

論文

大気汚染ガス (NO₂・SO₂) と大気浮遊粉じんによる 複合生体影響に関する研究 (第3報)

大山謙一 草野友子 泉川碩雄
薄田康広* 伊藤隆明* 蟹沢成好*
(*横浜市立大学医学部)

要 旨

F 344/Jclラット雄 (5週齢) に大気浮遊粉じん (TSP) 25 mgから抽出した抽出物と炭粉 (4.25 mg) の混合物を気管内に注入し、更に 6 ppm 二酸化窒素 (NO₂) 及び 4 ppm 二酸化硫黄 (SO₂) を暴露して肺における影響を検討した。

実験開始後 1, 4, 7 日及び 7 カ月のラット肺における³²P-ポストラベル法による発癌物質-DNA付加体の観察、実験開始後 1, 7 日, 7 カ月のラット肺における抗ブロムデオキシウリジン (BrdU) モノクロナール抗体を用いた肺上皮細胞のDNA合成活性の測定、及び実験開始後 7 カ月のラット肺の病理組織学的検討を行った。

その結果、

- ① TSP抽出物はラットの肺細胞核のDNAを修飾して付加体を形成し、肺発癌の直接的な要因になり得ることが明らかになった。
- ② 経気道的に侵入したTSP抽出物が付着した炭粉は、7カ月後も肺内に滞留し、肺胞炎や細気管支線毛上皮細胞の異所性増殖を引き起こすことが分かった。
- ③ TSP抽出物が付着した炭粉の気管内注入及びNO₂暴露により気管支上皮の線毛の短小化・消失及び細気管支の狭窄が生じた。

英文要旨

Study on Effects of Combined Air Pollutants in the Lungs of Rats (III)

Ken-ichi Ohyama, Tomoko Kusano, Sekio Izumikawa,

Yasuhiro Usuda*, Takaaki Ito* and Masayoshi Kanisawa*

*Yokohama City University School of Medicine

The effects of combined air pollutants were investigated Male SPF F 344/Jcl rats (5 weeks old) were exposed to 6 ppm NO₂ and 4 ppm SO₂ for 7 months and intratracheally instilled extracts of total suspended particles (TSP, total 25 mg per rat) once a week for 4 weeks. DNA adducts in the lungs of rats sacrificed after 1, 4, 7 days and 7 months were detected by a ³²P-postlabeling assay, DNA synthetic activities in the lungs of rats sacrificed after 1, 7 days and 7 months were studied by the use of anti-Bromodeoxyuridine (BrdU) monoclonal antibody, and the lungs of rats sacrificed after 7 months were histopathologically examined. The results show that TSP extracts formed DNA adducts in the lung cells and might directly induce lung cancer. Carbon coated with TSP extracts and intratracheally instilled stayed for 7 months in the lungs and caused alveolitis and ectopic proliferation of bronchiolar epithelial cells. The carbon instillation and NO₂ exposure caused cilia of bronchiolar epithelium to be shortened or disappeared, and bronchiolar stricture.

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、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NO₂及びSO₂ガスを暴露する実験的研究を行い、二酸化窒素 (NO₂)・二酸化硫黄 (SO₂) 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既に報告した¹⁾。

現在、前回の実験を基にTSPの注入量を25mg、炭粉注入量を4.25mgとして粉じん中のタール成分の影響に重点を置いた実験を実施中である。

本報は、この実験途中の7か月までに得られた結果であり、実験開始後1、4、7日及び7カ月のラット肺における³²P-ポストラベル法による発癌物質-DNA付加体の観察、実験開始後1、7日、7カ月のラット肺におけるブロムジオキシウリジン (BrdU) を用いた肺上皮細胞のDNA合成活性の測定、及び実験開始後7カ月のラット肺について病理組織学的検討を行ったものである。

2 実験方法

(1) 実験動物

SPF (Specific Pathogen Free) F344/Jcl ラット雄4週齢を購入し、1週間環境に慣らした後5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~Fの

表1 実験群

群	実験条件
A	TSP+Carbon+NO ₂ +SO ₂
B	TSP+Carbon+NO ₂
C	TSP+Carbon+SO ₂
D	TSP+Carbon
E	Carbon
F	Non treatment

6群に分けた。

(2) 注入物質

TSPは、1992年11月~1993年4月に当研究所屋上(6F)にてハイボリュームエアサンプラーにより採取した。集めた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、ろ紙でろ過して石英フィルター繊維を除去した。このろ液にジクロロメタン(残留農薬試験用)で洗浄済みの炭粉を添加した後減圧乾固した。

炭粉は、粉じんに類似した形態をとるようするために用いた。この乾固物を滅菌生理食塩液で29.25mg/0.8ml (TSPは25mg/0.8ml、炭粉は4.25mg/0.8ml)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2に、変異原活性を図1に示した。

表2 注入物質中のPAH量 (ng/mg)

Chemicals	TSP	Carbon
BaA	13.8	ND
BbF	31.6	ND
BkF	9.8	ND
BaP	13.5	ND
BghiP	27.3	ND
1-NP	0.8	ND
Phenanthrene	11.5	0.1
Fluoranthene	40.6	ND
Pyrene	46.4	ND
Fluorenone-9-o	28.2	ND
Anthraquinone	352.1	ND

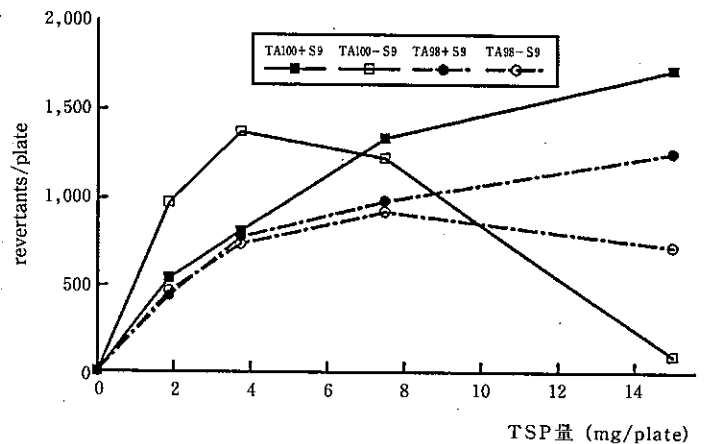


図1 TSPの変異原活性

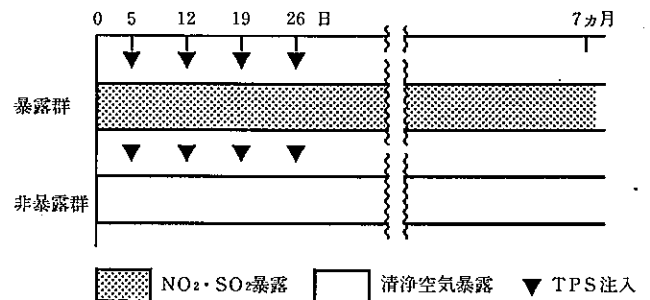


図2 実験期間

(3) 注入及びガス暴露 (図 2)

懸濁液 0.2 ml 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。TSP 抽出物注入は、ガス暴露開始 5 日後に第 1 回目を実施し、引き続き週に 1 回、連続して 4 週間行った (合計 4 回)。ラット 1 匹の総注入量は、TSP として 25 mg、タール量として 3.25 mg であった (TSP 注入時のラットの体重は 60~160 g であり、実験開始 7 カ月の時点では約 300 g となっている。ここで体重 152 g のラットが仮に体重が変わらないとすると、呼吸量は 66~114 ml/分であり、注入した粉じん量 25 mg は 191.5 m³ の大気から採取したことから、計算上 5.5~3.2 年分の吸入量に当たる²⁾)。

暴露ガスはいずれも環境基準の 100 倍である濃度 6 ppm の NO₂ 及び 4 ppm の SO₂ であった。

暴露は、既報と同様のガス暴露チャンバー¹⁾を使用して 1 日 16 時間行った。

(4) 採材方法

ラットをペントバルビタールナトリウム腹腔内注射により麻酔し、股動脈より放血死させた後、呼吸器官等を採材した。

(5) 発癌物質 DNA 付加体の観察

実験期間 1, 3, 7 日、及び 7 カ月後の各群 2 匹のラットの肺を既報と同様に処理して³²P-ポストラベル法により DNA 付加体を観察した³⁾。

(6) DNA 合成活性の測定

実験期間 1, 7 日、及び 7 カ月の各群 1 匹のラットに BrdU を 20 mg/kg BW の割合で腹腔内投与し、1 時間後に摘出した左肺を 4% パラフォルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋し、4 μm 切片を作成した。切片を 4 N 塩酸、0.4 mg/ml ペプシン処理後、抗 BrdU モノクロナール抗体で反応させ⁴⁾、ABC 法で発色させた。任意の細気管支上皮の細胞核を 1,000 個選び、その中の陽性細胞核数から標識率を算出した。

(7) 病理組織学的検討

実験期間 7 カ月のラットの肺を肉眼的観察後、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観察した。

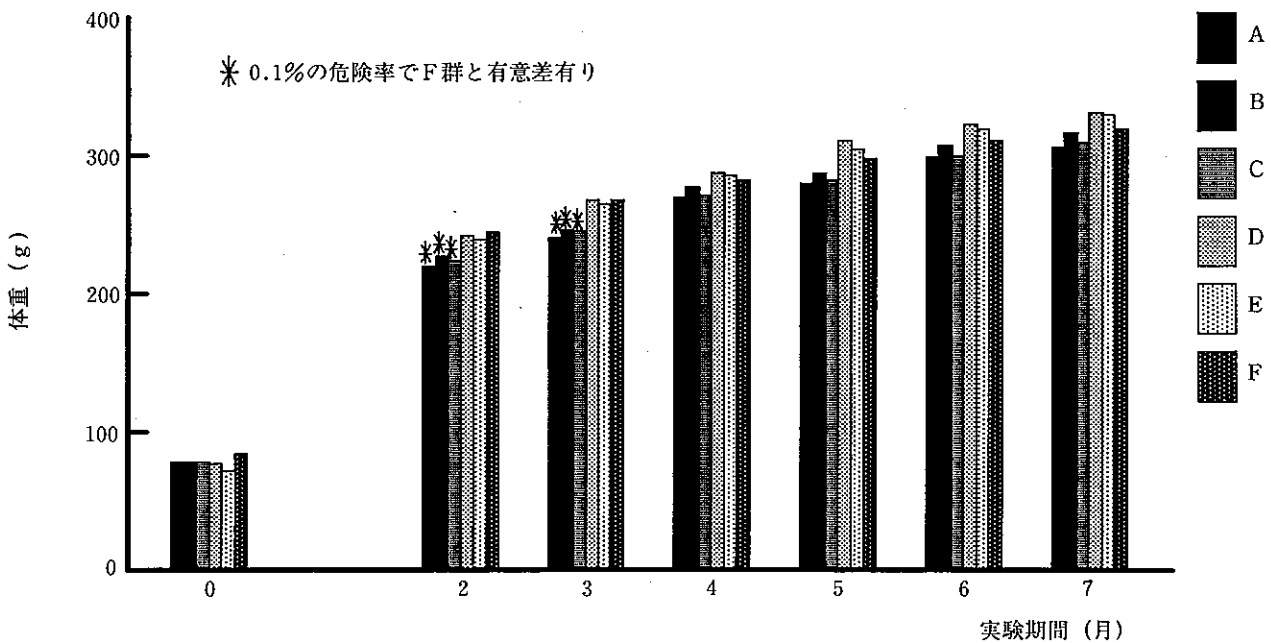


図 3 ラット体重の経時的変化

3 結果

各群のラットの体重増加を図3に示したが、ガス暴露をした群(A~C群)のラットの体重が無処置群(F群)に比べて少なく、炭粉を注入したD、E群のラットの体重はF群に比較して多い傾向であった。

(1) ³²P-ポストラベル法による発癌物質-DNA付加体の観察

① 無処置及び炭粉のみの注入群を含めた全群に4個のスポットが観察されたが、1日後のA、B、C、D群で一番大きく3日、7日後と次第に小さくなり、7日後では、無処置群とほぼ同じ大きさになっていた(写真1)(写真2)(写真3)(写真4)(写真5)(写真6)。

② 7カ月後の検体では①で見られた4個のスポットが見られたがスポットの大きさは①の無処置群と同じかそれよりも弱い活性で、A~F群間に差はみられなかった。

(2) DNA合成活性の測定

細気管支におけるBrdUの標識率を表3に示した。一般に、F群を除いて1~7日後において1日後が気道、

表3 BrdU標識率の経時的変化(%)

群	処置	1日	7日	7カ月
A	TSP+Carbon+NO ₂ +SO ₂	4.8	0.3	0.1
B	TSP+Carbon+NO ₂	4.2	0.4	0.0
C	TSP+Carbon+SO ₂	3.8	0.5	0.0
D	TSP+Carbon	3.2	0.3	0.0
E	Carbon	2.0	0.3	0.1
F	Non treatment	-	0.1	0.1

肺胞ともにBrdUの標識率が最も高く(写真7)(写真8)、経過とともに低下し、7カ月後では無処置群と変わりなく低値を示した。

(3) 病理組織学的検討(表4)

① TSPを注入したA~D群のラットの肺では、肺胞腔に炭粉を貪食した肺胞マクロファージが遊走し、肺胞壁間質に炭粉沈着がみられた。また、これらの所見は、炭粉のみ注入したE群で特に顕著であった(写真9)。

② TSPを注入したラットでは、肺胞腔に炭粉が充満していたり、肺胞道に炭粉塊が滞留している所見が散見された(写真10)(写真11)が炭粉のみを注入した群では認められなかった。また、細気管支の狭窄(写真12)が観察されたが、NO₂とSO₂を暴露したA群で100%、NO₂のみを暴露したB群で91%と高い値を示した。

更にTSPを注入したラットでは、細気管支線毛上皮細胞の異所性増殖が見られ、特にSO₂を暴露したC群では炭粉塊周囲に結合組織の増生を伴っていたり(写真13)、肺胞道において炭粉塊周囲に高円柱化した細気管支上皮細胞の異所性増殖(写真14)も見られた。

③ NO₂を暴露したA、B群のラットでは気管支上皮細胞の線毛の短小化や消失(写真15)、及び肺胞道壁の肥厚(写真16)が見られた。

④ 炭粉を注入したA~E群では、炭粉による肺胞炎が残存していたが、TSPを含有しないE群での発生率が90%と特に顕著であった。更にこの病巣部ではII型肺胞上皮細胞の増殖を伴っている場合(写真17)もあった。

表4 実験開始7カ月後のラット肺に見られた病変の発生率

群	動物数	炭粉貪食マクロファージの遊走	肺胞間質における炭粉沈着	肺 胞 炎			線毛上皮細胞の異所性増殖						
				II型肺胞上皮細胞の増殖を伴う	細気管支の狭窄	線毛の短小化	炭粉塊周囲で結合組織増生を伴う	炭粉塊周囲で高円柱細胞を呈する	線毛の短小化又は消失	肺胞道壁の肥厚	II型肺胞上皮細胞の過形成		
A	11	11 (100)	11 (100)	11 (100)	1 (9)	0 (0)	11 (100)	5 (45)	0 (0)	0 (0)	11 (100)	11 (100)	0 (0)
B	11	11 (100)	11 (100)	11 (100)	4 (36)	0 (0)	10 (91)	3 (27)	0 (0)	0 (0)	11 (100)	11 (100)	1 (9)
C	11	11 (100)	11 (100)	11 (100)	2 (18)	0 (0)	2 (18)	2 (18)	1 (9)	2 (18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
D	11	11 (100)	11 (100)	11 (100)	4 (36)	0 (0)	2 (18)	2 (18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
E	10	10 (100)	10 (100)	0 (0)	9 (90)	8 (80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
F	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

⑤ 将来、腫瘍にまで成長すると思われるII型肺胞上皮細胞の過形成(写真18)がB群に1例であるが観察された。

4 考 察

体重について見ると、ガス暴露した群のラットの体重増加抑制が見られると同時に、粒子状物質を気管内に注入した群のラットの体重増加促進がみられた。餌の摂取量を把握していないので精神的ストレスによるものか代謝異常によるものかは判断できなかった。

今回の実験では、³²P-ポストラベル法による発癌物質DNA付加体の観察とBr d U標識率によるDNA合成活性の測定及び病理組織学的観察を行い、TSPとNO₂・SO₂暴露の7カ月までの影響について検討した。

TSPは肺内に注入されると早期にDNAを修飾して付加体を形成することがわかり、肺発癌の直接的な要因になり得ることが明らかになった。³²P-ポストラベル法は非常に鋭敏な手法であるため、無処置群や炭粉群にも小さなスポットが見られたが、両者のプロフィールが同様なことから動物舎内で使用する空気を屋外気から取り入れる際、フィルターで除去しきれなかった微量の汚染物質が存在していたと思われる。

7カ月後のラットの病理組織学的観察によると、肺胞腔まで達した炭粉は肺胞マクロファージにより貪食されるか肺胞間質、又はリンパ小節や肺門リンパ節に沈着していた。また、肺胞炎が認められ炭粉が長期間滞留していることが分かった。これらの所見は、TSPの付着していないE群が最も顕著であった。各群の炭粉を比較してみると、TSPが付着している炭粉を注入したラット(A~D群)の肺では、炭粉が塊状を呈して肺胞道や肺胞腔に滞留していたが、塊が大きいために肺胞マクロファージに貪食されてはいなかった。そのため、肺胞マクロファージの遊走はE群に比較して軽度であった。TSPが付着した炭粉が塊状を呈するのは、TSPタールにより粘着しやすいためと思われる。

また、TSPの影響として細気管支線毛上皮細胞の異所性増殖が見られたが、C群では炭粉塊周囲に結合組織の増生を伴いその周囲に上皮細胞の異所性増殖がみられた。更に、肺胞道における炭粉塊周囲では、高円柱化した細気管支線毛上皮細胞の異所性増殖がみられ、ガス暴露の複合影響が考えられた。

B群のラットの肺に肉眼的に白色結節として認められ

た病変は、組織学的にはII型肺胞上皮細胞の過形成であったが、TSPの気管内注入とSO₂暴露開始から7カ月が経過した時点で、すでに腫瘍性病変が発生しておりTSP注入量が前回実施した17mgよりも25mgと多いためとNO₂暴露の腫瘍促進作用が示唆された。

5 おわりに

今回の実験から次のことが明らかになった。

- ① TSP抽出物はラットの肺細胞核のDNAを修飾して付加体を形成し、肺発癌の直接的な要因になり得ることが明らかになった。
- ② 経気道的に侵入した炭粉は、7カ月後も肺内に滞留し、肺胞炎を引き起こすことが分かった。更に、TSP抽出物が付着した炭粉の場合は、細気管支線毛上皮細胞の異所性増殖が認められた。
- ③ TSP抽出物が付着した炭粉の気管内注入とNO₂暴露により気管支上皮の線毛の短小化・消失、細気管支の狭窄が生じた。

参考文献

- 1) 大山謙一：大気浮遊粉じん抽出物の気管内注入およびNO₂・SO₂暴露をしたF344ラットにおける肺腫瘍発生に関する研究，大気汚染学会誌，28,4,p.210-219 (1993).
- 2) 石橋正彦ら：実験動物学ラット，講談社，p243(1984).
- 3) 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.
- 4) Shutte, B., *et al* : Effect of tissue fixation on anti-bromodeoxyuridine immunohistochemistry, J. Histochem., 35, p.1343-1345 (1987).

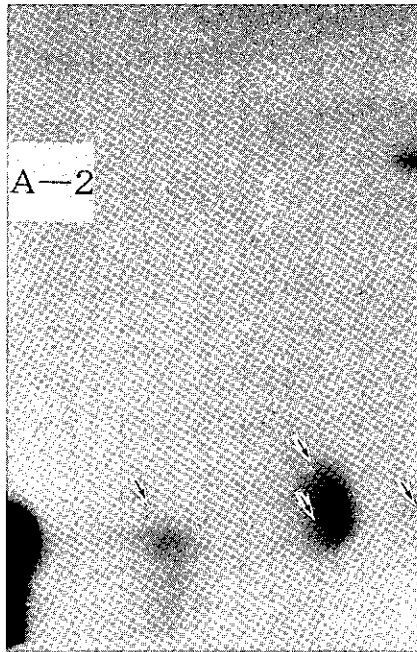


写真1

ラット肺における³²P-ポストラベル法によるDNA付加体のクロマトグラム：4個のスポットが形成されている，注入後1日，TSP+C+NO₂+SO₂群。

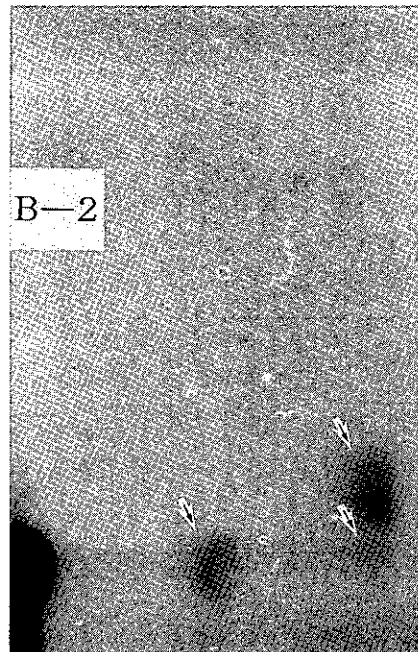


写真2

ラット肺における³²P-ポストラベル法によるDNA付加体のクロマトグラム：写真1と同様の4個のスポットが形成されている，注入後1日，TSP+C+NO₂群。

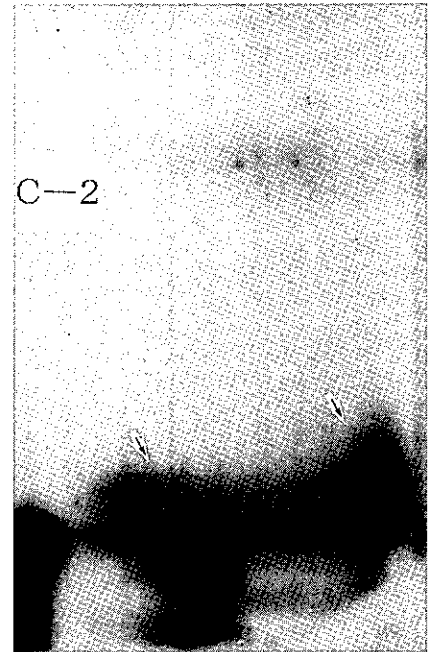


写真3

ラット肺における³²P-ポストラベル法によるDNA付加体のクロマトグラム：写真1と同様の4個のスポットが形成されている，注入後1日，TSP+C+SO₂群。

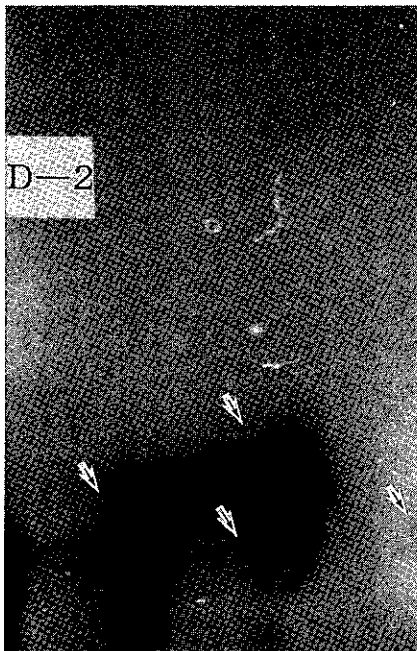


写真4

ラット肺における³²P-ポストラベル法によるDNA付加体のクロマトグラム：写真1と同様の4個のスポットが形成されている，注入後1日，TSP+C群。

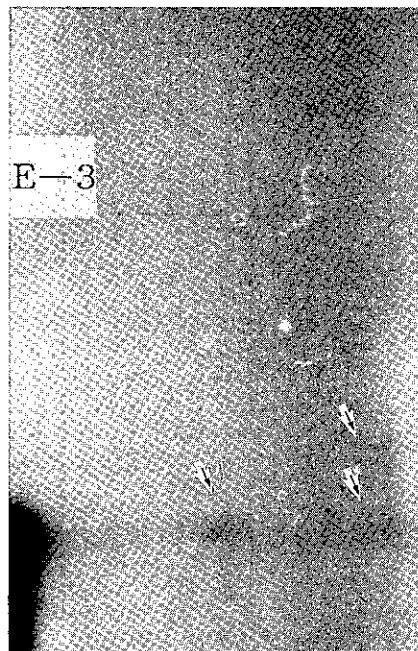


写真5

ラット肺における³²P-ポストラベル法によるDNA付加体のクロマトグラム：写真1と同様の4個のスポットが形成されているがスポットは小さい，注入後1日，Carbon群。

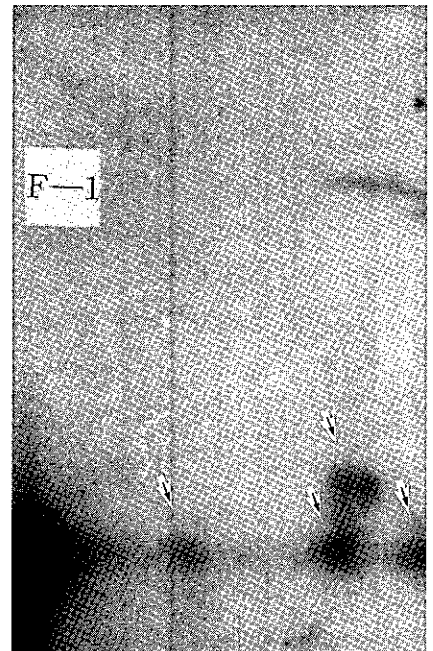


写真6

ラット肺における³²P-ポストラベル法によるDNA付加体のクロマトグラム：写真1と同様の4個のスポットが形成されているがスポットは小さい，注入後1日，無処置群。

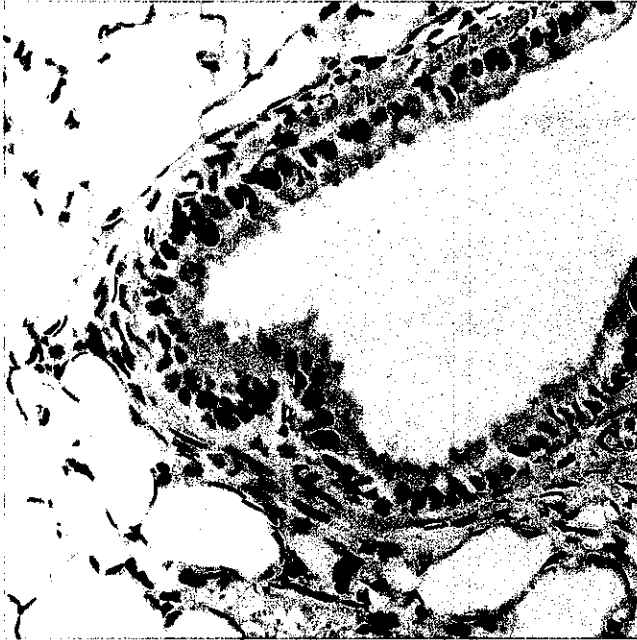


写真7
気管支上皮細胞にみられた茶褐色に染まった陽性核：TSP+C+NO₂群，注入後1日，BrdU免疫染色。

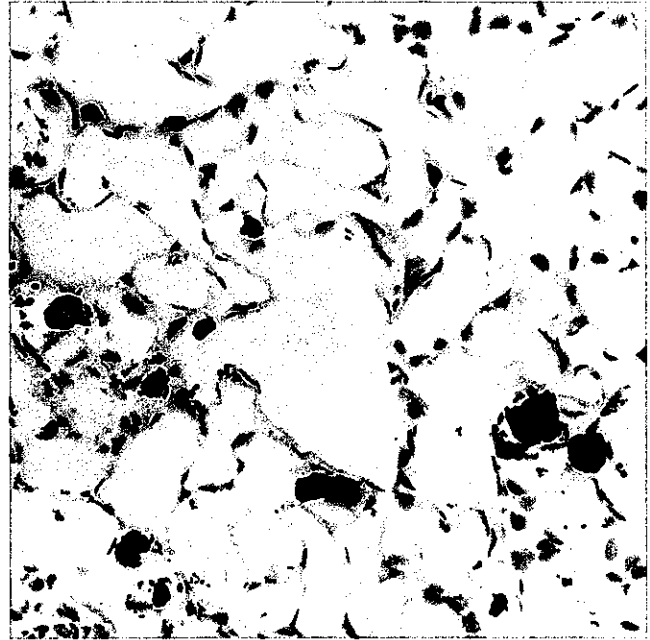


写真8
肺胞上皮細胞にみられた茶褐色に染まった陽性核：TSP+C+SO₂群，注入後1日，BrdU免疫染色。

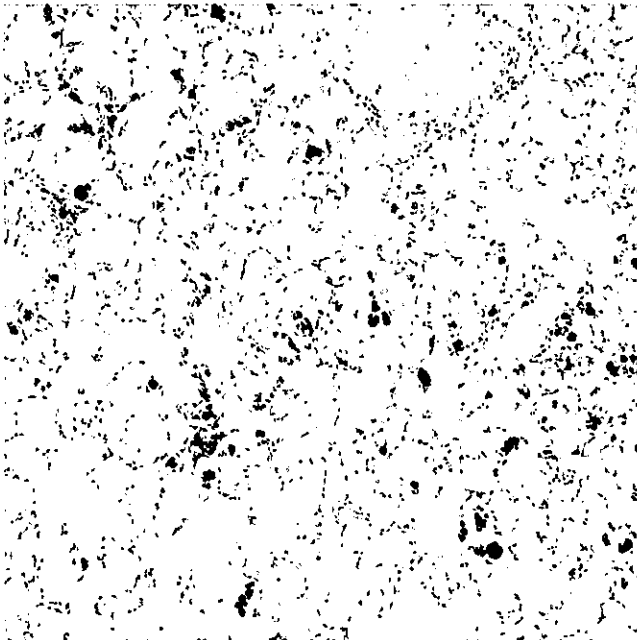


写真9
肺胞腔に遊走した肺胞マクロファージと間質に沈着した炭粉：炭粉を貪食した肺胞マクロファージが見られる，Carbon群，7カ月，H&E染色，対物レンズ倍率 ×10。

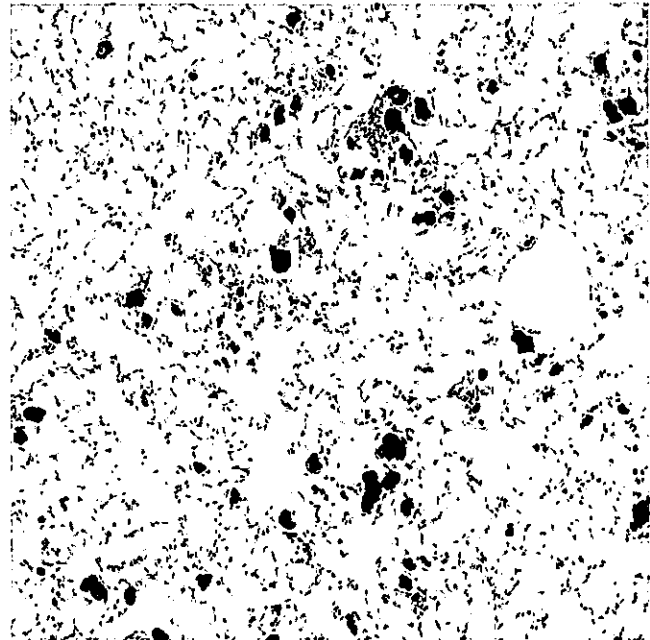


写真10
肺胞腔に充満した炭粉塊及び肺胞道に滞留した炭粉塊：TSP+C+NO₂+SO₂群，7カ月，H&E染色，対物レンズ倍率 ×10。

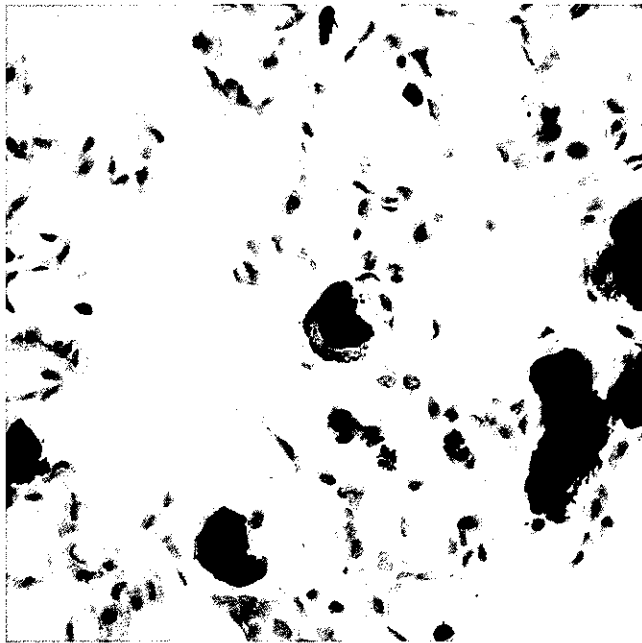


写真 11

写真 10 の拡大図, 対物レンズ倍率 $\times 40$

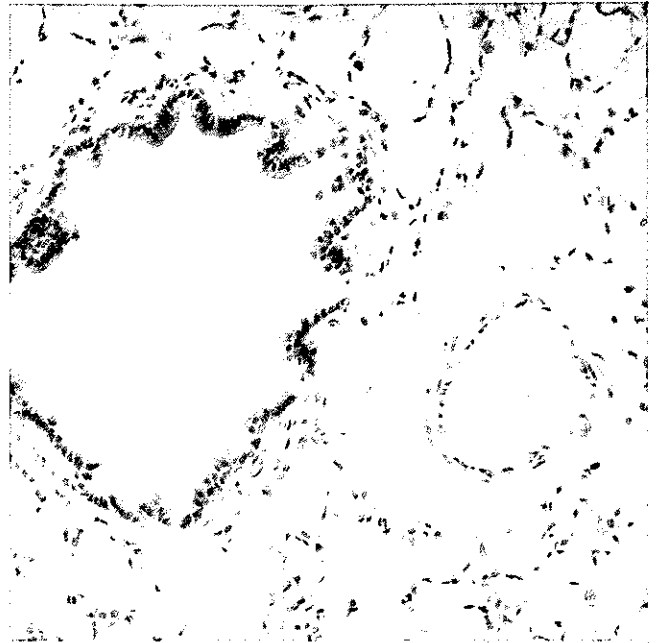


写真 12

細気管支の狭窄: TSP+C+NO₂+SO₂ 群, 7 カ月, H&E 染色, 対物レンズ倍率 $\times 20$.

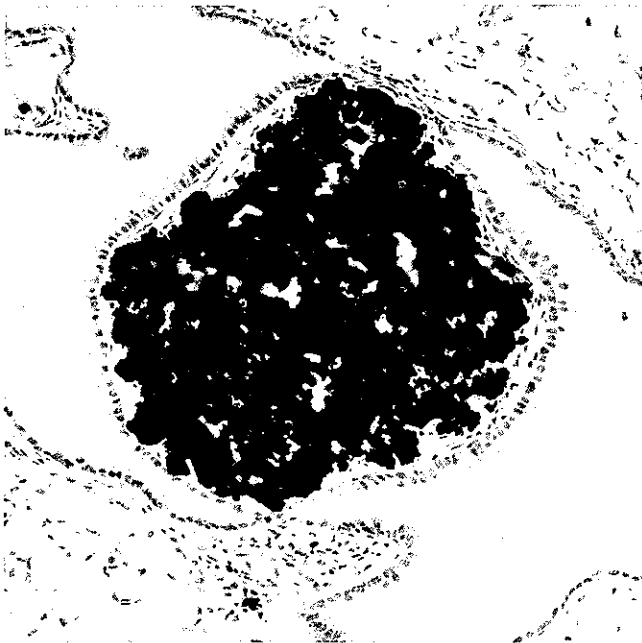


写真 13

肺胞間質に滞留した炭粉塊と周囲の結合組織増生: TSP+C+SO₂ 群, 7 カ月, H&E 染色, 対物レンズ倍率 $\times 20$.

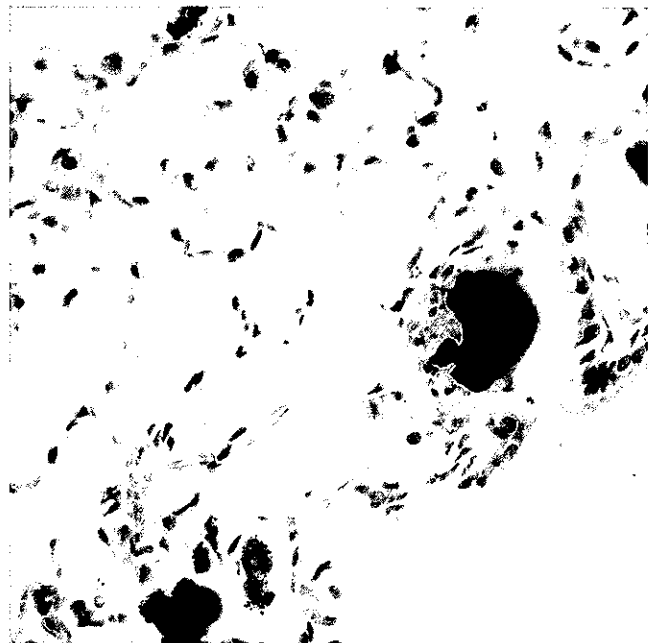


写真 14

肺胞道に滞留した炭粉塊近位における高円柱化した細気管支上皮細胞の異所性増殖: TSP+C+SO₂ 群, 7 カ月, H&E 染色, 対物レンズ倍率 $\times 40$.



写真 15
 気管支上皮細胞の線毛の短小化及び消失：T S
 P+C+NO₂群, 7カ月, H&E染色,
 対物レンズ倍率 ×80.

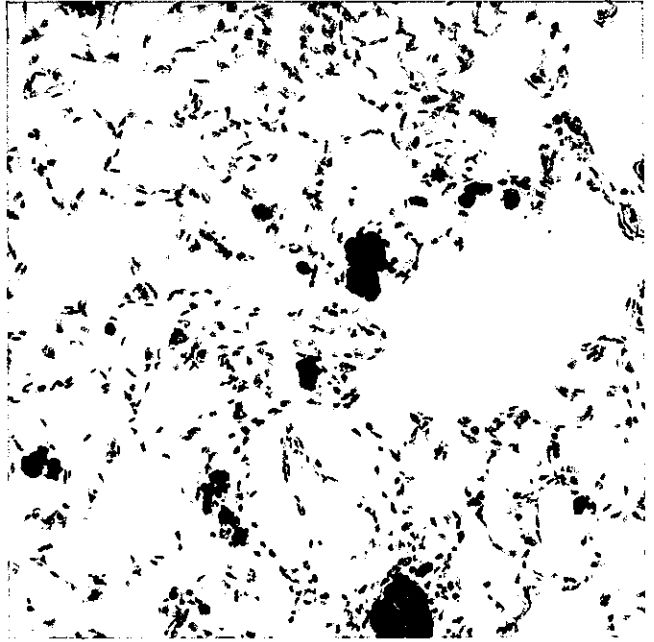


写真 16
 肺胞道壁の肥厚：T S P+C+NO₂群, 7カ月,
 H&E染色,
 対物レンズ倍率 ×20.

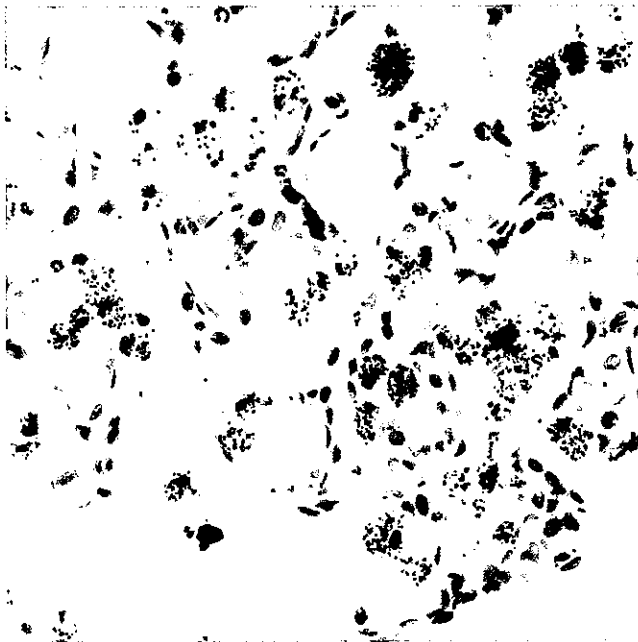


写真 17
 肺炎：炭粉食食肺胞マクロファージ遊走近位
 の肺胞にII型肺胞上皮細胞の増殖が見られる,
 Carbon群, 7カ月, H&E染色,
 対物レンズ倍率 ×40.



写真 18
 II型肺胞上皮細胞の過形成：正常肺組織と病変
 部の境界が明確である, T S P+C+NO₂群,
 7カ月, H&E染色,
 対物レンズ倍率 ×4.