

論文

## 大気汚染ガス (NO<sub>2</sub>・SO<sub>2</sub>) と大気浮遊粉じん による複合生体影響に関する研究

大山謙一 宮垣融 大野正彦  
泉川碩雄 吉岡秀俊 蟹沢成好  
(大気部) (大気部) (横浜市立大学医学部)

### 要 旨

大気汚染物質の複合生体影響を検討するため SPF Fischer 344 ラット雄 7 週齢に大気浮遊粉じん (Total Suspended Particles, TSP) 17mg から抽出した抽出物を 4 回に分けて気管内に注入し, 更に, 大気汚染ガス (6 ppm NO<sub>2</sub> 及び 4 ppm SO<sub>2</sub>) を 11 カ月間暴露した。注入開始後 18 カ月で解剖し, 形態病理学的に検討した。

TSP を注入し, 同時に NO<sub>2</sub> SO<sub>2</sub> を暴露した群に肺腫瘍が 10 匹中 2 匹に見られた。腫瘍は良性的の腺腫であった。TSP を注入しただけの群や TSP 注入と SO<sub>2</sub> を暴露した群には腫瘍は見られなかった。この結果から, NO<sub>2</sub>・SO<sub>2</sub> 暴露によって TSP 抽出物による腫瘍発生が促進されていることが示唆された。

### 1 はじめに

近年, ヒトの悪性新生物において肺癌の発生率が増加してきている<sup>1)</sup>。その原因として今まで喫煙が強調されてきたが, 近年の疫学的調査から肺の悪性新生物と NO<sub>x</sub> との相関係数が高いことが指摘されたり, 大気浮遊粉じん (以下 TSP と称す) 中にベンゾ(a)ピレン等の発癌物質が含有されていることなどから大気汚染も重要な原因の一つとして考えられてきている。

一方, 大気汚染ガスである NO<sub>2</sub> や SO<sub>2</sub> の単独での発癌性は無いといわれている<sup>2)</sup>。しかし, 10mg/m<sup>3</sup> の濃度のベンゾ(a)ピレンと 4 ppm の SO<sub>2</sub> を同時に 1 日に 1 時間ラットに暴露すると肺癌が発生し, 引き続き 10 ppm の SO<sub>2</sub> に 1 日に 6 時間ずつ暴露し続けると一層その発生率が高くなるという報告もある<sup>3)</sup>。このような状況から大気汚染物質は, それぞれ単体で存在しているよりも複合している状態のほうが生体にとって悪影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで, 大気汚染ガスと TSP を分離し, いくつかの組合せを設定して各物質の複合での生体影響を明確にする目的で, TSP 抽出物を気管内に注入したラットに, NO<sub>2</sub> 及び SO<sub>2</sub> ガスを暴露する実験を行い, 形態病理学的に検討した。

### 2 実験方法

#### (1) 実験動物

SPF (Specific Pathogen Free) Fischer 344 ラット雄 6 週齢を購入し, 1 週間環境にならした後 7 週齢で実験に供した。これらのラットを表 1 に示すように A~G 群の 7 群に分けた。

表 1 実験群

群	実験条件
A	TPS + 炭粉 + NO <sub>2</sub> + SO <sub>2</sub>
B	TPS + 炭粉 + SO <sub>2</sub>
C	TPS + 炭粉
D	炭粉 + NO <sub>2</sub> + SO <sub>2</sub>
E	炭粉 + SO <sub>2</sub>
F	炭粉
G	無処置

#### (2) 注入物質

TSP は, 1990 年 4 月~5 月に都内の 3 地点でハイボリュームエアサンプラーにより採取し混合した (表 2)。集められた TSP をジクロロメタン (残留農薬試験用) で 20 分間超音波抽出し, ろ紙でろ過した。更に, このろ液にジクロロメタン (残留農薬試験用) で洗浄済みの炭粉

表2 TSP採取場所と粉じん重量

採取場所	TSP重量 (mg)	吸引気積 (m <sup>3</sup> )
旧都庁第二庁舎屋上 (千代田区)	536	6,212
環境科学研究所2階 (江東区)	672	6,600
立川合同庁舎屋上 (立川市)	512	6,311

表3 TSP電分析値

化学物質	ng/mg
Benzo (b) fluorantene	32.8
Benzo (k) fluorantene	7.7
Benzo (a) pyrene	11.3
Benzo (ghi) pyrene	21.0
Fluorantene	1.1
Pyrene	1.1
1-Nitropyrene	0.7

を添加した後減圧乾固した。炭粉は、肺胞でのTSP抽出物の滞留期間を長くするためとTSP抽出物を生理的食塩液に懸濁させるための賦形剤として用いた。この乾固物を滅菌生理食塩液で21.25mg/ml(炭粉は10mg/ml)になるように懸濁させた。なお、TSPの多環芳香族炭化水素の分析値を表3に示した。

(3) 注入方法

懸濁液0.2mlを軽くエーテル麻酔したラットに気管からゾンデ針で直接注入した(写真1)。気管内注入は、週に1回、連続して4週間行いラット1匹の総注入量は、TSPとして17mg(体重152gのラットの呼吸量は、66~114ml/分であり、17mgの粉じんを集めるのに188.9m<sup>3</sup>の

大気を吸引したことから、計算上3.2~5.4年分の吸入量にあたる)、タール量として1.17mgであった。

(4) 暴露ガス

暴露ガスはいずれも環境基準の100倍である濃度6ppmのNO<sub>2</sub>及び4ppmのSO<sub>2</sub>であった。

(5) 暴露方法(図1)

暴露は、ステンレス製のチャンバー(幅140.5cm×奥行き120.5cm×高さ80cm)内で行い自由飲水及び無制限給餌とした。それぞれの暴露ガスはボンベから供給し、清浄空気で希釈して1日16時間、11ヵ月間間欠暴露した。清浄空気は、フィルターを通してNO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>、O<sub>3</sub>共に濃度は0.02ppm以下、粉じんは直径0.3μ以下とした。

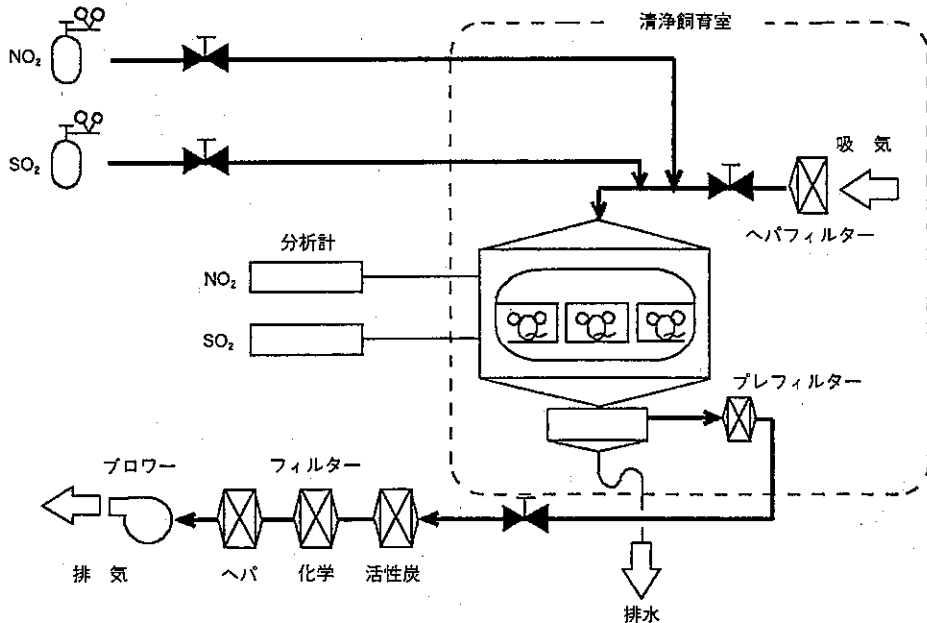


図1 実験装置

(6) 実験期間 (図2)

TSP抽出物注入は、ガス暴露開始5日目に第1回目を実施し、引き続き週に1回第4回目まで行った。ガス暴露開始11ヵ月目からは全群清浄空気で飼育し、18ヵ月後に解剖した。

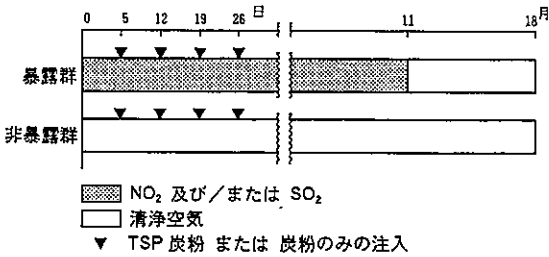


図2 実験期間

(7) 検討方法

実験期間終了時にラットをネブタール腹腔内注射により麻酔し、股動脈より放血死させた後、呼吸器及び主要腹腔臓器等を採材した。肉眼的観察後、臓器を10%緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色、必要に応じてPAS、アザン染色を実施して病理組織学的に検討した。

3 結果 (表4)

(1) 腫瘍

白色の結節 (写真2) がA群に10匹中2匹にそれぞれ

1個見られ、その存在部位は2例とも右肺中葉辺縁であった。この所見は他の群では認められなかった。組織学的に2例とも明るくやや大きい核と明瞭な核小体を持った立方状細胞が乳頭状に密に増殖し、既存の肺胞構造を留めぬ所と、主として既存肺胞壁に沿って増殖している部分から成っている。腫瘍は、正常部位との境界が比較的明瞭で核の大小不同も乏しく核分裂像も乏しい良性の腺腫 (adenoma) であった (写真3, 4)。なお、注入した炭粉の沈着は、腫瘍形成部に特に著しいということとはなかった。

(2) 肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成 (写真5)

肉眼的に肺表面に透明感のある白斑がA群とB群にそれぞれ10匹中3匹、C群でも10匹中1匹、F群では5匹中1匹にそれぞれ1~2個認められた。組織学的には、胸膜直下の肺泡領域に立方状ないしやや扁平な、多少泡沫状の細胞質を持つ肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成巣であり、既存の肺胞隔壁を一層に覆っていた。この病変は、胸膜下に限らず内部にも認められた。

(3) 肺胞Ⅱ型上皮細胞の軽度な過形成 (写真6)

扁平で核もそれほど大きくない肺胞Ⅱ型上皮細胞の軽度な過形成巣が炭粉を注入した全ての群に散在性に見られた。

(4) 細気管支上皮細胞の異所性増殖 (写真7)

細気管支上皮細胞が肺胞隔壁表面に散在する異所性増殖が炭粉を注入した全ての群に見られ、一部は腺管様構造を呈していた。

表4 ラットの肺に生じた新生物性病変

群	動物数	結節 (%)	腺腫 (%)	肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成		細気管支上皮細胞の異所性増殖 (%)
				重度	軽度 (%)	
A	10	2 (20)	2 (20)	3 (30)	5 (50)	5 (50)
B	10	0	0	3 (30)	6 (60)	5 (50)
C	10	0	0	1 (10)	7 (70)	10(100)
D	5	0	0	0	4 (80)	3 (60)
E	5	0	0	0	5(100)	5(100)
F	5	0	0	1 (20)	3 (60)	3 (60)
G	5	0	0	0	0	0

A: TSP + 炭粉 + NO<sub>2</sub> + SO<sub>2</sub>

B: TSP + 炭粉 + SO<sub>2</sub>

C: TSP + 炭粉

D: 炭粉 + NO<sub>2</sub> + SO<sub>2</sub>

E: 炭粉 + SO<sub>2</sub>

F: 炭粉

G: 無処置

(5) その他の病変

炭粉を注入した全てのラットの肺に炭粉が残存し、結合組織の増生や浮腫による肺胞隔壁の肥厚が観察された。炭粉は、肺胞腔内で肺胞マクロファージに貪食されたり肺胞隔壁間質に沈着していた。

ガス暴露による肺胞炎、気管支上皮細胞の線毛の脱落等の傷害は認められなかった。

4 考 察

大気汚染物質と肺癌の関係を探る動物実験にはいくつかの手法があるが、その内の一つとして動物を道路沿道で飼育して直接大気汚染物質を暴露する方法が行われている。しかし、大気汚染と肺癌発生の関係はまだ明確にされていないのが現状である。このような直接暴露実験では、例えば大気汚染ガスであるNO<sub>2</sub>を除去してTSPだけ吸入させるようなことは不可能であるというように要素を分離する手法に制限がある。このように、様々な実験条件を設定して解析していくことが困難である。

著者らは、この点をふまえて旧公害研究所の屋上（千代田区有楽町）で採取したTSP抽出物をオリーブオイルに溶かし新生児マウスに皮下注射する実験を行い、肺に腫瘍を発生させ、TSP抽出物が血行性作用因子として肺腫瘍に関連していることを示した。

今回は、より実際の状況に近づけるためにTSP抽出物を直接気管内に注入し、肺腫瘍との関連性を調べることにした。更に、TSP抽出物注入とガス暴露の組み合わせをいくつか設定して、TSPと大気汚染ガスの複合生体影響を検討した。

今回の実験で、特筆すべきことは、A群にのみ腺腫が発生したということである。ディーゼル排気ガス粉じんの気管内注入実験では10mg注入で74%のラットに肺腫瘍が見られるという<sup>9)</sup>。しかし、今回のTSP抽出物注入の場合では注入量が17mg (TSPとして)でも腫瘍ができなかった。この原因は、一般にTSPがディーゼル排気ガス粉じんに比較して単位粉じん重量当たりのタル重量が少ないこと(タル重量/TSP重量=0.069)によるものと思われる。

A群で発生した腫瘍は、良性の腺腫であったが、組織学的にみると腫瘍細胞は、過形成を起こした肺胞Ⅱ型上皮細胞と非常に良く類似していること、腫瘍が過形成巣に囲まれて存在していることから過形成から腫瘍へ成長

していく可能性が考えられる。また、この腺腫が将来悪性の腺癌になるのか確認する必要もあり、更に長期間の実験を行い観察していく必要がある。

炭粉は、当初生体に無害なものと考えたが、実際には肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成や細気管支上皮細胞の異所性増殖を引き起こすなど肺胞上皮細胞が損傷を受けていると推測された。炭粉の変異原性は、Amesテストでは陰性であったことから、このような変化は物理的な刺激等によるものである可能性が考えられた。

5 おわりに

本実験の結果から、TSP17mgから抽出した抽出物を気管内に注入しても18か月以内で腫瘍は発生しないこと、それ自体発癌性が無いといわれているNO<sub>2</sub>とSO<sub>2</sub>暴露によってTSP抽出物による腫瘍発生が促進されていることが示唆された。しかし、動物実験の常道として生体防御機構をある程度抑制したり、特異的な反応を明確に引き出すためにNO<sub>2</sub>とSO<sub>2</sub>の暴露濃度を環境濃度の100倍としてあるので、今回の結果を直接実際の状況に当てはめるわけにはいかない。今後はこれらのことを考慮しながら大気汚染と腫瘍発生との関係について更に研究していく必要がある。

参 考 文 献

- 1) 厚生統計協会：厚生指針、国民衛生の動向，37，p.59-60 (1990)。
- 2) 東京都衛生局：複合大気汚染に係わる健康影響調査総合解析報告書，p.109，(1986)。
- 3) Witschi, H., 嵯峨井勝：オゾンおよび二酸化窒素と肺がん，大気汚染学会誌，24，p.1-20 (1989)。
- 4) Laskin, S. *et al.*: Combined carcinogen - irritant animal inhalation studies, In: Air Pollution and the Lung, p.190-213, John - Wiley & Sons, N.Y. (1976)。
- 5) 石橋正彦ら：実験動物学ラット，講談社，p.243
- 6) 岡 三知夫ら：都市街路沿道における長期野外動物曝露実験，大気汚染学会誌，17，p.77-88 (1982)。
- 7) Ito, T. *et al.*: Production of bronchial papilloma with calcitonin-like immunoreactivity in rats exposed to urban ambient air, *Exp. Pathol.* 36, p. 89-96 (1989)。

8) 佐々木裕子ら：大気中変異原物質のマウス新生児試験（第二報），東京都環境科学研究所年報1984，p. 241-248.

9) 河端美則ら：ディーゼル排ガス粒子の気管内注入による肺障害と発癌，大気汚染学会誌，23. 1, p. 32-40 (1988).

---

Study on Effects of Combined Air Pollutants in the Lungs of Rats

Ken-ichi Ohyama, Tohru Miyagaki, Masahiko Ohno,  
Sekio Izumikawa, Hidetoshi Yoshioka and  
Masayoshi Kanisawa\*

\*Yokohama City University School of Medicine

(Abstract)

The effects of combined air pollutants were investigated. Male SPF Fischer 344 rats (7 weeks old) were exposed to 6 ppm NO<sub>2</sub> and 4 ppm SO<sub>2</sub> for 11 months and intratracheally instilled extracts of total suspended particles (TSP, total 17 mg per rat) once a week for 4 weeks. Rats were autopsied after 18 months and histopathologically examined.

Intratracheal instillation of TSP and exposure to NO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub> induced adenoma in lungs of 2 out of 10 rats. No tumor was shown in rats only instilled TSP, and also instilled TSP and exposed SO<sub>2</sub>.

These results suggest that the tumorigenesis by extract of TSP is enhanced by exposure to NO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub>.



写真1



写真2

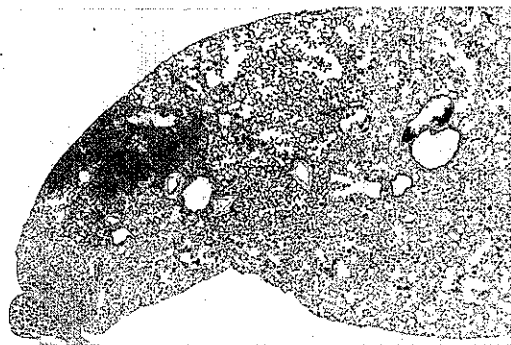


写真3

写真1

TSP 懸濁液の気管内注入

写真2

腫瘍の肉眼写真，右肺中葉に灰白色の結節（矢印）が見られる，TSP + 炭粉 + NO<sub>2</sub> + SO<sub>2</sub> (A) 群

写真3

写真2の結節部の顕微鏡写真，腫瘍は，正常部位との境界が比較的明瞭である，H&E，×20

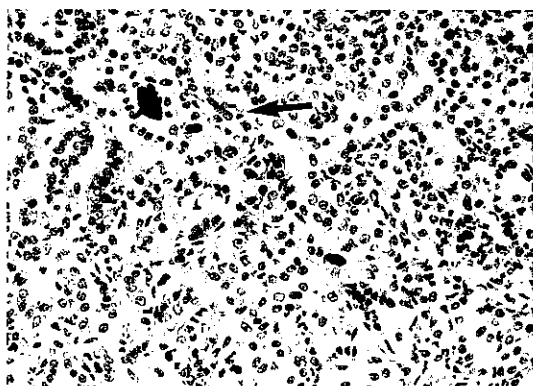


写真 4



写真 5

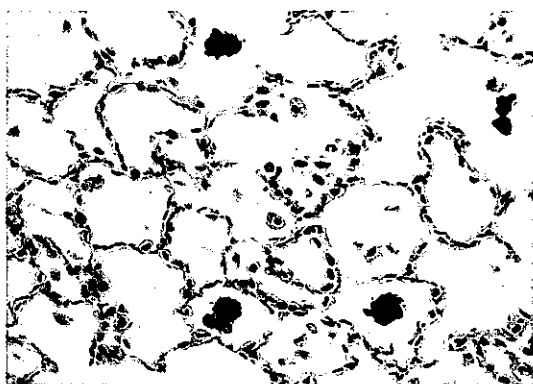


写真 6

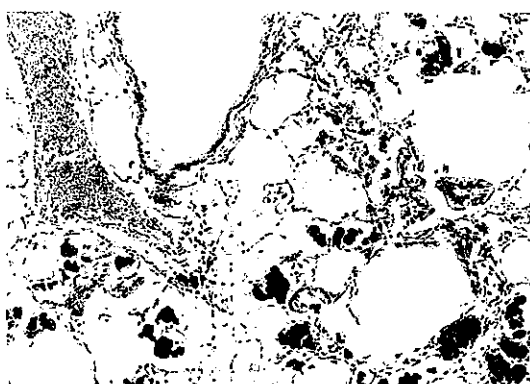


写真 7

写真 4

写真 3 の拡大写真，明るくやや大きい核と明瞭な核小体を持った立方状細胞が乳頭状に密に増殖し，既存の肺胞構造を留めない，×400

写真 5

Ⅱ型肺胞上皮細胞の過形成，立方状ないしやや扁平な肺胞Ⅱ型上皮細胞の過形成果で，既存の肺胞隔壁を一層に覆っている，TSP + 炭粉 + SO<sub>2</sub> (B) 群，H&E，×400

写真 6

肺胞Ⅱ型上皮細胞の軽度な過形成，扁平で核もそれほど大きくない肺胞Ⅱ型上皮細胞が呼吸機能を持った肺胞Ⅰ型上皮細胞と置き代わっている，TSP + 炭粉 (C) 群，H&E，×400

写真 7

細気管支上皮細胞の異所性増殖，細気管支上皮細胞が本来存在しない場所である肺胞隔壁表面で増殖している。腺管様構造を呈しているものもある，TSP + 炭粉 + SO<sub>2</sub> (B) 群，H&E，×200