

NO₂, SO₂ 混合暴露による有害性の検討

— 家兎のNO₂ 0.5ppm, SO₂ 0.1ppm混合暴露実験 —

川井利雄 遠藤立一 大山謙一 仲真晶子
 川原 浩 佐々木裕子 小松遵至
 (多摩環境保全事務所) (東海大学)
 渡辺慶一 中山 徹 真野喜洋
 (東海大学) (東京医科歯科大学) (非常勤研究員)

1 はじめに

大気汚染物質の生体影響の研究において、60年度より汚染物質の複合影響の検討を行っているが、NO₂、O₃にかわり62年度よりNO₂、SO₂の混合暴露の研究を開始した。今回の報告は、比較的高濃度における検討の中間報告であり、今後順次濃度を低下させ検討を行っていく計画である。

2 実験の方法

(1) 暴露物質及び暴露条件

暴露物質は、NO₂、SO₂であり、濃度はNO₂ 0.5 ppm, SO₂ 0.1 ppmであった。暴露濃度の設定は、NO₂、SO₂それぞれ単独に濃度設定を行い、その後、設定量を混合してチャンバー内に導入した。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、換気回数を一定になるように制御して実験を行った。

(2) 供試動物及び暴露期間

実験に用いた動物は、2ヶ月齢、日本白色種の清浄家兎で、すべて雄を用いた。1群6頭、合計72頭を暴露群、対照群に分け、3日、1週、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月の期間、それぞれ連続暴露を行った(表1参照)。

表1 家兎暴露期間及び動物数

	暴 露 期 間						計
	3日	1週	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	12ヶ月	
暴露群	6	6	6	6	6	6	36
対照群	6	6	6	6	6	6	36
計	12	12	12	12	12	12	72

(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。

(4) 採 材

各期間暴露終了後、動物をベントバルビタール麻酔下で開腹、後大静脈から採血後、生理食塩水で灌流放血し、主要臓器及びリンパ系を別出、重量測定の後、目的に応じて分割し、処理を行った。

(5) その他

上記実験を補足するために、SO₂ 0.2ppm単体による影響を検討した。用いた動物は、ラット(ウイスター、7週齢、♂、SPFレベル)で、10頭を1群として、24時間、1週、1ヶ月暴露を行い、それぞれ暴露直後群、回復期間を1週置いた群、及び対照群を設け実験を行った(表2参照)。これら各群について光学顕微鏡、電子顕微鏡による組織形態学、免疫細胞化学的検討を行った。

また、活性酸素種と生体の過酸化防御系の検討として、家兎を用い100%酸素の暴露実験を行った。暴露期間は、24時間、48時間であった。

表2 ラット暴露期間及び動物数

暴露期間	24時間		1 週		1ヶ月		計
回復期間	なし	1週	なし	1週	なし	1週	
暴露群	10	10	10	10	10	10	60
対照群	10		10		10		30
計	30		30		30		90

3 病理学的検討

(1) 検討の方法

家兎、ラット、ともに光学顕微鏡及び電子顕微鏡（走査型：SEM、透過型：TEM）を用いて、組織形態学的観察とグルタチオンペルオキシダーゼ（GSH-Po）、マイクロチュブルを対象とした免疫組織学による観察を行った。

(2) 検討の対象

各暴露期間終了後（但し、ラットについては、暴露後一定期間の終了後）、家兎については全身各臓器を、ラットは呼吸器系上皮のみを対象に病変の検索を行った。

(3) 結果

ア 形態学的検討

家兎の全臓器中病変が見出されたのは、呼吸器系（鼻、気管、気管支、肺臓）のみであった。そこで、呼吸器系の変化のみを記載する。

(ア) 光学顕微鏡による観察

暴露群に認められた主な変化は、気管支及び葉気管支と、終末細気管支上皮細胞の線毛の減少、消失ならびに細胞の増加であり、この変化は、3日暴露から始まり、1、3ヶ月で最も強く、6、12ヶ月群では、希になっている。当然の事であるが、対照群（清浄空気飼育群）ではこれらの所見はなかった。

(イ) 電子顕微鏡による観察

主に変化を見出したのは、SEMの標本で、TEMにおいては、対照群との間に有意な差は見出し得なかった。以下SEMによる観察結果を示す。気管では3日暴露群で無線毛細胞（微絨毛、或いは顆粒状微小隆起を有する細胞）が増加し、1週暴露群では全例に無線毛細胞の挙上、膨隆現象が観察され、1、3ヶ月暴露群ではこれらの変化にあわせて、線毛の短縮、消失が広範囲に観察された。しかしながら、6、12ヶ月暴露群では、変化は希なものとなっている。また、葉気管支及び細気管支においても同様の変化が見出された。この所見は光学顕微鏡による観察とも一致している。

イ 免疫組織化学的検討

免疫組織化学による細胞、組織の観察は、呼吸器上皮系（主に、気管、気管支、細気管支、肺胞の各上皮）のGSH-Poの局在及びチュブリンの重合と脱重合が、暴露とどのように対応しているかを、光学顕微鏡、電子顕

微鏡を併用して行った。

(ア) 家兎

1、3ヶ月暴露群で終末細気管支の線毛上皮中マイクロチュブルが減少し、この変化は、6ヶ月、12ヶ月暴露群にも見出せる。マイクロチュブルの減少した細気管支腔内に挙上した細胞（形態学的観察の項参照）中では、GSH-Poの増加が示され、特に、1、3ヶ月群で有意であるが、6ヶ月群にも同様の変化は持続していた。

(イ) ラット

細気管支上皮における変化が顕著で、1週暴露群に、すでに線毛の減少、消失した細胞にGSH-Poの増加が見出され、過酸化現象のあることが示されている。また、家兎の場合と同様にマイクロチュブルの減少も並行して生じている。肺胞レベルでは、著変は見出せなかったが、I型肺胞上皮細胞とII型肺胞上皮細胞の中間型を示す細胞（88年年報参照）に、GSH-Poの増加が1週暴露群から出現し、1ヶ月暴露群で著しく増加した。

(4) まとめ

暴露による影響は、主として呼吸器上皮のうち、気管支（葉気管支～終末細気管支）に認められ、組織形態上の変化は早期（1週暴露）から出現し、1、3ヶ月を頂点として減少して行くかに見られるが、免疫組織化学の所見を加味すると、呼吸上皮の変化は暴露物質による過酸化反応としてとらえられ、暴露期間を通じてその影響が持続していることが示された。また、ラットにおいて、暴露終了後1週間清浄空気中で飼育した群にも、これらの過酸化の影響を示す呼吸器上皮の変化が残存していることから、回復には1週間では充分でないことも同時に示されている。

4 生化学的検討

(1) 方法

検討を行った臓器は、血清、肺臓、肝臓で、採材部位は肺臓で左側の後葉、肝臓は辺縁の部分を用いた。

肺臓、肝臓については、リン酸緩衝液（pH 7.0）中でホモジナイズし、測定を行った。

検討した項目は、血清、肺臓、肝臓についてTBA法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（GSH-Po）活性、肺臓、肝臓においては、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) 量について測定を行った。

(2) 結 果

血清については, 対照群と暴露群との差は認められなかった。

過酸化脂質量については, 6ヶ月暴露群の肺臓で高い値を示したが, 個体差が大きく, 有意なものではなかった。

各防御系酵素の変動を見ると, 肝臓でGSH-Po活性が暴露3日でやや低下して, 1カ月, 3カ月でもとのレベルに戻り, 6ヶ月でやや低下するものの, 12ヶ月でまた, 対照群と同レベルに戻る変化を示した。

これに先だち, NADPH産生系酵素のG6PD, MEが, 3日で上昇を始め, 1週でかなり高い値を示し, 1ヶ月, 3ヶ月で低下し, 6ヶ月で少し上昇するが, 12ヶ月で対照と同じレベルになる変化を示した。

肝NPSH量については, 上記のG6PD, ME活性と連関して1週目で高値を示し, 1, 3ヶ月で低くなる結果であった。

肺臓については, ME活性が暴露3ヶ月, 6ヶ月で低い値を示したが, 他の酵素活性は, 対照群とほとんど同じレベルであった。

肝NPSH量は, 1週目で暴露群がやや高い値を示したが, 他の期間については対照群との差は見られなかった。

5 家兎の100%酸素暴露実験

NO₂, O₃などと同様, 酸素も生体に過酸化の影響を与えることが考えられており, その毒性については, 活性酸素の関与が示唆されている。本実験は, 活性酸素のひとつである過酸化水素 (H₂O₂) や, 過酸化脂質の除

去作用を持つGSH-Poの組織 (肺臓, 肝臓) 及び血液中の活性値についても検討した。またNPSHの組織濃度の変動についても検討し, NO₂, SO₂などの生体影響を解析した。

(1) 実験の方法

供試動物として家兎 (2.5~3.0kg, ♂) を用いた。7頭ずつ3群に分け, 2群はそれぞれ100%酸素を24時間, 48時間暴露した。検討項目は, 血液でH₂O₂を基質とするGSH-Po (GSH-Po), 肺臓及び肝臓では, GSH-Poとクメンヒドロパーオキシドを基質とするGSH-Po (GSH-Po (C)), NPSH量, 総タンパク量 (TP) で, 方法は前述と同様に行った。

(2) 結 果

血液GSH-Poについては, 血清, 血しょう共に, 変化は認められなかった。

組織中のGSH-PoとGSH-Po (C) との間の相関は, 組織のg当りのデータも, TP当りのデータも有意な相関を示した。肝臓のGSH-PoとGSH-Po (C) の活性は, 24時間で上昇する傾向が見られたが, 有意ではなかった。また, 肺臓に関しても同様であった。

NPSHは, 肝臓で暴露後48時間で低下したが (p < 0.05) 肺臓では, 24, 48時間で上昇傾向が認められたが有意ではなかった。

以上から, NO₂, SO₂, O₃などと同様の影響が認められ, 今後ガス状大気汚染物質を酸素毒性との関連でも解析を行っていく予定である。

本研究において, 長期にわたり実験動物の飼育管理を担当していただいた(株)アニマル・ケアの山元達哉氏に感謝いたします。