

ディーゼル排出微粒子 (DEP) による肺腫瘍発生と NO₂暴露の影響について —DEP及び除タールDEP投与による8ヵ月暴露実験—

中村 満 草野 友子 泉川 碩雄
大山 謙一* 伊藤 隆明**

(*東京都立衛生研究所 **横浜市立大学医学部)

要 旨

ディーゼルエンジン排出粉じん (以下「DEP」と言う。) 9 mgをラット (F344/Jcl 5週齢雄) の気管内に直接注入し、実験8ヵ月後の肺を病理学的に観察するとともに、0.6ppm二酸化窒素 (NO₂) ガス暴露の肺への影響を検討した。

今回、腺腫が除タールDEP投与群に認められ、ディーゼル粒子による発癌性が示唆された。また、DEP投与群においても腺腫の前段階と思われる重度のII型肺胞上皮細胞の過形成が観察されており、今後は、DEPによる肺腫瘍の発生原因を究明する上で、タール成分とディーゼル粒子の両面で検討していく必要があると思われる。

NO₂ガス暴露の肺への影響は、暴露期間が短かかったにもかかわらず肺胞道壁の肥厚や肺胞炎において認められた。しかし、DEP投与群に肺腫瘍が発生しておらず、また³²P-ポストラベル法による発癌物質DNA付加体の観察や肺内分泌細胞増殖性病変の免疫組織化学的検討においてもガス暴露の影響はなく、肺腫瘍促進作用は認められなかった。

A Study on Lung Tumor in Rats Injected Intratracheally with Diesel Exhaust Particulates (DEP) and Exposed to Nitrogen Dioxide (NO₂)

Mitsuru Nakamura, Tomoko Kusano, Sekio Izumikawa

Ken'ichi Ohyama* and Takaaki Ito**

*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

**Yokohama City University School of Medicine

Summary

We investigated the effects of diesel exhaust particulates (DEP) and nitrogen dioxide (NO₂) on the lungs of rats (male SPF F344/Jcl 5 weeks old). Rats were injected intratracheally with DEP (total 9mg per rat) once a week for 6 weeks and exposed to 0.6ppm NO₂ for 8 months.

This time, since adenoma was observed in a rat injected with DEP without tar, it was suggested that there was carcinogenic substance in inorganic matters in DEP. Marked hyperplasia of type II alveolar epithelium which seemed close to adenoma, was also observed in a rat injected with DEP. Therefore in future, investigation need to be done regarding both tar and inorganic substance in DEP which seem to be the cause of lung tumor.

In spite of short exposure term, the effects of NO₂ were admitted through hyperplasia of alveolar duct's walls and alveolitis. But tumor didn't occur in rats injected with DEP. And the effects of NO₂ wasn't admitted from either observation of DNA adduct detected by a ³²P-postlabeling assay or examination of

pulmonary endocrine cell stained by HE and immunological method. That was why promoter of lung tumor wasn't recognized by the exposure of NO₂.

1 はじめに

筆者らは、大気汚染物質と肺腫瘍の関連性を明確にする目的で、ディーゼルエンジン排出粉じん（以下「DEP」と言う。）の肺への影響を検討してきた。これまでにDEP抽出物による実験を行い、実験開始18ヵ月後の肺について病理組織学的に観察を行ったところ、肺に腫瘍を発生させることがわかった¹⁾。また、DEPターール付着炭粉を注入したラットにおいて6 ppmNO₂や4 ppmSO₂ガス暴露が肺腫瘍を促進させることが示唆された²⁾。

今回は注入物質としてDEPそのものを使用して同様の実験を行い、実験開始8ヵ月後の肺における腫瘍発生形態について観察した。また、0.6ppmNO₂ガス暴露による肺腫瘍発生促進作用についても検討した。

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週間の検疫、経過観察後に実験に供した。これらのラットを表1に示すようにA~Dの4群に分けた。体重は実験期間中、毎月1回測定した。

表1 実験群

群	実験条件
A	DEP + NO ₂
B	DEP
C	除ターールDEP
D	Non treatment

(2) 注入物質

DEPは、1995年2月~1995年3月にかけて当研究所の自動車排出ガス実験棟のいすゞ6 HE1エンジン排気量7.12ℓ直列6気筒直噴式エンジンをエンジンダイナモメーター上で運転し、テフロンフィルターで採取した。その時の走行は、東京都実走行パターンNo.2、5、8を合成したもので行った³⁾。採取したDEPは、投与まで-

80℃で凍結保存した。

次に、上記DEP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。その残滓を電気炉（350℃一晚）で燃焼し、これを除ターールDEPとした。

表2 DEPのPAH量 (ng/mg)

Chemicals	
B (a) A	38.9
B (b) F	36.9
B (k) F	7.0
BaP	43.1
BghiP	32.3
1-NP	2.5
Phenanthrene	82.0
Anthrasene	10.1
Fluoranthene	286.0
Pyrene	475.0
Fluorenone	662.0
Anthraquinone	1449.0

更に、これらを7.5mg/mlになるように各々滅菌生理食塩液で懸濁し、注入物質とした。なお、DEPの多環芳香族炭化水素の分析値を表2に示した。また、*Salmonella typhimurium*を用いたAmes法による変異原活性を図1に示した。

(3) 注入及びガス暴露

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。気管内注入は、1週間に1回の割合で、連続して6週間行った。ラット1匹の総注入量は、DEP、除ターールDEPともに9mgであった。

暴露ガスは、0.6ppmNO₂とし、第1回目の注入後直ちに暴露を開始し、1日24時間で8ヵ月連続して行った。暴露装置は既報⁴⁾と同様のガス暴露チャンバーを使用した。

(4) 採材方法

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

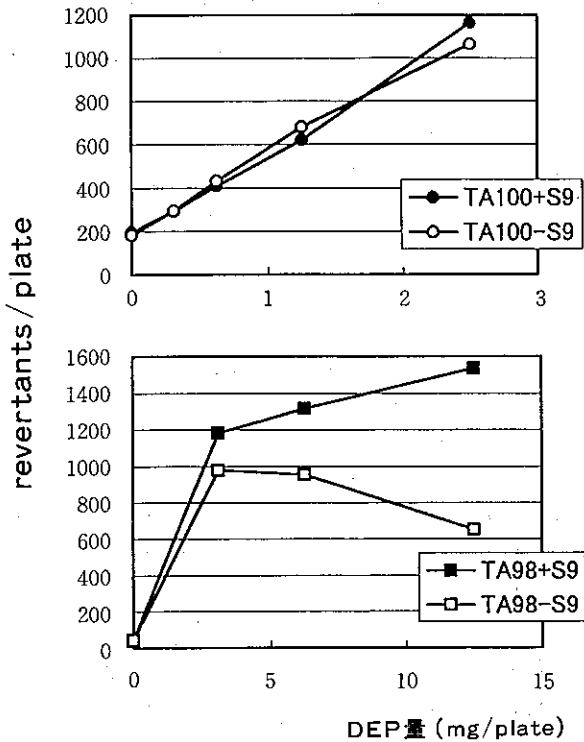


図1 DEPの変異原活性

材した。

(5) 病理組織学的検討

ラットの肺をはじめ、各主要臓器を肉眼的に観察した後、10%緩衝ホルマリン液で固定した。肺組織のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色をして観察した。

(6) 発癌物質DNA付加体の観察

各群2匹ずつラットの肺を既報⁵⁾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。

(7) 肺内分泌細胞増殖性病変の免疫組織化学的検討

既報⁶⁾の通り行った。

3 結 果

(1) 各群のラットの体重を図2に示した。実験開始5ヵ月後においてガス暴露群(A群)のラットの体重が、DEP投与群(B群)と無処置群(D群)に比べて有意に(危険率0.1%以下)少なかった。また、実験開始4ヵ月目以降、A群の体重は他の群に比べて少ない傾向がみられた。

(2) 病理組織学的検討(表3)

ア 肉眼的には、除タールDEPを投与したC群は、DEPを投与したA、B群に比べて肺全体が黒色を呈しており、炭粉の沈着が顕著だった。また組織学的にみると、C群はA、B群よりも肺胸腔における炭粉貪食肺胞マクロファージの遊走の程度が強く、肺胞間質における炭粉沈着も比較的多く見られた(写真1、2)。

イ 肺炎は、除タールDEPを投与したC群に86%と高率に観察された。また、NO₂を暴露したA群でも半数近くに認められた(写真3)。

ウ NO₂を暴露したA群に肺胞道壁の肥厚が全例に見られた。また、1例だけであるが肺胞における無線毛

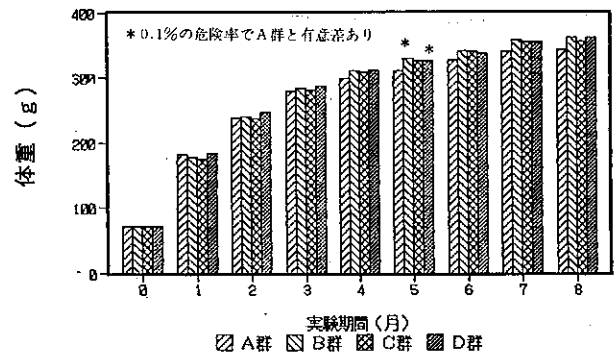


図2 ラット体重の経時的変化

表3 実験開始8ヵ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 軽度 重度	肺胞間質における炭粉沈着	肺炎	肺胞道壁の肥厚	線毛上皮細胞の異所性増殖	肺胞における無線毛立方上皮細胞の増生	肺胞道における無線毛細胞の乳頭状増殖	炭粉貪食マクロファージ遊走部位におけるII型肺胞上皮細胞の増殖	II型肺胞上皮細胞の過形成 軽度 重度	腺腫
A	20	17 (85) 3 (15)	20 (100)	8 (40)	20 (100)	4 (20)	1 (5)	3 (15)	3 (15)	1 (5) 0 (0)	0 (0)
B	21	17 (81) 4 (19)	21 (100)	1 (5)	0 (0)	7 (33)	0 (0)	4 (19)	1 (5)	1 (5) 1 (5)	0 (0)
C	21	0 (0) 21 (100)	21 (100)	18 (86)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	2 (10)	17 (81)	0 (0)	1 (5)
D	5	0 (0) 0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

立方上皮細胞の増生が認められた(写真4)。

エ 線毛上皮細胞の異所性増殖の発生率を見ると、DEPを投与した群では、A群で20%、B群で33%と比較的高かったが、DEPを投与していないC群では5%と低かった(写真5)。

オ 肺胞道における無線毛細胞の乳頭状増殖が、A、B及びC群において各群2~4例認められた(写真6)。

カ II型肺胞上皮細胞の過形成がA群で1例(軽度)、B群で2例(軽度1、重度1)見られた。また、腺腫がC群で1例見られた(写真7、8、9)。

キ 除タールDEPを投与したC群で炭粉貪食肺胞マクロファージ遊走部位におけるII型肺胞上皮細胞の増殖が81%とかなり高率に認められた(写真10)。

(3) 発癌物質DNA付加体の観察

A、B及びC群において1~2個のスポットが認められたが、D群からは認められなかった。また、ガス暴露の有無はプロフィールの差として現れなかった(写真11、12、13、14)。

(4) 肺内分泌細胞増殖性病変の免疫組織化学的検討

全群にpulmonary endocrine cell hyperplasia (PECH)が5~9個、またpulmonary endocrine cell papilloma (PECP)がA群に1個、C群に2個認められた。しかし、ガス暴露の有無は発生頻度の差として現れなかった(写真15、16)。

4 考 察

線毛上皮細胞の異所性増殖をみると、DEP投与群(A、B群)に比較的高率に認められているのに対し、除タールDEP群(C群)ではほとんど観察されなかった。このことから、線毛上皮細胞の異所性増殖にはDEPタールが大きく関与しているものと考えられる。また、C群においても1例認められたが、おそらくDEPのタール成分が完全に除去しきれなかったことが原因と思われる。

次にC群とB群についてみると、C群において、炭粉貪食肺胞マクロファージの遊走の程度が強く、また、肺胞炎が高率に発生していた。これは、肺胞マクロファージの影響によるものと思われる。大山らによるとDEPタール付着炭粉と炭粉とでは肺腫瘍の発生機序が異なり、DEPタール付着炭粉ではタール成分が、また炭粉では肺胞マクロファージが大きく関与していると考察してい

る。C群に炭粉貪食肺胞マクロファージ遊走部位におけるII型肺胞上皮細胞の増殖がかなり高率に認められたことはこのことを裏付けているものと思われる。

肺腫瘍である腺腫が、今回、C群に認められており、また最近の報告では、DEPによる肺腫瘍の発生原因としてディーゼル粒子の役割が注目されている^{7,8)}ことから、ディーゼル粒子による肺の発癌性が示唆された。また、B群においても腺腫の前段階と思われる重度のII型肺胞上皮細胞の過形成が観察されており、今後は、DEPによる肺腫瘍の発生原因を究明する上で、タール成分とディーゼル粒子の両面で検討していく必要があると思われる。

今回、大気汚染ガスとしてNO₂が依然として重要であるので、環境に近い濃度を考慮して0.6ppm(環境基準値の10倍)の暴露を行った。A群の病変を見ると、全例に肺胞道壁の肥厚がみられ、また肺胞炎でもB群に比べて発生率が高いことから、NO₂暴露の肺への影響が認められた。しかし、今回の実験ではDEPを投与したA、B群に肺腫瘍が発生しておらず、また発癌物質DNA付加体の観察や肺内分泌細胞増殖性病変の免疫組織化学的検討からもガス暴露の影響がみられなかったことから、8ヵ月後の時点では0.6ppmNO₂に肺腫瘍発生促進作用は認められなかった。今後、長期の観察を行っていく必要があると思われる。

5 おわりに

今回の実験では、腺腫が除タールDEP投与群で認められており、DEPによる肺腫瘍の発生原因を究明するためには、DEPタールとともにディーゼル粒子についても検討していく必要があると思われる。また、NO₂ガス暴露の肺への影響は、暴露期間が短かったにもかかわらず認められたが、肺腫瘍発生促進作用については認められなかった。NO₂ガス暴露の影響についてはさらに長期の観察期間を設けた実験を行う必要があると思われる。

最後に、DEP採取にご協力頂いた当研究所の自動車チームに深謝します。

引用文献

- 1) 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1報)，第35回大気汚染学会講演要旨集，

- p.555 (1994) .
- 2) 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），第35回大気汚染学会講演要旨集，p.556 (1994) .
 - 3) 東京都公害研究所：自動車排出ガスに関する調査研究（I）（昭和52年3月）；
 - 4) 大山謙一：大気浮遊粉塵抽出物の気管内注入及び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) .
 - 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) 草野友子ら：ディーゼル排出微粒子（DEP）による肺腫瘍発生とNO₂、SO₂暴露の影響について，東京都環境科学研究所年報1996，p.184~191.
 - 7) Herbert S. Rosenkranz *et al.* : Revisiting the role of mutagenesis in the induction of lung cancers in rats by diesel emissions, 303, p. 91~95 (1993) .
 - 8) K.J. Nikula *et al.* : Comparative Pulmonary Toxicities and Carcinogenicities of Chronically Inhaled Diesel Exhaust and Carbon Black in F334 Rats, 25, p.80~94, 1995.

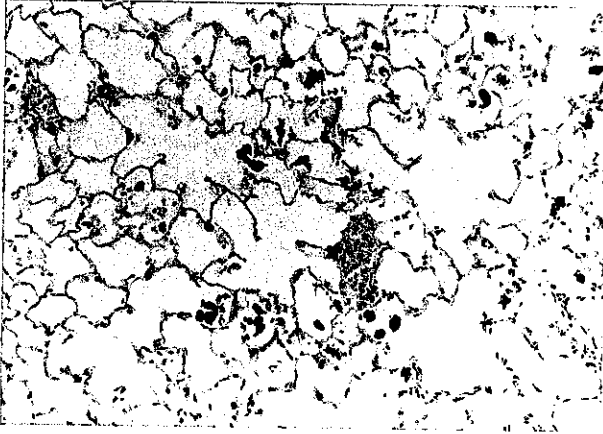


写真1
DEPを貪食している肺胞マクロファージとわずかに
間質への沈着がみられる。
DEP群、HE染色、×200

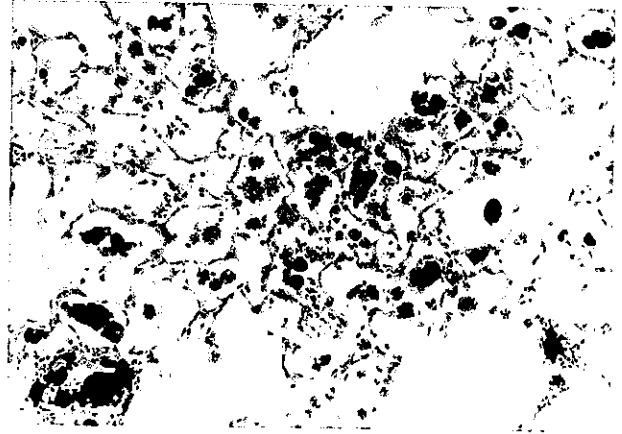


写真2
写真1に比べ、肺胞マクロファージの遊走も間質への
沈着の程度も著しい。
除タールDEP群、HE染色、×200

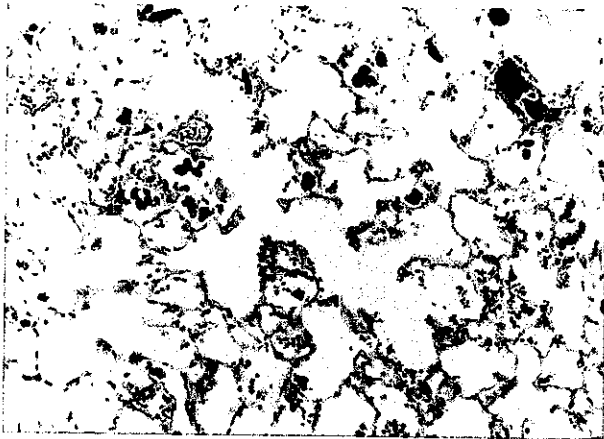


写真3
肺胞炎。肺胞マクロファージ、好中球の浸潤がみられ
る。
除タールDEP群、HE染色、×200

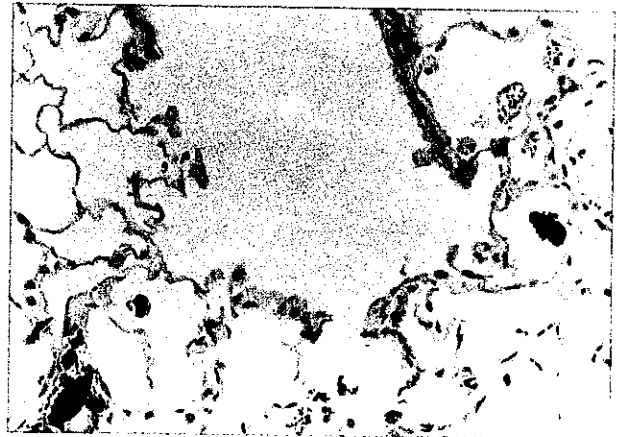


写真4
肺胞道壁の肥厚
DEP+NO₂群、HE染色、×400

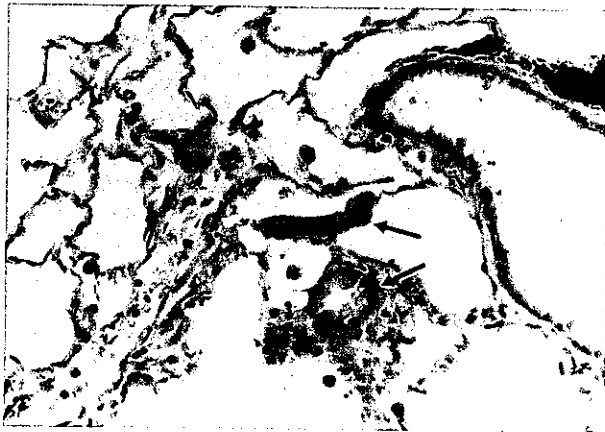


写真5
線毛上皮細胞の異所性増殖 (→ 2カ所)
DEP群、HE染色、×400

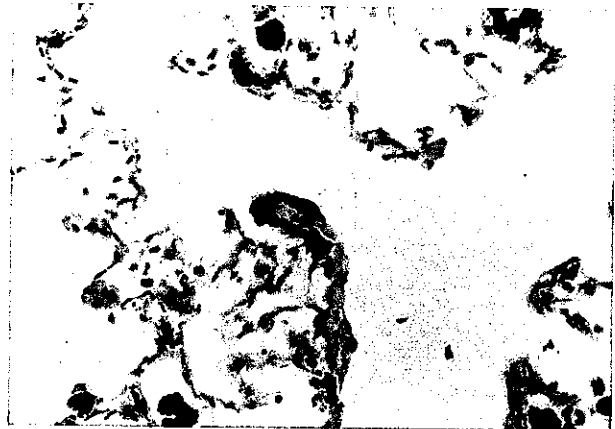


写真6
肺胞道における無線毛細胞の乳頭状増殖
DEP群、HE染色、×400



写真7
II型肺胞上皮細胞の過形成（軽度）
DEP+NO₂群、HE染色、×100

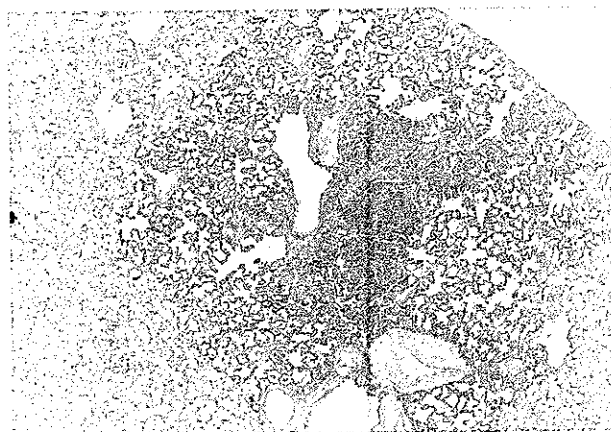


写真8
II型肺胞上皮細胞の過形成（重度）
腺腫の前段階と思われる。
DEP群、HE染色、×40

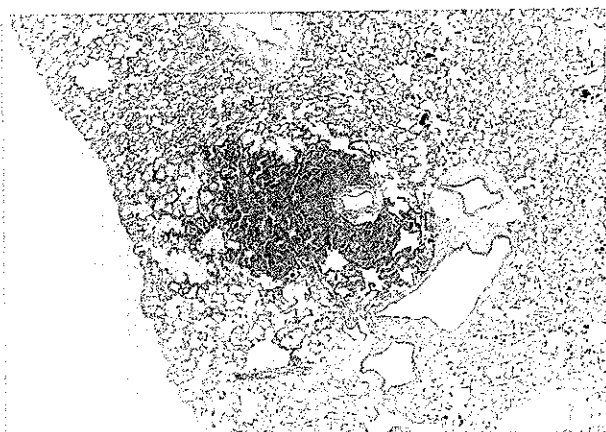


写真9
腺腫。周囲の正常組織との境界が明瞭で、既存の肺胞構造が失われている。
除タールDEP群、HE染色、×40

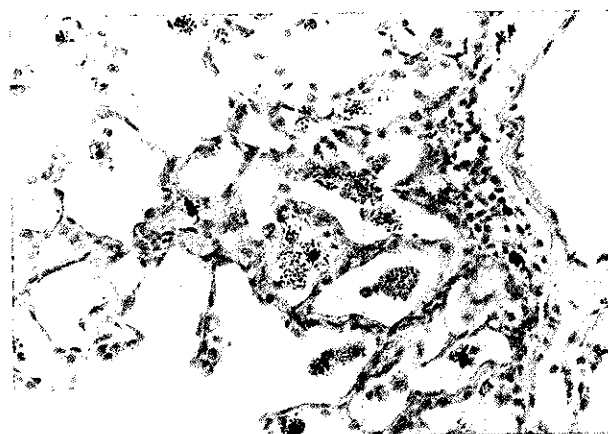


写真10
炭粉貪食肺胞マクロファージの遊走部位にII型肺胞上皮細胞の増殖がみられる。
除タールDEP群、HE染色、×400

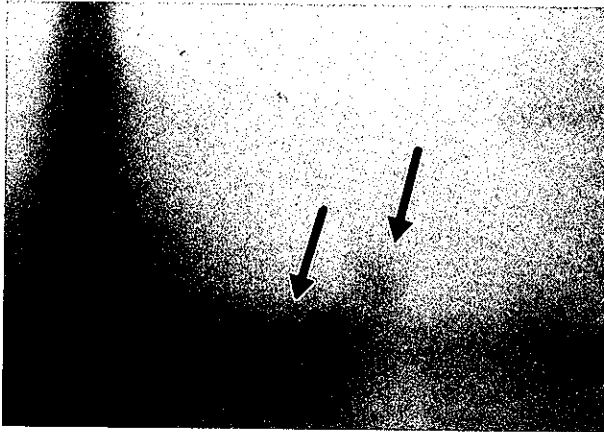


写真11
³²P-ポストラベル法によるDNA付加体のクロマトグラム。2個のスポット(→)が形成されている。DEP+NO₂群

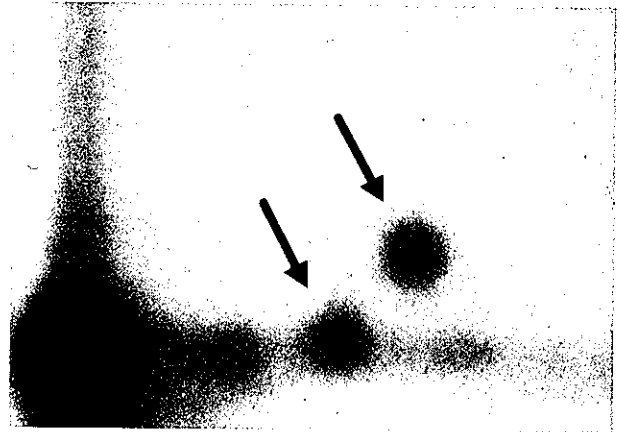


写真12
³²P-ポストラベル法によるDNA付加体のクロマトグラム。写真11と同様に2個のスポット(→)が形成されている。DEP群

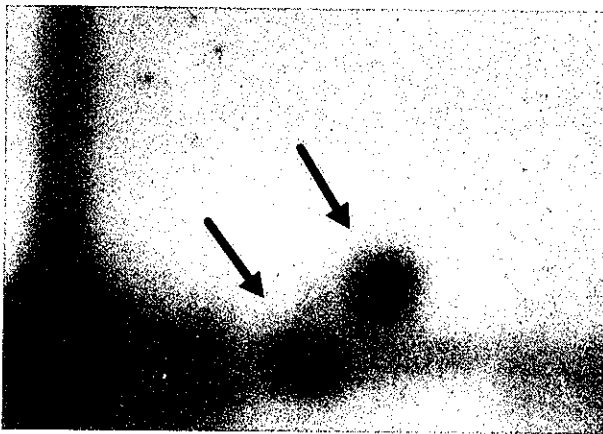


写真13
³²P-ポストラベル法によるDNA付加体のクロマトグラム。写真11と同様に2個のスポット(→)が形成されている。除タールDEP群

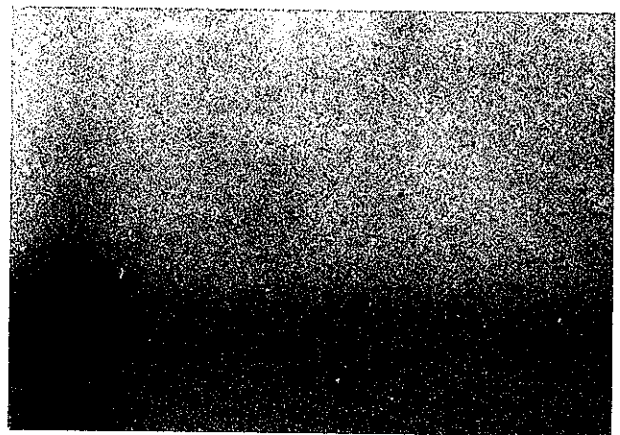


写真14
³²P-ポストラベル法によるDNA付加体のクロマトグラム。スポットの形成はない。無処置群



写真15
 細気管支末梢のCGRP陽性乳頭腫
 CGRP免疫染色、×450

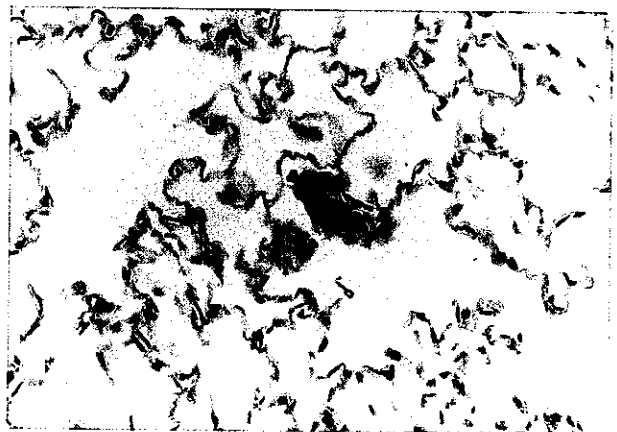


写真16
 肺胞道のCGRP陽性細胞増殖巣
 CGRP免疫染色、×450