

氏名(本籍)	いし せ なが みち (長野県) 市 瀬 孝 道
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第226号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 教授 村 田 元 秀 (副査) 教授 藤 岡 富士夫 教授 渡 植 貞一郎 教授 赤 堀 文 昭

論 文 内 容 の 要 旨

窒素酸化物には多くの種類があるが、環境大気中に存在して、人体影響の面から問題とされているのは、二酸化窒素(NO_2)と一酸化窒素(NO)である。

一酸化窒素は、主として物が高温で燃焼する際、空気中または燃料中の窒素と酸素の反応によって生じ、生成した一酸化窒素が大気中で酸化して二酸化窒素に変化していく。

かつて問題とされた硫黄酸化物は、燃料中の不純物である硫黄分が燃焼過程で酸化するため生成したが、窒素酸化物は、燃料由来というよりは、高温燃焼に伴う空気中の窒素の酸化が主であるため、硫黄酸化物のように工場ボイラー等の固定発生源だけでなく、内燃機関からも生成するため、移動発生源としての自動車、船舶、航空機等からの排ガスも問題とされ、特に、モータリゼーションの普及に伴う自動車排ガスが大きな社会問題となっている。また、住宅構造の変化に伴って、家庭暖房や厨房、さらには喫煙等も問題とされる場合が生じてきている。

このため、硫黄酸化物をはじめ、他のガス汚染質による汚染は改善されてきているのに、窒素酸化物による汚染状況は、依然として改善されておらず横ばいの状況が続いており、特に自動車排ガスの影響の大きい幹線道路沿いの住民の健康に与える影響が問題となっている。したがって、窒素酸化物と健康影響の関係については、各分野において調査、研究が行われているが、著者は、ラットに NO_2 を暴露して、肺において脂質過酸化反応が起こるかどうか、起こった場合の脂質過酸化反応と抗酸化性防禦機構との関係はどうなっているのか明らかにするとともに、肺の線維化に対する二酸化窒素の作用を、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を行った。以下その研究業績の概要について述べる。

1. 過酸化脂質の生成と抗酸化性防禦機構との関係

NO_2 の急性、亜急性および慢性暴露によるラット肺の過酸化脂質生成と酸化的障害から生体を防禦する肺の抗酸化性防禦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、その過酸化脂質生成量は NO_2 の濃度と暴露期間に依存して増加することが明らかとなった。

つきに、過酸化脂質の生成と Glutathione Peroxidase (GPx)、Glutathione reductase (GR)、Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) および 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) 活性などの抗酸化性防禦系酵素活性の変化との関係はきわめて対称的であった。すなわち、NO₂ 暴露初期に過酸化脂質が増加し、その値が最大レベルに達する時期に抗酸化性防禦系が増加しはじめ、逆に抗酸化性防禦系が最大レベルに達する時期には過酸化脂質は対称レベルに戻り、その後、抗酸化性防禦系が徐々に低下すると過酸化脂質は再び増加してくることが判った。

2. パラコート投与による実験的肺線維症の作成

パラコートを投与し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禦系の変化を調べ、NO₂ 暴露の場合と比較した。その結果、肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防禦系の経時変化は NO₂ 暴露の場合と同様に対称的な変化を示し、パラコートを投与した場合でも、NO₂ 暴露の場合と同様に、抗酸化性防禦機構は初期の段階で過酸化脂質生成防禦に重要な役割を示すが、パラコート投与の延長に伴って、抗酸化性防禦能が徐々に低下し、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。

また、パラコート投与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されて起こり、血清ヒドロキシプロリン (HOP) 量や尿中 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 量や尿中 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。

3. 肺の線維化に対する NO₂ の作用

高濃度 NO₂ の急性暴露では、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され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、肺のコラゲナーゼ活性も増加してコラーゲン分解が促進し、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急速な増加とコラゲナーゼ活性の低下によってコラーゲン分解能が低下し、血清や尿中の HOP 量が低下する。以上のような経過をへて、肺の線維化が起こるものであることが明らかとなった。また、肺および血清のコラゲナーゼ阻害因子活性の急速な増加が肺の過酸化脂質の増加した直後からみられることは、パラコート投与の場合と類似していた。

低濃度 NO₂ の長期暴露の場合には、過酸化脂質が一度増加した後減少し、ふたたび増加する時期にコラゲナーゼ阻害因子活性が増加し、コラゲナーゼ活性が低下することによってコラーゲン分解能が低下し、尿 HOP 比も低下することが明らかとなった。これらの結果から、低濃度長期暴露の場合には、パラコートと同じようにコラーゲン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、肺の過酸化脂質の増加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、血清を介して肺にコラゲナーゼ阻害因子が増加するものと推測された。

論文審査の結果の要旨

窒素酸化物による大気汚染は、かつて危機的とまで言われた硫黄酸化物による大気汚染が著しい改善をみせたのに反してなかなか改善されず、汚染状況は依然として横這いの状況が続いている。

この理由としては、その生成が、高温燃焼に伴う窒素と酸素によるものが大部分であるため、固定発生源だけでなく、自動車などの移動発生源や家庭における暖房、厨房などで発生源になり得ることと、特に移動発生源については、排出規制の強化を上回る保有台数の増加があげられよう。

また、窒素酸化物は、硫黄酸化物に比較して水に溶解し難いため、気道での吸収は少なく、気道内深部にまで侵入するとされており、したがってその影響も硫黄酸化物より大きいといわれている。

これらのことから、窒素酸化物の生体影響については、各分野で研究が行われているが、著者は、窒素酸化物中の二酸化窒素(NO_2)をラットに暴露して、過酸化脂質が生成するか、生成するとすれば、抗酸化性防禦機構との相互関係はどうなっているかについて検討を行った。また、肺の線維化に対する NO_2 の作用について、パラコートをを用いた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、多くの知見を得た。本研究の概要は、次のとおりである。

1. 過酸化脂質の生成と抗酸化性防禦機構との関係

1968年、Thomasらは1 ppmの NO_2 4時間暴露による肺脂質の共役ジェン出現を報告した。その後、Mustafaら(1978)、Csallanyら(1978)など多くの研究者が NO_2 暴露による過酸化脂質の検出を試みたが確認されなかった。

1974年、Rielyらによって過酸化脂質の分解物が呼気中にエタンやペンタンなどの低級炭化水素として排出されることが確認された。

著者は、この原理を用いて、 NO_2 で暴露したラット呼気中エタンの連続測定を行うとともに、肺ホモジネートを調整し、Thiobarbituric Acid (TBA) 反応性物質を測定した結果、 NO_2 暴露による過酸化脂質の生成を確認した。

また、Glutathione Peroxidase (GPx)、Glutathione reductase (GR)、Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) および6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) 活性などの抗酸化性防禦系酵素活性と過酸化脂質の消長についてはきわめて対称的な変化をすることが認められた。すなわち、 NO_2 暴露初期に過酸化脂質が増加し、その値が最大レベルに達する時期に抗酸化性防禦系が増加しはじめ、逆に抗酸化性防禦系が最大レベルに達する時期に過酸化脂質は対称レベルに戻り、その後、抗酸化性防禦系が徐々に低下すると過酸化脂質は再び増加してくることが判った。

これらの結果から、抗酸化性防禦系は NO_2 暴露の初期の過酸化脂質生成によって誘導され、その生成防禦に重要な役割を果たすが、これは一時的であり、 NO_2 暴露の長期化につれて抗酸化性防禦能が低下し、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った。

2. パラコート投与による実験的肺線維症の作成

1980年竹中らは、低濃度 NO_2 をラットに長期間暴露した場合、肺の過酸化脂質が再び増加する時期に肺の線維化が起きていることを病理学的に報告しているが、生化学的機序は現在まだ明らかではない。

NO_2 以外に肺に過酸化脂質を生成し、肺の線維化を起こす物質としては、除草剤のパラコート、抗癌剤のBleomycin、Monocratalineの他にX線やオゾン等が知られている。著者は、 NO_2 暴露による肺の線維

化と過酸化脂質生成との関連性を解明するため、短期間で線維化を起こすことができるパラコートを用いて、ラットに実験的肺線維症を作成し、その過程における肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防禦系の変化を調べ、NO₂ 暴露で得られた結果と比較しつつ肺線維症発症機序を生化学的に検討を行った。

その結果、肺の過酸化脂質生成と抗酸化性防禦系は NO₂ 暴露を行った場合と同様の経時変化を示すことが明らかにされた。

また、パラコート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。

3. 肺の線維化に対する NO₂ の作用

最後に、著者は、NO₂ の急性および慢性実験を行ない、コラーゲン代謝関連因子の変化を調べ、肺の線維化に対する NO₂ の作用を検討した。

その結果、NO₂ 濃度が高い場合には、過酸化脂質の初期の増加にともなって肺のコラーゲン合成が促進してコラーゲン含量が増加し、同時にコラーゲンの架橋が促進して線維化が起こり、この時コラーゲン分解も促進することが明らかになった。また、肺の過酸化脂質の増加が発端となって、血清・肺にコラゲナーゼ阻害因子が誘導されるとコラーゲン分解が抑制されることが明らかとなった。

また、低濃度 NO₂ 長期暴露の場合には、再び過酸化脂質の増加が起こる時期にコラゲナーゼ阻害因子活性が増加することによって、肺のコラーゲン分解能が低下すること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。

以上述べたように、著者は NO₂ 暴露によって、肺で過酸化脂質が増加することを明らかにした。また、過酸化脂質の生成と抗酸化性防禦機構の経時変化を明らかにした。

パラコート投与による実験的肺線維症の作成を行い、過酸化脂質の生成と抗酸化性防禦機構の経時変化が NO₂ 暴露の場合と同様に対称的な変化をすることを明らかにするとともに、これらの変化とも密接に関連してコラーゲン代謝に異常が起こり、肺の線維化が進むことを明らかにした。

さらに、肺の線維化に対する NO₂ の作用を過酸化脂質生成とコラーゲン代謝の面から検討し明らかにした。

これらの業績は、人体影響の面から、早急な解明が望まれている窒素酸化物についての実験的研究に大きな貢献をしたもので、獣医学博士の学位を授与するにふさわしいものであると認めた。