

オゾン(O₃)曝露家兎の微生物感染抵抗性に関する検討

遠藤 立一 佐々木 裕子 川井 利雄

大山 謙一 仲 真 晶子 毛 受 優

古井戸 良雄 小川 益雄 久保倉 洋子
(東京農工大学) (東京農工大学)

はじめに

オゾン(O₃)の生体への作用については、既に多くの報告があり、当部においても、1973年来、高濃度域、低濃度域における直接的影響を明らかにする目的で、家兎を用いた動物実験を行ない、主として病理形態学的手法で検討した結果、いくつかの知見を得、国際耳鼻咽喉科学会等に報告し、一部は1978年WHOクライテリアに引用されている。これらの成績から得られた結果は、直ちに人の臨床的变化と結び付かない、いわゆる subclinical な変化であって、我々が行って来た 0.2 ppm レベルでの O₃ の生体影響を従来手法の形態学的変化のみで追及することは、これ以上は望めないと考えられた。しかしながら、現実には種ガス体・粉じん等の共存する都市環境での O₃ の作用は、呼吸器の感染防禦能の低下を初めとする多くの実害をもたらしていることが推測されるので、この点についての検討を主体とする研究が望まれた。

研究の目的 比較的低濃度域(0.2 ppm)でかつその曝露による、経時的な病理形態学的変化の把握されている家兎を用いた動物実験で、O₃曝露に伴う、(1)常在細菌叢の経時的変動、(2)低病原性微生物(*Bordetella bronchiseptica*)の曝露に対する、生体防禦機構の反応性の異常の有無を明らかにすることを目的とした。

研究の方法

(1) ガス濃度曝露期間

O₃ 0.2 ppmに調整されたチェンバー内に動物を入れ、一日一回30分の給餌、清掃を除く連続曝露を1週及び2週実施した。チェンバー内での条件は、1時間15回換気、温度22℃±2℃、湿度60%±5%とした。また、同時に同一条件下で、清浄空気のみによる群を設定し、チェンバー内の各種影響の除去を配慮した。

(2) 実験動物及び実験群

実験動物は、5ヶ月令雄のヒマラヤン種清浄家兎を用いた。実験群は一群6羽とし、O₃曝露群、清浄空気群、対照群(購入直後)を設けた。O₃曝露群、清浄空気群には、それぞれ細菌曝露群、非曝露群の2系列を設定した。細菌は*Bordetella bronchiseptica*を用い、10⁷をネブライザーで強制的に吸入させた。更に、これ等の実験を補完する目的でウィスター系ラット雄5週令を用いて、同様の実験を行った。実験群の詳細については表1~3を参照されたい。

(3) 採材及び検討方法

飼育期間の終了した動物は、腹腔内へネプタール注麻酔の後体重測定を行ない、股静脈、後大静脈から採血し、各臓器の採材、重量測定を行った。更に呼吸器系臓器については、微生物、病理(光顕、電顕)、生化学用に分割して各々規定の方法で処理、検討に供した。検討項目に係わる詳細は、各検討事項を参照されたい。

(4) 検討方法

ア 病理学的検討

鼻粘膜、喉頭、扁桃、気管(支)、肺の光学顕微鏡及び電子顕微鏡(走査型、透過型)による形態学的観察。

イ 生化学的検討

血球中、肺中Glutathion peroxidaseの測定及び血清中、肺中過酸化脂質の定量を行った。

ウ 免疫学的検討

血清中蛋白分画、総蛋白量、血中IgA、IgGの測定並びに血清中特異抗体値の測定を行った。

エ 微生物学的検討

鼻・扁桃・気管および肺をホモジナイズし、好気培養用培地と嫌気性培地に接種、培養の後、得られた集落について、カウントと同定を行った。

結 果

(1) 病理学的検討 主な変化は、肺及び気管支に認められる。上皮の刺激反応性のもと、間質に認められる細胞の浸潤であった。また従来の上部気道上皮に見られた変化は、認められなかった。反応は、O₃+細菌群で反応部位及び反応態度は異なるものの強度、持続期間共頭著であった。

(2) 生化学的検討 肺中の過酸化脂質の増加は、O₃+細菌群、O₃群、細菌群の各群で2週目で増加していた。この傾向は4週まで漸増している。血清中過酸化脂質は、2週でO₃群のみ高価を示すが、全群8週では平衡となる。

(3) 免疫学的検討 血清IgA及び血清IgGは血清IgAがO₃+細菌群で4週目に最高に達した後下降するのに対し血清IgGは2週目に最高に達し、後下降する。また空気+細菌群ではIgAは2週、4週、8週と上昇する。IgGは4週目が最高で以後低下する傾向が認められた(家兎)。B. bronchisepticaの特異抗体については、O₃+細菌群の凝集価陽性を示すものは、空気+細菌群に比し著しく少ない、一方陽性値を示す個体を比較するとその凝集価は高かった(ラット)。

(4) 微生物学的検討 (ア)O₃曝露により正常家兎の総

菌数の減少、菌種の単純化の傾向が認められた。(イ)臓器中菌量は家兎で2週群、ラットで1週群が最高を示したが、共にO₃+細菌群が空気+細菌群の50倍を示した。

まとめ これらのことから今回の実験で次のことが示された。(1)統計的に有意な結果は得られなかったが、O₃曝露家兎は、細菌への抵抗性が低い傾向が明らかである。(2)正常家兎における総菌数の減少、菌種の減少単純化傾向は、日和見感染の発現の恐れがある。(3)血中特異抗体値の凝集価が陽性を示すものは、O₃曝露群では少くかつ陽性値を示すものの凝集価は、対照群に比し高い(ラット)。

考 察 これらのことからO₃0.2ppm 2週間曝露により家兎のBordetella bronchisepticaに対する感染抵抗性が低下する傾向が示唆されたが、実験動物の血中酵素、血中免疫抗体の数値に幅があるため、統計的に有意の結果を得ることが困難であった。また、同一個体に関する追跡検討も、曝露ガス体が低濃度になるに従い、採血の影響等好ましくない面もあるので、今後これらの点を個々に解決して、更に明確な結果を示せるようにする予定である。

表1 O₃曝露 Air曝露後細菌曝露群の構成(ヒマラヤン家兎)

		直 前 殺	2 週 群	4 週 群	8 週 群	終了直後	計	
							群・数	羽 数
O ₃ 曝露群	細菌曝露群 (O ₃ +細菌群)	—	1	1	1	—	3	18
	非曝露群 (O ₃ 群)	—	1	1	1	—	3	18
清浄空気群	細菌曝露群 (空気+細菌群)	—	1	1	1	—	3	18
	非曝露群 (空気群)	—	1	1	1	—	3	18
対 照 群		1	—	—	—	1	2	12
計		1	4	4	4	1	14群	84羽

週数はO₃又はair 2週曝露直後に細菌曝露をしその後経過した期間を示す。

表2 常在細菌叢の変動(ヒマラヤン家兔)

対 照 群	O ₃ 1週曝露群	O ₃ 2週曝露群	計	
			群	羽
1	1	1	3	18

表3 特異抗体産生検討の群構成(ラット)

	直前殺	細菌曝露 直後殺	1週群	2週群	4週群	計	
						群数	頭数
オゾン 曝露群	—	1	1	1	1	4	24
清浄空気 曝露群	—	1	1	1	1	4	24
対照群	1	—	—	—	—	1	6
計	1	2	2	2	2	9	54

週数はO₃又はAir 1週曝露後細菌曝露をし、その後経過した期間を示す。

1 微生物学的検討

生体の病原体感染に及ぼすO₃曝露の影響については、これまでもいくつかの研究報告がみられる⁵⁾、10)、11)、15)、20)、24)。しかし、それらは0.5 ppm以上の濃度のO₃、即ち、O₃単独でも明らかに生体に有害な作用を引き起こすといわれている濃度^{1)、8)、9)}のO₃が、比較的病原性の強い病原体の感染に及ぼす影響を検討したものが大部分であって、subclinicalなO₃量が、subclinicalな感染に及ぼす影響を検討した実験例は見あたらない。近年における感染症の特徴の一つは、日頃から動物体内やその周辺に遍在し、動物にsubclinicalに感染しながらも、一定の環境条件が満たされなければ発病を起ささないような事例(いわゆる日和見感染)が増加していることである。従って、環境汚染は感染症発生の重要な要因の一つと考えられるにいたった。

このような背景のもとに本研究では、*Bordetella bronchiseptica*をヒマラヤン兎(両者の関係は通常

subclinical)に感染させ、その感染像に及ぼす低濃度O₃曝露の影響を検討した。また、近年感染と発病の重要な要件の一つとして認識させるにいたった動物の正常細菌叢の攪乱に及ぼすO₃曝露の影響についても併せて検討した。

(1) 方法

ホモジナイズした各臓器を好気培養用培地(B-T SA, DHL, TATAC, PE, NAC, POなど¹⁶⁾)と嫌気培養用培地(EG, LBS, NBGTなど)に接種し、好気培養は37℃で48時間、嫌気培養はガスバック法で37℃4日間培養し、得られた集落についてカウントと同定⁶⁾を行った。

(2) 成績・考察およびまとめ

ア 呼吸器の正常細菌叢に及ぼすO₃曝露の影響に対する検討：O₃曝露が兎の呼吸器の正常細菌叢を攪乱するという確実な証明(統計的に有意)は得られなかった。しかし、O₃曝露によって、健康なウサギが保有する肺・気管の総菌数が減少し、かつ細菌数が単純化す

表 4 各臓器中の好気性細菌叢

臓器名	O ₂ 群						空 気 群								
	実験区			菌 種	実験区			臓器名	菌 種	実験区					
	A	B	C		A	B	C			A	B	C			
鼻	Strep	-	-	Strep	-	-	Strep	0.70	1.78	0.27	Strep	1.12	1.30	2.41	
	Stap	0.27	0.32	Stap	0.81	-	Stap	1.60	0.68	0.27	Stap	-	-	0.51	
	Micro	0.27	1.24	Micro	0.69	-	Micro	1.17	1.48	1.34	Micro	-	0.51	-	
	Coryne	-	-	Coyne	0.92	-	Coyne	0.43	-	-	Coryne	1.02	0.51	-	
	Baci	-	-	Baci	-	-	Baci	-	-	-	Baci	-	-	0.51	
	G+R	-	-	G+R	-	-	G+R	-	-	-	G+R	-	-	-	
	Bor	1.85	3.52	Bor	1.94	2.79	Bor	2.23	1.60	3.28	Bor	2.15	2.45	1.54	
	PS	1.66	-	PS	-	-	PS	-	1.12	-	PS	0.56	-	-	
	Mora	0.70	0.51	Mora	-	-	Mora	0.56	-	-	Mora	-	-	-	
	Acine	-	-	Acine	-	-	Acine	-	-	0.27	Acine	-	-	-	
粘	Ent	-	-	Ent	-	-	Ent	-	-	-	Ent	0.64	-	0.51	
	G-R	-	-	G-R	1.59	-	G-R	0.68	-	0.63	G-R	-	-	-	
	他	1.09	-	他	3.16	-	他	0.27	0.35	0.37	他	-	1.26	3.06	
	総菌数	3.76	3.95	総菌数	4.77	2.79	総菌数	3.60	3.99	3.72	総菌数	4.95	4.38	4.88	
	Strep	1.18	0.83	Strep	-	-	Strep	2.76	1.87	2.59	Strep	1.12	0.91	-	
	Stap	1.38	1.58	Stap	-	-	Stap	1.31	0.53	-	Stap	0.51	-	-	
	Micro	0.61	0.97	Micro	-	-	Micro	-	1.55	1.32	Micro	-	-	0.45	
	Coryne	0.74	0.62	Coryne	-	-	Coryne	-	1.04	0.53	Coryne	-	-	-	
	Baci	0.42	-	Baci	-	-	Baci	0.74	1.05	0.63	Baci	-	-	-	
	G+R	-	-	G+R	-	-	G+R	0.96	-	-	G+R	-	-	-	
膜	Bor	0.75	2.03	Bor	0.76	1.85	Bor	-	-	1.03	Bor	-	1.24	-	
	PS	1.31	-	PS	-	-	PS	-	-	0.61	PS	-	-	-	
	Mora	0.45	0.83	Mora	-	-	Mora	1.45	-	-	Mora	0.45	-	-	
	Acine	-	-	Acine	-	-	Acine	-	-	-	Acine	-	-	-	
	Ent	0.64	-	Ent	-	-	Ent	0.78	-	-	Ent	-	-	-	
	G-R	1.09	-	G-R	-	-	G-R	-	-	1.44	G-R	0.57	-	-	
	他	2.20	0.53	他	1.99	-	他	-	-	1.15	他	0.45	1.15	3.38	
	総菌数	4.72	3.80	総菌数	2.75	1.85	総菌数	4.11	3.83	4.64	総菌数	1.21	2.30	3.39	
	扁桃	Strep	-	-	Strep	-	-	Strep	-	-	-	Strep	-	-	-
		Stap	-	-	Stap	-	-	Stap	-	-	-	Stap	-	-	-
Micro		-	-	Micro	-	-	Micro	-	-	-	Micro	-	-	-	
Coryne		-	-	Coryne	-	-	Coryne	-	-	-	Coryne	-	-	-	
Baci		-	-	Baci	-	-	Baci	-	-	-	Baci	-	-	-	
G+R		-	-	G+R	-	-	G+R	-	-	-	G+R	-	-	-	
Bor		-	-	Bor	-	-	Bor	-	-	-	Bor	-	-	-	
PS		-	-	PS	-	-	PS	-	-	-	PS	-	-	-	
Mora		-	-	Mora	-	-	Mora	-	-	-	Mora	-	-	-	
Acine		-	-	Acine	-	-	Acine	-	-	-	Acine	-	-	-	
肺	Ent	0.64	-	Ent	-	-	Ent	0.78	-	-	Ent	-	-	-	
	G-R	1.09	-	G-R	-	-	G-R	-	-	1.44	G-R	0.57	-	-	
	他	2.20	0.53	他	1.99	-	他	-	-	1.15	他	0.45	1.15	3.38	
	総菌数	4.72	3.80	総菌数	2.75	1.85	総菌数	4.11	3.83	4.64	総菌数	1.21	2.30	3.39	

※数字は細菌数の対数を示す(各6頭の平均)。A:購入直後, B:1週曝露直後, C:2週曝露直後, Strep:Streptococcus, Stap:Staphylococcus, Micro:Micrococcus, Coryne:Coryneform, Baci:Bacillus, G+R:Coryneform以外のグラム陽性無芽胞桿菌, Bor:Bordetella, PS:Pseudomonas, Mora:Moraxella, Acine:Acinetobacter, Ent:Enterobacteriaceae, G-R:グラム陰性桿菌, 他:その他

る傾向がみられた(表4)。また、*Bordetella* の自然感染菌量も、空気曝露群にくらべて O_3 曝露群の方が高い傾向が認められた。これらのことは、あたかも抗菌剤の投与によって微生物叢が攪乱され特定の菌群だけが増加する現象と類似しており、日和見感染を引きおこす誘因になる可能性を示すものと考えられる。

① *Bordetella bronchiseptica* の感染に及ぼす O_3 曝露の影響に対する検討： 生体の病原菌に対する抵抗力 (*Bordetella* の感染性) に及ぼす低濃度 O_3 曝露の影響については、統計的に断定できる結論は得られなかった。しかし、①感染菌が諸臓器に最も多くみられた2週後においては、臓器中(特に扁桃・気管で)の感染菌量が空気曝露群よりも O_3 曝露群で平均して約50倍多かったこと(表5)、②ラットの場合も、臓器中で感染菌量が最高になった感染1週後において、臓器中(特に鼻粘膜・気管)の感染菌量は空気曝露群よりも O_3 曝露群で平均して約5.0倍多かったこと(表6)、③ O_3 曝露・*Bordetella* 非感染群のウサギでは比較的少なかった鼻粘膜中の偏性嫌気性菌群が、 O_3 曝露・*Bordetella* 感染群ではかなり多かったこと(表7)は、*Bordetella* の感染像が O_3 曝露によって影響されている可能性を示すものと思われる。

生体の感染像に及ぼす低濃度 O_3 曝露の影響について統計的に明確な結論を得るためには、今後、使用動物数を増やすことや感染群に再度 O_3 曝露を繰り返すなどの工夫が必要と思われる。

B. *bronchiseptica* を分与いただいた農林水産省家畜衛生試験場の清水健博士に深謝いたします。

表5 各臓器中の *Bordetella* 感染菌量
— *Bordetella* (10^7) 感染群(ウサギ)—

臓器名	清浄空気群			O_3 曝露群		
	D	E	F	D	E	F
鼻 粘 膜	6.60	6.04	6.13	7.18	5.97	6.18
扁桃	3.85	3.02	2.38	5.15	2.79	2.01
気 管	4.45	3.89	3.32	6.22	3.39	3.40
左肺前葉後部	2.79	2.02	3.33	3.83	1.08	4.66
左肺後葉辺縁	0.67	—	—	0.84	—	0.49
脾 臓	—	—	—	—	—	—

表6 各臓器中の *Bordetella* 感染菌量
— *Bordetella* (10^7) 感染群(ラット)—

臓器名	清浄空気群			O_3 曝露群		
	G	H	I	G	H	I
鼻 粘 膜	5.53	5.68	4.14	7.14	6.03	4.53
気 管	4.05	4.76	3.94	5.90	4.91	4.01
左肺前葉後部	4.31	4.12	2.67	5.58	3.71	2.86
左肺後葉辺縁	3.31	1.52	—	4.92	1.51	1.45
脾 臓	—	—	—	—	—	—

表7 各臓器中の偏性嫌気性細菌数
— *Bordetella* (10^7) 感染群(ウサギ)—

臓器名	清浄空気群			O_3 曝露群		
	D	E	F	D	E	F
鼻 粘 膜	1.16	1.61	1.29	4.23	2.57	3.31
扁桃	3.33	4.08	3.88	3.62	4.78	3.87
気 管	0.91	—	0.48	—	1.82	2.94
左肺前葉後部	—	0.84	—	—	0.45	1.16
左肺後葉辺縁	—	—	—	—	—	—
脾 臓	—	—	—	—	—	—

※ 数字は細菌数の対数(各6頭の平均)

- D: 2週曝露2週飼育 G: 1週曝露1週飼育
- E: 2週曝露4週飼育 H: 1週曝露2週飼育
- F: 2週曝露8週飼育 I: 1週曝露4週飼育

2 免疫学的検討

O_3 の生体に対する有毒性の主なものとして、呼吸器感染症に対する抵抗力の低下が指摘されてきた。そこで、感染防御機構としての液性免疫抗体産生機能に着目し、若干の知見を得たので報告する。

(1) 方法

ア 血液中 IgG, IgA の測定： 解剖時に後大静脈より採取した血液から血清を分離し、市販(Miles)の抗ウサギ IgG 血清(ヤギ)及び抗ウサギ IgA 血清(ヤギ)を用いて、単純放射状免疫拡散法によって定量した。IgG 濃度は市販のウサギ IgG を標準に用い、 mg/ml の値で、IgA は購入直後群の平均値を100として表わした。

イ 凝集価の測定： 解剖時にウサギでは後大静脈、ラットでは心臓より採取した血液から血清を分離し、市販(北研)の *Bordetella bronchiseptica* 用凝集原

を用いて試験管法により行ない、凝集価 20 倍以上を陽性とした¹⁷⁾。

(2) 結果

図 1. 2. にウサギの血清中 IgG, IgA レベルの変動を示した。非感染群においては、IgG が O₃ 曝露群でやや低い傾向を示したが、清浄空気群との間で明確な差は認められなかった。感染群においては、IgG, IgA とともに O₃ 曝露群と、清浄空気群との間で最高値に差はなかった。しかし、IgA が最高値に達したのは、清浄空気群では感染 8 週後であるのに対し、O₃ 曝露群では 4 週後であり、IgG の場合は、清浄空気群では 4 週後、O₃ 曝露群では 2 週後であった。このように、O₃ 曝露群が清浄空気に比べ、抗体価の上昇が早く、かつ早く低下する傾向が認められた。

表 8 は、ウサギの血清中にみられた凝集価を示したものである。感染前にもある程度の凝集価を示すウサギが過半数を占めたものの、感染後の凝集価は、O₃ 曝露群が清浄空気群に比べて低くなる傾向が認められ、それは、特に感染後 4 週と 8 週で顕著であった。

ラットの血清中にみられた凝集価を表 9 に示した。ラットにおいては、ウサギに比べ、感染後の抗体価の上昇はかなり低く、かつ、まったく抗体を産生しないものもみられた。抗体産生陽性の個体数の割合は、O₃ 曝露群が清浄空気群より有意に少なかった (P < 0.05, Yates の修正式使用)。一方、陽性の個体を比較すると、その凝集価は O₃ 曝露群の方が高かった。

(3) 考察

ガス体 (O₃ 10 ppm¹²⁾, O₃ 1 ppm²²⁾, SO₂ 100 ppm¹²⁾, NO₂ 2 ppm²¹⁾, NO₂ 1 ppm と O₃ 0.2 ppm の交互²³⁾ 他) の曝露により血中抗体価が上昇することが多く報告されている。本実験では、非感染群において、O₃ 曝露による明らかな影響は認められなかった。この理由として、① 0.2 ppm と、低濃度であったこと、② 個体にばらつきが多かったこと、が考えられる。今後、① 曝露期間を延長して検討する、② よりクリーンな動物を使用し、同一個体を経時的に追跡することにより個体のばらつきを小さくする必要があろう。

ガス体曝露後に各種抗原で感作し、抗体価の推移を検討した実験も数例報告されている。池田 (1974)¹²⁾ は、ウサギに O₃ 10 ppm を曝露した後、抗原感作することにより、血中抗体が高値傾向を示したとしている。また、Matsumura (1970)⁶⁾ は、モルモットに O₃

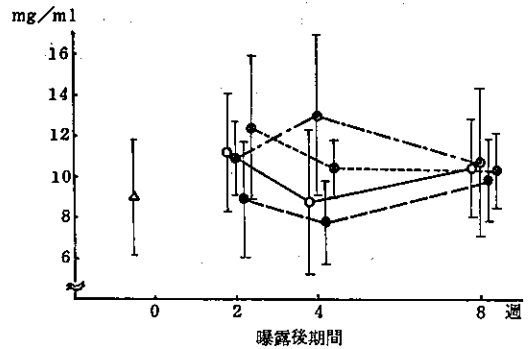


図 1 血清中 IgG - ウサギ -

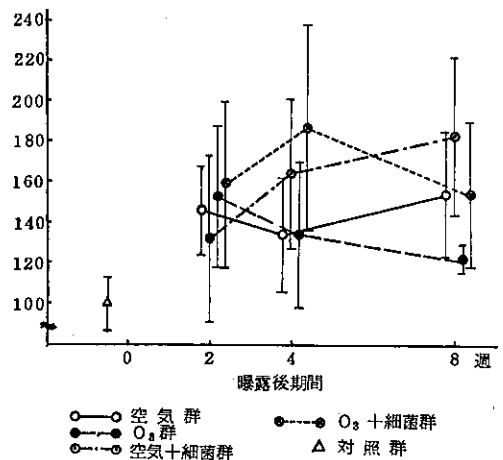


図 2 血清中 IgA - ウサギ -

を曝露した後抗原を吸入させたところ、5 ppm 以上では血中抗体価が有意に高かったことを報告している。さらに、O₃ 8 ppm を曝露後¹⁸⁾ I でラベルした抗原を肺に注入し、追跡したところ、O₃ 曝露は肺における抗原の吸収を促進し、かつ抗原の滞留を長びかせるという結果が得られ、このことが経気道感作を強めるメカニズムの重要な役割を示すと推定している。

本実験において、吸入 2 週後の感染菌の臓器中量は、清浄空気群より O₃ 曝露群で平均して約 50 倍も多かった。臓器中に抗原の滞留量が多いことは、Matsumura の結果と一致しており、O₃ 曝露群で IgG, IgA レベルの上昇が早い傾向のあることも、このことと関連しているものと思われる。それにもかかわらず、IgG, IgA レベルの低下が早く、さらに凝集価が低値を示す傾向のあることは、O₃ 曝露が免疫の産生または維持に negative に働く可能性を示唆している。

瀬戸 (1975)⁷⁾ は、マウスをヒツジ赤血球で免疫し、

24時間後に0.5および2ppmのO₃を1時間曝露した後、脾中の抗体産生細胞数を測定し、抗体産生の低下が認められたことを報告している。

長期間低濃度曝露の条件のもとで、抗体産生機構のどの段階がどのように影響されるかが、今後の課題といえよう。

表8 凝集価 -Bordetella 10⁷ 感染群(ウサギ)-

動物 No.	清浄空気群						O ₃ 曝露群						対照群	
	D		E		F		D		E		F			
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
1	-	160	40	160	20	1280	160	160	160	160	40	320	80	160
2	-	160	160	320	80	160	-	80	160	160	40	80	-	-
3	40	160	320	80	20	320	-	80	320	160	80		-	-
4	-	80	80	160	40	640	-	160	80	80	160	320	-	-
5	80	40	-	160	40	640	-	80	160	80	-	320	-	80
6	80	160	80	160	80	320	-	80	80	20	20	640	-	80

表9 凝集価 -Bordetella 10⁷ 感染群(ラット)-

動物 No.	清浄空気群				O ₃ 曝露群				対照群	
	J	G	H	I	J	G	H	I		
1		-	20	20	-	-	80	40	-	-
2		-	20	20	-	40	-	20	-	-
3		-	20	-		-	-	-	-	-
4		-	20	20		-	-	-	-	-
5						-	-	-	-	-
6						-			-	-

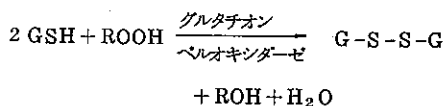
D : 2週曝露・2週飼育 G : 1週曝露・1週飼育 - : 凝集価陰性
 E : 2週曝露・4週飼育 H : 1週曝露・2週飼育 1 : Bordetella 感染前
 F : 2週曝露・8週飼育 I : 1週曝露・4週飼育 2 : Bordetella 感染後
 対照群 : 飼育場から購入直後 J : 1週曝露・感染直前

3 生化学的検討

一般に、O₃等のoxidantsはその酸化的性質から生体に悪影響をおよぼす過酸化物を、体内に作り出す作用がある。たとえば、生体膜に必ず存在する多不飽和脂酸を過酸化し細胞に障害を与える。特に呼吸で重要な役割を演じるミトコンドリアの系は、脂質過酸化物によって不可逆的に阻害されるといわれている。今回は過酸化のひとつの指標となる過酸化脂質(TBA-reactants)含量、および過酸化物を除く作用をする酵素のひとつであるグルタチオンペルオキシダーゼの活性をは

かり、生体の変化を調べた。

グルタチオンペルオキシダーゼの基質であるグルタチオンは、生体の酸化還元反応で重要な働きをするトリペプチドであり、SH基をもっている。この酵素系は生体に有害な、ヒドロペルオキシドを次の反応でこわすとされている。



GSH : グルタチオン ROOH : アルキルヒドロペル

オキシド GSSG：酸化型グルタチオン

これらのことから、グルタチオンペルオキシダーゼ活性は生体物質の過酸化の状態をとらえる良いパラメーターになると考えられる。Chow, C. K. and Tappel, A. L. (1972)³⁾によれば、 O_3 0.7 ppm を5日間曝露したラットの肺中グルタチオンペルオキシダーゼ活性が有意に上昇したことが示されている。このような活性の上昇は、生合成過程の重要な還元剤であるNADPHの要求を増し、その生産過程であるペントースリン酸経路に影響を与えるといわれている(Chow, C. K. and Tappel, A. L. 1973)⁴⁾。また、Buckley, R. D. et al. (1975)²⁾は、ヒトに O_3 を0.5 ppm, 2.75時間曝露して、赤血球中のグルタチオンの減少と、G-6-Pデヒドロゲナーゼ活性が有意に上昇したことを報告している。

(1) 方法

今回定量したものは血液成分では、血清中過酸化脂質(TAB reactants)含量(山崎, 1967²⁵⁾)、血球中ヘモグロビン濃度、血球中グルタチオンペルオキシダーゼ活性であり、また器官として肺中過酸化脂質含量を調べた。

採血は、ネプタール麻酔後、股静脈より行い、肺は切りはずして直後、冷等張リン酸緩衝液(pH7)中でテフロン製ホモジナイザーで処理し、ガーゼ2層で濾過し、濾液を分析に供した。過酸化脂質含量については、2-Thiobarbituric acid を用い発色させ、定量はmalonaldehydeの532 nmにおけるモル吸光係数(1.56×10^5)をもとに算出した。血球中ヘモグロビン濃度はシアンメトヘモグロビン法、血球中グルタチオンペルオキシダーゼ活性はPaglia, D. E. et al. (1967)¹⁸⁾によった。

(2) 結果と考察(図3参照)

血清中過酸化脂質含量については、2週目の O_3 群はかなり高い値となっている。しかし、4週目の群については、ばらつきが大きかった。変化にも傾向はみられない。8週目については、どの群も同じ値に近づくようである。なお、52年度の O_3 0.2 ppm 2週間曝露実験の知見では、直後殺群と2週目群との血清中過酸化脂質含量は、ほぼ同じ値であった。

肺中過酸化脂質含量については、2週目、4週目の O_3

を曝露した群と空気+細菌群に高い傾向がみられるが、8週目になると、 O_3 群は空気群とあまり変わらなくなるが、オゾン+細菌群と空気+細菌群が高い値を示している。

血球中グルタチオンペルオキシダーゼ活性は、2週目は O_3 曝露の群がやや高いが4週、8週目についてはばらつきが大きかった。

O_3 の吸入により生じた過酸化脂質は、グルタチオンペルオキシダーゼ等のPMP(peroxidative metabolic pathway)系の酵素の働きで除去されるといわれている(Chow, C. K. and Tappel, A. L. 1972)³⁾。血清中過酸化脂質含量が8週目で平衡になるのは、これら酵素で除去されていると考えられる。しかし、今回の実験では、この系の酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼの活性については有意な変化は見い出せなかった。また、細菌の影響については、はっきりとした変化はでなかった。今回のように比較的低濃度の曝露になると、生体の防御反応、摂餌、飼育環境等の影響が大きくなると考えられるが、低濃度長時間という我々がおかれている環境に近いところで、今後は更に、長時間連続曝露などを検討する必要があると思われる。

4 病理学的検討

家兎を用いて O_3 0.2 ppmの長期曝露を行なった遠藤ら⁷⁾は、肺胞上皮の脱落、肺胞内に偽好酸球出現、気管における杯細胞の腫大を報告している。又Freemanら⁹⁾はラットを用いて O_3 0.54 ppm 6ヶ月曝露後48時間で、肺におけるマクロファージ出現、肺胞上皮の肥厚を報じ、Maedaら¹³⁾も新生兎に細菌数約 $10^6 \sim 10^7$ 個のB. bronchisepticaを吸入させ、異形細胞浸潤、肺胞及び細気管支上皮細胞の剥離を呈するカタル性気管支肺炎、肺胞中隔に組織球及び線維芽細胞浸潤、又リンパ球浸潤を特徴とする気管支周囲炎及び細気管支周囲炎、気管支及び細気管支粘膜に軽度の異形細胞浸潤が見られたと報告している。

そこで今回の実験では、病理組織学的変化の指標として、肺胞内に大円形細胞出現、肺胞中隔の肥厚、細気管支周囲炎等を用い経時的に比較検討した。

(1) 材料と方法

採材臓器は鼻粘膜、喉頭、気管、気管支、肺の呼吸気系及び口蓋扁桃、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、脳ならび

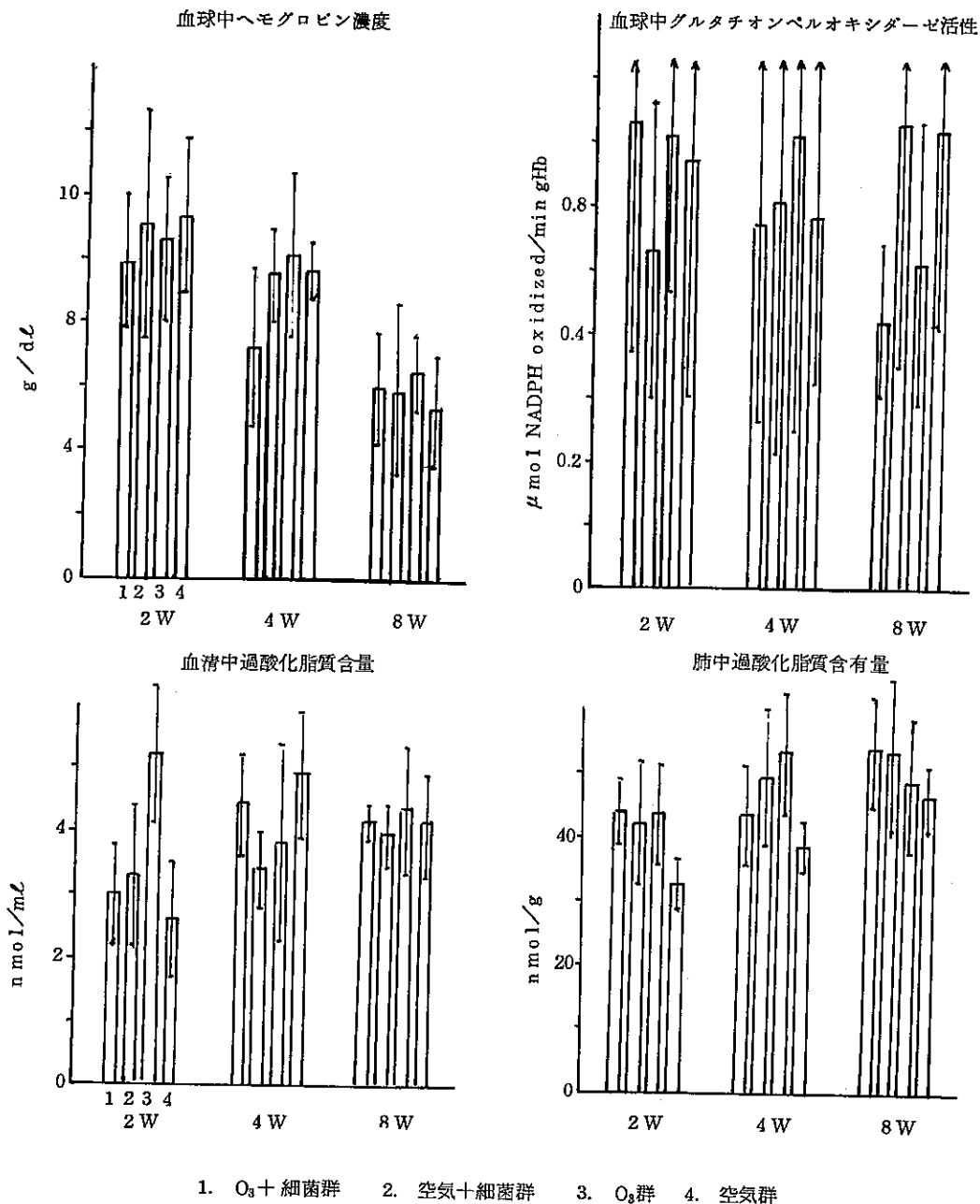


図3 生化学的变化

に附属リンパ節であるが、今回報告するのは呼吸気系の肺、喉頭、気管、気管支、鼻粘膜である。

光学顕微鏡用：臓器は直ちに10%バッファーホルマリン液で固定し、固定完了後に臓器片を切り出し、パラフィン包埋法によって切片を作製し、ヘマトキシリ

ン・エオジン(HE)染色、過ヨード酸シッフ染色、アザン染色を実施して、組織学的に観察した。

また、鼻はトリクロル酢酸で脱灰し、上顎部の前額断面の切片を作製した。

電子顕微鏡用：臓器は直ちに2.5%グルタルアルデ

ヒド液で固定し、固定後オスミウム酸固定を行ない、透過型はエボン包埋し、走査型は臨界点乾燥後金蒸着を行なって観察した。又鼻は鼻中隔軟骨を除去して粘膜のみを、又肺は右後葉の最後部を採材した。

(2) 成績(図4参照)

肺： 肺胞内における大円形細胞の出現が O_3 + 細菌群では2週に全例に見られ、(写真3, 4参照) 4週では3/6例見られたが、8週では認められなかった。 O_3 群では2週に1/6例、4週に3/6例、8週に1/6例認められた。

空気+細菌群では2週に1/6例、4週に4/6例、8週に3/6例見られた。空気群では2週に1/6例認められ、4週及び8週には認められなかった。

肺胞中隔に大円形細胞浸潤及び線維芽細胞出現が O_3 + 細菌群の2週及び4週にそれぞれ4/6例、8週に3/6例見られ、 O_3 群では2週に4/6例、4週及び8週にそれぞれ2/6例認められた。又、細菌群では2週及び4週にそれぞれ2/6例、8週に3/6例見られた。空気群では2週に1/6例見られたが、4週及び8週では見られなかった。

細気管支の病変は O_3 + 細菌群では2週に4/6例、4週及び8週にそれぞれ2/6例見られ、 O_3 群では2週、4週、8週にそれぞれ1/6例見られた。又、空気+細菌群では2週に2/6例、4週に3/6例見られたが、8週では認められなかった。空気群では2週、4週、8週共に認められなかった。

杯細胞の腫大が O_3 + 細菌群では2週に5/6例、4週に3/6例、8週に4/6例見られ、 O_3 群では各週それぞれ2/6例見られ、空気+細菌群では2週、4週にそれぞれ4/6例、8週に3/6例見られた。

又、空気群では2週に1/6例見られたが、4週及び8週では認められなかった。

気管： 杯細胞の腫大が O_3 + 細菌群では2週に2/6例、4週に1/6例、8週に5/6例見られた。 O_3 群では2週、8週では認められなかったが、4週に1/6例認められた。空気+細菌群では2週に1/6例、8週に3/6例見られたが、4週では認められなかった。又、空気群では2週に1/6例認められたが、4週及び8週には認められなかった。

粘膜下結合組織の軽度増生が O_3 + 細菌群では8週の

みに5/6例認められ、 O_3 群では8週のみに1/6例認められた。細菌群では2週を除き4週に1/6例、8週に5/6例認められた。空気群では2週に2/6例認められたのみである。

喉頭： 杯細胞の腫大が O_3 + 細菌群では各週共に2/6例見られ、 O_3 群では2週に3/6例、4週に4/6例、8週に3/6例見られた。空気+細菌群では2週には認められなかったが、4週に1/6例、8週に4/6例認められた。又、空気群では4週に1/6例見られただけである。

鼻粘膜： 各実験群を通じて著変は認められなかった。

電顕(SEM, TEM)： SEMによる扁桃上での *B. bronchiseptica* の増殖を確認した以外著変はなかった(写真7, 8参照)。

(3) 考察(図4参照)

肺胞内における大円形細胞の出現が O_3 + 細菌群では早期にしかも高率に見られ、時間の経過と共に減少していったが、 O_3 群及び空気+細菌群では早期には低率であるが、4週に半数例認められ、8週では減少した。これは O_3 曝露と細菌感染の相加作用と思われる。

肺胞中隔に大円形細胞浸潤及び線維芽細胞出現が見られたが O_3 + 細菌群では2週から8週まで高率に持続して見られた。これも O_3 曝露と細菌感染の相加作用と思われる。

細気管支周囲の変化が空気+細菌群、 O_3 群(写真6参照)に見られたが、特に O_3 + 細菌群では早期に高率に見られ、減少しながらも8週まで持続して認められた。これは O_3 と細菌曝露の相加作用と思われる。

気管の杯細胞腫大が O_3 + 細菌群の8週に5/6例で他群より高率に認められたが、 O_3 曝露と細菌感染の相加作用と思われる。

気管粘膜下結合組織の軽度増生が空気+細菌群と O_3 + 細菌の8週に各々5/6例認められた。この変化は O_3 曝露よりも細菌感染による影響が考えられる。

気管支及び気管支枝における杯細胞の腫大は空気+細菌群、 O_3 群及び O_3 + 細菌群共に認められ、細菌感染の強い影響が見られた。

喉頭の杯細胞腫大は O_3 曝露及び細菌感染の両方の影響が見られたが、細菌感染のみの影響は O_3 曝露より遅い時期に見られた。

組織学的変化を群別に検討すると、(図4-2参照) O₃+細菌群は各週其他群に比較し、多種の変化が高率に見られた。

電顕的観察において、著変が認められなかったのは、病変部の広がりか少なく、採材時に多面的に分割不能であったために光顕レベルでの検討を主体にしたため、今後は、光顕で観察する部位と近接した部分を電顕用検討の対象として用いることが望まれる。

(4) 結論

O₃ 0.2 ppm 2 時間曝露と *B. bronchiseptica* の単独又は相加的作用により、呼吸気系臓器に組織学的

変化が見られた。

肺胞内の大円形細胞出現、肺胞中隔の大円形細胞浸潤及び線維芽細胞出現、細気管支の病変、杯細胞腫大、気管粘膜下結合組織の軽度増生が認められた。

鼻粘膜に著変は認められなかった。

又、O₃ をあらかじめ曝露することにより、呼吸器系臓器の細菌曝露による組織学的変化の早期出現、相加作用が見られた。即ち、高濃度 O₃ が生体に有害である事は既に知られた所であるが²⁴⁾、0.2 ppm の低濃度であっても軽度な生体影響が認められ、さらに細菌曝露等による生体への有害性を助長する事が示された。

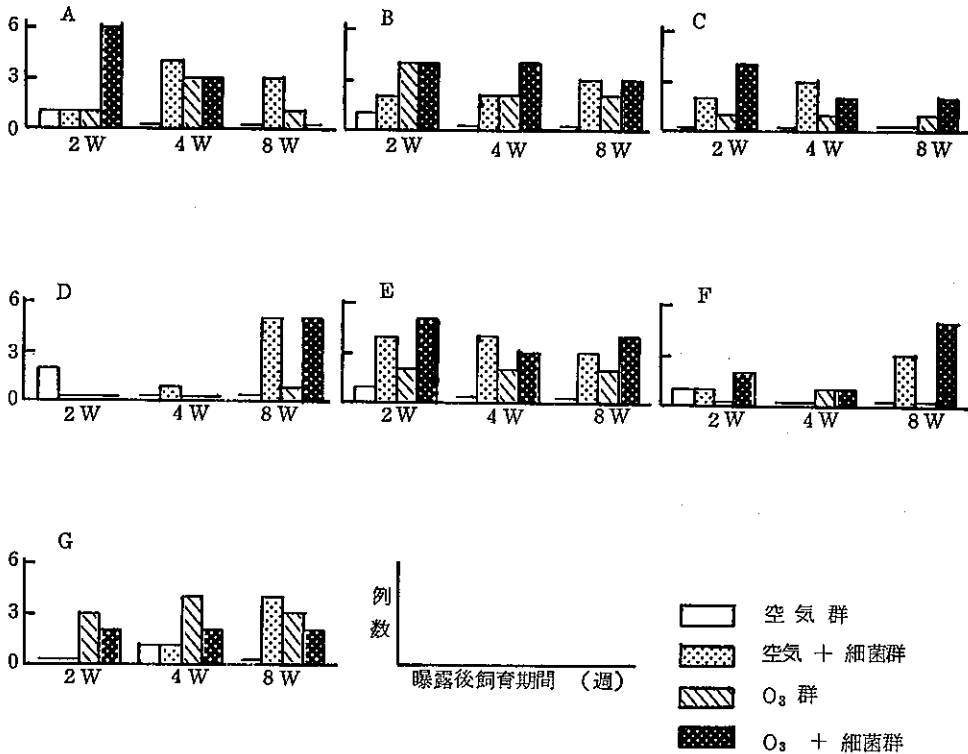
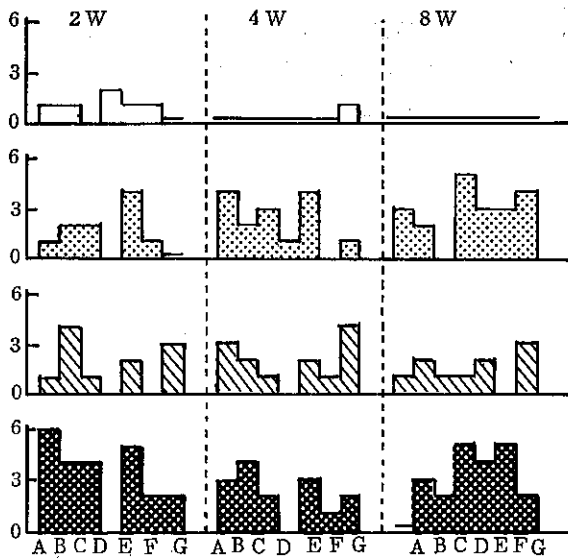


図4-1 病変の経時的変化 (I)



- A 肺胞内に大円形細胞出現
- B 肺胞中隔に大円形細胞浸潤及び線維芽細胞出現
- C 細気管支病変
- D 気管支粘膜下結合組織増生
- E 気管支杯細胞腫大
- F 気管杯細胞腫大
- G 喉頭杯細胞腫大

図4-2 病変の経時的変化(II)

(5) 写真説明

- 写真1：肺右中間葉及び左前葉前部に見られた病変， O_3 +細菌群2週例。
- 写真2：肺，空気群，HE染色， $\times 100$ 。
- 写真3：肺炎及び肺胞中隔の肥厚， O_3 +細菌群2週例，HE染色， $\times 100$ 。
- 写真4：写真3の拡大， $\times 200$ 。
- 写真5：気管支，粘膜下結合組織の増生が見られる， O_3 +細菌群8週例，HE染色， $\times 100$ 。
- 写真6：細気管支，粘膜及び気管支周囲にリンパ球浸潤が見られる， O_3 群8週例，HE染色， $\times 100$ 。
- 写真7：走査型電顕，扁桃，吸入細菌と思われる菌， $\times 3,000$ 。
- 写真8：走査型電顕，喉頭，吸入細菌と思われる菌， $\times 3,000$ 。



写真1

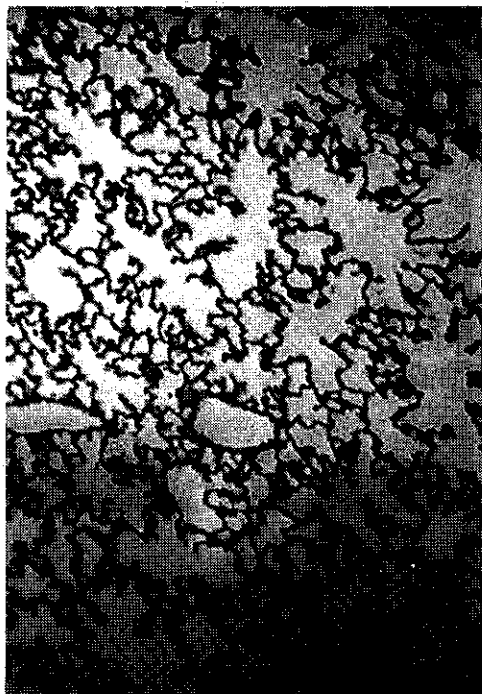


写真 2

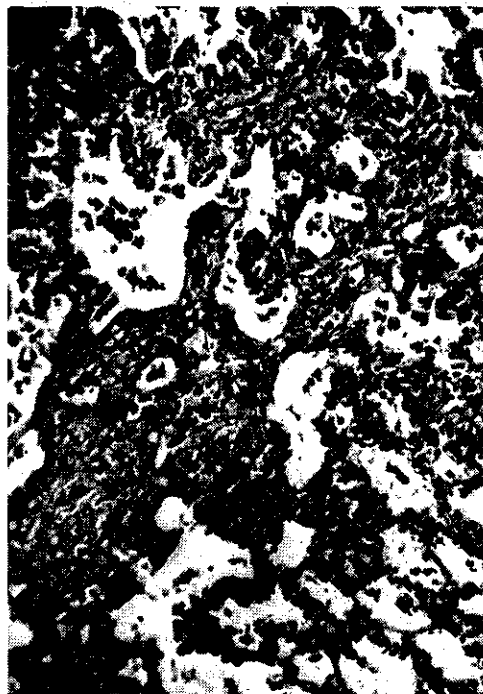


写真 4

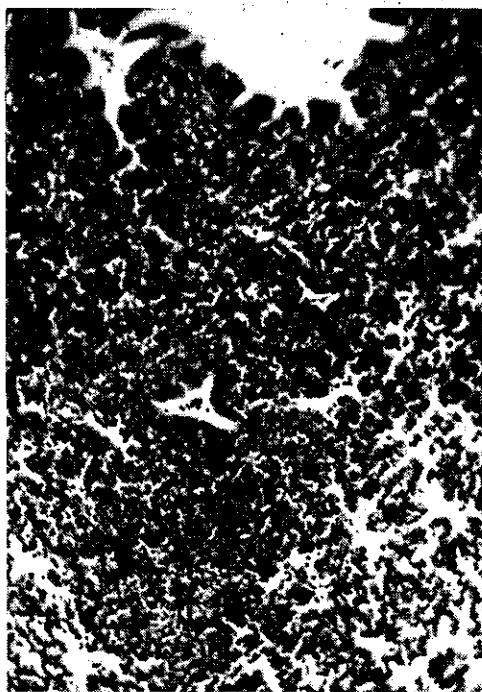


写真 3



写真 5



写真6



写真7

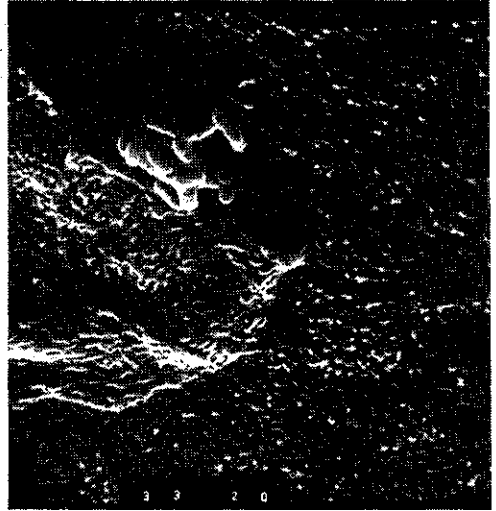


写真8

参 考 文 献

- 1) Biles, R.F. : Arch. Environ. Health, 20, 468-480(1970)
- 2) Buckley, R.D. et al. : Arch. Environ. Health, 30, 40-43(1975)
- 3) Chow, C.K. and Tappel, A.L. : Lipids, 7, 518-524(1972)
- 4) Chow, C.K. and Tappel, A.L. : Arch. Environ. Health, 26, 205-208(1973)
- 5) Coffin, D.L. and Blommer, E. : Aerobiology, Academic Press, 54-61(1970)
- 6) Cowan, S.T. : Manual for the identification of medical bacteria, 2nd ed, Cambridge university press, England (1974)
- 7) 遠藤立一他 : 東京都公害研究所報告書, 90-100 (1977)
- 8) Evans, M., Mayr, w., Bils, T. and Loosli, C. : Arch. Environ. Health, 22, 450-453(1971)
- 9) Freeman, G., Juhos, L.T. and Furios, N.J. : Arch. Environ. Health, 29, 203-210(1974)
- 10) Goldstein, E., Tyler, W., Hoeplich,

- P. and Eagle, C. : Arch. Internal Med., 128, 1099-1102(1971)
- 11) Goldstein, E., Tyler, W. S., Hoepri-
ch, P., and Eagle, C. Nature, 229, 262-
263(1971)
- 12) 池田種秀: 気食会報, 25, 113-126(1974)
- 13) Maeda, M., and Shimizu, T. : Nat. In-
st. Anim. Hith. Quart. 15, 29-37(1975)
- 14) Matsumura, Y. : Am. Rev. Resp. Dis,
102, 431-447(1970)
- 15) Miller, S. and Ehrich, R. : J. Infect.
Dis, 103, 145-149(1958)
- 16) Mizuoka, T., Segal, T., and Yamamoto,
S. : Zbl. Bact. I. Abt. Org. 195, 445-
469(1965)
- 17) Nakayama, M., Muto, T., Nakano., T.,
Yoda, H., Ando, K., Isobe, Y. and Ima-
izumi, K. : 実験動物, 18, 105-116,
(1969)
- 18) Paglia, D. E., and Valentine, W. N. :
J. Lab. and Clin. Med. 70, 158-169
(1967)
- 19) 瀬戸博: 医学のあゆみ, 94, 250-251(1975)
- 20) Stokinger, H. E., : Advances chem
Ser., 21, 360-369
- 21) 鈴木孝人他: 第20回大気汚染学会講演要旨集
P 335(1979)
- 22) 戸沢隆他: 第18回大気汚染協議会講演要旨集
P 223(1977)
- 23) 梅田昌樹他: 東京都公害研究所報告書, 101-
103(1978)
- 24) WHO: Environmental Health Crit-
eria for photochemical Oxidants(1975)
- 25) 山崎晴一郎: 臨床病理, 15, 616-619(1967)