

報告

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  
- 第 2 報 -

大 山 謙 一 大 野 正 彦 宮 垣 融  
(水道局)

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6週齢に大気浮遊粉じん (Total Suspended Particles, TSP) 或いは、TSP中に含有される発癌物質ベンゾ(a)ピレン (BaP) を気管内に注入し、同時に、大気汚染ガス (2ppmNO<sub>2</sub>及び2ppm SO<sub>2</sub>) を10週間暴露する実験を実施した。なお、今回は、賦形剤としてオリーブ油を使用した。

TSPは100mgから抽出したタールを、BaPは20mgをオリーブ油とリン酸緩衝液 (PBS) で懸濁液とし、1週間に1回、10回連続して気管内に注入した。また、オリーブ油を使用しないで粉末BaPをPBSに浮遊させただけの注入剤も試みた。気管内注入開始後16カ月で動物を解剖し、肺について形態病理学的に検討した。

TSPのオリーブ油懸濁液を気管内に注入したラット肺の変化は、第1報に比較して注入したTSP抽出物量が多いにもかかわらず強弱なく、腺腫が9匹中1匹に見られただけであった。また、BaPのオリーブ油懸濁液でも同様に変化が弱く、9匹中1匹に扁平上皮癌が見られたに過ぎなかった。これに対して、オリーブ油を使用しないBaP浮遊液を気管内に注入したラットの肺では、扁平上皮癌がガス暴露した群で5匹中4匹、非暴露群でも4匹中1匹に発生した。

これらの結果から、TSPやBaPのオリーブ油懸濁液による肺組織への影響は、弱いことがわかった。また、BaPによる肺癌発生をNO<sub>2</sub>・SO<sub>2</sub>暴露が促進していることが示唆された。

1 はじめに

環境複合汚染物質と肺癌の関連性を明確にする目的で、平成2年度からラットに大気浮遊粉じん (TSP) 抽出物を気管内に注入し、更にNO<sub>2</sub>及びSO<sub>2</sub>ガスを暴露する実験的研究を行っている。これまでNO<sub>2</sub>・SO<sub>2</sub>暴露がTSPによる肺腫瘍発生を促進している可能性があることを報告したり。その実験に際して、気管内にTSP抽出物を注入するために賦形剤として炭粉を用いたが、炭粉による組織障害が見られたり、TSP抽出物が炭粉により吸着され肺組織へ遊離する量が少なくなることが考えられた。そこで今回は、賦形剤としてオリーブ油を採用し、実験を試みた。TSP抽出物をオリーブ油に融解させた後にリン酸緩衝液 (PBS) で懸濁し、ラットの肺に高頻度で注入した。また、気管内注入物質として、TSP中に含有される発癌物質であるベンゾ(a)ピレン (BaP) を使用した実験も行い、併せて形態病理学的に検討した。更に、発癌物質の肺内での動態を見るために、BaPを家兎の気管内に注入し、肺の変異原活性を経時的

に測定した。

2 実験方法

(1) 実験動物

SPF(Specific Pathogen Free) Fischer 344 ラット雄

表 1 実験群

群	実験条件
A	TSP+Solvent+NO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub>
B	TSP+Solvent
C	BaP+Solvent+NO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub>
D	BaP+Solvent
E	BaP+PBS+NO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub>
F	BaP+PBS
G	Solvent+NO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub>
H	Solvent
I	PBS+NO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub>
J	PBS
K	No treatment

Solvent: オリーブ油+Tween 80+PBS

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)	1,373	13,303
環境科学研究所2階 (江東区)	2,439	13,263
立川合同庁舎屋上 (立川市)	1,323	13,060

5週齢を購入し、1週間環境に慣らした後6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~K群の11群に分けた。

(2) 注入物質

TSPとTSP中に含有される発癌物質BaPを使用した。

TSPは、1990年11月~12月に都内の3地点でハイボリウ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(残留農業試験用)で20分間超音波抽出し、ろ紙でろ過した後、ロータリーエバポレーターで減圧乾固させた。この乾固物を5%のオリーブ油で溶解し、0.05%のTween 80を加えたPBSで懸濁液にした(TSPとして10mg/0.2ml、TSP抽出物として1mg/0.2ml)。

BaPは、粉末のBaPを同様の方法で作成したオリーブ油懸濁液(2mg/0.2ml)と粉末のBaPを直接PBSに混合した浮遊液の2種類を作成した。

(3) 注入方法

懸濁液又は浮遊液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。気管内注入は、週に1回、連続して10週間行いラット1匹の総注入量は、TSPは100mg、BaPは20mgであった。

(4) ガス暴露

暴露ガスは、濃度2ppmのNO<sub>2</sub>及び2ppmのSO<sub>2</sub>とし、1日16時間で10週間連続暴露を行った。暴露装置は、第1報と同様である。

(5) 実験期間(図1)

気管内注入は、ガス暴露開始3日目に第1回目を実施し、引き続き週に1回第10回目まで行った。ガス暴露終了後は全群清浄空気で飼育し、16カ月後に解剖した。

(6) 検討方法

実験期間終了時にラットをペントバルビ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形態病理組織学的に検討した。

(7) BaPを気管内に注入した家兎肺の変異原活性の経時的变化

日本白色種家兎にBaP(5mg)を気管内に注入し、更に6ppm NO<sub>2</sub>及び4ppm SO<sub>2</sub>を暴露した。気管内注入後1、3、7日目に肺を剔出してホモジナイズし検体とした。変異原性試験は、菌株をAmesの*Salmonella typhimurium*

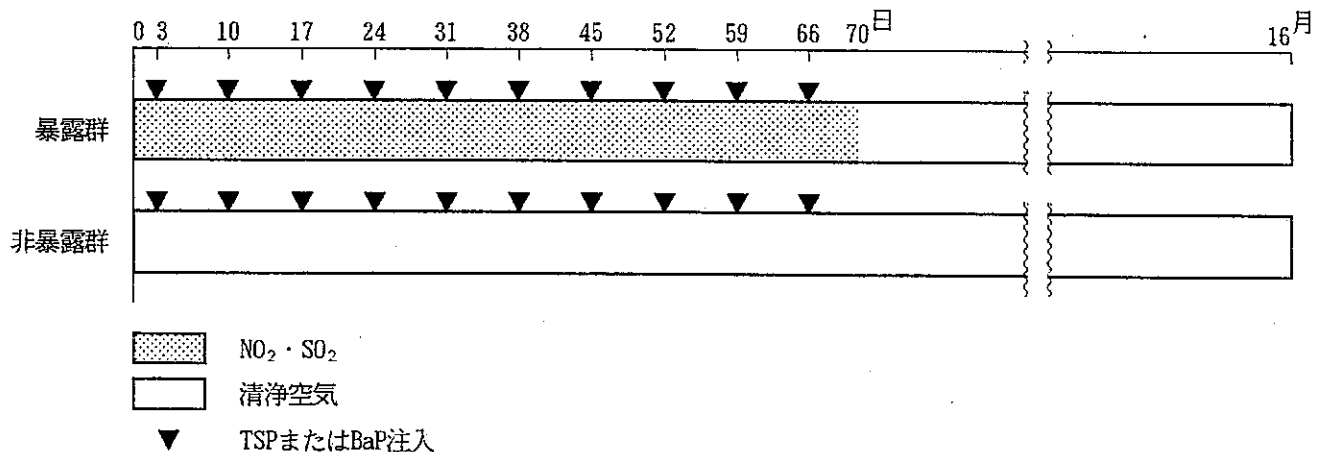


図1 実験期間

表3 ラットに応じた新生物性病変

群	気管内注入物質	NO <sub>2</sub> ・SO <sub>2</sub> 暴露	動物数	扁平上皮癌 (%)	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 (%)	気管支上皮の挙上 (%)
						重度 (%)	軽度 (%)		
A	TSP+Solvent	+	8	0	0	1 (13)	3 (38)	0	1 (13)
B	TSP+Solvent	-	9	0	1 (11)	1 (11)	1 (11)	0	0
C	BaP+Solvent	+	9	1 (11)	0	0	2 (22)	1 (11)	1 (11)
D	BaP+Solvent	-	8	0	0	0	1 (13)	0	0
E	BaP+PBS	+	5	4 (80)	0	1 (20)	1 (17)	0	0
F	BaP+PBS	-	4	1 (25)	0	1 (25)	1 (25)	0	0
G	Solvent	+	11	0	0	1 (9)	1 (9)	0	0
H	Solvent	-	11	0	0	0	0	0	0
I	PBS	+	4	0	0	0	0	0	0
J	PBS	-	4	0	0	0	0	0	0
K	-	-	8	0	0	0	0	0	0

TA98株、代謝活性化にはラットの肝S9 (PB&BF誘導) を用いて調製したS 9 mixを使用し、preincubation法で行った。

### 3 結果 (表3)

ラット肺において肉眼的には、注入物質の存在を確認できなかった。組織学的には、TSPを注入した肺にTSPと思える茶褐色の異物を貪食しているマクロファージが肺胞腔内に若干観察された(写真1)。また、肺門リンパ節や気管支周囲のリンパ小節には異物は見られなかった。

主な病変は、BaPによる扁平上皮癌(写真2)、TSPによる腺腫(写真3)(写真4)、TSP又はBaPによる肺胞II型上皮細胞の過形成(写真5)(写真6)であった。ガス暴露による影響である気管支及び細気管支上皮細胞の線毛の脱落、短小化、あるいは粘液分泌細胞の機能亢進、肺胞道壁の肥厚等の変化は認められなかった。

炭粉を使用した第1報の実験で見られた細気管支上皮細胞の過形成は、C群に1例見られただけであった。また、気管支上皮の挙上がA群(写真7)とC群(写真8)に各々1例であるが観察された。

#### (1) TSP・オリーブ油懸濁液注入群 (A、B群)

TSPを注入したラットの肺では、肺胞II型上皮細胞の過形成が観察された。この変化は、ガス暴露された群でより高率に認められた。しかし、腺腫は、非暴露群(B群)に1例のみ見られた。気管支・細気管支上皮につ

いては、上皮が同所性に増殖して内腔に迫り出した上皮の挙上がガス暴露群(A群)に1例であるが観察された。

#### (2) BaP・オリーブ油懸濁液注入群 (C、D群)

オリーブ油に懸濁したBaPを注入したラットの肺では、ガス暴露群(C群)で、扁平上皮癌、軽度の肺胞II型上皮細胞の過形成、細気管支上皮細胞の異所性増殖(写真9)および気管支上皮の挙上が認められた。しかし、非暴露群(D群)では、軽度の肺胞II型上皮細胞の過形成が1例見られたに過ぎなかった。

#### (3) BaP・PBS浮遊液注入群 (E、F群)

粉末のBaPをPBSに浮遊させて気管内に注入したラットの肺では、扁平上皮癌がガス暴露群(E群)で80%、非暴露群(F群)でも25%発生した。その他、肺胞II型上皮細胞の過形成がガス暴露の如何にかかわらず見られた。

#### (4) オリーブ油懸濁液注入群 (G、H群)

肺胞II型上皮細胞の過形成がガス暴露群に1例認められた。

#### (5) PBS注入群 (I、J群)

変化は、認められなかった。

#### (6) 未処置群 (K群)

変化は、認められなかった。

#### (7) 家兎肺の変異原活性

BaPを気管内に注入した家兎肺の変異原活性の経時的変化は、ガス暴露の如何にかかわらず注入後3日で1/3以下に減少し、7日で陰性となった(図2)。

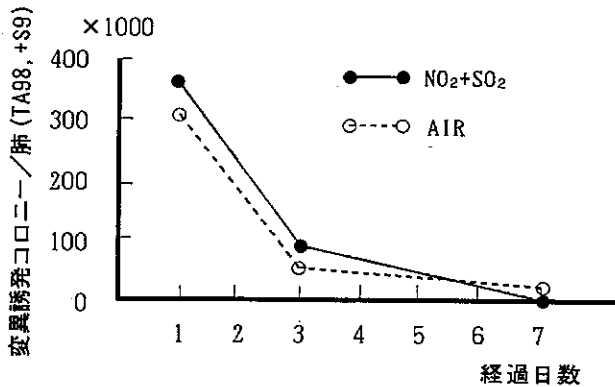


図2 BaPを気管内に注入した家兎肺の変異原活性

#### 4 考 察

発癌物質の気管内投与実験では、生体の様々な防御機構を無視するために環境大気中で吸入するより遙かに多量な発癌物質が投与され、更に発癌物質を肺組織内に長期間停滞させる目的で様々な賦形剤が用いられている。例えば、ラットにBaP (15mg) と黒インク粉末 (1.5mg)、カゼイン (24mg)<sup>2)</sup>、ハムスターにBaP (45mg) と酸化第二鉄 (45mg)<sup>3)</sup>、あるいはマウスにBaP (8mg) と炭粉 (4mg)<sup>4)</sup>を混合して気管内に注入して肺癌発生を証明している。これらの賦形剤は、BaPを実験動物の肺組織内に長期間に渡り停滞させ、高率に肺癌を誘発させる役目をしているが、肺以外の臓器に腫瘍が生じたり肺炎を起こす等の賦形剤による影響も存在する。また、著者らも第1報での実験では、TSPの賦形剤として炭粉を使用した。しかし、賦形剤による肺組織障害が観察されたり、TSPが炭粉により吸着され肺組織へ遊離する量が少なくなることが考えられたため、今回の実験では、賦形剤の生体への影響を少なくし、TSP抽出物が肺上皮組織に良く接触する目的で、オリーブ油に溶解させたTSP抽出物をPBSで懸濁液にして気管内に注入した。なお、BaPは、オリーブ油・PBS懸濁液のほかにPBSに浮遊させた浮遊液も作成した。

TSP抽出物の投与量は、第1報の実験では17mgを4回に分けて注入した (4.25mg×4回) のに対して、今回は、100mgを10回に分けて注入 (10mg×10回) した。投与量は前回と比較して約6倍、投与期間も2.5倍であったが、第1報の実験の方がより強い影響が観察された。

これは、BaPを気管内に注入した家兎肺の変異原活性

の経時的変化による実験でも明らかなように、肺内に注入された発癌物質は、数日で変異原活性が減衰する。このため、ラットの肺組織に対する注入物質の影響時間が短かったことが考えられる。しかし、昨年の年報で報告したように、TSPやBaPを気管内に注入した1、3、7日後にDNA付加体を検出していることから、初期の段階で遺伝子に影響を及ぼしていることは明かである<sup>5)</sup>。しかし、このように注入回数を10回に増やし10週間の長期に渡り注入物質を肺組織に作用させたにもかかわらず、TSPによる病変が比較的軽度であったり、BaPによる肺癌発生率がオリーブ油を用いなかった群よりも低かったことは、オリーブ油に溶解したTSP抽出物やBaPが肺組織上皮細胞に接触する時間が十分ではなかったからであると思われる。オリーブ油に溶解したTSPやBaPを気管内に注入して腫瘍を発生させるためには、更に長期に渡り継続的に作用させる必要があると思われる。

ところで都内のTSP中には、元素状炭素が約17%程度存在しているが、TSPの気管内注入実験においても元素状炭素即ち炭粉の存在が実は重要であるのかもしれない。第1報の実験で使用した炭粉投与比率は、肺組織内の停留を重視してTSPの47%としたが、環境での比率よりも大きいものであった。今後は、第1報で使用した量より少ない17%前後の炭粉を賦形剤として使用する実験を行う必要がある。

さて、ガス暴露の影響について見てみると、気管支、細気管支上皮の線毛の欠損、短小化等の傷害、粘液分泌細胞の機能亢進、肺胞道壁の肥厚等の変化は認められなかったが、暴露期間が10週間と比較的短期間であり、更に暴露終了後約14カ月が経過しているので回復したのではないかと考えられる。しかし、腫瘍発生の観点からは、PBSに混合したBaPを気管内に注入したE、F群では、ガス暴露されたE群の方が高率に扁平上皮癌が発生しており、オリーブ油に溶解したBaPを気管内に注入したC、D群でもガス暴露した群に1例であるが扁平上皮癌が発生していることから、ガス暴露の影響があったと推測される。

このように、環境基準の50倍の濃度であるがそれぞれ2ppmのNO<sub>2</sub>・SO<sub>2</sub>暴露が、BaPによる肺癌発生には促進的に作用していることが示唆され、第1報で示されたNO<sub>2</sub>・SO<sub>2</sub>を暴露されたラットの肺にTSP抽出物による腫瘍が発生したという実験結果と同様の傾向であった。

今後は、暴露ガスの濃度をより環境に近くして実験を実施していく必要がある。

#### おわりに

① TSP抽出物100mg又はBaP20mgをオリーブ油に溶解させPBSで懸濁液にしたものをラットの気管内に注入したが、腫瘍の発生はTSP+Solvent群に1例、BaP+Solvent群に1例見られただけであった。

② 粉末BaPのPBS浮遊液を気管内に注入したラット肺において、NO<sub>2</sub>・SO<sub>2</sub>暴露が扁平上皮癌の発生を促進していることが示唆された。

#### 参考文献

1) 大山謙一ら：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、東京都環境科学研究所年報1992、p245-251.

2) Shabad, L.M. *et al*: Important of the deposition of carcinogens for cancer induction in lung tissue, *J. Cancer Inst.*, 33, p135-141 (1964).

3) Saffiotti, U. *et al*: A method for the experimental induction to bronchogenic carcinoma, *Cancer Research*, 28, p104~124, (1968).

4) Yoshimoto, T. *et al*: Induction of squamous cell carcinoma in the lung of C57BL/6 mice by intra-tracheal instillation of benzo[a]pyrene with charcoal powder, *Gann*, 68, 343~352 (1977).

5) 大山謙一ら：ラット肺における発癌物質DNA付加体の観察、東京都環境科学研究所年報1992、p252-258.



写真1  
TSP抽出物を貪食しているマクロファージ、  
TSP+Solvent+NO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>(A)群、H&E染色、×400



写真2  
扁平上皮癌、Bap+PBS+NO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>(E)群、H&E染色、×400

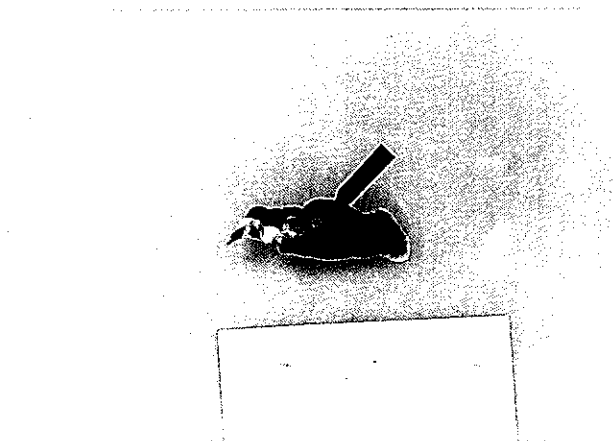


写真3  
肺の副葉にみられた白色結節を呈する腺腫(矢印)、  
TSP+Solvent(B)群



写真4  
写真3の拡大写真、明るくやや大きい核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、H&E  
染色、×400

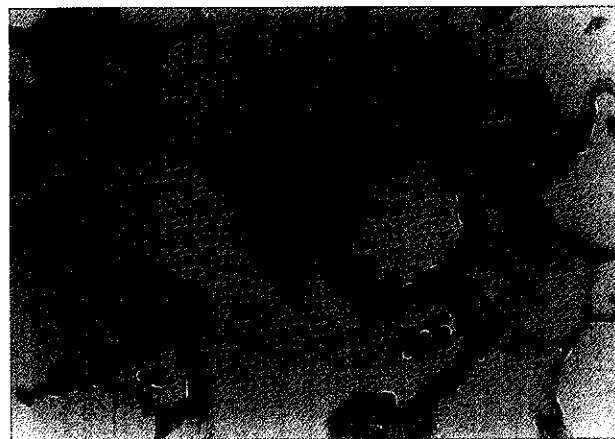


写真5  
II型肺胞上皮細胞の過形成、染色質に富む核を持った立方状  
ないしやや扁平な肺胞II型上皮細胞の過形成巣で、既存の肺



写真6  
肺胞II型上皮細胞の過形成、染色質に乏しい明るくやや大き  
い核を持った肺胞II型上皮細胞の過形成巣で既存の肺胞隔壁  
を覆っている、Bap+PBS(F)群、H&E染色、×400



写真7  
気管支上皮の挙上、気管支上皮が内腔に向かって迫り出している、TSP+Solvent+NO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>(A)群、H&E染色、×400



写真8  
細気管支の異所性増殖、細気管支上皮が肺胞腔内に増殖している、Bap+Solvent+NO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>(C)群、H&E染色、×200