

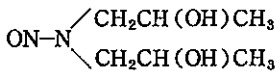
# NO<sub>2</sub>の癌原性に関する研究—第三報—

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  
 (埼玉県立衛生短期大学)

## 1 はじめに

昭和54年度来、二酸化窒素ガス(NO<sub>2</sub>)の癌原性について癌原物質の同時投与によりNO<sub>2</sub>の癌原性を拡大して明らかにする試みを行ってきた。すでに報告した如く<sup>1)2)</sup> NO<sub>2</sub>+ベンツ(a)ピレン, NO<sub>2</sub>+ウレタンの実験がいずれもNO<sub>2</sub>の癌原性を明確に証明する結果とはなっていない。NO<sub>2</sub>の癌原性については、WHOのクライテリア<sup>3)</sup>でもその危険性を示唆しているが、証明は困難である。これは又発癌の機構そのものの解明のむずかしさによるものと考えられる。本年度は、NO<sub>2</sub>濃度を0.5 ppmとし、発癌物質を内因性のDHPN※を使用して実験を行った。

※ DHPN [N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine]



(説明)ニトロソアミンは肝臓中で代謝されるが、一般にジアルキルニトロソアミンの場合、アルキル基中の炭素が水酸化され、モノアルキルニトロソアミン等を経てアルキルカチオンを生じ、これが核酸をアルキル化すると考えられている。ニトロソアミンの発癌標的器官は、物質、投与方法等により様々であるが、主に肝臓、食道、肺臓、膀胱に発生する。池田等<sup>4)</sup>によればDHPNの新生児ラットへの腹腔内1回投与で肺に高率に発癌がみられたことが示されている。またMohr等<sup>5)</sup>はラット皮下投与で鼻、肺臓の発癌を認めている。

### (1) 実験の方法

#### ア 材料および方法

実験に用いた動物は4週令のウイスター系ラット雄、SPFで実験頭数及び系列は、表1に見るとおりNO<sub>2</sub>+DHPN群, DHPN単独群, 対照群の3群をNO<sub>2</sub>曝露後

1ヶ月, 3ヶ月, 6ヶ月の時点で検討した。計9群延90頭である。

表1 観察時期および対象動物数

	1ヶ月後	3ヶ月後	6ヶ月後	計
DHPN+NO <sub>2</sub> 群	10	10	10	30
DHPN 群	10	10	10	30
対照群	10	10	10	30
計	30	30	30	90

注) 月数は、NO<sub>2</sub>曝露後に経過した期間を示す。

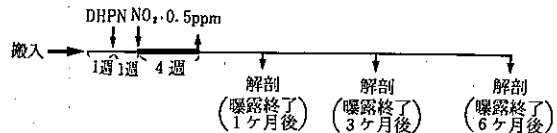


図1 実験方法

### イ 曝露の方法

搬入した動物は、図1に示すとおり、導入後1週間の観察の後、生理的食塩水20 ml中1 gの比率で溶解したDHPNを体重100 g当り0.1 gの割合で腹腔内に注入した後、1週間飼育のうえ0.5 ppm濃度のNO<sub>2</sub>で4週間連続曝露を行った。曝露チェンバー内および対照群飼育室への供給空気の組成はNO<sub>x</sub>, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>共0.02 ppm以下、粉じん粒径0.3 μ以下とした、換気回数は16回/毎時、温度22℃±1℃、湿度50~60%であり、チェンバー内のNO<sub>2</sub>濃度は全期間を通じ0.5 ppm ±5%に保たれた。

(2) 検討方法

前年に引き続き、飼育期間の終了した動物は、ネブタール麻痺下に脱血死させ、直ちに血液を生化学並びに免疫学用に採取し、残りの全臓器を中性ホルマリン液中で固定した。肺は中性ホルマリン液を喉頭から注入復元のうえ固定した。病理組織学の検討は専ら光学顕微鏡および肉眼による観察により行った。また、生化学の検討は、血清中のGPO活性、過酸化脂質量並びに、ALP, LDH, GOT, GPT等の酵素活性値の測定により行い、Ht値も併せて調べた。更に、免疫学では、主に血清中IgA, IgG, 総蛋白質量, A/G比の測定を行った。

(3) 結果

ア 組織学的変化

気道および肺末梢領域におけるNO<sub>2</sub>曝露の影響は、肺末梢領域に主に見出される。NO<sub>2</sub>曝露後1ヶ月のNO<sub>2</sub>群, DHPN + NO<sub>2</sub>群の細胞性の反応である。また、DHPN単独群, DHPN + NO<sub>2</sub>群の肺胞の内側の低い円柱状細胞および丈の高い円柱状細胞(ヘマトキ

リンに好染する細胞質を有する細胞)にうち張られた腺様化生像が曝露後3ヶ月群から見だされており、この細胞は6ヶ月群でも見られ、発生数、病疫保有個体数共に増加している。この病変は、対照群では見られていない。

イ 生化学的变化

DHPN+NO<sub>2</sub>群, DHPN群共に3ヶ月群, 6ヶ月群でGOTの上昇が示されたが、他の酵素系には著変が見られなかった。

ウ 免疫学的変化

特記すべき成績は得られなかった。

(4) 考察

今回は、実験未了のため中間報告として、検討結果の提示に留めて置き、研究終了時に全体像の考察を行うことにする。

2 病理組織学的検討

(1) 方法

各観察期において、採材した臓器(全身の各臓器、

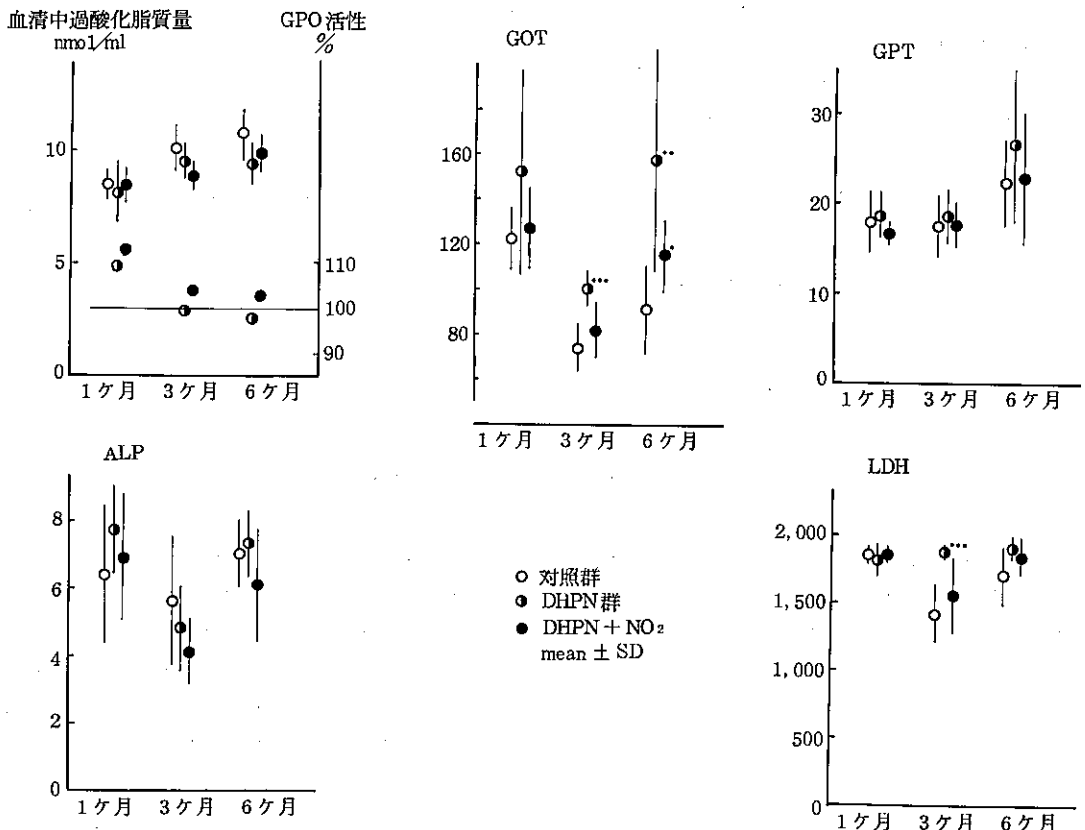


図2 生化学的検討

前報と同様)はパラフィン切片とした後、HE染色を主とし、一部特殊染色を行って、光学顕微鏡により観察を行った。

(2) 結果(表2参照)

DHPNおよびDHPN+NO<sub>2</sub>群共にDHPN曝露後1ヶ月で肺胞壁に化生性病変が認められた(写真1.2)。以後6ヶ月まで観察されたが、発生頻度および程度に差は存在しなかった。また、DHPN 6ヶ月群に腫瘍性病変が一例見られた(写真7・8)。NO<sub>2</sub>曝露後1ヶ月で軽度な末梢細気管支上皮の増殖肥厚が若干認められたが、3ヶ月、6ヶ月では見出せなかった。

表2 肺における化生性病変の出現例数

	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月
DHPN群	3/5	8/9	8/9
DHPN+NO <sub>2</sub> 群	3/5	7/9	8/9
対照群	0/5	0/9	0/8

3 生化学的検討

(1) 方法

検討した項目は、血清について過酸化脂質量(TBA値)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPO)活性、GOT、GPT、ALP、LDHを測定し、またヘマトクリット値を測定した。過酸化脂質量はTBA法により測定した。GPO活性は過酸化水素を基質とする方法<sup>6)</sup>により、反応は30℃で行った。GOT、GPT、ALP、LDHはそれぞれキット(和光純薬)を用い測定した。ヘマトクリットはマイクロヘマトクリット法で測定した。採血は麻酔下、後大静脈より行い、凝血後2,500 rpm × 15 min 遠心し血清を分離した。

(2) 結果(図2参照)

血清TBA値は1ヶ月で対照とほとんど同じ値をとり、3ヶ月はDHPN+NO<sub>2</sub>群が対照に比してやや低い値となっている。6ヶ月ではどの群も同程度の値を示した。各変化は小さい範囲にとどまっており、これは

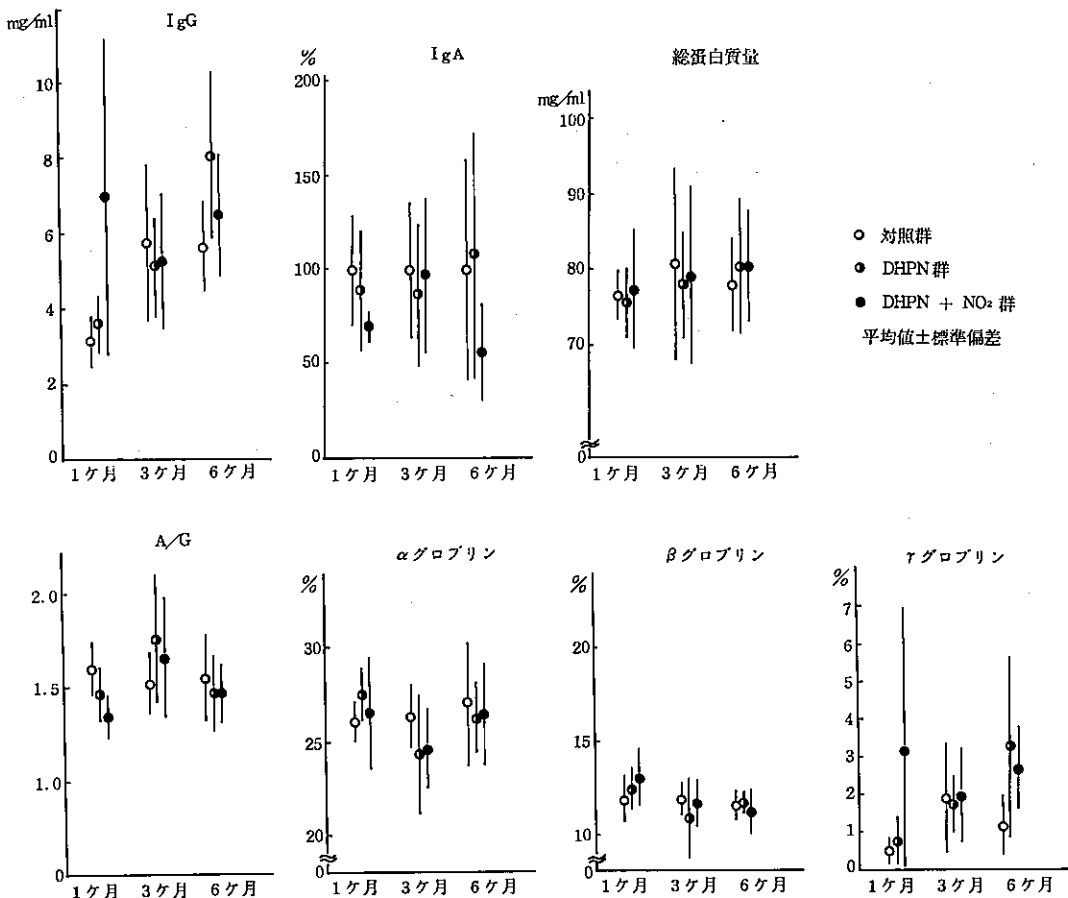


図3 免疫学的検討

NO<sub>2</sub>曝露後時間を経て曝露の直接の影響は消失したと考えられる。また、過酸化脂質代謝酵素であるGPO活性はTBA値と同様、特に変動は見られなかった。

次にGOT活性をみると、3ヶ月でDHPN群が有意(P<0.001)に上昇しており、また6ヶ月でもDHPN群が高い値(P<0.01)を示した。6ヶ月では、DHPN+NO<sub>2</sub>群も高いGOT活性(P<0.05)を示した。これらGOT上昇と形態学的所見は一致しないが、DHPN群、DHPN+NO<sub>2</sub>群の代謝系には何らかの変化が起こり始めていると考えられる。またLDH活性をみると、3ヶ月のDHPN群が対照に比して有意(P<0.001)に高い値を示した。また、6ヶ月でもやや高い値を示している。GPT、ALPは特に変化はみられなかった。これら酵素系の変動は、形態学的変化につながるものであるか否かは、現時点では明らかでないが、今後長期の観察により解明するものと考えられる。

#### 4 免疫学的検討

##### (1) 方法

解剖時に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、市販のラットIgGを標準に用いmg/mlの値で、IgAは、対照群の値を100として相対値で表わした。総蛋白質量は、ビウレット法で定量し、牛血清アルブミンを標準に用いmg/mlの値で表わした。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:NO<sub>2</sub>曝露後6ヶ月に、DHPN群が対照群と比して有意(P<0.05)に高い値を示した。

IgA:DHPN+NO<sub>2</sub>群が、NO<sub>2</sub>曝露後1ヶ月に対照群と比して有意(P<0.01)に、また、NO<sub>2</sub>曝露後6ヶ月にDHPN群に比して有意(P<0.01)に低い値を示した。

総蛋白質量:3群ともほぼ同じレベルを示し、有意差は認められなかった。

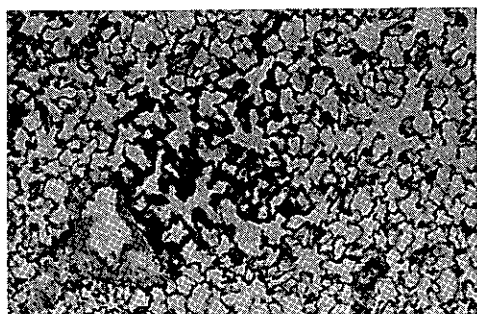
A/G比:NO<sub>2</sub>曝露後1ヶ月で、DHPN+NO<sub>2</sub>群が対照群と比して有意(P<0.01)に低い値を示した。

血清蛋白分画値:γグロブリン分画値が、NO<sub>2</sub>曝露後6ヶ月に、DHPN群およびDHPN+NO<sub>2</sub>群とともに対照群より有意(P<0.05)に低い値を示した。

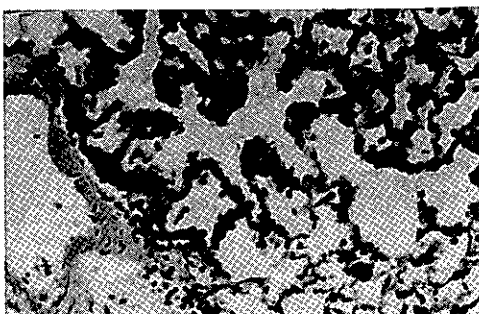
以上のように、数例有意差を示すデータが得られたが、個別的であり、DHPNあるいはDHPN+NO<sub>2</sub>の作用との因果関係を論ずるほどの傾向を示す結果は得られなかった。

#### 参 考 文 献

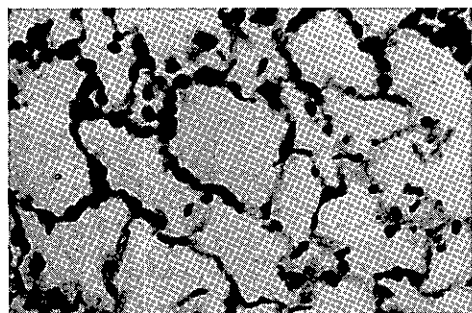
- 1) 遠藤立一ほか: NO<sub>2</sub>ガス曝露ラットの発癌に関する研究(第1報)東京都公害研究所年報255,(1981).
- 2) 遠藤立一ほか: NO<sub>2</sub>の癌原性に関する研究(第2報)一その1-,一その2-,東京都公害研究所年報243,(1982).
- 3) WHO: Oxides of Nitrogen, Environmental Health Criteria 4,(1977).
- 4) 池田富一ほか: 新生児ラットにおけるN-bis(2-hydroxypropyl)-nitrosamineの標的臓器, 医学のあゆみ, 113(6), 350,(1980)
- 5) Mohr, U. et al.: Carcinogenic Effects of Diisopropanol-nitrosamine in Sprague-Dawley Rats, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 58, 361,(1977).
- 6) 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).



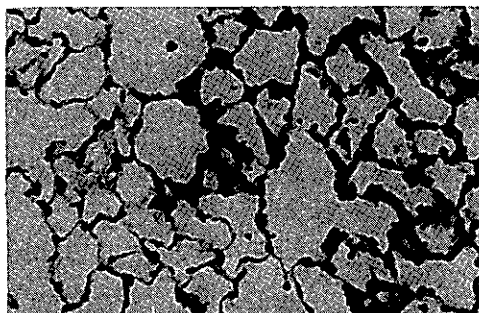
1 化生性病変, DHPN群 1ヶ月, ×4



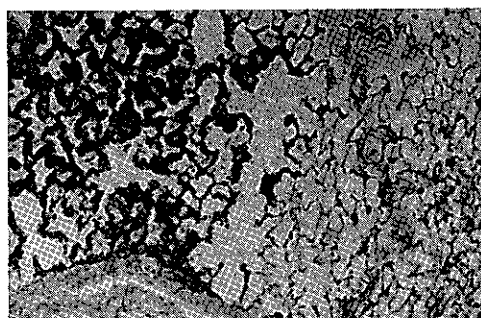
2 1の拡大, ×10



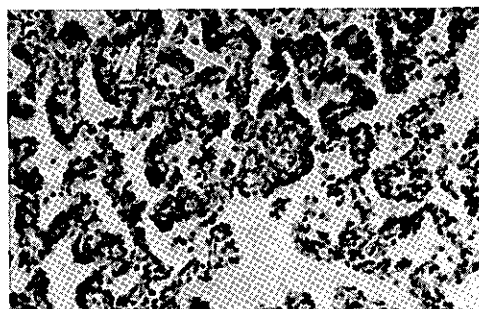
3 化生性病変, DHPN群 3ヶ月, ×20



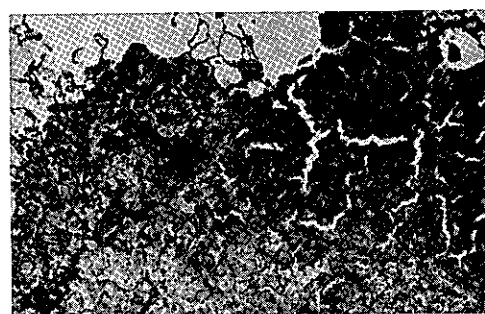
4 化生性病変, DHPN群 6ヶ月, ×10



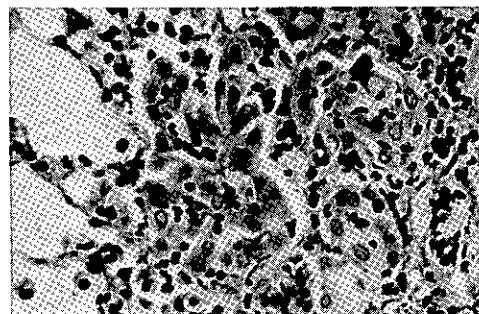
5 化生性病変, DHPN+NO<sub>2</sub>群 6ヶ月, ×4



6 5の拡大, ×10



7 腫瘍, DHPN群 6ヶ月, ×4



8 7の拡大, ×20