nakajima (1980): Reaction of hemoglobin with nitric oxide and nitrogen dioxide in mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **6**, 673-678.
 - 21) Stephens, R. J., G. Freeman, S. C. Crane and N. J. Furiosi (1971): Ultrastructural changes in the terminal bronchioles of the rat during continuous low-level exposure to nitrogen dioxide. *Exp. Mol. Path.*, **14**, 1-19.
 - 22) Rejthar, L. and A. Rejthar (1975): Histological changes of terminal bronchioles in rats during exposure to nitrogen dioxide, *Exp. Path.*, **10**, 245-250.
 - 23) Furiosi, N. J., S. C. Crane and G. Freeman (1973): Mixed sodium chloride aerosol and nitrogen dioxide in air. Biological effects on monkeys and rats, *Arch. Environ. Health.*, **27**, 405-408.
 - 24) 竹中参二・河合清之・清水不二雄・山田靖子・堀内博人・今井 透・原田隆彦・京野洋子・久保田憲太郎(1980): NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響。3.病理形態学的変化。第21回大気汚染学会講演要旨集, 703.
 - 25) Mustafa, M. G., A. D. Hacker, J. J. Ospital, M. Z. Hussain and S. D. Lee (1977): Biochemical effects of environmental oxidant pollutants in animal lungs, in *Biochemical Effects of Environmental Pollutants*, S. D. Lee ed. Ann Arbor Science Publishers, Mich, p 59.
 - 26) Buckley R. D. and C. G. Loosli (1969): Effects of nitrogen dioxide inhalation on germfree mouse lung. *Arch. Environ. Health*, **18**, 588-595.

II-6

二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響
—呼気中エタン産生による脂質過酸化—

Effects of Long-Term Exposure of Nitrogen Dioxide on Rats
—Lipid Peroxidation as Measured by Ethane Exhalation in Breath Gases—

嵯峨井 勝¹・市瀬孝道¹・小林隆弘¹

Masaru SAGAI¹, Takamichi ICHINOSE¹ and Takahiro KOBAYASHI¹

要 旨

本報告は、先の0.04 ppm, 0.4 ppm及び4 ppmの低濃度NO₂長期暴露によって過酸化脂質が増加したという報告¹⁾の再現性を確認することを主な目的として行われた。

8週令のJcl: Wistar系雄ラットを0.04 ppm, 0.12 ppm及び0.4 ppm NO₂に6か月, 9か月及び18か月間連続暴露し、*in vivo*の過酸化脂質産生の指標として呼気中のエタンとペンタンの測定を行った。エタンの産生は6か月暴露の場合には0.4 ppm NO₂群でのみ有意に増加し、9か月及び18か月暴露の場合には0.04 ppm, 0.12 ppm及び0.4 ppmのすべての暴露群で有意に増加していた。これら炭化水素量はNO₂の暴露濃度の上昇につれて増加し、かつNO₂の暴露期間の延長につれて増加しており、先の報告と同一傾向を示し、明らかに再現性が確認された。

次に、NO₂暴露による過酸化脂質生成が動物の老若によって異なるかどうかを調べた結果、加齢によって過酸化脂質が増加することは認められたが、NO₂暴露によって加齢動物のほうが過酸化脂質産生率が高いという結果は得られなかった。また、動物のNO₂暴露中に飼料もNO₂に暴露され過酸化されているため、この過酸化された飼料を摂取したことによって呼気中エタンが増加したという可能性を検討した。その結果、飼料の過酸化はNO₂暴露濃度に依存して上昇し、0.4 ppm群では対照群の約50%の増加を示していた。しかし、この過酸化された飼料を3~4日ごとに取りかえながら18か月間摂取させても呼気中エタンは対照動物の場合と全く異なることはなく、過酸化された飼料のエタン産生に及ぼす影響は認められなかった。

Abstract

This research was conducted to confirm reproducibility of the previous result, in which

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

lipid peroxidation was increased significantly even in exposure to low levels, such as 0.4 ppm and 0.04 ppm nitrogen dioxide (NO₂).

Jcl (®): Wistar male rats of 8 weeks-old were exposed continuously to 0.04, 0.12 and 0.4 ppm NO₂ for 6, 9 and 18 months, respectively, and the amounts of ethane and pentane in breath gases as indices of in vivo lipid peroxidation were measured. Ethane evolution of rats exposed to NO₂ for 6 months increased significantly only in 0.4 ppm group, and ethane evolution of rats exposed for 9 and 18 months increased significantly in all groups examined of 0.04, 0.12 and 0.4 ppm NO₂. The increment was dependent on exposure time and on exposure concentrations. These results are in complete agreement with the previous results.

The amounts of ethane produced by NO₂ exposure for six months were examined using young and old rats, and ethane exhalation in old rats was greater than that in young rats. The increment of ethane exhalation in old rats was due to aging effect.

In order to examine the effect of the diets oxidized by NO₂ on ethane exhalation, the diets were exposed to NO₂ of each concentration for 3-4 days and supplied to rats in control room. The diets were exchanged twice per week. Ethane exhalation of rats fed the NO₂-exposed diets for 18 months was not different from that of rats fed the control diets. This result shows that the increased amount of ethane exhalation is due to in vivo lipid peroxidation by NO₂, but not to the NO₂-exposed diets.

はじめに

比較的高濃度 NO₂ の短期間暴露により肺において過酸化脂質が増加することは Thomas ら²⁾, 著者ら³⁻⁶⁾ が報告している。また、著者らはこの過酸化脂質は呼気中エタン量で測定した場合、0.04~0.4 ppm のような極めて低濃度の場合でも 9 か月以上の長期暴露によって増加することを先に報告した⁷⁾。

生体内における過酸化脂質の上昇は老化や動脈硬化、肝臓病、腎臓病、糖尿病、脳卒中、未熟児網膜症あるいは癌など様々な疾患の場合にもみられ、最近基礎及び臨床医学上から注目されている⁷⁾。この過酸化脂質は生体内でタンパク質や脂質と反応して酵素の不活性化、細胞膜の破壊、ビタミンやホルモンの分解など多くの生体成分に作用し、重篤な場合には細胞変性や臓器障害を起こす。また近年、過酸化脂質あるいは過酸化脂質の生成過程で生ずるフリーラジカルは核酸と反応して突然変異を起こすことも報告されている。

本報告は先に報告した 0.04~0.4 ppm NO₂ の長期暴露によって過酸化脂質が増加したという報告の再現性を確認する為に行い、かつ加齢の影響と過酸化された餌の影響についても調べた。

方 法

実験には 8 週令の Jcl: Wistar 系雄ラットを用い、0.04 ppm, 0.12 ppm 及び 0.4 ppm NO₂ を連続 6 か月、9 か月及び 18 か月の長期暴露を行った。ラットはハンギング・ワイヤーメッシュ・ケージ (365 W×280 D×220 H, (mm)) の中で 6 匹ずつに分けて飼育した。なお、18 か月暴露の場合は動物が大きくなる為、9 か月暴露終了時点で 1 ケージ当り 4 匹に分けて飼育した。NO₂ 暴露はステン

NO₂長期暴露ラットの脂質過酸化

レス・スチール・ガラス製チャンパー (1500 W×1550 D×1000 H, (mm)) 内で既報⁸⁾ のように行った。チャンパー内温度は 55±5% に制御され、室内照明は 14 時間点燈, 10 時間消燈とした。なお飼料はオリエンタル酵母 KK 製 MF 固型飼料を滅菌して与え、飲料水も滅菌して自由に飲水させた。

In vivo の脂質過酸化の指標としての呼気中エタンとペンタンの測定は既報⁹⁻¹¹⁾ に従った。

NO₂ に暴露された飼料中の過酸化脂質 (TBA 値) の測定は、飼料を薄く輪切にしてから乳鉢中で粉末になるまで擦りつぶし、Folch の方法¹²⁾ に従って脂質を抽出し、一旦窒素気流下で乾燥してからエタノールに溶かし、Ohkawa らの方法¹³⁾ に従って TBA 反応を行い測定は Ex-515 nm, Em-553 nm の蛍光測定を行った。

肺のリン脂質中の Peroxidizability Index (PI) の計算は既報の結果¹⁴⁾ から Menzel の方法¹⁵⁾ に従って行った。

結果および考察

低濃度 NO₂ の長期暴露によって生体内の過酸化脂質が増加したという先の報告¹⁾ の再現性を調べる為に、ラットを、0.04, 0.12 及び 0.4 ppm の NO₂ に 6, 9 及び 18 か月間暴露し呼気中のエタンとペンタン量を測定した。

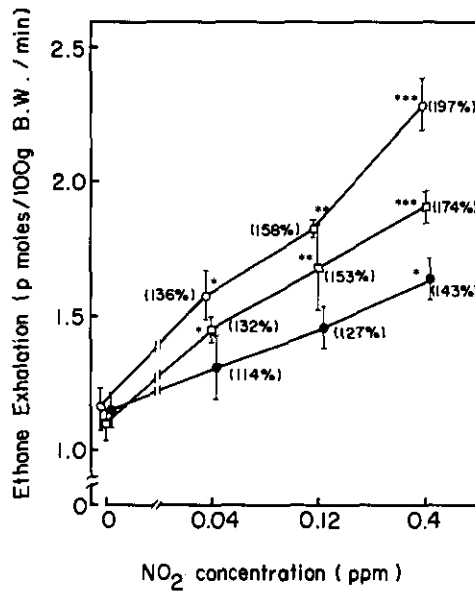


図 1 0.04 ppm, 0.12 ppm および 0.4 ppm, NO₂ に各々 6, 9 および 18 か月間連続暴露したラットの呼気中エタン産生量

Fig. 1 Ethane exhalation in expired gases of rats exposed continuously to 0.04, 0.12 and 0.4 ppm nitrogen dioxide for 6, 9 and 18 months.

●, 6 months; □, 9 months; ○, 18 months;
* *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001;

図1にエタン産生の結果を示した。6, 9及び18か月間NO₂暴露ともにエタン産生はNO₂の暴露濃度の増加に依存して増加し、かつNO₂の暴露期間の延長につれて増加しており、先の報告と極めて類似した結果が得られた。対照群との比較で有意な増加が検出されたものは6か月暴露の場合は0.4 ppm群のみであったが9及び18か月暴露の場合は0.04 ppm群を含むすべてのNO₂暴露群で有意な増加が認められた。一方、ペンタン産生(図2)は0.4 ppm NO₂の18か月暴露群で増加する傾向を示していたが有意差は認められず、その他のすべての群でも対照群のレベルにとどまった。

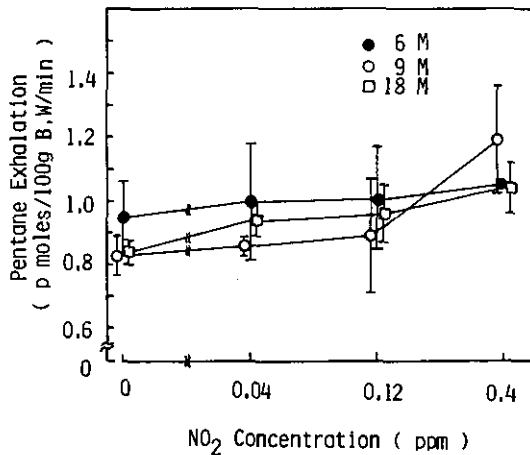


図 2 0.04 ppm, 0.12 ppm および 0.4 ppm NO₂ に各々 6, 9 および 18 か月間連続暴露したラットの呼気中ペンタン産生量

Fig. 2 Pentane exhalation in expired gases of rats exposed continuously to 0.04, 0.12 and 0.4 ppm nitrogen dioxide for 6, 9 and 18 months.
●, 6 months; □, 9 months; ○, 18 months:

次に、一般に大気汚染物質による生体影響は一定の月令を越えると加齢につれて強く現れるという報告¹⁶⁻¹⁸⁾があるので、NO₂暴露による過酸化脂質生成も加齢によって増加するかどうかを調べる為に、同一ロットの動物を用いて加齢による影響を調べた。実験は7週令で購入したラットを8群にわけ、4群は8週令時点から、対照群、0.04, 0.12及び0.4 ppm NO₂に6か月間暴露しエタンの産生量を測定した。この群をYoung rat群とする。あとの4群はSPF (Specific Pathogen Free) レベルに保たれた清浄飼育室で1年間飼育したあと、前記暴露群と同様に6か月間、各濃度のNO₂に暴露 (Old rat群) してからエタン産生量を測定した。この結果を図3に示した。図中に黒丸印で示したYoung rat群の値は図1の6か月暴露群の値を示している。これに対してOld rat群は0.12 ppm群で高値を示しているが、その他の群ではYoung rat群の値より若干高いレベルで、平行移動した値を示していた。この結果は加齢につれて過酸化脂質が増加するということを示しているが、NO₂暴露によって、特に加齢動物が若い動物より脂質過酸化を起こしやすいということを示すもの

NO₂長期暴露ラットの脂質過酸化

ではなかった。むしろ、エタン生産量の Old rat 群に対する Young rat 群の比率は対照群で 1.126, 0.04 ppm 群で 1.084, 0.4 ppm 群で 1.037 となり NO₂ 暴露濃度の増加につれて [Old rat 群のエタン生産量/Young rat 群のエタン生産量] その比率が低下していたことより、しいて言えば、加齢ラットは若いラットよりも NO₂ 暴露による過酸化脂質の産生は起こりづらい状態にあると考えることも出来る。

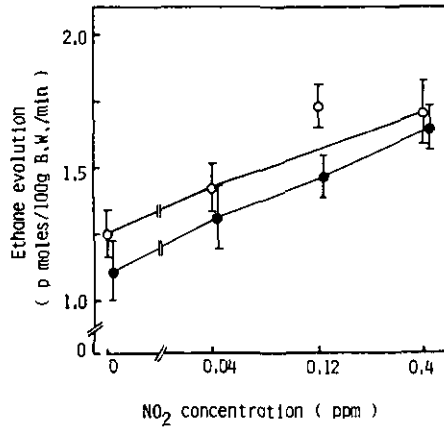


図 3 0.04 ppm, 0.12 ppm および 0.4 ppm NO₂ に 6 か月間連続暴露したラットの呼気中エタン生産量の年齢による相違

Fig. 3 Age-dependent differences of ethane exhalation in expired gases of rats exposed continuously to 0.04, 0.12 and 0.4 ppm nitrogen dioxide for 6 months

●, 6 months-old rats (Young rat); ○, 20 months-old rats (Old rat).

表 1 ラットの肺リン脂質の過酸化易容度 (PI) の変化

Table 1 Changes of Peroxidizability Index (PI) in phospholipids of rat lungs.

Exposed Period to NO ₂ (Age)	Control	0.04 ppm NO ₂	0.4 ppm NO ₂
9 month (11 month)	62.54	62.09	61.99
18 month (20 month)	62.09	61.15	59.95
27 month (29 month)	55.00	52.65	51.42

$$PI = (\% \text{ monoenoic acid} \times 0.025) + (\% \text{ dienoic acid} \times 1) + (\% \text{ trienoic acid} \times 2) + (\% \text{ tetraenoic acid} \times 4) + (\% \text{ pentaenoic acid} \times 6) + (\% \text{ hexaenoic acid} \times 8)$$

そこで次に、NO₂ 暴露によるエタン産生の増加は肺の変化に基づくものと仮定して、肺のリン脂質中の脂肪酸組成の測定結果¹⁴⁾ から脂質過酸化の起こりやすさを示す Peroxidizability Index (PI) を計算し表 1 に示した。その結果、9, 18 及び 27 か月間暴露群とも、対照群から 0.04 ppm 群、0.4 ppm 群と NO₂ 濃度の上昇に伴い PI 値は低下し、脂質過酸化は起こりづらい脂肪酸組成になっていた。また、対照群、0.04 ppm 群及び 0.4 ppm 群内で加齢による変化をみると、加齢につれて PI 値の低下は著しく、加齢につれて脂質過酸化は起こりづらくなることを示唆していた。また、0.04 ppm NO₂ の 9 か月暴露群の PI 値 (62.09) は対照群の 20 か月令ラットの PI 値と等しく、さらに 0.4 ppm NO₂ の 9 か月暴露群の PI 値は 0.04 ppm NO₂ を 18 か月間暴露したラット (20 か月令) の PI 値と類似の値を示していた。このことから NO₂ 暴露は加齢を促進する効果があると考えることが出来るかもしれない。しかしながら、脂質過酸化の起こりやすさを示す指標として、現在ビタミン E 量/PI 比が広く用いられている¹⁵⁾ 為、本当に NO₂ 暴露や加齢につれて脂質過酸化が起こりづらくなっているかどうかはビタミン E 含量がどのような変化を起こしているかを調べなければ正確なことはわからず今後の検討課題である。

以上の結果から、0.04 ppm という極めて低濃度の NO₂ でも 9 か月以上の長期暴露によっては過酸化脂質の生成が有意に増加するということの再現性が確認され、また、過酸化脂質の生成は Young rat と Old rat の比較から加齢影響よりも NO₂ の暴露期間により強く依存することが示唆され、さらに NO₂ 暴露は加齢を促進する可能性も示唆された。

最後に、NO₂ 暴露による脂質過酸化の増加は「NO₂ 暴露群の動物は飼料も NO₂ に暴露されて過酸化されたものを摂取していた」ことによる可能性が考えられる。事実、大石ら²⁰⁾ は過酸化脂質を投与したラットではある種の臓器で過酸化脂質が増加することを報告している。この時、過酸化脂質が最も増加するのは網膜であり約 1.8 倍に増え、次は肝臓で約 1.2 倍であった。その他の臓器ではほとんど変化がなかったという。そこで、本実験においても過酸化された飼料の影響を調べる為に、チャンバー内のラットが摂取していた飼料と同じ期間 (3~4 日) NO₂ に暴露された飼料を SPF レベルの清浄飼育室に戻してラットに 18 か月間与えた場合のエタン産生量を調べた。なお、過酸化された飼料は 3~4 日ごとに次の飼料と交換した。表 2 に 4 日間各濃度の NO₂ に暴露された飼料中の TBA 値と対照飼料及び 0.4 ppm NO₂ に暴露された飼料を連続 18 か月摂取したラットの呼気中エタン産生量を示した。飼料中の TBA 値は NO₂ 暴露濃度に依存して増加し、0.4 ppm NO₂ 暴露飼料では約 1.5 倍に増加していた。しかしながら、呼気中エタンの産生量は対照群の場合と全く変化がなかった。この結果より、飼料は NO₂ 濃度に依存して確かに過酸化されていたが呼気中エタン産生にはほとんど影響がなかったことが確認された。

以上の実験結果より、0.04 ppm から 0.4 ppm のような極めて低濃度の NO₂ でも暴露期間の長期化によって過酸化脂質は有意に増加し、その増加は過酸化された飼料を摂取したことによるものではないことが明らかとなった。

表 2 慢性実験における NO₂ 暴露飼料のエタン産生に及ぼす影響Table 2 Effect of Diets Exposed to NO₂ on Ethane Exhalation in Chronic Experiment

	Control	0.04 ppm·NO ₂	0.12 ppm·NO ₂	0.4 ppm·NO ₂
TBA values ^{a)}	25.0±0.8 (100%)	29.3±2.2 (113%)	29.6±1.2 (114%)	39.7±3.2 (153%)
Ethane ^{b)} Exhalation	2.11±0.15	2.09±0.16

a) nmoles of MDA/g·diet.

b) pmoles of Ethane/100g body wt/min.

引用文献

- 1) 嵯峨井 勝; 市瀬孝道 (1981): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響, ——脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化——. 国立公害研究所研究報告, 第31号, 95-108.
- 2) Thomas, H. V., P. K. Mueller and P. L. Lyman (1967): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
- 3) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. I. Lipid peroxidation as measured by ethane exhalation of rats exposed to nitrogen dioxide. *Lipids*, **16**, 64-67.
- 4) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the protective systems in rat lungs and lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153-164.
- 5) Ichinose, T. and M. Sagai (1982): Studies of biochemical effects of nitrogen dioxide. III. Changes of the antioxidative protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by chronic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **66**, 1-8.
- 6) Ichinose, T., A. K. Suzuki, H. Tsubone and M. Sagai (1982): Biochemical studies on strain differences of mice in the susceptibility to nitrogen dioxide. *Life Sciences*, **31**, 1963-1972.
- 7) 八木国夫; 五島雄一郎編集 (1982): 過酸化脂質と疾患, 医学書院発行.
- 8) 松木 茂; 藤田和伸; 清水 明; 木村英雄; 高橋 弘 (1980). 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——暴露チャンバーの環境制御——. 国立公害研究所研究報告第15号, 149-158.
- 9) Sagai, M. and A. L. Tappel (1979): Lipid peroxidation induced by some halomethanes as measured by in vivo pentane production in the rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **49**, 283-291.
- 10) Sagai, M. and T. Ichinose (1980): Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Sciences*, **27**, 731-738.
- 11) 嵯峨井 勝, A. L. Tappel (1979): 脂質過酸化の新しい測定法としての呼気ガス分析法. 過酸化脂質研究, **3**, 1-8.
- 12) Folch, J., M. Lees and H. G. Sloamestanley (1965): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **23**, 497-509.
- 13) Ohkawa, H., N. Oishi and K. Yagi (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- 14) 小林隆弘 (1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 275-288.
- 15) Menzel, D. B., (1979): Nutritional needs in environmental intoxication: Vitamin E and air pollution, *An*

example. *Environ. Health Perspective*, **29**, 105-114.

- 16) 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.
- 17) Evans, M. J., L. J. Cabral-Anderson and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats. II. Cell proliferation. *Exp. Mol. Pathol.*, **27**, 366-376.
- 18) 長谷川弘道; 佐藤光男; 本間健資; 須藤綾子; 宮川宗之; 河合清之; 小比木国明 (1980): 動物の aging 過程における NO₂ の影響について, (1) 生化学的検査結果, 第 21 回大気汚染学会講演要旨集頁 973.
- 19) Kornbrust, D. J. and Richard D. Mavis (1979): Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testis to lipid peroxidation. *Lipids*, **15**, 315-322.
- 20) 大石誠子 (1979): 過酸化脂質投与とビタミンの関係. *ビタミン*, **53**, 563-567.

III-1

大気汚染物質の吸入が神経系機能に
及ぼす影響に関する考察

Functional Alterations of Nervous System
Following Inhalation to Air Pollutants

局 博一¹

Hirokazu TSUBONE¹

要 旨

種々の大気汚染物質の吸入が神経系機能に与える影響について、過去に報告された資料に基づいて整理し総説した。とくに SO₂, O₃ 及び NO₂ などの主要な大気汚染物質が気道反射機構に及ぼす効果をもたらすかについて詳述した。

Abstract

A review was performed on the functional alterations of the nervous system when animals and men were inhaled air pollutants containing various chemical irritants, being based upon the past references reported by many researchers. Especially, the characteristics of airway reflex mechanisms to such common air pollutants as SO₂, O₃ and NO₂ were arranged and discussed in detail.

はじめに

各種の大気汚染物質の吸入ないし暴露によって、呼吸器や循環器を中心に、自律神経系を含む神経系の機能が変化することを示唆する研究報告例は少なくない。生体にとって神経系機能の変調ないし障害は、息苦しさ、頭重感、動悸、倦怠感、吐き気、痛みなどの自覚症状とも深い関係があるので、大気汚染物質が神経系機能に与える影響を研究することは重要である。しかしながら、神経系という内容自体が生理学的にも解剖学的にも複雑でわかりにくい面を多々有していることや、アプローチが比較的難しいこともあって、大気汚染の生体影響研究分野におけるこの方面の成果は期待されるほど蓄積されていないのが現状である。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba,
Ibaraki 305, Japan.

一般に、環境からの生体に対する化学的、物理的刺激が閾値以上に達した場合、各種の知覚神経や感覚神経系に興奮（インパルス）が生じ、興奮は入力情報として中枢に伝えられ、中枢内で一定の処理を受けたのち、最終的には出力情報として、生体各部位の効果器に伝えられるものと考えられている。また、これによって効果器に生じた反応は、再び入力情報として中枢に送られるのが原則である。このような一連の情報伝達、フィードバックシステムはいうまでもなく、生体の生命維持にとって重要なものであり、生体を常に一定範囲内の活動レベルに置くための功妙な装置として考えられている。大気汚染物質によって、直接影響を受ける可能性のある入力部は、気道や眼の粘膜面及び嗅覚器が挙げられる。これらの部位の刺激によって発生した入力情報は、嗅神経（第I脳神経）、三叉神経（第V脳神経）及び迷走神経（第X脳神経）によって、求心性に中枢側へ伝えられると思われ、また効果器に対する出力情報は迷走神経を含む副交感神経系、交感神経系ならびに横隔神経や肋間神経など脊髄から出る各種の運動神経系を介して運ばれると考えられる。

一般的にいて、大気汚染物質が神経系に与える影響は必ずしも明瞭ではなく、むしろ微妙かつ軽微な変化から成っている場合が多い。したがって大気汚染物質による神経系への影響を明確に把握することは容易ではないが、各種の大気汚染物質が生体のどの神経系に作用しやすいか、また作用の結果いかなる生体反応が起こるかといった点について、大まかながらも傾向を整理することは今日有意義なことと思われる。

この報告では大気汚染物質と神経系とのかかわりについて、我々の知見を含む過去の研究報告例の中から主だったものを取り挙げ概説し、今後の研究展望に対する資料の提供を試みたものである。

1. 二酸化硫黄 (SO₂)

一般的にいて、大気汚染物質が生体に作用した場合、大気汚染物質の種類によってその主たる作用部位が異なると考えられており、生体のどの部位に作用するかによって生体反応の現れ方も異なってくると思われる。SO₂は上位気道に作用するとの考え方が支配的である。SO₂の気道内吸入によって呼吸数の減少・気道抵抗（気流抵抗）の増大が起こることが、ヒト及び各種の哺乳動物で明らかにされている^{1,2,3}。このような反応が起こる閾値濃度の決定とともに、反応が気道のどの部位の刺激によって起こるか、また反応の出現にどのようなメカニズムが働いているかについて大きな関心が持たれている¹。

Davis, T. R. A.²⁾は、モルモットを用いて鼻咽頭、喉頭と気管上部、気管下部と肺及び全気道 (intact) の4区域に対して、それぞれSO₂ (5 ppm, 10 ppm) を含む種々の刺激剤の吸入実験を行い、呼吸器反応をみている。SO₂では経鼻的に吸入された intact な動物において、アクロレインやホルムアルデヒドの場合と同様に、吸入中、気道抵抗の増大、呼吸数の減少、分時換気量の減少、一回換気量の増加などの明瞭な変化が認められるのに対して、気管以下の気道に対する吸入では上述した指標に変化が認められなかったという。この研究では、intact な動物で出現する呼吸器反応が、暴露の終了とともに速やかに回復することから、反応の出現メカニズムはおそらく反射効果による

ものと考えられており、SO₂などの刺激剤に応答する受容器は喉頭部及び鼻咽頭に存在することを推測している。また intact な動物で観察された気道抵抗の増大は、肺ないし下位気道の反応によるものではなく、鼻咽喉を中心とした上位気道の反応に起因すると結論している。同様な研究成績はイヌを実験材料とした Frank, N. R. ら⁴⁾の報告にもみられる。これらの研究で明らかにされた気道抵抗の増大は、上位気道の収縮性反応のほかに粘膜における腫脹や粘液分泌亢進が原因として考えられる。

一方、上位気道に対する SO₂ の刺激によって、気管支収縮反応が出現するとの報告もあり、ここでは明らかに神経系が関与する反射効果が強調されている。すなわち、Nadel, J. A. ら⁵⁾は健康なヒト及びネコに SO₂ (ヒトの実験では 4~6 ppm) を短時間吸入させ、換気力学的指標の変化をみているが、ヒトとネコのいずれにも強い気管支収縮が起こること、またヒトでは咳、咽頭及び胸部の刺激感をもたらすことを報告している。この研究の中で、ネコの実験では上位気道(気管上部、喉頭、咽頭口部)と下位気道(気管下部、肺)の2区域に対してそれぞれ SO₂ の吸入を行い結果を比較しているが、上位気道への刺激においては、全肺気流抵抗が対照値の約 3.3 倍、下位気道への直接刺激では約 2.5 倍に増大している。さらに、このような反応における自律神経の関与を調べるために、ヒト及びネコに対するアトロピン投与ならびにネコにおける頸部迷走交感神経(cervical vagosympathetic nerve)の冷却遮断を行い、処理前後の変化を比較している。その結果、ヒト、ネコのいずれもこれらの処置により気管支収縮反応の消失が起こったとしている。このことから、SO₂ の吸入による気管支収縮反応には、迷走神経の求心路及び遠心路が関与しているものと考えており、とくに、咳受容器(cough receptor)が刺激される可能性を指摘している。

SO₂ の吸入による同様な知見は Yokoyama, E. ら⁶⁾によっても認められている。6 人の健康な志願者に対して、36-40 ppm の SO₂ を 10 分間経口的に吸入させ、暴露前、暴露の最終時点及び暴露終了後 10 分での各種の呼吸機能検査を試みるとともに、ピロカルピン、アトロピン投与の効果を調べている。薬物を投与しない場合、暴露を行うことによって肺気流抵抗は約 50 % の増加を示すのに対して、アトロピンを投与した場合には、暴露による肺気流抵抗の増加ははるかに小さいことを示した。またピロカルピンの投与では暴露によって気流抵抗が約 40 % の増加を示すものの、暴露終了後の回復過程が促進されることをみている。この研究では Nadel らの報告と同様に、気道狭窄の主な原因は副交感神経遠心路が関与する気管支収縮であると推測している。

このように、SO₂ の気道への影響を眺めた場合、SO₂ が大部分上位気道に作用するとの見方はほぼ一定している。しかし気道反応の生じる部位に関しては喉頭及びそれより上位の気道であるとする考え方と肺をも含む気道全体の変化であるとする 2 通りの考え方が存在するように思われる。上位気道の刺激によって誘発される反射効果は極めて多様であることが知られているが^{7,8)}、これらの反射効果の出現様式は動物種や麻酔の有無によって異なることがいわれている^{7,8)}。SO₂ など上位気道刺激剤の適用による生体反応の出現には、こうした反射様式の多様性ど実験条件の相違からくる複雑な要因が絡んでくるものと思われる。SO₂ の動物に対する吸入実験では、呼吸相の延長を伴う呼

吸数の減少が起こることが報告されている。この現象に関しては、前述の Davis, T. R. A.らの記載にもみられるように、“息こらえ、(breathholding)を行うことによって、過剰な異物侵入を防止するという生体防御の機構が働いていると解釈することも可能である。一般的にいて、外界に近い上位気道では反射効率がよく、かつ反射効果が多様であるとみなすことができるが、このことは異物侵入防御と異物吐出を主な働きとする気道反射の合目的性からいってもごく自然なことのようと思われる。しかし、呼吸数の減少・気管支収縮、分時換気量の減少、咳などの状態が長期間にわたり慢性的に持続するならば、呼吸困難などの生体にとって極めて不利な状況をもたらすことになると思われる。鼻粘膜ないし上位気道の刺激では、交感神経及び副交感神経の活動増加によって、末梢血管収縮、血圧上昇、心拍数減少などの変化が出現するとされている¹⁾が、SO₂に関してはこれらの知見は乏しい。

2. オゾン (O₃) 及び二酸化窒素 (NO₂)

O₃やNO₂の吸入実験では、呼吸数の増加、一回換気量の減少が起こるとの報告^{1,9,10)}が多い。呼吸数の増加はSO₂、Formaldehyde、CBMNなどの上位気道作用物質にみられる呼吸数の減少とは対称的である。O₃とNO₂は上位気道における吸収率が低く、吸入されたO₃やNO₂は比較的少量に下位気道に到達するものと考えられている。したがってこれらの物質の神経系への影響をみる場合、気管、気管支及び肺胞などに分布する神経終末への作用が問題になるが、これに関する報告は少ない。

Lee, L. Y. (1977)ら¹¹⁾はO₃を暴露(0.7~1.2 ppm, 2時間)したイヌについて、人工呼吸下でヒスタミンエーロゾルの吸入試験を行い、全肺気流抵抗の変化を観察している。O₃暴露前及び暴露後のいずれもヒスタミン吸入によって、気流抵抗が増大するが、暴露後は暴露前の約2倍に高まることを示した。またアトロピンエーロゾルの吸入を行うとヒスタミン吸入による気流抵抗の増加が抑制されること、及び迷走神経の伝導を冷却遮断すると同様に気流抵抗の増加が抑制されることを示した。この研究ではO₃暴露によって気管支の被刺激性が高まり、それは迷走神経路を介する機序によって起こるものと考えている。上述したヒスタミン吸入による気道抵抗の増大は、気管支に分布する肺刺激受容器(lung irritant receptor)の活動増加によることが他の研究者によってほぼ明らかにされている^{12,13)}。また、上述のLee, L. Y.ら¹⁴⁾はO₃吸入による浅速呼吸の発現メカニズムにも迷走神経路が働いているものと考えている。

O₃の暴露による中枢神経系の機能変化に関する二、三の報告がある。一般に中枢神経系の活動は、動物の意識レベルの変化によって大きく左右されるので、通常の脳波記録を行うだけでは、暴露による影響を十分に評価しきれないという難しさがある。Xintaras, Cら¹⁵⁾は、CO及びO₃の暴露による中枢機能の変化を把握するために、ラットの大脳皮質の視覚領及び中脳上丘から光誘発電位の記録を行った。この際、誘発時の意識レベルを統一し、また光源に対するラットの姿勢方向を整えるために、ラットにはほぼ一定の割合でレバー押し操作をするよう条件づけている。一回につき、

数百回の光刺激応答をマイクロコンピューターで加算平均して得られた誘発電位図を暴露前後で比較している。CO では 50 ppm, 2 時間の暴露で誘発電位図の振幅や潜時に変化がみられ、それらはベントバルビタール麻酔時の波形変化によく似ている。O₃ では CO とはやや異った波形を示すが、0.51 ppm, 1 時間の暴露で暴露前とは明らかに区別できる変化を認めている。このような誘発電位の変化が中枢神経系機能の低下と結びつくかどうかは、今後の詳細な検討が要求される。

類似した手法による O₃ に関する研究報告が Jognson, B.L. ら¹⁶⁾ によって発表されている。暴露濃度 (1~3 ppm) と 1 日あたりの暴露時間 (8~23.5 時間) を異にする 5 系統のチャンバー内でそれぞれ 8 頭ずつのビーグルを 18 ヶ月間飼育し、暴露の 9 か月目及び 18 ヶ月目で脳波及び光誘発電位の記録に基づく綿密な中枢神経系機能検査を行っている。検査はサクシニルコリン静注による非動化及び人工呼吸下でなされている。O₃ 暴露の 9 ヶ月目では多くの暴露群で頭頂部及び後頭部の脳波活動におけるベーター波 (14~31.75 Hz) 成分の減少とシーター波 (3~7.75 Hz), アルファ波 (8~13.75 Hz) 成分の増加が示されている。18 ヶ月目では頭頂部のベーター波成分の減少及び頭頂部、後頭部のアルファ波成分の増加がみられている。一方、光誘発電位は陰性波とそれに続く陽性波が主要な構成成分となっているが、O₃ 9 ヶ月目では頭頂部及び後頭部における陽性波の潜時の延長と陽性波の波高の増大を認めている。このような光誘発電位の変化は先に触れた Xintaras, C. らのラットにおける成績と類似点が多い。一般的にいて、脳波活動における低周波数域の増加は、麻酔時、睡眠時 (non-REM 睡眠)¹⁷⁾ あるいは意識レベルの低下時に共通して観察される現象である¹⁸⁾ ことから、上述した O₃ 暴露による知見は中枢神経系の活動レベルの低下を示唆するものと推測することがもともと自然のように思われるが、この点に関してもさらに詳細な検討が望まれる。

NO₂ の吸入と神経系機能の変化とに関する知見は乏しい。NO₂ の暴露がマウス自発運動量の抑制¹⁹⁾ あるいは遊泳時間の短縮²⁰⁾ を示す報告がみられる。これらの知見は神経系機能、循環系機能及び全身の代謝機能が関与するトータルとしての生体反応と思われる。NO₂ の暴露が循環機能に変化を来し、その要因として自律神経が関与する可能性を示唆する二、三の報告がある。山賀ら²¹⁾ はモルモットとウサギに比較的低濃度の NO₂ を数ヶ月間にわたって反復暴露し、各種の生理学的検索及び病理組織学的検索を行っている。この研究の一部としてウサギ 4 羽を暴露群とし、2-3 ppm の NO₂ を毎日 5 時間、週 6 日間、計 85 日間にわたって暴露した場合の心電図変化を対照群との間で比較している。この際、暴露開始後一定の時期に 3 ppm, 10 ppm または 20 ppm の NO₂ を短時間再暴露した場合、3 ppm と 10 ppm で 4 羽中 2 羽に心拍リズムに不整がみられ、また残り 2 羽のうち 1 羽については 30 ppm の暴露によって同様な心拍不整が出現したことを述べている。このとき、いずれの個体も再暴露の前には心拍不整が認められないこと、対照群では同様な暴露によって概して心拍数の減少を示すものの、心拍リズムの不整は終始出現しなかったと述べている。また呼吸運動と心電図の同時記録によって、両者の対応関係を調べたところ、呼吸運動は再暴露中も規則正しく現れ、心拍不整の出現との間に明瞭な時相関係は得られなかったことから、観察された心拍不整はいわゆる呼吸性不整脈ではないことを裏付けている。この研究ではまた、アトロピン、アセチルコリン、

アドレナリンの投与による心拍数の変化を追求し、暴露によって自律神経機能の不安定状態が認められたとしている。

一方、著者ら²³⁻²⁵⁾は 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm といった高濃度の NO₂ を無麻酔、無拘束のラットに 3 時間まで暴露し、標準肢誘導等による心電図を導出し、急性影響をみている。その結果 20 ppm 以上の暴露では暴露開始後約 30 分でまず徐脈が出現し、続いて約 60 分以降には房室ブロック、期外収縮などの不整脈ならびに P 波の異常を伴うワンダリングペースメーカーなどの心電図異常が現れることを観察した。とくに不整脈の出現は際立った特徴といえ、R-R interval histogram の解析では心拍間隔の著明な延長と二峰性の分布様式が示されている。暴露によって出現した徐脈や不整脈は暴露前または暴露中におけるアトロピン投与ならびに両側迷走神経切断によってほぼ完全に消失することから、NO₂ 暴露によって自律神経とくに迷走神経の機能が高まるものと考えている。また NO₂ では暴露中、血液中に亜硝酸イオンおよび硝酸イオンが生成される²⁶⁾ ことが知られているが、これらのイオンを投与した実験では心電図に変化を来たさないこともわかっている²⁷⁾。

NO₂ の吸入によって生じる気道反応に対する自律神経機能の関与の有無をみた報告も少ない。Yokoyama, E.²⁸⁾ は健康な 5 人の志願者に NO₂ 4.7~17.6 ppm を 10 分間吸入させ、吸入前後の気道反応をみているが、吸入によって気流抵抗が増加することを示すとともに、アトロピンの皮下投与による影響を調べている。その結果、アトロピンを投与した場合でも NO₂ の吸入によって気流抵抗が増加し、無処置との間に大差がなかったことを述べている。

3. その他の大気汚染物質

この項では光化学オキシダントに関連する炭化水素類、自動車排ガスおよびタバコ煙について述べたい。Acrolein, Benzene, Formaldehyde, Toluene, Xylene 及び自動車排ガス、タバコ煙などの物質は、いずれも上位気道に対して主体的に作用し、呼息相の延長などを伴う呼吸抑制を起こすことが知られている^{1,29)}。この呼吸抑制反応は概して反射効果によることが明らかにされており、関与する求心路は主に三叉神経と考えられ、また呼息相の延長時には横隔神経活動の停止及び第 5 肋間神経の活動停止が伴うとされる³⁾。またこれらの物質は鼻粘膜の刺激作用の結果、迷走神経遠心路の関与する心拍抑制と交感神経の関与する血圧上昇を起こすとされる。しかし、これら循環系における反応は呼吸抑制が出現するときに始めて認められるという。鼻粘膜刺激による一般的な効果に関しては Angell James, J. E.ら³⁰⁾ の詳細な研究報告がある。

光化学オキシダントに関連して Kane, L.E. ら³¹⁾ の研究成績について触れたい。Propylene, 1-butene, *cis*-2-butene, 1, 3-butadiene, *n*-butane, Ethylene および Ethane に対して NO₂ をそれぞれ 3:1 の割合で混合し、それらに紫外線照射を行って発生したガスをマウスに暴露して呼吸数の変化を観察している。*n*-butane および Ethane を除く他の 5 種類の炭化水素と NO₂ の組合せでは、5 分間の暴露中いずれも明瞭な呼吸数の減少を来し、呼吸数の 50% 減少率からみた作用力の傾向は Propylene > 1, 3-butadiene > 1-butene > *cis*-2-butene > Ethylene の順であったという。この研究

で、気管カニューレを施したマウスでは呼吸数の減少が認められなかったことから、作用部位は上位気道にあることを、また作用メカニズムは回復の早さなどから感覚刺激であることを示している。また呼吸数の減少が種々の光化学オキシダントにおける感覚刺激の強さを予測するための指標として有用であることを強調している。三叉神経の刺激によって呼吸抑制が起こることの直接の証明は Ulrich, C. E. ら³²⁾ によってなされている。ラットの三叉神経(第1枝及び第2枝を含む)を 100 Hz, 1 msec, 0.1~0.5 ma の条件下で電気刺激を行うと、電気刺激の間、呼吸相の延長を伴う呼吸数の減少が起こることを示し、呼吸数の減少率と刺激電流の大きさとの間に明瞭な関係があることを示している。また、粘膜刺激性の強い CBMN をマウスに吸入させると、明瞭な呼吸抑制がおこるが、これは三叉神経を切断したマウスではほとんどみられなくなることを示した。また三叉神経(第1枝+第2枝)の記録では、CBMN 溶液の鼻孔作用によってインパルスが増加することを示している。刺激性ガスの粘膜面に対する刺激閾値や刺激の強さに関する濃度-反応関係は、その粘膜を支配する神経の電気的活動を記録することによって、より正確に得ることができる。Kulle, T.J. ら³³⁾ は Formaldehyde 及び O₃ の鼻粘膜に対する刺激作用を評価するために、ラットの鼻口蓋神経(nasopalatine nerve) から記録を行っている。各種の濃度の Formaldehyde 及び O₃ を2分間吸入させ、その際、応答するスパイク数から非刺激時のスパイク数を引いた増加分をプロットすると、濃度の対数に比例する濃度-応答関係が得られることを示している。この濃度-応答関係図から推定される閾値は、Formaldehyde で 0.25 ppm, O₃ では 5.0 ppm であるとしている。また、0.5~2.0 ppm の Formaldehyde に一定時間暴露したラットのアミルアルコールに対する応答性は、暴露前の応答性に比べて鈍くなり、Formaldehyde の濃度の上昇に平行して閾値が高くなるのに対して、O₃ を暴露したラットでは逆にアミルアルコールに対する応答閾値が低くなるという極めて興味深い知見を得ている。

4. 総 括

大気汚染物質が気道や眼の粘膜面に触れたとき、どの部位にもっとも強く作用するか、また作用の結果いかなる生体反応が現れるかを見究めることは大気汚染物質による生体影響を理解する上で大切なことは言を待たない。気道や眼の粘膜近くには三叉神経や迷走神経に由来する各種の知覚神経終末が分布し、それらの刺激は様々な反射効果を惹起することが知られている。表1は眼及び呼吸器に対して物理的、化学的刺激を加えた際に起こることが明らかになっている各種の反射効果について整理したものである。表の右側には大気汚染に関係の深い化学物質の主な作用部位を対応させた。眼刺激症状は光化学オキシダントによる被害として重要な位置を占めるが、各眼刺激物質の刺激閾値や眼刺激に関与する神経性メカニズムなどについての基礎的研究は著しく立ち遅れている³⁴⁾。また眼刺激と呼吸抑制との関連性³⁵⁾など基礎的問題の解明が待たれる。鼻咽頭刺激による吸引反射(aspiration reflex)や喉頭弛緩、また肺における Hering-Breuer inflation reflex(呼吸抑制)が表の右に示したような化学物質によって引き起こされる否かについては明らかにされていない。

表 1 眼および呼吸器の刺激によって生じる種々の反射様式と、大気汚染物質を含む各種化学物質の主要な刺激部位

Table 1 Various reflex patterns caused by stimuli of eye and respiratory organ, and main stimulus sites of chemical substances containing common air pollutants

STIMULUS SITE	AFFERENT NERVE	REFLEX PATTERNS	SUBSTANCES
eye	trigeminal	lacrimation, decrease of respiratory rate?	formaldehyde, acrolein ammonium, PAN ¹ , PBzN ²
nose	trigeminal	sneezing, apnea, mucus secretion, bradycardia	
nasopharynx	trigeminal glossopharyngeal	aspiration reflex, hyperventilation, dilation of larynx, bronchoconstriction, hypertension	formaldehyde, acrolein, xylene, toluene, benzene, CBMN ³ , automobile exhaust, photochemical oxidants, cigarette smoke, SO ₂
larynx	trigeminal vagus	cough reflex, apnea, closure of glottis, bradycardia	
trachea (lower)	vagus cough receptor	cough reflex	
lung	vagus lung irritant receptor	bronchoconstriction, increase of respiratory rate, inspiratory-augmenting reflex	O ₃ , NO ₂ , cigarette smoke, various chemical irritants
	pulmonary stretch receptor	Hering-Breuer inflation reflex (inhibition of respiration)	
	J-receptor	apnea and rapid-shallow breathing, bradycardia, hypotension	

1; peroxyacetyl nitrate

2; peroxybenzoyl nitrate

3; *o*-chlorobenzylidene malononitrile

い。また O₃ や NO₂ の吸入で生じるといわれる呼吸数の増加、浅速呼吸、あるいは徐脈などが対応する神経機序によって起こる否かについてもまだ確証が得られていない。

大気汚染物質を含む種々の化学物質の作用部位や作用の結果生じる生体反応を全体として眺めた場合、SO₂ など水溶性が高く、粘膜刺激性の強い物質は鼻粘膜、鼻咽頭、喉頭などの上位気道に作用しやすく、それらの部位の刺激によって呼吸抑制などの一次的な反射効果を生じるが、逆に O₃ や NO₂ など水溶性が低く、粘膜刺激性もそれほど高くない物質では、主に気管下部、肺に持続的、慢性的に作用することにより種々の生体反応をもたらすと考えられる。このような傾向はすでに各方面で幾度か述べられてきているが、とくに O₃、NO₂ の吸入実験で得られる生体反応に関しては、気道に対する一次的刺激効果のほかに、全身の生理学的変化に由来する二次的効果についても十分に考慮する必要があると思われる。

大気汚染物質による神経系機能の変化を明確に把握したい場合には、どうしても動物実験が主体にならざるをえない。神経系の構成を動物とヒトの間で比較してみると、類似点はあるものの大脳皮質の発達状況や嗅覚に関連する領野の占める割合など、両者の間で著しく異なる面の存在することも否定できない。とくに上位気道の刺激による反射効果をみる際には、動物特有の反応パターン

が現れる可能性も否定できない。しかし反面、動物実験から得られた情報をもとにして、生体の複雑なメカニズムを合目的に推察することも可能になるという利点がある。動物からヒトへの外挿は必ずしも容易ではないが、今後とも動物実験を主体にした数多くのデータが蓄積されることが望まれる。

謝 辞

本報告は現在著者らが手元に有している文献、資料をもとに整理したものであるため、数多くの記載もれがあることをお詫び致します。また著者の関心が深い分野内での考察であったため、記述内容が不均一であったかもしれません。この点も含め今後の御指導、御鞭達を賜りたいと思います。

引用文献

- 1) Alarie, Y. (1973): Sensory irritation by airborne chemicals. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **2**, 299-363.
- 2) Davis, T. R. A., S. P. Battista and C. J. Kensler (1967): Mechanism of respiratory effects during exposure of guinea pigs to irritants. I. Sulfur dioxide: concentration and duration effects in rat. *Arch. Environ. Health*, **15**, 412-419.
- 3) Leong, K. J. and H. N. MacFarland (1965): Pulmonary dynamics and retention of toxic gases. *Arch. Environ. Health*, **11**, 555-563.
- 4) Frank, N. R. and F. E. Speizer (1965): SO₂ effects on the respiratory system in dogs. *Arch. Environ. Health*, **11**, 624-634.
- 5) Nadel, J. A., B. Tamplin and Y. Tokiwa (1965): Mechanism of bronchoconstriction. During inhalation of sulfur dioxide; Reflex involving vagus nerves. *Arch. Environ. Health*, **10**, 175-178.
- 6) Yokoyama, E., Y. Matsumura and T. Suzuki (1967): Effect of atropine and pilocarpine on flow resistance in the lung of healthy subjects exposed to SO₂. *Bull. Inst. Publ. Health*, **16**, 19-22.
- 7) 西野 卓 (1982): 気道反射の受容器と反射効果, 呼と循, **30**, 346-351.
- 8) 島田久八郎 (1979): 反射活動, 臨床呼吸生理学(工), 本田良行編, 直興交易出版部, 東京, 92-120.
- 9) Yokoyama, E. (1968): Comparison of the ventilatory effects on guinea pigs of exposure to SO₂ and NO₂. *Bull. Inst. Publ. Health*, **17**, 307-314.
- 10) Yokoyama, E. (1968): Effect of exposure to the mixture of SO₂ and NO₂ on ventilatory functions of guinea pigs. *Bull. Inst. Publ. Health*, **17**, 315-321.
- 11) Lee, L.-Y., E. R. Bleeker and J. A. Nadel (1977): Effect of ozone on bronchomotor response to inhaled histamine aerosol in dogs. *J. Appl. Physiol.*, **43**, 626-631.
- 12) Sellick, H. and J. G. Wilddicombe (1971): Stimulation of lung irritant receptors by cigarette smoke, carbon dust, and histamine aerosol. *J. Appl. Physiol.*, **31**, 15-19.
- 13) Vidruk, E. H., H. L. Hahn, J. A. Nadel and S. R. Sampson (1977): Mechanisms by which histamine stimulates rapidly adapting receptors in dog lungs. *J. Appl. Physiol.*, **43**, 397-402.
- 14) Lee, L.-Y., C. Dumont, T. D. Djokie, T. E. Menzel and J. A. Nadel (1979): Mechanism of rapid, shallow breathing after ozone exposure in conscious dogs. *J. Appl. Physiol.*, **46**, 1108-1109.
- 15) Xintaras, C., B. L. Johnson, C. E. Ulrich, R. E. Terrill and M. F. Sobocki (1966): Application of the evoked response technique in air pollution toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **8**, 77-87.
- 16) Johnson, B. L., J. G. Orthoefer, T. R. Lewis and C. Xintaras (1976): The effect of ozone on brain function. Clinical implications of air pollution research. Finkel, A. J. and W. C. Duel, eds, Publishing Sciences Group, Inc.

233-245.

- 17) Tsubone, H. and H. Sawazaki (1979): Electroencephalographic patterns and their alternating process in mice. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **41**, 495-504.
- 18) 大熊輝雄 (1970): 正常脳波、薬物と脳波。臨床脳波学。医学書院、東京、92-129, 366-382.
- 19) 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. *Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **25**, 246-253.
- 20) Suzuki, A. K., T. Ichinose, H. Tsubone, H. Oda and K. Kubota (1982): Effects of acute nitrogen dioxide exposure on swimming performance of mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 165-172.
- 21) 山賀岑郎・大森 薫・大屋敷萬幸・安倍和則・戸沢 隆・中野欣嗣・寺西文子 (1974): 低濃度二酸化窒素の反復暴露の影響。日本公衛誌, **21**, 387-394.
- 22) 鈴木 明・市瀬孝道 (1979): 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。国立公害研究所研究報告, 第8号, 51-60.
- 23) 局 博一・鈴木 明・市瀬孝道・織田 肇 (1980): 二酸化窒素暴露ラットにみられる心拍変動の要因について。国立公害研究所報告, 第15号, 7-17.
- 24) 局 博一・鈴木 明・市瀬孝道・嵯峨井 勝・織田 肇・久保田憲太郎 (1981): 二酸化窒素の急性暴露によるラット心機能の変化。日衛誌, **36**, 550-559.
- 25) 局 博一・鈴木 明・永澤節子・織田 肇 (1981): 二酸化窒素の急性暴露によるラットの必電図異常。国立公害研究所研究報告, 第31号, 59-65.
- 26) Oda, H., H. Tsubone, A. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **25**, 294-301.
- 27) Tsubone, H., H. Oda, A. K. Suzuki and K. Kubota (1982): Electrocardiographic abnormalities in rats by acute exposure to nitrogen dioxide. *Toxicol. Letters*, **12**, 125-129.
- 28) Yokoyama, E. (1968): Effects of acute controlled exposure to NO₂ on mechanics of breathing in healthy subjects. *Bull. Inst. Publ. Health*, **17**, 337-346.
- 29) Murphy, S. D., J. K. Leng, C. E. Ulrich and H. V. Davis (1963): Effects on animals of exposure to auto exhaust. *Arch. Environ. Health*, **7**, 60-70.
- 30) Angell James, J. E. and M. DE B. Daly (1972): Reflex respiratory and cardiovascular effects of stimulation of receptors in the nose of the dog. *J. Physiol*, **220**, 673-696.
- 31) Kane, L. E. and Y. Alarie (1978): Sensory irritation of select experimental photochemical oxidants. *Arch. Environ. Health*, **33**, 244-250.
- 32) Ulrich, C. E., M. P. Haddock, F. Church and Y. Alarie (1972): Airborne chemical irritants. Role of trigeminal nerve. *Arch. Environ. Health*, **24**, 37-42.
- 33) Kulle, T. J. and G. P. Cooper (1975): Effects of formaldehyde and ozone on the trigeminal nasal sensory system. *Arch. Environ. Health*, **30**, 237-243.
- 34) Wilson, K. W. (1974): Survey of eye irritation and lachrymation in relation to air pollution. Final report. Coordinating research council, Inc. New York. 1-62.
- 35) 野上浩志; 東 恵美子; 魚住光郎; 中島泰知 (1981): 光化学反応二次生成物質のマウスの呼吸数に及ぼす影響。第22回大気汚染学会講演要旨集, 608.

III-2

二酸化窒素の急性、亜急性及び慢性暴露による
脂質過酸化と抗酸化性防御機構の変化について

**Changes of Lipid Peroxidation and Antioxidative Protective
Systems in Lungs of Rats Exposed Acutely, Subacutely and
Chronically to Nitrogen Dioxide.**

市瀬孝道¹・嵯峨井勝¹

Takamichi ICHINOSE¹ and Masaru SAGAI¹

要 旨

NO₂の生体影響について脂質過酸化の面から、Wistar系雄ラットを用いて急性、亜急性及び慢性暴露実験を行った。

10 ppm NO₂ 2週間暴露では過酸化脂質生成は1日目に減少したがその後3~4日目に対照群の2倍に増加した。しかし、その後再び低下し5~10日目には対照レベルへ戻った。一方、過酸化脂質による障害から生体を防御するGSH peroxidase (GPx), GSH reductase (GR), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), Superoxide dismutase (SOD), Disulfide reductase (DSR)等の酵素活性と還元型グルタチオン (GSH)等は初期に低下するが3日目より増加しはじめ、5~7日目にはMaximumレベルに達し14日目までそのレベルを維持し、過酸化脂質生成とは対称的なinverse relationshipを示した。0.4 ppm, 1.2 ppm及び4 ppm NO₂の4か月暴露の亜急性暴露実験でも1か月目までは急性暴露の場合と同様の変動パターンを示したが、2~4か月目にかけて過酸化脂質は再び徐々に増加した。一方防御系酵素活性は逆に徐々に低下して対照レベルに近づく傾向を示し両者の間にはやはりinverse relationshipが成り立っていた。0.04 ppm, 0.4 ppm及び4 ppm NO₂の9, 18及び27か月暴露の慢性実験においても呼気中エタン測定による過酸化脂質生成は0.04 ppm, 9か月暴露の時点からすでに有意に対照群より増加し、その増加はNO₂濃度の増加に伴って上昇し、かつNO₂暴露期間の延長につれて増加していた。しかし、4 ppm 27か月暴露の場合はエタン生成はむしろ減少していた。これは回復を意味するものではなく、むしろ肺組織の質的变化を意味するものと考えられ、病理班の結果からもこのことは支持されている。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

今後、ここで得られた低濃度 NO₂による過酸化脂質生成を健康影響の観点からその生理的意味の解明を行う予定である。

Abstract

This work was done to clarify the relationship between the changes of lipid peroxidation and the protective systems in lungs of rats exposed acutely, subacutely and chronically to nitrogen dioxide (NO₂).

In acute experiment, Icl: Wistar 8 week-old male rats were exposed continuously to 10 ppm NO₂ for 2 weeks. Lipid peroxidation, measured by ethane exhalation in the breath of the rats and by the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with lung homogenates, increased to a maximum at the third day after declined at the first day, and then returned to the initial level (of day 0).

Activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), disulfide reductase (DSR), and superoxide dismutase (SOD) in the 105,000 × g supernatant of lung homogenates were depressed slightly at the first day. Thereafter, they increased significantly to their maximum levels from the 5th to 10th day, and these maximum levels were maintained until the 14th day. The pattern of change in these protective enzymes was symmetric to that of lipid peroxidation after the 3rd day. The order of the ratio of the increased value to the initial value was G6PD < DSR < 6PGD < GR < GPx < SOD. The time course of nonprotein sulfhydryls was similar to that of the protective enzymes. In contrast, the amounts of vitamin E increased to a maximum at the second day, and then returned to the initial level. The periodic change of vitamin E was similar to that of lipid peroxidation rather than that of the protective enzymes.

In subacute experiment, 13 week-old male rats were exposed continuously to 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for 1, 2, 4, 8, 12 and 16 weeks. Ethane exhalation increased to a maximum at the first week, and then returned to near the initial level at the 4th week. Thereafter, it showed a tendency toward gradual increase, again. TBA reactants in lung homogenates showed a similar pattern to that of ethane exhalation.

The activities of the antioxidative protective enzymes, i. e., glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), superoxide dismutase (SOD) and disulfide reductase (DSR) increased from the first week, and reached their maximum levels at the 4th week, and then decreased gradually until the 16th week. The order of the increased ratios against the control group at the 4th week was G6PD > 6PGD > GR > SOD > DSR > GPx, and the activities were dose-dependent against nitrogen dioxide levels of 0.4 to 4 ppm each period. The content of non-protein sulfhydryls reached maximum levels at the 4th week, and the levels were maintained until the 16th week. The time course of vitamin E was similar to that of lipid peroxidation as measured by ethane exhalation rather than those of protective enzymes.

In chronic experiment, 8 week-old male rats were exposed continuously to 0.04, 0.4 and 4 ppm NO₂ for 9, 18 and 27 months. Ethane exhalation increased significantly with 0.04, 0.4 and 4 ppm NO₂ exposure for 9 and 18 months, and dose-response relationship was clearly observed. Ethane exhalation of rats exposed to 0.04 and 0.4 ppm NO₂ for 27 months also increased two folds the control level. On the other hand, ethane exhalation of rats exposed to 4 ppm NO₂ for 27 months returned to the control level. Pentane exhalation was not so

markable. TBA reactants in lungs also increased significantly in the 4 ppm NO₂ groups at the 9th month, and in the 0.4 and 4 ppm NO₂ groups at the 18th month.

The activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase in lungs of rats exposed to 4 ppm NO₂ for 9 months were significantly higher than those in the control. Other enzymes did not show any significant changes at the 9th month. The activities of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in the 0.4 and 4 ppm NO₂ groups at the 18th month showed a tendency to decrease below the control. The activities of superoxide dismutase and disulfide reductase did not change from control level upon NO₂ exposure for 9 and 18 months.

From these results, it was confirmed that the ability of the antioxidative protective systems to protect cells from oxidative stress increased in an early phase, and then they decreased gradually. On the other hand, lipid peroxides increased once in an early phase, and then they returned to the control level. Thereafter, they increased gradually, again. It was confirmed that cytotoxic lipid peroxides forming process altered inversely with the protective systems.

はじめに

大気汚染物質の一つである NO₂は強い酸化性を有し、特に肺に病理学的障害を引き起こす^{1,2)}。組織の細胞膜中の脂質の過酸化は細胞障害や多くの毒性発現の原因であると見なされている³⁾。このため NO₂の毒性は脂質の過酸化と部分的に関連しているのではないかと考えられている。事実 NO₂暴露によって脂質過酸化が起こることは肺の共役ジェンの測定によって Thomos ら⁴⁾によって報告されている。しかし、その後多くの研究者が NO₂暴露による過酸化脂質の検出を試みたが成功していない⁵⁾。

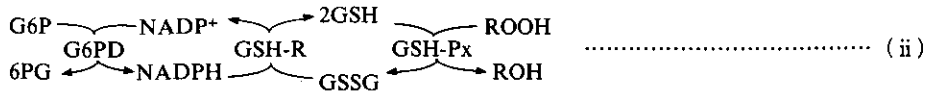
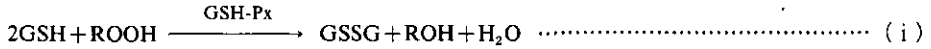
一方、生体内にはこの様な有害な過酸化脂質を代謝したりその生成を抑制する抗酸化性防御機構が存在している。今回我々が検討した細胞上清画分に存在する酵素的防御機構を表1に示した。また、生体内にはこの様な抗酸化性防御系酵素以外に内因性の抗酸化性物質である非タンパク性SH (NPSH) やビタミンEが存在し、過酸化反応から生体を防御している。これら生体内の酵素的防御系や抗酸化性物質は NO₂暴露によって変動することが示されている。Fukase ら⁶⁾は 28 ppm NO₂ 7日間暴露においてマウスの肺の GSH と GPx, GR, G6PD 活性の有意な増加を報告し、また彼ら⁷⁾は 6±1 ppm NO₂に 30日間暴露したマウスの場合にも肺の GR と G6PD 活性の増加を認めている。さらに、Chow ら⁸⁾も 2.3 ppm と 6.2 ppm NO₂に 4日間暴露したラット肺の GR と G6PD の活性上昇を報告している。これらのことから NO₂暴露に伴う抗酸化性防御機構の役割はきわめて重要なものであると考えられる。

そこで著者らは NO₂の生体影響を解明するためには NO₂暴露によって脂質過酸化が起こることを証明し、さらに過酸化脂質の毒性影響を解明するために抗酸化性防御機構と脂質過酸化の関連性について経時的に検討すると同時に量-効果関係を検討することは意義あることと考え、急性、亜急性及び慢性実験を行った。

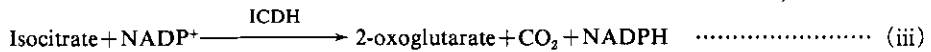
表 1 酸化ストレスに対する酵素的防御機構

Table 1 Enzymatic Protective Mechanisms against Oxidative Stress

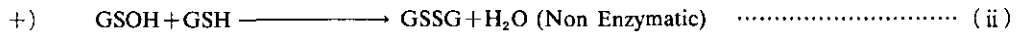
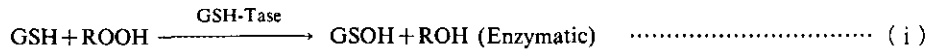
1) GSH-peroxidase as a member in peroxidative metabolic pathway



2) Enzymes for maintenance of reducing potential (NADPH formation)



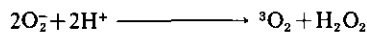
3) Glutathione S-transferase as a peroxidase



4) Superoxide dismutase (SOD)

Cu-Zn SOD in cytoplasm, erythrocyte (soluble)

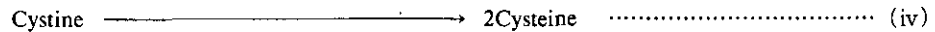
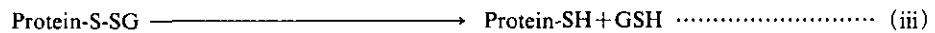
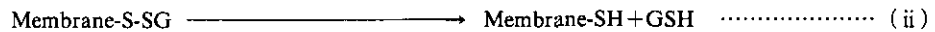
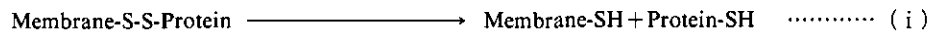
Mn-SOD } in mitochondria
Fe-SOD }



cf. Haber-Weiss Reaction ($\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\hspace{2cm}} \text{}^1\text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$)

5) Disulfide reductase for maintenance of SH-group

(Exchange of inter and/or intra molecular disulfide)



実 験

1. 動物及び暴露方法

急性実験は8週令のJcl: Wistar系雄ラットを用い10 ppm NO₂に2週間の連続暴露を行った。亜急性実験では13週令のJcl: Wistar系雄ラットを用いて0.4, 1.2及び4 ppmのNO₂にそれぞれ1, 2, 4, 8, 12, 16週間の連続暴露した。また慢性実験では8週令のJcl-Wistar系雄ラットを用い0.04 ppm, 0.4 ppm及び4 ppmのNO₂に連続9か月, 18か月及び27か月の長期暴露を行った。これらのラットはハンギングワイヤーメッシュ・ケージの中で6匹ずつ分けて飼育し, NO₂暴露はス

テンレス・スチールガラス製チャンバーを用いて既報^{10,11)}のように行った。チャンバー内温度は24±1°Cに、湿度は55±5%に制御され、室内照明は14時間点燈、10時間消燈とした。またこれらのラットは日本クレア製CE-2固型飼料で飼育し慢性実験の場合は滅菌したものを与え飲料水も滅菌して自由に飲水させた。なお、飼料は週に2回取りかえた。この固型飼料のVitamin E量は23 mg/kg、粗脂肪は3.5%であり、この粗脂肪の脂肪酸組成はパルミチン酸が18.3%、オレイン酸が21.0%、リノール酸が54.8%及びリノレン酸が2.8%であった。

ラットはエーテル深麻酔下で右の頸動脈より放血屠殺し、急性、亜急性実験では右心室に生理食塩水を注入して肺が白色になるまで灌流を行った。慢性実験では肺を灌流せずそのまま用いた。これらの肺は試料ビンに入れ、窒素ガス置換密閉後、用時まで-80°Cに保存した。なお、動物数は特にことわらないかぎり、すべて1群6匹(n=6)ずつ用いた。

2. 肺ホモジネートの調製

ラットの肺は窒素気流下、テフロンホモジナイザーでホモジナイズし、10%ホモジネートとした。このホモジネートを200×g、5分の遠心分離を行い、得られた上清はNPSH、TBA及びVitamin E測定に使用した。上清の残りは12,000×g、10分間の遠心分離を行い、さらにこの上清を105,000×g、60分間の遠心分離を行った。この上清の一部をGlutathione peroxidase (GPx)、Glutathione reductase (GR)、Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)、6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD)、Glutathione S-transferase及びIsocitrate dehydrogenaseの測定に用いた。残りの上清は0.1 mM EDTAを含む50 mM Na, K-リン酸緩衝液(pH 7.5)に20時間透析(透析外液2回交換)し、この透析上清をSuperoxide dismutase(SOD)とDisulfide reductase(DSR)の測定に使用した。

3. 酵素と抗酸化性物質の測定

Glutathione peroxidaseはCumene hydroperoxideあるいは過酸化水素を基質としてLittleらの方法¹²⁾によって測定した。Glutathione reductaseはBergmeyerが記載した方法¹³⁾、Glucose-6-phosphate dehydrogenaseはWilhelmらの方法¹⁴⁾、6-Phosphogluconate dehydrogenase活性は20 mM Mg Cl₂と6.5 mM Cysteineを含む0.1 M Tris-HCl bufferと6-Phosphogluconateを基質として使用してGlucose-6-phosphate dehydrogenaseの方法に従って測定した。Glutathione S-transferaseはKaplowitzの方法¹⁵⁾に従って測定した。なお基質として、Aryl S-transferaseには3, 4-Dichloro nitrobenzeneを、Aralkyl S-transferaseには*p*-Nitrobenzylchlorideを、Epoxy S-transferaseには1, 2-Epoxy-3(*p*-nitrophenoxy)-propaneを使用した。Isocitrate dehydrogenaseはBerntら¹⁶⁾の方法、Superoxide dismutase活性測定はキサンチンオキシダーゼによって酵素的に生じたsuperoxide anion radicalsが、チトクロームcを還元するのをSODがさまたげる反応を利用したMcCordとFridovich¹⁷⁾の方法に従った。

Disulfide reductase 活性の測定はシスチンを基質として Tietze の方法¹⁸⁾によって行い形成されたシステインを DeLucia らの方法¹⁹⁾で定量した。非タンパク性 SH (NPSH) 量は DeLucia らの方法¹⁹⁾, TBA 反応は Ohkawa らの方法²⁰⁾に従って行った。Vitamin E は肺ホモジネートの 200×g 画分から n-hexane を用いて抽出し、スタンダードとして 1 $\mu\text{g}\cdot\text{dl}^{-1}\cdot\alpha\text{-tocopherol/ml hexane}$ を使用して阿部ら²¹⁾の高速度液体クロマトグラフィー法で測定した。タンパク質はスタンダードとして牛血清アルブミンを使用して Lowry²²⁾らの法によって測定した。

4. In vivo の脂質過酸化の測定

NO_2 の急性、亜急性及び慢性暴露ラットの呼気中のエタン, エチレン, ペンタンの分析は FID 付き島津 GC-7AG ガスクロマトグラフィーを用いて既報^{23,24,25)}に従って行った。

結 果

1. 急性暴露実験

10 ppm の NO_2 に 2 週間連続暴露したラットの呼気中エタン産生の経時的变化と肺の TBA 値及び GPx 活性の経時的变化を図 1 に示した。エタンは暴露 1 日目で減少し初期レベル (100%) の約 70% に相当したが, 2 日目後から急速に増加し, 3 日~4 日目では初期レベル (100%) の約 210

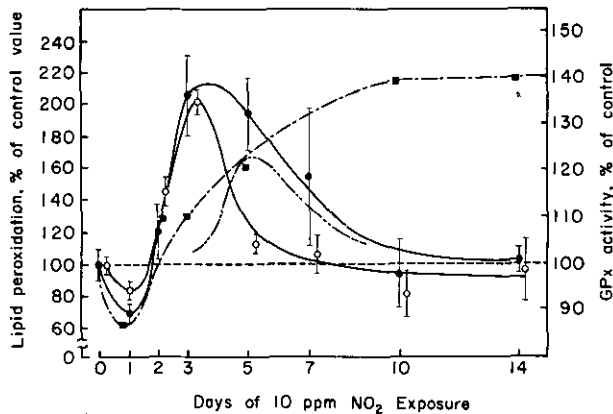


図 1 10 ppm NO_2 に 2 週間暴露したラットの呼気中エタンと肺の TBA 反応物質及びグルタチオンペーオキシダーゼ活性の経時的变化

Fig. 1 Time-dependent changes of ethane exhalation in breath gases, thiobarbituric acid reactants and glutathione peroxidase (GPx) activity in lungs of rats exposed to 10 ppm NO_2 for 2 weeks.

The initial values were: 2.07 ± 0.23 p moles/min/100 g body weight for ethane exhalation (●), and 24.5 ± 1.5 n moles/g lung for thiobarbituric acid reactants (○), 88.8 ± 2.9 (n moles NADP^+ reduced/mg of protein/min) for GPx (■). The dashed straight line shows the initial level, and the dashed curved line shows the difference between ethane exhalation and TBA reactants. The values are expressed as mean \pm SEM ($n=6-12$).

~220%のレベルに達した。その後呼気中エタンは急速に減少し、10日目で初期レベルに戻った。またTBA値も1日目に減少し2日目から3日目で急速に増加し、最高値は3日目に観察され、その値は初期値の200%に相当した。その後は再び急速に減少し5日目で初期レベルに戻った。

なお、図中にWhole bodyの脂質過酸化を示すエタン産生の増加率から肺の脂質過酸化を示すTBA値の増加を差し引いた値を2点破線で示した。この差は5日目で最大となり、この頃には肺以外の臓器でも脂質過酸化が起こっている可能性を示唆している。

また図中に過酸化脂質と抗酸化性防御系酵素活性の変化との相関性を理解しやすいようにGlutathione peroxidase (GPx) 活性の変化を挿入した。GPx活性は1日目で若干低下するが過酸化脂質生成が最大となる3日目頃より増加し始め、5日目から7日目に最高レベルに達し、そのレベルは14日目まで持続した。この結果から、過酸化脂質生成とその代謝酵素であるGPxは明瞭なinverse relationshipを示していることが明らかになった。

図2には肺のGPxと共にGlutathione reductase (GR), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 及び6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) 活性の経時変化を示した。GR, G6PD及び6PGD活性もGPx活性と同様の経時変化を示し、これらの活性の有意な増加は5日目から14日目まで認められた。

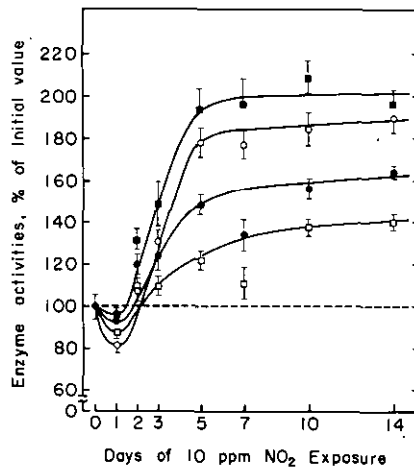


図 2 10 ppm NO₂ に 2 週間暴露したラットの肺のグルタチオンパーオキシダーゼ、グルタチオン還元酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素及び6-ホスホグルコネート脱水素酵素活性の経時変化

Fig. 2 Time-dependent changes of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) in lungs of rats exposed to 10 ppm NO₂ for 2 weeks.

The initial values (*n* moles NADP⁺ reduced/mg of protein/min) were 88.8 ± 2.9 for GPx (□), 124.4 ± 3.5 for GR (●), 126.6 ± 5.9 for G6PD (■), and 145.4 ± 5.6 for 6PGD (○), respectively. The values are expressed as mean ± SEM (*n* = 6-12).

一方、データは示していないが、Glutathione S-transferase 活性は2日目から3日目に最低レベルへ低下し、そのあとやや初期レベルに近づく傾向を示していた。DSR と SOD 活性の経時的変化を図3に示した。DSR 活性は NO₂ 暴露2日目で最低値を示しその値は初期レベルの60%に相当した。その後活性は著しく増加し10日目で最高レベル(210%)に達し14日目までそのレベルを維持した。SOD 活性の経時的変化も DSR 活性の変化と同様であった。しかしその変化の程度は比較的少ないが5日目以後では有意な増加であった。

肺における抗酸化性物質としての NPSH と Vitamin E 量の変化を図4に示した。NPSH は2日目で減少し初期レベルの約90%に相当した。その後5日から14日目にかけて初期レベルの約150~170%に増加した。これに対して、Vitamin E は2日目で初期レベルの140%に増加し、2日目以後急速に減少し、再び初期レベルに戻った。この Vitamin E の経時的変化は NPSH の変化と対称的でむしろ過酸化脂質の経時的変化に類似していた。

2. 亜急性暴露実験

対照群と0.4, 1.2及び4 ppm NO₂を連続16週間暴露したラットの呼気中エタンと肺のTBA反応による過酸化脂質生成量の経時的変化を図5に示した。NO₂暴露ラットの呼気中エタン量は1週目で最大に達し、その後減少し4週目で初期レベルに戻った。1週目の呼気中エタン量は0.4, 1.2及び

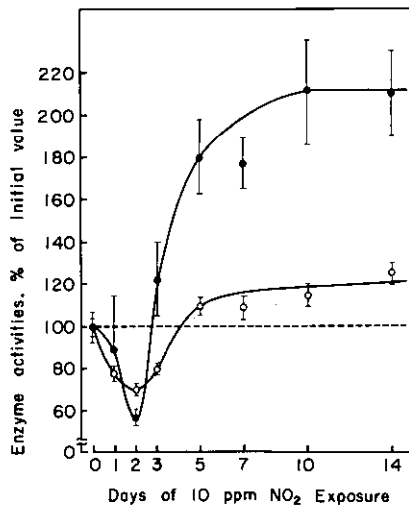


図 3 10 ppm NO₂ に2週間暴露したラットの肺のスーパーオキシド・デスモターゼとダイサルファイド還元酵素活性の経時的変化

Fig. 3 Time-dependent changes of disulfide reductase (DSR) and superoxide dismutase (SOD) in lungs of rats exposed to 10 ppm NO₂ for 2 weeks. The initial values were: 125.8 ± 8.8 (nmoles/hr/mg of protein) for DRS (●), and 18.8 ± 0.5 (units/min/mg of protein) for SOD (○). The values are expressed as mean \pm SEM ($n=6-12$).

NO₂暴露による脂質過酸化と抗酸化性防御機構の変化

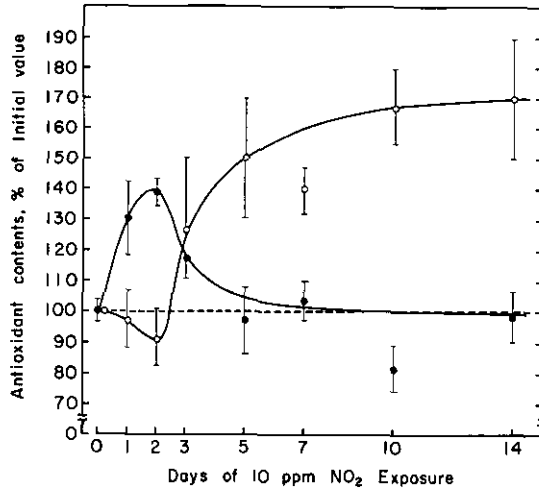


図 4 10 ppm NO₂ に 2 週間暴露したラットの肺の非タンパク性 SH 量とビタミン E 量の経時的変化

Fig. 4 Time-dependent changes of the amounts of nonprotein sulphhydryls (NPSH) and vitamin E in lungs of rats exposed to 10 ppm NO₂ for 2 weeks.

The initial values were: $1.11 \pm 0.05 \mu\text{moles}$ of nonprotein-sulphhydryls/g · lungs (○), and $33.2 \pm 1.1 \mu\text{g}$ of *dl*- α -tocopherol/g · lungs (●). The values are expressed as mean \pm SEM ($n=6-12$).

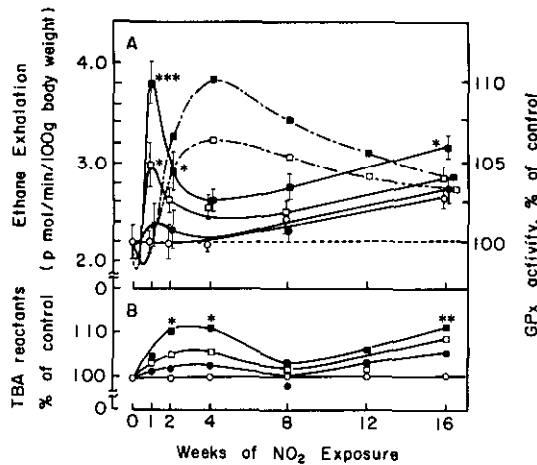


図 5 0.4, 1.2 及び 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラットの呼気中エタン産生と肺の TBA 値及びグルタチオンパーオキシターゼ (GPx) 活性の経時的変化

Fig. 5 Time-dependent changes of ethane exhalation in breath and glutathione peroxidase (GPx) activity in lungs (A), and TBA reactants in lungs (B) of rats exposed to 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for four months.

Control values of ethane exhalation were located between 2.20 and 2.62 p moles/100 g B.W./min., and control values of TBA reactants located between 34.1 and 46.2 moles/g · lungs from the first through the 16th week.

GPx activity in this figure was measured using cumene hydroperoxide as substrate. Control values of GPx were located between 145 and 111 n moles of NADP⁺ formed/mg protein/min.

び 4 ppm 群ではそれぞれ対照群の 108, 135 及び 172 % に相当した。その後、一旦低下し対照レベルに戻った後再び 8 週目から 16 週目にかけて徐々に増加した。またすべての期間で濃度との間に量一効果関係が見られた。呼気中ペンタンは NO₂ 暴露による過酸化脂質の指標となりえなかった。

また、図中に 1.2 ppm 及び 4 ppm NO₂ 暴露による肺の GPx 活性の経時的变化を 1 点破線で示した。GPx 活性は 4 週目で最大レベルへ増加したが、その後徐々に活性は低下し対照レベルに近づく傾向を示した。なお、0.4 ppm NO₂ 暴露群ではほとんど変化がなかった。これらの結果から、GPx 活性の変化は急性暴露実験の場合と同様に、その増減はエタン産生で示した過酸化脂質の変化と対称的な経時変化を示し、両者の間に *inverse relationship* が認められた。

また、肺の TBA 値は 4 週目で最大レベルに達し、この時の 0.4 ppm, 1.2 ppm 及び 4 ppm NO₂ 暴露群の値は対照群のそれぞれ 103 %, 106 %, 116 % に相当した。その後、TBA 値は 8 週目で一旦対照レベルに戻ったが、12 週目から 16 週目にかけて再び増加してゆく傾向を示し、4 ppm の 16 週間目で対照群と有意差を示した。

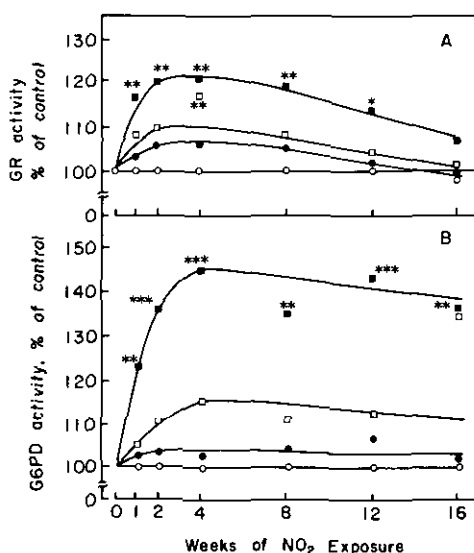


図 6 0.4, 1.2 及び 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラットの肺のグルタチオン還元酵素(GR)活性とグルコース-6-リン酸脱水素酵素活性の経時的变化

Fig. 6 Time-dependent changes of glutathione reductase (GR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activities in lungs of rats exposed to 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for four months.

Control values of GR activity located between 110 and 78 n moles of NADP⁺ formed/mg · protein/min. and control values of G6PD activity were located between 69.5 and 44.8 n moles of NADPH formed/mg · protein/min. from the first through the 16th week. (○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group) (**p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001)

次に、肺の GR と G6PD 活性の経時変化を図 6 に示した。両酵素とも GPx 活性と同様の変化を示した。GR 活性の 4 週目における 0.4 ppm 群、1.2 ppm 群及び 4 ppm 群の値はそれぞれ対照群 (100%) の 106、110 及び 120% に相当し、G6PD では各々 106、115 及び 145% に相当していた。6PGD 活性の経時的変化も G6PD の変化に類似したパターンを示し、4 週目に見られた最大活性値は各濃度群で対照群の 103、110 及び 131% に相当する増加を示した。ICDH 活性は NO₂ 暴露期間中有意な変化を示さなかった。SOD 活性と DSR 活性の経時的変化を図 7 に示した。これら酵素活性の変化もまた GR や G6PD 活性の変化と類似していた。2 週目から 4 週目で見られた SOD の最大活性値は対照群の 103、111 及び 119% に相当した。また対照群に対して 4 週目で見られた各酵素活性の増加率の順序は G6PD > 6PGD > GR > SOD > DSR > GPx の順であった。これとは別に GSH S-transferase の活性は 1 週目から 4 週目にかけて減少し、その後 8 週目から 16 週目で初期レベルまで回復した。抗酸化性物質である肺の非タンパク性 SH は防御系酵素の経時的変化と類似していた (図 8)。4 週目で最大レベルに達し、それぞれ対照群の 102、116 及び 132% に相当していた。しかし、NPSH 量は他の抗酸化性防御系酵素のように 4 週目以後での低下は示さず、2~4 週目で到達したレベルは 12~16 週目まで持続していた。

肺の α -Tocopherol 含量は 1 週目で最大レベルへ増加し、4 週目では対照レベルに戻っていた。こ

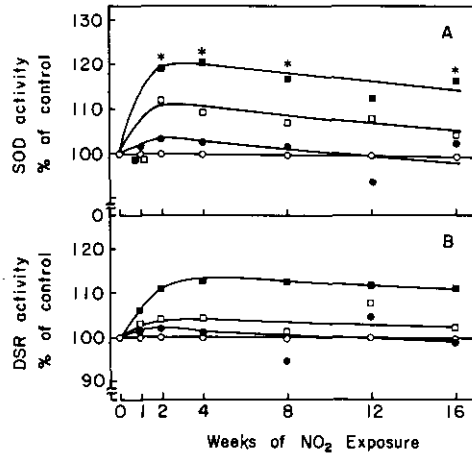


図 7 0.4, 1.2 及び 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラットの肺のスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性とダイサルファイド還元酵素 (DSR) 活性の経時変化

Fig. 7 Time-dependent changes of superoxide (SOD) and disulfide reductase (DSR) in lungs of rats exposed to 0, 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for four months.

Control values of SOD activity were located between 29.6 and 18.9 units/mg protein/min. and those of DSR activity located between 126 and 92 n moles of cysteine formed/mg · protein/min. from the first through the 16th week.

(○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group) (**p* < 0.05)

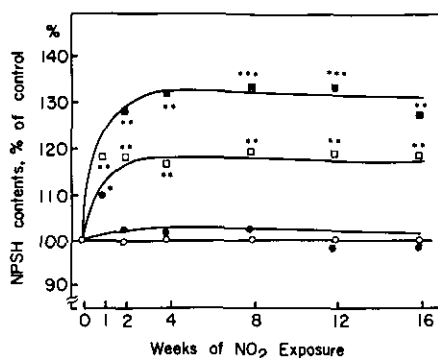


図 8 0.4, 1.2 及び 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラットの肺の非タンパク性 SH(NPSH)量の経時的変化

Fig. 8 Time-dependent changes of non-protein sulphhydryls (NPSH) contents in lungs of rats exposed to 0, 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for four months. Control values of NPSH were located between 1.10 and 0.95 μ moles/g of wet lungs.

(○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group) (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001)

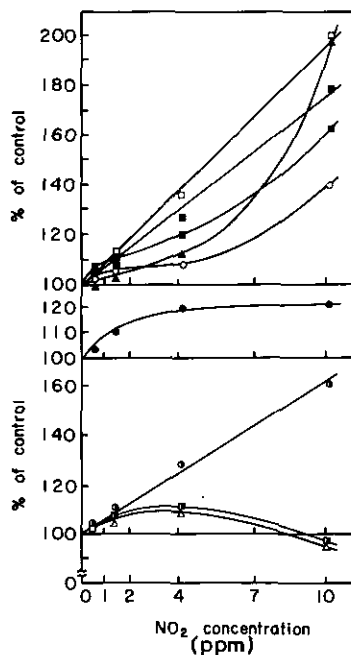


図 9 0~10 ppm NO₂ に 2 週間暴露されたラットの肺の防御系酵素活性及び TBA 値と抗酸化性物質の量-効果関係

Fig. 9 Dose-response relationship of antioxidative protective systems and lipid peroxides in lungs of rats exposed to 0 to 10 ppm NO₂ for two weeks.

Glutathione peroxidase (○), glutathione reductase (■), glucose-6-phosphate dehydrogenase (□), 6-phosphogluconate dehydrogenase (⊗), superoxide dismutase (●) and disulfide reductase (▲) activities, and non-protein sulphhydryls (●), TBA reactants (■) and α -tocopherol (△) contents.

の経時的变化は TBA 値よりもむしろエタン産生で示した過酸化脂質の変化に類似していた。

以上の結果から、NPSH と GSH S-transferase を除く防御系酵素の活性は NO₂ から細胞を保護するために初期 (2~4 週目) に急速に誘導されるがこの増加レベルはそれほど長くは持続できず 4 週目以降でゆっくりと低下してゆき、エタン産生で示された過酸化脂質生成の変化と対称的な inverse relationship を示していた。

この亜急性暴露実験の 2 週間目と 10 ppm 2 週間暴露で得られたラット肺の防御系酵素活性、TBA 値、非タンパク性 SH 量及び α -Tocopherol 含量の量-効果関係を図 9 に示した。0 ppm から 10 ppm までの NO₂ 暴露による量-効果関係は各防御系酵素及び NPSH 量について観察された。これには 3 種のタイプの量-効果関係が見られた。G6PD, 6PGD 活性及び NPSH 量は NO₂ 暴露濃度と直線的な量-効果関係を示し、GPx, GR 及び DSR は凹型の量-効果関係を、また SOD は凸型の量-効果関係を示していた。しかし TBA 値と α -Tocopherol 含量はこの様な量-効果関係を示さなかった。

3. 慢性暴露実験

肺の抗酸化性防御系酵素活性、非タンパク性 SH (NPSH) 量及び TBA 値測定の為に 0.04 ppm, 0.4 ppm 及び 4 ppm NO₂ に 9 か月間と 18 か月間の連続暴露実験を 2 回行い、それぞれの結果を Experiment 1 及び Experiment 2 として表 2~4 に示した。この Experiment 1 と 2 は再現性を確認する為に行ったものであるが、用いた動物のロットと実験を行った季節は異なっている。

表 2 に Total protein 量、GPx, GR 及び G6PD 活性の実験 1 と実験 2 の結果を示した。Cumene hydroperoxide (Cumene·OOH) を基質とした GPx 活性は 9 か月目で対照群よりやや増加傾向を示すが有意差は示さなかった。18 か月目の実験 2 では 0.4 ppm 群と 4 ppm 群で有意な低下を示したがやはり再現性は得られていない。過酸化水素 (H₂O₂) を基質とした場合も同様の傾向を示した。

GR と G6PD 活性は 9 か月目の 4 ppm 群でわずかながら有意な増加を示し再現性も認められた。6PGD と ICDH 活性は共に 9, 18 か月目で全く変化がみられなかった。

表 3 には GSH S-transferase のうち Aryl, Aralkyl 及び Epoxy S-transferase 活性を示した。これらの三酵素はともに 9 か月目では対照群と変わらないが 18 か月目では Aryl 及び Aralkyl S-transferase 活性が 4 ppm 群で有意に低下し、かつ再現性も認められた。Epoxy S-transferase 活性は対照群と変わりなかった。

SOD と DSR 活性については両者とも 1 度だけの測定であるが全く有意差はなく NO₂ 慢性暴露の場合には Superoxide や Disulfide の生成は起こっていない可能性を示唆した。

表 4 には TBA 法による肺の過酸化脂質量を示した。TBA 値は 9 か月目の 4 ppm 群、Experiment 1 で有意な増加を示したのみであるが、18 か月目では 0.4 ppm 群と 4 ppm 群で有意な増加を示し、かつ再現性も明瞭であった。

つぎに、図 10 に呼気中エタンの測定によって得られた過酸化脂質生成の結果を示した。なお、エ

表2 NO₂慢性暴露ラットの肺の総タンパク量およびグルタチオン・パーオキシダーゼ (GPx), グルタチオン還元酵素 (GR) とグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 活性の変化

Table 2 The changes of the contents of total protein, and the activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in rat lungs by chronic exposure of nitrogen dioxide.

		Rats exposed to NO ₂ for 9 months		Rats exposed to NO ₂ for 18 months	
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
		Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)
Total protein (mg/g · Lung)	Control	92.4 ± 7.7 (100%)	85.9 ± 4.9 (100%)	95.0 ± 10.4 (100%)	83.2 ± 3.8 (100%)
	0.04 ppm	92.7 ± 4.2 (100%)	82.7 ± 2.5 (100%)	96.3 ± 9.5 (101%)	87.2 ± 3.6 (105%)
	0.4 ppm	96.7 ± 4.4 (105%)	88.7 ± 14.5 (103%)	99.7 ± 3.7 (105%)	92.5 ± 6.6 (111%) *
	4.0 ppm	101.3 ± 3.0 (110%)	87.3 ± 6.3 (102%)	93.0 ± 5.2 (98%)	85.1 ± 3.2 (102%)
GPx-Cumene-OOH ^a (nmol/mg/min)	Control	181 ± 28 (100%)	253 ± 29 (100%)	150 ± 9 (100%)	266 ± 17 (100%)
	0.04 ppm	204 ± 10 (112%)	240 ± 20 (95%)	154 ± 13 (103%)	279 ± 10 (105%)
	0.4 ppm	193 ± 9 (107%)	252 ± 33 (100%)	162 ± 15 (108%)	191 ± 17 (72%) ***
	4.0 ppm	200 ± 91 (110%)	269 ± 40 (107%)	150 ± 20 (100%)	229 ± 14 (86%) **
GPx-H ₂ O ₂ ^b	Control		109 ± 16 (100%)		155 ± 18 (100%)
	0.04 ppm		109 ± 17 (100%)		159 ± 15 (102%)
	0.4 ppm		118 ± 19 (109%)		111 ± 13 (72%) **
	4.0 ppm		133 ± 25 (122%)		139 ± 10 (89%)
GR (nmol/mg/min)	Control	85.9 ± 15.0 (100%)	94.8 ± 8.4 (100%)	87.4 ± 4.1 (100%)	94.6 ± 4.5 (100%)
	0.04 ppm	89.9 ± 3.8 (104%)	89.6 ± 5.8 (95%)	90.9 ± 14.8 (104%)	88.4 ± 2.5 (94%)
	0.4 ppm	92.9 ± 5.4 (108%)	96.2 ± 11.2 (102%)	86.4 ± 4.4 (99%)	67.9 ± 6.6 (72%) ***
	4.0 ppm	102.8 ± 5.0 (120%) *	109.3 ± 10.9 (115%) *	97.5 ± 9.6 (112%)	95.3 ± 7.3 (101%)
G6PD (nmol/mg/min)	Control	48.7 ± 11.6 (100%)	61.3 ± 8.5 (100%)	67.2 ± 11.2 (100%)	79.2 ± 6.6 (100%)
	0.04 ppm	57.4 ± 10.5 (118%)	52.5 ± 3.9 (86%)	76.8 ± 17.5 (114%)	89.1 ± 8.6 (102%)
	0.4 ppm	65.8 ± 9.9 (135%) *	57.8 ± 8.1 (94%)	80.7 ± 11.6 (120%)	60.0 ± 9.3 (76%)
	4.0 ppm	86.8 ± 9.2 (178%) ***	79.7 ± 10.7 (130%) *	100.8 ± 11.4 (150%) ***	80.3 ± 9.5 (101%)

a) GRx-Cumene · OOH shows glutathione peroxidase assayed by cumene hydroperoxide as a substrate.

b) GPxH₂O₂ shows glutathione peroxidase assayed by hydrogen peroxide as a substrate.**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

タン測定に用いた動物のうち9か月間暴露群は前記9か月間暴露のExperiment 2と同一の動物(6匹)であるが、18か月と27か月間暴露動物はExperiment 1, 2に用いた以外の動物である。18か月と27か月間暴露動物のうち対照チャンパー内のラットは死亡により数が著しく少なかった為に、図中の対照群(C印)の値はNO₂暴露動物と一諸に購入した同一ロットの動物を清浄飼育室で同一期間飼育していたものの値を示した。この動物は9, 18及び27か月群ともすべて8匹ずつ測定に供し、9か月群の場合、清浄飼育室内で飼育したラット(8匹)と対照チャンパー内のラット(6匹)の呼気中エタン産生量の間には全く差は認められなかった。18か月と27か月間NO₂暴露群のラットも死亡例があったため、各群とも3匹か4匹の測定結果を示している。

NO₂暴露によるエタン生成は9か月と18か月目では0.04 ppm群, 0.4 ppm群及び4 ppm群のすべての群で対照群より有意に増加していた。さらに、その生成量はNO₂暴露濃度に依存し、かつ暴

NO₂暴露による脂質過酸化と抗酸化性防御機構の変化

表 3 NO₂慢性暴露ラットの肺のグルタチオン S-トランスフェラーゼ, すなわちアシル, アラルキルおよびエポキシ S-トランスフェラーゼ活性の変化
Table 3 The changes of the activities of three kind of glutathione S-transferase, aryl-, aralkyl-, and epoxy S-transferase in rat lungs by chronic exposure of nitrogen dioxide

		Rats exposed to NO ₂ for 9 months		Rats exposed to NO ₂ for 18 months	
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
		Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)
Aryl S-transferase (nmol/mg/min)	Control	2.88±0.52 (100%)	3.29±0.31 (100%)	3.42±0.13 (100%)	3.13±0.23 (100%)
	0.04 ppm	3.10±0.34 (108%)	3.05±0.33 (93%)	3.07±0.41 (90%)	2.63±0.31 (84%)
	0.4 ppm	3.36±0.24 (117%)	3.19±0.46 (97%)	3.53±0.38 (103%)	1.99±0.14 (64%) ***
	4.0 ppm	3.06±0.18 (106%)	3.00±0.56 (91%)	3.00±0.29 (88%) *	2.20±0.15 (70%) ***
Aralkyl S-transferase (nmol/mg/min)	Control	42.0±7.6 (100%)	44.9±2.8 (100%)	31.3±0.6 (100%)	45.5±2.5 (100%)
	0.04 ppm	44.0±2.4 (105%)	42.0±6.7 (94%)	30.1±3.0 (96%)	44.9±2.8 (99%)
	0.4 ppm	47.4±3.0 (113%)	45.6±5.7 (102%)	32.8±4.3 (105%)	31.8±1.5 (70%) ***
	4.0 ppm	46.4±2.7 (110%)	41.4±4.9 (92%)	29.1±1.5 (93%) *	35.9±2.7 (79%) ***
Epoxy S-transferase (nmol/mg/min)	Control	2.69±0.35 (100%)	2.10±0.35 (100%)		2.86±0.45 (100%)
	0.04 ppm	3.04±0.58 (113%)	2.49±0.39 (119%)		3.35±1.13 (117%)
	0.4 ppm	2.86±0.24 (106%)	2.33±0.85 (111%)		2.42±0.56 (84%)
	4.0 ppm	2.27±0.24 (84%) *	2.43±0.57 (116%)		3.05±0.52 (107%)

*p<0.05. ***p<0.005.

表 4 NO₂慢性暴露ラットの肺におけるチオバルビツール酸 (TBA) 反応性物質
量の変化
Table 4 The changes of the contents of thiobarbituric acid (TBA) reactants in rat
lungs by chronic exposure of nitrogen dioxide.

		Rats exposed to NO ₂ for 9 months		Rats exposed to NO ₂ for 18 months	
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
		Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)
TBA values (n mol/g-Lung)	Control	52.8±4.9 (100%)	39.6±1.5 (100%)	54.9±4.1 (100%)	46.9±2.9 (100%)
	0.04 ppm	52.9±3.1 (100%)	37.6±2.4 (95%)	56.2±4.1 (102%)	52.4±3.5 (112%)
	0.4 ppm	54.9±3.8 (104%)	38.7±1.4 (98%)	64.0±3.8 (106%) **	55.3±3.6 (118%) **
	4.0 ppm	66.2±4.4 (125%) ***	41.1±1.4 (104%)	69.8±3.2 (127%) ***	57.8±4.6 (123%) **

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

露期間に依存して増加していた。また、27 か月間暴露群では、0.04 ppm 群と 0.4 ppm 群が対照群の約 2 倍へと有意な増加を示していたが 4 ppm 群では逆に低下し対照群との間に有意差は認められなくなった。

一方、ペントンの変化 (図 11) はエンタンに比べると比較的少なく、有意差が見いだされたのは

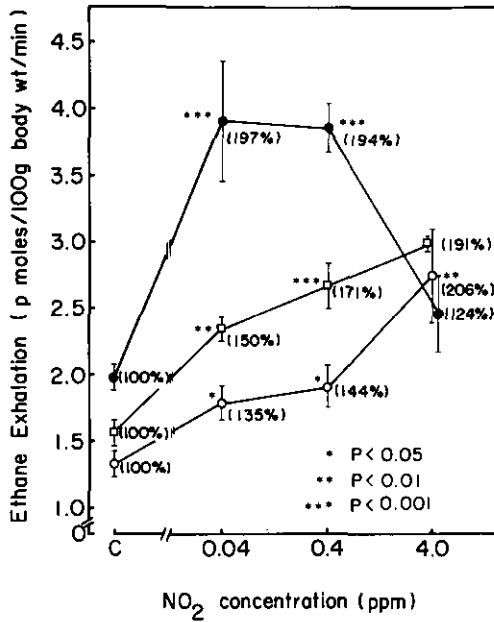


図 10 0.04, 0.4 及び 4 ppm NO₂ に各々 9, 18 及び 27 か月間連続暴露したラットの呼気中エタン産生量
 Fig. 10 Ethane exhalation in breath of rats exposed continuously to 0.04, 0.4 and 4 ppm NO₂ for 9, 18 and 27 months, respectively.
 ○, 9 months; □, 18 months; ●, 27 months;
 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

18 か月目の 0.04 ppm 群と 0.4 ppm 群のみであり、4 ppm 群ではエタンの 27 か月目の場合と同様にむしろ低下していた。

最後に NO₂ 慢性暴露によるエタン生成増加の再現性を確認すると同時に低濃度範囲での量-影響関係を把握する為に 0.04 ppm, 0.12 ppm 及び 0.4 ppm NO₂ に 6 か月, 9 か月及び 18 か月間連続暴露しエタン生成の変化を調べその結果を図 12 に示した。図から理解されるようにエタンの生成量は 6 か月間暴露の場合には 0.4 ppm NO₂ 暴露群で有意な増加を示しただけであったが 9 か月及び 18 か月間暴露の場合には 0.04 ppm, 0.12 ppm 及び 0.4 ppm NO₂ のすべての暴露群で有意に増加していた。また、このエタンの生成量は NO₂ の暴露濃度の上昇につれて増加し、かつ NO₂ の暴露期間の延長につれて増加しており、前記の結果と同一傾向を示し再現性が確認された。また 0.04~0.4 ppm NO₂ の間には直線的量-影響関係が存在し、特に何 ppm 以下では影響が現れないということを示すことはできなかった。なお、この実験においては、ラットの NO₂ 暴露中に飼料も NO₂ に暴露され過酸化されているので、この過酸化された飼料を摂取したことによって呼気中エタンが増加したのかもしれないという可能性についても検討した。実験は、NO₂ 暴露チャンバー内のラットが摂取していたものと同じ飼料を同じ期間 (3~4 日間) NO₂ に暴露されていた飼料を SPF レベルの清浄

飼育室に戻して正常ラットに与えた。なお、この飼料は3~4日ごとに次の飼料と取りかえながら連続18か月間与えた。この時の飼料の過酸化度(TBA法による)とそれを18か月間摂取したラットの呼気中エタン生成量を表5に示した。飼料中のTBA値はNO₂暴露濃度に依存して増加し、0.4 ppm NO₂暴露飼料は約1.5倍に増加していた。しかしながら、呼気エタンの産生量は0.4 ppm群のみの測定であるが対照群の値と全く異ならなかった。この結果より、飼料はNO₂暴露によって確かに過酸化されているが呼気中エタン生成には全く影響がないことが確認された。

考 察

本実験ではNO₂の急性、亜急性及び慢性暴露による過酸化脂質産生と酸化的障害から生体を防御する抗酸化性防御機構との関連を経時的に検討しその関係を調べた。その結果、高濃度及び低濃度NO₂暴露による過酸化脂質の増加を呼気中のエタン測定と肺ホモジネート中TBA値の測定によって明らかにすることができた。10 ppm NO₂暴露実験の過酸化脂質はNO₂暴露開始後1日目に1度減少するがその後2日目で以降から増加し始め3~4日目で最高レベルに達し、その後再び初期レベルに戻った。この過酸化脂質量の変動は肺の共役ジエン測定によるThomasら⁴⁾の結果と類似している。初期に見られたこの過酸化脂質の減少は肺の機能的SH基等の直接酸化による生物学的活性の低下によるものと考えられる。またエタン生成及びTBA値の経時変化はEvansら^{26,27)}が行った2 ppm及び15~17 ppm NO₂暴露による肺胞II型細胞の増殖過程とも類似している。つまり、NO₂暴露によって初期(0-1日)にI型細胞が障害を受け、1~3日でII型細胞の増加と修復が始まり、

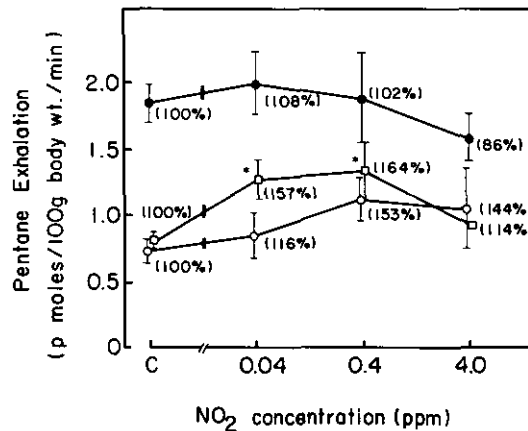


図 11 0.04, 0.4 及び 4 ppm NO₂ に各々9, 18 及び27か月間連続暴露したラットの呼気中ペンタン産生量

Fig. 11 Pentane exhalation in breath of rats exposed continuously to 0.04, 0.4 and 4 ppm NO₂ for 9, 18 and 27 months, respectively.

○, 9 months; □, 18 months; ●, 27 months.

*p<0.05

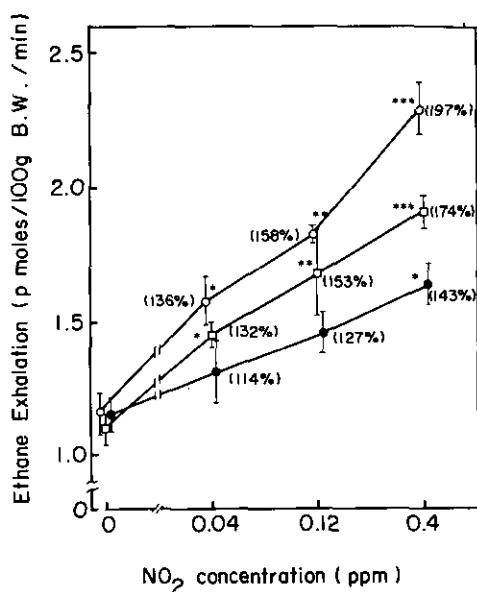


図 12 0.04, 0.12 及び 0.4 ppm NO₂ に各々6, 9 及び 18 か月間連続暴露したラットの呼気中エタン産生量

Fig. 12 Ethane exhalation in breath of rats exposed continuously to 0.04, 0.12 and 0.4 ppm NO₂ for 6, 9 and 18 months, respectively

●, 6 months; □, 9 months; ○, 18 months.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

表 5 慢性実験における NO₂ 暴露飼料のエタン産生に及ぼす影響

Table 5 Effect of diets exposed to NO₂ on ethane exhalation in chronic experiment

	Control	0.04 ppm · NO ₂	0.12 ppm · NO ₂	0.4 ppm · NO ₂
TBA values ^{a)} of diets	25.0±0.8 (100%)	29.3±2.2 (113%)	29.6±1.2 (114%)	39.7±3.2 (153%)
Ethane ^{b)} Exhalation	2.11±0.15	-----	-----	2.09±0.16

a) n moles of MDA/g · diet.

b) p moles of Ethane/100g body wt./min.

その増殖は3日以降で減少するという結果と類似していた。

一方、3日目にみられた呼気中エタン分析による脂質過酸化の増加率は TBA 反応による増加率より若干高く、また初期レベルに対する増加率を経時的に比較するとエタンの増加率曲線の方が TBA 値の増加率曲線よりもブロードであった。この増加率の経時変化の違いはその由来が肺によるものか、Whole body によるものかということの違いであると考えられる。それゆえに図中に

2点破線で示したように呼気中エタンの増加率から TBA 値の増加率を差し引いた差は5日目にピークとなり、肺以外の組織において脂質過酸化が起こったことを示唆している。

この様な過酸化脂質の変化に対して抗酸化性防御機構も 10 ppm NO₂急性暴露によって複雑な変化を示した。防御系酵素活性は Glutathione S-transferase を除いて、3日目以降では呼気中エタンと TBA 値で示した過酸化脂質の変化と対称的であった。過酸化脂質が最高レベルに達すると過酸化脂質を代謝したり生成を抑制する防御系酵素活性が増加し始め、逆に防御系活性が最高レベルに達すると過酸化脂質生成は対照レベルに戻っていた。これらの酵素活性の増加は NO₂暴露による酸化的ストレスから細胞を防御するための防御性変化であろうと考えられる。一方、抗酸化剤のうち非蛋白性 SH は防御系酵素と類似の変化を示したがビタミン E はむしろ過酸化脂質の変化と類似していた。ビタミン E は体内では合成できないため、この早期の増加は主に肝臓など肺以外の組織から運ばれてきたものと考えられる。それ故、ビタミン E は脂質過酸化反応を極力最少限にとどめるために動員される重要な早期防御因子の一つであると考えられる。このことは Dumelin ら²⁹⁾がラットに 1 ppm O₃を1時間暴露した場合、ビタミン E 含有食摂取ラットの呼気中ペンタンは増加せずむしろ若干低下するのに対して、ビタミン E 欠乏食摂取ラットの呼気中ペンタンは著しく増加していたという結果からも支持される。

次に、より低濃度長期の亜急性暴露を行った場合、過酸化脂質量がどのように変化するかを調べたが比較的低濃度の NO₂暴露の場合でも過酸化脂質が有意に増加することを確認した。急性暴露の場合と同様に過酸化脂質は NO₂暴露濃度に対応して初期に増加し、その後 10 ppm 暴露の場合と同様に減少しはじめ 1 か月目では 4 ppm 群で再び対照群との間に有意差はみられなくなった。しかし、その後再び極めてゆるやかに増加し始め、16 週目の 4 ppm 群で再び対照群との間に有意差が認められるようになった。また TBA 値も同様の変化を示したが、高濃度 NO₂暴露の場合とは異なり TBA 値が最高レベルに達する時期はエタンのそれより遅れていた。この相違は過酸化脂質の代謝経路におけるエタンと TBA 反応物質の形成過程の相違によるものと考えられる。すなわち、一旦形成されたエタンはそれ以上に代謝されることはない²⁹⁾が、TBA 反応物質の本体と考えられるマロンジアルデヒドはアルデヒド脱水酵素などによってさらに代謝されるため、組織中に蓄積されるまでに時間を要することによる相違であろうと考えられる。

一方、亜急性暴露実験における抗酸化性防御系酵素等も急性暴露の場合と同様に過酸化脂質の変化と対称的な inverse relationship を示していた。このような変化は慢性暴露の場合にも認められ、過酸化脂質の増加につれて抗酸化性防御機能は低下してゆくものであることが明らかにされた。

更に長期の慢性暴露を行った場合、9 か月及び 18 か月目で 0.04 ppm 群を含め、すべての NO₂暴露群でエタン測定による過酸化脂質は対照群より有意な増加を示し、かつ明瞭な量-効果関係を示し再現性も認められた。一方、27 か月間暴露の場合には 0.04 ppm 群と 0.4 ppm 群では対照群の約 2 倍へと有意な増加を示していたが 4 ppm 群では逆に低下し対照群との間に有意差はみられなくなった。この低下は回復を意味するものではなく、むしろ肺組織の質的变化を反映しているものと

考えられる。事実この変化は本研究と同時に実験した同一ロットのラットにおける電子顕微鏡的形態計測による肺胞壁の肥厚化³⁰⁾の濃度依存性変化と極めてよく対応した変化であった。さらに、4 ppm 27か月暴露では肺の線維化の進行が見られたという病理学的変化も鑑察されている。これらの変化を総合すると生体にとって有害な過酸化脂質の生成はNO₂の暴露濃度の増加に伴って上昇し、かつ暴露期間の延長につれて蓄積的に増加し、ある限界を超えると肺組織の質的变化を伴って減少することを示している。

以上の結果より急性、亜急性及び慢性暴露の場合の抗酸化性防御系と過酸化脂質生成の経時的変化を図13に模式的に示した。

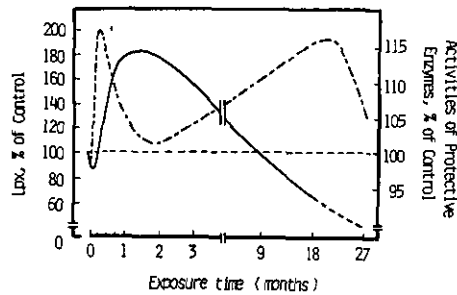


図 13 呼気中エタン測定による脂質過酸化と抗酸化性防御酵素活性との間のすべての期間にわたる変化

Fig. 13 The overall changes between lipid peroxidation measured by ethane exhalation in the breath and the antioxidative protective enzyme activities. (Ethane exhalation, ———; Antioxidative protective enzyme activities, —;)

最後に、上述してきたようなNO₂暴露によって過酸化脂質が増加する原因について考えてみる。その原因の一つには先に述べたように過酸化物を代謝する防御系酵素活性の低下によることが考えられる。その第二は本研究と同事に行われた動脈血酸素分圧(PaO₂)の測定により、NO₂を9か月間暴露した場合0.4 ppm群と4 ppm群でPaO₂が有意に低下していたという鈴木ら³¹⁾の生理学的知見と関連する可能性が考えられる。これは組織が低酸素状態に傾いていることを示唆し、低酸素性動脈硬化症の場合に動脈壁中に過酸化脂質が増加するのと似た現象であると考えられる。このようなNO₂暴露による動脈血酸素分圧の低下はDavidsonら³²⁾のウサギによる実験やFreemanら³³⁾のラットの実験あるいはNiedingら³⁴⁾のヒトでの実験などでも見いだされている。このような動脈血酸素分圧の低下による組織への酸素供給の低下は先に述べた肺胞壁の肥厚化による肺胞でのガス交換能の低下による可能性が考えられる。また、八木ら³⁵⁾は未熟児網膜症の原因を調べるためにニワト

りの胚網膜に高濃度酸素を暴露し網膜の肥厚化と肥厚した網膜中に過酸化脂質が著しく増加していることを見いだし、未熟児網膜症が過酸化脂質によるものであることを報告している。

以上のような事実から、NO₂慢性暴露による過酸化脂質の増加は1)過酸化物代謝系酵素活性の低下、2)動脈血中酸素分圧の低下、8)肺胞壁の肥厚化、等が複雑に関連して起こっている可能性が考えられる。しかしながら、これらの因果関係は現在の段階では断定できない。

一方、これまでNO₂による生体影響がみられるのは約0.4 ppm前後と考えられており、最低は0.12 ppm NO₂に35日間暴露したラットの肺胞壁の電子顕微鏡的形態計測で異常値が観察されたという京野と河合⁸⁶⁾の報告であり、0.1 ppm以下のNO₂暴露で影響を検出したという報告は全くない。この意味で、今回環境規準値の0.04 ppmでも明瞭な過酸化脂質の増加を検出したことは注目すべき事実であると考えられる。しかし、0.04 ppmのような極めて低濃度のNO₂暴露によって検出された変化が健康影響の点でどのような意味を持つかということの評価することは現時点では難しい問題であり今後の研究に待たなければならない。

引用文献

- 1) McAdams, A., Jr. (1955): Bronchiolitis obliterans. *Am. J. Med.*, **19**, 314-322.
- 2) Cray, E. (1959): Oxides of nitrogen: Their occurrence, toxicity, and hazard. *Arch. Ind. Health*, **19**, 479-486.
- 3) Tappel, A. L. (1975): Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. In *Pathobiology of cell membranes*. Acad. Press. N. Y., **1**, 145-170.
- 4) Thomas, H. V., P. K. Mueller and P. L. Lyman (1967): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
- 5) 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.
- 6) Fukase, O., K. Isomura and H. Watanabe (1976): Effects of nitrogen oxide on peroxidative metabolism in mice lungs. *Taiki Osen Kenkyu*, **11**, 65-69. (In Japanese).
- 7) 深瀬 完・磯村公郎・渡辺 弘 (1976): 窒素酸化物のマウス肺 Peroxidative metabolic pathway への影響。大気汚染研究。 **11**, 65-69。
- 8) 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**, 311-317.
- 9) Sagai, M. (1977): The effect of enzyme-inducing agents on the survival times of rats exposed to lethal levels of nitrogen dioxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **43**, 169-174.
- 10) 市瀬孝道・嵯峨井 勝 (1981): 二酸化窒素亜急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化。国立公害研究所研究報告, 第31号, 81-93。
- 11) 松本 茂・藤田和伸・清水 明・木村英雄・高橋 弘 (1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——暴露チャンバーの環境制御——国立公害研究所研究報告, 第15号, 149-158。
- 12) Little, C. and P. J. O'Brien (1970): Properties and regulation of glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3632-3639.
- 13) Bergmeyer, H. U. (1974): Reagents for enzymatic analysis: Glutathione reductase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. (ed. by Bergmeyer, H. U.), **2**, 465-466.
- 14) Wilhelm, L. G. and H. D. Waller (1974): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. (ed. by Bergmeyer, H. U.) Acad. Press. N. Y., **2**, 636-643.

- 15) Kaplowitz, N., J. Kuhlenkamp and G. Glichton (1975): Drug induction of hepatic glutathione S-transferase in male and female rats. *Biochem. J.* **146**, 351-356.
- 16) Bernt, E and H. U. Bergmeyer (1974): Isocitrate dehydrogenase. In "Methods of enzymatic analysis". (ed. by Bergmeyer, H. U.) Acad. Press. N. Y., **2**, 624-631.
- 17) McCord, J. M. and I. Fridovich (1969): Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.
- 18) Tietze, F. (1970): Disulfide reduction in rats liver: Evidence for the presence of nonspecific nucleotide dependent disulfide reductase and glutathione-disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 177-188.
- 19) 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 non-protein sulfhydryls. *J. Clin. Inv.*, **55**, 794-802.
- 20) Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- 21) Abe, K., M. Ohmae and G. Katsui (1976): Rapid and micro-method for the determination of tocopherols in liver. *Vitamins*, **50**, 453-357.
- 22) Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 23) Sagai, M. and A. L. Tappel (1979): Lipid peroxidation induced by some halomethanes as measured by in vivo pentane production in the rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **49**, 283-291.
- 24) Sagai, M. and T. Ichinose (1980): Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Sciences*, **27**, 731-738.
- 25) 嵯峨井 勝, A.L. Tappel, (1979): 脂質過酸化の新しい測定法としての呼気ガス分析法, 過酸化脂質研究, 1-8.
- 26) Evans, M. J., R. J. Stephens, L. J. Cabral and G. Freeman (1972): Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of NO₂. *Arch. Environ. Health*, **24**, 180-188.
- 27) Evans, M. J., L. J. Cabral, R. J. Stephens and G. Freeman (1973): Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. *Am. J. Pathol.*, **70**, Feb. 175-198.
- 28) Dumelin, E. E., C. J. Dillard., A. L. Tappel (1978): Effect of vitamin E and ozone on pentane and ethane expired by rats. *Arch. Environ. Health*, **33**, 129-135.
- 29) Ruiter, N. D., H. Muliawan, and H. Kappus (1980): Ethane production of mouse peritoneal macrophages as indication for lipid peroxidation and the effect of heavy metals. *Toxicology*, **17**, 265-268.
- 30) 竹中参二・清水不二雄・山田靖子・堀内博人・今井 透・原田隆彦・京野洋子・河合清之 (1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——病理形態学的所見——国立公害研究所研究報告, 第15号, 171-227.
- 31) 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・織田 肇 (1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——動脈血 pHa, PaCO₂ および PaO₂ —— 国立公害研究所研究報告, 第15号, 229-240.
- 32) Davidson, J. T., G. A. Lillington, G. B. Hydon and K. Wasserman (1967): Physiologic changes in the lungs of rabbits continuously exposed to nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respi. Dis.*, **95**, 790-796.
- 33) Freeman, G., S. C. Crane, N. J. Furioli, R. J. Stephens, M. J. Evans and W. D. Moore (1972): Covert reduction in ventilatory surface in rats during prolonged exposure to subacute nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **106**, 563-579.
- 34) Nieding, G. von and H. M. Wagner (1977): Experimental studies on the short-term effect of air pollutants on pulmonary function in man: Two-hour exposure to NO₂, O₃ and SO₂ alone and in combination. 4th. Int. Clean Air Congress, 5-8.
- 35) 八木国夫 (1980): フリーラジカルについて, 「虚血と細胞障害」早石, 八木, 五島監修, 医歯薬出版株式会社, pp. 29-45.

NO₂暴露による脂質過酸化と抗酸化性防御機構の変化

- 36) 京野洋子・河合清之(1977): 肺の電顕的形態計測II, NO₂吸入ラット肺. 第18回大気汚染研究全国協議会講演集(福岡), p. 220.

III-3

二酸化窒素暴露による生体膜系の損傷とその修復について

**Degradation and Repair of Biological Membrane upon
Nitrogen-Dioxide Inhalation**

三浦 卓¹

Takashi MIURA¹

要 旨

二酸化窒素 (NO_2) が生体に直接作用する化学形態は NO_2 ガス、硝酸イオン及び亜硝酸イオンである。 NO_2 はフリーラジカルであるので生体構成成分の中でも不飽和脂質に富む生体膜系に作用しやすい。そこで、 NO_2 及び NO_2 の水溶液中での存在形態である硝酸、亜硝酸イオンが赤血球膜、肺及び肝臓のミトコンドリア、ミクロソーム膜成分に及ぼす損傷について検索した。また、これら生体膜系の修復過程を検討し NO_2 に対する適応機構について討論した。

Abstract

The effect of nitrogen dioxide (NO_2) on biological membranes was reviewed, especially with respect to chemical forms of inhaled NO_2 . In addition, repair processes of biological membranes degenerated by NO_2 inhalation were discussed.

1. はじめに

生体が周囲の環境条件の変化を認識し、環境の変化に対抗して体内をほぼ一定の状態に保とうとする機構を持つことは、Walter B. Cannon によってホメオステシス (恒常性維持) の機構として指摘された¹⁾。大気中にある種のガスが増加することは、生体を取りまく外的環境の化学的条件が変化することであり、必要ならば生体は恒常性維持の機構を動員してこの刺激に対抗し生体内を正常な状態に保つ努力をする。外的環境の化学的条件の変化に対して生体は生理的反応と生化学的反応を行ない生体内を調整し環境変化に適応する努力を払う (図 1)。環境中の化学物質が量的に変動

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

する条件変化が感覚受容器によって認識されると、条件変化の情報は自律神経系内分泌系に伝達され体内器官の生理機能を変化させ生体内を調整する。このような生理的反応も本質的には生化学的変化として理解されるべきものである。また、化学物質は生体内に吸収され生体構成分子と何らかの化学反応を行うことによっても生体に認識される。化学物質を認識すると、生体は細胞内の物質代謝系を変化させ生体内をほぼ一定の状態に保つ恒常性の維持に努める。この生体反応は多くの場合酵素蛋白質の合成、新たな代謝系の誘導といった生化学的変化である。従って、環境中の化学物質が生体に影響を及ぼすのは、その物質が生体構成分子の原子に対して価電子の態様に応じた変化を与えるように反応するからである。

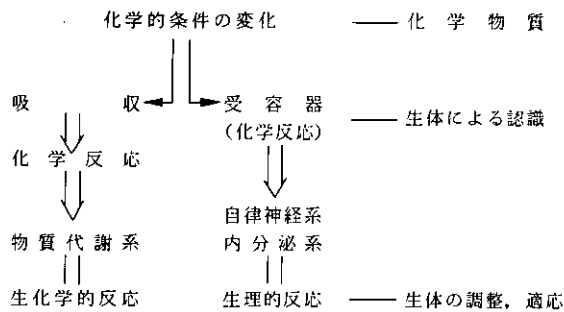



図 1 環境条件の変化と生体反応

代表的な大気汚染物質である二酸化窒素 (NO_2) が生体構成分子と反応する際の可能な化学形態について考えてみることにする。表1に示したように、 NO_2 は鼻腔から肺胞に至る呼吸器系の気相では NO_2 ガスの状態で存在する。 NO_2 と生体構成成分との反応についてはいまだ十分に解明されていないが、 NO_2 はフリーラジカルを持ち脂質の不飽和基と反応するとニトロソフリーラジカルを形成することが報告されている²⁾。Thomasらは *in vivo* の実験で NO_2 と肺リン脂質の不飽和脂肪酸が反応する可能性を示唆しており³⁾、Kamelらはコレステロール-レシチン膜に NO_2 が強い相互作用を持つことを報告している⁴⁾。従って、吸入された NO_2 が呼吸器を構成している細胞と接触すると、細胞の形質膜の構成成分であるコレステロールや不飽和脂肪酸と反応する可能性が考えられる。 NO_2 は水に難溶性なため肺深部にまで到達する。肺胞において NO_2 は毛細血管を通して血液の中に入るが、その際2)に示した反応で硝酸と亜硝酸とに形態を変えて血液中に溶解する⁵⁾。また、呼吸器内においても一部は水蒸気と反応し硝酸と亜硝酸になる可能性が考えられる。血液中の硝酸イオンと亜硝酸イオンは循環器系を通過する際に一部は血液中の細胞と臓器内にとりこまれ⁶⁾、大部分は硝酸イオンと尿素の形態で尿として排泄されることが明らかにされている⁷⁾。血液中の亜硝酸イオンは速かに赤血球内に取り込まれヘモグロビンをメト化し、その際自身は硝酸イオンに変換することが報告されている⁸⁾。従って、外的環境の NO_2 濃度が増加し生体が恒常性維持の機構を発揮

NO₂暴露による生体膜系の損傷とその修復

するに至るのは、呼吸器系では NO₂ と NO₂ が呼吸器内の水蒸気と反応して出来る硝酸、亜硝酸が原因であり、循環器系以後の生体内では硝酸イオンと亜硝酸イオンが主原因となると考えられる。

表 1 吸入された NO₂ の存在形態

存在形態	反応基
1) 気相 NO ₂	-HC=CH-CH ₂ -
2) 水相 2NO ₂ +H ₂ O→ HNO ₂ + HNO ₃	-NH ₂ , -SH,  -OH ?

吸入された NO₂ と生体との出会いは先ず生体を構成する細胞の膜で行われる。いうまでもなく生体の基本単位は細胞であり、生体内の組織は機能的に分化した細胞の集合体である。細胞は単独で生命活動を営む潜在性を持っているが、独立した存在となっているのは形質膜にとりかこまれ必要な物質を選択的に取り込み有害物質の侵入を抑えているからである。細胞内には生命の維持にとって重要な代謝機能を営む為の場としてミトコンドリアやマイクロソーム等の膜系を保持している。形質膜を含めこれら細胞内膜系を生体膜と総称している。生体膜の基本構造は全ての膜系で同一であり、リン脂質が二分子ずつ並んだ脂質二重層からなっている。この脂質二重層にほぼ等量の疎水性の部分を持つタンパク質粒子が散在して生体膜としての機能を発揮している。生体膜リン脂質の脂肪酸はフリーラジカルを形成しやすい不飽和基を持つ不飽和脂肪酸が約半数を占めており、NO₂ の主要な作用部位となる可能性が考えられる。

2. NO₂ と生体膜

1) 呼吸器への影響

呼吸によって吸入された NO₂ はまず気管粘膜と肺胞壁に作用する。7 ppm 以上の濃度では数日以内に種々の病理的变化が観察されている⁹⁾。15 ppm 前後の NO₂ をラットに暴露した場合、数日後に肺胞壁の I 型肺胞上皮細胞の変性と脱落、II 型肺胞上皮細胞の増殖と I 型上皮細胞との置換、肺気腫の成立などが観察されている^{10,11)}。一方、5~0.4 ppm の NO₂ 暴露では表 2 に要約したように数ヶ月以降になって、気管支上皮の線毛異常・分泌昂進・増殖、終末気管支から肺胞道にかけての壁肥厚・線維化・上皮増殖などが認められている¹²⁾。肺胞壁では I 型上皮細胞の壊死と II 型上皮細胞による置換がみられる。この現象は、NO₂ の作用によって肺胞上皮細胞が肥大化し或るものは変性脱落すると共に、II 型上皮細胞が増殖して修復する過程を繰り返しているものと解釈できる。この過程では抗酸化性防御系の酵素活性の増加が認められており、NO₂ により肺胞細胞が傷害を受ける一つ

の原因は過酸化物の生成である可能性が考えられる¹³⁾。

表 2 NO₂ (5 ppm 以下) の長期暴露による呼吸器の病理変化

動物種	濃度 (ppm)	暴露期間	病理所見	
イヌ	5.0	15~18ヶ月	異常なし	Wagner ら (1965)
リスザル	5.0	169日	肺胞浮腫	Fenter ら (1971)
ラット	4.0	9ヶ月	肺胞壁肥厚, 末梢気道の病変	竹中ら (1980)
	2.0	2年以上	基底膜肥厚	Stephens ら (1971)
	0.8~2.0	一生涯	上皮増殖, 線毛喪失	Freeman ら (1966)
	0.4	27ヶ月	肺胞壁肥厚, 末梢気道の変化	竹中ら (1980)
マウス	0.5	3ヶ月	肺胞細胞崩壊, 線毛喪失	Freeman ら (1968)
	0.5	3~4ヶ月	肺胞膨張, 末梢気道径の減少	Blair ら (1969)
	0.3~0.5	6ヶ月	気管支上皮の破壊	Chen ら (1972)

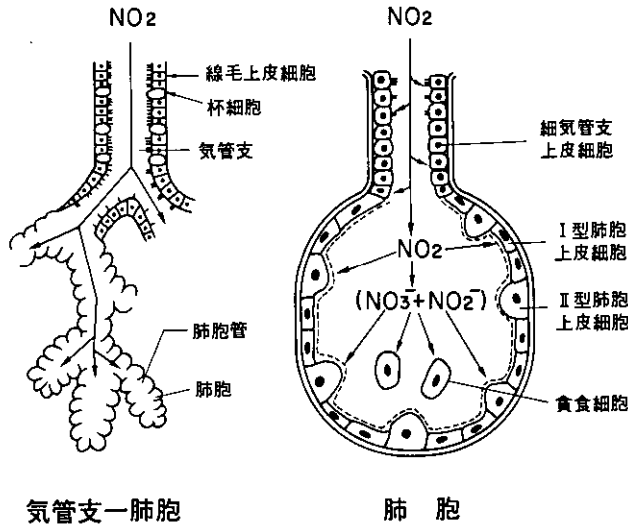


図 2 NO₂ と気管支, 肺の細胞 (中島泰知博士の原図を改変)

我々は肺における病理的变化の前段階を検出することを試み、4~0.4 ppm の NO₂ をラットに暴露し肺の生体膜成分が受ける影響について検討した。コハク酸-チトクロム c 還元酵素はミトコンドリア内膜に局在し、細胞内のエネルギー生産系の律速段階となっている。4 ppm NO₂ をラットに暴露すると、肺の本酵素活性は暴露当初増加した後減少し 2 週目には対照群の活性よりも有意に低い活性となる (図 3)¹⁴⁾。その後再び増加し 4 週目には対照群の活性よりも高い値となる。このような

NO₂ 暴露による生体膜系の損傷とその修復

増加→減少→増加のサイクルは肺のミクロソーム電子伝達系成分でも観察された。活性が最初に増加する時期に肺よりトリプシン消化によって細胞を分離し調べた結果では、4 ppm NO₂ 暴露によって肺胞から分離される細胞数が増加することと細胞数の増加以上に解糖系および呼吸系の酵素活性が増加していることが明らかになった¹⁵⁾。従って、4 ppm NO₂ 暴露に対して肺は病理的变化が観察される以前に、まず代謝系を昂進させるように対応していることになる。この際肺胞に存在する細胞数の増加が起っている可能性もある。次いで何らかの NO₂ の作用によってミトコンドリア及びミクロソームの電子伝達系成分は損傷を受ける。この損傷が肺の場合チトクロム P-450 に高い特異性を持つことは、NO₂ が NO₂ 又は亜硝酸イオンの形で作用する可能性を示唆しているのかもしれない。肺の生体膜系が受けた損傷はその後修復されていく。この肺の生体膜系が受ける損傷と修復は 1.2 ppm NO₂ 暴露によっても観察されたが、0.4 ppm NO₂ 暴露の場合 13 週目でも修復は起こらなかった。

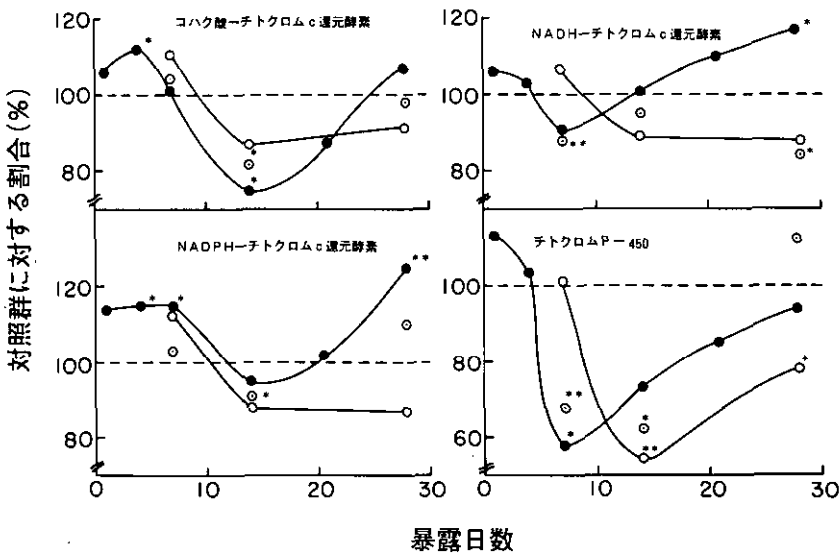


図 3 NO₂ 暴露による肺のミクロソーム、ミトコンドリア電子伝達系成分の変化
 ● : 4 ppm NO₂, ◐ : 1.2 ppm NO₂, ○ : 0.4 ppm NO₂.
 p* < 0.05, *p* < 0.01, ****p* < 0.001.

以上のように、呼吸器では病理的变化に先立って生体膜成分は NO₂ 暴露に対して複雑に対応していることが明らかとなった。呼吸器に対する NO₂ の傷害発生機構はいまだ不明であるが、同時に肺では 0.4~4.0 ppm NO₂ 暴露によって脂質過酸化物の増加と抗酸化性防御系酵素活性の上昇が認められている^{13,16)}。従って、NO₂ の肺細胞に対する作用は、形質膜に濃縮されている脂肪酸の不飽和基にラジカルを転移し脂質過酸化物を生成することが主要な作用である可能性が考えられる。肺

細胞の形質膜に脂質過酸化を起こり、過酸化脂質がすみやかに細胞内の抗酸化機構によって駆除されない場合には、膜流動性の低下、膜結合酵素活性の低下、ひいては膜構造の破壊が起こる。細胞が膜構造の破壊を修復しえない場合、その細胞は壊死し組織から脱落していく。NO₂によって気管および肺において認められた上皮細胞の変性と壊死の現象に亜硝酸イオン及び硝酸イオンが関与しているか否かについては不明である。

2) 赤血球への影響

肺胞にまで到達した NO₂ は、肺毛細血管に作用し、毛細血管の物質透過を増加させる可能性が示

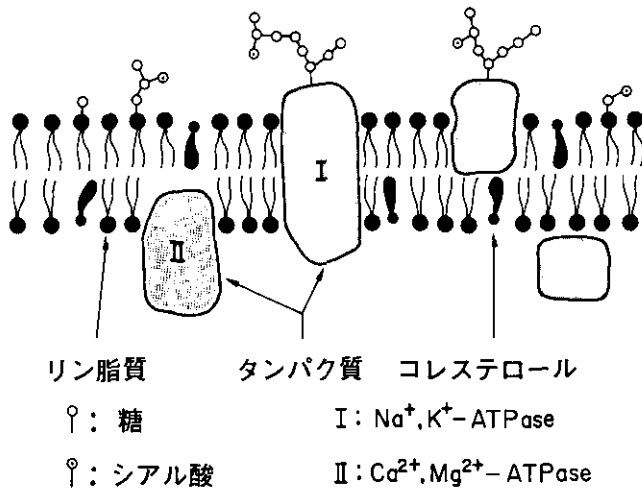


図 4 赤血球膜の模式図

表 3 4 ppm NO₂ 24 時間暴露による赤血球膜成分の変化

膜成分	対照群	暴露群	E/C
シアル酸 ¹⁾	12.4 ± 1.2	17.2 ± 2.3*	1.39
ヘキソース ¹⁾	55.1 ± 4.9	43.0 ± 3.3*	0.78
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase ²⁾	4.8 ± 0.1	6.1 ± 0.7*	1.27
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATPase ²⁾	5.7 ± 0.8	4.3 ± 0.7	0.75

* p < 0.05

1) μg/mg リン脂質

2) μモル/1時間/mg リン脂質

(平均値 ± 標準偏差)

峻されている¹⁷⁾。NO₂は毛細血管から血液中に硝酸イオン、亜硝酸イオンの形態をとって循環器系に入る。ラットにNO₂を暴露すると、血液中の硝酸イオン濃度が数時間後には数倍に増加する¹⁸⁾。硝酸イオンと同時に生成した亜硝酸イオンは赤血球内に速かに取り込まれ、ヘモグロビンをメトヘモグロビンにし、その際自身は硝酸イオンとなることが明らかにされている⁹⁾。従って、血液中の細胞はNO₂暴露下で亜硝酸イオンと高いレベルの硝酸イオンと絶えず接触していることになる。これらイオンと赤血球との接触は先ず赤血球の形質膜で起こる。そこで、ラットに4 ppm NO₂を暴露した場合に赤血球膜成分が受ける影響について検討した。

図4に赤血球膜の模式図を示した。リン脂質二重層を基本構造とし、細胞の外側に脂質およびタンパク質に結合した糖鎖が突出している。この糖鎖にはシアル酸も結合している。脂質二重層に浮かんでいる酵素蛋白質として、ナトリウムイオンを細胞外へ汲み出す役割をし脂質二重層に埋め込まれているNa⁺, K⁺-ATPase, カルシウムイオンを汲み出し細胞内のカルシウム濃度を調節しているCa²⁺, Mg²⁺-ATPaseがある。表3に4 ppm NO₂を24時間暴露したラットから赤血球を採集し赤血球膜成分が受ける影響を調べた結果を示した^{19)~21)}。赤血球膜のヘキソース含量とCa²⁺, Mg²⁺-ATPase活性は各々対照群の0.78, 0.75倍と減少していたが、シアル酸含量とNa⁺, K⁺-ATPase活性は各々1.39, 1.27倍と増加していた。図5に赤血球の分化の過程を図示した。赤血球は骨髄において幹細胞から分化し、血液中に浸出して来る際に細胞の核が脱落し網状赤血球となる。網状赤血球は血液中で成熟赤血球へと分化し、ラットの場合血液中に約70日間生存する間に老化し比重の増加、形態の変化、酵素活性の低下^{21,22)}、細胞内のカルシウムイオンとナトリウムイオン含量の増加が起こる。また、ラット赤血球では分化の過程で脂肪酸代謝能の著しい低下が起こることも報告されている²³⁾。赤血球膜表層に存在するシアル酸は血液中のシアリダーゼの作用を受け赤血球の老化につれて減少していくと考えられている²⁴⁾。成熟赤血球には細胞核がなくNa⁺, K⁺-ATPaseのような酵素蛋白質を生合成できない。従って、NO₂暴露によって赤血球のシアル酸含量とNa⁺, K⁺-ATPase活性が増加したことは、血液中に若い赤血球の割合が増加した結果である可能性が考えられる。この可能性を確かめるために、赤血球は老化に伴って比重が増加することを利用して若い赤血球と老化した赤血球とを分画した。図6に4 ppm NO₂暴露期間中における赤血球各画分の変化を示した。最も比重が小さく若い赤血球が集まっている画分IVの割合は、NO₂暴露1日目で増加しており、有意に高い割合が4日目まで続いた²¹⁾。その後、7日目には対照群のレベルにまで低下するが、その際比重の大きな画分IとIIの増加が起こった。この結果は、NO₂暴露によって1日目で血液中に若い赤血球の割合が増加し、7日目には比重が増加し老化していく可能性を示唆している。また、NO₂暴露16時間以内で比重の大きな赤血球の割合が増加することも観察されている²⁴⁾。

NO₂暴露1日目において観察されたNa⁺, K⁺-ATPase活性の増加の原因を明らかにするために、4 ppm NO₂を24時間暴露したラットの赤血球を比重により分画し、各画分の赤血球膜Na⁺, K⁺-ATPase活性を測定した(表4)²⁵⁾。NO₂暴露によって末分画の赤血球のNa⁺, K⁺-ATPase活

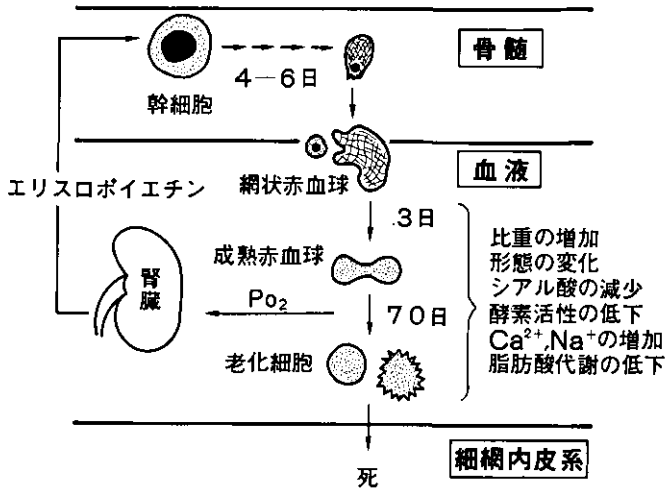


図 5 赤血球の分化

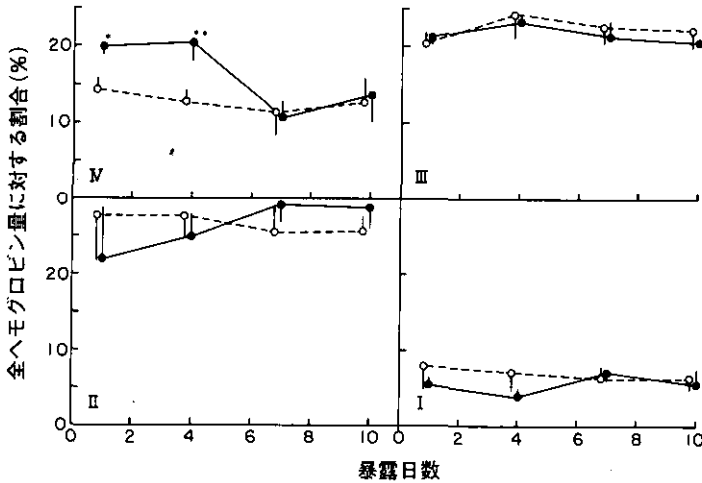


図 6 4 ppm NO₂ 暴露による赤血球画分の変化
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

性は 1.25 倍に増加したが、この際比重の最も大な画分 I 以外の全ての画分において暴露群の活性は対照群の 1.2 倍以上に増加していた。従って、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の増加は、最も高い活性を持つ画分 IV の赤血球の割合が増加したことで、高い活性を持ちながら比重が大きくなっている結果であることが明らかになった。同様の結果はシアル酸含量の増加についても得られた (表 5)。以上の

結果から、NO₂暴露によって赤血球は細胞内の酵素活性が高い状態で比重が大きくなり老化が促進されている可能性が考えられる。老化が促進された赤血球が血液中から速やかに除去されれば赤血球の新生が刺激されるという仮説をたてて現在研究中である。NO₂暴露によってラットの赤血球新生が促進されることは、0.5及び1.0 ppm NO₂を3, 6, 12か月間暴露した場合に血液中の網状赤血球が有意に増加していることから低濃度NO₂暴露で長期間にわたって起こっている現象と考えられる²⁶⁾。NO₂暴露によって赤血球の比重が増加する原因については不明である。

表 4 4 ppm NO₂を1日間暴露したラットの赤血球各画分のNa⁺, K⁺-ATPase 活性

	未分画 赤血球	赤 血 球 画 分			
		IV	III	II	I
対照群	5.7±0.9	6.0±0.8	5.2±1.0	5.1±0.2	4.8±0.6
暴露群	7.1±0.5	7.7±0.7	6.4±0.3	6.2±0.4	3.8±0.3
比率	1.25	1.28	1.24	1.22	0.79

Na⁺, K⁺-ATPase 活性は μモル/1時間/mg リン脂質で表わした。
(平均値±標準偏差)

表 5 4 ppm NO₂を1日間暴露したラットの赤血球画分のシアル酸含量

	未分画 赤血球	赤 血 球 画 分			
		IV	III	II	I
対照群	12.4±1.2	11.9±2.5	12.7±3.2	12.1±1.9	9.9±3.1
暴露群	17.2±2.3	17.4±3.4	18.3±3.5	13.7±1.7	11.5±2.9
比率	1.39	1.46	1.44	1.13	1.16

シアル酸含量は μg/mg リン脂質で表わした。
(平均値±標準偏差)

一方、NO₂暴露によって低下したCa²⁺, Mg²⁺-ATPase活性とヘキソース含量は、同様に赤血球を分画して調べた結果では、全ての画分の赤血球で低下していた。全ての赤血球が同程度の影響を受けることは、NO₂暴露によって血液中に増加した硝酸イオン、亜硝酸イオンの作用によって起こる可能性を考えさせる。そこでラットの頸静脈から硝酸イオンと亜硝酸イオンを注入して赤血球膜ATPase活性が受ける影響を調べた²⁷⁾。表6に、ラットに50, 100, 200 mMの硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムを0.4 ml ずつ1時間毎に5回注入し、5時間目に血液を採集して赤血球膜ATPase活性を測定した結果を示した。50, 100及び200 mMの硝酸ナトリウムの静注によって、5時間後には血液中硝酸イオン濃度が各々0.16, 0.30及び0.70 mMとなった。4 ppm NO₂を1日間暴露し

たラットの血液中硝酸イオン濃度は 0.1~0.2 mM となる。50 mM 硝酸ナトリウムの静注によって血液中硝酸イオン濃度は 0.16 mM となるが、この際赤血球膜の Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性は対照群の 68% と有意に低い値となった。また、100 mM, 200 mM と静注する硝酸ナトリウムの濃度を上げた場合も対照群より低い活性が観察されたが、静注濃度に依存して活性は低下せずその原因は不明である。同様に亜硝酸ナトリウムを静注した場合も 20~27% の活性低下が認められたが、対照群に対して有意な差はなかった。 Na^{+} , K^{+} -ATPase 活性は硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウムの静注によって増加することはなく、むしろ低下する傾向が認められた。従って、 NO_2 暴露によって Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性の低下は、 NO_2 が硝酸イオン或るいは亜硝酸イオンの形で作用した結果であると考えられる。両イオンのいずれが作用しているかについては不明であるが、硝酸イオン単独の作用としても充分説明ができる。 NO_2 暴露による Na^{+} , K^{+} -ATPase 活性の増加はこれらイオンの静注では起こらなかった。

表 6 赤血球膜 ATPase 活性に及ぼす硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム静注の効果

静注濃度 (mM)	Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase	Na^{+} , K^{+} -ATPase
硝酸ナトリウム	%	%
0	5.4 ± 1.0 (100)	5.6 ± 1.3 (100)
50	3.7 ± 0.3* (68)	5.4 ± 0.5 (97)
100	3.8 ± 0.1* (69)	5.1 ± 0.4 (91)
200	4.3 ± 0.9 (79)	4.8 ± 0.6 (87)
亜硝酸ナトリウム		
0	5.4 ± 0.5 (100)	5.9 ± 0.2 (100)
50	4.3 ± 0.7 (79)	4.7 ± 0.4 (80)
100	4.4 ± 1.1 (80)	4.9 ± 1.1 (83)
200	4.0 ± 1.2 (73)	5.9 ± 0.7 (101)

ATPase 活性は μ モル/1時間/mg リン脂質で表した。
(平均値 ± 標準偏差, n=4) * $p < 0.05$

NO_2 暴露による赤血球膜成分の変動が血液中に増加した硝酸イオン或るいは亜硝酸イオンの作用である可能性を更に確かめるために、ラットより採集した血液に 0.05~1.0 mM の硝酸ナトリウム又は亜硝酸ナトリウムを添加し 37°C で 1 時間インキュベーションした (表 7)²⁷⁾。硝酸ナトリウムの添加によって赤血球膜の Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性は添加濃度に依存して低下し 0.2 mM で対照値の 79% と有意に低い活性を示した。亜硝酸ナトリウムの添加によっても同様の効果が認められたが、その作用は硝酸ナトリウムよりも小さかった。 Na^{+} , K^{+} -ATPase 活性は両イオンにより増減が認められたが変動巾は微弱であった。同様に赤血球膜シアル酸含量はこれらイオンの添加によってほとんど変化しなかったが、ヘキソース含量は低下し 0.1 mM 亜硝酸ナトリウム添加によって対照

値の77%となった²⁷⁾。

表 7 赤血球膜成分に及ぼす硝酸ナトリウム及び亜硝酸ナトリウムの効果

濃度 (mM)	Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -ATPase	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	シアル酸	ヘキソース
硝酸ナトリウム	%	%	%	%
0	100	100	100	100
0.05	91	—	—	—
0.10	79	91	96	98
0.20	78	102	83	101
亜硝酸ナトリウム				
0.05	94	—	—	—
0.10	87	97	98	77
0.20	93	105	103	83

これらの結果から、NO₂暴露によって認められた赤血球膜のCa²⁺,Mg²⁺-ATPase活性とヘキソース含量の低下は、各々NO₂暴露によって血液中に増加する亜硝酸イオンと硝酸イオンの作用によることが支持された。最近我々はNO₂亜急性暴露実験を行い、赤血球のCa²⁺,Mg²⁺-ATPase活性の低下がNO₂暴露濃度0.4 ppmでも起こることを観察している²⁸⁾。

硝酸イオンや亜硝酸イオンが赤血球膜に作用する機作についてはほとんど解明されていない。NO₂暴露によって赤血球膜の脂肪酸組成が変化する原因を解明しようという試みの中で、硝酸イオンが0.1 mM程度存在すれば赤血球膜ホスファチジルセリンのアラキドン酸が増加することを見出した²⁹⁾。ラットより採集した赤血球を0.1~2.5 mM硝酸ナトリウムと37°Cで1時間インキュベーションすると、添加した硝酸ナトリウムの濃度に依存して赤血球膜ホスファチジルセリンのアラキドン酸量が増加した(図7)。この増加はカルシウムイオンの存在下で起こり、二価カチオンイオノホアであるA 23187の添加によっても起こることから、硝酸イオンは赤血球膜に作用しカルシウムイオンの赤血球内への流入を促進する作用を持っている可能性が示唆された。硝酸イオンは膜構造を乱すとされているカオトロピックイオンの一種である³⁰⁾。一連のカオトロピックイオンは硝酸イオンと同様に赤血球膜ホスファチジルセリンのアラキドン酸量を増加させるので、硝酸イオンは赤血球膜に対してカオトロピックに作用している可能性が考えられる(表8)。

3) 肝臓への影響

NO₂の生体影響に関しては、呼吸器と血液成分についての研究が中心となっており、その他の臓器への影響には余り関心が持たれて来なかった。NO₂暴露によって血液中に増加した硝酸イオンと亜硝酸イオンは門脈を通り肝臓に入る。肝臓では肝細胞の列の間を枝分れし灌流していく。4 ppm

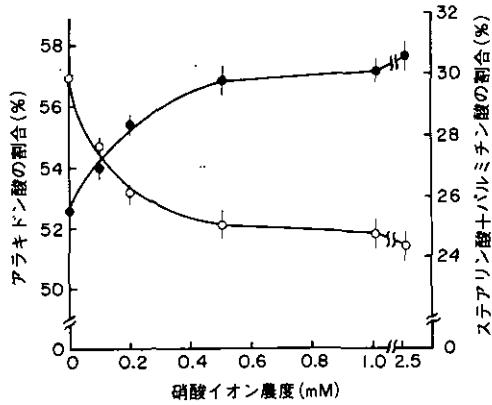


図 7 赤血球膜ホスファチジルセリンの脂肪酸組成に及ぼす硝酸ナトリウムの効果
●：アラキドン酸，○：ステアリン酸+パルミチン酸。

表 8 赤血球膜ホスファチジルセリン (PS) のアラキドン酸含量に及ぼす陰イオンの影響

添加イオン	PS の アラキドン酸含量 %	無添加に対する割合 %
無添加	52.4 ± 0.1	(100)
硫酸ナトリウム	52.8 ± 0.2	101
炭酸一水素ナトリウム	53.1 ± 0.3	101
酢酸ナトリウム	53.8 ± 0.2***	103
硝酸ナトリウム ¹	57.3 ± 0.4***	109
過塩素酸ナトリウム ¹	58.1 ± 0.4***	111
チオシアン酸ナトリウム ¹	59.2 ± 0.7***	113

(平均値 ± 標準偏差)

*** $P < 0.001$

¹ カオトロピックイオン

NO₂ をラットに暴露すると数日目から血清および肝上清中の不飽和脂肪酸組成に有意な変化が起こることを認めた³¹⁾。肝臓は生体内の脂質代謝に中心的な役割を担っており、脂肪酸の不飽和化はミクロソーム膜で行われている。従って、肝上清中の不飽和脂肪酸組成の変化は、NO₂ 暴露によって肝ミクロソーム機能が変化する可能性を考えさせる³⁵⁾。そこで、4 ppm NO₂ 暴露がラット肝ミクロソームの電子伝達系成分に及ぼす影響について検討した³⁶⁾。肝ミクロソームは二つの電子伝達系を持ち、脂肪酸の不飽和化、コレステロール生合成、異物の代謝等を行っている(図8)。4 ppm NO₂ を暴露すると4日目にミクロソーム電子伝達系成分の中でもチトクロム P450 含量は対照群の値に

比べ84%と有意に低い値を示した(表9)。またNADPH-チトクロムc還元酵素とNADH-チトクロムc還元酵素の活性も減少傾向を示した。図9に0.4~4.0 ppm NO₂をラットに1か月間暴露し、肝ミクロソーム成分が受ける影響を経時的に検討した結果を示した。肝ミクロソーム成分は暴露開始直後から低下し1週目で最低の値を示した後、2週目には対照群のレベルにまで回復した。その後更に低下していくことが明らかになった¹⁴⁾。この変動は肝ミクロソームの場合チトクロムP450とNADPH-チトクロムc還元酵素で大きく、0.4 ppm NO₂暴露でも有意な低下が認められた。また、このような増減のサイクルは少なくとも3ヶ月目までは続くことが確かめられた。従って、NO₂暴露によって肺のみならず肝臓の生体膜系も損傷→修復→損傷というサイクルを辿っていることが判明した。

次に、NO₂暴露によって起こるミクロソーム電子伝達系成分の低下の原因を明らかにすることを試みた。ラット肝臓よりミクロソームを分離し、硝酸ナトリウムまたは亜硝酸ナトリウムと37°Cで1時間インキュベーション後、ミクロソーム画分を遠心により回収して電子伝達系成分を測定した³²⁾。その結果、チトクロムP450含量およびNADPH-チトクロムc還元酵素とNADH-チトクロムc還元酵素活性は添加した硝酸ナトリウムの濃度に依存して低下し、0.1 mM硝酸ナトリウム添加でほぼ最低の値となった(図10)。亜硝酸ナトリウムの添加効果はチトクロムP450に対してはより低濃度で認められたが、その他の電子伝達系成分に対しては同濃度の硝酸ナトリウムよりも小さかった。表9に0.1 mM硝酸ナトリウムによって肝ミクロソーム成分が受ける影響を示した。チトクロムP450含量が最も低下し、次いでNADPH-チトクロムc還元酵素とNADH-チトクロムc還元酵素活性が減少した。チトクロムb₅含量とアリルサルファターゼ活性はほとんど変化しなかった。この結果は、変化するミクロソーム成分の種類と変化の度合いという点で、NO₂暴露による影響と0.1 mM硝酸ナトリウムの添加効果がよく一致していることを示している。従って、NO₂暴露によって血液中の硝酸イオン濃度が上昇し、このことが肝細胞内にも反映されればミクロソーム電子伝達系成分は硝酸イオンによって低下する可能性が考えられる。

この可能性を確かめるために、赤血球の場合と同様に硝酸ナトリウムまたは亜硝酸ナトリウムをラットに頸静脈から注入する実験を行った³³⁾。肝ミクロソーム電子伝達系成分は注入する硝酸ナトリウムの濃度に依存して低下し、特にチトクロムP450含量次いでNADPH-チトクロムc還元酵素活性の減少が認められた(表10)。一方、亜硝酸ナトリウムを静注した場合はチトクロムP450含量が特異的に顕著な低下を示した。これらの結果は、血液中の硝酸イオン濃度を上昇させればNO₂暴露の場合と同様な変化が肝ミクロソーム電子伝達系成分に起こることを示しており、NO₂は肝ミクロソームに対して硝酸イオンの形態で作用する可能性を支持している。硝酸イオンがミクロソーム膜に直接反応しているのか間接的に作用しているのかについては現在の所不明である。

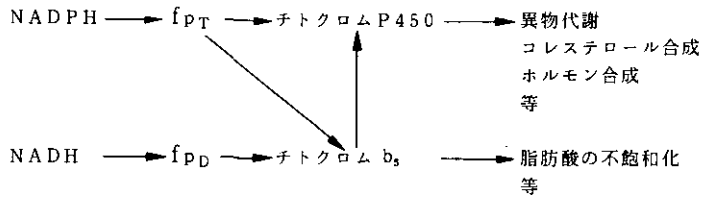


図 8 ミクロソームの電子伝達系

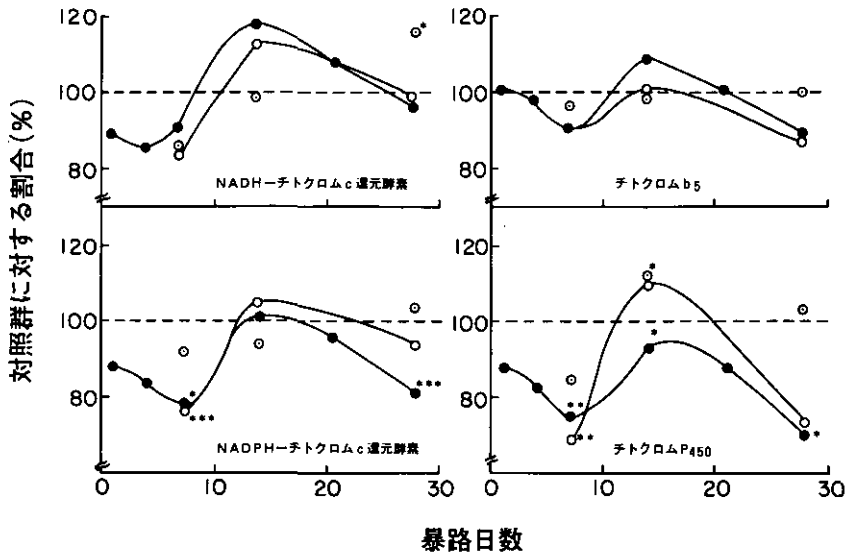


図 9 NO₂ 暴露による肝ミクロソーム電子伝達系成分の変化
 ● : 4 ppm NO₂, ◐ : 1.2 ppm NO₂, ○ : 0.4 ppm NO₂.
 p* < 0.05, *p* < 0.01, ****p* < 0.001.

表 9 肝ミクロソーム成分に及ぼすNO₂暴露と硝酸ナトリウム処理の効果

ミクロソーム成分	4 ppm NO ₂ (4日間)			0.1 mM NaNO ₃ (1時間)		
	対照群	暴露群	%	対照群	暴露群	%
NADPH-チトクロム c 還元酵素	19 ± 1	16 ± 2	85	684	568	83
チトクロム P-450	96 ± 5	81 ± 6*	84	298	212	71
NADH-チトクロム c 還元酵素	458 ± 29	407 ± 22	89	16488	13355	81
チトクロム b ₅	67 ± 4	65 ± 2	97	215	207	97
アリルサルファテース	10 ± 1	10 ± 1	95	388	347	98

* *p* < 0.05

3. NO₂の生体膜に及ぼす損傷と修復

図11にNO₂と生体膜との可能な反応を要約した。NO₂がNO₂ガスの状態で細胞の形質膜に作用した場合、脂質二重層の不飽和基にラジカルを転移し脂質過酸化が起こる。発生した過酸化物は形質膜の不飽和脂質やタンパク質と反応し、膜タンパク質の重合が起こることも報告されている³⁴⁾。このような状況の下では、膜流動性や膜の変形能も低下し、ひいては膜構造の破壊と細胞の破壊、死にまで至る可能性が考えられる³⁵⁾。NO₂暴露によって観察されたI型肺胞上皮細胞の壊死はNO₂のこのような作用によって起こっている可能性が考えられる。NO₂は血液中に亜硝酸イオンの形態で溶解するが、亜硝酸イオンはタンパク質を構成するアミノ酸と反応し生体膜のタンパク質を変性させている可能性も考えられる(表1)。また、ヘモグロビンやチトクロムP450のようなヘムタンパク質のヘムに高い親和性を持ちヘムと反応し変性させることが明らかにされている⁸⁾。NO₂暴露の影響が肺ではミクロソーム成分中チトクロムP450に著しい特異性を示したことは、NO₂が肺では亜硝酸イオンとして作用している可能性を示唆しているのかもしれない(図3)。NO₂のもう一つの産物である硝酸イオンはカオトロピックイオンの一種である³⁰⁾。血液中の亜硝酸イオンの多くも速やかに赤血球によって硝酸イオンに変換される。硝酸イオンはカオトロピックな作用によって膜構造を乱すが、直接的あるいは間接的に生体膜系に作用し膜タンパク質の解離や細胞内へのカルシウムイオンの流入促進をもたらしているのかもしれない。硝酸イオン及び亜硝酸イオンのこの

表 10 肝ミクロソーム成分に及ぼす硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム静注の効果

静注濃度 (mM)	NADH-チトクロムc 還元酵素	NADPH-チトクロムc 還元酵素	チトクロムP450	チトクロムb ₅
硝酸ナトリウム				
0	263±17 (100)	19.1±3.3 (100)	71±6 (100)	100±18 (100)
50	261±22 (99)	18.1±2.3 (95)	61±8 (86)	95±3 (95)
100	259±50 (98)	16.2±3.5 (85)	57±16 (80)	95±6 (95)
200	244±21 (93)	15.3±1.9 (80)	53±26 (75)	83±3 (83)
亜硝酸ナトリウム				
0	261±26 (100)	20.5±0.8 (100)	79±10 (100)	94±2 (100)
50	250±19 (96)	20.2±2.0 (99)	47±10** (59)	92±6 (98)
100	248±45 (95)	19.7±0.5 (96)	53±2* (67)	92±4 (98)
200	225±14 (86)	18.9±0.9 (92)	20±5*** (26)	89±4 (95)

(平均値±標準偏差, n=4)

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

ような作用によって肺及び肝臓のミクロソーム成分と赤血球膜 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性の低下が起こる可能性を考えている。赤血球の場合 NO_2 暴露によって比重の増加が起こる原因は不明であるが、肺胞において直接 NO_2 と反応することが可能である上血液中では硝酸イオン亜硝酸イオンと直接反応しており、この間に比重が増加し老化が促進される。このように NO_2 という単純な分子が生体内に吸入されると、生体膜系は多様な損傷を受けることが明らかになった。

低濃度の NO_2 の存在下で生体膜系は多様な損傷を受けるが、このような生体膜系の損傷が原因で疾病が発症することは通常起こりにくいと考えられる。図3及び図9の結果から明らかなように、肺および肝臓の生体膜成分は NO_2 暴露の影響で一担低下した後回復するという変動パターンを示した。従って、低濃度の NO_2 による損傷に対しては生体はかなりの程度まで修復することが可能であると考えられる。図12に NO_2 の作用に対する生体の可能な調整反応と適応反応とを図示した。 NO_2 暴露によるミトコンドリアやミクロソーム膜成分の変動は損傷と修復というサイクルを辿ることを示したが、この場合修復は膜成分の活性化というよりはむしろ膜タンパク質の生合成が促進されたことによる可能性が高い。また、硝酸イオンや亜硝酸イオンの腎臓での排出が促進され血液中のこれらイオンレベルが低下すれば細胞内膜系成分の損傷も起こらないであろう。 NO_2 暴露によって血液中の赤血球の比重が増加し見掛け上の老化が促進される可能性を示したが、生体はこれに対応し網状赤血球の産生を促進し血液中により活性が高く若いと考えられる赤血球の割合を増加させ調整している。肺胞細胞では抗酸化性代謝系酵素活性やエネルギー生産系酵素活性がこう進ずるが、この現象も NO_2 の酸化的作用に対抗し酵素タンパク質の生合成を促進しているものと考え

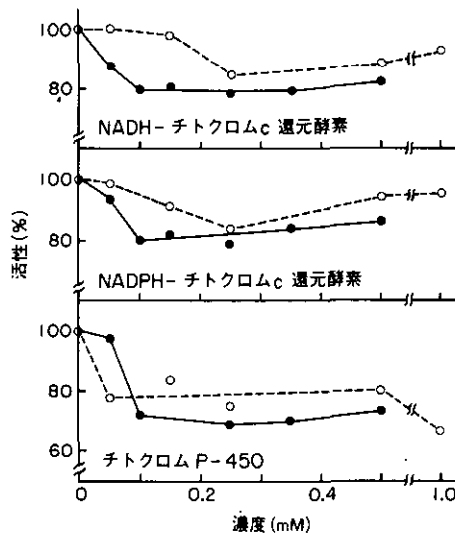


図 10 肝ミクロソーム成分に及ぼす硝酸ナトリウムと亜硝酸ナトリウムの効果
●：硝酸ナトリウム，○：亜硝酸ナトリウム

NO₂暴露による生体膜系の損傷とその修復

ることができる。このように代謝的に活発になった細胞は肥大化あるいは増殖を行っている。病理学的に観察されている肺胞細胞の過形成はNO₂暴露に対する生体の過剰調整と考えられている。

このようにNO₂の作用に対して生体は多様な対応をしているがこの多くは生体の調整作用あるいは代償作用として位置付けられる。NO₂の暴露が長期にわたる場合NO₂に対する生体の適応作用が発現される可能性も考えられる。これまでに述べたNO₂の作用に対する可能な適応について考えてみることにする。硝酸イオンあるいは亜硝酸イオンによって細胞内膜系成分が損傷を受けこれに対して細胞が適応しようとするれば、まず第一に細胞がこれらイオンの細胞内への流入を低下させるように形質膜のイオン透過機構を変化させることが考えられる。また、膜成分をこれらイオンに抵抗性を持つ成分に変えることも考えられる。このような適応作用はいずれも細胞内の遺伝子レベルの変化として理解されるべき問題であろう。NO₂による肺胞細胞群の変動は生体の適応作用とも考えられる内容を含んでいる。NO₂暴露が進行すると、NO₂に対して感受性が高いI型肺胞上皮細胞は壊死を起こし、NO₂に対して抵抗性を持つと考えられる立方形をした細胞で肺胞上皮は置き換えられていく。NO₂に対する細胞の抵抗性の一部は形質膜成分によって説明ができるのかもしれない。このようにNO₂という化学物質に対して生体は多様な調整、適応作用を発揮し生体内の恒常性維持に努めている可能性が考えられる。

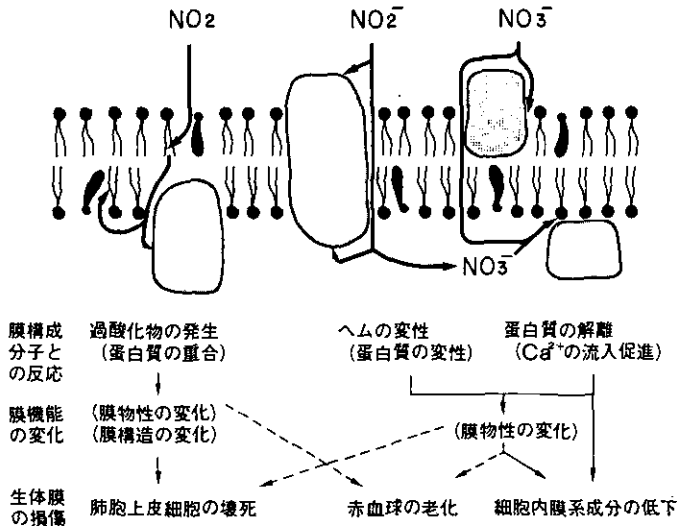


図 11 NO₂と生体膜

現実の環境汚染に通常認められるような低濃度のNO₂に対して多くの場合生体は健康を維持し正常な日常生活を過ごしているように見受けられる。それではNO₂に対する適応調整作用が抑制される要因が共存した場合、生体は恒常性を維持できるのであろうか。生体の調整、適応作用を抑制する生体側の要因を老令あるいは病態とし、外的因子を他の汚染物質とし、NO₂に対する恒常性維持の限界を明かにする研究が我々の今後の主要な課題であると考えている。

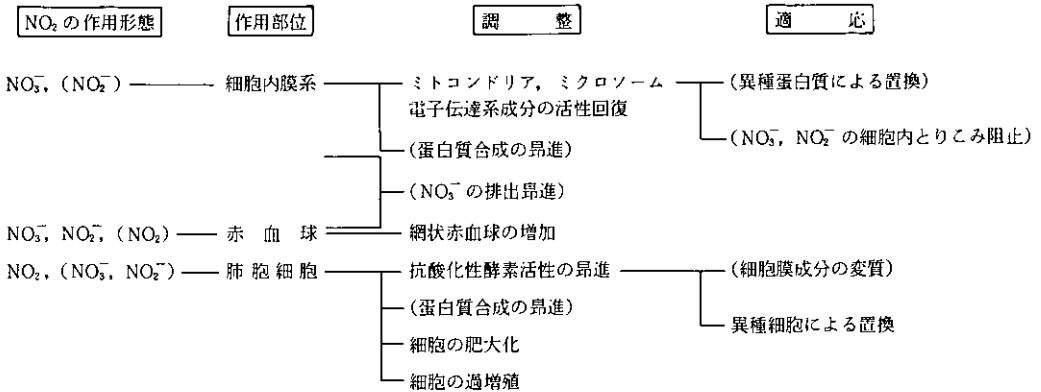


図 12 NO₂の作用に対する生体の調整と適応

引 用 文 献

- 1) キヤノン, W.B.著, 橋原一郎・大沢三千三共訳「人体の観知」創元社, 昭和34年.
- 2) Pryor, W. A. and J. Lightsey (1981): Mechanisms of nitrogen dioxide reactions: Initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous acid. *Science*, **214**, 436-437.
- 3) Thomas, H. V., P. K. Mueller and R. L. Lyman (1968): Lipo-peroxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
- 4) Kamel, A. M., N. D. Weiner and A. Felmeister (1970): Interaction of nitrogen dioxide with cholesterol-lecithin mixed monolayer. *Atmospheric Environ.*, **4**, 475-480.
- 5) Goldstein, E., N. F. Peek, N. J. Parks, H. H. Hines, E. P. Steffey and B. K. Tarkington (1977): Fate and distribution of inhaled nitrogen dioxide in rhesus monkeys. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **115**, 403-412.
- 6) 太田庸起子・山田 理・脇坂一郎(1980): 重窒素二氧化窒素の生体内動的観察, 産業衛生学会, 707-708.
- 7) 織田 肇・永沢節子・局 博一・鈴木 明(1981): 一酸化窒素および二氧化窒素の生体内挙動, 国立公害研究所研究報告第31号, 45-58.
- 8) Case, G. D., J. S. Dixon and J. C. Schooley (1978): Interactions of blood metalloproteins with nitrogen oxides and oxidant air pollutants. *Environ. Res.*, **20**, 43-65.
- 9) 和田 攻・奥田典夫訳「環境汚染物質の生体への影響」東京化学同人, 1979年, 第9巻, 208-212.
- 10) Evans, M. J., R. J. Stephens, L. J. Cabral and G. Freeman (1972): Cell renewal in the lungs of rats exposed to nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **24**, 180-188.
- 11) Freeman, G., S. C. Crane, R. J. Stephens and N. J. Furioli (1969): The subacute nitrogen dioxide-induced lesion of the rat lung. *Arch. Environ. Health*, **18**, 609-612.
- 12) 竹中参二・清水不二雄・山田靖子・堀内博人・今井 透・原田隆彦・京野洋子・河合清之(1980): 二氧化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——病理形態学的所見——国立公害研究所研究報告第15号, 171-227.
- 13) 嵯峨井 勝・市瀬孝道(1981): 二氧化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化. 国立公害研究所研究報告第31号, 95-108.
- 14) 高橋勇二・三浦 卓・持立克身・大住拓美・久保田恵太郎(1982): NO₂ 暴露のラット肺及び肝の生体膜成分に及ぼす影響. 第23回大気汚染学会.
- 15) 持立克身・高橋勇二・大住拓美・三浦 卓: 未発表
- 16) 市瀬孝道・嵯峨井 勝(1981): 二氧化窒素亜急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化. 国立公害研究所研究報告第31号, 81-93.

- 17) Sherwin, R. P. and V. Richters (1971): Lung capillary permeability. Nitrogen dioxide exposure and leakage of tritiated serum. *Arch. Intern. Med.*, **128**, 61-68.
- 18) 織田 肇・局 博一・鈴木 明・永沢節子(1981): 一酸化窒素および二酸化窒素の生体内挙動. 国立公害研究所研究報告第31号, 45-58.
- 19) 彼谷邦光・三浦 卓・国本 学・持立克身・久保田憲太郎(1981): NO₂ のラット赤血球膜に及ぼす影響. *日本衛生学雑誌*, **36**, 402.
- 20) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980): Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: Changes in components of red cell membranes during in vivo exposure. *Environ., Res.*, **23**, 397-409.
- 21) 国本 学・三浦 卓・彼谷邦光・持立克身・久保田憲太郎(1981): 二酸化窒素暴露によるラット赤血球膜の変化. *日本衛生学雑誌*, **36**, 403.
- 22) 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光・国本 学・久保田憲太郎(1982): 赤血球の解糖系に及ぼす二酸化窒素の影響. 第23回大気汚染学会.
- 23) 国本 学・彼谷邦光・三浦 卓(1981): 二酸化窒素暴露によるラット赤血球の変化. *日本薬学会第101年会講演要旨集*, 238.
- 24) Prankred, T. A. J. (1958): The aging of red cells. *J. Physiol.*, **143**, 325-331.
- 25) 三浦 卓・彼谷邦光・国本 学・持立克身・久保田憲太郎(1981): NO₂ 暴露による赤血球膜糖質の変動. *日本衛生学雑誌*, **36**, 404.
- 26) 福田雅夫ら(1980): NO₂ の長期暴露による網状赤血球数の変動. 第21回大気汚染学会講演要旨集, p. 463.
- 27) 国本 学・局 博一・辻井直樹・三浦 卓・彼谷邦光・持立克身・久保田憲太郎(1982): NO₂ 暴露のラット赤血球に及ぼす影響. *日本衛生学雑誌*, **37**, 289.
- 28) 述井直樹・国本 学・彼谷邦光・三浦 卓・久保田憲太郎(1982): NO₂ 暴露のラット赤血球膜 ATPase に及ぼす影響. 第23回大気汚染学会.
- 29) Kaya, K. and T. Miura (1982): Selective changes in fatty acid composition of phosphatidylserine in rat erythrocyte membrane induced by nitrate. *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 305-315.
- 30) Davis, K. A. and Y. Hatefi (1969): *Biochemistry*, **8**, 3355-3361.
- 31) Kaya K. and T. Miura (1982): Effects of nitrogen dioxide on fatty acid compositions of red cell membranes, sera, and livers in rats. *Environ. Res.*, **27**, 24-35.
- 32) 三浦 卓・彼谷邦光・持立克身(1981): ラット肝ミクロソームの電子伝達系に及ぼす二酸化窒素の影響. *生化学*, **53**, 616.
- 33) 持立克身・局 博一・国本 学・彼谷邦光・三浦 卓・久保田憲太郎(1982): 二酸化窒素のラット肝ミクロソーム成分に及ぼす影響. *日本衛生学雑誌*, **37**, 290.
- 34) Hogberg, J., A. Bergstrand and S. V. Jakobsson (1973): *Eur. J. Biochem.*, **37**, 51-59.
- 35) 三浦 卓・持立克身・彼谷邦光・久保田憲太郎(1980): O₃ または NO₂ 暴露のラット臓器に及ぼす影響. 第21回大気汚染学会.
- 36) Mochitate, K., K. Kaya and T. Miura (1983): In vivo effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung and liver of rats. *Environ. Res.*, in press.

III-4

大気汚染物質暴露による細胞の嫌氣的代謝こう進に関する考察

On Stimulation of Anaerobic Metabolism in Cells by Air
Pollutant Exposure

嵯峨井 勝¹

Masaru SAGAI¹

要 旨

オキシダント暴露された実験動物の細胞内グルコースの嫌氣的代謝こう進に関する文献的知見をまとめた。その内容は、1)グルコース代謝の概要、2)グルコース代謝に対するオキシダントの影響、3)二酸化窒素暴露による2,3-ジホスホグリセレートの変化、から成っている。

Abstract

A literature consideration on evidence of stimulation of anaerobic metabolism of glucose in cells of experimental animals exposed to oxidants was conducted in this review. The contents are consisted of 1) an outline of glucose metabolism, 2) effects of oxidant gases on glucose metabolism, 3) change of 2,3-diphosphoglycerate by nitrogen dioxide.

はじめに

オゾン (O₃) や二酸化窒素 (NO₂) のような大気汚染物質の生体影響に関する第一の標的臓器が肺であるということは異論の無いところである。

肺はこれまで単なるガス交換の場としてのみ評価されてきたが、近年になってむしろ積極的な代謝活動を営んでいることが物動実験などによって明らかにされてきた^{1,2)}。たとえば組織化学的研究から、肺細胞は TCA 回路^{3,4)}、解糖系⁵⁾ あるいは五炭糖回路^{4,6)}等に関与する酵素を比較的豊富に持っていることが示された。一方、肺組織自身は肝臓の70%に相当する酸素(全吸入酸素の約2~10%)を消費して生体成分の活発な酸化や合成反応を行っている⁷⁾。しかも肺における脂質の酸化や合成速度は肝臓のそれよりもはるかに早く^{8,9)}、かつ、この活発な脂質代謝は肺胞表面活性物質(Alveolar

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Serfactant) の合成に関与し^{6,8)}, さらにこれは炭水化物代謝とも密接な関係がある^{3,7)} こともよく知られている。

著者は先に、この脂質代謝を中心に肺胞表面活性物質への窒素酸化物の影響について現状をまとめた¹⁰⁾。

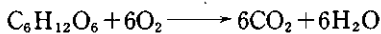
一方、我々は 0.04 ppm, 0.4 ppm 及び 4 ppm の低濃度 NO₂ の長期暴露により生体の過酸化脂質生成が著しく増加することを報告した。現在この過酸化脂質生成こう進の原因を検討中である。一般に O₃ や NO₂ のような大気汚染物質の吸入は生体 (Whole body) の酸素消費 (QO₂) を低下させる¹¹⁾ といわれていることから我々が現在見いだしている過酸化脂質生成のこう進は低酸素性動脈硬化症の場合と類似の現象ではないかという考え方を持っている。しかしながら現在まだ、大気汚染物質暴露によって組織や細胞レベルでの低酸素症を直接立証する知見は見あたらない。

今回は大気汚染物質吸入により細胞が嫌氣的代謝をこう進させるという事実を——糖代謝を中心に文献的考察を加えて、今後過酸化脂質生成のこう進をどのように説明すべきか、また今後どのような研究を進めるべきかを考える参考とした。

1. 糖代謝の概要

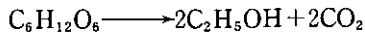
細胞は炭水化物、脂肪及びタンパク質などからエネルギーを取り出し、そのエネルギーを“高エネルギー化合物”である ATP にたくわえて様々な細胞の生命活動に利用している。

細胞が炭水化物からエネルギーを取り出し、ATP を合成する為の炭水化物分解システムには次の二つの様式がある。その一つは好気性細胞が行っている酸素呼吸による生体酸化、すなわち燃焼反応であり、これは分子状の酸素が関与している経路であり、ブドウ糖を例にとると、



のような反応が起こり、1 g 分子のブドウ糖が完全に酸化（燃焼）されると 674 Kcal の自由エネルギーが放出される。もう一つの方法は、嫌気性細胞や酸素欠乏状態の好気性細胞が行っている嫌気性呼吸で解糖現象といわれているものである。この場合は不完全分解であり、同じブドウ糖の場合でも、

アルコール醗酵では



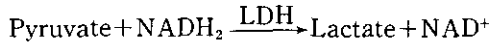
乳酸醗酵では



となり、放出される自由エネルギーはいずれも約 50 Kcal にすぎず、完全酸化の場合の約 7% にすぎない。残りのエネルギーは 2 分子のエタノールあるいは乳酸中に残存する。また、好気性細胞の酸素呼吸の場合は TCA 回路と電子伝達系によって完全酸化されると 38 分子の ATP を生ずるのに対し、嫌気性呼吸の場合にはブドウ糖 1 g 分子が Emden-Meyerhof (EM) 経路で解糖されてピルビ

ン酸になるときに4分子のATPが作られるが、途中2分子のATPが消費されるので最終的には2分子のATPが得られるにすぎない。したがって嫌氣的条件下でのエネルギー産生効率は極めて悪い。

このEM経路で解糖をうけるときの図1に示すように、Glyceraldehyde-3-phosphateの酸化に伴って還元型NAD(NADH)が生じるので、無酸素的な条件下ではNADHが増加するがこのようにピルビン酸やNADHが細胞内に蓄積するとこんどはLDHによって、



となり、細胞内のNADHおよびピルビン酸を減少させる。一方、NAD⁺はGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseの反応に必要とされる為に、嫌氣的の解糖現象は継続され、細胞内の一定の還元ポテンシャルを維持し、生体の恒常性を保つように再度NADHが生成される。このように細胞内では一定方向の円滑なサイクル反応が回転している。

ところが最近、O₃やNO₂のようなオキシダントの暴露が細胞内酸素消費に著しい影響を及ぼすと同時に上に述べたように細胞内の還元ポテンシャル維持に働くNADHやNADPH、さらには同じ作用を持つ還元型グルタチオン(GSH)等の生成にも著しい影響を及ぼすことが示唆されつつあり、糖代謝に対するオキシダントの影響に興味ある問題を提起している。

そこで、ここに述べた糖代謝に対するO₃及びNO₂暴露の影響について述べる。

2. 糖代謝に及ぼすオキシダントの影響

i) オゾンの影響

オゾン(O₃)の吸入は前記糖代謝にとってどのような影響を及ぼすのであろうか。

1959年Scheelら¹¹⁾はO₃吸入によってWhole bodyのO₂消費(QO₂)は著しく抑制されたと報告している。また生体にとって必要なO₂の供給が不十分になったとき細胞内では炭水化物の代謝に変化が起こることはMcDowell¹²⁾によって示され現在では広く知られている。このような事実から、もし「O₃吸入が結果的に細胞へのO₂供給を不十分にするとするならば、細胞内ではそのO₂不足を代償する為に嫌氣的代謝系のこう進が見られるのではないか」と考えられる。このような発想のもとにChowとTappel¹³⁾は1973年、ラットに0.8 ppmのO₃を1か月間連続暴露して肺の解糖系酵素と五炭糖回路の酵素活性を抗酸化剤であるビタミンEの効果と共に比較検討した。表1は肺の可溶成分の酵素活性に対するO₃暴露と食事性ビタミンEの効果を示している。

この表からわかるように五炭糖回路の律速酵素であるGlucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD)と6-Phosphogluconate dehydrogenase(6-PGD)活性はO₃の暴露によってビタミンE欠乏群及び供給群ともに有意に増加した。さらに、ピルビン酸からリンゴ酸への反応を触媒してTCA回路に入るステップのMalic enzymeもビタミンE欠乏群で有意に増加した。この3つの酵素は図1からわかるようにNADP⁺を補酵素としてNADPHを産生している。このように五炭糖回

表 1 肺の解糖系酵素活性に対するオゾン暴露と α -トコフェロールの影響¹³⁾.

Table 1 Effects of ozone exposure and dietary α -tocopherol on activities of lung soluble enzymes¹³⁾.

Enzyme	Dietary α -Tocopherol (mg/kg Diet)	Ozone-Exposed	Control	<i>p</i>
G-6-PD*	0	173±27††	121±10	<.001
	45	147±17	121±10	<.001
	<i>P</i> ‡	<.001	∴.1	
	\bar{X}	160±26	121±10	<.001
6-P-GD*	0	64±11	45±3	<.001
	45	51±6	42±6	<.01
	<i>P</i>	<.01	∴.1	
	\bar{X}	57±11	43±6	<.001
Malic enzyme*	0	31±3	25±1	<.05
	45	28±3	26±2	<.1
	<i>P</i>	<.05	>.1	
	\bar{X}	30±2	26±3	<.001
Malate dehydrogenase†	0	1820±210	1840±20	>.1
	45	1730±140	1790±20	>.1
	<i>P</i>	>.1	>0.1	
	\bar{X}	1770±170	1810±20	>.1
Phosphoactokinase†	0	84±6	78±6	<.01
	45	82±6	78±10	>.1
	<i>P</i>	>.1	>.1	
	\bar{X}	83±6	78±8	<.01
Aldolase†	0	60±9	55±8	>.1
	45	61±6	55±9	<.1
	<i>P</i>	>.1	>.1	
	\bar{X}	60±8	55±8	<.05
Pyruvate kinase†	0	448±88	376±16	<.001
	45	448±52	386±26	<.01
	<i>P</i>	>.1	>.1	
	\bar{X}	448±66	380±20	<.001
LDH†	0	1890±250	1530±260	<.001
	45	1750±280	1480±250	<.002
	<i>P</i>	<.1	>.1	
	\bar{X}	1820±270	1510±250	<.001

* Units of enzymic activity is expressed as nanomols *NADPH* formed per minute per milligram protein.

† Units of enzymic activity is expressed as nanomols *NADH* oxidized per minute per milligram protein.

†† Mean±standard deviation.

‡ Probability value of 0 vs 45 mg α -tocopherol per kilogram diet.

Mean±standard deviation of both dietary groups.

注 暴露オゾン濃度は 0.79 ± 0.14 ppm であった。

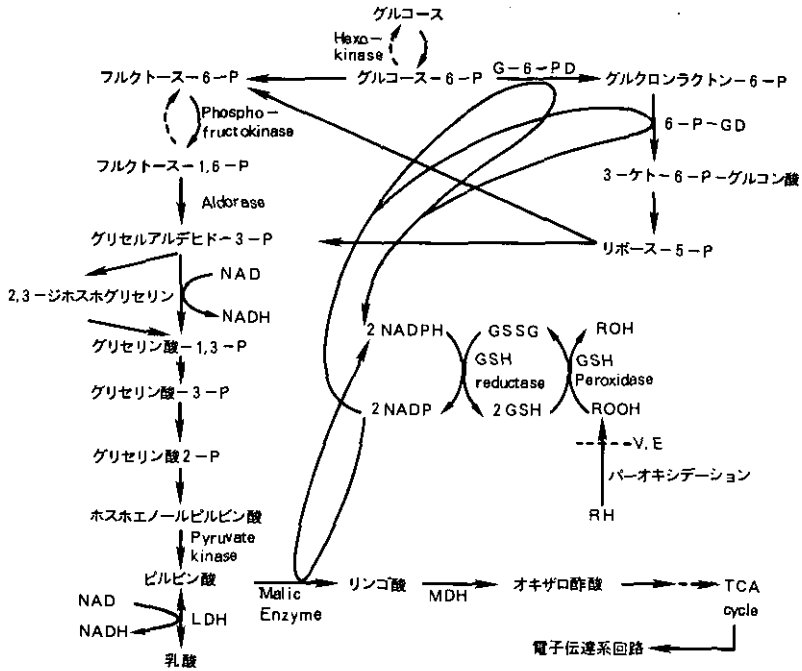


図 1 解糖系と GSH-peroxidase 系酵素による過酸化脂質の代謝
 Fig. 1 Glycolytic pathway and lipid peroxide metabolism by GSH-peroxidase system.
 RH, polyunsaturated fatty acid; ROOH, lipid peroxides; ROH, hydroxy fatty acid; GSH, reduced glutathione; GSSH, oxidized glutathione:

路と Malic enzyme によって生成された NADPH は細胞の還元ポテンシャルの維持に働くと同時に GSH reductase の補酵素として還元型グルタチオン (GSH) の必要濃度を保つ為に用いられる。さらに図 2 に示すごとく生体膜のリン脂質中の多価不飽和脂肪酸の過酸化反応によって生じる脂質過酸化物 (ROOH) による障害から細胞や組織を保護するのに役立っているものと思われる。

またこの O₃ 暴露は解糖系酵素である Phosphofructokinase, Pyruvate kinase 及び LDH をも共に上昇させ、特に Pyruvate kinase と LDH 活性を顕著に上昇させており嫌氣的代謝系のこう進を示している。一方、高エネルギー供給回路につながる TCA 回路の Malate dehydrogenase の活性にはほとんど変化が見られていない。

また先に述べた脂質過酸化との関連で、同じ Chow と Tappel による 0.7~0.8 ppm の O₃ に 7 日間暴露されたラットの肺での抗酸化性酵素活性と過酸化脂質 (TBA 反応物質) の増加に関する実験結果を表 2 に示した¹⁴⁾。

この結果もまた五炭糖回路の律速酵素である G6PD の増加とそれによって生じた NADPH を利

表 2 マロンアルデヒド形成、グルタチオン・パーオキシダーゼ、グルタチオン・レダクターゼ及び G-6-P 脱水素酵素活性に対するオゾン暴露と α -トコフェロール (V.E) の影響¹⁴⁾.

Table 2 Effects of O₃ exposure and dietary α -tocopherol on malonaldehyde formation and activities of GSH peroxidase, GSH reductase and G-6-P dehydrogenase¹⁴⁾.

Dietary α -tocopherol, mg/kg diet	TBA reactants, nmoles malonaldehyde/ g protein			GSH peroxidase, nmoles GSH oxidized/ min/mg protein			GSH reductase, nmoles NADPH oxidized/ min/mg protein			G-6-P dehydrogenase, nmoles NADPH formed/ min/mg protein		
	O ₃ Exposed	Control	<i>p</i>	O ₃ Exposed	Control	<i>p</i>	O ₃ Exposed	Control	<i>p</i>	O ₃ Exposed	Control	<i>p</i>
0	162±19 ^b	82±18	<0.001	50±4	30±0	<0.01	118±9	87±7	<0.05	236±7	154±11	<0.01
10	134±15	70±9	<0.001	39±5	26±3	<0.05	114±9	107±13	>0.1	216±29	158±7	<0.1
45	125±10	54±14	<0.001	39±4	24±5	<0.05	116±9	98±6	<0.1	210±17	156±9	<0.05
150	122±22	54±18	<0.001	37±1	24±3	<0.01	125±8	105±15	<0.1	209±17	159±9	<0.05
1500	106±11	40±0	<0.001	27±8	20±4	<0.1	118±4	107±15	>0.1	103±12	165±2	<0.1
\bar{X} ^c	113±25	63±19	<0.001	38±8	25±4	<0.001	118±8	101±11	<0.001	213±21	159±7	<0.01

^aGSH=Glutathione; G-6-P=glucose-6-phosphate.

^bMean±standard deviation.

^cMean±standard deviation for all dietary groups.

用して GSH を生成させる GSH-reductase 活性の増加とともに GSH を利用して過酸化脂質を代謝する GSH-peroxidase 活性の増加へとリンクして、O₃ 暴露によって生じた過酸化脂質の代謝を促進し、かつ生体の還元ポテンシャルを維持し恒常性を保つように働いていることを示唆している。またビタミン E はこのような O₃ 暴露の場合において抗酸化剤として働き過酸化脂質の生成を抑制する働きがあることが明瞭に示されている。さらにこのような抗酸化性酵素活性の増加は NO₂ 暴露の場合にも同じように起こることが知られている。

一方、このような五炭糖回路はむしろ好氣的な代謝経路であるがこの回路はまた図 1 に示したようにリボース-5-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸を経て嫌氣的な解糖系に進むものである。

また極めておもしろいことには、これまで述べてきた O₃ 暴露と直接の関係はないが、一般的に前述したようにビタミン E が欠乏した場合にも解糖系ではグリコーゲン量が減少し、乳酸やピルビン酸生成量が高まり、乳酸/ピルビン酸比が増加する¹⁵⁾(表 3)。このことは表 4 の TCA 回路系が E 欠乏によって部分的に障害を受けていることと合わせ考えれば、E 欠乏ではエネルギー獲得が正常動物に比べてやや嫌氣型になっていることを示す。五炭糖回路の G6PD 活性は E 欠乏で増加する^{16),17)}。これは細胞質において、NADPH の供給能力を高めると考えられるが、抗酸化剤であるビタミン E の欠乏が NADPH 供給を盛んにして GSH-peroxidase-reductase 系を活用することによ

り、生体過酸化に対する E 欠乏の部分的補償作用を行っている」と推定される。TCA 回路に関しては E 欠乏で部分的に障害を受けるが、isocitrate dehydrogenase や malate dehydrogenase が低下するという報告^{15,18,19)}と変化しないという報告^{16,20)}とがある。この両酵素は NO₂ 暴露によっては変化しない^{21,22)}。

その他、1975 年に Buckley ら²³⁾ はヒトに 0.5 ppm O₃ を 2 時間 45 分間暴露し、その赤血球中の

表 3 ビタミン E 欠乏動物の炭水化物代謝の変化
Table 3 Variation of sugar metabolism by vitamin E deficiency.

enzyme, substrate	animal	organ	index
Glycogen	rat	liver	(-)
Glycolysis	rabbit	muscle	(+) , (±)
Phosphoglucomutase	rabbit		(-)
	chick	muscle	(-)
Aldolase	rabbit	liver	(+)
		muscle	(-)
			(-) (FDP substrate)
			(+) (FIP substrate)
	rat	liver	(±)
			(±) (FDP substrate)
			(±) (FIP substrate)
		muscle	(+)
α-Glycerophosphate DH*	rat	muscle	(±)
Lactate dehydrogenase	rat	muscle	(-) , (±)
		liver	(±)
		testes	(-) (LDH 'X'-1, 'X'-2)
			(+) (LDH 2,3,4)
Lactate	rat	muscle	(+)
Pyruvate	rat	muscle	(+)
Lactate/pyruvate ratio	rat	muscle	(+)
β-Hydroxybutyrate DH	g.pig**	liver	(±)
	rat	muscle	(±)
Glucose 6-P DH	rat	liver	(+) , (±)
		kidney	(±)
		lung	(±)
		testes	(+)
		muscle	(+)
		adipose	(+)
Gluconate 6-P DH	rat	liver	(±)

*DH=dehydrogenase, **g.pig=guinea pig.

表 4 ビタミン E 欠乏動物のトリカルボン酸 (TCA) および有機酸代謝の変化
Table 4 Variation of TCA and organic acids metabolism by vitamin E deficiency.

enzyme, substrate	animal	organ	index
Isocitrate DH	rat	liver	(±) , (-)
	rabbit	muscle	(-)
Malate DH	rat	liver	(±)
		muscle	(-)
Citrate	rabbit	muscle	(+)
		liver	(+)
		kidney	(+)
	mouse	muscle	(+)
		liver	(+)
	kidney	(+)	
β -Hydroxyacetyl CoA DH	rat	liver	(+)
OAA* (from succinate)	rat	liver	(+)
Succinate DH	rat	fetus	(±)
Turn over of mitochondria	rat	liver	(-)

* OAA = Oxaloacetate

G6PD と LDH が有意に増加し、GSH 量は逆に減少していることを観察している。さらに表 5 と 6 に示すように 1975 年に Chow ら²⁴⁾ は 0.5 ppm の O₃ に 7 日間間歇暴露 (1 日に 8 時間) した猿とラットの肺と赤血球中の G6PD 活性を比較している。

この場合は、肺の上清画分中の G6PD 活性はラットで有意な上昇を示しているが猿では対照群との間に有意差を認めていない。これに対して、赤血球中の G6PD はラットの場合にも猿の場合と同様に対照群との間に差は見られない。この結果は猿とラットではラットのほうが O₃ 暴露の影響を受

表 5 猿とラットの肺におけるグルタチオン・パーオキシダーゼ系酵素活性とグルタチオン含量に対するオゾン暴露の影響²⁴⁾。

Table 5 Effect of ozone exposure on the activities of the glutathione peroxidase system, and level of GSH in the lungs of monkeys and rats²⁴⁾.

Species	Ozone	GSH peroxidase ^a	P ^b	GSH reductase ^a	P	G-6-P dehydrogenase ^a	P	GSH ^c	P
Monkey	Exposed	22±4	NS ^d	38±4	NS	23±4	NS	47±6	NS
	Control	20±3		35±5		20±3		42±4	
Rat	Exposed	84±4	<0.001	65±7	<0.01	78±6	<0.01	38±4	<0.001
	Control	70±5		53±7		62±9		31±2	

^a nmoles NADPH oxidized or formed/min/mg protein.

^b Student *t*-test.

^c nmoles/mg protein.

^d Non significant.

表 6 猿とラットの赤血球におけるグルタチオン・パーオキシダーゼ, G-6-P 脱水素酵素活性とグルタチオン含量に対するオゾン暴露の影響²⁴⁾.

Table 6 Effect of ozone exposure on the activities of GSH peroxidase and G-6-P dehydrogenase, and level of GSH in the erythrocytes of monkeys and rats²⁴⁾.

Species	Ozone	GSH peroxidase ^a	P ^b	G-6-P dehydrogenase ^a	P	GSH ^c	P
Monkey	Exposed	15±4	NS ^d	1.4±0.3	NS	7.3±0.8	NS
	Control	14±3		1.5±0.2		7.7±0.9	
Rat	Exposed	57±8	NS	7.8±0.9	NS	4.4±0.5	NS
	Control	53±11		7.5±0.7		4.8±0.6	

^a nmoles NADPH oxidized or formed/min/mg hemoglobin.

^b Student *t*-test.

^c nmoles/mg hemoglobin.

^d Not significant.

けやすく種 (Species) の違いによる感受性の相違を示しているものと思われる。また一般的に、感受性の違いに関してはこのような Species の違いばかりではなく系統 (Strain) の違いや性 (Sex) の違いについても NO₂ を含めてよく知られている^{25,26)}。

ii) 二酸化窒素の影響

次に、糖代謝への NO₂ 暴露の影響を見てみる。これに関しては Buckley と Balchum^{27,28)} のモルモットによる Aldolase, LDH 活性及び LDH のアイソザイムの変化に関する一連の報告を見ることが出来る。まず、表の 7 と 8 に 10 ppm の NO₂ に連続暴露した場合の各組織の Aldolase と LDH 活性の変化を示した²⁷⁾。

Aldolase 活性の変化は複雑であるが初期の 12 日目での肺における著しい増加が特徴的である。その後 19 日目及び 26 日目では肺と腎での活性は対照群より逆に減少するなど複雑な時間的経過をたどるが、また 32 日目では肺と肝では有意に増加し、腎と脾臓は有意な減少を示し、NO₂ 暴露による変化が一定の方向性を得たように見える。これに対して LDH 活性はすべての臓器において初期から顕著な増加を示している。なお、同じく NO₂ 暴露によって Aldolase や LDH 活性が増大するという結果はその後も Kosmider ら²⁹⁾ をはじめとする多くの研究者によっても報告され、さらに Hueter ら³⁰⁾ により、好気性反応の抑制と嫌気性反応の促進を支持する総説も出されている。一方、これまで見てきた肺をはじめとする各種臓器中の LDH 活性の増加の機序についても Sherwin ら³¹⁾ Evans ら^{32,33)}、あるいは Margolick ら³⁴⁾ によって肺の組織化学的あるいは生化学的からの結果が多数報告されている。たとえば、Sherwin ら³¹⁾ はモルモットに 2 ppm NO₂ を暴露して 1, 2 及び 3 週間にわたって LDH 陽性の II 型肺胞上皮細胞の変化を調べ、この II 型細胞数は経時的に増加し I 型肺胞上皮細胞が減少していることを報告している。さらに、Evans ら³²⁾ はこのような肺胞上皮の I 型細胞が NO₂ 暴露により損傷を受けて減少するのに対して、II 型細胞が I 型細胞の減少を補償する為に増殖するのであろうと述べている。

表 7 10 ppm NO₂ 暴露モルモットの各臓器におけるアルドラーゼ活性の変化²⁷⁾.
 Table 7 Aldolase enzyme activity levels in four tissues of guinea pig exposed to 10 ppm nitrogen dioxide²⁷⁾.

Days of Exposure	Tissue	Aldolase Activity (units/hr/mg Nitrogen)				
		Control	SE	Exposed	SE	P value†
12	Lung	380	±21.8	700	±33.4	≤0.001†
	Liver	220	±45.7	275	±51	>0.05
	Kidney	390	±52.4	475	±30.9	>0.05
	Spleen	235	±9.6	220	±7.4	
19	Lung	320	±46	308	±38	>0.05
	Liver	175	±24.6	180	±28.8	>0.05
	Kidney	490	±33.7	425	±25.1	>0.05
	Spleen	265	±13.4	235	±11.4	>0.05
26	Lung	325	±10.9	283	±10.5	≤0.005†
	Liver	175	±10.7	210	±16.2	>0.05
	Kidney	500	±24.4	400	±20	≤0.01†
	Spleen	395	±36.6	260	±37.9	≤0.025†
32	Lung	375	±26.6	640	±33.4	≤0.001†
	Liver	205	±11.8	270	±25.6	≤0.05†
	Kidney	530	±22.4	310	±21.3	≤0.001†
	Spleen	420	±40.4	283	±30.6	≤0.025†

* Change in optical density (OD) equals 0.001/hr/mg dry weight tissue homogenate¹²⁾.

† $p \leq 0.05$.

このような、肺における LDH 活性の増加は単なる酵素の構造的変化や誘導による増加ではなく LDH 陽性の肺胞 II 型細胞そのものの増殖によるものであることが示され組織の細胞レベルでの明確な Adaptation であることが示唆された。また、Buckley ら³⁵⁾ は NO₂ 暴露による肺可溶性画分の LDH isozyme パターンの変化について検討を行い、移動度の小さい嫌氣的酵素バンドの活性が増加することを見いだし嫌氣的代謝系のこう進を示唆した。

一方、1967 年に Davidson ら³⁶⁾ は図 3 に示すように、8~12 ppm の NO₂ に 3~4 か月間暴露したウサギの動脈血中の酸素分圧 (Pao₂) が有意に低下し、炭酸ガス分圧 (Paco₂) はわずかな増加を示したことを報告している。このような NO₂ 暴露による Pao₂ の低下現象はより長期の低濃度の NO₂ 暴露についても見いだされている。鈴木ら³⁷⁾ は図 4 に示すようにラットを 0.04 ppm, 0.4 ppm 及び 4 ppm の NO₂ に連続 9 か月間暴露し動脈血中の Pao₂ が 0.4 ppm と 4 ppm 群で有意に低下し弱いな

表 8 10 ppm NO₂ 曝露モルモットの各臓器における LDH活性の変化²⁷⁾.

Table 8 LDH enzyme activity levels in three tissues of guinea pig exposed to 10 ppm nitrogen dioxide²⁷⁾.

Days of Exposure	Tissue	LDH Enzyme Activity Levels (LDH units/mg N/min)				
		Control	SE	Exposed	SE	P values†
12	Lung	8,530	±298	12,100	±177	≤0.001†
	Liver	7,200	±112	9,200	±298	≤0.001†
	Kidney	11,400	±130	11,800	±184	>0.05
26	Lung	8,050	±36	8,300	±88	≤0.025†
	Liver	7,200	±112	7,900	±165	≤0.005†
	Kidney	9,400	±129	10,900	±430	≤0.01†
45	Lung	8,250	±204	9,850	±345	≤0.005†
	Liver	7,620	±185	8,050	±420	>0.05
	Kidney	9,400	±277	11,550	±380	≤0.001†

* Change of OD equals 0.001/min/mg tissue nitrogen .

†p≤0.05.

がらも低酸素血症になっていることを見いだした。さらに彼等は 0.04 ppm, 0.12 ppm 及び 0.4 ppm NO₂を 9 か月と 18 か月間連続曝露した実験においても 0.4 ppm 群でのみ有意差があったことを確認し、低酸素血症は 0.4 ppm 以上の NO₂曝露によって起こることを報告している³⁸⁾。

そこで、このような低酸素血症が起こる原因について考えてみると、第 1 には whole body への酸素そのものの取り込みの低下による可能性であり、第 2 には NO₂曝露によって各組織の酸素消費が増大したことによる血中酸素分圧の低下の可能性が考えられる。第 1 の可能性については、鈴木ら³⁸⁾ がラットを用いて 0.04 ppm, 0.12 ppm 及び 0.4 ppm NO₂に 3, 6 及び 9 か月間曝露した実験により whole body の酸素消費が 0.4 ppm 群で 3, 6, 9 か月曝露のすべての時期に 10%強の低下が起こっていることを認めている。しかし、この場合 0.04 ppm 群と 0.12 ppm 群では酸素消費は 3 か月目で逆に有意に増加し、6 か月 9 か月と曝露期間の延長につれて対照レベルに近づいていた。このことから whole body の酸素消費は NO₂の曝露濃度と曝露期間によって複雑に変化するものであることが明らかになった。第 2 の可能性については Buckley と Balchum²⁷⁾ が 10 ppm NO₂に 45 日まで曝露されたラットの各臓器の酸素消費 (QO₂) に関する報告を見る事が出来る (表 9)。表からわかるように、基質としてグルコースを添加した 19 日目では肝、腎、脾臓とも対照群に比べて酸素消費の変化は見られないが、26 日目以降では肺と腎で有意な増加を示し、肝と脾臓でも 32 日目では肝と脾臓でもやはり有意な増加が認められている。このように NO₂曝露の経過につれ肺はもちろん肝、腎、脾臓などの多くの臓器において in vitro 系での酸素消費が増加している。このような結果はウ

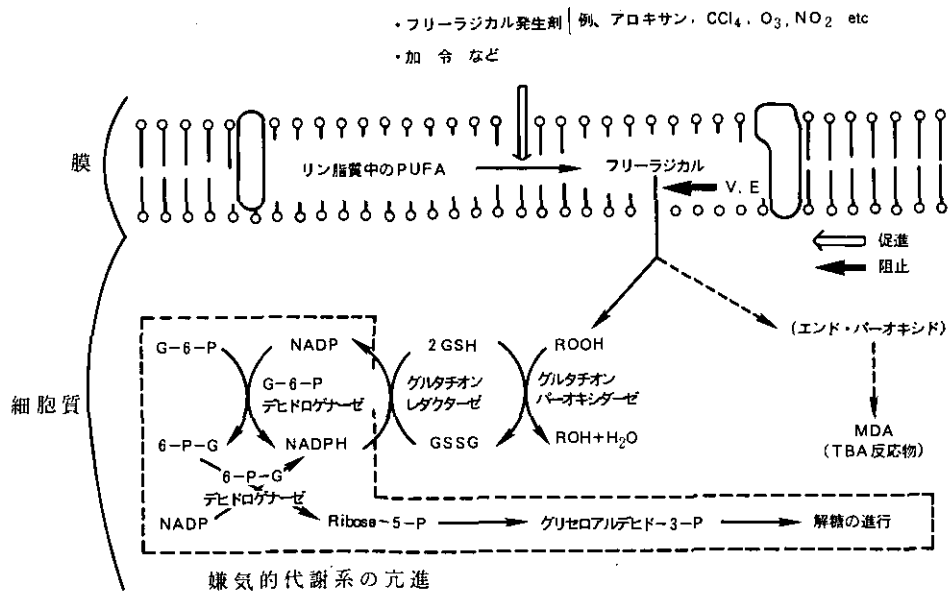


図 2 In vivo での過酸化脂質生成とビタミン E の作用部位

Fig. 2 In vivo lipid peroxide formation and metabolism, and action site of vitamin E.

PUFA, polyunsaturated fatty acid; V.E, vitamin E;
 MDA, malondialdehyde; TBA, thiobarbituric acid:

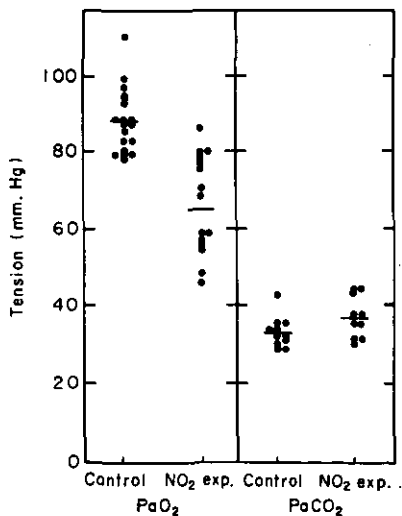


図 3 対照ウサギと 8~12 ppm NO_2 暴露ウサギの動脈血中酸素分圧 (PaO_2) と炭酸ガス分圧 (Paco_2)³⁶⁾.

Fig. 3 Arterial blood oxygen and carbon dioxide tensions in control animals and in rabbits exposed to 8-12 ppm nitrogen dioxide³⁶⁾.

表 9 10 ppm NO₂ 連続暴露モルモットの各臓器における in vitro 系酸素消費 (QO₂)²⁷⁾.
 Table 9 QO₂ values in four tissues of guinea pig exposed to 10 ppm nitrogen dioxide²⁷⁾.

Days of Exposure	Tissue	With Substrate (10 μ m Glucose)					Without Substrate (10 μ m Glucose)				
		Control	SE*	Exposed	SE	P values†	Control	SE	Exposed	SE	P values†
12	Lung
	Liver	1,129	±59	1,412	±110	≤0.05†	1,756	±358	1,387	±50	>0.05
	Kidney	536	±17	1,249	±40	≤0.001†	567	±11	1,198	±45	≤0.001†
	Spleen
19	Lung
	Liver	1,576	±26	1,641	±188	>0.05	1,739	±148	1,493	±61	>0.05
	Kidney	545	±34	638	±8.3	>0.05	581	±8.9	831	±31	≤0.001†
	Spleen	776	±18	782	±17	>0.05	807	±16	797	±21	>0.05
26	Lung	639	±19	935	±41	≤0.001†	732	±19	966	±61	≤0.005†
	Liver	1,690	±37	1,590	±85	>0.05	1,744	±19	1,420	±64	≤0.001†
	Kidney	817	±40	981	±10	≤0.005†	831	±12	860	±63	>0.05
	Spleen
32	Lung	494	±35	961	±71	≤0.001†	433	±27	734	±35	≤0.001†
	Liver	1,360	±48	1,951	±52	≤0.001†	1,465	±12	2,200	±26	≤0.001†
	Kidney	480	±6	769	±39	≤0.001†	508	±37	884	±38	≤0.001†
	Spleen	787	±22	1,027	±34	≤0.001†	769	±32	981	±30	≤0.001†
45	Lung	706	±33	1,439	±45	≤0.001†	785	±26	1,371	±32	≤0.001†
	Liver	1,839	±66	2,113	±30	≤0.005†	2,044	±31	2,055	±103	>0.05
	Kidney	677	±20	1,024	±23	≤0.001†	952	±35	908	±37	>0.05
	Spleen	879	±21	767	±42	≤0.05†	800	±22	870	±35	>0.05

Units, (μ l/g dry weight/hr)

* SE indicates standard error of the mean.

†p≤0.05.

注 酸素消費量 (QO₂) の測定はモルモットを表中の各暴露期間後に屠殺し、臓器を切除し、凍結粉碎してからホモジネートを作り、その 10,00×g, 30 分の遠心上清を用いて、Umbreit ら²⁷⁾の方法によってレスピロメーターで行った。

サギの肺胞マクロファージについても Acton と Myrvick³⁹⁾ によって報告されている。しかしながら、現在まだ低濃度長期暴露の whole body での酸素消費のデータと対比させるべき臓器レベルの酸素消費に関する報告がないので、0.4 ppm NO₂ の 9 か月暴露による低酸素血症の原因が臓器レベルでの酸素消費の増加によるものかどうかはわからない。しかし、鈴木⁴⁰⁾ は前記低濃度 NO₂ 暴露

ラットの肝、腎、脾の酸素分圧は明らかに低下していることを認めている。

一方、このようなオキシダント暴露とは別に、肝臓のような著しく好氣的な組織の細胞を比較的嫌氣的な条件である単層培養を行った場合、NADPH-Cyt c reductase や Cytochrome oxidase などの電子伝達系酵素活性は培養の経過とともに急激に低下し、培養5日目には両酵素活性ともに培養前の約1/5になり、逆に Hexokinase, Phosphofructokinase, Pyruvate kinase, Aldolase あるいは LDH などの解糖系の主要な酵素活性は培養経過とともに増加し、培養5日目には培養前の数倍にもなることが知られている⁴¹⁾。これは初代肝細胞が嫌氣的条件下の低エネルギー供給のもとで生存する為の一種の Anaerobic adaptation と考えられている。この単層培養による呼吸系酵素活性の低下は、コラーゲン膜浮上法により培養細胞面の酸素分圧 (P_{O_2}) を上げてやるとある程度回復する⁴¹⁾ ことも知られている。

その他に糖代謝に関して Simmons 一派によるヒト赤血球に対する *in vitro* での NO_2 暴露によるグルコース代謝と細胞内の Redox ratio ($NAD^+/NADH$) に関する一連の研究があり、 NO_2 暴露は細胞内の redox ratio を増大させるという結果を報告し^{42,43)}、このことからさらに NO_2 暴露が NADH-依存性酵素の活性に変化をひき起こす可能性も示唆している。

一方、これまで述べて来た動脈血中の酸素分圧の低下や組織細胞での解糖系酵素活性のこう進によってみられた嫌氣性代謝こう進とともに低酸素状態におかれた細胞に対して酸素の運搬役であるヘモグロビン (Hb) はどのような変化を示しているのかを解糖系の一環である Rapoport-Lueberg 回路の 2, 3-diphosphoglycerate (2, 3-DPG) の変化の面から調べてみよう。

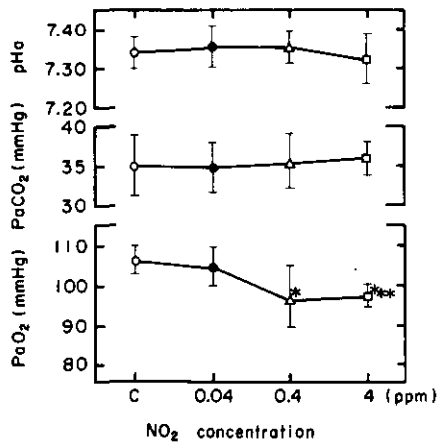


図 4 低濃 NO_2 9 か月暴露のラット動脈血 pHa, $Paco_2$, Pao_2 に及ぼす影響(無麻酔時)³⁷⁾。

Fig. 4 Effect of NO_2 exposure on arterial blood pHa, $Paco_2$ and Pao_2 in unanesthetized rats³⁷⁾.
($m \pm SD$; $n=6$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; C, control:)

3. NO₂暴露による 2, 3-Diphosphoglycerate の変化

i) 2, 3-Diphosphoglycerate の生理的意義

2, 3-Diphosphoglycerate (2, 3-DPG) は図 1 に示されたように D-glycerate-1, 3-diphosphate から diphosphoglyceromutase によって触媒され、不可逆的に合成され天然に広く存在する。特に哺乳動物の赤血球中には高濃度に存在し、その濃度は約 6 mM で、含量は赤血球中の全リン酸量の 64% を占めているといわれている。その他はアデノシンヌクレオチドが 26%、無機リンその他が 10% 程度である^{44,45)}。

それでは赤血球中にこのような多量に存在している 2, 3-DPG はどのような生理的役割を果たしているのだろうか。このことは 1967 年に Benesch ら^{46,47)} と Chanutin ら⁴⁸⁾ によって「2, 3-DPG は赤血球中でヘモグロビン (Hb) の酸素 (O₂) に対する親和性を調節する働きをしている」ということが証明され一躍注目をあびた。すなわち、2, 3-DPG は Hb と直接結合して Hb のコンホメーションを変え、赤血球の酸素解離特性を変化させることが明らかにされたわけである。図 5 に赤血球の酸素解離曲線に及ぼす赤血球中の 2, 3-DPG レベルの影響に関するデータを示した⁴⁹⁾。2, 3-DPG は Hb との直接結合によりそのコンホメーションを変化させ、Hb から O₂ 解離を高め、末梢組織への O₂ の供給を高める働きをする。このことは Hypoxia (低酸素症) において、2, 3-DPG 含量が増加し、Hyperoxia (高酸素症) において低下する (図 6) という Lenfant ら⁵⁰⁾、Valeri ら⁵¹⁾、Oski ら⁵²⁾ 及び Weissberg ら⁵³⁾ の報告によっても裏付けられた。

図 6⁵⁴⁾ に示すように 20% 酸素の正常空気にさらされた時の 2, 3-DPG 量が約 8 μmoles/ml・RBC であるのに対して O₂% が増加すると 2, 3-DPG 量は低下し、逆に 10% の低酸素空気にさらされると約 10 μmoles/ml・RBC へと増加した。

なおヒト赤血球中 2, 3-DPG に関しては濱崎⁵⁵⁾ による秀れた総説があるので参照されたい。

ii) NO₂暴露による 2, 3-DPG の変化

1973 年、Mersch ら⁵⁶⁾ はモルモットに 0.36 ppm の NO₂ を 1 週間連続暴露することによって 2, 3-DPG の有意な変化を見いだした。表 10 は同じ実験を 4 回行った結果を示しており、いずれの場合においても、NO₂ 暴露群の 2, 3-DPG 量は対照群の値よりも高値を示している。この結果は低酸素症 (Hypoxia) の場合と同様の現象であり、先に述べた Davidson ら³⁶⁾、鈴木ら^{37,38)} の Pao₂ 低下の結果ともよく対応するものである。すなわち「NO₂ 暴露による 2, 3-DPG の増加」は Hb との直接結合によりそのコンホメーションを変化させて Hb からの O₂ 解離を高め、末梢組織への O₂ 供給を高めている可能性が考えられる。いいかえるならば、この結果もやはり「NO₂ 暴露は赤血球や各種の組織を酸素欠乏性の状態に傾ける」と言うことを裏付けており Chow と Tappel¹³⁾ の O₃ 暴露による肺の嫌氣的解糖系酵素活性の増大、Buckley ら^{27,28)} NO₂ 暴露による肺その他の臓器での Aldolase や LDH 活性の増加や肺の LDH アイソザイムの嫌氣性画分の増加及び好氣性画分の減少など組織細胞内での嫌氣的代謝こう進を示す報告と合わせて考えると極めて興味ある結果であるといえよ

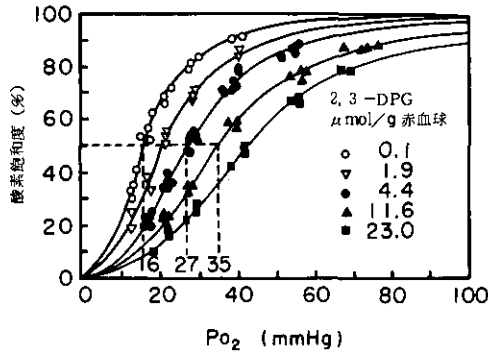


図 5 赤血球の酸素解離曲線に及ぼす赤血球中 2,3-DPG レベルの変化⁴⁹⁾。
 Fig. 5 Effect of 2, 3-diphosphoglycerate (2, 3-DPG) against oxygen-release curves of red blood cells⁴⁹⁾.

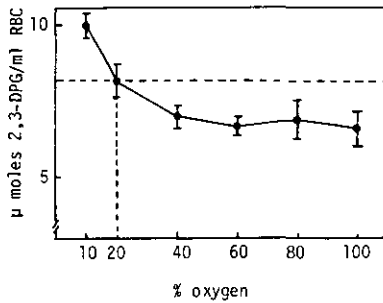


図 6 吸入空気中の酸素含有率の違いによる赤血球中 2,3-DPG レベルの変化⁵⁴⁾。
 Fig. 6 Effect of varying concentrations of oxygen on red blood cell 2,3-diphosphoglycerate (2, 3-DPG) in 4 week-old rats⁵⁴⁾.
 Exposures were carried out for 30 hr. A dose-response relationship between percent oxygen and 2, 3-DPG was demonstrated by Jonckheere's test at a level of significance of $p < 0.01$: $m \pm SD$, $n = 6$.

う。

おわりに

以上、糖代謝を中心としてオキシダントによる細胞レベルでの嫌氣的代謝系のこう進に関する文献的考察を行った。この文献的考察の中で現在もなお低濃度長期暴露による代謝系の変化を調べたデータが著しく不足していることを感じる。たとえば、比較的高濃度 NO_2 の 1 か月程度の暴露により、各臓器の酸素消費 (QO_2) は著しく増加することは詳しく調べられているが、低濃度長期暴露でも増加するのかどうかは調べられていない。これがどのような変化を示すかは著者にとって、低濃度長期暴露による過酸化脂質生成のメカニズムを考える場合に非常に重要な資料となる。今後、さ

表 10 0.36 ppm NO₂ 暴露モルモットの赤血球中 2,3-DPG 含量⁵⁶⁾.
 Table 10 2,3-Diphosphoglycerate phosphorus content of red blood cells (μ mol/ml) in guinea pigs⁵⁶⁾.

Group	1	2	3	4
Control	21.30	23.20	18.625	17.650
	19.30	24.40	17.025	16.650
	19.80	17.00	16.625	15.550
	20.05	17.00	17.325	16.250
SD	0.8508	3.9564	0.8655	0.8770
Mean	20.1125	20.4000	17.4000	16.5250
Exposed	24.650	21.175	30.925	20.600
	25.450	28.775	34.625	22.000
	17.950	22.775	32.925	20.700
	25.750	24.575	30.325	20.700
SD	3.6959	3.2756	1.9619	0.6683
Mean	23.4500	24.3250	32.2000	21.0000

* DPG μ mol values are equal to one half of the phosphorus values.

らに様々な角度から低濃度長期暴露の生体影響に関する知見の集積に努める必要があり、それらの蓄積によって現在見いだされている影響や変化の生理的意味づけが可能になるものと思われる。

引用文献

- 1) Felts, J. M. (1964): Biochemistry of the lung. Health Physics (Pergamon press), **10**, 973-979.
- 2) Felts, J. M. (1965): Carbohydrate and lipid metabolism of lung tissue. Med. thorac, **22**, 89-99.
- 3) Pearse, A. G. E. (1958): Extension of the limits of cellular pathology. The role of enzyme histochemistry. J. Clin. Pathol., **11**, 520-534.
- 4) Walker, D. G. (1963): A survey of dehydrogenases in various epithelial cells in the rat. J. Cell Biol., **17**, 255-277.
- 5) Oren, R. O., et al. (1963): Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. J. Cell Biol., **17**, 487-501.
- 6) Salisbury-Murphy S., D. Rubinstein and J. C. Beck (1966): Lipid metabolism in lung slices. Am. J. Physiol., **211**, 988-992.
- 7) Krebs, H. A. (1950): Body size and tissue respiration. Biochim. Biophys. Acta., **4**, 249-269.
- 8) Felts, J. M. (1964): Biochemistry of the lung. Health Phys., **10**, 973-979.
- 9) Harlan, W. R. Jr., S. I. Said and C. M. Baucerjee (1966): Metabolism of pulmonary phospholipids in normal lung and during acute pulmonary edema. Am. Rev. Resp. Dis., **94**, 938-937.
- 10) 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.
- 11) Scheel, L. D., et al. (1959): Biochemical, immunologic and pathologic changes following ozone exposure. J. Appl. Physiol., **14**, 67-80.
- 12) McDowell, D. G. (1969): Biochemistry of hypoxia: Current concepts II: Biochemical derangements associated with hypoxia and their measurements. Brit. J. Anaesth., **41**, 251.

- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Dhalla, N. S., M. Fedelesova and I. Toffler (1971): Biochemical alterations in the skeletal muscle of vitamin E deficient rats. *Can. J. Biochem.*, **49**, 1202-1208.
- 16) Caasi, P. I., H. J. Wittkop, P. P. Nair (1972): Biosynthesis of heme in vitamin E deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **203**, 93-102.
- 17) Chow, C. K., K. Reddy and A. L. Tappel (1973): Effect of dietary vitamin E on the activities of the glutathione peroxidase system in rat tissues. *J. Nutr.*, **103**, 6 3-624.
- 18) Shimbayashi, K. and S. Shoya (1971): Effect of vitamin E on the urea cycle enzymes, ornithine-keto acid transaminase, and isocitrate dehydrogenase in rat liver. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 983-988.
- 19) Barry, T. A. and H. Rosenkrantz (1962): The level of isocitric acid dehydrogenase in tissues of vitamin E-deficient rabbits. *J. Nutr.*, **76**, 447-452.
- 20) Bernhard, K. and R. Markstein (1972): Enzyme activities of liver cells in vitamin E deficiency. *Helv. Chem. Acta.*, **55**, 519-526.
- 21) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide, II. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153-164.
- 22) Ichinose, T. and M. Sagai (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide, III. Changes of the antioxidative protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by chronic exposure. *Toxicol. Appl. Pharm.* **66**, 1-8.
- 23) Buckley, R. D., J. D. Hackney, K. Clark and C. Posin (1975): Ozone and Human blood. *Arch. Environ. Health*. **30**, 40-43.
- 24) 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.
- 25) Ichinose, T., A. K. Suzuki, H. Stubone and M. Sagai (1982): Biochemical studies on strain differences of mice in the susceptibility to nitrogen dioxide. *Life Sciences*, **31**, 1963-1972.
- 26) 鈴木誠一・市瀬孝道・鈴木明・嵯峨井勝 (1983): 二酸化窒素暴露に対する肺の抗酸化性防御機構の動物種差に関する研究. 国立公害研究所研究報告第40号. pp. 89-111.
- 27) Buckley R. D. and O. J. Balchum (1967): Enzyme alterations following nitrogen dioxide exposure. *Arch. Environ. Health*, **14**, 687-692.
- 28) Buckley R. D. and O. J. Balchum (1965): Acute and chronic exposures to nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **10**, 220-223.
- 29) Kosmider, S. (1975): Electrolytes and lipid disturbances in chronic intoxication with nitrogen dioxide. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **35**, 217-232.
- 30) Hueter, F. G. and M. Fritzhand (1971): Oxidants and lung biochemistry. A brief review. *Arch. Intern. Med.* **128**, 48-51.
- 31) Sherwin, R. P., J. B. Margolick, et al. (1973): Hypertrophy of alveolar wall cells secondary to an air pollutant. A semi-automated quantitation. *Arch. Environ. Health*, **26**, 297-299.
- 32) Evans, M. J., et al (1964): Acute kinetic response and renewal of the alveolar epithelium following injury by nitrogen dioxide. *Chest*, **65**, 62s-65s (Suppl.).
- 33) Evans, M. J., et al (1971): Effects of nitrogen dioxide on cell renewal in the rat lung. *Arch. Intern. Med.*, **128**, 57-60.
- 34) Margolick, J. B., S. P. Azen and R. P. Sherwin (1973): An image analyzer quantitation of type 2 pneumocytes.

- Am. Rev. Respir. Dis., **108**, 704-707.
- 35) Buckley, R. D. and O. J. Bulchum (1967): Effects of nitrogen dioxide on lactic dehydrogenase isozymes. Arch. Environ. Health, **14**, 424-428.
- 36) Davidson, J. T., G. A. Lillington, G. B. Haydon and Wasserman (1967): Physiologic changes in the lungs of rabbit continuously exposed to nitrogen dioxide. Am. Rev. Respir. Dis., **95**, 790-796.
- 37) 鈴木明・局博一・市瀬孝道・織田肇 (1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——動脈血 pHa, Paco₂ および PaO₂——, 国立公害研究所研究報告, 第 15 号, pp. 229-240.
- 38) 鈴木明・局博一・嵯峨井勝 (1983): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——酸素量の変化について——, 国立公害研究所研究報告, 第 40 号, 221-227.
- 39) Acton, J. D. and Myrvick (1972): Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophages. Arch. Environ. Health, **24**, 48-52.
- 40) 鈴木明 (私信)
- 41) 青山和司・加藤知・中村敏一・市原明 (1978): ラット肝初代培養細胞エネルギー代謝の anaerobic adaptation について. 生化学, **50**, 871.
- 42) Cassan, S. M., D. H. Simmons. (1975): Nitrogen dioxide and the erythrocyte redox state. Arch. Environ. Health, **30**, 502-506. (1976): The influence of anaerobiosis and nitrogen dioxide on the human erythrocyte. Environ. Res., **11**, 5-12.
- 43) Cassan, S. M., B. Gross, and D. H. Simmons. (1976): The effect of NO₂ on erythrocyte glucose metabolism as related to changes in redox ratio [NAD⁺]/[NADH]. Environ. Res., **12**, 174-179.
- 44) Bartlett, G. R. (1975): Human red cell glycolytic intermediates. J. Biol. Chem., **234**, 449-458.
- 45) Dyce, B. J. and S. P. Bessman (1973): A rapid nonenzymatic assay for 2, 3-DPG in multiple specimens of blood. Arch. Environ. Health, **27**, 112-115.
- 46) Benesch, R., and R. E. Benesch (1967): The effect of organic phosphates from human erythrocytes on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem. Biophys. Res. Commun., **26**, 162-167.
- 47) Benesch, R., R. E. Benesch and C. I. Yu (1968): Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. Pro. Nat'l. Acad. Sci., **59**, 526-532.
- 48) Chanutin, A. and R. R. Curnish (1967): Effect of organic and inorganic phosphates on oxygen equilibrium of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys., **121**, 96-102.
- 49) Duhm, J. and E. Gerlach (1974): The human red cell in vitro (ed. by Greenwalt, T. J., et al). pp. 111.
- 50) Lenfant, C., J. Torrance, E. English, C. A. Finch, C. Reynafarje, J. Ramos and J. Faura (1968): Effects of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels. J. Clin. Invest. **47**, 2652-2656.
- 51) Valeri, C. R. and N. L. Fortier (1969): Red cell 2,3-diphosphoglycerate and creatine levels in patients with red cell mass deficiencies or with cardiopulmonary insufficiency. N. Eng. J. Med., **281**, 1452-1455.
- 52) Oski, F. A., A. J. Gottlieb, M. Delivora-Papadopoulos and W. W. Miller (1969): Red cell 2,3-diphosphoglycerate levels in subjects with chronic hypoxemia. N. Eng. J. Med., **280**, 1165-1166.
- 53) Weissberg, J. B. and J. D. Crapo (1974): Red cell 2,3-diphosphoglycerate and oxygen toxicity in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., **29**, 131-132.
- 54) Weissberg, J. B. and J. D. Crapo (1976): Hyperoxia and red cell 2,3-diphosphoglycerate. Toxicol. Appl. Pharmacol., **36**, 41-48.
- 55) 濱崎直孝 (1976): ヒト赤血球中 2, 3-ジホスホグリセリン酸, 蛋白質・核酸・酵素, **215**, 396-404.
- 56) Mersch, J., B. J. Dyce, B. J. Haverback and R. P. Sherwin (1973): Diphosphoglycerate content of red blood cell. Arch. Environ. Health, **27**, 94-95.
- 57) Umbreit, W. W., Burris, R. H. and Stauffer, J. F. (1957): Manometric Techniques, Minneapolis: Burgess Publishing Company.

III-5

二酸化窒素またはオゾン暴露のラット肺および血液中のSH化合物に及ぼす影響

Effect of Exposure to Nitrogen Dioxide or Ozone on
Sulfhydryls in Lung and Blood of Rats

河田明治¹

Meiji KAWATA¹

要 旨

NO₂ または O₃ をラットに暴露し、肺及び血液中の非タンパク性SH (NPSH)、還元型グルタチオン(GSH)、酸化型グルタチオン(GSSG)、ならびに肺のタンパク性SH (PSH) に及ぼす影響について検討した。NO₂ 急性、亜急性、慢性実験の結果と、O₃ 急性実験の結果とをここにまとめ、これに関連する他の研究成果と比較検討した。

Abstract

The effect of exposure to NO₂ or O₃ on the levels of nonprotein sulfhydryl (NPSH), reduced glutathione (GSH), and oxidized glutathione (GSSG) in lungs and blood, and protein sulfhydryl (PSH) in lungs were studied using rats. The results of acute, subacute, and long-term exposure to NO₂, and of acute exposure to O₃ were summarized and discussed in comparison with those of other workers.

1. はじめに

大気汚染物質である二酸化窒素 (NO₂) とオゾン (O₃) はともに酸化性を有する点で共通している。SH 基を有する化合物は生体内で重要な機能を営むものが多い。それはある意味では SH 基が容易に酸化される性質によるとも考えられることから¹⁾、NO₂ 又は O₃ の生体内 SH 化合物に対する影響については多数の研究が報告されている。しかし SH 化合物は不安定で、多くの物質と複雑な反応を示すことから、現在なお多くの問題が残されている。昭和 52 年度から 5 年間にわたって行われた特別研究「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」で行っ

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

た、ラットの肺及び血液中のSH化合物に及ぼすNO₂又はO₃の影響についての研究成果は、国立公害研究所研究報告²⁻⁵⁾に発表した。ここではこれら個々の実験結果を整理し、更にこれに関連する他の研究成果との比較検討を行った。

2. 肺に存在する還元型SH化合物の量的変動

NO₂又はO₃の低濃度暴露により肺の非タンパク性SH(NPSH)又は還元型グルタチオン(GSH)量は増加する。肺のGSH量は、6 ppm NO₂ (1日4時間)7日間(マウス)で変化が見られず、15および28 ppm NO₂ (1日4時間)7日間(マウス)で有意に増加⁶⁾、0.2, 0.5, 0.8 ppm O₃ 7日間(ラット)で暴露濃度に応じた増加⁷⁾、0.2, 0.5, 1.0 ppm O₃ (1日4時間)30日間(マウス)で暴露濃度、暴露時間に依存して増加した⁸⁾。0.8 ppm O₃ 3日間(ラット)で肺のNPSHは25%増加するが、暴露ラットを清浄空气中で飼育すると2日以内に減少を開始し、6日後にほぼ正常値に近づき9日後には完全に回復する⁹⁾。

NO₂またはO₃を暴露したラット肺のNPSH量をBeutler¹⁰⁾に準じた方法で、またGSH量をTietze¹¹⁾の方法により測定し以下の結果を得た。4および6 ppm NO₂ 10日間の急性暴露²⁾でNPSH, GSHは暴露開始直後より増加し、7日後に最高値に達した。0.4, 1.3, 4 ppm NO₂ 1週間~3か月間の亜急性暴露で⁴⁾ NPSH, GSHは0.4, 1.3 ppm群で有意な変化が見られず、4 ppm群では暴露開始1週間以後有意に増加した。0.04, 0.4, 4 ppm NO₂ 低濃度長期暴露実験³⁾では、0.04, 0.4 ppm

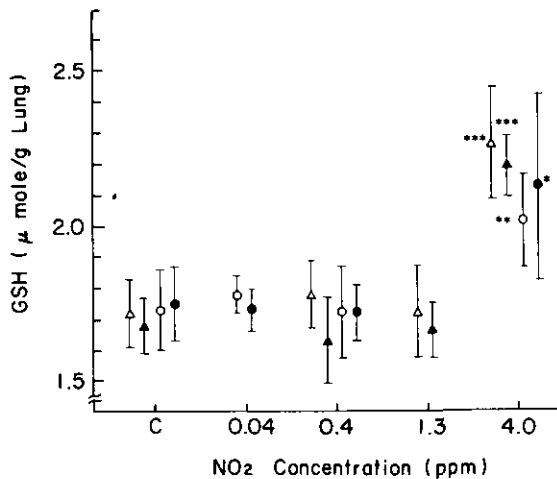


図 1 ラット肺中の還元型グルタチオン(GSH)量に及ぼすNO₂暴露の影響
 Fig. 1 Effect of NO₂ exposure on the level of reduced glutathione (GSH) in rat lungs
 Reduced glutathione levels is expressed as μ moles/g wet lung.
 Values are mean \pm SD ($n=6$). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, Δ : 1 week, \blacktriangle : 3 months, \circ : 9 months, \bullet : 18 months

18 か月間暴露で NPSH, GSH は変化せず, 4 ppm O₃, 18 か月間暴露で有意に増加した。NO₂ 急性, 亜急性, 長期暴露実験の結果より肺の NPSH, GSH は 0.04, 0.4 ppm NO₂ 長期暴露で変化が認められず 4 ppm 群では暴露 1 週間後に最高値に達したのちこの値は 18 か月間維持された。GSH についての結果を図 1 に示した。

Mustafa ら⁷⁾ は 0.8 ppm O₃ 7 日間暴露で, ラット肺の NPSH, GSH は暴露開始 3 日後に最高値に達し(対照群に対して NPSH で 40%, GSH で 30% の増加に相当する), 以後それぞれの値はほぼ一定に維持される結果を得た。しかしこれと同一条件での実験⁵⁾ では NPSH, GSH ともに 3 日以後 14~23% の増加を示し NPSH と GSH 値の間に有意な差は見られなかった。

高濃度の NO₂ 又は O₃ 暴露で肺の NPSH 又は GSH は減少し, O₃ 暴露では暴露濃度, 暴露時間に依存して減少することが認められた^{5,12)}。暴露群の肺の NPSH 又は GSH の対照群に対する値は, 20 ppm NO₂ 1 日間(ラット)で 80~60%²⁾, 2 ppm O₃ 8 時間(ラット)で 55%⁵⁾, 75%¹²⁾, 59%¹³⁾, 4 ppm O₃ 6 時間(ラット)で 51%¹²⁾ と著しく減少した。しかし 4 ppm O₃ 4 時間(マウス)で肺の GSH は変化せず⁸⁾, 8 ppm O₃ 4 時間(マウス)で 86%⁸⁾, 8 ppm O₃ 3 時間(マウス)で 46% まで減少した¹⁴⁾。ラットとマウスにおける O₃ の GSH への影響の違いは種差によるものと考えられ, マウス系統間においても感受性の差が認められた¹⁵⁾。

タンパク性 SH (PSH) 量は総 SH 量より NPSH 量を差し引くことにより求められる¹⁶⁾。肺の PSH は 4 ppm NO₂ 3 か月間(ラット)⁴⁾, 0.8 ppm O₃ 7 日間(ラット)⁵⁾, 2 ppm O₃ 4 時間(ラット)¹³⁾ で変化しないが(NPSH 及び GSH は有意に増加又は減少する), 2 ppm O₃ 6¹³⁾ 及び 8⁵⁾ 時間(ラット), 4 ppm O₃ 2 時間(ラット)⁵⁾ で暴露時間に依存して有意に減少した。これらの結果から肺にはタンパク性 SH 量が GSH 量より多いにもかかわらず, NO₂ 又は O₃ の影響を受け難いことが明らかになった^{5,13)}。

O₃ 暴露による肺 GSH の変動を他の生体成分や生体の状態との関係において調べた研究がある。マウス肺中の還元性物質である GSH とビタミン C に及ぼす O₃ 暴露の影響を検討し, ビタミン C 投与は低濃度繰り返し暴露による O₃ の影響を抑制した¹⁷⁾。O₃ 暴露でビタミン E 欠乏食を投与したラットでは赤血球中の GSH が減少した^{18,19)}。マウスの O₃ 暴露で, 運動させた群の肺 GSH は増加した²⁰⁾。

3. 肺に存在する SH 化合物の酸化

最も緩やかな条件で SH 化合物を酸化すると二分子よりジスルフィド, 異なる SH 化合物とで混合ジスルフィドを生成する。*in vitro* の系で SH 化合物に NO₂ や O₃ を作用させ, その酸化生成物を調べた例は多く, ジスルフィド以外に更に酸化の進んだ種々の酸化体や, NO₂ との反応で窒素を含む誘導体も得られている^{1,21-25)}。還元型グルタチオン(GSH)の酸化によって生じた酸化型(GSSG)は可逆的に還元されて再び GSH となること, チオールとジスルフィドの交換反応によって GSSG 自体が他の SH 化合物を酸化すること²⁵⁾, SH 化合物はフリーラジカル反応²⁶⁾によっても他の物質

と反応するなどSH化合物の酸化反応の過程は複雑である。これに加えて生体中では、SH化合物の代謝に関与する種々の酵素が存在するので、生体中のSH化合物の酸化過程を正しく把握するには困難な問題が多い。NO₂又はO₃を暴露した動物の組織や血液中のSH化合物の酸化についての研究は多いが、実際に酸化体を定量した例は少ない。その理由として、(1)生体中では低分子SH化合物はその大部分が還元型として存在する、(2)高濃度O₃暴露でも肺の低分子SH化合物の酸化体の濃度が低い¹²⁾、(3)低分子SH化合物とタンパク性SHとから生成する混合ジスルフィドを直接定量する優れた分析法が存在しないなどの点が挙げられる。

グルタチオンレダクターゼ(GR)、DTNB、NADPHを用いる方法¹¹⁾により、NO₂又はO₃を暴露したラット肺中のGSSG量を測定し以下の結果を得た。GSSGは10 ppm NO₂ 1日間暴露で増加傾向、20 ppm NO₂ 1日間暴露で有意に増加した²⁾。0.04、0.4、4 ppm NO₂ 低濃度長期暴露実験では、GSSGは表1に示す如く、4 ppm 9か月間、0.4 ppm 18か月間暴露で増加傾向を示し、4 ppm 18か月間暴露で有意に増加した(肺の総グルタチオン中の酸化型グルタチオン含有率で表した結果は前報³⁾に示した)。0.4、1.3、4 ppm NO₂ 3か月間暴露では肺のGSSGは有意な変化を示さない⁴⁾。0.8 ppm O₃ 7日間、2 ppm O₃ 12時間、4 ppm O₃ 6時間暴露で、ラット肺のGSSGは有意に増加したが、いずれの暴露群でも低い値を示した⁵⁾。この場合2及び4 ppm群では、肺に含まれる総グルタチオン量よりも多い量のPSHが減少することから、タンパク性SH間においてジスルフィドの生成していることが示唆された。

表 1 ラット肺の酸化型グルタチオン (GSSG) 量に及ぼす NO₂ 暴露の影響
Table 1 Effect of NO₂ exposure on the level of oxidized glutathione (GSSG) in rat lungs

9 Months Exposure

NO ₂	First Experiment	Second Experiment
Control	0.030±0.008	0.025±0.004
0.04 ppm	0.038±0.012	0.024±0.004
0.4 ppm	0.039±0.011	0.025±0.004
4 ppm	0.037±0.008	0.035±0.003**

18 Months Exposure

NO ₂	First Experiment	Second Experiment
Control	0.032±0.019	0.023±0.006
0.04 ppm	0.036±0.010	0.025±0.003
0.4 ppm	0.047±0.010	0.033±0.006*
4 ppm	0.065±0.018*	0.036±0.006**

Oxidized glutathione (GSSG) level is expressed as μ mole/g wet lung. Values are mean \pm SD ($n=6$).

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$.

DeLucia ら¹²⁾はラットを用いた 4 ppm O₃ 6 時間暴露の実験で、肺の GSSG が増加を示さず、上記の実験⁹⁾と異なる結果を得た。しかしその報告の中で、GSSG の測定に問題があったため肺の GSSG 量に変化が認められないとする結論には疑問のあることが指摘された。

酸化的条件下で赤血球中に Heinz bodies (ハインツ小体) が生成する。O₃ 又はオゾンイドの作用による Heinz bodies 生成と非タンパク性 SH (NPSH) 及びヘモグロビンの関与について論じた報告²⁷⁾があり、血球中のグルタチオン代謝に関連して GSH とヘモグロビンとのジスルフィドの生成とその性質について調べられている^{28,29)}。

以上述べた如く、生体内に存在する SH 基の NO₂ 又は O₃ による直接的な酸化に関する研究は多いが、一方 NO₂ 又は O₃ の大気汚染物質としての有害性とフリーラジカル反応の関与によって生成する過酸化脂質との関連性が論じられている²⁴⁾。Chow ら³⁰⁾により O₃ 暴露において脂質過酸化による障害に対する肺の防御機構として Peroxidative Metabolic Pathway (PMP) が示れた。PMP 系には GSH と GSSG との可逆的酸化還元反応が組み込まれており、ここでの GSH の役割は、不飽和脂肪酸に対する NO₂ 又は O₃ の作用によって生成する過酸化脂質の還元である。NO₂ 又は O₃ 暴露における肺の PMP 酵素活性に及ぼす影響についての研究は多く、PMP 活性の増加する場合、GSH も増加する³¹⁻³⁴⁾。PMP 系では GSSG の還元には GR が関与するが、ラットを用いた 0.8 ppm O₃ 暴露で GR の他にジスルフィドの還元酵素であるジスルフィドレダクターゼ、グルタチオン-ジスルフィドトランスヒドロゲナーゼ活性の増加が認められた⁷⁾。このように比較的低濃度の NO₂ 又は O₃ 暴露で種々の酵素活性が増加するが、2 ppm O₃ 8 時間暴露(ラット)では PMP 系酵素である GR、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)活性が低下した¹³⁾。この GR と G6PD 活性の低下は O₃ が活性部位の SH 基に障害を与えることによると推定されている。また、この酵素活性の低下とタンパク性 SH の経時的減少傾向とがよく一致するという結果が、同一条件による暴露実験で確認された⁹⁾。DeLucia ら¹²⁾は O₃ 暴露による肺 GSH 量の減少を GSH と PSH との混合ジスルフィド生成によると結論しているが、混合ジスルフィドの定量的な検討は試みられていない。

4. 血液中の SH 化合物への影響

血液中の還元型グルタチオン (GSH) は1または2 ppm O₃ 2.5~3時間暴露 (ヒト)³⁵⁾、0.04, 0.4, 4 ppm NO₂(ラット)の9か月間暴露で変化が認められず、0.4, 4 ppm 18か月間暴露で減少する傾向を示した³⁾。

O₃ 暴露が血液中の SH 化合物、他の生体成分、酵素活性に及ぼす影響に関する多数の研究が報告されているにもかかわらず、なお不明な点が多い³⁶⁾。0.8 ppm O₃ 7日間 (ビタミン E 欠乏食ラット)^{18,19)}、0.5 ppm O₃ 2.75 時間 (ヒト)³⁷⁾ の暴露では血液中の GSH は有意に減少したが、これに対し 0.15 及び 0.3 ppm O₃ 1 時間 (ヒト)³⁸⁾、0.5 ppm O₃ (1 日 8 時間) 7 日間 (ラット, サル)³⁹⁾、高濃度の 8 ppm O₃ 4 時間 (マウス)⁴⁰⁾ の暴露でも有意な変化は認められないと報告している。

このように O₃ 暴露による血液中の GSH に及ぼす影響については明確な結果が得られていない。

血液中の SH 化合物の変動を暴露濃度と暴露時間との関係において詳細に検討するため、ラットを用いて 0.8 ppm O₃ 7 日間, 2 ppm O₃ 12 時間, 4 ppm O₃ 6 時間の暴露を行い、血液中の GSH, GSSG, NPSH を Beutler¹⁰⁾ および Tietze¹¹⁾ の方法により測定した結果、GSSG は減少傾向を示したが、GSH 及び NPSH では有意な変化が認められなかった⁵⁾。

血漿中の GSH 量はマウスで 28 $\mu\text{moles/l}^{13)}$, ラットで 3~5 $\mu\text{moles/l}^{12,43)}$ で、血液中の GSH 量^{3,5)} に比べて著しく低く、静脈より投与された GSH は血中より速やかに消失して血漿中の GSH は正常値の低い濃度に保たれる⁴³⁾。これらのことから O₃ 暴露によって肺の GSH に著しい変化が見られるにもかかわらず、血液中の GSH が有意な変化を示さない事は血液中の GSH の大部分が赤血球中に存在しており、O₃ の直接的な影響を受け難い状態にあるためと考えられる。また、酸化された GSH が速かに血球内の酵素系によって還元されている可能性も考えられる。

5. おわりに

以上 NO₂ 又は O₃ の動物暴露実験における肺及び血液中の SH 化合物に及ぼす影響について述べた。これまでは生体成分の中で、酸化性を有する大気汚染物質である NO₂, O₃ と反応し易い SH 化合物を中心として研究を行ってきたが、これと関連する他の多くの研究結果とを合わせ考えると、なお検討を要する多くの問題の存在することが明らかになった。低濃度 O₃ 暴露によってタンパク合成の促進されることが認められていること⁷⁾ などから今後は生体中の SH 基だけでなく、SH 基を持ったアミノ酸、ペプチド及び関連物質にも注目し、これら生体成分に及ぼす NO₂, O₃ 等の暴露による影響へと研究を展開する予定である。

引用文献

- 1) Jocelyn, P. C. (1972): Oxidation of thiols. in *Biochemistry of the SH Group*, Academic Press, New York, 94.
- 2) 河田明治(1979): ラット肺の SH 化合物に及ぼす二酸化窒素の影響。国立公害研究所研究報告, 第 8 号, 91-101.
- 3) 河田明治(1980): 二酸化窒素長期暴露ラットに及ぼす影響—血液および肺に存在するグルタチオン含量—. 国立公害研究所研究報告, 第 15 号, 259-274.
- 4) 河田明治(1981): 二酸化窒素亜急性暴露のラット肺 SH 化合物に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告, 第 31 号, 109-115.
- 5) 河田明治(1983): オゾン急性暴露のラット肺及び血液中の SH 化合物に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告, 第 40 号, 147-156.
- 6) 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.
- 7) Mustafa, M. G., A. D. Hacker and J. J. Ospital, M. Z. Hussain, S. D. Lee (1977): Biochemical effects of environmental oxidant pollutants in animal lungs. in *Biochemical Effects of Environmental Pollutants*, S. D. Lee ed., Ann Arbor Science, Mich., 59-96.
- 8) 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, 58-66.
- 9) Chow, C. K., M. Z. Hussain, C. E. Cross, D. L. Dungworth and M. G. Mustafa (1978): Effect of low level of ozone on rat lungs I. biochemical responses during recovery and reexposure. *Exp. Mol. Pathol.* 25, 182-188.
- 10) Beutler, E. (1975): *Red Cell Metabolism, a manual of biological methods*. Grune and Stratton, New York, p.

112.

- 11) Tietze, F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, **27**, 502-522.
- 12) 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.
- 13) DeLucia, A. J., P. M. Hoque, M. G. Mustafa and C. E. Cross (1972): Ozone interaction with rodent lung: effect on sulfhydryl and sulfhydryl-containing enzyme activities. *J. Lab. Clin. Med.*, **80**, 559-566.
- 14) Mountain, J. T. (1963): Detecting hypersusceptibility to toxic substance. *Arch. Environ. Health*, **6**, 357-361.
- 15) 市瀬孝道・織田 肇・鈴木 明・局 博一・嵯峨井 勝(1980): 二酸化窒素暴露に対するマウス系統間の感受性の相違と酵素防御機構の役割について. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 61-75.
- 16) 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.
- 17) 深瀬 治・磯村公郎・渡辺 弘(1975): オゾンの生体内ビタミンCに及ぼす影響. *大気汚染研究*, **10**, 63-65.
- 18) Chow, C. K. and J. J. Kaneko (1979): Influence of dietary vitamin E on the red cell of ozone-exposed rats. *Environ. Res.* **19**, 49-55.
- 19) Chow, C. K., W. M. Aufderhide, J. J. Kaneko, C. E. Cross and E. C. Larkin (1976): Effect of dietary vitamin E on the red blood cells of ozone-exposed rats. *Fed. Proc.* **35**, 741.
- 20) Fukase, O., K. Isomura and H. Watanabe (1978): Effect of exercise on mice exposed to ozone. *Arch. Environ. Health*, **33**, 198-200.
- 21) Menzel, D. B. (1971): Oxidation of biologically active reducing substances by ozone. *Arch. Environ. Health*, **23**, 149-153.
- 22) Fierce, W. L., R. L. Weichman and W. J. Sandner (1964): Dialkyl disulfides. U.S. Pat., 3134798; *Chem. Abstr.*, **61**, p. 4220c.
- 23) Mudd, J. B., L. R. Leavitt, A. Ongun and T. T. McManus (1969): Reaction of ozone with amino acids and protein. *Atmos. Environ.*, **3**, 669-682.
- 24) Menzel, D. B. (1976): The role of free radicals in the toxicity of air pollutants (nitrogen oxides and ozone). in *Free Radicals in Biology Vol II*, W. A. Pryor ed., Academic Press, New York, 181-202.
- 25) Jocelyn, P. C. (1972): Chemical reactions of disulfides. in *Biochemistry of the SH Group*, Academic Press, New York, 116-136.
- 26) Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1976): The glutathione-glutathione disulfide system. in *Free Radicals in Biology. Vol II*, W. A. Pryor ed., Academic Press, New York, 55-84.
- 27) Menzel, D. B., R. J. Slaughter, A. M. Bryant and H. O. Jauregui (1975): Heinz Bodies formed in erythrocytes by fatty acid ozonides and ozone. *Arch. Environ. Health*, **30**, 296-301.
- 28) Srivastava, S. K. and E. Beutler (1970): Glutathione metabolism of the erythrocyte, the enzymic cleavage of glutathione-haemoglobin preparations by glutathione reductase. *Biochem. J.*, **119**, 353-357.
- 29) Allen, D. W. and J. H. Jandl (1961): Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II. role of thiols in oxidant drug action. *J. Clin. Invest.*, **40**, 454-475.
- 30) Chow, C. K. and A. L. Tappel (1972): An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. *Lipid*, **7**, 518-524.
- 31) 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**, 311-319.
- 32) Fukase, O. (1980): The effect of gaseous air pollutants on peroxidative metabolism in mouse lung. *日本衛生学雑誌*, **34**, 777-792.
- 33) 嵯峨井 勝・白石不二雄・河田明治(1979): 肺および赤血球のPeroxidative Metabolic Pathwayに及ぼす二酸

化室素の影響. 国立公害研究所研究報告, 第8号 135-147.

- 34) 嵯峨井 勝・市瀬孝道(1981): 二酸化窒素急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化防御機構の変化. 国立公害研究所研究報告, 第31号, 67-79.
- 35) Posin, C., C. Kenneth, M. P. Jones and J. V. Patterson (1978): Nitrogen dioxide inhalation and human blood biochemistry. *Arch. Environ. Health*, **33**, 318-324.
- 36) Schaich, K. M and D. C. Borg (1981): The effect of ozone on rat erythrocytes after exposure in vivo. U.S. Environ. Prot. Agency, Off. Res. Dev., [Rep.] EPA 1981, EPA-600/9-81-001, Proc. Res. Plann. Workshop Health Eff. Oxidants, PB81-178832, 91-125.
- 37) Buckley, R. D., J. D. Hackney, K. Clark and C. Posin (1975): Ozone and human blood. *Arch. Environ. Health*, **30**, 40-43.
- 38) DeLucia, A. J. and W. C. Adams (1977): Effect of O₃ inhalation during exercise on pulmonary function and blood biochemistry. *J. Appl. Physiol: Res. Environ. Exercise Physiol.*, **43**, 75-81.
- 39) Chow, C. K., M. G. Mustafa, C. E. Cross and B. K. Tarkington (1975): Effect of ozone exposure on the lungs and the erythrocytes of rats and monkeys: relative biochemical changes. *Environ. Physiol. Biochem.*, **5**, 142-146.
- 40) Goldstein, B. D., B. Pearson, C. Lodi, R. D. Buckley and O. J., Balchum (1968): The effect of ozone on mouse blood in vivo. *Arch. Environ. Health*, **16**, 648-650.
- 41) Griffith, O. W. and Meister (1979): Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5606-5610.
- 42) Häberle D., A. Wahlländer and H. Sies (1979): Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathione concentration and redox state in anaesthetized rats. *FEBS Lett.* **108**, 335-340.
- 43) Wendel, A. and P. Cikryt (1980): The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS Lett.* **120**, 209-211.

研究報告既刊リスト

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——昭和 51 年度。(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)
(日本産ユスリカ科 *Chironomus* 属 9 種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
- 第 4 号 スモッグチャンパーによる炭化水素——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——昭和 53 年度(1979)
- 第 7 号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
(日本産ユスリカ科 20 種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
- 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)
- 第 9 号 スモッグチャンパーによる炭化水素——窒素酸化物系光化学反応の研究——昭和 53 年度中間報告。(1979)
- 第 10 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 51/53 年度特別研究報告。(1979)
- 第 11 号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
- 第 12 号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
(コンピュータ制御装置を利用したフレイムおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
- 第 13 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980).
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
(多摩川に発生するユスリカの研究
——第 1 報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係——
——第 2 報 その一支流に見出された Chironominae 亜科の 20 種について——)
- 第 14 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究——昭和 53, 54 年度特別研究報告。(1980)
- 第 15 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 54 年度特別研究報告。(1980)
- 第 16 号 計測車レーザーレーダーによる大気汚染遠隔計測。(1980)
- 第 17 号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果——臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究——昭和 53/54 年度特別研究報告。(1980)

- 第 18 号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
(環境標準試料「リョウブ」の調製, 分析および保証値)
- 第 19 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(III)——霞ヶ浦(西浦)の湖流——昭和 53/54 年度. (1981)
- 第 20 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(IV)——霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響——昭和 53/54 年度. (1981)
- 第 21 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(V) ——霞ヶ浦流入河川の流出負荷量とその評価——昭和 53/54 年度. (1981)
- 第 22 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(VI) ——霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量——昭和 53/54 年度. (1981)
- 第 23 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(VII) ——湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究——昭和 53/54 年度. (1981)
- 第 24 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(VIII) ——富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関する研究——昭和 53/54 年度. (1981)
- 第 25 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(IX) ——Microcystis(藍藻類) の増殖特性——昭和 53/54 年度. (1981)
- 第 26 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(X) ——藻類培養試験法による AGP の測定——昭和 53/54 年度. (1981)
- 第 27 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(XI) ——研究総括——昭和 53/54 年度. (1981)
- 第 28 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究——昭和 54/55 年度特別研究報告. (1981)
- 第 29 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
——第 3 報 夏期の調査で見出されたエリユスリカ亜科 Orthoclaadiinae 各種の記載とその分布の下水汚染度との関係について——
——第 4 報 南浅川の冬期調査で見出された各種の分布と記載——)
- 第 30 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究——昭和 54/55 年度特別研究報告. (1982)
- 第 31 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 55 年度特別研究報告. (1981)
- 第 32 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 54 年度特別研究中間報告——環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究 1). (1982)
- 第 33 号 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究——大気運動と大気拡散過程のシミュレーション——昭和 55 年度特別研究報告. (1982)
- 第 34 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究——昭和 55 年度特別研究報告. (1982)
- 第 35 号 環境面よりみた地域交通体系の評価に関する総合解析研究. (1982)
- 第 36 号 環境試料による汚染の長期モニタリング手法に関する研究——昭和 55/56 年度特別研究報告. (1982)
- 第 37 号 環境施策のシステム分析支援技術の開発に関する研究. (1982)
- 第 38 号 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)
(環境標準試料「地底質」の調製, 分析および保証値)
- 第 39 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究——昭和 56 年度特別研究報告. (1982)
- 第 40 号 大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体に関する実験的研究——昭和 56 年度特別研究報告 (1983)

Report of Special Research the National Institute for Environmental Studies

- No. 1* Man activity and aquatic environment — with special references to Lake Kasumegaura — Progress report in 1966. (1977)
- No. 2* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants — Progress report in 1976 — 1977. (1978)

[Starting with Report No. 3, the new title for NIES Report was changed to :]

Research Report from the National Institute for Environmental Studies

- No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system — Progress report in 1977. (1978)
- No. 5* Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on Cultured Cells — Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6* Man activity and aquatic environment-with special references to Lake Kasumigaura — Progress report in 1977-1978. (1979)
- No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
- No. 8* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants — Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system — Progress report in 1978. (1979)
- No. 10* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plans — Progress report in 1976-1978. (1979)
- No. 11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No. 12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
- No. 13 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
 - Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
 - Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
- No. 14* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem — Progress report in 1978-1979. (1980)
- No. 15* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants — Research report in 1979. (1980)
- No. 16* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- No. 17* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes — Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region — Progress report in 1978-1979. (1980)
- No. 18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
- No. 19* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas — Lake current of Kasumigaura (Nishiura) — 1978-1979. (1981)
- No. 20* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas — Geomorphological and hydrometeorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment — 1978-1979. (1981)
- No. 21* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas — Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura — 1978-1979. (1981)

- No. 22* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas — Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura — 1978-1979. (1981)
- No. 23* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas — Applicability of trophic state-indices for lakes — 1978-1979. (1981)
- No. 24* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas — Quantitative analysis of eutrophication effects on man's utilization of lake water resources — 1978-1979. (1981)
- No. 25* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas — Growth characteristics of blue-green-algae, *microcystis* — 1978-1979. (1981)
- No. 26* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas — Determination of argal growth potential by algal assay procedure — 1978-1979. (1981)
- No. 27* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas — Summary of Researches — 1978-1979. (1981)
- No. 28* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants — Progress report in 1979-1980. (1981)
- No. 29 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
 Par 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
 Par 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
- No. 30* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment — Progress report in 1979-1980. (1982)
- No. 31* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants — Research report in 1980. (1981)
- No. 32* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system — Progress report in 1979 — Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 1). (1982)
- No. 33* Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region — *Simulation of atmospheric motions and diffusion processes* — Progress report in 1980. (1982)
- No. 34* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution — Research report in 1980. (1982)
- No. 35* Comprehensive evaluation of environmental impacts of road and traffic. (1982)
- No. 36* Studies on the method for long term environmental monitoring — Progress report in 1980-1981. (1982)
- No. 37* Study on supporting technology for systems analysis of environmental policy. (1982)
- No. 38 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)
- No. 39* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution — Research report in 1981. (1983)
- No. 40* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants—Research report in 1981. (1983)

* in Japanese

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

No. 40

国立公害研究所研究報告 第40号

(R-40-'83)

昭和58年3月30日発行

編集 国立公害研究所編集委員会
発行 環境庁国立公害研究所

茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

印刷 前田印刷株式会社東京支店
東京都新宿区新小川町2-10

Published by the National Institute for Environmental Studies
Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
March, 1983