

NO₂、O₃交互暴露による有害性の検討 — 家兎のNO₂ 0.06ppm、O₃ 0.06ppm交互暴露実験 —

川井利雄 遠藤立一 佐々木裕子
 大山謙一 仲真晶子 川原浩
 小松遵至 波辺慶一
 (東海大) (東海大)

1 はじめに

大気汚染物質の生体影響の検討に当っては、以前より単体暴露の手法で検討を行ってきた。しかし現在の都市域での大気汚染は、当然に各汚染物質の複合作用として現われており、この観点からの研究が不可欠と判断された。そこで、昭和60年度より、技術的な部分も含めて、主な汚染物質であるNO₂、O₃の有害性の検討を、交互暴露の手法で開始した。今回(61年度)は環境濃度に則した条件での交互暴露を行った。以下の報文は、今年度の検討を中心に、前回(60年度)の成績を含めて述べたものである。

2 実験の方法

(1) 暴露物質及び暴露条件

暴露物質は、NO₂、O₃であり、濃度は前回NO₂ 0.5ppm、O₃ 0.2ppmであり、今回は、現実の環境条件を考慮して、NO₂ 0.06ppm、O₃ 0.06ppmに設定して暴露を行った。また、暴露時間は、昼間オキシダント濃度が上がることを考え、O₃は6時間/日(10~16時)、NO₂は18時間/日(16~10時)として交互に暴露を行った。暴露装置は、1981年年報で報告したものと同様で、各種エアフィルターを用い、粉じん、有害ガス、細菌等を含まない空気を供給し、温度、湿度、換気回数も一定になるよう制御し実験を行った。

(2) 供試動物及び暴露期間

実験に用いた動物は、2ヶ月齢のヒマラヤン種の清浄家兎(♂)で、1群6頭、前回合計48頭、今回60頭を使用した。暴露期間は表1の通りで、前回3日、3週、3ヶ月、6ヶ月、今回は、3日、3週、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月とし、各期間ごと対照群、暴露群、計2群ずつで検討を行った。

表1 暴露期間及び動物数

		暴露期間					計
		3日	3週	3ヶ月	6ヶ月	12ヶ月	
昭和60年度	暴露群	6	6	6	6	/	24
	対照群	6	6	6	6		24
	計	12	12	12	12		48
昭和61年度	暴露群	6	6	6	6	6	30
	対照群	6	6	6	6	6	30
	計	12	12	12	12	12	60

(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、免疫細胞化学を主とする病理学的方法と、血清、組織中の過酸化脂質、各種酵素活性の変動を検索する生化学的方法を用いた。検討方法の詳細については、各論で述べる。

(4) 採材

各期間暴露終了後、動物をペントバルビタール麻酔下で開腹し、後大静脈から採血後、生理食塩水で灌流放血し、主要臓器及び淋巴系を剔出、重量測定の後、目的に応じ分割して、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

前回と同様常法に従い、H・E染色また、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、膵臓、心臓及び呼吸器系の肺、鼻粘膜、喉頭、気管、気管支であった。

イ 結果

今回については、各臓器とも対照群、暴露群間で有意

な差は、認められなかった。

(2) 電子顕微鏡による観察

ア 検討の方法

電子顕微鏡の観察に用いた家兎は、暴露群・対照群とも1群6頭中4頭で計40頭であった。検討の対象とした臓器は、透過型電子顕微鏡(以下TEMと略す)では、鼻粘膜、扁桃、気管、肺、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、リン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、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、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。その後、酢酸ウラン、鉛の二重染色を施し観察を行った。SEM観察用の材料は、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、イオンスプッター装置で金の表面被覆を行い観察に供した。

イ 結果

(ア) TEMによる観察

a 鼻粘膜

暴露各期間にわたり、線毛、無線毛細胞双方の細胞質に小胞体の拡張を伴った水腫性の変化が認められ、また無線毛細胞では、その頂上部の細胞質の腔へ向った突出がしばしば認められたが、これらの変化は対照群でも観察され、暴露による変化とは認め難かった。

b 扁桃(重層扁平上皮及び重層扁平上皮内への遊走細胞の浸潤部位)

暴露群、対照群との間に有意な差は認められなかった。

c 気管

気管上皮の線毛細胞、無線毛細胞、基底細胞及びクルチッキー細胞などについて観察を行ったが、前回同様有意な変化は認められなかった。

d 肺

6ヶ月で毛細管内皮細胞の一部の浮腫様変化、肺胞隔壁中の線維芽細胞(Septal cell)においても同様の変化が認められるが、対照群にも散見され、有意な変化とは言い難い。

(イ) SEMによる観察

a 鼻粘膜

暴露3週、3ヶ月群で各々1例に部分的な線毛の消失が観察されたが、他は有意な変化は見られなかった。

b 扁桃

暴露による特異的所見は、前回同様今回も認められなかった。

c 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、暴露群では線毛の短小化が散見されたが、前回の变化に比べ軽度であり、期間による差もなかった。

d 気管

暴露3ヶ月群には認められないが、各暴露群では、無線毛細胞の増加、^{*}挙上(写真1, 2,)が観察された。但し、この形態変化は、個体差に比較的左右されているものの、暴露期間による程度の差異は認められなかった。3日暴露群で変化のピークを示した前回の結果とは、この点で異っている。

以上から、TEMによる観察では有意な変化は認められなかったが、SEM観察で、僅かながら気管上皮における無線毛細胞の増加とその挙上現象が認められた。しかし、これら変化は、前回と比べると軽度なものとどまった。

※無線毛細胞が腔内へ、せり上がる様に突出する像

(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

材料は4%PLP(過ヨウ素酸-リジナー-バラホルムアルデヒド)溶液中に浸漬固定した後、6μmの凍結切片とした。酵素抗体法染色反応は、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%バラホルムアルデヒドで再固定し、標識酵素の組織化学的発色(Graham-Karnovsky法)を行った。TEM観察には、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超薄切片を作製し観察に供した。

イ 結果

今回については、全期間において、前回と同様な肺胞毛細血管内皮細胞、隔壁細胞にGSH-POの局在(localization=存在部位)を認めた。更に、暴露3ヶ

月以上のものでは、Ⅱ型肺胞上皮細胞のみならず、細胞質の厚みを増したⅠ型肺胞上皮細胞にもその局在を認めた(写真4, 5, 6, 8)。GSH-P〇陽性のⅠ型肺胞上皮細胞の多くは、細胞質に比して大きな核を持ち、その核にはユークロマチン(euchromatin)が多く、時に核小体も観察され、幼若な細胞(分化したての細胞)の性格を備えている(写真4, 5, 6, 8)。また写真8のように、Ⅰ型とⅡ型細胞の中間型の出現も見られた。前回と比較すると肺胞毛細管上皮、隔壁細胞の局在は、前回は3日をピークとして現われたが、今回は全期間で見られた。なお、前回では、Ⅱ型上皮にごく僅かながら局在を認めた例もあるが、多くは陰性で、Ⅰ型上皮細胞ではほとんどその局在を認めなかった。なお、写真7は今回6ヶ月の対照群であるが、Ⅰ型、Ⅱ型上皮細胞とも、ほとんど変化を示していない。

※過酸化脂質を直接分解、除去する酵素

(4) 気管支上皮細胞の細胞骨格及びGSH-P〇の免疫細胞化学的観察

ア 方法

α -チューブリン観察は、4%PLP溶液中に浸漬固定後、6 μ の凍結切片を作製した。酵素抗体法染色反応は、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。この後、光学顕微鏡観察では、メチルグリーンにて核染色をし、またTEM観察では、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、超薄切片として観察に供した。

GSH-P〇観察については、(3)肺内GSH-P〇の局在と同様な方法で行った。

イ 結果

(ア) α -チューブリンの局在変動の観察

今回において、非暴露対照群の細気管支上皮細胞では、写真9が示す様に、ほとんどの線毛上皮細胞の頂上部と、矢印が示す線毛部に α -チューブリンの顕著な局在が認められる。3日、3週では個体差もあって明確な変化は認められなかったが、3ヶ月では、線毛部で明らかな α -チューブリンの減少が観察された(写真10, 矢印)。この様な α -チューブリンの減少傾向は、6、12ヶ月で更に明確となり、線毛細胞自身の減少も認められた

(写真11, 12)。これに反し、腔内に突出する無線毛細胞(α -チューブリン陰性)の顕著な増加が認められた(写真11, 12)。

α -チューブリンの免疫電顕観察では、対照群及び3日暴露群の細気管支上皮の線毛細胞は大部分、あまり異常を示さず、 α -チューブリンは線毛の芯(core)にあたるマイクロチューブルと、核上部細胞質にランダムな走向を示すマイクロチューブル(写真13)に、その局在が認められた。また、マイクロチューブル周辺の細胞質にも重合(assembly)されない(または、脱重合(disassembly)された) α -チューブリンが観察された。暴露3日群の中には、写真14が示すように、線毛の脱落が進んでいる線毛上皮細胞が時折観察され、これらの細胞では α -チューブリンのマイクロチューブル局在はまれで、大部分重合されないままの α -チューブリンが認められた。

暴露3ヶ月群でも個体によっては、完全な線毛細胞が残存しているものが認められ、これらの細胞ではマイクロチューブルに重合された α -チューブリンが観察された。しかし、12ヶ月暴露では、大部分の線毛上皮細胞で線毛脱落が進み、これらの細胞ではマイクロチューブルに重合された α -チューブリンは、ほとんど認められなかった。また写真15に見られるように、無線毛細胞の細胞質には、少いながら重合されない α -チューブリンが含まれるものが散見された。

前回と比べて、3日群でのピークは認められず、3ヶ月以降に明確な変化が出現した。また変化の質については、前回、今回とも基本的に差異はない。

(イ) GSH-P〇局在変動の観察

今回の実験では、3日、3週でも、ある程度の個体差は認められたが、対照群とほぼ同様の所見であった。

前回は、3日暴露群で最も顕著な変化、すなわち、細気管支腔内に突出する無線毛ないし線毛脱落細胞が増加し、これらにGSH-P〇局在が認められた。この点で今回の結果と異なっている。また、今回、6ヶ月暴露群では、多くの細気管支に写真16の矢印に示すごとく、腔内に突出する無線毛細胞の増加が認められ、これらに種々の程度のGSH-P〇局在が観察された。さらに長期の暴露(12ヶ月)を続けるに従い、写真17が示すように、GSH-P〇陽性細胞は数を増し、また、GSH-P〇の化学的染色性も強さを増していた。

これらGSH-P〇陽性細胞の免疫電顕観察では、G

SH-P-Oは主として、線毛が脱落、減少している線毛細胞、及び腔内突出無線毛細胞の細胞質に局在していた(写真18, 19, 20)。また、注目されることとして、写真18, 19が示すように、脱落した線毛の根部に特に強い局在性が示された。

なお、写真20の☆印が示す様に、線毛の脱落した細胞の頂部の細胞質が、腔内に突出する像が時折観察されることは注目すべき事実である。

以上の様に、今回は特に3ヶ月以降、暴露が長期に及ぶほど、変化が大きく現われたと言え、これは線毛の構成、細胞骨格を担う α -チューブリンの局在に関しても同様に観察され、前回の結果と異なる点と言えよう。

(5) 病理学的検討の考察及びまとめ

前回の実験では、肺胞毛細血管内皮細胞と隔壁細胞でのGSH-P-Oの増強が認められたにすぎなかったが、今回の実験では、これに加えてI型、II型肺胞上皮細胞でのGSH-P-Oの増強を認めるという、一見矛盾する結果が得られた

これらの細胞におけるGSH-P-Oの増強は、 NO_2 と O_3 というような強力なオキシダントにより、肺胞領域に当然にもたらされると思われるフリーラジカルの発生、後の脂質過酸化に対応する変化と思われた。事実GSH-P-Oは、その基質である過酸化脂質の増加に対応し、その合成促進が起こることが、マクロファージ²⁾や、肝細胞³⁾で実証されている。また、逆に言えば、これらGSH-P-Oの増強している細胞では、脂質過酸化が進んでいると言えよう。

今回の様な、低濃度暴露でより明確なGSH-P-Oの増強が、肺胞上皮細胞に出現した理由であるが、オキシダントにより、最も強く影響を受けるとされる肺胞上皮細胞では、高濃度の時は、GSH-P-Oの合成能が影響を受け、合成が低下するものと考えられる。

また、今回の実験で、I型肺胞上皮細胞の幼若化、増加、さらにI型-II型中間細胞の出現が観察されたが、元来傷害されたI型肺胞上皮細胞の補充は、II型肺胞上皮細胞の増殖によって行われ、傷害-修復が頻繁に行われる場合には、幼若なI型上皮細胞ないしI型II型の中間型細胞の出現をみるというHiraiらの報告⁴⁾によって説明できると思う。

そこで、マイクロチューブルの構成たん白質である、 α -チューブリンの気管、ことに細気管支上皮における局在

の免疫細胞化学的観察を行った。その結果、線毛上皮細胞の内、正常のものでは、マイクロチューブルに重合(assembly)された、 α -チューブリンが観察されたが暴露により脱線毛が起ったり、無線毛となって細胞質が腔内に突出している様な細胞では、 α -チューブリンのマイクロチューブルへの重合の抑制が認められた。このマイクロチューブルの異常が線毛の減少、細胞の変形の主因と思われる。

ついで、なぜこの様な異常が発生するかについては、 NO_2 、 O_3 暴露による変化ということからも、線毛上皮における脂質過酸化の増強を想定し、これを解明すべく、細気管上皮におけるGSH-P-Oの局在観察を試みた(過酸化脂質増加によりGSH-P-Oの合成促進もたらされる²⁾³⁾)。その結果、線毛の異常が起り、変形の強い細胞にGSH-P-Oの増強が認められ、上記の推定の妥当性を示唆した。

それでは、なぜマイクロチューブルの異常もたらされるのであろうか。Jewell⁵⁾やBellomo⁶⁾らは、分離肝細胞にtert-ブチルヒドロペルオキシド(過酸化脂質の一種)を作用させると、細胞質中に Ca^{2+} の顕著な増加、蓄積が発生し、その結果 α -チューブリンのマイクロチューブルへの重合低下が起り、肝細胞には多数の“bleb”(細胞の外方への小突出)が出現したとしている。この“bleb”は、形態的に本実験で、暴露により線毛上皮細胞に出現した細胞頂部の突出と類似しており、これは、暴露により脂質過酸化の増強が起り、それにより Ca^{2+} の細胞内増量、おそらく流入(influx)の増強をきたし、ひいては、マイクロチューブルの異常をきたしたものと考えられる。今後このような現象を確認すべく、線毛上皮細胞でのカルシウムの移動(translocase)や Ca^{2+} -ATPaseの活性の変動、GSHの測定などを行わなければならないと考える。

以上のごとく、 NO_2 、 O_3 共に0.06ppmという低濃度の暴露でも、純形態学的、また生化学的な検索だけでは、なかなかとらえにくい変化でも、免疫細胞化学を応用し、特定の機能の局在性の変動を観察することにより明らかにすることができた。また、上記諸実験の組合せから、 NO_2 、 O_3 暴露による細胞傷害の病因論として、脂質過酸化の意義がクローズアップされた。

4 生化学的検討

(1) 方法

採材部位, 方法は前回と同じで, 臓器については, 等張リン酸緩衝液 (pH7.0) を用い, ポッター型ホモジナイザーで20%ホモジナイズとした。TBA値測定用は, そのまま, 酵素分析用は4℃, 9,000×g, 30分遠心分離後, 上清を用いた。

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, この他, 肺, 肝臓でグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-PO) 活性, 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。測定方法は, それぞれ, Paglia らの方法,⁸⁾ Kornberg らの,

Ochoa¹⁰⁾ら, Sedlak らの方法¹¹⁾によった。なお, TBA値については, 1, 1, 3, 3, -テトラメトキシプロパンを標準として算出し, NPSH量は, すべてをGSH (還元型グルタチオン) とみなして算出した。

(2) 結果と考察 (図1, 2参照)

血清については, 特に変化は見られなかった。

肺については, 酵素系もNPSH量も有意な変化はなかった。また, TBA値は, 加齢によるとみられる漸増はあったが, 対照群, 暴露群での差は見られなかった。

肝臓を見ると, G6PD, MEとも3日で低く (p < 0.05), 3週, 6ヶ月で対照群と同じレベルに戻り, 12ヶ月で再び低い値を取るという変化が見られた。これは, 昨年度の結果で, 3ヶ月でG6PD, MEが低下した事と比べると, 変化が経時的に後へずれたと言える結

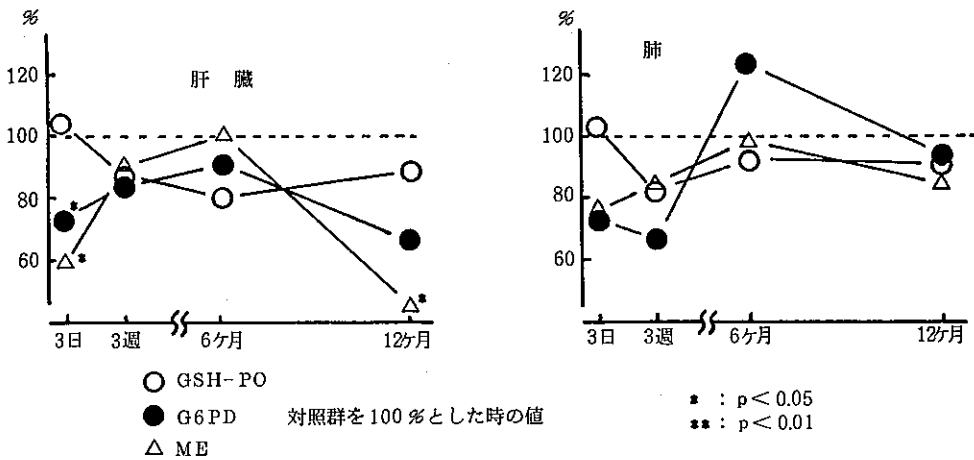


図1 酵素活性の変動

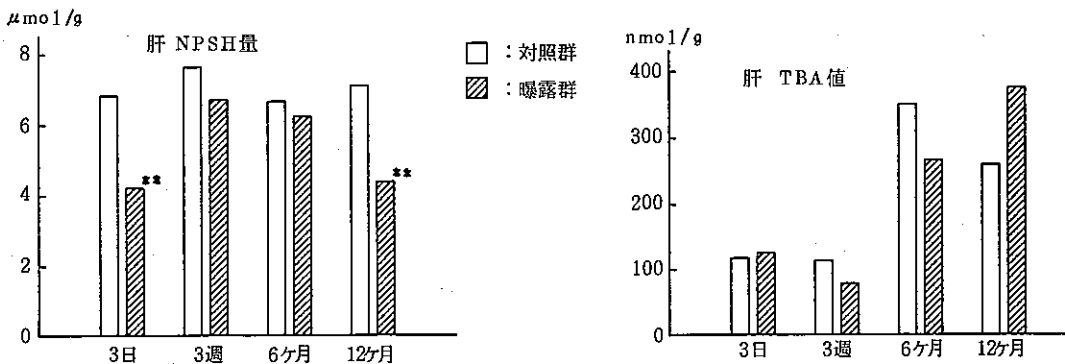


図2 測定結果

果である。TBA値については、12ヶ月で暴露群が高い値を示し、この時のNPSH量は低い値 ($p < 0.01$) を示している。また3日目でもNPSH量の低下 ($p < 0.05$) が見られた。GSH-P-Oについては、若干の増減はあるが、ほぼ一定のレベルを保っており、変化は見られなかった。

NO₂、O₃という酸化性の強いガスの性質として、生体内の不飽和脂肪酸を過酸化することが知られている。2年度にわたり、この面からの検討をしてきたが、今回12ヶ月で肝NPSH量の低下、TBA値の上昇が見られ、また、いわゆる抗酸化性防御系の酵素、G6PD、ME活性の低下も見られた。これは、生体の還元能力が下がり、外から加えられた、過酸化のストレスに応じきれなくなっていることを示すものと考えられる。特に、NPSH量については、その大部分はGSHと考えられるが、GSHの主要なプールとなっている肝臓で、低下していることは、暴露の影響が全身的であることを示すものと考えられる。

また、2回の実験を通して、肝臓の変化が、時間を追う形で現われており、これは、低濃度でも暴露期間が長くなるにつれて、過酸化の作用が蓄積されることを示唆している。

次にNO₂とO₃の複合という要素を考えると、O₃単体の0.06ppm暴露で示された結果²⁾と、今回の結果は類似しており、複合の影響は今回の実験の濃度を考えると、相加的あるいは、それ以上とも考え得るものと思われる。

5 まとめ

NO₂、O₃の生体に対する影響について、交互暴露という形で2年度にわたり検討を行った。今回の実験から、以下の諸点が結果として明らかになった。

- ① 細気管支の線毛上皮細胞における線毛の脱落、無線毛細胞の増加、挙上が認められ、肺胞上皮細胞では、I型細胞の幼若化、増加、更にI型II型中間型細胞の出現が認められた。
- ② 暴露3ヶ月以降になると、上記細胞にGSH-P-Oの顕著な局在、及びα-チューブリン局在の異常が観察された。
- ③ 肝臓において、NPSH量の減少等過酸化の作用と思われる変化が認められた。

今回は、前回の実験に比し、低い濃度で行ったために、生体に対する影響は明らかに軽度となる結果が示された。しかしながら、明確な細胞レベルでの影響が観察され、その影響がフリーラジカル、または、過酸化脂質の作用で起きていることが示された。また、影響は全身的に関連を持っていることも示された。

ガス体の影響は、低濃度暴露になった場合、その作用は濃度と時間の積という形で示されることが考えられ、今回のような酸化性のガスの場合には、過酸化脂質の蓄積として現われていると考えられる。また、複合的影響については、その作用は相加的であり、更に相乗的である可能性も残されたと言えるであろう。

以上の変化が、直ちに特定の疾患につながるものではないが、線毛の脱落という異物排除機能の低下を示す結果が得られたが、この点には留意が必要であろう。

都市域での汚染の実態を考えた場合、汚染物質の複合性は重視されるべきであり、今後更に解明が必要な部分と考えられる。

参考文献

- 1) 遠藤立一他：低濃度のO₃暴露による有害性の検討
— 家兎の0.08ppm オゾン暴露実験第1報 —
東京都公害研究所年報, 245, (1981) .
- 2) Watanabe, K., M. Murakoshi : Lipid Peroxidation and Arachidonate Cascade in Macrophages with a Special Reference to the Change of Glutathione Peroxidase, Lipid Peroxide Scavenger, Tokai J. Exp. Clin. Med., II Suppl., 105, (1986) .
- 3) 渡辺慶一：脂質過酸化と細胞傷害：その調節機構としてのグルタチオンペルオキシダーゼの意義, 日本病理学会誌, 75, 39 (1986) .
- 4) Hirai, K. et al. : Electron Microscopy of Butylated Hydroxytoluene-Induced Lung Damage in Mice, Exper. Mol. Path., 27, 295, (1977) .
- 5) Jewell, S. A., et al. : Bleb Formation in Hepatocytes during Drug Metabolism is caused by Disturbances in Thiol and Calcium Ion Homeostasis, Science, 217, 1257, (1982) .

- 6) Bellomo, G., et al. : Critical Role of Sulfhydryl Groups in ATP-Dependent Ca^{2+} Sequestration by Plasma Membrane Fraction from Rat Liver, FEBS, 163 (1), 136, (1983).
- 7) Ohkawa, H. et al. : Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric acid reaction, Anal. chem., 95, 351, (1979).
- 8) Paglia, D. E., W. N. Valentine : Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathion Peroxidase, J. Lab. and Clin. Med., 70, 158, (1967).
- 9) Kornberg, A. et al. : Methods in Enzymology I, Academic Press, N. Y., (1955).
- 10) Ochoa, S. : "Malic" Enzyme, Methods in Enzymology ed. by S. P. Colowich and N.O. Kaplan, Academic Press, N. Y., (1955).
- 11) 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).
- 12) 遠藤立一他 : 低濃度 O_3 暴露による有害性の検討—家兎の0.06 ppm オゾン暴露実験 第1報—, 東京都公害研究所年報, 219, (1984).