

# 低濃度O<sub>3</sub>曝露による有害性の検討(その1)

## — 家兎の0.06 ppmオゾン曝露実験 第一報 —

遠藤 立一	佐々木 裕子	川井 利雄
大山 謙一	仲 真 晶子	毛 受 優
石黒 辰吉	浪江 健二 (埼玉県立衛生短期大学)	山本 法 (埼玉県立衛生短期大学)
蓮沼 広子 (埼玉県立衛生短期大学)	小松 遵至 (東海大学医学部)	渡辺 慶一 (東海大学医学部)

### 1 はじめに

既報<sup>1)</sup>で述べたとおり、光化学オキダントの生体影響については、未だ明確でない。特にその主成分であるオゾン(O<sub>3</sub>)で代表される環境大気中の反応性に富む酸化性物質の慢性長期にわたる生体影響を明確にした報告は少なく、なかんずく環境基準値に対応した研究は稀である。本年度は、環境基準値濃度(0.06 ppm)のO<sub>3</sub>による家兎を主とした曝露実験を行った。本来環境中では、多種の有害物質(ガス状、浮遊粒子状)が共存するため、それら各種汚染物質の影響は生体に対し、相加、相乗的な複合作用である。研究もまた同様の設定をするべきであるが、前述のとおり環境基準値濃度そのもののO<sub>3</sub>に関する研究が稀な現況から、単体での研究を先行させた。但し、成績の評価に関しては、他種汚染物質の影響を極力排除した条件下での実験であるため、本実験の結果を直ちに環境中の濃度と対比するべきでない。

以下にO<sub>3</sub> 0.06 ppm 曝露実験の結果について報告する。

#### (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ヶ月令の雄で清

表 曝露期間および動物数

	曝 露 期 間					計
	24時間	72時間	2週	1ヶ月	6ヶ月	
O <sub>3</sub> 曝露群	6	6	6	6	6	30
対 照 群	6		6	6	6	24
計	18		12	12	12	54

浄レベルの動物である。群数並びに頭数、試験期間については表に示した。

#### イ. 曝露の方法

既報<sup>1)</sup>と同様の装置を用い、可能な限り生体への有害な大気由来の諸因子を除去するべく、NO<sub>x</sub>、O<sub>3</sub>、SO<sub>x</sub>は各々0.02 ppm以下とし、粉じんは0.3 μ以上のものを除いた空気を用いて、曝露及び対照群の飼育を行った。また、曝露チェンバー内O<sub>3</sub>濃度は0.06 ppm ± 5%に保った。

#### (2) 検討方法

病理組織学、生化学、免疫学の各手法により検討した。病理組織学は光学顕微鏡、電子顕微鏡(透過型、走査型)を用いた。生化学は、血清中、臓器(肺臓、肝臓)中の酵素類(GPX, G6PD, GPT)の代謝活性値の測定並びに過酸化脂質の定量を各群について行った。また、免疫学では、血清中IgG, IgA, 総蛋白量、血清蛋白分画値、A/G比の測定を実施した。

#### (3) 結 果

本年は、O<sub>3</sub> 0.06 ppmの連続曝露実験第1年次で、比較的短期間の曝露であるため、0.08 ppm曝露時に見出された変化<sup>1)</sup>のうち、今回も認められた明確な変化は、生化学でのG6PDの活性変動が主なものであった。以下検討項目別に述べると、病理組織学的検討の結果、光学顕微鏡では著変は認められず、電子顕微鏡でも肺のⅡ型肺胞上皮細胞(好オスミウム小体を有する)の増加及びⅠ型とⅡ型の中間型を示す肺胞上皮細胞の出現が著しいことが挙げられたのみであった。生化学においては、G6PDの活性低下が肝臓で明確であった以外は、0.08 ppm O<sub>3</sub>曝露時のような強い変

化は認められていない。免疫学的検討でも著明な変化は見出せなかった。これらの所見（明細な所見は各論を参照されたい）は $O_3$  0.06 ppm 曝露の影響が $O_3$  0.08 ppm 曝露のそれに比し量的に軽度であることを示すが、重要な点は、肝臓でG 6 P Dの代謝活性値の低下を主とした全身的な反応を示した事実である。

#### (4) 考 察

以上の成績から $O_3$  0.06 ppm 6ヶ月曝露の経時的影響は、 $O_3$  0.08 ppm 曝露より、軽度であるが依然として、呼吸器上皮系の喉頭部線毛の短縮化、肺胞上皮細胞の変異等同質の変化であることが認められた。特に生化学で示された肝臓でのG 6 P Dの変動は酸化物質としての $O_3$ の影響がこの低濃度域でも全身に及んでいることを示しており、直ちに特定の疾病との関連性を明確に出来ないが、長期慢性の影響を考慮すれば、生体にとり負の要因と考えられる。これらのことを総括すると、0.06 ppm  $O_3$ の6ヶ月曝露までの家兎を用いた動物実験の結果、軽度ながら全身性の影響を示す変化が観察され、生化学的手法による検討が有意 ( $p < 0.01$ ) な結果を示した。更に透過型電子顕微鏡で観察されたII型肺胞上皮細胞の増殖、I型とII型肺胞上皮細胞の中間型を示す異型細胞の出現は、0.08 ppm  $O_3$ により生じた変化と基本的に共通するものであり、変化の主体が膜を中心とする不飽和脂肪酸である点から、 $O_3$ の有する過酸化の作用によるものと考えられる。

## 2 病理学的検討

### (1) 光学顕微鏡による観察

#### ア 材料および方法

検討対象動物はネブタール麻酔下で、生理的食塩水で灌流、脱血の後、組織学的研究の対象となる臓器11種（鼻、扁桃、喉頭、気管（支）、肺臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、心臓）を摘出し、坪量の後10%バッファーホルマリン液で浸漬固定を行った。また、肺については同固定液を喉頭から注入復元の後同様に固定した。更に鼻は腹鼻甲介の観察が可能な部位で前額断とし固定後トリクロル酢酸で脱灰した。これらの材料はパラフィン包埋、薄切の後H. E染色を主とし、必要に応じ、PAS染色、AZAN染色などの特殊染色を行い、観察に供した。

#### イ 結 果

肺臓：主な変化は偽好酸球、リンパ球を主体とする肺胞壁への軽度な細胞浸潤である。 $O_3$ 曝露群では24時間で3/6例、72時間で2/6例、2週2/6例、1ヶ月2/6例、6ヶ月2/6例に見出され、うち6ヶ月の1例は軽度な浸潤であった。

また、対照群では同様な組織変化が72時間2/6例、2週2/6例、1ヶ月1/6例、6ヶ月2/6例に認められている。

気管： $O_3$ 曝露群、対照群間に有意差を示す病変は認められていない。

喉頭： $O_3$ 曝露群、対照群間に有意な病変の差は見出してない。

鼻腔：剥離上皮、遊離細胞（偽好酸球が主体をなす）、粘液で構成された鼻汁が $O_3$ 曝露群では、2週1/6例、1ヶ月1/6例、6ヶ月1/6例に認められ、対照群は、24時間1/6例、2週2/6例、6ヶ月2/6例に見出された。

扁桃： $O_3$ 曝露群、対照群共に著変はなかった。

肝臓： $O_3$ 曝露群の2週1/6例にリンパ球と偽好酸球から成る実質内細胞集簇が、また1ヶ月1/6例に軽度な小出血が見出された。この他 $O_3$ 曝露群の6ヶ月1/6例にグリソン鞘へのリンパ球浸潤が認められた。対照群にも、グリソン鞘のリンパ球浸潤を6ヶ月1/6例に見ている。

脾臓： $O_3$ 曝露群の2週1/6例にランゲルハンス島の小円形細胞浸潤が見られた。

その他の臓器即ち脾臓、副腎、心臓には有意な変化は認められなかった。

#### ウ 考 察

肺臓及びその他の臓器に認められた諸変化は、いずれも $O_3$ 曝露群と対照群の間に有意な差を示さず、病変発生についても、特定原因を推測させる事実を見出し得なかった。

### (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、 $O_3$ 曝露群、対照群とも1群6羽中4羽、計32羽である。検討の対象とした臓器は、透過型電子顕微鏡では鼻粘膜、扁桃、気管、肺、走査型電子顕微鏡では、鼻粘膜、扁桃、喉頭、気管である。各臓器は、冷2%グルタールアルデヒド溶液中で3時間浸潤固定を行った後、磷酸緩衝液による水洗で反応を停止させ、さらに1%四酸化オスミウ

ム溶液で4℃2時間の後固定を行った。透過型電子顕微鏡観察用組織は、固定後、エタノールの濃度上昇系列により脱水、さらにQY-1による置換を行った後、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作製した。

さらに、酢酸ウラン、鉛の二重染色を施し、JEM100C型透過型電子顕微鏡で観察を行った。走査型電子顕微鏡観察の材料は、エタノール濃度上昇系列にて脱水、さらに酢酸イソアミルによる置換後、臨界点乾燥装置にて乾燥し、イオン Sputter 装置で金の表面被覆を行った後、JSM-35型走査電子顕微鏡で観察した。

## イ 結果

### (ア) 透過型電子顕微鏡による観察

鼻粘膜：鼻粘膜の超微形態学的変化には、かなり強い個体差が認められ、O<sub>3</sub>曝露による影響は、その期間の長さによらず、明確なものは、ほとんど観察されなかった。対照群にも①粗面小胞体の拡大と分泌顆粒様の中小空胞の増加、②滑面小胞体の極端な増加その拡張、③細胞質の水腫性変化、④線毛上皮細胞の鼻腔に面した部分がポリープ状ないしは半島状に種々の程度に突出し、その内部にしばしば線毛が含まれている様な変化が認められた。これらの変化は、O<sub>3</sub>曝露群の鼻粘膜においてより強調されているが、決定的な差異はない。O<sub>3</sub>曝露による最も顕著な変化は、滑面小胞体の増加であり、それは72時間(写真1)および6ヶ月(写真2)曝露に認められるが、これも曝露期間に比例した変化ではない。いずれにせよ、今回の0.06 ppm O<sub>3</sub>曝露による変化は、昨年度の0.08 ppm O<sub>3</sub>曝露の場合よりかなり軽度であったといえよう。

扁桃：O<sub>3</sub>曝露群と対照群との間に有意な差は認められなかった。一部、細胞間隙が水腫性変化により拡大しているものが認められたが(写真3)、これも個体差によるもので、O<sub>3</sub>曝露による変化とは認められなかった。

肺：肺(ことに肺泡領域)の変化には個体差が激しく、O<sub>3</sub>曝露群と対照群との間に明確な差異は認められなかった。しいていえば、1ヶ月曝露で、異常に大きく数を増したいわゆる好オスミウム小体を持ったⅡ型肺泡上皮細胞がふえていること(写真4)、また、Ⅰ型とⅡ型の間中型の肺泡上皮細胞が増していることなどが挙げられる。いずれにせよ、昨年度の0.08 ppm O<sub>3</sub>曝露の場合より、その病変はかなり軽度である。

気管：O<sub>3</sub>曝露群と対照群との間に有意な差は認め

られなかった。

### (イ) 走査型電子顕微鏡による観察

鼻粘膜：嗅部において、嗅小胞の微細構造及び分布程度ともO<sub>3</sub>曝露群と対照群との間に有意差は認められなかった。呼吸部で、0.08 ppm以上の曝露例に見られた線毛の消失、短小化、無線毛細胞の増加などの変性像は認められなかった。

扁桃：O<sub>3</sub>曝露による特異的な変化は認められなかった。

喉頭：円柱上皮と扁平上皮の移行部及び移行周辺部に見られる線毛上皮の線毛は、対照群では長さ形状ともに比較的一定している(写真5)。これに対し、72時間曝露、2週曝露では、この線毛は粗になる傾向を示し。更に1ヶ月曝露(写真6)、6ヶ月曝露においては、短くなった線毛が殖えている。しかしながら同じ曝露群にありながらもこのような変性像を全く示さない例もあり、O<sub>3</sub>の影響が一様に現われた0.08 ppmの結果とは異なっている。

気管：0.08 ppm曝露では、線毛の消失、変形が見られたが、今回の実験では表面形態に局限すれば、O<sub>3</sub>曝露に基づく形態変化はほとんど認められていない。

## ウ まとめ

O<sub>3</sub>曝露濃度を0.06 ppmと下げることによって、0.08 ppmで観察された上気道諸組織、および肺の変化<sup>1)</sup>はかなり軽減し、対照群との差はあまり明確ではなかった。しかし、今回は曝露期間が最長6ヶ月であり、さらに期間を延ばした場合どうなるかの検討が必要である。

また、本年度実験に供された家兎の上気道および肺には、対照群でもかなりの超微形態学的な変化像を示した。変化像の第1は、上気道粘膜のうち、主として線毛上皮細胞の細胞質中に滑面小胞体および分泌空胞の拡張が認められたことである。また、第2に、Ⅰ型肺泡上皮細胞の細胞膜の軽～中等度の変化と肺泡毛細血管内皮細胞の水腫性変性である。これらの変化はいずれもO<sub>3</sub>の曝露である程度助長され、時によっては、かなり顕著に強調されていた。O<sub>3</sub>のようなオキシダントにより変化が助長されたこと、変化の主体が不飽和脂肪酸を多く含む膜であることから、脂質過酸化がその病因の根底にあることがうかがわれ、この方面からのアプローチが有効と思われた。

### 3 生化学的検討

#### (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、2,500 r・p・m 15分間遠心し血清を分離した。この後、生理食塩水で肺が白くなるまで灌流を行い、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。材料は等張リン酸緩衝液で洗浄後試料ビンに入れ、窒素で置換し-80℃で用時まで保存した。

測定した項目は、TBA法<sup>2)</sup>による過酸化脂質量を血清、肺、肝臓で、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)活性を血清、肺、肝臓で、グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)活性を肺、肝臓で測定した。またGPTを血清で測定した。GPX活性は、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を基質としPaglia, D. E. and W. N. Valentine (1967)<sup>3)</sup>の方法により、G6PDは、

Kornberg法で測定した。臓器は等張リン酸緩衝液(pH 7.0)を用いポッター型ホモジナイザーでホモジナイズし、4℃900g 20分遠心を行い上清を酵素分析試料とした。TBA値は、1, 1, 3, 3, -テトラエトキシプロパンを標準として反応を行い算出した。タンパク質量はビュレット法で測定した。また、臓器についてはNPSH量をDTNBを用いる方法<sup>4)</sup>で測定した。

#### (2) 結果 (図1参照)

血清についてTBA値をみると72時間、1ヶ月、6ヶ月でややO<sub>3</sub>曝露群が高い値を示した。肺のTBA値は、O<sub>3</sub>曝露群で1ヶ月までの各期間、低値を示すが6ヶ月目では逆に対照群に比し高い値を示した。この時の肺のGPX活性をみると、対照群とほとんど変わらない値を示した。1ヶ月以前については、2週でやや高く他はやや低い値を示した。肝臓のTBA値につ

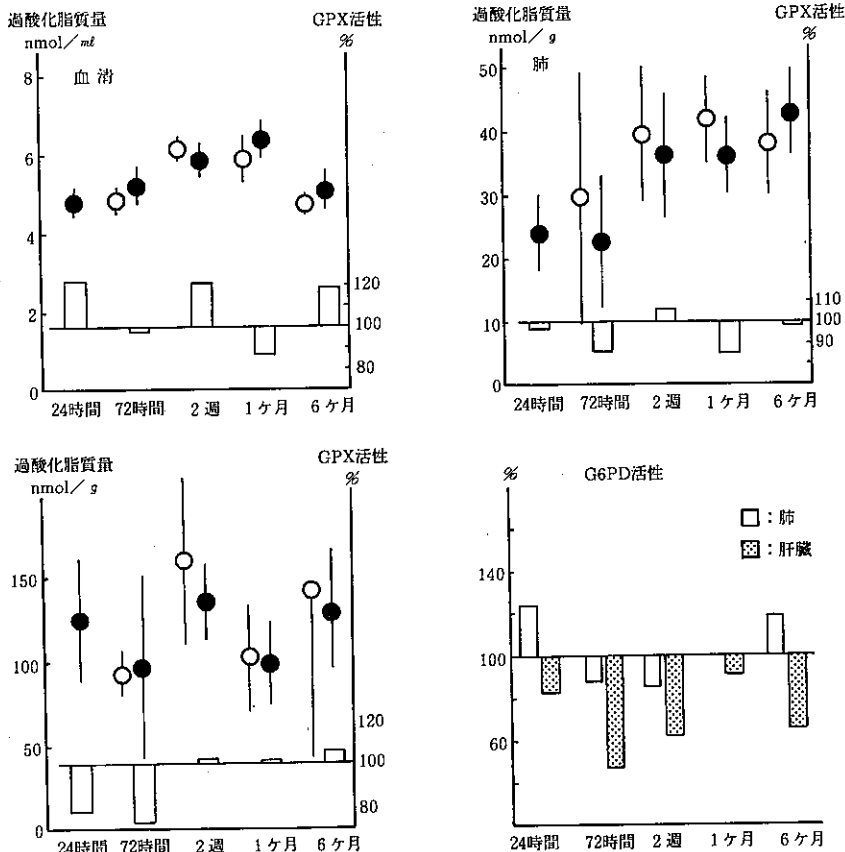


図1 生化学的検討

いては個体差がはげしく特に変化は見られない。肝G P X活性は、24時間、72時間で低い値を示したが、これは過去当部で行った0.08 ppm O<sub>3</sub>曝露実験でも72時間で肝G P Xの低下が観察されている。ペントースリン酸径路の酵素であるG 6 P Dについては、肺での動きは24時間でやや活性が上昇し、72時間、2週でやや下がり、6ヶ月でやや上昇したが有意な変化ではない。また肝臓では72時間 ( $p < 0.01$ )、2週 ( $p < 0.001$ ) 6ヶ月 ( $p < 0.05$ ) で有意に低下した。

### (3) 考 察

O<sub>3</sub>の生体に対する影響は、O<sub>3</sub>が強い酸化力を持つ点で生体中の様々な還元性物質、多不飽和脂肪酸等を過酸化することで障害が起こるとされている。過去のO<sub>3</sub> 0.08 ppmの実験では肝臓のTBA値が有意に上昇するという結果が得られた。<sup>1)</sup>今回は0.06 ppmに濃度を下げ、同じ観点から検討を行った。脂質過酸化のパラメーターと考えられるTBA値については、今回の実験では有意な変化は見られなかったが、曝露が長期になると、O<sub>3</sub>曝露群が対照群に比して高くなる傾向が見られ、これは前回0.08 ppmでも観察された。また、肝臓のG P X活性は曝露初期で下がっており、前回の実験でも同じ傾向がみられた。これは肝臓中のGSH、NADPHの減少ということが考えられる。この点で肝中のNPSH(非タンパク性SH)を測定したが、個体差が大きくデータとなりえなかった。0.06 ppm O<sub>3</sub>曝露は各臓器の直接的な過酸化を示すデータは得られなかったが、その防御系酵素であるG P X、G 6 P Dで変化が観察された。特に肝臓のG 6 P D活性の変化は、O<sub>3</sub>の直接的な影響が肺で見られないにもかかわらず観察されており、その影響が全身的であることを示唆している。またこの点G P Tを測定したが有意な変化はなく、肝の器質的障害の可能性は低いと考えられる。

G 6 P Dは、ペントースリン酸径路の分岐点にある酵素で解糖系より分かれる。つまり、生体中にあるグルコースは第一段階としてまず、ATPによりリン酸化されグルコース6リン酸となる。その後グルコースフォスフェートイソメラーゼにより、フルクトース6リン酸に変わり解糖系へ続く経路、およびG 6 P Dによりグルコノラクトン6リン酸となりペントースリン酸回路へつらなる2系統に分かれる。エネルギー利用の系としては前者であり、後者は主に生合成にあずか

るNADPH、リボースを産生する系とされている。特にNADPHについては、そのH<sup>+</sup>により様々な物質を還元し生合成上重要なものである。たとえば、脂肪酸の不飽和化、酸化型グルタチオン(GS-SG)の還元などで利用される。つまり、酸化防御系酵素はたらくための直接的な材料となっており、G 6 P DはそのNADPHを産生する酵素といえる。G 6 P Dの活性は、NADP<sup>+</sup>濃度に依存し、NADPHで阻害され、またNADPHと共役するグルタチオンレダクターゼの基質であるGSSGとの関連も指摘されている。<sup>5)</sup>G 6 P DやG P X等の活性が肺でNO<sub>2</sub>、O<sub>3</sub>の曝露で上昇することは多く報告されており、Chow, C. K.ら<sup>6)</sup>はO<sub>3</sub> 0.78 ppm曝露でG 6 P D活性が10日目まで最大となり、30日までで低下することを観察している、また嵯峨井ら<sup>7)</sup>はNO<sub>2</sub>曝露によりG 6 P D、G P X活性が曝露初期で下がり次第に上昇することを観察している。このように防御系酵素の動きは様々な要因が関連し複雑な動きを示す。今回の実験でも肝臓G 6 P D活性が低下するという結果が得られたが、現在のところこれが何を意味するか単純に結論づけることはできない。全体としては、O<sub>3</sub> 0.08 ppmにくらべて影響は小さくなっていると思われる。ただ肝臓のG 6 P D活性低下が6ヶ月目でも引き続いて起こっていることから今後さらにそのメカニズムと曝露の長期化という点から検討を加えていく必要があると思われる。

## 4 免疫学的検討

### (1) 方 法

血清中の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、IgGは、対照群の値を100として相対値で表した。血清総蛋白質量は、ビウレット法により測定し、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比の測定は、セルロースアセテート膜による電気泳動法によった。

### (2) 結 果 (図2参照)

IgG : O<sub>3</sub>曝露群と対照群との間に有意差はなかった。

IgA : O<sub>3</sub>曝露72時間以降の群では、平均値が対照群に比して高い値を示し、1ヶ月曝露群では有意( $p < 0.05$ )であった。O<sub>3</sub>曝露により、血清中IgAを上

昇させる傾向は、0.08 ppm 曝露でうかがわれており、<sup>1)</sup>  
 今回の0.06 ppmでも同様の結果を得た。

総蛋白質量：O<sub>3</sub> 曝露群、対照群ともほぼ同じレベルにあった。

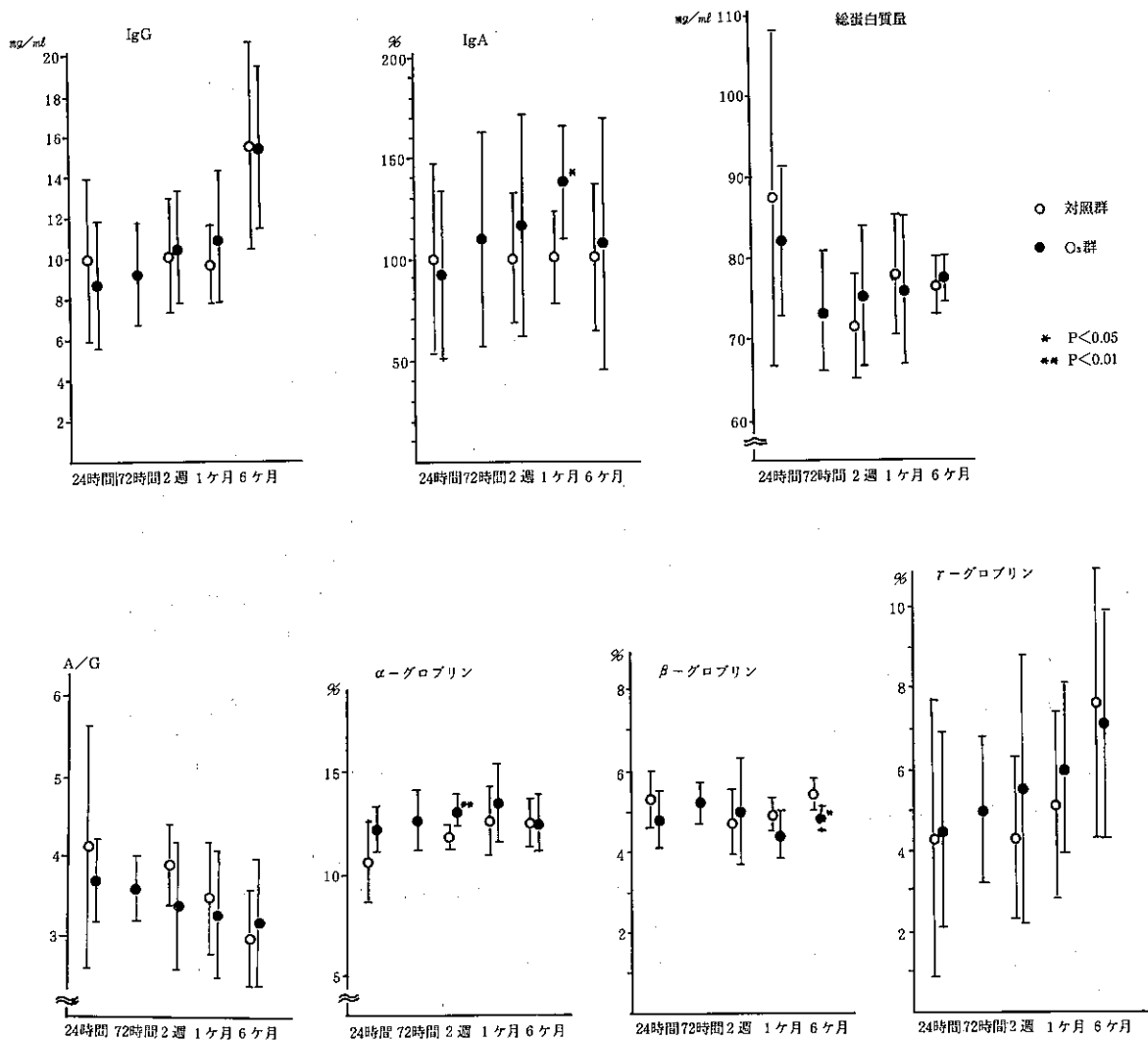


図2 免疫学的検討

A/G比：6ヶ月曝露で、やや高い値を示したことを除き、O<sub>3</sub>曝露群がやや低い値を示したが、有意差はなかった。

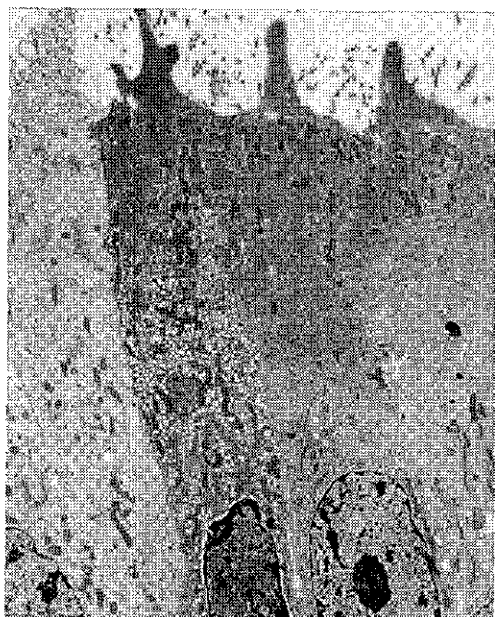
血清蛋白分画値：αグロブリンは、O<sub>3</sub>曝露群が平均値で高い値を示し、2週曝露では有意 ( $p < 0.01$ ) であった。βグロブリンは、6ヶ月曝露で有意 ( $p < 0.05$ ) に低い値を示した。γグロブリンは、O<sub>3</sub>曝露群と対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 参 考 文 献

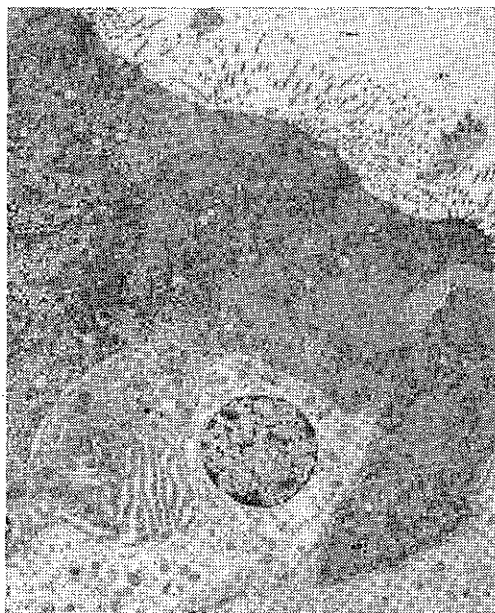
- 1) 遠藤立一ほか：低濃度O<sub>3</sub>曝露による有害性の検討，東京都公害研究所年報，253，(1983)。
- 2) Ohkawa, H. *et al* : Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Anal. Chem.*, **95**, 351, (1979).
- 3) Paglia, D. E., W. N. Valentine : Studies

on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, *J. Lab. and Clin. Med.* **70**, 158, (1967)。

- 4) Sedlak, J. , R. H. Lindsay : Estimation of Total, Protein-bond, and NonProtein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent, *Anal. Biochem.* **25**, 192, (1968)。
- 5) 渡辺明治：五炭糖リン酸回路の調節，蛋白質，核酸，酵素，**22**，1817，(1977)。
- 6) Chow, C. K. , A. L. Tappel : Activities of Pentose Shunt and Glycolytic Enzymes in Lungs of Ozone-Exposed Rats, *Arch. Environ. Health*, **26**, 205, (1973)。
- 7) 嵯峨井勝，市瀬孝道：二酸化窒素急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化，国立公害研究所報告，**31**，67，(1981)。



1 滑面小胞体の増加，鼻粘膜，72時間曝露群，  
×3,300



2 滑面小胞体の増加，鼻粘膜，6ヶ月曝露群，  
×3,300

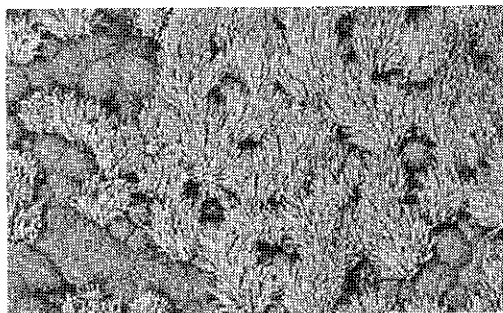


3 水腫性変化による細胞間隙の拡大，扁桃，1ヶ月  
曝露群，×1,000

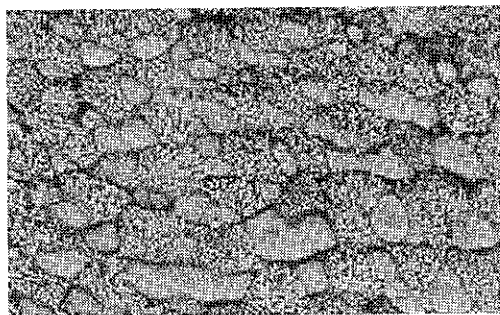


4 オスミウム小体の増数を伴い，異常に大型なⅡ型  
肺胞上皮細胞の増加，肺，1ヶ月曝露群，×2,600





5 正常像, 喉頭, 対照群,  $\times 1,000$



6 線毛の短小化, 喉頭, 1ヶ月曝露群,  $\times 1,000$