

R-15-'80

大気汚染物質の単一および複合汚染の生物
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——

Studies on the biological effects of
single and combined exposure of
air pollutants
Research report in 1979

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立公害研究所

国立公害研究所研究報告 第15号 (R-15-'80)

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—

正 誤 表

頁	行	誤	正
CONTENTS		7. Exhalation	Exhalation
1	↓ 2	Propects	Prospects
2	↓ 7	記述形態	記述形態
		計量形態	計量形態
5	文献 16)	194	194
8	↑ 1	_lectrode	electrode
13	Fig. 4	administratons	administrations
21	↓ 3	Pnemotachogram	Pneumotachogram
25	図5 縦軸	70	90
55	↑ 3	Sleep	Sheep
59	↓ 10	of exposure	of acute exposure
66	↑ 6	~100mMGS. 1.2ml	~100mMGS. 1.2ml
67	↓ 5		左へつめる
85	柱	Envirchmenbal	Environmental
88	図題名最下行	retention	retention
97	↓ 10	我の	我々の
98	1)	Barder, A.A.	Barber, A.A.
107	10)	transstilbene	trans-stilbene
107	17)	iso mers	isomers
109	↓ 6	暴露	暴露
126	↑ 4	10mMトリス-塩酸	10mMトリス-塩酸緩衝液
129	図2 B縦軸	OD(660nm)30/min	OD(660nm)/30min
146	↑ 9	紀本電子工業製	紀本電子工業製
151	↓ 1	この行を150ページの9行目に移す	
151	↓ 4	10台収容	12台収容
161	表 1	表頭 Period	Period
161	表 1	B groupの Date of rats' birth のところ 1978.3.9-14	1978 . 3.9.-11
163	表 3	27ヶ月 control ♀ No.4 cage のところ 2, 4	2, 5
168	Fig. 3	(Mean weight ± SD)	(Mean body weight ± SD)
243		図1	表1
243		表1 Bloodの項目に1行追加	Component Abbreviation Method
			Hemoglobin, Hb, CNHb.
268	↓ 10	c)	d)
275	柱	Euvironmental	Environmental
283	↑ 11	ミリスチン酸組成の減少と パルミチン酸組成	ミリスチン酸組成の減少とパルミチ ン酸組成の増加および肝でのパルミ チン酸組成
284	↓ 3	M. Kiuno	M. Kikuno

序

大気汚染の人体に及ぼす影響については国民の各層より多大の関心がよせられているが、特に、低濃度の慢性的影響については資料不足で十分なことが分かっていない。特に、大気汚染の慢性的な影響の生理学的あるいは病理学的な研究は、環境基準値を設定する上にも、また環境に対する予防医学の基礎を確立する上にも重要である。

本研究所では、昭和52年以来この問題に取り組み、ラットのライフスパンにわたる低・中・高の濃度の窒素酸化物の長期暴露実験を行った。これが本報告の第2部に相当する部分である。

第1部の部分は、国立公害研究所研究報告第8号(R-8-79)で発表した従来からの研究の延長で、さらに病理、生理、血液学、免疫学的な研究を追加充実したものである。

問題が環境行政上にも極めて重要であるために、本報告に得られた結果に対して多大の関心がよせられ、また結論を急がれていることをわれわれは十分承知している。しかしながら、ここに得られた結果だけをもって早急な決断を下すことは極めて難しい。その理由は、27か月の間に自然死による死亡等の原因で検体数が十分に得られなかったこと、また窒素酸化物の濃度も0.04, 0.4, 4.0 ppmと3種類しか行えなかったことなどによるものである。そこで、われわれは現在の基礎的な研究を今後も継続し、かつ、その結果を逐次公表することによって、今後も引き続いて窒素酸化物による大気汚染に関する基礎的な知見を提供しようとするものである。そして、このような科学的な研究こそが問題の根本的な解決への途であると堅く信じている。

当研究所の医学博士、久保田憲太郎環境生理部長をプロジェクト・リーダーとする研究班は1頭のラット検体でも全員総がかりで、生理学的、病理学的、生化学的、免疫学的、または血液学的検索を手分けして行い、またそれぞれの結果を全員で検討する等の方法でこのプロジェクトに取り組んできた。このような系統的かつ総合的な研究は、例えば大気汚染の人体に対する環境影響を判定するにははなはだ迂遠な方法であると考えられるかもしれないが、このような基本的なデータは一つの基準尺度として広く応用され、比較、対照の根拠とされるものと期待している。また、このような科学的真実が蓄積されて、初めて所期の目的を達することができるものと信じる。

この研究に関して多大の関心をよせられ、かつ御批判を賜るならば幸と考える。

昭和55年6月16日

国立公害研究所長
近藤次郎

目 次

序 (近藤次郎)	
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)	
I	
1. 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	7
局 博一・鈴木 明・市瀬孝道・織田 肇	
2. 二酸化窒素暴露がラットの動脈血pHa, PaCO ₂ , およびPaO ₂ に及ぼす影響	19
鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・織田 肇	
3. マウスの遊泳持続時間に及ぼす二酸化窒素の影響	33
鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇	
4. 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	43
織田 肇・局 博一・鈴木 明・市瀬孝道	
5. 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	55
藤巻秀和・清水不二雄	
6. 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	61
市瀬孝道・織田 肇・鈴木 明・局 博一・嵯峨井 勝	
7. 二酸化窒素暴露ラットの呼気中エタン測定による <i>in vivo</i> の脂質過酸化の変化について	77
嵯峨井 勝・市瀬孝道・織田 肇	
8. 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	85
嵯峨井 勝・市瀬孝道	
9. 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	101
小林隆弘・野口 忠	
10. 二酸化窒素の赤血球膜糖脂質に及ぼす影響	109
彼谷邦光・三浦 卓	
11. 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	117
彼谷邦光・三浦 卓	
12. 二酸化窒素の赤血球酵素および糖脂質に及ぼす影響	125
持立克身・三浦 卓・彼谷邦光	
13. 大気複合汚染ガス暴露チャンバーにおける二酸化窒素およびオゾンの濃度制御について	133
松本 茂・寺尾恵治・高橋慎司・高橋 弘・相賀一郎	

資料

大気複合汚染ガス暴露チャンバーの構成と性能

II 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響

1. 暴露チャンバーの環境制御	149
松本 茂・藤田和伸・清水 明・木村英雄・高橋 弘	
2. 供試動物の飼育経過	159
高橋 弘・山元昭二・石村俊治・高橋慎司・寺尾恵治	
3. 病理形態学的所見	171
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	
4. 動脈血 pHa, PaCO ₂ および PaO ₂	229
鈴木 明・局 博一・市瀬孝道・織田 肇	
5. 血液性状	241
市瀬孝道・鈴木 明・局 博一・織田 肇	
6. 血清アイソザイム	253
三浦 卓・彼谷邦光	
7. 血液および肺に存在するグルタチオン含量	259
河田明治	
8. 肺, 肝リン脂質の脂肪酸組成	275
小林隆弘	
資料 表 1-7, 臓器重量	285

CONTENTS

Preface

J.KONDO

Outline of Performed Researches and Future Prospects	1
K. KUBOTA, Project Leader	

I.

1. Cardiac Responses in Rats Exposed to Nitrogen Dioxide	7
H. TSUBONE, A. SUZUKI, T. ICHINOSE and H. ODA	
2. Effect of Nitrogen Dioxide Exposure on Arterial Blood pH, PaCO ₂ , PaO ₂ in Rats	19
A. SUZUKI, H. TSUBONE, T. ICHINOSE and H. ODA	
3. Effect of Nitrogen Dioxide of Forced Swimming Endurance in Mice	33
A. SUZUKI, T. ICHINOSE, H. TSUBONE and H. ODA	
4. Variations of Nitrite and Nitrate in the Blood of Mice Exposed to Nitrogen Dioxide	43
H. ODA, H. TSUBONE, A. SUZUKI and T. ICHINOSE	
5. Effect of Nitrogen Dioxide on Various Types of Cells Required for Primary Antibody Response	55
H. FUJIMAKI and F. SHIMIZU	
6. On Different Responses among Various Strain of Mice in Susceptibility to Nitrogen Dioxide Exposure and a Role of Enzymatic Protective System	61
T. ICHINOSE, H. ODA, A. SUZUKI, H. TSUBONE and M. SAGAI	
7. Lipid Peroxidation as Measured by Ethane Exhalation of Rats Exposed to Nitrogen Dioxide	77
M. SAGAI, T. ICHINOSE and H. ODA	
8. <i>In Vivo</i> Lipid Peroxidation and Serum Lipid Contents of Aging Rats	85
M. SAGAI and T. ICHINOSE	
9. Effect of Acute Nitrogen Dioxide Exposure on the Composition of Fatty Acids in Lung Lavage Phospholipids	101
T. KOBAYASHI and T. NOGUCHI	
10. Effect of Nitrogen Dioxide on Glycolipids of Rat Red Cell Membranes	109
K. KAYA and T. MIURA	
11. Changes of Fatty Acid Composition of Phospholipids in Rat Cell Membranes of Rats Exposed to Nitrogen Dioxide	117
K. KAYA and T. MIURA	
12. Effects of Nitrogen Dioxide on Enzyme Activities and Membrane-Bound Carbohydrate of Rat Red Blood Cells	125
K. MOCHITATE, T. MIURA and K. KAYA	
13. Control of Nitrogen Dioxide and Ozone Concentrations in Air Pollutants Exposure Chamber	133
S. MATSUMOTO, K. TERAOKA, S. TAKAHASHI, H. TAKAHASHI and I. AIGA	
Supplement	
Specifications and Constructions of Air Pollutants Exposure Chamber	

II. Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rats

1. Environmental Control	149
S. MATSUMOTO, K. FUJITA, A. SHIMIZU, H. KIMURA and H. TAKAHASHI	

2. Experimental Animals	159
H. TAKAHASHI, S. YAMAMOTO, T. ISHIMURA, S. TAKAHASHI and K. TERAO	
3. Morphological Observations	171
S. TAKENAKA, F. SHIMIZU, Y. YAMADA, H. HORIUCHI, T. IMAI, T. HARADA, H. KYONO and K. KAWAI	
4. Arterial Blood pH, PaCO ₂ and PaO ₂	229
A. SUZUKI, H. TSUBONE, T. ICHINOSE and H. ODA	
5. Blood Examinations	241
T. ICHINOSE, A. SUZUKI, H. TSUBONE and H. ODA	
6. Isozyme Profiles in Serum	253
T. MIURA and K. KAYA	
7. Glutathione Level in Lung and Blood	259
M. KAWADA	
8. Composition of Fatty Acid in Lung and Liver Phospholipids	275
T. KOBAYASHI	
Data Table 1-7. Organ Weight	285

研究の概要および今後の展望

Outline of Performed Researches and Future Projects

久保田憲太郎¹

Kentaro KUBOTA¹

昨年8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の実験的研究—昭和52/53年度研究報告”を本シリーズ第8号として発刊した。

今回は、従来の研究システムを踏襲し、専門領域別に特定のテーマを設けて行った研究の成果(I)と、動物実験棟に設置された低濃度長期用ガス暴露チャンバーを用い、NO₂濃度、0.04, 0.4, 4.0 ppmの27か月連続暴露の実験が完了したのでその結果(II)について、一部中間的なものを含めてとりまとめたものが本報告書である。

大気汚染物質の生体影響を研究する際に、実験動物の感受性に留意することが必要である。各種動物の感受性を比較する研究が、病理学的方法により昭和52年度より続けられてきた。これと並行してNO₂のラットへの影響を生理学的、生化学的方法によって検討する研究が行われた。前年度に比べて比較的低濃度の短期暴露実験でも、呼吸循環機能への影響が示唆され(I-1~3)、血液、血清の成分についても多様な変化がみられた(I-4, 8)。さらに新しい手法の発展に伴い、赤血球膜の糖脂質、リン脂質、酵素活性(I-10~12)、肺胞洗浄液中のリン脂質脂肪酸組成等(I-9)、肺の酵素活性、過酸化脂質(I-6)についても量的変動が観察された。さらに呼気分析によって生体影響を解析する方法が確立された(I-7)。

また以上の観点とは異なる研究としては生体防御反応への影響が検討され、NO₂急性、亜急性暴露がマウスの液性抗体産生能に影響を及ぼすことが観察された(I-5)。一方、大気複合汚染ガス暴露チャンバーにおけるNO₂、O₃の濃度制御に関する研究も行われ、動物のふん尿に由来するNH₃(アンモニア)存在下のNO₂の測定方式の確立がなされた(I-13)。

低濃度長期暴露実験はSPFラットを用い、NO₂: 0.04, 0.4, 4.0 ppmの濃度で、動物実験棟内

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, Head, Basic Medical Sciences
Division, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

に設置された低濃度用暴露チャンバー3基と対照群用には透過空気のみを送るチャンバー1基を用い、昭和52年7月から昭和54年10月まで27か月にわたり連続暴露を行った。温度、湿度およびNO₂濃度は設定値の±10%の範囲内に全期間中80~90%以上が含まれ、ほぼ満足すべき制御下で研究が遂行出来た(II-1)。供試動物についても18~27か月の間の自然発生腫瘍等による自然死以外には感染症を疑うような例はなく、体重の変化も各チャンバー間に差が認められなかった(II-2)。病理学的検索は主として肺について光学的顕微鏡、電子顕微鏡(走査型、透過型)を用いる記述形態学的観察と、Weibel法、あるいはポイント法による肺胞壁厚を評価する計量形態学的手法を併用して解析した。4 ppm群では9か月で呼吸器の形態学的変化が明らかで18、27か月と進行して行くが肺気腫の発生はみられない。0.4 ppmでは病変の進行は緩徐であるが、27か月後には軽度な変化がみられた。0.04 ppmでは、全実験期間を通じて光顕的には特記すべき病変は観察されなかった(II-3)。

血液生理学的検索では、動脈血のpH、ガス分析では無麻酔、自発呼吸においても、麻酔下人工呼吸時においても、0.4 ppmと4 ppm 9か月間暴露で、対照群と比較し、PaO₂の有意な低下が認められた(II-4)、さらに血液、血清成分の臨床検査的検索では検査項目の多くのものに多様な変化が観察されたが、その意味づけにはより詳細な検討が必要であると考えられる(II-5)。次に暴露動物の血清アイソザイム成分の解析(II-6)では、クレアチンホスフォキナーゼI型活性は4 ppm 9か月群で増加するが、0.4 ppmでは9、18か月共に低下し、アルカリ性フォスファターゼ活性中のI II型成分は4 ppmの9、18か月では低下が認められた。

血液および肺のSH化合物の変動を調べた結果、血液中の非タンパク性SH (NPSH)、還元型グルタチオン (GSH) は9か月までは変化がないが、4 ppm 18、27か月では両者共減少がみられた。一方肺では、NPSH、GSH共に4 ppm群のみ全暴露期間を通じて増加の傾向がみられた(II-7)。肺の表面活性物質として知られるリン脂質のNO₂に対する反応を脂肪酸組成の面から追跡した。その結果、肺の脂肪酸組成中最も多いパルミチン酸は、0.04 ppm、0.4 ppm 27か月群を除く、それぞれのNO₂濃度でも9、18、27か月いずれも増加の傾向がみられた。4 ppmではミリスチン酸、ステアリン酸、リノール酸に減少傾向、オレイン酸に増加の傾向がみられた。さらに代謝調節に重要な役割を演ずる肝臓の脂肪酸構成の分析、老化に伴う変化も検討された(II-8)。

以上NO₂長期暴露のラットに及ぼす影響に関する実験成績から、NO₂濃度の上昇と暴露時間の延長にしたがって反応が強くなる傾向があること、27か月暴露では十分な検体数を得ることはできなかったが、たとえば病理学的知見では4 ppmの場合18~27か月の間に肺胞上皮の修復、間質の浮腫の減退等が観察された。これらの現象は単に暴露時間の延長によるものか、動物の加齢による変化であるかは現在の段階では不明である。

長期暴露実験に関して、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り、老化現象の解明に関する論文は本報告書のI-8, II-8等に見られるが、この生理性状の面における変化と暴露動物の反応との差を、新しい検索法を開拓しつつ検討することが急務であると考えている。

既に第2回目の慢性影響実験としてNO₂の最高濃度0.4ppm 18か月間のシリーズが開始されている。

今回はNO₂単一暴露実験の成果を主として報告したがO₃単一暴露実験もすでに開始されており、さらに、NO₂とO₃の複合暴露による生体影響の比較検討を病理、免疫、生理、生化学等各分野を網羅して系統的、総合的に解析する予定である。

研究発表

(講演)

- 1) 堀内博人(慈恵医大)・本多芳男(慈恵医大)・竹中参二・久保田憲太郎: NO₂のハムスター、ラットの、マウスの鼻粘膜に及ぼす影響——5日連続暴露の病理変化。第80回日本耳鼻咽喉科学会、東京。(54.5)
- 2) 鈴木 明・市瀬孝道: 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、札幌。(54.8)
- 3) 河田明治・鈴木 明・久保田憲太郎: NO₂暴露がラット肺のSH化合物に及ぼす影響。日本薬学会第99年会、札幌。(54.8)
- 4) 嵯峨井勝・久保田憲太郎: 高濃度NO₂に暴露されたラットの生存時間に対する薬物代謝誘導剤の影響について。日本薬学会第99年会、札幌。(54.8)
- 5) 嵯峨井勝・A.L. Tappel(カリフォルニア大): 脂質過酸化の新しい測定法としての呼気ガス分析法。第3回日本過酸化脂質研究会、大阪。(54.10)
- 6) 藤巻秀和: NO₂急性暴露の第一次抗体産生能に及ぼす影響。第20回大気汚染学会、神戸。(54.11)
- 7) 鈴木 明・市瀬孝道・久保田憲太郎: NO₂ガス暴露がマウスの運動能力に及ぼす影響。第20回大気汚染学会、神戸。(54.11)
- 8) 嵯峨井勝・久保田憲太郎: NO₂暴露による赤血球と肺のAntioxidant系酵素活性の変化とin vivoの脂質過酸化。第20回大気汚染学会、神戸。(54.11)
- 9) 小林隆弘・浜野吉政(日立那珂工場・応技センター)・百面鬼秀子(日立那珂工場・応技センター): NO₂の急性暴露ラット血清における遊離アミノ酸組成の変化。第20回大気汚染学会、神戸。(54.11)
- 10) 小林隆弘・久保田憲太郎・野口 忠(上智大)・菊野正隆(上智大): NO₂急性暴露ラットにおける肺・肝リン脂質の脂肪酸組成変化。第20回大気汚染学会、神戸。(54.11)
- 11) 竹中参二・清水不二雄・久保田憲太郎・河合清之(産医研): NO₂のゴールデン・ハムスターに対する亜急性影響—トレランスとの関連について。第20回大気汚染学会、神戸。(54.11)

- 12)竹中参二：大気汚染ガスに対する各種実験動物の感受性 (1)肺水腫と種属差。第8回大気汚染生体影響の実験的研究懇話会，神戸。(54.11)
- 13)持立克身・三浦 卓・彼谷邦光・久保田憲太郎：肺のエネルギー代謝に及ぼす二酸化窒素の影響。第50回日本衛生学会総会，大阪。(55.4)
- 14)三浦 卓・持立克身・彼谷邦光・久保田憲太郎：NO₂暴露による赤血球膜酵素と糖質の変動。第50回日本衛生学会総会，大阪。(55.4)
- 15)彼谷邦光・三浦 卓・久保田憲太郎：NO₂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。第50回日本衛生学会総会，大阪。(55.4)
- 16)鈴木 明・市瀬孝道・局 博一・織田 肇・久保田憲太郎：NO₂暴露ラットにおける心拍数，呼吸数の変動について。第50回日本衛生学会総会，大阪。(55.4)
- 17)織田 肇・鈴木 明・局 博一・久保田憲太郎：NO₂暴露マウス血中のNitrite及びNitrate。第50回日本衛生学会総会，大阪。(55.4)
- 18)河田明治・久保田憲太郎：NO₂暴露 (4週間) がラット肺SH化合物に及ぼす影響。日本薬学会第100年会，東京。(55.4)
- 19)米谷民雄・鈴木和夫・西川雅高 (計測技術部) 久保田憲太郎：NO₂の高濃度急性暴露によるラット血清及び肺中の金属含量の変化。日本薬学会第100年会，東京。(55.4)
- 20)小林隆弘：NO₂急性暴露ラット血清における遊離アミノ酸量の変化(II)。第7回毒作用研究会，大阪。(55.6)

(印刷)

- 1)久保田憲太郎 (1979)：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—研究の概要と今後の展望。国立公害研究所研究報告，第8号，1-5。
- 2)竹中参二・堀内博人 (慈恵医大) 清水不二雄 (1979)：二酸化窒素急性暴露におけるゴールデンハムスターの高感受性。国立公害研究所研究報告，第8号，7-25。
- 3)堀内博人 (慈恵医大)・本多芳男 (慈恵医大)・竹中参二 (1979)：ゴールデンハムスターの鼻腔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，27-49。
- 4)鈴木 明・市瀬孝道 (1979)：二酸化窒素暴露が呼吸数，心拍数等に及ぼす影響。国立公害研究所研究報告，第8号，51-60。
- 5)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，61-69。
- 6)市瀬孝道・鈴木 明・高橋 弘 (技術部) (1979)：ラットの血液性状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，71-89。
- 7)河田明治 (1979)：ラットの肺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。
- 8)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.
- 9) 嵯峨井勝 (1979) : 致死濃度の二酸化窒素に暴露したラットの生存時間に対する酵素誘導薬物の影響。国立公害研究所研究報告，第8号，127—133.
- 10) 嵯峨井勝・白石不二雄・河田明治 : 肺をよび赤血球の 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.
- 11) 嵯峨井勝・有川由紀子 (1979) : 血清および肺の脂質成分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，149—163.
- 12) 彼谷邦光・三浦卓 (1979) : ラットの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.
- 13) 彼谷邦光・三浦卓 (1979) : 薄層クロマトグラフィーによるリン脂質組成の直接定量法。国立公害研究所研究報告，第8号，187—194.
- 14) 市瀬孝道・鈴木明・彼谷邦光・三浦卓 (1979) : ラットの血清アイソザイムパターン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，195—205.
- 15) 寺尾恵治 (予研・筑波霊長類センター) 高橋弘 (技術部) (1979) : ラットの性周期に及ぼす二酸化窒素低濃度連続暴露の影響。国立公害研究所研究報告，第8号，207—213.
- 16) 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.
- 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 Sciences, 27, 731-738.
- 18) 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. Lipids, (in press).
- 19) Morgan, C. J., M. Sagai and A. L. Tappel (1980) : Respiratory pentane : A measure of *in vivo* lipid peroxidation applied to rats fed diets varying in polyunsaturated fats, vitamin E, and selenium and exposed to nitrogen dioxide. Toxicol. Lett., 6, 251-256.
- 20) Fujimaki, H. and F. Shimizu (1980) : Effects of acute exposure to nitrogen dioxide on primary antibody response. Arch. Environ. Health., (in press).
- 21) Kobayashi, T., T. Noguchi, M. Kikuno and K. Kubota : Effect of acute nitrogen dioxide exposure on the composition of fatty acids in lung and liver phospholipids. Toxicol. Lett., 6, 149-156.
- 22) Kobayashi, T., Y. Hamano and H. Domeki (1980) : Effect of acute nitrogen dioxide exposure on the free amino acids of rat serum. Toxicol. Lett., 6, 157-162.

I-1

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

Cardiac Responses in Rats Exposed to Nitrogen Dioxide

局 博一¹・鈴木 明¹・市瀬孝道¹・織田 肇¹

Hirokazu TSUBONE¹, Akira SUZUKI¹, Takamichi ICHINOSE¹
and Hajime ODA¹

要 旨

10~40ppmのNO₂を無麻酔ラットに3時間暴露し、循環機能の変化を知るために、心電図および動脈血圧を記録した。20ppm以上の濃度で暴露開始後80分以内に心拍数は著明に減少した。この心拍数の減少は暴露の終了時まで持続した。この間心電図には房室ブロックから成る不整脈が頻繁に出現するとともに、心拍数の減少にほぼ平行して血圧は低下した。硫酸アトロピンの投与または左右の頸部迷走神経の切断により、上述した徐脈および不整脈はほぼ完全に消失することから、高濃度のNO₂暴露によって生じる不整脈ないし徐脈は迷走神経の興奮作用に起因することが明らかになった。

Abstract

The electrocardiogram (ECG) and arterial blood pressure in adult male rats were recorded under the unanesthetized conditions during the exposure to NO₂ at 10, 20, 30 and 40 ppm for 3 hours in order to elucidate the responses of circulatory function.

The heart rate markedly decreased within 80 minutes of the exposure at the

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116番2

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

concentrations above 20 ppm. The reduced heart rate continued during the following exposure time. The arrhythmias consisted of atrioventricular blocks (including the second A-V block), associated with a fall of arterial blood pressure, were observed in ECG records. The ECG abnormalities apparently disappeared by the administration of atropine sulfate or the surgical transection of bilateral cervical vagi.

It was concluded that the arrhythmias during the exposure of NO₂ at high concentrations were accelerated by the vagal activity.

はじめに

10ppm以上といった高濃度のNO₂ガスを動物に一定時間暴露した場合、生体の様々な器官ないし機能に比較的明瞭な変化をもたらすことが予想され、とくに呼吸器の病理組織像や呼吸機能に関する所見をはじめとして、各種の代謝機能および血液成分の変化等についても各方面から活発な研究報告が出され論議が展開されつつある。一方、NO₂暴露時の心臓を中心とした循環機能に与える影響に関しては、それがNO₂の第一次的標的器官でないことなどの理由によって、研究が著しく立ち遅れている事実は否めない。しかし山賀¹⁾らはNO₂の低濃度反復暴露によってウサギの心拍数に変動ないし不整の生じることをみており、NO₂暴露と循環機能の変化とが決して無関係でないことを裏づけるものとして注目される。一方、昨年度本報告で鈴木ら²⁾は高濃度のNO₂をラットに暴露した場合、呼吸数の増加とともに心拍数の減少が起こることを見い出している。今回は心電図記録に加えて薬物学的方法等を用いることにより、NO₂の循環機能への影響について一層詳細に検索を進めたものである。

方 法

NO₂暴露に際して使用した急性暴露装置、濃度測定器およびチャンバー条件については昨年度本報告²⁾で述べた通りである。供試動物には全実験を通じてウィスター系の雄ラット(12~16週令)を合計25匹用いた。

1. 心拍数の測定

NO₂暴露時の心拍数の経時的変化を把握するために、心電図記録を行った。暴露濃度は10, 20, 30および40ppmですべて3時間暴露とし、計12匹のラットを用いた。暴露および心電図記録に先立って2日前に麻酔(ネンブタール:30mg/kg腹注)下でラットの胸骨柄と剣状軟骨部位のそれぞれの皮下に銀線一球電極(Silver-ball electrode)を埋入縫合した。電極に接続したリード線は

ボディアース線も含めて計3本を頭上に集約し、各リード線の断端を合成樹脂製のソケットに固定し、記録時には入力ボックスに連なるリード線と連結できるようにした。心電図記録は暴露前約30分間と暴露開始後5分または10分間隔でおおよそ1分間ずつ記録した。心拍数を算出する際は、それぞれの記録時の10秒間に含まれる心電図波形上のR棘を計測した。なおこの実験ではラットはすべて無麻酔、自由姿勢下で暴露した。

2. 心電図と血圧の同時記録

心電図の出現状況をより詳細に吟味するために、標準肢誘導に基づく記録を行った。エナメル被覆銅線（先端の3mmはコーティングを除去）または皮下注射針を電極として用い、左右の前後肢の皮下に刺入した。誘導はI、II、IIIの全誘導を行ったが、波形の観察にあたってはP波の出現が比較的明瞭なII誘導を基本とした。また暴露時における血圧の変動および心拍動との関連を追求するために、上述した心電図記録とともに大腿動脈の血圧も同時に記録した。血圧記録にあたって、ポリエチレン製チューブ（外径1mm、長さ13cm）をあらかじめヘパリンを静注したラットの大腿動脈に挿入固定した。チューブ内は生理的食塩水で満たし、拡散型半導体圧力変換器（豊田工機製model PD-104）に接続した。血圧の読み取りは各脈波の平均圧を計測し、4秒間の記録の平均値を求めた。この実験では7匹のラットを使用し、心電図、血圧の施術および記録はすべて無麻酔、背位保定下で行い、暴露濃度と時間は30ppmまたは40ppmの3時間暴露とした。

3. 硫酸アトロピン投与実験と迷走神経切断実験

暴露時の自律神経系機能とりわけ迷走神経作用と心活動との関連性を明らかにする目的で、硫酸アトロピンの投与および迷走神経切断処置を行った。暴露中、後述する心電図異常がみられる時点で、硫酸アトロピン0.016~0.3mg/kgを皮下投与した。3匹のラットを使用し、暴露は40ppm、3時間暴露とし、腹位保定、無麻酔下で硫酸アトロピン投与前後における標準肢誘導の心電図記録を行った。迷走神経切断実験では切断部位を頸部迷走神経（Cervical Vagus）に定め、暴露前にあらかじめ頸部の腹側を切開したのち迷走神経幹を露出し、左側または右側のみの完全切断、もしくは両側を完全に切断後、ただちにチャンバー内に入れ、暴露を開始した。この実験では迷走神経の切断（とくに両側切断）により、切断後3後間以上経過すると、呼吸麻痺に陥ることもあるので、暴露時間は2時間とした。この実験では3匹のラットを使用し、暴露濃度は40ppmで、手術および暴露は無麻酔、背位保定下で行った。

以上述べた1~3の各実験において、心電図ないし血圧の増幅、記録は生体増幅器（ポリグラフ、三栄測器142システム）を用い、レクチグラフ（三栄測器、RECTIGRAPH-8S）で描記するか、またはブラウン管オシロスコープに描かせたものを連続撮影装置を用いて記録した。また一部の記録はデータレコーダー（TEAC、270A）に収録し、必要に応じて再現と解析を繰返したほか、心

拍間隔の解析（インターバルヒストグラム）等にはデータ処理装置（三栄測器，シグナルプロセッサ7T07A）を利用した。

結 果

10, 20, 30および40ppmのNO₂を無麻酔，無保定下のラットに3時間暴露した場合の心拍数の経時的变化について，典型的な例を図1に示した。10ppmでは暴露中心拍数の変動がみられるものの，暴露前値のレベル近くで増減を繰返すだけで，顕著な減少ないし増加は認められなかった。しかしながら，20ppm以上の暴露例ではいずれも暴露開始後一定時間（もっとも遅い場合で約80分）を経て心拍数は著明に減少し，暴露前値のおよそ25～60%の範囲を示しながら，暴露終了時まで持続した。

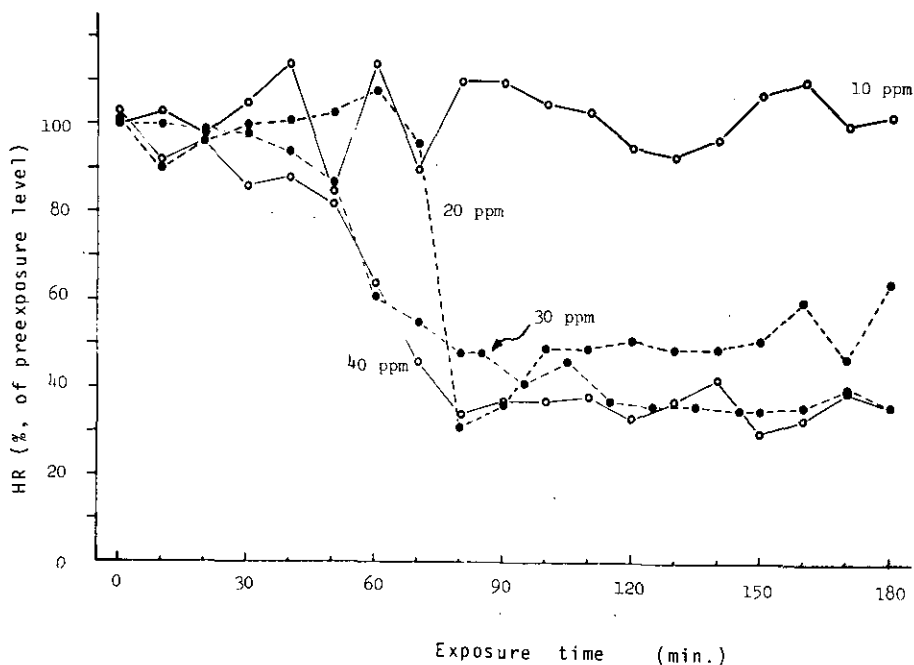


図 1 暴露中の心拍数の変化 (10~40ppm)

Fig. 1 Changes of heart rate(HR) during exposure to NO₂ at concentration of 10 to 40 ppm

心拍数の減少過程における心電図記録の実例 (40ppm) を図5に示す。暴露開始後約30分の記録では，心拍リズムは規則正しいが，暴露前の状態に比べて心拍動は明らかに緩慢になっており，いわゆる洞性徐脈を示した。心拍数の低下が最も激しくなる60分 (20ppmでは80分) 以降は心拍リズム

ムが極めて不規則となり、不整脈のパターンが明瞭に示されるようになった。この際図中に星印を符している部分では、P波が出現しているがQRS群が脱落しており、またその前後の心電図ではP波とQRS群が出現しているものの、QRS群の脱落に到る過程でPQ間隔が次第に延長しつつあることなどから、第Ⅱ度房室ブロック(Wenckebach周期)の所見と考えられた。この房室ブロックは暴露濃度や団体によって出現ひん度に若干の相違がみられたが、20ppm以上ではすべての暴露例に認められた。なおこれらの不整脈とは別に、P-P間隔の不整、P波の逆転ないし消失および期外収縮などの異常心電図も散見された。

心電図記録とともに大腿動脈からの血圧を記録した実例(30ppm)を図2に示した。暴露開始後血圧は徐々に下降し、計測した3例についていえば、暴露前の平均動脈血圧の範囲が125~140mmHgであるのに対し、暴露開始後60分では113~134mmHg、150分では97~115mmHgまで低下した。また脈波のリズムは暴露前では図2に示されるように規則正しく打たれているが、不整脈が出現する段階では心拍リズムの不整に同期して不規則に変動した。図3は心拍数の変化と血圧との関係を明らかにしたものであるが、心拍数の低下にほぼ平行して血圧が下降することが示された。

これまで述べてきた不整脈ないし徐脈の発現に、自律神経系とくに迷走神経の活動が関与しているかどうかを判定するために、硫酸アトロピンの投与試験を行った。図4は無麻酔、保定下で40ppm暴露中に、上述した不整脈が出現している各時点で硫酸アトロピンを投与した場合、投与前後の心拍数の変化をトレースしたものである。図からも明らかなように、暴露群に対する0.03mg/kg以上の投与では心拍数は投与後、速やかにかつ著明に増加した。また0.016mg/kgでは心拍数の積極的な増加はみられなかったが、下記のように心拍リズムは規則正しくなった。図4におけるCの例をとって投与前後の心電図記録の実例を図5に示した。70分の記録では不整脈が著明に出現しているが、硫酸アトロピン0.016mg/kgの投与で房室ブロック像は消失して心拍数は一様に規則正しくなり、さらに130分で0.16mg/kgを投与すると心拍間隔は著明に短縮し、心電図波形も暴露前の

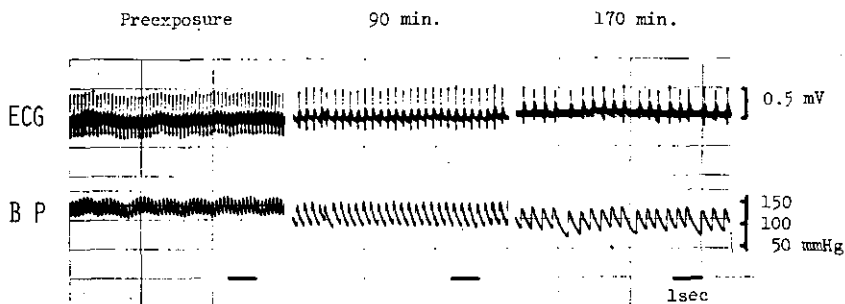


図 2 心電図と血圧の同時記録例(30ppm)

Fig. 2 Electrocardiogram(ECG) and arterial blood pressure(BP) in a rat exposed to NO_2 at concentration of 30 ppm.

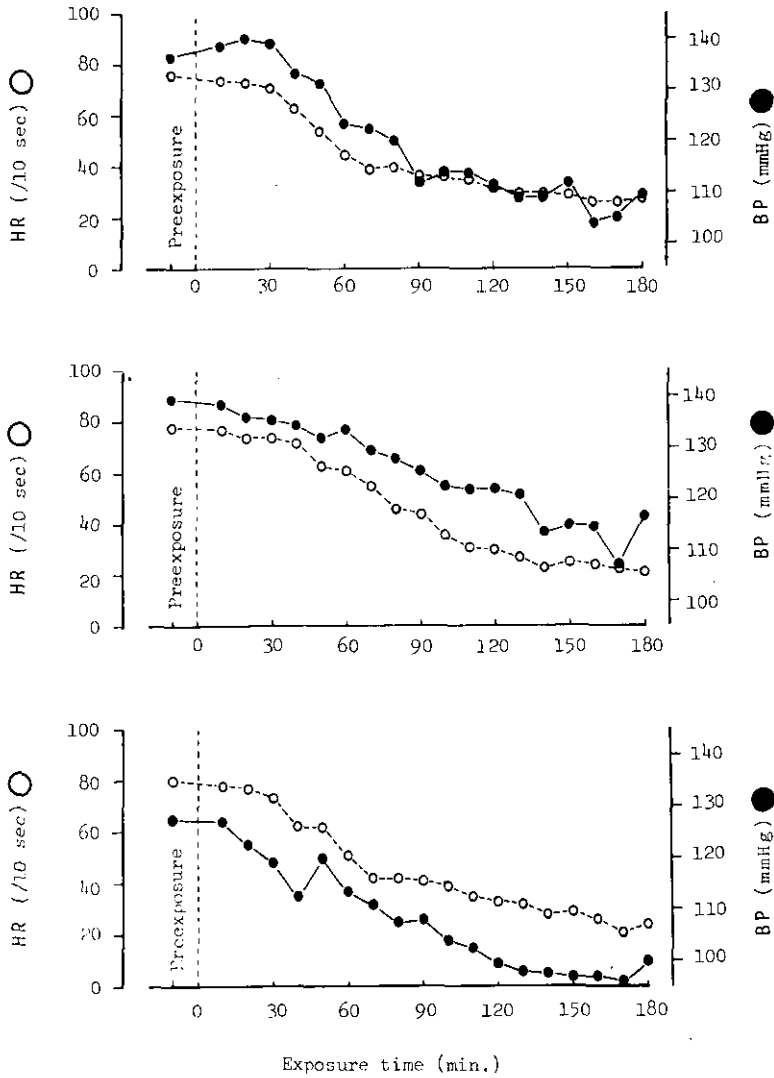


図 3 暴露中の心拍数と平均動脈血圧の推移 (30ppm)

Fig. 3 Changes of heart rate(HR) and mean arterial blood pressure(BP) in three rats exposed to NO_2 at concentration of 30 ppm.

パターンに近くなった。またこの例における心拍リズムの変化をより明確にするために、連続する100個の心拍について、R-R間隔のヒストグラムを解析したものを図6に示した。暴露開始後70分ではR-R間隔の分布域が広がるとともに、間隔の大きい部分と短い部分にそれぞれピークが形成される。しかし硫酸アトロピン0.016mg/kgを投与した直後の80分では分布域が狭くなって、心拍間隔が規則化していることが示される。その後120分ではピークがやや右へ移動して分布域は再び広がる傾向をみせているが、再度比較的多量の硫酸アトロピン(0.16mg/kg)を投与すると、

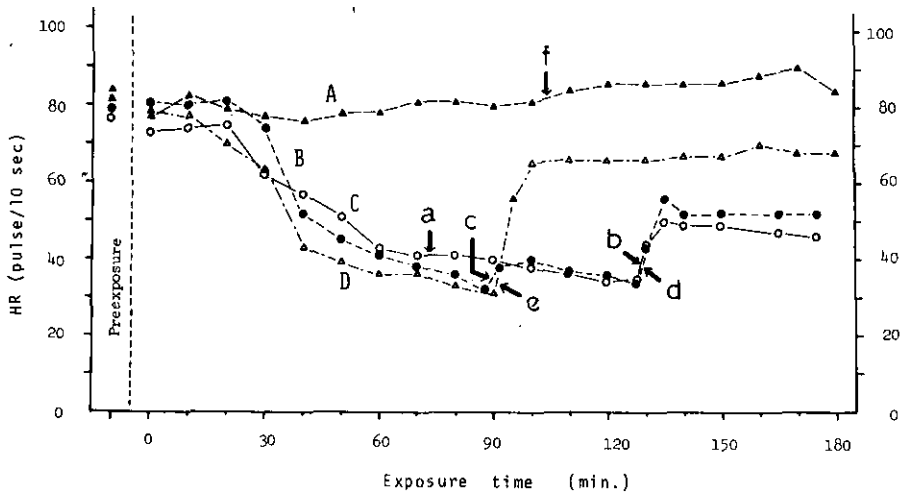


図 4 暴露中、硫酸アトロピンを投与したときの心拍数の変化 (40ppm)

Fig. 4 Effects of administraitons of various doses of atropine sulfate on heart rate(HR) during exposure to NO_2 of 40 ppm.

A : control, non-exposure, B, C and D : exposure group, The arrows a, b, c, d, e and f show the administrations of atropine sulfate of 0.016mg, 0.16mg, 0.03mg, 0.16mg, 0.3mg and 0.3mg per kg body weight, respectively.

135分のヒストグラムで明らかなように分布域は著しく狭くなり、R-R間隔値のピークがやや大きいことを除けば暴露前の分布パターンとほとんど差がない状態に戻った。これらの結果から硫酸アトロピン投与の効果は顕著であると判断された。

図7は頸部迷走神経の右側または左側、および両側を切断したラットについて、40ppm 2時間暴露を行い、心拍数の経時の変化をみたものである。迷走神経を両側とも切断した例(図中黒丸)では暴露中、軽度の心拍数低下がみられるにすぎないが、左側(図中三角)または右側(図中白丸)の迷走神経を切断した例では、比較的明瞭な心拍数の減少をきたし、その過程は無処置ラットに比べて大差がなかった。また両側切断例では不整脈はほとんど生じなかったのに対して、一側の切断例では房室ブロックから成る不整脈が明瞭に出現した。この実験から左側または右側のいずれか一方の迷走神経が作用していれば心拍数の減少および不整脈が起こりうる事が明らかになった。また NO_2 の暴露時に出現する徐脈、不整脈等の心電図異常の発現に迷走神経の興奮作用が少なからず関与していることを確認できた。

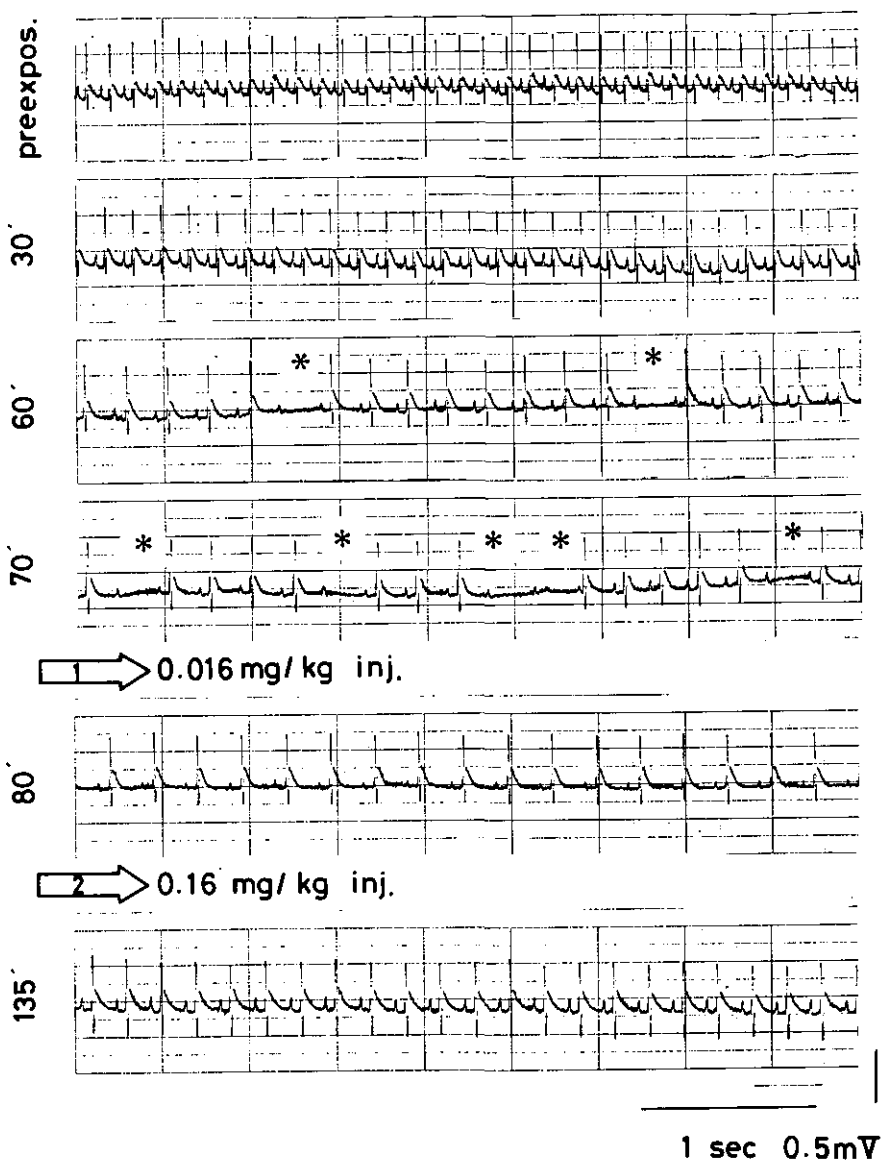


図 5 暴露中の心電図パターンと硫酸アトロピン投与の効果 (40ppm)

Fig. 5 Electrocardiographic patterns and effects of administration of atropine sulfate in the rat (C in Fig. 4) exposed to NO_2

The asterisks show the fallings of QRS complex in ECG records. The arrows 1 and 2 indicate the administrations of atropine sulfate at 73 and 130 minutes of exposure.

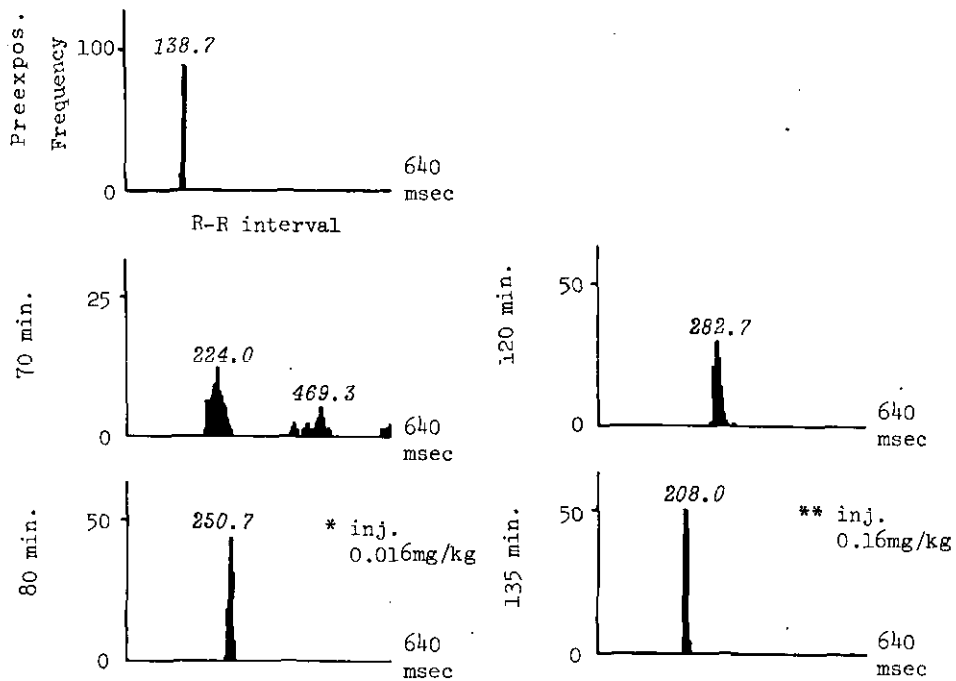


図 6 暴露中の心拍間隔 (R-R 間隔) のヒストグラムと硫酸アトロピン投与の効果 (40ppm)

Fig. 6 R-R interval histograms and effects of atropine sulfate administrations in the rat (C in Fig. 4) during exposure.

The asterisks indicate the administrations of atropine sulfate at 73 and 130 minutes of exposure.

考 察

40ppm, 60ppmないし80ppmの NO_2 を無麻酔, 自由姿勢下のラットに暴露すると心拍数が著明に減少することは, すでに前報で鈴木ら²⁾によって報告されている。今回の実験によって心拍数の減少はさらに低濃度のレベルすなわち20ppmでも起こることが明らかになった。10ppm, 3時間暴露では心拍数の著しい減少は生じなかったが, 暴露時間を3時間以上に延長した場合には同様な心拍数の減少が起こる可能性も考えられる。

心拍数の減少に伴って不整脈がひんぱんに出現したが, これは主に房室ブロック像を呈したことから, 心房一心室間に興奮の伝導障害が起こっていることが示唆される。一般に房室伝導障害は種々の原因, 疾患において出現する³⁾が, その背景要因として, 心筋の器質的障害によるもの, 冠循

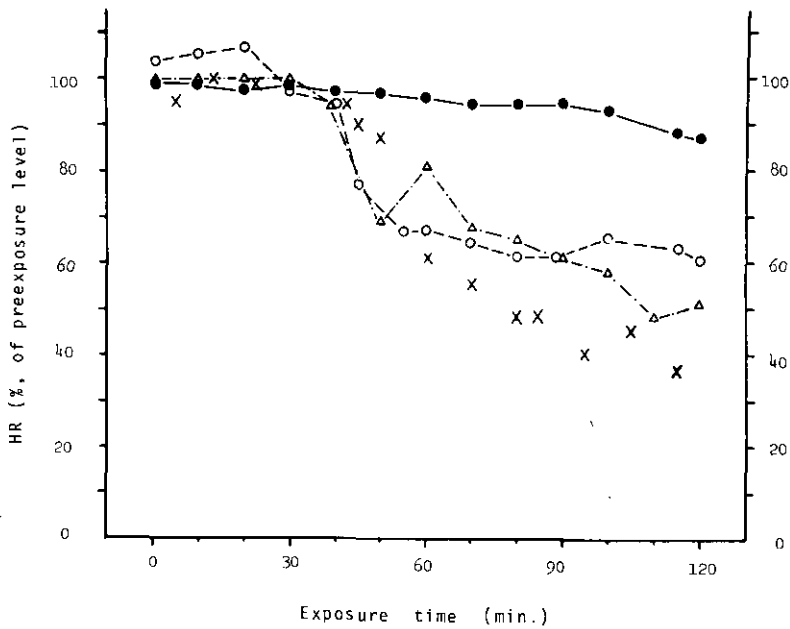


図 7 迷走神経切断による暴露中の心拍数の変化 (40ppm)

Fig. 7 Effects of vagotomy on heart rate(HR) during exposures.

- : transection of right cervical vagus.
- △: transection of left cervical vagus.
- : transection of bilateral cervical vagi.
- ×: intact(non-vagotomy)

環の不良による場合および迷走神経の興奮作用に由来する場合などが挙げられている。今回著者らの行った実験では副交感神経しゃ断薬の代表的薬物である硫酸アトロピンの微量投与によって、不整脈のほぼ完全な消失と心拍数の増加が認められ、また暴露時に頸部迷走神経を両側性に切断することによって、不整脈の出現を防ぐことができた。これらの実験成績から20ppm以上の高濃度NO₂暴露によって生じる不整脈ないし徐脈は迷走神経の興奮作用に起因するものと考えられた。また暴露期間中、心拍数の減少にほぼ比例して、動脈血圧は明瞭に低下したが、このことからNO₂暴露の影響は心臓のみにとどまらず、全身の循環機能障害を起こす可能性のあることも示唆される。

Taylor⁴⁾は低酸素下でフルオロカーボン-11 (fluorocarbon-11) を含むエーロゾルをウサギに暴露した結果不整脈(房室ブロック)と血圧下降が生じることを見出ししている。この研究では低酸素および暴露物質の心筋への直接作用が考えられている。一方、山賀ら¹⁾はNO₂の2~3ppmを1日5時間、週6日間、85日間反復暴露したウサギでガス暴露中に心拍数の増加、減少または心拍リズムの不整をみており、その現象の背景要因として、自律神経系機能の不安定が考えられるとしている。今回の著者らの行った実験とは動物種や暴露方法などの条件面で相互に異なっているが、NO₂の生体影響の一つとして、自律神経系機能の変調が存在する可能性は大きいように思われる。

現在のところラットの心電図に関する研究⁵⁾⁻⁹⁾はすでに少なからず報告されてきてはいるもの、それらは誘導法や波形の正常値についての検討にとどまっているものが多く、不整脈等の病的状態を十分に説明するだけの基礎的資料を提供するまでには至っていない。今後はラットの異常心電図に関して詳細かつ正確な分析を行い、情報量を多くする必要性が痛感される。また今回の研究では不整脈等の心機能異常をもたらす根本の原因は不明である。暴露中の血液のpHやPO₂, PCO₂の変動あるいは血中に生じた亜硝酸イオン、硝酸イオン等の有害物質、さらにはヒスタミン等の生理活性物質の変化等と心機能異常との関連性を明らかにすることが今後の課題の一つと思われる。

謝 辞

本研究に際し、貴重な助言を賜った東大農学部家畜労役生理研究室の沢崎坦教授に深甚なる謝意を表するとともに、菅野茂博士ほか同研究室の各位に心からお礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) 山賀岑郎・大森 薫・大屋敷萬幸・安倍和則・戸沢 隆・中野欣嗣・寺西文子 (1974): 低濃度二酸化窒素の反復暴露の影響. 日本公衛誌, 21, 382-394.
- 2) 鈴木 明・市瀬孝道 (1979): 二酸化窒素暴露が呼吸数, 心拍数等に及ぼす影響について. 国立公害研究所研究報告, 第8号, 51-60.
- 3) Goldman, M. J. (1979): Disturbances of atrioventricular conduction. In Clinical electrocardiography, LANGE Medical Publications, 229-244.
- 4) Taylor, G. J. (1975): Cardiac arrhythmias in hypoxic rabbits during aerosol propellant inhalation. Arch. Environ. Health, 30, 349-352.
- 5) Angelakos, E. T. and P. Bernardini (1963): Frequency components and positional changes in electrocardiogram of the adult rats. J. Appl. Physiol., 18, 261-263.
- 6) 山下政三 (1970): シロネズミの心電図. 心臓, 2, 141-152.
- 7) Beinfield, W. H. and D. Lehr (1956): Advantages of ventral position in recording electrocardiogram of the rat. J. Appl. Physiol., 9, 153-156.
- 8) Beinfield, W. H. and D. Lehr (1968): QRS-T variations in the rat electrocardiogram. Amer. J. Physiol., 214, 197-204.
- 9) Fraser, R. S., C. Harley and T. Wiley (1967): Electrocardiogram in the normal rat. J. Appl. Physiol., 23, 401-402.

I-2

二酸化窒素暴露がラットの動脈血pHa, PaCO₂ および PaO₂ に及ぼす影響

Effect of Nitrogen Dioxide Exposure on Arterial Blood pHa, PaCO₂, PaO₂ in Rats

鈴木 明¹・局 博一¹・市瀬孝道¹・織田 肇¹

Akira SUZUKI¹, Hirokazu TSUBONE¹, Takamichi ICHINOSE¹
and Hajime ODA¹

要 旨

NO₂の生体影響を評価するための一手段として、0.4ppm, 1.3ppmおよび4ppmのNO₂を1, 3か月間ラットに暴露し、心拍数、呼吸数、血液pHa, PaCO₂, PaO₂等について検討した。

心拍数は、1か月間暴露では1.3ppm群で対照群に比較して有意な減少を、4ppm群で減少傾向を示し、3か月暴露では、4ppm群で増加傾向を示した。呼吸数は1か月間暴露では対照群と暴露群の間に有意な変化を認めなかったが、3か月間暴露では、0.4, 1.3および4ppm群で増加傾向を示した。無麻酔時の動脈血PaO₂は4ppm, 3か月間暴露で有意に低下した。また毎分110回の人工呼吸下では、4ppm3か月間暴露で、PaCO₂が増加傾向をPaO₂が低下傾向を示した。人工呼吸数の増加に伴うPaO₂の増加率は、4ppm3か月間暴露群で有意に減少した。

Abstract

Rats were exposed continuously for 1 and 3 months to nitrogen dioxide at the concentration of 0.4, 1.3 and 4 ppm. Heart rate (HR), respiratory rate (RR), arterial blood pHa, oxygen tension (PaO₂) and carbon dioxide tension (PaCO₂) of the

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

control and exposed animals were examined. HR of rats exposed to 1.3 ppm for 1 month was significantly decreased from the control, however, HR of rats exposed to 4 ppm NO₂ for 3 months was increased. RR of rats exposed to 0.4, 1.3 and 4 ppm NO₂ for 3 months were increased. PaO₂ of unanesthetized rats exposed to 4 ppm NO₂ for 3 months was significantly lower. When the anesthetized rats were ventilated with mechanical respirator at 110 rpm, PaCO₂ of the rats exposed to 4 ppm NO₂ for 3 months was increased and PaO₂ of that was decreased. An increase of PaO₂ associated with an increase of mechanical respiratory rate was significantly lower in rats exposed to 4 ppm NO₂ for 3 months.

はじめに

数ppm以上のNO₂は肺内末梢部まで深く入り、呼吸器内での摂取率が高い¹⁾ことから、呼吸器の器質的^{2-4, 13)}機能的変化⁵⁻⁸⁾を引き起こすことが知られている。一方、呼吸器の主要な機能は、生体内の代謝に必要な酸素を外界から摂取し、代謝の結果生じた炭酸ガスを体外に排出することであり、ヒトのような高等動物では、必要とする酸素のすべてを外界から摂取し、生じた炭酸ガスの99%以上を呼吸によって体外に排出している。したがって、NO₂暴露によって呼吸器が障害を受けた場合肺におけるガス交換機能に変化が及び、肺と各種組織を循環する血液のpH、ガス成分の変化を引き起こすことが推測される。

Nieding⁹⁻¹²⁾らは5 ppmのNO₂に15分間暴露したヒトで、Freeman^{ら¹³⁾}は平均15ppmのNO₂を生涯暴露したラットで、Davidson¹⁴⁾は8~12ppmのNO₂を3~4か月間暴露した家兎で、それぞれ動脈血酸素分圧(PaO₂)の減少を報告したが、ヒトでの報告は短時間暴露であり、また実験動物での報告は8 ppm以上の比較的高濃度の暴露である。したがって0.4~4 ppmという比較的低濃度のNO₂を1~3か月間暴露した動物について、血液pH、ガス成分を検討した報告はほとんどない。

そこで、NO₂の生体への影響を評価するための一手段として、NO₂暴露動物の動脈血pHa、血液ガス分圧、呼吸数、心拍数および呼吸曲線図について検討した。

方 法

16~17週令のWistar系雄ラット(JCL:Wistar)を使用し、0.4, 1.3および4 ppmのNO₂を1, 3か月間暴露した。NO₂ガスの代わりに清浄空気で暴露した動物群を対照とした。チャンバーは本研究所の動物棟5階に設置されている中動物用慢性暴露チャンバー²⁰⁾を使用し、暴露期間中、チャンバー内温度を25±2℃、湿度を55±10%に設定した。

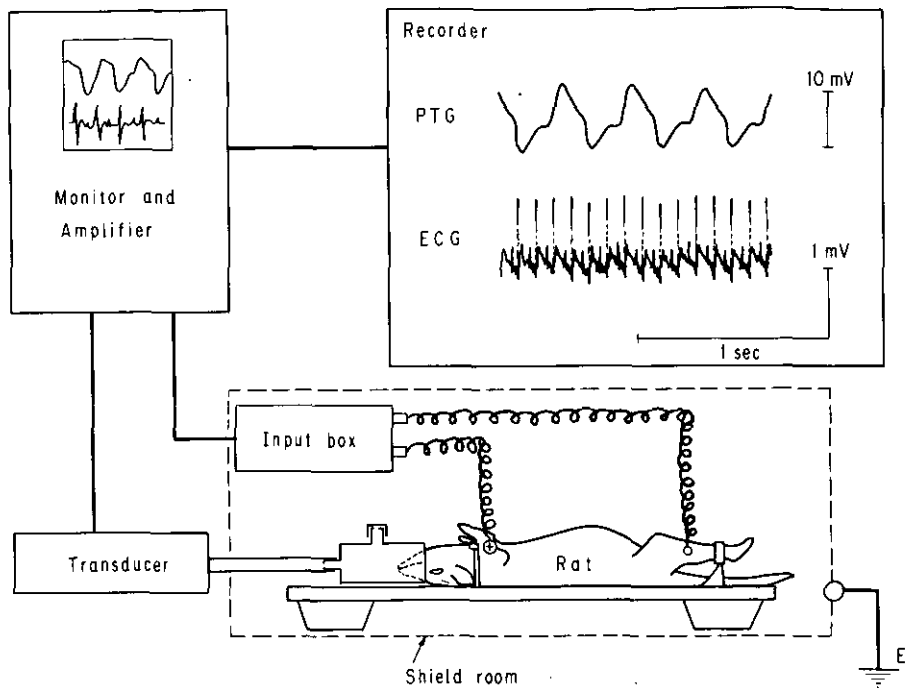


図 1 PTGと心電図 (ECG) の測定方法の模式図

Fig. 1 Schematic illustration of recording method for pneumotachogram and electrocardiogram

暴露後1および3か月目に動物を暴露チャンバーから各群6匹ずつ取り出し、無麻酔保定下で、図1に示すように、標準肢II誘導により心電図 (Electrocardiogram, ECGと略す) とマスク法により自発呼吸時の呼吸曲線 (Pneumotachogram, PTGと略す) を記録し、心拍数および呼吸数を算出した。また、図2に示すようにECGとPTGの測定後直ちに Lidcaine hydrochloride (xylocaine, 1%), 0.1mlの局所麻酔下で、大腿部を切開し、Heparin sodium (1,000unit/ml) を0.2ml大腿静脈から注入した。2~3分後に反対側大腿動脈から内面をヘパリン処理したディスポーザブル注射器で0.2~0.3mlの動脈血を採血し、無麻酔時の動脈血pHa, 炭酸ガス分圧 (PaCO_2), 酸素分圧 (PaO_2) の測定 (CORNING175) に供した。その後、Pentobarbital sodium (Nembutal[®] 50mg/ml) 30mg/kgBWを大腿静脈から注入し被検動物を麻酔した。麻酔後頸部を2~3cm切開し、気管と右側総頸動脈を露出させ、気管には人工呼吸器 (シナノ製作所, SN480-7) に接続したY字状の気管カニューレを挿入し、総頸動脈には内面をヘパリン処理した1ml用ディスポーザブル注射器を接続した。気管カニューレの挿入とほぼ同時に、正中線に沿って腹部に約1~1.5cmの小孔を開け、その小孔を介して横隔膜を切開し、直ちに人工呼吸を開始した。Y字状気管カニューレの加

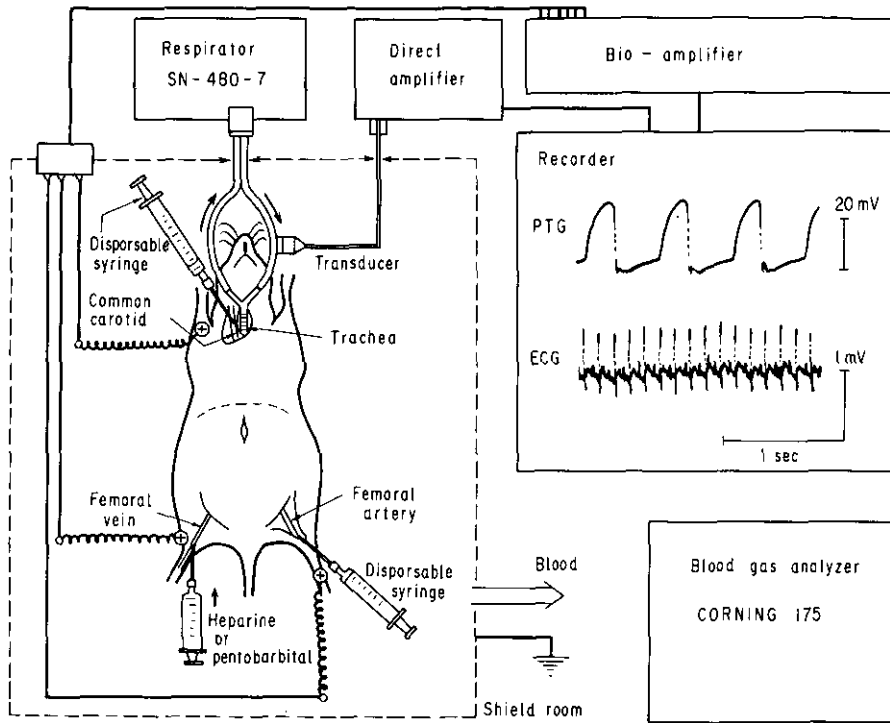


図 2 実験装置と方法の模式図

Fig. 2 Schematic illustration of experimental apparatus and methods

圧側（新鮮空気供給側）に小型圧トランスジューサー（拡散型半導体圧変換器, TOYODA, PD-104, 0.3F）を取り付け人工呼吸に伴う圧変化を記録し、人工呼吸数の確認と、最大圧振幅（上端と下端の差）を計測し、ここでは便宜的に人工呼吸時のPTGとした。

ところで、血液のpH, PCO_2 , PO_2 は肺換気量と密接な関係を持ち、肺換気量の変化は血液pH, PCO_2 , PO_2 を変化させる^{15, 16)}ことが知られている。同程度の重さのラットを用いた実験の結果、毎分30回の人工呼吸数では、 pHa は 7.22 ± 0.03 , $PaCO_2$ は 54.3 ± 2.4 mmHg, PaO_2 は 45.9 ± 10.1 mmHgであり、毎分110回になると、 pHa は 7.46 ± 0.05 , $PaCO_2$ は 30.1 ± 3.3 mmHg, PaO_2 は 71.0 ± 19.4 mmHgに変化し、人工呼吸数の増加に伴って、 pHa , PaO_2 の増加と、 $PaCO_2$ の減少が明瞭であったので、本実験では、換気量の増加に伴う動脈血 pHa , $PaCO_2$ および PaO_2 の変化を検討するために、人工呼吸数を毎分30回, 70回, 110回に変化させて測定した。また、人工呼吸数を変更して血液ガスの変化が安定してくる4分後に頸動脈から0.2~0.3mlずつ採血した。

PTGおよびECGの増幅およびモニター、記録には多用途生体増幅器（ポリグラフ, 三栄測器, 142システムおよび180システム）とデーターレコーダー（TEAC, 270A）を適宜組合せて使用し、必要に応じて再生と解析をくり返した。

結 果

1. 心拍数の変化

実測した10秒間当たりの心拍数の変化を図3に示した。1か月間暴露では1.3ppm群で対照群の約96% ($P < 0.01$)と有意な減少を、4ppm群で約95%と減少傾向を示した。3か月間暴露では、対照群と暴露群の間に有意な変化を認めなかったが、4ppm群で対照群の約104%と増加傾向を観察した。

2. 呼吸数の変化

PTGの記録から算出した10秒当たりの呼吸数の変化を図4に示した。1か月間暴露では、対照群と暴露群の間に大きな変化は認められなかったが、3か月間暴露では0.4ppm群で対照群の約115% ($P < 0.1$)、1.3ppm群で約108%、4ppm群で約109%と増加傾向を示した。

3. 無麻酔時のpHa, PaCO₂, PaO₂の変化

無麻酔下における動脈血pHa, PaCO₂およびPaO₂の測定結果を図5に示した。1か月間暴露では、pHaとPaO₂は対照群と暴露群との間に大きな変化を認めなかったが、PaCO₂は1.3ppm群で対照群の約103%、4ppm群で約105%と増加傾向を示した。3か月間暴露では、pHaとPaCO₂に大きな変化を認めなかったが、PaO₂は0.4ppm群で対照群の約98%、1.3ppm群で約98%、4ppm群で約90% ($P < 0.01$)に減少した。

4. 人工呼吸時における動脈血pHa, PaCO₂, PaO₂の変化

Pentobarbital sodium麻酔下で人工呼吸をさせ、人工呼吸数を毎分30, 70および110回とした時のpHa, PCO₂, PaO₂の測定結果を図6—図8に示した。動脈血pHaは図6に示すように、1か月間暴露では、毎分30回の1.3ppm群で有意な増加 ($P < 0.05$)を、毎分70回の0.4ppm群および毎分110回の0.4ppm群と1.3ppm群で有意な減少 ($P < 0.05$)を示した。3か月間暴露では、各呼吸数で対照群と暴露群との間に有意な変化を認めなかった。動脈血PaCO₂の変化を図7に示した。PaCO₂は1か月間暴露では毎分30回で対照群と暴露群の間に有意な変化を認めなかったが、70回では0.4ppm群 ($P < 0.05$)と1.3ppm群 ($P < 0.05$)で、110回では0.4ppm群 ($P < 0.01$)と1.3ppm群 ($P < 0.01$)で有意に増加した。3か月間暴露では、毎分30回と70回の0.4ppm群で有意に減少し、70回と110回の4ppm群で増加傾向を示した。PaO₂の変化を図8に示した。PaO₂は、1か月間暴露では70回の0.4ppm群で有意 ($P < 0.05$)に減少した。3か月間暴露では、対照群と暴露群との間に有意な変化を認めなかったが、110回ではNO₂濃度の増加に伴うPaO₂の減少傾向を認めた。

次に、人工呼吸数の増加に対応した血液pHa, PaCO₂およびPaO₂の変化を検討するために、毎分30回の測定値に対する毎分70回、110回の測定値の百分率を計算し図9—図11に示した。pHaは、

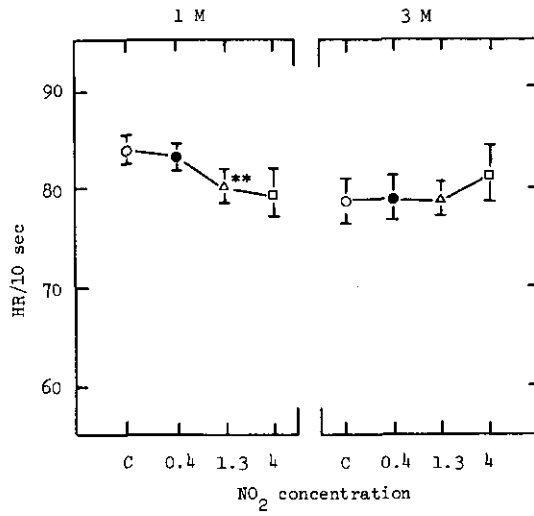


図 3 心拍数 (HR) に及ぼす影響

Fig. 3 Effect of NO₂ exposure on heart rate in rats ($m \pm SD$, $n = 6$,
*** $P < 0.01$)

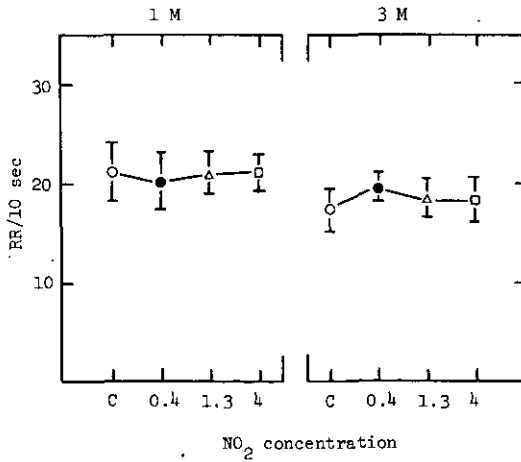


図 4 呼吸数 (RR) に及ぼす影響

Fig. 4 Effect of NO₂ exposure on respiratory rate in rats ($m \pm SD$, $n = 6$)

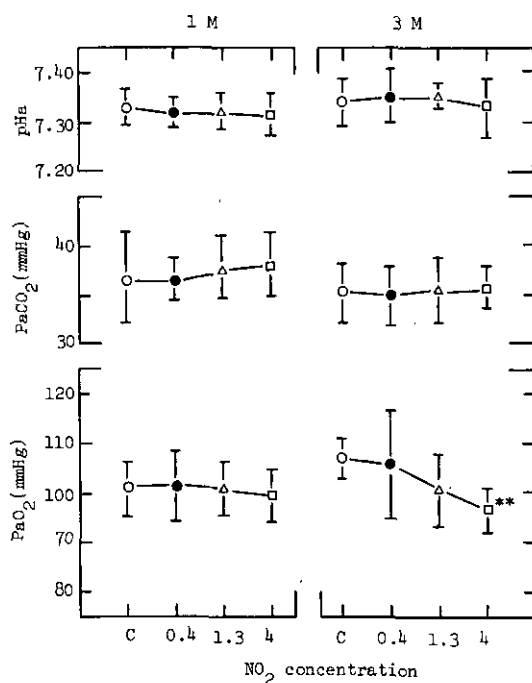


図 5 動脈血pHa, PaCO₂, PaO₂に及ぼす影響

Fig. 5 Effect of NO₂ exposure on arterial blood pHa, PaCO₂ and PaO₂ in unanesthetized rats ($m \pm SD$, $n = 6$, ** $P < 0.01$)

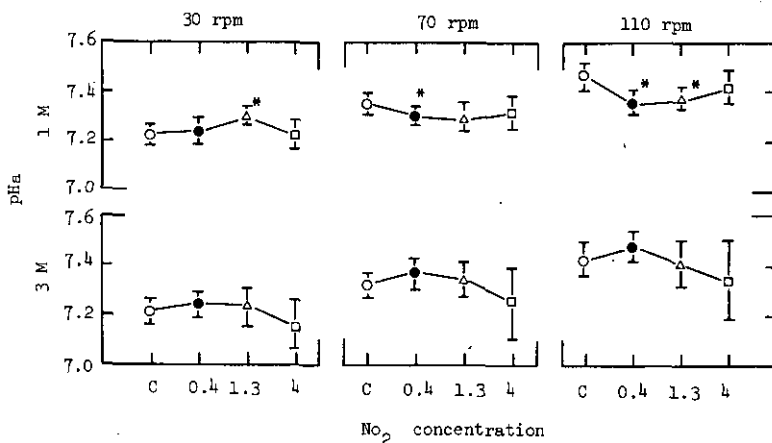


図 6 動脈血pHaに及ぼす影響 (麻醉下, 人工呼吸)

Fig. 6 Effect of NO₂ on arterial blood pHa, in anesthetized rats (ventilated with mechanical respirator, $m \pm SD$, $n = 6$, * $P < 0.05$)

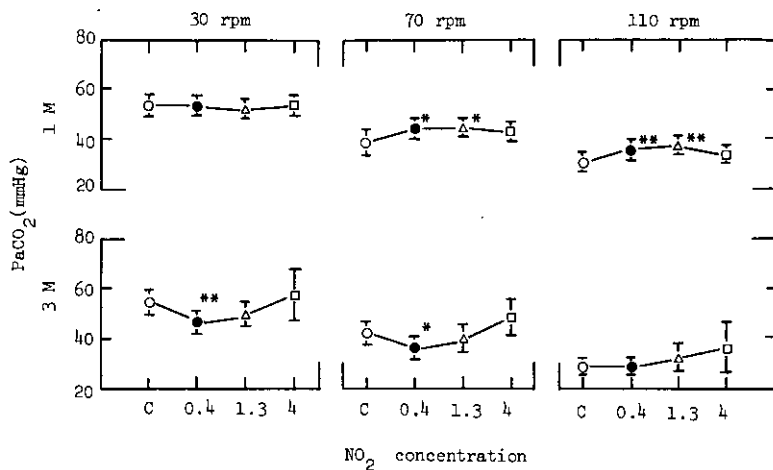


図 7 動脈血PaCO₂に及ぼす影響 (麻醉下, 人工呼吸)

Fig. 7 Effect of NO₂ on arterial blood PaCO₂ in anesthetized rats (ventilated with mechanical respirator, $m \pm SD$, $n = 6$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)

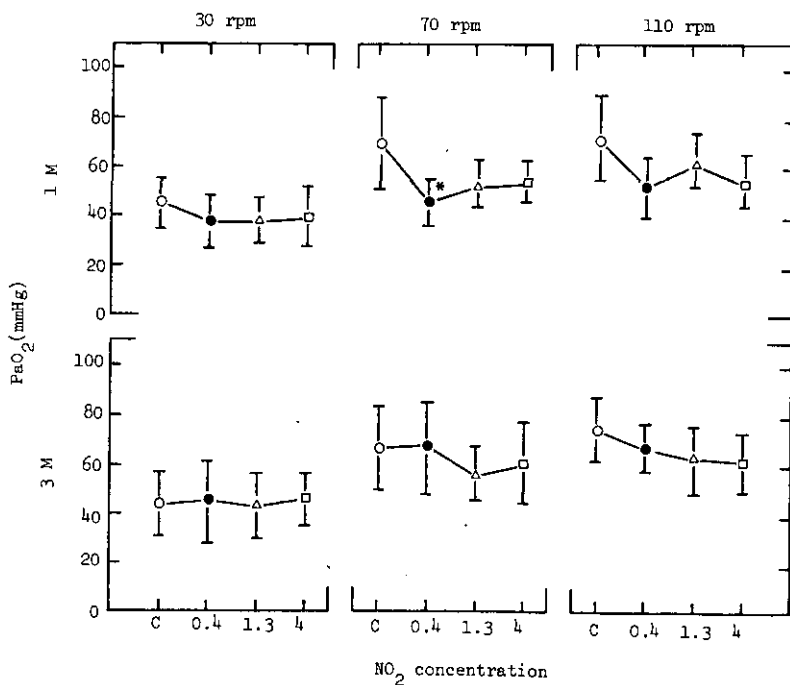


図 8 動脈血PaO₂に及ぼす影響 (麻醉下, 人工呼吸)

Fig. 8 Effect of NO₂ on arterial blood PaO₂ in anesthetized rats (ventilated with mechanical respirator, $m \pm SD$, $n = 6$, $*P < 0.05$)

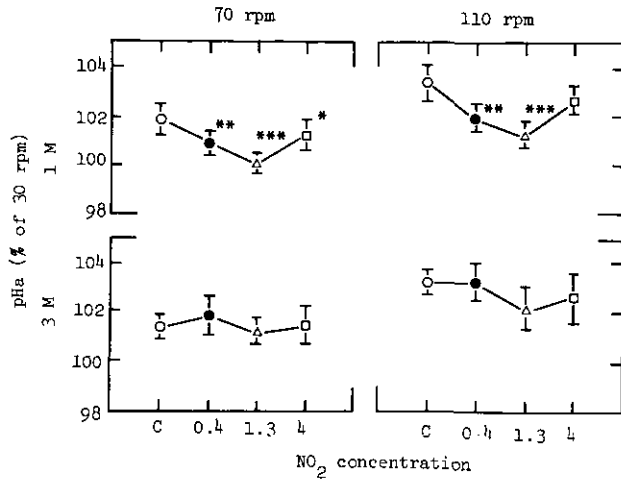


図 9 動脈血pHaの変化 (30回/分時に対する%で示す)

Fig. 9 Change of arterial blood pH_a (% of 30rpm, $m \pm SD$, $n = 6$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

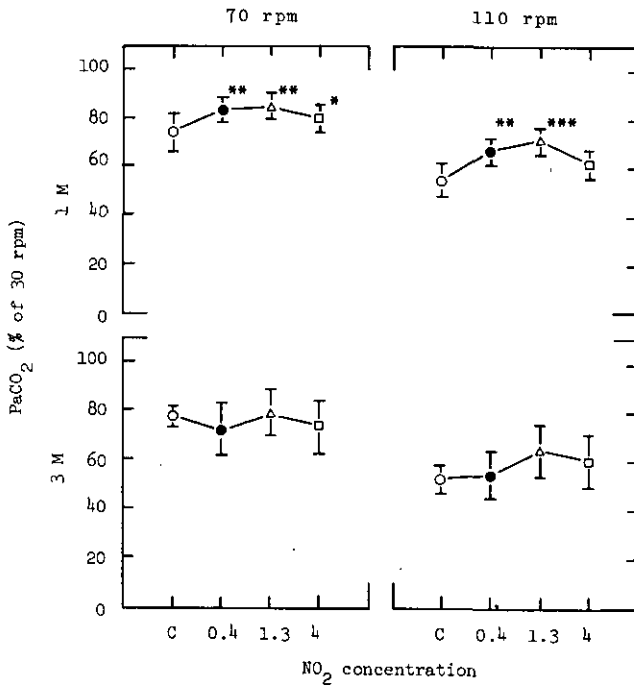


図 10 動脈血PaCO₂の変化 (30回/分時に対する%で示す)

Fig. 10 Change of arterial blood PaCO₂ (% of 30rpm, $m \pm SD$, $n = 6$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

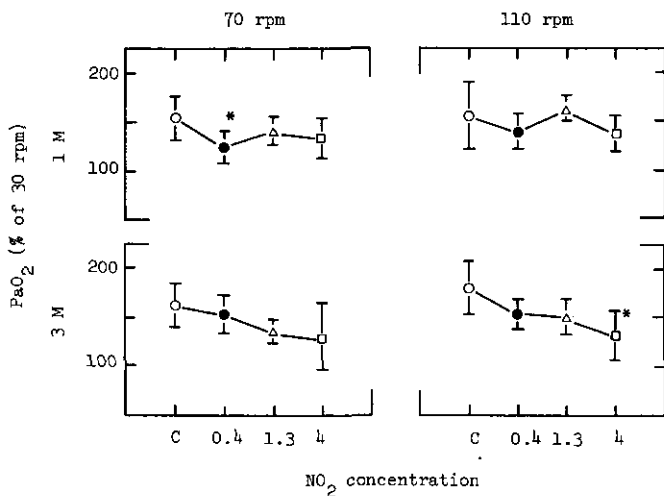


図 11 動脈血PaO₂の変化 (30回/分時に対する%で示す)

Fig. 11 Change of arterial blood PaO₂ (% of 30rpm, $m \pm SD$, $n=6$, $*P < 0.05$)

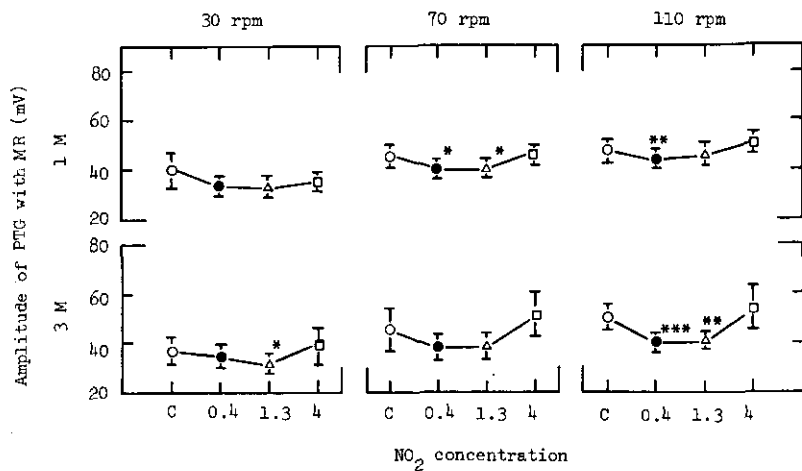


図 12 人工呼吸時におけるPTGの振幅の変化

Fig. 12 Change of amplitude in PTG of rats ventilated with mechanical respirator ($m \pm SD$, $n=6$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)

9 図に示すように、1 か月間暴露の70回で、対照群と比較して、0.4ppm群 ($P < 0.01$)、1.3ppm群 ($P < 0.001$) および 4 ppm群 ($P < 0.05$) で、110回で0.4ppm群 ($P < 0.01$) と1.3ppm ($P < 0.001$) で有意に減少した。3 か月間暴露ではpHaは70回、110回ともに、暴露群と対照の間に有意な変化を認めなかった。PaCO₂は図10に示すように、1 か月間暴露では毎分70回の0.4ppm群 ($P < 0.01$)、1.3ppm群 ($P < 0.01$) および 4 ppm ($P < 0.05$) で、110回の0.4ppm群 ($P < 0.01$) と1.3ppm群 ($P < 0.001$) で有意に増加した。3 か月間暴露では、対照群と暴露群の間に有意な変化を認めなかったが、110回の1.3ppm群と 4 ppm群で増加傾向 ($P < 0.1$) を示した。PaO₂は図11に示すように、1 か月間暴露では70回の0.4ppm暴露群で有意に減少し、3 か月間暴露では70回の1.3ppm群 ($P < 0.1$) と 4 ppmで減少傾向を、110回の 4 ppmで有意な減少 ($P < 0.05$) を示した。

5. 人工呼吸時におけるPTGの振幅の変化

毎分30、70および110回の人工呼吸を行った時の新鮮空気供給側（加圧側）で測定したPTGの振幅の計測結果を図12に示した。振幅は、1 か月間暴露では毎分70回の0.4ppm群 ($P < 0.05$) と1.3 ppm群 ($P < 0.05$) で、また110回の0.4ppm群 ($P < 0.01$) で有意に減少した。3 か月間暴露では、30回の1.3ppm群 ($P < 0.05$) で、110回の0.4ppm群 ($P < 0.001$) と1.3ppm ($P < 0.01$) で有意に減少し、70回の4 ppm群で対照群の約123%、110回ppmで約110%と増加傾向を示した。

考 察

NO₂暴露が血液の酸素分圧を低下させることがヒトおよび実験動物ですでに報告されている。Niedingら⁹⁻¹²⁾は 5 ppmのNO₂を15分暴露したヒトで、Freemanら¹³⁾は平均15ppmのNO₂を生涯暴露したラットで、そしてDavidsonら¹⁴⁾は 8-12ppm 3-4 か月暴露の家兎で、それぞれ動脈血 PaO₂の減少を報告したが、無麻酔ラットでは、より低濃度の 4 ppm 3 か月間暴露でも顕著なPaO₂の減少を起すことが明らかとなった。また、Freemanら¹³⁾は組織学的に肺胞ガス交換面積の減少を観察したことからこれをPaO₂の低下の一因と推定し、また、Davidsonら¹⁴⁾は、肺の換気力学的結果から不均一な気道障害を伴う換気拡散比の異常にPaO₂の減少の原因を求めた。また、Stephenら³⁾は 2 ppmNO₂を 2年間暴露したラットで肺胞壁の再被覆および空気-血液バリアーの肥厚を、Furiosiら²¹⁾は 2 ± 1 ppmのNO₂14か月間暴露のサルで細気管支上皮の肥大を、RejtharとRejthar²²⁾は 5 ± 1 ppmのNO₂ 7週間暴露ラットで細気管支内腔狭窄化がみられることを報告した。これらの事実はその障害の程度によっては、動脈血PaO₂を低下させる原因になると考えることができる。

ところで、動脈血pHa、血液ガスは、体位、精神状態、呼吸数などによって変化する¹⁷⁾ので、麻酔下で人工呼吸器を使用して換気量を一定にさせるとともに精神的变化を取り除くことを試みた。同一人工呼吸数における血液pH、ガス分析値を比較すると、対照群と比較して暴露群ではpHa、PaCO₂、

PaO₂に多様な変動が観察された。特に、110回の人工呼吸時の3か月間暴露で、暴露濃度の増加に伴うPaCO₂増加とPaO₂の減少が観察されたことは、NO₂暴露群では呼吸器でのガス交換が障害されていることを示唆するものであるが、体内の他の臓器の酸素消費の増加に起因^{18,19)}していることも否定できない。しかしながら、換気量とPaO₂、PaCO₂およびpHaの間には一定の関係が存在し^{15,16)}一般に正常な個体では換気量の増加に伴いPaO₂とpHaが増加し、PaCO₂が減少すると考えられ、同一個体ではその変化の程度は肺でのガス交換機能に大きく依存すると考えることができる。そこで、人工呼吸数30回に対する70回、110回の変化率を計算し、対照群と暴露群を比較すると、1か月間暴露群でpHaの有意な減少あるいは減少傾向を、PaCO₂の有意な増加あるいは傾向を認めたが、PaO₂に顕著な変化を認めなかった。また3か月間暴露では、pHaに著変を認めなかったが、110回/30回時に、PaCO₂の軽度の増加と、PaO₂の低下が認められた。このことは、1か月間暴露群と3か月間暴露群では、NO₂の血液に対する反応の仕方が異なることを示唆した。また、人工呼吸時のPTGの振幅の増加は、同一呼吸数では、振幅の大きい方が気道での空気抵抗が大きいと考えることができるので、4 ppm群では、対照群と比較して肺換気量が減少している可能性がある。逆に、0.4 ppmと1.3 ppm群では肺換気量が増加していることを示唆し、理由については不明であるが、この変化は、人工呼吸時のpHa PaCO₂、PaO₂の変化と一致すると考えられた。

一方、山林¹⁵⁾は、動脈血PaO₂の低下がみられるハイポキセミア (hypoxemia, 低酸素血症) を 1) 肺胞気酸素分圧 (PA O₂) の低下によるハイポキセミアと 2) 肺胞気酸素分圧は正常でハイポキセミアがみられるものに大別し、さらに、2) を a) 右→左シャントと b) 拡散障害に分け、肺拡散能力を左右する因子として①肺胞膜、肺毛細管壁の透過性、②ガス交換面積、③肺血管容量、④血液のヘモグロビン濃度を挙げた。比較的高濃度のNO₂暴露は肺水腫、肺気腫あるいは肺胞壁の肥厚³⁾などによって、肺毛細管壁のガス透過性の変化およびガス交換面積の減少¹³⁾を、さらに細気管支上皮の肥大による狭窄^{21,22)}を起こすことが病理学的に確認されているが、本実験のような0.4、1.3、4 ppmのNO₂ 3か月間暴露で上述のような形態変化が起こるか現在のところ明確ではない。また、肺機能検査で検出できないような軽度な変化の場合でも、血液ガスに異常が起こる¹⁷⁾ことを考慮すると、本実験の結果の解釈は慎重にする必要がある。いずれにしても、本実験の結果、4 ppmのNO₂ 3か月間暴露はラットにハイポキセミアの状態を起こしうるものと考えることができた。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、動物の飼育・管理およびNO₂ガスの供給・制御に多大の御助力を頂いた本研究所技術部および日本クレアの各位に衷心より感謝の意を表する。

引用文献

- 1) Wagner, H. M. (1970): Absorption von NO und NO₂ in MIK- und MAK-Konzentrationen bei der Inhalation. Staub-Reinhalt. Luft, 30, 380—381.
- 2) Stephens, R. J., G. Freeman, S. C. Crane and N. J. Furioli (1971): Ultrastructural changes in the terminal bronchiola of the rat during continuous low-level exposure to nitrogen dioxide. Exp-Mol. Path., 14, 1—19.
- 3) 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.
- 4) 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. *ibid.*, 17, 181—192.
- 5) Arner, E. C. and R. H. Rhoades (1973): Long-term nitrogen dioxide exposure. *ibid.*, 26, 156—160.
- 6) 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.
- 7) 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. Am. Ind. Hyg. Ass. J., 25, 246—253.
- 8) Freeman, G., N. J. Furioli and G. B. Haydon (1966): Effects of continuous exposure of 0.8 ppm NO₂ on respiration of rats. Arch. Environ. Health, 13, 454—456.
- 9) Nieding, G. von, H. Krekeler, U. Smidt and K. Muysers (1970): Akute Wirkung von 5 ppm NO₂ auf die Lungen- und Kreislauf-funktion des gesunden Menschen. Int. Arch. Arbeitmed., 27, 234—243.
- 10) Nieing, G. von, M. Wagner, H. Krekeler, U. Smidt and K. Muysers (1971): Grenzwertbestimmung der akuten NO₂-Wirkung auf den respiratorischen Gasaustausch und die Atemwegwiderstände des chronisch lungekranken Menschen. *ibid.* 27, 338—348.
- 11) Nieding, G. von and H. M. Wagner (1975): Vergleich der Wirkung von Stickstoffdioxid und Stickstoffmonoxid auf die Lungenfunktion des Menschen, Staub-Reinhalt. Luft, 35, 175—178.
- 12) 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.
- 13) Freeman, G., S. C. Crane, N. J. Furioli, R. J. Stephens, M. J. Evans and W. D. Moore (1972): Covert reduction in ventilatory surface in rats during prolonged exposure to subacute nitrogen dioxide. Am. Rev. Respir. Dis., 106, 563—579.

- 14) Davidson, J. T., G. A. Lilington, G. B. Haydon and K. Wasserman (1967): Physiologic changes in the lungs of rabbits continuously exposed to nitrogen dioxide. *ibid*, 95, 790—796.
- 15) 山林 一(1979): ハイポキシアとその成因. 代謝, 16, 2019—2025.
- 16) 本田良行(1979): 呼吸調節の生理. 総合臨床, 28, 1820—1830.
- 17) 白石 透・宮沢正治(1979): 血液ガス分析. 臨床検査, 23, 464—470.
- 18) Buckley R. D. and O. J. Balchum (1965): Acute and chronic exposures to nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, 10, 220—223.
- 19) Buckley R. D. and C. G. Loosli (1969): Effects of nitrogen dioxide inhalation on germfree mouse lung. *Arch. Environ. Health*, 18, 588—595.
- 20) 高橋 弘・相賀一郎・松本 茂・寺島貞二郎・額田正己(1977): 国立公害研究所動物用長期ガス暴露チャンバーの構造と性能について. 日本生物環境調節学会, 第15会大会講演要旨集, 35—36.
- 21) Furiosi, N. J., S. C. Crane and G. Freeman (1973): Mixed sodium chloride aerosol and nitrogen dioxide in air. Biological effects on monkeys and rats. *Arch. Environ. Health*, 27, 405—408.
- 22) Rejthar, L. and A. Rejthar (1975): Histological changes of terminal bronchioles in rats during exposure to nitrogen dioxide. *Exp. Path.*, 10, 245—250.

I-3

マウスの遊泳持続時間に及ぼす二酸化窒素の影響

Effect of Nitrogen Dioxide on Forced Swimming Endurance in Mice

鈴木 明¹・市瀬孝道¹・局 博一¹・織田 肇¹

Akira SUZUKI¹, Takamichi ICHINOSE¹, Hirokazu TSUBONE¹ and Hajime ODA¹

要 旨

NO₂の生体影響を評価するための一手段として、マウスに5, 10, 20, 40ppmのNO₂を24時間暴露し、遊泳持続時間 (FST), FSTの経日的推移, 血液中乳酸量の変化, 肺湿重量および肺水分含量について検討した。対照群と比較してFSTは10ppm以上の暴露群で有意に減少した。5 ppm暴露群のFSTは暴露直後には変化を認めなかったが, 暴露終了後1~4日目に有意な減少を認めた。5 ppm暴露群の血液中乳酸は, 遊泳負荷 (4分間) 直後および24時間後では, 対照群と比較して有意に増加した。肺湿重量は20, 40ppm暴露群で, 肺水分含量は10ppm以上の暴露群で有意に増加した。

Abstract

In order to evaluate the acute effect of NO₂ exposure on experimental animals, male mice were exposed to NO₂ at the concentration of 5, 10, 20 and 40 ppm for 24 hours, Forced swimming endurance time (FST), change of the FST during the post-exposure days, lactate content in blood, lung wet weight and lung water content were examined. The significant decrease in FST was observed in mice exposed to 10, 20 and 40 ppm, No significant difference from the controls was observed in FST of mice exposed to 5 ppm immediately after the exposure, while

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

remarked decrease in that was recognized during the first to fourth day of post-exposure. The significant increase in lactate in the blood of mice exposed to 5 ppm NO₂ was observed immediately and 24 hours after the swimming exercise, Lung wet weight in the mice exposed to 20 and 40 ppm NO₂, and lung water content at 10, 20 and 40 ppm exposure increased remarkably.

はじめに

Yokoyama¹⁾, Bruch²⁾ および Ichioka のモデル実験³⁾によって、NO₂は気道を介して肺内末梢部まで深く入ること、また呼吸器内での摂取率が高い⁴⁾ことが知られている。したがって、NO₂の第一次侵襲点が呼吸器であることは明確で、呼吸器の形態的あるいは機能的変化に関する報告^{5-9,19)}は比較的多い。一方、NO₂暴露によって動脈血酸素分圧が低下することが、ヒト¹⁰⁻¹³⁾および実験動物^{14, 15)}で報告されている。

一方、激しい運動時には、生体は、安静時に比較して、多量の酸素摂取を必要とする^{16, 17)}と言われている。したがって、生体内への酸素の摂取が呼吸器の器質的あるいは機能的変化によって阻害された場合には、その影響は運動持続能力の低下として現れるかもしれない。また、NO₂の影響が軽微で、安静時には認められないような場合、運動負荷を加えることによってその影響が顕在化してくることもあろう。

大気汚染と運動(行動)に関して、Wayne¹⁸⁾は、ロスアンジェルスのカロスカントリー・ランナーの記録とオキシダントスモッグ濃度間に有意な関係があることを証明した。また、動物実験では、Murphy⁵⁾はNO₂暴露マウスで自発走行運動量の減少を報告した。さらに、Tusler²⁰⁾は、NO₂暴露ラットの遊泳スピードの低下を報告した。いずれの報告も、暴露中に検索したものである。Campbell²¹⁾は、NO₂の暴露前後に測定し、暴露ラットの遊泳持続時間の減少を報告したが、暴露後に強制負荷を加え詳細に検討した報告はほとんどない。

NO₂の生体への影響を評価するための一手段として、NO₂暴露動物に遊泳負荷を加え、NO₂濃度と遊泳持続時間、暴露後の遊泳持続時間の経日の推移、血液中乳酸量の変化、肺湿重量および肺水分含量等について検討した。またNO₂暴露実験に入る前に(遊泳)負荷の大きさについて検討した。

方 法

15~17週令の雄マウス(JCL:ICR)を一群6~10匹として計150匹使用した。動物の平均体重は35.2g(範囲33.5g~37.6g)で対照群と暴露群との間に差がなかった。NO₂暴露時には水、エサを与えなかったが、その時以外は、一般上水と商用飼料で飼育した。NO₂の暴露は、濃度5, 10,

20, 40ppmで24時間とし、気積120ℓの急性暴露用チャンバーで行った。換気回数は毎時20回で、チャンバー内温度は 22 ± 1 ℃であった。NO₂の供給および排気には暴露実験装置（日本クレア、PT-300A）を使用し、チャンバー内のNO₂濃度はNO_x連続測定装置（ケミルミネッセンス法、モニターラボML-8440H）で測定した。

強制遊泳持続時間（Forced Swimming endurance Time, 以下FSTと略す）を、次に述べる方法で暴露終了直後から10日間にわたって、毎日同一時刻に測定した。被検動物の尾根部に体重比にして2.8~3.0%の鉛製のオモリを付け、水温 20 ± 1 ℃の水槽に入れた。水槽は直径24cm、深さ25cmの円形で、動物がつかまって休むことのないように内側面が平滑のものを用いた。動物が遊泳を開始してから遊泳を維持できなくなるまでの時間をストップ・ウォッチで正確に測定しFSTとした。なお遊泳停止時点の判定はCampbell²¹⁾の方法に従った。FSTとNO₂濃度との関係を検討する動物群（50匹）では、FST測定終了後直ちにエーテル麻酔下で心採血を行い、死後、肺を採取し、肺湿重量と乾重量を計測し、その差から肺水分含量を算出した。ここで乾重量とは105℃で10時間乾燥させた後の肺重量である。血液中乳酸の測定のため36匹を供した。5ppm暴露群と対照群をそれぞれ3群ずつ（1群6匹）に分け、第1群は遊泳負荷を加えないで、また他の2群のうち1群は4分間の強制遊泳直後に、残りの1群は24時間後に、エーテル麻酔下で心採血し、Gutman²²⁾の方法に従って血液中乳酸を測定した。試薬にはラクテート・UV・テスト（BMY）を用いた。

対照群と暴露群の平均値の統計的有意差の検定にはスチューデントの*t*検定を用い、 $p > 0.05$ の場合、有意差はないと判断した。

結 果

1. 負荷の大きさとFST

負荷の大きさはこの種の実験では重要な意味を持つ。すなわち、負荷が大きすぎると直ちに力つきて沈むし、逆に負荷が小さすぎると浮遊する時間が多くFSTを正確に測定することが困難なため測定誤差が大きくなる。そこで、本実験における適当な負荷を決定するために、負荷の大きさとFSTの関係について検討した。

図1に負荷（体重比に対する%）とFSTとの関係を示した。この図のY軸が対数で目盛られていることを考慮すると、負荷のわずかな変動でもFSTが大きく変化しうることが示唆された。ゆえに、本実験の場合には、負荷の変化範囲をできるだけ狭くするとともに、FST計測時の判定誤差、さらに負荷が2%以下では浮遊する個体があること等を考慮して、負荷として2.5~3.0%を選んだ。次に、ここで決定した負荷による動物の遊泳状態を検討するために最初のFST測定後、1時間目と4時間目にFSTを測定した。ここで、1時間目と4時間目の群は別の動物である。表1に示すように最初のFSTと1時間目および4時間目のFSTを比較すると、1時間目および4時間目のFSTは、

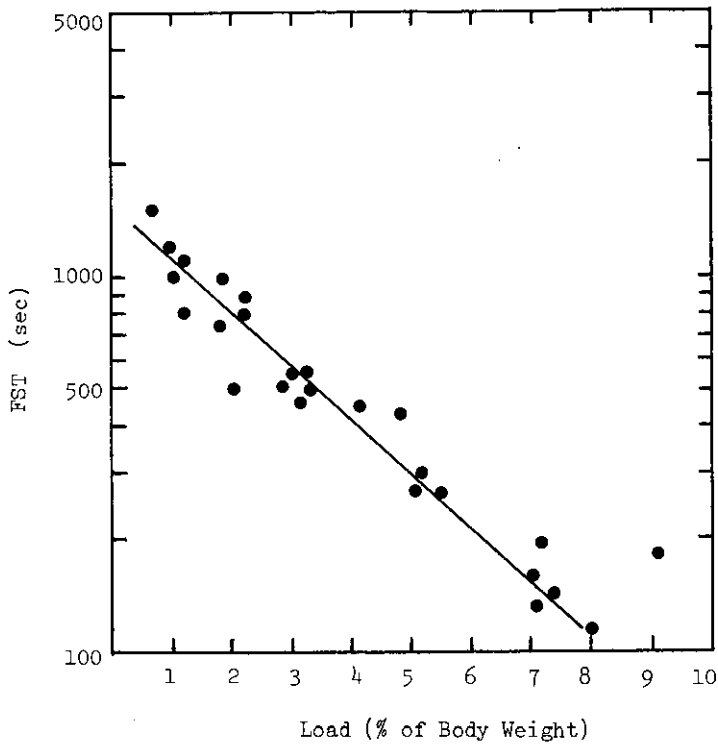


図 1 負荷の大きさと遊泳持続時間 (FST)

Fig. 1 Correlationship between forced swimming endurance time (FST) and loaded weight (% of body weight)

表 1 最初のFSTと、最初のFST測定後1, 4時間目のFSTの比較

Table 1. Comparison of 1st FST with that 1 and 4 hours after 1st (unit in sec)

1st FST	after 1st Exercise	
	1 hour	4 hours
624 ± 113	8 ± 3	
598 ± 101		10 ± 4

ともに最初のFSTの2%以下に減少した。従って、この負荷では、被検動物は最初の強制遊泳時に全力を出していると考えられた。以下、NO₂暴露のFST測定および強制遊泳(4分間)には、体重

比2.5~3.0%の負荷を使用することにした。

2. NO₂暴露濃度とFST

NO₂暴露濃度とFSTの関係を図2に示す。対照群のFSTと比較して、暴露群のFSTは、5 ppm群では有意差はなかったが対照群の約92%に減少し、10ppm群で約75%，20ppm群で約57%，40ppm群で29%といずれも有意 ($P < 0.01$) な減少を示した。

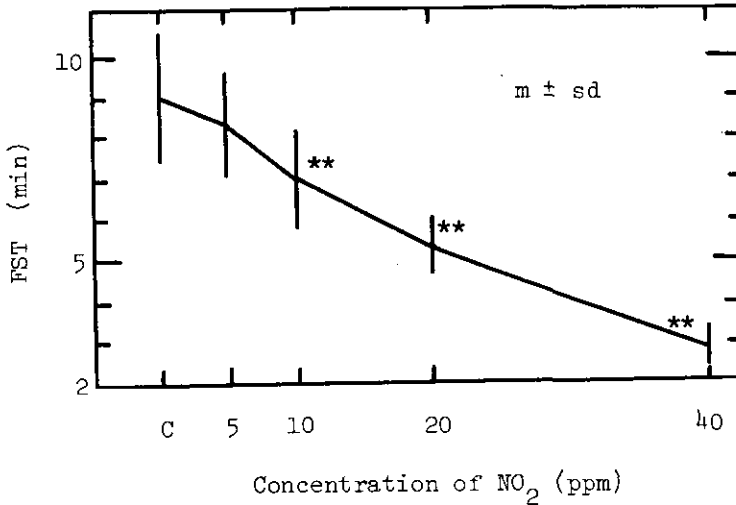


図 2 NO₂暴露濃度とFST

Fig. 2 Effect of NO₂ exposure on FST (Each point with bars represents mean \pm 1 SD of 10 subjects. C: Control, **: $P < 0.01$)

3. 経日的FSTの推移

対照群および5, 10, 20ppm暴露群について、暴露終了直後から10日間にわたって毎日同一時刻にFSTを測定した。その平均値の推移を図3に示した。

暴露群の平均FSTは、全観察期間を通して常に対照群の平均FSTより小さい値を示した。5 ppm暴露群のFSTは、対照群と比較し、暴露直後に有意な減少を認めなかったが、暴露終了1日目には対照群の約74% ($P < 0.05$)、2日目には約63% ($P < 0.001$)、3日目には約63% ($P < 0.001$)、4日目には約89% ($P < 0.05$)と有意な減少を示した。また、最初の対照群の平均FSTのレベルにもどるのに要する日数は、5 ppm群では暴露終了後5~6日、10ppm群では7~8日、20ppm群では9日以上であった。

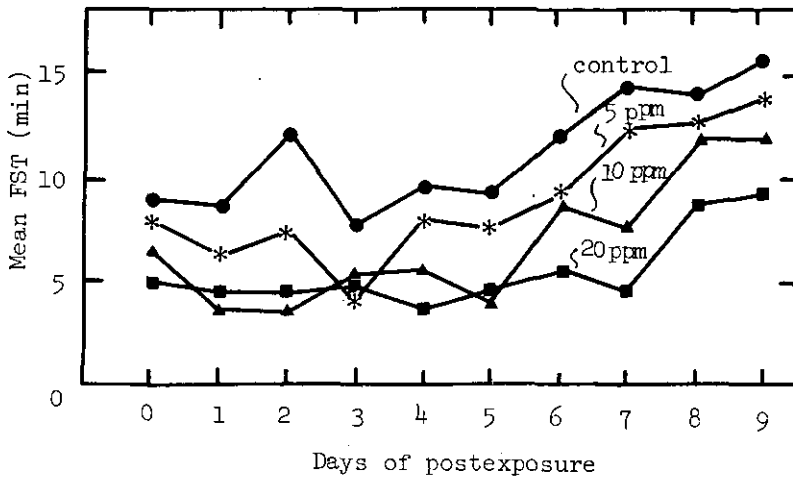


図 3 平均FSTの経日的推移

Fig. 3 Change of mean FST during postexposure days (Each point represents mean value of 10 subjects)

4. 血液中乳酸量の変化

対照群と5 ppm暴露群の遊泳負荷前、直後および24時間後の血液中乳酸の測定値を表2に示した。遊泳負荷を加えなかった群では、対照群と暴露群との間に有意な差が認められなかったが、遊泳負荷(4分間)直後および24時間後では有意に増加した。

表 2 血液中乳酸量の変化

Table 2. Lactate in blood of mice exposed to 5 ppm NO₂ immediately and 24 hours after exercise (Data are expressed as mean ± 1SD of 6 subjects, unit in mg/100ml, *: P < 0.05, **: P < 0.01)

	Unexercised group	Exercised group	
		Just after exercise	24h after exercise
Control	6.5 ± 0.5	8.2 ± 1.5	7.6 ± 1.7
Exposed	7.3 ± 1.6	11.4 ± 1.3	15.0 ± 3.0

5. 暴露濃度と肺湿重量および肺水分含量

肺湿重量および肺水分含量の測定結果を表3に示した。この表から明らかなように、対照群と比

較して、肺湿重量は20ppm群と40ppm群で、肺水分含量は10ppm以上の暴露群で有意に増加した。

表 3 NO₂暴露が肺湿重量および水分含量に及ぼす影響

Table 3. Effect of NO₂ exposure on lung wet weight and lung water content in mice (Data are expressed as mean \pm 1 SD of 5 subjects, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

	Control	NO ₂ concentration			
		5 ppm	10 ppm	20 ppm	40 ppm
Lung wet weight (mg)	190.2 \pm 15.2 (100%)	198.2 \pm 13.6 (104.2%)	204.6 \pm 18.8 (107.6%)	221.2 \pm 9.9* (116.3%)	388.0 \pm 78.5** (204.0%)
Water content (mg)	144.5 \pm 10.3 (100%)	153.3 \pm 11.3 (106.1%)	162.3 \pm 10.9* (112.3%)	176.9 \pm 12.1** (122.4%)	343.5 \pm 32.6** (237.7%)

考 察

動物実験において、NO₂暴露が運動能力を低下させるという報告^{5, 20, 21)}はあるが、NO₂暴露中に測定した報告がほとんどで、暴露後に強制負荷を加えて検討した報告は少ない。著者らは、NO₂を暴露したマウスに遊泳負荷を加え、暴露終了後の遊泳持続時間 (FST) とその経日的変化、そして一定の遊泳負荷時の血中乳酸量について検討した結果、5 ppm以上のNO₂、24時間暴露は、マウスの遊泳持続時間の減少、すなわち運動能力の低下を引き起こすことが明らかとなった。Campbell²¹⁾は、NO₂濃度40ppm、0.21日暴露および20ppm、1日暴露で対照群と比較し有意なFSTの減少を認めしたが、8 ppm、19日間暴露では有意な減少を観察しなかった。高濃度 (40, 20ppm) での彼の成績は著者らの結果と一致するが、8 ppm、19日間暴露で彼が有意な変化を認めなかったことは、著者らの5 ppmでの結果が示すように、8 ppm程度の濃度では、その影響が暴露直後には現れず、むしろ数日後に顕在化する可能性がある。

遊泳負荷のような実験においては、負荷の大きさの変化は重要な問題であり、可能な限り負荷を一定にするべきである。今回、本実験で使用した動物の平均体重は35.2 gで、その範囲は33.5~37.6 gであり、体重に対する負荷は平均2.9%、範囲2.7~2.9%であった。この負荷値は予備実験により設定した2.5~3.0%内に位置するとともに、対照群と暴露群の体重間に有意な差はなかったので、両群ともに同じ程度の負荷であったと考えられた。また、低濃度と高濃度暴露群では、摂水量および摂食量が異なることが知られているので、本実験では暴露中は絶食とした。一方、マウスの実験では発育成長に伴う体重および各種臓器の変化を考慮する必要がある。そこで、茨木ら^{23, 24)}によりJCL:ICRマウスの形態の完成および成熟する時期は9~10週前後であると報告されているのでそれより成長した15~17週令のJCL:ICR系マウスを使用した。

筋肉の行う仕事量, 生成する熱量, 乳酸量および酸素消費量との間に相互関係があることが知られている。すなわち筋収縮は嫌気的な条件下でも可能であるが, その結果乳酸が生じ, これが蓄積すると収縮困難となる。しかし酸素を供給すると, 収縮能力を回復する。また酸素が十分に供給されていれば, 乳酸の生成は少ないということである。本実験で用いた遊泳負荷を支える最も大きな要因は泳ぐという筋運動である。したがって筋運動によって筋肉で生成され, 拡散により血液の中に入った乳酸を測定したと考えることができる。5 ppm暴露群の乳酸量が遊泳負荷時に対照群より増加したことは, 上述の概念と考え合わせると, 暴露群では酸素の供給が対照群より少ないために筋での乳酸が増加し, 血中乳酸量を増加させたと考えられることもできよう。ただし, この前提として, 暴露群と対照の間に運動量が一定であることが必要である。著者らが4分間の遊泳負荷時を肉眼的に観察したところでは両群の運動量に差がないように見えたが, 今後検討すべき余地は残る。また, 10ppm以上のNO₂暴露で, FSTが有意に低下したことは, 肺湿重量および肺水分含量が増加したことから, 肺水腫等のために, 酸素の摂取量が減少し運動に伴う酸素消費に見合うだけの酸素を供給できないためであると考えられることもできる。しかしながら, 5 ppm程度のNO₂暴露が, 運動機能と関連の深い神経系, 循環器系へ与える影響についてまだ十分解明されていないことを考えに入れる必要があり, 今後十分に検討すべきであると考えられる。

10~40ppm, 24時間のNO₂暴露は, FSTを減少させたことから, 運動能力を低下させることが示唆された。また, その出現の時期は, 暴露終了直後とは限らず, 負荷を加えることによって出現することもあることが明らかにされた。運動能力を低下させる一要因として酸素の摂取抑制が推測された。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり, 終始実験に御指導, 御助言を頂いた東京大学農学部沢崎坦教授に衷心より感謝の意を表する。

引用文献

- 1) Yokoyama, E. (1968) : Uptake of SO₂ and NO₂ by the isolated airways. Bull. Inst., Publ. Health, 17, 302—306.
- 2) Bruch, J. (1972) : Nitrogen Dioxide, Medizinisches Institut für Lufthygiene und Silikoseforschung Jahresbericht. Düsseldorf, Michael Tritsch Verlag, 110—119.
- 3) Ichioka, M. (1972) : Model experiments on absorbability of the airway mucus membrane of SO₂ and NO₂ gases. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., 10, 361—375.

- 4) Wagner, H. M. (1970) : Absorption von NO und NO₂ in MIK- und MAK-Konzentrationen bei der Inhalation. Staub-Reinhalt. Luft, 30, 380—381.
- 5) 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. Am. Ind. Hyg. Ass. J., 25, 246—253.
- 6) Freeman, G., N. J. Furioli and G. B. Haydon (1966) : Effects of continuous exposure of 0.8 ppm NO₂ on respiration of rats. Arch. Environ. Health, 13, 454—456.
- 7) 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. *ibid.*, 17, 181—192.
- 8) Arner, E. C. and R. H. Rhoades (1973) : Long-term nitrogen dioxide exposure. *ibid.*, 26, 156—160.
- 9) 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.
- 10) Nieding, G. von, H. Krekeler, U. Smidt and K. Muysers (1970) : Akute Wirkung von 5 ppm NO₂ auf die Lungen- und Kreislauffunktion des gesunden Menschen. Int. Arch. Arbeitmed., 27, 234—243.
- 11) Nieding, G. von, M. Wagner, H. Krekeler, U. Smidt and K. Muysers (1971) : Grenzwertbestimmung der akuten NO₂-Wirkung auf den respiratorischen Gasaustausch und die Atemwegswiderstände des chronisch lungenkranken Menschen. *ibid.*, 27, 338—348.
- 12) Nieding, G. von and H. M. Wagner (1975) : Vergleich der Wirkung von Stickstoffdioxid und Stickstoffmonoxid auf die Lungenfunktion des Menschen. StaubReinhalt. Luft, 35, 175—178.
- 13) Nieding, G. von and H. M. Wagner (1977) : Experimental studies on the shortterm 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.
- 14) Freeman, G., S. C. Crane, N. J. Furioli, R. J. Stephens, M. J. Evans and W. D. Moore (1972) : Covert reduction in ventilatory surface in rats during prolonged exposure to subacute nitrogen dioxide. Am. Rev. Respir. Dis., 106, 563—579.
- 15) Davidson, J. T., G. A. Lillington, G. B. Haydon and K. Wasserman (1967) : Physiologic changes in the lungs of rabbits continuously exposed to Nitrogen dioxide. *ibid.*, 95, 790—796.
- 16) 朝比奈一男・中川功哉 (1969) : 運動生理学・現代保健体育学大系7, 大修館書店, 東京, pp 320.
- 17) 小野三嗣 (1978) : 運動の生理科学, 朝倉書店, 東京, pp 184.
- 18) Wayne, W. S., P. F. Wehrle and R. E. Carroll (1967) : Oxidant air pollution and athletic performance, JAMA, 199, 901.

- 19) Swann, H. E. Jr., D. Brunol and O. J. Balchum (1965) : Pulmonary resistance measurement. Arch. Environ. Health, 10, 24-32.
- 20) Tusl, M., V. Stolin, H. M. Wagner and D. Ast (1972) : Physical exertion (Swimming) in rats under the effect of Chemical Agents. Report of the International Association of Occupational Health, Milan, Italy.
- 21) Campbell, K. I. (1976) : Effect of exposure to nitrogen dioxide on swimming endurance in rats. Clin. Toxicol., 9, 937-942.
- 22) Gutmann, I. and A. W. Wahlefeld (1974) : in H. U. Bergmeyer, ed. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd English ed., Vol. III, Verlag Chemie, Weinheim, pp 1464.
- 23) 茨木弟介・野村晋一 (1967) : ICR-JCL系マウスの発育成長に関する研究, 第一報外部形態のバイオメトリー・実験動物, 16, 1-11.
- 24) 茨木弟介・野村晋一 (1970) : ICR-JCL系マウスの発育成長に関する研究, 第二報主要臓器の重量. 実験動物, 19, 133-140.

I-4

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

Variations of Nitrite and Nitrate in the Blood of Mice Exposed to Nitrogen Dioxide

織田 肇¹・局 博一¹・鈴木 明¹・市瀬孝道¹

Hajime ODA¹, Hirokazu TSUBONE¹, Akira SUZUKI¹ and Takamichi ICHINOSE¹

要 旨

NO₂に暴露したマウスの血液中のNO₂⁻, NO₃⁻の量をナフチルエチレンジアミン発色法とCu-Cd還元カラム法を用いて定量した。40ppmのNO₂に暴露すると、NO₂⁻は10分以内に一定値に達し、マウスを室内空気中に移すと数分の半減期で減少した。NO₃⁻はより緩徐な変動を示し、その量はNO₂⁻の約10倍であった。5, 10, 20, 40ppmに1時間暴露したマウスにつきNO₂⁻, NO₃⁻とNO₂濃度との間の量一反応関係をも求めた。メトヘモグロピンはいずれの濃度においても増加は認められなかった。*in vitro* で新鮮血液にNaNO₂を添加するとメトヘモグロピンが増加するとともに、NO₂⁻は半減期6分で速やかにNO₃⁻に変化した。一方NaNO₃の添加ではNO₃⁻量にほとんど変化はみられなかった。これらの成績から吸入されたNO₂の血液内の化学種としてはNO₂⁻とNO₃⁻を考慮すべきこと、またNO₂⁻はヘモグロピンにより速やかにNO₃⁻に変化することが示された。

Abstract

Blood nitrite and nitrate of mice were determined using naphthylethylenediamine and Cu-Cd reduction column. When mice were exposed to 40 ppm nitrogen dioxide, nitrite became constant in 10 minutes. It declined

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

rapidly with a half-life of several minutes when mice were removed to room air.

Nitrate showed similar change with larger contents and longer half-time than nitrite both in increase and decrease.

Dose-effect relationships were also determined at the concentrations ranging between 5-40 ppm for 1 hour exposure. No increase of methemoglobin was observed at these concentrations.

In vitro addition of fresh mouse blood to sodium nitrite rapidly converted nitrite to nitrate accompanied with the increase of methemoglobin, whereas addition to sodium nitrate did not cause any change. The fate of inhaled nitrogen dioxide in the living body is discussed based on the results obtained.

はじめに

吸入された一酸化窒素 (NO), 二酸化窒素 (NO₂) などの窒素酸化物 (NO_x) の生体内運命について, 最近吉田ら¹⁾は安定同位元素である¹⁵Nに着目し, ラットを138-880ppmの¹⁵NOに暴露した。血中および尿中の¹⁵Nを質量分析計を用いて測定した結果,¹⁵Nは血液中に多量に存在すること, ならびに24時間内に吸入した¹⁵Nの約半量が尿中に排泄されることが明らかとなった。また尿中¹⁵Nの40%は硝酸塩として存在していた。一方太田ら^{2, 3)}は11-60ppmの¹⁵NO₂を暴露したラットで同様の測定を行い,¹⁵N量は肺, 血漿, 腎に多く, 血中にNO₂⁻の増加することを示している。

Goldsteinら⁴⁾はサイクロトロンで合成した0.3-0.9ppmの¹³NO₂(半減期10分)をサルに暴露し胸腹部のシンチグラム, 血中の¹³Nを測定した。50%-60%の¹³Nが安静呼吸中に体内にとどまり, 肺で¹²⁵Xeに比較して長時間滞り, その後血流を通じて全身に広がった。彼等は気道、肺でのNO₂と水の反応によりNO₂⁻とNO₃⁻が生じることを示唆している。

SvorcovaとKaut⁵⁾は22.5ppmのNO₂に4時間暴露したウサギの静脈, 動脈中のNO₂⁻, NO₃⁻を定量し, 動脈血中では静脈血中に比してNO₂⁻は多く, 逆にNO₃⁻は少ないことを示し, ヘモグロビン(Hb)によるNO₂⁻からNO₃⁻への変換を示唆している。また両イオンは暴露開始1時間で平衡状態に達し, 暴露を中止すると1.5-2時間で元のレベルにもどること, 尿では暴露15分でNO₂⁻の検出されることを報告した。

織田ら⁶⁾は20-80ppmのNOあるいはNO₂を暴露したマウスについて, その血液中的一酸化窒素ヘモグロビン (NOHb) とメトヘモグロビン (MetHb) を電子スピン共鳴法を用いて定量し, その挙動を明らかにした。40ppmのNO₂ではNOHbは増加する(1時間後0.2%)がMetHbは増加せず, 一方同濃度のNOではより多量のNOHb (0.7%) とMetHb (5%) が検出された。NOHbの量はNO, NO₂濃度と直線的な比例関係があり, MetHbはNO濃度の上昇とともに指数関数的に上昇した。

上述のように、吸入された NO_x の血液内化学種としては NO_2^- 、 NO_3^- が考えられ、またそれらとHbとの相互作用を研究する必要があることが示された。本報告では前述の NOHb 、 MetHb の測定と対応する暴露条件下でマウスの全血中の NO_2^- 、 NO_3^- の挙動を調べるとともに、*in vitro*で全血と両イオンを反応させてその反応の様式を研究した。

方 法

窒素バランスした5,000ppmの NO_2 を用い、120ℓのチャンバー（日本クレア製、PT-300A）内でマウスを暴露した。 NO と NO_2 の濃度は化学発光法窒素酸化物連続測定器（モニターラボ、ML-8440H）によって連続的に測定した。チャンバー内温度は $22 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。

JCL：ICR♀マウス（4か月令）を暴露に供し、血液を可及的速やかにかつ多量に採取する為、頸椎脱臼後開胸し、注射器で右心室より採血した。 NO_2^- 、 NO_3^- の測定には、0.5mlの血液に3.0mlの蒸留水、1.0mlの8%硫酸亜鉛溶液、0.5mlの4%水酸化ナトリウム溶液を加え、よく攪拌した後、3,000rpmで10分間遠心して脱タンパクした。上清0.5mlに3.3%スルフェニル酸（20%酢酸中）0.5ml、0.1%ナフチルエチレンジアミン（NEDA）0.5mlを加え10分後に540nmの吸光度を測定した。あらかじめ NaNO_2 と上記の試薬を反応させて作成した検量線より NO_2^- 濃度を求め、稀釈倍数10をかけて血中濃度に換算した。上清の残り（約3ml）をCu-Cdカラムを用いて還元した⁷⁾硝酸分析用Cd小片（和光純薬工業KK製）を1N塩酸で処理したのち、数回蒸留水で洗い、その後2%硫酸銅溶液中で活性化した。Cd小片をガラスカラム（2.5mmφ×300mm）につめ、1%塩化アンモニウム溶液で十分に洗った。遠心上清を1ml/分の流量で流し、最後に流出した約1mlの試料を試験管に採取した。このうち0.5mlを用いて、 NO_2^- 定量と同一手法で、 $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- (= \text{NO}_x^-)$ を求めた。得られた値から前述の方法で求めた NO_2^- を差引いて NO_3^- とした。 NO_2^- 、 NO_3^- の量は $\text{NO}_2^- - \text{N} \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N} \mu\text{g}/\text{ml}$ として示した。いずれの場合も、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ は71.4 μM に相当する。

MetHb測定の為に約0.2mlの血液を用い、Evelyn-Malloy法⁸⁾に従って分光的定量を行った。

*in vitro*の実験では出来るだけ新鮮なマウス血液（数匹分をプール）を用いた。40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ $\text{NO}_2^- - \text{N}$ の NaNO_2 溶液、または40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ $\text{NO}_3^- - \text{N}$ の NaNO_3 溶液いずれも70 μl を0.63mlの血液（あらかじめ37 $^\circ\text{C}$ に加温）に加え、10分ごとに NO_2^- と NO_3^- の定量（血液0.5ml使用）と、MetHb定量（血液0.2ml使用）を実施した。

結 果

1. NO_2^- 、 NO_3^- の定量

0-1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\text{NO}_2^- - \text{N}$ （ NaNO_2 による）、および $\text{NO}_3^- - \text{N}$ （ NaNO_3 による）のTris-HCl（0.05

M)-NaCl (0.56%) 緩衝液 (pH7.4) 中の検量線を図1に示した。NO₂⁻は直接発色試薬と反応させ、NO₃⁻はCu-Cdカラム処理後に定量した。NO₂⁻は1.0μg/ml-Nまで直線的な関係を示したが、NO₃⁻は0.5μg/ml-N以上では検量線が傾く傾向を示した。これはこのサイズのカラムの処理能力の限界と考えられたので、以降のNO₃⁻の測定は0.5μg/ml-N、血液中ではその10倍の5μg/ml-N以下で実施した。

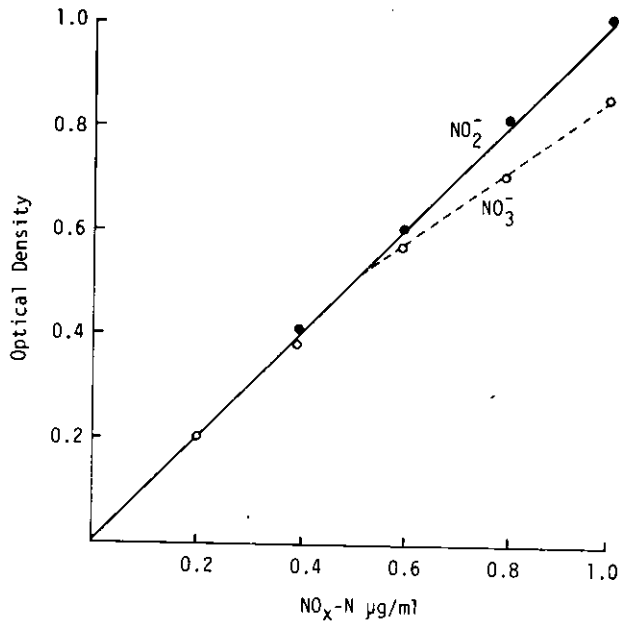


図 1 NO₂⁻, NO₃⁻ の検量線

Fig. 1 Calibration curves of nitrite and nitrate

表1にNO₂⁻とNO₃⁻の血液の添加実験の結果を示した。40μg/ml-NのNaNO₂溶液50μl、またはNaNO₃溶液50μlを0.45mlの血液に室温下で加え、直後にその回収率を測定した。後述するようにNO₂⁻は血液中では速やかにNO₃⁻に変化するので、NO₂⁻の回収率はNO_x⁻ (NO₂⁻+NO₃⁻)で計算した。回収

表 1 NO₂⁻, NO₃⁻をマウス血液へ添加した場合の回収率

Table. 1 Recoveries of nitrite and nitrate added to mouse blood

	+NO ₂	+NO ₃
Calculated*	4.00	4.00
Observed*	3.94±0.05	4.07±0.11
% recovery	98.5	101.5

n=4 *NO_x⁻ (NO₂⁻+NO₃⁻) -Nμg/ml

率は数回の実験を繰返した場合概ね満足すべきものであったが、 NO_3^- の回収率はCu—Cdカラムの効率により多少の変動を示した。従って、カラム効率を標準試料により適宜チェックするようにした。

2. NO_2 暴露マウス血中の NO_x^-

マウスを40ppmの NO_2 (混在するNOは0.1ppm以下)に2時間まで暴露した。暴露開始後一定時間ごとに3匹のマウスをチャンバーのパスボックスを通して取出し、可及的速やかに採血した。何匹かのマウスは1時間暴露後チャンバーより取出し室内空气中に放置後、一定時間ごとに採血した。図2に血液中の NO_2^- 、 NO_3^- の変動を示した。なお各点は3匹の平均値である。対照のマウスでは NO_2^- は検出されなかったが、 NO_3^- は0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ —Nの値を示した。暴露を開始すると両者とも増加し、 NO_2^- は10分後、 NO_3^- は30分後にはほぼ一定値に達した。その時 NO_3^- の量はNとして NO_2^- の約10倍であった。マウスを1時間暴露後室内空气中にうつすと、 NO_2^- は半減期数分以内の速度で消失した。一方 NO_3^- の半減期は約1時間であった。

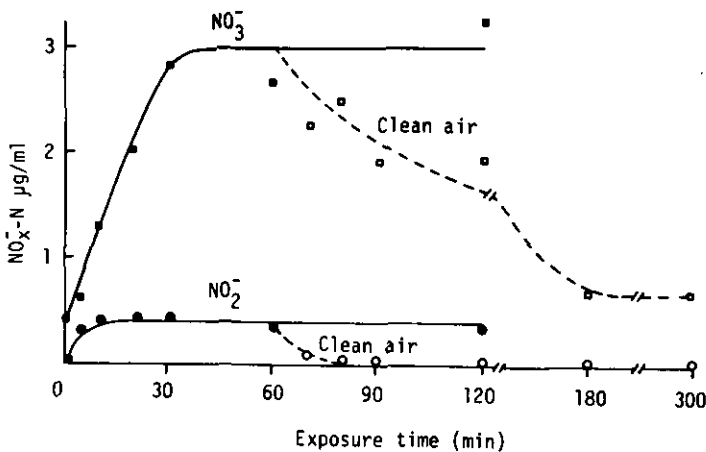


図 2 40ppm NO_2 暴露時のマウス血液中の NO_2^- 、 NO_3^- の変動

Fig. 2 Alterations of nitrite and nitrate in the blood of mice exposed to NO_2 at 40 ppm

5—40ppmの NO_2 を1時間暴露した時の NO_2^- 、 NO_3^- 、MetHb量を図3に示した。前2者は NO_2 濃度の増加に対して非直線的関係を示し、一般に NO_3^- の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ —N)は NO_2^- のその約10倍の値を示した。MetHbは対照群では0.5—1.0%の値を持ち、 NO_2 の暴露によってはその増加は認められなかった。なお各点は4匹の平均値である。

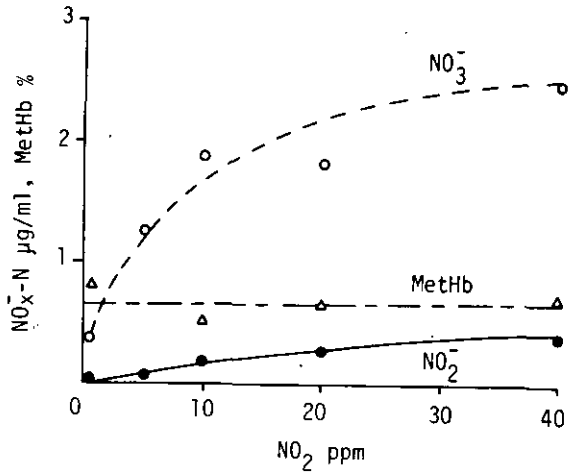


図 3 5—40ppmのNO₂ 1時間暴露時のNO₂⁻, NO₃⁻, MetHbのガス濃度依存性

Fig. 3 Dose dependence of nitrite, nitrate and MetHb in the blood of mice exposed to NO₂ at 5—40ppm for 1 hour

3. *In vitro*の反応

NaNO₂あるいはNaNO₃を37℃で血液と反応させ、10分ごとにNO₂⁻, NO₃⁻, MetHbを測定した。図4に示すように、NO₂添加後NO₂⁻は急速に減少し、逆にNO₃⁻の生成がみられた。NO₂⁻+NO₃⁻はほぼ一定であった。NO₂⁻の減少は図5に対数プロットで示すようにhalf-timeが6分の見かけ上一次

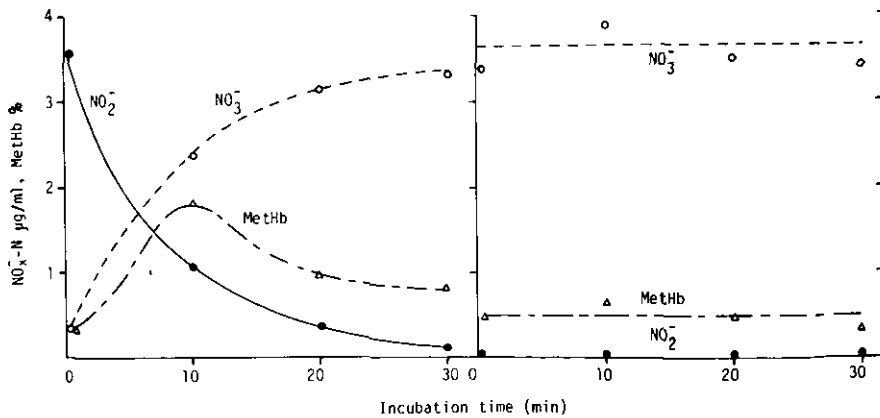


図 4 *In vitro* (37℃) でマウス血液に添加したNO₂⁻ (左図), NO₃⁻ (右図) の変化

Fig. 4 Changes of nitrite (left Fig.) and nitrate (right Fig.) incubated with mouse blood at 37℃ *in vitro*

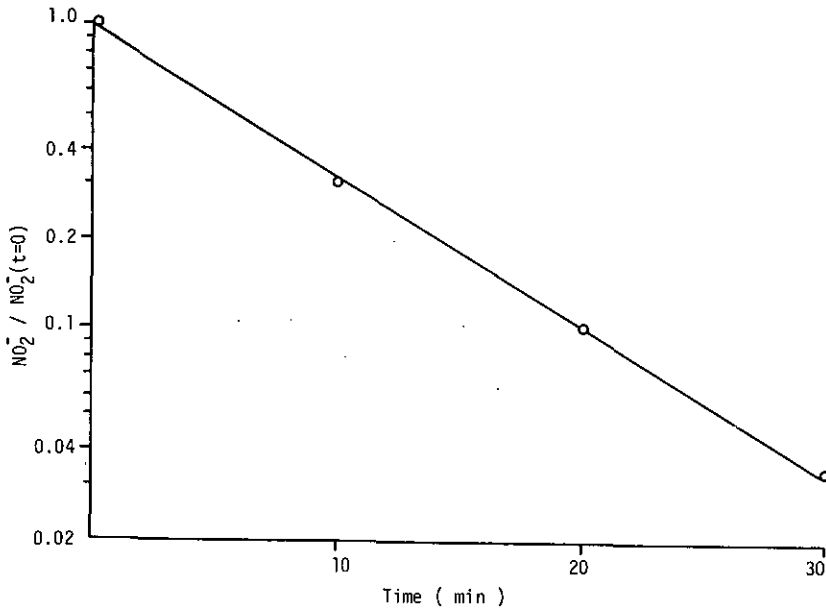


図 5 *in vitro* (37°C) でマウス血液に添加した NO_2^- の変化の対数プロット

Fig. 5 Log plot of nitrite content incubated with mouse blood at 37°C
in vitro

反応の形式をとった。MetHbは10分後に最高値となり、以降は低下した。1モルの NO_2^- が同モルのHbをMetHbに変えるとすると⁹⁾、添加した NaNO_2 と血液中Hb量から計算して、3.5%のMetHbが生成すると予測されるが、実際の生成量はこれより少なく、MetHb還元酵素による還元は速やかであることが知られた。 NO_3^- を添加した実験では、血液中の NO_3^- 、MetHbの量には変化はなく、 NO_3^- と血液の相互作用は非常に小さいことを示した。

考 察

血液中の NO_2^- 、 NO_3^- の測定に関してはこれまで数種の方法が提唱されている。^{7,10,11)} 血液を脱タンパク後、 NO_2^- をスルファニル酸（あるいはスルファニルアミド）とNEDAで発色させるのはいずれの方法もほぼ同様であるが、一方 NO_3^- の測定法に関してはSawicki¹²⁾はキシレノール、プルシン、クロモトロボ酸、アミノピレンによる方法を比較しており、この中ではアミノピレン法が最も感度がよいと指摘し、Wegner¹¹⁾も血液での測定に応用している。しかし、この方法を検討した結果では、濃硫酸を100°Cで湯浴する過程がやや繁雑であり、456nmの吸光度測定の際に妨害物質の吸収が重なるなどの問題点があった。従ってSchneiderら⁷⁾が提唱しているCu—Cdカラム法を検討した。

原法では50mlの流出液が必要とされているが、出来るだけ少量の血液で、かつ感度よく（試料を稀釈せずに）定量するために、小型のカラムを作製した。このサイズのカラムはテクニコン・オートアナライザーによる水、海水中 NO_2^- 、 NO_3^- の測定にも使用されている。なお、脱タンパクはShechterら¹⁰⁾にならい、硫酸亜鉛と水酸化ナトリウム溶液を用いて行った。図1に示したように NO_2^- の検量線は $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ —Nまで直線的であり、 NO_3^- も $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ —Nまで直線的であった。また血液への NaNO_2 と NaNO_3 の添加回収成績も満足できるものと考えられた。

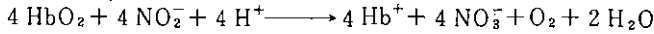
マウスの採血は可及的速やかに行ったが、この必要性は*in vitro*で NO_2^- を血液へ添加した実験において、 NO_2^- が6分で半減することからも示された。チャンバーより取出し、採血、NaOH試薬添加（ NO_2^- とHbの反応は停止する）まで普通2—3分を要したので、*in vitro*のデータから換算して暴露中の実際の血中 NO_2^- 濃度は得られたデータの1.25—1.4倍になると考えられる。従って NO_3^- の値も対応する NO_2^- の増加分を差引いて計算しなければならないが、 NO_3^- は NO_2^- のほぼ数倍の値を示すので、この誤差は小さなものである。

40ppmの NO_2 に暴露したマウスの血中の NO_2^- の挙動は、SvorcovaとKaut⁵⁾がウサギに22.5ppmの NO_2 を暴露して求めた NO_2^- のものとパターン、量ともに類似していた。しかし、対照群では NO_2^- が検出されなかったこと、また暴露中止後20分以内に NO_2^- は消失することなどが彼らの成績とは異なっており、動物の種族差を示すものかもしれない。一方 NO_3^- は NO_2^- の挙動と比較して、緩徐な経過をたどり、約30分で飽和し、減衰の半減期は約1時間であった。この半減期の成績はSvorcovaとKautのもの一致していた。しかし NO_3^- の量は彼等の得た値の約1/50であり、大きな差を示している。これは動物種族差による可能性もあるが、一方彼等の用いたポラログラフィー法と、本報の比色法の差による可能性も否定出来ない。今回血液への NaNO_3 添加実験では満足すべき回収率が得られていることから、マウスについての成績は妥当なものと考えられる。

血中 NO_x^- の暴露 NO_2 濃度に対する量—反応関係は直線的ではなく、ガス濃度の対数に対してはほぼ直線的であった。このことは血中 NO_x^- 量と暴露濃度の関係は複雑であることを示しており、 NO_2 暴露による体内への NO_2 のとりこみと腎よりの NO_x^- の排泄のガス濃度依存性を詳細に検討する必要があると考えられる。

20—80ppmの NO_2 にマウスを暴露した場合、MetHbの増加が認められないことは既に報告した⁶⁾が、今回の実験でも同じ成績が得られた。いずれの NO_2 の濃度でも血中には微量ながら NO_2^- の存在は認められたので、マウスの場合にはMetHb還元酵素によるMetHbからHbへの変化が迅速で、MetHbの増加は検出されなかったものと考えられる。従ってこの酵素の活性の低い動物種では同濃度の NO_2 でもMetHbが増加する可能性は残されており、ラットでそのような成績が報告されている¹³⁾

*In vitro*でHbと NO_2^- を反応させると、加えた NO_2^- は当量の NO_3^- に変化し、また当量のHbがMetHbに変化することが小坂ら⁹⁾によりすでに報告されている。彼等はこの反応のpH依存性をも考慮に入れて次式を提唱している。



本反応は lag phase をもつ S 字状の時間的経過をたどるとされている。一方血液に NaNO_2 を添加した今回の実験では、同様に NO_2^- は当量の NO_3^- に変化することが認められたが、反応は見かけ上一次式であり、かつ MetHb の生成量は計算量よりも少なかった。この原因として前者は NO_2^- に対して Hb が過剰であること、後者は血球中の MetHb 還元酵素による MetHb の Hb への還元として説明できよう。いずれにせよ、血液中で NO_2^- は血球内に入り Hb を MetHb に変え、自身は NO_3^- に変換されると結論することができる。一方血液と NO_3^- の反応はほとんど無視できるものであり、その変動は主として NO_2^- からの生成と尿への排泄によると考えられる。 NO_3^- の血液からの消失は暴露停止後のデータから半減期約 1 時間と計算される。一方 NO_2^- の血液からの排泄を NO_3^- と同じ半減期約 1 時間と仮定すると、 NO_2^- の Hb による変化の half time 6 分の方が迅速な反応であり、主な経路であるといえる。

以上の結果から、体内に入った NO_2^- の運命を推測して図 6 に模式的に示した。この図では Hb の誘

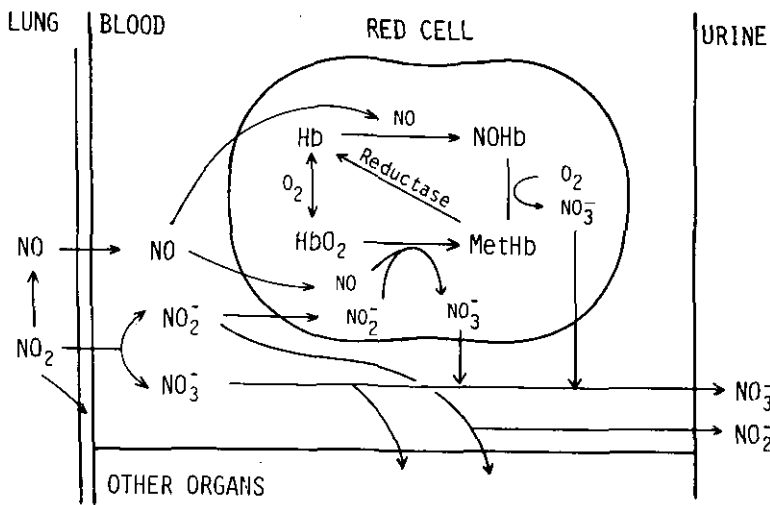
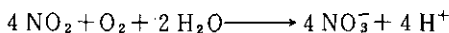
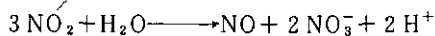
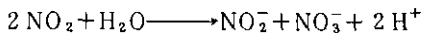


図 6 吸入された NO_2 の運命の模式図

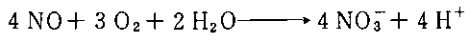
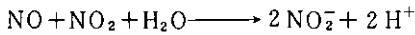
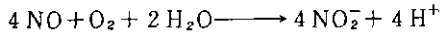
Fig. 6 Possible fate of inhaled NO_2

導体すなわち NOHb, MetHb の測定⁵⁾ から示唆された経路をも同時に示した。 NO_2 の生体内での挙動は非常に複雑であるが、関係する反応は次式のごとくと考えられる¹⁴⁾

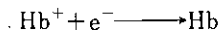
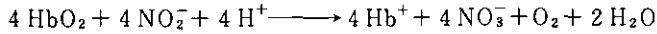
NO_2 と水との反応で、



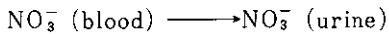
NO₂, NO (NO₂と水との反応で生成したNOあるいは混在するNO), 水との反応で,



NO_xとHbの反応として,



さらにNO₂暴露により尿中にNO₂⁻, NO₃⁻が認められる⁷⁾ことから,



以上のごとき反応について、今後より詳細な解析を行い、さらにNO₂⁻, あるいはNO₃⁻と生体内の物質の反応についての情報を得ることにより、NO₂暴露による生体影響の解析と、現在のところ知られていない影響の予測を進めていくことが重要であると考えられる。

引用文献

- 1) 吉田克己・今井正之・笠間一男・北畠正義・奥田みどり(1978):一酸化窒素の生体内運命. 三重大学環境科学研究紀要, 第3号, 11-16.
- 2) 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. 産衛学会, 東京.
- 3) 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. 産衛学会, 仙台.
- 4) 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.
- 5) Svorcova, S. and V. Kaut (1971): The arterio-venous differences in the nitrite and nitrate ions concentrations after the nitrogen oxides inhalation. *Cesk. Hyg.*, 16, 71-76.
- 6) 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.
- 7) Schneider, N. R. and R. A. Yearly (1973): Measurement of nitrite and nitrate in blood. *Am. J. Vet. Res.*, 34, 133-135.

- 8) Van Assendelft, O.W. (1970) : Spectrometry of haemoglobin derivatives. Royal Vangorcum, Assen., 128 pp.
- 9) Kosaka, H., K. Imaizumi, K. Imai and I. Tyuma (1979) : Stoichiometry of the reaction of oxy-hemoglobin with nitrite. *Biochem. Biophys. Acta*, 581, 184—188.
- 10) Schechter, H., N. Gruener and H.I. Shuval (1972) : A micromethod for the determination of nitrite in blood. *Anal. Chim. Acta*, 60, 93—99.
- 11) Wegner, T.N. (1971) : Simple and sensitive procedure for determining nitrate and nitrite in mixtures in biological fluids. *J. Dairy Sci.*, 55, 642—644.
- 12) Sawicki, E., H. Johnson and T.W. Stanley (1963) : Determination of nitrate or nitrate plus nitrite with 1-aminopyrene. *Anal. Chem.*, 35, 1934—1936.
- 13) Wagner, W.D., B.R. Duncan, P.G. Wright and H.E. Stokinger (1965) : Experimental study of threshold limit of NO_2 . *Arch. Environ. Health*, 10, 455—466.
- 14) 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.

I-5

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*

Effect of Nitrogen Dioxide on Various Types of Cells Required
for Primary Antibody Response*

藤巻秀和¹・清水不二雄¹

Hidekazu FUJIMAKI¹ and Fujio SHIMIZU¹

要 旨

二酸化窒素 (NO₂) の急性暴露が、液性一次抗体産生機構に関与する細胞群に及ぼす影響について検討した。BALB/Cマウスを用い、20ppm 12時間暴露を行った。その後、脾臓を摘出し、メッシュを通して細胞浮遊液を作製後、ヒツジ血球 (SRBC) と共に培養した。また、細胞の再構成実験として、ナイロンウールカラムと抗マウス脳θ抗体を用いて各々T細胞・B細胞群を分画後、暴露群、対照群由来細胞相互間の組み換えを行って、上記と同様に培養した。培養4～5日後に、溶血斑形成細胞 (PFC) 算定法により抗体産生能を検索した。その結果、*in vitro* での抗体産生能は、対照群に比べて暴露群で有意に低下した。組み換え実験により、暴露群での低下は、T細胞群より、B細胞群への影響により多く負うことが明らかとなった。

Abstract

The effect of acute exposure to nitrogen dioxide (NO₂) on cell populations required for *in vitro* primary antibody response to sheep red blood cells (SRBC) was studied in BALB/C mice.

After the *in vivo* exposure to 20ppm NO₂ for 12 hours spleen cells or cell

* 本文の要旨は、第21回大気汚染学会に発表、および英文にて投稿中。

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

mixtures which were separated by nylon wool column and anti-BA θ -antibody were cultured with SRBC.

The primary antibody response was significantly suppressed by acute exposure. The experiment of reconstitution revealed that B cells were more strongly suppressed than T cells in the spleen of exposed mice.

はじめに

これまで、大気汚染物質の標的臓器である肺において、その防御機構の一役をになっている肺胞マクロファージに対するNO₂の影響については、いくつかの報告がなされている^{1)~3)}。一方、生体の抗体産生機構に関与する細胞群にとって重要な臓器である胸腺や脾臓への影響については、あまり解明が進んでいない。我々は、NO₂暴露において、ヒツジ血球に対する抗体産生能が低下し、胸腺、脾臓の細胞数も減少するなど、その影響が、抗体産生機構に及ぼされていることを明らかにした^{4),5)}。本研究では、さらにNO₂の影響を詳細に解明するために、抗体産生機構に関与するどの細胞群が、NO₂急性暴露においてより強い影響をうけているかを、細胞の分画とその暴露群、対照群由来細胞分画相互間の組み換えを行って検討した。

方 法

実験動物は、6~9週令のBALB/C雄マウス（日本チャールスリバー）を用いた。NO₂の暴露条件は、20ppm12時間とし、暴露方法は、すでに報告したものと同様の方法を用いた⁴⁾。

暴露終了、12時間後、5~6匹のマウスより無菌的に脾臓をとりだし、ステンレスメッシュを通して、細胞浮遊液を作製した。1,000ppm10分間の遠心を2~3回繰り返したのち、細胞数を調整した。*in vitro*の培養条件は、Mishell and Dutton⁶⁾を参考にし、マルチウェルプレート(Linbro, 24穴)を用い、培養液として、10%FCS, 2mML-グルタミン, ペニシリン(100u/ml), ストレプトマイシン(100 μ g/ml)を含んだRPMI-1640を使用した。同時に、1 \times 10⁷mlの細胞につき5 \times 10⁶mlのヒツジ血球を抗原として加えた。細胞の再構成実験においては、脾臓のマクロファージは、Ly and Mishell⁷⁾の方法に従い、Sephadex G-10を用いて除去した。逆に、マクロファージ分画は、脾臓細胞を1 \times 10⁶/ml/well培養プレートに入れ、1.5時間培養し、その付着細胞を用いた。また、T細胞群は、Julius⁸⁾らの変法を用いて、ナイロンウールカラムを通して分画した。B細胞群は、脾臓細胞を、抗マウス脳 θ 抗体と補体とで処理し、T細胞群を除去してえた。このような方法で分画した細胞群を対照群と暴露群の間で組み換えを行い、上記と同様に、ヒツジ血球とともに培養した。培養4~5日後に、各wellごとに溶血斑形成細胞(PFC)算定法を用いて抗体産生細胞の

数を数えた。

なお、上記分画後の T. B細胞の比率は、抗マウス脳 θ 抗体、抗マウスIgG抗体を用いて、膜免疫蛍光法により検索した。

結果と考察

In vitro で、細胞の組み換えを行わないときの対照群と暴露群の PFC の数を表 1 に示した。3 回の実験すべてにおいて、暴露群の方が、対照群に比べて低い値をとり、抗体産生が、おさえられていることが明らかである。これは、20ppm 12時間暴露の *in vivo* での結果と同様であり、このことは、暴露開始から、培養までの24時間の間にすでに、抗体産生機構に関与している細胞群が、NO₂暴露の影響を強くうけていることを示している。

表 1 NO₂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 acute exposure to NO₂ on *in vitro* primary antibody response

Expt, no,	No. of PFC per well ^a	
	Control	Exposed
1	648 ± 87 ^b	455 ± 32
2	1240 ± 79	20 ± 8*
3	625 ± 79	117 ± 45*

a Anti SRBC IgM PFC responses were assayed on day 4 of the culture.

b Each value represents the mean ± SE of five wells.

*P < 0.01, Student's t test.

表 2 NO₂急性暴露の脾臓中の付着性細胞に及ぼす影響

Table 2. Effect of acute exposure to NO₂ on splenic adherent cells

Spleen cells added ^a	No. of adherent cells per field ^b	Sephadex G-10 passed cells	No. of PFC per well ^d
Control, 1 × 10 ⁶	33.4 ± 3.7 ^e	+	270 ± 17 ^f
Control, 1 × 10 ⁶		-	0
Exposed, 1 × 10 ⁶	32.6 ± 3.2	+	250 ± 70
Exposed, 1 × 10 ⁶		-	0
None		+	40 ± 20

a The number of spleen cells required for the preparation of adherent cells.

b One field of phase-contrast microscope (×400).

c 2 × 10⁷ per well, Spleen cells depleted of adherent cells.

d Anti SRBC IgM PFC responses were assayed on day 4 of the culture.

e The value represents the mean ± SE of ten fields.

f The value represents the mean ± SE of four wells.

次に、この低下の原因を解明するために、各細胞群の影響を検討した。まず、付着能をもっているマクロファージ系の細胞への影響を調べた結果を、表2に示した。

表2には、対照群と暴露群の1視野当たりの付着細胞の数と、それに、対照の Sephadex G-10 通過細胞を加えたときの PFC の数が示してあるが、共に、両群で差異は認められず、脾臓中のマクロファージ系の細胞においては、ほとんど影響をうけていないと思われる。

表 3 NO₂急性暴露の一次抗体産生におけるT.B細胞へ及ぼす影響

Table 3. Comparison of the effects of acute exposure on T and B cells of primary antibody response

Group	Cell sources				No. of PFC per well ^a	
	Anti- θ +C' treated cells ^a		Nylon wool passed cells ^b		Expt, 1	Expt, 2
	Control	Exposed	Control	Exposed		
A	+	-	-	-	0	60
B	-	+	-	-	0	0
C	-	-	+	-	0	0
D	-	-	-	+	0	0
E	+	-	+	-	387 ± 33	787 ± 120
F	+	-	-	+	120 ± 65	553 ± 108
G	-	+	+	-	< 1	33 ± 111
H	-	+	-	+	27 ± 14	7 ± 5

a Spleen cells incubated with anti- θ +complement.

b 1.5×10^6 per well, Spleen cells fractionated by nylon wool column.

c Anti SRBC IgM PFC responses were assayed on day 4 of the culture.

A, B, C and D values represent the number of PFC per well.

E, F, G and H values represent the mean \pm SE of three wells.

表3には、対照群と暴露群の間で、T.B細胞群を組み換えて、PFCを調べた結果が示してある。これによると、対照群と暴露群との間で、T細胞群を組み換えた群より、B細胞群を組み換えた群の方が、PFCの数が少ないことから、B細胞群の方が、T細胞群より活性が低下していることが明白である。

生体の抗体産生機構に関与する細胞群としては、主に、マクロファージ系、B細胞、T細胞の三つがあり、NO₂急性暴露においては、その中のB細胞群が、もっとも強く影響をうけたものと思われる。換言すれば、その影響に対する感受性がいちばん高いと考えられよう。

現に、放射線に対する感受性は、B細胞の方がT細胞より高いという報告もある⁹⁾。

このように、NO₂暴露により、肺以外の臓器中の細胞も影響をうけていることが明らかとなったが、その影響の及ぼされた経路、機構については、推測の域を出ないのが現状であり、今後更に検討を加える必要があるものと思われる。

引用文献

- 1) Acton, J.D. and Q.N. Myrvik (1972): Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophages. Arch. Environ. Health, **24**, 48—52.
- 2) Vassallo, C.L., B.M. Domm, R.H. Poe, M.L. Duncombe and J. B. L. Gee (1973): NO₂ gas and NO₂ effects on alveolar macrophage phagocytosis and metabolism. Arch. Environ. Health, **26**, 270—274.
- 3) Kleinerman, J. (1977): Some effects of nitrogen dioxide on the lung. Federation Proc., **36**, 1714—1718.
- 4) 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. 国立研究所研究報告, 第8号, 61—70.
- 5) Fujimaki, H. and F. Shimizu: Effects of exposure to nitrogen dioxide on primary antibody response. Arch. Environ. Health, (in press).
- 6) Mishell, R.I. and R.W. Dutton (1967): Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. J. Exp. Med., **126**, 423—442.
- 7) Ly, L.A. and R.I. Mishell (1974): Separation of mouse spleen cells by passage through columns of Sephadex G—10. J. Immunol. Methods, **5**, 239—247.
- 8) Julius, M.H., E. Simpson and L.A. Herzenberg (1973): A rapid method for the isolation of functional thymus—derived murine lymphocytes. Eur. J. Immunol., **3**, 645—649.
- 9) Anderson, R.E., J. Sprent and J. F. A. P. Miller (1974): Radiosensitivity of T and B lymphocytes: I Effect of irradiation on cell migration. Eur. J. Immunol., **4**, 199—203.

I-6

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

On Different Responses among Various Strain of Mice in Susceptibility to Nitrogen Dioxide Exposure and a Role of Enzymatic Protective System

市瀬孝道¹・織田 肇¹・鈴木 明¹・局 博一¹・嵯峨井 勝¹

Takamichi ICHINOSE,¹ Hajime ODA,¹ Akira SUZUKI,¹ Hirokazu TSUBONE¹
and Masaru SAGAI¹

要 旨

ICR, BALB/C, ddy および C57BL/6 の4系統マウスにNO₂を16時間暴露して得られたLC₅₀²⁾で示した感受性と肺の酵素的防御系の相関について比較検討した。系統の異なるマウスの間にはNO₂暴露前でもNO₂に対する感受性(LC₅₀)と酵素的防御系の活性との間に相関性があるものがいくつか認められた。そのうち Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), Glutathione-s-transferase (GSH-Tase), Superoxide dismutase (SOD), Disulfide reductase (DSR) 活性および還元型 Glutathione (GSH) 量は感受性の高い系統ほどそのLC₅₀値の順に低い値を示し、過酸化脂質量(TBA値)は逆に感受性の高いものほど高い値を示し両者の間には有意な相関性が認められた。一方、20ppm NO₂を16時間暴露した場合にはほとんどの酵素活性は暴露前の値より低下したが、その中で残存活性がLC₅₀値と相関性を示したものはGlutathione peroxidase (GSH-Px), Isocitrate dehydrogenase (ICDH), GSH-Tase, DSRおよびGSH, Vitamin E等があった。またSODはNO₂を暴露した場合は暴露前より4系統ともに40~60%の活性増加を示し、かつLC₅₀値の高い順に高い活性を示しLC₅₀値との間に有意な直線相関性を示した。さらにTBA値もNO₂暴露によって増加し、4系統間のLC₅₀値とは逆相関を示した。

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

これらの結果から、上記の防御系酵素およびGSH, Vitamin E等の抗酸化性物質等はNO₂暴露に対する生体防制上の重要な因子であり、またTBA値は感受性と直接関連する因子であることを示唆している。

Abstract

Strain differences of mice in susceptibility to nitrogen dioxide exposure were examined by measurement of protective enzymes and antioxidants such as glutathione and Vitamin E. Four strain mice, ICR, BALB/C, ddy and C57BL/6, were used. It was shown that there are genetical differences in activities of some protective enzymes and in contents of antioxidants among four strains. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione-s-transferase, superoxide dismutase, disulfide reductase and glutathione contents in lungs of four strain mice were related to each LC₅₀ determined previously²⁾ by nitrogen dioxide exposure for 16 hr with linear regression. TBA values in lungs of four strain mice were conversely related to each LC₅₀. After the exposure to 20 ppm nitrogen dioxide for 16 hr, the activities of protective enzymes and the contents of antioxidants were decreased by nitrogen dioxide exposure. Glutathione peroxidase, isocitrate dehydrogenase, glutathione-s-transferase, disulfide reductase, Vitamin E and glutathione were also related to each LC₅₀ with linear regression, and TBA values were increased by NO₂ exposure and conversely related to each LC₅₀. On the other hand, the activity of superoxide dismutase was increased by nitrogen dioxide exposure, and the ratio in increase was about 1.4-1.6 folds of each control value. The activity among four strain mice in exposed groups were also correlated to each LC₅₀ with linear regression.

From these results, it was suggested that the enzymes and the substances described above may be important factors in protective mechanism to nitrogen dioxide exposure.

はじめに

大気汚染物質の生体影響に関する研究は種々の汚染ガスについて種 (Species) や系統 (Strain) の異なる多くの動物を用いて研究されてきた。Goldsteinら¹⁾は系統の異なるマウスにオゾンを暴露しその致死濃度の違いからマウスの系統間に著しい感受性の違いがあることを示した。また竹中ら²⁾も系統の異なるマウスに種々の濃度のNO₂を暴露してLC₅₀を測定し更に呼吸器系の病理学

的障害度を比較しNO₂暴露に関してもマウスの系統間で感受性に相違があることを見出した。

マウスの系統間でこのような感受性の相違がみられる原因は、呼吸器の構造上の相違に伴う換気能および換気力学的な面での生理学的相違などが考えられるが、肺の酸化的障害防御機能等の生化学的な面での相違によることも考えられる。しかしながら現在このような大気汚染物質に対する感受性もしくは抵抗性について動物の系統間の相違を生化学的に比較研究した報告はない。今回、著者らは竹中ら²⁾によって示されたNO₂暴露によるマウスの系統間での感受性(LC₅₀)の相違を肺の酸化的障害の防御機能と比較しその関連性を比較検討した。

一方、これまでNO₂あるいはオゾン等の吸入による酸化的障害の発現には脂質過酸化反応が重要な役割を果たしていることが知られている³⁻⁷⁾。Chowら^{6),7),27)}はNO₂やオゾンの暴露によって生じる過酸化脂質の解毒代謝に関与するGlutathione peroxidase (GSH-Px)系酵素の防御的役割について報告している。この系は表1の1)の(i)に示したROOHで示される過酸化脂質あるいは過酸化水

表 1 酸化的障害に対する酵素的防御機構

Table 1. Enzymatic Protective Mechanisms against Oxidative Stress

1) GSH-peroxidase as a member in peroxidative metabolic pathway	
$2\text{GSH} + \text{ROOH} \xrightarrow{\text{GSH-Px}} \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$	(i)
$\text{G6P} \xrightarrow{\text{G6PD}} \text{6PG} \xrightarrow{\text{NADP}^+} \text{NADPH}$ $\text{GSH-R} \xrightarrow{\text{GSH-Px}} \text{GSSG} \xrightarrow{\text{ROOH}} \text{ROH}$	(ii)
2) Enzymes for maintenance of reducing potential (NADPH formation)	
$\text{G6P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6PD}} \text{6-PG} + \text{NADPH}$	(i)
$\text{6-PG} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{6-PGD}} \text{R5P} + \text{NADPH}$	(ii)
$\text{Isocitrate} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{ICDH}} \text{2-oxoglutarate} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$	(iii)
3) Glutathione-s-transferase as a peroxidase	
$\text{GSH} + \text{ROOH} \xrightarrow{\text{GSH-Tase}} \text{GSOH} + \text{ROH}$ (Enzymatic)	(i)
$\text{GSOH} + \text{GSH} \longrightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$ (Non Enzymatic)	(ii)
<hr/>	
$2\text{GSH} + \text{ROOH} \longrightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ (Net Reaction)	
4) Superoxide dismutase (SOD)	
Cu-Zn SOD in cytoplasm, erythrocyte (soluble)	
Mn-SOD } in mitochondria	
Fe-SOD }	
$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{}^1\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	
cf. Haber-Weiss Reaction ($\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{}^1\text{O}_2 + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$)	
5) Catalase	
$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	
6) Disulfide reductase for maintenance of SH-group	
(Exchange of inter and/or intra molecular disulfide)	
Membrane-S-S-Protein	Membrane-SH + Protein-SH
Membrane-S-SG	Membrane-SH + GSH
Protein-S-SG	Protein-SH + GSH
Cystine	2 Cysteine

素 (R=Hの場合) を代謝する酵素系である。なおGSH-Px は表1の1)の(ii)に示すようにGlutathione reductase (GSH-R) と共役してNADPHの供給を受けるサイクル反応によって活性を表す。またNADPHを供給する主な酵素としては表1の2) に示すようなGlucose-6-Phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD)あるいはIsocitrate dehydrogenase (ICDH) などがある。また、GSH-Px と同じ反応を行う酵素として表1の3) に示したGlutathione-S-transferase (GSH-Tase)の存在が知られている⁸⁾。GSH-Taseの触媒作用は表に示すとおり酵素的反応(i)とこれにつづく非酵素的反応(ii)をNet ReactionとしてみるならばGSH-Pxと全く同じ反応を触媒している。このことからGSH-TaseはGSH-Pxと同様に酸化障害に対する防御酵素の一つと考えることが出来る。またXanthine oxidaseやAmino acid oxidase等の各種の生体内酸化反応によって生成されるSuperoxide radical (O_2^-)は過酸化脂質を生成する強い活性分子種であることが知られており、生体にはこのようなラジカルによる酸化障害から細胞を保護する為にSuperoxide dismutase(SOD)が存在している⁹⁾。Leeら¹⁰⁾、Mustafaら¹¹⁾はオゾン暴露によるSODの活性の増加を報告しその役割の重要性を指摘した。Deluciaら¹²⁾はオゾン暴露によって生体内の還元型Glutathione (GSH)が酸化型Glutathione (GSSG)になるよりむしろタンパク質や膜内のSH基と反応してmixed disulfideを形成することを報告した。またLeeら¹⁰⁾はオゾン暴露によって生じたこのようなDisulfideを還元するDisulfide reductase (DSR)の誘導を見出し防御系酵素の一つと見なした。さらに各種の生体内酸化反応に伴って過酸化水素が生じ、この過酸化水素も生体内で酸化障害を発現すること、そしてCatalaseがそれを代謝することもよく知られている。以上のごとく、NO₂やオゾン暴露から生体を防御する酵素的防御系あるいは抗酸化物質の役割は極めて大きい。

著者らは本研究においてNO₂暴露によるマウスの各系統間での感受性の相違と肺の上記防御系酵素群および抗酸化物質との相関を比較しその役割について検討した。

方 法

1. 動物

動物はICR, BALB/C, ddyおよびC57BL/6の4系統の雄マウスを用いた。これらマウスは静岡実験動物農業協同組合より8週令で購入し、当研究所動物飼育施設内で2~3週間飼育した後10~11週令で実験に供した。ICRとddyマウスは対照群と暴露群とも各24匹ずつ、またBALB/CとC57BL/6マウスは各36匹ずつ、合計240匹を用いた。なお分析試料はICRとddyマウスの場合は各4匹の肺をまとめて1サンプルとし、BALB/CとC57BL/6マウスの場合は各6匹の肺をまとめて1サンプルとした。なお各群のサンプル数(n)は6とした。

暴露終了後、マウスをエーテル深麻酔状態で開胸し右心室から注射器で採血後、ただちに心臓と

肺を共に摘出し右心室に生理食塩水を注入して肺が白色になるまで還流を行った。その後、肺を心臓から分離し、ろ紙で水滴を除き試料ビンに入れ窒素ガス置換後用時まで -80°C に保存した。

2. 暴露方法

NO_2 暴露は当研究所実験動物飼育施設内の六錐形AC系チャンバー (1.68m^3) を用い、 20ppm - 16 時間暴露を行った。なをマウスをチャンバー内環境に順応させるために NO_2 を暴露する前日からチャンバーに入れ翌日に NO_2 暴露を行った。また NO_2 暴露中 (16 時間) は絶食・絶水状態に置いた。

3. 試料調製および測定方法

肺は減圧脱気後窒素を十分バブリングして嫌氣的にした 50mM リン酸緩衝液 ($\text{pH}7.5$) を用いてテフロンホモジェナイザーにより窒素気流下で磨砕し、 10% ホモジェネートを調製した。このホモジェネートを $200\times\text{g}$ 、 5 分間の遠心分離を行い上清を得た。この上清の一部をさらに $800\times\text{g}$ 、 20 分間および $105,000\times\text{g}$ 、 60 分間の遠心分離した。この上清を表1に示したGlutathione peroxidase (GSH-Px), Glutathione reductase (GSH-R), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), Isocitrate dehydrogenase (ICDH) およびGlutathion-s-transferase (aryl, aralkyl and epoxy) の活性測定用酵素標品とし、さらにこの上清の一部を 0.1mM EDTAを含む 50mM Phosphate buffer ($\text{pH}7.5$) で一夜透析したものをSuperoxide dismutase (SOD) およびDisulfide reductase (DSR) の酵素標品とした。また $200\times\text{g}$ の上清はCatalase, GSH, TBA値およびVitamin E の測定標品とした。DSRおよびCatalase以外の酵素活性はすべて遠心方式によるジュムサック自動分析装置を用いて測定し、その他は101型日立分光光度計およびPF-510型島津けい光分光光度計によって測定した。

(1) Glutathione peroxidase (GSH-Px) の測定

GSH-Px活性の測定はLittleら¹⁴⁾の方法に従った。反応液は 0.1M Tris-HCl buffer ($\text{pH}7.0$) $380\mu\text{l}$, 2mM NADPH (Oriental Yeast Co. Ltd.) $60\mu\text{l}$, 5mM GSH (和光純薬) $60\mu\text{l}$, 10mM Cumene hydroperoxide $60\mu\text{l}$, $20\mu\text{l}$ のGSH-R (1.2 units, Oriental Yeast Co. Ltd.) をこの順に加えて合計 $580\mu\text{l}$ とし、これに試料 $20\mu\text{l}$ を加えて 30°C で反応を開始した。反応初速度はNADPHの 340nm の減少から求めた。非酵素的反応の補正の為に酵素液の替わりにBufferを加えた場合の反応を同時に行い、この値を酵素添加反応の値から差し引き補正した。なおNADPHとGSHは 0.1M Tris-HCl buffer ($\text{pH}7.0$) に溶かし、Cumene hydroperoxideはエタノールに溶かしたあと同じBufferで 9.2 倍希釈したものを用いた。また測定は反応開始 20 秒後から 15 秒おきに 10 回の読み取りで行った。

(2) Glutathione reductase (GSH-R) の測定

GSH-R活性の測定はBergmeyer¹⁵⁾の記述に準拠した。反応液組成は1 mM EDTA・Na₂を含む0.1M Tris-HCl buffer (pH8.0) 460 μ l, 2 mM NADPH 60 μ l, 10mM GSSG (P L Biochemicals In.) 60 μ lの合計580 μ lからなり反応はこれに20 μ lの試料を加えて30℃で行った。なおNADPHおよびGSSGは1 mM EDTA・Na₂を含む0.1M Tris-HCl buffer (pH8.0) に溶かしたものをを用いた。測定条件はGSH-Pxと同じである。

(3) Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase (G6PD) の測定

G6PD活性の測定はWilhelmら¹⁶⁾の方法に従った。反応液組成は10mM MgCl₂を含む0.1M Tris-HCl buffer (pH7.5) 460 μ l, 4 mM NADP⁺ (Oriental Yeast Co. Ld.) 60 μ l, 12mM Glucose - 6 - phosphate・Na₂ (Sigma) 60 μ lの合計580 μ lからなり反応はこれに試料20 μ lを加えて30℃で行った。なおNADP⁺およびGlucose - 6 - phosphateは本反応に用いたbufferに溶かして用いた。測定は340nmにおける増加を反応開始60秒後から30秒おきに10回読み取りで行った。

(4) 6 - Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) 測定

6PGD活性の測定はG6PDの場合のbufferを20mM MgCl₂と6.5mM Cysteineを含む0.1M Tris-HCl buffer (pH8.5) に、G6Pを6 - Phosphogluconateに変えて行った。

(5) Isocitrate dehydrogenase (ICDH) 測定

ICDH活性の測定はBerntら¹⁷⁾の方法を修飾して行った。反応液組成は42mM NaClを含む0.1M Tris-HCl buffer (pH7.5) 340 μ l, 10mM NADP⁺, 55mM dl - isocitrate (和光純薬, 特級) 40 μ l, 110mM MnSO₄ 100 μ lの合計580 μ lからなり、反応はこれに105,000 \times g遠心上清の1/5希釈サンプルの20 μ lの酵素液を加えて30℃で行った。なおNADP⁺, isocitrateおよびMnSO₄は42mM NaClを含む上記bufferに溶かした。測定条件はGSH-Pxと同様である。

(6) Glutathione - s - transferase (GSH-Tase) 測定

GSH-Tase活性の測定はKaplowitzら¹⁸⁾の方法に従った。Aryl - s - transferase活性は0.143M Phosphate buffer (pH8.0) 8.4ml, 100mM GSH, 1.2mlと30mMの3,4-Dichloronitrobenzene (和光純薬, 特級) 0.4mlを合わせて10mlとした試薬液 500 μ lに100 μ lの試料を加えて30℃で反応を開始した。なお3,4-Dichloronitrobenzeneは57.6mgを5mlのエタノールに溶かした後5mlの蒸留水を加えて10mlとした溶液 (30mM) を用いた。測定は345nmの吸光度変化を反応開始30秒後から15秒おきに10回読み取りによって行った。酵素活性の計算の為の分子吸光係数(ϵ)は8.5(mM⁻¹・cm⁻¹)を用いた¹⁸⁾。Aalkyl - s - transferaseはbufferのpHを6.5に、基質をp-Nitrobenzylchloride

(和光純薬, 一級) の15mM溶液にかえ, Aryl-s-transferaseの場合と同様に測定した。なお測定波長は340nmを用い分子吸光係数(ϵ)は0.63を用いた。また Epoxy-s-transferaseは buffer のpHを7.5に, 基質を1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propane (Eastman Chem.) の15mM溶液にかえAryl-s-transferaseと同様に測定した。なお測定波長は360nmで分子吸光係数(ϵ)は0.5を用いた⁸⁾。

(7) Superoxide dismutase (SOD) 測定

SOD活性の測定はMcCordとFridovich⁹⁾によるFerricytochrome c還元法に従った。反応は 10^{-4} M EDTA \cdot Na₂を含む50mM Na, K-Phosphate buffer(pH7.8)80 μ l, 25×10^{-5} M Xanthine (和光純薬, 特級) 120 μ l, 1×10^{-5} M Ferricytochrome c (Sigma, Horse heart由来, Type III) 100 μ lおよび2.0 units Xanthine oxidase (Sigma, Butter milk由来, Grade III) 100 μ lの合計400 μ lの試薬溶液に試料200 μ lを加えて30 $^{\circ}$ Cで行った。なおXanthineおよびferricytochrome cは 10^{-4} MEDTAを含む50mM Na, K-Phosphate bufferに溶かして用いた。測定波長は550nmを用い測定条件はGSH-Taseと同様であった。またSODが存在しない状態での還元型 ferricytochrome c生成の反応速度(V)はSOD酵素液のかわりにBufferを用いて同時に測定した。SOD活性(Units)の計算はSOD存在による還元型 ferricytochrome c生成速度(v)と上記Vとから(V-v)/vによって求めた。

(8) Disulfide reductase (DSR) 測定

DSR活性の測定はTietze¹⁰⁾の方法に準拠した。酵素反応は10mM EDTA \cdot Na₂を含む50mM Na, K-Phosphate buffer (pH7.5) 100 μ l, 2 mM NADPH 100 μ l, 沸騰水浴中で加熱溶解した飽和Cystine液の2倍希釈液100 μ lの合計300 μ l試薬液に酵素液200 μ lを加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間Incubationした。なおDSRの反応はNADPH依存性であるので非特異的の反応を補正する為により上記反応液組成からNADPHを除いた反応も同時に行った。酵素反応速度の測定は反応終了時に上記反応液(0.5ml)に5 mM EDTA \cdot Na₂液0.5mlと10% TCA液1.0mlを加え3,500rpm, 10分間の遠心によってタンパクを除いた上清中のCysteine量の定量によってNADPH添加の場合から無添加の値を差し引いて求めた。Cysteineの定量は後に述べるGSH定量法によって行った。

(9) Catalaseの測定

Catalase活性の測定は50 μ lの酵素液を用いて3.0ml反応液としてAebi¹¹⁾の方法によった。

(10) Vitamin E の定量

Vitamin E はホモジェネートの200 \times g遠心上清からFolckら²⁰⁾の方法で抽出した脂質画分をエ

タノールに溶かしてEx298nm, Em325nmで測定し、肺のg重量当たりの相対強度で示した。

(11) Glutathione (GSH) 定量

GSHはSedlak - Lindsayら²¹⁾の方法を修飾したDeluciaら²²⁾の方法により、試料は0.5mlを用いて、非タンパク性SHを測定し、これをGSH量とした。

(12) 過酸化脂質 (TBA値) の測定

TBA値の測定は試料0.2mlを用いて、SDS可溶化を含む大川ら²³⁾の方法によった。

(13) タンパク質の定量

タンパク質の定量は牛血清アルブミン (BSA) を標準として用いたLowryら²⁴⁾の方法によった。

統計処理

表中の値はすべて平均±標準偏差で示し、平均値の有意差検定はStudentの*t*検定によった。

結 果

竹中ら²⁾によるマウスの各系統間の感受性 (LC₅₀) の相違に関する報告の中から、高感受性のICR (16時間NO₂暴露のLC₅₀=38ppm), 中感受性のBALB/C (LC₅₀=49ppm)とddy (LC₅₀=51ppm) および低感受性のC57BL/6 (LC₅₀=64ppm) の4系統マウスを選び、これらのマウスの肺における酵素的防御系および抗酸化性物質としてのGSH, Vitamin E さらに過酸化脂質の指標としてのTBA値の測定を行った。

まず肺のタンパク含量, GSH - Px系の酵素およびTCAサイクルのICDH活性の測定結果を表2に示した。まず対照群においては肺のタンパク含量とG6PD活性はLC₅₀値の順に高くなる傾向を示し統計的にもLC₅₀との間に有意な相関 ($P < 0.001$) が見られた。GSH - PxとICDHはC57BL/6のみがICRに比べ有意に高い活性を示しただけでGSH-R活性も4系統間に差は見られなかった。またG6PD活性はddyとC57BL/6の値もICRに比べて有意に低い値を示したが、これら4酵素の活性はすべてLC₅₀値の順序とは対応しなかった。

一方、NO₂暴露群においてGSH - PxとICDH活性はICRに比べて他の3系統のマウスで有意に高い値を示し、LC₅₀値との間にも有意な相関 ($P < 0.05$ と $P < 0.001$) がみられた。G6PD, G6PD活性はICRに対して他の3系統マウスではすべて有意に高い値を示したがLC₅₀との間に相関はなかった。また肺のタンパク含量, GSH - R活性は4系統間で全く差はなくこれらはLC₅₀値の順とも対応しなかった。

表 2 NO₂ 暴露マウスと対照マウスの各系統間における肺の総タンパク量とGSH-Px, GSH-R, G6PD, 6PGD, ICDH, の活性値

Table 2. Total protein and the activities of glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione reductase(GSH-R), glucose - 6 - phosphate dehydrogenase (G6PD), 6 - phosphogluconate dehydrogenase(6PGD)and isocitrate dehydrogenase(ICDH) in lungs of different strain mice exposed to nitrogen dioxide

	Mouse Strain	Non Exposed Group			Exposed Group			Expos/Non Expos	
		M ± SD	%	P	M ± SD	%	P	%	P
Total protein 200xg sup mg/g Lung	ICR	32.3 ± 4.1	100	...	37.8 ± 5.2	100	...	116	non
	BALB/C	32.0 ± 1.6	99	non	34.6 ± 3.2	92	non	108	non
	ddy	37.2 ± 1.4	115	P < 0.05	40.6 ± 4.7	107	non	109	non
	C57BL/6	43.0 ± 4.2	133	P < 0.01	37.9 ± 3.7	100	non	88	non
GSH-Px n moles/mg · prot/min	ICR	215.0 ± 29.9	100	...	133.1 ± 10.0	100	...	62	P < 0.001
	BALB/C	218.9 ± 17.3	102	non	176.5 ± 9.9	133	P < 0.001	81	P < 0.001
	ddy	212.2 ± 11.4	99	non	196.8 ± 13.5	148	P < 0.001	93	non
	C57BL/6	286.3 ± 15.1	133	P < 0.001	198.1 ± 19.9	149	P < 0.001	69	P < 0.001
GSH-R n moles/mg · prot/min	ICR	322.0 ± 45.0	100	...	218.7 ± 18.2	100	...	68	P < 0.001
	BALB/C	337.9 ± 25.0	105	non	278.1 ± 18.3	127	P < 0.001	82	P < 0.01
	ddy	283.1 ± 10.7	88	non	227.9 ± 10.7	104	non	81	P < 0.001
	C57BL/6	301.6 ± 16.2	94	non	207.6 ± 19.6	95	non	69	P < 0.001
G6PD n moles/mg · prot/min	ICR	215.9 ± 31.0	100	...	155.0 ± 13.6	100	...	72	P < 0.001
	BALB/C	217.7 ± 19.3	101	non	200.1 ± 15.2	129	P < 0.001	92	non
	ddy	225.3 ± 12.0	104	non	193.3 ± 11.8	125	P < 0.001	86	P < 0.01
	C57BL/6	248.4 ± 23.7	115	non	174.3 ± 12.8	112	P < 0.05	70	P < 0.001
6PGD n moles/mg · prot/min	ICR	102.4 ± 15.7	100	...	78.3 ± 6.4	100	...	76	P < 0.01
	BALB/C	105.7 ± 11.0	103	non	98.5 ± 6.0	126	P < 0.001	93	non
	ddy	67.0 ± 3.6	65	P < 0.001	103.4 ± 4.3	132	P < 0.001	154	P < 0.001
	C57BL/6	77.7 ± 7.3	76	P < 0.01	93.8 ± 7.5	120	P < 0.01	121	P < 0.01
ICDH n moles/mg · prot/min	ICR	442.8 ± 55.2	100	...	206.8 ± 37.8	48	P < 0.001
	BALB/C	400.9 ± 66.3	91	non	267.3 ± 34.2	129	P < 0.05	67	P < 0.01
	ddy	451.5 ± 15.7	102	non	295.1 ± 37.0	143	P < 0.01	65	P < 0.001
	C57BL/6	538.2 ± 7.9	122	P < 0.01	339.9 ± 43.5	164	P < 0.001	63	P < 0.001

なお対照群と暴露群の間で比較すると、肺のタンパク含量は表中Expos/Non Expos欄に示したごとく全く差は認められなかったが、NO₂ 暴露によって各酵素の比活性はddyとC57BL/6の6PGD以外はすべて低下していた。

次にGSH-Pxと類似の反応を行うGSH-Tase, Superoxide anion radicalを異性化するSOD, Disulfide化合物をSH化合物に還元するDSRおよび過酸化水素を代謝するCatalase等の結果を表3に示した。対照群において、GSH-Taseのうち, Aalkyl活性はICRに比べて他の3系統のマウスでは有意に高くかつLC₅₀との間にも明瞭な相関性が認められた。SOD, DSR活性はICRに比べてC57BL/6が有意に高い値を示しただけであるがLC₅₀値との間では両者ともに有意な相関(P < 0.01およびP < 0.001)を示した。その他, Epoxy活性はICRに比べてBALB/Cのみが有意に高く, またAryl活性は4系統間に差は見られず, Catalase活性もICRに比べBALB/Cが有意に低く, C57BL/6は逆に有意に高い値を示したのみで, これら3酵素の活性はLC₅₀値とは全く相関性がなかった。

表 3 NO₂暴露マウスと対照マウスの各系統間における肺のGSH - s - transferase (aryl, aralkyl, epoxy), SOD, DSR, Catalaseの活性値

Table 3. The activities of glutathione - s - transferase, superoxide dismutase (SOD), disulfide reductase (DSR) and catalase in lungs of different strain mice exposed to nitrogen dioxide

	Mouse Strain	Non Exposed Group			Exposed Group			Expos/Non Expos	
		M ± SD	%	P	M ± SD	%	P	%	P
Aryl n moles/mg · prot/min	ICR	46.8±6.1	100	...	37.7±5.4	100	...	81	P<0.05
	BALB/C	45.9±3.9	98	non	43.3±3.9	115	non	94	non
	ddy	45.6±2.4	97	non	47.4±4.0	126	P<0.01	104	non
	C57BL/6	45.5±2.7	97	non	35.2±3.9	93	non	77	P<0.001
Aralkyl n moles/mg · prot/min	ICR	137.9±21.2	100	...	123.3± 8.1	100	...	89	non
	BALB/C	171.9±14.8	125	P<0.05	178.9±16.1	145	P<0.001	104	non
	ddy	197.7±11.0	143	P<0.001	169.3±11.8	137	P<0.001	86	P<0.01
	C57BL/6	222.6±16.4	161	P<0.001	153.6±14.2	125	P<0.01	69	P<0.001
Epoxy n moles/mg · prot/min	ICR	13.5±1.4	100	...	7.9±1.4	100	...	58	P<0.001
	BALB/C	19.9±1.5	147	P<0.001	14.5±1.1	184	P<0.001	73	P<0.001
	ddy	12.4±1.9	92	non	12.2±1.0	155	P<0.001	99	non
	C57BL/6	14.7±1.2	109	non	10.7±1.8	135	P<0.05	73	P<0.01
SOD units/mg · prot	ICR	0.62±0.09	100	...	0.96±0.11	100	...	155	P<0.001
	BALB/C	0.61±0.09	98	non	0.97±0.13	102	non	160	P<0.001
	ddy	0.73±0.07	119	non	1.03±0.05	108	non	142	P<0.001
	C57BL/6	0.78±0.04	126	P<0.01	1.10±0.14	115	non	140	P<0.001
DSR n molesSH/mg · prot/hr	ICR	33.5±6.0	100	...	19.2±3.4	100	...	57	P<0.001
	BALB/C	37.0±5.9	110	non	31.5±5.0	161	P<0.01	85	non
	ddy	36.0±3.9	107	non	39.8±7.4	207	P<0.001	111	non
	C57BL/6	43.6±6.5	130	P<0.05	25.1±4.4	131	P<0.05	58	P<0.001
Catalase E ₂₄₀ /mg · prot/15sec	ICR	0.131±0.004	100	...	0.108±0.013	100	...	82	non
	BALB/C	0.094±0.008	72	P<0.01	0.116±0.012	107	non	123	P<0.01
	ddy	0.123±0.012	94	non	0.126±0.015	117	non	102	non
	C57BL/6	0.111±0.016	118	P<0.05	0.063±0.008	58	P<0.05	57	P<0.001

一方暴露群では、SOD活性はLC₅₀値の順に高い値を示し統計的にも有意な相関 (P<0.001) が見られた。Aralkyl, Epoxy, DSR活性は暴露群のG6PDおよび6PGDと同様にICRに比べて他の3系統はすべて有意に高かったがLC₅₀値の順序とは対応しなかった。Aryl活性はICRに比べてddyのみが有意に高く、Catalase活性はICRに比べてC57BL/6のみが有意に低い値を示したのみでこれら2酵素もLC₅₀値の順序とは対応しなかった。しかしAryl, DSRではC57BL/6を除くとLC₅₀値に対応して高くなり、LC₅₀値との間に有意な相関 (P<0.001) が見られた。

なお対照群と暴露群の間で比較すると、SODのみが4系統とも暴露後に有意な増加を示しNO₂暴露後の酵素誘導が極めて早くかつ酸化的障害を防御する重要な酵素であることを示唆した。

表4には酸化的障害に対して防御的作用を示すVitamin EとGSH、および過酸化脂質の指標としてのTBA値を示した。対照群および暴露群においてGSH値はICRに比べて他の3系統のマウスとも有意に高く、生体に有害な過酸化脂質量を示すTBA値は逆に有意に低い値を示した。また図1に示すごとく対照群および暴露群のGSH値はLC₅₀値との間に統計的にも有意な相関 (P<0.001) が見られ、TBA値は図2に示すごとく逆相関 (P<0.05, P<0.001) が見られた。Vitamin Eは暴

表 4 NO₂暴露マウスと対照マウスの各系統間における肺のVitamin E, GSH, Total SH, TBA値

Table 4. Vitamin E, glutathione, total sulfhydryls and TBA values in lungs of different strain mice exposed to nitrogen dioxide

	Mouse Strain	Non Exposed Group			Exposed Group			Expos/Non Expos	
		M ± SD	%	P	M ± SD	%	P	%	P
Vitamin E RI/g Lung	ICR				584±115				
	BALB/C				616±134				
	ddy				746± 80				
	C57BL/6								
GSH n molesSH/g Lung	ICR	641± 11	100	...	109±10	100	...	17	P<0.001
	BALB/C	854± 85	133	P<0.01	296±89	272	P<0.001	35	P<0.001
	ddy	852±128	133	P<0.05	194±64	178	P<0.05	23	P<0.001
	C57BL/6	1,258±200	196	P<0.001	391±84	359	P<0.001	31	P<0.001
Total SH μmolesSH/g Lung	ICR				4.27± 0.77	100	...		
	BALB/C				4.60± 0.46	108	non		
	ddy				4.08± 0.54	196	non		
	C57BL/6				4.78± 0.18	112	non		
TBA (OD532) n moles/g Lung	ICR	50.5± 3.6	100	...	72.7±20.9	100	...	144	P<0.05
	BALB/C	36.9± 8.3	73	P<0.01	48.2±15.2	66	P<0.05	131	non
	ddy	39.0± 4.5	77	P<0.01	39.0± 2.9	54	P<0.01	100	non
	C57BL/6	35.0± 5.6	69	P<0.001	35.9± 5.7	49	P<0.01	103	non

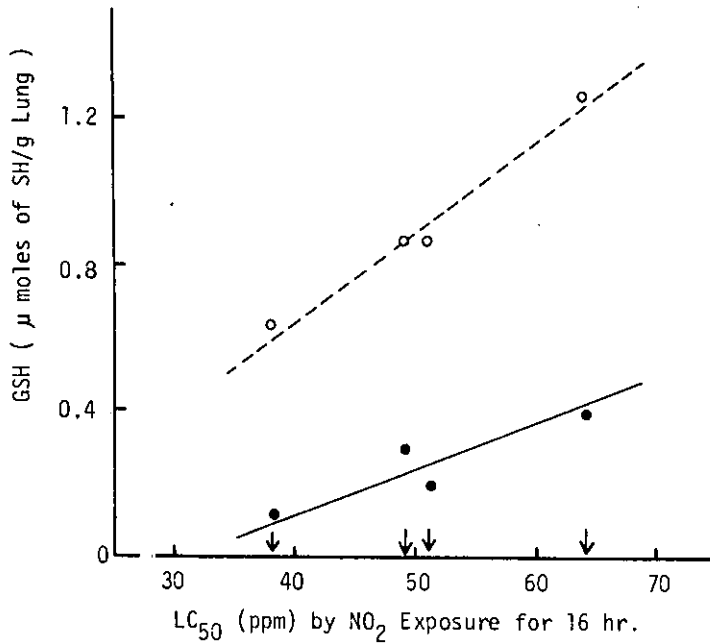


図 1 NO₂暴露によるICR, BALB/C, ddy およびC57BL/6 雄マウスのLC₅₀²⁾値と肺におけるGlutathione (NPSH) との相関
○, 対照群 (P<0.001); ●, 暴露群 (P<0.001)

Fig. 1 Relationship between LC₅₀²⁾of ICR, BALB/C, ddy and C57BL/6 mice exposed to nitrogen dioxide and glutathione in lungs of each strain mouse
○, control group (P<0.001); ●, NO₂ exposed groups (P<0.001)

露群のみの測定であるが、ICRの場合に異常な高値を示した以外は他の3系統ではLC₅₀値の順に高くなった。

また対照群と暴露群間の变化を比べると、暴露によりGSH値は4系統とも有意に低下し、TBA値は感受性の高いICRが暴露によって有意な増加を示しただけで感受性の低いddyやC57BL/6はほとんど変化が見られず、過酸化脂質生成の難易度もマウスの感受性の相違と関連が強いものと考えられる。

考 察

本研究はマウスの各系統間でのNO₂暴露に対する感受性の違いを酸化的障害から生体を防御する各種酵素やGSH, Vitamin E 含量および過酸化脂質量等の生化学的指標の比較から感受性の相違のメカニズムを解明する実験の一環として行われた。

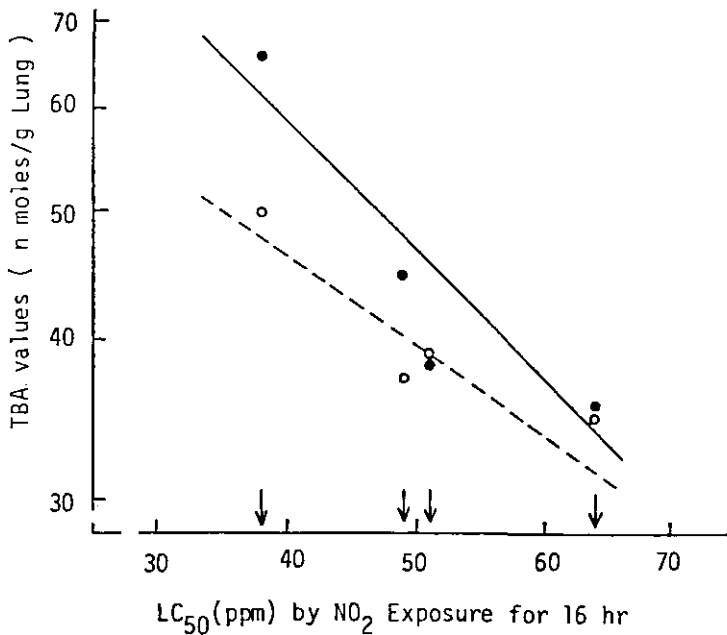


図 2 NO₂暴露によるICR, BALB/C, ddyおよびC57BL/6雄マウスのLC₅₀²⁾値と肺における過酸化脂質(TBA)との相関
○, 対照群(P<0.05); ●, 暴露群(P<0.001)

Fig. 2 Relationship between LC₅₀²⁾ of ICR, BALB/C, ddy and C57BL/6 mice exposed to nitrogen dioxide and lipid peroxides (TBA values) in lungs of each strain mouse
○, control groups(P<0.05); ●, NO₂ exposed groups (P<0.001).

系統の異なるマウスの間には上記のような酵素の活性や抗酸化性物質量が遺伝的に異なっているものがありこのような相違のうち、竹中ら²⁾によって報告されたNO₂の16時間暴露によるLC₅₀値とよく対応するものがいくつか見い出された。そのようなものとして対照群ではG6PDやGSH-Pxと同様に過酸化代謝に関与するGSH-Tase (Aryl-s-transferase), Superoxide anion radical (O₂⁻)を異性化し脂質過酸化を防止するSOD, 酸化的反応によって生じたDisulfidesを還元してもとのSH化合物に還元するDSRおよびGSH量等があげられる。さらに生体にとって有害な過酸化脂質はLC₅₀で示された高感受性マウスでは高く、感受性が低いマウスでは低い値を示した。このことは脂質過酸化現象およびその防御酵素系がマウスの感受性の主要な要因であることを示唆していると考えられる。このようなLC₅₀との対応性はNO₂暴露群の場合にさらに多くの酵素および抗酸化性物質について見られた。これらにはGSH-Px, ICDH, GSH-Tase (Aryl-s-transferase), SOD, DSR および Vitamin E 量, GSH量等があげられる。また過酸化脂質 (TBA値) は対照群に比べて一般に増加しておりかつ対照群と同様に感受性が高いマウスではその値が高く感受性が低いマウスでは低い値を示しLC₅₀値と統計的にも有意な逆相関性を示した。このようにNO₂暴露による結果も脂質過酸化現象およびその防御酵素系がマウスの感受性の主要な要因であることを強く示唆した。

またこれらの結果は白色マウスよりも黒色マウスのほうが感受性が低いことを示した。このような相違は Goldsteinら¹⁾も指摘しているようにチロシナーゼやパーオキシダーゼによって触媒されるメラニン色素形成能と関係があるものと考えられ、パーオキシダーゼの関与については本研究によって支持されたものとする。

Deluciaら¹²⁾は2 ppmオゾンの8時間暴露によってGSH-RやG6PDのような活性部位にSH基を含む酵素の活性およびGSHなどが顕著に低下することを示し、GSHについてはMountainら²⁵⁾も同様の結果を報告している。一方、Chowら^{6), 7), 27)}は低濃度のNO₂およびオゾンの8日間あるいは30日間暴露によってGSH-Px, GSH-RおよびG6PD等が初期に低下し、その後増加することを報告している。著者らも10ppmのNO₂暴露によってGSH-Px, GSH-RおよびG6PD等の酵素活性は低下しその後上昇することを確認している²⁶⁾。これらのことから、上記酵素活性やGSH等はNO₂やオゾンの暴露濃度と暴露時間によって変動するものであることが明らかとなっている。このような事実から、今回の実験において酵素活性がLC₅₀値と多少対応しない点のみうけられたがこの理由は上記のような減少あるいは増加が起る時期が各酵素によって異なることによるものと考えられる。さらにこのような変動は同じ酵素についてもマウスの系統によって異なる可能性がある。これらについては今後更に検討してゆく予定である。

引用文献

- 1) Goldstein, B. D., L. Y. Lai, S. R. Ross and R. Cuzzi—Spada (1973) : Susceptibility of inbred mouse strains to ozone. *Arch. Environ. Health*, **27**, 412—413.
- 2) 竹中参二, 堀内博人, 清水不二雄 (1979) : 二酸化窒素急性暴露によるゴールデンハムスターの高感受性; 国立公害研究所研究報告, 8号, 7—49.
- 3) 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.
- 4) Goldstein, D. B., C. Lodi, C. Collinson and O. J. Balchum (1969) : Ozone and lipid peroxidation. *Arch. Environ. Health.*, **18**, 631—635.
- 5) Tappel, A. L. (1975) : Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. In "Pathobiology of cell membranes." Acad. Press. N. Y., **1**, 145—170.
- 6) Chow, C. K., C. J. Dillard and A. L. Tappel (1974) : Glutathione peroxidase system and lysozyme in rats to exposed to ozone or nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **7**, 311—319.
- 7) Chow, C. K., A. L. Tappel (1973) : Activities of pentose shunt and glycolytic enzymes in lungs of ozone exposed rats. *Arch. Environ. Health*, **26**, 205—208.
- 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) McCord, J. M. and I. Fridovich (1969) : Superoxide dismutase : An enzymic function for erythrocyuprein (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049—6055.
- 10) Lee, S. D. and B. Peirano (1977) : Biochemical effects of environmental pollutants. *Ann. Arbor Science, Publishers Inc.*, 59—96.
- 11) Mustafa, M. G., S. M. Macres, B. K. Tarkington, C. K. Chow, and M. Z. Hussain (1975) : Lung superoxide dismutase (SOD) : Stimulation by low-level ozone exposure. *Clin. Res.*, **23**, 138A.
- 12) Delucia, A. J., P. H. Hoque, M. G. Mustafa and C. E. Cross (1972) : Ozone interaction with rodent lung : Effect on sulfhydryls and sulfhydryl containing enzyme activities. *J. Lab. Clin. Med.*, **80**, 559—566.
- 13) Aebi, H. (1974) : Catalase. In "Methods of enzymatic analysis." (ed. by Bergmeyer, H. U.) Acad. Press. N. Y., **2**, 673—684.
- 14) Little, C. and P. J. O'Brien (1970) : Properties and regulation of glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3632—3639.
- 15) Bergmeyer, H. U. (1974) : Reagents for enzymatic analysis : Glutathione reductase. In "Methods of enzymatic analysis." (ed. by Bergmeyer, H. U.), **2**, 465—466.
- 16) 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.
- 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957) : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497—507.
 - 21) 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.
 - 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 nonprotein sulfhydryls. *J. Clin. Inv.*, **55**, 794—802.
 - 23) Okawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979) : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analy. Biochem.*, **95**, 351—358.
 - 24) 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.
 - 25) Mountain, J. T. (1963) : Detection hypersusceptibility to toxic substances : An appraisal of simple blood tests. *Arch. Environ. Health*, **6**, 357—365.
 - 26) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1980) : Lipid peroxidation as measured by in vivo ethane exhalation of rats exposed to nitrogen dioxide. *Lipids*, (in press).
 - 27) 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.

I-7

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*

Lipid Peroxidation as Measured by Ethane Exhalation
of Rats Exposed to Nitrogen Dioxide*

嵯峨井 勝¹・市瀬孝道¹・織田 肇¹

Masaru SAGAI¹, Takamichi ICHINOSE¹ and Hajime ODA¹

要 旨

本研究はNO₂暴露ラットにおける過酸化脂質生成の経時的变化を調べるために行われた。実験はウイスター系雄ラットを用いて呼気中のエタンを測定する方法で *in vivo* の過酸化脂質の生成を調べた。

10ppmのNO₂に連続2週間暴露したラットの場合、呼気から排出されたエタンの量はNO₂暴露期間中に極めて複雑な変動を示した。すなわち、エタン産生量はNO₂暴露1日後にわずかに減少し、その後急速に増加した。この増加は4日目で最高レベルに達し、その値は暴露前の値(100%)の220%に相当した。さらに、肺の glutathione peroxidase (GP_x) と glutathione reductase (GR) 活性も1~2日目で若干減少したあとに増加しはじめ5~7日目には暴露前の130~150%に相当する有意な増加を示し、その後14日目まではそのレベルを維持した。なお3日目以後のエタン産生量の変化がGP_xやGR活性の変化と対称形であったことは示唆に富んでいる。

一方、0.4, 1.2および4.0ppmの低濃度のNO₂に4か月間暴露したラットの呼気中エタンの産生パターンは10ppmNO₂暴露の場合と極めて類似していた。10ppmNO₂暴露の場合と比べて、低濃度暴露の場合は第1にピーク時のエタン産生量が低レベルである

*本論文の原著(英文)は現在“Lipids”誌に印刷中である。

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

こと、第2にピークの出現時期が遅れていること、第3にNO₂暴露の長期化に伴いエタン産生は除々にではあるが再び増加することなどの特長的な違いが認められた。

Abstracts

This research was undertaken to follow the periodical fluctuation of lipid peroxidation products in rats exposed to nitrogen dioxide. Wistar male rats were examined for lipid peroxidation as demonstrated by ethane exhalation. In rats continuously exposed to 10 ppm nitrogen dioxide for two weeks, the amount of ethane exhaled fluctuated in a complex manner during the exposure. It was decreased slightly at the first day of exposure, and was then increased rapidly. The maximum value was observed at the fourth day, and it was 220% of the initial value. And then the value was decreased gradually again to the initial level. Furthermore, the activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase in lungs were depressed slightly after 1 to 2 days, and then after 5 to 7 days, significant increases were found and remained essentially plateau for as long as 14 days. The changes of these enzyme activities were symmetrical against the change of ethane formation after 3 days.

Similar changes in ethane formation were observed also in rats exposed to the lower levels of nitrogen dioxide (0.4, 1.2 and 4.0 ppm) for four months. Compared with 10 ppm nitrogen dioxide exposure for 14 days, the characteristic differences in rats exposed to the low concentrations of nitrogen dioxide (0.4-4.0ppm) were the declines of ethane formation the delay in alterations, and the tendency toward gradual increase during the longer period exposure.

はじめに

NO₂は大気中に一般的に存在している強力な酸化剤の一つであり、このNO₂が病理的な障害を引き起こすことはよく知られている^{1),2)}。生物の膜構成脂質の過酸化は細胞障害や多くの毒性発現過程の重要な部分と考えられている³⁾ので、NO₂の毒作用もその多くの部分は脂質の過酸化によるものと考えられる。NO₂暴露によって脂質の過酸化反応が起こるということは共役ジェンの測定によってThomasら⁴⁾により初めて報告された。その後、多くの研究者がNO₂暴露による脂質過酸化物の検出を試みたが成功していない⁵⁾。

炭化水素ガスの産生は食用油の自動酸化の初期に出現することが以前から知られていた^{6)~8)}。エタンはリノレン酸の自動酸化によって産生される⁹⁾ものであり、Rielyら¹⁰⁾はこのエタン分析法をはじめて生物システムに応用した。その後、多くの研究者が *in vivo* の脂質過酸化の証明としてエタン分析法を用いた実験結果を報告している^{11)~16)}。

本研究はNO₂暴露によって脂質過酸化が起こることを証明し、さらにNO₂暴露によるこの脂質過酸化の経時的変動を検討した。

方 法

動物はJCL:Wistar系雄ラットを用いた。10ppmNO₂暴露の実験には8週令のラットを、0.4、1.2および4.0ppmのNO₂暴露の場合には13週令ラットを使用した。10ppmNO₂暴露の場合は小型ハンギング・ワイヤーメッシュ・ケージにラットを各3匹ずつ入れガラス・ステンレス製小型チャンバー(0.4m³)を用いた。このチャンバーのNO₂濃度制御その他については前報¹⁷⁾で報告した。また0.4~4.0ppmNO₂暴露の場合は大型ハンギング・ワイヤーメッシュ・ケージに各6匹ずつ入れて同型の大型チャンバー(2.0m³)を用いた。なおチャンバー内は温度24~26℃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。また飼料は日本クレア製CE-2を与えた。

呼気から排出されたエタンの分析法は前報¹⁸⁾に述べたとおりである。また産生されたエタンの量は $p \text{ moles} \cdot \text{エタン}/100\text{g体重}/\text{min}$ の単位で表した^{19),20)}。

肺のグルタチオンパーオキシダーゼ(GP_x),グルタチオン還元酵素(GR),グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD)および6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PGD)の活性は50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.4)の15%ホモジェネートの100,000×g遠心上清を用いて測定した。

結 果

10ppmNO₂の2週間暴露によるエタン産生の経時変化とGP_xおよびGRの経時変化を図1に示した。エタンの産生はNO₂暴露の間に極めて複雑な変動を示した。このエタン産生は暴露1日後で有意な減少を示し、その値は暴露前(100%)の約60%に相当した。NO₂暴露の初期におけるこのような減少はラットに4.48ppmNO₂を1時間暴露してペンタンを測定した既報実験²¹⁾の場合にも観察された。その後、エタンの産生は急速に増加し4日目で最高レベルに達し、その時の値は暴露前の約220%に相当した。さらにその後、エタン産生量はふたたび減少し10日目で最初のレベルにもどった。このような変動のなかで有意な増加がみられたのは3日目から5日目の間であった。

一方、肺のGP_xとGR活性は2日目で一度減少し、その後5日目から7日目にかけて有意な増加を示し、14日目まではそのレベルを維持した。五炭糖リン酸回路のG6PDおよび6PGDの活

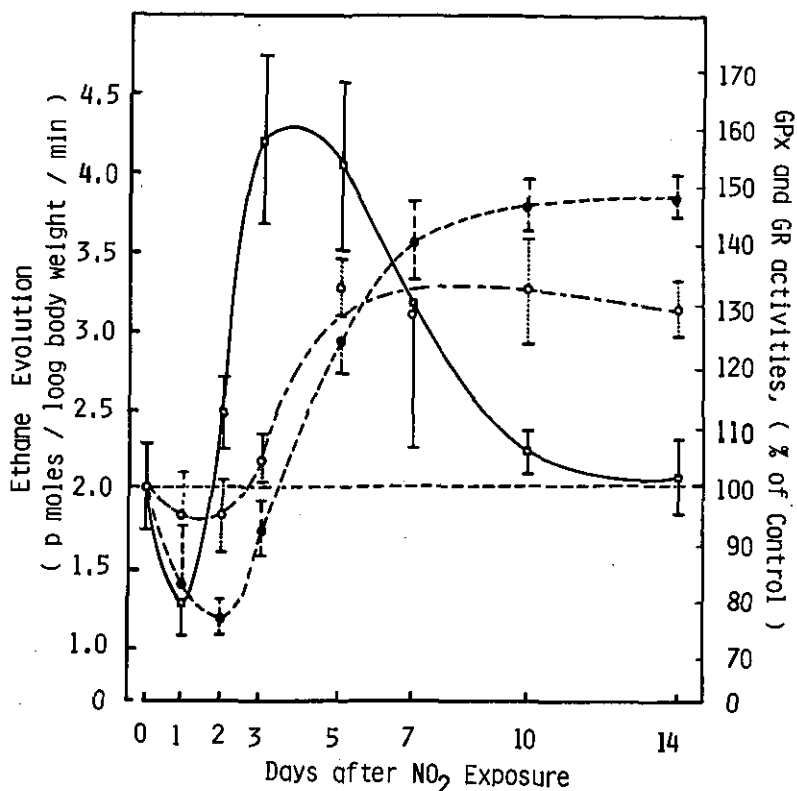


図 1 10ppmNO₂に2週間暴露したラットの呼気中エタン産生と肺のグルタチオン・パーオキシダーゼとグルタチオン還元酵素活性の経時的変化
 □, エタン産生; ●, グルタチオン・パーオキシダーゼ (GP_x); ○, グルタチオン・還元酵素 (GR): 値は平均値±標準誤差で示した。測定動物数 (n) は8~12匹であった。

Fig. 1 Periodical variations of ethane evolution in breath and of the activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase in lungs of rats exposed to 10 ppm nitrogen dioxide for two weeks
 □, Ethane evolution; ●, glutathione peroxidase (GP_x); ○, glutathione reductase (GR): The values were expressed by mean ± SEM (n = 8~12).

性もまた類似の経時的変動を示し、3日目以後で有意な増加を示した。この時の平均値は最初の値の170~200%に相当した。またエタン産生とGP_xおよびGRの変化は初期の減少期を除くと3日目以後では明瞭な対称性を示していた。

0.4, 1.2 および 4.0 ppmNO₂に暴露したラットのエタン産生の経時変化を図2に示した。これらの経時変化のパターンも 10ppmNO₂ 暴露の場合と極めてよく類似していた。最初の1週間目でエタン産生は最大の増加を示し、0.4, 1.2 および 4.0 ppmNO₂ 暴露の値はそれぞれ対照群の108, 135 および 172%に相当した。この時、1.2ppmと4.0ppm群は対照群と有意差 (P<0.05~

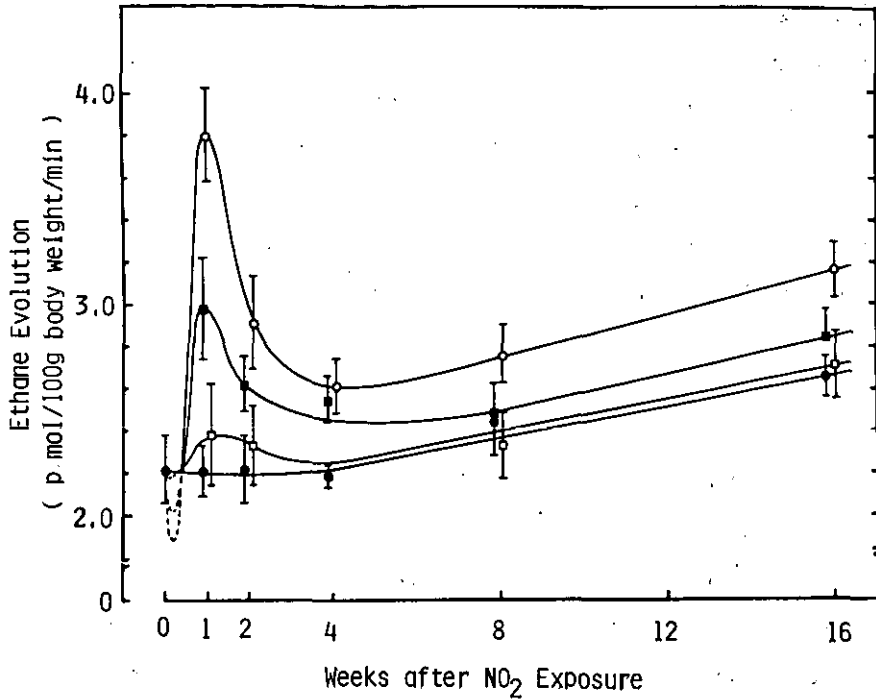


図 2 0.4, 1.2 および 4.0 ppm NO₂に4か月間暴露したラットの呼気中エタン産生の経時的变化
 ●, 対照群; □, 0.4 ppm; ■, 1.2 ppm; ○, 4.0 ppm: 値は平均値±標準誤差

Fig. 2 Periodical variations of ethane evolution in breath of rats exposed to 0.4, 1.2 and 4.0 ppm nitrogen dioxide for 4 months.
 ●, Control group; □, 0.4 ppm; ■, 1.2 ppm; ○, 4.0 ppm: The values are expressed by mean ± SEM (n = 5~12).

0.01) を示した。その後エタン産生量は4週間目まで減少を続けた。この時も、1.2 ppmと4.0 ppm 群では対照群との間で有意な高値 ($P < 0.05$) を示した。さらにその後、ふたたび徐々に増加して行き16週目でふたたび4.0 ppm群でのみ有意な増加を示した。なおNO₂暴露による1週間以内の減少は10 ppm NO₂暴露実験から推定したものであり図中には点線で示した。

考 察

本研究において、NO₂暴露によって脂質の過酸化反応が起こることをラットの呼気中エタンを分析する新しい方法によって証明し、さらにその脂質過酸化は複雑な経時的变化をたどることを示した。これまで、Thomasらによる脂質過酸化を示した報告があるが、その後の多くの研究者の追試にもかかわらずNO₂暴露による過酸化脂質の生成を検出することはできなかった。これは過酸化

脂質産生が非常に複雑な時間的経過をたどることによるものと考えられる。

10ppmNO₂暴露実験において、エタン産生とGP_xおよびGR活性の経時変化は極めて対称的な関係にあったことから、NO₂暴露によって過酸化脂質が早期に生じ、この過酸化脂質による障害から細胞を保護する為に次の段階でGP_xとGRが誘導され、生じた過酸化脂質を分解するのであろうと考えられる。なお過酸化脂質は主に生体膜中で産生されるがMcCayら²²⁾によれば、GP_xは膜の中に存在する過酸化脂質を代謝することは出来ない。一方、Tappel²³⁾は現在既知のホスホリパーゼよりもはるかに速い加水分解速度でリン脂質から脂肪酸の過酸化物を切断するホスホリパーゼの存在を報告した。もしこのように加水分解速度の速いホスホリパーゼが存在するならば上記の結果は矛盾なく説明することができる。その他に、McCayら²²⁾はGP_xは脂肪酸の過酸化物を無毒な水酸化脂肪酸に変えるよりは、むしろ脂肪酸の過酸化そのものを防ぐように作用しているということを報告している。この結果は“エタン産生とGP_x活性が極めて対称的に変化する”という著者らの結果を都合よく説明することが出来る。

一方、エタン産生の経時的変動パターンは15~17ppmのNO₂暴露によって肺胞Ⅱ型細胞が増殖する時のEvansら²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾のパターンと極めて類似している。すなわち著者らの実験のエタン産生が0~1日目で低下している結果はEvansらのⅠ型細胞が0~1日目で障害を受けるという結果と対応し、その後の1~3日目でのエタンの産生増加過程は肺胞の修復過程としてのⅡ型細胞の増殖開始過程と対応するものと考えられる。さらに3日目以後ではⅡ型細胞の増殖は低下し、GP_xやGRのような酸化的ストレスに対して防御的に働く酵素が誘導され始める可能性がある。

0.4, 1.2 および 4.0 ppmの低濃度NO₂に16週間暴露したラットのエタン産生過程も10ppmNO₂暴露の場合と極めて類似のパターンを示した。この結果は低濃度NO₂暴露の場合、エタン産生レベルが低く、かつエタン産生のピーク出現時点も高濃度暴露の場合よりも遅れるものであることを示している。また4週目以後での非常にゆっくりとした増加は先に報告した¹⁸⁾ように老化過程の変化に対応するものであると思われる。また4週目から8週目には対照群とNO₂暴露群の間でのエタン産生量の差は小さくなっているが、その後16週目ころには両者の差がひろがる傾向を示していることは興味ある事実である。このようなことから著者らは低濃度でもより長期の暴露を続けるならば対照群と有意な差を示す可能性を期待できると考えており、現在そのような研究を進めている。

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" (B. F. Trump and A. U. Arstila, eds.), 1, 145-170.
Academic Press, New York.

- 4) 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.
- 5) Mustafa, M. G. and D. F. Tierney (1978) : Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respira. Dis.*, **118**, 1061-1090.
- 6) Frankel, E. N., J. Nowakowska and C. D. Evans (1961) : Formation of methyl azelaaldehyde on autoxidation of lipids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **38**, 161-162.
- 7) Horvat, R. J., W. G. Lane, Ng, H. and A. D. Shepherd (1964) : Saturated hydrocarbons from autoxidizing methyl linoleate. *Nature*, **203**, 523-524.
- 8) Smouse, T. H., B. D. Mookherjee, and S. S. Chang (1965) : Identification of dec-1-yne in the initial autoxidation products of vegetable oils. *Chem. Ind.*, **29**, 1301-1303.
- 9) Lieberman, M. and L. W. Mapson (1964) : Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature*, **204**, 343-345.
- 10) Riely, C. A., G. Cohen, and M. Lieberman (1974) : Ethane evolution : A new index of lipid peroxidation. *Science*, **183**, 208-210.
- 11) Hafeman, D. G. and W. G. Hoekstra (1977) : Protection against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in the rat by dietary vitamin E, selenium and methionine as measured by ethane evolution. *J. Nutr.*, **107**, 656-665.
- 12) Hafeman, D. G. and W. G. Hoekstra (1977) : Lipid peroxidation *in vivo* during vitamin E and selenium deficiency in the rat as monitored by ethane evolution. *J. Nutr.*, **107**, 666-672.
- 13) Dillard, C. J., E. E. Dumelin and A. L. Tappel (1977) : Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat. *Lipids*, **12**, 109-114.
- 14) Köster, U., D. Albrecht, and H. Kappus (1977) : Evidence for carbon tetrachloride- and ethanol-induced lipid peroxidation demonstrated by ethane production in mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **41**, 639-648.
- 15) Dumelin, E. E., C. J. Dillard and A. L. Tappel (1978) : The effect of vitamin E and ozone on pentane and ethane expired by rats. *Arch. Environ. Health*, **33**, 129-134.
- 16) Lindstrom, T. D. and M. W. Anders (1978) : Effect of agents known to alter carbon tetrachloride hepatotoxicity and cytochrome P-450 levels on carbon tetrachloride-stimulated lipid peroxidation and ethane expiration in the intact rat. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 563-567.
- 17) Sagai, M. (1978) : The effects of enzyme-inducing agents on the survival times of rats exposed to lethal levels of nitrogen dioxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **43**, 169-174.

- 18) 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.
- 19) Sagai, M. and A. L. Tappel (1978) : Effect of vitamin E on carbon tetrachloride induced lipid peroxidation as demonstrated by *in vivo* pentane production. *Toxicol. Lett.*, **2**, 149—155.
- 20) Sagai, M. and A. L. Tappel (1979) : Lipid peroxidation induced by some halomethanes as measured by *in vivo* pentane production in the rat. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **49**, 283—291.
- 21) Morgan, C. J., M. Sagai and A. L. Tappel. (1980) : Respiratory pentane : A measure of *in vivo* lipid peroxidation applied to rats fed diets varying in polyunsaturated fats, vitamin E, and selenium and exposed to nitrogen dioxide. *Toxicol. Lett.*, **6**, 251—256
- 22) McCay, P. B., D. D., Gibson, K. L. Fong, and K. R. Hornbrook (1976) : Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, **431**, 459—468.
- 23) Tappel, A. L. (1980) : Measurement of and protection from *in vivo* lipid peroxidation. In "Free Radicals in Biology" (ed. by Pryor, W. A.), **4**, 1—47.
- 24) Evans, M. J., R. J. Stephen, L. J. Carbal and G. Freeman. (1972) : Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of NO₂. *Arch. Environ. Health*, **24**, 180—188.
- 25) 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. Path.*, **70**, 175—198.
- 26) Evans, M. J., L. J. Carbal-Anderson and G. Freeman (1975) : Transformation of alveolar type 2 cell to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp. Mol. Path.*, **22**, 142—150.

I-8

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*

In Vivo Lipid Peroxidation and Serum Lipid Contents of Aging Rats*

嵯峨井 勝¹・市瀬孝道¹

Masaru SAGAI¹ and Takamichi ICHINOSE¹

要 旨

生物の老化は脂質過酸化と深い関連があることが知られている。本研究は環境汚染物質の慢性影響を研究する際の老化にともなう影響の基礎資料を得ることを目的に行われた。実験には4, 12, 22 および32か月令のJCL:ウイスター系雄ラットを用いた。

*In vivo*の脂質過酸化の測定は呼気から排出される脂質過酸化物の β 分解によって生ずるエタン, エチレン, ブタン およびペンタンをFID-ガスクロマトグラフィーで分析する呼気ガス分析法によって行った。上記4種の炭化水素の産生量は老令ラットほど高く, その量は年令との間に対数的直線相関を示し, 相関係数(r)は0.408-0.796 ($P < 0.01-0.001$)であった。また32か月令ラットのペンタン産生量は4か月令ラットの約2.5倍であり, その他の炭化水素の産生はエチレン>エタン>ブタンの順であった。4か月令ラットにおけるエタンとエチレンの産生量は12か月令ラットの間とも有意な増加を示したが, その他の炭化水素の場合は, 22か月令以上の場合のみ有意差を示した。この結果, 呼気中炭化水素の測定法は老化に伴う *in vivo*の脂質過酸化の指標として極めて鋭敏なものであり, 特に四つの炭化水素のうちペンタンが最もよい指標であることを示している。

一方, TBA法による血清中の脂質過酸化も老化につれて増加する傾向を示したが32

* 本論文は "Life Sciences", 27, 731-738 (1980) に発表したものに資料を付け加えたものである。

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

か月令ラットの値は22か月令ラットの場合よりも低下していた。また血清脂質成分としてリン脂質 (PL), トリグリセリド (TG), 総コレステロール (T・CHL), 遊離型コレステロール (F・CHL) およびHDL-型コレステロール (HDL・CHL) について検討した。TG 以外はすべて4か月令から22か月令まで年令に依存して増加したが、32か月目では血清TBA値と同様にむしろ低下していた。血清TBA値と脂質成分との間の内部相関はリン脂質, 総コレステロールおよび遊離型コレステロールとの間で最も顕著であった。

Abstract

This research was undertaken to follow the course of lipid peroxidation products in rats of varying age by a new method. Wistar male rats, 4, 12, 22, and 32 months old, were examined for lipid peroxidation as demonstrated by *in vivo* ethane, ethylene, butane and pentane in the breath of intact animals. In the older rats, the amounts of the four hydrocarbons exhaled were greater than those in younger rats. Qualitatively, all hydrocarbons tested were related to age by an exponential relationship, with regression fit correlation coefficient, 0.408-0.796 ($p < 0.01-0.001$). When hydrocarbon gas production of 32 month-old rats was compared with that of 4 month-old rats, the greatest ratio was that for pentane (2.53). The remaining were ordered ethylene > ethane > butane. There were significant differences in the production of ethane and ethylene between 12 month-old rats and 4 month-old rats, and in the production of four hydrocarbons between 22 and 32 month-old rats and the youngest.

Thiobarbituric acid reactants in serum exhibited an increasing tendency with age, but the values for 32 month-old rats were lower than those for 22 month-old rats. However, the differences between the age groups were not significant.

These results showed that the measurement of hydrocarbons in the rats' breath was a sensitive index of *in vivo* lipid peroxidation during aging, and that pentane was the best index among the four hydrocarbons.

はじめに

環境汚染物質の慢性影響に関する長期間の研究においては、実験動物の老化とそれに伴って生ず

る生理的变化のは握は実験上最も留意すべき事柄の一つである。また一般に老化は脂質の過酸化と最も関係の深い生理現象と考えられている。

本研究は環境汚染物質の慢性影響を研究する際の重要な基礎資料を得ることを目的として計画された。

生物の老化過程が脂質過酸化による細胞膜成分の障害と密接に関連していることを示す実験的証拠は多くの人々によって示され^{1)~5)}, *in vivo*の脂質過酸化が老化の細胞レベルでの障害反応を起こす基本的機構であると見なされて来た^{2), 6)}。これまで老化過程において脂質過酸化反応が起こっていることを示す証拠がいくつかの実験手法によって証明されている。その一つはけい光セロイドやリポフスチン色素^{7), 8)}のような細胞内に蓄積する脂質過酸化産物やチオバルビツール酸(TBA)反応性物質⁹⁾等の測定によるものであり、第二に脂質過酸化物の β 分解によって生ずる動物呼気からの揮発性炭化水素の同定である^{10)~12)}。食品化学の分野においては食用油の自動酸化によって炭化水素ガスが生ずることは以前から知られていた^{13)~15)}。エタンはリノレン酸やドコサヘキサエン酸のような ω -3脂肪酸類の自動酸化によって生ずる¹⁴⁾。エチレンは過酸化されたリノレン酸の銅触媒による分解反応によって生ずることが Liebermanら^{16), 17)}によって報告された。ブタンはミリスチン酸の過酸化物の分解によって生じ¹⁸⁾またペンタンはリノール酸やアラキドン酸の過酸化物の熱分解^{19), 20)}や鉄の触媒による分解反応によって生ずる²¹⁾ことなどが知られている。

老化に伴う血清脂質成分の変化についてはヒトについての報告^{26), 27)}がいくつかみられているがラットについての報告はあまりみられない。

この研究は年令の異なるラットの脂質過酸化を4種類の呼気中炭化水素を測定する方法と血清中TBA反応物質を測定する方法で比較し、さらに血清中TBA値と血清脂質成分との内部相関性を調べる為に行われた。

方 法

実験には4か月令, 12か月令, 22か月令および32か月令のウィスター系雄ラットを用いた。ラットは日本クレアよりSPF状態の1か月令動物を購入し, 24—26℃に制御された飼育室で14時間照明10時間消燈サイクルの条件でハンギング・ワイヤー・メッシュ・ケージの中で5匹ずつにわけて飼育された。4か月令ラットの場合は購入後セミクリーン飼育室で3か月飼育し, 12か月令, 22か月令および32か月令ラットは購入後SPF飼育室で9か月間, 19か月間および29か月間飼育した後セミクリーン飼育室で2か月間飼育したものを実験に供した。飼料は日本クレア製CE-2飼料を与え, SPF飼育室で飼育中は同上飼料を滅菌して与えた。測定に際して特に絶食は行っていない。血清はエーテル麻醉下で頸動脈より採取した血液より遠心分離によって調製し, 用時まで-80℃に保存した。

呼気ガス分析にはFID付き島津GC-7AGガスクロマトグラフィーを用いた。ガス分析用カラムは活性アルミナ(Altteck社製, 80~100メッシュ)を充填した内径3mm, 長さ3.5mのステンレスカ

ラムを使用した。キャリア窒素ガスは40ml/minの流速に、検出器温度は260℃に、インジェクター温度は160℃にセットした。分離用カラムの温度は60℃からスタートして毎分16℃の速度で280℃まで昇温し、その後この温度に6.2分間保持し、トータルプログラム時間は20分間として行った。

呼気ガス採取の為にラットを Dillard ら¹¹⁾の報告と同様の保定チャンバーに入れ、その中で炭化水素フリーの純空気を約20分間吸わせて肺を Washout してから呼気ガスを濃縮採取した。呼気ガスの濃縮は活性アルミナを充填したループ型ステンレスカラム (長さ約30cm) を用い、-130℃の液体窒素・エタノールの内に浸して行った。この時の純空気の流量は120ml/minに設定し、2.5分間で300mlのサンプルを濃縮した。

各炭化水素量の標準化はエレクトロメーターを 4×10^{-12} amp/mV (Range, 1 : Attenuation, 4) に設定し、0.95ppmのエタン、1.01ppmのエチレン、1.10ppmのブタンおよび0.82ppmのペンタンの各標準ガス1mlをインジェクションして行った。実際の呼気ガス分析も同一の条件であった。各クロマトグラフのエタン、エチレンおよびブタンの相対ピーク面積の算出は島津クロマトパック・モデルC-R1Aによって自動的に計算されたものを用い、ペンタンの場合は図1に示すごとくブタンピークの出現後にベースラインの変動が生じた為にトライアングル法で計算した。各炭化水素の産出量の計算は次式によって求めた。

$$\begin{aligned} & (p \text{ moles of hydrocarbon})(\text{incoming flow rate of air}) / (\text{sample volume}) \\ & = p \text{ moles of hydrocarbon} / \text{min.} \end{aligned}$$

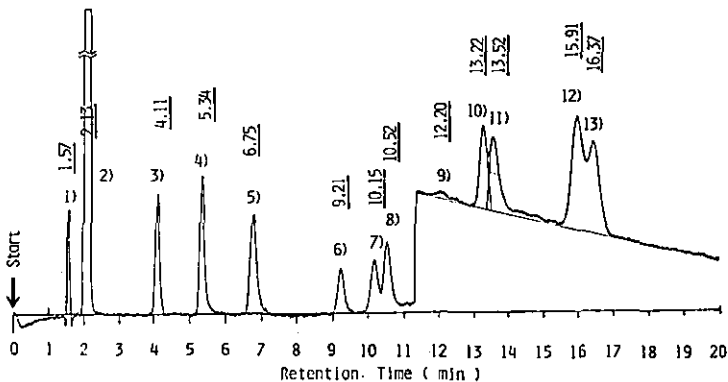


図 1 ラットの呼気中炭化水素のガスクロマトグラフィーによる分離

Fig. 1 A chart of gas chromatograph of hydrocarbons in a breath sample of a rat

1) Peak by air pressure, 2) Methane, 3) Ethane, 4) Ethylene, 5), 6) Unknown, 7) Iso-butane, 8) Butane, 9) Unknown, 10) Iso-pentane, 11) Pentane, 12) Iso-hexane, 13) Hexane.

Each number underlined on peak indicates retention time of each peak.

血清中脂質過酸化度はTBA試薬とマロンジアルデヒドの反応を用いる八木のけい光法²²⁾によって求めた。さらに血清中リン脂質、トリグリセリド、総コレステロールおよび遊離型コレステロール量は遠心方式のジエムサック自動分析装置を用いて酵素法で測定した。なお測定試薬はリン脂質の場合は和光純薬 Phospholipids 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、また遊離型コレステロールは和光純薬 Free Cholesterol C-Test Wakoキットをそれぞれ使用した。またHDL-型コレステロールの測定はヘパリン・マンガン結合沈澱法による和光HDL-コレステロール測定試薬キットを用いて用手法で行った。

各データ間の有意差検定および相関性の検定はStudentのt検定および直線回帰相関検定法によって行った。

結 果

図1にラットの実際の呼気中炭化水素類を分離した代表的なガスクロマトグラフィーのチャートを示した。各ピークはメタン、エタン、エチレン、ブタン、ペンタンおよびヘキサンと同定された。その他にいくつかの未同定ピークとともにブタン、ペンタン、およびヘキサンの Isomer が検出された。

表 1 老令ラットの体重と各臓器の湿重量

Table 1. Body weights and wet weights of various organs in aging rats

Age	4 month-old	12 month-old	22 month-old	32 month-old
Animal Numbers	12	12	9	12
Body Weight(g)	404±29 ^a	525±45	519±112	506±33
Liver (g)	12.94±1.50	16.76±1.82	16.57±1.56	16.28±1.55
Kidney (g)	2.47±0.20	3.07±0.34	3.68±0.84 ^b	4.00±0.36 ^d
Heart (g)	1.03±0.06	1.29±0.06	1.44±0.23 ^b	1.65±1.14 ^d
Lung (g)	1.41±0.10	1.64±1.13	1.70±0.16	1.90±0.15 ^c
Spleen (g)	0.72±0.09	0.85±0.09	0.93±0.26	1.34±0.18 ^d
Testis (g)	3.50±0.26	3.99±0.57	3.89±0.68	3.69±0.96
Brain (g)	2.14±0.06	2.28±0.07	2.40±0.20	2.30±0.11

a) 値は平均±SDで示した。

b) $P < 0.05$, 12か月令との間の有意差を示す。

c) $P < 0.01$, 12か月令との間の有意差を示す。

d) $P < 0.001$, 12か月令との間の有意差を示す。

4か月令との比較では12, 22および32か月令のすべての臓器で有意差を示した。

a) Values are expressed as mean ± SD.

b) $P < 0.05$, significant difference between the aged group indicated and 12 monthold.

c) $P < 0.01$.

d) $P < 0.001$.

Significant differences were found in all organs between 4 month-old and the others, respectively.

表1には実験に用いた動物数、平均体重および各臓器の湿重量を示した。体重は4か月令から12か月令にかけて急速に増加したが12か月以後ではむしろわずかな減少を示した。肝臓湿重量は体重と同様の傾向を示したが有意差は認められなかった。腎臓、心臓、肺および脾臓の各湿重量は加令につれて増加していたが、脳と精巣は加令に伴い減少する例も見られた。

表2に22か月令および32か月令ラットの解剖所見を示した。これら老令ラットにおいては自然発症的な脳下垂体腫瘍、脳腫瘍、白内障および後足麻痺などが見られ、特に後足麻痺は32か月ラットにおいて例外なく認められた。なお4か月令および12か月令ラットにおいて解剖による肉眼的異常所見は全くみられなかった。

In vivo の脂質過酸化の指標としてエタン、エチレン、ブタン および ペンタンの4種の炭化水素の測定結果を図2に示した。炭化水素の産生量は加令につれて増加してゆき、測定したすべての炭化水素類は年令との間で対数的直線相関を示し、各相関係数はエタンの場合が 0.408 ($P < 0.01$)、エチレンは0.647 ($P < 0.01$)、ブタンは0.683 ($P < 0.001$) およびペンタンは0.796 ($P < 0.001$) であっ

表 2 22か月令および32か月令ラットの解剖所見

Table 2. Anatomical finding of 22 and 32 month-old rats

22 month-old		32 month-old	
Animal No		Animal No	
1	TPH (+++)	1	Hypertrophy in bile duct
2	Cerebral tumor	2	Normal
3	Normal	3	Cataract in both eyes
4	Hydrocephalus	4	TPH (++) (partial hematoma)
5	TPH (++++)	5	TPH (+)
	Cataract in left eye	6	gl. submandibularis neoplasma
6	Normal	7	TPH (+)
7	TPH (+), Hydrocephalus	8	Abdomen subcutaneous abscess by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Fibroma in spleen (partial)
8	Adhesion in liver	9	Fibrosis in adrenal gland
9	TPH (++++) , Nephritis	10	Fibroma in spleen, Cerebral tumor, Atrophy in right testis
		11	Chronic nephritis of both side, Fibrosis in adrenal gland, Cataract in right eye
		12	Normal

た。また産生量については4種の炭化水素のうちエチレンが最も多量に産生されており、その他はエタン>ペンタン>ブタンの順であった。一方、4か月令から32か月令にかけての増加率でみるとペンタンの場合が最も高く、4か月令に対する32か月令の値は2.53倍に達していた。また相関係数についてもペンタンの場合が最も高い値を示し、その他の炭化水素の4か月令に対する32か月令ラットの増加率はエチレンの場合が2.03倍、エタンが1.87倍およびブタンの場合が1.67倍であった。エ

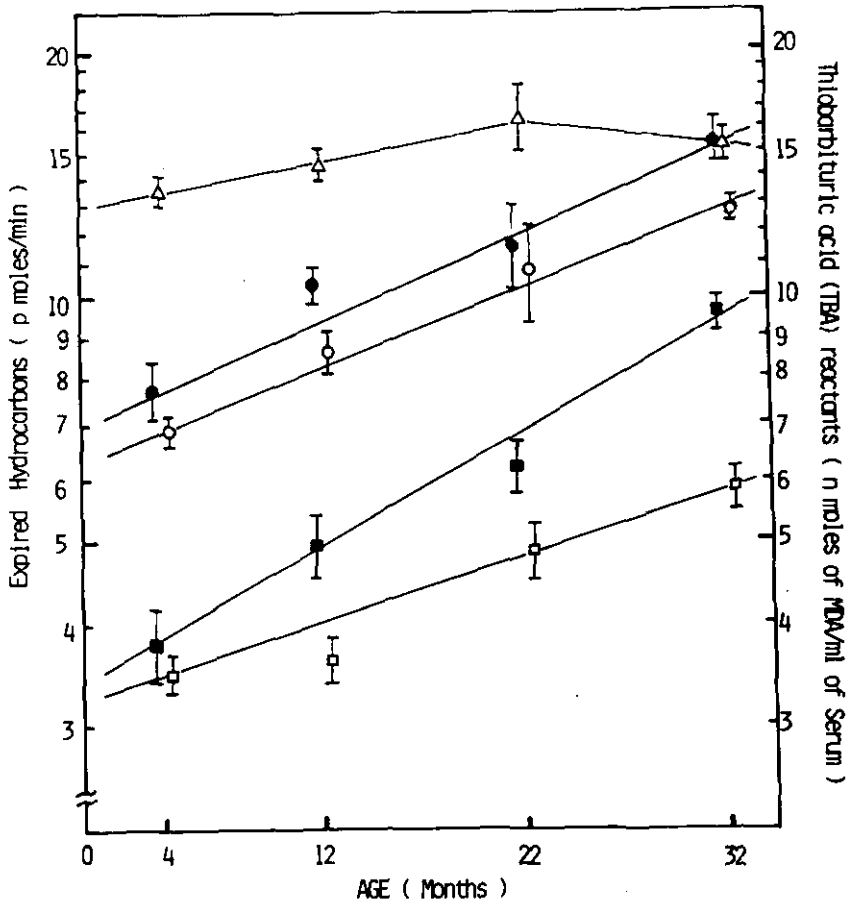


図 2 呼気中のエタン、エチレン、ブタンおよびペンタン測定による脂質過酸化と血清中TBA反応性物質測定による脂質過酸化の年齢による変化
●, エチレン; ○, エタン; ■, ペンタン; □, ブタン; △, TBA反応性物質。
図中の値は平均値±標準誤差で示した。

Fig. 2 Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in breath, and by thiobarbituric acid reactants in serum
●, Ethylene; ○, Ethane; ■, Pentane; □, Butane; △, Thiobarbituric acid reactants. The values are expressed by mean ± SE.

タンとエチレンの場合は4か月令に対する計算では12か月令, 22か月令および32か月令のすべてで有意な増加を示し, またブタンおよびペンタンの場合は22か月令と32か月令の場合でのみ有意な増加を示した。なおこれまでの研究^{12), 23), 24)}における炭化水素産生量の表示にはpmoles/100g体重/minの単位を使用してきたが今回は血清中TBA値との比較を中心とした為にpmoles/minの単位を用いた。上記の結果を仮に pmoles/100g体重/min の単位で比較するとやはり対数的相関性を示したが4か月令に対する有意な増加は4つの炭化水素とも32か月令の場合にのみ認められた。

TBA法で求めた血清中脂質過酸化物の変化も図2に示した。この値も加齢につれて増加する傾向を示したが32か月令ラットの場合はむしろ22か月令の場合よりも低下していた。しかし最も高い22か月令の場合でも4か月令に対してたかだか1.23倍の増加を示しただけで, 最も低い4か月令の場合との間にも有意な差は認められなかった。

これらの結果から, 呼吸中の炭化水素を測定する方法は加齢に伴う脂質過酸化の指標として極め

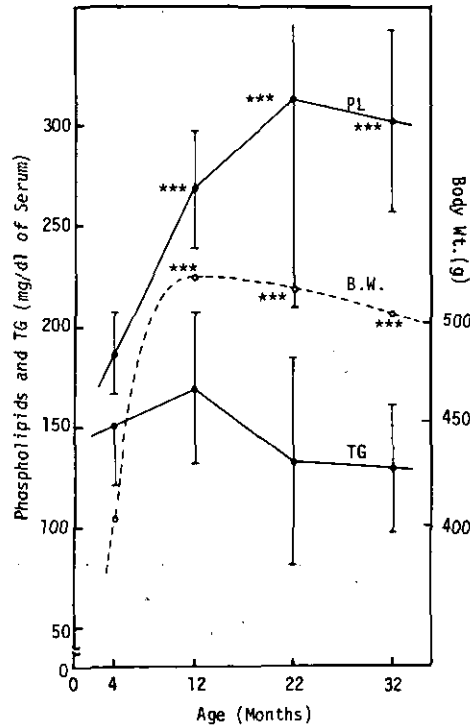


図 3 血清リン脂質とトリグリセリドの加齢による変化
●, リン脂質; ■, トリグリセリド; ○, 体重: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$
(各々4か月令に対して)

Fig. 3 Age-related changes of phospholipides and triglycerides in serum
●, Phospholipides; ■, Triglycerides; ○, Body weight: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$
(against 4 month-old).

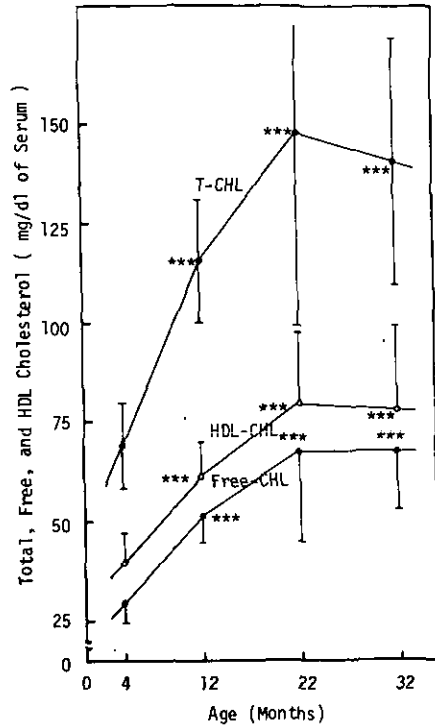


図 4 総コレステロール、遊離型コレステロールおよび HDL 型コレステロールの年齢による変化

●, 総コレステロール; ■, 遊離型コレステロール; ○, HDL-コレステロール:
 , $P < 0.01$; *, $P < 0.001$ (各々 4 か月令に対して)

Fig. 4 Age-related changes of total cholesterol, free cholesterol and HDL-cholesterol in serum

●, Total cholesterol; ■, Free cholesterol; ○, HDL-cholesterol:
 , $P < 0.01$; *, $P < 0.001$ (against 4 month-old.)

で敏感なものであることが示され、特に測定した 4 種の炭化水素のうちでペンタンが最もよい指標であることが示された。

次に老令ラットの血清中リン脂質、トリグリセリドおよび三種のコレステロール類の変化を図 3 および図 4 に示した。リン脂質とコレステロール類は加齢につれて増加する傾向を示したが 32 か月令ラットでは TBA 値の場合と同様にむしろ低下していた。一方、トリグリセリドは他の脂質成分の変化とは異なりむしろ体重と類似の変化を示した。さらにリン脂質および総コレステロールと血清 TBA 値との相関を図 5 と図 6 に示した。血清中脂質過酸化物量 (TBA 値) は血清脂質成分と深い関連を持つものであることが示された。しかしながら血清中の TBA 法による脂質過酸化と呼気ガス分析による脂質過酸化の結果が 32 か月令で異なることが明らかになった。さらに血清中の TBA 値と各

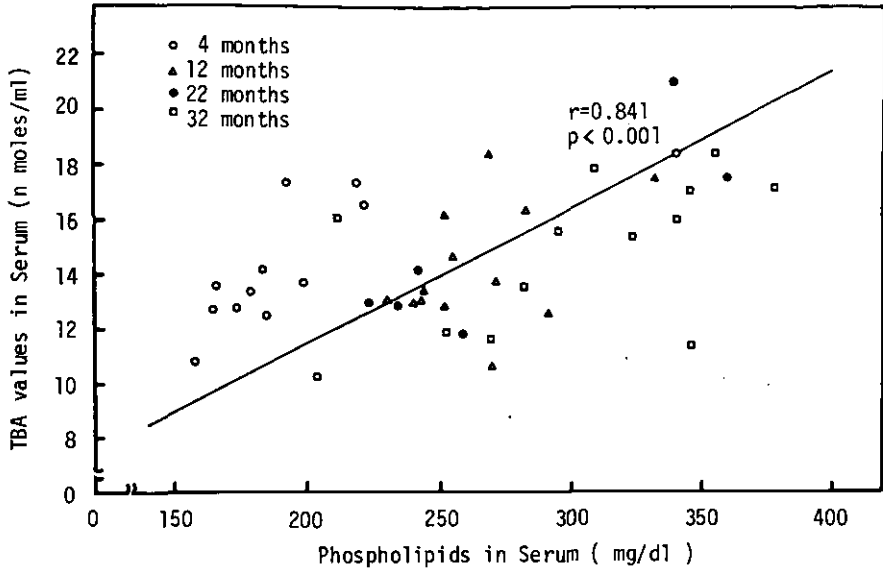


図 5 血清中TBA値とリン脂質の相関性
○, 4か月令; △, 12か月令; ●, 22か月令; □, 32か月令

Fig. 5 Relationship between TBA values and phospholipids in serum
○, 4 month-old; △, 12 month-old; ●, 22 month-old; □, 32 moth-old

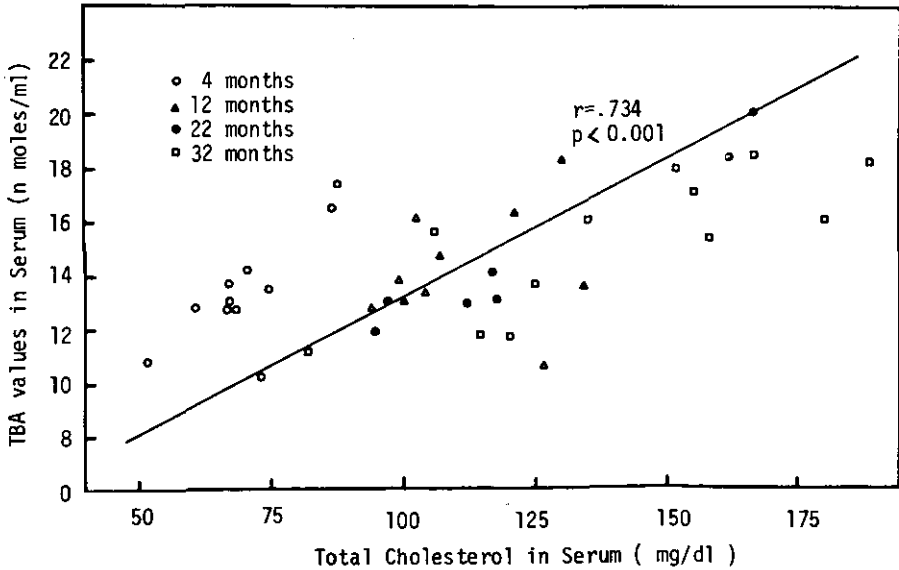


図 6 血清TBA値と総コレステロールの相関性
○, 4か月令; △, 12か月令; ●, 22か月令; □, 32か月令

Fig. 6 Relationship between TBA values and total cholesterol in serum
○, 4 month-old; △, 12 month-old; ●, 22month-old; □, 32 month-old

表 3 老令ラットの血清中TBA値と脂質成分の内部相関性

Table 3. Internal relationship between TBA values and various lipid contents in serum of aging rats

	TBA	PL	T-CHL	F-CHL	HDL-CHL	TG
TBA		$r=0.841$ $P<0.001$	$r=0.734$ $P<0.001$	$r=0.723$ $P<0.001$	non	non
PL			non	non	$r=0.901$ $P<0.001$	non
T-CHL				non	$r=0.829$ $P<0.001$	non
F-CHL					$r=0.892$ $P<0.001$	non
HDL-CHL						non
TG						

PL, Phospholipids; T-CHL, Total cholesterol; F-CHL, Free Cholesterol; HDL-CHL, High density lipoprotein-Cholesterol; TG, Triglyceride :

脂質成分間の内部相関については表3に示した。これよりTBA値はすでに述べたごとく脂質、総コレステロールおよび遊離型コレステロール量と相関性が高いことが明らかとなった。さらに、動脈硬化症の最も強力な予防因子と考えられているHDL型-コレステロールがリン脂質、総コレステロールおよび遊離型コレステロールとの間に極めて高い相関性を示したことは特徴的であった。

考 察

本研究は年令が異なるラットの *in vivo* の脂質過酸化を呼気中炭化水素を測定する方法で検討し血清TBA値と比較した。脂質過酸化の指標として低分子炭化水素を測定する方法は四塩化炭素(CCl_4)処理したマウスの呼気中エタン測定の実験として Rielyら¹⁰⁾によって最初に報告された。またペンタンの測定は脂質過酸化に対するビタミンEの防御効果を示すラットによる Dillardら¹¹⁾の実験によって報告された。我々も先に、四塩化炭素投与によって起こる脂質過酸化をビタミンEが阻害することをペンタン測定によって示した²³⁾。さらにビタミンEとセレン量が異なる飼料を8週間与えたラットの場合肝臓および腎臓中のTBA反応性物質とペンタン産出量との間に高い相関性があること²⁴⁾、および四塩化炭素投与ラットの肝臓中共投ジェン量もペンタン産出量との間で高い相関性を持つこと¹²⁾

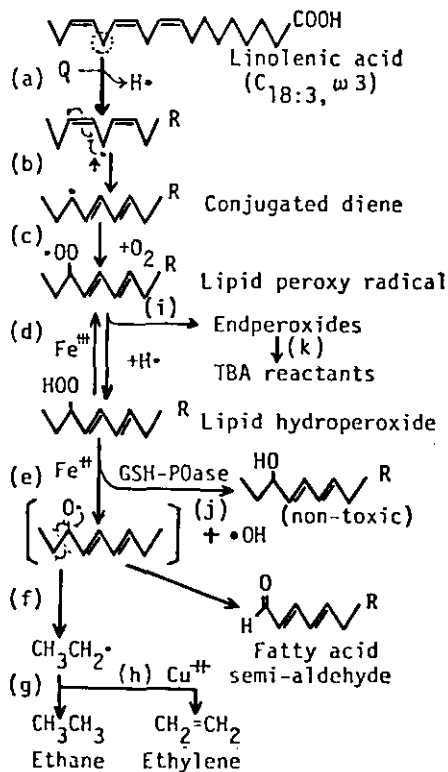


図 7 リノレン酸の過酸化によってエタンおよびエチレンが生成するメカニズム

Fig. 7 Possible mechanism of ethane and ethylene formation during peroxidation of linolenic acid

- (a) Initiation of lipid peroxidation by abstractable (doubly allylic) ω -5 hydrogen atom.
- (b) Isomerization to the more stable diene free radical.
- (c) Addition of oxygen to form the ω -3 peroxy radical.
- (d) Abstraction of hydrogen atom from another fatty acid to form the more stable ω -3 hydroperoxides.
- (e) Freeradical hydroperoxide decomposition, as proposed by Bell et al.³⁰⁾ would lead to scission of the carbon chain and formation of an aldehyde and nonradical products.
- (f) Formation of an ethyl radical by β -scission.
- (g) Ethane formation after the acquisition of a hydrogen atom.
- (h) Ethylene formation by Cu^{++} catalysis.
- (i) Endperoxides formation by cyclization.
- (j) Metabolism to non-toxic hydroxy fatty acid by glutathione peroxidase (GSH-PO ase).

等を示した。さらに、Lindstromら²⁵⁾も呼気中エタンが四塩化炭素投与ラットの肝臓共役ジェン量と相関していることを報告している。

今回の実験において、エタンおよびペンタンに加えて加齢につれてエチレンとブタンも増加し、その産生量は年齢との間に対数的直線相関を示すことが明らかになった。この結果はマウスの精巣中のけい光性老化色素と年齢との間で対数的直線相関を示すという Tappel ら⁶⁾の報告と一致している。一方、血清中のTBA反応性物質も4か月令から22か月令にかけて対数的に増加し年齢との間に直線相関を示したが32か月令ラットの場合にはむしろ22か月令の場合よりも減少し、かついずれの年齢のラットも4か月令ラットとの間に有意差を示さないという結果を得た。これまで幾人かの研究者^{26) 27)}もヒト血清中のTBA反応性物質は加齢につれて増加するがさらに高令になると逆に減少してくるということを指摘し、我々のラットによる結果と同様の傾向を報告している^{26), 27)}。このように32か月令ラットにおける呼気中炭化水素と血清中TBA値との間の結果には依然として矛盾がある。このような違いについて次のような可能性をあげることができる。すなわち、TBA反応性物質と炭化水素の生成経路は図7に示すように異なるものであり、前者は(c)から(i)の経路をたどって産生され、後者は(e)から(f)、(g)あるいは(h)の経路をたどって産生されるものである。このようなことから、32か月令ラットの場合には(c)から(i)の経路が何らかの理由によって不活性化されたり、あるいは(e)から(g)もしくは(h)の経路が活性化されるということによるものかもしれない。しかしながら現在、このような特定の経路の活性化あるいは不活性化を示す事実はまだ知られていない。一方、呼気中炭化水素と血清中TBA値の間に上に述べたような矛盾が存在するという結果から、生体の脂質過酸化の指標としてこれまで多くの人々に常用されてきたTBA法が真に whole bodyの脂質過酸化を示す指標として適当であるかどうかはさらに今後の研究が必要であろうと思われる。

一方、呼気中炭化水素の測定法には老化過程におけるフリーラジカル機構の役割解明上の利点がある。すなわち、けい光老化色素やTBA反応性物質の測定においては定量的な値を得ることが出来るだけであるのに対して、呼気中炭化水素の測定は過酸化の度合を定量的に測定出来るばかりでなく各脂肪酸の過酸化に関する定性的評価も行い得ることである。我々の結果はリノレン酸やドコサヘキサエン酸のような ω -3脂肪酸から生ずるエタンやエチレンがリノール酸やアラキドン酸のような ω -6脂肪酸から生ずるペンタンよりも多いことを明らかにした。また、若いラットと老令ラットとの炭化水素産生率がペンタンの場合に最も高かったことから、リノール酸やアラキドン酸のような ω -6脂肪酸が老化において生理的に何か重要な役割を果たしているのかもしれないということが示唆される。このことは血小板やある種の臓器においてアラキドン酸の過酸化物がプロスタグランジンの生合成上に重要な役割を果たしているという事実^{28) 29)}と関連があるのかもしれない。

引用文献

- 1) Barder, A. A. and F. Bernheim (1967) : Lipid peroxidation, its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. *Advan. Gerontol. Res.*, **2**, 355—403.
- 2) Packer, L., D.W. Deamer and R.L. Heath (1967) : Regulation and deterioration of structure in membranes. *Advan. Gerontol. Res.*, **2**, 77—129.
- 3) Russell, P.J. (1969) : In "Aging Life Process". (S. Bakerman, ed.) Thomas, Springfield, Illinois, 123—146.
- 4) Porta, E. A. and W. S. Hartroft (1969) : In "Pigments in Pathology". (ed. by Wolman, M) 191—235. Academic Press, New York.,
- 5) Tappel, A.L (1975) ; Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. In "Pathobiology of Cell Membranes." (B.F.Trump and A.U.Arstila, eds.), **1**, 145—170. Academic Press, New York.
- 6) Tappel, A.L., B.Fletcher and D.W.Deamer (1973) : Effect of antioxidants and nutrients on lipid peroxidation fluorescent products and aging parameters in the mouse., **28**, 415—424.
- 7) Weglicki, W.B., W.Reichel and P.P.Nair (1968) : Accumulation of lipofuscin like pigment in the rat adrenal gland as a function of vitamin E deficiency. *J. Gerontol.*, **23**, 469—475.
- 8) Harman, D. (1868) : Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF₁ mice. *J. Gerontol.* **23**, 476—482.
- 9) Tappel, A.L. (1978) : Protection against free radical lipid peroxidation reactions. *Advan. Exp. Med. Biol.*, **97**, 111—131.
- 10) Riely, C.A., G.Cohen and M.Lieberman (1974) : Ethane evolution: A new index of lipid peroxidation. *Science*, **183**, 208—210.
- 11) Dillard, C.J., E.E.Dumelin and A.L.Tappel (1977). : Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat. *Lipids*, **12**, 109—114.
- 12) Sagai, M and A.L.Tappel (1979) : Lipid peroxidation induced by some halomethanes as measured by *in vivo* pentane production in the rat. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **49**, 283—291.
- 13) Frankel, E.N., J.Nowakowska and C.D.Evans (1961) : Formation of methyl azelaldehyde on autoxidation of lipids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **38**, 161—162.
- 14) Horvat, R.J., W.G.Lane, H.Ng and A.D.Shepherd (1964) : Saturated hydrocarbons from autoxidizing methyl linoleate. *Nature*, **203**, 523—524.
- 15) Smouse, T.H., B.D.Mookherjee and S.S.Chang (1965) : Identification of de-l-yne in the initial autoxidation products of vegetable oils. *Chem. Ind.*, **29**, 1301—1303.
- 16) Lieberman, M. and L.W.Mapson (1964) : Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature*, **204**,

- 17) Lieberman, M. and P. Hockstein (1966) : Ethylene formation in rat liver microsomes. *Science*, **152**, 213—214.
- 18) Arnaud, M. and J.J. Wuhrmann (1974) : In "Work Documents, Topic 1b: Chemistry and Biochemistry of Food Deterioration, IV International Congress of Food Science and Technology, "Madrid, Sep. 23—27, p. 1.
- 19) Evans, C. D., G. R. List, A. Dolev, D. G. McConnell and R. L. Hoffman (1967) : Pentane from thermal decomposition of lipoxidase-derived products. *Lipids*, **2**, 432—434.
- 20) Evans, C. D., G. R. List, R. L. Hoffman and H. H. Moser (1969) : Edible oil quality as measured by thermal release of pentane. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **46**, 501—504.
- 21) Dumelin, E. E. and A. L. Tappel (1977) : Hydrocarbon gases produced during *in vitro* peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides. *Lipids*, **12**, 894—900.
- 22) Yagi, K. (1976) : A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212—216.
- 23) Sagai, M., and A. L. Tappel (1978) : Effect of vitamin E on carbon tetrachloride induced lipid peroxidation as demonstrated by *in vivo* pentane production. *Toxicol. Lett.*, **2**, 149—155.
- 24) Sagai, M. and A. L. Tappel (1978) : Significance of expired pentane produced by lipid peroxidation in intact animals. *Igaku No Ayumi.*, **106**, 691—683. [In Japanese].
- 25) Lindstrom, T. D. and M. W. Anders (1978) : Effect of agents known to alter carbon tetrachloride hepatotoxicity and cytochrome P-450 levels on carbon tetrachloride-stimulated lipid peroxidation and expiration in the intact rat. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 563—567.
- 26) 船迫真人・上江州朝洋・岡本幸春・阪上良行・谷本幸三・大田喜一郎・大畑雅洋・藤田拓男(1978) : 加齢と血清過酸化脂質——比色法及び蛍光法による検討. *日本老年医学雑誌*, **15**, 347—354.
- 27) 赤沢好温・小出操子・早川道雄・東淑江・大石まり子・菱本恒温・高野恵美子・高安正夫(1979) : 血清脂質とくに過酸化脂質と加齢の関係について. *医療*, **33**, 253—256.
- 28) Hamberg, M. and B. Samuelsson (1967) : On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandins E₁ and F₁. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5336—5343.
- 29) Hamberg, M. and B. Samuelsson (1974) : Prostagrandin endoperoxides. III. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**, 3400—3404.
- 30) Bell, E. R., J. H. Raley, F. H. Seubold and W. E. Vaughan. (1951) : *Disc. Faraday Soc.*, **10**, 242.

I-9

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

Effect of Acute Nitrogen Dioxide Exposure on the Composition
of Fatty Acids in Lung Lavage Phospholipids

小林隆弘¹・野口 忠²

Takahiro KOBAYASHI¹ and Tadashi NOGUCHI²

要 旨

NO₂の急性暴露(20ppm NO₂, 12時間)によってラットの肺胞洗浄液中のリン脂質が有意に増加した。またこのリン脂質脂肪酸組成のうち、パルミチン酸、ミリスチン酸、パルミトレイン酸は有意に増加した。またステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸は有意に減少した。またこれらの脂肪酸組成の暴露時間(12, 24, 36時間)に伴う変化も併せて検討した。以上の結果を肺組織におけるリン脂質脂肪酸組成の変化と比較し、多くの点で増減の傾向が同じであることを見いだした。

Abstract

The effects of acute NO₂ exposure on fatty acids composition in lung lavage phospholipids were examined. Among fatty acid species in the lung lavage phospholipids, the composition of palmitic acid, myristic acid and palmitoleic acid increased significantly. The composition of stearic acid, oleic acid, linoleic acid

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116番2

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

2. 上智大学 理工学部

Department of Chemistry, Sophia University, Kioicho-7 Chiyoda-ku, Tokyo 102,
Japan

and arachidonic acid decreased significantly. The time course study was also examined. These results are discussed in comparison with the results for the lung tissue.

はじめに

動物の呼吸器系に入った NO_2 は血液を介して体内に移行し、亜硝酸イオン、硝酸イオンとして大部分が尿中に排泄されることが知られている^{1),2)}。その間肺炎や肺水腫などの障害を引き起こす。一方 NO_2 は化学的にも反応性が高く、水酸基^{3)~6)}、SH基⁷⁾、アミノ基^{8),9)}、二重結合^{10),11)}などの官能基と反応することが報告されている。そこで肺内に入った NO_2 は肺胞表面にある種々の物質と反応する可能性を有している。肺胞表面は表面活性物質として、リン脂質が重要な役割をしているが、我々はこのリン脂質に対する NO_2 の影響を解析することを目的として、 NO_2 と不飽和脂肪酸との反応¹²⁾、 NO_2 急性暴露による肺組織のリン脂質脂肪酸組成への影響を検討してきた¹³⁾。今回は肺胞洗浄によって得られる肺の表面活性物質中のリン脂質の脂肪酸組成に NO_2 急性暴露がどのような影響を及ぼすか検討した。

方 法

Wistar JCL の雌ラット (11週令) を用い 20ppm NO_2 を暴露した。 NO_2 暴露はガラス・ステンレス製、容積 1.16m³ の暴露チャンバー (モデル D-ACG, 小糸工業社製) 内で行った。対照ラットは同一型のチャンバー内、フィルターで浄化された空気のもとで飼育された。換気量はいずれも 110m³/時間であった。チャンバー内の温度は 25±1℃、湿度は 55±5% に保たれた。 NO_2 の濃度は NO_x 分析計 (モデル 8440-H, 東京エレクトロン社製) を用いケミルミ法により測定した。20ppm NO_2 暴露下では、ラットは摂食しないため、実験は絶食下で行った。ラットは以下のように二群に分けた。

- 1) 対照群 (18匹) : 12時間浄化空気のもとにおく。(12時間絶食)
- 2) 暴露群 (18匹) : 12時間 20ppm NO_2 暴露 (12時間絶食)

なお NO_2 暴露の影響を時間経過を追って見る場合は、対照、暴露群ともに 36時間絶食下におき、暴露群では 20ppm NO_2 を 12, 24, 36時間暴露した。各群 12匹ずつで行った。暴露中は水のみ与えた。

暴露直後、頸動脈からの放血によりラットを殺した。肺胞洗浄液は生理食塩水を気管から肺胞内に注入後出し入れを 3 回行い採取した。この操作は各 7cc の生理食塩水を用い 3 回行った。3 ないし 4 匹のラットの肺胞洗浄液を集め、Folch ら¹⁴⁾ の方法で脂質を抽出した。リン脂質量は Bartlett ら¹⁵⁾ の方法により決定した。リン脂質は薄層クロマトグラフィーにより分離した。リン脂質は Morgan

ら¹⁶⁾の方法によりメタノリシスし、得られた脂肪酸のメチルエステルは島津GC-5A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40mガラスキャピラリーカラム(内径0.3mm)を用いた。液相は50%シアノエチル化したポリシロキサン(SS-4)を用いた¹⁷⁾。分析条件はカラム温度175℃, 検出器温度250℃, 注入口温度250℃である。

結 果

20ppm NO₂12時間暴露により、肺胞洗浄液の脂質中のリン量はラット1匹当たり24 μgから60 μgと大きな増加が観察され、リン脂質が肺胞中に分泌されることが示唆された。次に肺胞洗浄液中のリン脂質の脂肪酸組成を表1に示す。表1から明らかなように、最も多量に含まれているパルミチン酸は有意に増加(61.7%→63.5%)した。またミリスチン酸(2.4→2.6%), パルミトレイン酸(4.8→5.6%)も有意に増加した。一方ステアリン酸(4.4→3.7%), オレイン酸(6.1→5.6%), リノール酸(6.5→6.1%)およびアラキドン酸(4.4→3.6%)は有意に減少した。

図1, 2に脂肪酸組成の時間経過に伴う変化を示した。パルミチン酸は24時間後まで増加し続け、36時間後では減少傾向に転じた。ミリスチン酸は24時間後に波うつが36時間後まで上昇し続けた。

表 1 20ppm NO₂暴露後の肺胞洗浄液中のリン脂質脂肪酸組成

Table 1. Fatty acid composition of alveolar wash phospholipids after exposure of rats to 20 ppm NO₂

Fatty Acid	RT ^{a)}	Control N=6	NO ₂ Exposure 12 h N=6
Myristic Acid	3.5	2.39±0.11 ^{b)}	2.61±0.08 ^{** c)}
	4.2	0.67±0.04	0.73±0.02
Palmitic Acid	5.1	61.72±1.50	63.50±0.57*
Palmitoleic Acid	5.5	4.76±0.21	5.63±0.19 ^{***}
	5.6	3.90±0.18	3.84±0.33
	6.3	0.70±0.10	0.64±0.07
Stearic Acid	7.9	4.38±0.28	3.68±0.08 ^{***}
Oleic Acid	8.7	6.09±0.15	5.60±0.18 ^{***}
Linoleic Acid	10.2	6.52±0.20	6.06±0.23 ^{**}
Arachidonic Acid	20.9	4.40±0.39	3.63±0.15 ^{**}
	25.9	0.75±0.11	0.70±0.06
	49.5	1.75±0.09	1.90±0.13

a) Retention time (min.)

b) Mean % value ± S.D.

c) *t*-test as compared with control.

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

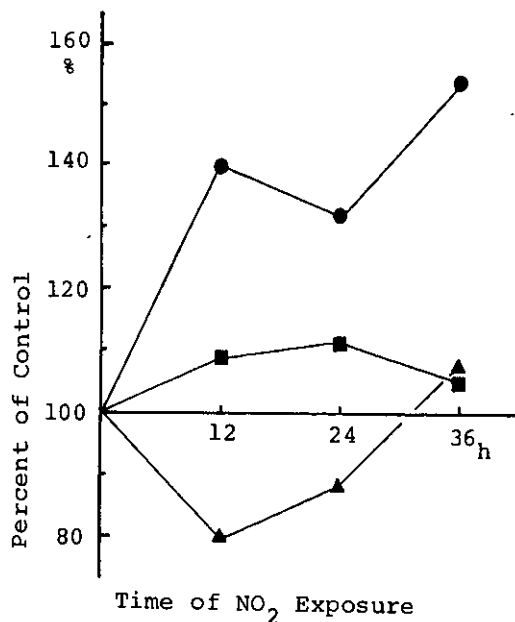


図 1 20ppm NO₂ 暴露による肺胞洗浄液リン脂質中の飽和脂肪酸組成の経時変化
 ●; ミリスチン酸 ■; パルミチン酸 ▲; ステアリン酸

Fig. 1 Time course of changes in the saturated fatty acid composition of lung lavage phospholipids during NO₂ exposure
 ●; Myristic acid ■; Palmitic acid ▲; Stearic acid

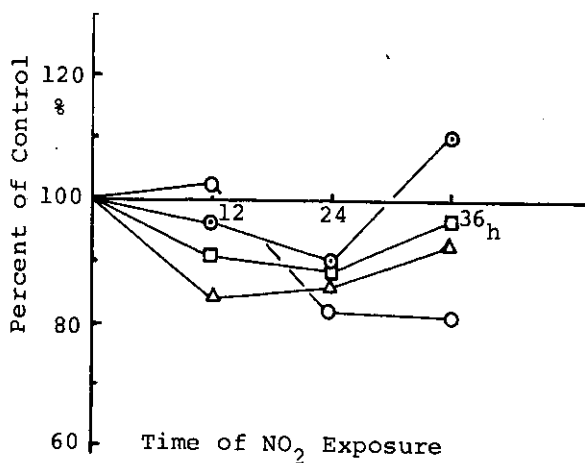


図 2 20ppm NO₂ 暴露による肺胞洗浄液リン脂質中の不飽和脂肪酸組成の経時変化
 ○; パルミトレイン酸 △; オレイン酸 ●; リノール酸 □; アラキドン酸

Fig. 2 Time course of changes in the unsaturated fatty acid composition of lung lavage phospholipids during NO₂ exposure
 ○; Palmitoleic acid △; Oleic acid ●; Linoleic acid □; Arachidonic acid

パルミトリン酸は12時間後まで上昇し以降減少した。ステアリン酸、オレイン酸は12時間後に最低となり以降増加した。またリノール酸、アラキドン酸は24時間後まで減少し、36時間後には上昇した。

考 察

NO₂急性暴露によって肺胞洗浄液の脂質中のリン脂質量が顕著に増加した。この肺胞洗浄液中のリン脂質の増加はWilliamsらによっても(NO₂ 15ppm 28日)報告されている¹⁸⁾。リン脂質量の増加には以下の点に関与している可能性がある。すなわち①20ppm NO₂による刺激で肺胞中に肺表面活性物質(パルミチン酸の割合が高い)としてリン脂質が分泌された。②NO₂暴露により剥落したI型細胞や、増加したマクロファージが肺胞洗浄液中に入り、それらのリン脂質成分が抽出された。③肺水腫により肺胞内に滲出した液体中のリン脂質成分が抽出された。

リン脂質の脂肪酸組成の中ではパルミチン酸の占める割合が増加することから①の可能性が高いが、暴露時間が長くなった場合②、③の寄与が大きくなると考えられる。

肺胞洗浄液リン脂質の脂肪酸組成の中ではパルミチン酸が有意に増加することが観察された。我々はすでに肺組織のリン脂質中でもパルミチン酸が増加することを報告した¹³⁾。またNO₂暴露によりパルミチン酸の肺への取り込みが増加することも観察されている。このことは肺表面活性物質の合成が活発になっていることを示唆している。肺胞洗浄液中のリン脂質量が増加していることからこの肺表面活性物質の肺胞内への分泌が増し、肺胞洗浄液中のパルミチン酸の割合が増すものと考えられる。一方24時間後を頂点として36時間後ではパルミチン酸の割合は減少傾向に変わっている。肺湿重量は20ppm NO₂ 40時間暴露で大きく増加する¹³⁾。従って36時間暴露後では滲出した液体が肺胞洗浄液中にかなり入って来ると考えられる。この肺胞中に滲出した液体がパルミチン酸の割合を減らしている可能性がある。従って以後肺組織のリン脂質脂肪酸組成との比較は12時間後と24時間後の値で比較する。一方Roehmらが行った亜急性暴露(NO₂ 10ppm, 4週間)の結果では、肺胞洗浄液中の全脂質中のパルミチン酸の割合は減少しており¹⁹⁾、我々と逆の結果であった。Roehmらの結果は肺胞洗浄液の全脂質中のパルミチン酸の割合であることからこの差異が生じた可能性もあり、今後検討する必要がある。

一方他の脂肪酸では、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸はいずれも減少し、ミリスチン酸、パルミトリン酸は増加した(パルミトリン酸は24時間暴露後では減少している)。我々は肺組織のリン脂質では、NO₂急性暴露によって、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、(40時間後では増加)アラキドン酸およびミリスチン酸が減少し、パルミトリン酸は20時間暴露後ではほぼ変化がないが、40時間後に増加することを報告した¹³⁾このことからミリスチン酸、パルミトリン酸の場合を除き、肺組織でのこれら脂肪酸の変化と肺胞洗浄液での変化は傾向が同じと

いえる。

肺胞洗浄液中のリン脂質全体の脂肪酸組成はNO₂暴露により、リン脂質全体の中で各リン脂質種が占める割合の変化と各リン脂質の脂肪酸組成の変化によって決まる。NO₂急性暴露によって肺胞洗浄液中ではパルミチン酸の割合が増加していることから、リン脂質中のホスファチジルコリンの割合が増加している可能性が示唆される。肺組織のホスファチジルコリンの脂肪酸組成中で、ステアリン酸、オレイン酸、アラキドン酸の割合は他のリン脂質中での割合に比べて少ない。一方ミリスチン酸はホスファチジルコリン中に他のリン脂質中より比較的多く含まれている²⁰⁾。肺組織と同じく肺洗浄液中に分泌されるホスファチジルコリン中のステアリン酸、オレイン酸、アラキドン酸の割合が他のリン脂質中の脂肪酸組成に比べ少なくミリスチン酸、パルミトリン酸は多いとすると肺胞洗浄液中のリン脂質中でホスファチジルコリンの量が増加することは、ステアリン酸、オレイン酸、アラキドン酸の割合の減少、ミリスチン酸、パルミトリン酸の増加につながると考えられる。一方各リン脂質中の脂肪酸組成のNO₂暴露による変化も、リン脂質全体の脂肪酸組成の変化につながる。中でもホスファチジルコリンはリン脂質中での割合が大きいため、その脂肪酸組成の変化が重要となる。肺組織のホスファチジルコリン中ではミリスチン酸、パルミトリン酸、オレイン酸が減少し、他の脂肪酸は増加または増加の傾向にあることが報告されている²⁰⁾が肺胞洗浄液中での知見はいまだ得られていない。

今後NO₂暴露による、リン脂質全体の中で占める各リン脂質種の割合の変化、および各リン脂質の脂肪酸組成の変化について検討する必要があると考える。

引用文献

- 1) Goldstein, E., N. F. Peck, 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. Resp. Dis.*, **115**, 403.
- 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. *日本衛生学雑誌*, **35**, 128.
- 3) Arvis, M. and L. Gilles (1970): Esterification of isopropanol by nitrous oxide and nitrosyl nitrate. *J. Chim. Phys. Physicochim. Biol.*, **67**, 1538—1543.
- 4) Silverwood, R. and J. H. Thomas (1967): Reaction between methanol and nitrogen dioxide. I. Low temperature reaction and thermodynamic constants of methyl nitrite. *Trans. Faraday Soc.*, **63**, 2476—2479.
- 5) Langenbeck, W. and M. Richter (1956): The mechanism of Maurer oxidation. *Chem. Ber.*, **89**, 202—208.

- 6) Fairlie, A. M., Jr., J. J. Carberry and J. C. Treacy (1953) : Kinetics of the reaction between NO_2 and alcohols. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 3786—3789.
- 7) Mathes, R. A. and F. D. Stewart (1953) : Heterocyclic sulfonic acids. *U. S.* 2, 656, 354, Oct. 20.
- 8) Olin Mathieson Chemical Corp. (1957) : N—Nitrosodimethylamine. *Brit.*, 772, 331, Apr. 10.
- 9) White, E. H. (1955) : N—Alkyl—N—nitrosoamides. I. Method of preparation. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6008—6010.
- 10) Stevens, T. E. (1959) : Addition of dinitrogen tetroxide to camphen and transstilbene ; The effect of oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3593—3597.
- 11) Vasil'ev, S. V. (1955) : The action of nitrogen dioxide upon erucic acid. *Tr. Mosk. Inst. Tonkoí Khim. Tekhnol. im. M. V. Lomosova*, No. 5, 50—58.
- 12) 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.
- 13) Kobayashi, T., T. Noguchi, M. Kikuno and K. Kubota (1980) : Effects of nitrogen dioxide exposure on the composition of fatty acids in lung and liver phospholipids. *Toxicol. Letters*, **6**, 149—155.
- 14) 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.
- 15) Bartlett, G. R. (1959) : Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, **234**, 466—468.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Williams, R. A. (1971) : The response of lung tissue and surfactant to nitrogen dioxide exposure. *Arch. Intern. Med.*, **128**, 101—108.
- 19) Roehm, J. N., J. G. Hadley and D. B. Menzel (1971) : Antioxidants vs lung disease. *Arch. Intern. Med.*, **128**, 88—93.
- 20) 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.

I --10

二酸化窒素の赤血球膜糖脂質に及ぼす影響

Effect of Nitrogen Dioxide on Glycolipids of Rat Red Cell Membranes

彼谷邦光¹・三浦 卓¹

Kunimitsu KAYA¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

NO₂暴露が赤血球糖脂質に及ぼす影響を明らかにするために、4 ppm NO₂を暴露したラットより赤血球膜を調製し糖脂質の変動を調べた。赤血球膜脂質抽出物および中性糖脂質画分のヘキソース含量は、暴露開始後1日目に对照群の55%と56%と低い値を示し5日目までは对照群より低い値を維持した。5日目以降脂質抽出物では对照群と同じレベルになったが、中性糖脂質画分では10日目まで对照群より低い値を示し続けた。赤血球膜脂質抽出物およびガングリオシド画分のシアル酸含量は、暴露開始後1日目に对照群の1.5倍および2倍と高い値を示し以後5日目まで直線的に低下し对照群の値に近付いた。脂質抽出物のシアル酸含量は5日目以降も低下し続けたが、ガングリオシド画分では10日目まで对照群より高い値を維持した。NO₂暴露の時間経過に伴いガングリオシドが質的に変化する可能性が薄層クロマトグラフィーで示された。

Abstract

Glycolipids of red cell membranes, prepared from red blood cells of rats exposed to 4.0 ppm nitrogen dioxide(NO₂) for 10 days, were analysed in order to examine effects of NO₂ exposure on cell membrane glycolipids. The hexose contents of the lipid extract and neutral glycolipid fraction were 55% and 56%,

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

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

respectively, one day after exposure to NO_2 . The reduced hexose content of the latter was maintained up to the end of exposure period, while that of the lipid extract reached the same level as that of the control. The sialic acid contents of the lipid extract and ganglioside fraction were 1.5- and 2.0-fold of that of the control one day after exposure to NO_2 . Then, the elevated contents decreased up to 5 days after exposure.

The elevated sialic acid content of ganglioside fraction was maintained during the following period of exposure. With the time of exposure reduction of Rf values of gangliosides was also observed by the thin layer chromatography.

はじめに

著者らは、二酸化窒素 (NO_2) をラットに暴露すると赤血球膜のリン脂質と脂肪酸に変動が起こることをこれまでに明らかにしてきた^{1), 2)}。また、赤血球膜のシアル酸およびヘキソース含量の変動についても報告²⁾した。これらの結果から、 NO_2 暴露によって赤血球膜の糖脂質も変動する可能性が考えられる。細胞膜に存在する糖脂質は、生体の抗原性の発現、細胞性免疫への関与の外に、ホルモンや毒素の受容器として機能している可能性が報告されている^{3), 4)}。従って、 NO_2 暴露によって生体内の細胞膜に存在する糖脂質に量的あるいは質的変動が起これば、これらの機能にも影響が及ぶことが考えられる。著者らは、調製が容易な赤血球膜を生体における細胞膜のモデル系として使用することを考え、 NO_2 暴露によって赤血球膜糖脂質がうける影響を明らかにすることを試みた。前報において、ラットに 4 ppm の NO_2 を暴露すると赤血球膜中性糖脂質画分の糖含量が低下することを報告した。本報告では、4 ppm NO_2 を暴露したラットの赤血球膜から脂質を抽出し、中性糖脂質とガングリオシドを部分精製して各々の量的変動について検討した結果を記した。

実 験

1. 暴露条件および赤血球膜の調製

実験には Wistar-JCL の雄ラット (14—18週令) を一群 6 匹として用いた。4.0 ± 0.08 ppm の NO_2 を 10 日間連続暴露し、経時的に頸動脈からヘパリン存在下で採血した。赤血球膜画分は、生理食塩水で 3 回洗浄した赤血球から Dodge らの方法⁵⁾ によって調製した。

2. 赤血球膜中性糖脂質およびガングリオシドの調製

脂質は赤血球膜画分 (約 6 mg のリン脂質を含む) から Folch の方法⁶⁾ によって 20 倍容のクロロホ

ルム—メタノール (2:1, v/v) で抽出した。脂質抽出液は1/5容の水を加えて分配し、下層はクロロホルム—メタノール—水 (3:48:47, v/v/v) よりなる上層溶媒で3回洗浄した。脂質抽出物上層液および洗浄上層液は混合してロータリーエバポレーターによって濃縮乾固した。乾固した上層液の脂質は少量のクロロホルム—メタノール (2:1, v/v) に溶解し不溶物を濾過除去した。この脂質溶液は再び窒素気流下で乾固させた後、クロロホルム—メタノール (2:1, v/v) に溶解し不溶物を除去した。このようにしてえられた脂質溶液は窒素気流で乾固させ、2mlのクロロホルム—メタノール (19:1, v/v, 1ℓの中に5mlの水を含む)(溶媒I)に溶解して、Wuthierの方法⁷⁾に従いセファデックスG25カラムクロマトグラフィーでガングリオシドを部分精製した。溶媒Iに溶解した脂質は、あらかじめメタノール—水 (1:1, v/v) で平衡にし使用直前に10mlの溶媒Iで洗浄したセファデックスG25のカラム (1×10cm) に重層し、50mlの溶媒Iで洗浄した。洗浄後、ガングリオシド画分は70mlのクロロホルム—メタノール—酢酸 (19:1:4, v/v/v, 1ℓの中に25mlの水を含む) で溶出し、ロータリーエバポレーターで乾固させた。

脂質抽出物の分配下層は、上記のように3回上層溶媒で洗浄した後不溶物を濾過除去し、窒素気流下で乾固させた。乾固した脂質は2mlのアセトンで1回洗浄しDawsonのアルカリ分解⁸⁾を行った。加水分解後、水を加えて2層に分配し、下層は3回上層溶媒で洗浄した後乾固させ中性糖脂質画分として使用した。

3. ヘキソースおよびシアル酸の定量

上記のようにして得られた赤血球膜ガングリオシド画分のシアル酸含量は、同画分をクロロホルム—メタノール (2:1, v/v) で4mlとした後、2mlを用いて測定した。この画分2mlは窒素気流で乾固させた後、同じ溶媒で0.8mlとし16 μ lの5N硫酸を加え80℃60分間加水分解した。加水分解後5N水酸化ナトリウムで中和し0.16mlの水を加えて2層に分配した。下層は1回上層溶媒で洗浄した。得られた両上層は、窒素気流下80℃で乾固させ20mMリン酸緩衝液 (pH7.2) で1mlとした。この溶液0.5mlに0.03単位のシアル酸アルドラーゼを加え37℃60分間インキュベーションしたものを対照として使用した⁹⁾。シアル酸アルドラーゼ処理および無処理の試料はAminoffのTBA法¹⁰⁾によってシアル酸の定量を行った。

中性糖脂質画分はクロロホルム—メタノール (2:1, v/v) で2.4mlとし、0.8mlを用いてヘキソースの定量を行った。0.8mlの脂質溶液は21 μ lの濃塩酸を加え80℃4時間加水分解を行い、加水分解後0.16mlの水を加えて2層に分配した。下層は上層溶媒で1回洗浄し、得られた上層は混合して窒素気流下80℃で有機溶媒を除いた。この溶液に2mlのアンスロン試薬を加えRoeの方法¹¹⁾によってヘキソースを定量した。

リン脂質はHarris and Popatの方法¹²⁾で定量した。

4. 糖脂質の定性分析

部分精製した中性糖脂質およびガングリオシドの定性は、クロロホルム-メタノール-水 (60:30:8, v/v/v) を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィーにより行った。中性糖脂質はアンスロン試薬により、ガングリオシドはレゾルシノール試薬により発色させ同定した。

結果および考察

前報において、4 ppmのNO₂を暴露したラットでは赤血球膜中性糖脂質画分のヘキソース含量が著しく低下することを報告した¹⁾。使用した中性糖脂質画分は、赤血球膜脂質抽出物からDEAE-セファデックスA25のカラムクロマトグラフィーにより調製したものであった。本報告では、Folchの分配を繰り返すことによってガングリオシドを中性糖脂質から分離した画分を用いた。図1の中に中性糖質画分 (I) およびガングリオシド画分 (II) の薄層クロマトグラムを示した。ラット赤

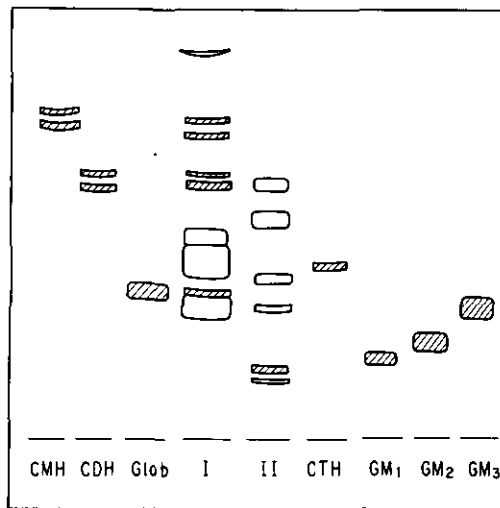


図 1 ラット赤血球膜糖脂質の薄層クロマトグラム
 I. 中性糖脂質画分, II. ガングリオシド画分; CMH, セラミドモノヘキソシド;
 CDH, セラミドジヘキソシド; CTH, セラミドトリヘキソシド; Glob, グロボシド;
 CM₁, GM₂, GM₃, GM₁-ガングリオシド, GM₂-ガングリオシド, GM₃-
 ガングリオシド
 展開溶媒, クロロホルム-メタノール-水 (60:30:8), 発色試薬, アンスロン

Fig. 1 Thin layer chromatogram of glycolipids of rat red cell membranes
 I, Neutral glycolipid fraction; II, Ganglioside fraction; CMH, Ceramide
 monohexoside; CDH, Ceramide dihexoside; CTH, Ceramide trihexoside;
 Glob, Globoside; GM₁, GM₂ and GM₃, GM₁-, GM₂- and GM₃-gangliosides.
 The plate was developed with chloroform-methanol-water(60:30:8, by volume)
 Shaded spots were stained with anthrone reagent.

血球膜には、セラミドモノヘキソシド (CMH) が最も多く存在し、セラミドジヘキソシド (CDH) がついで多く存在していた。グロボシド (Glob) も検出されたがガングリオシドは検出されず、ここにえられた中性糖脂質画分のヘキソース含量は中性糖脂質に由来すると考えられる。ガングリオシド画分 (II) では、アンスロンで発色するスポットが二つ存在し共にレゾルシノールでも発色した。これらは本研究に用いた展開溶媒ではGM₁ ガングリオシドよりも小さなRf値を示した。

NO₂ 暴露が赤血球膜の糖脂質に及ぼす影響を明らかにするために、赤血球膜の脂質抽出物および各糖脂質画分のヘキソースおよびシアル酸含量の変動について検討した。図 2 に、脂質抽出物および中性糖脂質画分におけるヘキソース含量の変動を示した。脂質抽出物のヘキソース含量は、暴露開始後 1 日目において暴露群では対照群の 55% と低い値を示した。1 日目以降 7 日目までは増加を

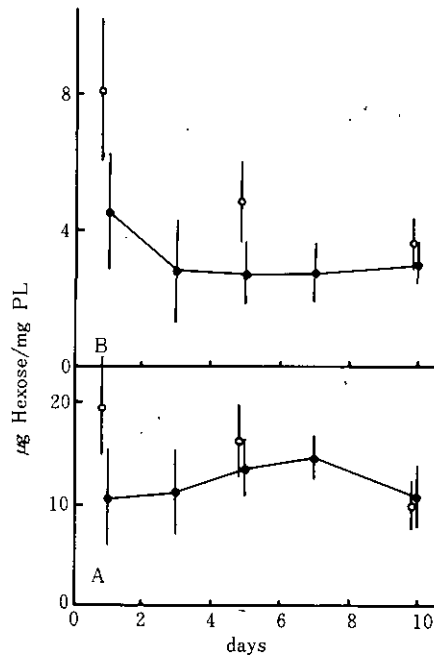


図 2 NO₂ 暴露による赤血球膜脂質抽出物および中性糖脂質画分中のヘキソース含量の変動
A: 脂質抽出物, B: 中性糖脂質画分。

Fig. 2 Changes in the hexose contents of the lipid extract and neutral glycolipid fraction of rat red cell membranes during exposure to 4 ppm NO₂

The hexose contents of the lipid extract and neutral glycolipid fraction were determined as described in the Methods. Closed symbols represent contents for exposed animals and open ones for control ones. A, The lipid extract; B, Neutral glycolipid fraction. Each point is the mean of six determinations. Error bars represent ± 2 standard deviation.

示し、7日目以降は対照群とほぼ同じ値を示した(図a A)。一方、対照群のヘキソース含量は暴露期間をとおして低下を示し、10日目には1日目の55%にまで減少した。中性糖脂質画分中のヘキソース含量は、脂質抽出物の場合と同様に暴露群では1日目に対照群の56%と低い値を示した。その後3日目まで低下し一定となった(図2 B)。対照群のヘキソース含量は脂質抽出物の場合と同様に暴露期間をとおして低下した。以上のように、脂質抽出物および中性糖脂質画分のヘキソース含量は暴露後5日目までは対照群よりも低い値を示した。脂質抽出物の場合はその後対照群とほぼ同じ値になり、赤血球膜の全ヘキソース含量と類似の変動を示した。

中性糖脂質画分では暴露群のヘキソース含量に増加が認められず、暴露期間をとおして対照群より低い値を維持した。このような相違は、脂質抽出物に混在してくる糖ペプチドによって起こるこ

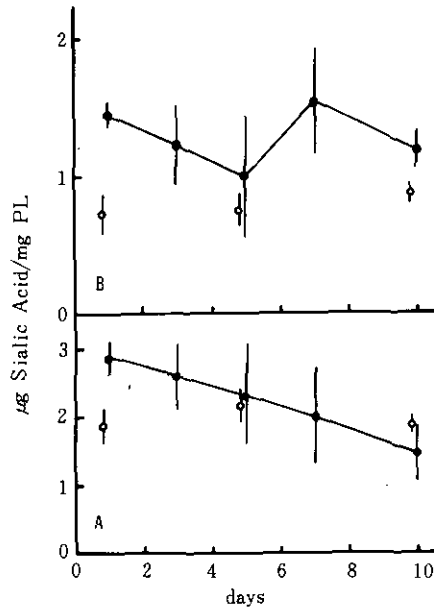


図 3 NO₂暴露による赤血球膜脂質抽出物およびガングリオシド画分中のシアル酸含量の変動
A：脂質抽出物，B：ガングリオシド画分。

Fig. 3 Changes in the sialic acid contents of the lipid extract and ganglioside fraction of rat red cell membranes during exposure to 4 ppm NO₂

The contents of sialic acid were determined as described in the Methods. Closed symbols represent contents for exposed animals and open ones for control ones. A, The lipid extract; B, Ganglioside fraction. Each point is the mean of six determinations. Error bars represent ± 2 standard deviation.

とが考えられる。ここで得られた中性糖脂質画分のヘキソース含量の変動は、異なる方法で調製した前報の結果とよく一致した。

次に、NO₂暴露が脂質抽出物およびガングリオシド画分中のシアル酸含量に及ぼす影響について検討した。脂質抽出物の場合、暴露群のシアル酸含量は暴露開始後1日目で対照群の1.5倍の値を示した(図3A)。その後暴露時間の経過に伴い直線的に減少し、10日目には1日目の52%となり対照群よりも低い値になった。一方、ガングリオシド画分中のシアル酸含量は、暴露開始後1日目で対照群の2倍の値を示し、以後5日目まで直線的に低下した(図3B)。しかしながら、5日目からむしろ増加を示し、以後の暴露期間中対照群より高いシアル酸含量を示した。10日間の暴露期間中、暴露群のシアル酸含量は対照群より常に高い値を示した。図4に、ガングリオシド画分の薄層クロマトグラムを示した。NO₂暴露開始後1日目に、暴露群の2種類からなるガングリオシドは共に対照群のものより小さなRf値を示すことが認められた。これら暴露群のガングリオシドは、1日目から3日目にかけてと5日目以降徐々にRf値が低下していった。以上の結果から、脂質抽出物およびガングリオシド画分のシアル酸含量は共に暴露開始後1日目には対照群より高い値を示し、その後5日目まで減少し続け対照群の値に近付くことが明らかとなった。この結果は、赤血球膜の全

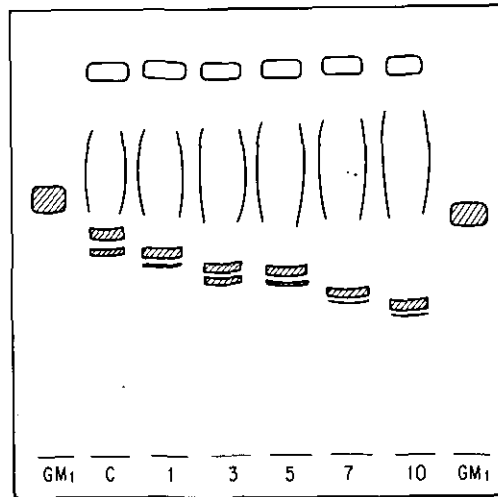


図 4 4 ppmのNO₂暴露ラットから調製した赤血球膜ガングリオシドの薄層クロマトグラム
GM₁, GM₁-ガングリオシド; C, コントロール
数字はNO₂暴露からの日数。展開溶媒は図1の展開溶媒に同じ。発色試薬, レゾルシノール。

Fig. 4 Thin layer chromatogram of gangliosides from red cell membranes of rats exposed to 4 ppm NO₂.
GM₁, GM₁-ganglioside; C, Control; the number represent days after exposure to NO₂. The plate was developed as described in the legend of Fig.1. Shaded spots were stained with resorcinol reagent.

シアル酸含量の場合と同様の変動が起こっていることを示している。

4 ppm NO₂をラットに暴露すると10日間の暴露期間をとおして、中性糖脂質画分のヘキソース含量は対照群のものより常に低い値を示し、ガングリオシド画分のシアル酸含量は常に高い値を示した。従って、NO₂暴露によって赤血球膜の糖脂質は糖タンパク質よりも著しい量的変動を受けると考えられる。また、ガングリオシドの場合には量的のみならず質的にも影響を受ける可能性が示された。このようなNO₂暴露によって起こる糖脂質の変化は、肺胞細胞や血液中に存在する赤血球以外の細胞においても起こりうる事が考えられる。

引用文献

- 1) 彼谷邦光・三浦 卓 (1979) : ラットの赤血球膜に及ぼす二酸化窒素の影響. 国立公害研究所報告, 第8号, 173—185.
- 2) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota, submitted to Environmental Research.
- 3) Yamakawa, T. and Y. Nagai (1978): Glycolipids at the cell surface and their biological functions. *TIBS*, **3**, 128—131.
- 4) Miura, T., S. Handa and T. Yamakawa (1979): Specific inhibition of macrophage migration inhibition factor by fucosylated glycolipid. *J. Biochem.*, **86**, 773—776.
- 5) Dodge, J. T., C. Mitchell and J. Hanahan (1963): Preparation and chemical characterization of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119—130.
- 6) 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.
- 7) Wuthier, R. E. (1966): Purification of lipids from nonlipid contaminations on Sephadex bead columns. *J. Lipid Res.*, **7**, 558—561.
- 8) Dawson, R. M. C. (1969): Hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological sample. *Biochem. J.*, **75**, 45—53.
- 9) Comb, D. G., and S. Roseman (1960): The sialic acids I. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2529—2537.
- 10) Aminoff, D. (1961): Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.*, **81**, 384—392.
- 11) Roe, J. H. (1954): The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **212**, 335—343.
- 12) Harris, W. D. and P. Popat (1954): Determination of the phosphorus content of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 124—127.

I-11

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

Changes of Fatty Acid Composition of Phospholipids in Red Cell Membranes
of Rats Exposed to Nitrogen Dioxide

彼谷邦光¹・三浦 卓¹

Kunimitsu KAYA¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

NO₂を10ppm 7日間暴露した Wistar の雄ラットから赤血球膜を調製し、赤血球膜の主要リン脂質であるホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルエタノールアミン (PE) を薄層クロマトグラフィーで分離し、それらの脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで分析した。

赤血球膜の PC および PE の脂肪酸組成にかなりの変化が見られた。特にアラキドン酸、ステアリン酸およびパルミチン酸の含有率の変化が顕著であった。上記以外の脂肪酸の含有率はほとんど変化しなかった。NO₂暴露の1日目および5日目に PC および PE のアラキドン酸が増加し、反対に PC ではパルミチン酸が、PE ではステアリン酸が減少した。

赤血球膜と同様の変化が血清 PC においても見られ、アラキドン酸の増加に伴ってリノール酸が減少した。

Abstract

Male Wister rats were exposed to NO₂ at the concentration of 10 ppm for 7 days. Red cell membranes were prepared from red cells of rats 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

phospholipids were extracted with chloroform-methanol (2:1) from red cell membranes. phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) were separated by thin-layer chromatography. Fatty acid compositions of PC and PE were determined by gas-liquid chromatography.

Considerable changes were shown in fatty acid composition especially in the proportion of arachidonic, stearic and palmitic acids in PC and PE of red cell membranes, and other fatty acids changed very little. The proportion of arachidonic acid in both PC and PE increased at the first and fifth days of exposure to NO_2 concomitantly with decreases in those of palmitic acid in PC and stearic acid in PE.

Simultaneously with the change in arachidonic acid of red cell membranes, the proportion of arachidonic acid of serum PC also increased and that of linoleic acid decreased with the time of exposure to NO_2 .

Based on the above results, we discussed possible alteration in membranous function of red cells resulting from exposure to NO_2 .

はじめに

大気汚染物質の一種である二酸化窒素 (NO_2) は肺から吸入され、硝酸イオン (NO_3^-) または亜硝酸イオン (NO_2^-) として血液中に溶解し、尿中に排泄されることが知られている。 NO_2 を暴露された動物の赤血球や血清成分に直接的であるか、間接的であるかは不明であるが、 NO_2 暴露による影響が現れるという報告¹⁾がある。

我々は NO_2 を暴露したラットの赤血球膜の変化を明らかにするために赤血球膜の主要リン脂質である *phosphatidylcholine* (PC) と *phosphatidylethanolamine* (PE) の脂肪酸組成の変化を血清の PC の脂肪酸組成の変化と対比させながら経時的に調べた。

赤血球膜リン脂質中に占める PC と PE の量はそれぞれ約45%と約25%であり、この両方で赤血球膜リン脂質の約70%を占めている。また、血清中の PC は血清リン脂質中に約70%含まれている。従って、これらのリン脂質の脂肪酸組成を調べることによって赤血球膜および血清リン脂質の構成脂肪酸の性状をは握することができる。また、赤血球膜および血清中のリン脂質を構成している脂肪酸の中でアラキドン酸は飼料中に存在せず、全て γ -リノレン酸経路によってリノール酸から合成されたものである。従って、アラキドン酸を脂標とすることによって NO_2 暴露による γ -リノレン酸経路への影響を見ることができる。

方 法

1. 暴露条件

6匹を一群とした Wistar JCL の雄ラット (14週令) を 10 ± 0.5 ppm の NO_2 で一週間連続暴露した。対照群も 6匹一群の同一ロットのラットを用い、 NO_2 暴露の場合と同型の暴露チャンバーに入れ、 NO_2 の代わりにフィルターを通した新鮮空気を通気した。

2. 赤血球膜の調製

NO_2 を暴露したラットの頸動脈から血液を採集した。採血に際してはヘパリンを用いて血液の凝固を防いだ。赤血球膜の調製は Dodge らの方法²⁾ に準じて行った。すなわち、血液に 5 倍量の生理食塩水を加えて 2 回洗浄して赤血球を集め、これに 20 倍量の 1 mM 塩化カルシウム (CaCl_2) を含んだ 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°C 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。

3. 脂質の抽出およびリン脂質の精製

脂質の抽出は Folch らの方法³⁾ に準じて行った。すなわち、赤血球膜画分に 20 倍量のクロロホルム-メタノール (2 : 1, v/v) を加えて時々振とうしながら室温に 3 時間おいて脂質を抽出した。不溶物質を濾過し、これに 1/5 量の生理食塩水を加えて分配させた。2 層に分離した後、下層を窒素気流下で乾固させてクロロホルムで一定量にした。

PC および PE は薄層クロマトグラフィーで分離精製した。用いた展開溶媒はクロロホルム-メタノール-28%アンモニア水-水 (28 : 10 : 1 : 1, v/v) である。

4. 脂肪酸の分析

脂肪酸はガスクロマトグラフィーを用いて測定した。すなわち、脂肪酸を BF_3 -MeOH を用いてメチルエステル⁴⁾ とし、これを Shimadzu GC-7 AG ガスクロマトグラフ装置で分析した。ガスクロマトグラフィーの運転条件は、カラム; EX-5 (3 mm × 4 m, ガラスカラム), カラム温度; 238°C , 試料注入温度; 270° , キャリアーガス; N_2 , 50 ml/min, 検出器; FID, (H_2 ; 0.60 kg/cm^2 , Air; 0.55 kg/cm^2) である。定量はインテグレータによるピーク面積の測定によって行った。定性は標準品の脂肪酸メチルを用いて行った。標準品のない脂肪酸は保持時間と炭素数を片対数グラフにプロットして得られる直線から未同定脂肪酸を推定する方法、いわゆる Semi-log plot 法で推定した。

結 果

1. 赤血球膜および血清リン脂質中のアラキドン酸含量の変動

NO₂を暴露したラットの赤血球膜の PC, PE および血清中の PC を構成している脂肪酸の中でアラキドン酸は対照群のそれに比べてかなり変動することが認められた。一方, 対照群におけるアラキドン酸含量は赤血球膜 PC で $9.8 \pm 0.3\%$, PE で $36.2 \pm 0.1\%$, 血清 PC で $13.2 \pm 0.4\%$ 含まれており, その含有量はほとんど変化しなかった(図1)。NO₂暴露群では1日目および5日目で赤血球膜の PC, PE で6~8%増加していたが, 3日目および7日目では対照群とほぼ同じ値を示した。血清 PC のアラキドン酸含量の変化は5日目まで赤血球膜リン脂質と同じような傾向を示したが, 7日目でアラキドン酸は対照群より7%増加し, 赤血球膜リン脂質との違いが現れた。

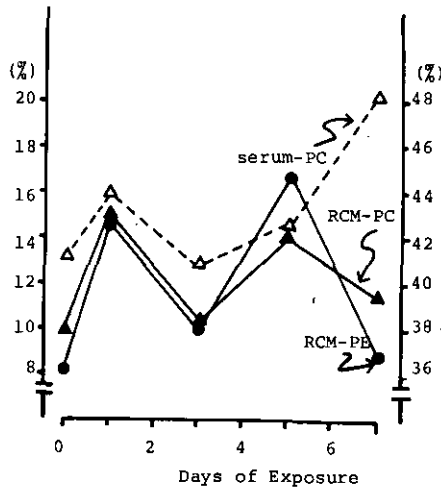


図 1 NO₂暴露ラットの赤血球膜ホスファチジルコリン, ホスファチジルエタノールアミンおよび血清ホスファチジルコリン中のアラキドン酸含量の変化

Fig. 1 Changes in content of arachidonic acid in phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine of red cell membranes and serum phosphatidylcholine of NO₂-exposed rats

RCM; red cell membranes, PC; phosphatidylcholine, PE; phosphatidylethanolamine.

2. 赤血球膜リン脂質の脂肪酸組成の変化

図1にアラキドン酸の含有率の変化を示したが, アラキドン酸の含有率の変化に伴って他の脂肪酸の含有率にも変化が認められた。図2および図3にアラキドン酸と他の脂肪酸の関係を示した。

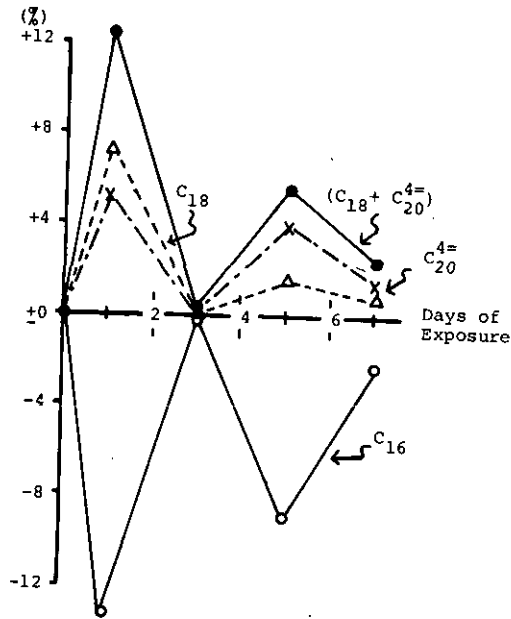


図 2 NO₂暴露ラットの赤血球膜ホスファチジルコリンの脂肪酸組成の変化

Fig. 2 Changes of fatty acid composition of phosphatidylcholine in red cell membranes of NO₂-exposed rats

C₁₆; palmitic acid, C₁₈; stearic acid, C₂₀⁴; arachidonic acid.

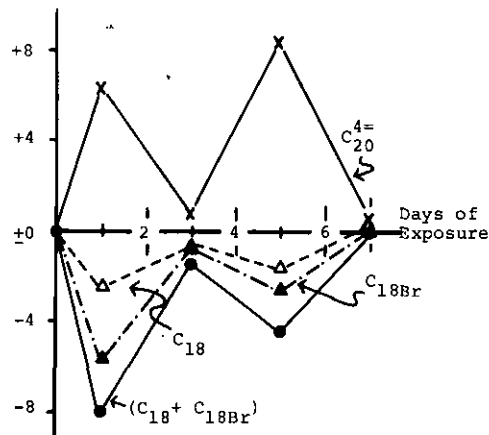


図 3 NO₂暴露ラットの赤血球膜ホスファチジルエタノールアミンの脂肪酸組成の変化

Fig. 3 Changes of fatty acid composition of phosphatidylethanolamine in red cell membranes of NO₂ exposed rats

C₁₈; stearic acid, C_{18Br}; branched fatty acid, C₂₀⁴; arachidonic acid.

赤血球膜 PC ではアラキドン酸の増減パターンとステアリン酸 (C₁₈) の増減パターンは一致していた。また、(アラキドン酸+ステアリン酸) の増減パターンとパルミチン酸 (C₁₆) の増減パターンとの間に鏡面对称の関係が認められた。一方、赤血球膜 PE ではアラキドン酸の増減パターンと (ステアリン酸+メチル基側鎖を持つ C₁₈ 脂肪酸 (C_{18_{Br}})) の増減パターンとの間に赤血球膜 PC と同様な鏡面对称の関係が認められた。

3. 血清リン脂質の脂肪酸組成の変化

血清 PC の脂肪酸組成の変化は赤血球膜リン脂質に見られるような明瞭な鏡面对称の関係は見られなかった。NO₂ 暴露 1 日目においてアラキドン酸およびステアリン酸は対照群より高い含有率を示し、パルミチン酸は低い含有率を示していた。この傾向は 7 日目においても同じであった。また、血清 PC の脂肪酸の中にリノール酸 (C_{18ⁿ}) は 27.8 ± 1.6 % 含まれているが、10 ppm の NO₂ 暴露によってその含有率が低下し、7 日間の暴露期間中対照群より 3 ~ 6 % 低い値を示していた。このようなリノール酸含有率の変動は赤血球リン脂質では見られなかった。これら脂肪酸含有率の変化を図 4 に示した。

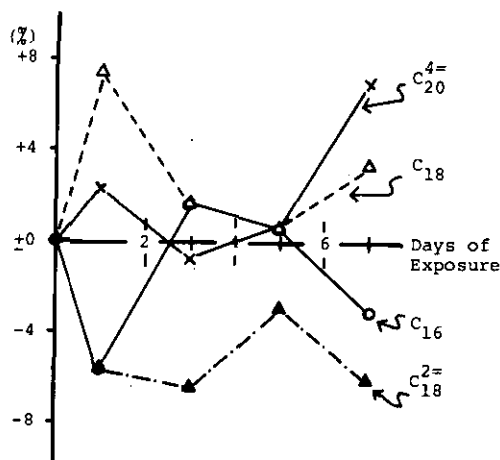


図 4 NO₂ 暴露ラットの血清ホスファチジルコリンの脂肪酸組成の変化

Fig. 4 Changes of fatty acid composition of serum phosphatidylethanolamine of NO₂ exposed rats

C₁₆; palmitic acid, C₁₈; stearic acid, C_{18ⁿ}; linoleic acid, C₂₀; arachidonic acid.

考 察

図1に示したように、血清および赤血球膜リン脂質のアラキドン酸の動向を見ると、5日目までは血清PC、赤血球膜PCおよび赤血球膜PEのアラキドン酸含量の増減は一致しているが、7日目では赤血球膜リン脂質中のアラキドン酸は5日目に比べて減少しているのに対して血清PCでは増加していることが認められた。このことは血清と赤血球との間でのリン脂質あるいは脂肪酸の交換に異常が起きていることを示すものと考えられる。

赤血球膜のリン脂質を構成している脂肪酸の中でアラキドン酸はほとんど β 位に結合していることが知られている。従って赤血球膜におけるアラキドン酸含量の変動はリン脂質の β 位に由来するものと考えられる。このことはリン脂質の β 位に特異的に作用するホスホリパーゼA₂やアシルトランスフェラーゼ等の酵素がこのアラキドン酸含量の変動に関与していることを示唆しているものと考えられる。

アラキドン酸含量の変動に伴って変動する他のリン脂質構成脂肪酸はPC、PE共に飽和型の脂肪酸であった。この飽和型脂肪酸の中のステアリン酸についてみるとPCとPEとでは逆の増減パターンを示していた。また、血清PCと比較してみるとNO₂暴露3日目までは赤血球膜PCと血清PCとは同じ増減傾向を示しているが、3日目以後7日目までは血清PCと赤血球膜PEとが比較

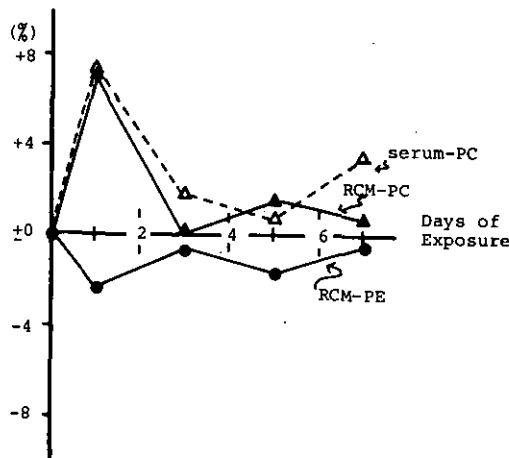


図 5 NO₂暴露ラットの赤血球膜ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンおよび血清ホスファチジルコリン中のステアリン酸含量の変化

Fig. 5 Changes in content of stearic acid in phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine of red cell membranes and serum phosphatidylcholine of NO₂ exposed rats

RCM; red cell membranes, PC; phosphatidylcholine, PE; phosphatidylethanolamine.

的一致した増減パターンを示していた。このことは、10ppmNO₂暴露の赤血球膜に対する作用が3日目以前と3日目以後とで異なっていることを示すものと考えられる。

引用文献

- 1) Oda, H., S. Kusumoto and T. Nakajima (1975): Nitrosyl-hemoglobin formation in the blood of animals exposed to nitric oxide. *Arch. Environ. Health*, **30**, 453-455.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Metcalfe, L. D. and A. A. Schmitz (1961): Rapid preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, **33**, 363-364.

I-12

二酸化窒素の赤血球酵素および膜糖質に及ぼす影響

Effects of Nitrogen Dioxide on Enzyme Activities and
Membrane-Bound Carbohydrate of Rat Red Blood Cells

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 ppm NO₂ をラットに暴露した場合、赤血球において、1日目に膜のシアル酸含量の増加とヘキソース含量の減少が認められた。暴露開始後5日目には、両者はそれぞれの対照群と同じ値になり、その後共に増加し、10日目にはそれぞれの対照群より高い値を示した。この間、Na, K-ATPase活性も増加し、10日目には対照群の3.2倍となった。また赤血球可溶性画分において、グルコース-6-リン酸脱水素酵素活性は暴露開始後7日目では対照群と同じ値を示したが、乳酸脱水素酵素活性は79%に低下した。また、ピルビン酸脱水素酵素活性には増加する傾向が認められた。

Abstract

Red cell membranes, prepared from red blood cells of rats exposed to 4.0 ppm nitrogen dioxide(NO₂) for 10 days, were examined for evidence of changes in membranous components.

One-day exposure to NO₂ caused an increase in sialic acid content and a decrease in hexose content. Seven days after exposure contents of both sialic acid and hexose increased and the elevated values were maintained up to the end of

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

exposure period. Na,K-ATPase activity was also increased and reached 3.2-fold the control 10 days after exposure. Enzyme activities of soluble fraction of red blood cells were examined. A decrease in lactate dehydrogenase activity was observed seven days after exposure, while the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase did not alter.

はじめに

大気汚染物質の一種である二酸化窒素 (NO_2) は、肺を通して吸入されると血中に入り尿中に排泄されることが報告されている¹⁾。吸入された NO_2 は、血液中で亜硝酸イオンと硝酸イオンとして存在することが明らかにされている²⁾。これらの報告は、 NO_2 ガスは吸入されると血液中に亜硝酸イオンまたは硝酸イオンの形で溶解し最終的には尿中に排泄されることを示唆している。従って、 NO_2 ガスを動物に暴露すると、血液中の血球は亜硝酸イオンおよび硝酸イオンと接触する可能性がある。このことは、 NO_2 暴露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ために赤血球がよいモデル系となりうることを示唆している。

我々はこれまでに 4 または 10 ppm の NO_2 をラットに暴露すると、赤血球膜タンパク質および脂質に顕著な変化が起こることを明らかにして来た^{3,4)}。本報告では、 NO_2 暴露によって赤血球が受ける影響を膜糖質および酵素活性を中心にして更に検索した結果を記した。

方 法

1. 暴露条件および赤血球の分画

前報に記したのと同様に Wistar-JCL の雄ラットを 4.0 ± 0.08 ppm の NO_2 で連続暴露した。 NO_2 暴露群および清浄空気のみを対照群のラットの頸動脈からヘパリン存在下で採血し、以下の実験の試料とした。赤血球膜分画は Dodge らの方法⁵⁾によって行った。赤血球を生理食塩水で 3 回洗浄後、15 倍容の 1 mM 塩化カルシウムを含む 10 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加え溶血させた。溶血後 20,000 g 20 分間の遠心によって沈渣を集め、同じ緩衝液で 3 回洗浄したものを赤血球膜分画として用いた。また、酵素活性を測定する場合、同様の方法で赤血球膜分画を調整したが、溶血および洗浄用の緩衝液は 10 mM トリシュー塩酸 (pH 7.4) を用いた。赤血球可溶性分画は溶血後遠心によってえた上清を用いた。

2. 赤血球膜シアル酸およびヘキサースの定量

シアル酸の定量は、赤血球膜標品 0.2 ml (3 - 5 mg のリン脂質を含む) に 0.5 N 硫酸 50 μ l を加え

て80℃60分間加水分解を行い、遊離したシアル酸について行った。加水分解後水冷し、0.6mlの水を加え5N水酸化ナトリウムで中和した。中和後2mlのクロロホルムを加えよく攪拌した後、3,000回転10分間の遠心を行い上層を分取し50 μ lの0.5Mリン酸緩衝液(pH7.2)を加えた。試料は水で1mlとし、0.5mlずつに分けた。一方に0.02単位のシアル酸アルドラーゼ(シグマ製)を加え、37℃60分間処理した。シアル酸アルドラーゼ処理した試料は対照として使用した。両者は、Aminoffの方法⁶⁾によって比色定量した。

ヘキソースの定量は、赤血球膜標品0.2mlに濃塩酸100 μ lを加え80℃4時間の加水分解によって遊離したヘキソースについて行った。加水分解物は水冷後クロロホルム-メタノール(2:1, v/v)を1.2ml加えて2層に分配した。上層0.6mlより0.2mlをとり、80℃で窒素ガスを通し溶媒を除去したのち、アンスロン試薬を加え、Roeの方法⁷⁾でヘキソース量を測定した。

赤血球膜画分のリン脂質量はHarrisらの方法⁸⁾で行い、赤血球可溶性画分のタンパク質量はLowryの方法⁹⁾によって測定した。

3. 赤血球膜結合性酵素の活性測定

Na, K-ATPase活性測定は、赤血球膜標品0.2mlを用い、これに140mM塩化ナトリウム、14mM塩化カリウム、5mM塩化マグネシウム、2.5mMエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)を含む20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)を加え、37℃5分間インキュベーションした後、0.15Mアデノシン-5'-三リン酸を10 μ l加え(最終容量0.5ml)、37℃30分間インキュベーションして行った。また、対照実験には塩化カリウムを除いたものを用いた。インキュベーション終了後30%TCAを0.1ml加え遠心により沈渣を除いた上清0.2mlのリン酸量をHarrisらの方法⁸⁾によって定量した。Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺存在下でのATPase活性をNa, K, Mg-ATPase活性とし、この活性から塩化カリウム無添加でのATPase活性を差引いた値をNa, K-ATPase活性とした。

コリンエステラーゼ活性は、最終濃度0.25mM5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を含む50mMリン酸緩衝液(pH7.2)に赤血球膜標品を加え、0.5mMアセチルチオコリンアイオダイドを基質とし、30℃での410nmの吸光度増加測定により求めた。

グルコース-6-リン酸脱水素酵素活性は、最終濃度0.4mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸(NADP⁺)、10mM塩化マグネシウムを含む100mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.7)に赤血球可溶性画分を加え、1.2mMグルコース-6-リン酸を基質として340nmの吸光度増加の測定により求められた。ピルビン酸キナーゼ活性は、最終濃度2mMホスホエノールピルビン酸、4mMアデノシン-5'-ニリン酸(ADP)、0.1mMフルクトースビスリン酸、0.16mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型(NADH)、100mM塩化カリウムおよび10mM塩化マグネシウムを含む100mMイミダゾール-塩酸緩衝液(pH6.4)に乳酸脱水素酵素10 μ gを加え(最終容量0.5ml)340nmの吸光度減少により測定した。乳酸脱水素酵素活性は、最終濃度0.6mMピルビン酸、0.16mM NADHを含む50mMリン酸

緩衝液 (pH7.5) で340nmの吸光度減少により測定した。これら可溶性酵素の活性測定はいずれも30℃で行った。

結 果

前報³⁾において、4および10ppm NO₂をラットに暴露すると赤血球膜中のリゾホスファチジルエタノールアミン(LysoPE)と不飽和脂肪酸の割合が増加することを報告した。更にNO₂暴露が赤血球膜成分に及ぼす影響を明らかにするために、糖タンパク質および糖脂質の糖鎖として赤血球の外側に突出していることが明らかにされているシアル酸およびヘキソース含量の定量を行った。図1に、4 ppm NO₂暴露による赤血球膜シアル酸およびヘキソース含量の変化を示した。シアル酸含量は、暴露群では暴露開始後1日目に对照群の1.5倍量を示し、以後徐々に減少し、5日目から再び増加し、10日目には对照群より高い値を示した。对照群においてもシアル酸含量は約1.5倍に増加した。一方、ヘキソース含量は、暴露群では、5日目まで对照群より低い値を示したが、それ以降増加し10日目には对照群の1.24倍に達した。

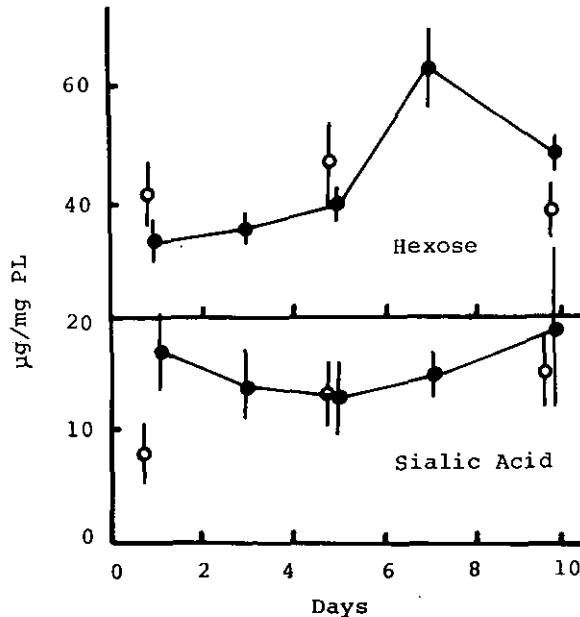


図 1 4 ppm NO₂暴露による赤血球膜シアル酸およびヘキソース含量の変化 (○)：对照群, (●)：暴露群。

Fig. 1 Changes in contents of sialic acid and hexose of red cell membranes during exposure to 4 ppm NO₂

The contents of sialic acid and hexose were determined as described in Methods.

Closed symbols represent contents for exposed animals and open ones for the control counterpart. Each point is the mean of six determinations. Error bars represent \pm standard deviation.

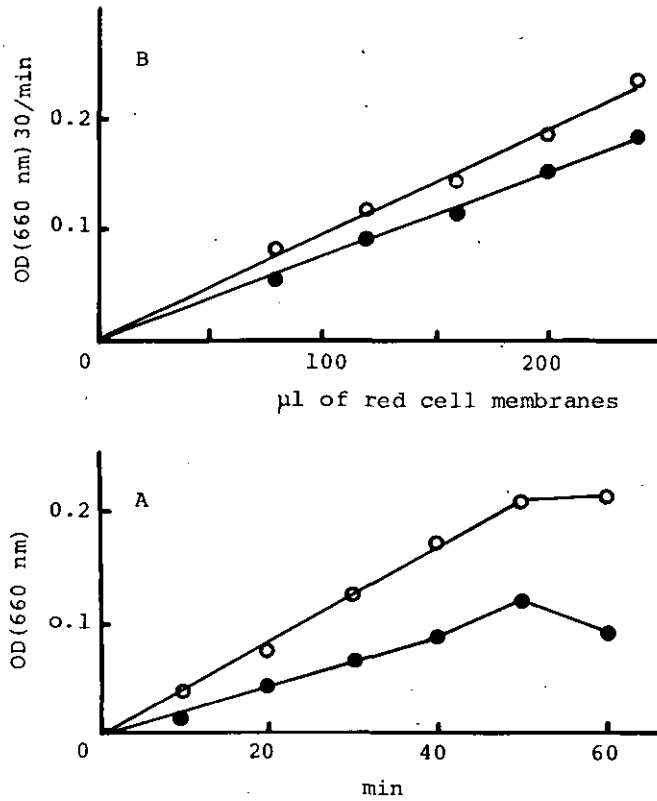


図 2 赤血球膜のNa, K-ATPase活性
 (○) : Na, K, Mg-ATPase, (●) : Na, K-ATPase
 (A)活性の経時変化, (B)赤血球膜量と活性

Fig. 2 Na, K-ATPase activity of red cell membranes of rats
 (A) Time course of ATPase activity, (B) Dependency of Na, K-ATPase activity on quantity of red cell membranes. (○): Na, K, Mg-ATPase, (●): Na, K-ATPase.

表 1 赤血球膜Na, K-ATPase

Table 1. Sensitivity of Na, K-ATPase activity to ouabain

	-Ouabain		+ 3 mM Ouabain	
	+KCl	-KCl	+KCl	-KCl
OD660/30min	0.142	0.072	0.096	0.098
ΔOD by KCl	0.072		-0.002	

赤血球膜には、膜外表面に局在するコリンエステラーゼ (ChE)、膜を横断して存在しているNa, K-ATPase の存在が知られている。図2および表1に、Na, K-ATPase 活性の測定条件について検討した結果を示した。Na, K, Mg-ATPase活性およびNa, K-ATPase活性は各々50分間および40分間37℃で直線性を示した (図2 A)。また、両活性ともに240μlの赤血球膜標品まで試料量に

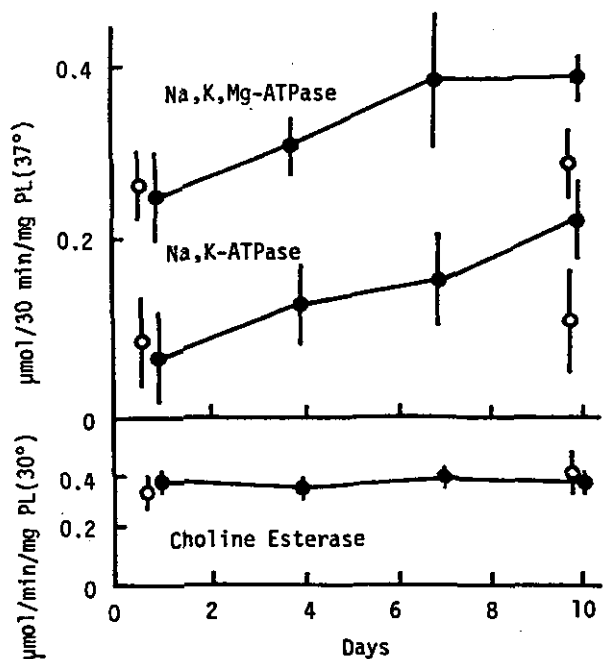


図 3 NO₂暴露による赤血球膜結合性酵素の活性変化
(○)：対照群，(●)暴露群。

Fig. 3 Changes in activities of membrane - bound enzymes of red blood cells during exposure to 4 ppm NO₂

The activities of Na, K, Mg-ATPase, Na, K-ATPase and choline esterase were determined as described in the Methods. Closed symbols represent activities for exposed animals and open ones for the control counterparts. Each point is the mean \pm standard deviation.

表 2 4 ppm NO₂ 7日間暴露による赤血球可溶性成分の酵素活性の変化

Table 2. Changes in activities of soluble enzymes of red blood cells seven days after exposure to 4 ppm NO₂

	Control	4 ppm
Glucose-6-phosphate DH*	9.6 \pm 0.4 (100) %	9.4 \pm 0.3 (98) %
Lactate DH*	104 \pm 6 (100)	82 \pm 5 (79)
Pyruvate Kinase*	9.8 \pm 1.6 (100)	10.9 \pm 1.5 (111)

* Specific activities were expressed as μ mol/min/g protein

依存して活性は直線的に増加した (図 2 B)。ここで測定されたNa,K-ATPase 活性は, Na, K-ATPaseの特異的阻害剤であるウアバインによって完全に阻害された(表 1)。図 3 に, NO₂暴露によるNa, K-ATPase活性およびコリンエステラーゼ活性の変化を示した。膜外表面に存在す

るChEの活性は、暴露期間を通じて対照群、暴露群ともに有意な変化は認められなかった。一方、膜内在性タンパク質であるNa,K-ATPaseの活性は、暴露開始後1日目から10日目までの間に対照群で1.2倍、暴露群で3.2倍にまで増加した。暴露群では7日目から10日目にかけて著しい増加がみられ、暴露開始後10日目には対照群の1.6倍に達した。また、Na, K, Mg-ATPase活性も暴露群は7日目以降有意に高い値を示した。

NO₂暴露による赤血球細胞内成分への影響を検討するために、赤血球可溶性画分の酵素活性を測定した。グルコース-6-リン酸脱水素酵素活性およびピルビン酸キナーゼ活性には4 ppm NO₂の7日間暴露によって有意な変化は認められなかったが、乳酸脱水素酵素活性は79%にまで低下した(表2)。

考 察

4 ppmのNO₂をラットに暴露すると、赤血球において膜表面に露出している糖タンパク質、糖脂質の糖含量が変化した。更に膜内在性タンパク質であるNa,K-ATPaseの活性増加のみならず赤血球内部に存在する乳酸脱水素酵素の活性が低下するなど赤血球は多様な影響を受けることが明らかとなった。さて、NO₂暴露による赤血球への影響は二つの時期に分けることが可能ではないかと考えられる。シアル酸含量が高く、ヘキソース含量が低い5日目までの前半期では、赤血球表面はより強い負の電荷をもち、赤血球表面に露出しているヘキソース量が減少している可能性が示された。この結果は、NO₂暴露により赤血球表面が質的变化を受ける可能性を示唆している。5日目以降の後半期では、いったん対照群に近付いたシアル酸およびヘキソース含量が共に増加する一方、膜内在性タンパク質であるNa,K-ATPaseの活性増加も認められた。このような変化は赤血球のポピュレーションとしての変動を示唆しているのかもしれない。

今後*in vitro*での赤血球の暴露実験を行うことによってNO₂が直接赤血球と反応して起こる変化を明らかにしていく予定である。

引 用 文 献

- 1) Shvorcova, S. and V. Kent (1971): The artero-venous differences in the nitrite and nitrate ion concentrations after nitrogenoxides inhalation. Cesh. Hyg., 16.
- 2) 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 Amer. Rev. Res. Dis., 115, 403-411.
- 3) 彼谷邦光・三浦 卓 (1979): ラットの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.

- 4) Kaya, K., T. Miura and K. Kubota, : Environmental Research, in press.
- 5) Dodge, J. T., C. Mitchell and J. Hanahan (1963): Preparation and chemical characterization of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys., **100**, 119—130.
- 6) Aminoff, D. (1961): Methods for the quantitative estimation of N-acetyl neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem. J., **81**, 384—392.
- 7) Roe, J. H. (1954) : The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. J. Biol. Chem., **212**, 335 —343.
- 8) Harris, W. D. and P. Poat, (1954): Determination of the phosphorus content of lipids. J. Am. Oil Chem. Soc., **31**, 124—127.
- 9) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough and A. L. Farr (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem, **193**, 265—275.

I-13

大気複合汚染ガス暴露チャンバーにおける二酸化窒素およびオゾンの濃度制御について

Control of Nitrogen Dioxide and Ozone Concentrations
in Air Pollutants Exposure Chamber

松本 茂¹・寺尾恵治²・高橋慎司¹・高橋 弘¹・相賀一郎¹

Shigeru MATSUMOTO¹, Keiji TERAO², Shinji TAKAHASHI¹,
Hiroshi TAKAHASHI¹ and Ichiro AIGA¹

要 旨

動物吸入実験用のNO₂、O₃複合汚染ガス暴露チャンバーの、ガス濃度制御上の問題を検討した。

制約された換気回数のもとでは、NO₂とO₃の濃度は互いの反応により、チャンバー内の上下の気流方向に沿って変化した。従ってNO₂およびO₃を定められた濃度に制御するためには、動物飼育部付近のガス濃度を検出する必要がある。限られた換気回数(100回/時)のもとでラット40匹を飼育した時、実験動物から発生したチャンバー内のNH₃濃度は約1.5 ppmとなることが観察された。またNO_x分析計に対するNH₃の干渉特性を調べた。1 ppmのNH₃はモリブデンコンバーターを使用したNO_x分析計ではNO₂として0.6 ppmと検出されたが、グラシーカーボンコンバーターを使用したNO_x分析計ではNO₂として0.03ppmしか検出されなかった。この結果から、NO₂ 1 ppmの制御センサーにモリブデンコンバーター-NO_x分析計を使用すると、NH₃の干渉により60%の制御誤差が生ずるが、グラシーカーボンコンバーター-NO_x分析計を使用すれば、

1. 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

2. 筑波医学実験用霊長類センター

Tsukuba Primate Center for Medical Science, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

制御誤差は3%まで小さくできた。

ガス暴露チャンバーの仕様、構成、特徴、および性能等については、末尾の資料にまとめている。

Abstract

Some problems concerning to control of NO_2 and O_3 concentrations in gases exposure chamber system as inhalation equipment for experimental animals were examined.

With chemical reactions between NO_2 and O_3 , each gas concentration altered along each positions from upper to lower in the chamber under the condition of some restricted ventilation times. It was necessary to detect the concentrations of NO_2 and O_3 surrounding animals in the chamber for the control of concentrations of NO_2 and O_3 to desired values. When forty rats were bred in the chamber under the condition of restricted ventilation times (100 times/h), about 1.5 ppm NH_3 gas generated from experimental animals, was observed. Interference characteristics of NH_3 gas to NO_x analyzers were examined. One ppm NH_3 gas was detectable as 0.6 ppm NO_2 by using NO_x analyzer with molybdenum (Mo) converter, but was detectable as 0.03 ppm NO_x by using the analyzer with glassy-carbon (C) converter. Consequently, interference of NH_3 caused error about 60% when NO_2 was controlled to 1 ppm using sensor with Mo converter, but the error decreased to about 3% using sensor with C converter.

Specifications and constructions of the equipment were described in the supplement of this paper.

はじめに

大気汚染物質の中で特に重要と考えられる二酸化窒素あるいはオゾン等の光化学関連物質の単一または複合暴露による生体影響を系統的・総合的に解析することを目的とした当研究所特別研究¹⁾(昭和52~56年度)が遂行されている。この特別研究に用いられる汚染ガス吸入実験装置として NO_2 と O_3 の複合汚染ガス暴露チャンバーが設計製作されることになり、ワーキンググループが組織され仕様条件等を検討した。設備はその仕様に基づいて設計製作され、昭和54年3月に完成し引きついで実験に利用されている。内容特徴および性能については末尾の資料にまとめられている。

この装置は慢性影響および急性亜急性影響研究に用いられるので、設備の性能としては長期間の連続稼動に耐えるものでなければならない。また動物実験の全期間を通じ最適の定値環境条件が要求されるので、温湿度、風速および光条件が考慮されねばならない。これらの条件の下にNO₂およびO₃複合暴露システムが製作されたが、チャンパー内ガス濃度制御上に種々の問題が生じた²⁾。例えばNO₂とO₃を混合暴露する場合各々のガス濃度を換気速度の制約条件下で設定値に維持するためには、チャンパー内でのNO₂とO₃の反応特性をは握ることが必要である。また供試動物飼育中に排泄物処理の方法に由来するNH₃がNO₂分析計に与える影響を調べる必要がある。本報告はこれらの問題について以下に述べる検討を行った。

1. NO₂とO₃を混合暴露した場合、反応によって起こるチャンパー内気流に沿ったNO₂とO₃の濃度分布を検討し、濃度制御用分析計へ導入するチャンパー内空気のサンプリング位置に関する知見を得た。

2. 実際に動物を収容した状態でのチャンパー内で発生するNH₃濃度について実測し、本チャンパーの定常かどうか時に動物から発生されるNH₃量を推定した。またこの結果をふまえて、ケミルミネッセンス方式NO_x分析計をNO₂濃度制御用検出端として使用する場合、供試動物に由来するNH₃が分析計に与える干渉特性について検討し、NO_xコンバーター選択についての知見を得た。

方 法

本実験で使用した分析計を表1に示す。NO₂分析計とNH₃分析計は、標準ガスを精密稀釈装置を使用してゼロガス（合成空気）で稀釈し分析計に導入して校正した。標準ガス、ゼロガスは製鉄化学工業製のものを使用し、稀釈装置は製鉄化学工業製SDS-201型を使用した。O₃分析計は東京工業製1000型O₃発生装置を使用して校正した。O₃濃度の値付けは当研究所大気環境部で開発された絶対校正法³⁾によった。

チャンパー内のガス濃度を測定するためのサンプリング位置を図1に示す。各サンプリング位置から分析計まではテフロン配管を使用した。サンプリング配管内の通過時間を短くするため、各分

表 1 使用分析計一覧表

Table 1. List of analyzers used

	Principle of analysis	Type
NO _x analyzer with molybdenum converter	Chemiluminescence	8440ES (Monitor Labs)
NO _x analyzer with glassy-carbon converter	Chemiluminescence	ACL-14DS (Yanagimoto)
O ₃ analyzer	Chemiluminescence	806S (Kimoto)
NH ₃ analyzer	Second-derivative spectroscopy	SM-1000 (Lear Siegler Inc)

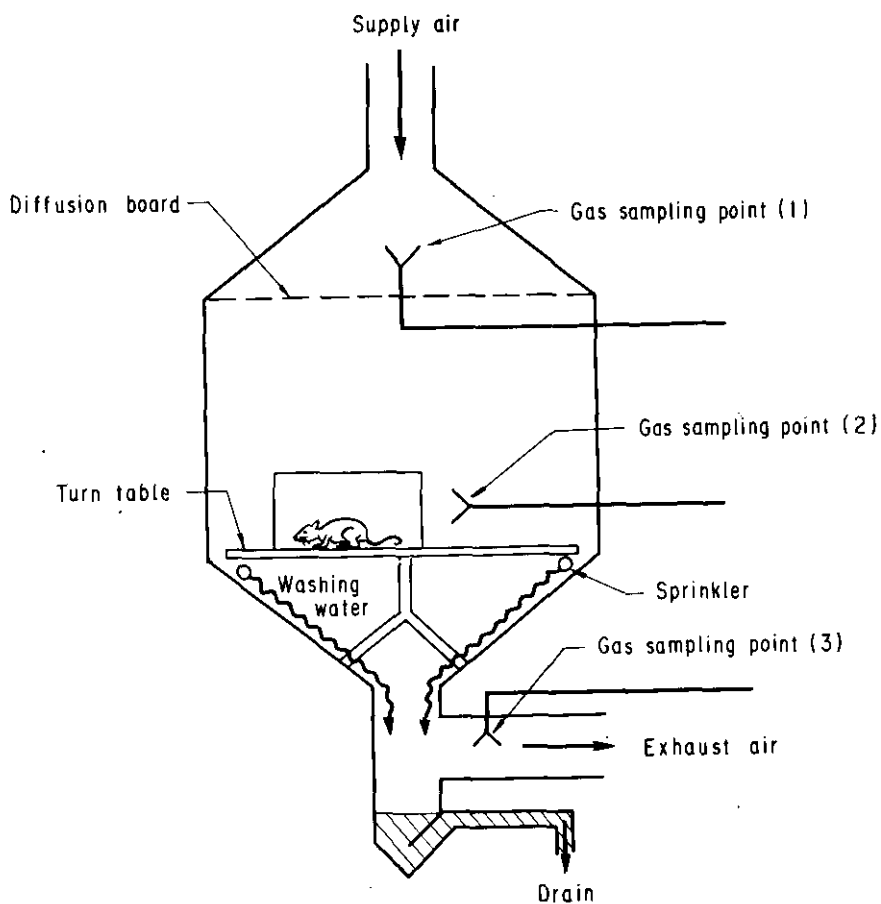


図 1 チャンバー断面図

Fig. 1 Cross section of chamber

析計にはバイパスポンプを取付た。

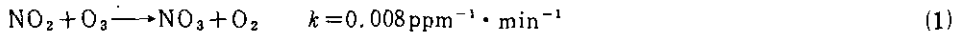
動物実験には14週令の雄のウイスターラット（体重約350g）と、8週令のゴールデンハムスター（体重約120g）を使用した。ラットは12匹を2ケージに分け同一のチャンバーで飼育し、ハムスターは48匹を8ケージに分けて同一チャンバーで飼育した。排泄物は一日一回水洗によりチャンバーから除去した。

結 果

1. ガスサンプリング位置について

チャンバーに供給する高濃度の NO_2 および O_3 は、ガス吹出ノズルまでは別々の配管で供給し配管

途中での化学反応を防止しているが、ダクト内空気と混合された後は時間の経過に従い反応により濃度が減少してゆく。チャンバー内のNO₂-O₃系の反応はほとんど



であると考えられる⁴⁾。これらの反応は(1)が律速と考えられ、C_{NO₂,t}、C_{O₃,t}を各々時刻 *t* におけるNO₂およびO₃の濃度、*k*を反応(1)の速度定数とするとNO₂とO₃の反応速度は次のようになる。

$$\frac{dC_{\text{NO}_2,t}}{dt} = 2 \frac{dC_{\text{O}_3,t}}{dt} = -2k C_{\text{NO}_2,t} C_{\text{O}_3,t} \quad (3)$$

換気がオールフレッシュエア換気であるためチャンバーの空気を一次元的な流れと仮定し、反応速度式(3)からチャンバー内のNO₂およびO₃濃度を求めると次のようになる。

$$C_{\text{NO}_2,t} = (C_{\text{NO}_2,0} - 2 C_{\text{O}_3,0}) / (1 - 2 \frac{C_{\text{O}_3,0}}{C_{\text{NO}_2,0}} e(t)) \quad (4)$$

$$C_{\text{O}_3,t} = C_{\text{O}_3,0} (C_{\text{NO}_2,0} - 2 C_{\text{O}_3,0}) e(t) / \{C_{\text{NO}_2,0} - 2 C_{\text{O}_3,0} \cdot e(t)\} \quad (5)$$

$$e(t) = \exp \{-k(C_{\text{NO}_2,0} - 2 C_{\text{O}_3,0}) t\} \quad (6)$$

ここで初期条件はガス吹出ノズル位置の時刻を *t* = 0 とし、その時のNO₂およびO₃濃度をC_{NO₂,0}、C_{O₃,0}とした。表2に慢性チャンバーでNO₂ 5 ppm、O₃ 1 ppmを設定した場合の計算値と実測値の1例を示す。計算値に対し実測値の反応量が多いのは、NO₂とO₃が吹出ノズルから出た直後ダクト内に充分拡散しない高濃度の状態で反応したためと考えられる。このためダクト中に吹出されたNO₂およびO₃が高濃度状態で接触しないような構造の吹出ノズルを今後検討する必要がある。またサ

表 2 慢性チャンバーの複合ガス制御における供給ガス流量比
設定値 NO₂ : 5 ppm, O₃ : 1 ppm

Table 2. Flow rate ratio of supplied gases for control of mixed gases in the chronic chamber.

Desired values NO₂ : 5 ppm, O₃ : 1 ppm

Ventilation (m ³ /h)	Sampling point (1)		Sampling point (2)		Note
	R _{NO₂} (%)	R _{O₃} (%)	R _{NO₂} (%)	R _{O₃} (%)	
50	0.84	2.09	3.57	8.92	Estimated
280	0.15	0.37	0.61	1.52	Estimated
302	1.59	3.88	10.6	26.2	Measured

Concentrations of NO₂ and O₃ were detected at sampling point (1) or (2) shown in figure 1, and were controlled. Flow rate ratio (R_{NO₂} or R_{O₃}) denotes the ratio of reacted NO₂ or O₃ to remained that.

ンプリング位置(1)とサンプリング位置(2)の実測値から両者の間ではNO₂で9%のO₃で22%の差があることが明らかとなった。この結果は、反応により減少するNO₂およびO₃の影響を補正して高精度で濃度制御をするためには、サンプラーを(2)の位置にする事が適切であることを示している。

2. チャンバー内のNH₃濃度とNO_x分析に対するNH₃の干渉について

動物飼育部付近からガスをサンプリングする場合、動物の糞尿等から発生するNH₃がガス濃度制御用分析計に干渉しガス濃度制御精度に影響する可能性がある。チャンバー内のNH₃濃度に関する知見は少なく、検討資料を得るためチャンバー内のNH₃の測定を行った。

チャンバー内のNH₃発生量は、NH₃濃度をサンプリング位置(3)で測定し換気風量で割って求めた。発生するNH₃量は飼育開始後徐々に増加するが、飼育開始後1週間でほぼ定常となった。またサンプリング位置(2)の値はサンプリング位置(3)の値と同じであった。NH₃発生量が定常値となった時の結果を表3に示す。表3に示したように動物1匹あたりに換算したNH₃発生量はウイスターラットの場合約8 mg/h、ゴールデンハムスターの場合約2 mg/hであった。発生したNH₃の除去は換気により行っているが、飼育動物に風速の影響を与えないよう換気風速を数cm/s以下に抑える必要があり、慢性チャンバーでは最大換気量を280m³/hとしている。この換気風量でラット40匹を使用する実験ではチャンバー内NH₃濃度は約1.5ppmとなる。

NO₂濃度制御センサーとしてのNO₂分析計は、環境レベルの低濃度からppmオーダーまでのNO₂を連続して安定に測定し、制御用信号として利用できることが必要である。この目的には大気モニター用のケミルミネッセンス方式NO_x分析計が最適である。この分析計はNO_xをNOに変換するためのNO_x/NOコンバーターを必要とするが、従来これにM₀を使用してきた。M₀コンバーターの変換効率は反応温度が上昇すると増大し、NO₂濃度が高くなると減少する。一般にM₀コンバーターの温度は、大気中に存在する程度の低濃度のNO₂を分析する場合には350℃位で使用されるが、ppmオーダーの高濃度領域で使用する場合にはこのような温度では必要とする変換効率が得られず、450℃位に温度を上げる必要がある。このような高温でコンバーターを使用する場合NH₃が酸化され、NO₂

表 3 チャンバー内で動物が発生するNH₃量

Table 3. NH₃ generated from animals in the chamber

	Number of animals	Total amount of NH ₃ (mg/h)	NH ₃ converted to relative value per head (mg/h)
Rat	12	100	8.3
Hamster	48	85	1.8

Rat : Aged 14 weeks, male, about 350 gB.W. per head.

Hamster : Aged 8 weeks, male, about 120 gB.W. per head.

濃度の測定に正の干渉を受ける可能性がある。そこでM₀コンバーターを使用したNO_x計と最近開発された比較的低温でNO_xをNOに変換するグラシーカーボンコンバーターを使用したNO_x計を用いて、両者に対するNH₃の干渉特性を測定した。

測定は稀釈装置で1~25ppmのAirバランスのNH₃標準ガスを作り各NO_x分析計に導入してNO₂モードの指示を記録した。結果を表4に示す。M₀コンバーターの場合1ppmのNH₃に対し450℃ではNO₂として0.6ppmを指示し、グラシーカーボンコンバーターでは310℃の温度で0.03ppmの指示をした。この結果はラット40匹を飼育しNO₂1ppmを暴露する場合、M₀コンバーターを使用したNO_x計でNO₂濃度を制御すると0.6ppm相当のNH₃の干渉により、0.4ppmのNO₂実験をすることを意味する。しかしグラシーカーボンコンバーターを使用すればNH₃の干渉は0.03ppmであり、干渉による制御エラーを3%程度に収めることが可能である。

表 4 グラシーカーボンコンバーターを使用したNO_x計とモリブデンコンバーターを使用したNO_x計に対するNH₃干渉

Table 4. Interference of NH₃ to NO_x analyzer using glassy-carbon converter (C conv.) or molybdenum converter (M₀ conv.)

NH ₃ /Air (ppm)	Response as NO ₂ (ppm)			
	C conv. (310℃)	C conv. (290℃)	M ₀ conv. (450℃)	M ₀ conv. (400℃)
0.98	0.028	0.007	0.61	0.18
1.95	0.041	0.013	1.11	0.32
4.98	0.060	0.022	2.28	0.58
9.77	0.077	0.031	3.69	0.85
24.4	0.103	0.052	6.77	1.30

考 察

この種の装置の設計製作に当たり最も重要なことは制御対象を明確にすることである。NO₂+O₃複合汚染実験装置の設計に際しては、①制御対象を動物飼育空間に存在するNO₂およびO₃とする。②制御対象を全NO_xとする。③NO₂やO₃等の特定の濃度制御対象を設定せず、動物が吸入する空气中に存在する汚染物質の検出測定に重点をおく、等いくつかの立場が考えられる。本報告は①の立場から装置に関する問題を検討した。実験の結果から明らかなように制御対象であるNO₂およびO₃濃度を動物飼育部で正確に制御するためには、動物飼育部にガスサンプラーを取付ける必要がある。この場合NO₂濃度制御用分析計に従来使用されてきたM₀コンバーター付のNO_x分析計を使用すると、動物に由来するNH₃の干渉を受け数十%の誤差を含む可能性があるが、しかしコンバーターにグラ

シーカーボンを使用したNO_x分析計を検出端として用いれば、NH₃の影響をほとんど受けないことが明らかとなった。

ガス濃度はアナログPID制御をしているが、サンプラーを動物飼育部付近に取付ることにより検出部に遅れが生じ制御特性が悪くなる。このため制御パラメーターの選択には十分注意する必要がある。

反応生成物の除去は換気により行うが、動物に影響を与えない換気風速の範囲内では十分に生成物を除去することができない。動物実験結果の解析に当たり反応生成物の影響の評価の検討は今後の課題である。

引用文献

- 1) 国立公害研究所 (1979) : 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. 国立公害研究所報告, 第8号.
- 2) 松本 茂・高橋 弘・相賀一郎 (1979) : 動物実験用大気複合汚染ガス暴露チャンバについて. 日本生物環境調節学会第17回大会講演要旨集, p 26.
- 3) 秋元 肇・井上 元・酒巻史郎・星野幹雄・奥田典夫 (1978) : 赤外吸光光度法, 紫外吸光光度法および気相滴定法によるオゾン測定器の絶対校正. 大気汚染研究, 13, p 266
- 4) 近藤次郎編 (1975) : 大気汚染研究—現象の解析とモデル化—. コロナ社

資 料

Supplement

大気複合汚染ガス暴露チャンバーの構成と性能

Specifications and Constructions of Air Pollutants Exposure Chamber

共同利用研究設備として、複合汚染ガス暴露チャンバーを設計製作するに当たり、仕様条件検討のためのワーキンググループが組織された。その構成は次のとおりである。

委員長 久保田憲太郎（環境生理部長）

委員	鈴木 明	（環境生理部）	相賀一郎	（技術部）
	竹中参二	（同上）	大政謙次	（同上）
	三浦 卓	（同上）	高橋 弘	（同上）
	安達史郎	（環境保健部）	寺尾恵治	（同上）
	中野篤浩	（同上）	松本 茂	（同上）
	秋元 肇	（大気環境部）	仁平隆史	（研究企画官）
	戸塚 績	（生物環境部）		

以下ワーキンググループの結論に基づき設計製作されたガス暴露チャンバーの仕様、構成、特徴および性能等について報告する。

ワーキンググループでは以下の4点を含め、表1に示すような基本仕様を決めた。

- 1) 本報告書の特別研究「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研究」の研究計画に整合した装置とする。
- 2) 装置は慢性影響および急性亜急性影響研究用とし、慢性コントロールチャンバー1台、ガスチャンバー2台、および急性亜急性用ガスチャンバー2台とする。チャンバー内空気の温湿度は1台の共通空調機で高精度で制御するものとする。
- 3) 暴露ガスはNO₂およびO₃の単一あるいは複合とし、環境大気レベルの低濃度からNO₂20ppm、O₃5ppmの高濃度領域まで定値制御できること。またプログラム設定器により間欠暴露ができること。
- 4) チャンバーは、内部がSPF環境に維持される構造とし、糞尿処理も水洗方式で自動化すること。

表 1 チャンバーの仕様

Table 1. Specifications of chambers

	Chronic chamber	Sub-acute chamber
Available space	2.4 m ³	1.4 m ³
Temperature		
Control range	20-27℃	20-27℃
Accuracy	±1℃	±1℃
Distribution	±1℃	±1℃
Humidity		
Control range	50-70%RH	50-70%RH
Accuracy	±10%RH	±10%RH
Distribution	±10%RH	±10%RH
Ventilation	50-280 m ³ /h	30-170 m ³ /h
Control range of gases		
NO ₂	0.05-5 ppm	0.5-20 ppm
O ₃	0.01-1 ppm	0.05-5 ppm
Accuracy for the control		
NO ₂ or O ₃ only	3 %FS	3 %FS
NO ₂ and O ₃ complex	5 %FS	5 %FS

1. 空気調和部

空調系統図を図1に示す。取入外気はフィルターで浄化され送風機で空気調和部へ送られる。外気浄化フィルターはフレドニフィルター、活性炭フィルター、二酸化マンガン触媒フィルターを使用し、ダンパーD₁を切替えることにより1系統を選択して交互に使用できる。送風機の能力は、1,180m³/h (320mm Aq)である。

換気はNH₃等の蓄積を防止するため、オールフレッシュエア換気とした。

各チャンバーの空気調和は共通空調機により行った。空調機の能力は冷却除湿コイルが0-2℃のブラインを使用し27,800 kcal/h、加熱ヒーターが18kW、加湿ノズルが26kg/hである。温湿度はアナログPID制御方式で吹出制御した。空調機を出た空気はDOPテスト99.99%以上のアブソリュートフィルターで除菌され、各チャンバーへ送風される。2系統あるアブソリュートフィルターはダンパーD₃、D₄により1系統を交互に使用するようになっている。

空気調和部と各チャンバー間にガス吹出ノズルがあり、ここで汚染成分ガスのNO₂、O₃がチャンバー供給空気中に混合され、チャンバーに送られる。各チャンバーの風量、圧力はダンパーD₅、D₆により調節される。

チャンバーを出た汚染ガスを含んだ空気はアブソリュートフィルターを通り、排気浄化フィルターで汚染ガスを除去され屋外へ排出される。排気浄化フィルターはマーツクリーンフィルターを使用した。排気浄化フィルターはダンパーD₈、D₉により1系統を選択して交互に使用する。

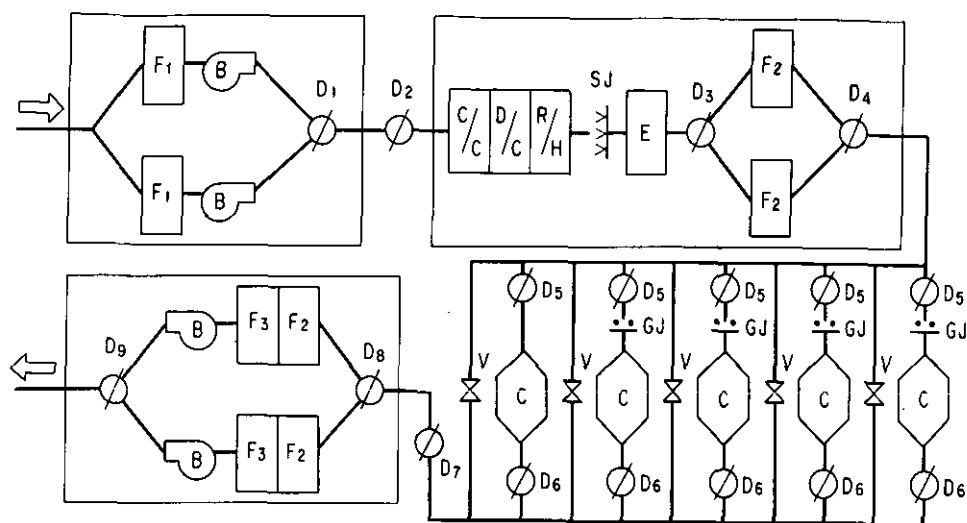


図 1 チャンバー系統ブロック図

- | | |
|--|--------------|
| B : 送風機 | GJ : ガス吹出ノズル |
| C : チャンバー | SJ : 加湿ノズル |
| D ₁ ~D ₉ : ダンパー | V : 弁 |
| E : エリミネーター | C/C : 冷却コイル |
| F ₁ : 除塵フィルター, 二酸化マンガン
触媒フィルター, 活性炭フィルター | D/C : 除湿コイル |
| F ₂ : アブソリュートフィルター | R/H : ヒーター |
| F ₃ : マーツグリーンフィルター, 除塵フィルター | |

Fig. 1 Block diagram of chamber system

- | | |
|---|--------------------------|
| B : blower | GJ : gas jet unit |
| C : chamber | SJ : steam jet unit |
| D ₁ ~D ₉ : damper | V : valve |
| E : eliminator | C/C : cooling coil |
| F ₁ : disposal filter, catalyst-bearing
filter (MnO ₂) and active
carbon filter | D/C : dehumidifying coil |
| F ₂ : absolute filter | R/H : heater |
| F ₃ : Matsuclean filter (K ₂ CO ₃ +Ca
(OH) ₂) and disposal filter | |

消毒等のため一部のチャンバーの給気を止めた場合に他のチャンバーの風量に大きな影響を与えないよう、各チャンバーには通常は閉鎖してあるバイパスダクトを取付けてある。急性亜急性チャンバーは、このバイパスダクトを利用して特殊なチャンバーを取付けることができるようになっている。

チャンパー設置室の温湿度は24時間空調により、ガラス構造のチャンパー内空気の空調外乱が最少となるようにした。また設置室の照明時間はタイマーにより調節され、飼育動物の種類に応じて照明時間を選択することができる。

2. チャンパー部

供試実験動物としてはマウス、ラット、うさぎ、犬等が予定されている。チャンパーサイズは慢性用チャンパーはうさぎ用ケージ5ケージまたは犬用ケージが入る広さを基準とし、急性亜急性チャンパーは犬用ケージが入る広さを基準として、大きさを決定した。

チャンパー構造は水平断面が六角形のガラス構造とし、飼育管理の簡便を図るため動物飼育部の床面は網目構造のターンテーブルとした。チャンパー内気流は下降流とし、気流分布が一様となるよう飼育部へは多孔板から吹出すようにしてある。

チャンパー内をSPF環境とするため、前述のようにアブソリュートフィルターで除菌した空気を給気することに加え、動物処理、飼育管理用に2個のパスボックスを各チャンパーに取付けてある。糞尿処理は水洗方式とし、洗浄水はタイマーにより自動調節される。

3. ガス濃度制御

ガス濃度制御システムのブロックダイアグラムを図2に示す。暴露用供給ガスおよび O_3 分析計用 C_2H_4 は、集中管理を行うために全てボンベ庫に設置し、各実験装置へ集中配管で供給されている。供給 NO_2/N_2 ガスは250ppm~4,000ppmの高圧容器充填ガスと、液化 NO_2 および液化 N_2 を原料に NO_2 発生装置で作られる4,000ppmの NO_2/N_2 を実験目的に合わせて選択して使用している。供給ガス濃度の選択はチャンパー内の分布を考慮し、稀積倍率が10,000倍以下となるようにした。 NO_2 発生装置の仕様を表2に、ブロックダイアグラムを図3に示す。 NO_2 発生濃度を一定に保つため、 NO_2 および N_2 流量は質量流量調節計で一定比率に制御されている。

ボンベ庫より供給された NO_2 は、ガス吹出ノズルよりチャンパー内に供給される。チャンパー内 NO_2 濃度は供給 NO_2 流量を質量流量調節計で制御して、目的とする値に制御される。 O_3 は O_2 を原

表 2 NO_2 発生装置の仕様

Table 2. Specifications of NO_2 generator

Concentration of generated gas	NO_2/N_2 4,000 ppm
Accuracy of concentration	$\pm 3\%$ (max.)
Capacity	4.5 Nm^3/h
Pressure	3 kg/cm^2
Raw materials	NO_2 pure gas and N_2 pure gas

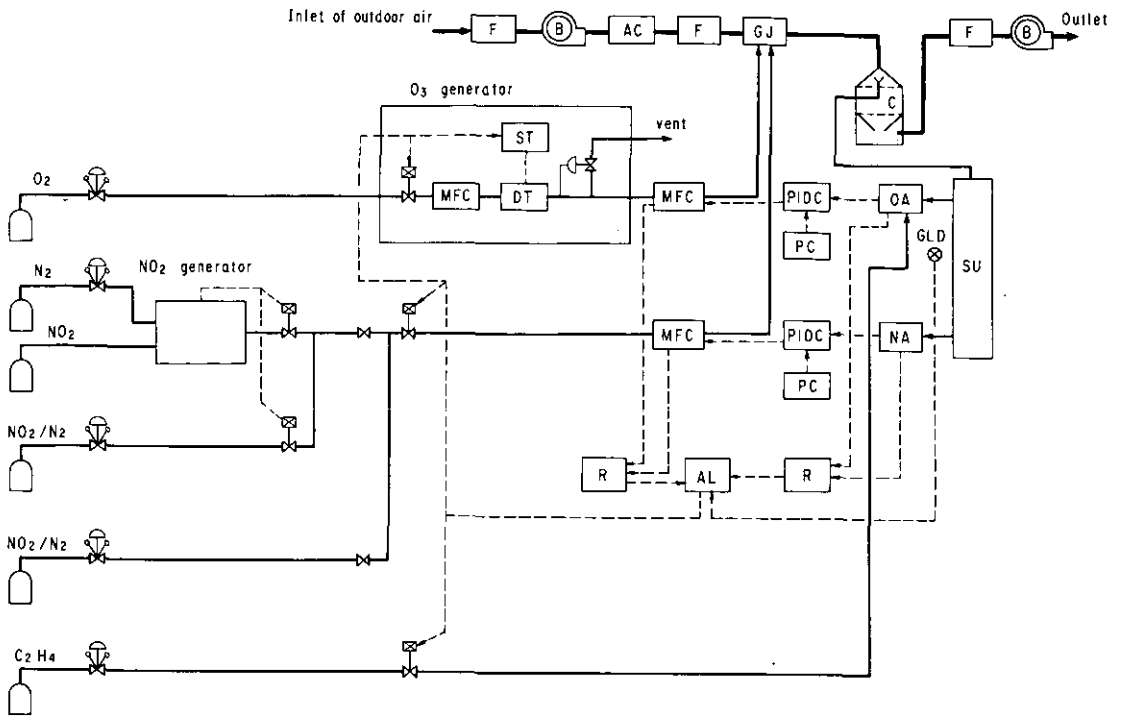


図 2 ガス濃度制御システムブロック図

- | | |
|-------------------|--------------------------|
| AC : 空調機 | NA : NO ₂ 分析計 |
| B : 送風機 | OA : O ₃ 分析計 |
| C : チャンバー | PC : プログラム調節器 |
| F : フィルターユニット | PIDC : PID制御器 |
| G : ガス吹出ノズル | R : 記録計 |
| AL : 警報装置 | S : サンプリング装置 |
| GLD : 可燃性ガス漏えい検知器 | DT : 放電管 |
| MFC : 質量流量調節計 | ST : 安定化電源 |

Fig. 2 Block diagram of gases concentration control system

- | | |
|----------------------------|-------------------------------|
| AC : air conditioning unit | NA : NO ₂ analyzer |
| B : blower | OA : O ₃ analyzer |
| C : chamber | PC : program controller |
| F : filter unit | PIDC : PID controller |
| G : gas jet unit | R : recorder |
| AL : alarm device | S : sampling unit |
| GLD : gas leak detector | DT : discharge tube |
| MFC : mass flow controller | ST : stabilized power supply |

料ガスとし無声放電により発生させ、NO₂と同様に質量流量調節計を通りガス吹出ノズルへ送られる。チャンバー内ガス濃度分布を一様とするためガス吹出ノズルは特殊な構造とした。NO₂とO₃の高濃度状態での反応を抑えるため、ガス供給配管を分離した。チャンバー内ガス濃度はアナログPID制御を行った。

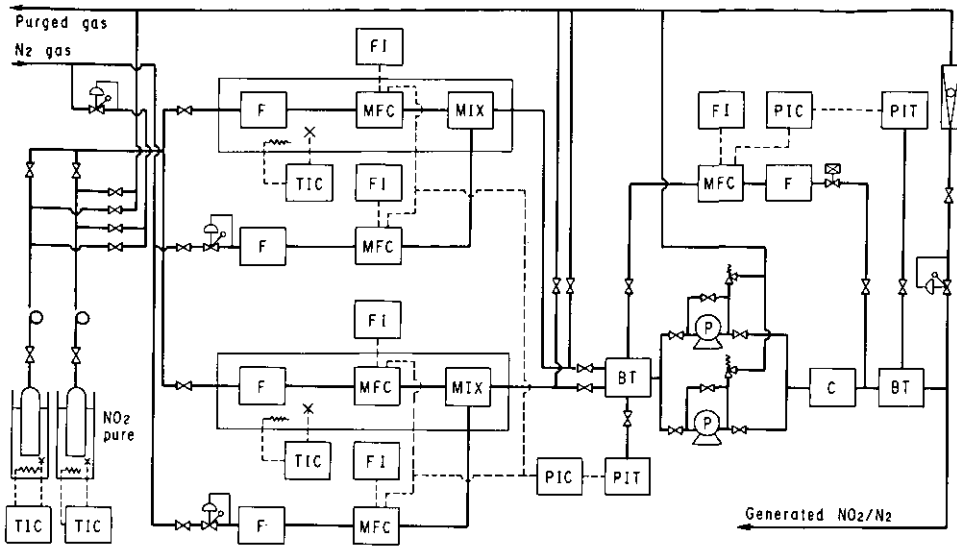


図 3 NO₂発生装置のブロック図

- | | |
|---------------|-------------|
| BT : バッファータンク | MIX : 混合器 |
| C : 冷却器 | P : 圧縮機 |
| F : フィルター | PIC : 圧力調節器 |
| FI : 流量指示計 | PIT : 圧力変換器 |
| MFC : 質量流量調節計 | TIC : 温度調節器 |

Fig. 3 Block diagram of NO₂ generator

- | | |
|----------------------------|------------------------------|
| BT : buffer tank | MIX : mixing chamber |
| C : cooler | P : compressor |
| F : filter | PIC : pressure controller |
| FI : flow indicator | PIT : pressure transducer |
| MFC : mass flow controller | TIC : temperature controller |

濃度の検出端としてO₃分析計は紀本電子工業製806S型を、NO₂分析計は慢性チャンバーに柳本製作所ACL-14DS型、急性亜急性チャンバーにモニターラボ社製8440ES型を使用した。

4. 制御結果

チャンバー完成後動物を入れない状態で作動試験を行い、温湿度制御およびガス濃度制御性能を確認した。表3に温湿度の制御結果を示す。検出器は横河電機HMT-11型を使用し5台のチャンバーで温湿度をモニターして得た。この結果から、チャンバー間の温湿度の偏差は小さく仕様条件を満足していることが明らかとなった。表4にチャンバー内温度分布を示す。測定はチャンバー内の76点から各々10回サンプリングして行った。計測器は江藤電気製サーモダックE60Tを使用しセンサーに熱電対を使用した。表4に示したように温度分布は仕様条件を満足しており、この結果か

表 3 温湿度の制御結果

Table 3. Results of temperature and humidity control

Desired values		Results	
Temperature (°C)	Humidity (%RH)	Temperature (°C)	Humidity (%RH)
20	50	20.0±0.5	50±5
20	70	20.0±0.8	70±5
27	50	27.0±0.5	50±5
27	70	27.0±0.5	70±5

表 4 チャンバー内の温度分布

Table 4. Distribution of temperature in chambers

	Chronic chamber			Sub-acute chamber	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
Mean temperature (°C)	25.8	25.9	25.8	25.6	25.6
Standard deviation (°C)	0.13	0.12	0.12	0.11	0.11

Temperature was measured at 76 points in each chambers, and the measurement was repeated 10 times during several hours.

表 5 NO₂およびO₃濃度制御結果

Table 5. Results of NO₂ and O₃ concentration control

Chamber	Gas	Desired value (ppm)	Ventilation (m ³ /h)	Temperature (°C)	Humidity (%RH)	Range of analyzer (ppm/FS)	Error (%)
Chronic	NO ₂	5.0	280	25	50	10	1
Chronic	NO ₂	0.50	280	25	55	1	2
Chronic	NO ₂	0.05	50	24	55	0.1	3
Chronic	O ₃	1.0	280	25	55	2	1
Chronic	O ₃	1.0	50	25	55	2	3
Chronic	O ₃	0.01	50	25	50	0.02	5
Chronic	NO ₂ and O ₃	5.0	280	25	50	10	1
		1.0				2	1
Chronic	NO ₂ and O ₃	0.05	50	25	55	0.1	4
		0.01				0.02	7
Sub-acute	NO ₂	20	170	25	50	20	2
Sub-acute	NO ₂	5.0	170	25	60	10	1
Sub-acute	NO ₂	0.5	30	24	60	1	1
Sub-acute	O ₃	5.0	170	25	60	5	2
Sub-acute	O ₃	5.0	30	23	60	5	1
Sub-acute	O ₃	0.05	30	24	55	0.1	3
Sub-acute	NO ₂ and O ₃	20	170	24	55	20	2
		5.0				5	2
Sub-acute	NO ₂ and O ₃	0.5	30	23	60	1	1
		0.05				0.1	2

ら温度分布についても同様のことが言える。

単一および複合状態におけるガス濃度制御結果を表5に示す。慢性チャンバーで仕様条件範囲で最も制御が困難な条件であるところの換気風量 $50\text{m}^3/\text{h}$ の時の NO_2 0.05ppm, O_3 0.01ppm複合制御における O_3 の制御結果は設定値に対し $\pm 7\%$ であった。この結果は、現在の分析技術の限界である。チャンバー内ガス濃度分布は、12点でサンプリングし測定した。この結果分布は NO_2 , O_3 両者とも $\pm 2\%$ 以内であった。

謝 辞

本チャンバーの設計製作に当たり御協力頂いた製鉄化学工業(株)額田正己氏, 小糸工業(株)寺島貞二郎氏に感謝致します。

II-1

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——

Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rats

——Environmental Control——

松本 茂¹・藤田和伸¹・清水 明¹・木村英雄¹・高橋 弘¹

Shigeru MATSUMOTO¹, Kazunobu FUJITA¹, Akira SHIMIZU¹, Hideo KIMURA¹
and Hiroshi TAKAHASHI¹

要 旨

本報告書第II章の一連の研究に用いられた大気汚染ガス暴露チャンバーのシステム概要について述べ、2年3か月の実験期間の各チャンバーの温湿度および二酸化窒素濃度制御結果をまとめた。これらの結果は仕様の各項目に一致していた。

Abstract

Outline of the air pollutant exposure chamber's system used in each experiment in this report, was described. The results of automatic control of temperature, humidity and low concentration NO₂ gas in each chamber during about two years, were summarized. The results of automatic control agreed with the performance of the specifications.

1. 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

本報告書第Ⅱ章のプロジェクト研究を遂行するために、環境基準値のNO₂濃度を2年以上の長期間にわたって連続的にガス暴露チャンバーに設定し維持することが必要であった。このような極低濃度のNO₂の長期間にわたる生体影響についての研究例は少なく、したがって実験装置内で設定濃度を安定して維持するための技術資料はほとんど見当たらない。一方、生体影響実験結果の再現性、信頼性が保証される前提条件として、チャンバー内ガス濃度設定値についての実体は把握されねばならぬことは当然のことである。

この報告では、当研究所動物実験施設に設置されている大気汚染ガス暴露チャンバーのシステム概

方 法

1. 大気汚染ガス暴露チャンバーシステム構成

マウスおよびラット等の小動物用暴露チャンバーは^{1),2)}、対照用としてのガス暴露装置をもってい

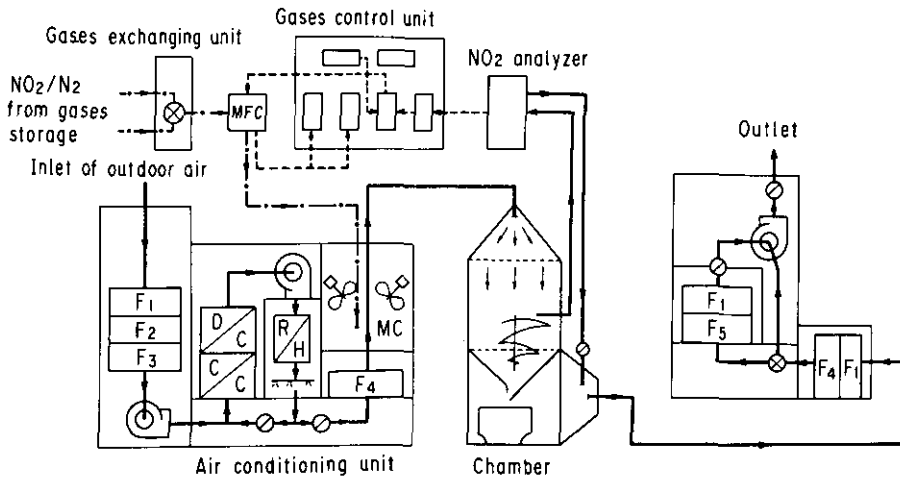


図 1 チャンバー系統ブロック図

- | | |
|---------------------------------|---------------|
| F ₁ : 除塵フィルター | MC : 混合器 |
| F ₂ : 二酸化マンガン触媒フィルター | MFC : 質量流量調節計 |
| F ₃ : 活性炭フィルター | C/C : 冷却コイル |
| F ₄ : アブソリュートフィルター | D/C : 除湿コイル |
| F ₅ : マツクリーンフィルター | R/H : ヒーター |

Fig. 1 Block diagram of chamber system

- | | |
|---|----------------------------|
| F ₁ : disposal filter | MC : mixing chamber |
| F ₂ : catalyst-bearing filter (MnO ₂) | MFC : mass flow controller |
| F ₃ : active carbon filter | C/C : cooling coil |
| F ₄ : absolute filter | D/C : dehumidifying coil |
| F ₅ : Matsuclean filter
(K ₂ CO ₃ + Ca(OH) ₂) | R/H heater |

要と、実験期間中の温湿度等飼育環境条件とガス濃度制御結果について述べ、問題点を明らかにした。ないコントロールチャンバー1台とガス暴露チャンバー3台の計4台で構成されている。ガス暴露装置を除けば4台共に同一の仕様である。チャンバーは角錐形で、飼育部の大きさは1,500mm(W)×1,550mm(D)×1,000mm(H)であり、それぞれマウス10匹飼育可能のケージを10台収容することができる。図1にチャンバーのブロックダイアグラムを、図2にチャンバー断面図を示した。取入外気は活性炭フィルターおよび二酸化マンガン触媒フィルターで浄化後空気を調和部に導入される。温湿度が設定値に制御された空気はDOPテスト99.99%以上のアブソリュートフィルターを通過した後、飼育部へ導入される。この途中で、大気汚染成分ガスが導入され混合される。排気ガスはアブソリュートフィルターを通過後、排気処理用のマーズクリーンフィルターで浄化され大気中へ放出される。チャンバー内の換気は、供試動物に由来するアンモニアガスの蓄積をさけるためオールフ

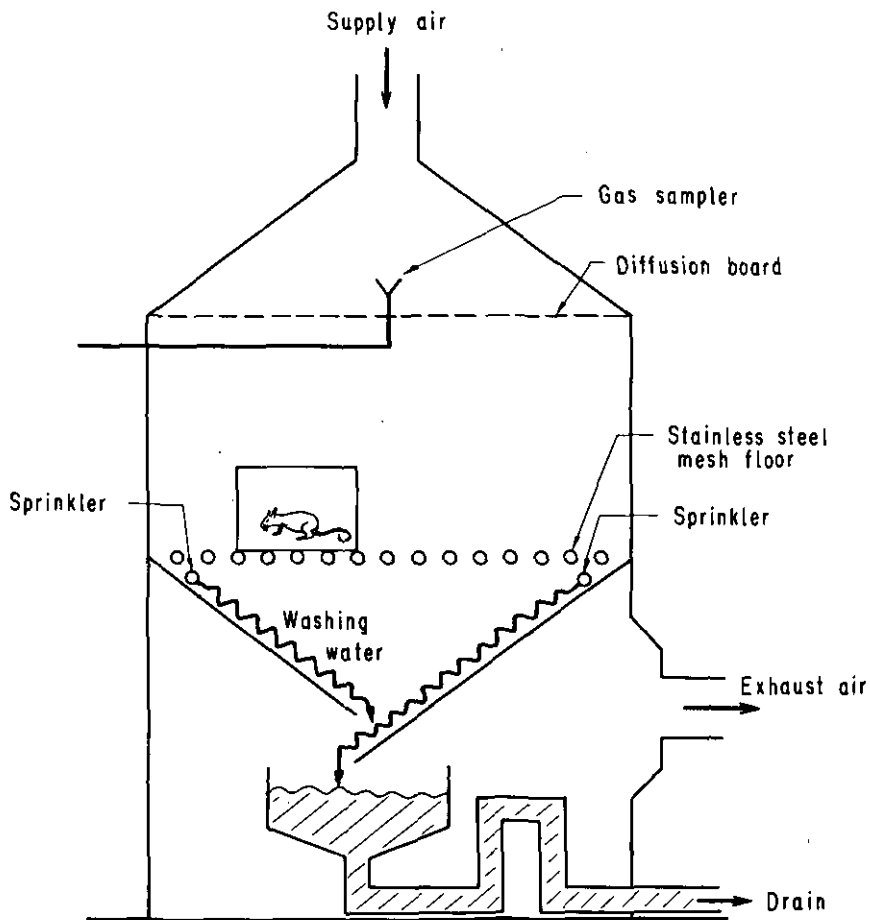


図 2 チャンバー断面図

Fig. 2 Cross section of chamber

レッシュエア換気で、飼育部の気流は下降流である。チャンバー内温湿度の制御センサーとして千野製作所R907, R020-10型を、モニター用センサーとして横河電機HMT-11型を使用した。温湿度の制御はアナログPID方式で行い、モニター結果は記録計に表示した。

暴露用ガスは、250ppm~4,000ppmのガスを容器に充填し、ボンベ庫からチャンバー室に集中配管で供給した。供給ガスは、設定濃度の10,000倍を稀釈限界として選択し供給され、チャンバー内ガス濃度は大倉電気製の質量流量調節計を操作端とするアナログPID方式により制御した。制御用センサーとして、大気モニター用のケミルミネッセンス方式のサーモエレクトロン社製Model-14D型NO_x分析計を使用し、設定濃度に対する偏差量を検出した。分析計の指示と質量流量指示を記録計に表示した。ガス濃度制御系が故障した場合は、フィードバック制御方式は手動方式に切替えられる。この場合、分析計は濃度モニターとして使用される。

分析計に導入するチャンバー内空気のサンプリングは、供試動物に由来するアンモニアガスが含まれぬ位置を検討し、飼育部上部の多孔板の上流側に定位置を定めた。

2. 暴露チャンバーの運転条件

長期実験期間中の温湿度およびガス濃度についての設定条件を表1に示す。温湿度は、各チャンバー共に25℃、55%RHの同一条件で、NO₂濃度は0.04ppm、0.4ppm、4ppmの3濃度である。供給ガスは、0.04ppm設定チャンバーが250ppm、0.4ppm設定チャンバーは1,000ppm、4ppm設定チャンバーは4,000ppmの濃度のものを使用した。

表 1 チャンバー設定条件

Table 1. Environmental conditions set in chambers

Chamber	Temperature (°C)	Humidity (%RH)	Concentration of supply NO ₂ /N ₂ gases (ppm)
Control	25	55	
0.04ppm NO ₂ exposure	25	55	250
0.4 ppm NO ₂ exposure	25	55	1,000
4 ppm NO ₂ exposure	25	55	4,000

結 果

運転の全期間を通じ温湿度の制御精度は、温度は±1℃/24h以内、湿度は±10%RH/24h以内であった。記録紙から温湿度の中心値を温度については1℃、湿度については10%RHでサンプリングし各温湿度の時間を積算し、これを全運転期間当たりの出現ひん度として表した結果を図3に示した。温度については全運転期間に対し、対照群は97%の期間、0.04ppm群は85%の期間、0.4ppm

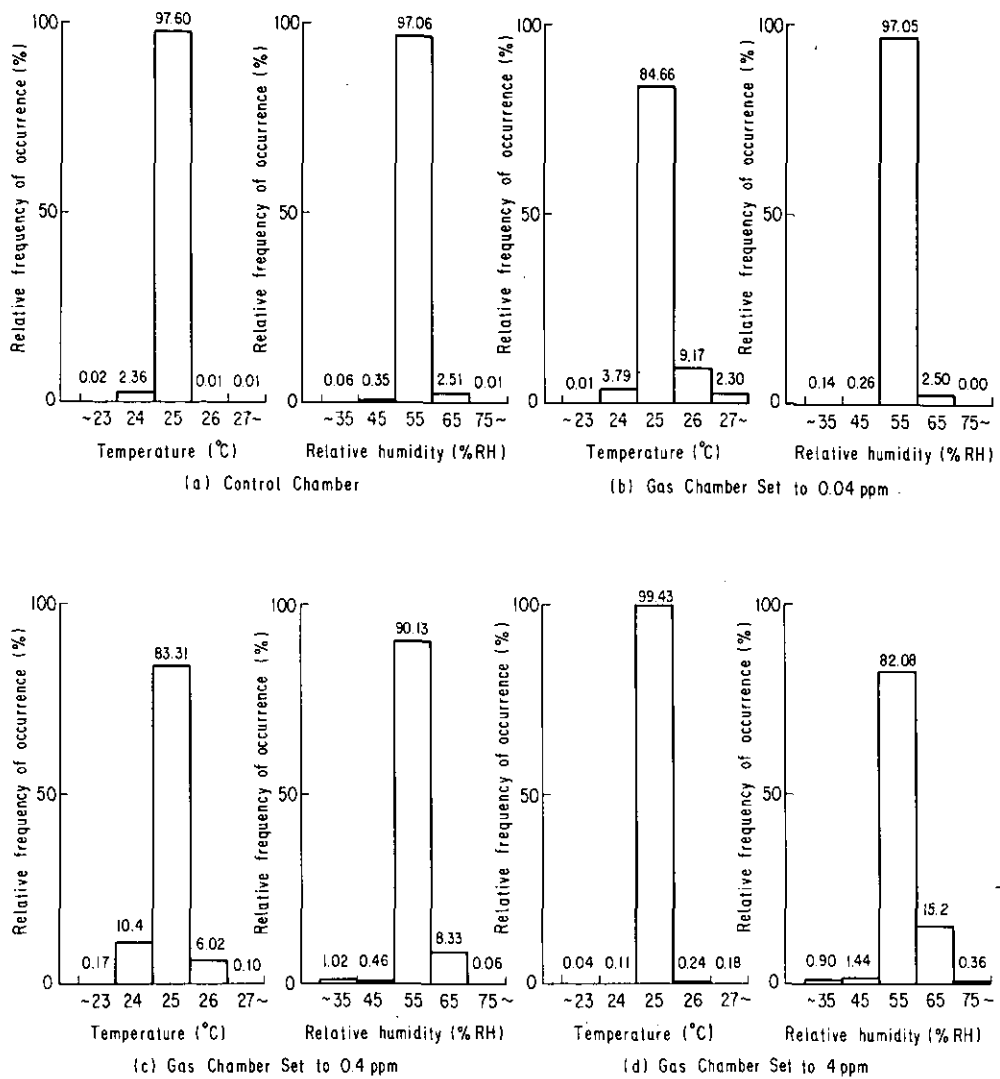


図 3 チャンバーの温湿度制御

Fig. 3 Control of temperature and humidity in chambers

群は83%の期間、4 ppm群は99%の期間 25 ± 1 °Cに制御された。湿度については、対照群が97%の期間、0.04ppm群は97%の期間、0.4ppm群は90%の期間および4 ppm群は82%の期間 55 ± 10 %に制御された。

上記期間以外の設定値に対してずれが生じた原因は、外気の温湿度の変化が急激に起こり異常な制御外乱として作用した場合のハンチングによるものであり、適切な制御パラメータの選択および調整に注意せねばならない。システムを構成する機器の故障および落雷停電その他のトラブルによ

るものも含まれている。

湿度センサーは、制御用、モニター用共に乾湿球方式のものを用いたが、このセンサーは、湿球の乾燥により湿度測定に大きな誤差を生じるため、湿球に適切な湿りを与えておく必要がある。制御用とモニター用のセンサーを分離したことにより湿球の乾燥を初期段階で発見することができ、制御精度の維持に有効であった。長い実験期間中で、両者の湿度表示に相違が起こり、計器の調整を必要とする場合があるが、この期間中は、モニター用センサーの指示が目標値になるように温湿度の設定器で処理した。

実験期間中チャンバーの換気量は40~80回/hであり、飼育部における平均風速の計算値は約2 cm/sであった。

NO₂濃度制御結果について、温湿度と同様に各チャンバーのガス濃度の出現時間を積算し、全運転期間中の出現ひん度としてまとめた結果を図4に示す。設定値に対する偏差をpeak to peakで表すとチャンバー内のガス濃度は全実験期間に対し、0.04ppm群は79%の期間0.04±0.008ppmに、0.4ppm群は80%の期間0.40±0.04ppmに、4ppm群は90%の期間4.0±0.4ppmに制御された。

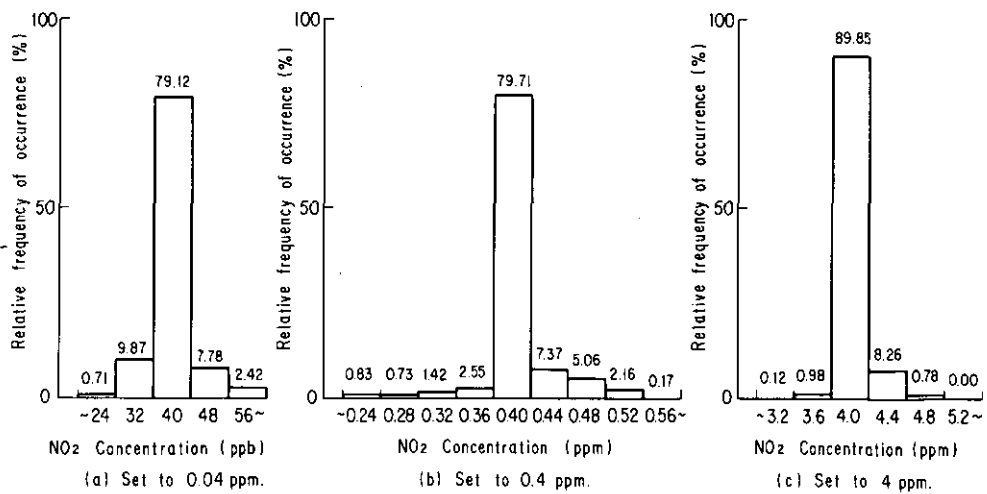


図 4 NO₂濃度制御結果

Fig. 4 Control of NO₂ concentration in gas exposure chambers

ガス濃度制御結果が設定値よりずれた部分については、制御系の故障特に分析計のトラブルによるものが多い。ガス濃度のフィードバック制御に対する外乱は、換気風量の変動および取入外気中のNO_xが主なものである。特に、0.04ppm設定の場合上記外乱を無視することはできず、自動制御系の管理には常時の点検が必要であった。分析計の故障の際は、手動方式により、設定値に対する既知濃度の供給量を計算し、一定流量流すことで対処したが、換気風量の変動による影響は

十分検討する必要がある。

排気ガス浄化フィルターの性能は排気ダクト開口部より1 mの位置におけるNO₂濃度をモニターした。測定結果は、常時0.02ppm以下であった。

次に、ガス濃度制御の信頼性について述べる。信頼性は制御センサーとして使用しているNO_x分析計の校正により保証される。校正は50ppm, 500ppm, 2,000ppmのNO₂標準ガスをゼロAirで稀釈し、分析計に導入した。校正用NO₂/N₂標準ガスおよび稀釈用Airは製鉄化学工業製を使用し、稀釈装置はスタンダードテクノロジー製のSGGU-14型を使用した。

チャンバー内部ガス濃度の監視は、制御センサーとしての分析計の指示と供給ガス量の両者を監視するクロスチェックシステムを採用している。このシステムは計測部と制御部が補完しているためガス濃度の制御状態が的確には握でき、制御精度の維持に非常に有効であった。ガス流量記録から分析計の故障が発見されたときの例を図5に示した。Ⓐは分析計が故障したときの時刻を表しⒷ

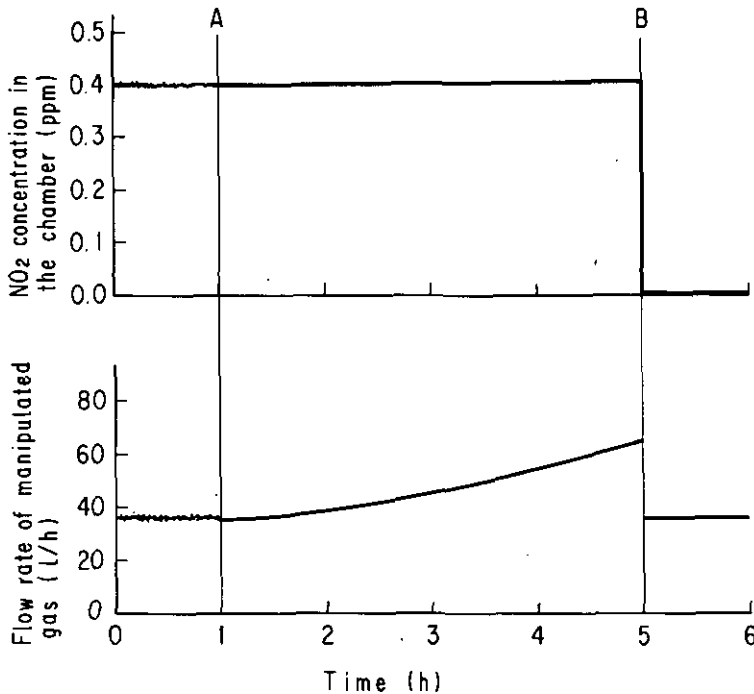


図 5 0.4ppm設定チャンバーのNO₂濃度と操作ガス流量の1例
A: NO₂分析計が故障した時刻
B: 警報装置が作動し、この時刻からNO₂をマニュアル操作で一定量供給した。

Fig. 5 An example of relation between NO₂ concentration in the chamber set to 0.4 ppm and flow rate of manipulated gas
A: The time when NO₂ analyzer troubled.
B: The time when alarm device worked, and then the NO₂ gas was supplied at constant rate with manual operation.

表 2 供給ガスの仕様

Table 2. Specifications of supply gases

Species of gases	NO ₂ /N ₂ 250 ppm, NO ₂ /N ₂ 1,000 ppm, NO ₂ /N ₂ 4,000 ppm
Purity of NO ₂ as raw materials	99.9% (min.)
Purity of N ₂ as raw materials	99.999% (min.)
Deviation from request concentration	±1.5% (max.)
Accuracy of concentration	±1.5% (max.)

はトラブルへの対処を開始した時刻を表す。時刻④までは制御系は正常に作動していたが④で故障した分析計が設定ガス濃度付近の誤値を指示し続けたためガス流量が徐々に増加し、⑤点でガス流量の上限警報が発報した。⑥点では、ガスを手動作で正常状態の流量に設定し、実験を続行しながら一方で分析計の修理を行った。

このような形式でトラブルに対処するには、供給ガス濃度が定値である場合にのみ対処できることである。この観点から、供給ガスの濃度についての仕様は表2に示すように決めた。供給ガスのロット間濃度変動は公称値の1.5%以内であり、前述したように濃度変動はガス濃度制御系の外乱要素としては無視することができた。この結果、供給ガス流量をモニターすることによりチャンバー

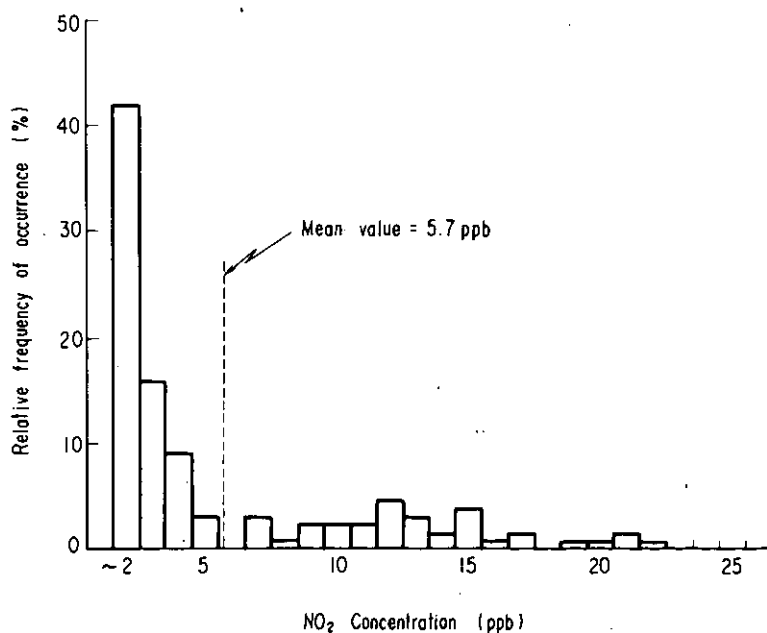


図 6 コントロールチャンバー内のNO₂濃度

Fig. 6 Contamination of NO₂ in control chamber

内のNO₂濃度を推定したり、換気風量の変化を観測することができた。また分析計の故障等によりフィードバック制御が困難な場合には一定流量のガスを供給することにより、チャンバー内ガス濃度は、ほぼ設定値に維持することができた。

0.04ppm設定チャンバーの場合、ガスの設定濃度が極低濃度であるため、外気のNO₂濃度の変動と外気処理フィルターの能力の関係が問題になる。図6に、実験期間の中程で対照チャンバー内のNO₂濃度をケミルミネッセンス方式NO_x分析計でモニターした結果を示す。横軸はNO₂濃度の1時間内の最大値を表し、縦軸は出現ひん度を表す。NO₂濃度の最大値は22ppbであり20ppb以上の濃度の出現ひん度は3.1%、平均値は5.7ppbであった。対照群チャンバーで検出されたNO₂は他のチャンバーにも同様に取込まれていると考えられる。全実験期間中の対照群のNO₂濃度を推定するため0.04ppm設定チャンバーの供給ガス流量記録を検討した。その結果0.04ppm設定チャンバーには常時供給ガスが導入されており、対照群にNO₂を含んだ空気が導入された時間は瞬時的なものであると推察される。

考 察

2年3か月の期間、大気汚染ガス暴露チャンバーを連続してかどうさせることは、構成機器の劣化による部品の取替えが容易にできる構造になっていること、運転方法の選択ができることおよび予備部品をそろえ故障時にはできるだけ早急に取替える以外に方法はない。温湿度およびガス濃度制御結果が動物実験結果の信頼性にどのように結びつくかについては今後の検討の課題である。特に0.04ppm群のNO₂濃度の制御結果と対照群チャンバーの空气中に混入するNO_x濃度の関係は厳密な検討が必要である。外気のNO₂は、遠方の比較的濃度が高い地域から流れてくる気団によるものに加え、周辺道路の自動車排ガス、当研究所の工事車輛その他比較的近距離の発生源に由来するもので、拡散不十分で比較的高濃度の状態で給気口より取込まれ、浄化フィルターの能力を越える場合が問題となるだろう。また取入外気中のNOは、NO₂濃度制御には直接的に外乱として作用することはない。

附 記

本報告をまとめるにあたり、国立公害研究所技術部相賀一郎氏より有益な御助言を頂いたことに感謝する。暴露チャンバーの設計製作は、小糸工業(株)および製鉄化学工業(株)が担当した。

引用文献

- 1) 高橋 弘・相賀一郎・松本 茂・寺島貞二郎・額田正己(1977) : 国立公害研究所動物用長期ガス暴露チャンバーの構造と性能について. 日本生物環境調節学会第15回大会講演要旨集 p 35
- 2) 小林雄一・高橋 弘・寺尾恵治・大政謙次(1980) : 国立公害研究所動物実験用環境調節施設. 空調方式空調設備実例集. p364 経営開発センター出版部

II-2

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——

Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rats

——Experimental Animals——

高橋 弘¹・山元昭二¹・石村俊治¹・高橋慎司¹・寺尾恵治^{2*}

Hiroshi TAKAHASHI¹, Shoji YAMAMOTO¹, Toshiharu ISHIMURA¹,
Shinji TAKAHASHI¹ and Keiji TERAO²

要 旨

大気汚染物質が生体に及ぼす影響についての研究は多くなされているが、現実の生活環境大気中に存在する程度の汚染レベルの環境下で長期間にわたって観察された成績は少ない。

本研究は、この観点から、NO₂ガスの低濃度環境を作出・維持し、その中で動物(ラット)を飼育し、生体に表れる影響を観察したものである。暴露飼育の期間は、ラットではほぼ一生涯とみられる27か月間とした。

その結果、全実験期間中の総てのラットにおいて、実験に障害となるような感染症の発症は皆無であった。また、NO₂ガスの3濃度実験群および対照群の間で比較してみても、(1)期間途中での死亡数、(2)体重の推移については、NO₂ガスの有無が原因となったとみられるような差異は認められなかった。

1. 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

2. 筑波医学実験用霊長類センター

Tsukuba Primate Center for Medical Science, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Abstract

Recently experimental and practical researches concerning with the effect of air pollution were performed by many researchers. However, the effects of the long term exposure in low concentration of air pollutant gases have not been investigated.

In this study, in order to clarify the biological effects of chronic exposure to NO₂, the experimental animals (rats) were maintained for 9, 18 and 27 months in the chambers, in which not only NO₂ gas concentration (0.04, 0.4 and 4 ppm) but also other environmental factors such as temperature, relative humidity and air ventilation were strictly controlled. During this experimental period, the changes of body weight, mortality rate and health condition were checked regularly.

No infectious disease was found in rats through the experiment and there were no significant differences in the mortality rate and body weight changes between the experimental and control groups.

はじめに

大気汚染物質が生体に及ぼす影響についての研究は多くなされているが、現実の生活環境大気中に存在する程度の汚染レベルの環境下で長期間にわたって観察された成績は少ない。

本研究は、上記課題のもとにNO₂ガス単一の長期暴露がラットに及ぼす影響を多面的に観察する目的で実施されたものである。

本報は、以下の総ての実験に供された動物の実験飼育期間中の環境条件（温度・湿度・ガス濃度）の設定と、1)実験飼育期間中の飼育状況と途中死亡数および2)体重の推移の結果について一括してとりまとめたものである。

方 法 (表1参照)

本実験に供試したラットは、総て日本クレア生産のJCL[®]: Wistar系の雄・雌である。実験飼育は、ガス暴露期間および動物の導入時期の別によって、(1)A群、(2)B群および(3)C群に大別した。各群ごとのガス暴露による実験飼育期間は、(1)A群: 9・18・27か月間、(2)B群: 18か月間、(3)C群: 9か月間であった。

ガス暴露群の構成は、これまでの本研究内でなされた急性暴露実験の成績（既報¹⁾および文献による考察結果から総合的に判断して、(1)NO₂ガスを添加しない対照群、(2)NO₂ガスを0.04ppm添加した群（0.04ppm群）、(3)NO₂ガスを0.4ppm添加した群（0.4ppm群）および(4)NO₂ガスを4ppm添

結果および考察

1. 実験飼育期間中の飼育状況と途中死亡数

A・B・C群において実験飼育したラットの匹数を、各チャンパー別に表2に示した。

これによれば全実験期間を通して使用したラットの匹数は、A群では対照群：♂19・♀23, 0.04 ppm群：♂22・♀23, 0.4ppm群：♂22・♀21, 4 ppm群：♂23・♀23となり、B群では対照群：♂11, 0.04ppm群：♂11, 0.4ppm群：♂12, 4 ppm群：♂11となり、C群では対照群：♂22, 0.04 ppm群：♂22, 0.4ppm群：♂22, 4 ppm群：♂22となり、合計♂219・♀90の309匹であった。

頭初のチャンパーへの収容頭数は、A群ではチャンパー1台当たり♂30・♀30の4台で計240匹、B群ではチャンパー1台当たり♂12の4台で計48匹、C群ではチャンパー1台当たり♂22の4台で計88匹であり、合計♂256・♀120の376匹であったので、その他の67匹は実験飼育期間の途中で死亡した例数となる。

表 2 実験群別の飼育動物数の推移

Table 2. Changes of the number of rats maintained in the chamber (ASC, ASG-1~3)

Experi- mental		Exp A						Exp B				Exp C					
Date year	month	ASC		ASG-1		ASG-2		ASG-3		ASC	ASG-1	ASG-2	ASG-3	ASC	ASG-1	ASG-2	ASG-3
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂
'77	8	30	30	30	30	30	30	30	30								
	9	30	30	30	30	30	30	30	30								
	10	30	30	30	30	30	30	29	30								
	11	30	30	30	30	30	29	29	30								
	12	30	30	30	30	30	29	29	30								
'78	1	30	30	30	30	30	29	29	29								
	2	30	30	30	30	30	29	29	29								
	3	30	30	30	30	30	29	29	29								
	4	22	15	22	15	22	14	21	14								
	5	22	14	22	15	22	14	21	14	12	12	12	12				
	6	22	13	22	15	22	14	21	14	12	12	12	12				
	7	22	13	21	15	22	14	21	14	12	12	12	12				
	8	22	13	21	15	21	13	21	14	12	12	12	12				
	9	22	13	21	14	21	13	21	14	11	12	12	12				
	10	22	13	21	14	21	12	21	14	11	12	12	12				
	11	20	12	21	13	18	12	19	14	11	12	12	12				
	12	18	11	20	12	18	10	18	13	11	12	12	12				
'79	1	8	8	9	8	6	6	7	8	11	12	12	12	22	22	22	22
	2	7	8	9	7	6	6	7	7	11	12	12	12	22	22	22	22
	3	7	7	9	7	6	6	7	7	11	12	12	12	22	22	22	22
	4	6	6	8	7	6	6	7	6	11	12	12	12	22	22	22	22
	5	5	5	8	5	6	3	5	4	11	12	12	12	22	22	22	22
	6	5	5	6	5	6	3	5	4	11	12	12	12	22	22	22	22
	7	5	5	5	4	3	3	5	4	11	12	12	12	22	22	22	22
	8	4	4	4	4	3	2	4	3	11	12	12	11	22	22	22	22
	9	1	1	3	3	3	2	4	3	11	11	12	11	22	22	22	22
	10	1	1	3	3	3	2	4	3	11	11	12	11	22	22	22	22

ところで、この種の実験では、途中死亡の時期や死因も実験上に重要な意味を持つものと考えられる。そこで、飼育期間の最も長かったA群について、実験使用匹数とその個体識別を表3に示し、途中死亡時の肉眼所見を表4にまとめて示した。

すなわち、A群での死亡個体数は、対照群：18(♂11・♀7)、0.04ppm群：15(♂8・♀7)、0.4 ppm群：17(♂8・♀9)、4 ppm群：14(♂7・♀7)の64匹(♂34・♀30)であり、死亡時の肉眼所見の結果、衰弱による処死(屠殺処死)：33、自然発生腫瘍による死亡：21、その他の原因(下痢、腎結石、落下死亡)：10例であった。

また、B群では3個体が途中で死亡(衰弱死)したが、C群での死亡例は全くみられず、結局、死亡した67例のうち感染症によると思われる症例は皆無であった。

なお、これら表2、3、4に示した結果は、以後に行われた各種実験検索の基本になるものである。また、A群における飼育状況と途中死亡数の推移を図1.1~1.4に示した。

表 3 9, 18, 27か月令での供試動物数と個体識別

Table 3. Number and individual discrimination of the rat used in Experiment A

NO ₂ exposure period	Cage No	Control (Air)		NO ₂ concentration					
				0.04ppm		0.4 ppm		4 ppm	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
9 (mth)	No. 1	123 ^{a)}	12345	123	12345	123	12345	123	2345
	2	2	12345	2	12345	2	12345	2	12345
	3	3	2 5	3	12	3	12	3	1 3
	4	4	3	1	3	4	3	4	3 4
	5	5	4		4	5	4	5	4
	6	1	5	4	5	1	5	1	1 4
	Total		8	15	8	15	8	15	8
18	No. 1	45		45		45		45	
	2	4				1 3			2 45
	3			5	34		34		5
	4		1 4	5		3		5	
	5	1234	2	123	1 3 5	1 34	23	1234	
	6	234		123 5		234		234	3 5
	Total		10	3	11	5	11	4	11
27	No. 1					5			
	2	1				1		1	
	3			1 4		2		5	1 4
	4		2 4	3	1 5			1	1
	5								
	6		1 34		4		2		
	Total		1	5	3	3	3	2	4
All total		19	23	22	23	22	21	23	23

a); 1 2 3……: Discrimination of the rat from No.1 to No.6

表 4 各実験群での途中死亡数の推移

Table 4. Total of dead rats in each experimental group through the all experimental periods

Exp Group	Sex	NO ₂ Exposure time (months)									Total (○・△・●)	
		0~3	3~6	6~9	9~12	12~15	15~18	18~21	21~24	24~27		
Air (Cont)	♂						○○○○	○○		△	○ △△ ●	11 (7・3・1)
	♀				○○		○ △		●●●			7 (3・1・3)
NO ₂ 0.04 ppm	♂				○		○	○	○○	●	△△	8 (5・2・1)
	♀					○	○	○		△△△	△	7 (3・4・0)
NO ₂ 0.4 ppm	♂					○	○○○	○		○ △ ●		8 (6・1・1)
	♀		○			○ △	○○ △			△ ●	△	9 (4・4・1)
NO ₂ 4 ppm	♂	○					○○ △			○ ●	●	7 (3・2・2)
	♀		○				△	○ △ ●	△		△	7 (2・4・1)
Total		1	2	0	3	4	18	11	15	10	64 (33・21・10)	

※ : ○; Sacrificed for weakness, △; Death of spontaneous tumor, ●; Death of other reasons

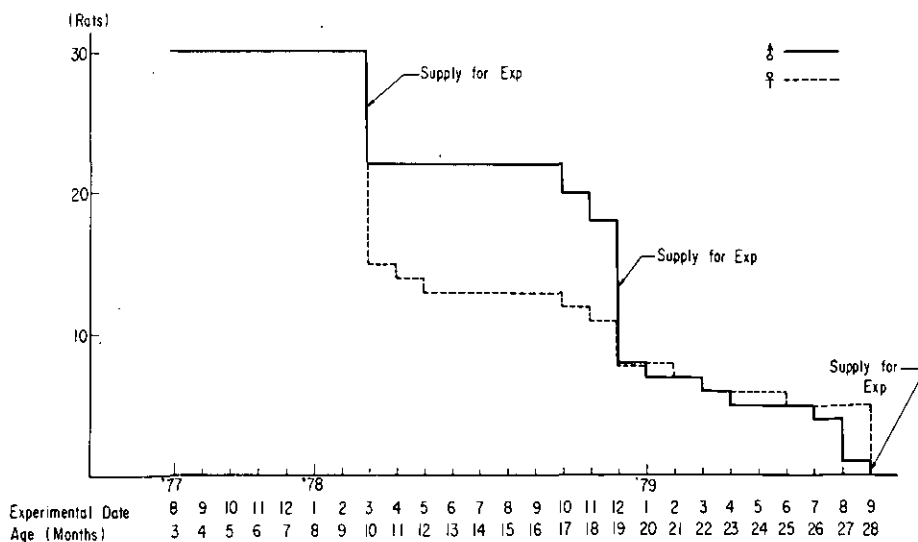
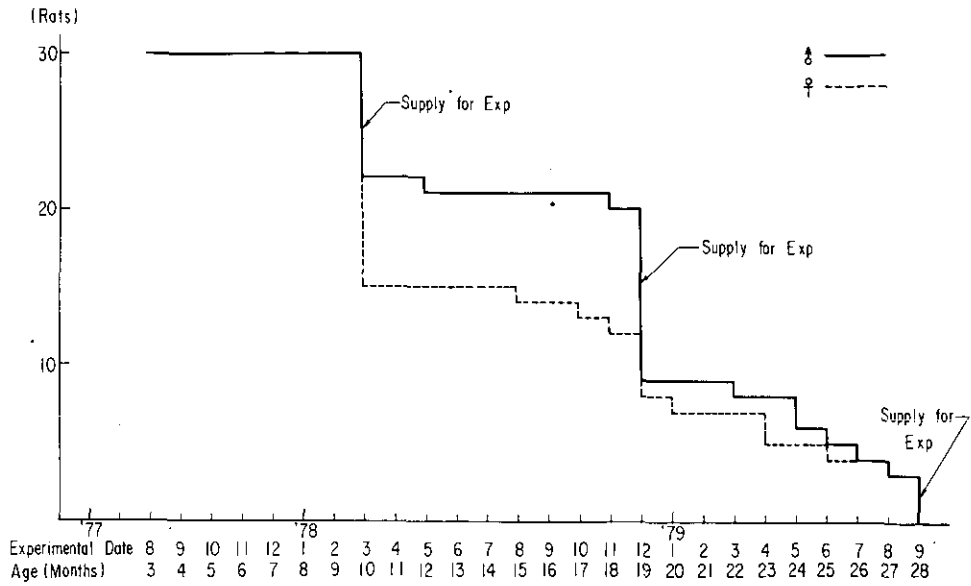


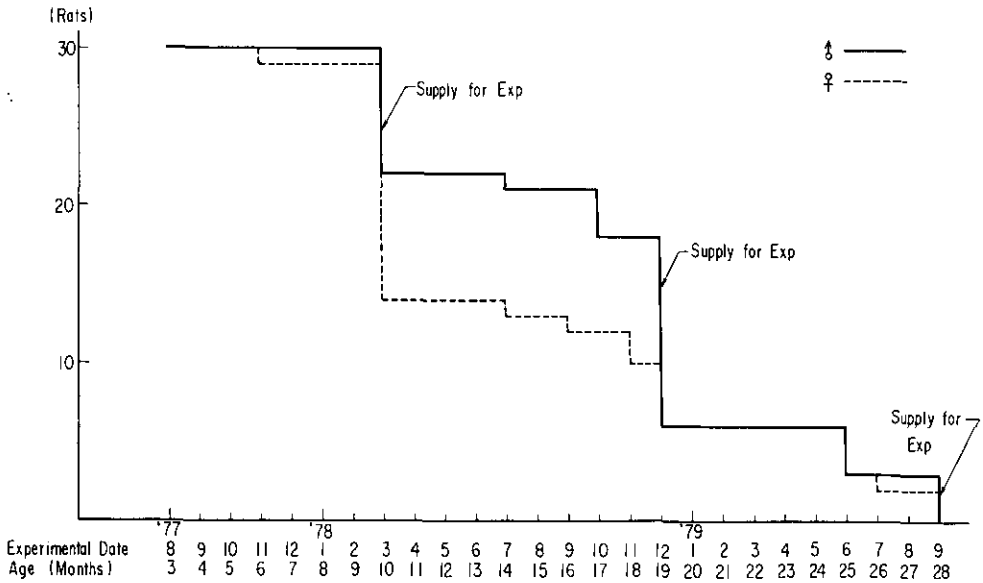
図 1.1 対照群の動物飼育数の推移

Fig. 1.1 Changes the number of rat (Exp. A) maintained in the ASC chamber (control)



☒ 1.2 0.04ppm群の動物飼育数の推移

Fig. 1.2 Changes of the number of rat (Exp. A) maintained in the ASG -1 chamber (NO₂ concentration : 0.04ppm)



☒ 1.3 0.4ppm群の動物飼育数の推移

Fig. 1.3 Changes of the number of rat (Exp. A) maintained in the ASG -2 chamber (NO₂ concentration : 0.4ppm)

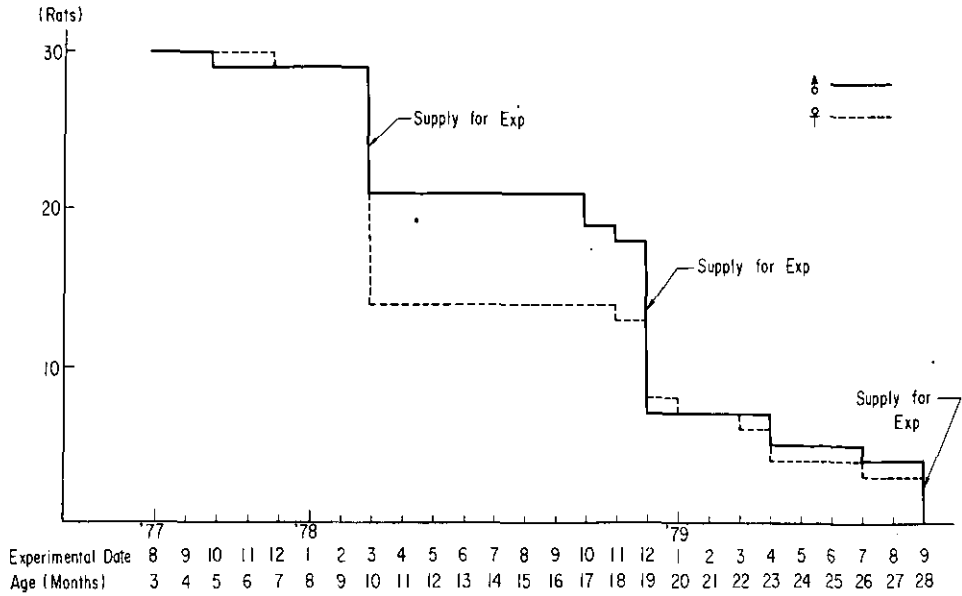


図 1.4 4 ppm 群の動物飼育数の推移

Fig.1.4 Changes of the number of rat (Exp. A) maintained in the ASG-3 chamber (NO₂ concentration: 4 ppm)

2. 体重の推移

体重の測定は、原則として1か月に1回の割合で実施した。

A群の各チャンパー別にみたラットの体重は、図2.1 (♂)、図2.2 (♀) に示した。また、B群 (♂のみ) の各チャンパー別のラットの体重を図3に示し、C群 (♂のみ) の各チャンパー別のラットの体重を図4に示した。

この種の長期にわたる実験においては、体重も含めて、各種測定値の解析は個体ごとに考察されることが妥当であると考えられるが、今回は各群をチャンパー別にまとめ、体重の平均値と標準偏差を示し、全体的な傾向として暴露ガス濃度の違いによって体重の推移に差異が認められるか否かを検討した。

その結果、各チャンパーとも平均体重ではほぼ同じような推移を示し、NO₂ガス暴露の影響によるとみられるような差異は、全期間をとおして認められなかった。

以上の結果から、本実験で設定したNO₂ガス濃度の0.04・0.4および4 ppmの環境下でのラットの飼育状況と生死(寿命)および途中期間での体重の推移等に関しては、NO₂を添加しない対照群のそれらと比較して、何らの差異も認められなかったと考察される。

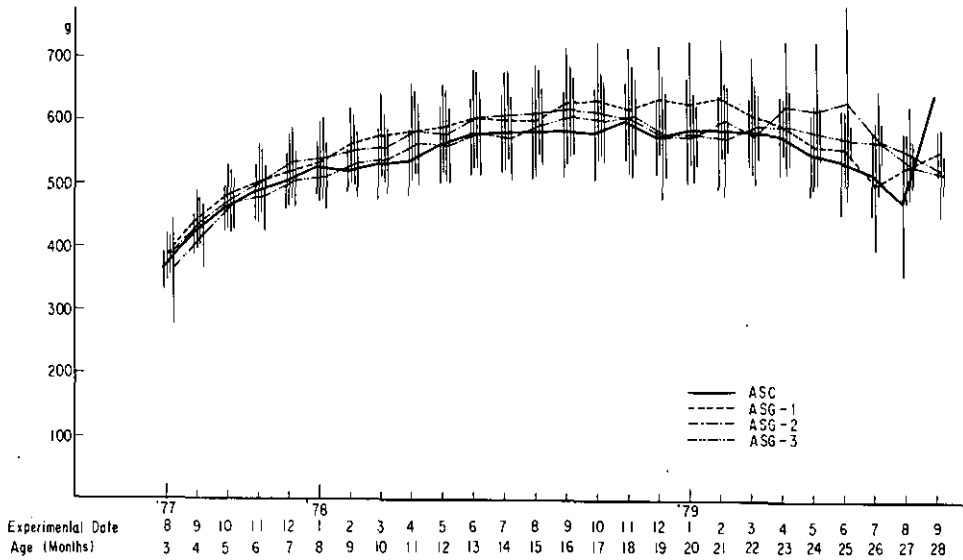


図 2.1 A群Wistar 雄ラットの平均体重の推移

Fig. 2.1 Changes of the body weight of male Wistar rat (Exp. A) maintained in the chamber (ASC, ASG-1 ~ 3) for 27 months (Mean body weight \pm SD)

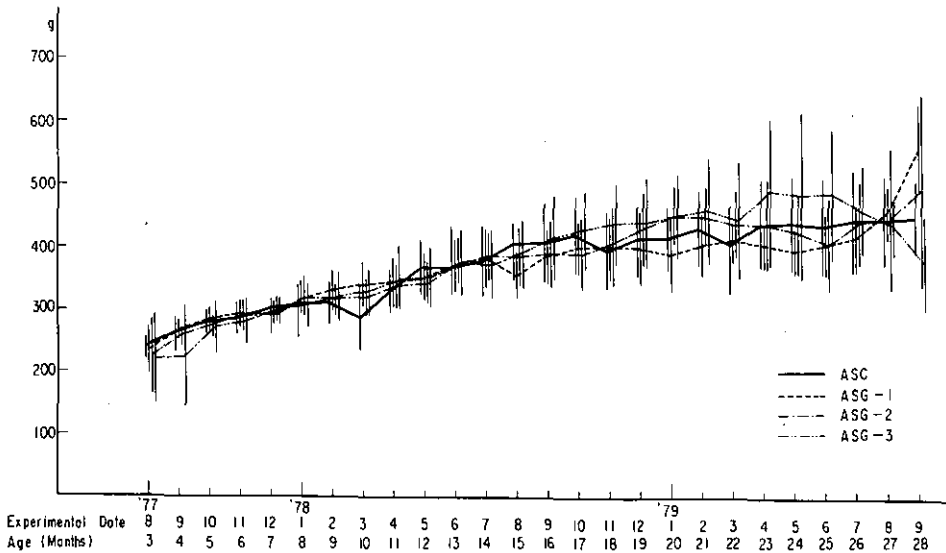
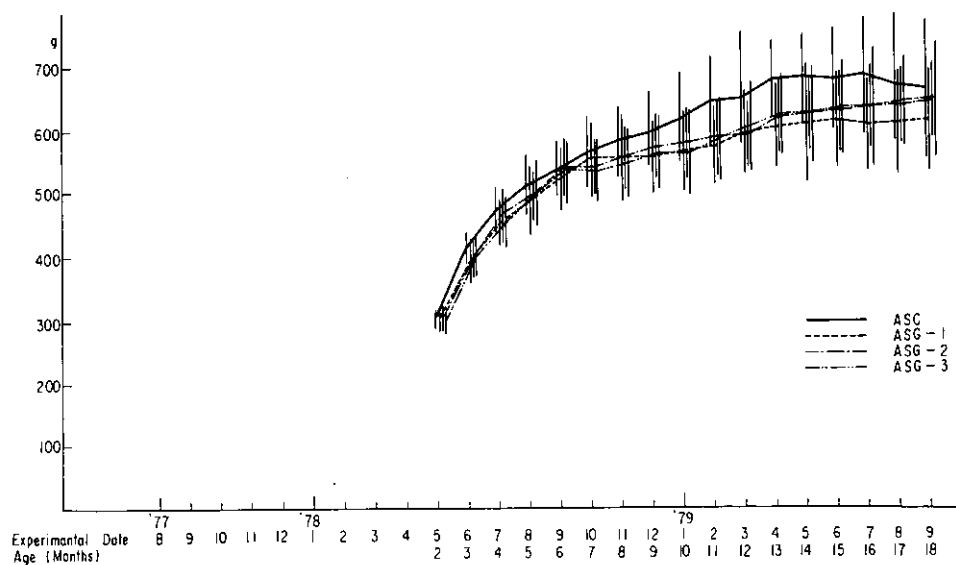


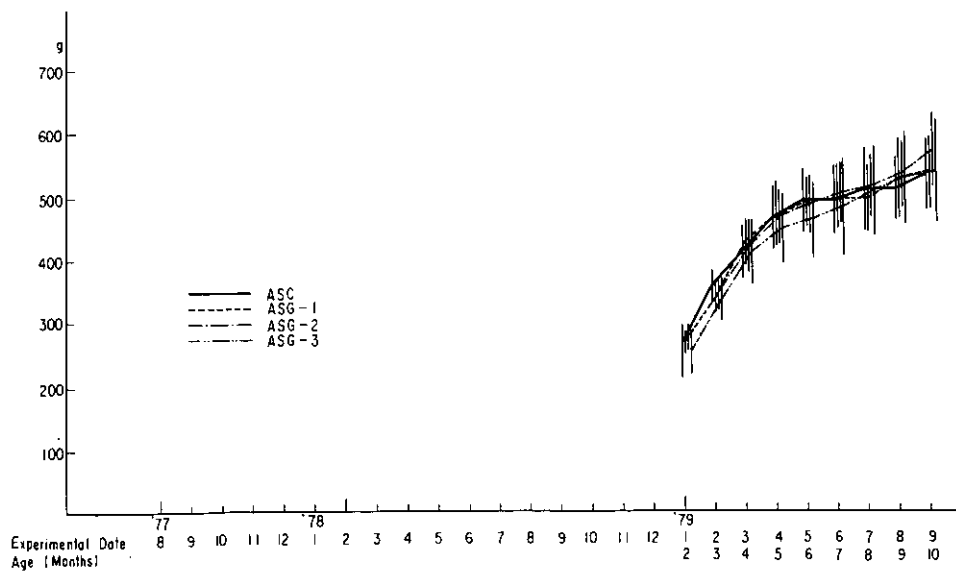
図 2.2 A群Wistar 雌ラットの平均体重の推移

Fig. 2.2 Changes of the body weight of female Wistar rat (Exp. A) maintained in the chamber (ASC, ASG-1 ~ 3) for 27 months (Mean body weight \pm SD)



☒ 3 B群Wistar 雄ラットの平均体重の推移

Fig. 3 Changes of the body weight of male Wistar rat (Exp. B) maintained in the chamber (ASC · ASG-1 ~ 3) for 18 months (Mean weight \pm SD)



☒ 4 C群Wistar 雄ラットの平均体重の推移

Fig. 4 Changes of the body weight of male Wistar rat (Exp. C) maintained in the chamber (ASC · ASG-1 ~ 3) for 9 months (Mean body weight \pm SD)

謝 辞

本実験の実施に当り、2年7か月に及ぶ動物の飼育管理には日本クレア動物飼育委託管理部の各位に多大の協力を得た。また、ガス・温湿度等チャンバー内実験環境の設定とその維持には当所技官、藤田和伸・清水 明・木村英雄・松本 茂の各氏の協力を得た。さらに、施設全般の空調維持管理には当所技術室の各位および裕生興業委託管理部の各位の協力を得た。

いずれも、本実験の遂行を支える上に不可欠な支援として、ここに記し、深甚の謝意を表する。

引用文献

- 1) 国立公害研究所 (1979): 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. 国立公害研究所研究報告, 第8号.
- 2) 高橋 弘・相賀一郎・松本 茂・寺島貞二郎・額田正己 (1977): 国立公害研究所動物用長期ガス暴露チャンバーの構造と性能について. 日本生物環境調節学会第15回大会講演要旨集, 35-36.
- 3) 小林雄一・高橋 弘・寺尾恵治・大政謙次 (1980): 空調設備空調方式実例集—国立公害研究所動物実験用環境調節施設. 経営開発センター出版部, 364-393.

II-3

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——

Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rats

——Morphological Observations——

竹中参二¹・清水不二雄¹・山田靖子¹・堀内博人²・

今井 透²・原田隆彦³・京野洋子⁴・河合清之⁴

Shinji TAKENAKA,¹ Fujio SHIMIZU,¹ Yasuko YAMADA,¹

Hirohito HORIUCHI,² Toru IMAI,² Takahiko HARADA,³

Hiroko KYONO⁴ and Kiyoyuki KAWAI⁴

要 旨

二酸化窒素の0.04, 0.4, 4.0ppm各濃度を用い長期連続暴露を行った本実験系列各群のラットについて、9, 18, 27か月の時点で病理形態学的観察を行った。検索はいまだ完了していないが、本報告は、肺について行った光顕的・電顕的および電顕形態計測によって得られた成績のうち、光顕および電顕形態計測の結果を中心とした予備的報告である。

通常の形態学的観察では、4 ppm群では、末梢気管支から肺胞道にかけての定型的

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. 東京慈恵会医科大学

Jikei University, School of Medicine

3. 日本獣医畜産大学

Japan Veterinary and Zootechnical College

4. 産業医学総合研究所

National Institute of Industrial Health

変化を中心とする病変が9か月において出現しており、18か月も更に進行を示す。0.4 ppm群は18か月では軽度の電顕的变化を認めるが全体としては確定的ではない。27か月に至れば光顕的にも軽度の変化が出現する。0.04 ppm群では27か月まで著変を見いださない。

電顕形態計測による肺胞の算術平均壁厚の値は、4 ppm群では9か月で軽度の増加傾向を示し、18か月では有意の増加を示す。27か月でその傾向は減弱するが、この理由は上皮成分変化の減弱と間質浮腫の減退と線維化によるものと考えられる。0.4 ppm群では18か月で軽度の増加を示し、27か月で有意となる。0.04 ppm群でもより軽度であるが、同様に18か月以降増加傾向が見られる。

以上の現在までに明らかとなった結果に関する限り、比較的低濃度の二酸化窒素への連続暴露による肺の形態学的病変の程度と進行の速さは、暴露濃度および暴露期間の延長と明らかに並行している。0.4 ppm以下の低濃度で27か月暴露動物に見いだされる変化が、単に暴露期間の長期化によるものか、動物の加齢による反応性の上昇と関連して出現したものかは今後の問題である。引続いて本試料について更に観察と解析を進めると共に、ここに述べた結果の再現性を確かめる必要があると考えられる。

Abstract

Rats exposed to nitrogen dioxide at the concentrations of 0.04, 0.4 and 4.0 ppm respectively as long as 27 months were submitted to morphological observations under light microscope, scanning electron microscope and transmission electron microscope including quantitative morphometric measurements on the lung. Present paper is a preliminary report on the morphological alterations in the lung of those rats, especially respecting dose, duration and effect relationship.

After continuous exposure to nitrogen dioxide at the concentration of 4 ppm for 9 months, bronchial epithelium showed typical pictures of proliferation, which further progressed at 18 months. At this stage, proliferation of the type II alveolar epithelium and edematous extension of the interstitial tissue were evident, which turned into fibrosis at 27 months.

At the 0.4 ppm level, morphological changes in the 18 months specimens were still ambiguous, although tendency toward epithelial changes as well as interstitial edema of the alveolar wall were noticed under the electron microscope. Slight but definite alteration became evident after 27 months. At the 0.04 ppm level, there were no remarkable change throughout the whole exposure period.

Electron microscopic morphometry has revealed concentration and duration dependent increase in arithmetic mean thickness (AMT) of the alveolar wall in term after Weibel. At the 4 ppm level, increase AMT started as early as 9 months and became significant at 18 months, which showed slight decrease at subsequent 27 months. This decrease was interpreted as due to recovery of the alveolar lining epithelium and decreased amount of the septal edema, which in turn converted into fibrosis. At the 0.4 ppm level, slight increase of AMT started at 18 months and further extended significantly in 27 months. Similar but slighter tendency was also evident even at the level of 0.04 ppm.

From the above findings, it was clearly shown that morphological alterations under continuous long-lasting exposure to nitrogen dioxide were parallel to the concentration and duration of exposure. The results, especially the findings after 27 months under low concentration levels should be confirmed by further examinations, in relations to the points whether those alterations were due to prolongation of exposure and/or due to elevated sensitivity of the lung in advanced ageing process.

はじめに

我々は、NO₂長期暴露実験において病理形態学的検索を担当した。実験群の構成は、対照群、NO₂濃度0.04ppm, 0.4ppm, 4.0ppm連続暴露各群の計4群、暴露期間は9, 18, 27か月であった。実験計画、実験条件、動物の一般状態、その他の詳細については、それぞれの報告を参照されたい。

NO₂の慢性生体影響に関する実験的研究はすでに数多く、形態学的検索も少なくない。^{1,2)}中でも、1960年代の半ばから今日まで続けられている Freeman グループによる一連の業績³⁻⁸⁾は多くの知見をもたらした。それらの報告中にはいくつかの長期暴露実験とその病理形態学的検索結果も含まれている。

これらの業績から明らかとなったNO₂長期暴露による呼吸器の形態学的病変として、気管支とくに末梢気管支の上皮の増殖性変化、および細気管支末梢から肺泡道へかけての上皮増殖と肺胞壁肥厚、などが認められており、肺実質病変としては、暴露濃度が十分に高いときにはI型肺胞上皮の変性、II型上皮の増殖とI型上皮の置換、肺気腫の成立などが見いだされている。

けれども、よく整備された同一の実験条件の下で、比較的低濃度領域において、暴露濃度と暴露

期間を十分に広くとり、病変の進展との関連を追求した実験は少なく、したがって病理形態学的記載も乏しい。また病理形態学的検索の手法も主として記述形態学によるものが多い。本検索では通常の光顕・走査電顕・透過電顕による観察のほかに、肺変化の検出に有用と考えられる電顕形態計測を導入して、変化の量的取扱いと評価の客観化を試みた。

現在のところ検索のすべてが完了してはいないので、本報は現在までに見いだされた肺についての所見とその評価に基づいた範囲での予備的報告である。より詳細な検索結果と上部気道およびその他の内臓についての検索が終了した時点で改めて総合的な結論を出し、続報としたい。

方 法

光顕・電顕および電顕形態計測を含む一連の系統的な形態学的検索に用いた動物は、各暴露群中の雄ラットの中から無作為的に選んだ3~4頭である。その他、同時に得られた雌ラットおよび9、18か月暴露群で生化学的検索に供された動物の左肺中央部水平断切片についても組織学的観察を行った。離断肺についての所見は主としてこれらの試料から得られた。

肺の系統的観察にあたっては、屠殺時にネブタール腹腔内注射による深麻酔下で、固定液の気管内注入法による再拡張固定を行った。9か月では剥出気管・肺に対し、18か月では開胸後原位置で大腿動脈から放血を行いつつ、気管から20cm水柱圧で、氷冷2.5%グルタルアルデヒド固定液(0.18Mカコゲル酸ナトリウムを用いpH7.4に緩衝、浸透圧330mOsm.)を気管から注入した。27か月では、同一個体から生化学的検索用試料を採取する必要が起り、深麻酔下に頸動脈からの採血に引続いて開胸し、右肺肺門部を鑷子によって閉止し、右肺を離断した後、上記の方法により左肺の再拡張固定を行った。

再拡張固定した左肺の中央部から3片の水平断切片を採取し、透過電顕・走査電顕および光顕用試料とした。また肺門部気管支から透過、走査電顕用試料を採取した。左葉残部および右葉各葉からも光顕用試料を採取した。それぞれの試料からの標本作成法は前報⁹⁾に記した。光顕観察には、ヘマトキシリン・エオジン、パス、マロリー(アザン変法)、エラスチカ・ワンギーソン各染色を用いた。走査電顕用試料は透過電顕用試料と同様の脱水処置後、酢酸イソアミルで透徹、臨界点乾燥(日立臨界点乾燥装置)、イオンスパタリング(日本電子イオンスパタリング装置)を行って標本を作成し、日立HHS-2R型走査電顕によって検鏡した。透過電顕はEpon812包埋薄切後、鉛・ウラニル重染色後、日立H-500を用いて検鏡した。

電顕的形態計測には、京野¹⁰⁾の方法により、3頭中の2頭を選び、1 μ 切片によって気管支を含む試料を除き、各個体から4ブロックを薄切し、Maxtaform H₂メッシュに載せ、日立H-500ないしHU-12で、倍率2,000倍でメッシュの一定隅を1メッシュ当たり10枚撮影する。こうして得られる各群80枚の電顕写真フィルムについて、投影器による4倍拡大の下でWeibel原法^{11,12)}によ

る計測を行い、各フィルムについて平均肺胞壁厚を算出した。計算に当たっては標本作製に伴う収縮率補正は行っていない。ポイント法による容量測定はポイント数293の円形スケールを用いて測定した。

結 果

1. 記述形態学的観察

1.1 4 ppm 暴露群所見

4 ppm 9 か月暴露後には大気管支から中等大気管支にかけて分泌細胞の気管支腔内への突出増加がみられ、局所的に上皮の肥大、線毛の短縮を認める。軽度の上皮増殖傾向を認めるところもある。上皮の変化は中等大細気管支から気管支末梢にかけて著しく、局所的な線毛上皮の肥大と線毛短縮ないし脱落、非線毛上皮の肥大と過形成が、ほぼ肺野全域にわたって認められる(図32)。肥大した上皮は、電顕的には一般に細胞小器官に富み、非線毛上皮ではしばしば分泌顆粒形成が豊富である。肺胞道壁も所により軽度の肥厚を示し、気管支終末部や肺胞口部でのクララ細胞の軽度の増殖を伴っている(図16, 図30, 図31, 図33)。肺胞部分の変化は光顕的には明らかでないが、電顕的には、後にのべるように形態計測学的指標のいくつかに変動が見いだされる。

18か月暴露群では、9か月に見いだされた気道上皮病変は更に進展を示し、線毛上皮では、胞体の肥大と線毛形成不全を伴う異形成の細胞を認める範囲が拡大している(図34)。突出細胞はむしろ減少した印象を与える。中等大以下の気管支では非線毛上皮の過形成が強く、所によって塊状ないし指状の突出像を示す(図20, 35, 36, 37)。気管支肺接合部から肺胞道にかけて壁は浮腫性に肥厚し、細胞浸潤と軽度の膠原線維増殖を伴っており、同時にクララ型細胞の増殖を認める(図35)。肺胞道に接した肺胞壁も軽度の壁肥厚を示し(図28)、所によってⅡ型上皮の増殖を伴う。一般肺胞部では光顕的には肺胞壁細胞が軽度の増加を示す印象を与えるが確言できず、肺胞構築はよく保たれている。電顕的には肺胞壁間質の浮腫がつよく、間質細胞の多形化がみられる。肺胞上皮ではⅡ型上皮は一般に大型で多数のラメラ体をもち、ライソゾームや他の細胞小器官に富むものが多い。Ⅰ型上皮の細胞質は一般に不規則な厚薄を示し、突起に富む。細胞質基質が暗調化を示す部分もある(図38, 39)。

27か月暴露では気管支上皮病変には18か月と同様上皮肥大と増殖がみられ、その様相と程度は18か月と比較して著しい差異はみられない(図12)。電顕的にも病変の基本的性格は同様であるが、ミエリン様内容物を含むライソゾーム様顆粒を含む上皮が多い(図42)。一方、気管支肺接合部では病変の進行が明らかで、壁肥厚が強くなり、浸潤細胞はむしろ減少し塊状の膠原線維の増加がみられる。肺胞道隣接肺胞の肺肥厚と上皮増殖も18か月に比してより著しい(図24, 29, 40, 41, 43, 44)。一般肺野の病変は光顕下には明らかでなく、肺胞構築もよく保たれ、肺気腫性変化への傾向

はみられない。電顕的には拡大した間質の中で、不規則な配列を示す膠原線維束を見いだすひん度が多い。I型上皮細胞細胞質の様相は18か月とほぼ同様であるが、II型上皮では大型のひん度が減じ、中等大ないし小型で、ラメラ体の数も少ない、比較的幼若なII型上皮や、伸展した細胞質が肺胞壁表面を被覆しているいわゆる中間型⁸⁾を呈するものが少なくない(図45, 46, 47, 48)。

1. 2 0.4 ppm 暴露群所見

0.4 ppm 9か月の暴露では光顕的には著変を認めず、電顕的にも変化を確定するには至らない(図17)。18か月暴露群では光顕的には著変を認めないが、気管支上皮の突出細胞が減少を示す印象を与える(図21)。電顕的には気管支上皮ではミエリン体様の構造物を含むライソゾーム顆粒の増加した印象があり、肺胞壁にも所によって間質の拡大、II型上皮ラメラ体の腫大など軽度の変化を認めるが、全体としては変化を確定し得ない。27か月では気管支上皮とくに中等大以下の細気管支上皮に軽い肥大傾向が見られ(図13)、電顕的にも線毛異常がみられる。気管支末梢部から気管支・肺接合部にかけて軽度の上皮増殖と肺胞道壁肥厚を示す箇所がときに見いだされ(図25)、電顕下でも確認される(図49)。一般の肺胞部では変化は確定出来ないが、所により間質浮腫がめりょうなところがみいだされる(図50)。

1. 3 0.04 ppm 暴露群所見

0.04 ppm 暴露群では、9か月から27か月各暴露群にわたって、通常形態学的検索の範囲では、対照群との間に差異を認めない(図14, 18, 22, 26)。対照群自身も9か月から27か月に至る各時期を通じて特記すべき変化を確定出来ない(図15, 19, 23, 27)。これに関しては後にも触れる。

2. 電顕形態計測結果

方法の項にのべた試料採集と計測法によって、Weibel原法¹²⁾による肺胞壁厚測定を行い、算術平均壁厚を算出した。またポイント法によって各構成成分容量を算出比較した。また測定に用いた各群80枚の電顕写真上に見いだされるすべての有核細胞数を数え、肺胞壁構成細胞の相対比率を算出した。この際血管内腔および肺胞腔内に位置する食細胞は計算から除外した。

Weibel法による算術平均壁厚を標準誤差と共に、各時期と各濃度群について表1および図1aに、また各時期の対照群平均壁厚に対する各濃度群の壁厚増加率を百分比で表し図16に示した。これらの表と図から明らかなように、4 ppm群では9か月から平均肺胞壁厚の増加傾向が明らかで、18か月では更に増加し対照群に対し有意である。27か月では18か月に比してやや減少を示す。これは記述形態学的観察で認められたように、肺胞上皮の復元と間質浮腫の減退および線維化の進行によるものと考えられる。0.4 ppm群では、18か月ではじめて増加傾向が現れ、27か月では更に増強する。0.04 ppmでも0.4 ppmよりは弱い全く同様に18か月以降暴露期間に応じた増加傾向がみられる。

表 1 NO₂長期暴露における算術平均肺胞壁厚

Table 1. arithmetic mean alveolar wall thickness
under long-lasting exposure to NO₂

NO ₂ conc	9 M	18M	27M
control	1.41±0.15 (100)	1.29±0.13 (100)	1.33±0.16 (100)
0.04 ppm	1.43±0.14 (100.9)	1.33±0.15 (103.6)	1.55±0.18 (116.5)
0.4 ppm	1.39±0.14 (98.2)	1.44±0.16 (111.9)	1.82±0.19 (136.7) ^{***}
4.0 ppm	1.50±0.18 (105.8)	1.71±0.16 (133.1) ^{***}	1.57±0.20 [§] (118.0)

values for mean alveolar wall thickness were expressed as $\mu\text{m} \pm \text{standard error}$

^{***} statistically significant to the corresponding control values ($P < 0.001$)

() numbers in the parenthesis show per cents to the corresponding control values

[§] decrease in AMT as compared to that of 18M was interpreted as due to recovery of the alveolar lining epithelium and decreased interstitial edema converting into fibrosis.

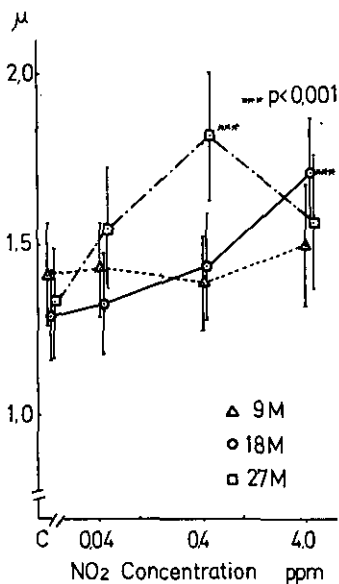


図 1a 算術平均肺胞壁厚

Fig.1a Arithmetic mean thickness
of alveolar wall

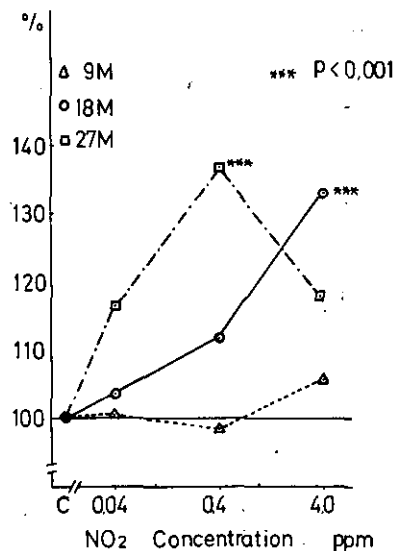


図 1b 平均肺胞壁厚の変化

Fig.1b Relative changes in alveolar
thickness

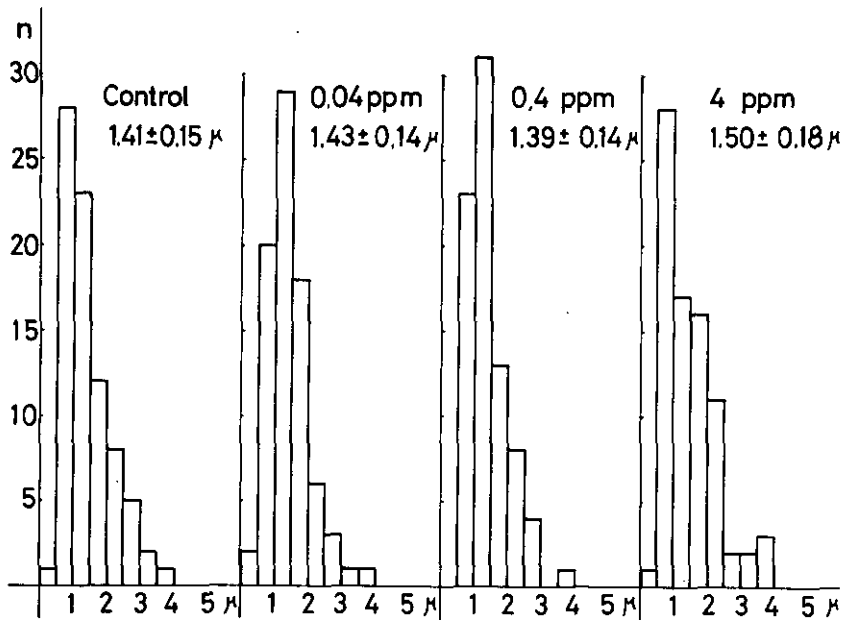


図 2 平均肺胞壁厚のひん度分布 NO₂9か月暴露

Fig.2 Frequency distribution of mean alveolar wall thickness NO₂ 9M Exposure

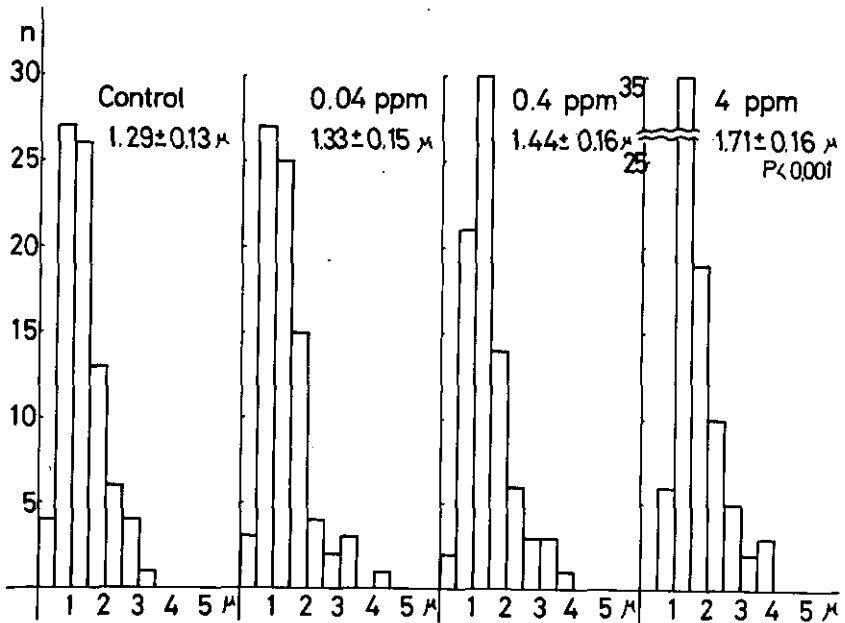


図 3 平均肺胞壁厚のひん度分布 NO₂18か月暴露

Fig.3 Frequency distribution of mean alveolar wall thickness NO₂ 18M Exposure

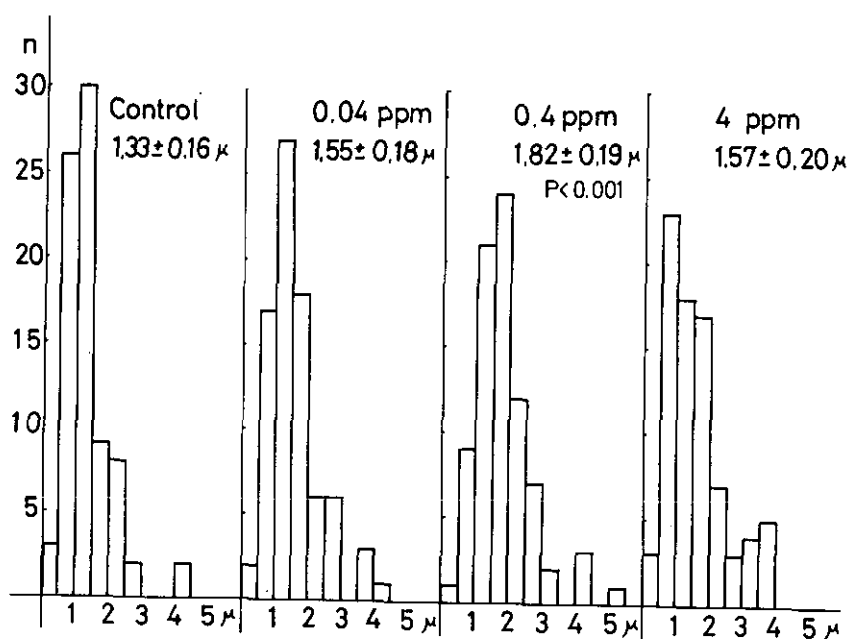


図 4 平均肺胞壁厚のひん度分布 NO₂27か月暴露

Fig.4 Frequency distribution of mean alveolar wall thickness NO₂ 27M Exposure

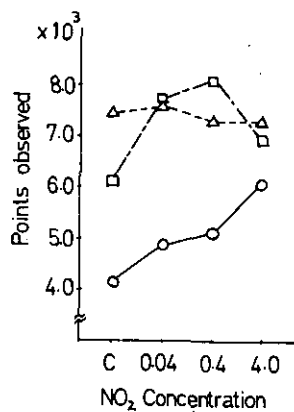


図 5a 全組織量

Fig.5a Total Tissue Volume*

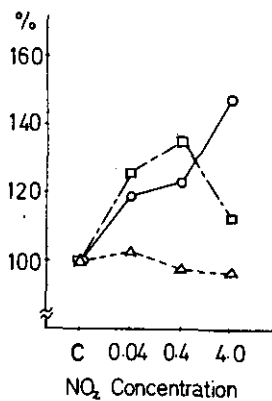


図 5b 全組織量の変化

Fig.5b Relative Changes in Total Tissue Volume**

* expressed as total numbers actually observed on the alveolar wall excluded capillary lumen
 △ 9M ○ 18M □ 27M

** expressed as percents to the corresponding control values

△ 9M ○ 18M □ 27M

方法の項に述べたように、平均肺胞壁厚は各群80枚の電顕写真の各々の壁厚測定値に基づいて算出されるが、その各写真の測定値のヒストグラムを算術平均値±標準誤差(95%信頼限界値)と共に各期間別に図2、図3および図4に示した。各時期を通じて最ひん値の右方への移動と、高値とくに3 μ を超える試料のひん度の増加が看取され、算術平均値の増加とほぼ対応している。

ポイント法によって算出される肺胞壁構成成分容積(I型およびII型肺胞上皮、間質細胞を含む間質、血管内皮各成分の総和)を図5aに示す。各屠殺時期によって試料作成とくに再膨張固定時の操作に細部の違いがあり、対照群のポイント数は各時期によって若干異なった。したがって比較の便宜のために各時期の対照群値に対する各濃度群の増減率を百分比で表し、図5bに示した。当然ではあるが、本図の示す肺胞壁構成成分全容積の濃度および期間による増加パターンは、先に図1bに示したWeibel法による算術平均肺胞壁厚の増加パターンとよく一致する。

図6から図11に、肺胞壁構成細胞成分(I型上皮、II型上皮、間質細胞、血管内皮)それぞれについて、全容量(A)、細胞数百分比(B)、およびその両パラメーターから算出される細胞1個当たりの容量値(C)を示す。それらの数値はいずれも、総容量に述べたと同じ理由によって、それぞれの時期の対照値に対する百分比として算出比較されている。

I型上皮の総容量は全期間を通じて著しい変動がみられないが、細胞数は9か月では濃度に依存した減少がみられ、これから算出される細胞容積は逆に増加を示す。一方27か月では対照と著しい差がなくなっている。II型上皮の総容量と総数は9か月では対照に比較してやや低い程度で著しい差異ではないが、18か月では、総容量の濃度水準の上昇と並行した増加が著しい。その増加の内容は、0.4ppm水準では主として1個当たりの細胞容量の増加、4ppm水準では容量および細胞数両要素の増加によると考えられる。27か月では、18か月に認められた変動は不めいりょうとなり、どの濃度水準でも軽度の細胞数減少と細胞容積増加がみられるにすぎない。I型上皮とII型上皮の細胞数比は、図10に示すように、9か月では濃度と並行した増加、18か月では対照群よりやや高値で、27か月では対照群よりやや低値で、濃度水準に関係なくほぼ一定の値を示している。

間質細胞の総容量の変動傾向は、18か月以降濃度依存性の増加を示すようにみえるが、明確な関連としてはなお理解出来ない。しかし間質の細胞成分、非細胞成分全体(全間質)として考えると、図11に示すように、0.04ppmを含めて暴露期間と濃度水準にほぼ依存した増加傾向が看取される。全間質の中で細胞成分と非細胞成分の占める比率としてみると、図11に示したごとくである。0.04ppm水準では、暴露期間の延長と共に、細胞成分容量の減少、非細胞成分容量の増加、の傾向があるようにみえる。0.4ppm、4ppm水準では、18か月までは両成分共に増加している。27か月では0.4ppm水準では非細胞性成分の増加が続いているのに対し、4ppmではむしろ減少している。これらの所見は、記述形態学の項でのべた透過電顕による間質の所見と対応して考えると、NO₂暴露下で間質基質の浮腫性変化がゆっくりと進行し、かつその程度はNO₂濃度水準と暴露期間にほぼ並行していると解釈出来よう。ただ4ppm27か月の暴露では浮腫性変化がむしろ減退し、膠原線維の形

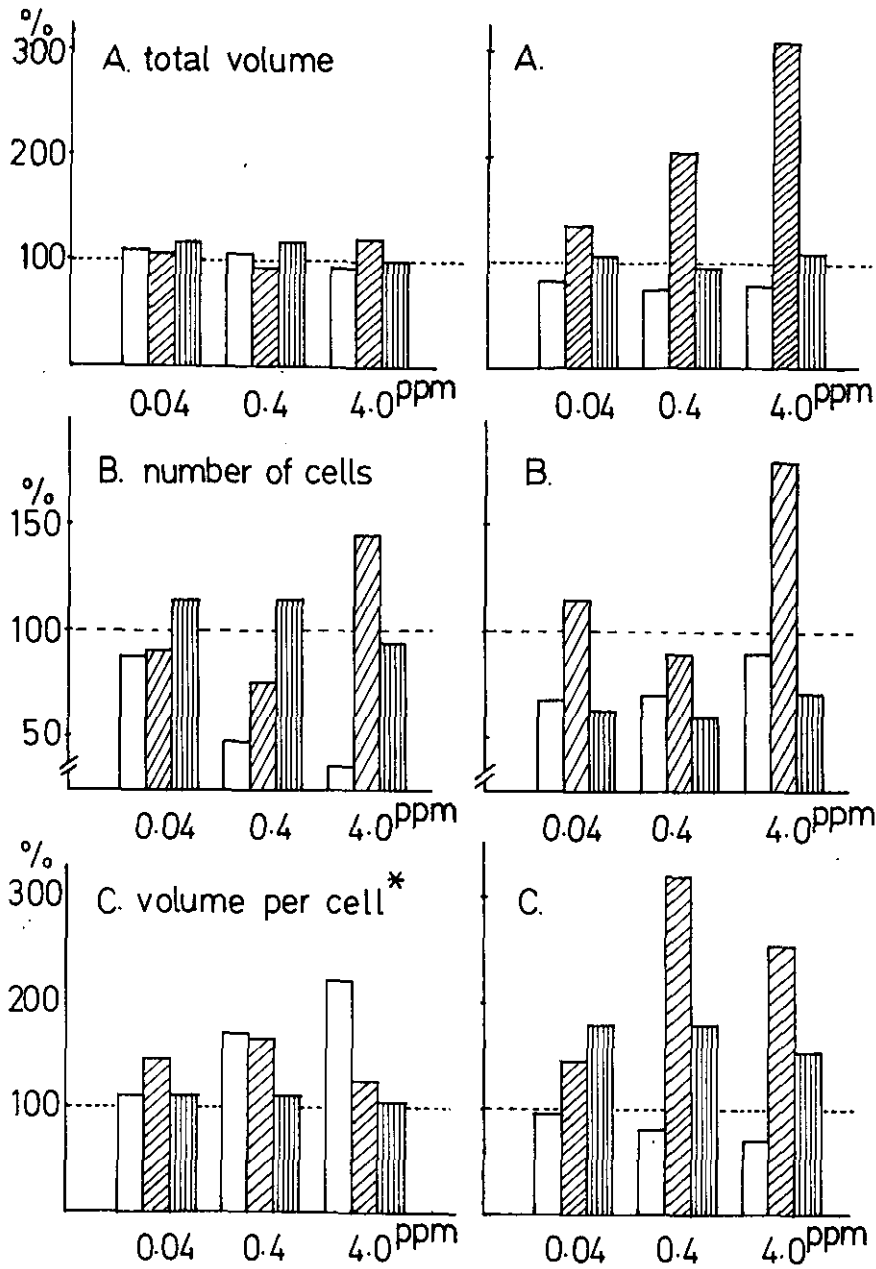


图 6 I型肺胞上皮

A全容積 B細胞数 C平均細胞容積

Fig.6 Type I Epithelium

图 7 II型肺胞上皮

A全容積 B細胞数 C平均細胞容積

Fig.7 Type II Epithelium

Explanation of colums for Fig.6 to Fig.11.

□ 9 M exposure ▨ 18M exposure ▩ 27M exposure

* Volume per cell was calculated as A divided by B.

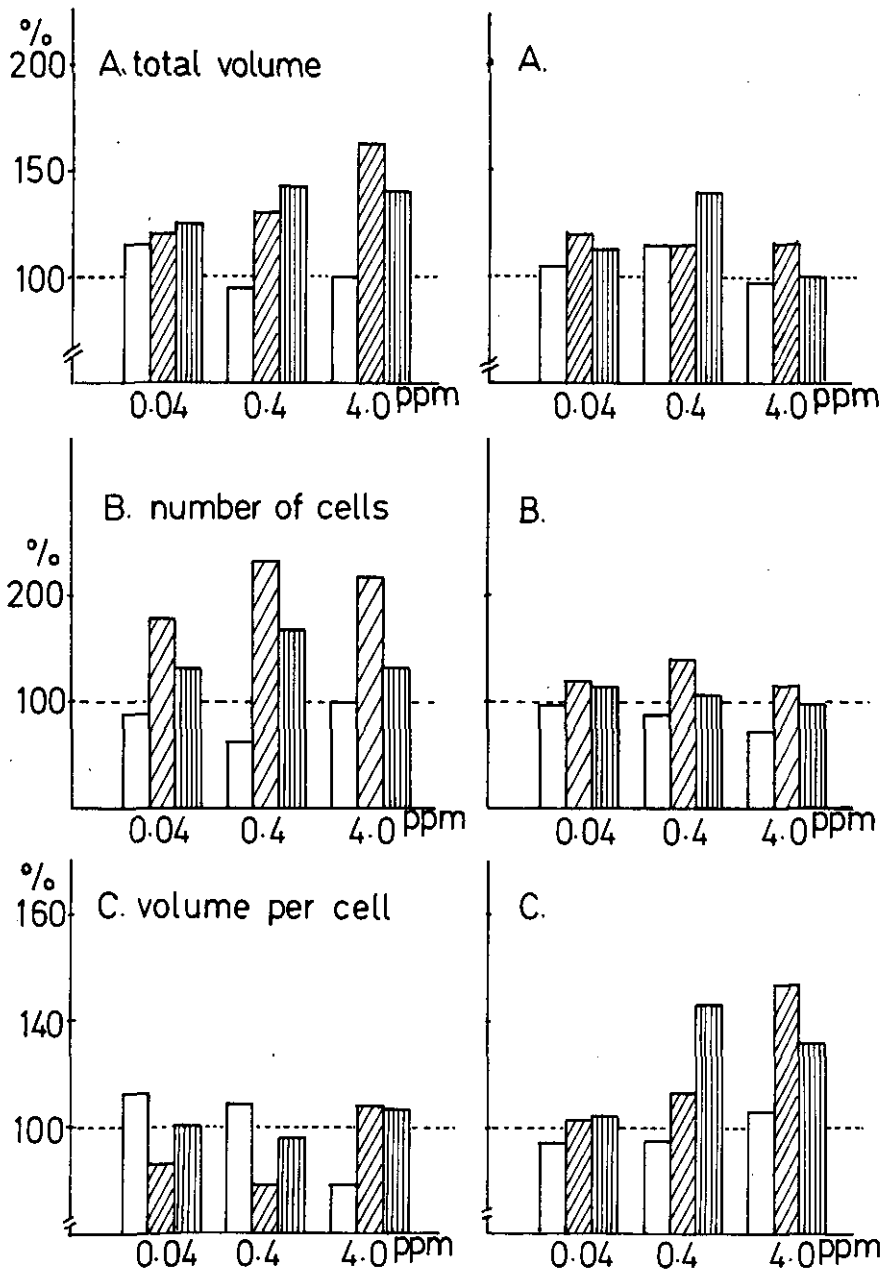


図 8 間質細胞

A全容積 B細胞数 C平均細胞容積

Fig.8 Interstitial Cell

図 9 毛細血管内皮

A全容積 B細胞数 C平均細胞容積

Fig.9 Capillary Endothelium

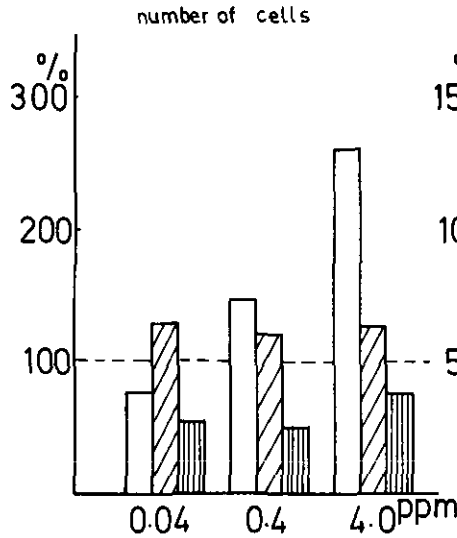


図 10 II型/I型 細胞数比

Fig.10 Ratio of Type II/ Type I

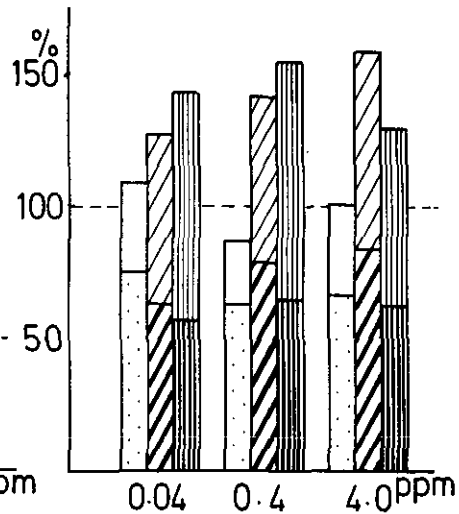


図 11 間質全組織量

Fig.11 Total volume of Interstitium

The upper half non-cellular element

The under half cellular element

成によって置換えられるために、総容積としては減少として観察されるものであろう。

血管内皮の変動も、間質細胞の態度にやや似ており、18か月以降濃度と並行した数と容量の増加の傾向があるように見える。

少なくとも0.4ppm以上、18か月以降その容量増加が出現してくると考えられるが、全体としての統一的な解釈はいまだめいりようでない。

3 その他の所見

3.1 血清学的検査と肺所見

本実験系列に使用されたすべての動物は、その屠殺時に採取された血清について、通常の補体結合反応による感染症のチェックを受けた。呼吸器に影響を及ぼしうる病原体の中で、*B. broncho-septica* (陽性率7.9%)、Sendaiウイルス (陽性率1.2%) に対する抗体価が少数の個体で上昇を示した。しかし検索された限りのすべての肺標本では病理組織学的には著変を認めず、また電顕形態計測の結果でも、各対照群はほぼ満足すべき正常範囲にあり、気道系感染を含めて病原微生物は肺の組織像に影響を与えていないと判断した。

3.2 肺内リンパ装置の発達

全般的にあって、本実験における動物の肺ではごく軽度の傍気管支および気管支壁リンパ装置な

いしリンパ球の結節性集簇を認めた。その発達の程度は個体により若干の差異があるが、対照群との間に差異は見いだされず、またNO₂暴露濃度、暴露期間のいずれとも関連しなかった。

3.3 特発性疾患

長期飼育されたラットには各種の自然発生性のいわゆる特発性疾患が見いだされる。本実験においても例外でなく、下垂体腫瘍、乳腺腫瘍、慢性腎症などの代表的な特発性疾患を合併した。9、18か月暴露群での合併は軽度であったが、27か月生存した暴露群では対照群を含むすべての動物に、多少とも上記疾患の発生を認めた。しかし肺における感染ないし腫瘍等の合併症は認めず、また上記の通常自然発生性疾患によると考えられる肺の合併病変は認めなかった。

4. 形態学的所見の小括と解釈

本実験系列のNO₂長期連続暴露実験でラット肺に見いだされる形態学的病変は、4 ppm暴露群において代表的であり、9か月ですでに明らかである。その性格は気管支粘膜上皮の肥大と過形成、線毛上皮の異形成、杯細胞の増加、気管支肺接合部から肺泡道へかけての細胞浸潤を伴う壁肥厚とクララ型上皮の増殖などとして要約される。これらの所見は既にいくつかの濃度水準で観察され報告されており³⁾、NO₂暴露に定型的な病変であると考えられる。これらの病変は4 ppm水準での暴露が継続するにつれて増強する。27か月暴露後での気管支粘膜の様相は18か月とあまり変わらないが、気管支・肺接合部から近接肺泡領域にかけての病変は18か月に比較して更に進展し、線維化と上皮増殖が進行するようにみえる。

一方、一般の肺胞壁の病変は、通常の光学顕微鏡観察では、4 ppm水準でもかならずしも明確には決定出来ない。また肺胞構造は最後までよく保たれ気腫性変化も発生していない。しかし、すでに述べたように透過電顕による観察では、各種の肺胞壁構成成分に変化を見いだす。それらは概括的にいえば、I型・II型上皮の腫大ないし大型化と細胞小器官の増加、間質の均質な基質の増加、間質細胞の多形化、間質での膠原線維の増加、血管内皮の不均一化などとして要約しよう。細胞質浮腫、変性、壊死所見はあっても弱くかつまれである。また食細胞の動員、肺胞壁への炎症性細胞の浸潤は全期間を通じて目立つものではない。

それらの肺胞壁病変は暴露期間の延長に伴って推移を示すものと考えられるが、上記の記述形態学的所見は常に定性的かつ局在的なので、その推移の様相をは握することは必ずしも容易でない。しかし形態計測による計量化はそうした記述形態学的観察の弱点を補い、かつ記述形態学的観察による変化の質を同時に考慮することによって、病変の時間的推移のは握をより明らかにし、かつ濃度依存性をめいりようには握出来る利点をもっている。

このような肺胞壁病変の質的・量的な観察によって、4 ppm濃度水準での病変の時間的推移を考えると、概括的にいえば、算術平均肺胞壁厚の推移に代表されるように、9か月から18か月にか

ての各種の組織成分量の増加と、18か月から27か月の間での減退という、二つの相が識別される。第Ⅰの相の9か月時点ではⅠ型上皮の数の減少と細胞当たり容積の増加がみられ、Ⅱ型対Ⅰ型細胞比でのⅡ型の相対的增加などⅠ型上皮を中心となっているのに対し、18か月ではⅡ型の数と大きさの増加、間質増加、血管内皮などが主像となっている。この推移をみると、4 ppm水準での肺胞壁変化は、Ⅰ型上皮の動きに始まり、引続いてゆっくりとⅡ型上皮をはじめ他の構成成分への影響が現れてくるようにみえる。また、気管支粘膜上皮の変化の推移と比較すると、深部一般肺胞の変化は少し遅れて発展するようにみえる。

第2の相である18～27か月では、既に述べたように、肺胞上皮に関する諸指標に復元傾向がみられ、電顕像にもこれを裏付ける所見が得られる。一方間質（細胞成分、非細胞成分）量は減退に転じ、電顕像の上でも間質浮腫の減退、塊状の膠原線維の増加が認められる。この18～27か月の間の推移とくに肺胞上皮の態度は一種の修復像と解することも出来る。しかし他方において間質の線維増生という質的な変化は、完全な復元とはいえず、生体機能の障害の可能性を含めて、この期間の間に病変は進行を示し、次の病期に移行したものと考えるのが妥当であろう。以上の考察から、4 ppmのNO₂の長期連続暴露下で、肺胞壁の病変はゆっくりと進行すると考えられる。病変の一部たとえば肺胞上皮の様相には復元傾向がみられるが、他の一部たとえば間質病変は常に進行性であると考えられる。

0.4 ppm水準での病変は、一般的にいえば4 ppm水準に比べて病変の程度は軽く、かつその出現時期は遅い。通常形態学的観察では、気管支上皮、気管支肺接合部や肺胞壁の変化が電顕観察で見いだされるのは18か月からであり、光顕観察で軽度の変化が見いだされるのは27か月に至ってからである。形態計測指標では、平均肺胞壁厚は期間の延長と並行して増加傾向を示している。間質に関連する諸指標も同様の動きを示している。興味あることは肺胞上皮の態度であって、4 ppm群と比べて変動量は小さいが、それと全く同様のパターンを示し27か月では復元傾向を示している。以上の所見を総合して考えると0.4 ppm水準では、4 ppm水準の第1相に当たる病変がゆっくりと進行し、時間の経過と共に増強して、暴露が長期化すれば軽度の定型的病変に進展するものと考えられる。

0.04 ppm群においては、通常電顕・光顕観察の範囲では、9か月から27か月に至る間、対照群との間にめいりょうな差異を確定出来ない。しかし形態計測の指標値の変動をみると、算術平均肺胞壁厚の暴露期間に対応した増加傾向、間質成分の同様な軽度の増加傾向、肺胞上皮とくにⅡ型上皮の変動パターンなど、0.4 ppm群に比べれば明らかに軽度ではあるが、全く同質の変動傾向が見いだされる。これらの所見をみると0.04 ppm群にも0.4 ppm群と同じ方向へ向かっての指標値の偏りが、ゆっくりではあるが進行しているものと考えられる。同時にこうした変化のもつ生理学的意義とその可逆性、暴露期間が更に延長されたときの進行度の検討などは、今後の重要な課題であろう。

考 察

NO₂は高濃度の暴露では、肺に出血・浮腫・炎症性細胞浸潤を伴う強い急性病変を引き起こし、致死的である。環境大気汚染物質とくに都市大気汚染などの一般環境汚染においては低濃度領域における長期連続暴露が重要な研究課題であることはいうまでもない。動物実験で、比較的低濃度のNO₂に長期にわたって暴露した動物の呼吸器の形態学的病変の性格と自然史(natural history)については、すでいくつかの研究の結果からある程度の知識が得られている。中でも1960年代後半から1970年代前半にかけて、Freemanおよびその共同研究者によって報告された一連の業績³⁻⁸⁾は最も詳しく、低濃度NO₂長期暴露下の呼吸器形態学的病変の原型像を与えている。その結果を要約すると、気管支上皮の線毛異常・分泌昂進・増殖、終末気管支から肺泡道にかけての壁肥厚・線維化・上皮増殖などが主像である。肺泡壁ではI型上皮の早期の障害とII型上皮による置換がみられる。暴露濃度が十分に高ければ肺気腫が発生する^{3-8,13)}。それらの変化の一部は、他のいくつかの報告にも記載されている¹⁴⁻¹⁶⁾。われわれの実験で得られた成績は、前節の4項に要約されているが、その性格とくに4 ppm群の定型的病変のそれは、上記の報告と基本的にはよく一致している。同時に本実験に用いた4 ppm以下の水準では、肺の各部分での炎症性細胞浸潤・リンパ装置の発達は認められず、この点もFreemanらの成績と一致している。またこの濃度範囲では27か月に至るまで肺気腫の発生には到っていない。

定型的病変の程度と出現経過は、用いられた濃度水準と暴露スケジュールによって支配されることは当然であるが、その他の実験条件とくに動物種や感染の合併、検索方法とその精度など多くの条件によって変わりうることは自然である。濃度水準と病変の程度との並行性すなわち量、影響関係を知ることは大切な課題であるが、従来の報告の大部分は単一濃度について行われており、相互の比較にはやや困難がある。その意味において暴露水準の幅と暴露期間の長さを十分に広くとった本実験の成績は、価値あるものと考えられる。

FreemanやStephensら^{7,17,18)}はラットに対する2 ppm 2年間の連続暴露で軽度の定型的病変の成立を認めている。本実験の4 ppm群で観察される定型的病変は、これに比べて明らかに強い。Furiosiら¹⁹⁾も2 ppm水準連続暴露425日で気管支上皮の肥大を見いだしている。Evans³⁾は最近1~2 ppmの生涯連続暴露は、強くはないが、はっきりした気道上皮病変を起こすと述べている。

2 ppm以下の濃度水準での長期暴露の報告は多くない。Wagnerら²⁰⁾がラット・マウスを含む数種の動物を用い、1, 5, 25 ppmの濃度水準で1日6時間、週5日、18か月までの間欠の連続暴露を行った結果では、1 ppm水準では陽性成績は得られていない。ラットの組織学的所見には対照群を含む各群に共通した炎症性変化が記載されている。Freemanら⁶⁾のラットに対する0.8 ppm 33か月の暴露では、時に細気管支上皮に軽度の変化を認めたが、全体としては陰性の結果であった。

Blairら²¹⁾のマウスを用いた0.5 ppm水準での最長12か月までの連続暴露実験は、肺気腫様の過拡張と肺泡壁肥厚が見いだされている。しかし定型的病変の記載に乏しいのと同時に、炎症性変化や

肺炎の記載があり、判断は慎重である必要があろう。本実験での0.4ppm水準では、18か月以降微弱な病変が出現しはじめ、27か月で軽度の定型的病変が成立する。以上の成績を通覧すると低濃度長期暴露では、少なくとも0.4ppm水準以上では暴露が長期にわたれば病変が発生するものと考えられる。

以上の長期暴露のほか、2～3か月以内での病変を検討したいくつかの報告があり、その中には、本実験で検討の対象とした低濃度領域の実験もいくつか含まれている。中島ら²²⁾はマウスによる0.5～0.8ppm領域での1～1.5か月連続暴露実験で、末梢気管支の増殖や肺胞上皮の水腫性腫脹を記載しており、三吉ら²³⁾は同様にマウスに対する0.55～1.6ppm連続5週間暴露で、気管粘膜上皮病変を認め、また末梢気管支上皮の増殖を認めている。著者ら²⁴⁾もラットにおいて0.1～10ppmの範囲での4段階濃度1か月連続暴露実験系列の中で、3ppm以上ではめいりょうな定型的病変を認め、0.5ppm水準では軽度の気管支上皮の変化と肺胞壁厚の増加を観察している。それらの低濃度領域での短期実験での軽度の陽性成績からみると0.5ppm前後の水準でも比較的早期になんらかの形態学的反応が出現する可能性が示唆される。本実験系列では、0.4ppm水準の病変の進行がそれらの比較的短期の暴露に比較して、著しく遅徐である。実験条件の差異によるものかもしれないし、最初の観察時点が9か月であるから、ごく初期に軽度の反応があり、その後9か月までの間に消退した可能性も否定出来ない。いずれにせよ、この解釈については、低濃度長期暴露下での軽度の反応とその時間経過に伴う消長の可能性という、より広い基本的な観点とも関連しているかもしれない、今後の課題であろう。

連続暴露下での肺胞上皮の反応経過は病変消長の1例である。すでにNO₂暴露下で、I型上皮の障害とII型上皮による置換が、暴露の比較的早期に認められており³⁾、2ppm水準での長期暴露でも同様の現象が見いだされている⁸⁾。この現象が起こった後には上皮はNO₂に対してより抵抗性を示すものと考えられている³⁾。一方本実験のように9か月という長い間隔で観察が行われたときにも、その各時期でI型・II型上皮の相互関係に同様の傾向が見いだされ、かつその程度は濃度と並行した強弱を示すらしいことは興味深い。換言すれば本実験に用いられた低濃度領域では、I型上皮障害とII型上皮反応さらに後者による前者の置換が、27か月という全期間を通じてゆっくりと継起しているように見える。これらの現象の統一的な理解は、長期暴露初期の病変の成立の速さとその後の進行の速さの差異の解釈をも含めて、今後の検討の課題であろう。

いずれにせよ、本実験系列の結果は、27か月という長い実験期間を通じてみれば、NO₂による呼吸器病変は、明らかに濃度水準と並行し、同時に期間の延長と並行して進行するものと考えられる。組織病変の一部たとえばI型上皮の修復像は一種の回復と理解することも出来るが、他の多くの病変たとえば気管支上皮や気管支・肺接合部病変、肺胞間質病変などは、常に進行性であるものと考えられる。同時に低濃度連続暴露下で病変のゆっくりとした蓄積性を示すものと考えねばなるまい。

0.4ppm以下の濃度水準における長期連続暴露の生体影響に関する動物実験の情報はきわめて少な

く、形態学的観察も乏しい。長谷川ら²⁵⁾は0.12ppm 1か月連続暴露ラットにおいて、血中グルタチオンの増加などの生化学的指標の変動を認め、京野ら²⁴⁾は同じ試料について、算術平均肺胞壁厚や他の形態計測指標の増加傾向を認め、この濃度水準での生体影響は陰性とはいききれないと述べている。この成績はその後の繰り返し実験でも確かめられている²⁵⁾。もしこれらの形態学的指標の変動傾向が、本実験でみられたように、暴露期間の延長と共に増加を続けるものであるならば、27か月後にはかなりの程度に達する可能性が存在する。本実験系列のうち0.04ppm水準で観察された形態計測指標のゆっくりとした上昇傾向は、すでに触れた0.4ppm、0.12ppmの所見と比べ、更に軽度であるが同じ方向性と内容をもっている点は無視することが出来ない。今後の検討の課題であろう。

本実験の成績において気付かれる要点の一つは、動物の加齢が進行する18～27か月の間に、病変の進行が強いという印象が得られる点である。0.4ppm水準での病変のめいりょう化、0.04ppm水準での形態計測指標値の上昇など、いずれもこの期間に著しい。この現象が単に暴露期間の延長によるものか、加齢に伴うなんらかの意味での感受性の上昇²⁶⁾によるものかは今後の検討課題であろう。

結 論

4, 0.4, 0.04ppmのNO₂に9, 18, 27か月連続暴露されたラットの呼吸器について病理形態学的検索を行った結果、肺病変に関して次のような結論を得た。

1) 4ppm水準では、最初の検索時点である9か月において、定型的病変が見いだされ、その後も暴露期間の延長と共に、ゆっくりと進行する。しかし27か月の時点では肺気腫の発生には至らない。0.4ppm水準では、病変の進行は緩徐であるが、27か月後には軽度の定型的病変を発現する。0.04ppm水準では、通常の観察方法の範囲では全実験期間を通じて病変を認めないが、形態計測指標値の中には時間の経過と共に上昇を続ける指標があり、陰性とはいききれない。

2) 以上の結果は、低濃度NO₂の連続暴露による形態学的病変は、濃度水準と暴露期間に並行し、明らかな量・影響関係が存在することを示している。

3) 病変の一部たとえば肺胞上皮には連続暴露下での修復像がみられるが、大部分の病変は常にゆっくりと進行しており、低濃度領域における影響の累積の存在を示唆している。

予定された解析はいまだ完全には終了していないので、以上の報告はなお中間的なものである。

謝 辞

本実験材料の検索に当たって、その熟練した技術によって協力された 清水聡子・木田あさひ・真保義子・望月和美 の諸氏に深く感謝致します。

引用文献

- 1) Coffin, D. L. and H. E. Stokinger (1977) : Biological Effects of Air Pollutants. Air Pollution, Vol. II, 231—360, Ed. Stern, Academic Press.
- 2) World Health Organization (1977) : Environmental Health Criteria 4: Oxides of Nitrogen. United Nations Environment Programme and the World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 3) Evans, M. J. and G. Freeman (1980) : Morphological and Pathological Effects of NO₂ on the Rat Lung. Nitrogen Oxides and Their Effects on Health, Ed. Lee S. D., Ann Arbor Science, 243—265.
- 4) Freeman, G. and G. B. Haydon (1964) : Emphysema after Low-Level Exposure to NO₂. Arch. Environ. Health, **8**, 133—136.
- 5) Haydon, G. B., G. Freeman and N. Furioli (1965) : Covert Pathogenesis of NO₂ Induced Emphysema in the Rat. Arch. Environ. Health, **11**, 776—783.
- 6) Freeman, G., N. J. Furioli and G. B. Haydon (1966) : Effects of Continuous Exposure of 0.8 ppm NO₂ on Respiration of Rats. Arch. Environ. Health, **13**, 454—456.
- 7) 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.
- 8) Stephens, R. T., G. Freeman and M. T. Evans (1972) : Early Response of Lungs to Low Levels of Nitrogen Dioxide. Arch. Environ. Health, **24**, 160—179.
- 9) 竹中参二, 他 (1979) : 国立公害研究所研究報告, 第8号.
- 10) 京野洋子・奥重治・河合清之 (1973) : 微弱肺反応の形態学的検出. 大気汚染研究, **8**(3), 432.
- 11) Weibel, E. R., G. S. Kistler and W. F. Scherle (1966) : Practical Stereological for Methods Morphometric Cytology. J. Cell Biol., **30**, 23—38.
- 12) Weibel, E. R. (1973) : Stereological Techniques for Electron Microscopic Morphometry. in Principles and Techniques of Electron Microscopy, M. A. Hayat, Ed. New York : Van Nostrand Reinhold Co., 237—291.
- 13) Juhos L. T., D. P. Green, N. J. Furioli and G. Freeman (1980) : A Quantitative Study of Stenosis in the Respiratory Bronchiole of the Rat in NO₂-Induced Emphysema. Am. Rev. Resp. Dis., **121**, 541—549.
- 14) Sherwin R. P., J. B. Margolick and S. P. Azen (1973) : Hypertrophy of Alveolar Wall Cells Secondary to an Air Pollutant. Arch. Environ. Health., **26**, 297—000.
- 15) Haydon, G. B., J. T. Davidson, G. A. Lillington and K. Wasserman (1967) : Nitrogen Dioxide-

- Induced Emphysema in Rabbits. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **95**, 797—805.
- 16) Kleinerman, J. (1977) : Some Effects of Nitrogen Dioxide on the Lung. *Federation Proceedings*, **36**(5), 1714—1718.
 - 17) Stephens, R. J., G. Freeman and M. J. Evans (1971) : Ultrastructural Changes in Connective Tissue in Lungs of Rats Exposed to NO₂. *Arch Intern. Med.*, **127**, 873—883.
 - 18) Stephens, R. J., G. Freeman, S. C. Crane and N. J. Furiosi (1971) : Ultrastructural Changes in the Terminal Bronchioles of the Rat During Continuous, Low-Level Exposure to NO₂ (Ciliogenesis). *Exp. Mol. Pathol.*, **14**, 1—19.
 - 19) Furiosi, N. J., S. C. Crane and G. Freeman (1973) : Mixed Sodium Chloride Aerosol and Nitrogen Dioxide in Air. *Arch. Environ. Health*, **27**(12), 405—408.
 - 20) Wagner, W. D., B. R. Duncan, P. G. Wright and H. E. Stokinger (1965) : Experimental Study of Threshold Limit of NO₂. *Arch. Environ. Health*, **10**(3), 455—466.
 - 21) Blair, W. H., M. C. Henry and R. Ehrlich (1969) : Chronic Toxicity of Nitrogen Dioxide 2. Effect on Histopathology of Lung Tissue. *Arch. Environ. Health*, **18**, 186—192.
 - 22) Nakajima T., H. Oda, S. Kusumoto and H. Nogami (1980) : Biological Effects of Nitrogen Dioxide and Nitric Oxide. in *Nitrogen Oxides*, S. D. Lee, Ed. Michigan : Ann Arbor Science, 121—141.
 - 23) 三吉康郎・井上ふさ・中野東右・新山宏二・若林致雄 (1980) : SO₂ならびにNO₂暴露後のマウス気管粘膜上皮の走査電子顕微鏡的観察. *気食会報*, **24**. 1.
 - 24) 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回大気汚染全国協議会講演要旨集, p. 220, 福岡.
 - 25) 長谷川弘道・河合清之ら : (未発表)
 - 26) Cabral-Anderson L. J., M. J. Evans and G. Freeman (1977) : Effects of NO₂ on the Lungs of Aging Rats. *Exp. Mol. Pathol.*, **27**, 353—365.

写真説明

- 図 12 4 ppm 27か月気管支上皮：広汎な上皮肥大と線毛の喪失（原倍率×160）
Fig. 12 4 ppm 27M Bronchial epithelium : Extensive hypertrophy and loss of cilia
(original mag. ×160)
- 図 13 0.4 ppm 27か月気管支上皮：部分的な上皮肥大と線毛喪失（原倍率×160）
Fig. 13 0.4 ppm 27M Bronchial epithelium : Partial hypertrophy and loss of the cilia
(original mag. ×160)
- 図 14 0.04 ppm 27か月気管支上皮：対照群との差は確定出来ない（原倍率×160）
Fig. 14 0.04 ppm 27M Bronchial epithelium : Difference to the control was not remarkable
(original mag. ×160)
- 図 15 対照群27か月気管支上皮（原倍率×160）
Fig. 15 Control 27M Bronchial epithelium (original mag. ×160)
- 図 16 4 ppm 9か月末梢気道：軽度の肺胞道壁肥厚と上皮の増殖（原倍率×50）
Fig. 16 4 ppm 9M Terminal Airway : Slight thickening in the wall of the alveolar
duct and proliferation of the epithelium (original mag. ×50)
- 図 17 0.4 ppm 9か月末梢気道：特記すべき所見を認めず（原倍率×50）
Fig. 17 0.4 ppm 9M Terminal airway : No remarkable alteration (original mag. ×50)
- 図 18 0.04 ppm 9か月末梢気道：特記すべき所見を認めず（原倍率×50）
Fig. 18 0.04 ppm 9M Terminal airway : No remarkable alteration (original mag. ×50)
- 図 19 対照群9か月末梢気道（原倍率×50）
Fig. 19 Control 9M Terminal airway (original mag. ×50)
- 図 20 4 ppm 18か月末梢気道：典型的な末梢気管支上皮の肥大と増殖軽度の肺胞道壁肥厚と上
皮増殖（原倍率×80）
Fig. 20 4 ppm 18M Terminal airway : Typical picture of continuous nitrogen dioxide

exposure.

Hypertrophy and proliferation of the epithelium of terminal airway. (original mag. $\times 80$)

図 21 0.4 ppm 18か月末梢気道：病変は確定出来ない (原倍率 $\times 50$)

Fig. 21 0.4 ppm 18M Terminal airway : No remarkable. (original mag. $\times 50$)

図 22 0.04 ppm 18か月末梢気道 (原倍率 $\times 50$)

Fig. 22 0.04 ppm 18M Terminal airway (original mag. $\times 50$)

図 23 対照群18か月末梢気道 (原倍率 $\times 50$)

Fig. 23 Control 18M Terminal airway (original mag. $\times 50$)

図 24 4 ppm 27か月末梢気道：著明な末梢気管支上皮の肥大と増殖 (原倍率 $\times 40$)

Fig. 24 4 ppm 27M Terminal airway : Hypertrophy and proliferation of the epithelium is remarkable. (original mag. $\times 40$)

図 25 0.4 ppm 27か月末梢気道：軽度の上皮肥大と増殖・気管支壁肥厚 (原倍率 $\times 80$)

Fig. 25 0.4 ppm 27M Terminal airway : Slight hypertrophy and proliferation of the epithelium.

Thickening of the bronchiolar and ductal wall (original mag. $\times 80$)

図 26 0.04 ppm 27か月末梢気道：変化は確定出来ない (原倍率 $\times 50$)

Fig. 26 0.04 ppm 27M Terminal airway : No definite change. (original mag. $\times 50$)

図 27 対照群27か月末梢気道：(原倍率 $\times 50$)

Fig. 27 Control 27M Terminal airway (original mag. $\times 50$)

図 28 4 ppm 18か月気管支・肺接合部：肺胞道壁および付近肺胞の壁肥厚 (原倍率 $\times 50$)

Fig. 28 4 ppm 18M Broncho-pulmonary junction : Thickening of the wall of the alveolar duct and adjacent alveoli. (original mag. $\times 50$)

図 29 4 ppm 27か月気管支・肺接合部：肺胞道壁および付近肺胞の壁肥厚・線維化 (原倍率 \times

100)

Fig. 29 4 ppm 27M Broncho-pulmonary junction : Thickening of the wall of the alveolar duct and adjacent alveoli, advanced fibrosis (original mag. $\times 100$)

図 30 4 ppm 9 か月末梢気管支 (走査電顕) : 末梢気管支上皮の不整と増殖 (原拡大 $\times 400$)

Fig. 30 4 ppm 9 M Terminal bronchioles (SEM) : Irregularly arranged and proliferated epithelium.

図 31 4 ppm 9 か月末梢気管支 (走査電顕) : 図30の拡大像 (原倍率 $\times 2000$)

Fig. 31 4 ppm 9 M Terimnal bronchioles (SEM) : Higher magnification of a part of the Fig. 30.

図 32 4 ppm 9 か月細気管支 (透過電顕) : 線毛上皮の肥大・線毛短縮, 基底細胞の増殖

Fig. 32 4 ppm 9 M Bronchioles (TEM) : Hypertrophy and shortening of the cilia in the ciliated epithelium, Proliferation of the basal cell.

図 33 4 ppm 9 か月末梢気管支 (透過電顕) : 線毛上皮およびクララ型上皮の塊状増殖, 線毛上皮の変性

Fig. 33 4 ppm 9 M Terminal bronchioles (TEM) : Proliferation of the ciliated and Clara-type cells. Degeneration in a ciliated epithelium.

図 34 4 ppm 18か月気管支上皮 (透過電顕) : 線毛の短縮, 右端に変性像

Fig. 34 4 ppm 18M Bronchial epithelium : Shortening of cilia. Degeneration of a epithelium on the right.

図 35 4 ppm 18か月気管支末梢 (透過電顕) : 末梢気管支上皮の塊状増殖

Fig. 35 4 ppm 18M Terminal bronchioles : Massive proliferation of the epithelium.

図 36 4 ppm 18か月気管支粘膜 (走査電顕) : 粘膜表面の畝状突出, 上皮の増殖 (原倍率 $\times 200$)

Fig. 36 4 ppm 18M Bronchial mucosa (SEM) : Ridgy projection of the mucosa. Proliferation of the epithelium (original mag. $\times 200$)

- 図 37 4 ppm18か月気管支粘膜上皮 (走査電顕) : 図36の強拡大 (原倍率×2000)
 Fig. 37 4 ppm 18M Bronchial epithelium (SEM) : Higher magnification of the Fig. 36
 (original mag. ×2000)
- 図 38 4 ppm18か月肺胞壁 (透過電顕) : 肥大し一部は剝離を示すⅡ型上皮, Ⅰ型上皮の核内空胞
 Fig. 38 4 ppm 18M Alveolar wall (TEM) : Several hypertrophied Type II epithelia.
 Note the intranuclear vacuoles in a Type I epithelium.
- 図 39 4 ppm18か月肺胞壁 (透過電顕)
 Fig. 39 4 ppm 18M Alveolar wall (TEM)
- 図 40 4 ppm27か月気管支末梢 (走査電顕) : 上皮配列の完全な不規則化 (原倍率×200)
 Fig. 40 4 ppm27M Terminal bronchioles (SEM) : Note a complete disarrangement of the
 epithelium (original mag. ×200)
- 図 41 4 ppm27か月気管支末梢 (走査電顕) : 気管支上皮の指状増殖 (原倍率×2000)
 Fig. 41 4 ppm 27M Terminal bronchioles (SEM) : Finger-like projection of the prolife-
 rated epithelium (original mag. ×2000)
- 図 42 4 ppm27か月気管支壁 (透過電顕)
 Fig. 42 4 ppm 27M Bronchial wall (TEM)
- 図 43, 44 4 ppm27か月気管支末梢 (透過電顕) : 気管支末梢部および肺胞道でのクララ型
 上皮の増殖. 粘膜下組織の膠原線維増加
 Figs. 43and 44 4 ppm 27M Bronchial Terminal (TEM) : Proliferation of the Clara Type
 epithelium in the bronchial terminal and in the alveolar duct. Increased
 collagen in the sumucosa.
- 図 45 4 ppm27か月肺胞壁 (透過電顕) : 肺胞道肺胞壁肥厚. 間質拡大・膠原線維増加. Ⅰ型上
 皮細胞質肥大. 間質細胞内のミエリン体様封入体.
 Fig. 45 4 ppm 27M Alveolar wall (TEM) : Thickening of the ductal alveolar wall.
 Extended interstitium with increased collagen fibers. Hypertrophy of the cytoplasm

of Type I epithelium. Myelin-like inclusion in a interstitial cell.

図 46 4 ppm27か月肺胞壁 (透過電顕) : 末梢部肺胞. 2個の正常に近いⅡ型上皮. 軽度の間質拡大.

Fig. 46 4 ppm 27M Alveolar wall (TEM) : Distal alveolar wall.
Two apparently normal Type II epithelia. Slightly extended interstitium.

図 47 4 ppm27か月肺胞壁 (透過電顕) : 末梢部肺胞. 間質の拡大と膠原線維増生.

Fig. 47 4 ppm 27M Alveolar wall (TEM) : Distal alveolar wall.
Extended interstitium with fibrosis.

図 48 4 ppm27か月肺胞壁 (透過電顕) : 末梢部肺胞. 延長した細胞質をもつⅡ型上皮. 間質拡大と線維増殖.

Fig. 48 4 ppm 27M Alveolar wall (TEM) : Distal alveolar wall.
Type II epithelium with extended cytoplasm. Extended interstitium with fibrosis.

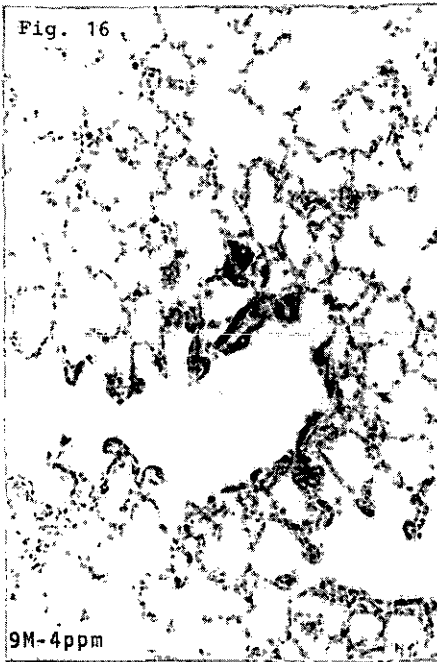
図 49 0.4ppm27か月気管支末梢部 (透過電顕) : クララ型上皮の増殖粘膜下組織の拡大と線維症

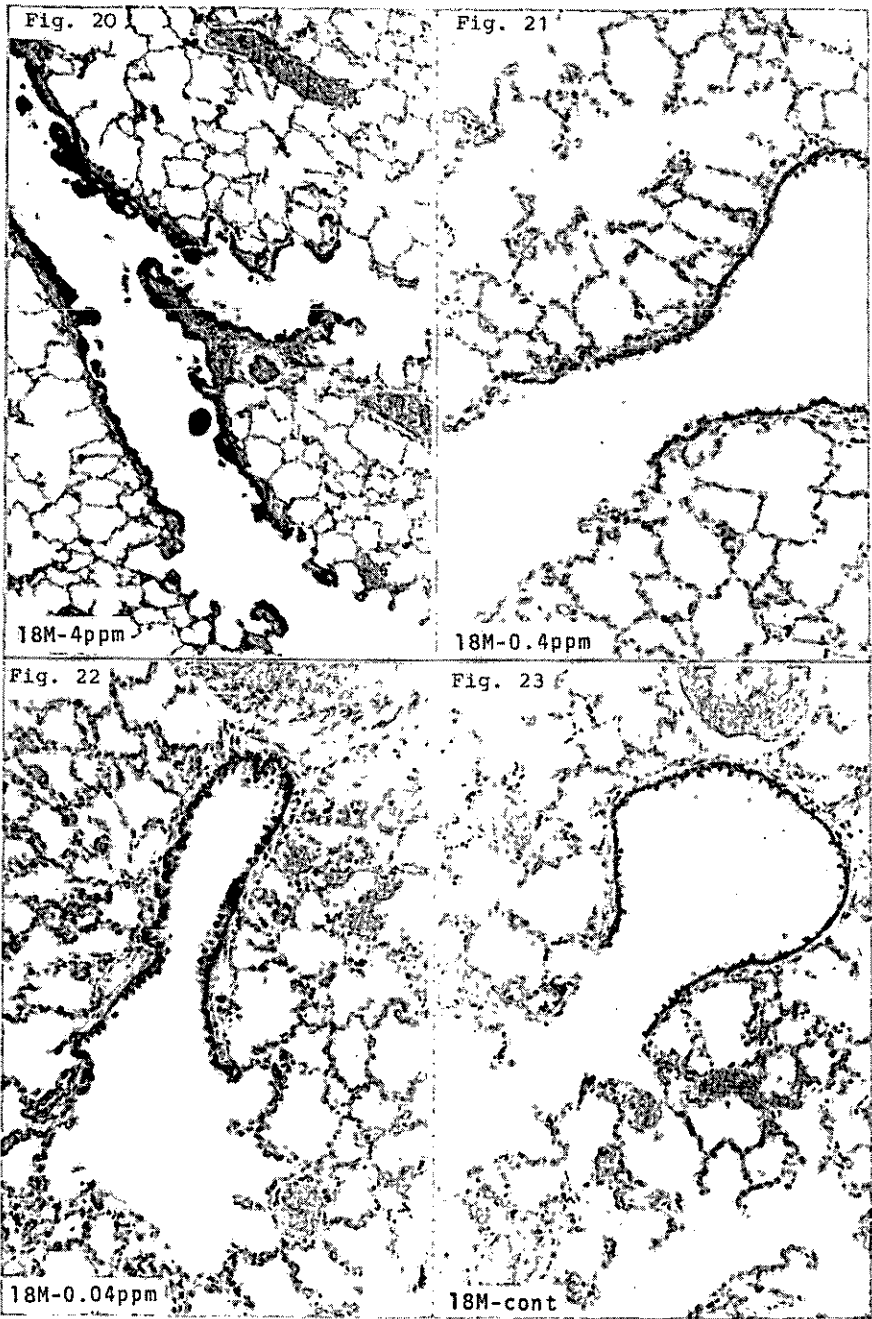
Fig. 49 0.4ppm 27M Terminal airway (TEM) : Proliferation of Clara Type epithelium.
Extended submucosal connective tissue and increased collagen fibers.

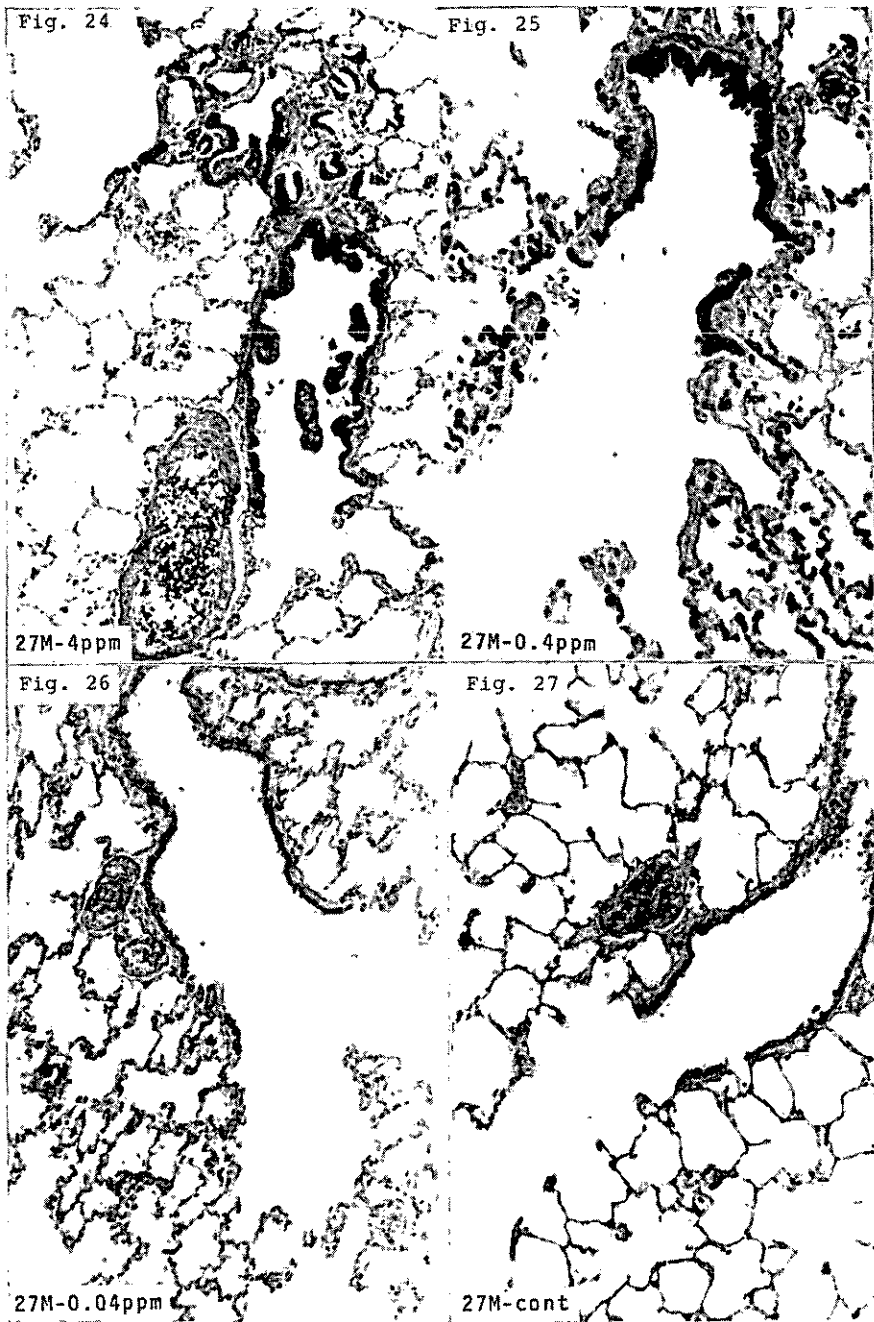
図 50 0.4ppm27か月肺胞壁 (透過電顕) : 末梢肺胞壁不規則な間質浮腫, 軽度の膠原線維形成

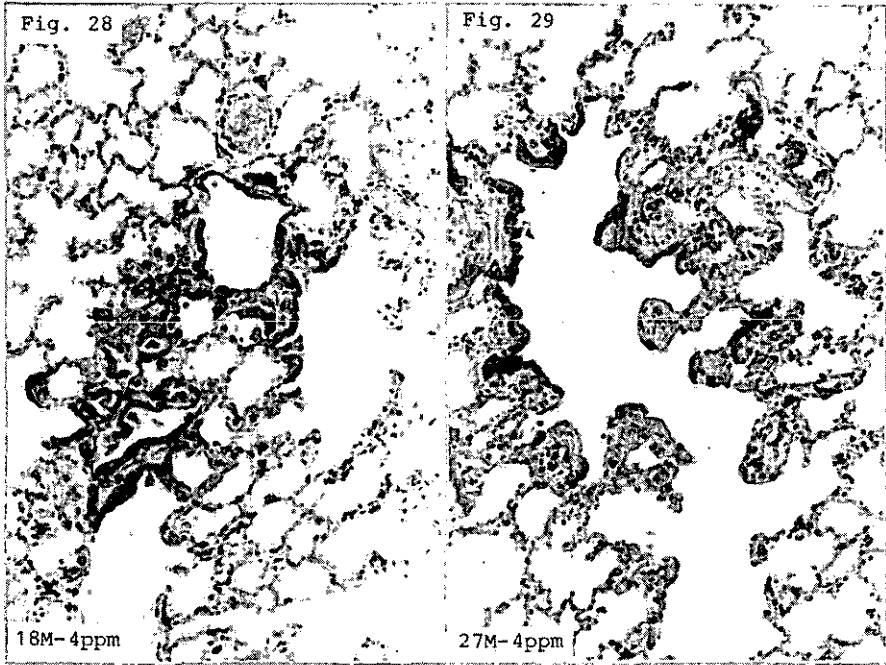
Fig. 50 0.4ppm 27M Alveolar wall (TEM) : Distal alveolar wall, edema and minimal collagen fiber formation in the interstitium.

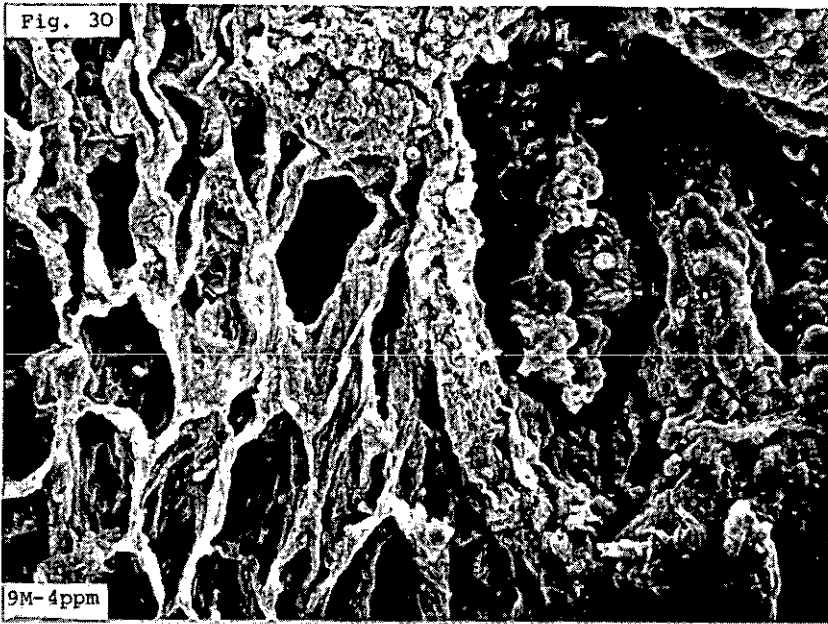


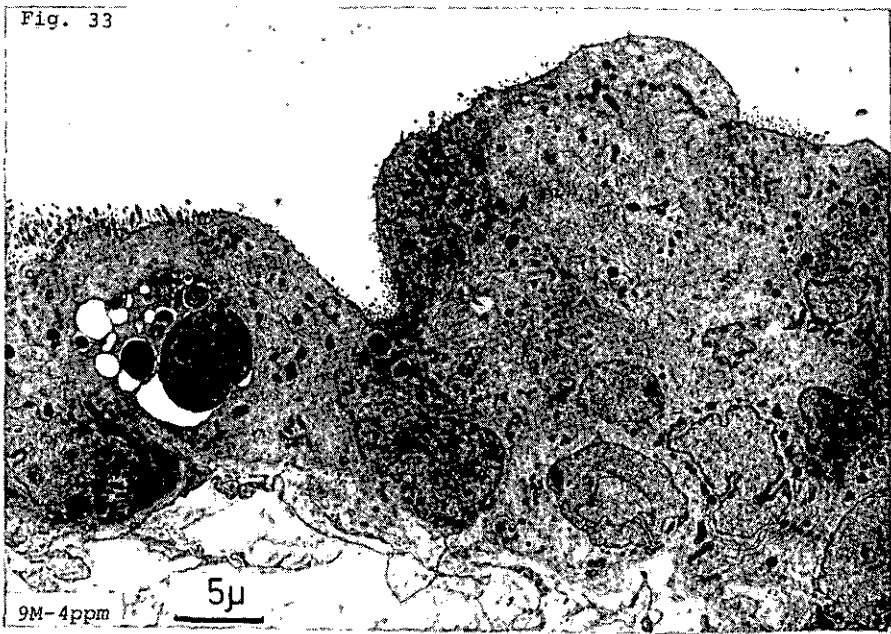
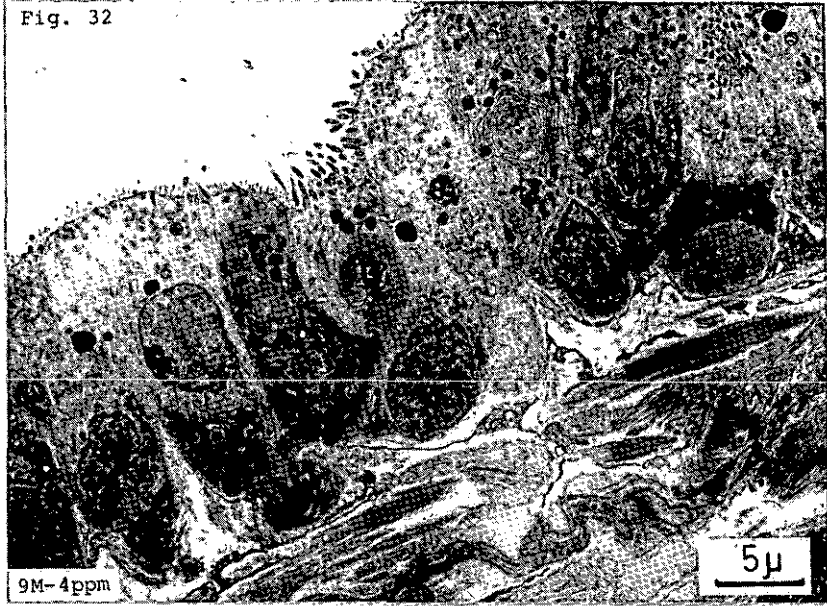


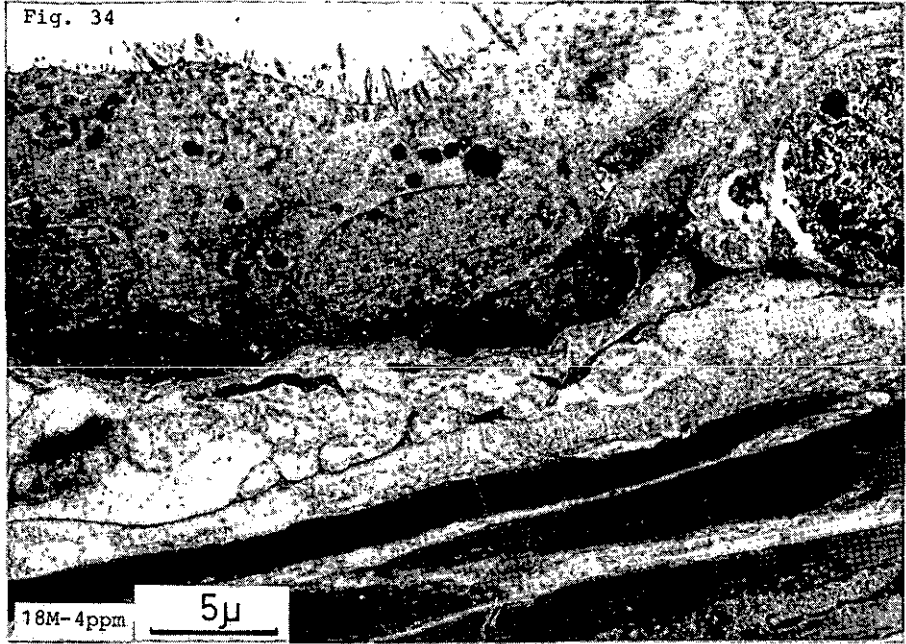


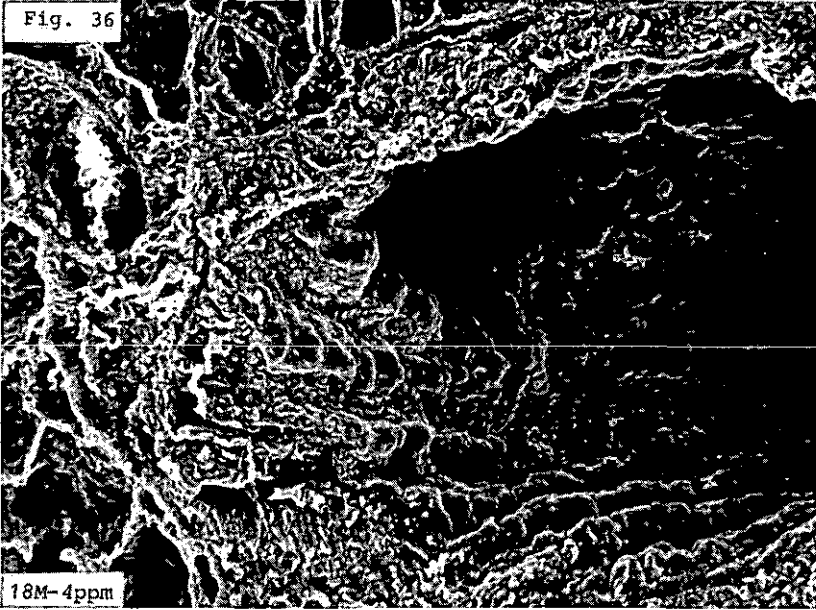


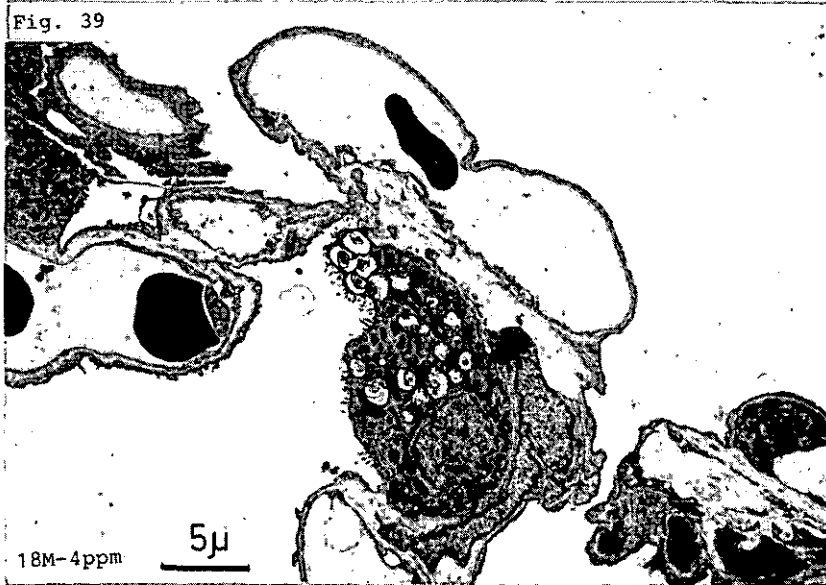












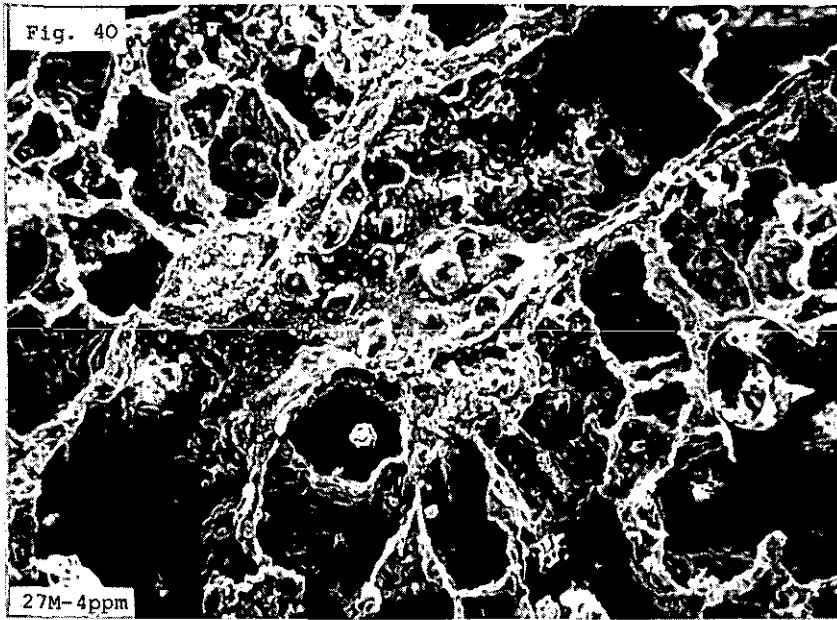
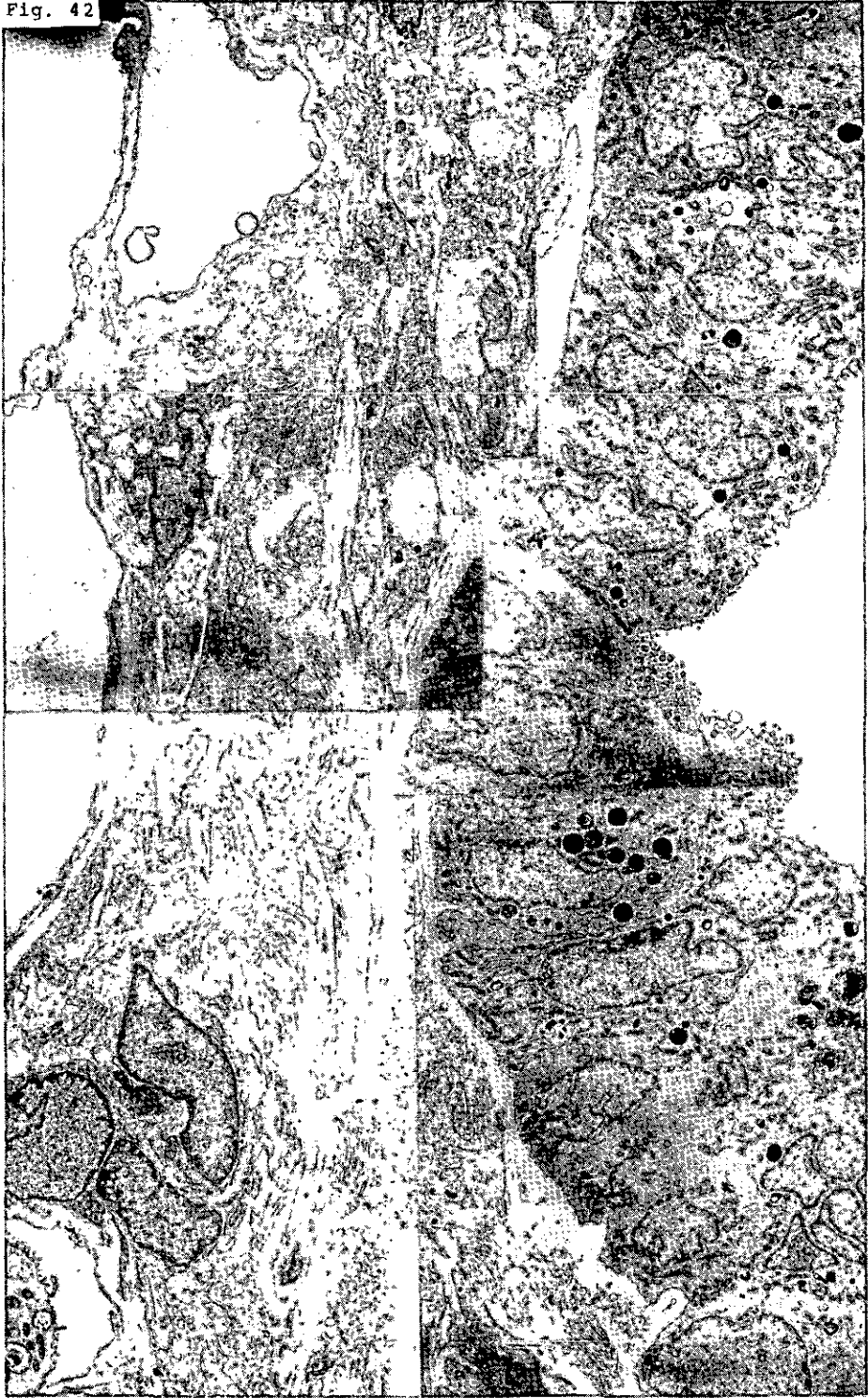
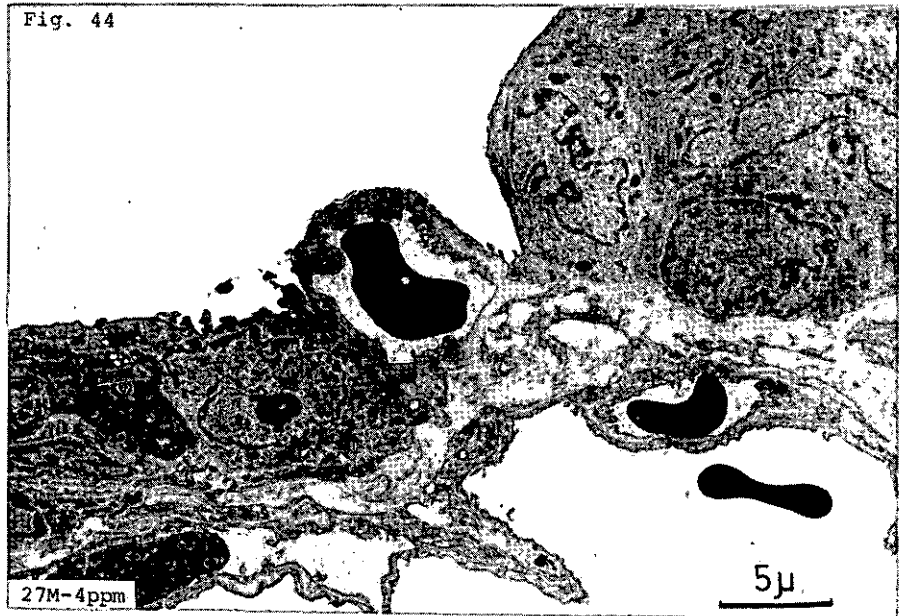
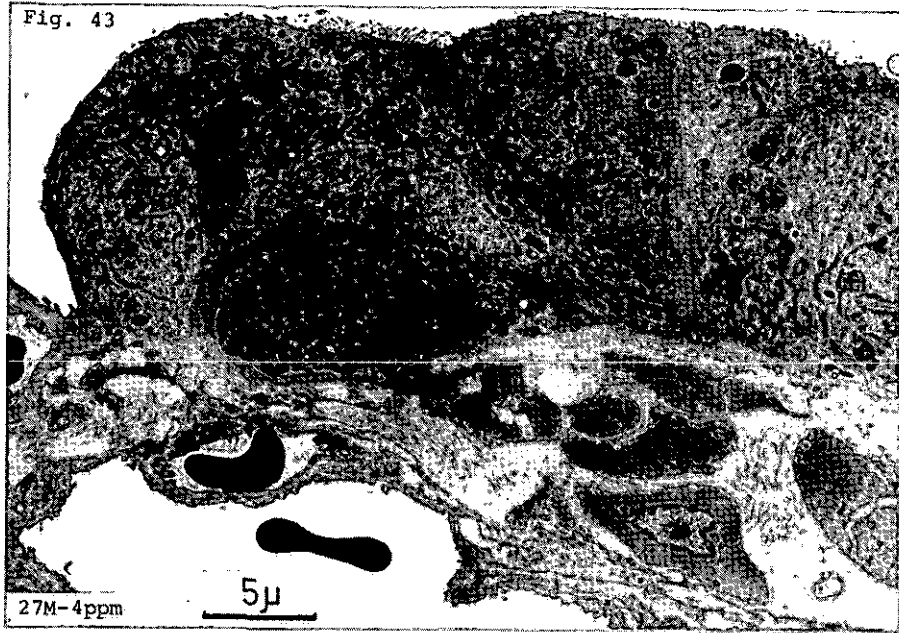
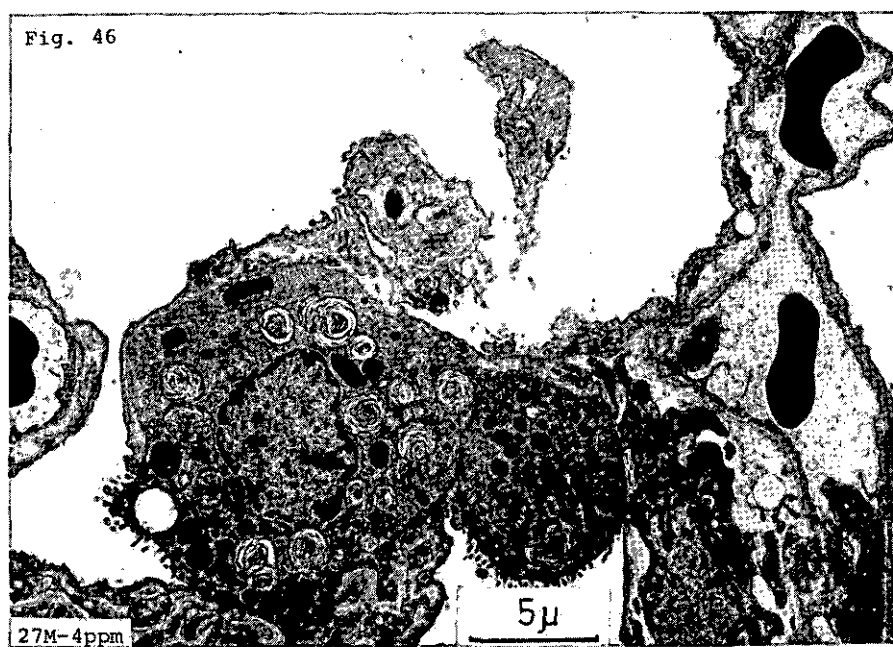
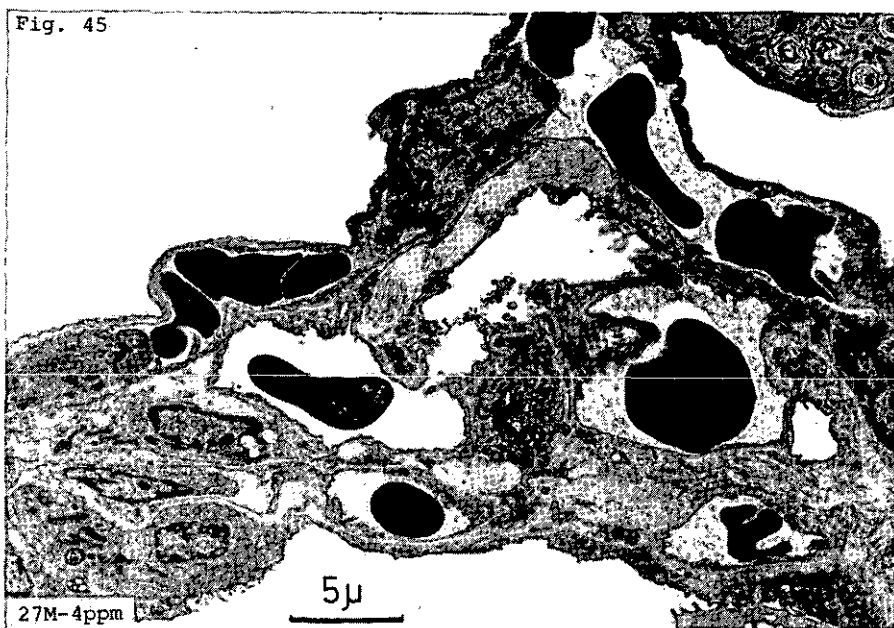
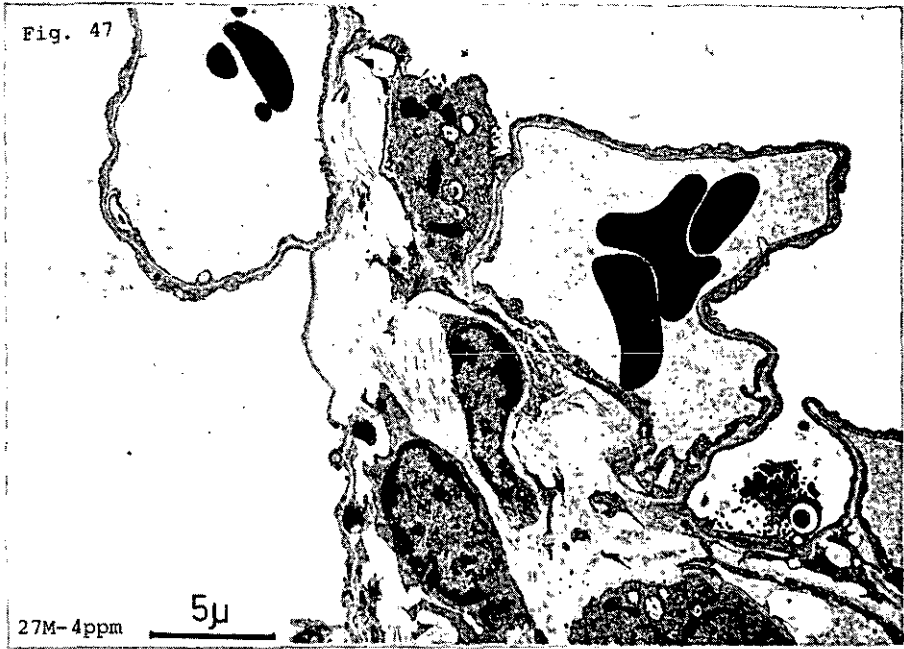


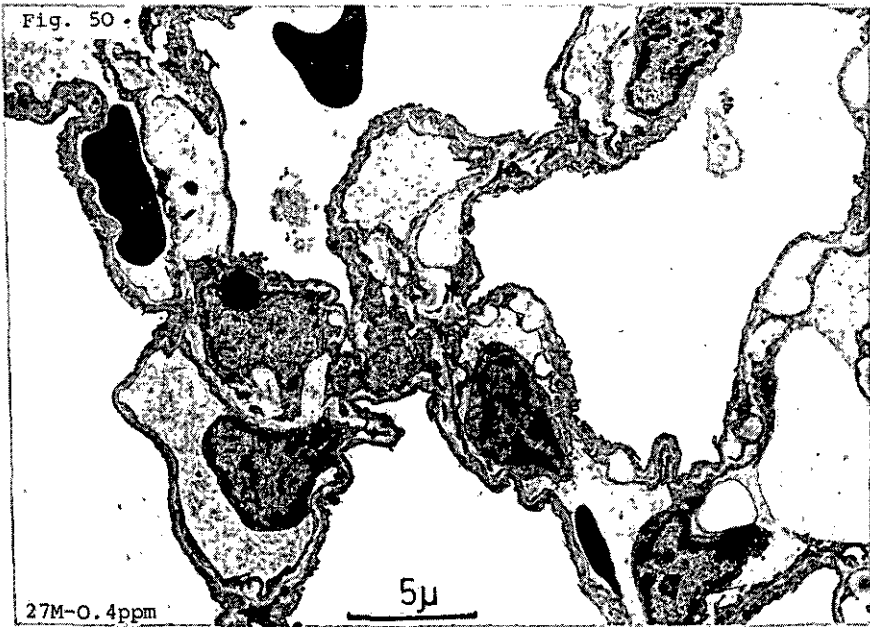
Fig. 42











II-4

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 ——

Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rats

—— Arterial Blood pHa, PaCO₂ and PaO₂ ——

鈴木 明¹・局 博一¹・市瀬孝道¹・織田 肇¹

Akira SUZUKI¹, Hirokazu TSUBONE¹, Takamichi ICHINOSE¹ and Hajime ODA¹

要 旨

NO₂低濃度・長期暴露の生体影響を評価するための一手段として、0.04ppm、0.4 ppmおよび4 ppmのNO₂を9か月間ラットに暴露し、心拍数、呼吸数、血液pHa、PaCO₂、PaO₂等について検討した。対照群と比較して、心拍数に変化は認められなかったが、呼吸数の減少が0.4ppm暴露で認められた。無麻酔時の動脈血PaO₂は0.4ppmおよび4ppm暴露で有意に減少した。また、種々の人工呼吸数下で測定したPaO₂は、0.4ppm、4ppm暴露で減少した。人工呼吸数の増加に伴うPaO₂の増加率は、4ppm暴露群で有意に減少した。

Abstract

Rats were exposed continuously for 9 months to nitrogen dioxide at 0.04, 0.4 and 4 ppm, and heart rate (HR), respiratory rate (RR), arterial blood oxygen tention (PaO₂), carbon dioxide tention (PaCO₂) and pHa of the control and experimental animals were examined. HR of exposed rats was not significantly different from the control, however, RR of rats exposed to 0.4 ppm were significantly

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, Tsu¹

decreased. PaO₂ of unanesthetized rats exposed to 0.4 and 4 ppm NO₂ were significantly lower. When the anesthetized rats was ventilated with mechanical respirator at 30, 70 and 110 rpm, PaO₂ of rats exposed to 0.4 and 4 ppm NO₂ were also significantly lower. Rate of increase in PaO₂ with increasing rate of mechanical respirator was significantly lower in rats exposed to 4 ppm NO₂.

はじめに

近年、アイトープを使用した実験^{1),2)}等によって、NO₂の生体内における動態が明らかにされようとしている。しかしながら、NO₂の第一次標的臓器が呼吸器であることは言うまでもない。したがって、従来から呼吸器に関する病理学的、生化学的実験報告は多く、比較的高濃度のNO₂暴露は、呼吸器の形態学的変化あるいは代謝機能の変化を引き起こすことが明らかにされている。一方、呼吸器は生体にとってガス交換の場として非常に重要な意味を有している。すなわち、外界の酸素を生体内に取り込み、体内の二酸化炭素を外に排出する機能である。したがって、呼吸器に何らかの変化が生じた場合、肺を介するガス交換機能に変化が及ぶことが推測される。そしてこの変化は、肺と各種組織を循環する血液ガス成分に及ぶであろう。NO₂暴露の血液ガス成分の変化に関して、動脈血酸素分圧の低下が、ヒト^{3),4)} および実験動物^{5),6)} で報告されているが、ヒト^{3),4)} での報告は低濃度・短時間暴露であり、また動物での報告^{5),6)} は比較的高濃度の暴露である。したがって低濃度かつ長期の暴露が実験動物の血液ガス成分に及ぼす影響については不明の点が多い。

そこで、NO₂の低濃度・長期暴露の生体への影響を評価するための一手段として、NO₂暴露動物の動脈血 pH_a, PaCO₂, PaO₂, 呼吸数、心拍数および呼吸曲線図について検討を加えた。

方 法

JCL:Wistar 系雄ラットを使用し、0.04, 0.4, 4 ppmのNO₂を9か月間暴露した。被検動物が8週令の時に暴露を開始した。暴露終了後、ラットをチャンバーから出して、呼吸数、心拍数、呼吸曲線図 (Pneumotachogram, PTG と略す) および血液ガスについて検索した。呼吸数はPTGから、心拍数は心電図から算出した。血液ガス分析は、無麻酔下で、およびPentobarbital麻酔下で人工呼吸数を毎分30, 70, 110回に変化させて行った。心電図、PTG および無麻酔時の血液ガスの分析はチャンバーから出して10~20分以内に行い、その後直ちに麻酔下で気管カニューレを挿入し人工呼吸下で採血を行った。なお供試動物およびNO₂ガス暴露方法について他項に詳述してあるのでここでは省略する。また、採血、血液ガス分析、PTG、心電図の記録方法については、本シリーズ「二酸化窒素暴露がラットの動脈血 pH_a, PaCO₂ および PaO₂ に及ぼす影響」の項に詳述した。

結 果

1. 呼吸数および心拍数の変化

NO₂ 9 か月間暴露の呼吸数および心拍数の変化を図1に示す。それぞれ10秒間の測定値である。対照群と暴露群との心拍数の間にほとんど差を認めなかった。呼吸数は、対照群と比較して0.04 ppm 暴露および4 ppm 暴露では有意な差がなかったが、0.4 ppm 暴露では対照群の約73%と有意 ($p < 0.01$) に減少した。

2. 呼吸曲線図 (PTG) の振幅の変化

呼吸数を算出する基となった呼吸曲線図について、その最大振幅 (上端のピークと下端のピークとの差) を求め図2に示した。各暴露群に平均値の変動が観察されたが、対照と比較して、いずれの場合も有意な変化ではなかった。

3. 動脈血 pH_a, PaCO₂, および PaO₂ の変化

9 か月間暴露直後に、無麻酔下で大腿動脈から採血した血液について pH_a, PaCO₂ および PaO₂

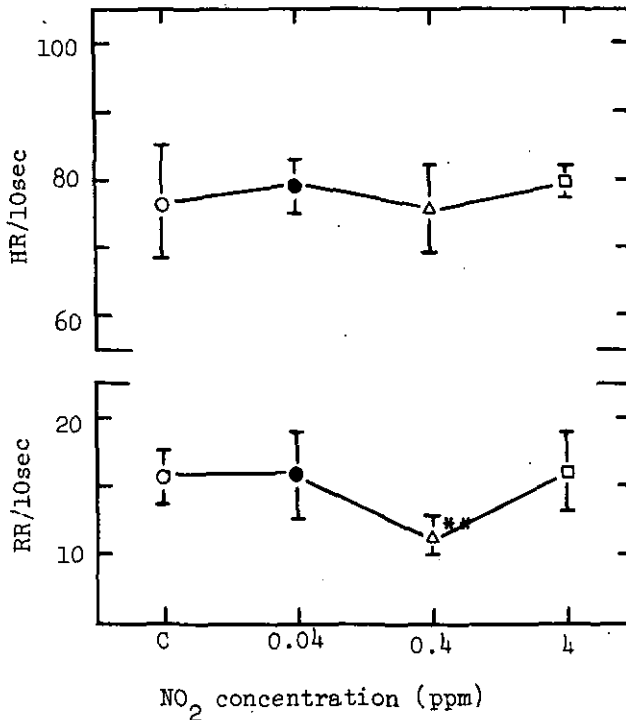


図 1 NO₂ 9 か月間暴露が呼吸数 (RR) と心拍数 (HR) に及ぼす影響

Fig. 1 Effect of NO₂ exposure on RR and HR in rats
($m \pm SD$, $n = 6$, **: $P < 0.01$)

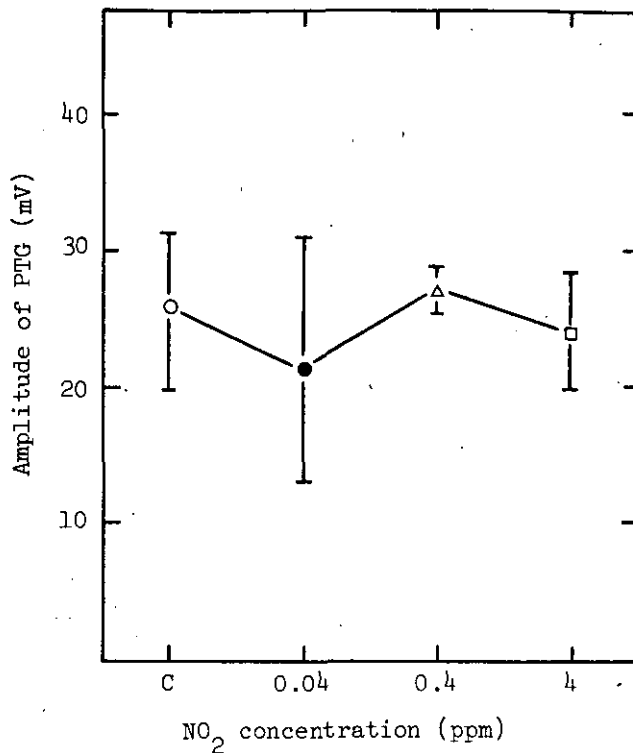


図 2 呼吸曲線図 (PTG) の振幅の変化

Fig. 2 Effect of NO₂ exposure on amplitude of PTG with spontaneous respiration
($m \pm SD$, $n = 6$)

を測定した。その後、ネンブタール (Pentobarbital sodium 30mg/kg, B. W. iv) 麻酔下で人工呼吸器を使い、呼吸数が毎分30回、70回および110回の条件下で同一個体から一回当たり0.2~0.3ml ずつ頸動脈から採血し検索に供した。

無麻酔時における動脈 pHa, PaCO₂ および PaO₂ の変化を図3に示した。暴露群の pHa および PaCO₂ は、対照群と比較して、有意な差を示さなかったが、PaO₂ は、0.4ppm 暴露で対照群の約91% ($P < 0.05$), 4ppm 暴露で約92% ($P < 0.001$) と有意な減少を示した。次に人工呼吸下で測定した結果を図4~図6に示した。pHa は図4に示す通り、毎分30回、70回および110回の人工呼吸下においても、対照群と各暴露群との間に有意な変化を認めなかった。PaCO₂ は図5に示すように、毎分30回では4ppm 暴露で、70回と110回では0.4ppm ($P < 0.1$) と4ppm 暴露で増加傾向を認めた。また、PaO₂ の変化は図6に示すように、0.4ppm 暴露では、毎分30回で対照群の約68%, 70回で約66%, 110回で約67% と有意 ($P < 0.05$) に減少し、4ppm 暴露では、30回で約79% ($P < 0.05$), 70回で約67% ($P < 0.01$), 110回で約60% ($P < 0.001$) と有意に減少した。毎分110回の人工呼吸

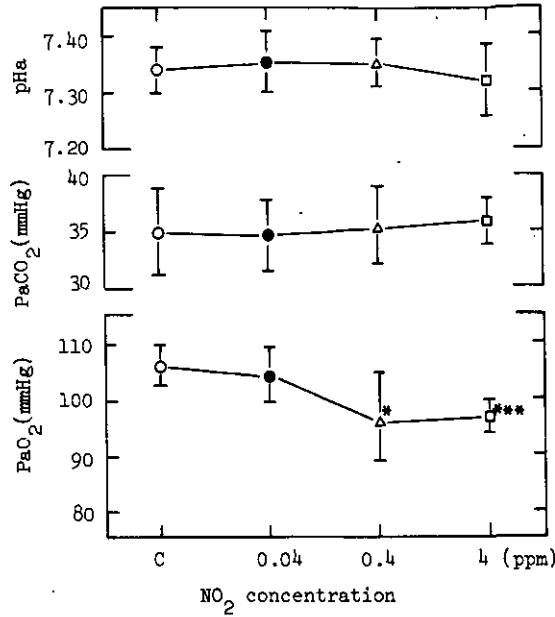


図 3 動脈血 pHa, PaCO₂, PaO₂ に及ぼす影響 (無麻醉時)

Fig. 3 Effect of NO₂ exposure on arterial blood pHa, PaCO₂ and PaO₂ in unanesthetized rats

($m \pm SD$, $n = 6$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, c : control)

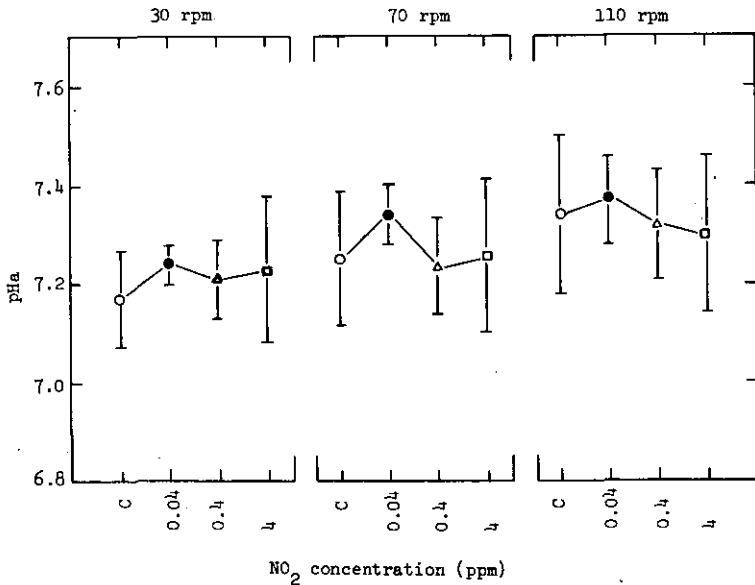


図 4 動脈血 pHa に及ぼす影響 (麻醉, 人工呼吸時)

Fig. 4 Changes of pHa in arterial blood of anesthetized rats exposed to NO₂

(ventilated with mechanical respirator, $m \pm SD$, $n = 6$)

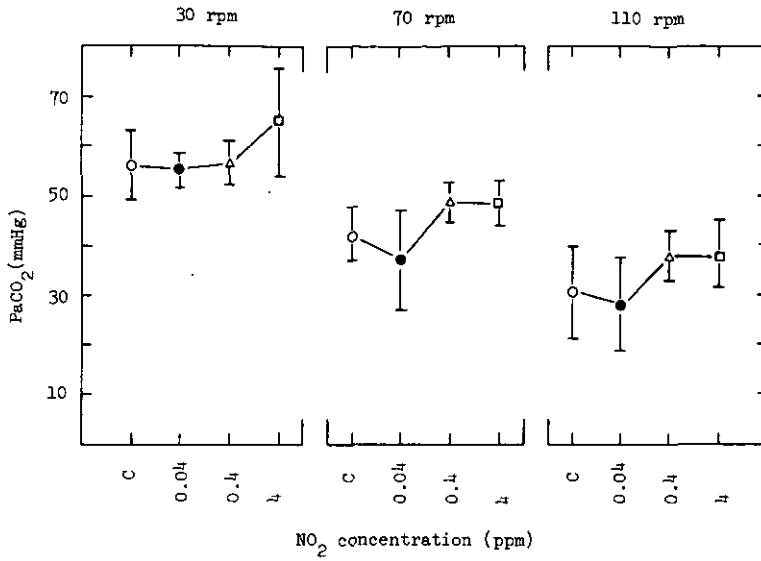


図 5 動脈血 PaCO₂ に及ぼす影響 (麻酔, 人工呼吸時)

Fig. 5 Changes of PaCO₂ in arterial blood of anesthetized rats exposed to NO₂ (ventilated with mechanical respirator, $m \pm SD$, $n = 6$)

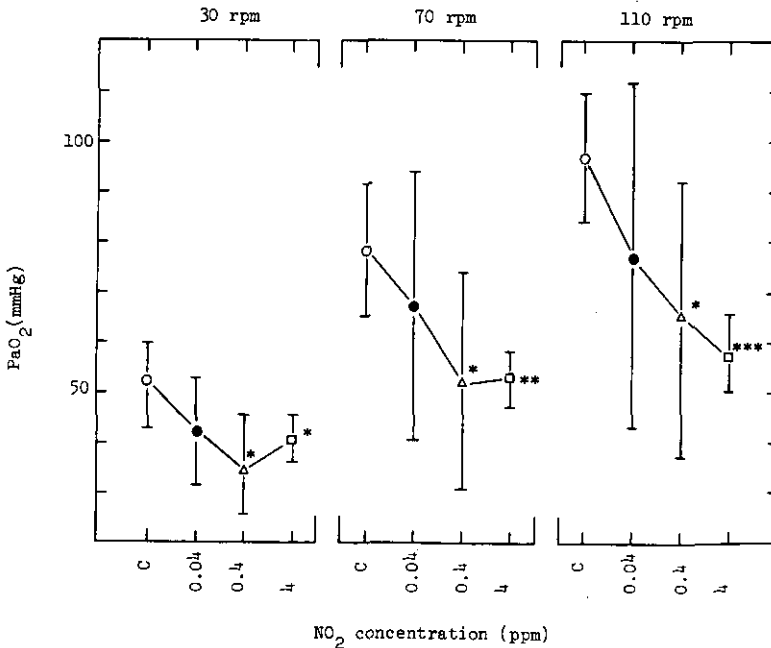


図 6 動脈血 PaO₂ に及ぼす影響 (麻酔, 人工呼吸時)

Fig. 6 Changes of PaO₂ in arterial blood of anesthetized rats exposed to NO₂ (ventilated with mechanical respirator, $m \pm SD$, $n = 6$, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)

回数では、NO₂濃度の増加に伴う PaO₂の著明な減少を認めた。

次に、人工呼吸数に対応した血液 pH_a、PaCO₂およびPaO₂の変化を検討するために、毎分30回の時の測定値に対する70回/分、110回/分の測定値の百分率を求め図7～9に示した。pH_aは図7に示すように、対照群と比較して有意ではないが、70回/分時および110回/分時の0.4ppmと4ppm暴露で減少傾向を示した。PaCO₂は図8に示すように、対照群と比較して、70回/分時および110回/分時の0.4ppm暴露で増加傾向を示したが有意な差ではなかった。また、PaO₂は、図9に示すように、4ppm暴露で70回/分時に対照群の約77.9% ($P < 0.05$)、110回/分時に約76% ($P < 0.01$)と有意に減少した。

4. 人工呼吸時におけるPTGの振幅の変化

毎分30回、70回および110回の人工呼吸を行い、その時の新鮮空気供給側（生体からみると吸気

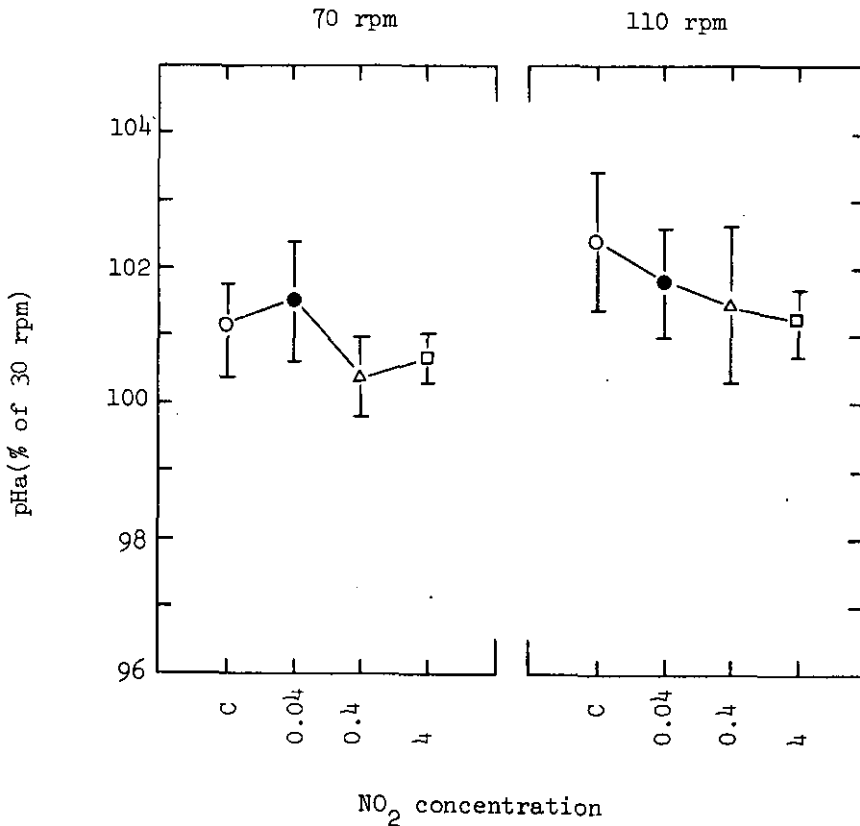


図 7 動脈血 pH_a の変化
(30回/分時に対する%で示す。)

Fig. 7 Changes of arterial blood pH_a
(% of 30 rpm, $m \pm SD$, $n = 6$)

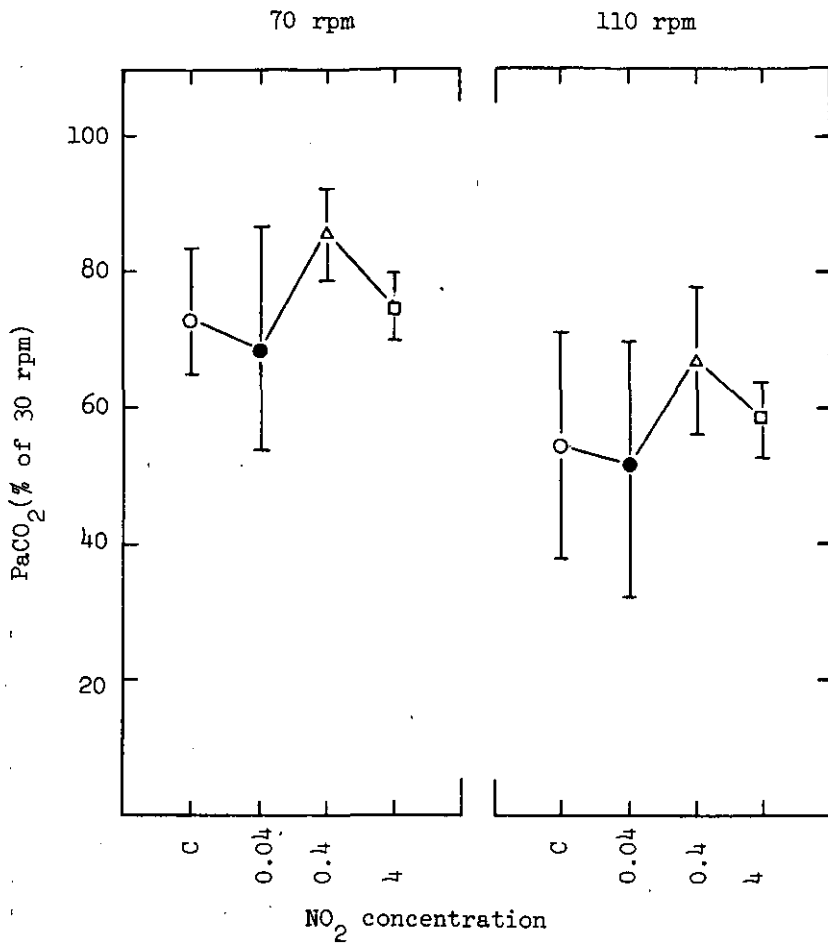


図 8 動脈血 PaCO₂ の変化
(30回/分時に対する%で示す。)

Fig. 8 Changes of arterial blood PaCO₂
(% of 30rpm, $m \pm SD$, $n = 6$)

側であるが、人工呼吸器からみると加圧側である。)から PTG を記録しその最大振幅の変化を図10に示した。PTG の振幅は、毎分30回では0.4ppmで減少傾向を示し、毎分70回および110回の4ppm暴露では増加傾向 ($P < 0.1$) を示した。

考 察

肺でのガス交換機能が障害されると、生体は酸素不足を引起し、さらに、二酸化炭素を蓄積することによっていわゆる呼吸不全の状態になることが知られており、その程度は血液ガス分析によ

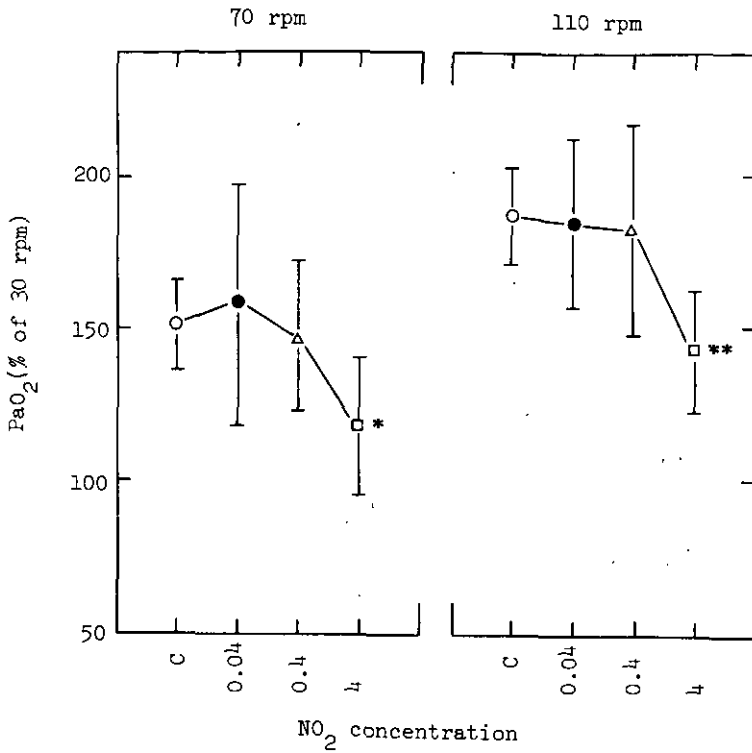


図 9 動脈血 PaO₂ の変化
(30回/分時に対する%で示す。)

Fig. 9 Changes of arterial blood PaO₂
(% of 30 rpm, $m \pm SD$, $n = 6$, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)

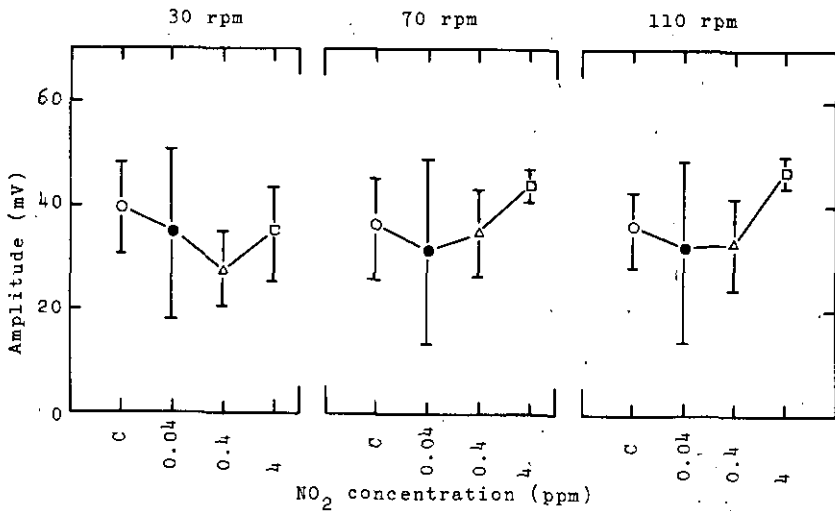


図 10 人工呼吸の PTG の変化

Fig. 10 Changes of PTG ventilated with mechanical respirator

て知ることができると言われている。NO₂の第一次標的臓器が呼吸器であり、比較的高濃度のNO₂暴露は呼吸器の器質的、機能的変化を生ずることから、その影響のは握のために血液ガスの分析をすることは有意義であると考え、低濃度のNO₂を長期間（9か月間）暴露したラットについて血液ガス分析を試みた。その結果、無麻酔時の pHa と PaCO₂ に大きな変化は認められなかったが、PaO₂ は0.4ppm暴露と4 ppm暴露で有意な減少を示した。この時、対照群と各暴露群間の心拍数に有意な差は認められなかったが、呼吸数が0.4ppm群で有意に減少した。一般に、一定量の換気を維持するためには、呼吸数が減少した場合呼吸様式の変化で対応することが知られているが、本実験における0.4ppm暴露ではPTGの振幅の変化は認められていない。したがって0.4 ppm暴露におけるPaO₂の減少は呼吸数の減少に伴う換気量の減少によるのかもしれない。ところで、NO₂暴露において呼吸数の増加を認める報告^{11),12)}は多いが、本実験では呼吸数の増加を観察しなかった。この一因として、他の報告と異なり本実験では、血液ガス分析の採血を行うために、チャンバー外に出し、緊縛保定下で検索したことを挙げることでできよう。この項目は暴露中に検索する必要があるかもしれない。

Nieding ら^{3),4)}は5 ppm 15分暴露のヒトで、Freeman ら⁵⁾は平均15ppm生涯暴露のラットで、そして、Davidson ら⁶⁾は8-12ppm 3-4か月暴露の家兎で、それぞれ動脈血PaO₂の減少を報告したが、本実験の成績はより低濃度の4 ppm以下の9か月間暴露したラットにおいても顕著なPaO₂の減少が無麻酔時に観察されることを示している。

ところで、動物実験において、採血時の状態および採血方法等を一定の条件下に行うことは困難である。そこで、Freeman ら⁵⁾は軽い麻酔を施し、その醒めた時点で採血し、またDavidson ら⁶⁾は無麻酔下で採血した。麻酔の状態および無麻酔における興奮は、血液ガス分析値の変動を起こさせるものであるから、前者の方法は麻酔の影響を、後者の方法はあばれ等の影響を無視することはできない。したがって著者らの実験では、前述の影響を少なくするために、麻酔下で人工呼吸器を使用し換気量を一定にさせることを試みた。同一人工呼吸回数における血液ガス分析の結果、毎分70回および110回時の0.4ppmと4 ppm暴露群でPaCO₂の増加傾向を、また毎分30,70回および110回時の0.4ppmおよび4 ppm暴露でPaO₂の減少を認めた。血液ガスの変動に及ぼす生理学的要因を大別すると、1) 換気量、2) ガス交換能、3) 循環血量、4) 組織での代謝活性の4点を挙げるができる。PaO₂とCO₂の変化はガス交換の障害を示唆するものであるが、暴露動物では組織での代謝が対照群に比較し活発で酸素消費が多い^{7),8)}可能性も残る。しかしながら同一個体を使用して換気量を変化させた時の血液ガスの変化は、同一個体では循環血量および組織での代謝活性に大きな変化がないと仮定すれば、ガス交換能と深い係りを持つと考えることができる。毎分30回時の測定値に対する70回および110回時の測定値の百分率を計算し、対照群と比較したところ4 ppm暴露において70回/30回値および110回/30回値に有意なPaO₂の減少を観察した。このことは、換気量の増加に伴う血中PaO₂の増加が4 ppm暴露群で少ないことを示し、呼吸器におけるガス交換を抑制さ

せていることを推測させた。しかし、人工呼吸器の駆出量および回数を一定にした場合も、肺での換気量が一定だと必ずしも言えない。なぜならばNO₂暴露のように末梢気管支に病理学的変化を引起こすような場合には、人工呼吸器によって送り込まれた空気が暴露動物では肺胞内まで達しにくいことも考えられるからである。実際、著者らは人工呼吸時のPTGの振幅の増大を4 ppm暴露の毎分70回および110回で認めた。この振幅の増大は、気道の狭窄等によって気流低抗が増加した場合にも観察されるものであり、この所見は、末梢気管支上皮の増生による狭窄という病理学的所見^{9),10)}と一致すると考えられた。したがって4 ppm暴露におけるPaO₂の減少は、気道および肺胞を含む呼吸器の器質的、機能的変化に起因すると考えることができる。また0.4 ppm暴露での変化の解釈にはより詳しい検討が必要であると考えられた。

引用文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Nieding, G. von, H. Krekeler, U. Smidt and K. Muysers (1970) : Akute Wirkung von 5 ppm NO₂ auf die Lungen-und Kreislauf funktion des gesunden Menschen. *Int. Arch. Arbeitmed.*, **27**, 234—243.
- 4) 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.
- 5) Freeman, G., S. C. Crane, N. J. Furiosi, R. J. Stephens, M. J. Evans and W. D. Moore (1972) : Covert reduction in ventilatory surface in rats during prolonged exposure to subacute nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **106**, 563—579.
- 6) Davidson, J. T., G. A. Lillington, G. B. Haydon and K. Wasserman (1967) : Physiologic changes in the lungs of rabbits continuously exposed to nitrogen dioxide. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **95**, 790—796.
- 7) Buckley R. D. and O. J. Balchum (1965) : Acute and chronic exposures to nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **10**, 220—223.
- 8) Buckley R. D. and C. G. Loosli (1969) : Effects of nitrogen dioxide Inhalation on germfree mouse lung. *Arch. Environ. Health*, **18**, 588—595.
- 9) Furiosi, N. J., S. C. Crane and G. Freeman (1973) : Mixed sodium chloride aerosol and nitro-

gen dioxide in air. Biological effects on monkeys and rats. Arch. Environ. Health, 27, 405—408.

- 10) Rejthar, L. and A. Rejthar (1975) : Histological changes of terminal bronchioles in rats during exposure to nitrogen dioxide. Exp. Path., 10, 245—250.
- 11) Freeman, G., N. J. Furiosi and G. B. Haydon (1966) : Effects of continuous exposure of 0.8 ppm NO₂ on respiration of rats. Arch. Environ. Health, 13, 454—456.
- 12) Freeman, G., R. J. Stephens, S. C. Crane and N. J. Furiosi (1968) : Lesion of the lungs in rats continuously exposed to two parts per million of nitrogen dioxide. Arch. Environ. Health, 17, 181—192.

II-5

二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響

—血液性状—

Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rats

—Blood Examinations—

市瀬孝道¹・鈴木 明¹・局 博一¹・織田 肇¹

Takamichi ICHINOSE¹, Akira SUZUKI¹,

Hirokazu TSUBONE¹ and Hajime ODA¹.

要 旨

NO₂暴露の生体への影響を解明するため、Wistar系ラットを用い、0.04, 0.4, 4 ppmのNO₂を9, 18か月間暴露し、臨床血液・生化学的検査値について検討した。

グルコースが0.04ppm以上の9か月間暴露で有意な増加を示した。グルタミン酸・オキサロ酢酸トランスアミナーゼが4 ppm, 9か月間暴露で、白血球数が0.4ppm, 18か月間暴露で、アルカリホスファターゼが4 ppm, 18か月間暴露で有意な減少を示した。

Abstract

The value of clinical examinations were determined using the blood and sera of rats exposed to 0.04, 0.4 and 4 ppm NO₂ for 9 and 18 months. Glucose in sera of rats exposed to 0.04, 0.4 and 4 ppm NO₂ for 9 months was significantly increased. However, white blood cell in blood of rats exposed to 0.4 ppm NO₂ for 9

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

months, glutamic oxalacetic transaminase in sera of rats exposed to 4 ppm NO₂ for 9 months, and alkaline phosphatase in sera of rats exposed to 4 ppm NO₂ for 18 months were significantly decreased.

はじめに

大気汚染物質の一種であるNO₂は、アイソトープを使用した実験^{1),2)}あるいは血中のNO₂, NO₃を測定した実験³⁾によって生体内に取り込まれることが確認された。したがって、NO₂は第一次標的臓器といわれる呼吸器だけでなく、他の生体内臓器へも影響を及ぼすことが推測される。動物実験において、NO₂ガスの呼吸器以外の臓器への影響に関する生化学的、血液学的研究報告がいくつかみられる。例えば、血液、血清に関して、Kosmiderら⁴⁾は1 ppm 1か月間暴露のモルモットで総タンパクとコリンエステラーゼの減少を、小此木ら⁵⁾は0.12ppm, 1.28ppm, 5.28ppmおよび18.3 ppm 35日間暴露ラットで血中GSHの減少を、Ehrmanら⁶⁾は5—10ppm 1時間暴露のマウスで赤血球数とヘモグロビンの減少を、Freemanら^{7),8)}は2 ppm 2—3週間暴露のラットで赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビンの増加を、Furiosiら⁹⁾は2 ± 1 ppm 2か月間暴露のサルで赤血球の増加を、嵯峨井と有川¹⁰⁾は0.4, 1.6および6.4 ppm 3か月間暴露のラットで、血清中の総脂質、トリグリ、総コレステロールが経時的に多様な変動をすることを、報告した。これらの報告はNO₂暴露が血液、血清中の成分に変動を起こさせることを示しているが、一方、Carsonら¹¹⁾は39と53 ppm 1時間、52と85ppm 15分、125と164ppm 5分暴露のイヌではヘマトクリット値および血小板数に変化がないことを、Wagnerら¹²⁾は1 ppmと25ppmを1日6時間18か月間暴露したイヌでは何らの血液学的変化が認められないことを報告した。これらのことは暴露方法、期間そして動物種等の違いによってNO₂の血液、血清への影響が多様であることを示唆している。また臓器に関しては、Buckleyら¹³⁾は、15ppm 26, 33, 40日間暴露のモルモットで、肝、腎のLDH活性量の変動を、同じくBuckley¹⁴⁾らは10ppm NO₂ 32日間暴露で肝のアルドラーゼ活性の上昇を、12日間暴露で肝の、26日から腎のLDHの上昇を報告した。このように、NO₂の呼吸器以外の臓器および血液、血清への影響を示唆する動物実験があるが、その報告は多様で必ずしも一致した見解に至らず、現在のところ不明な点が多いといえよう。

ところで、各種の臨床検査値はヒトでは疾病の診断、治療および予防に用いられ、生体内の各種臓器の機能や代謝を反映し、主要臓器の病態等を知る上で有効な手法であるといわれている。したがって、NO₂の影響が臓器に及んだ場合、臨床検査値の変動を引起すことが予測される。さらに、NO₂の長期間暴露のように、肺以外のどの臓器に影響が現れるか不明な場合には、臓器への影響の全体像をは握するために臨床検査値を使用することは適当であろう。

そこで、NO₂の生体への影響を解明するための一手段として、NO₂暴露動物の血液性状について、臨床検査的手法により検討した。

方 法

JCL: Wistar系雄ラットを0.04, 0.4, 4 ppmのNO₂に9 および18か月間暴露した。対照群を含め各群6匹とし、2回繰返したので総計96匹のラットを使用した。暴露終了後エーテル麻酔下で、頸動脈から採血し、ヘパリン血と血清に分離した。ヘパリン血については、赤血球数 (RBC), ヘマトクリット値 (Ht), ヘモグロビン量 (Hb) を定法に従って測定し、平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球色素量 (MCH), 平均赤血球色素濃度 (MCHC) を算出した。血清については、血糖 (Glu), アルトラーゼ (Ald), 乳酸脱水素酵素 (LDH), クレアチンホスホキナーゼ (CPK), 総タンパク (TP), グルタミン酸・オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT), グルタミン酸・ピルビン酸トランスアミラーゼ (GPT), 総コレステロール (TCh), アルブミン (Alb), 血液尿素窒素 (BUN), アルカリホスファターゼ (ALP), およびコリンエステラーゼ (ChE) を血清自動分析装置GEMSAEC (Electronucleonic社) を使用して測定した。測定項目及び略号と測定方法は表1の通りである。また赤血球の脆弱性を、ヘパリン血を用いて、CPC (Coil Planet Centrifuge) 法を用いて測定した。

図 1 臨床検査の測定項目及び略号と測定法

Table 1. Chincial examination.
Components, abbreviations and methods.

Component	Abbreviation	Method
Blood		
Red blood cell	RBC	} Bürker-Türk
White blood cell	WBC	
Hematocrit	Ht	Capillary
Mean corpuslar Volume	MCV	} Wintrobe's Constant
Mean corpuslar hemoglobin	MCH	
Mean corpuslar hemoglobin concentration	MCHC	
Sera		
Glucose	Glu	Hexokinase
Aldorase	Ald	Bergmeyer
Lactic dehydrogenase	LDH	W-L-Henry
Creatine phosphokinase	CPK	Oliver
Total protein	TP	Biuret
Glutamic oxalacetic transaminase	GOT*	Karmen-Henry
Glutamic pyruvic transaminase	GPT**	W-L-Henry
Total cholesterol	TCh	CHOD/PHP
Albumin	Alb	BCG
Blood urea nitrogen	BUN	Urease U V
Alkaline phosphatase	ALP	Bessy-Lowry
Cholinesterase	ChE	Ellmah

* AST: Aspartate aminotransferase.

** ALT: Alanin aminotransferase.

結 果

RBC, WBC, Ht, Hb, MCV, MCH, MCHCの暴露濃度と暴露期間に伴う変化の第1回目の結果を表2に, 第2回目の結果を表3に示した。

第1回目の実験では, 9か月間4 ppmNO₂暴露で, MCVが対照群と比較して有意 ($P < 0.05$) な増加を示し, 18か月間0.4ppm暴露で, WBCが対照群と比較して有意 ($P < 0.05$) に減少した。

第2回目の実験では, 9か月間0.04ppmと0.4ppm暴露で, MCHCが対照群と比較して有意 ($P < 0.05$) に減少を示した。また18か月間0.04ppm暴露でRBCが ($P < 0.05$), 0.4ppm暴露でRBC ($P < 0.01$); WBC ($P < 0.001$) が対照群と比較して有意に減少した。

2回の実験ともに0.4ppm18か月間暴露で, WBCが有意な減少を示した。

Glu, Ald, LDH, CPK, TP, GOT, GPT, TCh, Alb, BUN, ALP, ChEの暴露濃度と暴露期間に伴う変化の第1回目の実験結果を表4に, 第2回目の実験結果を表5に示した。

第1回目の実験では, 9か月間0.04ppm暴露で, Gluが対照群と比較して有意に増加 ($P < 0.001$), Albが有意に減少 ($P < 0.05$) し, 0.4ppm暴露で, Gluが有意 ($P < 0.05$) に増加, Albが有意 (P

表 2 NO₂ガス暴露が血液成分に及ぼす影響 (第1回目実験結果)

Table 2. Chronic effect of NO₂ exposure for 9 months and 18 months on blood components

A result of 1 st examination,
 $m \pm SD$, $n = 6$, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

		NO ₂ Concentration			
		Control	0.04ppm	0.4ppm	4 ppm
RBC ($\times 10^4$)	9	939 \pm 199	750 \pm 58	760 \pm 69	720 \pm 110
	18	852 \pm 124	873 \pm 169	859 \pm 97	755 \pm 73
WBC ($\times 10^2$)	9	41.3 \pm 15.6	54.0 \pm 5.9	56.0 \pm 6.3	39.0 \pm 6.8
	18	64.7 \pm 8.6	61.8 \pm 8.0	44.8 \pm 7.5*	77.3 \pm 8.5
Ht (%)	9	47.0 \pm 1.7	47.3 \pm 1.3	46.4 \pm 1.9	47.9 \pm 2.0
	18	46.6 \pm 2.7	43.4 \pm 4.5	44.4 \pm 4.9	44.5 \pm 2.9
Hb (%)	9	15.4 \pm 1.6	15.0 \pm 1.0	16.6 \pm 1.3	15.3 \pm 1.2
	18	17.6 \pm 1.4	15.9 \pm 1.9	15.9 \pm 2.3	17.4 \pm 1.5
MCV (μ^3)	9	51.9 \pm 10.8	63.2 \pm 3.9	61.4 \pm 5.1	67.6 \pm 9.7*
	18	55.6 \pm 7.0	53.4 \pm 5.8	51.8 \pm 2.8	59.2 \pm 4.2
MCH (pg)	9	17.0 \pm 3.8	20.0 \pm 2.3	22.0 \pm 3.3	21.6 \pm 3.8
	18	21.3 \pm 4.3	18.6 \pm 2.8	18.6 \pm 0.9	22.9 \pm 0.9
MCHC (%)	9	32.7 \pm 2.9	31.7 \pm 2.7	35.7 \pm 2.7	31.9 \pm 2.0
	18	37.8 \pm 3.2	36.5 \pm 1.6	35.7 \pm 1.9	38.9 \pm 2.3

表 3 NO₂ガス暴露が血液成分に及ぼす影響 (第2回目実験結果)

Table 3. Chronic effect of NO₂ exposure for 9 months and 18 months on blood components

A result of 2nd examination.

$m \pm SD$, $n = 6$, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

		NO ₂ Concentration			
		Control	0.04ppm	0.4ppm	4 ppm
RBC ($\times 10^4$)	9	974 \pm 203	917 \pm 171	840 \pm 102	926 \pm 60
	18	1071 \pm 220	830 \pm 129*	788 \pm 135**	956 \pm 116
WBC ($\times 10^3$)	9	45.7 \pm 16.0	40.2 \pm 13.5	46.3 \pm 9.2	48.5 \pm 11.8
	18	43.8 \pm 8.6	33.3 \pm 10.8	21.4 \pm 3.6***	45.9 \pm 16.8
Ht (%)	9	45.4 \pm 5.9	48.5 \pm 1.6	48.7 \pm 1.6	47.8 \pm 1.8
	18	46.5 \pm 0.9	48.1 \pm 2.0	46.5 \pm 5.2	47.6 \pm 4.1
Hb (%)	9	16.4 \pm 1.7	16.5 \pm 0.4	16.1 \pm 0.5	16.8 \pm 0.5
	18	15.9 \pm 1.8	15.7 \pm 1.1	15.3 \pm 2.0	16.8 \pm 1.6
MCV (μ^3)	9	46.7 \pm 8.3	52.9 \pm 6.6	58.0 \pm 7.4	51.6 \pm 4.8
	18	40.8 \pm 8.5	59.4 \pm 8.7**	69.2 \pm 16.5	50.3 \pm 5.5
MCH (pg)	9	16.5 \pm 2.9	17.2 \pm 0.6	18.7 \pm 2.8	17.3 \pm 1.2
	18	13.8 \pm 2.5	19.2 \pm 2.8**	23.0 \pm 6.0**	17.7 \pm 1.8*
MCHC (%)	9	36.2 \pm 1.6	33.9 \pm 0.9*	33.7 \pm 1.1*	35.1 \pm 1.9
	18	34.2 \pm 3.9	32.6 \pm 1.3	33.1 \pm 1.1	35.2 \pm 0.8

<0.05) に減少し, 4 ppm暴露では, Gluが対照群と比較して有意に増加し, GOTが有意($P < 0.05$)に減少した。18か月間0.04ppm暴露ではGPTが, 0.4ppm暴露でBUNが, 4 ppm暴露ではTCh, BUN, ALPが有意($P < 0.05$)に減少した。

第2回目の実験では, 9か月間0.04ppm暴露で, 対照群と比較してGlu ($P < 0.05$), TP, Alb, BUN ($P < 0.001$), ALP ($P < 0.05$)が有意に増加し, 0.4ppm暴露では, Glu, TP ($P < 0.01$), Alb, BUN ($P < 0.001$), ALP ($P < 0.05$)が有意に増加し, 4 ppm暴露では, Glu ($P < 0.05$), TP, BUN ($P < 0.01$), Alb ($P < 0.001$)が有意に増加し, GOTが有意($P < 0.01$)に減少した。また18か月間4 ppm暴露で, ALPが対照群と比較して有意($P < 0.05$)に減少した。

2回の実験ともに0.04, 0.4, 4 ppm 9か月間暴露で, Gluが有意な増加を示し, 4 ppm 9か月間暴露でGOTが有意に減少を示し, また4 ppm 18か月間暴露で, ALPが有意な減少を示した。

次に, RBC, WBC, Ht, Hb, MCV, MCH, MCHCについて対照群の平均値を100%とした時の9か月間暴露群の平均値の変化を図1に, 18か月間暴露群の平均値の変化を図2に示した。この図で, 実線は第一回目の実験結果を, 破線は第二回目の実験結果を示す。9か月間暴露では図1に

表 4 NO₂ガス暴露が血清成分に及ぼす影響 (第1回目実験結果)

Table 4. Chronic effect of NO₂ exposure for 9 months and 18 months on clinical biochemical examination in sera of rats

A result of 1st examination,

$m \pm SD$, $n = 6$, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

		NO ₂ Concentration			
		Control	0.04ppm	0.4ppm	4 ppm
Glu (mg/100ml)	9	150±12	193±17***	204±50*	181±14*
	18	149±13	136±16	153±11	162±14
Ald (mu/ml)	9	68.3±14.1	68.2±5.7	61.0±11.5	56.0±16.5
	18	31.3±4.7	30.8±6.1	38.2±7.0	30.3±2.4
LDH (mu/ml)	9	923±298	914±272	861±177	733±380
	18	1123±332	1077±337	1107±242	1046±202
CPK (mu/ml)	9	958±304	864±154	717±335	752±285
	18	952±506	1212±718	1276±378	873±180
TP (g/100ml)	9	8.96±0.21	7.95±0.98	8.02±1.10	7.66±1.76
	18	6.72±0.21	6.76±0.25	6.61±0.27	6.54±0.10
GOT (mu/ml)	9	115±38	135±60	120±26	101±27*
	18	117±9	115±26	130±43	122±39
GPT (mu/ml)	9	32.8±15.0	38.8±12.5	36.7±8.5	30.3±5.1
	18	32.1±3.6	28.1±1.2*	32.0±4.8	27.9±3.1
TCh (mg/100ml)	9	114±9	103±19	91±23	95±20
	18	90.9±10.1	81.0±17.5	79.0±11.5	71.0±5.4*
Alb (g/100ml)	9	4.40±0.53	3.65±0.36*	3.68±0.33*	4.40±0.32
	18	2.88±0.09	2.78±0.08	2.82±0.13	2.82±0.05
BUN (mg/100ml)	9	27.3±2.7	25.3±5.0	29.0±3.0	27.7±3.8
	18	18.6±1.4	16.3±1.1	15.8±0.8*	15.6±0.9*
ALP (mu/ml)	9	60.2±11.1	61.5±16.5	61.8±27.8	51.2±13.7
	18	74.8±7.8	60.0±16.9	62.2±12.1	53.0±10.1*
ChE (mg/ml)	9	1014±304	1028±275	1021±151	1124±267
	18	779±227	564±128	624±105	508±33

示すように対照群と比較して、RBCが0.04, 0.4, 4 ppmで2回の実験とも減少傾向を、MCVが0.04ppm, 0.4ppmと4 ppmで、MCHが0.4ppmで増加傾向を示した。また18か月間暴露では、図2に示すように0.4ppm暴露のWBCが2回の実験とも顕著な減少を示した。また、Glu, Ald, LDH, CPK, TP, GOT, GPT, TCh, Alb, BUN, ALP, ChEについて対照群の平均値を100%とした時の9か月間の暴露群の変化を図3に、18か月間暴露群の平均値の変化を図4に示した。図2と

表 5 NO₂ガス暴露が血清成分に及ぼす影響 (第2回目実験結果)

Table 5. Chronic effect of NO₂ exposure for 9 months and 18 months on clinical biochemical examination in sera of rats

A result of 2 nd examination,

$m \pm SD$, $n = 6$, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

		NO ₂ Concentration			
		Control	0.04ppm	0.4ppm	4 ppm
Glu (mg/100ml)	9	109±32	161±20*	157±9**	148±7*
	18	164±41	162±10	169±24	159±43
Ald (mu/ml)	9	57.7±19.8	43.0±13.0	42.2±13.0	55.4±14.2
	18	29.8±13.1	31.9±6.2	35.6±11.8	43.2±26.9
LDH (mu/ml)	9	889±514	809±286	805±348	988±245
	18	779±348	815±301	898±316	729±344
CPK (mu/ml)	9	807±395	733±241	681±299	1023±169
	18	866±519	781±172	1012±447	1208±824
TP (g/100ml)	9	6.59±0.38	7.66±0.13***	8.07±0.18**	7.25±0.19**
	18	8.07±0.88	7.99±1.06	9.16±0.77	8.43±1.11
GOT (mu/ml)	9	127±46	111±34	99±31	75±13**
	18	105±30	138±103	94±18	82±16
GPT (mu/ml)	9	32.2±17.0	33.3±13.0	23.7±5.7	22.2±10.4
	18	24.2±9.6	24.3±2.0	19.3±5.3	19.8±6.1
TCh (mg/100ml)	9	81±33	103±11	109±21	98±13
	18	109±17	92±29	109±23	110±15
Alb (g/100ml)	9	3.13±0.08	3.59±0.13***	3.72±0.20***	3.52±0.09***
	18	3.06±0.23	3.23±0.35	3.58±0.27**	3.21±0.12
BUN (mg/100ml)	9	15.7±1.1	32.4±0.6***	24.3±3.9***	19.2±1.4**
	18	15.4±1.4	18.2±2.9	16.8±2.8	15.4±1.5
ALP (mu/ml)	9	43.7±15.0	68.7±18.4*	65.2±11.3*	52.3±12.5
	18	68.7±16.7	52.8±10.3	61.3±29.6	43.5±8.0*
ChE (mg/ml)	9	762±248	434±165	1037±212	849±124
	18	673±131	602±105	750±388	713±123

同様、実線は第1回目の実験を、破線は第2回目の実験結果を示す。9か月間暴露では、図3に示すように対照群と比較して、Gluが0.04ppm以上で顕著な増加を、GOTが4ppmで2回の実験とも顕著な減少を示した。また18か月間暴露では、図4に示すように、ALPが4ppm暴露で2回の実験とも顕著な減少と、0.04ppmと0.4ppmで減少傾向を示した。

CPC法により赤血球の脆弱性は、表6に示すように、9か月間、18か月間暴露とも、暴露濃度に

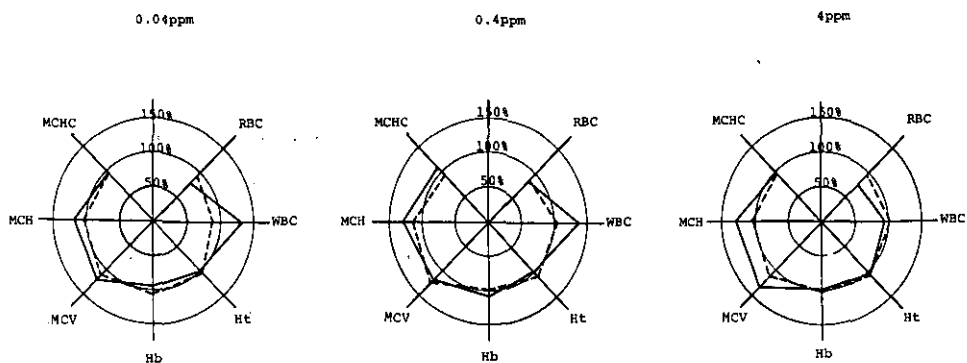


図 1 NO₂ 9か月間暴露における血液成分に及ぼす影響

Fig.1 Chronic effect of NO₂ exposure for 9 months on blood components of rats

Data are expressed as percent of control,
 solid line : 1 st experiment, dashed line : 2 nd experiment.

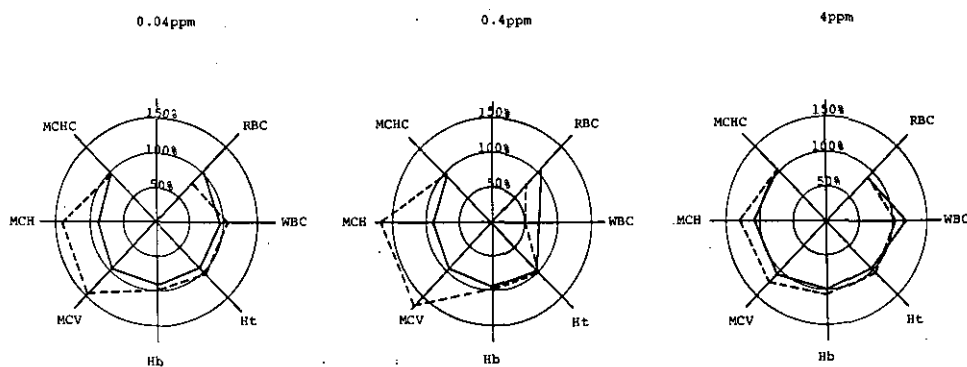


図 2 NO₂ 18か月間暴露における血液成分に及ぼす影響

Fig.2 Chronic effect of NO₂ exposure for 18 months on blood components of rats

Data are expressed as percent of control,
 solid line : 1 st experiment, dashed line : 2 nd experiment.

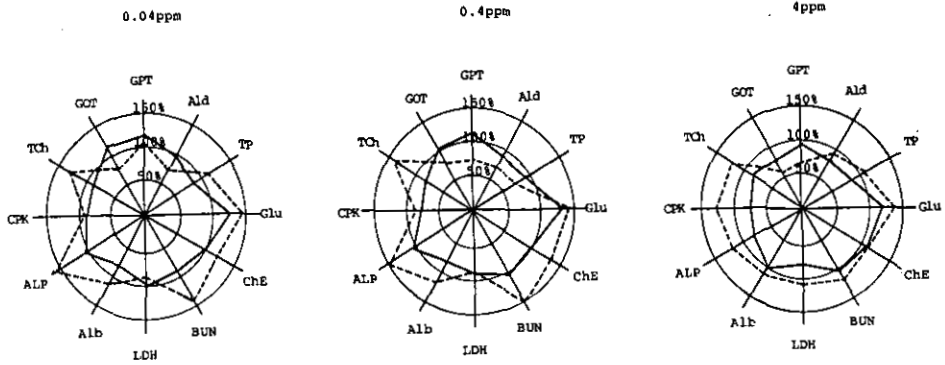


図 3 NO₂ 9か月間暴露における血清成分に及ぼす影響

Fig.3 Chronic effect of NO₂ exposure for 9 months on clinical biochemical examinations in sera of rats

Data are expressed as percent of control,
solid line : 1 st experiment, dashed line : 2 nd experiment.

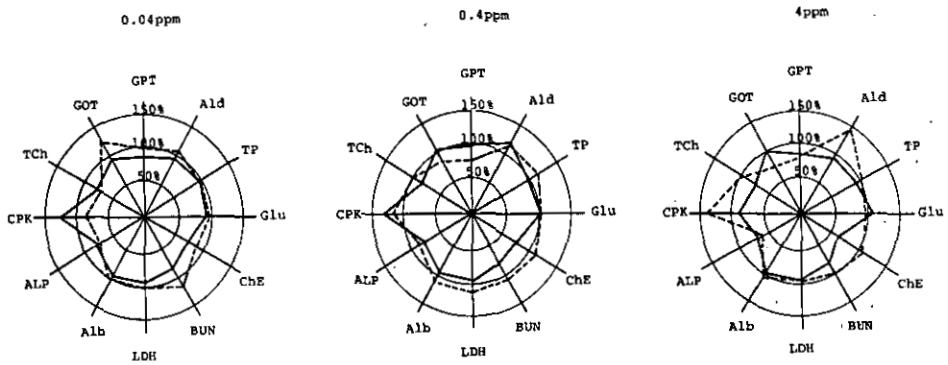


図 4 NO₂ 18か月間暴露における血清成分に及ぼす影響

Fig.4 Chronic effect of NO₂ exposure for 18 months on clinical biochemical examinations in sera of rats

Data are expressed as percent of control,
solid line : 1 st experiment, dashed line : 2 nd experiment.

表 6 NO₂暴露が赤血球の脆弱性に及ぼす影響

Table 6. Chronic effect of NO₂ exposure for 9 months and 18 months on the fragility of the blood red cells

period		Control	NO ₂ Concentration		
			0.04ppm	0.4ppm	4 ppm
9 M	Start	105.0±1.6	103.2±3.1	103.8±2.1	103.2±2.0
	Max	85.2±0.9	84.8±7.0	84.7±3.4	84.5±3.9
	End	64.7±1.4	63.8±4.4	62.8±2.5	65.0±2.7
18M	Start	99.5±4.4	102.2±2.1	103.3±1.4	99.7±3.2
	Max	76.2±5.0	77.8±2.0	79.0±2.6	77.5±2.0
	End	60.0±3.3	59.8±3.4	58.8±3.6	59.0±4.0

伴う変化は観察されなかった。

考 察

NO₂暴露が実験動物の血液および血清成分に多様な変化を引起すことはすでに報告されているが、本実験のように0.04, 0.4, 4 ppmのような低濃度のNO₂を長期間暴露した場合にも、血液・血清成分の多項目に多様な変化を引起すことが明らかとなった。今回、NO₂暴露を2回繰り返したが、本実験結果が示すように、第1回目と第2回目の検査成績が必ずしも一致しない項目も観察された。この理由として、他項の暴露方法と供試動物に述べられているように、第1回目と第2回目の検査時期および供試動物が異なることが挙げられるが、項目によっては変動しやすいために、本実験のような低濃度長期にわたる実験では、NO₂暴露以外の因子が検査値に影響を及ぼしている可能性も否定できない。しかしながら、第1回目と第2回目の実験でともに有意な変化を示したGlu, GOT (9か月間暴露)とWBC, ALP (18か月間暴露)はNO₂の生体影響を解釈するための指標となるかもしれない。

一般に白血球数の変動から骨髓系並びにリンパ組織系の病態を推定することができるといわれ、感染、骨髓機能異常等の場合には白血球数が異常に増加することが知られているが、白血球数の減少する理由について定説はない。いずれにしても、異常な高い値が本実験で観察されなかったことは、18か月間にわたる暴露期間中、チャンパー内の微生物学的統御が十分に行われたことを示唆している。

阿部ら¹⁵⁾は血糖値の増加を招来する因子として、1) 消化管から吸収されるブドウ糖、2) 肝臓でのグリコーゲン分解、3) 組織タンパクよりのグリコーゲンの新生を挙げ、予想される疾患とし

て、脾、肝、内分泌、中枢神経系等の疾患と機能的変化を報告した。血糖値の有意な増加は5 ppm—20ppm24時間暴露実験^{16),17)}でも観察されたが、ラットでの成績をヒトで定義されている高血糖と同様に考えるべきかについては検討を要し、その解釈は上記因子の直接的証明によってなされるべきであろう。

鈴木¹⁸⁾によると、GOT、GPTはともに、血中遊出酵素であり、その血中上昇機序は障害された細胞から血中にこの物質を遊出するためと考えられ、肝、心、溶血清疾患などに著しい増加を示すという。このGOTは急性実験^{16),17)}においても減少を示したが、このことは、臨床検査的概念だけでは解釈することは困難で今後の検討が必要であろう。

これまで述べてきた多くの検査項目は、臨床血液・生化学的検査として汎用され、その検査値の変動は各種臓器の病的状況を反映するといわれるが、本研究で得られた各種検査結果の変動を考えるならば、必ずしも臨床検査学的概念で解釈することは容易ではなく、臓器を含めたより詳しい検討が必要であると考えられる。

引用文献

- 1) 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.
- 2) 太田庸起子・脇阪一郎 (1979) : 安定同位体二酸化窒素の生体内移行. *産業医学*, 21, 707—708.
- 3) 織田 肇・鈴木 明・局 博一・久保田憲太郎 (1980) : NO₂暴露マウスのNitriteとNitrate. 第50回日本衛生学会 (3—4月, *日衛誌*35, P.128).
- 4) Kosmider, S. T. and A. Misiewicz (1972) : Experimental and clinical examinations of the emphysema—promoting effects of the oxides of nitrogen. *Zbl. Arbeitsmed.*, 22, 362—368.
- 5) 小此木国明・島岡 章・長谷川弘道・佐藤道男・河合清之 (1976) : NO₂連続暴露動物にみられる生化学的影響. *産業衛生学会*, 298—299.
- 6) Ehrman, R. A., M. Treshow and I. M. Lytle (1972) : The hematology of mice exposed to nitrogen dioxide. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 33, 751—755.
- 7) Freeman, G., S. C. Crane, R. J. Stephens and N. J. Furioli (1969) : The subacute nitrogen dioxide-induced lesion of the rat lung. *Arch. Environ. Health*, 18, 609—612.
- 8) Freeman, G., S. C. Crane, N. J. Furioli, R. J. Stephens, M. J. Evans and W. D. Moore (1972) : Covert reduction in ventilatory surface in rats during prolonged exposure to subacute NO₂. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 106, 563—579.
- 9) Furioli, N. J., S. C. Crane and G. Freeman (1973) : Mixed sodium chloride aerosol and NO₂

- in air Biological effects on monkeys and rats. Arch. Environ. Health, 27, 405—408.
- 10) 嵯峨井 勝・有川由紀子 (1979) : 血清および肺の脂質成分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, 149—164.
 - 11) Carson, T. R., M. S. Rosenholtz, F. T. Wilinski and M. H. Weeks (1962) : The responses of animals inhaling nitrogen dioxide for single, short-term exposure. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 23, 457—462.
 - 12) Wagner, W. D., B. R. Duncan, P. G. Wright and H. E. Stokinger (1965) : Experimental study of threshold limit of NO₂. Arch. Environ. Health, 10, 455—466.
 - 13) Buckley, R. D. and O. J. Balchum (1967) : Effects of NO₂ on lactic dehydrogenase isoenzymes. Arch. Environ. Health, 14, 424—438.
 - 14) Buckley, R. D. and O. J. Balchum (1967) : Enzyme alterations following nitrogen dioxide exposure. Arch. Environ. Health, 14, 687—692.
 - 15) 阿部正和・佐野隆志 (1980) : ブドウ糖, ブドウ糖負荷試験. 日本臨床, 第33巻臨時増刊, 100—112.
 - 16) 鈴木 明・市瀬孝道・久保田憲太郎 (1979) : NO₂の実験動物に及ぼす影響—血液性状に及ぼす影響. 国立公害研究所発表会予稿集, 155—157.
 - 17) 市瀬孝道・鈴木 明・高橋 引 (1979) : ラットの血液性状に及ぼす二酸化窒素の影響. 国立公害研究所報告, 第8号, 71—89.
 - 18) 鈴木 宏 (1980) : GOT (AST), GPT (ALT). 日本臨床, 第38巻臨時増刊, 781—778.

II-6

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——

Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rats

——Isoenzyme Profiles in Serum——

三浦 卓¹・彼谷邦光¹

Takashi MIURA¹ and Kunimitsu KAYA¹

要 旨

NO₂をラットに9, 18か月間暴露し血清アイソザイム成分に及ぼす影響を検討した。クレアチンホスホキナーゼ活性中のI型成分の割合は, 4 ppmNO₂暴露後9か月目で対照群の118%~138%に増加する傾向を示したが, 0.4ppmNO₂暴露では48%~70%に低下した。このような低いI型成分の割合はNO₂暴露後18か月目でも観察された。アルカリ性ホスファターゼ活性中の(I+II)型成分の割合は, 4 ppmNO₂暴露群で9か月目, 18か月目ともに対照群より低い傾向が認められた。また, 暴露濃度の低下に伴いIII型成分の割合が増加する可能性が考えられた。

Abstract

Isoenzyme profiles of rat sera were examined for evidence of effects of NO₂ exposure on rat tissues. 9-months exposure to 4 ppm NO₂ seems to result in an increase in the ratio of type I creatine phosphokinase activity to the total one. On the other hand, 0.4 ppm NO₂ caused a decrease in the ratio of type I activity 9 and 18 months after exposure. The ratio of activities of type (I+II) alkaline phos-

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

phatase also seems to decrease 9 and 18 months after exposure to 4 ppm NO₂.

はじめに

動物体内には、同一の触媒活性を発現するが化学的に性質の異なるタンパク質の存在が明らかにされている。これら酵素のあるものは臓器に特異的なアイソザイムとして存在しており、臓器が傷害をうけると血液中に流出することが考えられる。近年この性質を利用して臨床酵素化学領域で使用されはじめている¹⁾⁻³⁾。ヒトの場合に血清中のアイソザイムを検査することは、病因病態の解明に利用できる上に変動の起源となった臓器の同定も可能となっている。我々はこれまでにNO₂の影響指標の確立とその起源となった臓器を検索する目的から、ラットに4 ppmのNO₂を10日間暴露し血清中のアイソザイムパターンの変動を追跡して来た⁴⁾。その結果、アルカリ性ホスファターゼ、クレアチンホスホキナーゼおよび乳酸脱水素酵素に変動が認められた。本報告書では、NO₂長期暴露によるこれら酵素の血清中アイソザイムパターンに及ぼす影響について検討した結果を記した。

方 法

NO₂を暴露した一群6匹のラットの頸動脈からヘパリン存在下で血液を採集し、800xg 10分間の遠心を行い上清を血清として直ちにアイソザイムの分析に使用した。

アイソザイムの測定は、血清0.3-0.9 μ lをあらかじめ電気泳動用緩衝液に浸したセルロースアセテート膜に塗布し4°で電気泳動を行い活性染色により行った。電気泳動はアルカリ性ホスファターゼの場合イオン強度0.07のトリス-バルビタール緩衝液 (pH8.8) 中で、180V, 5 mA/cmで60分を行った。クレアチンホスホキナーゼは、イオン強度0.028の同じ緩衝液中で350V, 5 mA/cmで10分間泳動を行った。電気泳動後アルカリ性ホスファターゼの活性染色はFritscheらの方法⁵⁾に準じて行った。クレアチンホスホキナーゼはSommer and Konittinenの方法⁶⁾によって活性染色を行った。活性染色を行ったセルロースアセテート膜は風乾後ヘレナ製デンストメーター (Helena Lab., Beaumont, Texas) により活性を求めた。各アイソザイム成分の割合は、各活性ピークを切り抜き重量を測定することによって求めた。

結果および考察

4 ppmNO₂をラットに10日間暴露すると、血清クレアチンホスホキナーゼ活性中のI型成分の割合が5日目まで経時的に増加し、5日目以降低下することを前報において明らかにした⁴⁾。そこで、NO₂長期暴露によるラット血清クレアチンホスホキナーゼI型成分の変動について検討し、その結

表 1 NO₂暴露によるクレアチンホスホキナーゼ活性中の I 型成分の変動

Table 1. Changes in type I CPK activities during exposure to NO₂. CPK activities were determined as described in Methods. Type I CPK activity was shown as the percentage of the total CPK activity and values represent average \pm SD. Parentheses show % of the control counterpart.

	Control	0.04ppm	0.4ppm	4 ppm
9 months				
Exp. I	14.3 \pm 3.9 (100)	11.5 \pm 2.8 (80.4)	10.0 \pm 5.9 (69.9)	19.7 \pm 8.3 (137.8)
Exp. II	11.3 \pm 3.7 (100)	22.3 \pm 5.1 (197.3)	5.4 \pm 2.2* (47.8)	13.3 \pm 4.2 (177.7)
18 months				
Exp. I	13.8 \pm 9.1 (100)	5.7 \pm 1.7* (41.3)	5.2 \pm 2.2* (36.2)	13.3 \pm 4.2 (96.4)
Exp. II	9.3 \pm 3.6 (100)	15.7 \pm 5.0 (168.8)	9.2 \pm 2.5 (98.9)	13.2 \pm 5.1 (141.9)

* $P < 0.05$ significance from control.

表 2 NO₂暴露によるアルカリ性ホスファターゼ活性中の速動型成分の変動

Table 2. Changes in fast-moving ALP activities during exposure to NO₂. ALP activities were determined as described in Methods. Fast-moving ALP activities were expressed as the percentage of the total ALP activity and values represent average \pm SD. Parentheses show % of the control counterpart.

	Control	0.04ppm	0.4ppm	4 ppm
9 months				
Exp. I	19.8 \pm 2.4 (100)	22.8 \pm 2.1 (115.2)	24.7 \pm 5.6 (124.7)	18.8 \pm 2.2 (94.9)
Exp. II	28.3 \pm 3.5 (100)	21.1 \pm 3.0** (74.6)	22.7 \pm 3.1* (80.2)	26.3 \pm 3.7 (92.9)
18 months				
Exp. I	19.4 \pm 5.9 (100)	12.4 \pm 3.5 (63.9)	13.7 \pm 3.2 (70.6)	17.4 \pm 2.9 (89.7)
Exp. II	29.9 \pm 4.3 (100)	27.6 \pm 8.0 (92.3)	23.2 \pm 5.3 (77.6)	26.3 \pm 4.3 (88.0)

* and ** show $P < 0.05$ and $P < 0.01$ significances, respectively.

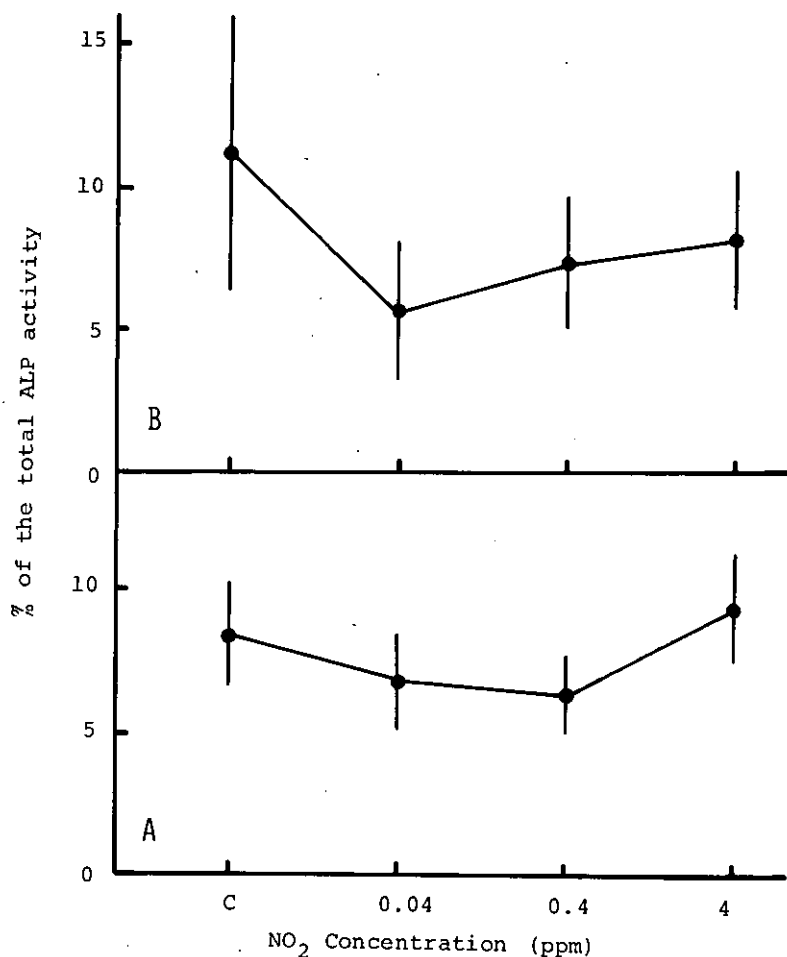


図 1 NO₂暴露によるⅠ型およびⅡ型アルカリ性ホスファターゼ活性の変動
A: Ⅰ型成分, B: Ⅱ型成分

Fig. 1 Changes in activities of types I and II alkaline phosphatases 18 months after exposure to NO₂

Activities of types I and II alkaline phosphatases were determined as described in the Methods. A and B show the ratios of types I and II alkaline phosphatases, respectively. Each point is the mean of six determinations. Error bars represent ± 2 SD.

果を表 1 に示した。4 ppmNO₂暴露群は、18か月暴露第 1 回目の実験結果を除き対照群に対して、117.7%から141.9%と高い値を示した。このように 4 ppmNO₂暴露によって血清中にⅠ型成分が増加する傾向が示唆されたが、有意な差は認められなかった。これに反し0.4ppmNO₂暴露群は、9か月、18か月暴露の全ての実験において対照群より低い値を示した。Ⅰ型成分の低下率は、1.1%から63.8%と幅広い変動を示したが、9か月暴露の第 2 回目および18か月暴露の第 1 回目の実験におい

で有意に低下した。0.04ppmNO₂暴露群はⅠ型成分の変動に一定の傾向を示さなかった。

血清中アルカリ性ホスファターゼのⅡ型成分の割合は、4 ppmNO₂暴露により変動し7日目には有意に増加することを前報において明らかにした。⁴⁾ 9か月および18か月NO₂暴露による速動型アルカリ性ホスファターゼ活性の変動を表2に示した。速動型アルカリ性ホスファターゼ活性の割合は、0.04および0.4ppmNO₂ 9か月暴露の第1回目の実験結果を除いて、全ての暴露群で対照群より低い値を示した。各暴露濃度での全ての実験結果の平均値は、4, 0.4, 0.04ppmで各々対照に対して91.4%, 88.3%, 86.5%となり低い暴露濃度で低い割合を示した。ラットの臓器には前報に示したように肺、腎型と考えられるⅠ型アルカリ性ホスファターゼ活性が存在する。⁸⁾ 前報に報告した2~4か月令ラットの血清ではⅡ型およびⅢ型アルカリ性ホスファターゼ活性が検出されたが、Ⅰ型成分の活性は検出されなかった。本研究に用いた9か月令以上のラットの場合、Ⅱ型Ⅲ型に加うるにⅠ型アルカリ性ホスファターゼ活性も検出されることが多かった。そこで、表2にはⅠ型およびⅡ型成分の活性を速動型として示した。図1に、NO₂暴露18か月目のⅠ型およびⅡ型成分の全アルカリ性ホスファターゼ活性に対する割合を示した。0.04ppmおよび0.4ppmNO₂暴露群はⅠ型およびⅡ型成分ともに対照群より低い値を示した。4 ppmNO₂暴露群はⅡ型成分では低いⅠ型成分では高い値を示した。

以上の結果から、クレアチンホスフォキナーゼ活性中のⅠ型成分はNO₂暴露の9か月および18か月目で4 ppmの場合高い値を示す傾向が認められたが、0.4ppmの場合対照群より低い値を示すことが明らかとなった。このことは、0.4ppmNO₂暴露後9か月、18か月目においてⅢ型成分が血清中に増加することを示唆しているのかもしれない。同様の傾向は速動型アルカリ性ホスファターゼ活性についても認められた。NO₂暴露18か月目では、4 ppmNO₂暴露群のⅠ型およびⅢ型成分の増加と0.4ppmおよび0.04ppmNO₂暴露群のⅢ型成分の増加の可能性が考えられる。今後さらにNO₂長期暴露によって変動する他のアイソザイムについても検討していけば、影響を受ける臓器の同定も可能となるのかもしれない。

引用文献

- 1) Galen, R. S. (1975): *The enzyme diagnosis of myocardial infraction. Human. Pathol.*, 6, 141-155.
- 2) Stolbach, L. L. (1969): *Clinical application of alkaline phosphatase isoenzyme analysis. Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 166, 760.
- 3) Roe, C. R., L. E. Limbird, G. S. Wagner and S. T. Nerengarg (1972): *Combined isoenzyme analysis in the diagnosis of myocardial injury. J. Lab. Clin. Med.*, 80, 577-590.
- 4) 市瀬孝道・鈴木 明・彼谷邦光・三浦 卓(1979): ラットの血清アイソザイムパターンに及ぼす二酸化

窒素の影響: 国立公害研究所研究報告, 第 8 号, 195-205.

- 5) Fritsche, H. A. and H. R. Adams-Park(1972): Cellulose acetate electrophoresis of alkaline phosphatase isoenzymes in human serum and tissues. Clin. Chem., 18, 417-421.
- 6) Somer, H. and A. Konttinen(1972): Demonstration of serum creatine kinase isoenzymes by fluorescence technique. Clin. Chim. Acta, 40, 133-138.

II-7

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——

Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rats
——Glutathione Level in Lung and Blood——

河田 明治¹

Meiji KAWATA¹

要 旨

血液および肺中のNPSHとGSH量はNO₂暴露に関係なく老令化に伴って減少すると考えられる。4 ppm暴露群における肺のNPSHとGSH量は9, 18か月間暴露ともに対照群の約115~130%となり、いずれも有意に増加した。今回の長期暴露実験の結果と、4 ppmNO₂急性(10日間)、亜急性(4週間, 3か月間)暴露の結果と考え併せると、4 ppmNO₂暴露では肺のNPSH量は暴露開始直後より急速に増加して数日後に一定値に達し、18か月間維持され、以後老令化とともに減少すると考えられる。9か月間暴露において変化がなく、18か月間暴露で変化が見られたのは次の場合であった。(1) NO₂ 0.4, 4 ppm 18か月間暴露において、血液中のNPSHとGSH量は低下する傾向を示した。(2) NO₂ 0.4, 4 ppm 18か月間暴露において、肺の総グルタチオン量中のGSSG含有率は増加する傾向を示した。

Abstract

The effect of long-term NO₂ exposure on glutathione level in blood and lung of rats was studied. Rats were exposed to NO₂ of 0.04, 0.4, and 4 ppm for 9, 18, and

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

27 months. Nonprotein sulfhydryl (NPSH) was estimated by the Ellman reagent (DTNB), and GSH or GSSG was determined by the enzymatic method based on the catalytic action of GSH or GSSG in the reduction of DTNB by a mixture of NADPH and glutathione reductase. The levels of NPSH and GSH in blood and lung of control rats were decreased on aging. 18 months exposure of 0.4 and 4 ppm NO₂ showed the tendency of decrease in NPSH and GSH levels in blood, while 9 months exposure did not affect on their levels. The GSSG level in blood was 1~2% of total glutathione for both control and exposed rats after 9, 18, and 27 months exposure.

The NPSH and GSH levels in lung of rats exposed to 4 ppm NO₂ increased significantly to 115~130% of control after 9 and 18 months exposure. The experiments of NO₂ exposure to rats (acute : for 10 days, subacute : for 4 weeks and 3 months, and this long-term : 9, 18, and 27 months) give the following results. The NPSH level in lung of rats exposed to 4 ppm NO₂ increased rapidly to attain to a definite level after several days, and the increased level was kept for 18 months, thereafter its level is supposed to show the tendency of decrease on aging. 18 months exposure of 0.4 and 4 ppm NO₂ showed the tendency of increase in the GSSG level in lung, while 9 months exposure did not affect on its level.

はじめに

代表的な大気汚染物質の中で酸化性を有するNO₂, オゾンをラットやマウスに暴露すると還元型グルタチオン (GSH) 量の増加することが示された¹⁻⁷⁾。SH化合物であるグルタチオンは生体中に広く分布し、酸化性物質の還元に関与する物質として知られている。GSHは容易に酸化されて酸化型グルタチオン (GSSG) になることから、生体中においてもNO₂暴露によりGSSG量の増加が示唆されるごとく、高濃度NO₂によるラットの急性暴露実験において、標的臓器である肺に存在するGSSG量が著しく増加する結果を得た⁶⁾。また肺組織をトリクロロ酢酸処理することによって除タンパクした上清中に含まれる非タンパク性SH化合物 (NPSH) 中には、GSHの外にいくつかのSH化合物の存在することを示唆する結果が得られている。

上記のようなNO₂急性暴露において見られた還元型および酸化型グルタチオン量の変動、およびGSH以外の低分子SH化合物の挙動が長期NO₂暴露においてどのように現れるかについては明らかでない。

今回このようなNO₂の慢性影響についての知見を得ることを目的として、0.04, 0.4, 4 ppm NO₂を9, 18, 27か月間暴露したラットの血液および肺に存在するNPSH, GSH, GSSG量を測定した。

さらにNO₂の急性、亜急性および慢性影響の関連性を明らかにするために同様な方法で行った4週間⁸⁾ および3か月間⁹⁾ のNO₂暴露実験の結果と比較した。

方 法

本研究では繰り返し実験が行われたので、ここでは昭和52年7月から54年10月まで(9, 18, 27か月間)の暴露実験を実験1とし、53年4月(18か月間)および54年1月(9か月間)から54年10月までの暴露実験を実験2とした。

実験1のラットは暴露開始時より暴露した雄(9, 18, 27か月間暴露群)と雌(9, 27か月間暴露群)であり、実験2のラットは途中より暴露を開始した雄(9, 18か月間暴露群)である。また暴露実験と同じロットのラットを飼育室内で飼育し、これをルームコントロール(RC)群とし、9, 18, 27か月間暴露における対照群と比較した。

ラット血液および肺中のNPSH, GSH, GSSG量は次の方法により測定した。ラットをエチルエーテルにより麻酔し、頸動脈から採血したのち直ちに胸部を切開し、採取した肺を超低温槽(-80℃)に保存した。ヘパリン処理を行った血液中のNPSH量は5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)を用いる方法¹⁰⁾により測定し、GSH, GSSG量はグルタチオンレダクターゼ, DTNB, NADPHを用いる酵素サイクリング法¹¹⁾により求めた。

実験1の9か月間暴露におけるラットについては、肺の試料として右肺の任意の2か所よりそれぞれ約0.2gを採取した。それ以外についてはすべて右肺の下葉(Lung B)と中葉(Lung D)を試料とした。試料を5%トリクロロ酢酸中で破砕し、ホモジネートを遠心分離して得られた上清中に含まれるNPSHは血液の場合に準じた方法^{10,12,13)}により求めた。GSHとGSSG量はNPSH量を測定した残りのトリクロロ酢酸上清を用いて上記の酵素サイクリング法により求めた。

結果と考察

1. 血液中に存在するグルタチオン含量に及ぼす影響

NO₂を暴露したラット血液中のNPSHとGSH量の測定結果を表1および表2に示した。

9か月間暴露(実験1)においては、暴露群の値は対照群にくらべてNPSHで93~108%, GSHで95~108%の範囲内にあり、NO₂暴露濃度に応じた増減は見られなかった。このことより9か月間暴露では、血液中のNPSHとGSH量は暴露により影響を受けないと考えられる。また雄についての繰り返し実験(実験2)においても、ルームコントロール群と暴露群のNPSHとGSH量は対照群の

表 1 NO₂暴露がラット血液中の非タンパク性SH化合物 (NPSH) 量に及ぼす影響 (実験1 および実験2)

Table 1. Effect of NO₂ exposure on nonprotein sulfhydryl (NPSH) level in blood of rats. (first and second experiments)

(μ moles/ml blood, $m \pm SD$, $n=6$, * : $P < 0.05$)

a) : room control group

b) : values in parentheses indicate percent of control

c) : two of three were the rats of the room control group

9 Months Exposure (male)

	First Experiment	Second Experiment
RC ^{a)}		1.38 \pm 0.07 [#] (101)
Control	1.25 \pm 0.12 (100) ^{b)}	1.39 \pm 0.09 (100)
0.04ppm	1.35 \pm 0.06 (108)	1.39 \pm 0.11 (100)
0.4ppm	1.31 \pm 0.07 (105)	1.43 \pm 0.10 (103)
4 ppm	1.24 \pm 0.06 (99)	1.38 \pm 0.12 (99)

: $n=15$

9 Months Exposure (female)

	First Experiment
Control	1.28 \pm 0.06 (100)
0.04ppm	1.19 \pm 0.09 (93)
0.4 ppm	1.30 \pm 0.08 (102)
4 ppm	1.23 \pm 0.07 (96)

18 Months Exposure (male)

	First Experiment	Second Experiment
RC ^{a)}		1.25 \pm 0.19 [#] (106)
Control	1.26 \pm 0.09 (100)	1.18 \pm 0.10 (100)
0.04ppm	1.20 \pm 0.13 (95)	1.08 \pm 0.07 (92)
0.4 ppm	1.16 \pm 0.14 (92)	1.01 \pm 0.11 (86)
4 ppm	1.12 \pm 0.03 (89) [*]	1.09 \pm 0.12 (93)

: $n=15$

27 Months Exposure

(male)

(female)

	First Experiment	n	First Experiment	n
RC ^{a)}	1.16 \pm 0.12 (105)	15		
Control	1.11 (100)	3 ^{c)}	0.93 (100)	4
0.04ppm	1.11 (100)	3	0.78 (84)	2
0.4 ppm	1.07 (96)	3	0.91 (98)	1
4 ppm	0.95 (86)	4	0.74 (80)	1

表 2 NO₂暴露がラット血液中の還元型グルタチオン (GSH) 量に及ぼす影響
(実験1 および実験2)

Table 2. Effect of NO₂ Exposure on reduced glutathione (GSH) level in
blood of rats (first and second experiments)

(μ moles/ml blood, $m \pm SD$, $n = 6$, *** : $P < 0.001$)

a) : room control group

b) : values in parentheses indicate percent of control

c) : two of three were the rats of the room control group

9 Months Exposure (male)

	First Experiment	Second Experiment
RC ^{a)}		1.35 \pm 0.09* (97)
Control	1.13 \pm 0.12 (100) ^{b)}	1.39 \pm 0.13 (100)
0.04ppm	1.22 \pm 0.09 (108)	1.41 \pm 0.12 (101)
0.4 ppm	1.16 \pm 0.06 (103)	1.39 \pm 0.20 (100)
4 ppm	1.14 \pm 0.06 (101)	1.38 \pm 0.16 (99)

: $n = 15$

9 Months Exposure (female)

	First Experiment
Control	1.12 \pm 0.08 (100)
0.04ppm	1.06 \pm 0.08 (95)
0.4 ppm	1.17 \pm 0.10 (104)
4 ppm	1.11 \pm 0.10 (99)

18 Months Exposure (male)

	First Experiment	Second Experiment
RC ^{a)}		1.24 \pm 0.19* (105)
Control	1.16 \pm 0.07 (100)	1.18 \pm 0.13 (100)
0.04ppm	1.08 \pm 0.12 (93)	1.16 \pm 0.03 (98)
0.4 ppm	1.04 \pm 0.10 (90)	1.03 \pm 0.11 (87)
4 ppm	0.95 \pm 0.04 (82)***	1.08 \pm 0.11 (92)

: $n = 8$

27 Months Exposure
(male)

(female)

	First Experiment	n	First Experiment	n
RC ^{a)}	1.13 \pm 0.14 (99)	15		
Control	1.12 (100)	3 ^{c)}	0.93 (100)	4
0.04ppm	1.09 (97)	3	0.80 (86)	2
0.4 ppm	1.05 (94)	3	0.91 (98)	1
4 ppm	0.94 (84)	4	0.74 (80)	1

表 3 NO₂暴露がラット血液中に存在する総グルタチオン中の酸化型グルタチオン (GSSG) 含有率に及ぼす影響 (実験1および実験2)

Table 3. Effect of NO₂ exposure on oxidized glutathione (GSSG) level, percent of total glutathione in blood of rats (first and second experiments)

(percent of total glutathione, $m \pm SD$, $n = 6$)

a) : room control group

b) : values in parentheses indicate percent of control

c) : two of three were the rats of the room control group

9 Months Exposure (male)

	First Experiment	Second Experiment
RC ^{a)}		1.4±0.2 [#] (120)
Control	1.5±0.4 (100)	1.2±0.1 (100)
0.04ppm	1.8±0.4 (120)	1.3±0.4 (110)
0.4 ppm	1.4±0.7 (93)	1.0±0.1 (80)
4 ppm	1.3±0.4 (87)	1.2±0.1 (100)

: $n = 10$

9 Months Exposure (female)

	First Experiment
Control	1.6±0.4 (100)
0.04ppm	1.2±0.3 (75)
0.4 ppm	1.1±0.4 (69)
4 ppm	1.5±0.5 (94)

18 Months Exposure (male)

	First Experiment	Second Experiment
RC ^{a)}		0.7±0.2 [#] (50)
Control	1.1±0.3 (100)	1.3±0.2 (100)
0.04ppm	1.4±0.2 (130)	1.4±0.3 (100)
0.4 ppm	1.2±0.5 (100)	1.5±0.6 (120)
4 ppm	1.5±0.4 (140)	1.6±0.3 (120)

: $n = 8$

27 Months Exposure

(male)

(female)

	First Experiment	n	First Experiment	n
RC ^{a)}	1.1±0.3 (90)	15		
Control	1.0 (100)	3 ^{c)}	1.4 (100)	4
0.04ppm	0.8 (80)	3	1.9 (140)	2
0.4 ppm	0.9 (90)	3	0.9 (60)	1
4 ppm	0.9 (90)	4	2.6 (190)	1

値の99~103%, および97~101%となり実験1と同様な結果を得た。

雄ラット18か月間(実験1)においては、対照群のNPSHとGSH量は9か月間暴露(実験1)の対照群の値の101%, および103%となり変化は認められなかったが、4ppm暴露群ではNPSH, GSH量ともに対照群に比べて有意に減少し、0.4ppm群においてもそれぞれ減少傾向が見られた。このような暴露濃度に応じてNPSHとGSH量が減少傾向を示す結果が実験2においても認められた。

27か月間暴露においては、対照群の雄ラットの生存数は1であったため、ルームコントロール群より補充して3匹とし、各測定値を平均して対照群の値とした。このように27か月間暴露の対照群、暴露群では雌雄ともに多数のラットが自然死により死亡したため、データを統計的に処理することができなかつたので各群の平均値を比較した。27か月間暴露における対照群のNPSHとGSH量は、雄のGSHの場合を除くと、9か月間暴露の対照群の値の70~80%となった。また4ppm27か月間暴露群では、雌雄ともにNPSHとGSH量は対照群の約80~86%であった。以上のことからNPSHとGSH量は暴露に関係なく老令化とともに減少する傾向が示唆され、更に暴露濃度の増加に従って減少するという18か月間暴露の場合と同様の傾向を示した。

血液中に存在する総グルタチオン中のGSSG含有率の測定結果を表3に示した。実験2のルームコントロール群の値を除くと、GSSG含有率は実験1および実験2の9, 18か月間暴露のすべてにおいて約1~2%であり、対照群と暴露群で差は見られなかった。27か月間暴露では、雄ラットの暴露群の値は対照群に比べて低下する傾向を示したが、雌の場合ではバラツキが大きく一定の傾向は見られなかった。

2. 肺に存在するグルタチオン含量に及ぼす影響

NO₂を暴露したラット肺中のNPSHとGSH量の測定結果を表4および5に示した。9か月間暴露では、実験1と実験2のすべての場合において、0.04ppmと0.4ppm暴露群のNPSHとGSH量は対照群の値の96~103%, および94~108%の範囲内にあり、NO₂暴露濃度に応じた増減は見られなかった。一方4ppm暴露群のNPSHとGSH量はそれぞれ対照群の値の116~126%, 114~125%といずれも有意に増加した。

18か月間暴露では、実験1と実験2の雄ラットにおいて、対照群のNPSHとGSH量は9か月間暴露の対照群の値の約90~100%であった。実験1と2における0.04ppmと0.4ppm暴露群のNPSHとGSH量は対照群の値の95~104%, 93~101%となり、9か月間暴露の場合と同様対照群と暴露群の間に差は見られなかった。一方4ppm暴露群においては、これらの値はそれぞれ115~127%, 116~124%といずれも有意に増加したが、その増加率は9か月間暴露の値に近似した。

27か月間暴露では、雌雄ともに対照群のNPSHとGSH量は9か月間暴露の対照群の値の80~90%となり、血液中のNPSH, GSHと同様に老令化に伴って減少すると考えられる。雄ラットにおける0.04ppm, 0.4ppm暴露群のNPSHとGSH量はそれぞれ対照群の値の102~105%, 93~110%となり

表 4 NO₂暴露がラット肺の非タンパク性SH化合物 (NPSH) 量に及ぼす影響
(実験1および実験2)

Table 4. Effect of NO₂ exposure on nonprotein sulfhydryl (NPSH) level in lungs of rats (first and second experiments)

(μ moles/g lung, $m \pm SD$, $n=6$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$).

a) : two samples were taken from the right lobe of lungs arbitrarily

b) : values in parentheses indicate percent of control

c) : caudal lobe of lung

d) : middle lobe of lung

e) : two of three were the rats of the room control group

[A] First Experiment

9 Months Exposure (male)

	Sample 1 ^{a)}	Sample 2 ^{a)}
Control	2.12 \pm 0.11 (100) ^{b)}	2.13 \pm 0.10 (100)
0.04ppm	2.04 \pm 0.04 (96)	2.08 \pm 0.10 (98)
0.4 ppm	2.05 \pm 0.16 (97)	2.17 \pm 0.13 (102)
4 ppm	2.46 \pm 0.10 (116) ^{***}	2.48 \pm 0.12 (116) ^{***}

9 Months Exposure (female)

	Sample 1 ^{a)}	Sample 2 ^{a)}
Control	2.05 \pm 0.05 (100)	2.08 \pm 0.12 (100)
0.04ppm	1.98 \pm 0.18 (97)	2.07 \pm 0.11 (100)
0.4 ppm	2.09 \pm 0.13 (102)	2.13 \pm 0.16 (102)
4 ppm	2.56 \pm 0.22 (125) ^{***}	2.62 \pm 0.13 (126) ^{***}

18 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	Lung D ^{d)}
Control	1.97 \pm 0.09 (100)	1.89 \pm 0.04 (100)
0.04ppm	1.98 \pm 0.07 (101)	1.94 \pm 0.15 (103)
0.4 ppm	2.03 \pm 0.10 (103)	1.96 \pm 0.12 (104)
4 ppm	2.48 \pm 0.23 (126) ^{**}	2.40 \pm 0.22 (127) ^{***}

27 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	<i>n</i>	Lung D ^{d)}	<i>n</i>
Control	1.65 (100)	3 ^{e)}	1.74 (100)	3 ^{e)}
0.04ppm	1.69 (102)	3	1.77 (102)	3
0.4 ppm	1.73 (105)	3	1.78 (102)	3
4 ppm	2.10 (127)	4	2.09 (120)	4

表 4 (つづき)

Table 4. (continued)

27 Months Exposure (female)

	Lung B ^{c)}	n	Lung D ^{d)}	n
Control	1.64 (100)	4	1.67 (100)	4
0.04ppm	1.53 (93)	3	1.96 (117)	3
0.4 ppm	1.36 (83)	1	1.37 (82)	1
4 ppm	1.63 (99)	1	1.72 (103)	1

[B] Second Experiment

9 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	Lung D ^{d)}
Control	1.99±0.09 (100) ^{b)}	1.96±0.08 (100)
0.04ppm	1.95±0.10 (98)	1.98±0.10 (101)
0.4 ppm	2.00±0.06 (101)	2.01±0.05 (103)
4 ppm	2.44±0.09 (123) ^{***}	2.37±0.10 (121) ^{**}

18 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	Lung D ^{d)}
Control	1.95±0.06 (100)	2.00±0.11 (100)
0.04ppm	1.87±0.08 (96)	1.91±0.11 (96)
0.4 ppm	1.91±0.11 (98)	1.89±0.08 (95)
4 ppm	2.30±0.08 (118) ^{***}	2.30±0.06 (115) ^{***}

表 5 NO₂暴露がラット肺の還元型グルタチオン (GSH) 量に及ぼす影響(実験1 および実験2)

Table 5. Effect of NO₂ exposure on reduced glutathione (GSH) level in lungs of rats (first and second experiments)

(μ moles/g lung, $m \pm SD$, $n=6$, * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)

- a) : two samples were taken from the right lobe of lungs arbitrarily
 b) : values in parentheses indicate percent of control
 c) : caudal lobe of lung d) : middle lobe of lung
 e) : two of three were the rats of the room control group

[A] First Experiment

9 Months Exposure (male)

	Sample 1 ^{a)}	Sample 2 ^{a)}
Control	1.73 \pm 0.13 (100) ^{b)}	1.83 \pm 0.17 (100)
0.04ppm	1.78 \pm 0.06 (103)	1.90 \pm 0.11 (104)
0.4 ppm	1.72 \pm 0.15 (99)	1.98 \pm 0.12 (108)
4 ppm	2.01 \pm 0.15 (116)**	2.08 \pm 0.15 (114)*

9 Months Exposure (female)

	Sample 1 ^{a)}	Sample 2 ^{a)}
Control	1.69 \pm 0.13 (100)	1.77 \pm 0.20 (100)
0.04ppm	1.64 \pm 0.21 (97)	1.68 \pm 0.15 (95)
0.4 ppm	1.69 \pm 0.13 (100)	1.74 \pm 0.22 (98)
4 ppm	2.06 \pm 0.21 (122)**	2.12 \pm 0.23 (120)*

18 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	Lung D ^{d)}
Control	1.75 \pm 0.12 (100)	1.68 \pm 0.09 (100)
0.04ppm	1.73 \pm 0.07 (99)	1.67 \pm 0.11 (99)
0.4 ppm	1.72 \pm 0.09 (98)	1.69 \pm 0.11 (101)
4 ppm	2.12 \pm 0.30 (121)*	2.08 \pm 0.22 (124)**

表 5 (つづき)

Table 5. (continued)

27 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	n	Lung D ^{d)}	n
Control	1.53 (100)	3 ^{e)}	1.73 (100)	3 ^{e)}
0.04ppm	1.48 (97)	3	1.61 (93)	3
0.4 ppm	1.68 (110)	3	1.68 (97)	3
4 ppm	2.03 (133)	4	2.06 (119)	4

27 Months Exposure (female)

	Lung B ^{c)}	n	Lung D ^{d)}	n
Control	1.52 (100)	4	1.56 (100)	4
0.04ppm	1.40 (92)	3	1.71 (110)	3
0.4 ppm	1.22 (80)	1	1.28 (82)	1
4 ppm	1.61 (106)	1	1.60 (103)	1

(B) Second Experiment

9 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	Lung D ^{d)}
Control	1.98±0.05 (100) ^{c)}	1.96±0.10 (100)
0.04ppm	1.99±0.11 (101)	1.85±0.15 (94)
0.4 ppm	1.93±0.05 (97)	1.93±0.07 (98)
4 ppm	2.47±0.09 (125) ^{***}	2.32±0.16 (118) ^{**}

18 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	Lung D ^{d)}
Control	1.89±0.03 (100)	1.92±0.16 (100)
0.04ppm	1.83±0.11 (97)	1.78±0.11 (93)
0.4 ppm	1.87±0.09 (99)	1.80±0.12 (94)
4 ppm	2.26±0.06 (120) ^{***}	2.24±0.11 (116) ^{**}

対照群との間に差は見られなかったが、4 ppm暴露群においてはこれらの値は120~127%、119~130%となり、9、18か月間暴露の場合とほぼ同程度の増加率であった。一方雌ラットのNPSHとGSH量は対照群の値に対して、0.4 ppm群で80~83%と著しく低下したが、4 ppm群では99~106%となり、対照群とほぼ同じ値となった。

肺の総グルタチオン量中のGSSG含有率の測定結果を表6に示した。実験1と実験2の雄ラット

表 6 NO₂暴露がラット肺中に存在する総グルタチオン中の酸化型グルタチオン (GSSG) 含有率に及ぼす影響 (実験1 および実験2)

Table 6. Effect of NO₂ exposure on oxidized glutathione (GSSG) level, percent of total glutathione in lungs of rats (first and second experiment)

(percent of total glutathione, $m \pm SD$, $n=6$, * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$)

a) : two sample were taken from the right lobe of lungs arbitrarily

b) : values in parentheses indicate percent of control

c) : caudal lobe of lung

d) : middle lobe of lung

e) : two of three were the rats of the room control group

[A] First Experiment

9 Months Exposure (male)

	Sample 1 ^{a)}	Sample 2 ^{a)}
Control	4.0±1.0 (100) ^{b)}	3.2±1.0 (100)
0.04ppm	3.6±0.9 (90)	3.9±1.3 (120)
0.4 ppm	4.7±1.2 (120)	3.7±1.0 (120)
4 ppm	3.3±1.1 (80)	3.5±1.0 (110)

9 Months Exposure (female)

	Sample 1 ^{a)}	Sample 2 ^{a)}
Control	3.7±1.1 (100)	4.2±1.3 (100)
0.04ppm	4.4±0.7 (120)	2.6±0.2 (60)
0.4 ppm	4.3±0.6 (120)	2.9±1.7 (70)
4 ppm	3.9±1.3 (110)	3.0±1.1 (70)

18 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	Lung D ^{d)}
Control	4.7±0.8 (100)	3.7±2.1 (100)
0.04ppm	4.4±0.6 (90)	4.1±1.3 (110)
0.4 ppm	6.2±1.1 (130)*	5.2±1.0 (140)
4 ppm	10.6±3.7 (230)**	6.3±1.6 (170)

27 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	n	Lung D ^{d)}	n
Control	3.1 (100)	3 ^{e)}	2.9 (100)	3 ^{e)}
0.04ppm	4.0 (130)	3	4.8 (170)	3
0.4 ppm	2.7 (90)	3	3.7 (130)	3
4 ppm	3.0 (100)	4	3.1 (110)	4

表 6 (つづき)

Table 6. (continued)

27 Months Exposure (female)

	Lung B ^{c)}	n	Lung D ^{d)}	n
Control	3.9 (100)	4	4.4 (100)	4
0.04ppm	3.3 (80)	3	4.1 (90)	3
0.4 ppm	4.1 (110)	1	4.8 (110)	1
4 ppm	5.0 (130)	1	5.4 (120)	1

[B] Second Experiment

9 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	Lung D ^{d)}
Control	2.3±0.3 (100) ^{b)}	2.5±0.3 (100)
0.04ppm	2.6±0.5 (110)	2.5±0.5 (100)
0.4 ppm	2.4±0.2 (100)	2.5±0.4 (100)
4 ppm	2.3±0.4 (100)	3.0±0.4 (120)

18 Months Exposure (male)

	Lung B ^{c)}	Lung D ^{d)}
Control	2.8±0.2 (100)	2.3±0.6 (100)
0.04ppm	3.2±0.3 (110)	2.8±0.6 (120)
0.4 ppm	3.6±0.7 (130)*	3.5±0.5 (150)**
4 ppm	3.0±0.3 (110)	3.1±0.5 (130)*

において、9か月間暴露では暴露群の値は対照群の80~120%となり、対照群との差は見られなかったが、18か月間暴露では0.4と4 ppm暴露群で増加する傾向を示した。27か月間暴露では雌雄ともにGSSG含有率の個々の値は約1~6%の範囲内で大きく変動し、対照群と暴露群の間に差は見られなかった。

血液および肺について、NPSH量中に占めるGSH量の割合を求めた。その結果、雌雄、暴露期間、および対照群と暴露群に関係なく、GSH量はNPSH量の約90~100%、(血液)、約85~95% (肺) となり、血液および肺に存在するNPSHの大部分はGSHであることが確認された。

9、18、27か月間暴露における対照群に関する測定結果より、Wistarラットの血液および肺のNPSHとGSH量は老令化にしたがって減少すると考えられる。今回の長期暴露実験の結果と、4ppm NO₂急性(10日間)、亜急性(4週間、3か月間)暴露の結果を考え併せると、肺のNPSH量は暴露

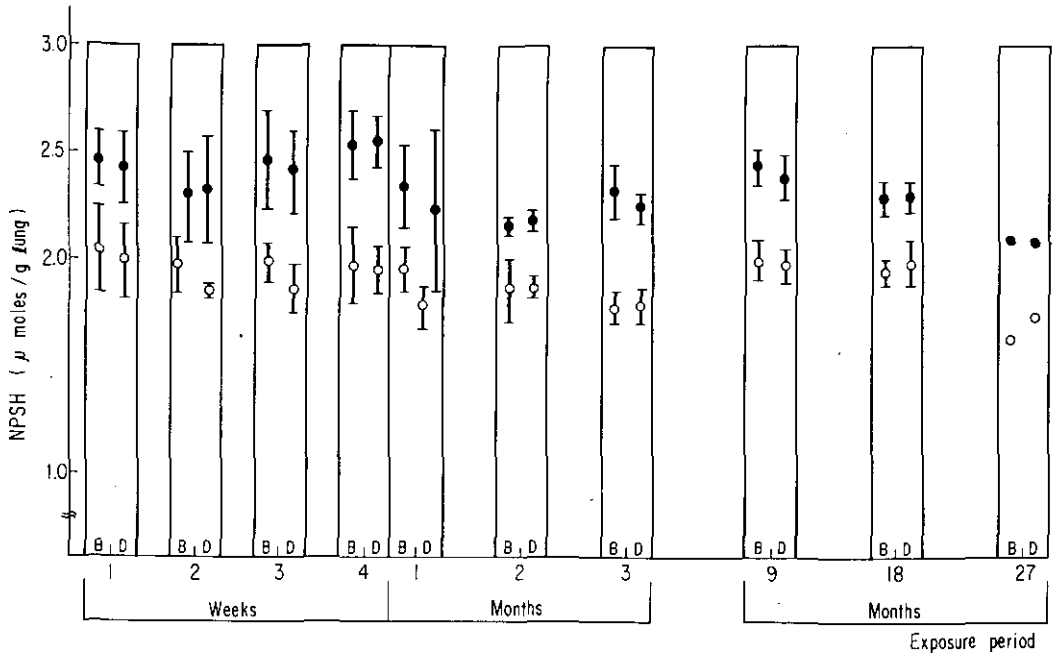


図 1 4 ppm NO₂暴露が雄ラット肺の非タンパク性SH化合物(NPSH)量に及ぼす影響
(○:対照群, ●:暴露群, m±SD, B:右肺下葉, D:右肺中葉)

Fig. 1 Effect of 4 ppm NO₂ exposure on nonprotein sulfhydryl (NPSH) level in lungs of male rats
(○: Control, ●: Exposed, m±SD, B: caudal lobe of lung, D: middle lobe of lung)

開始直後より急速に増加して数日後に一定値に達し、18か月間維持され、以後老令化とともに減少すると考えられる。4 ppm NO₂亜急性暴露と長期暴露がNPSH量に及ぼす影響の結果をまとめて図1に示した。暴露開始1週間後から18か月までの間、NPSHの平均値は対照群で1.78~2.05、暴露群で2.16~2.56 μ moles/g肺の範囲内にあった。9か月間暴露において変化がなく、18か月間暴露において変化が見られたのは次の場合であった。(1) NO₂ 0.4, 4 ppm 18か月間暴露で血液中のNPSHとGSHは低下する傾向を示した。(2) NO₂ 0.4, 4 ppm 18か月間暴露では、肺の総グルタチオン量中のGSSG含有率は増加する傾向を示した。

グルタチオンは、脂質過酸化による障害に対する防御機構として知られている系、すなわちグルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルタチオンレダクターゼ、およびグルタチオンパーオキシダーゼを含むPeroxidative Metabolic Pathway (PMP)¹⁴⁾と、グルタチオンの生成・代謝に関係があるγ-グルタミルサイクル¹⁵⁾の二つの系を結び合わせる物質である。

Chowら¹⁶⁾、深瀬ら³⁾、嵯峨井ら¹⁷⁾はラットあるいはマウスにNO₂を暴露し、肺のPMP系酵素の活

性が上昇することを報告している。PMP系酵素はグルタチオンの酸化と還元、すなわちGSHとGSSGの量比の決定に関与するが、グルタチオンの総量(GSH+GSSG量)の変動への直接的な関与は考えられない。GSH量の増加は、 γ -グルタミルサイクルにおいて、GSH生成の促進またはGSH代謝の阻害によって生じることが推察される。これまで行った4 ppm NO₂暴露実験においては、GSSG量が変化しないにもかかわらず、GSH量は暴露直後より急速に増加した。以上のことより、4 ppm NO₂暴露においては、暴露開始直後よりNO₂の影響が γ -グルタミルサイクル系にも及んでいると考えられる。

今後更に低分子SH化合物および高分子のSH基に及ぼすNO₂の影響、およびその作用機構について検討する予定である。

引用文献

- 1) 中島泰知, 他 (1968) : NO₂短期連続暴露のマウス肺・還元型グルタチオン量に及ぼす影響・大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 労働衛生編 6, 17-21.
- 2) 中島泰知, 他 (1969) : 二酸化窒素長期連続暴露のマウス肺の還元型グルタチオン量に及ぼす影響と病理組織学的変化, 付グルタチオン還元酵素に対する亜硝酸塩, 硝酸塩の作用. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告, 労働衛生編 7, 35-41.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 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) 河田明治 (1979) : ラットの肺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.
- 7) 河田明治, 他 (1979) : NO₂暴露がラット肺のSH化合物におよぼす影響. 日本薬学会第99年会(札幌)講演要旨集, p. 441.
- 8) 河田明治, 他 (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)講演要旨集, p. 417.
- 9) 河田明治 : (準備中).
- 10) Beutler, E. (1975) : Red Cell Metabolism. 2nd Ed., Grune and Stratton, p. 112.
- 11) Tietze, F. (1969) : Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Anal. Biochem., 27, 502-522.

- 12) Ellman, G.L. (1959) : Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70—77.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Meister, A. (1973) : On the enzymology of amino acid transport. *Science*, **180**, 33—39.
- 16) 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.
- 17) 嵯峨井 勝, 他 (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.

II-8

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——

Effects of Long-Term Nitrogen Dioxide Exposure on Rats

——Composition of Fatty Acid in Lung and Liver Phospholipids——

小林隆弘¹

Takahiro KOBAYASHI¹

要 旨

Wistar雄ラットに0.04ppm, 0.4ppm, 4 ppmのNO₂を9,18,27か月間暴露し, 肺および肝のリン脂質の脂肪酸組成に及ぼす影響を調べた。肺では, 有意な変化の多くは4 ppmで観察された。4 ppmではパルミチン酸, オレイン酸の増加, ミリスチン酸, ステアリン酸, リノール酸の減少が観察された。0.04ppm, 0.4ppmでも4 ppmと同じ変化を示す脂肪酸がいくつか観察された。

肝ではいずれの濃度においても有意差は観察されなかったが, 4 ppm濃度においてはパルミチン酸, オレイン酸, リノール酸の減少傾向, ステアリン酸, アラキドン酸, ドコサヘキサエン酸の増加傾向が観察された。

また加齢によって肺ではミリスチン酸が減少, パルミチン酸が増加し, 肝ではパルミチン酸が減少, ステアリン酸が増加した。またNO₂暴露群では, この加齢による変化が対照群より低い月令でである傾向にあった。

Abstract

Male Wistar rats were chronically exposed to three concentrations of

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, Tsukuda, Ibaraki 305, Japan

nitrogen dioxide (NO₂), such as 0.04 ppm, 0.4 ppm and 4 ppm of NO₂, for 9, 18 and 27 months. Effect of NO₂ exposure on the composition of fatty acid in the lung and liver phospholipids was investigated. Many of the significant changes in the composition of fatty acid for the lung were observed at 4 ppm of NO₂ concentration. At this NO₂ concentration, increases in the palmitic acid and oleic acid content and decreases in the myristic acid, stearic acid and linoleic acid content were observed. At 0.4 ppm and 0.04 ppm of NO₂ concentration, some of the fatty acid species in the lung showed the same trends of changes as were observed at 4 ppm of NO₂ concentration.

For the fatty acid composition in the liver, significant changes were not observed at any NO₂ concentrations. At 4 ppm of NO₂ concentration, however, trends of increases in stearic acid, arachidonic acid and docosahexaenoic acid content were observed. Trends of decreases in palmitic acid, oleic acid and linoleic acid were also observed.

As a function of age, the fatty acid composition of the phospholipids in the lung and liver changed in both the control group and the NO₂ exposed groups. In the lung, myristic acid content decreased, whereas palmitic acid content increased. In the liver, a decrease in palmitic acid content and an increase in stearic acid content were observed. These changes were observed at earlier stages in the NO₂ exposed groups than in the control group.

はじめに

肺の表面活性物質としてリン脂質が重要な役割をしている。このリン脂質に対するNO₂の影響を解析することを目的とした。これまでに我々は以下の点を明らかにしてきた。すなわち、1. 化学的にNO₂はリン脂質中の不飽和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および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、である³⁾。

そこで今回ラットNO₂慢性暴露により、肺、肝のリン脂質の脂肪酸組成がどのように変動するか検討した。また加齢による変動についても併せて検討した。

方 法

JCL:Wistar系雄ラットを用い8週令からNO₂に暴露した。ラットは対照群, 0.04ppmNO₂暴露群, 0.4ppmNO₂暴露群, 4ppmNO₂暴露群の4群に分けた。

実験中の飼育並びに暴露条件については, 本報告書別項(Ⅱ-1, 2)にて, 詳述してありである。

暴露期間は9, 18, 27か月間とした。9, 18か月間暴露では各群6匹のラットを用いた。27か月では対照群ともに生存数が少数であったため, 供試動物数は以下のようになった。対照群: 3匹(このうち2匹は飼育室のラット), NO₂暴露群: 0.04ppm: 3匹, 0.4ppm: 3匹, 4ppm: 4匹。

暴露後, ラットはエチルエーテル麻醉下で頸動脈からの放血によりごく短時間内に殺し, 死後すみやかに肺, 肝を採取した。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(2:1:0.3v./v.)の混合溶媒3.3ml中Polytronを用いホモジナイズした。Folchらの方法で脂質を抽出した⁴⁾。操作はすべて窒素気流, 氷冷下で行った。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-ヘキサン-エチルエーテル-酢酸80:40:1v./v.)を行い分取した。リン脂質はMorganらの方法で窒素気流下メタノリシスし, 得られた脂肪酸のメチルエステルは島津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)を用いた。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⁶⁾。分析条件は175°C, 検出器温度250°C, 注入口温度250°C, キャリアガス流量0.71ml/分で行った。

結 果

9, 18, 27か月間暴露後における体重, および試料に用いた, 肺, 肝の湿重量およびその体重比(27か月間暴露したものは右肺の値を用いた)は資料(表1~6)に示されたとおりである。(p. 285~288参照)肺の湿重量およびその体重比は18か月間暴露後の暴露群で増加の傾向がみられた。

9, 18, 27か月間暴露後における肺のリン脂質脂肪酸組成を表1, 2, 3に示す(27か月間暴露では対照群, 暴露群ともに生存数が少なかったため, その平均値と標準偏差値のみを記した。)

肺のリン脂質中含量が多いパルミチン酸については0.04ppmNO₂濃度では有意な増加は観察されなかったが, 0.4ppmNO₂濃度では, 18か月間暴露で, 4ppmNO₂濃度では, 9, 18か月間暴露で有意に増加することが観察された。27か月間暴露では対照群との間に有意な差は観察されなかったが4ppmNO₂濃度では平均値は対照群より高かった。

パルミチン酸以外の脂肪酸では, 0.04ppm, 0.4ppmNO₂濃度で, ミリスチン酸が9, 18か月間暴露後に減少傾向, オレイン酸, リノール酸は27か月間暴露後にそれぞれ増加, 減少傾向を示した。他の脂肪酸は一定の傾向を示さなかった4ppmNO₂濃度ではミリスチン酸は9か月間暴露で有意に

表 1 9か月間NO₂暴露の肺リン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響

Table 1. Change in the fatty acid composition of lung tissue phospholipids after 9 months exposure of rats to NO₂

	RT ^a	Control n=6	9 Months NO ₂ Exposure		
			0.04ppm n=6	0.4ppm n=6	4.0ppm n=6
Myristic Acid	261	1.39±0.10 ^b	1.61±0.10 ^{***c}	1.54±0.13	1.67±0.18*
	341	4.75±0.30	4.52±0.55	4.21±0.94	4.29±0.06**
Palmitic Acid	411	36.45±0.98	37.27±0.65	37.40±1.27	37.98±0.56*
	445	1.56±0.13	1.75±0.14	1.55±0.14	1.74±0.10
	558	3.07±0.34	2.77±0.31	2.96±0.43	3.09±0.47
Stearic Acid	694	11.32±0.31	11.22±0.50	11.27±0.26	11.04±0.31
Oleic Acid	763	11.41±0.31	10.67±0.36**	11.56±0.47	12.36±0.80*
Linoleic Acid	915	8.45±0.26	8.38±0.31	7.98±0.20*	8.36±0.40
Arachidonic Acid	2,018	13.45±0.57	13.36±0.68	13.43±0.76	14.42±0.42*

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

b : Mean value ± S. D. (%)

c : t-test as compared with control, *P<0.05 and** P<0.01

表 2 18か月間NO₂暴露の肺リン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響

Table 2. Change in the fatty acid composition of lung tissue phospholipids after 18 months exposure of rats to NO₂

	RT ^a	Control n=6	18 Months NO ₂ Exposure		
			0.04ppm n=6	0.4ppm n=6	4 ppm n=6
Myristic Acid	261	1.31±0.10 ^b	1.53±0.25	1.37±0.08	1.44±0.11
	341	4.19±0.73	3.55±1.02	3.26±0.18 ^{bc}	3.69±0.93
Palmitic Acid	411	36.66±1.31	37.97±1.47	38.65±0.82*	38.62±1.42*
	445	1.86±0.14	1.71±0.30	2.02±0.15	1.77±0.16
	558	2.91±0.46	2.45±0.50	2.39±0.69	3.33±0.30
Stearic Acid	694	11.62±0.44	12.15±0.30*	11.85±0.48	11.19±0.69
Oleic Acid	763	11.57±0.62	11.30±0.58	11.64±0.17	11.96±0.17
Linoleic Acid	915	8.08±0.43	8.47±0.76	8.26±0.46	7.80±0.19
Arachidonic Acid	2,018	13.61±0.75	13.10±0.71	12.85±0.27	13.31±0.35

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

b : Mean value ± S. D. (%)

c : t-test as compared with control, *P<0.05

表 3 27か月間NO₂暴露の肺リン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響

Table 3. Change in the fatty acid composition of lung tissue phospholipids after 27 months exposure of rats to NO₂

	RT ^a	Control n=3	27 Months NO ₂ Exposure		
			0.04ppm n=3	0.4ppm n=3	4.0ppm n=4
Myristic Acid	261	1.66±0.10 ^b	1.21±0.15	1.57±0.02	1.74±0.32
	341	1.81±0.44	1.78±0.27	1.65±0.09	1.84±0.27
Palmitic Acid	411	38.98±0.47	38.90±0.56	38.86±1.50	39.65±1.18
	445	1.99±0.11	2.75±0.28	2.72±0.42	2.63±0.18
Stearic Acid	558	2.00±0.14	1.40±0.21	1.61±0.13	1.98±0.13
	694	11.77±0.79	10.90±0.17	11.78±0.30	11.17±0.36
Oleic Acid	763	9.97±0.18	10.82±0.38	10.30±0.04	10.41±0.25
Linoleic Acid	915	7.97±0.19	7.34±0.33	7.32±0.19	7.69±0.15
Arachidonic Acid	2,018	11.82±0.30	11.26±0.30	10.96±0.34	11.85±0.53

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

b : Mean value ± S. D.

減少し、18か月間暴露でも減少傾向がみられた。オレイン酸は9か月間暴露で有意に増加した。18、27か月間暴露でも増加傾向がみられた。ステアリン酸、リノール酸では9、18、27か月間暴露で平均値が対照群よりもいずれも低かった。以上NO₂の慢性暴露により、肺リン脂質の脂肪酸組織が変動することが見いだされた。

次に9、18、27か月間暴露後における肝リン脂質脂肪酸組成を表4、5、6に示す。いずれの濃

表 4 9か月間NO₂暴露の肝リン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響

Table 4. Change in the fatty acid composition of liver tissue phospholipids after 9 months exposure of rats to NO₂

	Control n=6	9 Months NO ₂ Exposure		
		0.04ppm n=6	0.4ppm n=6	4.0ppm n=6
Palmitic Acid	20.37±0.47 ^a	20.31±0.97	20.46±1.02	20.05±0.73
Stearic Acid	17.45±1.22	16.90±1.44	16.95±1.30	18.07±1.37
Oleic Acid	7.36±0.37	7.76±0.72	8.09±0.60	7.29±0.71
Linoleic Acid	13.89±0.53	13.78±0.42	13.43±0.59	12.92±0.92
Arachidonic Acid	25.35±1.12	25.40±1.21	25.13±1.09	26.46±0.83
Docosahexaenoic Acid	9.94±0.63	10.75±0.91	10.79±1.04	10.53±0.61

a : Mean value ± S. D. (%)

表 5 18か月間NO₂暴露の肝リン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響

Table 5. Change in the fatty acid composition of liver tissue phospholipids after 18 months exposure of rats to NO₂

	Control n=6	18 Months NO ₂ Exposure		
		0.04ppm n=6	0.4ppm n=6	4.0ppm n=6
Palmitic Acid	19.52±0.6. ^a	20.06±0.68	18.54±1.42	18.21±3.46
Stearic Acid	18.12±1.21	18.80±2.08	19.47±2.17	20.80±4.86
Oleic Acid	7.91±0.96	7.53±0.86	7.41±0.87	7.23±1.45
Linoleic Acid	12.91±0.94	13.54±1.46	13.43±1.54	11.48±1.85
Arachidonic Acid	25.51±1.50	24.30±0.70	25.74±0.74	25.81±0.44
Docosahexaenoic Acid	11.50±1.29	11.32±1.43	11.15±1.90	12.58±1.69

a : Mean value ± S.D. (%)

表 6 27か月間NO₂暴露の肝リン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響

Table 6. Change in the fatty acid composition of liver tissue phospholipids after 27 month exposure of rats to NO₂

	Control n=3	27 Months NO ₂ Exposure		
		0.04ppm n=3	0.4ppm n=3	4 ppm. n=4
Palmitic Acid	19.27±1.81 ^a	17.79±2.33	16.97±0.26	16.71±0.98
Stearic Acid	21.09±3.36	22.20±2.90	21.64±0.16	23.06±1.64
Oleic Acid	6.89±0.75	6.88±1.81	7.33±0.55	7.20±0.87
Linoleic Acid	14.10±0.96	12.09±1.80	11.84±0.55	12.05±1.04
Arachidonic Acid	24.12±1.13	23.39±2.62	25.51±1.26	26.96±1.36
Docosahexaenoic Acid	11.09±0.58	13.47±1.86	14.10±0.64	11.27±0.69

a : Mean value ± S.D. (%)

度においても有意な差は観察されなかった。傾向としては4 ppmNO₂濃度ではいずれの暴露期間後でもパルミチン酸, オレイン酸 (27か月間暴露は除く), リノール酸は, 対照群の値よりも低く, ステアリン酸, アラキドン酸, ドコサヘキサエン酸は対照群の値より高いことが観察された。

加齢とこれらの臓器のリン脂質脂肪酸組成の関係について検討する。肺では図1, 2に示すように, 加齢により対照群, 暴露群ともにミリスチン酸は減少, パルミチン酸は増加する傾向を示した。肝では図3, 4に示すように加齢によって対照群, NO₂暴露群共にパルミチン酸は減少し, ステアリン酸は増加した。

肺, 肝で上記の脂肪酸組成が同じ値をとるようにラットの月令を, 対照群とNO₂暴露群で比較すると, NO₂暴露群の方が低い月令で対照群の高い月令の値になる傾向にあった。

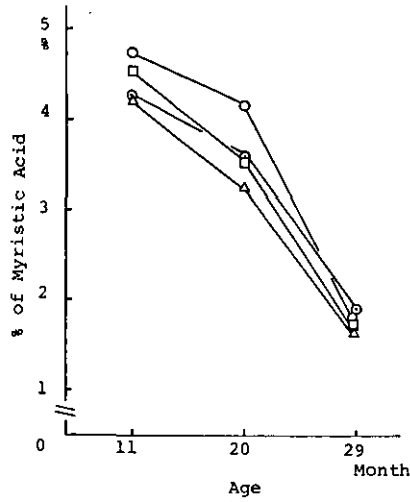


図 1 加齢およびNO₂暴露による肺リン脂質中のミリスチン酸量の変化
○ ; 対照, □ ; 0.04ppm NO₂, △ ; 0.4ppm NO₂, ⊙ ; 4 ppm NO₂

Fig. 1 Change in the content of myristic acid in lung tissue phospholipids by aging and NO₂ exposure.

○ ; Control, □ ; 0.04ppm NO₂, △ ; 0.4ppm NO₂, ⊙ ; 4 ppm NO₂.

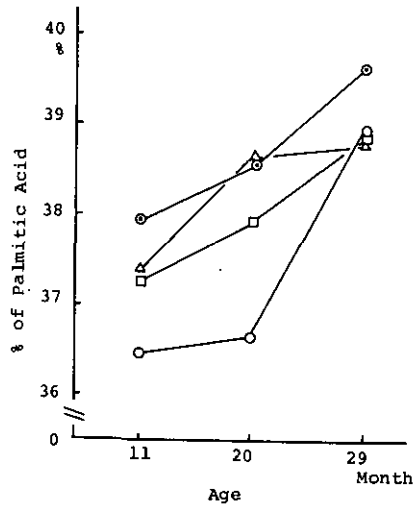


図 2 加齢およびNO₂暴露による肺リン脂質中のパルミチン酸量の変化
○ ; 対照, □ ; 0.04ppm NO₂, △ ; 0.4ppm NO₂, ⊙ ; 4 ppm NO₂

Fig. 2 Change in the content of palmitic acid in lung tissue phospholipids by aging and NO₂ exposure.

○ ; Control, □ ; 0.04ppm NO₂, △ ; 0.4ppm NO₂, ⊙ ; 4 ppm NO₂

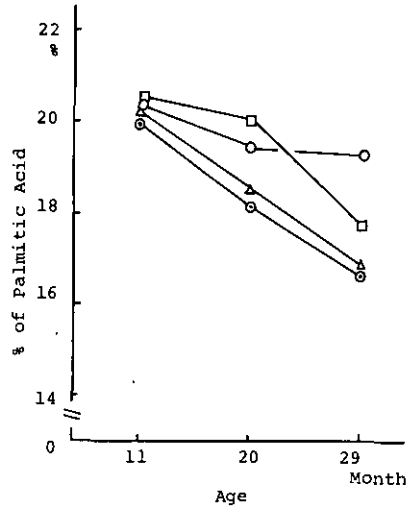


図 3 加齢およびNO₂暴露による肝リン脂質中のパルミチン酸量の変化
○ ; 対照, □ ; 0.04ppm NO₂, △ ; 0.4ppm NO₂, ⊙ ; 4 ppm NO₂

Fig. 3 Change in the content of palmitic acid in liver tissue phospholipids by aging and NO₂ exposure.

○ ; Control, □ ; 0.04ppm NO₂, △ ; 0.4ppm NO₂, ⊙ ; 4 ppm NO₂

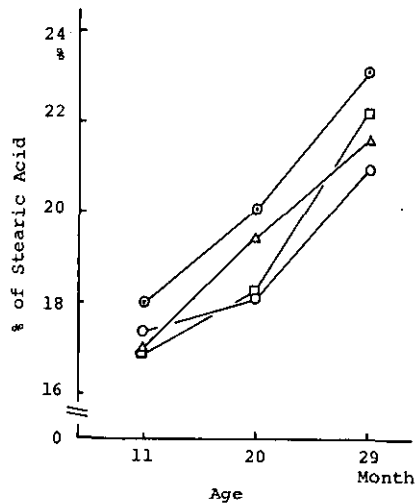


図 4 加齢およびNO₂暴露による肝リン脂質中のステアリン酸量の変化
○ ; 対照, □ ; 0.04ppm NO₂, △ ; 0.4ppm NO₂, ⊙ ; 4 ppm NO₂

Fig. 4 Change in the content of stearic acid in liver tissue phospholipids by aging and NO₂ exposure.

○ ; Control, □ ; 0.04ppm NO₂, △ ; 0.4ppm NO₂, ⊙ ; 4 ppm NO₂

考 察

4 ppm NO₂ 18か月間暴露で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(20ppm NO₂, 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, /週)でも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ではパルミチン酸がNO₂暴露群(0.4ppm, および4 ppm NO₂, 9, 18か月間)で有意に増加した。この増加は急性NO₂暴露(20ppm NO₂, 20, 40時間)³⁾ およびRoehmらの行った亜急性暴露(10ppm NO₂, 4週間)⁷⁾の総脂質中の脂肪酸組成においても観察された。このパルミチン酸の増加に寄与する要因として、1)パルミチン酸含量の多いレシチンの合成が他のリン脂質種の合成に比較して活発になること、⁹⁾ 2) de novo合成系でレシチン合成の段階でパルミチン酸の取り込みが増加すること、3)レシチン中のパルミチン酸含量を高めるレシチン再生系が活発になることなどのレシチン合成系の要因と4)パルミチン酸を取り込んだレシチンの分解が遅くなる¹⁰⁾などの代謝系の要因が考えられる。NO₂慢性暴露によるパルミチン酸増加にこれらの要因がどの程度寄与しているかに関して、相互の定量的な関係も含め今後検討する必要がある。

一方他の脂肪酸では4 ppm NO₂濃度でミリスチン酸、ステアリン酸、リノール酸が有意な減少または減少の傾向を示したが、この傾向は急性暴露(20ppm NO₂, 20時間)³⁾の場合でも観察された。

オレイン酸の増加またはその傾向は亜急性暴露(10ppm NO₂, 4週間)⁸⁾で観察されたが、急性暴露(20ppm NO₂, 20, 40時間)³⁾では減少した。

一方肝リン脂質の脂肪酸組成の4 ppm NO₂暴露群の変化の中で、パルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸の変化は肺と逆の傾向を示した。これらの脂肪酸が肺と肝で逆の傾向を示すことは急性暴露(20ppm NO₂, 20, 40時間)³⁾の場合も観察された。このことは肺でのリン脂質脂肪酸組成の変化に肝が対応している可能性も考えられ、リン脂質の合成、代謝、輸送を含めた生体内での挙動を検討する必要があると考えられる。

次に加齢との関係を検討する。加齢による変化(肺でのミリスチン酸組成の減少とパルミチン酸組成の減少とステアリン酸組成の増加)が対照群と比べNO₂暴露で低い月令から出る傾向にあった。このことはNO₂暴露が加齢を進める可能性があることを示している。加齢の促進に関しては、Harmanらが放射線照射により、発癌や突然変異とともに老化現象のみられることを報告し、放射線照射により生じる遊離基が老化を促進する一つの因子であるとした¹¹⁾一方我々はNO₂と不飽和脂肪酸との反応でニトロ置換した遊離基を中間体とした生成物が生成することを明らかにしてきた¹⁾。老化現象が生体内に生じた遊離基により促進されると仮定すると、NO₂も老化を促進する性質を有すると考えられる。老化に関しては老化とリポフスチン沈着との間に相関性のあることをStrehlerらが報告し、¹²⁾ Rivettらもリポフスチン由来のけい光物質がラットこう丸組織で加齢と共に増加することを報告している。¹³⁾ 肺、肝における上記脂肪酸組成の変化が老化と相関のある物質とどのような関係にあるか今後検討をすすめたい。

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. Kiuno 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. Letters.*, **6**, 149—155.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Kobayashi, T.: Gas-liquid chromatographic separation of gemetric isomers of unsaturated fatty acid methyl esters using a glass capillary column. *J. Chromatogr.*, **194**, 404—409.
- 7) Roehm, J. N., J. G. Hadley and D. B. Menzel (1971): Antioxidants vs lung disease. *Arch. Intern. Med.*, **128**, 88—93.
- 8) Arner, E. C., and R. A. Rhoades (1973): Long term nitrogen dioxide exposure. *Arch. Environ. Health.*, **26**, 156—160.
- 9) Blanck, M. L., W. Dalby, 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.
- 10) Thomas, T. Jr. and R. A. Rhoades (1970): ¹⁴C-1-palmitate incorporation by rat lung: Effect of nitrogen dioxide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **134**, 1181—1183.
- 11) Harman, D. (1956): Aging: A theory based on free radicals and radiation chemistry. *J. Geront.*, **11**, 298—300.
- 12) Strehler, B. L., D. D. Mark, A. S. Mildvan and M. V. Gee (1959): Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium. *J. Gerontol.*, **14**, 430—439.
- 13) Shimasaki, H., N. Takeshi, O. S. Privett (1977): Detection of age-related fluorescent substances in rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 443—451.

資料

Data

表 1 臓器重量およびその体重比 (9 か月間暴露, 1 回目, 雄)

Table 1. Organ weight and its relative weight to body weight(%) (exposed for 9 months, 1 st, male) $M \pm SD$, $n=6$.

		Control	0.04ppm	0.4ppm	4.0ppm
Body weight	g	564 ± 20	548 ± 12	583 ± 6	482 ± 69
Lung	g	1.641 ± 0.082	1.747 ± 0.259	1.708 ± 0.127	1.682 ± 0.140
	%	0.291 ± 0.015	0.300 ± 0.031	0.292 ± 0.020	0.306 ± 0.020
Liver	g	14.0 ± 0.3	15.0 ± 1.4	15.0 ± 0.8	16.2 ± 1.4
	%	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1	3.0 ± 0.3
Kidney (left)	g	1.43 ± 0.14	1.64 ± 0.25	1.53 ± 0.19	1.52 ± 0.11
	%	0.25 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.28 ± 0.02
Kidney (right)	g	1.50 ± 0.09	1.70 ± 0.26	1.57 ± 0.17	1.54 ± 0.11
	%	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.28 ± 0.01
Spleen	g	0.80 ± 0.08	0.81 ± 0.15	0.88 ± 0.04	0.90 ± 0.07
	%	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.05	0.16 ± 0.01
Heart	g	1.49 ± 0.06	1.49 ± 0.15	1.47 ± 0.06	1.44 ± 0.06
	%	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01

表 2 臓器重量およびその体重比 (9 か月間暴露, 1 回目, 雌)

Table 2. Organ weight and its relative weight to body weight(%) (exposed for 9 months, 1 st, female) $M \pm SD$, $n=6$.

		Control	0.04ppm	0.4ppm	4.0ppm
Body weight	g	324 ± 54	347 ± 30	335 ± 21	344 ± 43
Lung	g	1.009 ± 0.138	1.084 ± 0.069	1.075 ± 0.090	1.112 ± 0.169
	%	0.313 ± 0.016	0.319 ± 0.042	0.321 ± 0.028	0.320 ± 0.035
Liver	g	10.7 ± 1.2	10.8 ± 1.1	11.0 ± 1.0	12.0 ± 1.1
	%	3.3 ± 0.3	3.2 ± 0.4	3.3 ± 0.3	3.5 ± 0.4
Kidney (left)	g	1.03 ± 0.09	1.06 ± 0.14	1.15 ± 0.16	1.08 ± 0.08
	%	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.34 ± 0.06	0.31 ± 0.03
Kidney (right)	g	1.07 ± 0.09	1.11 ± 0.09	1.06 ± 0.31	1.14 ± 0.13
	%	0.34 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.31 ± 0.09	0.33 ± 0.03
Spleen	g	0.60 ± 0.09	0.63 ± 0.04	0.58 ± 0.08	0.60 ± 0.07
	%	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Heart	g	1.01 ± 0.09	1.06 ± 0.04	1.06 ± 0.10	1.01 ± 0.10
	%	0.32 ± 0.05	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.29 ± 0.04

表 3 臓器重量およびその体重化 (9か月間暴露, 2回目, 雄)

Table 3. Organ weight and its relative weight to body weight(%) (exposed for 9 months, 2nd, male) $M \pm SD$, $n = 6$, *: $p < 0.05$.

		Control	0.04ppm	0.4ppm	4 ppm
Body weight	g	496 ± 45	570 ± 54*	524 ± 54	494 ± 32
Lung	g	1.389 ± 0.082	1.445 ± 0.074	1.379 ± 0.083	1.417 ± 0.128
	%	0.282 ± 0.033	0.255 ± 0.023	0.265 ± 0.024	0.287 ± 0.018
Liver	g	15.143 ± 0.823	16.577 ± 1.74	15.867 ± 2.516	15.237 ± 1.041
	%	3.08 ± 0.34	2.91 ± 0.22	3.02 ± 0.29	3.10 ± 0.28
Kidney	g	2.713 ± 0.242	2.909 ± 0.269	2.851 ± 0.321	2.751 ± 0.259
	%	0.552 ± 0.08	0.512 ± 0.040	0.545 ± 0.034	0.557 ± 0.04
Spleen	g	0.917 ± 0.427	0.851 ± 0.141	0.775 ± 0.103	0.837 ± 0.097
	%	0.190 ± 0.102	0.149 ± 0.017	0.147 ± 0.007	0.170 ± 0.023
Brain	g	2.183 ± 0.048	2.202 ± 0.040	2.166 ± 0.046	2.137 ± 0.069
	%	0.444 ± 0.045	0.389 ± 0.033*	0.419 ± 0.055	0.434 ± 0.023
Heart	g	1.295 ± 0.083	1.422 ± 0.086*	1.329 ± 0.094	1.310 ± 0.124
	%	0.262 ± 0.023	0.252 ± 0.027	0.255 ± 0.018	0.265 ± 0.019
Testis	g	3.592 ± 0.839	3.886 ± 0.258	3.566 ± 0.957	3.747 ± 0.440
	%	0.734 ± 0.189	0.689 ± 0.094	0.672 ± 0.161	0.758 ± 0.064
Adrenal	mg	37.2 ± 4.4	41.0 ± 1.5	41.3 ± 4.4	36.3 ± 5.0
	%	0.076 ± 0.013	0.073 ± 0.007	0.079 ± 0.007	0.072 ± 0.009

表 4 臓器重量およびその体重比 (18か月間暴露, 1回目, 雄)

Table 4. Organ weight and its relative weight to body weight(%) (exposed for 18 months, 1st, male) $M \pm SD$, $n = 6$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

		Control	0.04ppm	0.4ppm	4 ppm
Body weight	g	598 ± 56	616 ± 31	647 ± 57	585 ± 106**
Lung	g	1.540 ± 0.086	1.574 ± 0.085	1.620 ± 0.124	1.793 ± 0.164
	%	0.259 ± 0.021	0.256 ± 0.014	0.251 ± 0.017	0.317 ± 0.062
Liver	g	17.424 ± 1.361	17.940 ± 1.740	19.568 ± 2.039	18.219 ± 2.245
	%	2.931 ± 0.268	2.911 ± 0.205	3.032 ± 0.296	3.307 ± 1.172
Kidney	g	3.555 ± 0.250	3.652 ± 0.426	4.000 ± 0.428	3.968 ± 0.528
	%	0.600 ± 0.069	0.595 ± 0.081	0.623 ± 0.090	0.703 ± 0.181
Spleen	g	1.020 ± 0.103	1.047 ± 0.192	0.995 ± 0.191	0.941 ± 0.087
	%	0.171 ± 0.017	0.169 ± 0.023	0.154 ± 0.027	0.166 ± 0.034
Heart	g	1.512 ± 0.176	1.497 ± 0.097	1.579 ± 0.184	1.585 ± 0.215
	%	0.254 ± 0.026	0.243 ± 0.014	0.244 ± 0.020	0.274 ± 0.021

表 5 臓器重量およびその体重化 (18か月間暴露, 2回目, 雄)

Table 5. Organ weight and its relative weight to body weight (%) (exposed for 18 months, 2nd, male.) $M \pm SD$, $n=6$, * : $P < 0.05$.

		Control	0.04ppm	0.4ppm	4 ppm
Body weight	g	672 ± 78	656 ± 70	604 ± 61	662 ± 70
Lung	g	1.579 ± 0.115	1.668 ± 0.133	1.603 ± 0.110	1.742 ± 0.193
	%	0.236 ± 0.016	0.256 ± 0.020	0.267 ± 0.024*	0.264 ± 0.028
Liver	g	20.302 ± 2.817	18.915 ± 3.010	17.295 ± 2.608	19.695 ± 4.028
	%	3.03 ± 0.35	2.88 ± 0.30	2.86 ± 0.29	2.96 ± 0.50
Kidney	g	3.781 ± 0.602	3.605 ± 0.562	3.639 ± 0.353	3.879 ± 0.595
	%	0.568 ± 0.102	0.551 ± 0.08	0.604 ± 0.053	0.587 ± 0.083
Spleen	g	1.183 ± 0.122	1.091 ± 0.134	0.955 ± 0.15*	1.121 ± 0.181
	%	0.177 ± 0.016	0.167 ± 0.018	0.158 ± 0.019	0.170 ± 0.024
Brain	g	2.281 ± 0.114	2.237 ± 0.101	2.224 ± 0.052	2.244 ± 0.049
	%	0.343 ± 0.030	0.345 ± 0.039	0.371 ± 0.037	0.343 ± 0.036
Heart	g	1.604 ± 0.131	1.608 ± 0.223	1.644 ± 0.274	1.713 ± 0.197
	%	0.240 ± 0.022	0.246 ± 0.030	0.273 ± 0.046	0.259 ± 0.018
Testis	g	3.743 ± 0.981	4.272 ± 0.219	4.176 ± 0.389	4.260 ± 0.412
	%	0.555 ± 0.130	0.656 ± 0.054	0.695 ± 0.072*	0.648 ± 0.074
Adrenal	mg	45.8 ± 4.3	49.0 ± 2.0	45.7 ± 4.1	48.3 ± 1.4
	‰	0.069 ± 0.011	0.076 ± 0.080	0.076 ± 0.010	0.074 ± 0.007

表 6 臓器重量およびその体重化 (27か月間暴露, 1回目, 雄)

Table 6. Organ weight and its relative weight to body weight(%) (exposed for 27 months, male) $M \pm SD$.

		Control (n=3)	0.04ppm (n=3)	0.4ppm (n=3)	4 ppm (n=4)
Boby weight	g	564±76	487±48	501±37	496±37
Lung (right)	g	1.228±0.085	1.032±0.109	1.586±0.583	1.179±0.093
	%	0.220±0.023	0.212±0.016	0.311±0.053	0.239±0.027
Liver	g	17.00±2.19	16.04±1.65	23.87±5.10	16.77±0.88
	%	3.02±0.07	3.30±0.12	4.73±0.75	3.39±0.10
Kidney	g	3.606±0.031	4.824±1.617	4.421±0.454	4.204±0.620
	%	0.653±0.082	0.980±0.249	0.890±0.144	0.843±0.092
Spleen	g	1.690±0.236	1.242±0.159	4.742±4.595	1.413±0.140
	%	0.301±0.030	0.255±0.027	0.890±0.814	0.291±0.045
Brain	g	2.282±0.088	2.375±0.039	2.213±0.123	2.269±0.148
	%	0.45±0.01	0.49±0.05	0.45±0.06	0.46±0.04
Heart	g	1.744±0.307	1.615±0.272	1.926±0.349	1.621±0.083
	%	0.30±0.01	0.33±0.02	0.38±0.06	0.33±0.03
Testis	g	4.011±0.363	3.749±0.329	2.754±0.921	3.774±0.159
	%	0.73±0.15	0.78±0.09	0.56±0.21	0.77±0.05
Adrenal	g	0.091±0.007	0.058±0.008	0.112±0.029	0.070±0.014
	%	0.02±0.005	0.01	0.02±0.005	0.01±0.004

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)

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)

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)

第12号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)

第13号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)

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)

RESEARCH REPORT FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

No. 15

国立公害研究所研究報告 第15号

(R-15-'80)

昭和55年10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 勝美印刷株式会社
東京都文京区小石川1-3-7

Published by The National Institute for Environmental Studies

Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

October, 1980