

低濃度O₃曝露による有害性の検討 — 家兎の0.08 ppm オゾン曝露実験第1報 —

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 上原 孝吉 浪江 健二
 鈴木 優治 (東京農工大学) (埼玉県立衛生短期大学)
 (埼玉県立衛生短期大学)

1 はじめに

当保健部では、大気汚染の要因としてのオゾン(O₃)の生体影響を明らかにするため、動物実験による研究を1968年来O₃濃度を順次引き下げつつ実施して来た。その結果O₃が0.2 ppmの濃度域で、呼吸器系、免疫産生能、脂質代謝系を主とする生理面でそれぞれ機能、形態上に好ましからざる影響を与えていることが判った。これ等の点からO₃は、都市域における環境濃度でも生体に有利な物質とは考えられず、更に低濃度における研究が望まれ、今回O₃0.08 ppmでの動物実験を行うことになった。

(1) 実験の方法

ア 材料及び方法

実験動物は2~3ヶ月令の清浄家兎の雄を用いた。従来O₃の実験は5ヶ月令のSPF家兎を用いて来たが入手が困難となったため、種、年令の変更を行わざるを得なかったが、このことは過去の実験との比較に問題がある。実験の群及び構成頭数については、表1を参照とされたい。

表1 曝露期間及び動物数

	曝露直前群	曝露期間				計
		1週	2週	1ヶ月	3ヶ月	
O ₃ 曝露群	6羽	6	6	6	6	24羽
対照群	6羽	6	6	6	6	30羽
計	6羽	12	12	12	12	54羽

使用動物 清浄家兎 54羽 Pasteurella属, Bordetlla bronchisepticaを含む有害微生物を持たない家兎
 使用開始時年令 2~3ヶ月令

イ 曝露の方法

従来用いて来たO₃濃度維持装置に比し優れた機能を

を持つ装置(図1参照)を導入し、更に取り入れ空気の浄化機能を強化した結果、動物飼育チェンバー内は、曝露ガス以外の有害物質の侵入を可能な限り排除したものとなった。また、換気速度(16回/時)、温度(22±1°C)、湿度(50~60%)等に関しては、前回と同一である、この条件は対照群を飼育する部屋においても変わらない。

(2) 検討の方法

今回のような極低濃度における明確な生体影響解析のための指標として有効な方法は過去の報告にも極めて少く、また研究者によりその評価は一定していないが、我々は、経験上下述の方法論を用いた。勿論検討法の開発も今回以後の研究計画には組込まれている。今回用いた検討手法は1,組織病理学(光学顕微鏡、電子顕微鏡)、2,免疫学(血清中免疫グロブリンの定量)、3,生化学(肺・血液中の過酸化指質量、グルタチオンペルオキシターゼの定量、ヘマトクリット値の測定)である。

(3) 結果

これ等の検討方法による実験結果の解析は曝露期間に比べ回数が少ないため、免疫・生化学のデータが不十分である点が考慮されねばならないが、次のとおりであった。

ア 病理学的検討

光学顕微鏡的観察では肺胞壁に偽好酸球の浸潤が認められた(O₃1週曝露群、O₃2週曝露群)。また走査型電顕ではO₃2週及び1ヶ月曝露群に粘液分泌の亢進、透過型電顕ではO₃2週曝露群でII型上皮の減少が見られかつラメラ構造の不明なものが見られたが、これは人工的な変化の可能性がある。

イ 免疫学的検討

血清中は Ig G は O₃ 1 カ月曝露群を除き対照群に比し低い傾向を示し、Ig A は O₃ 曝露群では (以下 O₃ 群とする) では平均値は各期間共に対照群よりやや高い値を示した。

ウ 生化学的検討

血清中の過酸化脂質は O₃ 群で 2 週群, 3 ヶ月群に対照群より高い値を示すものがみられるが、肺中の過酸化脂質では対照群より低い値を示す。また、赤血球中のグルタチオンペルオキシダーゼは、O₃ 1 ヶ月群を除いて常に対照群より低い値を示している。

(4) 考察

以上の結果から次のことが考えられた。即ち病理形態上に認められた変化は軽微ながら O₃ 0.08 ppm でも反応性的変化が認められ、免疫、生化学上の諸変化も従来の結果と著しい傾向の差を示さなかった。しかしながら、今回の成績では、O₃ 濃度が著しく低いため、従来に比し明確な結論は導き得なかった。今後は更に検討例数を増すとともに、新たな検討項目を加えることにより、有害性の追求を行う考えである。

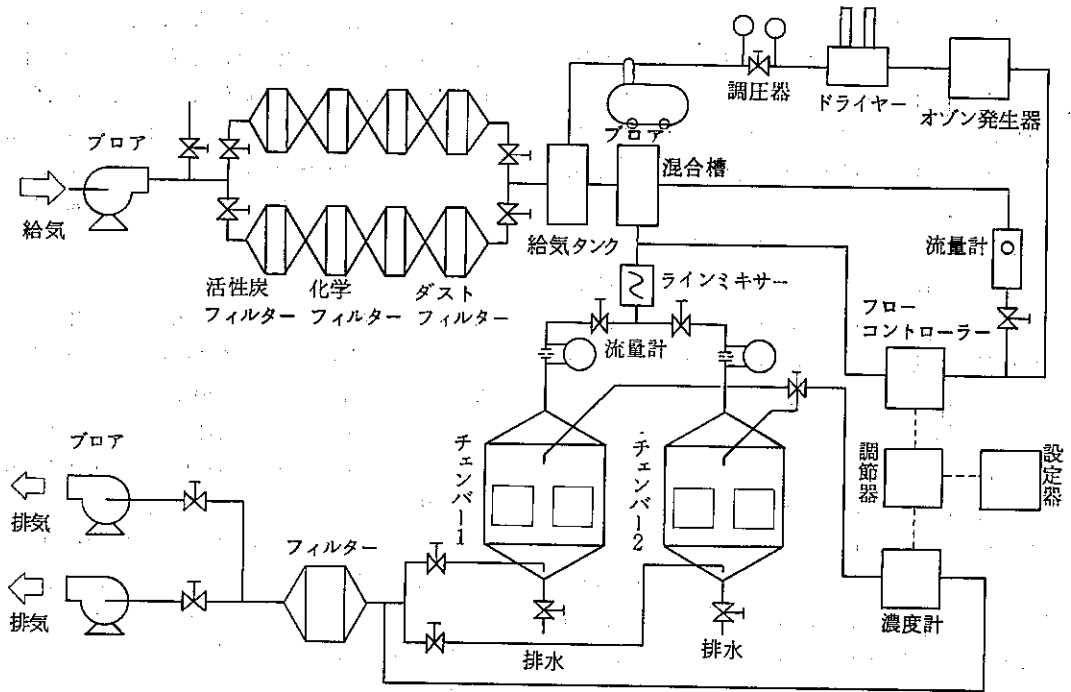


図1 動物吸入実験用自動オゾン供給装置フローシート

2 病理学的検討

(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、脾臓ならび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、扁桃および肝臓、腎臓、脾臓である。

光学顕微鏡：臓器は解剖後直ちに10%バッファールホルマリン液で固定し、固定完了後に臓器片に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 (H・E) 染色の後、組織学的に観察した。また、鼻はトリクロル酢酸で脱灰し、上顎部を前額断し、標本を作成した。

電子顕微鏡：臓器は解剖後直ちに25%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い、透過型はエポキシ包埋し、走査型は臨界点乾燥後金蒸着を行って観察した。又肺は右後葉の最後部を採材した。

(2) 成績

ア 肺

肺胞内における単核大円形細胞の出現がO₃群では1週に軽度 $\frac{3}{6}$ 例、中度 $\frac{1}{6}$ 例、2週に軽度 $\frac{4}{6}$ 例、3ヶ月に重度 $\frac{1}{6}$ 例見られ、対照群では1週に軽度 $\frac{5}{6}$ 例、中度 $\frac{1}{6}$ 例、2週に軽度 $\frac{4}{6}$ 例、中度 $\frac{1}{6}$ 例、1ヶ月に軽度 $\frac{1}{6}$ 例見られた。又、曝露直前群では軽度 $\frac{2}{6}$ 例、重度 $\frac{1}{6}$ 例見られた。(写真1~4参照)

肺胞壁に円形細胞浸潤がO₃群では1週に軽度 $\frac{3}{6}$ 例、中度 $\frac{1}{6}$ 例、2週に軽度 $\frac{4}{6}$ 例、3ヶ月に中度 $\frac{1}{6}$ 例見られ、対照群では1週に軽度 $\frac{3}{6}$ 例、中度 $\frac{1}{6}$ 例、2週に軽度 $\frac{2}{6}$ 例、1ヶ月および3ヶ月にそれぞれ軽度 $\frac{1}{6}$ 例、又、曝露直前群では軽度 $\frac{2}{6}$ 例、重度 $\frac{1}{6}$ 例見られた。(写真6、7参照)

肺胞壁に偽好酸球浸潤がO₃群では1週に軽度 $\frac{4}{6}$ 例、2週に軽度 $\frac{2}{6}$ 例、3ヶ月に軽度 $\frac{1}{6}$ 例、対照群では1週に軽度 $\frac{1}{6}$ 例、3ヶ月に軽度 $\frac{1}{6}$ 例、曝露直前群では、軽度 $\frac{2}{6}$ 例、重度 $\frac{1}{6}$ 例見られた。(写真5参照)

イ 扁桃 (写真8参照)

陰窩内に剥離上皮の出現がO₃では1週に $\frac{4}{6}$ 例、2週に $\frac{3}{6}$ 例、1ヶ月に $\frac{2}{6}$ 例、3ヶ月に $\frac{4}{6}$ 例、対照群では1週に $\frac{2}{6}$ 例、2週に $\frac{2}{6}$ 例、3ヶ月に $\frac{1}{6}$ 例、曝露直前群に $\frac{2}{6}$ 例見られた。

陰窩内に小円形細胞の出現がO₃群では1週に $\frac{3}{6}$ 例、2週に $\frac{4}{6}$ 例、3ヶ月に $\frac{2}{6}$ 例、対照群では1週に $\frac{1}{6}$ 例、2週に $\frac{2}{6}$ 例、曝露直前群に $\frac{1}{6}$ 例見られた。

ウ 気管、気管支、喉頭、脾臓、腎臓、心臓、鼻

O₃群と対照群の変化の差および経時的変化の差は認められなかった。

エ 電顕レベル (写真9~11)

SEM: O₃群2週の鼻 気管粘膜に分泌亢進像が見られ、気管粘膜に関しては1ヶ月にも同様の所見が得られた。

TEM: O₃群1ヶ月の気管上皮細胞の細胞の機能亢進像及び肺II型細胞の減少が見られ、肺に関してはラメラの不明確化が見られた。この変化はO₃群に多く見られたが、0.2 ppm 実験時には見られなかったことから人工的な所産であるかもしれない。今回の電顕像からは、光顕レベルでの変化に対応する明確な変化は得られなかった。

(3) 考察

我々は肺において肺胞内に単核大円形細胞の出現並びに肺胞中隔に円形細胞浸潤が濃度0.2 ppmオゾン2週間曝露で認められ、対照群ではほとんど認められな

い変化である事を既に報告した¹⁾。今回の実験ではO₃群の1週と2週に軽度であるが肺胞壁に偽好酸球の浸潤が見られた。又、O₃群の3ヶ月に1例であるが肺胞内に単核大円形細胞の出現が重度に認められ、濃度0.08 ppm オゾンは肺に刺激的及び慢性影響を与えるものと思われた。

(4) 写真説明

写真1: 肺胞腔内に単核大円形細胞出現, O₃群3ヶ月HE染色, ×40。

写真2: 拡大, ×400。

写真3: 拡大, ×400。

写真4: 正常肺胞, HE染色, ×400。

写真5: 肺胞壁に偽好酸球浸潤及び単核大円形細胞の肺胞腔内出現, O₃群1週, HE染色, ×400。

写真6: 肺胞壁に小円形細胞浸潤及び単核大円形細胞の肺胞腔内出現, O₃群3ヶ月, HE染色, ×400。

写真7: 肺胞壁に小円形細胞浸潤, O₃群1週, HE染色, ×200。

写真8: 扁桃陰窩内容, 剥離上皮, リンパ球が見られる, O₃群3ヶ月, HE染色, ×200。

写真9: 肺胞II型上皮細胞の肺胞腔内脱落, O₃群2週。

写真10: 肺胞II型上皮細胞の減少, O₃群1週。

写真11: 鼻粘膜, 粘液分泌亢進。

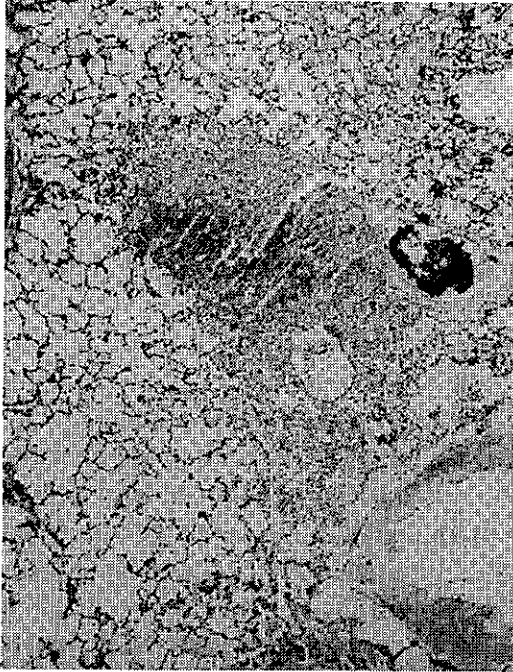


写真 1

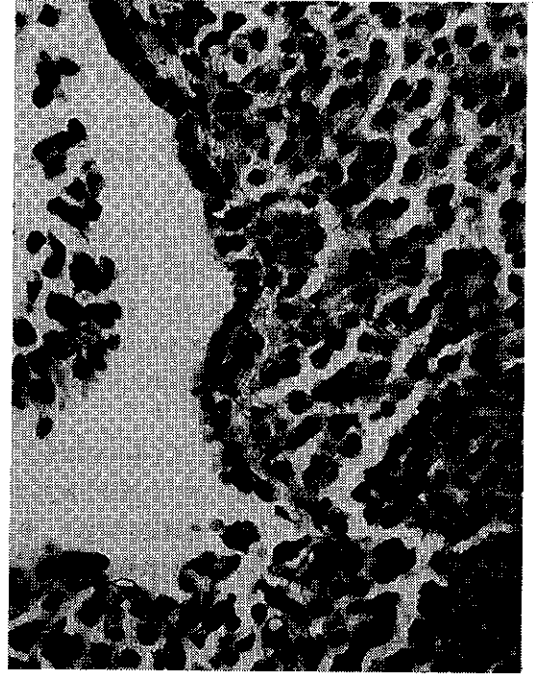


写真 2

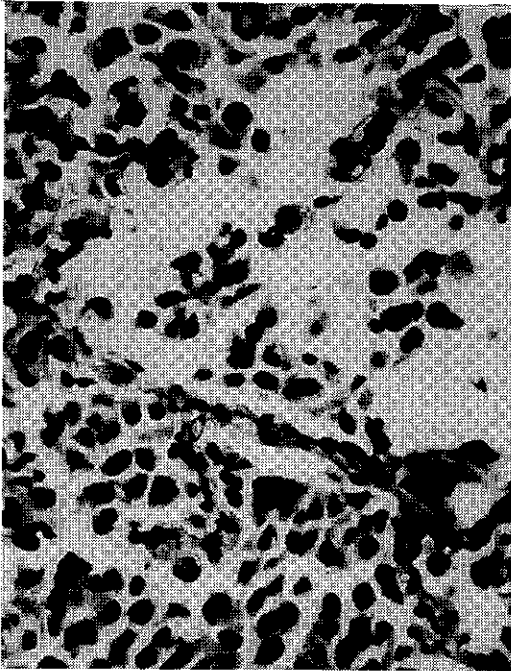


写真 3

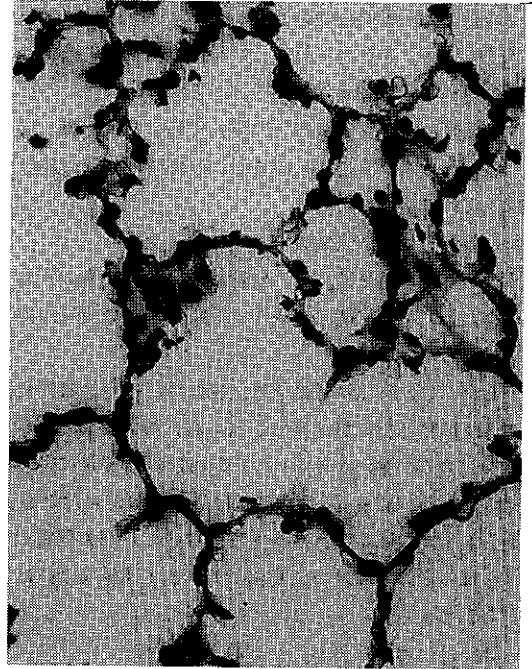


写真 4

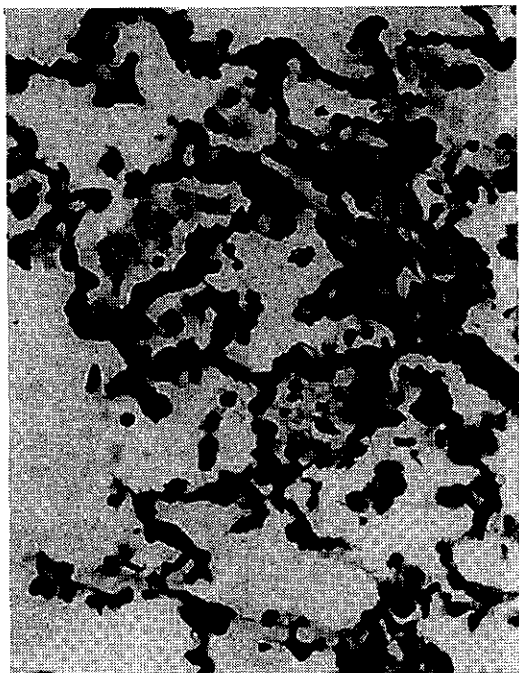


写真 5



写真 6

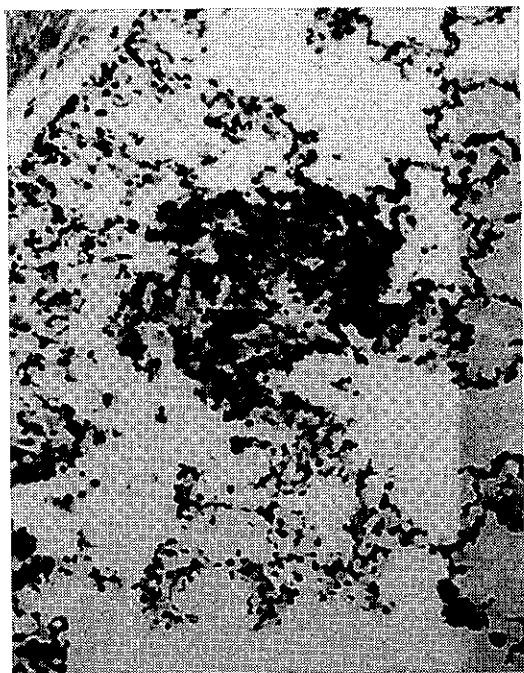


写真 7



写真 8



写真9



写真10

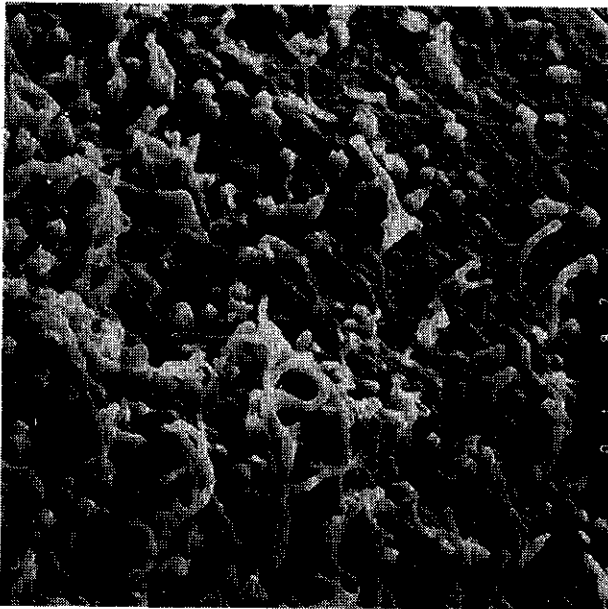


写真11

3 免疫学的検討 (図2~5参照)

O₃ 曝露により呼吸器感染症に対する抵抗力が低下することが知られており、免疫機構との関係が指摘されている。また感受性の増強が報告され、喘息などアレルギーとの関連から注目されている。しかし、従来この種の実験は環境レベルよりはるかに高い濃度で行なわれており、低濃度長期間曝露時における免疫学的検討はほとんどなされていない。

今回は、0.08 ppm という環境レベルに近い濃度で免疫機構がどのような影響を受けるかを知るための第一段階として血清中 Ig A、Ig G を測定した。同時に、血清中総蛋白質量、A/G比をも併せて測定した。

(1) 方法

ア 血清中 Ig G、Ig A 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 Ig G 血清 (ヤギ) 及び抗ウサギ Ig A 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。Ig G 濃度は市販のウサギ Ig G を標準に用い、mg/ml の値で、Ig A は曝露直前群の平均値を 100 として相対値で表わした。

イ 血清中総蛋白質量

ビウレット反応によって定量し、牛血清アルブミンを標準に用い mg/ml の値で表した。

ウ A/G 比

セルロースアセテート膜 (セパラックス) を用いた電気泳動法 (0.5 mA/cm, 50 分) により測定した。

(2) 結果

血清中 Ig G は、O₃ 1 ヶ月群が対照群より有意 ($P < 0.01$) に高い値を示した。O₃ 1 週、2 週、3 ヶ月群においては対照群よりやや低い傾向を示したものの有意差はなかった。

血清中 Ig A は、1 週、2 週、1 ヶ月、3 ヶ月ともに O₃ 群が対照群より平均値でやや上まわったが、ほぼ同じレベルを示した。

血清中総蛋白質量は、2 週、1 ヶ月、3 ヶ月ともに O₃ 群がやや低い値を示したが、有意差はなかった。

A/G 比は、1 週、2 週は O₃ 群が、1 ヶ月、3 ヶ月は対照群がやや高い値を示したが、有意差はなかった。

(3) 考察

O₃ 1 ppm 曝露²⁾、O₃ 0.2 ppm と NO₂ 1 ppm の交互曝露³⁾ によって血清中 Ig G、Ig A レベルが上昇したことが報告されている。今回、O₃ 1 ヶ月群において Ig G が有意に高い値を示したことから、すべての O₃

群において Ig A の平均値が対照群の平均値をやや上まわったことは、0.08 ppm という低濃度であっても、高濃度曝露時と同様な影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、一方、Ig G の値が O₃ 1 週、2 週、3 ヶ月群では、これとは逆に対照群より低い傾向を示していることから、一概に結論を下すことはできない。血中抗体価を決定する要因は多様である。O₃ は、気道蛋白を変性、抗原化させること⁴⁾、抗原物質の肺からの侵入を促進し、また肺内での滞留を長びかせることにより抗体価を上げる方向に働くことが指摘されている⁵⁾。一方、抗体産生能を抑制することにより抗体価を下げる方向に作用することを示唆する報告^{6) 7)} もある。これらのうちどれが強く作用するかによって抗体価が上下すると考えられる。よって、今後低濃度曝露時における免疫学的影響を論ずるためには、血中抗体価の測定等間接的な方法のみでなく、抗体産生細胞の検出、局所免疫としての重要な分泌型 Ig A の消長、局在等のより直接的な手法を用いての詳細な検討が必要である。さらに、細胞性免疫への影響についても今後の課題であろう。

4 生化学的検討

オゾンは、その酸化的性質により不飽和脂肪酸などの二重結合を攻撃しオゾニドを生成するということが古くから知られていた。これは、酸素による自動酸化の過程とは異っている。Srsankar, E. V. and Patterson, L. K. (1979) は、*in vitro* 0.03 ppm のオゾンが不飽和脂肪酸を短時間で分解することを示した⁸⁾。このように低濃度のオゾンであってもその酸化力は強く、生体に対しても少なからぬ影響を与えることが予想される。今回は、その過酸化の指標となる過酸化脂質含量 (TBA reactant) を血清および肺ホモジネートについて定量した。過酸化脂質は生体に対して有毒であり特に、ミトコンドリアは不可逆的に障害を受けるとされている。この過酸化脂質を基質として代謝する酵素にグルタチオンペルオキシダーゼ (GPO) があるが、今回は赤血球中の GPO 活性もあわせて測定した。GPO は、いわゆる PMP (Peroxidative Metabolic Pathway) 系 (図6) の酵素のひとつであり、生体の過酸化物質を除去し無毒化することが知られている。この基質となる還元型グ

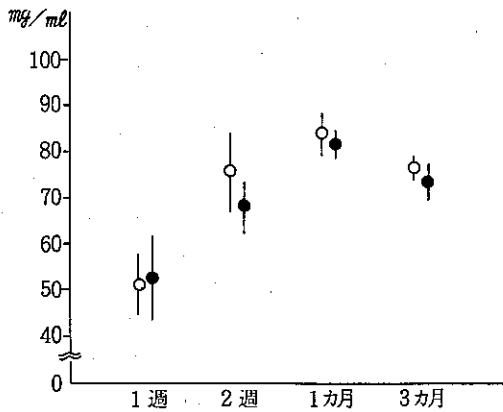


図2 血清中総蛋白質量

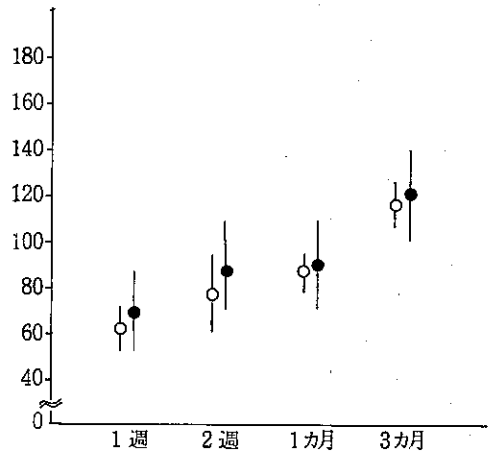


図4 血清中 IgA

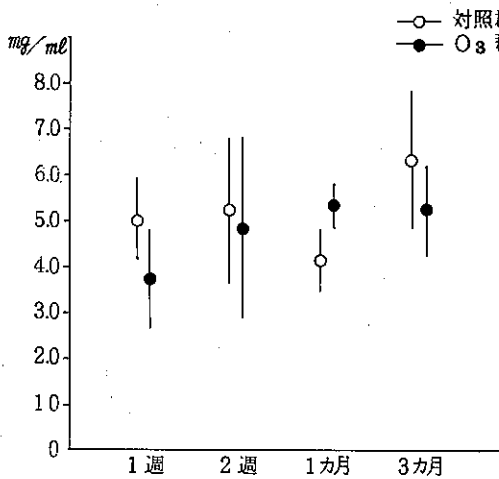


図3 血清中 IgG

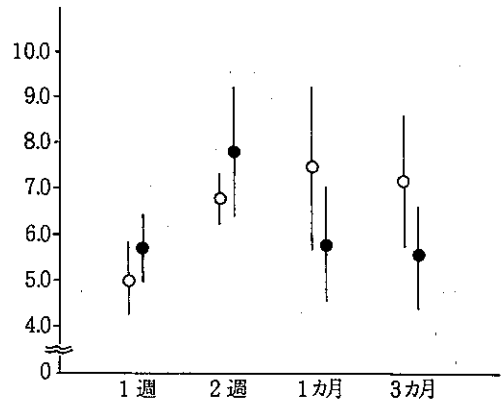


図5 A/G比

図2～5 凡例

○ 対照群
● O₈ 群

平均値±標準偏差

グルタチオン (GSH) は、この反応に大きな役割を持っている。Plopper, C. G. et al. (1979) によれば、オゾン 0.2 ppm, 7 日間曝露のラットの肺中 GPO 活性が有意に上昇したことが示されている⁹⁾。オゾンは、同じように酸化性的性質を持った二酸化窒素に比して、低濃度でも影響があることが考えられる。他に、今回は血液性状としてヘマトクリット値を測定した。

(1) 方法

採血はネブタール麻酔後、後大静脈より静脈血を採取した。肺は冷等張リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中でテフロン製ホモジナイザーで処理し、ガーゼを二層に重ね濾過し濾液を分析に供した。

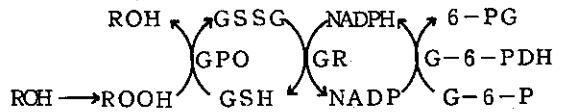


図6 PMP系 (Chow, C. K. and Tappel, A. L.¹⁰⁾ より)

血清は採血後凝固した後、2500 r. p. m. 15 分間遠心分離した。過酸化脂質含量は山崎 (1967)¹¹⁾ により、定量はマロンアルデヒドの 532 nm におけるモル吸光係数 (1.56 × 10⁵) をもとに算出した。赤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)¹²⁾ をもとに行なった。ヘマトクリット値は、マイクロヘマトクリット法で行った。

た。

(2) 結果と考察 (図7参照)

各群のヘマトクリット値については、1週目の群については差は認められなかったが、2週目以後の各々の群についてはO₃群の方がやや高い傾向を示した。これは赤血球膜に対するオゾンの影響、血球のエネルギー代謝に対する影響、生成物による骨髄の刺激等が考えられるが、今後の検討を待たなければならない。

赤血球を酸化作用から守る還元型グルタチオンは、赤血球中のペントースリン酸経路から生成されるNADPHとともに働き、この代謝系はPMP系と考えられ、特にグルタチオンペルオキシダーゼ(GPO)は重要な酵素とされる。赤血球中GPO活性は1週目、2週目、3ヶ月とO₃群が低値を示すが、1ヶ月目は逆に高い値となっている(P<0.01)。

血清中過酸化脂質含量は、3ヶ月目でO₃群が有意(P<0.01)に高い値を示した。肺中過酸化脂質含量は、1週目でO₃群が有意に(P<0.01)に近い値を示した。この傾向は2週目以後も続くが有意ではなかった。

血清中過酸化脂質含量についてはオゾン0.2ppm程度の曝露でも有意に上昇することは当部の実験でも得られている。これは生体中の脂質を構成する多不飽和脂肪酸がオゾンの酸化的性質から過酸化されると考えられる。特に生体膜は必ず多不飽和脂肪酸を持っており、その重要性は膜の流動性、やわらかさ等を決定するという点である。また、オゾンは二酸化窒素(NO₂)が基本的に自動酸化の過程を経るとされているのに対しその過酸化の過程はより直接的とされている。生化学的応答はNO₂に比して10~20倍強いという結果も出されている¹³⁾。今回の結果の中で血清中過酸化脂質含量で、1ヶ月目についてO₃群がやや低い値を示しているが、このときの赤血球中GPO活性は他の時期の傾向と異なりやや高い値を示している。これは過酸化脂質の代謝経路であるPMP系酵素の活性上昇により過酸化脂質が除去されていると思われる。しかし、3ヶ月目になるとその傾向はみられず、GPO活性は下がっており、血清中過酸化脂質含量はO₃群で有意に上昇しているが、代謝しきれなくなり上昇したとも考えられる。Chow, C. K. et al. (1973)によればオゾン0.75ppmをラットに連続曝露すると肺中GPO活性が30日目まで上昇し、グルタチオンレダクターゼ(GR)活性は10日目で最大値をとり以後下降することが示されている¹⁴⁾。これらのことか

らPMP系の酵素はその活性上昇には時間がかかると考えられるが今回の結果からはその経時変化を結論することは困難と思われる。

肺中過酸化脂質含量については、一貫してO₃群が低くなっているがこれは予想した結果とは逆であった。これは肺中PMP系酵素の活性が亢進しているか、また肺脂質総量が減少しているなど考えられるが今回の知見では明らかではない。肺はリン系に吸収される高級脂肪酸の最初に到達する器官であり、その脂質代謝における重要性が指摘されている¹⁵⁾。NO₂曝露のラットにおける肺脂質総量の減少、リン脂質また脂肪酸の変化が報告されているが¹⁶⁾、オゾンについても同様の変化は予測される。オゾンのNADPH, GSH等の生体の還元剤ともいうべき物質への直接の攻撃も示唆されており、生体の脂質代謝に与える影響を総合的に検討しなければならないであろう。

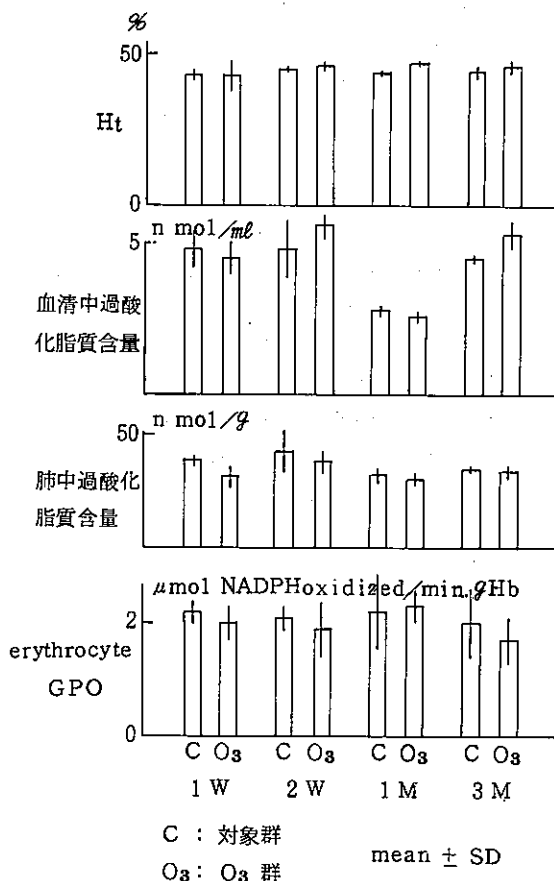


図7 生化学的变化

参 考 文 献

- 1) 遠藤立一ほか：オゾン(O₃)曝露家兎の微生物感染抵抗性に関する検討，東京都公害研究所年報，P 211，(1980)。
- 2) 戸沢隆ほか：オゾン曝露家兎のγ-Globulinレベル，第18回大気汚染協議会講演要旨集，P223，(1977)。
- 3) 遠藤立一ほか：大気汚染の生体に及ぼす影響，東京都公害研究所報告書，P 101，(1978)。
- 4) Scheel, L. D. *et al.* : Physiologic, Biochemical, Immunologic and Pathologic Changes Following Ozone Exposure, *J. Appl. Physiol.* **14**, 67, (1959)。
- 5) Matsumura, Y. : The Effects of Ozone, Nitrogen Dioxide, and Sulfur Dioxide on the Experimentally Induced Allergic Respiratory Disorder in Guinea Pigs, *Am. Rev. Resp. Dis.* **102**, 65, (1978)。
- 6) 瀬戸博：オゾンによる液性免疫機構への影響，医学のあゆみ，**94**，6，250，(1975)。
- 7) Savino, A. *et al.* : The Effect of Ozone on Human cellular and humoral immunity. *Envi. Res.* **15**, 65, (1978)。
- 8) Srisankar, E. V. and Patterson, L. K. : Reactions of Ozone with Fatty Acid Monolayers, A Model System for Disruption of Lipid Molecular Assemblies by Ozone, *Arch Environ. Health*, **34**, 346, (1979)。
- 9) Plopper C. G. *et al.* Pulmonary Alterations in Rats Exposed to 0.2 and 0.1 ppm Ozone : A Correlated Morphological and Biochemical Study. *Arch. Environ. Health*, **34**, 390. (1979)。
- 10) Chow, C. K. and Tappel, A. L. : An Enzymatic Protective Mechanism against Lipid Peroxidation Damage to Lungs of Ozone - Exposed Rats. **7** No 8 518 (1972)。
- 11) 山崎晴一郎：TBA法について，臨床病理 **15** 616. (1967)。
- 12) Paglia, D. E. and Valentine, N. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab and Clin. Med.* **70**. 158. (1967)。
- 13) Fukase, O. : The Effects of Gaseous Air Pollutants on Peroxidative Metabolism in Mouse Lungs, *Jpn. J. Hyg.* **34**. 777 (1980)。
- 14) Chow, C. K. and Tappel, A. L. : Activities of Pentose Shunt and Glycolytic Enzymes in Lungs of Ozone - Exposed Rats, *Arch. Environ. Health* **26** 205 (1973)。
- 15) 村尾誠，中村元臣：講座「病態の生化学」1. 呼吸器・循環器 **46** (1970) 中外医学社。
- 16) Arner, E. C. and Rhoades, R. A. : Long - Term Nitrogen Dioxide Exposure, *Arch. Environ. Health*, **26** 156 (1973)。