

NO₂ の癌原性に関する研究 - 第四報 -

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 山本 法
(埼玉県立衛生短期大学) (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

前報について、二酸化窒素 (NO₂) の癌原性を検討すべく DHPN 投与ラットに 0.5 ppm の NO₂ を曝露し非曝露 DHPN 群、対照群との間に腫瘍発生個体数、好発臓器、腫瘍の悪性度などについて、差を見出せるか否かに主眼を置き研究を行った。

(1) 実験の方法

ア 材料及び方法

実験に用いた動物は 4 週令のウイスター系雄ラット SPF で実験頭数及び系列は表 1 に示すとおり DHPN + NO₂ 群、DHPN 群、対照群の 3 群を NO₂ 曝露後

表 1 観察時期および対象動物数

	~12ヶ月後 い死	12ヶ月後	~18ヶ月後 い死	18ヶ月後	計
DHPN+NO ₂ 群	3	9	4	8	24
DHPN 群	3	9	4	2	18
対 照 群	0	9	0	6	15
計	6	27	8	16	57

注) 月数は、NO₂ 曝露終了後に経過した期間を示す。

12ヶ月、18ヶ月の時点で検討した。

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

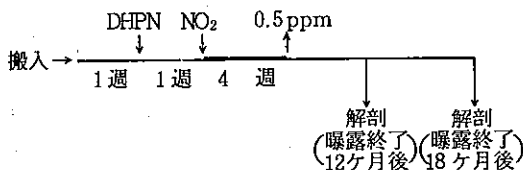


図 1 実験方法

の観察の後、生理的食塩水 20ml 中 1g の比率で溶解した DHPN を体重 100g 当 0.1g の割合で腹腔内に注入後、1 週間飼育のうえ 0.5 ppm 濃度の NO₂ で 4 週間連続曝露を行った。曝露の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_x, O₃, SO_x いずれも 0.02 ppm 以下とし、また、粉じんは粒径 0.3 μm 以上を含まない状態に保った。換気回数は 16 回/時、温度 22°C ± 1°C、湿度 50~60% で、チェンバー内の NO₂ 濃度は 0.5 ppm ± 5% に保った。

(2) 検討方法

飼育期間の終了した動物は、ネプタール麻痺下に脱血死させ、直ちに採血の後全臓器を緩衝ホルマリン液で固定した。肺のみは緩衝ホルマリン液を喉頭から注入復元の後、他臓器と同様に固定した。病理組織学的検討は、肉眼及び光学顕微鏡による観察で行なった。生化学の検討項目は、血清中酵素 (GPX, GOT, LDH, GPT, ALP)、過酸化脂質 (TBA 法) の測定を行った。免疫学は主に血清中 IgA, IgG, 総蛋白質量, A/G 比について検討した。

(3) 結果

ア 組織学的検討

主要な病変は、肺及び腎に見出される腫瘍性病変で、DHPN 群、DHPN + NO₂ 群共に出現して居り、特に NO₂ の影響による差は見出せない。

イ 生化学的検討

各群間、各年令間に有意な差は認められなかった。

ウ 免疫学的検討

各群間、各年令共に有意差は認めない。

(4) 考 察

前回報告した¹⁾ 肺における 3, 6 ヶ月の DHPN 群 DHPN + NO₂ 群の化生病変像は、12 ヶ月、18 ヶ月

で保有個体の増加を示し腺腫を主体とする腫瘍の発生も又増加したが、両群間に有意な差は認められず、腎腫瘍もDHPN群、DHPN+NO₂群間の発生に差を見なかった。生化学、免疫学共に対照群も含めた3群間に差を認めていない。このことは、腫瘍特に腎腫瘍発生個体は実験期間の途中死亡例が多く、血清の採取が不能であったことが、主な理由と考えられる。また、全体像の不鮮明さは、NO₂曝露期間が4週間と短かく、病像がDHPNの影響と加合性病変により覆われた点に原因を求められる。今後、同一研究を行うに当っては、NO₂曝露の長期化とともに、新生児など、より敏感な動物の使用を必要とすると考えられた。

2 病理学的検討

(1) 方法

各観察時期において採材した臓器(喉頭、気管、肺臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、心臓)はパラフィン切片とした後、HE染色を主に必要に応じてPAS、AZAN染色を実施して光学顕微鏡を用いて観察した。

(2) 結果(表2, 3, 図2, 3参照)

肺臓: 12ヶ月から18ヶ月群までDHPN+NO₂群及びDHPN群に腺様化生の発生個体数が高率であり、腺腫はDHPN+NO₂群では12ヶ月群に3/9例、18ヶ月までの死亡例に1/4例、18ヶ月群に4/8例見出され、DHPN群でも12ヶ月までの死亡例に1/3例、12ヶ月群に4/9例、18ヶ月群に2/2例存在した。腺癌はDHPN群の12ヶ月までの死亡例に1/3例、12ヶ月群に1/9例、18ヶ月までの死亡例に1/4例認められた。他方、対照群の18ヶ月群にも腺様化生2/6例、腺腫2/6例、腺癌1/6例が認められている。

肺臓以外の臓器: DHPN+NO₂群、DHPN群共に甲状腺、腎臓に増殖並びに腫瘍性の病変が見られた。主な病変は肉腫(nephrosarcoma)、甲状腺乳頭腺腫であり、肉腫はDHPN+NO₂群では12ヶ月までの死亡例に2/3例見られ、DHPN群では12ヶ月までの死亡例に3/3例、12ヶ月群に1/9例、18ヶ月までの死亡例に2/4例存在した。甲状腺乳頭腺腫はDHPN+NO₂群の12ヶ月群に1/9例、18ヶ月までの死亡例に2/4例、18ヶ月群に1/8例認められた。甲状腺腫はDHPN+NO₂群では12ヶ月までの死亡例に2/3例、12ヶ月群に4/9例、18ヶ月までの死亡

表2 肺における病変出現例数

群 ()母数		化生		腺腫		腺癌	
		例数	比率%	例数	比率%	例数	比率%
DHPN + NO ₂	死亡例(3)	3	100	0	0	0	0
	12ヶ月(9)	7	77	3	33	0	0
	死亡例(4)	4	100	1	25	0	0
	18ヶ月(8)	7	88	4	50	0	0
DHPN	死亡例(3)	3	100	1	33	1	33
	12ヶ月(9)	9	100	4	44	1	11
	死亡例(4)	4	100	0	0	1	25
	18ヶ月(2)	2	100	2	100	0	0
対照	12ヶ月(9)	0	0	0	0	0	0
	18ヶ月(6)	2	33	2	33	1	17

表3 腎臓、甲状腺に見られた腫瘍例数

群 ()母数		腎臓		甲状腺			
		nephrosarcoma	例数	乳頭腺腫		甲状腺腫	
				例数	比率%	例数	比率%
DHPN + NO ₂	死亡例(3)	2	67	0	0	2	67
	12ヶ月(9)	0	0	1	11	4	44
	死亡例(4)	0	0	2	50	4	100
	18ヶ月(8)	0	0	1	13	7	88
DHPN	死亡例(3)	3	100	0	0	1	33
	12ヶ月(9)	1	11	0	0	6	67
	死亡例(4)	2	50	0	0	4	100
	18ヶ月(2)	0	0	0	0	0	0
対照	12ヶ月(9)	0	0	0	0	0	0
	18ヶ月(6)	0	0	0	0	0	0

例に4/4例、18ヶ月群に7/8例見出され、DHPN群では12ヶ月までの死亡例に1/3例、12ヶ月群に6/9例、18ヶ月までの死亡例に4/4例認められている。他方、対照群ではこれらの変化は存在しなかった。DHPN+NO₂群の18ヶ月までの死亡例の腎臓皮質に腺癌が、また18ヶ月群の膵臓の小葉に多形核細胞からなる腺癌が1例認められた。

(3) 考察

病変の見られた臓器は肺臓、甲状腺、腎臓、膵臓であった。肺臓ではDHPN+NO₂群、DHPN群共に腺様化生、腺腫が出現し、DHPN群に腺癌が認められた。しかし、これらの変化はDHPN+NO₂群とDHPN群間の出現例数に有意差を見ることはできない。また、腎臓では肉腫(nephrosarcoma)が観察さ

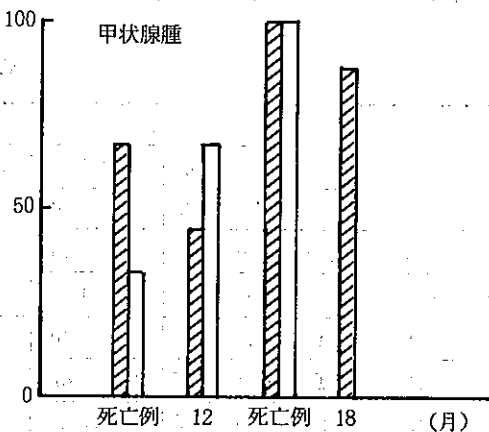
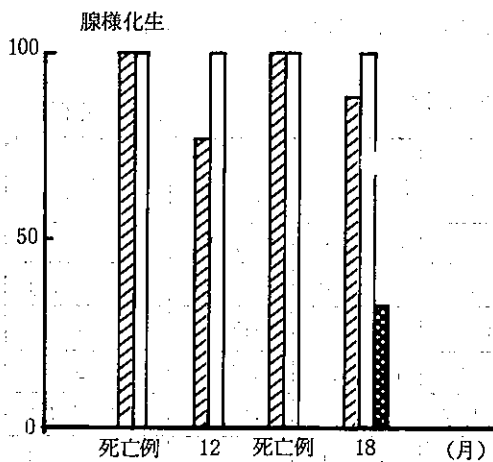
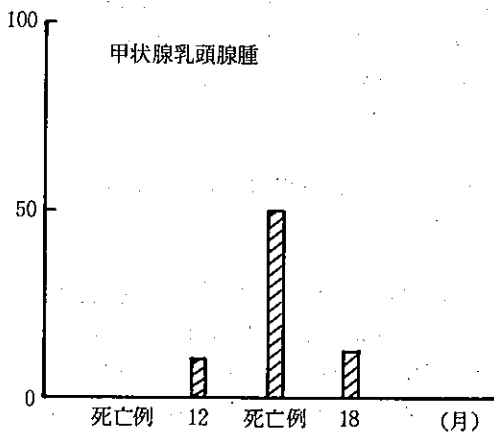
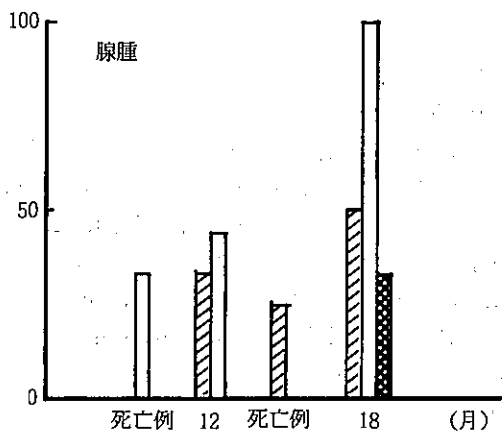
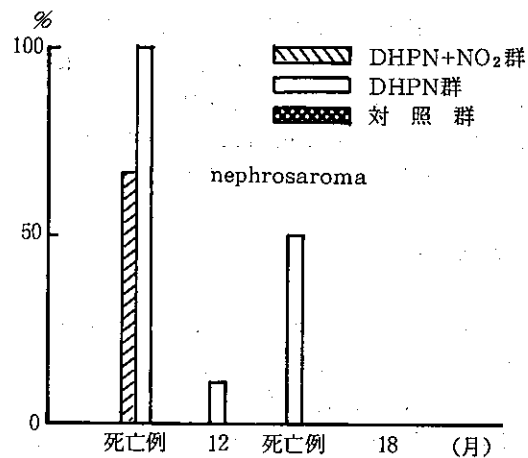
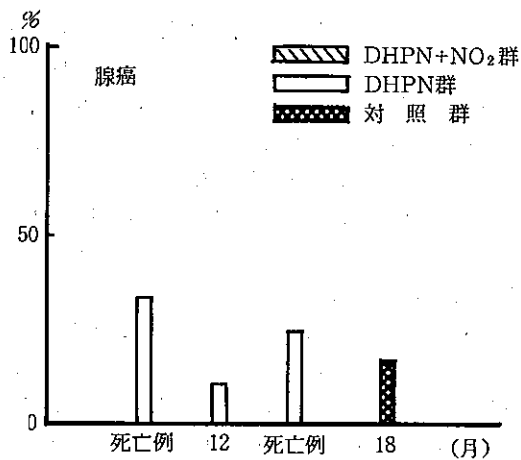


図2 肺臓における病変の発生率の経時的変化

図3 各臓器に見られた病変発生率の経時的変化

れDHPN+NO₂ 群, DHPN群共に死亡例に多かったが群間の差は有意ではない。甲状腺では両群共に甲状腺腫が高率に発生した。また, DHPN+NO₂ 群に乳頭腺腫が若干見られたが, NO₂ 曝露との関連性については今後の検討が必要と考えられた。

3 生化学的検討

(1) 方法

採血はネンブタール麻酔下, 後大静脈より行い凝血後2,500 r. p. m, 15 分間遠心し血清を分離した。測定した項目は, TBA法²⁾による過酸化脂質量, 過酸化水素を基質とするグルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)活性³⁾, GOT, GPT, ALP, LDHであった。またヘマトクリット値をマイクロヘマトクリット法で測定した。GOT, GPT, ALP, LDHについては市販のキット(和光純薬)を用いた。有意差の判断はStudentのt検定で行った。

(2) 結果

表4に示すように, 各項目とも有意な変化は観察されなかった。

(3) 考察

血清TBA値については, 前報¹⁾で報告したところでは, 1ヶ月群で対照とほとんど同じ値をとり, 3ヶ月群で, DHPN+NO₂ 群がやや低く, 6ヶ月も同じようにやや低い有意な差ではなかった。12ヶ月, 18ヶ月群については, 対照とほとんど同じ値であった。NO₂ の曝露から時間を経るとNO₂ の直接の過酸化による影響は見い出せなくなると考えられる。GPX活

性は, ほとんど変化はないが, 18ヶ月目のDHPN+NO₂ 群がやや低い値を示した。次にGOTを見ると, 3ヶ月, 6ヶ月ではDHPN群が有意($p < 0.001, p < 0.01$)に高い値を示したが12ヶ月, 18ヶ月では変化がなかった。また, DHPN+NO₂群も6ヶ月目で有意($p < 0.05$)に高かった。12ヶ月, 18ヶ月で他の酵素は特に変化はなかった。これら酵素系の変動と形態学的所見との関連を見ると, 6ヶ月目からDHPN群, DHPN+NO₂ 群に変化がみられるようになり, この点で酵素系の変化と一致する部分もある。しかし12ヶ月, 18ヶ月については変化は見られなくなっている。この時点での形態学的変化は消失してはいない。これらから腫瘍発生と酵素系の変化における明確な関連は見い出せなかった。

4 免疫学的検討

(1) 方法

血清中IgG, IgAは, 単純放射状免疫拡散法により測定し, IgGは, 市販のラットIgGを標準に用いmg/mlで, IgAは, 対照群の平均値を100とした相対値で表示した。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で表示した。血清蛋白分画値およびA/G比の測定には電気泳動法を用いた。

(2) 結果 (表5参照)

血清中IgG, IgA, 血清総蛋白質量, 血清蛋白分画値ならびにA/G比ともに, 曝露12ヶ月, 18ヶ月後において, 各群間で有意差は認められなかった。

表4 生化学的検討

平均値±標準偏差

	12 月			18 月		
	対 照 群	DHPN群	DHPN+NO ₂ 群	対 照 群	DHPN群	DHPN+NO ₂ 群
Ht (%)	46.7 ± 4.5	45.1 ± 4.4	46.2 ± 4.5	40.8 ± 5.4	47.6	27.3 ± 9.9
TBA値(nmol/ml)	6.0 ± 0.7	5.7 ± 1.0	5.7 ± 0.3	4.3 ± 0.3	5.0	4.3 ± 0.3
GPX活性 (%)	100	81	93	100	119	56
G O T	137 ± 37	131 ± 40	134 ± 33	128 ± 17	188	156 ± 38
G P T	42.2 ± 21.0	33.7 ± 15.4	38.9 ± 12.7	36.4 ± 18.5	113	27.5 ± 8.5
A L P	5.0 ± 0.7	6.7 ± 2.0	5.7 ± 1.6	5.0 ± 1.5	5.3	5.2 ± 2.3
L D H	1999 ± 406	1847 ± 299	1914 ± 352	1828 ± 678	1346	2759 ± 489

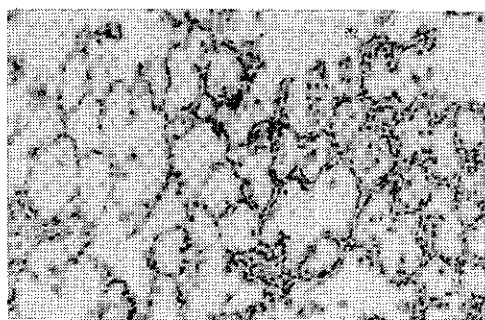
表 5 免疫学的検討

平均値±標準偏差

	12 月			18 月		
	対 照 群	DHPN群	DHPN+NO ₂ 群	対 照 群	DHPN群	DHPN+NO ₂ 群
I g G (mg/ml)	8.4 ± 1.6	9.9 ± 1.2	8.0 ± 2.5	14.5 ± 2.9	11.3	14.4 ± 4.1
I g A (%)	100 ± 24	91 ± 70	110 ± 62	100 ± 22	103	93 ± 16
総蛋白質量(mg/ml)	85.6 ± 6.6	89.5 ± 13.4	80.8 ± 5.0	78.6 ± 6.0	83.0	75.8 ± 8.3
A / G 比	1.22 ± 0.20	1.23 ± 0.22	1.20 ± 0.13	1.06 ± 0.19	1.19	0.83 ± 0.20
αグロブリン (%)	25.8 ± 3.7	24.8 ± 2.6	25.7 ± 2.6	26.9 ± 2.7	28.2	29.4 ± 2.6
βグロブリン (%)	13.7 ± 2.0	14.7 ± 2.3	14.1 ± 1.8	14.2 ± 2.1	12.8	16.4 ± 2.0
γグロブリン (%)	5.4 ± 1.6	5.8 ± 2.6	5.8 ± 1.6	7.7 ± 1.7	4.7	9.2 ± 3.4

参 考 文 献

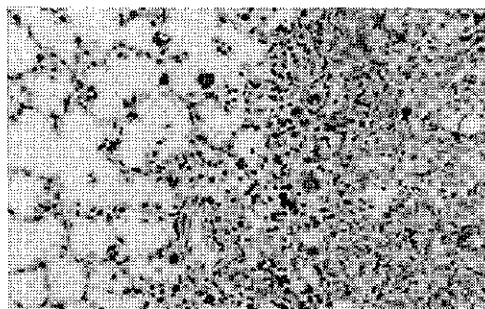
- 1) 遠藤立一ほか：NO₂ の癌原性に関する研究—第3報—, 東京都公害研究所年報, 267, (1983).
- 2) Ohkawa, H. *et al.*: Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction, *Anal. chem.*, **95**, 351, (1979).
- 3) Paglia, D. E., W. N. Valentine: Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, *J. Lab. and Clin. Med.*, **70**, 158, (1967).



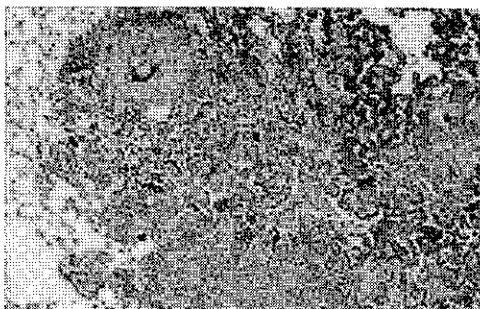
1 肺胞壁の肥厚, 肺, DHPN+NO₂群, 12ヶ月, HE



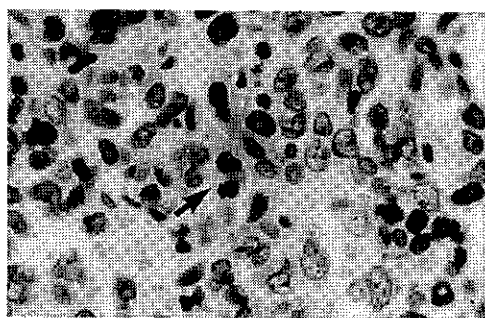
2 間質増殖の見られる化生, 肺, DHPN群, 18ヶ月, HE



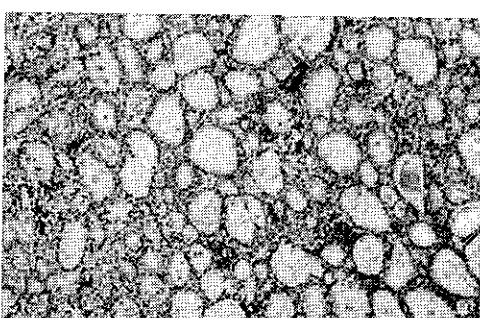
3 腺腫, 肺, DHPN+NO₂群, 12ヶ月, HE



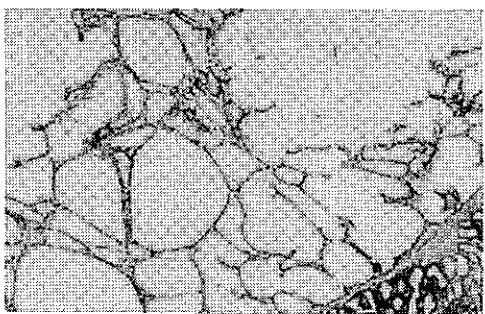
4 腺癌, 肺, DHPN群, 12ヶ月, HE



5 4の拡大, 細胞の異形性が見られ, 核分裂像も認められる。



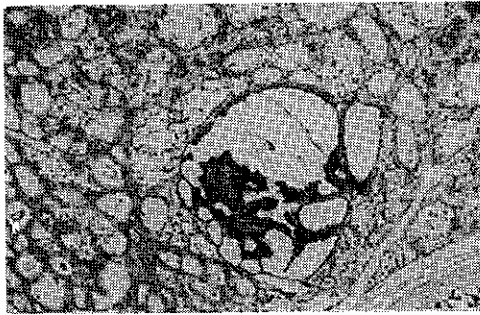
6 甲状腺, コントロール群, HE



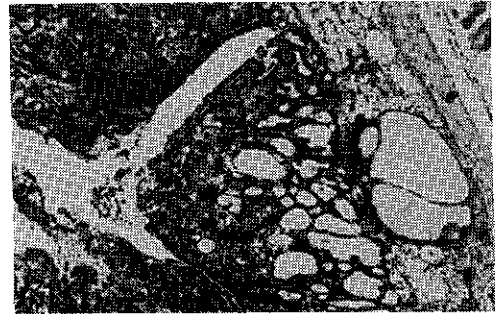
7 濾胞拡張の見られる甲状腺腫, DHPN+NO₂群, 14ヶ月, 死亡例, HE



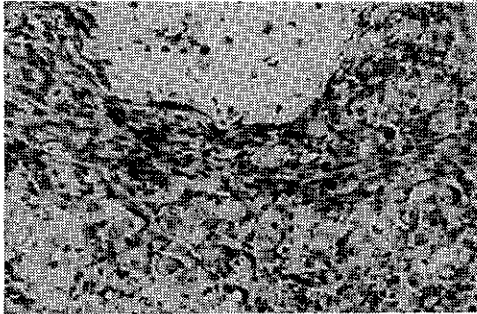
8 線維増殖の見られる甲状腺腫, DHPN群, 12ヶ月, AZAN



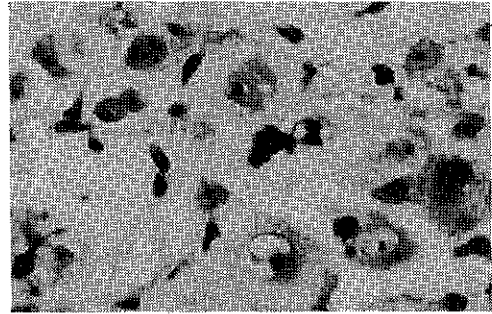
9 甲状腺乳頭腺腫, DHPN+NO₂群, 12ヶ月, HE



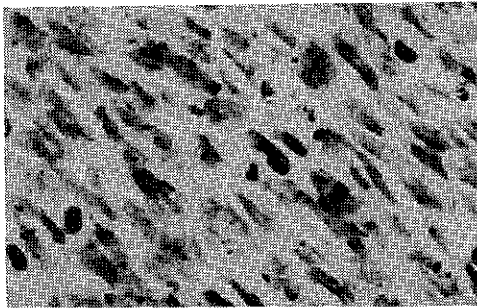
10 甲状腺乳頭腺腫, DHPN+NO₂群, 14.5ヶ月, 死亡例, HE



11 腎臓肉腫, 大型の細胞, 紡錘形の細胞, 軟骨細胞が見られる。腎臓, DHPN+NO₂群, 12ヶ月, HE



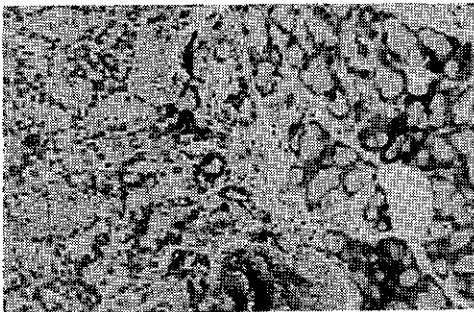
12 11の拡大, 大型円形細胞



13 11の拡大, 紡錘形細胞



14 腺癌, 腎臓, DHPN群, 16ヶ月, 死亡例, HE



15 多形核細胞から構成された腺腫, 脾臓, DHPN+NO₂群, 18ヶ月, HE