

〈原 著〉

オゾン，二酸化窒素の8週間複合暴露の相乗効果： メサコリンに対するモルモットの気道反応性亢進

神馬 征峰，荒川 はつ子，内山 巖雄，横山 栄二
(国立公衆衛生院・労働衛生学部)

Synergistic effect of a eight-week exposure to a combination of ozone and nitrogen dioxide: airway hyperresponsiveness to infused methacholine in guinea pigs

Masamine JIMBA, Hatsuko ARAKAWA, Iwao UCHIYAMA, Eiji YOKOYAMA
(from Department of Industrial Health, The Institute of Public Health)

M. JIMBA, H. ARAKAWA, I. UCHIYAMA, E. YOKOYAMA *Synergistic effect of a eight-week exposure to a combination of ozone and nitrogen dioxide: airway hyperresponsiveness to infused methacholine in guinea pigs*, Bull. Inst. Public Health, 43(4), 431-441, 1994.

Exposure to relatively low levels of ozone (O₃) can cause airway hyperresponsiveness (AHR) in rodents. However, it is not known whether comparatively long-term exposure to a combination of O₃ and nitrogen dioxide (NO₂) potentiates the pulmonary response as compared to exposure to either gas alone. This study was performed to determine if these gases have a synergistic effect on airway responsiveness (AR) in guinea pigs. Guinea pigs were continuously exposed either to filtered air, 2ppm NO₂, 0.2ppm O₃, or a combination of these two gases for 4 or 8 wk. After each period of exposure, pulmonary mechanics and AR to infused methacholine (Mch) of anesthetized, intubated animals were measured. None of the exposures altered static respiratory compliance, or baseline values of respiratory flow resistance (R), or dynamic compliance (C_{dyn}). Exposure to NO₂ alone had no effect on either ED₂₀₀R (the dose of Mch necessary to double R) or ED₆₅ C_{dyn} (the dose of Mch necessary to reduce C_{dyn} to 65% of its baseline value). Four weeks of O₃ exposure significantly decreased from 2.74±0.17μg/kg/min in air exposed rats to 1.63±0.12μg/kg/min (p<0.01). Exposure to O₃ and NO₂ together did not enhance this effect (ED₂₀₀R=1.74±0.15μg/kg/min) (p<0.01). The decrease in ED₂₀₀R was somewhat diminished after 8 wk exposure. While there was no synergy between NO₂ and O₃ in decreasing the ED₂₀₀R for Mch, synergism between these gases was seen in decreasing the ED₆₅C_{dyn}. Four weeks of exposure to O₃ alone decreased the ED₆₅C_{dyn} from 3.84±0.48μg/kg/min, seen in the air-exposed controls, to 2.92±0.63μg/kg/min. The combination of O₃ and NO₂ reduced this value significantly to 1.97±0.41μg/kg/min (p<0.05). This effect persisted after 8 weeks of exposure to the combined gases. These results demonstrate that comparatively long-term exposure to relatively low-levels of NO₂ and O₃ has synergistic effect of airway responsiveness in guinea pigs.

Key Words ozone, nitrogen dioxide, airway hyperresponsiveness

(Accepted for publication, September 21, 1994)

1. はじめに

[キーワード] O₃, NO₂, 気道反応性
[平成6年9月21日受理]

大気汚染は、大気中に存在する多数物質による汚染

である。そのような複数物質の継続暴露の典型例として現在もなおあげられるのは、光化学オキシダント発生時の NO₂ と O₃ による複合暴露である。両ガスの複合暴露の生体影響を知るべく、1950年代以来多くの実験的研究がなされてきているが、各々のガスの暴露量、暴露方法、影響を見る際のパラメーターの種類等によって、両ガスはさまざまな影響を及ぼすことが知られてきている。第 1 に、両ガスの複合暴露は相乗的な毒性効果を生体にもたらすと言われている。そのパラメーターとしては、呼吸困難、肺水腫、死亡率¹⁾、気道感染抵抗性の低下^{2),3)}、生化学的指標の変化⁴⁾⁻⁸⁾ 等がある。一方、気道感染抵抗性の低下や生化学的指標をパラメーターとした場合、両ガスの暴露方法を変えて得られた結果や²⁾、種々の生化学的指標の測定結果より、両ガスは相加作用をもたらすという報告もある⁴⁾。これとは別に、組織病理学的所見より、O₃ による変化が主体であり、ある所定濃度の NO₂ は相加的にも相乗的にも影響を与えなかった、という報告もある⁹⁾。また生理学的指標として、呼吸機能を測定した報告は極めて少ないが、Yokoyama らは、両ガスの継続暴露実験を行ない、肺 V/P 曲線や気流抵抗に対する O₃ の影響を NO₂ は修飾しなかった、という結論を得ている¹⁰⁾。

以上のように、O₃ と NO₂ の複合暴露の影響はさまざまな角度から検討されてきたが、本研究では近年、気管支喘息等の主要メカニズムとして注目されている気道過敏性をパラメーターとし、両ガスの複合生体影響を知る事を目的とした。その際、O₃ 暴露量としては、すでにその比較的長期暴露によって気道反応性を亢進せしめることがわかっている 0.2 ppm を選択した¹¹⁾。NO₂ に関しては、これまで動物実験では 4 ppm NO₂ の気道反応性に及ぼす影響が調べられているが¹²⁾、本研究ではそれより低い 2 ppm NO₂ を 4～8 週間暴露し、気管支収縮物質に対する気道反応性をまず測定した。さらに、O₃ 単独暴露、O₃ と NO₂ の複合暴露を行ない、それぞれ、同様に気道反応性を測定した。なお、気道反応性測定法には一般に静脈内投与（静注）法か、吸入法があるが、本研究では、より、気道平滑筋の反応性を反映し、かつ過去の実験において、比較的長期暴露後も気道反応性亢進を検出した静注法を用いた。気道反応性を測定するためには、通常気流抵抗を指標

とすることが多いが、本研究ではより末梢の気管支収縮をより敏感に感知し得るとされている動呼吸器コンプライアンスも同時に用いた。測定は暴露後 4 または 8 週間の暴露後に行ない、経時の変化についても合わせて検討した。

2. 実験 1 : NO₂ 単独暴露

(1) 方法

1) 使用動物

4 週令、体重 250～300g のモルモット (Hartley, SPF, 日本チャールズ・リバー株式会社) を購入し、1～2 週間の観察後実験に供した。

2) NO₂ 暴露法

ステンレススチール製の角錐形暴露チャンバー（気積約 0.59m³）を 2 ケ使用、換気回数は 10 回/時間とした。第 1 チャンバーには対照として清浄空気、第 2 チャンバーには NO₂ ガスを送った。NO₂ ガスは NO₂ 標準ガスボンベ（NO₂ 0.5%/N₂ balance、製造後有効期限 1 年高千穂化学工業株式会社）を製造後 3 ヶ月以内に使用した。NO₂ ガスの希釈は、フローメーターによりボンベから導入した NO₂ ガスを一定流量にコントロールし、プレフィルター・HEPA フィルター・活性炭フィルターにて処理した給気（100l/分）と混合して所定濃度（2 ppm）を得た後、チャンバーに送気した。チャンバー内の NO₂ の濃度測定は非分散赤外線吸収法（赤外線ガス分析計 ZRK、富士電機製を特注により改造、測定範囲 0～10ppm）により、連続測定し、自動記録計に出力した。この赤外線ガス分析計は、高感度マイクロフローセンサを使用し、サンプルスケッチ式を用いて N/S 比を高めることにより低濃度長期の安定した測定値が得られるよう工夫されている¹³⁾。暴露は 4 または 8 週間連続して行なった。暴露中飼料と飲料水は自由に摂取せしめた。なお、飼料給与や清掃のため 1 日に約 1 時間は暴露を中断した。明・暗は 12 時間毎とした。温度は 23～24℃ に、相対湿度は 55～65% に維持された。

3) 呼吸機能及び気道反応性測定法

a) 測定準備

呼吸機能測定当日の手術侵襲を軽減するため、測定前日、モルモットをペントバルビタール（35mg/kg 体重）腹腔内注射により麻酔し、右頸静脈よりカテーテ

ルを挿入し、その内腔をヘパリン液で満たした後、固定留置した。

測定当日、気道反応性測定のもとになる呼吸機能は、横山の方法¹⁴⁾に準じて測定した。即ち、まず、同カテーテルよりペントバルビタール (35mg/kg 体重) を静注した後、気管切開して気管カニューレを挿入し、ボディボックス内に正臥位に納めた。次いでサクシニルコリン (35mg/kg 体重) の筋注後、モルモットを Harvard ポンプ (680型) により、一回換気量 2.5~3.0ml、換気数 60回/分の人工換気下においた。次ぎに、気管カニューレ圧 (P) をインダクタンス型差圧計 (Validyne 製, MP45型) を用いて求めた。気流量 (\dot{V}) はボディボックスを出入する気流量として、ニューモタコグラフ (300メッシュスクリーン) とインダクタンス型差圧計 (Validyne 製, MP45型) により求めた。この2つのシグナル、及び \dot{V} シグナルの積分より求めた気量 (V) シグナルを、ペンオシログラムに連続記録した。呼吸器気流抵抗 (R) は換気時における呼吸器全体の摩擦抵抗であるが、mid-tidal volume における P の差圧 ΔP を同 $\Delta \dot{V}$ で割ることにより求めた。動呼吸器コンプライアンス (Cdyn) は、換気時における呼吸器全体の圧/量関係であるが、これはゼロフロー時の V の差圧 ΔV を同 ΔP で割ることにより求めた。連続記録した R と Cdyn より 3呼吸の平均値を求め、以下のデータ処理に用いた。この R, Cdyn が肺気流抵抗、動肺コンプライアンスと相関するとの結果は、Lorino らによって確かめられている¹⁵⁾。

b) R と Cdyn の基準値測定

生理的食塩水 (以下生食水) またはメサコリン (Mch) 溶液を投与する前に、まず各々のモルモットの R と Cdyn の基準値を求めた。即ち、モルモットを人工換気下においてから P が安定するまで約 5 分間待った後、P が 30cmH₂O を越えない程度の深吸気を与え、1.5分後に測定して得られた R, Cdyn を基準値とした。

c) 圧量曲線の作製

次いで吸入気を阻止し、30cmH₂O 以上の気道圧となるように注射器にて空気を注入して肺を拡張し、その後階段上に排気し、注射器の読みより得た肺内注入量とオシログラム上に記録された気道圧より圧量曲線を作成した。この結果は静呼吸器コンプライアンス

(Cst) の値を計算するために用いた。

d) 気道反応性の測定

気道反応性測定は、静注時できるだけ短時間にしかも P がプラトーに達し安定したところで R, Cdyn を測定できるように、5分間静注法を用いた¹⁶⁾。Mch 溶液投与前、シリンジポンプ (Harvard Apparatus Model 22) を用い、まず生食水を 0.1ml/min の速度で 5分間、計 0.5ml 持続静注した。終了時には再び R, Cdyn を測定し、これを生食コントロール値とした。Mch 溶液は 0.5, 1, 2, 4, 8 μ g/kg 体重/min を同様に 5分間静注し、その終了時に R, Cdyn を測定した。なお各濃度の溶液の投与間隔は約 5分間とした。またその間には無気肺を防ぐために深吸気も与え、P ができる限り基準値に戻りかつ安定したところで値が得られるようにした。

4) 呼吸機能及び気道反応性測定結果の評価法

まず基準値は NO₂ 暴露後の動物の呼吸機能をよく反映していると考え、この値について各群間の比較を行った。

次に上で得られた圧量曲線より、容量が 3 ml の時の Cst を、各々の動物について求めた後、群間比較を行なった。

気道反応性に関しては、まず各群の各々のモルモットについて、生食水または各濃度の Mch 溶液投与後に測定した R と Cdyn の実測値を、XY グラフ上にプロットした。これによって個々のモルモットの量反応曲線を作成し、それより R の基準値を 200% にする、あるいは Cdyn を 65% にする Mch 溶液の毎分あたりの体重 1 kg 換算の Mch 投与量を求め、それぞれ ED₂₀₀ R, ED₆₅ Cdyn として、群間比較を行なった。上記測定値の群間の平均値の差は、t 検定により検定した。

(2) 結果

1) 体重変化

4週間暴露した群の対照群 (N=8)、NO₂ 暴露群 (N=8) の暴露開始時体重はそれぞれ、363 \pm 10g (平均体重 \pm SE, 以下同様)、354 \pm 9g であった。暴露終了時の体重はそれぞれ、583 \pm 16g, 571 \pm 13g であり、両群とも順調に発育した。

8週間暴露した群では、対照群 (N=8)、NO₂ 暴露群 (N=8) でそれぞれ、343 \pm 8g, 354 \pm 11g から、728 \pm 15g, 766 \pm 23g へと順調に発育した。

2) R と Cdyn の基準値

表 1 に示すように 4 週間暴露後の対照群, NO₂ 暴露群の R の基準値はそれぞれ, 0.22±0.02, 0.22±0.00 cmH₂O/ml/s, Cdyn の基準値はそれぞれ 0.63±0.03, 0.62±0.04 ml/cmH₂O であり, 両群間に有意差は認めなかった. 同表に示すように, 8 週間暴露後も, 2 群間に有意差はなかった.

Table 1 Baseline values of respiratory flow resistance (R) and dynamic compliance (Cdyn) after exposure to filtered air or 2ppmNO₂ for 4 or 8 weeks.

| | 4wk EXPOSURE | | 8wk EXPOSURE | |
|----------------------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| | AIR | NO ₂ | AIR | NO ₂ |
| R (cmH ₂ O/ml/s) | 0.22 ±0.02 | 0.22 ±0.01 | 0.19 ±0.01 | 0.19 ±0.01 |
| C dyn (ml/cmH ₂ O) | 0.63 ±0.03 | 0.62 ±0.04 | 0.79 ±0.01 | 0.75 ±0.02 |

(MEAN±SE, N=7~8)

3) 静呼吸器コンプライアンス

表 2 に示すように, 4 週間暴露後の対照群および NO₂ 暴露群の Cst はそれぞれ, 1.30±0.06, 1.38±0.04 ml/cmH₂O であり, 2 群間に有意差はみられなかった. 8 週間暴露後も, 同様に 2 群間に有意差は認めなかった.

Table 2 Static respiratory compliance (Cst) of the guinea pigs exposed to filtered air or 2ppmNO₂ for 4 or 8 weeks.

| | AIR | NO ₂ |
|--------------------------------------|---------------|-----------------|
| C st(4wk) (ml/cmH ₂ O) | 1.30 ±0.06 | 1.38 ±0.04 |
| C st(8wk) (ml/cmH ₂ O) | 1.50 ±0.05 | 1.54 ±0.05 |

(MEAN±SE, N=7~8)

4) Mch 溶液静注に対する気道反応性

図 1 は, 対照群と NO₂ 暴露群の ED₂₀₀R の値を 4 週または 8 週間暴露後に比較したものである. 4 週間暴露後の ED₂₀₀R の値は, 対照群, NO₂ 暴露群の順にそれぞれ, 3.7±0.8, 3.4±0.6 μg/kg/min であり, 2 群間

に有意差は認めなかった. 8 週間暴露後も, それぞれ, 3.5±0.5, 2.9±0.4 μg/kg/min と, 2 群間に有意差は認めなかった.

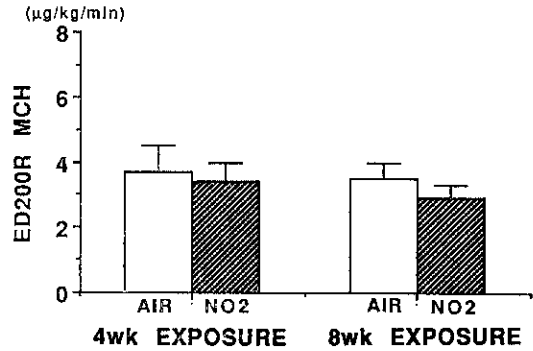


Fig. 1 ED₂₀₀R of the guinea pigs exposed to filtered air or 2ppmNO₂ for 4 or 8 weeks.

図 2 は, ED₆₅Cdyn について同様に示したものであるが, 4 週間暴露後の ED₆₅Cdyn の値は, 対照群, NO₂ 暴露群の順にそれぞれ, 4.7±0.9, 4.9±1.2 μg/kg/min と, 2 群間に有意差は認めなかった. 8 週間暴露後は, それぞれ, 5.1±0.7, 5.2±0.7 μg/kg/min と, この場合も 2 群間に有意差は認めなかった.

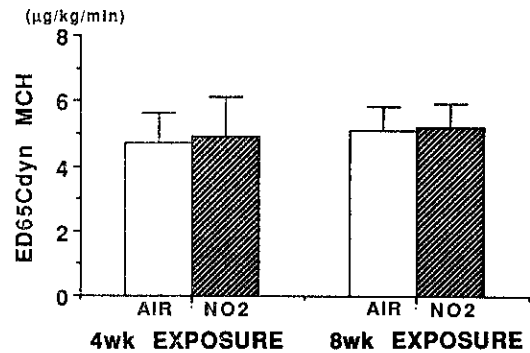


Fig. 2 ED₆₅Cdyn of the guinea pigs exposed to filtered air or 2ppmNO₂ for 4 or 8 weeks.

3. 実験 2 : O₃ 単独暴露, O₃・NO₂ 複合暴露

(1) 方法

1) 使用動物

4 週令, 体重 250-300g のモルモット (Hartley, SPF, 日本チャールズ・リバー株式会社) を購入し,

1～2週間の観察後実験に供した。

2) O₃暴露法

ステンレススチール製の角錐形暴露チャンバー（気積約0.59m³）を3ヶ使用，換気回数は10回/時間とした。第1チャンバーには清浄空気，第2チャンバーにはO₃，第3チャンバーにはO₃とNO₂の両ガスを送った。

O₃は無声放電型O₃発生器に乾燥空気を通して発生した。これを混合函に導いた後，各チャンバーに所定流量を送り，プレフィルター・HEPAフィルター・活性炭フィルターにて処理した給気と混合して所定濃度（0.2ppm）を得た。濃度測定は紫外吸光度法により行い，またこれらの濃度はマスフロー・コントロール方式により自動制御された。暴露は4または8週間連続して行ない，暴露中飼料と飲料水は自由に摂取せしめた。なお，飼料給与や清掃のため1日に約1時間は暴露を中断した。明・暗は12時間毎とした。温度は23～24℃に，相対湿度は55～65%に維持された。

3) O₃，NO₂複合ガス暴露法

複合暴露に先立ち，まずチャンバーにNO₂ガスを送った。NO₂ガスはNO₂標準ガスボンベ（NO₂0.5%/N balance，高千穂化学工業株式会社）よりチャンバー内に送気し，プレフィルター・HEPAフィルター・活性炭フィルターにて処理した給気と混合して所定濃度（2ppm）を得た。濃度測定は非分散型赤外線吸収法により連続測定し，自動記録計に出力した。NO₂濃度が

安定したところでO₃を加え，その後NO₂濃度の変化を観察した。最初の2～3時間，NO₂は混合前の濃度の80～90%に低下したが，さらに数時間経過後NO₂の濃度はほぼもとの状態にもどった。この確認を終えた後，4または8週間の連続暴露を行った。図3および図4に暴露中の両ガスの測定記録値を示した。暴露中は飼料および飲料水は自由摂取せしめた。なお，飼料給与や清掃のため1日に約1時間は暴露を中断した。明・暗は12時間毎とした。温度は23～24℃に，相対湿度は55～65%に維持された。

4) 呼吸機能，気道反応性測定法およびその評価法

RとC_{dyn}の基準値，C_{st}の測定，気道反応性の測定，およびこれらの評価と統計処理は，NO₂単独暴露時と同様に行なった。

(2) 結果

1) 体重変化

4週間暴露した群の対照群（N=8），O₃暴露群（N=8）および複合ガス暴露群（N=8）の体重は，暴露開始時はそれぞれ，313±9g，308±10g，316±7gであった。終了時には，それぞれ522±11g，535±11g，545±14gと順調に発育した。

8週間暴露した群の対照群（N=8），O₃暴露群（N=8）および複合ガス暴露群（N=8）の体重は，暴露開始時はそれぞれ，317±9g，317±9g，307±9gであった。終了時には，それぞれ707±15g，681±11g，691±18gと順調に発育した。

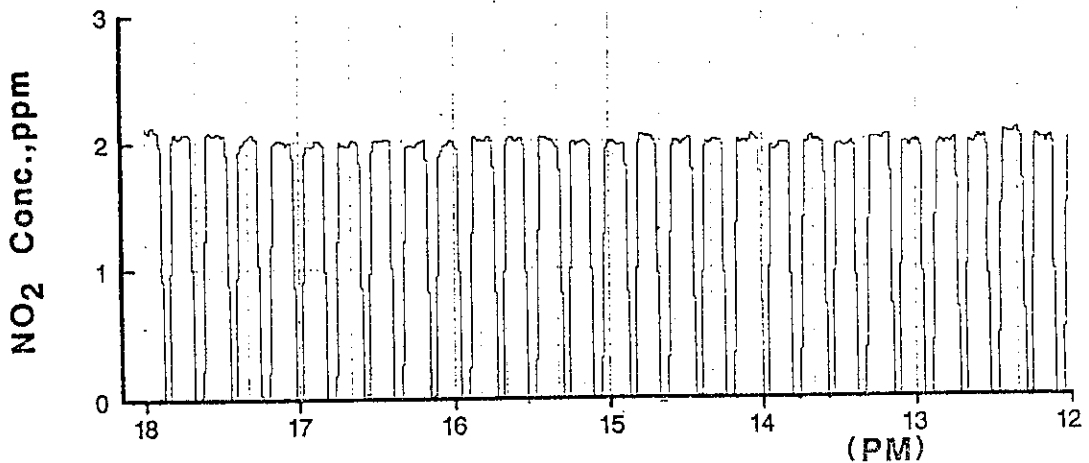


Fig. 3 A continuous record of NO₂ concentration, 2ppm, inside the exposure chamber.

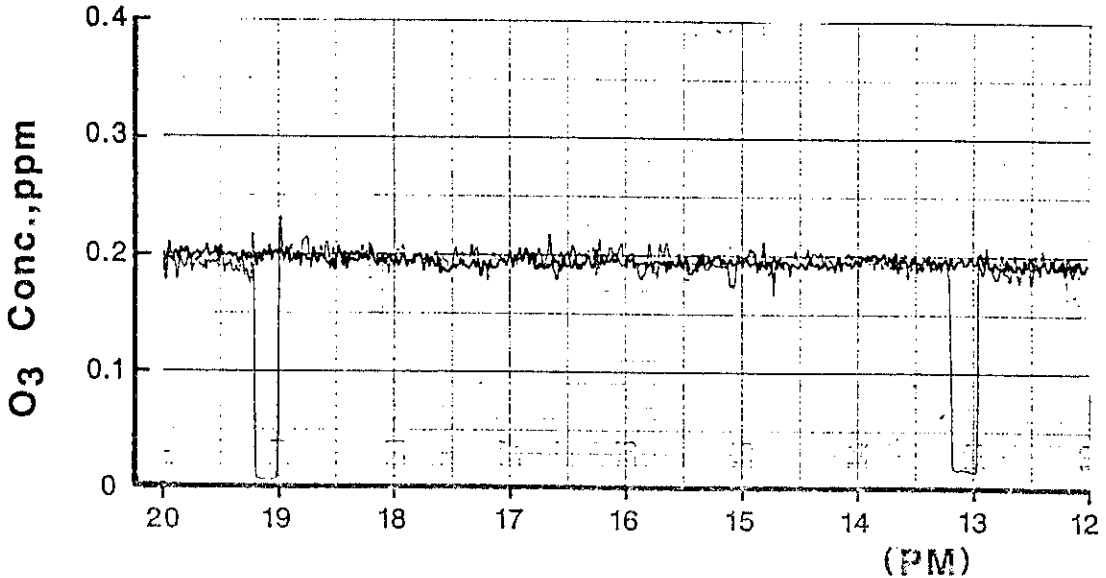


Fig. 4 A continuous record of O₃ concentration, 0.2ppm, inside the exposure chamber.

Table 3 Baseline values of R and C_{dyn} after exposure to filtered air, 0.2ppmO₃ or a combination of 0.2ppmO₃ and 2ppmNO₂ for 4 or 8 weeks.

| | 4wk EXPOSURE | | | 8wk EXPOSURE | | |
|---------------------------|--------------|----------------|---------------------------------|--------------|----------------|---------------------------------|
| | AIR | O ₃ | O ₃ +NO ₂ | AIR | O ₃ | O ₃ +NO ₂ |
| R | 0.15 | 0.15 | 0.16 | 0.19 | 0.21 | 0.21 |
| (cmH ₂ O/ml/s) | ±0.01 | ±0.01 | ±0.00 | ±0.00 | ±0.01 | ±0.02 |
| C _{dyn} | 0.75 | 0.74 | 0.71 | 0.65 | 0.70 | 0.70 |
| (ml/cmH ₂ O) | ±0.03 | ±0.02 | ±0.04 | ±0.02 | ±0.03 | ±0.03 |

(MEAN±SE, N=6~8)

2) R と C_{dyn} の基準値

表3に示すように、4週間暴露後の対照群、O₃暴露群および複合ガス暴露群のRの基準値はそれぞれ、 0.15 ± 0.01 , 0.15 ± 0.01 , 0.16 ± 0.00 cmH₂O/ml/s, C_{dyn}の基準値はそれぞれ 0.75 ± 0.03 , 0.74 ± 0.02 , 0.71 ± 0.04 ml/cmH₂Oであり、両群間に有意差は認めなかった。同表に示すように、8週間暴露後も同様に、3群間に有意差はなかった。

3) 静呼吸器コンプライアンス

表4に示すように、4週間暴露後の対照群および両暴露群のC_{st}はそれぞれ、 1.13 ± 0.05 , 1.17 ± 0.03 , 1.18 ± 0.03 ml/cmH₂Oであり、3群間に有意差はみら

れなかった。8週間暴露後も、同様に3群間に有意差は認めなかった。

Table 4 C_{st} of the guinea pigs exposed to filtered air, 0.2ppmO₃ or a combination of 0.2ppmO₃ and 2ppmNO₂ for 4 or 8 weeks.

| | AIR | O ₃ | O ₃ +NO ₂ |
|-------------------------|-------|----------------|---------------------------------|
| C _{st} (4wk) | 1.13 | 1.17 | 1.18 |
| (ml/cmH ₂ O) | ±0.05 | ±0.03 | ±0.03 |
| C _{st} (8wk) | 1.42 | 1.40 | 1.39 |
| (ml/cmH ₂ O) | ±0.04 | ±0.09 | ±0.02 |

(MEAN±SE, N=6~8)

4) Mch 溶液静注に対する気道反応性

図5は、各群のED₂₀₀Rの値を、4週または8週間暴露後に比較したものである。4週間暴露後のED₂₀₀Rの値は、対照群で2.74±0.17μg/kg/minだったものが、O₃暴露群では1.63±0.12μg/kg/minに低下しており、統計学的に有意差が認められた(p<0.01)。複合ガス暴露群では、O₃単独暴露による気道反応性亢進をさらに増強せしめることはなく、1.74±0.15μg/kg/minという値をとったが、対照群に対しては、有意に低い値で(p<0.01)、Rを2倍にまで反応せしめた。8週間暴露後も4週間暴露後と同様、各群それぞれ、2.24±0.22, 1.48±0.16, 1.47±0.18μg/kg/minと、O₃または複合ガス暴露群ではより低いED₂₀₀R値をとる傾向を示したが、対照群との間に統計学的有意差はなかった。

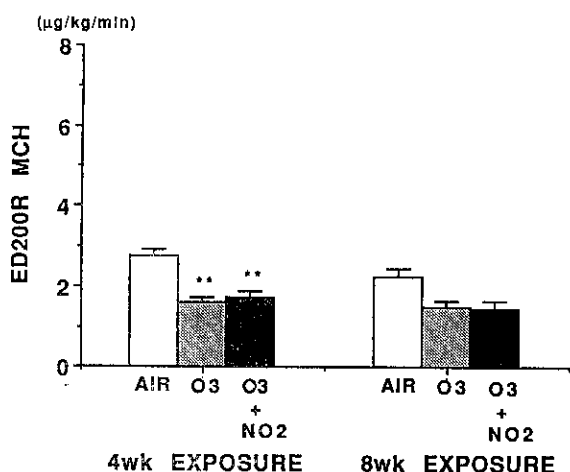


Fig. 5 ED₂₀₀R of the guinea pigs exposed to filtered air, 0.2ppmO₃ or a combination of 0.2ppmO₃ and 2ppmNO₂ for 4 or 8 weeks.

図6は、ED₆₅Cdynについて同様に示したものであるが、4週間暴露後のED₆₅Cdynの値は、対照群で3.84±0.48μg/kg/minだったものが、O₃暴露群では2.92±0.63μg/kg/minに低下する傾向を認めた。しかしこの2群間に統計学的有意差は認められなかった。複合ガス暴露群では、O₃単独暴露による気道反応性の変化をさらに増強せしめ、ED₆₅Cdynは1.97±0.41μg/kg/minにまで低下した。これは対照群に対して、統計学的に有意に低い値であった(p<0.05)。この結

果を、平均値に注目してしてみると、O₃暴露群においては対照群の76%にあたる濃度のMch溶液投与により、さらに複合ガス暴露群においては対照群の51%にあたる濃度のMch溶液投与により、対照群と同等のCdyn低下をもたらしたことになる。8週間暴露後の影響は4週間暴露後と同様の変化を示し、ED₆₅Cdyn値はそれぞれ3.75±0.47, 3.05±0.62, 1.97±0.41μg/kg/minと、複合ガス暴露群では対照群に比べ有意に低い濃度のMch溶液でCdynを低下せしめた(p<0.05)。この場合も平均値でみると、O₃暴露群は対照群の81%、複合ガス暴露群では53%にあたる濃度のMch溶液の投与により、対照群と同等のCdyn低下をもたらした。

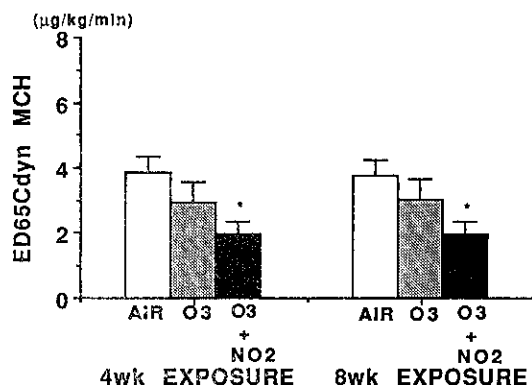


Fig. 6 ED₆₅Cdyn of the guinea pigs exposed to filtered air, 0.2ppmO₃ or a combination of 0.2ppmO₃ and 2ppmNO₂ for 4 or 8 weeks.

4. 考 察

本研究は、O₃とNO₂の4～8週間複合暴露がモルモットの気道反応性を相対的に亢進せしめることを示しているが、この複合ガスの影響について検討するに先立ち、まずO₃またはNO₂の単独暴露と気道反応性の関係について考察したい。

O₃と気道反応性の関係についてはモルモット¹⁷⁾やイヌ¹⁸⁾を始めとする種々の動物、またヒトにおいても¹⁹⁾、O₃を数時間短期暴露することにより、気管支収縮物質に対する気道反応性が亢進することが示されている。一方、比較的低濃度のO₃を数週間の長期暴露した時の気道反応性に及ぼす影響についてはこれまで3

つの報告がある。まず、Johnsonら²⁰⁾は、サルに 1 ppmO₃を週 1 回 2 時間、19 週間繰り返したのち気道反応性を測定し、Mch エーロゾル吸入に対する気道反応性が亢進することを示した。一方 Kagawa²¹⁾らは、モルモットに対して 0.15ppmO₃を 1 日 4 時間、週 5 日、19 週間暴露し、ヒスタミン・エーロゾル吸入に対する気道反応性が低下することを示した。これらの O₃長期暴露後の気道反応性は、いずれも気管支収縮物質の吸入により測定されているが、我々のモルモットに対する 0.2ppmO₃暴露 (9-10 週間) 実験¹⁾においても、Mch 吸入に対する気道反応性は、Kagawa らと同様に低下していた。しかしながら同暴露条件下のモルモットの Mch 溶液静注に対する気道反応性はこれとは逆に亢進することを我々は始めて示した。本実験においても、ほぼ同様の結果が確認されたが、4 週間暴露後明らかに統計学的有意差をもって亢進していた R の反応は、8 週間暴露後、幾分弱まる傾向がみられた。O₃暴露群または複合ガス暴露群と対照群との間に統計学的有意差は認められなかったが、その時用いる動物固有の気道反応性も考慮にいれれば、これをもって生理学的変化がなかったといえることはできない。なおこの R の変化に比べると Cdyn の変化は更に弱いものであり、これもまた既報と同様の結果であった¹⁾。

O₃に比べ、NO₂の気道反応性に及ぼす影響について検討した研究は比較的少ない。ヒトにおいては、喘息患者では 0.1~0.5ppmNO₂²²⁻²⁴⁾、健常人では 2 ppmNO₂²⁵⁾の短期暴露により、ヒスタミンや Mch エーロゾルに対する気道反応性が亢進することが示されている。しかし動物においては、そこまで低い濃度での NO₂暴露と気道反応性の関係について調べられた研究はまだない。40ppm 以上²⁶⁾、または 7.5~15 ppmNO₂暴露²⁷⁾によって、気管支収縮物質に対する気道反応性が亢進するという報告の他、Kobayashi ら¹²⁾による、4 ppmNO₂ 3 日暴露後に気道反応性が亢進するという報告があるのみである。本研究では、NO₂濃度をさらに 2 ppm にまで下げて NO₂を 4 週間または 8 週間暴露したが、Mch 溶液静注に対する気道反応性の亢進は認められなかった。

O₃と NO₂の複合影響を見る場合、何をパラメーターにとるかにもよるが、相乗作用、相加作用、またはいずれかのガスの単独作用のみがみられる場合が考えら

れる。本研究においては始めて気道反応性をパラメーターとして用い、両ガスの複合影響をみたが、NO₂単独暴露実験が複合ガス暴露実験と異なった時期に行なわれたことや、体重や R および Cdyn の基準値、Cst の値等が多少異なっていたことから、この群と O₃単独暴露群、複合ガス暴露群とのデータとの比較には慎重を要した。

さて、上記の結果より、まず R についてみると、O₃暴露後の Mch 溶液静注に対する気道反応性亢進は NO₂暴露によっては強められなかった。すなわち、R の反応性を高めるような変化は、主として O₃暴露によるものであり、NO₂はこれを増強せしめないものと示唆された。これと同様の関係は、Freedman らによる組織病理学的変化を指標とした実験⁹⁾や Yokoyama らの肺機能を指標とした実験結果¹⁰⁾にもみられるが、動物種、暴露量等に差があり、そこで見られた変化と今回の結果とをそのまま比較することはできない。

一方 Cdyn は、O₃の 4 週または 8 週間単独暴露後、対照群に比べわずかに反応性が高まる程度でしかなかったが、複合ガス暴露後は、有意に強い反応性を示した。Cst 一定の条件下においては、Cdyn の変化は R に比べ、より末梢気道の変化を反映すると言われている^{28,29)}。本研究では、実験 1, 2 において、Cst 値に関し群間に差がないことを示したが、このことから、NO₂は中枢気道に比べ、より末梢気道に作用し、O₃単独暴露ではわずかにしかみられなかった気道反応性亢進を、より強く有意に高める働きをしたと考えられた。NO₂単独の効果はほとんどみられなかったことから、ここで O₃と NO₂は相乗的に気道反応性を高めているものと考えられる。

これと同様の結果は寺田らによる³⁰⁾、ラットに対する 2 ppmNO₂+0.1ppmO₃、90 日暴露実験によっても示されている。すなわち、それ単独ではほとんど病変をもたらさなかった NO₂が、複合暴露した場合は、O₃単独暴露でみられた場合よりも、より強い気管支・肺接合部病変をもたらしていた。ラットでみられたこのような組織病理学的変化がそのままモルモットにおいても同様に生じるとは限らない。しかしながら、同濃度の NO₂に対して、モルモットはラット以上に強い傷害を受けやすいとされており³¹⁾、より強い組織病理学的変化がモルモットに生じている可能性はある。

本研究の結果はまた、気道反応性を亢進させるのに、健常人では 2 ppmNO₂を要し、気管支喘息患者では 0.1~0.5ppmNO₂を要したという結果と類似している。すなわち、気管支喘息患者に見られるような気道炎症等の変化が、同時に暴露した O₃によって生じていたということが、正常モルモットに影響を及ぼさない用量の NO₂であっても、後に気道反応性亢進を増強せしめるように作用したと考えられるのである。しかし、それだけでは、Yokoyama ら¹⁰⁾の O₃と NO₂の交互暴露実験が示すように、両ガスの相加作用にとどまる可能性があり、必ずしも本研究で示された相乗作用を説明することはできない。

O₃と NO₂の相乗効果の原因としては、さらに以下のようなメカニズムが考えられる。まずは、O₃と NO₂の化学反応によって生じる N₂O₅、HNO₃、NO₃ラジカル等による肺傷害の増強である。O₃は、同濃度の NO₂に比べ10~20倍の強い毒性作用を有すると言われて^{9,32,33)}。もし O₃と NO₂が相加的にしか作用しないとすれば、例えば0.45ppmO₃は0.3ppmO₃と1.2ppmNO₂の複合暴露よりも強い肺傷害作用をもたらすはずであるが、Lee ら⁴⁾が示したように、この両者はほぼ同様の傷害を肺にもたらしていた。このことは、O₃と NO₂が相乗的に作用したことを示唆するものであり、Lee らは、N₂O₅等の新たな化学物質がその相乗性の原因であろうと考えている。我々の実験においては、NO₂濃度が安定した所で O₃を加えることにより、一時的に暴露チャンバー内の NO₂濃度の低下が観察された。これは、O₃と NO₂の間に化学反応が生じ、新たな化学物質が生じていることを強く示唆するものであり、このメカニズムの妥当性を支持するものである。

次に考えられるのは、NO₂と気道液の反応によって生じる硝酸塩、亜硝酸塩³⁴⁾が O₃暴露による肺傷害を増強する場合である。酸性エアロゾルの存在は O₃単独の肺傷害作用を増強せしめるものと言われて³⁵⁾、本研究においても、そのような酸性塩の産生が、上記メカニズム同様、両ガスによる相乗効果に関係していた可能性がある。

以上、本研究においては、O₃と NO₂の複合暴露によって、モルモットの Mch 溶液静注に対する気道反応性が亢進すること、しかも、R の変化のみをみるのではなく、Cdyn の変化に注目することによって始めて、

O₃と NO₂は相乗的に作用することが示唆された。さらに本研究は、十分な気道反応性の亢進を起こし得ぬような比較的低い濃度の O₃または NO₂であっても、それらを複合させることにより、有意な気道反応性の亢進をもたらしうることをも示している。人を用いたこれまでの複合暴露実験結果の多くは両ガスの相乗効果を否定しているが、いずれも短期暴露実験であり³⁶⁻⁴⁰⁾、本研究で見られた両ガスの相乗効果はこれらの結果によって否定されるものではない。またすでに示してきたように、多くの動物実験結果は、両ガスの複合暴露が、種々のパラメーターを相乗的に変化せしめることを示している。そのメカニズムとしては、両ガス間の化学反応、または NO₂と気道液の反応によって、新しい化学物質が暴露チャンバー内または気道内に生じ、それらの毒性効果が両ガスのもつ毒性効果を増強せしめたものと考えられる。日常生活におけるこれらの大気汚染ガスの実際の濃度は、今回用いたものより下回るが、より日常生活に近い状況下で、複合汚染物質の8週間暴露が気道反応性を亢進せしめることを示した本研究の結果は、今後、大気汚染の生体影響を検討していく上で大きな意義を有するものと考えられる。

5. 謝 辞

稿を終えるに当たり、終始適切なる御指導、御助言を賜りました本院衛生獣医学部の山崎省二先生、町井研士先生、生物実験棟の皆様方に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Diggle, W.M., Gage, J.C.: The toxicity of ozone in the presence of oxides of nitrogen. *Br. J. Ind. Med.*, 12, 60-64, 1955.
- 2) Ehrlich, R., Findlay, J.C., Fenteres, J.D., Gardner, D.E.: Health effects of short-term inhalation of nitrogen dioxide and ozone mixtures. *Environ Res.*, 14, 223-231, 1977.
- 3) Graham, J.A., Gardner, D.E., Blommer, E.J., House, D.E., Menache, M.G., Miller, F.J.: Influence of exposure patterns of nitrogen dioxide and modifications by ozone on susceptibility to bacterial infectious disease in mice. *J. Toxicol. Environ. Health*,

- 21, 113-125, 1987.
- 4) Lee, J.S., Afifi, A.A., Mustafa, M.G.: Effects of short-term, single and combined exposure of rats to NO₂ and O₃ on lung tissue enzyme activities. *Inhalation Toxicol.*, 1, 21-35, 1989.
 - 5) Lee J.S., Mustafa M.G., Afifi, A.A.: Effects of short-term, single and combined exposure to low-level NO₂ and O₃ on lung tissue enzyme activities in rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, 29, 293-305, 1990.
 - 6) Ichinose, T., Sagai, M.: Biological effects of combined gases of nitrogen dioxide and ozone III. Synergistic effects on lipid peroxidation and antioxidative protective systems in the lungs of rats and guinea pigs. *Toxicology*, 59, 259-270, 1989.
 - 7) Sagai, M., Ichinose, T.: Biochemical effects of combined gases of nitrogen dioxide and ozone. IV. Changes of lipid peroxidation and antioxidative protective systems in rat lungs upon life span exposure. *Toxicology*, 66, 121-132, 1991.
 - 8) Gelzleichter, T.R., Witschi, H., Last, J.A.: Concentration-response relationships of rat lungs to exposure to oxidant air pollutants: A critical test of Haber's law for ozone and nitrogen dioxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 112, 73-80, 1992.
 - 9) Freeman, G., Juhos, L.T., Furioli, N., Mussenden, R., Stephens, R.J., and Evance, M.J.: Pathology of pulmonary disease from exposure to interdependent ambient gases (nitrogen dioxide and ozone) *Arch. Environ Health*, 29, 203-210, 1974.
 - 10) Yokoyama, E., Ichikawa, I., Kawai, K.: Does nitrogen dioxide modify the respiratory effects of ozone? In *Nitrogen Oxides and Their Effects on Health* S.D. Lee, ed., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich. pp217-229, 1980.
 - 11) 神馬征峰, 内山巖雄, 荒川はつ子, 横山栄二: 低濃度 O₃ 長期暴露がモルモットの気道反応性に及ぼす影響—静脈内投与法による反応性の亢進と吸入法による反応性の低下. *大気汚染学会誌*29, 286-295, 1994.
 - 12) Kobayashi, T., Shinozaki Y.: Induction of transient airway hyper-responsiveness by exposure to 4ppm nitrogen dioxide in guinea pigs. *J. Toxicol. Environ. Health*, 37, 451-461, 1992.
 - 13) 石沢秀宣, 新関満: 非分散赤外線吸収法による微量ガスの連続測定 (NO₂, 0-2ppm 計), 第23回大気汚染学会講演要旨集, 468, 1982.
 - 14) 横山栄二: ラット換気能測定法, *日胸疾会誌*21, 357-363, 1983.
 - 15) Lorino, A.M., Benichou, M., Macquin-Mavier, I., Lorino, H., Harf, A.: Respiratory mechanics for assessment of histamine bronchopulmonary reactivity in guinea pigs. *Resp. Physiol.*, 73, 155-162, 1988.
 - 16) Shore, S.A., Kariya, S.T., Anderson, K., Skornik, W., Feldman, H.A., Pennington, J., Godleski, J., Drazen, J.M.: Sulfur-dioxide-induced bronchitis in dogs: Effects on airway responsiveness to inhaled and intravenously administered methacholine. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 135, 840-847, 1987.
 - 17) Easton, R.E., Murphy, S.D.: Experimental ozone preexposure and histamine. Effect on the acute toxicity and respiratory function effects of histamine in guinea pigs. *Arch. Environ. Health*, 15, 160-166, 1967.
 - 18) Lee, Y.E., Bleecker, E.R., Nadel, J.A.: Effects of ozone on bronchomotor response to inhaled histamine aerosol in dogs. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.*, 43, 626-631, 1977.
 - 19) Golden, J.A., Nadel, J.A., Boushey, H.A.: Bronchial hyperirritability in healthy subjects after exposure to ozone. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 118, 287-294, 1978.
 - 20) Johnson, H.G., Stout, B.K., Ruppel, P.L.: Inhibition of the 5-lipoxygenase pathway with piriprost (U-60, 257) protects normal primates from ozone-induced methacholine hyperresponsive small airways. *Prostaglandins*, 35, 459-466, 1988.
 - 21) Kagawa, J., Haga, M., Miyazaki, M.: Effects of repeated exposure to 0.15ppm O₃ for four months on bronchial reactivity in guinea pigs (4 hrs/day; 5days/wk). *Atmospheric ozone research and its policy implications*. Schneider, T. et al. eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp545-552, 1989.
 - 22) Bylin, G., Hedenstierna, G., Lindvall, T., Sundin, B.: Ambient nitrogen dioxide concentrations increase bronchial responsiveness in subjects with mild asthma. *Eur Respir J.*, 1, 606-612, 1988.
 - 23) Kleinman, M.T., Baily, R.M., Linn, W.S., Anderson, K. R., Whynot, J. D., Shamoo, D.A., Hackney J. D.: Effect of 0.2ppm nitrogen dioxide on pulmonary function and response to bronchoprovocation in asthmatics. *J. Toxicol. Environ. Health*, 12, 815-826, 1983.
 - 24) Mohsenin, V.: Airway responses to nitrogen dioxide in asthmatic subjects. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 22, 371-380, 1987.
 - 25) Mohsenin, V.: Effect of vitamin C on NO₂-induced

- airway hyper-responsiveness in normal subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 136, 1408-1411, 1987.
- 26) Silbaugh, S.A., Mauderly, J.L., Macken, C.A.: Effects of sulfuric acid and nitrogen dioxide on airway responsiveness of the guinea pigs. *J. Toxicol. Environ. Health*, 8, 31-45., 1981.
- 27) Abraham, W.M., Welker, M., Oliver, W., Jr., Mingle, M., Januszkiewicz, A.J., Wanner, A., Sackner, M.A.: Cardiopulmonary effects of short-term nitrogen dioxide exposure in conscious sheep. *Environ. Res.*, 22, 61-72, 1980.
- 28) Drazen, J.M.: Physiologic basis and interpretation of common indices of respiratory mechanical function. *Environ. Health Perspect.*, 16, 11-16, 1976.
- 29) Drazen, J.M.: Physiologic basis and interpretation of indices of pulmonary mechanics. *Environ. Health Perspect.*, 56, 3-9, 1984.
- 30) 寺田伸枝, 鈴木孝人, 大沢誠喜, 福田雅夫, 池田真吾, 溝口勲: O₃単独暴露およびNO₂とO₃複合暴露によるラットの肺の病理形態学的変化. 東京都立衛生研究所研究年報33, 337-346, 1982.
- 31) Azoulay-Dupuis, E., Torres, M., Soler, P., and Moreau, J.: Pulmonary NO₂ toxicity in neonate and adult guinea pigs and rats. *Environ. Res.*, 30, 322-339, 1983.
- 32) Watanabe, H., Fukuse, O., Isomura, K.: Combined effects of nitrogen dioxide and ozone on mice. In *Nitrogen Oxides and Their Effects on Health* S.D. Lee, ed., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich. pp181-189, 1980.
- 33) Mustafa, M.G., Elsayed, N.M., von Dohlen, F.M., Hassett, C.M., Postlethwait, E.M., Quinn, C.L., Graham, J.A., Gardner, D.E.: A comparison of biochemical effects of nitrogen dioxide, ozone, and their combination in mouse lung 1. Intermittent exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72, 82-90, 1984.
- 34) Postlethwait, E.M., Mustafa, M.G.: Fate of inhaled nitrogen dioxide in isolated perfused rat lung. *J. Toxicol. Environ. Health* 7, 861-871, 1981.
- 35) Last, J.A., Hyde, D.M., Chang, D.P.Y.: A mechanism of synergistic lung damage by ozone and a respirable aerosol. *Exp. Lung. Res.* 7, 223-235, 1984.
- 36) von Nieding, G., Wagner, H.M., Lrekeler, H., Lolligen, H., Fries, W., Beuthan, A.: Controlled studies of human exposure to single and combined action of NO₂, O₃, and SO₂. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 43, 195-210, 1979.
- 37) Folinsbee, L.J., Bedi, J.F., Horvath, S.M.: Combined effects of ozone and nitrogen dioxide on respiratory function in man. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 42, 534-541, 1981.
- 38) Kagawa J.: Respiratory effects of two-hour exposure with intermittent exercise to ozone, sulphur dioxide and nitrogen dioxide alone and in combination in normal subjects. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 44, 14-20, 1983.
- 39) Koenig, J.Q., Covert, D.S., Smith, M.S., Van Belle, G, Pierson, W.E.: The pulmonary effects of ozone and nitrogen dioxide alone and combined in healthy and asthmatic adolescent subjects. *Toxicol. Indust. Health*, 4, 521-532, 1988.
- 40) Drechsler-Parks, D.M, Bedi, J.F., Horvath, S.M.: Pulmonary function responses of young and older adults to mixtures of O₃, NO₂ and PAN. *Toxicol. Indust. Health*, 5, 505-517, 1989.