

NO₂の癌原性に関する研究(第2報) - その1 --NO₂ガス曝露ラットの発癌に関する研究-

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 浪江健二 山本法
(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

我々は、NO₂が如何に発癌に対して係わりあいを持つかを、前年に引きつづき検討を加えた。今回行った実験と前年の実験との差は、NO₂ガス曝露に先立って、O₃曝露を行った点にある。この実験は、低濃度NO₂ガスの癌原性を明確化する手法として、O₃による呼吸器系への傷害を先行させ、以後、低濃度NO₂曝露を実施し、肺内に注入された既知癌原性物質(ベンツ(a)ピレン)との関係を注視すべく企図された。したがって実験設定は、前年の実験の成果をより明快にする目的およびさらに環境で起り得る事象、すなわち日中の光化学オキシダントにより傷害を受けた生体にNO₂ガスが作用するという様式に類似させる目的で行った。今回行ったO₃の曝露は5 ppm 6時間という比較的強い条件で実施した。したがって、呼吸器系に対する傷害の強さも予測され、またその結果も観察されている。従来から器質的傷害の生じた組織が再生する際に、局所に存在する物質の影響を受け易いといわれている。したがって、今回のO₃の曝露は呼吸器系傷害を先行させ以後の生体反応にNO₂が示す態度を観察しようとする実験目的は一応果したと考えられる。またO₃が主病変を鼻粘膜、気管に有し、肺実質部では刺激作用に止まり、NO₂とその生体影響に差異があることは両者の交互曝露実験でも指摘されているところである。したがって、今回の実験における肺内の増殖性病変発生に関してはO₃を発生要因から除外することは可能と考え、また病理組織学的にある程度両ガスの差も確認出来ている。

今回のガス曝露条件としては、NO₂は0.5 ppm

10日間の連続曝露、O₃は5 ppm 6時間曝露とし、NO₂曝露はO₃曝露後4日後から開始した。ベンツ(a)ピレン(以下Bp)に関しては、注入量および注入法とも前年と全く同様とし、O₃曝露前1週に行なった。実験群、観察時期および対象動物数は、(図1、表1)に示すとおりである。以下、今回の実験結果の概要について検索課題別に述べる。

表1 観察時期及び対象動物数

	O ₃ 曝露後	NO ₂ 曝露直後	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後	12ヶ月後	計
Bp+NO ₂ 群	7	7	7	7	7	21	56
NO ₂ 群	5	5	5	5	5	11	36
対照群	8	8	8	8	8	18	58
計	20	20	20	20	20	50	150

注)月数は、NO₂曝露後に経過した期間を示す。

(1) 病理組織学的検討

O₃曝露により生じた肺炎はNO₂曝露直前に実験群の全例にみとめられた。また、NO₂曝露直前まで継続して観察されている。Bp注入にともなう異物性急性炎症もまたNO₂曝露直前にみとめられた。したがって、NO₂+Bp群ではO₃曝露およびBp注入の影響が、NO₂単独群ではO₃曝露の影響がそれぞれNO₂曝露に加算されたと考えられる。しかしNO₂曝露後の観察では、O₃曝露によると考えられる炎症像は消退し、代ってNO₂曝露による末梢気管上皮の過形成がみとめられた。Bp注入後の急性炎症像も

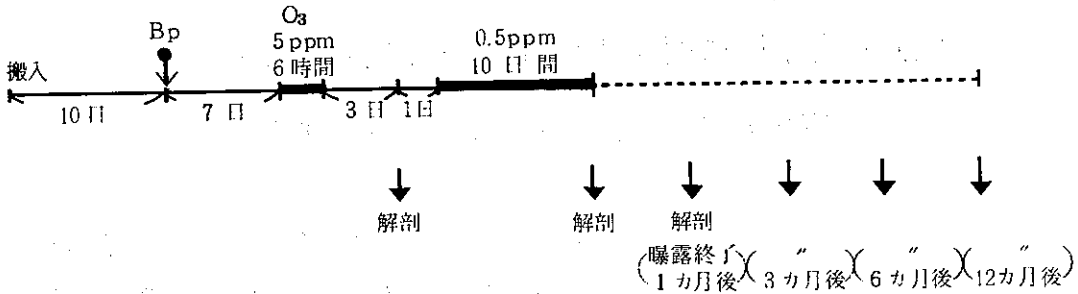


図1 実験方法

NO₂ 曝露終了後1カ月の時点で消退するが、3カ月後、粉じんの再遊出にともなう肺炎が出現し、以後12カ月まで観察されている。NO₂ 曝露による生体反応といわれるリンパ球浸潤は3カ月以後12カ月まで出現頻度に差はあるがみとめられている。これらの結果から、NO₂ 曝露に先行するO₃ 曝露の影響が少なくともNO₂ 曝露の初期には加算的に作用したと考えられる。しかし、NO₂ 曝露終了後に観察される病変は、従来からの記載および前年の実験からNO₂ ガス、および炭粉 (or Bp) による単独或いは複合した影響によるものと判断される。このような観点から考慮するとNO₂+Bp 群に6カ月、1・2カ月の時点でみられた肺胞部における腺様化生はNO₂ 或いは炭粉 (or Bp) の単独または複合影響と考えられる。さらにこの病変がNO₂ 単独群にみとめられないことおよび前年のBp 群にて10カ月の時点で1例に類表皮様増殖をみとめたにすぎないことを考えるとこの病変はNO₂ とBp の複合作用と考えるのが妥当であろう。このような化生病変が前年ではみとめられなかった原因としてはNO₂ 曝露条件の差或いはNO₂ 曝露に先行したO₃ 曝露が考えられる。しかし、端的にその原因を決定することは出来ないが、組織像からNO₂ 曝露直前にO₃ による傷害が残存して居りNO₂ ガスが傷害組織に負荷効果を示したことも十分に原因として考慮し得る。

(2) 免疫学的検討

IgGについてはO₃ 曝露後に有意の低値が実験群にみとめられた。また、IgAに関しては、Bp+NO₂ 群においてO₃ 曝露後に、NO₂ 群でNO₂ 曝露直後にそれぞれ有意に低い値がみとめられた。これらの結果はNO₂ 群に関するIgAの低値もNO₂ 曝露に先行したO₃ 曝露を考慮すると、IgG、IgAの低値はO₃

曝露により惹起されたと考えられる。さらに、前年の結果を対比してみると、前年ではBp注入2週後にIgGの有意な低値を示した以外有意差はみとめられていない。このことを今回の実験と前年の実験との実験条件の差に原因を求めるとすれば、O₃ 曝露の有無に帰着する。しかし、家兎における低濃度O₃ 曝露実験⁴⁾およびNO₂ との交互曝露実験⁵⁾では高値傾向が示されている。従って、今回の結果はデータの提示にとどめるのが妥当と考えられた。

(3) 生化学的検討

O₃ とNO₂ は生体の脂質に対し異なる作用機序を有すると考えられている。⁶⁾ 今回の実験もまた複合的条件設定のもとに行われており、したがって、生化学的検討の対象として脂質の過酸化の状態およびその分解を担うGPO活性を始めとしGOT、GPT、ALP、LDHの各酵素系の変動をBpとの関連を含め検討した。その結果、血清中過酸化脂質含量については、O₃ 曝露後の群で高い値を示しており、明らかに脂質過酸化の影響が現われている。NO₂ 曝露後は、対照との差は見られない。またこの時の血清中GPO活性は、やや高い値を示すが有意ではない。他の血清中酵素については、複雑な動きを示し、NO₂、Bpとの関連は不明であった。ヘマトクリット値については、NO₂ 曝露群が曝露直後で有意に上昇した。

2 病理組織学的検討

(1) 方法

観察時期に達した動物はネブタールで麻酔し、放血殺した。剖検後、肺は喉頭部より気管と共に剔出し、直ちに10%バッファーホルマリンを注入し、原型に復するように膨張させた後、固定液中に浸漬し固定した。以後、型の如くパラフィン包埋、薄切した後HE

染色, PAS, AZAN染色を実施し観察に供した。なお, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 心臓についても併せて検索した。

(2) 結果

Bp+NO₂群: O₃曝露後3日で肺に炭粉(or Bp)による軽度な異物性炎症が見られ, 同時にO₃による肺炎も観察された。NO₂曝露直後では末梢細気管支上皮の軽度過形成が見られたが, O₃による肺炎は見られなくなった。NO₂曝露後1ヶ月で末梢細気管支上皮の過形成および急性異物性炎症は見られなくなったが, NO₂曝露後3ヶ月では肺炎が再度出現し, 以後12ヶ月まで認められた。また, 囲管性および気管支周囲にリンパ球浸潤が2ヶ月で2/3例, 6ヶ月で4/5例, 12ヶ月で2/8例観察された。さらにNO₂曝露後6ヶ月から肺胞部に腺様化生が3/5例みられ, 12ヶ月では8/8例に認められた。

NO₂群: O₃曝露後3日でO₃による肺炎が見られたが, NO₂曝露直後では認められなくなった。しかし, 末梢細気管支上皮の軽度過形成が5/5例観察された。この変化はNO₂曝露後1ヶ月で見られなくなった。なお, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 心臓について著変は認められなかった。

3 免疫学的検討

(1) 方法

ア 血清中IgG, IgA

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)の抗ラットIgG血清(ウサギ)および抗ラット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の濃度は市販のラットIgGを標準に用い, mg/mlの値で, IgA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の値で表わした。

ウ 血清蛋白分画値およびA/G比

セルロースアセテート膜(セバラックス)を用いた電気泳動法(0.5 mA/cm, 60分)を用い, デンシトメーターにより測定した。

(2) 結果(図2参照)

ア 血清中IgG, IgA

O₃曝露後に, Bp+NO₂群およびNO₂群のIgG

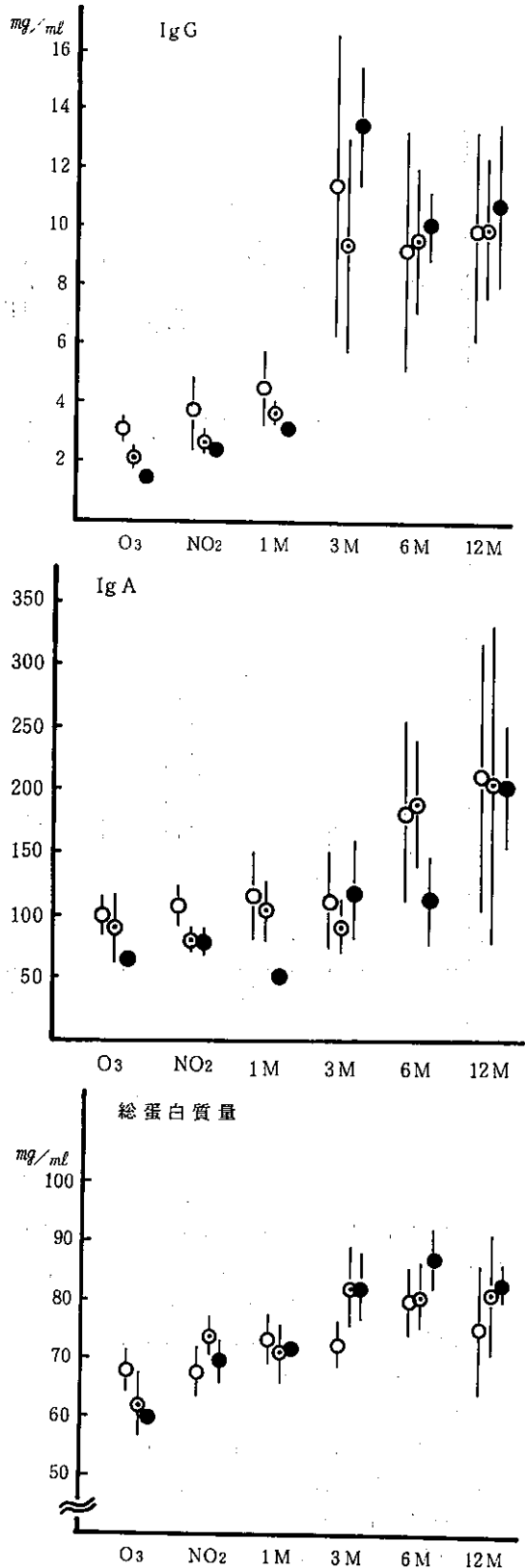


図2 免疫学的検討(1)

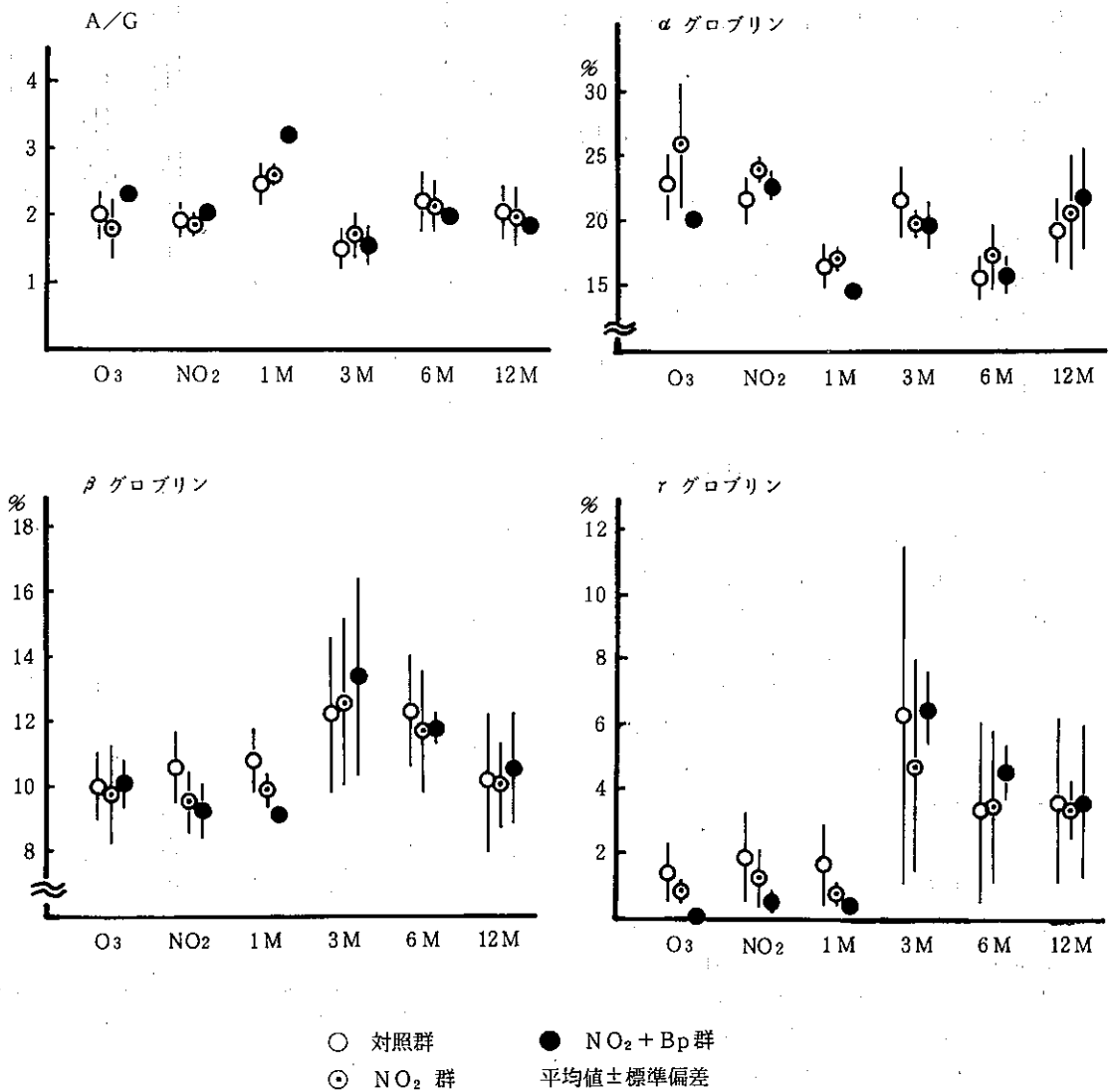


図2 免疫学的検討(2)

が対照群と比較して有意 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) に低い値を示した。この傾向は、有意差はないが、NO₂ 曝露終了後1カ月まで持続した。

IgA値は、O₃曝露後にBp + NO₂群で、NO₂ 曝露直後にNO₂ 群でそれぞれ有意 ($P < 0.05$) に低かった。

NO₂ 曝露終了後3カ月以降は、IgG, IgAともに各群間の差異は認められなかった。

イ 血清中総蛋白質量

O₃ 曝露後にBp + NO₂群が有意に ($P < 0.05$)

に低い値を示し、NO₂ 曝露終了後3カ月にBp + NO₂ およびNO₂ 群で有意 ($P < 0.01$) に高い値を示した。

ウ 血清蛋白分画値およびA/G比
 Bp + NO₂ 群で、O₃ 曝露後にA/G比が有意 ($P < 0.05$) に高く、NO₂ 曝露直後にγグロブリン分画値が有意 ($P < 0.05$) に低かった他は、血清蛋白分画値およびA/G比とも各群間で有意な差は認められなかった。

4 生化学的検討

(1) 方法

今回検討した項目は、血清について過酸化脂質含量 (TBA法)、GOT、GPT、ALP、LDHを、またグルタチオンペルオキシダーゼ (GPO) 活性を測定した。臓器は、肝臓の過酸化脂質含量 (TBA法) および、GPO活性を対照群とNO₂群について測定した。血液は、ヘマトクリット値を測定した。過酸化脂質含量はTBA法により測定し、数値はマロンジアルデヒドのモル吸光係数をもとに算出した。GPO活性は過酸化水素を基質とするPaglia, D. E. and Valentine, W. N.の方法によった。⁷⁾肝臓は生理食塩水で灌流後、剔出し20%ホモジネートとなるよう等張リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、ホモジナイズし、900×g、15分、4°Cで遠心分離し上清を試料とした。血清中GOT、GPT、ALP、LDHについてはRa BA 3010 (中外製薬) を用い測定した。

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。

(2) 結果 (図3参照)

血清中過酸化脂質含量については、O₃ 曝露後の群では高い値を示し、明らかに脂質過酸化の影響が見られた。NO₂ 曝露後については、防御系亢進のためか、特に差は見られない。この時の血清中GPO活性はやや高い値を示すが有意ではない。この後の血清中過酸化脂質含量は、差の大きなものもみられるが、複雑な動きをしておりNO₂ Bpとの関連は明らかではない。また、血清中GPO活性は、NO₂ 曝露後1ヶ月でやや下がり、3ヶ月で上昇するが、いずれも10%程度の変動であった。肝臓については、脂質過酸化の影響を検索するため、過酸化脂質含量、GPO活性を対照群、NO₂ 群について測定した。NO₂ 曝露後1ヶ月以後、時間を経ると肝中過酸化脂質含量については、

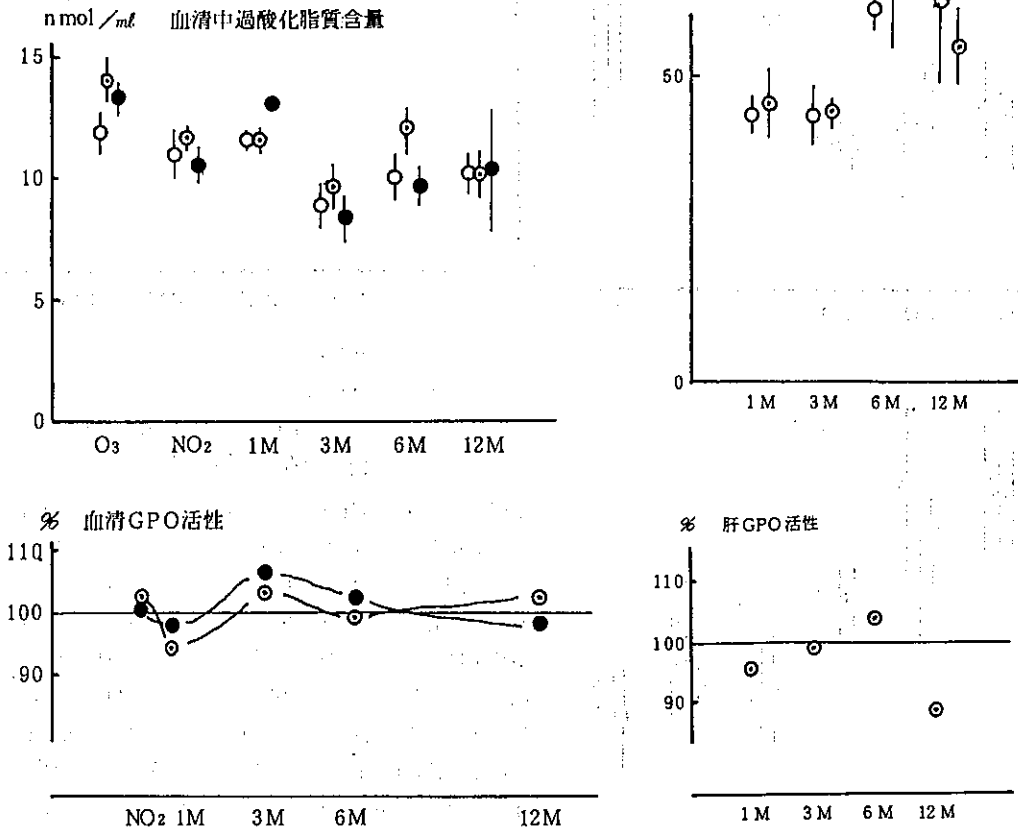


図3 生化学的検討(1)

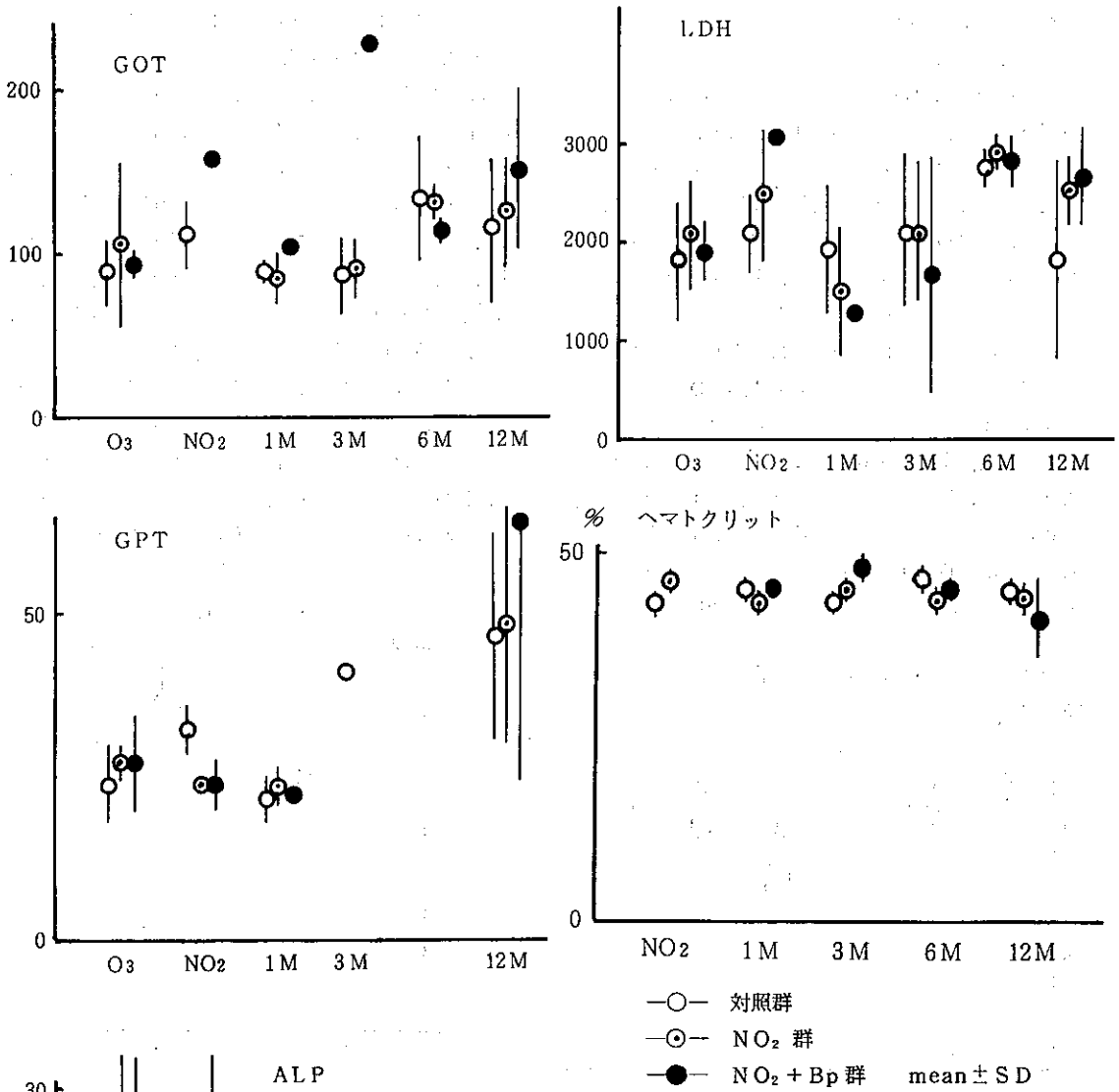


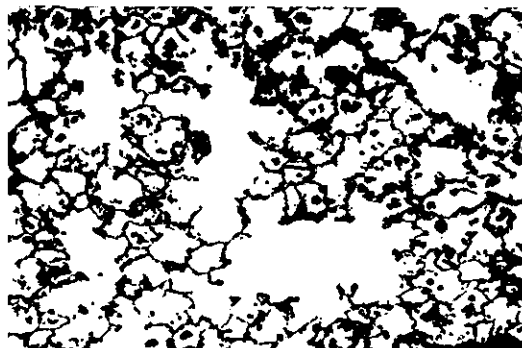
図3 生化学的検討(2)

対照との差はみられない。過去のデータでは、肝の脂質過酸化を示すものもあるが、いずれも曝露直後であり、時間を経ると代謝され減少するものと考えられる。肝GPO活性は有意な変化はみられなかった。血清中GOTについては、NO₂曝露直後のBp+NO₂群で高い値を示した。組織との関連をみると、O₃曝露の影響が大きく、肺炎が起きているがそれと、血清中各酵素活性との関連は希薄であった。曝露後6ヶ月、12ヶ月目については、個体のばらつきが大きくなり差は見られない。ヘマトクリット値については、NO₂群がNO₂曝露直後で有意に上昇している。他の期間

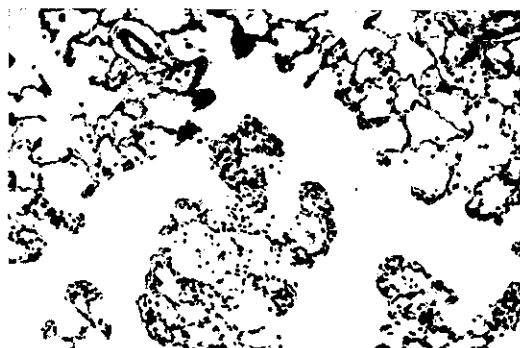
については一定の傾向は見られない。O₃ 曝露においては、曝露群でHtが上昇する傾向が見られるが、NO₂ 曝露後に同様の反応があったと考えられる。今回のO₃ およびNO₂ 曝露は明らかに脂質過酸化の影響をおよぼしたと考える。

参 考 文 献

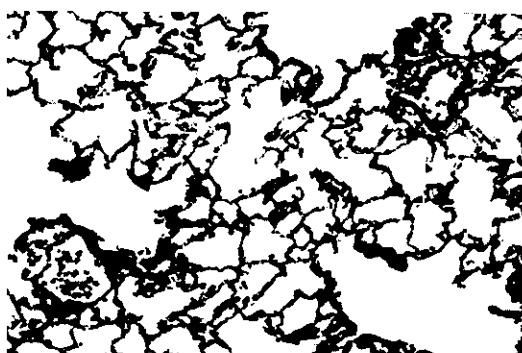
- 1) 遠藤立一ほか：NO₂ ガス曝露ラットの発癌に関する研究，東京都公害研究所年報，255（1981）。
- 2) 山本法，蓮沼広子：老令Wistar-JCLラットにおける上皮組織の病変について，埼玉県立衛生短期大学紀要，4，15，（1979）。
- 3) 浪江健二：塵肺の組織学的研究，お茶の水医学誌，15，（1），21，（1967）。
- 4) 遠藤立一ほか：低濃度O₃ 曝露による有害性の検討，東京都公害研究所年報，245，（1981）。
- 5) 遠藤立一ほか：大気汚染の生体に及ぼす影響，東京都公害研究所報告書，101，（1978）。
- 6) Roehm, J. N. *et al.* : Oxidation of Unsaturated Fatty Acids by Ozone and Nitrogen Dioxide, *Arch. Environ. Health*, 23, 142, (1971)。
- 7) Paglia, D. E., W. N. Valentine : Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, *J. Lab. and Clin. Med.*, 70, 158, (1967)。



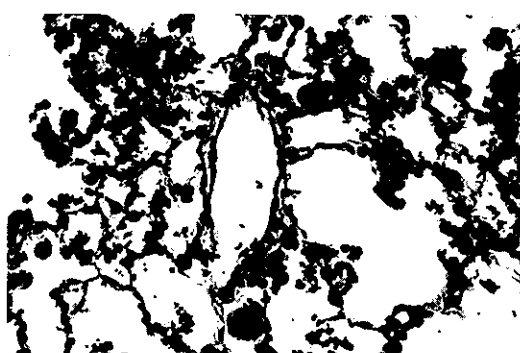
粉じんとO₃ 曝露による急性異物性肺炎, Bp注入後10日目およびO₃ 曝露後3日目 Bp + NO₂ 群, × 100



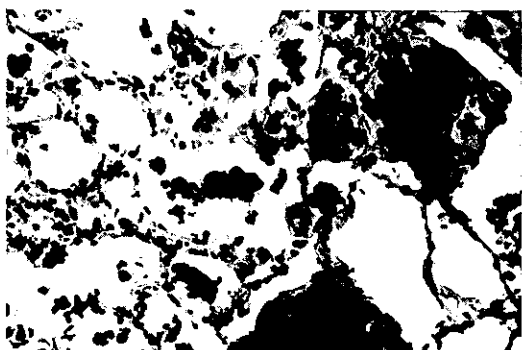
O₃ 曝露による肺胞炎
O₃ 曝露後3日目, NO₂ 群, × 100



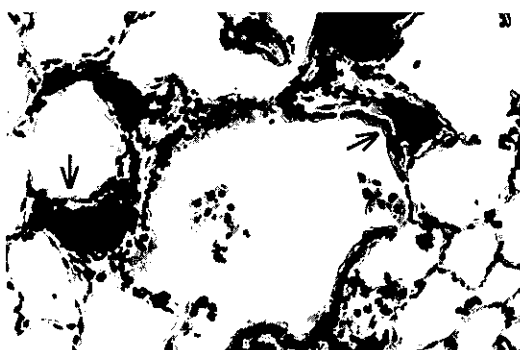
NO₂ 曝露による末梢細気管支の軽度増殖, NO₂ 曝露直後, NO₂ 群, × 100



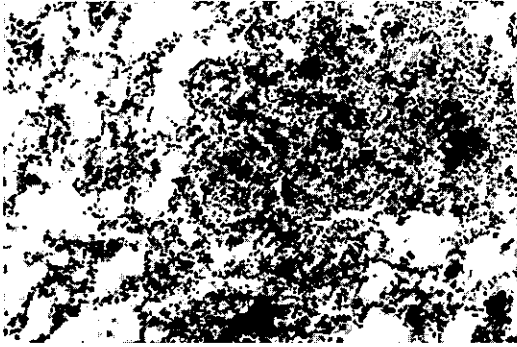
異物性肺炎, NO₂ 曝露後3ヶ月, Bp + NO₂ 群, × 200



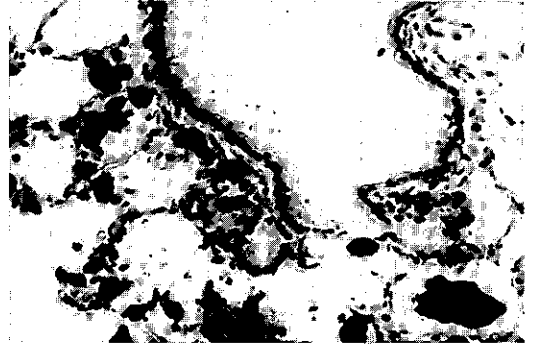
異物性肺炎, NO₂ 曝露後3ヶ月, Bp + NO₂ 群, × 200



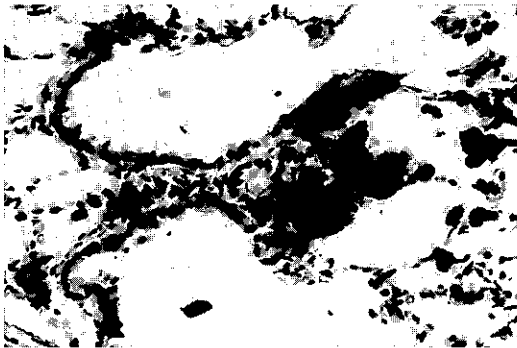
異物性肺炎, 炭粉 (Bp) が肺胞中隔に取り囲まれている (矢印), NO₂ 曝露後3ヶ月, Bp + NO₂ 群, × 200



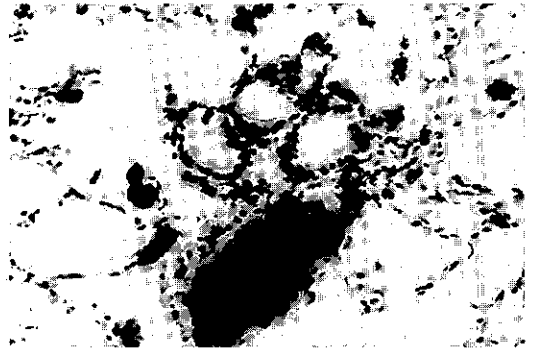
粉じんによる異物性肺炎, NO₂ 曝露後 3 ヶ月,
Bp + NO₂ 群, ×100



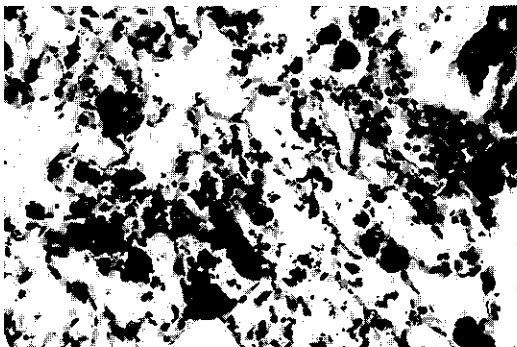
末梢細気管支近位に見られた腺様化生, NO₂ 曝露
後 6 ヶ月, Bp+NO₂ 群, ×200



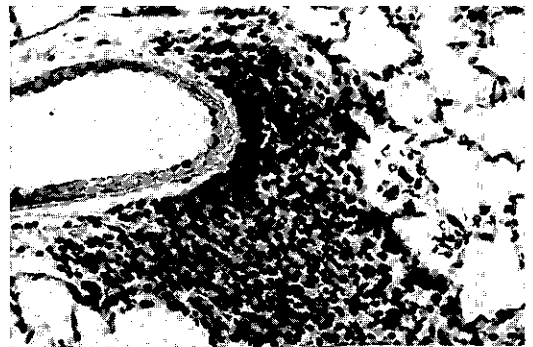
腺様化生, NO₂ 曝露後 6 ヶ月 Bp+NO₂ 群, ×200



腺様化生, NO₂ 曝露後 6 ヶ月 Bp+NO₂ 群, ×200



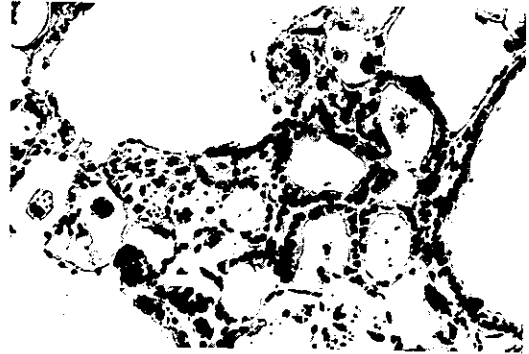
粉じんによる異物性肺炎, NO₂ 曝露後 6 ヶ月,
Bp + NO₂ 群, ×200



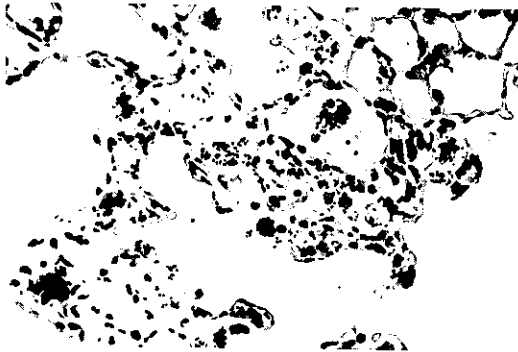
リンパ球の囲管性浸潤, NO₂ 曝露後 6 ヶ月,
Bp + NO₂ 群, ×200



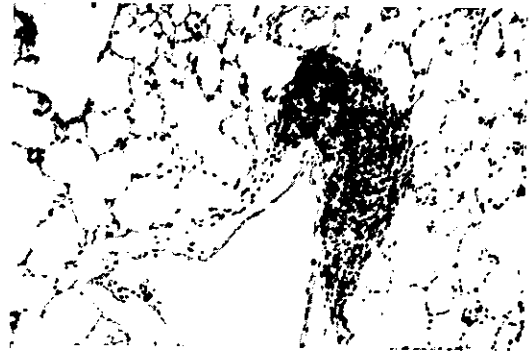
末梢細気管支近位のリンパ球浸潤NO₂ 曝露後6ヶ月, Bp + NO₂ 群, ×200



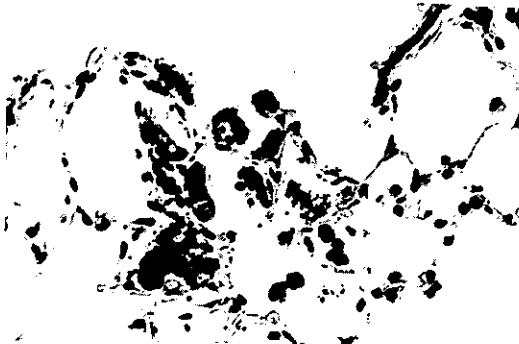
末梢細気管支近位に見られた腺様化生, NO₂ 曝露後12ヶ月, Bp + NO₂ 群, ×200



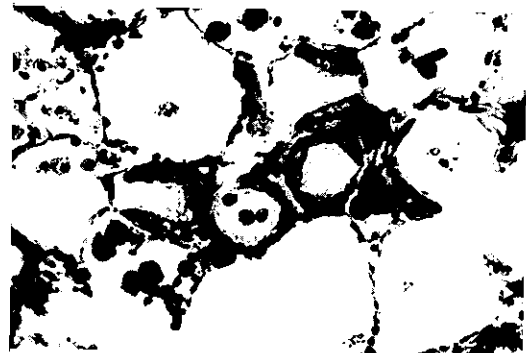
粉じんによる肺肺炎, 浮腫が見られる, NO₂ 曝露後12ヶ月, Bp + NO₂ 群, ×200



リンパ球の囲管性浸潤, NO₂ 曝露後12ヶ月, Bp + NO₂ 群, ×100



肺胞に見られた腺様化生, NO₂ 曝露後12ヶ月, Bp + NO₂ 群, ×200



腺様化生, NO₂ 曝露後12ヶ月, Bp + NO₂ 群, ×200