

NO₂ , O₃ 交互曝露による有害性の検討 家兔のNO₂ 0.5 ppm, O₃ 0.2 ppm 交互曝露実験

遠藤 立一 佐々木 裕子 川井 利雄
 大山 謙一 仲 真 晶子 川原 浩
 小松 遵至 渡辺 慶一 浪江 健二
(東海大学) (東海大学) (非常勤研究員)

1 はじめに

環境の生体に及ぼす作用は、大気、水、騒音などの総合作用として、理解されているが、現在の科学力では、その解析能力がない。このため、大気、水、騒音のそれぞれの影響を研究しているのが現状であり、更に、大気そのものの影響よりも、その中に含まれる物質の各単位の濃度と生体の影響との相関についての研究が主体を占めているが、近時ようやく複数の有害物質の組合せによる実験成績が報告されるようになって来た。

本報告は目下都市部の大気環境で主要な有害物質とされている、二酸化窒素（以下NO₂、とする）とオゾン（以下O₃、とする）の複合影響を動物実験により解明するために計画したものである。この実験設定に当り、NO₂ と O₃ の複合作用をO₃ 6時間/日、NO₂ 18時間/日と交互曝露により実施したが、その理由は、O₃、NO₂ を混合した場合、両者の共存により産生されるであろう化合物の濃度を連続的に把握することが、不能であり、本来目的とする物質の影響以外の因子の作用を除去するためである。

2 実験の方法

(1) 曝露物質及び曝露条件

O₃ は6時間/日0.2 ppmとし、NO₂ は18時間/日0.5 ppmに設定した。曝露施設は、1981年¹⁾年報で報告したもので、内部は、一定の温度、湿度、換気回数を保つ機能を有する他、空気中には実験ガス以外の有害物質、細菌等は含まない。

(2) 実験動物及び曝露期間

実験に用いた動物は、2ヶ月令のヒマラヤン家兔（清浄レベル）48頭で、1群6頭とし、別表1のとおり、

表1 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	
曝露群	6	6	6	6	24
対照群	6	6	6	6	24
計	12	12	12	12	48

3日、3週、3ヶ月、6ヶ月の曝露群4群と、各曝露期間に対応する対照群4群、計8群を検討の対象とした。

(3) 検討の方法

検討の方法は、光学及び電子顕微鏡（走査型、透過型）による組織形態学、免疫組織化学を主とする、病理学的方法と、血清、組織中の酵素活性の変動及び過酸化脂質量の変化を主に検索する生化学的手法を用いた、検討事項に関する詳細は、後述の各論を参照されたい。

(4) 採材

検討対象動物は、ネブタール麻酔下に開腹し、後大静脈から採血の後、生理食塩水で灌流放血し、主要臓器及び淋巴系を摘出、重量測定のうち、それぞれ目的に応じ、電子顕微鏡用、一般病理用、生化学用に分割して、処理を行った。

3 病理学的検討

(1) 光学顕微鏡による観察

ア 検討の方法

剖検時に採取した材料は、10%PBSホルマリン液に浸漬固定のうえ、パラフィン包埋、薄切片、H・E染色、PAS染色、AZAN染色を施して鏡検に供した。対象臓器は、肝臓、脾臓、腎臓、副腎及び呼吸器系の肺、鼻粘膜、喉頭、気管、気管支である。

イ 結果

曝露群と対照群間で組織形態上に変化の差を示したのは、呼吸器系の器官(肺, 気管支, 喉頭, 鼻粘膜)のうち肺であり, 他の臓器では, 両群間に差を認めなかった。主要な変化を示した肺では, 曝露群に, ① 肺胞上皮細胞の細動脈周囲における限局性増殖小病巣(写真2) ② 細気管支から呼吸細気管支へわたっての粘膜分泌亢進及び, 上皮細胞の増生傾向が認められ, 細気管支腔はやや収縮していた(写真4)。これらの変化は, O_3 , 0.2ppm , NO_2 1ppm 曝露時に観察されたものと同様であった²⁾。しかし, この時と異なり, 本実験では肺胞壁の肥厚を示したものは少かった。また, 鼻粘膜の変化は, 3ヶ月曝露群に, 扁平上皮化生と粘液分泌細胞の腫大が共存する例が見出されたが, 他の変化の差は見出せなかった。総じて, 光学顕微鏡レベルでの曝露群と対照群の差は, 大きくなく, その変化は, 曝露ガスの加算的影響の範囲に留るものとする。

(2) 電子顕微鏡による観察

ア 検討の方法および材料

電子顕微鏡の観察に用いた家兎は, O_3 , NO_2 曝露群, 対照群ともに1群6頭中4頭, 計36頭である。検討の対照とした臓器は, 透過型電子顕微鏡(以下TEMと略す)では鼻粘膜, 扁桃, 気管, 肺であり, 走査型電子顕微鏡(以下SEMと略す)では鼻粘膜, 扁桃, 喉頭, 気管である。各臓器は, 冷2%グルタ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。TEM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し, さらにQY-1による置換を行なった後, 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, JEM1200EX型TEMで観察した。SEM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, イオンスパッター装置で金の表面被覆を行った後, JSM35型SEMで観察した。

イ 結果

(ア) 透過型電子顕微鏡による観察

① 鼻粘膜

曝露3日, 3週を中心に, 線毛, 無線毛細胞に強い水腫性の変化(細胞質, 小胞体の膨化)が見られたが, 対

照群にもほぼ同様の変化があり, 両群間に差は, 認め難い, これらの変化は, 3ヶ月, 6ヶ月群では軽度となった。

② 扁桃

表層の扁平上皮及び陰窩の上皮共に曝露, 対照群間に有意な差は認められなかった。

③ 気管

線毛細胞, 粘液分泌細胞(無線毛), 基底細胞, 間質の細胞とも, 曝露による有意な変化は, 認められなかった。3週曝露群では, 写真5, 6(矢印)に示すとおり, 粗面, 滑面小胞体の中等度の膨化, 滑面小胞体の増加並びに空胞化が認められたが, 対照群に比し, 有意な変化とは言い難い。

④ 肺

3週, 3ヶ月曝露群にI型肺胞上皮細胞の軽度~中等に及ぶ変形(表面の凹凸の増加ないし小突起の形成, 細胞全体の肥厚)や, I型~II型の間中型細胞の出現(写真7, 8矢印)などが認められたが, 同時期の対照群にも同様な変化が観察されており, 曝露による変化とは断定し難い。また6ヶ月曝露群では変化が乏しい。しかし, 肺胞上皮細胞以外の変化として, 3週, 3ヶ月曝露群で肺胞隔壁中の線維芽細胞(隔壁細胞=septal cell)の軽度の増加とその細胞質中の小空胞の増量, 毛細血管内皮細胞の軽度な変形(肥厚の表面の凹凸化)などが認められ, これらのことを考え合わせると, 何らかの曝露の影響が出ていると考えられる。

(イ) 走査型電子顕微鏡による観察

① 鼻粘膜

曝露群に線毛の短小化が観察された。しかしながらこの形態変化には曝露期間による程度の差は認められなかった。

② 扁桃

曝露による特異的所見は, 認められなかった。

③ 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た。これに対し, 曝露群では, 線毛の短小化, 消失が散見され(写真9, 10), 3日曝露群でのこの変化が, 他の長期曝露群より顕著(広範囲)であった。

④ 気管

個体差は大きいものの, 3日曝露群では, 線毛の短小

化、減少が認められた(写真11, 12)。3週以上の曝露群では、微絨毛を有した無線毛細胞の挙上が特異的な変化として観察され、線毛の変形は1例を除き殆んど認められなかった(写真13, 14)。表面形態の面からは、喉頭と同様に3日間曝露が今回の実験における変化のピークを形成している。

(3) 肺内グルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-PO)の免疫細胞化学的観察

ア 方法

固定：4%PLP(過ヨウ素酸-リジン-パラホルムアルデヒド)溶液中に浸漬固定した。

切片作製：6 μ の凍結切片を作製し、これを酵素抗体法染色に用いた。

酵素抗体法染色反応：抗ウサギGSH-POのIgGにホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を標識したものを反応に用いた。反応停止後4%パラホルムアルデヒドにて再固定し、標識酵素の組織化学的発色(Graham-Karnovsky法)を行った。

電子顕微鏡観察：2%四酸化オスミウム溶液で固定後エポキシ樹脂に包埋し、その後超薄切片を作製してJeol 1200EXにて観察した。

イ 結果

曝露後GSH-POは主として肺胞毛細血管内皮細胞と隔壁細胞にその明瞭な局在(存在部位: localization)を観察した(写真15)。この変化は3日曝露群に最も顕著に認められた。これらの細胞への局在は0.08 ppm O₃間歇曝露実験でも観察されていた。しかし、この時認められたII型肺胞上皮細胞には本実験では局在は観察されなかった。

(4) 気管支上皮細胞の細胞骨格およびGSH-POの免疫細胞化学的観察

ア 方法

(ア) GSH-PO局在の観察

上記(3)肺内GSH-POの局在と同様な方法で観察した。

(イ) α -チューブリン(マイクロチューブルの主成分)局在の観察

固定：4%PLP溶液中に浸漬固定した。

切片作製：6 μ の凍結切片を作製し、これを酵素抗体法染色に用いた。

酵素抗体法染色反応：1次抗体として抗 α -チューブリンIgG(マウス)を用い、2次抗体としてHRPを標識

した抗マウスIgG(ヤギ)を用いた酵素抗体法間接法により行った。反応停止後4%パラホルムアルデヒドにて再固定し、標識酵素の組織化学的発色を行った。

光学顕微鏡観察：メチルグリーンにて核染色をした後観察に供した。

電子顕微鏡観察：2%四酸化オスミウム溶液で固定後エポキシ樹脂に包埋し、その後超薄切片を作製してJeol 1200EXにて観察した。

イ 結果および考察

最も顕著な変化の認められた細気管支(気管支周囲軟骨も平滑筋層も消失している末梢気管支)を観察の対象とした。

光学顕微鏡での観察では、GSH-POは気管支腔内に挙上、突出した無線毛ないし脱線毛細胞に集中して局在し、線毛細胞には少かった(写真16)。これに反し、 α -チューブリンは当然のことながら線毛細胞の線毛部分に集中して局在した(写真17)。この傾向は3日曝露群に最も顕著で、写真18が示すように増加した無線毛ないし脱線毛細胞(矢印)に強いGSH-POの染色が認められ、これらの細胞には α -チューブリンの局在を認めなかった(写真19:矢印)。次いで3週(写真20, 21)、3ヶ月(写真22, 23)曝露群にこの傾向は強かったが、6ヶ月曝露群では対照群との間に明瞭な差異は認め難かった(写真24)。

電子顕微鏡での観察では、GSH-POは無線毛細胞の細胞質可溶性部分に特異的に局在しており(写真25)、ある程度脱線毛の進んでいる細胞(写真26:C)に軽微な局在を認める以外線毛細胞にはほとんどその局在を見なかった。 α -チューブリンは線毛細胞の線毛内のマイクロチューブルに最も際立った局在が認められ(写真27)、無線毛細胞には全く認められなかった。また、脱線毛の進んだ細胞の線毛のマイクロチューブルには軽微な局在しか認められなかった(写真27, 28C-矢印)。さらに、これら脱線毛の進んだ細胞では、線毛の根元付近の細胞質中に α -チューブリン陽性のマイクロチューブル(写真29, 30)と共にdisassemblyされたか、またはassemblyされていない α -チューブリンの局在が認められた(写真29, 30)。

以上、細気管支上皮におけるGSH-POと細胞骨格(マイクロチューブルを主とした)の免疫細胞化学的観察は、本年度実験中最も興味ある際立った変化を示した。

筆者らはGSH-POがその基質である脂質過酸化物によってその合成の促進を見ることを立証し、それゆえ、GSH-POが増強する細胞では活発な脂質過酸化が起きていることを報告した。⁴⁾この事実と、本実験結果とを考え合わせると、曝露によって増加したGSH-PO陽性の無線毛、および脱線毛細胞(3日間のものが最も顕著)は、曝露によって顕著な脂質過酸化を生じていることが推測される。また、この様な脱線毛細胞では α -チューブリンのマイクロチューブルへのassemblyが低下している所から、脂質過酸化がその起因となっていることがうかがわれる。細胞膜の脂質過酸化により Ca^{++} イオンの流入が増強することは、よく知られている所であり、 α -チューブリンのdisassemblyを促進する作用のある Ca^{++} イオンの流入増強が究極的には脱線毛をひき起し、細胞質の腔内への挙上をも起す原因となっていることが強く示唆される。

また、ここに示された様に、気管支(ことに末梢の細気管支)の形態学および機能的変化により、同部位を中心とした諸感染に対する防禦反応(線毛上皮は、肺胞内マクロファージと共に重要な役割を担っている)に影響がおよぶことは充分考えられる所であり、 O_3 、 NO_2 曝露による直接的な作用のみならず、感染症による二次的な生体への影響が考慮されねばならないと思う。

(5) 病理学的検討の考察およびまとめ

走査型電子顕微鏡観察では、曝露を受けた気管、それも比較的早い時期(3日、3週)に無線毛(あるいは脱線毛)細胞の増加と特異的な挙上が認められた。透過型電顕による肺泡領域の観察では、I型肺胞上皮細胞の傷害変形、I型とII型肺胞上皮細胞の中間型細胞の出現と増生、肺胞毛細管上皮細胞の変形、肺胞隔壁細胞の増生などが認められた。これらの変化は、既報²⁾および本実験の免疫細胞化学的観察の結果と照合すると、 O_3 や NO_2 曝露による酸素radical発生とそれに次いで発生する脂質過酸化によるものと思われる。しかし、 O_3 も前年度より高濃度の0.2ppmを曝露し、これに加えて0.5ppmの NO_2 曝露を行っているにもかかわらず、変化が比較的軽微であるという矛盾が生じた。この説明として次のようなことが考えられよう。ミクロソームやミトコンドリアの電子伝達系の活動や放射線照射、 O_3 、 NO_2 などオキシダント曝露、薬物投与などにより生ずるradicalは細胞膜を中心に過酸化脂質を発生し、種々の

細胞傷害をもたらすが、筆者らが報告したように⁴⁾、それ自身強い細胞傷害性を有するradicalのエネルギーは発生した過酸化脂質に吸収され和らげられた形となる。過酸化脂質自身、細胞傷害性を有するが、radicalの傷害性から見ると一種の“shock absorber”的役目をも果している。GSH-POはこの過酸化脂質の有効なscavengerとして、その作用を調節しており、この“shock absorber”の機能を助長していると考えられよう。従って、 O_3 によって生じた過酸化脂質は、次に曝露される NO_2 によって当然惹起されるradicalの作用を和げ、さらに、過酸化脂質のscavengerであるGSH-POの合成促進をもたらす(この可能性も上記報告で立証した⁴⁾)、次に起る脂質過酸化を防禦することが考えられる。この現象が O_3 、 NO_2 の二重曝露にもかかわらず意外に変化が軽微だったことの説明として最も妥当性の高いものと考えられる。

しかし、さらに長期(6ヶ月以上)の曝露により徐々に全身的なGSH-POの過酸化脂質に対する反応性の生成促進能力が低下し、それに伴い過酸化脂質の蓄積が増し、ある一定の閾値を越えた時には強い傷害が招来されることも充分考えられる。また、本実験では生後2ヶ月という若い家兎を対象としているが、人、または実験動物でも老令のものもともと過酸化脂質が高いことも知られており、これらにあっては本実験と同じ曝露条件で強い傷害を来すことは十分考えられる。

4 生化学的検討

(1) 方法

血清は、凝血後2500r.p.m.で15分間遠心し分離した。

臓器についての採材部位は、肺では左肺後葉、肝臓は辺縁を用いた。材料は、等張りリン酸緩衝液で洗浄後、試料びんに入れ窒素ガスで置換し、 $-80^{\circ}C$ で用時まで保存した。

検討した項目は、血清、肺、肝臓についてTBA法による過酸化脂質量、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-PO)活性であり、肺と肝臓については、この他にグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)活性、マレートデヒドロゲナーゼ(Malic enzyme:ME)活性、非タンパク性SH(NPSH)量をそれぞれ測定した。GSH-PO活性は、過酸化水素(H_2O_2)を基質と

し、Paglia⁶⁾の方法で、G6PD活性はKornberg⁷⁾ら、ME活性はOchoa⁸⁾により、NPSH量はSedlak⁹⁾の方法によった。血清についてはGPTも測定した。

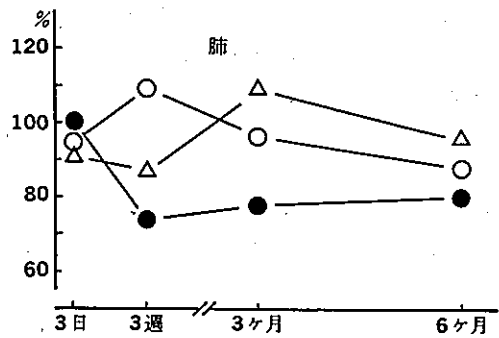
臓器は、冷等張リン酸緩衝液(pH 7.0)を用い、ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズし、4°C、9,000×gで30分間遠心した。この後上清を分離し、酵素分析用試料とした。TBA値については、1,1,3,3-テトラエトキシプロパンを標準として算出した。NPSH量は、すべて還元型グルタチオン(GSH)に換算して算出した。

(2) 結果

血清についてGPT、GSH-PO活性は有意な変化は見られなかった。TBA値は、6ヶ月曝露群で有意(p<0.01)に低い値を示した。

肺について見ると、GSH-POで6ヶ月曝露群が低い値を示した(p<0.1)。また、NPSH量を見ると、3週曝露群が有意(p<0.01)に上昇している。この時のME、G6PD活性は対照群に比べてやや低い値を示した。肺TBA値については、有意な変化はみられなかった。

肝臓については、TBA値を見ると6ヶ月曝露群が、対照群に比し有意(p<0.05)に高い値を示した。G6PD活性は3ヶ月曝露群で有意(p<0.05)に低下し、6ヶ月群も統計的には有意ではないものの、同様の傾向を示した。ME活性は、3週、3ヶ月曝露群で対照に比し有意(p<0.05)に低値を示した。GSH-PO活性は有



○ : GSH-PO活性 * : p<0.05
△ : ME活性
● : G6PD活性

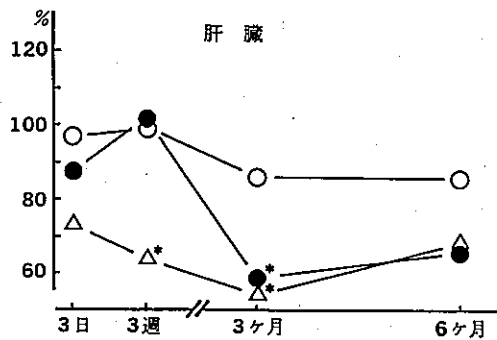
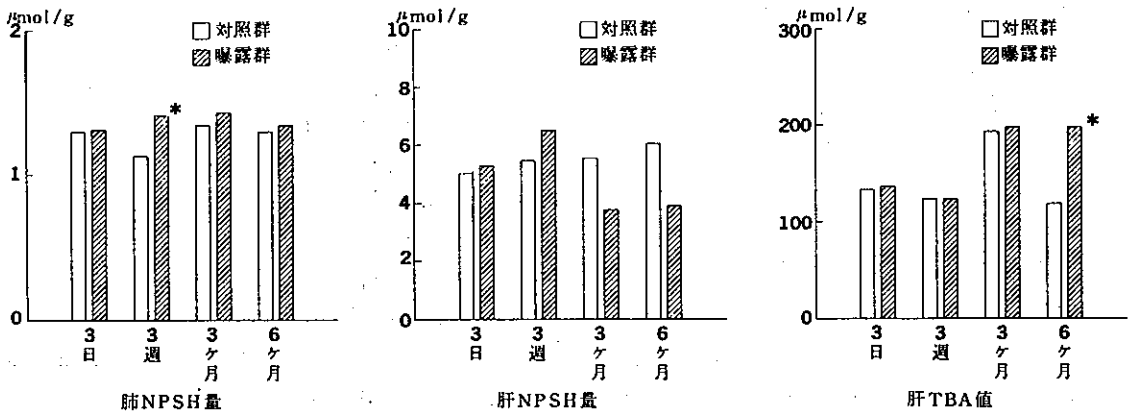


図1 酵素活性の変動



* : p<0.05

図2 測定結果

意な変化は無かった。次にNPSH量を見ると、3ヶ月曝露群でやや低い値を示し、6ヶ月でも有意ではないが ($p < 0.1$) 低い値であった。

有意差の判断は5%の危険率で、t検定を用いた。

(3) 考察

O_3 、 NO_2 はともに酸化性の強いガスと考えられている。これらの性質から、その生体に対する作用は、生体物質の酸化という面から、捕らえられている。 O_3 については、過去我々が得た知見から、その影響が全身的なものであり、特に比較的低濃度の O_3 (0.08 ppm) においても肝臓のTBA値(過酸化脂質量)が有意に上昇することが観察されている。生体は、これらの過酸化の影響を排除する一連の酵素系があり、過酸化脂質を直接代謝する酵素としてGSH-POがある。GSH-POは、SH基を持ったGSHを用いて、基質である過酸化脂質を還元する。最終的にはNADPHが、 H^+ の供給源となっており、これはペントースリン酸経路のG6PDから生成される。また一部TCA回路へ連なるMEによっても生成されている。これら一連の酵素活性の変動を測定することで生体の過酸化の状態を推測できると考えられる。(図3参照)

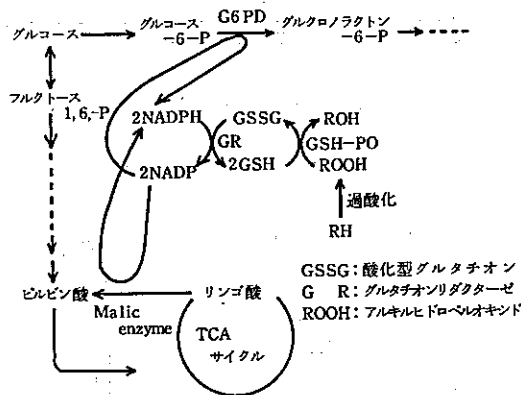


図3 NADPH産生と過酸化脂質の代謝

TBA値について見ると、肺では各期間とも有意な差はなく、肝臓で6ヶ月曝露群が有意に高い値を示した。この6ヶ月での肝臓NPSH量は有意ではないが ($p < 0.1$) 曝露群で低い値を示し、還元ポテンシャルの低い状態を示している。肺NPSH量は3週目で曝露群が高

値であり、3ヶ月、6ヶ月では対照群との差はなかった。ガス体と直接接触する器官は肺であるが、肺よりも肝臓が6ヶ月に至ると、明らかに過酸化された状態を示しており、過去の知見と同様、ガス体の影響が全身的なものであることが示された。この時の血清TBA値は逆に曝露群で低下しているが、現時点ではいかなることか不明である。肺については、6ヶ月で曝露群のGSH-POがやや低下する変化が起こっている。つまり、6ヶ月位までは肺は、全身的な連関の中で過酸化から防御されているが、更に長期間曝露が続けば、肺の過酸化が起こることが予想される。

G6PD, MEについては、肝臓で3週曝露群でMEが、3ヶ月曝露群でME, G6PDが有意に低下しており、NADPH合成の機能低下が示唆され、これが肝臓TBA値の増加につながったものと考えられる。また、肺ではG6PDが3週と3ヶ月曝露群で低下する傾向が見られた。嵯峨井らは、ラットに0.4 ppm NO_2 を9ヶ月と18ヶ月曝露し肺のTBA値を測定しているが、18ヶ月で有意に上昇し、また呼気中エタン濃度はすでに9ヶ月目で上昇することを示した。これは、肺の過酸化に先立ち全身的にはすでに過酸化が起こっていることを示すと考えられる。

今回の実験では、6ヶ月曝露群で明らかな肝臓の過酸化が示されたが、曝露が長期になるにつれて、防御機能の低下が起こり、全身的に過酸化の状態が進むと考えられ、特に肝臓が重要な役割を持っていることが示唆された。 NO_2 、 O_3 の交互曝露という条件で考えると、少なくとも相加的にその影響が現われていると考えられる。

5 まとめ

今回の実験では、 NO_2 あるいは O_3 単体での曝露実験に比べ、特に病理形態上の変化は少ないかに見える。しかしながら、生化学の成績を考慮に入れて、経時的に病変を観察すると、有害ガス体の影響に対して、生体の抵抗力が限界に近づいている様子が明確となって来る。このことは、免疫組織化学でのマイクロチュブリンの associate が妨げられていることや、短(無)絨毛の上皮の増生からも推定出来、曝露ガスに由来する radical の経時性累積作用が明確であり、生体の持つ緩衝能(前述)を越えた時点で、特定の疾患として、表現されることが、予測し得る。これらの点から、 NO_2 0.5 ppm,

O₃ 0.2ppm という濃度レベルでの交互曝露の有害性及び標的病変を見出すための本研究は、その目的を果たしたものと考える。

6 おわりに

近時、体内における radical の作用が注目されており、白内障、心臓血管の硬化、腫瘍の発生など、慢性的原因で生じる疾患の原因、あるいは、発病の主要因子としての位置付けがされている。この疾病原因としての radical の作用は研究の進展に伴い、更に多くの疾病との関連が見出されると考えられる。現在の大気汚染は、NO₂、O₃ などに代表される酸化性ガスと粉じんがその有害性の大部分を占めていることに間違いはない。特に、今回実験の対象とした。NO₂、O₃ のようなガス体は、従来呼吸器に与える直接作用のみが重視されて来たが、大気中濃度の低下と共に、直接的急性被害は減少した。今後の大気汚染は、その慢性長期の作用の結果、脳、心臓血管障害、腫瘍、などの成人病の原因、あるいはその他の原因不明の疾患との関連から研究されるべきであり、また、大気汚染の位置づけも、単に呼吸器疾患の有症率のみとの関連性ではなく広義の健康状態の低下との関係で見直されるべきであると考えられる。

参 考 文 献

- 1) 遠藤立一他：低濃度O₃ 曝露による有害性の検討一家兎の0.08ppm オゾン曝露実験第1報一、東京都公害研究所年報、245、(1981)
- 2) 遠藤立一他：大気汚染の呼吸器に及ぼす影響(家兎のO₃、NO₂ 交互曝露実験)、日本衛生学雑誌、33、(1)、71、(1978)
- 3) 遠藤立一他：低濃度O₃ 曝露による有害性の検討一家兎の0.08ppm オゾン間歇曝露実験一、東京都環境科学研究所年報、179、(1986)
- 4) 渡辺慶一：日本病理学会誌、75、(1986)印刷中。
- 5) Ohkawa, H, *et al.*: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. chem.* **95**, 351(1979)
- 6) 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)
- 7) Kornberg, A. *et al.*: *Methods in Enzymology I*, Academic Press, N.Y.(1955)
- 8) Ochoa, S.: "Malic " Enzyme, *Methods in Enzymology* ed. by S.P. Colowich and N.O.Kaplan, Academic Press, N.Y. (1955)
- 9) Sedlak, J. and R.H. Lindsay : Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Anal. Biochem.* **25**, 192 (1968)
- 10) 遠藤立一他：低濃度O₃ 曝露による有害性の検討一家兎の0.08ppm オゾン曝露実験 第三報一 東京都公害研究所年報、253 (1983)
- 11) 嵯峨井勝他：二酸化窒素長期曝露のラットに及ぼす影響、一脂質過酸化と肺の抗酸化性防禦機構の変化一 国立公害研究所研究報告、第31号、95 (1981)
- 12) 日本生化学会編：代謝マップー経路と調節一、7、東京化学同人 (1980)

光学顕微鏡による観察

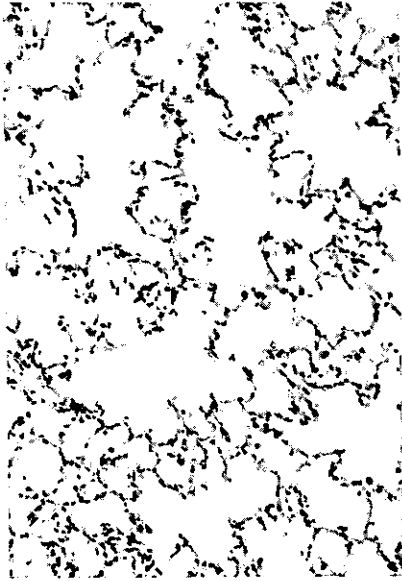


写真1 肺 对照群(×400)

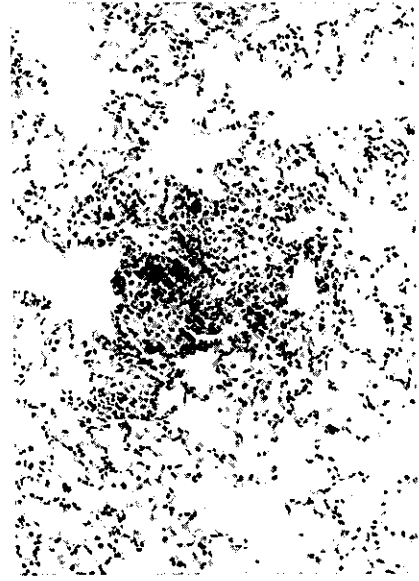


写真2 肺 3週曝露群(×200)

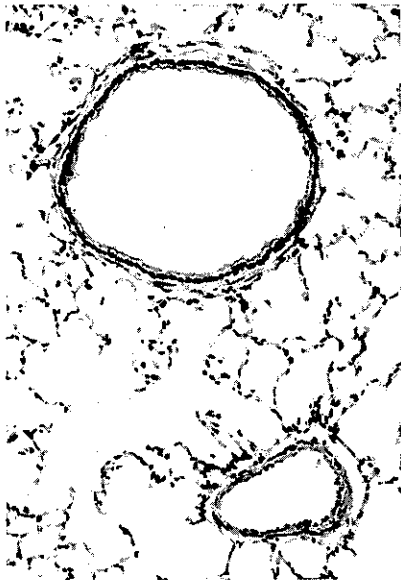


写真3 気管支 对照群(×200)

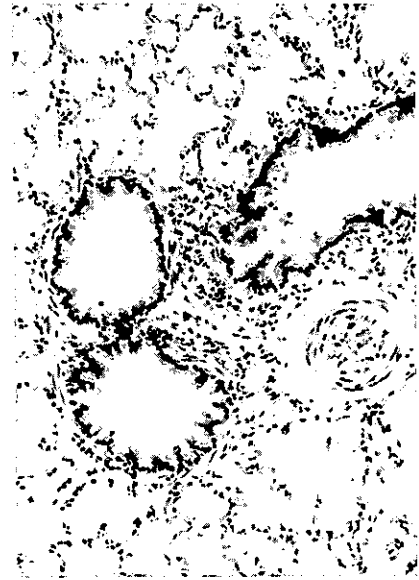


写真4 気管支 6ヶ月曝露群(×100)

透過型電子顕微鏡による観察

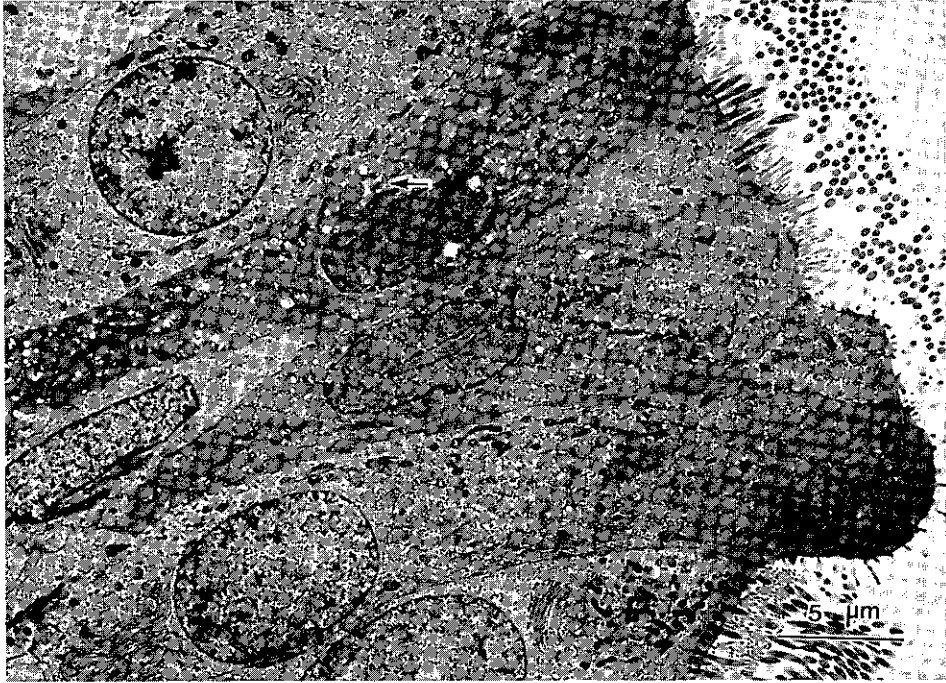


写真5 気管 3週曝露群(×3,750)

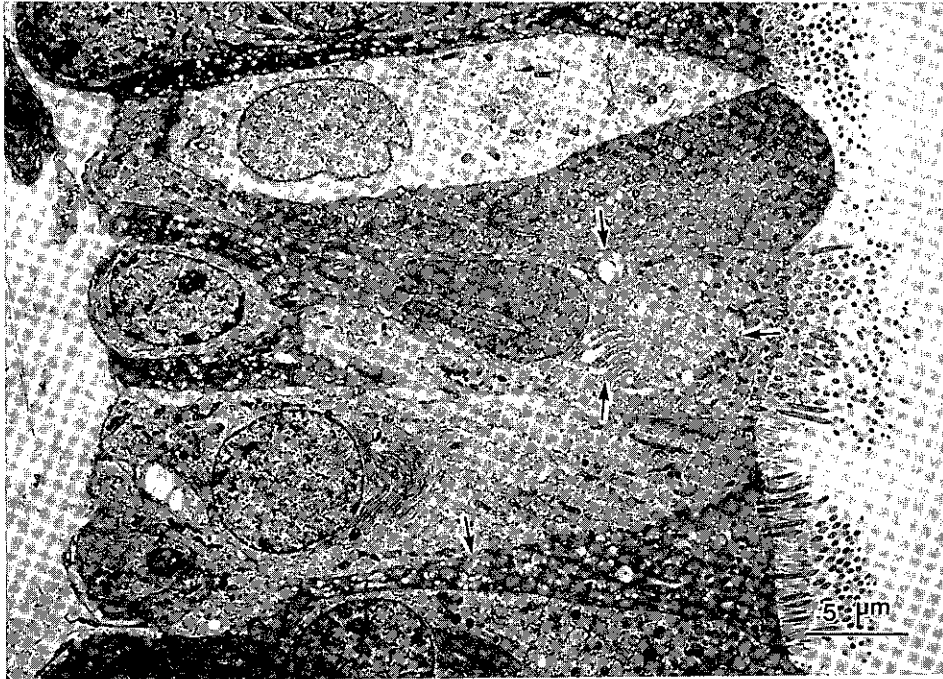


写真6 気管 3週曝露群(×3,000)

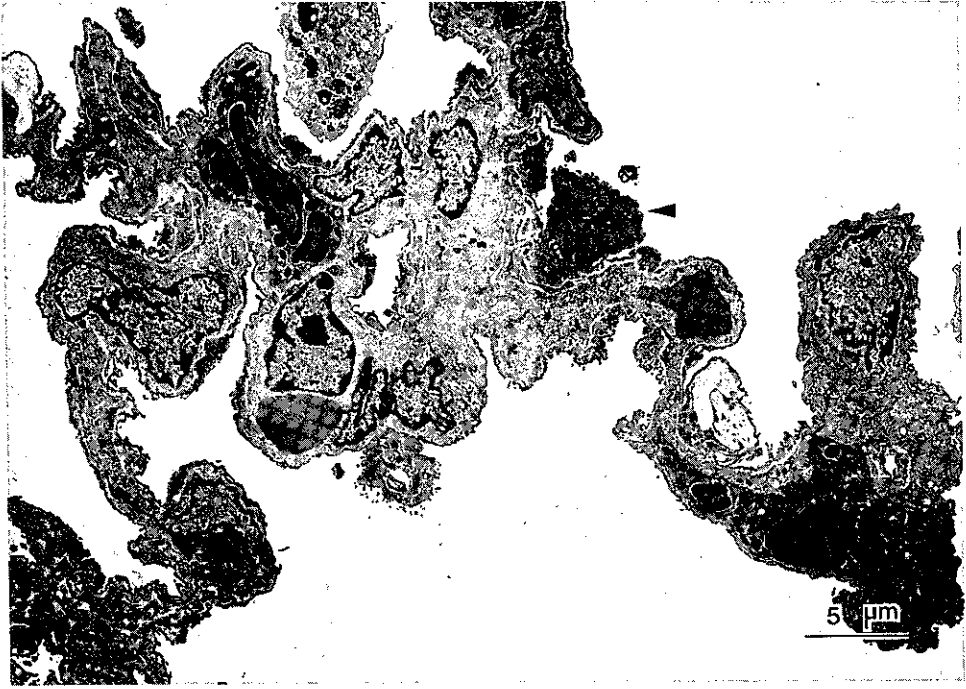


写真7 肺 3週曝露群(×3,000)

肺内GSH-POの局在(電子顕微鏡)

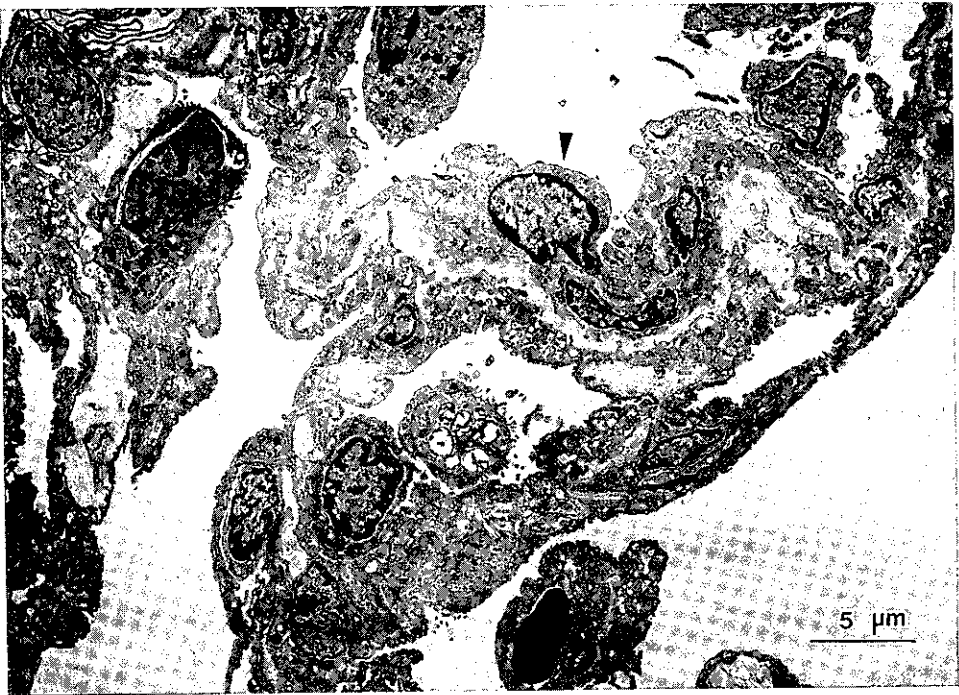


写真8 肺 3週曝露群(×3,000)

走査型電子顕微鏡による観察

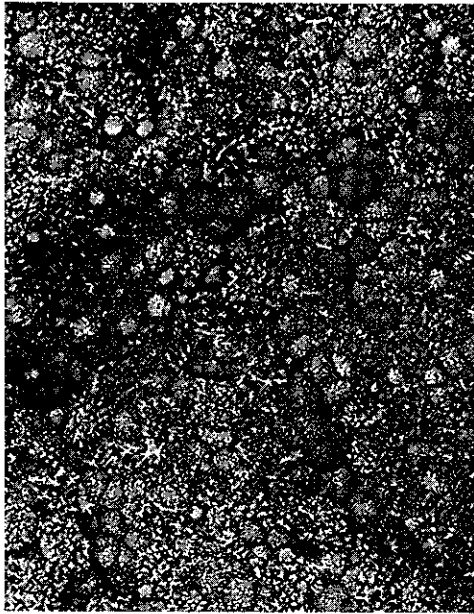


写真9 喉頭 3日曝露群(×1,100)

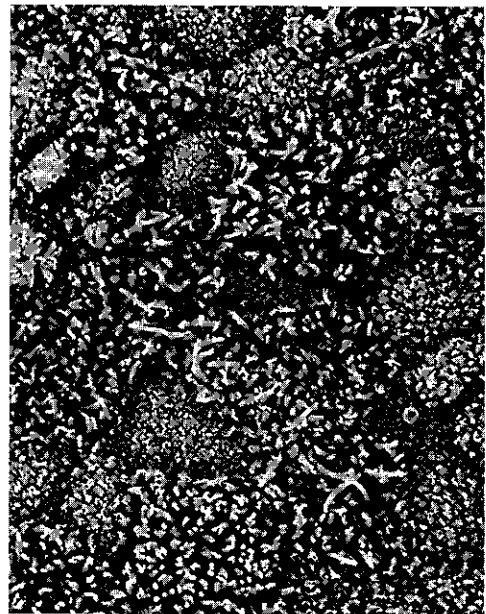


写真10 喉頭 3日曝露群(×3,300)

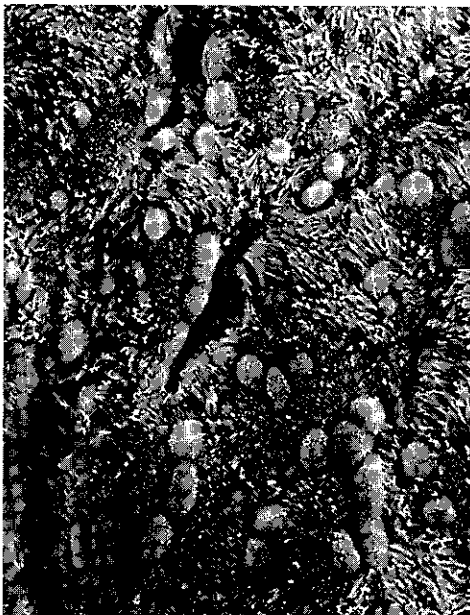


写真11 気管 3日曝露群(×1,300)



写真12 気管 3日曝露群(×4,400)

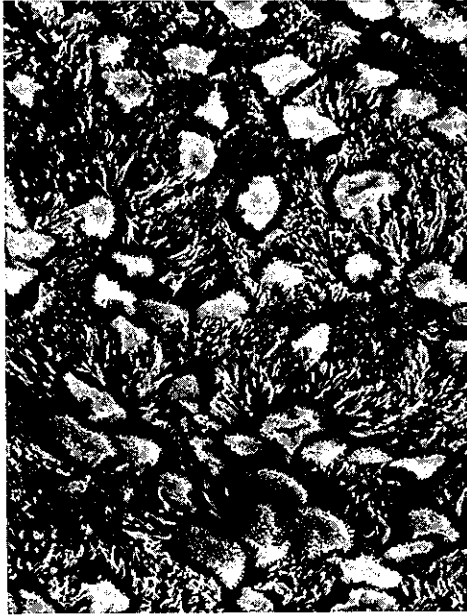


写真13 気管 6ヶ月曝露群(×1,600)



写真14 気管 6ヶ月曝露群(×6,600)

肺内GSH-POの局在(電子顕微鏡)

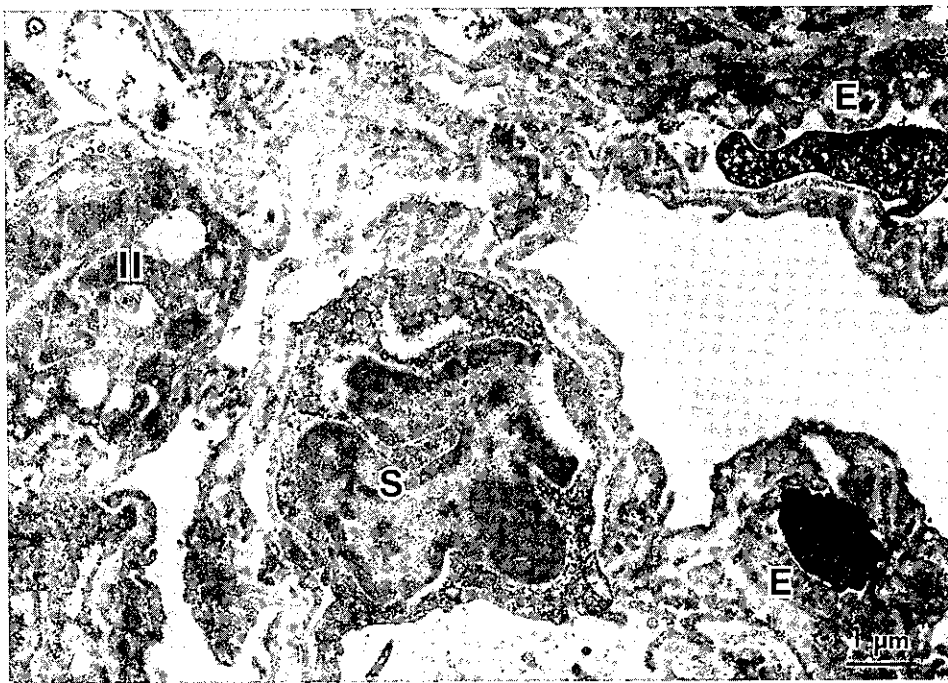


写真15 肺 3日曝露群(×9,200)

気管支上皮細胞のGSH-POおよび α -チュブリンの局在 (光学顕微鏡)

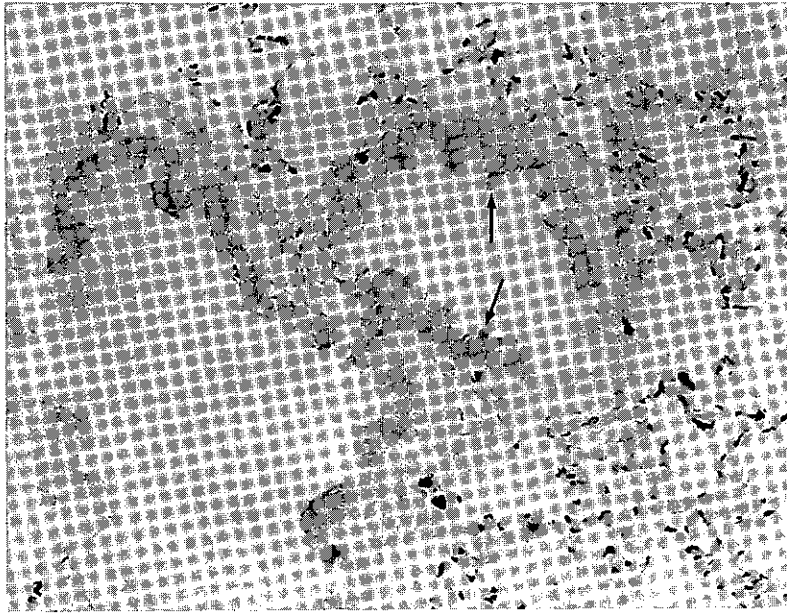


写真16 気管支上皮GSH-PO対照群 (×300) →: 無線毛細胞

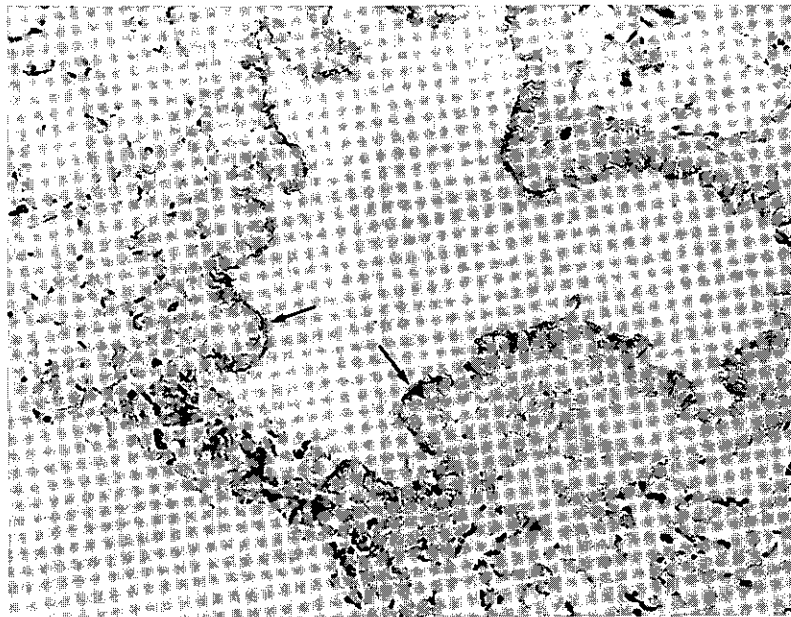


写真17 気管支上皮 α チュブリン対照群 (×300) →: 線毛細胞



写真 18 気管支上皮 GSH-PO 3日曝露群 (×750) →: 無線毛細胞

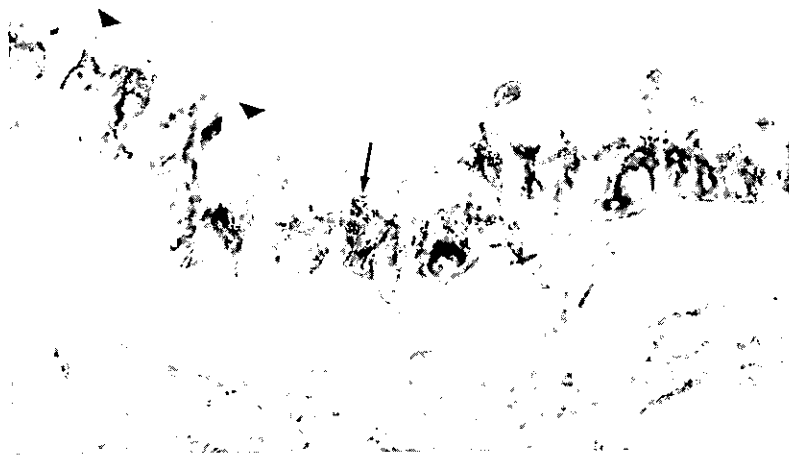


写真 19 気管支上皮 α -チユプリン 3日曝露群 (×750) →: 線毛細胞 ▶: 無線毛細胞



写真20 気管支上皮 GSH-P O 3週曝露群(×300) →: 無線毛細胞

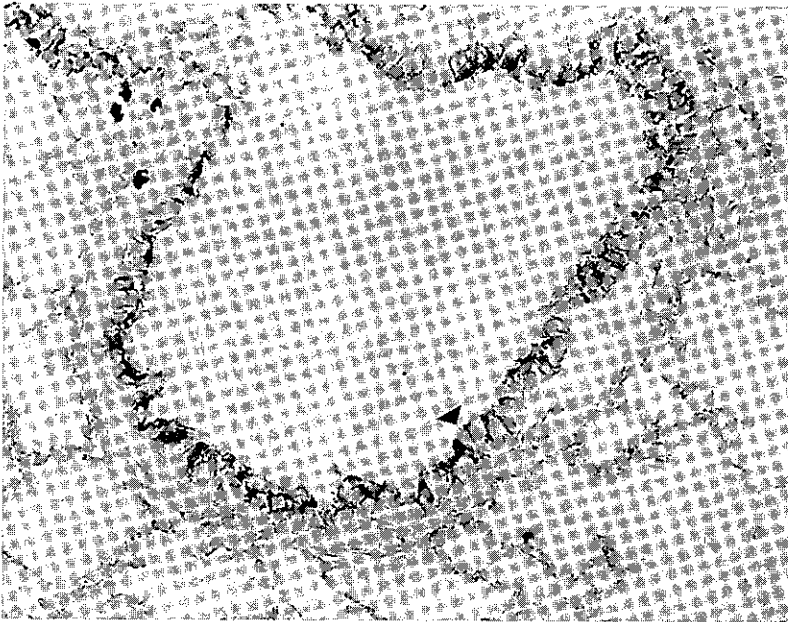


写真21 気管支上皮 α チムプリン 3週曝露群(×300) ▶: 無線毛細胞

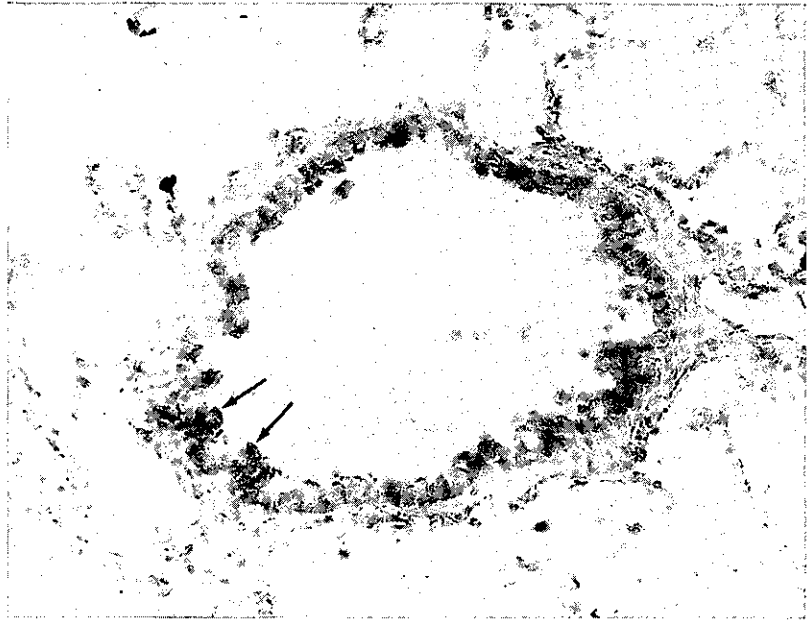


写真22 気管上皮 GSH-PO 3ヶ月曝露群(×300) →:無線毛細胞

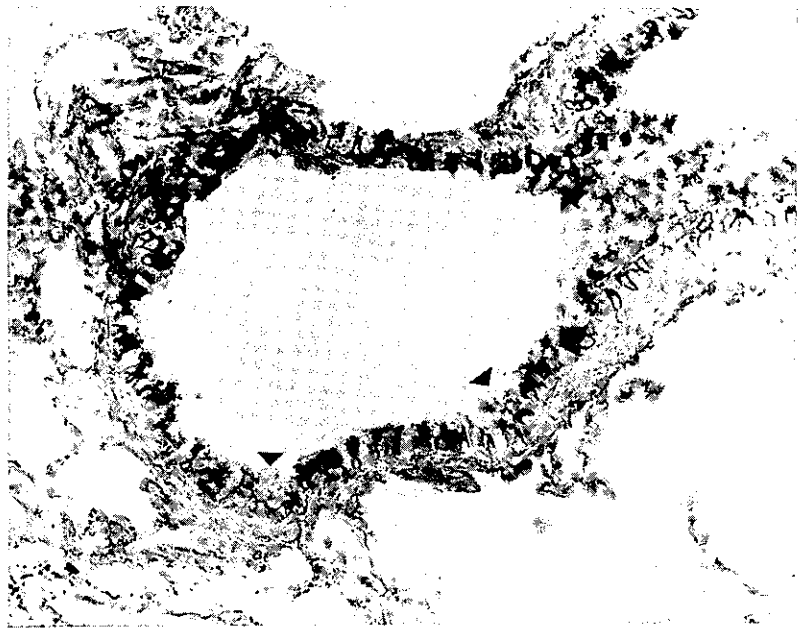


写真23 気管上皮 α チュブリン 3ヶ月曝露群(×300) ▶:無線毛細胞

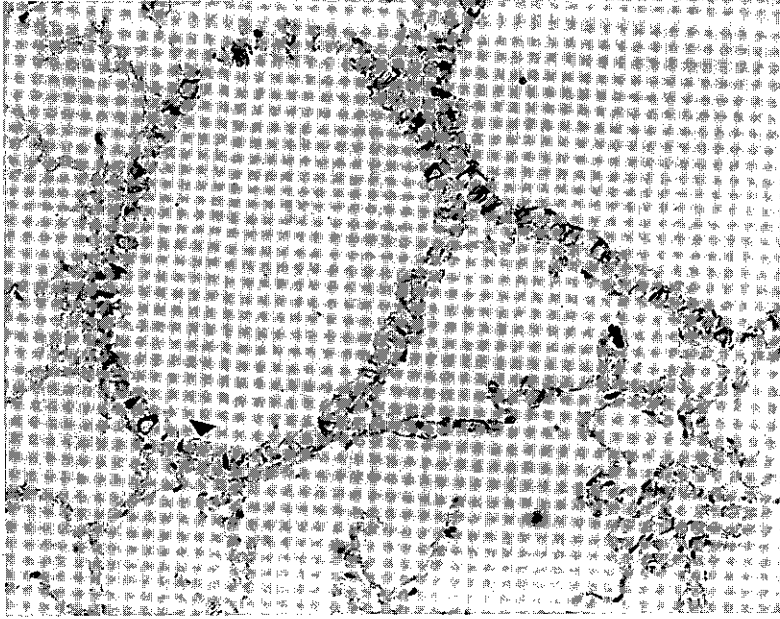


写真24 気管上皮 α -チユプリン 6ヶ月曝露群($\times 300$) \blacktriangleright : 無線毛細胞

(電子顕微鏡)

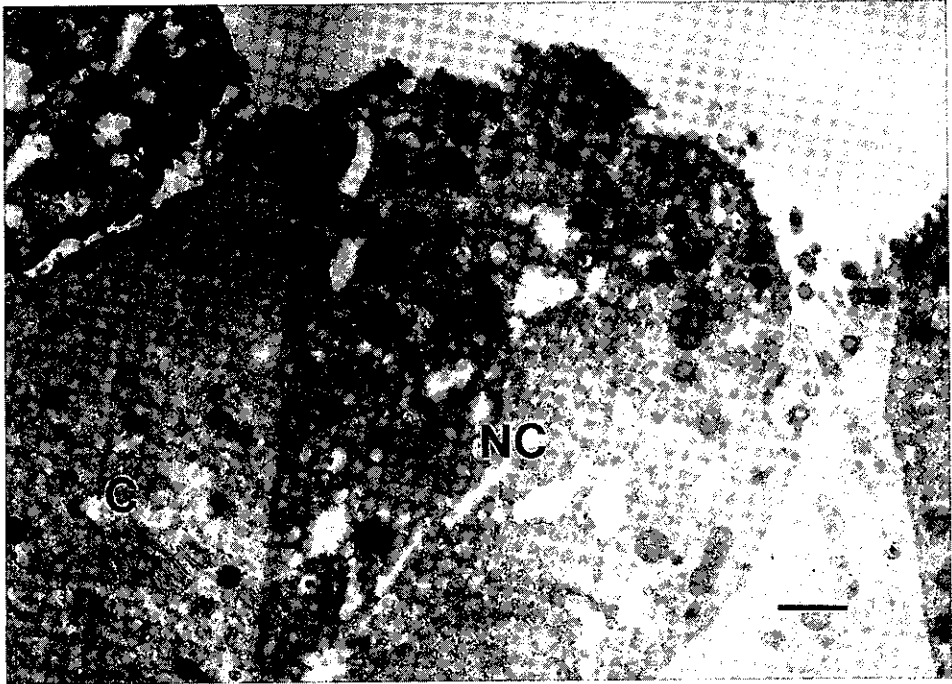


写真25 気管支上皮 GSH-P0 对照群 ($\times 10,000$) C:線毛細胞 NC:無線毛細胞

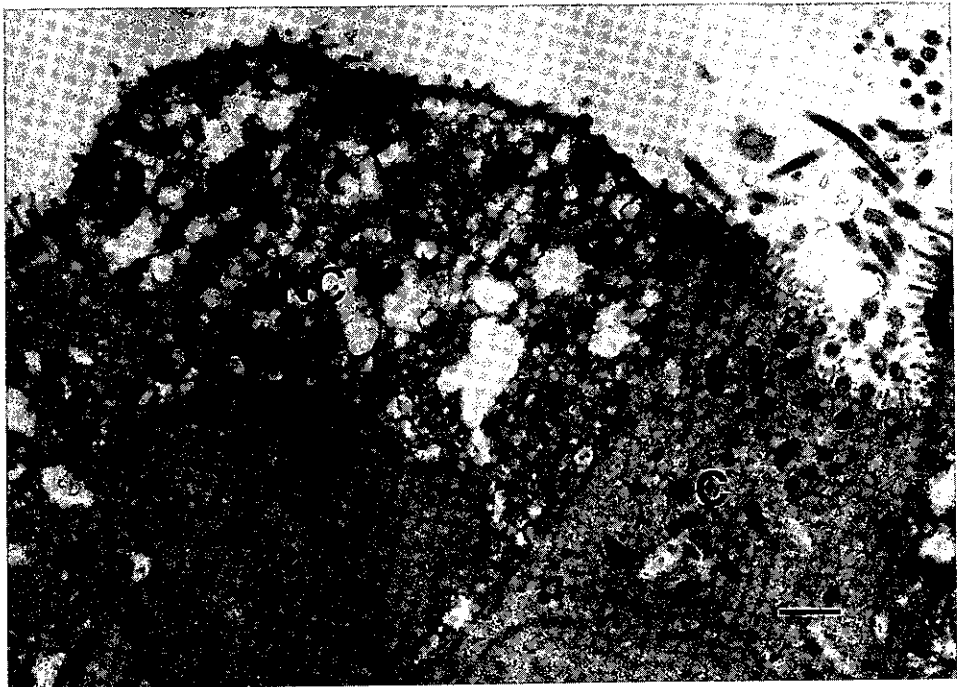


写真26 気管支上皮 GSH-P0 3週曝露群 ($\times 9,000$) C:線毛細胞 NC:無線毛細胞



写真27 気管支上皮 α チユプリン 3日曝露群($\times 7,800$) C:線毛細胞 NC:無線毛細胞 \rightarrow :線毛

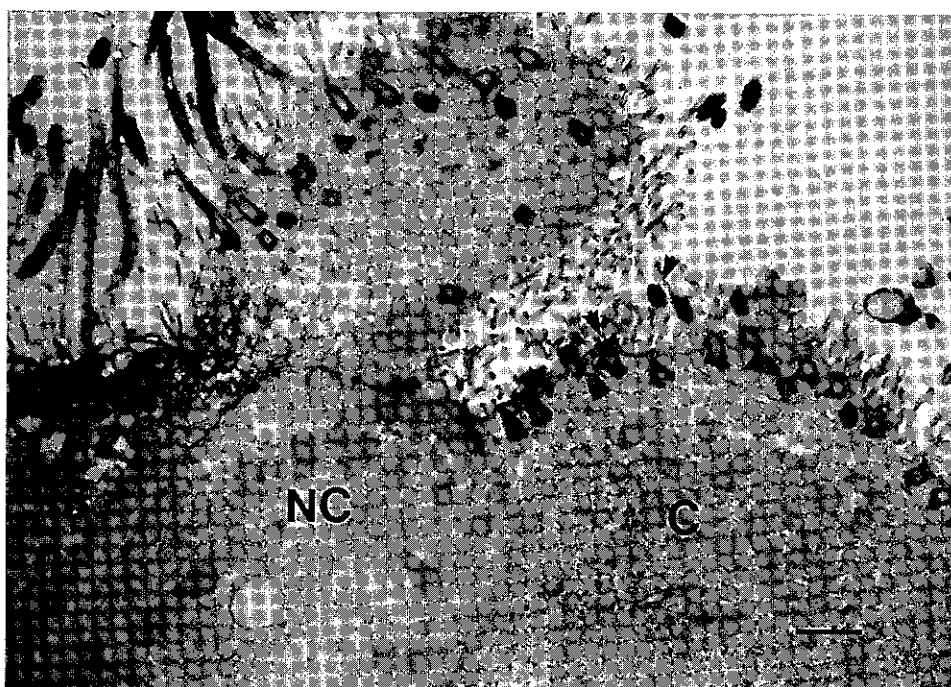


写真28 気管支上皮 α -チユプリン 3週曝露群($\times 9,600$) C:線毛細胞 NC:無線毛細胞 \rightarrow :線毛

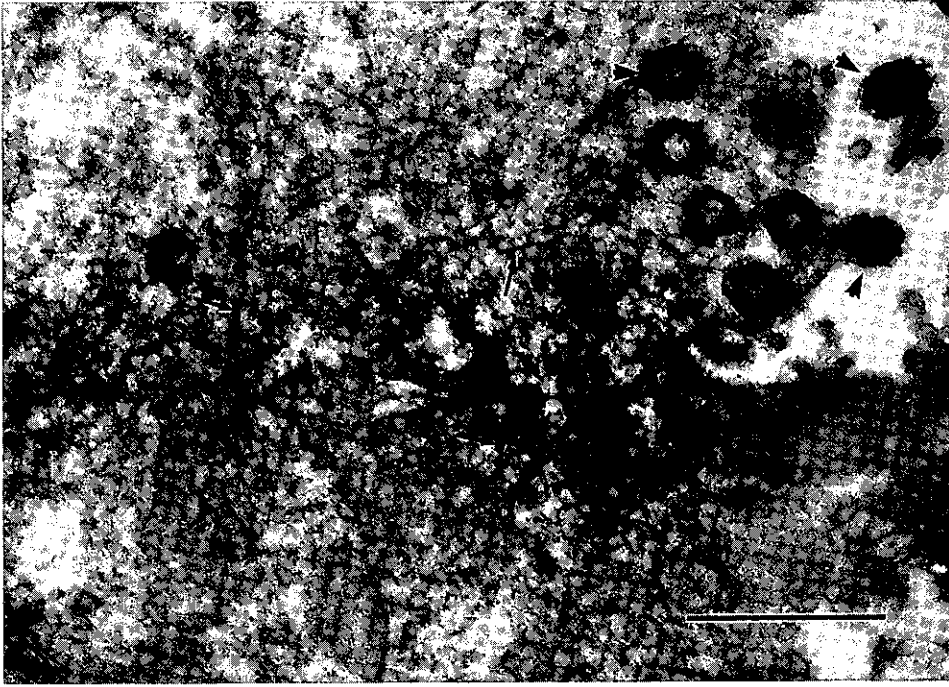


写真29 気管支上皮 α -チュプリン 3日曝露群 ($\times 29,000$) \rightarrow :線毛 \rightarrow :マイクロチュブル

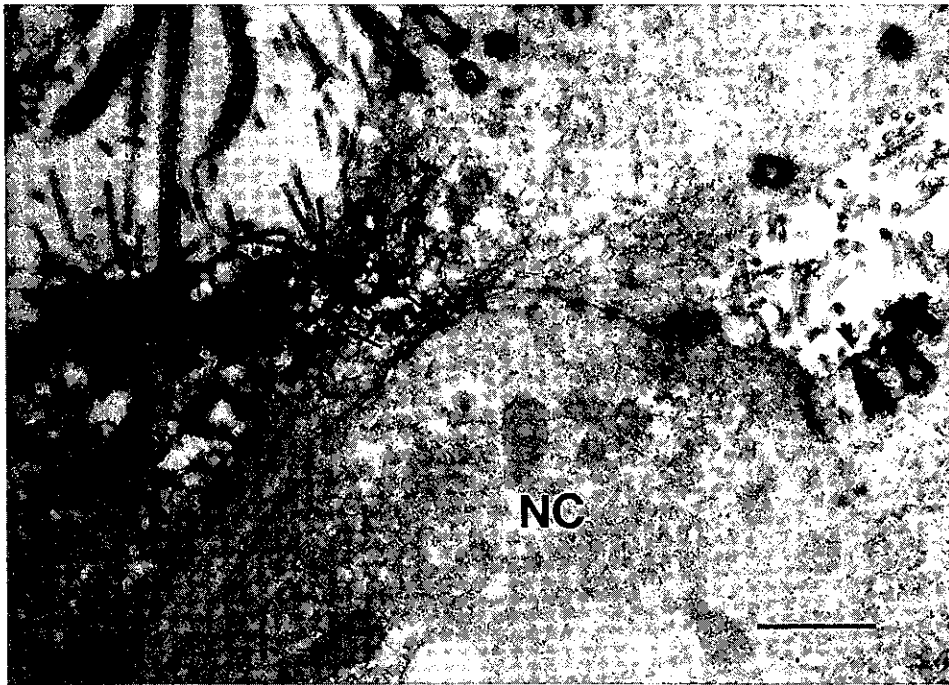


写真30 気管支上皮 α -チュプリン 3週曝露群 ($\times 16,800$)
C:線毛細胞 NC:無線毛細胞 \rightarrow :線毛 \rightarrow :マイクロチュブル