

# オゾン曝露の血液への影響

—赤血球浸透圧抵抗性への影響(第1報)—

鈴木 孝人 中沢 幸明 梅田 昌樹  
後藤 秀樹 長岡 滋

## 1 研究目的

オゾン曝露により肺のみでなく、血液にまで影響の及ぶことを示唆する報告、例えば、血清アルカリホスファターゼ活性低下<sup>1)</sup>、赤血球アセチルコリンエステラーゼ活性低下<sup>2)</sup>など酵素系に影響を与えたり、Brinkman ら<sup>3)</sup>によれば、ヒト赤血球の *in vitro* でのオゾン (0.2ppm, 2時間) 曝露による赤血球球状化の促進など、数多くの報告がされてきた。また、光化学スモッグ時のいわゆる重症被害例における血液検査においても血液性状に影響がみられるとの報告もある。そこで、本研究ではオキシダントの主成分であるオゾンを曝露することによって、赤血球に対してどのような急性影響を与えるかを赤血球の浸透圧抵抗性の変化を指標として検討し、また、そのメカニズムを解明することを目的として種々検討した。

## 2 実験方法

実験動物として、固形飼料と水道水を与え飼育した SD-JCL 系ラット10週令の雄を使用した。

### (1) 曝露方法

温度 $25 \pm 2$ ℃、湿度40~60%にコントロールした清浄室内で曝露チャンパー(約 $1 \times 1 \times 1$ m)の中にラットを入れ、3分間に約1回の換気速度で曝露した。オゾンは空気を原料として放電方式のオゾン製造機で生成し、オゾン濃度はエチレンケミルミネセンス方式の機器によって実験中連続測定した。

### (2) 赤血球浸透圧抵抗性測定

オゾン曝露による赤血球浸透圧抵抗性への影響の検討は、尾を切断採血し塩化ナトリウム溶液 30~150mOsm の連続的浸透圧勾配をもつコイルに注入し、コイルプラネット型遠心分離機装置を用いた柴田ら<sup>4)</sup>の方法を用いて行った。

### (3) 生化学的検討

曝露後ただちにネンブタール麻酔下で開腹し、大動脈

から採血した。ヘモグロビン(Hb)はCyanmet-Hemoglobin法、グルコースはOrtho-Toluidine法、コレステロールはLiebermann-Burchardt法変法、ビリルビンはBoutwell法変法、Sulfhydryl(SH)基はEllman法<sup>5)</sup>、Adenosin Triphosphatase(ATPase)はNakaoら<sup>6)</sup>の方法で測定した。また、分析検体として赤血球数、ヘマトクリット値、Hb値、SH基の測定には全血液を用い、ビリルビン量、グルコース量、コレステロール量の測定には血漿を用い、ATPase活性の測定には赤血球膜を用いた。なお、Hb、ビリルビン、グルコース、コレステロールの測定は市販キットを用いた簡易血液分析機器を使用して行った。

## 3 結果と考察

図1 オゾン曝露時の赤血球浸透圧抵抗の経時変化(曝露条件9ppm1時間)

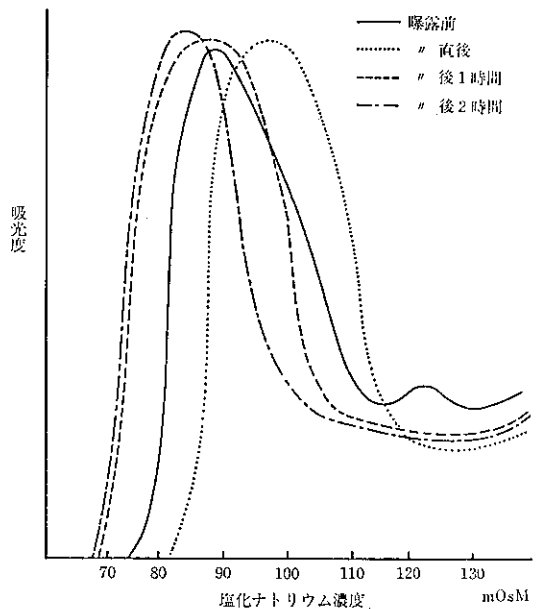
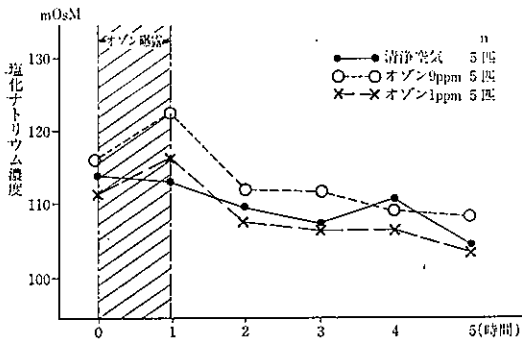


図2 主ピークの溶血開始点の経時変化



オゾン曝露後の赤血球を塩濃度勾配をもつコイルの中で展開し溶血させたときのパターンは図1に示すように、オゾン曝露直後では高浸透圧側で溶血し、その後は回復ないしは若干強くなる傾向を示した。また、図1での主ピークの溶血開始点での塩濃度を経時変化として図2に示したが、オゾン曝露群では曝露直後に対照群に比べ、赤血球膜浸透圧抵抗性が弱くなる傾向がみられた。大森ら<sup>7)</sup>もオゾン(10ppm, 3時間)曝露ラットにおいて高浸透圧側での溶血を報告しており、Goldsteinら<sup>8)</sup>も*in vitro*でのヒト赤血球へオゾン(40ppm, 2時間)曝露で赤血球膜の浸透圧脆弱性の増加と過酸化脂質の増加を報告している。我々の成績でもオゾン9ppm, 1時間曝露で曝露直後の赤血球へ影響が強くて出ているところから、オゾンが直接血液中に流入することは考えにくい

ので、オゾン曝露によって生成された有害な circulating substance の血液中の存在が示唆されるように思われる。また、その後の時間の経過とともに対照群と浸透圧抵抗性の差がなくなるのは、ラット血液中の老赤血球が先に侵され、膜抵抗性の強い若赤血球が残るためか、もしくは、還元性の生体成分が速やかに circulating substance を還元してしまうために対照群と差がなくなるのかもしれない。

赤血球は構造が比較的簡単で、赤血球内部に少なくとも成熟哺乳動物赤血球には核、ミトコンドリア、ミクロゾーム、その他一切の構造物を認められず、また代謝も簡単で、蛋白合成、核酸合成、脂質合成などを一切行わない。しかし、解糖系を中心とする一群の酵素系が存在しており、これが何らかの原因で阻害されれば溶血しやすくなる。さらに、それらの系統的代謝が阻害されると、一切の系統的構造も系統的機能も阻害されてしまうといわれている。また、上記の結果より、オゾン曝露により溶血を起す可能性も考えられるので、以下の検討を行った。一般に、溶血が亢進したとき、溶血確認の指標としていくつか考えられるが、今回は赤血球数、Hb量、ビリルビン量の変化を検討し、また解糖系への影響を検討するためにグルコース量の変化、さらに赤血球膜の形態維持のために必要不可欠なSH基量の変化、赤血球膜の脂質交換に関与するコレステロール量の変化を検討し、また、血液中塩濃度を調節し浸透圧に対する赤血球の形

表1 オゾン曝露時の血液性状

測定項目名	曝露 1時間	対 照 清 浄 空 気	オ ゾ ン 1 ppm	オ ゾ ン 9 ppm	検 体
赤血球数 $\times 10^4$		789 $\pm$ 79	812 $\pm$ 104	787 $\pm$ 91	全血液
ヘマトクリット値 %		41.9 $\pm$ 2.1	43.6 $\pm$ 2.2	43.2 $\pm$ 2.1	
ヘモグロビン量 g/dl		14.5 $\pm$ 1.1	14.6 $\pm$ 1.1	14.6 $\pm$ 0.6	
S H 基 $\mu$ mole/gHb		114.7 $\pm$ 12.7	118.9 $\pm$ 10.4	123.0 $\pm$ 17.2	
ビリルビン値 mg/dl		0.46 $\pm$ 0.16	—	0.43 $\pm$ 0.13	血漿
グルコース mg/dl		245 $\pm$ 48	209 $\pm$ 18	231 $\pm$ 35	
コレステロール値 mg/dl		54.5 $\pm$ 9.3	57.5 $\pm$ 5.6	50.3 $\pm$ 6.1*	
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase $\frac{\mu\text{moles P}}{\text{hr}}$ mg Protein		0.16 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.02**	0.07 $\pm$ 0.03**	赤血球膜

n=10, 危険率 P<0.20\*, P<0.05\*\*

態維持に関与する ATP ase 活性への影響を検討した。

オゾン曝露群と対照群との血液性状は、表1に示すように ATPase 活性以外は有意差はみられなかった。オゾンの血液に対する影響については、楠木ら<sup>9)</sup>はオゾン(3 ppm, 3時間)曝露マウスにおいて赤血球数の増加を、Goldstein ら<sup>2)</sup>もオゾン(8 ppm, 4時間)曝露マウスで Hb 量の増加傾向を、また、深瀬ら<sup>10)</sup>はオゾン(6 ppm, 3時間)曝露ラットでグルタチオン(GSH)量の減少を報告しているが、我々の成績では、オゾン1時間曝露直後に採血した血液では時間的關係から赤血球数、Hb 量、SH基量の変化は現われないのかもしれない。また、赤血球膜のSH基はGSH、Hb、その他の可溶性酵素と平衡関係にあり、SH基は細胞膜の完全性を保つのに必要で、細胞内の解糖を中心とする代謝と関連していると考えられており、ゆえに、オゾン曝露によりSH基が侵されると溶血が生じる可能性があると思われるのでさらにSH基への影響について検討を加える必要があると思われる。赤血球はグルコースを代謝基質とする解糖系酵素により代謝を行っている。グルコースは赤血球膜をかなり自由に通過するので、血漿中および赤血球中のグルコース濃度に差はない。マウスにオゾン(1.4 ppm, 5時間)曝露すると血液中の解糖系酵素の glucose 6-phosphate dehydrogenase 活性が減少すること<sup>11)</sup>から、オゾン曝露により解糖系酵素の阻害のためグルコース量は増加すると思われるが、我々の用いた方法での成績では対照群と比べ有意差はなく、解糖系への阻害は1時間の曝露直後では、はっきりした影響が現われないと思われる。赤血球膜を構成する物質として脂質特にコレステロールおよびフォスホリピッドは重要な存在であり、赤血球膜と血漿とのコレステロールの脂質交代は非常に速やかに行われる。in vitro でのオゾン曝露によって赤血球の不飽和脂肪酸の減少が生じることが報告されていることから<sup>12)</sup>、不飽和結合をもつコレステロール量の変化が期待されたが、我々の成績では9 ppm曝露群でP<0.20の危険率で若干の減少傾向を示したにすぎなかった。しかし、北島によれば<sup>13)</sup>、赤血球浸透圧抵抗の増強が赤血球コレステロール量の増加に並行すると報告もあることから、オゾン曝露による赤血球コレステロールへの影響を検討する必要があると思われる。水は赤血球膜を非常に自由とあって良いくらいの速度で通過し、陰イオンも水ほどではないが自由に膜を通

過するが、Na<sup>+</sup>やK<sup>+</sup>などの陽イオンは赤血球膜を通過するのが非常に遅い。しかも、ヒト赤血球と血漿の間にはNa<sup>+</sup>およびK<sup>+</sup>の濃度の差は著しいもので、細胞内外の濃度の比はNa<sup>+</sup>では1:12、K<sup>+</sup>では25:1であり、イヌやネコではこの濃度勾配はほとんどないがネズミではヒトとはほぼ同様であるといわれている。この濃度勾配に逆らって内部のK<sup>+</sup>を高濃度に保ち、外部からのNa<sup>+</sup>の侵入を防いでいる機構が能動輸送と呼ばれるものであり、この能動輸送は細胞膜自体で行われていて、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseがこの機能を行っている。正常の状態ではこの能動輸送は、濃度勾配によって生じる受動輸送を十分上回るが、能動輸送障害によって陽イオンのバランスが崩れると、すなわち、受動輸送が能動輸送を上回るようになると、赤血球は膨張して膜の透過性亢進が生じるようになる。ゆえに、オゾン曝露によって、表1に示したようにNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase活性が減少したことにより、能動輸送の障害が起り赤血球膜の浸透圧抵抗性が弱まったと思われる。

以上述べたように、高濃度短期オゾン曝露によって、赤血球浸透圧抵抗性が弱まる傾向がみられ、さらに比較的low濃度短期曝露によっていかなる影響を受けるかは今回のデータのみでは明確ではないが、オゾンの浸透圧抵抗性に影響を与えるメカニズムの究明とともに今後追求する必要があると思われる。

#### 参考文献

- 1) Scheel, L. D. et al., J. Appl. Physiol., Vol.14, 67~80, 1958
- 2) Goldstein, B. D. et al., Arch. Environ. Health, Vol. 16, 648~650, 1968
- 3) Brinkman, R. et al., Lancet, Vol. 18, 133~136, 1964
- 4) 柴田進ほか：医学器械学 Vol. 40, 619~626, 1970
- 5) Ellman, G. L., Arch. Biochem. Biophysics, Vol. 82, 70~77, 1959
- 6) Nakao, T. et al., Biochem. Biophys. Research Commun., Vol. 13, 444, 1963
- 7) 大森薫ほか：大気汚染研究 Vol.8, No.3, 422, 1973
- 8) Goldstein, B. D. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 126, 356~358, 1967
- 9) 楠本繁子ほか：大気汚染研究 Vol.7, No.2, 197, 1972
- 10) 深瀬治ほか：未発表
- 11) Air Pollution Vol. I, p. 463, edited by A. C. Stern, Academic Press, New York, London, 1968
- 12) Balchum, O. J. et al., Arch. Environ. Health, Vol. 22, 32~34, 1971
- 13) 北島和彦：医学と生物学 Vol. 87, 265~269, 1973