

# ディーゼル排出微粒子 (DEP) による肺腫瘍発生と NO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>暴露の影響について —DEP抽出物投与による18ヵ月長期暴露実験—

草野友子 中村満 泉川碩雄  
飯田靖雄 大山謙一\* 蟹沢成好\*\*  
伊藤隆明\*\*

(\*東京都立衛生研究所\*\*横浜市立大学医学部)

## 要 旨

F344/Jclラット (雄、5週齢) にディーゼルエンジン排出微粒子 (DEP) 20mgから抽出したタールと炭粉 4mgを気管内に注入し、さらに0.6ppmNO<sub>2</sub>と0.4ppmSO<sub>2</sub>に暴露した。実験開始後18ヵ月の肺病変について病理組織学的に検討するとともにDNA付加体、肺内分泌細胞の観察も行い、肺腫瘍発生に与えるNO<sub>2</sub>とSO<sub>2</sub>ガスの影響を調べた。

その結果、腺腫はDEPを注入した全群に発生し、特にNO<sub>2</sub>とSO<sub>2</sub>ガスの混合暴露群での発生率が高かった。しかし、NO<sub>2</sub>のみを暴露した群と、ガス暴露を行っていない群での発生率には差が認められなかった。

このことから、DEP注入による肺腫瘍発生において、0.6ppm、0.4ppmのNO<sub>2</sub>とSO<sub>2</sub>による暴露が促進的役割を果たしたことが示唆された。

## Effect on Lung Tumor in Rats Caused by Exposure of Diesel Exhaust Particulates (DEP), Nitrogen Dioxide and Sulfur Dioxide

Tomoko Kusano, Mitsuru Nakamura, Sekio Izumikawa, Yasuo Iida  
Ken'ichi Ohyama\*, Masayoshi Kanisawa\*\* and Takaaki Ito\*\*

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

\*\* Yokohama City University School of Medicine

## Summary

The health effects of air pollutants were investigated for test rats (F344/Jcl, male, 5 weeks old). The extracted tar from diesel exhaust particulates (DEP, total 20mg per rat) and carbon particulates (4mg per rat), were injected in the trachea of rats. The rats were also exposed to 0.6ppm NO<sub>2</sub> and 0.4ppm SO<sub>2</sub> for 18 months. The lungs of test rats were histopathologically examined after 18 months and also DNA adducts and pulmonary endocrine cell were studied.

The results show that adenomas grows on all injected tar groups and particularly higher on the groups exposed to NO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub>. But there was no difference of adenomas generation rate between the groups exposed to NO<sub>2</sub> and the groups without it. In this case, it suggests that the exposure to NO<sub>2</sub> (0.6ppm) and SO<sub>2</sub> (0.4ppm) plays a promotion role of the lung tumor under the injection of DEP.

## 1 はじめに

ディーゼル排出微粒子 (DEP) による肺腫瘍発生に関しては、DEP投与によるいくつかの肺腫瘍発生実験が報告されている<sup>1,2)</sup>。しかし、大気汚染ガスのNO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>が肺腫瘍発生に及ぼす影響に関する報告は少ない。筆者らは、DEPから抽出したタールをラットの気管内に投与し、さらにNO<sub>2</sub>(6 ppm)、SO<sub>2</sub>(4 ppm)を暴露することによって、腫瘍発生が促進される可能性があることを見いだした<sup>3)</sup>。そこで今回、暴露ガス濃度をさらに低くして(NO<sub>2</sub>:0.6ppm、SO<sub>2</sub>:0.4ppm)、DEPによる肺腫瘍発生とガス暴露の影響について、18ヵ月後の肺病変を病理組織学的に検討した。

また、DNA付加体、肺内分泌細胞過形成におけるガス暴露の影響についての検討もあわせて行ったのでその結果を報告する。

## 2 実験方法

### (1) 実験動物

動物は、F344/Jcl ラット (日本クレア) の5週齢の雄を購入し、1週間の検疫、経過観察後に実験に供した。実験群は表1に示す4群を設定した。

表1 実験群

群	実験条件	動物数
A	DEP+炭粉+NO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub>	40
B	DEP+炭粉+NO <sub>2</sub>	40
C	DEP+炭粉	40
D	無処置	6

### (2) 注入物質

DEPは、いすゞ6HE1、排気量7127ccの直噴式ディーゼルエンジンをエンジンダイナモメーター上で運転し、希釈トンネルで10倍希釈した排出ガスより、ハイボリュームエアサンプラーで採取した(採取条件は車速33km/h、エンジン回転1168rpm、トルク37kgm)。採取には石英ろ紙を使用した。

採取したDEPは、ジクロロメタン(残留農薬試験用)

で20分間超音波抽出し、ろ過液に炭粉を混合した後、ロータリーエバポレーターでジクロロメタンを除去した。炭粉は、DEP抽出タールを長期間肺胞内にとどめておくための賦形剤であり、使用前にジクロロメタンで洗浄し、電気炉で一晩燃焼(350℃)させた。注入液は、一匹あたり、DEP20mgから抽出したタールに4mgの炭粉を加えたものを、0.8mlの生理食塩水に混合して作成した。

なお、DEPについては、Ames試験を行い変異原活性について調べるとともに、ジクロロメタン抽出タール成分についても、高速液体クロマトグラフ及びガスクロマトグラフィー質量分析計で多環芳香族炭化水素の分析を行った。

### (3) 注入方法

注入方法は、一回につき0.2mlの注入液を、エーテル麻酔をしたラットの気管内に、4回にわけて(1回/週)ゾンデ針で注入した。注入は、ガス暴露開始後3日目に第一回を行った。

### (4) ガス暴露方法

ガス暴露方法は、既報<sup>4)</sup>と同様に、容積1350ℓのステンレス製チャンバーを使用しNO<sub>2</sub>濃度を0.6ppm、SO<sub>2</sub>濃度を0.4ppmに設定して行った。ボンベガスの希釈には、ヘパフィルターを通した清浄空気を使用した。動物は、無処置群も含めてすべてクリーンルーム内で飼育し、飼料と飲料水は滅菌したものを使用した。

暴露期間は、1日24時間、18ヵ月間連続して行った。

### (5) 病理組織学的検討

実験開始から18ヵ月後に、ラットをペントバルビタールで麻酔し、放血後に肺を採材した。採材した肺は、10%緩衝ホルマリン液で固定した後、ヘマトキシリンエオジン(H・E)染色を実施し病理組織学的な検討を行った。

### (6) DNA付加体の観察

暴露ガスのDNA付加体形成に与える影響を見るために、各群2匹ずつ、DNA付加体の観察を既報<sup>5)</sup>と同様、<sup>32</sup>P-ポストラベル法で行った。

### (7) 肺内分泌細胞の観察

肺内分泌細胞の観察は、A~C群各5匹、無処置群は2匹ずつ行った。観察はCGRP(calcitonin gene related peptide)免疫染色により行った。

すなわち、動物の右心臓を4%パラホルムアルデヒド固定後、4μmのパラフィン切片を各動物20枚ずつ

連続で作成した。切片を4枚おきにH・E染色して病変を数えた後に、必要に応じてCGRPに対するポリクロナール抗体を用いて免疫染色を行った。

### 3 DEPの変異原活性及び多環芳香族炭化水素濃度

DEPの変異原活性は図1に見るとおりであり、dose response があり、1mg当たりの誘発変異コロニー数は、TA100+S9が238、TA100-S9が329、TA98+S9が392、TA98-S9が182であった。いずれの菌株においても変異原性が認められた。

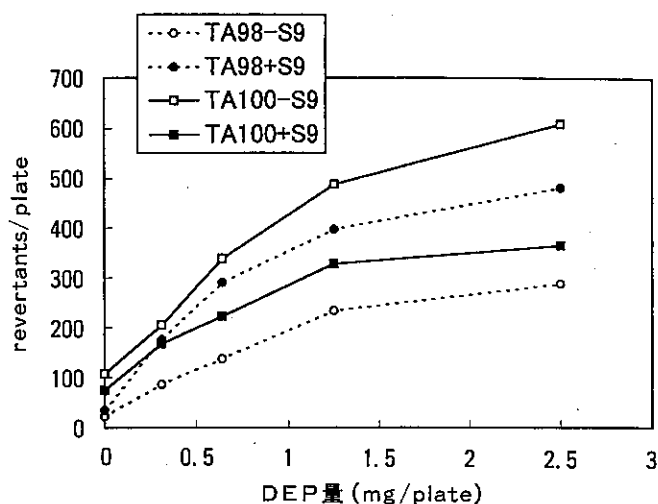


図1 DEPの変異原活性

抽出タールの分析結果から求めたDEP中の多環芳香族炭化水素(PAH)の濃度は、表2に示すとおり、Pyrene、Fluorantheneが主であった。なお、賦形剤である炭粉についても分析をしたが、Phenanthreneが微

量検出されただけである。

表2 多環芳香族炭化水素分析結果 (μg/mg)

	DEP	CB
BaA	0.003	0
BbF	0.006	0
BkF	0.01	0
BaP	0.008	0
BghiP	0.009	0
1-NP (ng)	0.231	0
Phenanthrene	1.99	0.003
Fluoranthene	8.70	0
Pyrene	10.9	0
Fluorenone-9-on	0.27	0
Anthraquinone	1.48	0

\* CB:炭粉

### 4 実験結果及び考察

実験期間中の動物の途中死亡は、A群3匹、B群4匹、C群2匹であった。いずれも誤飲による窒息等であり、病気との関連性はなかった。

18ヵ月後の肺に見られた病変について病理組織学的観察を中心に検討した結果は次のとおりである。

#### (1) 病理組織学的観察

病理学的観察結果を表3に示す。

①肺におけるDEPタール付着炭粉は肺の全域にわたり散在していた(写真1)。肺胞壁間質への炭粉沈着と、肺胞腔内へのマクロファージの遊走が、A、B、C群に認められた(写真2)。炭粉は、細胞核大のものから肺

表3 実験開始後18ヵ月にみられた病変の発生率

群	動物数	炭粉沈着	炭粉貪食マクロファージ	II型上皮細胞過形成	気管支線毛消失短小化	肺炎	線毛上皮異所性増殖	腺腫
A	37	100	100	10.8	100	2.7	83.8 *	10.8 *
B	36	100	100	5.6	100	8.3	72.2 *	2.8
C	38	100	100	13.9	0	5.3	38.9	2.6
D	6	0	0	0	0	0	0	0

\* P<0.05、χ<sup>2</sup>検定、対C群  
単位 %

胸腔内くらいまでと、大きさがまちまちであった。この結果から、炭粉は賦形剤としての役目をはたしており、また生体内では18ヵ月後においても異物除去機能が継続していることが推察される。

②気管支上皮の線毛の消失、短小化がA、B群で全例にみられたが、これは、ガス暴露の影響と考えられる。

③DEPを注入したA、B、C群に肺胞II型上皮細胞の過形成がみられた。立方状の肺胞II型上皮細胞が肺胞壁を一層に覆っており、一部のものは腺腫様構造を呈していた(写真3)。肉眼的には、肺表面に変色、やや隆起した結節としてみとめられた。これらは、将来、腺腫に発展していくことも考えられる。今回の集計では、軽度のものと同様に近いものとの区別をしていないので過形成の進展状況の観察が必要である。

④細気管支線毛上皮細胞の異所性増殖がA、B、C群にみられ、細気管支線毛上皮細胞が肺胞壁に散在していた(写真4)。異所性増殖の発生率をみると、DEP注入のみのC群よりも、ガス暴露を行ったA、Bが高かった( $\chi^2$ 検定、 $P < 0.05$ 、対C群)。ガス暴露もNO<sub>2</sub>単独暴露よりもSO<sub>2</sub>との混合暴露をしたA群での発生率が高かった。

ガス暴露を行ったA、B群がC群に比較して高かったことから、NO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>ガス暴露の促進作用が示唆された。またNO<sub>2</sub>単独よりもNO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>の混合暴露の方が、促進作用がより強くなると考えられる。

⑤肺炎が残存していたが、いずれも程度の軽いものであった。

⑥腺腫がA群に4例、B群に1例、C群に1例発生した。組織学的には、大型の核をもつ腫瘍細胞が認められた(写真5、6)。肉眼的には、周囲との境界が明瞭な、やや隆起した灰白色結節として認められる(写真7)。腺腫の発生率をみると、A群の発生率が高かった( $\chi^2$ 検定、 $P < 0.05$ 、対C群)。

このことから、NO<sub>2</sub>0.6ppm、SO<sub>2</sub>0.4ppmの混合暴露による腫瘍発生促進作用が示唆された。ただし、NO<sub>2</sub>暴露のB群とC群との間に有意差がなかったことから、NO<sub>2</sub>0.6ppm暴露による腫瘍発生促進作用は認められなかった。これは、嵯峨井らがDHPNによる肺腫瘍発生とNO<sub>2</sub>暴露の関係をガスの濃度を変えて行った結果<sup>6)</sup>と同様な傾向を示した。しかし、今回は、SO<sub>2</sub>のみの暴露群を設定していないために、混合暴露による肺腫

瘍発生促進におけるNO<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>ガスの寄与率が明確にはならなかった。

(2) DNA付加体の観察

A~C群とも、1~2個のスポットがみられた。スポットの数、場所には、A、B、C群での違いはみられなかった(写真8、9、10)。なおD群にはスポットは認められなかった(写真11)。

この結果から、付加体形成におけるガス暴露の影響はあまりないものと思われる。しかし、検体数が少ないため、すべてのケースにあてはまるか否かは断定できない。

(3) CGRPによる肺内分泌細胞過形成の観察

A~C群の連続切片中にみられたPECH (pulmonary endocrinecell hyperplasia) の数を表4に示す。

表4 各群にみられたPECH数

群	動物数	総PECH数
A	5	16
B	5	14
C	5	20
D	5	3

この結果からは、各種ガスによる暴露の影響は発生頻度の差としては現れなかった。

肺内分泌細胞の過形成は、将来、肺小細胞癌やカルチノイドに進展していく可能性があるといわれている<sup>7)</sup>。また、大気汚染ガスであるNO<sub>2</sub>が小細胞癌の病理に関与しているという報告もある<sup>8)</sup>。そのため、今後も、大気汚染ガスと肺内分泌細胞との関連について検討していく必要があると思われる。

引用文献

- 1) 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)。
- 2) 岩井和郎ら：ディーゼル排出物質の長期吸入暴露実験—肺および肺外臓器に見られた形態学的所見，大気汚染学会誌，21(1)，p.38-51(1986)。
- 3) 大山謙一ら：大気汚染物質による肺腫瘍発生に関する研究（第2報），大気環境学会要旨集，(1994)。
- 4) 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，p.245-251。
- 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，p.252-258。
- 6) 嵯峨井勝ら：二酸化窒素の肺腫瘍発生促進作用に関する実験的研究，大気汚染学会誌，25(5)，p.324-333(1990)。
- 7) Gosney, J.R. : Plumonary endocrine pathology. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1992.
- 8) 嵯峨井勝ら：オゾンおよび二酸化窒素と肺がん，大気汚染学会誌，24(1)，p.1-20 (1989)。

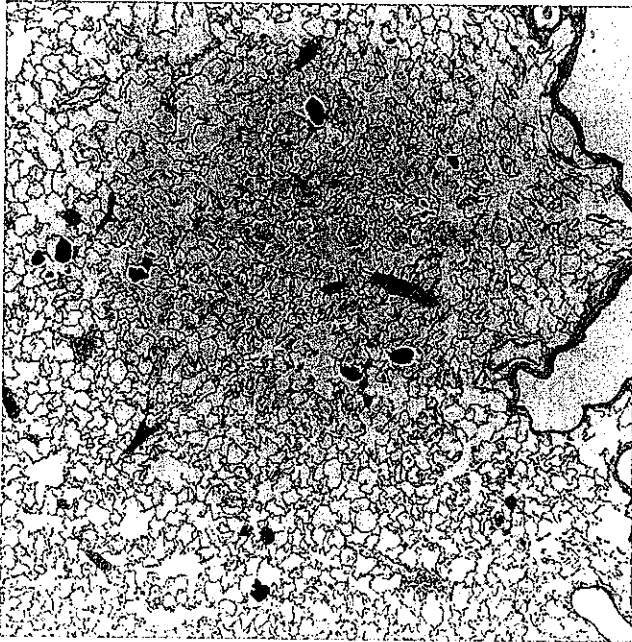


写真1  
DEP付着炭粉が散在しているラットの肺；DEP+NO<sub>2</sub>群，18ヵ月，H&E染色，  
対物レンズ倍率×4。

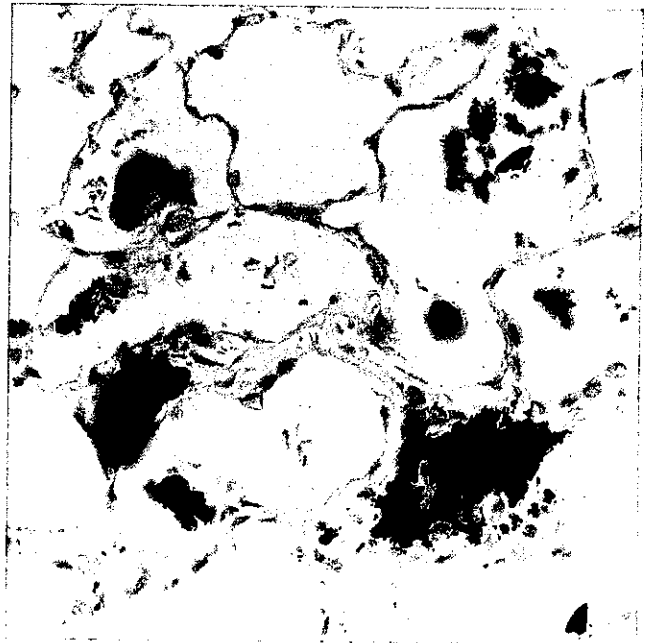


写真2  
肺胞壁間質に沈着するDEP付着炭粉と肺胞腔内へのマ  
クロファージ遊走；DEP+NO<sub>2</sub>群，18ヵ月，H&E染色，  
対物レンズ倍率×40。

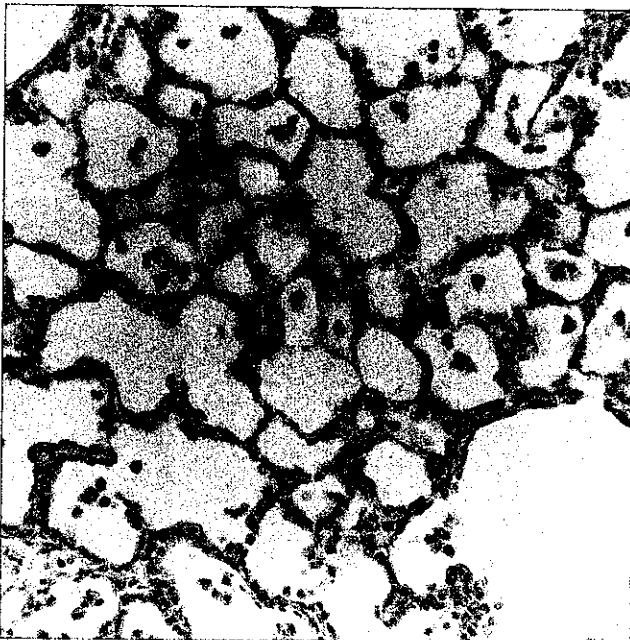


写真3  
肺胞II型上皮細胞の過形成；DEP+NO<sub>2</sub>群，18ヵ月，  
H&E染色，  
対物レンズ倍率×20。

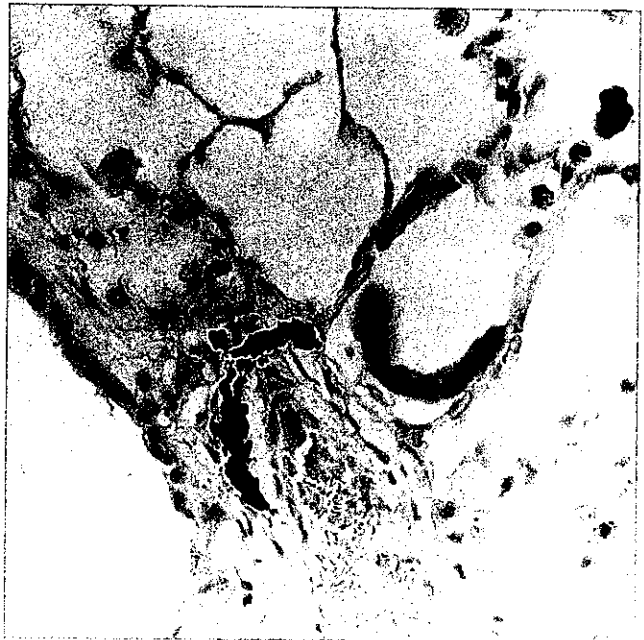


写真4  
細気管支線毛上皮細胞の異所性増殖；DEP+NO<sub>2</sub>群，  
18ヵ月，H&E染色，  
対物レンズ倍率×40。

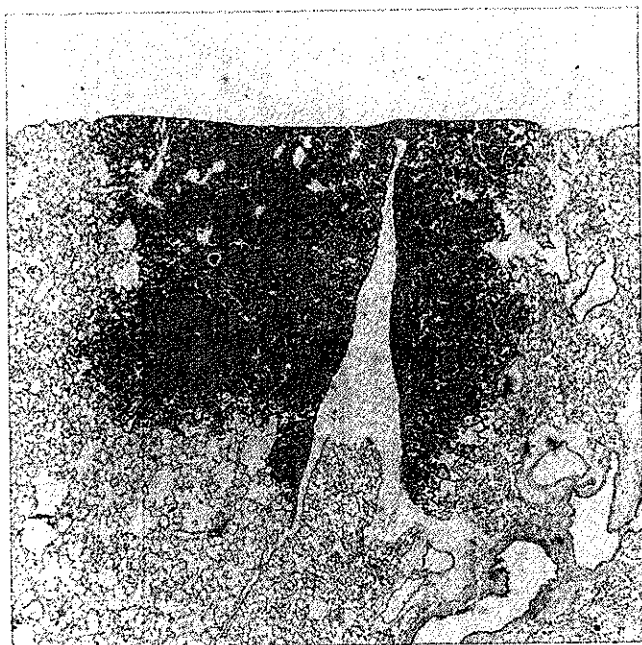


写真5  
腺腫；DEP+NO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>群，18ヵ月，H&E染色，  
対物レンズ倍率×2。

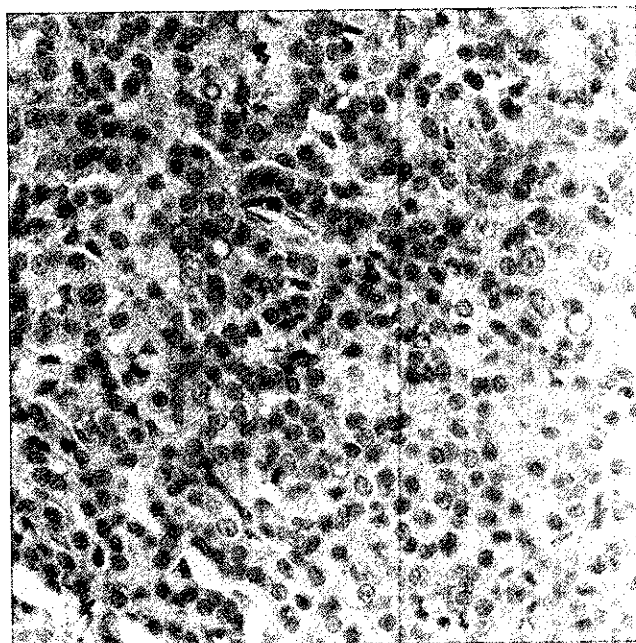


写真6  
腺腫の中心部；大型の核をもつ腫瘍細胞がみられた，18  
ヵ月，H&E染色，  
対物レンズ倍率×40。

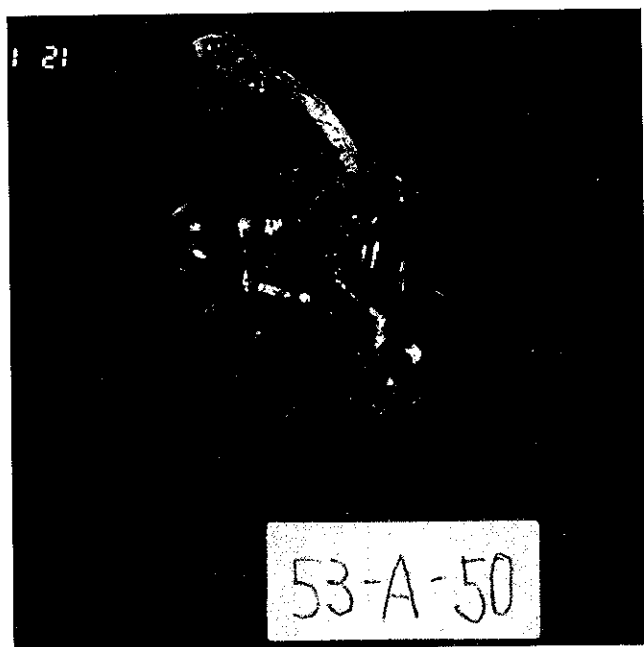


写真7  
腺腫部分；灰白色結節としてみとめられた，18ヵ月，  
H&E染色。

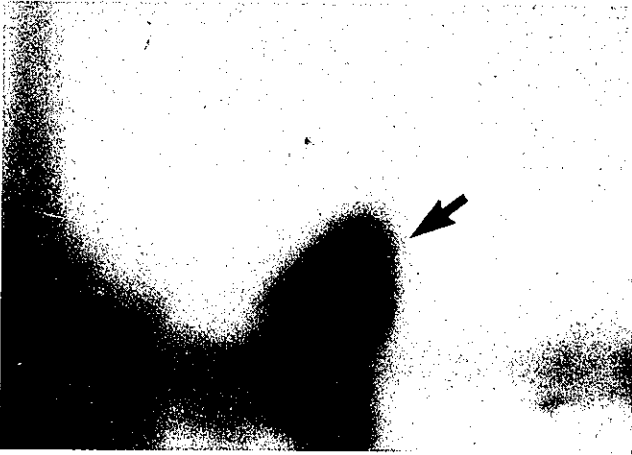


写真8  
DEP+NO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>群, 注入18ヵ月後のラット肺DNA<sup>32</sup>P-ポストラベル法による付加体のクロマトグラム. 1個のスポットが形成されている.

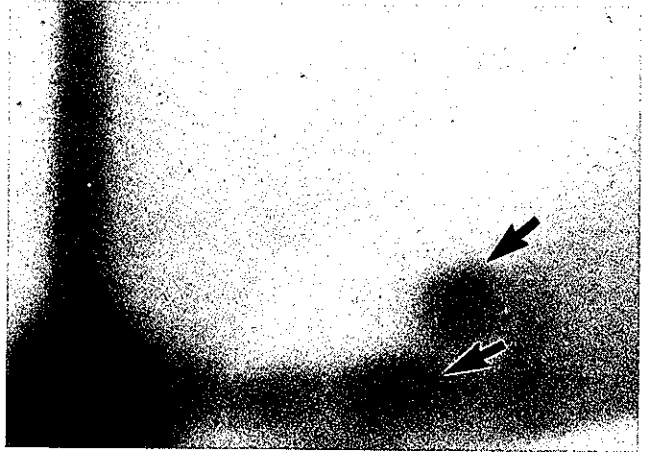


写真9  
DEP+NO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>群, 注入18ヵ月後のラット肺DNA<sup>32</sup>P-ポストラベル法による付加体のクロマトグラム. 2個のスポットが形成されている.



写真10  
DEP群, 注入18ヵ月後のラット肺DNA<sup>32</sup>P-ポストラベル法による付加体のクロマトグラム. 1個のスポットが形成されている.

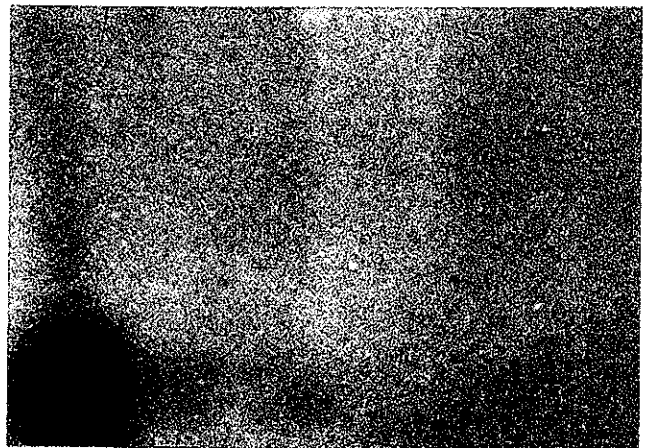


写真11  
無処置群; 18ヵ月後のラット肺DNA<sup>32</sup>P-ポストラベル法による付加体のクロマトグラム. スポットの形成は認められない.