

Research Report from the National Institute for Environmental Studies, Japan, No. 115, 1988.

国立公害研究所研究報告 第115号

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

Experimental Studies on the Effects of Gaseous Air Pollutants in Combination on Animals

昭和57～61年度 特別研究総合報告

Final Report in 1982~1986

環境庁 国立公害研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「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」

(期間：昭和57～61年度)

特別研究責任者：久保田憲太郎* (昭和57～60年度)

：村上正孝 (昭和61年度)

特別研究幹事：三浦 卓・嵯峨井勝

報告書編集担当：嵯峨井勝・鈴木 明・米元純三・持立克身(幹事)

(*昭和61年3月退任)

序

本報告書は国立公害研究所において実施された大気汚染物質の健康影響に関する特別研究「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」(昭和57年度から61年度)の5年間の研究成果の最終報告書である。この特別研究は動物実験であるが、得られた成果はヒトへの影響を予測するための基礎的資料になると考えられる。

従来の比較的高濃度の硫黄酸化物や粉じんによる環境汚染は、我が国ではこれまでに各関係者の努力により、改善されてきている。しかし、近年の都市部における大気汚染は、窒素酸化物、光化学オキシダント及び粒子状物質などを主体とする複合汚染が主であり、今日もなお、これらの汚染状況は必ずしも改善されたとは言えず、健康への影響が危惧されている。そこで大気汚染物質による生体影響を動物実験により明らかにすることは、健康への影響を評価するために不可欠である。

前回の特別研究「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」(昭和52年度から56年度)においては、二酸化窒素(NO_2)の慢性影響を中心に影響指標の検索を行い、二酸化窒素の環境基準に係るクライテリアの検討に必要な資料を提供した。その成果は国立公害研究所研究報告第8号、同第15号、同第31号、同第40号として既に公表されている。今回の特別研究は、この研究の延長線上に位置づけられる。本特別研究においては、ガス状大気汚染物質の複合化によって影響の作用様式及び発現の機序がどのように変化するかを明らかにすることを目的として、環境基準レベルを含む二酸化窒素とオゾンの複合ガスの慢性影響、及び亜急性影響に関する研究を行った。本研究において得られた知見は、中間報告として国立公害研究所研究報告第101号として既に公表しているので、前回の報告と合わせて読んでいただければ幸いである。

前回及び今回の特別研究においてラットの生涯ガス暴露実験を4回行ったが、感染事故などのトラブルもなく遂行された。これは、きわめて信頼性の高い動物飼育管理とガス暴露制御技術に基づくものであることを特記すべきであろう。

本研究の成果は当研究員のみによるものでなく、客員研究員をはじめとして多くの方々の御指導、御助言によるところが大きい。ここにこれらの方々に深く感謝するものである。

大気汚染による生体影響の評価研究に対する行政的ニーズは高く、当研究所では今後も引き続き、重点的にこの分野の研究を遂行し、科学的知見を集積してゆく必要があると考えている。

この研究報告と今後の研究活動に対して、なお一層のご批判、ご指導等をお寄せ頂ければ幸いである。

昭和63年3月

国立公害研究所
所長 江上 信雄

目 次

Abstract	1
I. 研究の概要と展望	3
村上正孝	
II. 報 文	
1. 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 I. 第2回目実験の暴露チャンバーの環境制御	41
清水 明・松本 茂・伊藤勇三・山元昭二・高橋慎二・高橋 弘	
2. 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 II. 第2回目実験の供試動物の飼育経過	49
伊藤勇三・高橋慎司・山元昭二・清水 明・高橋 弘	
3. 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 III. 病理形態学所見	61
村上正孝・河越昭子・米元純三	
4. 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 IV. 電顕形態計測所見	75
米元純三・河越昭子・村上正孝	
5. 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 V. 呼吸機能に及ぼす影響	85
鈴木 明・清水 明	
6. 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 VI. 脂質過酸化障害と抗酸化性防御系因子の変化	91
嵯峨井勝・市瀬孝道	
7. 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 VII. 肺, 血清及び尿中のコラーゲン代謝関連因子の変化	103
市瀬孝道・嵯峨井勝	
8. 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 VIII. 臓器の生体膜成分に及ぼす影響	117
高橋勇二・三浦 卓・持立克身・国本 学	

9. 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 IX. 肺胞マクロファージに及ぼす影響	127
持立克身・三浦 卓	
10. 二酸化窒素とオゾンの複合暴露が免疫機能に及ぼす影響	133
藤巻秀和	
11. ラット肺の異物代謝系に及ぼす二酸化窒素とオゾンの複合亜急性暴露の影響	139
高橋勇二・三浦 卓	
12. 二酸化窒素とオゾンの単独及び複合暴露によるラットとモルモットの肺の 過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化	151
市瀬孝道・嵯峨井勝	
13. 二酸化窒素とオゾンの複合暴露によるラット肺のグルタチオン合成系 酵素活性及びグルタチオン含量の変化	163
河田明治・高橋勇二・三浦 卓	
14. 老齡ラットに及ぼす二酸化窒素とオゾンの影響 I. Ht 値と臓器重量の変化	169
三浦 卓・高橋勇二・国本 学・持立克身・河田明治・彼谷邦光 野原恵子・伊藤勇三・高橋 弘	
15. 老齡ラットに及ぼす二酸化窒素とオゾンの影響 II. 肺異物代謝系の変化	177
高橋勇二・三浦 卓	
16. 老齡ラットに及ぼす二酸化窒素とオゾンの影響 III. 肝臓と腎臓の生体膜成分の変化	187
三浦 卓・高橋勇二	
17. オゾン暴露がモルモット気管平滑筋の自発性収縮並びにヒスタミンに 対する反応性に及ぼす影響	197
山根一祐・小林隆弘	
18. オゾン暴露がマウス肺ヒスタミン放出に及ぼす影響	205
足川哲夫・本多芳男・藤巻秀和・村上正孝	
19. オゾン暴露によるマウス線維肉腫 NR-FS 細胞の肺転移の促進	211
小林隆弘・轟 健・佐藤浩明	
20. オゾン暴露による肺胞マクロファージの代謝の活性化と細胞数の増加	219
持立克身・三浦 卓	
21. 肺胞マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響 I.	231
持立克身・三浦 卓	

22. 肺胞マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響 II. 老化に伴う傷害の増大	245
持立克身・三浦 卓	
23. 実験小動物の呼吸機能測定用高速デジタルリニアライザーの開発	253
清水 明・鈴木 明	
24. ラット肺遊離ドリコール定量法の改良	259
野原恵子・河田明治・彼谷邦光	

CONTENTS

Abstract	1
I. Outline of Performed Researches and Prospects	3
M. MURAKAMI	
II. Original Papers	
1. Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats I. Results of Environment Control in the 2nd Experiment	41
A. SHIMIZU, S. MATSUMOTO, Y. ITO, S. YAMAMOTO, S. TAKAHASHI and H. TAKAHASHI	
2. Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats II. Experimental Animals Supplied to the 2nd Experiment	49
Y. ITO, S. TAKAHASHI, S. YAMAMOTO, A. SHIMIZU and H. TAKAHASHI	
3. Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats III. Morphological Observation	61
M. MURAKAMI, A. KAWAGOE and J. YONEMOTO	
4. Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats IV. Electronmicroscopic Morphometry	75
J. YONEMOTO, A. KAWAGOE and M. MURAKAMI	
5. Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats V. On the Pulmonary Function	85
A. K. SUZUKI and A. SHIMIZU	
6. Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats VI. Formation of Lipid Peroxides and the Changes of Antioxidative Protective Systems in Lungs	91
M. SAGAI and T. ICHINOSE	
7. Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats VII. Changes of Collagen Metabolism-Related Factors Lungs, Serum and Urine	103
T. ICHINOSE and M. SAGAI	
8. Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats VIII. Changes in Membranous Components of Rat Tissues	117
Y. TAKAHASHI, T. MIURA, K. MOCHITATE and M. KUNIMOTO	

9. Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats IX Effects on Alveolar Macrophages	127
K. MOCHITATE and T. MIURA	
10. Effects of Subacute Exposure to Combined Gases of Nitrogen Dioxide and Ozone on Immune Responses in Mice	133
H. FUJIMAKI	
11. Effects of Subacute Exposures to Nitrogen Dioxide and Ozone, Alone and in Combination, on Xenobiotic Metabolism of Rat Lungs	139
Y. TAKAHASHI and T. MIURA	
12. Changes of Lipid Peroxidation and Antioxidative Protective Systems in Lungs of Rats and Guinea Pigs Exposed to Nitrogen Dioxide, Ozene and their Combined Gases	151
T. ICHINOSE and M. SAGAI	
13. Effects of Exposures to Nitrogen Dioxide and Ozone in Combination on the Activities of the Glutathione Synthesis Enzymes and on the Levels of Glutathione in Rat Lungs	163
M. KAWATA, Y. TAKAHASHI and T. MIURA	
14. Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on Aged Rats I. Changes in the Ht Values and Tissue Weights	169
T. MIURA, Y. TAKAHASHI, M. KUNIMOTO, K. MOCHITATE, M. KAWATA, K. KAYA, K. NOHARA, Y. ITO and H. TAKAHASHI	
15. Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on Aged Rats II. Changes in Xenobiotic Metabolizing System of Lungs	177
Y. TAKAHASHI and T. MIURA	
16. Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on Aged Rats III. Changes in Membranous Constituents of Liver and Kidney of Rats	187
T. MIURA and Y. TAKAHASHI	
17. Effect of Ozone Exposure on the Inherent Tone and on the Responsibility to Histamine in Guinea Pig Tracheal Smooth Muscle	197
K. YAMANE and T. KOBAYASHI	
18. Effect of Exposure to Ozone on Histamine Release from Lung in Mice	205
T. ASHIKAWA, Y. HONDA, H. FUJIMAKI and M. MURAKAMI	
19. Enhancement of Pulmonary Metastasis of Murine Fibrosarcoma NR-FS by Ozone Exposure	211
T. KOBAYASHI, T. TODOROKI and H. SATO	

20. Metabolic Enhancement and Increase of Alveolar Macrophages Induced by Ozone	219
K. MOCHITATE and T. MIURA	
21. Effects of Ozone on Cytokilling Activities of Alveolar Macrophages I.	231
K. MOCHITATE and T. MIURA	
22. Effects of Ozone on Cytokilling Activities of Alveolar Macrophages II. Amplification of Damage to Bacteriocidal Activities by Aging	245
K. MOCHITATE and T. MIURA	
23. A Development of Digital Linearlyzer for Measurement of Pulmonary Function in Rats	253
A. SHIMIZU and A. K. SUZUKI	
24. An Improved Method for the Quantitative and Qualitative Determination of Free Dolichols in Rat Lung	259
K. NOHARA, M. KAWATA and K. KAYA	

Abstract

Primary objectives of this research project were to examine whether and how biological effects of NO₂ or O₃ are altered by combined exposures to these gases. In order to clarify these objectives, rats were exposed to 0.05 ppm O₃ alone and in combination with 0.04 ppm NO₂ or 0.4 ppm NO₂ for up to 22 months. Acute and subacute exposure experiments were also conducted to assess the results obtained by chronic exposures. The following studies were performed in this research project.

1) Effects on the gaseous exchange in pulmonary system, 2) Effects on the neural function related to respiratory tract, 3) Effects on the immune responses relevant to humoral and cellular immunity, 4) Morphological effects on lungs examined by light and electron microscopy, 5) Effects on the microsomal xenobiotic metabolizing systems in lungs, liver and kidney, 6) Effects on lipid peroxidation and the related factors in lungs of various species of animals, 7) Effects on the metabolism of prostaglandins in lungs and other organs, 8) Effects on the amino acids and peptides containing sulfhydryl groups in lungs, 9) Cytogenotoxic effects estimated by sister-chromatid exchange, 10) Effects on red blood cells and the cytotoxic activities of alveolar macrophages.

Major results obtained by chronic exposures are as follows :

Morphological changes, such as enlargement and proliferation of the bronchiolar epithelial cells, were observed much earlier by exposure to 0.4 ppm NO₂ and 0.05 ppm O₃ in combination than by exposure to 0.4 ppm NO₂ alone. However, the extent of these morphological changes was not markedly affected by the addition of O₃ to NO₂.

The combined exposure to NO₂ and O₃ altered the change in the partial pressure of arterial gases caused by NO₂ alone. The decrease in arterial O₂ pressure was observed during exposures to NO₂ alone and in combination with O₃, and furthermore, the increase in arterial CO₂ pressure was observed during exposures to combined gases.

The cytotoxic activities of alveolar macrophages, especially against *Candida albicans* decreased more profoundly in rats exposed to combined gases than in those exposed to O₃ alone. As for the immune responses, subacute exposure of mice to combined gases caused a severe reduction in the wet weights of spleen and thymus, a decrease in the anti-OA IgE antibody production, and a suppression of the delayed hypersensitivity reaction in comparison with those caused by exposures to NO₂ and O₃ alone.

The microsomal xenobiotic metabolizing activities in the rat lungs were induced by O₃ while reduced by NO₂, and were not changed by exposures to combined gases, suggesting that NO₂ and O₃ affect the xenobiotic metabolizing systems independently and additively.

In conclusion, exposures to combined gases, NO₂ and O₃, augmented the effects of NO₂ and O₃ alone with regard to the changes in lung morphology, gaseous exchange, cytotoxic activities of alveolar macrophages, immune responses, and xenobiotic metabolizing system in the lung, which are all vital to health. However, careful considerations are needed for assessing the combined effects of NO₂ and O₃, because, for instance, the marked species differences were observed in the response of lipid peroxidation of experimental animals to the combined gases.

Key words : nitrogen dioxide, ozone, exposure in combination, rat, mouse, hamster, guinea pig, rabbit, lung, red blood cells, alveolar cells, tissue organella, physiology, pneumovascular function, neural function, bronchial epithelium, electron-microscopic morphometry, alveolar wall, collagen fiber, immunology, cytogenotoxicity, metabolic functions, proliferative responses, aging, ether-phospholipid, microsomal xenobiotic-metabolism, microsomal electron-transport system, cytochrome P-450, dolichol, lipid peroxides, Vitamin E, glutathione, phospholipids, fatty acid composition, polyunsaturated fatty acid, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, peroxidizability index, prostaglandin, prostaglandin I₂, thromboxane B₂, arachidonic acid, 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase, alveolar lavage, γ -glutamylcysteine synthetase, glutathione synthetase, alveolar macrophage, active oxygen, cytokilling activity, glycolytic enzymes, DNA synthesis.

I

研究の概要と展望

Outline of Performed Researches and Future Prospects

村上正孝

Masataka MURAKAMI

1 研究の目的と意義

近年の大気汚染の特徴は、従来の硫黄酸化物や降下媒じんによる汚染が大幅に減少した一方で、市街地及び幹線道路沿道を中心とした地域においては、窒素酸化物、光化学オキシダント、炭化水素、及び粒子状物質を主体とする複合汚染が進行し、その地域が広がりつつあることである。今日もなお、これらの大気汚染物質による汚染状況は必ずしも改善されたとは言えず、大気汚染物質の複合効果による人の健康への影響が危惧されている。このような状況下で、低濃度で存在する多数の汚染物質による人の健康への影響を明らかにする研究は、益々その重要性を増していると言えよう。大気汚染物質による健康への影響を解明する研究の方法としては、地域住民を対象にした疫学的研究と実験動物を用いて行う実験的研究がある。本特別研究「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」では、後者の立場から研究を行った。

前回の特別研究「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」(昭和52年度から56年度)においては、二酸化窒素(NO_2)の慢性影響(脚注1参照)を中心課題に据えて、生理学的、病理学的、生化学的及び免疫学的見地から系統的及び総合的に影響の検索を行い、 NO_2 の環境基準に係るクライテリアの検討に必要な資料の提供を行った。本特別研究においては、ガス状大気汚染物質の複合化によって影響の作用様式及び発現の機序がどのように変化するかを明らかにすることを目的として、環境基準レベルを含む二酸化窒素(NO_2)とオゾン(O_3)の複合ガスの慢性影響、及び亜急性影響に関する研究を行った。

2 研究課題と研究組織

本研究は、環境生理部と技術部(動物実験施設管理室)との共同研究で、昭和57年より5か年計画で開始された。本特別研究では、低濃度 $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 複合生涯暴露実験(脚注2参照)を中心課

脚注1: NO_2 長期暴露実験は、0.04, 0.40, 及び4.0ppmの三段階の濃度の NO_2 ガスをラットに連続暴露して行った。

脚注2: $\text{O}_3 + \text{NO}_2$ 複合長期暴露実験は、 NO_2 を混合しない O_3 のみの暴露群(G1群)、あるいは0.04ppm及び0.40ppm NO_2 を O_3 と混合した暴露群(G2及びG3群)の三種類の方法で行った。 O_3 の暴露方法は、午後1時に最大0.10ppm、その間の平均値が0.05ppmになる様に、午前9時から午後5時まで O_3 濃度を正弦曲線に沿ってプログラム制御で変化させた。 NO_2 は、連続暴露とした。

題の一つとし、ここで得られた影響の生物学的意味を理解するために、もう一つの中心課題として急性及び亜急性複合暴露実験を行った。このため本研究では、次の9の研究課題を設けた。

- 1) 呼吸生理学的研究
- 2) 神経機能に関する電気生理学的研究
- 3) 免疫反応に及ぼす影響の解明に関する研究
- 4) 病理学的研究
- 5) 細胞内顆粒成分に及ぼす影響に関する生化学的研究
- 6) 脂質過酸化障害と抗酸化性生体防御機構の変化に関する生化学的研究
- 7) 各種臓器におけるプロスタグランジン合成及び代謝に関する研究
- 8) アミノ酸及びペプチド等に及ぼす影響に関する研究
- 9) NO₂ と O₃ の低濃度混合ガスの慢性暴露実験

研究課題9)及びそれに関連する成果を研究課題1)～8)から抜粋し、「研究の概要」にまとめた。研究課題1)～8)の詳細な成果は、後述の小括に示した。この際、研究課題9)の成果を関連する他の研究課題1)～8)に分割して記述し、結果に対する生物学的意味の理解を図った。また、研究課題4)及び5)の中で、細胞に対する影響を抜粋し、新たに設けた9)及び10)項目にその結果を記述した。

本特別研究に参加した人員は、国立公害研究所・環境生理部及び技術部動物実験施設管理室と生物施設管理室の26名(表1)、及び以下の客員研究員と共同研究員である(表2)。

表 1 研 究 組 織

特別研究責任者	環境生理部長	久保田憲太郎 (昭和57～60年度) 村上 正孝 (昭和61年度)
環境生理部		
環境生理研究室	河田明治, 鈴木 明, 局 博一, 野原恵子	
環境病理研究室	彼谷邦光, 米元純三, 白石不二雄, 藤巻秀和, 河越昭子	
環境生化学研究室	三浦 卓, 持立克身, 国本 学, 高橋勇二	
慢性毒性研究室	嵯峨井勝, 小林隆弘, 市瀬孝道, 山根一祐, 佐野友春	
技術部		
動物実験施設管理室	高橋 弘, 高橋慎司, 清水 明, 山元昭二, 伊藤勇三	
生物施設管理室	松本 茂	

表 2 客員研究員及び共同研究員

客員研究員	足立 達	(東北大学農学部)		
	戎野 棟一	(東邦大学理学部)		
	大橋 昌子	(お茶の水女子大学生活環境センター)		
	京野 洋子	(産業医学総合研究所)		
	草野 忠治	(筑波大学農林学類)		
	小泉 明	(東京大学医学部)		
	後藤佐多良	(東邦大学理学部)		
	佐藤 了	(大阪大学蛋白質研究所)		
	沢崎 担	(東京大学農学部)		
	清水不二雄	(新潟大学医学部)		
	志賀 健	(愛媛大学医学部)		
	下条 信弘	(筑波大学社会医学系)		
	菅野 茂	(東京大学農学部)		
	帯刀 益男	(東京大学薬学部)		
	常俊 義三	(宮崎医科大学)		
	轟 健	(筑波大学臨床医学系)		
	野沢 義則	(岐阜大学医学部)		
	中島 泰知	(香川医科大学)		
	名取 俊二	(東京大学薬学部)		
	長谷川 鎮雄	(筑波大学臨床医学系)		
	藤井 良三	(東邦大学理学部)		
	本多 芳男	(慈恵会医科大学)		
	水島 昭二	(名古屋大学農学部)		
	矢尾板英夫	(自治医科大学)		
	山口 誠哉	(筑波大学社会医学系)		
	横山 栄二	(国立公衆衛生院)		
	吉田 克己	(三重大学医学部)	(以上アイウエオ順)	
	共同研究員	今井 透	(慈恵会医科大学)	(昭和57年度)
		大住 拓美	(日本女子大学家政学部)	(昭和57年度)
		辻井 直樹	(筑波大学大学院環境科学研究科)	(昭和57年度)
		原口 裕文	(筑波大学大学院環境科学研究科)	(昭和57年度)
内田 義之		(筑波大学大学院医学研究科)	(昭和57～58年度)	
佐藤 浩明		(東邦大学理学部)	(昭和57～58年度)	
矢野 友啓		(筑波大学大学院環境科学研究科)	(昭和57～58年度)	
小沢 仁		(慈恵会医科大学)	(昭和57～59年度)	
飯塚ゆかり		(日本女子大学家政学部)	(昭和58年度)	
夏目 徹		(筑波大学生物農林学系)	(昭和58年度)	
荒川 健二		(筑波大学大学院環境科学研究科)	(昭和58～59年度)	
前川 佳子		(東邦大学理学部)	(昭和58～59年度)	
足川 哲夫		(慈恵会医科大学)	(昭和59～60年度)	
石田 邦彦		(筑波大学大学院環境科学研究科)	(昭和59～60年度)	
梅津 豊司		(筑波大学大学院環境科学研究科)	(昭和59～60年度)	
近藤 一子		(東邦大学理学部)	(昭和59～60年度)	
井上 忠弘		(筑波大学大学院医科学研究科)	(昭和60～61年度)	
平良 淳誠		(筑波大学大学院環境科学研究科)	(昭和60～61年度)	
平山 伸		(筑波大学大学院環境科学研究科)	(昭和60～61年度)	

3 研究の概要

3.1 病理学的変化

低濃度 NO₂+O₃ 複合長期暴露による肺の病理学的変化の程度は、観察する部位によって異なり、気管支上皮においては軽度であり、遠位の肺胞においてはより軽度であった。また、NO₂ 単独長期暴露によって引き起こされた変化と質的な差異は認められず、肺の気腫性変化も同様に認められなかった。光学顕微鏡による中等大気管支から肺胞道にかけての観察では、18 か月以降に G3 群で細気管支を中心とした上皮の肥大と増生が認められた。その変化の程度は、前回の NO₂ 単独長期暴露の結果と比較すると、0.4 ppm NO₂ の場合よりは大きい、4 ppm NO₂ によって生じた定型的病変までには至らなかった。したがって、G3 群での変化は、気管支上皮の反応性の上昇の結果とみなされる。G2 群での変化は軽微であるが、G3 群の変化と同様の傾向を認めた。光学顕微鏡で観察の困難な肺胞壁の変化については、比較的均質な構造を持った末梢の肺胞について、電子顕微鏡による形態計測の手法を用いて定量的な評価を行った。その結果、暴露 2~4 か月目で肺胞壁厚の増加が認められた。しかしその後、9~18 か月では不明瞭になり、22 か月目には再び肺胞壁厚の増加と更に間質におけるコラーゲン線維の増加を認めた。この一連の変化は、2~4 か月目での初期反応とその修復、9~18 か月でのそれに引き続く変化、及び 18~22 か月目での間質の線維化傾向にみられる加齢による修飾など、いくつかの相に分けて理解することができる。肺胞における変化の程度は、G3 群でも 4 ppm NO₂ 単独長期暴露によって生じた病変までには至らなかった。

今回の複合長期暴露実験の結果を NO₂ 単独長期暴露実験の結果と比較すると、低濃度 O₃ との複合によって、気管支上皮の反応性は一層強まると結論できる。すなわち、光学顕微鏡による観察では複合暴露 18 か月目で、細気管支上皮の肥大と増生を示す個体の頻度が NO₂ 単独暴露の場合に比べて高くなった。他方、末梢の算術平均肺胞壁厚は、18 か月目では複合暴露と NO₂ 単独暴露との間に差は認められなかった。しかし、複合暴露 4 か月に肺胞壁厚が増加を示したことから、前回の NO₂ 単独暴露実験では 9 か月目以前の検索が行われていないため比較はできないが、肺胞上皮はより速やかに複合ガスに反応している可能性がある。

22 か月目で認められた肺胞壁間質の線維化傾向は、長期間の低濃度暴露によって軽微ではあるが蓄積性的変化がゆっくり進行し、加齢という修飾因子が加わったときに顕在化してきたものと解釈される。今後、生体側の反応を修飾する因子として加齢の影響はますます重要な研究課題と考えられる。

3.2 肺の線維化と気腫性変化

肺気腫は「肺胞壁の破壊的变化に伴い、呼吸細気管支以下の気腔の異常拡張を特徴とする解剖学的変化」と定義されている。病理学的検索によれば、今回の低濃度複合長期暴露実験でも、前回の低濃度 NO₂ 単独長期暴露実験と同様に、気腫性変化は認められず、肺の線維化傾向のみが再

現性良く認められた。また生化学的にも、前回の NO₂ 単独長期暴露の場合と同様にコラーゲンの架橋を促進すると考えられているモノアミンオキシダーゼ活性が、暴露時間の延長とともに次第に上昇し、形態学的に肺胞の線維化傾向が認められた 18~22 か月には有意に増加した。これらの結果は、前回及び今回の長期暴露実験と同程度の濃度の NO₂ で肺に気腫性変化が生ずるといふこれまでの報告とは異なる。

これまでの疫学調査によれば、都市においては肺気腫を示す症例が他の地域より多いことが知られている。しかしながら、我々のラットを用いた実験では、低濃度 NO₂ 単独及び O₃ との複合長期暴露によって肺の気腫性変化が生ずる知見は得られなかった。この理由としては、原因となる大気汚染物質が他に存在することが考えられる。この点では、影響の作用様式が異なると予想される粒子状物質、炭化水素、あるいは光化学反応生成物による影響の検索、及びこれらの物質も含めた広範な範囲での複合効果について今後とも検討が必要であろう。

3.3 呼吸生理学的変化

これまで、NO₂ や O₃ のような大気汚染ガスは、比較的低濃度でも長期間の暴露によって呼吸機能の低下をきたすことが報告されている。我々も前回の低濃度 NO₂ 長期暴露実験において、肺におけるガス交換機能が低下し、低酸素血症が引き起こされることを報告した。今回の低濃度 NO₂ 及び O₃ 複合長期暴露実験においては、肺におけるガス交換機能の低下、及び低酸素血症に加えて高炭酸血症も引き起こされることを明らかにした。さらに両ガスの複合化によって、これらの症状が悪化することを見いだした。

低酸素血症及び高炭酸血症の原因としては、気管支壁の肥厚による気道狭窄、肺胞壁肥厚や間質の増加によるガス交換面積の減少などの形態学的変化、換気能やガス交換能の低下等の呼吸機能の変化、及び循環機能の変化が考えられる。長期暴露の病理学的所見によれば、細気管支上皮の増生及び肺胞壁の間質の組成の変化は軽度であった。したがって、形態学的変化は低酸素血症及び高炭酸血症の一因ではあるが、主因とは判断し難い。他の要因としては、各組織における呼吸代謝の亢進、すなわち酸素消費の増加が低酸素血症及び高炭酸血症を引き起こすことが考えられる。そして、低酸素血症及び高炭酸血症がさらに呼吸機能の変調を起し、肺におけるガス交換を一層低下させている可能性がある。これまでの知見によれば、ガス暴露の初期には、呼吸数や心拍数の増加によって血液中の酸素濃度や炭酸ガス濃度を一定に保とうとする調節作用が働くが、数か月以上の暴露では、ヘモグロビンや赤血球数の増加などの代償作用が働いて、生体は恒常性を維持すると考えられている(図 1)。本研究でも、4~18 か月目には調節機能や代償作用が働いていることを認めている。しかし、本研究の結果は同時に、これらの調節機能や代償作用を働かせても、なお低酸素血症と高炭酸血症は解消できないことを示している。また、22 か月以上の長期暴露では、動物の老化に伴う代償作用の低下が推察されるので、このため複合ガス暴露の影響がより強くなる可能性がある。低濃度複合長期暴露による低酸素血症及び高炭酸血症は、組織や臓器の低酸素状態を誘引し、

種々の臓器で呼吸代謝の異常を起こす可能性があること、さらに呼吸筋及び呼吸中枢の機能あるいは循環機能などを低下させ、種々の呼吸器系疾患及び循環器系疾患を増悪させる可能性があると考えられる。

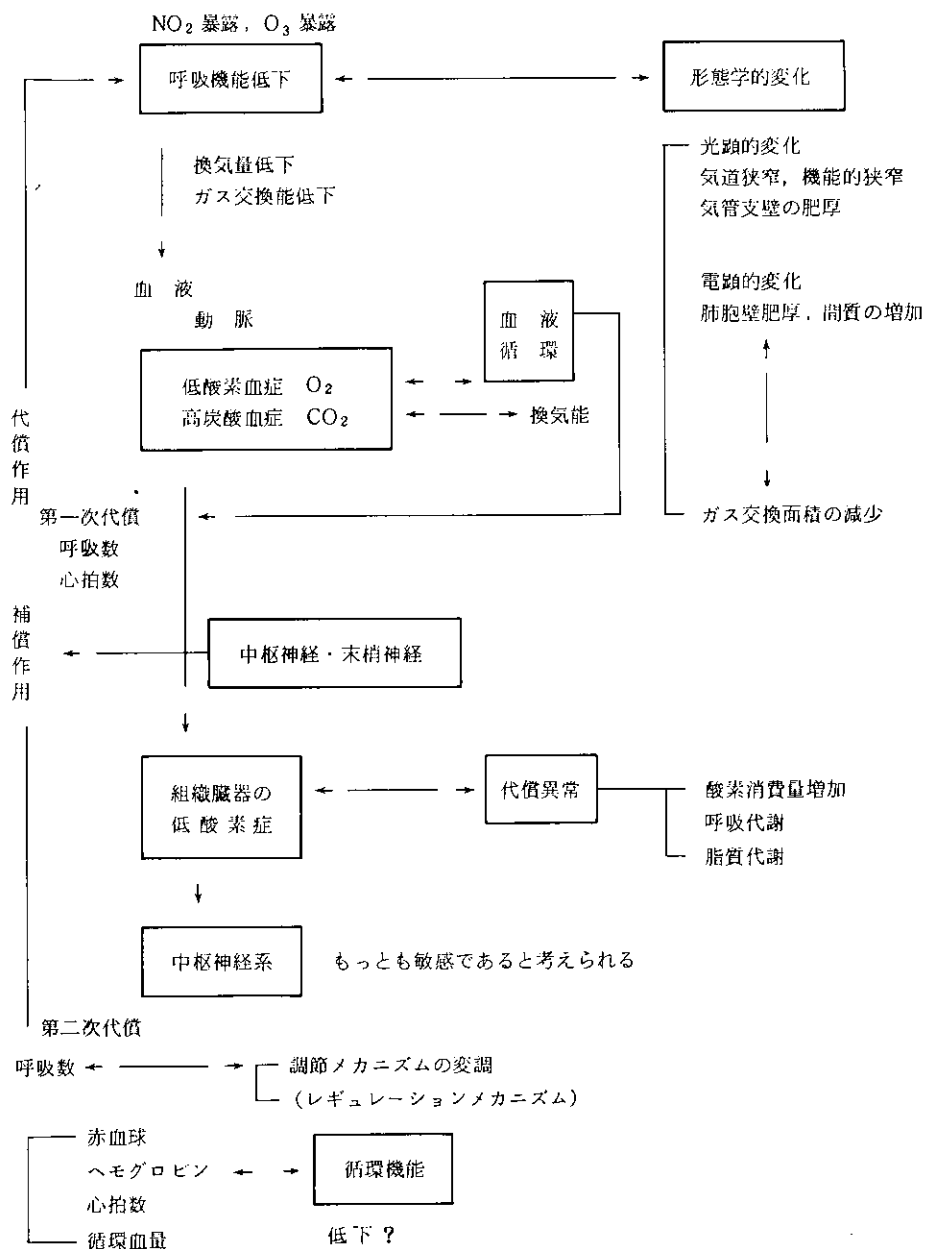


図 1 呼吸機能の変化に及ぼす種々の因子の関連を示す模式図

3.4 気道過敏性の上昇及び気道反応性の亢進

気管支ぜん息は、気道が種々の化学的あるいは物理的刺激等に過敏に反応して気道の閉塞をきたす疾患の一つである。この気道過敏性は、アレルギー素因がある場合に現れやすいことが知られている。また、各種の大気汚染物質も一過性ではあるが、ぜん息時にみられる気道過敏性と類似の状態を引き起こすことが明らかになっている。本研究においては、呼吸器を含む種々の器官に大きな影響を及ぼす生理活性物質であるプロスタグランジン (PG) の生合成とその代謝、及び呼吸気道における神経受容器の活動が NO_2 や O_3 暴露によってどの様な影響を受けるかを検索し、大気汚染物質による気道過敏性に対して PG 及び神経受容器の活動が果たす役割について検討した。

気管の平滑筋を弛緩させる作用を持つプロスタサイクリン (PGI_2) の肺における生合成は、10 ppm NO_2 あるいは 0.4~0.8 ppm O_3 急性暴露で低下した。一方、気管支平滑筋の収縮作用を示すトロンボキサン A_2 (TXA_2) 及びロイコトリエン C_4 (LTC_4) は、肺で増加した。この結果は、 NO_2 や O_3 によって PG の代謝が変化して、気道の弛緩の平衡が収縮方向にずれることにより、気道の過敏性が誘発されることを示唆している。

気道上皮に対する化学的及び機械的刺激を感知し、気管支収縮や呼吸数増加等の変化をもたらす肺刺激受容器の自発活動は、0.4~0.8 ppm O_3 急性暴露で増加した。また、気管支や肺胞壁に分布し、それらの部位の炎症や水腫性変化によって刺激され、呼吸異常と循環機能の低下を引き起こす C 線維の反射活動は、4~10 ppm NO_2 急性暴露で高まった。以上の結果から、これらの濃度レベルの NO_2 や O_3 による肺刺激受容器及び C 線維の活動の亢進は、呼吸困難等をもたらす原因になり得ることを示唆している。以上の結果は、これらの濃度レベル以上の NO_2 や O_3 は、気道の過敏性あるいは反応性の亢進を引き起こし得ることを示唆する。

3.5 薬物代謝系への影響

これまで O_3 及び NO_2 は、生体に類似の作用を及ぼす酸化性ガスと考えられてきた。しかしながら O_3 及び NO_2 は、肺のミクロソームの薬物代謝系に相反する影響を及ぼすことが本研究で明らかになった。これまで、肺の薬物代謝に関与するチトクロム P-450 の含量及び 7-エトキシマリン脱エチル化活性等の薬物代謝活性は、 NO_2 急性及び亜急性暴露によって低下することを明らかにした。本研究では、肺のチトクロム P-450 の含量及び 7-エトキシマリン脱エチル化活性等の薬物代謝活性は、 O_3 急性及び亜急性暴露によってむしろ増加することが明らかになった。 NO_2 及び O_3 の混合暴露の場合は、肺における薬物代謝の NO_2 暴露による活性低下の程度は軽減され、あるいは O_3 暴露による活性増加の程度も軽減される結果となった。この理由としては、 NO_2 及び O_3 が各々独立して肺ミクロソームの薬物代謝系に作用したため、現象的には互いに相殺する結果になったと考えられる。これと類似の現象は、低濃度 $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 複合長期暴露においても認められた。 O_3 のみの G1 群では、9 か月目にチトクロム P-450 含量が増加、22 か月目にクマリン

水酸化活性及びベンズフェタミン脱メチル化活性は増加したが、G1暴露条件にNO₂を混合したG3暴露群では、これらの薬物代謝活性は増加しなかった。また、実験に用いたラットの老化に伴い、薬物代謝活性のNO₂暴露による低下、あるいはO₃暴露による増加の程度は更に増大したことから、ガスに対する感受性は、老化に伴い増大していることが示された。このことから複合長期暴露において、より低濃度のNO₂及びO₃によってチトクロムP-450含量及び薬物代謝活性が変化したのは、老化に伴いガスに対する感受性が増大したのがその一因と考えられる。

さて肺においては、細気管支上皮のクララ細胞及び肺胞上皮のII型細胞が、チトクロムP-450含量が多く高い薬物代謝活性を示すことから、薬物代謝を最も活発に行っている細胞であり、肺に侵入してきた化学物質を代謝するのに関与すると推測されている。したがって、病理学的検索結果を考慮すると、O₃暴露による肺のチトクロムP-450含量の増加及び薬物代謝活性の亢進は、両細胞の増生あるいは代謝の活性化を反映していると考えられる。NO₂暴露の場合は、ヘムタンパクがNO₂もしくはNO_x⁻に対して不安定なため、両細胞の増加にもかかわらずチトクロムP-450含量が減少し、薬物の代謝活性が低下したと考えられる。肺の異物代謝機能によって、発ガン物質が無害化されると同時に、時には化学物質が発ガン物質に変化することから、大気中に存在する化学物質による発ガンへの影響を予測するために、大気汚染物質による肺の薬物代謝系の変化は重要な基礎資料となると考えられる。

3.6 感染抵抗性

本研究において、免疫反応に関与するリンパ球及び肺胞マクロファージは、NO₂あるいはO₃暴露によって傷害を受けること、及び回復した場合でも再び傷害を受けやすいことが明らかになった。暴露初期には、胸腺、脾臓や末梢血中のリンパ球数及び肺胞マクロファージの細胞数は減少し、更に機能の点でも、リンパ球の抗体産生能及び肺胞マクロファージの殺菌能は低下した。その後各臓器及び末梢血中のリンパ球数は、清浄空気を吸入させた対照群と同レベルに回復し、抗体産生能も徐々に回復した。しかし、更に暴露を継続すると再びリンパ球の細胞数は減少し、抗体産生活性も低下した。また、リンパ球の幼若化を抑制するプロスタグランジンD₂合成活性は、NO₂及びO₃急性暴露によって脾臓及び胸腺で亢進した。これらのことは、NO₂及びO₃暴露によってリンパ球の抗体産生能は傷害を受けることを示唆している。肺胞マクロファージでは、DNA合成の亢進後に小形の細胞が増加し、抗酸化系や解糖系の酵素活性が増加したことから、若いマクロファージとの交替促進及び抗酸化系及び解糖系代謝の亢進によって、これら酸化性ガスによる負荷に対して適応しているようにみえる。しかし殺菌能は、暴露初期には指標に用いたすべての微生物で減少し、その後も微生物の種類によっては回復しなかった。この殺菌能の低下は、低濃度NO₂及びO₃複合暴露22か月目におけるG1~G3のすべての群で、指標に用いた種々の微生物に対して認められた。そして、O₃暴露による肺胞マクロファージの殺菌能低下の程度は、実験に用いたラットの老化によって増大した。したがって、低濃度複合長期暴露によって

殺菌能が低下したのは、実験動物の老化に伴いガスに対する感受性が増大したのがその一因と考えられる。

リンパ球及び肺胞マクロファージは、骨髄の多能性造血幹細胞に由来し、この幹細胞の増殖によって補給されることが知られている。このことは、NO₂ 及び O₃ 暴露による傷害からリンパ球及び肺胞マクロファージが回復するためには、基本的にはこれらの幹細胞の増殖能力に負うところが大きいと推測される。老化に伴い多能性造血幹細胞の増殖能力が低下することが知られている。肺胞マクロファージの殺菌能が NO₂ 及び O₃ 暴露で傷害を受けやすくなったのは、老化に伴う造血幹細胞の増殖能力の低下によって代償能力が低下したためであろう。

3.7 脂質過酸化的傷害

全身の脂質過酸化によりラットの呼気ガス中に放出される各炭化水素の量は、NO₂ 単独長期暴露の場合と比較して複合長期暴露の場合には、最大に増加する時期が 27 か月から 9~13 か月に早まったが、増加の程度に変化は無かった。しかし、TBA 反応によって測定した肺の過酸化脂質量は、O₃ との複合によって最大に増加する時期が 18 か月から 9~13 か月に早まり、かつその程度も相乗的に増加した。他方、脂質過酸化やラジカル生成を抑制するビタミン E 及び C の肺における濃度も、複合長期暴露初期には増加したが、後期にはむしろ低下した。これらのことは、NO₂ と O₃ の複合暴露の影響は NO₂ 単独暴露の場合より早期に現れること、及び、暴露後期には肺の抗酸化性物質が減少し、生体はより強い酸化ストレスを受けていることを示唆している。

3.8 動物種差

本研究では、マウス、ハムスター、ラット、及びモルモットに NO₂ + O₃ を暴露し、肺の過酸化脂質生成、抗酸化性防御因子、及びリン脂質組成の変化を調べた。暴露は、NO₂ あるいは O₃ 単独暴露では、いずれの動物にも顕著な変化が起こらない条件で行った。このような条件下で複合暴露を行った結果、モルモットについてのみ、上記指標に顕著な変化が認められた。ラット及びハムスターでは、複合暴露による影響は認められなかった。このことは、複合暴露についての結論をヒトへの影響について外挿する際には、慎重な配慮が必要であることを示唆している。

3.9 複合影響のまとめ

本研究では、複合暴露による生体への影響を単独暴露の場合と比較し、両者の違いを明らかにするのが主な目的である。複合暴露に用いる物質としては、これまで知見の蓄積がある NO₂ と代表的なオキシダントである O₃ との複合ガスを選んだ。

本研究で明らかになった実験結果の中から、複合影響に関するものを各研究課題ごとに表 3 にまとめた。複合効果には、NO₂ と O₃ の複合によって各々の単独影響が増強される場合(増強)と、影響の程度は単独暴露の場合に比べて同程度であるが、その影響の発現する時期が早められる場

表 3 複合影響のまとめ

研究分野・手法	生体における観察レベル	影響指標	急性・亜急性実験	慢性実験
呼吸生理	個体	血中 PaO ₂ , PaCO ₂	+	+
神経・電気生理	器管・細胞	神経受容器	±	
免疫	個体・器管・細胞	胸線・脾臓湿重量	+	
		免疫反応	+	
		抗体産生能	+	
病理形態	器管・細胞(光顕)	細気管支上皮の肥大・増生		+
	細胞・オルガネラ(電顕)	算術平均肺胞壁厚		±
ミクロソーム異物代謝系	分子	チトクロム P-450 含量	+*	+*
		薬物代謝活性	+*	+*
脂質過酸化	分子	過酸化脂質生成	+	+
プロスタグランジン	分子	PGI ₂ 代謝		-
アミノ酸ペプチド	分子	GSH 代謝	±	
細胞遺伝毒性	染色体	姉妹染色分体交換(SCE)	-	
生体細胞	細胞	マクロファージ殺菌活性		+

+: 複合効果あり; ±: 複合効果不明瞭; -: 複合効果なし; *: 相殺効果

合(早期化)の二通りが認められた。慢性暴露実験を例にとると、前者の例としては、呼吸生理学的研究における血中酸素及び炭酸ガス濃度への影響、肺胞マクロファージの殺菌活性への影響などがあり、後者の例としては、光学顕微鏡観察による病理形態学的変化があげられる。過酸化脂質生成については両方の効果が認められた。ミクロソーム異物代謝系への複合効果は相加的であるが、O₃は促進する方向、逆にNO₂は抑制する方向へ働くため、複合暴露では見かけ上各々の影響が相殺されている。また、呼吸生理学的変化や病理形態学的変化に明らかのように、単独暴露による影響と異なる種類の影響が、複合暴露によって現れることは無かった。急性、亜急性実験の結果については、各実験ごとに濃度、期間が異なり並列的な比較はできない。詳しい暴露結果については各研究課題の小括を参照されたい。

さて、本研究で明らかになった生体に対する各々の影響指標の変化を評価するに当たっては、指標の生物学的意味、及び指標の変化の程度を考慮することが重要である。後者は、正常な生理機能を営む健康な状態から、死に至る幅広いスペクトラムの中の、どのレベルでの影響を見ているかという点で重要である。生体が示す反応の程度については、中公審専門委員会報告のモデルが参考となる(図2)。複合長期暴露実験で観察された影響は、血液ガス性状に関しては、観察された影響が疾病との関連で解釈される前臨床的な段階(図2のDの段階)に属し、他の指標は観察された影響の可逆性が明らかでないか、あるいは生体の恒常性の保持の破綻、疾病への発展については明らかでない段階(図2のCの段階)に属するか、もしくは両段階の境界に位置すると考えられる。急性及び亜急性実験でも、前臨床的な段階を越えることはなかった。

NO₂とO₃との複合暴露は、表3にみられるように常に単独暴露の影響を増強したわけではない。また、急性、亜急性実験でも指標によっては複合効果が認められない場合もあった。しかし、

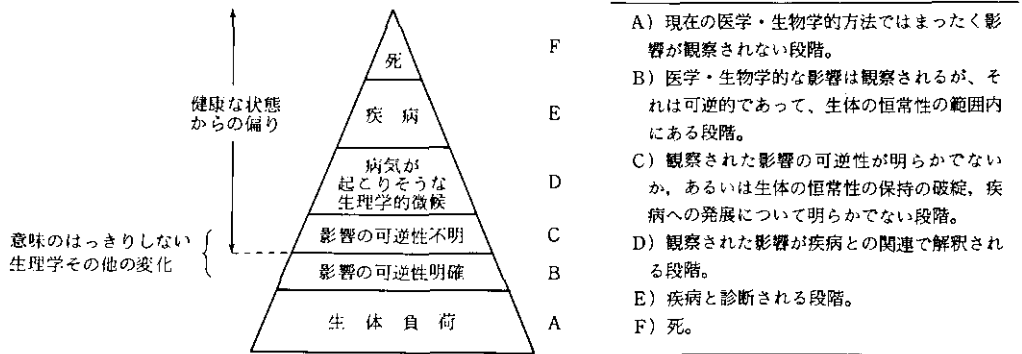


図 2 大気汚染の健康への影響の程度の考え方

(中央公害対策審議会大気部会 NO₂ 判定条件専門委員会報告 (付言) より)

個体全体に対する影響としてみれば、複合影響があったと判断される。さらに、過酸化脂質生成における種差の実験で、ラット、マウス、ハムスター、モルモットのうち、モルモットにだけ強い相乗作用が認められたように、複合効果に種差が存在することから、複合影響については一層慎重な検討が必要である。

4 今後の研究の展望と提言

特別研究「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」を終えるに当たり、本研究での成果を踏まえ、今後必要とされる研究について展望する。

4.1 大気汚染の現状と今後の研究分野

現在の大気汚染は、おおむね化石燃料の燃焼に帰因するものであり、特に幹線道路沿いの窒素酸化物と粒子状物質を主とする局地的複合汚染である。この汚染状態の改善は、いまだ不十分であり、特に粒子状物質の環境基準値達成率は依然として低い状況にある。他方、近年の産業構造の変化、エネルギー情勢の変化あるいは交通大系の変化などに伴って、新しい様々な有害化学物質が大気中に放出され、大気環境の汚染は更に複合化、及び広域化する傾向を示している。このような状況で、大気汚染物質によるヒトの健康への影響は益々危惧されている。

このような大気環境の現状を踏まえ、国立公害研究所が今後行うべき研究課題としては、粒子状物質とガス状成分の生体に及ぼす複合影響に関する研究が当面最も急がれる課題と考えられる。これについては、次の特別研究として予定されている。他方これと平行して、今後環境大気中に放出される可能性のある有害化学物質の毒性に関する研究、とりわけ化学物質が呼吸器を通して体内に取り込まれた場合の毒性を吸入実験により評価する方法の開発、さらには吸入毒性を予測するための方法論の体系化に関する研究が必要になるものと考えられる。

4.2 今後の研究の位置づけ

これまで述べたように、今後我々が研究対象とすべき物質は極めて多岐にわたると予想される。これらの物質の生体に与える毒性を評価する方法としては、動物による吸入実験が今後とも重要な位置を占めると考えられる。しかしながら、すべての物質の毒性評価を吸入実験のみで行うことは困難が予想される。この問題に対処する方法としては、発癌性のスクリーニングのために様々な短期検索法が開発されているのが参考となろう。大気汚染物質の毒性評価に関しても、細胞培養法、器官培養法、及び全胚培養法を利用した簡易毒性検索法の開発が強く望まれる。また、これらの *in vitro* 検出系を用いて大気汚染物質の毒性発現の機構を解明することは、毒性を評価する上でも極めて重要と考えられる。さらにこれらの研究結果は、粒子状物質や有害化学物質のリスクアセスメントを行うためにも重要な基礎資料となるであろう。

これまでの生体影響に関する研究は、観察された影響が疾病との関連で解釈される段階(図2のDの段階)や観察された影響の可逆性が明らかでないか、あるいは生体の恒常性の保持の破綻、疾病への発展について明らかでない段階(Cの段階)で議論されてきた。本特別研究では、特にCの段階における影響を対象に、総合的かつ系統的に研究を進めてきた。その成果を踏まえ本報告書では、NO₂やO₃ガスに対して生体が示す諸反応(生体影響)は、すべてがガスによる傷害を示しているのではなく、そこには生体側の修復反応(代償作用)が含まれていることを指摘した。生体は、この修復能力によって体内の恒常性を保持し、NO₂やO₃の毒性から自己を守っていると考えられる。この意味で、大気汚染物質による生体影響は、その毒性による傷害の発現として捕えるのではなく、生体の修復能力が通常の状態から一層強く求められる状態への移行として理解すべきであろう。したがって、NO₂やO₃による傷害を修復するために、生体が本来持っている能力以上の代償能力を求められたときに、恒常性は破綻し、生体は疾病もしくは死を迎えると理解される。また、何らかの原因で生体の傷害修復能力が弱まったとき、すなわち恒常性が破綻する方向へ生体の状態が大きく偏ったときに、生体はNO₂やO₃に対して高感受性になると予想される。今後、恒常性の破綻を招く因子の検索とその作用機構の解明を一層進めることは、大気汚染物質に対する毒性評価の上で重要なばかりでなく、高感受性集団を理解する上でも重要な手がかりを与えるであろう。このための方法論としては、*in vitro*の実験系、及び*in vivo*の吸入暴露実験を併用することが望まれる。*in vitro*の実験からは、各臓器を構成する細胞や組織への毒性発現の機構を解析するのが望まれる。しかし、各臓器が標的臓器になるなり易さ、あるいは各臓器の機能がどの程度保持されるかを*in vitro*の実験から予想することは難しいため、最終的には個体レベルでの吸入暴露実験が影響評価をする上で重要な位置を占めるであろう。

さて今後は、生体影響の解明と平行して、環境汚染物質による人体被害を未然に防ぐための研究が、ますます重要になると考えられる。この点でも、Cあるいはそれ以下の段階における生体への影響評価を系統的に進めることが重要である。先に述べた*in vitro*検出系を用いた大気汚染物質の毒性評価法の開発や毒性発現の機構の解明に関する研究、及び吸入暴露実験による個体レ

ベルでの恒常性維持に与える影響の研究は、このための有効な手段となるであろう。

4.3 今後必要とされる研究課題

今回の特別研究の成果を踏まえ、大気汚染物質の生体影響の解明に関する将来の研究課題としては、生体影響の評価に関する研究、及び生体影響を予測するシステムの開発に関する研究が必要と考えられる。各研究課題の詳細は、以下に示すとおりである。

I. 生体影響の評価に関する研究

(a) 生体の恒常性維持機構の解明に関する研究

○高感受性因子の解析

大気汚染物質による生体影響が、加齢等の生体側因子の変化に伴ってどのように修復されるかを解析し、高感受性因子の解明に努めることが必要である。

(b) 呼吸器疾患の発症の解明に関する研究

○免疫機能に関する基礎的研究

鼻アレルギー、気道過敏性、感染抵抗性の低下、腫瘍細胞の転移の促進等の発症の基礎には免疫系の機能異常がある。このため、免疫担当細胞群の機能に関する基礎的研究が上記疾患の原因解明には必須である。

○呼吸器疾患モデル動物の開発

呼吸器疾患の発症と大気汚染物質との因果関係の解析のために、特に気管支喘息あるいは気道過敏性などの疾患モデル動物の開発が必要である。

II. 生体影響を予測するシステムの開発に関する研究。

(a) 細胞毒性の *in vitro* 検出系の開発

各臓器由来の初代培養細胞もしくは細胞株、器官、及び全胚培養法を用いて、大気汚染物質の細胞毒性を検出する系を開発する。また、*in vivo* 暴露実験を必要に応じて行い、開発した *in vitro* 検出系を用いて各臓器への影響を評価する。

(b) 遺伝毒性の解明と検出系の開発

DNA への傷害、遺伝情報の発現、及び細胞の分化と増殖に及ぼす大気汚染物質の影響を検索する系を開発する。このためには、分子生物学及び細胞生物学的基礎研究が必要である。

小 括

1) 呼吸生理学的研究

10~20 ppm の NO₂ を短期間、あるいは 0.4~4 ppm の NO₂ を長期間暴露したラットでは、呼吸機能の低下、低酸素血症、心拍数の低下及び房室ブロックを主体とした異常心電図等が発現しやすいことを前回の特別研究で明らかにした。その原因としては、肺における酸素と炭酸ガスの交換能の低下及び自律神経系のアンバランス等が考えられた。そこで本研究では、NO₂+O₃ 複合暴露の影響を呼吸生理学的観点から明らかにする目的で、O₃ 単独ガス暴露と、種々の濃度の NO₂+O₃ の複合ガスをラット等の動物に暴露し、呼吸生理学的指標について測定し、総合的に検討した。

O₃ 単独暴露：ラットに、0.4~0.8 ppm O₃ を 2 週間暴露すると、10~20 ppm NO₂ 2 週間単独暴露と同様に低酸素血症と高炭酸血症が観察された。この時、呼気・吸気及び動脈・静脈血中の酸素分圧差は対照群に比較して小さく、吸気・動脈血酸素分圧差は大きいことから、肺におけるガス交換機能の低下が示唆される。しかし、10 ppm NO₂ 1 週間単独暴露による低酸素血症は必ずしも高炭酸血症を伴わないことから、O₃ と NO₂ ではガス交換に対する作用が異なることが推測される。また、O₃ を暴露した肺、肝等の組織では、*in vitro* 系及び *in vivo* 系の実験で共に酸素消費量の増加ないし増加傾向が認められ、呼吸代謝が亢進することが示唆された。したがって、呼吸代謝の亢進は低酸素血症と高炭酸血症の一因と考えられる。

複合暴露：4 ppm NO₂+0.2 ppm O₃ の 2~4 週間複合暴露で、低酸素血症及び高炭酸血症が観察された。4 ppm の NO₂ 及び 0.2 ppm の O₃ 単独暴露では上述のような症状が発現しないことから、複合暴露は血液ガスへの影響を強めることが判明した。さらに、前述のような複合暴露の影響は、ガス交換能の低下を引き起こすことが明らかになった。

一方、長期暴露実験(脚注参照)では、9 及び 18 か月暴露では G 3 群で低酸素血症及び高炭酸血症が認められ、同時に赤血球数とヘモグロビン量が増加したことから、代償作用が働いていることが判明した。22 か月暴露では、G 1 群で低酸素血症及び G 3 群で高炭酸血症を示した。この時、ヘモグロビン量と赤血球数の増加が認められなかったことから、老化による代償作用の低下が推測される。

以上の結果から、NO₂ と O₃ を呼吸生理学的側面からみると、NO₂ は O₃ より低酸素血症を起こしやすく、O₃ は低酸素血症と高炭酸血症を同時に起こすことが明らかになった。そして、その発症の程度は複合暴露によって強められる可能性が示唆される。長期暴露実験では、18 か月目ま

脚注：O₃ 及び NO₂ 複合長期暴露実験は、NO₂ を混合しない O₃ のみの暴露群 (G 1 群) あるいは 0.04 ppm 及び 0.40 ppm NO₂ を O₃ と混合した暴露群 (G 2 及び G 3 群) の三種類の方法で行った。O₃ の暴露方法は、午後 1 時に最大 0.10 ppm、その間の平均値が 0.05 ppm になる様に、午前 9 時から午後 5 時まで O₃ 濃度を正弦曲線に沿ってプログラム制御で変化させた。NO₂ は、連続暴露とした。

では代償作用が働くが、その後老化に伴って代償作用が低下することが推察される。

2) 神経系に関する電気生理学的研究

感覚神経並びに中枢神経の働きは、感覚の発生や生体の恒常性維持及び防御反射の遂行といった生命活動の調和に不可欠の要素と考えられる。このような神経系の機能が大気汚染物質によってどのような影響を受けるか知るために、呼吸気道受容器、中枢神経への影響及び行動観察の研究を行った。

神経受容器への影響：まず O_3 及び NO_2 の単独もしくは複合ガスが、ラットの呼吸気道に配置されている各種神経受容器の活動に与える影響を検討した。呼吸気道の平滑筋の伸縮状況を監視している肺伸展受容器は、 O_3 及び NO_2 の暴露による自発呼吸の不規則化に連動して、その活動を強めたり弱めたりした。しかし、気道内圧と受容器活動（放電頻度）との相関関係、及び一定の気道内圧下における放電間隔の規則性に関する解析からは、 $0.4 \text{ ppm } O_3$ 10 日間または $0.4 \text{ ppm } NO_2$ 2 か月間暴露による肺伸展受容器への影響は認められなかった。一方、気道上皮に加わる化学的及び機械的刺激を感知し、気管支収縮及び呼吸数増加等の呼吸変化をもたらす肺刺激受容器は、 $0.4 \sim 0.8 \text{ ppm } O_3$ 1~3 時間暴露によって、正常ラットでは認められない自発活動の増加を示した。また、細気管支及び肺胞壁に分布し、それらの部位の炎症や水腫性変化によって刺激され、浅表呼吸や無呼吸等の呼吸異常と循環機能の低下を引き起こす C 線維の反射活動は、 $4 \text{ ppm } 1$ 週間または $10 \text{ ppm } 1$ 日間の NO_2 暴露によって高められた。しかし、 $0.4 \text{ ppm } O_3$ 1 週間暴露及び $0.2 \sim 0.4 \text{ ppm } O_3 + 0.4 \text{ ppm } NO_2$ 、1~4 週間暴露では、C 線維による反射活動の変化は認められなかった。これらの実験を通じて、肺伸展受容器は O_3 や NO_2 によって影響を受けにくいこと、そして肺刺激受容器及び C 線維は、比較的高濃度の O_3 または NO_2 によって影響を受けることが明らかになった。肺刺激受容器及び C 線維活動の変化は、呼吸困難感等の症状をもたらす原因になり得ると推測される。

中枢神経への影響：中枢神経機能が O_3 の暴露により変化するかどうか検討するために、人工呼吸下で、ガラミン非動化により筋弛緩したラットに、一定の条件下で閃光刺激を行い、大脳皮質上から光誘発電位を測定した。光刺激をしてから大脳皮質の電氣的活動に反応が起こるまでの無反応時間（潜時）は、 $0.4 \text{ ppm } O_3$ 22 日間暴露では対照群に比べてごくわずかではあるが遅延する傾向を示した。このことより、 O_3 が中枢神経系を抑制する可能性が考えられる。

行動への影響：チャンバー内で通常に飼育されているラットに $0.2 \sim 0.8 \text{ ppm } O_3$ を 1 週間暴露し、飲水行動量、摂食量及び体重の変化を測定した。変化は暴露開始 1 日目で最も激しく、飲水行動量、摂食量は共に顕著に抑制された。その抑制度は暴露濃度が高いほど強く現れ、特に飲水行動量は生体リズムの乱れを良く反映していると思われた。このような行動変化には中枢神経機能への影響のほかに、呼吸機能、循環機能、体制骨格筋運動、感覚への影響が密接不可分に関与していると考えられる。

3) 免疫反応に及ぼす影響の解明に関する研究

感染、アレルギー及び発がん等から生体を守るため、免疫反応は重要な役割を果たしている。免疫反応は、生体へ侵入してきた異物あるいは生体内にできた異物を、抗体やリンホカイン等の特異なタンパク、及びリンパ球やマクロファージ等の白血球の働きにより排除する反応である。本研究においては、この免疫反応に及ぼす NO_2 及び O_3 の複合暴露の影響を、実験動物としてマウスを用いて検討し、それぞれの単独暴露による影響と比較することを目的とした。

複合暴露による影響：4 ppm NO_2 +0.8 ppm O_3 亜急性暴露により、第一にはリンパ球が分化及び増殖する臓器である胸腺や脾臓の湿重量の減少、及びこれらの臓器中のリンパ球数の減少が明らかになった。第二に機能変化の点では、脾臓中のリンパ球が、異物である羊赤血球 (SRBC) 抗原に対して IgM 抗体を産生する能力が低下し、また、SRBC 抗原の投与による血清中の抗体価上昇の程度も暴露をしない場合には及ばなかった。さらに、卵白アルブミン (OA) に対する IgE 抗体産生能の低下、及び SRBC 抗原に対する遅延型過敏反応の抑制も認められた。暴露の経過とともに、リンパ球はこれらの傷害から一時的に回復したが、その後再び傷害を受け上記の機能が低下した。このことは、リンパ球の機能は、生物のもつ補償作用によって暴露による傷害から回復すること、及びその補償能力の低下によっては再び機能の低下が起こることを示唆している。

単独暴露との比較：検索した免疫反応は、複合暴露によって単独暴露より著しい影響を受ける反応と、単独暴露と同程度の影響に留まる反応とに分けられた。胸腺や脾臓の湿重量の減少、OA に対する IgE 抗体産生能の低下、及び SRBC 抗原に対する遅延型過敏反応の抑制は、単独暴露の場合よりも一層著しく変化した。一方、SRBC 抗原に対して抗体を産生する脾臓中のリンパ球数の割合は、単独暴露の場合と同程度にしか減少しなかった。複合暴露によって単独暴露の影響が減少される反応は、検索した免疫反応の中では認められなかった。したがって全体的には、免疫反応に及ぼす影響は、単独暴露より複合暴露の方がより著しくなる傾向が示された。

免疫反応での感受性の差：免疫反応に関与している臓器及び各種細胞に対する影響の程度を比較することは、免疫反応の基礎的な調節機構を探る上で、さらにその影響により発症する疾患を予測する上でも重要と考えられる。影響を受ける臓器として、T リンパ球が成熟する器官である胸腺は、湿重量低下の程度から、他のリンパ球臓器である脾臓よりも複合暴露の影響を受けやすいと考えられる。T リンパ球非依存性抗原は、抗体を産生する B リンパ球に直接作用して抗体産生をうながし、他方 T リンパ球依存性抗原である SRBC 及び OA 抗原は、T リンパ球を介して抗体産生をうながすと考えられている。 NO_2 及び O_3 暴露によって、T リンパ球依存性抗原による抗体産生は影響を受けたが、T リンパ球非依存性抗原による抗体産生は影響を受けなかった。このことは、T リンパ球の中でも抗体産生を促進するヘルパー T リンパ球が、 NO_2 及び O_3 暴露による影響を強く受けることを示唆する。また、ヘルパー T リンパ球とは異なる T リンパ球が関与すると考えられている遅延型過敏反応も、暴露によって抑制された。

以上のことから、T リンパ球が増殖、分化及び成熟する場としての胸腺、及び成熟したヘルパー

Tリンパ球は、Bリンパ球に比べNO₂及びO₃ガス暴露により傷害を受けやすいことが明らかになった。このことは、大気汚染物質による呼吸器系の疾患を予測及び予防するうえで重要と考えられる。

4) 病理学的研究

前回の特別研究では、4.0 ppm NO₂慢性暴露実験によって、実験動物として用いたラットの肺に定型的病変が引き起こされることを報告した。今回はNO₂とO₃を複合したガスによるラットへの慢性暴露実験を行い、NO₂のみによる病変とどのように異なる影響を受けるか、すなわち、病変の種類やその程度及び病変の生じた部位がどのように変化するか明らかにすることを目的とした。光学顕微鏡による肺組織の観察は、中等大気管支から肺胞道にかけての部位について行い、その観察項目はNO₂による定型的病変とされる項目を中心に行った。また、電子顕微鏡による肺組織の観察は、光学顕微鏡で観察が困難な肺胞壁の変化について、形態計測の手法を用いて行った。

光学顕微鏡による観察結果では、22か月の暴露全期間を通じて、前回のNO₂慢性暴露による肺組織の定型的病変と異なる変化は認められず、NO₂+O₃複合暴露はNO₂単独暴露と同種の変化を肺組織に与えることが明らかになった。G3暴露群では、気管支から末梢気道にかけて軽度の変化が認められた。18か月暴露では、中等大気管支から末梢気道にいたる気道の一部、あるいは全領域にわたる上皮の肥大がすべての個体に認められ、終末細気管支における上皮の増生、肺胞道における気道上皮の増殖性延長、及び細気管支から肺胞道近傍にかけての結合組織の軽微な肥厚が各々2/3の個体に認められた。これらの変化の程度と変化を示した個体の出現頻度は18か月暴露で最も顕著であった。しかし、ここでみられた変化はより高濃度の4.0 ppm NO₂暴露による定型的病変までには至らなかった。22か月暴露では、気管支から末梢気道にかけての上皮の肥大が依然として2/3の個体に認められ、肺胞道における気道上皮の増殖性延長、及び細気管支から肺胞道近傍にかけての結合組織の軽微な肥厚も1/3の個体に認められた。しかし、終末細気管支における上皮の増生は認められなかった。G2群でも18及び22か月暴露で同種の変化を認めたが、その程度と頻度はG3群より低かった。G1群では、変化はさらに軽微であった。

G2及びG3暴露群と前回の0.04及び0.4 ppm NO₂単独慢性暴露群を比較すると、18か月目では0.05 ppm O₃との複合によって、肺胞道近傍の細気管支上皮の肥大と増生を示す個体の頻度が高くなり、気管支上皮の反応性が一層強められた。

電子顕微鏡による観察では、光学顕微鏡による観察では客観的評価が困難な末梢の肺胞壁における(1)算術平均肺胞壁厚の変化、(2)I型及びII型肺胞上皮の変化、及び(3)非細胞性間質の変化を、形態計測の手法を用いて定量的に評価した。算術平均肺胞壁厚は、4か月において暴露群で有意な増加を示したが、9及び18か月では壁厚に対する暴露の影響は不明瞭であった。22か月目では再び暴露濃度に依存した壁厚の増加傾向が認められた。

非細胞性間質のコラーゲン量については、4 か月目では暴露群においては有意な増加、9 か月目では G 1 群で有意な減少、18 か月目では G 3 群で増加傾向、及び 22 か月では G 2 及び G 3 群で増加傾向と、暴露濃度及び期間によって複雑に変化することが認められた。また、18 か月以降の増加傾向は暴露と加齢の影響による線維化の進行を示唆するものと考えられる。全体としてみると、電顕形態形測によって観察された $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 複合暴露による肺胞壁の変化は、暴露期間あるいは暴露濃度によって一様ではなく、初期反応とその修復の 2~4 か月、それに引き続く軽微な変化がみられる 9~18 か月、及び老化による修飾がみられる 18~22 か月等、いくつかの相における変化として把握すべきものと判断される。

前回の NO_2 単独暴露実験では、算術平均肺胞壁厚に代表される肺胞壁各種組織成分量の増加がみられた 9~18 か月目とその減退がみられた 18~27 か月目の二つの相に識別された。肺胞上皮については第一の相で I 型上皮を中心とした変化がみられ、第二の相ではこれらの変化の復元傾向が認められた。この第一の相で観察された I 型上皮を中心とした変化が、今回の複合慢性暴露実験で 2 か月から 4 か月においてみられた肺胞上皮の変化と対応するものであるとすれば、 0.05 ppm O_3 との複合によって肺胞上皮の反応の時期が早められたと考えられる。しかしながら前回では 9 か月以前の検索が行われていないため反応の早期化については確定できなかった。算術平均肺胞壁厚については、 0.4 ppm NO_2 単独暴露では 18 か月で増加傾向がみられ、27 か月目で有意な増加が観察された。今回の実験では、22 か月目で増加傾向はみられたが有意ではなく、肺胞壁厚においては、 0.05 ppm O_3 との複合暴露と NO_2 単独暴露との間に差は認められなかった。

5) 細胞内顆粒成分 (ミクロソーム異物代謝系) に及ぼす影響に関する生化学的研究

生体が生命活動を営む上で重要な生理機能の多くは、生体膜に取り囲まれている細胞内顆粒で行われている。前回の特別研究において、 $0.4 \sim 4.0 \text{ ppm NO}_2$ 亜急性暴露によって第一次標的臓器である肺のみならず肝臓及び腎臓の生体膜成分が変化することを見いだした。本研究では、 O_3 単独及び NO_2 との複合暴露がラット臓器の生体膜成分に及ぼす影響を検討した。

肺ミクロソームの異物代謝系に及ぼす影響： $0.1 \sim 0.4 \text{ ppm O}_3$ の急性及び亜急性暴露は、肺ミクロソーム異物代謝系を持続的に亢進させた。 NO_2 が特異的に異物代謝系を低下させたのとは対照的に、 O_3 はチトクロム P-450 含量を顕著に増加させた。この増加は、肺胞及び終末細気管支の上皮細胞が O_3 により変性壊死したのを修復するために、チトクロム P-450 含量の高い細胞の活性化と増殖の促進が起きている可能性を示唆する。 0.2 ppm O_3 に 1.2 または 4.0 ppm NO_2 を混合暴露した場合、 O_3 単独の場合よりも肺ミクロソームのチトクロム P-450 含量の増加の程度は縮小した。低濃度複合ガスの長期暴露により、 O_3 単独暴露の G 1 群では、肺ミクロソームのチトクロム P-450 含量は、9 か月目は増加したが 22 か月目は対照群の値に戻った。 NO_2 を添加した G 2 及び G 3 群の場合では、P-450 含量の増加の程度は、9 か月目は G 1 群の場合より縮小した

が、22 か月目は NO_2 の添加濃度に依存して増加した。すなわち、 NO_2 の添加によって、 O_3 暴露による肺ミクロソームの P-450 含量の増加は、最大になる時期は遅れたが、最終的には増幅された。このことは、老齢動物への NO_2 亜急性暴露で観察された反応の遅延化と過剰な代償反応が起こる可能性を示唆する。

チトクロム P-450 により触媒されるミクロソームの異物代謝活性も、チトクロム P-450 含量と同様に NO_2 亜急性暴露により持続的に低下し、 O_3 亜急性暴露により持続的に増加した。 NO_2 と O_3 の複合による亜急性及び長期暴露においても O_3 による活性増加は NO_2 の添加により縮小した。このことは、比較的低濃度の NO_2 及び O_3 亜急性暴露によって生ずる肺ミクロソーム異物代謝系の変化は、低濃度 NO_2 及び O_3 の長期暴露においても起こり得ることを示している。また、 O_3 によるミクロソーム異物代謝系の亢進が NO_2 の添加により軽減される現象は、 O_3 による上皮細胞の活性化及び増殖と NO_2 による異物代謝系の低下効果とが独立して進行し、現象面では相殺的となることによると考えられる。

肝臓及び腎臓のミクロソーム成分に及ぼす影響：0.4~4.0 ppm の NO_2 亜急性暴露によって肝ミクロソームの異物代謝系は周期的に低下した。0.8 ppm O_3 は、初期に異物代謝系を低下させたが、0.1~0.2 ppm 亜急性暴露では影響が認められなかった。しかし、低濃度長期暴露実験では G1 群で 22 か月目に、チトクロム b_5 含量及び異物代謝系が低下したことから、 O_3 によりヘム合成が抑制される可能性が示唆される。 NO_2 による異物代謝系の低下は NO_2 と O_3 の複合長期暴露でも観察されたが、 O_3 による低下効果はむしろ弱まった。

腎臓では、比較的低濃度の NO_2 や O_3 の単独暴露により、ミクロソーム成分が増加した。 NO_2 と O_3 の低濃度長期暴露においても、 O_3 によるミクロソーム成分の増加傾向は NO_2 の添加により一層強まった。

NO_2 及び O_3 の影響の加齢による修飾： NO_2 及び O_3 の影響が動物の加齢によりどのように修飾されるかを明らかにするために、老齢ラット (23~24 か月齢) に 1.2 及び 4.0 ppm NO_2 3 か月、あるいは 0.1 及び 0.2 ppm O_3 4 週暴露を行った。肺の湿重量は、12~14 か月齢の成熟ラットでは 4.0 ppm NO_2 暴露 3 か月目でのみ増加した。老齢ラットでは、 NO_2 及び O_3 のすべての暴露濃度で肺の湿重量が増加し、 NO_2 及び O_3 に対する感受性が高くなっていることが示唆された。腎臓の湿重量も、4.0 ppm NO_2 及び 0.2 ppm O_3 暴露に対して老齢ラットでは増加した。肺の抗酸化系酵素の活性は、 NO_2 暴露により増加するが老齢ラットでは増加しなかった。 O_3 暴露による肺のチトクロム P-450 含量の増加は、老齢ラットでは増加の程度が縮小した。更に、 NO_2 暴露による肺及び肝臓のミクロソーム異物代謝系成分及び異物代謝活性の減少は、老齢ラットでは減少幅が一層増大し、そしてより低濃度の NO_2 暴露によっても観察された。これらの結果は、個体の加齢と平行して生合成能が低下する生体分子に対しては、加齢とともに代償反応が弱まるために、 NO_2 や O_3 による傷害が一層強く現れやすいことを示唆する。

6) 脂質過酸化的障害と抗酸化性生体防御機構の変化に関する研究

ラットを用いた前回の NO₂ 慢性暴露実験 (27 か月暴露) において, NO₂ 濃度の上昇と暴露期間の延長につれて, 肺の抗酸化性防御系の活性は低下し, その結果として生体にとって有害な過酸化脂質が増加することを見いだした。

脂質過酸化的障害と抗酸化性生体防御機構の変化: 今回, ラットを用いて NO₂ と O₃ の低濃度複合長期暴露実験 (22 か月暴露) を行い, NO₂ 単独暴露の場合の影響と比較した。脂質過酸化により呼気ガス中に放出された各炭化水素の量及び TBA 反応によって測定した肺の過酸化脂質量は 9~13 か月目で最大レベルに増加し, その後 18 か月目以降では, 4 ppm NO₂ 27 か月間暴露の場合にみられたように, 対照レベル以下に低下した。また, ビタミン E 及び C のような抗酸化性物質濃度も 9 か月目頃には有意に増加したが, 18 か月目以降はむしろ有意に低下した。一方, 抗酸化性防御系酵素活性は全実験期間を通じて全く変化は認められなかった。これらのことは, NO₂ と O₃ の複合暴露の影響は NO₂ 単独暴露の場合より早期に現れ, さらに暴露後期には抗酸化性防御系の機能が一部低下をきたすことを示唆している。

コラーゲン代謝関連因子の変化: 肺のコラーゲン代謝に及ぼす関連因子の変化について検討した。肺のモノアミノオキシダーゼ (MAO) 活性は, G3 群では 9 か月目から有意に増加し, その程度は暴露期間の延長につれて増大し, 18~22 か月目に最大になった。G2 群でも MAO 活性は, 暴露期間の延長につれて増加傾向を示し, 22 か月目には有意に増加した。このように肺における MAO 活性増加の程度は, NO₂ 濃度の増加, 及び暴露期間の延長に伴って増大した。また, 肺のヒドロキシプロリン (HOP) 量から測定したコラーゲン量は, 暴露全期間を通じて有意な変化を示さなかった。MAO はコラーゲンの架橋化を促進すると考えられていることから, G2 及び G3 群では 9~22 か月目にかけて, 肺におけるコラーゲンの架橋化が進行していると予想される。

一方, 血清中の HOP 量は, 5 か月目には各暴露群で減少したが, その後は回復し, 更に 18 か月目には濃度に依存して増加した。血清中のコラーゲン分解酵素様活性も, 血清中 HOP 量と同様の経時変化を示し, 9~18 か月目に NO₂ 濃度に依存して増加した。他方, 血清中のコラゲナーゼ阻害因子の活性は, HOP 量及びコラーゲン分解酵素様活性の経時変化とは対照的に, 5 か月目には増加傾向を示し, 18 か月目には低下し, 22 か月目で対照群の値に近づいた。このように, 血清中のコラゲナーゼ阻害因子の活性は, 肺のコラーゲン含量の変化と類似の変化を示した。コラーゲン代謝に関連した各因子は, 時間経過とともに周期的変化を示したが, 代謝関連因子間の変化は妥当なものであった。尿中 HOP 量は, 5 か月目には各暴露群で増加したが, その後は減少し, 対照群より低い値を示す傾向を示した。今回の複合暴露では, 血清及び尿中の HOP 量の変化に類似性は認められなかった。

動物種差に関する研究: 本研究では, マウス, ハムスター, ラット及びモルモットを用いて, 各々 0.4 ppm NO₂ 及び 0.4 ppm O₃ の単独及び複合暴露による過酸化脂質生成と抗酸化性防御

系に及ぼす影響を比較した。4種の動物の肺の過酸化脂質量は、暴露をしない場合にはマウス>ハムスター>ラット>モルモットのように呼吸代謝率の高い順に高かった。また、NO₂あるいはO₃の単独暴露では、どの動物の過酸化脂質も増加しなかった。しかし、NO₂+O₃複合暴露ではモルモットの過酸化脂質が最も高い増加率を示し、マウスは中間の増加率を示し、ハムスターとラットはほとんど増加しなかった。この複合暴露において、過酸化脂質が増加しなかったハムスターやラットでは、抗酸化性防御系の活性が代償的に増加していたが、モルモットのように抗酸化性防御系が働かなかった動物では、過酸化脂質が顕著に増加していた。これらの結果は、大気汚染ガスは単独より複合することにより生体影響が強く現れる場合があることを示していると同時に、過酸化脂質の増加に関して動物種差が生ずる原因は、肺の抗酸化性防御系の酵素活性や抗酸化性物質が酸化性負荷によって増加し得るかどうかによると考えられる。このように、NO₂及びO₃暴露に対する動物種差の研究は、ヒトの健康への影響を考える上でどの動物を用いるのが適当かを判断する上からも重要であり、ヒトの健康への影響を予測するための基礎資料となると考えられる。

7) 各種臓器におけるプロスタグランジン合成及び代謝に関する研究

プロスタグランジン (PG) 類は、多様なそして強い生理活性を持つため、各器官におけるPG合成及び代謝が変化すると、その器官の機能に大きな影響を及ぼす可能性がある。そこで、NO₂やO₃の単独または複合暴露により、呼吸器及び免疫担当器官などにおいて、PGの合成や代謝がどのように変化するか、またその変化が、呼吸器及び免疫担当器官の機能にどのような影響を及ぼす可能性があるかに関して検討した。

呼吸器系への影響：10 ppm NO₂ 2週間暴露では、肺のPGI₂合成活性は3日目に最低になりその後徐々に回復すること、及び肺胞洗浄液中では主成分のPGI₂量が有意に低下しその状態が続くことが明らかになった。一方、トロンボキサン (TX) A₂及びロイコトリエン (LT) C₄含量は増加した。この肺でのPGI₂合成能の低下は、PGI₂合成酵素の阻害によるものであることが確認された。0.4及び0.8 ppm O₃ 4週間暴露の場合も、NO₂の場合と同様に肺のPGI₂合成は低下することが明らかになった。これらのことから、比較的高濃度のNO₂やO₃暴露により、気管平滑筋を弛緩させるPGI₂量及びその合成能が肺で低下し、気管平滑筋の収縮作用を示すTXA₂及びLTC₄含量は増加することから、アラキドン酸 (AA) 代謝は気管平滑筋の収縮と弛緩の平衡を収縮方向に移行させると考えられる。しかしながら、このような肺におけるPGI₂合成能の低下は、低濃度NO₂+O₃複合暴露9か月目では、すべての暴露群で認められなかった。

モルモットを用いた実験では、*in vivo*でのO₃暴露によって、気道は収縮刺激に過敏になることが報告されている。このオゾンによる気道過敏状態誘起に対するTXの関与に関しては、TXA₂合成阻害剤の投与により過敏状態から回復すること、TXA₂の類縁体であるU 46619を静脈内注射すると気道は収縮刺激に対して過敏になること、また、O₃暴露によって気道の過敏状態

が起きる時血漿中の TXB₂ 含量が増加することから、O₃ 暴露によって TXA₂ 合成が亢進し気道の弛緩と収縮の平衡を収縮方向に移行させることが過敏状態誘起の一因と考えられる。そこで、NO₂ 暴露による気道の過敏状態における AA 代謝物の役割を明らかにする目的で、血小板 TXA₂ 合成への影響を検討した。10 ppm NO₂ 2 週間暴露により、血小板の TXA₂ 合成が増加し血小板数は有意に減少することが判明した。このことより、NO₂ 暴露による血漿中の TXB₂ 含量の増加を引き起こす血小板の TXA₂ 合成の増加は、気道の過敏性を誘起する一因になる可能性があると考えられる。

以上のことより高濃度 NO₂ 及び O₃ 暴露による、肺及び血小板での PG, TX, 及び LT 類の合成能、及び肺胞洗浄液中の PG, TX, LT 類の含量の変化は、気道の過敏状態を引き起こす一因になる可能性を持つものと考えられる。

免疫担当器官への影響：10 ppm NO₂, 並びに 0.8 ppm O₃ の 2 週間暴露により、リンパ球臓器である脾臓及び胸腺の重量が低下すること、及び両器官の主要な AA 代謝物である PGD₂ 合成活性が亢進し、3~5 日目に活性が最大になることが明らかになった。また、PGD₂ はリンパ球の幼若化を抑制した。したがって、NO₂ 及び O₃ 暴露による PGD₂ の合成亢進は、脾臓や胸腺の免疫機能を低下させる可能性があると考えられる。

8) アミノ酸及びペプチド等に及ぼす影響に関する研究

これまでの研究において、ラットやマウスに比較的低濃度の NO₂ 及び O₃ を暴露すると、肺の還元型グルタチオン (GSH) の増加することが明らかにされ、GSH の増加は酸化性刺激を検出する指標になると考えられてきた。したがって、GSH の増加する機構を明らかにすることは、酸化性刺激に対する生体反応を理解する上で重要である。GSH は、GSH 合成系によってアミノ酸から合成される。そこで、本研究ではラット肺の GSH レベル及び GSH 合成系に及ぼす NO₂ と O₃ の単独及び複合での亜急性暴露の影響を検討した。また、NO₂ と O₃ の GSH 合成系への影響のラットの加齢による修飾についても検討した。

肺の GSH 含量に及ぼす影響：肺の GSH 含量は、4.0 ppm NO₂ 4 週間暴露において持続的に高いレベルに維持された。また、0.2 ppm O₃ 4 週間暴露も、肺の GSH 含量を有意に増加させた。しかしながら、4.0 ppm NO₂ に 0.2~0.4 ppm O₃ を複合し 4 週間暴露した場合、GSH 含量の増加はいずれの暴露群においても同程度であり、NO₂ による増加効果は O₃ の添加により増幅されなかった。この現象は、4.0 ppm NO₂ 暴露によって既に合成系が過剰に誘導されている可能性を示唆している。

GSH 合成系に及ぼす影響：GSH は γ -グルタミルシステインシンターゼ (γ -GC シンターゼ) 及びグルタチオンシンターゼ (GSH シンターゼ) 等で構成される酵素系で合成される。これらの酵素活性に及ぼす NO₂ 及び O₃ の影響について検討するために、ラットの肺におけるグルタチオン合成系酵素の反応系を検討し、反応生成物を高速液体クロマトグラフィーにより測定

する新しい方法を開発した。この測定法は高感度であり、これまで測定されなかった肺のグルタチオン合成系酵素活性を精度よく測定することができた。0.4~4.0 ppm NO₂ 3か月間暴露において、ラット肺の γ -GC シンターゼ活性は、1.2 ppm NO₂ 暴露群では変化しないが、4.0 ppm 暴露群で対照群に対して有意に増加した。一方、GSH シンターゼ活性はすべての暴露群で有意な変化が見られなかった。0.2 及び 0.4 ppm O₃ の 3か月間暴露では、この二つの合成系酵素活性はすべての暴露群において有意に増加した。したがって、NO₂ 及び O₃ による肺の GSH 含量の増加は、GSH 合成系の亢進によって起こることが明らかになった。0.2 ppm O₃ に 1.2 ppm NO₂ を複合し 3か月間暴露した場合、1.2 ppm NO₂ は 0.2 ppm O₃ のグルタチオン合成系酵素活性の増加作用を増幅させず、4.0 ppm NO₂ は、0.2 ppm O₃ の増加作用を増幅させたが、相加的には至らなかった。GSH 含量及び GSH 合成系酵素活性の増加が NO₂ と O₃ の複合によって相加的に増幅されない原因の一つは、GSH 合成系の過剰な亢進によると考えられる。

GSH 合成系の亢進に及ぼす加齢の影響：12~14 か月齢のラットを対照群とし、老齢ラット (23 又は 24 か月齢) の肺の GSH 合成系酵素活性に及ぼす NO₂ 及び O₃ 暴露の影響について検討した。4.0 ppm NO₂ の 3か月間暴露の場合、 γ -GC シンターゼ活性は対照群において有意に増加したが、老齢ラットでは必ずしも活性増加が起こらなかった。また、0.1 ppm O₃ の 4週間暴露の場合、 γ -GC シンターゼ活性は対照群において有意に増加したが、老齢ラットでは増加傾向が見られなかった。したがって老齢は、NO₂ 及び O₃ の酸化性刺激に対して、酵素活性を増加させる能力を低下させる可能性が示唆された。

9) 細胞遺伝学的影響

細胞分裂の休止期 (Go 期) にある末梢血リンパ球を幼若化剤 (mitogen) により培養・分裂させ、染色体核板の姉妹染色分体交換 (SCE) を分析することは、動物に暴露された環境変異原物質による細胞遺伝毒性の蓄積を調べる上で、優れた *in vivo* 検索系の一つである。特に、ヒトにおいては容易に採取できる臓器細胞であり、人間集団の細胞遺伝学的影響のモニタリングに広く用いられている。しかしながら、ラットなどのゲッ歯類は末梢血リンパ球の培養がヒトに比べて難しく、リンパ球を用いての SCE 分析の研究は少ない。そこで、まずラットの末梢血リンパ球の容易で安定した SCE 分析法の開発を試み、それを用いて、NO₂、O₃、及びそれらの複合ガス暴露によるラットへの細胞遺伝学的影響を、ガス暴露されたラットの末梢血リンパ球の SCE 頻度の誘発を指標として検討した。採血した全血を培養液に少量添加する簡便な培養法 (微量全血培養法) を用いて、幼若化剤としてコンカナバリン A と 2-メルカプトエタノールを添加することにより、ラット末梢血リンパ球についても SCE の分析に十分な幼若化率が得られることが明らかとなった。この結果、リンパ球を分別あるいは洗浄処理する操作なしで比較的容易に SCE を分析することが可能となった。上記の分析法を用いて 4 ppm NO₂、0.2 ppm O₃、1.2 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃、及び 4 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ の 4種類のガスについて、4週、8週、及び 12週間暴露した

ラットの末梢血リンパ球の SCE 分析を試みたところ、誘発剤を用いない場合の SCE(基底 SCE) 頻度に変化は認められず、基底 SCE 頻度の増加を指標とした場合、これら暴露条件ではラットに対する細胞遺伝毒性を検出することはできなかった。一方、SCE の強い誘発剤であるマイトマイシン C の *in vitro* での誘発 SCE 試験では、O₃、及びその複合暴露群の一部で有意な頻度の増加が認められた。このことは、O₃ がラットの末梢血リンパ球に対して細胞遺伝毒性因子(マイトマイシン C) への感受性を高める何らかの影響を示したものと推測された。なお、O₃、NO₂、及びそれらの複合ガスに暴露されたラットの末梢血リンパ球による SCE 分析の結果は、直接的には細胞遺伝毒性は陰性であったが、ラットへの他のガス暴露実験において、標的臓器である肺細胞では基底 SCE 頻度の有意な増加がみられ、陽性の結果を示す報告もある。また、培養細胞へのガス暴露による *in vitro* の実験系において、O₃ 及び NO₂ ガスは、両者ともわずかではあるが有意に SCE 頻度を増加させ、弱い細胞遺伝毒性があることを認めている。

10) 生体細胞に及ぼす影響

生体内には、骨髄で産生される赤血球や白血球が遊離細胞として存在し、多様な機能を発揮している。前回の特別研究において、NO₂ は赤血球の寿命を短縮させることを見いだした。また、肺に存在する肺胞マクロファージは、NO₂ 暴露によって代謝的に活性化され、肺胞中の細胞数が増加することを明らかにした。そこで、これらの細胞に対する O₃ の影響、NO₂ と O₃ の複合影響及び動物の加齢による影響の修飾について検討した。

赤血球に及ぼす影響：4.0 ppm NO₂ の急性・亜急性暴露によりラットの血液中には、NO₂ による傷害に対する代償反応の結果、代謝活性の高い若い赤血球の割合が多くなり、Ht 値も増加した。0.1 及び 0.2 ppm O₃ 亜急性暴露では、このような代償反応は一見認められず、高濃度 O₃ の急性暴露では Ht 値及び Hb 値はむしろ減少した。また、23~24 か月齢の老齢ラットにおいても 1.2 及び 4.0 ppm NO₂ の 3 か月暴露及び 0.1 及び 0.2 ppm O₃ の 4 週暴露により Ht 値及び Hb 値が減少した。更に、低濃度複合ガスの長期暴露実験により、G2 及び G3 群では Ht 値は 9 か月目には増加したが、22 か月目には減少した。以上の結果は、NO₂ と O₃ は赤血球に傷害を及ぼすが、この傷害は生体側の代償反応としての赤血球の増生により通常は発現しないこと、及び赤血球産生能の低下している老齢ラットでは代償反応が十分でなく傷害が発現しやすいことを示している。

肺胞マクロファージに及ぼす影響：0.2 ppm O₃ をラットに 2 週間暴露すると、肺のマクロファージでは、NO₂ 暴露の場合と同様に先ず抗酸化系と解糖系の酵素活性が増加し、次いで細胞数が増加した。肺におけるマクロファージの細胞数は、O₃ や NO₂ を動物に吸入させている限り高いレベルに維持された。この現象は、これらのガスによって変性壊死した上皮細胞を肺胞から除くためにマクロファージの細胞数が肺胞内で高いレベルに保たれることを示唆している。肺胞マクロファージは、肺における微生物への感染抵抗性に主要な役割を果たしている。マクロ

ファージによる殺菌活性を定量的にしかも簡便に測定する方法を開発し、0.2 ppm O₃ を暴露したラットの肺胞マクロファージの殺菌活性への影響について検討した。O₃ 暴露は殺菌活性を低下させた。そして、指標に用いた微生物の種類によっては、この活性低下が暴露期間中持続した。また、24 か月齢の老齢ラットでは、O₃ 暴露による殺菌活性の低下は一層顕著になった。低濃度複合ガスの長期暴露でも、肺胞マクロファージの細胞数は増加し、肺胞上皮細胞への傷害が生じている可能性を示唆した。また暴露 22 か月目には、すべての暴露群で殺菌活性が低下し、指標に用いた微生物の種類によっては、O₃ と NO₂ の複合により殺菌活性が著しく低下した。肺胞マクロファージの殺菌活性の低下は肺における感染抵抗性の低下の可能性を示唆する。

開発・改良した技術

1. 鈴木 明・清水 明：実験小動物用の呼気と吸気を分離し呼気を収集する装置。特許 1343294 号 (61 年 10 月 29 日) (第 45 回科学技術庁 注目発明選定。61 年 4 月)。
2. 清水 明・鈴木 明：実験小動物用呼吸機能検査用デジタルリニアライザー。(特許出願中)
3. 河田明治：グルタチオン生合成系酵素の活性測定法の改良。
4. 野原恵子：ドリコール定量法の改良。
5. 白石不二雄：ラット末梢血の姉妹染色分体交換 (SCE) 分析手法の開発。
6. 持立克身：マクロファージの殺菌活性の簡易測定法の開発。

研究成果一覧

〔印刷発表〕

1982 年

嵯峨井勝・市瀬孝道・原口裕文・与那覇政憲 (1982)：各種環境汚染物質による呼気中エタン、プロパンおよびペンタン産生の相違に関する研究。過酸化脂質研究, 6, 72-76.

市瀬孝道・鈴木誠一・嵯峨井勝 (1982)：過酸化脂質の動物種差および系統差、——NO₂ 暴露による脂質過酸化——。過酸化脂質研究, 6, 77-82.

嵯峨井勝 (1982)：栄養と脂質過酸化。変異原と毒性, 5, 223-232.

嵯峨井勝 (1982)：大気汚染物質による脂質過酸化。変異原と毒性, 5, 233-242.

嵯峨井勝 (1982)：NO₂ の生体影響—急性、亜急性および慢性暴露による脂質過酸化—。環境科学研究報告集・人体影響研究領域の研究成果, 40-51.

Suzuki, A. K., H. Tsubone and K. Kubota (1982): Changes of gaseous exchange of mice acutely exposed to nitrogen dioxide. Toxicol. Lett., 10, 327-335.

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, 71-79.

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.

Ohta, Y., M. Yamada, T. Yoneyama, A. Suzuki and I. Wakisaka (1982): Dynamic study on animal experiments using N-labeled nitrogen dioxide. *Proc. 4th Int. Conf. Stable Isotopes.*, March, 23-27, 1981, 557-561.

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 Sci.*, **31**, 1963-1972.

Ichinose, T. and M. Sagai (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide III. Changes of the antioxidative protective systems in rat lungs and lipid peroxidation by chronic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **66**, 1-8.

Tsubone, H., H. Oda, A. K. Suzuki and K. Kubota (1982): Electrocardiographic abnormalities in rats by acute exposure to nitrogen dioxide. *Toxicol. Lett.*, **12**, 125-129.

Fujimaki, H., F. Shimizu and K. Kubota (1982): Effect of subacute exposure to NO₂ on lymphocytes required for antibody responses. *Environ. Res.*, **29**, 280-286.

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.

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.

Sagai, M., T. Ichinose., H. Oda and K. Kubota (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the antioxidative protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **30**, 1437-1442.

Kobayashi, T., N. Miki, H. Oda., M. Akiyama., K. Kubota., H. Takahashi and S. Nagasawa (1982): Effect of nitrogen dioxide exposure on cyclic GMP in rat lung. *Toxicol. Lett.*, **13**, 35-41.

1983年

内田義之・本間敏明・斉藤武文・長谷川鎮雄・伊藤祐康・嵯峨井勝 (1983): 呼気中炭化水素測定
の臨床応用, 過酸化脂質研究, **7**, 154-158.

市瀬孝道・嵯峨井勝 (1983): パラコートによる肺の線維化と過酸化脂質の生成について. 過酸化
脂質研究, **7**, 133-137.

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ラッ

- トの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化について. 大気汚染学会誌, **18** (2), 131-145.
- 内田義之・本間敏明・藤岡 浩・市瀬孝道・嵯峨井勝・長谷川鎮雄 (1983): 呼気ガス炭化水素測定
の臨床応用—第1報—. 日本臨床生理学会雑誌, **13**, (1), 108-112.
- 嵯峨井勝 (1983): 生体内過酸化脂質の測定法 C. 呼気分析・過酸化脂質実験法, 金田・植田編, 医
歯薬出版, 98-108.
- 今井 透・小澤 仁・渡辺直熙・白石不二雄・久保田憲太郎 (1983): 抗原 aerosol による IgE 抗
体産生—実験動物における最近の知見より—. 耳鼻咽喉科展望, **26**, 623-627.
- 白石不二雄・坂東 博 (1983): ガス状物質の毒性試験法—培養細胞—. トキシコロジーフォーラ
ム, **6**, 250-257.
- 鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1983): 低濃度二酸化窒素長期暴露がラットの動
脈血 pHa, PaCO₂, PaO₂ に及ぼす影響. 日本衛生学雑誌, **38**, 758-763.
- 鈴木 明 (1983): 大気汚染物質が実験動物に与える影響について(1) SO₂ と NO₂ について. トキ
シコロジーフォーラム, **6**, 508-517.
- Kobayashi, T., I. Morita and S. Murota (1983): Effects of nitrogen dioxide exposure on
prostacyclin synthesis in lung and thromboxane A₂ synthesis in platelets in rats.
Prostaglandins, **26**, 303-310.
- Kobayashi, T. (1983): Effects of ozone exposure on prostacyclin synthesis in lung.
Prostaglandins, **26**, 1021-1027.
- Sagai, M., T. Ichinose, T. Kobayashi and K. Kubota (1983): Changes of lipid peroxidation and
antioxidative protective systems in rat lungs upon life span exposure to low levels of
nitrogen dioxide. Dev. Sci. Pract. Toxicol., A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya (ed.),
Elsevier Sci., Publ. B. V., 483-486.
- Sagai, M., S. Suzuki and T. Ichinose (1983): Relationship between survival times of rats
exposed to lethal level of nitrogen dioxide and arylhydrocarbon hydroxylase activity in
lungs. Toxicol. Lett., **19**, 233-239.
- Imai, T., F. Shimizu, H. Fujimaki and N. Watanabe (1983): Enhancement of IgE antibody
production by ovalbumin aerosol in mice. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., **70**, 368-372.

1984 年

- 市瀬孝道・嵯峨井勝 (1984): パラコートによる過酸化脂質生成とコラーゲン代謝関連因子に関す
る研究. 過酸化脂質研究, **8**, 63-66.
- 嵯峨井勝・市瀬孝道・前川圭子・矢野友啓・下條信弘 (1984): ペニシラミンのグルタチオンペル
オキシダーゼ阻害, —in vitro 実験と in vitro 実験—過酸化脂質研究, **8**, 87-91.
- 嵯峨井勝・小林隆弘 (1984): 窒素酸化物は肺の脂質にどのような変化をもたらすか. 環境と人体

- III. 窒素酸化物. 中馬一郎ら編, 東大出版会, 56-74.
- 三浦 卓 (1984): 窒素酸化物は細胞膜にどう影響するか. 環境と人体III, 中馬一郎ら編, 東京大学出版会, 75-87.
- 三浦 卓 (1984): 二酸化窒素の実験動物に及ぼす影響. 衛生化学, **30** (6), 344-355.
- Mochitate, K. and T. Miura (1984): *In vivo* effect of nitrogen dioxide on the activities of glycolytic enzymes in red blood cells of rats. *Toxicol. Lett.*, **22**, 315-321.
- Mochitate, K., K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, **33** (1), 17-28.
- Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1984): Different incorporation rates of arachidonic acid into alkenylacyl-, alkylacyl and diacylphosphatidylethanolamine of rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **796**, 304-311.
- Kunimoto, M., K. Mochitate, K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): Effect of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: Alterations of membrane components and populational changes of red blood cells during *in vivo* exposure to NO₂. *Environ. Res.*, **33**, 361-369.
- Kobayashi, T., T. Noguchi, M. Kikuno and K. Kubota (1984): Effect of acute nitrogen dioxide exposure on the composition of fatty acid associated with phospholipids in alveolar lavage. *Chemosphere*, **13** (1), 101-105.
- Tsubone, H. and A. K. Suzuki (1984): Vagal afferent activities corresponding to respiratory cycle in rats. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **46** (3), 377-380.
- Tsubone, H. and A. K. Suzuki (1984): Reflex cardiopulmonary responses by stimulation to type J receptors in rats exposed to NO₂. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **13**, 905-917.
- Tsubone, H., A. K. Suzuki, M. Sagai and S. Sugano (1984): Changes of cardiac and respiratory rhythm in non- and tracheostomized rats exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **35**, 197-203.
- Fujimaki, H., M. Ozawa, T. Imai and F. Shimizu (1984): Effect of short-term exposure to O₃ on antibody response in mice. *Environ. Res.*, **35** (2), 490-496.
- Fujimaki, H., S. Takahashi, M. Ozawa, M. Murakami, H. Takahashi and K. Kubota (1984): Enhancement of antibody response in Japanese quails by acute NO₂ exposure. *Environ. Res.*, **35**, 399-404.
- Sagai, M., T. Ichinose and K. Kubota (1984): Studies on the biochemical effects of nitrogen dioxide. IV. Relation between the changes of lipid peroxidation and antioxidative protective system in rat lung upon life span exposure to low levels of NO₂. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 444-456.

1985年

- 嵯峨井勝・市瀬孝道 (1985) : 3-メチルコランスレン, フェノバルビタール投与ラット肺における過酸化脂質について. 過酸化脂質研究, **9**, 66-69.
- 市瀬孝道・荒川健司・嵯峨井勝 (1985) : 老齡ラットの肺における過酸化脂質生成と関連因子の変化について. 過酸化脂質研究, **9**, 63-65.
- 嵯峨井勝 (1985) : 過酸化脂質と生理的因子. 3. 種差および系統差, 「過酸化脂質と生体」, 内山 充・松尾光芳・嵯峨井勝編. 学会出版センター, 145-170.
- 嵯峨井勝 (1985) : 過酸化脂質と環境因子. 2. 大気汚染物質, 過酸化脂質と生体, 内山 充・松尾光芳・嵯峨井勝編. 学会出版センター, 333-354.
- 嵯峨井勝 (1985) : ビタミン E と大気汚染, ビタミン E—基礎と臨床—. 福場博保・美濃真監修, 五十嵐脩編, 医歯薬出版, 250-258.
- 白石不二雄 (1985) : 大気汚染物質と SCE. SCE—姉妹染色分体交換と環境科学—. 小泉明・森本兼囊編, サンエンスフォーラム, 375-382.
- 内山 充・松尾光芳・嵯峨井勝編著 (1985) : 「過酸化脂質と生体」. 学会出版センター. p. 439.
- Levine, L. and T. Kobayashi (1985) : A caveat in the interpretation of radiomunoassays for arachidonic acid metabolites. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*, **14**, Raven press, New York, 83-85.
- Suzuki, H., T. Kobayashi, S. Hayakawa and O. Wada (1985) : Age associated changes in rat plasma lipids, platelet fatty acids and prostacyclin release. *Biochem. Biophys. Acta*, **836**, 394-396.
- Takahashi, Y., T. Miura and K. Kubota (1985) : *In vivo* effect of ozone inhalation on xenobiotic metabolism of lung and liver of rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 855-864.
- Takahashi, Y. and T. Miura (1985) : *In vivo* effects of nitrogen dioxide and ozone on xenobiotic metabolizing systems of rat lungs. *Toxicol. Lett.*, **26**, 145-152.
- Mochitate, K. and T. Miura (1985) : An increase in the activities of glycolytic enzymes in rat lung produced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 323-331.
- Tsuji, N., M. Kunimoto, N. Shimojo and T. Miura (1985) : *In vivo* effects of nitrogen dioxide on the blood nitrate level and the Na⁺, K⁺ -ATPase activity of red blood cells of rats. *Toxicol. Lett.*, **24**, 59-63.

1986年

- 嵯峨井勝 (1986) : 環境因子と過酸化脂質, 「過酸化脂質と栄養」, 五十嵐脩・金田尚志・福場博保・美濃真編, 光生館, 257-277.
- 小林隆弘 (1986) : NK 活性と易転移性. *Med. Immunol.*, **12**, 253-259.

- 村上正孝(1986) : NO₂生涯暴露の影響評価(動物実験)に際して加齢因子をどう考えるべきか. 60年度筑波大学老化特別プロジェクト研究報告集, 小町喜男編. 158-160.
- Ozawa, M., H. Fujimaki, T. Imai, Y. Honda and N. Watanabe (1986) : Suppression of IgE antibody production after exposure to ozone in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **76**, 16-19.
- Kobayashi, T. (1986) : Effects of nitrogen dioxide exposure on the contents of prostaglandins and thromboxane B₂ in bronchoalveolar lavage. *Prostaglandins*, **31**, 469-475.
- Arakawa, K. and M. Sagai (1986) : Species differences in lipid peroxide levels in lung tissue and investigation of their determining factors. *Lipids*, **21**, 769-775.
- Takahashi, Y., K. Mochitate and T. Miura (1986) : Subacute effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung, liver, and kidney of rats. *Environ. Res.*, **41**, 184-194.
- Tsubone, H. (1986) : Characteristics of vagal afferent activity in rats: Three types of pulmonary receptors responding to collapse, inflation, and deflation of the lung. *Exp. Neurol.*, **92**, 541-552.
- Fujimaki, H., S. Hirano, S. Takenaka, M. Murakami and N. Watanabe (1986) : Enhanced IgE antibody production in mice injected with fly ash. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **80**, 127-131.
- Mochitate, K., Y. Takahashi, T. Ohsumi and T. Miura (1986) : Activation and increment of alveolar macrophages induced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **17**, 229-239.
- 1987年
- 市瀬孝道・嵯峨井勝(1987) : 二酸化窒素暴露によるラットの肺, 血清及び尿中のコラーゲン代謝関連因子の変化. *大気汚染学会誌*, **22**, 397-407.
- 局 博一(1987) : 各種の鼻粘膜刺激に対応する三叉神経感覚受容器の存在, *医学のあゆみ*, **142**, 897-898.
- Kobayashi, T., T. Todoroki and H. Sato (1987) : Enhancement of pulmonary metastasis of murine fibrosarcoma NR-FS by ozone exposure. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **20**, 135-145.
- Umezū, T., N. Shimojo, H. Tsubone, A. K. Suzuki, K. Kubota and A. Shimizu (1987) : Effect of ozone toxicity in the drinking behavior of rats. *Arch. Environ. Health*, **42**, 58-62.
- Takahashi, Y. and T. Miura (1987) : A selective enhancement of xenobiotic metabolizing systems of rat lungs by prolonged exposure to ozone. *Environ. Res.*, **42**, 425-434.
- Murakami, M., J. Yonemoto and A. Kawagoe (1987) : Difference between human chronic bronchitis and morphological alterations in lung of rats exposed to low concentration of

- NO₂ and/or O₃ during life span. *Semin. Toxicol. Mech.*, **1**, 29-37.
- Kubota, K., M. Murakami, S. Takenaka, K. Kawai and H. Kyono (1987): Effects of long-term nitrogen dioxide exposure on rat lung: Morphological observations. *Environ. Health Perspect.*, **73**, 157-169.
- Fujimaki, H., Shiraishi, T. Ashikawa and M. Murakami (1987): Changes in delayed hypersensitivity reaction in mice exposed to O₃. *Environ. Res.*, **43**, 186-190.
- Tsubone, H., O.P. Mathew and G. Sant'Ambrogio (1987): Respiratory Activity in the superior laryngeal nerve of the rabbit. *Respir. Physiol.*, **69**, 195-207.
- Sagai, M. and T. Ichinose (1987): Lipid peroxidation and antioxidative protection mechanism in rat lungs upon acute and chronic exposure to nitrogen dioxide. *Environ. Health Perspect.*, **73**, 179-189.
- Sagai, M. and T. Ichinose (1987): Changes of lipid peroxides, vitamin E and peroxidizability index in rat lungs during aging. *Clinical and Nutritional Aspects of Vitamin E*. (ed. Hayaishi, O. and Mino, N.) Elsevier Science Publishers, 321-324.
- Sagai, M., K. Arakawa, T. Ichinose and N. Shimojo (1987): Biochemical effects of combined gases of nitrogen dioxide and ozone. I. Changes of lipid peroxides and phospholipids in lungs of various animals. *Toxicology*, **46**, 251-265.

〔口頭発表〕

1982年

- 市瀬孝道・鈴木誠一・嵯峨井勝・久保田憲太郎：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 (AHH) 活性の相関について。第23回大気汚染学会，宮崎(57. 11)。
- 市瀬孝道・鈴木誠一・鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝：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 (57. 11)。
- 市瀬孝道・嵯峨井勝：脂質過酸化の動物種差および系統差について—NO₂ 暴露による脂質過酸化—。第6回日本過酸化脂質研究会，仙台 (57. 10)。
- 嵯峨井勝・市瀬孝道・原口裕文・与那覇政憲：各種環境汚染物質による呼気中エタン，ペンタン生成の相違に関する研究。第6回日本過酸化脂質研究会，仙台 (57. 10)。
- 内田義之・本間敏明・藤岡 浩・長谷川鎮雄・嵯峨井勝：呼気ガス炭化水素測定 of 臨床応用 (第1報)。第19回日本臨床生理学会，徳島 (57. 10)。
- 嵯峨井勝・市瀬孝道・小林隆弘・久保田憲太郎：NO₂ の長期暴露のラットに及ぼす影響 10. 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 (57. 11)。
- 鈴木 明・局 博一・久保田憲太郎：NO₂ 長期暴露のラットに及ぼす影響 9. 血液 pH/ガスおよび

村上正孝

- 呼吸ガス (O_2 , CO_2) の変化について. 第 23 回大気汚染学会, 宮崎 (57. 11).
- 鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎: NO_2 および O_3 の単一あるいは複合暴露がラットの呼吸機能におよぼす影響. 第 23 回大気汚染学会, 宮崎 (57. 11).
- 高橋勇二・三浦 卓・大住拓美・久保田憲太郎: NO_2 暴露のラット肺および肝の生体膜成分に及ぼす影響. 第 23 回大気汚染学会, 宮崎 (57. 11).
- 太田庸起子・松本 理・鈴木 明・脇坂一郎・米山忠克: $^{15}NO_2$ の生体内動態に関する考察. 第 55 回日本産業衛生学会, 名古屋 (57. 4).
- 局 博一・鈴木 明・嵯峨井勝・久保田憲太郎: NO_2 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 (57. 11).
- 局 博一・鈴木 明・嵯峨井勝・久保田憲太郎: 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 (57. 11).
- 今井 透・小澤 仁・藤巻秀和・渡辺直昭: 卵白アルブミン aerosol にマウスの IgE 抗体産性 II. hapten-carrier 系を用いた解析. 第 32 回日本アレルギー学会, 岡山 (57. 10).
- 藤巻秀和・小澤 仁・村上正孝・久保田憲太郎: O_3 亜急性暴露のマウス抗体産性に及ぼす影響 I. IgM 抗体産性について. 第 23 回大気汚染学会, 宮崎 (57. 11).
- 辻井直樹・国本 学・彼谷邦光・三浦 卓・久保田憲太郎: NO_2 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, 宮崎 (57. 11).
- 持立克身・三浦 卓・国本 学・久保田憲太郎: 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 (57. 11).
- Kobayashi, T.: Effects of acute nitrogen dioxide exposure on prostacyclin (PGI_2) synthesis and content of cyclic nucleotides in the lung. Int. Symp. Biomed. Effects Ozone Relat. Photochem. Oxidants. Pinehurst (57. 3).

1983 年

- 市瀬孝道・嵯峨井勝: パラコートによる肺の線維化と過酸化脂質生成について (I). 第 7 回日本過酸化脂質学会, 名古屋 (58. 10).
- 市瀬孝道・竹中参二・嵯峨井勝・久保田憲太郎: パラコートによる肺線維症と過酸化脂質生成について (II). 第 24 回大気汚染学会, 四日市 (58. 11).
- 小澤 仁・今井 透・本多芳男・久保田憲太郎: オゾン暴露によるマウス鼻粘膜のヒスタミンの量の変化. 第 22 回日本鼻科学会, 鹿児島 (58. 11).
- 小林隆弘・久保田憲太郎: NO_2 暴露の肺胞内プロスタサイクリン量への影響. 第 24 回大気汚染学会, 四日市 (58. 11).
- 嵯峨井勝・市瀬孝道・久保田憲太郎: 二酸化窒素とオゾンの混合暴露によるラットの過酸化脂質生成と肺の防御系酵素等の変化について. 第 24 回大気汚染学会, 四日市 (58. 11).

- 岡三知夫・山岡茂夫・宮崎竹二・黒田孝一・魚住光郎・野上浩二・竹本和夫・片山博雄・嵯峨井勝・市瀬孝道：都市街路沿道における長期野外暴露実験—3年後、別系統マウスによる再実験（その1）—。第24回大気汚染学会，四日市（58. 11）。
- 内田義之・本間敏明・藤岡 浩・長谷川鎮雄・嵯峨井勝・伊藤裕康：呼気中炭化水素測定 of 臨床応用—第4報—。第7回過酸化脂質学会，名古屋（58. 10）。
- 鈴木 明：大気汚染生体影響の実験的研究懇話会，循環器生理学的立場から。第24回大気汚染学会，四日市（58. 11）。
- 鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎：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—特に酸素の動態について。第24回大気汚染学会，四日市（58. 11）。
- 高橋勇二・三浦 卓：二酸化窒素暴露によるラット肝ミクロソーム Cyt. P 450 の変動。第56回日本生化学会，福岡（58. 10）。
- 高橋勇二・三浦 卓・持立克身・国本 学・久保田憲太郎：NO₂ と O₃ 暴露によるラット臓器生体膜電子伝達系成分の変動 I. NO₂ と O₃ 単独暴露の影響。第24回大気汚染学会，四日市（58. 11）。
- 局 博一・鈴木 明・嵯峨井勝・久保田憲太郎：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 II. NO₂ 暴露による J 受容器の反射機能亢進について。第24回大気汚染学会，四日市（58. 11）。
- 藤巻秀和・小澤 仁・村上正孝・久保田憲太郎：O₃ 暴露によるマウス IgM 抗体産性の抑制。第24回大気汚染学会，四日市（58. 11）。
- 三浦 卓・高橋勇二・持立克身・国本 学・久保田憲太郎：NO₂ と O₃ 暴露によるラット臓器生体膜電子伝達系成分の変動 II. NO₂ と O₃ 複合暴露の影響。第24回大気汚染学会，四日市（58. 11）。
- 持立克身・三浦 卓・久保田憲太郎：肺のエネルギー代謝に及ぼす二酸化窒素の影響。第24回大気汚染学会，四日市（58. 11）。
- 持立克身・大住拓美・飯塚ゆかり・三浦 卓：肺のエネルギー代謝に及ぼす二酸化窒素の影響。第56回日本生化学会大会，福岡（58. 10）。
- Fujimaki, T. Imai, M. Ozawa and N. Watanabe: The effect of acute exposure to nitrogen dioxide on the IgE antibody production in mice. 5th Int. Congr. Immunol. Kyoto (58. 8).
- Ozawa, M., T. Imai, Y. Honda, N. Watanabe, H. Fujimaki and K. Kubota: The effect of exposure to ozone on the IgE antibody production in mice. 5th Int. Congr. Immunol., Kyoto (58. 11).

1984年

小林隆弘・森田育男・室田誠逸：大気汚染物質暴露による呼吸器，血管のプロスタグランジン合成

- の変化とその血小板に及ぼす影響. 日本炎症学会 84 年炎症セミナー, 東京 (59. 1).
- 彼谷邦光・三浦 卓: ラット赤血球のエーテル型とジアシル型エタノールアミンホスホグリセライドへのアラキドン酸の取り込みとホスホリパーゼ A₂ の基質特異性. 第 26 回日本脂質生化学研究会, 新潟 (59. 7).
- 河田明治・高橋勇二・三浦 卓: 酸化性刺激によるグルタチオン合成酵素活性の変動. 第 57 回日本生化学会大会, 東京 (59. 10).
- 小林隆弘: ラットの肺および血管壁のプロスタサイクリン合成におよぼすオゾン暴露の影響. 日本薬学会第 104 年会, 仙台 (59. 3).
- 白石不二雄・村上正孝・久保田憲太郎: 大気汚染物質のラット末梢血リンパ球姉妹染色分体交換への影響 I. 二酸化窒素. 第 25 回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).
- 河田明治・高橋勇二・三浦 卓・久保田憲太郎: 二酸化窒素暴露によるラット肺のグルタチオン合成系酵素活性に及ぼす影響. 第 25 回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).
- 小林隆弘: 二酸化窒素がラット脾臓のプロスタグランジン合成活性に及ぼす影響. 第 57 回日本生化学会大会, 東京 (59. 10).
- 小林隆弘・久保田憲太郎: NO₂ 暴露の脾臓及び胸線のプロスタグランジン合成能に及ぼす影響. 第 25 回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).
- 高橋勇二・三浦 卓・久保田憲太郎: オゾン亜急性暴露によるラット肺および肝臓の薬物代謝系成分の変動. 第 25 回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).
- 局 博一・鈴木 明・久保田憲太郎: 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 III. ラット肺刺激受容体の化学的・機械的刺激に対する応答性. 第 25 回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).
- 局 博一・鈴木 明・清水 明・久保田憲太郎: 大気汚染物質の生体影響に関する行動生理学的研究 I. O₃ 暴露による飲水行動量の変化. 第 25 回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).
- 小澤 仁・藤巻秀和・今井 透・本多芳男・渡辺直照: オゾン暴露によるマウス IgE 抗体産生の抑制. 第 34 回日本アレルギー学会, 京都 (59. 10).
- 藤巻秀和・小澤 仁・足川哲夫・村上正孝・久保田憲太郎: NO₂ と O₃ の複合暴露の免疫応答に及ぼす影響. 第 25 回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).
- 藤巻秀和・久保田憲太郎・渡辺直照: エアロゾル抗原による IgE 抗体産生の誘導. 第 14 回日本免疫学会総会, 大阪 (59. 12).
- 三浦 卓: 二酸化窒素の生体影響の加齢による修飾. 第 2 回環境科学シンポジウム, 岡山 (59. 11).
- 佐野憲一・村上正孝・下條信弘・加納克身・山口誠哉: SO₂ 暴露モルモットにおける生理学及び生化学検索第 1 報 SO₂ 混合アルブミン吸入実験. 第 57 回日本産業衛生学会, 札幌 (59. 6).
- 持立克身・三浦 卓・久保田憲太郎: 肺胞マクロファージに対する二酸化窒素の影響. 第 25 回大

気汚染学会, 宇部 (59. 11).

Kobayashi, T.: Effect of air pollutants on the content of metabolites of arachidonic acid in lung lavage. Kyoto Conf. Prostaglandins, Kyoto (59. 3).

1985年

白石不二雄・森本兼曩・小泉 明・村上正孝・久保田憲太郎: 大気汚染物質のラット末梢血リンパ球姉妹染色分体交換への影響II. オゾン. 第55回日本衛生学会総会, 熊本 (60. 4).

嵯峨井勝: 過酸化脂質と大気汚染、於過酸化脂質と栄養シンポジウム、第39回日本栄養・食糧学会総会, 東京 (60. 4).

高橋勇二・河田明治・持立克身・国本 学・三浦 卓: 肺の薬物代謝系に対する二酸化窒素及びオゾンの影響. 第58回日本生化学会大会, 仙台 (60. 9).

持立克身・高橋勇二・石田邦彦・三浦 卓: 肺胞マクロファージに対する二酸化窒素及びオゾンの影響. 第58回日本生化学会大会, 仙台 (60. 9).

小林隆弘・山根一祐: ラット肺胞洗浄液中のリポキシゲナーゼ系代謝物とオゾン暴露. 第58回日本生化学会大会, 仙台 (60. 9).

小林隆弘・久保田憲太郎: オゾン暴露がラット肺胞洗浄液中のリポキシゲナーゼ系代謝物量に及ぼす影響. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).

市瀬孝道・嵯峨井勝・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ の混合ガス暴露による過酸化脂質生成の動物種差について. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).

白石不二雄・村上正孝・久保田憲太郎: 大気汚染物質のラット末梢血リンパ球姉妹染色分体交換への影響III. NO_2 と O_3 の複合. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).

高橋勇二・持立克身・河田明治・三浦 卓・久保田憲太郎: 肺及び肝臓の薬物代謝系に対する NO_2 の影響. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).

石田邦彦・持立克身・三浦 卓・久保田憲太郎: マウスの免疫系に及ぼすオゾンの影響. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).

持立克身・三浦 卓・久保田憲太郎: 肺胞マクロファージに対するオゾンの影響. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).

高橋 弘・高橋慎司・伊藤勇三・山元昭二・米元純三・久保田憲太郎・ $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響1. 供試動物の飼育経過. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).

清水 明・松本 茂・藤田和伸・高橋 弘・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響2. 実験環境の設定と維持. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).

鈴木 明・局 博一・河田明治・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響3. 血液ガス分圧の変化. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).

村上正孝・米元純三・河越昭子・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響4. 病理

- 形態学的変化. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).
- 嵯峨井勝・市瀬孝道・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響 5. 過酸化脂質と抗酸化性防御系の変化. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).
- 市瀬孝道・嵯峨井勝・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響 6. コラーゲン代謝関連因子の変化. 第26回大気汚染学会, 東京 (60. 11).

1986年

- 嵯峨井勝: 環境科学における毒性指標としての過酸化脂質について. 第56回日本衛生学会総会(特別報告). 津市 (61. 3).
- 市瀬孝道・嵯峨井勝・佐野友春・村上正孝: NO_2 と O_3 の単一暴露によるラットとモルモットの肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化. 第27回大気汚染学会, 京都 (61. 11).
- 河越昭子・米元純三・村上正孝: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響—肺の電顕形態計測— 第27回大気汚染学会, 京都 (61. 11).
- 河田明治: 二酸化窒素又はオゾン暴露がラット肺のグルタチオンの合成系酵素活性に及ぼす影響. 文部省「環境科学」第1回環境科学シンポジウム, 東京 (61. 11).
- 河田明治・持立克身・高橋勇二・三浦 卓: 老齢ラットに及ぼす二酸化窒素の影響 (IV) —肺のグルタチオン代謝の変化—. 第27回大気汚染学会, 京都 (61. 11).
- 小林隆弘・井上忠弘・轟 健・垣生園子・奥村 康: オゾン暴露によるマウス繊維肉種の肺転移に及ぼす影響とNK細胞ならびに肺胞マクロファージの細胞傷害活性. 第45回日本癌学会総会, 札幌 (61. 10).
- 小林隆弘・山根一祐: 酸化力の強いガス状物質 (二酸化窒素, オゾン) が呼吸器系のアラキドン酸カスケードに及ぼす研究と気道の過敏状態に関して. 文部省「環境科学」第1回環境科学シンポジウム, 東京 (61. 11).
- 小林隆弘・井上忠弘・山根一祐・村上正孝: オゾン暴露が脾細胞および肺胞マクロファージの細胞傷害活性に及ぼす影響. 第27回大気汚染学会, 京都 (61. 11).
- 井上忠弘・山口誠哉・小林隆弘: 肺胞マクロファージの活性化に対する肺胞被覆物質の影響. 第16回免疫学会, 東京 (51. 12).
- 白石不二雄・菊池智徳・村上正孝: 大気汚染物質のラット末梢血リンパ球姉妹染色分体交換への影響IV. NO_2 と O_3 の交互暴露. 第27回大気汚染学会, 京都 (61.11).
- 鈴木 明・梅津豊司・局 博一・清水 明・河田明治: 大気汚染物質の生体影響に関する行動生理学的研究3. O_3 反復暴露による飲水行動量の変化. 第27回大気汚染学会, 京都 (61. 11).
- 鈴木 明・局 博一・清水 明・河田明治: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露がラットに及ぼす研究(7)ガス交換能の変化. 第27回大気汚染学会, 京都 (61. 11).
- 持立克身・三浦 卓: 肺胞マクロファージの食殺菌活性に及ぼすオゾンの影響. 第59回日本生

学会大会, 西宮 (61. 9).

高橋勇二・三浦 卓: 大気汚染ガス暴露によるラット肺チトクローム P-450 イソ酵素の変動. 第 59 回日本生化学会大会, 西宮 (61. 9).

高橋勇二・三浦 卓: 老齢ラットに及ぼす二酸化窒素の影響 (II) —肺のミクロソーム成分の変化. 第 27 回大気汚染学会, 京都 (61. 11).

三浦 卓・高橋勇二: 老齢ラットに及ぼす二酸化窒素の影響 (III) 肝臓及び腎臓のミクロソーム成分の変化一. 第 27 回大気汚染学会, 京都 (61. 11).

持立克身・三浦 卓: 肺胞マクロファージに及ぼすオゾンの影響 (II) —微生物に対する食殺菌活性の変化一. 第 27 回大気汚染学会, 京都 (61. 11).

持立克身・高橋勇二・三浦 卓: 酸化性ガスに対する生体の適応過程—その生化学的アプローチ—. 文部省「環境科学」第 1 回環境科学シンポジウム, 東京 (61. 11).

山根一祐・小林隆弘: *in vitro* でのアナフィラキシー反応前後におけるモルモット気管の β -アドレナージック反応およびヒスタミンに対する反応性. 第 36 回日本アレルギー学会総会, 岐阜 (61. 10).

小林隆弘・山根一祐: *in vivo* でのアナフィラキシー反応前後における気管の化学伝達物質に対する反応性および β -アドレナージック反応. 第 36 回日本アレルギー学会総会, 岐阜 (61. 10).

Kobayashi, T., T. Inoue, K. Yamane, S. Habu, K. Okumura: Damage of cytotoxicity of spleen cells and enhancement of pulmonary metastasis of murine fibrosarcoma NR-FS by ozone exposure. IV Int. Congr. Toxicol, Tokyo (61. 7).

Sagai, M., K. Arakawa, T. Ichinose: Comparison of lipid peroxides and phospholipids in lungs of four species of animals exposed to combined gases of nitrogen dioxide and ozone. IV Int. Congr. Toxicol, Tokyo (61.7).

1987 年

白石不二雄: ラット末梢血リンパ球の微量血培養による SCE 分析法と系統比較. 日本環境変異原学会第 16 回大会, 京都, (62. 10).

持立克身・三浦 卓: 肺胞マクロファージに及ぼす低濃度オゾン及び二酸化窒素の長期複合暴露の影響 (III) . 第 28 回大気汚染学会, 東京 (62. 10).

持立克身・三浦 卓: 肺胞マクロファージに及ぼすオゾンの影響 (IV) —老化による殺菌活性への傷害の増幅一. 第 28 回大気汚染学会, 東京 (62. 10).

伊藤勇三・三浦 卓・高橋 弘: 老齢ラットに及ぼすオゾンの影響 (I) —臓器重量, Ht 値等の変化及び死亡例ラットの解剖所見一. 第 28 回大気汚染学会, 東京 (62. 10).

高橋勇二・三浦 卓: 老齢ラットに及ぼすオゾンの影響 (II) —肺ミクロソーム成分の変化一. 第 28 回大気汚染学会, 東京 (62. 10).

三浦 卓・高橋勇二：老齡ラットに及ぼすオゾンの影響 (III) —腎臓ミクロソーム成分の変化—
第 28 回大気汚染学会, 東京 (62. 10).

三浦 卓・高橋勇二・持立克身・国本 学：大気汚染物質の生体影響の加齢による修飾. 文部省「環
境科学」環境科学シンポジウム 1987, 東京 (62. 11).

局 博一・O.P. Mathew・G. Sant'Ambrogio：ウサギ上喉頭神経内枝における求心性活動の特
徴. 第 64 回日本生理学会, 千葉 (62.4).

河田明治・高橋勇二・三浦 卓：二酸化窒素とオゾンの複合暴露によるラット肺のグルタチオン
合成系酵素活性及びグルタチオン量に及ぼす影響. 第 28 回大気汚染学会, 東京 (62. 10).

野原恵子・河田明治・彼谷邦光：酸化性ガス暴露によるラット肺遊離ドリコール量の変動. 第 60
回日本生化学会, 金沢 (62. 10).

嵯峨井勝・市瀬孝道：NO₂ と O₃ の複合暴露による肺の過酸化脂質生成とリン脂質組織の動物種
差について. 第 11 回日本過酸化脂質学会, 名古屋 (62. 10).

嵯峨井勝・市瀬孝道・平野靖史郎：硫酸エアロゾル吸入動物のコラーゲン代謝と病理組織学的変
化について. 第 28 回大気汚染学会, 東京 (62. 10).

市瀬孝道・嵯峨井勝：NO₂ と O₃ の単独および複合暴露によるラットとモルモットの肺の過酸化
脂質生成と抗酸化性防御系の変化. 第 11 回日本過酸化脂質学会, 名古屋 (62. 10).

山根一祐・小林隆弘：モルモット気管平滑筋の自発性張力維持ならびにヒスタミン収縮時におけ
る内因性アラキドン酸代謝物の役割. 第 37 回日本アレルギー学会総会, 東京 (62. 10).

山根一祐・小林隆弘：モルモット気管平滑筋に対するホルムアルデヒドの収縮作用とその機構.
第 28 回大気汚染学会, 東京 (62. 10).

Tsubone, H., O.P. Mathew, G. Sant'Ambrogio: Role of epiglottis on the afferent activity of
the superior laryngeal nerve (SLN) in the rabbit. 37th Ann, Fall Meeting of Amer. Physiol.
Soc., New Orleans (61.10).

Sant'Ambrogio, F.B., G. Sant'Ambrogio, O.P. Mathew (Univ. Texas) and H. Tsubone: Effect
of hypercapnia and hypoxia on trachealis muscle and tracheal stretch receptors. 71th Ann.
Meeting of FASEB. Washington (62.4).

Sant'Ambrogio, F.B., H. Tsubone, O.P. Mathew, G. Sant'Ambrogio, G. Insalaco (Univ.
Texas): Laryngeal afferents in the external branch of the superior laryngeal (EXT, SLN)
and the recurrent laryngeal (RLN) nerves. 38th Ann. Fall. Meet. of Amer. Physiol. Soc. San
Diego (62.10).

II-1

二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 I
—— 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 and Ozone on Rats I
—— Results of Environment Control in the 2nd Experiment ——

清水 明¹・松本 茂¹・伊藤勇三¹・山元昭二¹
高橋慎司¹・高橋 弘¹

Akira SHIMIZU¹, Shigeru MATSUMOTO¹, Yuzo ITO¹, Shouji YAMAMOTO¹
Shinji TAKAHASHI¹ and Hiroshi TAKAHASHI¹

要 旨

特別研究の一環として、低濃度の二酸化窒素 (NO₂) とオゾン (O₃) の長期複合暴露の、ラットに及ぼす影響についての第 2 回目実験が、22 か月間にわたって実施された。本報告では、この実験期間中の各チャンバーの温・湿度、二酸化窒素濃度及びオゾン濃度の設定条件と制御結果をまとめた。これらの結果から各環境因子の制御は、実験期間中おおむね良好に行われていた。

Abstract

The 2nd experiment concerned with biological effects of Nitrogen dioxide (NO₂) and/or Ozone (O₃) was performed from May, 1985 to March, 1987 using male Wister rats. This report showed the basic data of regulation and monitoring of NO₂ and/or O₃ gas concentration, temperature and humidity on the chambers (C, G-1, 2, 3) throughout 22 months.

The experiment groups were divided into 1) Control (C), 2) O₃ : 0.1ppm Max. (G-1), 3) NO₂ : 0.04ppm+O₃ : 0.1ppm Max. (G-2), and 4) NO₂ : 0.4ppm+O₃ : 0.1ppm Max. (G-3) according to the 1st experiment. And NO₂ was continuously exposed everyday, but O₃ was averaged at 0.021ppm per day in accordance with sine curve from 0 to max. 0.1ppm.

Throughout all the experiment periods, the gas concentrations were well controlled against the setting values. And also, the temperature and humidity were maintained almost 25±1°C, and 55±10%, respectively. These results were sufficient with each setting levels.

1. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川 16 番 2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1 はじめに

本特別研究における NO_2 と O_3 の複合暴露がラットに及ぼす影響に関する第一回目の実験は、1983年2月から1985年2月までの24か月間にわたって実施された。これに引き続き、第二回目の複合暴露実験が、1985年5月から1987年3月までの22か月間にわたり、Wistar系ラットの雄（従来と同じ¹⁾）384匹を使用して実施された。本報告は、この第二回目の複合暴露実験の制御環境因子、すなわち、全暴露期間中の NO_2 と O_3 の濃度及び温・湿度の維持状態について示し、本研究に関する一連の報告の共通の基盤を提供するものである。この実験で、温・湿度並びに NO_2 の制御については従来の長期暴露実験と同様の定値制御を行ったが^{2,3)}、 O_3 の暴露に関しては、実際の外気状態をシミュレートするために、濃度（目標値）をゼロから漸増し（朝：9時）、最大値に達し（昼：14時）、漸減してゼロへ（夕：19時）と連続的に変化させる追従制御を行った。したがって、今回の暴露実験（前回も含めて）は、長期連続・低濃度・複合暴露であるとともに、その暴露方法にも特徴があると言える。

2 方法

2.1 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、既報³⁾の NO_2 長期暴露のラットに及ぼす影響に使用したチャンバーに、 O_3 暴露機能を付加したもので、ガス暴露用3台、コントロール用1台の計4台（G-1, 2, 3及びCと呼称している）で構成されている。図1にチャンバーのブロックダイアグラムを示すが、 O_3 暴露の制御に関する部分を除いては、以前と同様であるので詳細は既報³⁾を参照されたい。 O_3 濃度制御用分析計としては、化学発光方式の紀本電子工業社製 MODEL-806 S 並びに

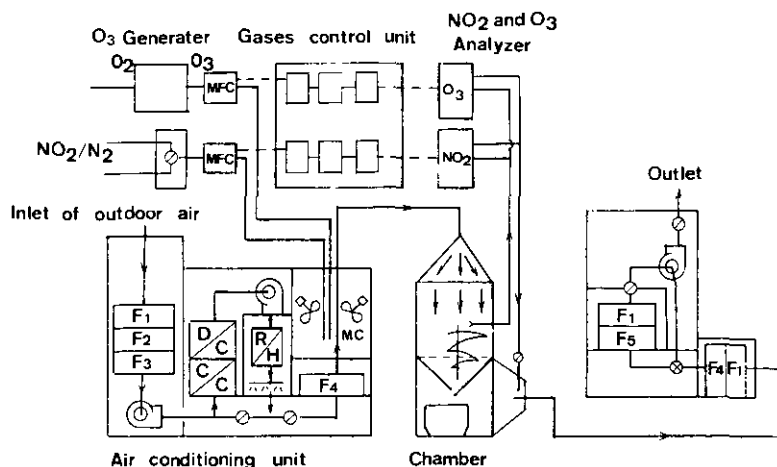


図 1 チャンバーシステムブロック図
Fig. 1 Block diagram of chamber system

モニターラボ社製 MODEL-8410 を使用した。

暴露用 O₃ は、液体酸素を気化させ、高電圧放電管に通して発生させたものを使用した。この時、発生する O₃ の濃度は、放電管内を流れる酸素の量によって変化するため制御上好ましくない。そこで、流す酸素の量は常に一定に保ちながら、濃度制御に必要なとされる量だけを MFC (マスフローコントローラ) で制御してミキシングチャンバーに吹き込み、残りはパージラインへ廃棄 (チャンバーの排気処理装置で処理) して、供給する O₃ の濃度の安定化を図った。さらに、オゾン吹き込みノズルは、NO₂ のノズルとは別に設置し、相互に 10 cm 程度の距離を置いた。これにより、NO₂ と O₃ が高濃度状態で接触しないようにして、二次生成物の発生を極力抑えた。また、O₃ 暴露の濃度変化は、濃度ゼロの状態から正弦波状のパターン変化をすることが要求されたが、これは MFC のみの制御では実現できない。それは、一般に MFC は、全閉状態でも数%程度の漏れがあるため、完全に操作量をゼロにすることができないためである。そこで、O₃ 濃度がゼロを要求される期間は、O₃ 吹き込みノズルを、電磁弁で遮断することでこれに対処した。実験期間中のガス濃度並びにガス流量は、データ収録装置で収集記録し、また温・湿度については、各記録紙から読み取ったデータを、それぞれマイクロコンピュータシステムを使用して処理した。

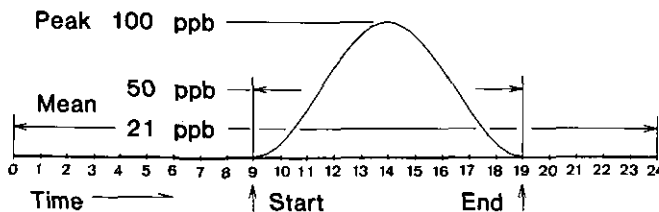
2.2 ガス暴露チャンバーの運転条件

本暴露実験の暴露期間は、1985年5月15日から1987年3月26日までの約22か月間(681日間)である。この期間中の各チャンバーのガス濃度及び温・湿度の設定条件を表1に示す。NO₂ は、0.04 ppm, 0.4 ppm の定値制御を2群設定した。O₃ は間欠暴露とし、表1に示すように毎日9時に暴露を開始し、14時に最大値0.1 ppmに達し、19時に暴露を終了する。濃度変化の概形は

表 1 チャンバー制御環境因子の設定条件
Table 1 Enviromental condition set in chambers

Chamber	Concentration		Temperature (°C)	R.Humidity (%)
	NO ₂ (ppb)	O ₃ (ppb)		
C	Fresh air only		25±2	55±10
G-1	Non	0 to 100*	25±2	55±10
G-2	40	0 to 100*	25±2	55±10
G-3	400	0 to 100*	25±2	55±10

* Program control as follows (1000ppb=1ppm)



正弦波で、外気状態のシミュレーションを行った。これによれば、暴露時間内（10時間）の平均値は 0.05 ppm であり、一日の平均値は 0.021 ppm となる。これと同じ濃度、同じパターンを 3 群設定した。これから、O₃ 単成分が 1 台、O₃ と NO₂（濃度差をつけた）複合成分が 2 台と、コントロールチャンバー 1 台の計 4 台構成で実験を行った。また、各チャンバーの換気量は 50 回/h に設定した。

3 結果及び考察

各チャンバー内の温度と湿度の制御結果を図 2、図 3 に示す。同様に、NO₂ の制御結果を図 4 に示す。これらの結果は、各測定値の 1 時間平均を求め、その値の全実験期間（22 か月）当たりの出現頻度としてまとめたものである。図 5 には、O₃ の制御結果を示す。これは、O₃ の暴露が追従制御であるため濃度が大きく日内変動するので、まず一日ごとに暴露濃度平均値を求め、その値の全実験期間について出現頻度としてまとめた。表 2 に、これらの平均値と標準偏差を示す。また、実験期間中の各チャンバーの換気量は 40~100 回/h であった。

制御結果の図 2、図 3、図 4 及び表 2 から、温・湿度、NO₂ の制御については、ほぼ目標値に分布のピークがあり、分布の広がりも過去の実験値と同程度であり良好と考える。これらに比べ、O₃ の制御結果は、平均値が目標（計算上 0.021 ppm）に比較して若干高く（0.026~0.028 ppm）、測定値（1 日平均値）の分布の広がりも大きい。分布については、O₃ の制御は 1 日内の目標値を大きく変化させた追従制御であり、他の環境制御因子（温・湿度、NO₂ 濃度は、定値制御である）に比べ、制御が困難であるためと考えられる。また、平均値が上がった原因の一つとしては、暴

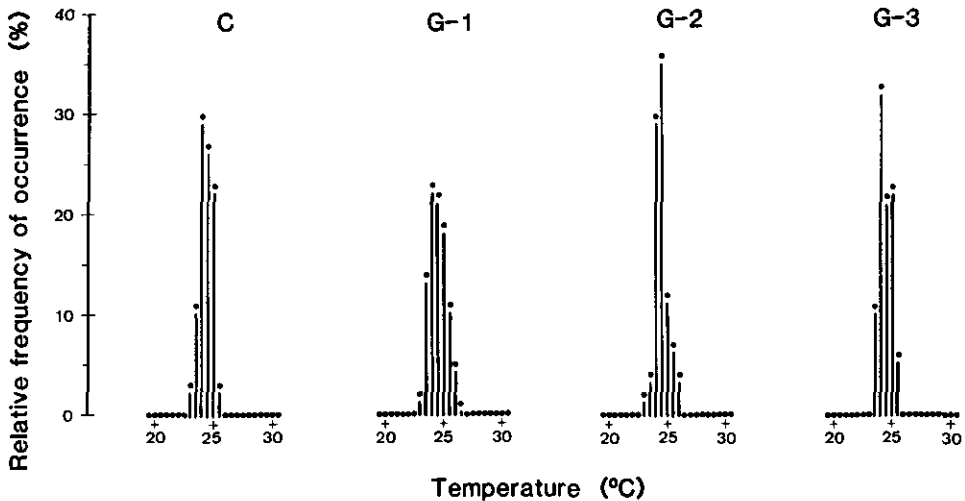


図 2 温度制御結果
Fig. 2 Results of temperature controls

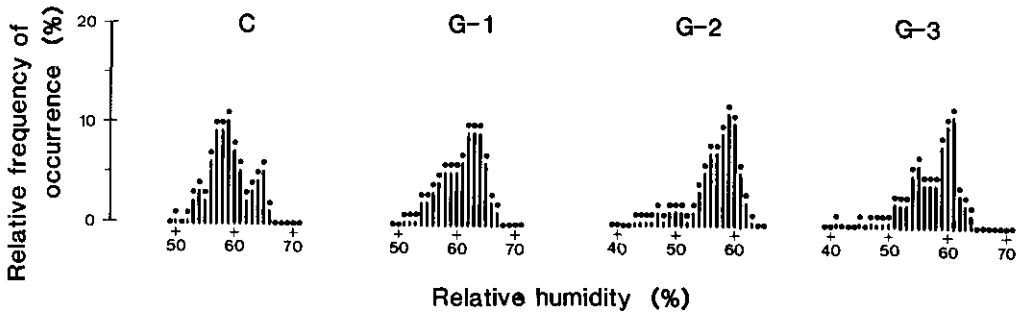


図 3 湿度制御結果
Fig. 3 Results of Relative humidity controls

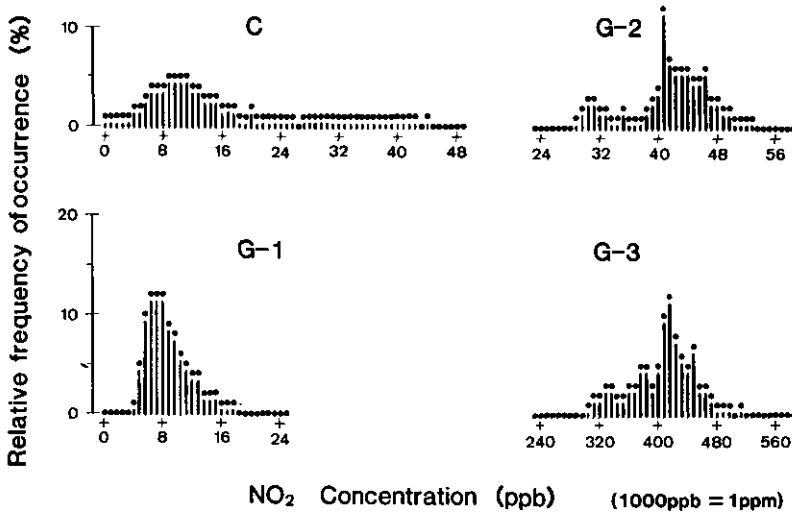


図 4 二酸化窒素濃度制御結果
Fig. 4 Results of NO₂ controls

露濃度がゼロであるべき期間にも若干の残留 O₃ がチャンバー内に存在することの影響が考えられる。しかしながら、3 チャンバーとも濃度測定値の分布状態 (図 5) は、似通っており、平均値もほぼ同じであり、チャンバー相互の比較に際して、障害にならないと考える。

次に、暴露を行っていないチャンバーのガス濃度すなわち、C の NO₂ と O₃ 濃度、G-1 の NO₂ 濃度についてみると、それぞれ暴露を行っていたチャンバーと比べ、ガス濃度の平均値はそれぞれゼロに近く、そのピークの位置は暴露群とは大きく離れている。したがって、暴露群に対するコントロールとしての機能は十分に果たしたものと考えられる。この中で、C と G-1 の NO₂ の平均値の差が大きいのが、これは当地において、冬期に外気の NO₂ 濃度が上昇し、給気浄化フィル

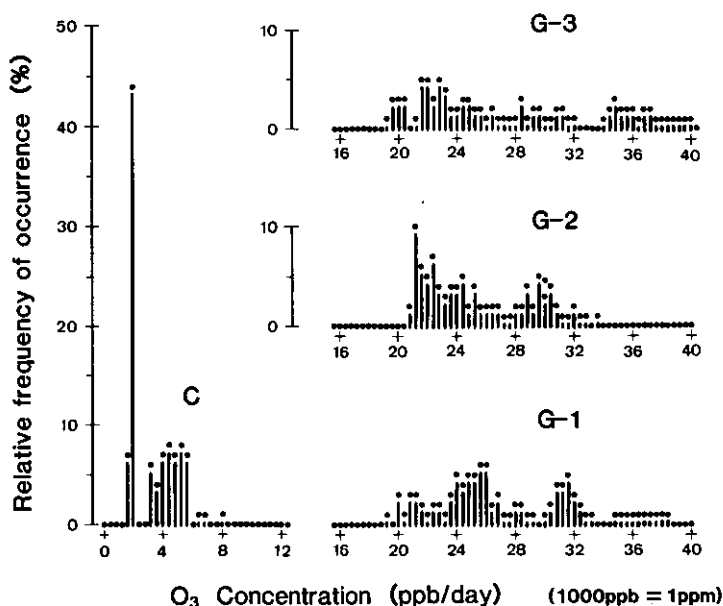


図 5 オゾン濃度制御結果
Fig. 5 Results of O₃ controls

表 2 チャンバー制御結果

Table 2 Environmental condition set in chambers

Chamber	Concentration		Temperature (°C)	R.Humidity (%)
	NO ₂ (ppb)	O ₃ (ppb)		
C	16.4±11.6 ¹⁾	3.1±1.5 ¹⁾	24.3±0.6	58.1±6.0
G-1	9.1±4.9 ²⁾	27.2±5.0	24.5±0.8	60.4±4.7
G-2	41.9±7.2	25.5±9.5	24.5±0.7	55.9±5.7
G-3	401±47	27.9±6.6	24.4±0.6	56.9±6.0

Monitoring-period : 1) 85/9~86/4 (8 months) (M±SD)

2) 85/6~8 and 86/6~8 (3 months×2)

and others : 85/5~87/3 (22 months)(1000ppb=1ppm)

ターによっても除去しきれない事態が多く発生するために、夏期にモニターを行った G-1 の結果との違いが表れたものと考えられる (コントロール群の結果は、表 2 の下段に示す各期間についての集計である)。

今回は NO₂ と O₃ の複合暴露であり、これらのガス反応によって生じる二次生成物の発生が懸念される⁴⁾。そのため、単成分と複合状態にした場合における、NO₂・O₃ 分析計の指示値の変化から、二次生成物の大まかな発生状態を把握することを試みた。チャンバーは、長期暴露実験の場

合と同一の条件（温・湿度，換気量，ただし動物は入れずケージのみ）とし， NO_2 と O_3 の濃度を各 0.4 ppm でそれぞれのガスを入り切りして，各分析計の指示値の変化を見たがこれによると，変化はそれぞれ 3% 以下であった。これらの結果は，長期暴露実験時の二次生成物の量は暴露ガス成分に比べて非常に少ないものと考えられるが，今後さらに詳細な検討が必要であろう。

以上の考察より，各チャンバーの環境因子の制御については当初計画されたとおりおおむね良好に遂行されており，初期の目的を達成できたものとする。

謝 辞

本報告をまとめるに当たり，暴露制御システムの設計製作に関して製鉄化学工業株式会社・小糸工業株式会社，故障時の対応に関しては裕生工業株式会社，基礎データの処理作業に関してはアニマルケア株式会社・ラボス株式会社の各位に御協力いただいた。ここに記して，深く謝意を表する次第である。

引 用 文 献

- 1) 高橋 弘・高橋慎司・山元昭二・伊藤勇三(1983): 二酸化窒素のラットに及ぼす影響—第二回目実験の供試動物の飼育経過. 国立公害研究所研究報告, 第 40 号, 181-193.
- 2) 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. 国立公害研究所研究報告, 第 15 号, 149-158.
- 3) 清水 明・松本 茂・藤田和伸・木村英雄・高橋 弘(1983): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響—第二回目実験の暴露チャンバーの環境制御. 国立公害研究所研究報告, 第 40 号, 171-179.
- 4) 松本 茂・寺尾恵治・高橋慎司・高橋 弘・相賀一郎(1980): 大気複合汚染ガス暴露チャンバーにおける二酸化窒素及びオゾンの濃度制御について. 国立公害研究所研究報告, 第 15 号, 133-140.

II-2

二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 II

—— 第2回目実験の供試動物の飼育経過 ——

Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats II

—— Experimental Animals Supplied to the 2nd Experiment ——

伊藤勇三¹・高橋慎司¹・山元昭二¹

清水 明¹・高橋 弘¹

Yuzo ITO¹, Shinji TAKAHASHI¹, Shouji YAMAMOTO¹

Akira SHIMIZU¹ and Hiroshi TAKAHASHI¹

要 旨

大気汚染物質であるオゾン (O₃) 及び二酸化窒素 (NO₂) が生体に及ぼす影響を明らかにするために、低濃度の O₃ (最大 0.1ppm), O₃ (最大 0.1ppm)+NO₂ (0.04ppm), O₃ (最大 0.1ppm)+NO₂ (0.4ppm) 及び対照群の 4 群とし、ラットに最大 22 か月間暴露した。

その結果、暴露したラット 384 匹のうち 355 匹は予定どおり搬出され、各実験に供試することができた。残りの 29 匹は暴露途中で死亡したが、O₃, NO₂+O₃の影響によるものではなく下垂体腫瘍等による死亡と考えられた。また暴露期間中の体重の推移についても、O₃, NO₂+O₃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 O₃, NO₂+O₃ 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、各種実験に供試することができた。

Abstract

Male Wistar rats were exposed to Ozone (O₃) and Nitrogen dioxide (NO₂) at the concentration of O₃ (0.1ppm max), O₃ (0.1ppm max) + NO₂ (0.04ppm), O₃ (0.1ppm max) + NO₂ (0.4ppm) for up to 22 months to clarify the biological effects of air pollutants.

The 355 rats out of 384 were supplied to planned experiments, and the residual 29 rats died of pituitary tumor and other reasons.

Throughout the experiment, there was no significant difference in the body weight of rats between any of group exposed NO₂ and/or O₃ and control.

Therefore, it was suggested that exposure to NO₂ and/or O₃ at low concentration (O₃; 0.1 ppm max, and NO₂; 0.04 ppm or 0.4 ppm) did not affect the life span of rats and their body weight.

These rats were supplied to the following various experiments.

-
1. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1 はじめに

大気汚染物質である O_3 ・ NO_2 が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、当施設と略す)では、ラットを用いて NO_2 単一及び O_3 、 NO_2 複合の長期暴露実験をこれまで計3回実施してきた。第1回の NO_2 単一長期間暴露実験は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^{1,2)}。第2回の NO_2 単一長期暴露実験は1980年5月から1981年11月までの最大18か月間行われ、その結果は国立公害研究所研究報告第40号にまとめている³⁾。また、3番目として第1回の O_3 、 O_3 + NO_2 複合長期暴露実験が1983年2月から1984年12月まで最大22か月間行われた。

本研究は第2回目の O_3 、 O_3 + NO_2 複合長期暴露実験として、1985年5月から1987年3月までの22か月の日程で実施され、 O_3 、 O_3 + NO_2 低濃度の複合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。

2 材料及び方法

2.1 供試動物

本実験に際して動物を3回導入したが、いずれも動物は、JCl. Wistar系ラット雄(6週齢)を導入して、当施設バリアー内検疫飼育室で1週間予備飼育を行った後に実験に供した(表1参照)。

表 1 材料及び方法
Table 1 Materials and methods

Group	Exp.	No. Animals (Sex)	Date of Birth	Date of Arrival at NIES (Age)	Date of Housing in Chamber (Age)	Period of O_3 , NO_2 Exposure
A		288 (♂)*	'85.3.21 —3.23	'85.4.30 (6wk)	'85.5.15 (8wk)	10mos 13mos 18mos 22mos
B		48 (♂)	'86.5.8 —5.10	'86.6.17 (6wk)	'86.6.30 (8wk)	7mos 8mos
C		48 (♂)	'86.10.2 —10.4	'86.11.11 (6wk)	'86.11.27 (8wk)	4mos
D (Cont.)		32 (♂)*	'85.3.21 —3.23	'85.4.30 (6wk)	Rearing in the Barrier ('85.5.15—'87.5.8)	
E (Exp. Food)		80 (♂)*	'85.3.21 —3.23	'85.4.30 (6wk)	Rearing in the Barrier ('85.5.15—'87.5.8)	

* Same Lot of Jcl: Wistar Rats

2.2 実験飼育期間

各群別に実験期間を図1に示した。各群のガス暴露期間は、A群：10か月・13か月・18か月・22か月、B群：7か月・8か月、C群：4か月とし、いずれも8週齢時より暴露を開始した。以下に各群での飼育日数を示した。

(1) A群 (22か月複合ガス暴露群)

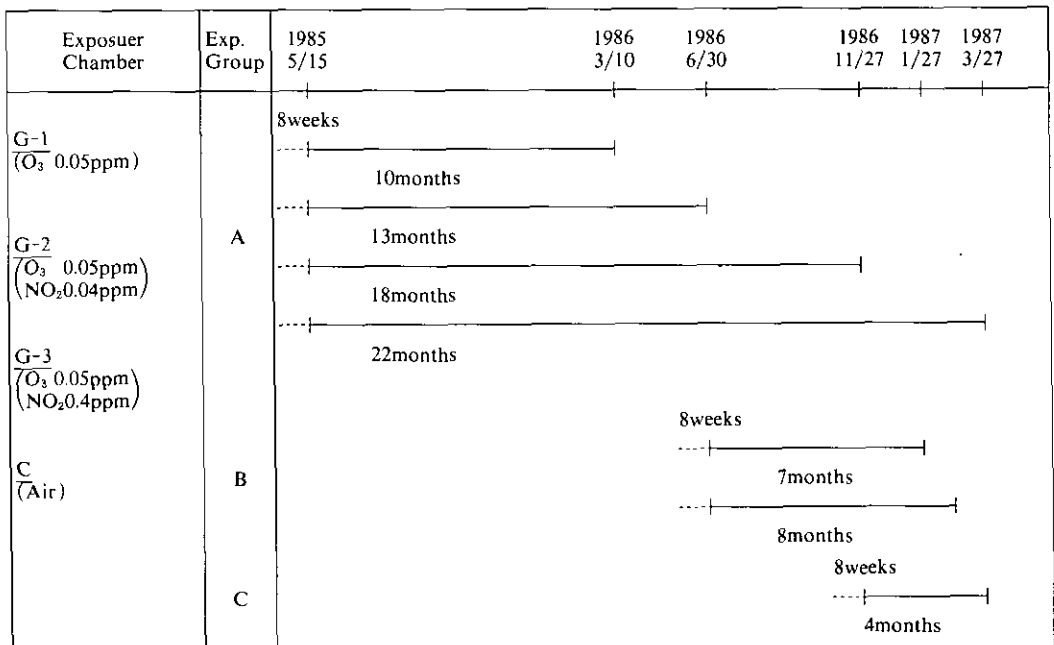
- 1985年5月15日から1986年3月10日まで 300日間
- 1985年5月15日から1986年6月26日まで 407日間
- 1985年5月15日から1986年11月25日まで 559日間
- 1985年5月15日から1987年3月26日まで 681日間

(2) B群 (8か月複合ガス暴露群)

- 1986年6月30日から1987年1月27日まで 212日間
- 1986年6月30日から1987年3月13日まで 257日間

(3) C群 (4か月複合ガス暴露群)

- 1986年11月27日から1987年3月26日まで 120日間



— : Experimental period in Gas Chamber

..... : Breeding period in SPF Room

• : Experimental Group were named "C" for Control, "G-1" for O₃ 0.05ppm, "G-2" for O₃ 0.05ppm+NO₂ 0.04ppm and "G-3" for O₃ 0.05ppm+NO₂ 0.4ppm

図 1 O₃+NO₂ ガス暴露タイムスケジュール

Fig. 1 Time schedule of O₃+NO₂ exposure

(4) D群 (22か月複合ガス暴露群のルームコントロール群)

1985年5月15日から1986年6月6日まで 387日間

1985年5月15日から1987年5月8日まで 724日間

2.3 O₃ 及び O₃ + NO₂ 暴露群の構成

これまでに当施設内でなされた暴露実験の成績から総合的に判断して、(1)O₃ (0.1 ppm max) 暴露群、(2)O₃ (0.1 ppm max) + NO₂ (0.04 ppm) 暴露群、(3)O₃ (0.1 ppm max) + NO₂ (0.4 ppm) 暴露群、及び(4)O₃ も NO₂ も添加しない対照群の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 (C, G-1, 2, 3) の性能・仕様については既報^{4,5)} のとおりである。

2.4 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 (365 W×280 D×220 H mm) で1ケージ当たり収容匹数は8週齢から42週齢までは6匹、それ以降は5匹を原則とした。飼料はオートクレーブで滅菌したマウス・ラット用固形飼料 (日本クレア製 CE-2) を自由摂食させ、飲水は滅菌蒸留水を給水瓶で自由に摂水させた。なお、飲料・給水瓶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5%ヒビテン・アルコール噴霧消毒を行って清浄度を維持した。なお、この手法についても既報^{3,6)} のとおりである。

2.5 動物搬入出方法

実験動物のチャンバー搬入出に際しては、SPFレベルを維持するよう配慮した。すなわち、SPFラット導入後、当施設のバリアー内検査室にて常法により1週間検疫し、検疫に合格したラットのみを飼育室で1週間予備飼育した後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的に確認し実験に供した。なお、動物に衰弱等の異常があった場合は、速やかにチャンバーから取り出し、解剖検査を行った。

2.6 体重測定方法

ラットの体重測定は、各ケージ別に個体識別をし1か月に1回の割合で全個体について実施した。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。

3 結果及び考察

3.1 実験飼育期間中の飼育経過

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、各実験群別にして図2(1)～(4)

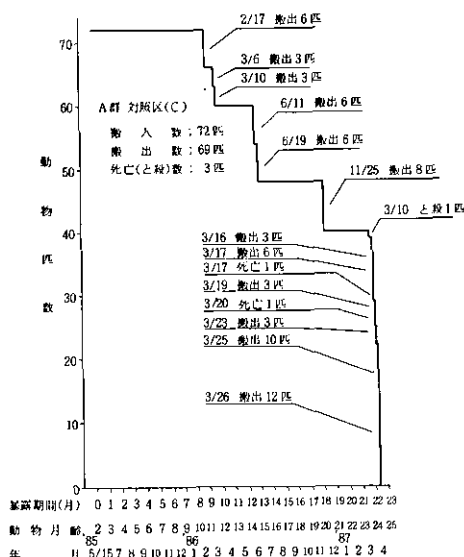


図 2 (1) C 对照群での動物飼育数の推移
 Fig. 2 (1) Changes of the number of rats maintained in C chamber (Cont. Exp. A)

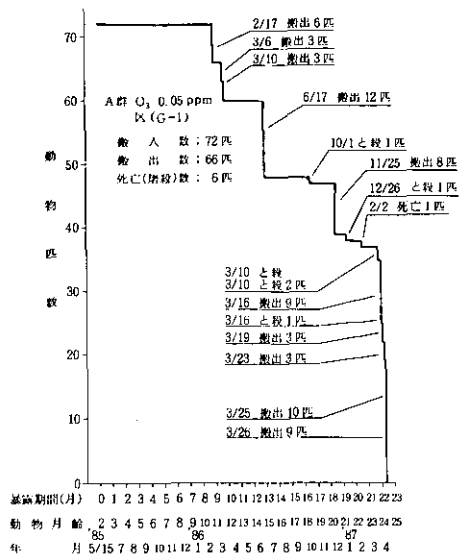


図 2 (2) G-1 暴露群での動物飼育数の推移
 Fig. 2 (2) Changes of the number of rats maintained in G-1 chamber (O₃; 0.05ppm, Exp. A)

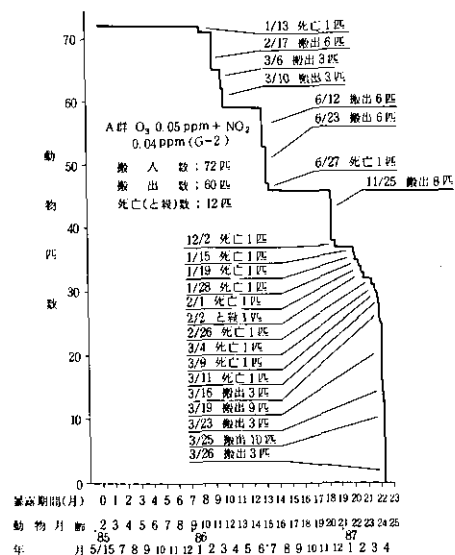


図 2 (3) G-2 暴露群での動物飼育数の推移
 Fig. 2 (3) Changes of the number of rats maintained in G-2 chamber (O₃; 0.05ppm+NO₂; 0.04ppm, Exp. A)

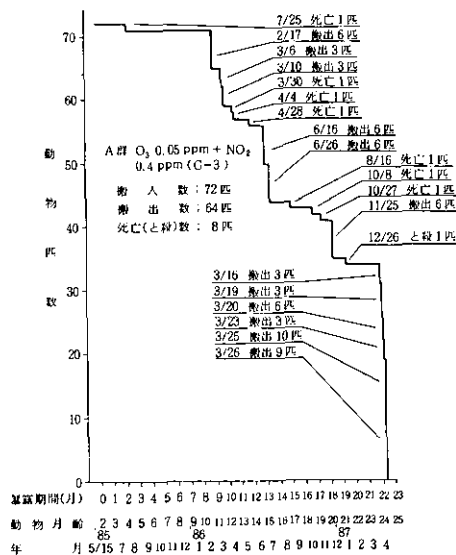


図 2 (4) G-3 暴露群での動物飼育数の推移
 Fig. 2 (4) Changes of the number of rats maintained in G-3 chamber (O₃; 0.05ppm+NO₂; 0.4ppm, Exp. A)

及び表 2 に示した。A 群では、1985 年 5 月 15 日に各チャンパー 72 匹の計 288 匹が 8 週齢で搬入され、10 か月間のガス暴露後に各チャンパー 12 匹の計 48 匹が搬出された(1986 年 2 月 17 日から 3 月 10 日)。また、13 か月間のガス暴露後に各チャンパー 12 匹の計 48 匹が搬出された(1986 年 6 月 11 日から 6 月 26 日)。また、18 か月間のガス暴露後に各チャンパー 8 匹の計 32 匹が搬出された(1986 年 11 月 25 日)。また、22 か月の暴露後に C : 39 匹・G-1 : 35 匹・G-2 : 28 匹・G-3 : 34 匹の計 136 匹が搬出され実験が終了した(1987 年 3 月 16 日から 3 月 26 日)。B 群では、1986 年 6 月 30 日に各チャンパー 12 匹の計 48 匹が 8 週齢で搬入され、7 か月間のガス暴露後に各チャンパー 6 匹の計 24 匹が搬出された(1987 年 1 月 27 日)。また、8 か月間のガス暴露後に各チャンパー 6 匹の計 24 匹が搬出された(1987 年 3 月 9 日から 3 月 31 日)。C 群では、1986 年 11 月 27 日に各チャンパー 12 匹の計 48 匹が 8 週齢で搬入され、4 か月間のガス暴露後に各チャンパー 12 匹の計 48 匹すべてが搬出された(1987 年 3 月 26 日)。D 群では、A 群のルームコントロールとして 1985 年 5 月 15 日から計 32 匹 8 週齢で実験飼育を開始され、12.5 か月間の実験飼育後に 8 匹が搬

表 2 各実験群での動物飼育数の推移
Table 2 Change of number of rats maintained in each chamber

Exp. Group	Chamber	Date (mos)	85					86										87					Out/In											
			5 (0)	6 (1)	7 (2)	8 (3)	9 (4)	10 (5)	11 (6)	12 (7)	1 (8)	2 (9)	3 (10)	4 (11)	5 (12)	6 (13)	7 (14)	8 (15)	9 (16)	10 (17)	11 (18)	12 (19)		1 (20)	2 (21)	3 (22)	4 (23)	5 (24)						
A	C	Total	72											60	54	48						40	39	69/72										
	G-1	288	72											60	48	47	39	38	37	35						66/72								
	G-2	In	72											71	59	53	46						37	32	29	60/72								
	G-3	In	72	71	59	57	56	50	44	43	42						41	35	34	34						64/72								
B	C	Total																					12					6	6	12/12				
	G-1	48																					12					6	6	12/12				
	G-2	In																					12					6	6	12/12				
	G-3	In																					12					6	6	12/12				
C	C	Total																					12					12	12/12					
	G-1	48																					12					12	12/12					
	G-2	In																					12					12	12/12					
	G-3	In																					12					12	12/12					
D	Room Cont	Total	32	32	31	32											24						23	19	19	19/32								
	In	In																									19	19	19	15				
E	C	Total	20																					19	18	17	17	17/20						
	G-1	80	20																					19	18	16						16/20		
	G-2	In	20																					19					19	19/20				
	G-3	In	20																					19	18	17	15						15/20	
A・B・C Total		384	288	287											286	238	236	235	217	234	233	231	230	247	245	215	209						355/384 (92%)	
D・E Total		112	112	111	112											111						110	109	107	103	100	96						96/112 (86%)	
A・B・C・D・E Total		496	400	399											398	350	348	347	328	345	344	341	340	356	352	318	309	96						451/496 (91%)

出され、24か月の実験飼育後に19匹の計27匹が搬出された(1987年5月8日)。ただし、この群では実験初期(1985年7月12日)に死亡した動物を補充するために、1985年7月15日に同じロットの予備動物を1匹補充した。このため、全搬出数は当初搬入数32匹より1匹多い33匹となった。

3.2 実験飼育期間中の途中死亡(と殺)についての考察

今回のような長期ガス暴露実験においては、途中死亡(と殺)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(と殺)したA・D群において、死亡の時期と死因(解剖所見)を表3に示した。A群では、搬入した288匹中29匹が実験飼育期間中の途中で死亡(と殺)した。これは、A群の暴露匹数288匹に対して占める割合は10.1%であった。その内訳として、C;4匹死亡(内1匹と殺)・G-1;6匹死亡(内1匹と殺)・G-2;12匹死亡(内1匹と殺)・G-3;3匹死亡(内1匹と殺)であった。B・C群では、実験飼育期間中の途中で死亡した個体は皆無であった。D群では、搬入した33匹中6匹が実験期間の途中で死亡(と殺)した。これは、D群の実験匹数33匹に対して占める割合は18.1%であった。また、途中死亡(と殺)の時期は、A群で暴露開始後14か月までに29匹の死亡例中6匹が

表 3 A・D・E群での実験途中死亡数の推移
Table 3 Number of the dead rats in each experimental group through experimental periods

Exp. Group	Experimental Period (Age, month)																										Total (○,▲,●)		
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24				
(A) O ₃ +NO ₂ Gas Exposure																													
C																												○●●	3 (1, 0, 2)
G-1																			○			○	●●●●						6 (2, 0, 4)
G-2								●						●							▲	●●●●●							12 (1, 2, 9)
G-3			●								●●●▲						●●●					○							8 (1, 1, 6)
(D) Room Cont			●																									●●○	8 (2, 1, 3)
(E) Exposure diel																													
C																												●▲○	4 (1, 1, 2)
G-1																							●○	●●					4 (1, 0, 3)
G-2																							●						1 (0, 0, 1)
G-3																			●				●○	●●					5 (1, 0, 4)
Total	A	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	1	2	1	1	2	6	7	3				29 (5, 3, 21)	
D	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	6 (2, 1, 3)	
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	4	2	2	2	1	14		(3, 1, 10)	
All Total	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	1	3	1	2	4	10	13	5	2	1	49	(10, 5, 33)		

○: Sacrificed for Weakness, ▲: Spontaneous Tumor, ●: Other Reason.

死亡し、残りの23匹の死亡例は暴露開始後15～22か月で死亡(と殺)した。D群で実験開始後20か月までに6匹中1匹が死亡し、残りの5匹は暴露開始後21～24か月で死亡(と殺)した。

次に、死因別では、A群は脳下垂体腫瘍が29例中7例(24%)と最も多く、その次に各種腫瘍が6例(21%)、皮下腫瘍が4例(13.8%)、腎臓異常が2例(6.9%)、その他が10例(34.5%)であった。衰弱による切迫と殺は5例(17.2%)であった。D群は脳下垂体腫瘍が6例中2例(33.3%)、皮下腫瘍が1例(16.7%)、腎臓異常が1例(16.7%)、その他が2例(33.3%)であった。また、衰弱による切迫と殺は3例(50%)であった。

上記のように今回のガス暴露期間中に死亡(と殺)したラットは計29匹(29/384:7.6%)であり、前回の22か月までの死亡(と殺)数は計73匹(73/324:22.5%)に対して、44匹(60.3%)少ない結果であった。なお、他の長期実験⁷⁾と比較しても今回の死亡率は低かった。

ガス濃度と死亡(と殺)数との関連をみるために、チャンバー間で比較すると、C(対照群):3匹(10%)、G-1(O₃ 0.1 ppm max):6匹(21%)、G-2(O₃ 0.1 ppm max+NO₂ 0.04 ppm):12匹(41%)、G-3(O₃ 0.1 ppm max+NO₂ 0.4 ppm):8匹(28%)となり、対照群が最も少なく、G-2暴露群が最も多かった。

なお、当施設では実験群とは別に導入したA・D群と同一ロットの動物をD群と同じ飼育室に同居させて動物の微生物学的検査を定期的に行った。その結果、当施設指定の病原微生物は検出されなかった。また、死亡したラットを含めて全実験飼育期間を通して感染症が疑われるような事例は皆無であった。

3.3 体重の推移

C, G-1, 2, 3の4台のチャンバー内で飼育したA・B・C群ラットの体重及び当施設バリアー飼育室で飼育したD群のラットの体重を一括して表4及び図3(1), (2)にそれぞれ示した。このように、各チャンバー間で体重の推移に有意な差異が認められなかったことは、第1回目の複合ガス暴露でも報告されており、今回のO₃, NO₂濃度の設定条件では、前回と同様に、ラットの体重に与える影響はなかったと考察された。

謝 辞

本実験の実施に当たり、22か月にわたる動物の飼育管理には、株式会社アニマルケア及びラボス株式会社各位の協力を得た。ここに記して謝意を表する。

表 4 ガス暴露群 (A・B・C群) とルームコントロール群 (D群) での実験飼育期間中の平均体重の推移 (C, G-1, 2, 3チャンパーとルームコントロール)

Table 1 Changea of the body weight of male Wistar rat maintained the chamber (C, G-1, 2, 3) for 4, 8 and 22 months, and Room Control for 22-months Experiment

Chamber	Exp. Group	Experimental Date (Age : month)																										
		85					86										87											
		5/15 (2)	6/14 (3)	7/15 (4)	8/15 (5)	9/13 (6)	10/15 (7)	11/15 (8)	12/16 (9)	1/14 (10)	2/14 (11)	3/14 (12)	4/15 (13)	5/15 (14)	6/16 (15)	7/15 (16)	8/15 (17)	9/16 (18)	10/15 (19)	11/14 (20)	12/16 (21)	1/14 (22)	2/16 (23)	3/11 (24)	4/15 (25)			
C	A	206 ± 11 (72)	297 ± 17 (72)	345 ± 23 (72)	376 ± 23 (72)	384 ± 26 (72)	396 ± 27 (72)	419 ± 28 (72)	419 ± 29 (72)	424 ± 30 (72)	428 ± 31 (72)	445 ± 33 (72)	452 ± 32 (72)	450 ± 34 (72)	463 ± 32 (72)	459 ± 32 (72)	466 ± 32 (72)	460 ± 32 (72)	475 ± 32 (72)	475 ± 33 (72)	473 ± 35 (72)	468 ± 36 (72)	468 ± 33 (72)	471 ± 36 (72)	471 ± 36 (72)	471 ± 36 (72)		
	B														279 ± 10 (12)	349 ± 22 (12)	365 ± 23 (12)	399 ± 25 (12)	407 ± 25 (12)	411 ± 30 (12)	421 ± 32 (12)	427 ± 28 (12)	437 ± 29 (12)	437 ± 29 (12)	437 ± 29 (12)	437 ± 29 (12)		
	C																				270 ± 10 (12)	318 ± 20 (12)	350 ± 22 (12)	361 ± 27 (12)	361 ± 27 (12)	361 ± 27 (12)	361 ± 27 (12)	
G 1	A	205 ± 12 (72)	302 ± 16 (72)	343 ± 23 (72)	367 ± 26 (72)	396 ± 22 (72)	395 ± 27 (72)	413 ± 26 (72)	420 ± 26 (72)	428 ± 26 (72)	434 ± 28 (72)	437 ± 25 (72)	442 ± 26 (72)	447 ± 27 (72)	452 ± 27 (72)	451 ± 29 (72)	459 ± 30 (72)	467 ± 29 (72)	468 ± 28 (72)	468 ± 28 (72)	469 ± 34 (72)	460 ± 36 (72)	456 ± 48 (72)	458 ± 45 (72)	458 ± 45 (72)	458 ± 45 (72)	458 ± 45 (72)	
	B														273 ± 17 (12)	347 ± 26 (12)	367 ± 25 (12)	395 ± 26 (12)	407 ± 28 (12)	412 ± 25 (12)	418 ± 25 (12)	423 ± 22 (12)	427 ± 21 (12)	427 ± 21 (12)	427 ± 21 (12)	427 ± 21 (12)	427 ± 21 (12)	
	C																				264 ± 10 (12)	325 ± 14 (12)	354 ± 17 (12)	374 ± 19 (12)	374 ± 19 (12)	374 ± 19 (12)	374 ± 19 (12)	
G 2	A	206 ± 11 (72)	299 ± 19 (72)	350 ± 21 (72)	373 ± 24 (72)	386 ± 24 (72)	401 ± 26 (72)	408 ± 25 (72)	415 ± 25 (72)	425 ± 26 (72)	428 ± 28 (72)	437 ± 26 (72)	443 ± 27 (72)	444 ± 29 (72)	450 ± 35 (72)	459 ± 29 (72)	462 ± 30 (72)	454 ± 33 (72)	461 ± 33 (72)	466 ± 36 (72)	461 ± 32 (72)	466 ± 62 (72)	462 ± 47 (72)	467 ± 44 (72)	461 ± 44 (72)	461 ± 44 (72)	461 ± 44 (72)	461 ± 44 (72)
	B														264 ± 17 (12)	333 ± 18 (12)	351 ± 16 (12)	378 ± 21 (12)	388 ± 25 (12)	403 ± 21 (12)	412 ± 23 (12)	417 ± 26 (12)	410 ± 19 (12)	410 ± 19 (12)	410 ± 19 (12)	410 ± 19 (12)	410 ± 19 (12)	
	C																				266 ± 14 (12)	332 ± 17 (12)	359 ± 25 (12)	368 ± 25 (12)	368 ± 25 (12)	368 ± 25 (12)	368 ± 25 (12)	368 ± 25 (12)
G 3	A	207 ± 13 (72)	297 ± 20 (72)	349 ± 27 (72)	377 ± 30 (72)	398 ± 30 (72)	405 ± 28 (72)	419 ± 29 (72)	417 ± 30 (72)	426 ± 34 (72)	438 ± 33 (72)	442 ± 39 (72)	447 ± 56 (72)	443 ± 40 (72)	461 ± 35 (72)	454 ± 36 (72)	460 ± 40 (72)	460 ± 40 (72)	451 ± 44 (72)	476 ± 37 (72)	470 ± 35 (72)	471 ± 37 (72)	477 ± 47 (72)	474 ± 46 (72)	474 ± 46 (72)	474 ± 46 (72)	474 ± 46 (72)	474 ± 46 (72)
	B														268 ± 17 (12)	327 ± 18 (12)	355 ± 16 (12)	370 ± 21 (12)	391 ± 25 (12)	407 ± 21 (12)	416 ± 23 (12)	441 ± 26 (12)	431 ± 19 (12)	431 ± 19 (12)	431 ± 19 (12)	431 ± 19 (12)	431 ± 19 (12)	431 ± 19 (12)
	C																				264 ± 10 (12)	312 ± 9 (12)	344 ± 12 (12)	357 ± 19 (12)	357 ± 19 (12)	357 ± 19 (12)	357 ± 19 (12)	357 ± 19 (12)
Room Cont.	D	210 ± 12 (32)	307 ± 15 (31)	345 ± 18 (31)	370 ± 19 (32)	392 ± 21 (32)	408 ± 22 (32)	419 ± 23 (32)	429 ± 24 (32)	440 ± 26 (32)	441 ± 26 (32)	448 ± 26 (32)	460 ± 25 (32)	461 ± 30 (32)	470 ± 25 (32)	476 ± 29 (32)	479 ± 26 (32)	473 ± 24 (32)	486 ± 28 (32)	500 ± 28 (32)	499 ± 30 (32)	496 ± 33 (32)	484 ± 63 (32)	499 ± 37 (32)	497 ± 35 (32)	497 ± 35 (32)	497 ± 35 (32)	497 ± 35 (32)

1: Mean ± S. D (N): Body Weight (gram)

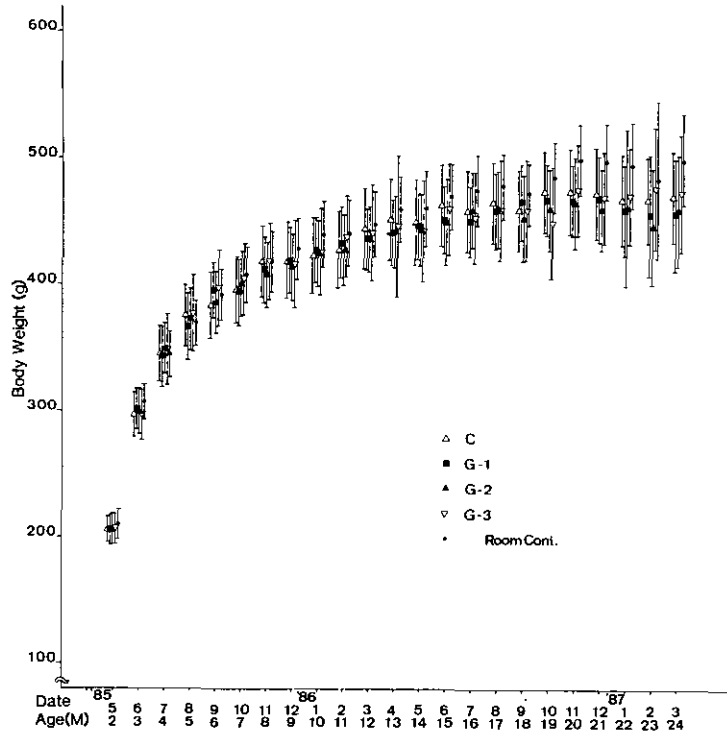


図 3(1) ガス暴露実験群 (A 群) での雄ラットの体重の推移*
 Fig. 3 (1) Changes of the body weight of male wistar rats
 in experiment A

*: Mean \pm SD: Body Weight (g)

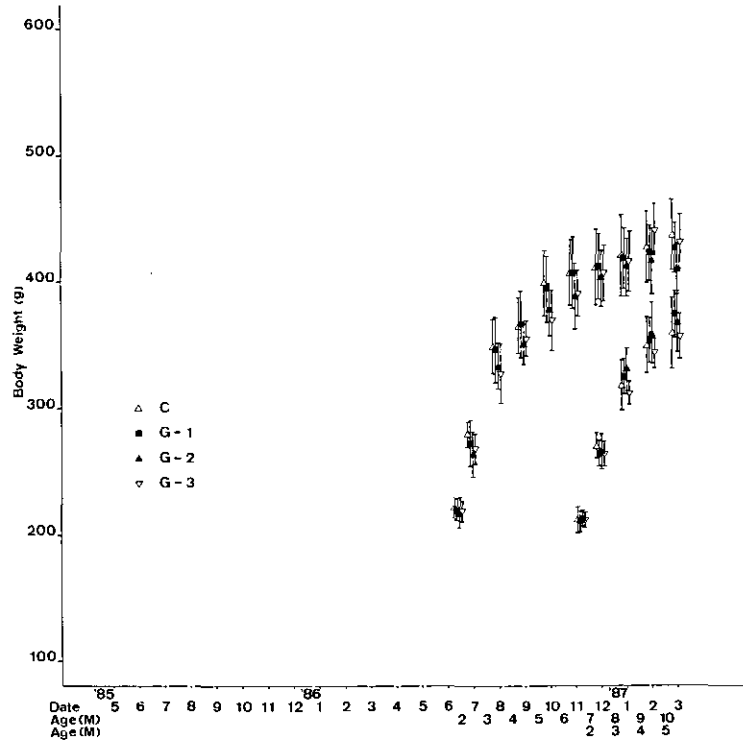


図 3(2) ガス暴露実験群 (B・C 群) での雄ラットの体重の推移*
 Fig. 3 (2) Changes of the body weight of male Wistar ratar rats
 in experiment B・C

*: Mean \pm SD: Body Weight (g)

引用文献

- 1) 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 52/53 年度研究報告. 国立公害研究所研究報告, 第 8 号, 213p.
- 2) 高橋 弘・山元昭二・石村俊治・高橋慎司・寺尾恵治(1983): 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, 159-169.
- 3) 高橋 弘・高橋慎司・山元昭二・伊藤勇三(1981): 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. 国立公害研究所研究報告, 第 40 号, 181-193.
- 4) 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バ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.
- 5) 小林雄一・高橋 弘・寺尾恵治・大政謙次(1980): 空調設備空調方式実例集—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.
- 6) 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, 252-257.
- 7) 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.
- 8) 清水 明・松本茂・伊藤勇三・山元昭二・高橋慎司(1988): 二酸化窒素とオゾンとの複合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—, 国立公害研究所研究報告, 第 114 号, 1-7.

II-3

二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 III
—— 病理形態学所見 ——

Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats III
—— Morphological Observation ——

村上正孝¹・河越昭子¹・米元純三¹

Masataka MURAKAMI¹, Akiko KAWAGOE¹ and Junzo YONEMOTO¹

要 旨

Wistar 系雄ラットに、0.05ppm O₃ (G1 群)、0.04ppm NO₂+0.05ppm O₃ (G2 群)、0.4ppm NO₂+0.05ppm O₃ (G3 群) の濃度で、2, 4, 9, 18, 22 か月連続暴露し、肺の病理形態的観察を行った。顕微鏡観察のかぎりでは、G3 群で9 か月まではほとんど変化はみられなかったが、18 か月以降では細気管支上皮が肥大と増生を示したことから、細気管支上皮の反応性が上昇していることが認められた。これまでの研究によると、NO₂ 18 か月単独暴露では細気管支上皮は弱い反応を示すにとどまったことから0.05ppm O₃ が加わることによって、反応の時期が早められたと考えられる。

しかし、G1~G3 すべての暴露群では、22 か月までの暴露期間の範囲において、前回の4ppm NO₂ 9 か月暴露でみられたような定型的肺病変を認めることはできなかった。

Abstract

Lungs of Wistar male rats were exposed continuously to 0.05ppm O₃ (G1), 0.04ppm NO₂+0.05ppm O₃ (G2) and 0.4ppm NO₂+0.05ppm O₃ (G3) for 2, 4, 9, 18 and 22 months and were submitted to microscopic observation.

The lungs of rats exposed to the 0.4ppm NO₂+0.05ppm O₃ for 18 months showed the enlargement and the proliferation of the bronchiolar epithelial cells, which indicates the elevated responses of epithelial cells, although they showed no morphological alteration at earlier time before 9 months. Addition of 0.05 ppm O₃ to 0.04ppm NO₂ promoted the much earlier occurrence of the epithelial enlargement and proliferation, compared to the NO₂ alone exposure.

In contrast to the exposure to 4 ppm NO₂ for 9 months, no definite and typical *morphological alterations of the lung* which was observed throughout the whole exposure period as long as 22 months even at the 0.4ppm NO₂+0.05ppm O₃ so far as light microscopic observation.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1 はじめに

大気汚染による呼吸器系疾患の発症機序解明に関する研究において、大気汚染質、特に $\text{NO}_2^{1,2)}$ 及び $\text{O}_3^3)$ に関して数多くの病理形態学的研究が報告されてきた。

通常の大気環境下でヒトが受ける影響を明らかにするには、実験動物を用いた長期にわたる低濃度暴露実験の結果は重要である。これまで NO_2 ガスのみによる肺組織の病理形態学的変化の過程については、Freeman 一派⁴⁻⁶⁾、都立衛生研究所⁷⁾そして国立公害研究所の研究⁸⁻¹⁰⁾等により、相当部分、解明されて今日に至っている。しかしながら、日常生活に関連した大気汚染状況に近似した状況下での動物実験はほとんど行われていない。そこで我々は、 NO_2 ガスに更にオキシダントの代表物質である O_3 を加えることにより、酸化的ストレスをより現実近づけるとともに、 NO_2 による慢性病変の病像が、どのように影響を受けるか、また病変の質がどう修飾されるかを検討した。本報告では肺組織の変化を光学顕微鏡の範囲に限って観察した。

2 方法

既報¹¹⁾の暴露条件に従って、8週齢の Wistar 系雄ラットに、0.05 ppm O_3 、0.05 ppm O_3 + 0.04 ppm NO_2 、0.05 ppm O_3 + 0.4 ppm NO_2 を連続 2 か月、4 か月、9 か月、18 か月及び 22 か月間暴露をした。検索は 1 群当たり 6 匹で行った。ラットを始めにネンブタール (50 mg/kg 体重) を腹腔内注射し、深麻酔下に腹大動脈切断により放血しながら、気管から 20 cm 水柱圧で氷冷固定液 (1% グルタルアルデヒド、1.5% ホルムアルデヒドを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 7.4) を注入し、肺を再拡張固定した。グルタルアルデヒド固定を一晩行った後、中性フォルマリンで再固定し、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、PAS、アザン、エラスチカ・トリクローム、エラスチカ・ヴァン・ギーソン染色標本を用い光顕観察を行った。

3 結果

光顕レベルでの肺組織の観察は、先の報告⁸⁾に基づき NO_2 による定型的病変とされる項目について行った。すなわち、(1) 中等大気管支から末梢気道の細気管支と終末細気管支における気管支上皮細胞の肥大と増生、(2) 気管支上皮細胞の肺胞道への増殖性延長 (気管支上皮化)、(3) 中等大気管支から末梢気道における結合組織の肥厚、(4) 中等大気管支腔、細気管支腔、肺胞道、肺胞内におけるマクロファージの動員、(5) 中等大気管支から末梢気道における杯細胞の出現、の各項目について実施した。

ガス暴露群の肺標本を鏡検する前に、対照群について上記所見の有無を確認した。

気管支以遠の気管を四つに分け、以下のように部位別名称をつける。(1) 中等大気管支、(2) 肺門に対して近位に位置する細気管支及び(3) 遠位に位置して肺胞道近傍に隣接する細気管支、(4) 続いて肺胞道近傍にある終末細気管支である。それぞれの特徴は、中等大気管支は粘膜下結合組織が発達し、平滑筋線維に囲まれた大きな径の気管支であり、丈の低い単層の線毛上皮が内腔に

並び、杯細胞は通常、認められない。細気管支は、やや径の大きな近位の部位と肺泡道近傍に隣接し、約10個の肺泡で外周を囲まれている遠位の部位とに分けられる。両者ともに薄い壁厚の粘膜下結合組織に囲まれている。遠位の細気管支上皮は近位に比べて、細胞の丈が高く、細胞の密集度が高い。終末細気管支は僅量の結合組織に囲まれ、突出したクララ細胞の間に低い丈の単層、小型の線毛上皮が存在し、肺泡道入口部で、その気管支上皮列は途切れる。通常は気管支上皮が肺泡道まで増殖延長することはない。

マクロファージは、ごく少数、気管支から細気管支の内腔に張りつくように存在するが、目立たない。

上述の形態が対照群において認められるが、各観察項目の陽性所見を次のように定義する。

気管支上皮の肥大：気道の四つの部位において、上述のように上皮細胞の形態をすなわち丈の高さ、細胞体の大きさに若干差異があるが、それぞれ対照と比較して、より高い、より大きい、そして胞体の好塩基性が増していると判断されたとき“有所見”と判定した。

気管支上皮の増生：部位により細胞密度が若干異なるが、それぞれ対照と比較して、単層で胞体の好塩基性が増している上皮細胞の密度が、より高いと判断されたとき“有所見”とした。なお、4 ppm NO₂ 9か月で認められた、重層した細胞の塊状増殖所見は本実験条件ではみられなかった。

杯細胞の存在：中等大気管支以下においてもPASで赤紫色に濃染した細胞が認められたとき、“有所見”とした。

結合組織の肥厚：それぞれの部位において、対照と比較し、より厚いと認めるとき“有所見”とした。しかし、肺泡道、肺泡の結合組織の肥厚は光顕レベルでは判定不能であった。

マクロファージは対照と比較して、著しい増加と認めたものを“有所見”とした。

終末細気管支における増殖性延長は肺泡道あるいは肺泡での気管支上皮細胞の存在を確認したとき“有所見”とした。

以上の基準をもとに判定した結果を表1にまとめた。

3.1 記述形態学的観察

3.1.1 0.4 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃ 暴露群 (G 3 群) の所見

22か月の暴露期間を通じて光顕的には著しい変化は認められず、前報⁹⁾で報告した4 ppm NO₂ 暴露によって生じた定型的病変は成立していないと判定された。しかしながら気管支、末梢気道における軽微な変化を示す個体が見られ、その出現頻度は他の濃度の暴露群より明らかに高かった。

2か月(図13, 15, 17)、4か月暴露群においては対照群との差異を認めない。9か月暴露後、中等大気管支上皮では対照群と差異を見いだせないが、細気管支上皮の肥大を1匹が示した。しかし、18か月群(図7, 9, 11)では対照群(図8, 10, 12)と比べて差異が明らかとなった。す

表 1 NO₂+オゾン複合暴露ラット肺における“有所見”動物数の経時的推移

Table 1 Time course changes in the number of rats showed the defined morphological alterations in the lung after exposure to combined gases of NO₂ and O₃

	暴露期間 暴露条件	2か月				4か月				9か月				18か月				22か月			
		C	G ₁	G ₂	G ₃	C	G ₁	G ₂	G ₃	C	G ₁	G ₂	G ₃	C	G ₁	G ₂	G ₃	C	G ₁	G ₂	G ₃
中等大気管支	上皮肥大	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	1	3
	上皮増生	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	杯細胞の存在	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	マクロファージ増加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	結合組織肥厚	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
細気管支	近位 上皮肥大	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	2	2	2	6	0	1	2	3
	近位 上皮増生	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
	遠位 上皮肥大	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	2	2	5	0	0	2	4
	遠位 上皮増生	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	遠位 マクロファージ増加	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
終末細気管支	結合組織肥厚	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	0	0	0	2
	上皮肥大	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	3
	上皮増生	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	0	0	1	1
	増殖性延長	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	4	0	2	3	2
	マクロファージ増加	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	3
肺細胞道近傍の結合組織肥厚	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	1	2	

*動物数は各群6匹であり、各観察項目の有所見についての定義は本文中に記述あり。

C: 対照群, G1: 0.05ppm O₃暴露群 G2: 0.05ppm O₃+0.04ppm NO₂群 G3: 0.05ppm O₃+0.4ppm NO₂群

なわち中等大気管支(図7)から末梢気道(図9, 11)に至る気道の一部あるいは全領域にわたって、上皮の肥大をすべての個体が示した。また、終末細気管支での上皮の増生、肺胞道での気道上皮の増殖性延長、細気管支から肺胞道近傍にかけての結合組織の軽微な肥厚をそれぞれ2/3に認めるなど、他群に比べてその“有所見”頻度は、明らかに高かった。

さらに長期の22か月後には中等大気管支(図1)から末梢気道(図3,5)にかけての気道の一部または全領域に上皮肥大を2/3に認めたが上皮の増生は、ほとんどなかった。また結合組織の肥厚を2匹に、肺胞道への上皮の増殖性延長を2匹に認めた。すなわち、18か月暴露と比較すると“有所見”の個体数が減少した。

3.1.2 0.04 ppm NO₂+0.05 ppm O₃暴露群(G2群) 所見

2か月, 4か月暴露時においては、対照群との差異は認められない。9か月暴露後、中等大気管支では、G3群と同様、差異は認められないものの、細気管支上皮の肥大を2匹が示した。18か

月暴露後、中等大気管支から細気管支にかけて上皮の肥大を2匹が示したが、終末細気管支では肥大を伴わない上皮の増生を3匹が示した。さらに肺胞道への増殖性延長を2匹が示した。中等大気管支から末梢気道における結合組織の軽微な肥厚を示したのは1匹だけであった。

22か月後には18か月と同様に気管支上皮の変化を2匹に認め、終末細気管支上皮の増殖性延長は3匹の個体が示した。肺胞道近傍の結合組織の肥厚が認められたのは1匹だけであった。

3.1.3 0.05 ppm O₃暴露群 (G1群) の所見

2か月では、近位の細気管支において、上皮の肥大を2匹に認めた。この時期は、他群では変化は認められない。4か月、9か月では変化なし。

18か月では、細気管支の気管支上皮の肥大を2匹が示し、終末細気管支では、肥大を伴わない上皮の増生を2匹が示した。増殖性延長は1匹だけであった。中等大気管支から末梢気道に至る気道の結合組織の肥厚を2匹が示した。

22か月では、肺胞道への増殖性延長を2匹に認めるものの、細気管支の気管支上皮肥大を1匹に認めるのみであり、結合組織の肥厚はなかった。

3.1.4 対照群

2か月(図14, 16, 18)では所見はないが、4か月において、終末細気管支に肥大を伴わない上皮増生を1匹が示した。さらに9か月群では、近位の細気管支上皮の肥大を示す個体が2匹認められた。18か月群においても細気管支上皮の肥大を2匹が示した。また、終末細気管支では、肥大を伴わない上皮の増生を示し、増殖性延長を示す1匹が認められた。

4 考 察

本実験による形態学的変化の特徴を、変化を多く認めた18か月、22か月の暴露群を中心に考察する。

低濃度のO₃を長期暴露したときの病理的变化について、Bils³⁾は、0.4 ppmのO₃をウサギに間欠暴露した実験結果¹²⁾から、その病変は間質の浮腫と肺胞上皮及び血管内皮の傷害による肺胞壁破壊に基づく中等度の肺気腫病変であると報告している。しかし、本実験では、肺胞構造に変化を認めることはできず、前報^{8,9)}で報告した0.4 ppm以下の濃度のNO₂暴露で観察されたように、その形態学的変化は末梢気道における軽度の気管支粘膜上皮の変化と気道結合組織の軽微な肥厚を主とする所見であった。

細気管支炎を代表とする末梢気道における病変は慢性肺気腫、肺線維症、肺の老化の成立に関連して、臨床的にまた病理学的にも関心のもたれているところである¹³⁾。

Reid¹⁴⁾は慢性気管支炎の特徴的な病理所見として、25 ppm NO₂の半年間¹⁵⁾、あるいは400 ppm SO₂を6週間暴露¹⁶⁾したとき多数の杯細胞が末梢気道に出現することを指摘した。しかしなが

ら、前報⁹⁾の4 ppm NO₂ 9, 18, 27 か月に至る実験及び本実験において、杯細胞の末梢気道での存在は認められなかった。また肺胞壁の破壊によって生起する肺気腫病変についても認められなかった。以上の事実から、0.4 ppm NO₂ レベルで観察された末梢気道の変化を、慢性気管支炎及び肺気腫発症の経過解明あるいはこれらの疾患の初期病変と位置づけて議論することは飛躍があり過ぎると考えられる。

観察された気管支上皮及び結合組織の変化が、4 ppm NO₂ で観察された定型的病変に連なるものである⁹⁾としても、対照群のなかにも末梢気道における上皮の肥大・増生、あるいは肺胞道への増殖性延長を示す個体が認められた。一方、表1に示されるごとく、この軽微な所見が、0.4 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃ 群においても、暴露時期によっては半数以上に認められず、対照群と差異が認められないなど、個体差が大きいことも確かである。このような事実からも観察された変化は気管支から末梢気道における病変と捕えるよりも、気管支上皮細胞及び組織の反応性の上昇という理解が適当と考えられる。

さて、前2回のNO₂単独ガスによる低濃度生涯暴露実験の結果^{8,9)}と今回のNO₂+O₃複合暴露実験結果を比較検討する。前述のごとく本実験の肺組織の変化は、肺胞構造の乱れにまでは及ばず、NO₂の暴露で観察された気管支上皮の肥大・増生そして結合組織の肥厚を主とするものであり、変化の内容は低濃度のNO₂によるものと質的に異なるものではなかった。結合組織については光顕レベルでの客観的評価の信頼性が低いため、検討の対象からはずし、肺胞道近傍及びこれに隣接する細気管支上皮の肥大と増生に観察の対象をしばって、NO₂単独暴露^{8,9)}及び本複合暴露実験の肺組織標本の観察結果を表2のごとく整理した。

まずNO₂単独暴露の気管支上皮の反応性の経時的変化を考察すると、4 ppm NO₂ 暴露⁸⁾では、9か月の暴露による肺胞道近傍の終末細気管支は、重層化して塊状増殖した上皮により内腔が狭小化していた。一方、これほど顕著に肥大した上皮の増生所見は、その他のガス暴露条件、例えば、0.4 ppm 以下のNO₂ 27 か月暴露では認められず、4 ppm に比べ0.4 ppm NO₂ 暴露では、気管支上皮細胞の反応性に著しい差異のあることを認めざるを得ない。

次に0.4 ppm NO₂単独暴露群⁹⁾においては、暴露3か月において、気管支上皮の肥大と増生で示される上皮細胞の反応が比較的強く出現した。このようなNO₂による初期反応は、Kyono¹⁷⁾、寺田ら^{18,19)}により、またO₃についてもFreeman²⁰⁾により報告されている。NO₂単独暴露⁹⁾の場合、6か月、9か月において、上皮の肥大、増生はむしろ3か月に比べて目立たず、18か月において再び反応は少し回復するものの、初期の3か月のそれには及ばなかった。一方、別時期に行われた0.4 ppm NO₂の27か月⁸⁾において、3匹中2匹に上皮の肥大、増生を認めるものの、対照群及び0.04 ppm 群においても、3匹中2匹に、また3匹中1匹にそれぞれ同様の所見が現れた。この27か月暴露の結果は、老齢ラットにおいては気管支上皮の反応性が上昇することを意味するであろう。このNO₂に対する老齢期での組織の反応性の上昇については、Kyono¹⁷⁾、Cabral-Andersonら²¹⁾、Evans²²⁾によって指摘されているところである。したがって、この時期(29か

表 2 NO₂単独とNO₂+オゾン複合生涯暴露実験結果の比較
肺胞道近傍及び隣接する遠位の細気管支上皮の反応性(肥大と増生)上昇を示した動物数

Table 2 Comparison of the morphological observation in the rat lung between NO₂ exposure and NO₂+O₃ exposure in combination for life span.

The number of rats showed the increased response of epithelial cells (enlargement and proliferation) in the proximal region of the alveolar ducts and the distal bronchili adjacent to them.

暴露条件 (ガスの種類と濃度) ppm		暴 露 期 間							
		2 か月	3 か月	4 か月	6 か月	9 か月	18 か月	22 か月	27 か月
NO ₂ ⁸⁾ 単 独	4					a b			
	0.4					2*(2)	3*(3)		3*(3)
	0.04					0 (2)	0 (3)		2 (3)
	0					0 (2)	0 (3)		1 (3)
NO ₂ ⁹⁾ 単 独	0.4		3		1	1	1 (5)		
	0.04		0		0	0	0 (5)		
	0		0		0 (5)	0	0 (5)		
NO ₂ + オ ゾ ン 複 合	NO ₂ O ₃								
	0.4 + 0.05	0		0		1	5	4	
	0.04 + 0.05	0		0		2	2	2	
	0 + 0.05	0		0		0	2	0	
	0	0		0		0	1	0	

注 動物数 各群6匹, ただし(n)^{*}の記載のある群の動物数はn匹

a* 4ppm NO₂暴露群では, 気管支上皮の反応性上昇著しく, 線毛の消失あるいは変形した, エオジン好染性の上皮の著明な肥大と塊状に増殖した増生所見を示す。

月齢)における上皮の反応性の上昇に対するガス暴露の影響についての議論は, 加齢の修飾を加味して行わねばならないことを示唆している。

0.04 ppm NO₂単独暴露では27か月暴露の老齢ラットを除いて, 上皮の反応性を示す個体は認められなかった。

以上, NO₂単独の経時的变化を示し, 複合の場合について以下考察する。本実験の他に Yokoyama²³⁾, Freeman²⁰⁾, 寺田ら^{18,19)}によってNO₂とO₃の複合長期暴露実験が報告されている。5 ppm以下のNO₂と1 ppmのO₃では, 気管支領域の気管収縮の持続と肺胞道壁の肥厚からなる病変が現れ, その病変の内容と程度は1 ppm O₃単独と差はなかった²³⁾。また2.5 ppmのNO₂に0.25 ppmのO₃を加えてもO₃単独で生じた肺胞道近傍の上皮肥大と肺胞道へのマクロファージの遊走を主とする病変を軽微に修飾する程度であり, 0.25 ppmのO₃の影響が主であったと考えられている²⁰⁾。さらに2 ppmのNO₂に低濃度のO₃ 0.1 ppmを複合暴露¹⁸⁾したところ,

1 か月にして気管支粘膜上皮の肥大，増生，肺胞道の肥厚からなる変化が現れ，3 か月の時点でもその状態は持続した。これに対して 0.1 ppm O₃ 単独においては 1 か月の時点で上述の初期変化が現れるものの，3 か月には上皮の肥大，増生は消失した。このことから，2 ppm NO₂ の複合は 0.1 ppm O₃ による初期変化の回復を遅延させ，NO₂ による気管支上皮の反応性の上昇をつけ加えたと考える。

さて本複合暴露実験 (0.4 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃) は，Yokoyama²³⁾，Freeman²⁰⁾ の実験と比べて，両ガスともに，ほぼ 1 けた低いレベルであり，寺田¹⁸⁾ と比べても NO₂ 1/5，O₃ 1/2 と低い濃度であるため，その影響は質的に差があり²³⁾，あるいはさらに軽微なもの^{18,20)}であった。

とはいえ，0.4 ppm NO₂⁹⁾ 3 か月においてみられた気管支上皮の初期反応は，本実験において観察されなかった。0.05 ppm O₃ が複合された影響か否か，今の段階ではコメントできない。この事実については，電顕レベルでの観察も含めて，今後の課題として追求されるべきであろう。

しかし，暴露 18 か月，0.4 ppm NO₂ 単独群⁹⁾ において，1 匹だけが気管支上皮の肥大，増生を示すに過ぎなかったのに対して，今回の複合暴露では 5 匹すなわち，ほとんどすべての個体の気管支上皮の反応性が明らかに上昇したことから，0.05 ppm の O₃ が 0.4 ppm NO₂ に加わることによって反応性の上昇が促進されたものと解釈される。なおこれより長期暴露の場合は，先述のごとく，老齢ラットでは，加齢による上皮の反応性の上昇があるため，ガスの影響の区別ができない。

さて 0.04 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃ 群については，0.04 ppm NO₂ 単独暴露⁹⁾ では 18 か月まで上皮の肥大，増生を示す個体がみられなかったのに対して，反応を示す個体が 2 匹見いだされたことから，0.05 ppm O₃ が上皮の反応性を高める方向に働くと考えられる。

以上の事実から，0.05 ppm O₃ を 0.04 及び 0.4 ppm の NO₂ に複合暴露すると，肺胞道近傍の細気管支上皮の反応性が促進され，その上皮細胞の肥大と増生を生じやすくする効果があることが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり，産業医学総合研究所・京野洋子氏 (客員研究員) のご指導をいただいた。



22M-G3

図 1 G3 群 22 か月中等大気管支上皮：
広汎な上皮肥大（原倍率×200）

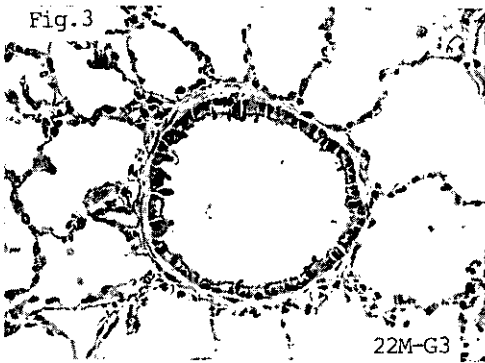
Fig. 1 G3 22M Middle size bronchial
epithelium : Extensive hypertrophy
(original mag. ×200)



22M-cont.

図 2 対照群 22 か月中等大気管支上皮（原
倍率×200）

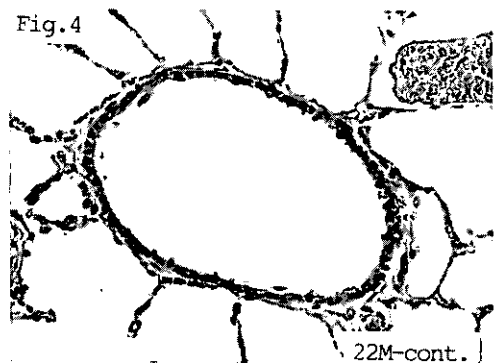
Fig. 2 Control 22M Middle size bronchial
epithelium (original mag. ×200)



22M-G3

図 3 G3 群 22 か月細気管支：上皮肥大
と軽度の上皮増生（原倍率×100）

Fig. 3 G3 22M Bronchiole : Hypertrophy
and slight proliferation of the
epithelium (original mag. ×100)



22M-cont.

図 4 対照群 22 か月細気管支（原倍率×
100）

Fig. 4 Control 22M Bronchiole (original
mag. ×100)

暴露条件 対照群：清浄空気
G1 群：O₃ 0.05ppm
G2 群：O₃ 0.05ppm + NO₂ 0.04ppm
G3 群：O₃ 0.05ppm + NO₂ 0.4ppm

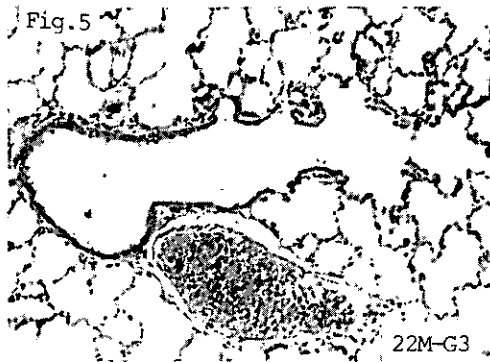


図 5 G3群22か月末梢気道：末梢気管支上皮の軽度の肥大と増生，増殖性延長（原倍率×100）

Fig. 5 G3 22M Terminal airway: Hypertrophy, proliferation and bronchiolization (original mag.×100)

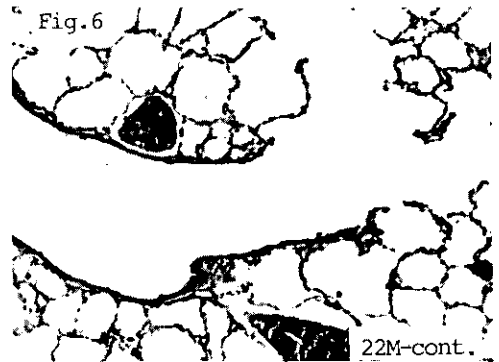


図 6 対照群22か月末梢気道（原倍率×50）

Fig. 6 Control 22M Terminal airway (original mag.×50)

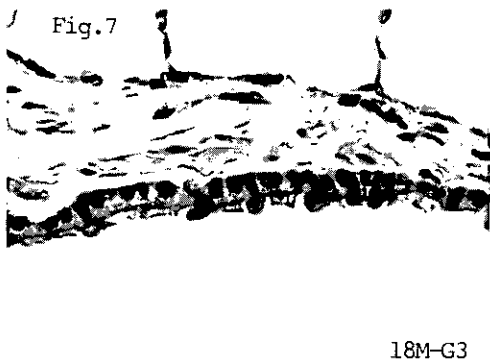


図 7 G3群18か月中等大気管支上皮：軽度の上皮肥大（原倍率×200）

Fig. 7 G3 18M Middle size bronchial epithelium: Slight hypertrophy (original mag.×200)

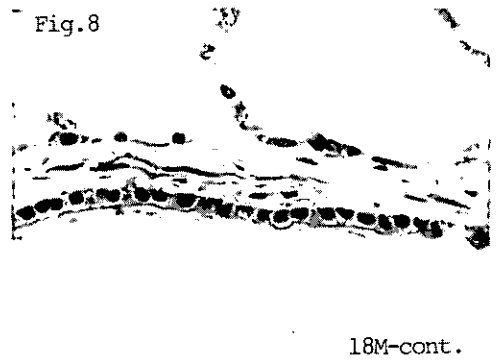


図 8 対照群18か月中等大気管支上皮（原倍率×200）

Fig. 8 Control 18M Middle size bronchial epithelium (original mag.×200)

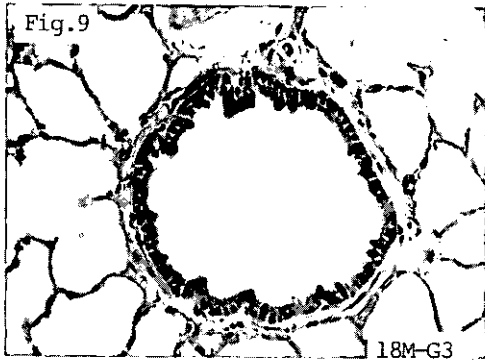


図 9 G3群 18 か月細気管支：軽度の上皮肥大増生（原倍率×100）

Fig. 9 G3 18M Bronchiole: Slight hypertrophy and proliferation (original mag. × 100)

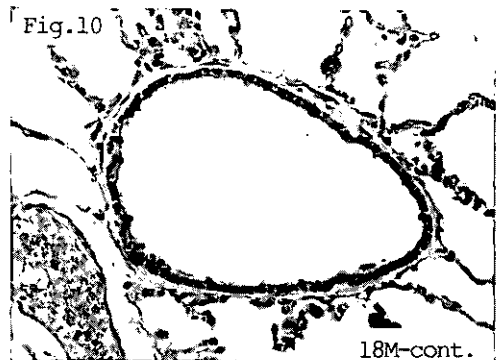


図 10 対照群 18 か月細気管支（原倍率×100）

Fig. 10 Control 18M Bronchiole (original mag. × 100)

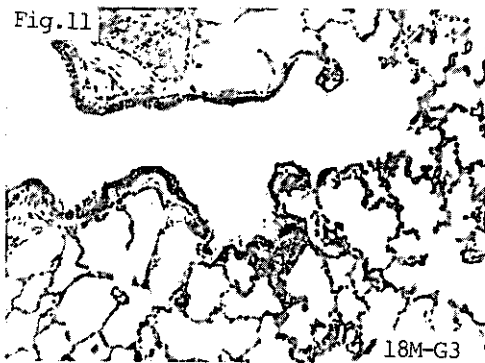


図 11 G3群 18 か月末梢気道：軽度の上皮肥大と増生，増殖性延長（原倍率×50）

Fig. 11 G3 18M Terminal airway: Slight hypertrophy and proliferation, bronchiolization (original mag. × 50)

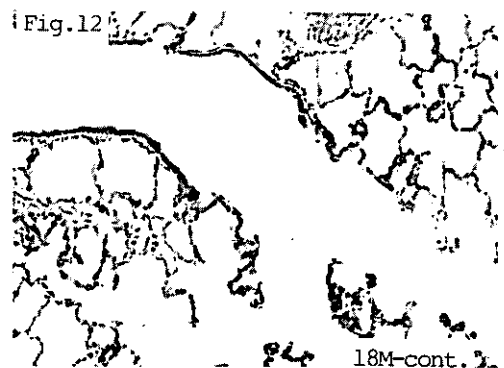


図 12 対照群 18 か月末梢気道（原倍率×50）

Fig. 12 Control 18M Terminal airway (original mag. × 50)



2M-G3

図 13 G3 群 2 か月中等大気管支上皮：
特記すべき所見を認めず（原倍
率×200）

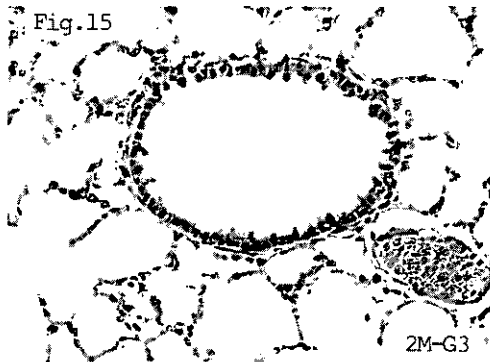
Fig. 13 G3 2M Middle size bronchial
epithelium: No remarkable altera-
tion (original mag. × 200)



2M-cont.

図 14 対照群 2 か月中等大気管支上皮
（原倍率×200）

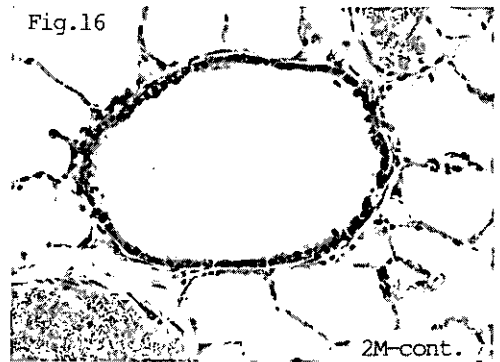
Fig. 14 Control 2M Middle size bronchial
epithelium (original mag. × 200)



2M-G3

図 15 G3 群 2 か月細気管支：特記すべ
き所見を認めず（原倍率×100）

Fig. 15 G3 2M Bronchiole: No remark-
able alteration (original mag. ×
100)



2M-cont.

図 16 対照群 2 か月細気管支（原倍率×
100）

Fig. 16 Control 2M Bronchiole (original
mag. × 100)

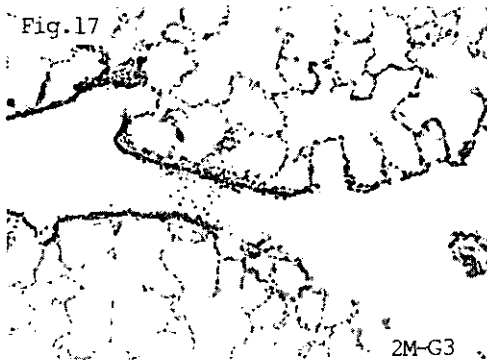


図 17 G3群2か月末梢気道：特記すべき所見を認めず（原倍率×50）
 Fig. 17 G3 2M Terminal airway: No remarkable alteration (original mag. ×50)

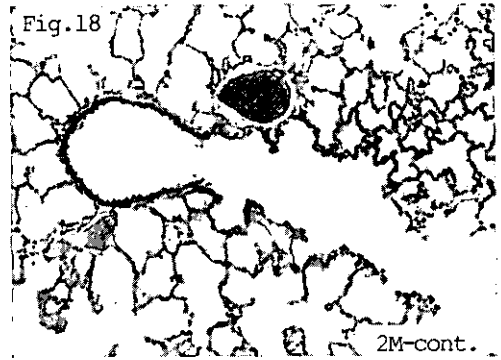


図 18 対照群2か月末梢気道（原倍率×50）
 Fig. 18 Control 2M Terminal airway (original mag. ×50)

引用文献

- 1) 横山栄二(1984): 大気汚染物質のレビュー (複合影響). 日本科学技術情報センター, 15-17.
- 2) 吉田克己(1987): 大気汚染物質レビュー (窒素酸化物). 日本科学技術情報センター, 2-13.
- 3) Bils, R.F. and B.R. Christie (1980): The experimental pathology of oxidant and air pollutant inhalation. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **21**, 211-243.
- 4) 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.
- 5) Stephens, R.T., G. Freeman and M.T. Evans (1972): Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **24**, 160-179.
- 6) Evans, M.J. and Freeman, G. (1980): Morphological and pathological effects of NO₂ on the rat lung. *In: Nitrogen oxides and their effects on health. S.D. Lee (ed.), Ann Arbor. Science*, 243-265.
- 7) 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・東京都立衛生研究所年報, 32-1, 250-256.
- 8) 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.
- 9) 京野洋子・三枝順三・河合清之・山田靖子・久保田憲太郎(1983): 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 40 号, 195-219.
- 10) Kubota, K., M. Murakami, S. Takenaka, K. Kawai and H. Kyono (1987): Effects of long-term nitrogen dioxide exposure on rat lung: morphological observations. *Environ. Health Perspect.*, **73**, 157-169.

- 11) 清水 明・松本 茂・伊藤勇三・山元昭二・高橋慎二・高橋 弘(1988): 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラット及ぼす影響 I. 第 2 回目実験の暴露チャンバーの環境制御. 国立公害研究所研究報告, 第 115 号, 41~47.
- 12) Pán. A.Y. S., J. Béland and Z. Jegier (1972): Ozone-induced arterial lesions. *Arch. Environ. Health*, **24**, 229-232.
- 13) 横山哲朗(1979): 細気管支炎とその周辺. *日本内科学会雑誌*, **68**, 363-378.
- 14) Reid, L. (1970): Evaluation of model systems for study of airway epithelium, cilia and mucus. *Arch. Intern. Med.*, **126**, 428-434.
- 15) Freeman, G., G.B. Haydon (1964): Emphysema after low-level exposure to NO_2 . *Arch. Environ. Health*, **8**, 125-128.
- 16) Lamb, D. and L. Reid (1968): Mitotic rates, goblet cell increase and histochemical changes in mucus in rat bronchial epithelium during exposure to sulphur dioxide. *J. Path. Bact.*, **96**, 97-111.
- 17) Kyono, H. and K. Kawai (1982): Morphometric study on age-dependent pulmonary lesions in rats exposed to nitrogen dioxide. *Ind. Health*, **20**, 73-99.
- 18) 寺田伸枝・鈴木孝人・大沢誠喜・福田雅夫・池田真吾・溝口 勲(1982): O_3 単独暴露および NO_2 と O_3 複合暴露によるラットの肺の病理形態的变化. 東京都立衛生研究所研究年報, **33**, 337-346.
- 19) Terada, N. I. Mizoguchi T. Kohno and Y. Hayashi (1986): Pulmonary effects in rats induced by prolonged exposure to a mixture of O_3 and NO_2 . *大気汚染学会誌*, **21**, 512-520.
- 20) Freeman, G., L.T. Juhos, N.J. Furioli, R. Mussenden, R.J. Stephens and M.J. Evans (1974): Pathology of pulmonary disease from exposure to interdependent ambient gases (nitrogen dioxide and ozone). *Arch. Environ. Health*, **29**, 203-210.
- 21) Cabral-Anderson, L.J., M.J. Evans and G. Freeman (1977): Effects of NO_2 on the lungs of aging rats I Morphology. *Exp. Mol. Pathol.*, **27**, 353-365.
- 22) Evans, M.J., L.J. Cabral-Anderson and G. Freeman (1977): Effects of NO_2 on the lungs of aging rats II Cell proliferation. *Exp. Mol. Pathol.*, **27**, 366-376.
- 23) Yokoyama, E., I. Ichikawa and K. Kawai (1980): Does nitrogen dioxide modify the respiratory effects of ozone? *In: Nitrogen oxides and their effects on health*. S.D. Lee (ed.), Ann. Arbor. Science, 217-229.

II-4

二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 IV
—— 電顕形態計測所見 ——

Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats IV
—— Electronmicroscopic Morphometry ——

米元純三¹・河越昭子¹・村上正孝¹

Junzo YONEMOTO¹, Akiko KAWAGOE¹ and Masataka MURAKAMI¹

要 旨

NO₂+O₃ 複合ガスの肺胞レベルへの影響を検討する目的で、Wistar系雄ラットに0.05 ppm O₃ 単独または0.04 ppmあるいは0.4 ppm NO₂を加えた混合ガスを2, 4, 9, 18, 22か月間暴露し、末梢の肺胞の変化を電顕形態計測の手法を用いて定量的評価を行った。

算術平均肺胞壁厚は4か月暴露群で有意な増加が認められた。22か月では濃度に依存した増加がみられたが統計的には有意ではなかった。I型及びII型の肺胞上皮には暴露による初期反応が2か月、4か月において認められた。非細胞性間質に占めるコラーゲンの割合は4, 9, 22か月で群間に有意差が認められた。22か月では暴露と加齢の影響による線維化の進行が示唆された。

電顕形態計測による肺胞壁の変化は多様で統一的な解釈は困難であったが、初期の肺胞上皮を中心とした変化、それに引き続く変化、老化による修飾など、いくつかの相における変化として捕えられるべきものと考えられた。

また、前回のNO₂長期暴露実験の結果との比較から肺胞レベルでは0.05 ppm O₃はNO₂の影響を強めているとは言えないと判断された。

Abstract

An electronmicroscopic morphometry was performed on the lungs of male rats exposed to 0.05 ppm O₃ alone or mixture of 0.05 ppm O₃ and 0.04 or 0.4 ppm NO₂ for 2, 4, 9, 18 and 22 months to examine the effects of NO₂ and/or O₃ on peripheral alveoli.

Arithmetic mean thickness (AMT) of alveolar wall was significantly increased in exposure groups at 4 months. A trend of dose-dependent increase of AMT was observed at 22 months, but it was not statistically significant. The initial responses of type I and type II epithelial cells to oxidative gases such as NO₂ and O₃ were observed at 2 and 4 months. The ratio of collagen to non-cellular interstitium was significantly different among groups at 4, 9 and 22 months. The increased ratio observed in groups exposed to mixture gas at 22

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

months was interpreted as fibrotic change caused by gas exposure and aging.

The changes detected in alveolar wall tissue by electronmicroscopic morphometry did not always show a dose-dependent trend. It rather seemed to indicate a multiphasic reaction pattern.

Comparing the present results with those obtained from the previous experiment of long-term exposure to NO₂ alone, 0.05 ppm O₃ did not show a potentiation of the effects caused by NO₂ alone.

1 はじめに

肺の形態学的変化，特に末梢の肺胞壁の微小な変化を客観的に評価することは光顕レベルでは難しく，電顕形態計測の手法が有用と考えられる。前報の NO₂ 0.04 ppm から 4 ppm のラットへの 27 か月までの暴露実験において，末梢の肺胞壁の電顕形態計測により，18 か月以降の肺胞壁の肥厚傾向，肺胞壁の線維化傾向が報告された¹⁾。

今回，NO₂ に 0.05 ppm O₃ を加えた条件によってラットへの 22 か月までの暴露を行い，末梢の肺胞壁の形態変化を電顕形態計測の手法を用いて計測し，肺胞壁の変化を定量的に評価を行うとともに，光顕レベルでの観察を補うことを目的とした。さらに，前報の NO₂ の単独暴露の結果と比較することにより，0.05 ppm O₃ が NO₂ の影響をどのように修飾するかを検討した。

2 材料及び方法

動物：Wistar 系雄性ラット（日本クレア）を用いた。9 週令から暴露チャンバーに搬入し，暴露 2，4，9，18，22 か月目に各群より 6 匹ずつ無作為に搬出し実験に供した。

暴露条件：国立公害研究所動物施設内の暴露チャンバーにおいて暴露を行った。暴露条件は以下のとおりである。C 群（対照群）清浄空気を暴露した。G 1 群（O₃ ガス単独群）午前 9 時から午後 7 時までの間欠暴露とし，正弦波状に濃度変化するようにプログラム制御を行った。ピーク濃度 0.1 ppm，平均濃度 0.05 ppm である。G 2 群（複合暴露群）G 1 群の O₃ ガス暴露条件に 0.04 ppm NO₂ を加えた。NO₂ は 24 時間暴露で濃度は一定である。G 3 群（複合暴露群）G 1 群の O₃ ガス暴露条件に 0.4 ppm NO₂ を加えた。チャンバー内の温度は 25°C，湿度は 55% に制御した。暴露条件の詳細については本報告書別報²⁾ 参照のこと。

電顕試料作製：ネブタール腹腔内注射（50 mg/kg 体重）による深麻酔下で気管を露出させカテーテルを挿入した。腹大動脈切断により放血しながら，気管カテーテルから 20 cm 水柱圧で氷固定液（1% グルタルアルデヒド，1.5% ホルムアルデヒドを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 pH 7.4）を注入し，肺の再拡張固定を行った。再拡張固定した左肺の中央部より水平断切片をとり，細切し，常法により一個体につき数ブロックの電顕試料を作製した。

電顕形態計測は京野ら³⁾の方法に準じ各個体からランダムに一つのブロックを薄切した。超薄切片は Veco grid square mesh (200 mesh) にのせ，鉛・ウラン二重染色を施し，日本電子 CX-

100型透過電顕を用い、倍率2,000倍でメッシュの一定隅を撮影した。得られたフィルムを3倍にプリントし、このプリントをmultipurpose test system⁴⁾に基づくテストシステム(ポイント数288, ラインの長さ2 μ m相当)により肺胞壁各構成成分の容量及び容積率, 算術平均肺胞壁厚を計測した。一個体10枚の写真をもって一つのRepresentative sample⁵⁾とし、10枚の測定値の合計から各パラメーターを算出した。

統計処理は国立公害研究所電算機管理室 HITAC M-280H システムにより BMDP プログラムパッケージを用いて行った。処置の効果の検定には分散分析(ANOVA)を、群間の比較には Duncan の Multiple Range Test を用いた。

3 結果

結果は1) I型, II型肺胞上皮の変化, 2) 算術平均肺胞壁厚の変化, 3) 非細胞性間質の変化, を中心に述べる。

3.1 I型, II型肺胞上皮の変化

I型肺胞上皮の容積率は暴露期間, 暴露条件にかかわらず, ほぼ, 一定の水準で約20%前後であった(図1A)。I型肺胞上皮の細胞一個当たりの容量は4か月において, 暴露群で対照に比べ有意な減少, 9か月のG2群で有意な増加が認められた(図1B)。また, 18か月では暴露群で増加傾向がみられた。この4か月における減少は細胞数の増加が, 9か月のG2群と18か月の暴露群における増加は細胞数の減少が寄与していた。

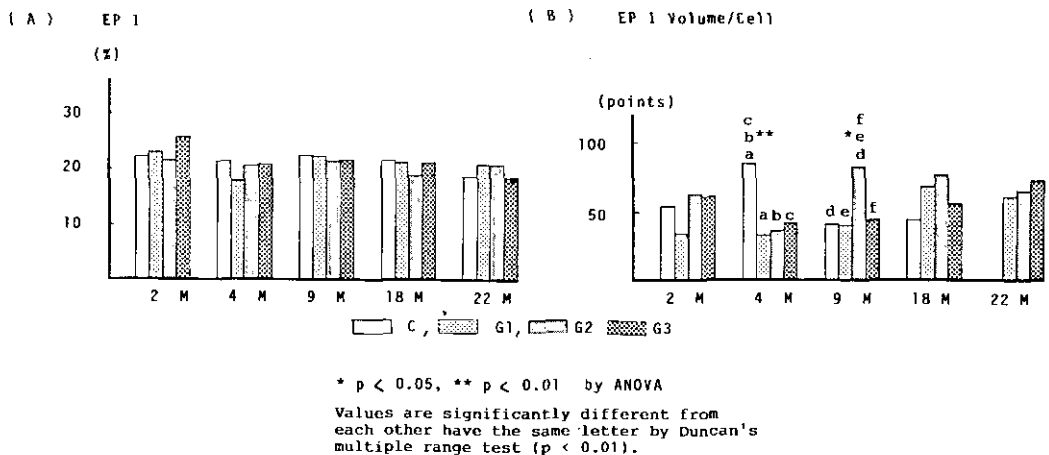


図 1 I型肺胞上皮

Fig. 1 Type I epithelial cell

(A) Volume density of type I epithelial cell

(B) Type I epithelial cell volume

II型肺胞上皮の容積率は2か月において、G1、G2群で対照に比べ有意な増加が認められた。4か月におけるG1群の増加、18か月におけるG1群の減少が目立つ、いずれも統計的には有意ではない(図2A)。II型肺胞上皮の細胞一個当たりの容量は2か月において暴露濃度に依存した有意な増加が認められた(図2B)。この増加にはG1群、G2群では容量の増加が、G3群では細胞数の減少が寄与していた。

I型肺胞上皮、II型肺胞上皮の細胞数の比を図3に示す。2か月、9か月、18か月と暴露濃度に

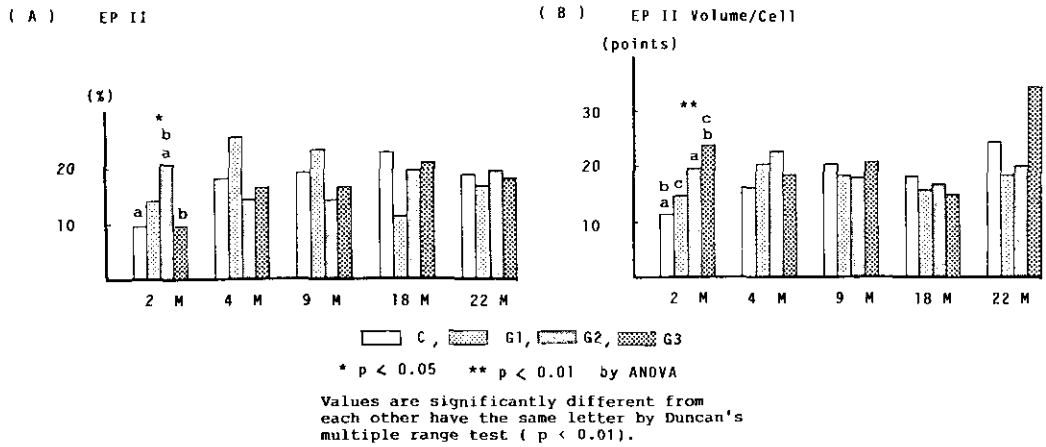


図 2 II型肺胞上皮

Fig. 2 Type II epithelial cell

- (A) Volume density of type II epithelial cell
- (B) Type II epithelial cell volume

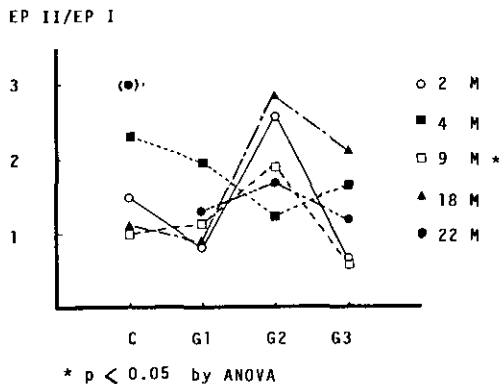


図 3 II型/I型細胞数比

Fig. 3 Ratio of Type II/Type I

(○) 2 months, (■) 4 months, (□) 9 months, (▲) 18 months, (●) 22 months

対して同様な変動パターンを示し、G 2 群での上昇が観察された。この G 2 群での I 型と II 型の細胞数の比の上昇は、2 か月では I 型の減少と II 型の増加、9 か月では I 型の減少、18 か月では II 型の増加によるものであった。G 3 群の 18 か月での上昇は II 型の増加によるものであった。

3.2 算術平均肺胞壁厚

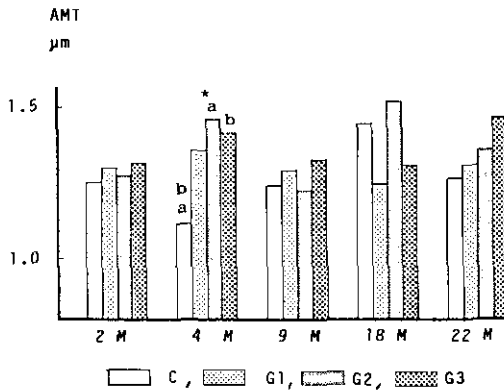
算術平均肺胞壁厚の推移を表 1, 図 4, に示す。4 か月において暴露群で対照に比べ有意な壁厚の増加が認められた。22 か月においても暴露濃度に依存した増加傾向がみられるが統計的には有意ではない。加齢に伴う肺胞壁の肥厚傾向も明らかではない。

表 1 O₃+NO₂ 長期暴露における算術平均肺胞壁厚
 Table 1 Arithmetic mean thickness of alveolar wall under long-term exposure to O₃+NO₂

GROUP.	2 M	4 M	9 M	18 M	22 M
		*			
C	1.25±0.09 ^a	1.11±0.45	1.24±0.10	1.44±0.07	1.26±0.04
G 1	1.30±0.05	1.36±0.11	1.29±0.05	1.24±0.10	1.31±0.08
G 2	1.27±0.07	1.46±0.06	1.20±0.06	1.52±0.12	1.36±0.08
G 3	1.32±0.01	1.42±0.06	1.33±0.04	1.31±0.10	1.47±0.09

a Mean ± S. E.

* Treatment is significant at p < 0.05 by ANOVA.



* p < 0.05 by ANOVA

Values are significantly different from each other have the same letter by Duncan's multiple range test (p < 0.01).

図 4 算術平均肺胞壁厚

Fig. 4 Arithmetic mean thickness of alveolar wall

算術平均肺胞壁厚と他の形態計測のパラメータとの相関を示す(表2)。算術平均肺胞壁厚は直接的には総容量/表面積として求められる。2か月においては総容量との正の相関、表面積との弱い負の相関傾向がみられ、両者の要因の関与が認められるが、4か月、9か月、18か月では総容量との正の相関が認められたが、表面積との負の相関はみられなかった。また、肺胞壁厚として測られる血管内皮、間質、肺胞上皮のうち、間質とより高い相関が認められた。全間質量と非細胞間質量を示す(図5)。いずれの暴露期間においても算術平均肺胞壁厚と並行した推移が見られた。

算術平均肺胞壁厚は9か月、18か月とII型肺胞上皮の容積率との相関が認められ、II型肺胞上皮の細胞当たり容量とは9か月から次第に正の相関傾向がみられ、22か月で統計的に有意であった。このII型肺胞上皮の動きと関連して、I型上皮の容積率とは9か月、18か月で負の相関が認められた。血管内皮の容積率とは、4か月、9か月において負の相関が認められた(表2)。

3.3 非細胞性間質の変化

コラーゲンとマトリックス(非線維性間質)の容積率の推移を示す(図6A, 6B)。コラーゲンは4か月において暴露群で対照に比べ有意な減少がみられ、9か月ではG1群において他の群よ

表 2 算術平均肺胞壁厚と他の形態計測諸指標との相関
Table 2 Correlation of arithmetic mean thickness of alveolar wall with other morphometric parameters

IS: Total volume of interstitium, NCIS: Total volume of non-cellular interstitium, EP1: Volume density of type I epithelial cell, EP2: Volume density of type II epithelial cell, EP1N: Type I epithelial cell volume, EP2N: Type II epithelial cell volume, END: Volume density of endothelial cell, MTRX: Volume density of matrix (non-cellular interstitium), CLGN: Volume density of collagen, DOSE: Exposure concentration, SA: Surface area of alveolar wall, TPT: Total tissue volume

	2 M	4 M	9 M	18 M	22 M
AMT-IS	0.6553**	0.6901**	0.7741**	0.7841**	0.7466**
-NCIS	0.6414**	0.6943**	0.7222**	0.6969**	0.6870**
-EP1	-0.1847	-0.2794	-0.5101*	-0.6348**	-0.3800
-EP2	-0.0494	0.3293	0.4160*	0.4487*	0.3013
-EP1N	-0.1499	-0.4095	-0.1196	-0.1782	-0.0380
-EP2N	0.0869	0.2858	0.3960	0.4391	0.5036*
-END	-0.2869	-0.5255**	-0.6697**	-0.2232	-0.1916
-MTRX	0.2251	0.1300	-0.1507	0.1073	-0.3453
-CLGN	0.2165	-0.1607	0.2689	-0.1877	0.2840
-DOSE	0.1298	0.4949*	0.1440	-0.0613	0.4132*
-SA	-0.2174	-0.0489	0.2406	-0.0339	0.0472
-TPT	0.5883**	0.7184**	0.8386**	0.9051**	0.7170**

** P<0.01, * P<0.05

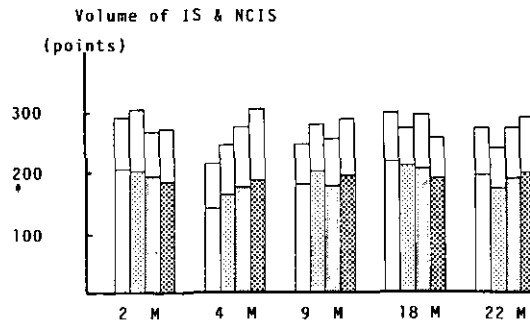


図 5 全間質量及び非細胞性間質量

Fig. 5 Total volume of interstitium and volume of non-cellular interstitium

り有意な減少がみられた。

マトリックスの容積率は、4 か月において G 1 群、G 3 群で対照に比べ有意な増加が認められた。非細胞性間質に占めるコラーゲンの割合を示す(図 6 C)。4 か月において、対照群が暴露群に比べ有意に高く、9 か月においては G 1 群が対照群、G 3 群に比べ有意に低かった。22 か月では G 2 群、G 3 群が対照群、G 1 群に比べ有意に高かった。

4 考 察

比較的高濃度の NO₂ 暴露によって I 型肺胞上皮の傷害とそれの II 型による修復、II 型から I 型への移行という I 型と II 型肺胞上皮の Kinetics が報告されている⁶⁻⁸⁾。京野らは、0.1 ないし 0.5 ppm NO₂ に様々な週齢のラットを 30 日間暴露し、形態計測の手法を用いて、非常にゆっくりではあるが I 型肺胞上皮の傷害とそれに続く II 型肺胞上皮の増殖を認めている⁹⁾。Sherwin と Richters はマウスへ 0.34 ppm NO₂ を 60 日間暴露し、像解析法を用いて II 型肺胞上皮細胞の数と大きさの増加を認めている¹⁰⁾。このように低濃度領域でも変化の進行はゆるやかであるが同様な肺胞上皮の反応が起こると考えられる。このような観点からみると、2 か月における II 型肺胞上皮の細胞当たり容量の暴露濃度に依存した増加、4 か月における I 型肺胞上皮の細胞数の暴露群における増加は、I 型肺胞上皮の傷害、II 型による修復が 2 か月で、I 型への移行が 4 か月で起きていることを示唆している。9 か月の G 2 群、18 か月の暴露群では I 型肺胞上皮の肥大傾向(細胞当たりの容量増加)がみられるが、22 か月ではむしろ減少する傾向にある。

前回の NO₂ 単独 27 か月暴露実験では 9 か月で I 型肺胞上皮細胞数の濃度に依存した減少、18 か月における II 型肺胞上皮細胞容量の濃度に依存した増加、I 型と II 型の細胞数比の 9 か月での濃度と並行した増加を認め、9 か月での I 型の変化を中心とした 9 か月から 18 か月の相と II 型肺胞上皮の変化を中心とした 18 か月以降の相とが識別されるとしている¹⁾。

今回の実験においても、I 型肺胞上皮の細胞当たり容量の 9 か月における G 2 群での有意な増

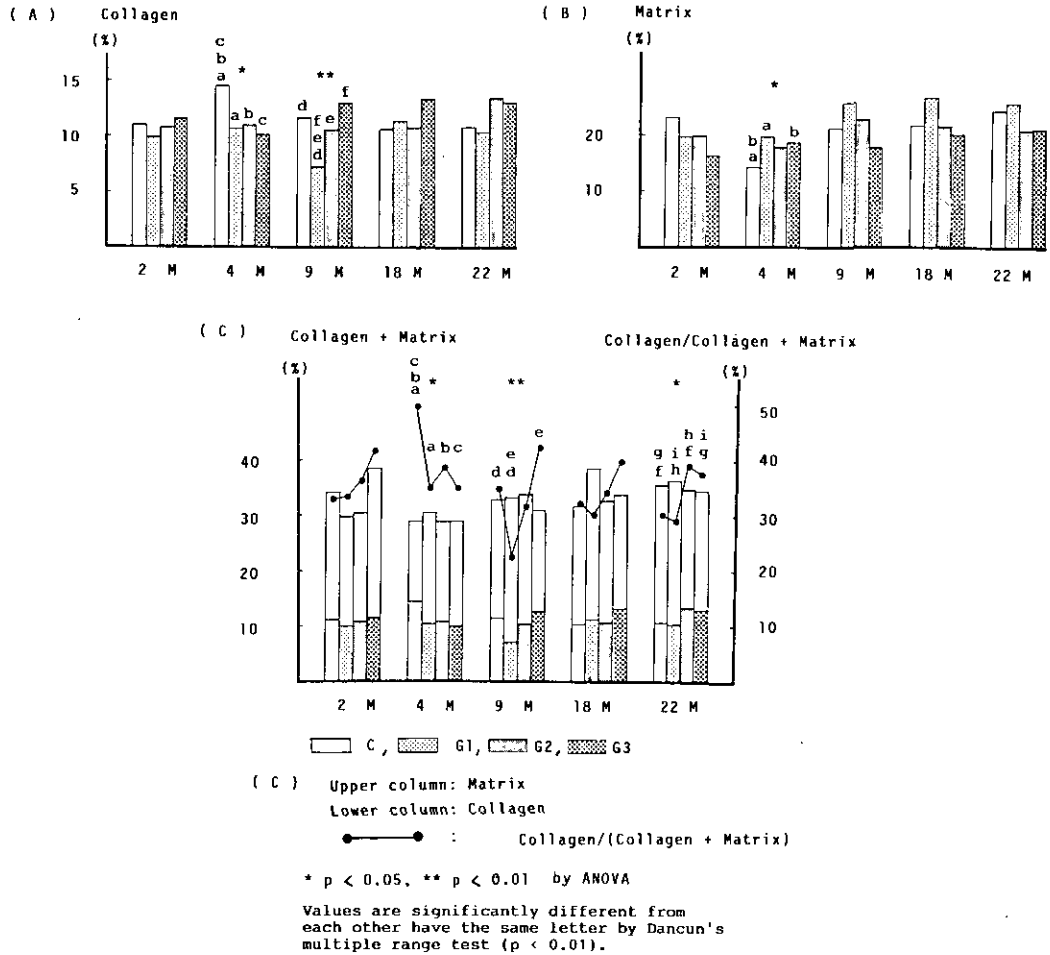


図 6 非細胞性間質

Fig. 6 Non-cellular interstitium

(A) Volume density of collagen

(B) Volume density of matrix

(C) Ratio of collagen to non-cellular interstitium

加, 18 か月における暴露群での増加傾向, 22 か月におけるこれらの減退傾向という同様な相が認められ, これらに加えて, 2 か月, 4 か月の初期反応の相が識別されるだろう。

算術平均肺胞壁厚は 4 か月において暴露群で対照に比べ有意な増加が認められた以外は有意な変化は認められなかった。肺胞壁の厚みには変化はなくても肺胞壁を構成する成分は変化している可能性を考え算術平均肺胞壁厚と他の形態計測のパラメータとの相関を検討した。その結果, 各暴露期間によって, 肺胞壁の内容が特徴的なことがわかる。すなわち, 9 か月, 18 か月と暴露期間の増加とともに, 算術平均肺胞壁厚は II 型肺胞上皮との正の相関, I 型肺胞上皮との負の相

関が認められた。4か月、9か月では血管内皮との負の相関が認められる。2か月、22か月ではこれらの相関は認められず、ここでも肺胞壁の内容の変化にいくつかの相が識別される。

非細胞性間質については4か月において、暴露群でのコラーゲンの有意な減少、マトリックスの有意な増加が認められた。非細胞性間質に占めるコラーゲンの割合は4か月、9か月、22か月で群間に有意差が認められるが、それぞれパターンが異なっており、ここでも肺胞壁の変化にいくつかの相があり、4か月、9か月が節目になっていることが示唆される。

O₃とNO₂との長期複合暴露実験の報告は少なく、濃度的に比較できるものとして寺田らのラットでの実験がある。0.1 ppm O₃と0.5, 1.0, 2.0 ppm NO₂との90日までの複合暴露を行い、0.5, 1.0 ppm NO₂との複合暴露においても2.0 ppm NO₂との複合でみられたII型肺胞上皮の増殖、I型上皮細胞質の不規則な厚薄、膠原線維と基質の増加による間質の拡大などの所見が程度は弱いながら認められたと報告している¹¹⁾。0.1 ppm O₃と0.3 ppm NO₂との18か月までの複合暴露では、II型細胞の腫大と増加、肺胞間質の軽度の水腫を認めている。いずれの実験においても変化はO₃単独と本質的に同じであり、複合によって変化の程度が強まり初期に起きた変化が持続する傾向がみられたと報告している¹²⁾。本実験でもO₃単独に比べ複合暴露群の方に影響が強く出ていること、初期の肺胞上皮の変化、後期の膠原線維の増加傾向など基本的には同様な結果と考えられるが、電顕形態計測により暴露期間に応じた変化の多様性が定量的に示されたと判断される。

前回のNO₂単独暴露実験において、算術平均肺胞壁厚は0.4 ppmでは18か月で初めて増加傾向が表れ、27か月では有意であった¹⁾。本実験においても22か月で増加傾向がみられたが有意ではなかった。18か月以降に認められた非細胞性間質の増加傾向は今回も同様に認められた。したがって、0.05 ppm O₃が0.4 ppmないし0.04 ppm NO₂の作用をより強めているとは認められなかった。

光顕レベルの観察では末梢気道においては、2, 4か月には変化は認められなかったが、電顕形態計測による肺胞所見ではI型、II型肺胞上皮の変化が認められた。また、18, 22か月における結合織の肥厚傾向は肺胞レベルでも非細胞性間質に占めるコラーゲンの増加という形で認められた。

以上をまとめると、肺胞壁の変化は、I型、II型肺胞上皮の初期反応を中心とした2か月、4か月の相、算術平均肺胞壁厚との相関という観点から、II型肺胞上皮の容積率、II型肺胞上皮の細胞当たり容量との相関が強まっていく9, 18か月の相、18か月でみられた変化が減退し非細胞性間質に占めるコラーゲンの割合が増加し、線維化が進行していると考えられる18か月から22か月の相、以上の三つの相の変化として捕えられよう。しかしながら、肺胞壁の変化は各時期によって多様であり、変化の程度もさほど大きいとは言えない。前回のNO₂単独暴露での結果との比較から、末梢の肺胞壁のレベルでは、0.05 ppm O₃は0.04, 0.4 ppm NO₂作用をより強めているとは判断されなかった。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、電顕形態計測の御指導を頂いた産業医学総合研究所、京野洋子博士（客員研究員）に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 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.
- 2) 清水 明・松本 茂・伊藤勇三・山元昭二・高橋慎二・高橋 弘(1988): 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 I. 第 2 回目実験の暴露チャンバーの環境制御. 国立公害研究所研究報告, 第 115 号, 41-47.
- 3) 京野洋子・興 重治・河合清之(1973): 微弱肺反応の形態学的検出. 大気汚染研究, **8**, 432.
- 4) Weibel, E.R., G.S. Kistler and W.F. Scherle (1966): Practical Stereological Methods for Morphometric Cytology. *J. Cell. Biol.*, **30**, 23-38.
- 5) Weibel, E.R. (1979): Point Counting Methods. *In: Stereological Methods. Vol. 1*, London: Academic Press Inc., 101-159.
- 6) 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 NO_2 . *Arch. Environ. Health*, **24**, 180-188.
- 7) Evans, M.J., L.J. Cabral, R.J. Stephens and G. Freeman (1975): Transformation of Alveolar Type 2 Cells to Type 1 Cells Following Exposure to NO_2 . *Exp. Mol. Pathol.*, **22**, 142-150.
- 8) Witschi, H. (1976): Proliferation of Type II Alveolar Cells: A Review of Common Responses in Toxic Lung Injury. *Toxicology*, **5**, 267-277.
- 9) Kyono, H. and K. Kawai (1982): Morphometric Study on Age-Dependent Pulmonary Lesions in Rats Exposed to Nitrogen Dioxide. *Ind. Health*, **20**, 73-99.
- 10) Sherwin, R.P. and V.R. Richters (1982): Hyperplasia of Type 2 Pneumocytes Following 0.34 ppm Nitrogen Dioxide Exposure: Quantitation by Image Analysis. *Arch. Environ. Health*, **37**, 306-315.
- 11) 寺田伸枝・鈴木孝人・大沢誠喜・福田雅夫・池田真悟・溝口 勲(1982): O_3 単独暴露および NO_2 と O_3 の複合暴露によるラットの肺の病理形態学的変化. 東京都立衛生研究所研究年報, **33**, 337-346.
- 12) Terada, N., I. Mizoguchi, T. Kohno and Y. Hayashi (1986): Pulmonary Effects in Rats Induced by Prolonged Exposure to a Mixture of O_3 and NO_2 . *J. Jpn. Soc. Air Pollut.*, **21**, 512-520.

II-5

二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 V
——呼吸機能に及ぼす影響——

Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats V
—— On the Pulmonary Function ——

鈴木 明¹・清水 明²

Akira K. SUZUKI¹ and Akira SHIMIZU²

要 旨

NO₂とO₃の複合長期暴露の呼吸機能に対する影響を明らかにするために、呼吸数(RR)、分時換気量(\dot{V}_E)、一回換気量(\dot{V}_T)、炭酸ガス呼出量(\dot{V}_{ECO_2})、酸素摂取量(\dot{V}_{IO_2})、基礎代謝量(B-Met)、呼吸商(RQ)について、4、9、18、22か月暴露ラットで検討した。

RRは4か月暴露のG3で有意に増加した。 \dot{V}_E は4か月暴露のG1で、9か月暴露のG3で、そして18か月暴露のG2で有意に減少した。 \dot{V}_{ECO_2} は4か月暴露でNO₂の濃度に依存して減少しG3群では有意であった。 \dot{V}_{IO_2} は \dot{V}_{ECO_2} と同様な変化を4か月暴露で示した。B-Metは4か月暴露で減少傾向を示した。

以上の結果は、4か月暴露では呼吸代謝の低下及び換気不全が起こっている可能性を示唆している。

Abstract

To clarify the effects of long-term exposure to nitrogen dioxide and ozone in combination on pulmonary function of rats. Respiratory rate (RR), minute volume (\dot{V}_E), tidal volume (\dot{V}_T), expired CO₂ content (\dot{V}_{ECO_2}), intake O₂ content (\dot{V}_{IO_2}), basic metabolism (B-Met) and RQ were examined in the rats exposed to NO₂ and O₃ in combination for 4, 9, 18 and 22 months. RR of G3 exposed rat for 4 months (mos). was significantly increased. \dot{V}_E of G1 rat for 4 mos., that of G3 rat for 9 mos. and that of G2 rat for 18 mos. were significantly decreased. \dot{V}_{ECO_2} of rat for 4 mos. was decreased in dependent on a increase of NO₂ concentration and significantly decreased in G3. Change of \dot{V}_{IO_2} of rat for 4 mos. was similar to that of \dot{V}_{ECO_2} . B-met of rat for 4mos. has a trend of decrease. From these results, a decrease of oxygen metabolism and a ventilation failure may occur in rat for 4 mos.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies. 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies. 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1 はじめに

NO₂ や O₃ ガスの第一次標的臓器が呼吸器であることは言うまでもない。著者らはこれまでに、マウスに 5~20 ppm の NO₂ を 24 時間暴露すると肺におけるガス交換能が変化すること^{1,2)}、また NO₂ はラットの血液中のガス分圧を変化させ、4 ppm 3 か月間暴露³⁾ 及び 0.4 ppm 9 か月間暴露⁴⁾ で低酸素血症が起こることを報告した。さらに、著者らは、5~20 ppm 急性暴露で、暴露濃度に応じて運動能力が低下することを報告した⁵⁾。これらの事実は影響と無関係とは言えず、NO₂ が呼吸機能、循環機能、運動機能等に影響を及ぼしていることを示している。一方、著者らは、同様の酸化性質を有する O₃ 急性暴露及び NO₂ との複合長期(9~18 か月)暴露で低酸素血症と高炭酸血症が起こることを報告した⁶⁾。そこで今回は、複合長期暴露のガス交換能を主体とした呼吸機能の変化について検討した。

2 実験方法及び実験材料

8 週齢の JCl: Wistar 系雄ラットを、G1: 0.5 ppm O₃ (Max 0.1 ppm) 単独, G2: 0.5 ppm O₃ + 0.04 ppm NO₂, G3: 0.5 ppm O₃ + 0.4 ppm NO₂ の複合で 4, 9, 18, 22 か月間暴露した。なお暴露方法及び飼育経過の詳細は I, II 項に書かれているのでここでは省略する。暴露後各チャンバーから無作為に 6 匹ずつ取り出し、ネンブタール (Pentobarbital Sodium 30 mg/kg B.W) 麻酔後直ちに気管カテーテルを挿入し、呼気・吸気分離器 (自己開発) にて呼気を採取するとともに呼気量を測定した。呼気収集中は体温が低下しないよう留意した。採取した呼気は直ちに O₂, CO₂ 分析器 (NEC 三栄 1 H 21) で O₂ 濃度と CO₂ 濃度を測定した。呼吸数は吸気分離回数から算出し、一回換気量 (V_T) は分時換気量を呼吸数で除して求めた。

換気量は BTPS で、O₂ 摂取量、CO₂ 呼出量、基礎代謝は定法に従って計算し、STPD で各々示した。また代謝系の指標は、ヒトでは体表面積当たりで計算しているが、ラットでは体表面積との関係が明確でないことや皮毛がありエネルギー放散の仕方がヒトと異なる等の理由から体重比で計算した。

有意差検定には Student の *t*-テストを用い、*p* < 0.05 の場合、有意と判定した。なお統計計算は実測値で行ったが、図では対照群を 100% とした相対値で示した。

3 結果

3.1 心拍数 (RR), 分時換気量 (\dot{V}_E), 一回換気量 (V_T) の変化

図 1 に RR, \dot{V}_E , V_T の変化を示す。RR は 4 か月暴露の G3 で有意に増加した。9 か月間暴露では有意ではないが、NO₂ 濃度の増加に伴い減少した。18 か月の G2 で有意に減少した。 \dot{V}_E は 4 か月暴露の G1 で、9 か月暴露の G3 で、そして 18 か月暴露の G2 で有意に減少した。V_T は 4 か月暴露群で減少傾向を示し、22 か月暴露の G3 では有意に増加した。

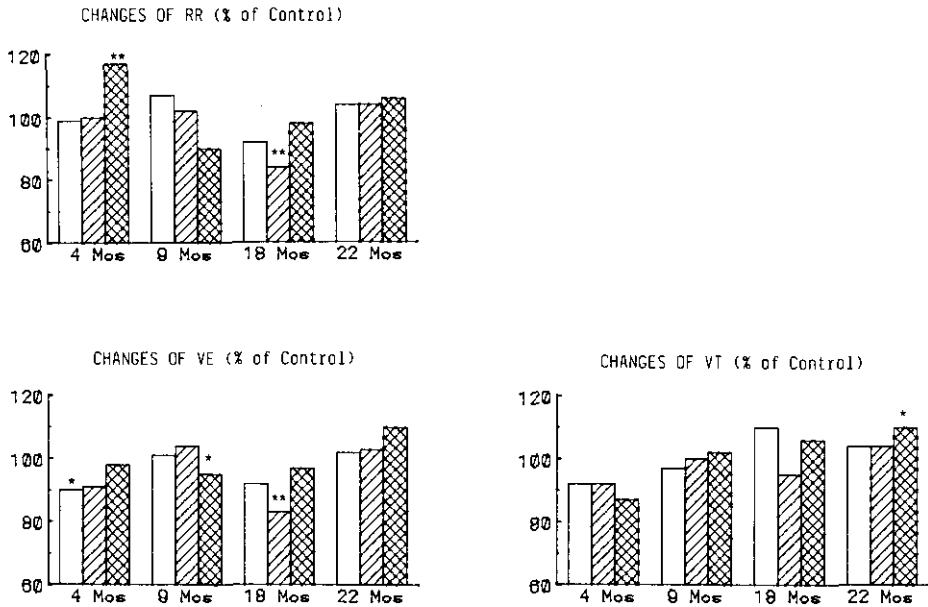


図 1 心拍数 (RR), 分時換気量 (\dot{V}_E), 一回換気量 (V_T) の変化
 Fig. 1 Changes of respiratory rate (R,R), minute volume (\dot{V}_E) and tidal volume (V_T). Bars show as percent of control value
 * : $P < 0.05$, ** $p < 0.01$. □ : G1, ▨ : G2, ▩ : G3

3.2 炭酸ガス呼出量 (\dot{V}_{ECO_2}) の変化

\dot{V}_{ECO_2} , 一呼吸当たりの \dot{V}_{ECO_2} (\dot{V}_{ECO_2}/RR), 体重当たりの \dot{V}_{ECO_2} (\dot{V}_{ECO_2}/BW) の変化を図 2 に示す。 \dot{V}_{ECO_2} , \dot{V}_{ECO_2}/RR , \dot{V}_{ECO_2}/BW の 4 か月暴露では NO_2 濃度の増加に伴って減少傾向を示した。特に G3 で有意に減少した。また, G3 では, 暴露期間の延長に伴い減少の程度が少なくなる傾向を示した。 \dot{V}_{ECO_2}/BW では 22 か月暴露の G1 で有意に増加した。

3.3 酸素摂取量の変化 (\dot{V}_{iO_2})

\dot{V}_{iO_2} , 一呼吸当たりの \dot{V}_{iO_2} (\dot{V}_{iO_2}/RR), 体重当たりの \dot{V}_{iO_2} (\dot{V}_{iO_2}/BW) の変化を図 3 に示す。 \dot{V}_{iO_2} , \dot{V}_{iO_2}/RR は \dot{V}_{ECO_2} とほぼ同様な傾向を示したが, \dot{V}_{iO_2} では, 18 か月暴露の G2 で有意な低下を, 22 か月暴露の G1 で有意な増加を示した。 \dot{V}_{iO_2}/BW では, 4 か月暴露の各群で減少傾向を示し, 22 か月暴露の G1 で有意に増加した。

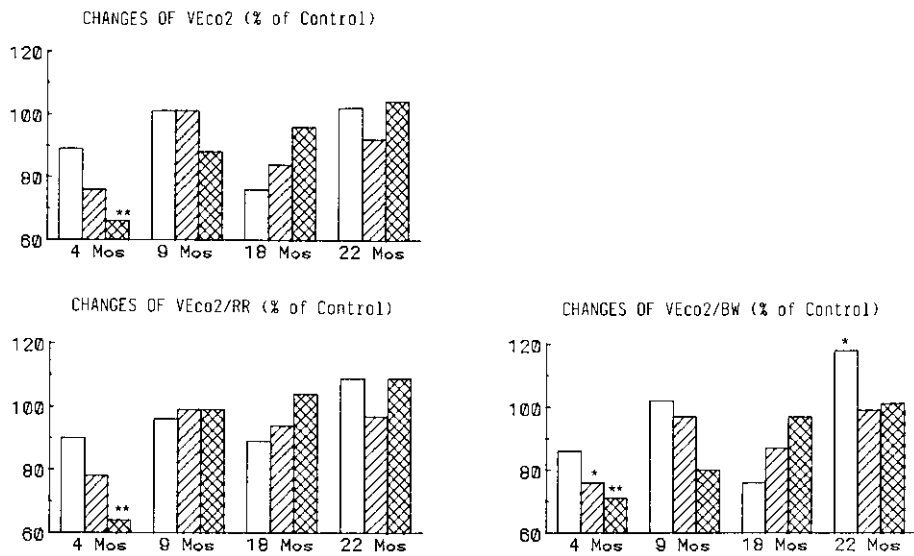


図 2 炭酸ガス呼出量 (\dot{V}_{ECO_2}), 一呼吸当たりの炭酸ガス呼出量 (\dot{V}_{ECO_2}/RR), 体重当たりの炭酸ガス呼出量 (\dot{V}_{ECO_2}/BW) の変化 (説明は図 1 と同じ)
 Fig. 2 Changes of expiratory CO_2 content (\dot{V}_{ECO_2}), \dot{V}_{ECO_2}/RR and \dot{V}_{ECO_2}/BW .
 Comments are described in Fig. 1.

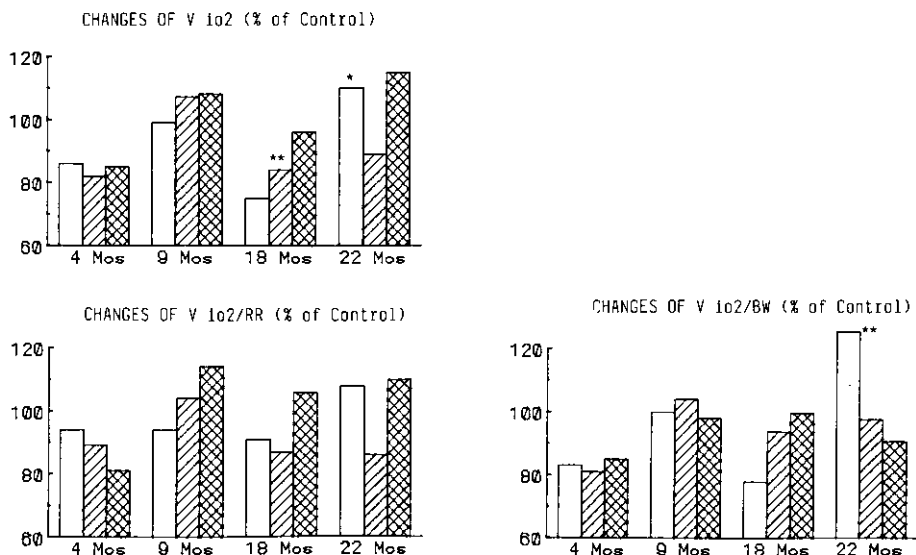


図 3 酸素摂取量 (\dot{V}_{IO_2}), 一呼吸当たりの酸素摂取量 (\dot{V}_{IO_2}/RR), 体重当たりの酸素摂取量 (\dot{V}_{IO_2}/BW) の変化 (説明は図 1 と同じ)
 Fig. 3 Changes of intake O_2 content (\dot{V}_{IO_2}), \dot{V}_{IO_2}/RR and \dot{V}_{IO_2}/BW .
 Comments are described in Fig. 1.

3.4 基礎代謝量 (B-Met), 体重当たりの基礎代謝量 (B-Met/BW) 及び呼吸商 (RQ) の変化

各々の変化を図4に示す。B-Met, B-Met/BWでは4か月暴露の各群で減少傾向を示した。また、B-Metでは、18か月暴露G2群で有意な低下を示し、22か月暴露のG1, G3で有意に増加した。B-Met/BWでは、22か月暴露のG1とG3で有意に増加した。RQは、4か月暴露でNO₂濃度の増加に伴い減少し、G3群で有意に減少した。

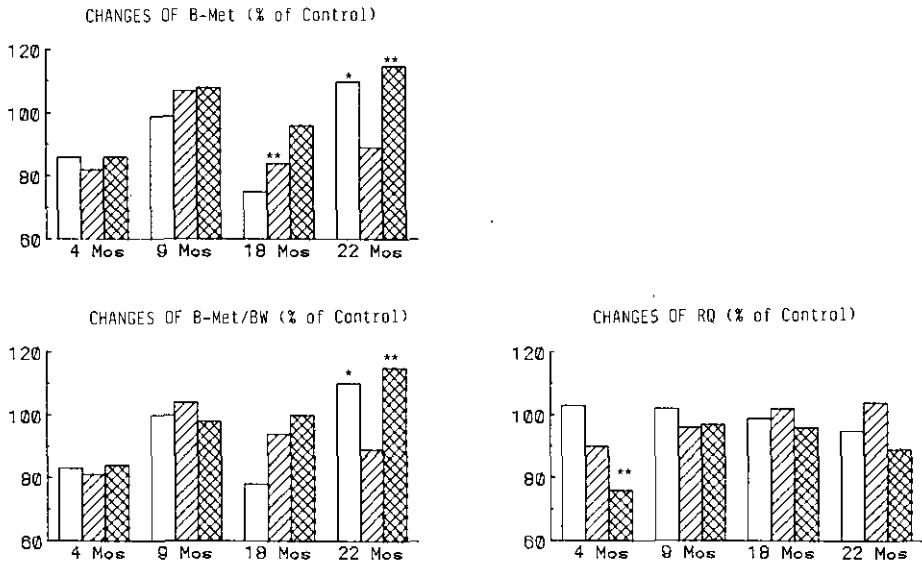


図 4 基礎代謝量 (B-Met), B-Met/B.W と呼吸商 (RQ) の変化 (説明は図1と同じ)
 Fig. 4 Changes of basic metabolism (B-Met), B-Met/BW and RQ
 Comments are described in Fig. 1.

4 考 察

一般に、RR, \dot{V}_E , V_T 等は換気状態を表す指標と言われ、一方、炭酸ガスの呼出量、酸素摂取量は個体レベルあるいは組織での呼吸代謝を表す指標と言われている。しかし、これらの指標の間には明りょうな区分はないようである。実験小動物を用いた従来の方法では換気状態を知ることができたが、呼吸を正確に分離できなかったことから呼吸代謝まで検索することはできなかった。

今回、著者らが開発した呼気・吸気分離装置を用いてはじめて呼吸代謝の検討が可能となった訳であるが、各々の指標の変化をヒトと同様に解釈することには困難さがあり、今後の課題として残されよう。しかし、これらの指標を原点に帰って考え、相互関連の上から見直した場合何らかの示唆を与えてくれるものと考え。

例えば、本実験では、4か月暴露で呼出炭酸ガスがNO₂濃度の増加に伴い減少し、また酸素摂

取量も同様の結果を示した。この時、基礎代謝は減少傾向を示すが濃度依存性はなかった。これらの事実は、CO₂が体外に出にくかつ酸素が体内に入りにくいことを示しており、一見すると体内の代謝レベルが低下したことに起因されるが、この場合、RQ 値 (CO₂濃度/O₂濃度) が減少していることから、その原因として換気不全も考えられる。そしてその代償作用として呼吸数が増加したと考えられよう。そしてこのことは、病理学的知見 (前項参照) の光顕的レベルの所見と一致すると考えることができる。

ところで、今回のような低濃度の複合長期間暴露では、変動範囲が大きく一定の意味付けは困難である。ただ、暴露条件の最も厳しい G3 について見ると、各指標は暴露初期の低レベルから経時的に増加し対照レベルに近づくというパターンがありそうである。しかし、G1 及び G2 群では変動が大きい。これらの解釈としては、G1、G2 では暴露が軽微なため生体の調節作用が働き生理的範囲内で大きな変動を表しているのかもしれない。一方、G3 では、生理的調節範囲を越える暴露量のため生体反応が一方に進む傾向を示しているのかもしれない。

いずれにしても、今回の知見は、血液ガスの性状とともに、ガス交換及び代謝の動態として考えられるべきであろう。

謝 辞

本研究に対して、終始有用なご助言とご指導を頂いた東大教授菅野 茂先生 (客員研究員) に感謝致します。

引 用 文 献

- 1) 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.
- 2) 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**, 71-79.
- 3) 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・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 pHa, PaCO₂, PaO₂ に及ぼす影響, *日本衛生学雑誌*, **36**, 816-823.
- 4) 鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎 (1983): 低濃度二酸化窒素長期暴露がラットの動脈血 pHa, PaCO₂, PaO₂ に及ぼす影響, *日本衛生学雑誌*, **38**, 758-763.
- 5) 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.
- 6) 鈴木 明・局 博一・河田明治・久保田憲太郎 (1985): NO₂+O₃長期暴露のラットにおよぼす影響, 3. 血液ガス分圧の変化, 第 26 回大気汚染学会, 東京. 277.

II-6

二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 VI

—— 脂質過酸化障害と抗酸化性防御系因子の変化 ——

Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats VI

—— Formation of Lipid Peroxides and the Changes of
Antioxidative Protective Systems in Lungs ——

嵯峨井勝¹・市瀬孝道¹

Masaru SAGAI¹ and Takamichi ICHINOSE¹

要 旨

0.05ppm O₃ (G1群), 0.05ppm O₃+0.04ppm NO₂ (G2群) 及び 0.05ppm O₃+0.4ppm NO₂ (G3群) に22か月間暴露したラットの肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の経時変化を調べ、NO₂単独ガス暴露との比較を試みた。

呼気中エタンと肺のTBA値は、各々9か月目まではG1群、G2群及びG3群の順で暴露濃度に依存して増加したが、18及び22か月目では対照群の値より低下した。肺の非酵素的防御因子の一つである非タンパク質性SHとビタミンE含量は9か月目で有意に増加していたが、それ以降では低下してゆき、18及び22か月目ではG3群で対照群より有意な低値を示した。一方、抗酸化性防御系酵素のグルタチオンペルオキシダーゼ系酵素、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ及びジスルフィドレダクターゼなどの活性は全期間を通じて全く変化しなかった。

これらのことから、NO₂とO₃との複合慢性暴露では、NO₂暴露の場合に比べて脂質過酸化障害は比較的早い時期に出現するが、その頃には非酵素的防御因子の含量も増加し、防御作用の亢進が観察された。しかし、その後暴露期間の延長につれて、過酸化脂質は若干低下するが、非酵素的防御因子の含量も有意に低下し、生体防御機能が低下してゆくことが示唆された。

Abstract

The periodic changes of lipid peroxide formation, antioxidant contents and the activities of antioxidative protective enzymes in lungs of rats exposed to 0.05ppm O₃ (G1 group), 0.05ppm O₃+0.04ppm NO₂ (G2 group) and 0.05ppm O₃+0.4ppm NO₂ (G3 group) for 22 months were examined, and they were compared with the previous results on the changes of the same items in lungs of rats exposed chronically to 0.04ppm NO₂, 0.4ppm NO₂ and 4ppm NO₂. Ethane exhalations in breath gases and TBA values in the lungs of rats

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2

Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

exposed to the combined gases for 9 months were increased with the increases of the gas concentrations, but their values in the lungs of rats exposed for 18 and 22 months were decreased below the control value. The contents of nonprotein-SH compounds at the 9th month, and then their contents after 18 and 22 months were decreased below the control value. On the other hand, enzyme activities of glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase and disulfide reductase did not show any significant changes during all periods of the experiments.

These results suggest that the protective ability against cell damage by lipid peroxides at an early stage was inducible, but the ability was lost by longer term exposure of the combined gases of NO_2 and O_3 .

1 はじめに

NO_2 と O_3 は大気環境中に広く存在する酸化性の強い汚染物質であり、肺に種々の障害を起こす。また、 NO_2 や O_3 は肺に脂質過酸化を起こすことがよく知られている¹⁻⁴⁾。細胞中の脂質の過酸化は組織に重大な障害を引き起こす⁵⁾ことから、 NO_2 や O_3 の毒性は肺での脂質過酸化によるものと考えられている⁶⁾。実際に、 NO_2 や O_3 が肺の脂質過酸化を起こすということは種々の動物を用いた実験によって明らかにされている。生体内での過酸化脂質の増加は老化や動脈硬化、糖尿病、脳卒中あるいはがん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も注目されるようになってきた⁷⁾。一方、生体にはこのような有害な過酸化脂質を代謝したり、その生成を抑制する、いわゆる抗酸化性防御機構が存在している⁸⁾。

我々は先に、低濃度 NO_2 慢性暴露実験において、生体にとって有害な過酸化脂質が NO_2 の暴露濃度と暴露期間につれて増加し、抗酸化性防御機能は逆に低下してゆくことを報告した⁹⁻¹¹⁾。

本報告では、環境レベルの低濃度 NO_2 に同等レベルの O_3 を複合したガスに 22 か月間暴露したラットの肺の過酸化脂質と抗酸化性防御機能の変化について検討したので、先の NO_2 慢性暴露実験の結果と比較して報告する。

2 方法

実験には 8 週令の Jcl: Wistar 系雄ラットを用い、0 ppm, 0.04 ppm 及び 0.4 ppm NO_2 に各々 0.05 ppm O_3 を複合し、この複合ガスにラットを 5, 9, 13, 18 及び 22 か月間暴露した。なお、 NO_2 は 1 日 24 時間の連続暴露とし、 O_3 は午前 10 時から午後 6 時までの 8 時間に 0 ppm → 0.1 ppm → 0 ppm の正弦曲線を描き、8 時間の 1 時間平均濃度は 0.05 ppm となるように暴露した。ラットはハンギング・ワイヤーメッシュ・ケージの中で 6 匹ずつに分けて飼育し、ステンレススチール・ガラス製チャンバー内で既報⁹⁻¹⁰⁾ のように O_3 あるいは $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ に暴露した。なお、暴露 9 か月目にはラットが大きくなるので各ケージ 5 匹ずつに分けて飼育した。また、暴露チャンバーは角錐形で、飼育部の大きさは 1500 mm(W) × 1550 mm(D) × 1000 mm(H) のサイズで、内容積は 2.3 m³ である。チャンバー内温度は 25 ± 2°C に、湿度は 55 ± 10% に制御され、室内照明は

14 時間点灯, 10 時間消灯とした。なお, 飼料は日本クレア製 CE-2 型固形飼料を滅菌したものを自由に食べさせ, 飲料水も滅菌したものを自由に飲ませた。

ガス暴露を終了したラットはエーテル麻酔下で頸動脈より放血と殺し, 心臓と気管を付けたまま肺を摘出し, 左肺葉の血管を鉗子で止め, 右肺葉のみを嫌気化した生理食塩水で白色になるまで十分かん流した。かん流しない左肺とかん流した右肺は窒素ガス置換後ドライアイスで急速に凍結させ, 用時まで -80°C に保存した。かん流しない左肺は, その日のうちに, ガラス・テフロン製ホモジナイザーでホモジナイズし, 非タンパク質性 SH, ビタミン C, ビタミン E 及び総タンパク質含量の測定に用いた。かん流した右肺は後日同様にホモジナイズし, TBA 値と抗酸化性酵素活性の測定に用いた。

肺のホモジネートの調製と酵素活性並びに生体内抗酸化性物質 (Antioxidants) の測定は先の報告⁹⁻¹¹⁾と同様に行った。Glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glutathione S-transferase (GSH S-Tr) 活性の測定は $105,000\times\text{g}$ 上清を用いて, 各々 Little らの方法¹²⁾, Bergmeyer の方法¹³⁾, Wilhelm らの方法¹⁴⁾ 及び Kaplowitz らの方法¹⁵⁾に従って行った。なお, 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) 活性の測定は 6-phosphogluconate を基質として G6PD の測定法¹⁴⁾に従って行った。Superoxide dismutase (SOD) と disulfide reductase (DSR) 活性の測定は各々 McCord と Fridovich の方法¹⁶⁾と Tietze の方法¹⁷⁾に従った。なお, SOD と DSR 測定用の $105,000\times\text{g}$ 上清は 0.1 mM EDTA で約 12 時間透析してから測定に供した。

肺のミクロソームは $105,000\times\text{g}$ で 60 分間の超遠心分離で得られた沈殿画分を 50 mM トリス塩酸 -0.15 M KCl 緩衝液 (pH 7.4) にサスペンドし, NADPH cytochrome C reductase¹⁸⁾と NADPH cytochrome P-450 peroxidase¹⁹⁾活性の測定に用いた。これらの酵素活性は, 各々 Strobel らの方法¹⁸⁾と O' Brien らの方法¹⁹⁾によって測定した。

また, 抗酸化性物質の非タンパク質性 SH, ビタミン C 及びビタミン E の測定は粗ホモジネートを用いて, 各々 DeLucia らの方法²⁰⁾, Omaye らが記載した α, α' -ジピリジル法²¹⁾及び Abe らの HPLC 法²²⁾に従って行った。粗ホモジネートとミクロソーム画分の TBA 値の測定は Ohkawa らの方法²³⁾によった。*in vivo* の過酸化脂質分析法としての呼気中エタン及びプロパンの分析は嵯峨井が記載した方法^{24,25)}によって行った。

本論文に示したデータは, すべて各時期の対照群の平均値を 100 とした相対値として示し, SE は各時期の SE の生データが対照群の平均値の何%に相当するかを計算にて求めた。また, 各時期ごとの対照群と暴露群の間の有意差は Student の *t* 検定によった。

3 結果

本実験では 8 週齢の Wistar 系雄ラットに, 清浄空気 (対照(C)群), 0.05 ppm O_3 (G1 群), $0.05\text{ ppm O}_3+0.04\text{ ppm NO}_2$ (G2 群) 及び $0.05\text{ ppm O}_3+0.4\text{ ppm NO}_2$ (G3 群) を, 各々 5, 9,

13, 18 及び 22 か月間暴露した。この全実験期間を通じて、三つの暴露群の体重, 肺, 肝, 腎, 脳, 心臓, 睪丸及び脾臓の平均湿重量が対照群の値から有意に変化したものはなかった。また, 肺の 8 湿重量当たりのタンパク質量も同様であった。なお, 肺の (湿重量-乾燥重量)/湿重量の比は 9 か月目で G2 群と G3 群で対照群よりわずかながら有意に増加していた。

図 1 には全身の過酸化脂質を反映する呼気中エタン生成の経時変化を, 対照群の値を 100 とする相対値として示した。0.05 ppm O₃ の G1 群は 5 か月目から 18 か月目にかけてわずかではあるが有意に増加し, 22 か月目では対照レベル以下に低下した。0.05 ppm O₃+0.04 ppm NO₂ の G2 群は 5 か月目から 13 か月目にかけて有意に増加し, 18, 22 か月目では対照レベル以下に低下した。また, 0.05 ppm O₃+0.4 ppm NO₂ の G3 群では 5 か月目から 9 か月目にかけて有意に増加したが, 13 か月目から低下しはじめ 18, 22 か月目では上記の G1, G2 群と同様に対照レベル以下に低下した。図 2 には図 1 の結果を暴露濃度群間との比較がしやすいように直して示した。なお,

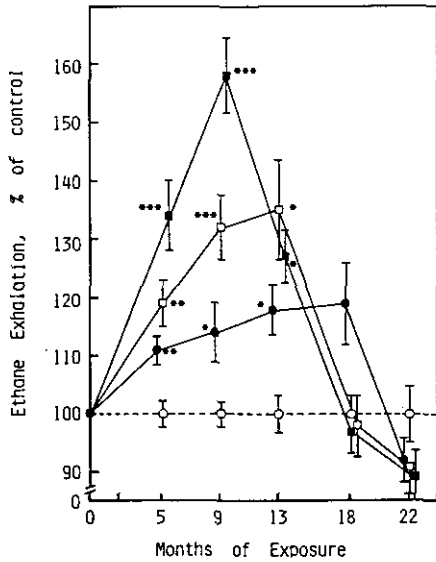


図 1 二酸化窒素とオゾンの複合ガスを 22 か月間暴露したラットの呼気中エタン生成の経時変化

Fig. 1 Periodical changes of ethane exhalation of rats exposed to the combined gases of nitrogen dioxide and ozone

○, Control; ●, 0.05ppm O₃ (G1) group; □, 0.05ppm O₃+0.04ppm NO₂ (G2) group; ■, 0.05ppm O₃+0.4ppm NO₂ (G3) group; The values are expressed as mean±SE (n = 6).

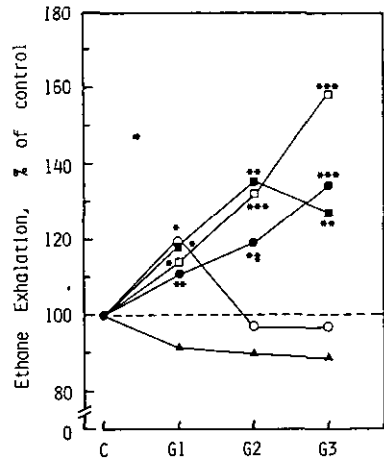


図 2 二酸化窒素とオゾンの複合ガスを 22 か月間暴露したラットの呼気中エタン生成の経時変化

Fig. 2 Periodical changes of ethane exhalation of rats exposed to the combined gases of nitrogen dioxide and ozone

●, 5 month-exposure; □, 9 month-exposure; ■, 13 month-exposure; ○, 18 month-exposure; ▲, 22 month-exposure; * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001;

繁雑になるので標準誤差の表示は省略し、各暴露期間ごとの対照値に対する有意差マークのみを付した。この図から理解し得るように、エタン産生は5, 9か月間暴露では暴露濃度に依存して増加するが、13か月目のG3群と18か月暴露では濃度依存性が認められなかった。図3には、肺の粗ホモジネート中のTBA値の変化を、対照群に対する相対値で示した。G1は対照群と変わらないが、G2群とG3群は5, 9か月目で対照群より有意に増加した。しかし、13~22か月目にかけてはG1, G2及びG3群とも対照レベルかそれ以下に低下する傾向を示した。図4には、9か月目の肺のTBA値と呼気中エタン産生量の相関を示した。両者の間には有意な相関($r=0.619$, $P<0.01$)が認められ、また肺のTBA値と呼気中プロパンとの間にも有意な相関($r=0.602$, $P<0.01$)が認められた。

図5と図6には先のNO₂単独暴露と今回のNO₂+O₃の9か月間暴露の場合の呼気中エタン生成と肺のTBA値を比較して示した。この9か月目の時点では、0.04 ppm NO₂と0.4 ppm NO₂

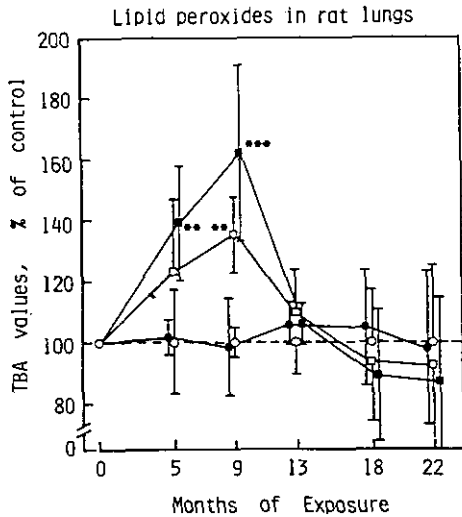


図 3 二酸化窒素とオゾンの複合ガスを22か月間暴露したラットの肺のTBA値の経時変化

Fig. 3 Periodical changes of TBA reactants in lungs of rats exposed to the combined gases of nitrogen dioxide and ozone

○, Control; ●, 0.05ppm O₃ (G1) group; □, 0.05ppm O₃+0.04ppm NO₂ (G2) group; ■, 0.05ppm O₃+0.4ppm NO₂ (G3) group; Each value is expressed as relative mean±SE (n=6).

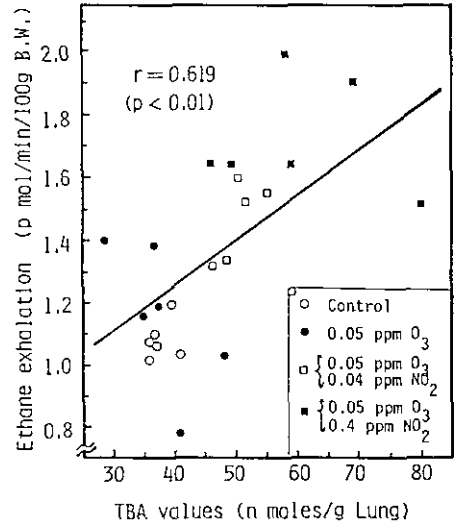


図 4 二酸化窒素とオゾンの複合ガスを9か月間暴露したラットの呼気中エタンと肺のTBA値との間の相関

Fig. 4 Relationship between ethane exhalation and TBA reactants of rats exposed to the combined gases of nitrogen dioxide and ozone
Correlation coefficient (r) was 0.619 ($P<0.01$).

の単独暴露の場合より、0.05 ppm O₃の複合化により、呼気中エタン量やTBA値は増加している。しかし、呼気中エタンは今回のO₃+NO₂暴露では9か月で最高レベルに増加し、例えばG3群では対照群の値の1.6倍になっているのに対し、先の0.4 ppm NO₂単独暴露では27か月目まで増加し続け、その時点では2倍以上に増加していた。一方、肺のTBA値は今回のO₃+NO₂9か月暴露ではG3群で対照群の1.6倍に増加しているのに対し、先のNO₂単独暴露では4 ppm

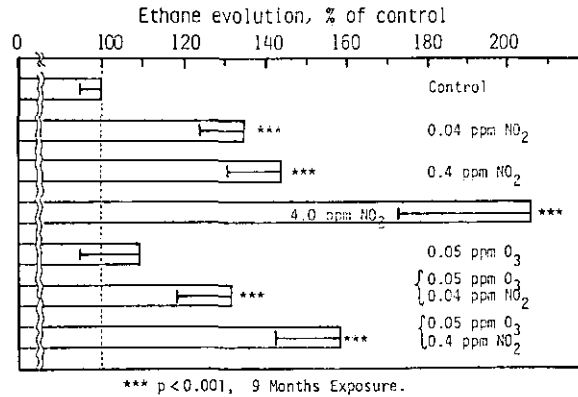


図 5 NO₂単独ガスとNO₂+O₃の複合ガスを9か月間暴露したラットの呼気中エタン生成量の比較

Fig. 5 Comparison of ethane exhalation of rats exposed to NO₂ gas and the combined gases of NO₂ and O₃ for 9 months
Each value is expressed as relative mean ± SE (n = 6).

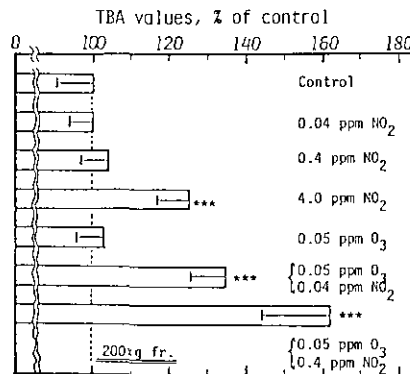


図 6 NO₂単独ガスとNO₂+O₃の複合ガスに9か月間暴露したラットの肺のTBA値の比較

Fig. 6 Comparison of TBA values of rats exposed to NO₂ gas and the combined gases of NO₂ and O₃ for 9 months
Each value is expressed as relative mean ± SE (n = 6).

NO₂ 群でさえも 9 か月目では 1.16 倍 (P < 0.05) で, 18 か月目では 1.25 倍 (P < 0.01) にしか増加せず, 0.04 ppm 群でも 18 か月で 1.17 倍の増加でようやく有意差 (P < 0.01) が認められる程度であった。これらの結果より, 呼気中エタン産生率は NO₂ 単独暴露群の場合のほうが, 暴露期間が 18~27 か月目へと長くなるにつれてより高くなっていったが, 肺の TBA 値の増加率は今回の O₃+NO₂ 暴露のほうが高くなっており, O₃ の複合化は肺の過酸化脂質の生成に強く影響していると考えられる。

図 7 と図 8 には肺の非タンパク質性 SH とビタミン E 含量の変化を示した。いずれも, 過酸化脂質が最も高く増加した 9 か月目に有意な増加を示していた。これに対し, 18~22 か月目では脂質の過酸化はむしろ低下しているのに, 非タンパク質性 SH やビタミン E は対照レベルより有意に低下していた。一方, 肺のビタミン C 濃度の変化も調べたが, G1~G3 のいずれの群のいずれの

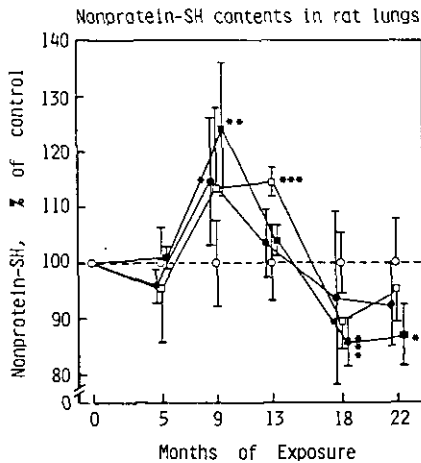


図 7 二酸化窒素とオゾンの複合ガスに 22 か月間暴露したラットの肺の非タンパク質性 SH 含量の経時変化

Fig. 7 Periodical changes of nonprotein sulphydryl contents of rats exposed to the combined gases of nitrogen dioxide and ozone

○, control; ●, 0.05ppm O₃ (G1) group; □, 0.05ppm O₃+0.04ppm NO₂ (G2) group; ■, 0.05ppm O₃+0.4ppm NO₂ (G3) group;

Each value is expressed as relative mean ± SE (n = 6).

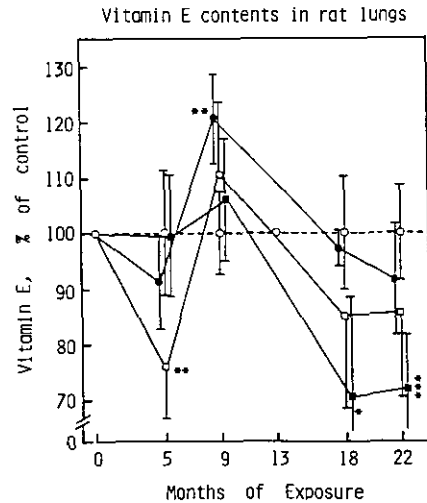


図 8 二酸化窒素とオゾンの複合ガスに 22 か月間暴露したラットの肺のビタミン E 含量の経時変化

Fig. 8 Periodic changes of vitamin E contents in lungs of rats exposed to the combined gases of nitrogen dioxide and ozone

○, control; ●, 0.05ppm O₃ (G1) group; □, 0.05ppm O₃+0.04ppm NO₂ (G2) group; ■, 0.05ppm O₃+0.4ppm NO₂ (G3) group;

* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001;

Each value is expressed as relative mean ± SE (n = 6).

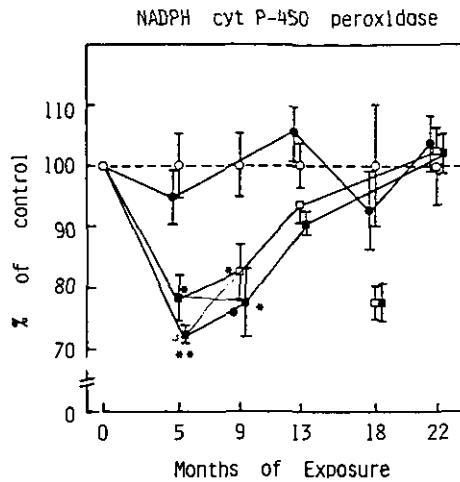


図 9 二酸化窒素とオゾンの複合ガスに22か月間暴露したラットの肺ミクロソームのNADPH cyt P-450 peroxidase活性の経時変化

Fig. 9 Periodic changes of microsomal NADPH cyt P-450 peroxidase activity in lungs of rats exposed to the combined gases of nitrogen dioxide and ozone
 ○, control; ●, 0.05ppm O₃ (G1) group; □, 0.05ppm O₃+0.04ppm NO₂ (G2) group; ■, 0.05ppm O₃+0.4ppm NO₂ (G3) group: * P<0.05, ** P<0.01; Each value is expressed as relative mean±SE (n=6).

時期にも対照群と異なることはなかった。

抗酸化性防御系酵素として, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD)等のいわゆる glutathione peroxidase 系酵素, glutathione S-transferase (GSH S-Tr), superoxide dismutase (SOD)及び disulfide reductase (DSR)等の 105,000×g 可溶性画分の酵素活性の変化を調べたが, いずれの酵素もどの暴露群及び暴露期間でも対照群と異なることはなかった。

図9にはミクロソームに存在する NADPH 依存性 cytochrome P-450 peroxidase (cyt P-450 Px) 活性の変化を示した。本酵素活性は G1 群では対照群と変わらないが, G2 群と G3 群では 5~9 か月目にかけて対照群より有意に低下し, 13 か月目以降では対照レベルに戻り, その経時変化は図3の肺の TBA 値と極めて類似していた。

4 考察

本研究では, 低濃度の NO₂ と O₃ の長期複合暴露ラットの過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化を調べ, 先の NO₂ 単独ガスの長期暴露実験の結果との比較を行った。

過酸化脂質についてみると, 全身の過酸化脂質を反映する呼気中エタンの生成はガス暴露条件が強いほど早い時期にピークに達し, その後は対照群の値以下に低下してゆく傾向を示していた。

一方、過酸化脂質のもう一つの指標である TBA 値による肺の過酸化脂質は G1 群は全期間を通じて全く変化しなかったのに対して、G2 群と G3 群は NO₂ 濃度に依存して 9 か月目まで増加し、その後は対照レベルあるいはそれ以下に低下していた。また、肺の TBA 値が最高レベルになった 9 か月までは呼気中エタンやエチレンと TBA 値との間には有意な相関が認められた。

これらのことから、9 か月までの呼気中炭化水素生成は肺の過酸化脂質生成を反映していることが示されたが、それ以降の呼気中炭化水素の生成は肺以外の臓器に由来するものであることが示された。

今回の、NO₂ と O₃ の複合ガス暴露と先の NO₂ 単独ガス暴露実験の呼気中エタンの生成を比較すると、0.04 ppm NO₂ と 0.4 ppm O₃ の添加による 9 か月目のエタン生成量の変化は各 NO₂ の単独暴露の場合に比べて有意な変化は認められなかった。これに対し、肺の TBA 値は、NO₂ 濃度が 0.04 ppm と 0.4 ppm の場合に 0.05 ppm O₃ と共存すると顕著に増加しており、O₃ 共存群では各々有意な増加を示していた。これらのことより、大気環境レベルの低濃度であっても O₃ の共存により肺の過酸化脂質の増加は顕著であり、ピーク出現時期も NO₂ 単独暴露の場合に比べると早くなることが明らかとなった。

このような過酸化脂質の変化、特に肺の過酸化脂質の変化にもかかわらず、肺の抗酸化性防御系酵素活性は全期間を通じて、どの群にも有意な変化は認められなかった。しかしながら、天然抗酸化剤の非タンパク質性 SH 化合物とビタミン E 含量は、肺の過酸化脂質がピークとなった 9 か月目でのみ有意に増加し、過酸化脂質の生成を抑制するために代償的に増加してきたものと思われる。その後、これら抗酸化剤の肺内含量は対照群のレベルか、それ以下に低下していた。18、22 か月目では過酸化脂質は対照レベルに戻っていたが、非タンパク質性 SH とビタミン E 含量は対照レベルよりも有意に低下していた。このことは、NO₂+O₃ 暴露後期には、過酸化脂質や抗酸化性防御系酵素活性等に有意な変化が認められないにもかかわらず、肺には酸化的ストレス (Oxidative stress) がかかっていることを示唆するものと思われる。一方、このような抗酸化剤の変化は加齢によっても促進することが知られている²⁶⁾。しかし、単なる加齢の場合には、肺の非タンパク質性 SH 含量は低下するが、ビタミン E は加齢に伴う脂肪の蓄積につれて増加していた。このようなことから、NO₂ と O₃ の複合暴露により、非タンパク質性 SH とビタミン E が共に低下するという事は Oxidative stress の存在を強く示唆する。

ミクロソームには脂質過酸化生成を抑制する作用を持つ NADPH cytochrome P-450 peroxidase が存在している¹⁹⁾。この酵素活性は G1 群では対照レベルと変わるところはなかったが、G2 群と G3 群では 5.9 か月目で TBA 値とは対称的に有意な低下を示していた。このようなことから、その活性低下は脂質の過酸化によってもたされたものと考えられる。

以上のように、生体にとって有害な過酸化脂質は NO₂ 単独ガス暴露の場合よりも早い時期に増加し、その増加程度も、複合暴露によって肺では著しかった。NO₂ と O₃ の複合暴露後期では過酸化脂質や抗酸化性酵素活性は対照レベルに戻る傾向を示していたが、非タンパク質性 SH とビ

タミンE等の抗酸化性物質濃度の低下により、肺には酸化的ストレスがかかっていることが認められるが、そのようなストレスが健康に対してどのような意味を持つかは今後の研究に負わなければならない。

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. *Sciences*, **159**, 532-534.
- 2) Sagai, M. and T. Ichinose (1987): Lipid peroxidation and antioxidative protective mechanism in rat lungs upon acute and chronic exposure to nitrogen dioxide. *Environ. Health Perspective*, **73**, 179-189.
- 3) Goldstein, B. D., C. Lodi, C. Collinson and O. J. Balchum (1969): Ozone and lipid peroxidation. *Arch. Environ. Health*, **18**, 631-634.
- 4) Menzel, D. B. (1984): Ozone: An overview of its toxicity in man and animals. *J. Toxicol. Environ. Health*, **13**, 183-204.
- 5) Tappel, A. L. (1975): Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. *In: Pathobiology of cell membranes*. B. F. Trump & A. Arstila, (eds). Vol. 1, Academic Press, N. Y. 145-170.
- 6) Menzel, D. B. (1976): The role of free radicals in the toxicity of air pollutants (Nitrogen oxides and ozone). *In: Free radicals in Biology*, Pryor W. A. (ed). Vol. II, 181-202.
- 7) 吉川敏一(1985): III-2. 疾患. 過酸化脂質と生体. 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝(編著), 学会出版センター, 289-313.
- 8) 福沢健治(1985): I-3. 過酸化脂質の生成防止. 過酸化脂質と生体. 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝(編著), 学会出版センター, 45-76.
- 9) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the antioxidative protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153-164.
- 10) 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. Pharmacol.*, **65**, 1-8.
- 11) Sagai, M., T. Ichinose and K. Kubota (1984): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. IV. Changes of lipid peroxidation and antioxidative protective systems in rat lungs by life span exposure to NO₂. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 444-456.
- 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.) Bergmeyer, H. U., **2**, 463-466. Acad. Press, N. Y.
- 14) Wilhelm, L. G. and H. D. Waller (1974): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *In: Methods of Enzymatic Analysis*. (ed.) by Bergmeyer, H. U., **2**, 636-643. Academic. Press, N. Y.
- 15) Kaplowitz, N., J. Kuhlenkamp and G. Clifton (1975): Drug induction of hepatic glutathione S-transferase in male and female rats. *Biochem. J.* **146**, 351-356.
- 16) McCord, J. M. and I. Fridovich (1969): Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte cuprein (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.

- 17) 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.
- 18) Strobel, W. and J. D. Dignam (1978): Purification and properties of NADPH-cytochrome P-450 reductase. *In: Methods in Enzymology*, Vol. 52, S. Fleisher and L. Packer, (eds.), Acad. Press, N. Y. 89-96.
- 19) Harycay, E. G. and J. O'Brien (1971): Cytochrome P-450 as a microsomal peroxidase utilizing a lipid peroxide substrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 14-27.
- 20) 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.
- 21) Omaye, S. T., Turnbull, J. D. and Sauberlich, H. E. (1979): [1] Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. *In: Methods in Enzymology*, Vol. 62, Acad. Press, N. Y. 3-11.
- 22) Abe, K., M. Ohmae and A. Katsui (1976): Rapid and micro-method for the determination of tocopherol derivatives in liver. *Vitamin*, **50**, 453-459 (in Japanese).
- 23) Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- 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 Sci.*, **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*, **3**, 1-8.
- 26) 市瀬孝道・荒川健司・嵯峨井勝(1985): 老齡ラットの肺における過酸化脂質生成と関連因子の変化について. *過酸化脂質研究*, **9**, 63-65.

II-7

二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 VII
—— 肺・血清及び尿中のコラーゲン代謝関連因子の変化 ——
Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats VII
—— Changes of Collagen Metabolism-Related Factors
in Lungs, Serum and Urine ——

市瀬孝道¹・嵯峨井勝¹

Takamichi ICHINOSE¹ and Masaru SAGAI¹

要 旨

低濃度の NO₂ と O₃ の複合ガスを 22 か月間暴露したラットの肺, 血清及び尿中のコラーゲン代謝関連因子の変化から, 肺のコラーゲン代謝に及ぼす影響について考察した。

血清コラゲナーゼ阻害因子活性は 5 か月目に G 1 群 (0.05 ppm O₃) と G 3 群 (0.4 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃) に増加傾向が認められたが 18 か月目には G 1, G 2 (0.04 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃), G 3 群とも有意に低下し, 減少率は G 1 < G 2 < G 3 群の順であった。22 か月目になると再び G 3 群と G 2 群で増加した。肺のコラーゲン量は血清コラゲナーゼ阻害因子とほぼ同様の変化を示し, 5 か月目では G 1 群と G 3 群に増加傾向を示し, 18 か月目には 3 群ともに低下傾向を示し, 減少率は G 1 < G 2 < G 3 群の順であった。22 か月目では G 2 群が増加傾向を示し, G 3 群は 18 か月目に比べて増加する傾向を示した。コラーゲン分解の指標である血清 HOP 量はこれらの変化とは逆の変化を示し, 5 か月目では 3 群とも有意に低下し, その減少率は G 3 > G 1 > G 2 の順であった。9 か月目には G 3 群で増加傾向を示し, 18 か月目には 3 群ともに有意に増加し, その増加率は G 1 < G 2 < G 3 群の順であった。22 か月目になると G 1 群は対照レベルに戻り, G 2, G 3 群は対照レベルより低下する傾向を示した。血清コラゲナーゼ様活性はほぼコラゲナーゼ阻害因子の変化と逆の変化を示し, 血清 HOP 量の変化と対応していた。肺の MAO 活性は G 3 群では 9, 18, 22 か月目で有意に増加し, G 2 群では 22 か月目に有意に増加した。これらの結果から, 18 か月目では血清コラゲナーゼ阻害因子活性の低下によって肺のコラーゲン分解が亢進し, 逆にその活性が増加傾向を示す 5 か月目の G 1, G 3 群, 22 か月目の G 2, G 3 群では肺のコラーゲン分解が低下している可能性が示唆された。また 22 か月目の G 2, G 3 群のこのような変化やコラーゲン架橋の亢進を示唆する MAO 活性の増加は 22 か月目の G 2, G 3 群にコラーゲン線維の増生を認めた形態学的変化²¹⁾ と対応するものと考えられる。尿中 HOP 比は 5 か月目に濃度に依って増加したが, 9~22 か月目では低下傾向を示し, 血清 HOP 量

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

と対応しなかった。

Abstract

Present study have examined the changes of collagen-metabolizing factors in lung, serum and urine of rats exposed continuously to combined gases of low level nitrogen dioxide and ozone for 22 months, in order to clarify the relationship between the alteration of collagen-metabolism in lung and fibrosis. The activities of collagenase inhibitor in serum of rats exposed to 0.05 ppm O₃ (G1) and 0.4 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃ (G3) at 5 months were higher than the control level, and then the activities were significantly decreased with the order of G1 < G2 (0.04 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃) < G3 at 18 months but the activities of G2, G3 significantly increased at 22 months. The changes of hydroxyproline (HOP) contents in lung were similar to those changes of collagenase inhibitor but were not significant. The HOP contents in serum significantly decreased with the order of G3 > G1 > G2 at 5 months, and the contents of G3 at 9 months was higher than the control level, and then the contents significantly decreased with the order of G1 < G2 < G3 at 18 months, but the contents of G1 returned to control level and G2, G3 were lower than the control level at 22 months. The changes of collagenolytic enzyme activity in serum were similar to those of serum hydroxyproline. The monoamine oxidase (MAO) activity in lungs, contributing to the formation of the cross-linking of collagen, was increased dose-dependently at 9, 18, 22 months. These results suggest that the collagen decomposition in lung at 18 months was promoted and that of G1, G3 at 5 months and G2, G3 at 22 months was decreased, and the changes of biochemical collagen-metabolizing factors in lung and serum at 22 months corresponded with lung fibrosis observed in the morphological examination reported 21).

1 はじめに

1 ppm 以下の O₃ の比較的短期暴露や長期暴露,あるいは低濃度 NO₂ やこれらの複合ガスの長期暴露によって肺の線維化や肺気腫様の変化が起こることが多くの動物種を用いて¹⁻¹³⁾ 報告されている。一方,これらの病変と関連する O₃ 単独あるいは NO₂ 単独暴露による肺のコラーゲン代謝に關与する生化学的指標の変化についての報告も少なくない。Hussain¹⁴⁾ らは O₃ 暴露したラットでは肺のコラーゲン合成律速酵素である prolylhydroxylase 活性が増加することを報告し,また,彼らや¹⁴⁾ Lust ら¹⁵⁾ は O₃ 暴露したラットの肺では³H-プロリンの取り込みが増加することから,コラーゲン合成速度の亢進を示唆し,更に肺のコラーゲン含量が増加することも報告している。NO₂ 暴露の場合でも, O₃ 暴露の場合と同様に肺の prolylhydroxylase 活性が増加する¹⁶⁾ ことや肺のコラーゲン合成速度が亢進することが¹⁷⁾ 報告されている。また, NO₂ 暴露の場合では肺のコラーゲン含量が低下する^{10,18)} とか,血清や尿中のヒドロキシプロリン (HOP) 量が増加すると^{10,19)} いうコラーゲン分解の亢進を示唆する報告もある。我々がラットに 10 ppm NO₂ を 2 週間暴露し,コラーゲン代謝関連因子の変化を調べた成績²⁰⁾ では,暴露初期に肺のコラーゲン量が増加することからコラーゲン合成の促進を示唆した。また,コラーゲン合成とともに酸化障害を修復する過程で血清や肺のコラゲナーゼ阻害因子活性が増加し,肺のコラーゲン分解を抑制

することが肺の線維化と関連することを示した。更に、0.4, 1.2 及び 4 ppm NO₂ 18 か月間の長期暴露の成績²⁰⁾でも、肺のコラゲナーゼ様活性の低下と肺、血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の増加から肺のコラーゲン分解能の低下を示唆し、これが肺の線維化と関連している可能性を示した。

このように NO₂ あるいは O₃ 暴露によって肺あるいは血清や尿中のコラーゲン代謝関連因子が複雑に変化するが、これらの変化と肺病変との関連性も徐々に明らかにされつつある。しかしながら、NO₂ と O₃ の複合暴露によって、コラーゲン代謝関連因子がどのように変化するかについてはいまだ明らかでない。

河越らは²¹⁾ 0.4 ppm NO₂ あるいは 0.04 ppm NO₂ と 0.05 ppm O₃ との複合ガスを 22 か月間暴露した場合、肺に軽度のコラーゲン線維の増生が起こることを報告している。本実験ではこの肺の軽度の線維化が起こる過程で、肺、血清及び尿中コラーゲン代謝関連因子がどのように変化するものなのかについて調べた。また、これらの複合ガスの肺のコラーゲン代謝に及ぼす影響について考察した。

2 材料と方法

動物は 8 週齢の JCl : Wistar 系雄ラットを用いた。NO₂ と O₃ の暴露実験は C 群(対照群), G 1 群 (0.05 ppm O₃), G 2 (0.04 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃) 及び G 3 群 (0.4 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃) の 4 群について行った。なお、供試動物の飼育経過及び実験環境の詳細は本報告書の中で伊藤ら²²⁾ が示すとおりである。ラットにこれらの 4 群のガスを 5, 9, 18 及び 22 か月間暴露し、各群 6 匹のラットについて肺、血清及び尿中のコラーゲン代謝関連因子の変化を調べた。

本報告書の中で嵯峨井らが報告²³⁾ した呼気ガス分析後にラットを代謝ゲージに入れて一昼夜採尿し、翌朝、エーテル麻酔下で放血と殺した。血清は常法により分離し、ヒドロキシプロリン量、コラゲナーゼ様活性、コラゲナーゼ阻害因子活性測定に用いた。肺の右葉はかん流せずに摘出してコラーゲン量測定に用い、右葉は生理食塩水でかん流してから摘出し、N₂ 置換密閉し、用時まで -80°C に保存した。左肺は湿重量測定後、電気オープン中で 95°C、2 日間乾燥し、乾燥重量を測定後、乳鉢中で粉末になるまで磨砕しこの試料を、HOP 量の測定に用いた。肺の HOP 量の測定は血清及び尿の場合の HOP 量測定と同様に、6 N 塩酸で加水分解後、Bergman らの方法²⁴⁾ に従って測定した。なお、尿中 HOP 比は、クレアチニン(Cre)量を Jaffe らの方法²⁵⁾ に従って測定し、松木らの報告²⁶⁾ に従って尿中 HOP/Cre (HOP 比) を求めた。

右肺は、脱気・N₂ パプリングにて十分に嫌気化した 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) を用いてガラス・テフロンホモジナイザーにより N₂ 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 分間遠心し、この上清を Monoamine oxidase (MAO) 活性の測定に用いた。

肺の MAO 活性は和光純薬工業製 MAO-B テストキットを用いて測定し、肺及び血清中の PZ

-peptidase 活性はコラゲナーゼによる PZ-peptide (PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg) の分解によって生じた PZ-Pro-Leu の蛍光を測定する Gries ら²⁷⁾ の方法に従った。血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の特性は血清中のコラゲナーゼ阻害因子がコラゲナーゼによってコラーゲンを分解するのを阻害する率から求める山本らの方法²⁸⁾に従った。

図 1~7 中の値は対照群の平均値を 100 とした時の相対平均値±SD あるいは SEM で示し、対照群と暴露群の有意差検定は Student の t 検定によった。

3 結果

3.1 肺の湿重量、乾燥重量及び水分含量

肺の湿重量、乾燥重量及び水分含量の測定は左肺を用いて行い、肺湿重量は体重当たりの重さで表し、その結果を図 1 に示した。

体重当たりの肺湿重量は 5 か月間暴露では G 1, G 2 及び G 3 群とも対照群と変わらない。9 か月間暴露では 3 群ともに低下傾向を示したが有意差は認められなかった。18 か月, 22 か月間暴露では逆に 3 群とも増加傾向を示したが、やはり有意差は認められなかった。また、図には示していないが、体重当たりの乾燥重量も湿重量の場合と同様の变化を示した。肺の g 湿重量当たりの

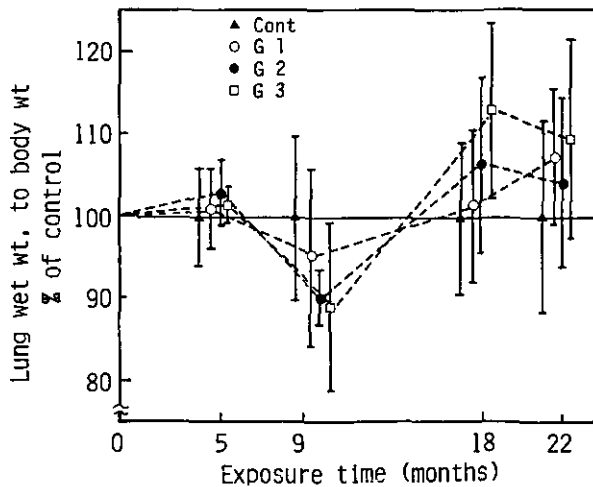


図 1 ラットの肺湿重量体重比の経時変化

各値は対照群の平均値を100とした時の相対平均値±SDで示した。

Fig. 1 Time-dependent changes of left lung wet weight to body weight of rats exposed to O₃ or NO₂ + O₃ for 22 months

Control values of lung wet weight were 1.05, 1.00, 0.86 and 0.93/body weight for rats 5, 9, 18 and 22 months, respectively (—▲—, control; ---○---, 0.05 ppm O₃; ---●---, 0.04 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃; ---□---, 0.4 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃). The values are expressed as mean ± SD.

水分含量は全暴露期間対照群と変わらなかった。

3.2 血清中のヒドロキシプロリン (HOP) 量

血清中の HOP 量の変化を図 2 に示した。血清 HOP 量は 5 か月間暴露では G 1, G 2, G 3 群とも対照群より有意に低下し、減少率は G 1 群 19%, G 2 群 13%, G 3 群 26% であり, G 3 群が最も低下した。9 か月目では G 1, G 2 群は対照レベルに戻ったのに対して G 3 群では対照レベルより若干増加傾向を示した。18 か月目では 3 群とも有意に増加し, その増加率は G 1 群 18%, G 2 群 22%, G 3 群 25% であった。しかし, 22 か月目では G 1 群では対照レベルより低下する傾向を示した。

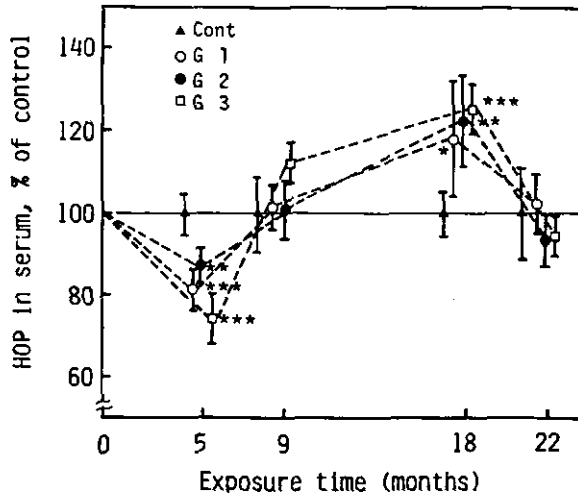


図 2 ラットの血清中のヒドロキシプロリン量の経時変化
各値は対照群の平均値を100とした時の相対平均値±SDで示した。

Fig. 2 Time dependent changes of hydroxyproline (HOP) contents in serum of rats exposed to O₃ or NO₂+O₃ for 22 months

Control HOP values in serum were 11.71, 9.10, 7.64 and 10.68 μg/ml for rats of 5, 9, 18 and 22 months, respectively (---▲---, control; ---○---, 0.05 ppm O₃; ---●---, 0.04 ppm NO₂+0.05 ppm O₃; ---□---, 0.4 ppm NO₂+0.05 ppm O₃). The values are expressed as mean ±SD. (* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

3.3 肺のコラーゲン含量

ヒドロキシプロリン量で示した肺の g 湿重量当たりのコラーゲン含量を図 3 に示した。肺のコラーゲン含量はすべての期間で有意差は認められなかった。しかし, その変化は血清 HOP 量の変化と対称的であり, 血清 HOP 量が低下した 5 か月目では若干増加する傾向を示し, 血清 HOP 量

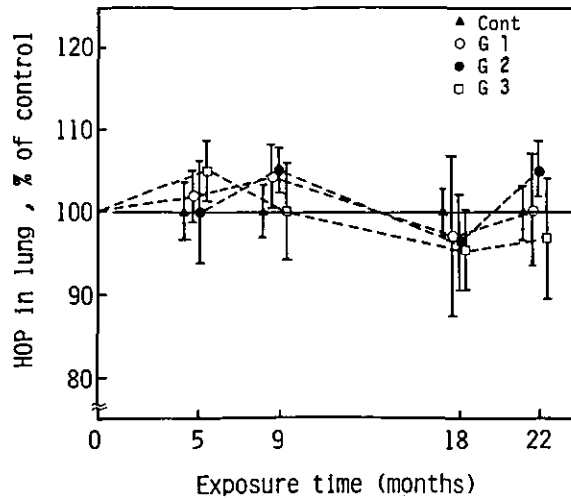


図 3 ラットの肺のコラーゲン量の経時変化
各値は対照群の平均値を100とした時の相対平均値±SDで示した。

Fig. 3 Time-dependent changes of hydroxyproline (HOP) contents in lung of rats exposed to O_3 or $NO_2 + O_3$ for 22 months
Control HOP values in lung were 3.48, 3.60, 5.10 and 4.89 mg/g. lung for rats of 5, 9, 18 and 22 months, respectively (---▲---, control, ---○---, 0.05 ppm O_3 ; ---●---, 0.04 ppm $NO_2 + 0.05$ ppm O_3 ; ---□---, 0.4 ppm $NO_2 + 0.05$ ppm O_3)
The values are expressed as mean ±SD.

が増加した18か月目では対照群より若干低下する傾向を示した。22か月目で血清HOP量が対照値ないしそれ以下になると肺のコラーゲン量は18か月レベルよりも増加する傾向を示し、G2群では対照群より若干増加する傾向を示した。

3.4 血清中のPZ-peptidase活性(コラゲナーゼ様活性)とコラゲナーゼ阻害因子活性

血清中のPZ-peptidase活性を図4に、コラゲナーゼ阻害因子活性を図5に示した。血清中のPZ-peptidase活性の変化は血清HOP量の変化と対応し、9か月目と18か月目でそれぞれの対照群で有意な増加を示し、その増加率は9か月目ではG1群40%、G2群46%、G3群50%であり、18か月目ではG1群50%、G2群56%、G3群73%であった。

コラゲナーゼ阻害因子活性は図中にも示すように、血清HOP量や血清コラゲナーゼ様活性とほぼ逆の変化を示し、5か月目でG1群とG3群で増加傾向を示したがその後低下し、18か月目ではそれぞれの暴露群で有意な低下を示した。その減少率はG1群70%、G2群73%、G3群100%であった。22か月目ではG1群は対照レベルに近づき、G2群は対照レベルより増加傾向を示し、G3群では対照群より55%の有意な増加を示した。

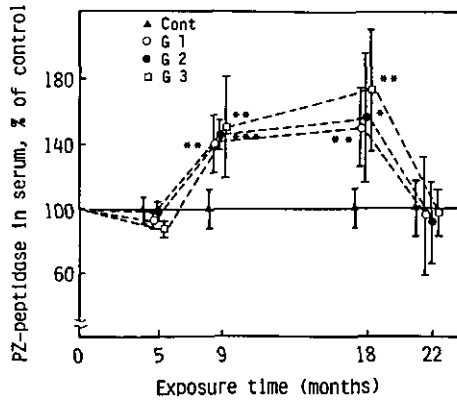


図 4 ラットの血清中の PZ・ペプチダーゼ活性 (コラーゲナーゼ様活性) の経時変化

各値は対照群の平均値を100とした時の相対平均値±SDで示した。

Fig. 4 Time-dependent changes of PZ-peptidase (collagenolytic enzymes) activity in serum of rats exposed to O₃ or NO₂+O₃ for 22 months. Control values of PZ-peptidase activity in serum were 60.2, 58.8, 48.7 and 56.1 units/ml for rats of 5, 9, 18 and 22 months, respectively (---▲---, control; ---○---, 0.05 ppm O₃; ---●---, 0.04 ppm NO₂+0.05 ppm O₃; ---□---, 0.4 ppm NO₂+0.05 ppm O₃). The values are expressed as mean ± SD. (*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001).

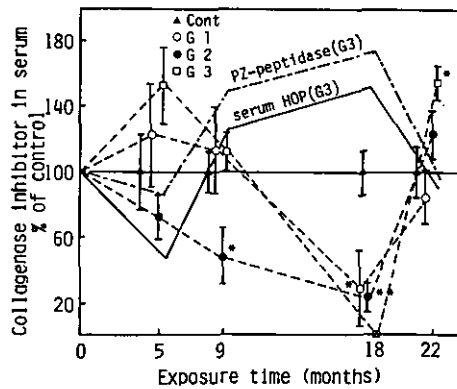


図 5 ラットの血清中のコラーゲナーゼ阻害因子活性の経時変化

各値は対照群の平均値を100とした時の相対平均値±SDで示した。

Fig. 5 Time dependent changes of collagenase inhibitor (CI) activity in serum of rats exposed to O₃ or NO₂+O₃ for 22 months. Control values of CI activity in serum were 15.9, 21.9, 23.7 and 25.3 % inhibition for rats of 5, 9, 18 and 22 months, respectively (---▲---, control; ---○---, 0.05 ppm O₃; ---●---, 0.04 ppm NO₂+0.05 ppm O₃; ---□---, 0.4 ppm NO₂+0.05 ppm O₃). The values are expressed as mean ± SEM. (*, P<0.05; **, P<0.01).

3.5 肺の Monoamine oxidase (MAO) 活性

肺の Monoamine oxidase (MAO) 活性を図 6 に示した。肺の MAO 活性は暴露期間の延長に従って増加し、その増加率は G 1 < G 2 < G 3 の順であった。G 3 群は 9 か月目、18 か月目、22 か月目で有意な増加を示し、その増加率はそれぞれ 14%、27%、28%であった。G 2 群では 22 か月目のみ有意な増加を示し、その増加率は 23%であった。

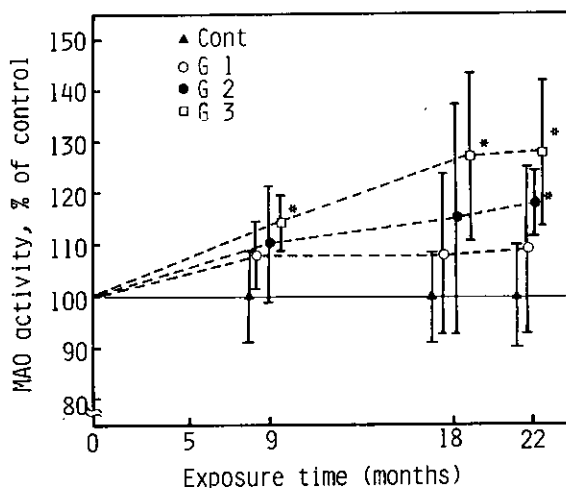


図 6 ラットの肺のモノアミンオキシターゼ活性の経時変化
各値は対照群の平均値を100とした時の相対平均値±SDで示した。

Fig. 6 Time-dependent changes of monoamine oxidase (MAO) activity in lung of rats exposed to O₃ or NO₂+O₃ for 22 months.

Control values of MAO activity in lung were 2950, 2990 and 3264 units/g·lung for rats of 9, 18 and 22 months, respectively (---▲---, control; ---○---, 0.05 ppm O₃; ---●---, 0.04 ppm NO₂+0.05 ppm O₃; ---□---, 0.4 ppm NO₂+0.05 ppm O₃). The values are expressed as mean ±SD. (*, P<0.05)

3.6 尿中のヒドロキシプロリン/クレアチニン比 (HOP比)

尿中の HOP 比を図 7 に示した。尿中 HOP 比は 5 か月目に増加し、それぞれの増加率は G 1 群 19%、G 2 群 20%、G 3 群 26%であり、有意差は G 1 群、G 3 群に認められた。しかしながら、9~18 か月目では G 2、G 3 が対照群より低下する傾向を示し、22 か月目では G 1、G 2 群が対照群より低下する傾向を示した。

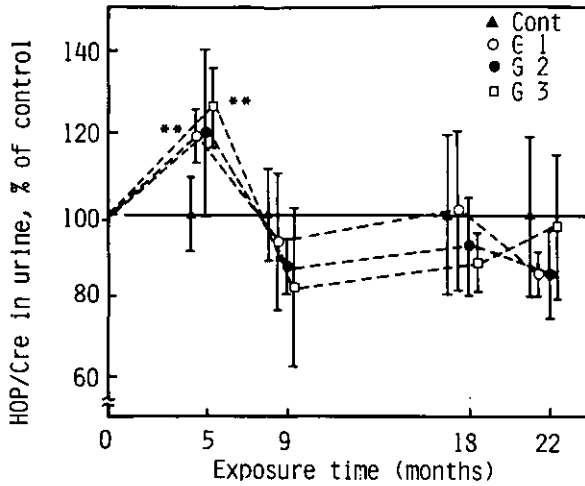


図 7 ラットの血中クレアチニン/ヒドロキシプロリン比(HOP比)の経時変化

各値は対照群の平均値を100とした時の相対平均値 \pm SDで示した。

Fig. 7 Time dependent changes of urinary hydroxyproline/creatinine ratio of rats exposed to O_3 or NO_2+O_3 for 22 months

Control values of urinary HOP ratio were 32.6, 26.3, 36.0 and 31.8 for rats of 5, 9, 18 and 22 months, respectively (---▲---, control; ---○---, 0.05 ppm O_3 ; ---●---, 0.04 ppm $NO_2+0.05$ ppm O_3 ; ---□---, 0.4 ppm $NO_2+0.05$ ppm O_3). The values are expressed as mean \pm SD. (* *, $P<0.01$)

3.7 尿中 HOP 量に対する混入飼料の影響

採尿したラットの尿中に飼料の混入が認められる。そのため、飼料中の HOP が尿中に溶出して尿中 HOP 量に影響を与えている可能性が考えられる。ここでは飼料中の HOP が尿中にどの程度溶出されているかについての検討を行った。

一昼夜採尿すると最低 5 cc の尿が得られる。そこで、5 cc の生理食塩水あるいは尿に 25~300 mg の飼料を入れて、一昼夜放置してそれぞれの HOP 量を調べた。その結果を図 8 に示した。飼料中の HOP 量は 100 mg で 127 μ g, 200 mg で 254 μ g, 300 mg では 381 μ g 存在する。一昼夜放置して 5 ml 中の生理食塩水中に溶出される HOP 量は 100 mg の場合 16.2 μ g, 200 mg で 37.5 μ g, 300 mg では 64.2 μ g であり、その溶出率はそれぞれ、12.7%, 14.8%, 16.4%であった。また、尿飼料を加えない場合の HOP 量は 850 μ g, 尿に 300 mg 飼料を加えた場合では 882 μ g であり、300 mg 飼料では無飼料群より約 3.8% 高い値を示した。本実験で採尿した尿中の飼料量を調べた結果、平均 25 mg 程度の混入が認められた。図に示すように 25 mg の飼料では生理食塩水並びに尿中ではほとんど飼料中の HOP の溶出による影響は認められない。このような結果から、採集した尿中の HOP 量には飼料の HOP の溶出による影響はほほないものと考えられる。

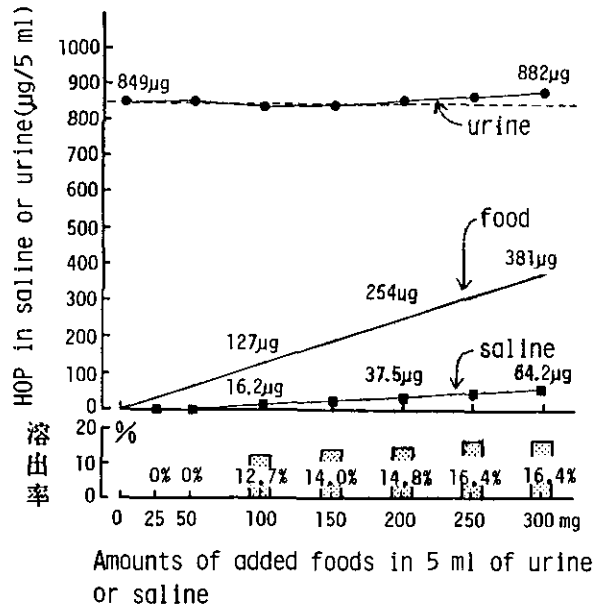


図 8 尿中ヒドロキシロプリン (HOP) 量への飼料中 HOP の影響
 Fig. 8 Effects of food HOP on HOP contents in urine

4 考 察

4.1 血清 HOP 量の変化について

血清 HOP 量は低濃度 O₃ 単独あるいは NO₂ + O₃ の長期暴露によって経時的に変動する因子であり、暴露条件が最も強い G3 群でその変動率が最も大きいことが明らかとなった。また、その経時変化は我々が以前報告²⁰⁾した 10 ppm NO₂ 2 週間暴露で認めた一時的に増加した血清 HOP 量が再び対照レベル以下に低下するという変化とよく類似していた。更に、このような変化は暴露条件が強い G3 群で、G1 群や G2 群より多少早い時期に起こるという成績を得た。同様の変化は低濃度 NO₂ 長期暴露の場合の尿中 HOP 量にも認められている。笠原ら²⁹⁾はラットに 0.3, 0.5 及び 1 ppm NO₂ を 110 日間暴露した場合、血清 HOP 量と同様、コラーゲン分解の指標である尿中 HOP 量が一時的に増加するのを認めたが、暴露期間の延長に伴って徐々に対照レベルに戻り、しかもこの現象が NO₂ 濃度が高い場合の方が早く起こることを報告している。このようなことから、血清あるいは尿中の HOP 量が一時的に増加し、再び対照レベルに戻る変化は NO₂ 単独、O₃ 単独あるいは NO₂ + O₃ 暴露のいずれの場合でも起こり、暴露条件が弱ければゆっくり進行し、暴露条件が強ければ、NO₂ 単独暴露であってもそれが早く進行するものと考えられる。

4.2 血清 HOP 量の増加原因について

血清 HOP 量の変化は生体のコラーゲン分解の状態を反映する指標であると考えられる。したがって、血清 HOP 量の増加はコラーゲン分解の亢進を示唆するものと考えられる。コラーゲン分解は血清中に存在するコラゲナーゼやエラスターゼ活性を阻害する α_1 -antitripsin (α_1 -AT) によって調節されている。この血清中の α_1 -AT の活性低下³⁰⁾ や遺伝的欠損³¹⁾ は肺のコラーゲンやエラスチンの分解を促進し、肺気腫を起こす原因と考えられている。本実験でも血清 HOP 量が増加した18か月目に血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性に低下が認められた。このようなことから、暴露 18 か月目に血清中コラゲナーゼ阻害因子活性の低下によって肺のコラーゲン分解が促進され、血清 HOP 量が増加した可能性が考えられる。肺のコラーゲン分解の促進は 18 か月目で肺のコラーゲン量が若干低下したことからも支持される。血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下原因については明らかではないが、コラゲナーゼ阻害因子活性を含む α_1 -プロテアーゼ阻害因子は種々の活性酸素やラジカルによって不活性化されること^{32,33)} が知られている。また、我々は NO_2 暴露による肺の過酸化脂質の形成によって肺のコラゲナーゼ阻害因子が不活性化されることを報告²⁰⁾ した。 O_3 や $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 暴露によって肺で脂質過酸化が起こることは報告されているが、本実験では、これらとコラゲナーゼ阻害因子活性との関連は明らかでない。

4.3 血清コラゲナーゼ阻害因子活性と肺線維化との関連

除草剤のパラコートは肺に高度の線維化を起こす³⁴⁾ ことが知られているが、この肺の線維化過程では血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性が増加することが報告²⁸⁾ されている。また、我々は先に NO_2 暴露による酸化的障害を修復する過程で血清や肺のコラゲナーゼ阻害因子活性が増加し、肺のコラーゲン分解を抑制し、それが肺の線維化と関連する可能性を報告²⁰⁾ した。本実験でその増加傾向が 5 か月目の G1 群と G3 群に、22 か月目の G2 群と G3 群に認められた。また、血清コラゲナーゼ阻害因子活性が増加する 5 か月目では G1 群、G3 群のコラーゲン量が増加する傾向があり、22 か月目では G2 群が若干増加傾向を示し、G3 群は 18 か月目に比べて増加する傾向にある。また、これらの時期にはコラーゲン分解指標の血清 HOP 量は低下する傾向にある。このような成績から、5 か月目の G1 群、G3 群、22 か月目の G2 群、G3 群では肺のコラーゲン分解能が低下している可能性が考えられ、特に、血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性が有意な増加を示す 22 か月目の G3 群でその分解能が最も低下している可能性が考えられる。

河越ら²¹⁾ は 22 か月目の形態学的観察によって肺の非細胞性間質に占めるコラーゲンの割合が G2 群、G3 群で増加するのを認め、これらの群の細胞壁の質的な変化(線維化)を示唆しているが、22 か月目の G2 群、G3 群の肺のコラーゲン分解能の低下の可能性や、また、肺の MAO 活性の G2 群、G3 群の有意な増加から、コラーゲンの架橋の亢進も推測され、このような変化が G2 群と G3 群で認められている肺胞壁の質的な変化と対応するものと考えられる。

以上、低濃度 $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ の長期暴露によるコラーゲン増生過程では肺や血清中のコラーゲン代

謝関連因子が複雑に変化し、ある時期にはコラーゲン分解が促進されるが、コラーゲンの増生が認められる時期にはコラーゲン分解が抑制され、それが肺の形態学的変化と関連する可能性が示唆された。

一方、尿中の HOP 比は 5 か月目で暴露条件の強さに対応した増加を示したのみで、9 か月目から 22 か月目までは対照群より低下する傾向を示し、血清 HOP 量とはむしろ逆の変化を示した。尿中 HOP 比は大気汚染物質のヒトへの影響を評価するための優れた指標として用いられている。今後、血清 HOP 量と尿中 HOP 比が対応しない原因を明らかにすることが大気汚染物質のヒトへの影響を外挿する上でも重要であると考えられる。

引用文献

- 1) Stephens, R.J., M.F. Sloan and D.G. Groth (1976): Effects of long-term, low level exposure of NO₂ or O₃ on rat lung. *Environ. Health Perspect.*, **16**, 178-179.
- 2) Stokinger, H.E., W.D. Wagner and O.J. Dobrogorski (1957): Ozone toxicity studies. III. Chronic injury to lung of animals following exposure at a low level. *Arch. Indust. Health*, **16**, 514-522.
- 3) Freeman, G., R.J. Stephens, D.L. Coffin and J.F. Stara (1973): Changes in dog's lung after long-term exposure to ozone. Light and electron microscopy. *Arch. Environ. Health*, **26**, 209-216.
- 4) 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.
- 5) Bruch, J. and H.W. Schliproter (1977): Tierexperimente über die chronische wirkung von ozone -morphologische und funktionelle veränderungen. *VDI-Ber. No. 270*, 111-117.
- 6) 竹中参二・清水不二雄・山田靖子・堀内博人・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—病理学的所見—. 国立公害研究所研究報告, 第 15 号, 171-227.
- 7) Kubota, K., M. Murakami, S. Takenaka, K. Kawai and H. Kyono (1987): Effects of long-term nitrogen dioxide exposure on rat lung: Morphological observation. *Environ. Health Perspective*, **73**, 157-169.
- 8) Stephans, R.J., G. Freeman. M.J. Evans. M.P. Galif (1971): Ultrastructural changes in connective tissue in lung of rats exposed to NO₂. *Arch. Intern. Med.*, **127**, 873-883.
- 9) Haydon, G.B., G. Freeman. N.J. Furioshi (1965): Convert pathogenesis of NO₂-induced emphysema in the rat. *Arch. Environ. Health*, **11**, 776-783.
- 10) Drozd, M., E. Kucharz. J. Szyja (1977): Effect of chronic exposure to nitrogen dioxide on collagen content in lung and skin of guinea pig. *Environ. Res.*, **13**, 369-377.
- 11) Blair, W.H., M.C. Henry. R. Ehrlich (1969): Chronic toxicity of nitrogen dioxide. II. Effect on histopathology of lung tissue. *Arch. Environ. Health*, **18**, 186-192.
- 12) Freeman, G. L.T. Juhos, N.J. Furioshi, R. Mussenden, R.J. Stephens, M.J. Evans (1974): Pathology of pulmonary disease from exposure to interdependent ambient gases (nitrogen dioxide and ozone). *Arch. Environ. Health*, **29**, 203-210.
- 13) Yokoyama, E, I. Ichikawa and K. Kawai (1980): Does nitrogen dioxide modify the respiratory effects of ozone. *In: Nitrogen Oxides and Their Effects on Health*. S.D. Lee (ed.) Ann. Arbor. Science. 217-229.
- 14) Hussain, M.Z., M.G. Mustafa, C.K. Chow, C.E. Cross (1976): Ozone-induced increase of lung proline hydroxylase activity and hydroxyproline content. *Chest.*, **69**, 273-275.

- 15) Last, J.A. and D.B. Greenberg (1980): Ozone-induced alterations in collagen metabolism of rat lung. II. Long-term exposure. *55*, 108-114.
- 16) Orthofer, G., R.S. Bhatnager, A. Rahman, Y.Y. Yung, S.D. Lee, J.F. Stara (1976): Collagen and prolylhydroxylase levels in lung of beagles exposed to air pollutants. *Environ. Res.*, **12**, 299-305.
- 17) Hacher, A.D. (1976): Effects of short-term nitrogen dioxide exposure on lung of collagen-synthesis. Meeting Abstract. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **113**, 107.
- 18) Kleinerman, J. (1979): Effects of nitrogen dioxide on elastin and collagen contents of lung. *Arch. Environ. Health*, **34**, 228-232.
- 19) Kosmidor, S., A. Misiewicz, E. Felus, M. Drozd, K. Ludyga (1972): Experimental and clinical investigations on the emphysema forming action of nitrogen oxide. *Zentralbl. Arbeitsmed. Albeitsschutz.*, **22**, 362-368.
- 20) 市瀬孝道・嵯峨井勝(1987): 二酸化窒素暴露によるラットの肺, 血清および尿中のコラーゲン代謝関連因子の変化. *大気汚染学会誌*, **22**, 397-407.
- 21) 河越昭子・米元純三・村上正孝(1986): NO₂+O₃長期暴露のラットに及ぼす影響—肺の電顕形態計測—第27回大気汚染学会講演要旨集. 京都, p. 224.
- 22) 伊藤勇三・高橋慎二・山元昭二・清水 明・高橋 弘(1988): 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響II—第2回目実験の供試動物の飼育経過—. 国立公害研究所研究報告, 第115号, 49-59.
- 23) 嵯峨井勝・市瀬孝道(1988): 二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響VI. —脂質過酸化障害と抗酸化性防御系因子の変化について—. 国立公害研究所研究報告, 第115号, 91-101.
- 24) Bergman, I. and R. Loxley (1970): The determination of hydroxyproline in urine hydrolysate. *Clin. Chim. Acta.*, **27**, 347-349.
- 25) Jaffe, M. and Hoppe-Seylitz (1886): *Physiol. Chem.*, **10**, 391.
- 26) 松木秀明・逢坂文夫・春日 斉・杉田 稔(1981): Hydroxyproline: Creatinine 比 (HOP 比) を指標とする健康学童および成人への大気汚染の影響に関する疫学的研究. *日本公衆衛生学雑誌*, **28**, 505-515.
- 27) Gries, G., H. Buresch and L. Stranch (1970): Collagenolytic enzymes in human serum. *Experientia*, **26**, 31-33.
- 28) 山本正彦・村松元江・木村 弘・植松平馬(1977): 肺線維症におけるコラゲナーゼ活性とその阻害活性. 厚生省特定疾患「肺線維症」調査研究班研究報告書, 89-93.
- 29) 笹原利英・大沢誠喜・鈴木孝人・溝口 勲(1979): ラット尿中ハイドロキシプロリン排泄に及ぼすNO₂暴露の影響. *東京都立衛生研究所年報*, **30**, 195-198.
- 30) Abrams, W.R., A.B. Cohen, V.V. Damiano, A. Eliraz, P. Kimbel, D.R. Meranze and G. Weinbaum (1981): A model of decreased functional α -1-protease inhibitor. *J. Clin. Invest.*, **68**, 1132-1139.
- 31) Eriksson, S. (1964): Pulmonary emphysema and alpha-1 antitrypsin deficiency. *Acta. Med. Scand.*, **117** (Suppl 432), 1-85.
- 32) Carp, H. and A.J. Janoff (1979): In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by reactive oxygen species generated by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.*, **63**, 793-807.
- 33) Pryor, W.A., M.M. Dooley and D.F. Church (1984): Inactivation of human α -1-proteinase inhibitor by gas-phase cigarette smoke. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 676-681.
- 34) Smith, P., D. Heath and J.M. Kay (1973): The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rat. *J. Pathol.*, **114**, 57-67.

II-8

二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 VIII
—— 臓器の生体膜成分に及ぼす影響 ——
Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats VIII
—— Changes in Membranous Components of Rat Tissues ——

高橋勇二¹・三浦 卓¹・持立克身¹・国本 学¹
Yuji TAKAHASHI¹, Takashi MIURA¹, Katsumi MOCHITATE¹
and Manabu KUNIMOTO¹

要 旨

JCl: Wistar 系雄ラットに、0.05 ppm O₃ (G 1群)、0.05 ppm O₃+0.04 ppm NO₂ (G 2群) 及び 0.05 ppm O₃+0.40 ppm NO₂ (G 3群) を 9 及び 22 か月間暴露し、肺、肝臓及び腎臓の生体膜成分に及ぼす影響を検討した。また、血液の Ht 値及び Hb 値に及ぼす影響も併せて検討した。

Ht 値と Hb 値は、9 か月目にはすべての暴露群で増加傾向が認められ、Ht 値が G 3 群で Hb 値が G 1 及び G 3 群で有意に増加した。一方、22 か月目にはすべての暴露群で減少する傾向が認められ、G 3 群で Hb 値が有意に低下した。

肺では、ミクロソーム異物代謝系の亢進が G 1 群で観察され、中でもチトクロム P-450 含量の増加が最も顕著であった。0.04 ppm NO₂ との複合暴露では、一定の効果を示さなかったが、0.4 ppm NO₂ との複合暴露では、G 1 群の亢進を軽減する効果を示した。NO₂ によるチトクロム P-450 含量の増加は、22 か月目に起こる可能性が示唆された。

肝臓では、22 か月目に G 3 群で湿重量の増加とミトコンドリア呼吸系の亢進が観察された。ミクロソームのチトクロム *b*₅ 含量と異物代謝活性は、G 1 群で 22 か月目に低下し、NO₂ との複合暴露はこの低下を軽減させた。G 2 及び G 3 群では 9 か月目にミクロソームの他の成分の低下が観察され、NO₂ と O₃ は独立して作用する可能性が示唆された。

腎臓では、G 1 群でミクロソーム及びミトコンドリアの増加が起こり、NO₂ との複合暴露ではこの傾向が増幅された。しかしながら、NO₂ 独自によると推察される低下効果も観察された。

以上の結果から、低濃度 NO₂ と O₃ の長期間暴露は、各臓器の生体膜成分に影響を及ぼし、特にミクロソーム異物代謝系への影響が顕著であることが明らかとなった。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Abstract

Male JCl: Wistar rats were exposed to 0.05ppm ozone (O_3 , G1), 0.05ppm O_3 +0.04ppm nitrogen dioxide (NO_2 , G2) and 0.05ppm O_3 +0.4 ppm NO_2 (G3) for 9 and 22 months to examine the effects of O_3 and NO_2 on the membrane constituents of lung, liver and kidney as well as the Ht and Hb values of blood. O_3 inhalation was daily 8 hours.

The Ht and Hb values of G1, G2 and G3 showed an increasing trend 9 months after exposure, in which the Ht value of G3 and the Hb one of G1 and G3 were significantly higher than those of the controls. Twenty-two months after exposure, however, all the exposed groups did not show such a trend and, rather, the Hb value of G3 was significantly lower than that of the control.

In the lung, the xenobiotic metabolizing systems of microsomes were enhanced in G1, in which the cytochrome P-450 content was notably increased. Exposures to O_3 in combination with 0.4ppm NO_2 (G3) diminished this enhancement, while that with 0.04ppm NO_2 (G2) scarcely affected. It should be noted that the cytochrome P-450 content increased dependent on the NO_2 concentration at the 22nd month of exposure.

In the liver, the wet weight and mitochondrial respiratory system increased in G3 22 months after exposure. In G1, however, the cytochrome b_5 content and xenobiotic metabolizing activity of microsomes were decreased. The combination with NO_2 lowered the magnitude of these decrements. On the other hand, other components of microsomes decreased in G2 and G3 9 months after exposure.

In the kidney, components of both mitochondria and microsomes increased in G1 and the combination with NO_2 reinforced such an increasing trend.

These results show that long-term exposures to NO_2 and O_3 at low levels sensitively affect membrane constituents, particularly microsomal xenobiotic metabolizing systems of lung, liver and kidney as well as the Ht and Hb values.

1 はじめに

二酸化窒素 (NO_2) とオゾン (O_3) は、光化学スモッグに含まれる主要なオキシダントである。両ガスは、生体に対して共に酸化的ストレスを引き起こすと考えられている。これまでに、0.2~0.4 ppm O_3 をラットに亜急性暴露すると肺ミクロソームの異物代謝系が持続的に亢進し、腎臓のミクロソーム成分も誘導されることを報告してきた^{1,2)}。一方、0.4~4.0 ppm NO_2 の亜急性暴露は、ラットの肺及び肝臓のミクロソーム成分及びミトコンドリア呼吸系酵素を低下させる^{3,4)}。ミクロソーム成分の低下は、亜急性暴露の間周期的に起こり異物代謝系に選択性が高い。また、 NO_2 亜急性暴露は、 O_3 と同様に腎臓のミクロソーム成分を誘導する。これらの結果は、外来性の脂溶性化学物質と同様に比較的低濃度の NO_2 や O_3 も、臓器の生体膜成分、特にミクロソーム異物代謝系に影響を及ぼし、 NO_2 と O_3 とでは影響が異なることを示している。

本研究では、0.05 ppm O_3 (8 h/d) に0.04 又は0.4 ppm NO_2 を複合し9及び22か月間ラットに暴露した際、肺・肝臓及び腎臓の生体膜成分が受ける影響を検討した。

2 材料と方法

2.1 試料の採取と酵素活性の測定

低濃度の NO_2 と O_3 を複合で9または22か月間暴露したJCl:Wistar系雄ラットを使用した⁵⁾。一群6匹のラットより前報で記した方法で肺、肝臓及び腎臓のホモジネートとミクロソーム画分を調製した⁶⁾。

ミトコンドリアのコハク酸-チトクロム *c* 還元酵素活性はホモジネートを用いて前報に記した方法で測定した⁶⁾。ミクロソームの電子伝達系成分(NADH-チトクロム *b₅* 還元酵素, NADH-チトクロム P-450 還元酵素, チトクロム *b₅* 及びチトクロム P-450) の活性も前報の方法で測定した⁶⁾。また、異物代謝活性は、ベンゾピレン, 7-エトキシクマリン, クマリン, ベンツフェタミン, アニリン, アミノピリン及び *p*-ニトロアニソールを基質としてミクロソーム画分を用いて前報の方法で測定した⁷⁾。タンパク質量は Lowry らの方法により定量した⁸⁾。

2.2 有意差の検定法

対照群と暴露群間の有意差は、分散の比を分析後、Student の *t* 検定又は Welch の *t* 検定法で調べた。

3 結果

3.1 臓器重量と血液性状に及ぼす影響

表1に、 O_3 と NO_2 の複合暴露が体重と臓器重量に及ぼす影響を示した。体重及び肺湿重量は、いずれの暴露群でも有意な変化を示さなかった。一方、肝臓及び腎臓の湿重量は、G1群で9か月目に有意に低下したが、22か月目には NO_2 添加濃度に依存して増加し、G3群では対照群の各々107% ($p < 0.05$) と108% ($p < 0.05$) となった。血液のHt値とHb値は、9か月目にはいずれの暴露群でも増加傾向が認められ、Ht値はG3群で対照群の107% ($p < 0.01$) に、Hb値はG1及びG3群で共に108%と有意に増加した(表2)。一方、22か月目にはHt値及びHb値に増加傾向は認められず、G3群のHb値は対照群の97% ($p < 0.05$) に低下した。

3.2 肺の生体膜成分に及ぼす影響

表3に、 NO_2 と O_3 の複合暴露による肺のタンパク質、異物代謝系成分及び異物代謝活性の変化を示した。ホモジネート及びミクロソーム画分のタンパク質量は、9、22か月間暴露でいずれの暴露群でも対照群に対して有意な変化を示さなかった。一方、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、9か月暴露においてG1群で対照群の129% ($p < 0.01$) に増加し、 NO_2 の添加により増加の程度が減少した。22か月暴露では、逆に NO_2 の添加により増加の程度が増大し、G3群で対照群の139% ($p < 0.001$) となった。ミクロソーム電子伝達系の他の成分、チトクロム *b₅*, NADH-チトクロム *b₅*還元酵素, NADPH-チトクロム P-450 還元酵素及びミトコン

表 1 臓器重量の変化
Table 1 Changes in the tissue weight

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)			
	Control	G1: 0.05 ppm O ₃	G2: 0.05 ppm O ₃ + 0.04 ppm NO ₂	G3: 0.05 ppm O ₃ + 0.4 ppm NO ₂
BODY WEIGHT				
9M	406±34	444±19 (109)	410±14 (101)	440±25 (108)
22M	473±37	450±22 (95)	463±18 (98)	463±36 (98)
LUNG				
9M	5.11±0.18	5.34±0.70 (1.5)	4.93±0.34 (97)	4.86±0.42 (95)
22M	4.62±0.80	4.87±0.49 (105)	4.57±0.38 (99)	4.63±0.62 (100)
LIVER				
9M	34.7±0.6	33.4±0.7* (96)	34.3±1.8 (99)	33.6±1.1 (97)
22M	33.4±2.1	32.0±2.6 (96)	34.6±1.8 (104)	35.6±2.1* (107)
KIDNEY				
9M	6.62±0.04	5.99±0.08*** (90)	6.31±0.45 (95)	6.43±0.27 (97)
22M	6.70±0.62	6.90±0.40 (103)	7.16±0.37 (107)	7.26±2.06* (108)
SPLEEN				
9M	1.82±0.18	1.81±0.15 (99)	1.84±0.04 (101)	1.81±0.24 (100)
22M	1.90±0.26	2.03±0.23 (107)	1.95±0.25 (103)	2.03±0.21 (107)

Values are expressed as the gram tissue/kg of body weight (Mean±SD, n=6 for 9 M and 12 for 22 M).

*p<0.05, ***p<0.001.

表 2 Ht 値及び Hb 値の変化
Table 2 Changes in the Ht and Hb values

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)			
	Control	G1: 0.05 ppm O ₃	G2: 0.05 ppm O ₃ + 0.04 ppm NO ₂	G3: 0.05 ppm O ₃ + 0.4 ppm NO ₂
Ht Value (%)				
9M	42.1±0.3	43.4±1.4 (103)	43.4±1.8 (103)	45.1±1.3*** (107)
22M	43.0±1.1	42.3±1.4 (98)	42.5±1.6 (99)	42.4±1.8 (99)
Hb Value (g/dl)				
9M	14.6±0.5	15.8±0.7** (108)	15.5±0.8 (106)	15.7±0.1*** (108)
22M	16.0±0.5	15.7±0.6 (98)	15.8±0.5 (99)	15.5±0.4* (97)

Values are expressed as the mean±SD (n=6 for 9 M and 12 for 22 M).

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

表 3 肺の膜成分の変化

Table 3 Changes in the membranous components of lungs

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)			
	Control	G1: 0.05 ppm O ₃	G2: 0.05 ppm O ₃ + 0.04 ppm NO ₂	G3: 0.05 ppm O ₃ + 0.4 ppm NO ₂
Homogenate Protein (mg/lung)				
9M	76.4±2.0	78.6±2.3 (103)	78.7±5.9 (103)	74.8±1.8 (98)
22M	82.8±5.6	81.0±4.2 (98)	80.9±3.7 (98)	85.6±7.0 (103)
Microsomal Protein (mg/lung)				
9M	9.05±0.47	9.09±0.80 (100)	9.38±0.58 (104)	9.42±0.45 (104)
22M	10.6±0.2	10.9±0.4 (102)	10.5±0.3 (9.8)	10.8±0.4 (101)
Cytochrome P-450 (pmol/mg homogenate protein)				
9M	7.81±0.84	10.1±1.3** (129)	8.40±2.15 (108)	7.91±0.88 (101)
22M	4.81±0.62	5.27±1.37 (109)	5.89±2.34 (122)	6.70±0.93*** (139)
HADPH-Cytochrome P-450 Reductase (nmol/min per mg homogenate protein)				
9M	1.17±0.14	1.14±0.09 (98)	1.19±0.15 (102)	1.22±0.07 (105)
22M	2.85±0.08	2.98±0.20 (105)	2.82±0.10 (99)	2.94±0.08 (103)
NADH-Cytochrome b ₅ Reductase (nmol/min per mg homogenate protein)				
9M	9.47±0.75	9.47±0.37 (100)	9.10±1.43 (96)	9.59±1.14 (101)
22M	22.6±3.3	22.8±7.9 (101)	21.9±6.6 (97)	22.4±4.1 (99)
7-Ethoxycoumarin O-Deethylase (pmol/min per mg homogenate protein)				
9M	22.1±1.6	24.0±3.4 (108)	25.3±2.6* (114)	23.2±4.2 (105)
22M	11.5±6.9	12.6±4.9 (110)	14.2±4.0* (124)	13.1±6.6 (114)
Coumarin Hydroxylase (pmol/min per mg homogenate protein)				
9M	1.06±0.13	0.98±0.19 (92)	0.96±0.22 (90)	0.85±0.09 (80)
22M	0.98±0.02	1.17±0.07* (120)	1.20±0.08* (122)	0.96±0.03 (98)
Benzphetamine N-Deethylase (pmol/min per mg homogenate protein)				
9M	494±28	497±63 (101)	490±58 (99)	473±75 (96)
22M	214±0	251±1* (117)	240±1* (112)	217±2 (101)
Benzo (a) pyrene Hydroxylase (pmol/min per mg homogenate protein)				
9M	3.46±0.19	3.61±0.33 (104)	3.45±0.25 (100)	3.54±0.31 (102)
22M	2.40±0.74	2.56±0.30 (107)	3.08±0.48 (128)	2.91±0.33 (121)
Succinate-Cytochrome c Reductase (nmol/min per mg homogenate protein)				
9M	2.99±0.44	3.06±0.26 (103)	2.71±0.26 (91)	2.92±0.27 (98)
22M	9.83±1.87	9.27±1.87 (94)	9.24±1.60 (94)	8.85±1.15 (90)

Values are expressed as the mean±SD (n=6 for 9 M and 12 for 22 M).

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

ドリア呼吸系のコハク酸-チトクロム c 還元酵素の諸活性は、9、22 か月暴露のいずれの暴露群でも有意な変化を示さなかった。

肺ミクロソームのチトクロム P-450 含量の変動は、ミクロソームの異物代謝活性が変化する可能性を示唆している。G1 群では、22 か月暴露でクマリン水酸化及びベンズフェタミン脱メチル化活性が各々対照群の 180% (p<0.05) 及び 117% (p<0.05) に増加した。G2 群でも同程度の有意な活性増加が認められた。一方、7-エトキシマリン脱エチル化活性は、9 及び 22 か月暴露のいずれの暴露群でも増加傾向が認められ、G2 群では 9 及び 22 か月暴露で各々対照群の 114%

($p < 0.05$) 及び 124% ($p < 0.05$) となった。しかしながら、いずれの代謝活性も G3 群では有意な変化を示さなかった。

3.3 肝臓の生体膜成分に及ぼす影響

表 4 に示したように、肝臓のホモジネート及びミクロソーム画分のタンパク質は有意な変化を示さなかった。G1 群では、9 か月目にチトクロム P-450 含量が対照群の 82% と減少傾向を示し、22 か月目にはチトクロム b_5 含量と p -ニトロアニソール脱メチル化活性が対照群の各々 87% ($p <$

表 4 肝臓の膜成分の変化
Table 4 Changes in the membranous components of livers

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)			
	Control	G1: 0.05 ppm O ₃	G2: 0.05 ppm O ₃ + 0.04 ppm NO ₂	G3: 0.05 ppm O ₃ + 0.4 ppm NO ₂
Homogenate protein (g/liver)				
9M	2.45±0.26	2.56±0.22 (105)	2.54±0.20 (104)	2.59±0.07 (106)
22M	2.81±0.23	2.69±0.35 (96)	2.86±0.17 (102)	2.87±0.06 (102)
Microsomal protein (mg/liver)				
9M	476±56	502±64 (106)	457±52 (96)	491±82 (104)
22M	513±49	494±94 (96)	532±41 (104)	532±30 (103)
Cytochrome P-450 (pmol/mg homogenate protein)				
9M	82.2±5.5	67.1±16.4 (87)	76.0±17.5 (92)	85.4±6.6 (104)
22M	66.3±9.0	64.3±11.4 (97)	67.5±8.4 (102)	69.8±9.4 (105)
Cytochrome b_5 (pmol/mg homogenate protein)				
9M	56±8	56±3 (99)	56±3 (99)	57±5 (101)
22M	74±6	64±13* (87)	68±4* (92)	76±5 (102)
NADPH-cytochrome P-450 reductase (nmol/min per mg homogenate protein)				
9M	10.9±1.1	10.3±0.3 (94)	8.8±0.4** (81)	9.2±0.9* (84)
22M	11.1±1.5	11.1±1.3 (100)	11.5±2.1 (104)	12.0±1.4 (108)
NADH-cytochrome b_5 reductase (nmol/min per mg homogenate protein)				
9M	654±64	619±40 (95)	668±70 (102)	561±23** (86)
22M	203±27	184±39 (91)	191±35 (94)	201±33 (99)
Aniline hydroxylase (pmol/min per mg homogenate protein)				
9M	71±10	62±5 (87)	64±5 (90)	64±2 (91)
22M	72±18	73±18 (102)	79±13 (111)	79±21 (110)
Aminopyrine N-demethylase (pmol/min per mg homogenate protein)				
9M	3.16±0.34	2.92±0.28 (92)	3.04±0.34 (96)	2.94±0.19 (93)
22M	1.13±0.27	1.11±0.20 (98)	1.21±0.15 (108)	1.15±0.22 (103)
p -Nitroanisole N-demethylase (pmol/min per mg homogenate protein)				
9M	805±9	793±10 (99)	809±59 (101)	810±73 (101)
22M	1054±94	881±195* (84)	972±106 (92)	963±50* (91)
Succinate-cytochrome c reductase (noml/min per mg homogenate protein)				
9M	15.8±2.3	15.4±4.2 (98)	15.0±3.1 (95)	14.7±2.9 (93)
22M	29.1±5.2	32.3±4.4 (111)	29.8±4.9 (102)	34.9±5.3* (120)

Values are expressed as the mean±SD (n=6 for 9 M and 12 for 22 M)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

0.05)と84% ($p < 0.05$)に低下した。NO₂の添加は、O₃によるこれらの活性低下を軽減させたが、G3群で9か月目にNADH-チトクロム *b*₅還元酵素とNADPH-チトクロム P-450還元酵素の活性は対照群の各々84% ($p < 0.05$)と86% ($p < 0.01$)に低下した。一方、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、G3群で22か月目に対照群の120% ($p < 0.05$)に増加した。

3.4 腎臓の生体膜成分に及ぼす影響

肺や肝臓と異なり腎臓の場合、ミクロソーム画分のタンパク質は増加傾向を示し、22か月目にはG1及びG3群で対照群の各々107% ($p < 0.01$)及び110% ($p < 0.01$)と有意に増加した。ホモジネートのタンパク質も22か月目にNO₂の添加濃度に依存して増加し、G2及びG3群で対照群の各々108% ($p < 0.01$)及び110% ($p < 0.01$)となった。同様に、チトクロム P-450含量も9か月目でNO₂の添加濃度に依存した増加傾向を示し、NADPH-チトクロム P-450還元酵素活性は22か月にG2及びG3群で対照群の各々108% ($p < 0.05$)及び114% ($p < 0.01$)に増加した。一方、ベンゾピレン水酸化活性は、9か月目にNO₂添加濃度に依存して、G3群では対照群の77% ($p < 0.01$)となった。ミトコンドリアのコハク酸-チトクロム *c*還元酵素活性は、9か月目に増加傾向を示しG1及びG3群で対照群の各々118% ($p < 0.05$)及び114% ($p < 0.05$)になったが、22か月目にはNO₂の添加濃度に依存して低下し、G3群では対照群の79% ($p < 0.05$)となった。

4 考察

本研究は、低濃度O₃の単独及び低濃度NO₂との複合長期間暴露が第一次標的臓器である肺のみならず肝臓、腎臓及び赤血球にも影響を及ぼすことを明らかにした。

著者ら⁹⁾は、比較的低濃度のNO₂をラットに急性、亜急性暴露すると血液中の赤血球の老化が促進され、この障害に対する代償作用として血液中に代謝活性の高い若い赤血球の割合が増加することとHt値が増加することを明らかにしてきた。高濃度のO₃暴露は赤血球を溶血させることが報告されているが¹⁰⁾、比較的低濃度のO₃亜急性暴露では赤血球量の減少は観察されず逆にHt値の増加も観察されている^{9,11)}。これらの現象は、NO₂やO₃の赤血球への障害に対する代償反応として赤血球の増生が起こると解釈できる。G1及びG3群で9か月目に観察されたHt値及びHb値の増加は、低濃度のO₃やNO₂暴露によっても赤血球に障害が及び、それに対して動物は代償的に反応したことによるとも推測できる(表2)。この場合、NO₂とO₃の複合効果が明確でないのは、代償反応がNO₂又はO₃に対して過剰に発現しているためとも考えられる。暴露22か月目では、増加は観察されず、G3群のHb値は有意に低下した。老齢ラットにNO₂を暴露すると同様の現象が観察されることから、暴露22か月目の老令ラットでは赤血球産生能が低下しており代償反応が十分でなく障害が発現したと考えられる。

比較的低濃度のNO₂ (0.4~4.0 ppm) 亜急性暴露によって、肺ミクロソームの異物代謝系成分と異物代謝活性は周期的に減少する⁴⁾。この際、ミトコンドリア呼吸系酵素の活性低下も観察され

る。一方、比較的低濃度の O_3 (0.2~0.4 ppm) 亜急性暴露は、 NO_2 と対照的に肺マイクロソームの異物代謝系成分と異物代謝活性を亢進させる²⁾。本研究の結果から、異物代謝系の亢進が 0.05 ppm O_3 の長期間暴露でも発現することが明らかになった (表 3)。0.04 ppm NO_2 との複合暴露は O_3 による増加効果を増幅させる場合も認められたが、0.4 ppm NO_2 の複合は O_3 による増加効果を軽減させた。これらの結果は、肺の異物代謝系が O_3 による増加効果と NO_2 による低下効果とを独立して受け、現象的には影響が相殺される可能性を示唆している。暴露 22 か月目に観察されたチトクロム P-450 含量の増加は、 NO_2 添加濃度に依存しており、長期間暴露での複合効果、あるいは NO_2 亜急性暴露で認められた過剰な代償反応を示唆しているのかもしれない。

肝臓のマイクロソーム成分は、0.8 ppm O_3 の急性暴露によって初期に低下するが速やかに回復する³⁾。比較的低濃度の O_3 亜急性暴露では影響が観察されない²⁾。しかしながら、本研究の結果から、0.05 ppm O_3 の長期間暴露ではチトクロム b_5 含量と異物代謝活性の低下することが明らかになった (表 4)。この結果は、 O_3 のへム合成抑制作用が低濃度 O_3 の長期間暴露で発現する可能性を示唆している。この O_3 による低下は NO_2 の添加によって軽減された。一方、G2 及び G3 群ではマイクロソームの他の成分の低下が観察された。したがって、 NO_2 と O_3 は共に肝臓のマイクロソーム成分を低下させる作用を示すが、両ガスは独立して作用すると考えられる。暴露 22 か月目に G3 群のミトコンドリア呼吸系酵素活性と肝湿重量が共に増加したことは、G3 群では NO_2 と O_3 による障害を修復する必要があることを示しているのかもしれない。

本研究の結果から、低濃度 NO_2 と O_3 の複合長期間暴露において 22 日目には腎臓の湿重量、タンパク質量及びマイクロソーム画分のタンパク質量が、G1 群で増加傾向を示し、 O_3 の添加濃度に依存して増加することが明らかとなった (表 1, 5)。この結果は、腎臓において細胞の過増生が起った可能性を示唆している。

腎臓のマイクロソーム成分は、比較的低濃度の NO_2 と O_3 単独亜急性暴露によって増加する^{2,4)}。0.05 ppm O_3 の長期間暴露においても同様の現象が観察され、 NO_2 の添加はこの傾向を増幅させた (表 5)。しかしながら、ベンゾピレン水酸化活性やコハク酸-チトクロム c 還元酵素活性のように、 NO_2 による低下効果と考えられる現象も観察された。

本研究の結果は、低濃度 NO_2 と O_3 の長期間暴露により臓器生体膜成分は鋭敏に反応し、その反応は各臓器に特異的なものであることを示している。 NO_2 と O_3 の影響は多くの場合独立している可能性が示唆された。特に、臓器マイクロソームの異物代謝系の変化は顕著であり、内在基質及び外来異物の代謝の程度と代謝のスペクトラムが修飾されると考えられる。

表 5 腎臓の膜成分量の変化

Table 5 Changes in the membranous components of kidneys

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)			
	Control	G1: 0.05 ppm O ₃	G2: 0.05 ppm O ₃ + 0.04 ppm NO ₂	G3: 0.05 ppm O ₃ + 0.4 ppm NO ₂
Homogenate protein (mg/kidney)				
9M	241±18	234±14 (97)	244±5 (101)	241±6 (100)
22M	332±18	337±15 (102)	359±17** (108)	366±31** (111)
Microsomal protein (mg/kidney)				
9M	42.9±5.1	45.0±3.0 (105)	46.0±3.1 (107)	47.0±2.6 (109)
22M	66.6±4.1	71.7±2.1** (107)	68.9±5.9 (103)	73.3±5.1** (110)
Cytochrome P-450 (pmol/mg homogenate protein)				
9M	0.46±0.16	0.59±0.24 (129)	0.61±0.11 (133)	0.64±0.04 (158)
22M	0.47±0.16	0.46±0.15 (98)	0.38±0.15 (80)	0.40±0.20 (84)
NADPH-cytochrome P-450 reductase (nmol/min per mg homogenate protein)				
9M	8.32±0.49	9.36±0.57 (113)	8.45±0.76 (102)	8.28±0.48 (99)
22M	11.0±0.9	11.7±1.6 (106)	11.9±0.3* (108)	12.6±1.2** (114)
NADH-cytochrome b ₅ reductase (nmol/min per mg homogenate protein)				
9M	18.6±0.6	20.4±1.9 (109)	21.9±1.8** (117)	20.6±1.6* (110)
22M	31.2±2.9	32.7±3.6 (105)	30.1±2.9 (97)	30.3±2.9 (97)
7-Ethoxycoumarin O-deethylase (fmol/min per mg homogenate protein)				
9M	157±77	183±35 (111)	157±22 (95)	192±12 (122)
22M	141±52	171±51 (125)	164±50 (120)	138±15 (98)
Benzo(a)pyrene hydroxylase (fmol/min per mg homogenate protein)				
9M	203±35	166±32 (82)	158±31 (78)	156±16** (77)
22M	91±10	97±11 (106)	94±3 (103)	85±10 (94)
Succinate-cytochrome c reductase (nmol/min per mg homogenate protein)				
9M	24.5±1.9	28.8±3.6* (118)	25.7±3.7 (105)	28.0±2.0* (114)
22M	29.1±4.8	29.8±2.5 (102)	25.9±2.5 (89)	23.3±1.4 (79)

Values are expressed as the mean±SD (n=6 for 9 M and 12 for 22 M)

*p<0.05, **p<0.01.

引用文献

- 1) Takahashi, Y. and T. Miura (1985): *In vivo* effect of ozone inhalation on xenobiotic metabolism of lung and liver of rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 855-864.
- 2) Takahashi, Y. and T. Miura (1987): A selective enhancement of xenobiotic metabolizing systems of rat lungs by prolonged exposure to ozone. *Environ. Res.*, **42**, 425-434.
- 3) Takahashi, Y. and T. Miura (1985): *In vivo* effects of nitrogen dioxide and ozone on xenobiotic metabolizing systems of rat lungs. *Toxicol. Lett.*, **26**, 145-152.
- 4) Takahashi, Y., K. Mochitate and T. Miura (1986): Subacute effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung, liver and kidney of rats. *Environ. Res.*, **41**, 184-194.
- 5) 清水 明・松本 茂・伊藤勇三・山元昭二・高橋慎司・高橋 弘(1988): オゾンと二酸化窒素との複合長期暴露のラットに及ぼす影響-第二回目実験の暴露チャンバーの環境制御. 国立公害研究所研究報告, 第115号, 41-47.

- 6) 三浦 卓・高橋勇二・持立克身・彼谷邦光・国本 学(1986): ラット臓器のミクロソーム電子伝達系に及ぼす二酸化窒素とオゾンの複合間欠暴露の影響. 国立公害研究所研究報告, 第 101 号, 107-116.
- 7) 高橋勇二・三浦 卓・持立克身・河田明治・国本 学(1986): ラット臓器のミクロソーム異物代謝系に及ぼす二酸化窒素とオゾンの複合間欠暴露の影響. 国立公害研究所研究報告, 第 101 号, 99-106.
- 8) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 365-275.
- 9) Kunimoto, M., K. Mochitate, K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): 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.*, **33**, 361-369.
- 10) Freeman, B. A., B. E. Miller and J. B. Mudd (1979): *Assessing Toxic Effects of Environmental Pollutants*. Lee, S. D. and Mudd, J.B. (eds.), Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich. 151-171.
- 11) Mochitate, K. and T. Miura (1985): In vivo effects of nitrogen dioxide on the activities of glycolytic enzymes in red blood cells of rats. *Toxicol. Lett.*, **22**, 315-321.

II-9

二酸化窒素とオゾンの複合長期暴露がラットに及ぼす影響 IX

—— 肺胞マクロファージに及ぼす影響 ——

Effects of Long-Term Exposure to Nitrogen Dioxide and Ozone on Rats IX

—— Effects on Alveolar Macrophages ——

持立克身¹・三浦 卓¹

Katsumi MOCHITATE¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

ラット (6週齢) に 0.04 ppm または 0.40 ppm NO₂ + 0.05 ppm O₃ (8h/d) を 22 か月複合暴露し、肺胞マクロファージに及ぼす影響を検討した。肺胞マクロファージの細胞数は、暴露 9 か月目では、O₃ のみ (G1) 及び 0.40 ppm NO₂ を混合した (G3) 暴露群で有意に増加し、暴露 22 か月目では、0.04 ppm NO₂ を混合した (G2) 群及び G3 群で有意に増加した。

暴露 22 か月目における *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 及び *Pseudomonas aeruginosa* に対する殺菌活性は、すべての暴露群で各々対照群の 0.81-0.83, 0.80-0.83 及び 0.71-0.81 倍に有意に低下した。*Candida albicans* に対する殺菌活性は、G1, G2 及び G3 群で各々対照群の 0.65, 0.52 及び 0.18 倍に NO₂ 濃度に依存して低下した。

以上の結果から、肺胞マクロファージの細胞数や殺菌活性は、これらの濃度の NO₂ 及び O₃ によって影響を受けることが明らかになった。また、*C. albicans* に対する殺菌活性には NO₂ と O₃ の複合ガス暴露による効果が、著しく認められた。

Abstract

Male Wistar rats (6 week-old) were exposed to 0.04 or 0.40 ppm NO₂ (continuous exposure) and 0.05 ppm O₃ (8h/d) in combination for 22 months and alveolar macrophages were collected by pulmonary lavage to examine the effects of NO₂ and O₃ on the cell number and cytotoxic activities. On the 9th month, the number of alveolar macrophages increased to 1.28-fold (G1 group: only O₃ exposure) and 1.32-fold (G3 group: O₃ + 0.40 ppm NO₂ exposure) those of the control values, respectively. On the 22nd month, the cell number also increased to 1.25-fold (G2 group: O₃ + 0.04 ppm NO₂ exposure) and 1.26-fold (G3 group) those of the control values, respectively.

On the 22nd month, the bacteriocidal activities of alveolar macrophages against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* decreased to 0.81 to 0.83-fold, 0.80 to 0.83-fold and 0.71 to 0.81-fold those of the control values, respectively, at

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川 16 番 2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

all exposure groups to the similar extent. In contrast, the cytotoxic activity against *Candida albicans* decreased to 0.65-fold, 0.52-fold and 0.18-fold that of the control value at G1, G2 and G3 groups, respectively, depending on the concentration of NO₂.

These results indicate that even these levels of NO₂ and O₃ affected the cell number and cytotoxic activities of alveolar macrophages and that the most obvious combination effect of NO₂ and O₃ were observed on the cytotoxic activity against *C. albicans*.

1 はじめに

オゾン (O₃) 及び二酸化窒素 (NO₂) は、代表的な大気汚染物質であり¹⁾、肺胞に傷害を与えることが知られている²⁻⁵⁾。肺胞マクロファージは肺胞に位置することから、呼吸の際に肺に侵入した微生物から生体を防御する機能もまた、高濃度の O₃ や NO₂ によって傷害を受ける⁶⁻¹⁰⁾ことが知られている。しかし、低濃度でのこれら酸化性ガスによる肺胞マクロファージの殺菌活性への影響は、ほとんど知られていない。これまで筆者らは、低濃度 0.2 ppm O₃ によって、肺胞マクロファージの殺菌活性及び活性酸素発生能が傷害を受ける^{11,12)}ことを明らかにした。本研究では、より環境中の濃度に近い O₃ 及び NO₂ による殺菌活性への影響について検索した。

O₃ 及び NO₂ はまた、肺胞内のマクロファージ数を増加させる¹³⁻¹⁵⁾ことが知られている。筆者らはこれまで、肺胞マクロファージの増加は多形核白血球の増加を伴わずに起こることを見いだし、この原因としては肺胞上皮細胞への傷害が誘引の原因になっている可能性について指摘した^{16,17)}。本研究では、より低濃度の O₃ 及び NO₂ によって肺胞マクロファージが増加するか調べることにより、この濃度における肺胞上皮細胞への傷害の可能性について検討を試みた。

2 方法

実験方法は、報文「肺胞マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響 (I)」¹¹⁾と同様であるので、異なる点のみ記載する。

2.1 暴露方法及び試料の調製

10匹を一群とした JCl: Wistar 系雄ラット (6週齢) に O₃ 及び NO₂ を 22 か月間暴露した。暴露は、O₃ のみの G1 暴露群、あるいは 0.04 ppm 及び 0.40 ppm NO₂ を O₃ と混合した G2 及び G3 暴露群の三種類で行った。O₃ は、最大 0.10 ppm、その間の平均値が 0.05 ppm になるように、濃度を正弦曲線に沿ってプログラム制御で間欠暴露した。NO₂ は、連続暴露した。暴露終了後生理的食塩水でかん流したラット肺に気管より 136mM NaCl-5.3mM KCl-2.5mM リン酸緩衝液-5.5 mM グルコース-10 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) を注入して肺胞を洗浄し、肺胞マクロファージを調製した。

細胞数は、直径 9 μm 以上の大きさの細胞をコールターカウンターで計測した。細胞の生存率は、トリパンブルー排除試験により測定した。

2.2 殺菌活性の測定

^3H -ウリジンで標識した *Escherichia coli* K 12, *Salmonella typhimurium* LT 2, *Pseudomonas aeruginosa* 及び *Candida albicans* を用いて、肺胞マクロファージの殺菌活性を測定した。始めに、*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* 及び *C. albicans* を各々 $[5\text{-}^3\text{H}]$ ウリジン ($5.0 \mu\text{Ci/ml}$, 0.19 nmol/ml) を添加した M 9+ポリペプトン, PAS 及び YNB 合成培地に懸濁し、 30°C で 18 時間インキュベーションすることにより、 ^3H -ウリジンで標識した微生物を調製した。 ^3H 標識した微生物は、0.95% NaCl 水溶液で洗った後、D-MEM-10 mM MOPS (pH 7.2) 溶液に懸濁し、殺菌活性の測定に用いた。次に、肺胞マクロファージをプレインキュベーション後、微生物を肺胞マクロファージの各々 100, 200, 50 及び 15 倍量添加し、細菌の場合は 30 分間、*C. albicans* の場合は 120 分間殺菌反応を行った。殺菌反応終了後のマクロファージの溶解には、0.15% デオキシコール酸を用いた。

E. coli K12, *P. aeruginosa* (IAM 1514) は東京大学応用微生物研究所, *S. typhimurium* LT2 は明治薬科大学微生物研究室, *C. albicans* 966 株は名古屋大学医学部附属病態制御研究施設医真菌部門より譲り受けたものを用いた。

3 結果

3.1 肺胞マクロファージの細胞数の変化

低濃度 $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 複合長期暴露による肺胞マクロファージの細胞数の変化を表 1 に示した。肺

表 1 低濃度オゾン及び二酸化窒素複合 22 か月暴露による肺胞マクロファージの細胞数の変化

Table 1 Changes in cell number of alveolar macrophages by 22 months exposure of rats to low level of ozone and nitrogen dioxide

Exposure Time (months)	Cell Number ($\times 10^6$ cells/rat)			
	Control	G1	G2	G3
9	6.55 \pm 1.07 (1.00)	8.39 \pm 0.72* (1.28)	7.35 \pm 0.68 (1.12)	8.65 \pm 0.82** (1.32)
22	7.95 \pm 1.16 (1.00)	8.78 \pm 1.59 (1.10)	9.96 \pm 2.20* (1.25)	10.04 \pm 1.36** (1.26)

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Exposure Time (months)	Viability (%)			
	Control	G1	G2	G3
9	92.1 \pm 2.6	89.5 \pm 3.8	90.8 \pm 4.1	89.2 \pm 4.2
22	97.3 \pm 1.1	97.1 \pm 1.1	97.3 \pm 1.4	97.0 \pm 1.2

胞マクロファージの細胞数は、暴露9か月目では、G1及びG3群で各々対照群の1.28倍及び1.32倍に有意に増加した。また、暴露22か月目では、G2及びG3群で各々1.25倍及び1.26倍に有意に増加し、全期間を通じG3群は常に高い値を保った。

マクロファージの生存率に、暴露群と対照群で差は認められなかった。

3.2 肺胞マクロファージの殺菌活性の変化

暴露22か月目における肺胞マクロファージの殺菌活性の変化を表2に示した。この表には、*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* 及び *Candida albicans* を各々³H量で、34500, 27200, 70500及び55000 dpm添加した際、反応液上清中に回収した正味の³H量を全添加量に対する割合で%表示した。*E. coli*, *S. typhimurium* 及び *P. aeruginosa* に対する殺菌活性は、すべての暴露群でほぼ同程度に、各々対照群の0.80-0.83, 0.81-0.83及び0.71-0.81倍に有意に低下した。しかし、*C. albicans* に対する殺菌活性は、G1, G2及びG3群で、各々対照群の0.65, 0.52及び0.18倍に低下し、NO₂の濃度の増加とともに殺菌活性が減少することが明らかになった。

表 2 低濃度オゾン及び二酸化窒素複合22か月暴露による肺胞マクロファージの殺菌活性の変化

Table 2 Changes in cyto-killing activities of alveolar macrophages by 22-months exposure of rats to low level of ozone and nitrogen dioxide

Microorganisms	cyto-killing Activity (released ³ H/total ³ H, %)			
	Control	G1	G2	G3
<i>Escherichia coli</i>	39.7 ± 6.9 (1.00)	32.9 ± 3.4* (0.83)	32.1 ± 3.8** (0.81)	32.5 ± 2.5** (0.82)
<i>Salmonella typhimurium</i>	22.4 ± 4.7 (1.00)	18.5 ± 2.8* (0.83)	18.1 ± 3.1* (0.81)	17.9 ± 2.7* (0.80)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17.4 ± 2.8 (1.00)	13.3 ± 2.8** (0.76)	14.2 ± 3.7 (0.81)	12.4 ± 2.3*** (0.71)
<i>Candida albicans</i>	13.3 ± 4.3 (1.00)	8.6 ± 2.7* (0.65)	6.9 ± 3.4** (0.52)	2.4 ± 1.8*** (0.18)

Total addition of ³H-uridine-labeled *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* : 34500, 27200, 70500 and 55000 (dpm), respectively.

Basal release of ³H from *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* : 44.6, 35.2, 39.7 and 74.2 (%), respectively.

Cell ratio (microorganisms/mφ) : 100, 200, 50 and 15, respectively.

*, P<0.05; **, P<0.01 and ***, P<0.001.

4 考 察

Goldstein らは、2.5 ppm O₃ 5 時間暴露,あるいは 4.1 ppm NO₂+0.36 ppm O₃ 4 時間暴露によって、肺胞マクロファージの殺菌活性が低下することを報告している^{8,9)}。本報告書の報文「肺胞マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響 I¹¹⁾及びII¹²⁾」において、より低濃度の 0.2 ppm O₃ 連続 2 週間暴露によって、*Candida albicans* や *Pseudomonas aeruginosa* に対する殺菌活性は有意に低下すること、及び老齢ラットでは、更に *Escherichia coli* や *Salmonella typhimurium* に対する殺菌活性も有意に低下することを報告した。本研究では、更に低濃度の 0.05 ppm O₃ (8 h/d) 間欠 22 か月暴露によっても、これらの指標微生物に対する肺胞マクロファージの殺菌活性は有意に低下することが明らかになった。試料の量の制約上本研究では、活性酸素発生能について検討できなかった。これまでの研究から、活性酸素発生能の低下は、殺菌活性減少の一因であること¹¹⁾、そして老齢ラットでは、肺胞マクロファージの殺菌活性及び活性酸素発生能は、O₃ 暴露によって一層傷害を受けやすいこと¹²⁾が明らかになっている。したがって、本研究における肺胞マクロファージの殺菌活性の低下の一因としては、活性酸素発生能の低下が推測される。

C. albicans に対する殺菌活性のみが、暴露した NO₂ ガス濃度の増加とともに著しく減少した。本研究で用いた殺菌活性測定のための方法は、微生物が食胞中でリソゾーム酵素による分解を受けて初めて活性として認められる特徴を有している。また、NO₂ や O₃ 暴露によって、肺胞マクロファージのリソゾーム酵素の活性が減少し、肺胞洗浄液上清中のリソゾーム酵素活性が増加すること^{18,19)}が知られている。したがって、*C. albicans* のように、真核細胞で厚い細胞壁を有している微生物は、前核細胞でグラム陰性菌である他の指標微生物と比較して、リソゾーム酵素による分解を受け難いために、NO₂+O₃ 複合暴露による肺胞マクロファージのリソゾーム酵素の活性低下の影響をより強く受けたのかも知れない。いずれにせよ、*C. albicans* に対する殺菌活性の著しい低下は、ガス暴露を受けた実験動物の *C. albicans* に対する感染抵抗性の低下を予想させる。

これまで、NO₂ や O₃ の酸化性ガスによって、肺胞内にはマクロファージが増加することが知られている。我々もまた、4 ppm NO₂ 7 日間暴露¹⁹⁾や 1.2 ppm NO₂ 3 か月暴露²⁰⁾、あるいは 0.2 ppm O₃ 3 日間暴露¹⁷⁾や 0.1 ppm O₃ 7 日間暴露²¹⁾によって、肺胞マクロファージが増加することを報告した。本研究の結果は、更に低濃度の 0.05 ppm O₃ (8 h/d) によっても、肺胞内にマクロファージが増加すること、そしてこのことは、生体はこの濃度の O₃ を刺激として認識していることを示唆する。

引 用 文 献

- 1) Eschenroeder, A. Q. (1977): Atmospheric concentrations of photochemical oxidants. In: Ozone Photochemical Oxidants. Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants., Division of Medical Sciences Assembly of Life Sciences National Research Council (ed.), 126-194.

- 2) Stephens, R. J., G. Freeman and M. J. Evans (1972): Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **24**, 160-179.
- 3) Stephens, R. J., M. F. Sloan, M. J. Evans and G. Freeman (1974): Early response of lung to low levels of ozone. *Am. J. Pathol.*, **74**, 31-58.
- 4) Stephens, R. J., M. F. Sloan, M. J. Evans and G. Freeman (1974): Alveolar type 1 cell response to exposure to 0.5 ppm O₃ for short period. *Exp. Mol. Pathol.*, **20**, 11-23.
- 5) Schwartz, L. W., D. L. Dungworth, M. G. Mustafa, B. K. Tarkington and W. S. Tyler (1976): Pulmonary responses of rats to ambient levels of ozone. Effects of 7-day intermittent or continuous exposure. *Lab. Invest.* **34**, 565-578.
- 6) Goldstein, E., W. Lippert and D. Warshauer (1974): Pulmonary alveolar macrophage. Defender against bacterial infection of the lung. *J. Clin. Invest.*, **54**, 519-528.
- 7) Acton, J. D. and Q. N. Myrvik (1972): Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **24**, 48-52.
- 8) Goldstein, E., W. Lippert and D. Warshauer (1974): Pulmonary alveolar macrophage. Defender against bacterial infection of the lung. *J. Clin. Invest.*, **54**, 519-528.
- 9) Goldstein, E. and D. Warshauer (1974): Ozone and nitrogen dioxide: Murine pulmonary defense mechanisms. *Arch. Environ. Health*, **28**, 85-90.
- 10) Vassallo, C. L., B. M. Domm, R. H. Poe, M. L. Duncombe and J. B. J. Gee (1973): NO₂ gas and NO₂-effects on alveolar macrophages phagocytosis and metabolism. *Arch. Environ. Health*, **26**, 270-274.
- 11) 持立克身・三浦 卓(1987): 肺胞マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響 I. 国立公害研究所研究報告, 第 115 号, 231-243.
- 12) 持立克身・三浦 卓(1987): 肺胞マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響II.一老化による傷害の増幅一. 国立公害研究所研究報告, 第 115 号, 245-252.
- 13) Schwartz, L. W., D. L. Dungworth, M. G. Mustafa, B. K. Tarkington and W. S. Tyler (1976): Pulmonary responses of rats to ambient levels of ozone. Effects of 7-day intermittent or continuous exposure. *Lab. Invest.*, **34**, 565-578.
- 14) Gardner, D. E., R. S. Holzman and D. L. Coffin (1969): Effects of nitrogen dioxide on pulmonary cell population. *J. Bacteriol.*, **98**, 1041-1043.
- 15) Coffin, D. L., D. E. Gardner, R. S. Holzman and F. J. Wolock (1968): Influence of ozone on pulmonary cell population. *Arch. Environ. Health*, **16**, 633-636.
- 16) Mochitate, K., Y. Takahashi, T. Ohsumi and T. Miura (1986): Activation and increment of alveolar macrophages induced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **17**, 229-239.
- 17) 持立克身・三浦 卓(1987): オゾン暴露による肺胞マクロファージの代謝の活性化と細胞数の増加. 国立公害研究所研究報告, 第 115 号, 219-229.
- 18) Hurst, D. J., D. Gardner and D. Coffin (1970): Effect of ozone on acid hydrolases of the pulmonary alveolar macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **8**, 288-300.
- 19) Goldstein, E., H. C. Bartlema, M. van der Ploeg, P. van Duijn, J. G. M. M. van der Stap and W. Lippert (1978): Effect of ozone on lysosomal enzymes of alveolar macrophages engaged in phagocytosis and killing of inhaled *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, **138**, 299-311.
- 20) 持立克身・高橋勇二・大住拓美・三浦 卓(1986): 二酸化窒素による肺胞マクロファージ活性化と細胞数の増加. 国立公害研究所報告, 第 101 号, 71-80.
- 21) 持立克身・石田邦彦・三浦 卓(1985): 肺胞マクロファージに対するオゾンの影響. 第 26 回大気汚染学会. 287.

II-10

二酸化窒素とオゾンの複合暴露が免疫機能に及ぼす影響
Effects of Subacute Exposure to Combined Gases of
Nitrogen Dioxide and Ozone on Immune Responses in Mice

藤巻秀和¹

Hidekazu FUJIMAKI¹

要 旨

二酸化窒素 (NO₂) とオゾン (O₃) の亜急性複合暴露が生体の抗体産生系に及ぼす影響を解明するために本研究を行った。

BALB/c雄マウスに4ppm NO₂と0.8ppm O₃を3日、7日、14日間連続複合暴露し、胸腺、ひ臓の湿重量の変動、ひ臓における抗体産生細胞数の変動について検索した。その結果、胸腺、ひ臓の湿重量はいずれの暴露期間でも有意に低下し、特に3日、7日目は顕著であった。また、すべての暴露期間で肺湿重量の増加がみられた。羊赤血球 (SRBC) 抗原に対する抗体産生能をひ臓での抗体産生細胞数と血中の抗体価の変化で調べたところ、すべての暴露群で抗体産生細胞数の有意な減少が認められ、血中の抗体価もすべて低下の傾向を示し、特に暴露3日目では有意な低下がみられた。DNP-Ficoll抗原にたいする抗体産生能も同様に調べたが、抗体産生細胞数の減少はみられず、暴露14日目で増加が見られた。

これらの結果を、以前のNO₂あるいはO₃の単独ガス暴露の結果と比較すると、複合暴露により臓器湿重量においては著しい影響がみられるものの、抗体産生においては、ほぼ単独暴露と同程度の影響であった。

Abstract

To investigate the effect of subacute exposure to the combined gases of 4.0ppm NO₂ and 0.8ppm O₃ on immune responses, male BALB/c mice were continuously exposed for 3, 7 and 14 days. The wet weights of spleen and thymus in the exposed mice were decreased significantly in all exposure periods. On the other hand, the wet weights of lung in the exposed mice were markedly increased. In spleen of the exposed mice, the numbers of anti-sheep red blood cells (SRBC) plaque forming cells (PFC) were decreased in comparison with those in control mice. The numbers of anti-DNP PFC in the exposed mice were not decreased for 3 and 7 days exposure, but slightly increased on 14 days exposure compared to controls.

Compared with previous our results by a subacute exposure to NO₂ or O₃, subacute exposure to the combined gases of NO₂ plus O₃ severely affected the wet weights of spleen and thymus, but did not shown the marked suppression of antibody responses.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1 はじめに

現実の大気汚染により生体が被る影響は、ガス状物質、粒子状物質に含まれる多くの物質の複合暴露の結果として現れるものである。我々はこれまでに、生体の免疫機能：IgM、IgE 抗体産生能、遅延型過敏反応などに及ぼす NO₂ あるいは O₃ の単独ガス暴露の影響について報告した¹⁻⁶⁾。また、肺における重要な免疫機能を担っている肺胞マクロファージに及ぼす影響についても多くの報告がみられる⁷⁻¹¹⁾。

しかしながら、NO₂ と O₃ の複合暴露の免疫機能に及ぼす影響に関しては、感染抵抗性に対する影響を検索した Ehrlich らの報告^{12,13)} 以外にはあまりなく、不明な点が数多く残されている。本研究は、抗体産生能に及ぼす NO₂ と O₃ の複合ガス暴露の影響を検索し、それぞれの単独ガス暴露の結果との比較を目的として行われた。

2 材料と方法

実験動物は、BALB/c 雄マウス (8~12 週齢) を日本チャールスリバー(株)より購入し、餌と水は 2, 3 日おきに交換した。

NO₂ と O₃ の暴露は、これまでに報告した条件¹⁴⁾ で、3 日、7 日及び 14 日間行った。暴露直後にマウスをと殺し湿重量の測定を行った。抗体産生能の測定は既報¹⁴⁾ のごとく抗原として羊赤血球 (SRBC) と DNP-Ficoll を用い、ひ臓での抗体産生細胞数の算定法 (PFC) と血中抗体価の測定 (HA) を指標として行った。

3 結果と考察

4.0 ppm NO₂ と 0.8 ppm O₃ の複合ガス 3 日、7 日及び 14 日間暴露による体重と肺、ひ臓、胸腺それぞれの湿重量の変化を表 1 に示した。体重はすべての暴露期間で対照群と比べて減少していた。臓器については、肺は湿重量及び体重比とも有意な増加がみられた。ひ臓では、湿重量はすべての暴露期間で減少し、体重比も 3 日間暴露で減少がみられた。胸腺では、湿重量はすべての暴露期間で有意に減少し、体重比も、3 日目、7 日目で減少が見られた。これらの結果を NO₂ あるいは O₃ の単独ガス暴露の結果と比較したのが図 1 である。(a) はひ臓湿重量における変動、(b) は胸腺における湿重量の変動を現したものであるが、いずれの場合も明らかに、複合ガス暴露の場合が一番傷害の程度が大きい。しかしながら、3 日、7 日間暴露と比べ、14 日間暴露で対照群の値に近づく傾向にあることが認められる。

複合暴露後、SRBC と DNP-Ficoll の抗原を静注し、抗体産生能を測定した結果が表 2 に示してある。抗 SRBC 抗体産生は、PFC の数ではすべての暴露群で対照群と比べ低下しており、HA では、3 日目のみ有意な低下がみられた。他方、抗 DNP 抗体産生においては、PFC の数では 3 日目、7 日目とも対照群と比べて差がみられず、14 日間暴露ではやや増加がみられた。HA では、3 日間暴露で有意に低下している以外は、ほとんど差がみられなかった。

表 1 複合3日, 7日及び14日暴露による体重と肺, ひ臓, 胸腺それぞれの湿重量の変動

Table 1 Effects of 0.8ppm O₃ and 4ppm NO₂ on lung, spleen and thymus in mice^a

Day	Body Wt (g)	Lung Wt (mg)	Wt /Bw ^b	Spleen Wt (mg)	Wt /Bw	Thymus Wt (mg)	Wt /Bw
3D							
control	26.3±0.6	158.0±2.5	6.02±0.13	103.8±2.8	3.95±0.07	47.7±3.3	1.82±0.13
exposed	19.5±0.6**	226.8±9.8**	11.71±0.65**	51.7±2.2**	2.68±0.16**	13.2±1.0**	0.68±0.05**
7D							
control	26.9±0.4	177.7±4.6	6.62±0.22	105.0±6.3	3.92±0.27	50.6±3.4	1.88±0.11
exposed	21.8±0.8**	251.8±24.6*	11.42±0.71**	79.2±7.0*	3.59±0.19	11.6±0.7**	0.53±0.03**
14D							
control	26.6±0.4	156.8±1.3	5.90±0.10	97.7±4.4	3.66±0.12	40.0±2.1	1.50±0.06
exposed	23.7±0.6**	210.0±6.4**	8.89±0.36**	81.0±3.1*	3.44±0.18	32.5±2.1*	1.39±0.12

a Each value represents the mean±SE of six mice

b Organ to body weight ratio

* P<0.05 ** P<0.01

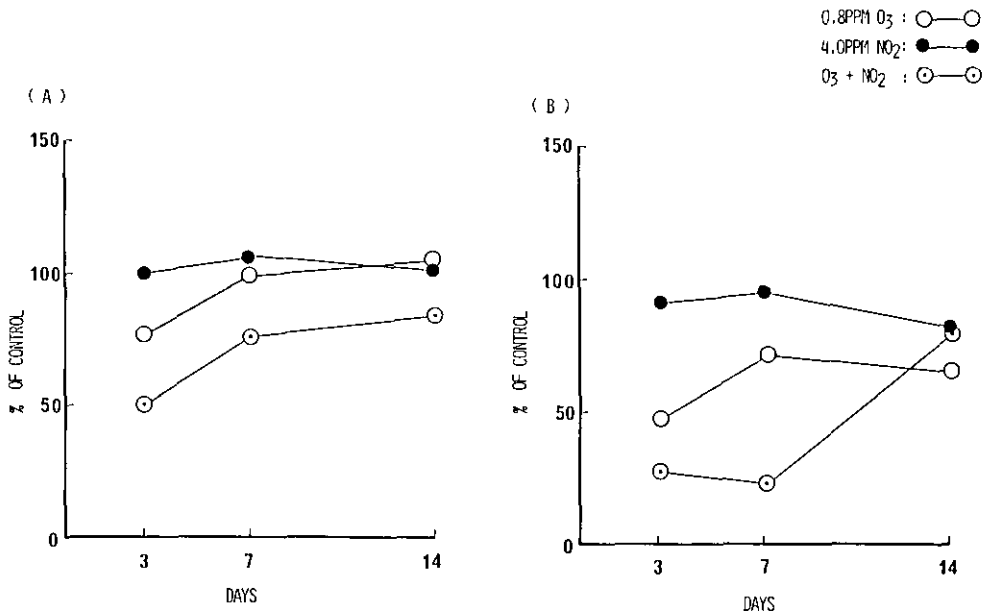


図 1 0.8ppm O₃ と 4.0ppm NO₂ の単独ガス暴露と複合ガス暴露との (a) ひ臓と (b) 胸腺湿重量に及ぼす影響の比較

Fig. 1 Comparison of the effects between a single and a mixture of O₃ and NO₂ exposure on wet weights of (a) spleen and (b) thymus

表 2 複合暴露の臓器での抗体産生に及ぼす影響

Table 2 Effect of 0.8ppm O₃ and 4ppm NO₂ on antibody response in mice

Day		Anti-SRBC PFC×10 ³ /spleen	HA	Anti-DNP PFC×10 ³ /spleen	HA
3	control	185±17	8.4±0.1	252±17	9.3±0.2
	exposed	111±21*	7.9±0.2*	278±32	8.4±0.2*
7	control	132±9	8.2±0.1	263±20	9.6±0.1
	exposed	83±6**	7.8±0.1	268±16	9.8±0.1
14	control	162±7	8.0±0.2	227±17	9.7±0.3
	exposed	95±10**	7.4±0.2	342±36*	9.3±0.3

* P<0.05 ** P<0.01

抗体産生細胞数 (PFC) への複合ガスあるいは単独ガス暴露の影響を比較したのが、図2である。(a)の抗SRBC PFCでは、複合ガス暴露の場合もO₃単独暴露の場合とほぼ同様の抑制が認められたが、(b)の抗DNP PFCではほとんど差がみられず14日間暴露でやや亢進する傾向が認められた。

以上の結果より、臓器レベルでは、複合ガス暴露は単独ガス暴露に比べて傷害がより増す傾向が見られたが、抗体産生能に関しては、ほぼ単独ガス暴露と同程度の影響を示すことがわかった。

Ehrlichら¹²⁾は、*Streptococcal pneumonia*に対する抵抗性について、NO₂とO₃の複合ガス暴露は、単独ガス暴露よりより強く抑制することを報告した。これは、本研究の臓器レベルでの結果と一致するが、抗体産生の結果のごとく、すべての反応が複合ガス暴露により相加、相乗的な反応を示すわけではない。

NO₂とO₃の複合ガス暴露ではないが、Aranyiら¹⁵⁾は、O₃とSO₂や(NH₄)₂SO₄との暴露の場合に、T細胞幼若化反応に及ぼす影響は、単独暴露では抑制するが、複合暴露では亢進するというように全く異なる結果がみられたことを報告している。

免疫反応をつかさどる多くの細胞の中でも、ガスの感受性にも当然差がみられ、我々のこれまでの研究⁴⁻⁶⁾で、O₃暴露では、B細胞に比べ、T細胞が影響を受けやすいことが明らかになっており、複合暴露の影響を予測する上でも、免疫機能に関する細胞間での感受性の差についての更に詳しい研究が必要と思われる。

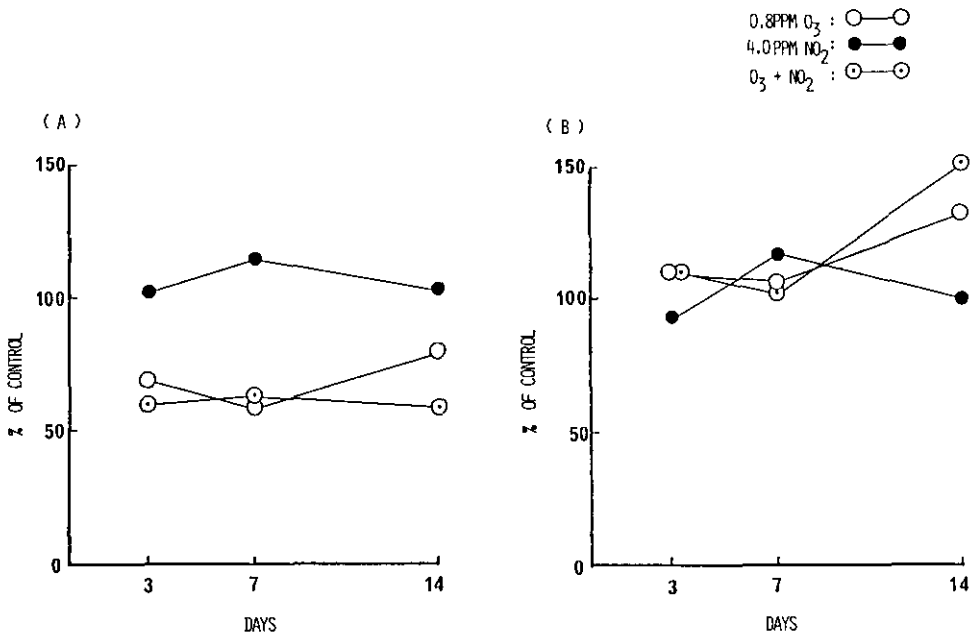


図 2 0.8ppm O₃ と 4.0ppm NO₂ の単独ガス暴露と複合ガス暴露との (a) 抗-SRBC と (b) 抗-DNP 抗体産生に及ぼす影響の比較

Fig. 2 Comparison of the effects between a single and a mixture of O₃ and NO₂ exposure on (a) anti-SRBC and (b) anti-DNP PFC responses

引用文献

- 1) Fujimaki, H. and F. Shimizu (1981): Effects of acute exposure to nitrogen dioxide on primary antibody response. Arch. Environ. Health, **36**, 114-119.
- 2) 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.
- 3) Fujimaki, H., F. Shimizu and K. Kubota (1982): Effect of subacute exposure to NO₂ on lymphocytes required for antibody responses. Environ. Res., **29**, 280-286.
- 4) Fujimaki, H., M. Ozawa, T. Imai and F. Shimizu (1984): Effect of short-term exposure to O₃ on antibody response in mice. Environ. Res., **35**, 490-496.
- 5) Ozawa, M., H. Fujimaki, T. Imai, Y. Honda and N. Watanabe (1985): Suppression of IgE antibody production after exposure to ozone in mice. Int. Archs. Allergy appl. Immun., **76**, 16-19.
- 6) Fujimaki, H., F. Shiraishi, T. Ashikawa, and M. Murakami (1987): Changes in delayed hypersensitivity reaction in mice exposed to O₃. Environ. Res., **43**, 186-190.
- 7) Coffin, D. L., D. E. Gardner, R. S. Holzman and F. J. Wolock (1968): Influence of ozone on pulmonary cells. Arch. Environ. Health, **16**, 633-636.

- 8) Christman, C. A., and L. W. Schwartz (1982): Enhanced phagocytosis by alveolar macrophages induced by short-term ozone insult. *Environ. Res.*, **28**, 241-250.
- 9) Acton, J. D. and Q. N. Myrvik (1972): Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **24**, 48-52.
- 10) Vassallo, C. L., B. M. Domm, R. H. Poe, and J. B. L. Gee (1973): NO₂ gas and NO₂⁻ effects on alveolar macrophages phagocytosis and metabolism. *Arch. Environ. Health*, **26**, 270-274.
- 11) Mochitate, K., Y. Takahashi, T. Ohsumi and T. Miura (1986): Activation and increment of alveolar macrophages induced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **17**, 229-239.
- 12) Ehrlich, R., J. C. Findlay, J. D. Fenters and D. E. Gardner (1977): Health effects of short-term inhalation of nitrogen dioxide and ozone mixtures. *Environ. Res.*, **14**, 2223-231.
- 13) Ehrlich, R. (1980): Interaction between environmental pollutants and respiratory infections. *Environ. Health Persp.*, **35**, 89-100.
- 14) 藤巻秀和・小澤 仁・今井 透・村上正孝 (1983): オゾン亜急性暴露の免疫応答に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第40号, 157-161.
- 15) Aranyi, C., S. C. Vana, P. T. Thomas, J. N. Bradof and J. D. Fenters (1983): Effects of subchronic exposure to a mixture of O₃, SO₂ and (NH₄)₂SO₄ on host defenses of mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **12**, 55-71.

II-11

ラット肺の異物代謝系に及ぼす二酸化窒素と
オゾンの複合亜急性暴露の影響

Effects of Subacute Exposures of Nitrogen Dioxide and Ozone Alone
or in Combination on Xenobiotic Metabolism of Rat Lungs

高橋勇二¹・三浦 卓¹

Yuji TAKAHASHI¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

JCI: Wistar系雄ラットに0.2 ppmO₃と1.2 ppmまたは4 ppmNO₂を1から3か月間単独あるいは複合暴露し肺の異物代謝系に対する影響を調べた。肺のホモジネートタンパク質量は4 ppmNO₂及び0.2 ppmO₃単独暴露3か月目に対照群の110%及び115%と増加した。更に、4 ppmNO₂と0.2 ppmO₃の複合暴露により対照群の120%と増加し、肺ホモジネートタンパク質量は複合暴露により相加的に増加する傾向を示した。ミクロソーム画分のタンパク質量及びNADPH-チトクロムP-450還元酵素活性に対してNO₂とO₃の複合効果は認められなかった。チトクロムP-450 (P-450)含量は、0.2 ppmO₃暴露1か月目に対照群の192%に増加した。4 ppmNO₂と0.2 ppmO₃の複合暴露群のP-450含量は対照群の169%でありO₃単独暴露群に比べて減少した。暴露2か月目にも同様の変化が認められた。

ベンゾピレン水酸化酵素(AHH)及び7-エトキシクマリン脱エチル化酵素(ECDE)活性は0.2 ppmO₃単独暴露により増加し、4 ppmNO₂単独暴露により低下した。NO₂とO₃の複合暴露によりAHH及びECDE活性はNO₂またはO₃単独暴露群の活性の中間の値を示し、NO₂とO₃の複合暴露はAHH及びECDE活性に対して相殺的に作用した。クマリン水酸化酵素(CH)活性はNO₂あるいはO₃単独暴露により低下した。NO₂とO₃を複合暴露したラット肺のCH活性はNO₂単独暴露の活性と変わりなく、複合効果は明らかでなかった。

これらの変化は、NO₂とO₃を複合暴露した場合、NO₂O₃はラット肺の異物代謝系に独立して作用することを示唆している。

Abstract

Male JCI: Wistar rats were exposed to 0.2 ppm ozone (O₃) and 1.2 ppm or 4.0 ppm nitrogen dioxide (NO₂) alone and in combination for 3 months to examine the effects of the single and the combined gases on the microsomal xenobiotic metabolizing systems of lungs.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

After 1 month exposure to 4 ppm NO₂ and 0.2 ppm O₃ alone, the protein content of homogenate increased to 110 % and 115 % of the control value, respectively. By exposure to the mixed gas of 4 ppm NO₂ and 0.2 ppm O₃, homogenate protein was additively increased to 120 % of the control value. The protein content of microsomal fraction and activity of NADPH-cytochrome P-450 reductase were not affected by exposures to NO₂ and O₃ alone and in combination.

The cytochrome P-450 content increased to 195 % of the control value after 1 month exposure to 0.2 ppm O₃ alone. After 1 month exposure to the mixed gas of 4 ppm NO₂ and 0.2 ppm O₃, the cytochrome P-450 content increased significantly to 169 % of the control value. The increases were much greater in an exposure to O₃ alone than that in exposure to O₃ and NO₂ in combination. A similar change was observed after 2 month exposures.

The activities of benzo (a) pyrene hydroxylase (AHH) and 7-ethoxycoumarin O-deethylase (ECDE) increased significantly after 1 and 2 months exposure to 0.2 ppm O₃ alone, and decreased after exposure to 4 ppm NO₂ alone. During exposures to the mixed gas of NO₂ and O₃, the activities of AHH and ECDE showed the intermediate value obtained by exposures to NO₂ and O₃ alone. The coumarin hydroxylase (CH) activity was decreased by exposure to NO₂ alone. Effects of combination with O₃ on this activity were not clear. These results show that the effect of O₃ on lung xenobiotic metabolizing systems forms contrast to NO₂, and show that an increasing tendency of xenobiotic metabolism after exposures to O₃ is lowered by combination with NO₂. And those changes may be due to an independent action of these two gases on the lung xenobiotic metabolizing systems.

In conclusion, the exposure to the mixed gas of NO₂ and O₃ had additive effects on xenobiotic metabolism of rat lungs. We shall propose model expression which explain effects of exposures to NO₂ and O₃ alone and in combination on xenobiotic metabolism of rat lungs.

1 はじめに

チトクロム P-450 (P-450) 及びその還元酵素群からなる代謝系は、生体に取り込まれた脂溶性化学物質の解毒を行う異物代謝系としての作用を有している¹⁾。環境中に存在する異物（化学物質）の毒性を考える上で、この代謝系は重要である。大気中に存在する主要なオキシダントである二酸化窒素 (NO₂) やオゾン (O₃) の単独暴露が肺の異物代謝系に影響を与えることがこれまでの我々の研究で明らかにされてきた²⁻⁵⁾。すなわち 1.2~6 ppm NO₂ を 4 日~3 か月間ラットに暴露すると 7-エトキシマリン脱エチル化酵素 (ECDE) 活性及びクマリン水酸化酵素 (CH) 活性が低下し、NO₂ の濃度を 10~15 ppm に増すと上記 2 種の酵素活性に加えて P-450 含量とベンゾピレン水酸化酵素 (AHH) 活性が低下した。また、0.1~0.4 ppm O₃ を 1 週から 3 か月間暴露すると P-450 含量、AHH 及び ECDE 活性が上昇した。今回、0.2 ppm O₃ と 1.2 ppm または 4 ppm NO₂ をラットに単独あるいは複合暴露し、肺の異物代謝系に与える NO₂ と O₃ の複合影響を調べた。

2 方法

2.1 暴露条件及び試料の採取

JCI: Wistar 系雄ラット (22 週齢) 計 90 匹を 5 群に分け (1) 対照空気, (2) 4 ppm NO₂, (3) 0.2 ppm O₃, (4) 1.2 ppm NO₂+0.2 ppm O₃, (5) 4 ppm NO₂+0.2 ppm O₃ を 1, 2 及び 3 か月間暴露した。暴露後, 1 群 6 匹のラットをチャンバーより取り出しエーテル麻酔下で頸動脈から採血してと殺した。肺を 0.95% NaCl 溶液を用いてかん流後, 4 倍量の 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.15 MKCl 溶液中でポッター・エルベジェム型テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。マイクロソーム画分はホモジネートを 10,000×g 15 分間遠心し, その上清を 105,000×g 60 分間遠心し調製した。

2.2 P-450 含量及び NADPH-チトクロム P-450 還元酵素活性の測定

P-450 の含量は, Omura と Sato の方法⁹⁾ で測定し, 分子吸光係数を 91 cm⁻¹mM⁻¹ として計算した。NADPH-チトクロム P-450 還元酵素活性は, Omura と Takesue の方法⁷⁾ に従い電子受容体としてチトクロム *c* を用いて測定をした。

2.3 異物代謝活性の測定

ECDE 活性は Aitio の方法⁸⁾ に従い測定した。AHH 活性は Dehnen らの方法⁹⁾ に従い測定した。CH 活性は Takahashi らの方法⁵⁾ に従い測定した。タンパク質量は Lowry らの方法¹⁰⁾ に従い測定した。チトクロム含量及び酵素活性はホモジネートタンパク質当たりで表した。

2.4 統計的検定法

対照群と暴露群の間の差の有意性の検定は Student の *t* 検定法を用いて行った。

3 結果

3.1 肺のホモジネート及びマイクロソーム画分のタンパク質量に及ぼす影響

図 1 に肺のホモジネートタンパク質量の変化を, 図 2 に肺のマイクロソーム画分のタンパク質量の変化を示した。ホモジネートのタンパク質量は 4 ppm NO₂ 暴露 2 か月目に対照群の 110% に増加した。0.2 ppm O₃ 暴露 2 及び 3 か月目に各々対照群の 118% 及び 115% に増加した。1.2 ppm NO₂+0.2 ppm O₃ の複合暴露 2 及び 3 か月目に対照群の 115% 及び 113% に増加した。4 ppm NO₂+0.2 ppm O₃ 暴露 1 から 3 か月目に対照群の 109% から 120% に増加し, 暴露 3 か月目に複合効果が認められた。また, マイクロソーム画分のタンパク質量は暴露 1 か月目に 0.2 ppm O₃ 群で対照群の 113% に増加した。暴露 2 か月目には各暴露群で対照群の 117% から 124% に増加した。しかし, 暴露 3 か月目には有意な変化を示さなかった。

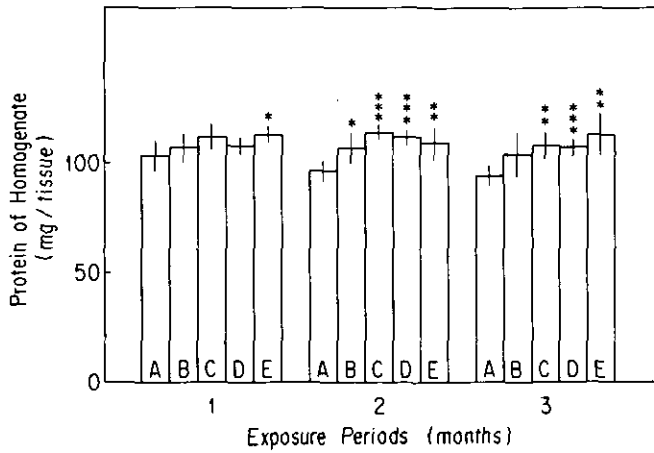


図 1 ホモジネートタンパク質量の変化

Fig. 1 Changes in protein contents of lung homogenate

Male wistar rats were exposed to filtered air (A), 4.0 ppm NO₂ (B), 0.2 ppm O₃ (C), 1.2 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ (D) and 4.0 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ (E) for 3 months. After exposure, protein contents of lung homogenates were measured under the section of the materials and methods. Values are expressed as mean ± SD (n=6). Significant differences between control and exposed values are shown as *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

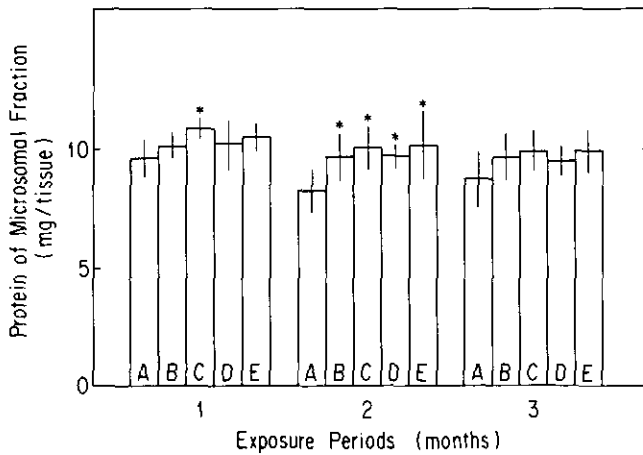


図 2 ミクロソーム画分のタンパク質量の変化

Fig. 2 Changes in protein contents of lung microsomal fraction

Experimental conditions are the same as in Fig. 1. Significant differences between control and exposed values are shown as *p < 0.05.

3.2 肺ミクロソームの P-450 含量及び NADPH-チトクロム P-450 還元酵素活性に及ぼす影響

図3に肺 P-450 含量の変化を示した。0.2 ppm O₃ 暴露 1 か月目に、P-450 含量は対照群の 192%に増加し、この増加は暴露 2 か月目にも認められた(対照群の 211%)。O₃ に 1.2 又は 4 ppm NO₂ を添加した複合暴露群の P-450 含量も対照群の 167%から 208%に増加した。しかし、4 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ 群の P-450 含量は O₃ 単独群の値に比較して有意に低かった。また、NO₂ 単独群の P-450 含量は対照群に比較して有意な変化を示さなかった。

図4に NADPH-チトクロム P-450 還元酵素活性の変化を示した。暴露 1 か月目に、1.2 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ 群及び 4 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ 群の NADPH-チトクロム P-450 還元酵素活性は対照群の各々 118%及び 110%に増加した。暴露 2 か月目には、各暴露群の活性とも対照群の 112%から 121%に増加したが、各群間に有意な変化は認められなかった。暴露 3 か月目には有意な変化は認められなかった。

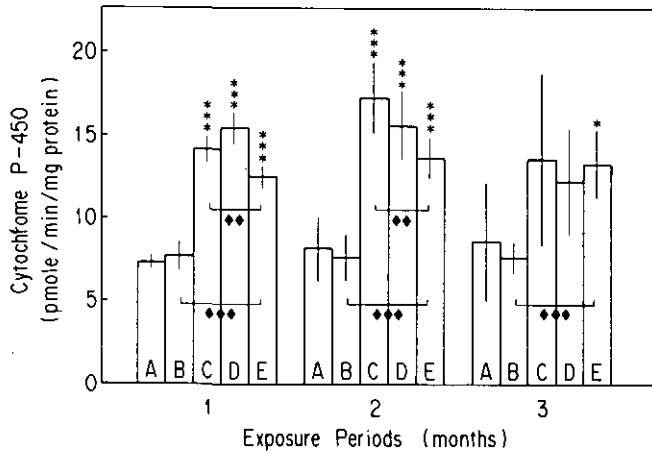


図 3 チトクロム P-450 含量の変化

Fig. 3 Changes in cytochrome P-450 contents of lung microsomes

Experimental conditions are the same as in Fig. 1. Significant differences between control and exposed values are shown as * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. And significant ones among groups exposed to NO₂ and O₃ alone and to the mixed gases are shown as ◆◆ $p < 0.01$, ◆◆◆ $p < 0.001$.

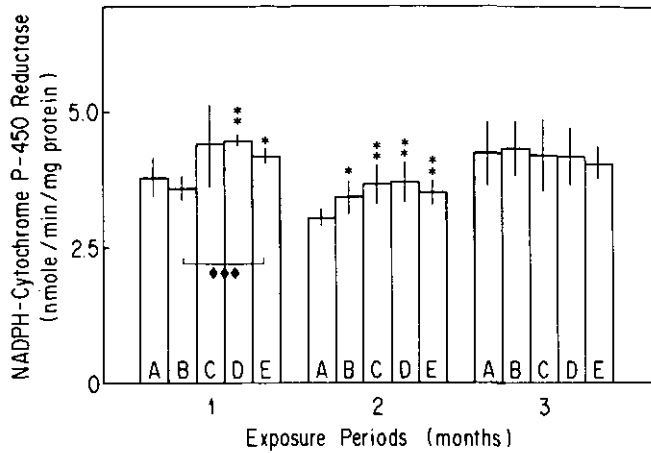


図 4 NADPH-チトクロム P-450 還元酵素活性の変化

Fig. 4 Changes in activities of NADPH-cytochrome P-450 reductase of lung microsomes

Experimental conditions are the same as in Fig. 1. Significant differences between control and exposed values are shown as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. And significant ones among groups exposed to NO_2 and O_3 alone and to mixed gases are shown as ◆◆ $p < 0.001$.

3.3 肺の異物代謝活性に及ぼす影響

図5にAHH活性の変化を示した。暴露1か月目に、0.2 ppm O_3 群のAHH活性は対照群の145%に増加した。4 ppm NO_2 暴露群のAHH活性は対照群の90%であった。4 ppm $\text{NO}_2 + 0.2$ ppm O_3 複合暴露群の活性値は対照群の128%と両単独群の中間値を示した。同様の変化が暴露2か月目にも認められた。暴露3か月目には有意な変化は認められなかった。図6にECDE活性値の変化を示した。暴露1か月目に、ECDE活性は4 ppm NO_2 単独暴露により対照群の69%に減少し、0.2 ppm O_3 単独暴露により対照群の137%に増加した。1.2または4 ppm NO_2 を O_3 に添加した複合暴露によりECDE活性は対照群のそれぞれ130%及び114%となり O_3 単独暴露に比べ添加した NO_2 濃度に依存して活性が低下した。4 ppm $\text{NO}_2 + 0.2$ ppm O_3 暴露群の活性値と NO_2 及び O_3 単独暴露群の活性値の差は有意であった。同様の変化が暴露2及び3か月目にも認められた。図7にCH活性の変化を示した。暴露1か月目に、CH活性は4 ppm NO_2 及び0.2 ppm O_3 単独暴露により対照群の43%及び75%に減少した。1.2または4 ppm NO_2 を O_3 に添加した複合暴露によりCH活性は対照群のそれぞれ70%及び41%となり O_3 単独暴露群に比べ添加した NO_2 濃度に依存して活性が低下した。4 ppm $\text{NO}_2 + 0.2$ ppm O_3 暴露群の活性値は NO_2 単独暴露群の活性値とほぼ等しかった。同様の変化が暴露2及び3か月目にも認められた。

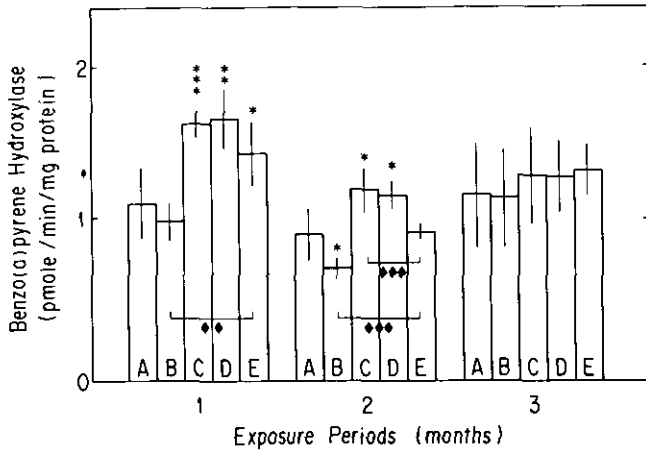


図 5 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性の変化
 Fig. 5 Changes in benzo(a)pyrene hydroxylase activities of lung microsomes

Experimental conditions are the same as in Fig. 1. Significant differences between control and exposed values are shown as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. And significant ones among groups exposed to NO_2 and O_3 alone and to mixed gases are shown as \blacklozenge $p < 0.01$ and $\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0.001$.

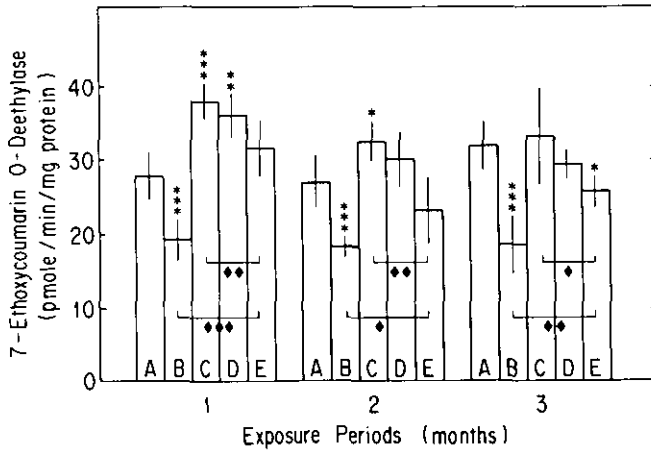


図 6 7-エトキシクマリン脱エチル化酵素活性の変化
 Fig. 6 Changes in 7-ethoxycoumarin O-deethylase activities of lung microsomes

Experimental conditions are the same as in Fig. 1. Significant differences between control and exposed values are shown as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. And significant ones among groups exposed to NO_2 and O_3 alone and to mixed gases are shown as \blacklozenge $p < 0.05$, $\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0.01$ and $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0.001$.

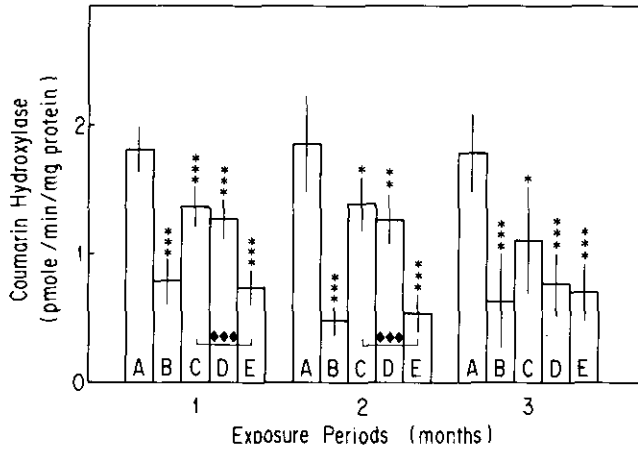


図 7 クマリン水酸化酵素活性の変化

Fig. 7 Changes in coumarin hydroxylase activities of lung microsomes

Experimental conditions are the same as in Fig. 1. Significant differences between control and exposed values are shown as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. And significant ones among groups exposed to NO_2 and O_3 alone and to mixed gases are shown as ◆◆◆ $p < 0.001$.

4 考 察

NO_2 と O_3 は共に酸化性のガスである。十数 ppm の NO_2 または 0.5~1.0 ppm の O_3 をラットに連続暴露すると暴露 1~2 日後に肺胞 I 型上皮細胞が傷害を受け、暴露 2~7 日目にかけてマクロファージと肺胞 II 型上皮細胞が増殖する。増殖したマクロファージは傷害を受けた I 型細胞を貪食し、肺胞 II 型上皮細胞は I 型細胞に分化し、肺胞が受けた傷害を修復する¹¹⁻¹³。今回の実験で NO_2 及び O_3 の単独または複合暴露により肺のホモジネート及びミクロソーム画分のタンパク質量が増加した。また、 NO_2 と O_3 の複合暴露 3 か月目にホモジネートタンパク質量は単独暴露群に比べ増加した。これらタンパク質量の増加は、マクロファージ及び肺胞上皮細胞数の増加を一部反映した結果と推定される。

これまで我々は、 NO_2 と O_3 は肺の異物代謝系に対して異なった影響を及ぼすことを示してきた²⁻⁵。1.2~15 ppm NO_2 暴露により異物代謝活性または P-450 含量は $\text{CH} > \text{ECDE} > \text{AHH} > \text{P-450}$ の順で低下した。また、0.1~0.4 ppm O_3 暴露によって $\text{P-450} > \text{AHH} > \text{ECDE} > \text{CH}$ の順に NO_2 とは逆に活性が増加した。今回の NO_2 または O_3 単独暴露がラット肺の異物代謝系に及ぼした影響はこれまで我々が得た結果とよく一致していた。 NO_2 と O_3 複合暴露 1 及び 2 か月目の P-450 含量、AHH 及び ECDE 活性は NO_2 と O_3 単独暴露群の中間値を示した。これらの結果は、 NO_2 と O_3 の異物代謝系に対する効果が独立して、しかも、逆方向に作用したため複合効果が相殺的に現れたものと考えられる。この相殺効果は相加効果の変形と考えられる。CH 活性に対する

NO₂ と O₃ の複合影響は NO₂ 単独の場合と同様であった。この原因については明らかでない。

NO₂ 暴露により肺の AHH, ECDE そして CH 活性は減少する方向へ、O₃ 暴露により AHH 及び ECDE 活性は増加する方向へ変化した。しかし、対照群に対する暴露群の相対活性値(%)は NO₂ 及び O₃ の単独または複合暴露のすべての群で AHH > ECDE > CH であった(表1)。NO₂ 及び O₃ の単独または複合暴露によって異物代謝の相対活性が同じ順序で変化した要因の一つは、NO₂ と O₃ に共通する酸化性ガスとしての性質によるものであろう。次に、同一暴露群の AHH, ECDE そして CH の相対活性の標準偏差を計算した(表1)。その値は、暴露1及び2か月目で、4 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ > 1.2 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ > 0.2 ppm O₃ > 4 ppm NO₂ の順序であり、暴露3か月目では、4 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ > 1.2 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ > 4 ppm NO₂ > 0.2 ppm O₃ であった。この順序は暴露したガスの酸化力とほぼ同一であり、各暴露群の AHH,

表 1 異物代謝活性の相対値の変動

Table 1 Changes in relative activities of xenobiotic metabolism of rat lungs during exposures to NO₂ and O₃

Exposure period	Groups	Percentile activities of xenobiotic metabolism			Mean	Standard deviation
		AHH	ECDE	CH		
1 month	Control	100	100	100	100	—
	4.0 ppm NO ₂	90	69	43	67	19.2
	0.2 ppm O ₃	145	137	75	119	31.2
	1.2 ppm NO ₂ + 0.2 ppm O ₃	148	130	70	116	33.4
	4.0 ppm NO ₂ + 0.2 ppm O ₃	128	114	41	94	38.1
2 months	Control	100	100	100	100	—
	4.0 ppm NO ₂	77	67	26	57	22.1
	0.2 ppm O ₃	131	120	75	109	24.2
	1.2 ppm NO ₂ + 0.2 ppm O ₃	127	112	68	102	25.0
	4.0 ppm NO ₂ + 0.2 ppm O ₃	102	85	29	72	31.2
3 months	Control	100	100	100	100	—
	4.0 ppm NO ₂	98	58	36	64	25.7
	0.2 ppm O ₃	110	104	63	92	20.9
	1.2 ppm NO ₂ + 0.2 ppm O ₃	110	92	43	82	28.3
	4.0 ppm NO ₂ + 0.2 ppm O ₃	113	80	40	78	29.9

AHH; benzo (a) pyrene hydroxylase, ECDE; 7-ethoxycoumarin O-deethylase, CH; coumarin hydroxylase.

Mean and standard deviation were calculated based on percentile activities of AHH, ECDE and CH in the same exposure condition.

ECDE 及び CH 活性の対照群に対する相対値の標準偏差は酸化性ガスの生体影響指標の一つになる可能性が示唆された。

NO₂ 及び O₃ がラット肺の異物代謝活性に及ぼす影響を数式を用いてモデル化して考えてみた。

$$O_3: IO_0 + UO_0 \quad (1)$$

$$NO_2: IO_N + UO_N + DL_N \quad (2)$$

$$NO_2 + O_3: \{(IO_0 + IO_N) + DL_N\} + \{UO_0 + UO_N\} \quad (3)$$

ここでは各指標を次のように定義した。

- I : 相対活性値の平均を増加させる作用
- D : 相対活性値の平均を減少させる作用
- U : 相対活性値の標準偏差を増大させる作用
- O : 酸化力に由来する影響
- L : P-450 分子との配位結合に由来すると考えられる影響
- n, o : NO₂ と O₃ の影響を示す添え字

O₃ がラット肺の異物代謝活性に及ぼす影響式(1)は、相対活性値の平均を増加させる作用(IO₀)と相対活性値の標準偏差を増大させる作用(UO₀)を加えたものである。この二つの作用は双方とも O₃ の酸化性ガスとしての性質(O)に由来する。NO₂ の影響式(2)は、NO₂ の酸化作用(IO_N + UO_N)と、NO₂ が P-450 分子に配位結合して P-450 を不安定化させ活性を低下させる作用(DL_N)を加えたものである。NO₂ と O₃ の複合影響式(3)は各要素が独立して作用していると考えられる。式(3)の前項{(IO₀ + IO_N) + DL_N}は異物代謝活性を増加させる作用(IO₀ + IO_N)と減少させる作用(DL_N)が相殺的に働くことを意味している。この例として、4 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ を1及び2か月暴露した群の ECDE 活性は NO₂ 単独暴露群より有意に高く O₃ 単独暴露群より有意に低い、対照群と比較して有意な変化は認められないことが挙げられる。また、この例は、DL_N の作用は IO_N に比べて大きい{IO_N < DL_N}ことを示している。式(3)の後項{UO₀ + UO_N}は、AHH, ECDE 及び CH 活性の対照群に対する相対値の標準偏差は複合暴露群で相加的に増大することを意味している。上記のモデル式は、NO₂ と O₃ がラット肺の異物代謝系に及ぼす影響を解明するための作業仮説を組み立てたものであり、今後さらにモデル式の妥当性を検討する必要がある。

結論として、ラット肺の異物代謝系に NO₂ と O₃ は独立して作用し、異物代謝系に対する NO₂ と O₃ の複合暴露影響は NO₂ と O₃ の相加影響として現れた。

引用文献

- 1) Philpot, R. M., M. W. Anderson and T. E. Dling (1977): Uptake, accumulation and metabolism of

- chemicals by the lung. *In: Metabolic Function of the Lung*. Y. S. Bakhle and J. R. Vane (ed.), Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 123-171.
- 2) Takahashi, Y. and T. Miura (1985): *In vivo* effects of nitrogen dioxide and ozone on xenobiotic metabolizing systems of rat lungs. *Toxicol. Lett.*, **26**, 145-152.
 - 3) Takahashi, Y., T. Miura and K. Kubota (1985): *In vivo* effect of ozone inhalation on xenobiotic metabolism of lung and liver of rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 855-864.
 - 4) Takahashi, Y., K. Mochitate and T. Miura (1986): Subacute effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung, liver and kidney of rats. *Environ. Res.*, **41**, 184-194.
 - 5) Takahashi, Y. and T. Miura (1987): Aselective enhancement of xenobiotic metabolizing systems of rat lungs by prolonged exposure to ozone. *Environ. Res.*, **42**, 425-434.
 - 6) Omura, T. and R. Sato (1964): Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
 - 7) 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.
 - 8) Aitio, A. (1978): A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal. Biochem.*, **85**, 488-491.
 - 9) Dehnen, W., R. Tomigas and J. Roos (1973): A modified method of the assay of benzo (a) pyrene hydroxylase. *Anal. Biochem.*, **53**, 373-383.
 - 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) Cabral-Anderson, L. J., M. J. Evans and G. Freeman (1977): Effects of NO_2 on the lungs of aging rats. I. Morphology. *Exp. Mol. Pathol.*, **27**, 353-365.
 - 12) Evans, M. J., N. P. Dekker, L. J. Cabral-Anderson and G. Freeman (1978): Quantitation of damage to the alveolar epithelium by means of Type 2 cell proliferation. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **118**, 787-790.
 - 13) Castlemal, W. L., D. L. Dungworth, L. W. Schwartz and W. S. Tyler (1980): Acute respiratory bronchiolitis. An ultrastructural and autoradiographic study of epithelial cell injury and renewal in rhesus monkeys exposed to ozone. *Am. J. Pathol.*, **98**, 811-840.

II-12

二酸化窒素とオゾンの単独及び複合暴露によるラットとモルモットの肺の
過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化

Changes of Lipid Peroxidation and Antioxidative Protective Systems
in Lungs of Rats and Guinea Pigs Exposed to Nitrogen Dioxide,
Ozone and Their Combined Gases

市瀬孝道¹・嵯峨井勝¹

Takamichi ICHINOSE¹ and Masaru SAGAI¹

要 旨

ラットとモルモットに2週間連続してNO₂とO₃(各0.4ppm)を単独あるいは複合暴露し、肺の過酸化脂質と抗酸化性防御系に及ぼす相加的あるいは相乗的効果を比較し、これら2種の動物の脂質過酸化の起こりやすさの原因について考察した。

肺の過酸化脂質の生成は、NO₂やO₃の単独暴露では両動物とも全く変化しないが、NO₂+O₃の複合暴露の場合にはモルモットだけが2.2倍に増加し、ラットでは全く変化しなかった。抗酸化性防御系酵素についてみると、GPx-CumeneとG6PDがNO₂とO₃の各単独暴露では両動物とも変化がないのに対し、NO₂+O₃ではラットで相乗的に増加していた。また、GPx-H₂O₂はモルモットでは欠損しているが、ラットではO₃単独の場合に有意に増加し、NO₂+O₃では相乗的に増加していた。しかし、モルモットではいずれも相乗的増加は認められなかった。また、抗酸化剤では、非タンパク質性SHとビタミンCがラットのO₃群で有意に増加し、NO₂+O₃群では相乗的に増加していたが、モルモットでは何の増加も認められなかった。

以上の結果から、ラットではNO₂暴露による変化はないが、O₃暴露で抗酸化性防御系因子が誘導され、さらにNO₂+O₃暴露ではこれらの因子が相乗的、相加的に増加するため、過酸化脂質の生成が起こりにくいと考えられる。しかし、モルモットではこれらの因子の誘導率がNO₂あるいはO₃群とともに低く、またNO₂+O₃の複合暴露によっても相乗あるいは相加効果を示さないことから、過酸化脂質が生成しやすいものと考えられる。

Abstract

We examined the changes of lipid peroxidation and antioxidative protective systems in lungs of rats and guinea pigs exposed to nitrogen dioxide, ozone and their combined gases for two weeks, and clarified the species differences of these animals in lipid peroxide formation. Lipid peroxide contents in the lungs of rats and guinea pigs exposed to 0.4ppm

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

NO₂ alone or O₃ alone and the contents of rats exposed to their combined gases did not change, but the contents of guinea pigs exposed to the combined gases were increased to 2.2 times height of the control levels.

Activities of selenium independent glutathione peroxidase (GPx-Cumene) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in lungs of each animal exposed to NO₂ or O₃ did not change, but those activities in lungs of rats exposed to the combined gases were increased.

Guinea pigs were lacking in the selenium dependent glutathione peroxidase (GPx-H₂O₂). The activity of GPx-H₂O₂ in lungs of rats exposed to O₃ increased significantly, and that of rats exposed to the combined gases showed significant increment. Activities of the protective enzymes in lungs of guinea pigs did not change. Contents of non-protein sulfhydryls (NPSH) and vitamin C in lungs of rats exposed to O₃ were increased significantly, and these contents were increased by the combined gases. These contents in guinea pigs did not change.

From these results, the increase of lipid peroxide level in guinea pigs exposed to the combined gases may be due to the low induction of the antioxidative protection factors and to the deficiency of GPx-H₂O₂.

1 はじめに

大気汚染物質に対する動物の種差や系統差に関する研究は、ヒトの健康に及ぼす影響を外挿するうえで重要である。大気汚染物質のNO₂やO₃に対する感受性が、動物の種やマウスの系統によって著しく異なること¹⁻⁴⁾はよく知られている。この感受性の一つとして過酸化脂質の生成が比較されることがある⁵⁻⁷⁾。

我々は先に、生理的条件のもとで、ウサギ、モルモット、ラット、ハムスター及びマウスの5種の動物の肺の過酸化脂質濃度が著しく異なること、すなわちウサギやモルモットの過酸化脂質濃度は低いのに対し、ハムスターやマウスの過酸化脂質濃度は高いことを報告した⁷⁾。

一方、0.4 ppm NO₂と0.4 ppm O₃の混合ガスをマウス、ハムスター、ラット及びモルモットの四種の動物に連続2週間暴露した場合、生理的条件下での肺の過酸化脂質が生成しづらいたと考えられたモルモットでは顕著に増加し、ハムスターやラットでは全く変化を示さないことを報告した⁸⁾。しかし、このような大気汚染物質に対する動物種の違いによる肺の脂質過酸化の起こりやすさの原因については、いまだ明らかではない。

本実験では肺の過酸化脂質が最も増加したモルモットと変化が見られなかったラットを用いて、NO₂とO₃(各0.4 ppm)を単独あるいは複合暴露し、肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化を調べ、これら大気汚染ガスの単独と複合暴露の場合の相加的あるいは相乗的效果を比較し、これら2種の動物の脂質過酸化の起こりやすさの原因について考察した。

2 材料と方法

動物はJCl: Wistar系ラットとHartley系モルモットの雄を用い、ラットは9週齢で、モルモットは13週齢で実験に供した。暴露実験は六錐型のステンレススチール・ガラスチャンパー

(1.63 m³) を用い、1群6匹として0.4 ppm NO₂ と0.4 ppm O₃ をそれぞれ単独あるいは複合して2週間暴露した。対照群は清浄空気を同一期間暴露した。これらの動物は暴露期間中、温度20~25°C、湿度50~70%、室内照明は14時間点灯、10時間消灯の条件下で飼育した。

暴露終了後、各々の動物をエーテル麻酔下で放血と殺し、左肺はかん流せずに摘出し、非タンパク質性SH(NPSH)、ビタミンE、ビタミンC量測定用とした。右肺は右心室から脱気後窒素ガスをバブリングし嫌氣的に調製した生理食塩水を右心室から注入し、肺をかん流してから摘出した。この右肺を抗酸化性酵素活性と過酸化脂質測定用とした。

肺は、上記のごとく嫌氣的に調製した50 mM Na, K-リン酸緩衝液 (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%ホモジネートとした。左肺のこの10%ホモジネートを200×g、5分間、遠心し、この上清を非タンパク質性SH(NPSH)、ビタミンE、VC量の測定に用いた。また、かん流した右肺の10%ホモジネートの200×g上清を過酸化脂質(TBA値)の測定に用いた。右肺の上清の残りは12,000×g、20分間遠心分離し、更にその上清を105,000×g、60分間超遠心分離し、この上清の一部を glutathione peroxidase (GPx), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), 及び glutathione S-transferase (GSH S-Tase) 活性の測定に用いた。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) で20時間透析 (透析外液は2度交換) し、superoxide dismutase (SOD) と disulfide reductase (DSR) 活性の測定に用いた。

肺のNPSH量の測定はDeLuciaら⁹⁾の方法、ビタミンCの測定はOmayeら¹⁰⁾の方法、また、ビタミンEの測定は阿部らの方法に従って測定した。肺のTBA値はOhkawaら¹¹⁾の方法に従い、励起波長515、蛍光波長553の相対蛍光強度を測定して求めた。GPx活性はcumene hydroperoxide及び過酸化水素を基質としてLittleら¹²⁾の方法、G6PD活性はWilhelmら¹³⁾の方法、6PGD活性は6-phosphogluconateを基質としてG6PDの測定法に従って測定し、GSH S-Tase活性はKaplowitzら¹⁴⁾の方法に従って測定した。また、SOD活性はMcCordとFridovich¹⁵⁾の方法、DSRはTietze¹⁶⁾の方法に従って測定した。DSR以外の酵素活性はすべて遠心方式のジュームサック自動分析装置を用い、30°Cで測定した。タンパク質の定量は牛血清アルブミンを標準物質としてLowryら¹⁷⁾の方法に従って行い、酵素活性はすべてmgタンパク質当たりの比活性で表示した。

3 結果

モルモットの生理的条件下での肺の抗酸化性防御系酵素活性と抗酸化性物質濃度及び過酸化脂質量とPI値はラットの各値を100%とした時の相対値として図1に示した。

NADPHを産生し、細胞の還元ポテンシャルの維持に働くG6PDと6PGD活性はモルモットの方がラットの値よりそれぞれ80%と31%程度高いが、過酸化脂質を代謝するGPx-Cumeneのモルモットの値はラットの21%に相当し、また、過酸化水素を分解するGPx-H₂O₂活性はモル

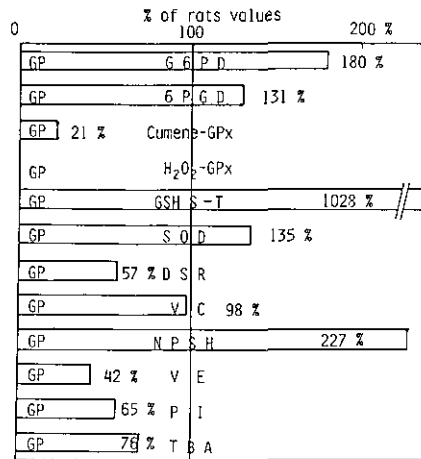


図 1 ラットとモルモットの生理的条件下での肺の抗酸化性防御因子と過酸化脂質値の比較

Fig. 1 The values of antioxidative protective factors and lipid peroxides in lungs of rats and guinea pigs under physiological status
The values of guinea pigs show percent ratio against the values of rats (100%).

モットでは欠損している。しかし、GPxと同様の反応によって過酸化物を代謝し得るとされているGSH-S-Tase活性はモルモットの値がラットより約10.3倍も高い。スーパーオキシド(O₂)を異性化し、過酸化脂質の生成を抑制するSOD活性はラットよりモルモットが35%高く、-SS一結合を還元して機能的SH基に変換するDSR活性はモルモットの方がラットに比べて43%程度低い。抗酸化剤のビタミンCは、モルモットでは体内では合成できないが、ラットとほぼ同じレベルに存在している。一方、NPSHはモルモットの値がラットに比べて約2.3倍高いのに対し、VEは逆にモルモットの値がラットより58%程度低い。また、過酸化脂質の起こりやすさを示す指標であるPI値はラットよりもモルモットの方が35%程度低く、肺の過酸化脂質量はモルモットの方が24%程度低いと良く対応している。

NO₂とO₃の単独及びNO₂+O₃の複合暴露によるラットとモルモットの肺の過酸化脂質生成を図2に示した。肺の過酸化脂質生成は、NO₂やO₃の暴露ではラットとモルモットともに全く変化しない。一方、NO₂+O₃暴露の場合でもラットでは変化が認められないが、モルモットでは約2.2倍に増加した。

ラットとモルモットの肺のGPx活性の変化を図3に示した。ラットの肺のGPx-CumeneとGPx-H₂O₂活性はNO₂暴露の場合よりO₃暴露で増加し、NO₂+O₃暴露では相乗的にさらに増加した。モルモットではGPx-H₂O₂が欠損しているが、GPx-Cumene活性はNO₂、O₃各暴露群で若干低下しているにもかかわらず、NO₂+O₃群では逆に有意に増加した。

ラットとモルモットの肺のG6PDと6PGD活性を図4に示した。ラットの肺のG6PDと

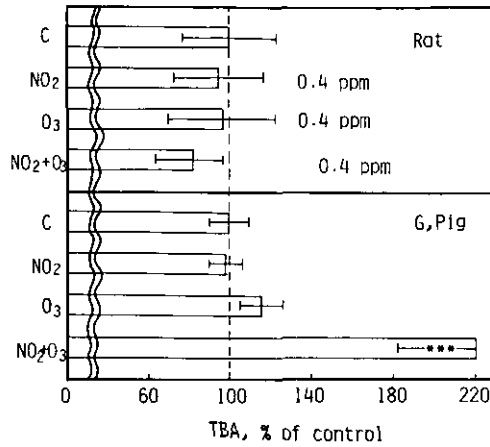


図 2 ラットとモルモットの肺の過酸化脂質量の変化

Fig. 2 Changes of TBA values in lungs of rats and guinea pigs

Control values were 38.63 and 29.33nmol/g. lung for rats and guinea pigs, respectively. The values are expressed as mean±SD. * * * : P<0.001.

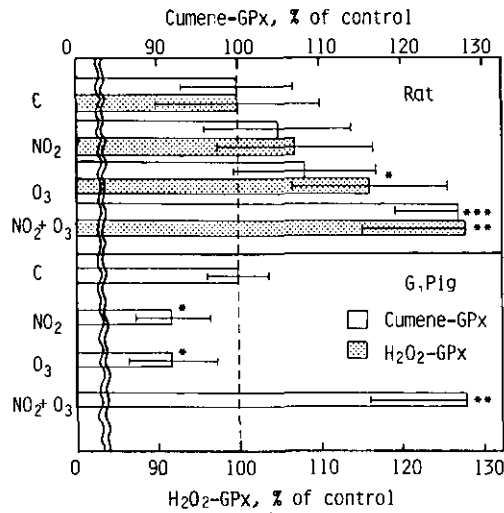


図 3 ラットとモルモットの肺のグルタチオン・ペルオキシダーゼ活性の変化

Fig. 3 Changes of glutathione peroxidase (GPx) activities in lungs of rats and guinea pigs

Control values of GPx-Cumene activity were 106.3 and 22.8nmol of NADP⁺ formed/mg · protein/min for rats and guinea pigs, and control values of GPx-H₂O₂ activity were 61.3 and 0 nmol of NADP⁺ formed/mg protein/min for rats and guinea pigs, respectively. □ ; GPx-Cumene, ▨ ; GPx-H₂O₂. The values are expressed as mean±SD, * P<0.05; **, P<0.01; * * *, P<0.001.

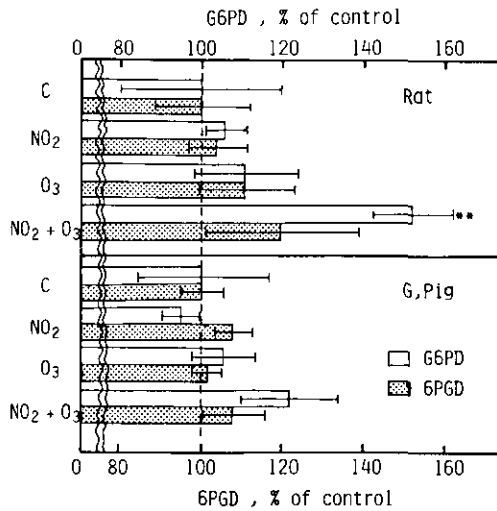


図 4 ラットとモルモットの肺のグルコース-6-リン酸脱水素酵素及び6-ホスホグルコン酸脱水素酵素活性の変化

Fig. 4 Changes of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in lungs of rats and guinea pigs

Control values of G6PD activity were 108.2 and 194.7nmoles of NADPH formed/mg protein/min for rats and guinea pigs, and control values of 6PGD activity were 127.8 and 167.9nmoles of NADPH formed/mg protein/min for rats and guinea pigs, respectively. □, G6PD; ▨, 6PGD. The values are expressed as mean±SD, **; P<0.01.

6PGD 活性も GPx 活性の場合同様に、NO₂ 暴露より O₃ 暴露で増加傾向を示しているが有意差はないのに対し、NO₂+O₃ 暴露では有意に増加し、G6PD 活性は相乗的増加を示した。モルモットでは、G6PD 活性が NO₂+O₃ 暴露で若干増加する傾向を示す程度であるが有意差はなく、NO₂ や O₃ の単独暴露では変化はなく、G6PD 活性も全く変化を示さなかった。ラットとモルモットの肺の DSR と SOD 活性の変化を図5に示した。ラットの DSR 活性と SOD 活性は NO₂ 暴露より O₃ で増加し、NO₂+O₃ 暴露では相加的増加を示した。一方、モルモットでは NO₂、O₃ 及び NO₂+O₃ 暴露のいずれの場合にも有意な増加は示さなかった。

ラットとモルモットの肺の GSH-Tase 活性とビタミン E 量を図6に示した。ラットとモルモットの活性は NO₂ 及び O₃ 暴露群とも対照群より低下し、NO₂+O₃ 暴露の場合にはラットでは対照値に戻るのに対して、モルモットでは O₃ 暴露と同レベルの低い値を示した。ビタミン E 量はラットで NO₂+O₃ 暴露群のみで8%程度ではあるが有意に増加していたのに対し、モルモットでは O₃ 暴露群で25%の有意な低下が認められただけで、他の群では変化がなかった。

ラットとモルモットの肺のビタミン C と NPSH 量の変化を図7に示した。ラットのビタミン

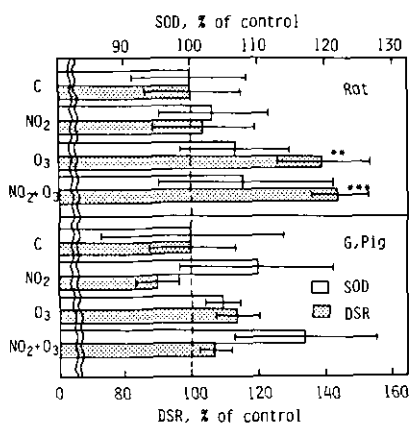


図 5 ラットとモルモットの肺のジスルフィド還元酵素活性とスーパーオキシド・ジスムターゼ活性の変化

Fig. 5 Changes of disulfide reductase (DSR) and superoxide dismutase (SOD) activities in lungs of rats and guinea pigs

Control values of DSR activity were 276.6 and 157.2 nmoles of cysteine formed/mg · protein/min for rats and guinea pigs, and control values of SOD activity were 48.8 and 65.8 units/mg · protein/min for rats and guinea pigs, respectively. □, SOD; ▨, DSR. The values are expressed as mean ± SD, ** : P < 0.01, *** : P < 0.001.

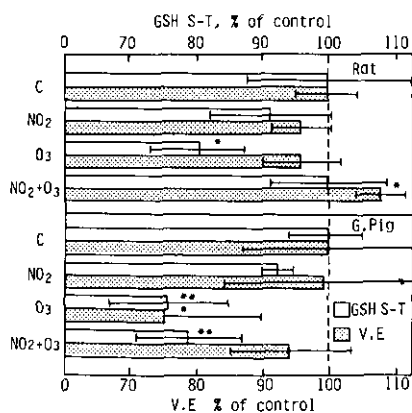


図 6 ラットとモルモットの肺のグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性とビタミン E 量の変化

Fig. 6 Changes of glutathione S-transferase (GSH S-Tase) activity and vitamin E (V. E) contents in lungs of rats and guinea pigs

Control values of GSH S-Tase activity were 138 and 1419 nmoles/mg protein/min for rats and guinea pigs, and control values of V. E were 20.5 and 8.6 μg/g · lung for rats and guinea pigs, respectively. □, GSH S-Tase; ▨, V.E. The values are expressed as mean ± SD, * , P < 0.05 ; ** , P < 0.01.

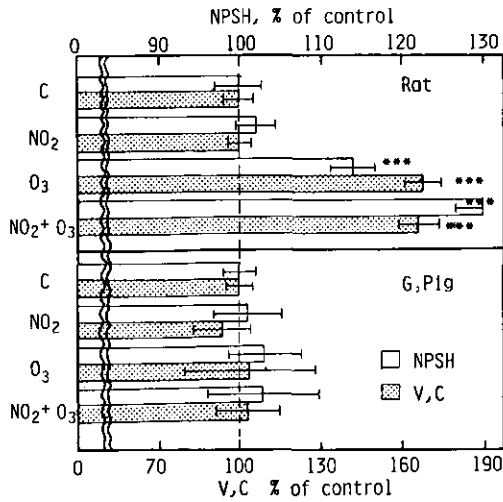


図 7 ラットとモルモットの肺の非タンパク質性SHとビタミンC量の変化

Fig. 7 Changes of nonprotein sulfhydryls (NPSH) and vitamin C (VC) contents in lungs of rats and guinea pigs

Control values of NPSH were 1.09 and 2.48 μ moles/g·lung, and control values of VC were 239.8 and 235.7 μ g/g·lung for rats and guinea pigs, respectively. □, NPSH; ▨, VC. The values are expressed as mean \pm SD. * * *, P < 0.001.

CはO₃単独暴露とNO₂+O₃暴露の場合で同じで、O₃単独暴露の効果が見られる。モルモットでは全く変化が見られない。NPSH量はラットではNO₂暴露では変化が見られないのに対してO₃暴露で有意に増加し、NO₂+O₃群では相乗的に増加している。これに対して、モルモットではNO₂、O₃及びNO₂+O₃の各群間で全く変化が認められない。

図8にNO₂とO₃の単独及び複合暴露によりラットとモルモットの肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化をまとめた。

4 考 察

本実験ではモルモットとラットを用いて、NO₂とO₃(各0.4 ppm)を単独あるいは複合暴露し肺の脂質過酸化と抗酸化性防御系の面から、これら大気汚染物質の単独及び複合暴露の場合の影響を比較し、これら2種の動物の脂質過酸化の起こりやすさの原因について検討した。

0.4 ppm NO₂と0.4 ppm O₃単独暴露を比較するとラットではGPx-Cumene, GPx-H₂O₂, G6PD, 6PGD, DSR及びSOD等の抗酸化性酵素やビタミンC, NPSH等の生体抗酸化剤はNO₂よりも、O₃暴露の方で誘導された。また、その誘導率の高いのはDSR, ビタミンC, NPSH等であった。これらの因子はO₃暴露による酸化的ストレスに対する重要な生体内抗酸化性因子と

	NO ₂ 0.4 ppm	O ₃ 0.4 ppm	NO ₂ + O ₃ 0.4 ppm
G 6 P D Rat G P	--	→	▲
6 P G D Rat G P	--	→	→
CumeneGPx Rat G P	↓	↓	▲
H ₂ O ₂ -GPx Rat G P	--	↑	▲
GSH S-T Rat G P	--	↓	↓
S O D Rat G P	--	--	--
D S R Rat G P	--	▲	▲
V C Rat G P	--	▲	▲
N P S H Rat G P	--	▲	▲
V E Rat G P	--	--	↑
T B A Rat G P	--	--	▲

→ non ↑↑ p<0.05 ▲↓ p<0.01 ▲ p<0.001

図 8 NO₂ と O₃ 単一及び複合暴露によるラットとモルモットの肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化

Fig. 8 Changes of lipid peroxidation and antioxidative protective systems in lungs of rats and guinea pigs exposed to nitrogen dioxide, ozone and their combined gases

考えられる。ラットの肺の GSH S-Tase は、我々が以前 10 ppm NO₂ 暴露で、低下することを報告した。本実験の 0.4 ppm NO₂ でも低下が認められ、さらに 0.4 ppm O₃ 暴露の場合でも低下が認められた。最近、平山ら¹⁸⁾は *in vitro* の実験で、ラット肝臓から生成した GSH S-Tase が O₂ や H₂O₂ あるいは過酸化脂質によって不活性化されることを報告している。O₃ 暴露の場合、ラットでは過酸化脂質は生成されず、GPx-H₂O₂ 活性に増加が認められていることから、H₂O₂ の産生が示唆され、O₃ 暴露による GSH S-Tase 活性の低下は H₂O₂ の産生による可能性が考えられる。また、GPx-H₂O₂ 活性の増加は発生した H₂O₂ を代謝するためのものと考えられよう。

NO₂+O₃ 暴露の場合では、GSH S-Tase は対照値に戻るのに対して、G6PD, GPx-cumene, GPx-H₂O₂ 等は更に相乗的に増加し、SOD, DSR 活性には相加的増加が認められた。また、ビタミン E は NO₂+O₃ 暴露のみで増加が認められた。これらのことから、このような防御因子の誘導は、O₃ 暴露の場合よりも NO₂ が加わることにより、更に相乗的、相加的に増加する酸化ストレスに対する生体の防御反応と考えられる。

一方、モルモットでは抗酸化性防御因子の誘導率が NO₂ あるいは O₃ 暴露群ともに低く、GPx-cumene 活性は NO₂, O₃ 暴露ともに低下し、GSH S-Tase 活性はラットよりも 10.3 倍高いものの O₃ 単独暴露の場合、その低下率はラットよりも高い。また、ビタミン C はラットと異なる

り体内で合成できないため、 O_3 暴露の場合でも誘導が認められない。 $NO_2 + O_3$ の複合暴露の場合、抗酸化性防御因子はラットのような相乗あるいは相加的誘導は示さなかった。また、ビタミンEはラットのような誘導は認められず、むしろ低下する傾向を示し、GSH S-Tase 活性はラットでは対照値に戻るのに対して、モルモットでは O_3 単独暴露同様、有意な低下を示した。唯一、増加が認められたのはGPx-cumeneのみであった。

図1に示すようにモルモットとラットの抗酸化性防御因子の正常値は相当異なり、モルモットではGPx- H_2O_2 が欠損しているが、GSH S-Tase 活性はラットよりも10.3倍高く、NPSH量も2.3倍高い。このような正常値の抗酸化性因子の値は、通常レベル以上に肺の過酸化脂質を増加させないためのものであると考えられる。酸化的ストレスが加わった場合、抗酸化性防御因子を誘導し得るかどうか、酸化的障害を受けやすいか、どうかを決定するものと考えられる。したがって、本実験の結果から、ラットでは大気汚染物質の酸化的ストレスの強さに対応して抗酸化性防御因子を誘導するために、脂質過酸化が起こりにくく、モルモットは NO_2 、 O_3 また、 $NO_2 + O_3$ の暴露の場合でもラットと異なり、肺の抗酸化性防御因子の誘導率が低いため肺の過酸化脂質が生成しやすく、酸化的障害を受けやすい動物であることが示唆された。

また、モルモットはヒトと同様ビタミンCを体内で合成できない。それゆえ大気汚染ガス暴露に対してビタミンCは誘導されない。ラットの場合、肺のビタミンCは O_3 暴露の効果のみが認められ、 NO_2 を加えた効果は認められなかったが、その誘導率は高い。また、ビタミンCを O_3 暴露前に投与することにより死亡率や肺水腫の形成が抑制されることが報告¹⁹⁾ されている。このようなことから、ビタミンCは大気汚染ガスによる酸化的障害に対する防御因子の中でも重要な因子であると考えられる。したがって、大気汚染地域の住民や喫煙者等はビタミンCをより多く摂取しなくてはならないのかもしれない。

引用文献

- 1) Goldstein, B.D., S.R. Ross and R.Cuzzi-Spanda (1973): Susceptibility of inbred mouse strain to ozone. *Arch. Environ. Health*, **27**, 412-413.
- 2) 竹中参二・堀内博人・清水不二雄(1979): 二酸化窒素急性暴露におけるゴールデンハムスターの高感受性. 国立公害研究所研究報告, 第8号, 7-25.
- 3) 竹中参二・堀内博人・今井 透・清水不二雄・村上正孝(1983): オゾン急性暴露に対する各種動物の感受性- NO_2 暴露との比較-. 国立公害研究所研究報告, 第40号, 139-146.
- 4) 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.
- 5) 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 Sci.*, **31**, 1963-1972.
- 6) Sagai, M and T. Ichinose (1987): Lipid peroxidation and antioxidative protection mechanism in rat lungs upon acute and chronic exposure to nitrogen dioxide. *Environ. Health Perspect.*, **73**, 179-189.

- 7) Sagai, M., K. Arakawa, T. Ichinose and N. Shimojo (1987): Biochemical effects of combined gases of nitrogen dioxide and ozone. I. Changes of lipid peroxides and phospholipids in lungs of various animals, *Toxicology*, **46**, 251-265.
- 8) Arakawa, K. and M. Sagai (1986): Species differences of lipid peroxide levels in lung tissue and investigation of their determining factors. *Lipids*, **21**, 769-775.
- 9) 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.
- 10) Omay, S.T., J.D. Turnbull and H.E. Sauberlich (1979): Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cell, tissues, and fluids. *In: Method in Enzymology*. D.B. McCormic., L.D. Wright (*ed.*), **62**,3-11.
- 11) Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- 12) Little, C. and P.J.O' Brien (1968): The effectiveness of a lipid peroxide in oxidizing protein and non-protein thiols. *Biochem. J.*, **106**, 419-423.
- 13) Wilhelm, L.G and H.D. Waller (1974): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *In: Methods of Enzymatic Analysis*. H.U. Bergmeyer (*ed.*), Vol. 2, 636-643.
- 14) Kaploeitz, N., J. Kuhlenkamp and G. Glifton (1975): Drug induction of hepatic glutathione S-transferase in male and female rats. *Biochem. J.*, **146**, 351-356.
- 15) McCord, J.M. and I. Fridovich (1969): Superoxide Dismutase: An enzymatic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.
- 16) Tietze, F (1970): Disulfide reduction in rat liver: Evidence for the presence of non specific nucleotide dependent disulfid reductase and glutathione-disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 177-188.
- 17) Lowry, O. H., J.J. Rosebrough., A.L. Farr and R.J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 18) 平山 伸・下条信弘・市瀬孝道・嵯峨井勝(1986): 過酸化脂質およびスーパーオキシドによるグルタチオンS-トランスフェラーゼアイソザイムの不活性化について. *過酸化脂質研究*, **10** (in press).
- 19) Matzen, R.N (1957): Effect of vitamin C and hydrocortisone on the pulmonary edema produced by ozone in mice. *J. Appl. Physiol.*, **11**, 105-109.

II-13

二酸化窒素とオゾンの複合暴露によるラット肺の
グルタチオン合成系酵素活性及びグルタチオン含量の変化
Effects of Exposures to Nitrogen Dioxide and Ozone in Combination
on the Activities of the Glutathione Synthesis Enzymes
and on the Levels of Glutathione in Rat Lungs

河田明治¹・高橋勇二¹・三浦 卓¹

Meiji KAWATA¹, Yuji TAKAHASHI¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

NO₂ と O₃ の複合暴露がラット肺のグルタチオン合成系酵素 (γ-グルタミルシステインシンテターゼ及びグルタチオンシンテターゼ) 活性に及ぼす影響について調べた。

0.2 ppm O₃, 0.2 ppm O₃ + 1.2 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ を 3 か月間暴露した場合、1.2 ppm NO₂ は 0.2 ppm O₃ のグルタチオン合成系酵素活性の増加作用を増幅させず、4.0 ppm NO₂ は 0.2 ppm O₃ の増加作用を増幅させたが、相加的には至らなかった。

NO₂ と O₃ の複合暴露がラット肺の還元型グルタチオン含量に及ぼす影響を検討した。還元型グルタチオン量として非タンパク性 SH 量を測定した。肺の非タンパク性 SH 含量は 0.2 ppm O₃, 4.0 ppm NO₂ 単独 4 週暴露で持続的に高いレベルに維持された。しかしながら 4.0 ppm NO₂ に 0.2, 0.4 ppm O₃ を複合し 4 週間暴露した場合、非タンパク性 SH 含量の増加はいずれの暴露群においても同程度であり、NO₂ による増加効果は O₃ の添加により増幅されなかった。

本研究の結果は NO₂ と O₃ の複合により増強された酸化性刺激に対して、本研究で観察された程度の GSH 合成系の亢進によって、GSH の合成が十分に促進されている可能性を示唆している。

Abstract

The effects of subacute exposures to NO₂ and O₃ in combination on the activities of glutathione synthesis enzymes (γ-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase) in rat lungs were investigated.

Male Jcl: Wistar rats were exposed to 0.2 ppm O₃, 0.2 ppm O₃ + 1.2 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂, and 4.0 ppm NO₂ + 0.2 ppm O₃ for 3 months. While 1.2 ppm NO₂ did not affect the effect of exposures to 0.2 ppm O₃ on the glutathione synthesis enzymes, 4.0 ppm NO₂

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2

Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

slightly enhanced the effect of 0.2 ppm O₃ on these enzymes.

Exposures to 4.0 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂+0.2 ppm O₃, and 4.0 ppm NO₂+0.4 ppm O₃ for 4 weeks, resulted in a 120-125% increase in the nonprotein sulfhydryl level in rat lungs.

1 はじめに

これまでの研究において、ラットやマウスに比較的低濃度の二酸化窒素(NO₂)又はオゾン(O₃)を暴露すると、肺の還元型グルタチオン(GSH)の増加することが明らかにされ、GSHの増加は酸化性刺激を検出する指標になると考えられてきた¹⁾。NO₂やO₃に対してGSHレベルが増加する機構は、酸化性刺激に対する生体防御機構の一つとして重要なものである。GSHはγ-グルタミルシステインシンターゼ及びグルタチオンシンターゼで構成されるグルタチオン合成系によってアミノ酸から合成される²⁻⁵⁾。そこで、ラット肺のGSHレベル及びグルタチオン合成系に及ぼすNO₂とO₃の単独及び複合での亜急性暴露の影響を検査した。

これまでに行ったNO₂又はO₃の単独暴露実験の結果から、ラット肺のGSHが増加する暴露濃度(4.0 ppm NO₂及び0.2, 0.4 ppm O₃)でグルタチオン合成系酵素活性もまた増加することを明らかにした^{6,7)}。本研究ではこれまで検討してきたNO₂、O₃の暴露実験の結果をもとに、NO₂とO₃との複合暴露がラット肺のグルタチオン合成系酵素活性並びにGSH含量に及ぼす影響を検討した。

2 方法

2.1 グルタチオン合成系酵素活性の測定

JCI: Wistar 系雄ラットを用い、22週齢において、0.2 ppm O₃, 0.2 ppm O₃+1.2 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂+0.2 ppm O₃を3か月間暴露した。ラットをエーテル麻酔し頸動脈から採血したのち、心臓から0.95% NaClを注入して肺をかん流した。採取した肺に0.15 M KCl-10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)を加えてホモジナイズし9 mlとした。ホモジネートを10,000×gで15分間遠心して得られた上清を105,000×gで60分間遠心し、上清を酵素液とした。肺のグルタチオン合成系酵素活性の測定は前報⁶⁾に従って行った。

γ-グルタミルシステインシンターゼ活性の測定では、1 M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.2) 0.1 ml, 0.05 M グルタミン酸 0.1 ml, 0.05 M α-アミノ酪酸 0.1 ml, 1% 牛血清アルブミン 0.1 ml, 酵素液 50 μl, H₂O 450 μl, 0.05 M ATP 0.1 mlを混和し、37°で60分間反応させた。グルタチオンシンターゼ活性の測定には、1 M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5) 0.1 ml, 基質として、0.05 M γ-グルタミル-α-アミノ酪酸 0.1 mlを用い、以下は前記と同様に反応を行った。反応終了後、それぞれの酵素反応液に1.8 M トリクロロ酢酸 0.1 mlを加え2,300×gで30分間遠心して得られる上清を分析用試料とした。それぞれの酵素反応によって生成するγ-グルタミル-α-アミノ酪酸及びγ-グルタミル-α-アミノブチリルグリシンを陽イオン交換樹脂カラム(Hitachi

Custom No. 2619) に充てんし, 0.14 M クエン酸緩衝液 (pH 3.2) で溶出分離後 835 型日立アミノ酸分析計により定量した。酵素活性は肺酵素液中に含まれるタンパク質量 (mg) 当たりで表した。タンパク質量は, Lowry ら⁸⁾ の方法に従って定量した。

2.2 非タンパク性 SH 含量の測定

JCl: Wistar 系雄ラットを用い, 13 週齢において 0.2 ppm O₃, 0.2 ppm O₃+4.0 ppm NO₂ を, また 19 週齢において 4.0 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂+0.4 ppm O₃ を 1, 2, 3, 4 週間暴露した。ラットをエーテルで麻酔し, 頸動脈から採血した後, 直ちに胸部を切開して採取した肺を -80°C に保存した。肺の非タンパク性 SH 含量は, 約 0.2 g の肺を 5 ml の 5% トリクロロ酢酸中で破碎し, ホモジネートを 2,300×g で 20 分間遠心して得た上清を用いて, Beutler の方法⁹⁾ を応用した DTNB 法¹⁰⁾ により求めた。

3 結果

NO₂ と O₃ の 1~3 か月間の複合暴露がラット肺の γ -グルタミルシステインシンターゼ活性に及ぼす影響について調べた結果を表 1 に示した。0.2 ppm O₃, 0.2 ppm O₃+1.2 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂ の各暴露群で γ -グルタミルシステインシンターゼ活性は対照群に対してそれぞれ 109~115%, 112~122%, 112~126% とほぼ同程度の有意な増加を示し, 3 か月間の暴露期間中一定の高い値が保持された。これに対して 4.0 ppm NO₂+0.2 ppm O₃ 群では酵素活性の増加率は 124~128% となり他の暴露群より高い値となった。

表 1 ラット肺の γ -グルタミルシステインシンターゼ活性に及ぼす NO₂ と O₃ の複合暴露の影響

Table 1 Effects of exposures to NO₂ and O₃ in combination on the activity of γ -glutamylcysteine synthetase of rat lungs

	1 month	(%)	2 months	(%)	3 months	(%)
Control	131 ± 4.2	(100)	126 ± 10.4	(100)	136 ± 10.8	(100)
0.2 ppm O ₃	145 ± 9.7*	(110)	137 ± 10.1	(109)	156 ± 16.3*	(115)
0.2 ppm O ₃ +						
1.2 ppm NO ₂	147 ± 13.9*	(112)	143 ± 12.5*	(114)	166 ± 9.3**	(122)
4.0 ppm NO ₂	148 ± 5.2***	(112)	158 ± 6.7***	(126)	153 ± 11.7*	(113)
4.0 ppm NO ₂ +						
0.2 ppm O ₃	168 ± 3.7***	(128)	155 ± 9.2***	(124)	171 ± 25.1*	(126)

Values were expressed as n mole/hr/mg protein (mean ± SD, n=6).

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

NO₂ と O₃ の 1~3 か月間の複合暴露がラット肺のグルタチオンシンターゼ活性に及ぼす影響の結果を表 2 に示した。0.2 ppm O₃, 0.2 ppm O₃+1.2 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂ の各暴露群でグルタチオンシンターゼ活性は対照群に対してそれぞれ 105~117%, 107~112%, 102~111% となり, 4.0 ppm NO₂+0.2 ppm O₃ 群では 114~120% に増加し, 他の暴露群よりわずかに高い値となった。

0.2 ppm O₃, 0.2 ppm O₃+4.0 ppm NO₂ の 4 週間暴露における肺の非タンパク性 SH 含量に及ぼす影響を表 3 に示した。暴露群の非タンパク性 SH 含量は対照群に対して有意に増加し, 増加率は 0.2 ppm O₃ 群, 0.2 ppm O₃+4.0 ppm NO₂ 群でそれぞれ 107~112%, 120~125% となった。このように複合暴露群の方が 0.2 ppm O₃ 単独暴露群より高い増加率を示したが, その値は暴露

表 2 ラット肺のグルタチオンシンターゼ活性に及ぼす NO₂ と O₃ の複合暴露の影響

Table 2 Effects of exposures to NO₂ and O₃ in combination on the activity of glutathione synthetase of rat lungs

	1 month	(%)	2 months	(%)	3 months	(%)
Control	126±4.3	(100)	124± 5.1	(100)	122±15.5	(100)
0.2 ppm O ₃	132±8.2	(105)	138± 6.8*	(111)	142±11.1*	(117)
0.2 ppm O ₃ +						
1.2 ppm NO ₂	135±7.8*	(107)	133± 9.9	(107)	136± 5.2	(112)
4.0 ppm NO ₂	129±7.2	(102)	138± 3.6***	(111)	130± 2.4	(107)
4.0 ppm NO ₂ +						
0.2 ppm O ₃	144±9.1**	(115)	141±11.7*	(114)	146± 8.4*	(120)

Values were expressed as n mole/hr/mg protein (mean±SD, n=6).

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

表 3 ラット肺の非タンパク性 SH 含量に及ぼす 4.0 ppm NO₂ と 0.2 ppm O₃ の複合暴露の影響

Table 3 Effects of exposures to 4.0 ppm NO₂ and 0.2 ppm O₃ in combination on nonprotein sulfhydryl (NPSH) level in rat lungs

	1 week	(%)	2 weeks	(%)	3 weeks	(%)	4 weeks	(%)
Control	1.70±0.07	(100)	1.64±0.04	(100)	1.66±0.06	(100)	1.59±0.07	(100)
0.2 ppm O ₃	1.83±0.07*	(108)	1.76±0.06**	(107)	1.86±0.04***	(112)	1.70±0.07	(107)
0.2 ppm O ₃ +								
4.0 ppm NO ₂	2.04±0.05***	(120)	2.02±0.06***	(124)	2.01±0.09***	(121)	1.99±0.13***	(125)

Values were expressed as μ mole/g lung (mean±SD, n=6).

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

表 4 ラット肺の非タンパク性 SH 含量に及ぼす 4.0 ppm NO₂ と 0.4 ppm O₃ の複合暴露の影響Table 4 Effects of exposures to 4.0 ppm NO₂ and 0.4 ppm O₃ in combination on nonprotein sulfhydryl (NPSH) level in rat lungs

	1 week	(%)	2 weeks	(%)	3 weeks	(%)	4 weeks	(%)
Control	1.63±0.07	(100)	1.63±0.07	(100)	1.46±0.01	(100)	1.34±0.05	(100)
4.0 ppm NO ₂	1.97±0.07***	(121)	1.97±0.05***	(121)	1.75±0.07***	(120)	1.67±0.10***	(125)
4.0 ppm NO ₂ + 0.4ppmO ₃	1.96±0.06***	(120)	1.97±0.04***	(121)	1.69±0.07***	(116)	1.67±0.04***	(125)

Values were expressed as μ mole/g lung (mean±SD, n=6), ***p<0.001

期間中一定に維持された。

4.0 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂+0.4 ppm O₃ の 4 週間暴露における肺の非タンパク性 SH 含量に及ぼす影響を表 4 に示した。暴露群の非タンパク性 SH 含量は有意に増加し、対照群に対する増加率は 4.0 ppm NO₂ 群, 4.0 ppm NO₂+0.4 ppm O₃ でそれぞれ 120~125%, 116~125% となった。

4 考 察

先に⁷⁾ NO₂ 又は O₃ の 1~3 か月間の単独暴露で、ラット肺の γ -グルタミルシステインシンターゼ活性は、0.4, 1.2, 4.0 ppm 暴露では 4.0 ppm 群のみ有意に増加し(対照群の 112~116%), 0.2, 0.4 ppm O₃ 暴露ではすべての暴露群において有意に増加する(対照に対しそれぞれ 105~107%, 110~114%) ことを報告した。この結果と表 1 より、1.2 ppm NO₂ は複合においても 0.2 ppm O₃ の γ -グルタミルシステインシンターゼ活性に対する増加作用に有意な影響を及ぼさず、また 4.0 ppm NO₂ は 0.2 ppm O₃ との複合で影響を増加させるが相加的には至らないことが明らかになった。

また前報⁷⁾ で NO₂ 又は O₃ の 1~3 か月間の単独暴露で肺のグルタチオンシンターゼ活性は、0.4, 1.2, 4.0 ppm NO₂ 暴露におけるすべての暴群で有意な増加が見られなかったが、0.2, 0.4 ppm O₃ 暴露では有意に増加する(対照群に対してそれぞれ 105~107%, 110~114%) ことを示した。この結果と表 2 より、1.2 ppm NO₂ は複合においても 0.2 ppm O₃ のグルタチオンシンターゼ活性に対する増加作用に影響を及ぼさず、また 4.0 ppm NO₂ は 0.2 ppm O₃ との複合でも相加的な増加効果を示さなかった。NO₂ 又は O₃ の単独暴露で GSH 含量及びグルタチオン合成系酵素活性が増加するが、NO₂ と O₃ の複合によって相加的に増幅されない原因の一つは、NO₂ あるいは O₃ の単独での刺激に対して GSH 合成系が過剰に亢進することによると考えられる。

NO₂ と O₃ の複合暴露がラット肺の非タンパク性 SH 含量に及ぼす影響については、表 3, 4 より、4.0 ppm NO₂, 4.0 ppm NO₂+0.2 ppm O₃, 4.0 ppm NO₂+0.4 ppm O₃ の 1~4 週間暴露で

べての暴露群の非タンパク性 SH 含量は対照群の約 120~125%の範囲で有意に増加したことから、0.2 ppm O₃、0.4 ppm O₃ のいずれにおいても、4.0 ppm NO₂ の GSH 含量に及ぼす影響を増加させる効果は認められなかった。この現象は、NO₂ と O₃ の複合により増強された酸化性刺激に対して本研究で観察された程度の GSH 合成系の亢進によって、GSH の合成が十分に促進されている可能性を示唆している。

引用文献

- 1) 河田明治 (1983): 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. 国立公害研究所研究報告, 第 40 号, 319-326.
- 2) Sies, H. and A. Wendel (*eds.*) (1987): *Functions of Glutathione in Liver and Kidney*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 212p.
- 3) Meister, A. and S. S. Tate (1976): Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 559-604.
- 4) 立石紀子・東 胤昭・坂本幸哉 (1980): グルタチオンの栄養生化学. 代謝, **17**, 2163-2172.
- 5) Meister, A. (1983): Metabolism and transport of glutathione and other γ -glutamyl compounds. *In: Functions of Glutathione: Biochemical, Toxicological, and Clinical Aspects.*, A. Larsson, S. Orrenius, A. Holmgren and B. Mannervik (*eds.*), Raven Press, New York, 1-22.
- 6) 河田明治・高橋勇二・三浦 卓 (1986): グルタチオン合成系酵素活性測定法の開発, 並びにラットの各種臓器における合成酵素活性に及ぼす二酸化窒素又はオゾン暴露の影響. 国立公害研究所研究報告, 第 101 号, 205-215.
- 7) 河田明治・高橋勇二・三浦 卓 (1986): 二酸化窒素又はオゾンの亜急性暴露がラット肺のグルタチオン合成系酵素活性に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第 101 号, 217-223.
- 8) 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.
- 9) Beutler, E. (1975): *Red Cell Metabolism*. 2nd ed., Grune and Strotton, 112p.
- 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.

II-14

老齡ラットに及ぼす二酸化窒素とオゾンの影響 I
—— Ht 値と臓器重量の変化 ——

Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on Aged Rats I
—— Changes in the Ht Value and Tissue Weight ——

三浦 卓¹・高橋勇二¹・国本 学¹・持立克身¹・河田明治¹
彼谷邦光¹・野原恵子¹・伊藤勇三²・高橋 弘²
Takashi MIURA¹, Yuji TAKAHASHI¹, Manabu KUNIMOTO¹
Katsumi MOCHITATE¹, Meiji KAWATA¹, Kunimitsu KAYA¹
Keiko NOHARA¹, Yuzo ITO² and Hiroshi TAKAHASHI²

要 旨

12-30 か月齢の JCI: Wistar 系雄ラットに NO₂ (1.2 及び 4.0 ppm) を 3 か月間又は O₃ (0.1 及び 0.2 ppm) を 4 週間暴露した。肺の湿重量は、4 ppm NO₂ 暴露によって 14 か月齢ラットで 3 か月目にのみ増加したが、24 か月齢ラットで 2 及び 3 か月目に増加し 1.2 ppm NO₂ 暴露でも増加した。O₃ 暴露は、12 及び 17 か月齢ラットの肺湿重量に影響を及ぼさなかったが、23 か月齢ラットの肺湿重量は 0.1 及び 0.2 ppm O₃ で有意に増加した。心臓及び腎臓の湿重量も、NO₂, O₃ 暴露で加齢に依存して増加した。

血液の Ht 値は、14 か月齢ラットでは 4 ppm NO₂ 暴露によって有意に増加した。逆に 23 か月齢ラットでは 1.2 及び 4 ppm NO₂ 暴露によって減少し、Hb 値の減少も観察された。O₃ 暴露の場合、12 か月齢ラットでは Ht 値及び Hb 値共に影響を受けなかったが、17 か月齢ラットで 0.2 ppm O₃ により減少し、23 か月齢ラットで 0.1 及び 0.2 ppm O₃ により減少した。

以上の結果は、肺等の臓器湿重量の増加及び血液の Ht 値、Hb 値の減少という点で、老齡は比較的低濃度の NO₂, O₃ 亜急性暴露に対して高感受性要因となる可能性を示している。

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川 16 番 2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies. 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川 16 番 2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies. 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Abstract

Male JCl: Wistar rats (12-30 months old) were exposed to either nitrogen dioxide (NO_2 , 1.2 and 4.0 ppm) for 3 months or ozone (O_3 , 0.1 and 0.2 ppm) for 4 weeks. The lung wet weight of senescent (24 months old) rats increased at the second and third months of exposures to 4 ppm NO_2 , while that of adult (14 months old) rats increased only 3 months after exposure to 4 ppm NO_2 . Exposures to 0.1 and 0.2 ppm O_3 also resulted in an increase in the lung wet weight of senescent (23 months old) rats, whereas they did not affect that of adult (12 and 17 months old) rats. The wet weights of heart and kidney too increased in an age-dependent fashion.

The Ht value of adult rats increased upon 2-months exposure to 4 ppm NO_2 . In contrast, that of senescent rats decreased at the second month of exposure to 1.2 ppm NO_2 and at the third month of exposure to 4 ppm NO_2 , in which the Hb value was also decreased. Similarly, exposures to 0.1 and 0.2 ppm O_3 resulted in a decrease in the Ht and Hb values of senescent rats, whereas these values did not alter in 12 months old rats.

These results show that aging leads to higher susceptibility to exposures to NO_2 and O_3 with regard to increase in the tissue weight and decrease in the Ht and Hb values.

1 はじめに

大気汚染物質の生体影響の発現については高感受性要因の存在する可能性が考えられている。現実に存在するような低レベルの大気汚染の場合、特に影響発現に占める高感受性要因の役割が大きくなると考えられる。しかしながら、大気汚染に対して高感受性となる機構については、いまだほとんど解明されていない。

生物学的な老化は、生体内組織の更新が適切に行われなくなることに密接に関連していると一般的に考えられている¹⁾。老齢の人や動物に特徴的な病理学的変化は、臓器の幹細胞が活発に増殖している状態から増殖できない状態へと移行して臓器の更新能力が低下することに起因している。この現象は、赤血球の幹細胞で典型的に観察されている²⁾。したがって、大気汚染物質が細胞に損傷をもたらす場合、老齢動物では修復能力が低下しており、細胞数の減少を招く可能性が考えられる。これまでに、老齢ラットは若齢に比べ NO_2 により肺の細胞傷害が起こりやすく、死亡率も上昇することが報告されている³⁻⁵⁾。また、老齢マウスでは、肺の傷害の程度も大きく修復されにくいことも明らかにされている⁶⁾。

本研究は、代表的な大気汚染物質である二酸化窒素 (NO_2) とオゾン (O_3) の影響が動物の加齢によりどのように修飾されるかを明らかにすることを目的としている。比較的低濃度の NO_2 や O_3 を成熟及び老齢ラットに暴露すると、老齢ラットに特異的な影響が臓器重量及び血液の Ht 値に観察された。

2 材料と方法

2.1 暴露条件及び試料の採取

JCl: Wistar 系雄ラット (6-10 週齢) を動物実験施設内のバリアー飼育室で 12-30 か月齢まで

飼育し、暴露実験に供した。ガス暴露は、 O_3 (0.1 ± 0.005 及び 0.2 ± 0.01 ppm) を 4 週間又は NO_2 (1.2 ± 0.06 及び 4.0 ± 0.2 ppm) を 3 か月間行った。経時的に暴露チャンバーより一群 6-8 匹の動物を取り出し、エーテル麻酔下で採血と殺後、臓器を分離して湿重量を測定した。また、ヘパリン血について Ht 値及び Hb 値を測定した。

2.2 有意差の検定法

対照群と暴露群の間の差の有意性は、分散の比を分析後、Student 又は Welch の *t* 検定法で調べた。

3 結果

3.1 NO_2 暴露の臓器重量に及ぼす影響

14 及び 24 か月齢ラットに 1.2 又は 4.0 ppm NO_2 を暴露した過程で、24 か月齢ラットのみ 72 匹中 14 匹が死亡した。解剖を行った 13 例中 11 例は、下垂体腫瘍を主症状とした死亡であった。また、13 例全例に感染症と疑われる所見は認められなかった。

体重は、4 ppm NO_2 暴露 2 か月目に対照群の 90% ($p < 0.05$) に低下した以外は有意な変化を示さなかった。表 1 に、臓器重量の変化を示した。肺の湿重量は、14 か月齢ラットでは 4 ppm NO_2 暴露 3 か月目に対照群の 114% ($p < 0.01$) に増加した。一方、24 か月齢ラットでは、暴露 2 か月目に 4 ppm NO_2 暴露群で対照群の 113% ($p < 0.05$) に増加し、暴露 3 か月目には 1.2 及び 4 ppm NO_2 暴露群で対照群の各々 110% ($p < 0.01$) 及び 111% ($p < 0.01$) であった。腎臓の湿重量は、24 か月齢ラットで増加傾向が認められ、4 ppm NO_2 暴露 2 か月目に対照群の 111% ($p < 0.05$) となった。24 か月齢ラットの場合、心臓の湿重量の増加も観察された。4 ppm NO_2 暴露群で 1 か月目に対照群の 108% ($p < 0.05$) に増加し、1.2 ppm 暴露群で 2 か月目に 110% ($p < 0.05$) となった。肝臓の湿重量は、有意な変化を示さなかった。

3.2 O_3 暴露の臓器重量に及ぼす影響

12, 17 及び 23 か月齢ラットに 0.1 又は 0.2 ppm O_3 を暴露した過程で、23 か月齢ラットで 72 匹中 2 匹の死亡があった。全死亡例に感染症と疑われる所見は認められなかった。

体重は、すべての暴露群で有意な変化を示さなかった。表 2 は、肺及び腎臓の湿重量の変化を示した。肺の湿重量は 12 及び 17 か月齢ラットでは O_3 暴露により有意な変化を示さなかった。23 か月齢ラットでは 0.2 ppm O_3 暴露群で 2 週目に対照群の 120% ($p < 0.01$) に増加し、0.1 ppm O_3 暴露群で 4 週目に 112% ($p < 0.05$) に増加した。腎臓の湿重量は、12 か月齢ラットでは O_3 暴露により有意な変化を示さなかった。17 か月齢ラットでは 0.2 ppm O_3 暴露 4 週目に対照群の 106% ($p < 0.05$) に増加し、23 か月齢ラットでは 0.2 ppm O_3 暴露 1 週目に 119% ($p < 0.01$) に増加した。肝臓及び心臓の湿重量は有意な変化を示さなかった。

表 1 1.2 及び 4.0 ppm NO₂ の 3 か月暴露による臓器重量の変化Table 1 Changes in the tissue weight during three-month exposures to 1.2 and 4.0 ppm NO₂

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)		
	Control	1.2 ppm	4.0 ppm
LUNG			
14-months old			
1 month	2.81±0.22	2.53±0.19** (90)	2.66±0.18 (95)
2 months	2.86±0.58	2.71±0.51 (95)	2.73±0.23 (95)
3 months	2.57±0.27	2.78±0.32 (108)	2.93±0.22** (114)
24-months old			
1 month	2.59±0.29	2.77±0.25 (107)	2.65±0.21 (102)
2 months	2.87±0.42	2.90±0.25 (101)	3.24±0.28* (113)
3 months	2.93±0.24	3.22±0.10** (110)	3.24±0.24** (111)
KIDNEY			
14-months old			
1 month	6.15±0.52	5.89±0.52 (96)	6.02±0.67 (98)
2 months	5.50±0.62	5.67±0.42 (103)	6.66±0.41 (103)
3 months	5.67±0.44	5.75±0.28 (101)	5.70±0.30 (100)
24-months old			
1 month	6.34±0.72	6.77±0.75 (107)	6.78±0.45 (107)
2 months	6.40±0.56	6.43±0.47 (101)	7.09±0.67* (111)
3 months	6.86±0.65	6.90±1.06 (101)	7.07±0.80 (103)
HEART			
14-month old			
1 month	2.33±0.09	2.32±0.16 (100)	2.30±0.10 (99)
2 months	2.20±0.20	2.26±0.11 (103)	2.31±0.18 (105)
3 months	2.34±0.25	2.30±0.11 (98)	2.17±0.29 (93)
24-months old			
1 month	2.37±0.20	2.55±0.24 (108)	2.56±0.19* (108)
2 months	2.49±0.23	2.73±0.24* (110)	2.64±0.25 (106)
3 months	2.62±0.18	2.54±0.16 (97)	2.56±0.22 (98)

Values are expressed as g tissue/kg of body weight (mean±SD, n=12).

*p<0.05, **p<0.01.

表 2 0.1 及び 0.2 ppm NO₂ の 4 週暴露による臓器重量の変化

Table 2 Changes in the tissue weight during four-weeks exposures to 0.1 and 0.2 ppm NO₂

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)		
	Control	0.1 ppm	0.2 ppm
LUNG			
12-months old			
2 weeks	2.76±0.14	2.93±0.58 (106)	2.73±0.38 (99)
4 weeks	2.98±0.29	3.05±0.17 (102)	2.83±0.05 (95)
17-months old			
2 weeks	2.73±0.20	2.74±0.16 (100)	2.77±0.17 (101)
4 weeks	2.79±0.21	2.79±0.29 (100)	2.62±0.25 (95)
23-months old			
2 weeks	2.76±0.31	2.98±0.14 (108)	3.31±0.19** (120)
4 weeks	2.97±0.17	3.32±0.19* (112)	2.77±0.62 (93)
KIDNEY			
12-months old			
2 weeks	5.37±0.29	5.46±0.11 (102)	5.40±0.33 (100)
4 weeks	5.63±0.52	5.54±0.18 (99)	5.64±0.20 (100)
17-months old			
2 weeks	6.13±0.42	5.71±0.27 (93)	5.92±0.38 (97)
4 weeks	5.71±0.27	6.14±0.62 (108)	6.06±0.25* (106)
23-months old			
2 weeks	6.06±1.16	6.22±0.34 (103)	7.23±0.15** (119)
4 weeks	6.67±0.27	6.94±0.83 (104)	6.45±0.49 (97)

Values are expressed as g tissue/kg of body weight (mean±SD, n=8).

*p<0.05, **p<0.01.

3.3 NO₂, O₃ 暴露の Ht 値及ぼす影響

表 3 に, NO₂ 暴露による血液の Ht 値及び Hb 値の変化を示した。14 か月齢ラットでは NO₂ 暴露 2 及び 3 か月目に Ht 値は増加傾向を示し, 4 ppm NO₂ 暴露群で 2 か月目に対照群の 106% (p<0.05) となった。23 か月齢ラットでは逆に有意な減少が認められた。4 ppm NO₂ 暴露 1 か月目及び 1.2 ppm NO₂ 暴露 2 か月目に対照群の各々 73% (p<0.01) と 79% (p<0.01) となった。Hb 値は, 14 か月齢ラットで NO₂ 暴露により有意な変化を示さなかった。一方, 23 か月齢ラットでは, 4 ppm NO₂ 暴露 1 及び 2 か月目に対照群の各々 76% (p<0.01) 及び 87% (p<0.05) に減少した。

表 4 に, O₃ 暴露による血液の Ht 値及び Hb 値の変化を示した。12 か月齢ラットでは O₃ 暴露により有意な変化を示さなかった。17 か月齢ラットでは 0.2 ppm O₃ 暴露 4 週目に対照群の 96% (p<0.05) に減少した。23 か月齢ラットでは 0.1 ppm O₃ 暴露 2 及び 4 週目に対照群の各々 96% (p<0.05) 及び 93% (p<0.001) に減少し, 0.2 ppm O₃ 暴露 4 週目にも 95% (p<0.01) となっ

表 3 1.2 及び 4.0 ppm NO₂ の 3 か月暴露による Ht 値及び Hb 量の変化Table 3 Changes in the Ht and Hb values during three -months exposures to 1.2 and 4.0 ppm NO₂

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)		
	Control	1.2 ppm	4.0 ppm
Ht Value (%)			
14-months old			
1 month	46.6±1.3	46.3±1.5 (99)	46.4±1.2 (99)
2 months	44.8±1.1	46.0±1.2 (103)	47.3±1.5* (106)
3 months	45.1±1.6	47.1±1.0 (104)	46.5±3.1 (103)
24-months old			
1 month	42.8±3.1	45.9±3.2 (107)	31.2±4.2** (72)
2 months	44.7±1.7	35.1±6.8** (79)	43.8±3.4 (98)
3 months	45.4±3.4	41.2±6.6 (91)	45.8±3.7 (101)
Hb Value (g/dl)			
14-months old			
1 month	16.1±0.3	15.9±0.4 (99)	15.8±0.3 (98)
2 months	16.2±0.9	16.3±0.4 (101)	16.1±0.6 (99)
3 months	16.6±0.4	16.7±0.4 (101)	16.1±1.2 (97)
24-months old			
1 month	15.6±1.3	16.2±0.7 (104)	11.9±1.3** (76)
2 months	16.6±0.5	15.3±1.0 (92)	14.5±0.9* (87)
3 months	15.5±1.8	15.0±2.0 (97)	16.0±1.4 (103)

Values are expressed as the mean±SD, n=12. *p<0.05, **p<0.01.

た。Hb 値も同様に 12 か月齢ラットでは O₃ 暴露により有意な変化を示さなかったが、17 及び 23 か月齢ラットでは O₃ 暴露 4 週目に有意な低下を示した。0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露で 17 か月齢ラットでは対照群の各々 97% (p<0.05) 及び 96% (p<0.001) に減少し、23 か月齢ラットでは各々 96% (p<0.01) 及び 94% (p<0.01) となった。

4 考 察

本研究の結果は、ラット臓器の湿重量が比較的低濃度の NO₂, O₃ 亜急性暴露の間に動物の加齢に伴い増加しやすくなることを示している。NO₂ や O₃ を高濃度で動物に暴露すると、一般的に標的臓器である肺に水腫が起こり湿重量の増加が観察される⁷⁾。本研究に用いた程度の濃度での NO₂ や O₃ の亜急性暴露では通常肺水腫による湿重量の増加を起こさない。臓器重量の増加は、臓器細胞への傷害を修復する際に観察される細胞の過増殖によっても起こる可能性が考えられる。老齢動物においても、傷害に対する腎臓の過増生や NO₂ に対する末梢気道の肥大、過形成⁷⁾が報告されている。4 ppm NO₂ 暴露によって、14 か月齢ラットでは 3 か月目に肺湿重量が増加したが、24 か月齢ラットでは 2 か月目に増加し、1.2 ppm NO₂ 暴露によっても増加が起こった(表 1)。O₃

表 4 0.1 及び 0.2 ppm O₃ の 4 週暴露による Ht 値及び Hb 量の変化Table 4 Changes in the Ht and Hb values during three-months exposures to 0.1 and 0.2 ppm O₃

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)		
	Control	0.1 ppm	0.2 ppm
Ht Value (%)			
12-months old			
2 weeks	46.2±0.7	46.2±2.0 (100)	46.8±1.1 (101)
4 weeks	46.4±0.6	46.7±1.1 (100)	46.6±1.5 (100)
17-months old			
2 weeks	46.6±0.9	46.8±0.4 (100)	46.3±1.2 (99)
4 weeks	45.8±0.9	45.1±1.0 (98)	44.0±0.9* (96)
23-months old			
2 weeks	45.5±1.3	43.9±1.0* (96)	44.0±1.6 (97)
4 weeks	46.9±0.5	43.6±0.6*** (93)	44.7±1.6** (95)
Hb Value (g/dl)			
12-months old			
2 weeks	16.4±0.3	16.7±0.6 (102)	16.7±0.3 (102)
4 weeks	16.4±0.5	16.5±0.3 (101)	16.4±0.4 (99)
17-months old			
2 weeks	17.0±0.4	16.5±0.4 (97)	16.3±0.3 (96)
4 weeks	16.4±0.4	16.0±0.4* (97)	15.7±0.1*** (96)
23-months old			
2 weeks	15.9±0.5	15.3±0.4 (96)	15.3±0.6 (96)
4 weeks	16.5±0.3	15.8±0.4** (96)	15.5±0.7** (94)

Values are expressed as the mean±SD, n=8.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

暴露の場合は、肺湿重量の増加の加齢依存性が更に明確になっていた。12 及び 17 か月齢ラットでは有意な変化を示さなかったが、23 か月齢ラットでは、0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露で増加した(表 2)。NO₂ や O₃ による老齡ラットの肺湿重量の増加機構については現在の所不明であるが、NO₂ や O₃ による傷害を老齡動物の肺では受けやすくなっていると考えられる。心臓及び腎臓の湿重量も、NO₂ や O₃ 暴露によって加齢依存的に増加した(表 1, 2)。今後、NO₂ や O₃ 暴露により加齢に依存して発現する臓器重量の増加について各臓器の受ける傷害との関連で更に検討する必要がある。

4 ppm NO₂ をラットに急性、亜急性暴露すると血液中に代謝的に活性な若い赤血球の割合が増加する^{8,9)}。この現象は、NO₂ 暴露により血液中の赤血球の老化が促進され、この障害に対する代償作用として赤血球の増生が起こったことによると説明された。高濃度の O₃ 暴露は赤血球の溶血を起こすことが報告されているが¹⁰⁾、比較的低濃度の O₃ を成熟ラットに亜急性暴露した場合、赤血球量は減少せず(表 4)、4 ppm NO₂ 亜急性暴露の場合にはむしろ Ht 値の増加が観察された

(表 3)。23~24 か月齢の老齢ラットを NO₂ や O₃ に暴露した場合には、Ht 値及び Hb 値の減少が認められた。これらの結果は、NO₂ と O₃ 暴露は共に赤血球に障害を及ぼすが通常この障害は動物の代償作用により修復されており、骨髄における赤血球の幹細胞の分裂能力が低下した老齢ラット²⁾では、代償反応が十分に発揮されず障害が発現したと解釈するのが妥当であろう。

本研究の結果から、老齢は肺、心臓及び腎臓の湿重量の増加、血液の Ht 値及び Hb 値の減少という点で比較的低濃度の NO₂、O₃ 亜急性暴露に対して高感受性となる可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Walton, J. (1982): The role of limited cell replicative capacity in pathological age change. A review. *Mech. Aging Dev.*, **19**, 217-244.
- 2) Harrison, D.E. (1979): Defective erythrocytic responses of aged mice not improved by younger marrow. *J. Gerontol.*, **30**, 286-288.
- 3) Cabral-Anderson, L.J., M.J. Evans and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats. I. Morphology. *Exptl. Mol. Pathol.*, **27**, 353-365.
- 4) Evans, M.J., L.J. Cabral-Anderson and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats. II. Cell proliferation. *Exptl. Mol. Pathol.*, **27**, 366-376.
- 5) Kyono, H. and K. Kawai (1982): Morphometric study on age-dependent pulmonary lesions in rats exposed to nitrogen dioxide. *Industrial Health*, **20**, 73-99.
- 6) Biles, R.F. and J.C. Romanovsky (1967): Ultrastructural alterations of alveolar tissue of mice. II. Synthetic photochemical smog. *Arch. Environ. Health*, **14**, 844-858.
- 7) 竹中参二・堀内博人・今井 透・清水不二雄・村上正孝(1983): オゾン急性暴露に対する各種動物の感受性. NO₂ との比較. 国立公害研究所研究報告, 第 40 号, 139-146.
- 8) Kunimoto, M., K. Mochitate, K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): 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.*, **33**, 361-369.
- 9) Mochitate, K. and T. Miura (1985): In vivo effect of nitrogen dioxide on the activities of glycolytic enzymes in red blood cells of rats. *Toxicol. Lett.*, **22**, 315-321.
- 10) Freeman, B.A., B.E. Miller and J.B. Mudd (1979): Assessing Toxic Effects of Environmental Pollutants. Lee, N.D. and Mudd, J.B. (eds.), Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich.

11-15

老齡ラットに及ぼす二酸化窒素及びオゾンの影響 II

—— 肺異物代謝系の変化 ——

Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on Aged Rats II

—— Changes in Xenobiotic Metabolizing System of Lungs ——

高橋勇二¹・三浦 卓¹

Yuji TAKAHASHI¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

二酸化窒素 (NO_2) とオゾン (O_3) 暴露によるラット肺の異物代謝系の変化が、ラットの加齢の進行に伴いどのような修飾を受けるかを明らかにするため次の実験を行った。5, 14, 及び24か月齢のJcl: Wistar系雄ラット(各月齢108匹)に清浄空気, 1.2及び4ppm NO_2 を1, 2, 及び3か月間, 1群12匹として, 暴露した。また, 17, 23及び30か月齢のJcl: Wistar系雄ラット(各月齢48匹)に清浄空気, 0.1及び0.2ppm O_3 を2及び4週間, 1群8匹として, 暴露した。暴露後肺の異物代謝活性に及ぼす影響を調べた。

NO_2 暴露により, 5か月齢ラット肺の7-エトキシマリン脱エチル化(ECDE)及びクマリン水酸化(CH)活性は暴露濃度に依存して低下した。24か月齢のラットでは, 5か月齢のラットに比較し, ECDE及びCH活性の低下率が増大し, さらに, 5か月齢のラットでは変化が認められなかったチトクロムP-450(P-450)含量及びベンゾ(a)ピレン水酸化(AHH)活性が低下した。 O_3 暴露により, 17か月齢ラットの肺のP-450含量及びベンズフェタミン脱メチル化(BPDM), ECDEそして, CH活性が暴露濃度に依存して増加した。30か月齢のラットでは, 上記の異物代謝活性の増加率が17か月齢のラットに比較して増大した。

これらの変化は, 老齡ラットは NO_2 及び O_3 に対して感受性が高まっていることを示唆している。

Abstract

The aim of this report is to examine the effects of aging on alteration of xenobiotic metabolism of rat lungs after exposures to nitrogen dioxide (NO_2) and ozone (O_3). Male Jcl: Wistar rats of 5, 14 and 24 months old were exposed to 1.2 and 4.0 ppm NO_2 for 1, 2 and 3 months ($n=12$). In another experiment, male rats of 17, 23 and 30 months old were exposed to 0.1 and 0.2 ppm O_3 for 2 and 4 weeks ($n=8$).

By NO_2 exposure, the activities of 7-ethoxycoumarin O-deethylase (ECDE) and

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

coumarin hydroxylase (CH) were decreased dose-dependently in all age group. The decreases were much greater in 24 months old rats than in 5 months old rats. Moreover, in 24 months old rats, the cytochrome P-450 content and benzo (*a*) pyrene hydroxylase (AHH) activity decreased, while these values in 5 months old rats were not affected. By O₃ exposure, the cytochrome P-450 content and activities of benzphetamine N-demethylase, ECDE and CH were increased in all age groups. However, relative values (exposed per control) of these activities increased much more in 24 months old rats than in 17 months old ones.

These results show that aged rats become more susceptible to the effects of NO₂ and O₃ gases.

1 はじめに

肺の異物代謝系は肺に吸い込まれた低分子性の化学物質を分解し、体外へ排せつしやすい化学形態へと変換している¹⁾。ほとんどの化学物質は異物代謝系の作用を受けて毒性を軽減するが、異物代謝系の作用を受け毒性が活性化される場合もある¹⁾。したがって、肺の異物代謝系は大気汚染物質の毒性を評価する上で重要な代謝系である。我々はこれまで都市環境に存在する主要なオキシダントである二酸化窒素 (NO₂) とオゾン (O₃) が肺の異物代謝系に及ぼす影響を検討し、肺の異物代謝系の変動は、NO₂ や O₃ の生体影響の良い指標となることを示してきた²⁻⁵⁾。

一般的に、老齢動物は細胞の分裂あるいは代謝活性が低下しており、毒物による傷害を受けやすいと考えられている。Bils は⁶⁾ は若齢マウスに比べ老齢マウスは大気汚染ガスによる傷害を受けやすいと報告している。また、Cabral-Anderson ら¹⁷⁾ は若齢ラットに比べ老齢ラットは NO₂ 暴露後の急性死亡率が高いことを報告している。しかし、彼らの実験は、高濃度の急性実験であり、低濃度の汚染ガスの影響は明らかではない。今回、比較的低濃度 (1.2~4 ppm NO₂ 又は 0.1~0.2 ppm O₃) のオキシダントが老齢ラットの肺の異物代謝系に及ぼす影響を検討し、老齢ラットはオキシダントに対する感受性が高まっていることを示唆する結果を得た。

2 方法

2.1 暴露条件及び試料の採取

5, 14 及び 24 か月齢の Jcl: Wistar 系雄ラット (各月齢 108 匹) に清浄空気, 1.2 及び 4.0 ppm NO₂ を 1, 2 及び 3 か月間, 1 群 12 匹として, 暴露した。また, 17, 23 及び 30 か月齢のラット (各群 48 匹) に, 清浄空気, 0.1 ppm 及び 0.2 ppm O₃ を, 2 及び 4 週間, 1 群 8 匹で, 暴露した。暴露後, ラットをチャンバーより取り出しエーテル麻酔下で頸動脈から採血してと殺した。肺を 0.95% NaCl 溶液を用いてかん流後, 4 倍量の 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.15 MKCl 溶液中でポッター・エルベジェム型テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ミクロソーム画分はホモジネートを 10000×g 15 分間遠心し, その上清を 105000×g 60 分間遠心し調製した。

2.2 チトクロム P-450 含量及び異物代謝活性の測定

P-450 の含量は, Omura と Sato⁸⁾ の方法で測定し, 分子吸光係数を $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ として計算した。ECDE 活性は Aitio⁹⁾ の方法に従い測定した。AHH 活性は Dehnen ら¹⁰⁾ の方法に従い測定した。BPDM 及び CH 活性は Takahashi ら⁵⁾ の方法に従い測定した。タンパク質量は Lowry ら¹¹⁾ の方法に従い測定した。チトクロム含量及び酵素活性はホモジネートタンパク質当たりで表した。

2.3 統計的検定法

対照群と暴露群の間の差の有意性の検定は Student の *t* 検定法を用いて行った。

3 結果

3.1 NO₂ 暴露の影響

肺の P-450 含量は, 5 か月齢のラットでは, いずれの暴露の濃度, 期間においても, 有意な変化は認められなかった(図 1)。14 か月齢のラットの P-450 含量は 1.2 及び 4 ppm NO₂ 暴露 1 か月目に対照群の 62% 及び 47% に各々低下した。その後, 暴露 2 か月目には対照値に近づき, 暴露 2 及び 3 か月目には有意な変化を示さなかった。24 か月齢ラットの P-450 含量は, 1.2 ppm NO₂ 暴露 1 か月目に対照値の 77% に低下したのち暴露 2 及び 3 か月目には対照値にまで回復したが, 4

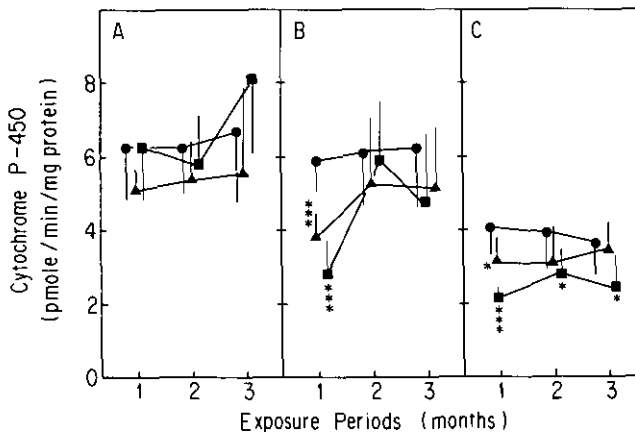


図 1 NO₂ 暴露によるチトクロム P-450 含量の変化

Fig. 1 Changes in chytochrome P-450 contents during NO₂ exposures
Male wistar rats of 5 (A), 14 (B) and 24 (C) months old were exposed to filtered air (●), 1.2 (▲) and 4 (■) ppm NO₂ for 3 months. After exposures, cytochrome P-450 contents were measured under the section of materials and methods. Values are expressed as mean of 12 animals and bars represent \pm SD. **p*<0.05, ****p*<0.001.

ppm NO₂ 暴露では、1 から 3 か月の暴露期間を通して、対照値の 51 から 72% に低下した。

肺の AHH 活性は (図 2), 5 か月齢ラットでは、1.2 ppm NO₂ 暴露 1 か月目に対照値の 117% に増加し、暴露 2 か月目にはほぼ対照値にまで低下した。14 か月齢ラットの AHH 活性は、4 ppm NO₂ 暴露 1 及び 3 か月目に低下し、対照値の各々 79% 及び 85% を示した 24 か月齢のラットの AHH 活性は 1.2 ppm NO₂ 暴露 2 か月目に、また、4 ppm NO₂ 暴露 1 か月目に各々対照値の 66% 及び 63% に低下し、暴露 3 か月目にはほぼ対照値まで回復した。

肺の ECDE 活性は (図 3), 5 か月齢のラットでは、1.2 ppm NO₂ 暴露 3 か月目に対照値の 85% まで低下し、また、4 ppm NO₂ 暴露 1 から 3 か月目に対照値の 67% から 81% に低下した。14 か月齢ラットの ECDE 活性は、4 ppm NO₂ 暴露による ECDE 活性の低下の程度が 5 か月齢のラットに比べて増大し、1 から 3 か月の暴露期間の通じて対照値の 55% から 65% であった。24 か月齢ラットの ECDE 活性は、1.2 ppm NO₂ 暴露 1 及び 2 か月目に対照値の 85% 及び 72% にて低下し、4 ppm NO₂ 暴露により、更に低下の程度が増大し、3 か月の暴露期間を通して対照値の 55% から 63% であった。

肺の CH 活性は (図 4), 5 か月齢のラットでは、1.2 ppm NO₂ 暴露 1 及び 2 か月目に対照値の 73% 及び 70% に、また、4 ppm NO₂ 暴露 1 から 3 か月目に対照値の 34% から 15% に低下した。14 か月齢ラット CH 活性は、1.2 ppm NO₂ 暴露 2 及び 3 か月目に対照値の 79% 及び 80% に、また、4 ppm NO₂ 暴露 1 から 3 か月目に対照値の 13% から 16% に低下した。24 か月齢のラットでは、1.2 ppm NO₂ 暴露 2 及び 3 か月目に対照値の 60% 及び 74% に、また、4 ppm NO₂ 暴露 1 か

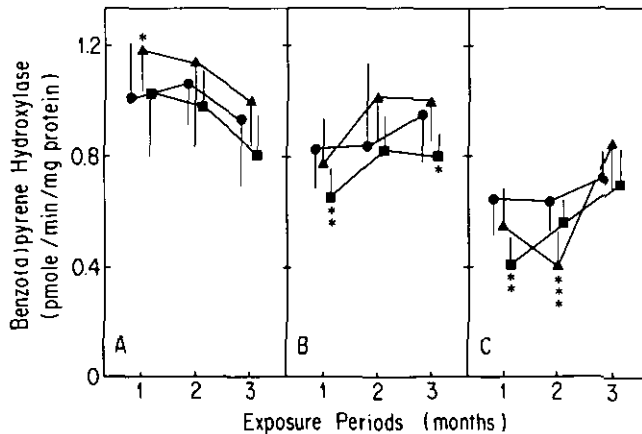


図 2 NO₂ 暴露によるベンゾ(a)ピレン水酸酵素活性の変化

Fig. 2 Changes in benzo (a) pyrene hydroxylase activities during NO₂ exposures

Experimental conditions are the same as in Fig 1. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

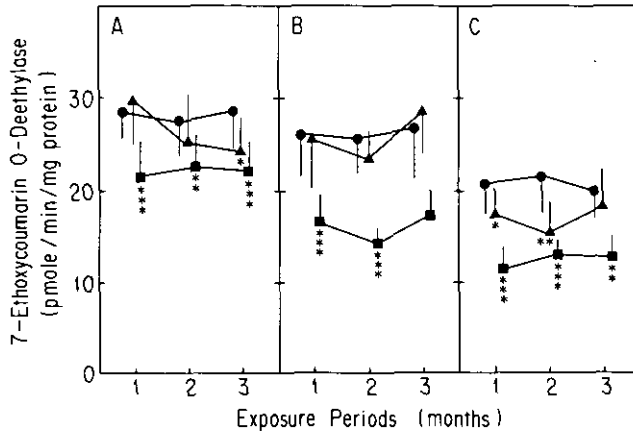


図 3 NO₂ 暴露による 7-エトキシクマリン脱エチル化酵素活性の変化

Fig. 3 Changes in 7-ethoxycoumarin O-deethylase activities during NO₂ exposures

Experimental conditions are the same as in Fig. 1. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

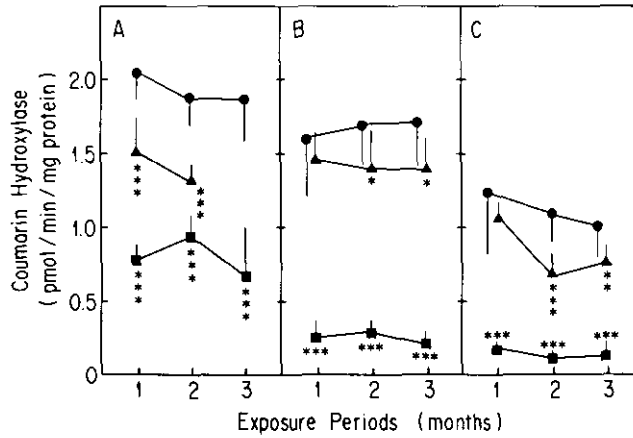


図 4 NO₂ 暴露によるクマリン水酸化酵素活性の変化

Fig. 4 Changes in coumarin hydroxylase activities during NO₂ exposures. Experimental conditions are the same as in Fig. 1

p<0.01, *p<0.001.

ら3か月目に対照値の11%から15%に低下した。

NO₂ 暴露後の肺異物代謝系の変化は、ラットの加齢の進行に伴い、活性が低下が持続する。そして、低下率が增大する方向に修飾された。

3.2 O₃ 暴露の影響

肺の P-450 含量は(図 5), 17 か月齢のラットでは, 0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に変化なく, 4 週目に対照値の各々 205% 及び 192% に増加した。23 か月齢のラットの P-450 含量は 0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照群の各々 132% 及び 152% に, また, 暴露 4 週目に対照値の各々 127% 及び 165% に増加した。30 か月齢のラットの P-450 含量は 0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照群の各々 137% 及び 150% に, また, 暴露 4 週目に対照値の各々 167% 及び 180% に増加した。

肺の BPDM 活性は(図 6), 17 か月齢のラットでは 0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照値の 128% 及び 146% に, 4 週目に対照値の各々 129% 及び 149% に増加した。23 か月齢のラットの BPDM 活性は, 0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照群の各々 121% 及び 140% に, また, 暴露 4 週目に対照値の各々 138% 及び 140% に増加した。30 か月齢のラットの BPDM 活性は, 0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照群の各々 147% 及び 157% に, また, 暴露 4 週目に対照値の各々 148% 及び 161% に増加した。肺の ECDE 活性は(図 7), 17 か月齢のラットでは, 0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照値の 113% に, また, 0.1 ppm 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 4 週目に対照値の 127% 及び

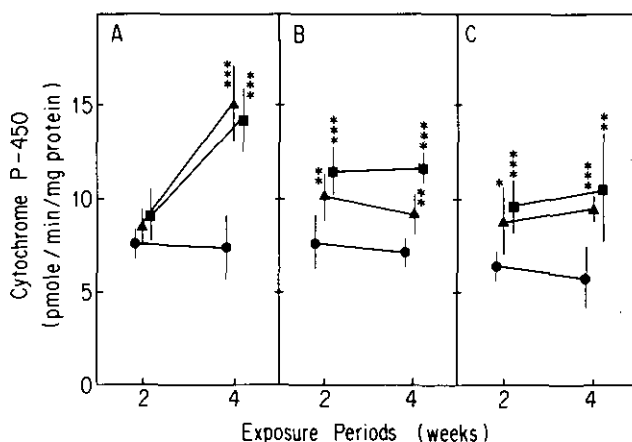


図 5 O₃ 暴露によるチトクロム-450 含量の変化

Fig. 5 Changes in cytochrome P-450 contents during O₃ exposures

Male wistar rats of 17 (A), 23 (B) and 30 (C) months old were exposed to filtered air (●), 0.1 (▲) and 0.2 (■) ppm O₃ for 4 weeks. After exposures, cytochrome P-450 contents were measured under the section of materials and methods. Values are expressed as mean of 8 animals and bars represent \pm SD. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

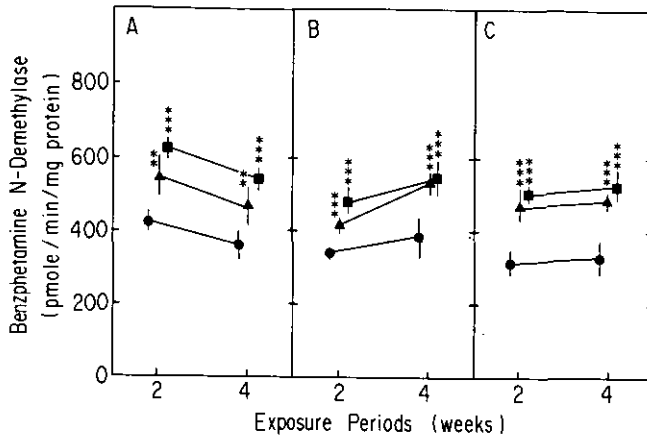


図 6 O₃ 暴露によるベンズフェタミン脱メチル化酵素活性の変化
 Fig. 6 Changes in benzphetamine N-demethylase activities during O₃ exposures

Experimental conditions are the same as in Fig. 5.

p<0.01, *p<0.001.

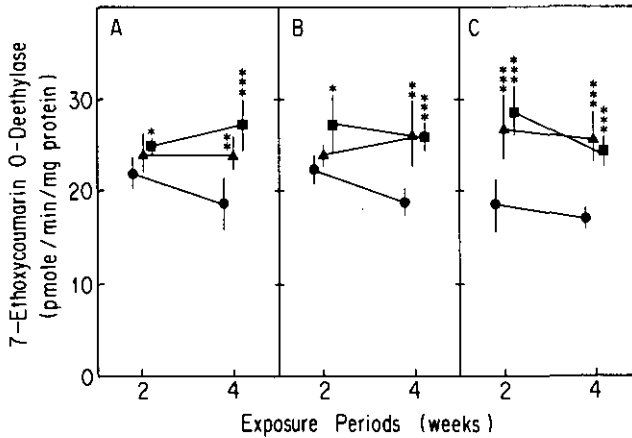


図 7 O₃ 暴露による7-エトキシマリンドエチル化酵素活性の変化
 Fig. 7 Changes in 7-ethoxycoumarin O-deethylase activities during O₃ exposures

Experimental conditions are the same as in Fig. 5.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

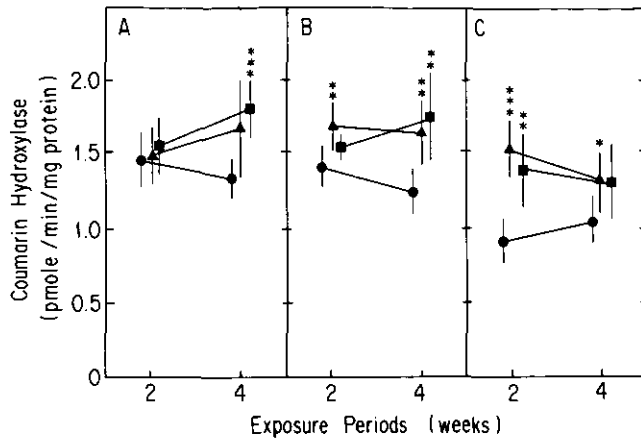


図 8 O₃ 暴露によるクマリン水酸化酵素活性の変化
 Fig. 8 Changes in coumarin hydroxylase activities during O₃ exposures
 Experimental conditions are the same as in Fig. 5
 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

145%に増加した。23 か月齢のラットの ECDE 活性は、0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照群の 121% に、また、0.1 ppm 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 4 週目に対照値の各々140%及び 139%に増加した。30 か月齢のラットの ECDE 活性は、0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照群の各々145%及び 154% に、また、暴露 4 週目に対照値の各々150%及び 145%に増加した。

肺の CH 活性は(図 8), 17 か月齢のラットでは 0.2 ppm O₃ 暴露 4 週目に対照値の 113%に増加した。23 か月齢のラットの CH 活性は、0.1 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照値の 120%に、また、0.1 ppm 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 4 週目に対照値の各々135%及び 142%に増加した。30 か月齢のラットの CH 活性は、0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照群の各々167%及び 151%に、また、暴露 4 週目には対照値の各々127%及び 126%に増加した。

O₃ 暴露により異物代謝性が増加するがラットの加齢の進行に伴い対照値に対する増加率が大きくなり、しかも、暴露 2 週間目にその変化が顕著に認められるようになった。

4 考 察

我々は、成熟ラットに NO₂ を暴露し、肺の異物代謝活性は NO₂ 暴露濃度に依存して低下することを報告してきた²⁻⁵⁾。すなわち、肺の ECDE 及び CH 活性は 1.2 ppm 以上の、BPDM 活性は 6 ppm 以上の、そして、P-450 含量は 10 ppm 以上の NO₂ 濃度に依存して低下することを示した。本実験で、24 か月齢ラットの肺の P-450 含量は、5 か月齢ラットでは変化が認められない暴露濃度である 1.2 ppm 及び 4 ppr NO₂ で有意な低下が起きた。AHH 活性も P-450 含量の変化と同様にラットの加齢に伴い活性低下の傾向が明らかになった。ECDE 及び CH 活性は NO₂ 暴露によ

り5か月齢のラットで既に活性が低下し、加齢の進行に伴い活性低下の率が増大した。これらの変化は、老齡ラットはNO₂に対する感受性が高いことを示唆している。

P-450は異物代謝系の律速酵素である。NO₂を暴露すると肺のP-450分子はNO₂と配位結合しニトロソP-450となり徐々に活性を失っていくと考えられている¹²⁾。5か月齢ラットの肺P-450含量は4ppm NO₂暴露により影響を受けない。この原因は、変性を受けた量に相当するP-450が新たに生合成され、分解と合成が平衡しているためと考えられる。老化したラットでは一般にタンパク質の生合成活性が低下していると考えられている¹³⁾。したがって、老齡ラットで認められた、P-450含量及び異物代謝活性の低下、あるいは、低下率の増大は、異物代謝系に関連するタンパク分子の生合成の速度の低下によると考えられる。

0.1ppmから0.4ppmのO₃が成熟ラットに暴露すると、NO₂を暴露した場合と異なり、肺の異物代謝活性は暴露濃度に依存して増加する²⁻⁵⁾。ただし、CH活性は変化しない。O₃暴露による肺異物代謝活性の増大は、異物代謝が活発な肺胞II型上皮細胞あるいはクララ細胞の増加によると解釈されている¹⁴⁾。II型細胞とクララ細胞は肺胞I型上皮細胞と繊毛細胞の前駆細胞である¹⁵⁾。Evansら¹⁶⁾はII型細胞の増加の程度は、I型細胞の傷害の程度を反映していると考えている。この考えは肺の異物代謝活性がO₃暴露濃度に依存して増加した我々の結果²⁻⁵⁾の解釈にも適用される。

O₃暴露によるラットの肺の異物代謝活性の増加率は30か月齢ラットが17か月齢ラットに比べて大きい。この変化は、O₃暴露により老齡ラットが受ける肺の初期傷害が若齡ラットに比べて大きいことを示唆している。しかし、異物代謝活性の増加は傷害の修復過程の随伴現象であるから、0.2ppm O₃暴露によって30か月齢のラットが受ける傷害は修復可能な範囲なのであろう。

これらの結果は、老齡ラットはNO₂又はO₃暴露による傷害を若齡ラットに比べ受けやすい可能性を示している。

引用文献

- 1) Philpot, R.R., M.W. Anderson and T.F. Fling (1977): Uptake, accumulation and metabolism of chemicals by the lung. *In: Metabolic Function of the Lung*, Y.S. Bakhle and J.R. Bakhle and J.R. Vane (ed.), Marcel Dekker. New York and Basel, 125-171.
- 2) Takahashi, Y. and T. Miura (1985): *In vivo* effects of nitrogen dioxide and ozone on xenobiotic metabolizing systems of rat lungs. *Toxicol. Lett.*, **26**, 145-152.
- 3) Takahashi, Y., T. Miura and K. Kubota (1985): *In vivo* effect of ozone inhalation on xenobiotic metabolism of lung and liver of rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 855-864.
- 4) Takahashi, Y., K. Mochitate and T. Miura (1986): Subacute effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung, liver and kidney of rats. *Environ. Res.*, **41**, 184-194.
- 5) Takahashi, Y. and T. Miura (1987): A selective enhancement of xenobiotic metabolizing systems of rat lungs by prolonged exposure to ozone. *Environ. Res.*, **42**, 425-434.

- 6) Bils, R.F. and J.C. Romanovsky (1967): Ultrastructural alterations of alveolar tissue of mice. II Synthetic photochemical smog. *Arch. Environ. Health*, **14**, 844-858.
- 7) 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.
- 8) Omura, T. and R.Sato (1964): Carbon monoxide-binding pirtment of liver microsomes. *J.Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- 9) Aitio, A. (1978): A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal. Biochem.*, **85**, 488-491.
- 10) Dehnen, W., R.Tomigas and J.Roos (1973): A modified method of the assay of benzo (*a*) pyrene hydroxylase. *Anal. Biochem.*, **53**, 373-383.
- 11) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Rrandall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent *J.Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 12) Case, G.D., J.S.Dixon and J.C.Scheeley (1979): Interahtion of blood metalloproteins mith niorage oxides and axiatnt tollutants. *Environ. Res.*, **20**, 43-63.
- 13) Mori, N., D.Mizuo and S.Goto (1978): Translational activity and fidelity of purufied ribosomes of aging mouse livers. *In: Aging phenomena*. K, Oota, T.Makinoda, M, Iriki and L.S. Baker (*ed.*) Plenum Press. New York and London, 151-156.
- 14) Devereux, T.R., C.J. Serabjit-Singh, S.R. Slaughter, C.R. Walf, R.M. Philpot and J. R. Fouts (1981): Identification of cytochrome P-450 isozymes in nonciliated bronchiolar epiothelial (Clara) and alveolar type II cells isolated from rabbit lung. *Exp. Lung Res.*, **2**, 221-230.
- 15) Evans, M.J., L.V. Jahnsn, R.J. Stephens and G.Freeman (1976): Renewal of the terminal bronchiolar epithelium in tee rat following exposure to NO₂ or O₃. *Lab. Invest.*, **35**, 246-257.
- 16) Evans, M.J., L.J. Cabral-Anderson and G.Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats. II Cell proliferation. *Exp. Pathol.*, **27**, 366-376.

II-16

老齡ラットに及ぼす二酸化窒素とオゾンの影響 III

—— 肝臓と腎臓の生体膜成分の変化 ——

Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on Aged Rats III

—— Changes in Membranous Constituents of Liver and Kidney of Rats ——

三浦 卓¹・高橋勇二¹

Takashi MIURA¹ and Yuji TAKAHASHI¹

要 旨

12~30か月齢のJCl: Wistar系雄ラットにNO₂ (1, 2及び4.0 ppm)を3か月間又はO₃ (0.1及び0.2 ppm)を4週間暴露し、NO₂, O₃亜急性暴露の臓器生体膜成分への影響が動物の加齢によりどのように影響されるかについて検討した。

肝臓のミクロソーム成分は、O₃暴露により変動せず、加齢による影響の発現も認められなかった。一方、NO₂暴露はミクロソーム成分を周期的に低下させるが、老齡ラットではチトクロムP-450含量及び7-エトキシクマリン脱エテル化活性の低下幅が大きくなり持続した。しかしながら、還元酵素活性等他のミクロソーム成分の変動は加齢により影響を受けなかった。

腎臓のミトコンドリア呼吸系酵素活性もNO₂, O₃暴露により低下傾向を示し、老齡ラットでは低下幅が大きくなった。一方、ミクロソーム成分はNO₂, O₃暴露により誘導されるが、老齡ラットではチトクロムP-450含量の増加が遅延した。

以上の結果から、加齢により生合成能が低下する生体膜成分は、NO₂やO₃の影響が加齢により増強される可能性が示唆された。

Abstract

Male JCl: Wistar rats (12-30 months old) were exposed to either nitrogen dioxide (NO₂, 1.2 and 4.0 ppm) for 3 months or ozone (O₃, 0.1 and 0.2 ppm) for 4 weeks to examine the effect of aging on alterations of membrane constituents of tissues produced by subacute exposures to NO₂ and O₃.

In the liver, subacute exposures of adult rats to 0.4-4.0 ppm NO₂ caused a periodic decrease in the microsomal constituents, especially cytochrome P-450 level, while those to 0.1-0.4 ppm O₃ did not affect the constituents of microsomes and mitochondria. Exposures of aged rats to 1.2 and 4.0 ppm NO₂ resulted in a persistent and augmented decrease in the cytochrome P-450 level and 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity. On the other hand, alterations of other microsomal constituents were not modified by aging of rats.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

In the kidney, subacute exposures of adult rats to 0.1-0.4 ppm O₃ and 1.2-4.0 ppm NO₂ increased the levels of microsomal constituents, especially that of cytochrome P-450. Exposures of aged rats to NO₂ and O₃ led to a delayed induction of cytochrome P-450. The activity of microsomal reductases were also induced in aged rats in a fashion similar to adult ones. The succinate-cytochrome *c* reductase activity of mitochondrial respiratory system showed a decreasing trend in adult rats upon exposures to NO₂ and O₃ and was led to an augmented decrease in aged rats.

These results show that aging leads to an augmented decrease and delayed induction of some membrane constituents of livers and kidneys.

1 はじめに

これまでに代表的な大気汚染ガスである二酸化窒素 (NO₂) とオゾン (O₃) をラットに暴露し、各種臓器の生体膜成分に及ぼす影響について検討してきた。その結果、比較的低濃度の NO₂ 亜急性暴露は、第一次標的臓器である肺のみならず肝臓及び腎臓のミクロソーム及びミトコンドリア成分を変動させることを見いだした^{1,2)}。これら臓器の生体膜成分の変動は、ミクロソーム成分、特に異物代謝系成分に選択性が高く、肺及び肝臓では 0.4—4.0 ppm NO₂ により周期的な低下が起こり、腎臓では 1.2-4.0 ppm NO₂ によりミクロソーム成分の誘導が起こる。一方、0.2-0.4 ppm O₃ のラットへの亜急性暴露は、肺ミクロソーム異物代謝系を持続的に亢進させるとともに、腎臓のミクロソーム成分を誘導する³⁾。これらの結果は、NO₂ と O₃ とでは臓器への影響が必ずしも同一でないことを示している。

動物の加齢に伴い臓器の生体膜成分のレベルの低下することが報告されている⁴⁾。この現象は、臓器における生体膜成分の生合成の低下、または変性の促進によると考えられている。本研究では、NO₂ や O₃ の臓器生体膜成分への影響がラットの加齢によりどのように修飾されるかについて検討した。

2 材料と方法

2.1 暴露条件及び試料の採集

JCl: Wistar 系雄ラット (6—10 週齢) を動物実験施設内のバリアー飼育室 (SPF) 内で 17—30 か月齢まで飼育し、暴露実験に供した。ガス暴露は、O₃ (0.1±0.005 及び 0.2±0.01 ppm) を 4 週間、または NO₂ (1.2±0.06 及び 4.0±0.2 ppm) を 3 か月間行った。経時的に暴露チャンパーより一群 6—8 匹の動物を取り出し、エーテル麻酔下で採血と殺後、臓器を分離した。臓器のホモジネート及びミクロソーム画分の調製は前報に記した方法で行った⁵⁾。

2.2 酵素活性の測定

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、ホモジネートを用いて前報に記した方法で測定した⁵⁾。

ミクロソームの電子伝達系成分(NADH-チトクロム b_6 還元酵素, NADPH-チトクロム P-450 還元酵素, チトクロム b_5 , チトクロム P-450) 及び異物代謝活性(ベンゾピレン水酸化, 7-エトキシマリン脱エチル化, *p*-ニトロアニソール脱エチル化及びアニリン水酸化)は, ミクロソーム画分を用いて前報の方法で測定した⁶⁾。タンパク質量は, Lowry の方法により定量した⁷⁾。

2.3 有意差の検定法

対照群と暴露群の間の有意差は, 分散の比を分析後, Student の *t* 又は Welch の *t* 検定法で調べた。

3 結果

3.1 NO₂ と O₃ 暴露の肝臓の生体膜成分に及ぼす影響

0.1 又は 0.2 ppm O₃ の 4 週間暴露の過程において, 17-30 か月齢ラットの肝臓の生体膜成分は有意な変化を示さなかった。一方, NO₂ の 3 か月間暴露の場合には, チトクロム P-450 含量が 14 か月齢ラットで 4 ppm NO₂ 暴露 1 及び 3 か月目に, 1.2 ppm NO₂ 暴露 3 か月目に有意な低下を示した(表 1)。24 か月齢ラットでは, 4 ppm NO₂ 暴露 1, 2 及び 3 か月目に, 1.2 ppm NO₂ 暴露 2 及び 3 か月目に低下した。この結果は, NO₂ の肝ミクロソームのチトクロム P-450 に対する低下効果が老齡ラットでは持続することを示している。他のミクロソーム電子伝達系成分, チトクロム b_6 , NADH-チトクロム b_6 還元酵素及び NADPH-チトクロム P-450 還元酵素活性は, NO₂ 亜急性暴露の過程で周期的に低下するが, 動物の加齢による影響は認められなかった。肝ミクロソームの 7-エトキシマリン脱エチル化活性は, 14 か月齢ラットでは, 4 ppm NO₂ 暴露 1 及び 2 か月目に対照群の各々 85 及び 84% ($p < 0.01$) に低下した。一方, 24 か月齢ラットでは, 1.2 及び 4 ppm NO₂ 暴露 2 か月目に対照群の各々 66% ($p < 0.01$) 及び 57% ($p < 0.001$) に低下した。これらの結果は, NO₂ による本酵素活性の低下が老齡ラットでは増幅されるとともにより低濃度の NO₂ によっても低下することを示している。一方, *p*-ニトロアニソール脱メチル化及びアニリン水酸化活性の NO₂ による変動は, 加齢により影響を受けなかった。

3.2 NO₂ 暴露の腎臓の生体膜成分に及ぼす影響

表 2 に, NO₂ 暴露による腎ミクロソームのチトクロム P-450 と b_5 含量の変化を示した。チトクロム P-450 含量は, 14 か月齢ラットでは 4 ppm NO₂ 暴露 1 か月目に対照群の 199% ($p < 0.001$) に, 1.2 ppm NO₂ 暴露 2 か月目に 167% ($p < 0.001$) に増加した。一方, 24 か月齢ラットでは 2 か月目に増加し, 1.2 及び 4 ppm NO₂ 暴露で対照群の各々 188% ($p < 0.001$) 及び 173% ($p < 0.001$) となった。1.2 ppm NO₂ 暴露の場合, 最高値は暴露 3 か月目に観察された。したがって, NO₂ 暴露によるチトクロム P-450 含量の増加は老齡ラットでは遅延すると考えられる。一方, チトクロム b_5 含量は, 14 か月齢ラットでは 1.2 及び 4 ppm NO₂ 暴露 2 及び 3 か月目に有意に増加した

表 1 1.2 及び 4.0 ppm NO₂ 3 か月暴露における肝ミクロソームのチトクロム P-450 含量と 7-エトキシマリン脱エチル化活性の変化
 Table 1 Changes in the cytochrome P-450 content and 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity of liver microsomes during three-months exposures to 1.2 and 4.0 ppm NO₂

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)		
	Control	1.2 ppm	4.0 ppm
Cytochrome P-450 (pmol/mg of homogenate protein)			
14-months old			
1 month	69.0 ± 7.2	63.3 ± 9.2 (91)	49.2 ± 10.2*** (71)
2 months	67.5 ± 5.9	66.9 ± 14.0 (99)	65.2 ± 4.6 (97)
3 months	69.5 ± 7.1	62.1 ± 8.0* (89)	55.2 ± 10.8** (79)
24-months old			
1 month	58.3 ± 9.2	69.2 ± 8.2 (118)	42.0 ± 8.5* (72)
2 months	61.6 ± 6.7	47.4 ± 7.1** (78)	42.5 ± 8.2** (70)
3 months	58.1 ± 4.6	45.8 ± 6.8** (79)	50.9 ± 9.0* (88)
7-Ethoxycoumarin O-deethylase (pmol/min per mg of homogenate protein)			
14-months old			
1 month	80.4 ± 4.9	70.6 ± 5.8 (88)	68.6 ± 5.8** (85)
2 months	78.4 ± 11.3	72.9 ± 9.4 (93)	65.9 ± 8.2** (84)
3 months	79.9 ± 19.8	83.6 ± 6.3 (105)	75.3 ± 28.6 (94)
24-months old			
1 month	56.4 ± 21.4	62.6 ± 11.0 (111)	44.6 ± 14.4 (79)
2 months	59.7 ± 15.9	39.5 ± 9.7** (66)	33.8 ± 6.5*** (57)
3 months	53.5 ± 14.2	57.0 ± 19.9 (107)	53.5 ± 14.1 (100)

Values are expressed as mean ± SD, n=12. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

が、24 か月齢ラットでは 4 ppm NO₂ 暴露 2 か月目にのみ有意な増加を示した。この結果は、NO₂ 暴露によるチトクロム b₅ の誘導が老齢ラットでは抑制されることを示している。他の腎ミクロソーム成分、NADH-チトクロム b₅ 還元酵素及び NADPH-チトクロム P-450 還元酵素の活性も NO₂ 暴露により誘導されるが、加齢はこの誘導に影響を及ぼさなかった。ミトコンドリア呼吸系のコハク酸-チトクロム c 還元酵素活性は、14 か月齢ラットでは 4 ppm NO₂ 暴露 1 か月目にのみ対照群の 88% (p<0.05) に低下したが、1.2 ppm NO₂ 暴露では 3 か月目に対照群の 110% (p<0.01) に増加した (表 3)。24 か月齢ラットでは、増加は観察されず 4 ppm NO₂ 暴露 1, 2, 3 か月目及び 1.2 ppm NO₂ 暴露 2 か月目に有意に低い値を示した。したがって、NO₂ 暴露によるコハク酸-チトクロム c 還元酵素活性の低下は、老齢ラットでは持続的となりより低い NO₂ 濃度でも起こるようになった。

表 2 1.2 及び 4.0 ppm NO₂ 3 か月暴露における腎ミクロソームのチトクロム P-450 と b₅ 含量の変化

Table 2 Changes in the contents of cytochromes P-450 and b₅ of renal microsomes during three-months exposures to 1.2 and 4.0 ppm NO₂

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)		
	Control	1.2 ppm	4.0 ppm
Cytochrome P-450 (pmol/mg of homogenate protein)			
14-months old			
1 month	0.64±0.11	0.70±0.20 (109)	1.28±0.35*** (199)
2 months	0.66±0.16	1.10±0.13*** (167)	1.01±0.28* (153)
3 months	0.68±0.09	0.88±0.11*** (129)	0.76±0.09 (111)
24-months old			
1 month	0.47±0.17	0.44±0.30 (94)	0.57±0.30 (120)
2 months	0.50±0.13	0.95±0.30*** (188)	0.87±0.36*** (173)
3 months	0.53±0.19	1.11±0.26*** (212)	0.57±0.30 (108)
Cytochrome b ₅ (pmol/mg of homogenate protein)			
14-months old			
1 month	16.5±3.5	18.5±2.5 (112)	19.6±1.4 (119)
2 months	15.2±2.7	18.8±2.7 * (125)	21.8±3.4 ** (145)
3 months	16.3±2.2	21.4±2.0 *** (131)	18.7±2.1 * (114)
24-months old			
1 month	15.2±2.5	17.0±5.2 (112)	18.1±5.0 (119)
2 months	16.1±3.1	17.9±2.7 (111)	19.0±3.0 * (118)
3 months	16.9±2.9	18.8±2.8 (111)	18.0±2.1 (107)

Values are expressed as mean ±SD, n=12, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

表 3 1.2 及び 4.0 ppm NO₂ 3 か月暴露における腎ミトコンドリアのコハク酸-チトクロム c 還元酵素活性の変化

Table 3 Changes in the succinate-cytochrome c reductase activity of renal mitochondria during three-months exposures to 1.2 and 4.0 ppm NO₂

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)		
	Control	1.2 ppm	4.0 ppm
14-months old			
1 month	21.6±3.2	21.7±2.4 (100)	19.1±2.3* (88)
2 months	20.8±2.6	20.0±1.2 (96)	18.9±2.2 (91)
3 months	22.5±1.7	26.0±2.7** (116)	23.0±1.7 (102)
24-months old			
1 month	25.2±3.6	23.9±4.8 (95)	19.0±3.3*** (75)
2 months	19.6±1.6	16.9±2.7* (86)	17.8±1.6* (91)
3 months	26.7±2.9	23.9±4.8 (90)	23.4±3.0* (88)

Values are expressed as mean ±SD, n=12, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

3.3 O₃ 暴露による腎臓の生体膜成分の変化

O₃ 暴露によっても腎ミクロソーム成分の誘導が起こり、チトクロム P-450 含量の増加が最も顕著であった(表 4)。17 か月齢ラットでは 0.2 ppm O₃ 暴露 2 及び 4 週間目に対照群の各々 116% ($p < 0.05$) 及び 137% ($p < 0.05$) に増加した。23 か月齢ラットでは 0.2 ppm O₃ 暴露 4 週目にのみ有意に増加したが、30 か月齢ラットでは有意な増加が観察されなかった。他のミクロソーム膜成分、NADH-チトクロム *b*₅ 還元酵素及び NADPH-チトクロム P-450 還元酵素の活性変動は、動物の加齢による修飾を受けなかった。これらの結果は、腎ミクロソーム成分の中でもチトクロム P-450 が暴露によって最も顕著に誘導され、動物の加齢に伴い誘導が抑制されることを示している。表 5 に、O₃ 暴露による腎ミクロソームの 7'-エトキシマリン脱エチル化及びベンゾピレン

表 4 0.1 及び 0.2 ppm O₃ 4 週暴露における腎ミクロソームのチトクロム P-450 含量と NADH-チトクロム *b*₅ 還元酵素活性の変化

Table 4 Changes in the cytochrome P-450 content and NADH-cytochrome *b*₅ reductase activity of renal microsomes during four-weeks exposures to 0.1 and 0.2 ppm O₃

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)		
	Control	0.1 ppm	0.2 ppm
Cytochrome P-450 (pmol/mg of homogenate protein)			
17-months old			
2 weeks	0.649±0.318	0.775±0.294 (115)	1.078±0.212* (166)
4 weeks	0.645±0.115	0.776±0.205 (120)	0.885±0.216* (137)
23-months old			
2 weeks	0.521±0.293	0.670±0.181 (128)	0.690±0.212 (132)
4 weeks	0.544±0.185	0.559±0.210 (103)	0.778±0.129* (143)
30-months old			
2 weeks	0.498±0.288	0.602±0.236 (121)	0.546±0.294 (110)
4 weeks	0.492±0.227	0.522±0.175 (106)	0.631±0.258 (128)
NADH-cytochrome <i>b</i> ₅ reductase (nmol/min per mg of homogenate protein)			
17-months old			
2 weeks	24.0±2.6	32.8±1.4** (123)	26.6±2.0* (112)
4 weeks	24.2±3.0	22.6±5.2 (94)	26.2±1.6 (109)
23-months old			
2 weeks	26.0±5.4	32.6±6.0 (126)	29.0±3.0 (112)
4 weeks	25.2±2.2	22.8±1.0 (91)	26.8±0.4 (107)
30-months old			
2 weeks	27.2±5.4	33.4±4.0 (123)	32.2±4.0 (118)
4 weeks	25.2±2.4	25.8±2.6 (102)	26.0±3.0 (103)

Values are expressed as mean ±SD, n=8. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

表 5 0.1 及び 0.2 ppm O₃ 4 週暴露における腎ミクロソーム 7-エトキシマリン脱エチル化とベンゾピレン水酸化 活性の変化

Table 5 Changes in the activities of 7-ethoxycoumarin 0-De-ethylation and benzo (a) pyrene hydroxylation of renal microsomes during four-weeks exposures to 0.1 and 0.2 ppm O₃

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)		
	Control	0.1 ppm	0.2 ppm
7-Ethoxycoumarin 0-deethylase (fmol/min per mg of homogenate protein)			
17-months old			
2 weeks	125 ± 16	133 ± 15 (106)	173 ± 12*** (138)
4 weeks	120 ± 18	122 ± 23 (103)	126 ± 23 (107)
23-months old			
2 weeks	110 ± 22	117 ± 20 (106)	129 ± 30 (117)
4 weeks	114 ± 20	116 ± 36 (102)	152 ± 32* (135)
30-months old			
2 weeks	130 ± 46	142 ± 30 (109)	150 ± 55 (115)
4 weeks	124 ± 82	126 ± 26 (101)	166 ± 36* (133)
Benzo (a) pyrene hydroxylase (fmol/min per mg of homogenate protein)			
17-months old			
2 weeks	419 ± 181	461 ± 143 (110)	510 ± 312 (122)
4 weeks	420 ± 192	357 ± 151 (85)	315 ± 203 (75)
23-months old			
2 weeks	220 ± 71	251 ± 108 (114)	238 ± 127 (108)
4 weeks	239 ± 128	182 ± 53 (86)	177 ± 44 (74)
30-months old			
2 weeks	145 ± 61	152 ± 60 (105)	83 ± 22* (57)
4 weeks	139 ± 15	97 ± 26* (70)	111 ± 24 (80)

Values are expressed as mean ±SD, n=8. *p<0.05, ***p<0.001.

水酸化活性の変化を示した。17 か月齢ラットでは、0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照群の 138% (p<0.001) に増加した後 4 週目には対照群のレベルになった。一方、23 及び 30 か月齢ラットでは、4 週目に対照群の各々 135% (p<0.05) 及び 133% (p<0.05) に増加した。したがって、本酵素活性の増加は、老齡ラットでは遅延すると考えられる。ベンゾピレン水酸化活性は、17 及び 23 か月齢ラットでは 0.1 及び 0.2 ppm O₃ 暴露 4 週目に低下傾向を示した。30 か月齢ラットでは、0.2 ppm O₃ 暴露 2 週目に対照群の 57% (p<0.05) に低下し、0.1 ppm O₃ 暴露でも 4 週目に 70% (p<0.05) に低下した。

表 6 に、ミトコンドリアのコハク酸-チトクロム c 還元酵素活性の O₃ 暴露による変化を示した。17 及び 23 か月齢ラットでは低下傾向が認められ、30 か月齢ラットでは暴露 4 週目に 0.1 及

表 6 0.1 及び 0.2 ppm O₃ 4 週暴露における腎ミトコンドリア
 のコハク酸-チトクロム c 還元酵素活性の変化
 Table 6 Changes in the succinate-cytochrome c reductase activity
 of renal mitochondria during four-weeks exposures to 0.1
 and 0.2 ppm O₃

Exposure Period	Exposure Concentration (ppm)		
	Control	0.1 ppm	0.2 ppm
17-months old			
2 weeks	24.2±3.6	26.8±2.6 (111)	22.5±5.0 (93)
4 weeks	23.6±3.3	21.9±2.6 (93)	21.2±3.1 (90)
23-months old			
2 weeks	24.6±2.7	23.4±3.4 (95)	21.5±3.8 (87)
4 weeks	28.3±4.6	23.7±6.5 (84)	24.4±5.0 (86)
30-months old			
2 weeks	23.1±4.1	20.3±2.6 (88)	19.4±2.8 (84)
4 weeks	22.2±4.3	17.8±1.4* (80)	17.2±1.2** (78)

Values are expressed as nmol/min per mg of homogenate protein (mean ±SD, n=8). *p<0.05, **p<0.01.

び 0.2 ppm O₃ で対照群の各々 80% (p<0.05) 及び 78% (p<0.01) に低下した。

4 考 察

本研究の結果は、NO₂、O₃ 亜急性暴露による腎臓の生体膜成分への影響がラットの加齢により修飾されることを示している。腎臓における NO₂、O₃ 暴露の影響は、ミクロソーム成分の誘導という点に特徴があり、ミクロソーム成分の中でもチトクロム P-450 含量の増加が顕著であった。NO₂ や O₃ による腎ミクロソーム誘導の生理的意義については不明であるが、NO₂ や O₃ によって呼吸器で生成する過酸化物の代謝に関連しているのかもしれない。NO₂ 暴露による腎臓のチトクロム P-450 の誘導は、老齢ラットで遅延した(表 3)。還元酵素等の他のミクロソーム成分も NO₂ 暴露によって誘導されるが、加齢による修飾は観察されなかった。O₃ 暴露の場合も同様に、チトクロム P-450 の誘導は老齢ラットで遅延したが、他のミクロソーム成分の誘導は加齢により修飾されなかった(表 4)。O₃ 暴露では、チトクロム P-450 イソ酵素により触媒される 7-エトキシクマリン脱エチル化活性の誘導がラットの加齢により遅延したが、ベンゾピレン水酸化活性では有意な増加は観察されず、30 か月齢ラットでは低下した(表 5)。この結果は、O₃ 暴露によるチトクロム P-450 の誘導がある種のイソ酵素に特異性の高い可能性を示唆している。ミクロソーム膜成分の中でもチトクロム P-450 は、動物の加齢により生合成能が低下することが明らかにされている^{8,9)}。本研究において見いだされたチトクロム P-450 誘導の加齢による遅延は、加齢による生合成能の低下が原因となっている可能性が考えられる。

NO₂, O₃ 暴露は、ミトコンドリア呼吸系の律速段階となっているゴハク酸-チトクロム c 還元酵素活性の低下を老齡ラットで増大させた(表 3, 6)。同様に、NO₂ 暴露による肝臓のミクロソーム成分の低下も、加齢により増大され持続的となった(表 1)。肝ミクロソーム成分の低下の加齢による増幅は、腎臓の場合と同様にチトクロム P-450 に特異性が高く、ある種のチトクロム P-450 イソ酵素に選択的である可能性が示唆された(表 2)。

結論として、NO₂, O₃ 暴露による臓器生体膜成分への影響の加齢による修飾は、ミクロソーム成分、特にチトクロム P-450 の腎臓での誘導の遅延と肝臓での低下の増幅及び持続であった。また、腎ミトコンドリアの呼吸系酵素活性の低下の増幅も起こった。これらの結果は、加齢による生合成能の低下により、老齡動物では NO₂ や O₃ の作用に対して代償反応が十分に行われない可能性を示唆している。

引用文献

- 1) Takahashi, Y. and T. Miura (1985): *In vivo* effects of nitrogen dioxide and ozone on xenobiotic metabolizing systems of rat lungs. *Toxicol. Lett.*, **26**, 145-152.
- 2) Takahashi, Y. and K. Mochitate and T. Miura (1986): Subacute effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung, liver and kidney of rats. *Environ. Res.*, **41**, 184-194.
- 3) Takahashi, Y. and T. Miura (1985): *In vivo* effect of ozone inhalation on xenobiotic metabolism of lung and liver of rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 855-864.
- 4) Van Bezooijen, C. F. A. (1984): Influence of age-related changes in rodent liver morphology and physiology on drug metabolism—A Review. *Mech. Aging Develop.*, **25**, 1-22.
- 5) 三浦 卓・高橋勇二・持立克身・彼谷邦光・国本 学(1986): ラット臓器のミクロソーム電子伝達系に及ぼす二酸化窒素とオゾンの複合間欠暴露の影響. 国立公害研究所研究報告, 第 101 号, 107-116.
- 6) 高橋勇二・三浦 卓・持立克身・河田明治・国本 学(1986): ラット臓器のミクロソーム異物代謝系に及ぼす二酸化窒素とオゾンの複合間欠暴露の影響. 国立公害研究所研究報告, 第 101 号, 99-106.
- 7) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 8) Walton, J. (1982): The role of limited cell replicative capacity in pathological age change. A Review. *Mech. Aging Develop.*, **19**, 217-244.
- 9) Blazejowski, C. A. and G. C. Webster (1983): Decreased rates of protein synthesis by cell-free preparations from different organs of aging mice. *Mech. Aging Develop.*, **21**, 345-356.

II-17

オゾン暴露がモルモット気管平滑筋の自発性収縮並びに
ヒスタミンに対する反応性に及ぼす影響

Effect of Ozone Exposure on the Inherent Tone and on the Responsibility to
Histamine in Guinea Pig Tracheal Smooth Muscle

山根一祐¹・小林隆弘¹

Kazusuke YAMANE¹ and Takahiro KOBAYASHI¹

要旨

オゾン(O₃)暴露が気道の反応性に及ぼす影響を解析する一環として、0.4ppm O₃の3, 7, 14日間暴露が気道平滑筋の自発性収縮及びヒスタミンに対する反応性に及ぼす影響をモルモットの摘出気管筋を用いて検討した。0.4ppm O₃ 3, 7日及び14日間暴露後のモルモット気管平滑筋の自発性収縮に有意な変化はみられなかった。シクロオキシゲナーゼの阻害剤であるインドメタシン、あるいはロイコトリエン(LT)の拮抗剤であるFPL55712処理により、自発性収縮の内、内因性プロスタグランジン(PG)及びLT類により維持されている自発性収縮に対するO₃暴露の有意な影響は見られなかった。気管平滑筋のヒスタミンに対する反応性もO₃暴露群と対照群の間で有意差はなかった。インドメタシン、あるいはFPL55712存在下でのヒスタミンに対する反応性もO₃暴露群と対照群との間で有意差はなかった。

Abstract

Female Hartley guinea pigs were exposed to 0.4 ppm ozone (O₃) for 3, 7, and 14 days and the tracheal smooth muscle was isolated to investigate the effect of O₃ exposure on the inherent tone and response to histamine from the aspect of arachidonic acid metabolism. The O₃ exposure did not affect significantly on the inherent tone. In order to examine the effect of the O₃ exposure on the contribution of arachidonic acid metabolites to the inherent tone, indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, and FPL 55712, a leukotriene antagonist, were used. The O₃ exposure did not affect the relaxation of the muscle induced by these drugs. It indicates that the contribution of arachidonic acid metabolites to the inherent tone was not affected by the O₃ exposure. Contractile responses to histamine in the presence and the absence of indomethacin or FPL 55712 were not altered significantly by the O₃ exposure.

These results indicate that the O₃ exposure did not effect significantly the inherent tone and the contractile responses in the tracheal smooth muscle in guinea pig.

-
1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1 はじめに

モルモットの気管平滑筋はヒスタミン、ロイコトリエン (LT)、プロスタグランジン (PG) 等の様々な化学伝達物質に対する反応性を有するため、気道平滑筋の研究に広く用いられている。一般に、平滑筋は静止時もある程度の収縮 (緊張 tonus) をしており、モルモットの気管筋においても持続性の自発的な収縮 (自発性収縮) がみられる¹⁾。この自発性収縮は、モルモット気管筋標本にシクロオキシゲナーゼの阻害剤であるインドメタシンあるいは LT の拮抗剤である FPL 55712 を加えると筋が弛緩することから、自発的に産生されるアラキドン酸 (AA) 代謝産物により維持されていると考えられている^{2,3)}。

一方、O₃ 暴露によりモルモットの気道反応性が亢進することが報告されている⁴⁾。この O₃ 暴露による気道反応性の亢進は AA 代謝産物に対する拮抗剤により抑制される。このことから O₃ 暴露による気道平滑筋周囲の AA 代謝の変化が気道の反応性の亢進と関連を持つ可能性が示唆された⁵⁾。気道筋の自発性張力は AA 代謝物により維持されているので、O₃ 暴露が気道平滑筋周囲の AA 代謝に影響を与えるとすれば自発性収縮に変化がでる可能性がある。そこで今回、O₃ 暴露が気道反応性に及ぼす影響を解析する目的で、モルモット摘出気管平滑筋を用い自発性収縮及びそのヒスタミンに対する反応性に及ぼす影響を検討した。

2 方法

2.1 暴露条件及び気管平滑筋標本の作製

ハートレー系雌モルモット (体重 330~730 g) を 0.4 ppm O₃ に 3 日, 7 日, 14 日間暴露した。対照群は清浄空気に暴露した。暴露終了後モルモットの頭部を強打し放血によりと殺した。頸部及び胸部を開き、平滑筋を痛めないように緩やかに気管を摘出した。摘出した気管は、Krebs Henseleit solution (KHS) を浸したシャーレ中で結合組織、脂肪等を取り除いた後、微小血管用のハサミを用いて螺旋状に 9 回転に切り開いた。約 3 mm 幅の九つの平滑筋切片が軟骨部でつながった帯を、三つの平滑筋切片が含まれるように 3 等分した。実験においては、対照群 (n=6~7) 及び暴露群 (n=6) において咽頭側と中央部と気管支側の三つの部位を対応させながら用いた。

以上のようにして作製した気管平滑筋標本は、10 ml の KHS を入れ、95%O₂ + 5%CO₂ を吹き込みジャケットを 37°C 温水で循環したオルガンバス中に懸垂した。組織切片の両端はセルフィンを用いて糸をつなぎ下端はオルガンバスに固定し、上端は等尺性トランスデューサーにつなぎ組織の張力を測定した。

2.2 自発性収縮の測定及びヒスタミン反応性の検討

2.1 に従い装置に設置した気管平滑筋標本は、KHS を 10 分おきに交換しながら 1 時間平衡においた後、a) 無処理 (normal KHS), b) 1 μ M インドメタシンを含む KHS, c) 1 μ M FPL

55712を含むKHSの3種の液に切り替え10分おきに液を交換しながら1時間インキュベートし自発性収縮の変化を調べた。1時間後張力の変動が安定した状態で、ヒスタミンを累積的に加えていき、0.1~100 μM のヒスタミンに対する反応を調べた。ヒスタミンに対する反応が最大に達したのち5 mM EGTAを含むCa-free KHSで組織を洗いさらに同液でインキュベートし、筋を最大弛緩させた。測定値は、最大弛緩をベースラインとして測定した active tension (g) で評価した。すべての実験は、暴露群と対照群を並行して行い、結果は暴露群をその対応する対照群と比較した。

3 結果

3.1 自発性収縮の比較

気管平滑筋の自発性収縮に及ぼす O_3 暴露の影響を表1~3に示した。気管筋標本は、約1~1.5 gの張力を持っており1時間のKHS処理前後では有意な変化は見られなかった。自発性収縮の大きさはいずれの暴露群もその対照群との間で有意な差はなかった。

次に内因性のシクロオキシゲナーゼ代謝産物及びLT類により維持される自発性収縮に対する O_3 暴露の影響を検討した。インドメタシン(1 μM)は自発性収縮を有意に減少させた。処理後の自発性収縮の値については暴露群とその対照群との間で有意な差はなかった。リポキシゲナーゼの代謝産物であるLTの拮抗剤であるFPL 55712は、1 μM の濃度で自発性収縮を有意に減少させた。処理後の自発性収縮については暴露群とその対照群との間で有意な差はなかった。

3.2 ヒスタミンに対する反応性 (図1~3)

図1~3に気管平滑筋のヒスタミンに対する反応性に及ぼす O_3 暴露の影響を示した。モルモット気管筋はヒスタミン濃度 10^{-6}M から収縮し始め 10^{-4}M で収縮は最高に達した。KHS中でこの

表 1 インドメタシン, FPL 55712処理による0.4ppm O_3 3日間暴露モルモット気管平滑筋の自発性収縮の変化 (単位: g)

Table 1 Effect of indomethacin or FPL 55712 treatment on the inherent tone of tracheal smooth muscle isolated from guinea pigs exposed to 0.4 ppm O_3 for 3 days (g)

処	理		control		O_3 exposed	
normal	KHS	処理前	1.33	\pm 0.44 ^a	1.24	\pm 0.55
		処理後	1.62	\pm 0.70	1.31	\pm 0.66
1 μM	インドメタシン	処理前	1.56	\pm 0.36	1.45	\pm 0.36
		処理後	0.46	\pm 0.16 ^{****b}	0.46	\pm 0.12 ^{**}
1 μM	FPL 55712	処理前	1.36	\pm 0.35	1.33	\pm 0.68
		処理後	0.59	\pm 0.18 ^{***}	0.67	\pm 0.33

a: 平均値 \pm SD (n=6), b: 処理前と処理後間のt検定, **p<0.01, ***p<0.001

表 2 インドメタシン, FPL 55712処理による 0.4ppm O₃ 7日間暴露モルモット気管平滑筋の自発性収縮の変化 (単位: g)

Table 2 Effect of indomethacin or FPL 55712 treatment on the inherent tone of tracheal smooth muscle isolated from guinea pigs exposed to 0.4 ppm O₃ for 7 days (g)

処	理		control		O ₃ exposed	
normal	KHS (1h)	処理前	1.43	± 0.48 ^a	1.56	± 0.66
		処理後	1.32	± 0.18	1.67	± 0.45
1 μ M	インドメタシン (1h)	処理前	1.53	± 0.32	1.55	± 0.37
		処理後	0.40	± 0.06 ^{****}	0.47	± 0.12 ^{**}
1 μ M	FPL 55712 (1h)	処理前	1.58	± 0.47	1.31	± 0.53
		処理後	0.35	± 0.08 ^{**}	0.43	± 0.11 [*]

a: 平均値±SD (n=6), b: 処理前と処理後間のt検定, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

表 3 インドメタシン, FPL 55712処理による0.4ppm O₃ 14日間暴露モルモット気管平滑筋の自発性収縮の変化 (単位: g)

Table 3 Effect of indomethacin or FPL 55712 treatment on the inherent tone of tracheal smooth muscle isolated from guinea pigs exposed to 0.4 ppm O₃ for 14 days (g)

処	理		control		O ₃ exposed	
normal	KHS (1h)	処理前	1.21	± 0.26 ^a	1.36	± 0.37
		処理後	1.45	± 0.58	1.35	± 0.52
1 μ M	インドメタシン (1h)	処理前	1.57	± 0.31	1.56	± 0.47
		処理後	0.43	± 0.13 ^{****}	0.53	± 0.19 ^{***}
1 μ M	FPL 55712 (1h)	処理前	1.44	± 0.42	1.43	± 0.43
		処理後	0.49	± 0.28 ^{***}	0.45	± 0.13 ^{**}

a: 平均値±SD (対照群n=7, 暴露群n=6), b: 処理前と処理後間のt検定, **p<0.01, ***p<0.001

濃度範囲のヒスタミンに対して発生する張力は, 暴露群, 対照群で有意な差はなかった (図1)。また 1 μ M インドメタシン存在下 (図2), 1 μ M FPL 55712 存在下 (図3) におけるヒスタミンによる収縮についても暴露群, 対照群で有意な差は見られなかった。

4 考 察

今回の実験結果より, O₃暴露の影響によるモルモット自発性収縮の有意な変化は見いだせなかった。自発性収縮には個体差がありその値はバラつきが大きい。O₃暴露の自発性収縮への影響はそのバラつきの中に隠れ, 有意な変動が見いだせなかったとも考えられる。

インドメタシンにより内因性のシンクロオキシナーゼ系代謝産物の産生を止めた場合, 自発性

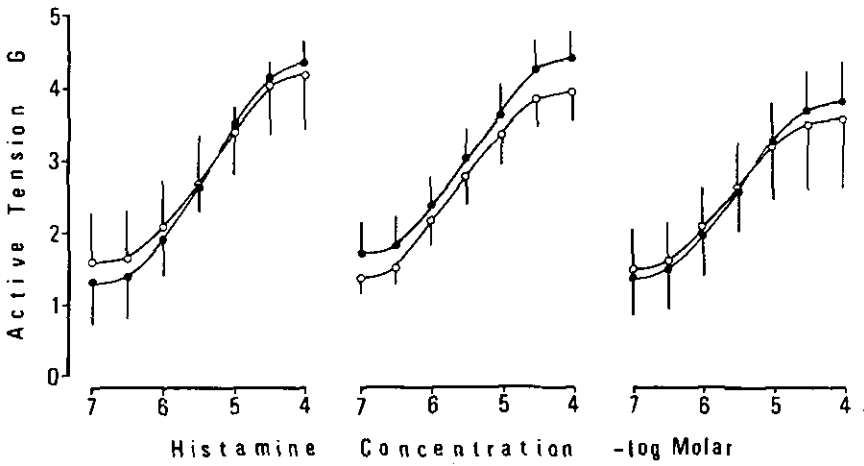


図 1 モルモット気管平滑筋のヒスタミンに対する収縮 (左: 3日間暴露, 中: 7日間暴露, 右: 14日間暴露)

Fig. 1 Contractile response of guinea pig tracheal smooth muscle to histamine (left: exposure for 3 days, middle: exposure for 7 days, right: exposure for 14 days)

○: clean air exposed animal (n=6~7), ●: 0.4 ppm O₃ exposed animal (n=6). Points represent mean; bars show SD.

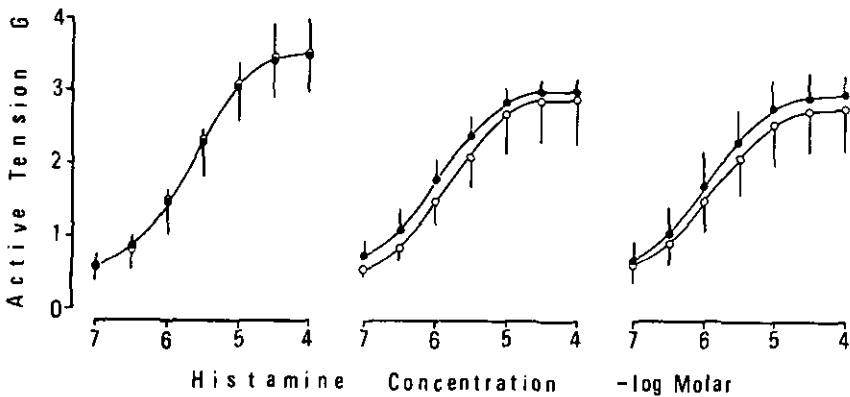


図 2 インドメタシン (1 μ M) 存在下におけるモルモット気管平滑筋のヒスタミンに対する収縮反応 (左: 3日間暴露, 中: 7日間暴露, 右: 14日間暴露)

Fig. 2 Contractile response of guinea pig tracheal smooth muscle to histamine in the presence of indomethacin (1 μ M) (left: exposure for 3 days, middle: exposure for 7 days, right: exposure for 14 days)

○: clean air exposed animal (n=6~7), ●: 0.4 ppm O₃ exposed animal (n=6). Points represent mean; bars show SD.

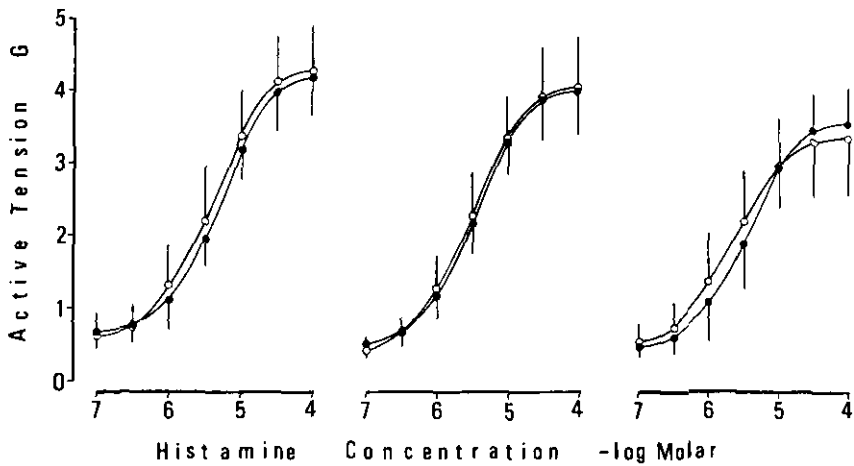


図 3 FPL 55712 ($1\mu\text{M}$) 存在下におけるモルモット気管平滑筋のヒスタミンに対する収縮反応 (左: 3 日間暴露, 中: 7 日間暴露, 右: 14 日間暴露)

Fig. 3 Contractile response of guinea pig tracheal smooth muscle to histamine in the presence of FPL 55712 ($1\mu\text{M}$). (left: exposure for 3 days, middle: exposure for 7 days, right: exposure for 14 days)
 ○: clean air exposed animal ($n=6\sim 7$), ●: 0.4 ppm O_3 exposed animal ($n=6$). points represent mean; bars show SD.

収縮は有意に減少するがその処理後の自発性収縮について O_3 暴露と対照群で有意な差はみられなかった。また、LT 拮抗剤 (FPL 55712) により内因性の LT の作用を阻害した場合でも同様であった。これらの結果は、自発性収縮のうち内因性 PG 及び LT により維持される分のどちらの自発性収縮に対しても O_3 暴露の有意な影響は見られなかったことを示している。

O_3 暴露群と対照群との間でヒスタミンに対する気管平滑筋の反応性に有意な差はなかった。また、インドメタシン、FPL 55712 存在下でのヒスタミンによる収縮についても有意な差がみられなかったことより、ヒスタミンにより誘起され気管の反応性に影響を与える可能性のある AA 代謝に関しても O_3 暴露の影響が見られないと考えられる。平滑筋の反応性は平滑筋細胞及びそれを取り巻く微小環境によるものと考えられている⁶⁾。摘出気管平滑筋を用いて反応性を見る今回の実験結果からは O_3 暴露がこれらに与える変化が平滑筋の反応性の亢進を導くということは確認できなかった。

引用文献

- 1) Kirkpatrick, C. T. (1981): Tracheobronchial smooth muscle. *In*: Smooth muscle: An Assessment of Current knowledge. E. Bülbbring, A. F. Brading, A. W. Jones and T. Tomita (*ed.*), Edward Arnold, London.
- 2) Mansour, S. and E. E. Daniel (1986): Maintenance of tone, role of arachidonate metabolites, and effects of sensitization in guinea-pig trachea. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **64**, 1096-1103.
- 3) Giembycs, M. A., D. Raeburn, J. A. Roberts, I. W. Rodger and N. C. Thomson (1983): Effect of guinine, indomethacin and FPL-55712 on contractions of guinea pig airway smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **80**, 446P.
- 4) Eaton, R. E. and S. D. Murphy (1967): Experimental ozone exposure and histamine: Effect on the acute toxicity and respiratory function effects of histamine in guinea pigs. *Arch. Environ. Health*, **15**, 160-166.
- 5) Murlas, C. and H. K. Lee (1985): U-60, 257 inhibits Ozone-induced bronchial hyperreactivity in the guinea-pig. *Prostaglandins*, **30**, 563-573.
- 6) Gordon, T., C. S. Venugopalan, M. O. Amdur and J. M. Drazen (1984): Ozone-induced airway hyperreactivity in the guinea-pig. *J. Appl. Physiol.*, **57**, 1034-1038.

II-18

オゾン暴露がマウス肺ヒスタミン放出に及ぼす影響
Effect of Exposure to Ozone on Histamine Release
from Lung in Mice

足川哲夫¹・本多芳男²・藤巻秀和³・村上正孝³

Tetsuo ASHIKAWA¹, Yoshio HONDA²,

Hidekazu FUJIMAKI³ and Masataka MURAKAMI³

要 旨

0.8ppm オゾン (O₃) 暴露が, BALB/c 雄マウス, W/W^v 雄マウス, +/+雄マウスの肺及び鼻粘膜に及ぼす影響について検討した。BALB/c マウスは, 1日, 3日及び1週間暴露で肺湿重量の有意な増加が認められたが, 肺, 鼻粘膜のヒスタミン量の変化は認められなかった。

そこで, この肺湿重量の増加に, 肥満細胞が関与しているかどうかを調べる目的で, W/W^v マウスと+/+マウスにオゾン暴露を行った。ヒスタミン含有細胞である肥満細胞を欠損する W/W^v マウスでは, 1週間暴露で肺湿重量の増加を認めなかったが, W/W^v マウスの野生型であり肥満細胞を保有する+/+マウスでは, BALB/c マウスと同様に肺湿重量の増加が認められた。しかし, +/+マウスでも肺ヒスタミン量の増加はなかった。

以上の結果より, 0.8ppm O₃ 暴露により, 肺ヒスタミン量は変化しないが, 肺湿重量の増加は認められ, この増加に肥満細胞の関与している可能性が示唆された。

Abstract

The effect of exposure to ozone (O₃) on histamine content in lung was investigated in male BALB/c mice, W/W^v mice and +/+ mice. BALB/c mice were continuously exposed to 0.8 ppm O₃ for 3 hrs, 1 day, 3 days and 7 days.

In other experiments, W/W^v mice which are mast cell deficiency and +/+ mice which contain mast cells were continuously exposed to 0.8 ppm O₃ for 7 days. In BALB/c mice, the increased lung weights were observed in 1 day, 3 days and 7 days exposure to O₃, but no

1. 昭和58~60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3-25-8) Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present address: The Jikei University School of Medicine, Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan.
2. 昭和58~60年度 国立公害研究所客員研究員 (東京慈恵会医科大学 〒105 東京都港区西新橋3-25-8) Visiting Fellow of the National Institute for Environmental Studies. Present address: The Jikei University School of Medicine, Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan.
3. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2 Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies. 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

significant change was observed in histamine content of lung and nasal mucosa through all exposure periods. The increased lung weights were also observed in +/+ mice, but not observed in W/W^v mice.

These results suggest that the increased weights of lung induced by O₃ exposure may be partly due to the presence of mast cells.

1 はじめに

O₃ は別名 edematogenic gas として知られるように、それを吸入することにより肺胞内水腫、肺胞壁細胞のえ死等が引き起こされる¹⁾。しかし、この肺水腫発生のメカニズムについては不明な点が多く残されている。

そこで、本研究では BALB/c 雄マウスを用いて O₃ 暴露を行い、肺及び鼻粘膜の湿重量とヒスタミン量の変化を調べるとともに、肺水腫の発生にヒスタミンを含有する肥満細胞が関与しているかどうかを明らかにするために、肥満細胞を欠損する W/W^v マウスと、その野生型で肥満細胞を保持する +/+ マウスに対しても O₃ 暴露を行い、O₃ 暴露による肺水腫発生のメカニズムの解析を行った。

2 材料と方法

実験動物は、6 週齢の BALB/c 雄マウス(日本チャールスリバー)と W/W^v 雄マウス及び +/+ 雄マウス(静岡実験動物協同組合)を用いた。O₃ の暴露は、既に報告した暴露条件²⁾で、BALB/c マウスに対しては 0.8ppm の濃度で 3 時間、1 日、3 日及び 1 週間連続暴露した。W/W^v マウス及び +/+ マウスに対しては、0.8ppm の濃度で 1 週間連続暴露した。ヒスタミン量の測定は、暴露終了後、採取した肺と鼻粘膜組織の総ヒスタミン量を Shore らの方法³⁾により測定し、さらに単位湿重量当たりのヒスタミン量を算出した。平均値の差の有意差検定は、Student の *t* 検定によった。

3 結果

3.1 O₃ 暴露による肺及び鼻粘膜湿重量の変動

BALB/c マウスに 0.8ppm O₃ 連続暴露を 3 時間、1 日、3 日及び 7 日間行い、直後にと殺し、肺左葉及び鼻粘膜湿重量を測定した。その結果、3 時間暴露では変化は認められなかったが、1 日、3 日及び 7 日間暴露では、対照群に比べて肺左葉湿重量の増加が認められた(図 1)。鼻粘膜湿重量は全暴露期間を通じて対照群と O₃ 暴露群との間で変化は見られなかった(図 2)。次に、肥満細胞を欠損する W/W^v マウス及び肥満細胞を保有する +/+ マウスに 0.8ppm O₃ の連続暴露を 1 週間行い、BALB/c マウスと同様の湿重量の測定を行った。+/+ マウスでは、肺左葉湿重量の増加は認められたが、W/W^v マウスでは、肺左葉湿重量に変化は認められなかった(図 3)。鼻粘膜湿重量の変化は両マウスで見られなかった。

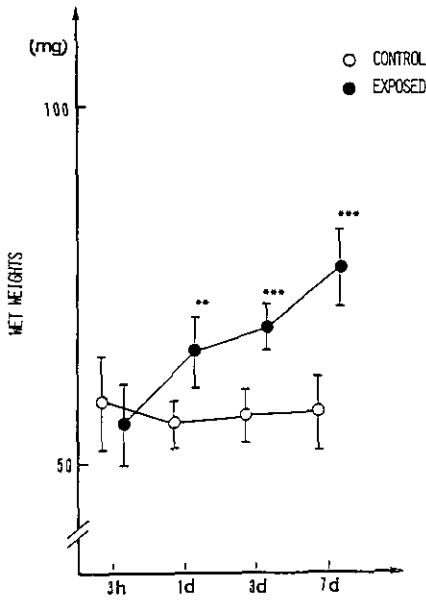


図 1 0.8 ppm O₃ 暴露の BALB/c マウス肺左葉湿重量に及ぼす影響

Fig. 1 Effects of 0.8 ppm O₃ exposure on wet weights of lung left lobe in BALB/c mice

All values are expressed as mean ± SE (n=6) **P<0.01, ***P<0.005, h: hour, d: day

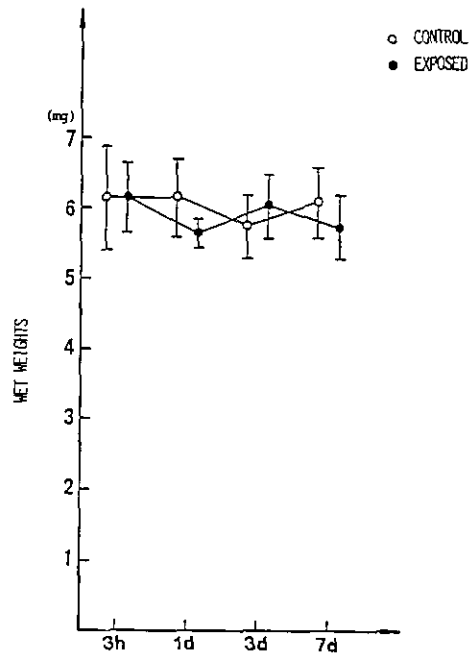
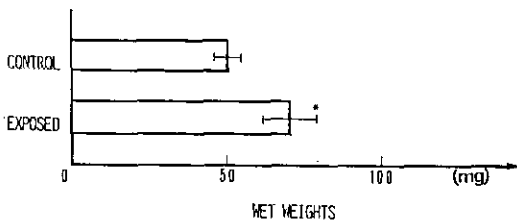


図 2 0.8 ppm O₃ 暴露の BALB/c マウス鼻粘膜湿重量に及ぼす影響

Fig. 2 Effects of 0.8 ppm O₃ exposure on wet weights of nasal mucosa in BALB/c mice

(A)



(B)

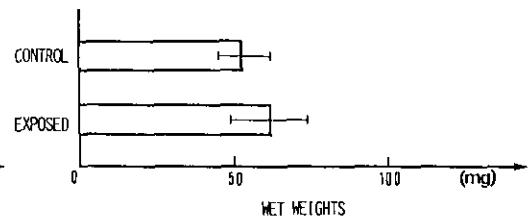


図 3 0.8 ppm O₃ 7日間暴露の W/W^v マウスと +/+マウスの肺左葉湿重量に及ぼす影響

Fig. 3 Effects of 0.8 ppm O₃ Exposure on wet weights of lung left lobe in W/W^v and +/+ mice

(A) in +/+ mice (B) in W/W^v mice. All values are expressed as mean ± SE (n=6) * P<0.05

3.2 O₃ 暴露による肺及び鼻粘膜のヒスタミン量への影響

BALB/c マウスの肺単位湿重量当たりのヒスタミン量には7日間暴露で低下が認められたが、肺左葉総ヒスタミン量は、全暴露期間を通じて変化はみられなかった (図4)。

W/W^v マウスでは、肺左葉、鼻粘膜ともにヒスタミンは検出されなかった。+/+マウスでは、肺単位湿重量当たりのヒスタミン量には低下がみられたが、肺左葉総ヒスタミン量には変化はみられなかった (図5)。鼻粘膜の総ヒスタミン量、単位湿重量当たりのヒスタミン量にすべてのマウスで変化は認められなかった。

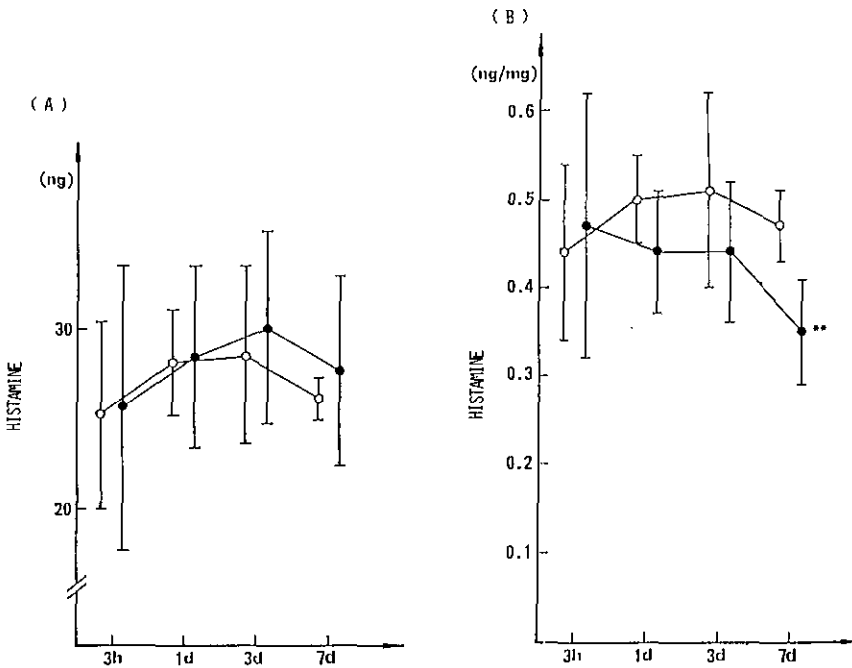


図 4 0.8 ppm O₃ 暴露の BALB/c マウス肺ヒスタミン量に及ぼす影響
Fig. 4 Effects of 0.8 ppm O₃ exposure on (A) total histamine and (B) histamine content of lung left lobe in BALB/c mice
All values are expressed as mean±SE (n=6) **P<0.01, ○ control, ● exposed

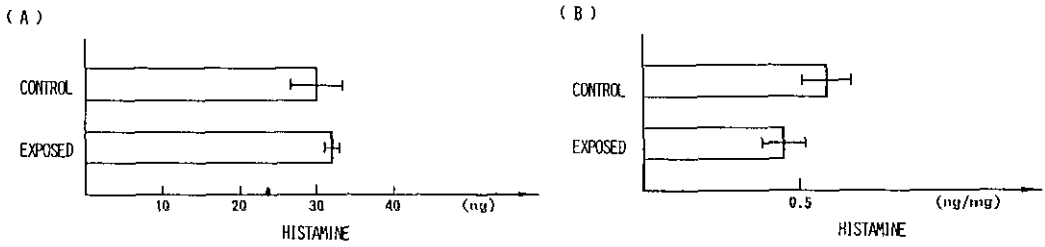


図 5 0.8 ppm O_3 7日間暴露の+/+マウス肺ヒスタミン量に及ぼす影響
 Fig. 5 Effects of 0.8 ppm O_3 exposure on (a) total histamine and (b) histamine content of lung left lobe in +/+ mice
 All values are expressed as mean \pm SE (n=6)

4 考 察

O_3 暴露による肺水腫発生のメカニズムとして、肺の血管内皮の障害⁴⁾とともに肺の局所におけるヒスタミンの放出^{5,6)}があげられており、 O_3 暴露による肺水腫発生と同時に肺ヒスタミン含有量の低下が認められることも報告されている^{7,8)}が、一方では肺ヒスタミン量には変化は認められないという Susan と Shri の報告⁹⁾もあり結論が得られていない。

本研究では、肺湿重量とヒスタミン量の変動について O_3 暴露後のマウスで調べたところ、BALB/c マウス及び+/+マウスへの 0.8 ppm O_3 暴露により、単位湿重量当たりのヒスタミン量の低下は 7日間暴露で認められるものの、肺左葉の総ヒスタミン量には低下が認められないため、この点から O_3 暴露による肺水腫発生のメカニズムにおけるヒスタミンの役割を明らかにすることはできないと考えられた。

そこで、さらにヒスタミン含有細胞である肥満細胞を欠損する W/W^v マウス^{10,11)}を用いて O_3 暴露を行いその野生型で肥満細胞を保有している+/+マウスの結果と比較したところ、W/W^v マウスでは肺湿重量に変化はみられなかったが、同様に行った+/+マウスでは、肺左葉の湿重量の増加がみられた。

これらの結果は、 O_3 暴露による肺湿重量の増加、すなわち肺水腫の発生の一因として、肥満細胞の関与を示唆するものであるが、その含有するヒスタミンの役割については不明であり、肥満細胞は、ヒスタミンのみならず白血球遊走因子、ロイコトリエン、プロスタグランジン、プロテオグリカン、タンパク分解酵素等多くのケミカルメディエーターを遊離する¹²⁾のでこれらの物質の関与が十分考えられる。

O_3 は肺などの下部気道のみならず、上部気道である鼻粘膜に対しても影響を与えることが報告されている¹³⁾が、本研究では肺と異なり鼻粘膜の湿重量に変化は認められなかった。このことの原因として、肺と鼻の構造、代謝等の差や鼻腔が開放性であることが考えられるため、鼻粘膜のみならずそこよりの分泌物の変化についての検討が望まれる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり終始有用なご助言、ご指導などをいただいた環境病理研究室の各位に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Scheel, L. D., O. J. Dobrogorski, J. T. Mountain, J. L. Svirbely and H. E. Stokinger (1959): Physiologic, biochemical, immunologic and pathologic changes following ozone exposure, *J. Appl. Physiol.*, **14**, 67-80.
- 2) Fujimaki, H., M. Ozawa, T. Imai and F. Shimizu (1984): Effect of short-term exposure to O₃ on antibody response in mice. *Environ. Res.*, **35**, 490-496.
- 3) Shore, P. A., A. Burkhalter and V. H. Cahn (1959): A method for fluorometric assay of histamine in tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**, 182-186.
- 4) Plopper, G., D. L. Dungworth and W. S. Tyler (1973): Morphometric evaluation of pulmonary lesions in rats exposed to ozone. *Am. J. Pathol.*, **71**, 395-408.
- 5) Majno, G. and G. E. Palade (1961): Studies in inflammation. I The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electronmicroscopic study. *J. Biophys. Cytol.*, **11**, 571.
- 6) Stokinger, H. E. (1965): Ozone toxicology-A review of research and industrial experience. *Arch. Environ. Health*, **10**, 719-731.
- 7) Dixon, J. R. and J. T. Maintain (1965): Role of histamine and related substances in development of tolerance to edematogenic gases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **7**, 756-766.
- 8) Suzuki, T. (1969): Effect of exposure to O₃, SO₂ and NO₂ upon the lung histamine content of guinea pigs. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, **16**, 99-108.
- 9) Susan, R. C. and N. G. Shri (1974): Effect of pulmonary irritants on DNA, ATPase activity and histamine on rat lung. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **146**, 120-125.
- 10) Kitamura, Y., S. Go and K. Hatanaka (1978): Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood*, **52**, 447-452.
- 11) Yamatodani, A., K. Maeyama, T. Watanabe, Y. Kitamura and H. Wada (1982): Tissue distribution of histamine in a mutant mouse deficient in mast cells. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 305-309.
- 12) Befus, A. D. (1987): The role of the mast cells in allergic bronchospasm. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **65**, 435-441.
- 13) 豊田泰雄 (1976): オゾン暴露ハツカネズミにおける上, 下気道の病理組織学的所見および血液所見に関する研究. *阪市医*, **25**, 305-324.

II-19

オゾン暴露によるマウス線維肉腫 NR-FS 細胞の肺転移の促進*
**Enhancement of Pulmonary Metastasis of Murine Fibrosarcoma
NR-FS by Ozone Exposure**

小林隆弘¹・轟 健²・佐藤浩明³

Takahiro KOBAYASHI¹, Takeshi TODOROKI² and Hiroaki SATO³

要 旨

オゾン(O₃)暴露がC3H/He マウスに自然発生した線維肉腫 NR-FS 細胞の肺転移に及ぼす影響を検討した。雄のC3H/He マウスを0.8, 0.4, 0.2あるいは0.1 ppm O₃に1, 3, 5, 7, 14日間暴露し, 暴露終了後ただちに, 一定数のNR-FS細胞(5×10⁵, 1×10⁶, 5×10⁴または1×10⁶個)を尾静脈より注入した。注入2週間後に, 肺への転移数を肺表面にできた腫瘍による結節の数を数えることにより比較すると, 1) O₃暴露群では対照群に比べ転移が促進されていること, 2) 転移数はO₃濃度が高いほど促進されること, 3) O₃暴露による転移の促進作用は暴露期間により変動すること, を見いだした。

Abstract

The effects of ozone exposure on the metastasis of a fibrosarcoma (NR-FS) that arose spontaneously in a C3H/He mouse was studied. Male C3H/He mice were exposed to 0.8, 0.4, 0.2 and 0.1 ppm ozone for 1, 3, 5, 7 and 14 d. After the exposure, the mice were infused intravenously with NR-FS cells. At 2 weeks postinfusion, the lungs were isolated to examine the colony development of metastasis. A significantly higher rate of pulmonary metastasis than that of normal mice was observed in the ozone-exposed mice. The metastasis was enhanced dose dependently by the concentration of ozone and varied with exposure length.

*本論文の要旨は, J. Toxicol. Environ. Health, 20: 135-145 (1987) に発表したものである。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 昭和59~62年度 国立公害研究所客員研究員 (筑波大学 臨床医学系消化器外科 〒305 茨城県つくば市天王台1-1)
Visiting Fellow of the National Institute for Environmental Studies. Present address: Department of Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
3. 昭和59年度 国立公害研究所共同研究員 (東邦大学 理学部生物科 〒274 千葉県船橋市三山2-2-1)
Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present address: Department of Biology, Toho University, Chiba, Japan.

1 はじめに

大気中の光化学反応によりオゾン (O_3) をはじめとするオキシダントが生成されることが知られている。Richters らは、 O_3 と同様に酸化力のある二酸化窒素 (NO_2) は大気中に存在する程度の低濃度の暴露で B 16 メラノーマの肺転移を有意に促進することを見いだした¹⁾。一方、肺転移の頻度を促進する効果を指摘されている、血小板の凝集能の増加²⁾、生体防御機構の低下³⁾、タンパク分解酵素阻害因子の低下⁴⁾が O_3 や NO_2 といった酸化力の強いガス状物質の暴露により起きることが報告されている。そこで、 O_3 暴露が腫瘍細胞の肺転移の頻度にどのような影響を与えるか検討した。

2 方法

2.1 動物暴露

一群 6 匹の JCl: C 3 H/He 系雄マウス (8~12 週齢) を 0.8, 0.4, 0.2 あるいは 0.1 ppm O_3 に 1, 3, 5, 7, 14 日間暴露した。

2.2 腫瘍細胞の調整

腫瘍は C 3 H/He 系マウスに自然発生した NR-FS 線維肉腫を使用した。

皮下に移植した NR-FS 線維肉腫を無菌的に取り出し、時計皿上で刻んだ。刻まれた腫瘍を 0.05% トリプシンを含む RPMI 1640 50 ml 中で 15 分間穏やかにかくはん処理し、5 分間静置後、死細胞、細胞片を含む上清を捨てた。同様のトリプシン処理をさらに 2 回行い、上清を室温にて 1800 rpm にて 5 分間遠心し、腫瘍細胞を得た。細胞は 10% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 を加え、遠心後、RPMI 1640 に浮遊させた。生細胞数を数えた後、一定の細胞濃度に希釈した。

2.3 実験的肺転移系

NR-FS 線維肉腫細胞を使用し、実験的肺転移系を確立した。単細胞浮遊液 200 μ l をマウス尾静脈より注射し、7~24 日後肺を摘出し、Bouin 液にて固定後⁵⁾、各肺葉の表面にある結節の数を数え転移数とした。注射後の日数と肺転移数の関係を図 1 に示した。1 \times 10⁶ 個注入した場合 14~18 日後に肺の結節数はほとんど変化しなくなることが明らかになり、腫瘍細胞注射後 14 日目の肺転移数を比較することにした。図 2 に O_3 暴露及び実験的肺転移のスケジュールを示した。

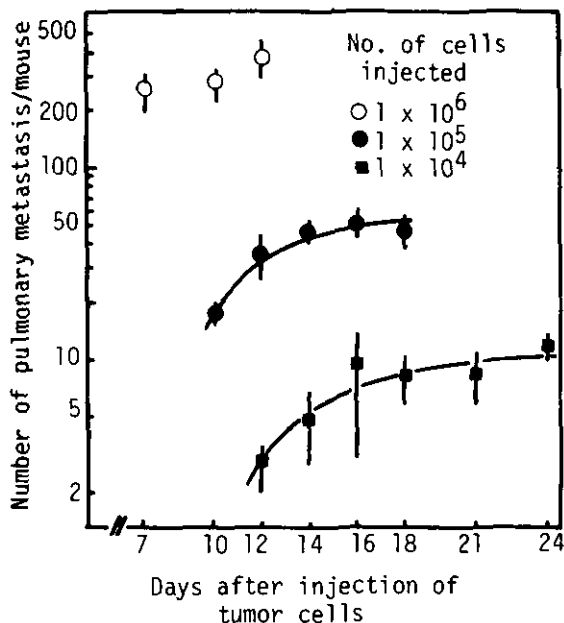


図 1 腫瘍細胞の尾静脈注射後の日数と肺転移数(肺表面の腫瘍による結節数)の関係

Fig. 1 Development of the number of pulmonary metastases after injection of tumor cells

Each point represents the mean value of six mice. Vertical bars indicate the standard deviation of the mean.

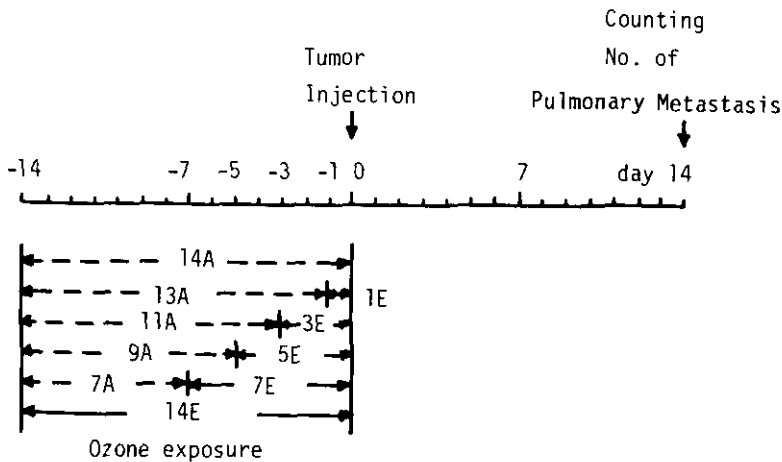


図 2 O₃ 暴露及び実験的肺転移の実験スケジュール

Fig. 2 Schedule of O₃ exposure and experimental lung metastases

On d 14, all the animals were exposed to filtered air (A) or O₃ (E). On the d 0, tumor cells were injected into the tail veins of mice. On d 14, the number of pulmonary metastases were counted.

3 結果

0.8 ppm O₃ 暴露により、NR-FS 線維肉腫細胞の実験的肺転移が顕著に促進されることを図 3 に示した。1×10⁵ 個注射した場合、0.8 ppm O₃ 1 日暴露により肺転移が対照群の 459%になることが明らかになった。その後、暴露を続けると、肺転移の促進された状態が続くが、促進する割合は徐々に低下していくことが判明した。この傾向は 5×10⁴、5×10⁵ 個尾静脈注射した場合も同様であった。

次に暴露濃度の異なる O₃ による肺転移の頻度に及ぼす影響を検討した (図 4)。0.4 ppm O₃ 暴露の場合 1 日及び 5 日暴露で肺転移が対照群のそれぞれ 2.3, 2.2 倍と有意に促進された。3 日暴露では一時的に肺転移の促進効果が低下した。この変動の傾向は図 5 に示すように尾静脈注射する細胞数を変えた実験でも再現された。一方、0.2 ppm, 0.1 ppm O₃ 暴露の結果から、暴露濃度が低下すると肺転移の促進効果が低下すること、また、これらの濃度でもわずかながら肺転移の促進効果があること (図 4) が判明した。

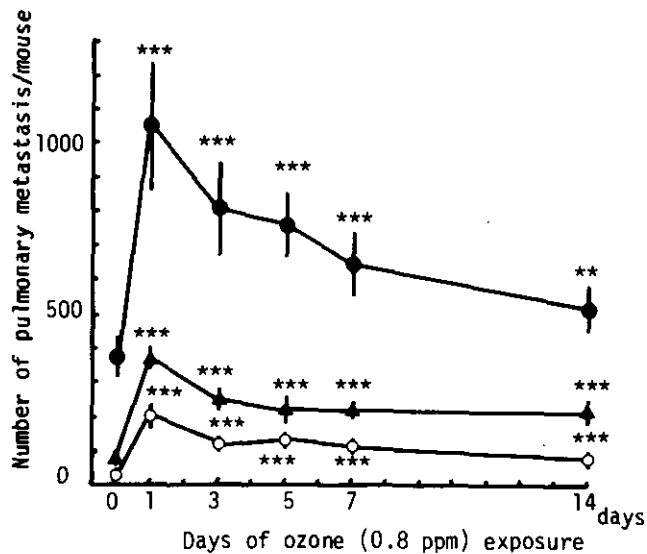


図 3 0.8 ppm O₃ 暴露の肺転移に及ぼす影響
 Fig. 3 Effect of the periods of O₃ (0.8 ppm) exposure on pulmonary metastases: 5×10⁵ (●), 1×10⁵ (▲) and 5×10⁴ (○) tumor cells were injected into tail veins of mice exposed to ozone
 At 14 d after injection, numbers of pulmonary metastases were counted. Points represent mean of six mice; bars show SD. Significant difference from mice not exposed to O₃ are presented as *** p<0.001 and ** p<0.01.

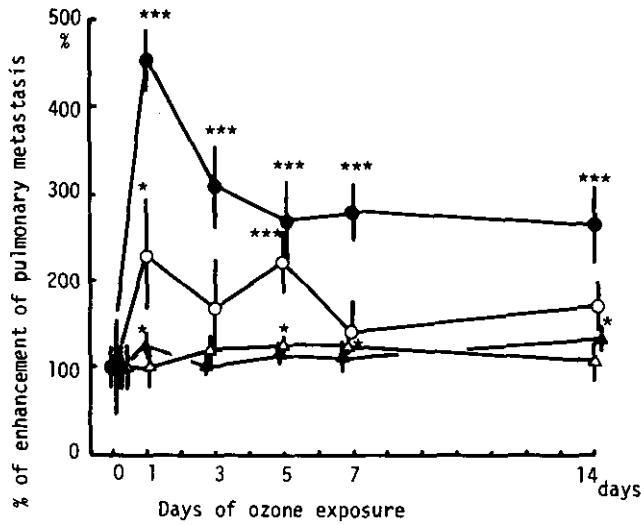


図 4 O₃ が肺転移に及ぼす影響：濃度依存性

Fig. 4 Effect of concentration of O₃ on pulmonary metastasis

Mice were exposed to 0.8 (●), 0.4 (○), 0.2 (△) and 0.1 (▲) ppm O₃ for 1, 3, 5, 7 and 14 d. At 14 d after injection, numbers of pulmonary metastases were counted. Points represent mean for six mice; bars show SD. Significant differences from mice not exposed to O₃ are presented as *** p < 0.001, * p < 0.05.

4 考 察

比較的高い濃度の O₃ 暴露により、NR-FS 線維肉腫細胞の実験的肺転移が顕著に促進されること、肺転移の促進の度合いは、O₃ 暴露の期間に依存し複雑に変化すること、O₃ 暴露濃度が低下すると O₃ による肺転移の促進効果が低下することが明らかになった。この O₃ 暴露による腫瘍細胞の肺転移促進効果がどのような因子により起きる可能性があるかに関し以下に考察する。

腫瘍の肺転移は Fidler が提唱するように、いくつかの段階を経て成立すると考えられる⁹⁾。すなわち、腫瘍細胞の 1) 原発巣から周囲の組織への浸潤、2) 血管内への移行、3) 血管を通して他の器官への移行、4) 血流中における、血小板、リンパ球などとの凝集塊の形成、5) 血管壁への着床あるいは毛細血管での凝集塊の捕捉、6) 血管壁から組織への浸潤、7) 組織内での増殖と新たな結節の形成、である。本実験で用いた実験的肺転移系は 3)~7) の段階をモデル化したものとして用いられている。

3)~7) のそれぞれの段階で、腫瘍細胞は宿主の免疫担当細胞の攻撃を受けると考えられる。Hanna らは、シクロホスファミド処理エフェクター細胞を減少させたマウスは肺転移が顕著に増加すること、このマウスに正常なマウスの血清と補体処理した脾細胞をエフェクター細胞とし

これを静脈注射すると、肺転移の抑制機能が回復するが、NK細胞に特異的でマクロファージ及びリンパ球の能力に影響のない、抗NK-1.2抗体と補体で処理した場合、抑制効果が回復しないことにより、肺転移の抑制にマクロファージ、リンパ球でなく、NK細胞が重要な役割をしていることを示した⁶⁾。我々は0.8及び0.4 ppm O₃ 1日暴露においてNK活性がそれぞれ対照群の28%、80%と有意に低下し、その後、対照群の値に徐々に回復することを見いだしている。肺転移も0.8及び0.4 ppm O₃ では1日暴露により促進されることから(図3, 5) O₃ 暴露によるNK活性の低下と肺転移の促進との間に関連性のあることが示唆された。

4)の段階では、腫瘍細胞と血小板、リンパ球などの凝集塊の生成は血管内皮細胞や肺から放出されているプロスタサイクリン(PGI₂)により阻害される。このPGI₂の凝集阻害能腫瘍細胞の肺転移抑制と関係していることがHonnらにより報告されている⁷⁾。我々はラット肺でのPGI₂合成能は0.8及び0.4 ppm O₃ 暴露により低下することを見いだしてきた⁸⁾。マウスの場合も同様の変化が起き、転移の促進に関連している可能性がある。

一方、より転移能の高いB 16 F 10 黒色腫瘍細胞変異株は転移能の低いB 16 F 1 よりも線維素溶解能が高いこと⁹⁾、V 2 腫瘍をもつ家兎をウロキナーゼで長期間処理すると転移が促進されることから¹⁰⁾、腫瘍細胞並びに宿主のタンパク分解酵素活性は転移を促進する可能性があると考えら

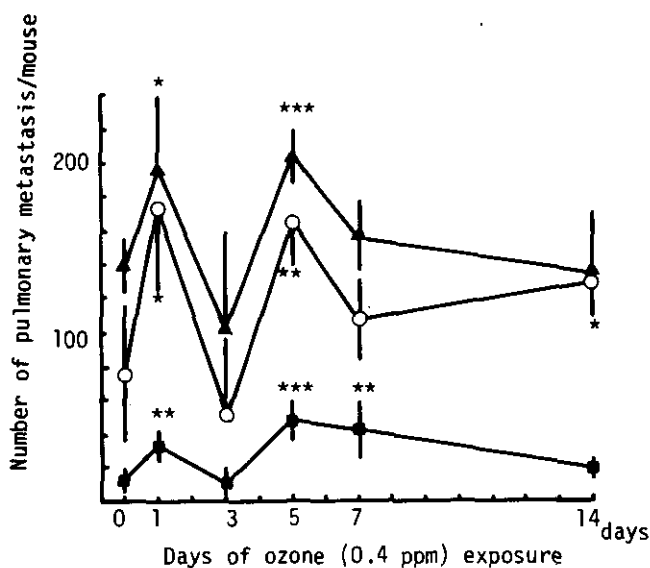


図 5 0.4 ppm O₃ 暴露の肺転移に及ぼす影響

Fig. 5 Effect of O₃ (0.4 ppm) exposure on pulmonary metastasis.

1 × 10⁵ (▲), 5 × 10⁴ (○) and 1 × 10⁴ (■) tumor cells were injected. At 14 d after injection, numbers of pulmonary metastases were counted. Significant differences from mice not exposed to O₃ are presented as *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05.

れている。また、タンパク分解酵素阻害剤であるロイペプチンの投与により実験的肺転移が抑制されることも報告されている¹¹⁾。このことより、宿主のタンパク分解酵素阻害活性は肺転移頻度を低下させる役割を持つと考えられている。O₃ 暴露によりタンパク分解酵素阻害活性が低下することが報告されており⁹⁾、これが O₃ 暴露による腫瘍細胞の肺転移を促進する一因になる可能性があると考えられる。

転移の成立過程は多くの因子が関係しているため、上記以外の因子が O₃ 暴露により修飾され転移促進に結びつく可能性があり、O₃ 暴露による腫瘍細胞の肺転移促進の機構解析は今後の課題と考えられる。

引用文献

- 1) Richters, A. and K. Kuraitis (1981): Inhalation of NO₂ and blood borne cancer cell spread to the lungs. Arch. Environ. Health, **36**, 36-39.
- 2) Kobayashi, T., I. Morita and S. Murota (1983): Effect of nitrogen dioxide exposure on prostacyclin synthesis in lung and thromboxane A₂ synthesis in platelets in rats. Prostaglandins, **26**, 303-310.
- 3) Miller, S. and R. Ehrlich (1958): Susceptibility to respiratory infections of animals exposed to ozone. Susceptibility to Klebsiella pneumoniae. J. Infect. Dis., **103**, 145-149.
- 4) Sharman, M. C. and J. B. Mudd (1981): Ozone inactivation of antielastase activity of chicken ovoinhibitor and human α -1-protease inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Commun., **102**, 640-645.
- 5) Fidler, I. J. (1978): General considerations for studies of experimental cancer metastasis. Methods Cancer Res., **15**, 399-433.
- 6) Hanna, N. and R. C. Burton (1981): Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis *in vivo*. J. Immunol., **127**, 1754-1758.
- 7) Honn, K. V., F. Cicone and A. Skoff (1981): Prostacyclin: A potent antimetastatic agent. Science, **212**, 1270-1272.
- 8) Kobayashi, T. (1983): Effect of ozone exposure on prostacyclin synthesis in lung. Prostaglandins, **26**, 1021-1027.
- 9) Wang, B. S., G. A. McLoughlin, J. P. Richie and J. A. Mannick (1980): Correlation of the production of plasminogen activator with tumor metastasis in B16 mouse melanoma cell lines. Cancer Res., **40**, 288-292.
- 10) Kodama, Y. and K. Tanaka (1978): Effect of urokinase on growth and metastasis of rabbit V2 carcinoma. Gann, **69**, 9-18.
- 11) Saito, D., M. Sawamura, K. Umezawa, Y. Kanai, C. Furihata, T. Matsushima and T. Sugimura (1980): Inhibition of experimental blood-borne lung metastasis by protease inhibitors. Cancer Res., **40**, 2539-2542.

II-20

オゾン暴露による肺胞マクロファージの代謝の
活性化と細胞数の増加
**Metabolic Enhancement and Increase of Alveolar
Macrophages Induced by Ozone**

持立克身¹・三浦 卓¹

Katsumi MOCHITATE¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

オゾン (O₃) による肺胞マクロファージの細胞機能への影響を検索するため、ラットに 0.2 ppm O₃ を 14 日間暴露した後、肺洗浄により肺胞マクロファージを調製し、抗酸化系及び解糖系の酵素活性、及び細胞数について検索した。グルコース-6-リン酸脱水素酵素及びグルタチオンパーオキシダーゼの比活性は、それぞれ対照群の 1.55 倍 (3 日目) 及び 1.47 倍 (5 日目) に増加した。また、ピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素及びヘキソキナーゼの比活性も、3 日目にそれぞれ対照群の 1.60、1.37 及び 1.20 倍に増加した。その後これらの酵素活性は、14 日目まで有意に高い値を示した。このことから、3 日目以降は肺胞マクロファージの抗酸化系及び解糖系の代謝が亢進していることが示唆された。更に肺胞マクロファージのチミジン取り込み活性も、1 日目及び 3 日目には対照群の 2 倍に増加し、DNA の生合成活性も促進されていることが示唆された。肺胞マクロファージの細胞数は、暴露 1 日目には対照群の 0.78 倍に減少したが、3 日目には 1.4 倍に増加し、その後も有意に高い値を維持した。特に 5 日目以降は、小形の細胞が顕著に増加した。

これらの結果から、0.2 ppm O₃ 暴露は、肺胞マクロファージの抗酸化系及び解糖系の代謝を亢進させ、細胞分裂を促すことが明らかになった。

Abstract

Male Wistar rats were exposed to 0.2 ppm ozone (O₃) for 14 days and at intervals alveolar macrophages were collected by pulmonary lavage to examine the effects of O₃ on cellular functions. The specific activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione peroxidase of alveolar macrophages from exposed rats increased to 1.55-fold (on day 3) and 1.47-fold (on day 5) those of the control values, respectively. Similarly, the specific activities of pyruvate kinase, lactate dehydrogenase and hexokinase increased to 1.60-fold, 1.37-fold and 1.20-fold those of the control values on the third day, respectively. The activities of all enzymes tested were maintained at significantly higher levels until the

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川 16 番 2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

fourteenth day. In addition, the incorporation of ^{14}C -thymidine into alveolar macrophages increased twice the control values on the first and third days. The number of alveolar macrophages collected from exposed animals also increased to 1.48-fold that of the control value on the third day and was maintained at a significantly higher level until the fourteenth day. It is noted that alveolar macrophages of small size preferentially increased between the fifth and fourteenth days.

These results show that exposures to 0.2 ppm O_3 induced a metabolic enhancement of the peroxidative metabolism and glycolysis in alveolar macrophages and increased the macrophages of small size.

1 はじめに

オゾン (O_3) 及び二酸化窒素 (NO_2) は代表的な大気汚染物質であり¹⁾, 肺胞及び終末細気管支の上皮細胞に傷害を与える²⁻⁵⁾ ことが知られている。肺胞マクロファージは肺胞に位置し、呼吸の際に肺に侵入した微生物から生体を防御する上で重要な役割を担っている⁶⁾。これまで、高濃度の O_3 及び NO_2 によって、肺胞マクロファージの抗ウイルス活性^{7,8)}, 殺菌活性^{9,7,9,10)} 及び貪食能^{7,10,11)} は傷害を受けることが知られている。しかし、低濃度でのこれら酸化性物質による肺胞マクロファージへの影響については、ほとんど知られていない。

これまで、筆者らは 2~10 ppm NO_2 暴露によって、肺の解糖系及び呼吸系の酵素活性が暴露濃度に比例して増加する^{12,13)} ことを明らかにし、肺におけるエネルギー代謝が NO_2 暴露によって傷害を受けた肺の上皮細胞の修復及び増殖の時期と一致して亢進することを示唆した。筆者らはまた、この時期には肺胞マクロファージの抗酸化系及び解糖系の酵素活性が増加し、DNA 生合成活性も上昇すること、更にその後細胞数も増加する¹⁴⁾ ことを明らかにした。したがって、肺におけるこれらの酵素活性の上昇及び肺胞マクロファージの酵素活性の上昇と細胞数の増加は、傷害を受けた肺の各種細胞が増殖と修復もしくは新しい細胞との交換によって NO_2 に対して適応する過程を反映していると考えられる。

本研究では、0.2 ppm O_3 14 日間の暴露によって、肺胞マクロファージの解糖系及び抗酸化系の酵素活性が上昇し、これらの代謝系が亢進すること、及び DNA 生合成活性が亢進した後、小型のマクロファージが増加することから肺胞マクロファージの細胞分裂が促進されることを明らかにした。

2 方法

2.1 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 (30~32 週齢) に 0.2 ppm O_3 を 14 日間連続暴露した。暴露期間中経時的にチャンバーよりラットを取り出し、頸動脈より放血した後、0.95% 食塩水で肺をかん流した。次にこの肺を取り出し、35 ml の 136 mM NaCl—5.3 mM KCl—2.5 mM リン酸緩衝液—5.5 mM グルコース—10 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) (等張 Hepes 溶液) で肺を洗

浄し、肺胞内の遊離細胞を洗い出した。回収した肺洗浄液中の遊離細胞は等張 Hepes 溶液で洗った後、肺胞マクロファージ標品として以下の実験に用いた¹⁴⁾。

細胞数は、血球計数板もしくはコールターカウンター(直径 $9\mu\text{m}$ 以上の大きさの細胞を計測するように調整)で計測した。細胞の生存率はトリパンブルー排除試験により測定したところ、すべての標品の生存率は 95%以上で、暴露群と対照群の間に差は認められなかった。

肺洗浄により溶出した遊離細胞の組成は、その塗抹標本をギムザ染色した結果、約 94%以上が肺胞マクロファージであった。

2.2 酵素活性の測定

肺胞マクロファージ標品の一部を 0.25 M 蔗糖—10 mM Tris-HCl 緩衝液—0.5 mM EDTA (pH7.4) 溶液に懸濁し Potter-Elvehjem テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。そのホモジネートを 105,000 \times g 60 分間遠心した上清を用いて以下の酵素活性を測定した。

グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) 活性は Löhner らの方法¹⁵⁾ に従い 30°C で測定した。グルタチオンパーオキシダーゼ (GPx) 活性は、Chiu らの方法¹⁶⁾ を一部変更し、100 mM Tris-HCl (pH 7.6)—2.7 mM 還元型グルタチオン—0.25 mM クメンハイドロパーオキシド—0.2 mM NADPH—0.1 mM EDTA—2 units/ml グルタチオン還元酵素の測定液を用いて 37°C で測定した。ピルビン酸キナーゼ (PK) 活性は Gutman らの方法¹⁷⁾ を一部変更し、100 mM Tris-HCl (pH 7.4)—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 MgCl_2 —30 units/ml 乳酸脱水素酵素の測定液を用いて 30°C で測定した。乳酸脱水素酵素 (LDH) 及びヘキソキナーゼ (HK) 活性は、Bergmeyer らの方法¹⁸⁾ を用いて、30°C で測定した。

タンパク質量は、Lowry らの方法¹⁹⁾ を用いて測定した。

2.3 ^{14}C -チミジンの取り込みの測定

2×10^6 個の肺胞マクロファージを ^{14}C -チミジン (50 nCi/ml) 及び 10% 牛胎児血清を含む Eagle の MEM 培地 4 ml に懸濁し、37°C で 3.5 時間、5% CO_2 下で培養した。培養後ディッシュに付着したマクロファージをラバーポリスマンではぎ取り、Dulbecco の PBS 溶液で洗った後、シンチレーターに懸濁して取り込んだ ^{14}C 量を測定した。Schmidt-Thannhauser-Schneider 法²⁰⁾ を用いて調べた結果、肺胞マクロファージに取り込まれた ^{14}C 量の約 80% は DNA 画分に存在した。

3 結果

3.1 肺胞マクロファージの酵素活性の変化

表 1 に 0.2 ppm O_3 14 日間暴露による肺胞マクロファージのタンパク量及び G6PDH, GPx 活性の経時変化を示した。タンパク量は、暴露 1 日目には対照群の 0.80 倍に減少したが、3 日目に

表 1 0.2 ppm O₃ 暴露による肺胞マクロファージのグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)及びグルタチオンパーオキシダーゼ(GPx)活性の変化

Table 1 Changes in the specific activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and glutathione peroxidase (GPx) of alveolar macrophages during exposure to 0.2 ppm ozone^a

Exposure Time	Protein ^b	E/C	G6PDH ^c	E/C	GPx ^c	E/C	
1 Day	Cont	0.699 ± 0.028			1890 ± 200		
	Expo	0.562 ± 0.062**	0.80	1.88 ± 17**	0.80	1630 ± 180	0.86
3 Days	Cont	0.702 ± 0.048		181 ± 15		2040 ± 120	
	Expo	0.871 ± 0.037***	1.24	280 ± 16***	1.55	2170 ± 250	1.06
5 Days	Cont	0.626 ± 0.103		194 ± 13		1990 ± 190	
	Expo	0.971 ± 0.101***	1.55	279 ± 18***	1.44	2930 ± 100***	1.47
7 Days	Cont	0.642 ± 0.108		180 ± 10		1910 ± 240	
	Expo	0.949 ± 0.177**	1.48	281 ± 41**	1.56	3110 ± 280***	1.63
14 Days	Cont	0.595 ± 0.059		192 ± 14		1910 ± 240	
	Expo	0.849 ± 0.192*	1.43	192 ± 28***	1.51	3040 ± 400***	1.59

^a The preparation of macrophage supernatants and the determination of the protein content and enzyme activities of the peroxidative metabolic pathway were performed as described in materials and methods.

^b mg of supernatant protein/lung (mean ± SD, n=6).

^c μmole/min/g of supernatant protein (mean ± SD, n=6).

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

は対照群の 1.24 倍に増加し、その後も有意に高い値を示した。抗酸化系酵素である G6PDH 活性は、タンパク量の変化と同様に暴露 1 日目は低下したが、3 日目には対照群の 1.55 倍に上昇した。GPx 活性もまた 5 日目に 1.47 倍に増加し、両酵素活性はその後にも有意に高い値を維持した。PK, LDH 及び HK 比活性は暴露 3 日目にそれぞれ対照群の 1.60, 1.37 及び 1.20 倍に増加し、14 日目まで有意に高い値を示した(表 2)。これらの結果から、0.2 ppm O₃ 暴露は抗酸化系の代謝の亢進とエネルギー産生の上昇を促すことが示唆された。

3.2 ¹⁴C-チミジンの取り込み量の変化

0.2 ppm O₃ 暴露による DNA の生合成活性への影響を調べるため、¹⁴C-チミジンを含む培地で肺胞マクロファージを 3.5 時間培養した。細胞内に取り込まれた ¹⁴C 量の約 80% は DNA 画分に存在した。表 3 に 0.2 ppm O₃ 14 日間暴露によるチミジンの取り込み量の経時変化を示した。O₃ 暴露を受けた肺胞マクロファージに取り込まれた ¹⁴C 量は、暴露 1 日目及び 3 日目にはそれぞれ対照群の 2.25 及び 2.01 倍に上昇した。その後 ¹⁴C の取り込み量は漸次減少し 7 日目以降は対照群の約 0.7 倍に低下した。

表 2 0.2 ppm O₃ 暴露による肺胞マクロファージのピルビン酸キナーゼ(PK), 乳酸脱水素酵素(LDH)及びヘキソキナーゼ(HK)活性の変化
 Table 2 Changes in the specific activities of pyruvate kinase (PK), lactate dehydrogenase (LDH) and hexokinase (HK) of alveolar macrophages during exposure to 0.2 ppm ozone^a

Exposure	Time	PK ^b		LDH ^b		HK ^b	
		Value	E/C	Value	E/C	Value	E/C
1 Day	Cont	2330 ± 300		1070 ± 50		99.3 ± 9.4	
	Expo	2350 ± 290	1.01	1020 ± 120	0.96	75.0 ± 5.4**	0.76
3 Days	Cont	1790 ± 380		930 ± 110		76.9 ± 9.7	
	Expo	2860 ± 290***	1.60	1270 ± 100	0.37	92.5 ± 10.5*	1.20
5 Days	Cont	2340 ± 90		1000 ± 60		94.3 ± 6.3	
	Expo	3230 ± 210***	1.38	1390 ± 100***	1.38	107 ± 12.0	1.14
7 Days	Cont	2360 ± 70		1040 ± 70		84.0 ± 6.6	
	Expo	3340 ± 290***	1.41	1390 ± 210**	1.35	97.1 ± 21.0	1.15
14 Days	Cont	2250 ± 170		820 ± 180		78.7 ± 6.3	
	Expo	3280 ± 470**	1.46	1170 ± 60**	1.43	94.3 ± 9.1*	1.20

^a Experimental conditions were the same as described in Table 1.

^b $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ of supernatant protein (mean \pm SD, n=6)

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

表 3 0.2 ppm O₃ 暴露による肺胞マクロファージの¹⁴C-チミジン取り込み量の変化

Table 3 Changes in the incorporation ¹⁴C-thymidine into alveolar macrophages during 14-days exposure to 0.2 ppm Ozone^a

Exposure Time	Incorporation (dpm/2×10 ⁶ cells)		
	Control ^b	Exposed ^b	Expo/Cont
1 Day	4,100 ± 680	9,220 ± 1,620***	2.25
3 Days	4,490 ± 610	9,030 ± 1,280***	2.01
5 Days	4,590 ± 560	5,680 ± 930	1.24
7 Days	4,760 ± 810	3,360 ± 580*	0.71
14 Days	4,330 ± 720	3,250 ± 760*	0.75

^a Alveolar macrophages (2 × 10⁶ cells) were suspended in 4 ml of Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% fetal calf serum and ¹⁴C-thymidine (50 nCi/ml) and incubated at 37°C for 3.5 hr.

^b Values were expressed as mean \pm SD (n=6).

* P<0.05, *** P<0.001.

3.3 肺胞マクロファージの細胞数の変化

表4に0.2 ppm O₃ 14日間暴露による肺胞マクロファージの細胞数の経時変化を示した。肺胞マクロファージの細胞数は、暴露1日目には対照群の0.78倍に低下したが、3日目には対照群の1.48倍に増加し、その後も有意に高い値を示した。肺胞内の他の遊離細胞に変化があるかどうかを調べるため、肺洗浄によって得られた遊離細胞の塗抹標本を作成しギムザ染色を行った。その結果、対照群及び暴露群共に94%以上は肺胞マクロファージであり、他は多形核白血球、リンパ球もしくは変性した細胞であった。多形核白血球の割合は、1%以下で全暴露期間中有意な変化は認められなかった。

肺胞マクロファージの大きさは不均一で、個々の細胞の直径は7~21 μmの間に分布しているが、対照群では約80%の細胞が11~17 μmの大きさである。図1に、0.2 ppm O₃ 暴露期間中の肺胞マクロファージの細胞の大きさの変化を示した。暴露3日目と7日目では、肺胞マクロファージの細胞数は同程度に増加したが、増加した細胞の大きさは異なった。暴露3日目には、直径17~21 μmの細胞が対照群の2.5倍に最も増加し、大きな細胞程増加の程度が著しかった。直径11~15 μmのより小さな細胞の増加は1.3倍に留まった。これとは対照的に、暴露7日目では小さな細胞程増加の程度が著しく、直径9-13, 13-15及び17-21 μmの細胞は、それぞれ対照群の2.1, 1.6及び1.3倍に増加した。また、増加した肺胞マクロファージの細胞数は、直径11-13 μmの大きさの細胞が最も多かった。小形の肺胞マクロファージの増加は、暴露14日目及び11週間目にも認められた。

表 4 0.2 ppm O₃ 暴露による肺胞マクロファージの細胞数の変化

Table 4 Changes in the number of alveolar macrophages during 14 -days exposure to 0.2 ppm Ozone^a

Exposure Time	Number of Cells ^b (×10 ⁶ /rat)		
	Control	Exposed	E/C
1 Day	11.0 ± 0.6	8.6 ± 1.3**	0.78
3 Days	9.4 ± 1.8	13.9 ± 1.0***	1.48
5 Days	9.3 ± 1.3	14.5 ± 2.5**	1.56
7 Days	9.4 ± 1.2	15.7 ± 3.7**	1.67
14 Days	10.6 ± 1.0	16.4 ± 4.2*	1.55

^a The cell number was counted in Coulter Counter adjusted to count particles larger than 9 μm in diameter.

^b Values were expressed as mean ± SD (n=6).

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

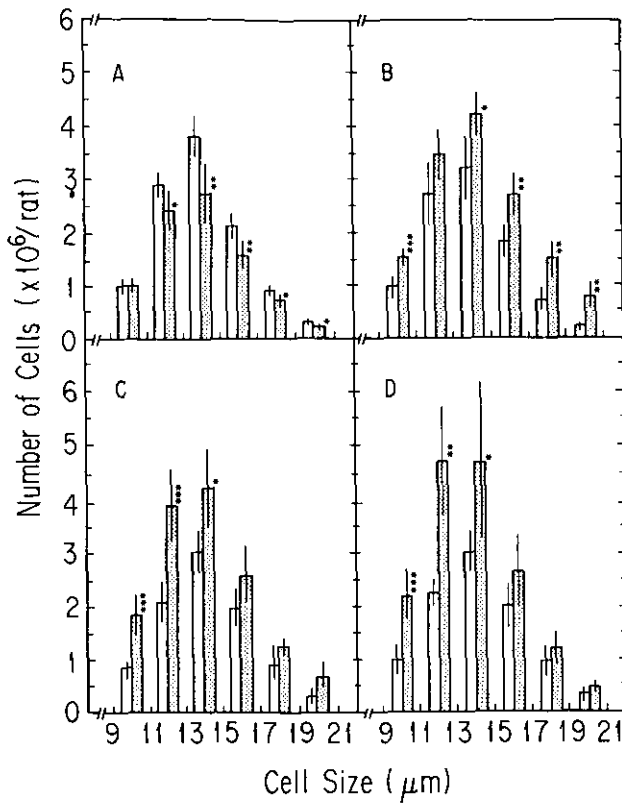


図 1 0.2 ppm O₃ 暴露による肺泡マクロファージの大きさの分布の変化

Fig. 1 Changes in the size distribution of alveolar macrophages during exposure to 0.2 ppm O₃

The cell number of alveolar macrophages in various size was counted with a Coulter Counter adjusted to count cells larger than 9, 11, 13, 15, 17, 19, and 21 μm in diameter and was estimated by calculating the difference between the values of nearest neighbors. Abscissa indicates the cell size: 7-9, 9-11, 11-13, 13-15, 15-17, 17-19, and 19-21 μm in diameter. Shaded column and open one show cells from exposed and control animals, respectively. Figures of A, B, C, and D represent the results on the first, third, fifth, and seventh days of exposure, respectively. Values are expressed as mean \pm SD ($n=6$). Asterisk indicates significant at $P<0.05$; double asterisk, $P<0.01$; triple asterisk, $P<0.001$.

4 考 察

本研究の結果、0.2 ppm O₃ 暴露によって暴露 3 日目には、肺泡マクロファージの過酸化物代謝系及び解糖系の酵素活性が増加し、その後も高いレベルに維持されることが明らかになった。グルタチオンパーオキシダーゼは、還元型グルタチオンを消費して過酸化物を還元する酵素であり、グルコース-6-リン酸脱水素酵素は、グルコース-6-リン酸を酸化する際 NADP⁺ を還元し、酸化

型グルタチオンを還元型に戻すのに必要な NADPH を供給する。両酵素活性が増加したことから、0.2 ppm O₃ 暴露によって肺胞マクロファージの過酸化物を代謝する能力は亢進していると考えられる。同様に、解糖系のピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酸素及びヘキソキナーゼの活性も増加した。肺胞マクロファージにおいては、エネルギーは主として解糖系から供給されている²¹⁾。ピルビン酸キナーゼ及びヘキソキナーゼは、解糖系の律速段階を触媒する酵素である²²⁾ ことから、0.2 ppm O₃ 暴露によってマクロファージのエネルギー産生能は亢進したと結論できる。過酸化物代謝能力及びエネルギー産生能の亢進は、オゾンによる傷害の修復もしくは細胞の増殖に必要なためであり、肺胞マクロファージの酸化性ガスに対する適応反応と考えられる。これまで、肺上清中の過酸化物代謝系及び解糖系の酵素活性が、0.2-0.8 ppm O₃ 短期暴露によって増加する^{2,23,24)} ことが知られている。本研究では、肺胞マクロファージの両代謝系の酵素活性の増加は、肺上清中の酵素活性の増加とよく一致することが示された。

肺胞マクロファージのチミジン取り込み量も、暴露 1~3 日目に著しく増加し、取り込まれたチミジンのほとんどが DNA 画分に回収されたことから、DNA 生合成活性の亢進が示唆された。肺胞マクロファージは、血流中の単球が肺胞内に流入することだけではなく、肺胞内のマクロファージが細胞分裂することによっても供給されている^{25,26)}。Evans ら²⁷⁾ は、オートラジオグラフィの技法を用い、0.8 ppm O₃ 暴露によって肺胞マクロファージのチミジン取り込み量が増加し、その増殖性応答は 1 日目に最大になると報告している。本研究では、暴露 1~3 日目にチミジンの取り込み量が一過性に上昇し、3 日目に細胞数が増加した。したがって、0.2 ppm O₃ 暴露による DNA 生合成活性の亢進は、肺胞マクロファージが細胞分裂をするために起こった一過性の応答と考えられる。

0.2 ppm O₃ 3 日間暴露によって肺胞マクロファージの細胞数は増加した。これまで肺胞におけるマクロファージ及び多形核白血球の増加は炎症反応の特徴と考えられてきた。例えば、0.5-7.0 ppm O₃ 3 時間暴露^{11,28)} 及び 0.8 ppm O₃ 7 日間暴露²⁾ によって、ウサギ及びラットの肺内に多形核白血球とマクロファージの著しい増加が認められたことから、O₃ は肺に炎症反応を引き起こすと考えられてきた。しかしながら本研究では、0.2 ppm O₃ 暴露によって多形核白血球は有意に増加しなかったことから、肺に炎症反応が起きたためマクロファージが増加したと結論するのは困難である。肺胞マクロファージの機能の一つは、肺胞内の起炎物質及び壊死した組織を取り除くことであると考えられている²⁹⁾。これまでの研究によれば、低濃度オゾン暴露によって肺の上皮組織は傷害を受け、2~3 日後には上皮細胞の再生が起こる³⁰⁾ とされている。また、肺胞マクロファージの増加は、組織学的には O₃ による傷害が最も著しい領域すなわち肺胞開口部の I 型肺胞上皮細胞上の集塊として認められる^{2,4,5,27,31)}。したがって、本研究で認められた肺胞マクロファージの増加は、0.2 ppm O₃ 暴露で壊死した肺胞上皮細胞が肺胞マクロファージの増加を誘導したためと考えられる。

肺胞マクロファージは、細胞の直径が 9~21 μm にわたる、大きさが不揃いの細胞集団である。

本研究において、暴露3日目及び7日目には肺泡マクロファージの細胞数は同程度に増加したが、増加した細胞の大きさは異なることが示された。すなわち、3日目には大きな細胞が増加したが、7日目にはこれと対照的に小さな細胞が増加した。Lumら³²⁾は、ラット肺では0.6 ppm O₃ 3日間暴露によって、大形の肺泡マクロファージの増加とその原因としての二次リソゾームの著しい発達を報告している。また Plopperら³³⁾は、3 ppm O₃ 4時間暴露によって、肺では貪食胞が著しく発達したマクロファージのみが増加すると報告している。したがって、本研究の暴露3日目において認められた大形の細胞の一過性の増加は、O₃ 暴露によって肺胞内に増加した界面活性物質、細胞の死骸及び血液から浸潤してきた血清成分等を貪食した^{5,31,33)}ことによって、二次リソゾームが発達し、膨潤したマクロファージの増加を反映していると考えられる。これと対照的に5日目で降認められた小形の細胞の増加は、細胞分裂の促進による娘細胞の増加、もしくは血液からの単球の浸潤によると考えられる。O₃ 暴露による小形の細胞の増加は、暴露11週目にも認められた。

これまでの研究で4 ppm NO₂ 暴露は、肺泡マクロファージの抗酸化性代謝、エネルギー産生及びDNA 生合成を亢進させ、その後小形の細胞を増加させることを示した¹⁴⁾。したがって、肺泡マクロファージは0.2 ppm O₃ に対して、4.0 ppm NO₂ の場合と同程度の反応性を示すことが明らかになった。

引用文献

- 1) Eschenroeder, A. Q. (1977): Atmospheric concentrations of photochemical oxidants. *In*: Ozone and Other Photochemical Oxidants. Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants., Division of Medical Sciences Assembly of Life Sciences, National Research Council (*ed.*), 126-194.
- 2) Schwartz, L. W., D. L. Dungworth, M. G. Mustafa, B. K. Tarkington and W. S. Tyler (1976): Pulmonary responses of rats to ambient levels of ozone. Effects of 7-day intermittent or continuous exposure. *Lab. Invest.*, **34**, 565-578.
- 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**, 160-179.
- 4) Stephens, R. J., M. F. Sloan, M. J. Evans and G. Freeman (1974): Early response of lung to low levels of ozone. *Am. J. Pathol.*, **74**, 31-58.
- 5) Stephens, R. J., M. F. Sloan, M. J. Evans and G. Freeman (1974): Alveolar type 1 cell response to exposure to 0.5 ppm O₃ for short period. *Exp. Pathol.*, **20**, 11-23.
- 6) Goldstein, E., W. Lippert and D. Warshauer (1974): Pulmonary alveolar macrophage. Defender against bacterial infection of the lung. *J. Clin. Invest.*, **54**, 519-528.
- 7) Acton, J. D. and Q. N. Myrvik (1972): Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **24**, 48-52.
- 8) Valand, S. B., J. D. Acton and Q. N. Myrvik (1970): Nitrogen dioxide inhibition of viral-induced resistance in alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **20**, 303-309.

- 9) Goldstein, E., H. C. Bartlema, M. van der Ploeg, P. van Duijn, J. G. M.M. van der Stap and W. Lippert (1978): Effect of ozone on lysosomal enzymes of alveolar macrophages engaged in phagocytosis and killing of inhaled *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, **138**, 299-311.
- 10) Vassallo, C. L., B. M. Domm, R. H. Poe, M. L. Duncombe and J. B. J. Gee (1973): NO₂ gas and NO₂ effects on alveolar macrophages phagocytosis and metabolism. *Arch. Environ. Health*, **26**, 270-274.
- 11) Coffin, D. L., D. E. Gardner, R. S. Holzman and F. J. Wolock (1968): Influence of ozone on pulmonary cell population. *Arch. Environ. Health*, **16**, 633-636.
- 12) Mochitate, K., K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, **33**, 17-28.
- 13) Mochitate, K., T. Miura and K. Kubota (1985): An increase in the activities of glycolytic enzymes in rat lungs produced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 323-331.
- 14) Mochitate, K., Y. Takahashi, T. Ohsumi and T. Miura (1986): Activation and increment of alveolar macrophages induced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **17**, 229-239.
- 15) Lohr, G. W. and H. D. Waller (1974): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *In: Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, H. U. (ed.), New York, Academic Press, Vol. 2, 636-643.
- 16) Chiu, D. T. Y., F. H. Stults and A. L. Tappel (1976): Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 558-566.
- 17) Gutman, I. and E. Bernt (1974): Pyruvate kinase: Assay in serum and erythrocytes. *In: Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, H. U. (ed.), New York, Academic Press, Vol. 2, 774-783.
- 18) Bergmeyer, H. U., K. Gawehn and M. Grassl (1974): Enzymes as biochemical reagent. *In: Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, H. U. (ed.), New York, Academic Press, Vol. 1, 473-474, and Vol. 2, 574-579.
- 19) 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.
- 20) Schneider, W. C. (1946): Phosphorus compounds in animal tissues. III. Comparison of methods for the estimation of nucleic acids. *J. Biol. Chem.*, **163**, 747-751.
- 21) Karnovsky, K. L., S. Simmons, E. A. Glass, A. W. Shafer and P. D. A. Hart (1970): Metabolism of macrophages. *In: Mononuclear Phagocytes.*, van Furth, R. (ed.), Hague, Martinus Nijhoff, 103-120.
- 22) Minakami, S. and H. Yoshikawa (1966): Studies on erythrocyte glycolysis. II. Free energy changes and rate limiting steps in erythrocyte glycolysis. *J. Biochem. (Tokyo)*, **59**, 139-145.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) Shellito, J., C. Esparza and C. Armstrong (1987): Maintenance of the normal rat alveolar macrophage cell population. The roles of monocyte influx and alveolar macrophage proliferation *in situ*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135**, 78-82.
- 26) van Furth, R. and A. B. van oud Alblas (1983): Origin of pulmonary macrophages in mice under normal conditions and during an inflammatory reaction by heat-killed BCG. *In: The Cells of the Alveolar Unit.*, Favez, G., A. Junod and P. Leuenberger (eds.), Bern, Hans Huber, 170-179.
- 27) Evans, M. J., L. V. Johnson, R. J. Stephens and G. Freeman (1976): Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of ozone. *Exp. Mol. Pathol.*, **24**, 70-83.
- 28) Gardner, D. E., R. S. Holzman and D. L. Coffin (1969): Effects of nitrogen dioxide on pulmonary

- cell population. *J. Bacteriol.*, **98**, 1041-1043.
- 29) Rabinovitch, M. (1970): Phagocytic recognition. *In*: Mononuclear Phagocytes., van Furth, R. (ed.), Oxford; Blackwell, 299-315.
- 30) Plopper, C. G., C. K. Chow, D. L. Dungworth, M. Brummer and T. J. Nemeth (1978): Effect of low level of ozone on rat lungs. II. Morphological responses during recovery and re-exposure. *Exp. Mol. Pathol.*, **29**, 400-411.
- 31) Plopper, C. G., D. L. Dungworth and W. S. Tyler (1973): *pulmonary lesions in rats exposed to ozone. A correlated light and electron microscopic study.* *Am. J. Pathol.*, **71**, 375-394.
- 32) Lum, H., W. S. Tyler, D. M. Hyde and C. G. Plopper (1983): Morphometry of in situ and lavaged pulmonary alveolar macrophages from control and ozone-exposed rats. *Exp. Lung Res.*, **5**, 61-78.
- 33) Plopper, C. G., D. L. Dungworth and W. S. Tyler (1973): Ultrastructure of pulmonary alveolar macrophages in situ in lungs from rats exposed to ozone. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **108**, 632-638.

II-21

肺胞マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響 I
Effects of Ozone on Cytokilling Activities of Alveolar Macrophages I

持立克身¹・三浦 卓¹

Katsumi MOCHITATE¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

オゾン(O₃)による肺胞マクロファージの殺菌活性及びその発現に重要な役割を果たす活性酸素発生能への影響を検索するため、ラットに0.2 ppm O₃を14日間暴露し、肺洗浄により肺胞マクロファージを調製した。始めに、³H-ウリジンで標識した微生物を用いて肺胞マクロファージの殺菌活性を簡便かつ定量的に測定する方法を開発した。*Escherichia coli*に対する殺菌活性は、暴露3日目には対照群の0.72~0.80倍に有意に低下したが、14日目には対照群のレベルに回復した。しかし、*Candida albicans*に対する殺菌活性は、暴露3日目に対照群の0.68~0.78倍及びラット血清存在下では0.77~0.82倍に有意に低下し、その後14日目にも活性の回復は認められなかった。

次に0.2 ppm O₃暴露による肺胞マクロファージの活性酸素発生能への影響を調べた。活性酸素発生のため消費された酸素量を溶存酸素の減少から検出する方法を用いた場合、Phorbol Myristate Acetate (PMA)、Opsonized Zymozan及びLipopolysaccharide (LPS, *E. coli*)刺激による肺胞マクロファージの活性酸素発生量は、暴露3日目で各々対照群の0.60, 0.79及び0.70倍に有意に低下した。暴露14日目には、活性酸素発生量はPMA及びLPS刺激では対照群のレベルに回復したが、Opsonized Zymozan刺激の場合には回復しなかった。また、発生したスーパーオキシド(O₂⁻)の量をチトクロムcの還元量から測定した場合も同様に、PMA、Opsonized Zymozan及びLPS刺激によるO₂⁻産生量は、暴露3日目で各々対照群の0.12, 0.31及び0.60倍に有意に低下した。暴露14日目にはPMA及びLPS刺激ではO₂⁻産生量は対照群のレベルに回復したが、Opsonized Zymozan刺激では対照群のレベルにまでは回復しなかった。

以上の結果から、肺胞マクロファージの殺菌能は、0.2 ppm O₃暴露によって傷害を受けること、及び微生物の種類によって殺菌活性が回復しないことが明らかになった。また、殺菌活性の低下及び回復と平行して活性酸素発生能の低下と回復が認められたことから、殺菌活性の低下の原因の一つは、活性酸素発生能の低下によることが示唆された。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Ongawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Abstract

Male Wistar rats were exposed to 0.2 ppm ozone (O_3) for 14 days and at intervals alveolar macrophages were collected by pulmonary lavage to examine the effects of O_3 on cytokilling and superoxide (O_2^-) generation activities. A convenient and quantitative method to measure a cytokilling activity of macrophage was devised using 3H -uridine-labeled microorganisms and deoxycholate to lyse only macrophages after cytokilling reaction. The cytokilling activities of alveolar macrophages from exposed animals decreased to 0.72 to 0.80-fold that of the control value against *Escherichia coli* on the third day and recovered to the control level on the fourteenth day. The cytokilling activities against *Candida albicans* similarly decreased to 0.68 to 0.78-fold and 0.77 to 0.82-fold those of the control values in the absence and in the presence of rat serum, respectively. On the fourteenth day, however, these cytokilling activities remained significantly lower than the control values.

It is known that active oxygen plays an important role for cytokilling activity of leukocytes. To examine the effect of O_3 on the active oxygen-generation, respiratory burst and reduction of exogenous cytochrome *c* were measured. Three kinds of reagents were used to stimulate alveolar macrophages: 0.33 μ g/ml phorbol myristate acetate (PMA), 200 μ g/ml opsonized zymozan and 5.0 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS, *E. coli*) plus 5.0 μ g/ml cytochalasin E (Cyt. E). Measuring the respiratory burst, the rate of oxygen-consumption produced by O_2^- generation decreased to 0.60-fold, 0.79-fold and 0.70-fold those of the control values by the stimulation of PMA, opsonized zymozan and LPS plus Cyt. E on the third day, respectively. On the fourteenth day, O_2^- consumption by PMA and LPS plus Cyt. E recovered to the control levels, while that by of opsonized zymozan remained 0.80-fold lower than the control value. Measuring the reduction exogenous cytochrome *c*, the O_2^- -generation rate by PMA, opsonized zymozan and LPS plus Cyt. E similarly decreased to 0.12-fold, 0.31-fold and 0.60-fold those of the control values on the third day, respectively. On the fourteenth day, the O_2^- generation by PMA and LPS plus Cyt. E recovered to the control levels, while that by opsonized zymozan remained 0.63-fold lower.

These results indicate that the cytokilling activity of alveolar macrophages alters in parallel with the generation activity of active oxygen, supporting the assumption that the decrease in the cytokilling activity is primarily due to the damage on the active oxygen-generation.

1 はじめに

オゾン (O_3) 及び二酸化窒素 (NO_2) は代表的な大気汚染物質であり¹⁾, 肺胞及び終末細気管支の上皮細胞に傷害を与える²⁻⁵⁾ことが知られている。肺胞マクロファージは肺胞に位置し、呼吸の際に肺に侵入した微生物から生体を防御する上で重要な役割を担っている^{6,7)}。これまで肺胞マクロファージについても、高濃度の O_3 及び NO_2 によって、抗ウイルス活性^{7,8)}、殺菌活性^{6,7,9,10)} 及び食能^{7,10,11)} は傷害を受けることが知られている。しかし、これら酸化性物質による低濃度での肺胞マクロファージへの影響については、ほとんど知られていない。

これまで筆者らは、4 ppm NO_2 もしくは 0.2 ppm O_3 暴露によって、肺胞マクロファージの抗酸化系及び解糖系の酵素活性が、肺全体における両代謝系の酵素活性の増加¹²⁾の時期と一致して上

昇すること、更に肺胞マクロファージの DNA 生合成活性も亢進し、その後小形の細胞が増加する^{13,14)}ことを明らかにした。肺全体における呼吸系及び解糖系の酵素活性の増加は、傷害を受けた肺の上皮細胞の修復と増殖及び肺胞マクロファージの増殖の時期と一致している^{12,15-17)}。したがって、肺胞マクロファージにおける抗酸化系及び解糖系酵素の活性上昇と細胞数の増加は、マクロファージが傷害を修復し増殖すること¹⁸⁾、もしくは血流中からの単球の流入¹⁹⁾が増加することによって NO₂ 及び O₃ に対して適応する過程を反映していると考えられる。

本研究では低濃度 O₃ 暴露による肺胞マクロファージの殺菌活性及びその発現に重要な役割を果たす活性酸素発生能への影響について検討した。その結果、0.2 ppm O₃ 暴露によって、肺胞マクロファージの殺菌活性は低下した。殺菌活性低下の原因の一つは、肺胞マクロファージの活性酸素発生能がオゾンによって低下したためであることが示唆された。

2 方法

2.1 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 (24~26 週齢) に 0.2 ppm O₂ を 14 日間連続暴露した。暴露期間中経時的にチャンバーよりラットを取り出し、頸動脈より放血した後、0.95% 食塩水で肺をかんだ。次にこの肺を取り出し、35 ml の 136 mM NaCl—5.3 mM KCl—2.5 mM リン酸緩液—5.5 mM グルコース—10 mM Hepes 緩液 (pH 7.4) (等張 Hepes 溶液) で肺を洗浄し、肺胞内の遊離細胞を洗い出した^{13,14)}。回収した肺洗浄液中の遊離細胞は等張 Hepes 溶液で洗った後、肺胞マクロファージ標品として以下の実験に用いた。

細胞数は、血球計数板もしくはコールターカウンター (直径 9 μm 以上の大きさの細胞を計測するように調整) で計算した。トリパンブルー排除試験により測定した細胞の生存率は、すべて 95% 以上で、暴露群と対照群の間に差は認められなかった。

肺洗浄により溶出した遊離細胞の組成は、その塗抹標本をギムザ染色した結果、94% 以上が肺胞マクロファージであった。

2.2 殺菌活性の測定

³H-ウリジンで標識した *Escherichia coli* K 12 及び *Candida albicans* を用いて、肺胞マクロファージの殺菌活性を測定した。始めに、*E. coli* 及び *C. albicans* を各々 [5-³H] ウリジン (10 μCi/ml, 0.38 nmol/ml) を添加した FJ+カザミノ酸及び YNB 合成培地に懸濁し、30°C で 18 時間インキュベーションすることにより、³H-ウリジンで標識した菌体を調製した。³H 標識した菌体は、0.95% NaCl 水溶液で洗った後、RPMI 1640-10 mM Hepes (pH 7.4) 溶液に懸濁し、殺菌活性の測定に用いた。殺菌活性測定の手順としては、始めに肺胞マクロファージ (2.0×10⁶ 細胞) を、10% 牛胎児血清を含む Eagle の MEM 培地に 2.5×10⁵ 細胞/ml の濃度に懸濁し、5% CO₂ 下 37°C で 30 分間プレインキュベーションした。次に、³H-ウリジンで標識した菌体をマクロ

ファージの培養液に添加し、*E. coli* の場合は 30 分間、*C. albicans* の場合は 120 分間インキュベーションした。肺胞マクロファージの殺菌作用によって溶菌した菌体より遊離した ^3H 量を測定するため、反応終了後 0.15% デオキシコール酸及び 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase I を反応液に添加し、更に 15 分間インキュベーションすることによりマクロファージのみを溶解した。この反応液を 8000 rpm で 10 分間遠心分離した上清中の ^3H 量を殺菌活性の値とした。

E. coli K12 は東京大学応用微生物研究所、*C. albicans* 966 株は名古屋立大学医学部附属病態制御研究施設医真菌研究部門より譲り受けたものを用いた。

2.3 活性酸素発生の測定

酸素電極を用いた呼吸の測定：Clark 型の酸素電極を用いて、溶存酸素の減少量から活性酸素の発生量を測定した²⁰⁾。始めに、肺胞マクロファージ (3.0×10^6 細胞) を、3 ml の A 溶液：Dulbecco リン酸緩衝液—1.3 mM MgCl_2 —5.5 mM グルコース—5.0 mM Hepes (pH 7.4) 溶液に懸濁した後、ミトコンドリアの呼吸を阻害するため 1 mM NaCN を添加し 37°C でプレインキュベーションした。次に、マクロファージに対する刺激物質として、0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Phorbol Myristate Acetate (PMA), 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Opsonized Zymozan または 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lipopolysaccharide (LPS, *E. coli*) と 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cytochalasin E (Cyt. E)²¹⁾ を添加し、活性酸素発生による溶存酸素の減少を酸素電極 (YSI 社 53 型) を用いて 37°C でかくはんしながら測定した。

スーパーオキシドの測定：細胞外に放出されたスーパーオキシド (O_2^-) を、 O_2^- により還元されたチトクロム *c* の量から分光学的に測定した²²⁾。分子吸光係数は、 $\Delta E^{1\text{mM}} = 21.0^{23)}$ を用いた。始めに、肺胞マクロファージ (1.0×10^6 細胞) を、20 μM チトクロム *c* 及び 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カタラーゼを含む A 溶液 1 ml に 37°C で懸濁し、刺激物質無添加における 500 nm の吸光度変化をかくはんしながら測定した。次に、刺激物質として 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMA, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Opsonized Zymozan または 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS と 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cyt. E²¹⁾ を添加し、550 nm の吸光度の増加から還元されたチトクロム *c* 量を測定して放出された O_2^- 量に換算した。細胞のかくはんには、風車によるかくはん器²⁴⁾ を用いた。

3 結果

3.1 殺菌活性の測定方法

肺胞マクロファージの殺菌活性を簡便かつ定量的に測定するための方法を開発した。測定に用いる微生物として *Escherichia coli* 及び *Candida albicans* を ^3H -ウリジンで標識し、殺菌反応終了後デオキシコール酸を反応液に添加して、肺胞マクロファージのみを溶解した。この方法では、マクロファージに貪食され、食胞内で溶解した微生物から反応液上清中に遊離した ^3H 量として、マクロファージの殺菌活性を測定することができる。またこの方法では、マクロファージによって再利用された ^3H 量を区別する必要がない。しかし、微生物のみでも反応液上清中に *E. coli* の

場合全 ^3H の $41 \pm 3\%$ (平均値 \pm SE), 及び *C. albicans* の場合 $44 \pm 2\%$ を遊離したため、この値を差し引いた正味の ^3H 増加量を殺菌活性の値とした。ラット血清の添加による ^3H 遊離量の増加は、微生物のみの場合は認められなかった。

図 1 に *E. coli* 添加量に対する肺胞マクロファージの殺菌活性を示した。*E. coli* を細胞数当たりマクロファージの 30~180 倍量添加すると、反応液上清中に遊離した正味の ^3H 量は、*E. coli* の添加量に比例して飽和せずに増加した。更に非働化していないラット血清を添加した場合には、添加しない場合に比べて、反応液上清中に遊離した正味の ^3H 量は 1.8~3.1 倍に増加した。2 時間のインキュベーションによって上清中に遊離した正味の ^3H 量は、ラット血清非存在下及び存在下の場合で、各々 ^3H 全添加量の $14 \pm 2\%$ 及び $35 \pm 5\%$ であった。

図 2 に *C. albicans* 添加量に対する肺胞マクロファージの殺菌活性を示した。*C. albicans* の場

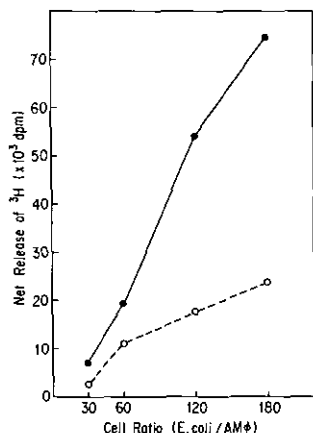


図 1 ^3H -ウリジンで標識した大腸菌に対する肺胞マクロファージの殺菌活性の量反応関係

Fig. 1 Dose-dependence of cytokilling activity of alveolar macrophages against ^3H -uridine-labeled *Escherichia coli*

Alveolar macrophages (2.0×10^6 cells/0.8 ml) were incubated with ^3H -uridine-labeled *Escherichia coli* (5.2×10^3 dpm/ 10^6 cells) for 120 min. Ordinate indicates the net increase in ^3H radioactivity released from *E. coli* into supernatant. Solid and dotted lines show the presence and absence of 2.6% rat serum, respectively, in the incubation medium.

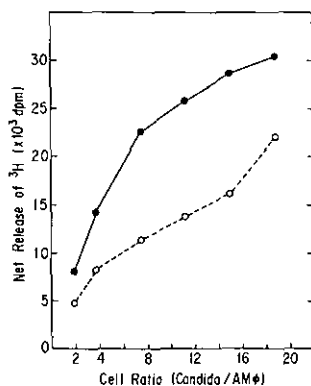


図 2 ^3H -ウリジンで標識したカンジダ菌に対する肺胞マクロファージの殺菌活性の量反応関係

Fig. 2 Dose-dependence of cytokilling activity of alveolar macrophages against ^3H -uridine-labeled *Candida albicans*

Alveolar macrophages (2.0×10^6 cells/0.8 ml) were incubated with ^3H -uridine-labeled *Candida albicans* (4.7×10^4 dpm/ 10^6 cells) for 120 min. Ordinate indicates the net increase in ^3H radioactivity released from *C. albicans* into supernatant. Solid and dotted lines show the presence and absence of 2.6% rat serum, respectively, in the incubation medium.

合も同様に、マクロファージの細胞当たり 2~18 倍の添加量に比例して、反応液上清中に遊離した正味の ^3H 量は増加した。非働化していないラット血清を添加した場合は、添加しない場合に比べて、反応液上清中に遊離した正味の ^3H 量は 1.4~2.0 倍に増加した。しかし、*C. albicans* の添加量が多い場合には、上清中に遊離した ^3H 量は飽和傾向を示し、ラット血清添加による殺菌活性増加の割合も縮小した。2 時間のインキュベーションによって上清中に遊離した正味の ^3H 量は、細胞比 (微生物/マクロファージ) が 8 以下の場合では、 ^3H 全添加量の $21 \pm 3\%$ (ラット血清非存在下) 及び $38 \pm 5\%$ (ラット血清存在下) と高い値を示したが、細胞比 12 以上の場合では、各々 ^3H 全添加量の $12 \pm 1\%$ 及び $19 \pm 2\%$ と低い値を示した。

3.2 オゾン暴露による殺菌活性の変化

0.2 ppm O_3 暴露により *E. coli* に対する肺胞マクロファージの殺菌活性は、暴露 3 日目に对照群の 0.72 (細胞比=30) 及び 0.80 倍 (細胞比=120) に有意に低下したが、14 日目には对照群のレベルに回復した (図 3)。

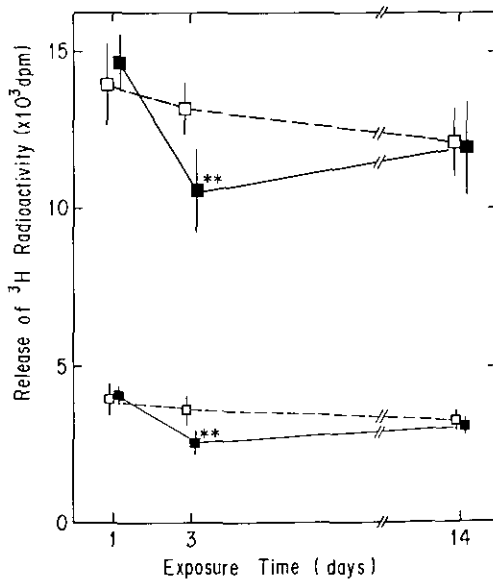


図 3 大腸菌に対する肺胞マクロファージの殺菌活性の 0.2 ppm オゾン暴露による変化

Fig. 3 Changes in the cytokilling activity of alveolar macrophages against ^3H -uridine-labeled *Escherichia coli* during exposure to 0.2 ppm ozone. Alveolar macrophages were incubated with 30-fold (lower) and 120-fold (upper) of *E. coli* for 30 min. Ordinate indicates the net increase in ^3H radioactivity in supernatant. Open and closed squares indicate control and exposed groups, respectively. **, $P < 0.01$.

C. albicans に対する肺胞マクロファージの殺菌活性は、暴露 1 日目に増加傾向を示したが、3 日目にはラット血清非存在下の場合対照群の 0.68 (細胞比=8) (図 4), または 0.78 倍 (細胞比=16) (図 5), 及びラット血清存在下の場合各々 0.82 または 0.77 倍に有意に低下した。14 日目も *E. coli* の場合とは異なり, *C. albicans* に対する殺菌活性は, ラット血清非存在下の場合対照群の 0.51 倍 (細胞比=16) 及びラット血清存在下の場合 0.71 倍 (細胞比=8) に有意に低下し, 他の場合も同様の低下を示した。

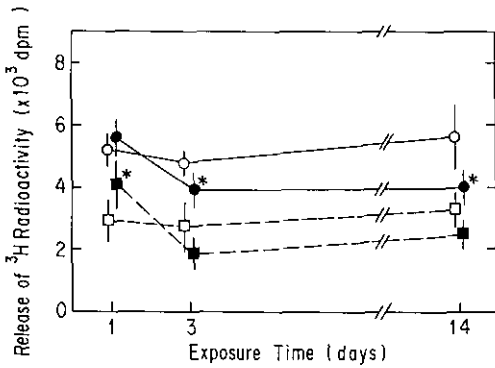


図 4 低投与量のカンジダ菌に対する肺胞マクロファージの殺菌活性の 0.2 ppm オゾン暴露による変化

Fig. 4 Changes in the cytokilling activity of alveolar macrophages against low dose of ^3H -uridine-labeled *Candida albicans* during exposure to 0.2 ppm ozone

Alveolar macrophages were incubated with 8-fold of *C. albicans* for 120 min. Ordinate indicates the net increase in ^3H radioactivity in supernatant. Solid and dotted lines show the presence and absence of 2.6% rat serum, respectively, in the incubation medium. Open and closed symbols show control and exposed groups, respectively. *, $P < 0.05$.

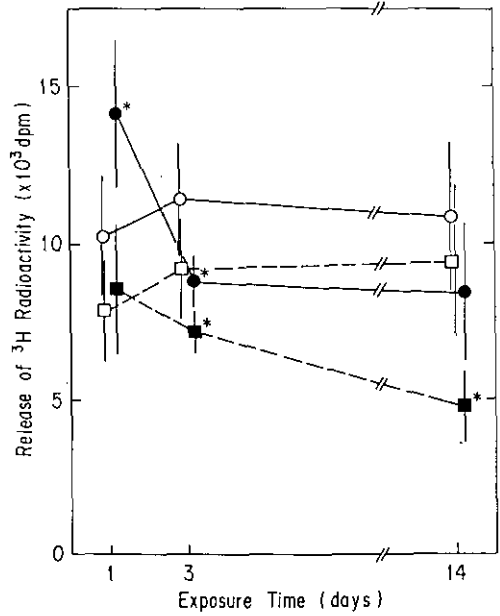


図 5 高投与量のカンジダ菌に対する肺胞マクロファージの殺菌活性の 0.2 ppm オゾン暴露による変化

Fig. 5 Changes in the cytokilling activity of alveolar macrophages against high dose of ^3H -uridine-labeled *Candida albicans* during exposure to 0.2 ppm ozone

Alveolar macrophages were incubated with 16-fold of *C. albicans* for 120 min. The reaction conditions are the same as in Fig. 4. *, $P < 0.05$.

3.3 オゾン暴露による活性酸素発生能の変化

殺菌活性の発現に重要な役割を果たしている活性酸素発生能への O_3 の影響を、二つの方法で検討した。始めに、1 mM NaCN 添加による肺胞マクロファージの呼吸を阻害した後、Phorbol Myristate Acetate (PMA), Opsonized Zymozan または Lipopolysaccharide (LPS) と Cytochalasin E (Cyt. E) 刺激により活性酸素を発生させ、その際に消費された溶存酸素の減少から活性酸素の発生量を測定した。PMA 刺激による肺胞マクロファージの活性酸素発生量は、0.2 ppm O_3 暴露 1 日目に対照群の 1.46 倍に増加し、他の刺激剤による活性酸素発生量も同様に増加傾向を示した (図 6)。しかし、暴露 3 日目には PMA, Opsonized Zymozan 及び LPS と Cyt. E 刺激による活性酸素発生量は、各々対照群の 0.60, 0.79 及び 0.70 倍に有意に低下した。その後

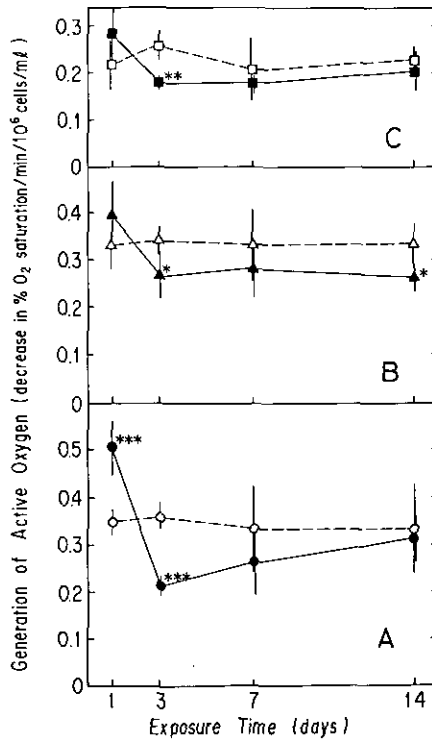


図 6 種々の刺激剤による肺胞マクロファージの呼吸活性の 0.2 ppm オゾン暴露による影響

Fig. 6 Changes in the respiratory burst by stimulants of alveolar macrophages exposed to 0.2 ppm ozone

Ordinate indicates the oxygen consumption of alveolar macrophages by the stimulation of phorbol myristate acetate (A), opsonized zymozan (B) and lipopolysaccharide plus cytochalasin E (C). Open and closed symbols show control and exposed groups, respectively.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

14日目には、PMA及びLPSとCyt. E刺激による活性酸素発生量は対照群のレベルに回復したが、Opsonized Zymozan刺激の場合は対照群の0.80倍に低下したまま回復しなかった。

もう一つの方法として、PMA、Opsonized ZymozanまたはLPSとCyt. E刺激によってマクロファージの細胞外に放出されたスーパーオキシド(O_2^-)により還元されたチトクロムcの吸光度増加から、活性酸素発生量を測定した。0.2 ppm O_3 暴露1日目には、PMA刺激による肺胞マクロファージの O_2^- 発生量は、前者の方法と同様に対照群の1.44倍に増加した(図7)。暴露3日目も同様に、PMA、Opsonized Zymozan及びLPSとCyt. E刺激による O_2^- 発生量は、各々対照群の0.12、0.31及び0.60倍に有意に低下した。その後14日目には、PMA及びLPSとCyt. E

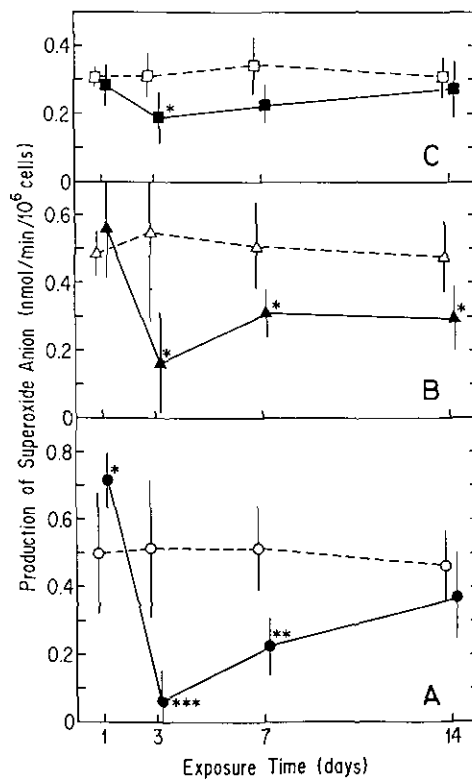


図 7 種々の刺激剤による肺胞マクロファージのスーパーオキシド産生の0.2 ppm オゾン暴露による変化

Fig. 7 Changes in the superoxide generation by stimulants of alveolar macrophages exposed to 0.2 ppm ozone

Ordinate indicates the superoxide generation of alveolar macrophages by the stimulation of phorbol myristate acetate (A), opsonized zymozan (B) and lipopolysaccharide and cytochalasin E (C). Open and closed symbols show control and exposed groups, respectively.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

刺激による O_2^- 発生量は対照群のレベルにほぼ戻ったが、Opsonized Zymozan 刺激の場合は対照群の 0.63 倍に有意に低下した状態が続いた。

この二つの方法から、0.2 ppm O_3 暴露を受けた肺胞マクロファージの活性酸素発生能は、殺菌活性の変化と平行して低下と回復をすることが明らかになった。

4 考 察

本研究では、白血球の殺菌活性を簡便にかつ定量的に測定するための方法を開発し、 O_3 暴露による肺胞マクロファージの殺菌活性への影響を調べた。これまで白血球の殺菌活性を調べる代表的な方法としては、Quie らの方法²⁵⁾が知られている。この方法は、白血球に摂取された微生物の生菌数を数えるために、低張処理によって白血球のみを溶解させ、その溶解質をプレートに撒き更に培養することによって、微生物のコロニー数を数える方法である。この方法では、白血球に摂取されなかった微生物を除くために、殺菌反応終了後白血球を十分洗浄しなければならない。またマクロファージの場合には、この操作中にディッシュに付着したマクロファージがはがれないように注意する必要があることから、多数の標品を扱う際はかなり煩雑であり、時間も要する。*Candida albicans* を対象にした Lehrer らの方法²⁶⁾についても同様である。放射性物質で標識した微生物を用いる方法では、寒天培地上のコロニーを数える煩雑さを省くことができるが、依然として細胞外の微生物を洗浄しなければならない煩雑さが残る²⁷⁾。また、細胞外に遊離した 3H は洗浄操作により失われ、殺菌活性は過小評価されやすい。本研究では、マクロファージを溶解するための界面活性剤として低濃度のデオキシコール酸を用いることにより、 3H -ウリジンで標識した微生物からの 3H の遊離を低く抑えることができた。このため、洗浄操作を行わずにマクロファージを溶解することができ、殺菌活性の測定を簡便に行えるようになった。この方法を用いた *Escherichia coli* 及び *C. albicans* に対する肺胞マクロファージの殺菌活性は、微生物の添加量に比例して飽和せずに増加した。また、オプソニンの効果も *E. coli* の場合は顕著に認められたことから、殺菌活性を測定する方法としては十分有用であることがわかった。*C. albicans* からの 3H の遊離量の全添加量に対する割合が、細胞比(微生物/マクロファージ) 12 以上では 8 以下の場合の約半分と低いのは、*C. albicans* が厚い細胞壁を持っているためリソゾーム酵素による消化を受け難いためであろう。

これまで Goldstein ら⁹⁾は、エアロゾルとして、*in vivo* 投与した *Staphylococcus aureus* に対する肺胞マクロファージの殺菌活性は、2.5 ppm O_3 5 時間暴露により著しく傷害を受けることを報告している。本研究では、より低濃度の 0.2 ppm O_3 暴露によって 3 日目には、*E. coli* 及び *C. albicans* に対する殺菌活性が低下することを明らかにした。その後は O_3 暴露継続下でも、指標に用いる微生物の種類によって、殺菌活性が回復する場合と回復し難い場合があること、及び *C. albicans* の場合は、回復し難い場合に属することが明らかになった。

これまで殺菌活性の低下については、高濃度 O_3 暴露によって肺胞マクロファージの貪食能は

傷害を受けることから、食食能の低下が重要な原因と考えられてきた。しかし、Goldstein らの報告⁶⁾によれば、2.5 ppm O₃ 5時間暴露により肺胞マクロファージの *Staphylococcus aureus* の摂取率は94%から79%に0.83倍の低下に留まったにもかかわらず、肺胞内からの生菌の除去率は64%からむしろ15%に著しく悪化し、肺胞内での *S. aureus* の増殖を許している。また我々の予備的検討でも、2時間のインキュベーションでカーボン粒子の貪食する肺胞マクロファージの割合は、0.2 ppm O₃ 暴露3日目までは対照群と暴露群との間で差は認められず、7日目も対照群の0.88倍とわずかに低下したに留まった。このため本研究では、殺菌作用の発現に重要な役割を果たすと考えられている活性酸素発生能について0.2 ppm O₃ 暴露の影響を検討した。*E. coli* の外膜の構成成分である Lipopolysaccharide (LPS)²¹⁾ 及び *C. albicans* の細胞壁の構成成分と類似の Zymozan をオプソニン処理したものは、白血球を刺激し活性酸素を発生させることが知られている。本研究の結果、これらの刺激物質による肺胞マクロファージの活性酸素発生量は、暴露3日目に殺菌活性の低下と平行して減少することが明らかになった。その後14日目には、LPS 刺激の場合は *E. coli* に対する殺菌活性の回復と平行して回復したが、Opsonized Zymozan 刺激の場合は *C. albicans* に対する殺菌活性と同様に回復しなかった。また、遺伝的に活性酸素を発生することができない慢性肉芽腫症の患者から採取した好中球は、*C. albicans* を殺菌することができず、*C. albicans* の殺菌には活性酸素が重要である²⁶⁾と報告されている。これらのことから、0.2 ppm O₃ 暴露による肺胞マクロファージの殺菌活性の低下の主要な原因の一つは、活性酸素発生能の低下であることが明らかになった。

謝 辞

この研究を行うに当たり、活性酸素の測定についてご指導を頂きました東京都臨床医学総合研究所炎症研究室柿沼カツ子室長及び山口照英博士に深く感謝します。

引用文献

- 1) Eschenroeder, A.Q. (1977): Atmospheric concentrations of photochemical oxidants. In: Ozone and Other Photochemical Oxidants. Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants., Division of Medical Sciences Assembly of Life Sciences National Research Council (ed.), 126-194.
- 2) Stephens, R.J., G. Freeman and M.J. Evans (1972): Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide. Arch. Environ. Health, **24**, 160-179.
- 3) Stephens, R.J., M.F. Sloan, M.J. Evans and G. Freeman (1974): Early response of lung to low levels of ozone. Am. J. Pathol., **74**, 31-58.
- 4) Stephens, R.J., M. F. Sloan, M.J. Evans and G. Freeman (1974): Alveolar type 1 cell response to exposure to 0.5 ppm O₃ for short period. Exp. Mol. Pathol., **20**, 11-23.
- 5) Schwartz, L.W., D.L. Dungworth, M.G. Mustafa, B.K. Tarkington and W.S. Tyler (1976):

- Pulmonary responses of rats to ambient levels of ozone. Effects of 7-day intermittent or continuous exposure. *Lab. Invest.*, **34**, 565-578.
- 6) Goldstein, E., W. Lippert and D. Warshauer (1974): Pulmonary alveolar macrophage. Defender against bacterial infection of the lung. *J. Clin. Invest.*, **54**, 519-528.
 - 7) Acton, J.D. and Q.N. Myrvik (1972): Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **24**, 48-52.
 - 8) Valand, S.B., J.D. Acton and Q.N. Myrvik (1970): Nitrogen dioxide inhibition of viral-induced resistance in alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **20**, 303-309.
 - 9) Goldstein, E., H.C. Bartlema, M. van der Ploeg, P. van Duijn, J.G. M.M. vander Satap and W. Lippert (1978): Effect of ozone on lysosomal enzymes of alveolar macrophages engaged in phagocytosis and killing of inhaled *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, **138**, 299-311.
 - 10) Vassallo, C.L., B.M. Domm, R.H. Poe, M.L. Duncombe and J.B. J. Gee (1973): NO₂ gas and NO₂⁻ effects on alveolar macrophages phagocytosis and metabolism. *Arch. Environ. Health*, **26**, 270-274.
 - 11) Coffin, D. L., D. E. Gardner, R. S. Holzman and F. J. Wolock (1968): Influence of ozone on pulmonary cell population. *Arch. Environ. Health*, **16**, 633-636.
 - 12) Mochitate, K., T. Miura and K. Kubota (1985): An increase in the activities of glycolytic enzymes in rat lungs produced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 323-331.
 - 13) Mochitate, K., Y. Takahashi, T. Ohsumi and T. Miura (1986): Activation and increment of alveolar macrophages induced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **17**, 229-239.
 - 14) 持立克身・三浦 卓(1988): オゾン暴露による肺胞マクロファージの代謝の活性化と細胞数の増加. 国立公害研究所研究報告, 第115号, 219-229.
 - 15) 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.*, **20**, 175-198.
 - 16) Evans, M. J., L. V. Johnson, R. J. Stephens and G. Freeman (1976): Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of ozone. *Exp. Mol. Pathol.*, **24**, 70-83.
 - 17) Mochitate, K., K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, **33**, 17-28.
 - 18) Shellito, J., C. Esparza and C. Armstrong (1987): Maintenance of the normal rat alveolar macrophage cell population. The roles of monocyte influx and alveolar macrophage proliferation *in situ*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135**, 78-82.
 - 19) van Furth, R. and A. B. van oud Alblas (1983): Origin of pulmonary macrophages in mice under normal conditions and during an inflammatory reaction by heatkilled BCG. *In: The Cells of the Alveolar Unit.*, Favez, G., A. Junod and P. Leuenberger (eds.), Bern, Hans Huber, 170-179.
 - 20) Estabrook, R.W. (1967): Mitochondrial respiratory and the polarographic measurement of ADP: O ratio. *In: Methods in Enzymology.* Estabrook, R. W. and M. E. Pullman (eds.), New York, Academic Press, vol. 10, 41-47.
 - 21) Kaku, M., K. Yagawa, S. Nagao and A. Tanaka (1983): Enhanced superoxide anion release from phagocytes by muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, **39**, 559-564.
 - 22) Babior, B.M., R. S. Kipnes and J. T. Curnutte (1973): Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bacteriocidal agent. *J. Clin. Invest.*, **52**, 741-744.
 - 23) Massey, V. (1959): The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 255-256.
 - 24) Kakinuma, K., T. Yamaguchi, M. Kaneda, S. Shimada, Y. Tomita and B. Chance (1979): A determination of H₂O₂ release by the treatment of human blood polymorphonuclear leukocytes with

myristate. J. Biochem., **86**, 87-95.

- 25) Quie, P. G., J. G. White and R. A. Good (1967): *In vitro* bacteriocidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: Diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. J. Clin. Invest., **46**, 668-679.
- 26) Lehrer, R. I. and M. J. Cline (1969): Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum. J. Bacteriol., **98**, 996-1004.
- 27) Jacobs, R. F., R. M. Cocksley, C. B. Wilson, J. E. Haas and S. J. Klebanoff. (1984): Interaction of primate alveolar macrophages and *Legionella pneumophila*. J. Clin. Invest., **73**, 1515-1523.

II-22

肺胞マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響 II

—— 老化に伴う傷害の増大 ——

Effects of Ozone on Cytokilling Activities of Alveolar Macrophages II

—— Amplification of Damage to Bacteriocidal Activities by Aging ——

持立克身¹・三浦 卓¹

Katsumi MOCHITATE¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

肺胞マクロファージの殺菌活性及びその発現に重要な役割を果たす活性酸素発生成に対するオゾン(O₃)の影響が、実験動物の老化によりどのように変化するかを検討した。成熟(12か月)及び老齢(24か月)ラットに0.2 ppm O₃を14日間暴露し、肺洗浄により肺胞マクロファージを調製した。肺胞マクロファージの細胞数は、成熟及び老齢ラットで、O₃暴露により各々対照群の1.12倍及び1.39倍に有意に増加した。

Escherichia coli 及び *Salmonella typhimurium* に対する殺菌活性は、成熟ラットでは有意の変化を示さなかったが、老齢ラットではO₃暴露により各々対照群の0.92倍及び0.72倍に有意に低下した。*Pseudomonas aeruginosa* に対する殺菌活性は、成熟及び老齢ラットで各々対照群の0.72倍及び0.79倍に有意に低下した。また、成熟及び老齢ラットの対照群を比較した場合、*E. coli* 及び *S. typhimurium* に対する殺菌活性は、老化に伴い低下する傾向を示した。

E. coli 及び *S. typhimurium* 由来の Lipopolysaccharide (LPS) 刺激による肺胞マクロファージのスーパーオキシド(O₂⁻)発生速度は、成熟ラットでは有意の変化を示さなかったが、老齢ラットではO₃暴露により各々対照群の0.49倍及び0.51倍に有意に低下した。*P. aeruginosa* 由来の LPS 刺激による O₂⁻発生速度は、成熟及び老齢ラットで低下傾向を示した。Phorbol Myristate Acetate (PMA) 刺激による O₂⁻発生速度は、O₃暴露による影響を受けなかった。

以上の結果から、肺胞マクロファージの殺菌能及びO₂⁻発生能は、実験動物の老化に伴い、O₃暴露による傷害を受けやすくなることが明らかになった。また、殺菌活性の低下と平行してO₂⁻発生速度も減少したことから、O₃暴露による殺菌活性低下の原因として、O₂⁻発生能への傷害が考えられる。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Abstract

Adult (12-months old) and aged (24-months old) male Wistar rats were exposed to 0.2 ppm ozone (O_3) for 14 days and alveolar macrophages were collected by pulmonary lavage to compare the effects of O_3 on cytokilling and superoxide (O_2^-)-generation activities between adult and aged rats. The number of alveolar macrophages increased to 1.12-fold and 1.39-fold those of the control values in adult and aged rats, respectively.

The cytokilling activities against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* of alveolar macrophages significantly decreased to 0.92-fold and 0.72-fold those of the control values in aged rats, but did not show any significant change in adult rats. The cytokilling activities against *Pseudomonas aeruginosa* decreased to 0.72-fold and 0.79-fold those of the control values in adult and aged rats, respectively.

The O_2^- -generation rate by the stimulation of lipopolysaccharides (LPS) prepared from *E. coli* and *S. typhimurium* significantly decreased to 0.49-fold and 0.51-fold those of the control values in aged rats, respectively, but did not show any significant changes in adult rats. The O_2^- -generation rate by the stimulation of LPS prepared from *P. aeruginosa* showed the inclinations to decrease in aged and adult rats.

These results indicate that aging alters the cytokilling and O_2^- -generation activities of alveolar macrophages more sensitive to the oxidative stress. Because in parallel with the cytokilling activities the O_2^- -generation activities was harmed by O_3 exposure, the damage on the generation activity of active oxygen is supposed to be a primary cause of the decrease in the cytokilling activity.

1 はじめに

オゾン (O_3) 及び二酸化窒素 (NO_2) は代表的な大気汚染物質であり¹⁾, 肺胞に傷害を与える²⁻⁵⁾ ことが知られている。肺胞マクロファージは肺胞に位置し, 呼吸の際に肺に侵入した微生物から生体を防御する上で重要な役割を担っている^{6,7)}。これまで高濃度の O_3 及び NO_2 によって, 肺胞マクロファージの抗ウィルス活性^{7,8)}, 殺菌活性^{6,7,9,10)}及び貪食能^{7,10,11)}は傷害を受けることが知られている。しかし, 低濃度でこれらの酸化性物質による肺胞マクロファージへの影響については, ほとんど知られていない。

これまで筆者らは, 低濃度 O_3 暴露による肺胞マクロファージへの影響について検討してきた^{12,13)}。その結果, 0.2 ppm O_3 暴露によって1日目には, 肺胞マクロファージの細胞数は減少し, また代謝面でも抗酸化系及び解糖系の酵素活性は低下するなど, O_3 の酸化的ストレスに対して肺胞マクロファージが傷害を受けることを明らかにした¹²⁾。しかし3日目以降は, 肺胞マクロファージの細胞数はむしろ増加し, また抗酸化系及び解糖系の酵素活性も上昇するなど, O_3 の酸化的ストレスに対して肺胞マクロファージが適応することを明らかにした¹²⁾。しかし *Escherichia coli* 及び *Candida albicans* に対する殺菌活性は, むしろ3日目に低下した¹³⁾。その後, *E. coli* に対する殺菌活性は回復したが, *C. albicans* に対する殺菌活性は回復しなかった¹³⁾。このことは, O_3 の酸化的ストレスに対して殺菌活性が回復するか否かは, 指標とする微生物によって異なることを示唆する。また, 殺菌活性が低下した原因の一つは, 活性酸素発生能が O_3 によって傷害を受

けたためであることを明らかにした¹³⁾。

マクロファージは、骨髄の多能性造血幹細胞を起源とし^{14,15)}、老化に伴いこの幹細胞の増殖能力は低下する¹⁶⁾ことが知られている。これまで筆者らは、同じく骨髄幹細胞を起源とする赤血球についても、酸化ストレスにより傷害を受け、その代償作用として若い赤血球が血液中に増加すること^{17,18)}、及び老齢ラットでは補償作用が不十分なため貧血になる¹⁹⁾ことを報告している。同様に、肺泡マクロファージの殺菌活性及び活性酸素発生能についても、老化に伴い O₃ 暴露による傷害を受けやすくなるか検討した。

2 方法

実験方法は、報文「肺泡マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響 (I)」¹³⁾と同様であるので、異なる点のみ記載する。

2.1 暴露方法及び試料の調整

6匹を一群とした JCl: Wistar 系成熟雄ラット (12 か月) 及び老齢雄ラット (24 か月) に 0.2 ppmO₃ を 14 日間連続暴露した。暴露終了後ラットの肺を洗浄し、肺泡マクロファージを調整した。

2.2 殺菌活性の測定

³H-ウリジンで標識した *Escherichia coli* K 12, *Salmonella typhimurium* LT 2 及び *Pseudomonas aeruginosa* を用いて、肺泡マクロファージの殺菌活性を測定した。始めに、*E. coli*, *S. typhimurium* 及び *P. aeruginosa* を各々 [5-³H] ウリジン (5.0 µCi/ml, 0.19 nmol/ml) を添加した M 9+ポリペプトン及び PAS 合成培地に懸濁し、30°C で 18 時間インキュベーションすることにより、³H-ウリジンで標識した細菌を調製した。³H 標識した細菌は、0.95% NaCl 水溶液で洗った後、D-MEM+10 mM MOPS (pH 7.2) 溶液に懸濁し、殺菌活性の測定に用いた。次に、肺泡マクロファージ (2.0×10⁵/0.8 ml) をプレインキュベーション後、細菌を肺泡マクロファージの 100 倍量添加し、30 分間殺菌反応を行った。

E. coli K12, *P. aeruginosa* (IAM 1514) は東京大学応用微生物研究所、*S. typhimurium* LT2 は明治薬科大学微生物学研究室より譲り受けたものを用いた。

2.3 スーパーオキシド発生能の測定

細胞外に放出されたスーパーオキシド (O₂⁻) を、O₂⁻ により還元されたチトクロム *c* の量から分光学的に測定した^{20,21)}。刺激物質としては、0.4 µg/ml Phorbol Myristate Acetate (PMA)、または *E. coli*, *S. typhimurium* 及び *P. aeruginosa* から調整した Lipopolysaccharide (LPS, 5 µg/ml) と Cytochalasin E (Cyt. E, 5 µg/ml)²²⁾を用いた。

3 結果

3.1 オゾン暴露による細胞数の変化

0.2 ppm O₃ 14 日間暴露による肺胞マクロファージの細胞数の変化を表 1 に示した。老齢及び成熟ラットでは、細胞数は各々対照群の 1.39 倍及び 1.12 倍に有意に増加した。また、老齢及び成熟ラットの対照群の細胞数は、両者で差が認められなかったが、O₃ 暴露による細胞数の増加率は、老化に伴い増す傾向が認められた。

表 1 0.2 ppm オゾン2週間暴露による肺胞マクロファージの細胞数の変化

Table 1 Changes in cell number of alveolar macrophages by 2-weeks exposure of rats to 0.2 ppm ozone

	Cell Number ($\times 10^6$ cells/rat)		
	Adult	Aged	Aged/Adult
Control	8.04 \pm 0.63	8.94 \pm 0.98	1.11
Exposed	9.01 \pm 0.54*	12.4 \pm 1.9 **	
Expo/Cont	1.12	1.39	

Viability of alveolar macrophages: 93.5 \pm 3.0 and 93.4 \pm 3.9 (adult), 92.6 \pm 2.5 and 92.4 \pm 1.8 (aged). *, P < 0.05; **, P < 0.01.

3.2 オゾン暴露による殺菌活性の変化

肺胞マクロファージの殺菌活性に対する 0.2 ppm O₃ 14 日間暴露の影響が、実験動物の月齢によりどのように変化するかを検討した。表 2 に、*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 及び *Pseudomonas aeruginosa* を各々 ³H 量で、37300 \pm 1800, 11400 \pm 500 及び 43500 \pm 600 dpm 添加した際、反応液上清中に回収した正味の ³H 量を全添加量に対する割合で%表示した。*E. coli* 及び *S. typhimurium* に対するの殺菌活性は、老齢ラットでは、各々対照群の 0.92 倍及び 0.72 倍に有意に低下したが、成熟ラットでは有意の変化を示さなかった。*P. aeruginosa* に対する肺胞マクロファージの殺菌活性は、老齢及び成熟ラットで、各々対照群の 0.79 倍及び 0.72 倍に低下した。また、両月齢ラットの対照群を比較した場合、*E. coli* 及び *S. typhi murium* に対する殺菌活性は、老化に伴い低下する傾向を示した。

3.3 オゾン暴露によるスーパーオキシド (O₂⁻) 発生能の変化

種々の刺激剤による肺胞マクロファージの O₂⁻ 発生に対する 0.2 ppm O₃ 14 日間暴露の影響が、実験動物の月齢によりどのように変化するかを検討した (表 3)。実験方法として、マクロファージの細胞外に放出されたスーパーオキシド (O₂⁻) により還元されたチトクロム *c* の吸光度増加から、O₂⁻ 発生量を測定した。*E. coli* 及び *S. typhimurium* から調製した Lipopolysaccharide

表 2 0.2 ppm オゾン2週間暴露による肺胞マクロファージの殺菌活性の変化

Table 2 Changes in bacteriocidal activities of alveolar macrophages by 2-weeks exposure of rats to 0.2 ppm ozone

Bacteria		Bacteriocidal Activity (released ^3H /total ^3H , %)		
		Adult	Aged	Aged/Adult
<i>Escherichia coli</i>	Control	71.9 ± 2.9	58.7 ± 2.1	0.82
	Exposed	70.4 ± 5.6	53.9 ± 1.1**	
	Expo/Cont	0.98	0.92	
<i>Salmonella typhimurium</i>	Control	39.5 ± 6.3	17.5 ± 1.5	0.44
	Exposed	37.2 ± 2.3	12.6 ± 2.9**	
	Expo/Cont	0.94	0.72	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Control	14.2 ± 2.2	15.1 ± 0.9	1.06
	Exposed	10.2 ± 1.4**	12.0 ± 1.9**	
	Expo/Cont	0.72	0.79	

Total addition of ^3H -uridine-labeled *E. coli*, *S. typhimurium* and *P. aeruginosa*: 37300 ± 1800, 11400 ± 500 and 43500 ± 600 (dpm), respectively. Cell ratio (bacteria/macrophages): 100. **, $P < 0.01$.

表 3 0.2 ppm オゾン2週間暴露による肺胞マクロファージのスーパーオキシド産生能の変化

Table 3 Changes in generation rate of superoxide anion of alveolar macrophages by 2-weeks exposure of rats to 0.2 ppm ozone

Stimulant		Superoxide Generation Rate (nmol/min/10 ⁶ cells)		
		Adult	Aged	Aged/Adult
PMA	Control	1.12 ± 0.76	1.06 ± 0.55	0.95
	Exposed	1.13 ± 0.32	0.92 ± 0.05	
	Expo/Cont	1.01	0.86	
LPS (<i>E. coli</i>)	Control	0.44 ± 0.15	0.71 ± 0.30	1.6
	Exposed	0.28 ± 0.02	0.35 ± 0.11*	
	Expo/Cont	0.64	0.49	
LPS (<i>S. typhimurium</i>)	Control	0.28 ± 0.02	0.36 ± 0.15	1.3
	Exposed	0.22 ± 0.06	0.18 ± 0.06*	
	Expo/Cont	0.77	0.51	
LPS (<i>P. aeruginosa</i>)	Control	0.26 ± 0.04	0.19 ± 0.05	0.71
	Exposed	0.20 ± 0.07	0.10 ± 0.10	
	Expo/Cont	0.78	0.52	

*, $P < 0.05$.

(LPS) 刺激による肺胞マクロファージの O_2^- 発生量は、殺菌活性の場合と同様に、老齢ラットでは各々対照群の 0.49 倍及び 0.51 倍に減少したが、成熟ラットでは有意の変化を示さなかった。*P. aeruginosa* から調製した LPS 刺激の場合は、低下傾向を示したに留まった。Phorbol Myristate Acetate (PMA) 刺激の場合は、有意の変化を示さなかった。

4 考 察

前報文「肺胞マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響 (I)」¹³⁾において、肺胞マクロファージの殺菌活性は、0.2 ppm O_3 14 日間暴露によって、*Escherichia coli* に対する活性は低下しないが、*Candida albicans* に対する活性は有意に低下することを明らかにした。本研究では、0.2 ppm O_3 14 日間暴露によって、*Pseudomonas aeruginosa* に対する殺菌活性が、*C. albicans* の場合と同様に低下することが明らかになった。*Salmonella typhimurium* に対する殺菌活性は、成熟ラットに関しては、*E. coli* の場合と同様に低下しなかったが、老齢ラットに関しては、*P. aeruginosa* の場合と同程度に低下した。老齢ラットの場合、*E. coli* に対する殺菌活性もわずかではあるが、 O_3 暴露により有意に低下した。これまでの結果をまとめると、 O_3 暴露による殺菌活性低下の程度が大きい指標微生物としては、*C. albicans* 及び *P. aeruginosa*、ほとんど活性低下が認められない微生物としては、*E. coli*、及び両者の間に位置する微生物として、*S. typhimurium* と分けすることができると考えられる。

成熟及び老齢ラットにおいて、殺菌活性の低下と平行して常に、指標微生物の細胞壁から得たリポポリサッカリド (LPS) 刺激によるスーパーオキシド産生量が減少した。このことより、前報文と同様に、殺菌活性低下の一因はスーパーオキシド産生量の低下であることが確認された。同時に、殺菌活性の O_3 に対する感受性が老化に伴い増大する原因の一つは、スーパーオキシド産生能が O_3 に対して一層感受性になるためであると考えられる。

各々の指標微生物に対する殺菌活性の中で、なぜ O_3 暴露に感受性が高いものと低いものが存在するかは、現在不明であるが幾つかの理由が考えられる。第一には、活性酸素に対する抵抗性に微生物間で差があること、第二には、各々の LPS に対するリセプターを介して活性酸素を発生するまでの過程に、 O_3 に対する傷害の受けやすさに違いがあることが考えられる。前報文で我々は、*E. coli* に対する殺菌活性及び *E. coli* の LPS 刺激による活性酸素産生量も、初期 (3 日目) には有意に低下するが、その後回復することを認めた。この間に、マクロファージの DNA 生合成は亢進し、小形の細胞が増加した¹²⁾。これまでの研究によれば、肺胞マクロファージの細胞数は、骨髄からの単球の補給のみならず細胞分裂によっても維持されている²³⁻²⁵⁾ことが知られている。したがって、 O_3 暴露によって増加する小形のマクロファージは、細胞分裂の結果生じた娘細胞あるいは単球に似た未熟な細胞と考えることもできる。この作業仮説に立てば、娘マクロファージあるいは未熟なマクロファージの殺菌活性及び活性酸素産生能は、成熟した細胞と比較して、*E. coli* に関してはほぼ等しい活性を有するが、*P. aeruginosa* や *S. typhimurium* に関しては十分成

熟していないため活性が低く、これが原因でO₃暴露による傷害が現れたと理解することができる。老齢ラットで、O₃暴露による傷害が強く現れやすいのは、嫌マクロファージもしくは単球が傷害を受けたマクロファージにとって代わる反応、すなわち代償能力が低下しているためかもしれない。今後、これらの可能性について、更に検討することが必要であろう。

謝 辞

この研究を行うに当たり、活性酸素の測定についてご指導を頂きました東京都臨床医学総合研究所炎症研究室柿沼カツ子室長及び山口照英博士に深く感謝します。

引 用 文 献

- 1) Eschenroeder, A. Q. (1977): Atmospheric concentrations of photochemical oxidants. *In*: Ozone and Other Photochemical Oxidants. Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants., Division of Medical Sciences Assembly of Life Sciences National Research Council (*ed.*), 126-194.
- 2) Stephens, R. J., G. Freeman and M. J. Evans (1972): Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **24**, 160-179.
- 3) Stephens, R. J., M. F. Sloan, M. J. Evans and G. Freeman (1974): Early response of lung to low levels of ozone. *Am. J. Pathol.*, **74**, 31-58.
- 4) Stephens, R. J., M. F. Sloan, M. J. Evans and G. Freeman (1974): Alveolar type 1 cell response to exposure to 0.5 ppm O₃ for short period. *Exp. Mol. Pathol.*, **20**, 11-23.
- 5) Schwartz, L. W., D. L. Dungworth, M. G. Mustafa, B. K. Tarkington and W. S. Tyler (1976): Pulmonary responses of rats to ambient levels of ozone. Effects of 7-day intermittent or continuous exposure. *Lab. Invest.*, **34**, 565-578.
- 6) Goldstein, E., W. Lippert and D. Warshauer (1974): Pulmonary alveolar macrophage. Defender against bacterial infection of the lung. *J. Clin. Invest.*, **54**, 519-528.
- 7) Acton, J. D. and Q. N. Myrvik (1972): Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **24**, 48-52.
- 8) Valand, S. B., J. D. Acton and Q. N. Myrvik (1970): Nitrogen dioxide inhibition of viral-induced resistance in alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **20**, 303-309.
- 9) Goldstein, E., H. C. Bartlema, M. van der Ploeg, P. van Duijn, J. G. M. M. van der Stap and W. Lippert (1978): Effect of ozone on lysosomal enzymes of alveolar macrophages engaged in phagocytosis and killing of inhaled *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, **138**, 299-311.
- 10) Vassallo, C. L., B. M. Domm, R. H. Poe, M. L. Duncombe and J. B. J. Gee (1973): NO₂ gas and NO₂⁻ effects on alveolar macrophages phagocytosis and metabolism. *Arch. Environ. Health*, **26**, 270-274.
- 11) Coffin, D. L., D. E. Gardner, R. S. Holzman and F. J. Wolock (1968): Influence of ozone on pulmonary cell population. *Arch. Environ. Health*, **16**, 633-636.
- 12) 持立克身・三浦 卓(1987): オゾン暴露による肺胞マクロファージの代謝の活性化と細胞数の増加. 国立公害研究所研究報告, 第 115 号, 219-229.
- 13) 持立克身・三浦 卓(1987): 肺胞マクロファージの殺菌活性に及ぼすオゾンの影響 I, 国立公害研究所研究報告, 第 115 号, 231-243.

- 14) van oun Alblas, A. B. and R. van Furth (1979): Origin, kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J. Exp. Med.*, **149**, 1504-1518.
- 15) Virolainen, M. (1968): Hematopoietic origin of macrophages as studied by chromosome markers in mice. *J. Exp. Med.*, **127**, 943-952.
- 16) Gozes, Y., T. Umiel and N. Trainin (1982): Selective decline in differentiating capacity of immunohemopoietic stem cells with aging. *Mech. Aging Develop.*, **18**, 251-259.
- 17) Mochitate, K, and T. Miura (1984): In vivo effect of nitrogen dioxide on the activities of glycolytic enzymes in red blood cells of rats. *Toxicol. Lett.*, **22**, 315-321.
- 18) Kunimoto, M., K. Mochitate, K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): 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.*, **33**, 17-28.
- 19) 三浦 卓・高橋勇二・国本 学・持立克身・河田明治・彼谷邦光・野原恵子・伊藤勇三・高橋 弘 (1987): 老齡ラットに及ぼす二酸化窒素とオゾンの影響I. -Ht 値と臓器重量の変化-. 国立公害研究所研究報告, 第115号, 169-176.
- 20) Massey, V. (1959): The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome *c*. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 255-256.
- 21) Babior, B. M., R. S. Kipnes and J. T. Curnutte (1973): Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bacteriocidal agent. *J. Clin. Invest.*, **52**, 741-744.
- 22) Kaku, M., K. Yagawa, S. Nagao and A. Tanaka (1983): Enhanced superoxide anion release from phagocytes by muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, **39**, 559-564.
- 23) Shellito, J., C. Esparza and C. Armstrong (1987): Maintenance of the normal rat alveolar macrophage cell population. The roles of monocyte influx and alveolar macrophage proliferation *in situ*. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135**, 78-82.
- 24) Tarling, J. D. and J. E. Coggle (1982): Evidence for the pulmonary origin of alveolar macrophages. *Cell Tissue Kinet.*, **15**, 577-584.
- 25) Pinkett, M. O., C. R. Cowdrey and P. C. Nowell (1966): Mixed hematopoietic and pulmonary origin of alveolar macrophages as demonstrated by chromosome markers. *Am. J. Pathol.*, **48**, 859-867.

II-23

実験小動物の呼吸機能測定用高速デジタルリニアライザーの開発
**A Development of Digital Linearizer for
Measurement of Pulmonary Function in Rats**

清水 明¹・鈴木 明²

Akira SHIMIZU¹ and Akira K. SUZUKI²

要 旨

本報告は、非線形な特性をもつ呼吸流速センサーの出力を、デジタル信号処理によって、高速、高精度に直線化する新方式について述べている。また、オゾンを暴露したラットの呼吸流速及び換気量をこの方式で測定し、従来の方法と比較した。これらの結果から、本方式のリニアライザーは、実験小動物の呼吸流速・換気量の測定に有用であるとともに、一般的な非線形特性を有する各種センサーの直線化にも使用できると結論された。

Abstract

This report presents a new method of digital linearizer for measurement of pulmonary function in rats. The method has some excellent characteristics on the data treatment speed and the precision, and consists of A/D converter and memory table controlled by a personal computer. Respiratory flow rate and flow velocity in rats exposed to ozone were examined using this method. It is concluded that this method is a very usable one for measurement and analysis of pulmonary function in the small experimental animals.

1 はじめに

近年、実験小動物における肺機能の換気力学的指標を測定する新しい方法が報告されている。呼吸流速、換気量、一回換気量等の換気力学的指標を正確に測定することは生体の呼吸機能及び代謝状態を知る上で非常に重要である。しかしながら、それらの測定は必ずしも容易ではなかった。なぜなら、測定管（抵抗管）の2点間の差圧と流速が比例関係にないため、これを簡単に高精度で補正測定することが困難であったためである。特に、ラットやマウスのような小動物では

-
1. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Engineering Division, the National Institute for Environmental Studies. 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川16番2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies. 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

呼吸量が小さいため従来の差圧方式では誤差も大きかった。そこで、非線形な特性を直線化するリニアライザーが必要となる。

著者らは、以前、アナログ方式のリニアライザーを製作し、改良を続けてきたが、この装置は、補正曲線を多くの可変増幅器の組み合わせで行っているため、操作が難しく、安定性に問題があった。そこで、これらの問題点を解決するために、必要とされる処理をデジタル方式にすることを考え、システム化し応用実験に成功したので報告する。

2 実験方法及び実験材料

2.1 リニアライザーの概念と基本原理

図1にリニアライザーの概念を示した。(a)のAのような特性の圧力変換器（圧力を電圧に変換）があるとき、このままでは圧力と出力電圧が比例しないので、(B)のような特性を持つ変換器で補正を加えて、見かけ上比例関係にするための装置を一般にリニアライザーという。従来ではこの変換はアナログ方式で行われていた(b)。

今回のデジタル・リニアライザーでは、原信号をまずA/D (Analog to Digital) 変換し、変換したデジタル値をマイクロコンピュータ等により補正のための数値演算処理を行い、D/A (Digital to Analog) 変換して目的とする信号を取り出す。これによって、補正精度が改善されるだけでなく、システムの制御全般についてマイクロコンピュータの支援が得られるので操作性も著しく向上している。

2.2 本装置の基本原則

デジタル・リニアライザーの基本については上述のとおりである。しかし、この場合、利点だけでなく、不利な点も考えなければならない。それは、補正処理のため高次の近似多項式の計算

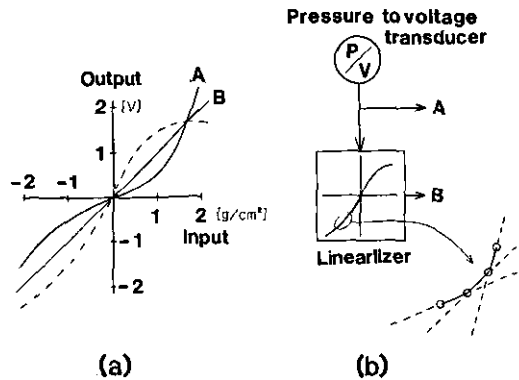


図 1 リニアライザーによる補正原理
Fig. 1 A principle of linearizing method

が必要とされるために、乗除算や条件判断等に時間がかかるという点である。このことは、サンプリング時間や即応性を制約するものである。そこで、著者らは、リニアライズ処理中には数値演算を行わない方式を考え出し、処理速度に関する問題を解決した。

図2にその概念図を示した。この図で(a)のような入出力関係をもつリニアライザーを考える。ここで、A/D変換器に12ビットのものを使用すると、その変換出力値は4096 (2^{12})通りしかないので、そのすべての場合について(b)のように、D/A変換器に送るべき出力値をあらかじめ計算した対応表(変換テーブル)を作成しておく。あるいは、何らかの対応関係を定義し対応表にする。そうしておく、単純なテーブルサーチを行うだけでリニアライズをすることができる。実際は、入力信号がA/Dに変換され、この変換出力をアドレスとしてメモリをアクセスする。この動作により、メモリにあらかじめ記入されていた補正データが得られ、これをD/A変換器に送り、アナログ信号として出力することにより、リニアライザーとして作動する。この方法によれば、どのような補正曲線であっても原理上、応答時間が一定である。さらに、これらの動作は非常に単純であるので、専用のハードウェアと置き換えることにより、極めて高速な作動も可能である。また、この方式によれば、補正テーブルの作成は高度な機能をもつコンピュータシステムで行い、リニアライズの実行はより簡易で専用化されたシステムで行うような、システムの階層構成も可能である。更に、変換テーブルを複数準備し、入出力部を多チャンネル化し、それを逐次切り換えることにより、容易に多チャンネルの特性の異なるリニアライズ用のシステムを構成することができる。

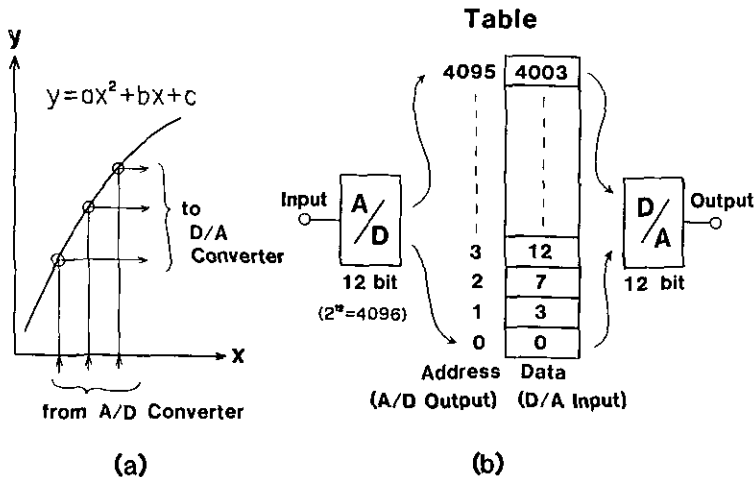


図 2 変換テーブルによるリニアライズ処理
Fig. 2 A new linearizing process using function tables

2.3 動物

雄の JCl: Wistar 系のラットを用い、対照群として 12 匹、0.8 ppm の O₃ 暴露群として 12 匹を使用した。暴露は 8 週齢から始め 1 週間連続した。暴露終了後直ちにネンブタール (pentobarbital sodium, 30mg/kg B.W) で麻酔し、自発呼吸時の呼吸をオリフィス型抵抗管に導き、オリフィス両端の差圧を差圧トランスジューサー (トヨタ工機, DD-101 S) で測定し、差圧変化をデータレコーダー (TEAC 270 A) に収録した。測定前後に抵抗管を窒素ガスとサーマルマスフロー (Ohkura 4-200 ml) で正確に校正し、変換表をメモリ (自作) 上に作成した。変換表の作成、データファイルの転送、数値処理等はすべてパーソナルコンピュータ (NEC-PC-9801) で行った。また、BTPS への変換は定法に従った。

3 結果

3.1 特性

図 3 に、今回製作した装置のブロックダイアグラムを示す。本器は、4 チャンネル同時にリニアライズができるとともに、A/D 変換したデータを記憶させるメモリも装備している。これらの制御には、8 ビットマイクロプロセッサ (Z-80 A) を使用している。リニアライズは、プログラム制御で変換テーブルのサーチを行い、1 チャンネル当たり 250 μ s 以内で処理を行うことができた。この装置は、変換テーブルの作成や、システム制御に必要なパラメータの作成は別のパソコンシステムが行い、通信線を介して本器に転送される。図 4(a) に、試みに定義した補正曲線 (横軸が入力、縦軸が出力) と、それに三角波入力を加えた場合の応答を図 4(b) に示す。このように複雑な (13 折点) 補正曲線でも、特性設定はマイクロコンピュータのソフトウェアによる支援があるため、操作上は容易である。また、どのような補正曲線でも (ただし、入力に対し出力は一価) 応答速度は一定である。

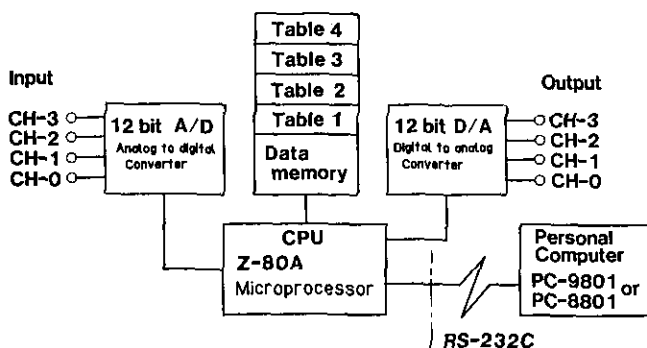


図 3 試作機のブロックダイアグラム

Fig. 3 A block diagram of primary linearizer

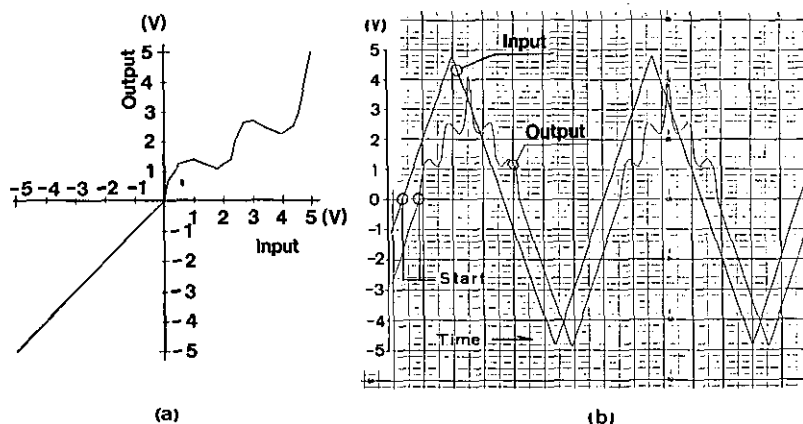


図 4 補正変換例

Fig. 4 An example of linearizing curves and original ones

3.2 動物実験例

本装置で求めた分時換気量 (\dot{V}_E) と一回換気量 (V_T) を補正前の値と比較した。両者ともに補正しない場合の最小誤差は 3%、最大誤差は 28% と大きな値を示し、特に低流速部での誤差が大きかった。すなわち、流速、流量が少ない部分での補正が大きいため、ラットやマウスのように換気が少ない動物に本装置は適していると考えられる。また、呼気ガスを分離して収集した換気量と比較すると、本装置の方が 2~3% 多い値を得た。この原因は、本装置では吸気相と呼気相が明瞭に分離でき、より正確な換気量を得ることができるが、呼気ガス分離器では、電磁弁を作動させるため死腔ができ、その分少ない値を示すものと考えられる。また、 O_2 暴露ラットでは、 \dot{V}_E は対照の 70~80% に低下し、吸気相の短縮及び呼気相の延長が観察された。

4 考察

現在本器が扱える最高周波数は、2 kHz である。これは、テーブルサーチや内部の制御のすべてをソフトウェアにより処理しているためである。もしこれを専用のハードウェアに置き換えれば、現用の各素子を使用しても $20 \mu s$ 以内 (A/D 変換時間 $10 \mu s$ + メモリアクセス時間 $0.3 \mu s$ + D/A 変換時間 $2 \mu s$ + 若干の制御時間) で処理でき、扱える最高周波数が 25 kHz まで可能となる。このように本方式では、構成素子の限界に近い性能を引き出すことが可能であると考えられる。補正テーブル用のメモリとしては、分解能 4096 (変換器 12 ビット) で約 8 k バイト必要である。

また、多チャンネルの対応をすると、処理時間はチャンネル数にほぼ比例して増加するが、システムを構成する部品はそれほど増加しないので、コストに関しては非常に有利である。これらの特性から、特殊なセンサーを使用し、高速・高精度あるいは多チャンネルのリニアライズ処理を必要とする工業計測機器や制御装置にも本器のような方式は有用であると考えられる。

本報告では、動物実験例数が少ないため、従来の報告と種々のパラメータを比較検討している段階である。しかし、呼吸流速が正確に把握できることは、従来困難であった呼気量・吸気量の差や呼吸パターンを正確に測定できることを意味しており、呼吸機能検査だけでなく代謝の検索にも有用な手法と期待できる。

なお、本システムは特許出願中である。

謝 辞

著者らは、本研究において終始有用な御助言及び激励して下さった高橋 弘動物施設管理室長に深く感謝の意を表するとともに、貴重な御助言を下さった客員研究員・菅野 茂東大教授に御礼申し上げます。

ラット肺遊離ドリコール定量法の改良
An Improved Method for the Quantitative and Qualitative
Determination of Free Dolichols in Rat Lung

野原恵子¹・河田明治¹・彼谷邦光¹

Keiko NOHARA¹, Meiji KAWATA¹ and Kunimitsu KAYA¹

要 旨

ラット肺の遊離ドリコールを簡便に精度よく測定するために、内部標準を用いた新しい遊離ドリコール定量法を確立した。本法では C-55 ドリコールを内部標準として用い、脂質画分より薄層クロマトグラフィーによって遊離ドリコール画分を分離後、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによって分析を行う。また脂質画分をアルカリ処理することによって、全（遊離及び脂肪酸とのエステル型）ドリコールが分析できた。

ラット肺の全ドリコール中、遊離ドリコール ($17.3\mu\text{g/g}$) は 73% を占めた。遊離ドリコールと全ドリコールの組成は極めて類似し、C-90 ドリコールを中心に C-80 から C-100 の同族体が主要ドリコールであった。0.4ppm O_3 、または 4 ppm NO_2 + 0.4 ppm O_3 を 1 か月間連続暴露したラットでは、肺の遊離及び全ドリコール含量は両群とも対照群と有意差がなく、組成にも差がなかった。

Abstract

A method for the precise determination of free dolichols in rat lung has been developed. Free dolichols in rat lung including C-55 dolichol as an internal standard were separated from lipid extract using thin-layer chromatography, and analyzed by high-performance liquid chromatography using a reversed phase column. Total dolichols (free dolichols and dolichyl fatty acyl esters) were also analyzed by this method after alkali treatment of the lipid extract.

Free dolichols in rat lung ($17.3\mu\text{g/g}$) represented 73 % of total dolichols. The compositions of free and total dolichols were very similar each other, mainly consisting of a series of homologues from C-80 to C-100. Exposure to 0.4 ppm O_3 alone or mixture of 4 ppm NO_2 and 0.4 ppm O_3 for one month, did not affect both of contents and compositions of free and total dolichols in rat lung.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県つくば市小野川 16 番 2
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies. 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

1 はじめに

ドリコールは真核細胞に広く分布する鎖長の長いポリプレノイドで、そのモノリン酸エステル、すなわちドリキルホスフェートが、N-グリコシド型糖タンパク質合成の中間体として機能することが明らかにされている¹⁾。一方、細胞内のドリコールの大部分(90%以上)は遊離型または脂肪酸とのエステル型として存在している²⁾。これらはドリキルホスフェートの前駆体となるばかりでなく、また細胞膜や細胞内小器官の膜に存在し^{2,3)}膜の流動性と密接に関係することが示唆されている^{4,5)}。

前報⁶⁾で報告したように、我々は大気汚染物質であるNO₂の暴露によってラット肺の遊離ドリコール量が有意に変動することを見いだした。このことから、本研究はオゾン等の各種大気汚染物質が肺ドリコール量に及ぼす影響を検討することを目的として行った。

ドリコールの分析法としては、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-UVモニターの系を導入することによって、各同族体の測定が可能となった⁷⁾。しかし組織中のドリコールを分析する方法としては、これまで容易に入手できる内部標準を使用する方法がなく、我々が前報⁶⁾で用いた Pullarkat らの遊離ドリコール測定法⁸⁾も内部標準を使用していないことから精度の点で十分とは言えなかった。このことから、本研究では市販され入手の容易な C-55 ドリコールを内部標準として Pullarkat らの方法を改良し、簡便に遊離ドリコール及び全ドリコール(遊離及び脂肪酸エステル型ドリコールを合わせたもの)を測定する方法を検討した。また、この方法を用いて O₃ 単独または O₃ 及び NO₂ 複合暴露を行ったラット肺の遊離、及び全ドリコールの測定を行った。

2 方法

2.1 標準試料

C-55 ドリコールは Sigma より購入した。定量、同定、及び TLC の対照としてブタ肝ドリコール (Sigma, 主要同族体のピーク面積比, C-85 (1.7%), C-90 (10.3%), C-95 (34.7%), C-100 (38.5%), C-105 (12.5%), C-110 (2.3%)) 及び C-90 ドリコール (Sigma) を使用した。

2.2 ドリコールの分析法

2.2.1 脂質の抽出

ラットをエーテル麻酔して腹大静脈から放血した後、肺を摘出してクロロホルム-メタノール (2:1, v/v), 40 倍容で抽出した。これに一定量の C-55 ドリコールを加えて混合した後ろ過した。この抽出液に 1/4 倍容の水を加えて分配することにより、脂質画分を得た。それぞれ肺組織 100 mg に相当する脂質画分を遊離ドリコールまたは全ドリコールの測定に用いた。

2.2.2 遊離ドリコールの調製

薄層プレート (HPTLC, Merck) を用いてラット肺の脂質画分から遊離ドリコール画分を調製した。標準試料としてブタ肝ドリコール及び C-55 ドリコールを用いた。ヘキサン-ジエチルエーテル-メタノール-アンモニア (80:20:1:0.5, v/v) で展開後、対照試料 (20% 硫酸発色) の R_f 値に対応する試料中の遊離ドリコール部分をかきとり、1 ml のクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) で抽出、遠心後、抽出液を分離し窒素気流下蒸発乾固した。これをヘキサン-メタノール (2:1, v/v) で分配し、ヘキサン層を蒸発乾固して遊離ドリコール画分を得た。

2.2.3 全ドリコールの調製

ラット肺の脂質画分をメタノール中 0.5 N NaOH に溶かし 45°C、1 時間加熱後酢酸で中和し、クロロホルムと水を加えて脂質層を分取した。この脂質画分より、2.2.2 項で述べたのと同様に TLC によるかきとり、分配によって全ドリコール画分を得た。

2.2.4 HPLC 分析

ドリコール試料は HPLC 移動相に溶かし、Zorbax ODS カラム (4.6 mm×25 cm) で分析した。移動相、メタノール-イソプロパノール-ヘキサン (5:4:1.8, v/v)；流速、0.7 ml/min；検出、UV (214 nm)。定量は重量既知のブタ肝ドリコールと C-55 ドリコールのピーク面積比より補正係数を求め、測定試料中ドリコールの C-55 ドリコールに対する面積比に補正係数をかけて重量を算出した。組成は各同旅体のピーク面積比として求めた。また各ピークの炭素数は、標準となる C-90 ドリコール及びブタ肝ドリコールの保持時間から求めた。

2.3 動物及び暴露条件

Jcl: Wistar 系雄ラット (12 週齢) に 0.4 ppm O₃ 単独、または 0.4 ppm O₃ 及び 4 ppm NO₂ 複合ガスを 1 か月間連続暴露した。

また、ドリコール分析法の検討には Jcl: Wistar 系雄ラット (20 週齢) の肺を用いた。

3 結果

3.1 分析法

ラット肺の脂質画分より遊離及び C-55 ドリコールを含む画分を分離するための TLC 展開溶媒を検討した結果、ヘキサン-エーテルの系にアンモニアを加えることによってドリコールと他の脂質との十分な分離が得られた。この展開溶媒は、全ドリコール分析のために脂質画分をアルカリ処理した後のアルカリ安定な脂質画分にも適用できた。

HPLC の分析条件については、標準試料の C-90 ドリコールでは 5 から 500 ng、ブタ肝ドリコール (C-85~C-110) では 50 から 800 ng の範囲で、注入量とピーク面積 (の総和) の間によい

直線性が得られた。

図1に本法によって分析したラット肺の遊離及び全ドリコールの HPLC パターンを示す。本法で調製したドリコール画分は夾雑物が少なく、また本 HPLC 条件によって内部標準及びすべての同族体をよく分離できた。

ラット肺組織のドリコールを HPLC 分析するためには最低 10 mg 程度の組織から分析が可能であったが、操作のしやすさの点からそれぞれ 100 mg を遊離または全ドリコールの分析に用いることとした。図2は、肺組織と内部標準との量比を変えて測定を行ったときのキャリブレーションカーブである。C-55 ドリコール 1 μg に対して肺組織 50 から 300 mg, すなわち肺組織 100 mg に対して C-55 ドリコール 2 から 0.33 μg の範囲で、遊離ドリコール, 全ドリコールいずれのグラフとも直線性を示した。同一試料 3 回の分析に対する標準偏差は 0.2 から 6.8% の間にあった。

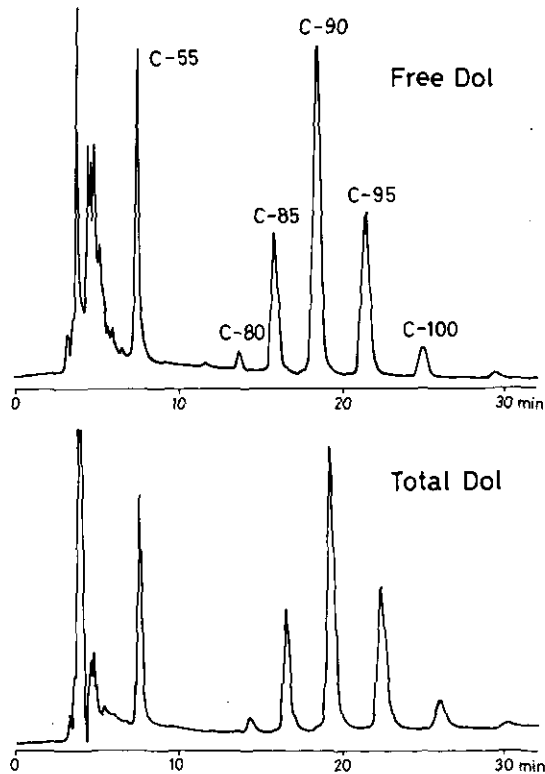


図 1 ラット肺の遊離及び全ドリコールの高速液体クロマトグラム
Fig. 1 HPLC analysis of free and total dolichols in rat lung on a Zorbax ODS column

Experimental conditions were as described in the text. Numbers on the peaks indicate the total number of carbons in each dolichol homolog. Dolichol C-55 was added as an internal standard.

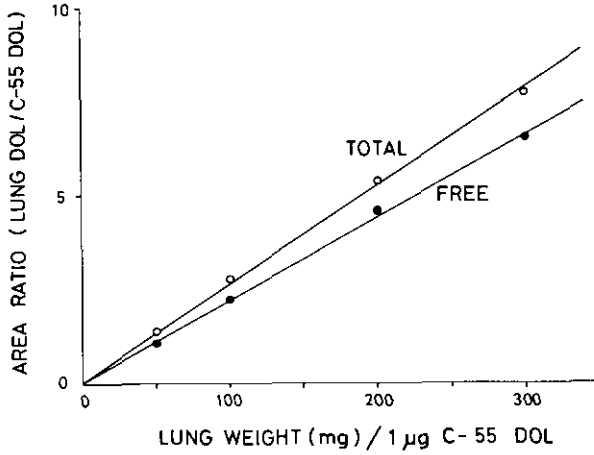


図 2 肺組織と C-55 ドリコールの量比を変えて測定した時の遊離及び全ドリコールの検量曲線

Fig. 2 Calibration curves for free and total dolichols in rat lung

Lung tissue (100 mg) was analyzed with dolichol C-55 ranging from 2 to 0.33 μg by the method described in the text. Each point is the mean of three replicates.

3.2 O_3 または $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ を暴露したラット肺のドリコールの測定

対照群、及び 0.4 ppm O_3 単独または 4 ppm NO_2 及び 0.4 ppm O_3 の複合暴露を 1 か月間行ったラット肺の、ドリコール含量と組成を表 1 に示した。対照群の遊離または全ドリコール量はそれぞれ 17.26 $\mu\text{g}/\text{g}$ と 23.57 $\mu\text{g}/\text{g}$ で、全ドリコール中の遊離ドリコールの比率は 73%であった。

表 1 O_3 及び NO_2 を暴露したラット肺の遊離及び全ドリコール含量と組成

Table 1 Effects of O_3 and NO_2 on the contents and compositions of free and total dolichols in rat lung

Dolichol	Group (n=5)	Amount ($\mu\text{g}/\text{g}$ tissue)	Composition (%)				
			C-80	C-85	C-90	C-95	C-100
Free	Control	17.26 \pm 1.39	1.8	17.4	47.5	27.3	6.0
	O_3	18.09 \pm 1.87	2.3	17.4	47.2	27.1	6.0
	$\text{NO}_2 + \text{O}_3$	18.34 \pm 0.58	2.0	17.8	46.7	27.6	5.9
Total	Control	23.57 \pm 2.29	1.8	18.2	47.7	26.7	5.8
	O_3	23.46 \pm 1.86	1.8	18.0	47.5	26.9	5.8
	$\text{NO}_2 + \text{O}_3$	23.05 \pm 2.50	1.9	17.7	47.6	27.2	5.6

Rats were exposed to 0.4 ppm O_3 or 4 ppm $\text{NO}_2 + 0.4$ ppm O_3 for 1 month.

組成は遊離ドリコール、全ドリコールとも極めて類似しており、C-90ドリコールを中心にC-80からC-100ドリコールが主要同族体であった。今回の暴露条件における各暴露群のラット肺遊離及び全ドリコール含量は、対照群のものと有意差がなく、組成にも差がなかった。

4 考 察

これまでに組織の全ドリコールを HPLC 分析する方法は、Rip ら⁹⁾、Eggens ら³⁾、Yamada ら¹⁰⁾などによって報告されている。これらの全ドリコール測定法では、脂肪酸とのエステル型ドリコールを遊離型に変えるために組織のホモジネートをあらかじめアルカリ処理することからアルカリ水解を受ける脂質が除かれ、比較的夾雑物の少ないドリコール画分を得やすい。これに対して遊離ドリコールのみを測定する場合は、アルカリ処理以外の前処理によって遊離ドリコール画分を分離する必要がある。我々が前報⁶⁾で用いた Pullarkat らの方法⁸⁾では、TLC によって遊離ドリコール画分を分画している。しかしながら彼らの方法は内部標準を用いていないことから、この方法を内部標準を用いる方法に改良するために検討を行った。内部標準としては、Yamada ら¹⁰⁾は全ドリコールの測定に 2, 2-didecaprenylethanol を合成して用いている。しかし、この試薬は TLC 上の Rf 値がドリコールと著しく異なるため、TLC によって前処理を行う方法には利用できなかった。Rip ら⁹⁾はトリチウムラベルしたドリコールを、また Eggens ら³⁾は C-75ドリコールと C-115ドリコールを、それぞれ内部標準として全ドリコールを測定しているが、C-75ドリコールと C-115ドリコールはそれぞれエゾマツ (*Picea abies*) の葉及び牛の脳下垂体より調製しており、これら内部標準の調製はいずれも繁雑である。我々は方法を簡便にするために、市販の C-55ドリコールを内部標準として選定した。この内部標準を用いて夾雑物の少ないドリコール画分を得るための TLC 展開溶媒と、内部標準及び試料中のドリコールを同時に分析するための HPLC 移動相を検討することによって、ラット肺の遊離及び全ドリコールを測定する方法を確立した。本法はラットの肝、腎、脾臓の遊離及び全ドリコールの測定にも応用できた(結果未発表)。

前報⁶⁾では、Pullarkat らの報告⁸⁾に準じて Sigma より購入したブタ肝ドリコール(C-90, C-95を中心にC-80~C-105が主要同族体)を標準試料としてドリコールの推定を行った。しかし、今回標準試料のC-90ドリコールと比較した結果、我々が標準試料として用いたブタ肝ドリコールの同族体はC-95, C-100を中心にC-85からC-110のものであることが明らかになった。この試料と対照した結果、ラット肺のドリコールはC-90を中心にC-80からC-100の同族体で構成されていた。また前報⁶⁾では、ラット肺、肝、腎のホモジネートより遊離ドリコールを測定し、タンパク質当たりの含量を求めた。しかし多くの報告が組織重量当たりの含量を示していることから、これらとの比較のため今回ドリコール含量は組織重量当たりで表した。

前報⁶⁾で報告したように、4 ppm NO₂ を 3 か月間連続暴露したラットでは肺の遊離ドリコール量は対照群より有意に増加した。一方、今回 0.4 ppm O₃ または 4 ppm NO₂+0.4 ppm O₃ を 1 か月間連続暴露したラット肺の遊離及び全ドリコールを測定した結果、含量、組成とも対照群と

差がなかった。以上の結果から、ガスの種類や暴露期間による影響の違いが考えられたが、この点についてはさらに検討が必要である。

大気汚染物質暴露による肺のドリコールの変化に関する研究は、大気汚染物質の肺細胞への影響を検索する新しい手がかりとなることが期待されるが、本研究で検討した測定法はそのための有用な研究手段となるものと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、標準試料 C-90 ドリコールの FD マス分析をご援助下さり、また 2, 2-didecaprenylethanol をご恵与下さいましたエーザイ株式会社、山田浩司博士に心から感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) Mookerjee, S., T. Coolbear and M. L. Sarkar (1983): Key role of dolichol phosphate in glycoprotein biosynthesis. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **61**, 1032-1040.
- 2) Rip, L. W., N. Chaudhary and K. K. Carroll (1983): Distribution and metabolism of dolichol and dolichyl phosphate in rat liver. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **61**, 1025-1031.
- 3) Eggens, I., T. Chojnacki, L. Kenne and G. Dallner (1983): Separation, quantitation and distribution of dolichol and dolichyl phosphate in rat and human tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **751**, 355-368.
- 4) Vigo, C., S. H. Grossman and W. Drost-Hansen (1984): Interaction of dolichol and dolichyl phosphate with phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **774**, 221-226.
- 5) Valtersson, C., G. van Duyn, A. J. Verkleji, T. Chojnacki, B. de Kruijff and G. Dallner (1985): The influence of dolichol, dolichol esters, and dolichyl phosphate on phospholipid polymorphism and fluidity in model membranes. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2742-2751.
- 6) 野原恵子・彼谷邦光・高橋勇二・三浦 卓・河田明治 (1986): ラット臓器中の遊離ドリコール量に及ぼす二酸化窒素の影響. 国立公害研究所研究報告, 第 101 号, 129-134.
- 7) Tavares, I. A., N. J. Johnson, F. W. Hemming (1977): A sensitive quantitative assay method for dolichols, cholesterol and ubiquinone using high-pressure liquid chromatography. *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 1771-1773.
- 8) Pullarkat, R. K., H. Reha and P. S. Pullarkat (1984): Age-associated increase of free dolichol levels in mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **793**, 494-496.
- 9) Rip, J. W., C. A. Rupa, N. Chaudhary and K. K. Carroll (1981): Localization of a dolichyl phosphate phosphatase in plasma membranes of rat liver. *J. Biol. Chem.*, **256**, 1929-1934.
- 10) Yamada, K., H. Yokohama, S. Abe, K. Katayama and T. Sato (1985): High-performance liquid chromatographic method for the determination of dolichols in tissues and plasma. *Anal. Biochem.*, **150**, 26-31.

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」の調整、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変化とその評価—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 南浅川の冬期の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 スモッグチャンパーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究――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)――昭和54年度 特別研究中間報告。(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「池底質」の調整、分析及び保証値)
- ※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。(1983)
- 第41号 土壌環境の計測と評価に関する統計学的研究。(1983)
- ※第42号 底泥の物性及び流送特性に関する実験的研究。(1983)
- ※第43号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)
 Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June with description of 15 new species.
 Part 6. Description of species of the subfamily Orthoclaadiinae recovered from the main stream in the June survey.
 Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
 (多摩川に発生するユスリカ類の研究
 ―第5報 本流に発生するユスリカ類の分布に関する6月の調査成績とユスリカ亜科に属する15新種等の記録
 ―第6報 多摩本流より6月に採集されたエリユスリカ亜科の各種について
 ―第7報 多摩本流より3月に採集されたユスリカ科の各種について)
- 第44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――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2)――昭和54年度 特別研究中間報告。(1983)
- 第45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53～55年度 特別研究総合報告。(1983)
- 第46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54、55年度 特別研究報告 第1分冊。(1983)
- 第47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54、55年度 特別研究報告 第2分冊。(1983)

- ※第48号 水質観測点の適正配置に関するシステム解析。(1983)
- 第49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57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第50号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(I)—霞ヶ浦の流入負荷量の算定と評価—昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第51号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(II)—霞ヶ浦の物質循環とそれを支配する因子—昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第52号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(III)—霞ヶ浦高浜入における隔離水界を利用した富栄養化防止手法の研究—昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第53号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(IV)—霞ヶ浦の魚類及び甲かく類現存量の季節変化と富栄養化—昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第54号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(V)—霞ヶ浦の富栄養化現象のモデル化—昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第55号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(VI)—富栄養化防止対策—昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第56号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(VII)—湯ノ湖における富栄養化とその防止対策—昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第57号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究(VIII)—総括報告—昭和55~57年度 特別研究報告。(1984)
- 第58号 環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究—昭和55~57年度 特別研究総合報告。(1984)
- 第59号 炭化水素-窒素酸化物-硫酸酸化物系光化学反応の研究—光化学スモッグチャンパーによるオゾン生成機構の研究—大気中における有機化合物の光酸化反応機構の研究—昭和55~57年度 特別研究報告(第1分冊)。(1984)
- 第60号 炭化水素-窒素酸化物-硫酸酸化物系光化学反応の研究—光化学エアロゾル生成機構の研究—昭和55~57年度 特別研究報告(第2分冊)。(1984)
- 第61号 炭化水素-窒素酸化物-硫酸酸化物系光化学反応の研究—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)—昭和55~57年度 特別研究報告(第3分冊)。(1984)
- 第62号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究—昭和56~58年度 特別研究中間報告。(1984)
- 第63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56年度 特別研究報告。(1984)
- ※第64号 複合大気汚染の植物影響に関する研究—昭和54~56年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※第65号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 1. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響—第1分冊)
- ※第66号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 2. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響—第2分冊)
- 第67号 環境中の有害物質による人の慢性影響に関する基礎的研究—昭和54~56年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※第68号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究—昭和56~57年度 特別研究報告。(1984)
- ※第69号 中禅寺湖の富栄養化現象に関する基礎的研究。(1984)
- 第70号 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park. (1984)
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park.
(日光国立公園の湖沼のユスリカに関する研究
—第1部 日光国立公園の湖のユスリカの生態学的研究
—第2部 日光国立公園の湖沼に生息するユスリカ類の分類学的、生態学的研究)
- ※第71号 リモートセンシングによる残雪及び雪田植生の分布解析。(1984)
- 第72号 炭化水素-窒素酸化物-硫酸酸化物系光化学反応の研究—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2)—昭和55~57年度 特別研究報告(第4分冊)。(1985)
- ※第73号 炭化水素-窒素酸化物-硫酸酸化物系光化学反応の研究—昭和55~57年度 特別研究総合報告。(1985)
- ※第74号 都市域及びその周辺の自然環境に係る環境指標の開発に関する研究。環境指標—その考え方と作成方法—昭和59年度 特別研究報告。(1984)
- 第75号 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
(琵琶湖底泥中の元素に関する陸水学及び環境化学的研究)

- 第76号 A study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)
(大気中モノテルペンの挙動に関する研究)
- 第77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58年度 特別研究報告。(1985)
- 第78号 生活環境保全に果たす生活者の役割の解明。(1985)
- 第79号 Studies on the method for long term environmental monitoring—Research report
in 1980-1982. (1985)
(環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究)
- ※第80号 海域における赤潮発生モデル化に関する研究—昭和57/58年度 特別研究報告。(1985)
- 第81号 環境影響評価制度の政策効果に関する研究—地方公共団体の制度運用を中心として。
(1985)
- 第82号 植物の大気環境浄化機能に関する研究—昭和57～58年度 特別研究報告。(1985)
- 第83号 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)
(日本の湖沼のユスリカの研究)
- 第84号 重金属環境汚染による健康影響評価手法の開発に関する研究—昭和57～59年度 特別研究
総合報告。(1985)
- 第85号 Studies on the rate constants of free radical reactions and related spectro-
scopic and thermochemical parameters. (1985)
(フリーラジカルの反応速度と分光学的及び熱力学的パラメーターに関する研究)
- 第86号 GC/MS スペクトルの検索システムに関する研究。(1986)
- 第87号 光化学二次汚染物質の分析とその細胞毒性に関する研究—昭和53～58年度 総合報告。
(1986)
- 第88号 都市域及びその周辺の自然環境等に係る環境指標の開発に関する研究Ⅱ。環境指標—応用
例とシステム—昭和59年度 特別研究報告。(1986)
- 第89号 Measuring the water quality of Lake Kasumigaura by LANDSAT remote sensing.
(1986)
(LANDSATリモートセンシングによる霞ヶ浦の水質計測)
- 第90号 ナショナルトラスト運動にみる自然保護にむけての住民意識と行動—知床国立公園内
100平方メートル運動と天神崎市民地主運動への参加者の分析を中心として。(1986)
- 第91号 Economic analysis of man's utilization of environmental resources in aquatic
environments and national park regions. (1986)
(人間による環境資源利用の経済分析—水環境と国立公園地域を対象にして)
- 第92号 アオコの増殖及び分解に関する研究。(1986)
- 第93号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究(I)—昭和58～59年度 特別研究総合報告
第1分冊。(1986)
- 第94号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究(Ⅱ)—昭和58～59年度 特別研究総合報告
第2分冊。(1986)
- 第95号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(I)—汚濁負荷の発生と流出・流達—
昭和58～59年度 特別研究報告。(1986)
- ※第96号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(Ⅱ)—水草帯・河口域・池沼の生態系構造
と機能—昭和58～59年度 特別研究報告。(1986)
- 第97号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(Ⅲ)—水路及び土壌による水質の浄化—
昭和58～59年度 特別研究報告。(1986)
- 第98号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究(Ⅳ)—自然浄化機能を活用した処理技術
の開発と応用—昭和58～59年度 特別研究報告。(1986)
- 第99号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究—昭和56～59年度
特別研究総合報告。(1986)
- 第100号 バックグラウンド地域における環境汚染物質の長期モニタリング手法の研究—特定汚染
選択的検出法及び高感度分析技術の開発—昭和58～60年度 特別研究報告。(1986)
- 第101号 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—昭和57～60年度 特別研究
報告。(1986)
- 第102号 地球規模大気質変動に関する予備的研究。(1986)
- 第103号 環境調和型技術としての電気自動車の評価に関する基礎的研究。(1987)
- 第104号 Studies on chironomid midges in lakes of the Akan National Park. (1987)
(北海道阿寒国立公園の湖におけるユスリカ相の研究)
- 第105号 畑地土壌における水分と諸元素の動態。(1987)
- ※第106号 筑波研究学園都市における景観評価と景観体験に関する研究。(1987)
- 第107号 遠隔計測による環境動態の評価手法の開発に関する研究—昭和59～60年度 特別研究報
告。(1987)
- 第108号 植物の大気環境浄化機能に関する研究—昭和57～60年度 特別研究総合報告。(1987)
- 第109号 地域環境評価のための環境情報システムに関する研究。(1987)

- 第110号 海域における赤潮発生モデル化に関する研究—昭和59～60年度 特別研究総合報告。(1987)
- 第111号 Application of X-Ray Photoelectron Spectroscopy to the Study of Silicate Minerals. (1987)
(ケイ酸塩鉱物研究へのX線光電子分光法の応用)
- 第112号 光化学汚染大気中における有機エアロゾルに関する研究—有機エアロゾルの生成と挙動に関する研究—昭和58～61年度 特別研究報告。(1988)
- 第113号 光化学汚染大気中における有機エアロゾルに関する研究—昭和58～61年度 特別研究総合報告。(1988)
- 第114号 水界生態系に及ぼす有害汚染物質の影響評価に関する研究—昭和60～61年度 特別研究総合報告。(1988)
- 第115号 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—昭和57～61年度 特別研究総合報告。(1988)

※ 残部なし

Report of Special Research Project the National Institute for Environmental Studies

- No. 1* Man activity and aquatic environment—with special references to Lake Kasumigaura—Progress report in 1976. (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 Reports 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 plants—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 comouter-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 effects 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 main 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, *Mycrocystis*—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)
Part 3. Species of the subfamily Orthocladiinae recorded at the summer survey
and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 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
—The Evaluation Laboratory of Man-Environment Systems. (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)
- ※No. 41* Statistical studies on methods of measurement and evaluation of chemical
condition of soil—with special reference to heavy metals—. (1983)
- ※No. 42* Experimental studies on the physical properties of mud and the characteristics
of mud transportation. (1983)
- ※No. 43 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)
Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main
stream in June, with description of 15 new species.
Part 6. Description of species of the subfamily Orthocladiinae recovered from
the main stream in the June survey.
Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
- No. 44* 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 2). (1983)
- No. 45* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem—Outlines of
special research project—1978-1980. (1983)
- No. 46* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem—Research report
in 1979-1980, Part 1. (1983)
- No. 47* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem—Research report
in 1979-1980, Part 2. (1983)
- No. 48* Study on optimal allocation of water quality monitoring points. (1983)
- No. 49* The development and evaluation of remote measurement method for environmental
pollution—Research report in 1982. (1984)
- ※No. 50* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Estimation
of input loading of Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)

- ※No. 51* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—The function of the ecosystem and significance of sediment in nutrient cycle in Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- ※No. 52* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Enclosure experiments for restoration of highly eutrophic shallow Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- No. 53* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Seasonal changes of the biomass of fishes and crustacia in Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- No. 54* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Modeling the eutrophication of Lake Kasumigaura—1980-1982. (1984)
- No. 55* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Measures for eutrophication control—1980-1982. (1984)
- No. 56* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Eutrophication in Lake Yunoko—1980-1982. (1984)
- ※No. 57* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters—Summary of researches—1980-1982. (1984)
- No. 58* Studies on the method for long term environmental monitoring — Outlines of special research project in 1980-1982. (1984)
- No. 59* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system — Photochemical ozone formation studied by the evacuable smog chamber—Atmospheric photooxidation mechanisms of selected organic compounds — Research report in 1980-1982, Part 1. (1984)
- No. 60* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Formation mechanisms of photochemical aerosol—Research report in 1980-1982, Part 2. (1984)
- No. 61* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system — Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 1) — Research report in 1980-1982, Part 3. (1984)
- No. 62* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems — Progress report in 1980-1983. (1984)
- ※No. 63* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment — Progress report in 1981. (1984)
- ※No. 64* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Final report in 1979-1981. (1984)
- ※No. 65 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 1. (1984)
- ※No. 66 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 2. (1984)
- No. 67* Studies on unfavourable effects on human body regarding to several toxic materials in the environment, using epidemiological and analytical techniques—Project research report in 1979-1981. (1984)
- ※No. 68* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil—Research report in 1981-1983. (1984)
- ※No. 69 Fundamental studies on the eutrophication of Lake Chuzenji — Basic research report. (1984)
- No. 70 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park. (1984)
- ※No. 71* Analysis on distributions of remnant snowpack and snow patch vegetation by remote sensing. (1984)
- No. 72* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere — Research report in 1980-1982, Part 4. (1985)
- ※No. 73* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides system—Final report in 1980-1982. (1985)
- ※No. 74* A comprehensive study on the development of indices system for urban and suburban environmental quality—Environmental indices—Basic notion and formation. (1984)

- No. 75 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
- No. 76 A study on the behavior of monoterpenes in the atmosphere. (1985)
- No. 77* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution—Research report in 1983. (1985)
- No. 78* Study on residents' role in conserving the living environment. (1985)
- No. 79 Studies on the method for long term environmental monitoring—Research report in 1980-1982. (1985)
- No. 80* Modeling of red tide blooms in the coastal sea—Research report in 1982-1983. (1985)
- No. 81* A studies on effects of implementing environmental impact assessment procedure —With particular reference to implementation by local governments. (1985)
- No. 82* Studies on the role of vegetation as a sink of air pollutants—Research report in 1982-1983. (1985)
- No. 83 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)
- No. 84* A comprehensive study on the development of assessment techniques for health effects due to environmental heavy metal exposure—Final report in 1982-1984. (1985)
- No. 85 Studies on the rate constants of free radical reactions and related spectroscopic and thermochemical parameters. (1985)
- No. 86* A novel retrieval system for identifications of unknown mass spectra. (1986)
- No. 87* Analysis of the photochemical secondary pollutants and their toxicity on cultured cells—Research report in 1978-1983. (1986)
- No. 88* A comprehensive study on the development of indices systems for urban and suburban environmental quality II —Environmental indices—Applications and systems. (1986)
- No. 89 Measuring the water quality of Lake Kasumigaura by LANDSAT remote sensing. (1986)
- No. 90* National trust movement in Japanese nature conservation — Trustworthy or illusion?(1986)
- No. 91 Economic analysis of man's utilization of environmental resources in aquatic environments and national park regions. (1986)
- No. 92* Studies on the growth and decomposition of water-bloom of *Microcystis*. (1986)
- No. 93* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil(I)—Research report and papers(Part 1) in 1983-1984. (1986)
- No. 94* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil(II)—Research report and papers(Part 2) in 1983-1984. (1986)
- No. 95* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(I)—Drainage and flowing down of pollutant load— Research report in 1983-1984. (1986)
- ※No. 96* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(II)—Structure and function of the ecosystems of littoral zone — Research report in 1983-1984. (1986)
- No. 97* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(III)—Self-purification in stream and soil—Research report in 1983-1984. (1986)
- No. 98* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management(IV)—Development and application of wastewater treatment technologies utilizing self-purification ability—Research report in 1983-1984. (1986)
- No. 99* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems—Final report in 1981-1984. (1986)
- No.100* Studies on the methods for long-term monitoring of environmental pollutants in the background regions—Development of highly sensitive and selective analytical methods for measurement of pollutants in the background regions—Progress report in 1983-1985. (1986)
- No.101* Experimental studies on the effects of gaseous air pollutants in combination on animals. (1986)
- No.102* A review on studies of the global scale air quality perturbation. (1986)
- No.103* Technological assessment of electric vehicle from the environmental protection viewpoint. (1987)

- No.104 Studies on chironomid midges in lakes of the Akan National Park. (1987)
 Part I. Distribution of chironomid larvae in Lake Akan, Lake Panke and Lake Kussyaro.
 Part II. Chironomid midges collected on the shore of lakes in the Akan National Park, Hokkaido (Diptera, Chironomidae)
- No.105* Formulation of the dynamic behavior of water and solutes leaching through the field soil. (1987)
- ※No.106* Appraised landscape and their environmental value in Tsukuba Science City. (1987)
- No.107* Studies on remote sensing for spatial and temporal analysis of environment— Research report in 1984-1985. (1987)
- No.108* Studies on the role of vegetation as a sink of air pollutants—Final report in 1982-1985. (1987)
- No.109* Studies on environmental information system for regional environmental evaluation. (1987)
- No.110* Modeling of Red Tide Blooms in the Coastal Sea — Final report in 1984-1985. (1987)
- No.111 Application of X-Ray Photoelectron Spectroscopy to the Study of Silicate Minerals. (1987)
- No.112* Study on the Organic Aerosols in the Photochemically Polluted Air — Studies on Formation and Behavior of Organic Aerosols — Research report in 1983-1986. (1988)
- No.113* Studies on the Organic Aerosols in the Photochemically Polluted Air — Final Report in 1983-1986. (1988)
- No.114* Studies on the Assessment of the Hazard of Chemical Substances to Aquatic Ecosystems — Progress Report in 1985-1986. (1988)
- No.115* Experimental Studies on the Effects of Gaseous Air Pollutants in Combination on Animals — Final Report in 1982-1986. (1988)

* in Japanese
 ※ out of stock

〔昭和62年11月30日受領〕

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN
No. 115

国立公害研究所研究報告 第115号
(R-115-'88)

昭和63年3月31日発行

発行 環境庁 国立公害研究所

〒305 茨城県つくば市小野川16番2

印刷 前田印刷株式会社筑波支店

〒305 茨城県つくば市東新井14-5

Published by the National Institute for Environmental Studies
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan
March 1988