

R-31-'81

大気汚染物質の単一および複合汚染の生体
に対する影響に関する実験的研究

——昭和55年度 特別研究報告——

Studies on the biological effects of
single and combined exposure of
air pollutants
Research report in 1980

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立公害研究所

序

現在、都市部における大気汚染物質として窒素酸化物、一酸化炭素、オゾン、エアロゾル等が注目されており、都市化、工業化の傾向とともに大気の汚染も広域化する傾向にある。したがって大気汚染物質の生体影響を解明することは、生活環境基準の設定の基礎として環境行政上も重要な側面を占めており、予防医学の基礎を確立するためにも必要である。

しかるに、大気汚染物質の生体影響は、これまで多くの研究が行われていたにもかかわらず、総合的、系統的なとり組みが不十分であったためにいまだ十分に解明されていない。

そこで本研究においては、動物実験棟（ズートロン）内の高性能暴露チャンバーを使用し、生理学的、病理学的、生化学的、免疫学的検索に新たな手法を開発しつつ研究を行って来た。

これまでに大気汚染物質中、とくに重要と考えられる窒素酸化物についてのラットの生涯期間（27か月）にわたる低濃度長期暴露実験を行い、得られた知見は“大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響の実験的研究”として国立公害研究所研究報告第15号に発表した。これは問題の重要性にかんがみ、とりあえず得られた研究成果を公表したものである。しかしその過程で見いだされた所見は必ずしも学問的に満足な説明ができるには到っていない。そこで低濃度長期暴露実験の結果を解析して現れた幾多の疑問箇所について追試を試みるとともに、新たに開発した手法を用いて結果の科学的根拠を明らかにすることを試みた。なお、本報告には窒素酸化物だけではなく、オゾンについて行った研究成果も含んでいる。

生物に対する大気汚染の影響の解明は環境行政の上からも予防医学上、治療方法の確立のためにも極めて重要で、そのための研究が急がれていることはよく承知している。ここに報告するものは期待する研究の極く一部にしかすぎない。しかしながら、正確な科学的知見を一步一步積み重ねて現象の本質に迫ることをわれわれは目標としている。

所期の目的を達成するためにはまだ多くの研究を必要とし、長い期間が必要なものと覚悟している。本研究に対して多くの方々に興味をひき、さらに研究の遂行上有益なる御支援を賜わることができれば甚だ光栄と存ずる次第である。

昭和56年7月15日

国立公害研究所

所長 近藤次郎

目 次

研究の概要および今後の展望	1
久保田憲太郎 (プロジェクトリーダー)	
1. 二酸化窒素急性暴露のマウスの肺機能に及ぼす影響	11
鈴木 明・市瀬孝道・局 博一	
2. ラットの呼気・吸気分離装置について — 装置の機能とその応用	21
清水 明・局 博一・鈴木 明	
3. 二酸化窒素吸入時のイヌの呼吸気道内二酸化窒素濃度の変化	31
鈴木 明・市瀬孝道・局 博一	
4. 一酸化窒素および二酸化窒素の生体内挙動	45
織田 肇・永澤節子・局 博一・鈴木 明	
5. 二酸化窒素の急性暴露によるラットの心電図異常	59
局 博一・鈴木 明・永澤節子・織田 肇	
6. 二酸化窒素急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化	67
嵯峨井 勝・市瀬孝道	
7. 二酸化窒素亜急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化	81
市瀬孝道・嵯峨井 勝	
8. 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響 — 脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構 の変化	95
嵯峨井 勝・市瀬孝道	
9. 二酸化窒素亜急性暴露のラット肺SH化合物に及ぼす影響	109
河田明治	
10. 二酸化窒素と肺の表面を構成する物質との反応 — コレステロールとの反応	117
小林隆弘	
11. 二酸化窒素と不飽和脂肪酸の反応生成物のラット肺リン脂質脂肪酸組成に及ぼす影 響	125
小林隆弘	
12. 二酸化窒素と不飽和脂肪酸の反応生成物の肺プロスタサイクリン合成に及ぼす影響	133
小林隆弘	
13. 二酸化窒素急性暴露の肺プロスタサイクリン合成に及ぼす影響	141
小林隆弘・森田育男・室田誠逸	

14. 二酸化窒素暴露ラットの臓器内膜成分に及ぼす影響	147
三浦 卓・持立克身・彼谷邦光・国本 学	
15. 二酸化窒素の肺の解糖系および呼吸系に及ぼす影響	163
持立克身・三浦 卓・彼谷邦光	
16. 二酸化窒素またはオゾンの赤血球解糖系に及ぼす影響	169
持立克身・三浦 卓・彼谷邦光・国本 学	
17. 二酸化窒素のラット肝臓・血清および赤血球膜の脂肪酸組成に及ぼす影響	175
彼谷邦光・三浦 卓	
18. 二酸化窒素またはオゾンの間歇暴露による赤血球膜成分の変動	187
彼谷邦光・国本 学・三浦 卓・持立克身	
19. 二酸化窒素亜急性暴露のリンパ球に及ぼす影響 — <i>In vitro</i> 系での検索	195
藤巻秀和	

Contents:

Preface: J. KONDO 1

Outline of Performed Researches and Future Prospects 1

K. KUBOTA (Project Leader)

 1. Effect of Acute Nitrogen Dioxide Exposure on Pulmonary Function of Mouse 11
 A.K. SUZUKI, T. ICHINOSE, and H. TSUBONE

 2. An Apparatus for Isolation of Inspiratory and Expiratory Gases of Rats
 — Function of Apparatus, and Application — 21
 A. SHIMIZU, H. TSUBONE and A.K. SUZUKI

 3. Alterations of Nitrogen Dioxide Concentration in Respiratory Tract of
 Nitrogen Dioxide Inhaling Dogs 31
 A.K. SUZUKI, T. ICHINOSE and H. TSUBONE

 4. Fate of Inhaled Nitric Oxide and Nitrogen Dioxide 45
 H. ODA, S. NAGASAWA, H. TSUBONE and A.K. SUZUKI

 5. Electrocardiographic Abnormalities in Rats by Acute Exposure to
 Nitrogen Dioxide 59
 H. TSUBONE, A.K. SUZUKI, S. NAGASAWA and H. ODA

 6. Changes of Lipid Peroxidation and Antioxidative Protective Systems
 in Lungs of Rats Exposed Acutely to 10 ppm Nitrogen Dioxide 67
 M. SAGAI and T. ICHINOSE

 7. Changes of Lipid Peroxidation and Antioxidative Protective Systems
 in Lungs of Rats Subacutely Exposed to Low Level Nitrogen Dioxide 81
 T. ICHINOSE and M. SAGAI

 8. Effects of Long-Term Exposure of Nitrogen Dioxide on Rats
 — Changes of Lipid Peroxidation and Antioxidative Protective Systems in Lungs 95
 M. SAGAI and T. ICHINOSE

 9. Effects of Subacute Nitrogen Dioxide Exposure on Lung Sulfhydryl
 Groups of Rats 109
 M. KAWATA

 10. The Reaction of Nitrogen Dioxide with Lung Surface Components
 — The Reaction with Cholesterol 117
 T. KOBAYASHI

11.	Effect of Reaction Products of Nitrogen Dioxide with Unsaturated Fatty Acid on the Composition of Fatty Acid in the Lung Phospholipid	125
	T. KOBAYASHI	
12.	Effect of Reaction Products of Nitrogen Dioxide with Unsaturated Fatty Acid on the Prostacyclin Synthesis of Lungs	133
	T. KOBAYASHI	
13.	Effect of Acute Nitrogen Dioxide Exposure on the Prostacyclin Synthesis in Lungs	141
	T. KOBAYASHI, I. MORITA and S. MUROTA	
14.	Effects of Nitrogen Dioxide Exposure on Membrane Constituents of Rat Tissues	147
	T. MIURA, K. MOCHITATE, K. KAYA and M. KUNIMOTO	
15.	Effects of Nitrogen Dioxide on Activities of Glycolytic and Respiratory Enzymes in Rat Lungs	163
	K. MOCHITATE, T. MIURA and K. KAYA	
16.	Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on Activities of Glycolytic Enzymes of Rat Red Blood Cells	169
	K. MOCHITATE, T. MIURA, K. KAYA and M. KUNIMOTO	
17.	Effects of Nitrogen Dioxide on Fatty Acid Compositions of Red Cell Membranes, Sera and Livers of Rats	175
	K. KAYA and T. MIURA	
18.	Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on the Components of Red Cell Membranes of Rats	187
	K. KAYA, M. KUNIMOTO, T. MIURA and K. MOCHITATE	
19.	Effect of Subacute Exposure to Nitrogen Dioxide on Lymphocytes Required for Antibody Response — <i>In vitro</i> Study	195
	H. FUJIMAKI	

研究の概要および今後の展望

Outline of Performed Researches and Future Prospects

久保田憲太郎¹

Kentaro KUBOTA

昨年10月に“大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和54年度特別研究報告”を本シリーズ、第15号として発刊した。

今回は、第15号に報告した慢性影響暴露実験の成績を解析し、得られた問題点を中心に、主として従来の研究システムを踏襲し、専門領域別に行った二酸化窒素(NO_2)に対するより詳細な研究成果とオゾンについて行った研究成果の一部を19編の論文に一括したものが本報告書である。

まず生理学的アプローチとしては、頭部閉鎖法により NO_2 暴露マウスの肺の換気力学的指標の変化に関する基礎的研究を行い、5 ppm以下の比較的低濃度領域では、生体内の O_2 、 CO_2 のガス代謝が亢進するが、10 ppm以上の高濃度群では肺でのガス交換機能の抑制およびガス代謝の変化がみられた〔1〕*。また小動物用の呼気・吸気分離装置を考案し、 NO_2 暴露動物の分離呼気について解析中であり、 NO_2 暴露の代謝に関する生理学的意義が明らかにされるであろう〔2〕。一方イヌに NO_2 を吸入させたときの呼吸気道内の濃度変化を検討した結果、 NO_2 濃度は呼吸気道の奥にゆくにしたがって低下していた。また鼻腔および口腔経由の吸入では、吸入された NO_2 濃度は、口腔だけを經由した場合に比較して2～3倍の高い値を示した〔3〕。

血液生理学的機能に関しては、 NO および NO_2 の生体内挙動を明らかにするため、昨年マウスでの実験につづいて、ラットを用いて、血中、尿中の NO_2^- 、 NO_3^- を定量すると共に N_2O 、 N_2O_3 による実験的シミュレーションを行い、各種の薬動力学的パラメーターの推定を試み、 NO_2 の生体内動態に関するシエマを提案した〔4〕。また、これと平行して行った N_2O 、 N_2O_3 の注入実験では、心電図に変化はなく、 NO_2 暴露ラットで観察された心電図異常は、むしろ副交感神経活動の変化に原因があると推測される結果を得た〔5〕。

1. プロジェクトリーダー、国立公害研究所 環境生理部長 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
Project Leader, The National Institute for Environmental Studies, Director, Basic Medical Sciences
Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

* 〔 〕内は論文番号

生化学的研究としては、比較的低濃度の NO₂ ガス暴露による急性、亜急性実験を行い、*in vivo* の脂質過酸化を反映すると考えられる呼気中エタン生成と過酸化物生成抑制酵素、抗酸化物質等の経時的変動と量-効果関係を明らかにした〔6,7〕。一方前年度の長期慢性暴露実験の補遺として、呼気中エタンの測定による脂質過酸化は9,18か月目では明瞭な量-効果関係を示し、0.04, 0.4 および 4.0 ppm のすべての群で有意に増加し、27か月ラットでは0.04, 0.4 ppm では有意に増加したが、4.0 ppm では逆に低下を示した。この4.0 ppm 27か月目でのエタン生成の低下は回復を示すものでなくむしろ肺の障害の質的变化を示唆しているものと考えられる。一方肺の抗酸化性防御機能についてみると、4.0 ppm NO₂ の9か月暴露ではグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD)、グルタチオンレダクターゼ (GR)、非タンパク性 SH (NPSH) が対照群より高い値を示したが、18か月目では、対照レベルに戻っていた。これに対し、脂質過酸化物代謝に直接関与するグルタチオン・パーオキシダーゼ (GPx) とグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GSH S-transferase) 活性は9か月目では対照群と変わりなかったが、18か月目ではそれより低下する傾向を示していた。これらのことから全般的にみて、肺の抗酸化性防御機能は NO₂ 暴露の長期化に伴って、対照レベルに近づくか、あるいはそれ以下に低下し、逆に脂質過酸化は NO₂ 暴露の長期化につれて増加する傾向にあることが認められた〔8〕。また肺の SH 化合物について、低濃度領域の亜急性実験が行われ、GSH, NPSH 含量は4.0 ppm 群のみが有意な上昇を示した〔9〕。

つぎに視点をかえて、NO₂ と肺細胞膜を構成する脂質の一つであるコレステロールとの反応を検討した。コレステロールの3位の OH 基と NO₂ とが反応したコレステリルナイトライト等の生成を確認した〔10〕。つぎに肺胞の表面を構成する脂質の一つであるオレイン酸と NO₂ との反応生成物をラットに静脈注射し、肺のリン脂質の脂肪酸組成に与える影響を検討した結果、パルミチン酸が有意に増加した。ここで得られた脂肪酸の組成変化は NO₂ 急性暴露による変化と同様の傾向を示した〔11〕。

前の論文をうけて、NO₂ とオレイン酸の反応生成物が肺のホモジネイトのプロスタサイクリン合成に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。反応生成物はプロスタサイクリン合成を低下させることが判明した。その原因は反応生成物中に存在する脂質過酸化物と考えられた〔12〕。つぎに NO₂ 急性暴露ラットの肺のプロスタサイクリン合成能について検討した。肺のホモジネイトを用いた実験では、NO₂ 濃度の上昇とともに合成能は低下し、Intact な肺組織を用いた血小板凝集抑制反応からも同様の結果が得られた〔13〕。プロスタサイクリン (PGI₂) はアラキドン酸を前駆体として合成されるプロスタグランジン類の一つであり、血小板凝集抑制、血管拡張、平滑筋弛緩等生体内の調節機構に重要な役割を果たすものである。

NO₂ の生体影響については、呼吸器系を中心として多くの研究が行われているが、肺以外にも肝臓、腎臓をとりあげ、生体にとって重要な数多くの機能を担っている生体膜系であるミトコンド

リア、ミクロソームおよび細胞膜の成分が NO₂ によって受ける影響を検索した。その結果、NO₂ 暴露ラットでは、肝臓および腎臓の呼吸系活性、ミクロソーム電子伝達系成分の活性と含量の低下が、暴露後 1 日目にみとめられ、7 日目には対照群のレベルにまで回復することが判明し、腎臓の場合、肝臓よりも速かに回復することが認められた。肺の場合、前二者と異なり、呼吸系活性の顕著な亢進とミクロソーム電子伝達系成分の活性低下の遅延が認められた〔14〕。

NO₂ 暴露ラットの肺ホモジネイトを用いて解糖系および呼吸系酵素活性の変化を追及したところ、これら各種酵素の活性上昇が観察され、NO₂ 暴露濃度にはほぼ比例して上昇することが判明した。特にピルビン酸キナーゼの活性増加が顕著であることが判明した〔15〕。

一方、4.0 ppm NO₂ 又は 0.8 ppm オゾンの 1 日 8 時間の間欠暴露を行ったラットでは、赤血球のピルビン酸キナーゼの活性増加が顕著であり、赤血球のエネルギー代謝が亢進されることが判明した〔16〕。

次に脂肪酸代謝に及ぼす影響に関する研究では、4.0 ppm または 10 ppm NO₂ に暴露したラットの赤血球膜、血清および肝臓上清画分中の脂肪酸組成の変化を調べた。その結果、両濃度群とも、赤血球膜のアラキドン酸の増加が認められ、血清のホスファチジルコリン(PC)においてもアラキドン酸の増加が認められた。この結果は、血清のアラキドン酸が赤血球膜に取りこまれたことを示すものと考えられる。4.0 ppm NO₂ 暴露では血清 PC のアラキドン酸が増加するのに対し、リノール酸は減少した。肝臓上清画分の脂肪酸組成の変化は 4.0 ppm の場合は血清 PC と同様であったが、10 ppm の場合には血清 PC とことなり、より複雑な変化が認められた〔17〕。

さらに、NO₂ 又はオゾン暴露の細胞膜に及ぼす影響を検討するために、0.8 ppm オゾン、または、4.0 ppm NO₂、1 日 8 時間の間欠暴露の実験を行い、ラット赤血球膜のリン脂質、シアル酸の含量の変化を追及した。その結果、NO₂、オゾン共に 7 日間の暴露では PC とシアル酸含量の著明な減少が認められた。赤血球膜の外側に存在する成分であるシアル酸および PC が低濃度のオゾン暴露によって顕著に減少することから、オゾンは主として赤血球膜の外側に障害を与えるものと考えられた〔18〕。

以上の観点と異なる研究として、生体防御反応に対する NO₂ の免疫学的影響が検討された。すなわち、マウスの抗体産生能に及ぼす NO₂ の亜急性暴露の影響を *in vitro* の系を用いて検索した。0.4、および 1.6 ppm NO₂ を 4 週間暴露し、ヒツジ血球に対する溶血斑形成細胞(PFC)数を算定した結果、一次反応は両濃度群とも抗体産生能を抑制した。一方、二次反応は、0.4 ppm 群では対照群と変わらないが、1.6 ppm では逆に抗体産生能の亢進が認められた。また抗体産生機構に関与する細胞群の組み合わせ実験を行い、細胞レベルでの影響を検討したが、T 細胞群、B 細胞群とも NO₂ 暴露による影響に明らかな違いは認められなかった〔19〕。

現在これらの基礎的な研究をさらに発展させながら、動物実験棟内に設置された慢性暴露チャン

バーを用いて、第2回慢性暴露実験として、0.04ppm、0.12ppm および0.4ppm NO₂の18か月間暴露の実験が進行中である。長期暴露実験に関しては、供試動物の老化による生理性状の変化が重要な問題である。この加齢に伴う生理性状の変化を考慮した上で、再現性を確認しつつ、見出された影響が暴露中止によって回復しうるものかどうか、また得られた影響はどのような生理的意義を持つものか、さらに人間集団の感受性の違いを、動物実験の成績からどのように評価すべきなど、健康影響の評価にとって重要な課題の解決に向かって研究を進めて行く予定である。

誌 上 発 表

1. 久保田憲太郎(1980):研究の概要および今後の展望. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 1-5
2. 局 博一・鈴木 明・市瀬孝道・織田 肇(1980):二酸化窒素暴露ラットにみられる心拍変動の要因について. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 7-18.
3. 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・織田 肇(1980):二酸化窒素暴露がラット動脈血 pHa, PaCO₂, および PaCO₂ に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 19-32.
4. 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇(1980):マウスの遊泳持続時間に及ぼす二酸化窒素の影響. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 33-42.
5. 織田 肇・局 博一・鈴木 明・市瀬孝道(1980):二酸化窒素を暴露したマウスの血液中亜硝酸・硝酸イオン量の変動. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 43-54.
6. 藤巻秀和・清水不二雄(1980):液性一次抗体産生に関与する細胞群に及ぼす二酸化窒素の影響. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 55-60.
7. 市瀬孝道・織田 肇・鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝(1980):二酸化窒素暴露に対するマウス系統間の感受性の相違と酵素的防御機構の役割について. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 55-60.
8. 嵯峨井勝・市瀬孝道・織田 肇(1980):二酸化窒素暴露ラットの呼気中エタン測定による *in vivo* の脂質過酸化の変化について. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 77-84.
9. 嵯峨井勝, 市瀬孝道(1980):老令ラットにおける脂質過酸化と血清脂質成分の変化について. 国立公害研究所研究報告 第15号 85-100.
10. 小林隆弘・野口 忠(1980):二酸化窒素急性暴露の肺胞洗浄液のリン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 101-108.
11. 彼谷邦光・三浦 卓(1980):二酸化窒素の赤血球膜糖脂質に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 109-116.
12. 彼谷邦光・三浦 卓(1980):二酸化窒素暴露によるラット赤血球膜リン脂質の脂肪酸組成の変動. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 117-124.
13. 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光(1980):二酸化窒素の赤血球酵素および糖脂質に及ぼす影響.

国立公害研究所研究報告, 第15号, 125-132.

14. 松本 茂・寺尾恵治・高橋慎司・高橋 弘・相賀一郎(1980): 大気複合汚染ガス暴露チャンパーにおけるオゾンの濃度制御について. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 133-148.
15. 松本 茂・藤田和伸・清水 明・木村英雄・高橋 弘(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——暴露チャンパーの環境制御. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 149-158.
16. 高橋 弘・山元昭二・石村俊治・高橋慎司・寺尾恵治(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——供試動物の飼育経過. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 159-170.
17. 竹中参二・清水不二雄・山田靖子・堀内博人・今井 透・原田隆彦・京野洋子・河合清之(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——病理形態学的所見. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 171-228.
18. 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・織田 肇(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——動脈血 pHa, PaCO₂ および PaO₂. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 229-240.
19. 市瀬孝道・鈴木 明・局 博一・織田 肇(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——血液性状. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 241-252.
20. 三浦 卓・彼谷邦光(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——血清アイソザイム. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 253-258.
21. 河田明治(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——血液および肺に存在するグルタチオン含量. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 259-274.
22. 小林隆弘(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——肺, 肝リン脂質脂肪酸組成. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 275-284.
23. Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980): Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: Changes in components of red cell membranes during in vivo exposure to NO₂. *Environ Res.*, **23**, 397-409.
24. Kaya, K. and T. Miura (1982): Effects of nitrogen dioxide on fatty acid compositions of red cell membranes, sera and livers in rats. *Environ. Res.*, **27**, (In press).
25. Kobayashi, T. and K. Kubota (1980): The reaction of nitrogen dioxide with lung surface components: The reaction with cholesterol. *Chemosphere*, **9**, 777-784.
26. Kobayashi, T. (1980): Effect of acute nitrogen dioxide exposure on the free amino acids of rat serum (II). *J. Toxicol. Sci.*, **5**, 263.
27. Kobayashi, T., I. Morita (Tokyo Metropolitan Inst. Gerontol.), S. Murota (Tokyo Metropolitan Inst. Gerontol.) (1981): Effect of acute nitrogen dioxide exposure on the prostacyclin synthesis in lung. *Toxicol. Lett.*, **9**, 373-378.
28. 局 博一・鈴木 明・市瀬孝道・嵯峨井勝・織田 肇・久保田憲太郎(1980): 二酸化窒素の急性暴露によるラット心機能の変化. *日本衛生学雑誌*, **36**, 550-559.

29. 嵯峨井勝・織田 肇・久保田憲太郎(1980): 大気中窒素酸化物の生体影響. 産業公害, 16, 987-994.
30. 嵯峨井勝・A. L. Tappel (カルフォルニア大)(1980): 脂質過酸化の新しい測定法としての呼気ガス分析法. 過酸化脂質研究, 3, 1-8.
31. Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide: I. Lipid peroxidation as measured by ethane exhalation of rats exposed to nitrogen dioxide. *Lipids*, 16, 64-67.
32. Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, (In press).
33. Oda, H., H. Tsubone, A.K. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, 25, 294-301.
34. Suzuki, A.K., T. Ichinose, H. Tsubone, H. Oda and K. Kubota (1981): Effects of acute nitrogen dioxide exposure on swimming performance of mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, (In press).
35. Suzuki, A.K., H. Tsubone and K. Kubota (1981): Changes of gaseous exchange in the lung of mice acutely exposed to nitrogen dioxide. *Toxicol. Lett.*, (In press).
36. 鈴木 明, 局 博一, 市瀬孝道, 織田 肇, 久保田憲太郎(1981): 二酸化窒素亜急性暴露がラットの動脈血 pHa, PaCO₂, PaO₂ に及ぼす影響. 日本衛生学雑誌, 36, 1-8.
37. Fujimaki, H. and F. Shimizu (1981): Effects of acute exposure to nitrogen dioxide on primary antibody response. *Arch. Environ. Health*, 36, 114-119 (1981).
38. Maitani, T., K.T. Suzuki and K. Kubota (1981): Changes of essential metal contents in lungs of rats acutely exposed to nitrogen dioxide. *Toxicol. Lett.*, 7, 289-295.
39. Maitani, T. and K.T. Suzuki (1981): Changes of essential metal levels in lungs of rats acutely exposed to ozone. *Toxicol. Lett.*; 8, 99-104

学 会 発 表

1. 市瀬孝道, 嵯峨井勝, 鈴木 明, 局 博一, 織田 肇; 久保田憲太郎(1980): NO₂ 暴露に対するマウス系統間の感受性の相違と肺の酵素的防御機構の役割について. 第21回大気汚染学会(浦和)
2. 織田 肇・鈴木 明・局 博一・久保田憲太郎(1980): NO₂ 暴露マウス血中のNitriteおよびNitrate. 第50回日本衛生学会(大阪)
3. 彼谷邦光・三浦 卓・持立克身・久保田憲太郎(1980): NO₂ またはO₃ 暴露がラットの赤血

- 球膜成分におよぼす影響. 第21回大気汚染学会(浦和)
4. 彼谷邦光・三浦 卓・久保田憲太郎(1980): NO₂ 暴露によるラット赤血膜リン脂質の脂肪酸組成の変動. 第50回日本衛生学会(大阪)
 5. 彼谷邦光・三浦 卓(1980): ラット血清中のスクワレンについて. 第22回日本脂質生化学研究会(岐阜)
 6. 河田明治・久保田憲太郎(1980): NO₂ 暴露(4週間)がラット肺のSH化合物に及ぼす影響. 日本薬学会第100年会(東京)
 7. 河田明治・久保田憲太郎(1980): NO₂ 長期暴露のラットに及ぼす影響. 肺および血液中のグルタチオン含量. 第21回大気汚染学会(浦和)
 8. 河村涼子・清水不二雄・藤巻秀和・山田靖子・久保田憲太郎(1980): カドミウムの免疫反応に及ぼす影響. 第2報 胸腺並びに脾臓に及ぼす影響について. 第50回日本衛生学会総会(大阪)
 9. 国本 学・井上圭三・野島庄七(東京大)(1980): 脂質過酸化による生体膜損傷のメカニズムの解析. 第22回日本脂質生化学研究会(岐阜)
 10. 小林隆弘(1980): NO₂ と不飽和脂肪酸の反応物のラット肺リン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響. 第21回大気汚染学会(浦和)
 11. 小林隆弘・久保田憲太郎(1980): NO₂ 長期暴露のラットに及ぼす影響. 肺・肝リン脂質の脂肪酸組成. 第21回大気汚染学会(浦和)
 12. 小林隆弘(1980): NO₂ 急性暴露ラット血清における遊離アミノ酸量の変化. 第7回毒作用研究会(大阪)
 13. 嵯峨井勝・市瀬孝道・織田 肇・久保田憲太郎(1980): NO₂ 長期暴露のラットに及ぼす影響. 酸化的障害に対する肺の酵素的防御機構の変化と呼気中炭化水素分析による脂質過酸化について. 第21回大気汚染学会(浦和)
 14. Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1980): Lipid peroxidation as measured by in vivo ethane in the breath of rats exposed to nitrogen dioxide. Int. Symp. Lipid Peroxide Biol. Med. (Nagoya)
 15. M. Sagai and T. Ichinose (1980): Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. Int. Symp. Lipid Peroxide Biol. Med. (Nagoya)
 16. 清水不二雄・藤巻秀和・河村涼子・山田靖子・白石不二雄・久保田憲太郎(1980): NO₂ 亜急性暴露の免疫反応に及ぼす影響. 第21回大気汚染学会(浦和)
 17. 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇・久保田憲太郎(1980): NO₂ 暴露ラットにおける心拍数, 呼吸数の変動について. 日本衛生学会(大阪)
 18. 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道(1980): NO₂ 暴露ラットの動脈血 pH_a, ガス分圧の変化について. 第90回日本獣医学会(山口)

19. 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇・久保田憲太郎(1980): NO₂ 長期暴露ラットに及ぼす影響. 2. 血液性状の変化. 第21回大気汚染学会(浦和)
20. 竹中参二・河合清之(産医研)・清水不二雄・山田靖子・堀内博人(慈恵医大)・今井 透(慈恵医大)・原田隆彦(日本獣畜大)・京野洋子(産医研)・久保田憲太郎(1980): NO₂ 長期暴露のラットに及ぼす影響. 病理形態学的変化について. 第21回大気汚染学会(浦和)
21. 局 博一・鈴木 明・市瀬孝道(1980): NO₂ 暴露ラットにおける心機能の変化について. 第90回日本獣医学会(山口)
22. 藤巻秀和・清水不二雄・久保田憲太郎(1980): 生体の抗体産生に関与する細胞群に及ぼすNO₂ の影響. 第21回大気汚染学会(浦和)
23. Fujimaki, H., F. Shimizu and K. Kubota (1980): Suppression of antibody response by exposure to nitrogen dioxide in mice. 4th Int. Congr. Immunol. (Paris)
24. 米谷民雄・鈴木和夫・西川雅高(計測技術部)・久保田憲太郎(1980): NO₂ の高濃度急性暴露によるラット血清および肺中の金属含量の変化. 日本薬学会第100年会(東京)
25. 三浦 卓・持立克身・彼谷邦光・久保田憲太郎(1980): NO₂ 暴露による赤血球膜酵素と糖質の変動. 第50回日本衛生学会(大阪)
26. 三浦 卓・持立克身・彼谷邦光・久保田憲太郎(1980): O₃ またはNO₂ 暴露のラット臓器に及ぼす影響. 第21回大気汚染学会(浦和)
27. 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光, 久保田憲太郎(1980): 肺のエネルギー代謝に及ぼす二酸化窒素の影響. 第50回日本衛生学会(大阪)
28. 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光・久保田憲太郎(1980): 赤血球の解糖系に及ぼす二酸化窒素およびオゾンの影響. 第21回大気汚染学会(浦和)
29. 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光・国本 学・久保田憲太郎(1981): 肺のエネルギー代謝に及ぼす二酸化窒素の影響(第2報). 第51回日本衛生学会(札幌)
30. 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・織田 肇・久保田憲太郎(1981): 二酸化窒素暴露がラットの動脈血pHa, ガス分圧に及ぼす影響について. 第51回日本衛生学会(札幌)
31. 彼谷邦光・三浦 卓・国本 学・持立克身・久保田憲太郎(1981): NO₂ のラット赤血球に及ぼす影響——亜硝酸ナトリウムのラット赤血球膜成分に及ぼす. *in vitro* 系での影響. 第51回日本衛生学会(札幌)
32. 国本 学・三浦 卓・彼谷邦光・持立克身・久保田憲太郎(1981): 二酸化窒素(NO₂)暴露によるラット赤血球膜の変化. 第51回日本衛生学会(札幌)
33. 三浦 卓・彼谷邦光・国本 学・持立克身・久保田憲太郎(1981): NO₂ 暴露による赤血球膜糖質の変動(第2報). 第51回日本衛生学会(札幌)
34. 藤巻秀和・久保田憲太郎・清水不二雄(新潟大・医)(1981): NO₂ 亜急性暴露の抗体産生能に及ぼす影響——*In vitro* 系での検索. 第51回日本衛生学会(札幌)

35. 嵯峨井勝・市瀬孝道・織田 肇・久保田憲太郎(1981): NO₂ 暴露による脂質過酸化と防御系の変化. 第51回日本衛生学会(札幌)
36. 国本 学・彼谷邦光・三浦 卓(1981): 二酸化窒素によるラット赤血球の変化——リン脂質脂肪酸組成の変化のメカニズムについて. 日本薬学会第101年会(熊本)
37. 河田明治(1981): NO₂ 亜急性暴露がラット肺のSH化合物に及ぼす影響. 日本薬学会第101年会(熊本)
38. 清水 明(技術部)・鈴木 明・局 博一・市瀬孝道(1981): ラットにおける呼気・吸気分離の試み. I 装置の概要. 第91回日本獣医学会(東京)
39. 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・清水 明(技術部)(1981): ラットにおける呼気・吸気分離の試み. II 呼気・吸気分離による一回換気量と分時換気量. 第91回日本獣医学会(東京)
40. 山崎英世(東京農工大)・局 博一・鈴木 明: イヌの麻酔時の脳波について. III パワースペクトルを用いた帯域区分の検討. 第91回日本獣医学会(東京)
41. Kobayashi, T., I. Morita (Tokyo Metrop. Inst. Gerontol.), S. Murota (Tokyo Metrop. Inst. Gerontol.) (1981): Effect of acute nitrogen dioxide exposure on the prostacyclin synthesis in lungs. 8th International Congress of Pharmacology (富士)

1

二酸化窒素急性暴露のマウスの肺機能に及ぼす影響

Effect of Acute Nitrogen Dioxide Exposure on Pulmonary Function of Mouse

鈴木 明¹・市瀬孝道¹・局 博一¹

Akira K. SUZUKI¹, Takamichi ICHINOSE¹ and Hirokazu TSUBONE¹

要 旨

NO₂の肺機能に及ぼす影響を解明する目的で、5, 10, 20 ppmのNO₂を24時間暴露したマウスを用いて、頭部密封法による呼気ガス、血液ガス、肺湿重量および肺水分含量について検討した。

頭部密封容気中のO₂、CO₂濃度と純粋空気との差を ΔO_2 、 ΔCO_2 とすると、 ΔO_2 は対照群と比較して5 ppm暴露群で増加する傾向を、10 ppmと20 ppm群では低下傾向を示した。 ΔCO_2 は5 ppm群で有意に増加し、10 ppm群でわずかな増加傾向を、20 ppmで逆に低下傾向を示した。呼吸一回当たりの ΔO_2 、 ΔCO_2 濃度を $\Delta O_2/RR$ 、 $\Delta CO_2/RR$ とすると $\Delta O_2/RR$ と $\Delta CO_2/RR$ は5 ppm群で減少傾向を、10 ppm群と20 ppm群で有意に低下した。P_ao₂は、5 ppm群でわずかに高く、一方、P_aco₂は有意に低下し、過呼吸による低炭酸血症の徴候を示した。10 ppmと20 ppm群ではP_ao₂が有意に低下した。肺湿重量および肺水分含量は10 ppm群と20 ppm群で有意に増加した。

以上の結果から、マウスに5-20 ppmのNO₂を暴露すると、比較的低濃度域では、生体内のO₂あるいはCO₂のガス代謝が亢進するが、10 ppm以上の高濃度暴露では、肺でのガス交換機能が抑制されている可能性が示唆された。

Abstract

In order to clarify the effect of acute NO₂ exposure on pulmonary function of experimental animal, mice were exposed to 5, 10, and 20 ppm NO₂ for 24 hr. Expired gas (O₂, CO₂) concentration was measured by head enclosed method, arterial blood pH, P_ao₂, P_aco₂, respiratory rate, lung wet weight and lung water content were examined.

ΔO_2 (difference between O₂ concentration in pure air and O₂ concentration in the container) was higher than control at 5 ppm exposure, but lower than control

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

at 10 ppm and 20 ppm. ΔCO_2 (difference between CO_2 concentration in pure air and P_{ACO_2} in the container) was significantly higher than control at 5 ppm exposure, but lower than control at 20 ppm. Respiratory rate (RR) in the exposed mice were increased dependent on the NO_2 concentration. $\Delta\text{O}_2/\text{RR}$ and $\Delta\text{CO}_2/\text{RR}$ were lower than control at 5 ppm and were significantly decreased at 10 ppm and 20 ppm NO_2 exposure. Pao_2 is slightly increased, but Paco_2 is significantly decreased at 5 ppm NO_2 exposure, from which seem to be slight hypocapnaemia. Pao_2 is significantly decreased at 10 ppm and 20 ppm exposure. Lung wet weight and lung water content were significantly lower than control at 10 ppm and 20 ppm NO_2 exposure.

From these results, it is concluded that O_2 and CO_2 metabolic rates may be accelerated in mice exposed to low concentration NO_2 exposure, and gas exchange functions in lung assume to be depressed in mice exposed to high concentration NO_2 exposure.

はじめに

大気汚染ガスの一つである二酸化窒素 (NO_2) は酸化性が高く、気道内末梢部まで達するために肺の形態学的変化^{1,2)}、生化学的変化^{3,4)}あるいは肺換気力学的変化^{5,6,7)}を引き起こすことが明らかとなっている。したがって、 NO_2 の呼吸器への影響に関する動物実験報告は、病理学的、生化学的知見を中心に多いが、測定上の技術的困難さも相まって、肺機能への影響に関する報告は比較的少なく、いまだ不明の点が多いといえる。そこで、 NO_2 の肺機能への影響を解明する目的で、 NO_2 を暴露したマウスの頭部密封法による呼気ガスの変化および、血液ガスについて検索を試みた。

方 法

14~16週令の JCL:ICR雄マウスを、1群6匹として総計54匹使用した。 NO_2 濃度は5, 10, 20ppmで24時間暴露とし、 NO_2 の代わりに清浄空気を NO_2 暴露と同一条件で暴露した群を対照群とした。 NO_2 暴露はチャンバー容量120 l、換気回数毎時20回、温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ で行った。 NO_2 暴露は、 NO_2 急性暴露装置(日本クレア, PT-300A)によって、5000 ppmのボンベを希釈して使用した。暴露中はチャンバー内の NO_2 , NO, NO_x 濃度をケミルミネッセンス法の窒素酸化物測定装置(モニターラボ, ML-8440H)によって測定し、目的濃度 $\pm 5\%$ 以内で暴露した。

図1は呼気ガス分析および呼吸気流曲線図を測定している時の模式図である。マウスの一回呼吸量は小さく早いため⁸⁾呼気と吸気を分離し、呼気だけを分析することは困難なので、この図に示したように、マウスの頭部を内容積45mlの容器内に一定時間(15~30秒間)入れ、その時の呼吸数を圧力トランスジューサー方式(西島電子)によって呼吸気流曲線図から算出した。その容器内の酸素と炭酸ガス濃度を呼気ガス分析装置(三栄測器 I HO2)で測定した。容器内へ頭部を保定する時および、測定の前には純エアボンベ(O_2 :20.9%, CO_2 :0.0%, N_2 バランス)供給の空気ですら十分に換気し、動物が安定し落ちついた様子を見せた時にバルブ操作によって頭部を密閉する方式

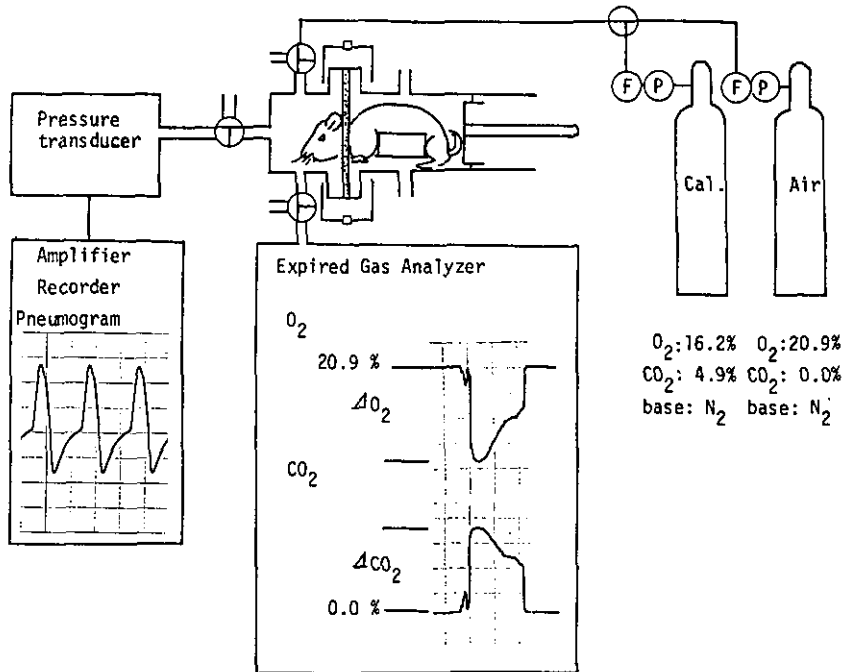


図 1 実験装置の模式図

Fig. 1 Schematic illustration of experimental method

とした。図1の中央に酸素濃度および炭酸ガス濃度の分析図を示した。酸素濃度はボンベ供給により大気中と同じ20.9%とみなせるので、呼吸することによって酸素は肺において交換され体内に入り、逆に炭酸ガスが呼出される。したがって一定時間内の頭部容気中の酸素濃度と炭酸ガス濃度はこの図のように酸素濃度は減少し、炭酸ガス濃度は増加する。これらの容器内の増加分および減少分を ΔO_2 、 ΔCO_2 (デルタ O_2 、デルタ CO_2)と示すと、 ΔO_2 の増加は、容器中の酸素含量の低下すなわち動物生体内への摂取量が増加した事を示し、逆に ΔO_2 の減少は、容器内の酸素の減少が少ない事すなわち酸素摂取量の減少を示すと解釈できる。また同様に、炭酸ガスはボンベ中の含有率を0%とみなし、その差を ΔCO_2 としたので ΔCO_2 の増加は、動物体内からの炭酸ガス呼出量の増加を、逆に ΔCO_2 の減少は炭酸ガスの呼出量の減少を示すことになる。

ここで使用した純粋空気(前述)および校正ガス(O_2 : 16.2%, CO_2 : 4.9%, N_2 バランス)は、調整された標準ガスを用い2~3回測定をくり返すことによって測定誤差をできるだけ小さくした。

一方、実験に使用したマウスの頭部の体積の平均値は約 $9.8\text{cc} \pm 1.2\text{cc}$ (範囲8~11.5cc)で対照群と暴露群との間に有意な差がなかったので、頭部容器中の頭を除いた残りの容積は、対照と暴露群の間で差がないと考えられた。

呼吸ガス分析後、クロロホルム浅麻酔下で腹大動脈から0.2~0.5 mlの動脈血を採血し、動脈血中のpH、酸素分圧および炭酸ガス分圧をpH/ガス分析器(コーニング168)によって分析した。測定終了後、肺の湿重量と乾燥重量(105℃, 10時間乾燥)を求め肺の水分含量を求めた。

呼吸図の記録および測定には三栄測器の180システムを使用した。

結 果

1) ΔO_2 と ΔCO_2 の変化

頭部密封容器内の ΔO_2 と ΔCO_2 について、対照群の測定値を100%として暴露群の変化を相対値で図2に示した。5 ppm暴露群では ΔO_2 , ΔCO_2 とともに増加を示し、特に ΔCO_2 は有意に増加した。10 ppm暴露群では ΔCO_2 は対照群と比較してやや高い傾向を、 ΔO_2 は逆に低い傾向を示した。20 ppm暴露群では ΔCO_2 , ΔO_2 とともに低下傾向を示した。

2) 呼吸数の変化

前述した ΔO_2 , ΔCO_2 の変化は、肺の機能的変化の他に呼吸数に依存している。一回換気量を一定と仮定した場合肺換気量は呼吸数に依存するからであり特に本実験のように密閉測定法の場合は、容気中の酸素濃度および炭酸ガス濃度が呼吸中枢に作用し、呼吸数の変化に伴う肺換気量の変化、ひいては ΔO_2 , ΔCO_2 の変化を引き起こすことが予想される。そこで呼吸数の変化について ΔO_2 , ΔCO_2 と同様に対照群を100%として暴露群の変化率を示すと図3に示したごとく呼吸数は、5 ppm群で対照群の134% ($P < 0.05$), 10 ppm群で146% ($P < 0.01$), 20 ppm群で162% ($P < 0.01$) と NO_2 濃度の増加に伴って明らかに増加した。

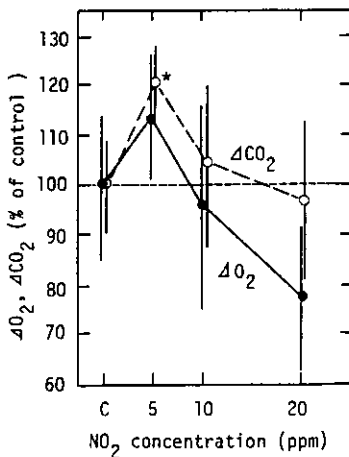


図 2 容器中の ΔO_2 , ΔCO_2 の変化

Fig. 2 Change of ΔO_2 and ΔCO_2 in the container, $n = 6$, * $P < 0.05$

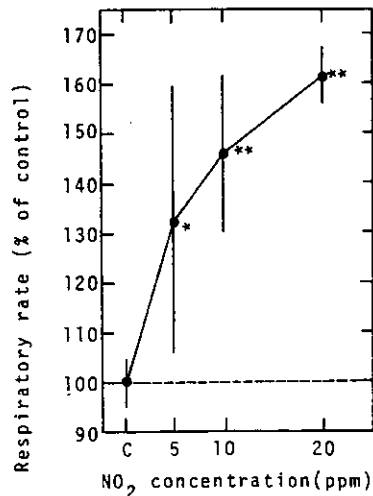


図 3 呼吸数の変化

Fig. 3 Respiratory rate of NO_2 exposed mice, $n = 6$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3) $\Delta O_2/RR$, $\Delta CO_2/RR$ の変化

上述したように呼吸数は暴露濃度の増加に伴って増加している。したがって一呼吸当たりの酸素および炭酸ガス濃度を検討するために ΔO_2 , ΔCO_2 をそれぞれ呼吸数 (Respiratory rate, RR と略す) で割って呼吸一回当たりの ΔO_2 と ΔCO_2 の変化を図4に $\Delta O_2/RR$, $\Delta CO_2/RR$ で示した。

$\Delta O_2/RR$ は、5 ppm 群で対照群の88%, 10 ppm 群で65% ($P < 0.01$), 20 ppm 群で48% ($P < 0.01$)へと減少し $\Delta CO_2/RR$ も5 ppm 群で85%, 10 ppm 群で71% ($P < 0.01$), 20 ppm 群で60% ($P < 0.01$)と減少した。

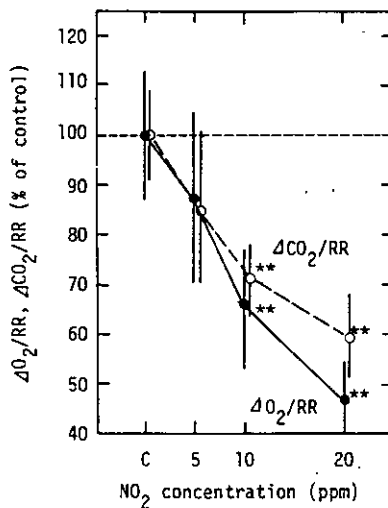


図 4 $\Delta O_2/RR$ と $\Delta CO_2/RR$ の変化
Fig. 4 Change of $\Delta O_2/RR$ and $\Delta CO_2/RR$ in the container, ** $P < 0.01$

4) 動脈血酸素分圧 (P_{aO_2}), 炭酸ガス分圧 (P_{aCO_2}) および pH の変化

クロロホルム浅麻酔下で腹部動脈から採血した動脈血の酸素分圧 (P_{aO_2}), 炭酸ガス分圧 (P_{aCO_2}) と pH の変化を表1に示した。

表に示したように pH はほとんど変化がなく P_{aCO_2} が対照群と比較して5 ppm で対照群の79% ($P < 0.01$) および10 ppm 群87%と低下傾向を示し、逆に20 ppm 群で107%と高い傾向を示した。 P_{aO_2} は5 ppm 群で対照の103%と増加傾向を示し、10 ppm 群で58% ($P < 0.01$), 20 ppm 群では52% ($P < 0.01$)と低下した。

5) 肺湿重量と肺水分含量の変化

肺湿重量と肺水分含量の変化を表2に示した。肺湿重量, 肺水分含量ともに NO_2 暴露濃度の増

加に伴って増加傾向を示し、10 ppm以上の暴露群では両者ともに有意な増加を示した。

表 1 5-20 ppmのNO₂を24時間暴露したマウスの動脈血Pao₂, Paco₂ pHの変化
Table 1 Arterial blood oxygen tension, carbon dioxide tension and pH in mice exposed to 5 - 20 ppm NO₂ for 24 hours

NO ₂ Concentration	Pao ₂ (mmHg)	Paco ₂ (mmHg)	pH
Control	95.2 ± 16.2	46.5 ± 4.8	7.28 ± 0.04
5 ppm	77.9 ± 13.5	36.6 ± 3.9**	7.29 ± 0.04
10 ppm	61.3 ± 14.7**	40.2 ± 4.5	7.28 ± 0.06
20 ppm	50.2 ± 16.5**	49.7 ± 11.0	7.23 ± 0.04

Data are expressed as mean ± SD of 6 subjects, **: P < 0.01.

表 2 肺湿重量と肺水分含量の変化

Table 2 Lung wet weight and lung water content of mice exposed to NO₂ at the concentration of 5 - 20 ppm NO₂ for 24 hours

NO ₂ Concentration	Lung Wet Weight (mg)	Lung Water Content (mg)
Control	208 ± 9	163 ± 12
5 ppm	217 ± 16	167 ± 14
10 ppm	289 ± 47**	217 ± 42*
20 ppm	321 ± 39**	262 ± 40**

Data are expressed as mean ± SD of 6 subjects, *: P < 0.05, **: P < 0.01.

考 察

比較的高濃度のNO₂暴露が、肺の形態学的、生化学的、換気力学的変化を引起こすことは種々の動物実験によって確かめられているところである。しかしながら技術的困難さもあって小動物を使用して肺機能の影響を検討した報告は少なく、呼気ガスおよび血液ガス分析に関しては特に少ないといえる。また、マウスのような小動物では、呼気と吸気を分離することは技術的に困難である。そこで図1のように頭部を密封容器中に一定時間(15~30秒間)入れ、その容器内の酸素濃度と炭酸ガス濃度の変化を、対照群のマウスとNO₂暴露マウスについて、測定し、対照群に対する相対値で比較することを試みた。

密封容器内でのΔO₂の増加は、動物生体内への摂取量が増加した事を示し、逆にΔO₂の減少は、生体の酸素摂取量が減少した事を示している。また、ΔCO₂の増加は、動物体内からの炭酸ガスの呼出量の増加を、逆にΔCO₂の減少は呼出量の減少を示し、この二つの要素はいずれも生体内の代謝と深い係わりをもつものである。5 ppmのNO₂ 24時間暴露では暴露動物の酸素の摂取が高く、炭酸ガスの排出も増加していることを示唆した。このことは生体内での酸素消費が活発で、いわゆ

る代謝が亢進していることが示唆される。また一呼吸当たりの酸素および炭酸ガスの運搬は、5 ppm 24時間暴露においても低下傾向を示したが、 ΔO_2 および ΔCO_2 の変化からみる限り、呼吸数を増加することによって代償的に生体内の代謝亢進を維持している可能性が示唆された。またこの時動脈血 P_{aO_2} は増加傾向を示し、 P_{aCO_2} は有意に低下し、一見すると過呼吸による低炭酸血症を示しているようにも考えられる。さらに5 ppm 暴露群では、肺湿重量および肺水分含量の増加もわずかで、肺水腫等による肺でのガス交換が抑制されているとは考え難い。いずれにしても5 ppm 24時間暴露はマウスに、機序は不明であるが、何らかの代謝性の変化を引き起こしていることが推測された。

Nieding ら⁹⁾¹⁰⁾ は、5 ppm の NO_2 を15分間暴露したヒトで、 P_{aO_2} の有意な減少を認めたが、呼気ガス中の P_{AO_2} および P_{ACO_2} に差を見いだせなかった。一方、鈴木らは4.0 ppm の NO_2 を3か月間暴露したラットで¹¹⁾、さらに0.4 ppm と4.0 ppm の NO_2 を9か月間暴露したラットで¹²⁾ P_{aO_2} の有意な低下が起こることを報告した。ほぼ同じレベルの NO_2 濃度において、Nieding らは短時間暴露で、また鈴木らは長期間暴露で P_{aO_2} の有意な減少を認めている。しかしながら、短時間暴露(15分~24時間)における P_{aO_2} 、 P_{AO_2} および P_{ACO_2} の Nieding の結果と鈴木らの結果の相違は、ヒトとラットという種の特性¹³⁾、暴露方法、暴露期間の違いに関係していることも考えられる。また、5~10 ppm の NO_2 を24時間暴露したマウスでは呼吸数が対照と比較して異常に高くなることが報告されている¹⁴⁾。したがって5 ppm の NO_2 を24時間暴露したマウスでは肺に水腫等の重大な損傷は本実験結果から考えられないので、過呼吸によって P_{aO_2} の増加および P_{aCO_2} の低下が生じたものと考えられる。しかし過呼吸の原因が単に神経性の直接作用なのか¹⁵⁾、各組織を含む代謝亢進によるのか、あるいは代謝とはあまり関与しない酸素の吸収のためなのかについては今後の課題であると考えられる。

10 ppm 24時間暴露では、 ΔO_2 、 ΔCO_2 はみかけ上対照群とほぼ同じレベルにあるが、 $\Delta O_2/RR$ 、 $\Delta CO_2/RR$ は有意に低く、呼吸数を増加させることによって ΔO_2 、 ΔCO_2 を維持しているように考えられ、動脈血 P_{aO_2} が低いことと肺湿重量および肺水分含量が増加していることを考え合せると、10 ppm の NO_2 24時間暴露は肺における O_2 、 CO_2 のガス交換機能を抑制している可能性が示された。

20 ppm の NO_2 24時間暴露では ΔO_2 および ΔCO_2 の減少、 $\Delta O_2/RR$ 、 $\Delta CO_2/RR$ の顕著な減少、さらに動脈血 P_{aO_2} の有意な低下、そして肺湿重量、肺水分含量の増加等を考え合わせると、20 ppm の NO_2 を24時間暴露したマウスの肺機能が抑制されていることは明らかである。

一方、高濃度の NO_2 暴露では、Buckley ら³⁾ は40 ppm の NO_2 を20日間暴露したマウス肺のスライス片で酸素消費が増加したことを報告した。また、Mustafa ら¹⁶⁾ は0.8 ppm の O_3 4日間暴露で同様にラット肺スライス片の酸素消費が31% ($P < 0.05$) 増加したことを報告した。これらの報告は、 NO_2 および NO_2 より強い酸化性をもつオゾン暴露によって組織での酸素消費が増加する可能性があることを示している。したがって組織での酸素消費増加は、血液中の P_{aO_2} の減少を引き

起こし、肺でのガス交換が肺水腫等によって抑制された場合、見かけ上、酸素摂取が減少したように誤って解釈される可能性がある。一方、炭酸ガスは各種の緩衝作用系によって変化が抑えられていることも考えられる¹⁷⁾。しかし肺でのガス交換機能の程度は血中ガス濃度によって推測できる¹⁸⁾という考えもある。

近年、アイソトープを使用した実験^{19, 20)}、および血中硝酸イオン、亜硝酸イオン濃度を測定した実験²¹⁾によって、NO₂の生体内での動態が明らかにされつつあり、NO₂が肺以外の血液および臓器に分布することが確認されている。したがって、NO₂の生体への影響を解明するに当っては、肺以外の臓器に対する直接作用をも考慮すべきである。

上述した結果から、マウスに24時間のNO₂を暴露した場合、比較的低濃度では生体内の酸素あるいは炭酸ガス代謝を亢進させ、逆に高濃度の暴露では肺でのガス交換機能が抑制されている可能性が示唆された。と同時に、組織でのガス代謝に変化が及ぶことが考えられた。

今回は呼気と吸気に分離が困難であるために頭部だけ密封容器の中に入れるというやり方をとった。この場合、容器中のO₂、CO₂ ガスの変化と生体内の代謝が平衡状態になっている事が必要であるが、残念ながら、この点については技術的側面も含めてより詳細な検討が必要であると考えられる。しかしながら、相対的評価といえ、呼気ガスおよび血液ガス分圧の検索は低濃度あるいは高濃度のNO₂等のガス暴露に関して今後より多くの資料をもたらすものと期待される。

引用文献

- 1) Freeman, G., R.J. Stephens, S.C. Crane and N.J. Furioli (1968): Lesion of the lung in rats continuously exposed to two parts per million of nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **17**, 181-192.
- 2) Stephens, R.J., G. Freeman and M.J. Evans (1972): Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide-light and electron microscopy. *Arch. Environ. Health*, **24**, 160-179.
- 3) Buckley, R.D. and C.G. Loosli (1969): Effects of nitrogen dioxide inhalation on germfree mouse lung. *Arch. Environ. Health*, **18**, 588-595.
- 4) Buckley, R.D. and O.J. Balchum (1967): Effects of NO₂ on lactic dehydrogenase isoenzymes. *Arch. Environ. Health*, **14**, 424-428.
- 5) Arner, E.C. and R.H. Rhoades (1973): Long-term nitrogen dioxide exposure. *Arch. Environ. Health*, **26**, 156-160.
- 6) 横山栄二 (1968): SO₂とNO₂およびO₃の換気能におよぼす影響の比較——モルモットにおける暴露実験. *産業医学*, **11**, 563-568.
- 7) Murphy, S.D., C.E. Ulrich, S.H. Frankowitz and C. Xintaras (1964): Altered function in animal inhaling low concentrations of ozon and nitrogen dioxide. *Am. Ind. Hyg. Ass. J.*, **25**, 246-253.
- 8) Stround, R., R.E. Forster, and E.I. Elisberg (1964): *In Biological Data Book* (ed. by Altman, P.L. and D.S. Diltmer) Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington p. 220.
- 9) Nieding, G. von, H. Krekeler, U. Smidt, und K. Muysen (1970): Wirkung von 5 ppm NO₂ auf die Lungen- und Kreislauffunction des gesunden Menschen. *Int. Arch. Arbeitmed.*, **27**, 234-243.
- 10) Nieding, G. von and H.M. Wagner (1977): Experimental studies on the short-term effect of air pollutants on pulmonary function in man: two-hour exposure to NO₂, O₃ and SO₂ alone and in combination, 4th Int. Clean Air Congress, 5-8.

- 11) 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・織田 肇・久保田憲太郎 (1981) 二酸化窒素亜急性暴露がラットの動脈血 pH, PaCO₂, PaO₂ に及ぼす影響, 日衛誌, 36, 763-771.
- 12) 鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇・久保田憲太郎 (1980) : NO₂ 長期暴露のラットに及ぼす影響 — 血液性状の変化 — 第21回大気汚染学会講演要旨集, 浦和, 702.
- 13) Tyler, W.S., R.F. McLaughlin, Jr. and R.O. Canada (1967): Structural analogues of the respiratory system. Arch. Environ. Health, 14, 62-69.
- 14) 鈴木 明・市瀬孝道 (1979) : NO₂ ガス暴露とマウスの肺機能について, 第88回日本獣医学会講演要旨集, 札幌, p. 236.
- 15) O'Cain, C.F., M.J. Hensley, E.R. McFadden, Jr. and R.H. Ingram, Jr. (1979): Pattern and mechanism of airway response to hypocapnia in normal subjects. J. Appl. Physiol. 47, 8-12.
- 16) Mustafa, M.F., J.J. Ospital and A.D. Hacker (1976): Effect of ozone and nitrogen dioxide exposure on lung metabolism. Environ. Health Pers. 16, 184.
- 17) 藤原孝憲 (1981) : 血液の緩衝作用系, 血液 (測定の理論と臨床応用), 真興交易, 東京, 25-36
- 18) 白石 透・宮沢正治 (1979) : 血液ガス分析. 臨床検査, 23, 464-470.
- 19) 太田庸起子・脇坂一郎 (1979) : 安定同位体二酸化窒素の生体内移行. 産業医学, 21, 707-708.
- 20) Ohta, Y., M. Yamada, Y. Yoneyama and A.K. Suzuki (1981): Dynamic study on animal experiments using nitrogen dioxide of stable isotope (¹⁵NO₂). Fourth International Conference on Stable Isotopes, Jülich.
- 21) Oda, H., H. Tsubone, A.K. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentration in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide. Environ. Res. 25, 294-301.

2

ラットの呼気・吸気分離装置について
— 装置の機能とその応用 —

An Apparatus for Isolation of Inspired and Expired Gases of Rats
— Function of Apparatus, and Application —

清水 明²・局 博一¹・鈴木 明¹

Akira SHIMIZU², Hirokazu TSUBONE¹ and Akira K. SUZUKI¹

要 旨

呼気ガスの分析は、生体内の呼吸機能あるいは代謝等の生理的状态を知る上で非常に重要である。しかしラットの様な小動物に於いて、受動的な方法で呼気を分離収集する事は、技術的に困難であった。

そこでラットの気管内圧力信号を処理して、呼気ガスだけを収集する装置の製作を試み、優れた結果を得ることができた。

本装置は、実験用小動物(特にラット)の呼吸生理学に関する研究および代謝の検索のために使用できると結論される。

Abstract

To analyze a expired gas is very important means for investigations of respiratory function and metabolic conditions in the living bodies. But in small experimental animal such as rat, isolation of expired and inspired gases by passive method has been difficult due to technical problems. Recently excellent parts have been developed for this purpose such as all teflon 3 way solenoid valves, miniature pressure transducer and their control systems. Using these excellent parts our working group designed and manufactured an apparatus for collecting only expired gas.

The present apparatus are useful for a study of respiratory physiology and a metabolic investigation of small experimental animal, especially rat.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

2. 国立公害研究所 技術部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Engineering Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

はじめに

呼気ガスの分析は、生体内の呼吸機能あるいは代謝等の生理的状態を知る上で非常に重要である。そのためには、可能な限り呼気と吸気を分離し、呼気ガスだけを採取する事が必要である。比較的大きなウサギ・イヌなどの実験動物に於いては、簡単な三方弁を用いて受動的に分離する事が容易であるが、ラットの様な小動物では1回の呼吸量が数ccと少なく、呼吸数は1分間に83~230回と高いので¹⁾受動的な方法で呼気と吸気を分離する事は困難であった。最近になってオールテフロン三方向電磁弁、小型圧力トランスデューサー、そしてそれらの制御系等のすぐれた部品が開発されてきている。それらの部品を使って、呼気と吸気を反映する気管内圧力の変化から、呼気相か吸気相かを判定し電磁弁を切り換える事により、能動的に呼気ガスを分離収集する方法が考えられた。

本論文は、ラットの呼吸生理に関する研究、あるいは有害ガスを暴露したラットの生理学的(代謝学的)変化の検索のために開発した装置の概略について報告する。

装置の機能

図1は、本装置の模式的ダイアグラムと、その構成成分の特性を示している。本装置は(1)圧力トランスデューサー、(2)直流増幅器、(3)電圧傾斜弁別器、(4)オールテフロン三方向性電磁弁、(5)記録システム、(6)呼気ガス収集器からできている。Pentobarbital sodium (Nembutal) 30mg/kg, B. W.で麻酔したラットの気管を切開し、図1の様に圧力トランスデューサー(1)の付いたカニューレを取り付ける。その信号を、(3)の電圧傾斜弁別器 (Voltage Slope Detector 以後 V. S. D. と略記する) に入力し、呼気相か吸気相の判定を行い、その結果から三方向性電磁弁 (3 way Solenoid Valve (4)) を切り換え、呼気ガスのみをガス収集器 (Gas Collector (6)) で収集する。

V. S. D. は、呼気ガスだけが収集されるように、図2に示す様ないくつかの重要な機能を持っている。圧力トランスデューサーの出力波形は、呼吸によって高圧、低圧の変化を交互に繰り返している。それを微分回路 (Differentiator) に通すと、高圧 (呼気相) から低圧 (吸気相) へ圧力が移行する時は負極性の出力が発生し、逆の場合は正極性の出力が得られる。従って、微分出力が負極性の時は外気管から肺への経路を接続し、逆の場合は肺から Collector へ経路切り換えが行われる様に、電磁弁を駆動する。また、Comparator は、微分出力の極性判定を行うと同時にヒステリシス特性を持たせる事により、不安定動作を防ぐ役割を持っている。本器は目的信号の検出を微分回路により行っているため、ノイズや波形の乱れに対し敏感であり、圧力トランスデューサーの出力を直接処理すると誤動作をする事がある。そのため Lowpass filter を通し、不要成分をある程度取り除いてから判定処理を行う様にしている。更に、入力信号のおおよその状態を知るために、ピークレベル計を装備している。

麻酔ラットを使用し、気管カテーテルを使用した場合、本装置によって呼気と吸気を分離できる事がわかったが、さらに、V. S. D. の応答性および、分離ガスが逆流などをしないか等について総合的な動作を詳細に検討した。

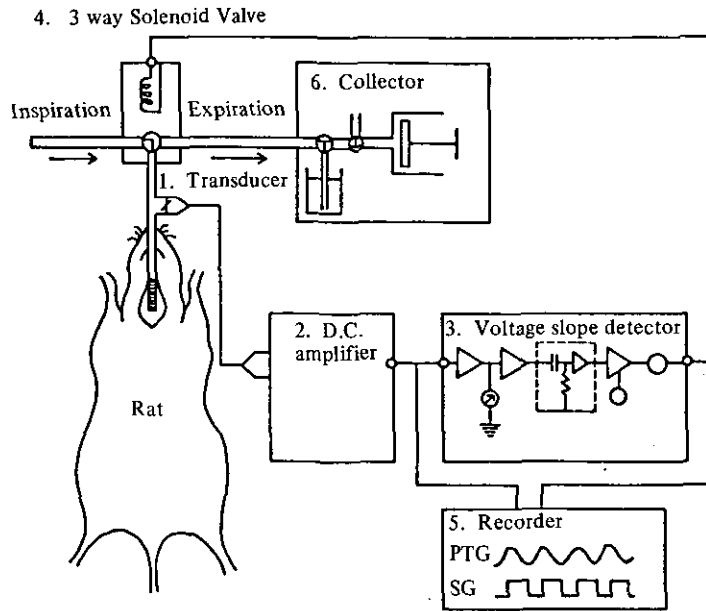


図 1 呼気ガス分離装置の模式図と各部の機能

Fig. 1 Schematic diagram of an apparatus for isolation of inspired and expired gases, and characteristic features of its components

Remarks:

- | | |
|----------------------------|----------------------------------|
| 1. Pressure transducer | Miniature pressure transducer. |
| 2. D.C. amplifier | |
| 3. Voltage slope detector* | |
| 4. 3 way solenoid valve | All tefron solenoid 3 way valve. |
| 5. Recorder system | |
| 6. Expired gas collector* | Cylinder type, (0 - 100 ml). |

* These were fabricated in Engineering Division, National Institute for Environmental Studies.

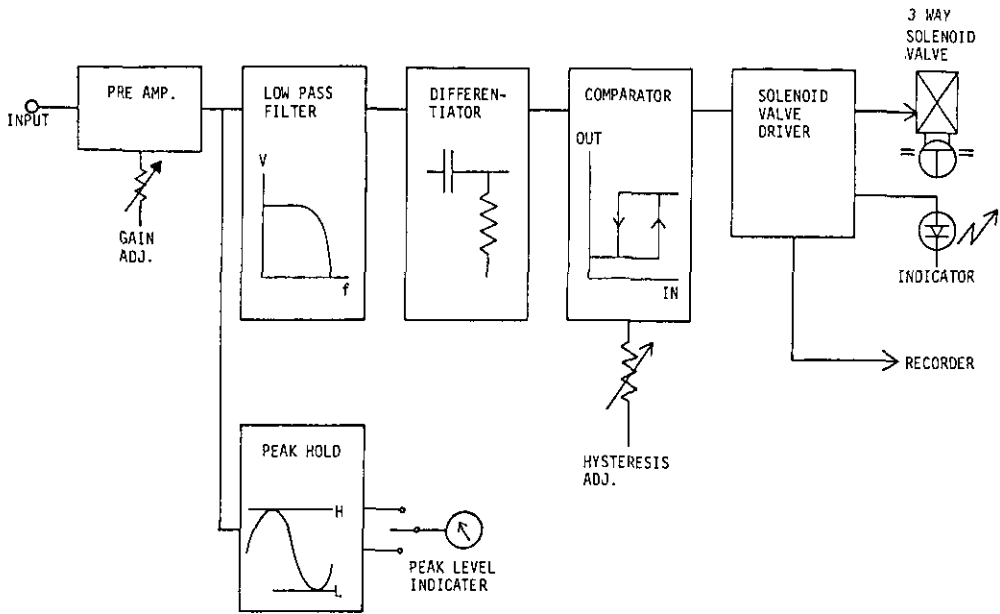


図 2 ボルテージ・スロープ・ディテクタのブロック・ダイアグラム
 Fig. 2 Block diagram of voltage slope detector

結 果

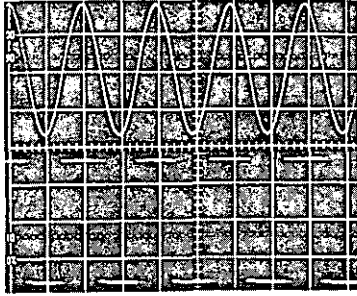
1. V. S. D. の応答性と逆流テスト

まず V. S. D. の入力に発振器を接続し、入力波形（正弦波および矩形波）および周波数に対する応答を調べた。図 3 は作動時間の遅延結果を示す。Function Generator (YHP-3311A) から正弦波あるいは矩形波が V. S. D. の入力に送られると、矩形波ではその出力信号は入力信号とほとんど一致しているが、正弦波では明瞭な遅延が観察された。図 4 は、正弦波での周波数と遅延時間（位相(度)で示す）との関係を片対数グラフ上に示してある。この結果は、4 Hz 以下では一定の遅延を示すが、6 Hz 以上では遅延が周波数に応じて増加してくる事を示す。

更に、ラットの代わりに人工呼吸器を接続し、外気導入部及び Collector 部の流速を差圧流速計により測定し、総合的な動作確認を行った。図 5 は毎分 30, 60, 120 回で人工呼吸器を作動した時の吸気と呼気の典型的パターンを示している。どの呼吸回数においても、吸気と呼気の切り換え (Signal 波形で示される) が適確に行われている。

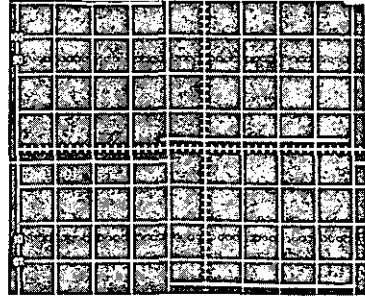
図 6 は本装置での結果と、流量測定法の結果の関係を示している。本装置によって収集した呼気量は、流量測定法²³⁾ による呼出量とほぼ一致していた。それ故、本方法は流量測定法の代わりにも使えるものと考えられた。

SINE WAVE INPUT

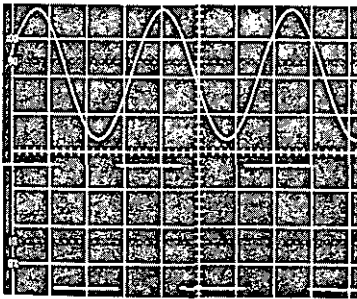


f : 10 [Hz] H : 10 [msec/div]

RECTANGULAR WAVE INPUT



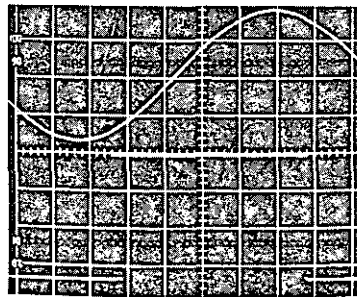
f : 10 [Hz] H : 50 [msec/div]



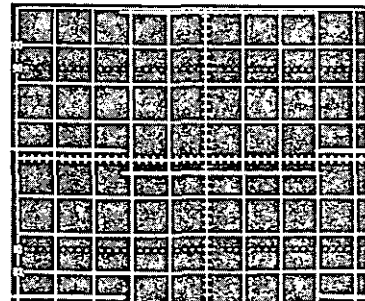
f : 6 [Hz] H : 50 [msec/div]



f : 6 [Hz] H : 20 [msec/div]



f : 2 [Hz] H : 50 [msec/div]



f : 2 [Hz] H : 50 [msec/div]

図 3 正弦波・矩形波入力に対する応答遅れ

Fig. 3 Relationship between the input of the sine wave or rectangular signal and delay of output pulse

Remarks:

UPPER WAVE: INPUT — 1 [V/div]

LOWER WAVE: OUTPUT — 0.5 [V/div]

f : FREQUENCY

H : HORIZONTAL TIME SCALE

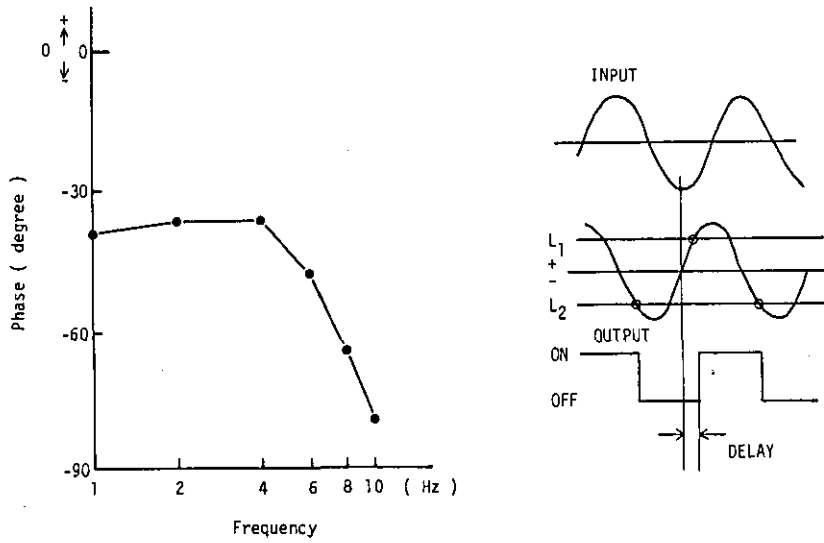


図 4 周波数対位相特性

Fig. 4 Relationship between frequency and the phase (degree) on the semilogarithmic scale. Delay is represented the difference between the base line and switching point of output pulse in degree.

Remarks

L_1 : Threshold level of positive signal

L_2 : Threshold level of negative signal

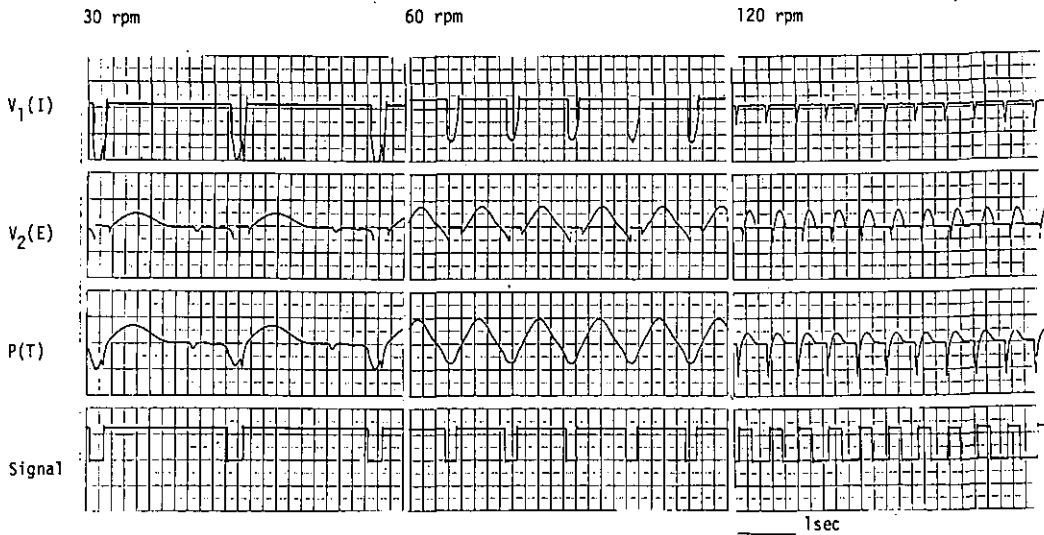


図 5 人工呼吸器使用時の呼吸流速と極性の記録

Fig. 5 Typical pattern of the inspiration and expiration using the flow velocity measuring method with mechanical respirator at the rate of 30 rpm, 60 rpm and 120 rpm

V_1 (I): Velocity of inspiration

P (T): Pressure of transducer

V_2 (E): Velocity of expiration

Signal: Signal of 3 way solenoid valve drive

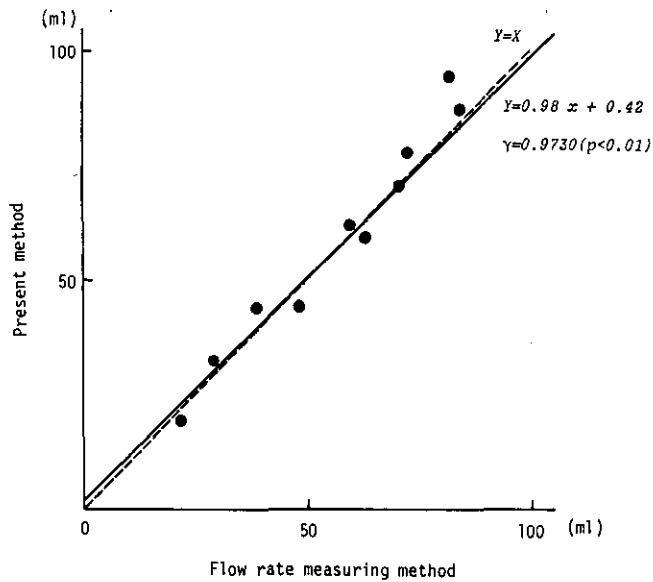


図 6 本装置の結果と流速積分による流量測定法の結果との比較
 Fig. 6 Relationship between the results of present method and flow rate measuring method (Velocity intergration method)

2. 本装置における応用

本装置をガス暴露動物に応用し呼吸機能に関する数種の指標について検討した。

実際に本装置を用いて呼気ガスを分離している典型的パターンを図7に示す。NO₂ (0.4 ppm) と O₃ (0.8 ppm) を1, 2週間複合暴露した時の ΔO_2 濃度, ΔCO_2 濃度, 分時換気量 (\dot{V}_E), 一回換気量 (V_T) の変化を表1に示した。この場合, ΔO_2 , ΔCO_2 は標準空気と呼気ガス成分中の P_{AO_2} , P_{ACO_2} との差である。1週間暴露では, V_T が O₃: 0.8 ppm および O₃: 0.8 ppm + NO₂: 0.4 ppm 群で有意に低下した。2週間暴露では, O₃: 0.8 ppm 群および O₃: 0.8 ppm + NO₂: 0.4 ppm 群で ΔO_2 , ΔCO_2 , V_T はいずれも有意に低下し, \dot{V}_E は逆に増加傾向を示した。この事は O₃: 0.8 ppm 単独でも O₃: 0.8 ppm + NO₂: 0.4 ppm 複合暴露においても, 肺換気機能の著しい低下が示唆された。

考 察

気管内圧力波形から呼気・吸気相を判定する方法として, 次のものが考えられる。

1. 気管内圧力が基準とした圧力レベルより高いか, 低いかにより呼気・吸気相の判定を行う。
2. 気管内圧力が高圧から低圧へ移行した場合は, 呼気相から吸気相への移行とみなし, 逆の場合は吸気相から呼気相への移行とみなす。
3. 気管内圧力波形のパターンから呼気相・吸気相を判定する。

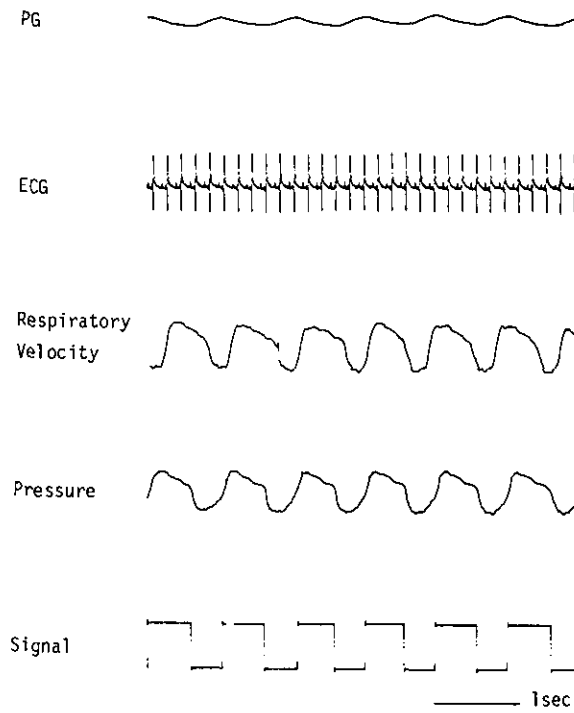


図 7 測定中の典型的パターン図

Fig. 7 Typical pattern of isolation of expired gas in measuring

PG: Pneumogram

ECG: Electro-cardiogram

表 1 NO₂ (0.4 ppm) と O₃ (0.8 ppm) を 1 および 2 週間、複合暴露した時の ΔO_2 , ΔCO_2 , \dot{V}_E および V_T の変化

Table 1 Change of ΔO_2 , ΔCO_2 , \dot{V}_E and V_T in mice exposed to NO₂ (0.4 ppm) and O₃ (0.8 ppm) with single or complex for 1 and 2 weeks.

	ΔO_2 (%)	ΔCO_2 (%)	\dot{V}_E (ml/min)	V_T (ml)
1W exposure				
Control	3.37 ± 0.38	2.52 ± 0.19	117 ± 9	1.49 ± 0.07
OZ: 0.8 ppm	3.19 ± 0.32	2.48 ± 0.25	128 ± 16	1.26 ± 0.13*
OZ: 0.8 ppm + NO ₂ : 0.4 ppm	3.31 ± 0.35	2.53 ± 0.28	126 ± 14	1.24 ± 0.15*
2WS exposure				
Control	5.71 ± 0.34	3.56 ± 0.21	122 ± 11	1.58 ± 0.13
OZ: 0.8 ppm	2.10 ± 0.45**	1.55 ± 0.22**	133 ± 16	1.25 ± 0.12*
OZ: 0.8 ppm + NO ₂ : 0.4 ppm	2.30 ± 0.15**	1.65 ± 0.15**	139 ± 16	1.15 ± 0.13*

mean ± SD, n = 6, *: P < 0.05, **: P < 0.01

三者を比較すると、方式としては3が最も望ましいが、かなり複雑な手順を必要とする。2は圧力の時間的变化に着目している点で、単に圧力レベルのみで判定する1に比較してすぐれていると思われたので、2の方式によりV. S. D.を試作した。この方式によると、図3に示される様に、矩形波入力に対して応答はほとんど同期しているが、正弦波入力の場合は周波数によって作動時間の遅れが変化していく。入力に対する応答の遅れは、電磁弁の駆動が遅れてガス逆流の原因となるが、図4は本方式にとってかなりきびしい正弦波に対する応答（本方式では矩形波が最も応答性が良い）であり、実際の呼吸波形では正弦波より矩形波に近いので、遅れはもっと短縮されると考えられる。

更に、実際の動作状態に近い人工呼吸器による結果をみると、図5に於いて差圧流速計出力 $V_1(I) \cdot V_2(E)$ は、流速が振幅、流速の方向が極性として出力されるので、気管内圧力 $P(T)$ の変化に伴って $V_1(I) \cdot V_2(E)$ がほぼ単一極性の出力を出している事から、呼気・吸気の経路切り換えが適切に行われている（V. S. D.がほぼ完全に動作している事を示唆している）と考えられる。

次に今後考慮すべき問題としては、V. S. D.回路上のキャパシタンス、レジスタンスなどの各定数の最適化による応答範囲の拡大、更に波形により逆流や不安定動作等が発生する場合があるので、先に述べた圧力レベルや波形の変化パターンから呼気相・吸気相を判定する方法をも加味して、動作をより確実なものにする事を検討している。

以上述べた事から、本装置はラットの呼吸生理学に関する研究および代謝の検索のために有用であると考えられる。本装置は吸入した物質の濃度あるいは量が、呼気ガスと吸気ガス濃度の差から計算できるため、有害なガスあるいは他の霧状物質をラットに暴露するのにも有用であると考えられる。

なお、本装置と方式は、特許出願中（受付番号、56-131215）である。

引用文献

- 1) Stround, R., R.E. Forster and E.I. Elisberg (1964): *In* Biological Data Book (ed. by Altman, P.L. and Diltmer, D.S.) Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington, p. 220.
- 2) Amdur, M.O., and J. Mead (1958): Mechanics of respiration in unanesthetized guinea pigs. *Amer. J. Physiol.*, **192**, 364-368.
- 3) Murphy, S.D. and C.E. Ulrich (1964): Multi-animal test system for measuring effect of irritant gases and vapors on respiratory function on Guinea pigs. *Industr. Hyg.*, **25**, 28-36.

3

二酸化窒素吸入時のイヌの呼吸気道内二酸化窒素濃度の変化

Alterations of Nitrogen Dioxide Concentration in Respiratory Tract
of Nitrogen Dioxide Inhaling Dogs

鈴木 明¹・市瀬孝道¹・局 博一¹

Akira K. SUZUKI¹, Takamichi ICHINOSE¹ and Hirokazu TSUBONE¹

要 旨

NO₂呼吸気道内の動態について検討するために、口部、気管部および気道の深度におけるNO₂濃度の変化について検討した。

同一濃度のNO₂を吸入させた場合、気道内のNO₂濃度は吸入したNO₂量に伴って変化し、吸気時・呼気時のNO₂濃度はともに吸入したNO₂量の減少に伴って減少した。また、吸気時のNO₂濃度と呼気時のNO₂濃度の差は、吸入したNO₂濃度に依存して減少した。またNO₂濃度は呼吸気道の深さ(長さ)に伴い低下した。口腔と鼻腔を介しての呼吸では、口腔だけを介する場合の2~3倍、NO₂濃度は高かった。気道内のNO₂濃度は経時的に変化しなかった。

Abstract

To clarify a change of NO₂ concentration in the respiratory tract, the NO₂ concentrations at mouth, trachea and descending tract of anesthetized dog were examined. When the dog was inhaled same concentration of NO₂, NO₂ concentrations in respiratory tract were decreased dependently on the decrease of NO₂ inhaled rate, NO₂ concentrations in inspiratory and expiratory gases were also decreased dependently NO₂ inhaled rate. The difference concentration between inspiratory gas and expiratory gas was decreased depending on the decrease of inhaled gas. NO₂ concentrations in the respiratory tract were lower associated with the depth (length) of respiratory tract. NO₂ concentration inhaled through the oral cavity and nasal cavity was two-three times higher than that through oral cavity only. NO₂ concentration in the trachea was no change with time course.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

はじめに

大気汚染物質中には呼吸器の上部気道を刺激する種々の化学物質が知られている¹⁾。その一つに二酸化窒素 (NO_2) がある。Wagner²⁾ は 0.5～5.0 ppm の NO_2 を吸入させると、正常換気時には吸入量の 81～87% の吸収が起こることを、さらに最大換気時には 90% 以上が呼吸器内に摂取されることを報告した。また Goldstein ら³⁾ は、サルに 0.30～0.91 ppm の N をラベルした $^{13}\text{NO}_2$ を 7～9 分間吸入させ ^{13}N の生体内分布を ^{13}N を追跡することによって調べ、吸入量の 50～60% が呼吸器内に摂取され、血流などを介して肺外に分布することを報告した。一方、Ichioka⁴⁾ はガラス管を使用して気道モデルを作り、 SO_2 の吸収は 96% 以上であるが、 NO_2 のガラスモデルでの吸収は 50% 以下であり、 NO_2 の方が SO_2 より気道内での吸収が少ないことを証明した。近年、太田ら^{5,6)} は $^{14}\text{NO}_2$ を暴露したラットでは組織および血液への分布が早いことを報告し、また Oda ら⁷⁾ は生体内に入った NO_2 は血中で NO_2^- および NO_3^- に変化し、さらに NO_2^- は NO_3^- に変化して尿中に排出されることを報告した。

このように酸化性が高く、生体内分布が早い NO_2 は呼吸器を介して生体内に入るために、呼吸器に病理形態学的^{8,9,10)} および機能的変化^{10,11,12)} を引き起こすことが知られている。

上述したように、吸入された NO_2 の生体内の動態は各種の実験によって明らかにされてきたが、呼吸器内 (特に上部気道) における動態については、 SO_2 などの研究等^{15,16,17,18)} に比較して、少なく不明な点が多い。

そこで、 NO_2 の上部気道における濃度変化を明らかにするために、イヌを用いて、口元部、咽・喉頭部、気管分岐部等の呼気・吸気に伴う NO_2 濃度を測定し検討を加えた。

方 法

雑種成犬 9 頭を用いた、このうち 6 頭は同腹のイヌであった。イヌの平均体重は 15.2 kg (範囲 10～20 kg) で、最大吸気時の胸囲は 58 cm～61.5 cm、胸長 (胸部横隔膜までの長さ) は、35 cm～42 cm、頸長は 7 cm～10 cm、頭部 (鼻端から後頭骨後縁まで) は 22 cm～23 cm で、胸囲および胸長に個体差が大きかったが、頭部および頸長では個体差が小さかった。

イヌにおける本研究にあう暴露方法には、Yokoyama¹⁹⁾ のように人工呼吸器を使う方法と、自発呼吸にまかせる方法がある。前者の場合は、換気量および換気回数そして暴露濃度を任意に変化させられる利点があるが、必ずしも自然の呼吸と一致しないという不利な点がある。逆に後者は、換気回数、吸収時の NO_2 濃度を任意に変えることは難かしいが、自発呼吸というより自然の呼吸に近い状態で呼気・吸気等の NO_2 濃度の変化を知ることができる。

本実験においては、動物にいわゆる負荷ができるだけかからないように考え、イヌの口元にテフロン製 Y ピースを取り付け、Y ピースを流れる流量を NO_2 の流量に関係なく常に 1 l/min とする方法をとった。本実験では 60 ml/min～360 ml/min まで一次希釈 NO_2 ガス量を変化させたが、Y ピースを通過する総量は、1 l/min で、Y ピースでの NO_2 濃度を変化させるには、一次希釈

NO₂ ガス量を増減させることによって行った。したがって一次希釈NO₂ ガス量 360 ml/minの時が最大のNO₂ 濃度を吸入していることになる。この方式では、NO₂ 濃度の調節は難かしいが、動物はより自然様式に近い呼吸を行った。

NO₂ 濃度の測定はすべて Pentobarbital Sodium (Nembutal[®]) 25mg ~30mg/kg 麻酔下で行い、口元部および口元部からカテーテルを挿入する方法と、喉頭部の後方1~2 cmの部位で気管を切開し、気管カニューレを挿入する方法で、口元部および気管部で呼気・吸気に伴うNO₂ 濃度の変化を測定した。さらにテフロン製の気管カテーテルを口元部から深さを測定しながら入れ、NO₂ 濃度の変化を測定した。またNO₂ 濃度の経時的变化を検索するために、80分間にわたり気管のNO₂ 濃度を測定した。

NO₂ 濃度は窒素酸化物測定装置 (モニターラボ・ML-8440H) で測定し、測定器へのガス導入はすべてテフロン製の製品を用いた。また、呼吸に伴う圧力の変化を測定器が直接受けないように、測定部位と測定器の途中に水トラップと圧力調整のためのテフロン容器を取り付けた。

NO₂ ガスは、急性暴露装置 (日本クレア, PT-300A) によって、5000 ppmのNO₂ を静浄空气中で希釈して一次希釈ガスとした。また、本実験では、Yピースを流れるガス量を調節するために、NO₂ 供給側と排気側との間に調節弁を取り付けた。

結 果

1) 口腔部—気管系

前述したように、自発呼吸においてイヌが吸入するNO₂ は口元部を流れる第二次希釈流量すなわちNO₂ の濃度を示すのであって、麻酔したイヌが自発呼吸中に自発的に吸入量を変化させることはできない。しかしながら、Yピースを流れるNO₂ を、複雑な系を介しての暴露のために、最初から設定できないのでこういう方法をとったのである。したがって図1~図5までのNO₂ 流量とはYピースに流れ込むNO₂ 量を示す。

そこで自発呼吸時におけるNO₂ ガス流量 (Yピースでの濃度) と口元部および気道内のNO₂ 濃度について検討した。図1に360 cc/min (53 ppm) と180 cc/ml (34 ppm) のNO₂ を流した時の呼気・吸気に伴うNO_x, NO₂ 濃度を示した。二本の波状波形ではNO_x 濃度とNO₂ 濃度を示し、濃度の高い方 (上方) は吸気時のNO₂ 濃度を、また低い方 (下方) は呼気時の濃度を示し、この差は体内でのNO₂ の吸収等による減少を示すものと推測できる。同一流量 (濃度) のNO₂ を吸入させても口元部と気管部ではNO₂ 濃度に差を生じ、吸入時における差は、口元部から気管までの吸収を示し、呼出時の差は、逆に気管部から口元部までのNO₂ 減少を示すと考えられる。また流量 (濃度) を下げると左図のように、同じ口元部で測定しても50 ppmからおよそ30 ppmへNO₂ 濃度が低下した。口元部におけるNO₂ ガス流量 (濃度) と、NO₂ 濃度の関係を示すと図2のように、呼気、吸気ともに、口部におけるNO₂ ガス流量の減少に伴ってNO₂ 濃度が低下した。このことは、吸入するNO₂ 濃度が低下すると呼気および吸気中のNO₂ 濃度が低下することおよび、吸気と呼気の

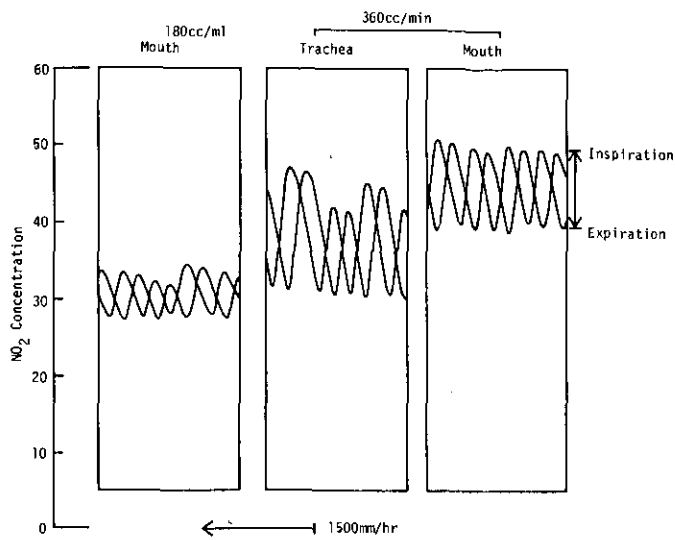


図 . 1 33~53 ppm の NO_2 を吸入させた時の呼吸に伴う NO_2 濃度の変化の 1 例

Fig. 1 Typical patterns of NO_2 concentration at mouth and trachea in anesthetized dog exposed to 33-53 ppm NO_2

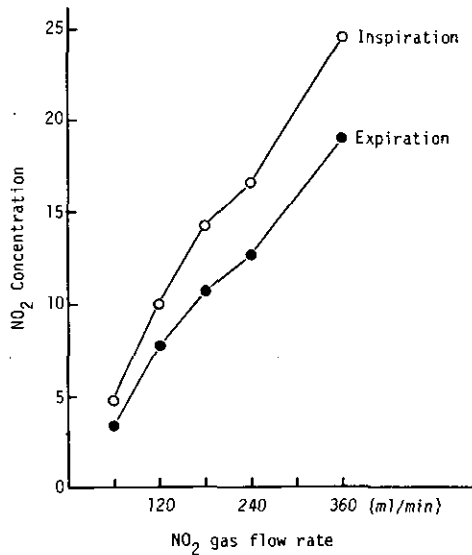


図 2 NO_2 の吸入量 (5~25 ppm NO_2) と口元部における吸気と呼気の NO_2 濃度

Fig. 2 Changes of NO_2 concentrations in inspiration and expiration at mouth associated with NO_2 gas flow rate (5 - 25 ppm NO_2)

NO₂ 濃度差が小さくなることが明らかに示された。同様のことは、図3に示すように気管部での測定についても確認された。さらに吸気と呼気の濃度差は口元部で測定した場合に大きいことから、この差は、口元測定部より深部（気管-気管支-細気管支-肺胞？）でのNO₂ 吸収が大きいことを示唆している。そして、その吸収の程度はNO₂ 濃度が低下すると減少することを示している。図4は、口部における呼気と吸気のNO₂ 濃度を気管部との濃度差で示した。いずれの吸入濃度の場合

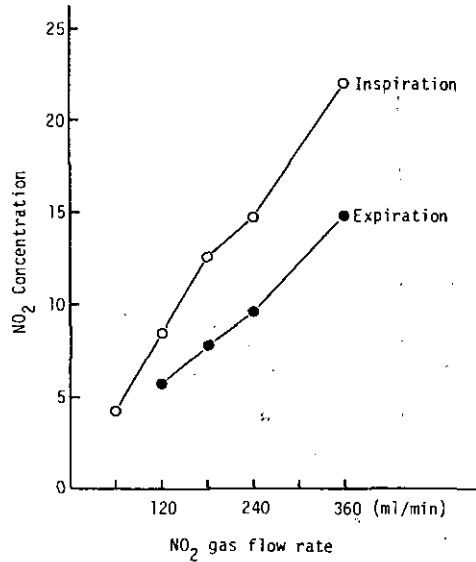


図 3 NO₂ の吸入量 (5~25 ppm) と気管における吸気と呼気のNO₂ 濃度
 Fig. 3 Changes of NO₂ concentrations in inspiration and expiration at trachea associated with NO₂ gas flow rate (5 - 25 ppm)

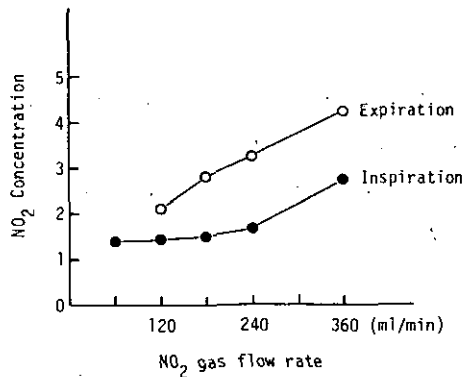


図 4 口部と気管部におけるNO₂ の濃度差
 Fig. 4 Difference of NO₂ concentrations between mouth and trachea

合も呼出時の NO_2 濃度が吸入時の NO_2 濃度より高いことを示した。このことは、気管-口元間においては、呼気時の NO_2 の吸収が少なく、吸気時の NO_2 の吸収が大きいことを示している。この現象は、一般的に呼吸様式が一樣と限らず吸気時が早く短く、逆に呼気時等が遅く長いことを考えると理解できよう。図5には、気管部と口元部における吸気と呼気の濃度差を示した。気管部における NO_2 濃度差はいずれの流速（濃度）においてもつねに大きかった。この口部での NO_2 濃度が低いことは、口部の方が気管部より、 NO_2 の通る経路が長いことから理解できる。

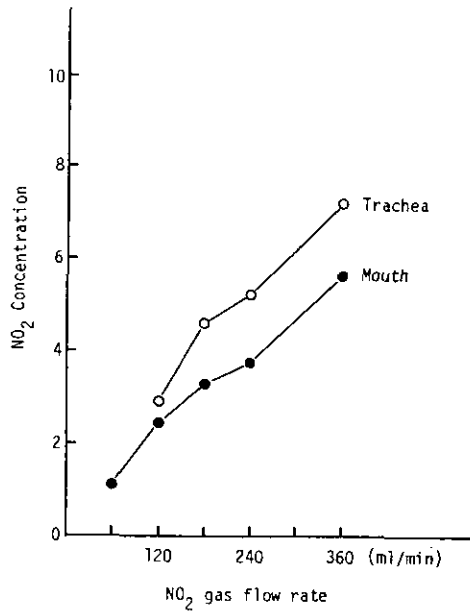


図 5 吸気と呼気の NO_2 の濃度差

Fig. 5 Difference of NO_2 concentrations between that of inspiration and that of expiration

次に、気道の深さ（長さ）と NO_2 濃度との関係を図6に示した。この図で明らかなように口元からの深さ（長さ）が大きくなるとともに NO_2 濃度は低下した。図の下部におおよその気道部位を示した。 NO_2 濃度の減少様式は、一樣ではなく喉頭部より深くなると NO_2 濃度の減少が大きくなり左右に気管が分岐する部位ではかなり低下することを示していた。

2) 鼻腔および口腔と気管系

以上述べてきたことは、口部にテフロン管を継ぎ、口腔部を通過する呼気・吸気の NO_2 濃度の変化に関するものである。しかしながら、動物によっては、鼻腔経由の呼吸が主たるものと、口腔経由の呼吸が主たるものがある²⁰⁾ことは周知の通りである。頭部における呼吸路としては鼻腔と

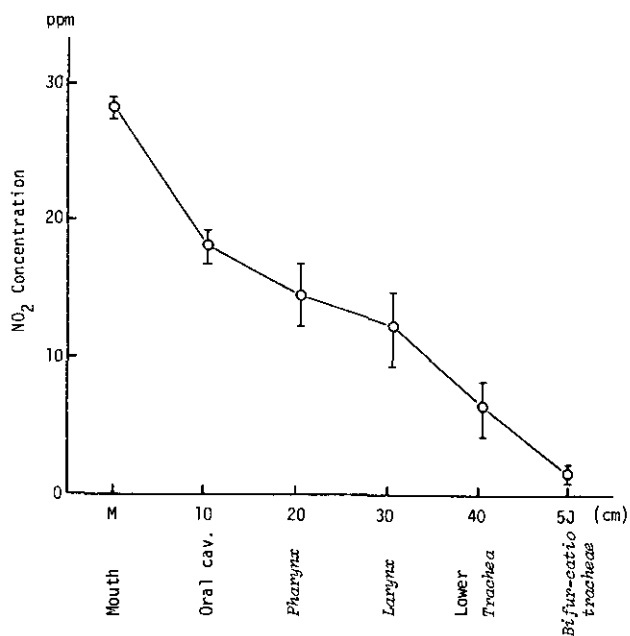


図 6 呼吸気道の深さ（長さ）に伴う NO₂ 濃度の変化
 Fig. 6 Change of NO₂ concentrations associated with the deepness (length) of respiratory tract

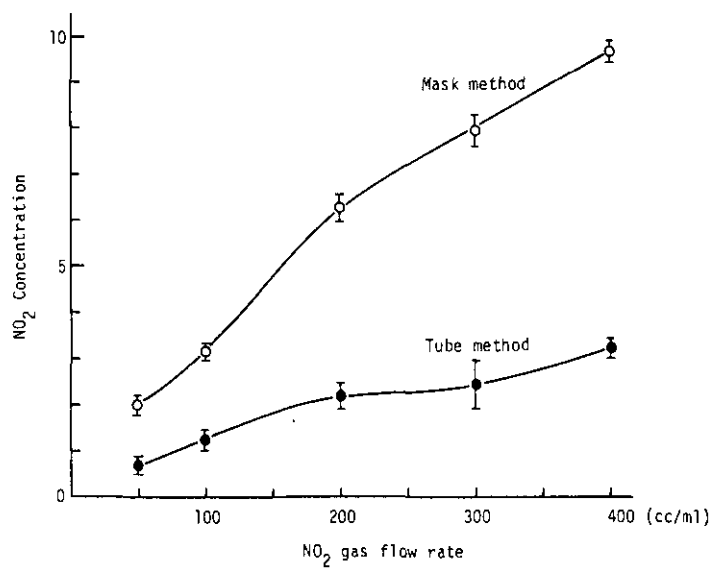


図 7 マスク法とチューブ法における NO₂ 濃度の変化
 Fig. 7 Change of NO₂ concentrations at mask method or tube method

口腔の2通りあるので、特別なイヌ用マスクを開発し、鼻腔、口腔の両方を通過する時の濃度と、口腔だけを通過する時のNO₂濃度を気管部で測定した。イヌにマスクをした場合には、口を閉じてしまうために、上歯と下歯の間に直径3cm、長さ6cmのテフロン管を狭み込んだ。これを後述のマスク法に対応させてチューブ法とした。マスク使用の場合、すなわち、鼻腔と口腔を通過する場合には、口腔だけを通過する場合よりもNO₂濃度は明らかに高いことを示した。マスク使用時の濃度とチューブだけでの濃度の比率を計算すると、口腔だけで呼吸した場合に比較して、口腔および鼻腔を介しての呼吸の場合には2～3倍の高い濃度のNO₂が体内に入ること示唆した。

3) 経時的变化

図8は、NO₂濃度の経時的变化を80分間にわたり気管部で測定したものである。この図では、上方の線と下方の線は呼気・吸気の変動範囲を示している。20～30分後に一時的な変化が観察されたが、全般的にみると、ほぼ安定した経過をたどり、吸入時間の経過に伴ってNO₂濃度が変化することがないことが明らかとなった。

図9は、イヌの頭部から胸・肺部にかけての断面図と、剖検図を参考のために示した。

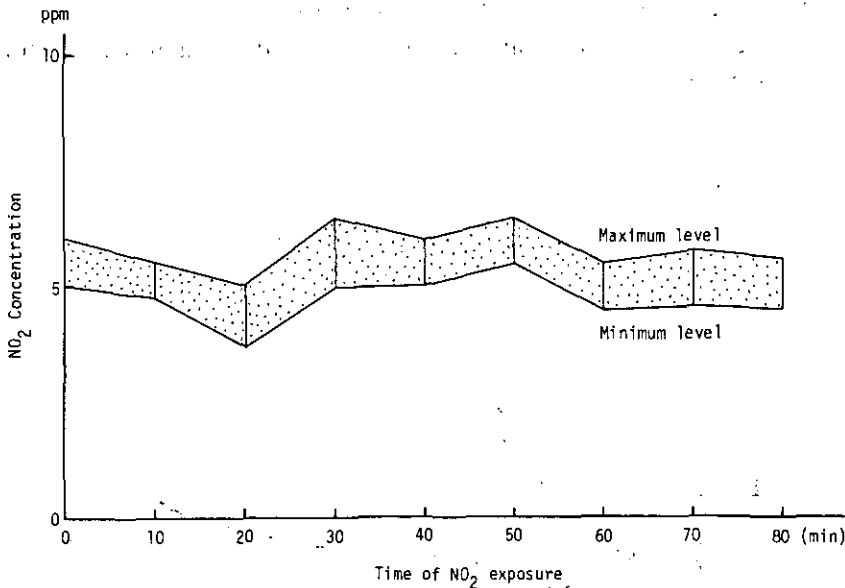


図 8 NO₂濃度の経時的变化
Fig. 8 Change of NO₂ concentration during NO₂ exposure

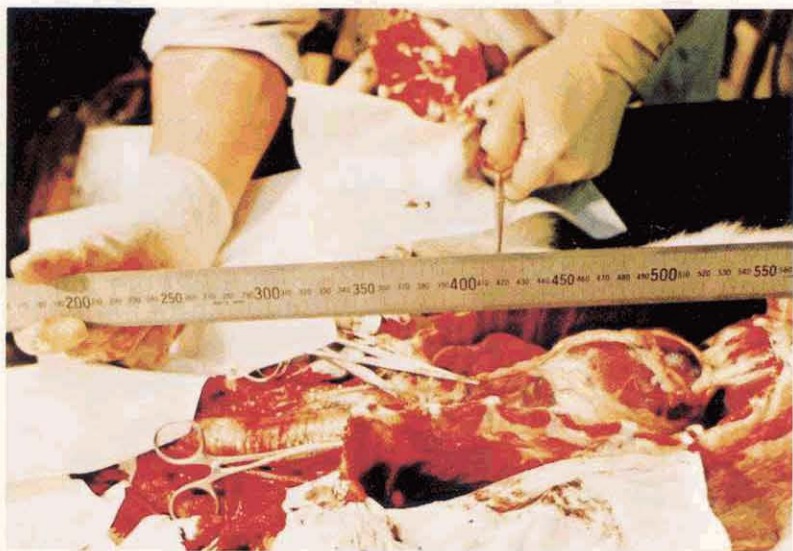
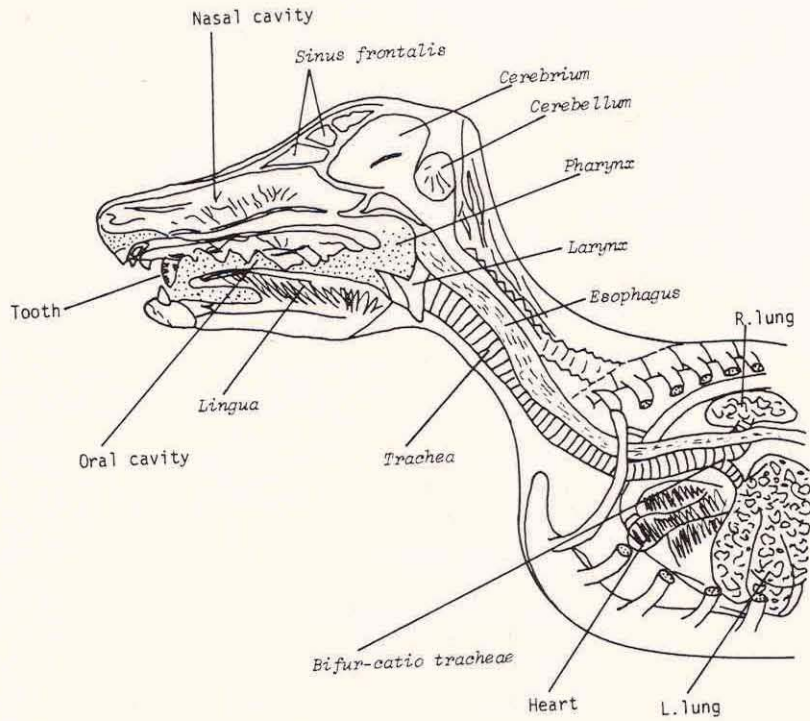


図 9 イヌの断面図と剖検図

Fig. 9 Illustrations of the vertical section and the autopsy

考 察

荻間²¹⁾によると大気汚染物質として、一次性汚染物質と、 O_3 、アルデヒド、PAN、アクロレイン等の二次性汚染物質が考えられるという。そして一次性汚染物質には、硫黄酸化物(SO_2 、 H_2S 、等)、窒素酸化物(NO 、 NO_2 、 N_2O_5 、 NH_3)等がある。これらのうち SO_2 は上部気道での吸収が多いため、疾患との関係から上部気道での吸収等の動態に関する研究は多い^{15,16,17,18)}、Amdur¹⁴⁾は、モルモットに SO_2 を吸入させて換気力学的手法により dose-response の関係を探り、0.16～835 ppm の濃度において直線的関係があることを報告した。また、Yokoyama¹⁹⁾はイヌ(3.5 l/min)およびウサギ(0.75 l/min)の遊離上部気道を使って上部気道での通過率は NO_2 で58%であり SO_2 (7～87 ppm)の6%より明らかに高いことを示した。一方、Yokoyama¹⁶⁾、Frank¹⁷⁾はラジオアイソトープを使用して SO_2 の上部気道での吸収について詳細に研究している。

上述したように、 SO_2 等の上部気道に関する研究に比較して NO_2 での研究は遅れているといわざるをえない。

近年、アイソトープを使用した実験^{5,6)}および、血中 NO_2^- 、 NO_3^- を測定した実験⁷⁾によって、 NO_2 の生体内における動態が明らかにされつつある。しかし、 NO_2 が末梢気道を経て体内に入り込むことから、 NO_2 の生体内での動態に注目が集まり、上部気道における NO_2 の濃度の変化については報告が少ないといえる。

一方、 NO_2 の生体への影響の程度は、動物種、系統などによって異なることが報告されている^{22,23)}。また、動物によって呼吸器の解剖学的構造が異なることも明確になっている¹³⁾したがって、種間の影響の違いを論ずる場合、吸入実験である限り、呼吸気道における NO_2 の動態を知るべきであると考え、今回は、イヌの上部気道における自発呼吸下の各種条件下の NO_2 濃度の変化について検討したわけである。

本実験において、呼気・吸気の NO_2 の濃度差および口元と気管との濃度差は、気道表面での吸収、吸着、また浮遊水分との化学反応などによる NO_2 濃度の減少等を示していると考えられる。

イヌに NO_2 を吸入させた場合、吸入濃度が同一であっても気道内の NO_2 濃度が低下し、その低下の程度は口元から遠ざかるほど大きく、気管分岐部では口元の NO_2 濃度の約1/10の濃度まで低下することが明らかとなった。このことは、口腔を経て気管分岐部までに約90%の NO_2 が上部気道において吸収されることを示し、Yokoyama¹⁹⁾およびIchiokaのモデル実験⁴⁾結果より吸収率が大きかった。この原因としては、動物の大きさ、実験条件の違い等が考えられる。

また、気道内の NO_2 濃度は、吸入濃度に依存しており、この傾向は、吸気時および呼気時においても認められた。このことは上部気道での吸収率が吸収した NO_2 濃度によって異なることを示し、 NO_2 の反応が口腔あるいは上部気道内の浮遊水分含量によって異なる⁴⁾ことを示唆した。

頭部における気道には口腔経由と鼻腔経由の2通りがあり、動物種によって異なる²⁰⁾といわれている。安静時には鼻腔経由で呼吸し、運動中には両者を経由して呼吸活動が行われるのが一般的である。口腔経由だけの NO_2 濃度は、鼻腔と口腔経由の場合の約30～40%と低く、口腔および鼻腔経

由では、口腔經由だけと比較して2～3倍の高濃度のNO₂が気道内に入り込むことが推測される。一般に鼻腔内にはヒダ状の鼻甲介があり、外気から入る物質の各種の防御の働きや、神経反射による有害物質の排除の働きをもっており²¹⁾、神経性の反射は気管の収縮等に直接的に作用する²⁴⁾といわれている。口腔は舌と上顎との間のすき間で、それほど異物に対する感受性は神経性反射を除くと高くないと推測される。にもかかわらず、NO₂の口腔および鼻腔經由の結果は鼻腔でのNO₂濃度の減少が少ないことを示し、NO₂暴露の場合、口腔中心の呼吸様式をした方がよいように考えられた。

また、同一部位でNO₂濃度を経時的に測定した場合、多少の変動を認めたものの、ほぼ一定の範囲内にあり、暴露後80分間にかぎって言えば、吸入濃度の経時変化はないと考えられた。

今回は、口腔および鼻腔から気管分岐部までの検索にとどまったが、これより深部の検索は技術的に困難な点が多い。また、動物実験の結果をヒトに外挿するためには動物種の特異性について検討する必要がある。Tyler¹³⁾らは、動物の呼吸器系を解剖学的特徴からI型；ウシ、ヤギ、ブタの肺、II型；サル、イヌ、ネコの肺、III型；ウマ、ヒトの肺、IV型；ウサギ、ラット、モルモットの肺、の四つのタイプに分け、呼吸器の構造でヒトに一番近いのはウマであることを報告し、他の生理学的、病理学的特徴についても検討すべきであると述べている。また、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモットおよびラットについて換気力学的に比較した報告^{25,26,27)}がある。いずれにしても今後実験を積重ねることによって、種、系統間の差を明確にしていく必要があると考えられた。

引用文献

- 1) Alarie, Y. and F. Church (1966): Irritating properties of air born materials to the upper respiratory tract, Arch. Environ. Health, 3, 433-449.
- 2) Wagner, H. (1970): Absorption von NO und NO₂ in MIK- und MAK-Konzentrationen beider Inhalation. Staub-Reinhalt, Luft, 30, 380-381.
- 3) Goldstein, E., N.F. Peek, N.J. Parks, H.H. Hines, E.P. Steffey and B. Tarkington (1977): Fate and distribution of inhaled nitrogen dioxide in rhesus monkeys, Am. Rev. Respir. Dis., 115, 403-412.
- 4) Ichioka, M. (1972): Model experiments on absorbability of the air way mucus membrane of SO₂ and NO₂ gases. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., 10, 361-375.
- 5) 太田庸起子・脇坂一郎 (1979): 安定同位体二酸化窒素の生体内移行. 産業医学, 21, 707-708.
- 6) Ohta, Y., M. Yamada, Y. Yoneyama and A.K. Suzuki (1981): Dynamic study on animal experiments using nitrogen dioxide of stable isotope (¹⁵N₂). Fourth International Conference on Stable Isotopes, Jülich.
- 7) Oda, H., H. Tsubone, A.K. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentration in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide, Environ. Res., 25, 294-301.
- 8) Stephens, R.J., G. Freeman, S.C. Crane and N.J. Furioli (1971): Ultrastructural changes in the terminal bronchiola of rat during continuous low-level exposure to nitrogen dioxide. Exp. Mol. Path., 14, 1-19.
- 9) Stephens, R.J., G. Freeman and M.J. Evans (1972): Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide-light and electron microscopy. Arch. Environ. Health, 24, 160-179.
- 10) Freeman, G., R.J. Stephens, S.C. Crane and N.J. Furioli (1968): Lesion of the lung in rats continuously exposed to two parts per million of nitrogen dioxide. Arch. Environ. Health, 17, 181-192.

- 11) 横山栄二 (1968) : SO₂とNO₂およびO₃の換気能に及ぼす影響の比較—モルモットにおける暴露実験. 産業医学, 11, 563-568.
- 12) Murphy, S.D., C.E. Ulrich, S.H. Frankowitz and C. Xintaras (1964): Altered function in animals inhaling low concentrations of ozon and nitrogen dioxide, Am. Ind. Hyg. Ass. J., 25, 246-253.
- 13) Tyler W.S., R.F. McLanghlin JR. and R.O. Canada (1967): Structural Analogues of the respiratory system. Arch. Environ. Health, 14, 62-69.
- 14) Amdur, M. (1966): Respiratory absorption data and SO₂ dose-response curve. Arch. Environ. Health, 12, 729-732.
- 15) Speizer, F.E. and N.R. Frank (1966): The uptake and release of SO₂ by the human nose. Arch. Environ. Health, 12, 725-728.
- 16) Yokoyama, E., R.E. Yoder and N.R. Frank (1971): Distribution of ³⁵S in the Blood and its excretion in urine of dogs exposed to ³⁵SO₂. Arch. Environ. Health, 22, 389-395.
- 17) Frank, N.R., R.E. Yoda and J. Brain (1969): SO₂ (³⁵S labeled) absorption by the nose and mouth under condition of varying concentration and flow. Arch. Environ. Health, 18, 315-322.
- 18) Balchum, O.J., J. Dybicki and G.R. Meneely (1960): Pulmonary resistance and compliance with concurrent radioactive sulfur distribution in dogs breathing ³⁵SO₂. J. Appl. Physiol., 15, 62-66.
- 19) Yokoyama, E. (1968): Uptake of SO₂ and NO₂ by the isolated airways. Bull. Inst. Publ. Health, 17, 302-306.
- 20) Halpern, M. and R.B. Schlesinger (1980): Simple oral delivery device for inhalation exposure of rabbits to aerosols. J. Toxicol. Environ. Health, 6, 751-755.
- 21) 荻間 勇 (1977) : 大気汚染と呼吸器. 大気汚染研究, 11, 371-377.
- 22) 竹中参二・堀内博人・河村涼子・寺尾恵二・清水不二雄・久保田憲太郎 (1978) : NO₂ 高濃度暴露に対するラット, マウス, ハムスターおよびモルモットの感受性について. 日衛誌, 33, 104.
- 23) 市瀬孝道・嵯峨井 勝・鈴木 明・局 博一・織田 肇・久保田憲太郎 (1980) : NO₂ 暴露に対するマウス系統間の感受性の相違と肺の酵素的防御機構の役割について. 第21回大気汚染学会, 711.
- 24) Angell James, J.E. and M. Burgh Daly (1972): Reflex respiratory and cardiovascular effects of stimulation of receptors in the nose of dog. J. Physiol., 220, 673-696.
- 25) Agostoni, E., F.F. Thimm and W.O. Fenn (1959): Comparative features of the mechanics of breathing. J. Appl. Physiol., 14, 679-683.
- 26) Crosfill, M.L. and J.G. Widdicombe (1961): Physical characteristics of the chest and lungs and the work of breathing in different mammalian species. J. Physiol., 158, 1-14.
- 27) Drorbauch J.E. (1960): Pulmonary function in different animals. J. Appl. Physiol., 15, 1069-1072.

4

一酸化窒素および二酸化窒素の生体内挙動

Fate of Inhaled Nitric Oxide and Nitrogen Dioxide

織田 肇¹・永澤節子²・局 博一¹・鈴木 明¹

Hajime ODA¹, Setsuko NAGASAWA², Hirokazu TSUBONE¹ and Akira K. SUZUKI¹

要 旨

NOおよびNO₂の生体内挙動を明らかにするために、ガス暴露したラットの血液中、尿中のNO₂⁻、NO₃⁻を定量し、血液へのとり込み、血液中での変化、尿中への排出を検索するとともに、NaNO₂、NaNO₃液をラットに注入し、ガス暴露の実験的シミュレーションを行い、さらに薬動学的シミュレーションによって各種のパラメーターの推定を試みた。

40 ppmのNO₂を暴露すると、暴露開始後血液中のNO₂⁻、NO₃⁻はともに増加したが、NO₂⁻は30分後にはほぼ一定となり、一方NO₃⁻は4時間後でも多少の増加傾向を示した。暴露1時間後ラットを室内に移すとNO₂⁻、NO₃⁻濃度は減少し、半減期はNO₂⁻で約15分、NO₃⁻で約60分であった。

40 ppmのNO暴露では、NO₂⁻の量はNO₂暴露と比較して少量であったが、時間的推移はNO₂暴露と同様であった。NO₃⁻もNO₂暴露の場合とほぼ同様な経過をたどった。

5, 10, 20, 40 ppmのNOまたはNO₂を1時間暴露した時、血液中のNO₂⁻、NO₃⁻は、NO₂濃度に対し非直線的な増加傾向を示し、NO暴露の場合は直線的であった。

NO₂⁻、NO₃⁻を血液内に連続的に注入すると、300 μg/ml NO₂-Nを1 ml/時間で注入した場合のNO₂⁻とNO₃⁻の挙動はラットに40 ppmのNO₂を暴露した場合の値と近似していた。

*in vitro*で37°Cの血液とNaNO₂またはNaNO₃を反応させると、NaNO₂では時間とともにNO₂⁻は減少してNO₃⁻の増加が認められた。NaNO₃ではNO₃⁻には変化がみられなかった。

尿中へのNO₃⁻の排出は、NOおよびNO₂の1時間暴露後、約0-8時間前後まで多量に行われ、24時間以内にそのほとんどすべてが排泄された。NO₂⁻は検出されな

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 東邦大学理学部化学科
Toho University, Faculty of Science.

った。

以上の成績に基づいて、NO₂の生体内動態が推測された。

Abstract

In order to elucidate the fates of inhaled NO and NO₂, rats were exposed to these gases and nitrite and nitrate in blood and urine were measured. When rats were exposed to 40 ppm NO₂ nitrite in the blood became constant in 30 min, while nitrate increased even after 4 hours with the higher concentration than nitrite. When rats were removed to room air, nitrite and nitrate in the blood declined with a half-life of 15 and 60 minutes, respectively. Blood of rats exposed to 40 ppm NO showed similar changes to those in NO₂ exposure; however the concentration of nitrite was lower than in NO₂ exposure. In urine of the rat exposed to the gases, only nitrate was detected. The excretion continued for 24 hours after the exposure. Dose dependence of nitrite and nitrate in the blood of rats exposed to NO or NO₂ at the concentrations ranging 5 to 40 ppm for one hour were also determined. Dose-response curve was linear in NO exposure and bent in NO₂ exposure. Nitrite or nitrate was administrated continuously via femoral vein of a rat and the concentration of the ions in the blood were measured. Their changes in the case of nitrite administration was similar to those by NO₂ exposure, which indicated that this method can be used as the experimental simulation of the effect of NO₂ exposure on blood. The changes of the ions in the blood was mathematically simulated based on the simple fate model and the fates of NO and NO₂ were discussed.

はじめに

窒素酸化物の健康影響に関する研究では、地域の住民を対象とした疫学調査、志願者による人の吸入実験の他に、マウスやラットなどの動物を用いて、肺の病理学的、生化学的变化、肺機能の変化、免疫学的影響、あるいはオゾンとの複合影響について詳細な検索がされている。

一方、吸入された窒素酸化物の生体内での挙動を知るとは、その毒性を理解するために必須のものである。一酸化窒素(NO)および二酸化窒素(NO₂)については、これまで安定同位体元素である¹⁵Nを含む¹⁵NO¹⁾、¹⁵NO₂²⁾のラットを用いた暴露実験、放射性同位体元素である¹³N(半減期10分)を含む¹³NO₂をサルに暴露した実験³⁾などによってその生体内挙動が研究されている。またNO₂を暴露したウサギの血液中のNO₂⁻、NO₃⁻イオンの定量も行われている⁴⁾。著者らは既報⁵⁾において、NO₂に暴露したマウスの血液中のNO₂⁻、NO₃⁻の経時的変動とガス濃度に対する量-効果関係を明らかにし、同時に実施した各イオンと血液の*in vitro*における反応の解析とあわせて、NO₂の生体内挙動に関する研究を行った。

本研究では、NOおよびNO₂の生体内挙動をより詳細に明らかにするために、これらのガスを暴露したラットの血液中、尿中のNO₂⁻、NO₃⁻を定量し、血液中への窒素酸化物のとりこみ、血液中での変化、尿中への排泄の様子を検索した。またNaNO₂、NaNO₃をラット体内に連続的に注入することにより、ガス暴露の実験的シミュレーションを行った。さらにこれらイオンについて挙動モデ

ルを作り、実験データと対比することにより、血液中での挙動に関係する各種のパラメーターを推定した。得られた成績に基づいて、NOとNO₂の生体内運命に関する考察も行った。

方 法

1. ガス暴露

動物は4週令のJCL : Wistar系雄ラットを用いた。NO₂暴露のために窒素バランスの5000 ppm NO₂を浄化空気です定の濃度に希釈し、22±1℃に保った400 lのチャンバー(日本クレア製)内でラットに暴露した。また、NO暴露では、窒素バランスのNOを標準ガス希釈装置(モニターラボ社製)を用いて浄化空気です希釈した後、混在するNO₂量をできるだけ少量にするために、6 lのチャンバー内に急速にガスを導入した。この場合、NO₂の混在はNO濃度(ppm)の2-3%であった。チャンバー内ガス濃度は化学発光法窒素酸化物測定器(モニターラボ社製, ML-8440 H)により測定した。

2. NO₂⁻, NO₃⁻の定量

採血はラットの眼窩静脈より可及的速やかに行い、血液中のNO₂⁻, NO₃⁻の測定は既報⁵⁾のとおりに行った。

尿については、あらかじめ適当に希釈し、Blank値を測定した後に、血液の場合と同様にNO₂⁻, NO₃⁻を定量した。

3. NO₂⁻, NO₃⁻の血液内注入実験

NO₂⁻, NO₃⁻の血液中での変化を観察するため、NaNO₂あるいはNaNO₃の注入実験を行った。ラットはJCL-Wistar雄ラット(8週令)を用いた。図1に示すように、ヘパリンを静注して血

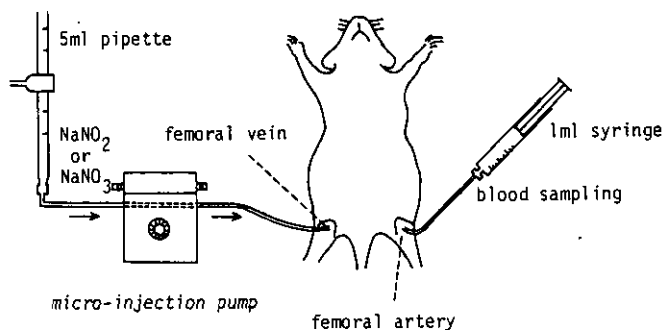


図 1 NaNO₂ および NaNO₃ 溶液の注入と採血方法

Fig. 1 Method of continuous administration of NaNO₂ and NaNO₃, and blood sampling

液凝固を阻止したラットの左大腿静脈に薬液注入ポンプを接続し、 $300 - 1200 \mu\text{gNO}_x\text{-N/ml}$ の NaNO_2 または NaNO_3 (生理食塩水中) を 1 ml/時間 の速度で連続的に注入し、一定時間ごとに右大腿動脈からディスポーザブル注射筒で採血を行った。その後、前述の方法により血液中の NO_2^- , NO_3^- を測定した。

4. *in vitro* での NO_x^- と血液の反応

新鮮なラットの血液 0.45 ml に $40 \mu\text{gNO}_x\text{-N/ml}$ の NaNO_2 あるいは NaNO_3 $50 \mu\text{l}$ を添加し 10 分ごとに、 NO_2^- , NO_3^- の量を測定した。

5. 薬動力学的モデル

実験結果を解析するために、体内に入った NO , NO_2 の運命を図 2 のように考え、各種パラメータを与えて微分方程式をたて、実験データに合致するように各々の値を求めた。

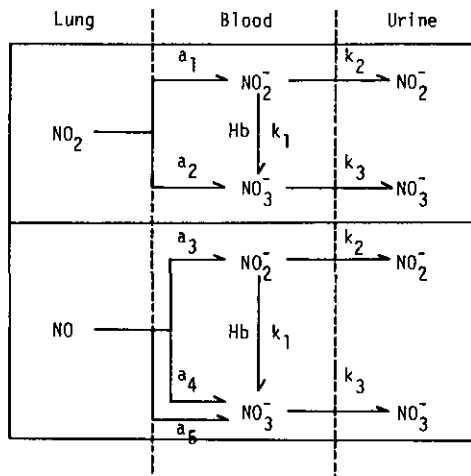


図 2 NO_2 および NO の生体内挙動モデル

Fig. 2 Models and parameters of the fates of inhaled NO and NO_2

NO_2 は肺から血液中に入ると溶解して NO_2^- と NO_3^- になると考え、ガスが一定濃度の場合、時間あたりの NO_2^- , NO_3^- の一次生成量は一定と仮定してそれぞれ $a_1, a_2 (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$ とおいた。次いで、Hb による NO_3^- の NO_2^- からの生成は後述の *in vitro* の血液と NO_2^- の反応の結果より一次反応とみなされるところから反応速度定数 $k_1 (\text{min}^{-1})$ とした。 NO_2^- , NO_3^- の尿中への排泄の速度定数をそれぞれ k_2, k_3 とした。ただし、今回の実験結果では、尿中に NO_2^- は検出されなかったので $k_2=0$ とおいた。微分方程式を書くと、

$$\frac{d(\text{NO}_2^-)}{dt} = a_1 - k_1 (\text{NO}_2^-) \quad (1)$$

$$\frac{d(\text{NO}_3^-)}{dt} = a_2 + k_1 (\text{NO}_2^-) - k_3 (\text{NO}_3^-) \quad (2)$$

血液中の NO_2^- , NO_3^- について対照群すなわち $t = 0$ の時, NO_2^- は血液中に全く検出されないが, NO_3^- は, ある程度の濃度が検出される。そこで, これを一定 ($= c$) と仮定した。(2)式の (NO_3^-) 濃度を (NO_3^-)_{Exposed} とすると NO_3^- の総量 (NO_3^-)_{Total} は下記に示す式で表現できる。

$$(\text{NO}_3^-)_{\text{Total}} = (\text{NO}_3^-)_{\text{Exposed}} + c \quad (3)$$

$t = 0$ の時 (NO_2^-) = 0, (NO_3^-)_{Exposed} = 0 の初期条件において連立微分方程式を解くと

$$(\text{NO}_2^-) = \frac{a_1}{k_1} (1 - e^{-k_1 t}) \quad (4)$$

$$(\text{NO}_3^-)_{\text{Total}} = \frac{a_1 + a_2}{k_3} (1 - e^{-k_3 t}) + \frac{a_1}{k_1 - k_3} (e^{-k_1 t} - e^{-k_3 t}) + c \quad (5)$$

暴露を中止した場合, t' 分後の NO_2^- , NO_3^- の量は, 中止時の NO_2^- , NO_3^- 量をそれぞれ n_1 , n_2 とおくと下記の通りになる。

$$(\text{NO}_2^-) = n_1 e^{-k_1 t'} \quad (6)$$

$$(\text{NO}_3^-) = \frac{n_1 k_1}{k_1 - k_3} (e^{-k_3 t'} - e^{-k_1 t'}) + (n_2 - c) e^{-k_3 t'} + c \quad (7)$$

一方, NO 暴露の場合は, 血液中での NO_2^- , NO_3^- の一次生成速度をそれぞれ a_3 , a_4 とし, 一方ガス状 NO と Hb が結合して NOHb が生成し, これに酸素が反応して MetHb と NO_3^- になる一連の経路 (図13参照) から生成する NO_3^- の生成速度を時間当り一定であると仮定して a_5 とした。 NO_2^- の場合と同様に k_1 , k_3 をおき微分方程式をたてると,

$$(\text{NO}_2^-) = \frac{a_3}{k_1} (1 - e^{-k_1 t}) \quad (8)$$

$$(\text{NO}_3^-)_{\text{Total}} = \frac{a_3 + a_4 + a_5}{k_3} (1 - e^{-k_3 t}) + \frac{a_3}{k_1 - k_3} (e^{-k_1 t} - e^{-k_3 t}) + c \quad (9)$$

となる。

暴露を中止した場合, t' 分後の値は

$$(\text{NO}_2^-) = n_1 e^{-k_1 t'} \quad (10)$$

$$(\text{NO}_3^-) = \frac{n_1 k_1}{k_1 - k_3} (e^{-k_3 t'} - e^{-k_1 t'}) + (n_2 - c) e^{-k_3 t'} + c \quad (11)$$

NO_2^- , NO_3^- の注入については、(1)(2)式において、 NO_2^- 注入で $a_2 = 0$, NO_3^- 注入で $a_1 = 0$ として計算した。計算及びプロットは、YHPパーソナルコンピュータ(9830 B)と日立大型電子計算機HITAC-M180を用い、計算は最小2乗法とPowellの共役傾斜法を使用した。

結 果

1. ガス暴露による血液中 NO_x^- の経時的变化

ラットを40 ppmの NO_2 に暴露開始後、一定時間ごとに2匹ずつ取り出し可及的速やかに採血を行った。暴露は4時間まで行った。また1時間暴露後、何匹かのラットは室内空气中に放置し、その後同様に一定時間ごとに2匹ずつ採血した。図3に、血液中の NO_2^- , NO_3^- の変動を示した。図中の各点は2匹の値の平均値である。

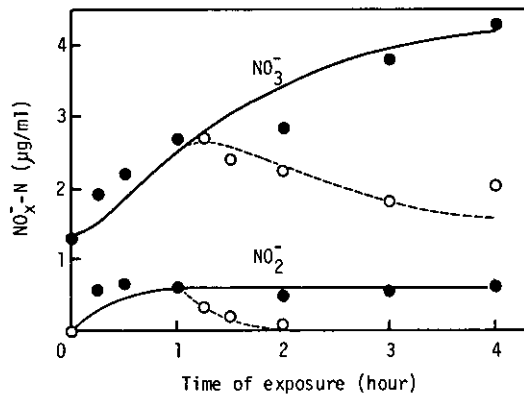


図 3 40 ppm NO_2 暴露時の血中 NO_2^- , NO_3^- 濃度の変化

Fig. 3 Changes of NO_2^- and NO_3^- concentrations in the blood of rats exposed to 40 ppm NO_2

Each point represents the mean value of two rats, ●: during exposure, ○: after one hour exposure, —: simulated curve during exposure, - - -: simulated curve after one hour exposure.

対照群では、 NO_2^- は検出されなかったが、 NO_3^- は平均 $1.3 \mu\text{g NO}_3^- \text{N/ml}$ の値を示した。暴露開始後血液中の NO_2^- と NO_3^- は次第に増加し NO_2^- は30分後にほぼ一定の値になり、一方、 NO_3^- は4時間後でも多少の増加を続けた。

また、1時間後、チャンバーから室内に移したラットの血液中の NO_2^- , NO_3^- 濃度は減少し、対

照群の値に近付いていった。その半減期は NO_2^- で約15分、 NO_3^- で約60分であった。

図中の実線は暴露中の NO_2^- 、 NO_3^- の実測値に理論式を最小2乗法でフィットさせたものである。計算の際 NO_2^- の暴露中止後の減少データおよび後述の*in vitro*における NO_2^- とHbの反応の実験結果より、Hbによる NO_2^- の NO_3^- への変換の半減期を15分、すなわち $k_1 = 0.0462 \text{ min}^{-1}$ ($k = \ln 2 / t_{1/2}$)とし、 NO_3^- の減少のデータから k_3 については半減期60分、すなわち $k_3 = 0.0116 \text{ min}^{-1}$ とした。また、初期値として $c = 1.3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ を与えた。最小2乗法で計算すると、もっとも近似の曲線を与える値として $a_1 = 0.03 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $a_2 = 0.05 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ が得られた。点線は暴露中止後の濃度変化について同様の計算を行った結果である。

40 ppmのNO暴露を行った結果を図4に示した。図中の各点は2匹の値の平均値である。 NO_2^- の量は NO_2 暴露に比較して少量であった。 NO_3^- は NO_2 暴露の場合とほぼ同様の経過をたどった。これらの結果から NO_2 暴露の場合と同様、 $k_1 = 0.0462 \text{ min}^{-1}$ 、 $k_3 = 0.0116 \text{ min}^{-1}$ とし、 $c = 1.2 \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ の値を与えてモデルに基づく計算をした。その曲線は図中に実線と点線で示した。もっとも近似の曲線を与える値として、 $a_3 = 0.006 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $a_4 + a_5 = 0.022 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ が得られた。

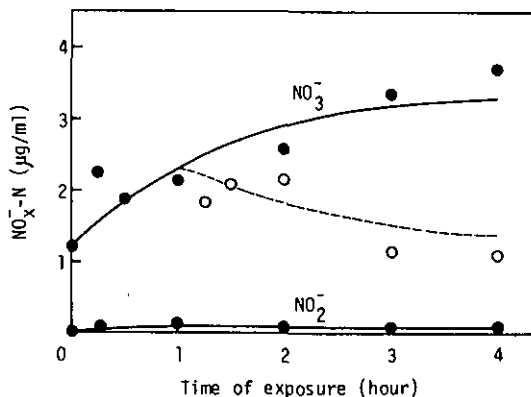


図 4 40 ppm NO暴露時の血中 NO_3^- 、 NO_2^- 濃度の変化

Fig. 4 Changes of NO_2^- and NO_3^- concentrations in the blood of rats exposed to 40 ppm NO

Remarks are the same as in Fig. 3.

2. 血液中の NO_x^- 濃度の暴露濃度依存性

5, 10, 20, 40 ppmの NO_2 またはNOを各3匹ずつ1時間暴露し、 NO_2^- 、 NO_3^- を測定した。図5に示したように NO_2 を暴露した場合は、 NO_2^- と NO_3^- 濃度の増加は NO_2 濃度に対して非直線的な傾向を示し、一方、NOを暴露した場合は NO_2^- 、 NO_3^- ともNO濃度に対しほぼ直線的な関係を示した。血液中の NO_2^- 、 NO_3^- は、 NO_2 暴露の方がNO暴露の場合よりも多量に観察された。

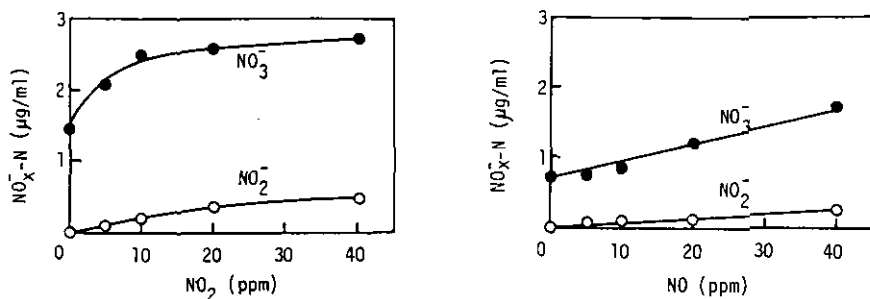


図 5 1時間暴露時の NO_2 および NO 濃度と血中 NO_2^- , NO_3^- 濃度の量-反応関係
 Fig. 5 Dose dependence of NO_3^- and NO_2^- in the blood of rats exposed to NO_2 or NO at 5 - 40 ppm for 1 hour
 Each point represents the mean value of 3 rats.

3. NO_2^- , NO_3^- の血液内注入実験

ラットに $300 \mu\text{g NO}_x^- \text{-N/ml}$ の NaNO_2 あるいは NaNO_3 を1時間にわたって連続的に注入した場合の血液中の NO_2^- , NO_3^- の濃度変化を図6, 7に示した。 NaNO_2 の注入では、血液中には NO_2^- と NO_3^- 濃度の増加が認められたが、 NaNO_3 の注入の場合には NO_2^- は検出されなかった。図6, 7の実線はいずれも理論式を実測値に最小2乗法でフィットさせたものである。

NO_2^- 注入の場合には $a_1 = 0.04 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}$, $a_2 = 0$, NO_3^- 注入の場合には $a_1 = 0$, $a_2 = 0.05 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ とすると実験結果とよく一致した。なお実際の 1 ml/h の注入量を血液量で補正して計算すると、前者で $a_1 = 0.23 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 後者の a_2 でも同じ値が得られた。

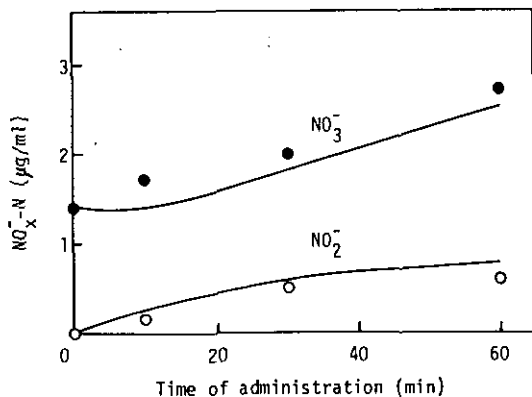


図 6 $300 \mu\text{g NO}_2^- \text{-N/ml}$ の連続的注入 (1 ml/h) による血中 NO_2^- , NO_3^- 濃度の変化
 Fig. 6 Changes of NO_2^- , NO_3^- concentrations in the blood of a rat by the continuous administration of $300 \mu\text{g NO}_2^- \text{-N/ml}$ (1 ml/h) via femoral vein
 Lines are simulated curves.

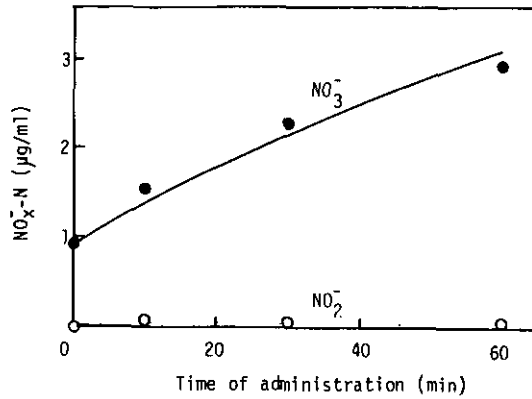


図 7 300 $\mu\text{g NO}_3^- \text{-N/ml}$ の連続的注入 (1 ml/h) による血中 NO_3^- , NO_2^- 濃度の変化

Fig. 7 Changes of NO_2^- and NO_3^- concentrations in the blood of a rat by continuous administration of 300 $\mu\text{g NO}_3^- \text{-N/ml}$ (1 ml/h) via femoral vein
The line is a simulated curve.

300 - 1200 $\mu\text{g NO}_x^- \text{-N/ml}$ まで NaNO_2 と NaNO_3 の濃度を変えて注入を行ったところ, 図 8 のように注入した $\text{NO}_2^- \text{-N}$, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ の濃度と 1 時間後の血液中の NO_3^- , NO_2^- の量の間には, 直線的な比例関係が成り立つことが判明した。

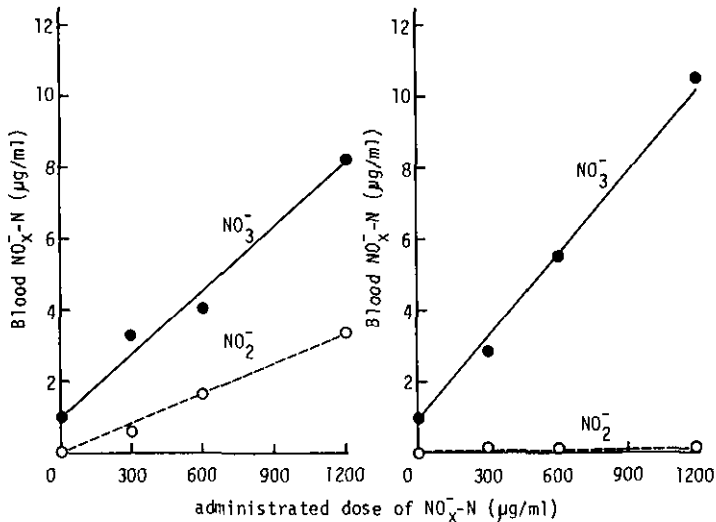


図 8 血管内に連続注入した NO_x^- の濃度と血中 NO_x^- 濃度の量-反応関係

Fig. 8 Dose dependence of NO_x^- in the blood after NO_2^- or NO_3^- were continuously administrated to rats via femoral vein for 1 hour
Left figure: NO_2^- administration; Right figure: NO_3^- administration

4. *in vitro* での NO_2^- と血液の反応

NaNO_2 または NaNO_3 を 37°C で血液と反応させ 10 分ごとに NO_2^- , NO_3^- 濃度を測定した。図 9 の左図に示すように、 NaNO_2 では血液中の NO_2^- は急速に減少し、逆に NO_3^- の生成が認められた。 NO_2^- の半減期は約 15 分であった。この反応の経過はマウスの場合⁵⁾ と相似であり、反応の次数は一次であると考えられた。一方、 NaNO_3 は、図 9 の右図に示すように血液中の NO_3^- 量には変化がみられず、 NO_3^- と血液の相互作用が非常に小さいことを示した。

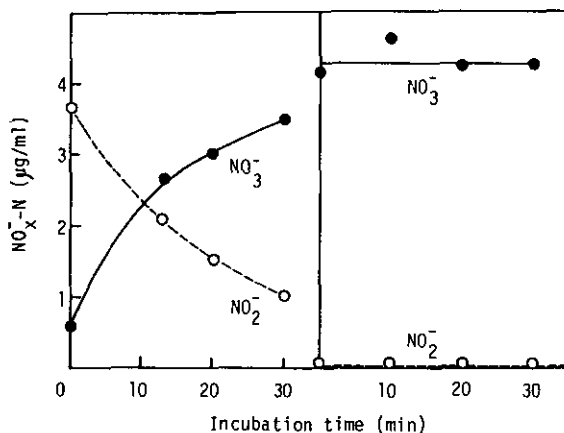


図 9 NO_2^- あるいは NO_3^- を血液中でインキュベートした時の変化
 Fig. 9 Changes of NO_2^- and NO_3^- incubated with rat blood in vitro
 Left figure: NO_2^- addition; Right figure: NO_3^- addition

5. 尿中への NO_2^- , NO_3^- の排泄

40 ppm の NO_2 あるいは NO を 1 時間暴露し、その後約 24 時間にわたり尿中の NO_2^- , NO_3^- の定量を行った。図 10 に排泄された NO_3^- の累積値 (4 匹の $m \pm \text{SD}$) を示した。暴露中止後 8 時間前後までは多量の NO_3^- の排泄がみられたが、 NO_2^- は検出されなかった。1 日後の NO_3^- の排泄は対照群とほぼ同程度になった。また NO の暴露の場合は同程度の NO_2 暴露による NO_3^- の排泄と比較すると、パターンは類似していたが、その量は少なかった。

6. 薬動学的モデルにおける各種パラメーターの決定

体内に入った NO , NO_2 の運命を図 3 のように考え、各種パラメーターを与えて (1)~(3) の連立微分方程式を解き、条件によって (4)~(11) の式を組立て、各種モデル実験によって各種のパラメーターを決定した。40 ppm NO_2 暴露において最小 2 乗法によって決定したパラメーターをまとめてみると、 $k_1 = 0.0462 \text{ min}^{-1}$, $k_3 = 0.0116 \text{ min}^{-1}$, $c = 1.3 \text{ µg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $a_1 = 0.03 \text{ µg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $a_2 = 0.005 \text{ µg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ となった。一方、Powell の共役傾斜法による多次元探索法によって、連立微分方程式を解くと、 $k_1 = 0.0747 \text{ min}^{-1}$, $k_3 = 0.0116 \text{ min}^{-1}$, $c = 1.185 \text{ µg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $a_1 =$

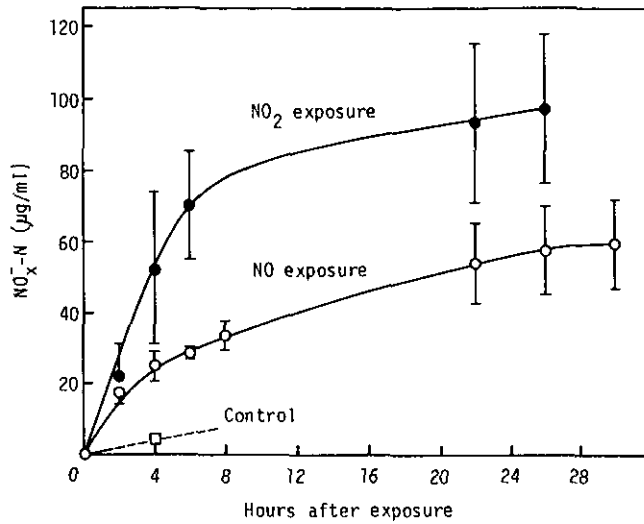


図 10 NOあるいはNO₂を1時間暴露した後の尿中NO₃⁻量の変化(累積値)
 Fig. 10 Excretion of NO₃⁻ in urine (accumulated values) after the rats were exposed to NO or NO₂ for 1 hour

0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, $a_2 = 0.026 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ となり、近似の値を示すものと、差が大きいものがみられた。この差は計算法の特長による差とも解釈され、どちらの方法が優れているかを判定することは困難である。最小2乗法においては初期推定値が重要であり、最適な初期推定値を与えなければ、十分近似した値をとらなくなり、非線形最小2乗法 $P_{N+1} = P_N + \Delta P$ は $|\Delta P| \neq 0$ に収束しなくなることもありうるということが知られている。一方、いわゆる山登り法といわれる共役傾斜法による多次元探索法では、初期推定値が必ずしも最適である必要はないが、計算過程が複雑であることおよび計算時間が長くなることなどの不利な点がある。生物実験などのように、実験ごとに最適パラメーターを決定する場合は、最小2乗法による計算法も十分に生かすことができると考えられるが、上述のような理由で、共役傾斜法による多次元探索法によって各種パラメーターの値を見直すことも必要であると考えられる。

考 察

窒素酸化物については、NO、NO₂ともに正常呼吸ではその80%以上が、深呼吸では90%以上が体内に侵入するといわれ⁶⁾、比較的水に難溶なNO₂の肺深部への侵入率はSO₂より大きく末梢の気管支肺泡まで到達して障害を及ぼすとされ、各方面で研究が進んでいる。

著者ら⁵⁾は、5~40 ppmのNO₂をマウスに暴露し血液中のNO₂⁻、NO₃⁻の時間経過とガス濃度に対する依存性を調べた。その結果、40 ppmのNO₂を暴露すると10分以内にNO₂⁻濃度は一定値を示すが、1時間暴露した後、マウスを室内空气中に移動すると数分の半減期で減少し、NO₃⁻の量はNO₂⁻の約10倍であり、またNO₂⁻とNO₃⁻の生成量は明らかにガス濃度に依存性することを報告

した。今回の一連の研究は、これらの成績を基礎としてラットについて窒素酸化物の生体内運命をより詳細に検討したものである。

40 ppm の NO_2 を暴露したラットの血液中の NO_2^- および NO_3^- の挙動のパターンは、前述のマウスの場合とほぼ類似していた。このことは動物種が異なっても NO_2 の生体内挙動は基本的に同一であることを示唆している。

今回の実験では、 NO を暴露した時の血液中の NO_2^- 、 NO_3^- をも測定した。 NO は一部体内でガス状のまま存在すると考えられるが、血液中のガス状 NO は定量が困難なため、その挙動は生成する NO_2^- と NO_3^- から推測を行った。同一濃度の場合、 NO では NO_2 に比較して血液中に生成する NO_2^- 、 NO_3^- および尿中に排泄される NO_3^- 量はいずれも少量であった。しかし、尿中への排泄物として両者ともに NO_3^- が検出されたことから、 NO_3^- が最終生成物の一つであることは共通していると考えられる。なお NO と NO_2 では、血液中の NO_x^- の暴露濃度に対する依存性のパターンが異なっており、この原因の一部に両ガスの肺から血液中への移行様式が関連することが考えられる。すなわち、ガス濃度が上昇した場合、 NO の血中侵入量が直線的に増加するのに対し、 NO_2 では高濃度になってもあまり増加しない可能性がある。これに関与する因子としては、換気量、肺組織への吸着量などをあげうる。

ガス暴露あるいは NO_x^- の血管内注入実験において、実験の結果とモデルによるシミュレーションは、一般によく一致しており、モデルが妥当性をもつ可能性のあることを示唆していた。モデルは極く単純化したものであり、特に NO と Hb の反応により NO_3^- の生成する一連のプロセス、および血液以外の臓器中の分布に関しては、今後のより詳細な検討が必要と考えられる。

興味深い事実としては、 NO_2^- あるいは NO_3^- の血管内注入実験において、血液中に観察された NO_x^- の値からモデルに基いて計算すると、血中での NO_2^- と NO_3^- の一次生成速度 a_1 、 a_2 は実際の注入速度に対し、それぞれ 17% および 22% であった。モデルを妥当とするならば、このことは注入された NO_2^- および NO_3^- の相当の部分が速やかに血液以外の部分に移行することを示している。

また、 NO_2 暴露における最小 2 乗法によるシミュレーションから、 NO_2 が血中に侵入した場合、 NO_2^- の一次生成速度 a_1 は NO_3^- の一次生成速度 a_2 に比して数倍大きいことが推定された。一方 NO では、 NO_2^- の一次生成速度 a_3 は NO_2 の場合に比較して小さく、また $a_3 : a_4$ を NO_2 の場合の $a_1 : a_2 = 6 : 1$ と仮定すると、 $a_4 + a_5$ の大部分は a_5 に寄与するものであり、 NO 暴露の場合の NO_3^- 生成の大部分が NOHb 経路のものであることが示唆された。

NaNO_2 の血管内注入実験において、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の NO_2^- -N の注入による血液中 NO_x^- の変動は、40 ppm のガスを暴露した際の変動と相似しており、 NO_2 暴露実験の実験的なシミュレーションとして用いることができるであろう。肺以外の臓器に対する NO_2 の影響の検索には有効な手段であり、 NO_2 により生じた影響が血液中に生じた NO_2^- 、 NO_3^- に由来するものか、あるいは肺の障害による二次的なものであるかを判断することが可能であると考えられる。

著者らはすでに前報⁵⁾において、NO₂の生体内運命に関する模式図を描いたが、本実験の結果に基づいて、NOおよびNO₂の運命を推測し、それを図11に模式的に示した。

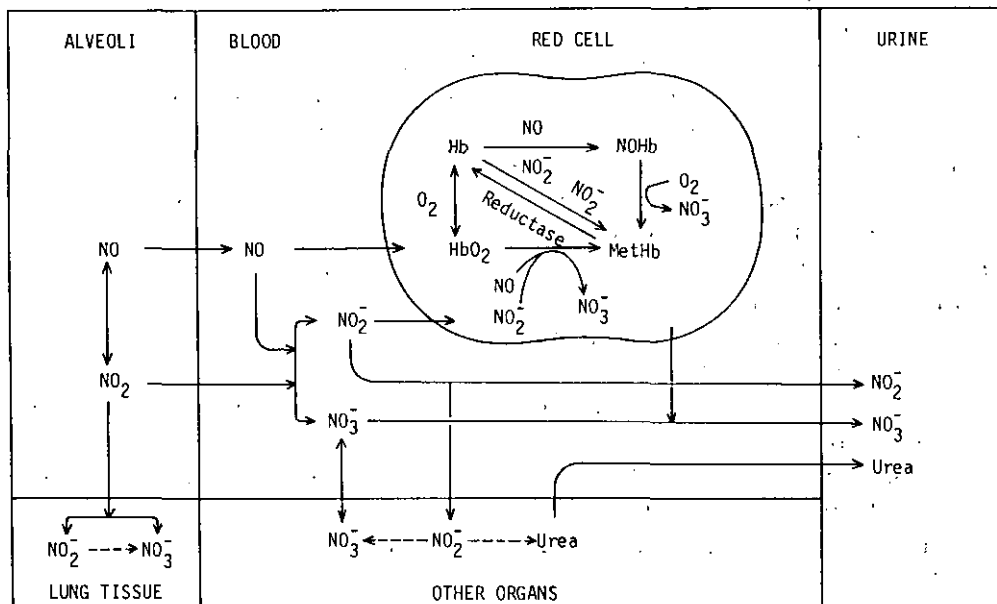


図 11 吸入されたNOとNO₂の生体内挙動の模式図

Fig. 11 Possible fates of inhaled NO and NO₂ in the living body

図のように肺胞内に侵入したガスは、一部は肺組織に入りNO₂またはNO₃となるが、大部分は血液に侵入してNO₂はNO₂とNO₃に、NOはNO、NO₂、NO₃となるであろう。これらは赤血球中に入り、HbO₂、Hb、NOHb、Met Hb間の反応に関与する。NOxとHb⁷⁻⁹⁾、NO₂とHb¹⁰⁾、NOHbとO₂¹¹⁾の反応に関してはこれまで種々の研究が報告されている。NO₂とNO₃の一部は組織中に入り、オルニチンサイクルを経て尿素になるといわれている。尿中へは、NO₂（存在したとしても極少量と考えられる）、NO₃あるいは尿素の形で排泄されるであろう。図中の点線で示したのは、現在のところ十分に解明されていない経路である。

今後はより詳細にNOおよびNO₂の生体内挙動を解析し、暴露による生体影響の研究のための基礎データを収積することが重要であると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行中、各種パラメーターの決定のため大型計算機による計算、多次元探索法のプログラムの作成等に御指導いただいた本研究所大気環境部鶴野伊津志研究員および環境情報部古川満信専門官に深く謝意を表す。

引用文献

- 1) Yoshida, K., M. Kasama, M. Kitabatake and M. Imai (1980): Metabolic fate of nitric oxide. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **46**, 71-77.
- 2) 太田庸起子・山田 理・脇坂一郎 (1980): 重窒素二酸化窒素の生体内動的観察. 産業衛生学会, 仙台. 707-708.
- 3) Goldstein, E., N.F. Peek, N.J. Parks, H.H. Hines, E.P. Steffey and B. Tarkington (1977): Fate and distribution of inhaled nitrogen dioxide in rhesus monkeys. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, **115**, 403-412.
- 4) Svorcova, S. and V. Kaut (1971): The arteriovenous differences in the nitrite and nitrate ions concentrations after the nitrogen oxides inhalation. *Cesk. Hyg.*, **16**, 71-76.
- 5) Oda, H., H. Tsubone, A.K. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentrations in blood of mice exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **25**, 294-301.
- 6) Wagner, H.M. (1970): Absorption of NO und NO₂ in MIK- und MAK-Konzentrationen bei der Inhalation. *Staub-Reinhalt. Luft*, **30**, 380-381.
- 7) Oda, H., S. Kusumoto and T. Nakajima (1975): Nitrosyl-hemoglobin formation in the blood of animals exposed to nitric oxide. *Arch. Environ. Health*, **30**, 453-456.
- 8) Oda, H., H. Nogami and T. Nakajima (1980): Reaction of hemoglobin with nitric oxide and nitrogen dioxide in mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **6**, 675-680.
- 9) Case, G.D., J.S. Dixon and J.C. Schooley (1979): Interactions of blood metalloproteins with nitrogen oxides and oxidant air pollutants. *Environ. Res.*, **20**, 43-65.
- 10) Kosaka, H., K. Imaizumi, K. Imai and I. Tyuma (1979): Stoichiometry of the reaction of oxyhemoglobin with nitrite.
- 11) 昆 和典・前田信治・須田武雄・志賀 健 (1980): 一酸化窒素ヘモグロビンと酸素との反応の解析. 大気汚染研究, **15**, 401-411.

5

二酸化窒素の急性暴露によるラットの心電図異常

Electrocardiographic Abnormalities in Rats by Acute Exposure to Nitrogen Dioxide

局 博¹・鈴木 明¹・永澤節子・織田 肇¹

Hirokazu TSUBONE¹, Akira K. SUZUKI¹, Setsuko NAGASAWA and Hijime ODA

要 旨

二酸化窒素 (NO_2) に急性暴露したラットの心機能の変化について、心電図 (ECG) 記録をもとに検索を行った。20 ppm 以上の NO_2 をラットに 3 時間暴露すると、徐脈や不整脈が観察されたが、それらの心機能異常は硫酸アトロピンの投与で消失した。正常ラットに NaNO_2 溶液を連続静注することにより、血液中に亜硝酸イオン (NO_2^-) と硝酸イオン (NO_3^-) を実験的に生成させ、心電図学的観察を行った。その結果、心電図には特記すべき変化は認められなかった。これらの成績から、 NO_2 に急性暴露して生じる心機能異常は、血中の NO_2^- や NO_3^- の増加によるよりは、副交感神経系の活動の変化に原因があるものと考えられた。

Abstract

Changes in cardiac function of rats acutely exposed to nitrogen dioxide (NO_2) were examined by electrocardiographic (ECG) records. Bradycardia and arrhythmia induced upon exposure to 20 ppm NO_2 or more for 3 hr were abolished by injection of atropine sulfate. ECGs were recorded following experimental formations of nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) in blood of normal rats by administration of NaNO_2 solution, but no remarkable changes were observed on ECG.

These results suggest that abnormal cardiac function observed during acute exposure to NO_2 is attributable changes in parasympathetic nervous activity and not to elevated NO_2^- and NO_3^- concentrations in blood.

はじめに

二酸化窒素 (NO_2) のような大気汚染物質やその他の化学的刺激剤の吸入による心機能に対する影響は呼吸器に対する影響^{1~3)} ほどよくは知られていない。

* 本報告の資料の一部はすでに日本衛生学雑誌、36 巻 2 号に発表済みである。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

最近になって、 NO_2 の暴露中、血液中に亜硝酸イオン(NO_2^-)と硝酸イオン(NO_3^-)が生成、増加することが報告されている^{4,5)}が、暴露中の両イオンの生体影響については検討すべき問題が少なくない。

この研究では、 NO_2 に急性暴露したラットの心機能の変化について明らかにした。また血中の NO_2^- 、 NO_3^- の生成と心機能との関連性、ならびに NO_2 暴露中の心臓に対する副交感神経活動の役割を追求した。

方 法

動物に対する NO_2 暴露は、窒素で安定化した5000 ppmの NO_2 を使って行われた。清浄室内空気で希釈した NO_2 を体積400 lのステンレススチール・ガラス製のチャンパーに導いた。チャンパー内の温度は $22 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持した。 NO_2 濃度の測定は化学的発光法に従って、窒素酸化物分析計(モニター・ラボ社 ML-8440 H)を用いて行った。実験にあたっては10~40 ppmの濃度を採用した。 NO_2 の暴露中、標準肢II誘導による心電図記録を無拘束、無麻酔下のラット(8~10週令)に対して行った。 NO_2 暴露中の血液中 NO_2^- と NO_3^- の濃度を測定するために、4週令ラットの眼窩から採血を行った。 NO_2^- と NO_3^- の測定は以前に報告した方法⁴⁾に従って行われた。300 $\mu\text{g NO}_2^-$ -N/mlの NaNO_2 溶液を1時間あたり1 mlの割合で8週令ラットに連続的に静注し、投与前と投与中の一定時間に採血を行い、 NO_2^- と NO_3^- の濃度測定を行ったほか、心電図を記録した。暴露中の心機能に対する副交感神経活動の役割を明らかにするために、暴露中に0.3 mg/kgの硫酸アトロピンを皮下投与した。

結 果

ラットに40 ppmの NO_2 を暴露したときの典型的な心電図パターンの1例を図1に示した。正常なラットの心電図は安静時に420~480/minの範囲内で規則正しい心拍リズムを示した。しかしながら、 NO_2 に暴露すると暴露開始後約30分で徐脈を示すようになり、90分以降では激しい不整脈が出現した。このような心電図異常は、しばしば房室ブロック、期外収縮およびワンダリングペースメーカーを伴って出現した。これらの知見は20 ppm以上の暴露で認められ、3時間暴露の最後まで観察された。また、心電図異常の強さは NO_2 の濃度上昇に平行して高まった。

上述した心機能障害では、血中 NO_2^- 、 NO_3^- 濃度の増加^{4,5)}や自律神経系活動、とくに副交感神経活動の変化⁶⁾が原因因子として作用していることが推測される。それゆえ、心機能と血中 NO_2^- 、 NO_3^- 濃度との関連性を明らかにするために、まず第一に40 ppmの NO_2 に暴露したときの NO_2^- と NO_3^- 濃度の測定、ならびに NaNO_2 溶液(300 $\mu\text{g NO}_2^-$ -N/ml)を連続的に投与したときの両イオン濃度の測定を行った(図2)。 NO_2 暴露のときと NaNO_2 溶液の投与のときとでは、血中 NO_2^- 、 NO_3^- の濃度の推移は類似した傾向を示した。最初の時点では NO_2^- は検出されず、一方 NO_3^- は1.4 $\mu\text{g NO}_3^-$ -N/mlの濃度を示した。両イオンとも暴露ないし NaNO_2 溶液の投与によって増加して

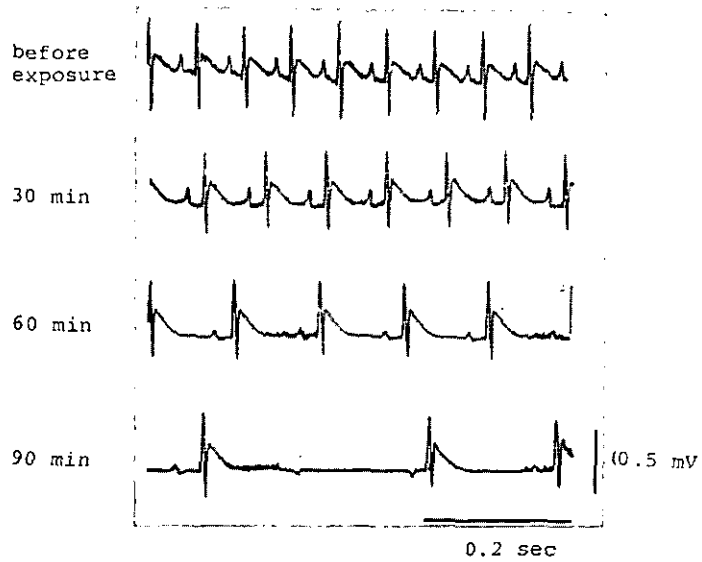


図 1 40 ppm NO₂ 暴露前と暴露中の心電図記録

Fig. 1 Electrocardiogram before and during exposure to 40 ppm NO₂

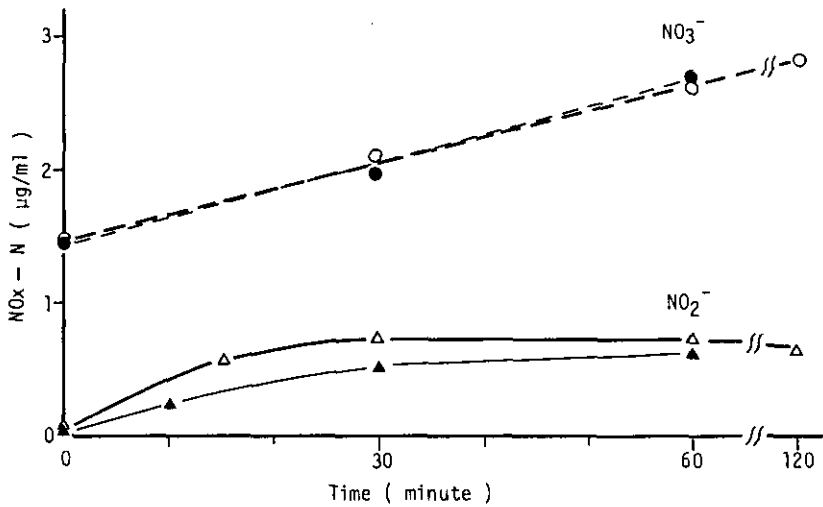


図 2 40 ppm NO₂ 暴露と NaNO₂ 溶液 (300 µg NO₂⁻-N/ml) の連続投与時における血中 NO₂⁻, NO₃⁻ の濃度

Fig. 2 Concentrations of NO₂⁻ and NO₃⁻ in the blood during exposure to 40 ppm NO₂ and continuous administration of NaNO₂ solution (300 µg of NO₂⁻-N/ml)

○△: Exposure to NO₂, ●▲: Administration of NaNO₂ solution

いくが、 NO_2^- は暴露開始後30分で最大のレベルに達し、 NO_3^- は120分まで増加を続けた。上述した同じ濃度の NaNO_2 溶液 ($300 \mu\text{g NO}_2^- \text{-N/ml}$)をラットに連続投与したとき、および40ppmの NO_2 に暴露したときの心拍数の変化を図3に示した。 NaNO_2 溶液を投与しているときの心拍数の変化は模擬処置を施した対照群と比べて、ほとんど差が認められなかった。それに反して、40ppmの NO_2 に暴露したラットでは心拍数の著明な減少が示された。また NaNO_2 溶液の投与中には、不整脈のような心電図異常も全く観察されなかった。次に、暴露中の心機能に対する副交感神経活動の役割を明らかにする目的で、硫酸アトロピンの投与による心電図記録の変化とR-R間隔(心拍間隔)のヒストグラムの変化を検索し、図4に示した。硫酸アトロピンの投与によって、徐脈や不整脈は直ちに消失した。投与前のR-R間隔ヒストグラムは間隔の増大と分布の広がりを示したが、投与後のヒストグラムは、暴露前のパターンに戻った。また暴露中および暴露前のP-Q間隔、P-Q間隔ならびにQRS持続時間を測定し、硫酸アトロピンの投与がこれらの測定値に及ぼす影響を調べ、表1にまとめた。40ppmの暴露では、暴露時間の進行に伴ってP-P間隔、P-Q間隔、QRS持続時間のいずれもが増大し、120分では暴露前の値に比べて、P-P間隔は195~360%に、P-Q間隔は138~188%に、QRS持続時間は131~146%に増加した。しか

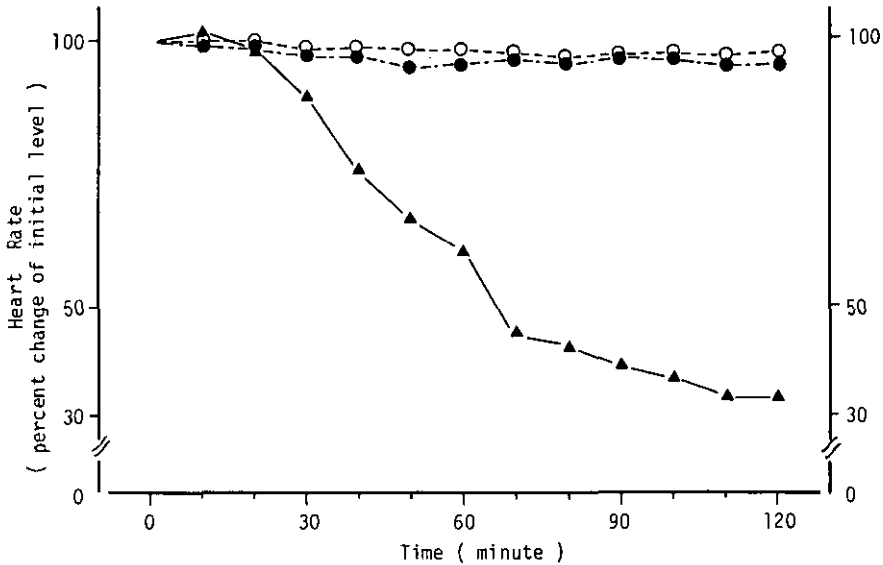


図 3 40ppm NO_2 暴露と NaNO_2 溶液 ($300 \mu\text{g NO}_2^- \text{-N/ml}$) の投与時における心拍数の変化

Fig. 3 Changes of heart rate during exposure to 40 ppm NO_2 and administration of NaNO_2 solution ($300 \mu\text{g}$ of $\text{NO}_2^- \text{-N/ml}$)

○: Administration of NaNO_2 solution, ▲: Exposure to NO_2 , ●: Sham-preparation with administration of saline water

Each point is expressed as a mean of four rats.

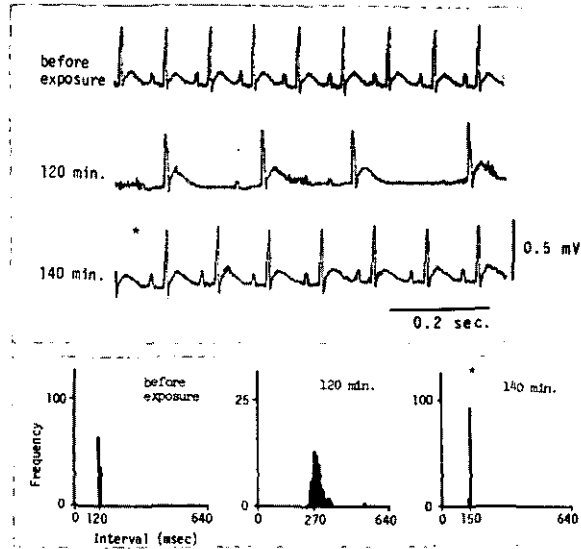


図 4 40 ppm NO₂ 暴露中に硫酸アトロピンを投与した場合の心電図および R-R 間隔ヒストグラムの変化

Fig. 4 Effects on ECG and R-R interval histogram following injection of atropine sulfate during exposure to 40 ppm NO₂

Asterisks: ECG and histogram after injection of atropine sulfate (0.3 mg/kg BW) at 130 min. The histograms were measured for subsequent 100 heartbeats using a micro-computer.

表 1 40 ppm NO₂ 暴露中に硫酸アトロピンを投与した場合の P-P 間隔, P-Q 間隔および QRS 持続時間の変化

Table 1 Changes in P-P interval, P-Q interval and QRS duration following the administration of atropine sulfate during exposure to 40 ppm NO₂

Atropine sulfate (0.3 mg/kg BW) was injected to each rat at 130 min of exposure. Each value is expressed as a mean ± S.D. of subsequent 15 samples.

Case	Time	P-P (msec)	P-Q (msec)	QRS (msec)
1	before	114.5 ± 2.7 (100)	41.9 ± 1.9 (100)	9.9 ± 0.7 (100)
	120 min	412.4 ± 66.2 (360)	58.0 ± 3.4 (138)	13.0 ± 1.7 (131)
	140 min	156.5 ± 4.3 (137)	47.9 ± 2.6 (114)	12.5 ± 1.0 (126)
2	before	114.6 ± 2.4 (100)	39.4 ± 1.7 (100)	10.1 ± 1.1 (100)
	120 min	318.1 ± 57.3 (278)	74.0 ± 13.4 (188)	14.7 ± 1.7 (146)
	140 min	150.7 ± 2.4 (132)	49.5 ± 1.6 (126)	13.0 ± 1.2 (129)
3	before	116.1 ± 4.7 (100)	36.9 ± 1.8 (100)	10.6 ± 0.8 (100)
	120 min	258.7 ± 27.4 (223)	61.2 ± 6.0 (166)	14.3 ± 1.1 (135)
	140 min	137.1 ± 4.7 (118)	42.1 ± 3.0 (114)	12.5 ± 0.5 (118)
4	before	130.1 ± 5.6 (100)	44.9 ± 2.3 (100)	10.4 ± 0.9 (100)
	120 min	253.7 ± 7.2 (195)	64.1 ± 4.9 (143)	14.1 ± 1.2 (136)
	140 min	139.0 ± 2.7 (107)	50.6 ± 2.2 (113)	12.0 ± 0.7 (115)

し40ppm 暴露中の130分時点で硫酸アトロピン0.3mg/kg を投与した10分後の計測では、P-Q間隔は107~137%に、P-Q間隔は113~126%に、QRS持続時間は115~129%となり、各計測値は明瞭な短縮を示した。

考 察

大気汚染物質の心臓への影響に関しては、一酸化炭素を除けばよく知られていない。このことはNO₂をはじめとする大気汚染物質による肺以外の臓器への影響についてあまり関心がもたれていなかった⁷⁾ことと関連している。しかしながら、オゾン⁸⁾や硫酸化物⁹⁾、エロゾルとしてのフルオロカーボン¹⁰⁾などは多少なりとも心臓血管系に影響を与える可能性が考えられ、とくに心筋硬塞や心筋虚血、冠動脈硬化などの心疾患が潜在する場合には、一酸化炭素におけると同様にこれらの物質も無視できない有害因子となる可能性がある。

この研究では、20~40ppmの高濃度のNO₂をラットに暴露したとき、徐脈や不整脈などの心機能異常が生じることが明らかになった。この知見がラットに特異的なものであるかどうかについては今後の研究に待たざるをえない。NO₂暴露による心臓への影響は、直接的効果とは考えにくく、むしろ血液や神経系を介する間接的効果であることは、NO₂が主に肺を経て生体内部に侵入することからも容易に推測される。NO₂暴露中に生じる血液性状の変化として、比較的明らかになっているのは、血中NO₂⁻とNO₃⁻の生成、増加^{4,5)}である。この研究では、40ppmのNO₂暴露で生じる血中のNO₂⁻、NO₃⁻濃度とほぼ等しい量を正常なラットに対して実験的に形成させ、心電図観察を行った。その結果、NO₂暴露では特徴的に出現する徐脈や不整脈などの心電図異常が全く認められなかったことから、この研究で行われた暴露時間と濃度範囲内では、NO₂⁻とNO₃⁻の心臓への影響は無視できるものと考えられた。このことはまた、5~40ppmのNO₂に暴露されたマウス血中のメトヘモグロビン量が1%以下¹¹⁾であり、血液の酸素運搬能の低下が極めて小さいことにも関連しているかもしれない。しかし、これらの成分が長期間にわたって慢性的に作用すると、心筋変性、冠動脈拡張¹²⁾や心電図波形におけるS波の異常¹³⁾などが観察されることから、NO₂の慢性暴露影響では重要な作用因子として考慮しなければならないと思われる。

ところで、本実験においてNO₂暴露中に生じた心電図異常は硫酸アトロピンの投与によって消失したことから、心機能異常の発現には副交感神経活動が関与していることが明らかになった。塵埃ならびにSO₂やアンモニアのような化学的刺激剤を吸入した際、迷走神経の求心性インパルスないし遠心性インパルスが増加することがすでに報告されている^{1,14)}。遠心性インパルスが増加した場合、気管支収縮や粘液分泌を起こすものと考えられている^{15,16)}。心臓は発生学的にも神経支配面でも呼吸器と密接な関係をもっていることから、呼吸器刺激による迷走神経活動の変化が心臓に対して反射性の効果を及ぼす可能性は否定できない。CBMN(o-chlorobenzylidene malononitrile)の吸入では、呼吸数の変化とともに反射性の徐脈が起こり、この徐脈は両側迷走神経の切断によって消失する¹⁷⁾ことが明らかにされている。CBMNとNO₂とでは呼吸器内での作用部位が異

なることも考えられるが、心臓に対する作用機作として迷走神経を介する点では共通の要素を含んでいると考えられる。

引用文献

- 1) Alarie, Y. (1973): Sensory irritation by airborne chemicals. *In* CRC Critical Reviews in Toxicology, Stokinger, H.E. (ref.) 299-363.
- 2) Murphy, S.D., C.E. Ulrich, S.H. Frankowitz and C. Xintaras (1964): Altered function in animals inhaling low concentrations of ozone and nitrogen dioxide. *Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 246-253.
- 3) Ulrich, C.E., M.P. Haddock and Y. Alarie (1972): Airborne chemical irritants. *Arch. Environ. Health*, 24, 37-42.
- 4) Oda, H., H. Tsubone, A. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, 25, 294-301.
- 5) Goldstein, E., N.F. Peek, N.J. Parks, H.H. Hines, E.P. Steffey and B. Tarkington (1977): Fate and distribution of inhaled nitrogen dioxide in rhesus monkeys. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 115, 403-412.
- 6) Higgins, C.B., S.F. Vatner and E. Braunwald (1973): Parasympathetic control of the heart. *Pharmacol. Rev.*, 25, 119-155.
- 7) 和田 政・奥田典夫ほか (1979): 窒素酸化物、環境汚染物質の生体への影響 9、和田政・木村正己監訳、東京、205-235.
- 8) Brinkman, R., H.B. Lamberts and T.S. Veninga (1964): Radiomimetic toxicity of ozonized air. *Lancet*, 1, 133-134.
- 9) Bloch, W.N., T.R. Lewis, K.A. Busch, J.G. Orthoefer and J.F. Stara (1972): Cardiovascular status of female beagles exposed to air pollutants. *Arch. Environ. Health*, 24, 342-353.
- 10) Taylor, G.J. (1975): Cardiac arrhythmias in hypoxic rabbits during aerosol propellant inhalation. *Arch. Environ. Health*, 30, 349-352.
- 11) 織田 肇・局 博一・鈴木 明・市瀬孝道 (1980): 二酸化窒素を暴露したマウス血液中亜硝酸イオン・硝酸イオン量の変動. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 43-53.
- 12) Gruener, N. and H.I. Schuval (1973): Studies on the Toxicology of Nitrites. *In* Environmental Quality and Safety, Global Aspects of Chemistry, Toxicology and Technology as Applied to the Environment 2, Albany F.C. and F.K. Munich (eds), George Thieme Verlag Stuttgart Academic Press, New York, London, 219-228.
- 13) 木下修三・垣平博臣・宮澤寿一郎・藤波襄二 (1981): 成熟マウスの心電図に及ぼす亜硝酸ナトリウムの影響. 日衛誌, 36(1), 248.
- 14) Widdicombe, J.G. (1954): Receptors in the trachea and bronch of the cat, *J. Physiol.*, 123, 71-104.
- 15) Nadel, J.A. (1980): Autonomic regulation of airway smooth muscle. *In* Physiology and Pharmacology of the Airways, Nadel, J.A. (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, 217-257.
- 16) Nadel, J.A. (1974): Parasympathetic nervous control of airway smooth muscle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 221, 99-102.
- 17) Alarie, Y. (1966): Irritating properties of airborne materials to the upper respiratory tract. *Arch. Environ. Health*, 13, 433-449.

6

二酸化窒素急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化*

Changes of Lipid Peroxidation and Antioxidative Protective Systems in Lungs of Rats Exposed Acutely to 10 ppm Nitrogen Dioxide

嵯峨井 勝¹・市瀬孝道¹

Masaru SAGAI¹ and Takamichi ICHINOSE¹

要 旨

本論文は NO₂ に対する肺の抗酸化性防御機構と脂質過酸化の関連性について経時的に検討したものである。実験は8週令の JCL : Wistar 系雄ラットを用いて、10 ppm NO₂ に2週間連続暴露した。

脂質過酸化はラットの呼気中エタンと、肺ホモジネート中の TBA 反応によって測定した。これらは1日目に減少し、続いて3日目で最大に上昇し、その後ふたたび初期のレベルに戻った。

酸化障害に対する防御系酵素である Glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, disulfide reductase および superoxide dismutase の活性は1日目、もしくは2日目で最低レベルに減少しその後徐々に増加し5~10日目でおおの最大レベルに達し、このレベルは14日目まで維持された。これらの防御系酵素の経時的变化は3日目以後についてみると、脂質過酸化の経時的变化と対称的であった。

非タンパク性 SH (NPSH) 含量の経時的变化は防御系酵素と類似した変動を示した。これに対しビタミンE量は2日目に最大レベルまで増加し、それ以降は過酸化脂質の変化と同様に初期レベルに戻り、その経時的变化は防御系酵素や非タンパク性 SH 量と対称的であった。

これらの結果から NO₂ に対する肺の防御機構は複雑な経時的变化を示し、その変化は、過酸化脂質と逆の変動パターンを示した。

*本論文の原著は現在 "J. Toxicol. Environ. Health" に印刷中である。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田郡町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Abstract

This work was done to clarify the relation between the change of lipid peroxidation and the protective systems in lungs after nitrogen dioxide exposure. JCL:Wistar 8 week-old male rats were exposed continuously to 10 ppm nitrogen dioxide for two weeks.

Lipid peroxidation, measured by ethane exhalation in the breath of the rats and by the reaction of thiobarbituric acid with lung homogenates, increased to a maximum at the third day after a decline at the first day, and then returned to the initial level (of day 0).

The activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), disulfide reductase (DSR) and superoxide dismutase (SOD) in 105,000 × g supernatant of lung homogenates were depressed slightly at the first day. Thereafter, they increased significantly to their maximum levels from the 5th to the 10th day, and these maximum levels were maintained until the 14th day. The pattern of change of these protective enzymes was symmetric to that of lipid peroxidation after the third day. The order of the ratio of the increased value to the initial value ("increased ratio") was G6PD > DSR > 6PGD > GR > GPx > SOD. The time course of nonprotein sulfhydryls was similar to that of the protective enzymes. In contrast, the amounts of vitamin E increased to a maximum at the second day, and then returned to the initial level. The periodic change of vitamin E was similar to that of the lipid peroxidation rather than that of the protective enzymes.

These results suggest that the ability of the enzyme systems in lungs to protect against nitrogen dioxide fluctuated in a complex manner and the activities of the protective enzymes varied inversely to the lipid peroxidation.

はじめに

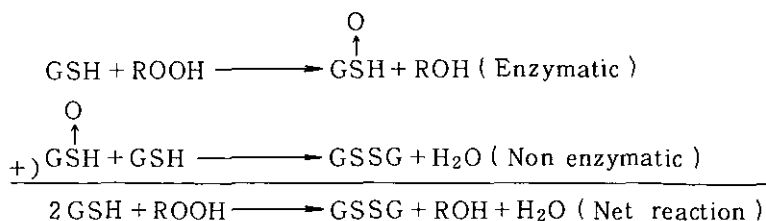
NO₂は肺に広範な病理学的障害を起こす^{1,2)}。多くの場合、NO₂による障害はその酸化作用によると考えられているため、生物細胞の膜脂質の過酸化が細胞の障害や多くの毒性発現の原因であるとみなされている³⁾。それゆえにNO₂の毒性も少なくとも部分的には脂質の過酸化と関連しているのかもしれない。NO₂暴露によって脂質過酸化が起こることは肺の共役ジエン (Conjugated dienes) の測定によってThomasら⁴⁾によって示された。その後、多くの研究者がNO₂暴露による過酸化脂質の検出を試みてきたが成功していない⁵⁾。最近、我々は先の論文⁶⁾において、NO₂暴露により *in vivo* で脂質過酸化が起こることをラットの呼気中エタンの測定によって明らかにした。

一方、生体において過酸化脂質を代謝したりあるいはその生成を防御するための酵素の役割はたいへん重要なものである。NO₂暴露に伴って防御系酵素機構の経時的变化を検討すること、および酸化ストレスに対する防護機構と過酸化脂質の毒性影響を解明するために過酸化脂質生成の経時的变化と防御系酵素の変化とを比較することは意義のあることと考えられる。

Glutathione reductase および glucose - 6 - phosphate dehydrogenase 等からなる

Glutathione peroxidase 系は、酸化的障害に対する代表的な防御酵素系である⁷⁾。

Glutathione S-transferase は net reaction として見るならば次式により glutathione peroxidase とまったく同じ反応を触媒し過酸化物を代謝する^{8,9)}。



それゆえに GSH S-transferase もまた NO₂ 暴露の様な酸化的ストレスに対する防御系酵素の一つと考えることができる。Superoxide dismutase (SOD) は細胞毒として強力な反応性を持つ superoxide anion radical を異性化し細胞を防御する酵素である¹⁰⁾ので SOD 活性の増加は酸化的障害を低減させることができる。

オゾン暴露の場合、肺においてタンパク性 SH 基と非タンパク性 SH 基の間で形成された mixed disulfide は酸化型 Glutathione よりも多いことが Delucia ら¹¹⁾によって報告されている。このように酸化的ストレスによって生成される mixed disulfide は disulfide reductase によって各々のフリーの SH 基に還元される¹²⁾。それゆえ Disulfide reductase は mixed disulfide 還元に必要な役割を果たすことから酸化的ストレスに対する防御系酵素と呼ぶことができる。

また、Glutathione や NADPH のような還元性物質は酸化的ストレスから細胞を保護したり、通常の細胞機能維持のために重要な働きをする物質である。特に Glutathione は多くの Glutathione 関連酵素、たとえば Glutathione peroxidase, Glutathione reductase, Glutathione S-transferase あるいは Disulfide reductase 等の基質として重要なものである。更に、ビタミン E もフリーラジカル補促剤として酸化的障害から細胞を保護する働きを有している^{13, 14, 15)}。

我々は本実験において 10ppm NO₂ に 2 週間暴露されたラットの肺の上記防御系酵素、および Glutathione やビタミン E の経時的変化を検討した。さらに防御機構の経時的変化を呼気中エタンや肺のチオバルビツール酸反応性物質 (TBA 値) と比較した。

材料および方法

<動物>

8 週令の JCL : Wistar 雄ラットを用い 10ppm NO₂ の 2 週間連続暴露を行った。このラットはハンギング・ワイヤーメッシュ・ケージの中で 6 匹ずつに分けて飼育し、ステンレス・スチールガラス製チャンバー (2.0 m³) の中で既報のように¹⁶⁾ NO₂ に暴露した。チャンパー内温度は 24~26°C に、湿度は 50~60% に制御され、室内照明は 14 時間点燈 10 時間消燈とした。これらのラットは日本クレア製 CE-2 飼料で飼育した。

ラットはエーテル深麻酔下で右の頸動脈より採血し、その後右心室に生理食塩水を注入して肺が白色になるまで灌流を行った。肺の湿重量は灌流により約30%ほど増加した。

この肺は窒素ガス置換密閉後用時まで -80°C に保存した。なお、体重あたりの肺湿重量比の測定の場合は肺の灌流は行わなかった。

<肺ホモジネートの調製>

肺は窒素気流下でテフロンホモジナイザーでホモジナイズし、10%ホモジネートとした。緩衝液は減圧脱気と窒素ガスをバブリングして嫌氣的に調製した50mM Na, K-リン酸緩衝液(pH 7.5)を用いた。このホモジネートを $200 \times g$ 、5分間の遠心分離を行い、得られた上清はNPSH, TBA値およびビタミンE測定に使用した。上清の残りは $12000 \times g$ 、10分間の遠心分離を行い、さらにこの上清を $105,000 \times g$ 、60分間の遠心分離を行った。この上清の一部をGlutathione peroxidase, Glutathione reductase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-Phosphogluconate dehydrogenase, と Glutathione S-transferase の測定に用いた。残りの上清は0.1mM EDTAを含む50mM Na, K-リン酸緩衝液(pH 7.5)で20時間透析(2回交換)した。この透析上清をsuperoxide dismutase と disulfide reductase の測定に使用した。

<酵素と抗酸化性物質の測定>

Disulfide reductaseを除くすべての酵素活性の測定はDECコンピューターを備えたJEMSAC自動分析器で 30°C にて行った。すべての酵素活性はタンパク量および時間の関数に対して直線になる条件下で測定している。

Glutathione peroxidaseはクメンハイドロパーオキシドを基質としてLittleらの方法¹⁷⁾によって測定した。非酵素的反応は酵素液のかわりにbufferを加えて測定した。真のGlutathione peroxidase活性は酵素添加反応値から非酵素的反応値を差し引いて補正した。Glutathione reductaseはBergmeyerが記載した方法¹⁸⁾によって測定した。Glucose-6-phosphate dehydrogenaseはWilhelmらの方法¹⁹⁾に従った。6-Phosphogluconate dehydrogenase活性は20mM MgCl_2 と6.5mM cysteineを含む0.1M Tris-HCl Bufferと6-Phosphogluconateを基質として使用してGlucose-6-phosphate dehydrogenaseの測定に従って行った。Glutathione S-transferaseはKaplowitzの方法²⁰⁾に従って測定した。なを基質として、Aryl-S-transferaseには3,4-Dichloro-nitrobenzeneを、Aralkyl-S-transferaseにはp-Nitrobenzylchlorideを、Epoxy-S-transferaseには1,2-Epoxy-3(p-nitrophenoxy)-propaneを使用した。Superoxide dismutase活性測定はキサンチンオキシダーゼによって酵素的に生じたsuperoxide anion radicalsが、チトクロームCを還元するのをSODがさまたげる反応を利用したMcCordとFridovichの方法¹⁰⁾に従った。

Disulfide reductase活性の測定はTietzeの方法¹²⁾によって測定した。シスチンを基質として使用し、完全反応によって形成されたシステインをDeluciaらの方法¹¹⁾で測定した。非酵素的反応はNADPHを除いて測定し、真のDisulfide reductaseの活性はNADPHプラスの完全反応値か

ら非酵素的反応値を差し引いて求めた。非タンパク性SH量は Delucia らの方法¹¹⁾に従って測定した。TBA反応は Ohkawa らの方法²¹⁾に従って行い、その測定は Excitation 515 nm と Emission 533 nm で蛍光的に測定した。

In vivo の脂質過酸化分析法としての呼気中エタンの分析は以前に述べた方法^{22~24)}に従った。

Vitamin Eは肺ホモジネートの 200×g から n-hexane を使って抽出し、スタンダードとして 1 μg·dl - α-tocopherol/ml of n-hexane を使用して、Excitation 298 nm と Emission 325 nm で蛍光的に測定した。タンパク質はスタンダードとして牛血清アルブミンを使用して Lowry 法²⁵⁾によって測定した。すべてのデータは平均値±SEM と Student の *t* 検定によって有意差レベルを $P < 0.05$ として解析した。

結 果

ラットの体重の経時的変化と体重当たりの肺湿重量比の変化を図 1 に示した。体重比は各々の時点での対照群の体重に対する 10 ppm NO₂ 暴露群の体重をパーセンテージで示した。10 ppm NO₂ 暴

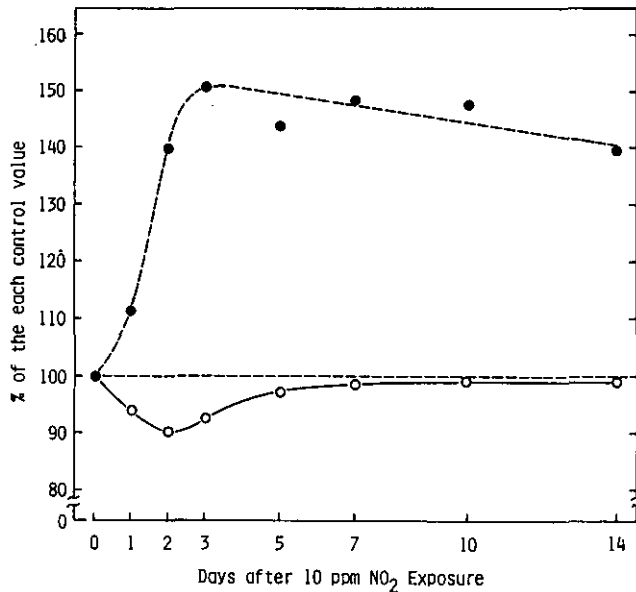


図 1 10 ppm NO₂ 暴露ラットの体重と体重当たりの肺湿重量の対照ラットに対する比率の経時的変化

Fig. 1 Periodical changes of the ratio against control value of body weight and lung wet weight/body weight of rats exposed to 10 ppm nitrogen dioxide for two weeks

- shows the ratio of lung wet weight per body weight.
- shows the ratio of body weight against control.

露ラットの体重は初期においては10%程度の減少が見られたが、その後7日目ごろから14日目では対照群のレベルに戻った。NO₂暴露ラットの体重当たりの肺湿重量の比は対照群に比べると2~3日目で急速に増加し、3日目で最大に達し、その値は初期レベルの1.5倍に相当した。この増加は肺水腫を引き起こした結果と思われる。その後、この比は次第にわずかずつ減少してゆく傾向を示している。この減少は肺水腫のある程度の回復と生長に伴う体重の増加によるものと考えられる。

ラットの呼気中エタン生産の経時的変化と肺のTBA値の経時的変化を図2に示した。エタンは暴露1日目で減少し初期レベルの約70%に相当したが、2日後から急速に増加しはじめ3日~4日目では初期レベルの約210~220%のレベルに達した。その後呼気中エタンは急速に減少し、10日目で初期レベルに戻った。またTBA値も1日目に減少し2日目から3日目で急速に増加し、最高値は3日目に観察され、その値は初期値の200%に相当した。その後はふたたび急速に減少し5日目で初期レベルに戻った。

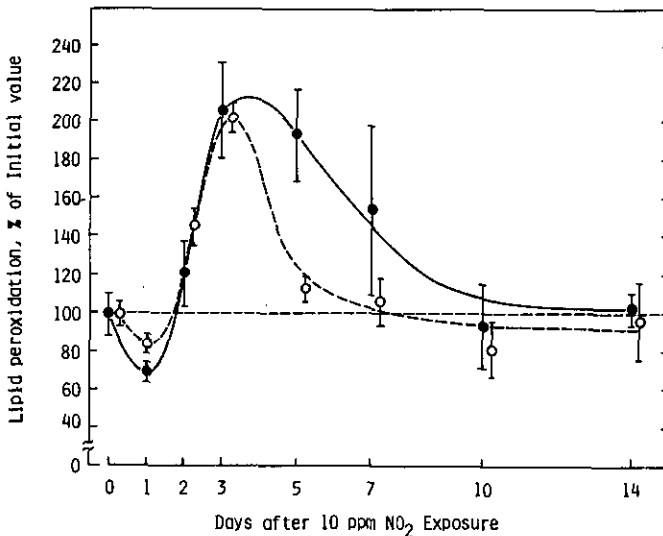


図 2 10ppm NO₂ に2週間暴露したラットの呼気中エタンと肺のTBA反応性物質の経時的変化

Fig. 2 Periodical variations of ethane exhalation in breath gases and thiobarbituric acid reactants in lung tissue of rats exposed to 10 ppm nitrogen dioxide for 2 weeks

The initial values were: 2.07 ± 0.23 p moles/min/100 g body weight for ethane exhalation (●), and 24.5 ± 1.5 n moles/g lung for thiobarbituric acid reactants (○). The values are expressed as mean \pm SEM ($n = 6 - 12$).

10 ppm NO₂ 暴露ラットの肺における Glutathione peroxidase, Glutathione reductase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase と 6-Phosphogluconate dehydrogenase 活性の経時変化を図3に示した。Glutathione peroxidase 活性は1日目まで有意に減少し、その後暴露3日目から5日目に

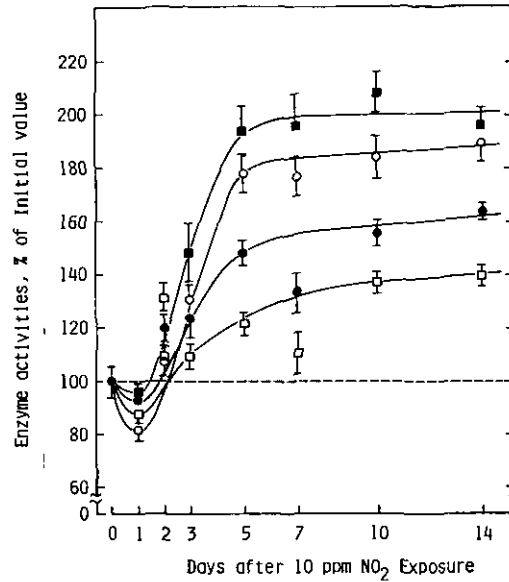


図 3 グルタチオンパーオキシダーゼ、グルタチオン還元酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素および6-ホスホグルコネート脱水素活性の経時変化

Fig. 3 Periodical variations of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD)

The initial values (*n* moles NADP⁺ reduced/mg of protein/min) were: 88.8 ± 2.9 for GPx (○), 124.3 ± 3.5 for GR (●), 126.6 ± 5.9 for G6PD (■), and 145.4 ± 5.6 for 6PGD (◻), respectively. The values are expressed as mean ± SEM (*n* = 6 - 12).

かけて増加し14日目までその最高レベルを維持した。Glutathione reductase 活性の経時変化はGlutathione peroxidaseの変動に類似していた。更に Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase と 6 - Phosphogluconate dehydrogenase 活性もまた同様の経時変化を示した。これらの活性の有意な増加は3日目から14日目まで見られた。Selenium に依存しない peroxidase としての Glutathione S - transferase のうち, Aryl -, Aralkyl -, および Epoxy - S - transferase 活性の変化を図4に示した。これらの酵素活性は2日目から3日目に最低レベルに低下し、そのあとやや初期レベルに近づく傾向を示した。

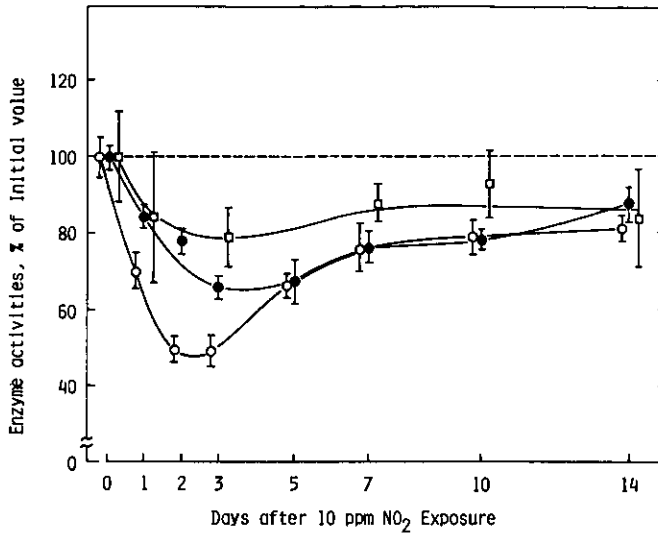


図 4 グルタチオン S-トランスフェラーゼのアリール、アラルキル、およびエポキシ-S-トランスフェラーゼの経時的変化

Fig. 4 Periodical variations of glutathione S-transferase, aryl-, aralkyl- and epoxy-S-transferase

The initial values (units of n mole/min/mg of protein) were: 3.75 ± 0.18 for aryl- (○) 70.4 ± 2.3 for aralkyl (●), and 4.71 ± 0.58 for epoxy-S-transferase (□), respectively. The values are expressed by mean \pm SEM ($n = 6-12$).

Disulfide reductase と Superoxide dismutase 活性の経時的変化を図5に示した。Disulfide reductase 活性はNO₂ 暴露初期に有意に減少し、2日目で最低値を示しその値は初期レベルの約60%に相当した。その後、活性は著しく増加し10日目で最高レベルに達し14日目までそのレベルを持続した。その最高レベルは初期レベルの約210%であった。Superoxide dismutase の経時的変化もまた Disulfide reductase の変化と同様であった。しかしその変化の程度は比較的少ないが、有意なものであった。2日目で減少は初期レベルの約70%に相当し、5日目から14日目の間の値は約110~120%に相当した。

肺における抗酸化物質としての非タンパク性SHとVitamin Eの量を図6に示した。非タンパク性SHは2日目で減少し初期レベルの約90%に相当した。その後5日から14日目にかけて初期レベルの約150~170%に増加した。これに対して、Vitamin Eは2日目で初期レベルの140%に増加し、2日目以後急速に減少し、初期レベルに戻った。このVitamin Eの経時的変化は非タンパク性SHの変化と対称的であった。

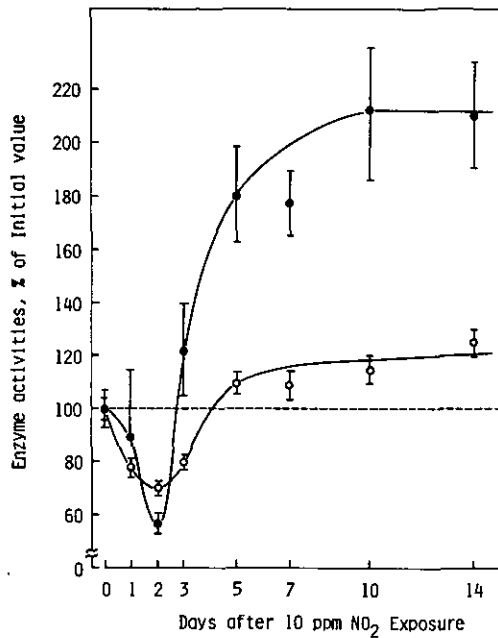


図 5 スーパーオキシド・ディスムターゼとダイサルファイド還元酵素の経時的変化
 Fig. 5 Periodical variations of disulfide reductase (DRS) and superoxide dismutase (SOD)

The initial values were: 125.8 ± 8.8 (n moles/hr/mg of protein) for DRS (●), and 18.8 ± 0.5 (units/min/mg of protein) for SOD (○). The values are expressed as mean \pm SEM ($n = 6 - 12$).

考 察

以前の報告で我々は10 ppm NO₂ に2週間暴露されたラットの呼気中エタンの量は NO₂ 暴露の間複雑に変化することを示した⁶⁾。

本実験では過酸化脂質産生と酸化的障害に対する防御機構との関連を経時的に調べその関係を明らかにした。NO₂ 暴露による過酸化脂質の増加を呼気中エタンの測定と肺ホモジネートの TBA 値の測定によって確認した(図2)。過酸化脂質はNO₂ 暴露開始後早期に一度減少するがその後2日目以降から増加しはじめ3~4日目で最高レベルに達した。この過酸化脂質量の変動は肺の共役ジェン測定によるThomas ら⁴⁾の結果と類似している。

今回の実験において見られた過酸化脂質の初期での減少は肺の中の機能的 SH 基の酸化というような直接酸化による生物学的活性の低下によるものと考えられる。

エタン生成および TBA 値の経時変化は Evans ら^{26,27)}が行った17 ppm NO₂ 暴露による肺胞 II 型細胞の増殖過程と類似している。つまり、NO₂ 暴露によって初期(0-1日)に I 型細胞が障害

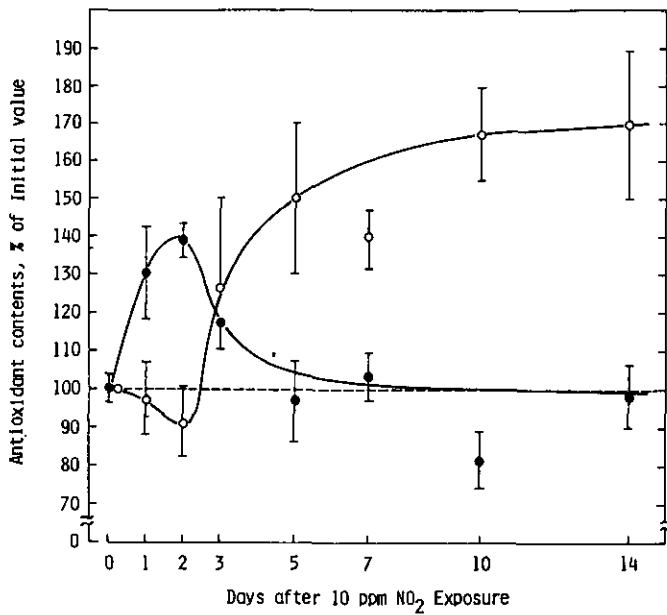


図 6 肺の非タンパク性 SH 量とビタミン E 量の経時的変化

Fig. 6 Periodical variations of the amounts of nonprotein sulfhydryls (NPSH) and vitamin E in the lungs.

The initial values were: $1.11 \pm 0.05 \mu$ moles of nonprotein-sulfhydryls/g-lungs (\circ), and $33.2 \pm 1.1 \mu$ g of d α -tocopherol/g-lungs (\bullet). The values are expressed as mean SEM (6 - 12).

を受け、1～3日でII型細胞の増殖と修復が初まり、その増殖は3日以降で減少するという経過をたどり、Evansら^{26,27)}の結果と類似している。

一方、3日目にみられた呼気中エタン分析による脂質過酸化はTBA値による脂質過酸化の値より若干高かった。また、初期レベルに対する各々の増加率を%で比較するとエタンのピークの方がTBA値のピークよりもブロードであった。この量的な違いはその由来が肺によるものか、Whole bodyによるものかという違いによるものと考えられる。それゆえに呼気中エタンの増加率からTBA値の増加率を差し引いた差の部分は5日目にピークとなり、肺組織以外の他の組織における脂質過酸化が生じたことを示唆している。

ここで検討した防御系酵素の活性は複雑な様式で変化した。これらの複雑な変化は酸化的障害から細胞を防護するための肺の相補的变化を反映しているものと考えられる。

Glutathione S-transferaseを除いた酵素活性の経時的変化は3日目以降では呼気中エタンとTBA値によって示した脂質過酸化の変化と対称的であった。それゆえ、それらの酵素の活性

増加は NO₂ による酸化的ストレスから細胞を防御するための相補的变化であると考えられる。これらすべての酵素活性は NO₂ 暴露によって形成された過酸化脂質によって誘導されたものと考えられる。さらにその誘導された Glutathione peroxidase が Glutathione reductase, Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase あるいは 6-Phosphogluconate dehydrogenase と連動して過酸化脂質を分解したりあるいは脂質過酸化物の形成を抑制している²⁸⁾ものと考えられる。そのために過酸化脂質は Glutathione peroxidase が誘導された5日目以降で減少したのであろう。

Fukase ら²⁹⁾は 1976年、マウスに 28ppm NO₂ を 7日間間歇暴露し、肺における Glutathione 量の上昇と同様にこれらの酵素活性の有意な増加が起きたことを報告している。しかし Chow ら³⁰⁾は 1974年、Glutathione peroxidase 活性が 2.3ppm と 6.2ppm NO₂ の 4日間連続暴露では増加しなかったことを報告しているが、この実験では Glutathione reductase と Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase 活性は有意に増加していたという。Menzel ら³¹⁾もまた 3.4 ± 0.1 ppm NO₂ に 3か月間暴露したマウス肺の Glutathione peroxidase は増加せず、また 1.0 ppm NO₂ に 3か月間長期暴露したモルモットの場合も Glutathione peroxidase 活性は増加しなかったことを報告している。Glutathione peroxidase の活性もまた経時的に複雑に変動することからこれらの結果の違いは NO₂ の暴露量と暴露期間さらに動物の種差によるものと考えられる。

ブラッドに NO₂ を暴露した場合、同様に誘導された Glutathione reductase は還元型 glutathione の要求を増加し、その結果 Glutathione peroxidase の活性増加を誘導するのであろう。また、Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase と 6-Phosphogluconate dehydrogenase 活性の増加は NADPH 形成による還元ポテンシャルの維持のために働く。一方、Selenium 非依存性 Glutathione peroxidase (Glutathione S-transferase) は誘導されなかった。それ故、基質として Cumene hydroperoxide を用いて測定した Glutathione peroxidase 活性の増加部分は Selenium 依存性の Glutathione peroxidase によるものと考えられる。

Disulfide reductase の誘導はタンパク性 SH 基、あるいは非タンパク性 SH 基の間の結合によって生じた disulfides の著しい増加を反映していると考えられる。

Superoxide dismutase は酸素³²⁾やオゾン³³⁾の高濃度暴露で誘導されることがよく知られている。これとは反対に、Crapo ら³⁴⁾は 25ppm NO₂ に 5日から 6日間の暴露によって、Whole Lung 当たりの Units で表した Cuprozinc superoxide dismutase 活性は有意差はないが約 10% の増加を示したことを報告している。我々は本実験において units/mg · protein/min によって示した Superoxide dismutase の活性が 1日目から 3日目までは減少したが、10日目以降は有意に増加したことを見いだした。Superoxide dismutase 活性の誘導増加は NO₂ 暴露による過酸化脂質の増加に Superoxide anion radical が関与していることを間接的に示唆し、さらに細胞障害が過酸化脂質の産生と関連していることを示唆している。

非タンパク性 SH の経時的変化は防御系酵素の変化に類似していた。この結果は SH 基量の増加が Glutathione reductase や Disulfide reductase 活性の増加と関連し、防御系酵素と同じ様に

酸化的障害から細胞を保護するために働くことを唆している。

これとは対照的に、ビタミンEは初期に増加しその経時的変化は非タンパク性SHの変化と対称的であった。ビタミンEは生体内では合成されず、肝臓等に貯蔵されていることからこのビタミンEの増加は主に肝臓など肺以外の組織から運ばれてきたのであろう。それゆえに、ビタミンEは脂質過酸化の予防のために動員される早期救済因子の一つであると考えられる。これらの結果から非タンパク性SHに対してビタミンEは酸化的障害から細胞を守る相補的因子として作用するものと考えられる。

以上、本実験においてNO₂暴露に対する肺の生化学的応答は複雑な様式で変化し、さらにNO₂暴露に対する防御機構は脂質過酸化と密接に関連していることを示唆している。

引用文献

- 1) McAdams, A., Jr. (1955): Bronchiolitis obliterans. *Amer. J. Med.*, **19**, 314-322.
- 2) Gray, E. (1959): Oxides of nitrogen: Their occurrence, toxicity, and hazard. *Arch. Ind. Health*, **19**, 479-486.
- 3) Tappel, A.L. (1975): Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. *In Pathobiology of cell membranes*. Acad. Press, N.Y., **1**, 145-170.
- 4) Thomas, H.V., P.K. Mueller and P.L. Lyman (1967): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
- 5) Mustafa, M.G. and D.F. Tierney (1978): Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide toxicity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **118**, 1061-1090.
- 6) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. I Lipid peroxidation as measured by ethane exhalation of rats exposed to nitrogen dioxide. *Lipids*, **16**, 64-67.
- 7) Chow, C.K. and A.L. Tappel (1972): An enzyme protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone exposed rats. *Lipids*, **7**, 518-524.
- 8) Habig, W.H., M.J. Pabst and W.B. Jakoby (1974): Glutathione S-transferase: The first enzymic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
- 9) Prohaska, J.R. (1980): The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta*, **611**, 87-98.
- 10) McCord, J.M. and I. Fridovich (1969): Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.
- 11) Delucia, A.J., M.G. Mustafa, M.Z. Hussain and C.E. Cross (1975): Ozone interaction with rodent lung: III. Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and nonprotein sulfhydryls. *J. Clin. Inv.*, **55**, 794-802.
- 12) Tietze, F. (1970): Disulfide reduction in rats liver: Evidence for the presence of nonspecific nucleotide dependent disulfide reductase and glutathione disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 177-188.
- 13) Fleicher, B.L. and A.L. Tappel (1973): Protective effects of dietary α -tocopherol in rats exposed to toxic levels of O₃ and NO₂. *Environ. Res.*, **6**, 165-175.
- 14) Tappel, A.L. (1972): Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **203**, 12-28.
- 15) Tappel, A.L. (1978): Protection against free radical lipid peroxidation reactions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **97**, 111-131.

- 16) Sagai, M. (1977): The effect of enzyme-inducing agents on the survival times of rats exposed to lethal levels of nitrogen dioxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **43**, 169-174.
- 17) Little, C. and P.J. O'Brien (1970): Properties and regulation of glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3632-3639.
- 18) Bergmeyer, H.U. (1974): Reagents for enzymatic analysis: Glutathione reductase. *In* *Methods of Enzymatic Analysis*. (ed. by Bergmeyer, H.U.), **2**, 465-466.
- 19) Wilhelm, L.G. and H.D. Waller (1974): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *In* *Methods of Enzymatic Analysis*. (ed. by Bergmeyer, H.U.) Acad. Press. N.Y., **2**, 636-643.
- 20) Kaplowitz, N., J. Kuhlenkamp and G. Glifton (1975): Drug induction of hepatic glutathione s-transferase in male and female rats. *Biochem. J.* **146**, 351-356.
- 21) Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- 22) Sagai, M. and A.L. Tappel (1979): Lipid peroxidation induced by some halomethanes as measured by in vivo pentane production in the rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **49**, 283-291.
- 23) Sagai, M. and T. Ichinose (1980): Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Sciences*, **27**, 731-738.
- 24) 嵯峨井 勝, A.L. Tappel, (1979): 脂質過酸化の新しい測定法としての呼気ガス分析法. 過酸化脂質研究, **3**, 1-8.
- 25) Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 26) Evans, M.J., R.J. Stephen, L.J. Cabral and G. Freeman (1972): Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of NO₂. *Arch. Environ. Health*, **24**, 180-188.
- 27) Evans, M.J., L.J. Cabral, R.J. Stephens and G. Freeman (1973): Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. *Am. J. Pathol.*, **70**, 175-198.
- 28) McCay, P.B., D.D. Gibson, K. Fong and K.R. Hornbrook (1976): Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **431**, 459-465.
- 29) Fukase, O., K. Isomura and H. Watanabe (1976): Effects of nitrogen oxide on peroxidative metabolism in mice lungs. *Taiki Osen Kenkyu*, **11**, 65-69. (In Japanese).
- 30) Chow, C.K., C.J. Dillard and A.L. Tappel (1974): Glutathione peroxidase system and lysosome in rats exposed to ozone or nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **7**, 311-317.
- 31) Menzel, D.B., M.B. Abou-Donia, C.R. Roe, R.E. Ehrlich, D.E. Gardner and D.L. Coffin (1977): Biochemical index of nitrogen dioxide intoxication of guinea pigs following low level long-term exposure. *In*: International Conference on Photochemical Oxidant Pollution and Its Control Proceedings. Vol. II. EPA 600/3-77-001h. Washington, D.C.
- 32) Crapo, J.D. and D.F. Tierney (1974): Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am. J. Physiol.*, **226**, 1401-1407.
- 33) Mustafa, M.G. (1975): Influence of dietary vitamin E on lung cellular sensitivity to ozone in rats. *Nutrition Reports International*, **11**, 473-476.
- 34) Crapo, J.D., K. Sjostrom and R.T. Drew (1978): Tolerance and cross-tolerance using NO₂ and O₃. I. Toxicology and biochemistry. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.*, **44**, 364-369.

7

二酸化窒素亜急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化

Changes of Lipid Peroxidation and Antioxidative Protective Systems in Lungs of Rats Subacutely Exposed to Low Level Nitrogen Dioxide

市瀬孝道¹・嵯峨井 勝¹

Takamichi ICHINOSE¹ and Masaru SAGAI

要 旨

本研究はNO₂の生体への慢性影響を評価する一環として、低濃度NO₂を4か月暴露したラットの肺の抗酸化性防御機構について経時的変化と量-効果関係を検討した。更にその結果を過酸化脂質の変化と比較してNO₂の酸化的障害に対する生体の代償能について検討した。実験には13週令のJCL: Wistar系雄ラットを用い、0.4, 1.2, および4 ppmのNO₂にそれぞれ1, 2, 4, 8, 12, 16週間の連続暴露を行った。ラットの呼気中のエタン産生量によって測定された過酸化脂質は1週目で最大となり、その後減少し4週目で初期レベルに戻った。しかし、その後ふたたびゆるやかな増加を示した。肺ホモジネート中のTBA反応によって測定した過酸化脂質量も同傾向の変化を示したが、最大ピークはエタンよりも時期的に遅れて現われ、かつ低値を示した。

一方、酸化的障害に対する防御系酵素であるGlutathione peroxidase (GPx), Glutathione reductase (GR), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), Superoxide dismutase (SOD), およびDisulfide reductase (DSR)活性は1週目から増加しはじめ、4週目で最大のレベルに達し、その後16週目まで徐々に低下した。また4週目における活性増加率の大きさはG6PD > 6PGD > GR > SOD > DSR > GPxの順であり、これら酵素活性は暴露終了まで3濃度間で量-効果関係を示した。またGSH S-transferase活性の変化は1週目から4週目にかけて減少し、その後8週目から16週目にかけて初期レベルに回復した。抗酸化性物質である非タンパク性SH量は防御酵素と類似した変化を示した。

前報告に記した高濃度暴露の場合と比較すると、低濃度長期暴露においては脂質過酸化および抗酸化性防御機構の変化は高濃度暴露の場合よりも小さく、そのピークの出現時期も遅れることが判明した。さらに暴露期間が長くなるにつれて酸化的障害から細胞を防御する機能が低下し、逆に細胞内に過酸化脂質生成がしだいに亢進してゆ

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

くことが示された。

Abstract

The time- and dose-dependent changes of antioxidative protective systems in lungs of rats exposed continuously to low levels of nitrogen dioxide for 4 months were examined for the evaluation of chronic health effects, and they were compared with those of lipid peroxidation. JCL: Wistar male rats of 13 week-old were exposed to nitrogen dioxide to 0 (control), 0.4, 1.2 and 4 ppm concentrations for 1, 2, 4, 8, 12 and 16 weeks.

Lipid peroxidation as measured by ethane exhalation in the breath of rats increased to a maximum at the first week, and then returned to near the initial level at the 4th week. Thereafter, it showed a tendency toward gradual increase, again. Lipid peroxidation as measured by the reaction with thiobarbituric acid and the lung homogenates showed a similar pattern, but the appearance of the maximum was later than that of ethane, and the relative peak height was also lower.

The activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), superoxide dismutase (SOD) and disulfide reductase (DSR) increased from the first week, and reached their maximum levels at the 4th week, and then decreased gradually until the 16th week. The order of the increased ratios against the control group at the 4th week was $G6PD > 6PGD > GR > SOD > DSR > GPx$, and the activities were dose-dependent against nitrogen dioxide levels of 0.4 to 4 ppm in each period. While, glutathione S-transferase activity decreased from the first to the 4th week, it recovered to the initial level from the 8th to the 16th week. The contents of non-protein sulfhydryls showed a similar pattern as the protective enzymes. The time course of vitamin E was similar to that of lipid peroxidation rather than those of the protective enzymes.

From these results, it was confirmed that the ability of the antioxidative protective systems to protect cells from the oxidative stress was at a maximum in the early phase, but it was not maintained so long. It was also confirmed the cytotoxic lipid peroxide forming process followed a reverse course. These results suggest the possibility that the antioxidative ability may decrease with longer term exposure to nitrogen dioxide and lipid peroxidation may increase more and more.

はじめに

大気汚染物質であるNO₂やO₃は生物細胞の不飽和脂肪酸と容易に反応してフリーラジカルメカニズムによって過酸化脂質を生ずる¹⁾。また細胞膜の脂質過酸化が細胞障害や多くの毒性発現の原因であると見なされている²⁾。一方細胞内には過酸化脂質やフリーラジカルから生体を防御するためのいくつかの生化学的な機構が存在していることが知られている³⁾。これらには抗酸化性防御機構として協同的に作用するG6PD, 6PGD, GR, GPx, GSH S-transferase, SOD, DSRなどの酵素群とさらに内因性の抗酸化性物質である還元型グルタチオンやビタミンEなどが含まれることを先の論文で詳細に説明した^{4,5,6)}。またNO₂を急性暴露すると過酸化脂質とこれら肺の防御系酵素活性が複雑な様式で変化し、この両者の変化は逆相関性の変化を示すことを報告した^{4,5,6)}。そのためNO₂の慢性影響を解明するためにはより長期の暴露実験を行い、抗酸化性防御機構の変

化を研究することが必要となる。

本実験は0.4, 1.2, および4 ppmのNO₂に4か月間暴露したラットの肺の抗酸化性防御機構の経時的变化と量-効果関係について検討し, 更にその結果を過酸化脂質の変化と比較し, NO₂の暴露経過に伴う酸化的障害に対する代償能の変化について調べた。

材料および方法

13週令のJCL: Wistar系雄ラットを用いて0.4, 1.2および4 ppmのNO₂にそれぞれ1, 2, 4, 8, 12, 16週間の連続暴露を行った。NO₂濃度はモニターラボ社の窒素酸化物分析計 (Model 8440-H型) によって測定した。ラットはハンギング・ワイヤーメッシュ・ケージの中で6匹を一群として飼育し, ステンレス・ガラス製チャンバーの中で各濃度のNO₂に暴露した。チャンバー内温度は24~26℃に, 湿度は50~60%に制御され, 室内照明は14時間点灯10時間消灯とした。またこれらのラットは日本クレア製CE-2固型飼料で飼育した。この固型飼料のVitamin E量は23mg/kg, 粗脂肪は3.5%であり, この粗脂肪の脂肪酸組成はパルミチン酸が18.3%, オレイン酸が21.0%, リノール酸が54.8%およびリノレン酸が2.8%であった。

ラットをエーテル深麻酔下で右の頸動脈より放血屠殺し, その後肺を摘出し, 生理食塩水で洗浄しスクリービンに入れ, 窒素ガス置換後用時まで-80℃に保存した。

肺のホモジネートの調整と酵素活性ならびに非タンパク性SH量, TBA値の測定は前報告⁶⁾と同様に行った。GPx活性測定はLittleらの方法⁷⁾, GR, G6PD, ICDHおよびGSH S-transferase活性測定はそれぞれBergmeyer法⁸⁾, Wilhelmらの方法⁹⁾, Berntらの方法¹⁰⁾およびKaplowitzらの方法¹¹⁾に従った。なお6PGD活性測定は6-Phosphogluconateを基質としてG6PDの測定法に従った。SODとDSR活性の測定はMcCordとFrindovichの方法¹²⁾, Tietzeの方法¹³⁾に従った。また非タンパク性SH量の測定はDeluciaらの方法¹⁴⁾, TBA値の測定はOhkawaらの方法¹⁵⁾に従って行った。*In vivo*の脂質過酸化の測定は呼気中エタン, エチレン, ペンタンの分析により既報^{16, 17, 18)}に従って行った。またタンパク量はLowry法¹⁹⁾によって測定した。呼気中エタンの値は平均値±SEで, またTBA値, 各酵素活性および非タンパク性SHの値は対照群を100%とした値で示し, Studentの*t*検定によって有意差レベルをP<0.05として解析した。

結 果

ラットの体重の経時的变化を図1に示した。NO₂に暴露したラットの体重は1~2週目の初期には対照群よりわずかに高い値を示したが, すべての期間において対照群との間に有意差は認められなかった。対照群と0.4, 1.2, および4 ppm NO₂を16週間暴露したラットの呼気中エタン測定による過酸化脂質生成量の経時的变化とTBA反応による肺の過酸化脂質量(TBA値)の経時的变化を図2に示した。NO₂暴露ラットの呼気中エタン量は1週目で最大に達し, その後減少し4週目で

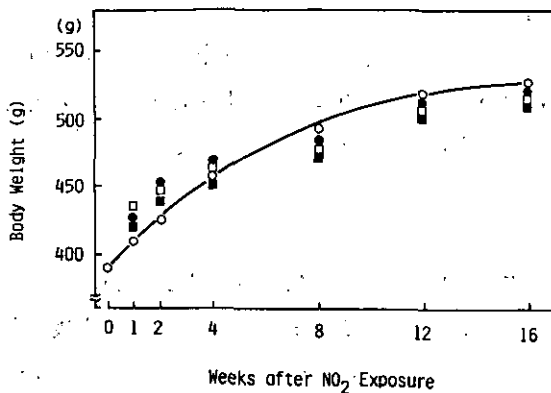


図 1 0.4, 1.2 および 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラットの体重の経時的変化

Fig. 1 Periodical changes of body weight of rats exposed to 0.4, 1.2 and 4.0 ppm nitrogen dioxide for 4 months

○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group;

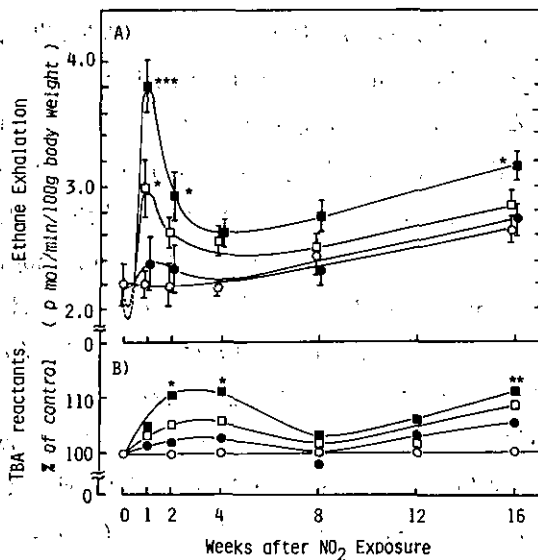


図 2 0.4, 1.2 および 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラットの呼気中エタン産生と肺の TBA 値の経時的変化

Fig. 2 Periodical changes of ethane exhalation (A) in breath and TBA reactants (B) in lungs of rats exposed to 0 (control), 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for four months

○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group;
*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

初期レベルに戻った。1週目の呼気中エタン量は0.4 ppm群では対照群の108%、1.2 ppm群では135%、4 ppm群では172%に相当した。呼気中エタンはその後ふたたびゆるやかに増加し初め、8週目から16週目にかけて徐々に増加した。また、すべての期間で濃度との間に量-効果関係が見られた。呼気中エチレンとペンタンはNO₂暴露による過酸化脂質の指標とはなりえなかった。また肺のTBA値は4週目で最大レベルに達し、この時の0.4 ppm、1.2 ppm および4 ppm NO₂暴露群の値は対照群のそれぞれ103%、106%、116%に相当した。その後TBA値は8週目で一旦対照レベルに戻ったが、12週目から16週目にかけてふたたび増加してゆく傾向を示し、4 ppmの16週間で対照群と有意差を示した。またエタン産生と比較した場合、最大ピークはエタンのピークが出現する時期よりも遅れ、かつ低い値を示した。

過酸化脂質を代謝する防御酵素としてのGPxとGR活性の経時的变化を図3に示した。NO₂の各濃度におけるGPx活性は1週目から4週目にかけて増加したが、その後ふたたび減少して対照レベルまで戻った。最大レベルに達した4週目の各濃度群における活性値は対照群のそれぞれ106、108および110%に相当し、その変化は極めてわずかなものであった。GR活性の経時変化はGPxと似たパターンを示したが、4週目以降に見られた減少はGPxの場合よりゆるやかで、より持続的な代償性変化を示す酵素であることを示した。G6PD活性の経時的变化を図4に示した。4週目に見られた最大活性値は対照群に比較して各濃度群でそれぞれ106、115および145%に相当した。またこの変化もGPx、GRと類似した経時的变化を示した。6PGD活性の経時的变化もGPxの変化に類似したパターンを示し、4週目に見られた最大活性値は各濃度群で対照群の103、110および131%に相当する増加を示した。ICDH活性はNO₂暴露期間中有意な変化は見られなかった。SOD活性とDSR活性の経時的变化を図5に示した。これら酵素活性の変化もまたGRやG6PDの変化と類似していた。2週目から4週目で見られたSODの最大活性値は対照群の103、111および119%に相当した。またDSR活性は4週目で最大レベルに達し、対照群のそれぞれ104、107および113%であった。また対照群に対して4週目で見られた各酵素活性の増加率の順序はG6PD > 6PGD > GR > SOD > DSR > GPxの順であった。これとは別にGSH S-transferaseの活性値は1週目から4週目にかけて減少し、その後8週目から16週目で初期レベルまで回復した(図6、図7)。この結果から、GSH S-transferaseを除く肺の防御系酵素はNO₂暴露から細胞を保護するために初期に急速に誘導されることを示しているが、この増加はそれほど長くは持続しなかった。抗酸化物質(Antioxidants)である肺の非タンパク性SH量は防御酵素の経時的变化と類似していた(図8)。4週目で最大レベルに達し、それぞれ対照群の103、133および164%に相当していた。

本実験のNO₂2週間暴露で得られたラット肺の防御系酵素活性、TBA値およびグルタチオンや α -Tocopherolのような抗酸化物質含量の量-効果関係を図9に示した。また10 ppm NO₂の2週間暴露の値は前報で得られた結果⁶⁾を引用した。0 ppmから10 ppmまでのNO₂暴露による量-効果関係はGSH S-transferaseを除いた非タンパク性SHおよび各防御系酵素について観察さ

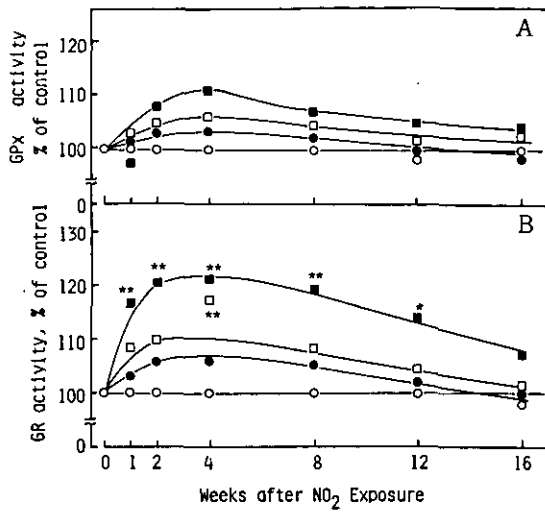


図 3 0.4, 1.2 および 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラット肺のグルタチオンペー
 ーオキシダーゼ(GPx) 活性とグルタチオン還元酵素 (GR) 活性の経時的変化

Fig. 3 Periodical changes of glutathione peroxidase (GPx) (A) and glutathione
 reductase (GR) (B) activities in lungs of rats exposed to 0, 0.4, 1.2 and 4
 ppm NO₂ for four months

○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group:
 *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

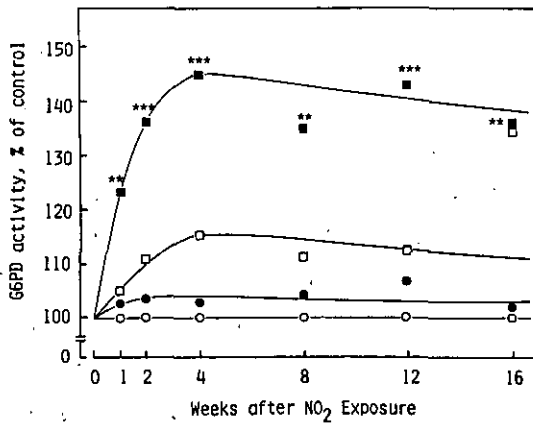


図 4 0.4, 1.2 および 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラット肺のグルコース-6-
 リン酸脱水素酵素活性の経時的変化

Fig. 4 Periodical changes of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in lungs
 of rats exposed to 0, 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for four months

○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group:
 *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

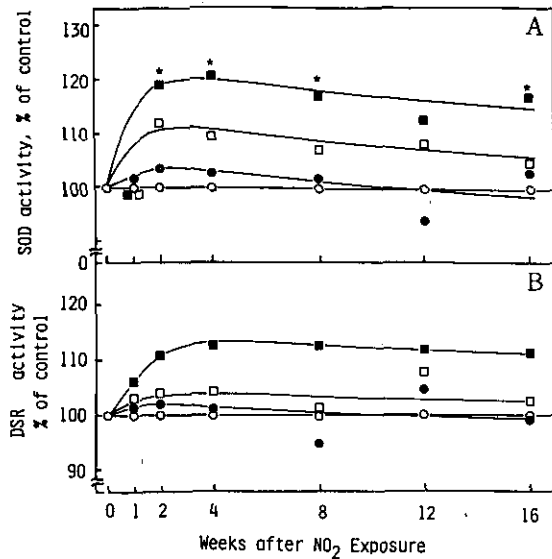


図 5 0.4, 1.2 および 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラット肺のスーパーオキシドディスムチース(SOD) 活性とダイサルファイド還元酵素(DSR)活性の経時的変化

Fig. 5 Periodical changes of superoxide dismutase (SOD) (A) and disulfide reductase (DSR) (B) in lungs of rats exposed to 0, 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for four months

○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group;
*, $P < 0.05$

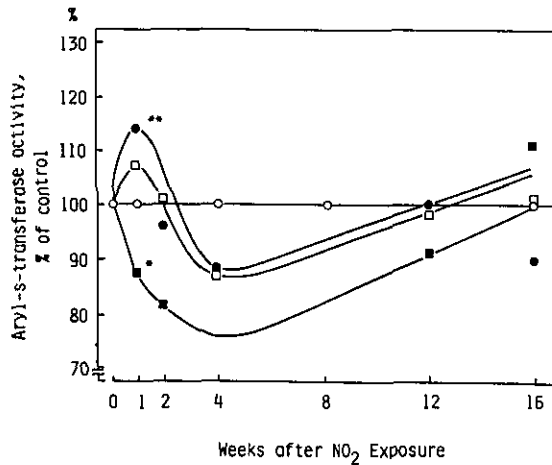


図 6 0.4, 1.2 および 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラット肺のアリル-S-トランスフェラーゼ活性の経時的変化

Fig. 6 Periodical changes of glutathione S-transferase (aryl-S-transferase) activity in lungs of rats exposed to 0, 0.4, 1.2 and 4 ppm nitrogen dioxide for 4 months

○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group;
*, $P < 0.05$; **, $P < 0.05$

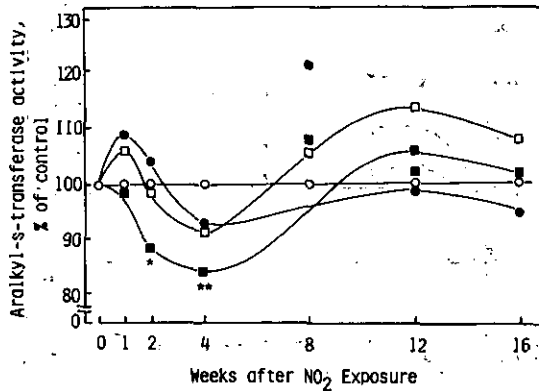


図 7 0.4, 1.2 および 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラット肺のアラルキル-S-トランスフェラーゼ活性の経時的変化

Fig. 7 Periodical changes of glutathione-S-transferase (aralkyl-S-transferase) activity in lungs of rats exposed to 0, 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for four months
 ○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group:
 *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

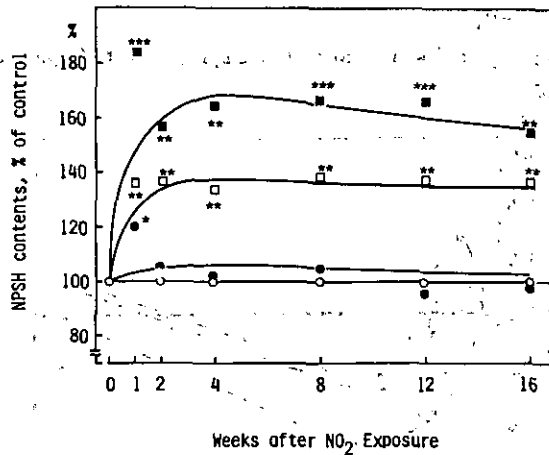


図 8 0.4, 1.2 および 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露したラット肺の非タンパク性 SH 量 (NPSH) の経時的変化

Fig. 8 Periodical changes of non-protein sulfhydryls (NPSH) contents in lungs of rats exposed to 0, 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for four months
 ○, control group; ●, 0.4 ppm group; □, 1.2 ppm group; ■, 4 ppm group:
 *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

れた。これには3種のタイプの量-効果関係が見られた。G6PD, 6PGDおよび非タンパク性SH含量はNO₂暴露濃度と直線的な量-効果関係を示し, GPx, GRおよびDSRは凹型の曲線的な量-効果関係を, またSODは凸型の曲線的な量-効果関係を示していることが認められた。しかし, TBA値と α -Tocopherol含量にはこの様な量-効果関係は認められなかった。

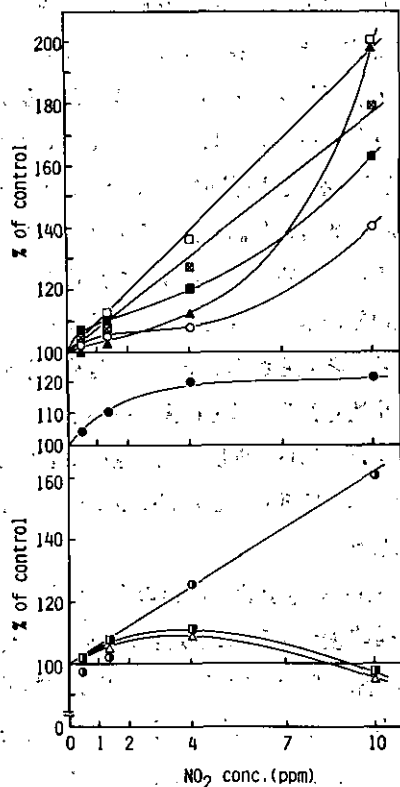


図 9 0~10 ppmのNO₂に2週間暴露されたラットの肺の防御系酵素活性およびTBA値と抗酸化物質の量-効果関係

Fig. 9 Dose-response relationship of glutathione peroxidase (○), glutathione reductase (■), glucose-6-phosphate dehydrogenase (□), 6-phosphogluconate dehydrogenase (⊠), superoxide dismutase (●) and disulfide reductase (▲) activities, and non-protein sulfhydryls (⊙), TBA reactants (■) and α -tocopherol (△) contents in lungs of rats exposed to NO₂ of 0 to 10 ppm concentrations for two weeks

The values in 10 ppm NO₂ were cited from the previous paper⁵⁾

考 察

我々は前報告^{4,5,6)}の10ppm NO₂ 2週間暴露実験で、ラットの過酸化脂質が3～4日目で最大レベルに上昇し、その後再び初期レベルに戻ることを報告した。この抗酸化性防御機能は3日目より増加し始めて、5～10日目で最大レベルに達することを報告した。この抗酸化性防御機能が3日目以降に増加するのに対して、過酸化脂質がその逆の変化を示したことから、これら防御機能の増加がNO₂暴露における脂質過酸化反応に対する相補的变化を起こしたものであることを示唆した。

本研究では更に、低濃度NO₂の長期暴露実験を行いNO₂暴露の経過に伴う脂質過酸化反応の昂進に対する抗酸化性防御機能について調べた。

本実験において、比較的低濃度のNO₂でも過酸化脂質が生成されることを呼気中エタン測定と肺のホモジネートのTBA値の測定によって確認することができた(図2)。過酸化脂質は初期に、NO₂濃度に対応した上昇を示し、呼気中エタンのピークは防御酵素の増加に先だって現れた。そしてエタンの上昇レベルはTBA値レベルより高い値を示し、この増加は肺以外の組織に生じた過酸化脂質による影響であると考えられる。また呼気中エタンとTBA値との間にピークの出現時期に違いが生じていた。この相違は過酸化脂質の代謝経路におけるエタンとTBA反応物質の形成過程の相違によるものと考えられる。過酸化脂質の減少によって形成されたエタンはそれ以上に代謝されることはないが、TBA反応性物質の本体と考えられているマロンジアルデヒド(MDA)は他の化合物に代謝される²⁷⁾ためであると考えられる。その後、過酸化脂質は一旦は対照レベルに戻るが再び増加する傾向を示し、抗酸化性防御系とは逆の変化を示したことから、徐々に過酸化脂質生成が進行していると考えられる。またこれら低濃度NO₂暴露における過酸化脂質の経時変化は、高濃度NO₂暴露よりもピークのレベルは低く、また経時的な遅れはあるが、10ppm NO₂急性暴露の場合と類似の経時的変化を示した。

一方、抗酸化性防御系は10ppm NO₂暴露と同様の複雑な変化を示し、低濃度長期暴露においても脂質過酸化障害に対する相補的变化を示すことが認められた。防御系酵素は1週目から4週目にかけて増加が見られ、特に4ppm群のG6PD活性の増加が特徴的であり、また6PGDやGR活性の増加率も4ppm群で比較的高かったのに対し、過酸化脂質を分解するGPx活性の増加率は低かった。深瀬ら²⁰⁾は6±1ppmのNO₂に30日間暴露したマウスの肺でG6PDとGRの活性の増加を認めているがGPx活性は変化しなかったと報告している。またMenzelら²¹⁾も3.4±0.1ppm NO₂に3か月間暴露したモルモットでもGPx活性の増加は認めなかったと報告している。一方、我々が行った10ppm NO₂ 2週間暴露^{4,5,6)}において、肺のGPx活性の有意な増加を認め、またFukaseら²²⁾が行った28ppm NO₂ 7週間暴露においてもGPx、GR、G6PD活性の有意な増加を認めたことを報告している。これらの結果から、GPx活性の増加は比較的高濃度のNO₂暴露の場合に限られ、低濃度NO₂暴露の場合にはG6PD、6PGDおよびGRなどのPMP系(Peroxi-oxidative metabolic pathway)の酵素活性の増加が特徴的であると言えよう。またGPxは図9に示す様に、凹型の曲線的量-効果関係を示すことから、低濃度レベルのNO₂暴露によって誘導

されにくく、高濃度レベルで誘導されることを示している。また図9で示す様に、TBA値が高濃度レベルで逆に低く量-効果関係を示さなかったことはこのGPxの過酸化脂質に対する解毒分解能を反映しているものと考えられる。SOD活性は酸素²³⁾やオゾン²⁴⁾の高濃度暴露で誘導されるが、我々は本実験において、比較的低濃度のNO₂暴露でも増加を認め、4ppmにおいては全期間で有意な増加を示す結果を得た。これらの結果から、NO₂の低濃度暴露でもSuperoxide anion radicalが発生することが間接的に示唆された。しかし、図9で示す様に凸型の曲線の量-効果関係が見られることから、高濃度レベルのNO₂でもそんなにSuperoxide radicalの発生は大きくはないと考えられる。またDSR活性も有意ではなかったが増加傾向を示したことから低濃度暴露でもdisulfideが生成されることが示唆された。

Fukaseら²²⁾は28ppm NO₂ 7日間の間歇暴露で肺におけるグルタチオン含量の上昇を認め、我々も前報^{5,6)}で非タンパク性SHの上昇を認めた。本実験において、比較的低濃度 NO₂ 暴露の場合にも非タンパク性SHの増加を認め、図9で示す様に、G6PDと同様に直線的量-効果関係を示していた。これらの結果から、その還元作用によって防御系酵素と同様に、酸化的障害から細胞を保護していることが示唆される。これらの酵素活性や抗酸化性物質の増加は酸化的ストレスから生体を防御するための相補的変化であると考えられ、この考えは酵素活性や抗酸化性物質が最大に上昇した4週目で、呼気中エタン測定による過酸化脂質量が最低レベルに減少したという結果によって支持された。しかし、酵素活性や抗酸化性物質の増加は長くは持続せず、4週目以降16週目までゆるやかに減少していったことから、酸化的ストレスに対する代償性反応は一時的なものであって、暴露の経過とともに代償能が徐々に低下してゆくことが考えられる。このことは中島ら^{25,26)}の0.8ppm 5日、0.7~0.8ppm NO₂ 1か月あるいは0.5ppm NO₂ に6か月暴露したマウスの還元型グルタチオンの消長に関する結果からも支持されている。この様に抗酸化性防御機構はNO₂暴露の初期段階で過酸化反応に対する代償機構として生体を防御する動きを示すが、これは一時的であり、NO₂暴露の長期化につれて徐々に代償能が低下し、逆に過酸化脂質の生成がしだいに進行することを示唆した。

引用文献

- 1) Menzel, D.B. (1976): The role of free radicals in the toxicity of air pollutants (Nitrogen oxides and Ozone). *In* Free radicals in biology, (ed, Pryer, A.W.) 2, 181-200.
- 2) Tappel, A.L. (1975): Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. *In* Pathobiology of cell membranes. Acad. Press, N.Y., 1, 145-170.
- 3) Chow, C.K. and A.L. Tappel (1972): An enzyme protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone exposed rats. *Lipids*, 1, 518-524.
- 4) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. I. Lipid peroxidation as measured by ethane exhalation of rats exposed to nitrogen dioxide. *Lipids*, 16, 64-67.

- 5) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide II. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health.* (in press).
- 6) 嵯峨井 勝・市瀬孝道 (1981): NO₂急性暴露ラットの脂質過酸化と肺における抗酸化性防御機構の变化. 国立公害研究所研究報告, 第31号, 67-79.
- 7) Little, C. and P.J. O'Brien (1970): Properties and regulation of glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3632-3639.
- 8) Bergmeyer, H.U. (1974): Reagents for enzymatic analysis: Glutathione reductase. *In Methods of Enzymatic Analysis.* (ed. by Bergmeyer, H.U.), **2**, 465-466.
- 9) Wilhelm, L.G. and H.D. Waller (1974): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *In Methods of Enzymatic Analysis.* (ed. by Bergmeyer, H.U.) Acad. Press, N.Y., **2**, 636-643.
- 10) Bernt, E. and H.U. Bergmeyer (1974): Isocitrate dehydrogenase. *In Methods of enzymatic analysis.* (ed. by Bergmeyer, H.U.) Acad. Press, N.Y., **2**, 624-631.
- 11) Kaplowitz, N., J. Kuhlenkamp and G. Clifton (1975): Drug induction of hepatic glutathione s-transferase in male and female rats. *Biochem. J.* **146**, 351-356.
- 12) McCord, J.M. and I. Fridovich (1969): Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.
- 13) Tietze, F. (1970): Disulfide reduction in rats liver: Evidence for the presence of nonspecific nucleotide-dependent disulfide reductase and glutathione-disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 177-188.
- 14) Delucia, A.J., M.G. Mustafa, M.Z. Hussain and C.E. Cross (1975): Ozone interaction with rodent lung: III: Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and non-protein sulfhydryls. *J. Clin. Inv.*, **55**, 794-802.
- 15) Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- 16) Sagai, M. and A.L. Tappel (1979): Lipid peroxidation induced by some halomethanes as measured by in vivo pentane production in the rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **49**, 283-291.
- 17) Sagai, M. and T. Ichinose (1980): Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Science*, **27**, 731-738.
- 18) 嵯峨井 勝, A.L. Tappel, (1979): 脂質過酸化の新しい測定法としての呼気ガス分析法. 過酸化脂質研究, **3**, 1-8.
- 19) Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 20) 深瀬 治・磯村公郎・渡辺 弘 (1976): 窒素酸化物のマウス肺 Peroxidative metabolic pathway への影響. 大気汚染研究, **11**, 61-69.
- 21) Menzel, D.B., M.B. Abou-Donia, C.R. Roe, R.E. Ehrlich, D.E. Gardner and D.L. Coffin (1977): Biochemical indexes of nitrogen dioxide intoxication of guinea pigs following low level long-term exposure. *In: International Conference on Photochemical Oxidant Pollution and Its Control Proceedings, II, EPA 600/3-77-001h.* Washington, D.C.
- 22) Fukase, O., K. Isomura and H. Watanabe (1976): Effects of nitrogen oxide on peroxidative metabolism in mice lungs. *Taiki Osen Kenkyu*, **11**, 65-69. (In Japanese).
- 23) Crapo, J.D. and D.F. Tierney (1974): Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am. J. Physiol.*, **226**, 1401-1407.
- 24) Mustafa, M.G. (1975): Influence of dietary vitamin E on lung cellular sensitivity to ozone in rats. *Nutrition*

Reports International, 11, 473-476.

- 25) 中島泰知・楠本繁子 (1968) : 短期連続暴露のマウス肺・還元型グルタチオン量におよぼす影響. 大阪府立公衆衛生研究所報告労働衛生編, 6, 17-21.
- 26) 中島泰知 (1973) : 窒素酸化物の生体影響 — 動物暴露実験 — 大気汚染研究, 8, 223-233.
- 27) Ruitter, N.D., H. Muliawan and H. Kappus, (1980): Ethane production of mouse peritoneal macrophages as indication for lipid peroxidation and the effect of heavy metals. Toxicology, 17, 265-268.

8

二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響
— 脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化 —

Effects of Long-Term Exposure of Nitrogen Dioxide on Rats
— Changes of Lipid Peroxidation and Antioxidative Protective Systems in Lungs —

嵯峨井 勝¹・市瀬孝道¹

Masaru SAGAI¹ and Takamichi ICHINOSE¹

要 旨

Wistar 系雄ラットに 0.04 ppm, 0.4 ppm, 4.0 ppm の NO₂ を 9, 18, 27 か月間暴露し、脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化について調べた。

呼気中のエタン測定による脂質過酸化は 9, 18 か月間暴露の場合 0.04, 0.4 および 4.0 ppm のすべての NO₂ 暴露群で対照群に比べて有意な増加を示し、かつその増加は NO₂ 濃度に依存していた。また 27 か月暴露の場合は 0.04 ppm と 0.4 ppm 群で対照群の約 2 倍に増加したが 4.0 ppm 群では逆に低下し対照群に近づく傾向を示し、肺障害の質的变化を示唆した。一方、呼気中ペンタンは 18 か月暴露の 0.04 ppm と 0.4 ppm での増加以外にはほとんど変化を示さなかった。TBA 法による肺の脂質過酸化は 9 か月間暴露では 4.0 ppm 群のみが、18 か月暴露では 0.4 ppm 群と 4.0 ppm 群で有意な増加を示し、その変化はエタン測定による脂質過酸化と類似の傾向を示した。

一方、肺の抗酸化性防御機構は 9 か月間暴露で Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase, Glutathione reductase 活性および非蛋白性 SH 含量が 4.0 ppm 群でわずかながら有意な増加を示したがその他は対照群と全くかわりなかった。

18 か月間暴露の場合過酸化物代謝に関与する Glutathione peroxidase と Glutathione S - transferase 活性が 0.4 ppm 群と 4 ppm 群で低下する場合があり、肺の防御機能が低下していることを示唆したが、非タンパク性 SH 基は 0.4 ppm と 4 ppm 群でなお対照群より有意に増加していた。

これらの結果から、肺の抗酸化性防御機能は NO₂ 暴露の長期化に伴って対照レベルに、あるいは対照レベルよりもさらに低下するのに対して、脂質過酸化は逆に NO₂ 暴露の長期化につれて増加しつづけ、その両者の変化は対称的であることが明らかとなった。更に、4 ppm NO₂ の 27 か月暴露の場合には肺障害の質的变化が示唆された。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川 16 番 2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Abstract

This work was conducted to evaluate the chronic health effects from the change of lipid peroxidation and the antioxidative protective systems in lungs after the life span exposure to low levels of nitrogen dioxide. JCL: male Wistar rats (8-weeks-old) were exposed continuously to 0.04, 0.4, and 4 ppm nitrogen dioxide for 9, 18 and 27 months.

Lipid peroxidation, as measured by ethane exhalation in the breath of the rats, increased significantly with 0.04, 0.4 and 4 ppm nitrogen dioxide exposure for 9 and 18 months, and the increasing ratio was dependent to the levels of nitrogen dioxide. In the exposure to 0.04 and 0.4 ppm nitrogen dioxide for 27 months, ethane formation increased to twice the control value. On the other hand, ethane formation in the exposure of 4 ppm nitrogen dioxide for 27 months returned to the control level. Pentane formation did not show such marked changes, except the increases significantly in the 0.04 and 0.4 ppm groups at the 18th month. Lipid peroxidation, as measured by thiobarbituric acid reaction, also increased significantly in the 4 ppm nitrogen dioxide exposure group at the 9th month, and in the 0.4 and 4 ppm nitrogen dioxide exposure groups at the 18th month.

The activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione reductase, and the contents of non-protein sulfhydryls increased significantly in the 4 ppm nitrogen dioxide exposure group at the 9th month. The other parameters did not show significant changes at the 9th month. The activities of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in the 0.4 and 4 ppm nitrogen dioxide exposure groups at the 18th month showed the tendency to decrease below the control.

From these results, it was suggested that the ability of the antioxidative protective systems in lungs and lipid peroxidation changed conversely by the prolongation of the exposure periods of nitrogen dioxide.

はじめに

NO₂は大気中に広く存在する酸化性の強い汚染物質の一つであり、肺に種々の障害を起こすことがよく知られている^{1,2)}。一方、細胞膜中の脂質の過酸化は細胞に重大な障害を起こすので³⁾、NO₂の毒性は肺で脂質過酸化を起こすことによる可能性が考えられている。事実、NO₂が過酸化脂質を生成するということは共役ジェンの測定によって1968年にThomasら⁴⁾が報告している。

生体内における過酸化脂質量の上昇は老化や動脈硬化、肝臓病、腎臓病、糖尿病、脳卒中あるいは癌など様々な疾患の場合にもみられ、最近基礎および臨床医学上からも注目されるようになってきた⁵⁾。この過酸化脂質は生体内でタンパク質や核酸あるいは脂質と反応し、細胞膜を破壊したり、酵素を不活性化したり、ビタミンやホルモンを分解するなど多くの生体成分に作用し、重篤な場合には細胞変性や臓器障害を起こす。

一方、生体にはこのような有害な過酸化脂質を代謝したりその生成を抑制する、いわゆる抗酸化性防御機構 (Antioxidative protective systems) が存在していることもよく知られている⁶⁾。

Chowら⁷⁾は2.3 ppmと6.4 ppm NO₂に4日間暴露したラットの肺の抗酸化性防御系である Peroxidative metabolic pathway (PMP) 酵素について調べている。この結果、glutathione reductase と glucose - 6 - phosphate dehydrogenase 活性の上昇を示したが過酸化脂質の代謝

に直接関与する glutathione peroxidase 活性には変化がなかったという。深瀬ら⁸⁾も 6 ± 1 ppm NO_2 に30日間暴露したマウスの肺では glutathione reductase と glucose - 6 - phosphate dehydrogenase 活性の増加を認めているが glutathione peroxidase 活性は変化しなかったと報告している。また Menzel ら⁹⁾も 3.4 ± 0.1 ppm NO_2 に3か月暴露したマウスでも 1.0 ppm NO_2 に3か月間暴露したモルモットでも glutathione peroxidase レベルの増加は認められなかったと報告している。

Thomas ら⁴⁾の NO_2 暴露による肺での過酸化脂質生成の報告にもかかわらず、その後多くの研究者が NO_2 暴露による過酸化脂質の検出を試みたが成功していない¹⁰⁾ ことと上記の実験で glutathione peroxidase 活性が変化しなかったことから、 NO_2 暴露は過酸化脂質を生成しないと考えられていた。

最近、著者ら^{11, 12, 13)}は 10 ppm NO_2 暴露による脂質過酸化と Peroxidative metabolic pathway (PMP) 酵素の経時的変化から過酸化脂質が2日目より増加し3~4日目に初期濃度の2倍に増加し、その後 glutathione peroxidase 活性が glutathione reductase や glucose - 6 - phosphate dehydrogenase とともに増加していることを見いだした。これら三つの酵素活性は7~14日目まで最高レベルを維持しているが、この時点で過酸化脂質は対照レベルに戻っており、10 ppm NO_2 暴露によって過酸化脂質が生成し、かつ glutathione peroxidase 活性も増加することを示した。また、市瀬らは 0.4 ppm, 1.2 ppm および 4.0 ppm NO_2 のような比較的低濃度暴露では glutathione reductase および glucose - 6 - phosphate dehydrogenase 活性が 4 ppm 群で有意な増加を示したが、glutathione peroxidase 活性は 4 ppm 群でも増加は示さなかったことを報告¹⁴⁾している。しかし、この場合でも呼気中エタンの測定による過酸化脂質は NO_2 暴露一週間後に 1.2 ppm 群と 4.0 ppm 群で有意に増加していた。

このように、過酸化脂質は比較的低濃度の NO_2 でも生成されるのに対して、glutathione peroxidase 活性の変化は比較的高濃度暴露の場合に限られていたが、PMP 系酵素の変化は酸化的ストレスから生体を防御する為の代償性変化とみることができる。

本報告では前記報告^{13, 14)}よりも更に低濃度の 0.04 ppm NO_2 を含む 0.4 ppm と 4 ppm NO_2 の長期慢性暴露によるラットの抗酸化性防御機構と脂質過酸化の変化について検討した。

方 法

実験には8週令の JCL : Wistar 系雄ラットを用い 0.04 ppm, 0.4 ppm および 4.0 ppm NO_2 を連続9か月、18か月および27か月の長期慢性暴露を行った。ラットはハンギング・ワイヤーメッシュ・ケージの中で6匹づつに分けて飼育し、ステンレス・スチール-ガラス製チャンバー内で既報¹⁵⁾のように NO_2 に暴露した。チャンバーは角錐形で飼育部の大きさは 1500 mm(W) × 1550 mm(D) × 1000 mm(H) (2.3 m^3) である。チャンバー内温度は 25 ± 1 °C に、湿度は 55 ± 5 % に制御され、室内照明は14時間点燈、10時間消燈とした。なお飼料は日本クレア製 CE-2 を滅菌したものを与

え、飲料水も滅菌して自由に飲食させた。

ラットはエーテル深麻酔下で右の頸動脈より放血屠殺し、肺を摘出して窒素ガス置換後用時まで -80°C に保存した。

肺のホモジネートの調製と酵素活性ならびに非タンパク性 SH の測定は先の報告^{13,14)}と同様に行った。Glutathione peroxidase, Glutathione reductase, Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase および G S H S - transferase 活性測定はそれぞれ Little らの方法¹⁶⁾, Bergmeyer 法¹⁷⁾, Wilhelm らの方法¹⁸⁾ および Kaplowitz の方法¹⁹⁾ に従った。なを 6 PGD 活性測定は 6-phosphogluconate を基質として Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase の測定法に従った。Superoxide dismutase と Disulfide reductase 活性測定は McCord と Fridovich の方法²⁰⁾, Tietze の方法²¹⁾ に従った。また非タンパク性 SH 量の測定は Delucia らの方法²²⁾, TBA 値の測定は Ohkawa らの方法²³⁾ に従って行った。*In vivo* の脂質過酸化分析法としての呼気中エタンとペンタンの分析は既報²⁴⁻²⁶⁾に従った。

総脂質量は肺ホモジネートの 200×g 遠心上清を用いて Frings ら²⁷⁾の Sulfo-phospho-Vanillin 法によって測定した。またリン脂質、トリグリセリドおよび総コレステロール量は肺ホモジネートの 200×g 上清から Folch の方法²⁸⁾ で抽出した脂質画分を用いて酵素法で測定した。なを測定試薬はリン脂質には和光純薬 Phospho lipid B-Test Wako キットを、トリグリセリドは Boehringer-Mannheim Triglyceride-UV-Test キットを、総コレステロールは栄研化学コレステザイム C-栄研テストキットを使用した。またタンパク量は Lowry 法²⁹⁾によって測定した。

結 果

表 1 には 0.04 ppm, 0.4 ppm および 4 ppm NO_2 に 9 か月および 18 か月間連続暴露したラットの肺の Total protein 量, Glutathione peroxidase, Glutathione reductase および Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase 活性の実験 1 と実験 2 の結果を示した。なお、実験 1 と 2 は再現性を確認する為に 2 度行ったものであるが、用いた動物のロットや実験を行った季節は異なっている。各酵素活性の測定は対照群, 0.04 ppm, 0.4 ppm 群および 4.0 ppm 群の 4 群を同時に行った。

Total protein 量は 9 か月暴露の実験 1 の 4 ppm 群と 18 か月暴露の実験 2 の 0.4 ppm 群のみが対照群より有意に増加していたが他の群では対照群と全く差がみられなかった。有意差がみられた群の増加も再現性は認められていない。クメンハイドロパーオキシド (Cumene · OOH) を基質とした Glutathione peroxidase 活性は 9 か月目で対照群よりやや増加傾向を示すが有意差はなかった。18 か月目の実験 2 では 0.4 ppm 群と 4 ppm 群で逆に有意な低下を示したがやはり再現性は得られていない。過酸化水素 (H_2O_2) を基質とした場合も同様の傾向を示した。

Glutathione reductase と Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase 活性は 9 か月目の 4

表 1 NO₂ 慢性暴露ラットの肺の総タンパク量およびグルタチオン・パーオキシダーゼ (GPx), グルタチオン還元酵素 (GR) とグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 活性の変化

Table 1 The changes of the contents of total protein, and the activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in rat lungs by chronic exposure of nitrogen dioxide.

		Rats exposed to NO ₂ for 9 months		Rats exposed to NO ₂ for 18 months	
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
		Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)
Total protein (mg/g·Lung).	Control	92.4 ± 7.7 (100%)	85.9 ± 4.9 (100%)	95.0 ± 10.4 (100%)	83.2 ± 3.8 (100%)
	0.04 ppm	92.7 ± 4.2 (100%)	82.7 ± 2.5 (100%)	96.3 ± 9.5 (101%)	87.2 ± 3.6 (105%)
	0.4 ppm	96.7 ± 4.4 (105%)	88.7 ± 14.5 (103%)	99.7 ± 3.7 (105%)	92.5 ± 6.6 (111%)*
	4.0 ppm	101.3 ± 3.0 (110%)	87.3 ± 6.3 (102%)	93.0 ± 5.2 (98%)	85.1 ± 3.2 (102%)
GPx-Cumene-OOH ^{a)} (nmol/mg/min)	Control	181 ± 28 (100%)	253 ± 29 (100%)	150 ± 9 (100%)	266 ± 17 (100%)
	0.04 ppm	204 ± 10 (112%)	240 ± 20 (95%)	154 ± 13 (103%)	279 ± 10 (105%)
	0.4 ppm	193 ± 9 (107%)	252 ± 33 (100%)	162 ± 15 (108%)	191 ± 17 (72%)*
	4.0 ppm	200 ± 91 (110%)	269 ± 40 (107%)	150 ± 20 (100%)	229 ± 14 (86%)*
GPx-H ₂ O ₂ ^{b)}	Control		109 ± 16 (100%)		155 ± 18 (100%)
	0.04 ppm		109 ± 17 (100%)		159 ± 15 (102%)
	0.4 ppm		118 ± 19 (109%)		111 ± 13 (72%)*
	4.0 ppm		133 ± 25 (122%)		139 ± 10 (89%)
GR (nmol/mg/min)	Control	85.9 ± 15.0 (100%)	94.8 ± 8.4 (100%)	87.4 ± 4.1 (100%)	94.6 ± 4.5 (100%)
	0.04 ppm	89.9 ± 3.8 (104%)	89.6 ± 5.8 (95%)	90.9 ± 14.8 (104%)	88.4 ± 2.5 (94%)
	0.4 ppm	92.9 ± 5.4 (108%)	96.2 ± 11.2 (102%)	86.4 ± 4.4 (99%)	67.9 ± 6.6 (72%)*
	4.0 ppm	102.8 ± 5.0 (120%)*	109.3 ± 10.9 (115%)*	97.5 ± 9.6 (112%)	95.3 ± 7.3 (101%)
G6PD (nmol/mg/min)	Control	48.7 ± 11.6 (100%)	61.3 ± 8.5 (100%)	67.2 ± 11.2 (100%)	79.2 ± 6.6 (100%)
	0.04 ppm	57.4 ± 10.5 (118%)	52.5 ± 3.9 (86%)	76.8 ± 17.5 (114%)	89.1 ± 8.6 (102%)
	0.4 ppm	65.8 ± 9.9 (135%)*	57.8 ± 8.1 (94%)	80.7 ± 11.6 (120%)	60.0 ± 9.3 (76%)
	4.0 ppm	86.8 ± 9.2 (178%)*	79.7 ± 10.7 (130%)*	100.8 ± 11.4 (150%)*	80.3 ± 9.5 (101%)

a) GPx-Cumene-OOH shows glutathione peroxidase assayed by Cumene hydroperoxide as a substrate.

b) GPx-H₂O₂ shows glutathione peroxidase assayed by hydrogen peroxide as a substrate.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

表 2 NO₂ 慢性暴露ラットの肺のグルタチオン S-トランスフェラーゼ, すなわちアリル, アラルキルおよびエポキシ-S-トランスフェラーゼ活性の変化

Table 2 The changes of the activities of three kind of glutathione S-transferase, aryl-, aralkyl-, and epoxy-S-transferase in rat lungs by chronic exposure of nitrogen dioxide

		Rats exposed to NO ₂ for 9 months		Rats exposed to NO ₂ for 18 months	
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
		Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)
Aryl-S-transferase (nmol/mg/min)	Control	2.88 ± 0.52 (100%)	3.29 ± 0.31 (100%)	3.42 ± 0.13 (100%)	3.13 ± 0.23 (100%)
	0.04 ppm	3.10 ± 0.34 (108%)	3.05 ± 0.33 (93%)	3.07 ± 0.41 (90%)	2.63 ± 0.31 (84%)
	0.4 ppm	3.36 ± 0.24 (117%)	3.19 ± 0.46 (97%)	3.53 ± 0.38 (103%)	1.99 ± 0.14 (64%)***
	4.0 ppm	3.06 ± 0.18 (106%)	3.00 ± 0.56 (91%)	3.00 ± 0.29 (88%)*	2.20 ± 0.15 (70%)***
Aralkyl-S-transferase (nmol/mg/min)	Control	42.0 ± 7.6 (100%)	44.9 ± 2.8 (100%)	31.3 ± 0.6 (100%)	45.5 ± 2.5 (100%)
	0.04 ppm	44.0 ± 2.4 (105%)	42.0 ± 6.7 (94%)	30.1 ± 3.0 (96%)	44.9 ± 2.8 (99%)
	0.4 ppm	47.4 ± 3.0 (113%)	45.6 ± 5.7 (102%)	32.8 ± 4.3 (105%)	31.8 ± 1.5 (70%)***
	4.0 ppm	46.4 ± 2.7 (110%)	41.4 ± 4.9 (92%)	29.1 ± 1.5 (93%)*	35.9 ± 2.7 (79%)***
Epoxy-S-transferase (nmol/mg/min)	Control	2.69 ± 0.35 (100%)	2.10 ± 0.35 (100%)		2.86 ± 0.45 (100%)
	0.04 ppm	3.04 ± 0.58 (113%)	2.49 ± 0.39 (119%)		3.35 ± 1.13 (117%)
	0.4 ppm	2.86 ± 0.24 (106%)	2.33 ± 0.85 (111%)		2.42 ± 0.56 (84%)
	4.0 ppm	2.27 ± 0.24 (84%)*	2.43 ± 0.57 (116%)		3.05 ± 0.52 (107%)

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

ppm群でわずかながら有意な増加を示し再現性も認められた。18か月目では実験1では増加傾向を示したが再現性はなく、むしろ対照群と差がなくなった。また、6-phosphogluconate dehydrogenase と Isocitrate dehydrogenase も共に9, 18か月目で全く変化がみられなかった。

表2には広範な生体異物を代謝すると同時に過酸化物の代謝も行う Glutathione S-transferase のうち、Aryl, Aralkyl および Epoxy-S-transferase の活性を示した。これら三つの酵素はともに9か月目では対照群と変わらないが18か月目では Aryl および Aralkyl-S-transferase 活性が4 ppm群で有意に低下し、かつ再現性も認められた。Epoxy-S-transferase 活性は対照群と変りなかった。

表3には Superoxide dismutase (SOD) と NO₂ 暴露によって生じた Disulfide を還元してもとの生物活性を持ったフリーのSH基にする Disulfide reductase (DSR) 活性を示した。両者とも一度だけの測定であるが全く有意な差はなく NO₂ 慢性暴露による Superoxide や Disulfide 生成は起こっていない可能性を示唆した。

表 3 NO₂ 慢性暴露ラットの肺のスーパーオキシド・ディスムターゼ (SOD) と
ダイサルファイド還元酵素活性の変化

Table 3 The changes of the activities of superoxide dismutase (SOD) and disulfide reductase (DSR) in rat lungs by chronic exposure of nitrogen dioxide.

		Rats exposed to NO ₂ for 9 months	Rats exposed to NO ₂ for 18 months
		Experiment 2	Experiment 2
		Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)
SOD (units/mg)	Control	17.4 ± 2.2 (100%)	17.6 ± 0.8 (100%)
	0.04 ppm	15.1 ± 1.3 (87%)	18.1 ± 3.2 (103%)
	0.4 ppm	16.8 ± 2.0 (96%)	17.4 ± 0.7 (99%)
	4.0 ppm	14.6 ± 1.0 (84%)	17.9 ± 1.5 (102%)
DSR (nmol/mg/min)	Control	162 ± 9 (100%)	142 ± 47 (100%)
	0.04 ppm	147 ± 23 (91%)	175 ± 27 (123%)
	0.4 ppm	147 ± 8 (91%)	163 ± 34 (115%)
	4.0 ppm	156 ± 30 (96%)	182 ± 42 (129%)

表4には肺の中で抗酸化作用を示す Antioxidant としての非タンパク性 SH 化合物 (90%以上はグルタチオンと考えられる) と TBA 法によって測定された過酸化脂質量を示した。非タンパク性 SH 化合物は9か月目で4.0 ppm群のみで有意な増加を示したが18か月目では0.4 ppm群と4 ppm群で有意な再現性のある増加を示していた。TBA値は9か月目の4.0 ppm群で増加傾向を示したが18か月目では0.4 ppm群と4.0 ppm群で有意な増加を示しかつ再現性も明瞭であった。

表 4 NO₂ 慢性暴露ラットの肺における非タンパク性SH量とチオバルビツール酸 (TBA) 反応性物質質量の変化

Table 4 The changes of the contents of non-protein sulfhydryls and thiobarbituric acid (TBA) reactants in rat lungs by chronic exposure of nitrogen dioxide.

		Rats exposed to NO ₂ for 9 months		Rats exposed to NO ₂ for 18 months	
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
		Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)
Non-protein sulfhydryls (μ mol/g·Lung)	Control	0.73 ± 0.17 (100%)	0.64 ± 0.06 (100%)	0.71 ± 0.08 (100%)	0.65 ± 0.8 (100%)
	0.04 ppm	0.80 ± 0.13 (109%)	0.64 ± 0.08 (100%)	0.83 ± 0.02 (114%)	0.68 ± 0.07 (105%)
	0.4 ppm	0.99 ± 0.12 (134%)	0.69 ± 0.07 (107%)	0.95 ± 0.13 (135%)**	0.84 ± 0.08 (129%)**
	4.0 ppm	1.57 ± 0.27 (213%)***	0.78 ± 0.15 (121%)*	0.93 ± 0.07 (132%)**	0.85 ± 0.12 (131%)**
TBA values (Fluorometric) (n mol/g·Lung)	Control	52.8 ± 4.9 (100%)	39.6 ± 1.5 (100%)	54.9 ± 4.1 (100%)	46.9 ± 2.9 (100%)
	0.04 ppm	52.9 ± 3.1 (100%)	37.6 ± 2.4 (95%)	56.2 ± 4.1 (102%)	52.4 ± 3.5 (112%)
	0.4 ppm	54.9 ± 3.8 (104%)	38.7 ± 1.4 (98%)	64.0 ± 3.8 (106%)**	55.3 ± 3.6 (118%)**
	4.0 ppm	66.2 ± 4.4 (125%)***	41.1 ± 1.4 (104%)	69.8 ± 3.2 (127%)***	57.8 ± 4.6 (123%)**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

表5には実験1の場合の肺の総脂質量と主要脂質成分である Phospholipid, Total cholesterol および Triglyceride 含量を示した。これらは9か月目で若干増加する傾向を示したが18か月目では total cholesterol を除き逆にむしろ若干低下する傾向を示した。しかし有意な差はいずれの群においても見いだしえなかった。

表 4 NO₂ 慢性暴露ラットの肺の総脂質, リン脂質, 総コレステロールおよびトリグリセリド量

Table 3 The changes of the contents of total lipid, phospholipids (PL), total cholesterol (T·CHL) and triglyceride (TG) in rat lungs by chronic exposure of nitrogen dioxide

脂 質	NO ₂ 濃度	9 か月			18 か月		
		M±SD	%	P	M±SD	%	P
Total lipid (Phospho - Sulfo - Vaniline法)		mg/g·tissue			mg/g·tissue		
	Control	19.2±2.9	(100)		22.3±0.9	(100)	
	0.04 ppm	17.7±1.6	(92)	NS*	21.1±2.5	(95)	NS
	0.4 ppm	18.6±1.3	(97)	NS	20.6±2.3	(92)	NS
	4.0 ppm	20.7±0.8	(108)	NS	20.4±1.8	(91)	NS
PL		mg/g·tissue			mg/g·tissue		
	Control	11.8±2.9	(100)		16.6±2.7	(100)	
	0.04 ppm	11.0±1.9	(93)	NS	15.9±2.2	(96)	NS
	0.4 ppm	11.5±1.7	(97)	NS	16.1±2.9	(97)	NS
	4.0 ppm	12.2±1.0	(103)	NS	15.7±1.8	(95)	NS
T·CHL		mg/g·tissue			mg/g·tissue		
	Control	2.81±0.73	(100)		1.64±0.84	(100)	
	0.04 ppm	2.56±0.43	(91)	NS	1.89±0.59	(115)	NS
	0.4 ppm	2.72±0.82	(97)	NS	2.53±0.64	(152)	NS
	4.0 ppm	3.06±0.19	(109)	NS	1.81±0.25	(110)	NS
TG		mg/g·tissue			mg/g·tissue		
	Control	4.98±0.22	(100)		7.79±1.41	(100)	
	0.04 ppm	5.30±1.24	(106)	NS	7.36±1.45	(95)	NS
	0.4 ppm	5.83±1.57	(117)	NS	7.69±1.13	(99)	NS
	4.0 ppm	5.70±0.76	(114)	NS	7.23±1.37	(93)	NS

* NS means non significant from the control value.

次に、図1と図2に実験2で呼気中エタンとペンタン測定によって得られた過酸化脂質生成の結果を示した。エタン生成は9か月と18か月目では0.04ppm群、0.4ppm群および4ppmのすべての群で有意に増加し、かつその生成量は濃度の上昇につれて増加していた。また27か月暴露群では0.04ppm群と0.4ppm群が対照群の約2倍へと有意な増加を示していたが4.0ppm群では逆に低下し対照群との間に有意差はみられなくなった。また0.04ppm群と0.4ppm群についてみると、9か月、18か月とNO₂の暴露期間の延長につれて過酸化脂質生成は増加していることを示している。一方、ペンタンの変化はエタンに比べると比較的小さなものであり、有意差が見いだされたのは18か月目の0.04ppm群と0.4ppm群のみであり、4ppm群ではエタンの27か月目の場合のようにむしろ低下していた。

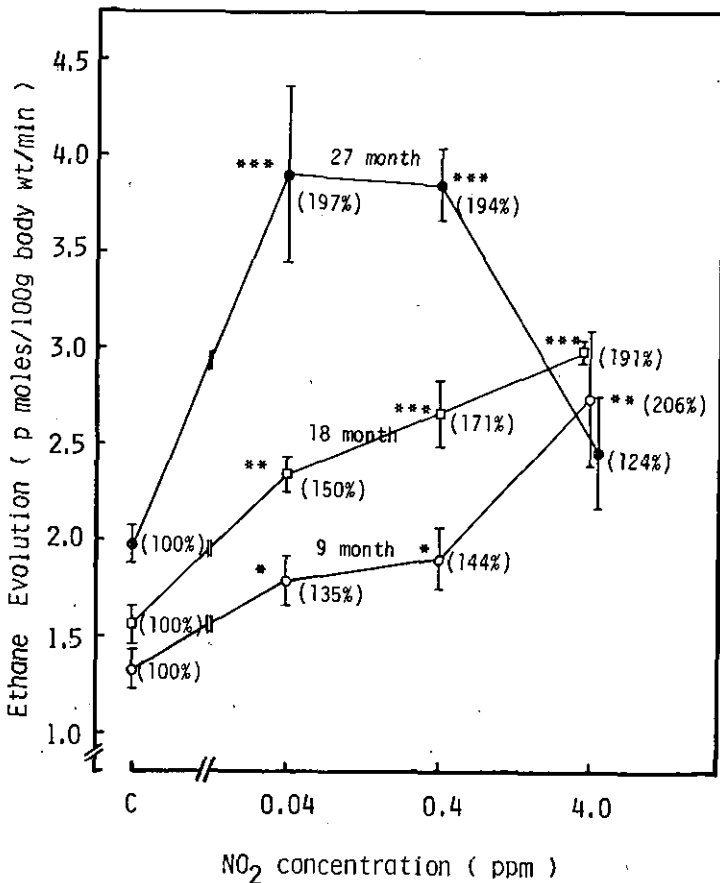


図 1 0.04ppm, 0.4ppm および 4ppm NO₂ に各々 9, 18 および 27 か月間連続暴露したラットの呼気中エタン産生量

Fig. 1 Ethane evolution in expired gases of rats exposed continuously to 0.04, 0.4 and 4 ppm nitrogen dioxide for 9, 18 and 27 months.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

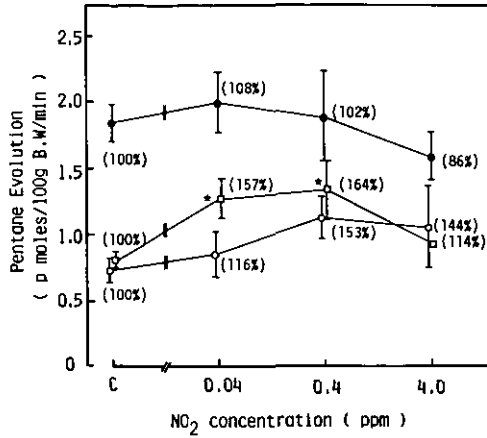


図 2 0.04 ppm, 0.4 ppm および 4 ppm NO₂ に各々 9, 18 および 27 か月間連続暴露したラットの呼気中ペンタン産生量

Fig. 2 Pentane evolution in expired gases of rats exposed continuously to 0.04, 0.4 and 4 ppm nitrogen dioxide for 9, 18 and 27 months.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

考 察

本研究において、NO₂ 慢性暴露によるラット肺の抗酸化性防御系酵素活性と過酸化脂質生成の変化について検討した。

この結果、NO₂ 暴露によって抗酸化性防御系酵素活性は 9 か月目では対照群よりわずかに高いか同じ程度であったが 18 か月目では対照群より高かったものは対照群と同じレベルへ、また対照群と同じだったものは更に低下する傾向を示した。一方、TBA 法や呼気中エタン測定による過酸化脂質の生成は NO₂ 暴露期間の延長につれて明瞭な増加を示し、抗酸化性防御系酵素活性の変化と対称的な変化を示すものであることが判明した。

我々は前報^{13, 14)}において NO₂ 急性および亜急性暴露による抗酸化性防御系酵素活性と過酸化脂質生成の変化について報告した。10 ppm NO₂ の急性暴露では¹²⁾ 抗酸化性防御系酵素活性は 1 ~ 2 日目で一旦低下するが 3 日目頃より増加し 5 ~ 7 日目には最大レベルに達し、実験した 14 日目まではそのレベルを維持していた。これに対し TBA 法と呼気中エタン測定による過酸化脂質の生成は 1 日目でやはり一旦低下するが、その後速急に増加し、3 日目で対照群の 2 倍の最高レベルへと増加した。しかし抗酸化性防御系酵素活性やグルタチオン含量が増加しはじめるのにつれて過酸化脂質生成は低下し 5 ~ 7 日目には対照レベルに戻っていた。また、0.4 ppm, 1.2 ppm および 4 ppm NO₂ に 4 か月間暴露した亜急性実験¹⁴⁾でも 1 週目に過酸化脂質が最大レベルに増加したが抗酸化性防御系酵素が最大レベルに達する 1 か月目には過酸化脂質は対照レベルに低下しており時間的な遅れはあるが、急性暴露の場合と類似の経時変化を示していた。なお、亜急性暴露におい

ては、1か月目以後は抗酸化性防御系酵素活性は徐々に低下して対照レベルに漸近してゆく傾向を示していたのに対して、過酸化脂質生成は逆にふたたび徐々に増加してゆき4 ppm群では4か月目に対照群より有意に増加するに至った。

このような抗酸化性防御機構のNO₂暴露初期の活性増加はNO₂に対する肺の代償性反応とみられるが、この代償性反応は一時的であって暴露期間の経過とともに、代償能が低下する時期に到るものと考えられる。このような考えはマウスに0.8 ppm NO₂ 5日、0.7~0.8 ppm NO₂ 1か月、あるいは0.5 ppm NO₂ 6か月暴露した中島ら^{30,31)}の肺の還元型グルタチオンの消長に関する結果からも支持されている。

本慢性暴露実験において得られた結果は上記の急性、亜急性実験の結果の延長線上であることを示しており、特に過酸化脂質生成に関してはNO₂暴露の長期化に伴いその生成は増加してゆくものであることが判明した。一方、呼気中エタンが27か月、4 ppm暴露群でむしろ低下したことは興味ある事実である。しかしながらこの低下は回復を意味するものではなく、むしろ肺の障害の質的变化を反映しているものと考えられる。事実、この変化は本研究のラットと同一ロットのラットで同時に実験した電子顕微鏡的形態計測による肺胞壁の肥厚化³²⁾の濃度依存性変化と極めて類似した変化であり病理学的にも病変の質的变化が示唆されている。

これらの変化を総合すると生体にとって有害な過酸化脂質の生成はNO₂の濃度の増加に伴って増加し、かつ暴露期間の延長につれて蓄積的に増加し、ある限界を越えると肺障害の質的变化とともに減少するものであることを示唆している。

次に、このような過酸化脂質が増加する原因について考えてみる。その原因の一つは先に述べたように過酸化物を代謝する防御系酵素活性の低下によることが考えられる。その第二は本研究と同時に行われた動脈血酸素分圧(PaO₂)の測定により、NO₂を9か月間暴露した場合0.4 ppm群と4 ppm群でPaO₂が有意に低下していたという鈴木ら³³⁾の生理学的知見と関連する可能性が考えられる。これは組織が低酸素状態に置かれていることを示唆し、低酸素性動脈硬化症の場合に動脈壁中に過酸化脂質が増加するのと似た現象であると考えられる。このようなNO₂暴露による動脈血酸素分圧の低下はDavidsonら³⁴⁾も8~12 ppm NO₂をウサギに3か月間暴露した実験で見いだしている。鈴木ら³³⁾の成績はより低濃度NO₂でも暴露期間の長期化によって同様の影響が生じることを示している。このような動脈血酸素分圧の低下による組織への酸素供給の低下は先に述べた肺胞壁の肥厚化による肺胞でのガス交換能の低下による可能性が考えられる。

一方、八木ら³⁵⁾は未熟児網膜症の原因を調べる為にニフトリの胚網膜に高濃度酸素を暴露し網膜の肥厚化と肥厚した網膜中に過酸化脂質が著しく増加していることを見だし、未熟児網膜症が過酸化脂質によるものであることを報告している。

以上のような事実から、NO₂慢性暴露による過酸化脂質の増加は1) 過酸化物代謝系酵素活性の低下、2) 動脈血中酸素分圧の低下、3) 肺胞壁の肥厚化、等が複雑に関連して起こっている可能性が考えられる。しかしながら、これらの因果関係は現在の段階では断定できない。

一方、これまで NO₂ による生体影響がみられるのは約 0.4 ppm 前後と考えられており、最低は 0.12 ppm NO₂ に 35 日間暴露したラットの肺胞壁の電子顕微鏡の形態計測で異常値が観察されたという京野と河合³⁶⁾の報告であり、0.1 ppm 以下の NO₂ 暴露で影響を検出したという報告は全くない。この意味で、今回環境規準値の 0.04 ppm でも明瞭な過酸化脂質の増加を検出したことは有意義であったと考える。しかし、0.04 ppm のような極めて低濃度の NO₂ 暴露によって検出された変化が健康影響の点でどのような意味を持つかということの評価することは現時点では難かしい問題であり今後の研究に待たなければならない。

引用文献

- 1) McAdams, A., Jr. (1955): Bronchiolitis obliterans. *Am. J. Med.*, **19**, 314-322.
- 2) Gray, E. (1959): Oxides of nitrogen: Their occurrence, toxicity, and hazard. *Arch. Ind. Health*, **19**, 479-486.
- 3) Tappel, A.L. (1975): Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. *In Pathobiology of cell membranes*. Acad. Press, N.Y., **1**, 145-170.
- 4) Thomas, H.V., P.K. Mueller and P.L. Lyman (1967): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
- 5) 最新医学(1978): 特集「過酸化脂質障害の再検討」33巻4号.
- 6) Chow, C.K. and A.L. Tappel (1972): An enzyme protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone exposed rats. *Lipids*, **7**, 518-524.
- 7) Chow, C.K., C.J. Dillard and A.L. Tappel (1974): Glutathione peroxidase system and lysosome in rats exposed to ozone or nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **7**, 311-317.
- 8) 深瀬 治・磯村公郎・渡辺 弘(1976): 窒素酸化物のマウス肺 Peroxidative metabolic pathway への影響. *大気汚染研究*, **11**, 61-69.
- 9) Menzel, D.B., M.B. Abou-Donia, C.R. Roe, R.E. Ehrlich, D.E. Gardner and D.L. Coffin (1977): Biochemical index of nitrogen dioxide intoxication of guinea pigs following low level long-term exposure. *In International Conference on Photochemical Oxidant Pollution and Its Control Proceedings, II*, EPA 600/3-77-001h. Washington, D.C.
- 10) Mustafa, M.G. and D.F. Tierney (1978): Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide toxicity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **118**, 1061-1090.
- 11) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. I. Lipid peroxidation as measured by ethane exhalation of rats exposed to nitrogen dioxide. *Lipids*, **16**, 64-67.
- 12) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda, and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*. (in press).
- 13) 嵯峨井 勝・市瀬孝道(1981): NO₂ 急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化. 国立公害研究所研究報告, 第31号, 67-79.
- 14) 市瀬孝道・嵯峨井 勝(1981): 二酸化窒素亜急性暴露ラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化. 国立公害研究所研究報告, 第31号, 81-93.
- 15) 松本 茂・藤田和伸・清水 明・木村英雄・高橋 弘(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響 — 暴露チャンバーの環境制御 — 国立公害研究所研究報告, 第15号, 149-158.

- 16) Little, C. and P.J. O'Brien (1970): Properties and regulation of glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3632-3639.
- 17) Bergmeyer, H.U. (1974): Reagents for enzymatic analysis: Glutathione reductase. *In Methods of Enzymatic Analysis*. (ed. by Bergmeyer, H.U.), **2**, 465-466.
- 18) Wilhelm, L.G. and H.D. Waller (1974): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *In Methods of Enzymatic Analysis*. (ed. by Bergmeyer, H.U.) Acad. Press, N.Y., **2**, 636-643.
- 19) Kaplowitz, N., J. Kuhlenskamp and G. Clifton (1975): Drug induction of hepatic glutathione s-transferase in male and female rats. *Biochem. J.* **146**, 351-356.
- 20) McCord, J.M. and I. Fridovich (1969): Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.
- 21) Tietze, F. (1970): Disulfide reduction in rats liver: Evidence for the presence of nonspecific nucleotide dependent disulfide reductase and glutathione-disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 177-188.
- 22) Delucia, A.J., M.G. Mustafa, M.Z. Hussain and C.E. Cross (1975): Ozone interaction with rodent lung: III. Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and non-protein sulfhydryls. *J. Clin. Inv.* **55**, 794-802.
- 23) Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- 24) Sagai, M. and A.L. Tappel (1979): Lipid peroxidation induced by some halomethanes as measured by in vivo pentane production in the rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **49**, 283-291.
- 25) Sagai, M. and T. Ichinose (1980): Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Sciences*, **27**, 731-738.
- 26) 嵯峨井 勝, A. L. Tappel, (1979): 脂質過酸化の新しい測定法としての呼気ガス分析法. 過酸化脂質研究, **31**, 1-8.
- 27) Frings, C.S., and R.T. Dunn (1970): A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Am. J. Clin. Path.*, **53**, 89-91.
- 28) Folch, J., M. Lees and H.G. Sloamestanley (1965): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **23**, 497-509.
- 29) Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 30) 中島泰知・楠本繁子 (1968): 短期連続暴露のマウス肺の還元型グルタチオン量におよぼす影響. 大阪府立公衆衛生研究所報告-労働衛生編, **6**, 17-21.
- 31) 中島泰知 (1973): 窒素酸化物の生体影響—動物暴露実験—大気汚染研究, **8**, 223-233.
- 32) 竹中参二・清水不二雄・山田靖子・堀内博人・今井 透・原田隆彦・京野洋子・河合清之 (1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響—病理形態学的所見—. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 171-227.
- 33) 鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・織田 肇 (1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響—動脈血 pH_a, PaCO₂ および PaO₂—. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 229-240.
- 34) Davidson, J.T., G.A. Lillington, G.B. Hydon and K. Wasserman (1967): Physiologic changes in the lungs of rabbits continuously exposed to nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respi. Dis.*, **95**, 790-796.
- 35) 八木国夫 (1980): フリーラジカルについて, 「虚血と細胞障害」早石, 八木, 五島監修, 医歯薬出版株式会社. pp. 29-45.
- 36) 京野洋子・河合清之 (1977). 肺の電顕的形態計測Ⅱ. NO₂ 吸入ラット肺. 第18回大気汚染研究全国協議会講演集(福岡). pp. 220.

二酸化窒素亜急性暴露のラット肺SH化合物に及ぼす影響

Effects of Subacute Nitrogen Dioxide Exposure on Lung Sulfhydryl Groups of Rats

河田明治¹

Meiji KAWATA¹

要 旨

0.4, 1.3, 4 ppm NO₂を1週間~3か月間雄ラットに暴露し、肺に存在する還元型グルタチオン(GSH)、酸化型グルタチオン(GSSG)、非タンパク性SH(NPSH)、タンパク性SH(PSH)量を測定した。肺重量はすべての暴露濃度、暴露期間において対照群と暴露群で差が見られなかった。GSH量は4 ppm群において対照群に対して有意に増加し、その値は1週間~3か月間一定に保たれた。GSSG量は対照群と暴露群との間に差が見られなかったことから、4 ppm以下の濃度ではNO₂はGSHからGSSGへの酸化反応には大きな影響を及ぼさないと考えられる。タンパクに結合しているSH基の量はNO₂暴露によって影響を受けなかった。4 ppm暴露群では、NPSH量は対照群に対して有意に増加し、4 ppm群のGSH量と近似した値を示した。

Abstract

The effect of subacute NO₂ exposure on sulfhydryl groups in rat lungs was studied. Rats were exposed to 0.4, 1.3, and 4 ppm NO₂ for 3 months. Protein sulfhydryl (PSH) and nonprotein sulfhydryl (NPSH) levels were determined with the Ellman reagent (DTNB). Reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were determined by the enzymatic method based on the catalytic action of NADPH and glutathione reductase. The wet weight of the lungs of the control and exposed rats did not change during the period of exposure. Exposure of 4 ppm NO₂ increased the GSH level in the lungs significantly, and the increased GSH level did not fluctuate during the 1 week - 3 months exposure. 4 ppm NO₂ exposure had no effect on the GSSG and PSH levels, but increased the NPSH level in the lungs significantly. There is no significant difference between the GSH and NPSH levels in the lungs of the rats exposed to 4 ppm NO₂.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

はじめに

低分子 SH 化合物であるグルタチオンは生体中に広く分布しており、酸化還元反応に関与して生体成分の酸化を防止し、SH 酵素の SH 基を保護する作用を有する。NO₂ またはオゾン暴露による生体に対する酸化的障害を、過酸化脂質の生成とこれを分解するために必要なグルタチオンが関与する酸化防止機構との関連において検討した多くの研究が報告されている^{1~7)}。

高濃度の NO₂ またはオゾンによる急性暴露実験において、標的臓器である肺に存在する還元型グルタチオン (GSH) が暴露時間とともに減少し、酸化型グルタチオン (GSSG) が増加すること⁸⁾ や GSH とタンパク性 SH (PSH) との混合ジスルフィドが生成すること⁹⁾ から、これら酸化性汚染物質が SH 基と直接反応することが示唆された。

これに対して比較的低濃度の NO₂ やオゾンをラットやマウスに暴露すると、グルタチオンパーオキシダーゼ、グルタチオンレダクターゼ、およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性が上昇し、GSH 量も増加することが報告されている^{3~6), 10~13)}。しかし GSH に関連のある物質の定量的検討が十分なされていないため、GSH の増加する機構についてはまだ明らかにされていない。

本研究では、NO₂ 暴露によって肺の GSH が増加する要因を明らかにすること、および GSH 以外の SH 化合物に及ぼす NO₂ の影響について検索することを目的とし、0.4, 1.3, 4 ppm NO₂ を 1 週間~3 か月間ラットに暴露し、肺の GSH とこれに関係のある GSSG、非タンパク性 SH (NPSH)、および PSH に及ぼす NO₂ の影響について検討した。

方 法

実験には 12~16 週令の JCL: Wistar 系雄ラットを用いた。6 匹を 1 群とし、0.4, 1.3, 4 ppm の NO₂ を 1, 2, 3 週間, 1, 2, 3 か月間暴露したのち、エチルエーテルを用いて麻酔し、頸動脈から採血し、直ちに胸部を切開して採取した肺を超低温槽 (-80°C) に保存した。約 0.2 g の肺を 5 ml の 5% トリクロロ酢酸中で破碎し、ホモジネートを遠心分離することにより上清を得た。

NPSH 量は、0.1 ml のトリクロロ酢酸上清に 0.9 ml の 0.3 M リン酸ニナトリウム溶液、10 μl の 0.01 M 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) を加え、412 nm における吸光度を測定することにより求めた。

トリクロロ酢酸上清に水を加えて 10 倍に希釈した溶液を試料とし、DTNB、グルタチオンレダクターゼ、NADPH を用いる酵素サイクリング法¹⁴⁾ により GSH と GSSG との総量を求めた。GSSG 量はトリクロロ酢酸上清に N-エチルマレイミドと pH 7.5 のリン酸緩衝液を加えて GSH を S-(エチルスクシンイミド)グルタチオンとし、過剰の N-エチルマレイミドをエーテル抽出により除いたものを試料として上記の酵素サイクリング法により求めた。GSH 量は総グルタチオン量より GSSG 量を差し引くことにより求めた。

また総 SH 量 (TSH) とタンパク性 SH (PSH) を Sedlak ら¹⁵⁾ の方法により求めた。約 0.2 g の肺を 5 ml の 0.02 M EDTA 中でホモネジートとし、pH 8.2 のトリス緩衝液、メタノール、DTNB

を加えて発色させ、遠心して得られる上清の吸光度より総SH(TSH)量を求め、この値からNPSH量を差し引くことによってタンパク性SH(PSH)量を求めた。

なお肺組織に直接5%トリクロロ酢酸を加えてホモジネートとした場合と、0.02M EDTA中でホモジネートとしたのちトリクロロ酢酸で除タンパクした場合とでNPSH量の測定値に有意な差は見られなかった。

結 果

0.4, 1.3, 4ppm NO₂をラットに1週間～3か月間暴露し、肺に存在する総グルタチオン(GSH+GSSG)と酸化型グルタチオン(GSSG)量とを測定し、それらの値から還元型グルタチオン(GSH)量を求めた結果を表1に示した。GSH量は、0.4と1.3ppm暴露において対照群と暴露群との間に差は見られなかったが、4ppm群では対照群に対しすべての暴露期間において有意に増加した。また4ppmの各暴露期間におけるGSH値の間には有意な差が見られないことから、4ppm NO₂暴露では肺のGSH量は1週間後には有意に増加し、以後その値が3か月間持続されるという結果が得られた。

酸化型グルタチオン(GSSG)は4ppm、1か月間暴露の場合を除くとすべて対照群と暴露群との間に差は見られなかった。表1に示す如く総グルタチオン中に占めるGSSGの割合は暴露濃度、暴露期間に関係なく2～4%とほぼ一定であった。したがって酸化性を有するNO₂であっても4ppm以下の暴露濃度では、GSHからGSSGへの酸化反応には大きな影響を及ぼさないと考えられる。

肺の総SH(TSH)量と非タンパク性SH化合物の総量を示すNPSH量の測定結果からタンパク性SH(PSH)量を求めた結果を表2に示した。NPSH量は、0.4, 1.3ppm暴露では1.3ppm 3か月間暴露の場合を除くと対照群と暴露群の間に差が見られなかったが、4ppm群では対照群に対しすべての暴露期間において有意に増加した。PSH量はすべての暴露濃度、暴露期間において対照群と暴露群との間に差が見られなかった。このことより4ppm NO₂暴露では、タンパクに結合したSH基には量的な変化が見られなかったが、これに対して量的に少ない非タンパク性SH化合物は有意に増加することが明らかになった。

考 察

Mustafaら¹²⁾は、比較的低濃度の0.8ppm オゾンに1週間ラットに暴露すると、肺の非タンパク性SH(NPSH)と還元型グルタチオン(GSH)量とともに暴露開始約3日後に最大値に達し、その後はほぼその値が持続されると考えられる結果を報告している。この場合に、NPSHとGSHが増加開始とともにNPSHとGSHとの差も次第に増大していることから、GSH以外の低分子SH化合物もオゾン暴露によって増加すると推定される。

肺におけるこの低分子SH化合物がどのような物質であるかは現在まだ明らかにされていない。

表 1 ラットの肺中総グルタチオン (GSH + GSSG), 酸化型グルタチオン (GSSG), および還元型グルタチオン (GSH) 量に及ぼす NO₂ 暴露の影響
 Table 1 Effect of NO₂ exposure on total glutathione (GSH + GSSG), oxidized glutathione (GSSG), and reduced glutathione (GSH) levels in rat lungs

NO ₂	Exposure period	A	B	A - 2 x B ^{b)}	$\frac{2B}{A} \times 100$
		GSH + GSSG ^{a)}	GSSG	GSH	GSSG per total glutathione
Control	1 W	1.78 ± 0.11	0.027 ± 0.007	1.72 ± 0.11	3.0
	2 W	1.93 ± 0.21	0.028 ± 0.005	1.88 ± 0.21	2.9
	3 W	1.87 ± 0.14	0.032 ± 0.005	1.81 ± 0.14	3.4
	1 M	2.09 ± 0.07	0.027 ± 0.001	2.04 ± 0.08	2.6
	2 M	1.93 ± 0.03	0.027 ± 0.007	1.88 ± 0.03	2.8
	3 M	1.75 ± 0.08	0.041 ± 0.010	1.68 ± 0.09	4.7
0.4 ppm	1 W	1.82 ± 0.12	0.018 ± 0.005	1.78 ± 0.11	2.0
	2 W	1.87 ± 0.17	0.031 ± 0.008	1.80 ± 0.17	3.3
	3 W	1.80 ± 0.14	0.031 ± 0.004	1.74 ± 0.13	3.4
	1 M	2.00 ± 0.10	0.025 ± 0.034	1.95 ± 0.10	2.5
	2 M	1.94 ± 0.10	0.028 ± 0.006	1.89 ± 0.11	2.9
	3 M	1.70 ± 0.13	0.036 ± 0.007	1.63 ± 0.14	4.2
1.3 ppm	1 W	1.76 ± 0.16	0.018 ± 0.005	1.72 ± 0.15	2.0
	2 W	1.91 ± 0.08	0.028 ± 0.006	1.86 ± 0.07	2.9
	3 W	1.88 ± 0.19	0.032 ± 0.005	1.81 ± 0.19	3.4
	1 M	2.00 ± 0.13	0.025 ± 0.003	1.96 ± 0.15	2.5
	2 M	2.00 ± 0.08	0.030 ± 0.002	1.94 ± 0.08	3.0
	3 M	1.74 ± 0.10	0.037 ± 0.009	1.66 ± 0.09	4.3
4 ppm	1 W	2.32 ± 0.19 ^{***}	0.030 ± 0.007	2.26 ± 0.18 ^{***}	2.6
	2 W	2.34 ± 0.24 [*]	0.038 ± 0.011	2.27 ± 0.24 [*]	3.2
	3 W	2.34 ± 0.30 [*]	0.035 ± 0.003	2.28 ± 0.29 [*]	3.0
	1 M	2.49 ± 0.19 ^{**}	0.036 ± 0.003 ^{***}	2.41 ± 0.19 ^{**}	2.9
	2 M	2.36 ± 0.08 ^{***}	0.034 ± 0.006	2.29 ± 0.07 ^{***}	2.9
	3 M	2.28 ± 0.11 ^{***}	0.045 ± 0.010	2.19 ± 0.10 ^{***}	3.9

a): GSSG in total glutathione (GSH + GSSG) is calculated in terms of reduced glutathione (GSH).

b): One mole of GSSG corresponds to two moles of GSH;

Total glutathione (GSH + GSSG), GSSG, and GSH levels are expressed as μ moles/g lung.

Values are means \pm SD, n = 6.

*: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001

表 2 ラットの肺中総 SH (TSH), 非タンパク性 SH (NPSH), およびタンパク性 SH (PSH) 量に及ぼす NO₂ 暴露の影響

Table 2 Effect of NO₂ exposure on total sulfhydryl (TSH), nonprotein sulfhydryl (NPSH), and protein sulfhydryl (PSH) levels in rat lungs

NO ₂	Exposure period	A	B	A - B
		TSH	NPSH	PSH
Control	1 W	10.6 ± 1.5	1.89 ± 0.08	8.7 ± 1.5
	2 W	10.6 ± 0.7	1.91 ± 0.06	8.7 ± 0.7
	3 W	10.7 ± 0.8	1.73 ± 0.12	9.0 ± 0.9
	1 M	11.2 ± 0.7	1.87 ± 0.21	9.3 ± 0.8
	2 M	12.0 ± 1.0	1.86 ± 0.11	10.1 ± 0.9
	3 M	11.2 ± 0.6	1.82 ± 0.09	9.3 ± 0.6
0.4 ppm	1 W	10.7 ± 0.5	1.88 ± 0.08	8.9 ± 0.5
	2 W	10.5 ± 1.0	1.97 ± 0.09	8.5 ± 0.9
	3 W	10.2 ± 0.8	1.77 ± 0.10	8.4 ± 0.8
	1 M	11.1 ± 0.9	1.81 ± 0.05	9.3 ± 0.9
	2 M	12.4 ± 1.0	1.95 ± 0.06	10.5 ± 0.3
	3 M	11.2 ± 0.5	1.87 ± 0.06	9.3 ± 0.5
1.3 ppm	1 W	10.6 ± 1.3	1.89 ± 0.11	8.7 ± 1.3
	2 W	11.0 ± 0.4	2.03 ± 0.06	9.0 ± 0.4
	3 W	10.6 ± 0.3	1.80 ± 0.07	8.8 ± 0.5
	1 M	11.8 ± 0.6	1.96 ± 0.07	9.8 ± 0.6
	2 M	12.0 ± 0.7	1.90 ± 0.08	10.1 ± 0.7
	3 M	11.7 ± 0.6	1.99 ± 0.09*	9.7 ± 0.5
4 ppm	1 W	11.0 ± 1.3	2.14 ± 0.15**	8.8 ± 1.4
	2 W	11.0 ± 1.0	2.38 ± 0.13**	8.6 ± 0.9
	3 W	10.9 ± 0.8	2.13 ± 0.03***	8.7 ± 0.8
	1 M	11.8 ± 0.5	2.30 ± 0.06**	9.5 ± 0.5
	2 M	12.3 ± 0.4	2.23 ± 0.11***	10.0 ± 0.4
	3 M	11.9 ± 0.3	2.33 ± 0.15***	9.6 ± 0.3

TSH, NPSH, and PSH levels are expressed as μ moles/g lung.

Values are means \pm SD, $n = 6$.

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

しかし、ラットやマウス等の哺乳動物の肝、腎におけるグルタチオンの合成および代謝に関する一連の反応については“ γ -グルタミルサイクル”の存在が主張されており^{16~18)}、このサイクルによるとGSH (L- γ -グルタミル-L-システニルグリシン)はSH基を有するL-システインからL- γ -グルタミルシステインを経て合成される。従ってこのサイクルから、GSH以外の低分子SH化合物はL-システインおよびシステイン残基を有する低分子ペプチド等が考えられる。

これまでの実験結果から、(1)4 ppm NO₂ 暴露群では、GSHとその他の低分子SH化合物との総量を示すNPSHの測定値とGSHの測定値の間には、すべての暴露期間において有意な差が見られなかったことから、NO₂ 暴露によってGSHは著しく増大したにもかかわらず、GSH以外の低分子SH化合物は本実験で測定したNPSHとGSHとの差による方法では検出できない程の低い値に常に保たれており、Mustafaら¹²⁾のオゾン暴露の場合とは異なる結果が得られた。(2)4 ppm NO₂ 暴露群では、肺の酸化型グルタチオン(GSSG)量は、4 ppm 1か月間暴露の場合を除くと、すべての暴露期間で対照群と暴露群との間に差は見られず、またGSSGの総グルタチオン量に対する割合は2~4%と低い値を示した。タンパクに結合したSH基の総量を示すタンパク性SH(PSH)量はすべての暴露濃度および暴露時間によって変化しなかった。このことは高濃度オゾン暴露で見られたタンパク性SHとGSHとの混合ジスルフィドへの酸化反応⁹⁾が起こっている可能性の少ないことを示している。

以上の(1)、(2)のことから4 ppm NO₂ 暴露によって肺のGSH量は対照群に対して有意に増加するが、GSH以外の低分子SH化合物は常に低い値に保たれていると結論されることから、暴露によって増加するGSHの合成に必要なL-システインやシステイン残基を含む低分子ペプチドがどこから供給されるかは“ γ -グルタミルサイクル”説では説明できず今後の問題点と考えられる。また増加するGSHの合成には、L-システインと同様に、L-グルタミン酸およびグリシンが必要である。従ってNO₂ 暴露の生体に対する影響を明らかにする上で、肺におけるGSH以外のSH化合物およびアミノ酸に及ぼすNO₂の影響も今後の課題と考えられる。

引用文献

- 1) Thomas, H.V., P.K. Mueller and R.L. Lyman (1976): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
- 2) Goldstein, D.B., C. Lodi, C. Collinson and O.J. Balchum (1969): Ozone and lipid peroxidation. *Arch. Environ. Health*, **18**, 631-635.
- 3) Chow, C.K. and A.L. Tappel (1972): An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. *Lipids*, **7**, 518-524.
- 4) Chow, C.K., C.J. Dillard, and A.L. Tappel (1974): Glutathione peroxidase system and lysozyme in rats exposed to ozone or nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **7**, 311-319.
- 5) 嵯峨井 勝・白石不二雄・河田明治 (1979) : 肺および赤血球の Peroxidative Metabolic Pathway に及ぼす二酸化窒素の影響. 国立公害研究所研究報告, 第8号, 135-147.

- 6) Fukase, O. (1980): The effects of gaseous air pollutants on peroxidative metabolism in mouse lung. 日本衛生学雑誌, 34, 777-792.
- 7) 市瀬孝道・織田 肇・鈴木 明・局 博一・嵯峨井 勝 (1980): 二酸化窒素暴露に対するマウス系統間の感受性の相違と酵素的防御機構の役割について. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 61-75.
- 8) 河田明治 (1979): ラット肺 SH 化合物に及ぼす二酸化窒素の影響. 国立公害研究所研究報告, 第8号, 91-101.
- 9) Delucia, A.J., M.G. Mustafa, M.Z. Hussain, and C.E. Cross (1975): Ozone Interaction with rodent lung III. Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and nonprotein sulfhydryls. J. Clin. Invest., 55, 794-802.
- 10) 深瀬 治・磯村公郎・渡辺 弘 (1975): オゾンの生体内グルタチオンに及ぼす影響. 大気汚染研究, 10, 58-62.
- 11) 深瀬 治・磯村公郎・渡辺 弘 (1976): 窒素酸化物のマウス肺 Peroxidative Metabolism への影響. 大気汚染研究, 11, 65-69.
- 12) Mustafa, M.G. and D.F. Tierney (1978): Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide toxicity. Am. Rev. Respir. Dis., 118, 1061-1090.
- 13) 河田明治 (1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響 — 血液および肺に存在するグルタチオン含量. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 259-274.
- 14) Tietze, F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Anal. Biochem., 27, 502-522.
- 15) Sedlak, J. and R.H. Lindsay (1968): Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal. Biochem. 25, 192-205.
- 16) Meister, A. (1973): On the enzymology of amino acid transport. Science, 180, 33-39.
- 17) Meister A. (産賀敏彦訳) (1976): γ -グルタミル残基の酵素学と機能, 生化学, 48, 155-166.
- 18) 日本生化学会編 (1981): 代謝マップ — 経路と調節 — . 東京化学同人, 74-75.

10

二酸化窒素と肺の表面を構成する物質との反応*
— コレステロールとの反応 —

The Reaction of Nitrogen Dioxide with Lung Surface Components
— The Reaction with Cholesterol —

小林 隆 弘¹

Takahiro KOBAYASHI¹

要 旨

二酸化窒素(NO_2)と肺の表面を構成する脂質の一つであるコレステロールとの反応を検討した。 NO_2 はコレステロールの3位のOH基と反応しコレステリルナイトライトを生成することが判明した。反応を続けるとコレステロールの5位の二重結合と反応した生成物も観察された。水はこの反応を加速し酸素はこの反応を抑制することが見出された。

Abstract

The reaction of nitrogen dioxide (NO_2) with cholesterol was investigated. NO_2 reacted with the hydroxyl group in cholesterol to produce cholesteryl nitrite. In this reaction, other minor products were also observed, cholesteryl nitrate, however, was not detected as was reported by other workers. Water accelerates and oxygen retards this reaction.

はじめに

NO_2 は水への溶解度が SO_2 などくらべ低いため、呼吸器系に吸入されると肺胞に達し¹⁾、硝酸塩、亜硝酸塩の形で血液中に入り、その多くは硝酸塩として尿中に排出される。その過程で呼吸器系にさまざまな変化を及ぼす^{2,3)}。化学的に見ると NO_2 は強い酸化力を有している。従って呼吸器系に入った NO_2 は肺の表面をおおう成分と反応する可能性を有している⁴⁻⁶⁾。肺胞の表面はコレステロールやリン脂質が重要な役割をしている。従ってもしこれらの脂質と NO_2 が反応すると脂質の組成⁷⁾

* 本論文は Chemosphere Vol. 9, pp. 777-784 (1980) に掲載したものを和訳したものである。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

や代謝に変化⁸⁾を与える可能性が考えられる。KamelらはNO₂はコレステロール単分子膜と強い相互作用をすると報告している⁹⁻¹¹⁾。そこでNO₂の肺胞への影響を検討する一環として、NO₂とコレステロールとの反応を解析した。

方 法

コレステロール $\underline{1}$ 、コレステリルナイトレイトとNO₂標準ガスは市販品を購入した。赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴(NMR)スペクトル、質量スペクトルはそれぞれ日立分光光度計285、ブルッカー社製パルス核磁気共鳴装置SXP型、日本電子製JMS-100質量分析計を用いて測定した。

$\underline{1}$ とNO₂との反応生成物の定量分析はヤترون社製ヤトロスキャンTH-10分析計を用いた。反応生成物の分離は0.9mmの直径で152mmの長さのガラス棒に75 μ mの厚さのシリカゲル微粉末を蒸着させたもの(クロマロッドS)を用いて行った。反応生成物をクロマロッドSに吸着させた後にn-ヘキサンで展開した。クロマロッドSを乾燥(5分)し溶媒を除いた後水素炎を通し、FID検出器で検出する方法をとった。

反応はコレステロール(1g)の四塩化炭素溶液(500ml)に5,100, 477, 44.4ppmのNO₂(窒素中)を流速50ml/minで吹き込みを行った。

水や酸素の反応に及ぼす影響を検討する場合は表1に示すような4条件下で2時間反応を行った。

反応過程の解析は赤外吸収スペクトル、NMRスペクトル、クロマロッドSを用いた薄層クロマトグラフィーを用いて行った。表1の反応条件ではいずれの場合も反応生成物の80%以上はコレステリ

表 1 反 応 条 件
Table 1 Reaction Conditions

	Gas	Solvent
Cholesterol ^a	NO ₂ ^b + N ₂ ^c	CCl ₄ (120 ml)
Cholesterol ^a	NO ₂ ^b + O ₂ ^c	CCl ₄ (120 ml)
Cholesterol ^a	NO ₂ ^b + N ₂ ^c	CCl ₄ (100 ml) + H ₂ O (20 ml)
Cholesterol ^a	NO ₂ ^b + O ₂ ^c	CCl ₄ (100 ml) + H ₂ O (20 ml)

a: 100 mg

b: 5,856 ppm in N₂, Flow rate 120 ml/min.

c: Flow rate 60 ml/min.

ルナイトライド $\underline{2}$ で残りは未反応の $\underline{1}$ であった。 $\underline{2}$ は-20°Cで四塩化炭素から再結晶により精製した。この物質はmp. 94°C¹²⁾, m/e: 415(M⁺), 368(M⁺-HONO), ν_{KBr} 2950, 2932, 2873, 2852, 1640, 1469, 1380, 1369, 862, 820, 785cm⁻¹, δ_{CDCl_3} 5.22(1H, m, C₃-H), 5.46(1H, m, C₆-H)の特性を示した。少量の生成物を分析する場合は1gの $\underline{1}$ の四塩化炭素溶液に5640ppmのNO₂を45ml/min流速で吹き込み27時間反応させた。1184mgの粗反応混合物を得た。四塩化炭素から再

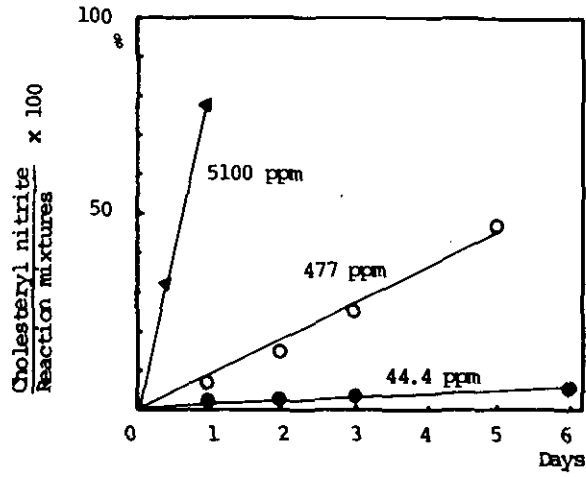


図 1 コレステロール(1g)と三種の濃度の NO_2 (5100, 477と44.4ppm, 流速50ml/min)との四塩化炭素溶液中での反応

Fig. 1 Reaction of cholesterol (1 g) with three different concentration of NO_2 (5,100, 477 and 44.4 ppm in N_2 , flow rate; 50 ml/min) in carbon tetrachloride

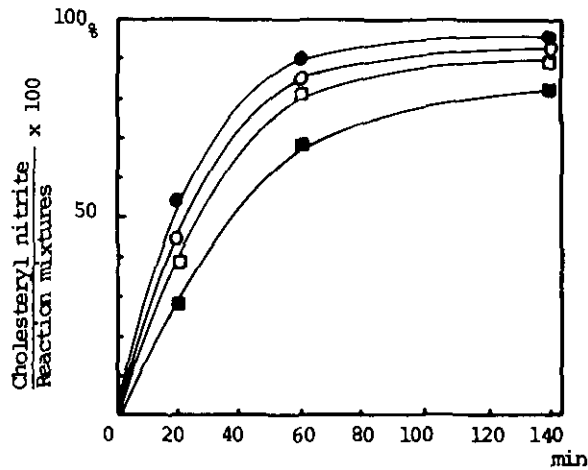


図 2 O_2 と H_2O の存在下でのコレステロールと NO_2 との反応, コレステリルナイトライトの生成量(%)の時間変化

Fig. 2 Reaction of cholesterol with NO_2 in the presence of O_2 and/or H_2O . Plot of % of cholesteryl nitrite vs. t. \square $\text{NO}_2 + \text{N}_2$, \blacksquare $\text{NO}_2 + \text{O}_2$, \bullet $\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ and \circ $\text{NO}_2 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$. For reaction conditions, see Table 1.

結晶を繰り返し 764mg の 2 を得た。残りをシリカゲルのカラムクロマトグラフィーを行いヘキサンとエーテルで溶離させた。エーテル分画から 39mg の 5α -OH, 6α -NO₂ - コレスタノール 3 の無色の結晶を得た。この物質は, mp. 193~194°C, m/e 449(M⁺), 431(M⁺-NO₂), $\nu_{\text{KB}} 3520, 3350, 2900, 1545\text{cm}^{-1}$. $\delta_{\text{DMSO-d}_6}$ 3.78(1H, m, C₃-H), 4.35(1H, dd, J=11, 6, C₆-H)ppm の特性を示した。

結果と考察

図 1 に NO₂ 濃度と 2 の生成量との関係を示した。図 2 に表 1 に示した四つの条件下での 2 の生成量を示した。赤外吸収スペクトル, NMR スペクトルはいずれも主反応生成物がコレステリルナイ

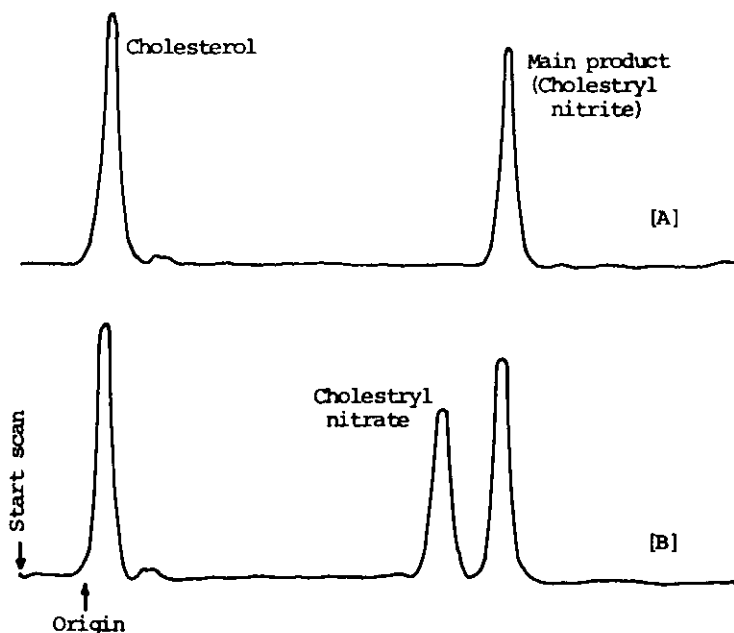


図 3 反応混合物〔A〕と反応混合物+コレステリルナイトレイト〔B〕の薄層クロマトグラム。展開溶媒 *n*-ヘキサン

Fig. 3 Thin layer chromatograms of reaction mixtures (A) and the mixtures plus cholesteryl nitrite (B). Development in *n*-hexane.

トライド 2 であることを示している。すなわち、赤外吸収スペクトルでは主生成物は典型的なナイトライドの吸収を $1,640, 785\text{cm}^{-1}$ に有しておりプロトン NMR スペクトルでは 5.22 と 5.46ppm に 2 の 3 位および 6 位の水素に帰属できる吸収が観察された。また質量スペクトル, 融点¹²⁾, R_f 値のいずれも主生成物が 2 であることを示している。

Kamel らは NO_2 と 1 との反応生成物のうちコレステリルナイトレイトが主生成物であるとしているが¹⁰, いずれの条件下でもコレステリルナイトレイトの生成は観察されなかった。図3Aは, 反応混合物をクロマロッドSを用いて分離した薄層クロマトグラムである。図3Bは, 反応混合物にコレステリルナイトレイトを加えて行った。主生成物のRf値はコレステリルナイトレイトのものと明らかに異なり, 反応混合物中にコレステリルナイトレイトは存在しないことが示されている。一方コレステリルナイトレイトの標準品の赤外吸収スペクトルは $1628, 1272, 868\text{cm}^{-1}$ にナイトレイトの典型的な吸収を示したが, 反応混合物の赤外吸収スペクトルにはこれらの吸収は観察されなかった。またコレステリルナイトレイトの標準品のNMRスペクトルには $\delta 4.85$ および 5.46ppm に3位と6位のプロトンの吸収を示すが反応混合物のNMRスペクトルにはこれらの吸収は観察されなかった。Kamel らの実験ではコレステリルナイトレイトの同定を薄層クロマトグラフィーだけで行っていることと, 彼らの薄層クロマトグラフィーの条件ではコレステリルナイトレイトと主生成物である 2 は Rf 値が極めて近くなるため 2 を誤ってコレステリルナイトレイトと同定したのではないかと推察される。

反応をさらに続けると多くの生成物が形成される。それらの生成物のうちで 3 が構造決定に必要なだけ得られた。3 は無色の結晶で質量スペクトルは m/e 449 に親ピークで 1 の親ピークより63マス分多くなっており 1 に H, N, O の原子が各1,1,3個付加した形をとっている。その赤外吸収スペクトルにはOH基の伸縮振動に基づく吸収が $3520, 3350\text{cm}^{-1}$ に見られ一つは水素結合したOH基の伸縮振動であることが判明した。また 1545cm^{-1} にはニトロ基の伸縮振動に基づく吸収が観察された。また DM SO-d_6 溶媒中でのNMR吸収スペクトルでは3位と6位のプロトンの吸収が $3.78, 4.35\text{ppm}$ に観察された。6位のプロトンはddカップリングしており, カップリング定数は $J=11$ と $J=6$ であり, 6位のプロトンがアキシアル(α)配向であることが示唆される¹³。5位のOH基はニトロ基と水素結合しているため α 側に配向していると推定される。従って 3 は $5\alpha\text{-OH}$, $6\alpha\text{-NO}_2$ -コレスタノールと推定された。

図4に反応機構を示した。1の3位のOH基は2分子の NO_2 と反応し 2 と硝酸を形成する。同様の反応はメタノールのOH基と NO_2 との反応でも見られ, Silverwood らにより化学量論的に扱われている。

3 は図4に示した経路で生成される。すなわち 1 の二重結合に NO_2 が付加し 4, 5 のニトロ置換したラジカルが形成される¹⁵。19位のメチル基のしゃへい効果によりニトロ基の攻撃は α 側からのもの 5 が優先すると推定される。生成したニトロ置換したラジカルは NO_2 の攻撃を再びうける。 β 側からの攻撃は19位のメチル基のしゃへい効果で起こりにくいと考えられる。4 に NO_2 が付加すると19位のメチル基と6位の β 側の NO_2 との間で van der Waals 相互作用が強くなると考えられるため不利と推定される。従って 5 に α 側から NO_2 は攻撃すると考えられる。この結果 $5\alpha\text{-ONO}$, $6\alpha\text{-NO}_2$ -コレスタノール 6 が生成する。6 は精製過程で加水分解され 3 が生成すると考えられる。図2に示すように水は反応を促進し, 酸素は反応を遅らせる。水が存在する場合は, NO_2 は水と反応し亜硝酸を生成する。この亜硝酸が 1 と反応し 2 と水を生成する。1 を亜硝酸ナトリウムと塩酸とで処理すると 1 のOH基は即座にナイトライトエステル 2 となる。この亜硝酸との反応が速い為 2 の生成が水の

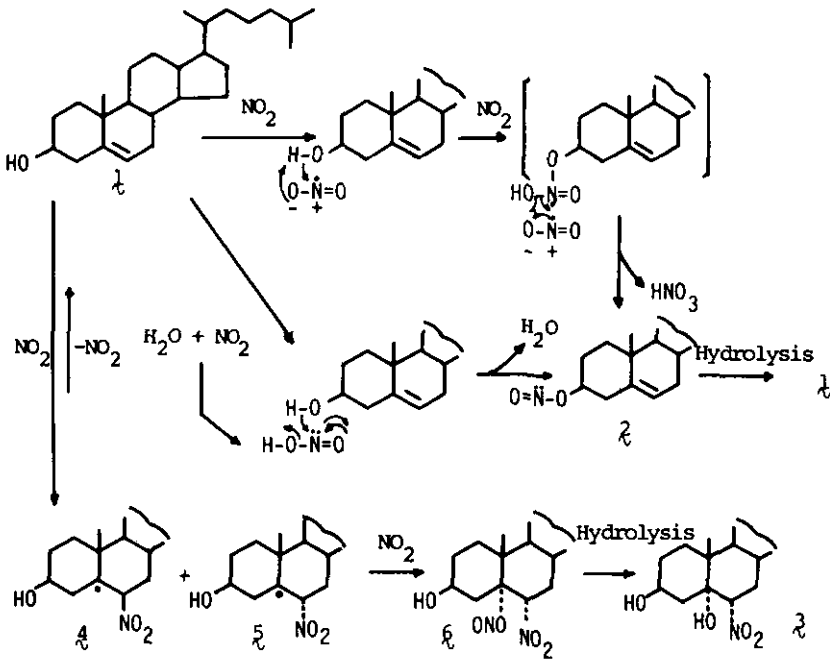


図 4 コレステロールと NO₂ との反応機構
 Fig. 4 Reaction process of cholesterol with nitrogen dioxide

存在下で促進されることが考えられる。一方酸素の存在下では酸素分子が中間体のラジカルと反応する為 2 の生成が遅くなると考えられる。

以上の結果は、NO₂ を含んだ大気に 1 を暴露すると、1 の 3 位の OH 基が NO₂ と反応し 2 が主に形成されることを示すものである。1 の単分子膜に NO₂ を作用させると、同様に 2 が生成することを確認したが、2 は膜から離脱し膜の凝縮が起きると考えられる。コレステロールの同様の離脱は、コレステロールとレシチンの混合単分子膜においても報告されている。動物の場合も NO₂ を暴露すると、肺胞の表面で NO₂ とコレステロールが反応する可能性がある。従って膜の性質が変化し、浸透圧等が変化する可能性がある。これらの変化が NO₂ 暴露した場合におきる肺の病変に^{16,17}、何らかの関係を持っている可能性があり、現在これについて検討中である。

引用文献

- 1) Wagner, H. (1970): Absorption von NO und NO₂ in MIK- und MAK-Konzentrationen bei der Inhalation, Staub-Reinhalt. Luft, 30, 380-381.
- 2) Morrow, P.E. (1975): An evaluation of recent NO_x toxicity data and an attempt to derive an ambient air standard for NO_x by established toxicological procedures, Environ. Res., 10, 92-112.
- 3) Reports by an Expert Committee of the Central Council for Environmental Pollution Control, (1978):

- J. Japan Soc. Air Pollution, 13, 164-196.
- 4) Felmeister, A., M. Amanat and N.D. Weiner (1968): Interaction of nitrogen dioxide-olefin gas mixtures with lecithin monomolecular films. *Environ. Sci. Tech.*, 2, 40-44.
 - 5) Thomas, H.V., P.K. Mueller and R.L. Lyman (1967): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, 159, 532-534.
 - 6) Ordin, L., M.L. Hall and J.I. Kindinger (1969): Oxidant-induced inhibition of enzymes involved in cell wall-polysaccharide synthesis. *Arch. Environ. Health*, 18, 623-636.
 - 7) Kobayashi, T., T. Noguchi, M. Kikuno and K. Kubota (1980): Effect of nitrogen dioxide exposure on the composition of fatty acids in lung and liver phospholipids. *Toxicol. Lett.*, 6, 149-155.
 - 8) Blanck, M.L., W. Dalbey, P. Nettesheim, J. Price, D. Creasia and F. Snyder (1978): Sequential changes in phospholipid composition and synthesis in lung exposed to nitrogen dioxide. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 117, 273-280.
 - 9) Kamel, A.M., N.D. Weiner and A. Felmeister (1970): Interaction of nitrogen dioxide with cholesterol-lecithin mixed monolayers. *Atmospheric Environ.*, 4, 475-480.
 - 10) Kamel, A.M., N.D. Weiner and A. Felmeister (1971): Identification of cholesteryl nitrate as a product of the reaction between NO_2 and cholesterol monomolecular films. *Chem. Phys. Lipids*, 6, 225-234.
 - 11) Kamel, A.M., A. Felmeister and N.D. Weiner (1971): Surface pressure-surface area characteristic of a series of autoxidation products of cholesterol. *J. Lipid Research*, 12, 155-159.
 - 12) Djerassi, C., H. Wolf and E. Bunnenberg (1963): Optical rotatory dispersion studies. LXXXV. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of the nitrite and nitro chromophores. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2835-2843.
 - 13) Anet, F.A.L., (1962): The use of remote desaturation for the determination of coupling constants and conformational equilibria in cyclohexane derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 1053-1054.
 - 14) Silverwood, R., and J. H. Thomas (1967): Reaction between methanol and nitrogen dioxide. *Trans. Faraday Soc.*, 63, 2476-2479.
 - 15) Stevens, T.E. (1959): Addition of dinitrogen tetroxide to camphen and trans-stilbene; the effect of oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 3593.
 - 16) Drozd, M., E. Kucharz and J. Szyja (1977): Effect of chronic exposure to nitrogen dioxide on collagen content in lung and skin of guinea pigs. *Environ. Res.*, 13, 369-377.
 - 17) Freeman, G. (1974): Pathology of pulmonary disease from exposure to interdependent ambient gases (nitrogen dioxide and ozone). *Arch. Environ. Health*, 29, 203-209.

11

二酸化窒素と不飽和脂肪酸の反応生成物のラット肺リン脂質
脂肪酸組成に及ぼす影響

Effect of Reaction Products of Nitrogen Dioxide with Unsaturated Fatty Acid
on the Composition of Fatty Acid in the Lung Phospholipid

小林 隆 弘¹

Takahiro KOBAYASHI¹

要 旨

NO₂ (5,000 ppm) とオレイン酸 (1g) を四塩化炭素溶液中酸素存在下で12時間反応させ、その反応生成物をリン酸緩衝液 (pH 7.56, Triton X-100 を含む) に懸濁させ、ラットに尾静注した。24時間後の肺と肝のリン脂質の脂肪酸組成の変化をみた。肺の湿重量は増加し、リン脂質中のパルミチン酸の割合も有意に増加した。また他の脂肪酸の増減の傾向はNO₂急性暴露の際の肺組織のリン脂質における脂肪酸の増減の傾向と同じであった。これらの結果は肺の表面でNO₂とリン脂質中の不飽和脂肪酸が反応すると仮定すると、その反応生成物は肺のリン脂質の脂肪酸組成を変化させる一因になりうることを示唆している。

Abstract

Oleic acid (1g) dissolved in CCl₄ was reacted with NO₂ (5,000 ppm) in the presence of O₂ for 12 hours. The resulting reaction products solved by phosphate buffer (pH 7.56) containing 0.1% Triton X-100 were injected to rats via the tail vein. After 24 hr, fatty acid compositions of phospholipids in the lung and liver tissues were observed. The lung wet weight and the relative ratio of palmitic acid increased by the injection of the reaction mixtures. The tendency of the changes in other fatty acids in the lungs was similar to the results for acute exposure of rats to 20 ppm NO₂. These observations suggest that the reaction product of NO₂ with unsaturated fatty acids would be one of the factors which make a change in the fatty acid composition of phospholipids in lungs, when rats were exposed to NO₂.

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

はじめに

ラットをNO₂に暴露すると肺の表面活性物質として重要な役割をしているリン脂質が種々の影響を受ける。我々はこのリン脂質に及ぼすNO₂の影響を検討し以下の点を明らかにしてきた。すなわち、1) 化学的にNO₂はリン脂質の脂肪酸の二重結合と容易に反応し、ニトロ置換したラジカル中間体を経たと考えられる誘導体を生成すること^{1,2)}。2) ラットのNO₂急性および慢性暴露により肺リン脂質の脂肪酸組成が有意に変動すること³⁾。3) ラットのNO₂急性暴露により肺胞洗浄液中のリン脂質の脂肪酸組成が有意に変動すること⁴⁾。4) 標的臓器以外の肝においても脂肪酸組成が有意に変動すること³⁾、などである。

Thomasらは*in vivo*の実験でNO₂と肺のリン脂質の不飽和脂肪酸が直接反応することを示唆する報告をしている⁵⁾。もしNO₂と不飽和脂肪酸が反応するとすれば、不飽和脂肪酸の過酸化物やニトロ化物などができる可能性が考えられる。Cortesiらはオゾンあるいは酸素と不飽和脂肪酸との反応によって生ずるオゾナイドやヒドロペルオキシドが肺のリン脂質の脂肪酸組成等に影響を及ぼすことを観察した⁶⁾。そこで今回はNO₂と不飽和脂肪酸との反応生成物が肺のリン脂質の脂肪酸組成にどのような影響を与えるか検討しNO₂暴露による肺リン脂質の脂肪酸組成の変化と比較することを目的とした。

方 法

不飽和脂肪酸としてはオレイン酸(99.9%純度PL社)を用いた。NO₂は5,000ppm標準ガス、O₂は99.99%純ガスを用いた。核磁気共鳴スペクトル、赤外吸収スペクトルはそれぞれ90Mcブルッカー社製パルス核磁気共鳴装置SXP型、日立赤外分光光度計285を用いた。ラットに静注する脂肪酸とNO₂の反応生成物は、オレイン酸(1g)の四塩化炭素溶液に5,000ppmのNO₂(120ml/min)と純酸素(60ml/min)を12時間反応させたものを使用した。NMR、IRの結果から反応混合物の組成はオレイン酸(15%)、エライジン酸(29%)、ニトロケトン体(30%)、ニトロヒドロキシル体(18%)、ジニトロ体(8%)であった¹⁾。また反応生成物はヨウ化カリウム-デンプン反応がプラスであったことから過酸化物の存在が示唆された。

JCL:Wistar系雌ラット(10週令)を各群6匹ずつ6群にわけた。第1群はpH7.56のリン酸緩衝液(水11中NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.15g, KH₂PO₄ 0.2gを含む)0.5mlを尾静注した。第2群は0.1%の割合でTriton X-100が入ったpH7.56のリン酸緩衝液0.5mlを尾静注した。第3群から第6群までは第2群で用いたTriton X-100を0.1%含むリン酸緩衝液を用い以下の物質を添加し尾静注した。第3群はNO₂とオレイン酸の反応生成物2.5mg、第4群はNO₂とオレイン酸の反応生成物5mg、第5群はオレイン酸5mg、第6群はエライジン酸5mgをそれぞれ含んでいる。これらを尾静注してから24時間後エーテル麻醉下で動脈から放血後、肺、肝を摘出した。採取した肺および肝の一部(約500mg)はメタノール-クロロホルム-水(2:1:0.3, v/v)の混合溶媒3.3ml中Polytronホモジナイザーを用いホモジナイズした。Folchらの方法で脂質を抽出した⁷⁾。操作はすべて窒素気流

中、水冷下で行った。リン脂質は薄層クロマトグラフィー(シリカゲルF₂₅₄メルク社製)、展開溶媒：n-ヘキササン-エチルエーテル-酢酸,(80:40:1, v/v)を行い分取した。リン脂質はMorganらの方法⁸⁾で窒素雰囲気中メタノリシスし、得られた脂肪酸のメチルエステルを島津GC-5Aガスクロマトグラフを用い分析した。カラムはスコット型の40mガラスキャピラリーカラム(内径0.3mm)を用い、液相はシアノエチル化したポリシロキサン(SS-4)を用いた。分析条件はカラム温度160℃、注入口温度250℃、キャリアガス流量0.71ml/分で行った⁹⁾。データの有意差は第2群を対象としStudentのt検定によって行った。

結 果

表1に体重および肺、肝湿重量ならびに肺の体重比を示した。NO₂とオレイン酸との反応生成物を静注した群では肺湿重量ならびに肺の体重比が有意に増加した。表2に肺リン脂質の脂肪酸組成を示した。表2から明らかなように肺リン脂質中最も多量に含まれているパルミチン酸は反応生成物を静注した3,4群で増加し、特に第4群では有意な増加を示した。オレイン酸投与群(第5群)でも増加傾向がみられた。他の脂肪酸ではパルミトレイン酸は有意に増加し、ミリスチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、アラキドン酸は第4群でオレイン酸投与群と第4群の反応生成物投与群の増減の傾向は同じ傾向を示した。

表3に肝リン脂質の脂肪酸組成を示した。肝のリン脂質の脂肪酸組成はこれらの物質を静注することにより顕著な変化を示さなかった。

表 1 体重, 肺, 肝湿重量およびその体重比

Table 1 Body weight, lung and liver wet weight and experimental data

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Initial Body Weight. (I) g	224 ± 2 ^{a)}	222 ± 9	226 ± 16	225 ± 13	219 ± 6	231 ± 11
Final Body Weight. (F) g	221 ± 3	220 ± 11	226 ± 8	219 ± 6	222 ± 12	226 ± 12
Lung Wet Weight. (Lu) mg	901 ± 32	888 ± 79	997 ± 103	1,047 ± 48 ^{**b)}	956 ± 32	945 ± 63
Lu/F (× 10 ³)	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.4 ± 0.4	4.6 ± 0.4	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.3
Liver Wet Weight. (Li) g	7.16 ± 0.60	7.88 ± 0.70	7.29 ± 0.51	7.47 ± 0.51	7.14 ± 0.44	7.53 ± 0.61
Li/F (× 10 ³)	32.5 ± 2.7	35.8 ± 2.1	32.3 ± 2.3	33.8 ± 1.4	32.3 ± 1.9	33.3 ± 1.8

a: Mean Value ± S.D.

b: t-test as compared with Group 2. ** P < 0.01.

表 2 NO₂とオレイン酸との反応生成物の静注による肺リン脂質脂肪酸組成の変化

Table 2 Changes in the fatty acid composition of lung tissue phospholipids by injection (i.v.) of reaction mixtures of oleic acid with NO₂

Fatty acids	RT ^{a)}	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
	261	1.40 ± 0.06 ^{b)}	1.59 ± 0.09	1.44 ± 0.12	1.55 ± 0.07	1.35 ± 0.10 ^{*c)}	1.24 ± 0.10 ^{***}
Myristic acid	341	3.27 ± 0.17	3.22 ± 0.17	3.26 ± 0.47	2.79 ± 0.27	3.58 ± 0.49	2.97 ± 0.21
Palmitic acid	411	34.77 ± 0.18	35.32 ± 1.01	36.43 ± 1.35*	38.62 ± 1.81**	36.16 ± 1.56	34.20 ± 0.78
Palmitoleic acid	558	2.04 ± 0.19	2.07 ± 0.19	2.03 ± 0.20	2.00 ± 0.17	2.06 ± 0.23	2.13 ± 0.17
Stearic acid	694	13.21 ± 0.24	13.04 ± 0.44	13.06 ± 0.51	12.33 ± 0.72	12.88 ± 0.42	13.28 ± 0.24
Oleic acid	763	11.28 ± 0.45	10.93 ± 0.45	11.22 ± 0.25	10.09 ± 0.32*	10.45 ± 0.35	11.48 ± 0.25*
Linoleic acid	915	7.03 ± 0.23	7.37 ± 0.20	7.45 ± 0.17	7.46 ± 0.11	7.55 ± 0.21	7.67 ± 0.25
Arachidonic acid	2,018	12.02 ± 0.45	11.82 ± 0.48	11.82 ± 0.48	11.36 ± 0.41	11.39 ± 0.74	12.93 ± 0.30**

a: Retention time (sec) at 160°C (column temperature).

b: Mean value ± S.D. (%).

c: *t*-test as compared with Group 2, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 and *** *P* < 0.001.

表 3 NO₂とオレイン酸との反応生成物の静注による肝リン脂質脂肪酸組成の変化

Table 3 Changes in the fatty acid composition of liver tissue phospholipids by the injection (i.v.) of reaction mixtures of oleic acid with NO₂

Fatty acids	Group 2	Group 4
Palmitic acid	11.83 ± 0.69 ^{a)}	11.73 ± 0.55
Stearic acid	30.41 ± 1.11	30.16 ± 0.63
Oleic acid	4.14 ± 0.35	4.25 ± 0.22
Linoleic acid	12.47 ± 0.91	12.72 ± 0.42
Arachidonic acid	25.16 ± 1.64	25.86 ± 1.27
Docosahexaenoic acid	11.31 ± 0.96	10.50 ± 0.94

a: Mean value ± S.D. (%).

考 察

NO₂とオレイン酸の酸素存在下での反応生成物を静注すると、肺の湿重量が有意に増加した。著者らの行った急性NO₂暴露(20ppmNO₂, 20, 40時間)³⁾, Arnerらの9か月間暴露実験(2.9ppm, NO₂, 24時間/日, 5日間/週)¹⁰⁾でも肺湿重量の増加が観察されている。

肺のリン脂質の脂肪酸組成は第2群と第4群を比較するとパルミチン酸が有意に増加していた。この増加はNO₂急性暴露(20ppm NO₂, 20,40時間)³⁾ NO₂長期暴露(0.4ppmおよび4ppm, 9.18か月間)¹¹⁾のリン脂質中の脂肪酸組成およびRoehmらの行った亜急性暴露(10ppm NO₂, 4週間)¹²⁾の場合の総脂質中の脂肪酸組成においても観察された。

一方他の脂肪酸ではミリスチン酸, ステアリン酸, オレイン酸, アラキドン酸が有意な減少またはわずかな減少傾向を示した。この傾向は、NO₂急性暴露(20ppm NO₂, 20, 40時間)³⁾の場合でも観察された。また、NO₂長期暴露¹¹⁾の場合でもオレイン酸の場合をのぞき傾向が一致した。またパルミトレイン酸, リノール酸の増加傾向もNO₂急性暴露で観察された。

肝リン脂質脂肪酸の場合NO₂急性暴露, NO₂長期暴露により、肺と逆の増減の傾向が観察されたが、反応生成物を静注した場合には一定の傾向はみられなかった。

以上NO₂とオレイン酸との反応生成物の静注により肺リン脂質脂肪酸組成がNO₂暴露の場合と同様の変動を示すことが判明した。中でもパルミチン酸の増加は、1) ジパルミチルホスファチジルコリンを多量に含む surfactant の合成, 分泌が活発になること, 2) パルミチン酸をとり込んだレシチンの分解が遅くなること, などの要因が考えられる。

NO₂暴露で肺の surfactant の合成が盛んになることは、Blanch¹³⁾らの報告でパルミチン酸の取り込みがNO₂急性暴露後増加することから、支持される。また surfactant の分泌が増すことは、著者等⁴⁾のNO₂暴露による肺胞洗浄液中のリン脂質量の増加とリン脂質中のパルミチン酸の増加の結果から支持される。従って、NO₂暴露による何らかの刺激が肺のII型上皮細胞に伝わり、surfactant が分泌されると同時に surfactant の合成も増加すると考えられる。surfactant の分泌をコントロールするものとしてはプロスタグランジンE₂, F_{2α}¹⁴⁻¹⁷⁾ β-adrenergic agents¹⁷⁻²¹⁾, cholinergic agents^{17,18,22-24)}, カルシウムイオノホア^{17,25,26)}, チロキシン²⁷⁾等々が挙げられる。プロスタグランジンE₂, F_{2α} (PGE₂, PGF_{2α})に関してはAndersonら¹⁵⁾がII型上皮細胞を使いホスファチジルコリン(PC)の分泌を促進すると報告している。またColacicco¹⁶⁾らはPGE₂, PGF_{2α}もコリンやパルミチン酸のPCへの取り込みを増加させると報告している。一方Marino¹⁷⁾らはPGE₂は確かにII型上皮細胞のPC分泌を促進するがPGF_{2α}は促進しないとしている。

肺はPGE₂, PGF_{2α}の活性を失わせる作用をもつ器官である。肺を1回通過するとこれらのPGの活性は98~99%失われる。著者らはNO₂暴露によってPGE₂やPGF_{2α}の活性を失わせるプロスタグランジンデヒドロゲナーズの活性が対照の60%へと有意に低下することを観察した²⁸⁾。従ってNO₂暴露により肺で活性が失われるPGE₂(F_{2α})が不活性化されず、surfactant の分泌を増加させる可能性が考えられる。同時に分泌された surfactant を補うため合成を活発にする経路があるの

かもしれない。NO₂とオレイン酸との反応生成物を静注した場合の肺のリン脂質脂肪酸組成の変動の傾向がNO₂暴露の場合と類似であることから、NO₂と不飽和脂肪酸の反応生成物も肺のプロスタグランジンデヒドロゲナーズの活性を低下させ、NO₂暴露の場合と同様の機構で surfactant の分泌、合成を盛んにさせている可能性が考えられる。

今後他の surfactant 分泌の要因である、カルシウム、 β -adrenergic receptor, cholinergic receptor などへのNO₂暴露の影響を検討すると共にこれらに対するNO₂と不飽和脂肪酸の反応生成物の影響を検討していく予定である。

引用文献

- 1) 小林隆弘・野口 忠(1979): 肺リン脂質に及ぼす二酸化窒素の影響。不飽和脂肪酸との反応並びに急性暴露による肺リン脂質脂肪酸組成の変化。国立公害研究所研究報告, 第8号, 103-126.
- 2) Kobayashi, T., T. Noguchi, M. Kikuno and K. Kubota (1974): Reaction of nitrogen dioxide with lipids (II). ACS/CSJ Chemical Congress (Meeting abstract) p. 73.
- 3) Kobayashi, T., T. Noguchi, M. Kikuno and K. Kubota (1980); Effect of nitrogen dioxide exposure on the composition of fatty acids in lung and liver phospholipids. Toxicol. Lett., 6, 149-155.;
- 4) 小林隆弘・野口 忠(1980): 二酸化窒素急性暴露の肺胞洗浄液のリン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告, 第15号, 101-107.
- 5) Thomas, H.V., P.K. Mueller and R.L. Lyman (1968): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. Science, 159, 532-534.
- 6) Cortesi, R. and O.S. Privett (1972): Toxicity of fatty acid ozonides and peroxides. Lipids, 7, 715-721.
- 7) Folch, J., M. Lees and G.A.S. Stanley (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem., 226, 497-509.
- 8) Morgan, T.E., A.A. Schmitz and J.R. Pelka (1966): Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem., 38, 514-515.
- 9) Kobayashi, T. (1980): Gas-liquid chromatographic separation of geometric isomers of unsaturated fatty acid methyl esters using a glass capillary column. J. Chromatogr., 194, 404-409.
- 10) Arner, E.C. and R.A. Rhoades (1973): Long-term nitrogen dioxide exposure. Arch. Environ. Health., 26, 156-160.
- 11) 小林隆弘(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響, 肺・肝リン脂質脂肪酸組成。国立公害研究所報告, 第15号, 275-284.
- 12) Roehm, J.N., J.G. Hadley and D.B. Menzel (1971): Antioxidants vs lung disease. Arch. Intern. Med., 128, 88-93.
- 13) Blanck, M.L., W. Dalbey, P. Nettesheim, J. Price, D. Creasia and F. Snyder (1978): Sequential changes in phospholipid composition and synthesis in lungs exposed to nitrogen dioxide. Am. Rev. Resp. Dis., 117, 273-280.
- 14) Oyarzun, M.J. and J.A. Clements (1978): Control of lung surfactant by ventilation, adrenergic mediators, and prostaglandins in the rabbit. Am. Rev. Resp. Dis., 117, 879-891.
- 15) Anderson, G.G., J.A. Cidlowski, P.L. Absher, J.R. Hewitt and W.H.J. Douglas (1978): The effect of dexamethasone and prostaglandin F_{2 α} on production and release of surfactant in type II alveolar cells. Prostaglandins, 16, 923-929.

- 16) Colacicco, G., M.K. Basu, A.K. Ray, M. Whittner and R.M. Rosenbaum (1977): Effects of prostaglandin E_2 and $F_{2\alpha}$ on lecithin biosynthesis by cultured lung cells, *Prostaglandins*, **14**, 283-294.
- 17) Marino, P.A. and S.A. Rooney (1980); Surfactant secretion in a newborn rabbit lung slice model. *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 509-519.
- 18) Dobbs, L.G. and R.J. Mason (1979): Pulmonary alveolar type II cells isolated from rats. Release of phosphatidylcholine in response to β -adrenergic stimulation. *J. Clin. Invest.*, **63**, 378-387.
- 19) Wyszogrodski, I., H.W. Taeusch, Jr., and M.E. Avery (1974): Isoxsuprine-induced alterations of pulmonary pressure-volume relationships in premature rabbits. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **119**, 1107-1111.
- 20) Corbet, A.J.S., P. Flax and A.J. Rudolph (1977): Role of autonomic nervous system controlling surface tension in fetal rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.*, **43**, 1039-1045.
- 21) Lawson, E.E., E.R. Brown, J.S. Torday, D.L. Madansky and H.W. Taeusch, Jr. (1978): The effect of epinephrine on tracheal fluid flow and surfactant efflux in fetal sheep. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **118**, 1023-1026.
- 22) Goldenberg, V.E., S. Buckingham and S.C. Sommers (1969): Pilocarpine stimulation of granular pneumocyte secretion. *Lab. Invest.*, 1969, **20**, 147-158.
- 23) Oyarzun, M.J. and J.A. Clements (1977): Ventilatory and cholinergic control of pulmonary surfactant in the rabbit. *J. Appl. Physiol.*, **43**, 39-45.
- 24) Abdellatif, M.M. and M. Hollingsworth (1979): Mediation by adrenaline of lung surfactant secretion induced by oxotremorine in neonatal rabbits. *Br. J. Pharmacol.*, **66**, 142-143.
- 25) Mason R.J., M.C. Williams and L.G. Dobbs (1977): *In* Pulmonary Macrophage and Epithelial Cells. Proceedings of the 16th Annual Hanford Biology Symposium (Sanders, C.L., R.P. Schneider, G.E. Dagle and H.A. Ragan eds.) 280-297, Technical Information Center, Energy Research and Development Administration, Springfield, VA.
- 26) Shapiro, D.L., L.L. Nardone, S.A. Rooney, E.K. Motoyama and J.L. Munoz (1978): Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **530**, 197-207.
- 27) Redding, R.A., W.H.J. Douglas and M. Stein (1972): Thyroid hormone influence upon lung surfactant metabolism. *Science*, 1972, **175**, 994.
- 28) Kobayashi, T., in preparation.

12

二酸化窒素と不飽和脂肪酸の反応生成物の肺プロスタサイクリン合成に及ぼす影響

Effect of Reaction Products of Nitrogen Dioxide with Unsaturated Fatty Acid on the Prostacyclin Synthesis of Lungs

小林 隆 弘¹

Takahiro KOBAYASHI¹

要 旨

二酸化窒素とオレイン酸との反応生成物が肺ホモジネートのプロスタサイクリン合成に及ぼす影響を検討した。ホモジナイズした肺のプロスタサイクリン合成能は反応混合物を添加すると低下する。このプロスタサイクリン合成能低下の一つの要因として反応生成物中に存在することが示唆される脂質過酸化物が挙げられる。

Abstract

The effect of reaction mixtures of NO_2 with oleic acid on the prostacyclin synthesis of the lung homogenate are reported. Prostacyclin synthesizing activity of homogenized lung is inhibited by the reaction mixtures. Lipid peroxide in the reaction mixtures may be one of the factors related to this decrease in prostacyclin synthesis.

はじめに

呼吸器系に吸入された NO_2 のうち大部分は NO_3^- , NO_2^- の形で血液中に入り、尿中に排出される。この過程で NO_2 が化学的に高い反応性を持っているため肺の表面を構成する成分と反応する可能性がある。Thomas らは NO_2 に暴露したラットの肺の脂質に過酸化反応がおきていることを示唆した¹⁾。我々は NO_2 とコレステロール²⁾、不飽和脂肪酸など³⁾の脂質との反応を解析してきた。 NO_2 と不飽和脂肪酸との反応ではニトロ置換したラジカル中間体に酸素が反応し、生成した過酸化物から誘導される物質を同定した。そこで NO_2 と不飽和脂肪酸との反応で生ずる物質が肺にどのような影響を与えるか検討を行っている。今回はこの反応生成物が肺のプロスタサイクリン合成にどのような影響を与えるか *in vitro* の系で検討した。プロスタサイクリン (PGI_2) は図1に示すアラキドン酸を前駆

1. 国立公害研究所 環境生理部, 〒305, 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

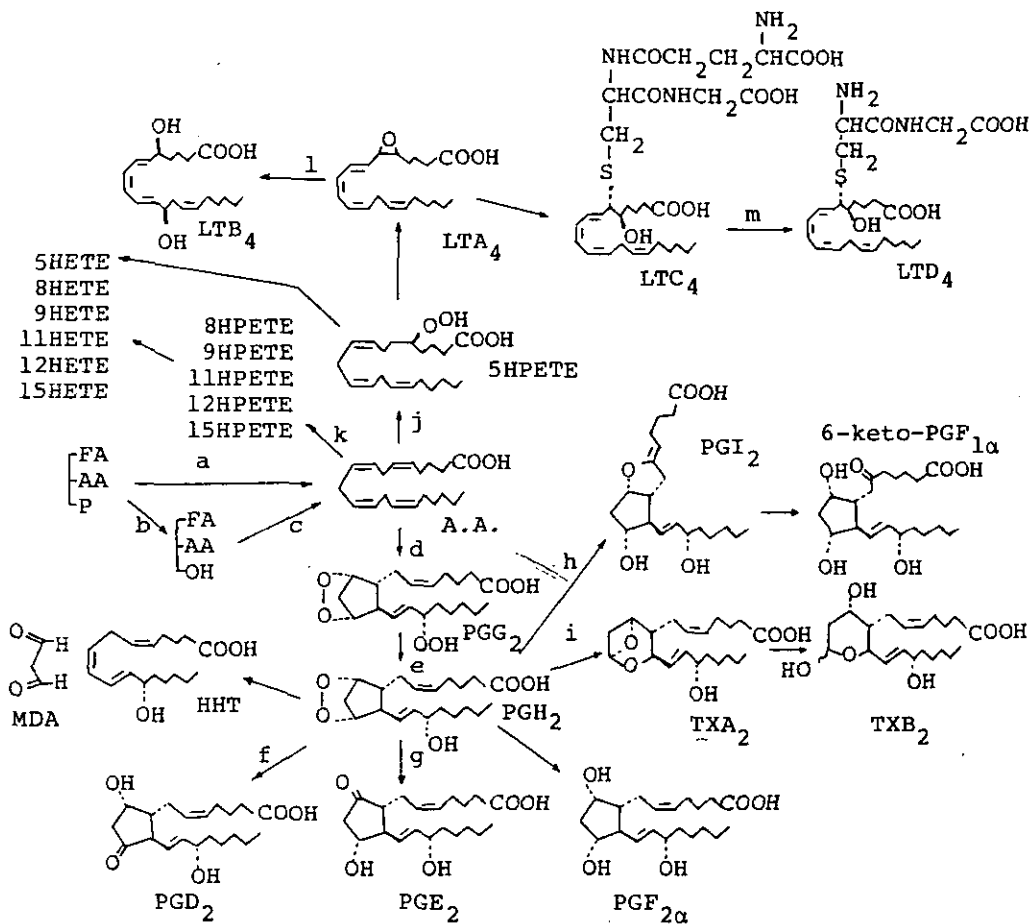


図 1 アラキドン酸カスケード

A.A.: アラキドン酸, PG: プロスタグランジン, TX: トロンボキサン,
HHT: 12L-ヒドロキシ-5,8,10-ヘプタデカトリエン酸,
MDA: マロンジアルデヒド, HPETE: ハイドロペルオキシ-
エイコサトリエン酸, HETE: ヒドロキシ-エイコサトリエン酸,
LT: ロイコトリエン

Fig. 1 Arachidonate cascade

A.A.: arachidonic acid, PG: prostaglandin, TX: thromboxane, HHT: 12L-hydroxy-
5, 8, 10-heptadecatrienoic acid, MDA: malondialdehyde, HPETE: hydroperoxy
eicosatetraenoic acid, HETE: hydroxy-eicosatetraenoic acid, LT: leukotriene
a: phospholipase A₂, b: phospholipase C, c: diglyceride lipase, d: PG cyclooxygenase,
e: PG hydroperoxidase, f: PGD isomerase, g: PGE isomerase, h: PGI isomerase, i: TX
isomerase, j: 5-lipoxygenase, k: 8-lipoxygenase, etc., l: lipoxygenase, m: γ -glutamyl
transpeptidase

体として合成されるプロスタグランジン類の一つである。肺はこのプロスタサイクリン合成が非常に活発な臓器である^{4,5)}。Moncadaらは15-ハイドロペルオキシアラキドン酸が動脈壁のプロスタサイクリン合成を抑えることを報告している⁶⁾。またOkumaらはビタミンE欠乏ラットでは脂質の過酸化がおき、動脈壁から分泌されるプロスタサイクリン様物質の量が有意に減少することを見出した⁷⁾。従ってNO₂と不飽和脂肪酸との反応生成物も肺におけるプロスタサイクリン合成を抑える可能性があるため、この点について *in vitro* の系で検討を行った。

方 法

不飽和脂肪酸としてはオレイン酸(99.9%純度PL社)を用いた。NO₂は5,000 ppm標準ガス、O₂は99.999%純ガスをを用いた。核磁気共鳴スペクトルは90 Mc ブルッカー社製パルス核磁気共鳴装置 SXP型、赤外吸収スペクトルは日立赤外分光光度計 285、脂肪酸のガスクロマトグラフィーは脂肪酸をジアゾメタンでメチルエステルとして島津GC-5 Aガスクロマトグラフを用い分析した。用いたカラムはスコット型の40 m ガラスキャピラリーカラム(内径0.3 mm)を用いた。液相は50% シアノエチル化した⁸⁾ポリシロキサン(SS-4)を用いた。また放射活性物質の検出にはベルトールド社製薄層クロマトスキャナー、放射活性はヒューレットパッカード社製液体シンチレーションカウンターを用いた。

反応は1 g のオレイン酸を500 ml の四塩化炭素に溶解し、5,000 ppm のNO₂とO₂をそれぞれ毎分120 ml, 60 ml 吹き込み、12時間反応を行った。そのIRスペクトル、NMRスペクトルより反応混合物中にはオレイン酸(15%)、エイジン酸(29%)、ニトロケトン体(30%)、ニトロヒドロキシル体(18%)、ジニトロ体(8%)が含まれていた³⁾。またヨウ化カリウムデンプン反応はプラスであり、過酸化物が生成されていることを示唆した。

12週令のWistar系雄ラットを勁椎脱臼後勁動脈から放血し屠殺した。左肺(三四分)1.5gを3mlの氷冷したリン酸緩衝液(pH 8.2, 1/15 M)中でホモジナイズした。一方pH 8.2のリン酸緩衝液0.5mlに0.2 μCiの[1-¹⁴C]-アラキドン酸(Specific activity 56.4 Ci/mol)と5 μgの¹⁴Cラベルしていないアラキドン酸を加えた後、NO₂とオレイン酸との反応混合物を2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0mg 加え、超音波処理した懸濁液を作った。この懸濁液0.5mlに肺のホモジネート0.5mlを加え1mlとし、37°Cで15分間インキュベートした。反応は0.1N HClを加えpH 3.0にすることにより止めた。反応混合物に酢酸エチル6ccを加え、10分間振とう後3,000 rpm 10分間遠心し、酢酸エチル層を採取した。溶媒除去後、エタノールに溶解し薄層クロマトグラフィー(シリカゲル)により分離した。展開溶媒は酢酸エチル/2, 2, 4-トリメチルペンタン/酢酸/水(11:5:2:10, v/v)の有機層を用いた⁹⁾。薄層クロマトスキャナーにて放射活性のある位置を検出し、薄層をかきとった後、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

結 果

図2に正常な肺とアラキドン酸をインキュベートした場合のラジオクロマトグラムを示した。主生成

物はプロスタサイクリンの安定な代謝物である6-ケト-プロスタグランジンF_{1α} (6-keto-PGF_{1α})であることが判明した。また、このピークにプロスタグランジンF_{2α}が重なっていないことは³H-PGF_{2α}とのコカラム、ならびに cold の PGF_{2α} とのコカラム後10%のリンモリブデン酸の発色によって確認した。

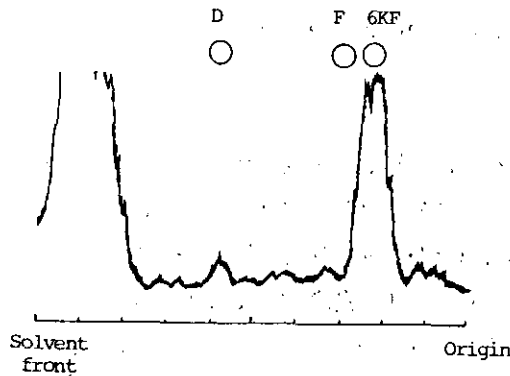


図 2 ラット肺組織ホモジネートのプロスタグランジン合成活性を示す典型的なラジオクロマトグラム

Fig. 2 Typical radiochromatogram showing prostaglandin synthesizing activity in the homogenate of lung tissue of Wistar rat.

Chromatography was carried out with 6-keto-prostaglandin F_{1α} (6KF) and prostaglandin F_{2α} (F) as authentic standards using the organic phase of a mixture of ethyl acetate, 2, 2, 4-trimethyl pentane, acetic acid and water (11 : 5 : 2 : 10, v/v).

また pH 7, 8, 8.5, 9.05, 10.1 のリン酸緩衝液でインキュベートをした結果 pH 8 ~ 9.05 の範囲で活性が最大であった。

オレイン酸と NO₂ の酸素存在下における反応機構を推定すると、NO₂ はオレイン酸の二重結合と反応する。ニトロ置換したラジカル中間体を経て主生成物のニドロケトン体となる。詳しくは前報を参照して頂きたい³⁾。反応混合物はヨウ化カリウムデンプン反応プラスであり、過酸化物の存在が示唆された。

図3に NO₂ とオレイン酸との反応生成物の添加量を変えた場合の肺ホモジネートのプロスタサイクリン合成能の変化を示した。反応生成物を添加するに伴い 6-keto-PGF_{1α} のピークは顕著に低下した。図4に添加した NO₂ とオレイン酸との反応生成物の添加量とプロスタサイクリンの合成能 (6-keto-PGF_{1α} の生成量) との関係を図に示した。加えた反応生成物の添加量が少ない所でプロスタサイクリンの合成能は多少活発になるが反応生成物の量が多くなるに伴いプロスタサイクリン合成能が顕著に低下することが明らかになった。

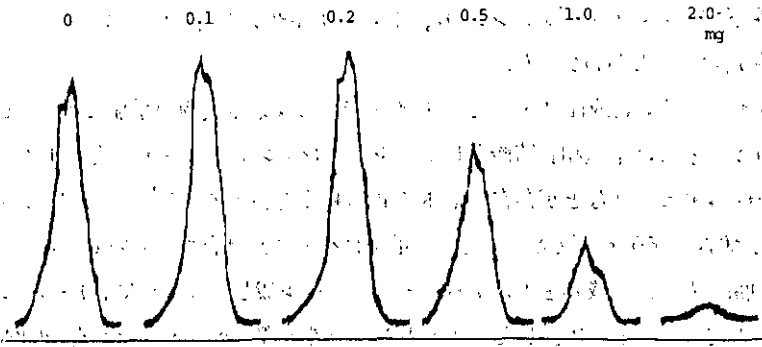


図 3 二酸化窒素とオレイン酸との反応生成物の肺のプロスタサイクリン合成に及ぼす影響

Fig. 3 Effect of reaction mixtures of NO_2 with oleic acid on the prostacyclin synthesis in lungs. Peak of 6-ketoprostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ vs amount of added reaction mixtures

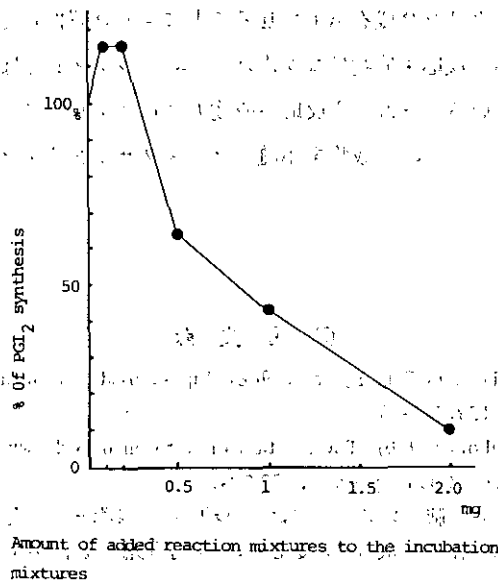


図 4 添加した NO_2 とオレイン酸との反応生成物のプロスタサイクリン合成に及ぼす影響

Fig. 4 Dose-response of reaction mixtures of NO_2 with oleic acid on the prostacyclin synthesis in lungs

考 察

ラットの肺のホモジネートはプロスタグランジンのうちプロスタサイクリンを主に合成することが明らかになった。この結果は Hartiala⁴⁾と Pace-Asciak⁵⁾の結果と一致していた。この他に我

々の実験条件下ではプロスタグランジンD₂, トロンボキサンA₂, プロスタグランジンE₂なども少量ではあるが生成することがわかった。

肺のプロスタサイクリン合成能はNO₂とオレイン酸との反応生成物の添加によって低下した。

肺組織のリン脂質には不飽和脂肪酸としてパルミトレイン酸, オレイン酸, リノール酸, アラキドン酸, ドコサヘキサエン酸などが存在し全体で40%程度を占めている¹⁰⁾。我々はこれらの不飽和脂肪酸とNO₂が酸素の存在下で反応すると, 二重結合を一つだけ有するものではニトロ置換したペルオキシドを中間体とした生成物を生成すること, リノール酸などのように1,4-ジエンの形の二重結合を有するものでは, ニトロ置換したペルオキシド以外に環状ペルオキシドを中間体とした生成物(アゼライン酸セミアルデヒド)を生成することを明らかにしてきた³⁾。従ってThomasら¹⁾が示唆しているようにNO₂暴露で肺に脂質過酸化が起きるとすると, 上述してきたようなNO₂と不飽和脂肪酸が化学的に反応したとき生成する化合物および反応中間体の過酸化物等が肺でも生成している可能性が考えられる。Moncada⁶⁾らは15-ハイドロペルオキシアラキドン酸がプロスタサイクリン合成を抑えることを報告している。Okuma⁷⁾らも同様の報告をしている。従ってNO₂とオレイン酸との反応生成物が肺のプロスタサイクリン合成を低下させることにニトロ置換した過酸化物が寄与している可能性があると考えられる。反応生成物はヨウ化カリウム-デンプン反応はプラスであり, 過酸化物が存在することを示唆している。一方, 主反応生成物もプロスタサイクリン合成能を低下させる可能性がある。従って今後一つ一つの生成物を単離しプロスタサイクリン合成に及ぼす影響を検討していく予定である。

引用文献

- 1) Thomas, H.V., P.K. Mueller and R.L. Lyman (1968): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
- 2) Kobayashi, T. and K. Kubota (1980): The reaction of nitrogen dioxide with lung surface components: The reaction with cholesterol. *Chemosphere*, **9**, 777-784.
- 3) 小林隆弘・野口 忠 (1979): 肺リン脂質に及ぼす二酸化窒素の影響——不飽和脂肪酸との反応並びに急性暴露による肺リン脂質脂肪酸組成の変化。国立公害研究所報告, 第8号, 103-126.
- 4) Hartiala, J., H. Toivonen and P. Uotila (1980): Demonstration of PGI₂ production by isolated perfused rat lungs with platelet aggregation test. *Prostaglandins*, **20**, 127-134.
- 5) Pace-Asiak, C.R. and B. Rangaraj (1977): Distribution of prostaglandin biosynthetic pathways in several rat tissues. Formation of 6-ketoprostaglandin F_{1α}. *Biochim. Biophys. Acta*, **486**, 579-582.
- 6) Moncada, S. and J.R. Vane (1978): Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in hemostasis and thrombosis. *Brit. Med. Bull.*, **34**, 129-135.
- 7) Okuma, M., H. Takayama and H. Uchino (1980): Generation of prostacyclin-like substance and lipid peroxidation in vitamin E deficient rats. *Prostaglandins*, **19**, 527-536.
- 8) Kobayashi, T. (1980): Gas-liquid chromatographic separation of geometric isomers of unsaturated fatty acid methyl esters using a glass capillary column. *J. Chromatog.*, **194**, 404-409.

- 9) Morita, I and S. Murota (1978): Prostaglandin-synthesizing system in rat liver. *Eur. J. Biochem.*, **90**, 441-449.
- 10) Kobayashi, T., T. Noguchi, M. Kikuno and K. Kubota (1980): Effect of acute nitrogen dioxide exposure on the composition of fatty acids in lung and liver phospholipids. *Toxicol. Lett.*, **6**, 149-155.

13

二酸化窒素急性暴露の肺プロスタサイクリン合成に及ぼす影響

Effect of Acute Nitrogen Dioxide Exposure on the Prostacyclin Synthesis in Lungs

小林 隆 弘¹・森 田 育 男²・室 田 誠 逸²

Takahiro KOBAYASHI¹, Ikuo MORITA² and Sei-itsu MUROTA²

要 旨

ラットにNO₂を急性暴露した場合の、肺のプロスタサイクリン合成に関して検討した。Wistar 系雄ラットを5, 10, 15, 20, 25 ppmのNO₂に24時間暴露した。肺のホモジネートのプロスタサイクリン合成活性は暴露濃度に依存して減少した。また、無処置のラットの肺のプロスタサイクリン分泌もNO₂の暴露濃度に依存して減少することが観察された。このNO₂暴露によるプロスタサイクリン合成能の減少はNO₂暴露によるプロスタサイクリン合成能の減少はNO₂暴露による脂質過酸化物の生成ならびに肺胞上皮細胞や毛細血管の内皮細胞の損傷によるものと推定される。

Abstract

The effect of acute nitrogen dioxide (NO₂) exposure on prostacyclin synthesis in the rat lung was studied. Male Wistar rats were exposed to 5, 10, 15, 20 and 25 ppm NO₂ for 24 h. Dose-dependent decrease in prostacyclin synthesizing activities of both homogenized and intact lung was observed. This decrease in prostacyclin synthesis by NO₂ exposure may be related to formation of lipid peroxides due to NO₂ exposure and to damage of pulmonary epithelial cells and endothelial cells by NO₂ exposure.

はじめに

新しいプロスタグランジン類がこの数年の間に次々と発見され強い生理活性を持っていることが確認された。それらを列挙すると、プロスタグランジンエンドパーオキシド(PGG, PGH), トロンボキサン(TX), プロスタサイクリン, ロイコトリエン(LT)となる。この中でプロスタサイクリン

本論文は現在 Toxicology Letters Vol.9, pp. 373-378 (1981) に掲載したものを和訳し、若干の説明を追加したものである。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 東京都老人総合研究所 〒173 東京都板橋区栄町35-2

は半減期が約10分で強い血小板凝集阻止作用、血管平滑筋弛緩作用を有している。プロスタサイクリンは肺や血管の内皮、腎、子宮、胃、炎症巣などで生合成される。この前駆体はアラキドン酸であり、リン脂質の2位のアシル基として貯えられている。細胞膜への刺激でホスホリパーゼA₂または、ホスホリパーゼCとジグリセリドリパーゼによりアラキドン酸が遊離され、リボキシゲナーゼ、サイクロオキシゲナーゼの作用により PGG₂、PGH₂を経て、プロスタサイクリン合成酵素により合成される。プロスタサイクリンは他のプロスタグランジン類と異なり、肺でほとんど不活性化されないこと、肺が常時プロスタサイクリンを産生して血中に送り出していることなどから肺を産生臓器とするホルモンの可能性がある。先の論文では *in vitro* の実験において NO₂ と不飽和脂肪酸の反応物は肺のプロスタサイクリンの合成能を減少させることを明らかにした¹⁾。Thomas らはラットへの NO₂ 暴露で肺の脂質に過酸化が起きることを示唆した²⁾。また、Moncada³⁾、Okuma⁴⁾ らは脂質過酸化物はプロスタサイクリン合成酵素の活性を阻害すると報告している。今回ラットを NO₂ に暴露し、肺のプロスタサイクリン合成活性の変化を検討したので報告する。

方 法

12週令の JCL: Wistar 系雄ラットを 1.16 m³ の暴露チャンバー内で NO₂ に暴露した。チャンバー内温度は 25 ± 1 °C、湿度は 55 ± 5%、空気流量は 110 m³/h である。NO₂ 濃度は化学発光法により測定した。用いたラットは対照群と暴露群の2群にわけた。対照群(10匹)は24時間清浄空気下におかれた。この間絶食した。NO₂ 暴露群(各3匹)は 5, 10, 15, 20, 25 ppm の NO₂ に24時間暴露し、この間絶食した。20 ppm NO₂ 24時間暴露の場合、同様の実験を2回繰り返した。(2回目は対照群、暴露群各6匹用いた。) NO₂ 暴露直後ラットを気絶させ動脈放血によって屠殺した。600 mg 程度の肺を 2.5 ml の氷冷したリン酸緩衝液 (pH 8.2, 1/15 M) でホモジナイズした。肺のホモジネートを 0.2 μCi の [1-¹⁴C]-アラキドン酸 (Specific activity 56.4 Ci/mol) と 5 μg の ¹⁴C ラベルしていないアラキドン酸を加え 37 °C で15分間インキュベートした。反応は 0.1 N HCl を加え pH 3.0 にすることにより止めた。反応混合物は 6 ml の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチルを留去した後、エタノールに溶解し薄層クロマトグラフィー(シリカゲル)により分離した。展開溶媒は酢酸エチル/2, 2, 4-トリメチルペンタン/酢酸/水 (11:5:2:10, v/v) の有機層を用いた⁵⁾。放射活性を持つ生成物は薄層クロマトスキャナーにて検出した。

血小板凝集抑制能は以下のように測定した。肺(100 mg)を 1 ml のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) と 30 °C 1分間インキュベートした。血小板富有プラズマ (PRP) はクエン酸を加えた家兎の血液を 200 × g, 10分間遠心した上清を用いた。PRP (200 μl) に肺とインキュベートしたホウ酸緩衝液 20 μl を入れ、1分後に 20 μl の ADP を加え血小板の凝集を起こさせた。ADP の最終濃度は 100 μM とした。反応はモデル DP-247 E Sienco 二重サンプル凝集メーター用試験管中攪拌しながら行った。タンパク定量は、Lowry らの方法⁶⁾により牛血清アルブミンを標準として測定した。

結 果

表1のa欄は20 ppm NO₂に24時間暴露した場合のプロスタサイクリン合成が対照群より有意(P<0.001)に低下していることを示している。NO₂暴露によるプロスタサイクリン合成の低下は比較的高濃度のNO₂急性暴露では一般的な現象である。表1のb欄にNO₂濃度と肺ホモジネートのプロスタサイクリン合成能との関係を示した。5—25 ppmの範囲の24時間NO₂暴露では、暴露濃度の増加と共にプロスタサイクリンの合成は抑制されることが判明した。次に肺の断片をそのまま用い内在するアラキドン酸によるプロスタサイクリンの合成活性をADPによって引き起こされる血小板の凝集抑制能を観察することにより検討した。図1に示すようにNO₂暴露濃度の増加と共にADPによって引き起こされる血小板の凝集作用を抑制する能力が低下していくことが明らかになった。この肺とインキュベートした媒体中にある血小板凝集の抑制因子は媒体を塩酸酸性にし再びpH9.0に戻すと完全に血小板凝集作用を抑制する能力が失われることから、媒体中に放出された物質はプロスタサイクリンと推定した⁷⁾。

考 察

NO₂暴露によってラットの肺のプロスタサイクリン合成能は暴露濃度に応じて減少することが明らかとなった。

このプロスタサイクリン合成能の減少は、

1) NO₂暴露による脂質過酸化物の生成, 2) 肺の上皮細胞や肺の毛細血管の内皮細胞がNO₂暴露で損傷を受けることと関係している可能性がある。まず第1の可能性を検討すると、前の論文で、

表 1 肺のホモジネートのプロスタサイクリン合成活性におよぼす急性NO₂暴露(24時間)の影響

Table 1 Effect of acute NO₂ exposure (24 h) on the prostacyclin synthesizing activity on lung homogenate

	NO ₂ concentration (ppm)	Prostacyclin synthesizing activity (dpm/mg protein per 15 min)	% of prostacyclin synthesizing activity
a	0 (n = 6)	1,104 ± 86 ⁱ⁾	100
	20 (n = 6)	613 ± 154*** ⁱⁱ⁾	56
b	0 (n = 10)	1,054 ± 225	100
	5 (n = 3)	846 ± 99	80
	10 (n = 3)	696 ± 72	66
	15 (n = 3)	578 ± 54	55
	20 (n = 3)	565 ± 106	54
	25 (n = 3)	454 ± 214	43

i) mean ± S.D.

ii) t-test as compared with control: *** P < 0.001.

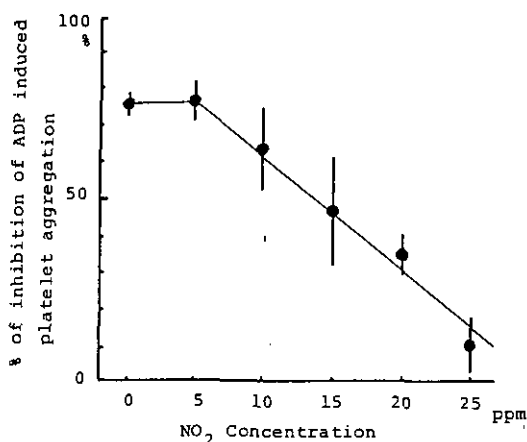


図 1 種々の濃度の NO₂ に暴露 (24 時間) したラットの肺とインキュベートした媒体による, ADP により起される血小板凝集の抑制

Fig. 1 Inhibition of ADP induced platelet aggregation by the media incubated with lungs of rats exposed to various concentrations of NO₂ for 24 h

NO₂ と不飽和脂肪酸との反応生成物がプロスタサイクリン合成を抑制することを明らかにした。ラットの肺組織には 40% 程度⁸⁾, 肺胞洗浄液中には 25% 程度⁹⁾ の不飽和脂肪酸があり, Thomas²⁾ が示唆しているように NO₂ 暴露で脂質過酸化が起きるとすると, その反応生成物はプロスタサイクリン合成を抑える可能性がある。事実, Moncada ら³⁾ は脂質の過酸化物がプロスタサイクリンの合成を抑制することを見出した。また, Okuma ら⁴⁾ はビタミン E 欠乏ラットではラットの動脈から分泌されるプロスタサイクリン様の物質の量が有意に減少することを見出し, ビタミン E 欠乏による脂質過酸化物の増加によるとしている。

次に第 2 の可能性を検討すると, Taylor らは肺胞 II 型上皮細胞はプロスタグランジン類の中でプロスタサイクリンを主に合成することを報告した¹⁰⁾。肺胞 I 型上皮細胞でどのような型のプロスタグランジンが合成されるかはいまだに明らかにされていない。一方肺の毛細血管の内皮細胞がプロスタサイクリンを放出していることを Weksler らが報告している¹¹⁾。従ってこれらの細胞が NO₂ 暴露で損傷を受けるとすると肺のプロスタサイクリンの合成能力の低下が起きる可能性がある。この点に関して Evans は I 型上皮細胞は NO₂ 暴露で損傷をうけ易く, II 型上皮細胞数は増加すると報告している¹²⁾。また, Dowell は NO₂ 暴露によって毛細血管の内皮細胞が肥厚することを観察している¹³⁾。肺でのプロスタサイクリン合成能力はこれらの細胞数とおのおの細胞のプロスタサイクリン合成活性によって決まる。従ってもし I 型上皮細胞のプロスタサイクリン合成能が高いとすると, 前述の 2) の I 型上皮細胞の損傷が重要な因子となる。また I 型上皮細胞のプロスタサイクリンの合成能が低いとすると, 前述の 1) などの原因によって II 型上皮と毛細血管の内皮細胞のプロスタサイクリン合成能が低下するか, 毛細血管内皮細胞の損傷の度合に応じてプロスタサイクリンの合成能が低下するかのどちらかが重要な要因

となってくると考えられる。

NO₂暴露により肺のプロスタサイクリン合成能が低下することが明らかとなった。プロスタサイクリンは動脈平滑筋弛緩作用、血小板凝集能阻止作用などいくつかの強力な生理作用を有している。肺におけるプロスタサイクリン合成の低下がNO₂暴露時にみられる生理的な変化と何らかの形で関連していると考えられる。現在この点に関して検討中である。

引用文献

- 1) 小林隆弘 (1981): 二酸化窒素と不飽和脂肪酸の反応生成物の肺プロスタサイクリン合成に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第31号, 133-139.
- 2) Thomas, H.V., P.K. Mueller and R.L. Lyman (1968): Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. *Science*, **159**, 532-534.
- 3) Moncada, S. and J.R. Vane (1978): Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in hemostasis and thrombosis. *Brit. Med. Bull.*, **34**, 129-135.
- 4) Okuma, M., H. Takayama and H. Uchino (1980): Generation of prostacyclin-like substance and lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats. *Prostaglandins*, **19**, 537-536.
- 5) Morita, I. and S. Murota (1978): Prostaglandin-synthesizing system in rat liver, *Eur. J. Biochem.*, **90**, 441-449.
- 6) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and K.J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 7) Johnson, R.A., D.R. Morton, J.H. Kinner, R.R. Gorman, J.C. McGuire, F.F. Sun, N. Whittaker, S. Bunting, J. Salmon, S. Moncada and J.R. Vane (1976): The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins*, **12**, 915-928.
- 8) Kobayashi, T., T. Noguchi, M. Kikuno and K. Kubota (1980): Effect of acute nitrogen dioxide exposure on the composition of fatty acids in lung and liver phospholipids. *Toxicol. Lett.*, **6**, 149-155.
- 9) 小林隆弘・野口 忠 (1980): 二酸化窒素急性暴露の肺胞洗浄液のリン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響. 国立公害研究所報告, 第15号, 101-107.
- 10) Taylor, L., P. Polgar, J.A. McAteer and W.H.J. Douglas (1979): Prostaglandin production by type II alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **572**, 502-509.
- 11) Weksler, B.B., A.J. Marcus and E.A. Jaffe (1977): Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3922-3926.
- 12) Evans, M.J. L.J. Cabral, R.J. Stephens and G. Freeman (1973): Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to nitrogen dioxide. *Amer. J. Pathology*, **70**, 175-198.
- 13) Dowell, A.R., K.H. Kilburn and P.C. Pratt (1971): Short-term exposure to nitrogen dioxide. Effects on pulmonary ultrastructure, compliance and the surfactant system. *Arch. Intern. Med.*, **128**, 74-80.

14

二酸化窒素暴露ラットの臓器内膜成分に及ぼす影響

Effects of Nitrogen Dioxide Exposure on Membrane Constituents of Rat Tissues

三浦 卓¹・持立 克身¹・彼谷 邦光¹・国本 学¹

Takashi MIURA¹, Katsumi MOCHITATE¹, Kunimitsu KAYA¹ and Manabu KUNIMOTO¹

要 旨

4 ppmまたは10 ppmのNO₂暴露によるラットの肺、肝および腎の膜成分に及ぼす影響を検索した。その結果、肝および腎の呼吸系とミクロソーム電子伝達系成分の活性および含量の低下が暴露後1日目に認められ、次いで7日目には対照群のレベルにまで回復することが明らかとなった。腎の場合、肝よりも速やかに回復することが認められた。肺の場合、肝および腎と異なり呼吸系の顕著な昂進とミクロソーム電子伝達系成分の活性低下の遅延とが起こった。

Abstract

Male Wistar rats were exposed to 4 ppm NO₂ for 10 days and 10 ppm NO₂ for 7 days, in order to examine effects of NO₂ on membrane constituents of lung, liver and kidney. The activities of components relevant to mitochondrial respiratory chain and microsomal electron-transport pathways in livers and kidneys reduced one day after exposure followed by recovery to the control level seven days after exposure. Response of lung tissues was different from those of the others: the activity of respiratory chain increased markedly with the time of exposure, while reduction of components of electron-transport pathways occurred in the late period of exposure to NO₂.

はじめに

NO₂の生体影響については呼吸器系を中心として多くの研究が行われてきた^{1,2,3}。15 ppm程度のNO₂をラットに暴露すると、肺の上皮細胞が傷害を受け脱落した後修復が起こることが明らかにされている^{4,5}。この際、肺組織において過酸化物質代謝系の活性昂進と還元型グルタチオン含量の上昇が起こることも知られている^{6,7}。これらの現象は、酸化性のガスに対して動物の肺組織が適応する反応と考えられる。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

一方、NO₂ガスは肺を経由して血液中に硝酸イオンと亜硝酸イオンの形で入り、体内を循環した後尿中に排泄されることが知られている^{8),9)}。従って、赤血球は肺胞においてNO₂ガスと直接接触する外に、血流中において硝酸イオンと亜硝酸イオンに暴露されていることになる。この仮説は、NO₂暴露によって赤血球内にメトヘモグロビンが形成されることと酸化還元状態が変化することにより支持されている^{10),11)}。更に、我々はNO₂暴露によって赤血球膜成分が多様な変化を受けることを報告して来た¹²⁾。これらの結果は、赤血球と同様に肺以外の臓器もNO₂暴露によってその機能が影響を受ける可能性を示唆している。最近、我々はNO₂暴露によって肝臓と血清中の脂肪酸組成が変化することを明らかにしてこの可能性を確認した¹³⁾。しかしながら、肺と血液以外の臓器に及ぼすNO₂の影響を生化学的に調べた研究は非常に少ない。我々は、NO₂暴露に対してラットの臓器がどのように対応するのかを明らかにするために、生体にとって重要な数多くの機能を担っている生体膜が受ける影響を検索した。本報告には、肺に加うるに肝、腎のミトコンドリア、ミクロソームおよび細胞膜の成分がNO₂暴露によって受ける変化を記した。

方 法

1. 暴露条件および試料の採集

JCL: Wistar 系雄ラット(13~26週令)を 10 ± 0.5 ppm NO₂に7日間、および 4.0 ± 0.08 ppmのNO₂に10日間連続暴露した。一群6匹のラットを経時的に屠殺し心臓より0.9% NaCl溶液を灌流して臓器から血液を除いた。各臓器は10倍容の20 mMトリス緩衝液(pH 7.4)と1 mM EDTAを添加した0.25 M蔗糖溶液中でポッター型ホモジェナイザーでホモジェナイズした。このホモジェネートをを用いてコハク酸-チトクロムc還元酵素活性およびナトリウム、カリウムATPase活性を測定した。後者の測定は、Skouの方法¹⁴⁾によりホモジェネートに等容の20 mMトリス緩衝液(pH 7.4)と1 mM EDTAを添加した0.2%デオキシコール酸ナトリウム(Difco Lab. Michigan USA)溶液を加えた後、 $105,000 \times g$ 60分間の遠心によって得られた沈殿を用いて行った。

ミクロソーム画分の調製は、各臓器を4倍容の20 mMトリス緩衝液(pH 7.4)を添加した0.15 M KC1溶液中でホモジェナイズして行った。肝、腎および肺のホモジェネートは各々75 ml, 15 ml および12 mlとし、 $10,000 \times g$ 15分間の遠心上清を $105,000 \times g$ 60分間遠心して得られた沈殿を同じ溶液に懸濁してミクロソーム画分とした。

2. 酵素活性およびチトクロム含量の測定法

コハク酸-チトクロムc還元酵素活性はSottocasaらの方法¹⁵⁾により測定した。NADH-チトクロムc還元酵素およびNADPH-チトクロムc還元酵素の両活性はOmura & Takesueらの方法¹⁶⁾により測定した。チトクロムb₅とチトクロムP-450含量はOmura & Satoの方法¹⁷⁾で測定し、分子吸光係数を各々 $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 及び $185 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ として含量を計算した。p-ニトロアニソールのO-脱メチル化活性は、Netter & Seidelの方法¹⁸⁾により測定し、ホルムアルデヒドの生成量をNash

の方法¹⁹⁾の方法で定量した。また、*p*-ニトロフェノールの生成を400nmの吸光度増加によっても測定し、分子吸光係数を $14.5\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (pH7.4)として活性を算出した²⁰⁾。ナトリウム、カリウムATPase活性はSkouの方法¹⁴⁾により測定し、遊離した無機リン酸を定量し活性を求めた。タンパク質はLowryの方法により測定した。

結 果

1. コハク酸-チトクロムc還元酵素活性

NO₂暴露がミトコンドリアの呼吸系におよぼす影響を調べるために呼吸系の律速段階となっているコハク酸-チトクロムc還元酵素の活性を測定した。細胞分画により得られたミトコンドリア画分よりもホモジェネートで高い活性が得られた。図1に10 ppm NO₂をラットに7日間暴露した際に肺、肝腎のコハク酸-チトクロムc還元酵素活性が受ける影響を示した。本活性はこれら臓器の全てにおいてNO₂暴露後1日目で対照群より低い活性を示した。腎と肝ホモジェネートの場合各々79%($P < 0.05$)と57%($P < 0.01$)と有意に低い値であった。いずれの臓器の場合もその後の暴露経過に伴い活性の増加が認められた。特に、肺ホモジェネートの活性はNO₂暴露後3日目には対照群より高い値となり、その後も増加を続け、暴露後7日目には対照群の1.44倍($P < 0.01$)となった。腎ホモジェ

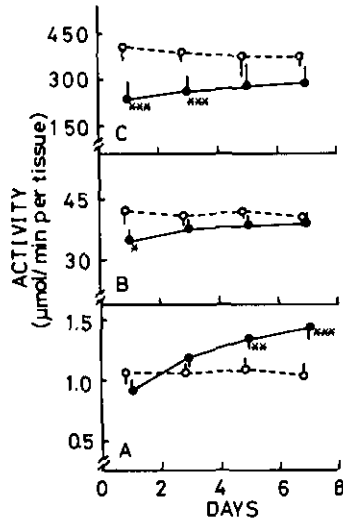


図 1 10 ppm NO₂暴露による肺、腎および肝のコハク酸-チトクロムc還元酵素活性の変化

Fig. 1 Changes in succinate-cytochrome c reductase activity of the homogenates of lung, kidney and liver during exposure to 10 ppm NO₂.

A, B and C; lung, kidney and liver.

○---○, control; ●---●, exposed.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

ネットの場合暴露後7日目には対照群と同じレベルにまで回復したが、肝ホモジェネートでは完全に回復するにはいたらなかった。4 ppm NO₂ 暴露により臓器ホモジェネートのコハク酸-チトクロムc還元酵素活性も同様の变化を示した(図2)。NO₂ 暴露後1日目に肺、肝および腎のホモジェネートの本活性は有意差は認められなかったが、いずれも低い値を示した。肺ホモジェネートの場合、暴露7日目まで徐々に増加し、4日目では対照群の1.27倍($P < 0.01$)となった。肝ホモジェネートにおいても活性増加が認められ7日目には対照群の1.16倍に増加した。このように暴露群で7日目にわずかながら高い値を示すことは再現性をもって観察された。一方、腎ホモジェネートのコハク酸-チトクロムc還元酵素活性は暴露後4日目までに対照群と同じレベルになり以後そのレベルを維持した。

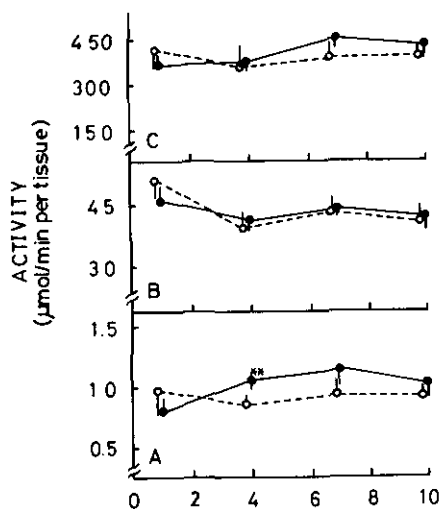


図 2 4 ppm NO₂ 暴露による肺、腎および肝のコハク酸-チトクロムc還元酵素活性の変化

Fig. 2 Changes in succinate-cytochrome c reductase activity of the homogenates of lung, kidney and liver during exposure to 4 ppm NO₂.

A, B and C; lung, kidney and liver.

** $p < 0.01$.

2. NADPH-チトクロムc還元酵素活性とチトクロムP-450含量

ミクロソームの主要な電子伝達系の一つはNADPH依存性であり、NADPH-チトクロムP-450還元酵素とチトクロムP-450からなっている。本研究ではNADPH-チトクロムP-450還元酵素はチトクロムcを電子受容体として測定した。10 ppm NO₂ 暴露による肝ミクロソームのNADPH-チトクロムc還元酵素活性とチトクロムP-450含量の変動を図3と図4に示した。NO₂ 暴露開始後1日目において両者は共に対照群より低い値を示した。この値は5日目まで維持され、この時のNADPH-チトクロムc還元酵素活性とチトクロムP-450含量は各々対照群の83% ($P < 0.01$)と、71%

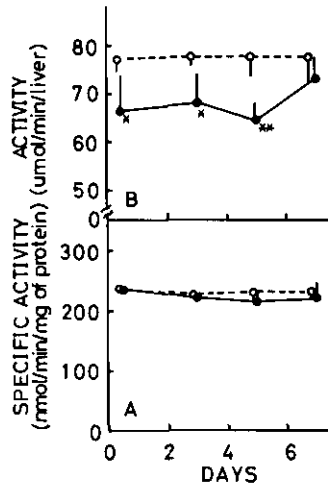


図 3 10ppmNO₂ 暴露による肝ミクロソーム画分のNADPH-チトクロムc還元酵素活性の変化

Fig. 3 Changes in NADPH-cytochrome c reductase activity of liver microsomal fractions during exposure to 10 ppm NO₂.

A, specific activity; B, total activity.

○---○, control; ●---●, exposed.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

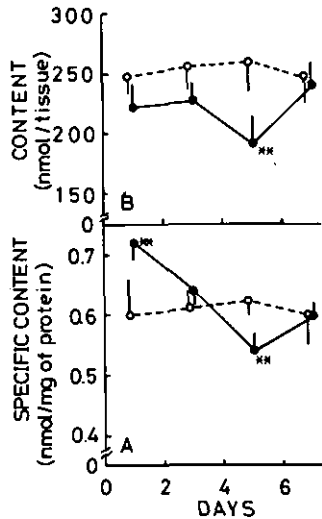


図 4 10ppmNO₂ 暴露による肝ミクロソーム画分のチトクロムP-450含量の変化
Fig. 4 Changes in cytochrome P-450 content of liver microsomal fractions during exposure to 10 ppm NO₂.

A, specific content; B, total content.

○---○, control; ●---●, exposed.

** $p < 0.01$.

($P < 0.01$)であった。一方、ミクロソーム画分の mg タンパク質当たりで示した比活性は、暴露後1日目から低下し5日目には対照群より低い値を示す傾向が認められ、チトクロムP-450の場合には1%レベルで有意差が認められた。4 ppm NO_2 暴露の場合も同様に、暴露開始後1日目で肝ミクロソームのNADPH-チトクロムc還元酵素活性(図5)とチトクロムP-450含量(図6)は各々対照群の86%($P < 0.05$)と80%($P < 0.01$)と低い値を示した後、7日目までには対照群のレベルにまで回復した。これに対し比活性は対照群よりも高い値を示し、10 ppm NO_2 暴露の場合と同様に、7日目には対照群よりも低い値を示す傾向が認められた。

表1と2に10および4 ppm NO_2 暴露が腎ミクロソーム画分のNADPH-チトクロムc還元酵素活性とチトクロムP-450含量におよぼす影響を検討した結果を示した。NADPH-チトクロムc還元酵素活性は両暴露濃度で共に変化が認められなかったが、P-450含量は1日目に10および4 ppm NO_2 で各々対照群の75%($P < 0.05$)と68%($P < 0.05$)と低い値を示した。一方、4 ppm NO_2 暴露が肺ミクロソーム画分におよぼす影響は暴露後7日目にチトクロムP-450含量が著しく低下することで認められた(表3)。

以上の結果から明らかのように、薬物代謝に関与している臓器ミクロソームの電子伝達系成分は、 NO_2 暴露によって変化することが明らかとなった。肝ミクロソームのp-ニトロアニソールO-脱メチル化活性におよぼす4 ppm NO_2 暴露の影響を検討した(表4)。この活性は暴露後1日目と10日目において対照群の55%($P < 0.01$)と66%($P < 0.05$)と低い値を示した。比活性も約70%と有意に低下していた。

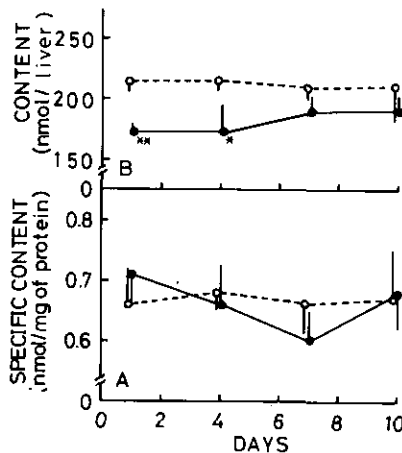


図 5 4 ppm NO_2 暴露による肝ミクロソーム画分のNADPH-チトクロムc還元酵素活性の変化

Fig. 5 Changes in NADPH-cytochrome c reductase activity of liver microsomal fractions during exposure to 4 ppm NO_2 .

A, specific activity; B, total activity.

○---○, control; ●---●, exposed.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

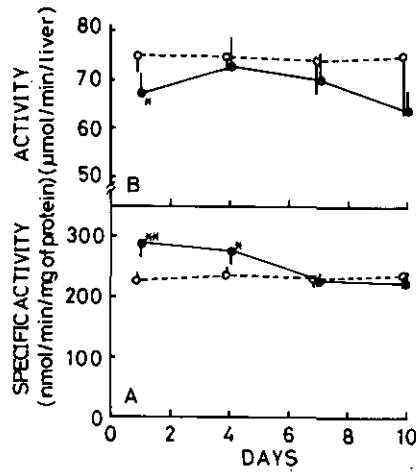


図 6 4 ppm NO₂ 暴露による肝ミクロソーム画分のチトクロム P-450 含量の変化
 Fig. 6 Changes in cytochrome P-450 content of liver microsomal fractions during exposure to 4 ppm NO₂.
 A, specific content; B, total content.
 ○-○, control; ●-●, exposed.
 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

表 1 NO₂ 暴露後 1 日目および 7 日目における腎ミクロソームの NADPH-チトクロム c 還元酵素活性

Table 1 NADPH-cytochrome c reductase activity of kidney microsome one and seven days after exposure to NO₂

		Total activity ^a	% of control	Specific activity ^b	% of control
10 PPM NO ₂					
1 day	Control	1.14 ± 0.12	(100)	28 ± 3	(100)
	Exposed	1.25 ± 0.09	109	28 ± 2	100
7 days	Control	1.22 ± 0.14	(100)	26 ± 3	(100)
	Exposed	1.28 ± 0.07	105	27 ± 1	104
4 PPM NO ₂					
1 day	Control	1.38 ± 0.14	(100)	31 ± 4	(100)
	Exposed	1.30 ± 0.15	94	30 ± 3	97
7 days	Control	1.30 ± 0.10	(100)	31 ± 4	(100)
	Exposed	1.27 ± 0.29	98	33 ± 2	106

a: μ mol cytochrome c reduced/min per kidney.

b: n mol cytochrome c reduced/min per mg of microsomal protein.

Rats are exposed to 4 and 10 ppm NO₂ as indicated. Preparation of kidney microsomal fraction and determination of NADPH-cytochrome c reductase activity are performed as described in Materials and Methods. Values are mean \pm SD.

表 2 NO₂暴露後1日目および7日目における腎ミクロソームの
チトクロムP-450含量

Table 2 Cytochrome P-450 content of kidney microsomes one and seven days
after exposure to NO₂

		Total content ^a	% of control	Specific content ^b	% of content
10 PPM NO ₂					
1 day	Control	4.31 ± 0.60	(100)	0.080 ± 0.010	(100)
	Exposed	3.21 ± 0.51	75	0.062 ± 0.007*	78
7 days	Control	4.47 ± 0.51	(100)	0.081 ± 0.022	(100)
	Exposed	4.38 ± 0.60	98	0.075 ± 0.010	93
4 PPM NO ₂					
1 day	Control	3.93 ± 0.48	(100)	0.067 ± 0.013	(100)
	Exposed	2.70 ± 0.84*	68	0.040 ± 0.018*	60
7 days	Control	3.87 ± 0.90	(100)	0.074 ± 0.016	(100)
	Exposed	3.87 ± 0.60	100	0.082 ± 0.015	111

a: n mol cytochrome P-450 per kidney.

b: n mol cytochrome P-450 per mg of microsomal protein.

Rats are exposed to 4 and 10 ppm NO₂ as indicated. Preparation of kidney microsomal fraction and determination of cytochrome P-450 content are performed as described in Materials and Methods. Values are mean ± SD. The significance of the difference between control and experimental values is shown: * $p < 0.05$.

表 3 4ppmNO₂暴露後1日目および7日目における肺ミクロソームの
NADPH-チトクロムc還元酵素活性とチトクロムP-450含量

Table 3 NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 content
of lung microsomes one and seven days after exposure to 4 ppm NO₂

		Total value	% of control	Specific value	% of control
NADPH-cytochrome c reductase ^a					
1 day	Control	801 ± 133	(100)	77 ± 7	(100)
	Exposed	788 ± 81	98	77 ± 8	100
7 days	Control	898 ± 171	(100)	84 ± 9	(100)
	Exposed	884 ± 50	98	78 ± 5	93
Cytochrome P-450 ^b					
1 day	Control	0.38 ± 0.21	(100)	0.037 ± 0.019	(100)
	Exposed	0.43 ± 0.14	112	0.042 ± 0.016	114
7 days	Control	0.40 ± 0.17	(100)	0.042 ± 0.016	(100)
	Exposed	0.25 ± 0.08*	50	0.021 ± 0.006**	53

a: Total and specific values are expressed as n mol cytochrome c reduced/min per lung and n mol cytochrome c reduced/min per mg of microsomal protein, respectively.

b: Total and specific values are expressed as n mol cytochrome P-450 per lung and per mg of microsomal protein, respectively.

Rats are exposed to 4 ppm NO₂ as indicated. Preparation of lung microsomal fraction and determination of cytochrome P-450 content and NADPH-cytochrome c reductase activity are performed as described in Materials and Methods. Values are mean ± SD. The significance of the difference between control and experimental values is shown: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

表 4 4 ppm NO₂ が肝ミクロソームの *p*-ニトロアニソール O-脱メチル化活性に及ぼす影響

Table 4. Effect of 4 ppm NO₂ on *p*-Nitroanisole O-Demethylation activity of liver microsomes

		Total activity ^a	% of control	Specific activity ^b	% of control
1 day	Control	112 ± 5	(100)	0.41 ± 0.03	(100)
	Exposed	61 ± 9***	55	0.29 ± 0.02***	71
7 days	Control	101 ± 10	(100)	0.41 ± 0.04	(100)
	Exposed	96 ± 13	95	0.39 ± 0.04	95
10 days	Control	96 ± 29	(100)	0.47 ± 0.04	(100)
	Exposed	64 ± 9*	66	0.34 ± 0.01***	72

a: n mol *p*-nitrophenol formed/min per liver.

b: n mol *p*-nitrophenol formed/min per mg of microsomal protein.

Rats are exposed to 4 ppm NO₂ as indicated. Preparation of liver microsomal fraction and determination of *p*-nitroanisole O-demethylation activity are performed as described in Materials and Methods. Values are mean ± SD. The significance of the difference between control and experimental values is shown: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

3. NADH-チトクロム *c* 還元酵素活性とチトクロム *b*₅ 含量

ミクロソームにおけるもう一つの主要な電子伝達系は NADH 依存性であり、NADH-チトクロム *b*₅ 還元酵素とチトクロム *b*₅ とからなっている。本研究では NADH-チトクロム *b*₅ 還元酵素活性をチトクロム *c* を電子受容体として測定した。図 7 に、4 ppm NO₂ 暴露による肝ミクロソームのチトクロム *b*₅ 含量の変化を示した。チトクロム *b*₅ 含量は NO₂ 暴露後 1~4 日目まで対照群より低い傾向を示したが 7 日目には対照群よりも高い値を示し、以後減少傾向を示した。一方、ミクロソームタンパク質当たりのチトクロム *b*₅ 含量は暴露群で 7 日目まで高い値を維持した。図 8 に、4 ppm NO₂ 暴露による肝ミクロソームの NADH-チトクロム *c* 還元酵素活性の変化を示した。暴露群の活性は暴露後 1 日目および 4 日目において対照群の 72% ($p < 0.01$) および 66% ($p < 0.01$) に相当した。次いで対照群の 88% にまで増加した。ミクロソームタンパク質当たりの比活性は、暴露後 4 日目までは対照群と同じレベルであったが 7 日目にはわずかに減少した。

4. ナトリウム、カリウム-ATPase 活性

ナトリウム、カリウム-ATPase は細胞膜に結合しナトリウムポンプの役割りを果たしている。細胞膜画分を精製せずに本酵素の活性を測定するため、腎ホモジェネートを「方法」の項に記したようにデオキシコール酸処理を行い試料とした。肺および肝の場合、同様の方法あるいは蔗糖密度勾配遠心法により細胞画分を分画して測定を試みたが再現性ある結果は得られなかった。図 9 に 4 ppm NO₂ 暴露による腎ホモジェネートのナトリウム、カリウム-ATPase 活性の変動を示した。本酵素活性は暴露後 7 日目を降対照群の 1.2 倍にまで増加したが有意な差は認められなかった。

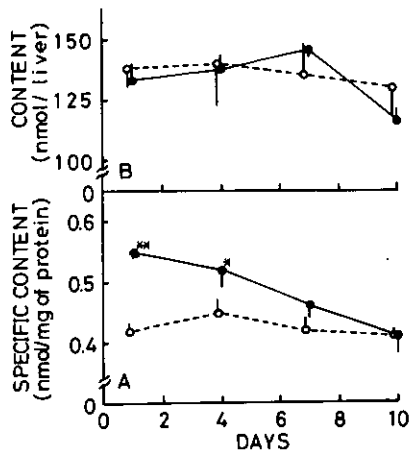


図 7 4 ppm NO₂ 暴露による肝ミクロソーム画分のチトクロム b₅ 含量の変化

Fig. 7 Changes in cytochrome b₅ content of liver microsomal fractions during exposure to 4 ppm NO₂.

A, specific content; B, total content.

○---○, control; ●---●, exposed.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

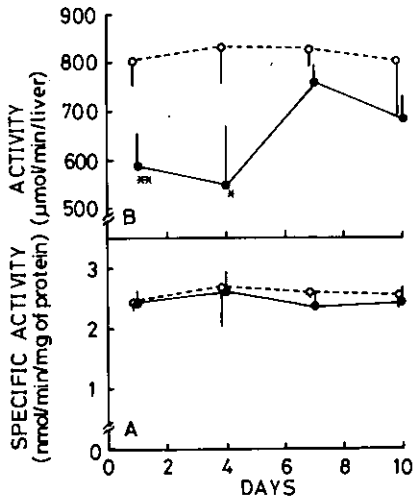


図 8 4 ppm NO₂ 暴露による肝ミクロソーム画分の NADH-チトクロム c 還元酵素活性の変動

Fig. 8 Changes in NADH-cytochrome c reductase activity of liver microsomal fractions during exposure to 4 ppm NO₂.

A, specific activity; B, total activity.

○---○, control; ●---●, exposed.

** $p < 0.01$.

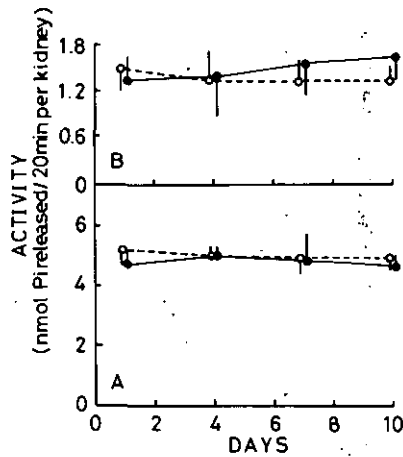


図 9 4 ppm NO₂ 暴露による DOC 処理腎ホモジェネートのナトリウム、カリウム-ATPase 活性の変動

Fig. 9 Changes in Na⁺, K⁺-ATPase activity of DOC-treated homogenates of kidney during exposure to 4 ppm NO₂.

A, Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺-ATPase activity; B, Na⁺, K⁺-ATPase activity.

o---o, control; ●—●, exposed.

5. 肝ホモジェネートおよびミクロソーム画分のタンパク質量の変化

図10に、4.0 ppm NO₂ 暴露による肝のホモジェネートとミクロソーム画分のタンパク質量の変化を示した。ホモジェネートのタンパク質量は、NO₂ 暴露によって4日目までわずかな減少傾向が認められたが、7日目以降にはむしろ対照群よりわずかに高くなる傾向を示した。一方、ミクロソーム画分のタンパク質量は4 ppm 暴露で1日目に対照群の84% ($p < 0.05$) と有意に低い値を示し、その後徐々に増加し7日目には対照群に近いレベルにまで回復した。

考 察

本研究の結果から、ラットの肺、肝、腎の膜成分がNO₂ 暴露によって多様な変化を受けることが明らかとなった。特に、肺と共に肝臓の膜成分が受ける影響は顕著であった。4および10ppm NO₂ 暴露後1日目に肝のミトコンドリア呼吸系とミクロソーム電子伝達系構成成分の活性低下が起こった。次いでこれらの成分の値は増加し暴露後7日目にはほとんど対照群のレベルまで回復した。これらの現象をラットの肝臓がNO₂ 暴露に対して適応する過程ととらえるのが妥当と思われる。生体膜成分の生合成はむしろのこと、生体膜の組み換えにもエネルギーが必要である。4 ppm NO₂ 暴露によって、ミトコンドリアのエネルギー産生系の律速段階となっているコハク酸-チトクロムc還元酵素活性はわずかではあるが対照群より高い値を示したが、10 ppm NO₂ 暴露では暴露期間中対照群より低

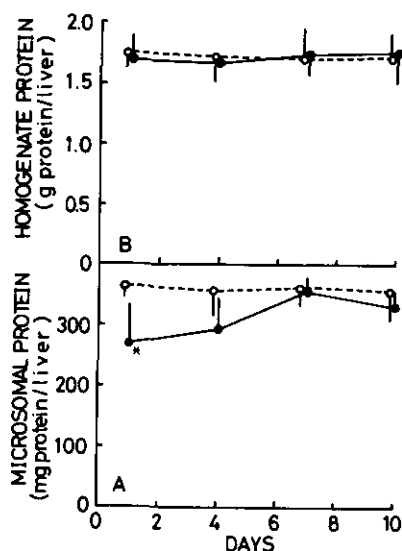


図 10 4 ppm NO₂ 暴露による肝ホモジェネートおよびミクロソーム画分のタンパク質含量の変化

Fig. 10 Changes in protein contents of homogenates and microsomal fractions of liver during exposure to 4 ppm NO₂.

A, microsomal fraction; B, homogenate.

○---○, control; ●—●, exposed.

* $p < 0.05$.

表 5 4 ppm NO₂ 暴露後1日目および7日目におけるミクロソームのチトクロム *b*₅ 含量

Table 5 Cytochrome *b*₅ content of kidney microsomes one and seven days after exposure to 4 ppm NO₂.

		Total content ^a	% of control	Specific content ^b	% of control
1 day	Control	9.7 ± 1.8	(100)	0.21 ± 0.04	(100)
	Exposed	6.9 ± 1.5*	72	0.16 ± 0.02*	76
7 days	Control	9.3 ± 3.2	(100)	0.20 ± 0.06	(100)
	Exposed	8.4 ± 2.3	90	0.19 ± 0.04	95

a: n mol cytochrome *b*₅ per kidney.

b: n mol cytochrome *b*₅ per mg of microsomal protein.

Rats are exposed to 4 ppm NO₂ as indicated. Preparation of kidney microsomal fraction and determination of cytochrome *b*₅ content are performed as described in Materials and Methods. Values are mean ± SD. The significance of the difference between control and experimental values is shown: * $p < 0.05$.

い値を維持した。従って、肝臓は4 ppm NO₂には7日間でほぼ適応できるが、10 ppm NO₂には充分適応し切れないように思われる。

肝ミクロソーム画分のタンパク質量は、4 ppm NO₂暴露後1日目において74%にまで減少した。この時点でNADPH-チトクロムc還元酵素活性とチトクロムP-450含量の低下は20%以下であり、チトクロムb₅含量の低下は更に少なかった。その結果、これらの成分のタンパク質当たりで示した比活性は暴露群の方が高くなった。また、NADH-チトクロムc還元酵素の場合は対照群と同じレベルであった。これらの結果は、チトクロムb₅はミクロソームに保持されているのに対してNADH-チトクロムc還元酵素を含むミクロソーム画分のタンパク質は全体としてNO₂暴露によってミクロソームから容易に遊離することを示唆していると思われる。次いで暴露期間の経過につれて対照群より高い値を示していたミクロソーム電子伝達系成分の比活性は、全活性の増加にもかかわらず、対照群のレベルあるいはそれ以下にまで減少した。このことは、ミクロソーム画分のタンパク質量が増加した結果であると説明できる。暴露後10日目には、ミクロソーム電子伝達系成分の全ての比活性が対照群とほぼ同じ値になった。

ミトコンドリアのコハク酸-チトクロムc還元酵素活性の変化は4 ppmと10 ppmのNO₂暴露濃度で著しい差異が認められた。このような濃度依存性はミクロソーム電子伝達系成分の場合明瞭ではなかった。同様に、腎ミクロソームの電子伝達系成分にもNO₂暴露濃度に対する依存性は認められなかった。この原因は、第一にNO₂暴露のミクロソームへの作用が4 ppmのNO₂濃度ですでに最高値に達しているからであると考えられる。現在この可能性を確かめるために、4 ppm以下のNO₂濃度での暴露実験を行っている。第二にNO₂の作用する際の形態がミトコンドリアとミクロソームとで異なることが考えられる。ミトコンドリアの呼吸系は過酸化脂質により活性が低下することが知られているが²¹⁾、ミトコンドリア内膜に局在し外膜で保護された形となっている。一方、ミクロソームの電子伝達系成分は同様に過酸化脂質によって活性が低下するが²²⁾、細胞質側に露出していることが知られている。従って、ミクロソームに対してNO₂が過酸化脂質等の形で酸化的に作用している場合、ミトコンドリアよりも感受性が高い可能性が考えられる。しかしながら、10 ppm NO₂暴露によってラット肺に過酸化脂質が生成することが明らかにされているが²³⁾、4 ppm NO₂急性暴露では過酸化脂質の生成は認められない。

NO₂が生体の臓器に影響をおよぼす機構としては少なくとも三つの可能性が考えられる。

1) NO₂そのもの、あるいはNO₂が血液中に入ったNO₂⁻とNO₃⁻が臓器に作用する場合、2) NO₂が呼吸器の組織成分と反応して形成される過氧化物等が臓器に作用する場合、そして3) 前二者の形で生体器官に影響を受け二次的に他の臓器に影響が伝達される場合であろう。我々は1)の可能性を探るために肝ミクロソームをNO₂⁻およびNO₃⁻と反応させる*in vitro*の実験を行った結果、0.05 mM~0.15 mM NO₃⁻によって*in vivo*と同様に電子伝達系成分がミクロソーム画分に回収されなくなる可能性を見出した(未発表データ)。この範囲のNO₃⁻濃度は5 ppm~20 ppmのNO₂急性暴露によってラット血液中出现し濃度平衡に達することがOda²⁴⁾らにより報告されている。従って、

NO₂暴露1日目に認められたミクロソーム電子伝達系成分の低下は、NO₂暴露によって増加した血液中のNO₃⁻が臓器の細胞内に取り込まれるとすればNO₃⁻によって起こりうると考えられるが、現在その他の可能性も排除することはできない。

NO₂暴露による腎臓の膜成分の変化は、肝臓の場合と同様に暴露後1日目に認められたが、その影響からは肝臓よりも速やかに回復するよう見える。有意差は認められないがナトリウムイオンの汲み出しに参与しているナトリウム、カリウム-ATPase 活性の増加が認められることは興味深い。NO₂暴露によって血液中のNO₃⁻濃度は上昇し定常状態になるが²⁴⁾、この定常状態を維持するためには腎臓の陰イオン汲み出し機構が昇進する必要がある。多くの場合、陰イオンの汲み出しは陽イオンの透過に付随して起こると考えられている²⁵⁾。従って、ナトリウム、カリウム-ATPase活性の増加は、腎においてNO₃⁻の汲み出しの必要性が増大したことに対応している可能性を示唆しているのかも知れない。

NO₂暴露による肺の膜成分への影響は、肝および腎臓と異なる様相を示した。NADPH-チトクロムc還元酵素活性およびチトクロムP-450含量はNO₂暴露後1日目でむしろ増加している傾向も認められた。また、NO₂暴露後7日目には低下する傾向が認められた。更に、コハク酸-チトクロムc還元酵素活性の顕著な昇進が暴露時間の経過と共に起こった。これらの現象は肺における各種細胞群の組み換え等を反映しているのかもしれない⁵⁾。

引用文献

- 1) Morrow, P.E., (1975): An evaluation of recent NO_x toxicity data and an attempt to derive an ambient air standard for NO₂ by established toxicological procedures. *Environ. Res.*, **10**, 92-112.
- 2) Acton, J.D. and N. Quentin (1972): Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **24**, 48-52.
- 3) Sherwin, R.P. and L.J. Layfield (1976): Protein leakage in the lungs of mice exposed to 0.5 ppm nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **31**, 116-118.
- 4) Evans, M.J., R.J. Stephens, L.J. Cabral and G. Freeman (1972): Cell renewal in the lungs of rats exposed to nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **24**, 180-188.
- 5) Stephens, R.J., G. Freeman and M.J. Evans (1972): Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **24**, 52-59.
- 6) Chow, K., C.J. Dillard and A.L. Tappel (1974): Glutathione peroxidase system and lysozyme in rats exposed to ozone and nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **7**, 311-319.
- 7) Fukase, O. (1980): the effects of gaseous air pollutants on peroxidative metabolism in mouse lungs. *Jap. J. Hyg.*, **34**, 777-792.
- 8) Shvorcova, S. and V. Kant (1971): The artero-venous differences in the nitrite and nitrate ion concentrations after nitrogen oxides inhalation. *Cesk. Hyg.*, **17**, 71.
- 9) Goldstein, E., N.F. Peek, N.J. Parks, H.H. Hines, G.P. Steffey and B. Tarkington (1977): Fate and distribution of inhaled nitrogen dioxide in Rhesus monkeys. *Amr. Rev. Resp. Dis.*, **115**, 403-411.

- 10) Cassan, M. and D.H. Simmons (1975): Nitrogen dioxide and the erythrocytic redox state. Arch. Environ. Health, **30**, 502-506.
- 11) Case, G.D., J.S. Dixon and J.C. Schooley (1979): Interactions of blood metalloproteins with nitrogen oxides and oxidant air pollutants. Environ. Res., **20**, 43-65.
- 12) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980): Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: Changes in components of red cell membranes during *in vivo* exposure to NO₂. Environ. Res., **23**, 397-409.
- 13) Kaya, K. and T. Miura (1982): Effects of nitrogen dioxide on fatty acid compositions of red cell membranes, sera and livers in rats. Environ. Res., in press.
- 14) Skou, J.C. (1962): Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na⁺ and K⁺. Biochim. Biophys. Acta., **58**, 314-325.
- 15) Sottocasa, G.L., B. Kuylenstierna, L. Ernster and J. Bergstrans (1967): An electron-transport pathway associated with the outer membrane of liver mitochondria. J. Cell Biol., **32**, 415-423.
- 16) Omura, T. and S. Takesue (1970): New method for simultaneous purification of cytochrome *b*₅ and NADPH-cytochrome *c* reductase from rat liver microsomes. J. Biochem., **67**, 249-257.
- 17) Omura, T. and R. Sato (1964): Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J. Biol. Chem., **239**, 2370-2378.
- 18) Netter, K.J. and G. Seidel (1964): An adaptively stimulated O-demethylation system in rat liver microsomes and its kinetic properties. Exptl. Therap., **146**, 61-65.
- 19) Nash, J. (1953): Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem. J., **55**, 416-421.
- 20) Shigematsu, H., S. Yamano and H. Yoshimura (1976): NADH-dependent O-demethylation of *p*-nitrophenetol with rabbit liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys., **173**, 178-186.
- 21) Miura, T. and T. Yanagita (1972): Cellular senescence in yeast caused by carbon-source starvation. I. Changes in activities of respiratory system and lipid peroxidation. J. Biochem., **72**, 141-148.
- 22) Högbert, J., A. Bergstrand and S.V. Jakobsson (1973): Lipid peroxidation of rat-liver microsomes. Eur. J. Biochem. **37**, 51-59.
- 23) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on Biochemical effects of nitrogen dioxide. J. Toxicol. Environ. Health, in press.
- 24) Oda, H., H. Tsubone, A. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide. Environ. Res., **25**, 294-301.
- 25) Boulpaep, E.L. (1978): Solute-coupled water transport in the kidney in "Molecular Specialization and Symmetry in Membrane Function" ed. by Solomon, A.K., and M. Karnovsky, Harvard Books in Biophysics, **2**, 294-315, Harvard University Press, Mass and London.

二酸化窒素の肺の解糖系および呼吸系に及ぼす影響

Effects of Nitrogen Dioxide on Activities of Glycolytic and Respiratory Enzymes in Rat Lungs

持立克身¹・三浦 卓¹・彼谷邦光¹

Katsumi MOCHITATE¹, Takashi MIURA¹ and Kunimitsu KAYA¹

要 旨

4.0 および 10 ppm NO₂ をラットに暴露した場合、肺において暴露開始後それぞれ7日目および5日目に、解糖系および呼吸系の各酵素活性が増加し、肺のエネルギー代謝が昂進していることが認められた。活性増加の程度は、4 ppm NO₂ 暴露の場合 10~40%、および 10 ppm NO₂ 暴露の場合 20~80%であり、NO₂ 濃度にはほぼ比例した。特にピルビン酸キナーゼの活性増加が顕著であった。

Abstract

Enhancement of activities of glycolytic and respiratory enzymes, especially pyruvate kinase and succinate-cytochrome *c* reductase was notable in rat lung five and seven days after exposure to NO₂ at the concentrations of 10 ppm and 4 ppm, respectively. These activities increased corresponding to the exposure concentration of NO₂: the increment was 10 to 40% and 20 to 80% at the exposure concentrations of 4 ppm and 10 ppm, respectively.

はじめに

大気中の代表的な汚染物質の一つである二酸化窒素(NO₂)は、第一次標的である肺に作用し、末梢細気管支上皮の増殖、肺胞壁の肥厚やI型上皮の脱落とII型上皮による置換、そして更に著しい場合は肺水腫等の数々の病変を引き起こすことが知られている^{1,2)}。また生化学的には、肺における過酸化化物代謝系(PMP系)の酵素活性の上昇が明らかにされている³⁾。この現象は、NO₂のような酸化性の強いガスに対して肺が耐性を獲得する過程の一つと考えられている。

しかしそれ以外にも、肺において種々の細胞が増殖しつつNO₂に対して耐性になっていく際には、エネルギーの供給が必要であり、この為、肺の耐性獲得の過程に平行もしくは先立って、エネルギー

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

一代謝系が昂進する可能性が考えられる。この理由から、我々は肺がNO₂によって障害を受けた後、それを修復する過程に注目し、その過程を肺のエネルギー代謝の面から明らかにすることを試みた。その第一段階として、肺ホモジネート中の解糖系および呼吸系の酵素活性を経時的に調べた。

方 法

1. 暴露条件および試料の調製

JCL:Wistar系雄ラット(14-18週令)に、4.0もしくは10 ppm NO₂を7~10日間連続暴露した。暴露後ラットを瀉血し、心臓から生理的食塩水を注入し肺を還流した後、0.25 M蔗糖-10 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)-1 mM EDTA 溶液中で肺をホモジナイズした。

呼吸系酵素のコハク酸-チトクロムc還元酵素の活性測定にはホモジネートを用い、解糖系の各酵素およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性測定には、ホモジネートを105,000 g × 60分遠心して得た上清を用いた。

2. 酵素活性およびタンパク量の測定方法

低km型ヘキソキナーゼ(HK)⁴⁾、ホスホフルクトキナーゼ(PFK)^{5),6)}、ピルビン酸キナーゼ(PK)^{7),8),9)}および、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)⁷⁾活性は、30°C、至適pHにおいて、定法に従いNADH、NADPHの増加減少より測定した。尚、PFKおよびPKの活性測定溶液には、これらのアロステリック酵素を、ミカエリス・メンテン型に転換させる為に、それぞれ5 mM 硫酸アンモニウム および 0.2 mM フルクトース-1,6-ビスリン酸を添加した。コハク酸-チトクロムc還元酵素はSottocasaの方法¹⁰⁾に従い、還元型チトクロムcの増加より求めた。

タンパク量の測定はLowryの方法¹¹⁾に従って行った。

結 果

肺のタンパク量(ホモジネートおよび上清)は、4 ppm NO₂暴露の際は、10日間を通じわずかに増加する傾向が認められたものの、有意な増加を示さなかった(図1,2)。また10 ppm NO₂暴露の場合は、3日目に約20%の有意な増加を示したが、この時にはG6PDHを除いて、解糖系の各酵素活性はほとんど増加していなかった(図2)。

解糖系の各酵素 および 呼吸系酵素であるコハク酸-チトクロムc還元酵素活性は、4 ppm NO₂の場合は暴露開始後4日目まで、10 ppm NO₂の場合は3日目まで、対照群との間に差異は認められなかったが、その後著しく増加し、それぞれ7日目、5日目に最大になり、それ以後は減少して対照値に近づく傾向を示した(図1,2)。解糖系の律速段階を触媒するHK活性は、約1.1倍(4 ppm)~1.2倍(10 ppm)に、PFK活性は、約1.2倍(4, 10 ppm)に、PK活性は、約1.4倍(4 ppm)~1.8倍(10 ppm)になる等、解糖系での後の段階に位置するもの程、顕著な活性増加が認められた。またNO₂濃度が増すにつれ、活性が最大になるのに要す時間は、7日間(4 ppm)から5日間(10

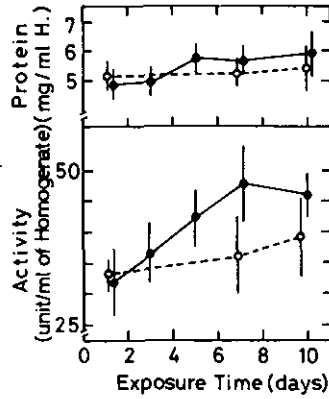


図 1 NO₂ 暴露による肺のコハク酸-チトクロム *c* 還元酵素活性の変化

Fig. 1 Change of succinate-cytochrome *c* reductase activity in rat lung during exposure to 4 ppm NO₂

Closed circles represent activity for exposed animals and open ones for control counterparts. Each point is the mean \pm SD.

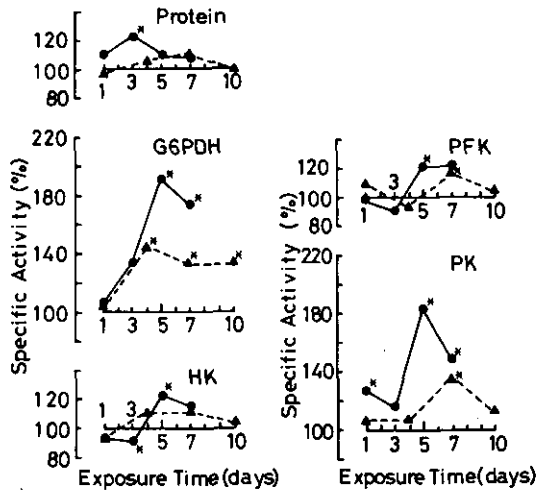


図 2 NO₂ 暴露による肺の解糖系酵素活性の変化

Fig. 2 Changes of activities of glycolytic enzymes in rat lung during exposure to NO₂

Activities for exposed animals are represented as relative values to their control counterparts. -▲-, 4 ppm NO₂; -●-, 10 ppm NO₂. *, $P < 0.01$.

ppm)に短縮された。3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)や乳酸脱水素酵素(LDH)等、他の解糖系の酵素活性も図2に示したHK活性と類似の変化を示し、その最大値は対照値の約1.1倍(PGK)~1.2倍(LDH)(4ppm)、および約1.2倍(PGK)~1.4倍(LDH)であった。

PMP系の代表的酵素であるG6PDHの活性は、4ppm NO₂暴露の場合、解糖系および呼吸系各酵素の活性増加に先立って著しく増加し5日目まで最大になり、解糖系の各酵素活性が対照値に戻った10日目においても、最大値とほぼ等しい値を維持した。

考 察

これまでNO₂暴露によって、肺のG6PDH、グルタチオン・パーオキシダーゼ、グルタチオン・還元酵素等の酵素活性が増加することから、これらに代表されるPMP系酵素の活性上昇が、NO₂による酸化作用から肺を保護する機構の一つであると考えられて来た³⁾。

肺におけるエネルギー代謝の昂進は、G6PDH活性の増加に代表されるPMP系の活性上昇よりも遅れること、および暴露開始後10日目で、PMP系が十分昂進されているにもかかわらず、エネルギー代謝系は既に対照群の状態に戻りつつあることから、今回認められたエネルギー代謝の昂進は、PMP系の活性上昇とは生化学的に別の現象であると考えられる。このことは、エネルギー代謝系酵素の活性上昇もまた、肺がNO₂による障害を修復し、耐性となる過程に関与する可能性があることを示唆している。

本研究では、解糖系および呼吸系の各酵素活性は、NO₂暴露によってほぼ同調して増加すること、および解糖系の律速段階を触媒するHK、PFK、PKの各酵素活性の増加程度は、解糖系での後の段階に位置するもの程大きいことが示された。このことは、肺が血漿中から取り込んだグルコースを効率よくATP生産に結びつける上でも重要であると考えられる。

引 用 文 献

- 1) Evans, M.J. and G. Freeman (1980): Morphological and pathological effects of NO₂ on the rat lung. *In* "Nitrogen Oxides and Their Effects on Health" (Lee S.D. ed.) Ann Arbor Science, 243-265.
- 2) 竹中参二, 他(1980): 二酸化窒素の長期暴露のラットに及ぼす影響 — 病理形態学的所見. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 171-227.
- 3) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota: Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. *Lipids*, 16, 64-67.
- 4) 石橋貞彦・村上幸子(1977): 動物のヘキソキナーゼ. 蛋白質核酸酵素, 22, 1510-1514, 1781-1785.
- 5) 河野典夫(1977): ホスホフルクトキナーゼ. 蛋白質核酸酵素, 22, 1562-1568.
- 6) Nagata, K., K. Suzuki and K. Imahori (1979): Analysis of the Allosteric properties of rabbit muscle phosphofructokinase by means of affinity labeling with a reactive ATP analog. *J. Biochem.*, 86, 1179-1189.
- 7) Bergmeyer, H.U., K. Gawehn and M. Grassl (1974): Enzymes as biochemical reagent *in* "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H.U. ed.) Vol. 1, p. 458, 636-643, 774-778, Academic Press, New York.
- 8) 田中武彦(1977): ピルビン酸キナーゼ. 蛋白質核酸酵素, 22, 1680-1685.

- 9) 今村喜一 (1977) : ピルビン酸キナーゼアイソザイム, 蛋白質核酸酵素, **22**, 1799-1804.
- 10) Sottocasa, G.L., B. Kuylenstierna, L. Ernster and A. Bergstrand (1967): An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell Biol.*, **32**, 415-423.
- 11) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough and A.L. Farr (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

二酸化窒素またはオゾンの赤血球解糖系に及ぼす影響

Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on Activities of Glycolytic Enzymes of Rat Red Blood Cells

持立克身¹・三浦 卓¹・彼谷邦光¹・国本 学¹

Katsumi MOCHITATE¹, Takashi MIURA¹, Kunimitsu KAYA¹ and Manabu KUNIMOTO¹

要 旨

4 ppm 二酸化窒素, もしくは0.8 ppm オゾンをラットに間欠暴露(8時間/日)すると, 赤血球のピルビン酸キナーゼ活性は, 両暴露において4日間に約35%, 7日目に10数%増加した。このことより, 両暴露によって, 赤血球におけるエネルギー代謝が昂進する可能性が示唆された。

Abstract

An increase in pyruvate kinase activity of red blood cells was observed four to seven days after intermittent exposure (daily 8 hours) to either 4 ppm NO₂ or 0.8 ppm O₃.

The increment was about 35% in both exposures four days after exposure.

はじめに

我々はこれまで, NO₂が生体組織中の細胞に及ぼす影響を明らかにし, その作用機作を解明する為のモデル系として赤血球を用い, その生体膜への影響を検索して来た。その結果, NO₂暴露により赤血球膜タンパク質, 膜脂質, および膜糖質に顕著な変化が起こることを見出した¹⁻⁴⁾。本報告では, NO₂の赤血球可溶成分への影響を知るために, 赤血球が機能する上で必要なエネルギーを供給する働きをしている解糖系をとりあげ, この系への影響を記した。また併せて, 解糖系に対するNO₂とオゾンの作用の類似点についても検討した。

方 法

1. 暴露方法および試料の調製

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

6匹を一群とした JCL:Wistar 系雄ラット(14-18週令)に, 4.0 ppm NO₂ または 0.8 ppm O₃ を10日間間欠暴露(8時間/日, 9:00-17:00, 暴露休止中のみ給餌)した。採血は暴露停止後翌朝に, ヘパリン存在下で行った。赤血球を生理的食塩水で洗った後, 15倍量の10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)中で溶血させ, それを18,000g × 20分 遠心して得た上清を酵素活性測定試料とした。

2. 酵素活性およびヘモグロビン量の測定

グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)⁵⁾, 低km型ヘキソキナーゼ(HK)⁶⁾, グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)⁷⁾, 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)⁸⁾およびピルビン酸キナーゼ(PK)^{5,9,10)}活性は, 30°C, 至適pHにおいて, 定法に従いNADH, NADPHの増加減少より測定した。尚, PKの活性測定溶液には, シグモイド型からミカエリス・メンテン型に転換するために0.2mMフルクトース-1,6-ビスリン酸を添加した。

ヘモグロビン量はシアンメトヘモグロビンとして求めた¹¹⁾。

結 果

NO₂の間欠暴露の場合, PK(図1)およびG6PDH活性(図2)にのみ変化が認められ, 他のHK(図3), GAPDH(図4), およびPGK(図5)活性はほとんど変化しなかった。PK活性は, 暴露開始後4日目に32%有意に増加し, 7日目には減少する傾向をみせたが対照群より12%も高い値を示し, 10日目には対照群と一致した。一方G6PDH活性は1日目に対照群の84%にまで有意に減少し

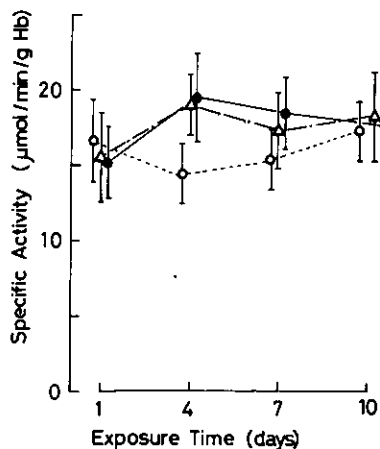


図 1 NO₂およびオゾン暴露による赤血球のピルビン酸キナーゼ活性への影響

Fig. 1 Effects of NO₂ and O₃ on pyruvate kinase activity in red blood cells

---○---, control; ---△---, 4 ppm NO₂; —●—, 0.8 ppm O₃.

Each point is the mean ± SD.

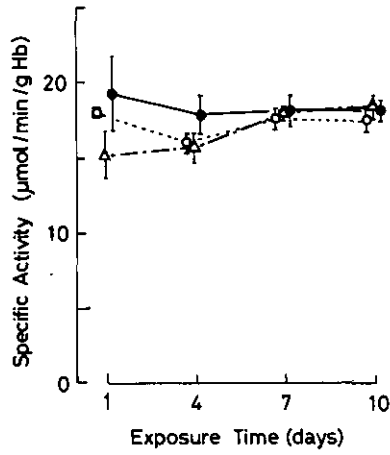


図 2 NO₂およびオゾン暴露による赤血球のグルコース-6-リン酸脱水素酵素への影響

Fig. 2 Effects of NO₂ and O₃ on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in red blood cells

--○--, control; --△--, 4 ppm NO₂; —●—, 0.8 ppm O₃.
Each point is the mean ± SD.

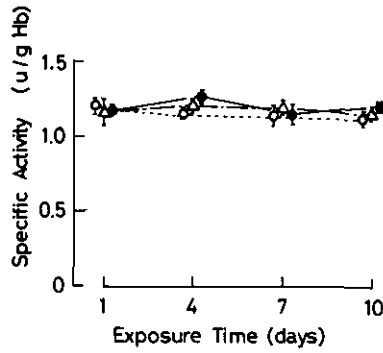


図 3 NO₂およびオゾン暴露による赤血球のヘキソキナーゼ活性への影響

Fig. 3 Effects of NO₂ and O₃ on hexokinase activity in red blood cells

--○--, control; --△--, 4 ppm NO₂; —●—, 0.8 ppm O₃.
Each point is the mean ± SD.

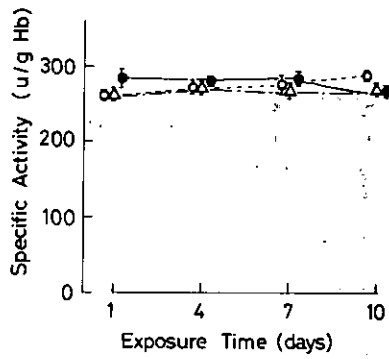


図 4 NO₂およびオゾン暴露による赤血球のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素活性への影響

Fig. 4 Effects of NO₂ and O₃ on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in red blood cells

--○--, control; --△--, 4 ppm NO₂; —●—, 0.8 ppm O₃.

Each point is the mean ± SD.

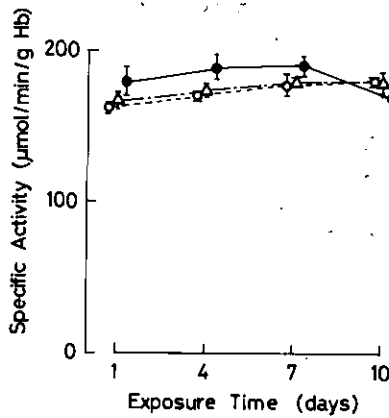


図 5 NO₂およびオゾン暴露による赤血球のホスホグリセリン酸キナーゼ活性への影響

Fig. 5 Effects of NO₂ and O₃ on 3-phosphoglycerate kinase activity in red blood cells

--○--, control; --△--, 4 ppm NO₂; —●—, 0.8 ppm O₃.

Each point is the mean ± SD.

たが、4日目にはすでに回復し対照群と同じ値を維持した。NO₂は酸化性の強いガスであることから、活性部位に反応性の高いSH基を持つGAPDHの活性は、NO₂暴露により失活するのではないかと考えられたが、本暴露実験においてはほとんど変化せず、10日目にわずかに減少したのみであった。

オゾンの間欠暴露の場合、NO₂の場合と同様に、PK活性に著しい変化が認められた(図1)。PK活性は、暴露開始後1日目にはわずかに減少する傾向を示したが、4日目には35%も有意に増加し、7日目には対照群に近づく傾向をみせたが、それでも19%高い値を示し、10日目には対照群と一致した。G6PDHおよびPGK活性は、暴露期間の前半には、対照群より10%程度高い値を示したが、後半には対照群と一致もしくは低い値を示した。他のHK、GAPDHに大きな変化は認められなかった。

考 察

NO₂およびオゾンの間欠暴露により、赤血球中の解糖系酵素であるPK活性が、暴露開始後4～7日目に著しく増加することが認められた。PKが解糖系の律速段階を触媒する酵素の一つであることから、PK活性の増加は赤血球において解糖系によるエネルギー生産が両暴露により昂進していることを示唆すると思われる。

赤血球には、タンパク合成系がないことから本実験で認められたPK等の活性増加の理由としては、不活性型から活性型への転換、もしくはPK活性に富む赤血球の割合が増加したことが考えられる。現在、これらの可能性について検討中である。

引 用 文 献

- 1) 彼谷邦光・三浦 卓(1979): ラット赤血球膜に及ぼす二酸化窒素の影響. 国立公害研究所研究報告, 第8号, 173-185.
- 2) 彼谷邦光・三浦 卓(1980): 二酸化窒素暴露によるラット赤血球膜リン脂質組成の変動. *ibid.*, 第15号, 117-124.
- 3) 持立克身・三浦 卓・彼谷邦光(1980): 二酸化窒素の赤血球酵素及び膜糖質に及ぼす影響. *ibid.*, 第15号, 125-132.
- 4) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980): Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: Changes in components of red cell membranes during *in vivo* exposure to NO₂. *Environ. Res.*, **23**, 397-409.
- 5) Bergmeyer, H.U., K. Gawehn and M. Grassl (1974): Enzymes as biochemical reagents in "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H.U., ed.), Vol. 1, p. 458, 663-643, 774-778, Academic Press, New York.
- 6) 石橋貞彦・村上幸子(1977): 動物のヘキソキナーゼ. 蛋白質核酸酵素, **22**, 1510-1514, 1781-1785.
- 7) 鈴木絃一(1977): グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素. 蛋白質核酸酵素, **22**, 1614-1620.
- 8) 鈴木絃一(1977): ホスホグリセリン酸キナーゼ. 蛋白質核酸酵素, **22**, 1631-1640.
- 9) 田中武彦(1977): ピルビン酸キナーゼ. 蛋白質核酸酵素, **22**, 1680-1685.
- 10) 今村喜一(1977): ピルビン酸キナーゼアイソザイム. 蛋白質核酸酵素, **22**, 1799-1804.

11) 松原高賢 (1966) : 臨床病理, 14, 29-34.

17

二酸化窒素のラット肝臓、血清および赤血球膜の脂肪酸組成に及ぼす影響

Effects of Nitrogen Dioxide on Fatty Acid Compositions of Red Cell Membranes,
Sera and Livers of Rats

彼谷邦光¹・三浦 卓¹

Kunimitsu KAYA¹ and Takashi MIURA¹

要 約

Wistarの雄ラットにNO₂を4.0 ppm, 10日間および10 ppm, 7日間暴露し, 赤血球膜, 血清および肝臓上清画分中の脂肪酸組成の変化を調べた。4 ppmおよび10 ppm暴露によって赤血球膜のアラキドン酸(20:4)の増加が認められた。血清および血清 phosphatidyl choline (PC)においても20:4の増加が認められた。これらの結果は血清の20:4が赤血球膜に取り込まれたことを示すものと考えられる。4 ppm NO₂暴露において血清PCの20:4が増加するのに対して18:2の減少が認められた。また, 肝臓上清画分の脂肪酸組成の変化からこれらの脂肪酸は precursor-product の関係にあることを示していた。10 ppm NO₂暴露の場合には 4 ppm NO₂の場合のような明瞭な関係は見い出せずより複雑な変化を示した。これらの結果から, 4 ppmと10 ppmのNO₂暴露における肝臓での脂肪酸代謝の違いについて検討した。

Abstract

Male wistar rats were exposed to nitrogen dioxide (NO₂) at the concentration of 4 ppm and 10 ppm for 10 and 7 days, respectively, in order to obtain evidence of changes in fatty acids of red cell membranes, sera and liver supernatants. A significant increase in the percentage of arachidonic acid (20:4) to the total fatty acid was observed in red cell membranes during exposure to NO₂ at both concentrations. This increase accompanied a decrease in palmitic acid (16:0) and/or stearic acid (18:0), so that the ratio of major unsaturated fatty acids to major saturated fatty acids was raised to 1.25 and 1.33 fold at the concentration of 4 ppm and 10 ppm, respectively. Consistently, the percentage of 20:4 in serum showed a highly significant increase simultaneously with a less significant decrease in oleic acid (18:1) and linoleic acid (18:2) upon 7-days exposure to 10 ppm NO₂. It must be noted that a decrease in 16:0 and an increase in 18:0 were also observed with high significance. In addition, fatty acid composition of serum phosphatidyl-

本論文の原著は現在 "Environmental Research" に印刷中である。

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2
The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi,
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

choline (PC) paralleled the fatty acid composition of sera but these changes were more pronounced. The percentage of 20:4 was increased to 1.53 fold the control. 10-days exposure to 4 ppm NO₂ resulted in the same profile of changes in serum PC as that of 10 ppm NO₂ inhalation although the magnitude of changes was smaller. These results may support the assumption that 20:4 in serum is preferentially incorporated into red cell membranes.

During exposure to 4 ppm NO₂ the percentage of 20:4 in serum PC increased progressively in striking contrast to a decrease in 18:2. A precursor-product relationship of these fatty acids was also suggested from alteration profile in liver supernatant fraction (S₁₀₅). It is, therefore, assumed that synthesis of 20:4 molecules might be stimulated in the liver upon exposure to 4 ppm NO₂. Exposure to 10 ppm NO₂ caused completely different and more complex alterations of the percentages of 18:2 and 20:4 in serum PC and liver S₁₀₅. In serum PC the percentage of 20:4 stayed at a higher level than the control and that of 18:2 remained at a lower level in the whole period of exposure. On the other hand, the percentage of 20:4 in liver S₁₀₅ showed a rather lower value than the control, while that of 18:2 stayed at a higher level. From these results differences between effects of 4 ppm and 10 ppm NO₂ were discussed.

はじめに

NO₂ 暴露によって血液成分に種々の変化が起こることが指摘されている。例えばアセチルコリンエステラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやカタラーゼ等の酵素活性の変化¹⁾やメトヘモグロビンの生成^{2,3)}等である。また、我々は NO₂ 暴露による赤血球膜成分の変化を調べ、糖脂質含量の変化や Lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE) の著しい増加が起こることを見出した⁴⁾。この Lyso-PE の増加は赤血球の脂肪酸代謝に影響を与えることが考えられる。そこで我々は赤血球膜の脂肪酸代謝に及ぼす NO₂ 暴露の影響を検討している。

成熟赤血球には脂肪酸の生合成系がなく⁵⁾、脂肪酸の更新は血清脂肪酸の取り込みや血清脂質との交換によって行われていることが知られている⁶⁾。従って赤血球膜の脂肪酸組成の変化は血清脂肪酸の組成の変化によって起こる可能性が高い。また、肝臓は多くの血清成分の供給源であり、血清脂肪酸代謝の中心的役割を担う臓器である⁷⁾ことから、肝臓の脂肪酸組成の変化と血清の脂肪酸組成の変化は密接に関係していると考えられる。

本報は赤血球膜の脂肪酸組成に及ぼす NO₂ の影響を明らかにし、この影響と血清および肝臓の脂肪酸組成の変化との関係を明らかにしたものである。

方 法

1. 暴露条件および試料調製

前報⁴⁾と同様に一群6匹の Wistar 雄ラット(8~18週令)に 10±0.5 ppm または 4.0±0.08 ppm の NO₂ を連続暴露した。血液は頸動脈から採集した。採血に際してはヘパリンを用いて血液の凝固を妨いだ。赤血球膜の調製は Dodge ら⁸⁾の方法に順じて行った。すなわち、血液に5倍量

の生理食塩水を加えて3回洗浄して赤血球を分取し、これに20倍量の1 mM塩化カルシウム (CaCl₂) も含んだ10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて溶血させた。これを4℃で20,000×g 20分間遠心してゴースト画分を分取し、溶血に用いた緩衝液と同じ緩衝液で3回洗浄して赤血球膜画分を得た。血清は凝固防止剤を用いないで採血した血液を遠心分離して調製した。肝臓は摘出後冷却した生理食塩水で灌流し、10倍量の蒸留水を加えてホモジナイズした。肝臓ホモジネートは25,000×gで20分間遠心し、その上清をさらに105,000×gで60分間遠心した。各遠心で得られた沈殿はP₂₅ および P₁₀₅ とし、最後の遠心で得られた上清を liver S₁₀₅ とした。

2. 脂質の抽出と分析

脂質の抽出はFolchらの方法⁹⁾に従って行った。すなわち、各試料に20倍量のクロロホルム-メタノール(2:1)を加えて振とう後、残渣を濾過し、濾液に1/5量の生理食塩水を加えて分配させた。下層を窒素気流下で乾固させて脂肪酸分析用の試料とした。Phosphatidyl choline (PC) はHP TLCシリカゲルプレート(Merck)を用いて分画した。用いた展開溶媒はクロロホルム-メタノール-アンモニア水-水(28:10:1:1)である。リン脂質量はHarrisらの方法¹⁰⁾で測定した。脂肪酸組成は脂肪酸をBF₃-メタノールを用いてメチルエステル¹¹⁾とし、ガスクロマトグラムより求めた。

結 果

1. 赤血球膜の脂肪酸組成の変化

ラット赤血球膜に含まれる不飽和脂肪酸の主なものはオレイン酸(18:1)、リノール酸(18:2)およびアラキドン酸(20:4)である。また、飽和脂肪酸の主なものはパルミチン酸(16:0)とステアリン酸(18:0)である。これら5種類の脂肪酸で全体の95%以上を占めており、3種類の不飽和脂肪酸で全体の40%以上を占めている。図1は10 ppm NO₂ 暴露による赤血球膜の脂肪酸組成の変化を示したものである。NO₂ 暴露によって20:4はしだいに増加するのに対して16:0と18:0は有意な差はないが徐々に減少した。20:4は5日間暴露で対照群より4.8%増加($P < 0.001$)し、7日間暴露では2.9%増加($P < 0.001$)した。また不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸の比は暴露5日目には0.76から1.01に上昇した。このような20:4の増加傾向は4 ppm NO₂ 暴露についても観察された(図2)。

2. 血清脂肪酸組成の変化

表1は10 ppm NO₂ 暴露による血清の脂肪酸組成の変化を示したものである。暴露1日目に大きな脂肪酸組成の変化が認められ、特に20:4とRt 1044の増加、16:0、18:1および18:2減少が著しい変化であった。また、20:4は全暴露期間を通して高い値を維持しているのが観察された。これらの変化は血清PCにおいてより明瞭に観察された(表2)。血清中のPCは全血清リン脂質

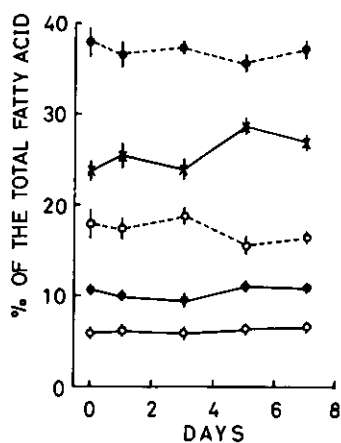


図 1 10 ppm NO₂ 暴露による赤血球膜脂肪酸組成の変化

Fig. 1 Changes in fatty acid composition of red cell membranes during *in vivo* exposure to 10 ppm NO₂.

Rats were exposed to 10 ppm NO₂ as indicated. At intervals blood samples were collected. Preparation of red cell membranes and determination of fatty acid composition were performed as described in Materials and Methods. •---•, palmitic acid (16:0); ○---○, stearic acid (18:0); ○—○, oleic acid (18:1); ●—●, linoleic acid (18:2); and ×—×, arachidonic acid (20:4). Fatty acids less than 1% are omitted. Each point is the mean of six rats. Error bars represent ± SD.

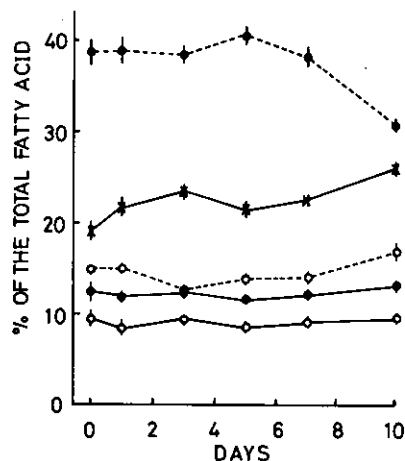


図 2 4 ppm NO₂ 暴露による赤血球膜脂肪酸組成の変化

Fig. 2 Changes in fatty acid composition of red cell membranes during *in vivo* exposure to 4 ppm NO₂.

Rats were exposed to 4 ppm NO₂ as indicated. Preparation of red cell membranes and determination of fatty acid composition were the same as in Fig. 1. •---•, palmitic acid (16:0); ○---○, stearic acid (18:0); ○—○, oleic acid (18:1); ●---●, linoleic acid (18:2), and ×—×, arachidonic acid (20:4). Fatty acids less than 1% are omitted. Each point is the mean of six rats. Error bars represent ± SD.

表 1 10ppm NO₂ 暴露と血清脂肪酸組成Table 1 Serum fatty acid composition with the time of exposure to 10 ppm NO₂

Fatty Acid	Control	1 day		3 days		5 days		7 days	
		%	Ratio	%	Ratio	%	Ratio	%	Ratio
16:0	24.9 ± 0.9	20.0 ± 1.0	0.80***	26.4 ± 0.8	N.S.	26.6 ± 1.0	N.S.	24.0 ± 0.8	N.S.
18:0	15.2 ± 0.4	15.6 ± 0.6	N.S.	16.7 ± 0.4	1.10***	15.4 ± 0.4	N.S.	16.4 ± 0.5	1.08***
18:1	10.7 ± 0.2	7.2 ± 0.4	0.67***	8.8 ± 0.2	0.82***	9.8 ± 0.6	N.S.	8.9 ± 0.4	0.83***
18:2	30.8 ± 0.9	22.9 ± 0.8	0.74***	27.6 ± 0.8	0.90**	28.2 ± 1.0	0.92**	28.6 ± 0.6	0.93*
20:4	12.9 ± 0.4	17.3 ± 0.6	1.34***	14.6 ± 0.4	1.13***	14.5 ± 0.6	1.12***	16.2 ± 0.8	1.26***
Rt1,044 ^a	3.0 ± 0.4	5.4 ± 0.4	1.80***	3.8 ± 0.6	N.S.	3.5 ± 0.4	N.S.	3.8 ± 0.6	N.S.

a: Unidentified fatty acid showing a retention time of 1,044 sec.

Rats are exposed to 10 ppm NO₂ as indicated. At intervals serum is collected and fatty acid composition is determined as described in Materials and Methods. Number to the left of the colon in the first column refers to the number of carbon atoms; number to the right of the colon refers to the number of double bonds. Values are the mean percentage of six rats ± SD, and ratios of experimental values to control ones are also shown. Fatty acids less than 1% are omitted. The significance of the difference between control and experimental values are shown: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; N.S., not significant.

表 2 NO₂ 暴露と血清レシチンの脂肪酸組成Table 2 Fatty acid composition of serum phosphatidylcholine upon exposure to NO₂

Fatty Acid	10 ppm NO ₂			4 ppm NO ₂		
	Control	7 days	Ratio	Control	10 days	Ratio
	%	%		%	%	
16:0	26.7 ± 0.8	23.7 ± 0.6	0.89***	26.9 ± 0.1	26.0 ± 0.6	0.97**
18:0	17.7 ± 0.6	21.2 ± 0.9	1.20***	16.5 ± 0.5	17.5 ± 0.6	N.S.
18:1	9.7 ± 0.5	7.1 ± 0.3	0.73***	7.9 ± 0.1	6.8 ± 0.3	0.86***
18:2	27.8 ± 0.6	21.8 ± 0.6	0.78***	28.5 ± 0.6	25.5 ± 0.3	0.89***
20:4	13.2 ± 0.4	20.2 ± 1.0	1.53***	14.8 ± 0.5	19.3 ± 0.5	1.30***
Rt1,044 ^a	1.7 ± 0.2	2.8 ± 0.4	1.65***	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.7	N.S.

a: Unidentified fatty acid showing a retention time of 1,044 sec.

Rats are exposed to 4 and 10 ppm NO₂ for 10 and 7 days, respectively, as indicated. Preparation of serum PC and determination of fatty acid composition are performed as described in Materials and Methods. Number to the left of the colon in the first column to the number of carbon atoms; number to the right of the colon refers to the number of double bonds. Values are the mean percentage of six rats ± SD, and ratios of experimental values to control ones are also shown. Fatty acids less than 1% are omitted. The significance between control and experimental values are shown: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; N.S., not significant.

中の $72.5 \pm 1.4\%$ 含まれており、10 ppm NO₂ の 7 日間暴露による 18:0, 20:4 および Rt 1044 の増加と 16:0, 18:1 および 18:2 の減少の傾向は血清の脂肪酸組成の変化と一致していた。また、血清 PC におけるこれらの変化は 0.1% 以下の危険率で有意であった。図 3 は 4 ppm NO₂ 暴露による血清 PC の主要不飽和脂肪酸の変化を経時的に調べたものである。20:4 は暴露第 1 日目を除いて全暴露期間中増加した。反対に 18:2 は減少していた。しかし、10 ppm NO₂ の場合は 4 ppm NO₂ で見られた 20:4 と 18:2 との関係は見られなかった (図 4)。10 ppm NO₂ 暴露の場合、20:4 は暴露 3 日目から増加し始め、7 日目で急激な増加が認められた。また 18:1 は 4 ppm NO₂ の場合と同じような変化を示した。

3. 肝臓上清画分の脂肪酸組成の変化

表 3 は 4 ppm および 10 ppm NO₂ を暴露したラットの肝臓上清画分 (S₁₀₅) の脂肪酸組成の変化を示したものである。表 3 に示したように、4 ppm NO₂、10 日間暴露によって 18:0 と 20:4 は対照群に対して 1.20 と 1.30 倍に増加し、16:0 は 0.81 倍に減少した。一方、10 ppm NO₂ 7 日間暴露の場合は 4 ppm NO₂ 暴露の場合とは異なり、18:0 と 20:4 の減少と 18:2 の増加が認められた。図 5 は 4 ppm NO₂ 暴露による S₁₀₅ 画分中の主要不飽和脂肪酸の変化を経時的に調べたものである。18:2 は 5 日目まで増加し、以後しだいに減少した。一方、20:4 は 3 日目まで対照群より低い値を示し、3 日目以後しだいに増加した。この 20:4 の変化は肝臓ホモジネート、P₂₅ および P₁₀₅ においても同様に認められた。10 ppm NO₂ 暴露の場合は 4 ppm NO₂ の場合と異なり、暴露 1 日目に 18:2 と 20:4 の増加が起こり以後減少した。そして、4 日目以後は対照群より低い

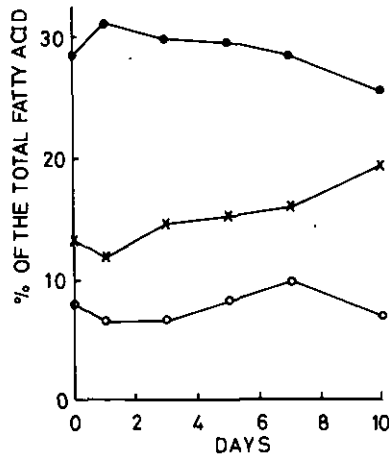


図 3 4 ppm NO₂ 暴露による血清レシチン中の不飽和脂肪酸の変化
 Fig. 3 Changes in the percentages of major unsaturated fatty acids in serum phosphatidylcholine during *in vivo* exposure to 4 ppm NO₂.
 Rats were exposed to 4 ppm NO₂ as indicated. Preparation of serum PC and determination of fatty acid composition were the same as in Fig. 1. ○ — ○, oleic acid (18:1); ● — ●, linoleic acid (18:2), and x — x, arachidonic acid (20:4). Each point is the mean of six rats.

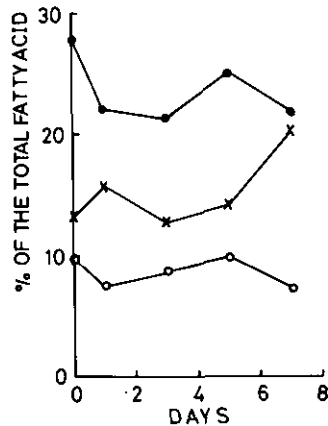


図 4 10 ppm NO₂ 暴露による血清レシチン中の不飽和脂肪酸の変化
 Fig. 4 Changes in the percentages of major unsaturated fatty acids in serum phosphatidylcholine during *in vivo* exposure to 10 ppm NO₂.
 Rats were exposed to 10 ppm NO₂ as indicated. Experimental conditions were the same as in Fig. 1. ○ — ○, oleic acid (18:1); ● — ●, linoleic acid (18:2), and x — x, arachidonic acid (20:4). Each point is the mean of six rats.

表 3 NO₂ 暴露と肝上清画分の脂肪酸組成

Table 3 Fatty acid composition of liver supernatant fraction upon exposure to NO₂

Fatty Acid	10 ppm NO ₂			4 ppm NO ₂		
	Control	7 days	Ratio	Control	10 days	Ratio
	%	%		%	%	
16:0	34.6 ± 1.7	31.5 ± 1.4	N.S.	33.2 ± 0.7	26.8 ± 0.2	0.81***
18:0	8.8 ± 0.4	7.5 ± 0.2	0.85***	11.1 ± 1.4	13.3 ± 0.4	1.20**
18:1	14.6 ± 0.5	14.3 ± 0.7	N.S.	14.0 ± 0.4	13.5 ± 0.5	N.S.
18:2	20.2 ± 0.4	23.6 ± 0.3	1.17***	20.3 ± 2.0	21.9 ± 0.7	N.S.
20:4	10.8 ± 0.5	9.5 ± 0.4	0.88***	12.2 ± 1.0	15.8 ± 0.2	1.30***

Rats are exposed to 4 and 10 ppm NO₂ for 10 and 7 days, respectively, as indicated. Preparation of liver supernatant fraction and determination of fatty acid composition are performed as described in Materials and Methods. Number to the left of the colon in the first column refers to the number of carbon atoms; number to the right of the colon refers to the number of double bonds. Values are the mean percentage of six rats ± SD, and ratios of experimental values to the control ones are shown. Fatty acids less than 1% are omitted. The significance of the difference between control and experimental values are shown: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; N.S., not significant.

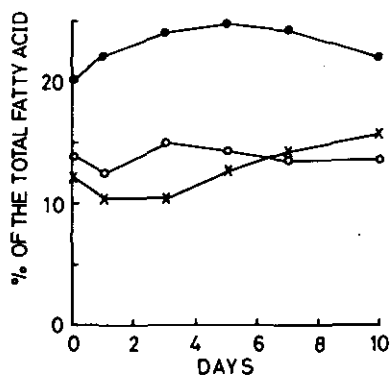


図 5 4 ppm NO₂ 暴露による肝上清中の不飽和脂肪酸の変化

Fig. 5 Changes in the percentages of major unsaturated fatty acids in liver supernatant during *in vivo* exposure to 4 ppm NO₂.

Rats were exposed to 4 ppm NO₂ as indicated. Preparation of liver supernatant fraction and determination of fatty acid composition were performed as described in Materials and Methods. ○ — ○, oleic acid (18:1); ● — ●, linoleic acid (18:2), and x — x, arachidonic acid (20:4). Each point is the mean of six rats.

値を示した。18:1 はこれらの変化とは異なり、4 ppm NO₂ 暴露の場合と同様の変化を示した。

考 察

NO₂ 暴露による赤血球膜不飽和脂肪酸の増加, 特に 20:4 の増加は 16:0 あるいは 18:0 の減少を伴っている。なぜなら, 赤血球膜における脂質の含有量は NO₂ 暴露によって変わらない⁴⁾から

である。このような 20:4 の増加は膜機能の変化や膜の流動性に関係がある¹²⁾ものと考えられる。前述のように、赤血球における脂肪酸代謝はリン脂質の脱アシル化と脱アシル化によって生成したリゾ型リン脂質の再アシル化および血清脂質との交換によるものが全てであって、赤血球自身によるアシル鎖の延長や不飽和化は存在しない^{5,6)}、したがって赤血球膜の脂肪酸組成の変化は血清遊離脂肪酸の取り込みと赤血球膜 PC と血清 PC との交換によって起こったものと見る事ができる。

血清中の PC は極めて多い。一方、赤血球膜 PC の大部分は膜の外側に分布している¹³⁾ことから PC の交換は容易に行われるものと考えられる。De Gier と Van Deenen は赤血球膜 PC の 1/4 は血清 PC と 24 時間で交換すると報告している¹⁴⁾。4 ppm NO₂ 暴露における血清 PC (図 3) と赤血球膜の 20:4 の増加 (図 2) の一致はこれらの仮説を支持しているものと考えられる。また 7 日目を除けば 10 ppm NO₂ においても 20:4 の変化は血清 PC と赤血球膜とで一致している。

肝臓上清画分においても脂肪酸組成の変動が認められ、4 ppm NO₂ 暴露によって 20:4 の増加が認められた (表 1, 表 2)。20:4 は肝臓ミクロソームで 18:2 からアシル鎖の延長と不飽和化をへて生合成される¹⁵⁾。

哺乳動物には 18:2 の生合成系は存在せず、全て食物から供給されている¹⁶⁾。血液中の 18:2 は肝臓に取り込まれ、20:4 の合成に利用される。NO₂ 暴露においても、肝臓上清画分の暴露前期における 20:4 の低下と 18:2 の増加は血清 PC の 18:2 の減少とよく対応している。また、肝臓上清画分の 18:2 が最大値に達した時点から 20:4 の増加が起こっている (図 5)。これらの現象は血清の 18:2 の肝臓への取り込みと肝臓での 20:4 の合成が活発化していることを示すものと考えられる。これらのことから、4 ppm NO₂ 暴露によって肝臓での脂肪酸代謝が活発化するものと考えられる。このような考えは肝臓と血清 PC における 16:0 の減少と 18:0 の増加と云う変化によっても裏付けられる。なぜなら、18:0 は 16:0 のアシル鎖延長によって合成される脂肪酸だからである。

10 ppm NO₂ 暴露の場合は 4 ppm NO₂ 暴露の場合と異なり、血清および血清 PC の 18:2 のレベルは対照群より全暴露期間を通して低く、肝臓上清画分では逆に高くなっていった (図 4 ; 図 6)。このことは肝臓へ取り込まれる血清の 18:2 が多くなっていることを示すのかもしれない。20:4 について見ると、暴露 1 日目を除けば肝臓上清画分中で減少し、対照群の値以下に低下した。一方、血清および血清 PC はしだいに増加した。この現象の解釈には少なくとも二つのことが考えられる。つまり、(a) 20:4 の合成が活発化する以上に 20:4 が肝臓から血清へ出て行く、(b) 血清の 20:4 の増加は肝臓以外の組織からの流入によって起こる。というものである。現在のところ、この問題に対してははっきりとした答を見い出せないが、NO₂ 暴露による肝臓での脂肪酸の不飽和化やアシル鎖延長反応等の変化を調べることによって明らかになるものと考えられる。

前にも述べたように、4 ppm NO₂ 暴露によって肝臓での 18:0 と 20:4 の合成が活発化することが明らかとなった。一方、10 ppm NO₂ の場合はより複雑で、単純に肝臓での脂肪酸代謝が活発化するとは云いきれない。この 4 ppm と 10 ppm NO₂ との違いは肝臓ミトコンドリアの電子伝達系

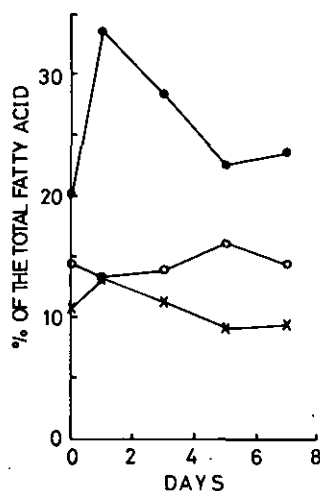


図 6 10ppm NO₂ 暴露による肝上清中の不飽和脂肪酸の変化

Fig. 6 Changes in the percentages of major unsaturated fatty acids in liver supernatant during *in vivo* exposure to 10 ppm NO₂.

Rats were exposed to 10 ppm NO₂ as indicated. Experimental conditions were the same as in Fig. 5. ○ — ○, oleic acid (18:1); ● — ●, linoleic acid (18:2), and x — x, arachidonic acid (20:4). Each point is the mean of six rats.

にも認められた。4 ppm NO₂ 暴露によってその成分の低下が起り、その後しだいに对照群の値に回復して行くのが認められた。一方、10 ppm NO₂ 暴露の場合は暴露7日目においても回復せず、低い値のままであった。このことは、4 ppm NO₂ 暴露の場合に起こる代謝系の障害は回復可能なものであるのに対して10 ppm の場合は回復困難な障害となることを意味している。

今まで述べてきた肝臓における脂肪酸代謝の活性化や障害が NO₂ 暴露によってなぜ起こるのかは現在のところ不明である。

結論的に云えば、NO₂ 暴露によって肝臓の脂肪酸代謝系に変化が起り、この変化が血清の脂肪酸組成に影響を与え、特に20:4の増加として現れる。さらに、この20:4の増加は赤血球膜の20:4の増加として反映される。

引用文献

- 1) Misiakiewicz, A., G. Szulkinska, A. Chyba and E. Czyz (1974): Effect of nitrogen dioxide polluted air on experimental animals under conditions of long-term continuous exposure. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.*, **25**, 245-254.
- 2) Cassan, M. and D.H. Simmons (1975): Nitrogen Dioxide and erythrocytic redox state. *Arch Environ. Health*, **30**, 502-506.
- 3) Case, G.D., J.S. Dixon and J.C. Schooley (1979): Interactions of blood metalloproteins with nitrogen oxides and oxidant in air pollutants. *Environ. Res.*, **29**, 43-65.

- 4) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980): Effects of Nitrogen Dioxide on Red Blood Cells of Rats: Changes in components of red cell membranes during *in vivo* exposure to NO₂. *Environ. Res.*, **23**, 397-409.
- 5) Shohet, S.B. (1977): Red blood cells. *In* "Lipid metabolism in mammals" (Fred Shnyder, ed.), Vol. 1, 191-205, Plenum Press, New York and London.
- 6) Farquhar, J.W. (1965): Human erythrocyte phosphoglycerides, II. Diet and lecithin structure. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 615.
- 7) Van Golde and Van den Bergh (1977): Liver. *in* "Lipid metabolism in mammals" (Fred Shnyder, ed.), Vol. 1, 35-149, Plenum Press, New York and London.
- 8) Dodge, J.T., C. Mitchell and J. Hanahan (1963): Preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119-130.
- 9) Folch, J., M. Lees and G.H.S. Stanley (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 10) Harris, W.D. and P. Popat (1954): Determination of the phosphorus content of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 124-127.
- 11) Metcalfe, L.D. and A.A. Schmitz (1961): Rapid preparation of fatty acids esters for gas-chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, **33**, 363-364.
- 12) Bloj, B., R.D. Morero, R.N. Farias and R.E. Trucco (1973): Membrane lipid fatty acids and regulation of membrane bound enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 67-79.
- 13) Bretscher, M. (1972): Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature New Biol.*, **236**, 11-12.
- 14) De Gier, J. and L.L.M. Van Deenen (1964): A dietary investigation on the variations in phospholipid characteristics of red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 294-304.
- 15) Hassam, A.G., A.J. Sinclair and M.A. Crawford (1975): The incorporation of orally fed radioactive γ -linolenic acid and linoleic acid into the liver and brain lipids of suckling rats. *Lipids*, **10**, 417-420.
- 16) Brenner, R.R. (1971): The desaturation step in the animal biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, **6**, 567-575.

二酸化窒素またはオゾンの間歇暴露による赤血球膜成分の変動

Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on the Components of Red Cell Membranes of Rats

彼谷邦光¹・国本 学¹・三浦 卓¹・持立克身¹

Kunimitsu KAYA¹, Manabu KUNIMOTO¹, Takashi MIURA¹ and Katsumi MOCHITATE¹

要 旨

4 ppm NO₂ または 0.8 ppm オゾンをラットに暴露 (8 時間/日) し, ラット赤血球膜中のリン脂質組成とシアル酸含量の変化をしらべた。NO₂ またはオゾンの 7 日間暴露によって赤血球膜中のリゾホスファチジルエタノールアミンは 2.7% に増加した。オゾンの 10 日間暴露ではホスファチジルコリンとシアル酸含量の著しい減少が認められたが, NO₂ の 10 日間暴露ではこれらの成分の含量は対照群の値と同じであった。これらのことから NO₂ とオゾンの赤血球膜に及ぼす影響の違いについて検討した。

Abstract

Changes of phospholipids and sialic acid contents in red cell membranes of rats exposed daily 8-hours to 4.0 ppm NO₂ or 0.8 ppm O₃ for 1 to 10 days were examined. Seven days after exposure to either NO₂ or O₃, lysophosphatidylethanolamine content in red cell membranes was increased to 2.7% of the total phospholipid. A marked decrease in the contents of phosphatidylcholine and sialic acid was observed 10 days after exposure to 0.8 ppm O₃. On the other hand, these contents showed the same value as the control 10 days after exposure to 4.0 ppm NO₂. Based on these results, difference between the effects of NO₂ and of O₃ on red cell membranes was discussed.

はじめに

我々は NO₂ 連続暴露によって赤血球膜成分に種々の変化が起こることを明らかにして来た¹⁾。しかし、赤血球膜成分に対するオゾンの作用については不明な点が多い。そこで、オゾンの赤血球膜に対する作用および NO₂ とオゾンの赤血球膜に対する作用の類似点と相違点を明らかにするために NO₂ およびオゾンを暴露したラットの赤血球膜成分の変動を調べた。赤血球膜の主要成分

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba Ibaraki 305, Japan.

であり、また NO₂ の連続暴露によって変動の著しいリン脂質および糖質の変化を経時的に調べた。

方 法

1. 暴露方法

6匹を一群とした14週令の JCL : Wistar の雄ラットに 4.0 ppm の NO₂ または 0.8 ppm のオゾン
を10日間間歇暴露 (8 hrs/day (9:00~17:00)) した。暴露中は水だけを与え、暴露後に飼料を
与えた。これは NO₂ やオゾンによる飼料の酸化による影響を除くためである。

2. 採 血

採血は暴露後16時間経過した翌日の午前9時に行った。頸動脈からの採血は前報¹⁾と同様に行っ
た。

3. 赤血球膜成分の分析

赤血球膜の調製および膜成分の分析は前報^{1,2)}と同様に行った。

結 果

1. Lysophosphatidylethanolamine (Lyso-PE) 含量に及ぼす NO₂ および O₃ の影響

赤血球膜の Lyso-PE 含量は NO₂ を 7 日間連続暴露すると NO₂ の暴露濃度に比例して増加した。
また、O₃ の間歇暴露においても Lyso-PE は O₃ の濃度に比例して増加した (図 1)。Lyso-PE
を基準として見た場合、4 ppm-NO₂ と 0.8 ppm-O₃ の間歇暴露は赤血球膜に対して同程度の影響
を与えていると見ることができる。このことから、4 ppm-NO₂ と 0.8 ppm-O₃ の間歇暴露がラ
ットの赤血球膜成分に及ぼす影響を比較することとした。また、Lyso-PE 含量を経時的に調べると
O₃ では 4 日目に 3.3% まで増加し、以後徐々に減少して 10 日目には対照群と同程度の含量になっ
た。一方 NO₂ の場合はしだいに増加し、10 日目では 3.1% となった (図 2)。これは NO₂ の連
続暴露の場合と同様であった。

2. Phosphatidylethanolamine (PE) および phosphatidylcholine (PC) 含量の変化

赤血球膜リン脂質の中の約 1/4 を占めている PE は NO₂ 暴露に比べて O₃ 暴露の方が著しい変化
を示していた (図 3)。一方、PC は NO₂ 暴露によって暴露期間中対照群より約 2% 低い値を示し
たが、O₃ 暴露では 4 日目以後急激に減少し、10 日目では対照群より 8% 低い 38% に減少した (図
4)。O₃ 暴露における PE と PC の組成変化を見ると、この変化は PC の減少によって PE の増加
が起こったものと見ることができる。

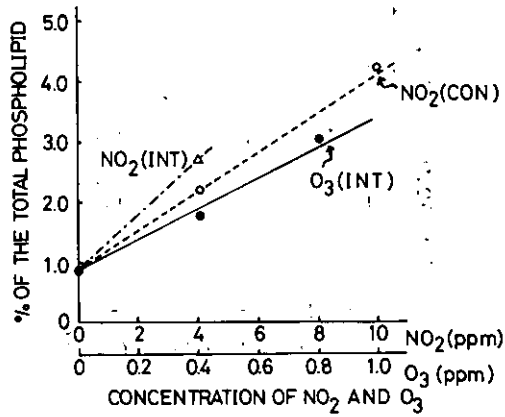


図 1 ラット赤血球膜中の Lysophosphatidylethanolamine 含量と NO₂ および O₃ の暴露濃度との関係

Fig. 1 Relationship between the lysophosphatidylethanolamine content in red cell membranes of rats and the exposure concentration of NO₂ and O₃ (Rats were exposed to NO₂ and O₃ for 7 days)
 INT: intermittent exposure (8 hrs/day)
 CON: continuous exposure.

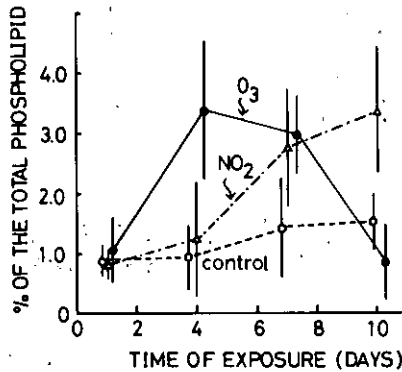


図 2 ラット赤血球膜の Lysophosphatidylethanolamine 含量に及ぼす NO₂ または O₃ 暴露の影響

Fig. 2 Changes in lysophosphatidylethanolamine content of red cell membranes of rats during exposure to NO₂ and O₃
 NO₂, 4.0 ppm; O₃, 0.8 ppm exposure (8 h/d).

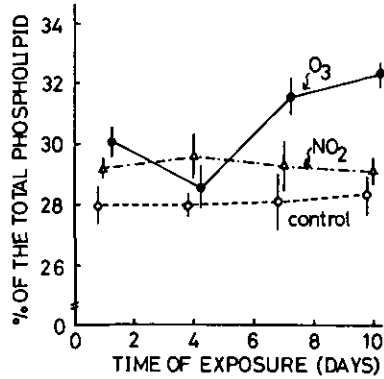


図 3 ラット赤血球膜の Phosphatidylethanolamine 含量に及ぼす NO₂ または O₃ 暴露の影響

Fig. 3 Changes in phosphatidylethanolamine content of red cell membranes of rats during exposure to NO₂ and O₃
Exposure condition was the same as described in Fig. 2.

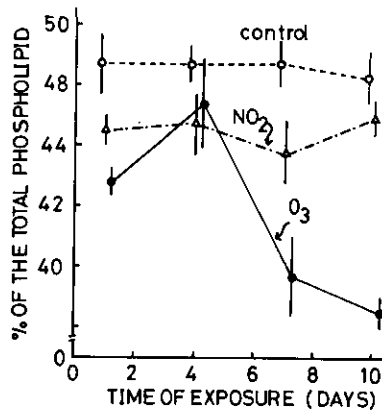


図 4 ラット赤血球膜の Phosphatidylcholine 含量に及ぼす NO₂ または O₃ 暴露の影響

Fig. 4 Changes in phosphatidylcholine content of red cell membranes of rats during exposure to NO₂ and O₃
Exposure condition was the same as described in Fig. 2.

3. 脂肪酸組成の変動

前報と同様に赤血球膜脂肪酸中のアラキドン酸含量を調べた結果、NO₂暴露の場合は暴露1日目から7日目まで対照群より約1%高い値を示し、10日目には対照群より約1.5%高い27%となった。一方、O₃暴露の場合、暴露1日目と10日目は対照と同じ値を示し、4日目と7日目は NO₂ 暴露

の場合と同じ値を示した（図5）。

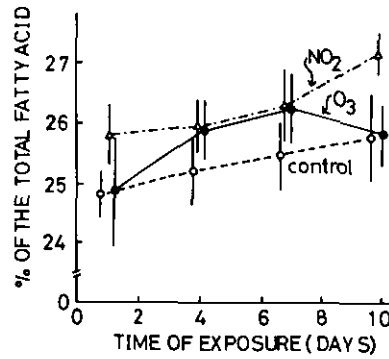


図 5 ラット赤血球膜のアラキドン酸含量に及ぼす NO₂ または O₃ 暴露の影響

Fig. 5 Changes in arachidonic acid content of red cell membranes of rats during exposure to NO₂ and O₃

Exposure condition was the same as described in Fig. 2.

4. 糖質含量の変化

赤血球膜に含まれる糖脂質や糖タンパク質の変化を調べるために赤血球膜のヘキソース (Hexose) 含量を見ると, NO₂ および O₃ 暴露共に対照群より低い値を示したが, 10日目では共に対照群と同程度の値に回復した (図6)。また, 全て赤血球膜の外側に存在しているとされているシアル酸の含量の変化を見ると, NO₂ 暴露では7日目まで対照群より低い値を示すが, 10日目では平均

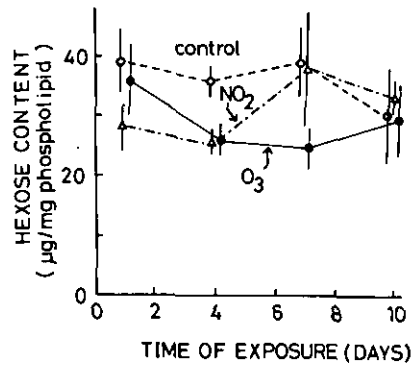


図 6 ラット赤血球膜のヘキソース含量に及ぼす NO₂ または O₃ 暴露の影響

Fig. 6 Changes in hexose content of red cell membranes of rats during exposure to NO₂ and O₃

Exposure condition was the same as described in Fig. 2.

値として対照群より高い値を示した。一方、 O_3 暴露の場合は10日間の暴露期間を通して対照群より低い値を示し、10日目においても NO_2 暴露の場合と異なり低い値を維持していた(図7)。

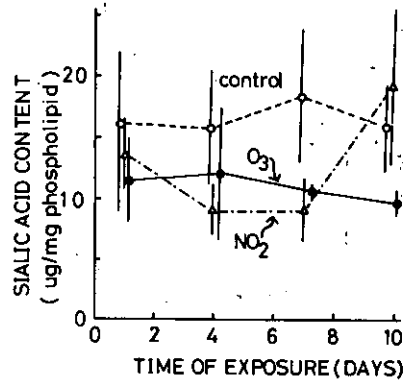


図 7 ラット赤血球膜のシアル酸含量に及ぼす NO_2 または O_3 暴露の影響

Fig. 7 Changes in sialic acid content of red cell membranes of rats during exposure to NO_2 and O_3

Exposure condition was the same as described in Fig. 2.

考 察

以上の結果から特に O_3 で変化の著しいシアル酸と PC は主として赤血球膜の外側に存在する成分であることから、 O_3 は主として赤血球膜の外側に障害を与えているものと考えられる。この理由として、 NO_2 と O_3 の物性の違いが大きき原因と考えられる。 NO_2 は水と反応して NO_2^- と NO_3^- となり、この NO_2^- は赤血球内のヘモグロビン(Hb)と反応してMet Hb と NO_3^- となることが知られている³⁾。一方、 O_3 は不安定な物質であり水系と反応して分解すると同時に不飽和化合物を酸化する能力が高く、赤血球膜に O_3 を暴露すると PC 中の不飽和脂肪酸が分解され、膜酵素に影響を与えることが知られている⁴⁾。これらの性質の違いが赤血球膜に対する NO_2 と O_3 の作用の違いとなって現れたと考えられる。

NO_2 および O_3 暴露によってヘキサースの含量は4日目で対照群より低下し、10日目では対照群と同じ値を示したが、このような現象は NO_2 または O_3 と赤血球とが反応した結果としては説明できないものである。なぜなら、赤血球には生成系が存在しないからである。このような現象の説明には赤血球の新生や機能低下した赤血球の除去機構を考える必要がある。

引 用 文 献

- 1) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1980): Effects of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: changes in components of red cell membranes during *in vivo* exposure to NO_2 . Environ. Res., 23, 397-409.

- 2) 彼谷邦光・三浦 卓 (1980)・二酸化窒素暴露によるラット赤血球膜リン脂質の脂肪酸組成の変動, 国立公害研究所研究報告, 第15号, 117-124.
- 3) Oda, H., H. Tsubone, A. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alterations of nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*,
- 4) Kesner, L., R.J. Kindya and P.C. Chan (1979): Inhibition of erythrocyte membrane (Na⁺-K⁺)-activated ATPase by ozone-treated phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2705-2709.

二酸化窒素亜急性暴露のリンパ球に及ぼす影響

— *In vitro* 系での検索 —

Effect of Subacute Exposure to Nitrogen Dioxide on Lymphocytes

Required for Antibody Response

— *In vitro* Study —

藤巻秀和¹

Hidekazu FUJIMAKI¹

要 旨

マウスの抗体産生能に及ぼす二酸化窒素 (NO₂) の亜急性暴露の影響を *in vitro* の系を用いて検索した。BALB/C雄マウスを用いて、7週令時より、NO₂ 0.4 ppmと1.6 ppmの4週間暴露を行った。抗体産生能の検索は、ヒツジ血球 (SRBC) に対する溶血斑形成細胞 (PFC) 算定法によった。その結果、一次反応は、NO₂ 暴露により抑制された。二次反応は、0.4 ppm NO₂ 暴露では、対照群と変わりなかったが、1.6 ppm NO₂ 暴露では、抗体産生能の亢進がみられた。そこで、1.6 ppm 暴露群と対照群との間で抗体産生機構に関与する細胞群の組み換えを行い、細胞レベルでの影響を検討したが、T細胞群とB細胞群の間で NO₂ 暴露による影響に明らかなちがいは認められなかった。

Abstract

BALB/c mice were continuously exposed to 0.4 and 1.6 ppm NO₂ for 4 weeks, and the effects on lymphocytes required for primary and secondary antibody responses to sheep red blood cells (SRBC) were examined *in vitro*. The primary antibody response was suppressed by NO₂ exposure, whereas the secondary antibody response was slightly stimulated. By the experiment of reconstitution, it was found that no significant difference of activities between T and B cells under condition of subacute NO₂ exposure was observed.

はじめに

NO₂ の比較的低濃度の短期および長期暴露による生体の免疫反応への影響については、いくつかの報告がある^{1~3)}。Maigetter⁴⁾は、0.5 ppm NO₂ をマウスに長期暴露すると、T細胞やB細胞の mitogen に対する反応が抑制されたことを報告している。Holt⁵⁾らは、血中の抗体価、T

1. 国立公害研究所 環境生理部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

The National Institute for Environmental Studies, Basic Medical Sciences Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

細胞の mitogen に対する反応や移植片対宿主反応などの免疫機能が、短期の暴露では、亢進するが、長期暴露では、逆に、抑制されることを明らかにした。我々は、これまで、主に NO₂ の急性暴露による抗体産生能への影響について、“*In vivo*”と“*In vitro*”の系で検索し、抑制がみられること、その抑制は、主にB細胞の活性低下によることを明らかにした⁶⁻⁸⁾。本研究では、この抗体産生機構に及ぼすNO₂亜急性暴露の影響を、“*In vitro*”の抗体産生系を用いて検索し、合わせてその機構に参与している細胞レベルでの影響の違いの有無についても検討した。

方 法

実験動物は、BALB/C雄マウスを日本チャールスリバー株より6週令で購入し、7週令より暴露を行った。NO₂暴露は、0.4ppmおよび1.6ppmの4週間連続暴露とし、ガラス・ステンレス製大型チャンバー(18001)を用いて行った。内部温度は、24~26℃に、湿度は、50~60%に制御された。対照群のマウスは、同型チャンバー内で、フィルターを通した空気を暴露し、他の条件は、暴露群と同様にしたものを用いた。抗体産生能の検索について、一次反応は、暴露終了後マウスより脾臓をとりだし、その細胞浮遊液をつくり、細胞数を調整して抗原(ヒツジ血球)とともに培養した。4~5日後に溶血斑形成細胞(PFC)算定法を用いて行った。二次反応は、暴露直前に抗原を5×10⁷/マウス尾静脈注射し、NO₂暴露後に、一次反応の手順と同様に行った。脾臓細胞の培養条件、T細胞、B細胞群の分画法は、前報⁷⁾に述べた通りである。

結 果

*In vitro*系での一次反応は、0.4ppmおよび1.6ppm NO₂暴露により、対照群に比べて有意に抑制された(表1)。その抑制は、0.4ppm NO₂暴露群に比べ、1.6ppm NO₂暴露群の方により強く現れる傾向にあった。

*In vitro*系での二次反応の結果は、表2に示してある。0.4ppm NO₂暴露群のPFCの数は対照群の数とあまり差はないが、1.6ppm NO₂暴露群のPFCの数は対照群と比べて有意に亢進

表 1. NO₂亜急性暴露の*in vitro*での一次抗体産生に及ぼす影響

Table 1 Effect of subacute exposure to NO₂ on *in vitro* primary antibody response

ppm	No. of PFC per well ^a		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Control	3,273 ± 134 ^b	1,344 ± 24	5,656 ± 155
0.4	2,247 ± 159**	952 ± 91**	3,464 ± 191***
1.6	2,087 ± 170***	712 ± 76***	2,624 ± 68***

a: Anti SRBC IgM PFC responses were assayed on day 4 to 5 of the culture.

b: Each value represents the mean ± SE of five to six wells.

Parameters differing from control levels by Student's *t* test are indicated as; **, *p* < 0.01;

***, *p* < 0.001.

表 2 NO₂ 亜急性暴露の *in vitro* での二次抗体産生に及ぼす影響

Table 2 Effect of subacute exposure to NO₂ on *in vitro* secondary antibody response

ppm	No. of PFC per well ^d				
	Exp. 1 ^b		Exp. 2 ^c		
	day 4	day 5	day 4	day 5	
Control	2,984 ± 183 ^d	6,780 ± 588	7,760 ± 661	4,120 ± 146	
0.4	3,268 ± 212	7,220 ± 493	8,060 ± 685	3,200 ± 314	
1.6	4,888 ± 191***	10,140 ± 882*	11,600 ± 344**	4,920 ± 104**	

a: Anti SRBC IgM PFC responses were assayed on day 4 to 5 of the culture.

b: 1 × 10⁷ cells: Cultured spleen cells per well.

c: 2 × 10⁷ cells: Cultured spleen cells per well.

d: Each value represents the mean ± SE of five to six wells.

Parameters differing from control levels by Student's *t* test are indicated as; *, *p* < 0.05;

** , *p* < 0.01; *** , *p* < 0.001.

していることが認められた。

1.6 ppm NO₂ 暴露群で、抗体産生に明らかな影響が認められたため、抗体産生機構に関与する細胞群に対する 1.6 ppm NO₂ 暴露の影響について実験を行った。

まず、脾細胞をプラスチック・ディッシュへ付着する群と付着能をもたない群に分け、付着能をもつ群に対する影響を検討した(表3)。Sephadex G-10 通過細胞を付着能をもたない細胞群として用いた。その結果、対照群の非付着性細胞に、暴露群と対照群の付着性細胞を、別々に加えて

表 3 1.6 ppm の NO₂ 暴露の脾臓中付着性細胞に及ぼす影響

Table 3 Effect of subacute exposure to 1.6 ppm NO₂ on splenic adherent cells

Group	Cell sources				No. of PFC per well ^c	
	Sephadex G-10 passed cells ^a	Adherent cells ^b		Primary response	Secondary response	
		Control	Control			Exposed
A	+	+	-	520 ± 34 ^d	447 ± 127	
B	+	-	+	445 ± 38	507 ± 114	
C	+	-	-	0	0	
D	-	+	-	0	ND ^e	
E	-	-	+	0	ND	

a: 2 × 10⁷ cells per well in primary response: Spleen cells depleted of adherent cells.

1 × 10⁷ cells per well in secondary response: Spleen cells depleted of adherent cells.

b: 2 × 10⁵ cells per well.

c: Anti SRBC IgM PFC responses were assayed on day 4 of the culture.

d: The value represents the mean ± SE of four wells.

e: Not done.

Responses in exposed mice did not differ from controls by *t* test.

培養しても、一次反応二次反応ともに、PFCの数に差がみられないことから、脾臓中の付着能をもつ細胞群の活性は、NO₂暴露によって影響がみとめられないことが明らかとなった。

次に、T細胞とB細胞（付着性細胞を含）を暴露群と対照群とからそれぞれ分画して、組み合わせ実験を行った結果を表4に示した。一次反応と二次反応において、Group A から Dの間で有意な差がみられないことから、T細胞、B細胞群への特異的なNO₂の影響は認められなかった。

表 4 T細胞とB細胞に及ぼす1.6ppm NO₂暴露の影響の比較

Table 4 Comparison of the effects of 1.6 ppm NO₂ exposure on T and B cells in primary and secondary antibody responses

Group	Cell sources				No. of PFC per well ^c	
	Anti- θ + C' treated cells ^a		Nylon wool passed cells ^b		Primary response	Secondary response
	Control	Exposed	Control	Exposed		
A	+	-	+	-	1,680 ± 168	9,760 ± 346
B	+	-	-	+	2,005 ± 80	10,440 ± 614
C	-	+	+	-	1,525 ± 136	9,520 ± 524
D	-	+	-	+	1,240 ± 183	10,240 ± 377
E	+	-	-	-	60	1,680
F	-	+	-	-	80	1,680
G	-	-	+	-	20	0
H	-	-	-	+	20	0

a: B cell populations: Spleen cells (2×10^7 per well) incubated with anti- θ + complement.

b: T cell populations: 1.2×10^6 cells per well in primary response.

1.0×10^6 cells per well in secondary response.

c: Anti SRBC IgM PFC responses were assayed on day 4 of the culture.

A, B, C and D values represent the mean ± SE of four wells.

E, F, G and H values represent the mean of PFC per two wells.

考 察

今回の実験で、比較的低濃度のNO₂ 4週間暴露で、“*In vitro*”系での抗体産生能が影響を受けたことが明らかになり、中でも一次反応は著しい抑制影響を受けていた。この結果は“*In vivo*”での実験結果と良く一致していた⁹⁾。

抗体産生系に関与する細胞レベルでのNO₂による影響については、急性暴露により一次反応においてB細胞の活性がT細胞の活性より低下することが明らかとなっている^{7,8)}。今回の亜急性暴露では、NO₂による特異的な細胞群の活性の低下は認められなかった。抗体産生能の抑制は、脾臓中の細胞数の減少、つまり、T細胞、B細胞群の脾臓中にしめる割合の減少によるかもしれないが、この点について今回の実験では明確な結論は得られなかった。

Thomasら^{9,10)}は免疫反応に対するたばこの影響について調べ、比較的短期暴露ではその反応が亢進される傾向にあるが、長期暴露になるとむしろ抑制される二相性の変化が認められること

を報告している。NO₂ 暴露についても、Holtら⁵⁾は長期暴露において同様の報告をしている。その中で、T細胞が上記の二相性の変化に重要な役割を果たしていることを示している。今回の報告の中で、二次反応が1.6ppm暴露により亢進したことは、彼らの指摘した短期暴露における亢進と一致しているものと思われる。

NO₂暴露による生体の免疫反応、特に脾臓における反応がいかんして影響をうけるのか、その詳しいメカニズムは明らかでない。最近、Schnitzleinら¹¹⁾は肺の免疫機能に及ぼすNO₂急性暴露の影響について報告している。その中で、暴露の直前、直後に抗原の吸入感作をすることにより、肺近接のリンパ節における抗体産生が亢進することを示した。更に、彼らはそのリンパ節での抗体産生の亢進が肺でのNO₂による損傷に起因するものであり、リンパ節、脾臓などのリンパ性器官は、NO₂の影響はうけていないとしている。一方、我々は抗体産生能に及ぼすNO₂急性暴露の影響を調べた先の報告^{6,7)}で脾臓や胸腺も影響をうけていることを明らかにしており、NO₂暴露の影響は肺組織に限られたものでないことを示した。

ただ、肺以外の組織での影響が肺における影響の間接的なものである可能性は否定できない。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、終始実験に御指導、御助言をいただいた新潟大学医学部清水不二雄教授に深甚の謝意を表す。

引用文献

- 1) Fenters, J.D., R. Ehrlich, J. Findlay, J. Spangler and V. Tolkacz (1971): Serologic response in squirrel monkeys exposed to nitrogen dioxide and influenza virus. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **104**, 448-451.
- 2) Fenters, J.E., J.C. Findlay, C.D. Port, R. Ehrlich and D.S. Coffin (1973): Chronic exposure to nitrogen dioxide. Immunologic, physiologic and pathologic effects in virus-challenged squirrel monkeys. *Arch. Environ. Health*, **27**, 85-89.
- 3) Ehrlich, R., E. Silverstein, R. Maigetter, J.D. Fenters and D. Gardner (1975): Immunologic response in vaccinated mice during long term exposure to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **10**, 217-223.
- 4) Maigetter, R.Z., J.D. Fenters, J.C. Findlay, R. Ehrlich and D.E. Gardner (1978): Effect of exposure to nitrogen dioxide on T and B cells in mouse spleens. *Toxicol. Lett.*, **2**, 157-161.
- 5) Holt, P.G., L.M. Finlay-Jones, D. Keast and J.M. Papadimitrou (1979): Immunological function in mice chronically exposed to nitrogen oxides (NO_x). *Environ. Res.*, **19**, 154-162.
- 6) 藤巻秀和・清水不二雄 (1979): 二酸化窒素の急性および亜急性暴露の免疫反応に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告, 第8号, 61-70.
- 7) 藤巻秀和・清水不二雄 (1980): 液性一次抗体産生に關与する細胞群に及ぼす二酸化窒素の影響。国立公害研究所研究報告, 第15号, 55-59.
- 8) Fujimaki, H., F. Shimizu and K. Kubota: Suppression of antibody response in mice by acute exposure to nitrogen dioxide: *In Vitro* study. *Environ. Res.* (in press).
- 9) Thomas, W.N., P.G. Holt and D. Keast (1973): Cellular immunity in mice chronically exposed to fresh cigarette smoke. *Arch. Environ. Health*, **27**, 372-375.

- 10) Thomas, W.N., P.G. Holt and D. Keast (1974): The development of alterations in the primary immune response of mice by exposure to fresh cigarette smoke. *Int. Arch. Allergy*, **46**, 481-486.
- 11) Schnizlein, C.T., D.E. Bice, A.H. Rebar, R.K. Wolff and R.L. Beethe (1980): Effect of lung damage by acute exposure to nitrogen dioxide on lung immunity in the rat. *Environ. Res.*, **23**, 362-370.

国立公害研究所特別研究成果報告

- 第 1 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究 — 霞ヶ浦を対象域として、(1977)
第 2 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究 — 昭和51/52年度 研究報告、(1978)

(改 称)

国立公害研究所研究報告

- 第 3 号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) (1978)
(日本産ユスリカ科 *Chironomus* 属 9 種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
- 第 4 号 スモッグチャンバーによる炭化水素 — 窒素酸化物系光化学反応の研究 — 昭和52年度 中間報告、(1978)
- 第 5 号 芳香族炭化水素 — 窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究 — 昭和51/52年度 研究報告、(1978)
- 第 6 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(II) — 霞ヶ浦を中心として、(1979)
- 第 7 号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera), (1979)
(日本産ユスリカ科20種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
- 第 8 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和52/53年度 研究報告、(1979)
- 第 9 号 スモッグチャンバーによる炭化水素 — 窒素酸化物系光化学反応の研究 — 昭和53年度 中間報告、(1979)
- 第 10 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究 — 昭和51/53年度 特別研究報告、(1979)
- 第 11 号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
- 第 12 号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
(コンピュータ制御装置を利用したフレイムおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
- 第 13 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
(多摩川に発生するユスリカの研究
— 第 1 報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係 —
— 第 2 報 その一支流に見出された *Chironominae* 亜科の20種について —)
- 第 14 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壌生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和53, 54年度 特別研究報告、(1980)
- 第 15 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和54年度 特別研究報告、(1980)
- 第 16 号 計測車レーザーレーダーによる大気汚染遠隔計測、(1980)
- 第 17 号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果 — 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究 — 昭和53/54年度 特別研究報告、(1980)

- 第 18 号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
(環境標準試料「リョウブ」の調製, 分析および保証値)
- 第 19 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅲ) — 霞ヶ浦(西浦)の湖流 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 20 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅳ) — 霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖水環境に及ぼす影響 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 21 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅴ) — 霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 22 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅵ) — 霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 23 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅶ) — 湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 24 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅷ) — 富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関する研究 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 25 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅸ) — *Microcystis* (藍藻類) の増殖特性 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 26 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(X) — 藻類培養試験法によるAGPの測定 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 27 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(XI) — 研究総括 — 昭和53/54年度. (1981)
- 第 28 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究 — 昭和54/55年度特別研究報告. (1981)
- 第 29 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthocladiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
— 第3報 夏期の調査で見出されたエリユスリカ亜科 Orthocladiinae 各種の記載と, その分布の下水汚染度との関係について —
— 第4報 南浅川の冬期の調査で見出された各種の分布と記載 —)
- 第 30 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究 — 昭和54/55年度 特別研究報告. (1982)
- 第 31 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和55年度. 特別研究報告. (1981)

Report of Special Research Project the National Institute for Environmental Studies

- No. 1* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1966. (1977)
- No. 2* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1977. (1978)

[Starting with Report No. 3, the new title for NIES Reports was changed to:]

Research Report from the National Institute for Environmental Studies

- No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1977. (1978)
- No. 5* Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on Cultured Cells – Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1977-1978. (1979)
- No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
- No. 8* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1978. (1979)
- No.10* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1978. (1979)
- No.11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No.12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
- No.13 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
 - Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
 - Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
- No.14* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Progress report in 1978-1979. (1980)
- No.15* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1979. (1980)
- No.16* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- No.17* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes – Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region. (1980)
- No.18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
- No.19* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Lake current of Kasumigaura (Nishiura) – 1978-1979. (1981)
- No.20* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Geomorphological and hydro-meteorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment – 1978-1979. (1981)

- No.21* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.22* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.23* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Applicability of trophic state indices for lakes – 1978-1979. (1981)
- No.24* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Quantitative analysis of eutrophication effects on main utilization of lake water resources – 1978-1979. (1981)
- No.25* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Growth characteristics of *Microcystis* – 1978-1979. (1981)
- No.26* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Determination of algal growth potential by algal assay procedure – 1978-1979. (1981)
- No.27* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Summary of Researches – 1978-1979. (1981)
- No.28* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Progress report in 1979-1980. (1981)
- No.29 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
 Part 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
 Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
- No.30* Eutrophication and Red Tides in the coastal marine environment – Progress report in 1979-1980. (1982)
- No.31* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1980. (1981)

* in Japanese

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

No. 31

国立公害研究所研究報告 第31号
(R-31-'81)

昭和56年12月25日発行

編集・発行 国立公害研究所

茨城県筑波郡谷田部町小野川16番2

印刷 日青工業株式会社
東京都港区西新橋2-5-10

Published by the National Institute for Environmental Studies
Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

December, 1981