

## 低濃度 O<sub>3</sub> 曝露による有害性の検討 — 家兎の 0.08 ppm オゾン間歇曝露実験 —

遠藤 立一 佐々木 裕子 川井 利雄  
 大山 謙一 仲 真 晶子 石黒 辰吉  
 浪江 健二  
(非常勤研究員)  
 小松 達至 渡辺 慶一  
(東海大学医学部) (東海大学医学部)

### 1 はじめに

光化学オキシダントの主成分である O<sub>3</sub> の有害性について、濃度及び曝露時間がどのように生体に作用するかを昭和 49 年度以来検討して来たが、前年度報告のとおり、0.06 ppm の O<sub>3</sub>、連続曝露では 3 ヶ月群に気管線毛上皮細胞の線毛短縮、短絨毛を有する細胞の腔内突出或は数の増加が超微形態的に示され、生化学的検討でも G6PD の変動が見出された、これらの変化は、主に O<sub>3</sub> の有する脂質過酸化の増進作用を基にしていることと推測した。

これらの諸変化は生体にとって、微生物感染抵抗性の低下、粉じん等の体外への排泄力の低下を予測させた。しかしながら、環境大気の実態は、他種汚染質との共存が通常であり、また、O<sub>3</sub> 濃度は 1 日を通じて高値を示すわけでもない。そこで、本年度は連続曝露実験で明確に有害性を示した、O<sub>3</sub> 0.08 ppm を 1 日 6 時間曝露し、他の時間は清浄な空気的环境下に飼育することで、環境中光化学オキシダントの発生時間と関連付けることにした。

#### (1) 実験の方法

##### ア 材料および曝露

実験に用いた家兎は、ヒマラヤン種 2 ヶ月令の雄で清

浄動物のレベルのものである。群数並びに頭数、試験期間については表に示すとおりである。

##### イ 曝露の方法

既報<sup>1)</sup>と同様の装置により、実験系に他因子の介入を阻止すべく、NO<sub>x</sub>、O<sub>2</sub>、SO<sub>x</sub> は各々 0.02 ppm 以下とし、粉じんは 0.3 μm 以上のものを除いた空気を用い、曝露群及び対照群の飼育を行った。また、曝露チャンパー内の O<sub>3</sub> 濃度は 10:00 ~ 16:00 迄は 0.08 ppm O<sub>3</sub> 濃度に保ちその他の時間は清浄空気を 16 回/時の換気回数に保った。なお、温度は 23 ± 1℃、湿度は 56% ± 10% である。

##### (2) 検討方法

病理組織学、生化学、免疫学的手法を用いて検討した。

病理組織学は、光学顕微鏡、電子顕微鏡(走査型:TEM、透過型:SEM)を用いて形態、酵素局在、細胞構成要素などの免疫組織化学<sup>2)</sup>の手法を併用した。生化学は、血液中、臓器(肺臓、肝臓)中の酵素(GPX、G6PD、GPTなど)の代謝活性値並びに過酸化脂質の定量を行った。また、免疫学では、血清中総蛋白量、血清蛋白分画、A/G比の測定を行った、各検討手法には、実験群、対照群の全動物を対象とした。

##### (3) 結果

本年は、実験施設の使用期間の関係から最長 6 ヶ月間の実験に留まったうえ 1 日 6 時間の曝露と云うことから 0.08 ppm 連続曝露に比較すると、<sup>1)</sup> 比較的軽度な変化が認められた。以下検討項目別に述べると、病理組織学的検討のうち光学顕微鏡では著変は見出せず、超微形態観察(電顕による観察)のうち特に SEM では気管上皮細胞の線毛の短縮、微絨毛を有する細胞の増加、気管

表 0.08 ppm 実験系曝露期間および動物数

	曝露期間				計
	3日	3週	3ヶ月	6ヶ月	
オゾン曝露群	6	6	6	6	24
対照群	6	6	6	6	24
計	12	12	12	12	48

支腔への突出などが特徴的变化として見出された、他方、免疫組織化学的手法を用いた超微形態観察では、気管支上皮の無線毛細胞にGSH-POが強く染色され、対照群では弱く染色されており好対照を示した。また、Tublinは、曝露群の無線毛細胞に弱く、線毛細胞に強く染色されていた。他の検討手法即ち生化学、免疫学による検討では、統計的に有意な変化は把握出来なかった。

#### (4) 考察

以上の成績からO<sub>3</sub> 0.08ppm 1日6時間の間歇曝露の影響は、O<sub>3</sub> 0.06ppm 連続曝露に比し、軽度の結果を示したが、新に導入した、Tublinの動向を把握する免疫組織化学的手法及び走査電子顕微鏡による観察で、気管上皮を構成する細胞にオゾンの有する脂質過酸化の影響と考えられる異常が見出されたことは、その因果関係の証明には、更なる研究の必要性が重視されるものの、気道の異物(ウイルス、細菌、粉じん)排除能に影響するものと思われる。

## 2. 病理学的検討

### (1) 電子顕微鏡観察

透過型電顕観察：対照群に比し有意な変化は各曝露群を通じ見出せなかった。

走査型電顕観察：3日～3ヶ月の曝露群に気管上皮の無線毛細胞の軽度増加、一部線毛上皮細胞の線毛の短小化が認められ、6ヶ月曝露群では、グルタチオンペルオキシダーゼ局在観察(後述2)における、気管支上皮での無線毛細胞の増加、腔への突出(elongation)、GSH-POの増量、さらに、Tublin(microtubuleの前駆物質)の局在観察(後述3)における上記無線毛細胞でのTublinの減少と見合う変化と考えられた。総じて、長期連続曝露では、線毛上皮細胞を中心にかなりの傷害を生じせしめた。0.08ppmのO<sub>3</sub>も、6時間/日という間歇曝露では、下部気道の線毛上皮細胞の変化を例外として、その他の呼吸器系組織には、有意な傷害を示さなかった。この点から、O<sub>3</sub>にもっとも感受性の高いのは、線毛細胞であり、GSH-POや、Tublinの局在性の観察を加味して考えると、Tublinの合成、あるいはTublinから線毛中のmicrotubuleへの集成(Assembly)がO<sub>3</sub>によって障害され易く、その作用機序は、O<sub>3</sub>の脂質過酸化増強作用がもっとも重きをなしていることが考えられる。低濃度O<sub>3</sub>曝露では、呼吸

器の殆ど組織には、余り有意な変化は少いと云うものの、線毛細胞、ことにその線毛の形態、機能のいずれかの面で傷害が起っているとすると、ウイルス、細菌などの感染、更にその他異物即ち粉じん中の癌原物質などに対する防禦反応に異常を来とし、病変を発生することは、充分考えられる。(写真1～6)

### (2) 肺内酵素の局在観察

本実験では、曝露群と対照群との間に有意の差は認めがたかったが、3週曝露群で、肺泡毛細血管内皮細胞のGSH-POが極く僅か減少し、同細胞には、小空胞(small vesicles)が増加した。いずれの変化が先行するかは、明かでないが、膜の脂質に過酸化が進んでいることは想像のつく所である。また、写真3, 6, 8に見られるように、肺泡隔壁細胞(Septal cell)細胞質中にもかなり強いGSH-PO局在が認められるが、この近辺には写真3, 8に明かに示されるように線維の増生が認められるのも興味のある所見である。Septal cellは元々線維芽細胞由来の細胞であり、膠原線維の生成能力を持つ細胞とされており、線維増生とGSH-POの変動ひいては脂質過酸化の増減との関連がどのようなものであるか興味のあるところである。ただし、このようなseptal cellにおけるGSH-POの変化、線維増生の像は、O<sub>3</sub>曝露群のみならず、頻度は少ないにしても、非曝露対照群にも散見され、O<sub>3</sub>曝露との直接的な関連は考えにくい。

なお、tublin, actinなどの細胞骨格の免疫細胞化学的観察(後述3)と共に行った気管上皮のGSH-PO局在の観察では、曝露群でやゝ増加した無線毛細胞が撰択的に強く染色され、非曝露対照群の気管支上皮が皆一様に弱く染色されているのと好対照を成している。また、tublinはGSH-PO局在と対照的に無線毛細胞に弱く、線毛細胞に強く染色され、tublinの合成、microtubuleへのAssemblyに脂質過酸化が河等の影響を及ぼし得ることが推定された。(写真1～10)

### (3) 細胞骨格の免疫細胞学的観察

Tublin, actinなどの細胞骨格関連蛋白の免疫細胞化学的局在観察の目的に、それぞれ現在最も信頼のおけるアマシャム社の $\alpha$ -Tublin,  $\alpha$ -actinに対するモノクローナル抗体を用い酵素抗体法直接法(電顕)、間接法(光顕)を行った。Tublinの局在の変化に関しては、同時に行ったGSH-POの局在性の変化共々、種々の段

階の気管支上皮に有意なものが認められた。すなわち、Tublinは非曝露対照群では、線毛の部分、及び線毛、無線毛細胞の核周囲などに万遍なく局在していたが、O<sub>3</sub>曝露群の3週以上の群では、増加した無線毛細胞、ことにその細胞頂部 (Apex)が気管支腔に突出している細胞に、Tublinの減少ないし欠損が認められた。これと反対に、GSH-POはこれらの細胞に有意に増強が観察された。線毛細胞の減少、線毛の短小化、無線毛細胞の増加、腔内の挙上、膨隆は走査型電顕観察でも認められた現象であるが、この現象は本実験で認められたTublinの減少(合成の低下あるいはmicrotubuleへのAssemblyの異常)がその成因と考えられる。また、当該細胞に撰択的にGSH-POが増強しているところから、これらTublinの異常→線毛の変化には、何らかの形

で脂質過酸化が関連しているものと思われる。以上の結果から、O<sub>3</sub>による脂質過酸化の増強作用は、単に肺胞領域のみでなく、気管支上皮での病変発生にも意義を有していることが、示唆された。線毛の機能、形態の異常は、細菌、ウイルスなどの感染の他塵埃などの異物に対する防禦に支障を来すことは、容易に考えられるところであり、こうしたO<sub>3</sub>曝露による呼吸器の2次的傷害も考慮されねばならないことが強調されたと云えよう。(写真1~4)

#### 参 考 文 献

- 1) 遠藤立一他：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 213, (1984)
- 2) 渡辺慶一他：酵素抗体法 学際企画(1985)

電子顕微鏡観察



写真1



写真2

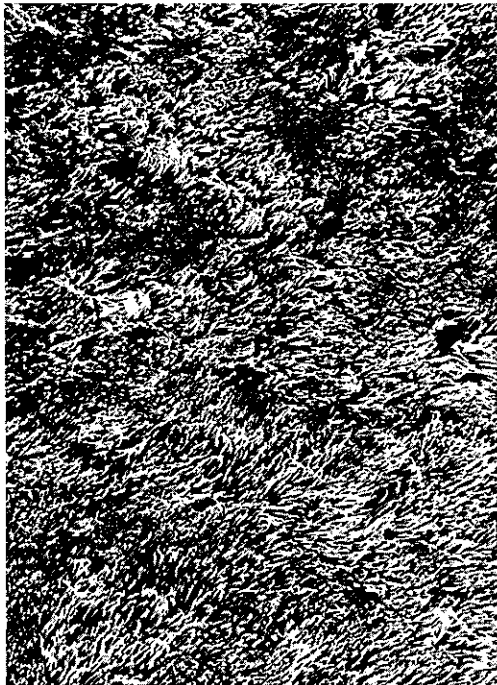


写真3



写真4

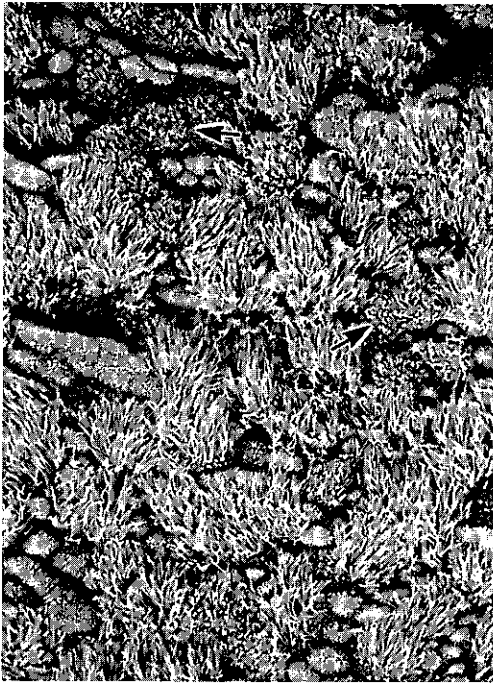


写真5



写真6

### 写 真 説 明

写真1：鼻粘膜（3ヶ月6時間/日O<sub>3</sub>曝露）

線毛細胞の粗面小胞体（三角矢印）にかなりの拡張を認めるもの、また、細胞質が腔に向かって坊主頭状に突出する像がしばしば観察されるが、これらの像は非曝露対照群の鼻粘膜にも同程度認められる。（×4,000）

写真2：肺胞（6ヶ月6時間/日O<sub>3</sub>曝露）

I型（I）、II型（II）肺胞上皮細胞共、殆んど変化を認めない。（×5,500）

写真3：気管上皮（非曝露対照群）

大部分が比較的に長い線毛を有する細胞で占められ、無線毛細胞はその蔭にかくれて確認が難しい。

（×1,200）

写真4：気管上皮（O<sub>3</sub> 3ヶ月6時間/日曝露）

無線毛細胞（矢印）が中等度に増加し、明瞭に確認出来るようになっている。（×1,200）

写真5：気管上皮（O<sub>3</sub> 3ヶ月6時間/日曝露）

矢印が示す如く、短小化した線毛を有する細胞が出現して来ている。（×1,200）

写真6：気管上皮（O<sub>3</sub> 6ヶ月6時間/日曝露）

無線毛細胞が数を増すと共に、表面に隆起し（矢印）非常に目立つようになっている。

（×1,200）

肺内酵素の局在観察



写真1



写真2

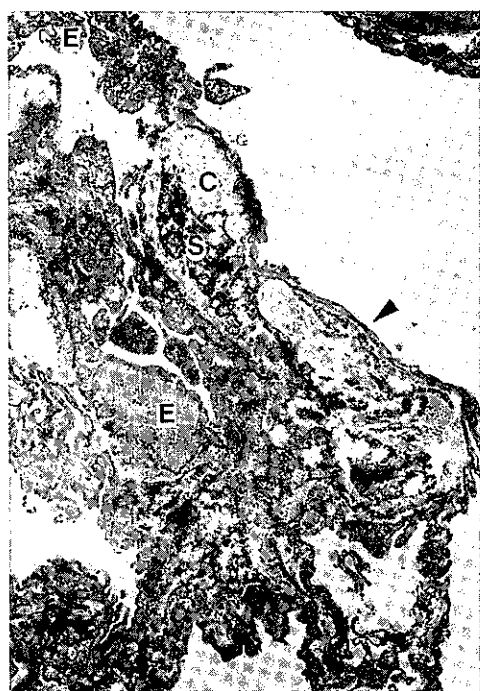


写真3



写真4

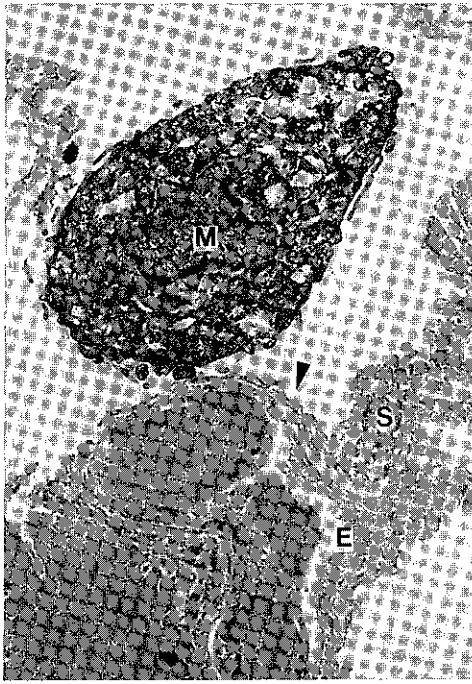


写真5

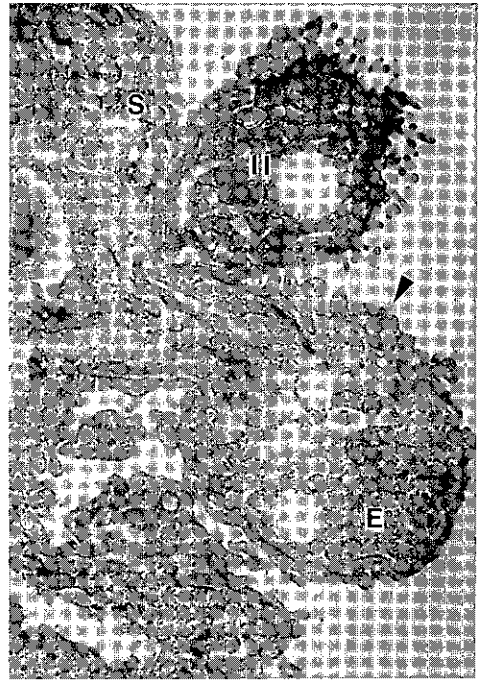


写真6

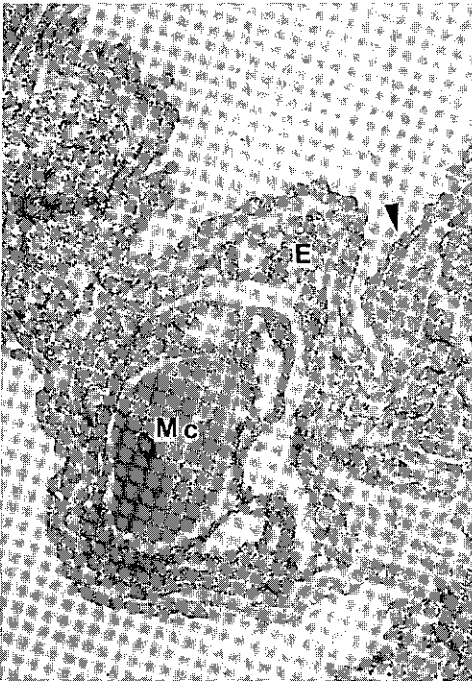


写真7

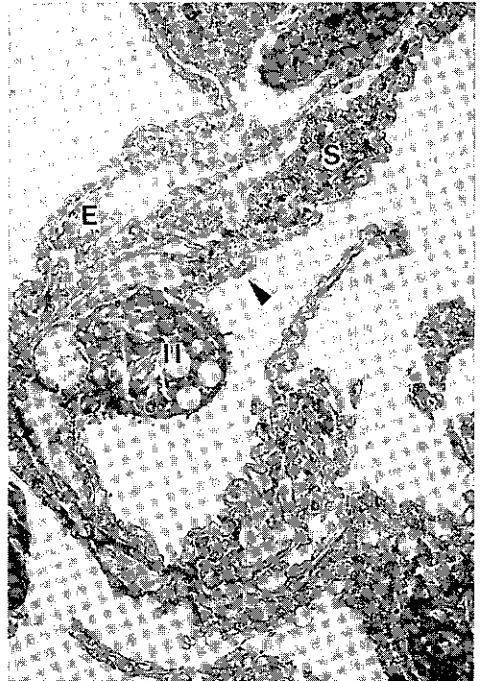


写真8



写真9

写 真 説 明

写真1：非曝露対照肺（3日曝露群に対する対照）  
GSH-PO局在は、肺胞毛細血管内皮細胞(E)のみに明瞭に認められ、I型肺胞上皮細胞、肺胞隔壁細胞(Septal Cell=S)などには殆ど観察されない。(×4,000)

写真2：非曝露対照肺（3日曝露群に対する対照）  
中央に見られるII型肺胞上皮細胞(II)の細胞質には僅かながらGSH-POの局在が認められるが、矢印が示すI型肺胞上皮細胞には局在は殆ど認められない。(×9,000)

写真3：O<sub>3</sub> 3日間曝露肺  
毛細血管内皮細胞(E)におけるGSH-PO局在はやや減弱しているが、Septal Cell(S)にGSH-PO局在が出現し始めている。矢印が示すI型肺胞上皮細胞は局在を示さない。(C)は肺胞隔壁結合織であり水腫性であると共に軽度の線維の増生も認める。(×4,000)

写真4：O<sub>3</sub> 3日間曝露肺  
GSH-PO局在は毛細血管内皮細胞とII型肺胞上皮細胞(II)及び肺胞マクロファージ(M)に認められる。I型肺胞上皮(矢印)は陰性。(×5,000)

写真5：O<sub>3</sub> 3週曝露群に対する対照肺  
肺胞マクロファージ(M)及びE(内皮細胞)に明瞭なGSH-PO局在を認める。Septal Cell(S)には弱いながらも同局在が観察される。(×9,000)

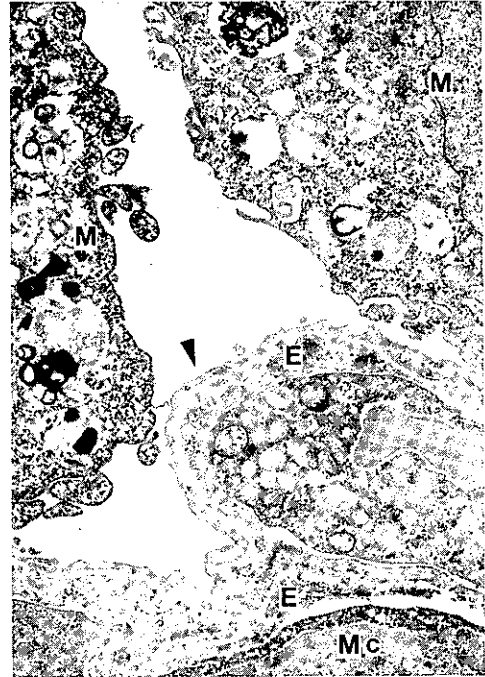


写真10

写真6：O<sub>3</sub> 3週曝露肺  
II型肺胞上皮細胞(II)、内皮細胞(E)及びSeptal Cell(S)にかなり明瞭なGSH-PO局在を認める。Eには小空胞が増加し、胞質は厚みを増しているが、GSH-PO染色性はやや減弱している。(×8,000)

写真7：O<sub>3</sub> 3ヶ月曝露肺  
内皮細胞は小空胞の増加と共に肥厚し、明瞭なGSH-PO局在を示している。毛細血管にはGSH-PO弱陽性の単球(monocyte=Mc)が認められる。(×8,000)

写真8：O<sub>3</sub> 6ヶ月曝露肺  
3週、3ヶ月曝露の肺と基本的には変わらない像を呈している。内皮細胞(E)、II型肺胞上皮細胞は強いGSH-POの染色性を示すが、I型肺胞上皮細胞(I)は陰性。(×4,500)

写真9：O<sub>3</sub> 6ヶ月曝露肺  
動物によっては矢印が示すようにGSH-POの染色性(局在)を示すI型肺胞上皮細胞が認められる場合がある。(×7,000)

写真10：O<sub>3</sub> 6ヶ月曝露肺  
肺胞腔にはGSH-PO局在を示すマクロファージ(M)が増し、又、毛細血管内にもGSH-PO陽性の単球(Mc)が散見される。Mcはそれに見られる好中球と較べて、遙かに明瞭なGSH-PO局在を示す。I型肺胞上皮細胞(矢印)には、殆どGSH-PO局在を認めない。(E)は毛細血管内皮細胞でGSH-PO中等度陽性。(×9,000)



細胞骨格の免疫細胞学的観察

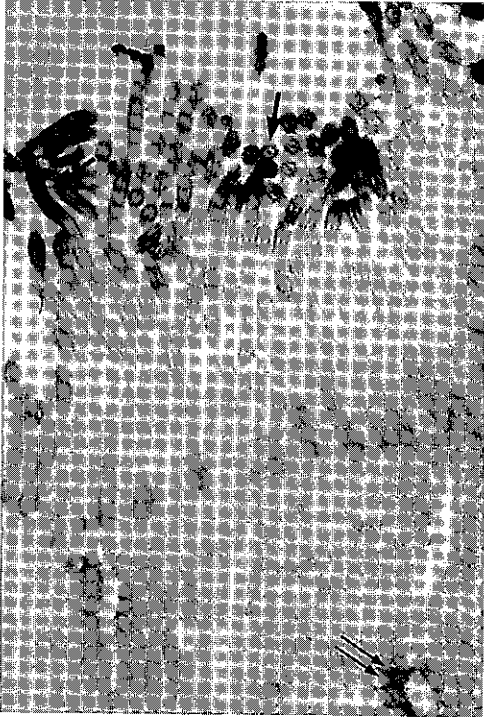


写真 1



写真 2

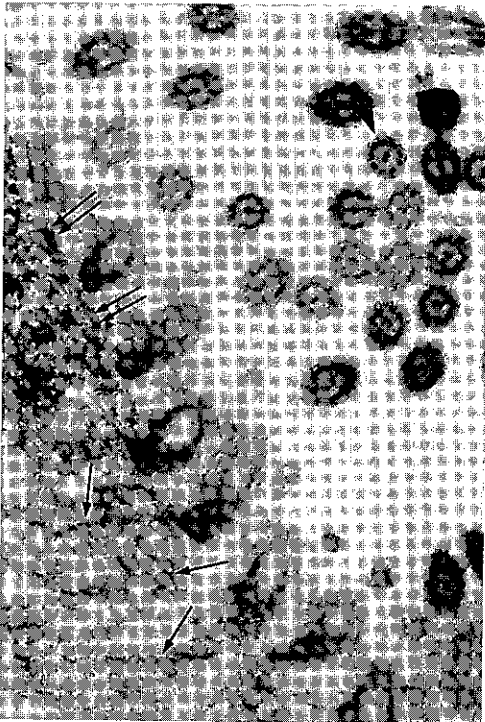


写真 3



写真 4

### 写 真 説 明

写真1：3週曝露群に対する非曝露対照動物の気管支上皮細胞。Tubulinは線毛内のmicrotubuleに一致してその最も鮮明な局在が認められる。写真下部の二重矢印の示すように細胞質の可溶性部分(cytosol)にも僅かながらその局在が観察される。恐らくこれはmicrotubulesにassemblyされていないtubulinの局在を示すものと思われる。(×10,000)

写真2：写真1の強拡大図。輪切りにされた線毛の断面図(矢印)では、周辺の9本のmicrotubulesと中央のcoreに当る部分の2本のmicrotubulesに明瞭なtubulin局在が認められる。(×20,000)

写真3：写真1の細胞頂上部の強拡大図。矢印は、tubulin染色陽性のmicrotubulesを示し、二重矢印は、assemblyされていない細胞質中のtubulin局在を示している。(×20,000)

写真4：O：3週曝露の気管支上皮細胞。線毛内のmicrotubuleにおけるtubulin染色性はやや減弱しているが、細胞質中のtubulin染色は、やや増強している。矢印は、細胞質中によるrandomに走るmicrotubulesにおけるtubulinの局在性を示している。(×12,000)