

複合ガス状大気汚染物質の生体影響に関する実験的研究

Experimental Studies on the Effects of Gaseous Air Pollutants in
Combination on Animals

昭和57～60年度 特別研究報告

Research Report in 1982-1985

村上正孝・河田明治・小林隆弘 編著

Edited by Masataka MURAKAMI, Meiji KAWATA and Takahiro KOBAYASHI

環境庁 国立公害研究所

THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

序

現在、都市部における代表的汚染物質として、二酸化窒素、二酸化硫黄、オゾン、一酸化炭素、一酸化窒素等があげられるが、その他にも浮遊粒子状物質や浮遊粉じん、炭化水素と二酸化窒素の光化学反応によって生ずる光化学第二次生成物質等が知られており、これらによる大気汚染は二酸化硫黄、一酸化炭素以外についてあまり改善がみられていない。

近年の大気汚染は複雑な、いわゆる複合汚染として知られるものであり、それらの汚染の様子は複雑化、広域化の傾向にある。したがって、大気汚染物質の生体影響を解明することは、生活社会や行政のニーズとしても重要な部分を占めており、予防医学の基礎を確立するためにも極めて重要な課題である。

先の特別研究、「大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究」においては主として二酸化窒素を中心に生体に対する急性、亜急性、慢性影響研究を行い、生理学的、病理学的、生化学的、免疫学的検索手法の開発により、各種の影響指標を確立した。これらの研究成果は国立公害研究所研究報告第8号、同第15号、同第31号、同第40号として既に公にされている。この研究の延長線上に、今回の特別研究「複合ガス状大気汚染物質の生体影響に関する実験的研究」は位置づけられ、昭和57～61年度の5か年計画で進行しつつある。

昭和57年度において、動物実験棟(ズートロン)の中にある二酸化窒素専用の低濃度長期慢性暴露チャンバーにオゾンガスを同時に供給するシステムを附加設置し、直ちに長期慢性暴露実験が開始された。

今回の報告書は昭和57～60年度にわたる研究成果をまとめる中間報告である。

本報告においては生理学的、生化学的、免疫学的、細胞遺伝学的手法を用いた研究成果18編が収録されている。内10編が二酸化窒素+オゾンの複合汚染の研究成果で、8編はその前段階としてそれぞれのガスに対する単独影響の基礎研究であり、慢性暴露実験の研究成果は次の報告にゆずることとした。

本研究の成果が急がれていることはよく承知している。ここに報告するものは期待する成果のごく一部にすぎないが、科学的知見を一步一步積み重ねて現象の本質に迫ることを我々は目標としている。

所期の目的を達成するためにはまだまだ多くの研究を必要とし、長い期間が必要なものと覚悟している。

昭和61年3月

国立公害研究所 環境生理部長

久保田 憲太郎 (プロジェクト・リーダー)

目 次

Abstract	1
I. 研究の概要及び今後の展望	3
久保田憲太郎	
II. 報 文	
1. 二酸化窒素及びオゾン暴露による自律神経系機能変化に 関する影響評価の試み	17
局 博一	
2. オゾン及び二酸化窒素急性暴露によるマウス IgE 抗体産生の増強	29
今井 透・藤巻秀和・白石不二雄・本田芳男・清水不二雄	
3. オゾン亜急性暴露がマウス IgE 抗体産生に及ぼす影響	35
小澤 仁・藤巻秀和・白石不二雄・本田芳男・村上正孝	
4. オゾン及び二酸化窒素暴露による細胞性免疫応答に及ぼす影響	43
藤巻秀和・白石不二雄・足川哲夫・村上正孝	
5. 二酸化窒素, オゾン, 及びそれらの複合暴露による ラット末梢血リンパ球の姉妹染色分体交換頻度への影響	51
白石不二雄・村上正孝・森本兼義・小泉 明	
6. ラット赤血球のアルケニルアシル, アルキルアシル及び ジアシルエタノールアミンホスホグリセライドへの アラキドン酸取り込み速度の違い	61
彼谷邦光・三浦 卓	
7. 二酸化窒素による肺胞マクロファージの活性化と細胞数の増加	71
持立克身・高橋勇二・大住拓美・三浦 卓	
8. ラット臓器ミクロソームの異物代謝系に及ぼすオゾン間欠暴露の影響	81
高橋勇二・三浦 卓・持立克身・河田明治・国本 学	
9. ラット肺の異物代謝系に及ぼす二酸化窒素とオゾンの影響の比較	91
高橋勇二・三浦 卓	

10. ラット臓器のミクロソーム異物代謝系に及ぼす 二酸化窒素とオゾンの複合間欠暴露の影響	99
高橋勇二・三浦 卓・持立克身・河田明治・国本 学	
11. ラット臓器のミクロソーム電子伝達系に及ぼす 二酸化窒素とオゾンの複合間欠暴露の影響	107
三浦 卓・高橋勇二・持立克身・彼谷邦光・国本 学	
12. ラット臓器のエネルギー供給系に及ぼす 二酸化窒素とオゾンの間欠複合暴露の影響	117
持立克身・高橋勇二・竹中参二・ 三浦 卓・河田明治・国本 学	
13. ラット臓器中の遊離ドリコール量に及ぼす二酸化窒素の影響	129
野原恵子・彼谷邦光・高橋勇二・三浦 卓・河田明治	
14. 二酸化窒素とオゾンの混合ガス暴露による肺の脂質過酸化と その動物種差について	135
荒川健司・市瀬孝道・嵯峨井勝	
15. 二酸化窒素暴露によるラットの肺、血清及び尿中の コラーゲン代謝関連因子の変化	177
市瀬孝道・嵯峨井勝・久保田憲太郎	
16. 二酸化窒素暴露がラット肺胞洗浄液中のプロスタグランジン類及び トロンボキサン B ₂ 含量に及ぼす影響	197
小林隆弘	
17. グルタチオン合成系酵素活性測定法の開発、並びに ラットの各種臓器における合成酵素活性に及ぼす 二酸化窒素又はオゾン暴露の影響	205
河田明治・高橋勇二・三浦 卓	
18. 二酸化窒素又はオゾンの亜急性暴露がラット肺の グルタチオン合成系酵素活性に及ぼす影響	217
河田明治・高橋勇二・三浦 卓	

CONTENTS

Abstract	1
I. Outline of Performed Researches and Future Prospects	3
K. KUBOTA	
II. Papers	
1. Assessment for Functional Changes of Autonomic Nervous System due to Exposures with Nitrogen Dioxide and Ozone	17
H. TSUBONE	
2. Enhancement of IgE Antibody Production by Acute Exposure to Ozone or Nitrogen Dioxide in Mice	29
T. IMAI, H. FUJIMAKI, F. SHIRAISHI, Y. HONDA and F. SHIMIZU	
3. Effect of Subacute Exposure to Ozone on IgE Antibody Production in Mice	35
M. OZAWA, H. FUJIMAKI, F. SHIRAISHI, Y. HONDA and M. MURAKAMI	
4. Effect of Exposure to Ozone or Nitrogen Dioxide on Cellular Immunity in Mice	43
H. FUJIMAKI, F. SHIRAISHI, T. ASHIKAWA and M. MURAKAMI	
5. The Effects of <i>in vivo</i> Exposure to Nitrogen Dioxide, Ozone, and their Combined Gases on Frequencies of Sister Chromatid Exchanges in Peripheral Blood Lymphocytes of Rats	51
F. SHIRAISHI, M. MURAKAMI, K. MORIMOTO and A. KOIZUMI	
6. Different Incorporation Rates of Arachidonic Acid into Alkenylacyl, Alkylacyl and Diacyl ethanolaminephosphoglyceride of Rat Erythrocytes	61
K. KAYA and T. MIURA	
7. Activation and Increment of Alveolar Macrophages Induced by Nitrogen Dioxide	71
K. MOCHITATE, Y. TAKAHASHI, T. OHSUMI and T. MIURA	
8. Effects of Intermittent Exposures to Ozone on the Microsomal-Xenobiotic Metabolizing Systems of Rat Tissues	81
Y. TAKAHASHI, T. MIURA, K. MOCHITATE, M. KAWATA and M. KUNIMOTO	

9. <i>In vivo</i> Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on the Xenobiotic-Metabolizing Systems of Rat Lungs	91
Y. TAKAHASHI and T. MIURA	
10. Effects of Intermittent Exposures to Nitrogen Dioxide and Ozone Alone and in Combination on the Microsomal Xenobiotic-Metabolizing Systems of Rat Tissues	99
Y. TAKAHASHI, T. MIURA, K. MOCHITATE, M. KAWATA and M. KUNIMOTO	
11. Effects of Intermittent Exposures to Nitrogen Dioxide and Ozone Alone and in Combination on the Microsomal Electron-Transport Systems of Rat Tissues	107
T. MIURA, Y. TAKAHASHI, K. MOCHITATE, K. KAYA and M. KUNIMOTO	
12. Effects of Intermittent Exposures to Nitrogen Dioxide and Ozone Alone and in Combination on the Energy-Generating Systems of Rat Tissues	117
K. MOCHITATE, Y. TAKAHASHI, S. TAKENAKA, T. MIURA, M. KAWATA and M. KUNIMOTO	
13. Effects of Nitrogen Dioxide on Free-Dolichol Contents in Rat Tissues	129
K. NOHARA, K. KAYA, Y. TAKAHASHI, T. MIURA and M. KAWATA	
14. Species Differences of Lipid Peroxidation and the Related Factors in Lungs of Various Animals Exposed to Combined Gas of Nitrogen Dioxide and Ozone	135
K. ARAKAWA, T. ICHINOSE and M. SAGAI	
15. Changes of Collagen Metabolism-Related Factors in Lung, Serum and Urine in Rat Exposed Acutely and Chronically to Nitrogen Dioxide	177
T. ICHINOSE, M. SAGAI and K. KUBOTA	
16. Effects of Nitrogen Dioxide Exposure on the Contents of Prostaglandins and Thromboxane B ₂ in Broncho Alveolar Lavage	197
T. KOBAYASHI	
17. A New Method for Assay of the Glutathione Synthesis Enzymes and the Effects of Exposure to Nitrogen Dioxide or Ozone on the Activity of the Enzymes in Rat Tissues	205
M. KAWATA, Y. TAKAHASHI and T. MIURA	
18. Effects of Subacute Exposure to Nitrogen Dioxide or Ozone on the Activity of the Glutathione Synthesis Enzymes of Rat Lungs	217
M. KAWATA, Y. TAKAHASHI and T. MIURA	

Abstract

The object of this research is to understand the health effect of gaseous air pollutants in combination, and to provide basic information for determining air quality criteria of ambient air or for preventing the occurrence of new adverse effects.

The Basic Medical Sciences Division and Engineering Division (Animal Research Center Section) are concerned with the research project for the period 1982 to 1986. Approaches used to perform the investigations include physiological, pathological, biochemical, toxicological, and immunological studies. Although so many chemical substances have been recognized as gaseous air pollutants, particularly nitrogen dioxide and ozone were used in the exposure experiments. Major problems designed to study are as follows.

- 1) Changes of gaseous exchange in lung, oxygen metabolism in organs and pneumo-vascular function,
- 2) Electrophysiological changes of neural function related to respiratory movement and the action potential of the muscles,
- 3) The morphological alteration, particularly, in the respiratory system, the immunological responses including humoral and cellular immunity, and the cytogenic effect indicated frequencies of sister-chromatid exchange,
- 4) Effects on the metabolic functions in tissue organella and the proliferative response of red blood cells and alveolar cells by using young and aged animals,
- 5) The changes of lipid peroxidation and the related factors in lungs of various animals,
- 6) Effects on the synthesis and metabolism of prostaglandins in lung and other organs, and on the contents of prostaglandins in broncho-alveolar lavage,
- 7) Effects on the amino acids and peptides containing sulfhydryl groups to understand the mechanism of oxidative toxicity,
- 8) Physiological, biochemical, and pathological effects at long-term, low-level exposure.

Key words:

nitrogen dioxide, ozone, exposure in combination, rat, mouse, hamster, guinea pig, rabbit, lung, red blood cells, alveolar cells, tissue organella, physiology, pneumo-vascular function, neural function, pathology, respiratory system, immunology, cytogenecity, metabolic functions, proliferative response, aging, ether-phospholipid, microsomal xenobiotic-metabolism, microsomal electron-transport system, dolichol, lipid peroxides, Vitamin E, glutathione, phospholipids, fatty acid composition, polyunsaturated fatty acid, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, peroxidizability index, prostaglandin, prostaglandin I₂, thromboxane B₂, arachidonic acid, 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase, alveolar lavage, γ -glutamylcysteine synthetase, glutathione synthetase.

I

研究の概要及び今後の展望

Outline of Performed Researches and Future Prospects

久保田憲太郎

Kentaro KUBOTA

本特別研究は複合ガス状大気汚染物質による生体の反応並びにその影響の発現機構を解明することを目的としている。この研究は環境生理部と技術部(動物実験施設管理室)との共同で、5か年計画で昭和57年度より開始された。研究の全体計画は以下の通りである。

(1)呼吸生理学的研究, (2)神経系機能に関する電気生理学的研究, (3)免疫反応に及ぼす影響の解明に関する研究, (4)病理学的研究, (5)細胞内果粒成分に及ぼす影響に関する生化学研究, (6)脂質過酸化障害と抗酸化性生体防御機構の変化に関する生化学的研究, (7)各種臓器におけるプロスタグランジン合成及び代謝に関する研究, (8)アミノ酸及びペプチド等に及ぼす影響に関する研究, (9)複合汚染ガスの低濃度長期暴露による慢性影響の解明に関する研究

現在、都市における代表的大気汚染物質として窒素酸化物、オゾン、二酸化硫黄、一酸化炭素、炭化水素、その他にも光化学大気汚染物質などの多くのガス状汚染物質があげられるが、本研究においては、動物実験施設に設置されている二酸化窒素慢性暴露チャンバーにオゾン供給系を増設して二酸化窒素(NO_2)とオゾン(O_3)の混合ガスによる亜急性及び慢性影響に関する問題を中心に研究を進めてきた。

本報告書はこれまでに得られた主な成果、並びに先の特別研究「大気汚染物質の単一及び複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究」において十分満足すべき段階にまで到達し得なかった問題についても検討を加え、その得られた結果をとりまとめたものである。以上の研究成果の内容を次に概説する。

大気汚染物質が神経系に及ぼす影響を系統的に追求した研究は非常に少なく、一部の行動学的研究を除けば、わずかに中枢神経系機能変化に関する報告や呼吸生理機能との関連において報告されているものがあるに過ぎない。神経系機能に関する電気生理学的研究として、 NO_2 及び O_3 暴露がラットにおける自律神経系機能に及ぼす影響について検討した。その一つの試みとして、肺におけるJ受容器を刺激する薬物である Phenyl diguanide を対照ラット及び暴露ラットに一定量投与したときの呼吸気流曲線、心電図及び血圧の変化の違いを調べた。その結果、比較的高濃度の NO_2 暴露により迷走神経、特にJ受容器を介する呼吸・循環反射が亢進することを示した(報文1)。

生体防御反応に対する O_3 及び NO_2 の影響を、マウスの液性あるいは細胞性免疫応答を調べることにより検討した。1.8ppm O_3 及び 30ppm NO_2 の 3 時間という急性暴露において、卵白アルブミン(OA)をエアロゾルとして暴露し、経気道的に投与した場合、抗 OA IgE 抗体産生能は O_3 及び NO_2 の暴露群で増強された。しかしながら、OA と水酸化アルミニウム混和物の腹腔内投与のみによる抗 OA IgE 抗体産生能には、 O_3 及び NO_2 の暴露による影響は認められなかった。このことは、 O_3 及び NO_2 の気道局所での反応が IgE 抗体産生に影響を与えることを示唆した(報文 2)。一方、0.8ppm O_3 を 1 週、2 週、及び 4 週間と亜急性暴露した場合、 O_3 暴露後の OA のエアロゾル投与では、抗 OA IgE 抗体産生能は、かえって抑制された。また、OA と水酸化アルミニウム混和物の腹腔内投与による抗 OA IgE 抗体産生能には、 O_3 暴露による影響は認められなかった。そこで、 O_3 暴露による IgE 抗体産生の抑制現象のメカニズムを hapten-carrier を用いた実験系により解析したところ、 O_3 影響は B 細胞よりも T 細胞に及ぼされていることが示唆された(報文 3)。さらに、0.8ppm O_3 及び 4 ppm NO_2 を 3 日、7 日、及び 14 日間と暴露して、マウスの胸腺重量と細胞性免疫応答の遅延型過敏(DH)反応への影響を検討した。胸腺重量は、 O_3 暴露の全暴露期間とも対照に比べて低下がみられ、一方、 NO_2 暴露では 14 日間の暴露群のみ低下がみられた。DH 反応は、 O_3 暴露の 3 日、7 日で抑制傾向がみられ、特に 7 日間暴露群では有意な抑制がみられた。それに対して、 NO_2 暴露ではほとんど変化はみられなかった。 O_3 暴露による DH 反応の抑制機構を解明するために、暴露マウスの胸腺と血中の T 細胞数の比率を調べたところ、7 日間暴露で胸腺の Thy 1.2 陽性細胞数及び血中リンパ球数の低下がみられた。血中でのリンパ球数は、3 日及び 7 日間暴露で減少したが、T 細胞と B 細胞の比率は対照群と差がみられなかった。これらの結果は、0.8ppm O_3 が 4 ppm NO_2 に比べて胸腺で分化・増殖する T 細胞に対して、より抑制効果を示すことが考えられた(報文 4)。

NO_2 , O_3 , 及び NO_2 と O_3 の複合ガスの暴露による細胞遺伝学的影響をラットを用いて検討した。はじめに、細胞遺伝毒性の指標となる姉妹染色分体交換(SCE)頻度をガス暴露されたラットの末梢血リンパ球で調べるために、ラットの末梢血リンパ球の SCE 分析法を検討し、micro 法と Concavalin A 及び 2-Mercaptoethanol を細胞分裂促進に使用することにより、比較的容易に、かつ安定して SCE の観察が可能となった。この検索系の有用性を試験するために、SCE 誘発の陽性対照としての Cyclophosphamide を気管内投与したところ、ラット末梢血リンパ球の SCE 頻度を有意に増加させることが確認された。 NO_2 4.0ppm, O_3 0.2ppm, O_3 0.2ppm + NO_2 1.2ppm, 及び O_3 0.2ppm + NO_2 4.0ppm の 4 種類のガスまたは複合ガスについて、4 週、8 週、及び 12 週間の亜急性暴露を行った。全暴露群とも全暴露期間を通して、基底 SCE 頻度には対照群との間に差は認められなかった。しかしながら、 O_3 の 8 週と 12 週、 O_3 0.2ppm + NO_2 4.0ppm の 12 週の暴露群で、*in vitro* での Mitomycin-C の負荷による誘発 SCE を高める作用が認められた。これらの結果は、 O_3 あるいはその複合ガスの暴露がラット末梢血リンパ球に何らかの細胞遺伝的影響を及ぼしていることを示唆するものである(報文 5)。

NO₂ 暴露において、吸入された NO₂ により血液中の硝酸イオン濃度が増加すること、及び赤血球膜のリン脂質組成とその脂肪酸組成に変化が起こることが明らかにされている。このことに関連して、ラット赤血球膜エタノールアミンホスホグリセライドの各成分へのアラキドン酸の取り込み速度の違いはホスホリパーゼ A₂ の基質特異性によるものと推定されること、また硝酸イオンによってホスホリパーゼ A₂ の活性が増加されるという結果を得た。硝酸イオンによる赤血球の脂肪酸代謝の活性化は硝酸イオンによる膜構造の変化と、それに伴う細胞外カルシウムイオンの細胞内流入、更に流入したカルシウムイオンによるホスホリパーゼ A₂ の活性増加によるためと考えられる(報文6)。

各種臓器における主要なエネルギー産生系は、ミトコンドリアに局在する呼吸系と可溶性画分に局在する解糖系である。ミトコンドリア呼吸系の律速段階となっているコハク酸-チトクロム C 還元酵素の活性は、4 ppm NO₂ あるいは 0.8 ppm O₃ 間欠暴露(7~8 h/d)により14日間の暴露期間中、ラットの肺、肝臓、腎臓において有意な変化を示さなかった(報文12)。しかしながら、両ガスの複合暴露は、いずれの臓器においても活性を減少させた。一方、肺においては解糖系の律速段階を触媒している酵素及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性が O₃ 間欠暴露により増加した。酵素活性の増加は、肺胞マクロファージにおいても観察された(報文7)。ラットに 4 ppm NO₂ を連続暴露すると、4日目には肺胞マクロファージのエネルギー産生系、抗酸化系、蛋白質及び DNA 合成系が昂進し、次いで細胞数が増加した。O₃ 間欠暴露は、肺胞壁細胞の増殖と間質中の膠原線維の増加による肺胞壁の肥厚を起こすことが病理学的に観察された(報文12)。したがって、NO₂ や O₃ による肺の酵素活性の増加は、代謝系の活性化のみならず肺細胞の増殖をも反映していると考えられる。

O₃ 暴露により肺のミクロソーム成分は顕著に変化した。0.8 ppm O₃ 間欠暴露(1日7又は8時間)により肺の異物代謝系成分が特異的に増加し、14日間の暴露期間中有意に高い活性を維持した。異物代謝系成分の中でもチトクロム P-450 含量は最も高い感受性を示した(報文8)。0.2及び0.4 ppm O₃ 連続暴露によっても同様の現象が観察された(報文9)。異物代謝系成分の増加と並行してベンゾピレン、7-エトキシマリン等の代謝活性も増加した(報文8, 9)。O₃ 暴露とは対称的に、NO₂ 暴露は肺ミクロソームのチトクロム P-450 含量を減少させるが、この減少と並行して7-エトキシマリンの代謝活性が特異的に減少した(報文9)。したがって、肺ミクロソームの異物代謝系は NO₂ と O₃ に対して感受性が高く、両ガスに対して対称的に反応した。また、O₃ と NO₂ 暴露各々に対して感受性の高いチトクロム P-450 イソ酵素の存在する可能性が考えられる。肝ミクロソーム電子伝達系成分は、0.8 ppm O₃ 間欠暴露1日目に減少した後4日目までには回復し、14日目まで対照群のレベルに止まった(報文8)。数種の異物代謝活性も同様の変化を示した。

NO₂ と O₃ の複合効果を明らかにするために、4 ppm NO₂ と 0.4 ppm 又は 0.8 ppm O₃ の複合ガスを14日間間欠暴露(7 h/d)した。0.8 ppm O₃ 暴露による肺ミクロソームの異物代謝活性の増加は、NO₂ との複合により軽減された(報文10)。O₃ 暴露による肝ミクロソームの異物代謝活性の減少も

NO₂との複合により軽減された。しかしながら、NO₂とO₃の複合暴露による変化が、各ガス単独の場合には発現されない暴露14日目に観察された。同様に、肺及び肝ミクロソーム電子伝達系成分も、NO₂とO₃の複合により各ガス単独での効果が軽減されたが、暴露14日目に複合暴露による変化が観察された(報文11)。これらの結果から、臓器ミクロソーム電子伝達系、特に異物代謝系に対するNO₂とO₃の複合効果は、暴露初期には相殺的であるのに対して、暴露後期に発現される可能性が示唆された。

ドリコールは動物臓器に存在するポリイソプレノールであり、糖タンパク質生合成において重要な中間受容体の役割を果たしていることが明らかにされてきた。ラットにNO₂を暴露すると、遊離ドリコール量は肝臓及び腎臓では有意な変化が認められず、標的臓器である肺においてのみ増加した。ラット肺の遊離ドリコールは炭素数が75から100(イソプレノイドユニット15~20個)の6種で構成されており、NO₂暴露により炭素鎖の短い同族体ほど著しく増加するという結果が得られた。このことは、NO₂暴露が糖タンパク質の生合成に影響を及ぼす可能性のあることを示唆している(報文13)。

NO₂とO₃の混合ガスのヒトの健康に及ぼす影響を外挿するに役立つ基礎資料を得ることを目的に、5種の実験動物の正常肺の過酸化脂質と抗酸化性防御系の比較及び4種の実験動物に0.4ppm NO₂と0.4ppm O₃を連続2週間暴露した場合の過酸化脂質の生成と抗酸化性防御系の変化について検討した。

まず、ICR系マウス、Golden系ハムスター、Wistar系ラット、Hartley系モルモット及びNew Zealand White系ウサギの5種の動物の肺の生理的過酸化脂質レベルはどのような因子によって規定されているのかを調べたところ、マウス>ハムスター>ラット>モルモット>ウサギの順となり、マウスの値はウサギの3.7倍もあり、動物の種間には著しい相違が存在していることが明らかにされた。さらに、このような相違は肺のリン脂質中の不飽和脂肪酸の含量とその各々の脂肪酸の過酸化反応の起こりやすさを示す係数から計算された Peroxidizability Index (PI)によって強く規定されており、ビタミンEと非蛋白性SH基含量を考慮すると両者の相関性はより高くなった。

一方、ウサギを除く4種の動物にNO₂とO₃の混合ガスを暴露すると、モルモットとマウスで顕著な過酸化脂質の増加が認められた。これらの変化も対照動物で認められた、Peroxidizability Index (PI)、ビタミンE及び非蛋白性SH含量の変化で説明しうるが、モルモットの値だけは他の動物が示す傾向からはずれる傾向を示していた。モルモットは過酸化脂質を代謝する肺のSe-依存性グルタチオンペルオキシダーゼ活性が遺伝的に欠損しているうえに、ヒトと同様にビタミンC合成能力を欠損しているなどの点で他の動物とは異なる特徴を持った動物であると言える。今後も、これら実験動物間の生理的相違及びヒトとの相違を明らかにすることにより、実験動物に及ぼす大気汚染物質の影響からヒトへの影響を外挿する方法の確立に有益な研究が必要とされるものと思われる(報文14)。

NO₂の急性及び慢性暴露実験を行い、コラーゲン代謝関連因子の変化を調べ、肺線維化発症経過

の変化と発生メカニズムの検討を試みた。10ppm, 2週間のNO₂急性暴露実験では病理学的検索を行った7日目, 14日目で肺の線維化が確認されたが, 肺胞道や肺胞壁の肥厚は7日目より2週間目の方が軽度であった。この肺の線維化発症過程におけるコラーゲン代謝の変化は, 壁肥厚が認められる線維化進行段階ではコラーゲン合成と分解が促進し, 肺のコラーゲン含量の増加と共に血清ヒドロキシプロリン(HOP)量が増加するが, 最終的に線維化が認められた2週間後ではコラーゲナーゼ阻害因子の増加によってコラーゲン分解が抑制され, 血清HOP量や尿HOP比が低下することが明らかになった。

0.4, 1.2及び4 ppm NO₂ 18か月間の慢性暴露実験ではコラーゲナーゼ阻害因子活性の増加とコラーゲナーゼ活性の低下によってコラーゲン分解能が低下し, その結果, 尿中HOP比が低下した。そして, その分解能が最も低下している4 ppm群で肺のコラーゲン含量が増加することが明らかとなった。この結果は竹中らが報告した4 ppm NO₂ 暴露18か月目のラットの肺に軽度の線維化が認められたという病理学的結果とも一致している(報文15)。

アラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ産物である, プロスタグランジン(PG)_{I₂}とPGEは気管平滑筋を弛緩する作用を持つが, トロンボキサンA₂(TXA₂)やPGF_{2 α} は気管を収縮する作用を示す。したがって肺胞洗浄液中でのこれらシクロオキシゲナーゼ産物の含量の変化は肺の機能に重要な影響を及ぼすと考えられる。そこで二酸化窒素NO₂を暴露した場合のラットの肺胞洗浄液中のPG類及びTXA₂の代謝物であるTXB₂量に及ぼす影響に関して検討した。ラットを10ppm NO₂に1, 3, 5, 7, 14日暴露すると, ラット一匹当たりの全肺胞洗浄液中のPGI₂量は1日目で既に減少し, その後暴露期間中この減少状態が続いた。これに対しTXB₂量は増加し5日目に最大となったが, 以後NO₂暴露を続けるとTXB₂量は次第に減少し対照群のレベルに戻った。PGF_{2 α} 及びPGE含量は1日間暴露で減少し3日及び5日間暴露では一時的に増加したが7日及び14日暴露後には再び有意に減少した。PGF_{2 α} 及びPGE量が増加した時点で, 肺のホモジネートのプロスタグランジン-15-ヒドロキシ-デヒドロゲナーゼ(PGデヒドロゲナーゼ)の活性は減少していることが観察された。

以上の結果から, NO₂暴露により気管の平滑筋の弛緩作用のあるPGI₂及びPGE含量が減少し, 収縮作用のあるTXA₂の代謝物であるTXB₂及びPGF_{2 α} 含量が増加したことにより, 気管が収縮しやすい方向に平衡がずれている可能性が考えられた(報文16)。

グルタチオン生成に及ぼすNO₂又はO₃暴露の影響を明らかにすることを目的として, ラットの各種臓器におけるグルタチオン合成系酵素(γ -グルタミルシステインシンターゼ及びグルタチオンシンターゼ)の活性を測定する新しい方法を開発した。ラットにNO₂, O₃を暴露すると, この合成系酵素活性は肝臓及び腎臓では有意な変化が認められず, 標的臓器である肺においてのみ増加した。更に肺においては, O₃暴露により二つの合成酵素活性がいずれも増加するが, NO₂暴露では γ -グルタミルシステインシンターゼ活性のみ増加することから, NO₂とO₃ではグルタチオン合成系酵素活性に対して異なる影響を及ぼすことが明らかになった。またNO₂亜急性暴露では

肺のグルタチオン量と γ -グルタミルシスチンシンターゼ活性は類似した変動傾向を示した(報文17, 18)。

本研究の主要な課題は、前期特研において得られたところの NO_2 単独暴露による生体影響の結果と、今特別研究における、 $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ の複合暴露の影響の結果を比較検討して、その影響の異同を明らかにすること、また作用として、相加的かあるいは相乗的であるかの作用効果様式の確認、さらに影響発現の機序の解明に迫ることであり、慢性の結果も、このような観点から整理する予定である。

研究成果一覧

[印刷発表]

1982年

- Ichinose, T., A. K. Suzuki, H. Tsubone and M. Sagai (1982): Biochemical studies on strain differences of mice in the susceptibility to nitrogen dioxide. *Life Sci.*, **31**, 1963-1972.
- Ichinose, T. and M. Sagai (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide III. Changes of the antioxidative protective systems in rat lungs and lipid peroxidation by chronic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **66**, 1-8.
- Tsubone, H., H. Oda, A. K. Suzuki and K. Kubota (1982): Electrocardiographic abnormalities in rats by acute exposure to nitrogen dioxide. *Toxicol. Lett.*, **12**, 125-129.
- 嵯峨井勝(1982): 栄養と脂質過酸化. 変異原と毒性, **5**, 223-232.
- 嵯峨井勝(1982): 大気汚染物質による脂質過酸化. 変異原と毒性, **5**, 233-242.
- 嵯峨井勝(1982): NO_2 の生体影響—急性, 亜急性および慢性暴露による脂質過酸化—. 環境科学研究報告集・人体影響研究領域の研究成果, 40-51.
- Suzuki, A. K., H. Tsubone and K. Kubota (1982): Changes of gaseous exchange of mice acutely exposed to nitrogen dioxide. *Toxicol. Lett.*, **10**, 327-335.
- Suzuki, A. K., H. Tsubone, M. Sagai and K. Kubota (1982): Changes of gaseous exchange in the lungs of mice exposed to nitrogen dioxide and their recovery process. *Toxicol. Lett.*, **13**, 71-79.
- Suzuki, A. K., T. Ichinose, H. Tsubone, H. Oda and K. Kubota (1982): Effects of acute nitrogen dioxide exposure on swimming performance of mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 165-172.
- Ohta, Y., M. Yamada, T. Yoneyama, A. Suzuki and I. Wakisaka (1982): Dynamic study on animal experiments using N-labeled nitrogen dioxide. *Proc. 4th Int. Conf. Stable Isotopes.*, March, 23-27, 1981, 557-561.

1983年

- 今井 透・小澤 仁・渡辺直熙・白石不二雄・久保田憲太郎(1983)：抗原 aerosol による IgE 抗体産生—実験動物における最近の知見より—。耳鼻咽喉科展望, **26**, 623-627.
- 白石不二雄・坂東 博(1983)：ガス状物質の毒性試験法—培養細胞—。トキシコロジーフォーラム, **6**, 250-257.
- 鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎(1983)：低濃度二酸化窒素長期暴露がラットの動脈血 pHa, $Paco_2$ PaO₂ に及ぼす影響。日本衛生学雑誌, **38**, 758-763.
- 鈴木 明(1983)：大気汚染物質が実験動物に与える影響について(1)SO₂ と NO₂ について。トキシコロジーフォーラム, **6**, 508-517.
- Imai, T., F. Shimizu, H. Fujimaki and N. Watanabe (1983): Enhancement of IgE antibody production by ovalbumin aerosol in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **70**, 368-372.
- 市瀬孝道・嵯峨井勝・久保田憲太郎(1983)：二酸化窒素の急性、亜急性および慢性暴露によるラットの脂質過酸化と肺の抗酸化性防御機構の変化について。大気汚染学会誌, **18**(2), 131-145.
- 内田義之・本間敏明・藤岡 浩・市瀬孝道・嵯峨井勝・長谷川鎮雄(1983)：呼気ガス炭化水素測定の実用応用—第1報—。日本臨床生理学会雑誌, **13**(1), 108-112.
- Kobayashi, T., I. Morita and S. Murota (1983): Effects of nitrogen dioxide exposure on prostacyclin synthesis in lung and thromboxane A₂ synthesis in platelets in rats. *Prostaglandins*, **26**, 303-310.
- Kobayashi, T. (1983): Effects of ozone exposure on prostacyclin synthesis in lung. *Prostaglandins*, **26**, 1021-1027.
- Sagai, M., T. Ichinose, T. Kobayashi and K. Kubota (1983): Changes of lipid peroxidation and antioxidative protective systems in rat lungs upon life span exposure to low levels of nitrogen dioxide. *Dev. Sci. Pract. Toxicol.*, A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya (ed.), Elsevier Sci., Publ. B. V., 483-486.
- Sagai, M., S. Suzuki and T. Ichinose (1983): Relationship between survival times of rats exposed to lethal level of nitrogen dioxide and arylhydrocarbon hydroxylase activity in lungs. *Toxicol. Lett.*, **19**, 233-239.
- 嵯峨井勝(1983)：生体内過酸化脂質の測定法 C. 呼気分析・過酸化脂質実験法, 金田・植田編, 医歯薬出版, 231p, 98-108.

1984年

- Sagai, M., T. Ichinose and K. Kubota (1984): Studies on the biochemical effects of nitrogen dioxide. IV. Relation between the changes of lipid peroxidation and antioxidative protective system in rat lungs upon life span exposure to low levels of NO₂. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 444-456.
- 嵯峨井勝・小林隆弘(1984)：窒素酸化物は肺の脂質にどのような変化をもたらすか。環境と人体Ⅲ。

- 窒素酸化物. 中馬一郎ら編, 東大出版会, 297p, 56-74.
- Mochitate, K., K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, **33**(1), 17-28.
- Kaya, K., T. Miura and K. Kubota (1984): Different incorporation rates of arachidonic acid into alkenylacyl-, alkylacyl and diacylphosphatidyl-ethanolamine of rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **796**, 304-311.
- Kunimoto, M., K. Mochitate, K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): Effect of nitrogen dioxide on red blood cells of rats: Alterations of cell membrane components and populational changes of red blood cells during *in vivo* exposure to NO₂. *Environ. Res.*, **33**, 361-369.
- Kobayashi, T., T. Noguchi, M. Kikuno and K. Kubota (1984): Effect of acute nitrogen dioxide exposure on the composition of fatty acid associated with phospholipids in alveolar lavage. *Chemosphere*, **13**(1), 101-105.
- Tsubone, H. and A. K. Suzuki (1984): Vagal afferent activities corresponding to respiratory cycle in rats. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **46**(3), 377-380.
- Tsubone, H. and A. K. Suzuki (1984): Reflex cardiopulmonary responses by stimulation to type J receptors in rats exposed to NO₂. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **13**, 905-917.
- Tsubone, H., A. K. Suzuki, M. Sagai and S. Sugano (1984): Changes of cardiac and respiratory rhythm in non-and tracheostomized rats exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **35**, 197-203.
- Fujimaki, H., M. Ozawa, T. Imai and F. Shimizu (1984): *Effect of short-term exposure to O₃ on antibody response in mice.* *Environ. Res.*, **35**(2), 490-496.
- 三浦 卓(1984): 窒素酸化物は細胞膜にどう影響するか. 環境と人体Ⅲ, 中馬一郎ら編, 東京大学出版会, 297p, 75-87.
- 三浦 卓(1984): 二酸化窒素の実験動物に及ぼす影響. 衛生化学, **30**(6), 344-355.
- Mochitate, K. and T. Miura (1984): *In vivo* effect of nitrogen dioxide on the activities of glycolytic enzymes in red blood cells of rats. *Toxicol. Lett.*, **22**, 315-321.

1985年

- 白石不二雄(1985): 大気汚染物質と SCE. SCE—姉妹染色分体交換と環境科学—, 小泉明・森本兼彙編, サンエンスフォーラム, 375-382.
- Tsujii, N., M. Kunimoto, N. Shimojo and T. Miura (1985): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on the blood nitrate level and the Na⁺, K⁺-ATPase activity of red blood cells of rats. *Toxicol. Lett.*, **24**, 59-63.
- 嵯峨井勝(1985): ビタミン E と大気汚染, ビタミン E—基礎と臨床—, 福場博保・美濃真監修, 三十嵐齋編, 医歯薬出版, 250p.

内山 充・松尾光芳・嵯峨井勝編著(1985)：過酸化脂質と生体。学会出版センター。

嵯峨井勝(1985)：過酸化脂質と生理的因子。3. 種差および系統差, 過酸化脂質と生体, 内山 充・松尾光芳・嵯峨井勝編。学会出版センター, 145p.

嵯峨井勝(1985)：過酸化脂質と環境因子。2. 大気汚染物質, 過酸化脂質と生体, 内山充・松尾光芳・嵯峨井勝編。学会出版センター, 333p.

Levine, L. and T. Kobayashi (1985): A caveat in the interpretation of radioimmunoassays for arachidonic acid metabolites. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*, 14, Raven press, New York, 83-85.

Suzuki, H., T. Kobayashi, *et al.* (1985): Age associated changes in rat plasma lipids, platelet fatty acids and prostacyclin release. *Biochem. Biophys. Acta*, **836**, 394-396.

Takahashi, Y., T. Miura and K. Kubota (1985): *In vivo* effect of ozone inhalation on xenobiotic metabolism of lung and liver of rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 855-864.

Takahashi, Y. and T. Miura (1985): *In vivo* effects of nitrogen dioxide and ozone on xenobiotic metabolizing systems of rat lungs. *Toxicol. Lett.*, **26**, 145-152.

Mochitate, K. and T. Miura (1985): An increase in the activities of glycolytic enzymes in rat lung produced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 323-331.

1986年

Ozawa, M., H. Fujimaki, T. Imai, Y. Honda and N. Watanabe (1986): Suppression of IgE antibody production after exposure to ozone in mice. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, **76**, 16-19.

Tsubone, H. (1986): Characteristics of vagal afferent activity in rats - Three types of pulmonary receptors responding to collapse, inflation and deflation of the lung. *Exp. Neurol.*, (in press).

Mochitate, K., Y. Takahashi, T. Ohsumi and T. Miura (1986): Activation and increment of alveolar macrophages induced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **17**, 229-239.

Takahashi, Y., K. Mochitate and T. Miura (1986): Subacute effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung, liver and kidney of rats. *Environ. Res.*, (in press).

Takahashi, Y. and T. Miura (1986): A selective enhancement of xenobiotic metabolizing systems of rat lungs by prolonged exposure to ozone. *Environ. Res.*, (in press).

Kobayashi, T. (1986): Effects of nitrogen dioxide exposure on the contents of prostaglandins and thromboxane B₂ in broncho alveolar lavage. *Prostaglandins*, **31**, 469-475.

〔口頭発表〕

1982年

市瀬孝道・鈴木誠一・嵯峨井勝・久保田憲太郎：高濃度二酸化窒素暴露によるラットの生存時間と肺の Arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性の相関について。第23回大気汚染学会，宮崎 (57. 11)。

市瀬孝道・鈴木誠一・鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝：二酸化窒素暴露に対する肺の抗酸化性防御機能の動物種差に関する研究。第23回大気汚染学会，宮崎 (57. 11)。

市瀬孝道・嵯峨井勝：脂質過酸化の動物種差および系統差について—NO₂ 暴露による脂質過酸化—。第6回日本過酸化脂質研究会，仙台 (57. 10)。

Kobayashi, T. : Effects of acute nitrogen dioxide exposure on prostacyclin (PGI₂) synthesis and content of cyclic nucleotides in the lung. Int. Symp. Biomed. Effects Ozone Relat. Photochem. Oxidants, Pinehurst (57. 3)。

嵯峨井勝・市瀬孝道・原口裕文・与那覇政憲：各種環境汚染物質による呼気中エタン，ペンタン生成の相違に関する研究。第6回日本過酸化脂質研究会，仙台 (57. 10)。

内田義之・本間敏明・藤岡 浩・長谷川鎮雄・嵯峨井勝：呼気ガス炭化水素測定の実用応用(第1報)。第19回日本臨床生理学会，徳島 (57. 10)。

嵯峨井勝・市瀬孝道・小林隆弘・久保田憲太郎：NO₂ の長期暴露のラットに及ぼす影響10。呼気中炭化水素分析による脂質過酸化について。第23回大気汚染学会，宮崎 (57. 11)。

鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎：NO₂ 長期暴露のラットに及ぼす影響9。血液 pH/ガスおよび呼気ガス (O₂, CO₂) の変化について。第23回大気汚染学会，宮崎 (57. 11)。

鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎：NO₂ および O₃ の単一あるいは複合暴露がラットの呼気機能におよぼす影響。第23回大気汚染学会，宮崎 (57. 11)。

高橋勇二・三浦 卓・大住拓美・久保田憲太郎：NO₂ 暴露のラット肺および肝の生体膜成分に及ぼす影響。第23回大気汚染学会，宮崎 (57. 11)。

太田庸起子・松本 理・鈴木 明・脇阪一郎・米山忠克：¹⁵N₂O の生体内動態に関する考察。第55回日本産業衛生学会，名古屋 (57. 4)。

局 博一・鈴木 明・嵯峨井勝・久保田憲太郎：NO₂ 暴露による心電図異常—とくに呼気運動との関連性について。第23回大気汚染学会，宮崎 (57. 11)。

局 博一・鈴木 明・嵯峨井勝・久保田憲太郎：大気汚染物質が気道反射機構に及ぼす影響に関する研究 I。肺伸展受容器について。第23回大気汚染学会，宮崎 (57. 11)。

今井 透・小澤 仁・藤巻秀和・渡辺直照：卵白アルブミン aerosol によるマウスの IgE 抗体産性 II。hapten-carrier 系を用いた解析。第32回日本アレルギー学会，岡山 (57. 10)。

藤巻秀和・小澤 仁・村上正孝・久保田憲太郎：O₃ 亜急性暴露のマウス抗体産性に及ぼす影響 I。IgM 抗体産性について。第23回大気汚染学会，宮崎 (57. 11)。

辻井直樹・国本 学・彼谷邦光・三浦 卓・久保田憲太郎：NO₂ 暴露のラット赤血膜 ATPase に及

ばす影響. 第23回大気汚染学会, (57.11).

持立克身・三浦 卓・彼谷邦光・国本 学・久保田憲太郎: 赤血球の解糖系に及ぼす二酸化窒素の影響. 第23回大気汚染学会, 宮崎(57.11).

1983年

市瀬孝道・嵯峨井勝: パラコートによる肺の線維化と過酸化脂質生成について(1). 第7回日本過酸化脂質学会, 名古屋(58.10).

市瀬孝道・竹中参二・嵯峨井勝・久保田憲太郎: パラコートによる肺線維症と過酸化脂質生成について(II). 第24回大気汚染学会, 四日市(58.11).

小澤 仁・今井 透・本多芳男・久保田憲太郎: オゾン暴露によるマウス鼻粘膜のヒスタミンの量の変化. 第22回日本鼻科学会, 鹿児島(58.11).

小林隆弘・久保田憲太郎: NO₂ 暴露の肺胞内プロスタサイクリン量への影響. 第24回大気汚染学会, 四日市(58.11).

嵯峨井勝・市瀬孝道・久保田憲太郎: 二酸化窒素とオゾンの混合暴露によるラットの過酸化脂質生成と肺の防御系酵素等の変化について. 第24回大気汚染学会, 四日市(58.11).

岡三知夫・山岡茂夫・宮崎竹二・黒田孝一・魚住光郎・野上浩二・竹本和夫・片山博雄・嵯峨井勝・市瀬孝道: 都市街路沿道における長期野外暴露実験—3年後, 別系統マウスによる再実験(その1)—. 第24回大気汚染学会, 四日市(58.11).

内田義之・本間敏明・藤岡 浩・長谷川鎮雄・嵯峨井勝・伊藤裕康: 呼気中炭化水素測定の実臨床応用—第4報—. 第7回日本過酸化脂質学会, 名古屋(58.10).

鈴木 明: 大気汚染生体影響の実験的研究懇話会, 循環器生理学的立場から. 第24回大気汚染学会, 四日市(58.11).

鈴木 明・局 博一・嵯峨井勝・久保田憲太郎: NO₂ および O₃ の単一あるいは複合暴露がラットの呼吸機能に及ぼす影響—特に酸素の動態について—. 第24回大気汚染学会, 四日市(58.11).

高橋勇二・三浦 卓: 二酸化窒素暴露によるラット肝ミクロソーム Cyt. P450 の変動. 第56回日本生化学会大会, 福岡(58.10).

高橋勇二・三浦 卓・持立克身・国本 学・久保田憲太郎: NO₂ と O₃ 暴露によるラット臓器生体膜電子伝達系成分の変動 I. NO₂ と O₃ 単独暴露の影響. 第24回大気汚染学会, 四日市(58.11).

局 博一・鈴木 明・嵯峨井勝・久保田憲太郎: 大気汚染物質が気道反射機構に及ぼす影響に関する研究 II. NO₂ 暴露による J 受容器の反射機能亢進について. 第24回大気汚染学会, 四日市(58.11).

Fijimaki, H., T. Imai, M. Ozawa and N. Watanabe: The effect of acute exposure to nitrogen dioxide on the IgE antibody production in mice. 5th Int. Congr. Immunol. Kyoto(58.8).

Ozawa, M., T. Imai, Y. Honda, N. Watanabe, H. Fujimaki and K. Kubota: The effect of exposure to

ozone on the IgE antibody production in mice. 5th Int. Congr. Immunol., Kyoto (58. 11).

藤巻秀和・小澤 仁・村上正孝・久保田憲太郎：O₃ 暴露によるマウス IgM 抗体産性の抑制. 第24回大気汚染学会, 四日市 (58. 11).

三浦 卓・高橋勇二・持立克身・国本 学・久保田憲太郎：NO₂ と O₃ 暴露によるラット臓器生体膜電子伝達系成分の変動Ⅱ. NO₂ と O₃ 複合暴露の影響. 第24回大気汚染学会, 四日市 (58. 11).

持立克身・三浦 卓・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24回大気汚染学会, 四日市 (58. 11).

持立克身・大住拓美・飯塚ゆかり・三浦 卓：肺のエネルギー代謝に及ぼす二酸化窒素の影響. 第56回日本生化学会大会, 福岡 (58. 10).

1984年

小林隆弘・森田育男・室田誠逸：大気汚染物質暴露による呼吸器, 血管のプロスタグランジン合成の変化とその血小板に及ぼす影響. 日本炎症学会84年炎症セミナー, 東京 (59. 1).

彼谷邦光・三浦 卓：ラット赤血球のエーテル型とジアシル型エタノールアミンホスホグリセライドへのアラキドン酸の取り込みとホスホリパーゼ A₂ の基質特異性. 第26回日本脂質生化学研究会, 新潟 (59. 7).

河田明治・高橋勇二・三浦 卓：酸化性刺激によるグルタチオン合成系酵素活性の変動. 第57回日本生化学会大会, 東京 (59. 10).

小林隆弘：ラットの肺および血管壁のプロスタサイクリン合成におよぼすオゾン暴露の影響. 日本薬学会第104年会, 仙台 (59. 3).

Kobayashi, T. : Effect of air pollutants on the content of metabolites of arachidonic acid in lung lavage. Kyoto Conf. Prostaglandins, Kyoto (59. 3).

白石不二雄・村上正孝・久保田憲太郎：大気汚染物質のラット末梢血リンパ球姉妹染色分体交換への影響Ⅰ. 二酸化窒素. 第25回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).

河田明治・高橋勇二・三浦 卓・久保田憲太郎：二酸化窒素暴露によるラット肺のグルタチオン合成系酵素活性に及ぼす影響. 第25回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).

小林隆弘：二酸化窒素がラット脾臓のプロスタグランジン合成活性に及ぼす影響. 第57回日本生化学会大会, 東京 (59. 10).

小林隆弘・久保田憲太郎：NO₂ 暴露の脾臓及び胸腺のプロスタグランジン合成能に及ぼす影響. 第25回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).

高橋勇二・三浦 卓・久保田憲太郎：オゾン亜急性暴露によるラット肺および肝臓の薬物代謝系成分の変動. 第25回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).

局 博一・鈴木 明・久保田憲太郎：大気汚染物質が気道反射機構に及ぼす影響に関する研究Ⅲ. ラット肺刺激受容器の化学的・機械的刺激に対する応答性. 第25回大気汚染学会, 宇部 (59. 11).

- 局 博一・鈴木 明・清水 明・久保田憲太郎：大気汚染物質の生体影響に関する行動生理学的研究Ⅰ。O₃ 暴露による飲水行動量の変化。第25回大気汚染学会，宇部(59.11)。
- 小澤 仁・藤巻秀和・今井 透・本多芳男・渡辺直熙：オゾン暴露によるマウス IgE 抗体産生の抑制。第34回日本アレルギー学会，京都(59.10)。
- 藤巻秀和・小澤 仁・足川哲夫・村上正孝・久保田憲太郎：NO₂ と O₃ の複合暴露の免疫応答に及ぼす影響。第25回大気汚染学会，宇部(59.11)。
- 藤巻秀和・久保田憲太郎・渡辺直熙：エアロゾル抗原による IgE 抗体産生の誘導。第14回日本免疫学会総会，大阪(59.12)。
- 三浦 卓：二酸化窒素の生体影響の加齢による修飾。第2回環境科学シンポジウム，岡山(59.11)。
- 佐野憲一・村上正孝・下條信弘・加納克身・山口誠哉：SO₂ 暴露モルモットにおける生理学及び生化学検索第1報 SO₂ 混合アルブミン吸入実験。第57回日本産業衛生学会，札幌(59.6)。
- 持立克身・三浦 卓・久保田憲太郎：肺胞マクロファージに対する二酸化窒素の影響。第25回大気汚染学会，宇部(59.11)。

1985年

- 白石不二雄・森本兼曇・小泉 明・村上正孝・久保田憲太郎：大気汚染物質のラット末梢血リンパ球姉妹染色分体交換への影響Ⅱ。オゾン。第55回日本衛生学会総会，熊本(60.4)。
- 高橋勇二・河田明治・持立克身・国本 学・三浦 卓：肺の薬物代謝系に対する二酸化窒素とオゾンの影響。第58回日本生化学会大会，仙台(60.9)。
- 持立克身・高橋勇二・石田邦彦・三浦 卓：肺胞マクロファージに対する二酸化窒素及びオゾンの影響。第58回日本生化学会大会，仙台(60.9)。
- 小林隆弘・山根一祐：ラット肺胞洗浄液中のリポキシゲナーゼ系代謝物とオゾン暴露。第58回日本生化学会大会，仙台(60.9)。
- 小林隆弘・久保田憲太郎：オゾン暴露がラット肺胞洗浄液中のリポキシゲナーゼ系代謝物量に及ぼす影響。第26回大気汚染学会，東京(60.11)。
- 市瀬孝道・嵯峨井勝・久保田憲太郎：NO₂ + O₃ の混合ガス暴露による過酸化脂質生成の動物種差について。第26回大気汚染学会，東京(60.11)。
- 白石不二雄・村上正孝・久保田憲太郎：大気汚染物質のラット末梢血リンパ球姉妹染色分体交換への影響Ⅲ。NO₂ と O₃ の複合。第26回大気汚染学会，東京(60.11)。
- 高橋勇二・持立克身・河田明治・三浦 卓・久保田憲太郎：肺及び肝臓の薬物代謝系に対する NO₂ の影響。第26回大気汚染学会，東京(60.11)。
- 石田邦彦・持立克身・三浦 卓・久保田憲太郎：マウスの免疫系に及ぼすオゾンの影響。第26回大気汚染学会，東京(60.11)。
- 持立克身・三浦 卓・久保田憲太郎：肺胞マクロファージに対するオゾンの影響。第26回大気汚染

学会, 東京(60.11).

高橋 弘・高橋慎司・伊藤勇三・山元昭二・米元純三・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響 1. 供試動物の飼育経過. 第26回大気汚染学会, 東京(60.11).

清水 明・松本 茂・藤田和伸・高橋 弘・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響 2. 実験環境の設定と維持. 第26回大気汚染学会, 東京(60.11).

鈴木 明・局 博一・河田明治・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響 3. 血液ガス分圧の変化. 第26回大気汚染学会, 東京(60.11).

村上正孝・米元純三・河越昭子・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響 4. 病理形態学的変化. 第26回大気汚染学会, 東京(60.11).

嵯峨井勝・市瀬孝道・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響 5. 過酸化脂質と抗酸化性防御系の変化. 第26回大気汚染学会, 東京(60.11).

市瀬孝道・嵯峨井勝・久保田憲太郎: $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 長期暴露のラットに及ぼす影響 6. コラーゲン代謝関連因子の変化. 第26回大気汚染学会, 東京(60.11).

II-1 二酸化窒素及びオゾン暴露による自律神経系機能変化に 関する影響評価の試み*

Assessment for Functional Changes of Autonomic Nervous System due to Exposures with Nitrogen Dioxide and Ozone*

局 博一¹

Hirokazu TSUBONE¹

要 旨

NO₂及びO₃に暴露されたラットにおける自律神経系機能の変化を評価するために、肺におけるJ受容器を刺激する phenyl diguanide を対照ラット及び暴露ラットに一定量投与し、投与直後に生じる呼吸・循環反射を比較検討した。

20ppmのNO₂に1.5時間または3時間暴露した群と、10ppmのNO₂に24時間暴露した群では、心拍数の有意な減少が認められた。一方呼吸数の有意な増加が10ppm 3時間暴露群と4ppm 1週間暴露群で認められた。0.4ppmのNO₂またはO₃を4週間暴露した群、さらには0.4ppmのNO₂に0.2または0.4ppmのO₃を加え、1～4週間暴露した群では心拍数、呼吸数のいずれにも特記すべき変化は認められなかった。

これらの成績は、比較的高濃度のNO₂暴露によって、迷走神経、とりわけJ受容器を介する呼吸・循環反射の亢進が生じることを示した。

Abstract

To assess the functional changes of autonomic nervous system in NO₂- and O₃-exposed rats, phenyl diguanide, which stimulates type J receptors in the lungs, was injected to control and exposed rats at a constant dose. Based on a statistical test, a decrease in the heart rate (HR) after the injection was observed in the groups exposed to 20 ppm NO₂ for 1.5h and 3h, and 10 ppm NO₂ for 24h.

On the other hand, an increase in respiratory rate (RR) was observed in the groups exposed to 10 ppm NO₂ for 3h and 4 ppm NO₂ for 1 wk. All groups exposed to combined gas containing both 0.4ppm NO₂ and 0.2 or 0.4ppm O₃ showed no considerable change in HR and RR.

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

* 本論文の内容の一部は、J. Toxicol. Environ. Health, 13, 905-917 (1984) に発表したものである。

These results suggest that the augmentation of the reflex cardiopulmonary responses due to stimulation vagal afferent fibers, especially type J receptors, was induced by exposures with a higher concentration of NO₂.

1 はじめに

大気汚染物質が神経系に及ぼす影響を系統的に追求した研究は非常に少なく¹⁾、一部の行動学的研究を徐げば、わずかに中枢神経系の機能変化に関する報告^{2,3)}や呼吸生理機能との関連性で報告されている⁴⁻¹¹⁾ものがあるに過ぎない。

本研究は、大気汚染物質が自律神経反射に及ぼす影響を評価するための一つの試みとして、NO₂及びO₃を暴露したラットに対して phenyl diguanide という特殊な薬物を一定量投与することにより、薬物反応の違いから暴露の影響を検討したものである。

phenyl diguanide (*N*-phenyl-*N'*-guanylguanidine, C₈H₁₁N₅)の薬理作用に関しては、末梢神経系を中心としてかなり多くの研究がなされている。これらの研究から、phenyl diguanideの神経作用及び反射作用について知られていることをまとめると、以下に述べるとおりである。

①静脈内または動脈内に投与されたとき、胃、小腸、肺、心臓、大動脈弓、頸動脈洞に分布する無髄または有髄の細い求心性線維(主に迷走神経)を強く刺激する¹²⁻¹⁴⁾。②静脈内投与によって生じる反射効果の中で、最も特徴的な反応は呼吸・循環反射にみられ、それらは呼吸促進または無呼吸に続く呼吸促進、徐脈、血圧降下である¹⁵⁻¹⁷⁾。③脊髄の単シナプス反射の抑制に起因する運動抑制(J reflex)をもたらす¹⁵⁾。ここに挙げた②の反射効果の機序については、Dawesら¹⁸⁾や Paintal^{15, 19, 20)}を始め、多くの研究²¹⁻²³⁾によって検討された結果、肺に分布する迷走神経中のJ受容器(多分C線維の一種)がphenyl diguanideに対して強い刺激を受け、上述の呼吸・循環反射に深く関与するものと考えられている。最近では肺における類似の作用をもつcapsaicinと共に、いくつかの詳細な研究^{24, 25)}がなされ、J受容器と呼吸・循環反射とが強く結びついていることが再認識されている。著者はこの薬物により誘発される呼吸・循環反射に注目して多くの暴露群について投与実験を行った結果、NO₂の暴露群の一部では反射の著しい増強作用が起こることを明らかにした。

2 材料と方法

2.1 実験項目と供試動物

実験には合計161匹のウィスター系雄ラットを用いたが、それらは実験内容に応じて、以下に述べる各実験項目2.1.1~2.1.4に配分された。なお各項目の中で記されている週令は、実験終了時点での週令を示す。

2.1.1 投与量-反応関係

12~13週令、正常ラットの、phenyl diguanide(以下PDGと略す)に対する投与量-反応関係を調べ

るために、5匹のラットに対して2.5, 5, 10, 20及び50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のPDGをそれぞれ投与した。

2. 1. 2 NO₂ 急性暴露実験

a. 20ppm 暴露：12～13週令。1時間暴露群(20ppm/1h群, $n=5$)、1.5時間暴露群(20ppm/1.5h群, $n=5$)、3時間暴露群(20ppm/3h群, $n=6$)、3時間暴露した後24時間清浄空気に放置した群(20ppm/3h-clean群, $n=6$)、及びこれらの対照群(control群, $n=6$)。以下、同様の方法で記載する。

b. 10ppm 暴露：11週令。10ppm/3h群($n=6$)、10ppm/3h-clean群($n=6$)、10ppm/24h群($n=6$)、control群($n=5$)。

c. 肺湿重量測定：9～10週令。20ppm/1.5h群($n=10$)、20ppm/3h群($n=10$)、control群($n=10$)。

2. 1. 3 NO₂ 及び O₃ の単独の亜急性暴露実験

a. 4ppm 暴露：12～13週令。NO₂ 4ppm/1w群($n=6$)、control群($n=6$)。

b. 0.4ppm 暴露：12～13週令。NO₂ 0.4ppm/4w群($n=6$)、O₃ 0.4ppm/4w群($n=6$)、control群($n=6$)。

2. 1. 4 NO₂+O₃ 亜急性暴露実験

a. 1週間暴露：9週令。NO₂ 0.4ppm+O₃ 0.2ppm/1w群($n=5$)、NO₂ 0.4ppm+O₃ 0.4ppm/1w群($n=5$)、control群($n=5$)。

b. 4週間暴露：12週令。NO₂ 0.4ppm+O₃ 0.2ppm/4w群($n=5$)、NO₂ 0.4ppm+O₃ 0.4ppm/4w群($n=5$)、control群($n=5$)。なお、この実験は2回行われた。

2. 2 実験操作手順及び記録法

暴露チャンバーないし対照チャンバーからラットを外に取り出した後、直ちにラット用固定器を用いてラットを背臥位に保定した。左後肢の脛骨部内側面の皮膚を鋭利なハサミで薄く切皮し伏在静脈が見えるようにした。1mlのツベルクリン用注射シリンジを用いてネンブタール(pentobarbital sodium)を30mg/kg、伏在静脈に投与し、麻酔を行った。続いて、右側大腿部の内側面で皮膚を取り除いた後、脂肪組織を分け開き、大腿静脈を大腿動脈及び坐骨神経から分離した。PDG投与のために準備された外径1mmのポリエチレンチューブ(Hibiki, No. 3)を大腿静脈内にその先端を中枢部に向けて約1cm挿入し、血管とチューブとの間を細い縫合糸で結紮した。次に、頸部腹側の皮膚を広く取り徐き、胸骨舌骨筋を正中線に沿って左右に開くことにより気管を露出した。気管の背側部を結合組織から分離して、太目の縫合糸を間に通した後、第4気管軟骨～第5気管軟骨間の軟組織の腹側部にハサミで小さな割れ目を入れた。外径2.5mm、長さ2cmのポリエチレンチューブ(Hibiki, No. 8)を呼吸気流曲線用のカニューレとして用い、上述の割れ目から肺に向

けて5～7mm挿入したところで止め、気管と共に縫合糸で固定した。

呼吸気流曲線の記録は気管カニューレにオリフィスと半導体差圧式トランスジューサー (Toyoda-koki, PD102) を接続することによって行った。気管カニューレを出入りする空気の流れはトランスジューサーで電気的变化に置換された後、直流増幅器で増幅された。心電図の記録は、ステンレス製注射針を導出電極として利用し、ラットの右前肢と左右後肢の皮下に電極を刺入して、標準肢Ⅱ誘導を行った。一部の実験では大腿動脈に挿入したカニューレを介して全身血圧を記録した。

呼吸気流曲線、心電図及び血圧は実験中、4チャンネルのブラウン管オッシロスコープ (National, VP5403A) でモニターすると共に、直記式ペン書きレコーダー (San-ei, Rectigraph 8 S) で記録紙上に描出された。PDGの投与は、インジェクターを用いて約3秒間かけて行った。PDG投与前後の各々1分間における記録に基づいて、10秒ごとの心拍数 (HR) 及び呼吸数 (RR) を計測した。

なお、PDGはICN Pharmaceutical, Inc. (Plainview, N. Y.) 製の製剤を用い、リン酸バッファーを含む生理的食塩水で10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (実験項目 2.1.2-2.1.4) になるよう希釈し、pHは7.36に調整した。

3 結果と考察

3.1 投与量-反応関係

2.5, 5, 10, 20及び50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の phenyl diguanide (以下、PDGと略す) を正常ラットに投与し、投与量と、心拍数及び呼吸数の変化度との関係を調べた。その結果を図1に示す。最小量の2.5 μg は心拍数 (HR) と呼吸数 (RR) のいずれにも変化を起こさなかった。5 μg では心拍数は不変か、またはごく軽微な減少にとどまった。10 μg から心拍数の減少は明りょうとなり、投与量が増すほど減少度が大きくなった。特に最大量の50 μg では、投与前に比べて半減し、投与後1分を経過しても完全な回復はみられなかった。呼吸数は5～20 μg の投与で増加したが、50 μg では反対に著しく減少した。これは投与直後に約10秒間持続する無呼吸相が出現するためである。

図2には5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のPDGを投与したときの呼吸気流曲線 (A)、心電図 (B) 及び血圧 (C) の変化を示す。呼吸気流曲線では、吸息相の増高を伴って呼吸運動が活発化していることを示す。血圧は下降したが、心拍動にはほとんど変化が生じていない。前述したように10 μg 以上の投与量では心拍数が減少したが、このとき心電図は房室伝導障害 (A-Vブロック) や羽性不整脈を示した。

PDG投与によるこのような呼吸・循環反応はすべての個体で投与開始後2.5秒以内、遅くとも3秒以内に発現し、この時間はネコやウサギなどで知られているPDGの右心房内投与による injection-response time とほとんど同じであった。このように投与から反応までの潜時が極めて短いことから、これらの呼吸・循環反応は神経系を介した反射性のものであることを示唆する。事実多くの研究^{15, 18, 19, 21, 22)}によって、この反射の主要ルートは迷走神経であることが明らかになっている。迷走神経中のどのような線維がPDGによって刺激を受けるのかが問題となるが、この点に関して Paintal^{15, 19)} は綿密な実験を行った結果、肺の細気管支壁内または肺胞壁内に到達していると思わ

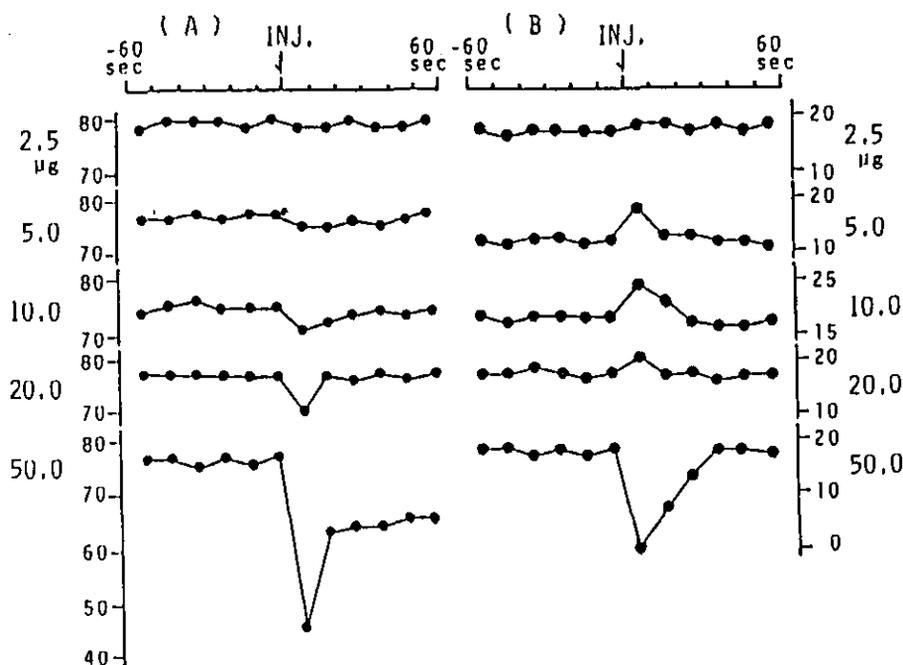


図 1 正常ラットの心拍数(a)及び呼吸数(b)に及ぼす phenyl diguanide (2.5~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与の効果

Fig. 1 Effects of phenyl diguanide (2.5~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) on (a) heart rate and (b) respiratory rate of normal rats
Each point represents the value per 10 seconds.

れる細い無髄線維すなわちJ受容器(juxta-pulmonary capillary receptor)がこの薬物に対して、最も鋭敏に応答することを見いだした。この際、J受容器はPDGの投与後、遅くとも2.5秒以内に刺激を受け放電している。この受容器は肺循環中のPDGのみならず、気管支動脈の血流中に含まれるPDGによっても刺激を受けることが確実視されている^{24,25)}。また、呼吸・循環反射に関して、PDGと類似の作用をもつcapsacinをイヌの気管支動脈中に投与し、この際投与された薬物が、純粹に肺のみを循環するように特別な手術を施した場合でも、上述の反射が明りょうに出現する²⁵⁾ことがわかっている。著者は、迷走神経を頸部で左右の両方とも切断したラットでは、PDGの投与を行っても心拍数の減少と血圧降下は全くみられないこと、同様の知見はアトロピン投与ラットでも認められること、また両側迷走神経切断ラットでは、PDGの投与直後に、呼吸気流曲線が1~2秒間、瞬間的に増高することはあっても、呼吸数そのものは、投与前後でほとんど変化しないこと、及び迷走神経求心性線維の電気的活動の記録では、PDGの投与によって低振幅の一過性バーストを示す線維群が存在すること(著者未発表データ)をみている。これらの知見から、PDGは静脈内に投与されたとき、主に肺のJ受容器を刺激することは明らかで、このことはたぶんラット

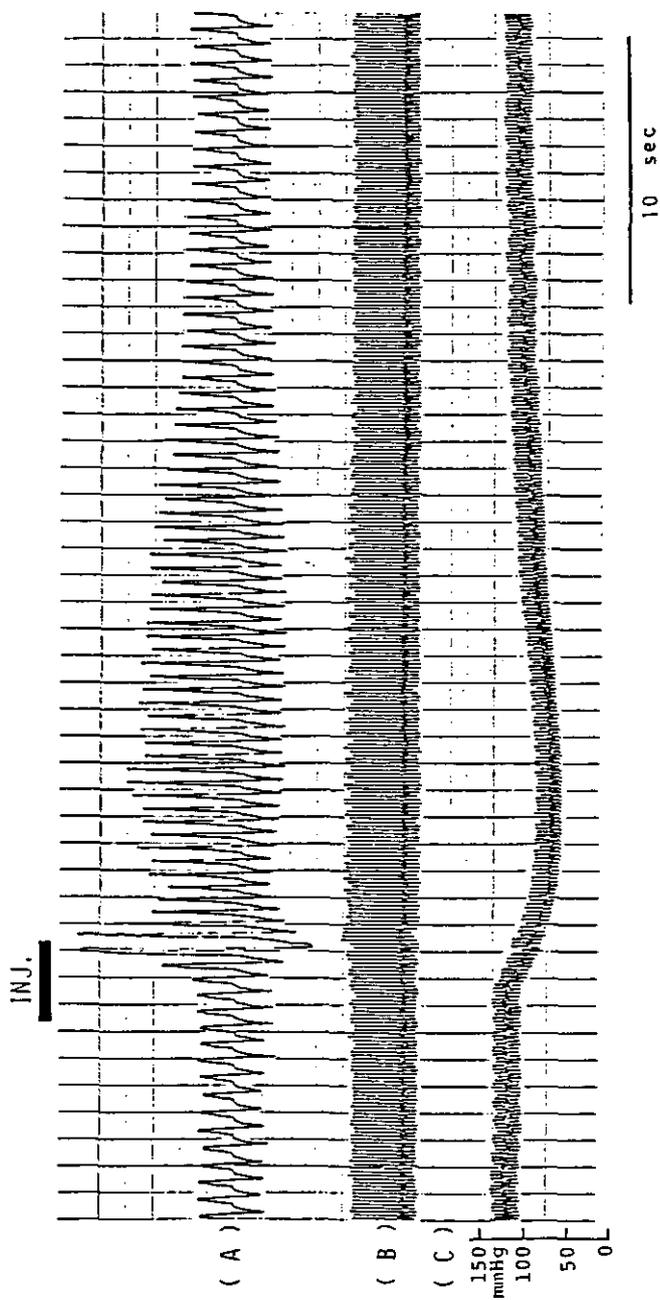


図 2 正常ラットにおける呼吸気流曲線(a), 心電図(b)及び血圧(c)の同時記録
Fig. 2 A simultaneous record of (a) pneumogram, (b) electrocardiogram, and (c) blood pressure of a normal rat
Phenyl diguanide ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) was injected at the upper left signal.

についても当てはめることが可能と思われる。

NO₂ や O₃ に暴露されたラットは呼吸・循環系に変化をきたし、それらの一部には副交感神経の関与も示唆される²⁶⁾ことから、暴露ラットの PDG に対する反応性を調べることは意義深い。そこで、正常動物では心拍数、呼吸数に軽微な変化しか起こさなかった 5 μg/kg を投与量として選び、後述の各暴露群で投与前後の反射反応を比較した。

3. 2 NO₂ 急性暴露実験

control 群, 10ppm NO₂/24h 群及び 20ppm NO₂/3h 群における PDG 5 μg/kg 投与前後各々 1 分間の心拍数と呼吸数の変化を図 3 に示す。両暴露群とも投与後の 10 秒間に、心拍数と呼吸数の著明な減少が認められた。10ppm/24h 群では投与後 1 分以内での心拍数の回復は認められなかった。PDG に対するこのような反応の大きさは、正常動物に 50 μg/kg (10 倍量) を投与したときの反応 (図 1) に近かった。

これらの実験例も含めて、20ppm 及び 10ppm 暴露群に対して行ったすべての実験結果を図 4 に

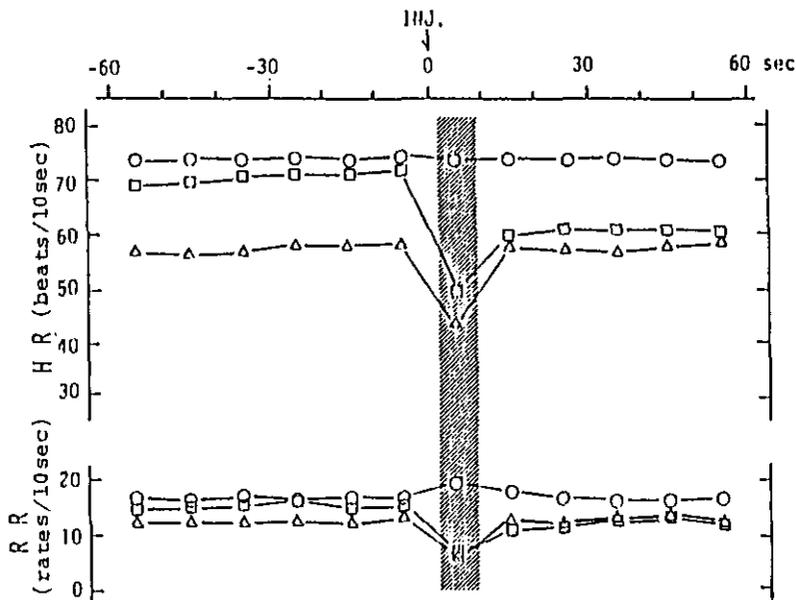


図 3 phenyl diguanide (5 μg/kg) 投与による対照群と暴露群の心拍数(HR), 呼吸数(RR)の変化

Fig. 3 Changes of heart rate (HR) and respiratory rate (RR) of the control and exposed groups by phenyl diguanide injections (5 μg/kg body weight)
 (○): control group (n=6), (□): NO₂ 10ppm/24h group (n=6), (△): NO₂ 20ppm/3h group (n=6).

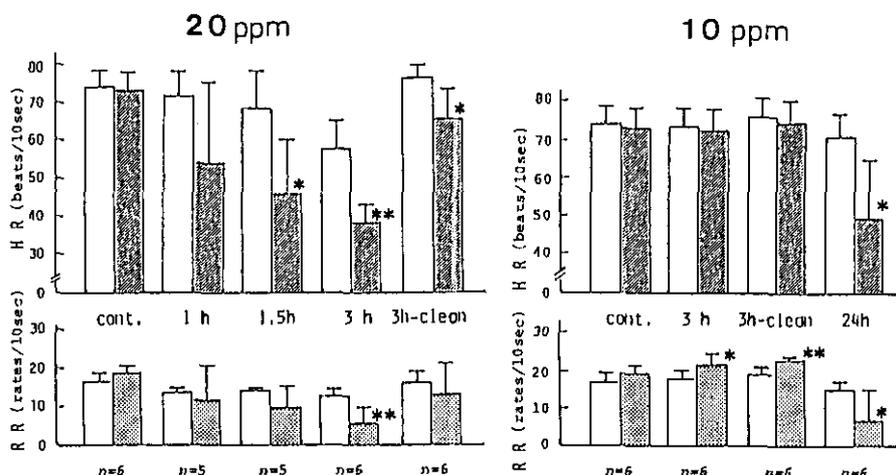


図 4 20ppm 及び10ppm 暴露群における phenyl diguanide (5 μ g/kg) 投与前後10秒間の心拍数(HR), 呼吸数(RR)の値

Fig. 4 Values of heart rate (HR) and respiratory rate (RR) 10 s before and after phenyl diguanide injection (5 μ g/kg body weight) in control, and 20 ppm and 10 ppm exposure groups

(A) 20ppm exposure. (B) 10ppm exposure. Each value shows the mean value and standard deviation. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

Open bars show the value before injection and closed bars after injection.

示す。20ppm 暴露群ではいずれの群においても心拍数が減少することを示し、20ppm/1.5h 群、/3h 群、/3h-clean 群では、投与前の値との間で有意差が認められた。20ppm/3h 群では、投与前の心拍数レベルがはっきりと低下しているが、これはこれまで著者らが報告してきたように、高濃度の NO_2 暴露それ自身が激しい徐脈を起こしているためである。20ppm/3h-clean 群では、投与前の心拍数レベルが既に正常レベルに復しているにもかかわらず、投与後には心拍数の減少が明瞭であることから、投与前の心拍数レベルの違いに関係なく、20ppm NO_2 3時間暴露の影響は明瞭に現れていると考えられる。呼吸数に関して、20ppm 暴露群では/3h 群でのみ、有意な減少が示された。20ppm/1h 群と/1.5h 群では、投与後呼吸数が異常に増加する個体(1h 群で1匹, 1.5h 群で1匹)と反対に極端に減少する個体(1h 群で2匹, 1.5時間群で1匹)とが観察された。このような正反対の反応は、正常動物における呼吸数が50 μ g/kg の場合と、20 μ g/kg 以下の場合とで逆転すること(図1)を考えると興味深い。

10ppm 暴露群における心拍数の変化は全般的に乏しかったが、10ppm/24h でのみ有意な減少が示された。呼吸数は10ppm/3h 群と、/3h-clean 群で有意に増加した。10ppm/24h 群の心拍数及び呼吸数の減少度は、20ppm/3h 群における減少度に比較的近かった。

3.3 NO₂ 及び O₃ の単独亜急性暴露実験

同様に、NO₂ 0.4ppm/4 w 群、O₃ 0.4ppm/4 w 群及び NO₂ 4 ppm/1 w 群に PDG 5 µg/kg を投与したときの投与前後における心拍数、呼吸数の比較を図5に示す。4 ppm/1 w 群でのみ呼吸数の有意な増加が認められた。他の群では投与後の変化は小さく、control 群と同じ程度であった。

3.4 NO₂+O₃ 亜急性暴露実験

同様に NO₂ 0.4ppm+O₃ 0.2ppm/1, 4 w 群と NO₂+O₃ 0.4ppm/1, 4 w 群の各群における実験結果を図6に示す。心拍数はすべての群で有意の変化は認められなかった。しかしながら、NO₂ 0.4ppm+O₃ 0.2ppm/4 w 群の一匹のラットでは心拍数が異常に減少(投与前の47%に減少)した。呼吸数は NO₂ 0.4ppm+O₃ 0.4ppm/1 w 群と、4 w 群で有意に増加した。しかしいずれの群もそれらに対応する control 群で呼吸数が有意に増加していた。これらの実験は同じ暴露濃度と時間の組み合わせで、再度繰り返して行われたが、ここではすべての暴露群と control 群で、心拍数、呼吸数のいずれも有意の変化が示されなかった。

以上の各暴露実験で得られた成績から、10ppm 及び20ppm の NO₂ 急性暴露群や 4 ppm の NO₂ 亜急性暴露群において、それらの一部では PDG による呼吸・循環反射の明りような増強が示された。

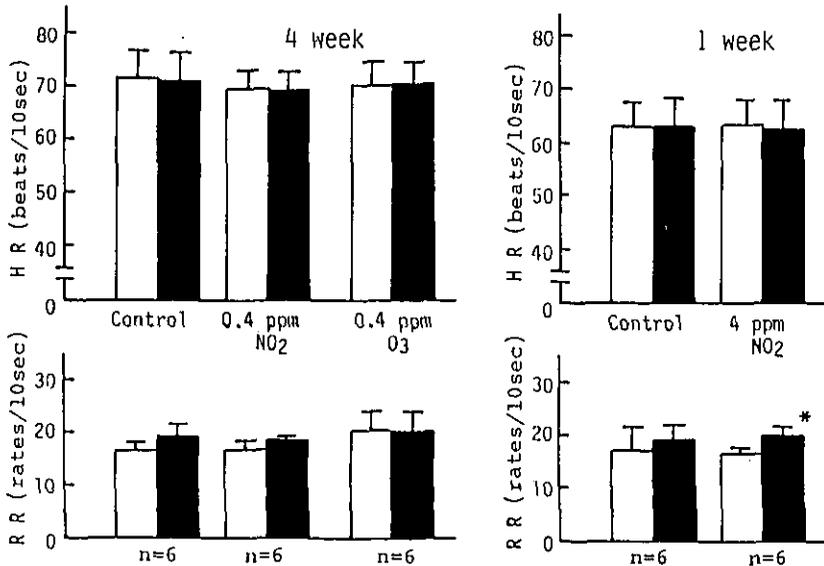


図 5 NO₂ 及び O₃ 単独暴露群における phenyl diguanide (5 µg/kg) 投与前後10秒間の心拍数(HR), 呼吸数(RR)の値

Fig. 5 Values of heart rate (HR) and respiratory rate (RR) 10 s before and after phenyl diguanide injection (5 µg/kg body weight) in control, and exposure groups subjected to NO₂ or O₃ alone

Remarks are the same as in Fig. 1.

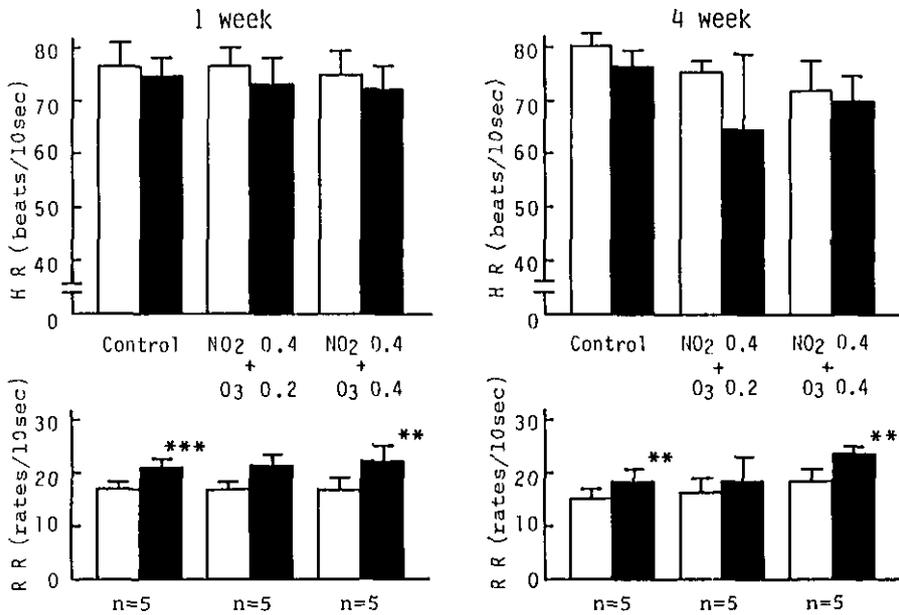


図 6 NO₂+O₃ 複合暴露群における phenyl diguanide (5 μg/kg) 投与前後10秒間の心拍数(HR), 呼吸数(RR)の値

Fig. 6 Values of heart rate (HR) and respiratory rate (RR) 10 s before and after phenyl diguanide injection (5 μg/kg body weight) in control, and exposure groups subjected to the mixed gas of NO₂ and O₃

Remarks are the same as in Fig. 1. * *p<0.01. * * *p<0.001.

このような反射の増強が起こることの原因を直接的に証明することは困難である。J受容器の興奮に関連して次のことが知られている。J受容器は肺が正常状態にあるときはほとんど活動していないが、気胸による肺虚脱²²⁾、肺充血¹⁹⁾、肺水腫²⁰⁾及び運動時¹⁶⁾など、肺が病的な状態にあるときや非安静状態で始めて刺激を受け興奮するといわれる。J受容器に対する最も自然な刺激は、この受容器の終末が到達している部位における間質液の増加で、上述した肺の各種病態においても、このことが最終的な刺激として関与する可能性が高い¹⁶⁾といわれる。周知のとおり、NO₂の暴露下ではある濃度と時間を越えると、肺水腫もしくは間質中に浮腫が生じることから、本実験でも肺水腫の形成ないしは肺水腫に至る過程が、J受容器の刺激効果を増強している可能性は否定できない。表1はPDGに対する反射効果が著明であった20ppm/1.5h群と20ppm/3h群について、暴露終了直後に測った肺湿重量の値をcontrol群との間で比較したものである。肺湿重量は20ppm/1.5h群で、control群に比べ有意に増加した。単位体重あたりに補正した肺湿重量は20ppm/3h群で有意に増加した。ことような成績は、これらの群では肺水腫が進行しつつある状況と受けとめることができる。このことがJ受容器の終末部を取り巻く環境を微妙に変え、終末部のPDGに対する感受性を高める可能性は十分に考えられる。

表 1 対照群及び NO₂ 10, 20ppm 暴露群における肺湿重量
Table 1 Lung wet weights of control and 10ppm and 20ppm-exposed groups

	control			20ppm/1.5h			20ppm/3h		
	B.W. (g)	W (g)	W/kg	B.W.	W	W/kg	B.W.	W	W/kg
M	273.6	1.095	4.018	279.6	1.164*	4.164	262.8	1.136	4.324**
S D	7.8	0.054	0.134	8.3	0.060	0.202	8.2	0.080	0.280

(B.W.) body weight, (W) lung wet weight (g), (W/kg) lung wet weight/kg body weight.

*: p<0.05, **: p<0.01

NO₂ 0.4ppm/4w 群, O₃ 0.4ppm/4w 群及び NO₂ 0.4ppm+O₃ 0.2ppm/1, 4w 群, NO₂ 0.4ppm+O₃ 0.4ppm/1, 4w 群の各群では, J 受容器を介する反射機能は変化していないものと推測される。しかしながら, J 受容器の刺激受容性が間質液の増大で高まることが事実であるとすれば, これらの濃度群においても暴露時間の選択が問題となり, この研究で得られた知見のみですべてを判断することはできない。また一部の暴露群でみられた PDG による反射亢進の原因が単に求心性経路のレベルに限られるのか, あるいは中枢神経や効果器といった反射弓全体の感受性変化にも関与しているのか, などの点に関しても現時点では不明である。

本研究では大気汚染物質の神経系影響を評価する一つの試みとして, 薬物投与実験の成績を報告したが, 今後他の実験方法による研究とも平行しながら, NO₂ や O₃ などの物質が神経系に及ぼす影響をより明りょうにする必要性が残されている。

引用文献

- 1) 局 博一 (1983): 大気汚染物質が神経系機能に及ぼす影響に関する考察. 国立公害研究所研究報告, 第40号, 245-254.
- 2) Johnson, B. L., G. Orthoefer, T. R. Lewis and C. Xintaras (1976): The effect of ozone on brain function. In: Clinical implications of air pollution research. Finkel, A. J. and W. C. Duel (eds.), Publishing Sciences Group, Inc., Massachusetts, 233-245.
- 3) Xintaras, C., B. L. Johnson, C. E. Ulrich, R. E. Terril and M. F. Sobecki (1966): Application of the evoked response technique in air pollution toxicology. Toxicol. Appl. Pharmacol., **8**, 77-87.
- 4) Nadel, J. A., B. Tamplin and Y. Tokiwa (1965): Mechanism of bronchoconstriction. During inhalation of sulfur dioxide; Reflex involving vagus nerves. Arch. Environ. Health, **10**, 175-178.
- 5) Yokoyama, E., Y. Matsumura and T. Suzuki (1967): Effect of atropine and pilocarpine on flow resistance in the lung of healthy subjects exposed to SO₂. Bull. Inst. Publ. Health, **16**, 19-22.
- 6) Ulrich, C. E., M. P. Haddock, F. Church and Y. Alarie (1972): Airborne chemical irritants. Role of trigeminal nerve. Arch. Environ. Health, **24**, 37-42.
- 7) Kulle, T. J. and G. P. Cooper (1975): Effects of formaldehyde and ozone on the trigeminal nasal sensory system. Arch. Environ. Health, **30**, 237-243.
- 8) Lee, L.-Y., E. R. Bleecker and J. A. Nadel (1977): Effect of ozone on bronchomotor response to inhaled histamine aerosol in dogs. J. Appl. Physiol. : Respir. Environ. Exercise Physiol., **43**, 626-631.

- 9) Lee, L. -Y., C. Dumont, T. D. Djokic, T. E. Menzel and J. A. Nadel (1979) : Mechanism of rapid, shallow breathing after ozone exposure in conscious dogs. *J. Appl. Physiol. : Respir. Environ. Exercise Physiol.*, **46**, 1108-1109.
- 10) 局 博一・鈴木 明・嵯峨井 勝・久保田憲太郎(1982) : 大気汚染物質が気道反射機構に及ぼす影響に関する研究. I. 肺伸展受容器について. 第23回大気汚染学会講演要旨集, 宮崎, 465p.
- 11) Gordon, T., C. S. Venugopalan, M. O. Amdur and J. M. Drazen (1984): Ozone-induced airway hyper-reactivity in the guinea pig. *J. Appl. Physiol. : Respirat. Environ. Exercise Physiol.*, **57**, 1034-1038.
- 12) Paintal, A. S. (1954): The response of gastric stretch receptors and certain other abdominal and thoracic vagal receptors to some drugs. *J. Physiol. (London)*, **126**, 271-285.
- 13) Paintal, A. S. (1957): The influence of certain chemical substances on initiation of sensory discharges in pulmonary and gastric stretch receptors and atrial receptors. *J. Physiol. (London)*, **135**, 486-510.
- 14) Paintal, A. S. (1954): A method of locating the receptors of visceral afferent fibres. *J. Physiol. (London)*, **124**, 166-172.
- 15) Paintal, A. S. (1970): The mechanism of excitation of type J receptors, and the J reflex. *In: Ciba Found. Symp., Breathing: Hering-Breuer Centenary Symposium*, Porter, R. (ed.), Churchill, London, 59-71.
- 16) Paintal, A. S. (1973): Vagal sensory receptors and their reflex effects. *Physiol. Rev.*, **53**, 159-227.
- 17) Widdicombe, J. G. (1964): Respiratory reflexes. *In: Handbook of Physiology, Respiration*. sect. 3. Vol. 1. Fenn, W. O. and H. Rahn (eds.), American Physiological Society, Washington, D. C., 585-630.
- 18) Dawes, G. S., J. C. Mott and J. G. Widdicombe (1952): Chemoreceptor reflexes in the dog and the action of phenyl diguanide. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **90**, 203-222.
- 19) Paintal, A. S. (1955): Impulses in vagal afferent fibres from specific pulmonary deflation receptors. The response of these receptors to phenyl diguanide, potato starch, 5-hydroxytryptamine and nicotine and the role in respiratory and cardiovascular reflexes. *Quart. J. Exptl. Physiol.*, **40**, 89-111.
- 20) Paintal, A. S. (1969): Mechanism of stimulation of type J pulmonary receptors. *J. Physiol. (London)*, **203**, 511-532.
- 21) Karezewski, W. and J. G. Widdicombe (1969): The role of the vagus nerves in the respiratory and circulatory responses to intravenous histamine and phenyl diguanide in rabbits. *J. Physiol. (London)*, **201**, 271-291.
- 22) Sellick, H. and J. G. Widdicombe (1970): Vagal deflation and inflation reflexes mediated by lung irritant receptors. *Quart. J. Exptl. Physiol.*, **55**, 153-163.
- 23) Armstrong, D. J. and J. C. Luck (1974): A comparative study of irritant and type J receptors in the cat. *Respir. Physiol.*, **21**, 47-60.
- 24) Coleridge, H. M. and J. C. G. Coleridge (1977): Impulse activity in afferent vagal C-fibers with endings in the intrapulmonary airways of dogs. *Respir. Physiol.*, **29**, 125-142.
- 25) Green, J. F., N. D. Schmidt, H. D. Schultz, A. M. Roberts, H. M. Coleridge and J. C. G. Coleridge (1984): Pulmonary C-fibers evoke both apnea and tachypnea of pulmonary chemoreflex. *J. Appl. Physiol. : Respirat. Environ. Exercise Physiol.*, **57**, 562-567.
- 26) Tsubone, H., A. K. Suzuki, M. Sagai and S. Sugano (1984): Changes of cardiac and respiratory rhythm in non-and tracheostomized rats exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **35**, 197-203.
- 27) Tsubone, H. and A. K. Suzuki (1984): Reflex cardiopulmonary responses by stimulation to type J receptors in rats exposed to NO₂. *J. Toxicol. Environ. Health*, **13**, 905-917.

II-2

オゾン及び二酸化窒素急性暴露による
マウス IgE 抗体産生の増強

Enhancement of IgE Antibody Production by Acute Exposure
to Ozone or Nitrogen Dioxide in Mice

今井 透¹・藤巻秀和²・白石不二雄²・

本多芳男³・清水不二雄⁴

Toru IMAI¹, Hidekazu FUJIMAKI², Fujio SHIRAISHI², Yoshio HONDA³
and Fujio SHIMIZU⁴

要 旨

BALB/c マウスに、1.8ppm O₃ 及び 30ppm NO₂ のそれぞれ 3 時間、急性暴露を行ってその後の IgE 抗体産生に及ぼす影響を検討した。1.8ppm O₃ 及び 30ppm NO₂ 急性暴露は、エアロゾル抗原投与後に引き起こされる抗卵白アルブミン (OA) IgE 抗体産生をそれぞれ増強した。これに対し抗原の腹腔内接種単独による IgE 抗体産生には O₃ 及び NO₂ 急性暴露による影響は認められなかった。これらの結果より O₃ 及び NO₂ が気道局所での反応を介して、IgE 抗体産生に影響を与えることが示唆された。

Abstract

The effects of acute exposure to 1.8ppm O₃ or 30ppm NO₂ on IgE antibody production were investigated in BALB/c mice. When aerosolized antigen (ovalbumin; OA) was administered after the exposure for 3 h, anti-OA IgE antibody productions were enhanced. In

1. 昭和57~60年度 国立公害研究所共同研究員(東京慈恵会医科大学 〒105 東京都港区西新橋 3-25-8)
Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present address: The Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo 105, Japan
2. 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
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies. Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
3. 昭和57~61年度 国立公害研究所客員研究員(東京慈恵会医科大学 〒105 東京都港区西新橋 3-25-8)
Visiting Fellow of the National Institute for Environmental Studies. Present address: The Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo 105, Japan
4. 昭和57~61年度 国立公害研究所客員研究員(新潟大学医学部 〒951 新潟市十日町通り 1-757)
Visiting Fellow of the National Institute for Environmental Studies. Present address: Niigata University School of Medicine, Niigata, Niigata 951, Japan.

contrast, the exposure to O₃ or NO₂ did not change primary IgE antibody response by intraperitoneal injection of the antigen.

These results suggest that the acute exposure to O₃ or NO₂ affect the IgE antibody production through the response of respiratory tract.

1 はじめに

アレルギー性気道疾患の発症と大気汚染との間に因果関係の存在することが疫学的研究により指摘されている¹⁾。

1型のアレルギー反応ではIgE抗体が重要な役割を果たしていることが知られているが、大気汚染物質がIgE抗体産生に与える影響についての実験動物を用いた報告はほとんどみられない。そこで我々は、O₃及びNO₂の急性暴露が、マウスのIgE抗体産生に及ぼす影響を明らかにする目的で本研究を行った。

2 方法

2.1 動物

6～8週令のBALB/c雄マウス(日本チャールスリバー)をIgE抗体産生に、また200～250g Wistar系雄ラット(日本クレア)をPCA(Passive Cutaneous Anaphylaxis)反応に用いた。

2.2 O₃及びNO₂の暴露

O₃暴露は、1.8ppmの濃度で3時間、NO₂暴露は、30ppmの濃度で3時間、我々が既に報告した方法^{2,3)}でそれぞれ行った。

2.3 抗原投与

GradeⅢ(Aerosol暴露)とGradeⅦ(腹腔内接種)の卵白アルブミン(OA: Sigma)を用いた。抗原Aerosolは、1%OA生理食塩水溶液を超音波nebulizer(Devilbis Model 65)を用いて発生させた。このAerosolをアクリル製チャンパー(3l)内に鼻尖を固定されたマウスに6分間暴露した。

2.4 免疫法

1%OAを6分間マウスに暴露することで抗OA IgE抗体産生におけるPriming効果をマウスに起こさせた⁴⁾。次に7日後、10 μ gOAを2mgAl(OH)₃(和光純薬)と共にマウス腹腔内接種することで、抗OA IgE抗体産生を誘導した。これらのマウスの眼静脈より経時的に0.2mlの採血を行い、0.9mlのヘパリン加生理食塩水(10unit/ml)と混合し、遠沈した上清をもって10倍希釈血清とした。

2.5 IgE 抗体価の測定

マウス血清中の抗 OA IgE 抗体は Wistar ラット背部皮膚を用いた PCA 反応で測定した。まずプール血清の希釈系列の 0.1ml ずつをラット皮内に注射した。2 時間後ラット尾静脈より 1 mg OA を含む 1% Evans Blue 1 ml を注射し、30 分後にはく脱したラット皮膚における青色斑を観察した。直径 5 mm 以上の青色斑を示す血清の最終希釈倍数をもって PCA 抗体価とした。なお、被検ラットとして 2 匹以上を使用した。

3 結果

3.1 O₃ 及び NO₂ 急性暴露による IgE 抗体産生の増強

BALB/c マウスに 1.8ppm O₃ 又は 30ppm NO₂ を 3 時間暴露した。その直後に 1% OA Aerosol を 6 分間暴露し、更に 7 日後 10 µg OA 2 mg Al(OH)₃ と共に腹腔内投与し、抗 OA IgE 抗体産生を誘導した。その結果、OA 腹腔内接種 7 日後の血清中の抗 OA IgE 抗体は、O₃ 暴露群、NO₂ 暴露群において 1:160 を示し対照群の 1:40 に比べ有意に増加した(表 1)。NO₂ 暴露群においては、OA 接種 14 日後における抗体価にも差を認めた。

表 1 O₃ 及び NO₂ 急性暴露による IgE 抗体産生の増強

Table 1 Enhancement of anti-OA IgE antibody productions by acute exposure to O₃ or NO₂

Exposure*	Aerosolized OA administration day 7	Immunization (i.p.)** day 0	Anti-OA	IgE PCA
			titers day 7	day 14
1.8ppm O ₃	+	10 µg OA + 2mg Al(OH) ₃	160	160
30ppm NO ₂	+	10 µg OA + 2mg Al(OH) ₃	160	320
Control	+	10 µg OA + 2mg Al(OH) ₃	40	80

*: Exposure to O₃ or NO₂ for 3 h

** : Intraperitoneal injection

3.2 O₃ 及び NO₂ 急性暴露の一次 IgE 抗体産生への影響

前実験で 1.8ppm O₃ 及び 30ppm NO₂ が IgE 抗体産生を増強させたことから、O₃ あるいは NO₂ が 2 度の OA 抗原刺激のいずれに作用したかを知る目的で次の実験を行った。

BALB/c マウスに 1.8ppm O₃ 及び 30ppm NO₂ を 3 時間暴露し、7 日後に 10 µg OA を 2 mg Al(OH)₃ と共に腹腔内接種することで抗 OA IgE 抗体産生を誘導した。その結果 1.8ppm O₃ 及び 30ppm NO₂ 暴露は、抗原腹腔内接種による一次 IgE 抗体産生に影響を及ぼさなかった(表 2)。こ

表 2 O₃ 及び NO₂ 急性暴露の一次 IgE 抗体産生に及ぼす影響Table 2 Effect of acute exposure to O₃ or NO₂ on primary IgE antibody response to OA

	Exposure*	Immunization**	Anti-OA	IgE PCA titers
	day 7	day 0	day 7	day 14
Exp. 1	Control	10 µg OA+2mg Al(OH) ₃	0	160
	1.8ppm O ₃	10 µg OA+2mg Al(OH) ₃	0	160
Exp. 2	Control	10 µg OA+2mg Al(OH) ₃	20	160
	30ppm NO ₂	10 µg OA+2mg Al(OH) ₃	40	160

*: Exposure to O₃ or NO₂ for 3 h

**: Intraperitoneal injection

の結果より、O₃ 及び NO₂ 急性暴露の影響が抗原 Aerosol 投与された際に認められることが示唆された。

4 考察

1.8ppm O₃ 及び 30ppm NO₂ の暴露は、その後の OA 抗原投与に対するマウス IgE 抗体産生を増強した。この増強は抗原を Aerosol 投与したときにのみみられた。これに対し、抗原の腹腔内接種単独による一次 IgE 抗体産生には O₃ 及び NO₂ 暴露は影響を示さなかった。これらの結果は、今回の実験条件下で O₃ 及び NO₂ 急性暴露が気道局所に影響を与え、経気道的に投与された OA 抗原による抗体産生系を変化させたと推測される。

O₃ 及び NO₂ の作用機序については、次のことが考えられる。1) O₃ 及び NO₂ の酸化作用により気道粘膜の損傷が起こり、細胞間げきへの抗原の侵入が容易になった。2) 繊毛運動や換気能力の抑制により異物に対する clearance 機能が低下した。3) 抗原の変性により抗原性が増強した。これらの可能性の検討には種々の手段を用いた実験による解決が必要と考えられる。

これまでに大気汚染物質が生体の抗体産生系にも影響を与えるという動物実験での報告はいくつかある⁵⁻⁷⁾。しかし IgE 抗体産生への影響を実験動物を用いて検討しているものは少ない。Gershwin ら⁸⁾ は O₃ 暴露及び抗原 Aerosol 暴露したマウスの肺に非特異的に IgE 含有細胞の分布が著明に増加したが、血中での IgE 抗体価には変化がみられなかったことを報告している。今回の我々の結果では、抗原特異的な IgE 抗体産生の増強が血清中に認められた。

O₃ と NO₂ の呼吸器への影響は異なるという報告があるが^{9,10)}、今回の条件下では両者共に同様の IgE 抗体産生の増強を観察した。このため、両者共、同様の機序が働いた可能性が示唆されるが、今後さらに大気汚染物質の濃度、暴露期間の比較検討が望まれる。

謝 辞

稿を終えるに当たり、この研究にご助言を頂いた渡辺直熙博士(東京慈恵会医科大学寄生虫学教室)に深謝いたします。

引用文献

- 1) 兼子順男・島田和也・堀内博人・遠藤朝彦・児玉 実・篠田伸正・今井 透・滝口清徳(1980)：鼻アレルギーの増加とその要因，鼻アレルギーと大気汚染，耳鼻咽喉科展望，**23**，270-281.
- 2) 竹中参二・堀内博人・今井 透・清水不二雄・村上正孝(1983)：オゾン急性暴露に対する各種動物の感受性，国立公害研究所研究報告，第40号，139-146.
- 3) 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.
- 4) Imai, T., F. Shimizu, H. Fujimaki and N. Watanabe (1983): Enhancement of IgE antibody production by ovalbumin aerosol in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **70**, 368-372.
- 5) Osebold, J. W., S. L. Owens, Y. C. Zee, W. M. Dotson and D. D. La Barre (1979): Immunological alterations in the lungs of mice following ozone exposure: Changes in immunoglobulin levels and antibody-containing cells. *Arch. Environ. Health*, **34**, 258-265.
- 6) Fujimaki, H., F. Shimizu and K. Kubota (1982): Effect of subacute exposure to NO₂ on lymphocytes required for antibody responses. *Environ. Res.*, **29**, 280-286.
- 7) Fujimaki, H., M. Ozawa, T. Imai and F. Shimizu (1984): Effect of short-term exposure to O₃ on antibody response in mice. *Environ. Res.*, **35**, 490-496.
- 8) Gershwin, L. J., J. W. Osebold and Y. C. Zee (1981): Immunoglobulin E-containing cells in mouse lung following allergen inhalation and ozone exposure. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **65**, 266-277.
- 9) 横山栄二 (1969)：SO₂ と NO₂ 及び 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) 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**, 61-69.

II-3 オゾン亜急性暴露がマウス IgE 抗体産生に及ぼす影響 Effect of Subacute Exposure to Ozone on IgE Antibody Production in Mice

小澤 仁¹・藤巻秀和²・白石不二雄²

本多芳男³・村上正孝²

Masashi OZAWA¹, Hidekazu FUJIMAKI², Fujio SHIRAISHI²

Yoshio HONDA³ and Masataka MURAKAMI¹

要 旨

0.8ppm オゾン(O₃)の1, 2及び4週間暴露によるBALB/c雄マウスのIgE抗体産生に及ぼす影響について検討した。

全暴露群とも、O₃暴露後に抗原Ovalbumin(OA)とAl(OH)₃の投与により引き起こされる抗OA IgE抗体産生は、対照群との間に差がみられなかった。一方、Aerosol抗原の経気道投与後に引き起こされる抗OA IgE抗体産生は、1～4週間のO₃暴露により抑制された。

さらに、このIgE抗体産生の抑制現象のメカニズムを解析するためにHapten-carrierを用いた実験を行ったところ、O₃の影響はB細胞よりはT細胞に及ぼされていることが示唆された。

Abstract

The effect of subacute exposure to ozone (O₃) on IgE antibody production was investigated in BALB/c mice.

Mice were continuously exposed to 0.8 ppm O₃ for 1, 2, or 4 weeks, respectively. No significant difference in the primary IgE antibody production by intraperitoneal immunization alone was observed between O₃-exposed and non-exposed mice. However, IgE antibody production after administration of aerosolized antigen was suppressed in O₃-

1. 昭和57～60年度 国立公害研究所共同研究員(東京慈恵会医科大学 〒105 東京都港区西新橋3-25-8)
Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present address: The Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo 105, Japan.
2. 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
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
3. 昭和57～61年度 国立公害研究所客員研究員(東京慈恵会医科大学 〒105 東京都港区西新橋3-25-8)
Visiting Fellow of the National Institute for Environmental Studies. Present address: The Jikei University School of Medicine, Minato-ku, Tokyo 105, Japan.

exposed mice.

In order to elucidate the suppressive mechanism of the IgE antibody production, hapten-carrier antigenic system was used. It is shown that the induction of helper T cell function was suppressed while B cell was almost intact.

These results suggest that O₃ exposure has the effect on T cell and the quite insignificant effect on the IgE antibody production after intraperitoneal immunization with antigen.

1 はじめに

気道のアレルギー性疾患と大気汚染との間の因果関係が示唆されている^{1,2)}にもかかわらず O₃ と IgE 抗体との関連性についての実験的研究は少ない。

先に我々は O₃, NO₂ の急性暴露がその後の抗原 Aerosol 感作により引き起こされる IgE 抗体産生を増強することを報告した³⁾。また, O₃ 亜急性暴露の免疫応答に及ぼす影響について検討したところ, 0.8ppm O₃ の2週間暴露により IgM 抗体産生の抑制が観察された。

本研究は O₃ 亜急性暴露後, マウスに Aerosol 抗原を経気道的に投与して, O₃ の IgE 抗体産生に及ぼす影響の機構の解明を目的とするものである。

2 方法

2.1 実験動物

日本チャールス・リバーより購入した7週令の雄 BALB/c マウスを一群6匹として使用した。IgE 抗体価測定用として, 200~250g 雄 Wistar ラット(日本クレア)を使用した。

2.2 O₃ 暴露

マウスに0.8ppmの濃度の O₃ で, それぞれ1, 2, 及び4週間の連続暴露を行った。暴露は既報⁴⁾の方法に従った。対照群として O₃ を含まない清浄空気を暴露群と同一条件で暴露した。O₃ 暴露中, 飼料は毎日交換し, 水は隔日交換した。

2.3 抗原投与方法

Ovalbumin (OA) は Sigma Chemical Co. USA より, Keyhole limpet hemocyanin (KLH) は Calbiochem Behring Corp. USA より, Human gamma-globulin (HGG) は AB Kabi, Sweden より購入した。Hapten-carrier 系の実験のために, OA・KLH・HGG の3種の抗原は Eisen らの方法⁵⁾により Dinitrophenol (DNP) とそれぞれ結合させた。蛋白分子1個当たりの DNP の分子数は OA では3, KLH では9, HGG では6であった。DNP と OA を結合した溶液(DNP-OA)は, Aerosol 抗原及び腹腔内接種用抗原として, DNP と KLH を結合した溶液(DNP-KLH)は腹腔内接種用抗原として, さらに DNP と HGG を結合した溶液(DNP-HGG)は PCA 反応の challenge 用抗原として使用した。

Aerosol 化した OA 及び DNP-OA の経気道投与は超音波ネブライザー (Devilbiss Co. Ltd., Model

65)とガラスチャンバーを用いて行った。超音波ネブライザーは、1分間に約10 lの風量と1分間に約2 mlの霧化量を有するものである。ガラス・チャンバーは容量が6.2 lで、一度に8匹のマウスを同一条件下で Aerosol 抗原に暴露できる性能を有する。6匹のマウスをチャンバー内に鼻尖部のみを挿入した姿勢で固定し、1% OA あるいは DNP-OA 生理食塩水の Aerosol を6分間経気道投与した。

2.4 免疫法

10 μ g OA と adjuvant としての 2 mg Al(OH)₃ とを混和したものをマウスの腹腔内に接種して免疫した。Aerosol 抗原の経気道投与後に誘導される IgE 抗体産生においては、Aerosol OA の投与より7日後に同様の操作で免疫した⁷⁾。また、O₃ の B 細胞に与える影響を hapten-carrier 系により検討するために、KLH で前もって免疫したマウスに1%の Aerosol 化した DNP-OA を投与し、7日後に10 μ g DNP-KLH と 2 mg Al(OH)₃ とを腹腔内接種した⁸⁾。さらに、やはり hapten-carrier 系を使用して T 細胞に及ぼす O₃ の影響を検索する目的で、1% OA Aerosol 投与し、7日後に10 μ g DNP-OA と 2 mg Al(OH)₃ とを腹腔内接種した。

2.5 IgE 抗体価の測定

抗原の腹腔内接種より7日後と14日後に、マウスの後眼窩静脈叢よりそれぞれ0.2ml ずつ採血し、これと0.9 ml のヘパリン加生理食塩水(10U/ml)とを直ちに混和した後1000g で10分間遠心分離した。その上清を10倍の希釈抗血清とし、それぞれ6匹分を混合した血清の IgE 抗体価を各群ごとに PCA 反応によって測定した⁹⁾。PCA 反応は剃毛した雄 Wistar ラットの背部の皮内に0.1ml の一連の希釈抗血清を注射した。24時間後に1 ml の0.5% Evans blue に溶解した1 mg の適当な抗原をラットの尾静脈より静注した。抗原感作より30分後に、ラットの皮膚上の青色斑の大きさを測定し、直径5 mm 以上を陽性とした。これらの判定には2匹のラットを使用し、反応が陽性となった最高希釈倍数を抗体価とした。ラットの個体差による反応の相違はほとんど認められなかった。

2.6 放射線照射

放射線感受性のある抑制性細胞の存在を除外する目的で、マウスに200R の放射線全身照射を抗原の腹腔内接種より1日後に行った。放射線照射装置は MBR1505R 日立メディコ製を使用した。

3 結果

3.1 抗原の腹腔内接種後に引き起こされる一次 IgE 抗体産生に及ぼす O₃ 暴露の影響

0.8 ppm O₃ 1週、2週及び4週間の暴露終了後に、10 μ g OA と 2 mg Al(OH)₃ とを混和し、これを腹腔内接種した。その結果、O₃ 暴露群と対照群との間の血清中の抗 OA IgE 抗体価に有意差は認められなかった(図1)。また、O₃ 暴露終了7日後に同一の抗原を腹腔内接種した場合にも同様な結果が認められた(図2)。

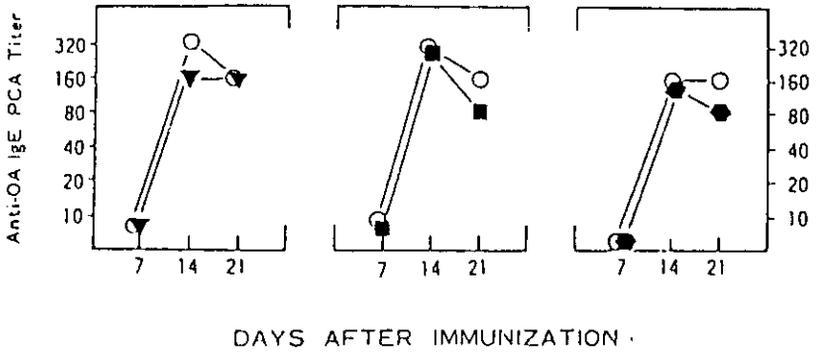


図 1 オゾン暴露の一次 IgE 抗体産生に及ぼす影響 (1)

Fig. 1 Effect of exposure to ozone for various periods on primary IgE antibody production in mice immunized immediately after exposure to ozone

All mice received 10 μ g OA 2mg Al(OH)₃ intraperitoneally on Day 0 immediately after exposure to ozone for 1 week (▼), 2 weeks (■), 4 weeks (●), respectively. A control group (○) was exposed to ambient air.

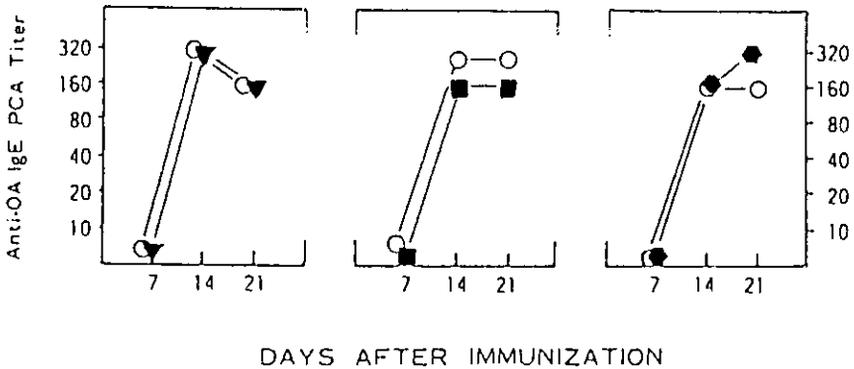


図 2 オゾン暴露の一次 IgE 抗体産生に及ぼす影響 (2)

Fig. 2 Effect of exposure to ozone for various periods on primary IgE antibody production in mice immunized 7 days after exposure to ozone

Groups of mice were exposed ozone for 1 week (▼), 2 weeks (■) or 4 weeks (◆) by Day-7.

A control group (○) was exposed to ambient air. All mice received 10 μ g OA with 2 mg Al(OH)₃ intraperitoneally on Day 0.

3. 2 Aerosol 抗原の経気道投与後に引き起こされる IgE 抗体産生に及ぼす O₃ 暴露の影響

種々の期間の O₃ 暴露後マウスに 1% の Aerosol 化した OA を 6 分間投与し, その 7 日後に 10 μ g OA と 2 mg Al(OH)₃ とを腹腔内接種した。図 3 のごとく, O₃ の亜急性暴露は, 抗 OA IgE 抗体産生を有意に抑制した。

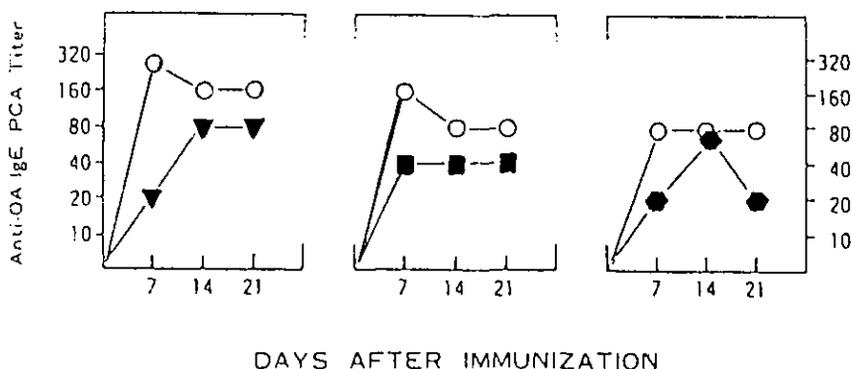


図 3 オゾン暴露のエアロゾル抗原投与後に引き起こされる IgE 抗体産生に及ぼす影響

Fig. 3 Effect of exposure to ozone on IgE antibody response after aerosolized OA inhalation

Groups of mice exposed to ozone for 1 week (▼), 2 weeks (■) or 4 weeks (◆) by Day-7. A control group (○) was exposed to ambient air.

Immediately after ozone exposure, all mice were administered 1% aerosolized OA for 6 min on Day-7. On Day 0, all mice received 10 μg OA with 2 mg Al(OH)₃ intraperitoneally.

3.3 hapten 特異的 B 細胞に及ぼす O₃ 暴露の影響

上記の抑制機構を解明するために以下の実験を行った。まず、マウスの Carrier 特異的 T 細胞を誘導するために、O₃ 暴露 7 日前に 1 μg KLH で免疫した。次に、O₃ 1 週間暴露終了直後に Aerosol 化した DNP-OA を投与した。さらにその 7 日後に、DNP-KLH を腹腔内接種した。その結果、対照群と O₃ 暴露群の両者において抗 DNP IgE 抗体産生に有意な差は認められなかった(表 1)。

3.4 T 細胞に及ぼす O₃ 暴露の影響

1 週間の O₃ 暴露後に、1% の Aerosol 化した OA を 6 分間マウスに投与した。さらに、1 週後に 2 mg Al(OH)₃ に混和した 10 μg DNP-OA を腹腔内接種した。表 2 に示すように O₃ 暴露群 (C) に

表 1 オゾン暴露のハプテン特異的 B 細胞に及ぼす影響

Table 1 Effect of ozone exposure on hapten specific B cells

Intraperitoneal immunization	Ozone (0.8ppm) from day-14 to day-7	Administration of DNP-OA aerosol day-7	Intraperitoneal immunization day 0	Anti-DNP IgE PCA titer ²	
				day 7	day 14
1 μg KLH+2mg Al(OH) ₃	None	6min. ¹	10 μg DNP-KLH+2mg Al(OH) ₃	160	320
1 μg KLH+2mg Al(OH) ₃	Exposed	6min.	10 μg DNP-KLH+2mg Al(OH) ₃	80	320

¹Mice were administered 1% aerosolized DNP-OA in saline for 6 min.

²Titer determined by pooled sera from 6 mice.

表 2 オゾン暴露のエアロゾル抗原投与後に引き起こされる IgE 抗体産生に及ぼす影響

Table 2 Effect of ozone exposure on T cells induced with aerosolized OA

Ozone (0.8ppm) from day .14 to .7	Administration of OA aerosol day .7	Intraperitoneal immunization day 0	Irradiation day 1	IgE PCA titer ²	
				Anti-DNP day 7	Anti-OA day 7
A. None	6min. ¹	10 μ g DNP-OA+2mg Al(OH) ₃	0 R	80	80
B. None	6min.	10 μ g DNP-OA+2mg Al(OH) ₃	200R	320	160
C. Exposed	6min.	10 μ g DNP-OA+2mg Al(OH) ₃	0 R	10	10
D. Exposed	6min.	10 μ g DNP-OA+2mg Al(OH) ₃	200R	10	10

¹Mice were administered 1% aerosolized OA in saline for 6 min.

²Titer determined by pooled sera from 6 mice.

においては、対照群(A)に比べ抗OA IgE抗体産生で認められたのと同様の抑制が抗DNP IgE抗体産生でも認められた。次に、放射線感受性の抑制性細胞を除去するためにDNP-OA免疫1日後に200Rの放射線照射を行った。放射線照射を行った対照群(B)とO₃暴露群(D)の両者のIgE抗体産生を比較すると、O₃暴露群において、抗DNP IgE抗体及び抗OA IgE抗体ともに、その産生の増強は認められず、抑制されたままであった。

4 考察

近年、O₃暴露した実験動物におけるアレルギー反応についての報告が認められる。松村¹⁰⁾は、モルモットにおいてO₃の急性暴露がOAに対する感作を促進させるとし、またOseboldら¹¹⁾も、O₃暴露したマウスにおいて感作閾値が著明に亢進したと報告している。さらにGershwinら¹²⁾は、Aerosol抗原で免疫し、かつO₃を暴露したマウスの肺においてIgE含有細胞の分布が著明になったと述べている。これらの報告は、O₃暴露の局所での刺激によって、IgE抗体産生が亢進したことを示唆している。我々もO₃急性暴露で同様の結果を得た³⁾。しかしながら今回の実験ではAerosol抗原により誘導される一過性のIgE抗体産生は、0.8ppm O₃の1週間・2週間・4週間暴露により抑制された。すなわちO₃亜急性は動物のIgE抗体産生を増強しなかった(図3)。これは藤巻らがこれまでに報告^{4,5)}した0.8ppm O₃の2週間暴露によって、IgG, IgM抗体産生が抑制された結果と一致するものと考えられ、O₃亜急性暴露はマウスの液性免疫応答に抑制的に働くことが示唆された。

一方、腹腔内接種により誘導される一次IgE抗体産生は、O₃暴露により増強も抑制も起こさなかった(図1・図2)。これらの結果は、O₃のIgE抗体産生に及ぼす影響は、Aerosol抗原が気道を介して摂取される過程に対するものと思われる。また、亜急性のO₃暴露後に気道の粘膜の透過性及び防御機構が変化することにより、抗原の取り込みも変化した可能性が考えられる。これらの点より今回の実験とこれまでの報告との間に相違が生じたものと思われる。

さらに、0.8ppm O₃ の亜急性暴露による Aerosol 抗原の経気道投与後の IgE 抗体産生の抑制機構を hapten-carrier 系を用いて解析したところ、DNP-OA の免疫の 7 日前に Aerosol OA を投与したときに O₃ 暴露群では放射線照射の有無にかかわらず、抗 hapten あるいは抗 carrier IgE 抗体の産生が抑制された(表 2)。これらの結果は、抑制現象が helper T 細胞の誘導の遅延か、あるいは放射線抵抗性の suppresser 細胞の関与によるものであることを示唆する。放射線感受性の suppresser 細胞や hapten 特異的 B 細胞の障害が、この抑制現象に関与しているとは考えにくい。また、Peterson ら¹³⁾ は O₃ 暴露直後に得られたヒトのリンパ球は、T 細胞の mitogen である PHA に対しての反応が著明に抑制されたと報告しており、このことは T 細胞群は、B 細胞群より亜急性の O₃ 暴露に対して感受性が高いことを推測させた。

引用文献

- 1) Horiuchi, H., S. Kaneko and T. Endo (1982): An epidemiological study of the relationship between air pollution and nasal allergy. *Rhinology Suppl.*, **1**, 161-167.
- 2) 兼子順男・島田和也・堀内博人・遠藤朝彦・児玉 実・篠田伸正・今井 透・滝口清徳(1980): 鼻アレルギーの増加とその要因, 鼻アレルギーと大気汚染. 耳鼻咽喉科展望, **23**, 270-281.
- 3) 今井 透・藤巻秀和・白石不二雄・本多芳男・清水不二雄(1986): O₃ および NO₂ 急性暴露によるマウス IgE 抗体産生の増強. 国立公害研究所研究報告, 第101号, 29-33.
- 4) 藤巻秀和・小澤 仁・今井 透・村上正孝(1983): オゾン亜急性暴露の免疫応答に及ぼす影響, 国立公害研究所研究報告, 第40号, 157-161.
- 5) Fujimaki, H., M. Ozawa, T. Imai and F. Shimizu (1984): Effect of short-term exposure to ozone on antibody response in mice. *Environ. Res.*, **35**, 490-496.
- 6) Eisen, H. N., S. Belman and M. E. Carsten (1953): The reaction of 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid with free amino groups of proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4583-4585.
- 7) Imai, T., F. Shimizu, H. Fujimaki and N. Watanabe (1983): Enhancement of IgE antibody production by ovalbumin aerosol in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **70**, 368-372.
- 8) Ovary, Z. and B. Benacerraf (1963): Immunological specificity of the secondary response with dinitrophenylated proteins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**, 72-76.
- 9) Watanabe, N. and Z. Ovary (1977): Antigen and antibody detection by *in vivo* methods; A reevaluation of passive cutaneous anaphylactic reactions. *J. Immunol. Methods*, **14**, 381-390.
- 10) Matsumura, Y. (1970): The effect of ozone, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide on the experimentally induced allergic respiratory disorder in guinea pigs. 1. The effect on sensitization with albumin through the airway. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **102**, 430-437.
- 11) Osebold, J. W., L. J. Gershwin and Y. C. Zee (1980): Studies on the enhancement of allergic lung sensitization by inhalation of ozone and sulfuric acid aerosol. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **3**, 221-234.
- 12) Gershwin, L. J., J. W. Osebold and Y. C. Zee (1981): Immunoglobulin E-containing cells in mouse lung following allergen inhalation and ozone exposure. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **65**, 266-277.
- 13) Peterson, M. L., N. Rummo, D. House and S. Harder (1978): *In vitro* responsiveness of lymphocytes to phytohemagglutinin. *Arch. Environ. Health*, **33**, 59-63.

II-4

オゾン及び二酸化窒素暴露による
細胞性免疫応答に及ぼす影響
Effects of Exposure to Ozone or Nitrogen Dioxide
on Cellular Immunity in Mice

藤巻秀和¹・白石不二雄¹・足川哲夫²・村上正孝¹
Hidekazu FUJIMAKI¹, Fujio SHIRAISHI¹, Tetsuo ASHIKAWA²
and Masataka MURAKAMI¹

要 旨

0.8ppm オゾン(O₃)及び4 ppm 二酸化窒素(NO₂)暴露によるマウス胸腺及び遅延型過敏(DH)反応に及ぼす影響について検索した。0.8ppmの3, 7及び14日間暴露ではすべての暴露群で、対照群に比べて胸腺重量の低下がみられた。一方、4 ppm NO₂の暴露では、14日間の暴露で低下がみられたが、3日と7日間暴露では胸腺重量に変化はみられなかった。DH反応については、3~7日のO₃暴露で抑制傾向が認められ、特に7日間暴露では有意な抑制がみられた。それに対して、NO₂暴露ではほとんど変化がみられなかった。そこで、O₃暴露によるDH反応の抑制機構解明のため、O₃暴露マウスの胸腺と血中のT細胞数(Thy 1.2抗原陽性細胞)の比率を検討した。その結果、7日間暴露で胸腺のThy 1.2陽性細胞数の低下がみられた。血中でのリンパ球数は、3日及び7日間暴露で減少したが、T細胞とB細胞(表面免疫グロブリン陽性細胞)の比率はほとんど対照群と差がみられなかった。0.8ppm O₃の暴露は、4 ppm NO₂に比べリンパ球、中でも胸腺で分化・増殖するT細胞に対して、より抑制効果を示すことが考えられた。

Abstract

To investigate the effect of ozone(O₃) or nitrogen dioxide(NO₂) on delayed hypersensitivity (DH) reaction, mice were exposed to 0.8ppm O₃ or 4 ppm NO₂ for continuously 3 days, 7 days or 14 days and then sheep red blood cells (SRBC) were injected.

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
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
2. 昭和58~60年度 国立公害研究所共同研究員(東京慈恵会医科大学 〒105 東京都港区西新橋3-25-8)
Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present address: The Jikei University School of Medicine Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan.

The weights of the thymus in O₃ exposed mice decreased through all exposure periods. Though the decreased weight of thymus was also observed in 14 days exposure to NO₂, other periods of NO₂ exposure did not affect the weights of thymus.

O₃ exposure suppressed the DH reaction in mice, particularly 7 days exposure to O₃ significantly suppressed it. On the other hand, no effect of NO₂ exposure on DH reactions was shown.

To estimate the suppression of DH reaction by O₃ exposure, the numbers of lymphocytes in thymus and blood of exposed mice were compared with those of control mice. It was found that the decrease of the numbers of lymphocytes in both thymus and blood were observed in 3 days and 7 days exposure to O₃. The rate of T and B lymphocytes in blood of exposed mice was the same as that in blood of control mice.

These results suggest that 0.8ppm O₃ exposure, compared with 4 ppm NO₂ exposure, affects the numbers and the function of lymphocytes, especially T lymphocytes.

1 はじめに

これまでに我々は、オゾン(O₃)や二酸化窒素(NO₂)が生体の防御機能の一つである抗体産生機構に対して抑制効果のあることを報告した¹⁻³⁾。さらに、0.8ppm O₃の短期暴露によって、T細胞依存性抗原である羊赤血球(SRBC)に対する抗体産生は抑制するが、T細胞非依存性抗原であるDinitrophenol(DNP)-Ficollに対する抗体産生にはほとんど変化を及ぼさないことを示した⁴⁾。また、O₃暴露されたマウスのIgE抗体産生は抑制され、その機構解明のために、hapten-carrier系を用いた実験を行ったところ、B細胞よりT細胞への影響によることを見いだした⁵⁾。

そこで、今回は、免疫応答の中で抗体産生と共に重要な役割をもつ細胞性免疫に及ぼすO₃及びNO₂暴露の影響について検索した。

2 方法

2.1 実験動物

2-3か月齢の雄BALB/cマウスを日本チャールスリバー(株)より購入して使用した。

2.2 O₃及びNO₂暴露

マウスに0.8ppm O₃あるいは4.0ppm NO₂を3日、7日及び14日間連続暴露した。O₃及びNO₂のマウスへの暴露条件は、既報^{2,3)}に従って行った。

2.3 遅延型過敏(Delayed hypersensitivity; DH)反応の測定

細胞性免疫反応の一つであるDH反応の測定は、Mitsuokaら⁶⁾の方法で行った。すなわち、抗原SRBC(1×10^6 /マウス)を暴露直後に静注し、4日後に右足蹠に $1 \times 10^8/20 \mu\text{l}$ /マウスのSRBCを注射した。対照として、左足蹠に同量の生理食塩水を注射した。24時間後にエーテル麻醉下で屠殺し、左右の足蹠の厚さをダイマルゲージ(Peacock G. Ozaki Seisakusho, Tokyo)で測定し、その差をDH

反応の指標値とした。

2.4 リンパ球の分離

胸腺細胞浮遊液は、マウスより取り出した胸腺をステンレスメッシュを通してバラバラにし、100~150gで5~10分の遠心操作により2~3回洗浄したものを用いた。

血中のリンパ球は、マウスの心臓より採血した1mlの血液を3mlのBalanced salt solution(BSS)と混合し、それを3mlのFicoll-paque(Pharmacia)に重層し、400gで30~40分遠心し、取り出したリンパ球層を3回BSSで遠心洗浄して用いた。

2.5 T細胞, B細胞の同定

前報に述べた方法¹⁾と同様に、FITC標識抗マウスThy1.2抗血清とFITC標識抗マウスIgG抗血清(両抗血清ともMiles-Yeda LTDで購入)を用いた直接法による免疫蛍光法でT細胞(Thy1.2陽性細胞)とB細胞(表面IgG陽性細胞)の同定を行った。

3. 結果

3.1 O₃及びNO₂暴露による胸腺重量の変動

マウスに0.8ppm O₃あるいは4.0ppm NO₂の連続暴露を3, 7及び14日間行い、直後にマウスを屠殺し、胸腺重量を測定した。その結果、O₃暴露では、全暴露期間を通じて胸腺重量の低下がみられた。一方、NO₂暴露では、14日暴露で低下がみられたが、3日、7日暴露ではあまり変化は認められなかった(図1)。4ppm NO₂暴露に比べ0.8ppm O₃暴露の胸腺重量の低下が著しかった。

3.2 O₃暴露によるDH反応への影響

0.8ppm O₃を1, 3, 7及び14日間それぞれ暴露後、抗原を静注してDH反応への影響を調べた。表1に示すように、7日暴露で有意なDH反応の抑制(対照群の63%)がみられた。1日、3日間暴露でも対照群の87%, 75%と抑制傾向が認められたが、14日間暴露ではほとんど差はみられなかった。

3.2 NO₂暴露によるDH反応への影響

マウスに4ppm NO₂を3日、7日及び14日間暴露し、抗原を静注してDH反応を調べた。その結果、いずれの暴露群でもDH反応に著しい変化はみられなかった。7日及び14日間暴露では、対照群に比べ暴露群で亢進の傾向がみられた(表2)。

3.4 O₃暴露の胸腺と血中のT細胞へ及ぼす影響

0.8ppm O₃を3日及び7日間暴露して、胸腺と血中のThy1.2抗原陽性細胞の比率の変動につ

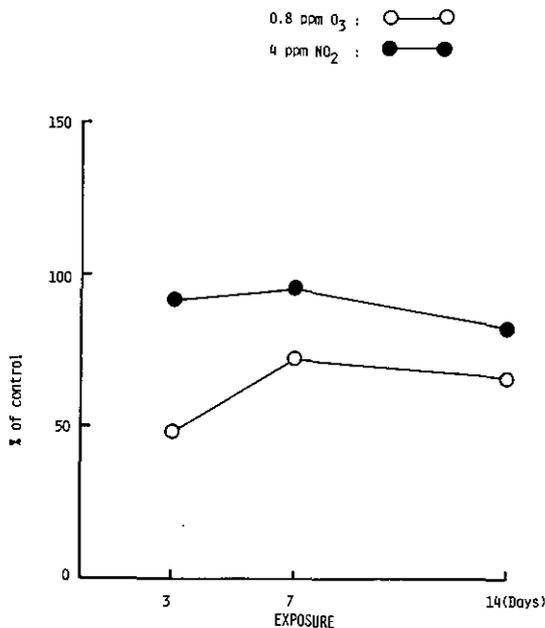


図 1 胸腺重量に及ぼす O₃ 及び NO₂ 暴露の影響
 Fig. 1 Effects of O₃ and NO₂ on thymus weight

表 1 マウスの DH 反応に及ぼす 0.8ppm O₃ 暴露の影響
 Table 1 Effects of 0.8ppm O₃ exposure on DH reaction in mice

Exposure (day)	Footpad swelling (0.01mm) ^a		No. of mice
	control	exposed	
1	40.3±3.8	35.2±2.8 (87) ^b	8
3	48.0±4.9	35.8±2.8 (75)	7
7	41.8±3.7	26.5±5.0* (63)	7
14	31.0±2.3	30.2±2.4 (97)	10

* p<0.05 (Student's t-test)

^a Each value is expressed as mean ± SE of seven to ten mice.

^b Percent to control value.

いて検索した。3日及び7日間の両暴露で胸腺の細胞数は、胸腺重量と同様に減少した。Thy 1.2 抗原陽性細胞の比率は、3日間暴露では、ほとんど差がみられないが、7日間暴露で減少しているのが認められた(表3)。表4には、暴露後血中より回収されたリンパ球数と、その中の Thy 1.2 抗原陽性細胞(T細胞)と表面免疫グロブリン陽性細胞(B細胞)の比率を示した。血中のリンパ球数も3日及び7日間暴露で胸腺の場合と同様に減少しているのが認められた。しかしなが

表 2 マウスのDH反応に及ぼす4 ppm NO₂暴露の影響
Table 2 Effects of 4.0ppm NO₂ exposure on DH reaction in mice

Exposure (day)	Footpad swelling (0.01mm) ^a		No. of mice
	control	exposed	
3	48.0±4.9	45.5±5.2(95) ^b	7
7	41.8±3.7	50.2±5.1(120)	7
14	36.0±2.0	43.0±6.3(119)	5

^a Each value represents mean ± SE of five or seven mice.

^b Percent to control value.

表 3 胸腺に及ぼす0.8ppm O₃暴露の影響
Table 3 Effects of 0.8ppm O₃ exposure on thymus^a

	O ₃ exposure for	
	3 days	7 days
Wt. of thymus	57.8±2.9 ^b	30.7±5.1
No. of thymus cells	45.9±4.5	11.1±6.3
Thy 1.2 positive cells	96.4±2.6	74.4±2.3

^a Each result represents mean ± SE of six mice.

^b Percent to control value.

表 4 O₃暴露による血中リンパ球亜集団の変動
Table 4 Changes of lymphocyte subpopulations in blood of O₃ exposed mice

	O ₃ exposure for			
	3 days		7 days	
	control	exposed	control	exposed
No. of lymphocytes (×10 ⁴ /ml of blood)	76.7±4.3 ^a	26.3±3.4*	77.0±3.5	46.0±8.0
T-B lymphocyte proportion				
T cell(%)	75±3	80±3	70±2	63±10
B cell(%)	25±3	20±3	31±2	37±10

^a Each value is expressed as mean ± SE of six mice.

* p<0.01 (Student's *t*-test)

ら、T 及び B 細胞の比率には、3 日及び 7 日間暴露ともに対照群と比べ、ほとんど差がみられなかった。

4 考 察

本研究で、0.8ppm O₃ の短期暴露によりマウスの胸腺湿重量は減少し、DH 反応は抑制されることが明らかとなった。一方、それに比べ、4 ppm NO₂ の暴露は、胸腺への影響は少なく、DH 反応に大きな変動は認められなかった。NO₂ 暴露の抗体産生に及ぼす影響についてはいくつかの報告があり、濃度や暴露期間の違いにより抗体産生の抑制あるいは亢進が観察されている^{2,7)}。我々は 4 ppm NO₂ の 14 日間暴露で抗 SRBC 抗体産生にほとんど変動がみられなかったことを確認している(未発表)。これらの事実から、4 ppm NO₂ の短期暴露では免疫応答への影響は少ないことが考えられる。

ところで、我々は 0.8ppm O₃ 暴露によって、T 細胞に依存性の抗原に対する抗体産生を抑制し、非依存性の抗原に対する抗体産生にはあまり影響がみられないことを報告してきた⁴⁾。しかし今回の実験で、胸腺の重量、細胞数が減少し、T 細胞が重要な働きをする細胞性免疫の中の DH 反応の抑制もみられたことから、0.8ppm O₃ は、リンパ球の中の B 細胞より T 細胞により強い影響を与えることが示唆された。細胞性免疫には、DH 反応以外にも感染防御、移植片や癌細胞に対する拒絶反応、幼若化反応などが含まれ、これらの機能にも O₃ 暴露が影響を及ぼすことが推察され、既に感染防御系については、Coffin ら⁸⁾が 0.3~1.0ppm O₃ の 3 時間暴露によりウサギの肺胞マクロファージの貪食能の低下、また Goldstein ら⁹⁾が Staphylococcus aureus 感染後 2 ppm O₃ の 4 時間暴露により肺の殺菌作用の抑制を報告している。他方、肺胞マクロファージの latex 貪食能や肺での殺菌作用が 0.1~0.8ppm O₃ 暴露により亢進したという報告もあり^{10,11)}、肺における感染防御に対する O₃ 暴露の影響は、暴露濃度、暴露期間、感染時期の違いにより変動すると思われる。

Aranyi ら¹¹⁾は、5 h/d, 5 d/wk の 103 日間の 0.1ppm O₃ 暴露により、B 細胞による lipopolysaccharide (LPS) に対する幼若化反応にはほとんど影響がみられなかったが、T 細胞の phytohemagglutinin や Concanavalin A に対する幼若化反応は抑制されたことを明らかにした。

今回の研究とこれまでの 2, 3 の報告^{4,11)}から O₃ 暴露に対する感受性について、リンパ球の中でもその機能の異なる集団によって、差がみられることが示唆され、今後、その機構がそれぞれの機能の異なるリンパ球の細胞表面への O₃ の作用によるのか、細胞内への作用によるのか、詳しい検討が望まれる。

引用文献

- 1) Fujimaki, H. and F. Shimizu (1981): Effects of acute exposure to nitrogen dioxide on primary antibody response. *Arch. Environ. Health*, **36**, 114-119.
- 2) Fujimaki, H., F. Shimizu and K. Kubota (1982): Effect of subacute exposure to NO₂ on lymphocytes required for antibody responses. *Environ. Res.*, **29**, 280-286.
- 3) 藤巻秀和・小澤 仁・今井 透・村上正孝(1983): オゾン亜急性暴露の免疫応答に及ぼす影響, 国立公害研究所研究報告, 第40号, 157-161.
- 4) Fujimaki, H., M. Ozawa, T. Imai and F. Shimizu (1984): Effect of short-term exposure to O₃ on antibody response in mice. *Environ. Res.*, **35**, 490-496.
- 5) Ozawa, M., H. Fujimaki, T. Imai, Y. Honda and N. Watanabe (1985): Suppression of IgE antibody production after exposure to ozone in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **76**, 16-19.
- 6) Mitsuoka, A., T. Teramatsu, M. Baba, S. Morikawa and K. Yasuhira (1978): Delayed hypersensitivity in mice induced by intravenous sensitization with sheep erythrocytes: evidence for tuberculin type delayed hypersensitivity of the reaction. *Immunology*, **34**, 363-370.
- 7) Holt, P. G., L. M. Finlay-Jones, D. Keast and J. M. Papadimitrou (1979): Immunological function in mice chronically exposed to nitrogen oxides (NO_x). *Environ. Res.*, **19**, 154-162.
- 8) Coffin, D. L., D. E. Gardner, R. S. Holzman and F. J. Wolock (1968): Influence of ozone on pulmonary cells. *Arch. Environ. Health*, **16**, 633-636.
- 9) Goldstein, G., W. S. Tyler, P. D. Hoepflich and C. Eagle (1971): Ozone and the antibacterial defense mechanisms of the murine lung. *Arch. Intern. Med.*, **127**, 1099-1102.
- 10) Christman, C. A. and L. W. Schwartz (1982): Enhanced phagocytosis by alveolar macrophages induced by short-term ozone insult. *Environ. Res.*, **28**, 241-250.
- 11) Aranyi, C., S. C. Vana, P. T. Thomas, J. N. Bradof, J. D. Fenters, J. A. Graham and F. J. Miller (1983): Effects of subchronic exposure to a mixture of O₃, SO₂, and (NH₄)₂SO₄ on host defenses of mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **12**, 55-71.

II-5 二酸化窒素, オゾン, 及びそれらの複合暴露による
ラット末梢血リンパ球の姉妹染色分体交換頻度への影響
The Effects of *in vivo* Exposure to Nitrogen Dioxide, Ozone, and
their Combined Gases on Frequencies of Sister Chromatid Exchanges
in Peripheral Blood Lymphocytes of Rats

白石不二雄¹・村上正孝¹・森本兼義²・小泉 明³

Fujio SHIRAIISHI¹, Masataka MURAKAMI¹, Kanehisa MORIMOTO²
and Akira KOIZUMI³

要 旨

ラット末梢血リンパ球の姉妹染色分体交換(SCE)の分析の検討を行い、二酸化窒素(NO_2), オゾン(O_3), 及びそれらの複合ガスのラット末梢血リンパ球のSCE頻度及びその影響について検討を行った。ラット末梢血リンパ球のSCE分析は、RPMI1640培養液5.0mlに全血0.4mlを加えるマイクロ法を用いることと、Concanavalin Aと2-Mercaptoethanolを細胞分裂刺激物質あるいは補助剤とすることにより、容易に、かつ安定して行えるようになった。

*in vivo*におけるSCE誘発試験の陽性対照として用いたCyclophosphamideは、気管内注入によりラット末梢血リンパ球の基底SCE頻度を有意に増加させた。 NO_2 4.0ppm, O_3 0.2ppm, O_3 0.2ppm + NO_2 1.2ppm, 及び O_3 0.2ppm + NO_2 4.0ppmの4種類のガスについて、亜急性暴露(4週, 8週, 及び12週)を行い、ラット末梢血リンパ球のSCE頻度を調べたところ、基底SCE頻度は対照(清浄空気暴露)との間に有意な差は認められなかった。一方、Mitomycin Cによる誘発SCE頻度は O_3 0.2ppmの8週と12週, O_3 0.2ppm + NO_2

-
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
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 昭和58~61年度 国立公害研究所共同研究員(東京大学医学部 公衆衛生学教室 〒113 東京都文京区本郷7-3-1)
Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present address: Department of Public Health, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113, Japan.
 3. 昭和58~60年度 国立公害研究所客員研究員(東京大学医学部 公衆衛生学教室 〒113 東京都文京区本郷7-3-1)
Visiting Fellow of the National Institute for Environmental Studies. Present address: Department of Public Health, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113, Japan.

4.0ppm の12週の群で対照との間で有意な増加が認められた。このことは O_3 あるいはその複合ガスの暴露がラット末梢血リンパ球の SCE 誘発剤に対する感受性を高めるような細胞遺伝的影響を引き起こすことを示唆するものである。

Abstract

The studies were made on the experimental method for sister chromatid exchange (SCE) analysis in peripheral blood lymphocytes of rats, and the effects of *in vivo* exposure to nitrogen dioxide (NO_2), ozone (O_3), and their combined gases on frequencies of SCE in peripheral blood lymphocytes of rats.

It was found that SCEs in peripheral blood lymphocytes of rats were analyzed easily and stably by the micro method which we added 0.4ml of heparinized whole blood to the 5 ml of RPMI1640 medium containing 2-mercaptoethanol ($10 \mu M$), and concanavalin A ($20 \mu g/ml$) as a mitogen. Cyclophosphamide which was used as a positive control in the *in vivo* experiment of SCE induction, caused a dose-dependent increase in baseline SCE frequencies following 1.8 to 7.2mg/kgb.w. of intratracheal injection. In exposure to NO_2 4.0ppm, O_3 0.2ppm, O_3 0.2ppm + NO_2 1.2ppm, and O_3 0.2ppm + NO_2 4.0ppm from 4 weeks to 12 weeks, no significant increase in baseline SCE frequencies was found in all the exposed groups. On the other hand, significant increase of the mitomycin C-induced SCEs in exposed groups to O_3 0.2ppm for 8 weeks and 12 weeks, and O_3 0.2ppm + NO_2 4.0ppm for 12 weeks, compared with control were found. These results suggest that *in vivo* exposure to O_3 , or its combined gases caused cytogenetic effects that raise the sensitivity of blood lymphocytes of rats to the SCE inducers treated *in vitro*.

1 はじめに

姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange; SCE) は染色体 DNA 傷害の鋭敏な指標であり¹⁾, 例えば, 人間集団における末梢血リンパ球の SCE 分析は有害環境因子による細胞遺伝毒性のヒトモニタリング系として広く用いられている^{2,3)}。有害環境因子の影響を末梢血リンパ球の SCE 分析で検索する利点としては, 末梢血リンパ球は他の臓器細胞に比べて容易に採取できること, 全臓器内を循環していること, 分裂を停止した休止期 (G_0 期) の細胞であることなどがあげられている⁴⁾。しかしながら, 実験動物, 特に様々な毒性試験に汎用されているラットでの末梢血リンパ球の SCE 検索は末梢血リンパ球の培養が困難であるためにほとんど試みられなかった。

最近になって, Kligerman ら^{4,5)} は, ラット末梢血リンパ球での SCE 分析法について検討を行い, その検索系を用いてエチレンオキシドやホルムアルデヒドなどのガス状物質のラットへの吸入暴露によるラット末梢血リンパ球での細胞遺伝的影響の検索を試みている⁶⁻⁸⁾。しかしながら, 彼等の検索系はラットから採取した血液を培養する前にリン酸緩衝液で洗浄するなど, かなりの複雑な操作を必要とする。そこで, 我々は, 多数のサンプルを培養する必要性から, できるだけ簡単に培養が行える方法として培養液に無処理の全血を添加するいわゆるマイクロ法によるラット末梢血リンパ球の SCE が分析できる検索系の検討を行った。そしてその検索系を用いて, 大気汚染物質の吸入暴露によるラットへの細胞遺伝毒性を末梢血リンパ球の SCE 分析により試みることにした。

代表的なガス状大気汚染物質として知られている二酸化窒素 (NO_2) 及びオゾン (O_3) の変異原性あるいは細胞遺伝毒性は、多くの様々な検索系により検討されており、哺乳動物細胞を用いた *in vitro* の検索では陽性の報告が多数を占めている⁹⁻¹²⁾。しかしながら、実験動物を用いた吸入暴露による *in vivo* の実験系においては、末梢血リンパ球での細胞遺伝毒性は一報告例¹³⁾を除いて陰性の報告が多い^{9, 14, 15)}。

本研究では、 NO_2 、 O_3 、及びそれらの複合ガスについて4週から12週と比較的長期間ラットに暴露して、末梢血リンパ球での細胞遺伝毒性の検索を SCE 頻度により検討を試みたので報告する。

2 実験材料及び方法

2.1 動物

すべての実験に Wistar 系雄ラット (Jcl) の生後10週令以降を使用した。ガス暴露実験においては暴露期間中、SPF レベルで飼育した。

2.2 採血及び培養液

末梢血は、ラットにエーテル麻酔をほどこした後、大腿骨動物より無菌的に採血し、ヘパリンで凝固防止して培養開始まで氷温で保持した。

末梢血リンパ球の基底 SCE 頻度を検索するために、市販の RPMI1640 液 (Flow Lab.) に最終濃度が牛胎児血清 15%、HEPES 10mM、L-Glutamine $20 \mu\text{M}$ 、Penicillin 50IU/ml、Streptomycin 50mcg/ml、5-Bromodeoxyuridine (BUdR) $20 \mu\text{M}$ になるように添加した培養液を使用し、また *in vitro* での SCE 誘発剤添加による誘発 SCE 頻度を検索するために、さらに Mitomycin C (MMC) を最終濃度が $3.3 \times 10^{-8}\text{M}$ になるように添加した培養液を使用した。両培養液は15ml 用の滅菌プラスチック尖底遠心管に 5ml ずつ分注し、0.4ml の全血を培養液に添加した。

2.3 細胞分裂誘発物質

末梢血リンパ球の細胞分裂誘発剤 (mitogen) として、Concanavalin A (Con A) と 2-Mercaptoethanol (2 ME) を組み合わせて用いることとし、両者の培養液への最適添加量について末梢血リンパ球の幼若化率及び分裂中期細胞の出現率により検討した。

Con A は $5 \mu\text{g/ml}$ から $20 \mu\text{g/ml}$ の3段階の濃度について、2 ME は $10 \mu\text{M}$ と $20 \mu\text{M}$ の濃度について実験を行った。

2.4 培養

培養液に全血及び mitogen を添加した遠心管をよく混和した後、試験管培養用斜位台に立てて、 37°C の CO_2 インキュベーターで48時間培養を行い、細胞分裂周期を M 期に同調するために Colcemid (最終濃度 $0.2 \mu\text{M}$) を添加して、さらに、5時間培養を行った。なお、リンパ球への酸素の供

給が促進されるように培養期間中、12時間ごとに遠心管を軽く振とうする操作を繰り返した。

2.5 染色体標本の作成と染色分体の染色

培養後、遠心管の末梢血リンパ球は0.075MのKCl溶液で低張液処理し、メタノール：酢酸(3:1)液で3回の固定処理を行った。少量の固定液で細胞浮遊液として、その2ないし3滴をスライドグラスに落としホットプレート(80°C)上で乾燥を行い、染色体標本とした。なお、培養以降の処理はすべて暗所あるいは、540nm以下の波長がカットされたイエロー蛍光灯(三菱;FLR40Y-FII/M)のもとで行った。SCE分析のための染色体核板の染色はGotoら¹⁶⁾の改良したFluorescence-Plus-Giemsa法により行った。

2.6 SCE頻度の算定

SCE頻度は光学顕微鏡(×1,000倍)を用いて、1サンプルにつき明りょうにSCEが観察できる25個の2回分裂中期細胞の細胞当たりの平均頻度として求め、*in vitro*でSCE誘発剤を添加しなかった無処理のSCE頻度を基底SCE(Baseline SCE)、SCE誘発剤のMMCを添加して得られたSCE頻度から基底SCE頻度を減じた値をMMC誘発SCE(MMC-induced SCE)として算定した。

2.7 Cyclophosphamideの気管内投与によるSCE誘発試験

*in vivo*実験におけるSCE誘発剤としてよく用いられるCyclophosphamide(CP)を気管内に投与し、ラット末梢血リンパ球のSCE誘発の陽性試験を行った。生理食塩水に溶かしたCPをペントバルビタールナトリウム液の腹腔内注射により麻酔を施したラットの気管内に、1.8mg/kgBW、3.6mg/kgBW、及び7.2mg/kgBWの3段階の量について投与した。投与後、24時間目に末梢血を採取し、培養を行った。そして、それぞれの投与量について基底SCEとMMC誘発SCEの検索を行った。

2.8 NO₂単独、O₃単独、及びO₃+NO₂複合ガスの暴露

5台の暴露チャンバーを用いて、清浄空気暴露による対照群、NO₂ 4.0ppm単独暴露群、O₃ 0.2ppm単独暴露群、O₃ 0.2ppm+NO₂ 1.2ppm暴露群、及びO₃ 0.2ppm+NO₂ 4.0ppm暴露群について、6匹を一群として4週、8週、及び12週の期間について暴露した。暴露後、速やかに末梢血を採取し、培養を行い、基底SCEとMMC誘発SCEの検索を行った。

3 結果

3.1 Con Aと2MEの刺激によるラット末梢血リンパ球の幼若化率

Con Aと2MEの組み合わせによるラット末梢血リンパ球の幼若化率を図1に示した。幼若化率は、実験を試みたCon Aあるいは2MEの濃度に依存した増加を示したが、全細胞に占める分裂

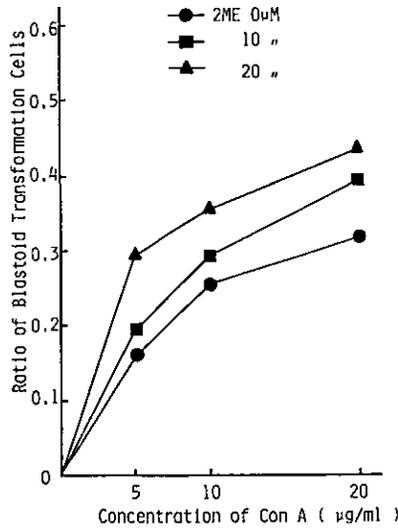


図 1 ラット末梢血リンパ球の幼若化に及ぼす Con A と 2 ME の影響
 Fig. 1 Effects of Con A and 2 ME concentrations on blast transformation of peripheral blood lymphocytes of rats

中期細胞の比率は Con A の濃度が $20 \mu\text{g/ml}$ のとき、2 ME の濃度が $10 \mu\text{M}$ の場合と $20 \mu\text{M}$ の場合とではほとんど差は認められなかった。また、48時間培養と5時間の Colcemid の処理時間で得られる2回分裂中期細胞の全分裂中期細胞に対する比率はほとんどのサンプルで30%以上を示した。そこで、ラット末梢血リンパ球の SCE を分析するための mitogen として、最終濃度が Con A $20 \mu\text{g/ml}$ 、2 ME $10 \mu\text{M}$ になるように添加量を設定して以下の実験を行った。

3.2 ラット末梢血リンパ球の基底 SCE 頻度の分布

対照として使用したラット24匹から得られた末梢血リンパ球(600細胞)の基底 SCE 頻度の分布を図2に示した。基底 SCE 頻度の平均値は8.97/細胞を示し、ほぼ平均値を頂点とする山形の分布を示したが、分布に正規性は認められなかった。

3.3 CPの気管内投与による末梢血リンパ球の SCE 頻度

CPの気管内投与によるラット末梢血リンパ球の基底 SCE 及び MMC 誘発 SCE を表1に示した。生理食塩水を投与した対照群の基底 SCE 頻度は9.63/細胞を示したのに対して、CPを投与した群では投与量に依存した顕著な増加が認められ、最高投与量の 7.2mg/kg BW 群では対照の2.6倍を示した。一方、MMC 誘発 SCE 頻度は対照群との間で有意な変化は認められなかった。

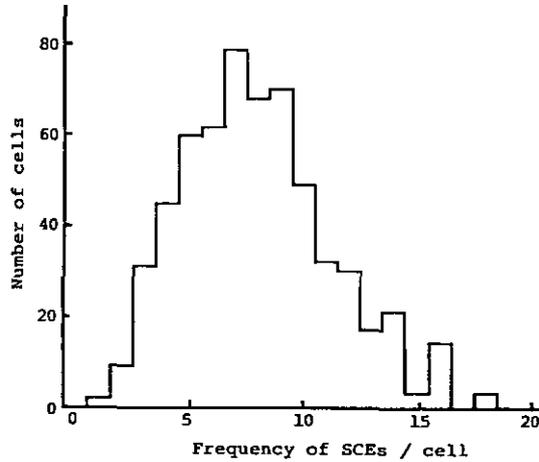


図 2 Con A 刺激による無処理ラット末梢血リンパ球の基底 SCE 頻度の分布
 Fig. 2 Distribution of baseline SCE frequencies in peripheral blood lymphocytes of non-treated rats

表 1 Cyclophosphamide の気管内投与によるラット末梢血リンパ球の SCE 頻度への影響
 Table 1 The effect of cyclophosphamide on SCE frequencies in peripheral blood lymphocytes of rats by intratracheal injection

Dose	SCEs/cell ^a			
	Baseline SCEs	Net induction	MMC - induced SCEs ^b	Net induction
Control	9.63±0.63	—	7.45±1.32	—
CP 1.8 mg/kgBW	15.13±1.51**	5.50	6.32±0.43	-1.12
CP 3.6 mg/kgBW	19.88±1.12***	10.25	3.93±1.06	-3.94
CP 7.2 mg/kgBW	24.86±2.65***	15.23	5.58±0.84	-1.87

^a Each value is expressed as mean ± SE of four rats, significant at **p<0.01 and ***p<0.001 by Student's *t*-test, compared with control value.

^b MMC-induced SCEs is expressed as Value which subtract the corresponding baseline SCEs from the SCE frequencies treated *in vitro* by mitomycin C (3.3×10^{-8}).

3.4 ガス暴露による末梢血リンパ球の SCE 頻度

NO₂ 4.0ppm, O₃ 0.2ppm, O₃ 0.2ppm+NO₂ 1.2ppm, O₃ 0.2ppm+NO₂ 4.0ppm の暴露群と対照群のラット末梢血リンパ球の基底 SCE 及び MMC 誘発 SCE の成績を表 2 に示した。

基底 SCE は、全暴露群とも 4 週, 8 週, 及び 12 週の暴露期間を通じて対照群との間で有意な差は認められなかった。一方, MMC 誘発 SCE は, NO₂ 4.0ppm 暴露群の 4 週暴露で対照群に比べて有意な減少が, また O₃ 0.2ppm 暴露群の 8 週と 12 週, O₃ 0.2ppm+NO₂ 4.0ppm 暴露群の 12 週暴露でそれぞれの対照群に比べて有意な増加が認められた。

表 2 NO₂, O₃, 及びそれらの複合ガスの *in vivo* 暴露によるラット末梢血リンパ球の SCE 頻度への影響
 Table 2 The effects of *in vivo* exposure to NO₂, O₃, and their combined gases on SCE frequencies in peripheral blood lymphocytes of rats

Exposure	SCEs/cell ^a	
	Baseline SCEs	MMC - induced SCEs
Exposure for 4 weeks		
Control	9.70±0.44	14.15±1.60
NO ₂ 4.0ppm	10.16±0.26	9.43±1.24*
O ₃ 0.2ppm	9.79±0.21	14.78±1.11
O ₃ 0.2ppm+NO ₂ 1.2ppm	9.60±0.54	15.36±1.16
O ₃ 0.2ppm+NO ₂ 4.0ppm	10.27±0.60	15.58±0.95
Exposure for 8 weeks		
Control	8.77±0.25	8.16±0.50
NO ₂ 4.0ppm	8.99±0.22	6.58±0.49
O ₃ 0.2ppm	8.73±0.23	10.64±0.46**
O ₃ 0.2ppm+NO ₂ 1.2ppm	8.95±0.31	7.37±0.51
O ₃ 0.2ppm+NO ₂ 4.0ppm	8.35±0.28	8.53±1.20
Exposure for 12 weeks		
Control	9.51±0.20	13.50±0.92
NO ₂ 4.0ppm	9.87±0.33	13.63±0.76
O ₃ 0.2ppm	9.36±0.20	17.03±1.36*
O ₃ 0.02ppm+NO ₂ 1.2ppm	9.61±0.39	13.72±0.75
O ₃ 0.2ppm+NO ₂ 4.0ppm	9.84±0.38	17.65±0.58**

^a Each value is expressed as mean ± SE of six rats, significant at *p<0.05 and **p<0.01 by Student's *t*-test, compared with corresponding control value.

4 考 察

我々は、ラット末梢血リンパ球の SCE を分析する方法として、比較的簡単に培養ができるマイクロ法で、mitogen として Con A と 2 ME を組み合わせることにより、容易に、かつ安定して SCE が分析できる検索系を開発した。本検索系では、Con A を 20 μg/ml、2 ME を 10 μM の濃度に調整したとき、幼若率が約 40% と高い値を示し、またスライドグラス上での全細胞数に対する分裂中期細胞の出現率は 8% 近い値を示した。そして、ほとんどのサンプルで 2 回分裂中期細胞の全分裂中期細胞に対する比率は 30% 以上を示し、広く試みられているマイクロ法によるヒト末梢血リンパ球の SCE 分析と同様、比較的容易に SCE 頻度の測定が可能となった。本検索系の利点を挙げるとこれまで報告されているラット末梢血リンパ球の SCE 検索系の多くが末梢血を培養前に洗浄するなどの処理を必要とする^{4, 17, 18)}のに比べて、採血した全血をそのまま培養に供するために前処理にてもならず、多くのサンプルを培養でき、また前処理操作による細胞への傷害なども除外できることで

ある。

正常ラット(無処理ラット)の基底 SCE 頻度を測定し、その頻度分布を検索したところ、平均値は8.97/細胞を示し、ほぼ平均値の付近を頂点とした山形の分布を示したが、高 SCE 頻度の付近に肩が認められ、正規性は認められなかった。ラット末梢血リンパ球の基底 SCE 頻度は、培養液中の BUdR の濃度の違い⁴⁾やラットの系統差²⁰⁾により、値が違うことが報告されている。また、末梢血リンパ球だけを分離して培養した場合にも基底 SCE 頻度は高く出ることが知られている。本実験で得られた Wistar ラットでの8.97/細胞の基底 SCE 頻度を BUdR の濃度の違い、mitogen の違いなどはあるが、Kligerman ら⁶⁻⁸⁾の Fischer-344 ラットでの7.5から9.5/細胞の基底 SCE 頻度や Dearfield ら¹⁹⁾の Fischer-344 ラットでの10.83から11.91/細胞、Sprague-Dawley ラットでの7.62から9.05/細胞の基底 SCE 頻度と比較した場合、ほぼ同程度の枠内にあるといえる。一方、分布曲線の山形には正規性は認められず、高 SCE 頻度側に肩が認められることにより、Carrano ら²⁰⁾の示したヒトの基底 SCE 頻度の分布と類似しているといえる。

実験動物の *in vivo* 実験における変異原性あるいは細胞遺伝毒性の陽性対照としてよく用いられる CP について、ラットの気管内に投与して24時間後の末梢血リンパ球の SCE 頻度を調べたところ、基底 SCE 頻度は投与量に依存した顕著な増加が認められ、最高投与量の7.2mg/kg BW のとき、対照群の2.6倍にも増加した。これは、例えば SCE 誘発物質が気管を通過して肺に吸入された場合でも、末梢血リンパ球に作用して SCE 頻度を誘発することを証明するものである。一方、CP 投与実験による MMC 誘発 SCE 頻度は投与群と対照群との間に差は認められなかった。*in vitro* でのいわゆる化学物質負荷法は微小な SCE 頻度の差を拡大すると考えられているが、CP 投与実験で MMC 誘発 SCE 頻度に差が認められなかったことは、基底 SCE 頻度の増加が著しいために誘発 SCE 頻度の差が相殺されたものと考えられる。

NO₂、O₃、及びそれらの複合ガスについてラットへ吸入暴露を行ったところ、末梢血リンパ球の基底 SCE 頻度は全暴露期間を通じて対照群との間で有意な差は認められなかった。NO₂ 及び O₃ を実験動物に吸入暴露を行い末梢血リンパ球で細胞遺伝毒性を検索した報告としては、NO₂ ではマウスに0.1ppm から10ppm の4段階の濃度を6時間暴露したとき、染色体異常は増加しないという Gooch ら¹⁴⁾の報告がある。一方、O₃ ではチャイニーズ・ハムスターに0.2ppm を5時間暴露したとき、染色体異常が増加するという Zelac ら¹³⁾の報告があるが、逆にマウスに0.15ppm 5時間、0.21ppm を5時間、及び0.99ppm を2時間と3段階暴露した場合でも染色体異常や SCE 頻度は増加しないという Tice ら¹⁵⁾の報告がある。NO₂ も O₃ も哺乳動物細胞の *in vitro* の実験では変異原性あるいは細胞遺伝毒性はほとんどの報告が陽性であることも併せて判断すると、NO₂ も O₃ のどちらも強い変異原活性や細胞遺伝毒性活性を持たないために引き起こされる結果と推察される。一方、MMC 誘発 SCE 頻度は NO₂ 4.0ppm 暴露群の4週暴露で有意な減少が、また O₃ 0.2ppm 暴露群の8週及び12週、O₃ 0.2ppm + NO₂ 4.0ppm の12週暴露で有意な増加が認められた。ガス暴露群の誘発 SCE 頻度における減少あるいは増加による対照群との差は、暴露群の末梢血リンパ球の質的变化、

例えばガス暴露によるリンパ球の老化の促進,あるいは turnover の促進による細胞の幼令化が細胞の感受性の差異として MMC の負荷により拡大して示されたものと考えられ, NO₂ 及び O₃ のラットへの暴露は末梢血リンパ球への細胞遺伝的影響を示すことが示唆された。しかしながら,本研究では NO₂ と O₃ の複合効果は特に認めることはできなかった。

引用文献

- 1) Perry, P. and H. J. Evans (1975): Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchanges. *Nature*, **257**, 121-125.
- 2) Lambert, B., A. Lindblad, K. Holmberg and D. Francesconi (1982): The use of sister chromatid exchanges to monitor human populations for exposure to toxicologically harmful agents, *In: Sister Chromatid Exchanges*, Wolff (ed.), Wiley-Interscience, New York, 149-182.
- 3) Nagaya, T. and H. Toriumi (1985): Effects of smoking on spontaneous and induced sister chromatid exchanges in lymphocytes. *Toxicol. Lett.*, **25**, 293-296.
- 4) Kligerman, A. D., J. L. Wilmer and G. L. Erexson (1981): Characterization of a rat lymphocyte culture system for assessing sister chromatid exchange after *in vivo* exposure to genotoxic agents. *Environ. M.*, **3**, 531-543.
- 5) Kligerman, A. D., J. L. Wilmer and G. L. Erexson (1982): Characterization of a rat lymphocyte culture system for assessing sister chromatid exchange. II. Effects of 5-bromodeoxyuridine concentration, number of white blood cells in the inoculum, and inoculum volume. *Environ. M.*, **4**, 585-594.
- 6) Kligerman, A. D., G. L. Erexson, M. E. Phelps and J. L. Wilmer (1983): Sister chromatid induction in peripheral blood lymphocytes of rats exposed to ethylene oxide by inhalation. *Mutat. Res.*, **120**, 37-44.
- 7) Kligerman, A. D., G. L. Erexson, J. L. Wilmer and M. C. Phelps (1983): Analysis of cytogenetic damage in rat lymphocytes following *in vivo* exposure to nitrobenzene. *Toxicol. Lett.*, **18**, 219-226.
- 8) Kligerman, A. D., M. C. Phelps and G. L. Erexson (1984): Cytogenetic analysis of lymphocytes from rats following formaldehyde inhalation. *Toxicol. Lett.*, **21**, 241-246.
- 9) Gooch, P. C., D. A. Creasia and J. G. Brewen (1976): The cytogenetic effects of ozone: Inhalation and *in vitro* exposure. *Environ. Res.*, **12**, 188-195.
- 10) Guerrero, R. R., D. E. Rounds, R. S. Olson and J. D. Hackney (1979): Mutagenic effects of ozone on human cells exposed *in vivo* and *in vitro* based on sister chromatid exchange analysis. *Environ. Res.*, **18**, 336-346.
- 11) Tsuda, H., A. Kushi, D. Yoshida and F. Goto (1981): Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges induced by gaseous nitrogen dioxide in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, **89**, 303-309.
- 12) Shiraiishi, F. and H. Bandow (1985): The genetic effects of the photochemical reaction products of propylene plus NO₂ on cultured Chinese hamster cells exposed *in vitro*. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 531-538.
- 13) Zelac, R. E., H. L. Cromroy, W. E. Bolch, Jr., B. G. Dunavant and H. A. Bevis (1971): Inhaled ozone as a mutagen I. Chromosome aberrations induced in Chinese hamster lymphocytes. *Environ. Res.*, **4**, 262-282.

- 14) Gooch, P. C., H. E. Luippold, D. A. Creasia and J. G. Brewen (1977): Observations on mouse chromosome following nitrogen dioxide inhalation. *Mutat. Res.*, **48**, 117—120.
- 15) Tice, R. R., M. A. Bender, J. L. Ivett and R. T. Drew (1978): Cytogenetic effects of inhaled ozone. *Mutat. Res.*, **58**, 293—304.
- 16) Goto, K., S. Maeda, Y. Kano and T. Sugiyama (1978): Factors involved in differential Giemsa-staining of sister chromatid. *Chromosoma*, **66**, 351—359.
- 17) Granberg-Ohman, I., S. Johansson and A. Hjerpe (1980): Sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in rats treated with phenazons and caffeine. *Mutat. Res.*, **79**, 13—18.
- 18) Tates, A. D., N. de Vogel and I. Neuteboom (1980): Cytogenetic effects in hepatocytes, bone-marrow cells and blood lymphocytes of rats exposed to ethanol in the drinking water. *Mutat. Res.*, **79**, 285—288.
- 19) Dearfield, K. L., D. Jacobson-Kram and J. R. Williams (1984): A comparison of sister chromatid exchange frequencies in peripheral lymphocytes and bone marrow cells of Fisher 344 and Sprague-Dawley rats. *Cytogenet. Cell genet.*, **38**, 216—220.
- 20) International Agency for Research on Cancer (1981): Some antineoplastic and immunosuppressive agents. *IARC Monographs*, **26**, Lyon, France, 165—202.

II-6 ラット赤血球のアルケニルアシル, アルキルアシル及び ジアシルエタノールアミンホスホグリセライドへの アラキドン酸取り込み速度の違い*

Different Incorporation Rates of Arachidonic Acid into Alkenylacyl, Alkylacyl and Diacyl ethanolaminephosphoglyceride of Rat Erythrocytes*

彼谷邦光¹・三浦 卓¹

Kunimitsu KAYA¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

二酸化窒素の生体内存在形態である硝酸イオンが赤血球膜リン脂質への脂肪酸取り込みを促進する機構を明らかにすることを試みた。

ラット赤血球膜エタノールアミンホスホグリセライド(EPG)はアルケニル型60%, アルキル型5%及びジアシル型35%からなっており, 各成分へのアラキドン酸の取り込み速度はアルケニル型89, アルキル型136及びジアシル型1360pmol/h per μ mol EPGであった。この取り込み速度の違いを明らかにするために, 赤血球膜にホスホリパーゼ活性があるか否かを調べたところ, ジアシル型を選択的に分解するホスホリパーゼ A₂ が検出された。アシル-CoA-リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼも 1-アシルリゾ EPG の 2 位を持異的にエステル化したが, このアシルトランスフェラーゼ活性はホスホリパーゼ A₂ 活性よりかなり高いことから, EPG 各成分へのアラキドン酸の取り込み速度の違いはホスホリパーゼ A₂ の基質特異性によるものと推定された。

このホスホリパーゼ A₂ の活性はカルシウムイオンによって増加したが, 基質特異性には変化はなかった。これらの結果と前回(BBA688, 305-315(1982))の結果から, 硝酸イオンによる赤血球の脂肪酸代謝の活発化のメカニズムを推定した。

Abstract

Rat erythrocyte ethanolaminephosphoglyceride (EPG) consists of 60% alkenylacyl, 5% alkylacyl and 35% diacyl types. The fatty acid at the 2-position of these types is mainly composed of arachidonic acid. When intact rat erythrocytes were incubated with

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

* 本論文の内容の一部は Biochim. Biophys. Acta, 796, 304-311(1984)に発表したものである。

exogenous arachidonic acid, about 90% of the arachidonic acid incorporated into the EPG fraction was found in the 2-position of the diacyl type. The rates of incorporation of arachidonic acid into alkenylacyl-, alkylacyl- and diacyl EPG were 78, 134 and 1360 pmol/h per μ mol of the corresponding EPG, respectively. The substrate specificities of endogenous phospholipase A_2 and acyl-CoA: lysophospholipid acyltransferase were observed. Diacyl EPG was hydrolysed rapidly by endogenous phospholipase A_2 , while alkenylacyl and alkylacyl EPG were poor substrates for the enzyme. The selective transfer of arachidonic acid into the 2-position of 1-acyl-lysoEPG was observed. 1-alkenyl- and 1-alkyl-lysoEPG were also poor substrates for acyl-CoA: lysophospholipid acyltransferase. The acyltransferase activities with the lysoEPG analogues were higher than the phospholipase A_2 activities with EPG analogues. These results suggest that the different incorporation rates of arachidonic acid into alkenylacyl-, alkylacyl- and diacyl EPG are based on the substrate specificity of endogenous phospholipase A_2 .

The activity of phospholipase A_2 was increased by calcium ion, while the substrate specificity was unaffected. From these results and our previous results [BBA 688, 305-315 (1982)], the stimulation mechanism of fatty acid metabolism in rat erythrocyte by nitrate ion, was postulated.

1 はじめに

大気汚染物質である NO_2 は、吸入されると硝酸イオンまたは亜硝酸イオンになって血液及び尿中に現れる¹²⁾。我々は、 NO_2 暴露によって血液中の硝酸イオン濃度が増加すること³⁾、及び赤血球膜のリン脂質組成とその脂肪酸組成に変化が起こることを明らかにしてきた⁴⁾。また、ラット赤血球を硝酸イオンとインキュベートすると赤血球膜リン脂質へのアラキドン酸の組み込みが促進されることを見いだした⁵⁾。

赤血球膜リン脂質の脂肪酸代謝に関する研究⁶⁾のほとんどはエーテル型とジアシル型の区別をしないで行われたものであり、エーテル型とジアシル型リン脂質における脂肪酸代謝の違いについては不明な点が多い。また、エーテル型リン脂質の脂肪酸代謝に及ぼす硝酸イオンの影響についてもほとんど知られていない。これらの不明な点を明らかにするために、ラット赤血球アルケニル型、アルキル型及びジアシル型エタノールアミンホスホグリセライド (EPG) へのアラキドン酸 (20:4) の取り込みと取り込みに関連する酵素の基質特異性を明らかにし、エーテル型、EPG への脂肪酸取り込みに及ぼす硝酸イオンの影響を調べた。

2 方法

2.1 赤血球の調製

ラット頸動脈より得たヘパリン血を遠心して血清及び buffy coat を除き、SE-セルロースカラム処理して赤血球を得た。

2.2 赤血球の20:4の取り込み

赤血球を Nakao の medium にサスペンドし, $[^3\text{H}]20:4$ ($2.7 \mu\text{Ci}/3.6 \mu\text{mol}$)-BSA Complex を加えて 37°C , 1 時間インキュベートした。インキュベーション後, 赤血球を溶血させ, 膜画分を調製した⁵⁾。

2.3 脂質の抽出と分離

脂質は Bligh-Dyer 法⁷⁾で抽出した。中性脂質とリン脂質を TLC (ジエチルエーテル/酢酸, 100/1 v/v) で分離した後, クロロホルム/メタール/酢酸/水, 67/33/4/2, v/v) 及びクロロホルム/メタノール/アンモニア/水, 70/30/2.5/2.5, v/v) で展開して各リン脂質を分離した。

2.4 エーテル型及びジアシル型リン脂質の分離及び定量

各リン脂質をホスホリパーゼ C (*B. Cereus*) で処理し, 次いで ^3H または ^{14}C -無水酢酸を用いてアセチル化して 1-radyl-2-acyl-3- $[^3\text{H}]$ or $[^{14}\text{C}]$ acetyl/glycerol/誘導体を調製した。アルケニル型, アルキル型及びジアシル型の分離は Sugiura ら⁸⁾の方法に従って行った。成分組成は放射活性から求めた。定量は 1,2-ジオレインから誘導した 1,2-dioleoyl-3- $[^3\text{H}]$ or $[^{14}\text{C}]$ acetyl/glycerol (標準物質) を外部標準として用いて行った。脂肪酸は BF_3 -メタノールを用いて脂肪酸メチルエステルとし, GLC で分析した。

2.5 ホスホリパーゼ A₂ 及びアシルトランスフェラーゼ活性の測定

赤血膜から調製した inside-out vesicles (IOV) を酵素源として用いた。A₂ の活性は 1-palmitoyl-2-[1- ^{14}C]arachidonyl EPG 及び 1-radyl-2- $[^3\text{H}]$ arachidonyl/EPG 用いて測定した。アシルトランスフェラーゼ活性は IOV に $[^3\text{H}]20:4$ 及び 1-radyl Lyso EPG を加え, 室温でインキュベートして測定した。

2.6 放射活性の測定

放射活性はトルエンシンチレーターを用いて液体シンチレーションカウンターで測定した。

3 結果

ラット赤血球膜の主要リン脂質はコリン, セリン及びエタノールアミンホスホグリセライドである⁵⁾。これら主要リン脂質のアルケニル型, アルキル型及びジアシル型の組成 (表 1) を見ると, コリン及びセリンホスホグリセライドでは 90% 以上がジアシル型であるのに対して, EPG ではアルケニル型が約 60% 含まれ, ジアシル型は 35% と他のリン脂質の 1/3 であった。アルキル型はコリン, セリン及びエタノールアミンの各リン脂質共に約 5% 含まれていた。

EPG 3 成分の脂肪酸組成を見ると (表 2), 3 成分ともに 20:4 が 2 位で最も多く, アルケニル

表 1 ラット赤血球膜エタノールアミン, コリン及びセリンホスホグリセライドの成分組成

Table 1 Class composition of ethanolamin, choline and serine phosphoglycerides of rat erythrocyte membranes

Class compositions of phosphoglycerides were determined as described under Materials and Methods. The mean percentages \pm SD were taken from three different samples.

Class	Ethanolamine	Choline	Serine
	phosphoglycerides (mol %)	phosphoglycerides (mol %)	phosphoglycerides (mol %)
Alkenylacyl	59.7 \pm 1.0	4.2 \pm 0.8	2.1 \pm 0.4
Alkylacyl	5.5 \pm 0.8	4.1 \pm 0.5	4.4 \pm 1.3
Diacyl	34.8 \pm 0.6	91.7 \pm 0.7	93.5 \pm 0.9

表 2 エタノールアミンホスホグリセライドの脂肪酸組成

Table 2 Fatty acid composition of ethanolamine phosphoglycerides of rat erythrocyte membranes

Fatty acids were analysed as the methylesters. To determine the positional distribution of the fatty acids in diacyl compounds, snake venom phospholipase A₂ was used as described in Materials and Methods. The mean percentages (weight %) \pm SD were taken from different samples ($n = 6$). Fatty acids are designated by number of carbon atoms: number of double bonds.

Class Fatty acids position	Alkenylacyl	Alkylacyl	Diacyl	
	2	2	1	2
16:0	34.6 \pm 0.7	11.8 \pm 1.0	53.2 \pm 1.6	7.5 \pm 0.9
17:0	2.5 \pm 0.6	2.5 \pm 0.3	1.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
18:0	1.6 \pm 0.1	1.8 \pm 0.2	9.5 \pm 1.3	4.7 \pm 0.5
18:1	0.8 \pm 0.1	3.3 \pm 0.3	22.9 \pm 1.2	17.2 \pm 0.4
18:2	0.6 \pm 0.2	3.3 \pm 0.7	5.1 \pm 0.4	13.2 \pm 0.3
18:3	—	6.1 \pm 3.0	—	—
20:4	37.7 \pm 0.6	56.7 \pm 1.5	7.8 \pm 1.2	49.6 \pm 0.8
20:5	0.5 \pm 0.1	—	—	0.6 \pm 0.1
22:4	6.2 \pm 0.9	3.8 \pm 0.2	—	2.1 \pm 0.4
22:5	8.0 \pm 0.7	5.7 \pm 0.8	—	1.1 \pm 0.6
22:6	6.4 \pm 0.4	5.5 \pm 0.6	—	3.3 \pm 0.2

型37.7%, アルキル型56.7%及びジアシル型で49.6%であった。不飽和脂肪酸の割合はアルケニル型で60.2%, アルキル型で84.4%, ジアシル型の1位で35.8%, ジアシル型の2位で87.1%であり, アルケニル型で少なかった。

赤血球に20:4を取り込ませると, EPGに取り込まれた20:4の約90%はジアシル型に見いだされた(表3)。各成分への20:4の組み込み速度はアルケニル型89, アルキル型134, ジアシル型1360pmol/h per μ mol EPGであった。アルケニル型への組み込み速度を1.0とした場合, アルキル

表 3 EPGに取り込まれた³Hアラキドン酸の分布

Table 3 Distribution of [³H] arachidonic acid incorporated into EPG

Intact erythrocytes were incubated with [³H] arachidonic acid at 37°C for 1 h. Distribution and incorporation rates of [³H] arachidonic acid were determined as described under Materials and Methods. The mean percentages ± SD were taken from six different samples.

Class	[³ H] Arachidonic acid (mol %)	Incorporation rate (pmol/h per umol EPG)
Alkenylacyl	8.8±1.1	89 (1.0)
Alkylacyl	1.4±0.2	134 1.7
Diacyl	89.8±0.9	1360 17.4

型は1.7, ジアシル型は17.4倍であった。

赤血球にはリン脂質及び脂肪酸の de novo 合成系がないことから, 20:4の組み込み速度の違いはホスホリパーゼ, またはアシルトランスフェラーゼの基質特異性によるものと考えられる。そこで, 赤血球膜にホスホリパーゼ活性があるか否かを調べるために, 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]arachidonyl EPGを基質として各pHにおける¹⁴C-20:4の遊離を調べたところ, pH8.5で最大の遊離量を示した(図1)。また, 1 mMカルシウムの添加によって遊離量が増加した。¹⁴C-20:4の遊離量が赤血球膜蛋白質に比例していることから, 赤血球膜にはpH8.5のoptimum pHを持つホ

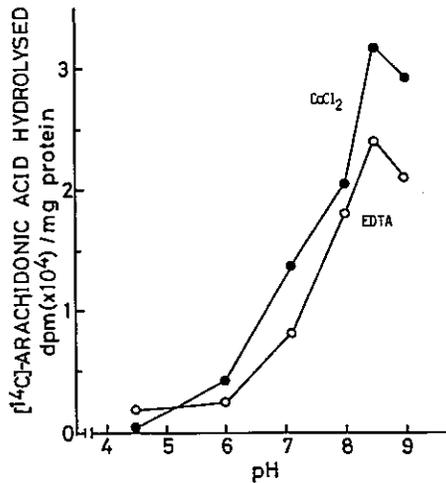


図 1 赤血球膜 IOV による 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]arachidonyl EPG 分解の pH 依存性

Fig. 1 pH optima for the hydrolysis of 1-palmitoyl-2-[1-¹⁴C]arachidonyl EPG by inside-out vesicles (IOV) of rat erythrocyte membranes

Activities were assayed with 1 mM CaCl₂ (○) or 1 mM EDTA (●) in 0.1M buffer. Reactions at pH 4.5-6 were in sodium acetate/acetic acid buffers and those at 7-9 were in Tris-HCl buffers. Incubation were for 2 h. Results are expressed as averages of triplicate determinations with standard deviations less than 10%.

スホリパーゼ A₂ が存在することを確認した。このホスホリパーゼ A₂ の基質特異性を調べるために、赤血球に [³H]20 : 4 を取り込ませて 1-radyl-2-[³H]arachidonyl EPG (³H の 98% は 2 位に取り込まれる。) を調製した。これを基質として IOV と 37°C 16 時間インキュベートし、未反応基質の各成分の ³H 量から反応量を求めた (表 4)。16 時間のインキュベーションで 60.2 nmol の基質のうち 3.5 nmol が分解された。もとの基質の組成に比較して、分解された基質の組成は著しく異なっていた。すなわち、もとの基質の組成がアルケニル型 59.9%、アルキル型 5.1% 及びジアシル型 35.0% であるのに対して、分解された基質の組成はアルケニル型 10.2%、アルキル型 0.9% 及びジアシル型 88.9% であった。アルケニル型の分解速度を 1.0 とした場合、アルキル型は 1.1、ジアシル型は 15.0 倍であった。分解された基質の組成は基質の濃度及び pH によって変動しなかった。

アシル-CoA : リゾホスホリピドアシルトランスフェラーゼの基質特異性を調べるために、IOV に [³H]20 : 4-CoA 及び 1-radyl-Lyso EPG (アルケニル型 60.1%、アルキル型 4.9%、ジアシル型 35.0%) を加えて室温で 40 分間インキュベートした。表 5 に示したように、エステル化された基質のほとんどはジアシル型であった。IOV に [³H]20 : 4-CoA を加えて 37°C、2 時間インキュベート (pH 7.4) すると、リン脂質画分に少量の ³H が検出されたが、リゾリン脂質は検出されなかった。このことはホスホリパーゼ A₂ の活性よりアシルトランスフェラーゼ活性が高いことを示すものと考えられる。

以上ラット赤血球のホスホリパーゼ A₂ 及びアシルトランスフェラーゼの基質特異性を調べてきたが、硝酸イオンによってこれら酵素の基質特異性が影響を受けるか否かを調べるために、1 mM 硝酸ナトリウムと [³H]20 : 4 を含むインキュベーションメジウム中で赤血球をインキュベートし、

表 4 ラット赤血球のホスホリパーゼ A₂ による 1-radyl-2-[³H]arachidonyl EPG の加水分解

Table 4 Hydrolysis of 1-radyl-2-[³H]arachidonyl EPG by phospholipase A₂ in raterythrocytemembranes

Inside-out vesicles (2.0mg of protein) were incubated at pH8.0 with 1-radyl-2-[³H]arachidonyl EPG (60.187nmol) at 37°C for 16h. Class composition of hydrolysed substrate was determined as described in Materials and Methods. Values are averages of three replicate experiments. Total amount of hydrolysed substrate is expressed as mean ± SD. /16 h per 2.0 mg protein of three replicate experiments. Class composition is given as mol%, values for radioactivity are dpm (×10⁻³) and total are nmol and dpm (×10⁻³), respectively.

Class	Original substrate		Hydrolysed substrate				(C) / (A) - (B)
	Class	radioactivity	Control		Phospholipase A ₂		
	Composition	(A)	Class	radioactivity	Class	radioactivity	
			composition	(B)	composition	(C)	
Alkenylacyl	59.9	33.54	18.5	0.04	10.2	0.33	0.99 · 10 ⁻² (1.0)
Alkylacyl	5.1	5.56	4.7	0.02	0.9	0.06	1.08 · 10 ⁻² (1.1)
Diacyl	35.0	384.06	76.8	3.27	88.9	56.59	14.86 · 10 ⁻² (15.0)
Total	60.187	423.16	0.233 ± 0.024	3.33	3.487 ± 0.191	56.98	—

表 5 ラット赤血球 acyl-CoA: Lysophospholipid acyltransferase によってエステル化された基質の成分組成

Table 5 Class composition of esterified substrate by acyl-Co A: lysophospholipid acyltransferase of rat erythrocyte membranes

IOV (1.0mg) were incubated with 1-radly lyso EPG (712.8nmol), [³H] arachidonyl-Co A (432nmol), and 0.5ml of 0.1 M Tris buffer (pH7.4) at room temperature for 40 min. Class composition of esterified substrate was determined as described under Materials and Methods. Values are mol percentages and are averages of three replicate experiments. Total amount of esterified substrate is expressed as mean ± SD/40 min per mg protein of three replicate experiments.

Class	(A)	(B)	(B)/(A)	
	Original substrate (mol %)	Esterified substrate (mol %)		
Alkenylacyl	60.1	1.1	0.018	(1.0)
Alkylacyl	4.9	0.1	0.020	1.1
Diacyl	35.0	98.8	2.823	156.8
Total amount	712.8nmol	192.2±11.2nmol		

20:4の取り込みに及ぼす硝酸イオンの影響を調べた。図2に示したように、アルケニル型、アルキル型及びジアシル型への20:4の取り込みは硝酸イオン(1 mM)によっていずれも1.45倍に増加した。このことは、硝酸イオンによってホスホリパーゼA₂及びアシルトランスフェラーゼの基質特異性が変化しなかったことを示すものと考えられる。また、EPGの3成分に取り込まれた³Hの割合がコントロールと同じであったことも硝酸イオンによって上記酵素の基質特異性が変化しなかったことを裏付けている。

4 考 察

ラット赤血球 EPG アナログへの20:4の取り込みの違いの理由を明らかにするために、赤血球膜ホスホリパーゼA₂の確認及び基質特異性を調べ、赤血球膜にはホスホリパーゼA₂が存在し、ジアシル型 EPG を選択的に分解することを示した。このことは、このA₂がグリセロリン脂質の1位のエーテル結合とエステル結合とを識別していることを示すものであり、エーテル型リン脂質の脂肪酸代謝の面から重要な意味を持つものと思われる。エーテル型 EPG が脂肪酸の取り込みにあまり関与していないという結果は赤血球におけるエーテル型リン脂質とジアシル型リン脂質の役割(機能)の違いを示唆しているものと考えられる。

また、赤血球膜中のエーテル型リン脂質及びジアシル型リン脂質の20:4代謝が硝酸イオンによって活発になることを示した。この活発化の原因の一つとして、硝酸イオンによるホスホリパーゼA₂の活性の増加が考えられた。これらの結果は硝酸イオンのカオトロピック効果によって膜構造が変化するという前報¹²⁾の結果を支持するものである。前報での結果と本研究で得られた赤血球膜ホスホリパーゼA₂の基質特異性とカルシウムイオン依存性の結果から、硝酸イオンによる赤

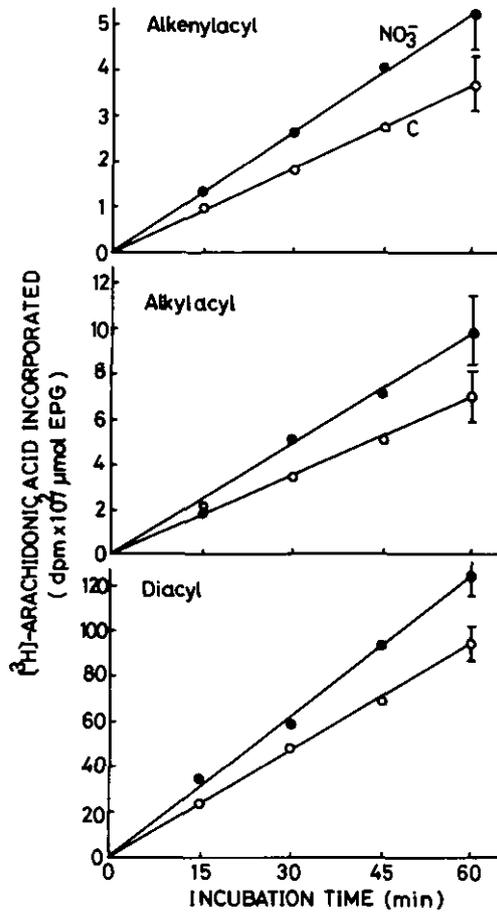


図 2 ラット赤血球膜アルケニル型, アルキル型及びジアシル型 EPG への [1-¹⁴C]20:4 の取り込みに及ぼす硝酸ナトリウムの影響

Fig. 2 Effect of nitrate on incorporation of [1-¹⁴C] arachidonic acid (20:4) into alkenylacyl-, alkylacyl- and diacyl EPG of erythrocyte membranes

Erythrocytes were incubated with 1.0mM sodium nitrate in an incubation medium supplemented with 4 mM CaCl₂ and [1-¹⁴C] 20:4 (3.6μM/2.7uCi) complexed to bovine serum albumin. NO₃⁻, + nitrate; C, - nitrate. Each point is mean of three samples and error bars represent ± S. D.

血球の脂肪酸代謝の活発化は硝酸イオンのカオトロピック効果による膜構造の変化と、それに伴う細胞外カルシウムイオンの細胞内流入、さらに流入したカルシウムイオンによるホスホリパーゼ A₂ の活性増加が起こったためであると考えられた。

引用文献

- 1) Shvorcova, S. and V. Kant (1971): The artero-venous differences in the nitrite and nitrate ion concentrations after nitrogen oxides inhalation. *Cesk. Hyg.*, **17**, 71.
- 2) Goldstein, E., N. F. Peek, N. J. Oarks, H. H. Hines, G. P. Steffer and B. Tarkington (1977): Fate and distribution of inhaled nitrogen dioxide in Rhesus monkeys. *Amr. Rev. Resp. Dis.*, **115**, 403-411.
- 3) Oda, H., H. Tsubone, A. Suzuki, T. Ichinose and K. Kubota (1981): Alteration of nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **25**, 294-301.
- 4) Kaya, K. and T. Miura (1982): Effects of nitrogen dioxide on fatty acid compositions of red cell membranes, sera and livers in rats. *Environ. Res.*, **27**, 24-35.
- 5) Kaya, K. and T. Miura (1982): Selective changes in fatty acid composition of phosphatidylserine in rat erythrocyte membrane induced by nitrate. *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 305-315.
- 6) Shohet, S. B. (1977): *In: Lipid Metabolism in Mammals*. Snyder, F. (ed.), Vol. 1. Plenum Press. New York. 191-208.
- 7) Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- 8) Sugiura, T., M. Nakajima, N. Sekiguchi, Y. Nakagawa and K. Waku (1983): Different fatty acid composition of alkenylacyl, alkylacyl and diacylphospholipids in rabbit alveolar macrophages: high amounts of arachidonic acid in ether phospholipids. *Lipids*, **18**, 125-129.

II-7 二酸化窒素による肺胞マクロファージの活性化と 細胞数の増加*

Activation and Increment of Alveolar Macrophages Induced by Nitrogen Dioxide*

持立克身¹・高橋勇二¹・大住拓美²・三浦 卓¹

Katsumi MOCHITATE¹, Yuji TAKAHASHI¹,

Takumi OHSUMI² and Takashi MIURA¹

要 旨

NO₂による肺胞マクロファージへの影響を検索するため、ラットに4 ppm NO₂を10日間暴露し、肺洗浄により調製した肺胞マクロファージの抗酸化系及びエネルギー代謝系の酵素活性及び細胞数の変化について調べた。暴露4日目には、肺胞マクロファージの代謝が著しく昂進した。抗酸化系酵素のグルコース-6-リン酸脱水素酵素及びグルタチオンパーオキシダーゼ活性はそれぞれ対照群の1.29倍及び1.17倍に有意に増加した。また、ミトコンドリアの呼吸系酵素であるコハク酸-チトクロームc還元酵素及び解糖系のピルビン酸キナーゼ活性は、それぞれ対照群の1.17倍及び1.20倍に有意に増加した。これらの酵素活性の増加と平行して、暴露4日目には³H-ロイシン及び¹⁴C-チミジンの取り込みもそれぞれ対照群の1.77倍及び1.84倍に有意に増加し、蛋白質及びDNAの生合成が著しく促進していることが示唆された。暴露10日目までには、測定した酵素活性及びRIの取り込みは対照群のレベルに戻った。

暴露群の肺胞マクロファージの細胞数は、暴露4日目までは対照群との間に有意の差は認められなかったが、暴露7日目には対照群の1.24倍に有意に増加し、10日目も有意に高い値を維持した。肺胞マクロファージは、そのほとんどが直径11~17 μmの細胞であるが、4 ppm NO₂暴露7日目で増加した細胞は、その大きさが9~13 μmで小形の細胞であった。これらの結果から、4 ppm NO₂暴露によって肺胞マクロファージの代謝が上昇し、

-
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
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. 昭和57年度 国立公害研究所共同研究員(日本女子大学家政学部 〒113 東京都文京区目白台2-8-1)
Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present address: Faculty of Home Economics, Japan Woman's University, Mejirodai, Tokyo 113, Japan.
- * 本論文の内容の一部はJ. Toxicol. Environ. Health, 17, 229-239(1986)¹²⁾に発表したものである。

その後、少なくともその一部は細胞分裂によって細胞数が増加したことが明らかになった。

なお、0.4、1.2及び4.0 ppm NO₂ 3か月間の亜急性暴露によっても、肺胞マクロファージの細胞数はそれぞれ対照群の1.18倍、1.27倍及び1.30倍とNO₂濃度に依存して増加した。このことは、4 ppmより低濃度のNO₂暴露でも前述と同様の機作によって肺胞マクロファージが増加したことを示唆すると考えられる。

Abstract

Male Wistar rats were exposed to 4 ppm nitrogen dioxide (NO₂) for 10 days and at intervals alveolar macrophages were collected by pulmonary lavage. A metabolic enhancement of alveolar macrophages was observed on the fourth day of exposure. The specific activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione peroxidase of the peroxidative metabolic pathway increased to 1.29- ($p < 0.001$) and 1.17- ($p < 0.05$) fold those of the control values, respectively. The specific activities of succinate-cytochrome *c* reductase of the mitochondrial respiratory system and pyruvate kinase of the glycolytic pathway also increased to 1.17- ($p < 0.01$) and 1.20- ($p < 0.01$) fold those of the control values, respectively. In addition, the incorporation of ³H-leucine and ¹⁴C-thymidine into alveolar macrophages were elevated to 1.77- ($p < 0.001$) and 1.84- ($p < 0.01$) fold those of the control values, respectively. The activities of all enzymes tested decreased to control levels by the tenth day.

The number of alveolar macrophages collected from exposed animals increased to 1.24-fold ($p < 0.01$) that of the control value on the seventh day and was maintained at a significantly higher level until the tenth day. Alveolar macrophages were heterogeneous in size (7-21 μ m in diameter) and most of them were distributed between 11-17 μ m in diameter. Exposures to 4 ppm NO₂ increased significantly the cells of 9-13 μ m in diameter on the seventh day. A significant increase in the cell number also was observed at 1.2 and 4.0 ppm NO₂ after 3 months of exposure.

These results show that exposures to 4 ppm NO₂ cause a metabolic enhancement and subsequent increase in alveolar macrophages.

1 はじめに

代表的な大気汚染物質の一つである二酸化窒素(NO₂)は、肺の最深部に位置し、ガス交換の場になっている肺胞に傷害を与えることが知られている^{1,2)}。肺胞マクロファージは肺胞に存在し、呼吸の際肺胞内に侵入した微生物を貪食し殺菌することにより微生物が肺胞内で増殖することを防いでおり、生体防御の上から重要な役割を担っている。これまで、15 ppm以上のNO₂暴露によって肺胞マクロファージの貪食能及び殺菌能は傷害を受け³⁻⁵⁾、そしてまた抗ウイルス物質であるインターフェロンを産生する能力も低下する^{4,6)}ことが報告されている。しかしながら、より低濃度のNO₂暴露による肺胞マクロファージへの影響についてはほとんど研究されていない。

筆者ら^{7,8)}はこれまで2~10 ppm NO₂暴露によって肺の呼吸系及び解糖系の酵素活性が暴露濃度に比例して増加することを明らかにし、肺におけるエネルギー代謝がNO₂暴露で昂進することを示唆した。また、肺におけるこれらの酵素活性の増加は、終末細気管支上皮の過増殖やII型肺胞上

皮細胞の増殖及び肺胞マクロファージの増加^{1,2,9-11)}の時期とほぼ一致している。したがって、酵素活性の増加は傷害を受けた肺の各細胞がNO₂に対して適応するため、増殖もしくは新しい細胞と交換する過程を反映しているとも考えられる。本研究では、4 ppm NO₂ 10日間の暴露期間中に、肺胞マクロファージのエネルギー代謝及び抗酸化系の酵素活性が肺全体のこれらの酵素活性と平行して上昇し、その後炎症性細胞である多形核白血球やリンパ球の増加を伴わずにマクロファージの細胞数が増加することを明らかにした¹²⁾。

2 方法

2.1 暴露方法及び試料の調製

6匹を一群としたJcl: Wistar 系雄ラット(19~23週令)に4.0 ppm NO₂を10日間連続暴露した。暴露期間中経時的にチャンバーよりラットを取り出し、頸動脈より放血した後0.95%食塩水で肺を灌流した。次にこの肺を取り出し、35 mlの128 mM NaCl-5 mM KCl-2.5 mM リン酸緩衝液-5 mM グルコース-17 mM Hepes 緩衝液(pH7.4)(等張 Hepes 溶液)で肺を洗浄し、肺胞内の遊離細胞を洗い出した。回収した肺洗浄液中の遊離細胞は等張 Hepes 溶液で洗った後、肺胞マクロファージ標品として以下の実験に用いた。

細胞数は血球計算板もしくはコールターカウンター(7 μ以上の大きさの細胞を計測するように調製)で計測した。細胞の生存率はトリパンブルー排除試験により測定したところ、すべての標品の生存率は95%以上で、暴露群と対照群の間に差は認められなかった。

肺洗浄により溶出した遊離細胞の組成は、その塗抹標本をギムザ染色した結果、約97%が肺胞マクロファージ、多形核白血球及びリンパ球はそれぞれ約1%、残り約2%は変性した細胞であった。

2.2 酵素活性の測定

肺胞マクロファージ標品の一部を0.25 M 蔗糖-10 mM Tris-HCl 緩衝液-0.5 mM EDTA (pH7.4)溶液に懸濁し Potter-Elvehjem テフロンホモジェナイザーでホモジェナイズした。そのホモジェネートを用いてコハク酸-チトクロムc還元酵素活性を測定し、ホモジェネートを105,000×g 60分間遠心した上清を用いて他の酵素活性を測定した。

コハク酸-チトクロムc還元酵素及びグルタチオン パーオキシダーゼ(GPx)活性は、それぞれ Sottocasa ら¹³⁾及び Chiu ら¹⁴⁾の方法を用い37°Cで測定した。グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)活性は Löhr ら¹⁵⁾の方法に従い30°Cで測定した。ピルビン酸キナーゼ(PK)活性は Gutman ら¹⁶⁾の方法を一部変更し、100 mM Tris-HCl(pH7.4)-2 mM ホスホエノールピルビン酸-4 mM ADP-0.2 mM フルクトース-1,6-ビスリン酸-0.13 mM NADH-100 mM KCl-10 mM MgCl₂-30 units/ml 乳酸脱水素酵素の測定液を用いて30°Cで測定した⁷⁾。

2.3 ^3H -ロイシン及び ^{14}C -チミジンの取り込みの測定

2×10^6 個の肺胞マクロファージを ^3H -ロイシン ($1 \mu\text{Ci/ml}$), ^{14}C -チミジン (50nCi/ml) 及び10% 牛胎児血清を含む Eagle の MEM 培地 4 ml に懸濁し, 37°C 3.5時間 5% CO_2 下で培養した。培養後ディッシュに付着したマクロファージをラバーポリスマンで剥ぎ取り, Dulbecco の PBS 溶液で洗った後, シンチレーターに懸濁して取り込んだ ^3H 及び ^{14}C 量を測定した。Schmidt-Thannhauser-Schneider 法¹⁸⁾を用いて調べた結果, 肺胞マクロファージに取り込まれた ^{14}C 量の約80%は DNA 画分に存在した。

3 結果

3.1 肺胞マクロファージの酵素活性の変化

表1に4 ppm NO_2 10日間暴露による肺胞マクロファージの G6PDH, GPx 及び PK 活性の経時変化を示した。抗酸化系酵素である G6PDH 及び GPx 活性は, 暴露4日目にそれぞれ対照群の1.29倍 ($p < 0.001$) 及び1.17倍 ($p < 0.05$) に増加した。ミトコンドリアの呼吸系の律速段階を触媒する酵素であるコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性は同じく暴露4日目に対照群 ($25.9 \pm 1.5 \mu\text{mol cytochrome } c \text{ reduced/min/g protein}$) の1.17倍 ($p < 0.01$) に増加した。これと平行して解糖系の律速段階を触媒する PK 活性も対照群の1.20倍 ($p < 0.01$) に増加した。その後これらの酵素活性は, G6PDH 除き暴露7日目には対照群の値に戻った。G6PDH 活性は7日目も対照群より有意に高い値を示したが, 10日目には対照群の値に戻った。

表 1 4 ppm NO_2 10日間暴露による肺胞マクロファージのグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH), グルタチオンパーオキシダーゼ (GPx) 及びピルビン酸キナーゼ (PK) 活性の変化

Table 1 Changes in the specific activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione peroxidase (GPx) and pyruvate kinase (PK) of alveolar macrophages during 10-days exposure to 4 ppm NO_2

Exposure Time	Protein ^a	E/C	G6PDH ^b	E/C	GPx ^b	E/C	PK ^b	E/C
1 Day	Cont		186 ± 5		364 ± 34		1950 ± 110	
	Expo	0.97	195 ± 11	1.05	385 ± 38	1.06	$1780 \pm 80^*$	0.91
4 Days	Cont		199 ± 12		371 ± 28		1950 ± 140	
	Expo	1.00	$257 \pm 9^{***}$	1.29	$436 \pm 46^*$	1.17	$2330 \pm 180^{**}$	1.20
7 Days	Cont		192 ± 17		385 ± 14		2020 ± 110	
	Expo	1.10	$228 \pm 9^{**}$	1.19	401 ± 29	1.04	2240 ± 200	1.10
10 Days	Cont		187 ± 24		361 ± 61		1870 ± 70	
	Expo	1.13	210 ± 6	1.12	393 ± 24	1.09	2010 ± 310	1.07

Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$).

^amg of supernatant protein/lung.

^b $\mu\text{mole/min/g}$ of supernatant protein.

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

3.2 ^3H -ロイシン及び ^{14}C -チミジンの取り込み量の変化

4 ppm NO_2 暴露による蛋白質及び DNA の生合成への影響を調べるため、 ^3H -ロイシン及び ^{14}C -チミジンを含む培地で肺胞マクロファージを3.5時間培養した。細胞内に取り込まれた ^{14}C 量の約80%はDNA画分に存在した。表2に4 ppm NO_2 10日間暴露によるロイシン及びチミジンの取込量の経時変化を示した。肺胞マクロファージに取り込まれた ^3H 及び ^{14}C 量は、暴露4日目にはそれぞれ対照群の1.77倍($p < 0.001$)及び1.84倍($p < 0.01$)倍に上昇した。その後 ^3H 及び ^{14}C の取込量は10日目までには対照群の値に戻った。

表 2 4 ppm NO_2 10日間暴露による肺胞マクロファージの ^3H -ロイシン及び ^{14}C -チミジン取に込み量の変化

Table 2 Changes in the incorporation of ^3H -leucine and ^{14}C -thymidine into alveolar macrophages during 10-days exposure to 4 ppm NO_2

Exposure Time	Incorporation (dpm/ 2×10^6 cells)				
		^3H -Leucine	E/C	^{14}C -Thymidine	E/C
1 Day	Cont	24200 \pm 5000		2720 \pm 710	
	Expo	22900 \pm 2700	0.95	3210 \pm 900	1.18
4 Days	Cont	23700 \pm 3200		2700 \pm 700	
	Expo	41900 \pm 2500 ***	1.77	4960 \pm 1180 **	1.84
7 Days	Cont	22000 \pm 7400		2610 \pm 600	
	Expo	31400 \pm 8100	1.43	2890 \pm 450	1.11
10 Days	Cont	18400 \pm 4400		2060 \pm 470	
	Expo	19400 \pm 5000	1.05	2180 \pm 510	1.06

Alveolar macrophages (2×10^6 cells) were suspended in 4 ml of Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% fetal calf serum. ^3H -leucine (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) and ^{14}C -thymidine (50 nCi/ml) and incubated at 37°C for 3.5h.

Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$).

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3 肺胞マクロファージの細胞数の変化

表3に4 ppm NO_2 10日間暴露による肺胞マクロファージの細胞数の経時変化を示した。暴露4日目までは、対照群と暴露群の間に肺胞マクロファージの細胞数に関して、有意の差は認められなかった。しかし暴露7日目には、暴露群の細胞数は対照群の1.24倍($p < 0.01$)に増加し、10日目も有意に高い値を維持した。肺胞内の他の遊離細胞に増減があるかどうかを調べるため、肺洗浄によって得られた遊離細胞の塗抹標本を作成しギムザ染色を行った。その結果、対照群及び暴露群共に約97%は肺胞マクロファージであり、他の多形核白血球及びリンパ球の割合は2%以下で全暴露期間中有意の変化は認められなかった。

肺胞マクロファージの大きさは不均一で、個々の細胞の直径は7-21 μm の間に分布しているが、対照群では約76%の細胞が直径11-17 μm の大きさである。4 ppm NO_2 暴露4日目までは対照群

と暴露群の間に細胞の大きさに違いは認められなかった。しかし暴露7日目には、暴露群で小形の肺胞マクロファージが著しく増加した。すなわち、直径9~11及び11~13 μm の細胞数がそれぞれ対照群の2.16倍 ($p < 0.01$) 及び1.51倍 ($p < 0.05$) に増加した(図1)。暴露群における小形の細胞の増加は10日目も認められた。

表 3 4 ppm NO₂ 10日間暴露による肺胞マクロファージの細胞数の変化
 Table 3 Changes in the number of alveolar macrophages during 10-days exposure to 4 ppm NO₂

Exposure Time	Number of Cells ($\times 10^6$ /rat)		
	Control	Exposed	E/C
1 Day	10.6 \pm 2.2	9.8 \pm 1.4	0.92
4 Days	10.9 \pm 1.5	10.5 \pm 1.7	0.96
7 Days	10.2 \pm 1.3	12.6 \pm 0.6**	1.24
10 Days	10.6 \pm 1.1	13.1 \pm 1.8*	1.23

Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

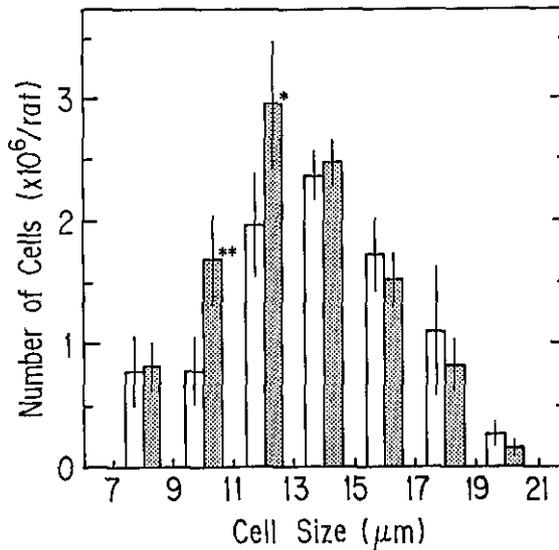


図 1 4 ppm NO₂ 7日間暴露による肺胞マクロファージの細胞の大きさの変化
 Fig. 1 Changes in the size distribution of alveolar macrophages on the seventh day of exposure to 4 ppm NO₂

The cell number of alveolar macrophages in various size was counted with Coulter Counter adjusted to count cells larger than 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, and 21 μm in diameters and was estimated by calculating the difference between the values of nearest neighbours. Abscissa indicates the cell size, that is, 7-9, 9-11, 11-13, 13-15, 15-17, 17-19, and 19-21 μm in diameters. Shaded column and open one show cells from exposed and control animals, respectively. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 6$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4 ppmより低濃度のNO₂による肺胞マクロファージの細胞数への影響を検索する目的で、0.4、1.2及び4.0 ppm NO₂を3か月間ラットに暴露した。表4に示したように、肺胞マクロファージの細胞数はNO₂濃度に依存してそれぞれ対照群の1.18倍、1.27倍(p<0.05)及び1.30倍(p<0.05)に増加することが明らかになった。

表 4 NO₂ 3か月間暴露による肺胞マクロファージの細胞数の変化
Table 4 Effect of 3-months exposure to NO₂ on the number of alveolar macrophages

Concentration of NO ₂	Number of cells	
	($\times 10^6$ /rat)	E/C
Control	12.0 \pm 2.3	(1.00)
0.4 ppm	14.2 \pm 3.0	1.18
1.2 ppm	15.2 \pm 2.1*	1.27
4.0 ppm	15.6 \pm 2.1*	1.30

Values are expressed as mean \pm SD (n=6).

*p<0.05.

4 考 察

本研究の結果、4 ppm NO₂暴露によって肺胞マクロファージの代謝は暴露4日目に昂進し、その後10日目には対照群の値に戻る事が明らかになった。グルタチオンパーオキシダーゼは還元型グルタチオンを消費して過酸化物を還元する酵素であり、グルコース-6-リン酸脱水酵素はグルコース-6-リン酸を酸化する際NADPを還元し、酸化型グルタチオンを還元型に戻すのに必要なNADPHを供給する。両酵素活性が増加したことから、4 ppm NO₂暴露によって肺胞マクロファージの過酸化物を代謝する能力は昂進していると考えられる。筆者ら⁸⁾はこれまで、4~10 ppm NO₂暴露によって肺全体の過酸化物代謝系酵素の活性が上昇することを報告した。今回肺胞マクロファージにおいて認められた過酸化物代謝系酵素の活性増加は、肺全体での活性増加とよく一致している。

同様にしてピルビン酸キナーゼ及びコハク酸-チトクロームc還元酵素活性も暴露4日目に増加した。肺胞マクロファージにおいては、エネルギーは主として解糖系から、一部はミトコンドリアの呼吸系から供給されている¹⁹⁾。ピルビン酸キナーゼ²⁰⁾及びコハク酸-チトクロームc還元酵素はそれぞれ解糖系及び呼吸系の律速段階を触媒する酵素であることから、4 ppm NO₂暴露によって肺胞マクロファージのエネルギー産生能は上昇したと結論できる。これは細胞が増殖する際にはエネルギー供給量が増加する必要があるためと考えられる。

ピルビン酸キナーゼやコハク酸-チトクロームc還元酵素の活性増加と平行して、暴露4日目に

は³H-ロイシン及び¹⁴C-チミジンの取込量も対照群の約1.8倍に上昇した。¹⁴C-チミジンはほとんどがDNAに取り込まれた。肺胞マクロファージは、血流中の単球が肺胞内へ流入することだけではなく、肺胞内へ流入して間もない単球が細胞分裂することによっても補給されている²¹⁾。したがって、エネルギー産生系の酵素活性とチミジン及びロイシン取り込み量が一過性に上昇したのは、4 ppm NO₂ 暴露に対して肺胞マクロファージが増殖性の応答を示したためとも考えられる。Evans ら^{9, 10, 22)}はオートラジオグラフィの技術を用い、17 ppm NO₂ 暴露に対して肺胞マクロファージのチミジン取り込み、すなわち増殖性の応答は暴露4日目に最大になると報告している。本研究では、暴露4日目に一連の代謝の昂進が起きた後、7日目に細胞数の増加を認めた。しかも増加したのは小形の細胞であった。これらの知見を総合すると、DNA及び蛋白合成の促進、そしてエネルギー産生系の昂進は肺胞マクロファージが細胞分裂するために起こった一過性の応答であると考えられる。

4 ppm NO₂ 7日暴露、及び1.2 ppm NO₂ 3か月間暴露によって肺胞マクロファージの細胞数は増加した。これまで肺胞におけるマクロファージ及び多形核白血球の増加は炎症反応の特徴と考えられてきた。例えば、60 ppm NO₂ 3時間暴露³⁾、30 ppm NO₂ 2~30日間暴露²³⁾、及び12~22 ppm NO₂ 2日間暴露²⁴⁾によって、ウサギ及びハムスターの肺内には多形核白血球やマクロファージの著しい増加が認められたことから、NO₂は肺に炎症反応を引き起こすと考えられたきた。しかしながら本研究では、4 ppm NO₂ 暴露によって多形核白血球が全く増加しなかったことから、肺に炎症反応が起きたためマクロファージが増加したと結論するのは困難である。肺胞マクロファージの機能の一つは、肺胞内の起炎物質及び壊死した組織を取り除くことであると考えられている²¹⁾。これまでの研究によれば、15~17 ppm NO₂ 暴露によって肺の上皮組織は傷害を受け、2~3日後には上皮細胞の再生が起こるとされている。また2 ppm NO₂によっても上皮細胞の再生もしくは肥大が起こることが知られている^{1, 10)}。したがって、本研究の結果は、4 ppm NO₂ 暴露で壊死した肺胞上皮細胞が直接肺胞マクロファージの増加を誘引したものと考えられる。今回、0.4 ppm NO₂ 3か月間の暴露によって肺胞マクロファージの細胞数は増加する傾向を示し、1.2 ppmの濃度では有意に増加した。このことは0.4~1.2 ppm NO₂ 亜急性暴露によっても肺胞の上皮組織は傷害を受け、それが肺胞マクロファージの増加を引き起こしていると予想される。

引用文献

- 1) Stephens, R. J., G. Freeman and M. J. Evans (1972): Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **24**, 160-179.
- 2) Parkinson, D. R. and R. J. Stephens (1973): Morphological surface changes in the terminal bronchiolar region of NO₂-exposed rat lung. *Environ. Res.*, **6**, 37-51.
- 3) Gardner, D. E., R. S. Holzman and D. L. Coffin (1969): Effects of nitrogen dioxide on pulmonary cell population. *J. Bacteriol.*, **98**, 1041-1043.

- 4) Acton, J. D. and Q. N. Myrvik (1972): Nitrogen dioxide effects on alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **24**, 48-52.
- 5) Vassalo, 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.
- 6) Valand, S. B., J. D. Acton and Q. N. Myrvik (1970): Nitrogen dioxide inhibition of viral-induced resistance in alveolar macrophages. *Arch. Environ. Health*, **20**, 303-309.
- 7) Mochitate, K., K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, **33**, 17-28.
- 8) Mochitate, K., T. Miura and K. Kubota (1985): An increase in the activities of glycolytic enzymes in rat lungs produced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 323-331.
- 9) Evans, M. J., R. J. Stephens, L. J. Cabral and G. Freeman (1972): Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of NO₂. *Arch. Environ. Health*, **24**, 180-188.
- 10) Evans, M. J., L. J. Cabral, R. J. Stephens and G. Freeman (1973): Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. *Am. J. Pathol.*, **70**, 175-198.
- 11) 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**, 297-299.
- 12) Mochitate, K., Y. Takahashi, T. Ohsumi and T. Miura (1986): Activation and increment of alveolar macrophages induced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **17**, 229-239.
- 13) Sottocasa, G. L., B. Kuylenstierna, L. Ernster and J. Bergstrans, (1967): An electron-transport pathway associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell Biol.*, **32**, 415-423.
- 14) Chiu, D. T. Y., F. H. Stults and A. L. Tappel (1976): Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 558-566.
- 15) Lohr, G. W. and H. D. Waller (1974): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *In: Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. Bergmeyer (ed.), Academic Press, New York, U. S. A., 636-643.
- 16) Gutman, I. and E. Bernt (1974): Pyruvate kinase: Assay in serum and erythrocytes. *In: Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. Bergmeyer (ed.), Academic Press, New York, U. S. A., 774-783.
- 17) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 18) Schneider, W. C. (1946): Phosphorus compounds in animal tissues. III. Comparison of methods for the estimation of nucleic acids. *J. Biol. Chem.*, **164**, 747-751.
- 19) Karnovsky, M. L., S. Simmons, E. A. Glass, A. W. Shafer and P. D'A. Hart (1970): Metabolism of macrophages. *In: Mononuclear phagocytes*, R. van Furth (ed.), Martinus Nijhoff Publishers, Hague, Netherlands, 103-120.
- 20) Minakami, S. and H. Yoshikawa (1966): Studies on erythrocyte glycolysis II. Free energy changes and rate limiting steps in erythrocyte glycolysis. *J. Biochem.*, **59**, 139-145.
- 21) van Furth, R. and A. B. van oud Alblas (1983): Origin of pulmonary macrophages in mice under normal conditions and during an inflammatory reaction by heat-killed BCG. *In: The Cells of the Alveolar Unit*, G. Favez, A. Junod and P. Leuenberger (eds.), Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland, 170-179.
- 22) Evans, M. J., L. J. Cabral-Anderson and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats. II. Cell proliferation. *Exp. Mol. Pathol.*, **27**, 366-376.
- 23) Kleinerman, J. and J. Sorensen (1982): Nitrogen dioxide exposure and alveolar macrophage elastase in

持立克身ら

hamsters. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **125**, 203—207.

- 24) DeNicola, D. B., A. H. Rebar and R. F. Henderson (1981): Early damage indicators in the lung. V. Biochemical and cytological response to NO_2 inhalation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **60**, 301—312.

II-8 ラット臓器ミクロソームの異物代謝系に及ぼす オゾン間欠暴露の影響*

Effects of Intermittent Exposures to Ozone on the Microsomal-Xenobiotic Metabolizing Systems of Rat Tissues*

高橋勇二¹・三浦 卓¹・持立克身¹

河田明治¹・国本 学¹

Yuji TAKAHASHI¹, Takashi MIURA¹, Katsumi MOCHITATE¹,

Meiji KAWATA¹ and Manabu KUNIMOTO¹

要 旨

オゾン(O₃)間欠暴露が肺及び肝臓の異物代謝系に及ぼす影響を調べる目的で、Jcl: Wistar 系雄ラットに0.4ppm, または、0.8ppm O₃を1日7時間、14日間暴露し、ミクロソーム画分の電子伝達系成分及び異物代謝活性を測定した。0.4ppm O₃暴露によっては、肺と肝ミクロソームの異物代謝活性に変化は認められなかった。しかし、0.8ppm O₃暴露により肺ミクロソームのNADPH-チトクロームP-450還元酵素活性と、チトクロームP-450含量は有意に増加した。肺のベンゾピレン水酸化活性と7-エトキシマリン脱エチル化活性も同様に、暴露7日目に有意な増加を示し、14日目まで活性の増加が続いた。

一方、肝臓では、0.8ppm O₃暴露1日目に、ミクロソーム画分の蛋白質量及びすべての電子伝達系成分の減少が認められた。ベンゾピレン水酸化活性、7-エトキシマリン脱エチル化活性、そして、アニリン水酸化活性も暴露1日目に減少した。暴露1日目に認められたこれら活性の減少は、暴露4から7日目には対照群の値まで回復した。p-ニトロアニソール脱メチル化活性は、他の異物代謝活性とは挙動が異なり、暴露期間を通じて変化しなかった。これらの結果は、肝臓のチトクロームP-450イソ酵素には、O₃暴露に対して感受性の高い酵素分子種と、低い酵素分子種があることを示唆している。

Abstract

Male Jcl: Wistar rats were exposed to 0.4 and 0.8ppm O₃ daily for 7 hours for 14 day to examine the effect of O₃ on xenobiotic metabolism of lung and liver microsomes. An

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

* 本研究の原著は、J. Toxicol. Environ. Health, 15, 855-864(1985)に発表したものである。

exposure to 0.4ppm O₃ did not affect the microsomal xenobiotic metabolism of either lung or liver. On the other hand, 0.8ppm O₃ increased significantly the NADPH-cytochrome P-450 reductase activity and the cytochrome P-450 content of lung microsomes. The activities of lung benzo(a)pyrene hydroxylase and 7-ethoxycoumarin O-deethylase also increased significantly on the 7th day, and remained at a higher level by the 14th day. These results show that exposures to 0.8ppm O₃ induce the xenobiotic metabolizing systems in the lung.

In the liver, after the first day of exposure to 0.8ppm O₃, a significant reduction occurred in all components of the electron-transport systems examined as well as in the microsomal protein. A significant decrease was also observed in benzo(a)pyrene hydroxylation, 7-ethoxycoumarin O-deethylation, and aniline hydroxylation. The decreased activities recovered in the following period of exposure. In contrast, the *p*-nitroanisole N-demethylase activity was not altered during the 14-day exposures. These results suggest that some isozymes of the hepatic cytochrome P-450 are sensitive to O₃, inhalation but other(s) are resistant.

1 はじめに

チトクロームP-450及びその還元酵素群から成る、チトクロームP-450依存性一原子酸素添加酵素系は、生体に取り込まれた脂溶性化学物質の解毒を行う異物代謝系としての作用を有している。環境中に存在する異物(化学物質)の毒性を考える上で、この代謝系は重要である¹⁾。大気汚染ガスの吸入によって肺のチトクロームP-450を中心とする異物代謝系が影響を受けることが考えられる。オゾン(O₃)は、光化学スモッグを代表するオキシダントの一つである。Palmer ら²⁾、Goldstein ら³⁾、そして、Montgomery と Niewoehner⁴⁾は、0.75~1 ppm O₃ を数時間から1日暴露すると肺の異物代謝活性が低下することを報告した。しかし、O₃ を繰り返し暴露した場合に肺の異物代謝系が受ける影響を研究した報告はない。

外来性化学物質の代謝は主に肝臓で行われる。これまで、O₃ 暴露と肝臓の異物代謝系に関する、2, 3の研究が報告されているが、その結果は必ずしも明確なものではない。Goldstein ら³⁾は、1 ppm O₃ の急性暴露によりウサギ肝臓のチトクロームP-450含量は変化しないことを報告した。しかし、Graham ら⁵⁾は、1日5時間、2日間の1 ppm O₃ 暴露により、肝ミクロソームのアニン水酸化活性が増加することを見いだした。

今回、0.4ppm 及び0.8ppm O₃ を1日7時間、14日間暴露し、肺及び肝臓の異物代謝系が受ける影響を検討した。その結果、0.4ppm O₃ 暴露により、肺及び肝臓の異物代謝系に変化は認められなかったが、0.8ppm O₃ 暴露により、肺の異物代謝活性は増加するが、肝臓では、暴露1日目に減少することが明らかになったので報告する。

2 方法

2.1 暴露条件及び試料の採取

Jcl: Wistar 系雄ラット (19~22週令) を 0.8 ± 0.02 ppm, 0.4 ± 0.01 ppm O_3 に 1 日 7 時間 (9:30~16:30) 1, 4, 7 及び 14 日間暴露した。暴露後, 1 群 6 匹のラットをチャンバーより取り出しエーテル麻酔下で頸動脈から採血してと殺した。臓器を 0.95% NaCl を用いて灌流後, 4 倍量の 10 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.15 M KCl 溶液中, ポッター・エルベジェム型テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ミクロソーム画分は, 肺及び肝臓のホモジネートを 10,000 × g 15 分間遠心し, 遠心上清を 105,000 × g 60 分間遠心し調製した。

2.2 チトクローム含量及び還元酵素活性の測定

チトクローム b_5 とチトクローム P-450 の含量は, Omura と Sato⁶⁾ の方法で測定し, 分子吸光係数を各々 $185 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 及び $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ として計算した。NADH-チトクローム b_5 還元酵素及び NADPH-チトクローム P-450 還元酵素活性は Omura と Takesue⁷⁾ の方法により測定した。

2.3 異物代謝活性の測定

7-エトキシクマリン脱エチル化活性は Aitio⁸⁾ の方法により測定した。50 mM トリシュー塩酸 (pH 7.4), 0.1 mM 7-エトキシクマリン, 1 mM NADPH 及びミクロソーム懸濁液 (0.25~0.5 mg 蛋白質当量) を含む反応液 0.5 ml を 37°C で 10 分間反応させた。反応により生じる, 7-ヒドロキシクマリンを蛍光法により測定した。

ベンゾピレン水酸化活性は Dehnen ら⁹⁾ の方法により測定した。50 mM トリシュー塩酸 (pH 7.4), 3 mM $MgCl_2$, 40 μ M ベンゾピレン, 900 μ g アルブミン, 0.5 mM NADPH, 及びミクロソーム懸濁液 (50~150 μ g 蛋白質相当量) を含む反応液 1.0 ml を 37°C で, 肺ミクロソームの場合は 10 分, 肝ミクロソームは 3 分間反応させた。反応により生じた 3-ヒドロキシベンゾピレンを蛍光法により測定した。

p-ニトロアニソール及びアニリンの代謝活性は Litterest ら¹⁰⁾ の方法に準じ測定した。100 mM トリシュー塩酸 (pH 7.4), 1 mM *p*-ニトロアニソールあるいは 5 mM アニリン, ミクロソーム懸濁液 (0.7 mg 蛋白質相当量), 及び 1 mM NADP⁺, 10 mM グルコース 6-リン酸, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 units グルコース 6-リン酸脱水素酵素からなる NADPH 生成系を含む反応液 0.5 ml を 37°C で 10 分間インキュベートした。*p*-ニトロアニソール脱メチル化反応により生じたホルムアルデヒドは Nash¹¹⁾ の方法に従い定量した。アニリン水酸化反応により生じた *p*-アミノフェノールは, 2% フェノール, 0.5 M NaOH と反応させ, 630 nm の吸光度より定量した。

蛋白質量は Lowry ら¹²⁾ の方法により測定した。チトクローム含量及び酵素活性はホモジネート蛋白質当たりで表した。

2.4 有異差の検定法

対照群と暴露群の間の差の有意性は、分散を分析後、Student 又は Welch の t 検定法で調べた。

3 結果

3.1 肺の蛋白質質量及びミクロソーム電子伝達系成分の変化

表 1 に、0.4ppm 及び 0.8ppm O₃ 暴露による蛋白質質量の変化を、また、表 2 にミクロソーム電子伝達系成分の変化を示した。0.8ppm O₃ 暴露によって、ホモジネート及びミクロソームの蛋白質質量は暴露 7 日目に各々対照群の 109% ($p < 0.05$) 及び 120% ($p < 0.05$) と増加し、14 日目に対照群の値まで減少した。チトクローム P-450 含量は、暴露 1 日目に減少の傾向を示したが、4 日目及び 7 日目には対照群の各々 165% ($p < 0.05$)、186% ($p < 0.01$) と著しく増加し、14 日目には、わずかに対照

表 1 肺のホモジネート及びミクロソーム画分の蛋白質質量の変化

Table 1 Changes in the protein contents^a of lung homogenate and microsomal fraction

	Time of exposure (days)							
	1		4		7		14	
Homogenate protein		(%)		(%)		(%)		(%)
Control	102±12.1	(100)	98±4.5	(100)	98±6.4	(100)	98±8.0	(100)
0.4ppm O ₃	101±5.8	(99)	91±3.7	(93)	100±9.8	(102)	96±7.2	(98)
0.8ppm O ₃	104±3.4	(102)	103±5.4	(105)	107±3.4 ^b	(109)	96±5.0	(98)
Microsomal protein		(%)		(%)		(%)		(%)
Control	9.7±1.8	(100)	9.0±0.7	(100)	9.3±1.2	(100)	9.2±0.8	(100)
0.4ppm O ₃	9.3±0.8	(96)	8.7±9.6	(97)	9.7±0.9	(104)	8.9±1.0	(97)
0.8ppm O ₃	9.5±0.8	(98)	9.9±1.1	(110)	11.2±0.8 ^b	(120)	9.7±1.0	(106)

^amg protein per tissue, (mean ± SD).

^bSignificant at $p < 0.05$.

表 2 肺ミクロソーム電子伝達系成分の変化

Table 2 Changes in components of electron-transport systems of lung microsomes

Components	Time of exposure (days)							
	1		4		7		14	
Cytochrome P-450 ^a		(%)		(%)		(%)		(%)
Control	4.78±0.89	(100)	4.26±1.06	(100)	4.56±0.92	(100)	4.36±1.04	(100)
0.4ppm O ₃	3.82±1.21	(80)	5.67±1.29	(133)	5.47±2.00	(120)	5.67±1.22	(130)
0.8ppm O ₃	3.98±0.58	(83)	7.05±1.75 ^c	(165)	8.50±2.14 ^d	(186)	6.41±1.53 ^c	(147)
NADPH-cytochrome P-450 reductase ^b		(%)		(%)		(%)		(%)
Control	4.13±0.41	(100)	4.27±1.25	(100)	4.01±0.31	(100)	3.92±0.53	(100)
0.4ppm O ₃	4.21±0.36	(102)	4.70±0.41	(110)	4.37±0.43	(109)	4.27±0.29	(109)
0.8ppm O ₃	4.42±0.53	(107)	4.96±0.51	(116)	5.04±0.71 ^c	(126)	4.65±0.38 ^c	(119)

^a pmol/mg homogenate protein, (mean ± SD).

^b nmol cytochrome c reduced/min/mg homogenate protein.

^c Significant at $p < 0.05$, ^d Significant at $p < 0.01$.

値に近づいたものの対照群の147% ($p < 0.05$)と有意な増加を示した。NADPH-チトクローム P-450還元酵素活性は、暴露7及び14日目に対照群の各々126% ($p < 0.05$)及び119% ($p < 0.05$)と有意に増加した。一方、NADH-チトクローム b_5 還元酵素活性は有意な変化を示さなかった。0.4ppm O_3 暴露により蛋白質量及び、両チトクローム還元酵素活性は有意な変化を示さなかった。

3.2 肺ミクロソーム異物代謝活性の変化

上記の結果は、肺ミクロソームの異物代謝活性が O_3 暴露により活性化されている可能性を示唆している。表3に肺ミクロソームのベンゾピレン水酸化及び7-エトキシマリン脱エチル化活性の変化を示した。0.8ppm O_3 暴露によりベンゾピレン水酸化活性は、1日目にわずかに減少したが、7日及び14日目には対照群の各々132% ($p < 0.05$)及び162% ($p < 0.05$)に増加した。7-エトキシマリン脱エチル化活性は、暴露7日目に対照群の140% ($p < 0.05$)に増加したが、14日目には対照値に近づき、有意な変化を示さなかった。

0.4ppm O_3 暴露により肺ミクロソーム異物代謝活性に有意な変化は認められなかった。

表 3 肺ミクロソーム異物代謝活性の変化

Table 3 Changes in xenobiotic-metabolizing activities^a of lung microsomes

Enzyme	Time of exposure(days)		
	1	7	14
Benzo(a)pyrene hydroxylase	(%)	(%)	(%)
Control	0.86±0.22 (100)	0.92±0.15 (100)	0.95±0.22 (100)
0.4ppm O_3	0.72±0.23 (84)	1.09±0.20 (119)	1.09±0.31 (115)
0.8ppm O_3	0.60±0.17 (69)	1.21±0.22 ^b (132)	1.54±0.39 ^b (162)
7-Ethoxycoumarin O-deethylase			
Control	28.5±6.7 (100)	31.0±5.3 (100)	33.6±6.6 (100)
0.4ppm O_3	27.6±5.4 (97)	38.1±8.6 (123)	41.3±9.0 (123)
0.8ppm O_3	31.0±4.3 (109)	43.5±7.7 ^a (140)	41.3±5.2 (123)

^a nmol/min/mg homogenate protein, (mean ± SD).

^b Significant at $p < 0.05$

3.3 肝臓の蛋白質量及びミクロソーム電子伝達系成分の変動

表4に、0.4ppm及び0.8ppm O_3 、14日間暴露による肝臓の蛋白質量の変化を、表5にミクロソーム電子伝達成分の変化を示した。ホモジネートの蛋白質量は14日間の暴露期間を通じて変化が認められなかった。しかし、ミクロソーム画分の蛋白質量は0.8ppm O_3 暴露1日目に対照群の80% ($p < 0.01$)と有意に低下し、暴露4日目には対照群の値まで回復した。同様に、0.8ppm O_3 暴露1日目にはすべてのミクロソーム電子伝達系成分が減少した。すなわち、チトクローム P-450含量及びNADPH-チトクローム P-450還元酵素活性は各々対照群の73% ($p < 0.01$)及び72% ($p < 0.01$)を示した。チトクローム b_5 含量及びNADH-チトクローム b_5 還元酵素活性はそれぞれ対照群の80% ($p <$

表 4 肝ホモジネート及びミクロソーム画分の蛋白質量の変化
Table 4 Changes in protein contents^a of liver homogenate and microsomal fraction

	Time of exposure (days)							
	1		4		7		14	
Homogenate protein		(%)		(%)		(%)		(%)
Control	2813±160	(100)	2903±236	(100)	2745±146	(100)	2850±101	(100)
0.4ppm O ₃	2700±188	(96)	2699±107	(93)	2635±302	(96)	2689±183	(94)
0.8ppm O ₃	2739±234	(97)	2933±301	(101)	2708±152	(99)	2835±291	(100)
Microsomal protein								
Control	298±32	(100)	271±36	(100)	288±24	(100)	276±24	(100)
0.4ppm O ₃	295±50	(102)	247±39	(91)	291±43	(101)	257±30	(93)
0.8ppm O ₃	230±20 ^b	(80)	252±30	(93)	284±16	(99)	267±39	(97)

^a mg protein per tissue, (mean ± SD).

^b Significant at $p < 0.01$ (mean ± SD).

表 5 肝ミクロソーム電子伝達系成分の変化
Table 5 Changes in components of electron-transport systems of liver microsomes

Components	Time of exposure (days)							
	1		4		7		14	
Cytochrome P-450 ^a		(%)		(%)		(%)		(%)
Control	71.5±8.4	(100)	68.4±5.9	(100)	71.8±10.6	(100)	65.8±11.1	(100)
0.4ppm O ₃	75.8±9.8	(106)	73.9±8.5	(108)	82.6±14.1	(90)	59.2±4.6	(90)
0.8ppm O ₃	51.9±10.2 ^d	(73)	65.9±7.3	(96)	70.5±5.9	(98)	68.2±12.1	(104)
NADPH-cytochrome P-450 reductase ^b								
Control	29.2±4.2	(100)	25.6±3.0	(100)	26.0±3.4	(100)	22.4±4.0	(100)
0.4ppm O ₃	32.1±3.7	(110)	27.6±2.8	(108)	27.8±3.7	(107)	25.5±3.1	(114)
0.8ppm O ₃	21.1±3.0 ^d	(72)	23.3±3.1	(91)	25.9±4.0	(100)	21.8±2.9	(97)
Cytochromes ^a								
Control	58±8	(100)	53±7	(100)	54±7	(100)	52±6	(100)
0.4ppm O ₃	63±8	(109)	57±3	(108)	57±6	(105)	52±5	(100)
0.8ppm O ₃	46±6 ^c	(80)	54±5	(104)	48±5	(89)	52±6	(100)
NADH-cytochrome <i>b₅</i> reductase ^b								
Control	316±43	(100)	294±54	(100)	277±42	(100)	296±31	(100)
0.4ppm O ₃	356±66	(112)	288±11	(98)	283±52	(102)	305±37	(103)
0.8ppm O ₃	248±37 ^d	(79)	263±33	(90)	239±37	(86)	299±27	(100)

^a pmol/mg homogenate protein, (mean ± SD).

^b nmol cytochrome *c* reduced/min/mg homogenate protein.

^c Significant at $p < 0.05$, ^d Significant at $p < 0.01$.

0.05)及び79% ($p < 0.05$)を示した。しかし、これら暴露1日目の減少は、4日目までに回復し、以後14日目まで有意な変化を示さなかった。0.4ppm O₃暴露により、肝臓の蛋白質量及びミクロソーム電子伝達系成分は有意な変化を示さなかった。

3.4 肝臓ミクロソームの異物代謝活性の変化

表6に、0.4ppm及び0.8ppm O₃ 14日間暴露による、肝臓ミクロソームの異物代謝活性の変化を示した。0.8ppm O₃ 暴露1日目に、ベンゾピレン水酸化活性、7-エトキシクマリン脱エチル化活性及びアニリン水酸化活性は各々対照群の64% (p<0.05), 73% (p<0.01)及び77% (p<0.05)と有意に低下した。アニリン水酸化活性は暴露14日目に有意に増加した。一方、p-ニトロアニソール脱メチル化活性は、14日間の暴露を通じて変化が認められなかった。0.4ppm O₃ 暴露により、いずれの異物代謝活性も有意な変化を示さなかった。

表 6 肝ミクロソーム異物代謝活性の変化

Table 6 Changes in xenobiotic-metabolizing activities^a of liver microsomes

Enzyme	Time of exposure(days)					
	1		7		14	
Benzo(a)pyrene hydroxylase		(%)		(%)		(%)
Control	86±16	(100)	93±21	(100)	79±14	(100)
0.4ppm O ₃	84±13	(98)	97±20	(104)	70±11	(88)
0.8ppm O ₃	61±17 ^b	(64)	91±18	(98)	70±17	(88)
7-Ethoxycoumarin O-deethylase						
Control	84.7±12.8	(100)	79.7±8.6	(100)	77.5±12.4	(100)
0.4ppm O ₃	87.2±10.3	(103)	82.8±9.3	(104)	69.8±11.0	(90)
0.8ppm O ₃	61.9±7.5 ^c	(73)	73.8±10.3	(93)	79.1±9.6	(102)
Aniline hydroxylase						
Control	63.2±11.9	(100)	60.5±18.7	(100)	57.3±7.4	(100)
0.4ppm O ₃	61.9±8.4	(98)	64.1±9.3	(106)	63.0±10.1	(110)
0.8ppm O ₃	48.6±6.1 ^b	(77)	63.1±4.5	(104)	68.4±6.3 ^b	(119)
p-Nitroanisole N-demethylase						
Control	308±42	(100)	356±34	(100)	330±31	(100)
0.4ppm O ₃	326±37	(106)	381±41	(107)	389±38	(118)
0.8ppm O ₃	327±27	(106)	335±34	(97)	345±52	(108)

^a pmol product/min/mg homogenate protein, (mean ± SD).

^b Significant at p<0.05, ^cSignificant at p<0.01.

4 考察

1 ppm 前後の O₃ を 3~24時間暴露すると肺ミクロソームの異物代謝系の活性が低下することが知られている²⁻⁴⁾。本研究においても、0.8ppm O₃ 7時間暴露によって肺のチトクロームP-450含量とベンゾピレン水酸化活性が減少する傾向を示す結果を得た(表2, 3)。しかし、0.8ppm O₃ 暴露が肺の異物代謝系にもたらす最も顕著な変化は、暴露を繰り返すことによって、異物代謝活性が増加することであった。

今回の O₃ 暴露により生じた異物代謝活性の変化と、これまで報告されといる肺の病理学的知見を比較することも興味深い。O₃ や NO₂ などの酸化性ガスに対して肺胞 I 型上皮細胞は最も障害を

受けやすい細胞種の一つであることが広く認められている¹³⁾。Stephens ら¹⁴⁾は、0.5ppm O₃, 2～6時間暴露によりこのI型上皮細胞が著しい障害を受けたことを示した。また、I型上皮細胞が損傷を受けると、肺胞II型上皮細胞が増殖し^{15, 16)}、I型上皮細胞に分化する可能性¹⁷⁾が示唆されている。近年、肺胞II型上皮細胞は、チトクローム P-450を比較的多く含む細胞であることが De-verux ら^{18, 19)}によって明らかにされた。したがって、O₃暴露によって肺の異物代謝活性が増加する機構の一つとして、チトクローム P-450を比較的多く含んだ細胞の数が増えたことが考えられる。

肝臓では、0.8ppm O₃ 7時間暴露により、ミクロソームの構成成分、特に異物代謝系の酵素活性が減少した(表5, 6)。以前我々は²⁰⁾ 4 ppm NO₂急性暴露によって、肝ミクロソームの構成成分、特に異物代謝系の酵素活性が減少することを認めている。したがって、肝異物代謝系酵素の減少は、動物が酸化ストレスを受けた場合に共通して認められる現象なのかもしれない。

肝ミクロソームの

-ニトロアニソール脱メチル化活性は、0.4ppm 及び0.8ppm 14日間暴露により、暴露期間を通じて有意な変化を示さなかった。さらに、暴露14日目には、測定した4種の異物代謝活性の中で、アニリン水酸化活性が唯一増加した。同様に、Graham ら⁵⁾は、1 ppm O₃を2日間(5 h/d)暴露し、肝ミクロソームのアニリン水酸化活性は上昇したが、アミノピリン脱メチル化活性及び

-ニトロアニソール脱メチル化活性は変化がないと報告している。Imai ら²¹⁾らは、肝臓の異物代謝に関与するチトクローム P-450には十数種のイソ酵素があることを示した。したがって、我々の結果及びGraham らの結果は、O₃暴露によって、選択的に分解または変性を受けるチトクローム P-450のイソ酵素が肝ミクロソームに存在する可能性を示唆している。

引用文献

- 1) Philpot, R. M., M. W. Anderson and T. E. Eling (1977): Uptake, accumulation and metabolism of chemicals by the lung. *In: Metabolic Function of the Lung*, Y. S. Bakhle and J. R. Vane (ed.), Marcel Dekker, New York and Basel, 123-171.
- 2) Palmer, M. S., D. H. Swanson and D. L. Coffin (1971): Effect of ozone on benzophenanthrene hydroxylase activity in the Syrian golden hamster. *Cancer Res.*, **31**, 730-733.
- 3) Goldstein, B. D., S. Solomon, B. S. Pasternack and D. R. Bickers (1975): Decrease in rabbit lung microsomal cytochrome P-450 levels following ozone exposure. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **10**, 759-762.
- 4) Montgomery, M. R. and D. E. Niewoehner (1979): Oxidant-induced alteration in pulmonary microsomal mixed-function oxidation: acute effects of paraquat and ozone. *J. Environ. Sci. Health*, **C13**, 205-219.
- 5) Graham, J. A., E. J. Miller, D. E. Gardner, R. Ward and D. B. Menzel (1982): Influence of ozone and nitrogen dioxide on hepatic microsomal enzymes in mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 849-856.
- 6) Omura, T. and R. Sato (1964): Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- 7) Omura, T. and S. Takesue (1970): New method for simultaneous purification of cytochrome b₅ and NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. *J. Biochem.*, **67**, 249-257.

- 8) Aitio, A. (1978): A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal. Biochem.* **85**, 488-491.
- 9) Dehnen, W., R. Tomigas and J. Roos (1973): A modified method of the assay of benzo(a)pyrene hydroxylase. *Anal. Biochem.*, **53**, 373-383.
- 10) Litterest, C. L., E. G. Mimnaugh, R. L. Reagan and T. E. Gram (1975): Comparison of in vitro drug metabolism by lung, liver and kidney of several common laboratory species. *Drug. Metabolism and Disposition*, **3**, 259-265.
- 11) Nash, T. (1983): The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.*, **55**, 416-421.
- 12) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 13) Stephens, R. J. and M. J. Evans (1973): Early response of lungs to low levels of ozone. *Am. J. Pathol.*, **74**, 31-58.
- 14) Stephens, R. J., M. F. Sloan, M. J. Evans and G. Freeman (1974): Alveolar Type 1 cell response to exposure to 0.5ppm O₃ for short periods. *Exp. Mol. Pathol.*, **20**, 11-23.
- 15) Cabral-Anderson, L. J., M. J. Evans and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of aging rats. I. Morphology. *Exp. Mol. Pathol.*, **27**, 353-365.
- 16) Evans, M. J., N. P. Dekker, L. J. Cabral-Anderson and G. Freeman (1978): Quantitation of damage to the alveolar epithelium by means of Type 2 cell proliferation. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **118**, 787-790.
- 17) Castleman, W. L., D. L. Dungworth, L. W. Schwartz and W. S. Tyler (1980): Acute respiratory bronchiolitis. An ultrastructural and autoradiographic study of epithelial cell injury and renewal in rhesus monkeys exposed to ozone. *Am. J. Pathol.*, **98**, 811-840.
- 18) Devereux, T. R. and J. R. Fouts (1981): Xenobiotic metabolism by alveolar type II cells isolated from rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1231-1237.
- 19) Devereux, T. R., C. J. Serabjit-Singh, S. R. Slaughter, C. R. Walf, R. M. Philpot and J. R. Fouts (1981): Identification of cytochrome P-450 isozymes in nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) and alveolar type II cells isolated from rabbit lung. *Exp. Lung Res.*, **2**, 221-230.
- 20) Mochitate, K., K. Kaya and T. Miura (1984): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, **33**, 17-28.
- 21) Imai, Y., Y. C. Hashimoto, H. Satake, A. Girardin and R. Sato (1980): Multiple forms of cytochrome P-450 purified from liver microsomes of phenobarbital- and 3-methylcholanthrene-pretreated rabbits. *J. Biochem.*, **88**, 489-503.

II-9 ラット肺の異物代謝系に及ぼす二酸化窒素と
 オゾンの影響の比較*
In vivo Effects of Nitrogen Dioxide and Ozone on the
Xenobiotic-Metabolizing Systems of Rat Lungs*

高橋勇二¹・三浦 卓¹

Yuji TAKAHASHI¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

Jc1 : Wistar 雄ラットに NO₂ 又は O₃ を 7 及び 14 日間連続暴露し、肺ミクロソームの異物代謝系に及ぼす両ガスの影響を比較した。0.2 及び 0.4 ppm O₃ 暴露 14 日目に、ミクロソーム蛋白質、NADPH-チトクローム P-450 還元酵素及びチトクローム P-450 含量は増加した。一方、NADH-チトクローム b₅ 還元酵素活性は変わらなかった。最も顕著な増加は、チトクローム P-450 含量であった。この増加と平行してベンゾピレン水酸化及び 7-エトキシマリン脱エチル化活性の増加が、0.2 及び 0.4 ppm O₃ 暴露 7 及び 14 日目に観察された。

NO₂ 暴露は、O₃ とは逆に 7 日目にチトクローム P-450 含量を減少させた。また、7-エトキシマリン脱エチル化活性も、4 ppm NO₂ 暴露 7 及び 14 日目に对照群の各々 61% (p < 0.05) と 74% (p < 0.001) に減少した。この減少は、0.4~4.0 ppm NO₂ 暴露で濃度依存的であった。一方、ベンゾピレン水酸化活性は、有意な変化を示さなかった。

以上の結果から、O₃ は低濃度で肺の異物代謝系を誘導し、NO₂ は減少させることが明らかになった。

Abstract

Male Jc1 : Wistar rats were exposed continuously to either ozone (O₃) or nitrogen dioxide (NO₂) for 7 and 14 days to examine the effects of these gases on the xenobiotic metabolizing systems of lung microsomes. Exposures to 0.2 and 0.4 ppm O₃ increased NADPH-cytochrome P-450 reductase activity and cytochrome P-450 as well as microsomal protein by the 14th day, whereas NADH-cytochrome b₅ reductase was not affected. The most marked increase was observed in cytochrome P-450. In parallel to this increment, the activities of benzo (a) pyrene hydroxylase and 7-ethoxycoumarin O-deethylase of exposed

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

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

* 本論文の原著は、*Toxicol. Lett.*, **26**, 145-152 (1985) に発表したものである。

animals increased significantly on the 7th and 14th days of exposures to 0.2 and 0.4ppm O₃.

In contrast, exposures to 1.2 and 4ppm NO₂ decreased cytochrome P-450 on the 7th day. Moreover, the 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity of exposed animals decreased to 61% ($p < 0.05$) and 74% ($p < 0.001$) of the control values on the 7th and 14th days of exposure to 4ppm NO₂, respectively. This decrease occurred in a dose-dependent manner by exposure to 0.4~4.0ppm NO₂, whereas the benzo (a) pyrene hydroxylase activity was not affected.

These results show that O₃ at low doses induces the xenobiotic metabolizing activities in the lung, whereas NO₂ reduces the activity metabolizing certain xenobiotic.

1 はじめに

二酸化窒素(NO₂)とオゾン(O₃)は、都市環境に存在する主要なオキシダントである。両ガスは、フリーラジカルを生じ呼吸器内に酸化反応を引き起こす¹⁾と考えられており、NO₂やO₃に短期間暴露すると肺の抗過酸化物質代謝系が昂進される²⁻⁴⁾。呼吸器のチトクローム P-450依存性一原子酸素添加酵素系は、呼吸により吸入される生体異物(化学物質)の代謝に重要な役割を果たしている⁵⁾。これまでに、1 ppm 前後のO₃を暴露すると、24時間以内に肺のチトクローム P-450と異物代謝活性が減少すると報告されている⁶⁻⁸⁾。最近、我々は⁹⁾、0.8ppm O₃ 間欠暴露4日目からラット肺のチトクローム P-450含量が増加することを明らかにした。

二酸化窒素の肺異物代謝系に及ぼす影響は、ほとんど明らかにされていない。Palmerら⁶⁾は、5~50ppm NO₂をラットに3時間暴露しても肺のベンゾピレン水酸化活性は影響を受けないと報告している。次いで、HusainとDehnenは¹⁰⁾、14.4ppm NO₂をラットに7日間暴露すると肺のベンゾピレン水酸化活性が増加することを示した。最近、我々は、0.4~4.0ppm NO₂急性・亜急性暴露によって肺のチトクローム P-450含量が周期的に減少することを見いだした^{11,12)}。これらの結果は、NO₂の肺異物代謝系に及ぼす影響がO₃のとは同一でない可能性を示唆している。本研究の目的は、肺の異物代謝系に及ぼすNO₂とO₃の効果の相違を明らかにすることである。

本報告は、低濃度のNO₂とO₃をラットに14日間単独暴露し、肺ミクロソームの異物代謝系に及ぼす影響について検討した結果を記している。O₃暴露はベンゾピレン水酸化及び7-エトキシマリン脱エチル化活性を昂進させるが、NO₂暴露は後者の活性を減少させた。

2 方法

2.1 使用動物及び暴露条件

Jcl: Wistar系雄ラット(CLEA-Japan Co., SPF)を10週令で購入し、滅菌餌・水で飼育し暴露開始時までSPF状態を維持した。

ラット(22~24週令)に、O₃(0.2±0.01及び0.4±0.01ppm)又はNO₂(4.0±0.2ppm)を14日間暴露した。暴露7及び14日目に暴露チャンバーより一群6匹の動物を取り出し、屠殺後心臓より0.95%

NaCl 溶液を灌流して臓器より血液を除去した。暴露したすべての動物に呼吸器系の病変は観察されなかった。肺を灌流後取り出し、0.15M KCl を含む10mM トリス緩衝液 (pH7.4) 中で薄片化後ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。得られたホモジネートから分画遠心法によってマイクロソーム画分を調整し、酵素活性の測定に供した。

2. 2 酵素活性の測定法

NADPH-チトクローム P-450還元酵素及びNADH-チトクローム b_5 還元酵素の活性は、Omura と Takasue¹³⁾の方法によりチトクローム c を電子受容体として測定した。チトクローム P-450含量は、Omura と Sato¹⁴⁾の方法により測定し分子吸光係数を $91\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ として算出した。

7-エトキシマリン脱エチル化及びベンゾピレン水酸化活性は、各々 Aitio¹⁵⁾ 及び Dehnen¹⁶⁾ の方法に準じ、Takahashi と Miura¹⁷⁾ に記した方法で測定した。

肺のホモジネート及びマイクロソーム画分の蛋白質量は、Lowey¹⁸⁾の方法で定量した。

2. 3 有意差の検定法

対照群と暴露群の間の差の有意性は、分散の比を分析後、Student 又は Welch の t 検定法で調べた。

3 結果

3. 1 肺マイクロソームの異物代謝系に及ぼす O_3 の影響

表1に、0.2又は0.4ppm O_3 暴露による肺の蛋白質量、異物代謝系成分及び異物代謝活性の変化を示した。ラットに0.4ppm O_3 を暴露すると、肺ホモジネートの蛋白質量は7日目に対照群の112% ($p < 0.05$) に増加し、14日目までには対照群のレベルに減少した。一方、マイクロソーム画分の蛋白質量は、0.2及び0.4ppm O_3 暴露14日目に各々対照群の117% ($p < 0.05$) 及び128% ($p < 0.01$) と暴露濃度に依存した増加を示した。この増加と平行して、NADPH-チトクローム P-450還元酵素活性も、0.2及び0.4ppm O_3 暴露14日目に各々対照群の123% ($p < 0.01$) 及び126% ($p < 0.01$) に増加した。更に、チトクローム P-450含量は顕著な増加を示した。0.2ppm O_3 暴露7及び14日目では、各々対照群の166% ($p < 0.001$) 及び192% ($p < 0.001$) に増加し、0.4ppm O_3 暴露7及び14日目では、各々対照群の147% ($p < 0.001$) 及び246% ($p < 0.001$) に達した。NADH-チトクローム b_5 還元酵素活性は、 O_3 暴露により有意な変化を示さなかった。

チトクローム P-450含量の増加とほぼ平行して、ベンゾピレン水酸化活性が増加し、0.2ppm O_3 暴露7及び14日目には各々対照群の145% ($p < 0.01$) 及び175% ($p < 0.01$) に達した。0.4ppm O_3 暴露により、本活性は暴露7及び14日目に各々対照群の137% ($p < 0.01$) 及び190% ($p < 0.001$) に増加した。7-エトキシマリン脱エチル化活性も O_3 暴露により増加し、0.2及び0.4ppm O_3 暴露7日目では各々対照群の133% ($p < 0.01$) 及び130% ($p < 0.05$) に達した。暴露14日目においても有意に高い活性が維持された。

表 1 O₃ 暴露による肺ミクロソームの蛋白質含量, 電子伝達系成分及び異物代謝活性の変化Table 1 Changes in protein content, components of electron-transport systems and xenobiotic metabolizing activities of lung microsomes produced by O₃

	Time of exposure (days)			
		7		14
Homogenate protein ^d		(%)		(%)
Control	93±6	(100)	88±8	(100)
0.2ppm O ₃	94±6	(102)	94±3	(106)
0.4ppm O ₃	104±2 ^a	(112)	99±6	(111)
Microsomal protein ^d				
Control	8.4±1.3	(100)	8.9±1.1	(100)
0.2ppm O ₃	8.7±0.7	(104)	10.5±0.5 ^a	(117)
0.4ppm O ₃	9.3±0.7	(110)	11.4±0.8 ^b	(128)
NADPH-cytochrome P-450 reductase ^f				
Control	4.3±0.7	(100)	4.4±0.4	(100)
0.2ppm O ₃	5.0±0.4	(116)	5.4±0.4 ^b	(123)
0.4ppm O ₃	4.6±0.6	(107)	5.6±1.4 ^b	(126)
Cytochrome P-450 ^c				
Control	4.2±1.0	(100)	4.0±0.6	(100)
0.2ppm O ₃	7.0±0.7 ^c	(166)	7.6±0.7 ^c	(192)
0.4ppm O ₃	6.2±0.8 ^c	(147)	9.8±1.1 ^c	(246)
Benzo(a)pyrene hydroxylase ^g				
Control	0.99±0.14	(100)	0.84±0.16	(100)
0.2ppm O ₃	1.43±0.07 ^c	(145)	1.48±0.18 ^c	(175)
0.4ppm O ₃	1.33±0.19 ^b	(137)	1.60±0.13 ^c	(190)
7-Ethoxycoumarin O-deethylase ^g				
Control	25±4	(100)	23±2	(100)
0.2ppm O ₃	34±4 ^b	(133)	29±5 ^c	(123)
0.4ppm O ₃	33±5 ^a	(100)	29±3 ^c	(123)

Values are expressed as the mean of six animals ± S. D. ^ap<0.05; ^bp<0.01; ^cp<0.001.

^dmg of protein per tissue; ^epmol/mg of homogenate protein; ^fnmol/min per mg of homogenate protein; ^gpmol/min per mg of homogenate protein.

3.2 肺ミクロソームの異物代謝系に及ぼす NO₂ の影響

表2に, 4ppm NO₂ 暴露による肺の蛋白質量, 異物代謝系成分及び異物代謝活性の変化を示した。肺のホモジネート蛋白質量は, 暴露7日目に対照群の112% (p<0.01)に増加した後, 14日目までには対照群のレベルに回復した。O₃ 暴露の効果とは反対に, チトクローム P-450含量は暴露7日目に対照群の55% (p<0.05)に減少し, 次いで14日目には対照群のレベルにまで回復した。7-エトキシマリン脱エチル化活性も, 4ppm NO₂ 暴露により減少した。本活性には, NO₂ 暴露7及び14日目で各々対照群の61% (p<0.05)及び74% (p<0.001)となった。ミクロソーム画分の蛋白質量, NADPH-チトクローム P-450還元酵素, NADH-チトクローム b₅還元酵素及びベンゾピレン水酸化

表 2 NO₂ 暴露による肝ミクロソームの蛋白質含量, 電子伝達系成分及び異物代謝活性の変化Table 2 Changes in protein content, components of electron-transport systems and xenobiotic metabolizing activities of lung microsomes produced by NO₂

	Time of exposure (days)			
	7		14	
Homogenate protein ^d		(%)		(%)
Control	95±6	(100)	93±4	(100)
4ppm NO ₂	106±4 ^b	(112)	97±8	(104)
Microsomal protein ^d				
Control	8.8±0.5	(100)	8.3±0.7	(100)
4ppm NO ₂	9.8±0.6	(111)	9.1±0.9	(109)
Cytochrome P-450 ^e				
Control	3.9±1.1	(100)	3.9±0.7	(100)
4ppm NO ₂	2.2±0.7 ^a	(55)	4.0±0.7	(102)
NADPH-cytochrome P-450 reductase ^f				
Control	4.3±0.5	(100)	4.2±0.2	(100)
4ppm NO ₂	4.4±0.2	(103)	4.2±0.2	(100)
Benzo(a)pyrene hydroxylase ^g				
Control	0.92±0.27	(100)	1.04±0.10	(100)
4ppm NO ₂	1.00±0.25	(109)	1.02±0.19	(98)
7-Ethoxycoumarin O-deethylase ^h				
Control	28±6	(100)	30±3	(100)
4ppm NO ₂	19±4 ^a	(61)	22±2 ^c	(74)

Values are expressed as the mean of six animals ± S. D., ^ap<0.05; ^bp<0.01; ^cp<0.001.

^dmg of protein per tissue; ^epmol/mg of homogenate protein; ^fnmol/min per mg of homogenate protein; ^gpmol/min per mg of homogenate protein.

酵素の活性は 4 ppm NO₂ 暴露で有意な変化を示さなかった。

7-エトキシマリン脱エチル化活性は, 0.4~4.0ppm NO₂ 暴露 7 日目に, NO₂ の暴露濃度に依存して減少した(表 3)。0.4, 1.2及び4.0ppm NO₂ 暴露で, 各々対照群の84%, 73% (p<0.005)及び64% (p<0.05)であった。一方, ベンゾピレン水酸化活性は, 本研究で用いた NO₂ のいずれの暴露濃度, 暴露期間においても有意な変化を示さなかった。

4 考 察

本研究の結果は, O₃ の肺異物代謝系への効果が NO₂ の効果と異なることを明らかにしている。0.2及び0.4ppm O₃ 暴露が, 肺ミクロソームの異物代謝系を誘導することは明りょうである(表 1)。ミクロソーム電子伝達系成分の中でも, 異物代謝系成分がより選択的に誘導された。0.75~1ppm O₃ 暴露により, 1 日以内に肺ミクロソームのチトクローム P-450が減少することが報告されている⁶⁻⁸⁾。最近, 我々は, 0.8ppm O₃ をラットに 1 日 7 時間間欠暴露すると, 肺ミクロソームのチト

表 3 肺マイクロソームのベンゾピレン水酸化酵素及び7-エトキシマリン脱エチル化酵素に及ぼすNO₂ 7日間暴露の影響

Table 3 Effects of seven-day exposures to 0.4, 1.2 and 4.0 ppm NO₂ on benzo (a) -pyrene hydroxylase and 7-ethoxycoumarin O-deethylase of lung microsomes

	Exposure concentrations of NO ₂			
	Control	0.4ppm	1.2ppm	4.0ppm
Homogenate protein ^b	101±7	99±12	99±7	112±5 ^a
7-Ethoxycoumarin O-deethylase ^c	33±6	29±10	24±6 ^a	21±7 ^a
Benzo (a) pyrene hydroxylase ^c	0.98±0.20	1.07±0.20	1.00±0.19	1.03±0.09

Values are expressed as the mean ± S. D., ^ap<0.05

^bmg of protein per tissue; ^cpmol/min per mg of homogenate protein.

クローム P-450が1日目に減少した後4日目から増加することを見いだした⁹⁾。したがって、低濃度オゾン暴露の場合暴露期間が延長されると、肺においてマイクロソーム異物代謝系が誘導され、異物代謝活性が昂進すると結論できる。

オゾンの場合とは反対に、4ppm NO₂ 暴露は、7日目に肺のチトクローム P-450を減少させた(表2)。この結果は、Mochitateら¹¹⁾の報告と一致している。この報告では、1.2~4.0ppm NO₂ をラットに7日間暴露すると、肺のチトクローム P-450は減少するが、NADH-チトクロームb₅還元酵素活性は変化しないことを示している。以上の結果から、NO₂ 暴露は、その作用機作は不明であるが、肺のチトクローム P-450を減少させると結論できる。7-エトキシマリン脱エチル化活性もまた、1.2~4.0ppm NO₂ 暴露7日目に減少した(表3)。一方、ベンゾピレン水酸化活性はNO₂ 暴露に影響されなかった。マイクロソームの異物代謝は、多くのアイソザイムからなるチトクローム P-450によって触媒されている¹⁹⁾。Ueng と Alvares²⁰⁾ は、ラビット肺においてチトクローム P-450アイソザイムの1種であるチトクロームP-450_I がポリクロリネイテッドビフェニル投与により選択的に分解されると報告している。この結果から類推して、NO₂ 暴露は7-エトキシマリン脱エチル化を触媒するチトクローム P-450アイソザイムを選択的に減少させる可能性が考えられる。

結論として、本研究の結果からNO₂ とO₃ は、共に生体成分に対して酸化的ストレスを引き起こすにもかかわらず、肺マイクロソームの異物代謝系に対して相反する影響を及ぼすことが明らかになった。

引用文献

- 1) Menzel, D. B. (1976): The role of free radicals in the toxicity of air pollutants. *In*: Free Radicals in Biology, Vol. II, W. A. Pryor (ed.), Academic Press, New York, 181-202.
- 2) Chow, C. K., M. G. Mustafa, C. E. Cross and B. K. Tarkington (1975): Effects of ozone exposure on the

- lungs and the erythrocytes of rats and monkeys: Relative biochemical changes. *Environ. Physiol. Biochem.*, **5**, 142-146.
- 3) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide II. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153-164.
 - 4) Mochitate, K., T. Miura and K. Kubota (1985): An increase in the activities of glycolytic enzymes in rat lungs produced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 855-864.
 - 5) Philpot, R. M. M. W. Anderson and T. E. Eling (1977): Uptake, accumulation and metabolism of chemicals by the lung. In: *Metabolic Function of the Lung*. Y. S. Bakhle and J. R. Vane (ed.), Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 123-171.
 - 6) Palmer, M. S., D. H. Swanson and D. L. Coffin (1971): Effect of ozone on benzpyrene hydroxylase activity in the Syrian golden hamster. *Cancer Res.*, **31**, 730-733.
 - 7) Goldstein, B. D., S. Solomon, B. S. Pasternack and D. R. Bikers (1975): Decrease in rabbit lung microsomal cytochrome P-450 levels following ozone exposure. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **10**, 759-762.
 - 8) Montgomery, M. R. and D. E. Niewoehner (1979): Oxidant-induced alteration in pulmonary microsomal mixed-function oxidation: Acute effects of paraquat and ozone. *J. Environ. Sci. Health*, **C13**, 205-219.
 - 9) Takahashi, Y., T. Miura and K. Kubota (1985): *In vivo* effect of ozone inhalation on xenobiotic metabolism of lung and liver of rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 855-864.
 - 10) Husain M. M. and W. Dehnen (1978): Effect of NO₂ and SO₂ inhalation on benzo(a)pyrene metabolism in rat lung. *Arch. Toxicol.*, **40**, 207-210.
 - 11) Mochitate, K., K. Kaya, T. Miura, and K. Kubota (1984): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, **33**, 17-28.
 - 12) Takahashi, Y., K. Mochitate and T. Miura (1986): Subacute effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung, liver and kidney of rats. *Environ. Res.*, (in press.)
 - 13) Omura, T. and S. Takesue (1970): New method for simultaneous purification of cytochrome b₅ and NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. *J. Biochemistry*, **67**, 249-257.
 - 14) Omura, T. and R. Sato (1964): Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
 - 15) Aitio, A. (1978): A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal. Biochem.*, **85**, 488-491.
 - 16) Dehnen, W. R. Tomingas and J. Roos (1973): A modified method of the assay of benzo(a)pyrene hydroxylase. *Anal. Biochem.*, **53**, 373-383.
 - 17) Takahashi, Y. and T. Miura (1985): *In vivo* effects of nitrogen dioxide and ozone on xenobiotic metabolizing systems of rat lungs. *Toxicol. Lett.*, **26**, 145-152.
 - 18) Lowry, O. H. N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 - 19) Imai, Y., C. Y. Hashimoto, H. Satake, A. Girardin and R. Sato (1980): Multiple forms of cytochrome P-450 purified from liver microsomes of phenobarbital and 3-methylcholanthrene-pretreated rabbits. *J. Biochem.*, **88**, 489-503.
 - 20) Ueng T. H. and A. P. Alvares (1981): Selective loss of pulmonary cytochrome P-450₁ in rabbits pretreated with polychlorinated biphenyls. *J. Biol. Chem.*, **256**, 7536-7542.

II-10 ラット臓器のミクロソーム異物代謝系に及ぼす 二酸化窒素とオゾンの複合間欠暴露の影響

Effects of Intermittent Exposures to Nitrogen Dioxide and Ozone Alone and in Combination on the Microsomal Xenobiotic-Metabolizing Systems of Rat Tissues

高橋勇二¹・三浦 卓¹・持立克身¹・河田明治¹・国本 学¹

Yuji TAKAHASHI¹, Takashi MIURA¹, Katsumi MOCHITATE¹, Meiji KAWATA¹
and Manabu KUNIMOTO¹

要 旨

Jc1: Wistar 系雄ラットに、4 ppm NO₂ と 0.4 ppm 又は 0.8 ppm O₃ の複合ガスを 14 日間間欠暴露 (7 h/d) し、肺及び肝臓のミクロソーム異物代謝活性に対する NO₂ と O₃ の複合影響を検討した。

肺では、0.8 ppm O₃ 間欠暴露によるベンゾピレン水酸化及び 7-エトキシクマリン脱エチル化活性の増加が、4 ppm NO₂ の添加によって軽減された。0.8 ppm O₃ と 4 ppm NO₂ の間欠暴露は、肺ミクロソームの異物代謝活性に対して相殺的に作用すると考えられる。

肝ミクロソームの異物代謝活性は、0.8 ppm O₃ の間欠暴露によって 1 日目で減少した後回復する。この異物代謝活性の減少は、4 ppm NO₂ の添加によってほとんど観察されなくなった。しかしながら、0.8 ppm O₃ と 4 ppm NO₂ の複合暴露で、アニリン水酸化及び 7-エトキシクマリン脱エチル化活性が 7 日目に減少し、*p*-ニトロアニソール脱メチル化活性が 7 日目に増加した後 14 日目に減少した。これらの結果は、肝ミクロソーム異物代謝活性に対する 0.8 ppm O₃ と 4 ppm NO₂ の複合効果は、暴露初期では O₃ の作用の軽減であるが、暴露後期に発現される可能性を示唆している。

Abstract

Male Jc1: Wistar rats were exposed to nitrogen dioxide (NO₂, 4.0 ± 0.08 ppm) and ozone (O₃, 0.4 ± 0.02 ppm and 0.8 ± 0.04 ppm) alone and in combination daily for 7 hours for 14 days to examine the effects of single and multiple gases on the microsomal xenobiotic-metabolizing systems of lung and liver.

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

In the lung, exposures to 0.8ppm O₃ increased benzo(a) pyrene hydroxylation and 7-ethoxycoumarin O-deethylation on the seventh and fourteenth days. Exposures to the mixture of 4ppm NO₂ and either 0.4 or 0.8ppm O₃ too increased the former activity, although the magnitude of the increase was reduced by combination of 4ppm NO₂ and 0.8ppm O₃. Moreover, 7-ethoxycoumarin O-deethylation was not altered by exposures to the mixture of NO₂ and O₃. Similarly, combination of NO₂ and O₃ suppressed the early effect of O₃ exposure on the xenobiotic-metabolizing activities of liver microsomes, which were decreased on the first day of exposure and then recovered. The effects of the mixture of NO₂ and O₃ developed in the latter phase of exposure period. Exposures to the mixture of 4ppm NO₂ and 0.8ppm O₃ caused decreases in aniline hydroxylation and 7-ethoxycoumarin O-deethylation on the seventh day and *p*-nitroanisole *N*-demethylation on the fourteenth day.

These results show that exposures to NO₂ and O₃ in combination suppress the effect of O₃ on the xenobiotic-metabolizing systems of lung and liver microsomes. It is, however, suggested that the effect of the mixture of NO₂ and O₃ develops in the latter phase of exposure period.

1 はじめに

二酸化窒素(NO₂)とオゾン(O₃)は、光化学スモッグに含まれる主要なオキシダントである。両ガスは、生体に対して酸化ストレスを引き起こすと考えられている¹⁾。大気中に存在する異物(化学物質)が呼吸によって吸入されると呼吸器において代謝されるが、特に脂溶性有機化合物の場合、ミクロソームに局在するチトクローム P-450依存性酸素添加酵素系(薬物代謝系)によって水溶性物質に変換され体外に排泄される²⁾。この酵素系はまた、化学物質をより毒性の強い物質に変換する場合もある。

これまでに、0.2~0.4ppm O₃ をラットに連続暴露すると肺ミクロソームの薬物代謝系と異物代謝活性が昂進することを報告してきた³⁾。同様の結果は、0.8ppm O₃ 間欠暴露によっても得られている⁴⁾。一方、0.4~4.0ppm NO₂ をラットに連続暴露した場合、肺及び肝臓のミクロソーム薬物代謝系は特異的に低下する^{5,6)}。この際、ある種の生体異物を代謝する活性も特異的に減少する³⁾。以上のように、臓器ミクロソーム薬物代謝系は、NO₂ や O₃ の暴露に対して鋭敏に反応する。したがって、NO₂ や O₃ を吸入した場合、臓器における異物代謝の修飾が考えられる。

本研究では、NO₂ と O₃ の複合間欠暴露によって肺及び肝臓の異物代謝活性が受ける影響を検索した。

2 方法

2.1 暴露条件及び試料の採集

Jc1: Wistar 系雄ラット(18~22週令)に4.0±0.08ppm NO₂ と0.4±0.02ppm 又は0.8±0.04ppm O₃ の複合ガスを、14日間間欠暴露(7 h/d)した⁷⁾。暴露期間中経時的にチャンバーよりラットを取り出し屠殺し心臓より0.95% NaCl 溶液を灌流して臓器から血液を除いた。肺及び肝臓を10mM トリ

ス緩衝液を含む0.15MKCl 溶液中でホモジナイズし Takahashi ら⁴⁾の方法によりミクロソーム画分を調製した。

2.2 ミクロソーム異物代謝活性の測定法

肺及び肝ミクロソームの異物代謝活性は、Takahashi ら⁴⁾の使用した方法で測定した。7-エトキシマリン-O-脱エチル化及びベンゾピレン水酸化活性の測定は、Aitio⁸⁾及び Dehnen ら⁹⁾の方法に準じて行った。アニリン水酸化と *p*-ニトロアニソール-O-脱メチル化の活性は、Litterest ら¹⁰⁾の方法で測定した。

肺及び肝ホモジネートの蛋白質量は、Lowry ら¹¹⁾の方法で定量した。

2.3 有意差検定法

対照群と暴露群との間の差の有意性は、分散の比を分析後 Student の *t* 又は Welch の *t* の検出法を用いて検定した。

3 結果

3.1 肺ミクロソームの異物代謝活性に及ぼす NO₂ と O₃ の影響

0.8ppm O₃ をラットに間欠暴露 (7 h/d) すると、1 日目にベンゾピレン水酸化活性が対照群の69%に低下した後、7 及び14日目には対照群の各々132%と160%に増加するが0.4ppm O₃ 暴露では有意な変化が認められなかった⁴⁾。表1に示したように、0.8ppm O₃ 暴露による本酵素活性の減少の度合いは、4 ppm NO₂ の添加によって増幅されることはなかった。また、0.8ppm O₃ 暴露7 及び14日

表 1 NO₂ と O₃ 暴露による肺ミクロソームのベンゾピレン水酸化酵素活性の変化

Table 1 Changes in the benzo (a) pyrene hydroxylase activity of lung microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure Time (days)					
	1		7		14	
		(%)		(%)		(%)
Control	1.04±0.31	(100)	0.91±0.18	(100)	1.04±0.16	(100)
4ppm NO ₂	0.67±0.25	(64)	1.09±0.33	(120)	0.97±0.31	(87)
Control	1.00±0.14	(100)	1.15±0.20	(100)	1.20±0.20	(100)
4ppm NO ₂	0.98±0.26	(93)	1.90±0.28***	(163)	1.32±0.28	(110)
+0.4ppm O ₃						
4ppm NO ₂	0.68±0.11**	(68)	1.20±0.15	(104)	1.56±0.20*	(130)
+0.8ppm O ₃						

Values are expressed as pmol/min per mg of homogenate protein.

p*<0.05, *p*<0.01, ****p*<0.001 (mean ± SD, *n* = 6).

目に観察された増加も、4 ppm NO₂ によって軽減した。一方、0.4 ppm O₃ と 4 ppm NO₂ 単独暴露 7 日目でベンゾピレン水酸化活性は増加傾向を示すに過ぎないが、両ガスの複合によって対照群の 163% ($p < 0.001$) と有意な増加を示した。

7-エトキシマリン脱エチル化活性は、0.8 ppm O₃ 暴露 7 日目に対照群の 140% に増加するが、4 ppm NO₂ との複合はむしろ減少の傾向をもたらした(表 2)。アミノピリン脱メチル化活性も同様の傾向を示した。

表 2 NO₂ と O₃ 暴露による肺ミクロソームの 7-エトキシマリン脱エチル化酵素活性の変化
Table 2 Changes in the 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity of lung microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure Time (days)					
	1		7		14	
		(%)		(%)		(%)
Control	28.4±6.5	(100)	27.4±7.1	(100)	28.7±8.0	(100)
4ppm NO ₂	27.3±4.5	(96)	26.4±3.0	(96)	40.1±9.3	(140)
Control	29.3±7.4	(100)	30.0±3.8	(100)	30.1±3.9	(100)
4ppm NO ₂	33.0±7.6	(113)	34.6±9.6	(115)	29.4±9.0	(98)
+0.4ppm O ₃						
4ppm NO ₂	23.2±5.0	(97)	25.0±3.5	(83)	32.0±11.3	(106)
+0.8ppm O ₃						

Values are expressed as pmol/min per mg of homogenate protein. (mean ± SD, n = 6).

3. 2 肝ミクロソーム異物代謝活性に及ぼす NO₂ と O₃ の影響

0.8 ppm O₃ 間欠暴露 1 日目に、肝ミクロソームのベンゾピレン水酸化、7-エトキシマリン脱エチル化及びアニリン水酸化の諸活性は、各々対照群の 64、73 及び 77% に低下するが、*p*-ニトロアニソール脱メチル化活性は変化しない⁴⁾。0.8 ppm O₃ と 4 ppm NO₂ 複合暴露 1 日目には、いずれの異物代謝活性も有意な変化を示さなかった(表 3 ~ 6)。0.8 ppm O₃ 暴露による肝ミクロソーム異物代謝活性への影響は、7 及び 14 日目には認められない。一方、0.8 ppm O₃ と 4 ppm NO₂ の複合暴露では、*p*-ニトロアニソール脱メチル化活性が 7 日目に対照群の 112% ($p < 0.05$) に増加した後、14 日目には対照群の 83% ($p < 0.05$) に減少した(表 3)。アニリン水酸化及び 7-エトキシマリン脱エチル化活性も、0.8 ppm O₃ と 4 ppm NO₂ の複合暴露 7 日目で、各々対照群の 82% ($p < 0.05$) と 85% ($p < 0.05$) に減少した(表 4, 5)。ベンゾピレン水酸化活性は、NO₂ と O₃ の複合暴露で有意な変化を示さなかった(表 6)。

表 3 NO₂ と O₃ 暴露による肝ミクロソームの *p*-ニトロアニソール N 脱メチル化酵素活性の変化

Table 3 Changes in the *p*-nitroanisole N-demethylase activity of liver microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure Time (days)					
	1		7		14	
		%		%		%
Control	310±21	(100)	322±23	(100)	317±18	(100)
4ppm NO ₂	326±45	(105)	306±21	(96)	311±17	(98)
Control	336±24	(100)	300±18	(100)	359±24	(100)
4ppm NO ₂	332±16	(98)	294±21	(99)	341±45	(94)
+0.4ppm O ₃						
4ppm NO ₂	313±42	(93)	336±26*	(112)	300±21*	(83)
+0.8ppm O ₃						

Values are expressed as pmol/min per mg of homogenate protein.

**p*<0.05 (mean ± SD, *n* = 6)

表 4 NO₂ と O₃ 暴露による肝ミクロソームのアニリン水酸化酵素活性の変化

Table 4 Changes in the aniline hydroxylase activity of liver microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure Time (days)					
	1		7		14	
		(%)		(%)		(%)
Control	70±8	(100)	63±12	(100)	69±10	(100)
4ppm NO ₂	68±8	(96)	65±13	(104)	59±8	(87)
Control	64±14	(100)	71±5	(100)	70±8	(100)
4ppm NO ₂	75±13	(117)	66±7	(93)	72±10	(102)
+0.4ppm O ₃						
4ppm NO ₂	67±13	(105)	58±6*	(82)	64±6	(92)
+0.8ppm O ₃						

Values are expressed as pmol/min per mg of homogenate protein.

**p*<0.05 (mean ± SD, *n* = 6).

4 考察

1 ppm 前後の O₃ を暴露すると、1 日以内に肺の薬物代謝系成分と異物代謝活性の減少することが、ハムスター、ラビットやラットで知られている¹²⁻¹⁴⁾。一方、0.8ppm O₃ の間欠暴露期間を延長すると、4 日目にラット肺の薬物代謝系成分が特異的に増加し、14 日目まで高い値を維持する⁴⁾。この際ベンゾピレン水酸化及び 7-エトキシマリン脱エチル化活性も増加する。0.4ppm O₃ の間欠暴露でも同様の傾向が観察されている。これに反して、1.2~4.0ppm NO₂ の連続暴露によって肺ミクロソームのチトクローム P-450 含量と 7-エトキシマリン脱エチル化活性は特異的に減少

表 5 NO₂ と O₃ 暴露による肝ミクロソームの7-エトキシマリン脱エチル化酵素活性の変化Table 5 Changes in the 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity of liver microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure Time (days)					
	1		7		14	
		(%)		(%)		(%)
Control	84±6	(100)	85±15	(100)	81±13	(100)
4ppm NO ₂	80±9	(95)	88±19	(102)	73±13	(91)
Control	73±19	(100)	70±7	(100)	79±20	(100)
4ppm NO ₂	76±14	(104)	63±12	(90)	71±18	(90)
+0.4ppm O ₃						
4ppm NO ₂	62±12	(85)	59±7*	(85)	67±12	(85)
+0.8ppm O ₃						

Values are expressed as pmol/min per mg of homogenate protein.

*p<0.05 (mean ± SD, n=6).

表 6 NO₂ と O₃ 暴露による肝ミクロソームのベンゾピレン水酸化酵素活性の変化Table 6 Changes in the benzo(a)pyrene hydroxylase activity of liver microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure Time (days)					
	1		7		14	
		(%)		(%)		(%)
Control	80±25	(100)	80±17	(100)	84±28	(100)
4ppm NO ₂	110±40	(136)	80±10	(104)	66±12	(77)
Control	80±18	(100)	84±13	(100)	87±28	(100)
4ppm NO ₂	78±15	(95)	67±13	(80)	87±23	(104)
+0.4ppm O ₃						
4ppm NO ₂	65±13	(81)	71±11	(86)	123±27	(141)
+0.8ppm O ₃						

Values are expressed as pmol/min per mg of homogenate protein(mean ± SD, n=6).

する³⁾。しかしながら、本研究の結果から明らかなように、4 ppm NO₂ の間欠暴露では14日間の暴露期間中肺ミクロソームの異物代謝活性は有意な変化を示さなかった。4 ppm NO₂ の添加は、0.8ppm O₃ による肺ミクロソーム異物代謝活性の増加を軽減させた(表1, 2)。したがって、0.8ppm O₃ と 4 ppm NO₂ は、肺ミクロソームの異物代謝活性に対して相殺的に作用すると考えられる。0.4ppm O₃ と 4 ppm NO₂ の複合暴露7日目でベンゾピレン水酸化活性が有意に増加したことは、低濃度ではO₃ の効果がNO₂ により増幅される可能性を示唆しているのかもしれない。

肝ミクロソームの薬物代謝系成分は、0.8ppm O₃ の間欠暴露によって1日目で減少した後、4日

目には対照群のレベルに回復し14日目まで対照群のレベルにとどまる⁴⁾。この際、異物代謝活性も同様の変化を示す。4 ppm NO₂ 間欠暴露は、14日間の暴露期間中肝ミクロソームの異物代謝活性に影響を及ぼさなかった(表3～6)。0.8ppm O₃ の間欠暴露1日目に観察される異物代謝活性の減少は、4 ppm NO₂ との複合によって軽減された(表4～6)。0.8ppm O₃ と4 ppm NO₂ の複合による異物代謝活性の減少は、むしろ7日目(表4, 5), 又は14日目(表3)に発現した。これらの結果は、肝ミクロソーム異物代謝活性に対する0.8ppm O₃ と4 ppm NO₂ の複合効果は、暴露初期ではNO₂ によるO₃ の作用の軽減であるが、暴露後期に両ガスによる低下作用が増幅(発現)される可能性を示唆している。

引用文献

- 1) Menzel, D. B. (1976): The role of free radicals in the toxicity of air pollutants. W. A. Pryor (ed.), *In: Free Radicals in Biology*, vol. II Academic Press, New York, 181-202.
- 2) Philpot, R. M., M. W. Anderson and T. E. Eling (1977): Uptake, accumulation and metabolism of chemicals by the lung. *In: Metabolic Function of the lung*. Y. S. Bakhle and J. R. Vane (ed.), Merckel Dekker, New York and Basel, 123-171.
- 3) Takahashi, Y. and T. Miura (1985): *In vivo* effects of nitrogen dioxide and ozone on xenobiotic metabolizing systems of rat lungs. *Toxicol. Lett.*, **26**, 145-152.
- 4) Takahashi, Y., T. Miura and K. Kubota (1985): *In vivo* effect of ozone inhalation on xenobiotic metabolism of lung and liver of rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 855-864.
- 5) Mochitate, K., K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, **33**, 17-28.
- 6) Takahashi, Y., K. Mochitate and T. Miura (1986): Subacute effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung, liver and kidney of rats. *Environ. Res.*, (in press).
- 7) 持立克身・高橋勇二・竹中参二・三浦 卓・河田明治・国本 学(1986): ラット臓器のエネルギー供給系に及ぼす二酸化窒素とオゾンの間欠複合暴露の影響. 国立公害研究所研究報告, 第101号, 117-127.
- 8) Aitio, A. (1978): A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal. Biochem.*, **85**, 488-491.
- 9) Dehnen, W., R. Tomingas and J. Roos (1973): A modified method of the assay of benzo(a)pyrene hydroxylase. *Anal. Biochem.*, **53**, 373-383.
- 10) Litterest, C. L., E. G., Mimnaugh, R. L. Reagan and T. E. Gram (1975): Comparison of *in vitro* drug metabolism by lung, liver and kidney of several common laboratory species. *Drug. Metabolism and Disposition*, **3**, 259-265.
- 11) Lowry, O. H., N. J., Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Rrandall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 12) Palmer, M. S., D. H. Swanson and D. L. Coffin (1971): Effect of ozone on benzpyrene hydroxylase activity in the Syrian golden hamster. *Cancer Res.*, **31**, 730-733.
- 13) Goldstein, B. D., S. Solomon, B. S. Pasternack and D. R. Bikers (1975): Decrease in rabbit lung microsomal cytochrome P-450 levels following ozone exposure. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **10**, 759-762.

高橋勇二ら

- 14) Montgomery, M. R. and D. E. Niewoehner (1979): Oxidant-induced alteration in pulmonary microsomal mixed-function oxidation: acute effects of paraquat and ozone. *J. Environ. Sci. Health*, **C13**, 205-219.

II-11 ラット臓器のミクロソーム電子伝達系に
 及ぼす二酸化窒素とオゾンの複合間欠暴露の影響
**Effects of Intermittent Exposures to Nitrogen Dioxide and Ozone Alone
and in Combination on the Microsomal Electron-Transport Systems
of Rat Tissues**

三浦 卓¹・高橋勇二¹・持立克身¹・彼谷邦光¹・国本 学¹

Takashi MIURA¹, Yuji TAKAHASHI¹, Katsumi MOCHITATE¹, Kunimitsu KAYA¹
and Manabu KUNIMOTO¹

要 旨

Jc1: Wistar 系の雄ラットに、4 ppm NO₂ と0.4又は0.8ppm O₃ の複合ガスを14日間間欠暴露 (7 h/d) し、肺、肝臓、腎臓のミクロソーム電子伝達系成分に対する NO₂ と O₃ の複合影響を検討した。NO₂ と O₃ の複合暴露は、肺、肝臓、腎臓のミクロソーム電子伝達系成分を変動させ、その作用は薬物代謝系成分、特にチトクローム P-450含量に特異性が高かった。

肺では、14日間の暴露期間中チトクローム P-450含量と NADPH-チトクローム P-450還元酵素活性が NO₂ 単独暴露で増加したが、増加の度合いは O₃ 単独暴露の場合よりも小さかった。しかしながら、NO₂ と O₃ の複合暴露14日目には、各ガス単独の場合よりも顕著な増加が認められた。また、肺蛋白質量は、複合暴露によって増加する期間が持続した。肝臓では、NO₂ と O₃ の単独暴露によってミクロソーム電子伝達系の各成分が暴露1日目に減少したが、複合暴露では低下効果が軽減された。しかしながら、NO₂ と O₃ の複合暴露14日目にチトクローム P-450含量の顕著な低下が認められた。腎ミクロソームの場合も同様に、NO₂ によるチトクローム P-450含量の減少が O₃ との複合により相殺された。

以上の結果から、NO₂ と O₃ の複合によって各ガス単独での臓器ミクロソーム電子伝達系成分への影響が軽減されることが明らかになった。また、NO₂ と O₃ の複合効果は、暴露後期に発現される可能性が示唆された。

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

Abstract

Male Jcl: Wistar rats were exposed to nitrogen dioxide (NO_2 , $4.0 \pm 0.08\text{ppm}$) and ozone (O_3 , $0.4 \pm 0.02\text{ppm}$ and $0.8 \pm 0.04\text{ppm}$) alone and in combination daily for 7 hours for 14 days to examine the effects of single and multiple gases on the microsomal electron-transport systems of lung, liver and kidney. Exposures to the mixture of NO_2 and O_3 caused alterations preferential for the drug-metabolizing systems, especially for the cytochrome P-450 level in all tissues examined.

In the lung, the cytochrome P-450 content and NADPH-cytochrome P-450 reductase activity were increased by exposures to 0.8ppm O_3 and 4ppm NO_2 alone. Exposures to the mixtures of 4ppm NO_2 and either 0.4 or 0.8ppm O_3 too increased these components over the entire period of exposures, although the magnitude of the increases was not necessarily augmented by combination of both gases. In addition, the activities of these enzymes became considerably higher in animals exposed to the mixture of the two than in those exposed to each individual gas on day 14. In the liver, all the components examined of the microsomal electron-transport systems decreased on the first day of exposures to 4ppm NO_2 and 0.8ppm O_3 alone. Combination of NO_2 and O_3 reduced the magnitude of the decrease in these components. On day 14, however, the cytochrome P-450 content was decreased again by exposures to the mixtures of 4ppm NO_2 and either 0.4 or 0.8ppm O_3 , whereas it remained within the control level upon exposures to each individual gas. In the kidney, the effects of exposures to 4ppm NO_2 and 0.8ppm O_3 alone on the microsomal drug-metabolizing systems were suppressed by combination of the two.

These results show that exposures to NO_2 and O_3 in combination reduce the effects of a single gas on the microsomal electron-transport systems. It is, however, suggested that the effects of exposures to the mixture of NO_2 and O_3 develop in the latter phase of exposure period.

1 はじめに

二酸化窒素(NO_2)とオゾン(O_3)は、大気中に存在する主要なオキシダントである。両ガスは、呼吸器に吸入されるとフリーラジカルを生じ酸化的に作用すると考えられている¹⁾。呼吸器のチトクローム P-450依存性酸素添加酵素系は、吸入された生体異物(化学物質)の代謝に重要な役割を果たしている²⁾。これまでに、 1ppm 前後の O_3 を実験動物に暴露すると、1日以内に肺のチトクローム P-450含量とある種の生体異物の代謝活性が減少すると報告されている³⁻⁵⁾。最近我々は、 0.8ppm O_3 をラットに間欠暴露すると4日目から肺の薬物代謝系成分と異物代謝活性が昂進することを報告した⁶⁾。一方、肺の薬物代謝系に及ぼす NO_2 の影響は必ずしも明確にされていない。Palmerら³⁾は、 $5\sim 50\text{ppm NO}_2$ をラットに3時間暴露しても肺の芳香族炭化水素水酸化活性は影響されないと報告している。HusainとDehnen⁷⁾は、 14.4ppm NO_2 をラットに7日間暴露すると、肺の芳香族炭化水素水酸化活性が増加することを示した。これまでに我々は、 $0.4\sim 4.0\text{ppm NO}_2$ をラットに暴露すると、肺及び肝臓の薬物代謝系成分が周期的に減少することを明らかにしてきた^{8,9)}。

このように肺ミクロソームの薬物代謝系成分に対して、 NO_2 と O_3 は相反する影響を及ぼし、肝ミクロソームの薬物代謝系成分に対しては共に低下効果を示す。また、腎ミクロソームの電子伝達

系成分は、1.2~4.0ppm NO₂ 亜急性暴露により顕著に昂進する⁹⁾。NO₂ と O₃ の生体影響に関する病理学的、生化学的研究の結果から、O₃ は NO₂ よりも 5~20倍毒性の高いことが知られている。そこで本研究では、4 ppm NO₂ に、0.4又は0.8ppm O₃ を添加して、ラットに間欠暴露し、臓器のミクロソーム電子伝達系成分に及ぼす NO₂ と O₃ の複合効果を明らかにすることを目的とした。本研究の結果から、NO₂ と O₃ の作用は、ミクロソーム薬物代謝系成分に特異性が高く、両ガスの複合は相殺的に作用するが、暴露後期に影響を発現することを明らかにした。

2 方法

2.1 暴露条件及び試料の採集

Jcl: Wistar 系雄ラット(13~26週令)を 4.0±0.08ppm NO₂, 0.4±0.02ppm 又は0.8±0.04ppm O₃ を単独又は複合で14日間暴露した。ガス暴露は午前 8時半から午後 4時半まで 1日 7時間行い、暴露時間中は餌を与えなかった。ガス停止後16時間目に一群 6匹のラットを屠殺し心臓より0.9% NaCl 溶液を灌流して臓器から血液を除いた。肺及び肝臓を 4倍容の10mM トリス緩衝液(pH 7.4)を含む0.15M KCl 溶液中でポッター型ホモジナイザーによってホモジナイズした。ミクロソーム画分は、肺、肝臓及び腎臓のホモジネートを10,000×g 15分間遠心し、遠心上清を105,000×g 60分間遠心して調製した。

2.2 酵素活性及びチトクローム含量の測定法

NADH-チトクローム b₅ 還元酵素及び NADPH-チトクローム P-450 還元酵素の両活性は Omura と Takesue らの方法¹⁰⁾により測定した。チトクローム b₅ とチトクローム P-450含量は Omura と Sato の方法¹¹⁾で測定し、分子吸光係数を各々185cm⁻¹mM⁻¹ 及び91cm⁻¹mM⁻¹ として含量を計算した。蛋白質は Lowry の方法¹²⁾により測定した。

3 結果

3.1 肺ミクロソームの電子伝達系に及ぼす NO₂ と O₃ の影響

表 1 に、NO₂ と O₃ の単独又は複合暴露が肺ホモジネートの蛋白質量に及ぼす影響を示した。14日間の暴露期間中、0.8ppm O₃ 暴露群で 4日目に有意に増加した後 7日目には対照群のレベルにまで低下し、以後の暴露期間中対照群のレベルにとどまった。0.8ppm O₃ + 4 ppm NO₂ 暴露群でも 4日目に蛋白質量が増加したが、0.8ppm O₃ 暴露群と異なり10日目まで有意に高い値を維持した。4 ppm NO₂ 又は0.4ppm O₃ + 4 ppm NO₂ 暴露群では有意な変化が認められなかった。肺ミクロソームの蛋白質量は、4 ppm NO₂ + 0.8ppm O₃ 暴露 4日目で対照群の136% (p<0.01)に増加した以外有意な変化を示さなかった。肺ミクロソームの電子伝達系成分の中では、チトクローム P-450含量の変動が最も顕著であった。表 2 に示したように、4 ppm NO₂ 暴露群では、4日目に対照群の138% (p<0.05)に増加した後 7日目には対照群のレベルにまで減少し、以後の暴露期間中対照群のレベル

表 1 NO₂ と O₃ 暴露による肺の蛋白質含量の変化

Table 1 Changes in the protein content of lungs during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)					
	1	4	7	10	14	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	8.9±0.5 (100)	8.4±0.6 (100)	9.5±0.5 (100)	10.6±0.9 (100)	11.2±0.6 (100)	
4.0 ppm NO ₂	9.5±1.0 (107)	8.8±0.7 (105)	9.6±0.9 (101)	10.4±0.5 (99)	11.0±0.9 (98)	
0.8 ppm O ₃	9.2±0.8 (104)	9.6±0.7* (114)	9.6±0.8 (101)	10.8±0.9 (103)	10.2±0.9 (91)	
Control	11.2±0.5 (100)	11.1±0.9 (100)	11.4±0.8 (100)	11.8±1.0 (100)	12.4±1.2 (100)	
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	11.3±0.4 (101)	11.5±0.7 (104)	12.2±0.9 (107)	13.0±0.7 (110)	12.7±0.5 (102)	
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	10.8±1.4 (97)	12.2±0.3* (111)	12.3±0.4* (108)	13.5±0.3** (115)	12.9±0.7 (104)	

Values are expressed as mg protein/ml of homogenate (mean ± SD, n = 6).

*p<0.05, **p<0.01.

表 2 NO₂ と O₃ 暴露による肺ミクロソームのチトクローム P-450含量の変化

Table 2 Changes in the cytochrome P-450 content of lung microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)					
	1	4	7	10	14	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	7.7±1.4 (100)	7.7±1.3 (100)	7.8±1.3 (100)	7.6±1.0 (100)	7.0±1.7 (100)	
4.0 ppm NO ₂	7.7±1.5 (100)	10.6±1.9* (138)	6.3±2.6 (81)	5.5±1.7 (86)	7.7±2.3 (111)	
0.8 ppm O ₃	5.3±1.1* (69)	16.5±1.1*** (215)	7.3±2.0 (94)	12.5±3.8* (193)	8.3±0.9 (118)	
Control	6.1±2.4 (100)	5.7±1.2 (100)	6.6±2.0 (100)	7.6±1.0 (100)	5.4±1.2 (100)	
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	7.2±2.2 (101)	8.2±2.5 (145)	8.1±1.0 (123)	8.6±3.8 (110)	10.1±2.7** (186)	
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	6.3±1.1 (97)	8.7±1.5** (154)	8.9±1.8 (135)	9.0±1.2 (115)	8.7±2.4* (160)	

Values are expressed as pmol/mg of homogenate protein (mean ± SD, n = 6).

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

にとどまった。一方、0.8ppm O₃ 暴露群では、1日目に対照群の69% (p<0.05) に低下するが、4日目及び10日目には、215% (p<0.001) 及び193% (p<0.05) にまで増加した。NO₂ と O₃ の複合暴露群では、1日目から14日目まで増加傾向を示し、0.4ppm O₃ は4 ppm NO₂ によるチトクローム P-450の増加を増幅させたが、0.8ppm O₃ による増加の度合いは4 ppm NO₂ によって軽減された。肺ミクロソームのNADPH-チトクローム P-450還元酵素活性も増加したが、増加の度合いは、チトクローム P-450より小さく14~22%であった(表3)。チトクローム P-450の場合と同様に、4 ppm NO₂ と0.4ppm O₃ の複合は活性増加を増幅させた。一方、NADH-チトクローム b₅ 還元酵素活性は、すべての暴露群において有意な変化を示さなかった(表4)。

表 3 NO₂ と O₃ 暴露による肺ミクロソームの NADPH-チトクローム P-450還元酵素活性の変化

Table 3 Changes in the NADPH-cytochrome P-450 reductase activity of lung microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)				
	1	4	7	10	14
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	7.3±0.7 (100)	6.5±0.7 (100)	7.0±0.5 (100)	6.4±0.9 (100)	6.1±0.7 (100)
4.0 ppm NO ₂	6.7±0.5 (91)	7.3±0.7 (111)	7.6±0.7 (108)	6.2±0.7 (97)	6.6±0.8 (107)
0.8 ppm O ₃	6.5±0.5 (89)	7.8±0.3** (119)	8.1±1.1 (116)	7.5±1.4 (118)	7.1±1.4* (115)
Control	5.7±0.4 (100)	6.1±0.6 (100)	5.6±0.5 (100)	5.5±0.6 (100)	5.9±0.4 (100)
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	6.5±0.6* (114)	6.3±0.2 (103)	6.4±0.7 (113)	5.9±0.4 (107)	6.8±0.6* (115)
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	5.6±0.7 (97)	6.6±0.3 (108)	6.2±0.2 (110)	6.0±0.6 (109)	7.1±0.6** (122)

Values are expressed as pmol/min per mg of homogenate protein (mean ± SD, n = 6).

*p<0.05, **p<0.01.

表 4 NO₂ と O₃ 暴露による肺ミクロソームの NADH-チトクローム b₅還元酵素活性の変化

Table 4 Changes in the NADH-cytochrome b₅ reductase activity of lung microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)				
	1	4	7	10	14
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	40.4±4.5 (100)	33.9±8.4 (100)	42.6±2.6 (100)	38.5±5.2 (100)	41.2±4.2 (100)
4.0 ppm NO ₂	39.3±4.6 (97)	40.2±4.2 (119)	45.0±6.7 (106)	41.2±4.5 (107)	37.3±5.0 (91)
0.8 ppm O ₃	37.2±4.2 (91)	40.0±2.5 (118)	48.9±6.2 (115)	41.5±7.7 (108)	38.4±2.1 (93)
Control	51.6±4.5 (100)	55.5±8.1 (100)	55.4±6.8 (100)	62.5±8.3 (100)	49.7±5.7 (100)
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	56.1±5.7 (109)	65.3±7.2 (118)	59.7±5.6 (108)	54.8±2.6 (88)	48.0±5.4 (97)
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	45.9±3.2* (89)	63.5±7.6 (114)	61.6±5.5 (111)	56.2±4.9 (90)	52.8±4.0 (106)

Values are expressed as nmol/min per mg of homogenate protein (mean ± SD, n = 6).

*p<0.05.

3.2 肝ミクロソームの電子伝達系に及ぼす NO₂ と O₃ の影響

0.8ppm O₃, 4 ppm NO₂, 並びに 4ppm NO₂ と 0.4又は0.8ppm O₃ の複合暴露は、14日間の暴露期間中、肝臓ホモジネート及びミクロソーム画分の蛋白質量に影響を及ぼさなかった。しかしながら、いずれの暴露群においてもチトクローム P-450含量の低下が認められた。0.8ppm O₃ 暴露は、1日目にチトクローム P-450含量を対照群の46% (p<0.01)にまで低下させた。4 ppm NO₂ 暴露の場合も、1日目に対照群の57% (p<0.01)に減少したが、4日目には対照群のレベルにまで回復し14日目まで対照群のレベルにとどまった(表5)。4 ppm NO₂ に0.4ppm又は0.8ppm O₃ を添加するといずれの場合も単独暴露によるチトクローム P-450含量の低下は軽減された。14日目に複合暴露にお

表 5 NO₂ と O₃ 暴露による肝ミクロソームのチトクローム P-450含量の変化
 Table 5 Changes in the cytochrome P-450 content of liver microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)					
	1	4	7	10	14	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	55 ± 11 (100)	53 ± 12 (100)	59 ± 10 (100)	50 ± 19 (100)	52 ± 10 (100)	
4.0 ppm NO ₂	32 ± 12** (57)	41 ± 11 (77)	57 ± 28 (96)	37 ± 18 (73)	44 ± 9 (101)	
0.8 ppm O ₃	26 ± 8** (46)	50 ± 11 (95)	58 ± 12 (98)	42 ± 17 (83)	52 ± 4 (101)	
Control	51 ± 4 (100)	50 ± 10 (100)	40 ± 13 (100)	42 ± 9 (100)	40 ± 9 (100)	
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	37 ± 11* (73)	61 ± 13 (122)	30 ± 9 (75)	38 ± 13 (90)	20 ± 6* (51)	
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	32 ± 5*** (62)	56 ± 15 (112)	33 ± 12 (111)	45 ± 14 (106)	20 ± 10* (49)	

Values are expressed as pmol/mg of homogenate protein (mean ± SD, n = 6).
 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

いて対照群の約半分にまで有意に低下したことは注目に値する。一方、NADPH-チトクローム P-450還元酵素活性は、0.8ppm O₃ 暴露1日目で対照群の59% (p<0.01) に低下した以外、有意な変化を示さなかった(表6)。

肝ミクロソームのチトクロームb₅含量も、NO₂ と O₃ の単独又は複合暴露により低下した(表7)。0.8ppm O₃ 暴露は、1及び10日目に対照群の67% (p<0.001) 及び81% (p<0.05) に減少させた。4 ppm NO₂ 暴露も同様に、チトクロームb₅含量を1日目に対照群の76% (p<0.05) に減少させた後、10日目にも有意に低下させた。しかしながら、NO₂ と O₃ の複合暴露は、各ガス単独でのチトクロームb₅含量を低下させる効果を軽減させた。有意な減少は、4 ppm NO₂ + 0.8ppm O₃ 暴露7日目で観察されたに過ぎなかった。NADH-チトクロームb₅還元酵素活性は、0.8ppm O₃ 暴露1及び4日目

表 6 NO₂ と O₃ 暴露による肝ミクロソームのNADPH-チトクローム P-450還元酵素活性の変化

Table 6 Changes in the NADPH-cytochrome P-450 reductase activity of liver microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)					
	1	4	7	10	14	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	19.5±4.1 (100)	25.6±3.0 (100)	19.7±3.2 (100)	26.0±3.4 (100)	22.4±4.0 (100)	
4.0 ppm NO ₂	15.2±2.7 (78)	26.4±1.4 (103)	22.1±4.4 (112)	21.5±3.5 (83)	21.6±2.6 (96)	
0.8 ppm O ₃	11.5±1.7** (59)	23.7±3.7 (93)	21.4±3.0 (108)	20.3±2.9 (78)	22.3±3.1 (99)	
Control	17.1±2.4 (100)	17.5±5.1 (100)	20.5±4.2 (100)	15.0±2.1 (100)	15.8±1.7 (100)	
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	17.6±3.0 (103)	20.6±5.8 (118)	22.1±4.6 (107)	17.4±2.4 (116)	16.3±1.9 (103)	
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	15.8±2.3 (92)	16.4±3.5 (94)	19.8±3.5 (97)	16.8±4.5 (112)	13.4±3.2 (85)	

Values are expressed as nmol/min per mg of homogenate protein (mean ± SD, n = 6).
 **p<0.01.

に対照群の54% ($p < 0.01$)及び78% ($p < 0.05$)に減少した(表8)。4 ppm NO₂暴露によっても1及び10日目に対照群の71% ($p < 0.05$)及び76% ($p < 0.05$)に減少した。しかしながら、NO₂とO₃の複合暴露では、14日間の暴露期間中有意な減少は観察されず、むしろ、0.4ppm O₃暴露群で10日目には対照群の134% ($p < 0.05$)にまで増加した。

表 7 NO₂とO₃暴露による肝ミクロソームのチトクローム b₅含量の変化
Table 7 Changes in the cytochrome b₅ content of liver microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)					
	1	4	7	10	14	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	58 ± 4 (100)	50 ± 4 (100)	53 ± 7 (100)	51 ± 5 (100)	46 ± 3 (100)	
4.0 ppm NO ₂	44 ± 5* (76)	51 ± 4 (100)	44 ± 12 (84)	41 ± 4* (80)	43 ± 5 (93)	
0.8 ppm O ₃	38 ± 3*** (67)	52 ± 6 (103)	41 ± 4 (78)	42 ± 5* (81)	43 ± 5 (94)	
Control	40 ± 5 (100)	44 ± 8 (100)	44 ± 4 (100)	42 ± 4 (100)	44 ± 2 (100)	
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	34 ± 7 (87)	65 ± 23 (150)	39 ± 5 (88)	46 ± 3 (112)	45 ± 3 (101)	
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	35 ± 4 (89)	55 ± 23 (128)	36 ± 5* (82)	40 ± 6 (96)	39 ± 7 (88)	

Values are expressed as pmol/mg of homogenate protein (mean ± SD, n = 6).
* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

表 8 NO₂とO₃暴露による肝ミクロソームのNADH-チトクローム b₅還元酵素活性の変化
Table 8 Changes in the NADH-cytochrome b₅ reductase activity of liver microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)					
	1	4	7	10	14	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	367 ± 53 (100)	316 ± 43 (100)	294 ± 54 (100)	277 ± 42 (100)	231 ± 40 (100)	
4.0 ppm NO ₂	260 ± 41* (71)	259 ± 46 (82)	275 ± 51 (94)	211 ± 21* (76)	232 ± 23 (100)	
0.8 ppm O ₃	197 ± 38** (54)	247 ± 29* (78)	277 ± 34 (94)	224 ± 38 (81)	252 ± 41 (109)	
Control	213 ± 40 (100)	267 ± 18 (100)	377 ± 82 (100)	242 ± 29 (100)	295 ± 35 (100)	
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	152 ± 31 (71)	270 ± 48 (101)	297 ± 31 (79)	324 ± 60* (134)	300 ± 16 (106)	
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	171 ± 32 (80)	273 ± 70 (114)	285 ± 38 (76)	248 ± 67 (103)	232 ± 34 (89)	

Values are expressed as nmol/min per mg of homogenate protein (mean ± SD, n = 6).
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3. 3 腎ミクロソームの電子伝達系に及ぼす NO₂ と O₃ の影響

腎臓のホモジネート及びミクロソーム画分の蛋白質量は、肝臓の場合と同様に、NO₂ と O₃ の単独又は複合暴露により影響されなかった。一方、ミクロソームのチトクローム P-450含量と NADPH-チトクローム P-450還元酵素活性は、有意な変動を示した(表 9, 10)。チトクローム P-450含量は、4 ppm NO₂ 暴露 1 日目で対照群の58% (p<0.05)に減少し、以後10日目まで、低下傾向を示した。4 ppm NO₂+0.4ppm O₃ 暴露では、チトクローム P-450含量と NADPH-チトクローム P-450還元酵素活性が暴露 1 日目に対照群の各々197% (p<0.05)と138% (p<0.01)に増加し、以後10日目まで経時的に低下した。腎ミクロソームのチトクローム b₅ 含量及び NADH-チトクローム b₅ 還元酵素活性はいずれの暴露群でも有意な変化を示さなかった。

表 9 NO₂ と O₃ 暴露による腎ミクロソームのチトクローム P-450含量の変化
Table 9 Changes in the cytochrome P-450 content of kidney microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)			
	1	4	7	10
	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	4.7±1.5 (100)	5.1±1.9 (100)	5.7±2.0 (100)	7.6±2.4 (100)
4.0 ppm NO ₂	2.7±0.9* (58)	2.7±0.7 (54)	3.8±1.3 (67)	6.4±2.9 (84)
0.8 ppm O ₃	6.7±3.1 (141)	3.6±1.5 (72)	4.8±2.7 (85)	10.7±4.1 (141)
Control	4.6±2.2 (100)	5.0±1.9 (100)	8.1±4.0 (100)	8.3±2.9 (100)
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	9.1±2.4* (197)	6.6±2.2 (132)	7.4±2.2 (94)	7.2±1.9 (87)
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	4.0±1.9 (87)	3.8±1.7 (77)	8.4±1.3 (104)	5.7±2.5 (69)

Values are expressed as µmol/mg of homogenate protein (mean ± SD, n = 6).

*p<0.05.

表 10 NO₂ と O₃ 暴露による腎ミクロソームの NADPH-チトクローム P-450還元酵素活性の変化

Table 10 Changes in the NADPH-cytochrome P-450 reductase activity of kidney microsomes during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)			
	1	4	7	10
	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	2.6±0.5 (100)	2.7±0.3 (100)	3.0±0.5 (100)	3.6±0.5 (100)
4.0 ppm NO ₂	2.5±0.4 (97)	2.9±0.7 (109)	3.2±0.5 (108)	3.3±0.6 (92)
0.8 ppm O ₃	3.3±0.7 (128)	2.6±0.2 (96)	3.1±0.5 (104)	4.6±0.3 (128)
Control	2.3±0.3 (100)	2.0±0.2 (100)	2.0±0.3 (100)	1.9±0.2 (100)
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	3.1±0.4** (128)	2.0±0.3 (105)	1.9±0.2 (91)	1.6±0.2 (84)
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	2.8±0.8 (123)	2.0±0.2 (100)	1.9±0.1 (91)	1.9±0.2 (97)

Values are expressed as nmol/min per mg of homogenate protein (mean ± SD, n = 6).

**p<0.01.

4 考察

ラットに NO_2 を連続暴露すると、肺及び肝ミクロソームの電子伝達系成分は周期的に減少する^{8,9)}。この減少は、チトクローム P-450 と NADPH-チトクローム P-450還元酵素よりなる薬物代謝系に特異性が高く、チトクローム P-450 が最も顕著な変化を示した。本研究の結果から、 NO_2 と O_3 の複合暴露によっても肺、肝臓、腎臓のミクロソーム電子伝達系成分中、チトクローム P-450 含量が最も顕著な変化を示すことが明らかになった。

肺ミクロソームのチトクローム P-450含量は、0.8ppm O_3 の間欠暴露1日目に減少した後、4日目までに増加し14日目まで高い値を維持する⁶⁾。この増加は、4 ppm NO_2 との複合によって軽減された(表2)。同様の NO_2 と O_3 の複合による相殺的な効果は、NADPH-チトクローム P-450還元酵素活性でも観察された(表3)。4 ppm NO_2 及び0.8ppm O_3 単独間欠暴露は、肝ミクロソーム電子伝達系成分を減少させるが、 NO_2 と O_3 の複合暴露は両ガス単独での低下効果を軽減させた(表5~8)。同様の相殺的な効果は、腎ミクロソームの薬物代謝系成分についても観察された(表9, 10)。したがって、 NO_2 と O_3 の単独暴露による臓器ミクロソーム電子伝達系成分への影響は、本研究で使用した濃度範囲では両ガスの複合により軽減されると結論づけられる。

肺の蛋白質含量は、0.8ppm O_3 単独暴露によって4日目に増加したが、 NO_2 と O_3 の複合暴露によって、その増加は10日目まで持続した(表1)。更に、肺ミクロソームのチトクローム P-450含量と NADPH-チトクローム P-450還元酵素活性は、 NO_2 と O_3 単独暴露では必ずしも有意な増加が認められない暴露14日目においても、 NO_2 と O_3 の複合暴露によって有意に増加した(表2, 3)。同様に、肝ミクロソームのチトクローム P-450含量も、 NO_2 と O_3 の複合暴露によって14日目に有意な変化を示した(表5)。これらの結果は、 NO_2 と O_3 の複合効果の一つが、影響の持続である可能性を示唆している。また、 NO_2 や O_3 暴露により周期的に変化する生体成分の場合、両ガスの複合効果は、変化の周期を短縮させることである可能性も考えられる。

1.2~4.0ppm NO_2 をラットに連続亜急性暴露すると、肝ミクロソームのチトクローム b_5 含量が持続的に低下する⁹⁾。本研究の結果から、4 ppm NO_2 と0.8ppm O_3 の単独間欠暴露によっても肝ミクロソームのチトクローム b_5 及びチトクローム P-450含量の低下することが明らかになった(表5, 7)。 NO_2 と O_3 は、生体に対して酸化ストレスをもたらすと考えられている。酸化ストレスによってヘムの生合成が低下するので、 NO_2 と O_3 は一義的にはチトクローム含量を低下させる作用を持つ可能性が考えられる。

引用文献

- 1) Menzel, D. B. (1976): The role of free radicals in the toxicity of air pollutants. *In*: Free Radicals in Biology, Vol. II, W. A. Pryor (ed.), Academic Press, New York, 181-202.
- 2) Philipot, R. M., M. W. Anderson T. E. Eing (1977): Uptake, accumulation and metabolism of chemicals by the Lung. *In*: Metabolic Function of the Lung, Y. S. Bakkhle and J. R. Vane (ed.), Marcel Dekker,

- New York and Basel. 123—171,
- 3) Palmer, M. S., D. H. Swanson and D. L. Coffin (1971): Effect of ozone on benzpyrene hydroxylase activity in the Syrian golden hamster. *Cancer Res.*, **31**, 730—733.
 - 4) Goldstein, B. D., S. Solomon, B. S. Pasternack and D. R. Bickers (1975): Decrease in rabbit lung microsomal cytochrome P-450 levels following ozone exposure. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **10**, 759—762.
 - 5) Montgomery, M. R. and D. E. Niewoehner (1979): Oxidant-induced alteration in pulmonary microsomal mixed-function oxidation: acute effects of paraquat and ozone. *J. Environ. Sci., Health*, **C13**, 205—219.
 - 6) Takahashi, Y., T. Miura and K. Kubota (1985): *In vivo* effect of ozone inhalation on xenobiotic metabolism of lung and liver of rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 855—864.
 - 7) Husain, M. M. and W. Dehnen (1978): Effect of NO₂ and SO₂ inhalation on benzo (a) pyrene metabolism in rat lung, *Arch. Toxicol.*, **40**, 207—210.
 - 8) Mochitate, K., K. Kaya T. Miura and K. Kubota (1984): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, **33**, 17—28.
 - 9) Takahashi, Y., K. Mochitate and T. Miura (1986): Subacute effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung, liver and kidney of rats. *Environ. Res.*, (in press).
 - 10) Omura, T. and S. Takesue (1970): New method for simultaneous purification of cytochrome b₅ and NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. *J. Biochem.*, **67**, 249—257.
 - 11) Omura, T. and R. Sato (1964): Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **339**, 2370—2378.
 - 12) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.

II-12 ラット臓器のエネルギー供給系に及ぼす
 二酸化窒素とオゾンの間欠複合暴露の影響
Effects of Intermittent Exposures to Nitrogen-Dioxide
and Ozone Alone and in Combination on the
Energy-Generating Systems of Rat Tissues

持立克身¹・高橋勇二¹・竹中参二^{1,2}・三浦 卓¹・河田明治¹・国本 学¹
Katsumi MOCHITATE¹, Yuji TAKAHASHI¹, Shinji TAKENAKA^{1,2}, Takashi MIURA¹,
Meiji KAWATA¹ and Manabu KUNIMOTO¹

要 旨

Jcl: Wistar 系の雄ラットに、4 ppm NO₂ と 0.4 ppm 又は 0.8 ppm O₃ の単独及び複合ガスを14日間間欠暴露 (7h/d) し、肺、肝臓、腎臓のエネルギー産生系に対するNO₂ と O₃ の単独及び複合暴露の影響を検討した。また、0.8 ppm O₃ 間欠暴露による肺の病理学的変化も検討した。

生体内における主要なエネルギー産生系であるミトコンドリア呼吸系に及ぼすNO₂ と O₃ の影響を検索するために、肺、肝臓及び腎臓のコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性を測定した。4 ppm NO₂ と 0.8 ppm O₃ の単独暴露では、暴露期間中いずれの臓器においても有意な活性変化はほとんど認められなかった。しかしながら、4 ppm NO₂+0.8 ppm O₃ 暴露群は、肺において1日目に、肝臓において1, 7, 14日目に有意に減少した。後者の場合、4 ppm+0.4 ppm O₃ によっても14日目に有意に減少した。一方、腎臓のコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性は、0.8 ppm O₃ 暴露により10日目に有意に増加したが、4 ppm NO₂+0.8 ppm O₃ 及び 4 ppm NO₂+0.4 ppm O₃ 暴露により各々14日目及び7日目に有意な減少を示した。これらの結果は、NO₂ と O₃ の複合暴露が、ミトコンドリアのコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性を相加的に低下させる可能性を示唆している。

肺における主要なエネルギー産生系は解糖系である。解糖系の律速段階を触媒している肺のピルビン酸キナーゼ (PK) 活性は、0.8 ppm O₃ 単独及び 4 ppm NO₂ との複合暴露14日目に同程度の有意な増加を示した。また、4 ppm NO₂ 及び 0.8 ppm O₃ の単独暴露は、

-
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
Basic Medical Sciences Division, the National Institute for Environmental Studies, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.
 2. Present address: Fraunhofer Institute für Toxikologie und Aerosol forschung, Nikolai-Fuchs-Strasse 1, D-3000 Hannover 61, F. R. G.

肺のグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) 活性を増加させ、4 ppm NO₂ と 0.4 ppm 又は 0.8 ppm O₃ の複合暴露も同程度に活性を増加させた。したがって、NO₂ と O₃ の複合暴露は、肺の PK 及び G6PDH 活性を増加させるが、複合による効果を示さなかった。

0.8 ppm O₃ を間欠暴露したラット肺では、1 日目に肺胞壁細胞の変性脱落が観察された。暴露 14 日目には、肺胞壁の肥厚が認められた。この肥厚は、間質中の膠原線維の増加と肺胞壁細胞の増殖によると考えられた。

Abstract

Male Jcl: Wistar rats were exposed to nitrogen dioxide (NO₂, 4.0 ± 0.08 ppm) and ozone (O₃, 0.4 ± 0.02 ppm and 0.8 ± 0.04 ppm) alone and in combination daily 7 hours for 14 days to examine the effects of single and multiple gases on the energy-generating systems of lung, liver and kidney. In addition, pathological examination was performed on the lung exposed to 0.8 ppm O₃.

The succinate-cytochrome *c* reductase activity, a limiting-step of the mitochondrial respiratory system of lung, liver and kidney was not altered significantly by exposures to a single gas. However, exposures to the mixture of 4 ppm NO₂ and 0.8 ppm O₃ decreased this enzyme activity on the first day in the lung and on the first, seventh and fourteenth days in the liver. Similarly, exposures to mixed gases reduced the succinate-cytochrome *c* reductase activity of the kidney. These results show that the effect of each individual gas is augmented by combination of the two in lung and liver.

The activities of pyruvate kinase, a limiting-step of the glycolytic pathway, and glucose-6-phosphate dehydrogenase of the lung increased during exposures to 4 ppm NO₂ and 0.8 ppm O₃ alone. Combination of NO₂ and O₃ also increased these activities, although the magnitude of the increases was not augmented.

Exposures to 0.8 ppm O₃ resulted in necrotic response of alveolar walls on the first day. On day 14, however, the alveolar walls were thickened owing to the increase of collagen fibers and alveolar wall cells.

1 はじめに

二酸化窒素 (NO₂) とオゾン (O₃) は、大気中に存在する主要なオキシダントである。両ガスは、呼吸器に吸入されるとフリーラジカルを生じ生体成分に対して酸化的に作用すると考えられている¹⁾。これまで比較的高濃度の NO₂ 及び O₃ 単独暴露による呼吸器の病理学的、生化学的变化について、多くの報告がなされてきた。

NO₂ 及び O₃ の連続暴露による病理学的変化としては、第一次標的臓器である肺において I 型肺胞上皮細胞が傷害を受け、その後 II 型上皮細胞が増殖、分化して傷害が修復されることが知られている²⁻⁸⁾。また、生化学的变化としては、過酸化物代謝系の酵素活性は初期に減少するがその後増加することが知られている^{9,10)}。これらの病理学的、生化学的变化は、酸化性ガスに対する呼吸器系の適応反応と考えられている。

我々は、これまでに 0.4~10 ppm NO₂ の連続急性、亜急性暴露及び 0.2~0.4 ppm O₃ の連続急性暴露による生化学的影響を検討してきた¹¹⁻¹⁵⁾。その結果、両ガスは、第一次標的臓器である肺の

エネルギー産生系と薬物代謝系に影響を及ぼすのみならず、肝臓及び腎臓の薬物代謝系にも影響を及ぼすことが明らかになった。

本研究では、NO₂ と O₃ の単独及び複合での間欠暴露を行い、エネルギー供給系に及ぼす影響について検討した。また、O₃ 単独暴露による肺の病理学的検討も行った。

2 方法

2.1 暴露条件及び試料の採取

Jc1: Wistar 系ラット (18~22週令) に、 4.0 ± 0.08 ppm NO₂ 及び 0.4 ± 0.02 ppm 又は 0.8 ± 0.04 ppm O₃ を単独または複合で14日間間欠暴露した。ガス暴露は、午前9時から午後4時まで1日7時間行い、ガス暴露時間中は餌を与えなかった。チャンバーからのラットの取り出しは、ガス停止後翌朝9時に行った。一群6匹のラットを屠殺し心臓より0.95% NaCl 溶液を灌流して臓器から血液を除いた。肺、肝臓及び腎臓を10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) を含む0.15M KCl 溶液中でポッター型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。このホモジネートを用いてミトコンドリアのコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性を測定した。また、肺ホモジネートを105,000×g 60分遠心し得られた上清画分を用いて可溶性酵素活性を測定した。

2.2 酵素活性の測定

コハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性は、Sottocasa ら¹⁶⁾の方法により測定した。細胞分画法により調製したミトコンドリア画分とホモジネートの本酵素活性を比較した結果、調製したミトコンドリア画分では回収率が著しく低下するので、本研究ではホモジネートを用いてコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性を測定した。

ピルビン酸キナーゼ (PK) 及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) の活性は、各々 Staal¹⁷⁾ 及び Bergmeyer ら¹⁸⁾の方法に従い、Mochitate ら¹³⁾に記した変法で測定した。

肺ホモジネート及び上清画分の蛋白質量は、Lowry ら¹⁹⁾の方法で定量した。

2.3 肺の形態学的観察

肺の形態学的観察に当たっては、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。気管から20cm 水柱圧で、氷冷2.5%グルタールアルデヒド固定液/0.18M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4, 浸透圧330mOsm) を気管から注入した。

再拡張固定した肺から切片を採取し、顕微鏡用試料とした。顕微鏡観察には、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いた。

2.4 有意差の検定

対照群と暴露群の間の有意差は、分散の比を分析後、Student の *t* 検定又は Welch の *t* 検定法で調べた。

3 結果

3.1 肺, 肝臓, 腎臓のコハク酸-チトクローム *c*還元酵素活性に及ぼす NO₂ と O₃ の影響

生体内における主要なエネルギー産生系は, ミトコンドリアに局在する呼吸系である。コハク酸-チトクローム *c*還元酵素は, 呼吸系の律速段階となっている。そこで, NO₂ と O₃ の単独及び複合での臓器エネルギー産生系への影響を検索するために, 肺, 肝臓, 腎臓のコハク酸-チトクローム *c*還元酵素活性を測定した。表 1 に, 肺のコハク酸-チトクローム *c*還元酵素活性の変化を示した。4 ppm NO₂ と 0.8 ppm O₃ の単独暴露では, 有意な活性変化は認められなかったが, 1 日目に減少傾向を示した。次いで O₃ 暴露では 7 及び 14 日目に増加する傾向が観察された。4 ppm NO₂ + 0.8 ppm O₃ 暴露群では, 1 日目に对照群の 76% ($p < 0.05$) に減少した後 10 日目には对照群のレベルに回

表 1 NO₂ 及び O₃ 暴露による肺のコハク酸-チトクローム *c*還元酵素活性の変化
Table 1 Changes in the succinate-cytochrome *c* reductase activity of lung during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)				
	1	4	7	10	14
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	3.0±0.4 (100)	3.1±0.5 (100)	3.2±0.5 (100)	3.1±0.5 (100)	3.2±0.4 (100)
4.0 ppm NO ₂	2.5±0.2 (85)	2.6±0.3 (85)	3.1±0.3 (96)	3.1±0.2 (103)	3.4±0.6 (105)
0.8 ppm O ₃	2.5±0.3 (85)	3.1±0.2 (100)	3.6±0.2 (111)	2.8±0.2 (93)	3.7±0.4 (115)
Control	3.0±0.4 (100)	3.0±0.4 (100)	3.0±0.4 (100)	3.0±0.4 (100)	2.9±0.3 (100)
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	2.9±0.3 (97)	2.8±0.2 (89)	2.9±0.3 (97)	2.8±0.3 (93)	2.7±0.2 (93)
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	2.0±0.2* (76)	2.8±0.3 (94)	2.7±0.3 (90)	3.1±0.4 (103)	3.0±0.5 (102)

Values are expressed as nmol/min per mg of homogenate protein (mean ± SD, $n = 6$).

* $p < 0.05$.

表 2 NO₂ 及び O₃ 暴露による肝臓のコハク酸-チトクローム *c*還元酵素活性の変化
Table 2 Changes in the succinate-cytochrome *c* reductase activity of liver during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)				
	1	4	7	10	14
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	227 ± 12 (100)	235 ± 15 (100)	280 ± 50 (100)	236 ± 31 (100)	230 ± 17 (100)
4.0 ppm NO ₂	206 ± 31 (91)	234 ± 20 (100)	255 ± 22 (91)	206 ± 20 (87)	224 ± 16 (98)
0.8 ppm O ₃	195 ± 30 (86)	208 ± 22 (88)	258 ± 14 (92)	225 ± 19 (95)	223 ± 14 (97)
Control	228 ± 25 (100)	250 ± 20 (100)	270 ± 24 (100)	226 ± 16 (100)	226 ± 16 (100)
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	253 ± 12 (110)	216 ± 25 (88)	230 ± 24 (85)	233 ± 20 (103)	197 ± 13* (87)
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	228 ± 26 (100)	176 ± 21* (71)	207 ± 32* (77)	233 ± 35 (103)	190 ± 23* (84)

Values are expressed as nmol/min per mg of homogenate protein (mean ± SD, $n = 6$).

* $p < 0.05$.

復した。

肝臓のコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性は、NO₂ 及び O₃ の単独暴露により共に減少する傾向を示し複合暴露により有意に減少した(表 2)。4 ppm NO₂+0.8 ppm O₃ 暴露群では、4, 7, 14 日目に対照群の各々 71% ($p < 0.05$), 77% ($p < 0.05$), 84% ($p < 0.05$) に減少した。4 ppm NO₂ + 0.4 ppm O₃ 暴露群でも 14 日目に対照群の 87% ($p < 0.05$) に減少した。

腎臓のコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性は、0.8 ppm O₃ 単独暴露では増加傾向を示し、10 日目には対照群の 123% ($p < 0.05$) に増加した(表 3)。しかしながら 0.8 ppm O₃ に 4 ppm NO₂ を添加した複合暴露群では O₃ による増加効果は認められなくなり、14 日目には対照群の 75% ($p < 0.05$) に減少した。4 ppm NO₂+0.4 ppm O₃ 暴露群でも 7 日目に対照群の 82% ($p < 0.05$) に減少した。

表 3 NO₂ 及び O₃ 暴露による腎臓のコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性の変化
Table 3 Changes in the succinate-cytochrome *c* reductase activity of kidney during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)				
	1	4	7	10	14
		(%)	(%)	(%)	(%)
Control	156 ± 21 (100)	138 ± 11 (100)	123 ± 23 (100)	127 ± 11 (100)	164 ± 10 (100)
4.0 ppm NO ₂	166 ± 17 (107)	136 ± 16 (98)	116 ± 13 (94)	141 ± 19 (111)	161 ± 20 (98)
0.8 ppm O ₃	166 ± 15 (106)	151 ± 20 (110)	116 ± 7 (94)	156 ± 16* (123)	181 ± 29 (113)
Control	148 ± 12 (100)	139 ± 17 (100)	133 ± 12 (100)	145 ± 20 (100)	177 ± 23 (100)
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	152 ± 13 (102)	152 ± 18 (109)	110 ± 10* (82)	123 ± 22 (85)	167 ± 32 (84)
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	153 ± 13 (103)	112 ± 24 (81)	122 ± 16 (92)	138 ± 23 (96)	132 ± 20* (75)

Values are expressed as nmol/min per mg of homogenate protein (mean ± SD, $n = 6$).

* $p < 0.05$.

3. 2 肺の解糖系酵素活性に及ぼす NO₂ と O₃ の影響

肺におけるエネルギー産生は主に解糖系で行われている。これまでに著者らは 2~10 ppm NO₂ をラットに連続暴露し、肺の解糖系酵素活性とグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)活性が増加することを明らかにしてきた¹³⁾。解糖系酵素の中ではピルビン酸キナーゼ(PK)が最も顕著な増加を示した。本研究では、NO₂ と O₃ の間欠暴露が肺の解糖系に及ぼす影響を肺可溶性画分の PK 活性を測定することによって検討した。

表 4 に、4 ppm NO₂ と 0.4 ppm 又は 0.8 ppm O₃ の単独及び複合暴露が肺可溶性画分の蛋白質質量に及ぼす影響を示した。0.8 ppm O₃ 暴露群では 7 日目に対照群の 119% と増加傾向を示した。0.8 ppm O₃ に 4 ppm NO₂ を添加した複合暴露群では、暴露 1 日目で対照群の 122% ($p < 0.05$) に増加したがその後対照群のレベルに戻った。その他の暴露群では、ほとんど変化しなかった。

表 5 に示したように、肺可溶性画分の PK 活性は、4 ppm NO₂ 暴露群では有意な変化を示さなかつ

表 4 NO₂ 及び O₃ 暴露による肺上清中の淡白量の変化Table 4 Changes in the supernatant protein of lung during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)		
	1	7	14
	(%)	(%)	(%)
Control	38 ± 6 (100)	44 ± 4 (100)	46 ± 3 (100)
4.0 ppm NO ₂	37 ± 2 (98)	45 ± 1 (103)	48 ± 2 (105)
0.8 ppm O ₃	41 ± 2 (109)	52 ± 6 (119)	46 ± 2 (100)
Control	47 ± 3 (100)	46 ± 2 (100)	46 ± 4 (100)
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	43 ± 3 (92)	49 ± 4 (107)	44 ± 4 (95)
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	58 ± 7* (122)	49 ± 2 (105)	48 ± 3 (103)

Values are expressed as mg protein/lung supernatant (mean ± SD, n = 6).

*p < 0.05.

表 5 NO₂ 及び O₃ 暴露による肺のピルビン酸キナーゼ活性の変化Table 5 Changes in the pyruvate kinase activity of lung during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)		
	1	7	14
	(%)	(%)	(%)
Control	2120 ± 130 (100)	1840 ± 50 (100)	1880 ± 80 (100)
4.0 ppm NO ₂	2110 ± 170 (100)	1890 ± 90 (103)	1890 ± 110 (101)
0.8 ppm O ₃	1980 ± 50 (93)	1680 ± 120* (91)	2110 ± 50*** (112)
Control	1810 ± 20 (100)	1960 ± 60 (100)	1950 ± 110 (100)
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	1880 ± 70 (104)	1940 ± 40 (99)	1980 ± 60 (102)
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	1730 ± 240 (96)	1970 ± 40 (101)	2250 ± 110* (115)

Values are expressed as nmol/min/g supernatant protein (mean ± SD, n = 6).

*p < 0.05, ***p < 0.001.

た。0.8 ppm O₃ 暴露では7日目に对照群の91% (p < 0.05) に減少したが、14日目には对照群の112% (p < 0.001) に増加した。また、0.8 ppm O₃ + 4 ppm NO₂ 暴露群でも、14日目に对照群の115% (p < 0.05) に増加した。

G6PDH は、核酸合成系の第一段階を触媒すると共に、臓器における主要な NADPH 産生系である。NADPH は、過酸化物代謝系に電子を供与する還元型グルタチオンの生成に必須である。本酵素活性は、4 ppm NO₂ の単独暴露では1日目及び7日目に各々对照群の118% (p < 0.05) 及び110% (p < 0.01) に増加した(表6)。0.8 ppm O₃ 暴露では、1日目及び14日目に各々对照群の115% (p < 0.05) 及び114% (p < 0.01) に増加した。NO₂ と O₃ の複合暴露もまた G6PDH 活性を増加させた。4 ppm NO₂ と 0.4 ppm O₃ 複合暴露では1日目及び7日目に各々对照群の109% (p < 0.01) 及び108% (p < 0.05) に増加した。4 ppm NO₂ と 0.8 ppm O₃ 複合暴露では7日目及び14日目に各々对照群の118% (p < 0.001) 及び112% (p < 0.01) に増加した。

表 6 NO₂ 及び O₃ 暴露による肺のグルコース-6-リン酸脱水素酵素活性の変化
 Table 6 Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of lung during exposures to NO₂ and O₃

	Exposure time (days)		
	1	7	14
	(%)	(%)	(%)
Control	104 ± 13 (100)	104 ± 4 (100)	107 ± 6 (100)
4.0 ppm NO ₂	123 ± 5* (118)	114 ± 5** (110)	110 ± 5 (103)
0.8 ppm O ₃	120 ± 4* (115)	102 ± 8 (98)	122 ± 5** (114)
Control	101 ± 3 (100)	105 ± 4 (108)	111 ± 6 (100)
4.0 ppm NO ₂ +0.4 ppm O ₃	110 ± 4** (109)	113 ± 5* (108)	112 ± 4 (101)
4.0 ppm NO ₂ +0.8 ppm O ₃	101 ± 1 (100)	124 ± 7*** (118)	124 ± 4** (112)

Values are expressed as nmol/min/g supernatant protein (mean ± SD, n = 6).

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

3.3 O₃ 間欠暴露による肺の形態学的変化

0.8 ppm O₃ の7時間暴露によって、肺胞壁細胞の変性脱落が観察された(図1, 2)。暴露4日目には、軽度ながら限局性の肺胞壁肥厚が認められた。さらに肺胞マクロファージの増数も観察された(図3)。

図4に、暴露14日目における細気管支及び肺胞像を示した。この時点では、明らかに肺胞壁の肥厚が見いだされた。この肥厚は、間質中の膠原線維増加及び肺胞壁細胞の増殖に因っていた(図5)。また、軽度の限局性細気管支-肺胞部増殖も観察された(図6)。

4 考察

肺胞壁表面を覆っているI型肺胞上皮細胞は、O₃ や NO₂ 暴露に対してとりわけ感受性が高い²⁰⁾。Stephens ら²⁰⁾ は、0.5 ppm O₃ を2~6時間暴露するとI型肺胞上皮細胞が重篤な傷害を受けると報告している。本研究においても、0.8 ppm O₃ 7時間暴露後17時間目において、肺胞上皮細胞の変性脱落が顕著に観察された(図1~3)。0.8 ppm O₃ 暴露では、12時間目に肺胞上皮細胞の壊死が最大となることが知られている⁸⁾。そして、肺胞I型上皮細胞が変性脱落すると、肺胞II型上皮細胞が増殖しI型細胞に分化すると考えられている^{6,8)}。しかしながら、O₃ 暴露によって増殖する肺胞II型上皮細胞は、180日間の暴露によっても完全にI型細胞へ分化することではなく、代謝的に活性な中間型細胞として止まっている²¹⁾。これまでに著者らは、2~10 ppm NO₂ をラットに連続暴露すると肺の解糖系酵素活性が増加すること、この増加は肺胞上皮の増殖と一致することを報告してきた¹³⁾。本研究に用いた4 ppm NO₂ の間欠暴露によっても、解糖系酵素活性の昂進が認められないが、0.8 ppm O₃ 暴露14日目には有意に増加した。この時点で、肺胞壁の肥厚が観察され特に間質の肥大が顕著であった(図4~6)。10 ppm 前後のNO₂ 連続急性暴露の場合、このような病変

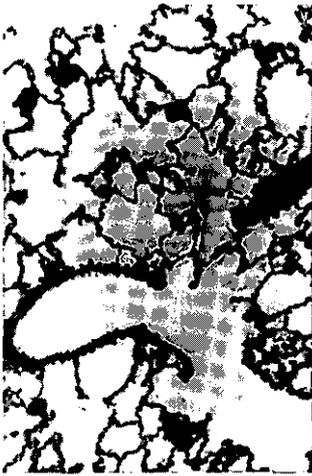


図 1 0.8 ppm O₃ 暴露 1 日目のラット肺：肺胞壁細胞の変性脱落

Fig. 1 Lung of a rat exposed to 0.8 ppm O₃ for one day

Degenerative and desquamative changes of alveolar wall cells (Hematoxylin-Eosin, × 82).

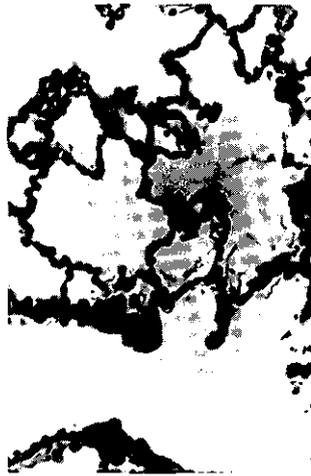


図 2 図 1 の強拡大像

Fig. 2 Higher magnification of Fig. 1. (H-E, × 164)

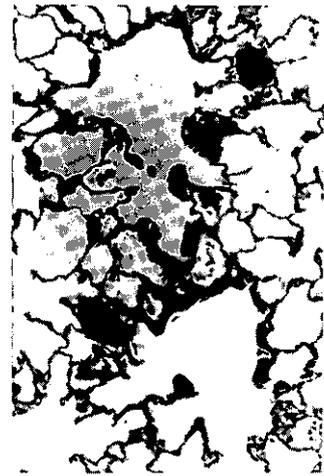


図 3 0.8 ppm O₃ 暴露 4 日目のラット肺：軽度の限局性肺胞壁肥厚及び軽度の肺胞マクロファージの増数

Fig. 3 Lung of a rat exposed to 0.8 ppm O₃ for 4 days

Slight, focal thickening of alveolar walls; slight increase of alveolar macrophages (H-E, × 82).

は必ずしも観察されず、O₃ 暴露による病理学的変化とはこの点で異なる。0.8 ppm O₃ 暴露による PK 活性の増加は、少なくとも一部は肺胞壁における細胞の肥大もしくは増殖を反映していると考えられる。0.8 ppm O₃ に 4 ppm NO₂ を添加すると、暴露 1 日目から肺の全 PK 活性が増加し、14 日目では比活性も有意に増加した(表 5)。しかし、活性増加の度合いは NO₂ 添加によりほとんど影響されなかった。

肺の G6PDH は、4 ppm NO₂ 及び 0.8 ppm O₃ の単独暴露で 1 日目から有意に増加した(表 6)。NO₂ や O₃ 暴露による肺の G6PDH 活性の増加については多くの報告がなされており^{9, 10, 13, 22}、酸化刺激に対する肺の適応反応と理解されている。NO₂ と O₃ は共に酸化的ガスであるが、4 ppm NO₂ に 0.8 ppm O₃ を添加しても G6PDH の比活性増加の度合いはほとんど変わらなかった(14 日目)。また 0.4 ppm O₃ の添加は 4 ppm NO₂ による活性増加の度合いを軽減させた(表 6, 1 日目)。

ミトコンドリア呼吸系の律速段階となっているコハク酸-チトクローム c 還元酵素活性は、肺の場合 NO₂ 及び O₃ の単独初期で減少傾向を示した(表 1)。更に 4 ppm NO₂ と 0.8 ppm O₃ の複合暴



図 4 0.8 ppm O₃ 暴露14日目のラット肺：中程度の限局性肺胞壁肥厚

Fig. 4 Lung of rat exposed to 0.8 ppm O₃ for 14 days

Moderate thickening of alveolar walls (H-E, × 82).



図 5 図4の強拡大像
Fig. 5 Higher magnification of Fig. 4 (H-E, × 164)



図 6 0.8 ppm O₃ 暴露14日目のラット肺：細気管支-肺胞部の増殖性変化

Fig. 6 Lung of a rat exposed to 0.8 ppm O₃ for 14 days

Slight, focal bronchiolo-alveolar hyperplasia (bronchiolization), (H-E, × 164).

露によって、本酵素活性は有意な低下を示した。また、肝臓のコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性も、NO₂ 及び O₃ の単独暴露によって減少傾向を示し、両ガスの複合は本酵素活性の有意な減少をもたらした(表2)。これらの結果は、肺及び肝臓のコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性に対して NO₂ と O₃ は相加的な低下効果を示す可能性を示唆している。一方、腎臓のコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素は、NO₂ 及び O₃ の単独暴露によって活性増加を示したが、両ガスの複合は有意な低下効果を示した(表3)。

したがって、4 ppm NO₂ と 0.8 ppm O₃ の間欠複合暴露は、単独暴露に比して、ミトコンドリアのコハク酸-チトクローム *c* 還元酵素活性の低下すなわち、ATP 産生の低下をもたらすと考えられる。また、肺のビルビン酸キナーゼ及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素活性は複合暴露による比活性の増大を示さなかった。なお、4 ppm NO₂ 連続暴露で観察された PK 活性の増加が、今回の間欠暴露で認められなかったのは、暴露時間が約1/3に短縮されたためと考えられる。

引用文献

- 1) Menzel, D. B. (1976): The role of free radicals in the toxicity of air pollutants. *In: Free Radicals in Biology*, Pryor, W. A. (ed.), Vol. II, Academic Press, New York, 181-202.
- 2) Stephens, R. J., G. Freeman and M. J. Evans (1972): Early response of lungs to low levels of nitrogen dioxide. *Arch. Environ. Health*, **24**, 160-179.
- 3) Parkinson, D. R. and R. J. Stephens (1973): Morphological surface changes in the terminal bronchiolar region of NO₂-exposed rat lung. *Environ. Res.*, **6**, 37-51.
- 4) Evans, M. J., R. J. Stephens, L. J. Cabral and G. Freeman (1972): Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of NO₂. *Arch. Environ. Health*, **24**, 180-188.
- 5) Evans, M. J., L. J. Cabral, R. J. Stephens and G. Freeman (1973): Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. *Am. J. Pathol.*, **70**, 175-198.
- 6) Cabral-Anderson, L. J., M. J. Evans and G. Freeman (1977): Effects of NO₂ on the lungs of ageing rats. I. Morphology. *Exp. Mol. Pathol.*, **27**, 353-365.
- 7) Evans, M. J., N. P. Dekker, L. J. Cabral-Anderson and G. Freeman (1978): Quantitation of damage to the alveolar epithelium by means of Type 2 cell proliferation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **118**, 787-790.
- 8) Castleman, W. L., D. L. Dungworth, L. W. Schwartz and W. S. Tyler (1980): Acute respiratory bronchiolitis: An ultrastructural and autoradiographic study of epithelial cell injury and renewal in rhesus monkeys exposed to ozone. *Am. J. Pathol.*, **98**, 811-840.
- 9) Chow, C. K., C. J. Dillard and A. L. Tappel (1974): Glutathione peroxidase system and lysozyme in rats exposed to ozone and nitrogen dioxide. *Environ. Res.*, **7**, 311-319.
- 10) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the protective system in rat lungs and lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153-164.
- 11) Kaya, K. and T. Miura (1982): Effects of nitrogen dioxide on fatty acid compositions of red cell membranes, sera and livers in rats. *Environ. Res.*, **27**, 24-35.
- 12) Mochitate, K., K. Kaya, T. Miura and K. Kubota (1984): *In vivo* effects of nitrogen dioxide on membrane constituents in lung and liver of rats. *Environ. Res.*, **33**, 17-28.
- 13) Mochitate, K., T. Miura and K. Kubota (1985): An increase in the activities of glycolytic enzymes in rat lungs produced by nitrogen dioxide. *J. Toxicol. Environ. Health*, **15**, 323-331.
- 14) Takahashi, Y. and T. Miura (1985): *In vivo* effects of nitrogen dioxide and ozone on xenobiotic metabolizing systems of rat lungs. *Toxicol. Lett.*, **26**, 145-152.
- 15) Takahashi, Y., K. Mochitate and T. Miura (1986): Subacute effects of nitrogen dioxide on membrane constituents of lung, liver and kidney of rats. *Environ. Res.*, (in press).
- 16) Sottocasa, G. L., B. Kuylenstierna, L. Ernster and J. Bergstrans (1967): An electron-transport pathway associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell Biol.*, **32**, 415-423.
- 17) Staal, G. E. J. (1970): Properties of pyruvate kinase of human erythrocytes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **52**, 1297-1302.
- 18) Bergmeyer, H. U., K. Gawehn and M. Grassl (1974): Enzyme as biochemical reagent. *In: Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 1, Bergmeyer, H. U. (ed.), Academic Press, N. Y., 473-474, 502-503, 574-579.
- 19) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

- 20) Stephens, R. J., M. F. Sloan, M. J. Evans and G. Freeman (1974): Alveolar Type 1 cell response to exposure to 0.5 ppm O₃ for short periods. *Exp. Mol. Pathol.*, **20**, 11-23.
- 21) Moore, P. F. and L. W. Schwartz (1981): Morphological effects of prolonged exposure to ozone and sulfuric acid aerosol in the rat lung. *Exp. Mol. Pathol.*, **35**, 108-123.
- 22) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the protective system in rat lungs and lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153-164.

II-13

ラット臓器中の遊離ドリコール量に 及ぼす二酸化窒素の影響

Effects of Nitrogen Dioxide on Free-Dolichol Contents in Rat Tissues

野原恵子¹・彼谷邦光¹・高橋勇二¹・三浦 卓¹・河田明治¹

Keiko NOHARA¹, Kunimitsu KAYA¹, Yuji TAKAHASHI¹, Takashi MIURA¹

and Meiji KAWATA¹

要 旨

ドリコール代謝系に対する NO₂ の影響を検索するために、ラットに4.0ppm NO₂ を3か月間暴露し、肺、肝及び腎の遊離ドリコール量の変化を調べた。

NO₂ 暴露ラットの肺で遊離ドリコール量が有意に増加し、その増加は炭素鎖の短い同族体ほど顕著であった。肝及び腎では遊離ドリコール量の有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、大気汚染物質である NO₂ が肺のドリコールサイクルに影響を及ぼすことが示唆された。

Abstract

Changes in free-dolichol contents in lung, liver and kidney of rats which were exposed to nitrogen dioxide at the concentration of 4.0 ppm for three months, were examined. By the exposure of nitrogen dioxide, the free-dolichol content in rat lung was increased to 133% of that of the control, whereas those in liver and kidney were unaffected.

These results suggested that nitrogen dioxide as an air pollutant affects dolichol cycle in rat lung.

1 はじめに

ドリコールは、糖蛋白質合成に必須の mediator であることが明らかにされてきた¹⁾。N-グリコシド結合を有する糖蛋白質は、ドリコールサイクルを経由して生合成される(図1)。図1に示すように、ドリコールは遊離型(Dolichol)、脂肪酸とのエステル(Dol-FA)、モノリン酸エステル(Dol-P)

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

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

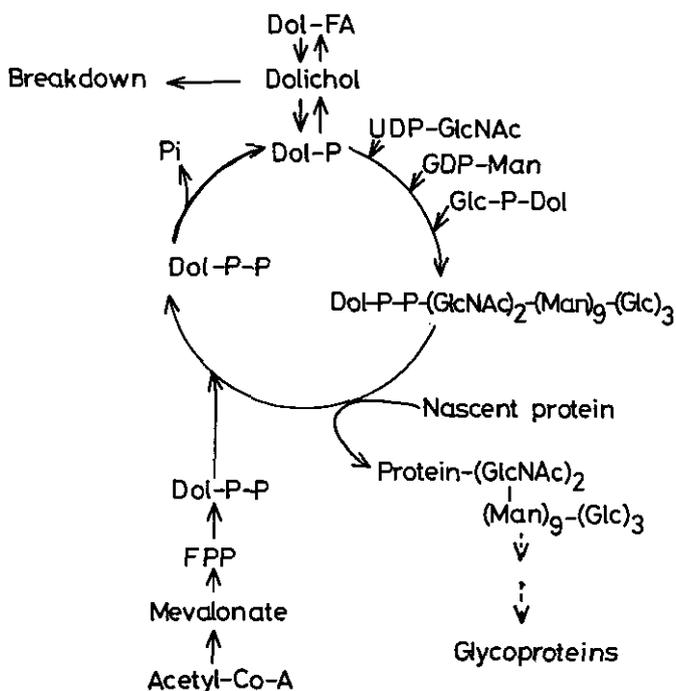


図 1 ドリコールサイクルと N-グリコシド型糖蛋白質の生合成

Fig. 1 Utilization of dolichol derivatives in glycoprotein formation
FPP, farnesyl diphosphate.

及びジリン酸エステル (Dol-PP) として細胞内に分布するが、その大部分 (90% 以上) は遊離型及び脂肪酸とのエステル型である²⁾。

最近, Mookerjee ら¹⁾はラットに松やにを投与し炎症を起こさせた際に、肝臓のドリコールサイクルに変化が起こることを報告した。フタル酸ジエチルヘキシルを投与したラットの肝臓でも、ドリコールサイクルの変動が観察された³⁾。また、ラットにフェニルヒドラジンを投与すると、脾臓における遊離ドリコール及びモノリン酸エステル合成が高まるという報告もなされている^{4,5)}。

大気汚染物質である NO₂ が上記のようなドリコール代謝系に対する影響をもつか否かを検討するために、4.0ppm NO₂ を 3 か月間暴露したラットの肺及び腎について遊離ドリコール量の測定を行った。

2 方法

2.1 暴露条件及び試料の採集

Jc1: Wistar 系雄ラット (SPF) (12週令) に 4.0ppm NO₂ を 3 か月間連続暴露した。暴露終了後、動物をエーテル麻酔下で放血し、心臓から生理的食塩水を注入して肺、肝及び腎を灌流した。各臓器

を0.25M 蔗糖-10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.4) でホモジナイズし、以下の実験に用いた。

2.2 ドリコールの分析

各臓器ホモジネートからクロロホルム・メタノール(2:1, v/v)で遊離ドリコールを抽出し、Pullarkat らの方法⁶⁾で分画、定量した。ドリコールの同族体は高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて定性、定量した。分析条件は、カラム, Zorbax ODS: 溶出液, ヘキサン・イソプロパノール・メタノール(4:4:2, v/v): 検出器, UV(214nm)である。

蛋白質量は、Lowry の方法⁷⁾に従って定量した。

3 結果

NO₂ 暴露において、対照群と暴露群のラットの体重及び臓器重量に有意差はなかった。

3.1 各臓器の遊離ドリコール組成

図2に、ラットの肺、肝及び腎の遊離ドリコールの高速液体クロマトグラムを示した。標準物質として、ブタ肝臓のドリコール(Sigma)を用いた。

ラットの肺、肝及び腎の遊離ドリコールは炭素数75から100(C75~C100, イソプレノイドユニット15~20個)の6種類で構成されており、臓器によって含有量及び組成に違いが見られた(表1)。各臓器を通してC85ドリコールが主要成分であった。蛋白質当たりの遊離ドリコール量は、肺、腎、肝の順に多かった。

3.2 臓器の遊離ドリコール量に及ぼす NO₂ の影響

NO₂ 暴露されたラットの肺の遊離ドリコール量は対照群のそれに比べて有意に増加した(1.33倍)が、肝及び腎の遊離ドリコール量には変化が認められなかった(表2)。肺の遊離ドリコール量

表 1 ラット(対照群)の肺、肝及び腎の遊離ドリコール含量

Table 1 Free dolichol compositions of lung, liver and kidney of control rat

dolichol	dolichol composition (%)		
	Lung	Liver	Kidney
C 75	1.9	5.2	1.3
C 80	18.8	21.9	12.6
C 85	47.3	45.5	46.2
C 90	26.0	23.2	31.1
C 95	6.0	4.2	7.4
C100	—	—	1.5
Total (ng/mg protein)	109.85±9.40 (n=4)	49.15±4.16 (n=6)	90.46±19.19 (n=4)

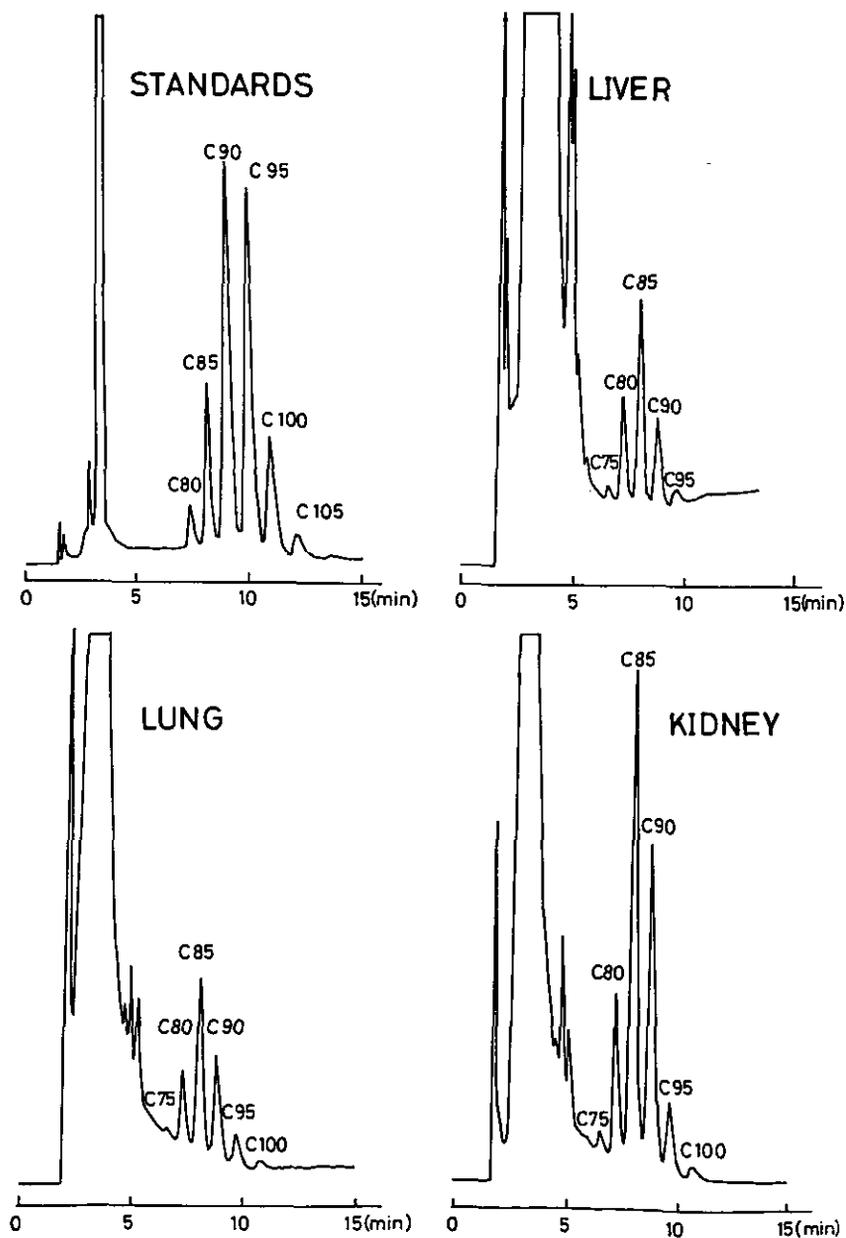


図 2 ラット(対照群)臓器の遊離ドリコールの高速液体クロマトグラム

Fig. 2 HPLC analysis of free dolichols in rat tissues on a Zorbax ODS column

Experimental conditions were as described in the text.

Numbers on the peaks indicate the total number of carbons in each dolichol homolog. Standards, mixture of pig liver dolichols.

表 2 NO₂ 暴露したラットの肺、肝及び腎の遊離ドリコール含量
 Table 2 Effects of NO₂ on free dolichol contents in lung, liver and kidney of rat

dolichol	Lung		Liver		Kidney	
	control (n=4)	NO ₂ (n=4)	control (n=6)	NO ₂ (n=6)	control (n=4)	NO ₂ (n=4)
C 75	2.08±0.38	3.23±0.22*	2.58±0.82	1.17±0.12	1.18±0.59	1.46±0.21
C 80	20.60±2.21	31.12±3.00*	10.75±0.72	9.09±0.95	11.36±1.42	14.06±1.32
C 85	52.00±4.81	68.70±3.40*	22.36±2.20	23.57±2.06	41.76±9.05	49.72±2.97
C 90	28.55±2.09	36.04±2.44*	11.39±1.50	13.97±1.23	28.15±6.30	34.20±2.76
C 95	6.62±0.71	6.86±1.14	2.06±0.24	2.94±0.34	6.67±2.04	8.10±1.38
C100	—	—	—	—	1.35±0.54	1.64±0.44
Total	109.85±9.40	145.95±9.96*	49.15±4.16	50.74±4.13	90.46±19.19	109.17±7.68

Values were expressed as M±SD (ng/mg protein). *: p<0.01.

Rats were exposed to NO₂ at the concentration of 4.0 ppm for 3 months.

の増加は各同族体によって異なり、炭素鎖の短い同族体ほど増加が著しかった。C75, C80, C85, C90及びC95の対照群に対する増加は、それぞれ1.55, 1.51, 1.32, 1.26及び1.04倍であった。C75 から C90 までの増加に有意差が認められたが、C95 には有意差はなかった。

4 考 察

本実験で分析したラット臓器のドリコール含量及び組成は、Pullarkat ら⁶⁾の結果と異なっていた。これは本実験で用いたラットがSPFであったためかもしれないが、詳細は不明である。

糖蛋白質の生合成には、ドリコールモノリン酸エステル(図1, Dol-P)の生成が律速段階となると考えられている¹⁾。ラットに松やにを投与すると、肝臓でドリコールリン酸の増加が起こる¹⁾。また、この場合には α_1 -酸性糖蛋白質が肝臓で増加することも確認されている⁸⁾。またフェニルヒドラジンを投与したラットの脾臓では、遊離ドリコール及びモノリン酸エステルの合成が起こることが示されている⁵⁾。しかし一方で、フタル酸ジエチルヘキシルを投与した肝では、遊離ドリコールは増加するがモノリン酸エステルの増加は起こらず、さらにドリコールリン酸に糖の結合したものの(図1, Dol-P-Glc)及び糖蛋白質の生成が阻害されることが示されている³⁾。これらの知見から、遊離ドリコールの増加は直接糖蛋白質生合成の活発化にはつながらず、正または負の影響を与えることを意味するものと考えられる。

本実験において、NO₂ 暴露によってその標的臓器である肺でのみ遊離ドリコール量の増加が認められ、しかも短い同族体ほど増加が著しいという結果を得た。このことは、大気汚染物質であるNO₂ がラット肺のドリコールサイクルに影響を及ぼすことを示唆するものと考えられるが、糖タンパク質合成との関連など、詳細については現在検討中である。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、貴重な御助言を賜った岐阜大学医学部の野沢義則教授、東北大学農学部
の足立達教授及び東北福祉大学の斎藤忠夫博士に深く感謝致します。また蛋白質の定量に際し御援
助をいただいた片岡裕子氏に感謝致します。

引 用 文 献

- 1) Mookerjee, S., T. Coolbear and M. L. Sarkar (1983): Key role of dolichol phosphate in glycoprotein biosynthesis. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **61**, 1032-1040.
- 2) Rip, L. W., N. Chaudhary and K. K. Carroll (1983): Distribution and metabolism of dolichol and dolichyl phosphate in rat liver. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **61**, 1025-1031.
- 3) Edlund, C., A. E. Ganning and Å. Elhammere (1985): Effect of plasticizers on the polyprene distribution in the liver. *Acta Chem. Scand.*, **B39**, 315-328.
- 4) Potter, J. E. R., M. J. James and A. A. Kandutsch (1981): Sequential cycles of cholesterol and dolichol synthesis in mouse spleens during phenylhydrazine-induced erythropoiesis. *J. Biol. Chem.*, **256**, 2371-2376.
- 5) Potter, J. E. R. and A. A. Kandutsh (1982): Increased synthesis and concentration of dolichyl phosphate in mouse spleens during phenylhydrazine-induced erythropoiesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 691-696.
- 6) Pullarkat, R. K., H. Reha and P. S. Pullarkat (1984): Age-associated increase of free dolichol levels in mice. *Biochim. Biophys. Acta*, **793**, 494-496.
- 7) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough and A. L. Farr (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 8) Jamieson, J. C., H. A., Kaplan, B. M. R. N. J. Woloski, M. Hellman and K. Ham (1983): Glycoprotein biosynthesis during the acute phase response to inflammation. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **61**, 1041-1048.

II-14 二酸化窒素とオゾンの混合ガス暴露による 肺の脂質過酸化とその動物種差について

Species Differences of Lipid Peroxidation and the Related Factors in Lungs of Various Animals Exposed to Combined Gas of Nitrogen Dioxide and Ozone

荒川健司¹・市瀬孝道²・嵯峨井勝²

Kenji ARAKAWA¹, Takamichi ICHINOSE² and Masaru SAGAI²

要 旨

複合ガス状大気汚染物質の生体影響の解明、及びその影響のヒトへの外挿を考える場合、様々な実験動物に及ぼす生体影響を比較、検討することは極めて重要と思われる。

ここでは、各種の動物に比較的低濃度の二酸化窒素(NO_2)とオゾン(O_3)の混合ガス(各0.4ppm)を暴露し、その生体影響指標として、肺の過酸化脂質生成とその関連因子の変化について検討を行った。実験にはICR系マウス、Golden系ハムスター、Wistar系ラット、Hartley系モルモット及びNew Zealand White系ウサギの5種の動物を用いた。

$\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 暴露以前の、いわゆる生理的条件下での5種の動物の肺の過酸化脂質量(n moles/g・lung)はマウス>ハムスター>ラット>モルモット>ウサギの順となり、動物の種間に著しい相違が存在することが判明した。なお、マウスの値はウサギの3.7倍であった。

このような各動物の肺の過酸化脂質量の相違はどのような因子によるものであるかについて検討した。その結果、肺の主要脂質成分であるリン脂質中の不飽和脂肪酸の含量とその反応性から求めたPeroxidizability Index (PI)、ビタミンE含量(VE)及び非蛋白性SH量(NPSH)の三つの因子からなる対数値、すなわち $\log(\text{PI}/\text{VE} \cdot \text{NPSH})$ が過酸化脂質量との間に高い相関($r=0.917$, $p<0.001$)を示した。一方、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)系酵素、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GSH-Tase)、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)及びジスルフィド還元酵素(DSR)などの、過酸化脂質代謝やその生成抑制に働く、いわゆる抗酸化性防御系酵素の中でその活性が過酸化脂質と高い相関を示すものは

1. 昭和58~59年度 国立公害研究所共同研究員(筑波大学大学院環境科学科 〒305 茨城県新治郡桜村天王台1-1)

Research Collaborator of the National Institute for Environmental Studies. Present address: School of Environmental Sciences, Tsukuba University, Sakura-mura, Niihari, Ibaraki 305, Japan.

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

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

認められなかった。

次に、ウサギを除く4種の動物にNO₂ + O₃を連続2週間暴露した。NO₂ + O₃暴露により、過酸化脂質生成が最も著しく増加したのはモルモット(2.2倍)であり、次はマウス(1.7倍)であった。一方、ハムスターとラットは対照群に比べて全く変化を示さなかった。なお、NO₂ + O₃の1週間暴露後のモルモットとマウスの過酸化脂質生成は各々1.4倍と1.25倍であったことから、両動物の過酸化脂質生成はNO₂ + O₃の暴露期間の延長につれて増加しているものと思われる。一方、ハムスターとラットは1週間目でも全く変化を示さなかった。

過酸化脂質生成に関するこのような種差を反映して、モルモットとマウスで、特にモルモットのリン脂質組成及びリン脂質中脂肪酸組成の変化が著しかった。リン脂質組成の変化についてみると、モルモットとマウスではホスファチジルコリン(PC)画分の増加とそれ以外のリン脂質画分の減少が特徴的であった。また、リン脂質中の脂肪酸組成の変化についてみると、飽和脂肪酸のパルミチン酸(C_{16:0})含量の増加と高度不飽和脂肪酸(C_{20:4}, C_{22:4}, C_{22:5}, C_{22:6})含量の低下が特徴的であった。一方、ハムスターとラットではこのような変化はほとんど認められていない。

これらのことより、NO₂ + O₃を暴露されたモルモットとマウスでは過酸化反応を受けた高度不飽和脂肪酸が分解されて含量の低下をきたしているのに対して、一方の修復過程では過酸化反応を受けないパルミチン酸のような飽和型脂肪酸に置き換えられ、さらに過酸化反応が亢進するのを避けるような変化を起こしているものと推測される。

NO₂ + O₃を暴露された4種の動物の肺のビタミンE含量は肺の過酸化脂質量と負の有意な相関を示したが、非蛋白性SH含量にはそのような相関性は認められなかった。また、抗酸化性防御系の各酵素活性も特に過酸化脂質と相関を示すものはなかった。しかしながら、過酸化脂質の代謝に働くGPxとGSH-Tase活性はモルモットとマウスで低かったり、遺伝的に欠損していることがNO₂ + O₃暴露による過酸化脂質生成の増加を引き起こしている可能性として考えられる。

Abstract

To compare the biological effects of various experimental animals exposed to the complexed gaseous air pollutants is very important to extrapolate the effects to human from the results of animals. In the present study, the changes of lipid peroxidation and the related factors in lungs of various animals under physiological condition and the animals exposed to the combined gas of nitrogen dioxide and ozone were examined. ICR mouse, Golden hamster, Wistar rat, Hartley guinea pig and New Zealand White rabbit were used in experiments.

Marked species differences in lipid peroxide levels were found. The order of the values was mouse > hamster > rat > guinea pig > rabbit, and the value for mice was 3.7 times higher than that for rabbit. The contents of vitamin E (VE) and nonprotein sulfhydryls (NPSH) in lungs varied widely among the five animal species. Both antioxidants showed an inverse relationship with lipid peroxide levels. Species differences were also observed for polyunsaturated fatty acid composition in lung phospholipids. Especially, the composition of docosahexaenoic acid (C_{22:6}) varied widely among the five animal species. The peroxidizability index (PI), which shows the relative rate of peroxidation reaction, was calculated from

the composition ratio and the reactivity of each polyunsaturated fatty acid, and the index (PI) was found to be significantly correlated to the lipid peroxide levels in lungs ($r=0.886$, $p<0.001$). The PI value normalized by the reciprocal of VE content, (PI/VE), also was found to correlate significantly to the TBA values ($r=0.865$, $p<0.001$), but the correlation coefficient of PI/VE with lipid peroxides was lower than that of only PI. However, the log value of PI normalized by the reciprocal of $VE \times NPSH$, $\log (PI/VE \cdot NPSH)$, showed a highest correlation coefficient ($r=0.935$, $p<0.001$). Normalization by the activities of antioxidative protective enzymes, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase and disulfide reductase in lungs did not show higher correlation coefficients than the normalization by the contents of VE and NPSH. These results suggest that lipid peroxide levels in the lungs of animals may be regulated mainly by the contents of vitamin E and nonprotein sulfhydryls, the composition ratio and the reactivity of each polyunsaturated fatty acid in lung phospholipid fraction.

The other hand, four species animals, mice, hamsters, rats and guinea pigs were used to examine the changes of lipid peroxides and phospholipids in lungs of four animal species exposed continuously to combined gases of 0.4 ppm nitrogen dioxide and 0.4 ppm ozone for two weeks. Lipid peroxides in lungs of mice and guinea pigs increased significantly with the prolongation of the exposure period, and the increment ratio of lipid peroxides in guinea pigs was higher than that in mice at the first and second week after the start of exposure. Lipid peroxides in hamsters and rats did not change even at the second week. Changes of VE contents at the second week was a little, but the contents were related significantly with lipid peroxide levels of four animals. On the other hand, increments of NPSH were striking, and the order of changed degree was inverse with that of lipid peroxide levels of four animals, however NPSH did not show a significant correlation with lipid peroxide levels. Total phospholipids in lungs of mice, rats and guinea pigs were increased significantly by the exposure of combined gases for two weeks, but not in hamsters. The increment ratio of total phospholipids changed with the order of guinea pig > mouse > rat. Changed degree of fatty acid composition in the phospholipids was similar to that of lipid peroxides among four animals. The changes of fatty acid composition in mice and guinea pigs were marked, especially the increases of palmitate and palmitoleate and the decreases of polyunsaturated fatty acids were characteristic. On the other hand, the changes in hamsters and rats were inconsiderable. Changes of phospholipid classes were also similar to the changes of lipid peroxides among four animals. Phosphatidylcholine contents increased and phosphatidylethanolamine contents decreased by the exposure of the combined gases, with the order of guinea pig > mouse > rat. These contents of hamster did not change at all.

From these results, it was observed that the changes of lipid peroxides and phospholipids in lungs exposed to the combined gases of nitrogen dioxide and ozone were different markedly with species of animals, and it was suggested that the changes of phospholipid classes and fatty acid composition might be induced by oxidative damage such as lipid peroxidation.

1 はじめに

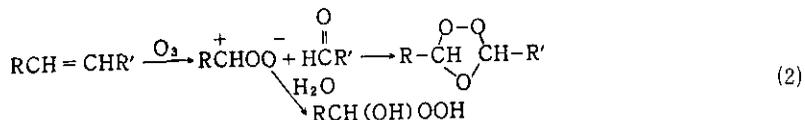
今日の大気汚染の状況は様々な汚染物質の複合化, 広域化の傾向にあるが, その生体影響の面から特に二酸化窒素 (NO_2) とオゾン (O_3) が重視されている。 NO_2 は工場のボイラーや自動車のエンジ

ンなどのすべての燃焼過程において窒素と酸素の反応によって生じる典型的な大気汚染物質であり、現在都市部では比較的高い濃度に汚染されている地域が多い。光化学オキシダントの主成分である O₃ は自然大気中に 0.01~0.03ppm 程度含まれており、さらに成層圏 O₃ の沈降及び上記のように人為的に発生した NO₂ と炭化水素との光化学反応等によって生成することが認められている。したがって、NO₂ と O₃ の混合ガス (NO₂ + O₃) 暴露による生体影響を研究することは住民の健康を守る立場から極めて重要な課題である。そこで本研究は、NO₂ + O₃ 暴露によって生ずる生体影響について、主に肺の過酸化脂質生成を中心に、その基礎的知見を得ることを目的として行った。

過酸化脂質とは、膜脂質の重要な構成成分である不飽和脂肪酸の過酸化反応によって生ずる物質であり、ヒドロペルオキシド体 (ROOH)、環状ペルオキシド体 (R<O) 及びその他多くの前駆体や分解生成物等を指す¹⁾。これらの過酸化脂質は、膜構造を破壊して細胞の膜機能を低下させたり²⁾、酵素や蛋白質を変性させたり³⁾、核酸を切断したり⁴⁻⁷⁾、核酸の塩基部分と反応して細菌の突然変異を起こしたり^{8,9)}する。更に、ホルモンやビタミン等の生理活性を失わせるなど多くの生体成分に作用し、細胞の機能障害や変性、壊死、ひいては臓器障害を起こしたりすることが知られており¹⁰⁾、生体にとって極めて有害な物質である。加えて、過酸化脂質は老化や動脈硬化、肝臓病、糖尿病、脳卒中あるいはがんなど多くの疾患の場合にも増加することが認められており、最近では基礎及び臨床医学上からも大変注目されている^{11,12)}。

肺は酸素をはじめとするガス状物質や粒子状物質に対する第一次標的臓器であり、一定濃度以上の NO₂ や O₃ の吸入は特に肺に様々な病理学的障害を引き起こす^{13,14)}。また、そのような障害を起こさない程度の濃度においても、肺組織内で両者はその水に溶けづらいという性質により、肺深部の肺胞にまで達し、肺胞内細胞に種々の生化学的影響を及ぼしているものと推測される^{15,16)}。特に、両者とも非常に酸化性の強いガスであるため、これらの毒性の一部は肺の脂質の過酸化反応と関連しているとする考え¹⁷⁾が多くの研究者に受け入れられている。

NO₂ と O₃ によって脂質の過酸化反応が起こることは、はじめに高度不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid: PUFA) の *in vitro* の系で証明され、両ガスと PUFA の反応による過酸化脂質の生成はフリーラジカル反応によるとされている¹⁸⁾。すなわち、NO₂ は RCH=CHR' で示した二重結合を持つ脂肪酸と反応して NO₂ が付加したラジカル体 [下式 (1)] を、O₃ は活性の高いフリーラジカル化合物である Criegee の zwitterion を経てオゾナイド [下式 (2)] を生ずる。



これらのラジカル化合物は第 2 の不飽和脂肪酸 (R''H) と反応して脂肪酸のフリーラジカル体 (R''·) を生じ、この R''· は酸素と反応してペルオキシラジカル体 (R''OO·) を生ずる。この R''OO·

は第3の不飽和脂肪酸(R''H)から水素を引き抜いて自らは脂肪酸ヒドロペルオキシド(R''OOH)となり第3の脂肪酸をフリーラジカル化(R''·)し、このR''·がさらに反応を繰り返すことによって、脂質過酸化反応は連鎖的に進行していく¹⁹⁾。

一方、*in vivo*でNO₂吸入によって肺に過酸化脂質が生成することは、共役ジエンの測定によりThomasら²⁰⁾によって初めて報告された。しかし、その後多くの研究者が検討を行ったがNO₂吸入による過酸化脂質生成を証明することはできなかった¹⁶⁾。その後、Sagaiら²¹⁻²⁴⁾は過酸化脂質の分解物が呼気中にエタンやペンタンなどの低級炭化水素として放出されているという事実に基づく呼気ガス分析法²⁵⁾及び過酸化脂質の定量に最も広く用いられているチオバルビツール酸(TBA)法を用いて、それぞれNO₂吸入により過酸化脂質が増加することを認めた。更に、Sevanianら²⁶⁻²⁸⁾も脂質epoxidesの測定などからNO₂による過酸化脂質生成を報告している。O₃吸入の場合については、Goldsteinらによって赤血球²⁹⁾と肺³⁰⁾での過酸化脂質生成が報告され、その後も多くの研究者によってO₃暴露による肺の過酸化脂質の増加が報告されている^{31, 32)}。しかしながら生体内では、*in vitro*の系とは異なり、過酸化脂質が際限なく生成され、蓄積するものではない。生体内には抗酸化剤のように、有害な過酸化脂質の生成を抑制したり、また過酸化脂質が生成してもそれを代謝する機構が存在していることが知られている^{15, 16)}。

生体内には数種の抗酸化剤の存在が知られているが、最も注目されているのはビタミンE(VE: α -トコフェロール)である。生体内でVEが過酸化脂質生成の抑制に働いているという報告は極めて多い³¹⁻³⁴⁾。VEは細胞膜を構成する高度不飽和脂肪酸(PUFA)と複合体を形成して膜内に存在しており、ラジカル反応によってPUFAが過酸化されるのを防ぐために自らがラジカル化され、ラジカルによる連鎖反応を防ぐ作用を有している。一方、いったん生じた α -トコフェロール・ラジカル体は α -トコフェロールキノンとなり分解されるか³⁵⁾、あるいは還元型グルタチオン(GSH)、アスコルビン酸(VC)、NADPH等の還元性物質によって再生される^{36, 37)}。さらに、GSH、VC、NADPH等の還元性物質もラジカルに水素を与えて連鎖反応を停止させると考えられている。また、特に、GSHは過酸化脂質の代謝系において中心的な物質であることから、VE同様脂質過酸化に対する抗酸化性物質として特に重要な役割を果たしている^{38, 39)}。一方、VCやNADPHは遷移金属イオン(特にFe²⁺)と共同して脂質過酸化を促進する、という逆の作用も有している⁴⁰⁾。

さらに生体内には表1に示したような酵素的抗酸化性防御機構が存在している。Glucose-6-phosphate dehydrogenase、あるいは6-Phosphogluconate dehydrogenase及びGlutathione reductaseと共役して働くGlutathione peroxidase(GPx)を介して、脂肪酸ヒドロペルオキシドは無毒なヒドロキシ脂肪酸へと代謝され、この系が代表的な過酸化脂質代謝系であると考えられている⁴¹⁾。Glutathione S-transferaseも総反応としてGPxと同じ反応を触媒することができる⁴²⁾。Superoxide dismutaseは、過酸化脂質生成のイニシエーターのひとつであるスーパーオキシド・ラジカル(O₂⁻)を異性化し、O₂⁻による酸化的障害から生体を防御している⁴³⁾。また、オゾン暴露の場合、非蛋白性SHは主に蛋白質や酵素のSH基と反応しMixed disulfideを形成すると報告されている⁴⁴⁾が、

表 1 酸化ストレスに対する酵素的防御機構
Table 1 Enzymatic Protective Mechanisms against Oxidative Stress

1) Glutathione peroxidase as a member in peroxidative metabolic pathway

$$2\text{GSH} + \text{ROOH} \xrightarrow{\text{GPx}} \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} \dots\dots\dots (\text{i})$$

$$\begin{array}{ccccccc} \text{G6P} & \xrightarrow{\text{NADP}} & \text{2GSH} & \xrightarrow{\text{ROOH}} & & & \\ \text{6PG} & \xleftarrow{\text{G6PD}} & \text{GSSG} & \xleftarrow{\text{GPx}} & \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} & & \dots\dots\dots (\text{ii}) \\ & & \text{GR} & & & & \end{array}$$

2) Enzymes for maintenance of reducing potential (NADPH formation)

$$\text{G6P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6PD}} \text{6-PG} + \text{NADPH} \dots\dots\dots (\text{i})$$

$$\text{6-PG} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{6PGD}} \text{R5P} + \text{NADPH} \dots\dots\dots (\text{ii})$$

$$\text{Isocitrate} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{ICDH}} \text{2-oxoglutarate} + \text{CO}_2 + \text{NADH} \dots\dots\dots (\text{iii})$$

3) Glutathione S-transferase as a peroxidase

$$\text{GSH} + \text{ROOH} \xrightarrow{\text{GSH-Tase}} \text{GSOH} + \text{ROH} \text{ (Enzymatic)} \dots\dots\dots (\text{i})$$

$$\text{GSOH} + \text{GSH} \xrightarrow{\quad\quad\quad} \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} \text{ (Non Enzymatic)} \dots\dots\dots (\text{ii})$$

2GSH + ROOH $\xrightarrow{\quad\quad\quad}$ GSSG + ROH + H₂O (Nat Reaction)

4) Superoxide dismutase

Cu-Zn SOD in cytoplasm, erythrocyte (soluble)

Mn-SOD in mitochondria

$$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{}^3\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$$

cf. Haber-Weiss Reaction ($\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\quad\quad\quad} \text{}^1\text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$)

5) Disulfide reductase for maintenance of SH-group
(Exchange of inter and/or intra molecular disulfide)

$$\begin{array}{ll} \text{Membrane-S-S-Protein} & \xrightarrow{\quad\quad\quad} \text{Membrane-SH} + \text{Protein-SH} \dots\dots\dots (\text{i}) \\ \text{Membrane-S-SG} & \xrightarrow{\quad\quad\quad} \text{Membrane-SH} + \text{GSH} \dots\dots\dots (\text{ii}) \\ \text{Protein-S-SG} & \xrightarrow{\quad\quad\quad} \text{Protein-SH} + \text{GSH} \dots\dots\dots (\text{iii}) \\ \text{Cystine} & \xrightarrow{\quad\quad\quad} \text{2 Cysteine} \dots\dots\dots (\text{iv}) \end{array}$$

ABBREVIATIONS. GPx: Glutathione peroxidase. G6PD: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. GR: Glutathione reductase. 6PGD: 6-Phosphogluconate dehydrogenase. ICDH: Isocitrate dehydrogenase. GSH-Tase: Glutathione S-transferase. SOD: Superoxide desmutase.

Disulfide reductase はこれらを元の機能的 SH 基に戻す働きをしている⁴⁵⁾。
一方、生体内の過酸化脂質の生成は主にリン脂質中の PUFA の過酸化反応に基づくものであり、その生成に預かる主な場所は生体膜及び細胞内器官であるとされている。特にミトコンドリアやミクロソームはその構成成分であるリン脂質中に多量の PUFA を含有しており、過酸化脂質生成の主要な部分を占めている^{46,47)}。リン脂質は生体膜の主要構成成分であるのみならず、膜結合酵素の活性の制御や膜の流動性や透過性を含めた膜の諸機能に極めて重要な役割を果たしている⁴⁸⁾。加えて、肺リン脂質の一部は肺胞表面活性物質 (surfactant) の主要構成成分として膨大な気相-液

相界面の維持に寄与している⁴⁹⁾。このようなことから、NO₂ や O₃ による肺の脂質、特にリン脂質への影響については多くの研究がなされてきており、リン脂質量、リン脂質組成及びその構成脂肪酸組成の変化についての様々な報告がある⁵⁰⁻⁷⁸⁾。

生体膜内での過酸化脂質生成の主要な基質がリン脂質中の PUFA であることから、リン脂質の脂肪酸組成は過酸化脂質生成にとって特に重要な因子となる。これに関して、Kornbrast と Mavis の報告⁷⁹⁾ は極めて興味深い。彼らは、ウサギ、ラット、ヒト及びマウスの肺のミクロソーム中の二重結合を 3 個以上もつ、過酸化を受け易い(peroxidizable) PUFA、いわゆる PPUFA 含量に対するビタミン E 含量の比(VE/PPUFA)と、鉄(II) - アスコルビン酸添加時の *in vitro* におけるそれぞれの肺ミクロソームの過酸化脂質生成を比較している。その結果、VE/PPUFA 比はウサギが最も高く、次にラット、ヒト、マウスと並び、*in vitro* での過酸化脂質生成とは全く逆の相関を示すと報告されている。しかし、ここでは各々の PUFA の反応性の相違は考慮されていない。一般に PUFA の酸化速度は二重結合の数によって異なり、その数が増加するにつれて反応性が增大することが知られている。各々の反応速度定数も知られており、二重結合の数が 1, 2, 3, 4, 5, 6 個の不飽和脂肪酸についての相対的反應速度定数はそれぞれ 0.025, 1, 2, 4, 6, 8, とされている⁸⁰⁻⁸⁵⁾。Witting と Horwitt⁸⁰⁾ は下式のように、各不飽和脂肪酸の組成比(%)にこれらの各定数を乗じたものの合計を、Peroxidizability Index : PI(被過酸化指数)として提案している。

$$\text{PI} = (\text{Wt \% monoenoic} \times 0.025) + (\text{Wt \% dienoic} \times 1) + (\text{Wt \% trienoic} \times 2) \\ + (\text{Wt \% tetraenoic} \times 4) + (\text{Wt \% pentaenoic} \times 6) + (\text{Wt \% hexaenoic} \times 8)$$

このような報告から、生体内での脂質過酸化に際して、リン脂質の PI 値、さらに PI/VE 値等が重要な因子である可能性が考えられる。

また、Kornbrast ら⁷⁹⁾ の *in vitro* の実験から、*in vivo* における肺の過酸化脂質生成も動物の種類によって差があることが推測される。さらに、通常生体内の過酸化脂質量はほぼ一定のレベルに保たれていると言われているが、肺の過酸化脂質の生理的レベルが果たして動物の種類によって異なるのかどうかにも興味をもたれる。しかし、これまで過酸化脂質の動物種属間の相違(種差)について系統的に調べた報告はほとんど見当たらない。動物の種類によって生体反応が著しく異なることは数多く知られており、動物実験の結果からヒトに及ぼす影響を予測したり、外挿する上で、動物種差に関する成績は極めて重要である。環境汚染物質の生体影響を研究する場合においても、その究極の目的がヒトに及ぼす影響を予測し、それによる障害を防ぐことであることから、動物種差に関するデータは非常に重要なものになると考えられる。

そこで本研究は、肺の脂質過酸化を中心に、NO₂ + O₃ 暴露による生体影響についての基礎的知見を得ること及びヒトに対する影響を外挿するための基礎資料とすることを目的として、動物種差についての検討を含めた次のような実験を行った。まず、第 1 に、各種実験動物の肺の過酸化脂質とその関連因子、特に過酸化脂質生成の主要な基質であるリン脂質に着目して、動物の種差を調べ

た。次に、 $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ を暴露した場合のそれらの変化について比較検討した。

2 材料と方法

2.1 動物

動物は、静岡県実験動物農業協同組合より7週令で購入したICR系マウス、Golden系ハムスター、Wistar系ラット、Hartley系モルモットの雄を、9週令で実験に供した。更に、体重約3.5kg(16週令相当)のNew Zealand White系雄ウサギも用いた。

マウスは48匹、ハムスターは12匹、ラット、モルモット及びウサギは各6匹を1群として実験に用いた。分析試料として、マウスは8匹、ハムスターは2匹、その他の動物は各1匹分の肺をそれぞれ1サンプルとし、すべての動物とも1群を各々6サンプル($n=6$)となるようにした。

これらの動物は、温度20~25°C、湿度50~70%、室内照明14時間点燈、10時間消燈の条件下で飼育された。飼料は、マウス、ハムスター及びラットには日本クレア社製CE-2固形飼料を、モルモットとウサギには飼料1kg当たりビタミンCが500mg強化されオリエンタル酵母社製RC4固形飼料を与え、飲料水は蒸留水を、それぞれ自由摂取させた。

2.2 二酸化窒素(NO_2)とオゾン(O_3)の混合ガス暴露

NO_2 と O_3 の混合ガスの暴露実験には環境庁国立公害研究所実験動物飼育施設内の六錐型AC系チャンバー(1.68 m^3)を用いた。暴露実験にはウサギを除く4種の動物を用い、0.4ppm NO_2 と0.4ppm O_3 の混合ガス(0.4ppm $\text{NO}_2 + 0.4\text{ppm } \text{O}_3$)に1~2週間連続暴露した。対照群には、 NO_2 も O_3 も含まない清浄空気を、 $\text{NO}_2 + \text{O}_3$ 暴露群と同一条件下で暴露したものをを用いた。

2.3 肺の摘出方法

既報²¹⁻²⁴⁾のように、エーテル麻酔下で頸動脈より放血屠殺した後開胸し、肺を心臓とともに摘出した。左肺を脂質抽出用として心臓より分離し、右肺は右心室から、脱気後窒素ガスをバブリングし嫌氣的に調整した生理食塩水を注入して、白色になるまで灌流した。それぞれの肺は表面の水分を除き、窒素ガス置換密封し、使用時まで-80°Cで冷凍保存した。

2.4 肺ホモジネートの調製

灌流した肺は窒素気流下でテフロン・ガラスホモジナイザーにて磨碎し、10%ホモジネートに調製した。なお、ホモジネート用緩衝液はあらかじめデガッサー(Erma Optical Works社製、ERC-3310)で脱気後、窒素を十分バブリングして嫌氣的に調製した50mM Na, K-リン酸緩衝液(pH7.5)を用いた。10%ホモジネートは200×g、5分間の遠心分離を行い、得られた上清を過酸化脂質量、非蛋白性SH(NPSH)量及びビタミンE量の測定に用いた。上清の残りは12,000×g、20分間遠心分離し、更にその上清を105,000×g、60分間超遠心分離した。この上清の一部をGlu-

tathione peroxi dase (GPx), Glutathione reductase (GR), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), Glutathione S-transferase (GSH-Tase) の活性測定に用いた。残りの上清は、0.1mM EDTA を含む50mM Na, K-リン酸緩衝液 (pH7.5) で20時間透析(透析外液は2度交換)し、Superoxide dismutase (SOD) と Disulfide reductase (DSR) の活性測定に使用した。

2.5 過酸化脂質の測定法

本実験の TBA 反応性物質量の測定は、SDS 可溶化を含む Ohkawa ら⁸⁶⁾の方法に従った。肺の200×g 上清試料0.2ml に8% SDS (和光純薬) 溶液0.2ml を加えて混和、20% 酢酸緩衝液 (pH3.5) 及び0.5% TBA 試薬 (Merck) を各々1.5ml ずつ加え、そのつど十分に混和してから、沸騰水浴中で1時間加熱した。加熱後冷却し、*n*-ブタノール5ml を加え30分間振とうし、遠心分離(3,000rpm, 10分間)後、ブタノール層について、励起波長515nm 蛍光波長553nm の相対蛍光強度を測定した。なお、標準物質として1, 1, 3, 3-Tetramethoxypropane を用い、TBA 反応性物質量は肺のグラム湿重量当たりのモル数(n moles/g · lung)として示した。

2.6 抗酸化物質の測定法

NPSH 量は DeLucia ら⁴⁴⁾の方法で測定した。200×g 上清試料0.5ml に5mM EDTA0.5ml と10% TCA 1ml を加え、氷冷下20分間放置後、3,000rpm, 10分間の遠心分離で蛋白質を沈殿させた。上清1ml をとり、0.4M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.9) 2ml, 0.1M EDTA0.2ml を加え、2.5mM の5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) 試薬0.2ml を加えた後、412nm の吸光度を測定した。なお、標準物質として還元型グルタチオン (GSH) を用い、値は肺のグラム湿重量当たりのモル数(μ moles/g · lung)として表示した。

ビタミン E (α -トコフェロール)量は阿部ら⁸⁷⁾の方法によって測定した。肺の200×g 上清試料1ml にエタノール1ml を加えてよくかくはんした後、*n*-ヘキサン5ml を加えて振とう抽出を2回繰り返し、窒素気流下、40°Cの温浴上で乾固させた。この試料を100 μ l の*n*-ヘキサンに溶かしたものを、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)により分離定量した。なお、外部標準はエーザイ株式会社より供与いただいた精製 α -トコフェロールを用いて定量した。結果は肺のグラム湿重量当たりの重量(μ g/g · lung)で表した。

2.7 抗酸化性酵素活性の測定法

GPx 活性は Cumene hydroperoxide 及び過酸化水素を基質として Little ら⁸⁸⁾の方法、GR 活性は酸化型グルタチオン (GSSG) を基質として Bergmeyer⁸⁹⁾が記載した方法によって測定した。G6PD 活性は10mM · MgCl₂ を含む0.1M トリス-塩酸緩衝液を用い、Glucose-6-phosphate · Na₂ 塩を基質として、Wilhelm ら⁹⁰⁾の方法によって、6PGD 活性は20mM · MgCl₂ と6.5mM · Cysteine を含む0.1M

トリス-塩酸緩衝液を用いて、6-Phosphogluconateを基質としてG6PDの測定法に従って測定した。GSH-Tase活性の測定はHabigら⁴²⁾の方法に準じて、1-chloro-2, 4-dinitrobenzeneを基質として測定した。SOD活性はキサンチンとXanthine oxidaseによって酵素的に生じたSuperoxide anion radicalがチトクロームCを還元するのをSODが妨げる反応を利用したMcCordとFridovich⁴³⁾の方法に従った。DSR活性の測定は、シスチンを基質としてTietze⁴⁵⁾の方法によって行い、それから形成されたシステインはNPSHと同様にDeLuciaら⁴⁴⁾の方法で定量した。

DSR以外の酵素活性はすべて遠心方式のジェムサック自動分析装置を用い、30°Cで測定した。なお、蛋白質の定量は牛血清アルブミンを標準物質としLowryら⁹¹⁾の方法に従って行い、酵素活性値はすべて蛋白質mg当たりの比活性で表示した。

2.8 肺の脂質の抽出

Folchの方法⁹²⁾に従って、左肺の一部(湿重量約300mg)に2mlのクロロホルム-メタノール(C-M, 2:1)を加え、ポリトロン(クリエンス社製, CH-6010)を用い、窒素気流下でホモジナイズした。これを3,500rpm, 10分間遠心後、クロロホルム層を分取してから残部にさらに4mlのC-M(2:1)を加え、再びホモジナイズした。同様に遠心し、次いで上澄みを分取し、前回の分と合わせて粗脂質抽出液とした。

混在する非脂質成分の除去は、Folchの水洗法⁴⁴⁾によって行った。粗脂質抽出液に、約0.2容の0.9%KClを加えてよく振とう混和し、2,000rpm, 5分間の遠心により2層に分離し、非脂質性の上層をとらないように下部のクロロホルム層をシリンジで分取し、10ml容の褐色スピッツ管に回収した。溶媒乾燥器(石井商店社製, Jet Air Vapozizer)で窒素を吹きつけながら40°Cの温浴中で乾固させた後、素早く5mlのC-M(2:1)混液に溶かし、総リン脂質量用にマイクロシリンジで50 μ lを取り、乾固させた。残りの抽出液は、さらにC-M(2:1)でスピッツ管の首まで溶媒を満たして、-20°Cで用時まで保存した。

なお、脂質の抽出に用いた溶媒及び薄層クロマトグラフィーに用いた溶媒には、すべて抗酸化剤としてブチル化ヒドロキシトルエン(BHT:2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチルフェノール)を0.005%(w/v)添加したものをを用いた。

2.9 リン脂質の分析

2.9.1 リン脂質構成脂肪酸組成

脂質保存液を乾固させた後、素早く300 μ lのC-M(2:1)に溶かし、その50 μ l(あるいは100 μ l)についてリン脂質を分離し、その構成脂肪酸組成の分析を行った。

リン脂質はKobayashiら⁹³⁾の方法で分離した。薄層クロマトグラフィー(プレート:HPTLC Fertigplatten Kieselgel 60, Merck社製, 展開溶媒:n-Hexane-Ethylether-Acetic acid, 80:40:1, v/v)で非極性脂質を上昇させ、原点にリン脂質を残した。薄層面への着点及び展開後の乾燥は窒素気流

下で行った。

リン脂質画分をプレートから吸着剤ごとにかき取り、ネジふた付きパイレックス試験管に入れ、Metcalf⁹⁴⁾の方法で脂肪酸のメチルエステルを調製した。シリカゲルを入れた試験管に、0.5N-NaOH(メタノール溶液)0.8mlを加え、シリカゲルをよく分散させた後、窒素中100°Cで20分間加熱した。水冷後さらに14% BF₃(メタノール溶液) 1 mlを加え窒素中100°Cで10分間反応させた。十分に冷却した後蒸留水6.5mlを加え、次いでこれに1 mlの*n*-ヘキサンを加え、よく振とう混合した後、2,000rpm、5分間遠心分離しヘキサン層をとり、この操作をさらにもう1度繰り返すことによって、脂肪酸メチルエステルを回収した。分取したヘキサン層を合わせ、窒素気流下で溶媒を留去した後、ヘキサン50 μ lに溶かし直してShimadzu GC-7A ガスクロマトグラフィーで分析した。

ガスクロマトグラフィーの運転は、カラム：5%Shinchrome E-71(3 mm ID×3 m, ガラスカラム)、カラム温度：230°C、試料注入口温度：250°C、キャリアーガス：窒素、40ml/min、検出器：FID、(水素：0.6kg/cm²、空気：0.5kg/cm²)の条件で行った。定量はインテグレーター(Shimadzu クロマトパック C-R1B)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エステルを用いて行った。標準品のない脂肪酸は保持時間の対数と炭素数を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 Semilog plot 法で推定した。

2.9.2 リン脂質組成

リン脂質組成は薄層クロマトグラフィーで分離したリン脂質の各スポットをかき取り、それを分解して生じた無機リン酸を定量することによって求めた。薄層クロマトグラフィーのプレートはMerck社製のHPTLC(High-performance Thin-layer Chromatography) Fertigplatten Kieselgel 60(10×20cm)を用いた。プレートは110°C、1時間加熱して活性化した後、シリカゲルの入った薄層板保存箱の中で室温になるまで放置してから、試料を窒素気流下で下端から約2 cmの位置に幅3.5mm、長さ2 cmの帯状にスポットした。試料は約15~17 μ gのリンを含む脂質抽出液を用いた。クロロホルム-メタノール-酢酸-水(50:30:8:1)の溶媒を用い、展開槽内を溶媒で十分に飽和させてから、約17cm展開させた(展開時間約2時間30分)。展開後、プレートをドライヤーで乾燥させ、次いでヨウ素蒸気にさらして各スポットを検出した。

各試料スポット及びそれぞれの試料スポットの大きさに相当するスポットのない部分(薄層プランク)をほぼ同量かき組み、Rouser⁹⁵⁾の方法で無機リン酸を定量した。かき取った試料に70%過塩素酸0.5mlを加え、180°Cで30分間の加水分解によりリン脂質のリン酸を無機リン酸に変えた。室温に放置後2.5mlの蒸留水を加えて試験管の内壁を洗い、次いで2.5%モリブデン酸アンモニウム溶液0.5ml、その都度調製した10%アスコルビン酸溶液0.5ml、蒸留水1 mlを加え、その都度よく混和した。5分間沸騰水浴中で加熱し、次いで冷却し、2,000rpm、5分間遠心後、透明な上澄みをキュベットに移し、試薬プランクに対して820nmの吸光度を測定した。試料の吸光度から薄

層ブランクの吸光度を差し引いて読みを補正し、全画分の補正值の合計から、総脂質リンに対する各リン脂質画分の組成パーセントを算出した。

2. 9. 3 総リン脂質の定量

総リン脂質定量用にとった試料に、70%過塩素酸0.5mlを加え、2.9.2と同じ方法で加水分解と無機リン酸の定量を行った。1.097gの KH_2PO_4 を250mlの蒸留水に溶かした液を100倍希釈した標準液(10 μg リン/ml)を用いて、検量線を作成した。総リン脂質量は肺のグラム湿重量当たりの脂質性リン量($\mu\text{mol/g}\cdot\text{lung}$)として表した。

3 結果

3. 1 生理的条件下における肺の過酸化脂質関連因子の動物種差について

3. 1. 1 過酸化脂質量

5種の実験動物の肺のTBA反応性物質量(TBA値)を図1に示した。各動物の肺のTBA値には著しい動物種差が認められ、マウスの値が最も高く、最も低い値を示したウサギの3.7倍以上の値であった。更に、これらの動物の肺のTBA値は、マウス>ハムスター>ラット>モルモット>ウサギの順に並び、この5種の動物の間では小動物程高い値を示した。このように、肺の過酸化脂質の生理的レベルには大きな動物種差が存在する、という結果が得られた。

なお、以後のすべての結果はこの肺のTBA値に対応させるため、その値の高かった順、すなわちマウス、ハムスター、ラット、モルモット、ウサギの順に表示した。

3. 1. 2 リン脂質構成脂肪酸組成

肺のリン脂質を構成する脂肪酸組成も動物の種類によりかなりの相違が存在した。肺のリン脂質の脂肪酸の中で、特に過酸化を受け易いと考えられる高度不飽和脂肪酸のアラキドン酸(20:4)、ドコサテトラエン酸(22:4)、ドコサペンタエン酸(22:5)及びドコサヘキサエン酸(22:6)の各

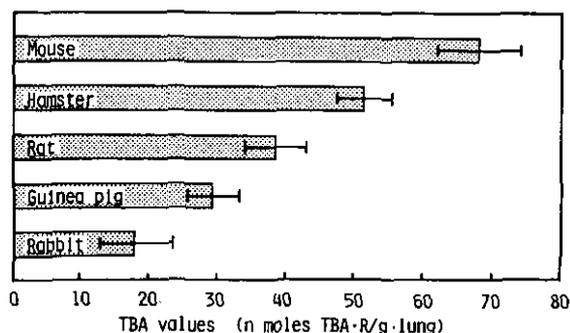


図 1 生理的条件下の各種実験動物の肺のTBA反応物質濃度(TBA値)

Fig. 1 TBA values in lungs of five animal species under physiological status. The values are expressed as mean \pm SD

動物における組成比(%)を図2に示した。アラキドン酸は、ラットが約11%で比較的高い値であった以外は、8%程度でほとんど差がなかった。これに対して、ドコサテトラエン酸は他の動物と比べて、これもラットが高いのに加えてウサギで低い値を示し、またドコサペンタエン酸はマウス、ハムスター、ラットではほぼ同じレベルであったが、モルモット、ウサギへとTBA値が低くなる順に従って低い値を示した。脂肪酸組成の中で最も顕著な差が認められたのはドコサヘキサエン酸であった。マウスで最も高く、平均6.71%を占めていたのに対し、ハムスターでは2.97%、ラットでは2.42%と低く、さらにモルモットとウサギでは検出されなかった。

図2の上端に、すべての不飽和脂肪酸の組成比(%)と反応性から計算した Peroxidizability Index (PI値, 141ページ参照)を示した。それぞれの動物のリン脂質のPI値の平均は、マウスが129.2、ハムスターが104.6、ラットが110.8、モルモットが72.2、ウサギが69.7となり、最も高いマウスはモルモットやウサギの値の2倍近い値を示した。そして、各々のPI値とTBA値との相関を調べた結果、両者の間には極めて高い有意な正の相関($r=0.886$, $p<0.001$)が認められた(図3)。このことから、肺の過酸化脂質の生理的レベルの動物種差に関して、リン脂質の脂肪酸組成とそれぞれの反応性が重要な因子であることが示唆された。

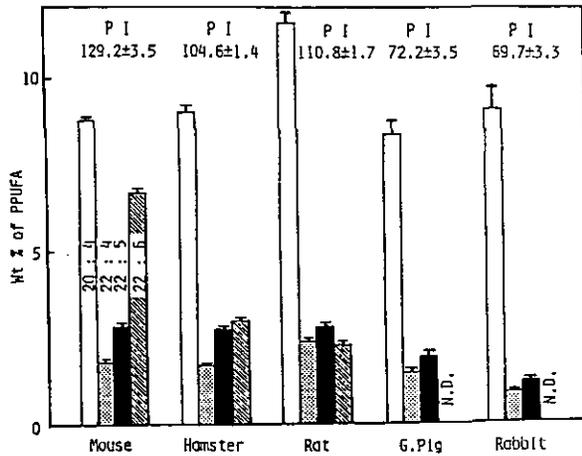


図 2 生理的条件下の各種実験動物の肺のリン脂質の多価不飽和脂肪酸組成と Peroxidizability Index (PI 値)

Fig. 2 Polyunsaturated fatty acid composition and peroxidizability index (PI) in lungs of five animal species under physiological status

Values of fatty acid composition are expressed as mean of area percent \pm SD. PI (Peroxidizability Index) values are expressed as mean \pm SD.

3. 1. 3 リン脂質組成及び総リン脂質量

各動物の肺のリン脂質組成を表2に示した。リン脂質組成はどの動物もホスファチジルコリン(PC)が最も多く、46~47%とほぼ半分を占めており、次いでホスファチジルエタノールアミン(PE)

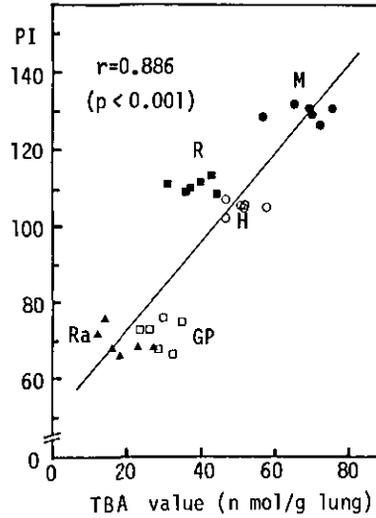


図 3 生理的条件下の各種実験動物の肺のTBA反応性物質量(TBA値)とPeroxidizability Index(PI値)の相関

Fig. 3 Relation between TBA values and peroxidizability index (PI) in lungs of five animal species under physiological status

表 2 生理的条件下の各種実験動物の肺のリン脂質組成と総リン脂質量

Table 2 Phospholipid classes and total phospholipid contents in lungs of five animal species under physiological status

	Mouse	Hamster	Rat	G. Pig	Rabbit
LPC	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.4
Sph	9.5 ± 0.2	10.4 ± 0.3	10.2 ± 0.1	11.2 ± 0.3	11.7 ± 0.8
PC	46.9 ± 0.4	47.4 ± 0.4	47.1 ± 0.6	46.2 ± 0.3	47.0 ± 3.0
	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.2
PI + PS	12.7 ± 0.2	12.9 ± 0.2	12.5 ± 0.2	13.1 ± 0.5	13.0 ± 0.8
PE	21.9 ± 0.6	21.9 ± 0.3	21.6 ± 0.3	22.3 ± 0.4	21.3 ± 1.5
	4.5 ± 0.4	4.1 ± 0.4	3.7 ± 0.3	3.5 ± 0.3	2.8 ± 0.6
	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.5 ± 0.4	2.3 ± 0.4
solvent front	0.5 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.4
	(% ratio of total P of lung lipid)				
Total P	39.2 ± 1.2	35.8 ± 1.9	33.6 ± 0.6	34.6 ± 1.4	35.7 ± 4.5
	(μ mol/g · lung)				

All values are expressed as mean ± SD.

ABBREVIATIONS

LPC: Lysophosphatidylcholine, Sph: Sphingomyelin, PC: Phosphatidylcholine, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserine, PE: Phosphatidylethanolamine, P: Phosphorus.

が21~22%、ホスファチジルイノシトールとホスファチジルセリンの混合画分(PI+PS)が約13%、スフィンゴミエリン(Sph)が9~11%程度を占めていた。これら主要構成成分以外にもリゾホスファチジルコリン(LPC)及び未同定画分(PEのリゾ体、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン等と考えられる)の成分が少量ずつ存在しているが、全動物を通じてその変動は極めて狭い範囲にあり、肺のリン脂質組成については動物種間の相違はほとんど認められなかった。このことは、この肺のリン脂質組成は肺の構造あるいは肺の諸機能にとってエッセンシャル(essential)なものである可能性を示唆しているものと思われる。

また、各動物の肺の総リン脂質量も、マウスが他の動物よりやや高い値を示したものの、ハムスター、ラット、モルモット及びウサギの間にはほとんど差はみられず、動物種間で大きな相違は認められなかった。

3. 1. 4 抗酸化性物質量

各動物の肺のビタミンE(VE)量と非蛋白性SH(NPSH)量を図4に示した。VE量はラットとウサギが非常に高く、マウスは最も低い値を示した。ラットを除くとウサギ>モルモット>ハムスター>マウスの順に高く、肺の過酸化脂質の生理的レベルと全く逆の順に並んだ。NPSH量は、モルモット

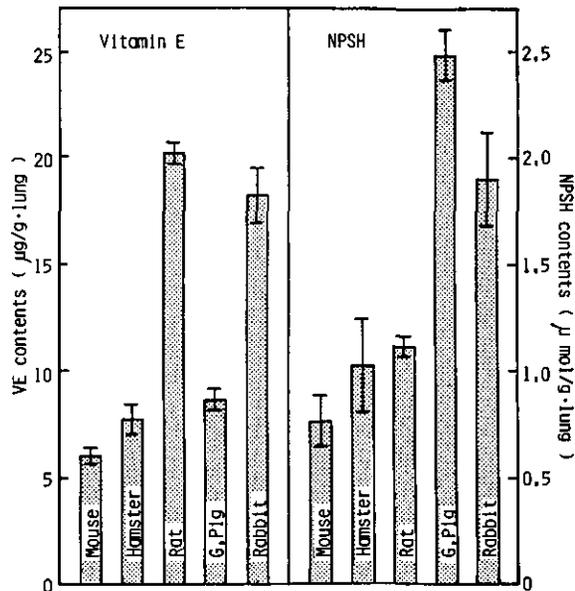


図 4 生理的条件下の各種実験動物の肺のビタミンE(VE)量と非蛋白性SH(NPSH)

Fig. 4 Contents of vitamin E and nonprotein sulfhydryls (NPSH) in lungs of five animal species under physiological status

The values are expressed as mean \pm SD.

トとウサギが高い値を示した。NPSH量も、モルモットが若干飛び抜けているものの、各動物の平均値はやはり肺の過酸化脂質の生理的レベルとは逆の順であった。

さらに、すべての動物の肺のVE量とTBA値の間の相関及びNPSH量とTBAとの間の相関について調べ、その結果を図5に示した。両者とも有意な負の相関を示し、VEもNPSHもその含量が高い動物程、過酸化脂質量は低い傾向がみられた。しかし、VEではラットの値が、NPSHではモルモットの値がその他の動物の値から著しくずれていた。

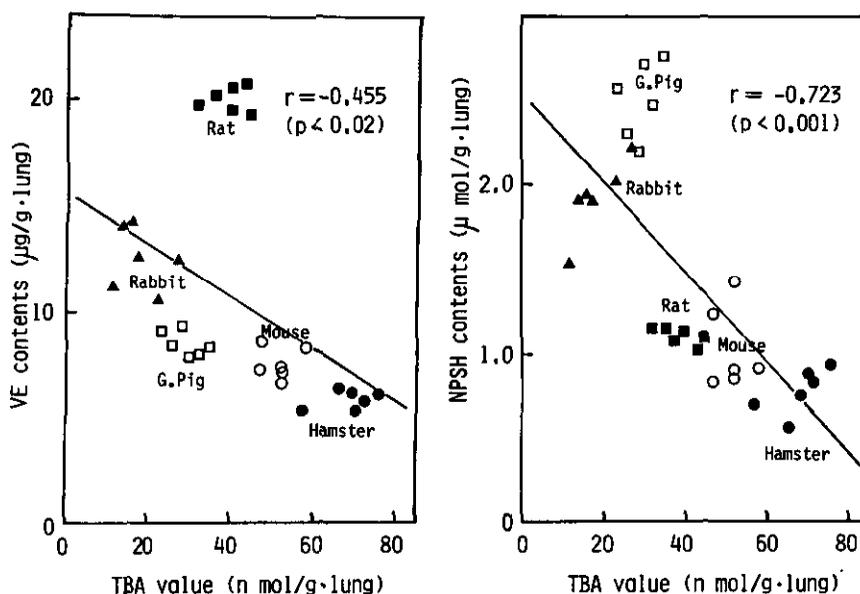


図 5 生理的条件下の各種実験動物の肺のTBA 反応性物質質量(TBA 値)とビタミン E(VE)量との相関(A)とTBA 反応性物質質量(TBA 値)と非蛋白質性SH(NPSH)量との相関(B)

Fig. 5 Relation between TBA values and vitamin E contents (A), and relation between TBA values and nonprotein sulfhydryls (NPSH) (B) in lungs of five animal species under physiological status

○: Mouse, ●: Hamster, ■: Rat, □: G. Pig, ▲: Rabbit.

3. 1. 5 抗酸化性酵素活性

表3に各動物の肺のGlutathione peroxidase(GPx)系酵素の活性を示した。Cumene hydroperoxideを基質としたGPx活性はマウス>ウサギ>ラット>ハムスター>モルモットの順で高く、動物種によって比較的大きな相違が認められた。GPxは活性中心にセレン(Se)を含有し有機過酸化物と過酸化水素の両方を基質にしうる酵素(Se依存性GPx)と、Seを含まず有機過酸化物のみを基質としうる酵素(Se非依存性GPx)の2種類が存在している。過酸化水素を基質とした場合のGPx活性は、ウサギが非常に高く、モルモットでは活性を示さなかった。すなわち、Se依存性と非依存性

表 3 生理的条件下の各種実験動物の肺のグルタチオンペルオキシダーゼ系の酵素活性の比較

Table 3 The activities of glutathione peroxidase enzyme system in lungs of five animal species under physiological status.

Enzyme	Animal	Mean \pm SD ^{a)}	% ^{b)}
G6PD	Mouse	213.0 \pm 15.8	100
	Hamster	127.3 \pm 8.9	60
	Rat	108.2 \pm 31.0	51
	G. Pig	194.7 \pm 34.2	91
	Rabbit	115.4 \pm 33.2	54
6PGD	Mouse	122.6 \pm 10.9	100
	Hamster	139.6 \pm 8.0	114
	Rat	127.8 \pm 10.9	104
	G. Pig	167.9 \pm 15.0	137
	Rabbit	44.3 \pm 8.0	36
GR	Mouse	299.6 \pm 12.7	100
	Hamster	252.1 \pm 16.7	84
	Rat	190.9 \pm 13.6	64
	G. Pig	303.3 \pm 13.2	101
	Rabbit	260.3 \pm 8.1	87
GPx- Cumene	Mouse	197.0 \pm 2.8	100
	Hamster	63.9 \pm 4.7	32
	Rat	106.3 \pm 10.5	54
	G. Pig	22.8 \pm 2.5	12
	Rabbit	149.2 \pm 15.7	76
GPx- H ₂ O ₂	Mouse	57.1 \pm 1.9	100
	Hamster	14.0 \pm 4.4	25
	Rat	61.3 \pm 9.0	107
	G. Pig	0	0
	Rabbit	128.9 \pm 15.3	226

a) The values are expressed as n mol NADPH formed or reduced/mg protein/min.

b) The values show percent ratio against the value of Mouse.

の割合も動物によってかなりの相違があり、モルモットのGPx活性は、それ自体極めて低いが、100%がSe依存性であるのに対して、その他の動物は両方存在しているが、マウス、ハムスターに比べてラットとウサギが、特にウサギがSe依存性酵素の占める割合が高いようである。共役系のGlucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD)活性は、マウスとモルモットが非常に高いが他の3種の動物には差はなく、6-Phosphogluconate dehydrogenase(6PGD)活性はウサギが極端に低く、モルモットが若干高かった。Glutathione reductase(GR)活性は、ラットが若干低い以外はほぼ同じレベルであった。

各動物の肺のGlutathione S-transferase(GSH-Tase), Superoxide dismutase(SOD), 及び, Disulfide reductase(DSR)活性を表4に示した。GSH-Tase活性は、マウスとモルモットで非常に高く、

表 4 生理的条件下の各種実験動物の肺のグルタチオン S-トランスフェラーゼ、スーパーオキシド異性化酵素、ジスルフィド還元酵素活性の比較
 Table 4 The activities of glutathione S-transferase, superoxide dismutase and disulfide reductase in lungs of five animal species under physiological status.

Enzyme	Animal	Mean ± SD	% ^{a)}
GSH-Tase ^{b)}	Mouse	1459 ± 49	100
	Hamster	408 ± 29	28
	Rat	138 ± 13	9
	G.Pig	1419 ± 69	97
	Rabbit	622 ± 36	43
SOD ^{c)}	Mouse	61.8 ± 2.7	100
	Hamster	48.4 ± 4.3	78
	Rat	48.8 ± 5.6	79
	G.Pig	65.8 ± 11.3	106
	Rabbit	30.9 ± 2.8	50
DSR ^{d)}	Mouse	115.2 ± 13.0	100
	Hamster	236.2 ± 36.5	205
	Rat	276.6 ± 28.9	240
	G.Pig	157.2 ± 18.5	136
	Rabbit	67.1 ± 1.4	58

- a) The values show percent ratio against the value of mouse.
- b) The values are expressed as n mol. of metabolite formed/mg · protein/min.
- c) The values are expressed as unit/mg · protein/min.
- d) The values are expressed as n mol cysteine formed/mg · protein/h.

ラットではそれらの10分の1程度の活性しか示さなかった。SOD活性は、ウサギが低かったが、その他の動物の間の変動は比較的少なかった。DSR活性は、ハムスターとラットが高く、ウサギが極端に低い値を示した。なお、各抗酸化系酵素の活性値は、いずれも各動物の肺のTBA値との間に、VEやNPSHのような一定の方向の相関性を示さなかった。

3. 1. 6 肺の過酸化脂質量の動物種差の決定因子について

これまでの結果から、肺の過酸化脂質の生理的レベルの動物種差を決定する因子について検討した。

本実験における肺のリン脂質の脂肪酸組成から、不飽和脂肪酸の二重結合の数による反応性の相違を考慮した Peroxidizability Index (PI 値) を算出したところ、PI 値と TBA 値で示された *in vivo* の肺の過酸化脂質量との間に極めて高い正の相関性 ($r=0.886$, $p<0.001$) が認められた(図3)。

一方、肺の総リン脂質量は動物種間で大きな相違はみられなかった(表1)。これらのことから、本論文では Kornbrast らが用いた PPUFA 含量の代わりに PI 値を用いた PI/VE 比を求め、*in vitro* での肺の過酸化脂質量との間の相関を調べた。その結果、図6に示したとおり、PI/VE 比と TBA 値との間にも有意な正の相関が認められた ($r=-0.806$, $p<0.001$)。しかし、ラット以外の動物は

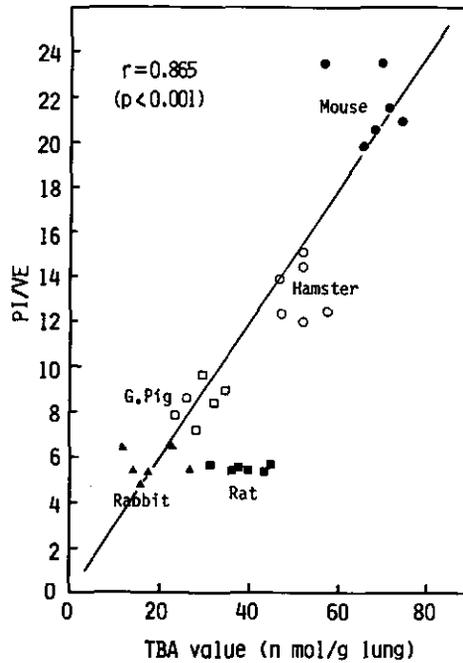


図 6 生理的条件下の各種実験動物の肺の TBA 反応性物質量(TBA 値)とビタミン E と Peroxidizability Index 比 (PI/VE) の相関

Fig. 6 Relation between TBA values and peroxidizability index/vitamin E (PI/VE) in lungs of five animal species under physiological status

一定の直線上に乗るものの、ラットの肺の VE 量は非常に高かった(図 4)ため、ラットだけが他の動物との関係から外れ、相関係数の絶対値も PI 値単独と TBA 値との間で得られた値(0.886)より低下した。*in vivo* の過酸化脂質生成においては、細胞の可溶性画分の抗酸化性因子の関与も考える必要がある。

可溶性画分に存在する NPSH は、VE と同様に、その含量が高い動物程肺の TBA 値は低い値を示す傾向(図 4, 図 5)がみられた。肺の NPSH の 90% 以上は還元型グルタチオン (GSH) である。“はじめに” で述べたとおり、GSH は細胞内に比較的高い濃度で存在する抗酸化性物質であり、また GPx, GSH-Tase 等の過酸化脂質の代謝に働く酵素の重要な基質でもある。したがって、これらのことから、NPSH 量も過酸化脂質の生理的レベルを規定する重要な因子である可能性が考えられる。そこで、NPSH 量を PI/VE 比の補正係数として用いた $(PI/VE) \cdot (1/NPSH)$ を計算し、この値の対数値と TBA 値との相関を調べた。その結果は、図 7 に示したとおり、極めて強い有意な負の相関 ($r = -0.935, P < 0.001$) を示し、相関係数の絶対値も増大した。また、TBA 値対 PI/VE 比の場合のような他の動物との関係から特に外れる値を示す動物もなくなった。各動物の平均値の分布は、図 8 に示す如く、すべての動物の値が一定のシグモイド曲線上にプロットされた。なお、PI/VE 比の補正項として NPSH のほかに可溶性画分中に存在する抗酸化性酵素の活性値についても検討し

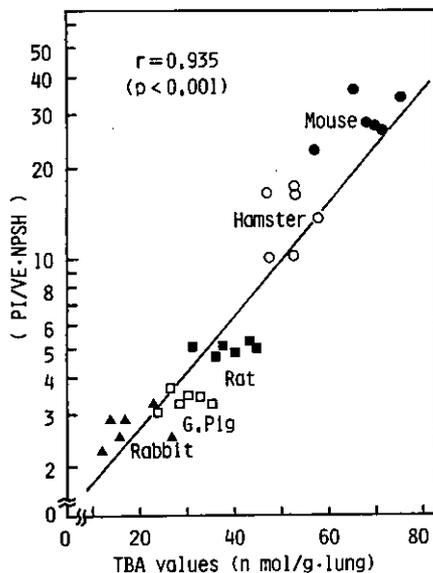


図 7 生理的条件下の各種実験動物の肺のTBA値と $\log (PI/VE \cdot NPSH)$ 値の相関

Fig. 7 Relation between TBA values and $\log (PI/VE \cdot NPSH)$ in lungs of five animal species under physiological status

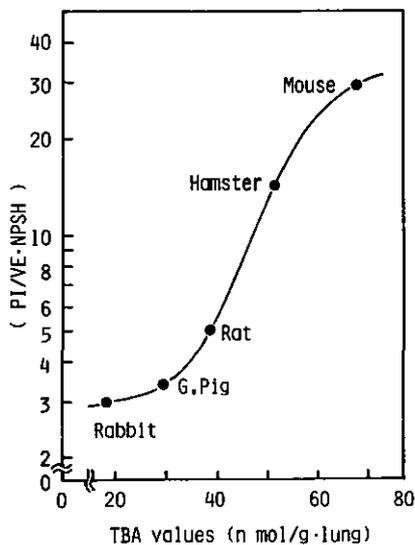


図 8 生理的条件下の各種実験動物の肺の TBA 値の平均値と $\log (PI/VE \cdot NPSH)$ 値の平均値との関係

Fig. 8 Relation between TBA values and $\log (PI/VE \cdot NPSH)$ in lungs of five animal species under physiological status

てみたが、すべて相関係数の絶対値は著しく低下し、有効な補正項となるものは見いだされなかった。

以上の結果から、現時点では、肺の過酸化脂質の生理的レベルの動物種差に関して、過酸化脂質生成の主要成分であるリン脂質の脂肪酸の組成比、過酸化に対する反応性、ビタミンE量及びGSH量の四つが特に重要な因子であることが示唆された。

なお、生理的条件下の動物については、ウサギを除いて2度の実験を行った。相対的な傾向は極めて高い再現性が得られたが、実験に用いた動物のロットが異なるため、得られた絶対値は項目によつて多少のズレがみられた。本稿で用いた結果は2度目の実験のものであり、次に述べる急性実験に用いた動物と同一ロットの動物、すなわち対照動物の結果の方を記載した。

3.2 0.4ppm NO₂と0.4ppm O₃の混合ガス暴露による肺の過酸化脂質関連因子の変化の動物種差について

3.2.1 過酸化脂質量

0.4ppm NO₂と0.4ppm O₃の混合ガス(NO₂ + O₃, 各0.4ppm)に1~2週間連続暴露したマウス、ハムスター、ラット及びモルモットの肺の過酸化脂質量(TBA値)の変化を図9に示した。マウスの肺の過酸化脂質量は、暴露7日目で24%, 14日目では69%, それぞれ対照群より有意に増加した。また、モルモットでは、7, 14日目でそれぞれ対照群より44%, 123%の有意な増加を示した。一方、ハムスターとラットの肺の過酸化脂質量は7日目, 14日目とも対照群と変わらなかった。また、ラットについては暴露10日目についても検討したが対照群と全く変わりがなく、7日目及び14日目では逆に若干低下する傾向がみられたが、いずれも有意差は認められなかった。

このように、生理的条件下で肺の過酸化脂質が最も高い値を示したマウスでは、NO₂ + O₃(各0.4ppm)の暴露期間の延長につれて過酸化脂質は増加した。一方、ハムスターとラットではNO₂ + O₃暴露による肺の過酸化脂質の増加は認められなかった。この4種の動物の中では肺の過酸化脂質量の生理的レベルが最も低く、さらに過酸化脂質も生成されにくい状態にあったモルモットで、NO₂ + O₃暴露によって肺の過酸化脂質の顕著な増加が認められた。NO₂ + O₃の2週間暴露後の各動物の肺のTBA値は、マウスが114.9±19.2, ハムスターが55.7±9.3, ラットが31.3±8.5そしてモルモットで65.2±12.1(n mol/g·lung, 平均±標準偏差)となり、肺の過酸化脂質のレベルはマウス>モルモット>ハムスター>ラットの順となった。

3.2.2 リン脂質構成脂肪酸組成

ハムスターとラットの対照群及びNO₂ + O₃(各0.4ppm)2週間暴露群のリン脂質の構成脂肪酸組成を表5に示した。ハムスターでは、ステアリン酸(18:0)の含有率が若干増加し、オレイン酸(18:1)及びパルミトレイン酸(16:1)がわずかながら減少し、共に有意差を示した。ラットではオレイン酸(18:1)とドコサペンタエン酸(22:5)がわずかに減少し、アラキドン酸(20:4)がわず

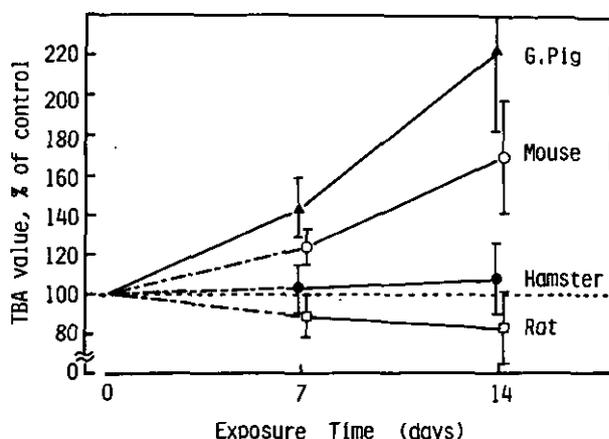


図 9 0.4ppm NO₂ と 0.4ppm O₃ の混合ガス暴露による各種実験動物の肺の TBA 反応性物質量 (TBA 値) の変化

Fig. 9 Periodical changes of TBA values in lungs of four animal species exposed continuously to the combined gases of 0.4ppm NO₂ and 0.4ppm O₃ for two weeks. Control values were located 68.0 and 51.5 n mol/g · lung for mouse and hamster, 36.3, 26.6, and 38.7 n mol/g · lung for rat of 7, 10 and 14 days, 33.5, 29.3 n mol/g · lung for G. pig of 7, 14 days, respectively.

The values are expressed as mean ± SD.

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

かながら増加し、いずれも有意差がみられた。しかし、ハムスターとラットは、いくつかの脂肪酸が統計的有意差を示したものの、その変化は極めて小さいものであった。脂肪酸の Peroxidizability Index (PI 値) は、ハムスターでは全く変化がなく、ラットでは、ドコサペンタエン酸 (22: 5) の有意な減少に加えてドコサテトラエン酸 (22: 4) 及びドコサヘキサエン酸 (22: 6) の含有率がともに減少傾向を示したことを反映して有意ではあるがわずかな低下 (110.8→107.6) を示した程度であった。

一方、マウスとモルモットの肺のリン脂質の脂肪酸組成は比較的大きな変動を示した。この両動物の対照群及び NO₂ + O₃ (各 0.4ppm) 2 週間暴露群のリン脂質の構成脂肪酸組成を表 6 に示した。両動物とも特に顕著な変化を示した脂肪酸はパルミチン酸 (16: 0) であり、マウスでは 37.60→39.42% へ、またモルモットでは 34.60→41.43% へとそれぞれ有意な増加を示した。また、ミリスチン酸 (14: 0) 及びマウスではパルミトレイン酸 (16: 1) もわずかながら有意に増加していた。これに対して、両動物ともステアリン酸 (18: 0)、オレイン酸 (18: 1)、ドコサテトラエン酸 (22: 4) 及びドコサペンタエン酸 (22: 5) が有意な減少を示した。特に、モルモットのステアリン酸 (18: 0) は 11.52%→9.37% へと著しく減少した。加えて、モルモットでは、アラキドン酸 (20: 4) も 8.37%→6.61% へと比較的大きな減少を示した。モルモットではすべての高度不飽和脂肪酸 (PUFA) 含有率が減少したことを反映して、PI 値は 72.2 から 57.3 へと著しく有意に低下した。マウスでは、ド

表 5 0.4ppm NO₂ と 0.4ppm O₃ の混合ガス連続 2 週間暴露によるハムスターとラットの肺のリン脂質構成脂肪酸組成の変化

Table 5 Changes of fatty acid composition of phospholipids in lungs of hamsters and rats exposed continuously to the combined gases of 0.4ppm NO₂ and O₃ for two weeks

	Control	Exposed
(A) Hamster		
14:0	1.37 ± 0.11	1.49 ± 0.08
16:0	34.14 ± 0.47	33.68 ± 0.39
16:1	4.75 ± 0.08	4.63 ± 0.08*
18:0	11.46 ± 0.21	12.07 ± 0.11***
18:1	15.33 ± 0.22	14.51 ± 0.17***
18:2	10.40 ± 0.18	10.60 ± 0.18
20:4	8.99 ± 0.19	9.04 ± 0.18
22:4	1.72 ± 0.06	1.74 ± 0.05
22:5	2.76 ± 0.11	2.79 ± 0.10
22:6	2.97 ± 0.09	2.96 ± 0.09
P I	104.6 ± 1.4	104.8 ± 0.8
(B) Rat		
14:0	2.66 ± 0.15	2.75 ± 0.13
16:0	34.83 ± 0.44	35.47 ± 0.54
16:1	5.16 ± 0.17	4.91 ± 0.22
18:0	11.79 ± 0.15	11.59 ± 0.22
18:1	11.67 ± 0.11	11.10 ± 0.12***
18:2	7.99 ± 0.19	8.25 ± 0.21
20:4	11.59 ± 0.27	12.07 ± 0.35*
22:4	2.41 ± 0.09	2.32 ± 0.05
22:5	2.85 ± 0.07	2.51 ± 0.15**
22:6	2.42 ± 0.07	2.29 ± 0.18
P I	110.8 ± 2.8	107.6 ± 1.5*

Minor components of fatty acids were omitted for clarity.

Values of fatty acid composition are expressed as area percent mean ± SD. PI (Peroxidizability Index)

values are expressed as mean ± SD.

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

コサヘキサエン酸(22:6)が増加傾向を示したこともあって、PI値はわずかな低下(129.2→127.5)にとどまり、有意な変化を示すには至らなかった。

なお、4種の動物のうちで、PI値が最も低い値を示したモルモットで過酸化脂質が増加したことから、暴露後の肺のTBA値とPI値との間に、生理的条件下の動物間でみられたような有意な相関性は認められなかった。

表 6 0.4ppm NO₂ と 0.4ppm O₃ の混合ガス連続 2 週間暴露によるマウスとモルモットの肺のリン脂質構成脂肪酸組成の変化

Table 6 Changes of fatty acid composition of phospholipids in lungs of mice and guinea pigs exposed continuously to the combined gases of 0.4ppm NO₂ and O₃ for two weeks

	Control	Exposed
(A) Mouse		
14:0	1.86 ± 0.08	2.26 ± 0.19**
16:0	37.60 ± 0.44	39.42 ± 0.27***
16:1	6.04 ± 0.10	6.47 ± 0.17***
18:0	11.01 ± 0.09	10.12 ± 0.12***
18:1	10.04 ± 0.18	9.45 ± 0.15***
18:2	7.01 ± 0.15	7.04 ± 0.14
20:4	8.78 ± 0.07	8.85 ± 0.15
22:4	1.82 ± 0.06	1.50 ± 0.06***
22:5	2.84 ± 0.07	2.67 ± 0.07**
22:6	6.71 ± 0.06	6.85 ± 0.08
P I	129.2 ± 1.9	127.5 ± 0.7
(B) G.Pig		
14:0	3.15 ± 0.21	3.45 ± 0.18*
16:0	34.60 ± 1.16	41.43 ± 1.93***
16:1	4.02 ± 0.45	4.30 ± 0.45
18:0	11.52 ± 0.35	9.37 ± 0.47***
18:1	17.71 ± 0.49	16.17 ± 0.62***
18:2	9.91 ± 0.87	9.42 ± 1.22
20:4	8.37 ± 0.39	6.61 ± 0.43***
22:4	1.49 ± 0.12	1.13 ± 0.11***
22:5	1.96 ± 0.15	1.41 ± 0.08***
P I	72.2 ± 3.5	57.3 ± 5.0***

Minor components of fatty acids were omitted for clarity.

Values of fatty acid composition are expressed as area percent mean ± SD. PI (Peroxidizability Index) values are expressed as mean ± SD.

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

3. 2. 3 リン脂質組成及び総リン脂質量

4 種の動物の対照群及び NO₂ + O₃ (各 0.4ppm) 2 週間暴露群の肺のリン脂質組成を表 7 に示した。モルモットは、NO₂ + O₃ 暴露によりリン脂質組成にも大きな変動がみられ、ホスファチジルコリン (PC) の含有率が大きく増加 (46.2% → 54.7%) し、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトールとホスファチジルセリンの混合画分 (PI+PS) 及びスフィンゴミエリン (Sph) がすべて減少し、それぞれ有意差も認められた。また、ホスファチジルコリンのリゾ体 (LPC) の増加もみられた。マウスでは、モルモット程顕著ではないが、PC が有意に増加し、PE、PI+PS

及び Sph が有意に減少した。しかし、LPC はモルモットの場合とは逆に、若干の減少を示した。ラットでも、PC の増加及び PE, Sph, LPC の減少がみられ、いずれも有意差も認められた。しかし、その変動幅はマウスの場合より小さかった。一方、ハムスターでは、PI+PS がわずかではあるが有意に減少した以外は、有意な変化はみられなかった。

図10には、NO₂ + O₃(各0.4ppm)を2週間暴露した各動物の肺の総リン脂質量の変化を示した。モルモットの肺の総リン脂質量は、暴露によって対照群より30%の有意な増加を示した。マウスの肺の総リン脂質量は対照動物で既に他の3動物よりやや高かったが、暴露後さらに8%の有意な増加を示し、ラットでは5%程度であるが有意に増加していた。しかし、ハムスターでは全く変化がみられなかった。

リン脂質組成及び総リン脂質量についても、脂肪酸組成の変化と同じく、過酸化脂質の増加がみられたマウス及びモルモットで変動がみられ、特にモルモットの変化が顕著であった。以上の変化の程度は、TBA 値の変化と比較的対応しているように思われた。

3. 2. 4 抗酸化性物質

NO₂ + O₃(各0.4ppm)を連続2週間暴露した各動物の肺のビタミン E(VE)量及び非タンパク性 SH(NPSH)量を、それぞれを対照群と比較して図11に示した。VE 量はハムスターとラットで8%増加したが、マウスは対照群と全く変わらずモルモットでは逆に6%減少した程度であり、いずれも有意差はなかった。NPSH 量は、マウスで67%、ハムスターでは95%、そしてラットで30%のそれぞれ有意な増加を示し、これに対して、モルモットでは対照群とほとんど差がなかった。

表 7 NO₂ と O₃ の混合ガスに暴露された各種動物の肺リン脂質組成の変化

Table 7 Changes of total phospholipids and phospholipid classes in lungs of various animals exposed to the combined gases of nitrogen dioxide and ozone

Animals	Phospholipids ($\mu\text{mol Pi/g} \cdot \text{lung}$)	Total					
		LPC (%)	Sph (%)	PC (%)	PI + PS (%)	PE (%)	
Mouse	Control	39.2 \pm 1.2	1.7 \pm 0.2	9.5 \pm 0.2	46.9 \pm 0.4	12.7 \pm 0.2	21.9 \pm 0.6
	Exposed	42.5 \pm 0.7*** (108%)	1.4 \pm 0.2* (82.4%)	8.6 \pm 0.1*** (90.5%)	50.8 \pm 0.5*** (108.3%)	10.6 \pm 0.2*** (83.5%)	20.7 \pm 0.2*** (94.5%)
Hamster	Control	35.8 \pm 1.9	1.3 \pm 0.1	10.4 \pm 0.3	47.4 \pm 0.4	12.9 \pm 0.2	21.9 \pm 0.3
	Exposed	35.5 \pm 1.3 (99%)	1.4 \pm 0.2 (107.7%)	10.1 \pm 0.2 (97.1%)	47.0 \pm 0.5 (99.2%)	12.4 \pm 0.2 (96.1%)	22.1 \pm 0.3 (100.9%)
Rat	Control	33.6 \pm 0.6	1.9 \pm 0.1	10.2 \pm 0.1	47.1 \pm 0.6	12.5 \pm 0.2	21.6 \pm 0.3
	Exposed	35.5 \pm 1.6* (106%)	1.7 \pm 0.1* (89.5%)	9.2 \pm 0.3** (90.2%)	50.0 \pm 0.8*** (106.2%)	12.2 \pm 0.3 (102.5%)	20.9 \pm 0.3* (96.8%)
G. Pig	Control	34.6 \pm 1.4	0.8 \pm 0.1	11.2 \pm 0.3	46.2 \pm 0.3	13.1 \pm 0.5	22.3 \pm 0.4
	Exposed	45.2 \pm 3.4*** (131%)	1.5 \pm 0.3** (187.5%)	8.5 \pm 0.6** (75.9%)	54.7 \pm 1.4*** (118.4%)	11.4 \pm 0.3*** (87.0%)	17.4 \pm 1.0*** (78.0%)

Unidentified components were omitted for clarity. The values are expressed as mean \pm SD.

Abbreviations: see Table 3 footnote. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

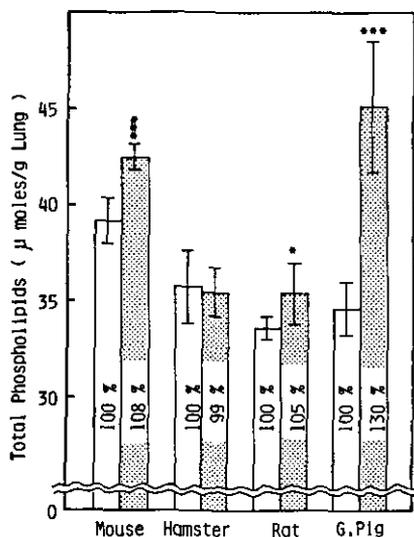


図 10 0.4ppm NO₂ と 0.4ppm O₃ の混合ガス連続 2 週間暴露による各種実験動物の肺の総リン脂質量の変化

Fig. 10 Comparison of the total phospholipid contents in lungs of the four control animal species and animals exposed continuously to the combined gases of 0.4 ppm NO₂ and 0.4 ppm O₃ for two weeks. □: control, ▨: NO₂+O₃ group. The values are expressed as mean ± SD. *: p<0.05, ***: p<0.001.

NO₂ + O₃ (各0.4ppm) を 2 週間暴露したすべての動物の肺の VE 量と TBA 値の相関を図12に示した。生理的条件下の 5 種類の動物でみられたと同様に、有意な負の相関が認められた。相関係数の絶対値は0.713となり、生理的条件下の 5 種の動物の間で得られた値(|r| = 0.455) より著しく上昇した。なお、肺の NPSH 量と TBA 値の間には、生理的条件下の 5 種の動物の間でみられたような有意な相関性は認められなくなった。これらのことから、NO₂ + O₃ による脂質過酸化に対する抗酸化作用に関しては、還元型グルタチオン(GSH)よりも VE がより効果的である可能性が示唆された。

一方、生理的条件下の 5 種の動物で、TBA 値との間に非常に高い負の相関性が認められた (PI/VE · NPSH) の対数値について、NO₂ + O₃ (各0.4ppm) 2 週間暴露時の各動物の値を求め、同じく 2 週間暴露時のそれぞれの TBA 値に対してプロットした結果を図13に示した。統計的には有意な正の相関性(r=0.761, p<0.001)が得られ、生理的条件下の 5 種の動物で得られた相関と類似の結果が得られた。このことから、NO₂ + O₃ (各0.4ppm) 暴露により肺の過酸化脂質生成も、リン脂質の脂肪酸の組成比と過酸化に対する反応性、VE 量及び GSH 量によって規定されている可能性が考えられる。

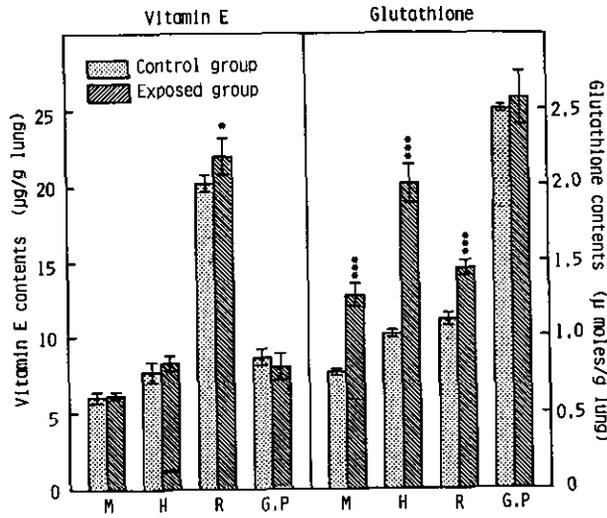


図 11 0.4ppm NO₂ と0.4ppm O₃ の混合ガス連続 2 週間暴露による各種実験動物の肺のビタミン E (VE) 量及び非タンパク性 SH (NPSH) 量とその対照群との比較

Fig. 11 Comparison of the vitamin E and nonprotein sulfhydryls (NPSH) contents in lungs of the four control animal species and animals exposed continuously to the combined gases of 0.4 ppm NO₂ and 0.4 ppm O₃ for two weeks respectively. The values are expressed as mean ± SD. *: p < 0.05, ***: p < 0.001.

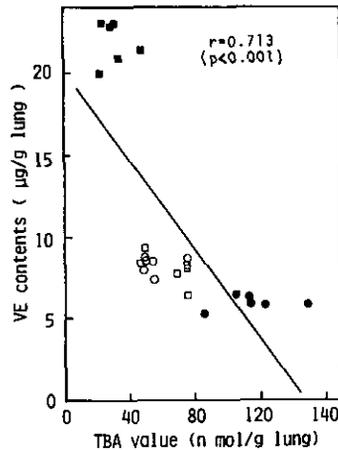


図 12 0.4ppm NO₂ と0.4ppm O₃ の混合ガス連続 2 週間暴露による各動物における肺の TBA 反応性物質 (TBA 値) とビタミン E (VE) の相関

Fig. 12 Relation between TBA values and vitamin E contents in lungs of four animal species exposed continuously to the combined gases of 0.4 ppm NO₂ and 0.4 ppm O₃ for two weeks

●: Mouse, ○: Hamster, ■: Rat, □: G. pig.

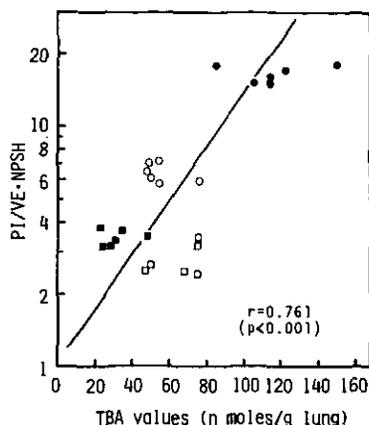


図 13 0.4ppm NO₂ と 0.4ppm O₃ の混合ガス連続 2 週間暴露の各動物における肺の TBA 値と log (PI/VE · NPSH) 値の相関

Fig. 13 Relation between TBA values and log (PI/VE · NPSH) in lungs of four animal species exposed continuously to the combined gases of 0.4 ppm NO₂ and 0.4 ppm O₃ for two weeks

●: Mouse, ○: Hamster, ■: Rat, □: G. pig.

3. 2. 5 抗酸化性酵素活性

NO₂ + O₃ (各0.4ppm) 暴露による各動物の Glutathione peroxidase (GPx) 系の各酵素の活性変化を図14に示した。Cumene hydroperoxide を基質としたときの GPx 活性は、すべての動物で有意に増加していた。過酸化水素を基質とした場合の GPx 活性も、ハムスターでは減少傾向を示したが、マウス及びラットでは有意に増加していた。Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 活性も、モルモット以外のすべての動物で有意な増加を示した。モルモットでも有意差はないが増加傾向がみられた。6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) も、ラットでは対照群とほとんど変わらなかったが、マウス及びハムスターでは有意に増加し、モルモットでも増加傾向がみられた。Glutathione reductase (GR) 活性は、データは示していないが、どの動物でもわずかに増加する傾向はみられたが有意な変化は認められなかった。

さらに図15に NO₂ + O₃ (各0.4ppm) 2 週間暴露による各動物の Glutathione S-transferase (GSH-Tase), Superoxide dismutase (SOD), Disulfide reductase (DSR) 活性の変化を示した。GSH-Tase 活性は、過酸化脂質の増加がみられたマウスとモルモットで有意に減少し、逆にハムスターは有意に増加、ラットは対照群と全く変わりがなかった。SOD 活性は、すべての動物で増加しており、マウスとハムスターでは有意な増加を示した。DSR 活性は、マウスで有意に増加し、モルモットは増加傾向を示したが有意差はなかったのに対して、ハムスターとラットでは逆に有意に減少していた。

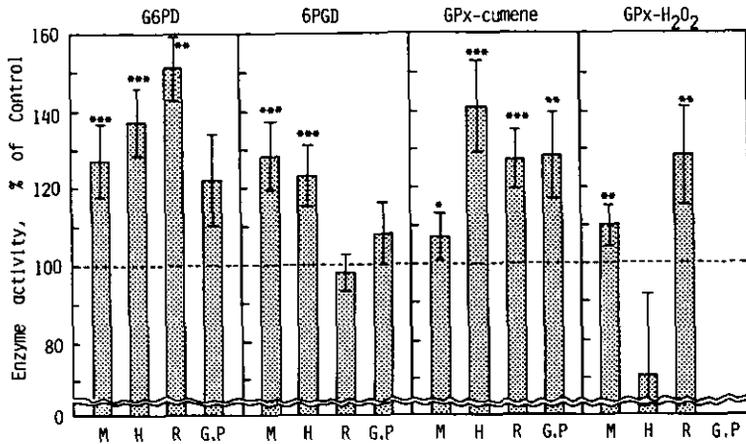


図 14 0.4ppm NO₂ と 0.4ppm O₃ の混合ガス連続 2 週間暴露による各動物の肺のグルタチオン・ペルオキシダーゼ系の酵素活性の変化

Fig. 14 Changes of the activities of glutathione peroxidase system enzymes in lungs of four animal species exposed continuously to the combined gases of 0.4 ppm NO₂ and 0.4 ppm O₃ for two weeks

Control values were located the corresponding mean values in Table 3. The values are expressed as mean ± SD. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

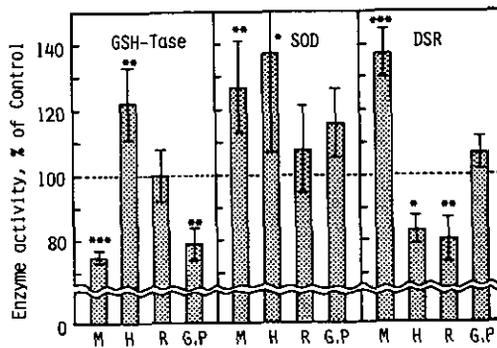


図 15 0.4ppm NO₂ と 0.4ppm O₃ の混合ガス連続 2 週間暴露による各動物の肺のグルタチオン S-トランスフェラーゼ, スーパーオキシド異性化酵素, ジスルフィド還元酵素活性の変化

Fig. 15 Changes of the activities of glutathione S-transferase (GSH-Tase), superoxide dismutase (SOD) and disulfide reductase (DSR) in lungs of four animal species exposed continuously to the combined gases of 0.4 ppm NO₂ and 0.4 ppm O₃ for two weeks

Control values were located the corresponding mean values in Table 4. The values are expressed as mean ± SD. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

4 考察

4.1 生理的条件下での肺の過酸化脂質量の動物種差とその決定因子について

本実験では、5種の実験動物の生理的条件下の肺の過酸化脂質量を調べた結果、肺の過酸化脂質の生理的レベルには著しい動物種差があり、これらの差を決定する因子として、肺のリン脂質中の脂肪酸の組成比及び過酸化に対する反応性、ビタミンE量及び還元型グルタチオン量の四つの因子が重要であることが明らかとなった。

各動物の肺の過酸化脂質量をTBA反応性物質質量として測定した結果、肺の過酸化脂質の生理的レベルは動物種によって異なり、その幅が比較的大きいものであることを見いだした。このように、正常時の生体内の各種臓器中や血液中にも、生体に有害な作用をもつ過酸化脂質が検出される。しかし、生物は長い進化の中で、自己の体中にある因子及びその作用を、単に避けるべき対象として放置しておいたものはほとんどなく、必ず何か有用な目的あるいは調節因子として有効に利用する形に変えている例が多い。このことから、過酸化脂質も、生体にとって何らかの存在意義のある物質である可能性が考えられる。事実、過酸化脂質からの代謝物であるプロスタグランジン(PG)やプロスタサイクリン(PX)は生体内で重要な役割を果たす生理活性物質である⁹⁶⁾。さらに、Hemlerら^{97,98)}は、PGは生体内にその前駆物質であるアラキドン酸と酸素があるだけでは生成されず、これに加えて微量の過酸化脂質の存在が必須条件であることを報告している。また、Vladimirovら⁹⁹⁾は生体内の過酸化脂質の有用な働きとして、1) 過酸化脂質が細胞膜や顆粒膜の表面陰電荷や粘性を増加させて、膜のイオン透過を促進したり、膜結合性ホスホリパーゼを活性化したりすることによって、リン脂質等の交換を調節していること、2) 細胞内の過酸化脂質量が生理的条件下での細胞の増殖や分裂を規定していることなどをあげている。このようなことから、通常の生体内では過酸化脂質は一定の必要レベルに調節されており、この調和が崩れ過酸化脂質が増加することによって、病的状態へと進行してゆくものと考えられる。

次に本研究では、肺の過酸化脂質の生理的レベルの動物種差の成績から、過酸化脂質量の調節因子についての考察を試みた。過酸化脂質量を調節している因子として、過酸化脂質生成の主要成分であるリン脂質の脂肪酸の組成比と過酸化に対する反応性、抗酸化性物質質量及び抗酸化性酵素活性等を考慮した。肺のリン脂質中の各脂肪酸の組成比と各脂肪酸の反応性から計算された Peroxidizability Index (PI 値) と TBA 値の間には正の相関性 ($r=0.886$, $p<0.001$) が認められ、ビタミンE (VE) 量と TBA 値の間には負の相関 ($r=-0.455$, $p<0.02$)、肺においてはほぼ90%が還元型グルタチオンと考えられる非蛋白性SH (NPSH) 量と TBA 値との間にも負の相関性 ($r=-0.723$, $p<0.001$) が認められた。これらのことから、これら四つの因子が過酸化脂質の生理的レベルの調節に強く関与していることが示唆された。さらに、Kornbrastら⁷⁹⁾の *in vitro* での知見から *in vivo* でも過酸化脂質生成の規定因子となりうるのではないかと考えられた PI/VE 比を NPSH 量で補正した (PI/VE · NPSH) 値と TBA 値との間には極めて強い相関性 ($r=-0.904$, $p<0.001$) が認められ、各動物の TBA 値の差が (PI/VE · NPSH) 値によって説明可能であることが示された。

また、表3と4に示したように、ほとんどの抗酸化性酵素活性は動物種によって大きく異なっていたが、どの項目もTBA値と負の相関を示すものはなかった。抗酸化性酵素の中で、Superoxide dismutase (SOD)は脂質過酸化の開始剤の一つと考えられている活性酸素種のスーパーオキシドラジカル(O_2^-)を異性化しうることから、またGlutathione peroxidase (GPx)はヒドロペルオキシドを還元する酵素であることから、共に脂質過酸化抑制機能を持つ酵素として特に注目されている。本実験では、各動物の肺のSOD活性はウサギで最も低い値を示したが、動物種間にはさほど大きな差はないことが示された。また、SOD活性がしばしば O_2^- の間接指標とされる^{100,101)}ことから、肺での O_2^- の発生頻度が動物種によって大きく異なることもないのかもしれない。また、生理的条件下での脂質過酸化反応の開始条件として、 O_2^- を含む各種活性酸素種(一重項酵素、 1O_2 ; ヒドロキシラジカル、 $HO\cdot$; 過酸化水素、 H_2O_2)やフリーラジカルの発生等が考えられるが、肺の過酸化脂質の生理的レベルが(PI/VE・NPSH)でほぼ決定されることから、肺の活性酸素やラジカル量もGPxやSODのような酵素類よりも(PI/VE・NPSH)によって規定されているものと思われる。一方、GPxについては、この酵素の脂質過酸化抑制機能を示唆する成績が数多く報告されている。例えば、*in vivo*の実験では、 NO_2 暴露²¹⁻²⁴⁾、 O_3 暴露³¹⁻³²⁾などの脂質過酸化促進条件に対応したGPx活性の増加、またSe欠乏ラットでの呼気中エタン産生の増加とそのSe投与による抑制¹⁰²⁾、さらに*in vitro*でも O_2^- 生成系による膜脂質の過酸化反応のGPx系の共存による阻害¹⁰³⁾等が認められている。しかしながら、本実験では肺のTBA値が最も高いマウスでGPx活性が最も高く、TBA値が比較的低いモルモットのGPx活性は極めて低いというような結果となり、GPxによる脂質過酸化抑制を示唆する結果は見いだされなかった。McCayら¹⁰⁴⁾は*in vitro*での O_2^- 生成系による過酸化連鎖反応系はGPx系の添加で確かに阻害されたが、膜内脂肪酸のうち、不飽和脂肪酸の減少や水酸化脂肪酸の増加はみられず、GPxは膜中の脂肪酸ヒドロペルオキシドを還元しえないと報告している。このようなことから、GPxの脂質過酸化抑制作用は、GPxによる H_2O_2 の除去による活性酸素分子種の発生頻度の低下(例えば、鉄イオンの存在下でのFenton反応による $HO\cdot$ の生成抑制など)としての解釈も可能であると思われる。ただし、このことは膜脂質から遊離してくる脂肪酸ヒドロペルオキシドの還元作用そのものを否定するものではない。事実、Sevanianら¹⁰⁵⁾は、ラット肝ミクロソーム及びリポソーム中で生成した過酸化脂質がPhospholipase A₂の作用で切り出され、これが可溶性画分に存在するGPxで効率よく代謝されることを見いだしている。一方、吉村ら¹⁰⁶⁾はGPx、Glutathione reductase (GR)、還元型グルタチオン(GSH)濃度を正常ラットの肝の10万×g上清中と同レベルに調製し、これにNADPHを加えてCumene hydroperoxideを還元させる系で、GPx、GR、GSHのそれぞれの含量を100%~300%まで増やしていった場合、GSH量を増加させたとき、この系の活性上昇が最も著しかったことから、生体内でのGPx活性はGSH量に強く規定されているのではないかと述べている。

4. 2 0.4ppm NO₂と0.4ppm O₃の混合ガス暴露による肺の過酸化脂質関連因子の 変化の動物種差について

本研究では、マウス、ハムスター、ラット、モルモットの4種の実験動物に0.4ppm NO₂と0.4ppm O₃の混合ガスを1～2週間暴露し、肺の過酸化脂質量の変動及び2週間暴露後の肺のリン脂質並びに抗酸化性物質質量、抗酸化性酵素活性の変化について検討した。その結果、動物種によって異なる変化を示す項目がいくつか見いだされた。

肺の過酸化脂質量は、マウス及びモルモットで有意に増加し、対照動物に対する増加率で見るとモルモットの増加が最も著しかった。一方、リン脂質についてもモルモットで見られた変化が最も顕著で、脂肪酸組成ではパルミチン酸(16:0)の含有率が大きく増加し、リン脂質組成ではホスファチジルコリン(PC)の含有率の増加と他の主要リン脂質種の減少を、さらに肺の総リン脂質量が増加することを見いだした。マウスの肺のリン脂質も、モルモット程変化率は大きくなかったが、全く同じ傾向の変化を示した。

本実験で認められたリン脂質の変化と類似の変化は、NO₂あるいはO₃の単独暴露実験でも認められている。例えば、NO₂暴露によって肺のリン脂質中のパルミチン酸が増加することは小林ら^{58, 93)}によって報告され、Roehmら¹⁰⁷⁾も総脂質を用いて調べたところ、やはりパルミチン酸が増加することを認めている。O₃暴露でもパルミチン酸が増加することは、PCについて市川ら⁷⁷⁾が、総脂質についてRoehmら⁶⁹⁾及びMenzelら¹⁰⁸⁾が、それぞれ見いだしている。また、Blankら⁵⁵⁾及びKleinermanら⁵⁴⁾は、NO₂暴露で肺のPCの含有率及び肺のリン脂質量の増加を報告している。一方、パルミチン酸をリン脂質に導入しようとする動きについては、胎生末期の肺についてOkanoら¹⁰⁹⁾により観察されており、肺で呼吸を始める際の酸化防御機構の一つとして論じられている。本実験結果でも、モルモットではPI値が著しく低下し、過酸化を受けにくい脂肪酸組成に変化していたことから、モルモットでのリン脂質の変化が同様の意味あいをもつ可能性も考えられる。多くの動物組織において、リン脂質はグリセロールの1位飽和、2位不飽和脂肪酸型PCが主成分であるが、肺においては1、2位飽和脂肪酸型PCであるジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)が主成分である⁴⁹⁾。本実験で、マウス及びモルモットの肺のリン脂質量が増加し、脂肪酸ではパルミチン酸、リン脂質種ではPCの含有率が比較的大きく増加したことから、これらのリン脂質の変化はDPPCの増加に起因しているものと考えられる。一方、ハムスターのリン脂質はほとんど変化せず、Huberら¹¹⁰⁾もO₃短期暴露でウサギの肺のリン脂質組成及び脂肪酸組成に変化はなかったと報告している。ラットについては、PC含有率の増加及びリン脂質量のわずかな増加はみられたが、脂肪酸組成でパルミチン酸の有意な増加は認められなかった。これらのことから、ハムスター及びラットの肺では、マウスやモルモットのようなDPPCの増加は起こっていないものと考えられる。肺の過酸化脂質の増加がみられたマウスとモルモットでのみDPPCの特異的な増加が推測されることから、DPPC増加に対する過酸化脂質の関与が推測される。過酸化脂質がDPPCを増やす要因であるという考え方は、Cortesiら¹¹¹⁾のオゾンナイド及びヒドロペルオキシドの経口投与が肺の脂肪酸

組成を変化させるとの報告、更に、Roehmら⁶⁹⁾のO₃暴露による総脂質中のパルミチン酸の増加がビタミンE欠乏食を与えた動物でより著しかったとする報告からも支持されるものと思われる。

肺のリン脂質の大部分は他の組織の場合と同様に組織中の種々の細胞の膜構成要素として存在し、生体膜中のリン脂質の脂肪酸が膜の安定性、透過性あるいは流動性などの物理的性質と深い関連があることはよく知られている⁴⁸⁾。膜中脂質でDPPCが増加しているとする、これによる膜の流動性の低下等、膜の物理的性質の変化が生ずる可能性が考えられ、また過酸化脂質による毒性発現機構のひとつとして膜機能の低下を引き起こす可能性が考えられていることから、過酸化脂質の増加に起因するDPPCの増加による膜の性質の変化が、過酸化脂質の毒性の発現につながっていく可能性も考えられる。一方、肺のリン脂質はsurfactantの主要構成成分としても重要で、特にDPPCは最も表面活性が高いことが知られており、surfactantの中で最も重要な役割を果たしているものと考えられている⁴⁹⁾。今回は肺細胞内のリン脂質とsurfactantのリン脂質を分離した測定は行わなかったため推測の域を出ないが、マウスやモルモットにおいてsurfactant中でもDPPCが増加していることが考えられる。そしてこのことが肺胞の表面活性を増加させることによって、過酸化脂質により障害された肺胞細胞の虚脱や、あるいは肺胞機能(ガス交換能等)の低下等を防御する作用を有するのかもしれない。

DPPCの増加が過酸化脂質の増加と関連している可能性が示唆されたが、DPPCの増加機構としては次のようなことが考えられる。まず第1に、DPPCの合成系の活性化である。すなわち、肺の総リン脂質量も増加していたことから、de novo合成系の活性化によりPCの生合成が高まったことが考えられる。しかし、この系で合成されるPCの2位にはほとんど不飽和脂肪酸が導入され、直接DPPCの合成への寄与は少ないと考えられている⁴⁹⁾ことから、同時に、1, 2位飽和型PCを合成する再アシル化系あるいはアシル基転移系の活性化が推定される。Ichikawaら⁷⁶⁾は、NO₂を暴露したラットの肺で、再アシル化系酵素であるリゾレシチンアシルトランスフェラーゼ活性は、パルミチン酸を基質とした場合に変化はないが、不飽和脂肪酸に対する活性は対照群より有意に低下したことを認めている。第二には、DPPCの分解が遅くなるなどの代謝系の要因が考えられる。Thomasら⁵⁰⁾は、NO₂暴露で、¹⁴C-パルミチン酸を取り込んだ肺のPCの生物学的半減期が長くなることを報告している。第三に、surfactantを合成し分泌するⅡ型肺胞上皮細胞は、NO₂暴露でもO₃暴露でも増殖することが形態学的に認められており^{112, 113)}、このことがDPPCの増加に寄与していることも考えられる。このように、DPPCの増加に関しては以上のような多くの要因が考えられるが、これらの要因がどの程度寄与しているのかについて、相互の定量的な関係及びそれぞれの要因に対する過酸化脂質の影響も含めて、今後更に検討を進める必要があると思われる。

一方、各動物の肺のビタミンE量はあまり大きな変化は認められなかったが、非蛋白性SH(NPSH)量はモルモット以外の動物で有意に増加していた。Mustafaら¹⁶⁾は0.8ppm O₃の2~7日暴露でラットの肺のNPSH量が増加することを認めている。このようなNPSH、すなわち還元型グルタチオン(GSH)の増加は、NO₂やO₃の酸化作用から細胞を保護するための防御性変化であると

考えられる。また、GSHは多くの生化学反応に関与しており、多くの細胞が正常の機能を保つのに不可欠な物質である。特に、GSHは細胞の再生、修復あるいは増殖時に必要であることから、GSHの増加はI型上皮細胞や内皮細胞などが障害を受けたことに対応した変化である可能性もある。

Glutathione peroxidase (GPx)系の酵素活性は、どの動物でも、Glutathione reductase (GR)を除いて、暴露後増加することが認められた。NO₂やO₃暴露によりGPx系酵素(GRも含む)の活性上昇については多くの報告があり^{15, 16, 31, 33, 41)}、このGPx系酵素の活性化は酸化的障害に対する防衛的変化であると考えられている。一方、Chowら³¹⁾やNishikiら¹¹⁴⁾はGPx活性の増加は過酸化脂質増加のマーカーとなると解釈しているが、本実験の結果では過酸化脂質の増加のみられなかったハムスターとラットでもその活性上昇がみられることから、GPxが過酸化脂質のマーカー酵素であるとする解釈は適当ではないように思われる。また、Glucose-6-phosphate dehydrogenase活性や6-Phosphogluconate dehydrogenase活性の増加は種々の組織の障害修復過程、いわゆる炎症過程で観察されており、これらの変化はおそらく修復に必要とされるNADPHが増加するのに対応して起こっているものと考えられている¹⁶⁾。したがって、本実験でのこれら酵素活性の上昇も、NO₂とO₃による障害の修復過程を示したものであるかもしれない。

Glutathione S-transferase (GSH-Tase)活性は、過酸化脂質の増加のみられたマウス及びモルモットで有意に低下した。Sagaiら²²⁻²⁴⁾は、NO₂暴露によってラットの肺に過酸化脂質の増加がみられた時期には、やはりGSH-Tase活性が低下することを認めている。SH酵素であるコハク酸酸化酵素や乳酸脱水素酵素が過酸化脂質によって阻害され易いことはよく知られている¹¹⁵⁾。このような事実から、GSH-Tase活性の低下は過酸化脂質によって不活性化されたことによる可能性が考えられる。すなわちGSH-Taseの活性中心の構造についてはまだ明らかではないが、ラット肝GSH-Tase活性がSH試薬で阻害されることが知られている¹¹⁶⁾ことから、GSH-Tase活性の低下はそのSH基が過酸化脂質の作用で酸化されることによるのかもしれない。また、Superoxide dismutase活性がすべての動物で増加する傾向がみられたことから、NO₂とO₃の混合ガスを暴露した動物の肺でスーパーオキシドラジカル(O₂⁻)が発生していることが示唆される。Disulfide reductase (DSR)活性についてはマウスでのみ増加していたことから、マウスの肺で混合ジスルフィドの形成が増加した可能性、あるいは先に述べたGSH量の増加にDSRの活性化が寄与している可能性が考えられる。

一方、暴露後の各動物の肺のビタミンE(VE)量とTBA値との間には生理的条件下で得られた結果よりも強い相関性($r=0.826$, $p<0.001$)が認められ、VEの抗酸化作用が、NO₂とO₃の混合ガス暴露時のような脂質過酸化促進条件下において、特に重要となる可能性が考えられる。これに対して、NPSHについては、暴露後もなお4種の動物の中で最もそのレベルの高かったモルモットで過酸化脂質が著しく増加したため、NPSH量とTBA値の間に生理的条件下でみられたような相関性は認められなくなった。同様に、リン脂質のPeroxidizability Index (PI値)についても、モルモット

トの値が最も低いにもかかわらず過酸化脂質が大きく増加したため、PI値とTBA値の間にも生理的条件下のような正の相関性はみられなくなった。しかしながら、O₃暴露後の各動物の肺の過酸化脂質量は、生理的条件下の場合のように4種の動物のうちモルモットを例外的な動物として除外すると、4種の動物のTBA値とlog(PI/VE・NPSH)値の関係はほぼ生理的条件下で得られたものと類似しており、暴露後の過酸化脂質量の変化もlog(PI/VE・NPSH)で説明しうる。

また、モルモットの肺で脂質過酸化が亢進することに関して、今回の実験結果からは明りょうな解釈は下せないが、過酸化脂質の生成がミクロソームのチトクロムP-450やP-450還元酵素などの働きによることを考えると、モルモットの肺のこれら酵素活性が他の動物の活性とはかなり異なるという鈴木ら¹¹⁷⁾の結果からそれら活性の相違に基づく可能性も考えられる。この点については、過酸化脂質量の決定因子としてのlog(PI/VE・NPSH)の妥当性も含めて、今後さらに検討されなければならない問題であると考えられる。

一方、このようなガス暴露実験を異なる動物種に対して行う場合には、たとえ同一条件で暴露して肺の生化学的変化に差が観察されたとしても、それが呼吸生理に関する差異(呼吸数や呼吸量の差など)、あるいは呼吸器の解剖学的相違(気道・肺胞系において事実上NO₂やO₃をろ過する作用における差など)等¹¹⁸⁾によるものではないかという疑問が常に付随してくること、さらに、すべての動物を同一の飼料で飼育するわけにはゆかないため、食餌条件が異ならざるをえないこと等を考えると、動物の種差に関する研究は非常に困難な課題であると思われるが、さらに詳しく研究されるべき課題であると思われる。

引用文献

- 1) 内山 充・松尾光芳・嵯峨井勝 編(1985): 過酸化脂質と生体. 学会出版センター.
- 2) Ernster, L., K. Nordenbrand and S. Orrenius (1982): Microsomal lipidperoxidation: Mechanism and some biomedical implications. *In: Lipid Peroxides in Biology and Medicine*. Yagi, K. (ed.); Acad. Press, N. Y., 55-80.
- 3) Desai, I. D and A. L. Tappel (1963): Damage to proteins by peroxidized lipid. *J. Lipid Res.*, **4**, 204-207.
- 4) Ames, B. N. (1982): Lipid peroxidation and oxidative damage to DNA. *In: Lipid Peroxides in Biology and Medicine*, Yagi, K. (ed.), Acad. Press, N. Y., 339-349.
- 5) Lown, J. W., A. V. Joshua and H. -H. Chen (1982): Reactive oxygen species leading to lipid peroxidation and DNA lesions implicated in the cytotoxic action of certain antitumor antibiotics. *In: Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*. McBrien, D. C. H. and T. F. Slater (ed.), Acad. Press., N. Y., 305-328.
- 6) Morita, J., K. Ueda, K. Nakai, Y. Baba and T. Komano (1983): DNA strand breakage in vitro by autoxidized unsaturated fatty acids. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2977-2979.
- 7) Nakayama, T., M. Kodama and C. Nagata (1984): Free radical formation in DNA by lipid peroxidation. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 571-572.
- 8) 大沢俊彦・並木満男(1982): 脂質の過酸化と変異原性, 変異原と毒性, **5**, 243-252.

- 9) 永田親義(1985): 発ガン及び変異原性, 過酸化脂質と生体. 内山 充・松尾光芳・嵯峨井勝(編), 学会出版センター, 255-287.
- 10) Tappel, A. L. (1973): Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.*, **32**, 1870-1874.
- 11) 八木国夫・五島雄一郎 編(1981): 過酸化脂質と疾患. 医学書院.
- 12) 吉川敏一(1985): 過酸化脂質と疾患. 過酸化脂質と生体. 内山 充・松尾光芳・嵯峨井勝(編), 学会出版センター, 289-313.
- 13) Witschi, H. and M. G. Côte (1977): Primary pulmonary responses to toxic agents. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **5**, 23-66.
- 14) Bils, R. F. and B. R. Christie (1980): *The experimental pathology of oxidant and air pollutant inhalation*. *Inter. Rev. Exp. Pathol.*, **21**, 195-293.
- 15) Mustafa, M. G., A. D. Hacker, J. J. Ospital, M. Z. Hussain, S. D. Lee (1977): Biochemical effects of environmental oxidant pollutants in animal lungs. *In: Biochemical Effects of Environmental Pollutants*. S. D. Lee(ed.), Ann Arbor, Sci., Michigan, 59-93.
- 16) 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.
- 17) Menzel, D. B. (1976): The role of free radicals in the toxicity of air pollutants (nitrogen oxides and ozone) *In: Free Radicals in Biology*, volume II. Pryor, W. A.(ed.) Acad. Press, N. Y., 181-202.
- 18) Roehm, J. N., J. G. Hadley and D. B. Menzel (1971): Oxidation of unsaturated fatty acids by ozone and nitrogen dioxide. A common mechanism of action. *Arch. Environ. Health*, **23**, 142-148.
- 19) 嵯峨井 勝(1985): 大気汚染, 過酸化脂質と生体. 内山 充・松尾光芳・嵯峨井勝(編), 学会出版センター, 333-354.
- 20) 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.
- 21) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1981): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide: I. Lipid peroxidation as measured by ethane exhalation of rats exposed to nitrogen dioxide. *Lipids*, **16**, 64-67.
- 22) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide: II. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153-164.
- 23) Ichinose, T. and M. Sagai (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide: III. Changes of the antioxidative protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by chronic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **66**, 1-8.
- 24) Sagai, M., T. Ichinose and K. Kubota (1984): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide: IV. Relation between the changes of lipid peroxidation and the antioxidative protective system in rat lungs upon life span exposure to low levels of NO₂. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 444-456.
- 25) 嵯峨井 勝(1983): 生体内過酸化脂質の測定. C. 呼気分析, 過酸化脂質実験法. 金田・植田(編), 医歯薬出版, 98-108.
- 26) Sevanian, A., N. Elsayed and A. D. Hacker (1982): Effects of vitamin E deficiency and nitrogen dioxide exposure on lung lipid peroxidation: Use of lipid epoxides and malonaldehyde as measures of peroxidation. *J. Toxicol. Environ. Health*, **10**, 743-756.
- 27) Sevanian, A., A. D. Hacker and N. Elsayed (1982): Influence of vitamin E and nitrogen dioxide on lipid peroxidation in rat lung and liver microsomes. *Lipids*, **17**, 269-277.
- 28) Sevanian, A., J. F. Mead, and R. A. Stein (1979): Epoxides as products of lipid autoxidation in rat

- lungs. *Lipids*, **14**, 634—643.
- 29) Goldstein, B. D. and O. J. Balchum (1967): Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **126**, 356—358.
 - 30) Goldstein, B. D., C. Lodi, C. Collinson and O. J. Balchum (1969): Ozone and lipid peroxidation. *Arch. Environ. Health*, **18**, 631—635.
 - 31) 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.
 - 32) Fletcher, B. L. and A. L. Tappel (1973): Protective effect of dietary α -tocopherol in rats exposed to toxic levels of O₃ and NO₂. *Environ. Res.*, **6**, 165—175.
 - 33) Chow, C. K. and A. L. Tappel (1973): Activities of pentose shunt and glycolytic enzymes in lungs of ozone-exposed rats. *Arch. Environ. Health*, **26**, 205—208.
 - 34) Witting, A. (1980): Vitamin E and lipid, antioxidants in free radical initiated reactions. *In* : Free Radicals in Biology, Vol. IV. Pryor, W. A. (ed.), Acad. Press, N. Y., 295—319.
 - 35) Svanholm, U., K. Bechgaard and V. D. Parker (1974): Electrochemistry in media of intermediate acidity. VIII Reversible oxidation products of the α -tocopherol model compound. Cation radical, cation, and dication. *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 2409—2413.
 - 36) Leung, H-W., Vang, M. J. and Mavis, R. D. (1981): The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **664**, 266—272.
 - 37) Packer, J. E., T. F. Slater and R. L. Willson (1979): Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, **278**, 737—739.
 - 38) Christopherson, B. O. (1968): The inhibitory effect of reduced glutathione on the lipid peroxidation of the microsomal fraction and mitochondria. *Biochem. J.*, **106**, 515—522.
 - 39) Little, C. and P. J. O'Brien (1968): The effectiveness of a lipid peroxide in oxidizing protein and non-protein thiols. *Biochem. J.*, **106**, 419—423.
 - 40) Menzel, D. B. (1970): Toxicity of ozone, oxygen and radiation. *Ann. Rev. Pharmacol.*, **10**, 379—394.
 - 41) 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.
 - 42) Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974): Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130—7139.
 - 43) McCord, J. M. and I. Fridovich (1969): Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049—6055.
 - 44) DeLucia, A. J., M. G. Mustafa, M. Z. Hussain and C. E. Cross (1975): Ozone interaction with rodent lung: III, Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and non-protein sulfhydryls. *J. Clin. Inv.*, **55**, 794—802.
 - 45) Tietze, F. (1970): Disulfide reduction in rat 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.
 - 46) Fleischer, S and G. Rouser (1965): Lipids of subcellular particles. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 588—607.
 - 47) Dillard, C. J. and A. L. Tappel (1971): Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes. *Lipids*, **6**, 715—721.
 - 48) 野沢義則 (1975) : 生体膜の流動性と機能. *生化学*, **47**, 52—82.

- 49) 秋野 豊 (1973) : 肺のリン脂質代謝—肺表面活性物質の生化学—, 生化学, **50**, 539—562.
- 50) Thomas T. Jr., and R. A. Rhoades (1970): ^{14}C -1-Palmitate incorporation by rat lung: Effect of nitrogen dioxide. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, **134**, 1181—1183.
- 51) Dowell, A. R., K. H. Kilburn, and P. C. Pratt (1971): Short-term exposure to nitrogen dioxide: Effects on pulmonary ultrastructure, compliance, and the surfactant system. *Arch. Inter. Med.*, **128**, 74—80.
- 52) Williams, R. A., R. A. Rhoades, and W. S. Adams (1971): The response of lung tissue and surfactant to nitrogen dioxide exposure. *Arch. Inter. Med.*, **128**, 101—108.
- 53) Arner, E. C. and R. A. Rhoades (1973): Long-term nitrogen dioxide: Effects on lung lipids and mechanical properties. *Arch. Environ. Health*, **26**, 156—160.
- 54) Kleinerman, J. (1977): Some effects of nitrogen dioxide on the lung. *Fed. Proc.*, **36**, 1714—1718.
- 55) Blank, 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. Respi. Dis.*, **17**, 273—280.
- 56) 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.
- 57) 小林隆弘・野口 忠(1980) : 二酸化窒素急性暴露の肺胞洗浄液のリン脂質脂肪酸組成に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 101—107.
- 58) 小林隆弘(1980) : 二酸化窒素長期暴露ラットに及ぼす影響—肺, 肝リン脂質脂肪酸組成. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 275—284.
- 59) Wright, E. S. and R. D. Mavis (1981): Changes in pulmonary biosynthetic enzymes after nitrogen dioxide exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **58**, 262—268.
- 60) Wright, E. S., M. J. Vang, J. N. Finkelstein and R. D. Mavis (1982): Changes in phospholipid biosynthetic enzymes in Type II cells and alveolar macrophages isolated from rat lungs after NO_2 exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **66**, 305—311.
- 61) Blank, M. L., W. Dalbey, E. A. Cress, S. Garfinkel and F. Snyder (1982): Pulmonary NO_2 toxicology: Phosphatidylcholine levels and incorporation of ^3H -thymidine into DNA. *Environ. Res.*, **27**, 352—360.
- 62) Leung, H. -W. (1983): Effect of nitrogen dioxide exposure on rat lung lipids. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **40**, 519—522.
- 63) Yokoyama, E., I. Ichikawa and K. Kawai (1980): Dose nitrogen dioxide modify the respiratory effects of ozone. *In: Nitrogen oxides and their effects on health*. Lee, S. D. (ed.), Ann. Arbor. Sci., Michigan, 217—229.
- 64) 瀬戸勝男・他(1973) : 肺のリン脂質の生成に対するオゾンおよび二酸化窒素吸入の影響. 医学と生物学, **86**, 317—320.
- 65) 瀬戸勝男・他(1975) : 肺のリン脂質の生成に対するオゾンおよび二酸化窒素の短時間暴露の影響. 医学と生物学, **87**, 57—60.
- 66) 瀬戸勝男・他(1975) : 肺のリン脂質生成に対する NO_2 および O_3 の混合気体吸入の影響. 医学と生物学, **91**, 143—146.
- 67) 昆 真紀子・他(1976) : 肺リン脂質生成に対する NO_2 および SO_2 の混合気体吸入の影響. 医学と生物学, **92**, 523—536.
- 68) Menzel, D. B., J. N. Roehm and S. D. Lee (1972): Vitamin E: The biological and environmental antioxidant. *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 481—486.
- 69) Roehm, J. N., J. G. Hadley and D. B. Menzel (1972): Influence of vitamin E on the lung fatty acids of rats. Exposed to ozone. *Arch. Environ. Health*, **24**, 237—242.

- 70) 内山照雄・森脇紀夫・萩原忠文(1972): 肺脂質および surfactant に対するオゾンの影響. 医学と界面活性, **3**, 142-146.
- 71) Kyei-Aboagye, K., M. Hazucha., I. Wyszogrodski., D. Rubinstein and M. E. Avery (1973): The effect to ozone exposure *in vivo* on the appearance of lung tissue lipids in the endobronchial lavage of rabbits. Biochem. Biophys. Res. Commun., **54**, 907-913.
- 72) 市川 勇・横山栄二 (1974): O₃ 急性暴露によるラット肺の phospholipase A₂ 活性の挙動. 医学と界面活性, **5**, 37-41.
- 73) Shimasaki, H., T. Takatori., W. R. Anderson., H. L. Horten and O. S. Privett (1976): Alteration of lung lipids in ozone exposed rats. Biochem. Biophys. Res. Commun., **68**, 1256-1262.
- 74) Donovan, D. H., S. J. Williams., J. M. Charles and D. B. Menzel (1977): Ozone toxicity: Effect of dietary vitamin E and polyunsaturated fatty acids. Toxicol. Lett., **1**, 135-139.
- 75) Menzel, D. B. (1979): Nutritional needs in environmental intoxication: Vitamin E and air pollutants, An example. Environ. Health Perspect., **29**, 105-114.
- 76) Ichikawa, I. and E. Yokoyama (1982): Effect of short-term exposure to ozone on the lecithin metabolism of rat lung. J. Toxicol. Environ. Health, **10**, 1005-1015.
- 77) 市川 勇・横山栄二(1974): ラット肺リン脂質構成脂肪酸組成に対する O₃ の影響. 大気汚染研究, **9**, 331.
- 78) 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.
- 79) Kornbrust, D. J. and R. D. Mavis (1979): Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: Correlation with vitamin E content. Lipids, **15**, 315-322.
- 80) Witting, L. A. and M. K. Horwitt (1964): Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency induced creatinuria. J. Nutr., **82**, 19-33.
- 81) Witting, L. A. (1965): Biological availability of tocopherol and other antioxidants at the cellular level. Fed. Proc., **24**, 912-916.
- 82) Witting, L. A. (1965): Lipid peroxidation *in vivo*. J. Am. Oil Chem. Soc., **24**, 908-913.
- 83) Cortesi, R. and O. S. Privett (1972): Toxicity of fatty acid ozonides and peroxides. Lipids, **7**, 715-719.
- 84) Gunstone, F. D. and T. P. H. Hilditch (1945): The union of gaseous oxygen with methyloleate, linoleate and linolenate. J. Chem. Soc., 836-841.
- 85) Holman, R. T. and O. C. Elmer (1947): The rates of oxidation of unsaturated fatty acids and esters. J. Am. Oil Chem. Soc., **24**, 127-129.
- 86) Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., **95**, 351-358.
- 87) Abe, K., M. Ohmae and G. Katsui (1976): Rapid and micro-method for the determination of tocopherols in liver. Vitamin, **50**, 453-457 (in Japanese).
- 88) Little, C. and P. J. O'Brien (1970): Properties and regulation of glutathione peroxidase. J. Biol. Chem., **245**, 3632-3639.
- 89) Bergmeyer, H. U. (1974): Reagents for enzymatic analysis: Glutathione reductase. In: Methods of Enzymatic Analysis, Vol II. Bergmeyer, H. U. (ed.), Acad. Press, N. Y., 465-466.
- 90) Wilhelm, L. G. and H. D. Waller (1974): Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Methods of Enzymatic Analysis, Vol II. Bergmeyer, H. U. (ed.), Acad. Press, N. Y., 636-643.

- 91) 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.
- 92) Folch, J., M. Lees and G. H. S. Stanley (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 93) 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. Lett.*, **6**, 149-155.
- 94) Metcalfe, L. D., 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.
- 95) Rouser, G., A. N. Siakotos and S. Fleischer (1966): Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids*, **1**, 85-86.
- 96) 腰原康子・室田誠逸(1982): アラキドン酸カスケード代謝産物とその生物活性一. *臨床化学*, **17**, 995-1013.
- 97) Hemler, M. E., G. Graff and W. E. M. Lands (1978): Accelerative autoactivation of prostaglandin biosynthesis by PGG₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1325-1331.
- 98) Hemler, M. E., H. W. Cook and W. E. M. Lands (1979): Prostaglandin biosynthesis can be triggered by lipid peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**, 340-345.
- 99) Vladimirov, Yu. A., V. I. Olenev., T. B. Suslove and Z. P. Cheremisina (1980): Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *In: Adv. Lipid Res.*, Vol. 17, Paoletti, R. and D. Kritchevsky (ed.), Academic Press, N. Y., 173-249.
- 100) Gregory, E. M. and I. Fridovich (1973): Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. *J. Bacteriol.*, **114**, 543-548.
- 101) Crapo, J. D. and D. F. Tierney (1974): Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am. J. Physiol.*, **226**, 1401-1407.
- 102) 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.
- 103) Flohe, L. and R. Zimmermann (1970): Role of GSH peroxidase in protecting the membrane of rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 210-213.
- 104) 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. *Biochim. Biophys. Acta*, **431**, 459-468.
- 105) Sevanian, A., S. F. Muakkassah-Kelly and S. Montestruque (1983): The influence of phospholipase A₂ and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 441-452.
- 106) 吉村真一・渡辺慶一(1983): グルタチオンパーオキシダーゼに関する最近の進歩. 「毒性学における過酸化脂質」に関するシンポジウム予稿集, 国立公害研究所, 7-11.
- 107) Roehm, J. N., J. G. Hadley and D. B. Menzel (1971): Antioxidant vs lung disease. *Arch. Intern. Med.*, **128**, 88-93.
- 108) Menzel, D. B., J. N. Roehm and S. D. Lee (1972): The biological and environmental antioxidant. *J. Agr. Food Chem.*, **20**, 481-486.
- 109) Okano, G. and T. Akino (1978): Changes in the structure and metabolic heterogeneity of phosphatidylcholines in the developing rat lung. *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 373-384.
- 110) Huber, G. L., R. J. Mason., M. LaForce., N. J. Spencer., D. E. Gardner and D. L. Coffin (1971): Alteration in the lung following the administration of ozone. *Arch. Intern. Med.*, **128**, 81-87.

- 111) Cortesi, R. and O. S. Privett (1972): Toxicity of fatty ozonide and peroxides. *Lipids*, **7**, 715—721.
- 112) Evans, M. J., R. J. Stephens., L. J. Cabral and G. Freeman (1972): Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of NO₂. *Arch. Environ. Health*, **24**, 180—188.
- 113) Dungworth, D. L. (1976): Short-term effects of ozone on lung of rats, mice and monkeys. *Environ. Health Perspect.*, **16**, 179.
- 114) Nishiki, K., D. Jamieson., N. Oshino and B. Chance (1976): Oxygen toxicity in the perfused rat liver and lung under hyperbaric conditions. *Biochem. J.*, **160**, 343—355.
- 115) Little, C. and P. J. O'Brien (1963): The effectiveness of a lipid peroxide in oxidizing protein and non-protein thiols. *Biochem. J.*, **106**, 419—423.
- 116) Carne, T., E. Tipping and B. Ketterer (1979): The binding and catalytic activities of forms of ligandin after modification its thiol group. *Biochem. J.*, **177**, 433—439.
- 117) 鈴木誠一・市瀬孝道・鈴木 明・嵯峨井 勝 (1983): 二酸化窒素暴露に対する肺の抗酸化性防御機構の動物種差に関する研究. 国立公害研究所研究報告, 第40号, 89—111.
- 118) 松岡 理 (1980): 実験動物からヒトへの外挿——その考察と資料——. ソフトサイエンス社, 113—118.

II -15 二酸化窒素暴露によるラットの肺、血清及び
 尿中のコラーゲン代謝関連因子の変化
**Changes of Collagen Metabolism-Related Factors in Lung,
Serum and Urine in
Rats Exposed Acutely and Chronically to Nitrogen Dioxide**

市瀬孝道¹・嵯峨井勝¹・久保田憲太郎¹

Takamichi ICHINOSE¹, Masaru SAGAI¹ and Kentaro KUBOTA¹

要 旨

NO₂の急性及び慢性暴露実験を行い、コラーゲン代謝関連因子の変化を調べ、肺線維化の発生経過の変化と発生メカニズムの検討を試みた。

10ppm NO₂ 2週間の急性暴露実験では肺のコラーゲン含量は4～10日目にかけて最も増加したが、14日目では低下する傾向を示した。肺の過酸化脂質量も暴露初期から急速に増加し、4～7日目にかけて最も増加したが14日目では対照レベルに戻った。病理学的検索では7日目、14日目に肺の線維化が確認されたが、肺胞道や肺胞壁の肥厚は7日目より14日目の方が軽度となった。これらの結果から肺胞壁の肥厚組織中には過酸化脂質とコラーゲンが増加していると思われる。一方、肺のコラゲナーゼ様活性はコラーゲン含量が最も増加している時期に増加し、血清 HOP 量もこの頃に増加していたが、14日後の壁肥厚が軽度になった頃にはコラゲナーゼ様活性は対照レベルより低下した。また、肺のコラゲナーゼ様活性と血清中の HOP 量との間に有意な正の相関が認められた。この結果から、コラゲナーゼ様活性の増加によりコラーゲンの代謝回転が一時的に亢進し、血清中 HOP 量が増加したものと思われる。一方、肺及び血清のコラゲナーゼ阻害因子活性は、NO₂ 暴露初期に低下し、肺の過酸化脂質が最高レベルに達した頃から急速に増加した。この増加のために NO₂ 暴露 2 週間後では肺のコラゲナーゼ様活性が抑制されたものと思われる。また、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性が低下する時期には肺の過酸化脂質量とコラゲナーゼ阻害因子活性との間に有意な負の相関性が認められた。しかし、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下によって肺のコラーゲン分解が促進するような結果は得られなかった。コラーゲンの架橋にあずかるモノアミノオキシダーゼ(MAO)活性は NO₂ 暴露初期から急速

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

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

に増加した。この結果から、NO₂ 暴露によって、コラーゲンの架橋が促進していることが示唆された。

0.4, 1.2及び4 ppm NO₂ 18か月間の慢性暴露実験では、4 ppm 群のみでコラーゲン含量が若干増加した。血清 HOP 量は増加することなく、尿 HOP 比は NO₂ 濃度の上昇につれて低下する傾向を示した。これとは対称的に、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性は NO₂ 濃度の上昇につれて増加する傾向を示し、また、肺のコラゲナーゼ様活性は1.2及び4 ppm 群で有意に低下した。肺の MAO 活性及び過酸化脂質量は NO₂ 濃度に依存して増加した。これらの成績から、肺の過酸化脂質が再び増加する NO₂ 暴露18か月目では、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の増加とコラゲナーゼ様活性の低下によってコラーゲン分解能が低下し、その結果、尿 HOP 比が低下する。そして、その分解能が最も低下している可能性が考えられる4 ppm 群でコラーゲン含量が増加するものであることが明らかとなった。この結果は竹中ら³⁾が報告した4 ppm NO₂ 暴露18か月目のラットの肺に軽度のコラーゲン線維の増生が認められたという病理学的な結果とも一致している。

Abstract

This study was done to clarify the mechanism of appearance of the lung fibrosis by NO₂, investigating the alteration in related factors of collagen metabolism in rats exposed acutely and chronically to NO₂.

In acute experiment of 10 ppm NO₂, collagen contents in lung increased rapidly after the second day, and reached to the maximum level at the 4th day. Thereafter, the level was remained to 10th day, but decreased at the 14th day. Lipid peroxides measured by thiobarbituric acid (TBA) reaction with lung homogenate increased from the first day, and then reached to the maximum level from the 4th to 7th day. Thereafter, lipid peroxides level returned to the control level after the 14th day.

Thickening of the wall of alveolar duct and adjacent alveoli and lung fibrosis were observed by microscopical observation at the 7th and 14th day, but the degree of the thickening at the 14th day was slightly less than that at the 7th day. This fact suggests that lipid peroxide and collagen contents in lungs increased in the wall of the alveolar duct and alveoli at the 7th day. When the collagen contents in lungs increased from the 4th to the 10th day, collagenolytic enzymes and serum hydroxyproline (HOP) increased also. Thereafter the collagenolytic enzyme activity, the hydroxyproline contents in serum and urinary HOP ratio (HOP: creatinine ratio in urine) decreased below the control level. A significant relationship between the collagenolytic enzyme activity in lungs and the hydroxyproline contents in serum was observed.

Changes of the collagenase inhibitor (CI) activity in lungs and serum decreased from the first to the 5th day, and then they rapidly increased. It seemed that the decrease of the collagenolytic enzyme activity in lung at the 14th day was caused by the increment of the collagenase inhibitor activity at this time point. When the CI activity in lungs decreased, a significant and negative relationship between the lipid peroxides and the CI activity in lungs was observed. But there was no evidence that the collagen decomposition was promoted by the decrease of the CI activity in lungs, because HOP in serum did not increase from the first to the third day. The activity of monoamine oxidase (MAO) in lungs which involves in the formation of cross-linking of collagen increased from the first day to the 4th day, and then the maximum level was remained until the 14th day. A significant relationship between the lipid peroxides and the MAO activity was observed. This result sug-

gests that the formation of cross-linking of collagen was promoted by MAO.

In chronic experiment of 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂, the collagen contents in lungs increased in 4 ppm NO₂ exposure group, and the urinary HOP ratio was decreased with the increment of NO₂ concentrations, inversely. The CI activity in lungs was increased with the increment of NO₂ concentrations. On the other hand, the collagenolytic enzyme activity in lungs decreased dose-dependently, and significant decreases were observed in 1.2 and 4 ppm NO₂ groups. The MAO activity and amounts of the lipid peroxides in lungs increased dose-dependently, and a significant relationship was observed between them. These results show clearly that the collagen contents in lungs increased in 4 ppm NO₂ group, in which the ability of collagen decomposition decreased, because CI activity in lungs and serum increased, and this agrees with the results of the morphological observation, which lung fibrosis was observed previously³⁾ in 4 ppm NO₂ group. These results suggest that the decline of the ability of the collagen decomposition and the increments of lipid peroxides are related to the occurrence of lung fibrosis by long-term exposure to NO₂.

1 はじめに

NO₂ 暴露によって肺に線維化が起こることは数多く報告されている。Freeman ら¹⁾は25ppm NO₂に40日間暴露したラットについて、Stephans ら²⁾は17ppm NO₂に90日間暴露したラットについて、また竹中ら³⁾は4 ppm NO₂に18か月及び27か月間暴露したラットについて肺の軽度のコラーゲン線維の増生を認めている。さらに低濃度の実験では Freeman ら⁴⁾が0.8ppm NO₂に約2年間暴露したラットの肺に、また、Hattori ら⁵⁾は0.5ppm NO₂に6か月間暴露したマウスの肺に線維化を認めている。一方、NO₂ 暴露によって肺気腫が起こることも数多く報告されている。Haydon ら⁶⁾は25ppm NO₂に135日間暴露したラットについて、Drozd ら⁷⁾は1 ppm NO₂を1日8時間ずつ、180日間暴露したモルモットについて肺気腫を認めている。しかし、これらの肺線維症や肺気腫の成因はいまだ十分に解明されていない。

一方、NO₂ 暴露により、これら成因に関係すると思われる肺のコラーゲンの代謝に関与する生化学的指標の変化も報告されている。Orthoefer ら⁸⁾は1.21ppm の NO₂ と 0.31ppm の NO、あるいは 0.27ppm の NO₂ と 2.05ppm の NO をイヌに5年間暴露したところ、肺のコラーゲン合成律速酵素である prolyl hydroxylase 活性が増加することを報告している。また、Hacker ら⁹⁾は5 ppm の NO₂ を12時間暴露した後のラットの肺のコラーゲン画分への¹⁴C-プロリンの取り込み量を調べ、不溶性コラーゲンへの¹⁴C-プロリンの取り込みが増加することから、NO₂ 暴露によって肺のコラーゲン合成が促進することを報告している。しかし、Kleinerman ら¹⁰⁾はハムスター(シリアン系)に30ppm NO₂を21日間暴露すると肺のコラーゲン含量が4日目から10日目にかけて低下し、エラスチン含量もやや遅れて低下することを報告している。また、Drozd ら⁷⁾も1 ppm の NO₂ を180日間暴露したモルモットでは肺の総コラーゲン含量が低下し、一方で血清や尿中のヒドロキシプロリン量が増加することを報告している。また、Kosmidor ら¹¹⁾や Kucharz ら¹²⁾も NO₂ 暴露によってモルモットの尿中ヒドロキシプロリン排せつ量が増加することを報告している。このように、Kleinerman ら以

下の研究者は肺のコラーゲン含量の低下や血清あるいは尿中ヒドロキシプロリンの増加が肺の結合組織や肺胞細胞の損傷や消失、すなわち肺気腫に起因するものであることを示唆している。このように生化学的には、NO₂がコラーゲン含量の低下を引き起こすという報告がある一方で、肺のコラーゲン合成を促進するという報告もあり、NO₂が肺のコラーゲン代謝に複雑に関与していることが示されている。

また、我々は先にNO₂暴露によって肺で脂質過酸化反応が起こることを報告¹³⁻¹⁵⁾したが、過酸化脂質生成に関する活性酸素(スーパーオキシド・ラジカル、O₂⁻)がprolyl hydroxylase活性を増加させコラーゲン合成を促進させること^{16,17)}も報告されている。Bleomycin¹⁸⁾やパラコート¹⁹⁾による肺の線維化はこのようなO₂⁻によってコラーゲン合成が促進されることによって起こるものと考えられている。一方、コラーゲンやエラスチンの分解酵素であるコラゲナーゼやエラスターゼ活性を阻害するα₁-antitrypsin(α₁-AT)活性が種々の活性酸素(O₂⁻, H₂O₂, ·OH)によって不活性化される²⁰⁾ことも報告されている。血清中α₁-AT活性の低下は肺気腫への進行と関連すること²¹⁾が報告されており、Janoffら²²⁾はオゾンやタバコの煙を暴露したラットの肺ではα₁-ATのエラスターゼ阻害因子活性が低下することを見だし、喫煙によって肺気腫が起こる可能性を示唆している。また最近、Pryorら²³⁾もタバコの煙に含まれるNO₂から生じる短寿命フリーラジカル等によってα₁-proteinase inhibitor(α₁-PI)活性が不活性化されることを報告している。このようにO₂⁻がコラーゲン合成を促進させ、それが肺の線維化につながるという報告がある一方で、O₂⁻をはじめとする活性酸素やフリーラジカルがα₁-ATやα₁-PIの活性低下を引き起こし、それが肺気腫への進行と関連する可能性を示唆する報告も数多い。しかし、現在のところNO₂暴露による肺の線維化が生化学的にどのような過程をへて、どのようなメカニズムで起こっているのかを明らかにすることは大気汚染物質による健康影響の解明にとって極めて重要である。

また、大気汚染物質の健康影響に関する疫学的研究において、NO₂汚染地域住民や喫煙者では尿中HOP比が増加する²⁴⁻²⁶⁾と報告されており、この尿中HOP比の増加機序の解明はその影響指標としての有用性を評価する上でも極めて重要である。

本研究ではNO₂の急性及び慢性暴露実験を行い、活性酸素あるいはフリーラジカル発生指標として肺のSuperoxide dismutase活性と過酸化脂質量を測定し、これらの変化とコラーゲン代謝関連因子の変化を比較し、肺線維化の発生経過と発生のメカニズムについて検討すると共に、現在疫学的研究で注目されている尿中HOP比の増加機序を明らかにすることを試みた。

2 材料及び方法

急性実験では10週令のJcl:Wister系雄ラットを10ppm NO₂に1, 2, 3, 4, 7, 10及び14日間連続暴露した。慢性実験では8週令のJcl:Wistar系雄ラットを0.4, 1.2及び4 ppm NO₂に18か月間連続暴露した。これらのラットは各6匹ずつハンギングワイヤーメッシュ・ケージの中で飼育し、NO₂暴露はステンレス・スチール製ガラスチャンバーを用いて既報^{14,27)}のように行った。なお、

急性実験のラットの数は特に断らない限り対照群、暴露群とも各々6匹ずつであった。また、慢性暴露実験では対照群5匹、0.4ppm群7匹、1.2ppm群と4ppm群はそれぞれ6匹ずつであった。暴露終了後ラットをエーテル麻酔下で頸動脈より放血屠殺し、血清を常法によって分離した。肺については左肺をただちに摘出し、電気オープンに入れ95°C 2日間放置後、コラーゲン含量測定に用いた。また、右肺は生理食塩水で灌流してから摘出し、-80°Cに保存し、後日TBA値、モノアミンオキシダーゼ(MAO)活性、SOD活性、コラゲナーゼ様活性及びコラゲナーゼ阻害因子活性の測定に用いた。

肺の過酸化脂質測定は前報¹³⁾のとおり、10%ホモジネートの200×g上清を用い、TBA反応はOhkawaらの方法²⁸⁾によって行い、定量はEx 515, Em 553nmでの蛍光測定によった。また、O₂⁻発生の間接指標としてのSOD活性は10%ホモジネートの105,000×g上清を一夜透析した試料を用いて、McCordとFridovichの方法²⁹⁾に従って測定した。蛋白量は牛血清アルブミンを標準としてLowryらの方法³⁰⁾によって測定した。コラーゲン代謝関連因子として肺及び血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の測定は、コラーゲン(Sigma社製, Type I)とコラゲナーゼ(Sigma社製, Type VI)を用い、山本ら³¹⁾の方法に従って測定した。肺及び血清中のコラゲナーゼ活性の指標としてのPZ-peptidase(コラゲナーゼ様活性)はPZ-peptide(Sigma社製)を用いるGriesらの方法³²⁾によって測定した。なお、肺の活性の測定には10%ホモジネートの105,000×g上清を用いた。

肺、血清及び尿中のヒドロキシプロリン(HOP)量の定量は各々の試料を6N塩酸で、肺の場合は120°C・24時間、血清と尿は110°C・18時間加水分解後Bergmanらの方法³³⁾に従って測定した。なお、肺のヒドロキシプロリン量測定は乾燥左肺を乳鉢中で粉碎したものをを用いた。また、尿中クレアチニン(Cre)量はJaffeらの方法³⁴⁾に従って測定し、松木らの報告²⁴⁾に従って尿中HOP:Cre比(HOP/Cre, HOP比)を求めた。急性実験の尿HOP比の測定は、NO₂暴露14日目の尿についてのみ行った。肺のMAO活性は和光純薬MAO・B・Test Wakoキット(*m*-ニトロベンジルアミン基質法)を用いて用手法にて測定した。また、急性暴露実験における肺の病理形態学的検索はラット6匹をNO₂に暴露し、暴露7日目と14日目に、各々3匹ずつのラットを用いて行った。肺は10%ホルマリンで固定しアルコール脱水-パラフィン包埋後、4~5μの薄片標本を作成し、Hematoxylin-Eosin(HE)染色とAzan Mallory染色(アザン変法)を施し鏡検した。

3 結果

3.1 急性暴露実験

3.1.1 コラーゲン代謝関連因子の変化

ヒドロキシプロリン(HOP)量で示した肺のコラーゲン含量と血清HOP量の経時変化を図1に示した。肺のコラーゲン含量はNO₂暴露1日目で若干低下したあと2~4日目にかけて急速に増加し、4日目では対照群より12%の有意な増加を示した。その後、10日目までは4日目と同じレベルを維持していたが14日目では対照値に近づく傾向を示し、対照群の6%程度の増加にとどまった。

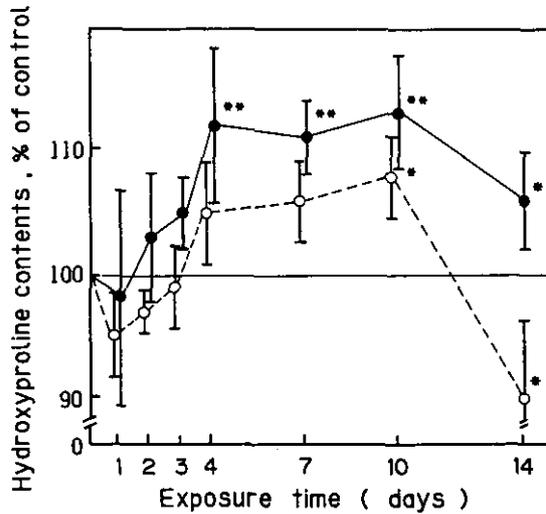


図 1 10ppm NO₂ に 2 週間暴露したラットの肺の血清中のヒドロキシプロリン (HOP) 量の経時変化

Fig. 1 Time-dependent changes of hydroxyproline (HOP) contents in lung and serum of rats exposed to 10 ppm NO₂ for 2 weeks

Control values of HOP in lung were located between 0.832 and 0.958mg/left lung, and control values of HOP in serum were located between 44.8 and 50.7 μ g/ml from the first through the 14th day (○---: Serum HOP, ●—: Lung HOP). The values are expressed as mean \pm SD (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

血清中の HOP 量は NO₂ 暴露 1 日目に 5% 程度低下したが 3 日目には対照レベルに戻った。その後 4~10 日目にかけて対照群より 5~7% 増加し、10 日目には有意な増加を示した。14 日目には再び対照群より 8% 程度低下し有意差も認められた。また、図に示すごとく血清 HOP 量は肺のコラーゲン含量と同調した経時変化を示し、両者の間には有意な正の相関 ($r = 0.324$, $p < 0.01$, $n = 82$) が認められた。

表 1 には対照群と NO₂ 暴露群の 14 日目の尿中ヒドロキシプロリン：クレアチニン比 (HOP 比) を示した。対照群には病理検索用の対照群として用いた 2 匹のラットの結果も加え、合計 8 匹の値を示した。対照群では HOP 比の平均値が 107.4 ± 11.3 であったのに対して NO₂ 暴露群では 88.6 ± 8.4 となり、対照群より約 18% 低い値を示し有意差も認められた。この結果は血清 HOP 量が 14 日目では対照群より有意に低下していたのによく対応している。

肺及び血清中の PZ-peptidase 活性 (コラーゲナーゼ様活性) の経時変化を図 2 に示した。NO₂ 暴露 1~2 日目の肺の PZ-peptidase 活性の測定値はないが、3 日目では対照群とほぼ同じレベルで、4~10 日目では対照群より 9~10% 増加していた。しかし、14 日目では対照群より 6% 程度逆に低下した。また、3 日目以後の肺の PZ-peptidase 活性と血清 HOP 量の経時変化は類似しており、かつ 3 日目以後についてみると両者の間には有意な正の相関 ($r = 0.389$, $p < 0.05$, $n = 58$) が認められ

表 1 10ppm NO₂ に2週間暴露したラットの尿中ヒドロキシプロリン：クレアチニン比(HOP比)の変化

Table 1 The changes of hydroxyproline: creatinine ratio (HOP ratio) in urine of rats exposed continuously to 10 ppm NO₂ for 2 weeks
The values are expressed as HOP/Cre×10³

	Control	NO ₂ expos
MEAN	107.4	88.6
SD	11.3	8.4
%	100%	83%
p		p<0.01

The values are expressed as HOP/Cre×10³

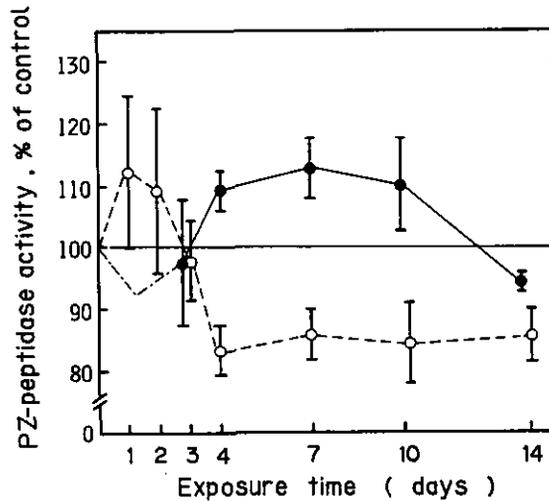


図 2 10ppm NO₂ に2週間暴露したラットの肺と血清のピーゼット・ペプチダーゼ活性の経時変化

Fig. 2 Time-dependent changes of PZ-peptidase (Collagenolytic enzymes) activity in lung and serum of rats exposed to 10 ppm NO₂ for 2 weeks

Control values of PZ-peptidase activity in lung were located 6.23 and 7.95 units/mg · protein/h × 10³, and control values of PZ-peptidase activity in serum were located 51.2 and 75.9 units/ml from first through the 14th day (○---: Serum PZ-peptidase, ●—: Lung PZ-peptidase). The values are expressed as mean ± SEM.

た。一方、血清中のPZ-peptidase活性はNO₂暴露1～2日目にかけて対照群より12%～9%程度増加し、3日目には対照レベルに戻った。しかし、4日目には逆に対照群より17%低下し、さらにこのレベルは14日目まで持続し、肺のPZ-peptidase活性とは対称的な経時変化を示した。

次に肺及び血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の経時変化を図3に示した。肺のコラゲナーゼ阻害因子活性はNO₂暴露1日目から低下し、3日目に最低となり対照群より25%も低下した。その後は徐々に回復し、7日目には対照レベルに達し、10日目には対照群より9%増加し、このレベルは

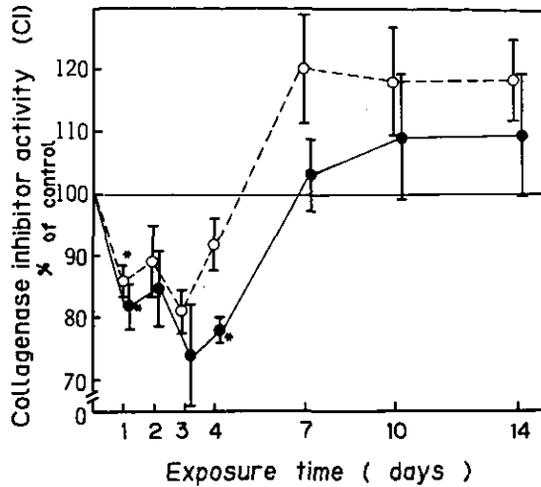


図 3 10ppm NO₂ に 2 週間暴露したラットの肺と血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の経時変化

Fig. 3 Time-dependent changes of collagenase inhibitor (CI) activity in lung and serum of rats exposed to 10 ppm NO₂ for 2 weeks

Control values of CI activity in lung were located 18.5 and 26.5% inhibition, and control values of CI activity in serum were located 20.3 and 25.1% inhibition from the first through the 14th day (○—: Serum CI, ●—: Lung CI). the values are expressed as mean ± SEM (*: p<0.05).

14日目まで持続した。血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性も肺と同様に、NO₂ 暴露 1 日目から低下したが肺で見られたほどの低下は示さず、3 日目では対照群より 19% 程度の低下にとどまった。その後、4 日目には対照レベルに近づき、7 日目には対照群より 20% 増加し、このレベルはほぼ 14 日目まで持続した。肺及び血清のコラゲナーゼ阻害因子活性に低下が見られた 1 ~ 4 日目までは両者の間に有意な正の相関 ($r=0.525$, $p<0.001$) が認められた。

肺の MAO 活性は図 4 に示すごとく 1 日目から増加しはじめ、4 ~ 14 日目にかけて対照群より 26 ~ 34% 増加し、2 日目を除き対照群との間に有意差を示した。

3. 1. 2 肺の Superoxide dismutase (SOD) 活性と過酸化脂質量及びコラーゲン代謝関連因子との相関

肺の SOD 活性と TBA 法で測定した過酸化脂質量の経時変化を図 5 に示した。肺の SOD 活性は NO₂ 暴露 3 日目で 10% 程度ではあるが有意な低下を示し、その後、7 ~ 10 日目にかけて対照群より若干増加し、14 日目には 14% の有意な増加を示した。肺の過酸化脂質量は NO₂ 暴露 2 日目から急速に増加しはじめ、4 ~ 7 日目にかけて最大レベルに達し、対照群より約 80% の有意な増加を示した。その後 10 ~ 14 日目にかけて対照レベルに近づく傾向を示し、14 日目では対照群より 9% の増加にとどまった。なお、1 ~ 4 日目までの肺の TBA 値と肺のコラゲナーゼ阻害因子活性との間には

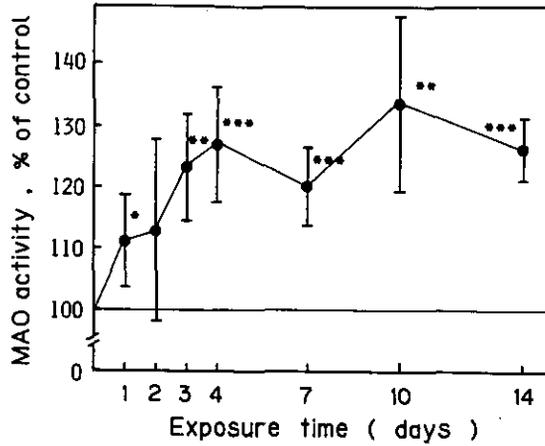


図 4 10ppm NO₂ に 2 週間暴露したラットの肺のモノアミノオキシダーゼ (MAO) 活性の経時変化

Fig. 4 Time-dependent changes of monoamine oxidase(MAO) activity in lung of rats exposed to 10 ppm NO₂ for 2 weeks

Control values of MAO activity were located 2445 and 2913 units/g · lung from the first through the 14th day. The values are expressed as mean ± SD (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001).

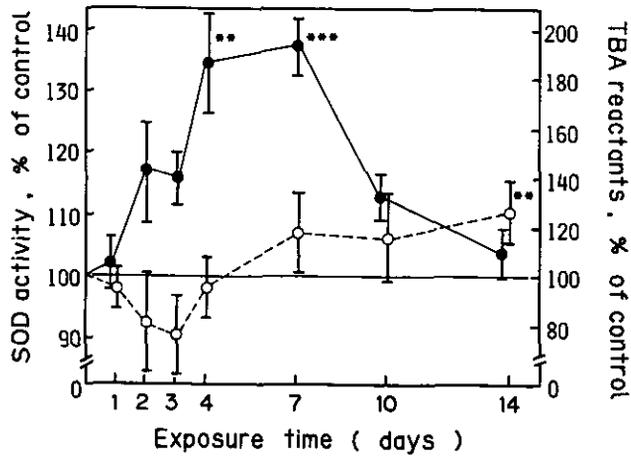


図 5 10ppm NO₂ に 2 週間暴露したラットの肺のスーパーオキシド・ディスムターゼ(SOD)活性と TBA 値の経時変化

Fig. 5 Time-dependent changes of TBA reactants and superoxide dismutase(SOD) activity in lung of rats exposed to 10 ppm NO₂ for 2 weeks

Control values of TBA reactant were located 17.7 and 31.9 n moles/g · lung, and control value of SOD activity were located 26.0 and 33.3 units/mg · protein/min from the first through the 14th day (●—: TBA reactants, ○---: SOD). The values are expressed as mean ± SD (**: p<0.01, ***: p<0.001).

有意な負の相関 ($r = -0.585, p < 0.001$) が認められた。また、肺の TBA 値と血清のコラゲナーゼ阻害因子活性との間にも負の相関が認められた。

3. 1. 3 肺の光学顕微鏡的所見

NO₂ 暴露 7 日目では図 6 に示すごとく、細気管支接合部から肺胞道にかけて浮腫性の肥厚と軽度の線維化が見られ、また、肺胞道に隣接した肺胞壁にも軽度の壁肥厚が見られた。しかし、肺胞構築はよく保たれ肺気腫様の変化は認められなかった。NO₂ 暴露 14 日目では 7 日目より肺胞壁の肥厚は軽度であった。

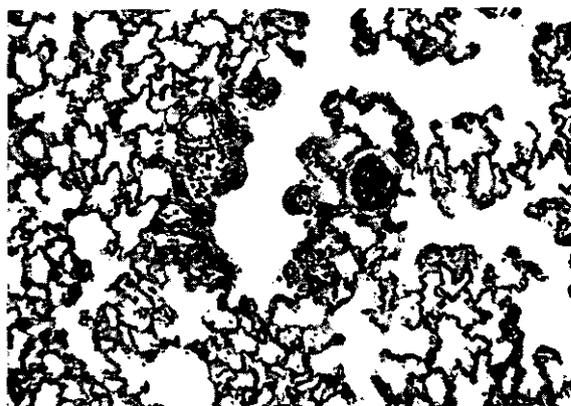


図 6 10ppm NO₂ 暴露 7 日目のラットの肺 (Azan Mallory 法), 肺胞道壁及び付近肺胞壁の肥厚・線維化 (原拡大×50)

Fig. 6 Rat lung exposed to nitrogen dioxide of 10 ppm for 7 days. (Azan Mallory staining)
Thickening of the wall of the alveolar duct and adjacent alveoli, advanced fibrosis. (original mag×50)

3. 2 慢性暴露実験

3. 2. 1 コラーゲン代謝関連因子及び肺の過酸化脂質量の変化

図 7 の A) に肺のコラーゲン含量, B) に血清ヒドロキシプロリン (HOP) 量, C) に尿 HOP 比を示した。ヒドロキシプロリン量で示した肺のコラーゲン含量はそれぞれの体重に差があるため、体重当たりの左肺のヒドロキシプロリン量比によって求めた。肺のヒドロキシプロリン量比は 0.4ppm 群では対照群と変わらなかったが、1.2ppm 群では対照群より 6% 低下し、4 ppm 群では 15% 増加していたがいずれも有意差は認められなかった。しかし、4 ppm 群でコラーゲン含量の増加傾向が見られたことは竹中ら³⁾の NO₂ 18 か月暴露の 4 ppm 群で軽度のコラーゲン線維の増生が見られたという病理学的結果と一致している。血清 HOP 量は 0.4ppm 群では対照群より 11% 低下してい

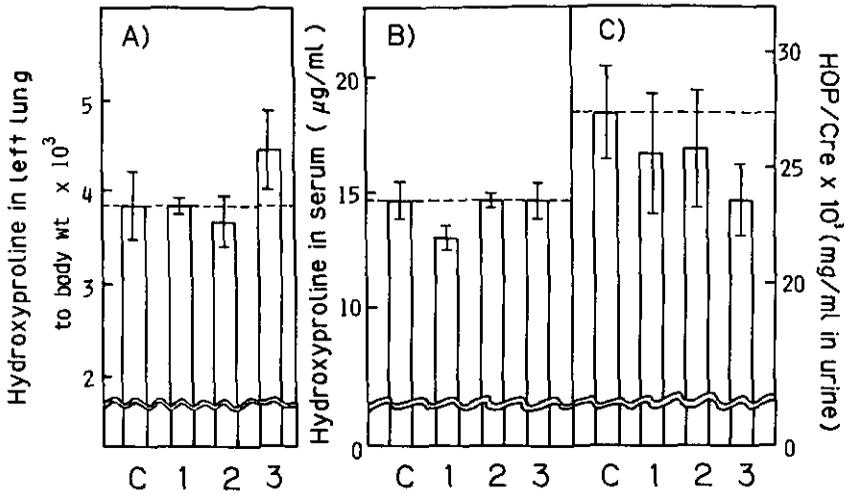


図 7 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂に18か月間暴露したラットの肺のヒドロプロリン量：体重比，血清ヒドロキシプロリン量及び尿中ヒドロキシプロリン：クレアチニン比の変化

Fig. 7 The changes of the contents of hydroxyproline (HOP) in lung (A) and serum (B), hydroxyproline: Creatinine ratio (HOP/Cre) in urine (C) of rats exposed continuously to 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for 18 months

The values expressed as mean ± SEM (C: Control group, 1: 0.4 ppm group, 2: 1.2 ppm group, 3: 4 ppm group).

たが有意差は認められず，また，1.2ppm群と4ppm群では対照群と変わりなかった。尿HOP比は0.4, 1.2及び4ppm群で対照群よりそれぞれ6%, 5%及び14%低下していた。しかし，いずれも有意差は認められなかった。このようにNO₂18か月暴露では血清HOP量や尿HOP比は増加することなくむしろ対照群より低下する傾向を示した。

図8のA)に肺のPZ-peptidase, B)に血清のPZ-peptidase活性を示した。肺のPZ-peptidase活性は尿HOP比と同様0.4, 1.2及び4ppm群とも対照群よりそれぞれ6%, 24%及び23%低下し，1.2及び4ppm群には有意差が認められた。血清のPZ-peptidase活性は0.4ppm群は対照群より12%低下していたが，1.2ppm群と4ppm群では対照群よりそれぞれ12%と36%増加し，4ppm群に対照群との間に有意差が認められた。血清のPZ-peptidase活性は肺のPZ-peptidase活性とは逆の変化を示していた。

図9のA)に肺のコラーゲナーゼ阻害因子活性を，B)に血清のコラーゲナーゼ阻害因子活性を示した。肺のコラーゲナーゼ阻害因子活性は0.4, 1.2及び4ppm群とも対照群よりそれぞれ13%, 11%及び30%増加した。最も増加していたのは4ppm群であるが有意差は認められなかった。血清中のコラーゲナーゼ阻害因子活性も，肺の場合と同じように0.4, 1.2及び4ppm群とも対照群よりそれぞれ22%, 26%及び26%増加していたが，いずれも有意差は認められなかった。

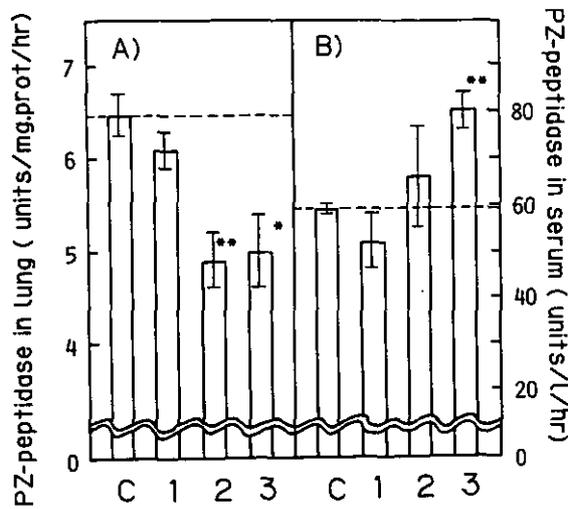


図 8 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂に18か月間暴露したラットの肺と血清のピーゼット・ペプチダーゼ活性の変化

Fig. 8 The changes of PZ-peptidase (collagenolytic enzymes) activity in lung(A) and serum(B) of rats exposed continuously to 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for 18 months

The values are expressed as mean ± SEM (C: Control group; 1: 0.4 ppm group; 2: 1.2 ppm group; 3: 4 ppm group). (*: p<0.05, **: p<0.01).

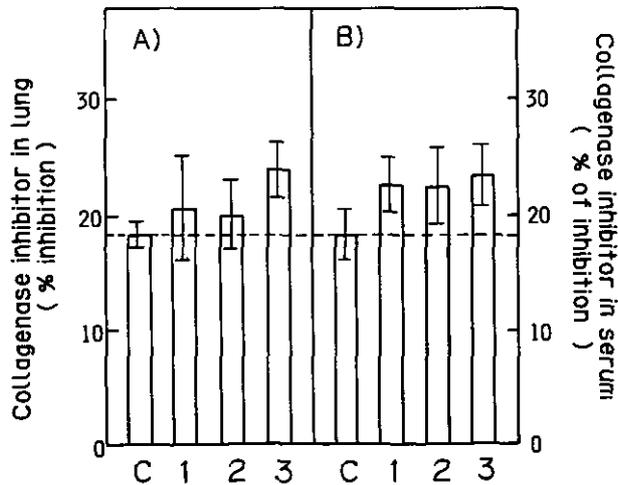


図 9 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂に18か月間暴露したラットの肺と血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の変化

Fig. 9 The changes of collagenase inhibitor(CI) activity in lung(A) and serum(B) of rats exposed continuously to 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for 18 months

The values are expressed as mean ± SEM (C: Control group, 1: 0.4 ppm group, 2: 1.2 ppm group, 3: 4 ppm group).

図10の A) に肺の MAO 活性を, B) に TBA 法による肺の過酸化脂質量を示した。0.4, 1.2及び 4 ppm 群の肺の MAO 活性は対照群よりそれぞれ 8%, 20%及び23%と NO₂ の暴露濃度に依存して増加し, 1.2ppm 群及び 4 ppm 群には対照群との間に有意差が認められた。肺の過酸化脂質量は 0.4, 1.2及び 4 ppm 群で対照群よりそれぞれ12%, 23%及び28%と NO₂ 濃度に依存して増加していたが対照群との間に有意差は認められなかった。又, 肺の MAO 活性と過酸化脂質量の間には正の相関($r=0.556$, $p<0.001$)が認められた。

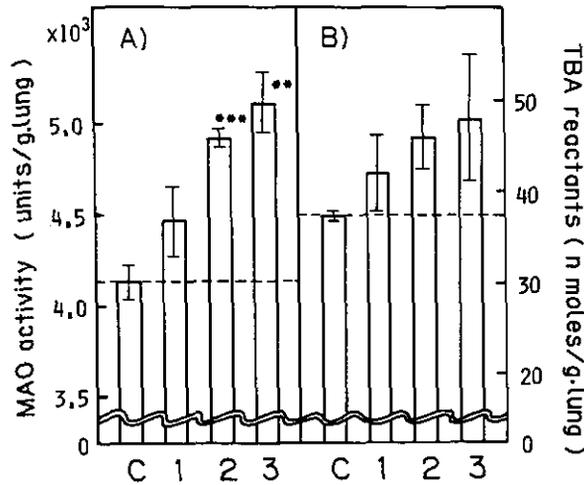


図 10 0.4, 1.2及び 4 ppm NO₂ に18か月間暴露したラットの肺のモノアミンオキシダーゼ(MAO)活性と TBA 値の変化

Fig. 10 The changes of monoamine oxidase(MAO) activity in lung(A) and TBA reactants in lung(B) of rats exposed continuously to 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for 18 months

The values are expressed as mean ± SEM (C: Control group, 1: 0.4 ppm group, 2: 1.2 ppm group, 3: 4 ppm group) (**: $p<0.01$, ***: $p<0.001$).

4 考察

本実験の10ppm NO₂ 暴露によって見られた病理学的変化は肺泡道や肺胞壁の肥厚と軽度の線維化であり, 肺気腫様の変化は認められなかった。生化学的にも, 肺胞壁の肥厚が軽度となった14日目には肺のコラーゲン含量も10日目のレベルより低い値を示していたが, 全体的に肺のコラーゲン含量が対照群より低下することはなかった。

肥厚した動脈硬化組織中にはコラーゲンと過酸化脂質が増加している^{35, 36}ことが報告されている。本実験でも肺の過酸化脂質量の増加に伴って肺のコラーゲン量が増加し, この時肺胞壁の肥厚もみられた。しかし, 肺のコラーゲン量が対照レベルに近づいた14日目では肺胞壁の肥厚の低下と共に過酸化脂質量も低下していた。このようなことから, NO₂ 暴露ラットの肺胞壁の肥厚組織中に

もコラーゲンと過酸化脂質が増加しているのかもしれない。

NO₂ と NO の混合暴露によってコラーゲン合成律速酵素である prolyl hydroxylase 活性が増加することは Orthoefer ら⁸⁾によって報告されている。一方, Hussain ら¹⁶⁾は NO₂ と同様に肺の線維化を起こすことが知られているオゾン(0.2ppm から0.8ppm の濃度でラットに暴露すると, 肺の prolyl hydroxylase 活性は高濃度オゾンの方が速い時期に上昇し, しかも低濃度の場合よりも高くなり, その後この活性は再び対照レベルに戻ることを報告している。このような報告から, 本実験に関しても, コラーゲン含量が最も増加した4~10日目では prolyl hydroxylase 活性が増加し, コラーゲン合成が促進しているものと思われるが, コラーゲン含量が対照レベルに近づく14日目頃では, その活性が低下しコラーゲン合成も対照群とあまりかわりなくなっているのかもしれない。Prolyl hydroxylase 活性はスーパーオキシド・ラジカル(O₂⁻)によって誘導され, これによってコラーゲン合成が促進することは既に報告^{16,17)}されている。しかし, 本実験では, O₂⁻ 発生の間接指標として測定した SOD 活性は4日目以降では増加していたが, 肺のコラーゲン含量の変化とは必ずしも明白な対応を示さず, 肺のコラーゲン含量はむしろ肺の過酸化脂質量の経時変化と類似していた。コラーゲン合成に O₂⁻ 以外の活性酸素やフリーラジカルあるいは過酸化脂質等が関与しているという報告はないが, 本実験の結果からするとコラーゲン合成に O₂⁻ 以外の活性酸素, フリーラジカルあるいは過酸化脂質の何かが関与している可能性も考えられる。また, 肺のコラーゲン含量が急速に増加しはじめた1~4日目頃には肺の過酸化脂質量と MAO 活性との間に有意な正の相関($r=0.528$, $p<0.001$)が認められた。このことから, この時期ではコラーゲン合成の促進とともに, 肺の過酸化脂質の増加と平行して何らかの理由で MAO が活性化されコラーゲンの架橋も促進されていることが推測される。

一方, 肺のコラゲナーゼ阻害因子活性は NO₂ 暴露1~4日目にかけて対照群より低下していた。Dooley と Pryor³⁷⁾は NO₂ と過酸化水素(H₂O₂)との次式の反応によって生ずるヒドロキシラジカル(\cdot OH)がヒトの α_1 -proteinase inhibitor (α_1 -PI)を酸化して, エラスターゼ阻害能(Elastase inhibitory capacity)を低下させることを報告している。



また, 最近 Pryor ら²³⁾はコラゲナーゼやエラスターゼ活性を阻害する α_1 -PI がタバコのガス成分中に含まれているラジカルから生ずる peroxy-nitrate によって不活性化されるという *in vitro* の結果を報告している。このような \cdot OH や peroxy radical は脂質過酸化反応を起こす³⁸⁾ことはよく知られている。本実験では, NO₂ 暴露1~4日目に肺の過酸化脂質量が増加し, コラゲナーゼ阻害因子活性は逆に低下し, 両者の間には有意な負の相関($r=-0.585$, $p<0.001$)が認められた。本実験の NO₂ 暴露により肺で過酸化脂質が生成していることから, この生成に関与する \cdot OH や peroxy-nitrate がコラゲナーゼ阻害因子を不活性化している可能性が示唆される。また, 1~4日目の肺と血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の間には有意な正の相関($r=0.525$, $p<0.001$)が認められてい

ることから、血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下は肺でコラゲナーゼ阻害因子が不活性化されたことによって起こったものと推測される。今後は10ppm NO₂ 暴露条件下で確かに・OH や peroxynitrate が生成しているかどうかを調べる必要がある。しかし、コラゲナーゼ阻害因子活性が低下している1～3日目頃の時期には血清 HOP 量は必ずしも増加していず、また肺のコラーゲン含量もこの時期には低下していないことから、肺のコラゲナーゼ様活性は図2に一点破線で示した如く、この時期には低下し肺のコラーゲン分解は促進していないものと推測される。

血清中の α_1 -antitrypsin は肝臓で合成され、血清のプロテアーゼ活性の約90%を阻害し、炎症や組織破壊などの際に増加し、ライソゾーム、マクロファージあるいは好中球から放出されるコラゲナーゼを初めとする様々なプロテアーゼ活性を阻害し、組織破壊を防止している³⁹⁾とされている。本実験の血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性は肺の過酸化脂質が最大レベルに達する4日目頃から7日目にかけて急速に増加し、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性も対照値まで回復した。Kleinerman ら⁴⁰⁾は20ppm の NO₂ に暴露したハムスターでは暴露1日目に肺の総プロテアーゼ活性が増加し、2日目には血清中のプロテアーゼ阻害因子活性が増加しているのを見だし、血清中のプロテアーゼ阻害因子活性の増加は肺のプロテアーゼ活性を中和するためのものと示唆している。本実験では、NO₂ 暴露濃度が低いために、肺のコラゲナーゼ様活性は4日目になってようやく対照群より増加し、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の増加はさらに時間的に遅れていたが、両者がたどる経時変化は基本的には Kleinerman ら⁴⁰⁾の結果と一致していた。このようなことから、血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性の増加は肺の過酸化脂質が最大レベルに達する時期に肺が障害され、炎症が起こることによって増加するコラゲナーゼ等のプロテアーゼが炎症部位の組織を無秩序に分解するのを防ぐために肝臓がコラゲナーゼ阻害因子を盛んに合成し血清中に放出しているためなのかもしれない。また、NO₂ 暴露14日目で肺のコラゲナーゼ様活性が低下するのは、このような血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性の増加に伴った肺のコラゲナーゼ阻害因子の増加によるものかもしれない。

血清 HOP 量は肺のコラーゲン含量が最も増加した4～10日目にかけて対照群より増加した。この増加はこの時期に肺のコラゲナーゼ様活性が増加し、コラーゲン分解が促進したことによると考えられる。それゆえ、測定はされていないが、この時期には尿中 HOP 比も増加して行くことが推測される。後述の笠原ら⁴²⁾の結果はこの推測を裏付けている。肺のコラゲナーゼ様活性の増加による肺のコラーゲン分解の促進は肺のコラゲナーゼ様活性と血清 HOP 量との間に正の相関が認められたことから支持される。しかし、4～10日目にかけて肺のコラーゲン分解が促進されているにもかかわらず、この時期の肺のコラーゲン含量は対照群より有意に増加していることから、この時期にはコラーゲン合成は分解を上回るほどに充進しているものと推測される。これに対して、14日目に血清 HOP 量や尿 HOP 比が低下するのは肺のコラゲナーゼ様活性が低下したことによるものと考えられる。

以上、10ppm NO₂ 暴露の場合ではコラーゲン合成の促進に始まり、それに伴ってコラーゲン分

解も促進する。この時、コラーゲンの架橋形成が促進して肺の線維化へと進むのであろう。その後、更に NO₂ 暴露を受け続けると肺のコラーゲン分解能がむしろ低下し、血清 HOP 量や尿中 HOP 比は逆に低下するものと思われる。

一方、0.4、1.2及び4 ppm NO₂ の18か月暴露では肺の過酸化脂質量が増加傾向を示していることから、活性酸素やフリーラジカル等の発生が推察される。しかし、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下は認められず、むしろ NO₂ 濃度に依存して増加する傾向を示していた。この増加は肺でコラゲナーゼ阻害因子が活性酸素やフリーラジカル等によって不活性化される、あるいはコラゲナーゼ阻害因子がコラゲナーゼを初めとするプロテアーゼと結合する⁴¹⁾以上に肝でコラゲナーゼ阻害因子の合成が促進されて肺に運ばれているためとも考えられよう。NO₂ 長期暴露の場合では、このような肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の増加によって肺のコラゲナーゼ様活性が NO₂ 濃度に依存して低下し、肺のコラーゲン分解速度が低下して尿中 HOP 比が NO₂ 濃度の上昇につれて低下するであろうと推測される。また、コラゲナーゼ様活性が最も低下していたことにより、コラーゲンの分解速度が最も低下しているであろうと推測される4 ppm 群では肺のコラーゲン含量の増加傾向が認められた。このような結果から、NO₂ 暴露18か月目での病態は、コラゲナーゼ阻害因子活性の増加によるコラーゲン分解の低下と、また、この時、MAO 活性の増加が見られていることからコラーゲンの架橋形成の促進によって肺線維化への方向に進行しているものと考えられよう。事実、竹中ら³⁾は4 ppm NO₂ 18か月暴露では肺の軽度のコラーゲン線維の増生を認めている。しかし、コラーゲンの増生はコラーゲン分解の低下によるものだけとは考えにくい面がある。なぜなら、0.4、1.2ppm 群でもコラーゲン分解の低下が考えられるが、コラーゲン含量は増加していない。それゆえ、この程度の濃度の NO₂ ではコラーゲン合成はあまり促進していないのかもしれない。竹中ら³⁾も0.4ppm NO₂ 18か月暴露では肺のコラーゲン線維の増生を認めていない。しかし、彼らは4 ppm NO₂ 27か月暴露ラットの肺では18か月暴露ラットの肺に比較してコラーゲン線維の増生が更に進行していることを報告している。このような報告から、4 ppm NO₂ 18か月暴露ではコラーゲン分解の低下とともに肺のコラーゲン合成が促進しているのかもしれない。

笠原ら⁴²⁾はラットに0.3、0.5及び1 ppm NO₂ を30、60、及び110日間、あるいは8 ppm NO₂ を24日間暴露すると尿中ヒドロキシプロリン量は一時的に増加するが暴露期間の延長に伴って徐々に対照レベルに戻り、しかもこの現象は NO₂ 濃度が高い場合の方が早く起こることを報告している。本実験の10ppm NO₂ 急性暴露でも血清 HOP 量や尿 HOP 比は暴露14日目に既に低下している。このようなことから、本実験の0.4、1.2及び4 ppm NO₂ 18か月暴露の各群の尿 HOP 比は対照群より低下しているが、笠原らの報告のように18か月目以前に尿 HOP 比がいったん増加し、しかも4 ppm 群の方が先に増加していた可能性が考えられる。竹中ら³⁾は4 ppm NO₂ 9か月暴露の時点では肺の軽度のコラーゲン線維の増生を認めていない。このようなことから、4 ppm 程度の濃度で初期に血清 HOP 量や尿 HOP 比が増加すると思われる時期には、肺の線維化は起こらないのかもしれない。

大気汚染物質の健康影響に関する疫学的研究において、NO₂ 汚染地域住民や喫煙者の尿中 HOP

比が増加する²⁴⁻²⁶⁾ことが報告されているが、本実験結果から尿 HOP 比の増加機序を考えると、その増加は10ppm NO₂ 暴露実験の4～10日目頃に観察された肺のコラーゲン代謝回転の亢進によるものなのかもしれない。また、低濃度 NO₂ に慢性的に暴露された場合にはコラゲナーゼ阻害因子が誘導されコラーゲン分解が抑制されるために肺の軽度のコラーゲン線維の増生が起こるのかもしれない。したがって肺の線維化の点から見ると、むしろ HOP 比が低下している事例の方に注意を払うべきかもしれない。一方、尿 HOP 比の増加は、肺気腫発症の要因であるプロテアーゼ阻害因子活性が低下し続けた場合⁴³⁾に起こりうると考えられる。したがって疫学的研究において、尿 HOP 比と同時に血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性の変化を調べることは極めて重要であると思われる。ある大気汚染物質の比較的長期間の吸入によってコラゲナーゼ阻害因子活性が増加したり、低下したりする原因を実験的に、より詳しく解明することができれば疫学的研究において優れた指標として多くの研究者に用いられている尿中 HOP 比の増加の意味をより正確に理解しうるものと考ええる。

引用文献

- 1) Freeman, G. and G. B. Haydon (1964): Emphysema after low-level exposure to NO₂. Arch. Environ. Health, **8**, 125-128.
- 2) Stephanes, R. J., G. Freeman, M. J. Evens and M. P. Galif (1971): Ultrastructural changes in connective tissue in lung of rats exposed to NO₂. Arch. Intern Med., **127**, 873-883.
- 3) 竹中参二・清水不二雄・山田靖子・堀内博人・京野洋子・河合清之(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響—病理学的所見—. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 171-227.
- 4) Freeman, G., N. J. Furiosi and G. B. Haydon (1966): Effects of continuous exposure of 0.8ppm NO₂ on respiration of rats. Arch. Environ. Health, **13**, 454-456.
- 5) Hattori S. and K. Takemura (1973): Ultrastructural changes in the bronchial alveolar system caused by air pollution and smoking. J. Clin. Microscopy., **6**, 350.
- 6) Haydon, G. B., G. Freeman and N. J. Furiosi (1965): Covert pathogenesis of NO₂-induced emphysema in the rat. Arch. Environ. Health, **11**, 776-783.
- 7) Drozd, M., E. Kucharz and J. Szyja (1977): Effect of chronic exposure to nitrogen dioxide on collagen content in lung and skin of guinea pigs. Environ. Res., **13**, 369-377.
- 8) Orthoefer, J. G., R. S. Bhatnagar, A. Rahman, Y. Y. Yang, S. D. Lee and J. F. Stara (1976): Collagen and prolylhydroxylase levels in lung of beagles exposed to air pollutants. Environ. Res., **12**, 299-305.
- 9) Hacker A. D. (1976): Effects of short-term nitrogen dioxide exposure on lung of collagen synthesis. (Meeting Abstract) Am. Rev. Respir. Dis., **113**, 107.
- 10) Kleinerman, J. (1979): Effects of nitrogen dioxide on elastin and collagen contents of lung. Arch. Environ. Health, **34**, 228-232.
- 11) Kosmidor, S., A. Misiewicz, E. Felus, M. Drozd and K. Ludyga (1972): Experimental and clinical investigations on the emphysema forming action of nitrogen oxide. Zentralbl Arbeitsmed Arbeitsschutz., **22**(12), 362-368.
- 12) Kucharz, E., G. Miodonska and A. Kozlowski (1972): Wplyw tlenkow azotuna na metabolizm kolagenu

- wplucach swinck morskich. *In*: Informator XII Uczelnianej Konferencji Stud. Kola Naukowego Slaskiej a Kademii Medycznej, Zabrze, Abstract, p. 40.
- 13) Sagai, M., T. Ichinose, H. Oda and K. Kubota (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153-164.
 - 14) Ichinose, T. and M. Sagai (1982): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. III. Changes of the antioxidative protective systems in rat lung and of lipid peroxidation by chronic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **66**, 1-8.
 - 15) Sagai, M., T. Ichinose and K. Kubota (1984): Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. IV. Relation between the change of lipid peroxidation and the antioxidative protective system in rat lung upon life span exposure to low levels of NO₂. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 444-456.
 - 16) Hussain, M. Z., M. G. Mustafa, C. K. Chow and C. E. Cross (1976): Ozone-induced increase of lung proline hydroxylase activity and hydroxyproline content. *Chest*, **69**, 273-375.
 - 17) Bhatnagar, R. S. and T. Z. Liv (1972): Evidence for free radical involvement in the hydroxylation of proline: Inhibition by nitroblue tetrazidium. *FEBS Lett.*, **26**, 32-34.
 - 18) Giri, S. N., H. P. Misra, D. B. Chandler and Z. Chen (1983): Increases in lung prolyl hydroxylase and superoxide dismutase activities during breomycin-induced lung fibrosis in hamsters. *Exp. Mol. Pathol.*, **39**, 317-326.
 - 19) Hussain, M. Z., and R. S. Bhatnagar (1979): Involvement of superoxide in the paraquat-induced enhancement of lung collagen synthesis in organ culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 71-76.
 - 20) Carp, H. and A. J. Janoff (1979): *In vitro* suppression of serum elastase-inhibitory capacity by reactive oxygen species generated by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.*, **63**, 793-807.
 - 21) Eriksson, S. (1964): Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta. Med. Scand.*, **117** (suppl 432), 1-85.
 - 22) Janoff, A., H. Carp, D. K. Lee and R. T. Drew (1979): Cigarette smoke inhalation decrease α_1 -antitrypsin activity in rat lung. *Science*, **206**, 1313-1314.
 - 23) Pryor, W. A., M. M. Dooley and D. F. Church (1984): Inactivation of human α_1 -proteinase inhibitor by gas-phase cigarette smoke. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 676-681.
 - 24) 松木秀明・逢坂文夫・春日 齊・杉田 稔(1981): Hydroxyproline: Creatinine 比(HOP 比)を指標とする健康学童および成人への大気汚染の影響に関する疫学的研究. 日本公衆衛生雑誌, **28**, 505-515.
 - 25) 柳沢幸雄・西村 肇・春日 齊・逢坂文夫・松木秀明(1982): NO₂ 被曝量と尿中 Hydroxyproline: Creatine 比(その1): 主婦を対象とした年間調査. 第23回大気汚染研究全国協議会講演集, 宮崎, p. 527.
 - 26) 柳沢幸雄・西村 肇・春日 齊・逢坂文夫・松木秀明(1982): NO₂ 被曝量と尿中 Hydroxyproline: Creatine 比(その2): 主婦を対象とした冬期断面調査. 第23回大気汚染研究全国協議会講演集, 宮崎, p. 528.
 - 27) 松本 茂・藤田和伸・清水 明・木村英雄・高橋 弘(1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響—暴露チャンバーの環境制御. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 149-158.
 - 28) Ohkawa, H., N. Ohnishi and K. Yagi (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
 - 29) McCord, J. M. and I. Fridovich (1969): Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.

- 30) 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.
- 31) 山本正彦・村松元江・木村 弘・植松平馬(1977): 肺線維症におけるコラーゲナーゼ活性とその阻害活性. 厚生省特定疾患「肺線維症」調査研究班研究報告書, 89-93.
- 32) Gries, G., H. Buresch and L. Stranch (1970): Collagenolytic enzymes in human serum. *Experientia*, **26**, 31-33.
- 33) Bergman, I. and R. Loxley (1970): The determination of hydroxyproline in urine hydrolysate. *Clin. Chim. Acta.*, **27**, 347-349.
- 34) Jaffe, M. and Hoppe-Sey letz (1886): *Physiol. Chem.*, **10**, 391.
- 35) Glavind, J., S. Hartman, J. Clemmeson, K. E. Jessen and S. Dan (1952): Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipid in the atherosclerotic aorta. *Acta. Path. Micro. Scand.*, **30**, 1-6.
- 36) Ross, R. and J. A. Glomset (1973): Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science*, **180**, 1332-1339.
- 37) Dooley, M. M. and W.A.Pryor (1982): Free radical Pathology: Inactivation of human α -1-proteinase inhibitor by products from the reaction of nitrogen dioxide with hydrogen peroxide and the etiology of emphysema. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**(3), 981-986.
- 38) Menzel, D. B. (1976): The nrole of free radicals in the toxicity air pollutants (nitrogen oxides and ozone). *In: Free radical in Biology*. W. A. Pryor (ed.), Vol. 2, Academic Press, N. Y., 181-202.
- 39) 西本幸男・稲水 淳・山木戸道郎(1981): α ₁-アンチトリプシン欠乏による肺気腫. *医学のあゆみ*, **117**, 690-697.
- 40) Kleinerman, J. and D. Rynbrandt (1976): Lung proteolytic activity and serum protease inhibition after NO₂ exposure. *Arch. Environ. Health*, **31**, 37-41.
- 41) Sellers, A., E. Cartwright, G. Murphy and J. J. Reynolds (1977): Evidence that latent collagenases are enzyme-inhibitor complexes. *Biochem. J.*, **163**, 303-307.
- 42) 笠原利英・大沢誠喜・鈴木孝人・溝口 勲(1979): ラット尿中ハイドロキシプロリン排泄に及ぼす NO₂ 暴露の影響. *東京都立衛生研究所年報*, **30**, 195-198.
- 43) Abrams, W. R., V. V. Cohen, A. Damiano, P. Kimbel, D. R. Merauze and G. Weinbaum (1981): A model of decreased functional α -1-protease inhibitor. *J. Clin. Invest.*, **68**, 1132-1139.

II-16 二酸化窒素暴露がラット肺胞洗浄液中の
プロスタグランジン類及びトロンボキサン B₂ 含量に及ぼす影響*
Effects of Nitrogen Dioxide Exposure on the Contents
of Prostaglandins and Thromboxane B₂ in Broncho Alveolar Lavage*

小林隆弘¹

Takahiro KOBAYASHI¹

要 旨

二酸化窒素(NO₂)を暴露した場合のラットの肺胞洗浄液中のプロスタグランジン(PG)類及びトロンボキサン B₂(TXB₂)量に及ぼす影響に関して検討した。正常ラット一匹(体重399±16g)当たりの全肺胞洗浄液中のPG類とTXB₂量は以下のとおりであった。PGI₂(38.0±6.4ng) > TXB₂(11.8±4.0ng) > PGF_{2α}(5.7±1.6ng) > PGE(0.5±0.3ng)。ラットを10ppm NO₂に1, 3, 5, 7, 14日間暴露するとラット一匹当たりの全肺胞洗浄液中のPGI₂量は、一日間暴露後には65%に減少し、その後暴露期間中この減少状態が続いた。これに対しTXB₂量は増加し5日目に最大(155%)となったが、以後NO₂暴露を続けるとTXB₂量は次第に減少し対照群のレベルに戻った。PGF_{2α}及びPGE含量は1日間暴露で減少し3日及び5日間暴露では一時的に増加したが7日及び14日間暴露後には再び有意に減少した。PGF_{2α}及びPGE量が増加した時点で、PGF_{2α}やPGEを代謝し、不活性化するプロスタグランジン-15-ヒドロキシデーヒドロゲナーゼ(PGデヒドロゲナーゼ)の活性が、肺のホモジネートで低下していることが観察された。

以上の結果から、NO₂暴露により気管の平滑筋の弛緩作用のあるPGI₂及びPGE含量が減少し、収縮作用のあるTXA₂の代謝物であるTXB₂及びPGF_{2α}含量が増加したことにより、気管が収縮しやすい方向に平衡がずれている可能性が考えられる。

Abstract

Effects of 10 ppm nitrogen dioxide (NO₂) exposure on the contents of prostaglandins (PGs) and thromboxane (TX) B₂ in broncho alveolar lavage (BAL) of rats were studied.

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

* 本論文の要旨は Prostaglandins, 31, 469-475 (1986) に発表したものである。

In the BAL of normal rats, the amounts of PGs and TXB₂ in the whole lavage were PGI₂ (38.0±6.4ng) >TXB₂ (11.8±4.0ng) >PGF_{2α} (5.7±1.6ng) >>PGE (0.5±0.3ng). Rats were exposed to NO₂ for 1, 3, 5, 7 and 14 days. The NO₂ exposure decreased in the level of PGI₂ by about 35% throughout the exposure. The level of TXB₂ was higher in the day 5 exposure group (155%). The contents of PGF_{2α} and PGE first, decreased and then transiently increased on days 3 and 5. PG 15-hydroxy-dehydrogenase activity of lung homogenate decreased correspondingly on days 3 and 5. Then the contents PGF_{2α} and PGE decreased on days 7 and 14.

PGI₂ and TXA₂ are a bronchorelaxant, and a strong bronchoconstrictor respectively. Therefore the results suggested that the decrease in PGI₂, a major prostanoid in the BAL and the increase in TXB₂ (metabolite of TXA₂) may correlate with broncho constriction by NO₂ exposure.

1 はじめに

アラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ産物は気管や肺で重要な役割を果たしている。PGI₂^{1,2)}とPGE^{3,4)}は気管平滑筋を弛緩する作用を持つが、TXA₂⁵⁾やPGF_{2α}^{6,7)}は気管を収縮する作用を示す。したがって肺胞洗浄液中でのこれらシクロオキシゲナーゼ産物の含量の変化は、換気量、呼吸数といった、肺の機能に重要な影響を及ぼすと考えられる。一方、我々は酸化力の強いNO₂やオゾン暴露が肺のアラキドン酸代謝を変化させることを報告してきた⁸⁻¹⁰⁾。すなわちラットにおいては肺でのアラキドン酸代謝の主産物であるPGI₂の合成活性がNO₂暴露によって低下することを見いだした。このPGI₂の合成活性の低下に伴い血小板のTXA₂合成が増加することを観察してきた。一方、NO₂暴露は肺のPGデヒドロゲナーゼ活性を低下させることが報告されている¹¹⁾。このことは、肺胞内でのPGEやPGF_{2α}の含量に影響を及ぼす一因になると考えられる。そこでNO₂暴露による呼吸機能への影響の解析のため、気管や気管支の平滑筋の収縮と弛緩に強い作用を及ぼすPG類及びTXB₂の肺胞洗浄液中の含量への影響を検討した。

2 材料と方法

2.1 実験動物

11週令のJcl: Wistar 系雄ラット(各群6匹)を用いた。

2.2 NO₂ 暴露

NO₂暴露は10ppm NO₂を容量1.39m³の暴露チャンバー内に流量110~120m³/hで流し1, 3, 5, 7, 14日間ラットに暴露する方法をとった。チャンバー内は温度25±1℃, 湿度55±5%に保たれた。

2.3 肺胞の洗浄

肺胞の洗浄は10mlの氷冷したダルベッコのCa, Mg 不含リン酸緩衝液を気管から注入し出し入れを3回行った後回収する方法をとった¹²⁾。上記操作を3回行ったが1回目は8mlを、2, 3回目は各10mlを回収した。集められた洗浄液は3,000rpmで20分間遠心し細胞を除去し、その上清を肺胞洗浄液とした。

2.4 ラジオイムノアッセイ

肺胞洗浄液は4倍量のエタノールを加え除蛋白後溶媒を溜去し各ラジオイムノアッセイ用の溶媒に溶解させ試料とした。PGI₂及びPGEはそれぞれ安定な誘導体である6-keto-PGF_{1α}及びPGBとして測定に供した。6-keto-PGF_{1α}及びTXB₂はNew England Nuclear社製^[3H]RIAキットをPGF_{2α}及びPGEはTravenol社製^[3H]RIAキットを用いて測定した。

2.5 肺ホモジネートのPGデヒドロゲナーゼ活性の測定法

およそ500mgの肺を2mlの氷冷したトリス-塩酸緩衝液(pH 8.4, 1/10 M)でホモジナイズした。肺のホモジネート1.0mgと10μCiの[5, 6, 8, 11, 12, 14, 15(n)-³H]-PGE₂(160Ci/mmol)と8mMのβ-NAD⁺を含んだ0.5mlのトリス-塩酸緩衝液と37°Cで20分間インキュベートした。1N塩酸を加えpHを3にし反応を止めた。代謝物である15-oxo-PGE₂は薄層クロマトグラフィーにより分離した。展開溶媒は酢酸エチル/2,2,4-トリメチル-ペンタン/酢酸/水(11/5/3/10)系の有機層を用いた。放射活性産物は薄層ラジオクロマトグラフィーにより分析した。蛋白量は牛血清アルブミンを標準としてLowryらの方法¹³⁾により測定した。

2.6 統計処理

PG類並びにTXB₂の含量はラット1匹当たりの全肺胞洗浄液中に含まれる量とし平均値±SDで表した。検定はStudentの*t*検定を用いた。

3 結果

正常なラット1匹当たりの全肺胞洗浄液中のPG類とTXB₂類の含量はPGI₂(38.0±6.4ng) > TXB₂(11.8±4.0ng) > PGF_{2α}(5.7±1.6ng) >> PGE(0.5±0.3ng)であった(図1)。

図2にNO₂暴露で全肺胞洗浄液中のPGI₂含量が減少することを示した。PGI₂含量は1日間暴露で既に有意に減少(65%)し、その後PGI₂含量は減少したまま(59~66%)14日後まで回復しなかった。

図3にNO₂暴露が全肺胞洗浄液中のTXB₂含量に及ぼす影響を示した。TXB₂量はNO₂暴露すると徐々に増加し5日間暴露後に最大(155%)になり、その後徐々に対照群の値に戻る事が明らかになった。

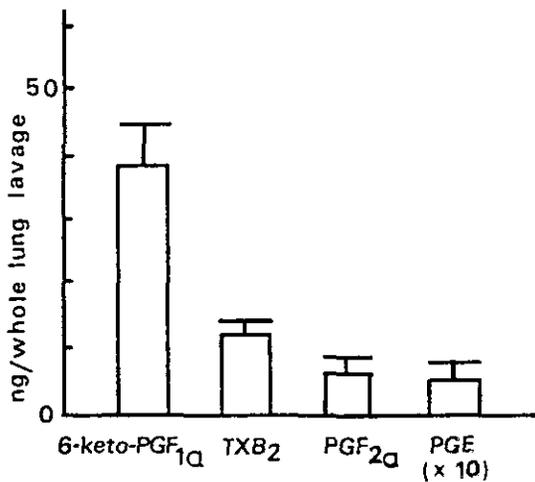


図 1 正常ラットの肺胞洗浄液中の PG 類と TXB₂ の含量
 Fig. 1 Contents of PGs and TXB₂ in the BAL of normal rats
 The levels of PG_{I₂} is expressed as the contents of 6-keto-PGF_{1α}, respectively. Values are means ± SD for 6 rats.

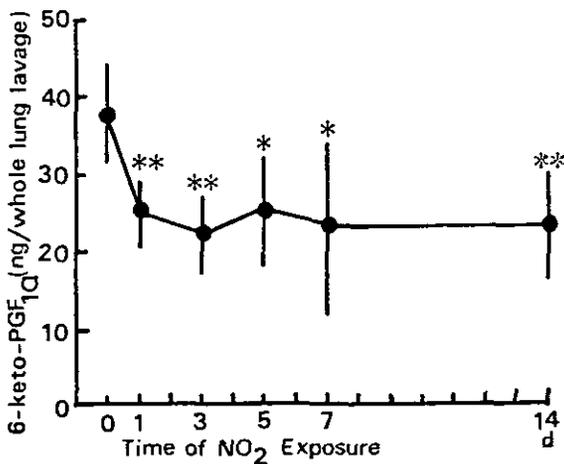


図 2 NO₂ (10ppm) 暴露によるラット 1 匹当たりの全肺胞洗浄液中の PGI₂ 含量の変化
 Fig. 2 Changes in the level of PGI₂ in the BAL by NO₂ (10ppm) exposure
 Values are means ± SD for 6 rats. ** and *: t-test as compared with rats exposed to only filtered air, p<0.01 and p<0.05 respectively.

図4, 図5に全肺胞洗浄液中のPGF_{2α}及びPGE含量に及ぼすNO₂暴露の影響を示した。両者とも1日間暴露で有意に減少(それぞれ45%, 44%)した。その後3日間暴露(それぞれ122%, 164%)及び5日間暴露(それぞれ120%, 134%)で一時的に増加した。その後再び減少した。

図6にPGF_{2α}及びPGE代謝するPGデヒドロゲナーゼ活性に及ぼすNO₂暴露の影響を示した。

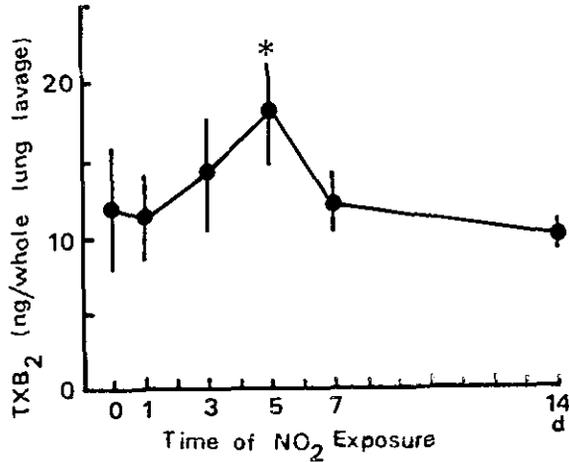


図 3 NO₂(10ppm)暴露による肺胞洗浄液中のTXB₂含量の変化

Fig. 3 Changes in the level of TXB₂ in the BAL by NO₂ (10ppm) exposure

Values are means ± SD for 6 rats. *: t-test as compared with rats exposed to filtered air, p<0.05.

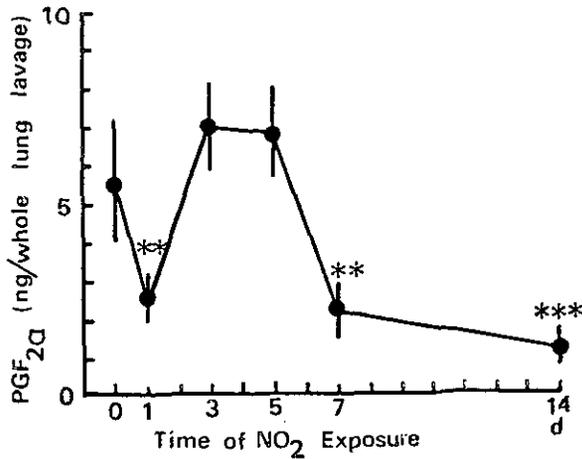


図 4 NO₂(10ppm)暴露による肺胞洗浄液中のPGF_{2α}含量の変化

Fig. 4 Changes in the content of PGF_{2α} in the BAL by NO₂ (10ppm) exposure

Values are means ± SD for 6 rats. *** and **: t-test as compared with rats exposed to filtered air, p<0.001 and p<0.01, respectively.

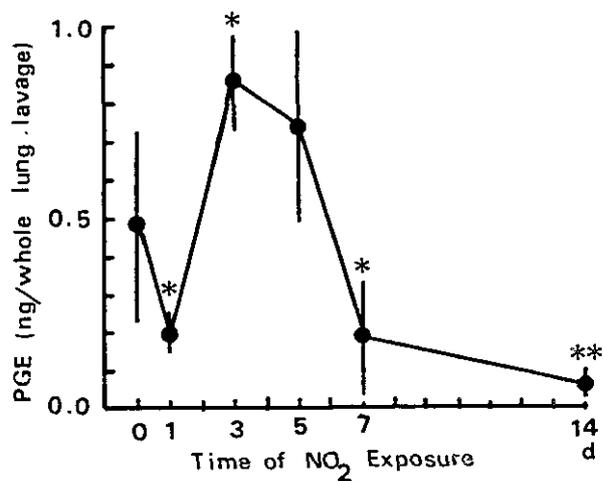


図 5 NO₂(10ppm)暴露による肺胞洗浄液中のPGE含量の変化
 Fig. 5 Changes in the content of PGE in the BAL by NO₂ (10ppm) exposure
 Values are means \pm SD for 6 rats. ** and *: t-test as compared with rats exposed to filtered air, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively.

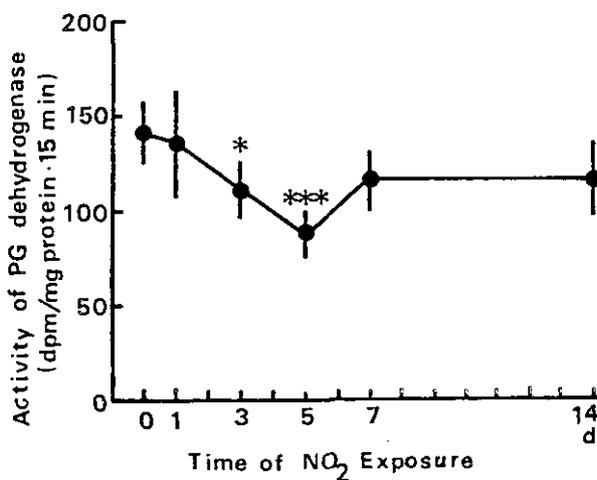


図 6 NO₂(10ppm)暴露によるPGデヒドロゲナーゼ活性の変化
 Fig. 6 Changes in activity of PG dehydrogenase of lung by NO₂ (10ppm) exposure
 Values are means \pm SD for 6 rats. *** and *: t-test as compared with 6 rats exposed to filtered air, $p < 0.001$ and $p < 0.05$ respectively.

3日間暴露後から有意に減少することが観察され、5日間暴露で最小になり以後徐々に回復していくことが見いだされた。

4 考 察

今回の実験結果から NO₂ 暴露により肺胞洗浄液中の PGI₂ 含量が減少することが明らかになった。既に、我々は肺のホモジネートの PGI₂ 合成活性が NO₂ 暴露により低下することを見いだしてきた^{8,9)}。肺のホモジネートの PGI₂ 合成活性は 10ppm NO₂ の 3 日間暴露で最低になった後徐々に回復し、14 日間暴露後では対照群の値に戻っていることを報告した。一方、今回の結果から肺胞洗浄液中の PGI₂ 含量は NO₂ 暴露により 1 日後から減少し、その減少した値は 14 日間暴露後も続き、肺のホモジネートの場合と差があることが明らかになった。肺胞や気管の上皮細胞からの PGI₂ の放出が肺胞洗浄液中の PGI₂ 含量に主に反映されるとすると、NO₂ は酸化力が強い物質のため暴露により肺胞や気管の上皮細胞からの PGI₂ 合成活性は早い時期に傷害されることが推測される。また肺胞や気管は常に NO₂ にさらされているため、低下した PGI₂ 合成活性は暴露中その状態にあるものと考えられる。一方、肺のホモジネートは血管内皮細胞などの上皮細胞の内側の細胞も含まれているので NO₂ による PGI₂ 合成活性は肺胞内の PGI₂ 含量の低下から遅れ、回復は早かったものと考えられる。このことは NO₂ 暴露による血管内皮の PGI₂ 合成活性は 3 日後に最低となり 14 日間暴露後には回復することから¹⁴⁾も支持される。

次に肺胞洗浄液中の TXB₂ 量は 5 日間暴露後に最大になりその後対照群の値に戻った。この NO₂ 暴露の際に血中の血小板数は減少し血小板の TXA₂ 合成活性は増加していることは既に報告してきた⁹⁾。したがって NO₂ 暴露により血小板は凝集しやすくなり、血小板の凝集塊が毛細血管に詰まり TXA₂ を合成し、この合成された TXA₂ (TXA₂ の半減期は 30 秒程度なので TXB₂ にすぐ変換される) が肺胞内に浸出液と共に入って行くことが TXB₂ 量の増加の一因と考えられる。

PGF_{2α} 及び PGE は 1 日間暴露で減少したが NO₂ 暴露によりシクロオキシゲナーゼの活性が低下している可能性が考えられる。その後 PGF_{2α} 及び PGE の含量は 3 日及び 5 日間暴露後に増加する。血中の PGF_{2α} 及び PGE は PG デヒドロゲナーゼにより肺を 1 回通過するとほとんどが代謝されることが知られている。この PG デヒドロゲナーゼ活性は 3 日及び 5 日間暴露後に減少した。したがってこの時期の PGF_{2α} 及び PGE の増加は PG デヒドロゲナーゼ活性の低下に関係している可能性が考えられる。

NO₂ 暴露による肺胞洗浄液中の PG 類や TXB₂ 含量の変動は呼吸器系の機能にどのような影響を与える可能性があるであろうか。これらシクロオキシゲナーゼ系産物のなかでも PGI₂ は気管の平滑筋を弛緩し、TXA₂ は強く収縮することが知られている。正常な状態ではこの PGI₂ を含む気管の弛緩効果のある物質群と TXA₂ を含む気管の収縮効果のある物質群とが平衡を保っていると考えられる。NO₂ 暴露により PGI₂ が減少し TXA₂ の代謝物である TXB₂ が増加したことにより正常状態での平衡が崩れ収縮しやすい方向に傾いているものと考えられる。

引用文献

- 1) Spannake, E. W., J. L. Levin, B. T. Mellion, C. A. Gretter, A. L. Hyman and P. J. Kadowitz (1980): Reversal of 5-HT induced bronchoconstriction by PGI₂: Distribution of central and peripheral actions. *J. Appl. Physiol.*, **49**, 521—527.
- 2) Wasserman, M. A., D. W. DuCharme, M. G. Wendling, R. L. Griffin and G. L. Degraaf (1980): Bronchodilator effects of prostacyclin (PGI₂) in dogs and guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.*, **66**, 53—63.
- 3) Wasserman, M. A., R. L. Griffin and F. B. Marsalisi (1980): Inhibition of prostaglandins E₁ and E₂. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**, 76—81.
- 4) Rosenthale, M. E., A. Dervinis and J. Kassarich (1971): Bronchodilator activity of the prostaglandins E₁ and E₂. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **178**, 541—548.
- 5) Piper, P. J. and J. L. Walker (1973): Release of spasmogenic substances from human chopped lung tissue and its inhibition. *Brit. J. Pharmacol.*, **47**, 291—304.
- 6) Mathe, A. A. and P. Hedquist (1975): Effect of prostaglandins F_{2α} and E₂ on airway conductance in healthy subjects and asthmatic patients. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **3**, 313—320.
- 7) Brown, R., R. H. Ingram, Jr. and E. R. McFadden, Jr. (1978): Effects of prostaglandin F_{2α} on lung mechanics in nonasthmatic and asthmatic subjects. *J. Appl. Physiol.*, **44**, 150—155.
- 8) Kobayashi, T., I. Morita and S. Murota (1983): Effects of nitrogen dioxide exposure on prostacyclin synthesis in lung and thromboxane A₂ synthesis in platelets in rats. *Prostaglandins*, **26**, 303—310.
- 9) Kobayashi, T., I. Morita and S. Murota (1981): Effects of acute nitrogen dioxide exposure on the prostacyclin synthesis in lung. *Toxicol. Lett.*, **9**, 373—378.
- 10) Kobayashi, T. (1983): Effects of ozone exposure on prostacyclin synthesis in lung. *Prostaglandins*, **26**, 1021—1027.
- 11) Chaudhari, A., K. Sivarajah, R. Warnock, T. E. Eling and M. W. Anderson (1979): Inhibition of pulmonary prostaglandin metabolism by exposure of animals to oxygen or nitrogen dioxide. *Biochem. J.*, **184**, 51—57.
- 12) Kobayashi, T., T. Noguchi, M. Kikuno and K. Kubota (1984): Effect of acute nitrogen dioxide exposure on the composition of fatty acid associated with phospholipids in alveolar lavage. *Chemosphere*, **13**, 101—105.
- 13) Lowry, L. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and K. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
- 14) Kobayashi, T. (in preparation).

II-17 グルタチオン合成系酵素活性測定法の開発, 並びに ラットの各種臓器における合成酵素活性に及ぼす 二酸化窒素又はオゾン暴露の影響

A New Method for Assay of the Glutathione Synthesis Enzymes and the Effects of Exposure to Nitrogen Dioxide or Ozone on the Activity of the Enzymes in Rat Tissues

河田明治¹・高橋勇二¹・三浦 卓¹

Meiji KAWATA¹, Yuji TAKAHASHI¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

ラットの各種臓器(腎, 肝, 肺)のグルタチオン合成系酵素(γ -グルタミルシステインシンテターゼ及びグルタチオンシンテターゼ)の反応系を検討し, 反応生成物を高速液体クロマトグラフィーにより測定する新しい方法を開発した。この測定法は高感度であり, この方法によりこれまで測定されていなかった肺のグルタチオン合成系酵素活性を精度よく測定することが可能になった。グルタチオン合成系酵素活性は臓器間に大きな差が見られ, 検討した臓器における酵素の比活性は腎, 肝, 肺の順に減少し, 特に肺においては著しく低い値を示した。次に新しく確立した測定法を用いて二酸化窒素(NO_2), オゾン(O_3)暴露がラットの各種臓器におけるグルタチオン合成系酵素活性に及ぼす影響を調べた。

Jcl: Wistar 系雄ラットに, 4.0ppm NO_2 又は0.4ppm, 0.8ppm O_3 を14日間間欠暴露(7 h/d)し, 肺の γ -グルタミルシステインシンテターゼ活性の変動を検討した。 γ -グルタミルシステインシンテターゼ活性は, 4 ppm NO_2 暴露及び0.4ppm O_3 暴露で暴露期間中対照群と暴露群で差は見られなかったが, 0.8ppm O_3 暴露では暴露7日目以後有意に増加し, その高い値は14日目まで維持された。一方, 腎では, 0.2ppm, 0.4ppm O_3 を3か月間連続暴露した場合両活性とも3か月目にのみ有意な増加を示した。肝では, 3か月の暴露期間中いずれも有意な変化を示さなかった。

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

Abstract

A new method for the assay of the glutathione synthesis enzymes (γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase) in rat tissues (kidney, liver, and lung) was developed by using high-performance liquid chromatography. The activity of the glutathione synthesis enzymes in tissues decreased in the order: kidney, liver and lung.

This sensitive assay method was used to examine the effects of exposure to nitrogen dioxide or ozone on the activity of the enzymes in rat tissues. Male Wistar rats were exposed to 4.0 ppm NO₂ or 0.4 and 0.8 ppm O₃ daily for 7 hours for 14 days and the activity of γ -glutamylcysteine synthetase of rat lung was determined. While exposure to 4.0 ppm NO₂ or 0.4 ppm O₃ did not affect the enzyme activity, an exposure to 0.8 ppm O₃ increased significantly the enzyme activity after 7 days of exposure, and the increased activity was maintained throughout the exposure period. Continuous exposures of rats to 0.2 and 0.4 ppm O₃ for 3 months did not affect the activities of both γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase in kidney and liver.

1 はじめに

これまでの研究において、比較的低濃度の二酸化窒素(NO₂)又はオゾン(O₃)をラットに暴露し、肺の非蛋白性SH(NPSH)、還元型グルタチオン(GSH)、酸化型グルタチオン(GSSG)量の変動について検討した。その結果、暴露群では肺に存在する低分子SH化合物の総量を示すNPSHが増加するが、その大部分はGSHであること、又、O₃暴露ではGSSG量も増加するが、その増加量はGSHの増加量に比べると著しく低い値であることを明らかにした¹⁻³⁾。

Mustafaら⁴⁾は0.8ppm O₃をラットに暴露すると、肺のNPSH又はGSH含量が増加すると共にSH代謝系酵素(sulfhydryl metabolizing enzymes: グルタチオンレダクターゼ, ジスルフィドレダクターゼ, グルタチオン-ジスルフィドトランスヒドロゲナーゼ)の活性も又増加することを明らかにし、このことから肺におけるGSHの増加によって肺細胞に対する酸化的障害が軽減されると推論している。しかしこの三つの酵素はSH基を有する化合物の酸化体を還元する反応を触媒するものであって、グルタチオン量の増減に直接関与する酵素ではない。

GSHの生合成には、グルタチオン合成系酵素(γ -グルタミルシステインシンターゼ及びグルタチオンシンターゼ)が関与しており、肝臓及び腎臓を中心としたGSHの代謝に関する多くの報告があるが⁵⁻⁸⁾肺についてはまだ研究が行われていない。

GSHの増加する直接的な要因を明らかにするためには、NO₂又はO₃暴露がラットの各種臓器におけるグルタチオン合成系酵素活性に及ぼす影響について研究を行う必要がある。そこでまず腎、肝、肺のグルタチオン合成系酵素活性の測定法について検討した。

次に、新しく開発した高速液体クロマトグラフィーによるグルタチオン合成系酵素活性測定法を用いて、NO₂又はO₃暴露がラットの各種臓器におけるグルタチオン合成系酵素活性に及ぼす影響について検討を試みた。

2 方法

2.1 酵素液の調製

Jcl: Wistar 系雄ラットをエーテル麻酔下で頸動脈から採血したのち、心臓から0.95% NaCl を注入して肺、肝及び腎を灌流した。肺、肝及び腎に0.15M KCl-10mM トリス緩衝液 (pH7.4) を加えてホモジナイズし、それぞれ9 ml, 75ml 及び12ml とした。ホモジネートを10,000×g で15分間遠心して得られる上清を更に105,000×g で60分間遠心した。この上清をグルタチオン合成系酵素の活性測定用酵素液として用いた。

2.2 試薬

① 1 M トリス—塩酸緩衝液 (pH8.2, 0.2M MgCl₂, 1 mM EDTA), ② 1 M トリス—塩酸緩衝液 (pH8.5, 1 M KCl, 0.1M MgCl₂), ③ 0.05M グルタミン酸, ④ 0.05M α-アミノ酪酸, ⑤ 0.05M γ-グルタミル-α-アミノ酪酸, ⑥ 0.05M グリシン, ⑦ 1% 牛血清アルブミン, ⑧ 0.05M ATP, ⑨ 1.8M トリクロロ酢酸

γ-グルタミルシステインシンターゼ活性測定における基質として、又、グルタチオンシンターゼ活性測定における標準物質として必要なγ-グルタミル-α-アミノ酪酸は、Waley の方法⁹⁾により合成した。グルタミン酸のγ位のカルボキシル基をアジド法により活性化したのちα-アミノ酪酸と結合させ、塩化カルボベンゾキシによる保護基を接触還元によって除去する方法によりγ-グルタミル-α-アミノ酪酸を合成し、高速液体クロマトグラフィー及び再結晶により精製した。

2.3 酵素反応

2.3.1 γ-グルタミルシステインシンターゼ

肺の酵素活性測定には、① 1 M トリス—塩酸緩衝液 (pH8.2) 0.1ml, ③ 0.05M グルタミン酸0.1ml, ④ 0.05M α-アミノ酪酸0.1ml, ⑦ 1% 牛血清アルブミン0.1ml の各試薬及び酵素液50 μl, H₂O 450 μl を混和し、37°C, 5分間ブレインキューベーションした後、⑧ 0.05M ATP 0.1ml を加えて37°C, 60分間反応させ、⑨ 1.8M トリクロロ酢酸0.1ml を加えて反応を停止し、60分後に2,300×g で30分間遠心して得られる上清を分析用試料とした。

肝臓の酵素活性測定には、試薬 ①, ③, ④, ⑦をそれぞれ0.2ml 取り、酵素液15 μl, H₂O 985 μl, 試薬 ⑧ 0.2ml を用い37°C, 20分間反応させ、試薬 ⑨ 0.2ml を加えて除蛋白し、その他の操作は肺の場合と同様に行った。腎臓の酵素活性測定には試薬 ①, ③, ④, ⑦をそれぞれ0.6ml 取り、酵素液10 μl, H₂O 2.99ml, 試薬 ⑧ 0.6ml を用い、37°C, 10分間反応させ、試薬 ⑨ 0.6ml を加えて除蛋白したのち遠心により上清を得た。

2.3.2 グルタチオンシンターゼ

肺の酵素活性測定には、② 1 M トリス—塩酸緩衝液 (pH8.5) 0.1ml, ⑤ 0.05M γ-グルタミル-α

-アミノ酪酸0.1ml, ⑥ 0.05M グリシン0.1ml, ⑦ 1%牛血清アルブミン0.1mlの各試薬及び酵素液50 μ l, H₂O 450 μ lを混和し, 37°C, 5分間プレインキュベーションした後, ⑧ 0.05M ATP 0.1mlを加えて37°C, 60分間反応させ, ⑨ 1.8M トリクロロ酢酸0.1mlを加えて反応を停止し, 60分後に2,300×gで30分間遠心して得られる上清を分析用試料とした。

肝臓の酵素活性測定には, 試薬 ②, ⑤, ⑥, ⑦をそれぞれ0.1ml取り, 酵素液10 μ l, H₂O 490 μ l, 試薬 ⑧ 0.1mlを加え, 37°C, 20分間反応させ, 試薬 ⑨ 0.1mlを加えて除蛋白し, その他の操作は肺の場合と同様に行った。腎臓の酵素活性測定には試薬 ②, ⑤, ⑥, ⑦をそれぞれ0.1ml取り, 酵素液10 μ l, H₂O 490 μ l, 試薬 ⑧ 0.1mlを加え, 37°C, 10分間反応させ, 試薬 ⑨ 0.1mlを加えて除蛋白したのち遠心により上清を得た。

2.4 反応生成物の測定

上記の酵素反応によって生成する γ -グルタミル- α -アミノ酪酸及び γ -グルタミル- α -アミノブチリルグリシンを陽イオン交換樹脂カラム(4.0mm×500mm, Hitachi Custom No. 2619)に充てんし, 0.14M クエン酸リチウム緩衝液(pH3.2)により流量0.30ml/minで溶出分離した。次いで835型日立アミノ酸分析計により定量した。 γ -グルタミルシステインシンターゼ及びグルタチオンシンターゼ活性は肺, 肝, 腎上清中に含まれる蛋白質質量(mg)当たりで表した。蛋白質質量は, Lowryら¹⁰⁾の方法により測定した。

2.5 暴露条件

暴露実験にはJcl:Wistar系雄ラットを使用した。19週令のラットに4.0ppm NO₂を14日間間欠暴露(7h/d)し, 23週令のラットを用いて0.4ppm及び0.8ppm O₃を14日間間欠暴露(7h/d)した。また19週令のラットに0.2ppm及び0.4ppm O₃を3か月間連続暴露した。

3 結果

これまでに報告されているグルタチオン合成系酵素活性測定法は主として高い酵素活性を有する肝臓及び腎臓を対象としたものである。その測定法を改良して, 酵素反応生成物を高速液体クロマトグラフィーによって測定できるようにカラム, 溶出溶液などの分離条件を確立すること, 及びこれまで測定されていない肺の合成系酵素活性に対しても精度よく測定できる分析条件の確立を目的として種々検討を行った。

グルタチオン合成系酵素反応に用いる試薬, 反応液組成, 反応条件などについては, γ -グルタミルシステインシンターゼ活性はGriffithら¹¹⁾の方法を, 又グルタチオンシンターゼ活性はMoozら¹²⁾の方法を参考にして, 検討した。また, 酵素反応の反応生成物の測定に関する条件, 方法も方法の項に示すごとく決定した。

確立した酵素活性測定法を用いて各種臓器の酵素活性に及ぼすpHの影響について調べた。デー

タは示していないが pH7.8-8.6の間で検討した結果、肺の γ -グルタミルシステインシテターゼ活性は肝、腎の場合とよく一致し、pH8.2で最高値を示した。又、肺のグルタチオンシテターゼ活性においても肝、腎と同様に pH8.5で最高となった。

ラット肺上清と基質とを含む反応液をインキュベーションすることによって生成する γ -グルタミル- α -アミノ酪酸及び γ -グルタミル- α -アミノブチリルグリシンを高速液体クロマトグラフィーによって分離したクロマトグラムを図1に示した。 γ -グルタミルシステインシテターゼの反応系では、43分付近に γ -グルタミル- α -アミノ酪酸が単一のピーク(ピーク No. 3)として検出され、ATPを除去した反応系では検出されず反応は全く進行しなかった(図1-A, B)。グルタチオンシテターゼの反応系では、29分付近に、 γ -グルタミル- α -アミノブチリルグリシンが単一のピーク(ピーク No. 7)として検出され、ATPを除去した反応系においては検出されず反応は進行しなかった(図1-C, D)。基質として加えたグルタミン酸及び γ -グルタミル- α -アミノ酪酸がそれぞれ図1-A, Bのピーク No. 6, 及び図1-C, Dのピーク No. 3に大きく現れた。

腎、肝及び肺の上清量とグルタチオン合成系酵素活性との直線性について検討した結果を図2に示した。 γ -グルタミルシステインシテターゼ、グルタチオンシテターゼともに、測定条件下

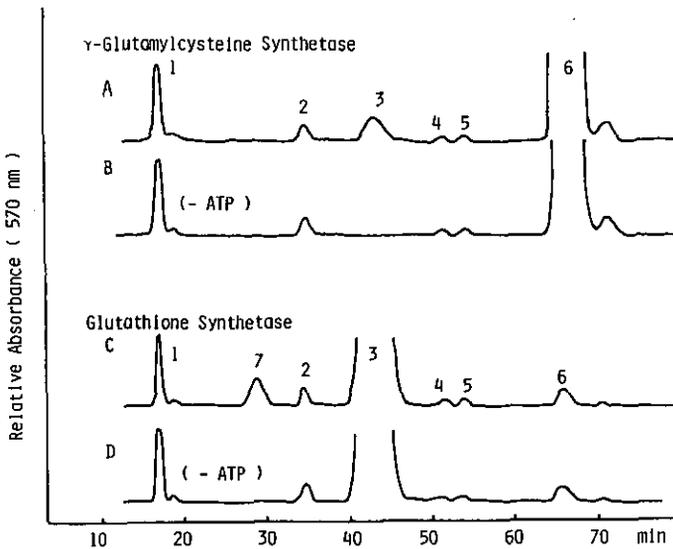


図 1 ラット肺上清と基質をインキュベーションすることによって生成する γ -グルタミル- α -アミノ酪酸及び γ -グルタミル- α -アミノブチリルグリシンの分離

Fig. 1 Separation of γ -glutamyl- α -aminobutyric acid and γ -glutamyl- α -aminobutyrylglycine produced by incubation of the substrates with rat lung supernatant

- 1: Taurine, 2: Aspartic acid,
 3: γ -Glutamyl- α -aminobutyric acid, 4: Threonine,
 5: Serine, 6: Glutamic acid,
 7: γ -Glutamyl- α -aminobutyrylglycine

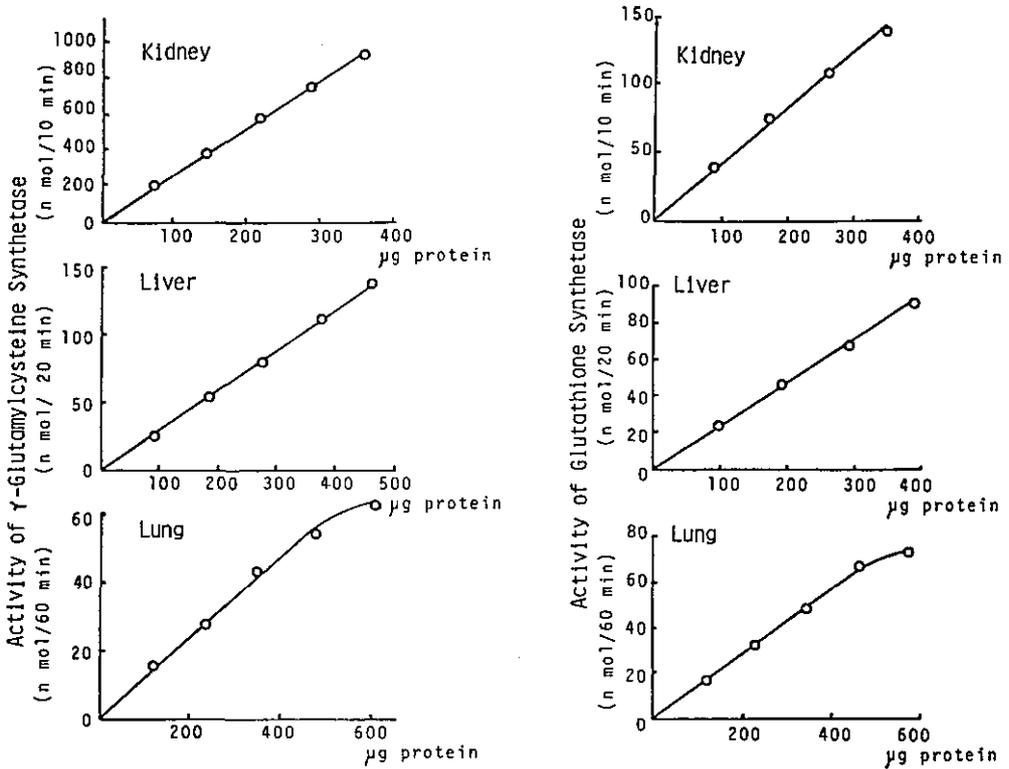


図 2 ラットの腎、肝及び肺の上清量とグルタチオン合成系酵素活性との直線性

Fig. 2 Linearity between the amount of supernatants of kidney, liver, and lung of rat and activities of the glutathione synthesis enzymes

The amount of supernatants was expressed as that of the supernatant protein.

において反応液中に含まれる上清の蛋白量が0から約400~500 μg の範囲内で、反応生成物と直線関係にあることが明らかになり、各組織に存在するグルタチオン合成系酵素活性を精度よく測定する方法が確立された。

ラットの腎、肝及び肺におけるグルタチオン合成系酵素活性の正常値を表1に示した。6匹のラットを1群として mean \pm SD 値を求め、6群の値の最小値と最大値とで活性値の範囲を示した。各臓器における γ -グルタミルシステインシンターゼとグルタチオンシンターゼの活性を比較すると、肝と肺ではほぼ同じ値であるが、腎では γ -グルタミルシステインシンターゼが著しく高い値を示した。また GSH 量は腎、肝、肺のうち、肺が最も低いことから推定されるごとく、肺のグルタチオン合成系酵素活性も他の臓器に比べて著しく低い値を示した。

ラットに 4 ppm NO_2 及び 0.4, 0.8 ppm O_3 を 14 日間間欠暴露 (7 h/d) した場合、肺の γ -グルタミルシステインシンターゼ活性の変動を表2に示した。4.0 ppm NO_2 及び 0.4 ppm O_3 暴露群では対照群との間に有意な差が見られなかったが、0.8 ppm O_3 暴露群では暴露7日目に有意に増加(110%)

表 1 Wistar 系雄ラットの腎臓、肝臓及び肺におけるグルタチオン合成系酵素活性の正常値

Table 1 Activity of the glutathione synthesis enzymes (γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase) in kidney, liver and lung of control rat

Organ	γ -Gultamylcysteine synthetase		Glutathione synthetase	
Kidney	11,300 \pm 620	— 15,000 \pm 440	2,440 \pm 90	— 2,810 \pm 170
Liver	620 \pm 50	— 940 \pm 40	720 \pm 20	— 740 \pm 40
Lung	110 \pm 10	— 130 \pm 10	110 \pm 20	— 130 \pm 10

Values were expressed as n mole/h/mg protein (mean \pm SD, n=6).

表 2 ラット肺の γ -グルタミルシステインシンターゼ活性に及ぼす NO₂ 又は O₃ 間欠暴露 (7 h/d) の影響

Table 2 Effect of NO₂ or O₃ exposure on the activity of γ -glutamylcysteine synthetase of rat lung

NO ₂ exposure (7 h/d)						
NO ₂	1 day	(%)	7 days	(%)	14 days	(%)
Control	134 \pm 5.0	(100)	126 \pm 6.7	(100)	132 \pm 6.2	(100)
4.0 ppm	136 \pm 7.6	(101)	131 \pm 4.8	(104)	139 \pm 13	(105)

O ₃ exposure (7 h/d)						
O ₃	1 day	(%)	4 days	(%)	7 days	(%)
Control	118 \pm 5.2	(100)	125 \pm 2.4	(100)	113 \pm 5.9	(100)
0.4 ppm	118 \pm 5.1	(100)	127 \pm 5.9	(102)	117 \pm 3.2	(104)
0.8 ppm	115 \pm 4.2	(97)	130 \pm 8.3	(104)	124 \pm 3.7*	(110)

O ₃						
O ₃	10 days	(%)	14 days	(%)		
Control	129 \pm 4.3	(100)	123 \pm 3.9	(100)		
0.4 ppm	132 \pm 3.1	(102)	128 \pm 11	(104)		
0.8 ppm	138 \pm 3.7*	(107)	133 \pm 6.5*	(108)		

Values were expressed as n mole/h/mg protein (mean \pm SD, n=6).

*: p<0.05.

し、それ以後その高い値は暴露期間中持続した。

ラットに0.2, 0.4ppm O₃ を3か月間連続暴露し、肝、腎における γ -グルタミルシステインシンターゼ及びグルタチオンシンターゼ活性に及ぼす影響を表3及び表4に示した。その結果、肝ではグルタチオン合成系酵素活性に有意な変動は見られないと結論された。一方、腎では3か月目にはのみ両活性とも有意な増加を示した。

表 3 ラットの肝臓及び腎臓における γ -グルタミルシステインシンターゼ活性に及ぼす O_3 暴露の影響

Table 3 Effect of O_3 exposure on the activity of γ -glutamylcysteine synthetase in liver and kidney of rat

Liver						
	1 month	(%)	2 months	(%)	3 months	(%)
Control	759 \pm 69	(100)	941 \pm 43	(100)	681 \pm 44	(100)
0.2 ppm	729 \pm 25	(96)	951 \pm 81	(101)	732 \pm 42	(107)
0.4 ppm	721 \pm 24	(95)	916 \pm 98	(97)	702 \pm 58	(103)

Values were expressed as n mole/h/mg protein (mean \pm SD, n=6).

Kidney						
	1 month	(%)	2 months	(%)	3 months	(%)
Control	15.0 \pm 0.44	(100)	13.8 \pm 0.76	(100)	13.6 \pm 0.43	(100)
0.2 ppm	15.1 \pm 0.66	(101)	13.4 \pm 1.0	(97)	15.7 \pm 0.62***	(115)
0.4 ppm	14.3 \pm 2.1	(96)	12.5 \pm 0.94	(90)	13.8 \pm 1.2	(101)

Values were expressed as μ mole/h/mg protein (mean \pm SD, n=6).

***p<0.001.

表 4 ラットの肝臓及び腎臓におけるグルタチオンシンターゼ活性に及ぼす O_3 暴露の影響

Table 4 Effect of O_3 exposure on the activity of glutathione synthetase in liver and kidney of rat

Liver						
	1 month	(%)	2 months	(%)	3 months	(%)
Control	717 \pm 22	(100)	740 \pm 40	(100)	741 \pm 36	(100)
0.2 ppm	742 \pm 21	(103)	750 \pm 39	(101)	752 \pm 44	(104)
0.4 ppm	726 \pm 34	(101)	751 \pm 36	(101)	724 \pm 13	(98)

Values were expressed as n mole/h/mg protein (mean \pm SD, n=6).

Kidney						
	1 month	(%)	2 months	(%)	3 months	(%)
Control	2.81 \pm 0.17	(100)	2.44 \pm 0.09	(100)	2.81 \pm 0.09	(100)
0.2 ppm	2.80 \pm 0.14	(100)	2.59 \pm 0.12	(106)	3.05 \pm 0.18*	(109)
0.4 ppm	2.90 \pm 0.25	(103)	2.51 \pm 0.06	(103)	2.88 \pm 0.10	(103)

Values were expressed as μ mole/h/mg protein (mean \pm SD, n=6).

*p<0.05.

4 考 察

酸化性を有する大気汚染物質である NO_2 又は O_3 を比較的低濃度においてマウス、ラットに暴露すると肺の NPSH 又は GSH が増加するという研究が多数報告されているにもかかわらず^{1-4, 13-15)}, まだその機構については不明である。また NO_2 と O_3 の化学的性質には著しい相違のあることが詳細に検討されているが、生体に及ぼす影響に関する両者の違いについてもまだ十分な研究が行われていない。

これらの酸化性大気汚染物質が、SH 化合物の代謝に関係のある酵素の活性に及ぼす影響についての研究としては、 O_3 暴露によりラット肺において -S-S-結合の還元反応に関与する SH 代謝系酵素 (sulfhydryl metabolizing enzymes) の活性が増加するという結果が得られている⁴⁾。

一方、Tateishi ら^{7, 16)} は肝臓 GSH の動態と代謝回転に与える諸因子の検索において、GSH の変動に直接影響を及ぼす因子として、第 1 に GSH の合成に関与するグルタチオン合成系酵素 (γ -グルタミルシステインシンターゼとグルタチオンシンターゼ) の活性、第 2 に GSH 合成に必要なアミノ酸、すなわちグルタミン酸、システイン、グリシンの細胞内濃度、第 3 にグルタチオン分解酵素 (γ -グルタミルトランスフェラーゼ) 活性を挙げている。以上のことから第 1 の要因として考えられるグルタチオン合成系酵素活性に着目し、酸化性汚染物質による暴露の影響について検索するため、最初にラットの各種臓器における酵素活性測定法について検討した。

新しく開発した高速液体クロマトグラフィーを利用したグルタチオン合成系酵素活性測定法は、従来の γ -グルタミルシステインシンターゼ^{17, 18)}、グルタチオンシンターゼ^{12, 19, 20)} 活性測定法に比べて、放射性同位体でラベルした基質を必要としないこと、反応生成物の煩雑な分離操作を省略できるなどの利点があり、高感度であるため肺における低い酵素活性を精度よく測定することが可能となった。

この度開発したグルタチオン合成系酵素活性測定法を用いて、 NO_2 及び O_3 の生体に及ぼす影響に関する一つの新しい指標の確立を試みた。ラットに 0.2, 0.4ppm O_3 を 3 か月間連続暴露し、肺以外の臓器として肝臓と腎臓を選びグルタチオン合成系酵素活性への影響を調べたが、肝臓の酵素活性は暴露による有意な変化は認められなかった。腎臓では 3 か月のみ有意な増加を示した。一方、4.0ppm NO_2 及び 0.4, 0.8ppm O_3 の 14 日間の間欠暴露実験の結果、0.8ppm 暴露群において、肺の γ -グルタミルシステインシンターゼ活性が対照群に対して有意に増加したことから、今後は NO_2 及び O_3 の連続暴露実験を行い、ラット肺におけるグルタチオン合成系酵素活性に及ぼす影響に関する詳細な検討を試みる必要のあることが示唆された。更にその結果と、これまで行った NO_2 及び O_3 暴露がラット肺の GSH 量に及ぼす影響についての結果とを比較検討する予定である。

引用文献

- 1) 河田明治 (1980): 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響——血液及び肺に存在するグルタチオン含量——. 国立公害研究所研究報告, 第15号, 259-274.
- 2) 河田明治 (1981): 二酸化窒素亜急性暴露のラット肺 SH 化合物に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第31号, 109-115.
- 3) 河田明治 (1983): オゾン急性暴露のラット肺及び血液中の SH 化合物に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第40号, 147-156.
- 4) Mustafa, M. G., A. D. Hacker, J. J. Ospital, M. Z. Hussain and S. D. Lee (1980): Biochemical effects of environmental oxidant pollutants in animal lungs. *In: Biochemical Effects of Environmental Pollutants.*, S. D. Lee (ed.), Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 59-96.
- 5) Sies, H. and A. Wendel (eds.) (1978): Functions of Glutathione in Liver and Kidney. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 212p.
- 6) Meister, A. and S. S. Tate (1976): Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 559-604.
- 7) 立石紀子・東 胤昭・坂本幸哉 (1980): グルタチオンの栄養生化学. 代謝, **17**, 2163-2172.
- 8) Meister, A. (1983): Metabolism and transport of glutathione and other γ -glutamyl compounds. *In: Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological, and Clinical Aspects.*, A. Larsson, S. Orrenius, A. Holmgren and B. Mannervik (eds.), Raven Press, New York, 1-22.
- 9) Waley, S. G. (1958): Acidic peptides of the lens 3: the structure of ophthalmic acid. *Biochem. J.*, **68**, 189-192.
- 10) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 11) Griffith, O. W., A. Larsson and A. Meister (1977): Inhibition of γ -glutamylcysteine synthetase by cystamine; approach to a therapy of 5-oxoprolinuria (pyroglutamic aciduria). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 919-925.
- 12) Mooz, E. D. and A. Meister (1971): Glutathione biosynthesis. *In: Methods in Enzymology.* XVII B, H. Tabor and C. W. Tabor (eds.), Academic Press, New York, 488-495.
- 13) 深瀬 治・磯村公郎・渡辺 弘 (1976): 窒素酸化物の肺 Peroxidative Metabolism への影響. 大気汚染研究, **11**, 65-69.
- 14) 深瀬 治・磯村公郎・渡辺 弘 (1975): オゾンの生体内グルタチオンに及ぼす影響. 大気汚染研究, **10**, 58-66.
- 15) Chow, C. K., M. Z. Hussain, C. E. Cross, D. L. Dungworth and M. G. Mustafa (1978): Effect of low level of ozone on rat lungs 1. Biochemical responses during recovery and reexposure. *Exp. Mol. Pathol.*, **25**, 182-188.
- 16) Tateishi, N., T. Higashi, K. Nakashima and Y. Sakamoto (1980): Nutritional significance of increase in γ -glutamyltransferase in mouse liver before birth. *J. Nutr.*, **110**, 409-415.
- 17) Orłowski, M. and A. Meister (1971): γ -glutamylcysteine synthetase. *In: Methods in Enzymology.*, XVII B, H. Tabor and C. W. Tabor (eds.), Academic Press, New York, 495-500.
- 18) Wirth, P. J. and S. S. Thorgersson (1978): Glutathione synthesis and degradation in fetal and adult rat liver and Novikoff hepatoma. *Cancer Res.*, **38**, 2861-2865.
- 19) Sekura, R., M. Hochreiter and A. Meister (1976): α -Aminomethylglutarate, a β -amino acid analog of

glutamate that interacts with glutamine synthetase and the enzymes that catalyze glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.*, **251**, 2263–2270.

- 20) Griffith, O. W. and A. Meister (1977): Selective inhibition of γ -glutamyl-cycle enzymes by substrate analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3330–3334.

II-18 二酸化窒素またはオゾンの亜急性暴露がラット肺の
グルタチオン合成系酵素活性に及ぼす影響
Effects of Subacute Exposure to Nitrogen Dioxide or Ozone on the
Activity of the Glutathione Synthesis Enzymes of Rat Lungs

河田明治¹・高橋勇二¹・三浦 卓¹

Meiji KAWATA¹, Yuji TAKAHASHI¹ and Takashi MIURA¹

要 旨

NO₂ と O₃ の単独亜急性暴露によるラット肺のグルタチオン合成系酵素活性の変動について調べた。

0.4, 1.2, 4.0ppm NO₂ を3か月間暴露した場合、γ-グルタミルシステインシンターゼ活性は、0.4, 1.2ppm 暴露群では変化が認められなかったが、4.0ppm 暴露群では対照群の値の112~116%と有意に増加した。これに対してグルタチオンシンターゼ活性はすべての暴露群において対照群との間に有意な差は見られなかった。

0.2及び0.4ppm O₃ を3か月間暴露した場合、γ-グルタミルシステインシンターゼ活性は0.2ppm 暴露群では対照群の値の108~113%と有意に増加し、0.4ppm 暴露群では112~118%と更に高い値を示した。またグルタチオンシンターゼ活性は0.2ppm 暴露群では対照群の値の105~107%と有意に増加し、0.4ppm 暴露群では更に110~114%と高い値を示した。

以上の結果と、0.4, 1.3, 4.0ppm NO₂ 3か月間暴露がラット肺の還元型グルタチオン(GSH)量に及ぼす影響に関する結果より、4.0ppm NO₂ 亜急性暴露では肺のGSH量とγ-グルタミルシステインシンターゼ活性は類似した変動傾向を示すことが明らかになった。

Abstract

The effect of subacute exposure to NO₂ or O₃ on the activities of glutathione synthesis enzymes (γ-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase) in rat lungs was investigated.

Male Wister rats were exposed to 0.4, 1.2, and 4.0 ppm NO₂ for 3 months. An exposure to 4.0 ppm NO₂ resulted in 112-116% increase in γ-glutamylcysteine synthetase

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

activity, while this activity remained unchanged during exposures to 0.4 and 1.2 ppm NO₂. On the other hand, exposures to 0.4, 1.2, and 4.0 ppm NO₂ did not affect the activity of glutathione synthetase.

When rats were exposed to 0.2 and 0.4 ppm O₃ for 3 months, the activity of γ -glutamylcysteine synthetase was increased in a dose-dependent manner to 108-113% and 112-118% of the control for 0.2 and 0.4 ppm O₃, respectively. The activity of glutathione synthetase too increased to 105-107% and 110-114% of the control for 0.2 and 0.4 ppm O₃, respectively.

1 はじめに

前報¹⁾において、ラットの各種臓器を用いてグルタチオン合成系酵素(γ -グルタミルシステインシンターゼ及びグルタチオンシンターゼ)の反応系を検討し、反応生成物を高速液体クロマトグラフィーにより定量する新しい方法を開発した。またこの測定法を用いることにより4.0ppm NO₂及び0.4, 0.8ppm O₃をラットに14日間間欠暴露した場合、0.8ppm O₃暴露群で肺の γ -グルタミルシステインシンターゼ活性が有意に増加することを明らかにした。

これまでの実験において0.4, 1.3, 4.0ppm NO₂をラットに3か月間連続暴露すると、4.0ppm暴露群における肺の還元型グルタチオン(GSH)含量は暴露1週間目に対照群に対して有意に増加し、それ以後その高い値が暴露期間中一定に持続した²⁾。このことから同様な暴露条件において肺のグルタチオン合成系酵素活性がどのように変化するかについて調べると共に、肺のGSH量と酵素活性の変動との関連性について検討した。

更に0.2, 0.4ppm O₃をラットに3か月間暴露し、グルタチオン合成系酵素活性に及ぼす影響を調べることにより、NO₂とO₃との酵素活性に対する作用の相違について比較検討した。

2 方法

肺のグルタチオン合成系酵素活性測定は前報に従って行った¹⁾。

2.1 暴露条件及び酵素液の調製

4.0ppm NO₂ 13週間暴露では25週令、0.4, 1.2, 4.0ppm NO₂ 3か月間暴露では10週令と19週令、0.2, 0.4ppm O₃ 暴露では19週令のJcl:Wistar系雄ラットを使用した。

ラットをエーテル麻酔して頸動脈から採血したのち、心臓から0.95% NaClを注入して肺を灌流した。採取した肺に0.15MKCl-10mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.4)を加えてホモジナイズし9 mlとした。このホモジネートを10,000×gで15分間遠心して得られた上清を105,000×gで60分間遠心し、上清を酵素液とした。

2.2 γ -グルタミルシステインシンターゼ活性の測定

1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.2, 0.2M $MgCl_2$, 1 mM EDTA) 0.1ml, 0.05M グルタミン酸 0.1ml, 0.05M α -アミノ酪酸 0.1ml, 1% 牛血清アルブミン 0.1ml, 酵素液 50 μ l, H_2O 450 μ l, を混和し, 37°C, 5 分間プレインキュベーションした後 0.05M ATP 0.1ml を加えて 37°C, 60 分間反応させた。反応終了後, 1.8M トリクロロ酢酸 0.1ml を加え 60 分後に 2,300 \times g で 30 分間遠心して得られる上清を分析用試料とした。

酵素反応によって生成する γ -グルタミル- α -アミノ酪酸を陽イオン交換樹脂カラム (4.0mm \times 500mm, Hitachi Custom No. 2619) に充てんし, 0.14M クエン酸リチウム緩衝液 (pH3.2) で溶出分離後 835 型日立アミノ酸分析計により定量した。

γ -グルタミルシステインシンターゼ活性は肺酵素液中に含まれる蛋白質量 (mg) 当たりで表した。蛋白質の定量は Lowry ら³⁾の方法により測定した。

2.3 グルタチオンシンターゼ活性の測定

1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5, 1 M KCl, 0.1M $MgCl_2$), 0.05M γ -グルタミル- α -アミノ酪酸 0.1ml, 0.05M グリシン 0.1ml, 1% 牛血清アルブミン 0.1ml, 酵素液 50 μ l, H_2O 450 μ l を混和し, 37°C, 5 分間プレインキュベーションした後 0.05M ATP 0.1ml を加えて 37°C, 60 分間反応させた。反応終了後 1.8M トリクロロ酢酸 0.1ml を加えて 60 分後に 2,300 \times g で 30 分間遠心して得られる上清を分析用試料とした。酵素反応によって得られる γ -グルタミル- α -アミノブチリルグリシンを γ -グルタミルシステインシンターゼの場合と同様の方法で測定した。

3 結果

25 週令ラットに 4.0ppm NO_2 を 13 週間暴露した場合, 肺の γ -グルタミルシステインシンターゼ活性の受ける変化を図 1 に示した。暴露群の酵素活性は暴露 1 日目で既に対照群に対して有意に増加し, それ以後その高い値が暴露期間中維持された。

10 週令のラットを用い, 0.4, 1.2, 4.0ppm NO_2 を連続 3 か月間暴露し, 肺の γ -グルタミルシステインシンターゼ及びグルタチオンシンターゼ活性に及ぼす影響について調べた結果を表 1 及び表 2 に示した。

γ -グルタミルシステインシンターゼ活性は 0.4 及び 1.2ppm NO_2 暴露群では変化が認められなかったが, 4.0ppm NO_2 暴露群では対照群の値の 112~116% まで有意に増加した。

これに対して NO_2 暴露におけるグルタチオンシンターゼ活性は表 2 に示すごとく, 0.4, 1.2 及び 4.0ppm NO_2 すべての暴露群において対照群との間に有意な差は見られなかった。

更に 19 週令のラットを用い 0.4, 1.2, 4.0ppm NO_2 を 3 か月間暴露した繰り返し実験においても, 肺の γ -グルタミルシステインシンターゼ及びグルタチオンシンターゼ活性に及ぼす NO_2 暴露の影響は表 1 及び表 2 に示す結果と良く一致した。

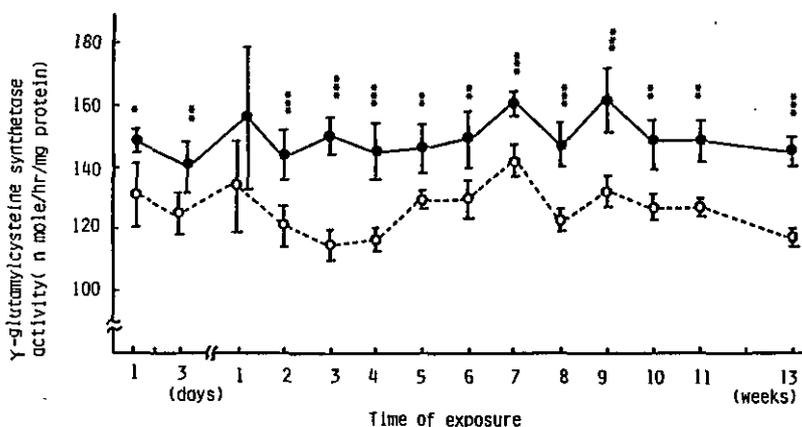


図 1 ラット肺のγ-グルタミルシステインシンターゼ活性に及ぼす4.0ppm NO₂ 暴露の影響

Fig. 1 Effect of exposure to 4.0ppm NO₂ on the activity of γ-glutamylcysteine synthetase of rat lung

---○--- : control, —●— : exposed.
*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

表 1 ラット肺のγ-グルタミルシステインシンターゼ活性に及ぼす NO₂ 暴露の影響

Table 1 Effect of NO₂ exposure on the activity of γ-glutamylcysteine synthetase of rat lung

NO ₂	1 month	(%)	2 months	(%)	3 months	(%)
Control	124 ± 4.8	(100)	130 ± 6.1	(100)	122 ± 6.1	(100)
0.4 ppm	120 ± 9.7	(97)	124 ± 1.6	(95)	126 ± 3.9	(103)
1.2 ppm	124 ± 4.6	(100)	130 ± 5.1	(100)	128 ± 5.7	(105)
4.0 ppm	144 ± 2.9***	(116)	146 ± 4.8**	(112)	140 ± 5.4**	(115)

Values were expressed as n mole/h/mg protein (mean ± SD, n=6).

** : p<0.01, *** : p<0.001.

表 2 ラット肺のグルタチオンシンターゼ活性に及ぼす NO₂ 暴露の影響

Table 2 Effect of NO₂ exposure on the activity of glutathione synthetase of rat lung

NO ₂	1 month	(%)	2 months	(%)	3 months	(%)
Control	112 ± 6.4	(100)	117 ± 5.4	(100)	115 ± 7.3	(100)
0.4 ppm	109 ± 4.1	(97)	114 ± 3.0	(97)	114 ± 4.5	(99)
1.2 ppm	114 ± 3.7	(102)	114 ± 5.5	(97)	109 ± 8.8	(95)
4.0 ppm	116 ± 6.9	(104)	117 ± 7.8	(100)	109 ± 1.9	(95)

Values were expressed as n mole/h/mg protein (mean ± SD, n=6).

19週令のラットを用いて0.2及び0.4ppm O₃を連続3か月間暴露し、肺のγ-グルタミルシステインシンテターゼ及びグルタチオンシンテターゼ活性に及ぼす影響について調べた結果をそれぞれ表3及び表4に示した。

γ-グルタミルシステインシンテターゼ活性は0.2ppm O₃暴露群では対照群の値の108~113%と有意に増加し、0.4ppm O₃暴露群では112~118%と更に高い値を示した。また0.2ppm及び0.4ppm O₃暴露群とも暴露1か月後における高い酵素活性が3か月間の暴露期間中変動することなく持続された。

O₃暴露におけるグルタチオンシンテターゼ活性は表4に示すごとく、0.2ppm O₃暴露群では対照群の値の105~107%と有意に増加し、0.4ppm O₃暴露群では更に110~114%と高い値を示した。またO₃暴露群のこれらの高い酵素活性が暴露期間中一定に保持された。また表3及び表4に見られるごとく、γ-グルタミルシステインシンテターゼ及びグルタチオンシンテターゼ活性は共にO₃の暴露濃度に依存して増加する傾向が見られた。

更に19週令のラットを用いて0.2ppm及び0.4ppm O₃を3か月間暴露した繰り返し実験においても肺のγ-グルタミルシステインシンテターゼ及びグルタチオンシンテターゼ活性に及ぼすO₃の影響は表3及び表4に示す結果とよく一致した。

表 3 ラット肺のγ-グルタミルシステインシンテターゼ活性に及ぼすO₃暴露の影響

Table 3 Effect of O₃ exposure on the activity of γ-glutamylcysteine synthetase of rat lung

O ₃	1 month	(%)	2 months	(%)	3 months	(%)
Control	126 ± 3.7	(100)	132 ± 8.8	(100)	122 ± 7.3	(100)
0.2 ppm	136 ± 6.6*	(108)	142 ± 4.9*	(108)	137 ± 10*	(113)
0.4 ppm	142 ± 12*	(114)	148 ± 5.7*	(112)	143 ± 11**	(118)

Values were expressed as n mole/h/mg protein (mean ± SD, n=6).

*: p<0.05. **: p<0.01

表 4 ラット肺のグルタチオンシンテターゼ活性に及ぼすO₃暴露の影響

Table 4 Effect of O₃ exposure on the activity of glutathione synthetase of rat lung

O ₃	1 month	(%)	2 months	(%)	3 months	(%)
Control	115 ± 0.8	(100)	128 ± 5.8	(100)	127 ± 6.2	(100)
0.2 ppm	121 ± 5.1*	(105)	135 ± 3.5*	(105)	136 ± 4.8*	(107)
0.4 ppm	127 ± 5.5**	(110)	146 ± 9.6**	(114)	145 ± 7.2**	(114)

Values were expressed as n mole/h/mg protein (mean ± SD, n=6).

*: p<0.05. **: p<0.01

4 考 察

これまで行った研究において、ラットに4.0ppm NO₂を1, 3, 5, 7日間暴露すると、肺のGSHは徐々に増加して5日目に最高値に達すること⁴⁾、また0.4, 1.3, 4.0ppm NO₂の1, 2, 3週間及び1, 2, 3か月間暴露では、肺のGSHは0.4と1.3ppm NO₂暴露において対照群と暴露群との間に差は認められなかったが、4.0ppm暴露群では暴露1週間後には対照群に対して131%と有意に増加し、以後その高い値が3か月間持続した²⁾。

本研究の結果は、4.0ppm NO₂13週間暴露及び0.4, 1.2, 4.0ppm NO₂3か月間暴露において、ラット肺のγ-グルタミルシステインシンターゼ活性は、0.4ppmと1.2ppm NO₂暴露群では変化が見られないが、4.0ppm暴露群では暴露1日後に有意に増加し、それ以後その高い値が暴露期間中持続することを示している。これらの結果から4.0ppm NO₂亜急性暴露では肺のGSH量とγ-グルタミルシステインシンターゼ活性は類似した変動を示すことが明らかになった。

肺のグルタチオン合成系酵素活性に及ぼすNO₂暴露とO₃暴露の結果を比較すると、4.0ppm NO₂暴露でγ-グルタミルシステインシンターゼ活性は増加するがグルタチオンシンターゼ活性には変化が見られないこと、及び0.2, 0.4ppm O₃暴露ではいずれの酵素活性も増加することから、NO₂とO₃とではグルタチオン合成系酵素活性に対して異なった影響を示すことが結論される。

γ-グルタミルシステイン及びGSHには、これまで述べてきた合成系酵素の他に、それぞれに分解系酵素が関与している。

γ-グルタミルシステインには、γ-グルタミルトランスフェラーゼ(γ-GT)によりグルタミン酸とシステインに分解される系⁵⁻⁷⁾とγ-グルタミルシクロトランスフェラーゼによって5-オキソプロリンとシステインに分解される系⁵⁻⁷⁾との二つの分解系が関与している。またGSHには、γ-グルタミル基をアミノ酸又はペプチドに転移することによってGSHを分解するγ-GTが関与している。

GSHの合成系酵素はすべて細胞内に局在しているが、GSHの分解酵素(γ-GT)は細胞膜外側に局在している⁸⁾。細胞内のGSHは非常に速い速度で代謝回転を行っており^{8,9)}、また最近臓器間相関によるGSHの代謝・輸送サイクルの存在する可能性が考えられるようになってきている。したがって、GSHに関する問題を総合的に明らかにするためには、生体膜高分子の酸化還元状態の変化と細胞内のGSH代謝との関係を明らかにすることの重要性が示唆されている⁸⁾。

大気汚染物質の生体影響において、最初の作用点が肺であることから、NO₂又はO₃暴露による生体膜系の損傷と修復について報告されている¹⁰⁾。GSHを分解するγ-GTが主に上皮組織細胞膜に存在することから、NO₂又はO₃暴露の生体に対する影響を細胞内GSHの量的変動としてとらえるのみならず、この現象を細胞外膜に存在するGSH分解酵素の変化との関連性について追求することも今後の課題であると考えられる。

以上のことから、酸化性を有する大気汚染物質の生体に及ぼす影響に関する研究を生体内SH化合物との関連において進めるためには、γ-グルタミルシステイン及びGSHの分解系酵素活性及び

上皮細胞膜高分子の酸化還元状態に及ぼすこれら汚染物質の影響についても更に検討する必要のあることが示唆された。

引用文献

- 1) 河田明治・高橋勇二・三浦 卓 (1986): グルタチオン合成系酵素活性測定法の開発, 並びにラットの各種臓器における合成酵素活性に及ぼす二酸化窒素又はオゾン暴露の影響. 国立公害研究所研究報告, 第101号, 205-215.
- 2) 河田明治 (1981): 二酸化窒素亜急性暴露のラット肺 SH 化合物に及ぼす影響. 国立公害研究所研究報告, 第31号, 109-115.
- 3) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 4) 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.
- 5) Meister, A. (1974): Glutathione: metabolism and function via the γ -glutamyl cycle. *Life Sci.*, **15**, 177-190.
- 6) Meister, A. and S. S. Tate (1976): Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 559-604.
- 7) Sies, H. and A. Wendel (eds.) (1978): *Functions of Glutathione in Liver and Kidney*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 212p.
- 8) 井上正康 (1984): グルタチオン代謝と膜輸送の臓器相関. *蛋白質・核酸・酵素*, **29**, 695-707.
- 9) Higashi, T., N. Tateishi, A. Naruse and Y. Sakamoto (1977): A novel physiological role of liver glutathione as a reservoir of L-cysteine. *J. Biochem.*, **82**, 117-124.
- 10) 三浦 卓 (1983): 二酸化窒素暴露による生体膜の損傷とその修復について. 国立公害研究所研究報告, 第40号, 279-297.

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——昭和51年度。(1977)
- 第 2 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究——昭和51/52年度 研究報告。(1978)

(改 称)

国立公害研究所研究報告

- ※ 第 3 号 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
(日本産ユスリカ科 *Chironomus* 属9種の成虫, サナギ, 幼虫の形態の比較)
- 第 4 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究——昭和52年度 中間報告。(1978)
- 第 5 号 芳香族炭化水素-窒素酸化物系の光酸化反応機構と光酸化二次生成物の培養細胞に及ぼす影響に関する研究——昭和51, 52年度 研究報告。(1978)
- 第 6 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅱ)——霞ヶ浦を中心として。——昭和53年度。(1979)
- ※ 第 7 号 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
(日本産ユスリカ科20種の成虫, サナギ, 幼虫の形態学的研究)
- ※ 第 8 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和52, 53年度 研究報告。(1979)
- 第 9 号 スモッグチャンバーによる炭化水素-窒素酸化物系光化学反応の研究——昭和53年度 中間報告。(1979)
- 第 10 号 陸上植物による大気汚染環境の評価と改善に関する基礎的研究——昭和51~53年度 特別研究報告。(1979)
- ※ 第 11 号 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
(大気汚染物質の植物影響およびその植物毒性の機構に関する研究)
- 第 12 号 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
(コンピュータ制御装置を利用したフレームおよび誘導結合プラズマ分光法による多元素同時分析)
- 第 13 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
(多摩川に発生するユスリカの研究
— 第1報 その一支流に見出されたユスリカ各種の分布と下水による汚染度との関係
— 第2報 その一支流に見出された Chironominae 亜科の20種について)
- 第 14 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究——昭和53, 54年度 特別研究報告。(1980)
- ※ 第 15 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究——昭和54年度 特別研究報告。(1980)
- 第 16 号 計測車レーザーレーダーによる大気汚染遠隔計測。(1980)
- ※ 第 17 号 流体の運動および輸送過程に及ぼす浮力効果——臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究——昭和53, 54年度 特別研究報告。(1980)

- 第 18 号 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
(環境標準試料「リョウブ」の調製, 分析および保証値)
- ※第 19 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅲ) — 霞ヶ浦(西浦)の湖流 — 昭和53, 54年度.
(1981)
- 第 20 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅳ) — 霞ヶ浦流域の地形, 気象水文特性およびその湖
水環境に及ぼす影響 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 21 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅴ) — 霞ヶ浦流入河川の流出負荷量変化とその評価 —
昭和53, 54年度. (1981)
- 第 22 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅵ) — 霞ヶ浦の生態系の構造と生物現存量 — 昭和53,
54年度. (1981)
- 第 23 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅶ) — 湖沼の富栄養化状態指標に関する基礎的研究 —
昭和53, 54年度. (1981)
- 第 24 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅷ) — 富栄養化が湖利用に及ぼす影響の定量化に関す
る研究 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 25 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(Ⅸ) — *Microcystis* (藍藻類)の増殖特性 — 昭和53,54
年度. (1981)
- 第 26 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(X) — 藻類培養試験法によるAGPの測定 — 昭和53,
54年度. (1981)
- 第 27 号 陸水域の富栄養化に関する総合研究(XI) — 研究総括 — 昭和53, 54年度. (1981)
- 第 28 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究 — 昭和54, 55年度 特別研究報告. (1981)
- 第 29 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
Part 3. Species of the subfamily Orthoclaadiinae recorded at the summer survey and their distri-
bution in relation to the pollution with sewage waters.
Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
(多摩川に発生するユスリカ類の研究
— 第3報 夏期の調査で見出されたエリユスリカ亜科 Orthoclaadiinae 各種の記載と, その分
布の下水汚染度との関係について —
— 第4報 南浅川の冬期の調査で見出された各種の分布と記載 —)
- ※第 30 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究 — 昭和54, 55年度 特別研究報
告. (1982)
- 第 31 号 大気汚染物質の単一および複合汚染の生体に対する影響に関する実験的研究 — 昭和55年度
特別研究報告. (1981)
- 第 32 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 — 環境大気中における
光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究1) — 昭和54年度 特別研究報告.(1982)
- 第 33 号 臨海地域の気象特性と大気拡散現象の研究 — 大気運動と大気拡散過程のシミュレーション
— 昭和55年度 特別研究報告. (1982)
- ※第 34 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和55年度 特別研究報告. (1982)
- 第 35 号 環境面よりみた地域交通体系の評価に関する総合解析研究. (1982)
- ※第 36 号 環境試料による汚染の長期モニタリング手法に関する研究 — 昭和55, 56年度 特別研究報告.
(1982)
- 第 37 号 環境施策のシステム分析支援技術の開発に関する研究. (1982)
- 第 38 号 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)
(環境標準試料「池底質」の調製, 分析及び保証値)
- ※第 39 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和56年度 特別研究報告. (1982)

- 第 40 号 大気汚染物質の単一及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56年度 特別研究報告. (1983)
- 第 41 号 土壤環境の遠隔計測と評価に関する統計学的研究. (1983)
- ※ 第 42 号 底泥の物性及び流送特性に関する実験的研究. (1983)
- ※ 第 43 号 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)
 Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June with description of 15 new species.
 Part 6. Description of species of the subfamily Orthoclaadiinae recovered from the main stream in the June survey.
 Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.
 (多摩川に発生するユスリカ類の研究
 — 第 5 報 本流に発生するユスリカ類の分布に関する 6 月の調査成績とユスリカ亜科に属する 15 新種等の記録 —
 — 第 6 報 多摩本流より 6 月に採集されたエリユスリカ亜科の各種について —
 — 第 7 報 多摩本流より 3 月に採集されたユスリカ科の各種について —)
- 第 44 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 — 環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究 (フィールド研究 2) — 昭和54年度 特別研究中間報告. (1983)
- 第 45 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和53/55年度 特別研究報告. (1983)
- 第 46 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和54/55年度 特別研究報告 第 1 分冊. (1983)
- 第 47 号 有機廃棄物, 合成有機化合物, 重金属等の土壤生態系に及ぼす影響と浄化に関する研究 — 昭和54/55年度 特別研究報告 第 2 分冊. (1983)
- 第 48 号 水質観測点の適正配置に関するシステム解析. (1983)
- 第 49 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和57年度 特別研究報告. (1984)
- ※ 第 50 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (I) — 霞ヶ浦の流入負荷量の算定と評価 — 昭和55~57年度 特別研究報告. (1984)
- ※ 第 51 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (II) — 霞ヶ浦の湖内物質循環とそれを支配する因子 — 昭和55~57年度 特別研究報告. (1984)
- ※ 第 52 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (III) — 霞ヶ浦高浜入における隔離水界を利用した富栄養化防止手法の研究 — 昭和55~57年度 特別研究報告. (1984)
- 第 53 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (IV) — 霞ヶ浦の魚類及び甲かく類現存量の季節変化と富栄養化 — 昭和55~57年度 特別研究報告. (1984)
- 第 54 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (V) — 霞ヶ浦の富栄養化現象のモデル化 — 昭和55~57年度 特別研究報告. (1984)
- 第 55 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VI) — 富栄養化防止対策 — 昭和55~57年度 特別研究報告. (1984)
- 第 56 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VII) — 湯ノ湖における富栄養化とその防止対策 — 昭和55~57年度 特別研究報告. (1984)
- ※ 第 57 号 陸水域の富栄養化防止に関する総合研究 (VIII) — 総括報告 — 昭和55~57年度 特別研究報告. (1984)
- 第 58 号 環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究 — 昭和55~57年度 特別研究総合報告. (1984)

- 第 59 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 光化学スモッグチャンパーによるオゾン生成機構の研究 — 大気中における有機化合物の光酸化反応機構の研究 — 昭和55~57年度 特別研究報告(第1分冊)。(1984)
- 第 60 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 光化学エアロゾル生成機構の研究 — 昭和55~57年度 特別研究報告(第2分冊)。(1984)
- 第 61 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究1) — 昭和55~57年度 特別研究報告(第3分冊)。(1984)
- 第 62 号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究 — 昭和56~58年度 特別研究中間報告。(1984)
- 第 63 号 海域における富栄養化と赤潮の発生機構に関する基礎的研究 — 昭和56年度 特別研究報告。(1984)
- ※ 第 64 号 複合大気汚染の植物影響に関する研究 — 昭和54~56年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※ 第 65 号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 1. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響 — 第1分冊)
- ※ 第 66 号 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants—Part 2. (1984)
(複合大気汚染の植物に及ぼす影響 — 第2分冊)
- 第 67 号 環境中の有害物質による人の慢性影響に関する基礎的研究 — 昭和54~56年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※ 第 68 号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究 — 昭和56~57年度 特別研究総合報告。(1984)
- ※ 第 69 号 中禅寺湖の富栄養化現象に関する基礎的研究。(1984)
- 第 70 号 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park (1984)
Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park.
Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park.
(日光国立公園の湖沼のユスリカに関する研究
— 第1部 日光国立公園の湖のユスリカの生態学的研究 —
— 第2部 日光国立公園の湖沼に生息するユスリカ類の分類学的, 形態学的研究 —)
- ※ 第 71 号 リモートセンシングによる残雪及び雪田植生の分布解析。(1984)
- 第 72 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 環境大気中における光化学二次汚染物質生成機構の研究(フィールド研究2) — 昭和55~57年度 特別研究報告(第4分冊)。(1985)
- ※ 第 73 号 炭化水素-窒素酸化物-硫黄酸化物系光化学反応の研究 — 昭和55~57年度 特別研究総合報告。(1985)
- ※ 第 74 号 都市域及びその周辺の自然環境等に係る環境指標の開発に関する研究。環境指標 — その考え方と作成方法 — 昭和59年度 特別研究報告。(1985)
- 第 75 号 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
(琵琶湖底泥中の元素に関する陸水学及び環境化学的研究)
- 第 76 号 A Study on the behavior of monoterpens in the atmosphere. (1985)
(大気中モノテルペンの挙動に関する研究)
- 第 77 号 環境汚染の遠隔計測・評価手法の開発に関する研究 — 昭和58年度 特別研究報告。(1985)
- 第 78 号 生活環境保全に果たす生活者の役割の解明。(1985)
- 第 79 号 Studies on the method for long term environmental monitoring—Research report in 1980–1982. (1985)
(環境試料による汚染の長期的モニタリング手法に関する研究)

- 第 80 号 海域における赤潮発生モデル化に関する研究 — 昭和57/58年度 特別研究報告. (1985)
- 第 81 号 環境影響評価制度の政策効果に関する研究 — 地方公共団体の制度運用を中心として. (1985)
- 第 82 号 植物の大気環境浄化機能に関する研究 — 昭和57~58年度 特別研究報告. (1985)
- 第 83 号 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)
(日本の湖沼のユスリカの研究)
- 第 84 号 重金属環境汚染による健康影響評価手法の開発に関する研究 — 昭和57~59年度 特別研究総合報告. (1985)
- 第 85 号 Studies on the rate constants of free radical reactions and related spectroscopic and thermochemical parameters. (1985)
(フリーラジカルの反応速度と分光学的及び熱力学的パラメーターに関する研究)
- 第 86 号 GC/MS スペクトルの検索システムに関する研究. (1986)
- 第 87 号 光化学二次汚染物質の分析とその細胞毒性に関する基礎的研究 — 昭和 53~58 年度 総合報告. (1986)
- 第 88 号 都市域及びその周辺の自然環境等に係る環境指標の開発に関する研究Ⅱ. 環境指標 — 応用例とシステム — 昭和59年度 特別研究報告. (1986)
- 第 89 号 Measuring the water quality of Lake Kasumigaura by LANDSAT remote sensing. (1986)
(LANDSAT リモートセンシングによる霞ヶ浦の水質計測)
- 第 90 号 ナショナルトラスト運動にみる自然保護にむけての住民意識と行動 — 知床国立公園内 100 平方メートル運動と天神崎市民地主運動への参加者の分析を中心として. (1986)
- 第 91 号 Economic analyses of man's utilization of environmental resources in aquatic environments and national park regions. (1986)
(人間による環境資源利用の経済分析 — 水環境と国立公園地域を対象にして)
- 第 92 号 アオコの増殖及び分解に関する研究. (1986)
- 第 93 号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究 (Ⅰ) — 昭和58~59年度 特別研究総合報告 第1分冊 (報文1). (1986)
- 第 94 号 汚泥の土壌還元とその環境影響に関する研究 (Ⅱ) — 昭和58~59年度 特別研究総合報告 第2分冊 (報文2). (1986)
- 第 95 号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究 (Ⅰ) — 汚濁負荷の発生と流出・流達 — 昭和58~59年度 特別研究報告. (1986)
- ※第 96 号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究 (Ⅱ) — 水草帯・河口域・池沼の生態系構造と機能 — 昭和58~59年度 特別研究報告. (1986)
- 第 97 号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究 (Ⅲ) — 水路及び土壌による水質の浄化 — 昭和58~59年度 特別研究報告. (1986)
- 第 98 号 自然浄化機能による水質改善に関する総合研究 (Ⅳ) — 自然浄化機能を活用した処理技術の開発と応用 — 昭和58~59年度 特別研究報告. (1986)
- 第 99 号 有害汚染物質による水界生態系のかく乱と回復過程に関する研究 — 昭和56~59年度 特別研究総合報告. (1986)
- 第 100 号 バックグラウンド地域における環境汚染物質の長期モニタリング手法の研究 — 特定汚染選択的検出法及び高感度分析技術の開発 — 昭和58~60年度 特別研究報告. (1986)
- 第 101 号 複合ガス状大気汚染物質の生体影響に関する実験的研究 — 昭和57~60年度 特別研究報告. (1986).

※残部なし

Report of Special Research Project the National Institute for Environmental Studies

- No. 1* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1976. (1977)
- No. 2* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1977. (1978)

[Starting with Report No. 3, the new title for NIES Reports was changed to:]

Research Report from the National Institute for Environmental Studies

- ※ No. 3 A comparative study of adults and immature stages of nine Japanese species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). (1978)
- No. 4* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1977. (1978)
- No. 5* Studies on the photooxidation products of the alkylbenzene-nitrogen oxides system, and on their effects on Cultured Cells – Research report in 1976-1977. (1978)
- No. 6* Man activity and aquatic environment – with special references to Lake Kasumigaura – Progress report in 1977-1978. (1979)
- ※ No. 7 A morphological study of adults and immature stages of 20 Japanese species of the family Chironomidae (Diptera). (1979)
- ※ No. 8* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1979)
- No. 9* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1978. (1979)
- No.10* Studies on evaluation and amelioration of air pollution by plants – Progress report in 1976-1978. (1979)
- ※ No.11 Studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. (1980)
- No.12 Multielement analysis studies by flame and inductively coupled plasma spectroscopy utilizing computer-controlled instrumentation. (1980)
- No.13 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1980)
- Part 1. The distribution of chironomid species in a tributary in relation to the degree of pollution with sewage water.
- Part 2. Description of 20 species of Chironominae recovered from a tributary.
- No.14* Studies on the effects of organic wastes on the soil ecosystem – Progress report in 1978-1979. (1980)
- ※ No.15* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1977-1978. (1980)
- No.16* Remote measurement of air pollution by a mobile laser radar. (1980)
- ※ No.17* Influence of buoyancy on fluid motions and transport processes – Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region – Progress report in 1978-1979. (1980)
- No.18 Preparation, analysis and certification of PEPPERBUSH standard reference material. (1980)
- ※ No.19* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Lake current of Kasumigaura (Nishiura) – 1978-1979. (1981)
- No.20* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Geomorphological and hydrometeorological characteristics of Kasumigaura watershed as related to the lake environment – 1978-1979. (1981)

- No.21* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Variation of pollutant load by influent rivers to Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.22* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Structure of ecosystem and standing crops in Lake Kasumigaura – 1978-1979. (1981)
- No.23* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Applicability of trophic state indices for lakes – 1978-1979. (1981)
- No.24* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Quantitative analysis of eutrophication effects on main utilization of lake water resources – 1978-1979. (1981)
- No.25* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Growth characteristics of Blue-Green Algae, *Mycrocystis* – 1978-1979. (1981)
- No.26* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Determination of algal growth potential by algal assay procedure – 1978-1979. (1981)
- No.27* Comprehensive studies on the eutrophication of fresh-water areas – Summary of researches – 1978-1979. (1981)
- No.28* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Progress report in 1979-1980. (1981)
- No.29 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1981)
 Part 3. Species of the subfamily Orthocladiinae recorded at the summer survey and their distribution in relation to the pollution with sewage waters.
 Part 4. Chironomidae recorded at a winter survey.
- ※ No.30* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment – Progress report in 1979-1980. (1982)
- No.31* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1980. (1981)
- No.32* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1979 – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 1). (1982)
- No.33* Meteorological characteristics and atmospheric diffusion phenomena in the coastal region – Simulation of atmospheric motions and diffusion processes – Progress report in 1980. (1982)
- ※ No.34* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution – Research report in 1980. (1982)
- No.35* Comprehensive evaluation of environmental impacts of road and traffic. (1982)
- No.36* Studies on the method for long term environmental monitoring – Progress report in 1980-1981. (1982)
- No.37* Study on supporting technology for systems analysis of environmental policy – The evaluation laboratory of Man-environment Systems. (1982)
- No.38 Preparation, analysis and certification of POND SEDIMENT certified reference material. (1982)
- ※ No.39* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution – Research report in 1981. (1983)
- No.40* Studies on the biological effects of single and combined exposure of air pollutants – Research report in 1981. (1983)
- No.41* Statistical studies on methods of measurement and evaluation of chemical condition of soil. (1983)
- ※ No.42* Experimental studies on the physical properties of mud and the characteristics of mud transportation. (1983)
- ※ No.43 Studies on chironomid midges of the Tama River. (1983)

Part 5. An observation on the distribution of Chironominae along the main stream in June, with description of 15 new species.

Part 6. Description of species of the subfamily Orthocladiinae recovered from the main stream in the June survey.

Part 7. Additional species collected in winter from the main stream.

- No.44* Smog chamber studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides system – Progress report in 1979 – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 2). (1983)
- No.45* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Outlines of special research project – 1978-1980. (1983)
- No.46* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Research report in 1979-1980, Part 1. (1983)
- No.47* Studies on the effect of organic wastes on the soil ecosystem – Research report in 1979-1980, Part 2. (1983)
- ※ No.48* Study on optimal allocation of water quality monitoring points. (1983)
- No.49* The development and evaluation of remote measurement method for environmental pollution – Research report in 1982. (1984)
- ※ No.50* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Estimation of input loading of Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- ※ No.51* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – The function of the ecosystem and the importance of sediment in natural cycle in Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- ※ No.52* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Enclosure experiments for restoration of highly eutrophic shallow Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.53* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Seasonal changes of the biomass of fish and crustacea in Lake Kasumigaura and its relation to the eutrophication. – 1980-1982. (1984)
- No.54* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Modeling the eutrophication of Lake Kasumigaura. – 1980-1982. (1984)
- No.55* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Measures for eutrophication control. – 1980-1982. (1984)
- No.56* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Eutrophication in Lake Yunoko. – 1980-1982. (1984)
- ※ No.57* Comprehensive studies on the eutrophication control of freshwaters – Summary of researches. – 1980-1982. (1984)
- No.58* Studies on the method for long term environmental monitoring – Outlines of special research project in 1980-1982. (1984)
- No.59* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen-sulfur oxides system – Photochemical ozone formation studied by the evacuable smog chamber – Atmospheric photooxidation mechanisms of selected organic compounds – Research report in 1980-1982 Part 1. (1984)
- No.60* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen-sulfur oxides system – Formation mechanisms of photochemical aerosol – Research report in 1980-1982 Part 2. (1984)
- No.61* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen-sulfur oxides system – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere (Part 1). – Research report in 1980-1982, Part 3. (1984)

- No.62* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems – Progress report in 1980-1983. (1984)
- No.63* Eutrophication and red tides in the coastal marine environment – Progress report in 1981. (1984)
- ※ No.64* Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Final report in 1979-1981. (1984)
- ※ No.65 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Part 1. (1984)
- ※ No.66 Studies on effects of air pollutant mixtures on plants – Part 2. (1984)
- No.67* Studies on unfavourable effects on human body regarding to several toxic materials in the environment, using epidemiological and analytical techniques – Project research report in 1979-1981. (1984)
- ※ No.68* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil – Research report in 1981-1983. (1984)
- ※ No.69* Fundamental studies on the eutrophication of Lake Chuzenji – Basic research report. (1984)
- No.70 Studies on chironomid midges in lakes of the Nikko National Park – Part I. Ecological studies on chironomids in lakes of the Nikko National Park. – Part II. Taxonomical and morphological studies on the chironomid species collected from lakes in the Nikko National Park. (1984)
- ※ No.71* Analysis on distributions of remnant snowpack and snow patch vegetation by remote sensing. (1984)
- No.72* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides-system – Research on the photochemical secondary pollutants formation mechanism in the environmental atmosphere. – Research report in 1980–1982, Part 4. (1985)
- ※ No.73* Studies on photochemical reactions of hydrocarbon-nitrogen oxides-sulfur oxides-system – Final report in 1980–1982. (1985)
- ※ No.74* A comprehensive study on the development of indicessystem for urban and suburban environmental quality–Environmental indices–Basic notion and fromation. (1984)
- No.75 Limnological and environmental studies of elements in the sediment of Lake Biwa. (1985)
- No.76 A Study on the behavior of monoterpens in the atmosphere. (1985)
- No.77* The development and evaluation of remote measurement methods for environmental pollution –Research report in 1983. (1985)
- No.78* Study on residents' role in conserving the living environment. (1985)
- No.79 Studies on the method for long term environmental monitoring – Research report 1980–1982. (1985)
- No.80* Modeling of red tide blooms in the coastal sea – Research report in 1982–1983. (1985)
- No.81* A study on effects of implementing environmental impact assessment procedure – With particular reference to implementation by local governments. (1985)
- No.82* Studies on the role of vegetation as a sink of air pollutants – Research report in 1982–1983. (1985)
- No.83 Studies on chironomid midges of some lakes in Japan. (1985)
- No.84* A comprehensive study on the development of assessment techniques for health effects due to environmental heavy metal exposure – Final report in 1982–1984. (1985)
- No.85 Studies on the rate constants of free radical reactions and related spectroscopic and thermochemical parameters. (1985)
- No.86* A novel retrieval system for identifications of unknown mass spectra. (1986)
- No.87* Analysis of the photochemical secondary pollutants and their toxicity on cultured cells – Research report in 1978–1983. (1986)
- No.88* A comprehensive study on the development of indices system for urban and suburban environmental quality II –Environmental indices –Applications and systems. (1986)
- No.89 Measuring the water quality of Lake Kasumigaura by LANDSAT remote sensing. (1986)

- No. 90* National trust movement in Japanese nature conservation—Trustworthy or Illusion ? (1986)
- No. 91 Economic analysis of man's utilization of environmental resources in aquatic environments and national park regions. (1986)
- No. 92* Studies on the growth and decomposition of water-bloom of *Microcystis*. (1986)
- No. 93* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil (I) — Research report and papers (Part 1) in 1983—1984. (1986)
- No. 94* Studies on the environmental effects of the application of sewage sludge to soil (II) — Research report and papers (Part 2) in 1983—1984. (1986)
- No. 95* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management (I) — Drainage and flowing down of pollutant load—Research report in 1983—1984. (1986)
- No. 96* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management (II) — Structure and function of the ecosystems of littoral zone—Research report in 1983—1984. (1986)
- No. 97* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management (III) — Self-purification in stream and soil—Research report in 1983—1984. (1986)
- No. 98* Comprehensive studies on effective use of natural ecosystems for water quality management (IV) — Development and application of wastewater treatment technologies utilizing self-purification ability —Research report in 1983—1984. (1986)
- No. 99* Effects of toxic substances on aquatic ecosystems—Final report in 1981—1984. (1986)
- No.100* Studies on the methods for long-term monitoring of environmental pollutants in the background regions—Development of highly sensitive and selective analytical methods for measurement of pollutants in the background regions—Progress report in 1983—1985. (1986)
- No.101* Experimental Studies on the Effects of Gaseous Air Pollutants in Combinatinon Animals Research Report in 1982—1985

* in Japanese
out of stock