

二酸化窒素のラットにおよぼす影響

— 肺の過酸化脂質生成とコラーゲン代謝関連因子の変化 —

市 瀬 孝 道

1985

二酸化窒素のラットにおよぼす影響
肺の過酸化脂質生成とコラー
ゲン代謝関連因子の変化

環境庁国立公害研究所

市瀬 孝道

目 次

序論	-----	1
第一章	-----	4
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過酸化脂質生成と肺の抗酸化性防御機構の変化について		
(I)	緒言	4
(II)	実験材料及び方法	6
	(1) 動物及び二酸化窒素の暴露方法	6
	(2) 肺ホモジネートの調製	6
	(3) 抗酸化性酵素と抗酸化性物質の測定法	7
	(4) 過酸化脂質の測定法	7
	(a) チオバルビツール酸反応性物質の測定法	7
	(b) 呼気中炭化水素分析法	8
(III)	結果	9
	(1) 急性暴露実験	9
	(2) 亜急性暴露実験	10
	(3) 慢性暴露実験	12
(IV)	考察	14
(I)	小括	19
第二章	-----	21
パラコート (PQ) による肺の線維化過程と過酸化脂質生成について		
(I)	緒言	21
(II)	実験材料及び方法	23
	(1) 動物及びパラコート投与	23
	(2) 肺ホモジネートの調製	23

(3) 肺の過酸化脂質, 抗酸化性酵素活性及び抗酸化性物質の測定	24
(4) コラーゲン代謝関連因子の測定	24
(5) 肺の形態学的検索	25
(6) 動脈血 pHa, PaCO ₂ 及び PaO ₂ の測定	26
(III) 結果	27
1. 体重の変化	27
2. 肺の光学顕微鏡的所見	27
3. 生化学的变化	27
1. 肺の過酸化脂質と抗酸化性防御系の変化	27
2. コラーゲン代謝関連因子の変化	29
4. 動脈血 pHa, PaCO ₂ 及び PaO ₂	32
(IV) 考察	33
(V) 小括	38

第三章 ----- 40

二酸化窒素の急性及び慢性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

(I) 緒言	40
(II) 実験材料及び方法	42
(1) 動物及び二酸化窒素の暴露法	42
(2) 肺の摘出方法及び肺ホモジネートの調製	42
(3) 肺の過酸化脂質量, Superoxide dismutase(SOD) 活性の測定	42
(4) コラーゲン代謝関連因子の測定	42
(5) 肺の形態学的検索	43
(6) 肺の湿重量比と肺含水量	43

(Ⅲ)	結果	4 4
	1. 急性暴露実験	4 4
	1. 肺湿重量と肺含水量	4 4
	2. 肺の光学顕微鏡的所見	4 4
	3. 肺の生化学的変化	4 4
	2. 慢性暴露実験	4 7
	1. 肺湿重量と肺含水量	4 7
	2. 肺の生化学的変化	4 7
(Ⅳ)	考察	5 0
(Ⅴ)	小括	5 5
	総括ならびに結論	5 7
	文献	6 3
	謝辞	7 3

序論

現在知られている代表的なガス状大気汚染物質には二酸化窒素 (NO_2), 一酸化窒素 (NO), 二酸化硫黄 (SO_2), あるいはオゾンを中心とする光化学オキシダントなどが上げられる。周知のごとく, 我が国においては四日市ぜん息の原因が SO_2 を中心とする大気汚染物質であることが確認されてから, その不幸な経験を繰り返さないために国をあげて大気汚染物質の低減努力が重ねられ, 現在では図 I に示すごとく, SO_2 の汚染地域に設置された15局の SO_2 の年平均濃度と全国に設けられた26局の NO の年平均濃度は年々低下の傾向を示している。また, 光化学オキシダントの発生日数や被害届け出人数も図 II に示すごとく, 昭和50年をピークとしてその後は徐々に低下してきている。しかし, このような状況にありながら全国に設けられた, 一般大気環境測定局における NO_2 の年平均濃度だけは昭和50年以降も横ばい傾向を示し, また, 図 I に示すごとく, 全国の大都市部に設けられた自動車排ガス測定局, 26局の年平均値はかなり高く, NO_2 の健康影響については多くの国民が不安をいっているところである。このような状況から, NO_2 の健康影響に関するより詳しい研究が必要とされている。

NO_2 は高温燃焼過程において窒素と酸素との反応によって生ずる褐色の気体で強い刺激性の臭気を有する極めて酸化性の強い物質である。一定濃度以上の NO_2 を吸入すると肺のうっ血, 浮腫, 細気管支炎, 肺胞壁細胞のはく離や肺胞壁の肥厚化, 気道線毛の退縮, 気道狭窄, 肺胞腔の拡大, コラーゲン線維の増加などを起こし, ひいては肺線維症や肺気腫などの回復が極めて困難な疾病を引き起こすことが病理学的に詳しく調べられている。

NO_2 のヒトや動物に対する影響は主に呼吸器障害であるが, 吸入された NO_2 は肺胞に到達すると毛細血管を通じて血中に硝酸イオン (NO_3^-) と亜硝酸イオン (NO_2^-) の形^{67,72)} で溶解し, この形態で赤血球膜や肝ミクロソームの電子伝達係にまでも影響を及ぼしている⁶⁴⁾ ことが明らかにされている。更に, マクロファージのインターフェロン生産能力の低下⁹⁴⁾ や病原体に対する血清中和抗体等の免疫抗体産生能力の低下等²³⁾ の免疫機能への影響も明らかにされている。また, NO_2 は強い酸化性を有する性質上, その生化学的な生体作用としては酸化反応が最も注目される。このような生体成分の酸化反応に関しては, まず生体膜成分の不飽和脂肪酸と NO_2 との反応によってフリーラジカル生成を経る脂質過酸化反応があげられる。事実, Thomas⁹¹⁾ は NO_2 暴露によって肺に脂質過酸化反応が起

こることを報告している。この反応によって生成した過酸化脂質は生体にとって極めて有害であることが広く知られている。ところが、Thomas らの報告のあと、多くの人が研究をかさねたがNO₂ 暴露による過酸化脂質の生成は証明されな⁶⁶⁾かった。

一方、脂質の過酸化に関与する活性酸素がコラーゲン代謝に異常を起こすことが明らかにされつつあるが、NO₂ による肺の線維化が生化学的にどのような過程を経て起こるのかは明らかではない。

そこで本研究ではラットを用いてNO₂ の急性、亜急性および慢性暴露による肺での過酸化脂質生成の有無とそのような有害な物質から生体を防御する為の抗酸化性防御系の変化の検討（第一章）から出発した。また、過酸化脂質を生成し肺に線維化を起こす因子には除草剤のパラコート、抗癌剤のBleomycin、X線照射、またオキシダントであるオゾン等があげられるが、第二章ではパラコートを用いた肺線維化のモデルを設定することにより、線維化の全てのメカニズムに共通する病理学的、生化学的な変化を把握することを目的として、まず肺線維化を起こす因子に共通した過酸化脂質生成とコラーゲン代謝関連因子について調べ、両者の関連性について検討することを試みた。そして、第三章では再びNO₂ の急性暴露実験と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、パラコート投与によるこの変化と比較し、肺の線維化に対するNO₂ の作用を検討することを試みた。

図 I 継続15局における二酸化流黄年平均値と継続26局における一酸化窒素及び二酸化窒素年平均値の経年変化

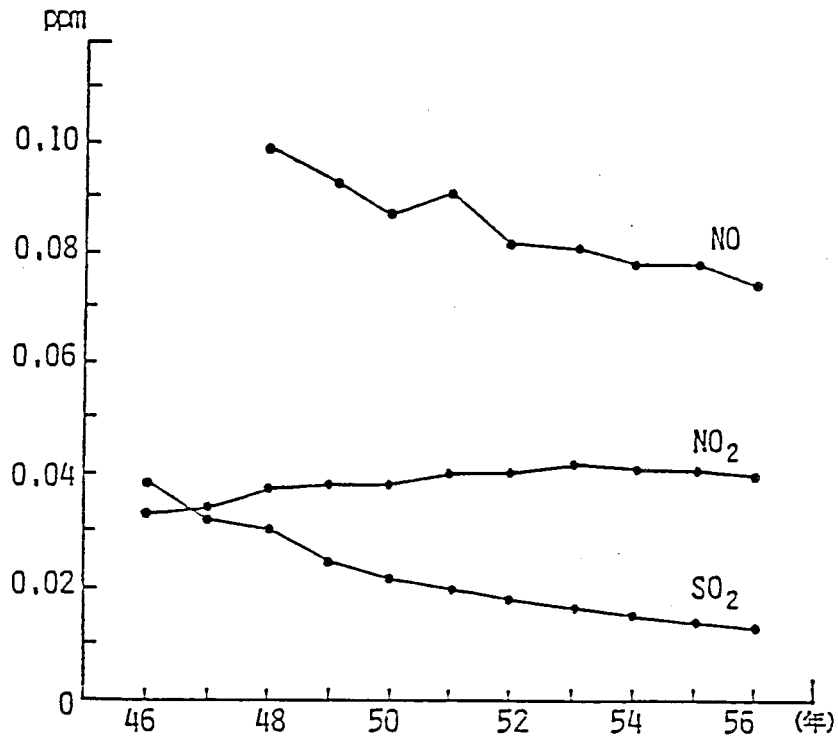
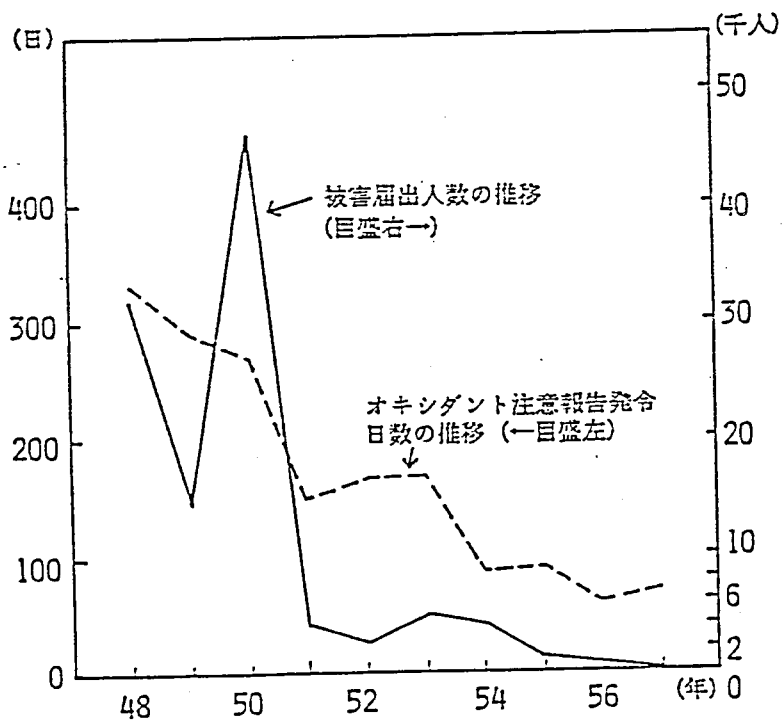


図 II 光化学大気汚染の推移



第一章

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過酸化脂質生成と肺の抗酸化性防御機構の変化について

(I) 緒言

大気汚染物質の一つである二酸化窒素 (NO_2) は強い酸化性を有し、特に肺に様々な病理学的障害を引き起こす³⁰⁾。組織の細胞膜を形成している脂質の過酸化は細胞障害や多くの毒性発現の原因と見なされている⁶⁰⁾。このため、 NO_2 の毒性の一部は脂質の過酸化と関連しているのではないかと考えられている。事実、 NO_2 暴露によって脂質過酸化反応が起こることは肺の共役ジエン (Conjugated dienes) の測定により Thomas⁹¹⁾ によって報告されている。しかし、その後多くの研究者が NO_2 暴露による過酸化脂質の検出を試みたが成功していない⁶⁶⁾。

過酸化脂質は生体膜成分を構成している不飽和脂肪酸 (RH) が過酸化を受けて生じる物質 (ROOH) であり、生体にとって極めて有害な物質である。この過酸化脂質は生体内では蛋白質や核酸あるいは脂質成分と反応し、膜構造を破壊し生体膜機能を障害したり、酵素や蛋白質を変性させたり、更にはホルモンやビタミン等の失活を引き起こす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引き起こすことが知られている。したがって、過酸化脂質の生成は動脈硬化、肝疾患、腎疾患、脳疾患あるいは癌等の種々の疾患や老化などとの関連が報告されており、最近では基礎および臨床医学上からも特に注目されるようになって^{36, 93, 101)}いる。

一方、生体内にはこのような有害な過酸化脂質を代謝したりその生成を抑制する抗酸化性防御機構が存在している。表1には本実験で著者が検討した細胞上清画分に存在する酵素的防御系を示した。1) の Glutathione peroxidase (GPx) 系は ROOH で示される過酸化脂質あるいは過酸化水素 (R=H の場合) を代謝する酵素系である。なお GPx は表1) の (ii) に示すように酸化型グルタチオン (GSSG) から還元型グルタチオン (GSH) の還元を触媒する Glutathione reductase (GR) と NADP^+ から NADPH を産生する Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) との共役によって過酸化脂質を代謝する。また、2) に示したような還元ポテンシャルの維持に働く NADPH を産生する G6PD, 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) および TCA サイ

クル上に位置するIsocitrate dehydrogenase (ICDH) などの酵素も酸化障害から生体を守る上で重要な役割を果たしている。また、生体異物あるいは過酸化物の代謝に働く酵素であるGlutathione S-transferase について見ると、3) に示す如くGPxと同じ反応を触媒し、過酸化脂質代謝に関与する。また、Xanthine oxidase やAmino acid oxidase 等の各種の生体内酸化反応や食細胞の食作用の際に生成されるスーパーオキシド・ラジカル (O_2^-) は脂質過酸化反応に関与する活性酸素分子種の一つであるが、生体にはこの様な O_2^- を異生化する為に4) に示すSuperoxide dismutase(SOD) が存在し、 O_2^- による酸化障害から生体を防御している。また、オゾン暴露の場合、非タンパク性SH基は主に蛋白質や酵素のSH基と反応し、Mixed disulfideを形成し細胞機能を低下させる。しかしこのようなMixed disulfide は5) の(i) ~ (iv) 式に示すようにDisulfide reductaseによって元のフリーのSH基に還元される。Disulfide reductaseはこの様に遊離のSH基の維持に重要な役割を果たし、酸化障害から細胞を守る働きをしている。

また、生体内にはこのような抗酸化性防御系酵素以外に内因性の抗酸化性物質として非タンパク性SH化合物(肺では90%以上がGSH)などの還元性物質やフリーラジカル消去剤としてのビタミンE等が存在し、過酸化反応が起こるのを防いでいる。

一方、これら生体内の防御系酵素活性や抗酸化性物質濃度は NO_2 暴露により変動することが知られている。深瀬ら²⁷⁾ は28ppm NO_2 の7日間暴露によってマウスの肺のGSHとGPx, GRおよびG6PD活性の有意な増加を報告し、更に 6 ± 1 ppm NO_2 に30日間暴露したマウスの場合にも肺のGRとG6PD活性の増加を認めている。またChowら¹¹⁾ も2.3 ppm と6.2 ppm NO_2 に4日間暴露したラットの肺のGRとG6PDの活性上昇を報告している。これらのことから、 NO_2 を暴露された場合の抗酸化性防御機構の役割は極めて重要なものと考えられている。

そこで著者は、 NO_2 の生体影響解明の一環として、 NO_2 暴露によって脂質過酸化反応が起こるかどうかを明らかにし、更に脂質過酸化反応が起こるならばその作用を明らかにするために、抗酸化性防御機構と脂質過酸化反応の関連性および両者間の量-効果関係を検討することは意義あることと考え、急性、亜急性および慢性暴露実験を行った。

(II) 実験材料及び方法

(1) 動物及びNO₂の暴露方法

急性実験には8週令のJCL:Wistar系雄ラットを用いて、10ppm NO₂に2週間の連続暴露を行った。亜急性実験では13週令のJCL:Wistar系雄ラットを用いて0.4, 1.2および4ppmのNO₂にそれぞれ1, 2, 4, 8, 12, 16週間の連続暴露を行った。また、慢性実験では8週令のJCL:Wistar系雄ラットを用いて0.04, 0.4および4ppmのNO₂に連続9カ月, 18カ月および27カ月の長期暴露を行った。これらのラットはハンギングワイヤーメッシュ・ケージの中で6匹ずつに分けて飼育し、NO₂暴露はステンレス・スチールガラス製チャンバーを用いて既報^{42, 57, 81)}のように行った。チャンバー内温度は24±2℃に、湿度は55±10%に制御され、室内照明は14時間点燈, 10時間消燈とした。また、これらのラットは日本クレア製CE-2固型飼料で飼育し、慢性実験の場合は滅菌したものを与え飲料水も滅菌して自由に飲水させた。なお、この固型飼料のVitamin E量は23mg/kg, 粗脂肪は3.5%であり、この粗脂肪の脂肪酸組成はパルミチン酸が18.3%, オレイン酸が21.0%, リノール酸が54.8%およびリノレン酸が2.8%であった。

ラットはエーテル深麻酔下で右の頸動脈より放血屠殺し、急性および亜急性実験では右心室に生理食塩水を注入して肺が白色になるまで灌流した。慢性実験では肺を灌流せずそのまま用いた。これらの肺は試料ビンに入れ、窒素ガス置換後、用時まで-80℃に保存した。なお、動物数は特にことわらないかぎり、すべて1群6匹(n=6)ずつ用いた。

(2) 肺ホモジネートの調製

ラットの肺は窒素気流下、テフロン・ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、10%ホモジネートとした。このホモジネートを200xg, 5分の遠心分離を行い、得られた上清は非タンパク性SH(NPSH)量, thiobarbituric acid(TBA)反応性物質およびVitamin E量の測定に用いた。上清の残りは12,000xg, 20分間遠心分離し、更にその上清を105,000xg, 60分間遠心分離した。この上清の一部をGPx, GR, G6PD, 6PGD, Glutathione S-transferase 活性および Isocitrate dehydrogenase 活性の測定に用いた。残りの上清は0.1mMEDTAを含む50mMNa, K-リン酸緩衝液(pH7.5)に20時間透析(透析外液は2回交換)し、この透析上清をSODとDisulfide reductase活性の測定に使用した。Disulfide reductase以外の酵素活性はすべて遠心方式のジュームサック自動分析装置を用い、30℃にて測定し、その他は100型日立分光光度計およびPF-510型島

津蛍光分光光度計によって測定した。

(3) 抗酸化性酵素と抗酸化性物質の測定

G P x は Cumene hydroperoxide あるいは過酸化水素を基質として Little らの方法⁵⁶⁾によって測定した。G R は酸化型グルタチオン (G S S G) を基質として Bergmeyer が記載した方法⁶⁾, G 6 P D 活性は Glucose-6-phosphate · Na₂ 塩を基質として Wilhelm らの方法⁹⁶⁾によって測定した。6 P G D 活性は 20mM g C l と 6.5 mM Cysteine を含む 0.1 M トリス-塩酸緩衝液と 6-phosphogluconate を基質として用いて, G 6 P D 測定法に従って測定した。Glutathione S-transferase 活性は Kaplowitz の方法⁴⁶⁾に従って測定した。なお, 基質として Aryl S-transferase には 3,4-Dichloro nitrobenzene を, Aralkyl S-transferase には p-Nitrobenzylchloride を, Epoxy S-transferase には 1,2-Epoxy-3(p-nitrophenoxy)-propane を使用した。I C D H は dl-isocitrate を基質とする Bernt らの方法⁵⁾, S O D 活性は 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 S O D がさまたげる反応を利用した Mc Cord と Fridovich の方法⁶¹⁾に従った。D S R 活性の測定はシスチンを基質として Tietze の方法⁹²⁾によって行い, その形成されたシステインを De Lucia らの方法¹⁴⁾で定量した。

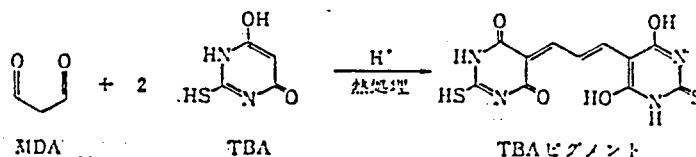
抗酸化性物質の非タンパク性 S H 基 (N P S H) 量は De Lucia らの方法に従って測定した。Vitamin E は肺ホモジネートの 200xg 上清から n-hexane を用いて抽出し, スタンダードとして 1ug · dl- α -tocopherol/ml of n-hexane を使用して阿部ら¹⁾の高速液体クロマトグラフィー法で測定した。蛋白量はスタンダードとして牛血清アルブミンを使用して Lowry らの方法⁵⁵⁾に従って測定した。

(4) 過酸化脂質の測定

a) チオバルビツール酸反応性物質の測定

多価不飽和脂肪酸の過酸化反応によって生じたエンドパーオキサイドが分解され, 最終的に生じるマロンジアルデヒド (MDA) が, 酸性条件下で 2 分子のチオバルビツール酸 (Thiobarbituric acid, T B A) と次式のように反応して赤色物質を生ずる。この赤色物質の蛍光強度をもって過酸化脂質量とされている。

TBA reaction Malondialdehyde Assay



本実験のTBA反応性物質量の測定にはSDS可溶化を含むOhkawa⁷³⁾の方法を用いた。肺の200xg上清試料0.2mlに8%SDS(和光純薬製)0.2mlを加えて混和後、20%酢酸緩衝液(pH 3.5)及び0.5%TBA試薬(和光純薬)を各々1.5mlずつ加えそのつど充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分振盪し、n-ブタノール層を遠心分離し、Excitation 515nm, Emission 553nmの蛍光強度を測定した。なお標準物質にはテトラメトキシプロパンを用いた。

b) 呼気中炭化水素分析

食用油の自動酸化によって炭化水素ガスが出現することは以前からよく知られていた。エタンはリノレン酸やドコサヘキサエン酸などの ω 3族の脂肪酸の自動酸化によって産生されるものであり、Riely⁷⁷⁾はこのエタン分析法を初めて生物システムに応用した。彼らは四塩化炭素(CCl₄)を投与して脂質過酸化を促進させたマウスの呼気中に呼出されてくるエタンをガスクロマトグラフィーで分離・定量することにより、Whole bodyのnativeな脂質過酸化の度合を測定することができることを報告した。その後、多くの研究者がin vivoの脂質過酸化の証明としてエタン分析法を用いた実験結果を報告^{15,34)}している。この方法の利点は動物を殺すことなく生理的な条件のもとで過酸化脂質を測定でき、かつ同一固体を対照群とする実験や同一固体での経時的変化を検討できるなどの点にある。

不飽和脂肪酸の一つであるリノレン酸(C_{18:3} ω 3)からフリーラジカル反応を出発点として、炭素数2個のエタンとエチレンが生ずるメカニズムを図1に示した。図に示すごとく、脂質過酸化反応はIの○印を付けた ω 5位の反応性に富むdouble allyl位の水素の引き抜き反応によってスタートし、IIに示すフリーラジカル中間体を経由して、IIIで示す共役ジエン化の後にチトクロームの関与する酵素添加反応によってIVに示すようなlipid peroxy radicalからVに示すlipid hydroperoxide(過酸化脂質)を形成する。このものは鉄などの触媒作用によってVIに示したような不安定なalkoxy radical中間体を経由した後、 β -分解によってフリーラジカルエタン(VII)と脂肪酸のsemialdehydeに分解される。このフリーラジカルエタンは他から水素を奪ってきて、みずからはエタンとなる。また、こ

のフリーラジカルエタンは2価の銅イオンの存在下においてエチレンになる。このエタンやエチレンは組織から血液中を流れて肺に到達し、呼気中に排出される。呼気ガス分析法はこの呼気中に呼出された炭化水素をFID検出器付きガスクロマトグラフィーで分離・⁸²⁾定量する方法である。本実験では嵯峨井の記載した方法⁸²⁾に従って測定した。

〔Ⅲ〕 結果

(1) 急性暴露実験

10ppm のNO₂ に2週間連続暴露したラットの呼気中エタンの経時変化と肺のTBA反応性物質量 (TBA値) およびGlutathione peroxidase(GPx)活性の経時変化を図2に示した。エタンは暴露1日目で減少し初期レベル(100%)の約70%に相当したが、2日目後から急速に増加し、3~4日目では初期レベルの約210~220%のレベルに達した。その後呼気中エタンは急速に減少し、10日目で初期レベルに戻った。またTBA値も1日目に減少し2日目から3日目で急速に増加し、最高値は3日目に観測され、その値は初期値の200%に相当した。その後は再び急速に減少し5日目で初期レベルに戻った。

なお、図中にWhole bodyの脂質過酸化を示すエタン産生の増加率から肺の脂質過酸化を示すTBA値の増加率を差し引いた値を2点破線で示した。この差は5日目で最大となり、この頃には肺以外の臓器でも脂質過酸化が起こっている可能性を示唆している。

また図中に過酸化脂質と抗酸化性防御系酵素活性の変化との関連性を理解しやすいようにGPx活性の変化を挿入した。GPx活性は1日目で若干低下するが過酸化脂質生成が最大となる3日目頃より増加し始め、5日目から7日目に最高レベルに達し、そのレベルは14日目まで持続した。この結果から、過酸化脂質生成とその代謝酵素であるGPxは明瞭な逆相関を示していることが明らかになった。

図3には肺のGPxと共にGlutathione reductase (GR), Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD) および6-Phosphogluconate dehydrogenase(6PGD)活性の経時変化を示した。GR, G6PDおよび6PGD活性もGPx活性と類似の経時変化を示し、これらの活性の有意な増加は5日目から14日目まで認められた。

一方、データは示していないが、Glutathione S-transferase活性は2日目から3日目に最低レベルに低下し、そのあとやや初期レベルに近づく傾向を示していた。Disulfide reductase(DSR)活性はNO₂暴露2日目で最低値を示しその値は初期レベルの60%に相当した。その後活性は著しく増加し10日目で最高レベル(210%)に達し14日目

までそのレベルを維持した(図4)。Superoxide dismutase(SOD)活性の経時変化もDSR活性の変化と同様であった(図4)。しかし、その変化の程度は比較的少ないが5, 10, 14日目では有意な増加を示した。

肺における抗酸化性物質としての非タンパクSH基(NPSH)とVitaminE量の変化を図5に示した。NPSHは2日目で減少し初期レベルの約90%に相当した。その後5日から14日目にかけて初期レベルの約150~170%に増加した。これに対して、VitaminEは2日目で初期レベルの140%に増加し、2日目以後急速に減少し、ふたたび初期レベルに戻った。このVitaminEの経時変化はNPSHの変化と対称的でむしろ過酸化脂質の経時変化に類似していた。

(2) 亜急性暴露実験

対照群と0.4, 1.2および4 ppm NO₂を連続16週間暴露したラットの呼気中エタンと肺のTBA反応による過酸化脂質生成量の経時変化を図6にした。NO₂暴露ラットの呼気中エタン量は1週目で最大に達し、その後減少し4週目で初期レベルにもどった。1週目の呼気中エタン量は0.4, 1.2および4 ppm群ではそれぞれ対照群の108, 135および172%に相当した。その後、一旦低下し対照レベルに戻った後ふたたび8週目から16週目にかけて徐々に増加した。またすべての期間でNO₂濃度との間に量-効果関係が見られた。なお、呼気中ペンタンはNO₂暴露による過酸化脂質の指標とはなりえなかった。

また、図中に1.2 ppm および4 ppm NO₂暴露による肺のGPx活性の経時変化を1点破線で示した。GPx活性は4週目で最大レベルへ増加したが、その後徐々に低下し対照レベルに近づく傾向を示した。なお、0.4 ppm NO₂暴露群ではほとんど変化が無かった。これらの結果から、GPx活性の変化は急性暴露実験の場合と同様に、その増減はエタン産生で示した過酸化脂質の変化と対称的な経時変化を示し、両者の間に逆相関が認められた。

また、肺のTBA値は4週目で最大レベルに達し、この時の0.4 ppm, 1.2 ppm および4 ppm NO₂暴露群の値は対照群のそれぞれ103%, 106%, 116%に相当した。その後、TBA値は8週目で一旦対照レベルに戻ったが、12週目から16週目にかけてふたたび増加していく傾向を示し、4 ppmの16週目で対照群と有意差を示した。

次に、肺のGRとG6PD活性の経時変化を図7に示した。両酵素ともGPx活性と類似の変化を示した。GR活性の4週目における0.4 ppm群, 1.2 ppm群および4 ppm群の

値はそれぞれ対照群(100%)の106, 110 および 120%に相当し、G 6 P Dでは各々106, 115 および 145%に相当していた。6 P G D活性の経時変化もG 6 P Dの変化に類似したパターンを示し、4週目に見られた最大活性値は各濃度群で対照群の103, 110および131%に相当していた。Isocitrate dehydrogenase(I C D H)活性はNO₂ 暴露期間中有意な変化を示さなかった。S O D活性とD S R活性の経時変化を図8に示した。これら酵素活性の変化もまたG RやG 6 P D活性の変化と類似していた。2週目から4週目で見られたS O Dの最大活性値は対照群の103, 111および 119%に相当していた。また対照群に対して4週目で見られた各酵素活性の増加率の順序はG 6 P D > 6 P G D > G R > S O D > D S R > G P x の順であった。これとは別に、G S H S - transferase の活性は1週目から4週目にかけて減少し、その後8週目から16週目で初期レベルへ回復した。抗酸化性物質である肺の非タンパク性S H (N P S H)量は防御系酵素活性の経時変化と類似していた(図9)。4週目で最大レベルに達し、それぞれ対照群の102, 116および132%に相当していた。しかし、4週目以後での低下は示さず、2~4週目で到達したレベルは12週目まで持続していた。肺の α -Tocopherol 含量は1週目で最大レベルへ増加し、4週目では対照レベルに戻っていた。この経時変化はT B A値よりもむしろエタン産生で示した過酸化脂質の変化に類似していた。

以上の結果から、G S H S - transferase を除く防御系酵素活性はNO₂ から細胞を保護するために初期(2~4週目)に急速に誘導されるがこの増加レベルはそれほど長くは持続できず4週目以降でゆっくり低下してゆき、エタン産生で示された過酸化脂質生成の変化と対照的な変化を示していた。

この亜急性暴露実験の2週間目と10ppmNO₂ 2週間暴露で得られたラット肺の防御系酵素活性、T B A値、N P S H量および α -Tocopherol 含量の量-効果関係を図10に示した。0 ppm から10ppmまでのNO₂ 暴露による量-効果関係は各防御系酵素およびN P S H量について観察された。これには3種のタイプの量-効果関係が見られた。G 6 P D, 6 P G D活性およびN P S H量はNO₂ 暴露濃度と直線的な量-効果関係を示し、G P x, G RおよびD S R活性は凹型の量-効果関係を、またS O D活性は凸型の量-効果関係を示していた。しかし、T B A値と α -Tocopherol 含量はこのような量-効果関係を示さなかった。

(3) 慢性暴露実験

肺の抗酸化性防御系酵素活性、非タンパク性SH (NPSH) 量およびTBA値測定の為に0.04ppm, 0.4ppm および4 ppm NO₂ に9カ月および18カ月間の連続暴露実験を2回行い、それぞれの結果を実験1および実験2として表2~4に示した。この実験1と2は再現性を確認する為に2度行ったものであるが、用いた動物のロットと実験を行った季節は異なっている。表2にTotal protein量, GPx, GRおよびG6PD活性の実験1と実験2の結果を示した。Cumene hydroperoxide(Cumene-OOH)を基質としたGPx活性は9カ月目では対照群とほとんど変わりがなかった。18カ月目の実験2では逆に0.4 ppm 群と4 ppm 群で有意な低下を示した。しかし、再現性は得られていない。過酸化水素(H₂O₂)を基質とした場合も同様の傾向を示した。

GRとG6PD活性は9カ月目の4 ppm 群でわずかながら有意な増加を示し、再現性も認められた。6PGDとICDH活性は共に9, 18カ月目で全く変化が見られなかった。

表3にはGSH S-transferaseのうち, Aryl, Aralkyl および Epoxy S-transferase 活性を示した。これらの三酵素はともに9カ月目では対照群と変わらないが18カ月目ではAryl およびAralkyl S-transferase 活性が4 ppm 群で有意に低下し、かつ再現性も認められた。Epoxy S-transferase 活性については両者とも1度だけの測定であるが全く変化はなかった。Superoxide dismutase やDisulfide reductase活性は対照群と全く差がなかった。このことからNO₂ 慢性暴露実験の場合にはSuperoxide やDisulfideの生成は起こっていない可能性が示唆される。

表4にはTBA法による肺の過酸化脂質量を示した。TBA値は9カ月暴露で、4 ppm 群の実験1で有意な増加を示したのみであるが、18カ月目では0.4 ppm 群と4 ppm で有意な増加を示し、かつ再現性も明瞭であった。

次に、図11に呼気中エタンの測定によって得られた過酸化脂質生成の結果を示した。なお、エタン測定に用いた動物のうち9カ月暴露群は前記9カ月暴露の実験2と同一の動物(6匹)であるが、18カ月と27カ月暴露動物は実験1, 2に用いたものとは別の動物である。18カ月と27カ月暴露動物のうち対照チャンパー内のラットは死亡により数が著しく少なかったために、図中の対照群(C印)の値はNO₂ 暴露動物と一緒に購入した同一ロットの動物を清浄飼育室で同一期間飼育していたものの値を示した。この動物は9, 18および27カ月群ともすべて8匹ずつ測定に供し、9カ月群の場合、清浄飼育室内で飼育したラット(8匹)と対照チャンパー内のラット(6匹)の呼気中エタン産生量の間には全く差

は認められなかった。18カ月と27カ月間NO₂ 暴露群のラットも死亡例があったため、各群とも3匹か4匹の測定結果を示している。

NO₂ 暴露によるエタン産生は、9カ月と18カ月では0.04ppm 群、0.4 ppm 群および4 ppm 群のすべての群で対照群より有意に増加していた。さらに、その生成量はNO₂ 暴露濃度に依存し、かつ暴露期間に依存して増加していた。また、27カ月暴露群では0.04ppm 群と0.4 ppm 群が対照群の約2倍へと有意な増加を示していたが、4 ppm 群では逆に低下し対照群との間に有意差は認められなくなった。一方、ペンタンの変化(図12)はエタンに比べると比較的少なく、有意差が見いだされたのは18カ月目の0.04ppm 群と0.4 ppm 群のみであり、4 ppm 群ではエタン生成の27カ月目の場合と同様にむしろ低下していた。また、ペンタンの変化はあまり顕著ではなく、わずかに18カ月暴露0.04ppm 群と0.4 ppm 群のみで有意な増加を示していた。

最後にNO₂ 慢性暴露によるエタン生成増加の再現性を確かめることと同時に低濃度範囲での量-効果関係を把握するために0.04ppm, 0.12ppmおよび0.4 ppm NO₂ に6カ月、9カ月および18カ月間連続暴露し、エタン生成の変化を調べた結果を図.13 に示した。図から理解されるようにエタンの生成量は6カ月間暴露の場合には0.4 ppm NO₂ 群で有意な増加を示しただけであったが、9カ月および18カ月間暴露の場合には0.04ppm, 0.12ppm および0.4 ppm NO₂ のすべての暴露群で有意に増加していた。また、このエタンの生成量はNO₂ の暴露濃度につれて増加し、かつNO₂ の暴露期間につれて増加しており、前記の結果と同一傾向を示し再現性が確認された。また、0.04~0.4 ppm NO₂ の間には直線的量-効果関係が存在した。

この実験においては、ラットのNO₂ 暴露中に飼料もNO₂ に暴露され過酸化されているので、この過酸化された飼料を摂取したことによって呼気中エタンが増加したのかもしれないという可能性についても検討した。実験は、NO₂ 暴露チャンバー内のラットが摂取していたものと同じ飼料を同じ期間SPFレベルの清浄飼育室に戻して正常ラットに与えた。この飼料は3~4日ごとに次の飼料と取りかえながら連続18カ月間与えた。この時の飼料の過酸化度(TBA法による)とそれを18カ月間摂取したラットの呼気中エタン生成量を表5に示した。飼料中のTBA値はNO₂ 暴露濃度に依存して増加し、0.4 ppm NO₂ 暴露飼料は約1.5倍に増加していた。しかし呼気中エタンの産生量は、0.4ppm群のみの測定であるが対照群の値と全く変わらなかった。この結果より、飼料はNO₂ 暴露によって確かに過酸化されているが、呼気中エタン生成には全く影響がないことが確認された。

(IV) 考 察

本実験ではNO₂の急性、亜急性および慢性暴露による肺の過酸化脂質産生と酸化障害から生体を防御する抗酸化性防御機構の変化を経時的に検討し、その関連を調べた。その結果、高濃度及び低濃度NO₂暴露による過酸化脂質の増加を呼気中エタンと肺ホモジネートTBA値の測定によって明らかにすることができた。10ppmNO₂急性暴露実験の過酸化脂質はNO₂暴露開始後1日目に一度減少するが、その後2日目以降から増加し始め3~4日目で最高レベルに達し、その後再び初期レベルに戻った。この過酸化脂質の変動は肺の共役ジェン測定によるThomas⁹⁾らの結果と類似している。初期に見られたこの過酸化脂質の減少は、肺の機能的SH基等の直接酸化による生物学的活性の低下によるものと考えられる。また、エタン生成およびTBA値の経時変化はEvans^{20, 21)}が行った2ppmおよび15~17ppmNO₂暴露による肺胞II型細胞の増殖過程ともよく似ている。つまり、NO₂暴露によって初期(0~1日目)にI型細胞が障害を受け、1~3日目でII型細胞の増殖と修復が始まり、その増殖は3日目以降で減少するという結果と類似している。このことから、過酸化脂質の消長はII型細胞の増殖や修復と深い関連があるのかもしれない。

一方、3日目に見られた呼気中エタン分析による過酸化脂質の増加率はTBA反応による肺の過酸化脂質の増加率より若干高く、また初期レベルに対する増加率を経時的に比較するとエタンの増加率曲線の方がTBA値の増加率曲線よりもブロードであった。この増加率の経時変化の違いはその由来が肺によるものか、全身によるものかということの違いであると考えられる。それゆえに、呼気中エタンの増加率からTBA値の増加率を差し引いた差は図中に2点破線で示したように5日目にピークとなり、肺組織以外の組織において脂質過酸化が起こったことを示唆している。

この様な過酸化脂質の変化に対して、抗酸化性防御機構も10ppmNO₂急性暴露によって複雑な変化を示した。防御系酵素活性はGlutathione S-transferaseを除いて、3日目以降では過酸化脂質の変化と対称的であった。過酸化脂質が最高レベルに達すると過酸化脂質を代謝したり生成を抑制する防御系酵素活性が増加し始め、逆に防御系酵素活性が最高レベルに達すると過酸化脂質は対照レベルに戻っていた。これらの酵素活性の増加はNO₂の酸化作用から細胞を保護するための防御性変化であろうと考えられ、NO₂暴露によって形成された過酸化脂質によって誘導された可能性が考えられる。G6PDからGPxに至る抗酸化性防御系酵素活性が増加すると、酸化型グルタチオン(GSSG)を

還元してグルタチオンを補給する能力が増加すると考えられるが抗酸化剤の非タンパク性SHも抗酸化性防御酵素、あるいは非タンパク性SH基とタンパク性SH基との間で形成されたS-S結合を元の基能的SH基に還元するDisulfide reductaseと類似した変化を示した。この結果はSH基の増加が抗酸化性防御系酵素、特にGRやDisulfide reductase活性の増加と関連して、防御系酵素と同様に酸化的障害から細胞を保護するために働くことを示唆している。一方、抗酸化剤のVitaminEはむしろ過酸化脂質の変化と類似していた。VitaminEは体内では合成されないため、この早期における増加は主に肝臓など肺以外の組織から運ばれてきたものと考えられる。それゆえ、VitaminEは脂質過酸化反応を極力最小限にとどめるために動員される重要な早期防御因子の一つであると考えられる。このことは、Dumelinら¹⁸⁾がラットに1ppm O₃を1時間暴露した場合、VitaminE含有食摂取ラットの呼気中ペンタンはむしろ若干低下するのに対して、VitaminE欠乏食ラットの呼気中ペンタンは著しく増加していたという結果からも支持される。

次に、より低濃度長期暴露を行った場合、過酸化脂質量がどのように変化するかを調べ、比較的低濃度のNO₂暴露の場合でも過酸化脂質は有意に増加することを確認した。呼気中エタン測定による過酸化脂質は急性暴露より時期的な遅れはあるがNO₂暴露濃度に依存して1週目で最大となりその後急性暴露の場合と同様に減少し始め、4週目では4ppm群でも対照群との間に有意差は見られなくなった。しかし、その後極めてゆるやかに増加し始め、16週目の4ppm群で再び対照群との間に有意差を示すようになる。また、TBA値も同様の変化を示したが10ppmNO₂暴露の場合とは異なりTBA値が最高レベルに達する時期はエタンのそれより遅れていた。この相違は過酸化脂質の代謝経路におけるエタンとTBA反応性物質の生成経路と代謝の相違によるものと考えられる。すなわち、いったん生成されたエタンはそれ以上代謝されることはない⁸⁰⁾が、TBA反応性物質の本体と考えられるマロンジアルデヒドはアルデヒド脱水素酵素などで更に代謝されるため、組織中に蓄積されるまでに時間を要することによるものと考えられる。一方、NO₂の亜急性暴露による抗酸化性防御系酵素活性等も急性暴露の場合と同様に過酸化脂質が最大になる頃から増加し始め、防御系酵素活性が最大になると過酸化脂質は最低となった。しかし、防御系酵素活性の増加はそれほど長くは持続せず過酸化脂質が再びゆるやかに増加すると対称的にゆるやかに低下する傾向を示した。この結果から、NO₂による酸化的障害に対する防御反応は一時的なものであって、NO₂暴露の長期化につれて抗酸化性防御機構が低下してゆくものであることが明らかとなった。このような過酸化脂質と防御系酵素と

の対照的变化は慢性暴露の場合でも認められ、肺のTBA値がほぼNO₂濃度に依存して増加し、しかも9カ月、18カ月と暴露期間の延長に伴って増加するのに対して、いずれの抗酸化性防御系酵素活性も亜急性暴露実験の4カ月時より9カ月、18カ月と暴露期間が延長するにつれて低下した。9カ月暴露ではG6PD、GR活性が4ppm群でわずかながら有意な増加を示したが、その他の酵素活性は対照群と全く変わりなく、18カ月暴露では過酸化脂質代謝に關与するGPxとGSH S-transferase活性は0.4ppmと4ppm群で³⁾対照群よりも低下していた。Ayazら³⁾もマウスに1ppm NO₂を17カ月間暴露すると、VitaminE欠乏食ラットの肺ではGPx活性が低下することを報告している。また、Mi-⁶⁵⁾yazawaらはメチル化リノール酸の過酸化物を長期間ラットに投与すると肺や心臓の過酸化脂質量が増加し、一方でGPxやGR活性が対照群より有意に低下することを報告している。これらのことから、防御系酵素活性が低下することによって過酸化脂質が増加するものと考えられる。また、肺の防御系酵素活性はI型上皮細胞よりII型上皮細胞の方が高いことが報告されている⁹⁰⁾が竹中らは0.4ppmと4ppm NO₂に9カ月あるいは18カ月間暴露したラットの肺ではI型上皮細胞とII型上皮細胞数の比(II型/I型)が増加することを報告している。この報告から、防御系酵素活性の低下はII型上皮細胞の減少によるものではないことが示唆される。

一方、エタン測定による過酸化脂質は9カ月および18カ月目で0.04ppmを含め、すべてのNO₂暴露群で対照群より有意な増加を示し、かつ明瞭な量-効果關係を示し再現性も認められた。一方、27カ月間暴露の場合には0.04ppm群と0.4ppm群では対照群の約2倍へと有意な増加を示していたが、4ppm群では逆に低下し、対照群との間に有意差は認められなくなった。

以上の結果より4ppm NO₂暴露で得られたエタン測定による過酸化脂質生成と過酸化脂質を代謝するGPx活性に代表される防御系酵素活性の経時変化を図14に模式的に示した。図に示すように防御系酵素活性と過酸化脂質生成の経時変化は極めて対称的である。防御系酵素のGPx活性は1カ月後に最大レベルに達するが、NO₂暴露期間の延長に伴って徐々に低下することを示している。過酸化脂質はGPx活性に先だって増加するが、GPx活性の増加とともに急速に対照レベルに戻る。その後、徐々に増加しNO₂暴露18カ月目には最大レベルに達する。そしてNO₂暴露27カ月目の時点で過酸化脂質は再び対照レベルに近づくことを示している。この4ppm NO₂暴露27カ月目の呼気中エタン量で⁹⁰⁾測定した過酸化脂質の低下は肺の回復を意味するものではないと考えられる。竹中らは

4 ppm NO₂ 暴露27カ月目で肺の線維化が認められたことを報告している。このようなことから呼気中エタン量が低下する原因の一部は肺の線維化による換気量の低下によると考えられる。しかし、4 ppm NO₂ 暴露18カ月目でも竹中らによって肺の線維化が確認されていることから呼気中エタン量の低下は単に肺の線維化による換気量の低下だけでは説明できない。一方、呼気中エタン量で測定した過酸化脂質量の変化(図10)は同時に実験したラットの電子顕微鏡的形態計測による肺胞壁の肥厚化⁹⁰⁾の変化とも極めてよく対応していた。すなわち、NO₂ 暴露9カ月と18カ月目のラットではNO₂ 濃度に依存して平均肺胞壁厚が増加するのに対してNO₂ 暴露27カ月目のラットでは0~0.4 ppmの間ではNO₂ 濃度に依存して増加するが4 ppm NO₂ 暴露27カ月目のラットの平均肺胞壁厚は4 ppm NO₂ 暴露18カ月目のそれより低下していた。このようなことから、過酸化脂質の増加は肺胞壁の肥厚と関連しているものと考えられる。このことはニワトリの培養胚網膜に高濃度酸素を暴露すると胚網膜の肥厚化と肥厚した網膜中に過酸化脂質が著しく増加していたという八木ら¹⁰⁰⁾の報告からも支持される。

一方、鈴木ら⁸⁸⁾は本研究と同じ実験プロジェクトの中でNO₂ を9カ月間暴露した場合、0.4 ppm 群と4 ppm 群のラットの動脈血酸素分圧(PaO₂)が対照群より有意に低下していたことを報告している。このようなNO₂ 暴露による動脈血酸素分圧の低下は、Davidsonら¹³⁾のウサギによる実験やFreemanら²³⁾のラットの実験、あるいはNiedingとWagnerら⁶⁹⁾のヒトでの実験などでも見い出されている。このようなPaO₂の低下は肺胞壁の肥厚化による酸素交換能の低下による可能性が考えられる。Yoshikawaら^{105,106)}は低酸素下で飼育したラットではPaO₂が低下するとともに血清、腹大動脈および脳のTBA反応物質が増加することを報告している。これらの報告から、0.4 ppmと4 ppmのNO₂ を9カ月間暴露したラットでは間接的ではあるが、慢性的に組織への酸素供給が低下しているものと思われる。また、このような慢性的な酸素供給の低下が刺激となって過酸化脂質量が増加するものと考えられる。

以上のような事実から、NO₂ 慢性暴露による肺のTBA反応物質ならびにエタン測定による過酸化脂質の増加は 1) 過酸化脂質代謝系酵素活性の低下、2) 肺胞壁の肥厚化、3) 動脈血酸素分圧の低下、等が複雑に関連して起こっている可能性が考えられる。

なお、NO₂ 暴露による呼気中エタンの変化は必ずしも肺での過酸化脂質の変化を意味するものではなく、体全体の変化を反映しているものと考えべきである。4 ppm NO₂ を9カ月間、0.4あるいは4 ppm NO₂ を18カ月間暴露したラットの肺ではTBA反応性

物質に増加が見られたけれども、肺以外の組織のTBA反応性物質は測定していない。一方、Gelmontら²⁸⁾は呼気中のペンタンが腸内細菌に由来するものであると報告している。そのようなことから、脂質過酸化の指標としての炭化水素が細菌由来の炭化水素である可能性が心配されている。しかし、本実験の結果では呼気中エタンの増加が著しいのに対してペンタンの増加はそれほど大きくはない。さらに、呼気中炭化水素の増加が腸管を經由してきたものに起因するとすれば、NO₂ 暴露によって酸化された飼料を摂取したラットの方がNO₂ に暴露されていない飼料を摂取したラットより呼気中のエタンが増加するものと考えられる。しかし、Specific Pathogen Free(SPF)レベルの清浄飼育室でNO₂ 酸化された飼料を与えたラットの呼気中エタン産生量はNO₂ 酸化を受けていない飼料を摂取したラットのそれと全く異ならなかった(表5)。このような結果からも、呼気中のエタンの増加はNO₂ による過酸化脂質生成によるものであることが示された。

一方、これまでNO₂ による生体影響が見られるのは約0.4 ppm 前後と考えられており、最低でも0.12ppmNO₂ に35日間暴露したラットの肺胞壁の電子顕微鏡的形態計測で異常が観察されたという京野と河合⁵³⁾の報告があるだけで、0.1 ppm 以下のNO₂ 暴露で影響を検出したという報告は全くない。この意味で、今回環境規準値の0.04ppm でも明瞭な過酸化脂質の増加を検出しえたことは注意を要すべきことと考えられる。しかし、0.04ppm のような極めて低濃度のNO₂ 暴露によって検出された変化が健康影響の点でどのような意味を持つかということの評価することは現時点では難しい問題であり、今後の研究に待たなければならない。また、4 ppm NO₂ , 18ヵ月間暴露では肺胞壁の肥厚とともに肺の線維化が起きていることを竹中ら⁹⁰⁾が報告しているが、著者は本実験で肺胞壁の肥厚とともに過酸化脂質が増加することを明らかにした。NO₂ 以外に過酸化脂質を生成し、肺に線維化を起こす因子には除草剤のパラコート、抗癌剤のBleomycin、X線照射、またオキシダントであるオゾン等が上げられ、NO₂ による慢性肺疾患としての肺線維症が肺の過酸化脂質生成と関連している可能性が考えられる。次章ではこの問題について検討を進める。

(V) 小 括

NO₂ の生体影響について過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化について、Wistar 系雄ラットを用いて急性、亜急性および慢性暴露実験を行った。

10ppm NO₂ 2週間暴露では過酸化脂質生成は1日目に減少したがその後3~4日目に対照群の2倍に増加した。しかしその後再び低下し10~14日目には対照レベルに戻った。一方、過酸化脂質による障害から生体を防御するGlutathione peroxidase(GPx), Glutathione reductase (GR), Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD), 6-Phosphogluconate dehydrogenase(6PGD), Superoxide dismutase(SOD), Disulfide reductase (DSR)等の酵素活性と非タンパク性SH量等はNO₂ 暴露初期に低下するが3日目より増加しはじめ、5~7日目にはMaximumレベルに達し14日目までそのレベルを維持し、過酸化脂質生成と対称的な変化を示した。0.4 ppm, 1.2 ppm および 4 ppm NO₂ の4カ月暴露の亜急性実験でも過酸化脂質生成は 10ppmNO₂ 暴露の場合よりは時期的なおくれはあるがNO₂ 濃度に依存して増加し、その後、急性実験の場合と同様に低下するが3~4カ月目にかけて過酸化脂質は再びゆるやかに増加した。一方、防御系酵素活性は1カ月目に最高レベルに達するが、その後ゆるやかに低下して対照レベルに近づく傾向を示し、過酸化脂質生成と対称的な変化を示した。このような過酸化脂質生成と防御系酵素活性の対称的な変化は0.04ppm, 0.4 ppm および 4 ppm NO₂ の慢性暴露実験でも認められた。

慢性実験においては、TBA法による肺の過酸化脂質量がNO₂ 濃度の上昇に伴って増加し、しかも9カ月、18カ月と暴露期間の延長につれて増加するのに対して防御系酵素活性は9カ月、18カ月と暴露期間が延長するにつれて低下した。呼気中エタン測定による過酸化脂質生成は 0.04ppm 9カ月暴露時点からすでに対照群より有意に増加し、その増加はNO₂ 濃度に依存し、かつNO₂ 暴露期間の延長につれて増加していた。しかし、4 ppm 27カ月暴露の場合ではエタン生成はむしろ減少していた。これは肺の回復を意味するものではなく、むしろ肺組織の質的变化を意味するものと考えられ、病理学的検討の結果からもこのことは支持されている。

以上のごとくNO₂ 暴露による過酸化脂質生成と抗酸化性防御系は、経時的に複雑な様式で変化するものであることが明らかとなった。これらの結果から、抗酸化性防御機構はNO₂ 暴露の初期段階で過酸化脂質生成防御に重要な役割を果たすが、これは一時的であり、NO₂ 暴露の長期化につれて抗酸化性防御能も低下し、逆に過酸化脂質生成がしだい

に進行するものであることが明らかとなり、肺疾患はその両方のバランスが恒常性の範囲を越えた時に起こる可能性があるものと思われる

第二章

パラコート (PQ) による肺の線維化過程と過酸化脂質生成について

(I) 緒言

パラコート(1,1-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride または methylviologen, PQ または MV と略す) は1962年に英国ICI社によって開発された除草剤である。PQが除草作用を示すためには分子状酸素が必要であること⁶²⁾ や植物の葉のホモジネートにPQを加えインキュベーションするとTBA反応性物質が蓄積すること¹⁶⁾ から、植物に対するPQの毒性は脂質過酸化反応によるものと考えられている。PQはヒトや動物においても脂質過酸化反応を起こし肺を強く障害し、致命的な進行性呼吸不全を引き起こすことが知られている¹⁶⁾。

PQによる過酸化脂質生成機序に関しては多くの報告がある。Busら⁸⁾ はマウスの肺ミクロソームを嫌氣的条件下でNADPHとCytchrome C reductaseの存在下でPQと共にインキュベーションすると還元型パラコートラジカル体が生成することを認め、このラジカル体が基状態の酸素($^3\text{O}_2$)を一電子還元し、スーパーオキシドラジカル(O_2^-)を生じ、更に O_2^- から一重項酸素($^1\text{O}_2$)が生じ、これによって脂質の過酸化が引き起こされると報告している⁵⁹⁾。しかし、 O_2^- から $^1\text{O}_2$ への変化については否定的な報告もある。一方、Winterbournら⁹⁸⁾ およびYoungmanら¹⁰⁴⁾ は還元型パラコートラジカル体と過酸化水素(H_2O_2)の反応によって生じるヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)によって脂質の過酸化が起こると報告している。また、Nanniら⁶⁸⁾ は還元型パラコート(MV^+)と O_2^- が反応して生ずる MV^+O_2^- やこれらの分解物が脂質の過酸化を引き起こすと報告している。この様に、過酸化脂質生成に至る詳しい機序はいまだ不明な点も多いが、PQの毒性は最終的には脂質過酸化反応によるものではないかと考えられている。事実、Se欠乏飼料を摂取したラットではPQ投与によって死亡率が上昇し、肺のTBA値も上昇するという報告⁷⁴⁾ や、PQと同時にSuperoxide dismutase(SOD)を投与すると肺障害が著しく軽減し、生存時間も延長するという報告²⁾ はPQの毒性が過酸化脂質生成によるものである可能性を示している。また、呼気ガス分析法による過酸化脂質生成に関してもSteffenら⁸⁶⁾ がラットでエタン量の増加を、また、Burkら⁷⁾ もSe欠乏食摂取ラットでのエタン量の増加を報告している。

一方、病理学的にみると、PQ投与により肺胞壁の浮腫、肺胞上皮細胞の破壊、炎症性細胞浸潤、硝子膜形成や肺の線維化等^{85,95)}が観察されている。PQによる肺障害と線維化についてRobertら⁷⁸⁾はPQ投与初期に毛細血管内皮細胞が障害を受け、血管壁を透過したPQが酸素の存在下で肺胞細胞の不飽和脂肪酸を過酸化することによって肺胞細胞を破壊し、その障害の修復過程で線維化が起こると報告している。このようなPQによる肺の線維化の原因としてはコラーゲンの合成と分解のバランス異常が考えられる。コラーゲンの合成に関してみると、ラットにPQを投与すると肺のコラーゲン合成が促進される³¹⁾ことやコラーゲン合成の律速酵素であるProllyhydroxylase活性が増加する³²⁾ことが報告されている。また、Hussainら³⁹⁾はリボフラビン-光照射系を用いたin vitroの実験から、O₂⁻が線維芽細胞のProllyhydroxylase活性を増加させ、これによってコラーゲン合成が促進することを示した。更に彼らはラットの肺切片の培養液にPQを加えるとコラーゲン合成が促進し、この系にSuperoxide dismutase(SOD)を添加するとコラーゲン合成が抑制される⁴⁰⁾ことも報告している。これらの事実から、PQによる肺の線維化は肺内で生じたO₂⁻によってコラーゲン合成が促進することによるものと考えられている。一方、コラーゲンの分解過程に関してはPQ投与によって血清中にコラゲナーゼ阻害活性が増加すると同時に、コラーゲン分解酵素の活性低下も起こることが山本ら⁹⁹⁾によって報告されている。以上のようにPQ投与によって、コラーゲン合成が促進されると共にコラーゲンの分解過程にも異常が生じて肺の線維化が起こるものと考えられている。しかしながら、活性酸素と過酸化脂質は密接に関連する不可分のものでありながら過酸化脂質と線維化の関連性はいまだ明らかにされていない。

一方、著者は低濃度NO₂をラットに長期間暴露した場合、肺の過酸化脂質と抗酸化性防御系とが対称的な変動パターンを示し、暴露期間の延長に伴って防御系酵素活性の低下および過酸化脂質の増加が起こることを明らかにした。また、過酸化脂質が再び増加する⁹⁰⁾時期に肺線維化が起こることも竹中ら⁹⁰⁾が報告している。しかし、NO₂暴露による肺の線維化に関する生化学的機序は現在まだ明らかにされていない。また、NO₂暴露により血清や尿中のヒドロキシプロリン(HOP)量が増加することは報告されているが肺の線維化との関連性は明らかではない。尿中や血清中のHOP量の増加はむしろ肺気腫に起因する^{17,52)}という報告もある。

このようなことから、本実験ではNO₂暴露による肺線維化のメカニズムを明らかにする目的で、肺に過酸化脂質を生成し、かつ短期間で線維化を起こすことができるPQを用

いて実験的に肺線維症を作成し、その発症過程における肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化を調べNO₂ 暴露の場合と比較した。更に、肺線維症の発症過程におけるコラーゲン代謝関連因子の変化を調べ、肺の過酸化脂質生成との関連について検討すると共に肺の線維化に伴って血清や尿中のヒドロキシプロリン量がどのように変化するかを調べた。

〔Ⅱ〕 実験材料及び方法

(1) 動物及びパラコート投与

動物は10週令のJCL:Wistar系雄ラットを用い体重kg当たり10mgのパラコート(PQ, 東京化成製)を滅菌生理食塩水に溶かして週1回、各々連続して1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, および24回腹腔内に投与した。対照群には生理食塩水をPQの場合と同じ回数だけ投与した。また、これと平行してPQを16週目迄投与し、その後投与を中止し24週目迄8週間通常飼育したラットについての実験と、16週目以後10mgのPQと共にSuperoxide dismutase(SOD)を週1回、24週目まで8回投与したラットについての実験も行った。SODは滅菌生理食塩水に溶かして体重kg当たり14,000unitsを尾静脈からPQ投与30分前に投与した。対照群には生理食塩水あるいはSODを尾静脈から、PQ投与のかわりに生理食塩水を腹腔内に投与する30分前に投与した。なお、PQ連続投与実験の各時期の検査に用いたラットの数は特に断らない限り対照群、PQ投与群とも各々6匹ずつであり、SOD投与実験の場合には各々4~5匹ずつであった。

ラットは温度24±2℃、湿度55±10%の条件下で飼育し、室内照明は14時間点燈、10時間消燈とした。また、これらラットには日本クレア製CE-2固形飼料を与え、飲料水は滅菌したものを自由に飲ませた。PQの最終投与1週間後にラットをエーテル深麻酔下で頸動脈より放血屠殺し、減圧下で脱気後窒素を充分バブリングした生理食塩水を右心室より注入し肺が白色になるまで灌流し、その後、肺を摘出し十分に水分を除き試料ビンに入れ窒素ガスで置換密閉後用時まで-80℃に保存した。なお、8週、16週および24週目のPQ投与群の中から2匹を無差別に選択し、その右肺を病理学的形態観察用としてホルマリン固定し、残りの左肺は前述のとうり生理食塩水で灌流し生化学検査に用いた。

(2) 肺ホモジネートの調製

ラットの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、窒素を充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(pH 7.5) を用いた。10%ホモジネートの 200xg遠心上清をTBA 反応性物質および非タンパク性SH量の測定に用い、105,000xg 遠心上清の一部をGlutathione peroxidase(GPx), Glutathione reductase (GR), Glucose-6-phosphatodehydrogenase(G6PD), および6-Phosphogluconate dehydrogenase(6PGD) 活性の測定に用いた。更に 105,000xg上清透析試料をSuperoxide dismutase(SOD) 活性測定に用いた。また、蒸留水で2.5%に調製した粗ホモジネートを肺のヒドロキシプロリン量の測定に用い、1, 2, 4および8週目の肺については 200xg上清中のMonoamine oxidase(MAO) 活性と105,000xg 上清中のコラゲナーゼ阻害因子活性の測定を行った。

(3) 肺の過酸化脂質、抗酸化性酵素活性及び抗酸化性物質量の測定

肺の過酸化脂質量の測定のためのTBA反応、抗酸化性酵素のGPx, GR, G6PD, 6PGD, SOD活性および抗酸化性物質の非タンパク性SH量の測定は第一章に示した方法に従って行った。

(4) コラーゲン代謝関連因子の測定

コラーゲン代謝関連因子として肺および血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性、血清中のPZ-peptidase 活性(コラゲナーゼ様活性)、肺、血清および尿中のヒドロキシプロリン(HOP)量、肺のMAO活性を測定した。

a) コラゲナーゼ阻害因子活性の測定

肺及び血清中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 VII) を用い山本らの方法⁹⁹⁾に従って行った。反応はコラーゲン50mgに0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.1) 2.35mlを加え37℃ 5分間インキュベーションした後、50ulの血清あるいは肺の 105,000xg上清50ulを加え、その後16units のコラゲナーゼ(100ul) 加えて全量2.5 mlとして37℃で反応を開始した。反応開始15分後に6%のTCA溶液を2.5 ml加え反応を停止させた。さらに、30分後にWhatman No.1ろ紙で沈澱物をろ過し、得られたろ液40ulに0.5 Mホウ酸緩衝液(pH 8.0) を4 ml加え、さらにFluorescamine溶液1 ml (Sigma社製 Fluorescamine30mgをアセトン 100mlに溶解) を加えて素速く30秒間混和し、励起波長 405nm, 蛍光波長 475nmで蛍光強度を測定した。コラゲナーゼ阻害因子活性はコラゲナーゼのみを添加した場合の値(V) とコラゲナーゼ

および試料を添加した場合の値 (v) から、 $V - v/V =$ 阻害率として現した。

B) P Z-peptidase 活性 (コラゲナーゼ様活性) の測定

血清中の P Z-peptidase 活性は P Z-peptide (Sigma社製) を用いる Griesらの方法³²⁾ に従って測定した。すなわち 0.5mM P Z-peptide 溶液 1ml (0.406mg P Z peptide /ml 0.05M トリス塩酸緩衝液 pH 7.2) に血清 0.5 ml を加え、25℃ 2 時間インキュベーションした後、10% (W/V) クエン酸溶液 (pH 3.0) 0.5 ml を加え反応を停止させた。その後 2.5 ml のベンゼンを加えて 30 秒間振盪し、3000 回転 10 分間遠心分離した後、ベンゼン層の 440nm での吸光度を測定した。また、P Z-peptide 溶液にあらかじめ 10% クエン酸溶液を加えて血清を添加したものを、それぞれの対照とした。なお、標準として Sigma 社製 Type VII コラゲナーゼを用いた。

c) 肺、血清および尿中のヒドロキシプロリン量の測定

肺のヒドロキシプロリン量の測定には前処置として 2.5% の肺ホモジネートを調製し、その 4 ml をネジ口付試験管に移し、12N 塩酸 4 ml を加え電気オープンにて 110℃ 24 時間加水分解した。血清は蒸留水で 2 倍希釈し、尿は 4 倍希釈した試料のそれぞれ 2 ml をネジ口付試験管に入れ、これに 12N 塩酸 2 ml を加え電気オープンにて 110℃ 18 時間加水分解を行った。血清と尿の試料には冷却後、蒸留水 4 ml を加えた。これらの試料にあらかじめ 6 N 塩酸で洗浄乾燥させた活性炭 (Norit-SX II, Norit社製) 約 500mg を加え、30 分間振盪してから遠心で活性炭を沈殿させ、その上清を得た。肺の上清は 6 倍希釈し、血清と尿はそのまの上清試料を各々 2 ml 取り、メチルレッド (和光純薬製) を指示薬として NaOH で中和し、蒸留水で 10ml にメスアップした。この各試料 1 ml を用いて Bergman らの方法⁴⁾ に従ってヒドロキシプロリンを定量した。また、尿中のクレアチニン量は Jaffe らの方法⁴³⁾ に従ってジェムサック自動分析装置にて測定し、松木らの報告⁵⁸⁾ に従って尿中ヒドロキシプロリン:クレアチニン (HOP/Cre) 比を算出した。Monoamine oxidase 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。蛋白質は牛血清アルブミンを標準として Lowry らの方法⁵⁵⁾ によって測定した。

(5) 肺の形態学的検索

ラットの右肺を 10% の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 ~ 5 μ の薄切標本を作製し、Hematoxylin — Eosin (HE) 染色あるいはアザン染色を施

し鏡検した。

(6) 動脈血 pHa, Pa CO₂ 及び Pa O₂ の測定

PQ投与24週目のラットとPQを16週間迄投与し、その後投与を中止し、24週目迄無処置通常飼育したラットの pHa, Pa CO₂ および Pa O₂ をCorning社製モデル 168 コーニング自動 pH/血液ガス分析装置を用いて測定した。

(Ⅲ) 結果

1 体重の変化

体重kg当たり10mgのP Qを週1回連続24回反復投与したラットとP Qを16週目迄投与し、その後投与を中止し24週目迄無処置通常飼育したラットおよび対照ラットの体重変化を図15に示した。

P Q投与群の体重は対照群より増加率が徐々に低下し、12週目では対照群より8%程度低下した。12週目以後P Q投与群ではほとんど体重増加を示さず、16週目ではP Q投与群の体重は対照群より13%、20週目では17%低く、最終投与の24週目では対照群の体重が $597 \pm 32g$ であったのに対してP Q投与群では $472 \pm 39g$ となり、P Q投与群の体重は対照群より21%も低下した。またこの実験中、P Q投与群に7週目と16週目でそれぞれ1匹の死亡例が認められ、死亡したラットの体重はそれぞれ対照群より33%も低下していた。また、P Qを16回投与し、その後投与を中止し24週目迄飼育したラットの体重は17週目から19週目迄ではP Q連続投与群とほぼ同様の体重を示していたが20週目以降P Q連続投与群よりわずかに増加する傾向を示した。

2 肺の光学顕微鏡的所見

P Q投与開始8週目、16週目および24週目の肺について病理組織学的検査を行った結果、P Q投与8週間目の肺では円形核細胞を主とする炎症性細胞浸潤と肺胞壁の肥厚が見られた(図16)。一部には細胞分裂を伴う肺胞壁細胞のBronchiolizationが観察され(図17)、加えて同部位には明らかな線維増殖が認められた(図18,19)。

P Q投与16週目および24週目の肺では線維化、炎症性細胞の著名な浸潤及び肺胞腔の消失を主とする巣状の病変、すなわち肺胞構造の崩壊が認められた(図20,21,22,23)。

3 生化学的变化

3.1 肺の過酸化脂質と抗酸化性防御系の変化

TBA反応による肺の過酸化脂質量と非タンパク性SH量の経時的变化を図24に示した。なお、図中の値は各時期の対照値(100)に対する百分率で示した。肺の過酸化脂質はP Q投与2週~4週目で対照群より約40%程度増加した。その後、6週目から対照レベルに近付きはじめ、8週目から12週目には完全に対照レベルに戻った。その後、16週目から24週目にかけて再び急速に増加し、24週目では対照群の約2.1倍に増加していた。このように

PQ投与の場合でもNO₂ 暴露の場合と同様に、肺の過酸化脂質量は一方向性の変化ではなく、一度増加したあと一旦対照レベルに戻り再び増加するものであることが示された。肺の非タンパク性SH基濃度は6週目から急速に増加し8週目で最大レベルに達し、対照群の1.88倍に相当した。その後、12週目から24週目では対照群より22%程度のわずかな増加にとどまった。この肺の非タンパク性SH量の経時変化はNO₂ 暴露の場合と同様に肺の過酸化脂質量の変化と極めて対称的であった。

次に、NADPHを供給する主な酵素であるGlucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) と6-Phosphogluconate dehydrogenase(6PGD) 活性の経時変化を図25に示した。また図24に示した非タンパク性SH量の経時変化も図中に挿入した。G6PDおよび6PGD活性も非タンパク性SH量と類似した経時変化を示し、かつ肺の過酸化脂質とは対称的な経時変化を示した。このような非タンパク性SH量やG6PDおよび6PGD活性の増加は過酸化脂質生成抑制のための防御性変化と考えられ、NO₂ 暴露の場合と同様、過酸化脂質の2度目のゆるやかな増加につれて低下してゆくものであることが明らかとなった。

次に、Glutathione peroxidase(GPx), Glutathione reductase (GR), およびSuperoxide dismutase(SOD) 活性の経時変化を図26に示した。GPx, GRおよびSOD活性は6PGDやG6PDに見られたような大きな変化は示さなかった。GR活性はPQ投与開始2週目で対照群より19%増加したが、4週目から6週目で若干低下し、8週目から24週目迄は対照群より9~10%増加する程度であった。SOD活性は2週目頃からわずかに増加しはじめ4週目で対照群より13%増加したが6週~8週目にかけて若干低下し、その後12週~24週目迄は11~14%程度の増加を示した。わずかではあるが、このようなSOD活性の増加からPQ投与によってスーパーオキシド・ラジカル(O₂⁻)の発生が裏づけられる。また、その経時変化は肺の過酸化脂質量の経時変化と類似している。このような結果からO₂⁻が関与した脂質過酸化反応がおこることが示唆される。過酸化脂質を代謝するGPx活性は2週、6週および16週目ではほぼ対照群と同じレベルであり、4週、8週、12週および24週目ではむしろ対照群より5~14%低下していた。また、これら抗酸化性防御成分の8週目で見られた対照群に対する増加率の順序は抗酸化性物質である非タンパク性SH量が最も高く、続いて防御系酵素の6PGD>G6PD>SOD>GPxの順であった。この結果から過酸化脂質の生成抑制に対してはGPxの寄与よりも非タンパク性SHや6PGD, G6PDなどが効果的に働いているものと考えられる。

次にP Qを16回投与し、その後投与を中止し、24週目迄飼育したラットの肺のTBA反応による過酸化脂質量と抗酸化性防御成分の結果を表6に示した。16週目以後P Q投与を中止した群の肺の過酸化脂質量は対照群の約1.5倍に相当していたが、P Q連続投与群の2.1倍よりは明らかに低く、P Q投与中止によって過酸化脂質生成が低下することが示された。一方、P Q投与中止群の非タンパク性SH量は対照群とほとんど変わらず、防御系酵素活性に至っては対照群より低下し、6PGDとGPx活性は有意に低下していた。また、SOD活性も対照群とほとんど変わらないことからP Q投与中止によってO₂⁻の生成はあまり起こっていないものと思われる。

3.2 コラーゲン代謝関連因子の変化

3.2.1 肺組織中のヒドロキシプロリン量

肺組織中のg湿重量当たりのヒドロキシプロリン量の経時変化を図27に示した。対照群のヒドロキシプロリン量は1週目から24週目迄ラットの成長に伴って増加し、1週目には $3.00 \pm 0.21 \text{ mg/g}$ であったが24週目では $4.43 \pm 0.58 \text{ mg/g}$ となり1週目の値より47%増加していた。P Q投与群のヒドロキシプロリン量はP Q投与開始後、1、2週目で対照群よりそれぞれ10%と7%程度低下したが4週目以降では対照群より増加し、16週目では対照群より30%、24週目では45%も増加した。なお、16週目以降P Q投与を中止した群の24週目のヒドロキシプロリン量は対照群より34%の増加にとどまり、P Q投与中止によってヒドロキシプロリン量、すなわちコラーゲン量の増加率が低下することが示された。また、16週目、24週目の肝臓と腎臓のg湿重量当たりのヒドロキシプロリン量も測定したが、肺で見られたような有意な変化は認められなかった。以上のことより、肺のコラーゲン含量はP Q投与初期に若干低下するがP Q投与期間の延長に伴って徐々に増加する。しかし、肝臓や腎臓ではP Q投与24週目でもコラーゲン含量は変わらなかった。

3.2.2 尿中のヒドロキシプロリン：クレアチニン比 (HOP/Cre, HOP比)

実験開始後、1週、2週および4週目以降は2週間おきに採尿したHOP比の経時変化を図28に示した。対照群のHOP比はラットの成長に伴って徐々に低下し、実験開始時(10週令時)にはその比が85であったが、24週目(34週令時)では14.2へと低下していた。P Q投与群では投与後の1週目で対照群より21%、2週目では25%と有意に増加していたが、4週目以後24週目までは対照群より低下し、24週目では対照群より48%も低下してい

た。また、16週目でP Q投与を中止した群のH O P比は対照レベルより徐々に増加し、24週目では対照群より有意に増加していた。この結果からH O P比が増加していた1～2週目ではコラーゲンの分解が亢進し、H O P比が低下した4週目以後ではコラーゲン分解が低下していると考えられる。また、P Qの投与中止によってH O P比が増加することから逆にコラーゲンの異化が亢進することが示唆される。図29には肺の過酸化脂質量、コラーゲン含量および尿中H O P比の経時変化をまとめて示した。図に示すごとく肺のコラーゲン含量と尿中H O P比は比較対称的な変化を示している。この結果は尿中H O P比が増加しコラーゲン分解が促進している1～2週目では肺のコラーゲン含量が低下することを示し、逆に、尿中H O P比が低下しコラーゲン分解が低下する4週目以後では肺のコラーゲン含量が増加することを示している。また、肺の過酸化脂質量の4週目のピークを境に尿中H O P比が低下し、肺のコラーゲン量が増加している。また、4週目以後では肺の過酸化脂質量と尿中H O P比は対称的な変化を示している。この結果は肺の過酸化脂質の増加がコラーゲン分解と密接に関連していることを示唆しているものと思われる。

3.2.3 血清中ヒドロキシプロリン量とP Z-peptidase 活性 (コラゲナーゼ様活性)

肺のコラーゲン量と尿中のH O P比の関連をより詳しく知るためにその中間に位置する血清中のH O P量とコラゲナーゼ様活性の変化を調べ、その1～8週目の経時変化を図30に示した。P Q投与群の血清中H O P量は1週目で対照群より8%増加し、2週目では19%の有意な増加を示した。しかし、4週目以後では逆に対照群より低下しはじめ、8週目では12%の有意な低下を示した。この血清H O P量の変化は尿中H O P比の経時変化と極めて類似しており、尿中H O P比は血清H O P量をよく反映している。

次に、P Q投与群の血清コラゲナーゼ様活性 (P Z-peptidase 活性) は1週目で対照群より8%、2週目で19%増加したが、4週目では逆に対照群より29%、8週目では38%低下し、その変化は血清H O P量や尿中H O P比の1～8週目迄の経時変化とよく対応していた。さらに血清中のH O P量やコラゲナーゼ様活性の1～2週目の増加と4週目以降の低下は図27の肺のコラーゲン含量の経時変化と逆のパターンを示している。これらの結果から、1～2週目ではコラゲナーゼ様活性が高まりコラーゲン分解が促進され血清中H O P量が増加し、4週目以後ではコラゲナーゼ様活性が低下しコラーゲン分解が低下することによって血清中H O P量が低下していることが示唆される。

3.2.4 血清及び肺組織中のコラゲナーゼ阻害因子活性

血清および肺組織中のコラゲナーゼ阻害因子活性の1～8週目の経時変化を図31に示した。PQ投与群の血清コラゲナーゼ阻害因子活性は1, 2週目で対照群よりそれぞれ18%, 24%と低下したが, 4, 8週目では逆に対照群よりそれぞれ30%, 50%増加した。また, PQ投与群の肺のコラゲナーゼ阻害因子活性も1週目では対照群より24%, 2週目では32%とそれぞれ有意に低下した。一方, 4週目から8週目には血清と同様にそれぞれ10%と19%増加した。また, これら血清と肺組織中のコラゲナーゼ阻害因子活性は図26に示した肺のコラーゲン含量と同調した経時変化を示し, 血清中HOP量, 尿中HOP比および血清中のコラゲナーゼ様活性とは対称的な経時変化を示していた。これらの結果は肺や血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性が低下する1, 2週目では肺のコラゲナーゼ様活性が高まりコラーゲン分解が亢進し, 血清HOP量や尿HOP比が増加することを示し, 逆に肺や血清中のコラゲナーゼ阻害活性が増加する4, 8週目では肺のコラゲナーゼ様活性が低下しコラーゲン分解が抑制され, 血清HOP量や尿HOP比が低下することを示している。また, 肺や血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性が増加している時期には肺のコラーゲン含量も増加することを示している。

図32に1～8週目の肺のコラゲナーゼ阻害因子活性と血清HOP量との相関を示した。両者の間には有意な負の相関 ($r = -0.565, P < 0.001$) が認められ, 肺のコラゲナーゼ阻害因子活性が低いものほど血清HOP量が高く, 逆に肺のコラゲナーゼ阻害因子活性が高いものほど血清HOP量が低い値を示している。このように肺のコラゲナーゼ阻害因子活性によって血清HOP量が変動することから, 血清HOP量は肺のコラーゲン分解がよく反映されていることが示された。

図33には1, 2週目の肺のTB A値と肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の相関を示した。両者の間にも有意な負の相関 ($r = -0.557, P < 0.05$) が認められ, 肺の過酸化脂質量が高いものほど肺のコラゲナーゼ阻害因子活性が低く, 逆に肺の過酸化脂質量が低いものほどコラゲナーゼ阻害因子活性が高い値を示し, 過酸化脂質が肺のコラゲナーゼ阻害因子の活性に影響を及ぼしていることを示唆している。

3.2.5 肺のMonoamine oxidase (MAO) 活性

コラーゲンの架橋にあずかると考えられている肺のMAO活性の1～8週目の経時変化を図34に示した。PQ投与群の肺のMAO活性は1週目より増加しはじめ, 2週目以後で

は有意な増加が認められ、8週目では対照群より35%増加していた。

3.2.6 Superoxide dismutase(SOD) 投与実験における肺のSOD活性と肺組織中ヒドロキシプロリン量

PQ単独投与群とPQ投与に先だってSODを投与したラットの24週目の肺のSOD活性とヒドロキシプロリン量を指標とした肺のコラーゲン含量を図35に示した。PQ+SOD群あるいはPQ単独投与群のSOD活性あるいはコラーゲン含量は対照群(Saline + Saline 群)や(Saline + SOD群)より有意に増加している。また、Saline + Saline 群、Saline + SOD群、PQ+SOD群およびPQ単独投与群の4群の間のSOD活性とコラーゲン含量の間には有意な正の相関($r = 0.618, P < 0.01$)が成立することから、スーパーオキシド・ラジカル(O_2^-)によって肺のコラーゲン合成が促進されていることが間接的に支持される。なお、ここで検出されたSOD活性は尾静脈投与したSODによるものでないことはSaline + SOD群のSOD活性が、Saline + Saline 群より低く、かつPQ+SOD群のSOD活性がPQ単独投与群の値より低いことなどから明らかである。また、SOD活性はPQによって誘導されていることも明瞭に示された。

4 動脈血 pHa, PaCO₂ 及びPaO₂

PQを連続24回投与した群と16週目でPQ投与を中止した群の24週目の動脈血 pHa, PaCO₂ およびPaO₂ の測定結果を表7に示した。PQ連続投与群と16週目以後PQ投与中止群のpHaは対照群とほぼ同じ値を示した。PaCO₂もPQ連続投与群では対照群よりわずかに低下した程度であり、16週目以後PQ投与を中止した群でも11%の増加を示した程度でいずれも対照群との間に有意差は認められなかった。一方、PaO₂はPQ連続投与群で対照群より14%低下し、有意差が認められた。このようなPaO₂の低下は肺での換気に支障が起きていることを示唆している。16週目以後PQ投与を中止した群では5%程度の低下にとどまり、対照群との間に有意差は認められなくなった。

(IV) 考 察

本章ではパラコート (PQ) を用いてラットに実験的肺線維症を作成し、その発症過程における肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化を調べ、NO₂ 暴露の場合と比較した。その結果、PQはその化学的性質はおろか、肺に到達する経路もNO₂ とは全く異なるが、肺線維症発症過程で肺に生じる過酸化脂質と防御系酵素活性の経時変化はNO₂ 暴露の場合と極めて類似したパターンを示した。

TBA法で測定した肺の過酸化脂質量はPQ投与開始後、2～4週目にかけて増加するが、この増加は一方向性のものではなく8～12週目にかけて一旦対照レベルに戻る。しかし、その後16～24週目にかけて再び過酸化脂質量は増加する。このような過酸化脂質の経時変化に対して抗酸化性物質の非タンパク性SH量やNADPH供給系酵素の6PGDやG6PDなどの活性は8週目で最大となり、特に非タンパク性SH量の増加が顕著であった。PQ投与によってこれら肺の非タンパク性SH量や6PGD、G6PD活性が特に著しいことは、Omayeら⁷⁴⁾のSe欠乏ラットに体重kg当たり25mgのPQを投与した実験でも認められている。またBusら⁷⁵⁾もラットに100ppmのPQを3週間飲水させると肺のNADPH供給系酵素のG6PDやGSSGからGSHへの還元を触媒するGR活性が著しく増加したことを報告している。

一方、本実験のGR活性はPQ投与期間中わずかに増加した程度であり、GPx活性にいたってはほとんど増加せず、むしろ低下傾向を示した。SOD活性もPQ投与期間中わずかに増加した程度であったが、この経時的変化は肺の過酸化脂質量の経時変化と類似していることから、PQ投与によってO₂⁻が生成され、このO₂⁻が関与して脂質過酸化反応が起こったことが推測される。

Williamら⁷⁷⁾はオートラジオグラフを用いてマウスの体内のPQ存在量を測定し、PQは静脈内投与3時間後にはそのほとんどが消失するが肺と腎では24時間を経過してもなお若干残存していることを報告し、またSharpら⁸⁴⁾はPQの排泄は早く3～4日でその85～100%が体外に排泄されることを報告している。これらの報告から本実験ではPQ投与後一週間目のラットについて検討を行っていることから、投与したPQはほとんど生体内から消失しているものと考えられる。それゆえに、本実験で見られた肺の過酸化脂質量の一連の増加はPQそれ自身によるのではなくPQ投与によって肺で生じたO₂⁻が関与するフリーラジカル反応が引金となって連鎖的に脂質過酸化反応が起こって、さらにPQを反復投与することによってフリーラジカル反応が一層促進され、肺組織に過酸化脂質が蓄積

してゆくためと考えられる。

一方、このようにして生じた過酸化脂質を代謝するGPx 活性の増加が認められないにもかかわらず2週目、4週目に増加した過酸化脂質は8~12週目にかけて対照レベルに戻った。このことは特にGPx 活性が増加しなくとも非タンパク性SH（主にGSH）やNADPH供給が増加すれば過酸化脂質の増加を抑制しうることを示しているものと思われる。しかし、16週目以後には非タンパク性SHや6PGD、G6PD活性が低下するため再び肺組織中に過酸化脂質が増加すると考えられる。このようなことから低濃度のPQ反復投与による肺の過酸化脂質生成抑制に対してはGPx よりも、非タンパク性SH量や6PGD、G6PD活性の増加によるNADPHの増加が効果的に作用していることが示唆される。このようにPQを投与した場合でもNO₂ 暴露の場合と同様に初期の過酸化脂質生成によって抗酸化性防御系が誘導され、その生成抑制に重要な役割を果たすが、これは一時的なものであり、長期のPQ反復投与によって過酸化脂質生成の抑制作用は打ち負かされるものであることが明らかとなった。

本研究では更に、PQによる肺線維症発症過程におけるコラーゲン代謝関連因子の経時変化を調べ、肺の過酸化脂質生成とこれら因子の関連について検討するとともに肺の線維化に伴って尿や血清中のヒドロキシプロリン量がどのように変化するかを調べた。

PQによる肺線維症の発症過程において、PQ投与1~2週目に血清HOP量や尿HOP比が増加し、この時肺のコラーゲン含量は低下するが、その後肺のコラーゲン含量が増加する4週目以後では血清HOP量や尿HOP比は逆に低下した。また、8、16および24週目とPQ投与期間の延長に伴って肺の線維化は進展した。

コラーゲンの分解はコラゲナーゼとコラゲナーゼ阻害因子のバランスによって調節されているが、本実験で見られた血清HOP量や尿HOP比の増加や低下は両者のバランスの変化によって起こっているものと考えられる。プロテアーゼ阻害因子として知られる α_1 -antitrypsin や α_2 -macroglobulin は組織中ではコラゲナーゼと結合してコラゲナーゼ活性を阻害している。⁸³⁾ α_1 -antitrypsin は肝で合成され、血清中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は血清中に増加し、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はじめとする様々なプロテアーゼを阻害し組織破壊を防止していると言われている。⁷⁰⁾ ⁷⁹⁾山本らは高濃度(40mg/kg 体重)のPQをラットに投与すると血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性が増加し6日目には対照群より76.4%も増加し、一方でコラゲナーゼ様活性は逆に低下することを報告している。

本実験では血清および肺のコラゲナーゼ阻害因子活性について検討を加えた結果、山本らの報告とは異なりPQ投与1, 2週目で肺および血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性は低下し、4週目以後では逆に増加するという2相性の変化を示した。本実験で測定したコラゲナーゼ阻害因子には α_1 -antitrypsin と α_2 -macroglobulin が含まれているものと思われるが、Carp¹⁰⁾らはin vitroの実験から α_1 -antitrypsin が O_2 や H_2O_2 あるいはヒドロキシラジカル($\cdot OH$)などの活性酸素によって不活性化されることを報告している。本実験でも肺のコラゲナーゼ阻害因子活性が低下した時期に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($r = -0.565, P < 0.05$)が認められたが、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性が低下する時期は肺の過酸化脂質量が増加する時期より1~2週間早いことから、1~2週目のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下は過酸化脂質によると考えるよりは、むしろPQ投与初期に生じる活性酸素によって α_1 -antitrypsin などが不活性化されることによって起こると考える方が妥当であろう。このような活性酸素による α_1 -antitrypsin の不活性化の機序としてJohnson⁴⁵⁾らは α_1 -antitrypsin に含まれるメチオニン残基のチオエステルの酸化によるものと報告している。一方、4週目以後の血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性の急速な増加はPQ投与によって肺が障害され炎症が起こりプロテアーゼ活性が増加するため肝臓でのコラゲナーゼ阻害因子合成が盛んになり肺組織に運ばれるためと考えられる。肺のコラゲナーゼ阻害因子活性は血清ほど増加しない。その原因は肺で増加したプロテアーゼがコラゲナーゼ阻害因子と結合しコンプレックスを作ったり⁸³⁾、あるいはPQによって生成された活性酸素などによって肺のコラゲナーゼ阻害因子が不活性化されるためと考えられる。また、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増加する4週目から認められることから、肺の過酸化脂質が増加し肺が障害されることによって、血清中にコラゲナーゼ阻害因子が輸送されてくる可能性は否定できない。このようなコラゲナーゼ阻害因子活性の経時変化から、PQ投与初期の血清HOP量および尿HOP比の増加は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ことによって起こるものと考えられる。また、それによって初期には肺のコラーゲン含量が低下するものと考えられる。肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下による肺のコラーゲン分解の促進事実は肺のコラゲナーゼ阻害因子活性と血清HOP量との間いだに有意な負の相関が認められた結果からも支持される。一方、4週目以後の血清HOP量や尿HOP比の低下は肺および血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の増加によってコラーゲン分解が抑制されたことによると考えられる。しか

かし、このようなコラーゲン分解の抑制とともに、肺のコラーゲン合成が促進している場合には当然肺のコラーゲン含量は増加するものと考えられる。PQ投与ラットの肺ではコラーゲンの生合成が促進すること³¹⁾や、PQ投与によって生じるO₂⁻がコラーゲン合成を高めることはすでに報告されている⁴⁰⁾が、本実験でも肺のSOD活性の増加からO₂⁻の発生が裏づけられた。また、SODを投与した実験では肺のコラーゲン含量とSOD活性との間に正の相関 ($r = 0.618, P < 0.01$) が認められた。この結果は間接的ではあるが肺のコラーゲン合成がO₂⁻によって促進されていることを示唆するものと思われる。また、O₂⁻によるコラーゲン合成は肺が障害されその修復過程でコラーゲンの合成にあずかる線維芽細胞の増殖が盛んになる時期から促進されるのであろう。

一方、コラーゲンの分解によって尿中に排泄されるヒドロキシプロリンの多くは可溶性コラーゲンに由来すること⁷¹⁾から、コラーゲンの分解がコラゲナーゼ阻害因子活性の増加によって抑制された場合には合成された可溶性コラーゲンは当然肺組織中に蓄積するものと考えられる。本実験で、可溶性コラーゲンの架橋にあずかるMonoamine oxidase活性を測定したところ、2週～8週目にかけて有意に増加していた。この結果から、PQ投与後はすべての期間においてコラーゲンの架橋形成が促進しているものと考えられる。このようなことから、肺のコラーゲン含量の増加ならびに線維化は i) コラーゲン分解の抑制、ii) コラーゲン合成の促進、iii) コラーゲンの架橋形成促進等によって起こったものと考えられる。

一方、Yoshikawa^{105,106)}らは低酸素下で飼育したラットではPa O₂の低下と共に血清、腹大動脈および脳で過酸化脂質量が増加することを報告している。また、低酸素下において起こる動脈硬化組織には過酸化脂質の増加とともにコラーゲンや酸性ムコ多糖が増加することも報告されている^{29,77)}。Chvapil¹²⁾らの報告によれば局所の低酸素症は線維芽細胞のコラーゲンとムコ多糖の産生を促進し、リゾチームの非コラーゲン蛋白(コラーゲン分解酵素を含む)の合成を抑制するという。また炎症やうっ血がある場合には局所の低酸素症の結果、過剰の線維形成が起こるといふ。本実験結果でも24週目の動脈血酸素分圧(Pa O₂)の低下から間接的ではあるが組織への酸素供給が低下していることが推測される。また、このような酸素供給の低下が刺激となって肺のコラーゲン合成が促進されると共に肺の過酸化脂質が増加するものと考えられる。

以上のようにPQによる肺の線維化過程では初期に肺のコラーゲン含量が低下し、その低下は肺の過酸化脂質生成に関与する活性酸素などによって肺に存在するコラゲナーゼ阻害

因子が不活性化されて肺のコラーゲン分解が促進して起こり、それによって血清HOP量や尿HOP比が増加するが、その後、コラゲナーゼ阻害因子活性の急速な増加によってコラーゲン分解が逆に抑制され血清HOP量や尿HOP比が低下し、その延長線上で肺の線維化が起こることが明らかとなった。

一方、コラゲナーゼやエラスターゼを阻害する血清 α_1 -antitrypsin 活性の低下は肺^{17,51)}気腫とも関連していることが報告されている。⁴⁴⁾ Janoff らはNO₂と同じオキシダントであるオゾン(O₃)やタバコの煙を暴露したラットの肺では α_1 -antitrypsinのエラスターゼ阻害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、Carp¹⁰⁾ らは in vitro の実験から α_1 -antitrypsin が種々の活性酸素によって不活性化されることから、オキシダントによる α_1 -antitrypsin 活性の低下はメチオニン残基のスルフォキシド化($\text{>S}\rightarrow\text{O}$)反応に基づくものであることを示唆^{25,37)}している。NO₂ 暴露によっても肺気腫が起こることは数多く報告されている⁴⁹⁾がKleinerman らはハムスターに 30ppmのNO₂を21日間暴露すると肺のコラーゲン含量が低下することを報告し、また、Drozd¹⁷⁾ らも 1 ppm のNO₂を 180日間暴露したモルモットの肺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、彼らは肺のコラーゲン含量の低下あるいは血清や尿のヒドロキシプロリン量の増加が肺気腫に起因することを示唆している。これらの報告は本実験のPQ投与初期の変化と類似している。それ故、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起こるものかについては次章で検討を進める。

(V) 小 括

Wistar 系ラットにkg体重当たり10mgのパラコート (P Q) を週1回連続24回腹腔内投与し、実験的に肺線維症を作成し、その発症過程における肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化をしらべ、NO₂ 暴露の場合と比較した。さらに、コラーゲン代謝関連因子の変化を経時的に調べ、肺の過酸化脂質生成との関連について検討した。

T B A法によって測定した肺の過酸化脂質量はP Q投与開始後、2～4週目にかけて増加し、その後8～12週目にかけて一旦対照レベルに戻るが16～24週目にかけてふたたび増加し、24週目には対照群の約2.1倍に増加した。一方、抗酸化性物質の非タンパク性S H量や、防御系酵素の6-Phosphogluconate dehydrogenase(6 P G D), Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G 6 P D) 等の酵素活性は8週目をピークとして増加した。しかし、12～24週目にかけて徐々に低下しその経時変化は肺の過酸化脂質量の変化と極めて対称的であった。これらの結果から、P Qを投与した場合でもNO₂ 暴露の場合と同様に、抗酸化性防御機構は初期の段階で過酸化脂質生成防御に重要な役割を果たすが、P Q投与の延長に伴って、抗酸化性防御能が徐々に低下し、逆に過酸化脂質が再びゆるやかに増加するものであることが明らかとなった。

一方、血清中ヒドロキシプロリン (H O P) 量や尿中H O P比はP Q投与開始後1～2週目に増加したが、4週目以後では対照レベルより低い値を示した。これに対して肺のコラーゲン含量は1～2週目に低下し、4週目以後では逆に増加し24週目では対照群の1.45倍に増加した。肺および血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性は1～2週目に低下したが、肺の過酸化脂質量が最大に達する4週目以後で急速に増加した。これとは対称的に血清中のコラゲナーゼ様活性は1～2週目に増加し、4週目以後では低下した。また、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性と血清H O P量の間には有意な負の相関 ($r = -0.565, P < 0.001$) が認められ、血清H O P量の変化は肺でのコラーゲン分解を反映したものであることが示唆された。またコラゲナーゼ阻害因子活性が低下する1～2週目で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 ($r = -0.557, P < 0.05$) が認められた。コラーゲンの架橋にあずかるMonoamine oxidase活性は1週目から増加した。また、S O D活性の増加からO₂の発生が間接的に示唆され、コラーゲン合成が促進していることが推察された。肺の病理学的検索では8、16および24週目とP Q投与の延長に従って線維化の進展が認められ、24週目には動脈血酸素分圧 (P a O₂) も低下した。これらの結果から、P Qによる肺の線維化過程では初期に肺のコラーゲン含量が低下し、その低下は

肺の過酸化脂質生成に関与する活性酵素によって肺に存在するコラゲナーゼ阻害因子が不活性化されて肺でのコラーゲン分解が促進して起こり、血清HOP量や尿HOP比が増加する。その後、過酸化脂質の増加に伴って肺が障害されると血清中にコラゲナーゼ阻害因子活性が増加し、それに伴って肺でも増加し、結果的に肺でのコラーゲン分解を抑制して血清HOP量や尿HOP比が低下し、その延長線上でコラーゲン合成とコラーゲンの架橋の促進につれて肺の線維化が起こるものであることが明らかとなった。

第三章

二酸化窒素の急性及び慢性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

(I) 緒言

NO₂ 暴露によって肺の線維化が起こることは数多く報告されている。Freeman²⁶⁾らは25 ppm NO₂ に40日間暴露したラットについて、Stephans⁸⁶⁾らは17ppm NO₂ に90日間暴露したラットについて肺の線維化を認めている。低濃度ではFreeman²⁴⁾らが0.8ppm NO₂ に約2年間暴露したラットの肺に、また、Hattori³⁵⁾らは0.5 ppm NO₂ に6カ月間暴露したマウスの肺に線維化を認めている。また、竹中⁹⁰⁾らも4 ppm NO₂ に18カ月および27カ月間暴露したラットの肺に線維化を認めている。一方、著者は肺の線維化に先だって肺の過酸化脂質と抗酸化性防御系が対照的な変動パターンを示し、暴露期間の延長に伴って防御酵素活性の低下と過酸化脂質の増加が起こることを見いだした(第一章)。さらに、著者はNO₂ による肺線維化のメカニズムを解明する手段としてパラコート(PQ)を用いてラットに実験的に肺線維症を作成し、コラーゲン代謝関連因子について調べた(第二章)。その結果、肺線維症発症過程のごく初期において血清中のヒドロキシプロリン(HOP)量や尿のHOP比が増加し、この時肺のコラーゲン含量は低下するが、その後肺のコラーゲン含量は増加しだし、血清中のHOP量や尿のHOP比が逆に低下することを見いだした。初期の血清HOP量や尿のHOP比の増加は肺のコラゲナーゼ阻害因子がPQによって生じた活性酵素によって不活性化され、肺のコラーゲン分解が促進されることによって起こる。その後の血清HOP量や尿HOP比の低下は肺の過酸化脂質の増加に伴って肺が障害されることによってコラゲナーゼ阻害因子が肝臓で合成され、血清を介して肺に到達し、結果的に肺のコラーゲン分解を抑制することによって起こり、肺の線維化はその延長線上で起こるものであることを明らかにした。

一方、NO₂ 暴露によってコラーゲン代謝に異常が起こることも数多く報告されている。Orthoefer⁷⁵⁾らは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、Hacker³³⁾らは5ppmのNO₂を12時間暴露した後のラットの肺の可溶性コラーゲンと不溶性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-プロリン取り込み量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。一方、これとは逆にKleinerman⁴⁹⁾らはハムスター（シリアン系）に30ppmの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、Drozdz¹⁷⁾らも1ppm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、Kosmidor⁵²⁾やKucharz⁵¹⁾らも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泄量が増加することを報告し、Kleinermanら以下の研究者は肺のコラーゲン含量の低下や血清、尿中のヒドロキシプロリン量の増加が肺結合組織や肺胞細胞の損傷、すなわち肺気腫に起因することを示唆している。このように生化学的には、NO₂が肺のコラーゲン合成を促進するという報告がある一方で、肺のコラーゲン含量の低下を引き起こすという相反する報告も数多くみられる。このようなことから、現在のところNO₂による肺の線維化が生化学的にどのような経過を経て起こり、それがどのようなメカニズムで起こっているのかは明らかではない。

一方、大気汚染物質の健康影響に関する疫学的研究において松木⁵⁸⁾らは喫煙者や自動車排ガス汚染地域住民あるいは非排気型ストーブ使用家庭の学童等では尿中ヒドロキシプロリン：クレアチニン比（HOP比）が増加することを報告している。また、柳沢^{102, 103)}らはフィルターバッチを用いて測定したNO₂の暴露量と尿中HOP比との間に有意な正の相関が認められることを報告している。これらの結果は、尿のHOP比が大気汚染物質の生体影響を研究する上で極めてすぐれた指標であることを示している。しかし現在、NO₂吸入によって尿のHOP比が増加する機序は明らかではない。尿HOP比増加の生化学的機序の解明はNO₂等の大気汚染物質の生体影響指標としての有用性を評価する上で極めて重要である。

本実験ではNO₂の急性暴露実験と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、パラコート投与によって得られた結果と比較し、肺線維化に対するNO₂の作用を検討することを試みるとともに、現在疫学的研究で注目されている尿中HOP比の増加する機序を明らかにすることを試みた。

〔Ⅱ〕 実験材料及び方法

2.1 動物及びNO₂の暴露方法

急性実験では10週令のJCL:Wistar系雄ラットを10ppmNO₂にそれぞれ1, 2, 3, 4, 7, 10および14日間連続暴露した。なお、ここで用いた暴露チャンバーは第一章の実験に用いたものとは別で容積その他はほとんど慢性用チャンバーに近い高性能チャンバーである。また、慢性実験では8週令のJCL:Wistar系雄ラットを0.4, 1.2および4ppmのNO₂に連続18カ月間暴露した。NO₂暴露および動物の飼育は第一章に述べた条件で行った。なお、急性実験のラットの数は特に断らないかぎり対照群、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。

2.2 肺の摘出方法及び肺ホモジネートの調製

NO₂暴露終了後、ラットをエーテル麻酔下で放血屠殺し、左肺をコラーゲン含量測定用として摘出し肺湿重量測定後、電気オープンに入れ95℃2日間放置後に乾燥重量を測定した。右肺は右心室より生理食塩水を注入して灌流後に摘出し、テフロン・ガラスホモジナイザーにより窒素気流下で磨砕し、10%ホモジネートに調製した。このホモジネートを200xg5分間遠心分離し、得られた上清をTBA反応物質量とMonoamine oxidase(MAO)活性の測定に用いた。残りの上清は12,000xg, 10分間遠心分離し、さらにその上清を105,000xg, 60分間遠心分離をした。この上清の一部をPZ-peptidase活性(コラゲナーゼ様活性)およびコラゲナーゼ阻害因子活性の測定に用いた。残りの上清は0.1mMEDTAを含む50mMNa, K-リン酸緩衝液(pH7.5)で20時間透析(2回交換)後、Superoxide dismutase(SOD)活性の測定に用いた。

2.3 肺の過酸化脂質量, SOD活性の測定

肺の過酸化脂質はTBA法を用い、SOD活性の測定とともに第一章に述べた方法に従った。

2.4 コラーゲン代謝関連因子の測定法

肺のMAO活性とコラゲナーゼ阻害因子活性の測定は第二章に述べた方法に従った。肺のPZ-peptidase活性の測定は105,000xg上清の300ulを用いて、第二章で示した血清

中の P Z-peptidase 活性測定法に従った。また、肺のヒドロキシプロリン量の測定は肺の乾燥試料を乳鉢中で粉碎し、その試料の50mgを、ネジロ試験管に移し、4mlの蒸留水と12N塩酸を4ml加え、電気オープンにて120℃、24時間加水分解した。その後は第二章に述べた方法に従った。また、コラーゲン代謝関連因子としての血清ヒドロキシプロリン量、コラゲナーゼ阻害因子活性および P Z-peptidase 活性と尿のヒドロキシプロリン：クレアチニン比（HOP比）は、第二章に述べた方法に従って測定した。なお、急性実験の尿HOP比の測定はNO₂ 暴露14日目の尿について行った。

2.5 肺の形態学的検索

肺の形態学的検索は急性実験のNO₂ 暴露7日目と14日目のラットについて各々3匹づつを調べた。肺を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、4~5uの薄切標本を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色あるいはアザン染色を施し鏡検した。

2.6 肺の湿重量と肺含水量

肺湿重量は体重あたりの左肺の湿重量であらわし、肺含水量は屠殺直後の肺湿重量と95℃2日間放置後の乾燥重量から求め、湿重量あたりの水分含量であらわした。

(Ⅲ) 結果

1. 急性暴露実験

1.1 肺湿重量と肺含水量

10ppm のNO₂ に2週間連続暴露したラットの体重あたりの左肺の湿重量比と左肺の含水量の経時変化を図36に示した。なお、図中の値は各時期の対照値(100)に対する百分率で示した。NO₂ 暴露ラットの体重あたりの左肺の湿重量比は1日目では対照群と変わりなかったが2日目では対照群より14%、4日目では23%増加し、その後も若干増加し10日目では28%増加した。しかし、14日目では14%程度のレベルまで低下した。NO₂ 暴露2日目以後の肺湿重量比はすべて対照群との間で有意差を示した。左肺の含水量は1日目から14日目まで対照群と変わりなかった。この結果からNO₂ 暴露による肺湿重量の増加は肺の水分以外の成分の増加によることが示唆される。

1.2 肺の光学顕微鏡的所見

NO₂ 暴露7日目では細気管支接合部から肺泡道にかけて浮腫性の壁肥厚と軽度の膠原線維の増生が見られ、また、肺泡道に隣接した肺泡壁にも軽度の壁肥厚が見られた(図37, 38, 39, 40)。しかし、肺泡構築はよく保たれ肺気腫性の変化は見られなかった。NO₂ 暴露14日目では7日目より壁肥厚は軽度であった(図41, 42)。

1.3 生化学的变化

1.3.1 肺のコラーゲン含量と血清中のヒドロキシプロリン量

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のヒドロキシプロリン(HOP)量の経時変化を図45に示した。肺のコラーゲン含量はNO₂ 暴露1日目では若干低下したあと2日目から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日目のレベルを維持していたが14日目では低下し、対照群の6%増加にとどまった。また、図46に示すごとく肺のコラーゲン含量と肺湿重量比との間には有意な正の相関($r = 0.526, P < 0.001$)が認められた。この結果から肺湿重量の増加の一部はコラーゲン成分の増加によるものであることは明らかである。

血清中のHOP量はNO₂ 暴露1日目に対照群より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日目から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日目では再び対照群より8%程度低下したが有意差も認められ

た。また、図に示すごとく血清HOP量は肺のHOP量で示したコラーゲン含量とほぼ平行した経時変化を示し、また、図47に示すごとく両者の間には有意な正の相関 ($r = 0.324$, $P < 0.01$) が認められた。この結果は血清HOP量の増加が肺のコラーゲン含量の増加によるものであることを反映している。

1.3.2 尿中ヒドロキシプロリン：クレアチニン比 (HOP比)

対照群とNO₂ 暴露群の14日目の尿中HOP比を表8に示した。なお、対照群の試料には病理用の対照として用いた2匹のラットの結果もこれに加えたため試料数 (n) は8である。対照群では尿のHOP比が 107.4 ± 11.3 であったのに対してNO₂ 暴露群ではその比が 88.6 ± 3.4 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14日目で血清HOP量が対照群より有意に低下していたのと同様であった。

1.3.3 肺および血清中のPZ-peptidase 活性の変化

肺および血清中のPZ-peptidase 活性 (コラゲナーゼ様活性) の経時変化を図48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日目では対照群より若干低下し、4日目では対照群より9%、7日目では14%と増加した。しかし、10日目では7日目より若干低下し、対照群の10%増にとどまり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 活性の経時変化と血清HOP量の経時変化は類似しており、また、図49に示すごとく3日目~14日目の肺のPZ-peptidase 活性と血清HOP量との間には有意な正の相関 ($r = 0.389$, $P < 0.05$) が認められた。これらの結果から、肺のPZ-peptidase 活性が増加する時期には肺のコラーゲン分解が促進し、その分解産物であるヒドロキシプロリンが血清中に増加するものと考えられる。

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日目には対照群より17%低下し、このレベルは14日目まで持続していた。このように、血清中のPZ-peptidase 活性は肺のPZ-peptidase 活性とは極めて対称的な経時変化を示していた。

1.3.4 肺及び血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の変化

肺および血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の経時変化を図50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26%も低下した。その後、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。この血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性は血清中のコラゲナーゼ様活性とほぼ対称的な変化を示していた。また、肺およ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日目から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 (図51)。これらの結果から、1日目から4日目の血清コラゲナーゼ阻害因子活性の低下は肺のコラゲナーゼ阻害因子の低下によって起こったものと思われる。一方、4日目以後の血清コラゲナーゼ阻害因子活性の急速な増加は4~10日目で増加した肺のコラゲナーゼをはじめとする様々なプロテアーゼによって肺組織が分解ささるのを防ぐ為に肝臓でその合成が盛んとなって血清中に輸送されてきたことによるとと思われる。

1.3.5 肺のMonoamine oxidase (MAO) 活性の変化

肺のMAO活性の経時変化を図52に示した。肺のMAO活性はNO₂ 暴露1日目から増加し4日目では対照群より27%、7日目から14日目にかけては対照群より26~34%増加した。なお、NO₂ 暴露群のMAO活性は1~2日目を除き対照群との間に有意差を示した。

1.3.6 肺のSuperoxide dismutase(SOD) 活性と過酸化脂質量及び肺と血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の相関

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53に示した。肺のSOD活性はNO₂ 暴露3日目で対照群より10%の有意な低下を示したが4日目には対照レベルに近づく傾向を示した。その後、7日目から10日目にかけて対照群とあまりかわりなかったが、14日目には対照群より14%増加し、有意差を示した。

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日目から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日目から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。この結果は第一章 図2に示した結果よりピークに達する時間が遅れるのとピークの

高さも少し低く、大きなストレスの少ないチャンバーを用いたことにより影響が若干mildになっているようである。なお、図54に示すごとく1日目から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有意な負の相関 ($r = -0.585, P < 0.001$) が認められた。また、この時期では図55に示すごとく肺のTBA値と血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性との間にも有意な負の相関 ($r = -0.402, P < 0.05$) が認められた。これらの結果から、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下は肺の過酸化脂質生成に関与するフリーラジカルや活性酸素等によって肺のコラゲナーゼ阻害因子が不活性化されることによると考えられる。また、血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下は肺での不活性化によるものと思われる。さらに、1日目から4日目には図56に示すごとく肺のTBA値とMAO活性との間に正の相関 ($r = 0.528, P < 0.001$) が認められた。

2. 慢性暴露実験

2.1 肺湿重量と肺含水量

0.4 ppm, 1.2 ppm および 4 ppm NO₂ に18カ月間暴露したラットの体重あたりの肺湿重量比を図57のA) に示した。体重あたりの肺湿重量比は0.4 ppm および 1.2 ppm 群では対照群よりそれぞれ5%と8%低下していたが、4 ppm 群では対照群より18%も増加していた。しかし、有意差は認められなかった。肺含水量は 10ppmNO₂ 暴露実験と同様0.4, 1.2 および 4 ppm 群とも対照群と変わりなかった。これらの結果から、4 ppm 群の肺湿重量の増加は肺の水分以外の成分であることが示唆される。

2.2 生化学的変化

2.2.1 肺のコラーゲン含量

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ラットの体重に差があるため、体重あたりの左肺のヒドロキシプロリン量比によって求めた。その結果を図57のB) に示した。左肺のヒドロキシプロリン量比は0.4 ppm 群では対照群と変わりなかったが、1.2 ppm 群では対照群より6%低下し、4 ppm 群では逆に対照群より15%増加していた。しかし、いづれも有意差は認められなかった。また、4 ppm 群でコラーゲン含量の増加が見られたことは竹中ら⁸⁶⁾のNO₂ 18カ月暴露の4 ppm 群で線維化が見られたという病理学的結果と一致している。このことから、4 ppm NO₂ 18カ月暴露群の肺湿重量の増加の一部はコラーゲン成分の増加によるものと考えられる。

2.2.2 血清中のヒドロキシプロリン (HOP) 量と尿中ヒドロキシプロリン：クレアチニン比 (HOP比)

図58のA) に血清HOP量を, B) に尿のHOP比を示した。血清HOP量は0.4 ppm 群では対照群より11%低下していたが有意差は認められず, また, 1.2 ppm 群と4 ppm 群では対照群と変わりなかった。

尿のHOP比は0.4, 1.2および4 ppm 群とも対照群よりそれぞれ6%, 5%および14%低下していた。しかし, いずれの有意差は認められなかった。このようにNO₂ 18カ月暴露では血清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。

2.2.3 肺及び血清中のPZ-peptidase 活性 (コラゲナーゼ様活性)

図59のA) に肺のPZ-peptidase 活性を, B) に血清中のPZ-peptidase 活性を示した。肺のPZ-peptidase 活性も尿HOP比と同様0.4, 1.2および4 ppm 群とも対照群よりそれぞれ6%, 24%および23%低下し, 1.2 ppm 群と4 ppm 群は対照群との間に有意差が認められた。この結果から肺のコラゲナーゼ様活性の低下によって肺のコラーゲン分解が低下し尿HOP比が低下するものと考えられる。

血清中のPZ-peptidase 活性は0.4 ppm 群では対照群より12%低下していたが, 1.2 ppm 群と4 ppm 群では対照群よりそれぞれ12%と36%増加し, 4 ppm 群には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。

2.2.4 肺及び血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性

図60のA) に肺のコラゲナーゼ阻害因子活性を, B) に血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性を示した。肺のコラゲナーゼ阻害因子活性は0.4, 1.2および4 ppm 群とも対照群よりそれぞれ13%, 11%および30%増加した。最も増加していたのは4 ppm 群であるが有意差は認められなかった。

血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性も肺と同じように0.4, 1.2および4 ppm 群とも対照群よりそれぞれ22%, 26%および26%増加していたがいずれも有意差は認められなかった。しかし, このようなコラゲナーゼ阻害因子活性の肺や血清中での増加によってコラー

ゲンの分解速度が低下し、尿HOP比が低下するものと考えられる。

2.2.5 肺のMonoamine oxidase (MAO) 活性と肺の過酸化脂質量

図61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 および 4 ppm 群の肺のMAO活性は対照群よりそれぞれ8%, 20%および23%とNO₂ の暴露濃度に依存して増加し、1.2 ppm および 4 ppm 群には対照群との間に有意差が認められた。

0.4, 1.2 および 4 ppm 群の肺の過酸化脂質量は対照群よりそれぞれ12%, 23%および28%と増加し、肺のMAO活性と同じように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。また肺のMAO活性と過酸化脂質量の間には正の相関 ($r = 0.5564$, $P < 0.001$) が認められた。

(IV) 考 察

本研究ではNO₂の急性および慢性暴露によるラットの肺、血清および尿中のコラーゲン代謝関連因子の変化について調べ、肺の線維化との関連について検討した。その結果、NO₂暴露によって最終的にコラーゲン代謝の低下が起こり、その結果肺の線維化に進むものであることが明らかとなった。

10ppm NO₂暴露ラットの肺湿重量比は暴露2日目以後に増加したが、肺の水分含量は14日目まで対照群と変わりなかった。この結果から、NO₂暴露による肺湿重量の増加成分は水分以外のものであることが示唆される。この増加した成分の一部はコラーゲンであることが明らかとなった。肺のコラーゲン含量は1日目で対照群より若干低下したあと、2日目から4日目にかけて急速に増加し、4日目にはプラトーに達した。この値は10日まで持続するが14日目では10日目のレベルより低下していた(図45)。

NO₂暴露によってコラーゲン合成律速酵素であるProlyl hydroxylase活性が上昇することはOrthoeferら⁷⁵⁾によって報告されているが、Hussainら³⁹⁾はNO₂と同様に肺の線維化を起こすオゾン(O₃)をラットに0.2ppmから0.8ppmの濃度で暴露すると、肺のProlyl hydroxylase活性が高濃度オゾンの場合の方が速く上昇し、しかも低濃度の場合より高くなるが、その後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、NO₂暴露初期ではProlyl hydroxylase活性が上昇し、肺のコラーゲン合成が促進していることが推測されるが、コラーゲン含量が低下する14日目頃ではコラーゲン合成は低下しているものと推察される。一方、スーパーオキシド・ラジカル(O₂⁻)がProlyl hydroxylase活性を高めコラーゲン合成を促進することはすでに報告されている^{39, 40)}が、本実験のNO₂暴露の場合では図45と図53に示すようにコラーゲン含量が増加した7~10日目頃にはSOD活性が若干増加しているが、14日目のようにSOD活性が有意に増加しているのにコラーゲン含量は7~10日目の値より低下している時期もあり、O₂⁻の間接指標であるSOD活性とコラーゲン合成の間の関連を明確に説明することはできなかった。

肺の過酸化脂質生成との関連でみると、肺のコラーゲン含量が急速に増加した1~4日目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(図56)。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かの理由でMAOが活性化されコラーゲンの架橋を促進していることが示唆される。また、過酸化脂質が最も高く増加が見られた7日目では気管支接合部、肺胞道および肺胞壁の肥厚が認められ、肺のコラーゲン含量にも増加が見られる

こと、さらに、過酸化脂質量が低下した14日目では肺胞壁の肥厚が軽度となり、肺のコラーゲン含量も低下することから、7日目の肥厚した組織中には過酸化脂質とコラーゲンが増加しているものと思われる。

肺のコラゲナーゼ様活性は肺のコラーゲン含量 (図45) が最大レベルに増加した4~10日目にかけて対照群より増加していた。この時、血清HOP量も増加したが14日目にはコラゲナーゼ様活性は対照群より低下し、この時には血清HOP量と共に尿HOP比も対照群より低下した。また、この肺のコラゲナーゼ様活性と血清HOP量との間に正の相関 ($r = 0.389, P < 0.05$) が認められた。これらの結果から、肺でのコラーゲン合成と分解が共に促進する、即ちコラーゲンの代謝回転の亢進によって血清HOP量が増加するものと示唆された。一方、コラーゲンの分解によって血清や尿中に排泄されるヒドロキシプロリンの多くは可溶性コラーゲンに由来することから、肺に線維化が認められ血清HOP量が増加した7日目頃には、肺には可溶性コラーゲンと不可溶性コラーゲンが共に増加しているものと考えられる。しかし、血清HOP量が低下した14日目頃では肺の可溶性コラーゲンの分解が進んでしまい、不溶性コラーゲンが残存しているものとも考えられる。病理学的に見られた肺胞壁肥厚の低下は、可溶性コラーゲンの分解が進んだためと考えられる。

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。Kenley ら⁴²⁾ はNO₂ 暴露によって生成される peroxy radicalが更にNO₂ と反応してperoxynitrate を形成する ($ROO \cdot + NO_2 \rightleftharpoons ROONO_2$) ことを報告している。Peroxy radicalは不飽和脂肪酸と反応して過酸化脂質を生成する⁶³⁾ が、最近Pryorらは⁷⁶⁾ in vitro の実験からコラゲナーゼやエラスターゼ活性を阻害する α_1 -antitrypsin が Tert-butyl peroxynitrate によって不活性化されることを報告している。本実験では1~4日目に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 ($r = -0.585, P < 0.001$) が認められた。これはNO₂ 暴露により肺で peroxy radicalが関与した過酸化脂質生成、およびperoxy radical からperoxynitrate が形成され、これによってコラゲナーゼ阻害因子が不活性化されている可能性を示唆している。従って、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下はNO₂ 暴露によってperoxynitrate が生成されてコラゲナーゼ阻害因子を不活性化しているためのもと考えられよう。また、血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下は、1~4日目の肺と血清のコラゲナーゼ阻害因子活性との間に有意な正の相関 ($r = 0.525, P < 0.001$) が認められていること、さらに、1~4日目の血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性と肺の過酸化脂質量との間にも有意な負の相関 ($r =$

-0.402, $P < 0.05$) が認められていることなどから、肺でコラゲナーゼ阻害因子がperoxy nitrate のようなものによって消耗されることにより起こるのであろう。このようなNO₂ 暴露初期のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下はP Q投与初期の場合と類似している。しかし、P Q投与の場合と異なる点はコラゲナーゼ阻害因子活性が低下しても血清中のHOP量は増加せず、むしろ1日～3日では低下傾向を示したことである。また、肺のコラーゲン含量もこの時期にはP Qの場合のように低下せず、むしろ急速に増加する傾向を示した。これらの結果は、NO₂ 暴露初期にコラゲナーゼ阻害因子活性が低下してもコラーゲン分解は促進しないことを示している。コラーゲン分解が促進しない理由としてはこの時期に肺のコラゲナーゼ阻害因子が低下すると同時に肺のコラゲナーゼ活性も低下してしまうか、あるいはこの程度のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下ではコラーゲンの分解が促進しないものとも考えられる。

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、これに伴って肺のコラゲナーゼ阻害因子活性も増加した。Kleinerman⁵⁰⁾らは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活性の増加は肺のプロテアーゼ活性を調節していることを示唆している。本実験でも4日目にはすでに肺のコラゲナーゼ様活性が対照群より増加していた。また、肺の過酸化脂質が最大レベルに達する直後から血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性が急速に増加するのはP Qの場合と一致している。このようなことから、血清中のコラゲナーゼ阻害因子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、あるいはプロテアーゼ活性を調節する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ものと考えられる。NO₂ 暴露14日目頃では、このような血清中のコラゲナーゼ阻害因子の増加に伴った肺のコラゲナーゼ阻害因子の増加によって肺のコラゲナーゼ様活性が低下するものと考えられる。

以上、10ppm NO₂ 暴露では肺の過酸化脂質生成を一つの引きがねとして肺のコラーゲン合成が促進し、コラーゲン含量の増加と同時にコラーゲンの架橋が促進して肺の線維化が起こり、また、肺胞道や肺胞壁は肥厚する。この時、肺のコラーゲン分解も促進して血清中のHOP量も増加する。その後、肺のコラーゲン分解が進み最終的に肺の線維化が認められる時期には壁肥厚は軽度となり、また、肺の過酸化脂質量、コラーゲン含量は低下

する。しかし、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の分解能が低下し、血清のHOP量や尿HOP比が低下する。このような一連の過程をへて肺の線維化が起こるものであることが明らかとなった。

一方、0.4、1.2および4 ppm NO₂ 18カ月暴露では肺湿重量は4 ppm 群のみで増加していたが、水分含量はいずれの場合も対照群と変わりなかった。4 ppm 群の肺湿重量の増加は肺の水分以外の成分の増加によるものと考えられるが、体重補正したコラーゲン含量に増加が見られたのは4 ppm 群のみであった。この結果から、その増加成分の一部はコラーゲン成分によるものと考えられる。この結果は竹中ら⁹⁰⁾の行ったNO₂ 18カ月間の慢性暴露実験で4 ppm 群のラットの肺のみで線維化が認められたという病理学的な所見とも一致する。

一方、血清HOP量や尿HOP比は増加することはない、むしろ尿HOP比はNO₂ 暴露濃度の上昇につれて低下する傾向を示した。この尿HOP比の低下の原因は、血清や肺のコラゲナーゼ阻害因子活性がほぼNO₂ 濃度に依存して増加していること、また、逆に肺のコラゲナーゼ様活性がNO₂ 濃度に依存して低下していることなどから、肺のコラーゲンの分解速度が低下していることによるものと考えられる。

コラゲナーゼ阻害因子活性増加の原因については肺の過酸化脂質の増加に伴って肺に障害が起こり、炎症が起こることによって増加するコラゲナーゼやプロテアーゼによる肺組織の分解を防ぐために肝臓でその合成が盛んとなって血清中に放出されていることによるものと考えられる。また、0.4、および1.2 ppm 群でもコラゲナーゼ阻害因子活性に増加が見られるが、肺のコラーゲン量は増加していない。この原因として、この濃度のNO₂ 暴露ではコラーゲン合成はあまり促進していないことによるのかもしれない。竹中ら⁹⁰⁾も0.4 ppm NO₂ 18カ月暴露では肺の線維化は認めていない。また、彼ら⁹⁰⁾は4 ppm NO₂ 27カ月暴露ラットの肺では18カ月暴露に比較して線維化が更に進行していることを報告している。このような結果から、4 ppm NO₂ 暴露群では18カ月暴露以後でも肺のコラーゲン合成が促進している可能性が推察される。

笠原ら⁴⁷⁾はラットに0.3 ppm、0.5 ppm および1 ppm NO₂ を30日、60日および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速く起こることを報告している。本実験の10 ppm NO₂ 急性暴露でも血清HOP量や尿HOP比は暴露14日目にすでに低下している。このようなことから、本実験

の0.4, 1.2および4 ppm NO₂ 18カ月暴露の時点で尿HOP比が対照群より低下しているが、それ以前に血清HOP量や尿HOP比が一旦増加し、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⁹⁰⁾は4 ppm NO₂ 9カ月暴露の時点では肺の線維化を認めていない。このようなことから、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。また、肺のコラーゲン合成は肺の過酸化脂質生成と同じように暴露初期に高まり一旦は終息するが、NO₂ 暴露の長期化につれて再び合成が高まるものと考えられよう。そして、4 ppm 群ではコラーゲン合成の促進と、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、更にコラゲナーゼ阻害因子の増加とコラゲナーゼ活性の低下によるコラーゲン分解速度が低下することによって、PQとの場合と同様に肺の線維化へ進展するものと考えられる。

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比が増加すること^{58,102,103)}が報告されており、この尿中HOP比の増加機序の解明は大気汚染物質の生体影響指標としての有用性を評価する上で極めて重要と考えられる。

本実験結果から尿HOP比の増加機序を考えると、その増加は肺のコラーゲン合成と分解が共に促進することによると考えられる。また、慢性的に低濃度NO₂ に暴露された場合には過酸化脂質が増加して障害が起こり、コラゲナーゼ阻害因子活性が誘導されコラーゲン分解が抑制されて肺の線維化が起こる可能性は否定できない。従って肺の線維化の点からみるとむしろHOP比が低下している事例の方が注意をはらうべきなのかもしれない。一方、尿HOP比の増加は肺気腫発症の要因であるコラゲナーゼ阻害因子活性が低下し続けた場合にも起こりうると考えられる。従って疫学的研究においても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が、コラゲナーゼ阻害因子活性がある大気汚染物質の比較的長期間の吸入によって増加したり、低下したりする原因を実験的にも解明することができれば尿中HOP比の増加の意味をより正確に理解しうるものと考えられる。今後はより多くの汚染物質の複合影響や実験動物の種差などの点からさらに詳しく研究を進める予定である。

(V) 小 括

NO₂ 急性および慢性暴露実験を行い、ラットのコラーゲン代謝関連因子について、肺の線維化との関連で検討した。

10ppm NO₂ 2週間暴露では肺の過酸化脂質量は4～7日目にかけて対照群の1.8倍に増加した。その後低下し、14日目には対照レベルに近づいた。肺の総コラーゲン含量は2日～4日目にかけて急速に増加し、4日目には対照群の1.12倍に増加した。この値は10日目迄持続するが、14日目では10日目のレベルより低下した。肺のPZ-peptidase 活性（コラゲナーゼ様活性）は肺のコラーゲン含量が最も増加した4日～10日目にかけて増加し、この時血清中ヒドロキシプロリン（HOP）量も増加していた。その後、14日目にはコラゲナーゼ様活性は対照群より低下し、この時には血清HOP量や尿HOP比も低下した。また、肺のコラゲナーゼ様活性と血清中HOP量との間に有意な正の相関（ $r = 0.389$ $P < 0.05$ ）が認められたことから、肺のコラゲナーゼ様活性の増加によって肺でのコラーゲン分解が促進し、血清中HOP量が増加することが示唆された。一方、肺および血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性は1日～4日目にかけて低下したが、肺の過酸化脂質量が最高レベルに達した直後の7日目から14日目には対照群より増加しその変化はPQ投与実験の場合と類似していた。また、コラゲナーゼ阻害因子活性が低下した1日～4日目ではPQ投与実験の場合と同じように肺の過酸化脂質量と肺のコラゲナーゼ阻害因子活性との間に有意な負の相関（ $r = -0.585$ $P < 0.001$ ）が認められた。しかし、この時期には、肺のコラーゲン含量の低下や血清HOP量の増加は起こらずPQの場合と異なった結果が得られた。肺のMonoamine oxidase活性は1日目から増加しコラーゲンの架橋が促進していることが示唆された。病理学的検索では7日、14日目と肺胞道に軽度の線維化が認められたが、肺胞道、肺胞壁肥厚は7日目より14日目の方が軽度であった。10ppm NO₂ 暴露実験ではみかけ上、肺の過酸化脂質の増加に伴って肺のコラーゲン合成が促進し、コラーゲン含量が増加する。同じにコラーゲンの架橋が促進し肺の線維化が起こり、また、肺胞道や肺胞壁は肥厚する。この時、肺のコラーゲン分解も促進して血清中のHOP量も増加する。その後コラーゲン分解が進み最終的に肺の線維化が認められる14日目頃には壁肥厚は軽度となり、また、肺の過酸化脂質量、コラーゲン含量も低下する。しかし、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、コラーゲンの分解能が低下し、血清中のHOP量や尿中HOP比が低下する。このような一連の過程をへて肺の線維化が起こるものであることが明らかとなった。

0.4, 1.2 および 4 ppm NO₂ 18カ月暴露実験では 4 ppm 群のみで体重補正した肺のコラーゲン含量が増加した。血清HOP量と、尿HOP比はNO₂ 濃度に依存し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 濃度に依存して増加し、肺のコラゲナーゼ様活性は1.2 および 4 ppm 群で有意に低下した。肺のMAO活性および過酸化脂質量はNO₂ 濃度に依存して増加した。

これらの結果から、肺の過酸化脂質が増加するNO₂ 暴露18カ月目では、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 4 ppm 群ではコラーゲン含量は有意に増加していた。この結果は竹中ら⁹⁰⁾が報告した 4 ppm NO₂ 暴露18カ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な結果とも一致している。また、肺の過酸化脂質生成は肺の障害を引き起こし、肝臓でのコラゲナーゼ阻害因子の合成を促進し、血液を介して肺に増加するものと推測された。

総括ならびに結論

二酸化窒素 (NO_2) は工場のボイラーや自動車のエンジンなどすべての燃焼過程において、窒素と酸素との反応によって生じる一般的な大気汚染物質である。特に大都市部ではその濃度が比較的高いため健康への影響が心配されている。従って、 NO_2 の生体影響を解明することは生活環境に関する予防医学の基礎を確立するためにも極めて重要である。

NO_2 は酸化性が強く、呼吸器の深部にまで進入して生体成分と反応し、様々な病理学的障害を引き起こす。組織の細胞膜を形成している脂質の過酸化は細胞障害や多くの毒性発現の原因と見なされている。このため NO_2 の毒性の一部は脂質の過酸化と関連しているのではないかと考えられている。事実、 NO_2 暴露によって肺で脂質過酸化反応が起こることはThomas らにより1968年に初めて報告された。しかし、その後多くの研究者が NO_2 暴露による過酸化脂質の検出を試みたが成功しなかった。

一方、 NO_2 暴露によって肺の線維化が起こることは多く報告されている。最近、脂質の過酸化に関与する活性酸素がコラーゲン代謝に異常を起こすことが明らかにされつつあるが、 NO_2 による肺の線維化が生化学的にどのような過程をへて起こるのかは明らかではない。

本研究は NO_2 の生体影響解明の一環として、 NO_2 暴露によって脂質過酸化反応が起こるかどうかを明らかにし、更に脂質過酸化反応と抗酸化性防御機構との関連性を明らかにするとともに、肺の線維化に対する NO_2 の作用を肺線維症のモデル実験を含めて、脂質過酸化とコラーゲン代謝の面から検討した。

第一章では NO_2 の急性、亜急性および慢性暴露によるラットの肺およびWhole body の過酸化脂質産生と酸化的障害から生体を防御する肺の抗酸化性防御機構の変化を経時的に検討し、両者の関連性を調べた。その結果、高濃度および低濃度の NO_2 暴露による過酸化脂質の増加を呼気中エタンと肺ホモジネート中のThiobarbituric acid (TBA) 反応性物質量の測定によって明らかにすることができた。また、慢性暴露条件下での過酸化脂質生成は NO_2 濃度に依存して増加し、更に NO_2 の暴露期間に依存して増加することが明らかとなった。また、過酸化脂質生成と抗酸化性防御機構は経時的に複雑な様式で変化するものであることが明らかとなった。

10ppm NO_2 2週間暴露実験では過酸化脂質生成は1日目に減少し、その後急速に増加し、3～4日目で最高値に達し、以後再び減少し10日目では対照レベルに戻った。一方、

過酸化脂質代謝系の細胞上清画分酵素，抗酸化性物質の非タンパク性SHは1日目で低下するが，過酸化脂質生成が最高値に達する頃から誘導され初め，5～7日目頃には最高値に達し，14日目迄そのレベルを維持し，過酸化脂質生成とは対称的であった。一方，フリーラジカルを消去する抗酸化性物質であるVitaminEの変化は過酸化脂質生成の変化と類似していた。この結果から，VitaminEは脂質過酸化反応を極力最小限にとどめるために肝などの肺以外から動員される早期防御因子の一つであることが明らかとなった。

0.4，1.2および4 ppm NO₂ 4カ月間の亜急性暴露実験では過酸化脂質生成は10ppm NO₂ 暴露の場合より時期的な遅れと量的な相違はあるが，NO₂ 濃度に依存して増加し，その後一旦対照レベルに戻るが，暴露期間の延長につれて再び増加するものであることが明らかとなった。過酸化物代謝系酵素活性ならびに非タンパク性SH量はNO₂ 暴露初期では増加したが，その後酵素活性は過酸化脂質の増加につれて低下し，対照レベルに近づき，やはり過酸化脂質と対称的な変化を示した。

0.04，0.4および4 ppm NO₂ の9カ月，18カ月および27カ月間暴露の慢性実験では過酸化脂質生成と過酸化物代謝系酵素活性は亜急性実験の延長線上にあり，両者の変化はやはり対称的であった。TBA法による肺の過酸化脂質量はNO₂ 濃度の増加に伴って上昇し，しかも9カ月，18カ月と暴露期間の延長につれて増加するのに対して，過酸化物代謝系酵素活性は亜急性実験の4カ月より9カ月，18カ月と暴露期間の延長につれて低下した。呼気中エタン測定による過酸化脂質生成は0.04ppm NO₂ 9カ月暴露時点からすでに対照群より有意に増加し，その増加はNO₂ 濃度に依存し，かつNO₂ 暴露期間の延長につれて増加していた。しかし，4 ppm 27カ月暴露の場合ではエタン生成はむしろ低下していた。一方，本研究と同じ慢性実験プロジェクトの中で4 ppm NO₂ を18カ月間暴露したラットの肺では肺胞壁の肥厚や肺の線維化が認められ，更に27カ月間暴露したラットの肺では肺胞壁の肥厚の程度は低下するが，肺の線維化は18カ月暴露時点より更に進行していることが病理学的に明らかにされている。このようなことから，過酸化脂質量が再び増加するのに伴って肺の線維化が進行するが，最終的に肺の線維化が成立する4 ppm NO₂ 27カ月目の時点では肺胞壁厚の低下と共に過酸化脂質量は低下するものであることが判明した。従って4 ppm NO₂ 暴露27カ月目の過酸化脂質量の低下は肺の回復を意味するものでないことが明らかとなり，また，過酸化脂質の増加は肺疾患，すなわち肺の線維化と関連している可能性が示唆された。

以上の成績より，抗酸化性防御系はNO₂ 暴露の初期の過酸化脂質生成によって誘導さ

れ、その生成防御に重要な役割を果たすがこれは一時的であり、NO₂ 暴露の長期化につれて抗酸化性防御能が低下し、逆に過酸化脂質がしだいに増加するものであることが明らかとなり、肺疾患はその両方のバランスが恒常性の範囲を越えた時に起こる可能性があると推測された。

第二章ではNO₂ によって肺の線維化がおこるメカニズムを解明する手段として肺に過酸化脂質を生成し、短期間で間質性肺炎から線維化を起こすことが知られている除草剤のパラコート (PQ) を用いて実験的に肺線維症を作成し、その発症過程における肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防御系の変化を調べNO₂ 暴露の場合と比較した。更にこの章では肺の線維化との関連でコラーゲン代謝関連因子についても調べ、肺の過酸化脂質生成との関連について検討した。その結果、PQを投与した場合でも肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防御系はNO₂ 暴露の場合と同様に複雑な様式で変化することが明らかとなった。すなわち、PQ投与初期の肺の過酸化脂質生成に対して細胞上清画分の過酸化物代謝系酵素や抗酸化性物質の非タンパク性SHが誘導され、これらが最大に達すると肺の過酸化脂質量は対照レベルに戻るが、その後、過酸化物代謝系酵素活性や非タンパク性SH量が徐々に低下すると再び過酸化脂質生成がしだいに進行するものであることが判明し、PQ投与による過酸化脂質生成に対する抗酸化性防御能も一時的であることが明らかとなった。また、PQによる肺の線維化過程では肺の過酸化脂質生成とも密接に関連してコラーゲン代謝に異常が起こり、肺の線維化に進むことが明らかとなった。過酸化脂質生成に関与するスーパーオキシド・ラジカル (O₂⁻) がコラーゲン合成を高めることはすでに知られているが、そのO₂⁻ の発生がO₂⁻ を異性化するSuperoxide dismutase 活性の増加から裏づけられ、間接的ではあるがPQ投与によってコラーゲン合成が促進していることが示唆された。また、PQ投与初期にはコラーゲン分解酵素のコラゲナーゼ活性を阻害する肺および血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下が見られた。この時、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性と過酸化脂質量との間に有意な負の相関が認められたが、過酸化脂質の増加時期よりコラゲナーゼ阻害因子活性の低下時期の方が若干早いことから、コラゲナーゼ阻害因子活性の低下は過酸化脂質生成に関与する活性酸素によって不活性化されることによると考えられる。また、血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下は肺での不活性化によるものと思われる。このような肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下によって、PQ投与初期では肺のコラーゲン分解が促進し、肺のコラーゲン含量が若干低下すると共に、コラーゲンの分解

によって血清中に排泄されるヒドロキシプロリン (HOP) や尿中ヒドロキシプロリン：クレアチニン比 (HOP比) が増加する。肺のコラゲナーゼ阻害因子活性の低下による肺のコラーゲン分解の促進事実は肺のコラゲナーゼ阻害因子活性と血清HOP量との間に有意な負の相関性が認められた結果から支持された。その後、血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性は肺の過酸化脂質量が増加した直後に急速に増加し、肺のコラゲナーゼ阻害因子活性も血清ほどではないが増加した。肺で血清と同じ程度の増加が見られない原因としては活性酸素が関与してコラゲナーゼ阻害因子活性が不活性化されるか、あるいは炎症によってプロテアーゼ活性が高まり、それによってコラゲナーゼ阻害因子活性が調節されているためであろうと推察された。このようなコラゲナーゼ阻害因子活性の増加が見られる時期には血清HOP量や尿HOP比は初期の変化とは逆に低下し、肺のコラーゲン含量には増加が認められた。また、コラーゲンの架橋にあずかるMonoamine oxidase (MAO) 活性も増加し、病理学的にも炎症性変化や肺の線維化を確認することができた。これらの成績から、PQによる肺の線維化は、血清を介した肺でのコラゲナーゼ阻害因子活性の増加によってコラーゲン分解が抑制されるのと同時に、コラーゲン合成の促進、コラーゲンの架橋促進等によって起こるものであることが示唆された。また、過酸化脂質量に増加が見られた直後に血清中のコラゲナーゼ阻害因子活性が急速に増加するのは、肺の過酸化脂質が増加する時期に肺が障害され、炎症が起こることによってコラゲナーゼあるいはプロテアーゼ活性が高まり、それを調節するために肝臓でコラゲナーゼ阻害因子の合成が盛んとなるためと推察された。しかし、それが結果的に肺のコラーゲン分解を抑制し肺の線維化の原因になることが明らかとなった。

第三章では再びNO₂の急性暴露実験と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、PQの場合と比較し、肺の線維化に対するNO₂の作用を検討することを試みた。その結果PQの場合とは若干異なるがコラーゲン代謝に異常が生じ肺の線維化に進むものであることが明らかとなった。

10ppm NO₂ 2週間の急性暴露実験では肺のコラーゲン含量は2日目から急速に増加し、4～10日目にかけて最も増加した。しかし、2週間後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2週間後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、肺泡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。このような結果から肺胞

壁の肥厚が見られた7日目では肥厚した組織中に過酸化脂質とコラーゲンが増加しているものと思われた。一方、コラーゲンを分解する肺のコラゲナーゼ様活性は肺のコラーゲン含量が最も増加する時期に増加し、この時、血清HOP量も増加したが2週間後にはコラゲナーゼ様活性は対照レベルより低下した。この時、血清HOP量と共に尿中HOP比も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、肺のコラーゲン含量が最も増加する時期に肺のコラゲナーゼ様活性が増加して分解が促進する、即ちコラーゲンの代謝回転の亢進によって血清中HOP量が増加するものであることが明らかとなった。一方、肺およ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、肺の過酸化脂質が増加した直後から急速に増加し、その経時的変化はPQ投与実験の場合と類似していた。このようなコラゲナーゼ阻害因子活性の増加は肺で炎症が起こることによって増加するコラゲナーゼやプロテアーゼが炎症部位の細胞構成成分を無秩序に分解するのを防ぐために誘導されてくるものと考えられ、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低下するものと思われた。また、肺のコラゲナーゼ阻害活性に低下が見られた時期にはPQの場合と同じように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、そ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ず、PQの場合とは異なった結果が得られた。コラーゲンの架橋にあずかるMonoamine oxidase (MAO) 活性はNO₂ 暴露初期から急速に増加し、この時期には肺の過酸化脂質量との間で有意な正の相関が認められた。この結果から、肺の過酸化脂質生成によってMAOが活性化され、コラーゲンの架橋が促進していることが示唆された。

以上の成績より、10ppm NO₂ 暴露では肺の過酸化脂質の増加に伴って肺のコラーゲン合成が促進し、コラーゲン含量が増加する。同じに、コラーゲンの架橋が促進して肺の線維化が起こり、また、肺胞道や肺胞壁は肥厚する。この時、肺のコラーゲン分解も促進して血清HOP量も増加する。その後、コラーゲン分解が進み最終的に肺の線維化が認められる時期には肺胞道や肺胞壁の肥厚は軽度となり、また、肺の過酸化脂質量、コラーゲン含量は低下する。しかし、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の分解能が低下し、血清HOP量や尿HOP比が低下する。このような一連の過程をへて肺の線維化が起こるものであることが明らかとなった。

0.4, 1.2および4 ppm NO₂ 18ヵ月間の慢性暴露実験では4 ppm 群のみで肺の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および4 ppm 群で有意に低下した。肺のMAO活性および過酸化脂質量は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カ月目では、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⁹⁰⁾が報告した4 ppm NO₂暴露18カ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な結果とも一致しており、NO₂長期暴露の場合では、PQの場合と同じようにコラーゲンの分解能の低下も肺の線維化を起こす要因の一つであることが示唆された。また、肺の過酸化脂質は肺に障害を引き起こし、それが肝臓でのコラゲナーゼ阻害因子合成を促進し肺に輸送するものと推測された。

一方、大気汚染物質の健康影響に関する疫学的研究で高濃度NO₂汚染地域住民や喫煙者の尿中HOP比が増加することが報告されており、この尿中HOP比の増加機序の解明はその影響指標の有用性を評価する上で極めて重要である。本実験結果から尿HOP比の増加機序を考えると、その増加は肺のコラーゲン合成と分解が共に促進することによると考えられる。また、慢性的に低濃度NO₂に暴露された場合には過酸化脂質が増加して障害が起こり、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て肺の線維化が起こる可能性は否定できない。従って肺の線維化の点からみるとむしろHOP比が低下している事例の方が注意をはらうべきなのかもしれない。一方、尿HOP比の増加は肺気腫発症の要因であるコラゲナーゼ阻害因子活性が低下し続けた場合も起こりうると思われる。従って疫学的研究においても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が、コラゲナーゼ阻害因子活性がある大気汚染物質の比較的長期間の吸入によって増加したり、低下したりする原因を実験的にも解明することができれば尿中HOP比の増加の意味をより正確に理解しうるものと考えられる。今後はより多くの汚染物質の複合影響や実験動物の種差などの点からさらに詳しく研究を進める予定である。

以上、著者は本研究でNO₂暴露による過酸化脂質生成とそれにたいする抗酸化性防御機構能の役割を明らかにすると共に肺の線維化に対するNO₂の作用を過酸化脂質生成と肺のコラーゲン代謝との面から検討した。

文 献

1. Abe, K., Ohmae, M., and Katsui, G. 1976. Rapid and micro-method for the determination of tocopherols in liver. Vitamins. 50: 453-457.
2. Aitor, A.P. 1974. Reduction of paraquat toxicity by superoxide dismutase. Life Sci. 14: 1309-1319.
3. Ayaz, K.L., and Csallany, A.S. 1978. Long-term NO₂ exposure of mice in the presence and absence of vitamin E. II. Effect of glutathione peroxidase. Arch. Environ. Health 33: 292-296.
4. Bergman, I., and Loxley, R., 1970. The determination of hydroxyproline in urine hydrolysates. Clin. Chim. Acta. 27: 347-349.
5. Bernt, E., and Bergmeyer H.U. 1974. Reagents for enzymatic analysis: Isocitrate dehydrogenase In "Methods of enzymatic analysis". (ed. by Bergmeyer, H.U.) Acad. Press. N.Y. 2:624-631.
6. Bergmeyer, H.U. 1974. Reagents for enzymatic analysis: Glutathione reductase. In Methods of Enzymatic Analysis (ed. by Bergmeyer, H.U.) 2: 465-466.
7. Burk, R.F., Lawrence, R.A., and Lane, J.M. 1980. Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diquat administration. J. Clin. Invest. 65: 1024-1031.
8. Bus, J.S., Aust, S.D., and Gibson, J.E. 1974. Superoxide- and singlet oxygen-catalysed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58: 749-755.
9. Bus, J.S., Cagen, S.Z., Olgaard, M., and Gibson, J.E. 1976. A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 35: 501-513.
10. Carp, H., and Janoff, A. J. 1979. In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by reactive oxygen species generated by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest. 63:

793-707.

11. Chow, C.K., Dillard, C.J., and Tappel, A.L. 1974. Glutathione peroxidase system and lysozyme in rats exposed to ozone or nitrogen dioxide. Environ. Res. 7: 311-317.
12. Chvapil, M., Hurych, J. 1968. Rev Connect. Tissue Res (ed. Hall D.A.) 4, 68 ital. Academic Press, New York & London.
13. Davidson, J.T., Lillington, G.A., Hydon, G.B., and Wasserman, K. 1967. Physiologic changes in the lungs of rabbits continuously exposed to nitrogen dioxide. Am. Rev. Respi. Dis. 95: 790-796.
14. DeLucia, A.J., Mustafa, M.G., Hussain, M.Z., and Cross, C.E. 1975. Ozone interaction with rodent lung: III. Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and non-protein sulfhydryls. J. Clin. Inv. 55: 794-802.
15. Dillard, C.J., Dumelin, E.E., and Tappel, A.L. 1977. Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat. Lipid. 12: 109-114.
16. Dodge, A.D., Harris, N., Baldwin, B.C. 1970. The mode of action of paraquat and diquat. Biochem. J. 118: 43-44.
17. Drozd, M., Kucharz, E., and Szyja, J. 1977. Effect of chronic exposure to nitrogen dioxide on collagen content in lung and skin of guinea pigs. Environ. Res. 13: 369-377.
18. Dumelin, E.E., Dillard, C.J., Tappel, A.L. 1978. Effect of vitamin E and ozone on pentane and ethane expired by rats. Arch. Environ. Health. 33: 129-135.
19. Eriksson, S. 1964. Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. Acta. Med. Scand. 117 (suppl 432): 1-85.
20. Evans, M.J., Stephens, R.J., Cabral, L.J., and Freeman, G. 1972. Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of NO₂. Arch. Environ. Health. 24: 180-188.

21. Evans, M.J., Cabral, L.J., Stephens, R.J., and Freeman, G. 1973. Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. Am. J. Pathol. 70: Feb. 175-198.
22. Fairshter, R.D., Wilson, A.F. 1975. Paraquat poisoning, manifestation and the rapy. Am. J. Med. 59: 751-753.
23. Fenters, J.D., Ehrlich, R., Findlay, J., Spangler, J., and Tolkacz, V. 1971. Serologic response in squirrel monkeys exposed to nitrogen dioxide and influenza virus. Am. Rev. Res. Dis. 104: 448-451.
24. Freeman, G., Crane, S.C., Furiosi, N.J., Stephens, R.J., Evans, M.J., and Moore, W.D. 1972. Covert reduction in ventilatory surface in rats during prolonged exposure to subacute nitrogen dioxide. Am. Rev. Respir. Dis. 106: 563-579.
25. Freeman, G., Haydon, G.B. 1964. Emphysema after low-level exposure to NO₂. Arch. Environ. Health. 8: 125-128.
26. Freeman, G., Furiosi, N.J., Haydon, G.B. 1966. Effects of continuous exposure of 0.8 ppm NO₂ on respiration of rats. Arch. Environ. Health. 13: 454-456.
27. 深瀬 完, 磯村 公郎, 渡辺 弘. 1976. 窒素酸化物のマウス肺 Peroxidative metabolic pathway への影響. 大気汚染研究. 11: 65-69.
28. Gelmont, D., Stein, R.A., and Mead, J.F. 1981. The bacterial origin of rat breath pentane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 932-936.
29. Glavind, J., Hartman, S., Clemmeson, J., Jessen, K.E., and Dan, S. 1952. Studies on the role of lipoperoxides in human pthology. II. The presence of peroxidized lipid in the atheroscleroric aorta. Acta. Path. Micro. Scand. 30: 1-6.
30. Gray, E. 1959. Oxides of nitrogen: their occurence, toxicity. and hazard. Arch. Ind. Health. 19: 479-486.
31. Greenberg, D.B., Lyons, S.A., and Last, J.A. 1978. Paraquat induced changes in the rate of collagen biosynthesis by rat lung explants. J.

Lab. Clin. Med. 92: 1033-1042.

32. Gries, G., Buresch, H., and Stranch, L. 1970. Collagenolytic enzymes in human serum, Experientia. 26: 31-33.
33. Hacker, A.D. 1976. Effects of short-term nitrogen dioxide exposure on lung collagen synthesis. (Meeting Abstract) Am. Rev. Respir. Dis. 113: 107.
34. Hafeman, D.C., and Hoekstra, W.G. 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.
35. Hattori, S., and Takemura, K. 1973. Ultrastructural changes in the bronchial alveolar system caused by air pollution and smoking. J. Clin. Microscopy. 6: 350.
36. 早石 修, 八木 国夫, 五島 雄一郎. 1980. 虚血と細胞障害. 活性酸素, フリーラジカル
医歯薬出版株式会社.
37. Haydon, G. B., Freeman, G., Furiosi, N.J. 1965. Covert pathogenesis of NO₂-induced emphysema in the rat. Arch. Environ. Health. 11: 776-783.
38. Hollinger, M.A. and Chvapil, M. 1977. Effect of paraquat on rat lung prolyl hydroxylase. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 16: 159-163.
39. Hussain, M.Z., Mustafa, M.G., Chow, C.K., and Cross, C.E. 1976. Ozone-induced increase of lung proline hydroxylase activity and hydroxyproline content. Chest. 69: 2, 273-275.
40. Hussain, M.Z., and Bhatnagar, R.S. 1979. Involvement of superoxide in the paraquat-induced enhancement of lung collagen synthesis in organ culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 89: 71-76.
41. Ichinose, T., and Sagai, M. 1982. Studie 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.
42. 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. 大気汚染研究. 18 : 132~146.
43. Jaffe, M. 1886. Hoppe-Seylerz. Physiol. Chem. 10: 391.
44. Janoff, A., Carp, H., Lee, D.K., and Drew, R.T. 1979. Cigarette smoke inhalation decrease α_1 -antitrypsin activity in rat lung. Science. 206: 1313-1314.
45. Jhonson, D., Travis, J. 1979. The oxidative inactivation of human alpha 1-proteinase inhibitor: further evidence for methionine at the reactive center. J. Biol. Chem. 254: 2022-2026.
46. Kaplowiz, N., Kuhlenkamp, J., and Glifton, G. 1975. Drug induction of hepatic glutathione S-transferase in male and female rats. Biochem. J. 146: 351-356.
47. 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. 30-1 : 195~198.
48. Kenley, R.A., and Hendry, D.G. 1982. Generation of peroxyradical from peroxy nitrates (ROO NO₂). Decomposition of peroxybenzoylnitrate (PBzN). J. Am. Chem. Soc. 104: 220-224.
49. Kleinerman, J. 1979. Effects of nitrogen dioxide on elastin and collagen contents of lung. Arch. Environ. Health. 34: 228-232.
50. Kleinerman, J., Rynbrandt. D. 1976. Lung proteolytic activity and serum protease inhibition after NO₂ exposure. Arch. Environ. Health. 31: 37-41.
51. Kucharz, E., Miodonska, G., and Kozłowski, A. 1972. Wplyw tlenkow azotu na metabolizm kolagenu wplucach swinck morskich. In "Informator XII uczelnianej koferencji stud. Kola naukowego slaskiej a kadomii medycznej, zabrze", Abstract p. 40.

52. Kosmidor, S., Misiewicz, A., Felus, E., Drozd, M., and Ludyga, K. 1972. Experimental and clinical investigations on the emphysema-forming action of nitrogen oxide. Zentralbl Arbeitsmed Arbeitsschutz. 22(12): 362-368.
53. 京野 洋子, 河合 清之 (1977) : 肺の電顕的形態計測 II, NO₂ 吸入ラット肺。
第18回大気汚染研究全国協議会公演集 (福岡), P.220.
54. Kucppers, F., and Bloack, L.F. 1974. α_1 -antitripsin and its deficiency. Am. Rev. Resp. Dis. 110: 176-181.
55. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurment with the Folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
56. Little, C., and O'Brien, P.J. 1970. Properties and fegulation of glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. 245: 3632-3639.
57. 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 国立公害研究所報告. 第15号 : 149~158.
58. 松本 秀明, 逢坂 文夫, 春日 斎, 杉田 稔. 1981. Hydroxyproline : Creatinine 比 (H O P 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. 日本公衛誌. 28 : 505~515.
59. 松尾 光芳. 1980. 過酸化脂質と活性酸素, 油化学. 29 : 316~322.
60. McAdams, A., Jr. 1955. Bronchiolities obliterans. Am. J. Med. 19: 314-322.
61. McCord, J.J., and Fridovich, I. 1969. Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyuprein (Hemocuprein). J. Biol. Chem. 244: 6049-6055.
62. Mees, G.C. 1960. Herbicidal action of 1-1'-ethylene-2,2'-dipyridylum dibromide. Ann. Appl. Biol. 48: 601-612.
63. Menzel, D.B. 1976. The role of free radicals in the toxicity of air pollutants (nitrogen oxides and ozone). In "Free radical in biology." (ed. by Pryor W.A) Acad. Press N.Y., 2: 181-202.

64. 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, 江上 信雄, 武部 啓, 編. 東京大学出版会. 75~85.
65. Miyazawa, T., Sato, C., and Kaneda, T. 1983. Antioxidative effects of α -tocopherol and riboflavin-butyrates in rats dosed with methyl linoleate hydroperoxide. Agric. Biol. Chem. 47: 1577-1582.
66. Mustafa, M.G., and Tierney, D.F. 1978. Biochemical and metabolic changes in the lung with oxygen, ozone, and nitrogen dioxide toxicity. Am. Rev. Respir. Dis. 118: 1061-1090.
67. 中島 泰知. 1982. 窒素酸化物. 環境と人体Ⅰ. 中馬 一郎, 近藤 宗平, 武部 啓, 編 東京大学出版会. 155 ~ 173.
68. Nanni, E.J., Angelis, C.T., Dickson, J., and Sawyer, D.T. 1981. Oxygen activation by radical coupling between superoxide ion and reduced methyl viologen. J. Am. Chem. Soc. 103: 4268-4270.
69. Nieding, G. von., and Wagner, H.M. 1977. Experimental studies on the short-term effect of air pollutants on pulmonary function in man: Two-hour exposure to NO_2 , O_3 and SO_2 alone and in combination 4th. Int. Clean Air Congress. 5-8.
70. 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. 肺のすべて. 117, 9: 690~697.
71. 堺 隆弘. 1975. コラーゲンと疾患. 野田 春彦, 永井 裕, 藤本 大三郎. 編 「コラーゲン」南江堂 (東京). 226 ~227.
72. Oda, H., Tsubone, H., Suzuki, A., Ichinose, I., and Kubota, K. 1981. Alteration of nitrite and nitrate concentrations in the blood of mice exposed to nitrogen dioxide. Environ. Res. 25: 294-301.
73. Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351-358.
74. Omaye, S.T., Reddy, K.A., and Cross, C.E. 1978. Enhanced lung toxicity of paraquat in selenium deficient rats. Toxicol. Appl.

Pharmacol. 43: 237-247.

75. Orthoefer, J.G., Bhatnagar, R.S., Rahman, A., Yang, Y.Y., Lee, Si. D., and Stara, J.F. 1976. Collagen and proly hydroxylase levels in lung of beagles exposed to air pollutants. Environ. Res. 12: 299-305.
76. Pryor., W.A., Dooley, M.M., and Church, D.F. 1984. Inactivation of human α -1-Proteinase inhibitor by gas-phase cigarette smoke. Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 676-681.
77. Riely, C.A., Cohen, G., and Lieberman, M. 1974. Ethane evolution. A new index of lipid peroxidation. Science. 183: 208-210.
78. Robert, E.B. 1971. Ultrastructure of lung lesions produced by ingested chemicals. Laboratory. Investigation. 25.6: 536-545.
79. Ross, R., and Glomset, J.A. 1973. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. Science. 180: 1332-1339.
80. Ruiter, N.D., Muliawan, H., and Kappus, H. 1980. Ethane production of mouse peritoneal macrophages as indication for lipid peroxidation and the effect of heavy metals. Toxicology. 17: 265-268.
81. Sagai, M 1977. The effect of enzyme-inducing agents on the survival times of rats exposed to lethal levels of nitrogen dioxide. Toxicol. Appl. Pharmacol. 43: 169-174.
82. 嵯峨井 勝, Tappel, A. L. 1979. 脂質過酸化の新しい測定法としての呼気ガス分析法. 過酸化脂質研究. 3 : 1 ~ 8.
83. Sellers, A., Cartwright, E., Murphy, G., and Reynolds, J.J. 1977. Evidence the latent collagenases are enzyme-inhibitor complexes. Biochem. J. 163: 303-307.
84. Sharp, C.W., Ottolengi, A., and Posnet, H.S. 1972. Correlation of paraquat toxicity with tissue concentration and weight loss of the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 22: 241-251.
85. Smith, P., Heath, D., and Kay, J.M. 1973. The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rat. J. Path.

114: 57-67.

86. Steffen, C., Muliawan, H., and Kappus, H. 1980. Lack of in vivo lipid peroxidation in experimental parquat poisoning. Naunyn-Schioderberg's. Arch. Pharmacol. 310: 241-243.
87. Stephaneş R.J., Freeman G., and Evans, M.J., Galif M.P. 1971. Ultrastructural changes in connective tissue in lung of rats exposed to NO₂. Arch. Intern. Med. 127: 873-883.
88. 鈴木 明, 局 博一, 市瀬 孝道, 織田 肇. 1980. 二酸化窒素長期暴露のラットに及ぼす影響 動脈血 pHa, P a CO₂ および P a O₂ 国立公害研究所研究報告, 第15号 : 229~240.
89. Tappel. A.L. 1975. Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. In Pathobiology of cell membranes Acad. Press. N.Y. 1: 145-170.
90. 竹中 参二, 清水 不二夫, 山田 靖子, 堀内 博人, 京野 洋子, 河合 清元. 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.
91. Thomas, H.V., Mueller, P.K., and Lyman, P.L. 1967. Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide. Science. 159: 532-534.
92. Tietze, F. 1970. Disulfide reduction in rats liver: Evidence for the presence of nonspecific nucleotide dependent disulfide reductase and glutathione-disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. Arch. Biochem. Biophys. 138: 177-188.
93. 植田 伸夫. 1983. 過酸化脂質と疾患「過酸化脂質実験法」金田 尚志, 植田 伸夫監修. 医歯薬出版株式会社 : 223~227.
94. Valand, S.B., Acton, J.D., and Myruik, Q.N., Winston Salem. 1970. Nitrogen dioxide inhibition of viral-induced resistance in alveolar monocytes. Arch. Environ. Health. 20: 303-309.
95. Vijayaratnam, G.S., and Corrin, B. 1971. A histological and

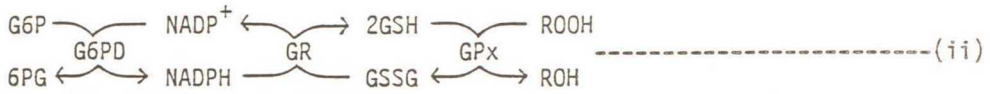
- election-optical study of the changes in the lung. J. Path. 103: 123-129.
96. Wilhelm, L.G., and Waller, H.D. 1974. Reagents for enzymatic analysis: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In Methods of Enzymatic Analysis. (ed. by Bergmeyer, H.U.) Acad. Press. N.Y. 2: 636-643.
97. William, J.W., and Carolyn, M. 1980. Tissue and cellular disposition of paraquat in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 56: 127-140.
98. Winterborum, C.C. 1981. Production of hydroxy radicals from paraquat radicals and H_2O_2 . FEBS. Lett. 128: 339-342.
99. 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.
100. 八木 国夫. 1980. フリーラジカルについて. 「虚血と細胞障害」早石 修, 八木 国夫, 五島 雄一郎, 医歯薬出版株式会社: 29~45.
101. 八木 国夫, 五島 雄一郎. 過酸化脂質と疾患. 医学書院.
102. 柳沢 幸雄, 西村 肇, 春日 斎, 逢坂 文夫, 松木 秀明. 1982. NO_2 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公演集 (宮崎), P. 527.
103. 柳沢 幸雄, 西村 肇, 春日 斎, 逢坂 文夫, 松木 秀明. 1982. NO_2 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公演集 (宮崎), P. 528.
104. Youngman, R.J., and Elstner, E.F. 1981. Oxygen species in paraquat toxicity; The crypto-OH radical. FEBS. Lett. 129: 265-268.
105. Yoshikawa, T., Furukawa, Y., Wakamatsu, Y., Takemura, S., Tanaka, H., and Kondo, M. 1982. The increase of thiobarbituric acid reacting substances in rats with experimental chronic hypoxia. Experientia. 38: 312-313.
106. Yoshikawa, T., Furukawa, Y., Wakamatsu, Y., takemura, S., Tanaka, H., and Kondo, M. 1982. Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats. Biochemn. Med. 27: 207-213.

謝 辞

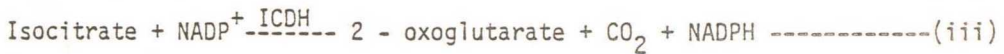
本研究を遂行するにあたり終始適切な御助言を賜った麻布大学獣医学部公衆衛生学第一講座，村田元秀教授ならびに寄生虫学講座，板垣博教授に対して深甚なる謝意を述べるとともに，日頃懇切な御指導を頂きました国立公害研究所環境生理部，久保田憲太郎部長ならびに慢性影響研究室，嵯峨井勝室長に厚く御礼を申し上げます。なお，本研究期間中，長年に亘り暖かい激励と多大なる御協力を戴いた環境生理部の各位，技術部動物施設管理室の皆様衷心より感謝の意を表明します。

表1 酸化的障害に対する酵素的防御機構

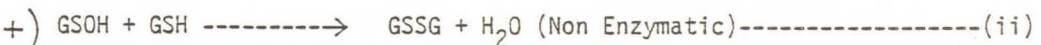
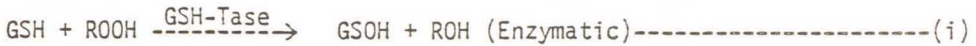
1) Glutathione peroxidase as a member in peroxidative metabolic pathway



2) Enzymes for maintenance of reducing potential (NADPH formation)



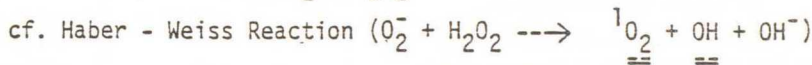
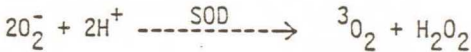
3) Glutathione S-transferase as a peroxidase



4) Superoxide dismutase

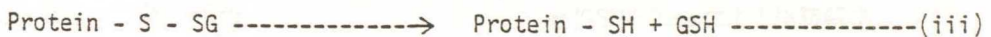
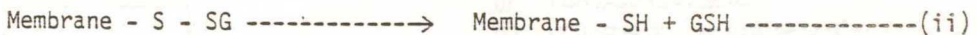
Cu - Zn SOD in cytoplasm, erythrocyte (soluble)

Mn - SOD } in mitochondria
Fe - SOD }



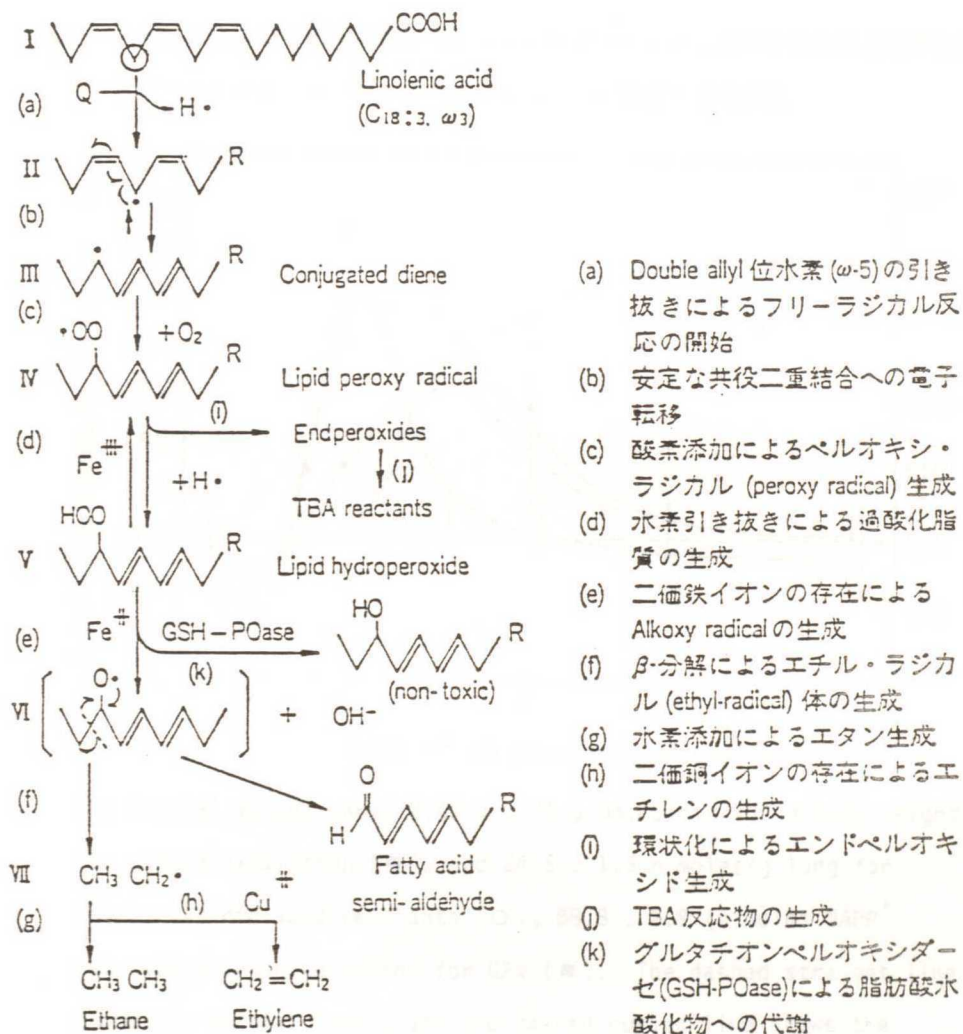
5) Disulfide reductase for maintenance of SH - group

(Exchange of inter and/or intra molecular disulfide)



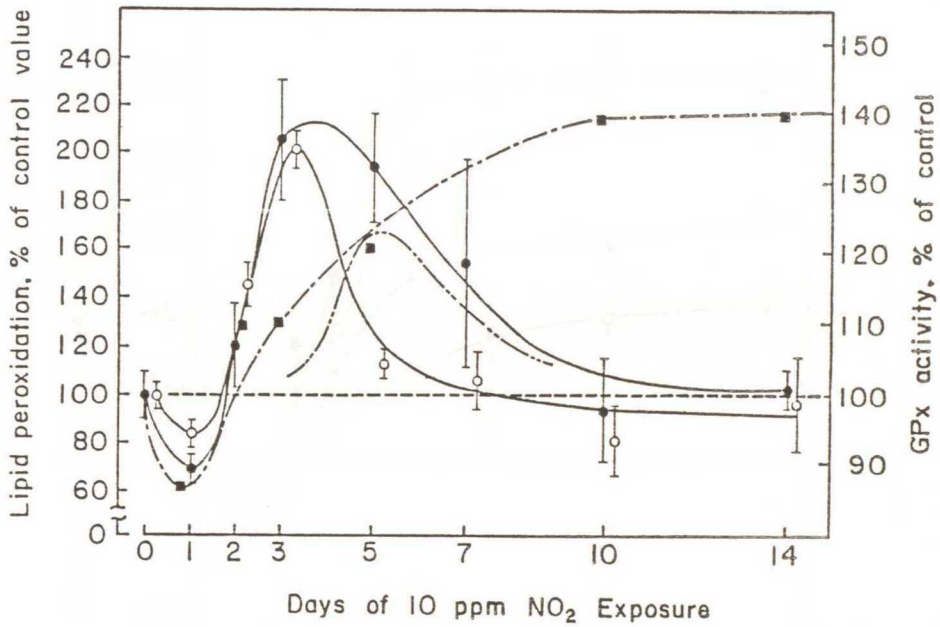
ABBREVIATIONS. GPx : Glutathione peroxidase. G6PD : Glucose 6-phosphate dehydrogenase. GR : Glutathione reductase. 6PGD : 6 Phosphogluconate dehydrogenase. ICDH : Isocitrate dehydrogenase. GSH-Tase : Glutathione S-transferase. SOD : Superoxide desmutase.

図 1 リノレン酸の過酸化によるエタンとエチレン生成のメカニズム



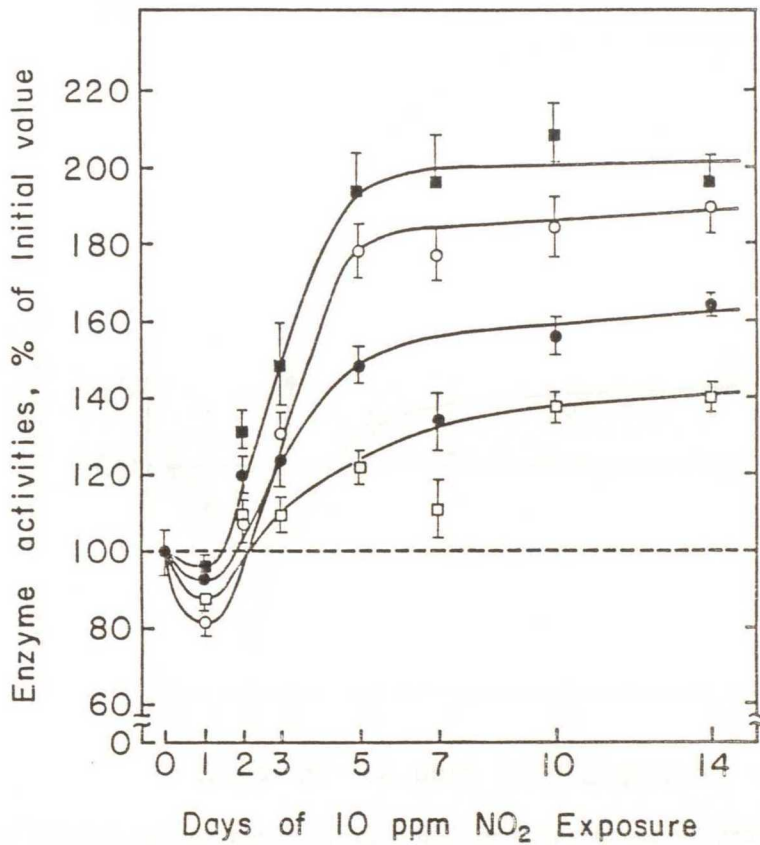
- (a) Double allyl 位水素 (ω-5) の引き抜きによるフリーラジカル反応の開始
- (b) 安定な共役二重結合への電子転移
- (c) 酸素添加によるペルオキシラジカル (peroxy radical) 生成
- (d) 水素引き抜きによる過酸化脂質の生成
- (e) 二価鉄イオンの存在による Alkoxy radical の生成
- (f) β-分解によるエチルラジカル (ethyl-radical) 体の生成
- (g) 水素添加によるエタン生成
- (h) 二価銅イオンの存在によるエチレンの生成
- (i) 環状化によるエンドペルオキシド生成
- (j) TBA 反応物の生成
- (k) グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-POase) による脂肪酸水酸化物への代謝

図2 10ppm NO₂ に2週間暴露したラットの呼気中エタンと肺のTBA反応性物質
 及びグルタチオン・パーオキシダーゼ (GPx) 活性の経時変化



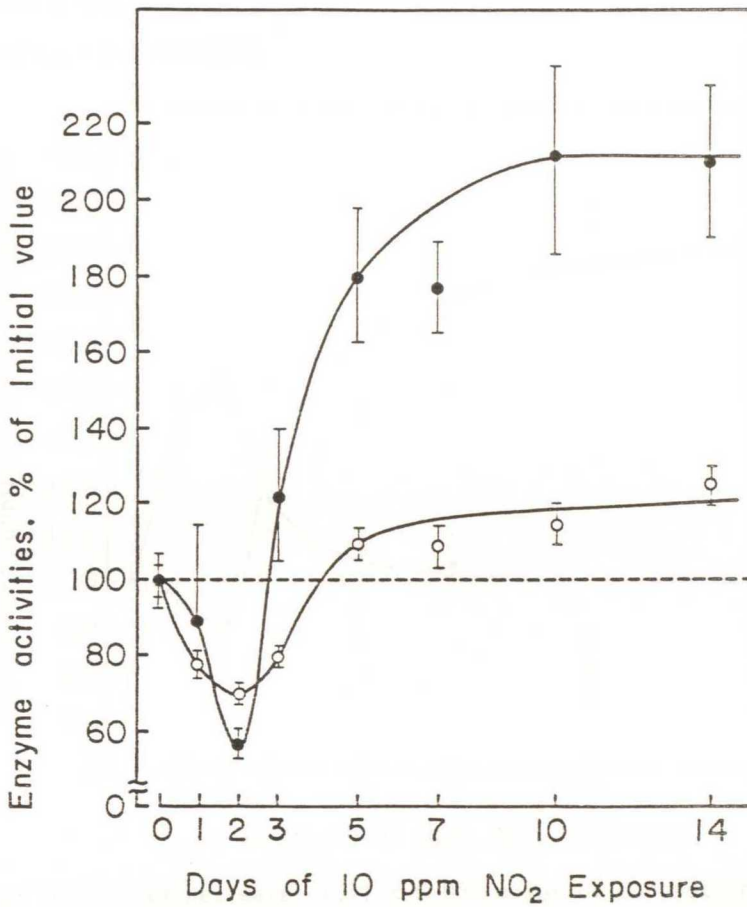
The initial values were: 2.07 ± 0.23 p moles/min/100 g body weight for ethane exhalation (●), and 24.5 ± 1.5 n moles/g lung for thiobarbituric acid reactants (○), 88.8 ± 2.9 (n moles NAPP⁺ reduced/mg of protein/min) for GPx (■). The dashed straight line shows the initial level, and the dashed curved line shows the difference between ethane exhalation rate and TBA reactants forming rate. The values are expressed as mean \pm SEM ($n=6-12$).

図3 10ppm NO₂ に2週間暴露したラットの肺のグルタチオン・パーオキシダーゼ (GPx)、グルタチオン還元酵素 (GR)、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 及び6-ホスホグルコネート脱水素酵素 (6PGD) 活性の経時変化



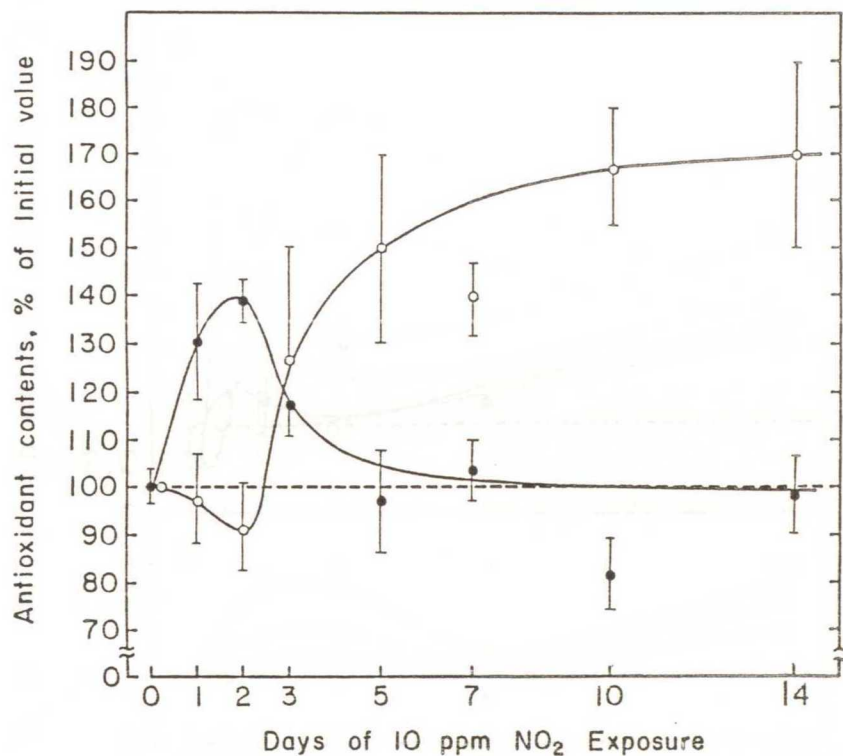
The initial values (*n* moles NADP⁺ reduced/mg of protein/min) were 88.8 ± 2.9 for GPx (□), 124.3 ± 3.5 for GR (●), 126.6 ± 5.9 for G6PD (■), and 145.4 ± 5.6 for 6PGD (○), respectively. The values are expressed as mean ± SEM (*n*=6-12).

図4 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) とダイサルファイド還元酵素 (DSR) 活性の経時変化



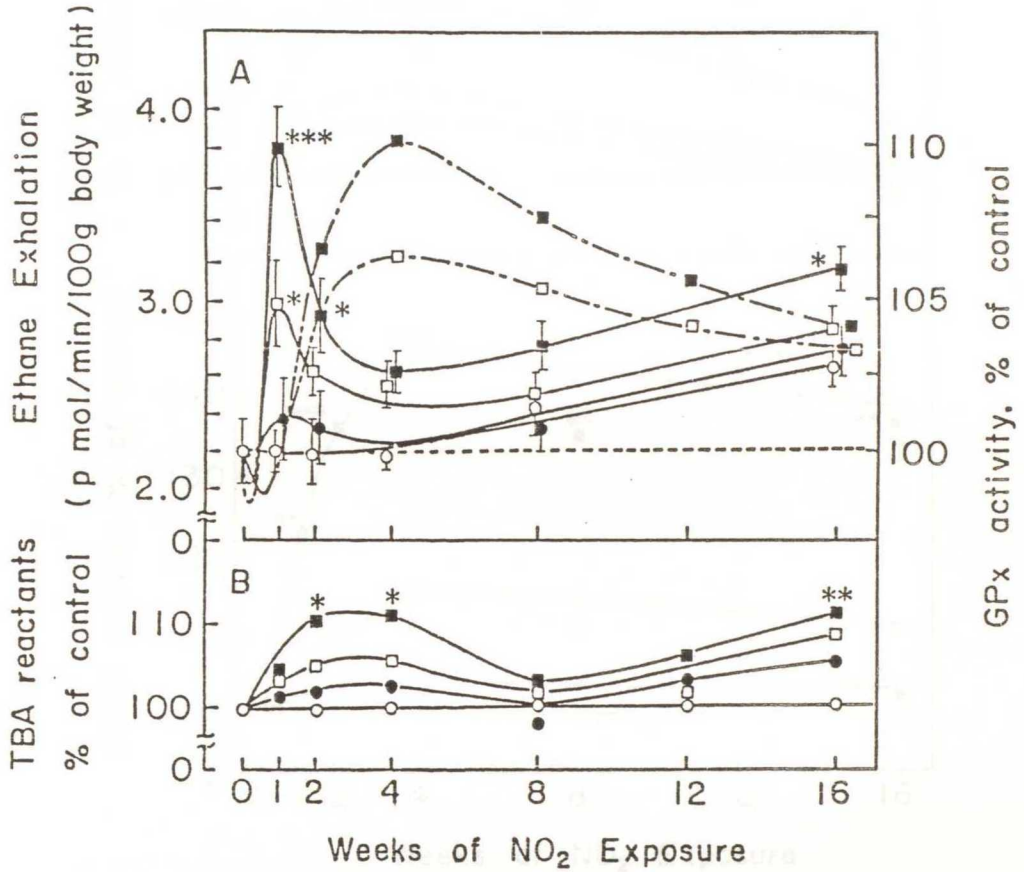
The initial values were: 125.8 ± 8.8 (n moles/hr/mg of protein) for DRS (●), and 18.8 ± 0.5 (units/min/mg of protein) for SOD (○). The values are expressed as mean \pm SEM ($n=6-12$).

図5 10ppm NO₂ に2週間暴露したラットの肺の非タンパク性SH (NPSH) 量と
 ビタミンE量の経時変化



The initial values were: $1.11 \pm 0.05 \mu\text{moles}$ of nonprotein-sulphydryls/g·lungs (○), and $33.2 \pm 1.1 \mu\text{g}$ of dl- α -tocopherol/g·lungs (●). The values are expressed as mean \pm SEM ($n=6-12$).

図6 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂ に4カ月間暴露したラットの呼気中エタン産生と肺のTBA値及びグルタチオン・パーオキシダーゼ (GPx)活性の経時変化

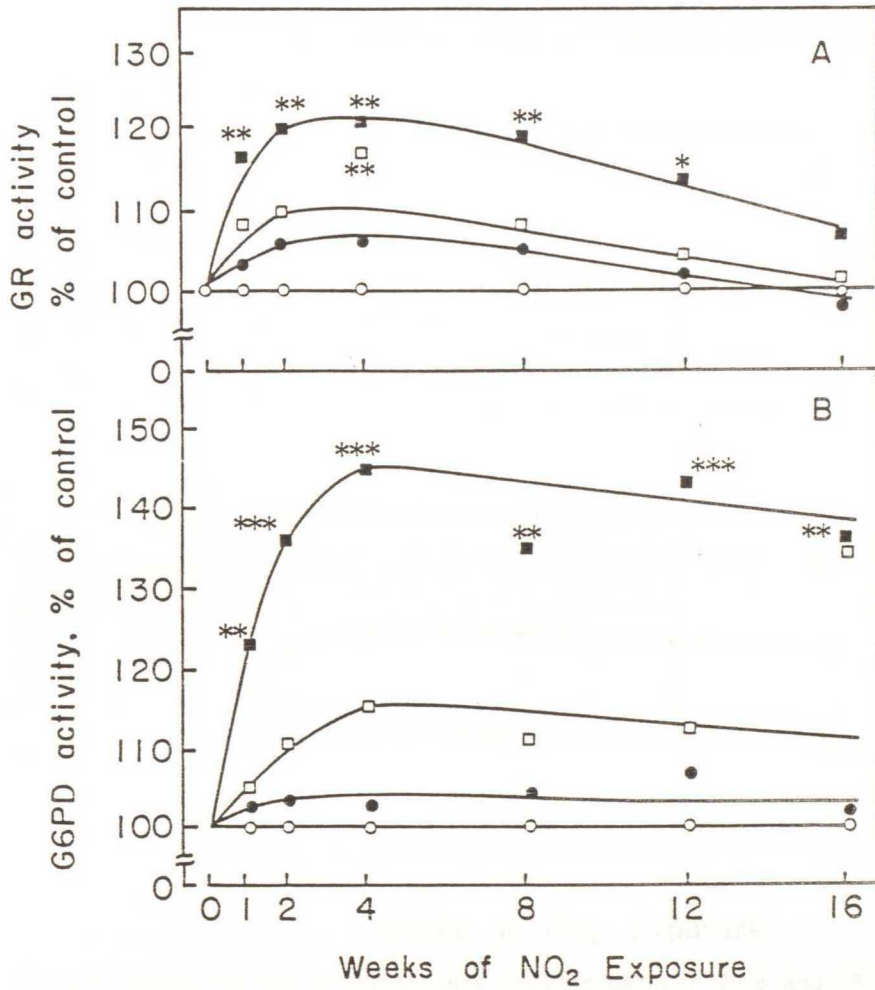


Control values of ethane exhalation were located between 2.20 and 2.62 p moles/100 g B.W./min., and control values of TBA reactants located between 34.1 and 46.2 moles/g·lungs from the first through the 16th week. GPx activity in this figure was measured using cumene hydroperoxide as substrate. Control values of GPx were located between 145 and 111 n moles of NADP⁺ formed/mg protein/min.

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

(* , p<0.05; ** , p<0.001)

図7 0.4, 1.2及び4ppm NO₂ に4カ月間暴露したラット肺のグルタチオン還元酵素 (GR) 活性とグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 活性の経時変化

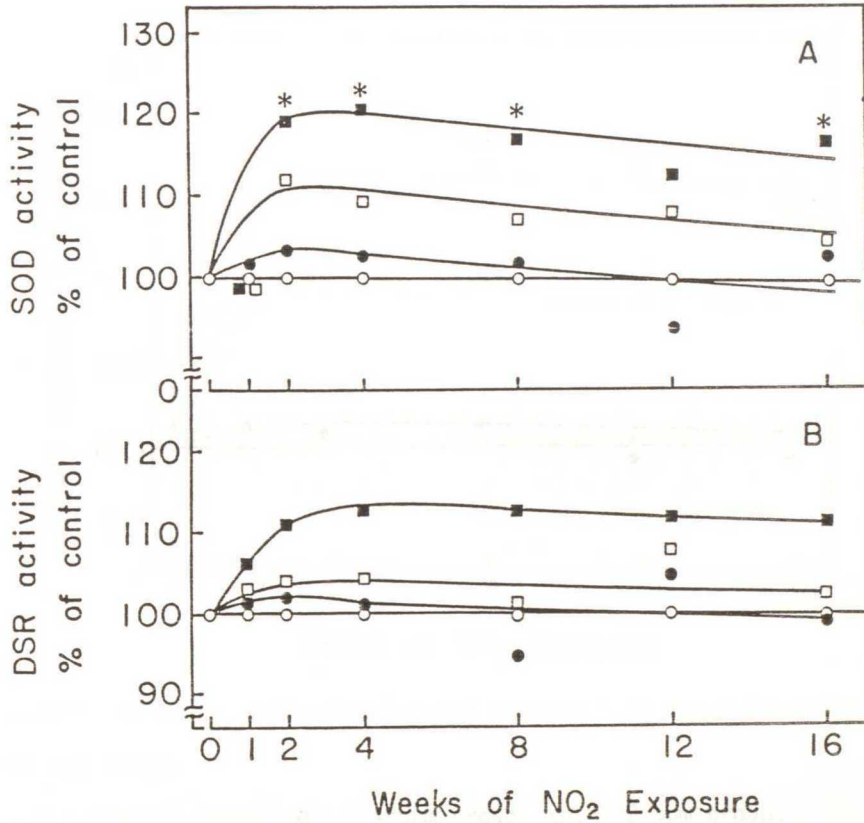


Control values of GR activity located between 110 and 78 n moles of NADP⁺ formed/mg·protein/min. and control values of G6PD activity were located between 69.5 and 44.8 n moles of NADPH formed/mg·protein/min. from the first through the 16th week.

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

(* , p<0.05; ** , p<0.01; *** , p<0.001)

図8 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂ に4カ月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) 活性とダイサルファイド還元酵素 (DSR) 活性の経時変化

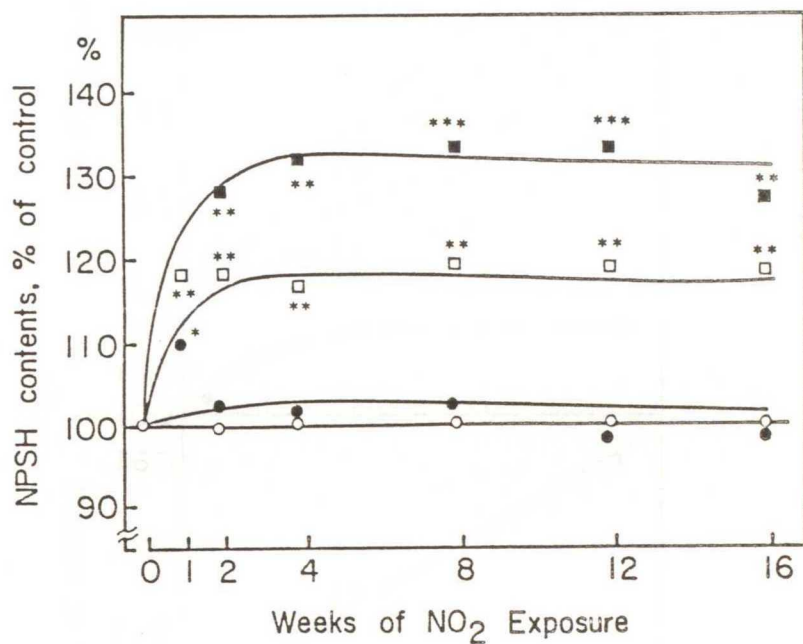


Control values of SOD activity were located between 29.6 and 18.9 units/mg protein/min., and those of DSR activity located between 126 and 92 n moles of cysteine formed/mg·protein/min., from the first through the 16th week.

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

(* , p<0.05)

図9 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂ に4カ月間暴露したラットの肺の非タンパク性SH (NPSH) 量の経時変化

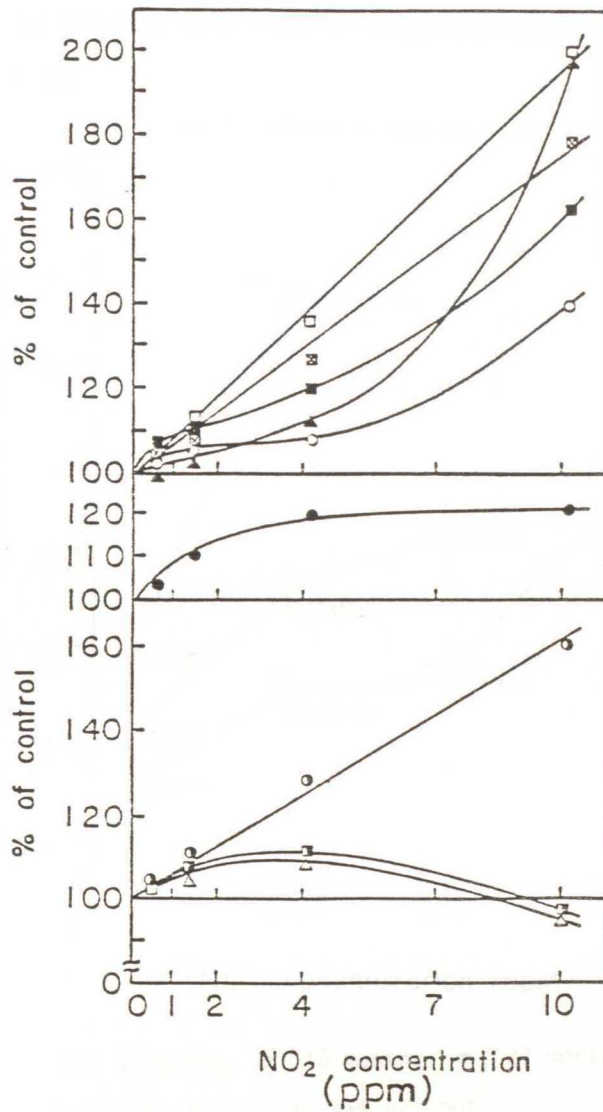


Control values of NPSH were located between 1.10 and 0.95 μ moles/g of wet lungs.

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

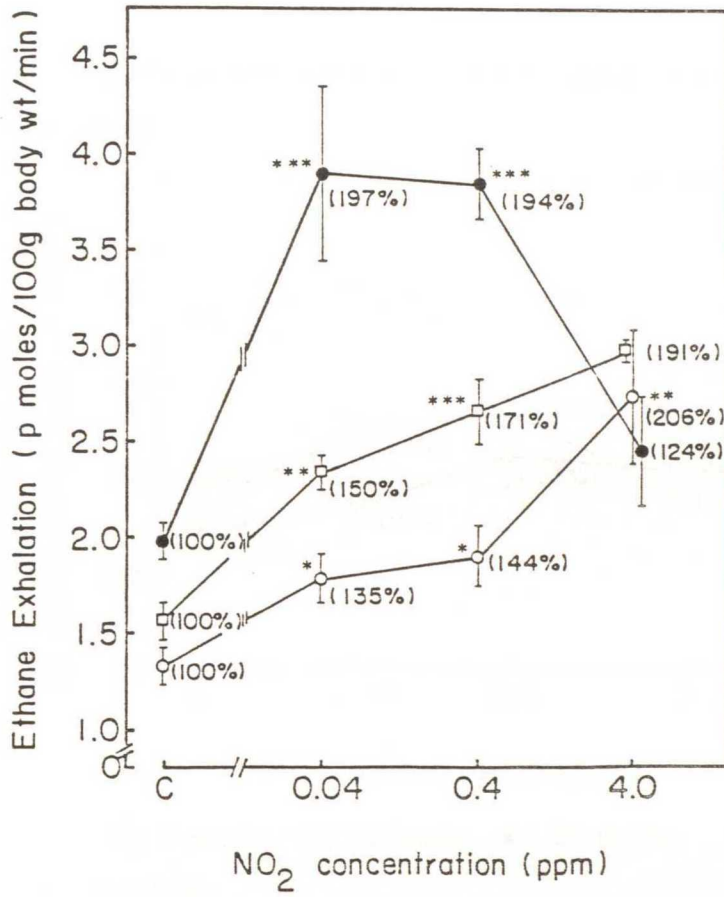
(* , $p < 0.05$; ** , $p < 0.01$; *** , $p < 0.001$)

図10 0~10ppm NO₂ に2週間暴露したラットの肺の防御系酵素活性及びTBA値と抗酸化性物質の量-効果関係



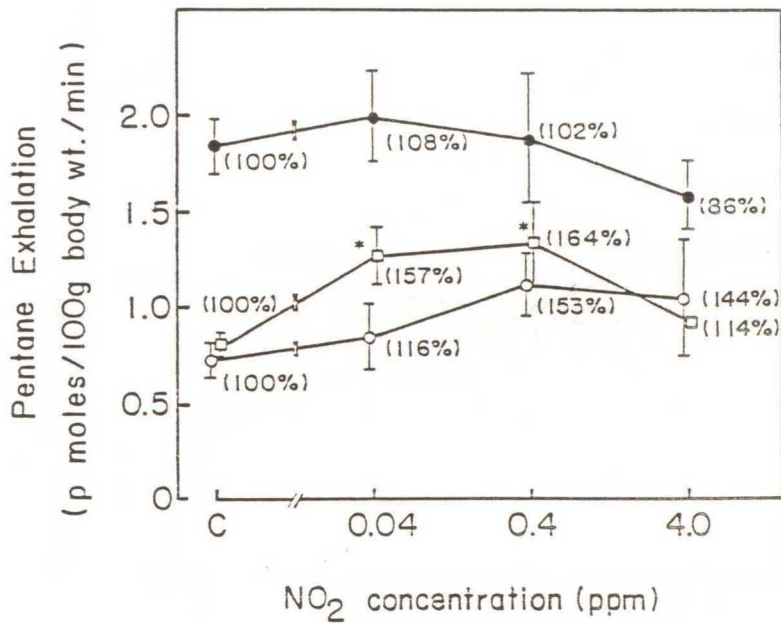
Glutathione peroxidase (○), glutathione reductase (■), glucose-6-phosphate dehydrogenase (□), 6-phosphogluconate dehydrogenase (⊠), superoxide dismutase (●) and disulfide reductase (▲) activities, and non-protein sulfhydryls (●), TBA reactants (■) and α-tocopherol (Δ) contents.

図11 0.04, 0.4及び4 ppm NO₂ に各々9, 18及び27カ月間暴露したラットの呼気中エタン産生量



○ ; 9 months, □ ; 18 months, ● ; 27 months,
 * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

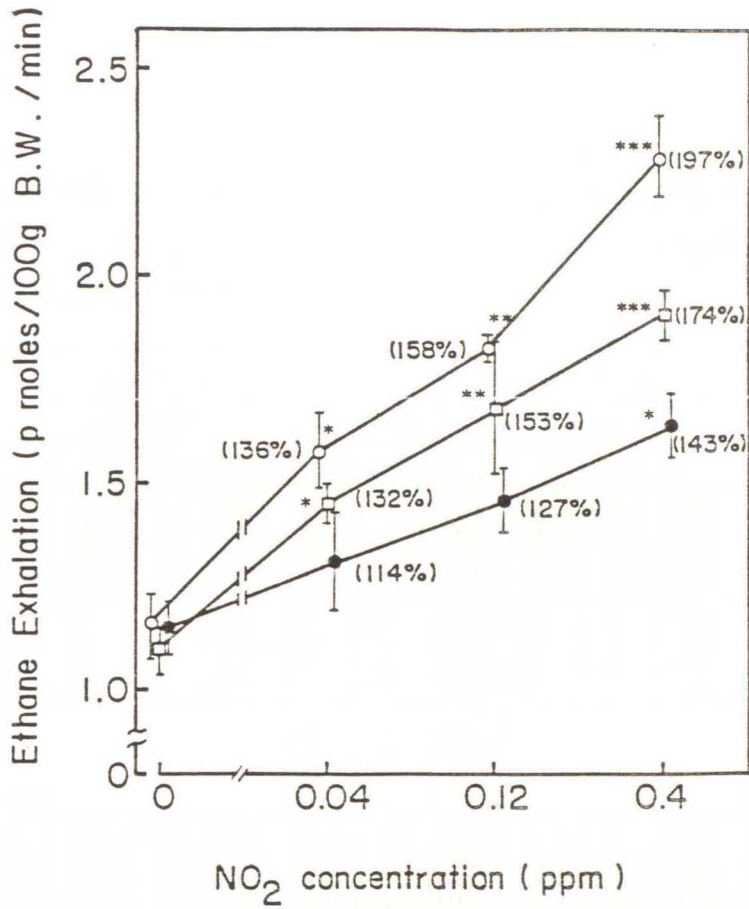
図12 0.04, 0.4及び4 ppm NO₂ に各々9, 18及び27カ月間暴露したラットの呼気中ペンタン産生量



○ ; 9 months, □ ; 18 months, ● ; 27 months.

* p<0.05

図13 0.04, 1.2及び0.4 ppm NO₂ に各々6, 9及び18カ月間連続暴露したラットの呼気中エタン産生量



● ; 6 months, □ ; 9 months, ○ ; 18 months.

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

表2 NO₂ 慢性暴露ラットの肺の総タンパク量およびグルタチオン・パーオキシダーゼ (GPx), グルタチオン還元酵素 (GR) とグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 活性の変化

		Rats exposed to NO ₂ for 9 months		Rats exposed to NO ₂ for 18 months	
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
		Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)
total protein (mg/g·Lung).	Control	92.4 ± 7.7 (100%)	85.9 ± 4.9 (100%)	95.0 ± 10.4 (100%)	83.2 ± 3.8 (100%)
	0.04 ppm	92.7 ± 4.2 (100%)	82.7 ± 2.5 (100%)	96.3 ± 9.5 (101%)	87.2 ± 3.6 (105%)
	0.4 ppm	96.7 ± 4.4 (105%)	88.7 ± 14.5 (103%)	99.7 ± 3.7 (105%)	92.5 ± 6.6 (111%)*
	4.0 ppm	101.3 ± 3.0 (110%)	87.3 ± 6.3 (102%)	93.0 ± 5.2 (98%)	85.1 ± 3.2 (102%)
GPx-Cumene·OOH ^{a)} (nmol/mg/min)	Control	181 ± 28 (100%)	253 ± 29 (100%)	150 ± 9 (100%)	266 ± 17 (100%)
	0.04 ppm	204 ± 10 (112%)	240 ± 20 (95%)	154 ± 13 (103%)	279 ± 10 (105%)
	0.4 ppm	193 ± 9 (107%)	252 ± 33 (100%)	162 ± 15 (108%)	191 ± 17 (72%)*
	4.0 ppm	200 ± 91 (110%)	269 ± 40 (107%)	150 ± 20 (100%)	229 ± 14 (86%)*
GPx-H ₂ O ₂ ^{b)}	Control		109 ± 16 (100%)		155 ± 18 (100%)
	0.04 ppm		109 ± 17 (100%)		159 ± 15 (102%)
	0.4 ppm		118 ± 19 (109%)		111 ± 13 (72%)*
	4.0 ppm		133 ± 25 (122%)		139 ± 10 (89%)
GR (nmol/mg/min)	Control	85.9 ± 15.0 (100%)	94.8 ± 8.4 (100%)	87.4 ± 4.1 (100%)	94.6 ± 4.5 (100%)
	0.04 ppm	89.9 ± 3.8 (104%)	89.6 ± 5.8 (95%)	90.0 ± 14.8 (104%)	88.4 ± 2.5 (94%)
	0.4 ppm	92.9 ± 5.4 (108%)	96.2 ± 11.2 (102%)	86.4 ± 4.4 (99%)	67.9 ± 6.6 (72%)*
	4.0 ppm	102.8 ± 5.0 (120%)*	109.3 ± 10.9 (115%)*	97.5 ± 9.6 (112%)	95.3 ± 7.3 (101%)
G6PD (nmol/mg/min)	Control	48.7 ± 11.6 (100%)	61.3 ± 8.5 (100%)	67.2 ± 11.2 (100%)	79.2 ± 6.6 (100%)
	0.04 ppm	57.4 ± 10.5 (118%)	52.5 ± 3.9 (86%)	76.8 ± 17.5 (114%)	89.1 ± 8.6 (102%)
	0.4 ppm	65.8 ± 9.9 (135%)*	57.8 ± 8.1 (94%)	80.7 ± 11.6 (120%)	60.0 ± 9.3 (76%)*
	4.0 ppm	86.8 ± 9.2 (178%)*	79.7 ± 10.7 (130%)*	100.8 ± 11.4 (150%)*	80.3 ± 9.5 (101%)

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

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

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

表3 NO₂ 慢性暴露ラットの肺のグルタチオン S-トランスフェラーゼ, すなわち

アリル, アラキル, およびエポキシ-S-トランスフェラーゼ活性の変化

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

* p < 0.05, *** p < 0.001

表4 NO₂ 慢性暴露ラットの肺のチオバルビツール酸 (TBA) 反応性物質質量の変化

		Rats exposed to NO ₂ for 9 months		Rats exposed to NO ₂ for 18 months	
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
		Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)	Mean ± SD (%)
TBA values (Fluorometric) (nmol/g·Lung)	Control	52.8 ± 4.9 (100%)	39.6 ± 1.5 (100%)	54.9 ± 4.1 (100%)	46.9 ± 2.9 (100%)
	0.04 ppm	52.9 ± 3.1 (100%)	37.6 ± 2.4 (95%)	56.2 ± 4.1 (102%)	52.4 ± 3.5 (112%)
	0.4 ppm	54.9 ± 3.8 (104%)	38.7 ± 1.4 (98%)	64.0 ± 3.8 (106%)**	55.3 ± 3.6 (118%)**
	4.0 ppm	66.2 ± 4.4 (125%)***	41.1 ± 1.4 (104%)	69.8 ± 3.2 (127%)***	57.8 ± 4.6 (123%)**

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

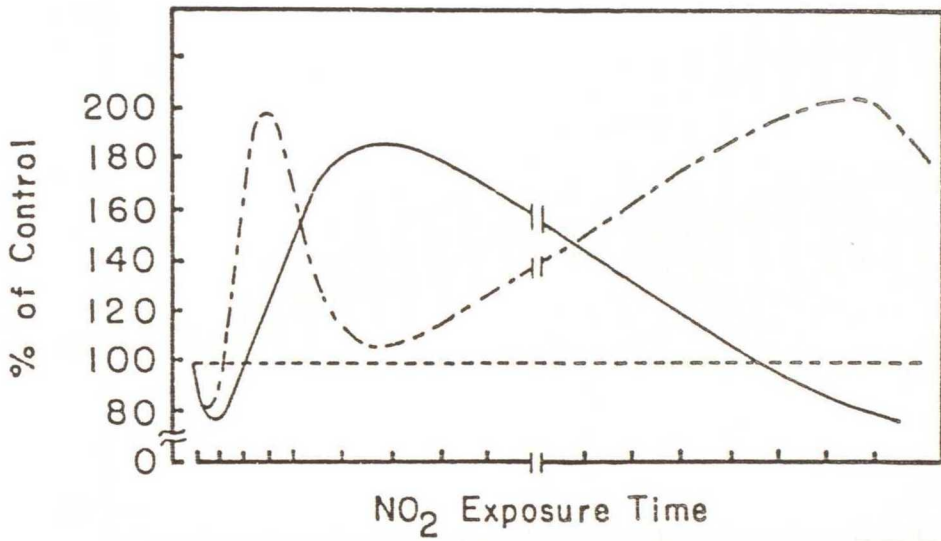
表5 慢性実験におけるNO₂ 暴露飼料のエタン産生に及ぼす影響

	Control	0.04ppm·NO ₂	0.12ppm·NO ₂	0.4ppm·NO ₂
TBA values ^{a)} of diets	26.0 ± 0.8 (100%)	29.3 ± 2.2 (113%)	29.6 ± 1.2 (114%)	39.7 ± 3.2 (153%)
Ethane ^{b)} Exhalation	2.11 ± 0.15	-----	-----	2.09 ± 0.16

a) n moles of MDA/g-diet.

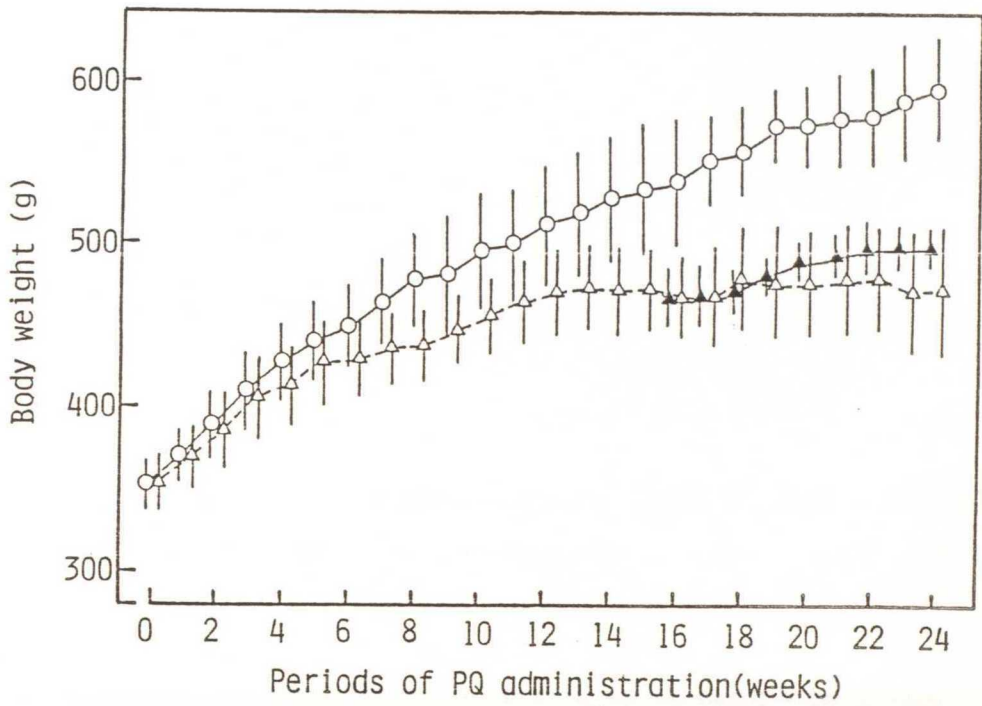
b) p moles of Ethane/100g body wet/min.

図14 呼気中エタン測定による脂質過酸化と抗酸化性防御酵素活性との間のすべての期間にわたる変化



(Ethane exhalation; ---, Antioxidative protective enzyme activities; —,)

図 15 パラコート (PQ) 反復投与ラットの体重の経時変化



(○ — ; Control group, △ --- ; PQ administered group, ▲ — PQ ; 16w stop group). The values are expressed as mean \pm SD.

図 16 パラコート (PQ) 反復投与8週目のラットの肺 (HE 染色) : 炎症反応と肺胞壁の肥厚 (原拡大 ×40)

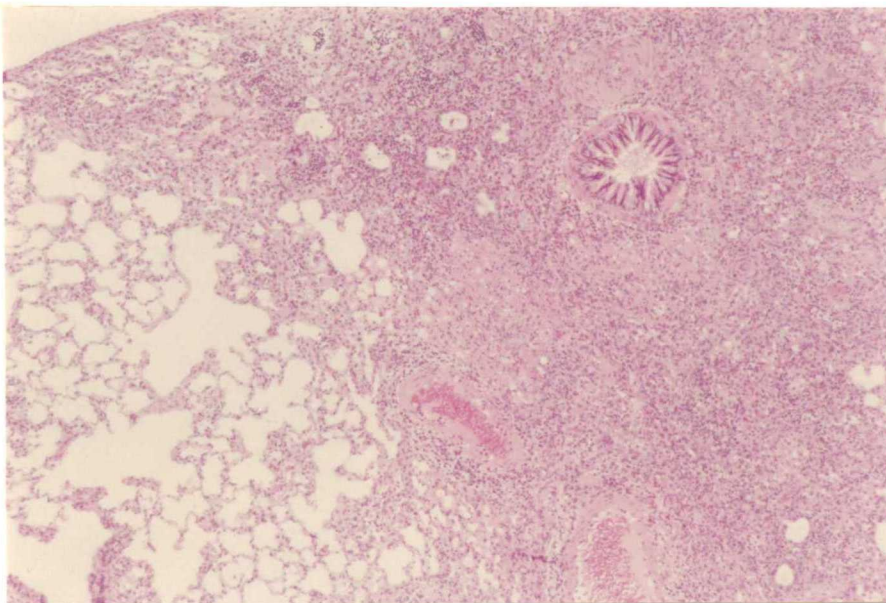


図 17 パラコート (PQ) 反復投与8週目のラットの肺 (HE 染色) : 図16右下部拡大, 細胞分裂を伴う肺胞壁細胞のBronchiolization (原拡大 ×200)

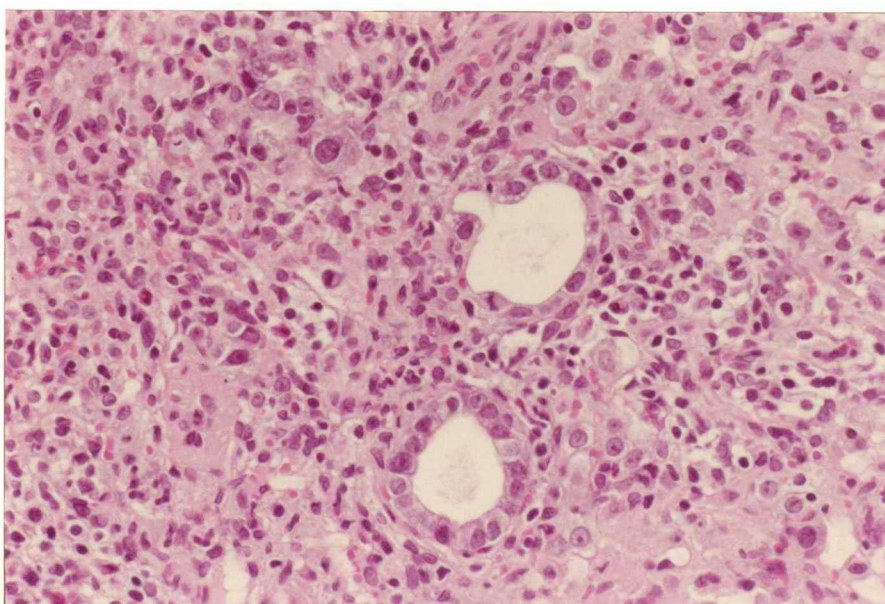


図 18 パラコート (PQ) 反復投与8週目のラットの肺 (アザン染色) : 炎症反応と線維化 (×40)

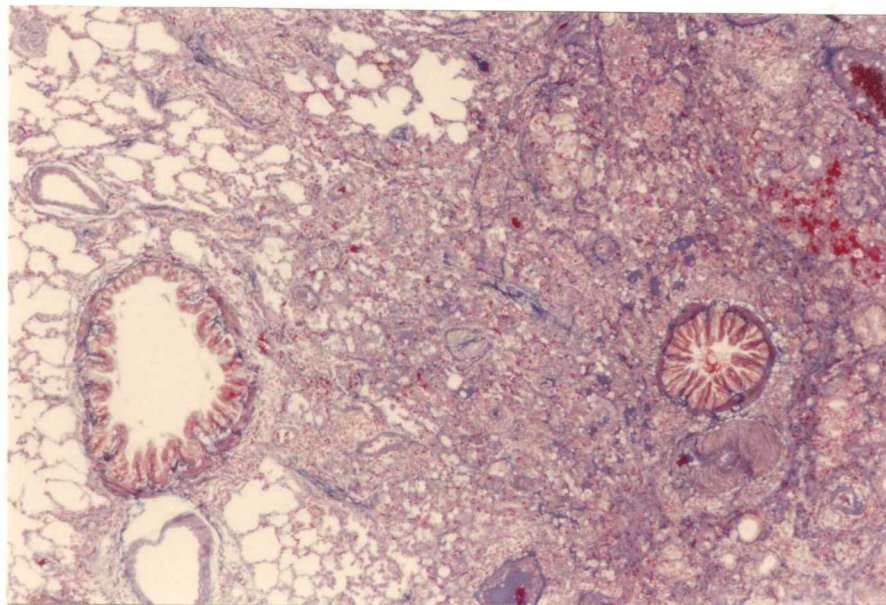


図 19 パラコート (PQ) 反復投与8週目のラットの肺 (アザン染色) : 図18の中央部 (原拡大 ×200)

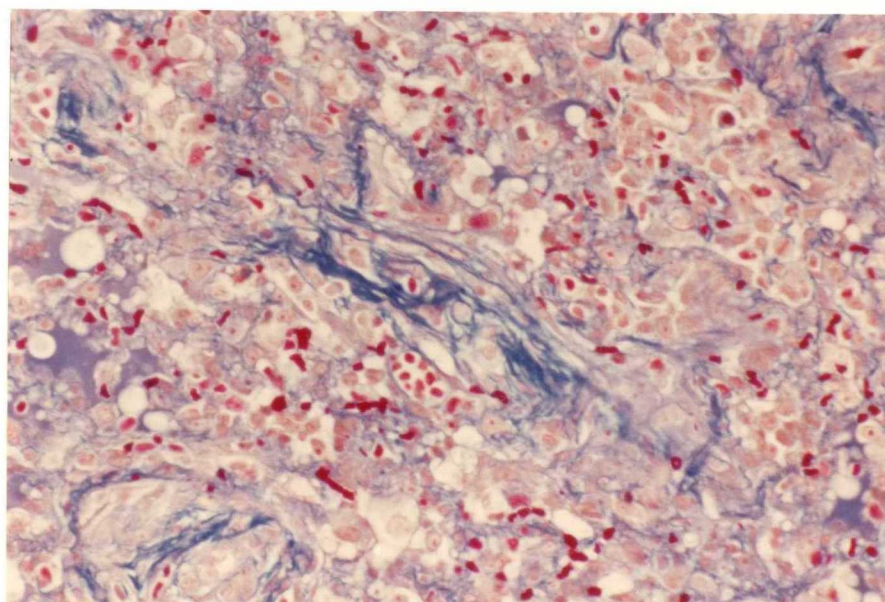


図 20 パラコート (PQ) 反復投与16週目のラットの肺 (HE染色) : 炎症反応
と肺胞構造の崩壊 (原拡大 ×40)

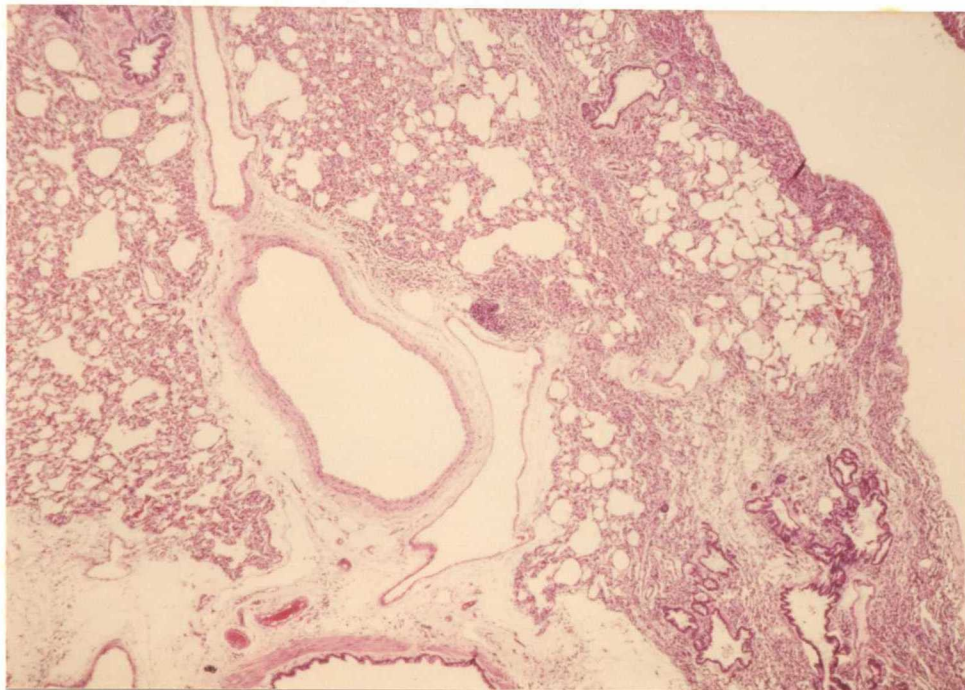


図 21 パラコート (PQ) 反復投与16週目のラットの肺 (アザン染色) : 右下部の
拡大, 肺胞構造の崩壊と線維化 (原拡大 ×100)

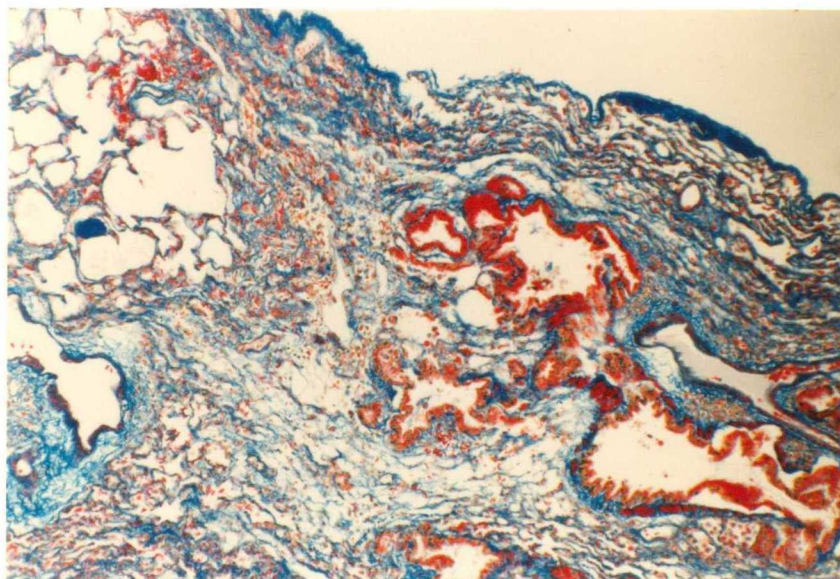


図 22 パラコート (PQ) 反復投与24週目のラットの肺 (アザン染色) : 肺胞構造の崩壊と線維化 (原拡大 ×40)

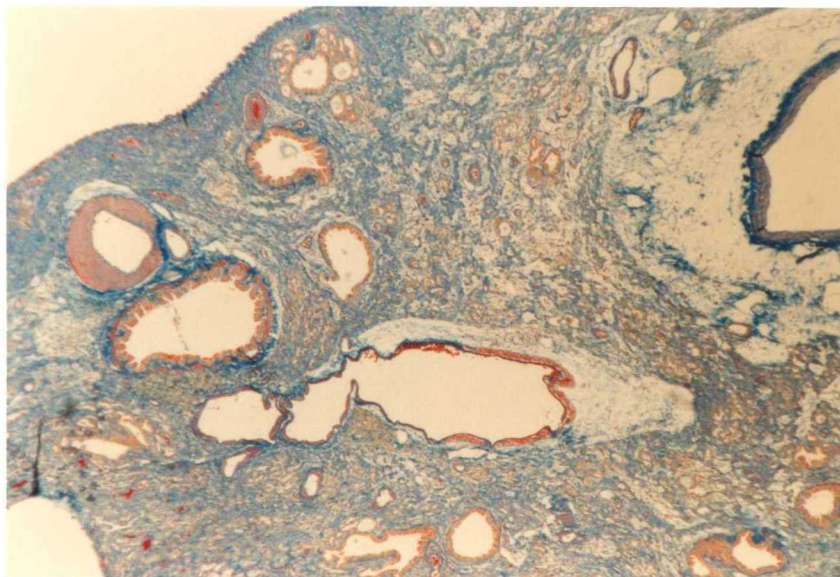


図 23 パラコート (PQ) 反復投与24週目のラットの肺 (アザン染色) : 図20の中央下拡大 (原拡大 ×100)

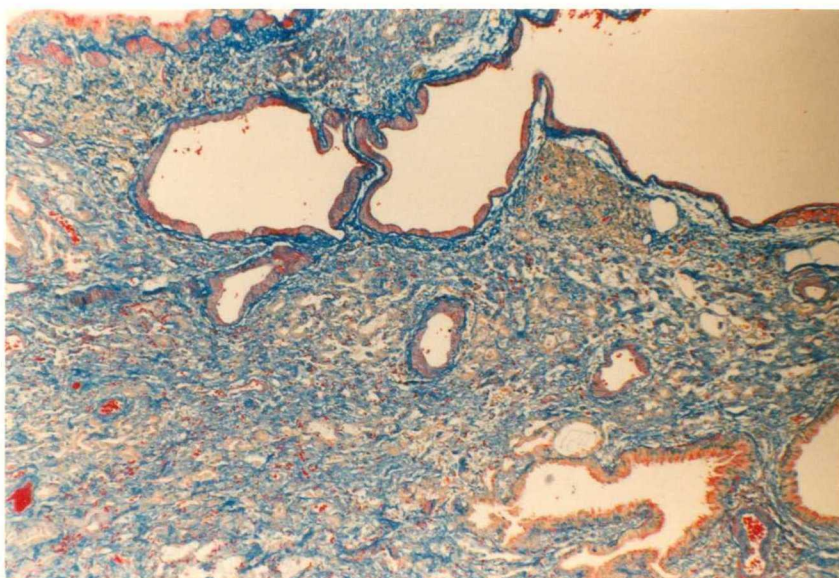
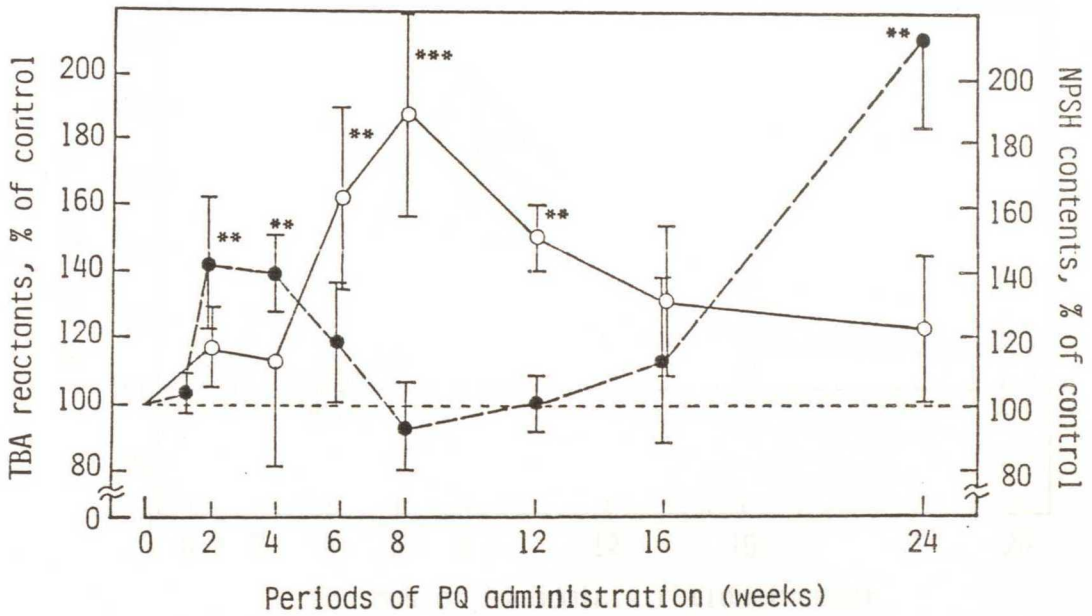
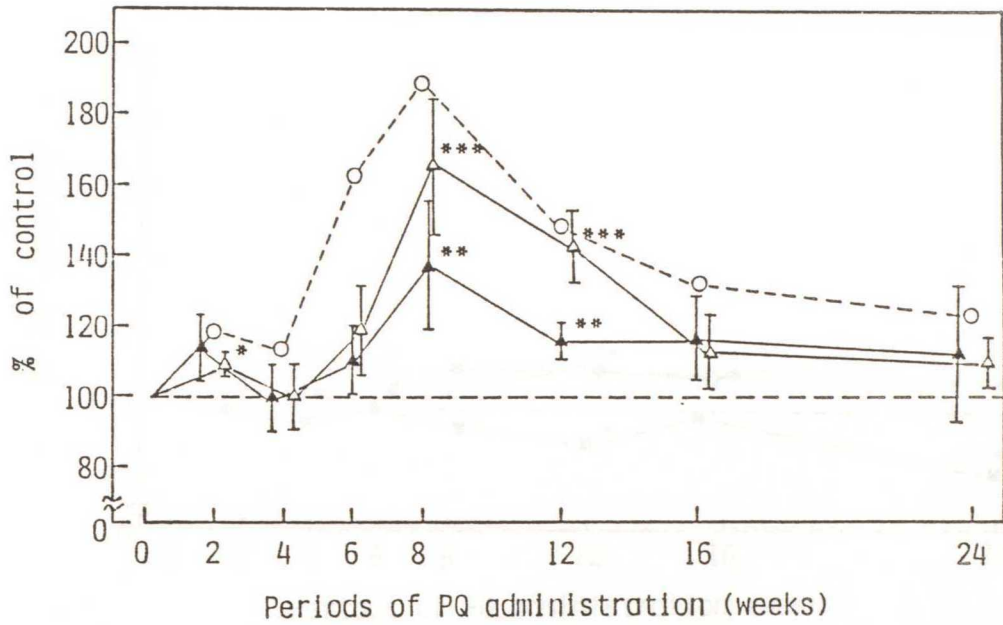


図 24 パラコート (PQ) 反復投与ラットの肺のTBA値と非蛋白性SH (NPSH) 量の経時変化



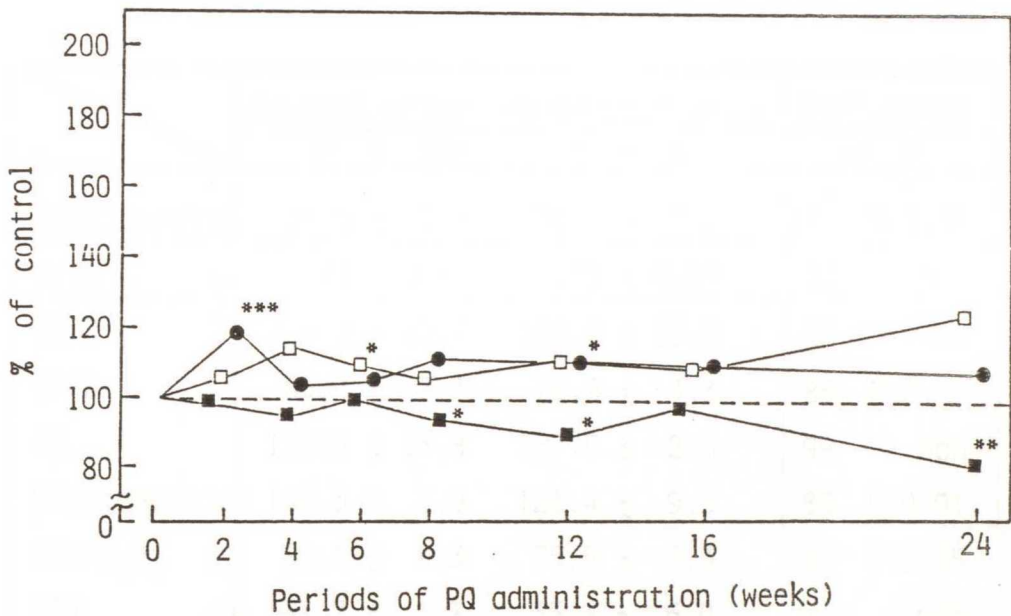
Control values of TBA reactants were located between 17.0 and 26.8 n moles/g·lung, and control values of NPSH were located between 0.69 and 1.10 μ moles of nonprotein-sulphydryls/g·lung from the second through the 24 th week (● --- ; TBA reactants, ○ — ; NPSH). The values are expressed as mean \pm SD (* ; P < 0.05, ** ; P < 0.01, *** ; P < 0.001).

図 25 パラコート (PQ) 反復投与ラットの肺のグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD), 6-ホスホグルコネート脱水素酵素 (6PGD) 及び非蛋白性 SH (NPSH) 量の経時変化



Control values of G6PD activity were located between 134.7 and 189 n moles NADPH^+ reduced/mg·protein/min, and control values of 6PGD activity were located between 80.8 and 129.5 n moles NADPH^+ reduced/mg·protein/min from the second through the 24th week (○ --- ; NPSH, ▲ — ; G6PD, △ — ; 6PGD). The values are expressed as mean \pm SD (* ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$, *** ; $P < 0.001$).

図 26 パラコート (PQ) 反復投与ラットの肺のグルタチオン還元酵素 (GR), グルタチオンパーオキシダーゼ (GPx) 及びスーパーオキシド・ディスムターゼ (SOD) 活性の経時変化



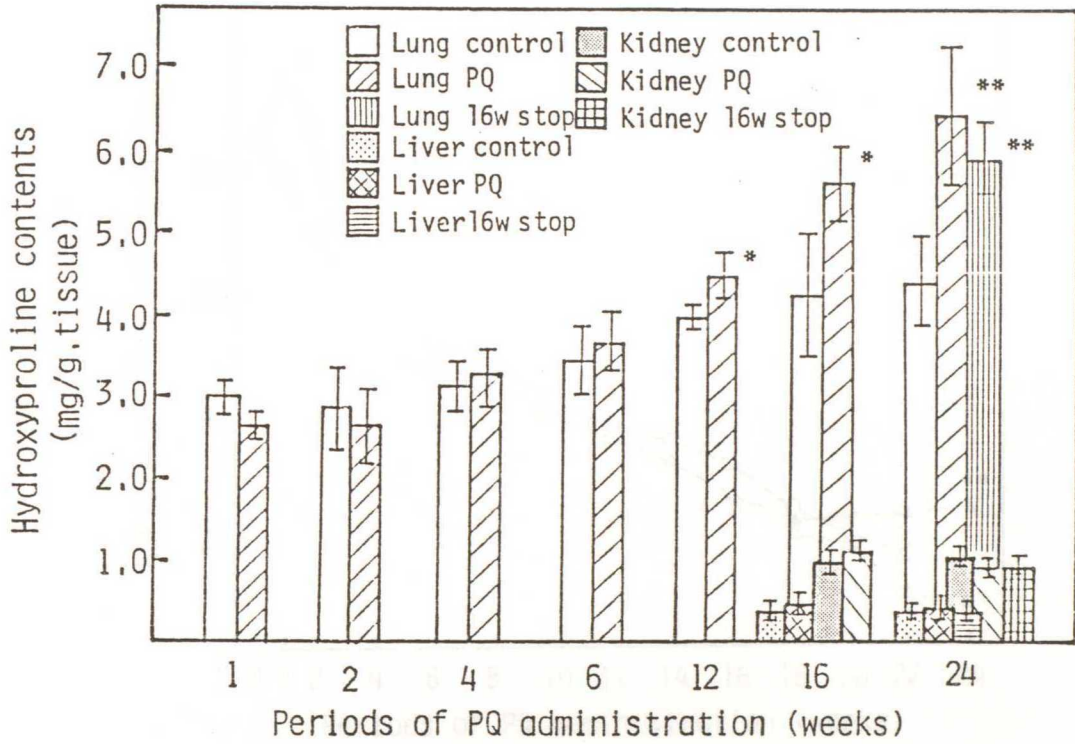
Control values of GR activity were located between 95.1 and 145.6 n moles of NADP^+ formed/mg·protein/min, and cocontrol value of GP_x -Cumene·OOH activity were located between 75.7 and 157.1 n moles of NADP^+ formed/mg·protein/min, and control values of SOD activity were located between 27.3 and 47.5 units/mg·protein/min from the second through the 24th week (● ; GR, ■ ; GP_x -Cumene·OOH, □ ; SOD). The values are expressed as mean (* ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$, *** ; $P < 0.001$).

表6 パラコート投与中止群の24週目の肺のTBA値, 非蛋白性SH (NPSH) 量
 グルコースー6ーリン酸脱水素酵素 (G6PD), 6ーホスホグルコネート脱水
 素酵素 (6PGD), グルタチオン還元酵素 (GR), グルタチオンパーオキシ
 ダーゼ (GPx) 及びスーパーオキシド・ディスムターゼ (SOD) 活性の変化

	Control group		PQ16W, Stop group		PQ/Control	
	M	± SD	M	± SD	% e)	P
TBA(200xg) a)	23.6	± 2.7	35.7	± 8.2	151	P<0.05
NPSH b)	0.79	± 0.19	0.73	± 0.69	92	non
G6PD c)	166.2	± 13.7	158.8	± 15.0	96	non
6PGD	85.7	± 7.1	72.9	± 3.3	85	P<0.01
GR	138.5	± 13.8	137.6	± 2.6	99	non
GPx-Cumene 1)	146.3	± 7.9	121.4	± 9.9	83	P<0.01
GPx-H ₂ O ₂ 2)	89.4	± 7.3	75.5	± 7.3	84	P<0.05
SOD d)	37.7	± 1.7	35.9	± 6.0	95	non

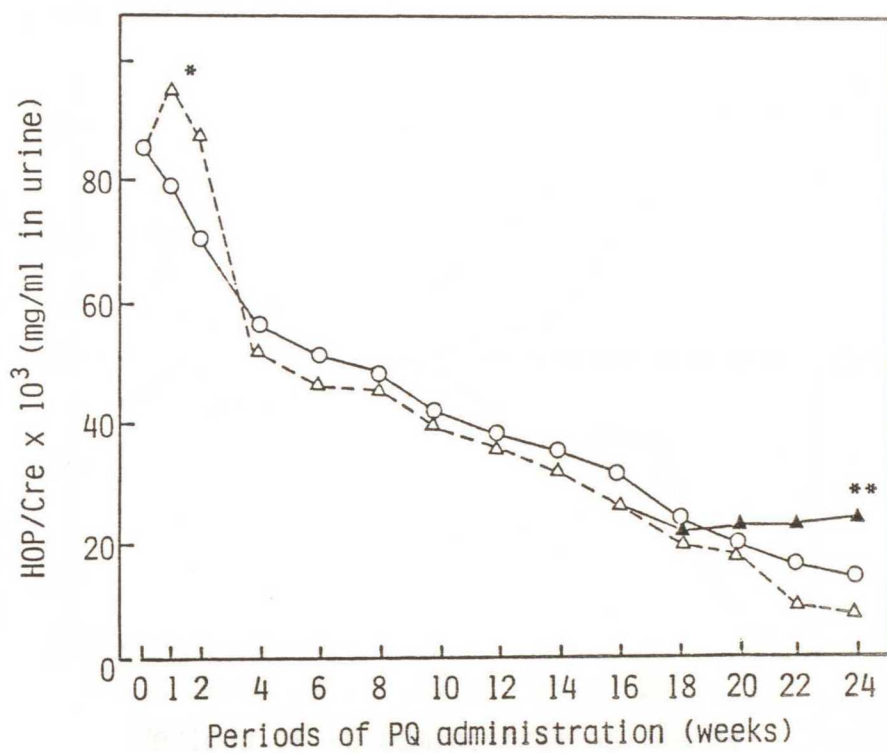
- a) The values are expressed as n moles/g·lung for thiobarbituric acid reactants.
- b) The values are expressed as μ moles of nonprotein-sulfhydryls/g·lung.
- c) The values are expressed as NADP⁺ reduced/mg·protein/min.
- d) The values are expressed as units/mg·protein.
- e) The value shows percent ratio against the value of control group(100%)
- 1) GP_x-Cumene·OOH shows glutathione peroxidase assayed by cumene hydroperoxide as a substrate
- 2) GP_x-H₂O₂ shows glutathione peroxidase assayed by hydrogen peroxide as substrate

図 27 パラコート (PQ) 反復投与ラットの肺, 肝臓及び腎臓のヒドロキシプロリン (HOP) 量の経時変化



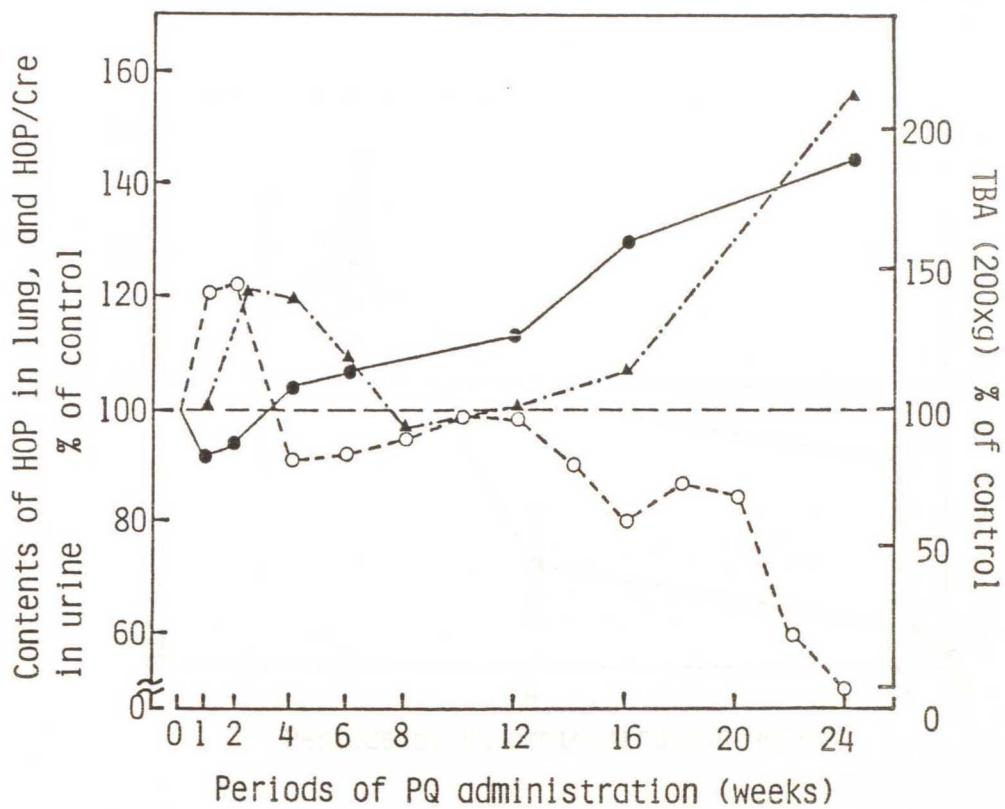
The values are expressed as mean \pm SD (* ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$).

図 28 パラコート (PQ) 反復投与ラットの尿中ヒドロキシプロリン:クレアチニン比 (HOP比) の経時変化



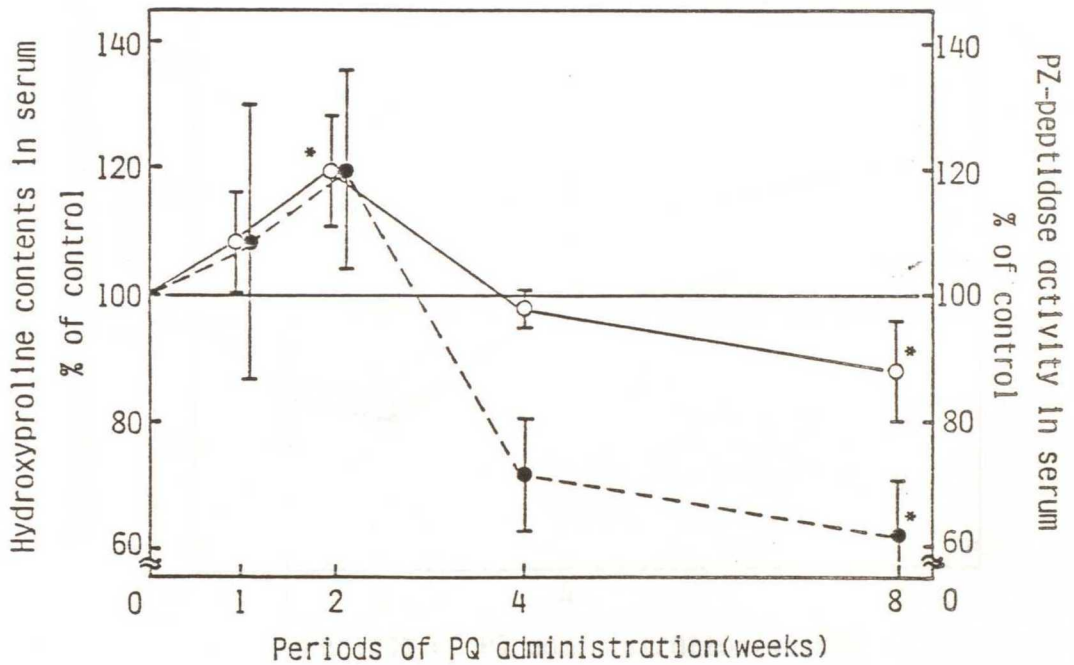
The values are expressed as mean (○ — ; Control group, △ --- ; PQ administered groups, ▲ — ; PQ 16 w stop group) (* ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$).

図 29 パラコート (PQ) 反復投与ラットの肺のTBA値, ヒドロキシプロリン (HOP) 量及び尿中ヒドロキシプロリン:クレアチニン比 (HOP比) の経時変化



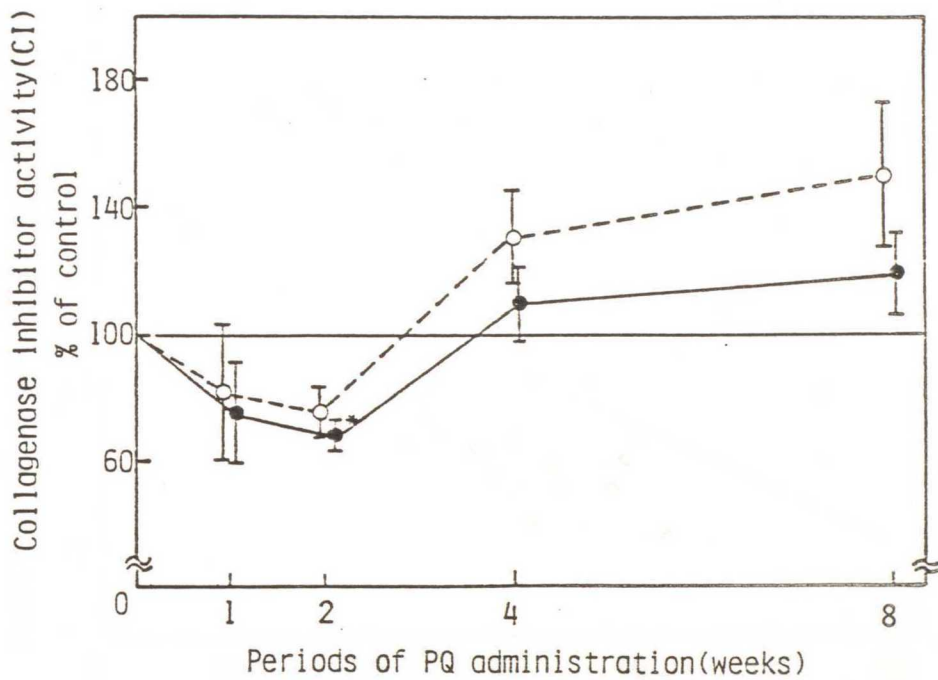
(▲ --- ; TBA reactants, ● — ; Lung HOP, ○ --- ; HOP/cre).

図 30 パラコート (PQ) 反復投与ラットの血清ヒドロキシプロリン (HOP) 量
とピロゼット・ペプチダーゼ活性の経時変化



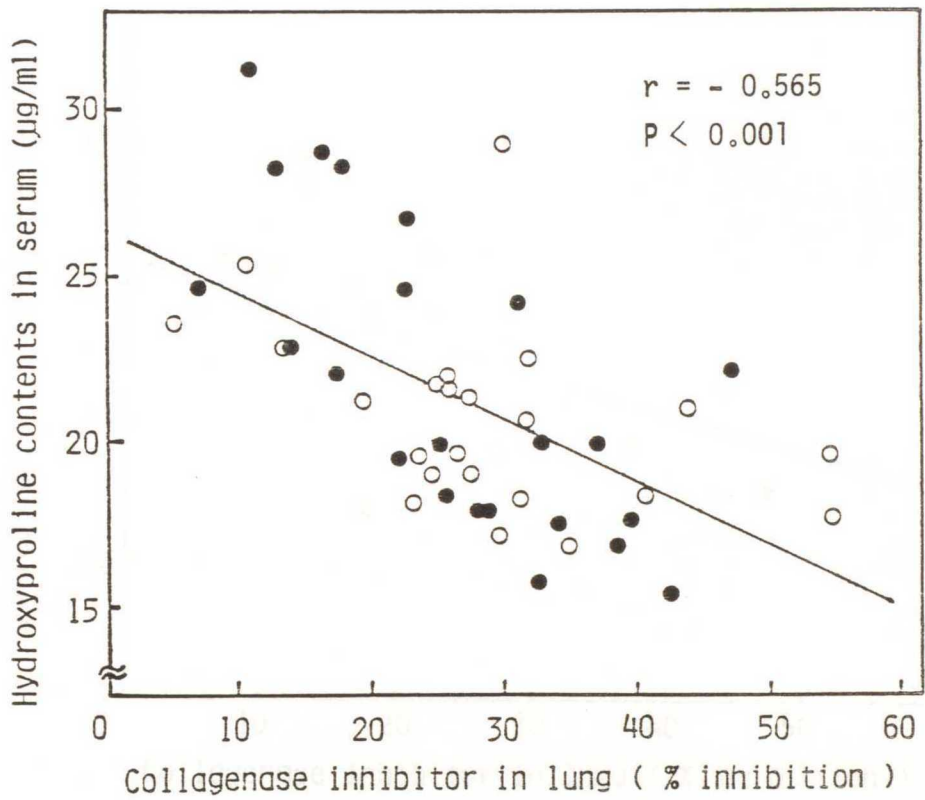
Control values of HOP in serum were located between 18.0 and 23.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and control value of PZ-peptidase activity in serum were located between 50.6 and 58.5 units/mg·protein/hr from the first through the 8th week (○ — ; Serum HOP, ● --- ; Serum PZ-peptidase). The values are expressed as mean \pm SD (* ; $P < 0.05$).

図 31 パラコート (PQ) 反復投与ラットの血清と肺のコラゲナーゼ阻害因子 (CI) 活性の経時変化



Control values of collagenase inhibitor activity (CI) in serum were located between 17.7 and 21.6% inhibition, and control values of CI activity in lung were located between 25.5 and 33.9 % inhibition from the first through the 8th week (O --- ; Serum CI, ● — ; Lung CI). The values are expressed as mean \pm SD (* ; $P < 0.05$).

図32 パラコート反復投与1週～8週目のラットの肺のコラゲナーゼ阻害因子活性と血清ヒドロキシプロリン (HOP) 量の相関



(○ ; Control group, ● ; PQ administered group).

図33 パラコート投与1, 2週目のラットの肺のTBA値とコラゲナーゼ阻害因子活性の相関

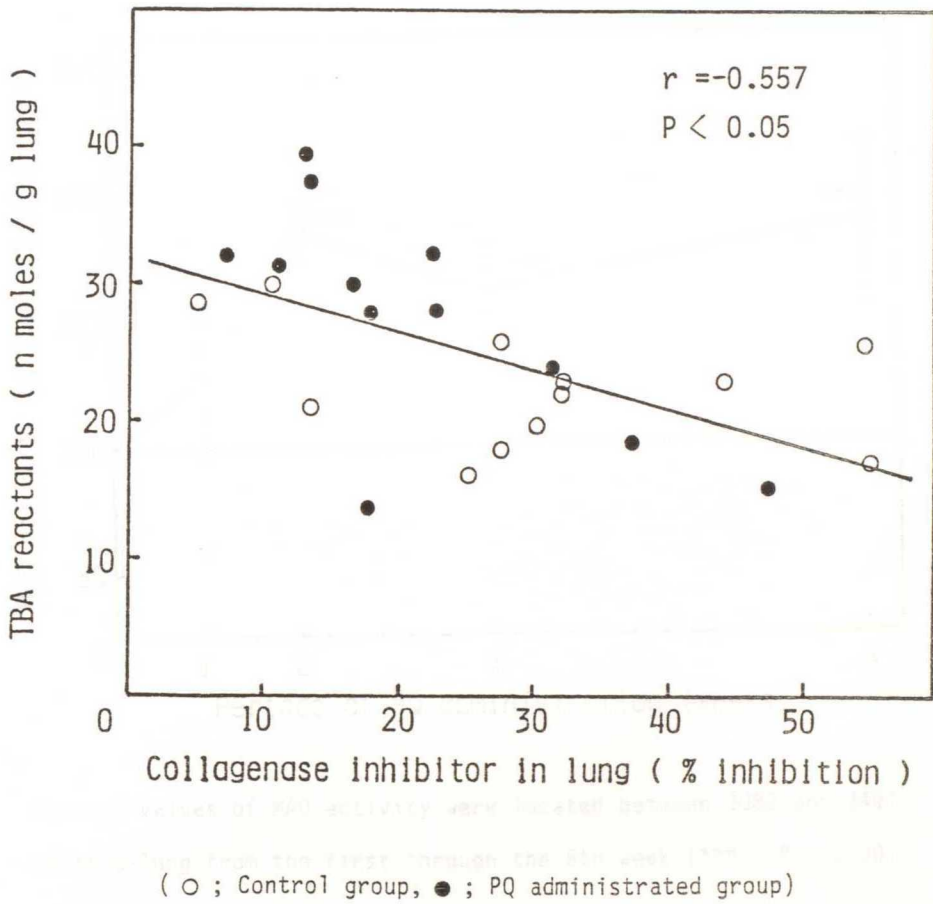
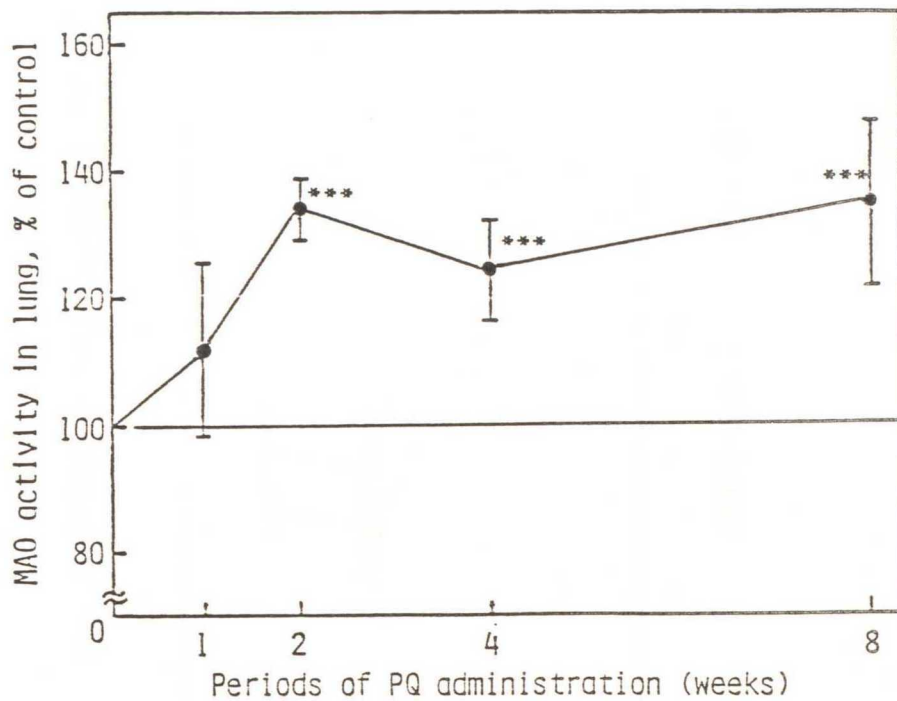
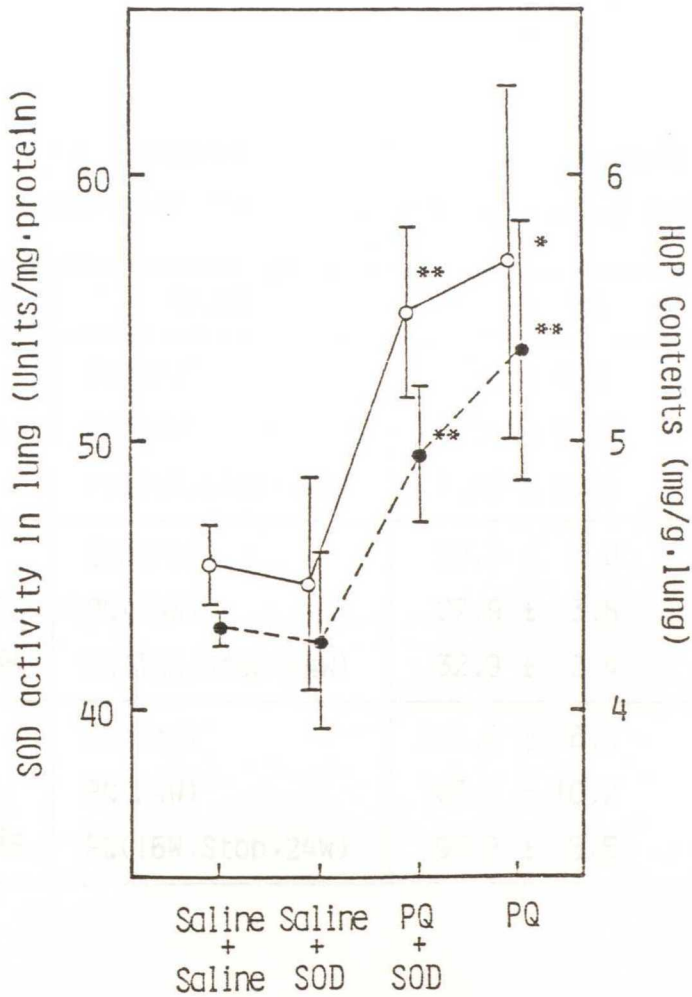


図34 パラコート (PQ) 反復投与ラットの肺のモノアミンオキシダーゼ (MAO) 活性の経時変化



Control values of MAO activity were located between 3082 and 3491 units/g·lung from the first through the 8th week (***) ; $P < 0.001$)

図35 パラコート (PQ) 投与前にスーパーオキシド・ディスムターゼ (SOD) を投与したラットの肺のSOD活性とヒドロキシプロリン (HOP) 量の変化

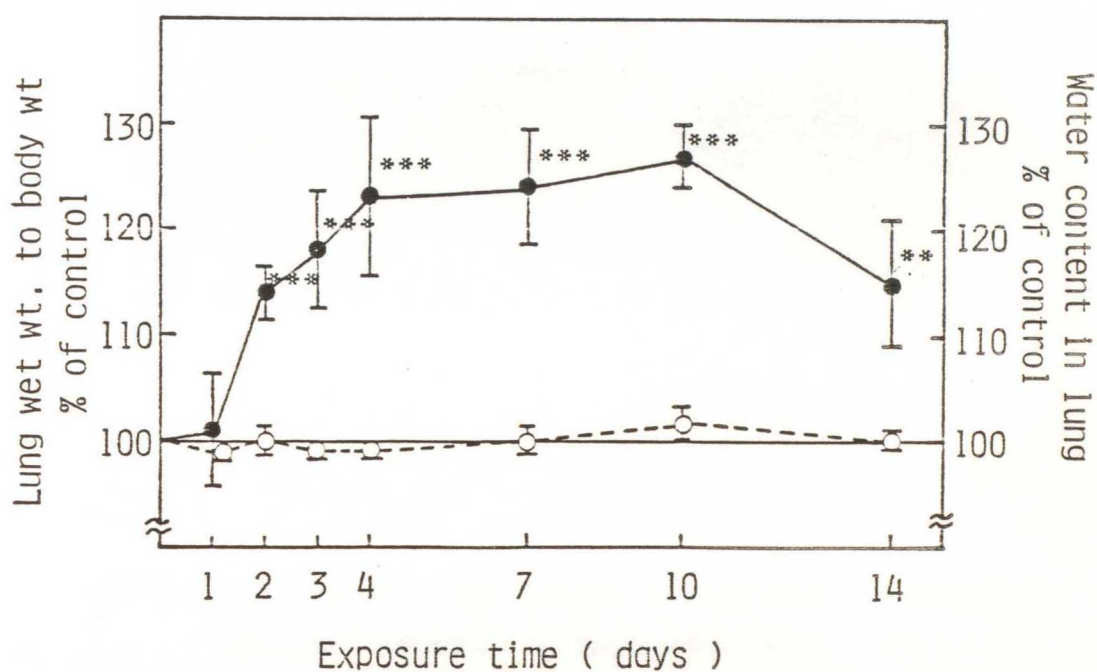


The values are expressed as mean \pm SD at the 24th week. Superoxide dismutase (14,000 units/kg B.W) was injected via tail vein (\circ — ; SOD, \bullet --- ; Lung HOP) (* ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$).

表7 バラコート連続投与群とバラコート投与中止群の24週目のラット動脈血pHa
 , 炭酸ガス分圧 (PaCO₂) 及び酸素分圧 (PaO₂) の変化

	Group	M ± SD	%	P
pHa	Control	7.40 ± 0.02	100	
	PQ(24W)	7.38 ± 0.03	100	NS
	PQ(16W,Stop・24W)	7.35 ± 0.05	95	NS
PaCO ₂ mmHg	Control	29.7 ± 3.0	100	
	PQ(24W)	27.9 ± 3.6	94	NS
	PQ(16W,Stop・24W)	32.9 ± 2.4	111	NS
PaO ₂ mmHg	Control	101.8 ± 6.0	100	
	PQ(24W)	87.2 ± 10.2	86	P<0.05
	PQ(16W,Stop・24W)	97.2 ± 6.5	94	NS

図36 10ppm NO₂ に2週間暴露したラットの肺湿重量：体重比と肺含水量の経時変化



Control values of lung wet weight ratio were located between 1.17 and 1.25 lung wet weight/body weight $\times 10^3$, and control value of water content ratio were located between 0.766 and 0.782 lung wet weight - lung dry weight/lung wet weight from the first through the 14th day (O --- ; Water content, ● — ; Lung wet wt. to body wt). The values are expressed as mean \pm SD (** ; $P < 0.01$, *** ; $P < 0.001$).

図 37 10 ppm NO₂ 暴露7日目のラットの肺 (HE染色) : 肺胞道壁および付近肺胞の壁肥厚 (原拡大 ×100)

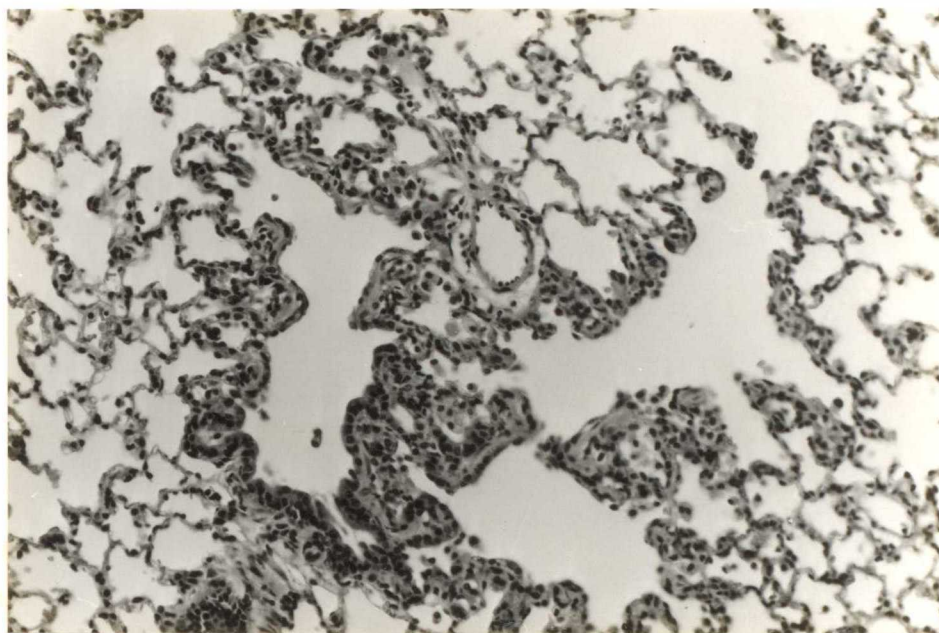


図 38 10 ppm NO₂ 暴露7日目のラットの肺 (HE染色) : 末梢気管支上皮の肥大と増殖, 肺胞道壁および付近肺胞の壁肥厚 (原拡大 ×100)

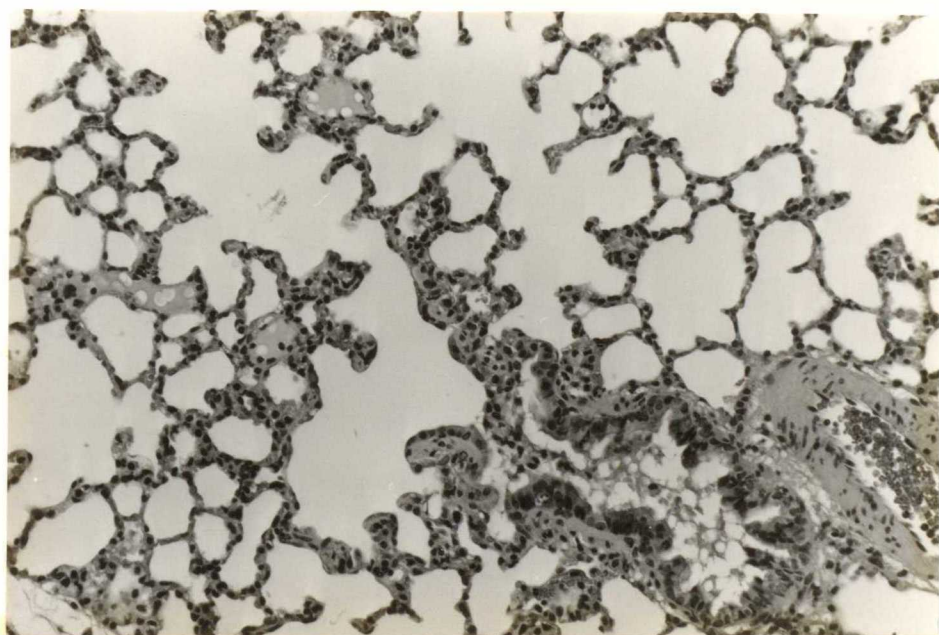


図 39 10 ppm NO₂ 暴露7日目のラットの肺（アザン染色）：肺胞道壁および
付近肺胞の壁肥厚・線維化（原拡大 ×100）

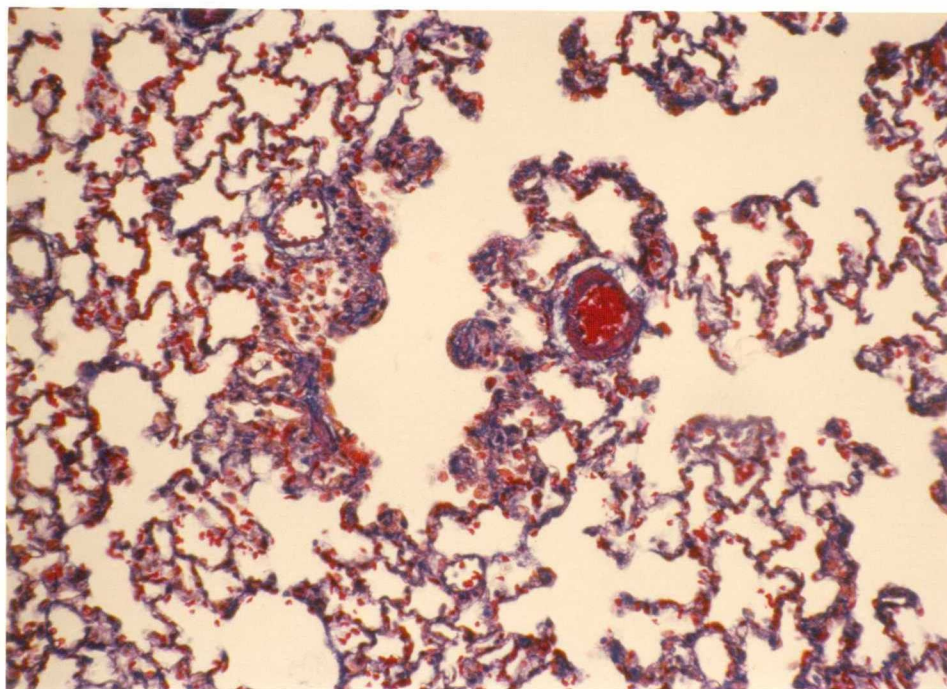


図 40 10 ppm NO₂ 暴露7日目のラットの肺（アザン染色）：図39の拡大
（原拡大 ×200）

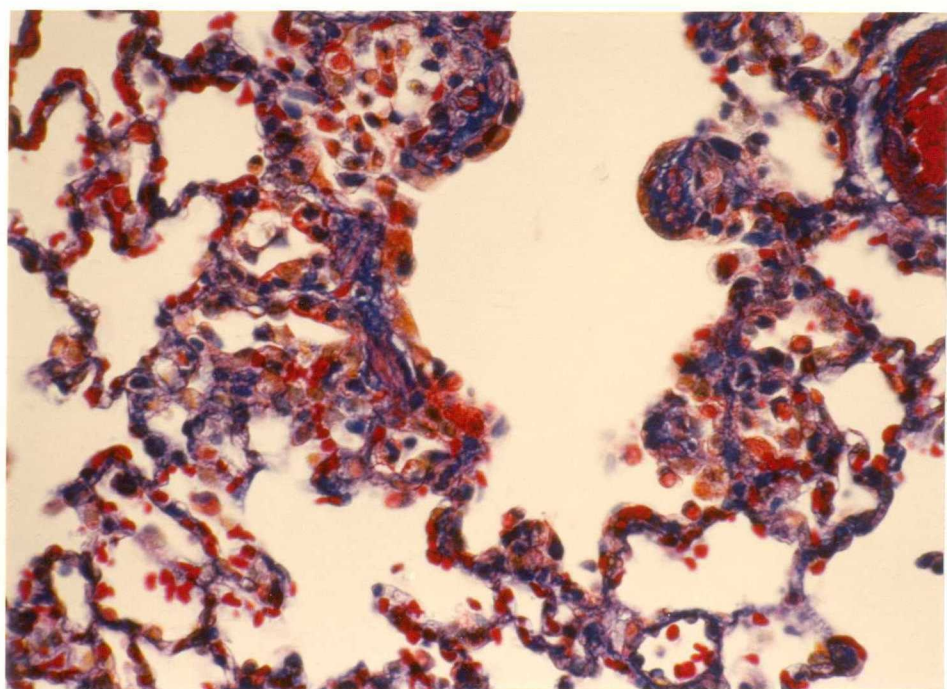


図 41 10 ppm NO₂ 暴露14日目のラットの肺（アザン染色）：肺泡道壁および付近肺胞壁の線維化（原拡大 ×40）

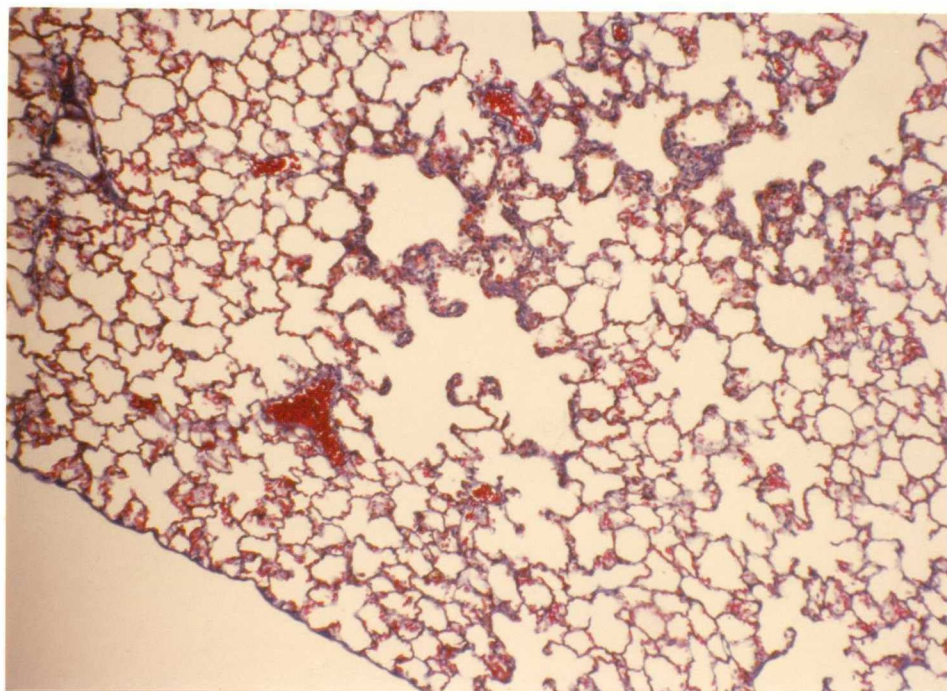


図 42 10 ppm NO₂ 暴露14日目のラットの肺（アザン染色）：図41の拡大（原拡大 ×100）

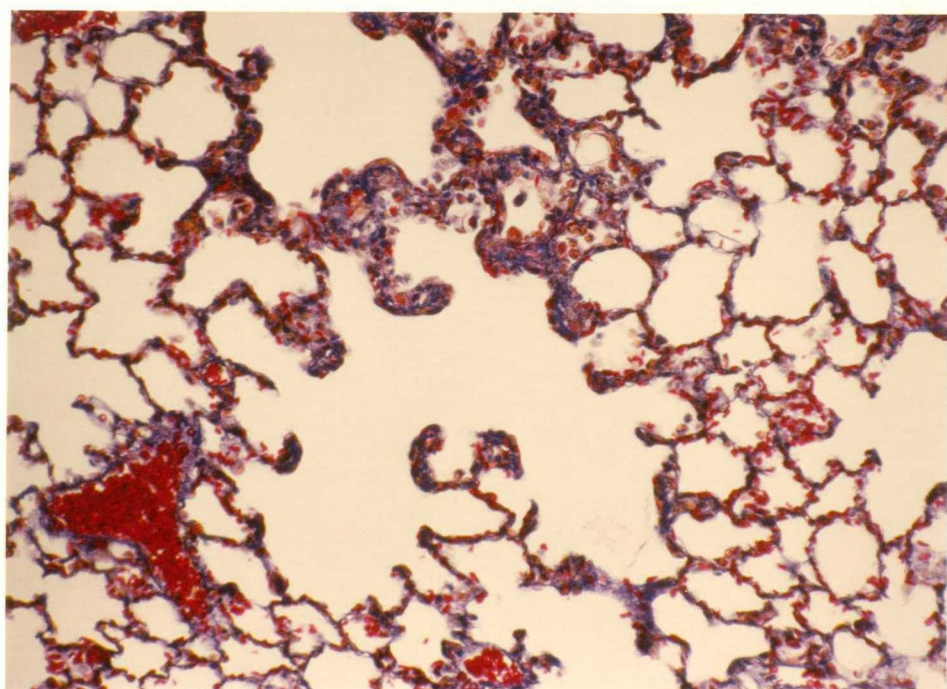


図 4 3 対照群のラットの肺（アザン染色）：（原拡大 ×100）

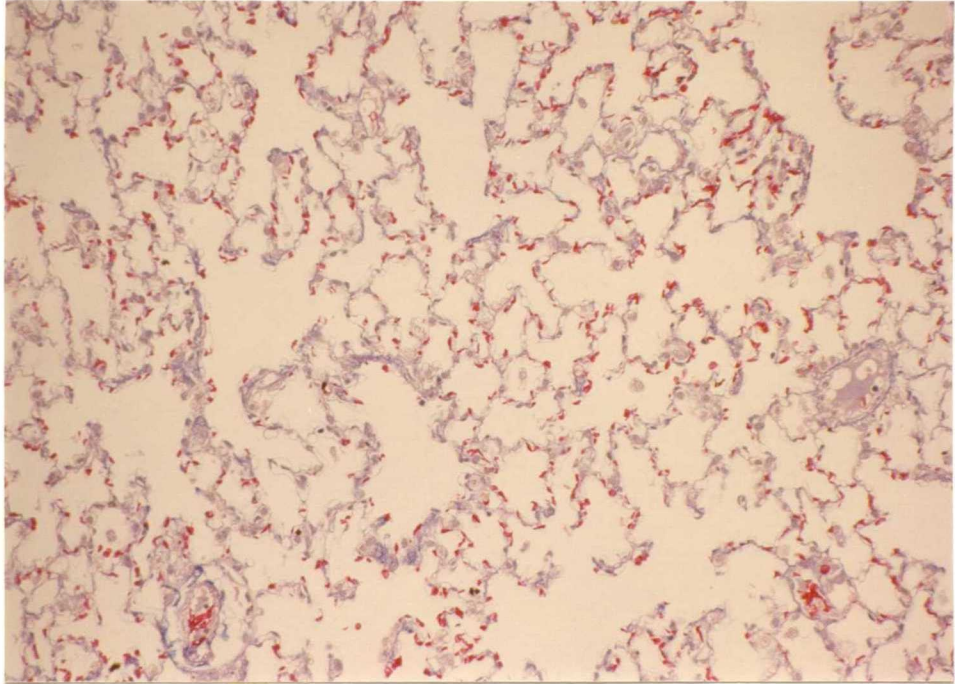


図 4 4 対照群のラットの肺（アザン染色）：（原拡大 ×200）

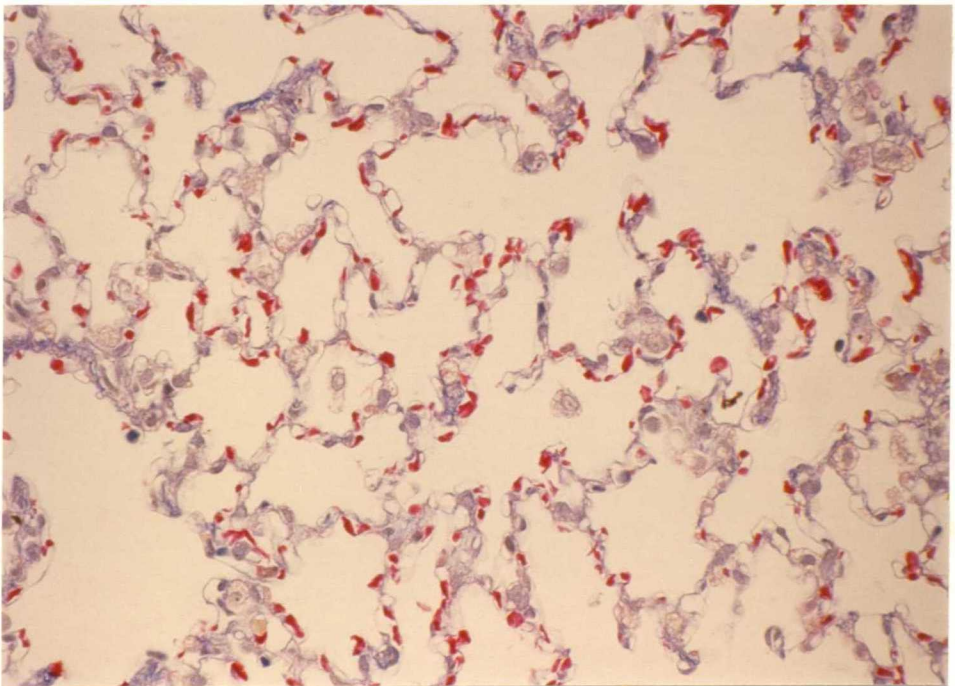
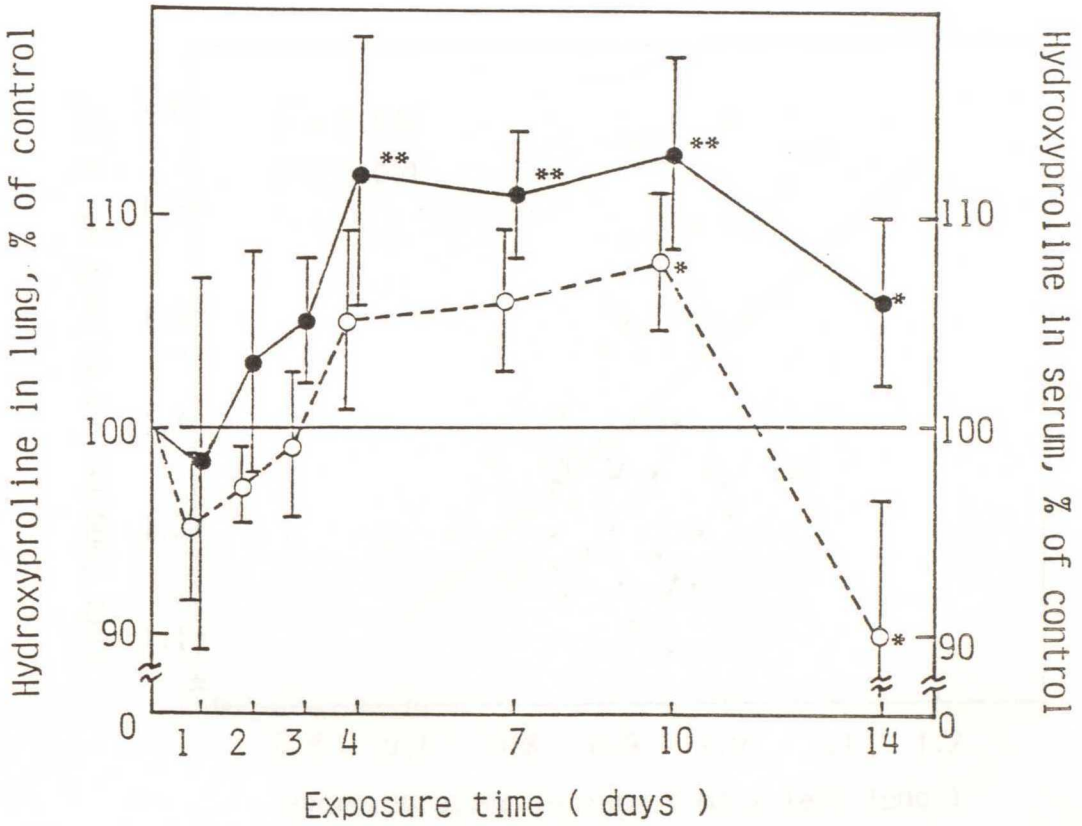
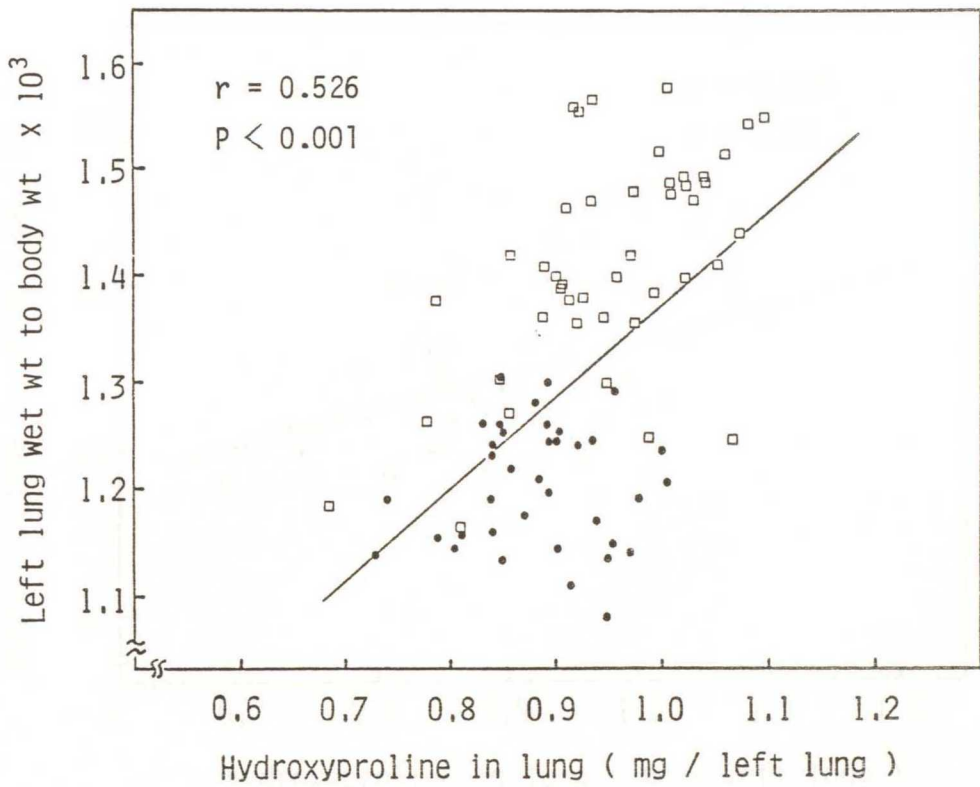


図45 10ppm NO₂ に2週間暴露したラットの肺と血清中のヒドロキシプロリン (HOP) 量の経時変化



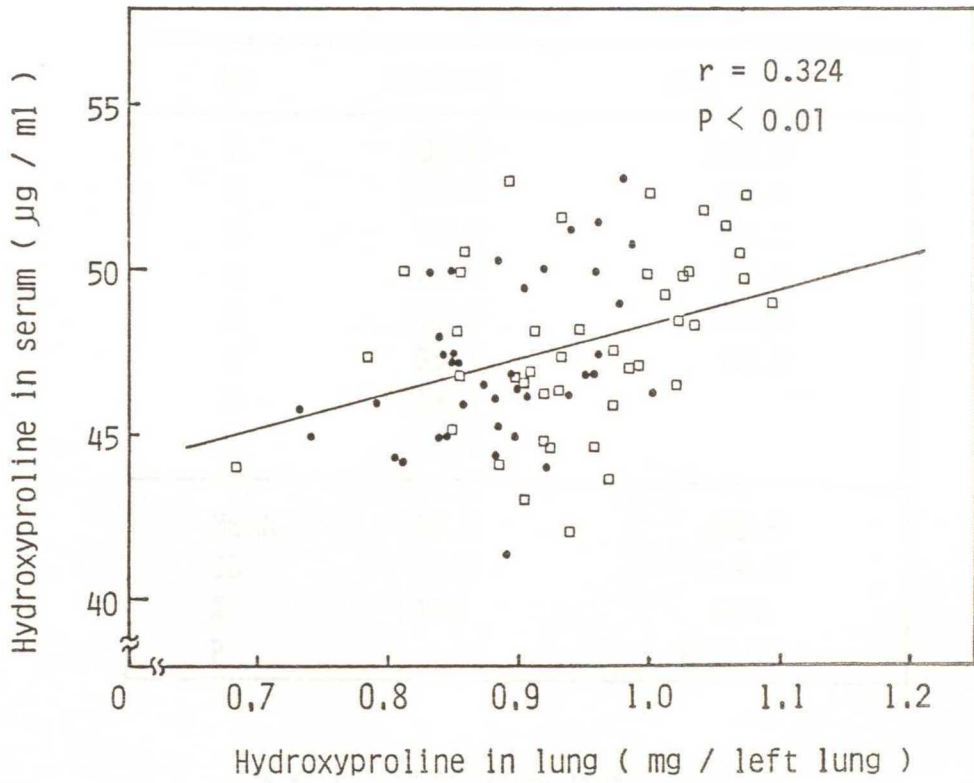
Control values of HOP in lung were located between 0.832 and 0.958 mg/left lung, and control values HOP in serum were located between 44.8 and 50.7 μ g/ml from the first through the 14th day (O --- ; Serum HOP, ● — ; Lung HOP). The values are expressed as mean \pm SD (* ; P < 0.05, ** ; P < 0.01).

図46 10 ppm NO₂ 暴露ラットの肺のヒドロキシプロリン (HOP) 量と肺湿重量 : 体重比の相関



(● ; Control group, □ ; NO₂ exposed group)

図47 10ppm NO₂ 暴露ラットの肺と血清のヒドロキシプロリン (HOP) 量の
相関



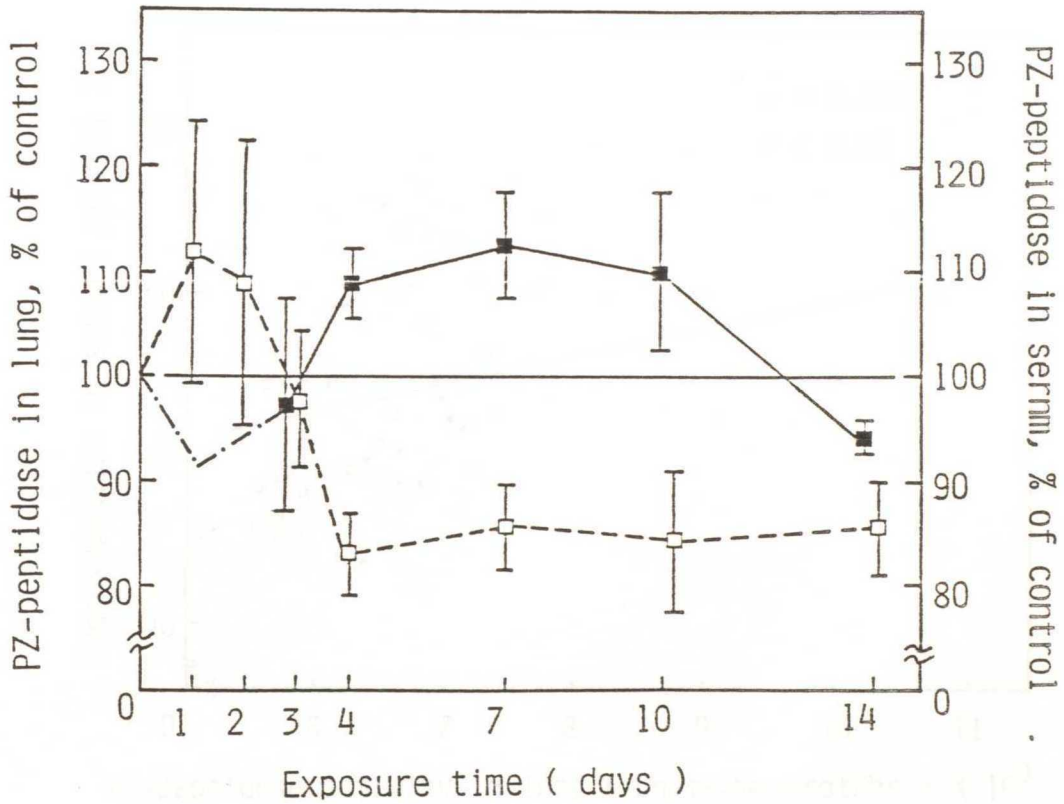
(●; Control group, □; NO₂ exposed group).

表8 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

No	Control	NO ₂ expos
1	100.4	105.8
2	124.0	84.4
3	90.9	87.2
4	111.9	78.8
5	100.5	89.4
6	95.7	86.1
7	118.8	
8	117.1	
MEAN	107.4	88.6
SD	11.3	8.4
%	100%	83%
P		P<0.01

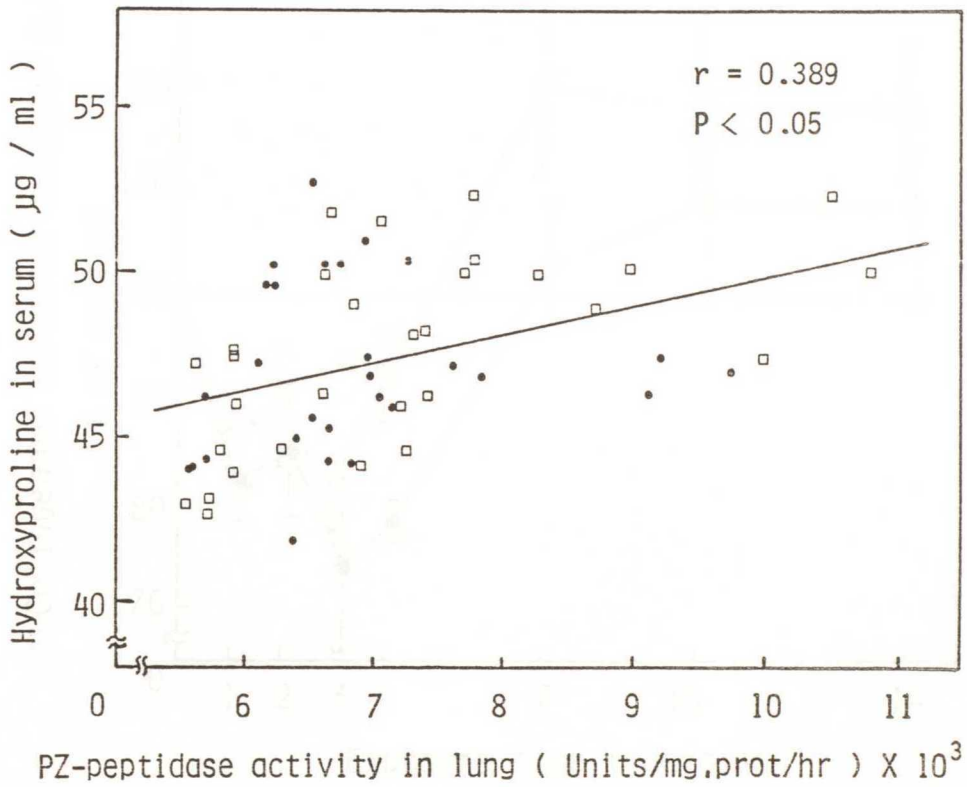
The values are expressed as HOP/Cre x 10³

図48 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



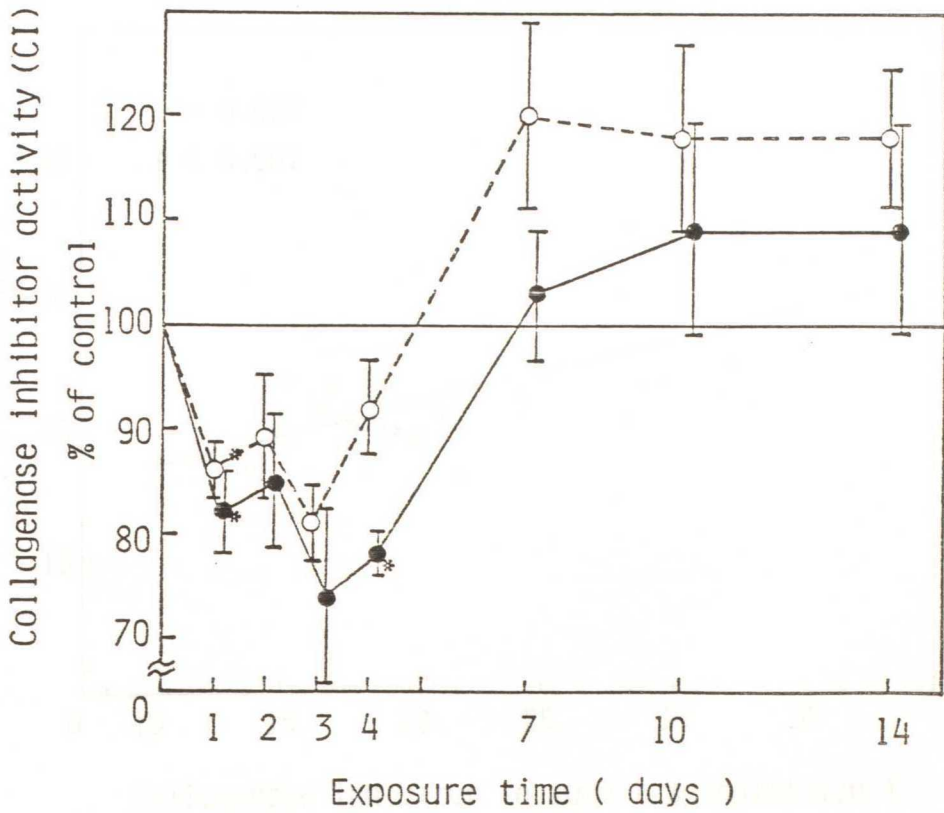
Control values of PZ peptidase activity in lung were located 6.23 and 7.95 units/mg. protein/hr $\times 10^3$, and control values of PZ-peptidase activity in serum were located 51.2 and 75.9 units/ml from first through the 14th day (□ --- ; Serum PZ-peptidase, ■ — ; Lung PZ-peptidase). The values are expressed as mean \pm SEM.

図49 10 ppm NO₂ 暴露3日~14日目のラットの肺のPZ-peptidase 活性と血清ヒドロキシプロリン (HOP) 量の相関



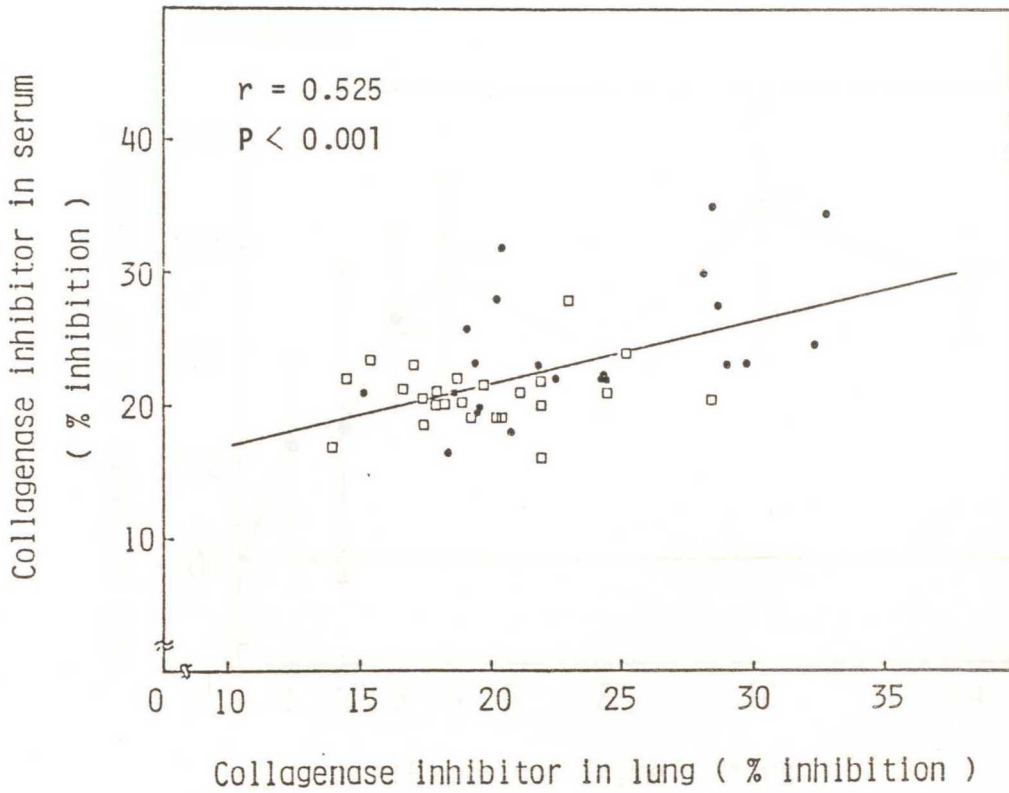
(● ; Control group, □ ; NO₂ exposed group).

図50 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



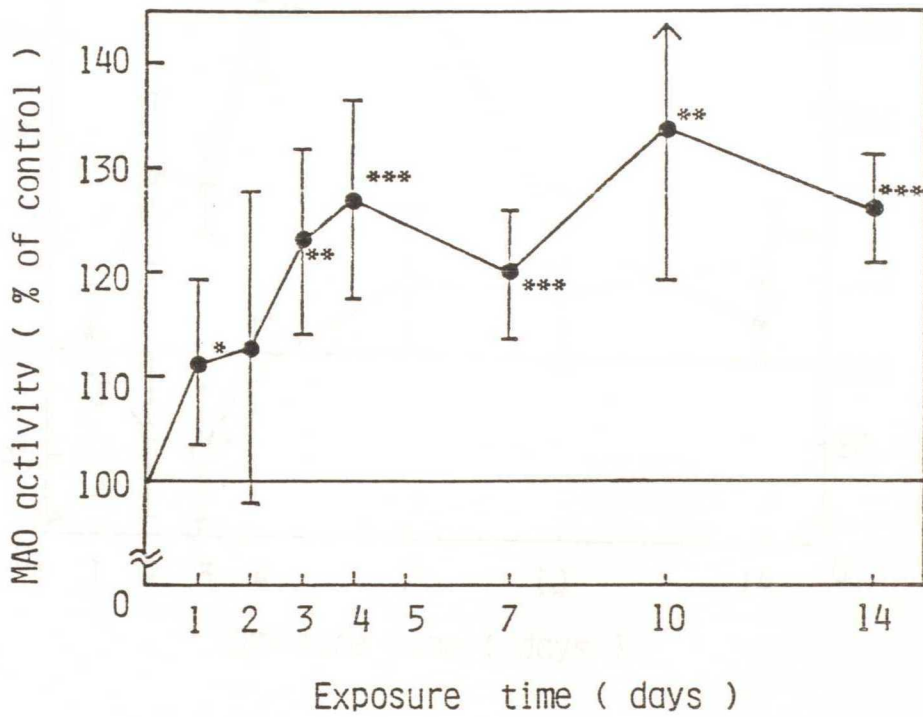
Control values of collagenase inhibitor (CI) activity in lung were located 18.5 and 26.5 % inhibition, and control values of CI activity in serum were located 20.3 and 25.1 % inhibition from the first through the 14th day (○ --- ; Serum CI, ● — ; Lung CI). The values are expressed as mean ± SEM (* ; P < 0.05).

図51 10 ppm NO₂ 暴露1日～4日目のラットの肺と血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の相関



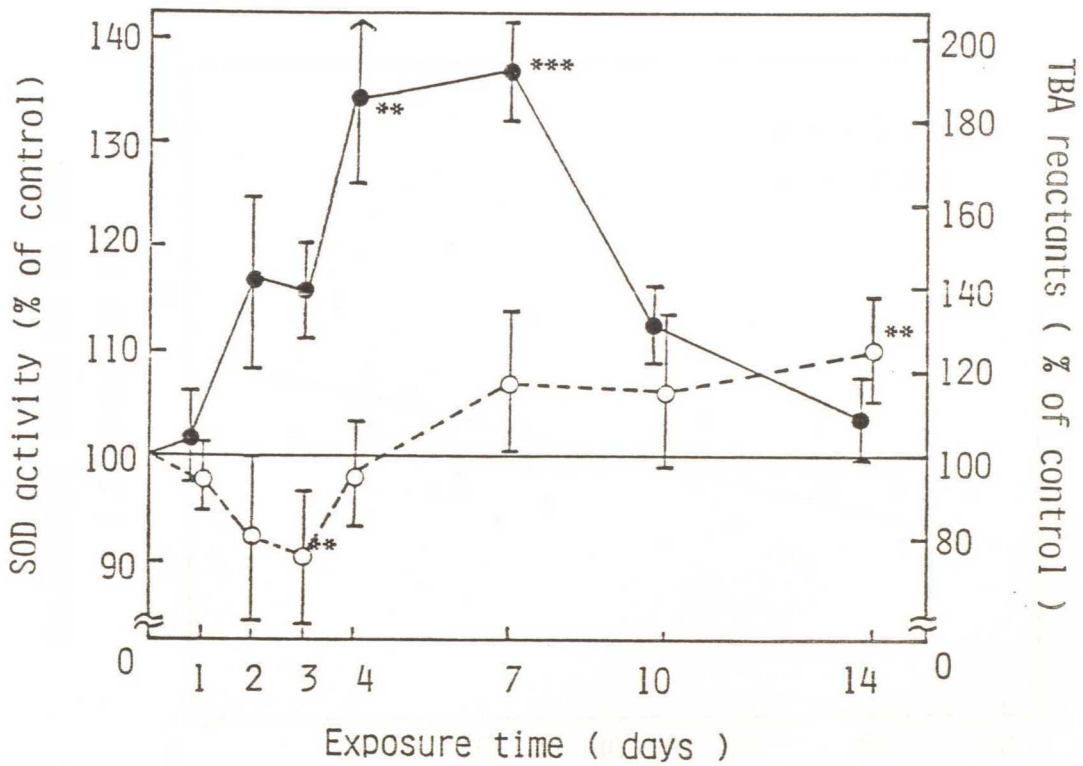
(●; Control group, □; NO₂ exposed group).

図52 10ppm NO₂ に2週間暴露したラットの肺のモノアミノキシダーゼ (MAO) 活性の経時変化



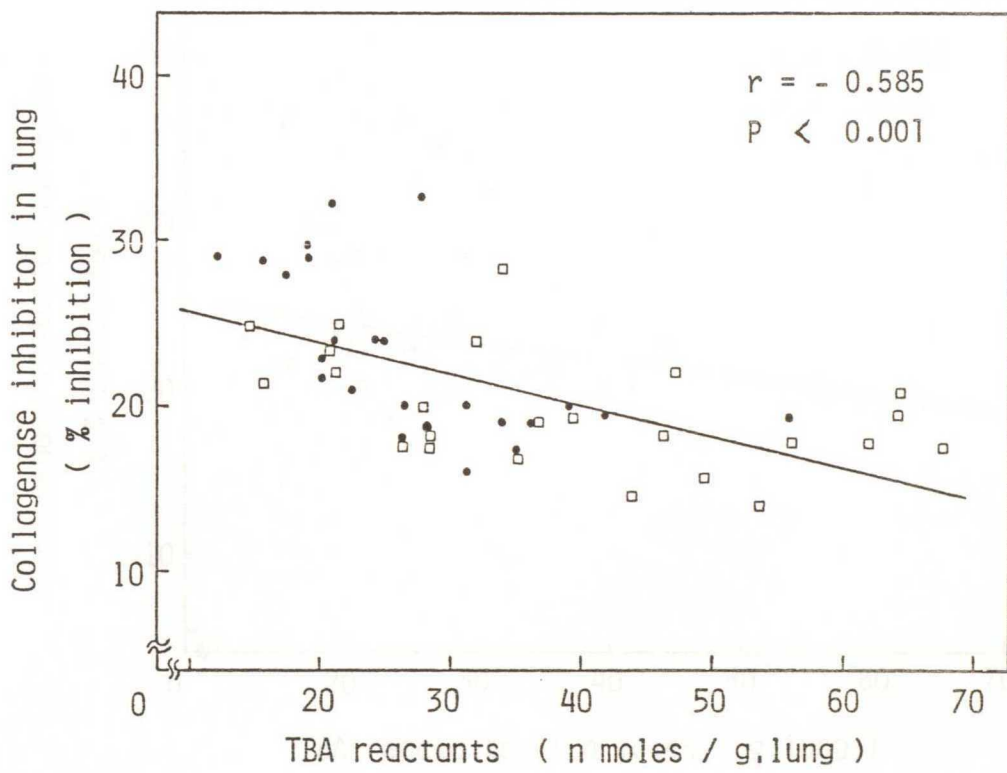
Control values of MAO activity were located 2445 and 2913 units/g·lung from the first through the 14th day. The value are expressed as mean ± SD (* ; P < 0.05, ** ; P < 0.01, *** ; P < 0.001).

図53 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



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 < 0.01).

図54 10ppm NO₂ 暴露1日~4日目のラットの肺のTBA値とコラゲゼ阻害因子活性の相関



(● ; Control group, □ ; NO₂ exposed group).

図55 10ppm NO₂ 暴露1日~4日目のラットの肺のTBA値と血清コラゲナーゼ阻害因子活性の相関

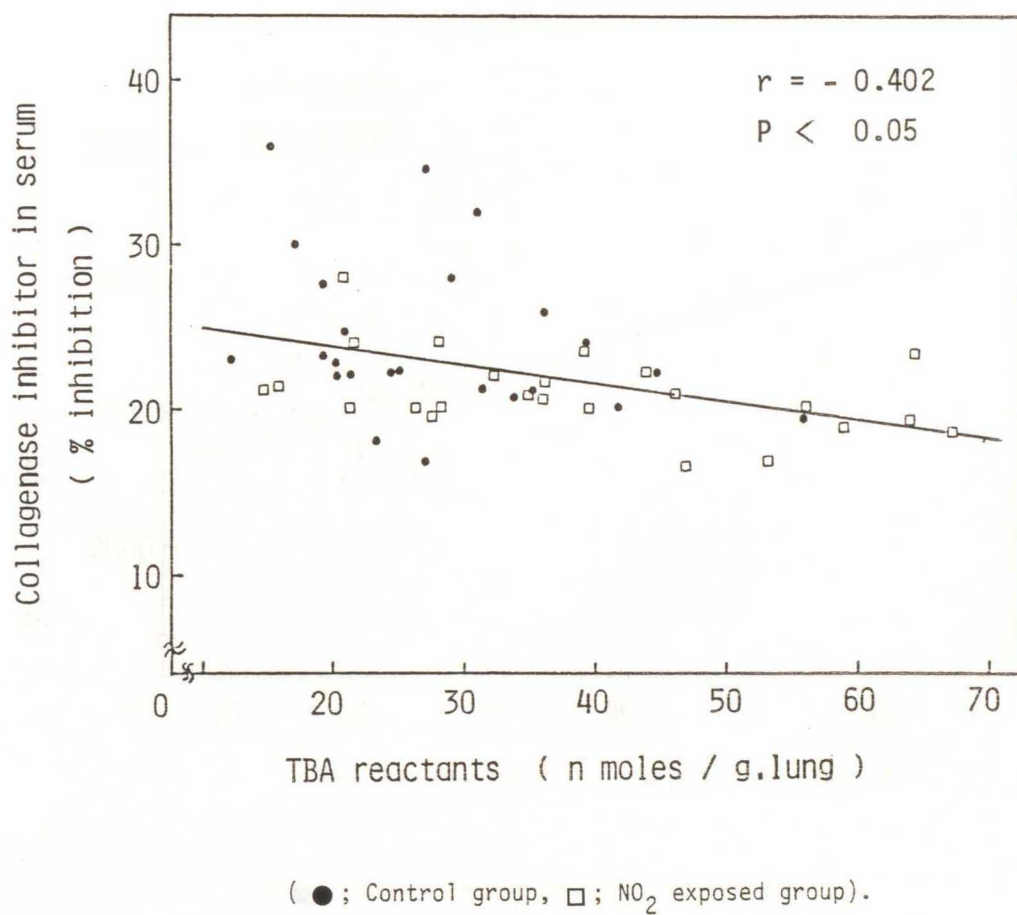
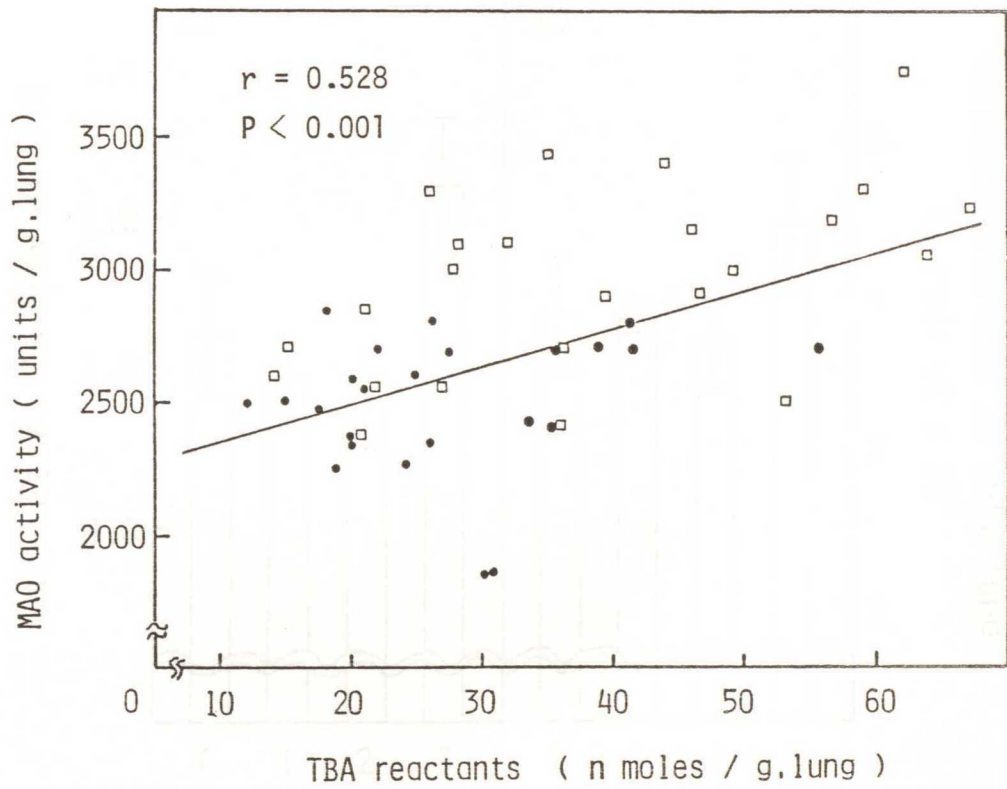
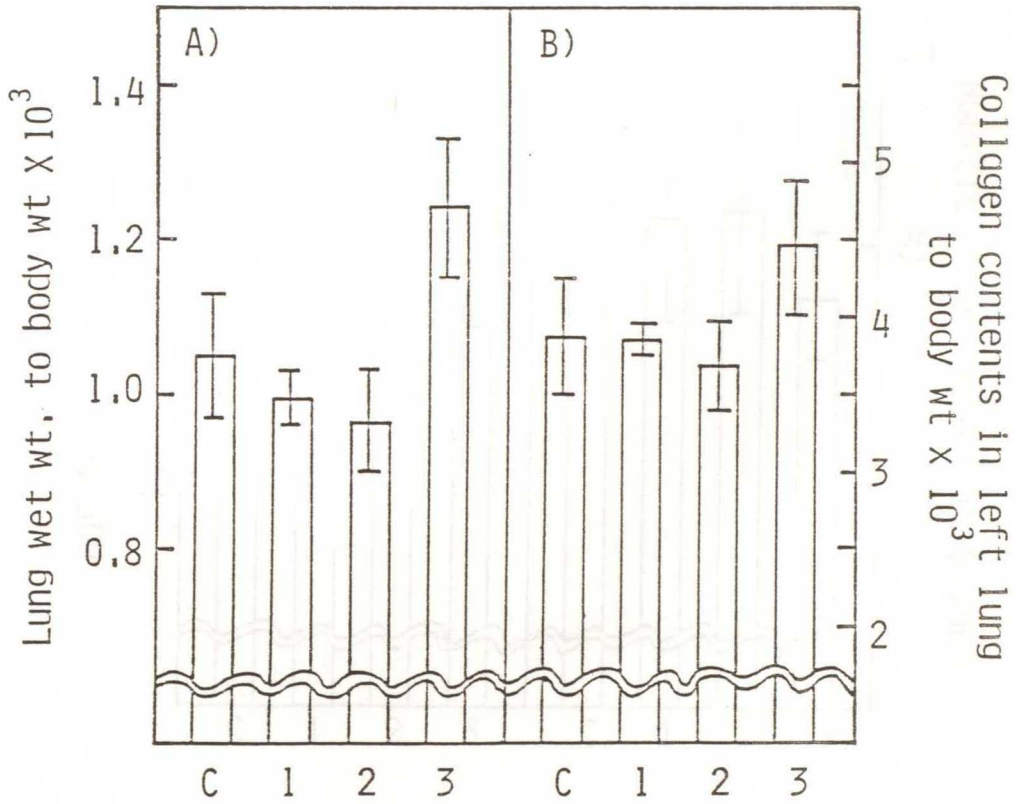


図56 10 ppm NO₂ 暴露1日～4日目のラットの肺のTBA値とモノアミノキシダーゼ (MAO) 活性の相関



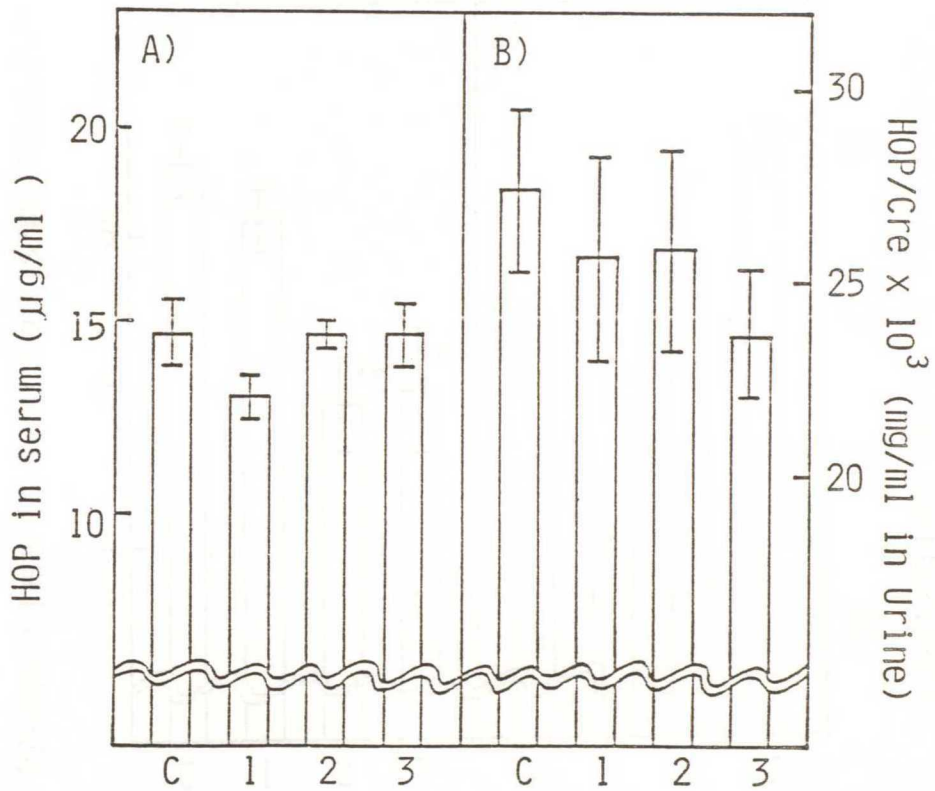
(● ; Control group, □ ; NO₂ exposed group).

図57 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂ に18カ月間暴露したラットの肺湿重量：体重比と肺のヒドロキシプロリン：体重比の変化



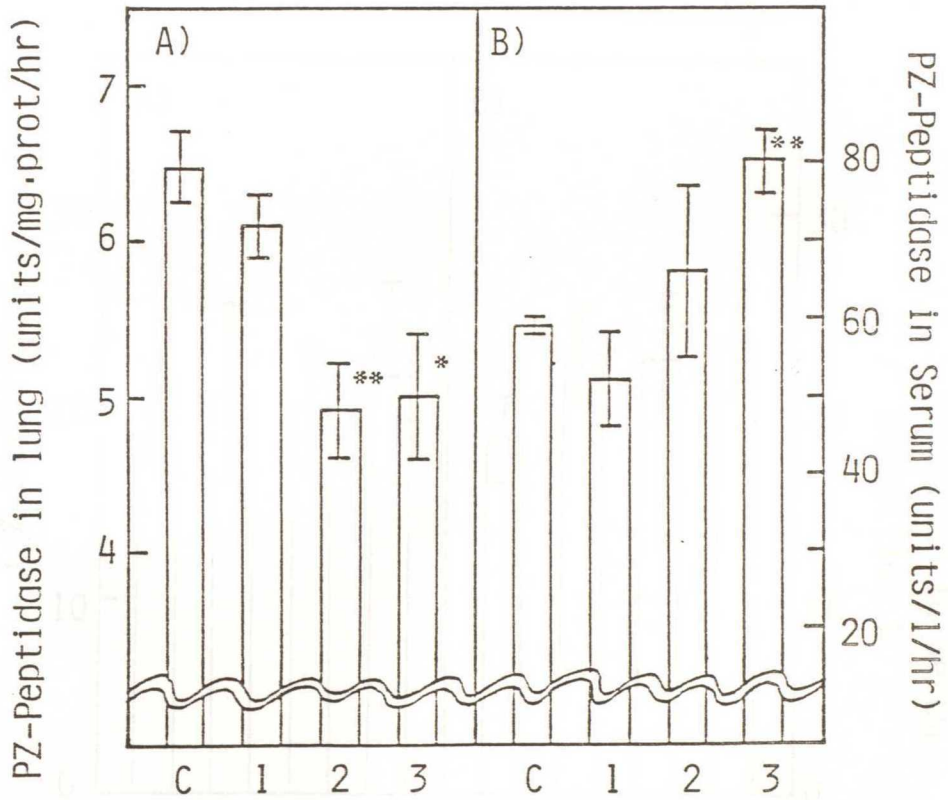
The values are expressed as mean \pm SEM (C ; Control group, 1 ; 0.4 ppm group, 2 ; 1.2 ppm group, 3 ; 4 ppm group).

図58 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂ に18カ月間暴露したラットの血清ヒドロキシプロリン (HOP) 量と尿中ヒドロキシプロリン:クレアチニン比の変化



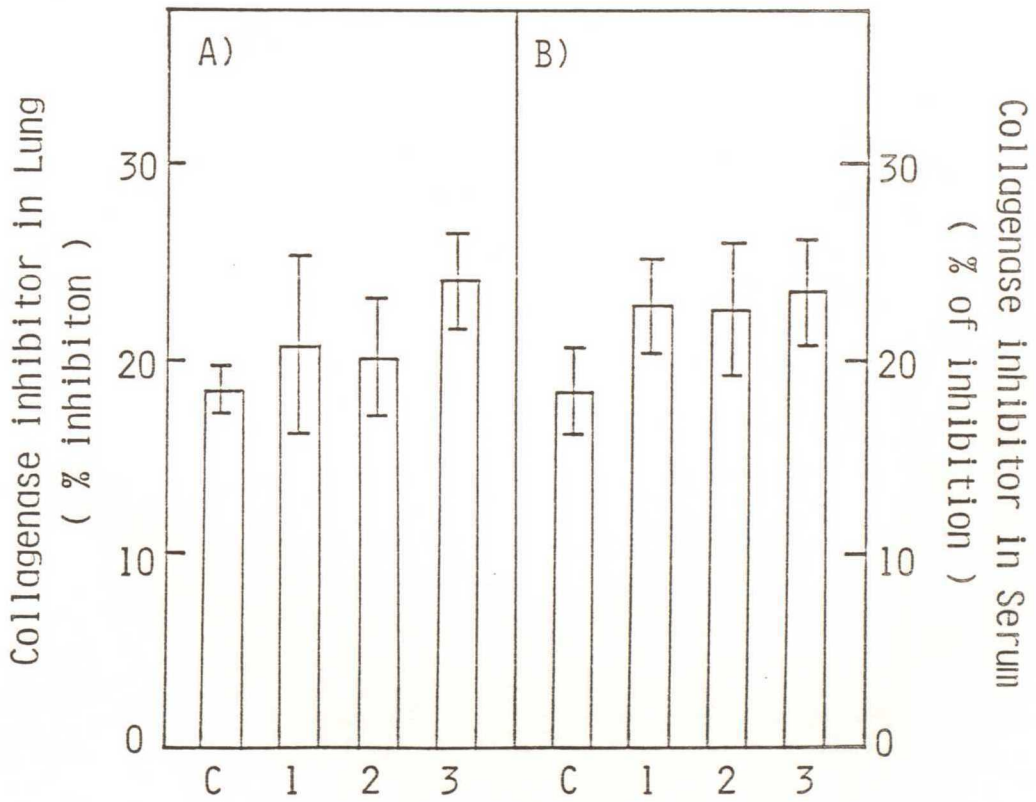
The values are expressed as mean \pm SEM (C ; Control group, 1 ; 0.4 ppm group, 2 ; 1.2 ppm group, 3 ; 4 ppm group).

図59 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂ に18カ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



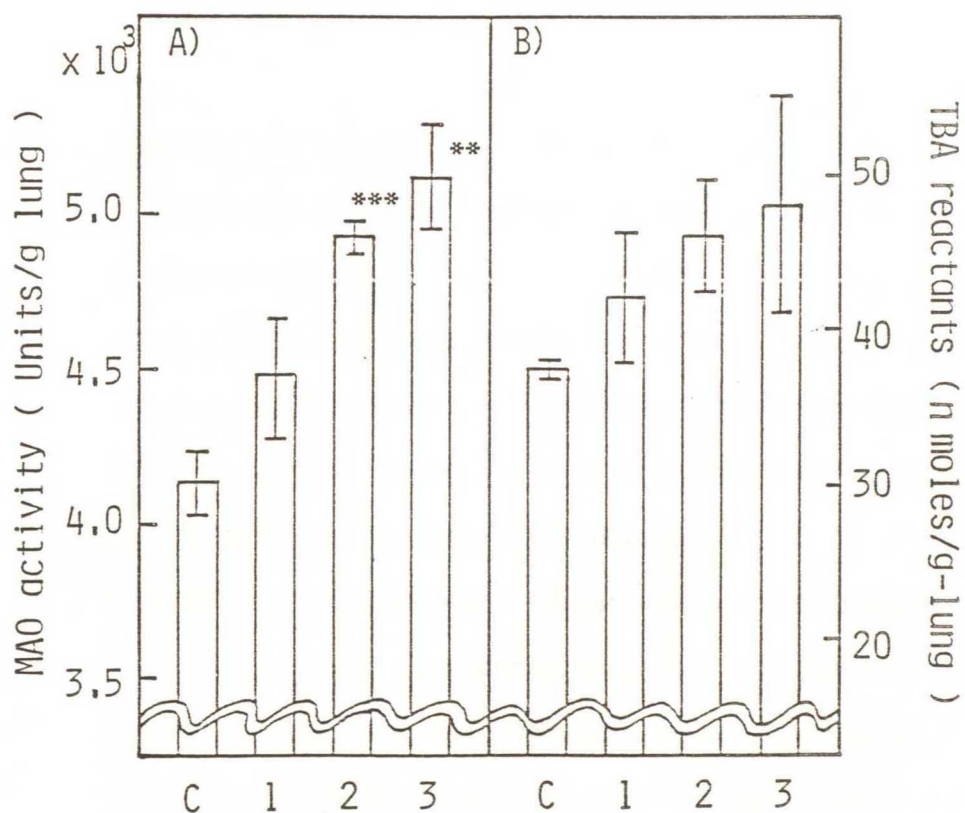
The values are expressed as mean \pm SEM (C ; Control group, 1 ; 0.4 ppm group, 2 ; 1.2 ppm group, 3 ; 4 ppm group) (* ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$).

図60 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂ に18カ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



The values are expressed as mean \pm SEM (C ; Control group, 1 ; 0.4 ppm group, 2 ; 1.2 ppm group, 3 ; 4 ppm group).

図61 0.4, 1.2及び4 ppm NO₂ に18カ月間暴露したラットの肺のモノアミノオキシダーゼ (MAO) 活性とTBA値の変化



The values are expressed as mean \pm SEM (C ; Control group, 1 ; 0.4 ppm group, 2 ; 1.2 ppm group, 3 ; 4 ppm group) (** ; P < 0.01, *** ; P < 0.001).

A study on biochemical effects of nitrogen dioxide on the rats

---- Alterations of lipid peroxidation and of related
factors in collagen metabolism ----

Takamichi Ichinose

Basic Medical Sciences Division

National Institute for Environmental Studies

SUMMARY

Nitrogen dioxide(NO_2) is a common air pollutant causing from the reaction between nitrogen and oxygen in combusting process such as boilers of factories and automobile engines. Especially, atmospheric NO_2 concentration in large cities is comparatively high level, most of persons has anxieties about it's health effects. Therefore, to clarify the biological effects of NO_2 on the living body is very important to establish the basis of preventive medicine in life environment.

NO_2 is a high oxidizing substance and causes various pathological injury in lungs. Generally, it is considered that peroxidation of membrane lipids causes to effects on cell damages and on many toxic process, and the toxic action of NO_2 may be an result from lipid peroxidation.

An evidence that NO_2 exposure causes lipid peroxidation in vivo was shown by Thomas et al. using new method of conjugated diene. Thereafter, many investigators have tried to measure the lipid peroxides in tissues, but, they have failed to measure the lipid peroxides following exposure to NO_2 . In this report the author has established the method to measure these lipid peroxides in tissues.

On the other hand, many reports on lung fibrosis caused by exposure to

high and low-level of NO_2 have been published. Recently, it has been clarified that active oxygen species concerning with lipids peroxidation causes to an abnormal changes in collagen metabolism. There is, however, no evidence that biochemical changes induced by NO_2 exposure occur to the lung fibrosis.

As a step to clarify the biochemical effect of NO_2 exposure on the living body, this study was performed and this study contains of three parts, first is to determine whether lipid peroxidation is caused by exposure to NO_2 or not, second is to clarify the relationship between the changes of lipid peroxidation and the antioxidative protective systems in lungs of rats exposed to NO_2 , and third is to examine an experiments on an model of lung fibrosis, and the effects of NO_2 on pulmonary fibrosis was investigated from aspects of lipid peroxidation and collagen metabolism.

In the first chapter, lipid peroxides in rats lungs and in whole body were examined to clarify the relationship between the changes of lipid peroxidation and the antioxidative protective system, to which acute, subacute and chronic exposure to NO_2 were performed. Lipid peroxidation measured by ethane exhalation and thiobarbituric acid (TBA) reactive material increased after the exposure to NO_2 , and the lipid peroxidation increased dose-dependently, and it changes dependent on the period of NO_2 exposure, but the changes of the antioxidative protective systems is very complex.

Activities of antioxidative protective enzymes such as glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase(6PGD), disulfide reductase(DSR), and super oxide dismutase(SOD) in the 105,000xg supernatant of lung homogenates decreased slightly at the first days. Thereafter, they increased to their maximum levels from the 5th to 10th day, and their maximum levels were maintained until the 14th day. The time course of

non-protein sulfhydryls(NPSH) was similar to that of the antioxidative protective enzymes. The patterns of change in these protective enzymes and NPSH were symmetric to that of lipid peroxidation after the 3rd day. In contrast, the amount of Vitamin E, that is a free-radical scavenger, increased to maximum at the 2nd day, and returned to the initial level. The change of Vitamin E was similar to that of lipid peroxidation. Therefore, vitamin E may be an initial factor to prevent from the peroxidation and it may be transported from other organs, mainly the liver.

In subacute experiment, rats were exposed continuously to 0.4, 1.2 and 4 ppm NO₂ for one, two and four months respectively. Lipid peroxidation and the reaction of TBA values increased and are dependent on the NO₂ concentrations, but the increases of these values were slower than that of rats exposed to 10 ppm NO₂ and then these values returned to the initial level. Thereafter, they had a tendency to decrease dependent on the increase of lipid peroxidation. The activities of antioxidative protective enzymes and the contents of NPSH increased at the first week and reached to their maximum levels at the 4th week. And the activities of antioxidative protective enzymes decreased gradually until the 16th week, but the levels of NPSH were maintained until the four months. Changes of antioxidative protective enzymes showed an inverse relationship to that of lipid peroxidation. In chronic experiments, rats were exposed continuously to 0.04, 0.4 and 4 ppm NO₂ for 9, 18 and 27 months respectively. The formation of lipid peroxides increased with higher NO₂ concentrations and exposure period. The lipid peroxidation increased significantly in the 4 ppm NO₂ group of the 9-months and in the 0.4 and 4 ppm NO₂ groups of the 18-months exposure. The activities of antioxidative protective enzymes in lung of rats decreased gradually from 9 months to 18 months, changing inversely the formation of lipid peroxides. An ethane exhalation increased significantly-from the that of control in the 0.04, 0.4 and 4 ppm

NO₂ exposure for 9 and 18 months, and a dose response relationship was clearly observed. Furthermore, ethane formation of rats exposed to 0.04 and 0.4 ppm NO₂ for 27 months also increased to twice of the control level. But after the exposure to 4 ppm NO₂ 27 month, the ethane level returned to the control level. In the meanwhile, in a pathological experiment projected at the same with this experiment, the lung fibrosis and the thickness of alveolar wall in lungs of rats exposed to 4 ppm NO₂ for 18 months were observed by Takenaka et al. Furthermore, they observed that the thickness of the alveolar wall decreased than that of rats exposed to 4 ppm NO₂ for 18 months, and the lung fibrosis progressed than that of rats for 18 months-exposure these facts show that, the lung fibrosis gradually progresses following the increase of lipid hydroperoxides and prolongation of the NO₂ exposure period, and, when lung fibrosis was formed finally, the amount of exhaled ethan of rats exposed to 4 ppm NO₂ 27 months decrease, this shows that the decrease of lipid peroxides did not recovery signal to the normal state of lungs. Therefore, the lung fibrosis may relate to the formation of lipid peroxides.

These results showed that the ability of the antioxidative protective systems to protect cell from oxidative damage increasing in the early time, and then they decreased gradually. On the other hand, lipid peroxides increased temporary in the early time, but they returned to the control level. Thereafter, they increased gradually, again. It was confirmed that the forming process of cytotoxic lipid peroxides altered inversely with the protective system. This supposed that lung disease would be caused, as a balance of lipid peroxidation and the ability of the antioxidative protective systems exceeds a limit of homeostasis.

In the second chapter; using paraquat(1, 1-dimethyl-4, -4'-dipyridyl-ium dichloride, MV, PQ), a simulation experiment was performed to investigate the mechanism of lung fibrosis. PQ is widely used in

agriculture and it has been well known to cause severe interstitial pneumonia and fibrosis in human and animal, and to forming lipid peroxides. An experimental model of lung fibrosis in rats was induced by following intra-peritoneal injection of PQ. The relationship between the changes of lipid peroxidation and the antioxidative protective system in lungs during the time course was investigated and the development of PQ-induced lung fibrosis was compared with the results obtained by exposure to NO_2 . And the relationship between collagen metabolism related factors in the course of development of lung fibrosis and lipid peroxidation were examined.

It was clarified that the time-dependent changes of lipid peroxidation and the antioxidative protective systems in lungs varied inversely as well as the changes observed by exposure to NO_2 . It was found that the antioxidative protective enzymes such as G6PD, 6PGD and NPSH in lungs were induced to protect cell from lipid peroxides increased in early time of PQ i.p. and when they increased to the maximum level, lipid peroxides returned to control level, thereafter the antioxidative protective enzymes and the NPSH decreased gradually with a time course of administration of PQ and the lipid peroxidation increased inversely to the antioxidative protective system. The antioxidative protective ability against lipid peroxide was temporary action. Furthermore, that lung fibrosis progressed by abnormal change of collagen metabolism related to lipid peroxidation in the developmental course of PQ-induced lung fibrosis.

On the other hand, it has been known that superoxide anion radical (O_2^-) participate with lipid peroxidation enhanced collagen synthesis. The transformation of superoxide radical was supported by the increase of superoxide dismutase activity in lungs PQ-treated rats. It suggests indirectly that collagen synthesis in lungs of rats administered PQ, was enhanced. The activities of lung's and serum's collagenase inhibitor, which inactivate collagenase, decreased in the early

time. At this time, a significant negative relationship between lipid peroxides and collagenase inhibitor activity in lungs was observed, but the decreasing-time of collagenase inhibitor activity in lungs was earlier than the increasing-time of lipid peroxides in an early time. These results suggests that the decline of collagenase inhibitor activity was inactivated by reactive oxygen species, which concerns with lipid peroxidation, and that the decline of collagenase inhibitor activity in serum was due to inactivation of collagenase inhibitor in lungs. The decline of collagenase inhibitor activity like this promotes to the collagen decomposition in lungs in an early time, at the same time the hydroxyproline excreted to serum by collagen decomposition and the urinary hydroxyproline:creatinine ratio (HOP ratio) increased. The fact that the decline of collagenase inhibitor activity in lungs promote collagen decomposition in lungs was supported by this result, that is a significant negative relationship between the collagenase inhibitor activity in lungs and the hydroxyproline content in serum, was observed. Thereafter the collagenase inhibitor activity in serum rapidly increased after the increase of lipid peroxides in lungs , but the increase of collagenase inhibitor activity in lungs was less than that in serum. As for the reason, it was supposed that the collagenase inhibitor was inactivated by reactive oxygen species or was neutralized by their proteases, causing increase of proteolytic enzymes at an inflammation. When the increment of collagenase inhibitor activities in lungs and serum was observed, the amount of hydroxyproline in serum and the urinary HOP ratio decreased inversely against the change observed in the early time, and the collagen content in lungs increased gradually. The activity of monoamine oxidase (MAO) concerning with formation of cross-link of collagen increased, and interstitial pneumonia and lung fibrosis were confirmed by morphological observation. These results suggested that PQ-induced lung fibrosis was

caused by suppression of collagen decomposition on account of the increase of collagenase inhibitor activity in lungs, associated with the rapid increase of collagenase inhibitor in serum, and by a promotion of collagenase synthesis and cross-link of collagen. The increase of collagenase inhibitor activity in serum after the increase of lipid peroxide in lungs was due to the promotion of synthesis of collagenase inhibitor in liver, because of that increment is due to neutralized collagenase and proteolytic enzymes increased by inflammation, that is caused by lipid peroxide-induced injury. As a result of the increase of lung collagenase inhibitor activity, a degradation in lung collagen is suppressed, and that cause to lung fibrosis.

In the third chapter, to clarify the effects of NO_2 on the lung fibrosis and the alteration in related factors of collagen metabolism in rats exposed acutely and chronically to NO_2 was examined, comparing with the results of PQ administrated rats. In this experiment, lung fibrosis was observed at the 7th and 14th day by morphological observation, but thickening of the wall of the alveolar duct and adjacent alveoli at the 14th day was slightly thinner than at 7th day. This fact suggested that the lipid peroxide and the collagen in lungs increased in the wall of the alveolar duct and alveoli at the 7th day. On the other hand, when the collagen content in lungs increased, collagenolytic enzymes and serum HOP increased too. Thereafter the collagenolytic enzymes, the hydroxyproline content in serum and the urinary HOP ratio decreased than that of control level and a significant relationship between the collagenolytic enzymes activities in lungs and the hydroxyproline contents in serum was observed. These results suggest that the collagen synthesis and decomposition were promoted in lungs.

The time-dependent changes of the collagenase inhibitor activities in lungs and in serum showed a similar pattern to that of the collagenase

inhibitor activities observed in PQ administrated rats. This increment of the collagenase inhibitor activities was induced to protect lung tissue from decomposing confusely by collagenase and protease increasing by inflammation. When the collagenase inhibitor activity in lungs decreased, a significant negative relationship between the lipid peroxides and the collagenase inhibitor activity in lungs was observed as well as that observed in PQ administrated rats. But there was no evidence that the collagen decomposition was promoted by the decrease of the collagenase inhibitor activity in lungs. This result was different from that observed in PQ administrated rats. The activity of MAO in lungs participating with the formation of cross-link of collagen increased rapidly from the first day to the 4th day, at the same time, a significant relationship between the lipid peroxides and the MAO activity was observed. This results suggest that the formation of cross-link of collagen was promoted by MAO, that was activated by the lipid peroxidation. These changes in enzymes cause to the thickening of the wall of the alveolar duct and alveoli slightly.

In chronic experiment, the collagen contents in lungs increased in 4 ppm NO₂ exposure group, and the urinary HOP ratio was decreased with NO₂ concentratons higher. The MAO and amounts of the lipid peroxides in lungs increased dose-dependently to the concentration of NO₂. These results show clearly that the collagen content in lungs increased in the 4 ppm NO₂ group, in which the ability of collagen decomposition decreased exceedingly, and this is in agreement with the results of the morphological observation, and lung fibrosis was observed in the 4 ppm NO₂ group. It suggests that decline of the ability of the collagen decomposition is also a factor to occur lung fibrosis in long-term exposure to NO₂ as well as PQ treated rats.

We must pay attentions to the decrease of the urinary HOP ratio from

an aspect of lung fibrosis. On the other hand, the increase of urinary HOP ratio may occur by the decrease of the collagenase inhibitor activity that continues for a long-term, that is a factor to induce pulmonary emphysema. Therefore, to investigate the changes of collagenase inhibitor activity is very important in epidemiological study. If we can show clearly and experimentally the causes of the increase and the decrease of the collagenase inhibitor activity by comparative long-term exposure to some air pollutants, we may be able to understand more exactly the meaning of the increase of the urinary HOP ratio.

From these results, the author clarified the formation of lipid peroxides and a role of the antioxidative protective systems to lipid peroxide, that induces cell damage, and the effect of NO_2 on the lung fibrosis, from the aspects of lipid peroxidation and collagen metabolism.