

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 第三報 -

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 浪江 健二 山本 法
 (東京都研究員) (埼玉県立衛生短期大学)
 蓮沼 広子 渡辺 慶一
 (埼玉県立衛生短期大学) (東海大学医学部)

1 はじめに

光化学オキシダントの構成成分のうちで量的に主体を占めるオゾン(O₃)の環境大気中での許容濃度域値について現行の環境基準値は、疫学および動物実験の成績に基いて作成されている。しかし、この基準値が現在の都市域において、望ましい値であるか、否かについては、環境大気中に共存する、他の有害物質との相加、相乗作用についての研究が少ない事他に、ラット、マウスによるデータが主体を占める点が考慮されねばならない。これらの動物は、有害ガス体に対する抵抗性が強く、¹⁾ 実験成績の利用に難かしい面も考えられる。我々の行った家兎による低濃度O₃の曝露実験は、これらの諸問題を解決するために、従来試みられることの少なかった方法論(5免疫細胞化学的検討)を加えて検討を行った。本報告では、O₃の0.08 ppm曝露の結果、従来と異なった知見が得られたので、以下にその成績について論述する。

表1 0.08ppm実験系曝露期間および動物数

	曝 露 期 間					計
	72時間	2週	3週	1ヶ月	6ヶ月	
O ₃ 曝露群	5	5	5	5	5	25
対 照 群	5	5	5	5	3	23
計	10	10	10	10	8	48

(1) 実験の方法

ア 材料および方法

実験に用いた家兎はヒマラヤン種5ヶ月令の雄で、SPFレベルのものである。群数および頭数は、表1に示すとおりである。

イ 曝露の方法

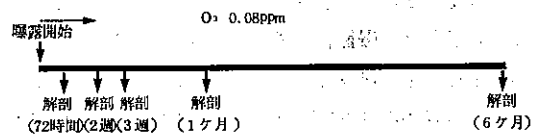


図1 実験方法

曝露に用いた装置は、1981年の年報で報告したものと同一の装置である。曝露の条件は前報に述べたとおりで可能な限り実験への干渉となる諸因子を除外すべく、NO_x、O₃、SO_xについては各々0.02 ppm以下、粉じんは0.3μ以下に浄化した空気を用いて、O₃の稀釈、対照群の飼育を行った。家兎の曝露濃度はO₃0.08 ppm ± 5%に保った。

(2) 検討方法

病理組織学、生化学、免疫学の手法を用いて検討を行った。即ち病理学では、光学顕微鏡、電子顕微鏡(透過型、走査型)による形態学的観察を主として行った。生化学は組織(肺臓、肝臓)、血清中の過酸化脂質量の経時的推移について検討するとともに臓器、血清中の酵素類(GPO, G6PD)の変動について測定を行った。また、免疫学では、血清中IgG, IgA, 総蛋白質量、血清蛋白分画値、A/G比の測定を行った。

(3) 結果

本年は、前年に比べ短期間の曝露であったが、前年、前々年の実験で提起されたいくつかの問題点について留意のうえ検討を行った。今回の成績のうちで重要なものは次のとおりである。病理組織学上透過型電顕を用いて得られた鼻粘膜(曝露期間2週以上)の線毛の脱落、微絨毛を有する細胞の増加、肺領域で曝露2週

以後から始まるI型肺胞上皮 (Type I pneumocyte =Ipc) の滑面小胞体 (sER) 又は Smooth Vesicles の増加, また, 3週曝露群から認められるI-ipcとII-ipcの中間型を示す細胞の出現並びに6ヶ月曝露群に見られた肺胞壁毛細血管の透過性の亢進である。これらの変化は, 肺並びに肝の過酸化脂質の増加とそれに対応するGPOの活性値の変動として表れたものと何らかの関わりを有するものと推測された。(各論参照)。また, 生化学の分野では, 肝臓中過酸化脂質量の曝露初期(72時間曝露)からの増加は, 従来報告されていない。この現象は吸入されたO₃の酸化により生じた物質が, 全身性の影響を生体に与える可能性を示唆するものとして, 重要な所見と考えらる。他方A/G比の変動は, 曝露初期(72時間曝露)から低下の傾向を示し, 1ヶ月曝露群で有意な低下を示しており, 体内の炎症の存在を間接的に肯定するものと推測される。

(4) 考察

以上の成績から次のことが考えられた。即ち, 透過型電顕による観察結果からO₃ 0.08 ppmの曝露による影響は, 鼻腔, 肺の上皮系の変性, 異形細胞の出現を招き, 長期にわたる曝露は肺毛細血管壁の透過性の亢進を示す。他方, 生化学で認められた変化は, O₃と接触した部位の変化のみでなく, 全身にO₃吸入の影響の

及ぶことを示しており, この点は将来の解明を必要とするが, O₃による過酸化物の循環系への侵入について, 部位, 生成物について重要な所見であろう。また, A/G比の減少は, 間接的にこれらの事実の裏付けとなるものと考えられる。従来の多くの研究報告が少数の例外を除き, O₃の全身影響の機構的解明は脂質酸化系についてであるが, 更に重要な成果を得る足掛りとなる可能性もある。また, O₃曝露に対する過酸化脂質代謝系機能低下が6ヶ月に到る迄代償されないことは, 都市域居住者にとって負の要因と考えられた。これらのことから, 今回の実験で0.08 ppmと云う低濃度にかかわらず, 器質的にも生化学的にも有意な影響が早期に出現し長期間持続したことが証明されたのは, 注目すべき点と考えられる。

2 病理組織学的検討

(1) 光学顕微鏡による観察

ア 材料および方法

観察時期に達した動物をネンブタール麻酔下で開腹し, 門脈からカニューレを挿入, 生理食塩水による灌流, 脱血の後, 鼻, 喉頭, 気管(支), 肺臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 膀胱, 脳, 副腎を摘出し, バッファーホルマリン液で固定した。なお, 肺は同液を気管

表 2 O₃ 曝露による出現病変例数

			72時間	2週間	3週間	1ヶ月	6ヶ月
鼻 中 隔 粘 膜 上 皮	化生性病変	O ₃ 曝露群	0	5	4	3	5
		対照群	0	0	0	0	0
	線毛消失	O ₃ 曝露群	0	5	5	5	5
		対照群	0	0	0	0	0
	杯細胞の機能亢進	O ₃ 曝露群	0	1	4	5	5
		対照群	0	0	0	1	0
偽好酸球浸潤	O ₃ 曝露群	0	1	3	4	3	
	対照群	0	0	0	0	0	
腹粘 鼻 膜 上 皮	上皮の増殖肥厚	O ₃ 曝露群	0	5	2	5	5
		対照群	0	0	0	1	0
	杯細胞の機能亢進	O ₃ 曝露群	0	1	2	3	4
		対照群	0	0	0	2	0
	偽好酸球浸潤	O ₃ 曝露群	1	4	2	5	2
		対照群	0	0	0	1	0
鼻 腔	鼻汁	O ₃ 曝露群	1	5	5	5	5
		対照群	0	0	0	2	0

より注入し、膨張させた。固定完了後、パラフィン包埋、薄切の後、HE染色を主に必要に応じ、PAS、AZAN染色を実施し観察に供した。

イ 結果 (表2)

曝露2週間で鼻中隔粘膜において線毛の消失(写真2)、化生性病変(写真3)、上皮の増殖肥厚(写真4)、杯細胞機能亢進(写真6)、偽好酸球浸潤(写真7)、が存在した。これらの変化は6ヶ月まで継続して見られた。同様に腹鼻甲粘膜においても杯細胞機能亢進(写真10)、偽好酸球浸潤、上皮の増殖肥厚(写真12)が認められ、鼻腔内には剝離上皮、粘液、偽好酸球等より構成された鼻汁(写真8)が存在した。肺においては曝露群と対照群間で差は認められなかった(写真13)。また、扁桃、喉頭、気管(支)、肝臓、腎臓、脾臓、心臓において著変は見られなかった。

(2) 電子顕微鏡による観察

ア 材料および方法

電子顕微鏡の観察に用いた家兎は、オゾン曝露群延5群20羽、対照群延5群15羽の計35羽である(表1)。検討の対象とした臓器は、透過型電子顕微鏡(TEM)では鼻粘膜、扁桃、気管、肺を用い、走査型電子顕微鏡(SEM)は鼻粘膜、扁桃、喉頭、気管である。各臓器は摘出後直ちに一部を切出し、リン酸緩衝液でpH7.2に調整した2%グルタルアルデヒド溶液にて4℃3時間の固定後、リン酸緩衝液で洗滌し、1%四酸化オスミウムで4℃2時間の固定を行った。TEM観察の材料は上昇アルコール系列にて脱水し、QY-Iにて置換の後エポキシ樹脂にて包埋した。包埋試料はLKB8800型超ミクロトームにより超薄切片を作製の後、酢酸ウラン、鉛の二重染色を行いJEM100C型透過顕微鏡で観察、撮影を行った。SEM観察の材料は上昇アルコール系列にて脱水の後、酢酸イソアミルによる置換を行い、臨界点乾燥装置で乾燥のうえイオンスパッター装置で金の被覆後、JSM-35型SEMによる観察並びに撮影を行った。

イ: 結果

(7) 透過型電子顕微鏡による観察

鼻粘膜: オゾン(O₃)曝露群(写真14)が対照群に比し異なった変化を示すのは今回の実験群では2週曝露群からで、写真15に見られるとおり線毛の短小化したものから、写真16に見られるように微絨

毛を有する細胞の増加を見る。これらの細胞の多くは、細胞質内に小空胞が増していた。同様の変化は、3週曝露群で高頻度に認められた(写真17)。この変化はSEMによっても観察されている(後述)。線毛の減少、微絨毛化は1ヶ月曝露群、6ヶ月曝露群でも認められており、更に1ヶ月曝露群では写真18に見られるとおり、細胞内小器管の崩壊消失を伴う顕著な水腫が出現する。6ヶ月曝露群では、これらの変化は減少するが、1例かなり大きな所謂Post nuclear vacuoleを示すものがあつた。

扁桃: O₃ 0.08 ppmの全観察例について、認むべき変化はなかった。

気管支粘膜: 全例に認むべき変化はなかった。

肺(肺胞): 全例(実験群、対照群)を通じて、II型肺胞上皮細胞の多くにコレステロール乃至はその他の脂質によるものと思われる結晶状の物質の蓄積が認められた。これは、他の実験動物には見出さないものである。O₃曝露72時間群迄は著変はないが、曝露2週群からは肺胞上皮細胞に特色のある変化を見た。曝露2週群ではI型肺胞上皮細胞(Type I pneumocyte以後I-pcと略す)がやや厚みを増し肺胞腔面の表層に凹凸が激しくなる(写真20)。また、その細胞質中には小空胞(Smooth Vesicles)が甚しく数を増す。さらにI-pcにしては、細胞質が厚く、大きく、II型肺胞上皮細胞(Type II pneumocyte以後II-pcと略す)にしては胞質が狭く所謂Osmiophilic Lamellate Bodyは見られないI-pcとII-pcの中間型の細胞の出現を見る。また、II-pcの数がやや増加するものが多く、変性、崩壊に陥っている場合がある(写真21)。曝露3週では極めて特色のある細胞(写真22)の出現を見るようになる。すなわち、曝露2週群でも観察されたような、I-pcとII-pcの中間型の細胞で、Smooth endoplasmic reticulum(sER)ないしはSmooth vesiclesが激増し、その細胞質をほぼ一杯に充満している。曝露1ヶ月群の肺の変化は曝露3週群のほぼ延長線上に並ぶものである。この実験群では、典型的なI-pcの細胞質中にも、上記sERあるいはSmooth vesiclesの減増した像が認められる(写真23)。さらに、肺毛細血管内皮細胞にもかなりの変性像が認められる。6ヶ月曝露群でも3週、1ヶ月曝露群のものと同様な特異な細胞が認められるが、I-pcの変性はさらに著しくなっている(写真24)、また、肺胞隔壁中

に水腫様の変化がしばしば認められる(写真25)

(f) 走査型電子顕微鏡(SEM)による観察

鼻粘膜:呼吸部と嗅部では、呼吸部に変化が観察された。O₃曝露2~3週群では、線毛はその長さを減じ、所々線毛の替りに微絨毛を有する無線毛細胞の出現を見る(写真27)、1ヶ月、6ヶ月曝露群でもこれらの変化は進行している(写真28)

扁桃:O₃曝露群に特有の変化は認めない。

喉頭:O₃曝露2週以後の各群に線毛上皮と扁平上皮との移行部附近の線毛上皮細胞の線毛の短小化、無線毛細胞の漸増が観察され、6ヶ月曝露群では、無線毛細胞のあるものは、細胞膜の破綻によると思われる表面の陥凹像が観察された。

気管:特記すべき変化は、観察されない。

ウまとめ

本年度は0.08 ppm O₃の比較的短期間(72時間、2週、3週、1ヶ月、6ヶ月)の実験を超微形態的に観察した。その結果と問題点は、次のとおりである。

① 上気道から肺に到るまでの諸組織の変化は今回実験の範囲内では曝露2週から見られた。

② 上気道の変化は主に線毛上皮細胞に生じ、扁平上皮細胞は殆んど変化を示さない。この線毛上皮細胞の変化の主体は線毛の短小化と消失である。なお、線毛上皮でも気管のそれは、殆んど有意な変化を示さない。

③ 肺胞においても著明な変化は2週曝露群から見られるが、その主体はI-pcにあるように思えた。I-pcは2週曝露の時点で細胞質の厚さを増し、その細胞質中には、sER或はSmooth vesiclesの際立った増加が認められた。この変化は3週曝露群で観察された特異な細胞、すなわち、I-pcとII-pcの中間型と思える細胞の細胞質を充満するように、sER或はSmooth vesicles(SV)の極端な増加を示す変化に直結するものと思われた。このsER、SVの激増する変化は、肝におけるPhenobarbital傷害に類似が求められ、肝細胞におけるミクロソームの脂質過酸化の増加とその防禦機構の一つであるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPO)の減少、活性低下などと類似の現象がI-pcにも起こっている可能性が強く示唆された。O₃によるこのようなI-pcの変性、崩壊、そのreplace(補填)のためのII-pcの増生を招き、これがI-pcへと成熟して行く過程であるものは、I-pc

とII-pcとの中間型の細胞の出現を招くようになるものと思われる。O₃の6ヶ月曝露では、前年度の長期曝露群の場合と同様、肺胞毛細血管の透過性亢進を招き、肺胞隔壁に水腫性変化を示すものがあり、病変の慢性化のきざしを示している。既述のとおり、O₃、0.08 ppmの比較的短期間曝露で、前年度の長期曝露実験で観察されたと同様な細胞傷害、病変が確認され、O₃曝露による初発病変の実態を把握することが出来た。

3 生化学的検討

オゾンの毒性発現の機構は、その酸化性由来し、生体内でフリーラジカル反応により不飽和脂肪酸等の生体物質を過酸化するためとされている。過酸化脂質は生体膜、酵素系等に障害を与えることがわかっており、最近では、血管障害、間質性肺炎などとの関連が報告されている。この過酸化脂質を代謝する酵素にグルタチオンペルオキシダーゼがあり、いわゆるPMP系(Peroxidative Metabolic Pathway)酵素のひとつである。また、この系に連関する、ペントースリン酸系路があるが、この系はPMP系にNADPHを供給する系とされている。このペントースリン酸系路の中にグルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)がある。この酵素はNADP⁺によって律速されており、GSSG(酸化型グルタチオン)の還元に共役している。

今回検討したのは、過酸化脂質量(TBA値)および酸素であるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPO)、グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)を測定した。TBA値は血清、肺、肝臓について、また、G6PDは肺について測定を行った。

(1) 方法

動物は、ネブタール麻酔下で開腹し、後大静脈より採血し、凝血後2500 rpm × 15 min 遠心し血清を分離した。この後、生理食塩水で灌流を行い血液をできる限り除き、臓器を剔出した。採材部位は、肺では左肺後葉、肝臓は辺縁を用いた。臓器は密封して-80°Cで用時まで保存した。

過酸化脂質の測定法は種々あるが、一般にチオバルビツール酸との反応生成物をもって過酸化脂質量とする、TBA法が生体試料については用いられている。これは直接、過酸化脂質と反応するものではなく、その分解生成物であるマロンジアルデヒドと反応し呈色するとされている。しかし、感度のよいこと、また操作

が比較的簡単なため生体試料については多用されている。今回の測定は前報同様この方法で行った。臓器のホモジネート調製は、pH7.0の等張リン酸緩衝液を用いポッター型ホモジナイザーで作成した。この後900g×15min, 4℃で遠心し上清を試料とした。酵素活性については、GPOは過酸化水素を基質とする方法³⁾で、G6PDはKornberg法により、試薬はペーリンガーマンハイム社のキットを用いた。ヘマトクリットはマイクロヘマトクリット法、タンパク質量はビュレット法で測定した。

(2) 結果 (図2参照)

血清TBA値をみると、72時間でO₃群が対照に比してやや低い値をとり、その後2週、3週、1ヶ月、6ヶ月では逆にやや高い値を示した。この時の血清GPO活性は、1ヶ月でやや低下している。肺TBA値については、72時間でO₃群がやや低い値を示し、その後はほぼ対照群と同じかやや高い値を示している。肺GPO活性は6ヶ月でやや低下している。次に肝TBA値をみると、72時間でO₃群が対照に比して有意(P<0.05)に高い値を示し、また3週でもO₃群が有意(P<0.05)に高い値を示した。3週以後1ヶ月、6ヶ月もO₃群が高い値を示している。このときの肝GPO活性をみるとTBA値と対応して72時間で低い値を示し(P<0.1)、また3週でも低下している。次に肺G6PD活性でタンパク質量を基準とする比活性でみると対照群に比しO₃群が、いずれの期間もやや低い値を示しているが有意な変化ではなかった。以上より、肝臓においてはオゾンによる過酸化の影響が比較的早い時期から現われ、その代謝系も変化していることがわかった。また、

有意ではないが血清、肺で72時間でTBA値が低下し、後上昇する傾向がみられ、代謝の変化のパターンを示唆するとも考えられる。オゾンの影響は、体内のGSH代謝、抗酸化物質であるビタミンEなどと大きく関連していると考えられ、また、今回でも示されたようにその影響は肺のみならず全身的なものであることが明らかになった。

4 免疫学的検討

(1) 方法

解剖時に後大静脈より採取した血液から血清を分離し検体とした。IgG, IgAは、単純放射状免疫拡散法により定量し、IgGは、市販のウサギIgGを標準に用いmg/mlの値で、IgAは、対照群の値を100として相対値で表した。総蛋白質量は、ビュレット法で定量し、牛血清アルブミンを標準に用いmg/mlの値で表した。血清蛋白分画値およびA/G比は、セルロースアセテート膜による電気泳動法を用いデンストメーターで測定した。

(2) 結果 (図3参照)

IgGは、72時間以降1ヶ月曝露群までは、平均値が対照群と比べやや高かったが有意差はなかった。6ヶ月曝露群は、対照群と同じレベルを示した。IgAは、1ヶ月曝露群の平均値がやや低かった他は、対照群と同値あるいはやや高かったが、有意差はなかった。

総蛋白質量は、3週以降、1ヶ月、6ヶ月曝露群でやや低い値を示したが、有意な差ではなかった。

A/G比は、72時間、2週曝露群でやや低く、1ヶ月曝露群では有意(P<0.01)に低かった。なお、1

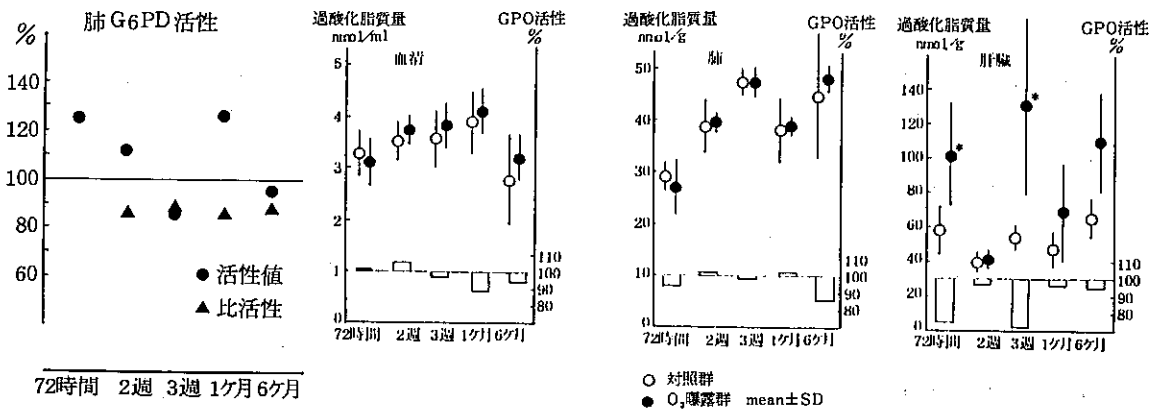


図2 生化学的検討

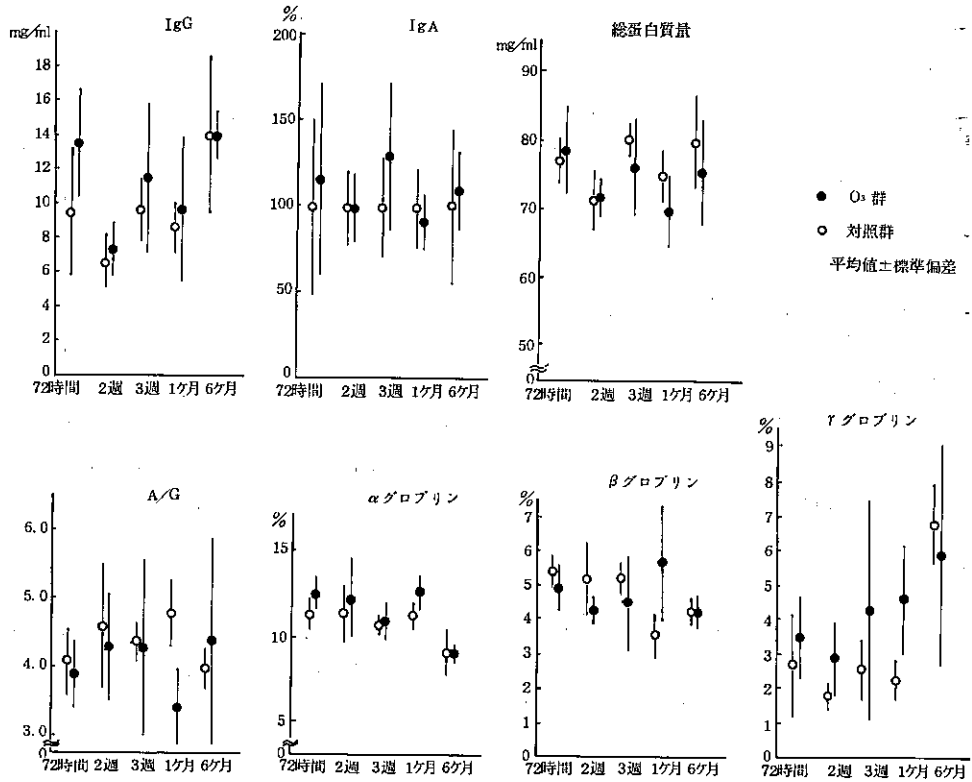


図3 免疫学的検討

ヶ月曝露群の α 、 β 、 γ グロブリン分画値は、それぞれ有意 ($P < 0.05$) に高かった。3週、6ヶ月曝露群では、個体差が大きかった。

家兎のO₃ 0.08 ppm曝露実験は、54年度に開始され、本年度は最終年度であるため、以下に3年間のまとめを記す。

ア 血清中I_GG、I_GA

I_GGは、54年度の1ヶ月曝露群、および55年度の6ヶ月曝露群で有意 ($P < 0.01$) に高い値を示した。その他の曝露群では、有意差は認められなかったが、平均値では、54年度の1週、2週、3ヶ月曝露群で低い値を示した他は、55年度の2ヶ月、11ヶ月、56年度の72時間、2週、3週、1ヶ月曝露群ともに高い値を示した。56年度の6ヶ月曝露群は、対照群と同値であった。

I_GAは、56年度の1ヶ月曝露群で平均値がやや低い値を示し、また、2週曝露群で同値であった他は、すべての曝露群で、平均値がやや高い値を示した。しか

し、どの群も有意差は認められなかった。

以上、O₃ 0.08 ppm曝露は、O₃ 1ppm⁴⁾あるいはO₃ 0.2 ppmとNO₂ 1ppmの交互曝露⁵⁾時同様、血清中I_GG、I_GAレベルを上昇させる傾向がうかがえたが、明らかな有意差を示すには至らなかった。

イ 血清蛋白質質量

54年度の1週、56年度の72時間、2週曝露群でやや高い値を示したが、3週以降の曝露群では同値あるいは、やや低い値を示した。しかし、どの群も有意差は認められなかった。

ウ A/G比

55年度の6ヶ月および56年度の1ヶ月曝露群で有意 ($P < 0.01$) に低い値を示した。

5 免疫細胞化学的検討

肺は脂質代謝の最も盛んな臓器のひとつであり、大気中に含まれる種々のオキシダントにより、脂質過酸化を受け易いと考えられる。そこで、我々は呼吸作用

表4 肺GPO活性とTBA値

平均値±SE

期 間	GPO 活 性 u/g lung		GPO 比 活 性 u/mg prot		TBA値nmol/g lung	
	C	O ₃	C	O ₃	C	O ₃
曝露直前	15.6±0.8	—	0.10±0.01	—	70±2	—
48 時間	14.5±0.6	15.2±0.5	0.12±0.01	0.11±0.01	74±1	73±3
1 週	17.1±0.6	16.9±1.2	0.18±0.01	0.16±0.01	89±3	84±3
2 週	13.9±0.4	14.5±0.4	0.16±0.01	0.19±0.01	79±3	77±3
1 ヶ月	19.7±1.0	21.2±0.9	0.24±0.01	0.27±0.01*	90±5	122±14*

C:対照群 O₃:曝露群

* P<0.05

の現場であり、酸素の取り込みが最も多く、さらに細胞内物質移動に必要な細胞内小胞 (pinocytotic vesicles) に富んだ肺上皮および肺胞毛細血管領域を選び、オゾン曝露の影響を脂質過酸化の状況とその細胞傷害性の観察、および修復因子としてのグルタチオンペルオキシダーゼを電顕酵素抗体法による局在変動観察で検討した。

表3 GPO 局在実験系曝露期間および動物数

	曝 露 期 間					計
	曝露直前	48時間	1週	2週	1ヶ月	
O ₃ 曝露群	—	10	10	10	10	40
対 照 群	10	10	10	10	10	50
計	10	20	20	20	20	90

(1) 方 法

供試動物はウィスター系雄ラット、7週齢(体重約200g)、90頭について表3のようなオゾン曝露を行った。オゾン濃度は0.2ppmで曝露を行った。生化学的検討は、各群ラットの血清、および採取した肺の1/3について、TBA法による過酸化脂質の測定、Awasthi法によるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPO)の活性測定を行った。形態学的観察は、各群ラット肺について光顕による通常組織化学的観察、通常電顕による超微形態学的観察、アルカリフォスファターゼの酵素組織化学的観察、光顕および電顕によるGPO局在の酵素抗体法による3観察を行った。通常電顕観察については、肺を2.5%グルタルアルデヒドおよび1%オスミウム酸による二重固定後、Queto1 812に包埋し、これより超薄切片を作製し、ウラン、酢酸鉛による二重

染色を行い電顕観察した。アルカリフォスファターゼの組織化学的観察については、4%フォルモルカルシウムで固定後、6μmの凍結切片を作製し、これについてBurstonの変法(アゾ色素法)により染色した。GPO局在観察についてはMcLean-Nakaneによる2%PLP(Periodatylsine-paraformaldehyde)液で固定した後、8μmの凍結切片を作製し、これについて、Nakaneによる酵素抗体法染色を行った。

(2) 結果と考察

生化学的検討では、1ヶ月のO₃群の肺で表4に示すようなGPOの活性とTBA値の僅かながら有意の上昇が認められた。血清については特に変化は認められなかった。

光顕による形態学的観察では、変化は認められなかったといって差支えない。

通常電顕観察では、昨年度本研究におけるオゾン0.5ppm曝露肺ほどではないが、I型およびII型肺胞上皮細胞、肺胞毛細血管内上皮細胞の変性、変形、あるいは増生などの変化が曝露1週の群を主体に認められ、曝露1ヶ月ではむしろ変化は軽減しているように思われた。以下要約すると、曝露48時間では、粗面小胞体の拡張を主体としたI型肺胞上皮細胞の軽度の腫張(写真30,31)が見られ、また長く伸びた細胞突起の表面の凹凸不整形(矢印)も認められる。さらに、II型肺胞上皮にも、いわゆるラメラ構造の変形、腫大、増加が散見される。

曝露1週では、さらに上記の傾向が強まり、1例ではI型肺胞上皮細胞の極度の空胞化も認められた(写真32)、また、他の一例では、肺胞毛細血管内皮の水腫が著しかった(写真33)。これらの変化は、GPO局在観察でI型肺胞上皮細胞でのGPOの減少(曝露1、

2週)に相当し、同酵素による脂質過酸化防御の減退による変化と考えられる。また、II型肺胞上皮細胞の軽度の増生も認められるが(写真34)これは崩壊したI型肺胞上皮細胞の補強のためと考えられる(I型肺胞上皮細胞の補強はII型肺胞上皮細胞の増生によって行われるとされている)。曝露2週でも、上記とほぼ同様の変化(写真35)が認められたが、1週よりやや軽減しているように思われた。

曝露1ヶ月では、肺胞の変化はかなり軽減し、幼若な核を持つI型肺胞上皮細胞の出現が目立ち、その細胞質も、free ribosomesに富んでいるか(写真36,37)、または粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアにも富んだ比較的若く、生きの良い細胞であることを示している。この時期肺GPO活性がやや上昇しており、またGPO局在も軽度に増強するなど、対応する変化が観察された。

アルカリフォスファターゼ組織化学的観察では、曝露1週~1ヶ月の群でわずかなALP陽性II型肺胞上皮細胞の増加が認められ、電顕観察による同細胞の軽度の増加を裏付けている。GPO局在の酵素抗体法観察では、曝露48時間ではGPO局在にほとんど変化は認められないが、1週、2週にかけて、I型肺胞上皮細胞のGPOはやや減少する(写真38~41)。曝露1、2週の肺の通常電顕観察で認められたI型肺胞上皮細胞の傷害像と考え合わせ興味深い。曝露1ヶ月では、I型肺胞上皮細胞のGPO局在は元に復したばかりでなく、少量のGPOがII型肺胞上皮細胞の遊離表面にも沈着している像が認められた(写真42)。通常、細胞のcytosol(細胞質可溶性部分)に局在するGPOが遊離表面のみに認められたということは、傷害を受けたI型

肺胞上皮細胞から放出されたGPOがII型肺胞上皮細胞の表面に沈着したものと思われる。以上のように、0.2 ppmのO₃曝露では、0.5 ppmで得られた結果に比べると、かなり弱い肺胞の傷害が、やや時期も遅れて出現し、1ヶ月ではむしろやや回復をみたかのような感を呈した。しかし、これも正常肺のそれとは異なったもの(正常肺ではII型肺胞上皮細胞にGPO局在は認められない)であり、持続するO₃刺激に対する一時的な適応状態の可能性が強く、更に長期にわたるO₃曝露によりどのような変化がもたらされるか検索することが、低濃度O₃曝露の肺胞傷害性の本態を知る上に必要であると考えられる。

参 考 文 献

- 1) 竹中参二ほか：NO₂ 高濃度曝露に対するラット・マウス・ハムスターおよびモルモットの感受性について、日本衛生学雑誌，33，69，(1978)。
- 2) Chow, C. K. and A. L. Tappel : An Enzymatic Protective Mechanism against Lipid Peroxidation Damage to Lungs of Ozone-Exposed Rats, *Lipids*, 7, No 8, 518, (1972)。
- 3) Paglia, D. E. and W. N. Valentine : Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, *J. Lab. and Clin. Med.*, 70, 158, (1967)。
- 4) 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，223，(1977)。
- 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)。

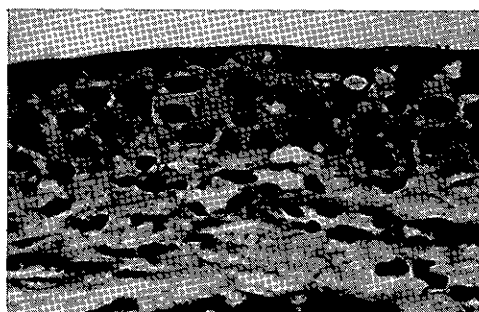
病理組織学的検討
光学顕微鏡写真



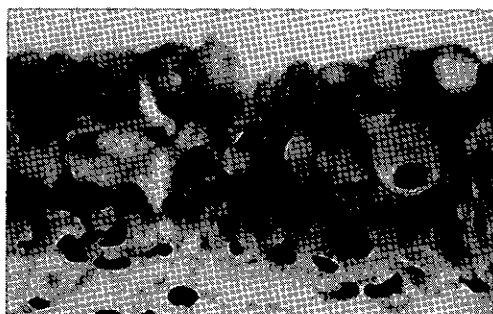
1 鼻中隔上皮, 対照群, × 40



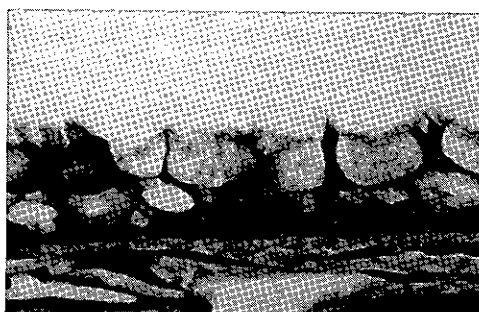
2 鼻中隔上皮における線毛消失, O₃ 曝露 3 週群, × 40



3 鼻中隔上皮における化生性病変, O₃ 曝露 3 週群, × 40



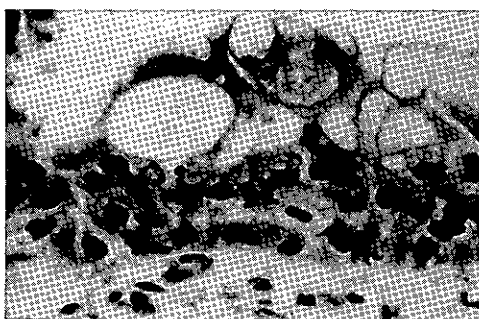
4 鼻中隔上皮の増殖肥厚, O₃ 曝露 2 週群, × 40



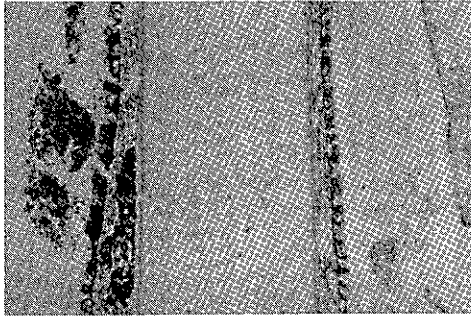
5 対照群における鼻中隔上皮の杯細胞, × 40



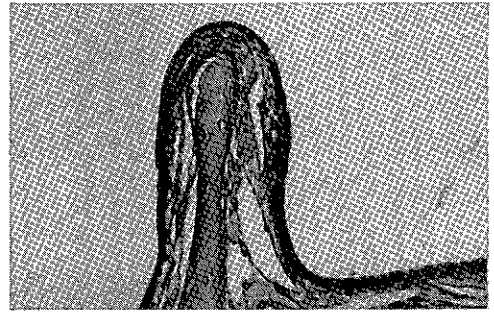
6 鼻中隔上皮の杯細胞機能亢進, O₃ 曝露 2 週群, × 40



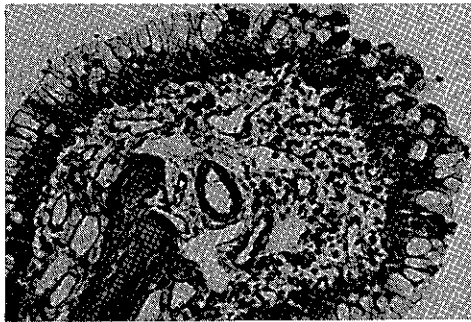
7 鼻中隔上皮における偽好酸球浸潤, O₃ 曝露 1 ヶ月, × 40



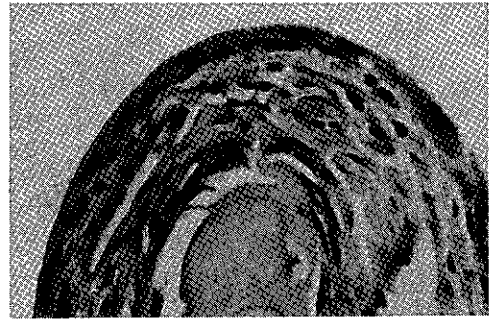
8 鼻腔に存在する鼻汁, O₃ 曝露3週群, × 4



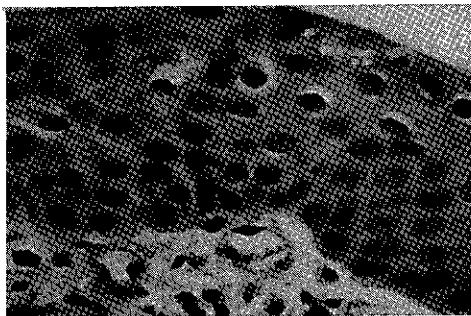
9 鼻甲介上皮, 対照6ヶ月群, × 10



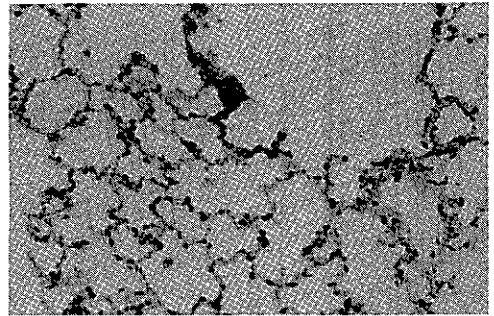
10 鼻甲介上皮における杯細胞機能亢進, O₃ 曝露6ヶ月群, × 10



11 鼻甲介上皮, 対照6ヶ月群, × 40

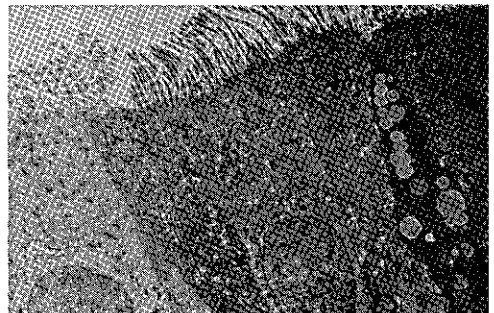


12 鼻甲介上皮の増殖肥厚, O₃ 曝露6ヶ月群, ×40



13 肺, O₃ 曝露6ヶ月群, × 10

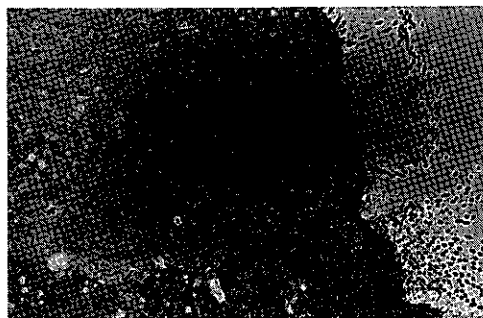
電子顕微鏡写真



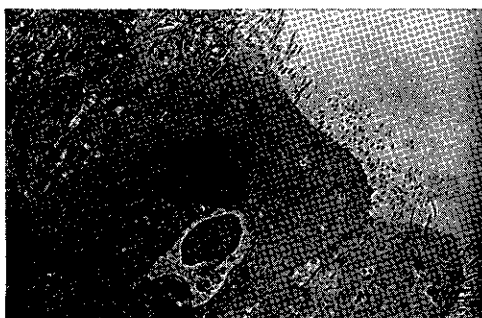
14 正常な鼻粘膜上皮, × 4,800



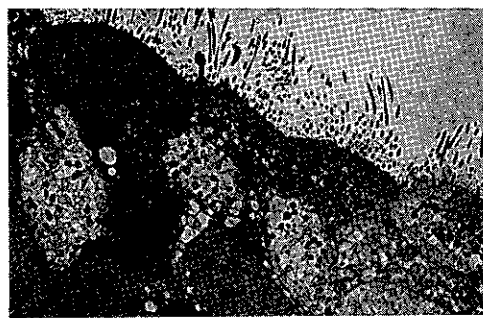
15 線毛の短縮 2週曝露群, × 2,200



16 微絨毛を有する細胞の増加, 2週曝露群, × 2,400



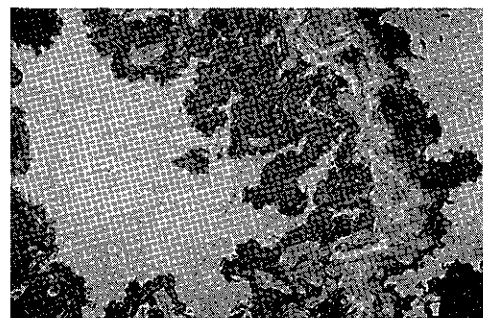
17 微絨毛を有する細胞の高度な増加, 3週曝露群 × 1,700



18 細胞内小器官の崩壊・消失を伴う水腫, 1ヶ月曝露群, × 2,200



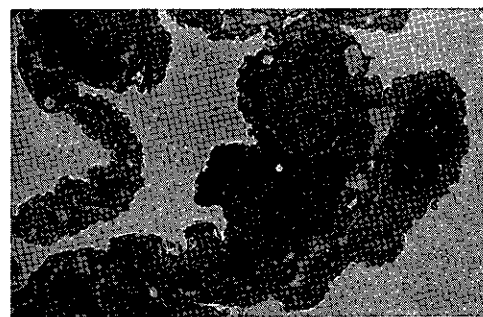
19 正常な肺胞上皮, × 3,000



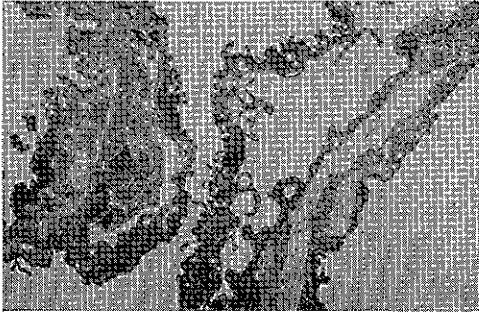
20 厚みを増し, 肺胞腔面の凹凸の激しいI-pc, 2週曝露群, × 2,300



21 数を増し, 変性崩壊に陥っているものもある -pc, 2週曝露群, × 1,400



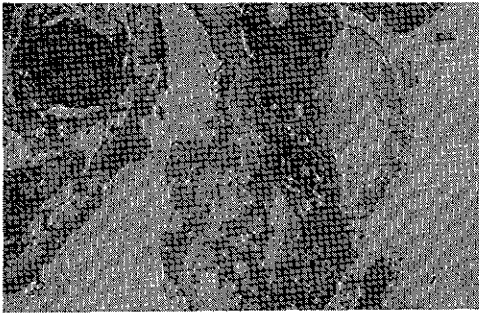
22 I-pcとII-pcの中間型の細胞, 3週曝露群, × 4,400



23 sERあるいはSmooth vesiclesの減増したI-PC, 1ヶ月曝露群, × 3,500



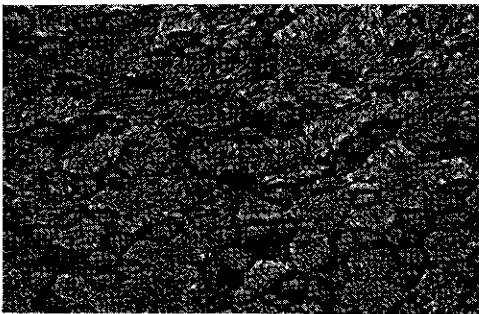
24 変性の激しいI-PC, 6ヶ月曝露群, × 3,000



25 肺泡隔壁中の水腫様変化, 6ヶ月曝露群, × 3,300



26 正常像, × 800

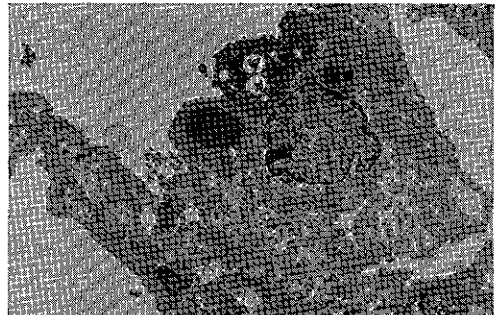


27 微絨毛を有する無線毛細胞(呼吸部), 3週曝露群, × 4,800



28 微絨毛を有する無線毛細胞(呼吸部), 6ヶ月曝露群, × 800

免疫細胞化学的検討
通常電顕写真および
酵素抗体法によるG
PO観察写真



29 対照ラットの透過型電顕写真, × 2,600



30 2日曝露群, I-pcのrERが軽度に腫張(矢印), × 4,000



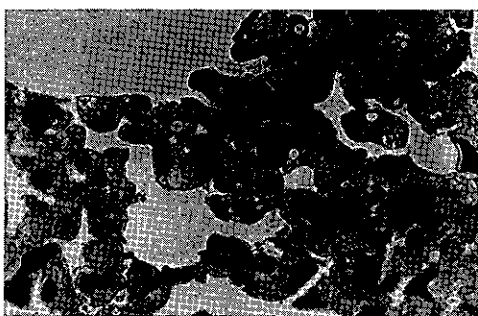
31 2日曝露群, I-pc表面の不整化(矢印) II-pcのラメラ構造の拡張, 増数, 毛細血管内皮(E)には貧飲小空胞が増加している, × 4,000



32 1週曝露群, I-pc表面の不整化(矢印), 細胞質に空胞(右下矢印)が生じている, × 2,600



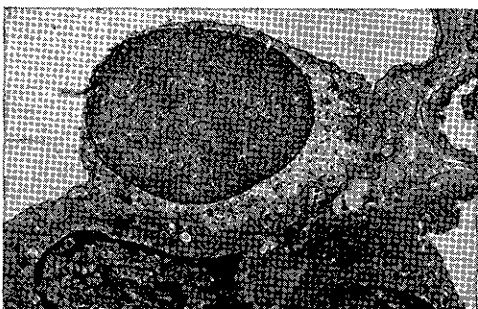
33 1週曝露群, II-pcのrERが中程度に拡張(II), 毛細血管内皮細胞(E)の水腫性変化, × 2,600



34 1週曝露群, II-pcの増数, × 1,000



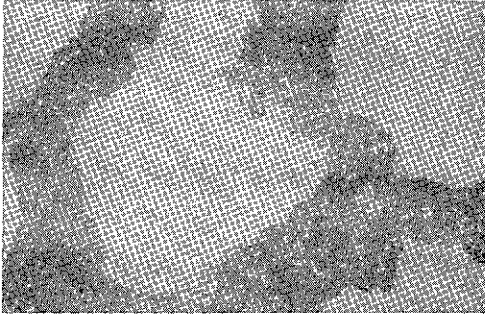
35 2週曝露群, I-pc表面の不整化, × 2,600



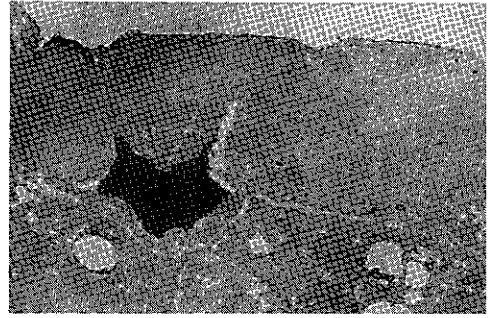
36 1ヶ月曝露群, I-pc中の比較的幼若な核と free ribosomes, 細胞表面の平滑化, × 4,000



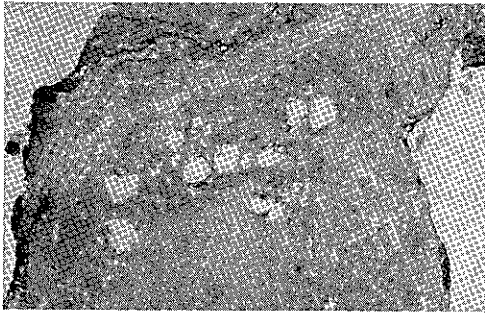
37 1ヶ月曝露群, I-pcの肥厚(矢印), ミトコンドリア, rER, ゴルジ装置, free ribosomesが多い, × 6,500



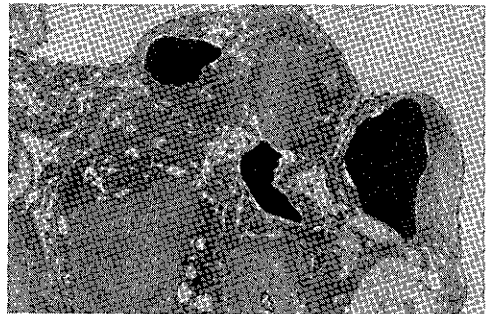
38 非免疫家兎 IgG Fab'を用いた酵素抗体法の対照試験, × 1,600



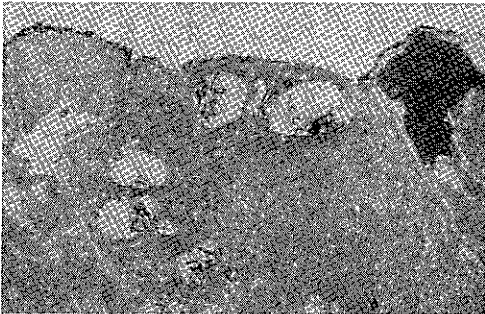
39 対照群, I-pc中のみ局在するGPO, × 5,600



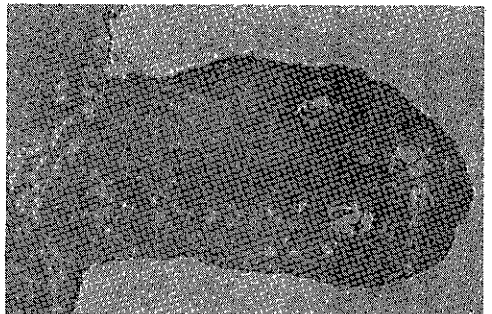
40 2日曝露群, I-pc中のGPOがやや増強している, × 6,300



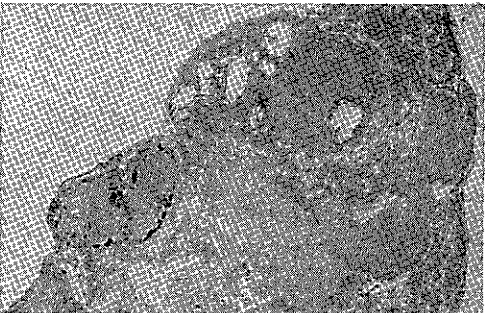
41 2週曝露群, GPOはむしろ減少している, × 5,000



42 1ヶ月曝露群, I-pc細胞質とII-pc表面のGPO局在, × 7,900



43 1ヶ月曝露群, II-pcがやや変形している, × 6,000



44 1ヶ月対照群, I-pcのみ局在するGPO, × 3,600