

論文内容要旨

序 論

動物が生命を維持するには、消化管から吸収する栄養素とともに、肺から取り込む酸素が必須である。酸素を得るために成人は1日に10-15 m³もの大気を呼吸している。したがって、健康を維持するためには大気を清浄に保つことが重要となる。しかし、大気中には多種類の毒性物質が含まれている。

オゾン(O₃)は光化学オキシダントの主成分である。わが国の都市部のO₃濃度は環境基準値の0.06ppmを越えその倍の濃度に達する時もあり、O₃は大気汚染物質の中で最も健康への影響が懸念されるものの一つである。1970年代に、O₃による肺傷害の発症過程とその機構の一部が明らかにされた。しかし、O₃が他の大気汚染物質の影響発現を修飾する可能性、あるいは、O₃への抵抗性を減少させる個体側の因子の検討に関する研究は、その重要性にもかかわらず少ない。

シトクロムP-450を中心とした異物代謝系は、低分子の脂溶性化学物質を代謝しその毒性を減じたり、また、逆に毒性を活性化したりもする酵素系である。異物代謝系は肝臓での活性が高いが、肺にも存在し、大気中に含まれる多環芳香族炭化水素などの解毒および毒性の活性化に重要な役割をはたしている。さらに、異物代謝系はミクロソーム画分に存在する膜酵素であるため、強い酸化作用を有するO₃の影響を受け易いと考えられる。しかし、O₃が肺の異物代謝系に及ぼす影響を調べた研究は殆どない。

毒性影響を修飾する個体側の因子としては栄養条件が考えられる。低栄養動物は環境変化への適応能力が劣り、毒物に対する抵抗性も低いことが知られている。ビタミンA(V. A)は、上皮性細胞の正常な分裂と分化に必要であること、さらに、O₃暴露の影響は気道上皮に強く現れることが明らかとなっている。したがって、V. A欠乏動物は、O₃暴露による肺傷害を強く受ける可能性がある。

以上の観点から、O₃暴露が他の大気汚染物質の影響を修飾する可能性、および、O₃に対する抵抗性を低める個体側の因子を明らかにすることを目的とし、正常あるいはV. A欠乏ラットに及ぼすO₃暴露の影響、特に異物代謝系に及ぼす影響とその機構に関する検討を行った。

第一章 肺の異物代謝系に及ぼすオゾン暴露の影響

成熟雄ラットをガス暴露用チャンバー(図1)に入れ、0.05ppmから0.8ppmまでのO₃を1日から9か月間暴露後、O₃が肺の異物代謝系の酵素成分および異物代謝活性に及ぼす影響を検討した。異物代謝系成分の中でシトクロムP-450(P-450)が最も著しい変化を示した。P-450は0.8ppmのO₃暴露1日目に減少傾向

を示すが、4日目から増加に転じ、暴露7日目には対照値の約2倍に増加した(表1)。NADPH-シトクロムP-450還元酵素(P-450red)活性も暴露7日目に約1.4倍と有意に増加した。しかし、NADH-シトクロムb5還元酵素活性に有意な変化は認められなかった。P-450の増加は一過性ではなく、暴露を続ける限り暴露濃度に依存した増加を示した。すなわち、0.1および0.2ppmO₃の4週間暴露でP-450は対照値の約1.8および約2.3倍に増加し(表2)、さらに低濃度のO₃(0.05ppm)の9か月間暴露によっても有意に増加した(表3)。P-450は異物代謝系の律速酵素であり、P-450の増加は異物代謝活性の増加を示唆している。肺で測定可能な活性としてBenzphetamine N-demethylase(BPHDM)、Benzo(a)pyrene hydroxylase(BPHY)、7-Ethoxycoumarin O-deethylase(ECDE)およびCoumarin hydroxylase(COHY)を選び、これら4種類の異物代謝活性に及ぼすO₃の影響を検討した。0.1および0.2ppmO₃の4週間暴露により4種類の活性はそれぞれ異なった影響を受けた(表4)。すなわち、BPHDM活性が対照値の約2倍を示しP-450の増加に匹敵した。しかし、COHY活性は有意な影響を受けなかった。また、BPHYおよびECDE活性は、対照値の約1.5倍に増加しBPHDM活性とCOHY活性の間の変化を示した。

肺のP-450はO₃暴露に対し鋭敏に反応し、P-450の増加はO₃暴露影響の指標となる可能性が示唆された。異物代謝活性はO₃暴露により増加すること、さらに、活性測定に用いる基質によって影響の程度が異なることが示された。このことは、ラット肺に基質特異性の異なる数種類のP-450イソ酵素分子が存在することを示唆している。

第二章 肺のシトクロムP-450イソ酵素の検索とシトクロムP-450イソ酵素に及ぼすオゾン暴露の影響

ラット肺から精製されているP-450としては3-Methylcholanthrene投与により誘導されるP-450MCが知られている。しかし、未処理のラット肺のP-450イソ酵素分子種に関する知見は少ない。第二章では、肝臓の主要なP-450に対する抗体を作製し、それら抗体と肺P-450との反応性などを利用して肺P-450の性質を明らかにし、さらに、O₃暴露が肺のP-450イソ酵素に及ぼす影響を検討した。

Phenobarbital投与ラット、3-Methylcholanthrene投与ラット、および未処理のラットから各々主要なP-450である、P-450b、P-450c、およびP-450hを精製し抗体を作製した。これらの抗体に対する、上記薬剤を投与した、あるいは、未処理のラット肺から調製したマイクロソームの反応性をOuchterlony二重拡散法を用いて調べた(図2)。抗P-450b抗体はすべての肺マイクロソームと反応し、その沈降線は肝臓から精製したP-450bに対する沈降線とフューズした。抗P-450c抗体は3-Methylcholanthrene投与ラットの肺から調製したマイクロソームと

反応し、その沈降線は肝臓から精製したP-450cに対する沈降線とフューズした。抗P-450h抗体はいずれの肺ミクロソームとも反応しなかった。これらの結果から肝臓でP-450bは、Phenobarbital投与によって誘導される誘導酵素(inducible enzyme)であるが、肺では常在性の構成酵素(constitutive enzyme)であることが示された。

対照および0.2ppmO₃を2週間暴露したラットの肺ミクロソームに対する3種の抗P-450抗体の反応性をOuchterlony二重拡散法を用いて検討した。いずれのラットの肺ミクロソームも抗P-450b抗体と反応し、他の2種の抗体とは反応しなかった。P-450cは高いBPHY活性を有することが知られている。しかし、この結果は、O₃暴露による肺ミクロソームのBPHY活性の増加はP-450cの誘導によるものではないことを示している。

対照および0.2ppmO₃を2週間暴露したラットの肺ミクロソームを界面活性剤を用いて可溶化し、陽イオン交換セルロースカラムクロマトグラフィーを用いて肺P-450を部分精製した。対照ラット肺のP-450は、2つの画分(P-450FIとP-450FII)に分離された(図3)。P-450FIとP-450FIIに含まれるP-450の量比は36:64であった(表5)。O₃暴露されたラットの肺からもP-450FIとP-450FIIの2つのピークのみ認められた。O₃暴露ラットのP-450FIとP-450FIIに含まれるP-450量は対照ラットの各々1.7倍と1.9倍に増加したがP-450FIとP-450FIIの量比は対照ラットから得られた比と変わらなかった。両群から得られたP-450FIおよびP-450FIIを各々SDS電気泳動法で分離後、イムノブロットィング法を用いて抗P-450抗体に対する反応性を検討した。両群ともにP-450FIIにP-450bと分子量が一致したバンドが抗P-450b抗体と反応した。P-450FIおよびP-450FIIから界面活性剤を除いた後、肝臓から精製したP-450red, Dilauroyl phosphatidylcholineおよびNADPHを用いた再構成系でECDEとCOHY活性を測定した。この再構成系でP-450FIはECDEおよびCOHY活性を有し、P-450FIIはP-450FIに比べて高いECDE活性を有したもののCOHY活性は有さないことが明らかとなった(表6)。さらに、抗P-450b抗体はP-450FIIが触媒するECDE活性をほぼ完全に阻害した(図4)。また、O₃暴露によってP-450FIおよびP-450FIIの単位P-450当りの代謝活性は影響を受けなかった。

以上の事実より、O₃暴露による肺P-450含量の増加は常在性のP-450イソ酵素の増加によること、また、P-450bは肺の主要なP-450イソ酵素の1つであることが明らかにされた。

第三章 肺の組織形態およびシトクロムP-450含有細胞の分布に及ぼすオゾン暴露の影響

O₃暴露により肺に常在するP-450イソ酵素が増加したことから、O₃暴露によ

るP-450の増加は、肺の形態変化と密接に関連することが推定される。また、第二章で、ラット肺には抗P-450b抗体反応性のP-450が構成的に存在することを明らかにした。そこで、O₃暴露によるP-450の増加を組織学的に理解することを目的として、0.4ppmO₃を2週間暴露したラット肺の、ヘマトキシリン・エオジン染色標本、また、抗P-450b抗体による酵素抗体染色標本を用いた肺組織の光学顕微鏡による観察を行った。その顕微鏡写真を用いて、細気管支上皮細胞、肺泡道領域の肺胞細胞そして末梢領域の肺胞細胞の各々の全細胞数に対する抗P-450b抗体陽性細胞数の割合を算定した。O₃暴露による形態変化は細気管支から肺泡道にいたる領域(bronchio-alveolar junction)に強く現れた。その部位の主な変化は、クララ細胞(非線毛気管支上皮細胞)の肥大と増性、肺泡道上皮細胞の肥大と増性、細気管支周囲の結合組織および肺胞間質の肥厚、マクロファージの増加であった。抗P-450b抗体はクララ細胞と強く反応した。また、肺泡上皮にも少数の弱陽性細胞が見いだされた。O₃暴露によってクララ細胞の陽性像が一段と強くなり、さらに、肺泡道上皮に細胞質が斑点状に染色される細胞が出現した。この細胞は対照群には見いだされない細胞であった。O₃暴露によって抗P-450b抗体陽性細胞率は細気管支上皮で1.2倍、肺泡道領域の肺胞細胞では5.5倍と有意に増加した(表7)。しかし、末梢領域の肺胞細胞では有意な変化を示さなかった。

これらの結果は、O₃暴露によるP-450陽性細胞数の増加が、P-450含量増大の主な原因であることを示している。

第四章 正常あるいはビタミンA欠乏ラットの肺の組織形態、異物代謝系、および、チミジン取り込み活性に及ぼすオゾン暴露の影響

序論でも述べたように、V. Aは上皮細胞の分裂と分化に関与しており、V. A欠乏ラットはO₃暴露の影響を強く受ける可能性がある。そこで、正常(V. A suf)あるいはV. A欠乏(V. A def)ラットの肺組織形態、異物代謝系、チミジン取り込み活性、および、取り込み部位に及ぼすO₃暴露影響を経時的に検討した。

3週齢のラットをV. A欠乏飼料で4週間飼育するとV. A欠乏の初期状態になることを確認した。高度のV. A欠乏では感染症の増加などV. A欠乏による不可逆的影響が顕著となる。そこで、暴露終了日が飼育開始4週目となるように、0.4ppmO₃を6時間から14日間暴露した。暴露1日目に細気管支の線毛細胞の線毛の脱落およびクララ細胞の気道への突出部(apical cap)の消失が起こった。この変化はV. A def群で顕著であった。暴露3日目には上皮細胞の傷害は修復され、14日目にはクララ細胞のapical capの肥大が認められた。暴露3日目以降に両群の動物が示す傷害修復像に差異は認められなかった。抗P-450b抗体反応性のP-450量およびBPHY活性は2相性の変化を示した。すなわち、暴露6

時間目に増加傾向を示し、1日目には対照値まで低下し、7日目に増加に転じ、その増加は14日目まで続いた。V. Adef群の異物代謝系の変化はV. Asuf群と差がなかった。

V. AsufおよびV. Adef欠乏動物に0.4ppmO₃を1, 2, 3および14日間暴露し、暴露終了直後にトリチウム標識チミジンを投与しチミジン取り込み活性を調べた(図5)。V. Asufラットの取り込み速度は暴露1日目に清浄空気群の4倍に、2日目には7倍に達し、3日目に再び4倍となり、14日目には清浄空気群の値まで低下した。V. Adefラットの取り込み活性の増加はV. Asufラットに比べて有意に低く、暴露1, 2および3日目の値は清浄空気群の3倍、4倍および2倍にとどまった。マイクロオートラジオグラフィを行い、取り込み部位の検討と標識細胞の数をカウントした(表8)。V. Asufラットでは、標識率の最も高い部位は肺泡道の肺胞細胞であり、暴露2日目に清浄空気群の約30倍に達した。細気管支上皮細胞の標識率は暴露2および3日目に2倍に増加した。末梢の肺胞細胞は暴露2日目には変化せず、3日目に約4倍に増加し、暴露時間の延長とともに標識部位が末梢に及ぶことが示された。また、標識部位は傷害部位およびP-450陽性部位とほぼ一致することが明かとなった。V. Adefラットの標識部位はV. Asufラットと変わらないが、標識率はいずれの部位でもV. Asufラットに比べて低かった。このことは、O₃を暴露されたV. Adefラットの肺細胞の分裂活性はV. Asufラットに比べて低いことを示している。

V. AdefラットではO₃暴露による初期傷害が強く、修復の遅延あるいは不全が起こることが示唆された。また、チミジンによる標識部位はP-450陽性細胞の増加する部位とほぼ一致し、陽性細胞の増加あるいは出現に細胞の分裂が関与することが強く示唆された。

第五章 総合的考察

O₃暴露によって以下の一連の変化が認められた(図6)。形態的には0.4ppm O₃暴露1日目に細気管支上皮の傷害が認められ、その傷害は暴露3日目までに修復された。暴露1日目から3日目にチミジン取り込み活性の増加が認められ、標識率は肺泡道部位で著しく高く、次に、細気管支および末梢肺胞部位であった。また、肺泡道周囲にマクロファージが著しく集積し、高率にチミジンにより標識された。マクロファージは細胞の損傷部位に集積することから、O₃による傷害部位は細気管支から肺泡道にいたる領域(bronchio-alveolar junction)であると考えられた。暴露14日目にはクララ細胞、また肺泡道部位の肺胞上皮細胞の肥大と増性像が認められた。さらに、これらの細胞がP-450陽性であることが明らかになった。したがって、O₃暴露によるクララ細胞の肥大と増加および肺泡道部の肺胞上皮での陽性細胞の出現が、P-450増加の

原因と考えられた。また、 O_3 は強力な酸化剤であるので、 O_3 暴露により生じた酸化物を除去し、 O_3 に対する抵抗性を獲得するためP-450が増加したとも推測される。

O_3 暴露による肺のP-450の増加は異物代謝活性の上昇をともなった。P-450と肺異物代謝活性の増加は一過性の変化ではなく、暴露を続ける限り認められた。また、その増加は $0.05\text{ppm}O_3$ の9か月間暴露という比較的穏やかな暴露条件下でも認められた。したがって、異物代謝系によって毒性が活性化される化学物質が O_3 暴露時に肺に取り込まれた場合、 O_3 はその化学物質の毒性を強める可能性があることを本研究の結果は示唆している。

O_3 暴露にV. A欠乏を負荷すると、 O_3 暴露による初期傷害の増幅が形態的に認められた。また、その傷害の修復の遅延あるいは不全がチミジン取り込み実験より示唆された。したがって、V. A欠乏ラットは O_3 暴露に対する抵抗性が弱まっていると考えられる。

今後、大気汚染物質の生体影響を評価するに際し、個体側の栄養条件、また、異物代謝系の変化という観点からとらえた汚染物質の複合影響を考慮していくことが重要であることを本実験の結果は示唆している。

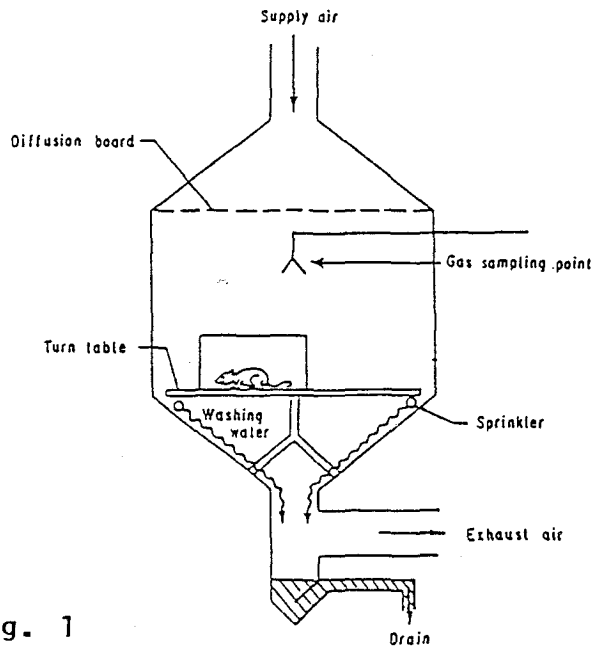


Fig. 1

Cross Section of Chamber

Table 1

Changes in Protein Contents and Components of Xenobiotic-Metabolizing Systems of Lung Microsomes during Intermittent Exposures to O₃

Component	Exposure periods (days)			
	1	4	7	14
Homogenate protein ^a	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	102±12.1 (100)	98± 4.5 (100)	98± 6.4 (100)	98± 8.0 (100)
0.8 ppm O ₃	104± 3.4 (102)	103± 5.4 (105)	107± 3.4 (101)	96± 5.0 (98)
Microsomal protein ^a				
Control	9.7±1.8 (100)	9.0± 0.7 (100)	9.3± 1.2 (100)	9.2±0.8 (100)
0.8 ppm O ₃	9.5±0.8 (98)	9.9± 1.1 (105)	11.2±0.8* (120)	9.7±1.0 (98)
Cytochrome P-450 ^b				
Control	488± 91 (100)	417± 104 (100)	447± 90 (100)	427±102 (100)
0.8 ppm O ₃	416± 60 (85)	726± 169** (174)	910±179*** (203)	615±147* (144)
NADPH-cytochrome P-450 reductase ^c				
Control	421± 41 (100)	418± 93 (100)	393± 37 (100)	384± 52 (100)
0.8 ppm O ₃	460± 55 (109)	511± 53 (122)	539± 76** (137)	446±147* (116)
NADH-cytochrome b ₅ reductase ^c				
Control	4450±377 (100)	3780±519 (100)	3850±519 (100)	3970±598 (100)
0.8 ppm O ₃	4230±279 (95)	4050±279 (107)	4230±492 (110)	3730±385 (94)

^a mg protein/whole lung. ^b pmole/whole lung. ^c nmole/min/whole lung.

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

Table 2

Effects of 4-Week Exposures to 0.1 and 0.2 ppm O₃ on Protein Content and Components of Xenobiotic-Metabolizing Systems of Lung Microsomes

	Exposure concentration of O ₃		
	control	0.1 ppm	0.2 ppm
Homogenate protein ^a	(%)	(%)	(%)
Control	91 ± 4 (100)	105 ± 6** (115)	103 ± 6** (113)
Microsomal protein ^a	9.7±1.0 (100)	12.0±1.0** (124)	11.1±1.4 (114)
Cytochrome P-450 ^b	855±216 (100)	1502±318** (176)	1978±198*** (231)
NADPH-cytochrome P-450 reductase ^c	315± 46 (100)	416 ± 48** (132)	457 ± 55** (145)
Cytochrome b ₅ ^b	358±68 (100)	434 ± 81 (121)	477 ± 73* (133)
NADH-cytochrome b ₅ reductase ^c	2139±367 (100)	2478±243 (116)	2812±316* (131)

^amg protein/whole lung. ^bpmole/whole lung. ^cnmole/min/whole lung.

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

Table 3

Effects of 9-Month Exposure to 0.05 ppm O₃ for 10 Hours per Day on Protein Content and Xenobiotic-Metabolizing Systems of Lung Microsomes

	Control		0.05 ppm O ₃	
		(%)		(%)
Homogenate protein ^a	92.0±4.0	(100)	95.1± 7.3	(103)
Microsomal Protein ^a	9.53±0.43	(100)	9.52±0.49	(100)
Cytochrome P-450 ^b	718 ± 76	(100)	960 ± 124**	(134)
Benzphetamine N-demethylase ^c	45.4± 3.5	(100)	47.2± 5.7	(104)
Benzo(a)pyrene hydroxylase ^d	318 ±18.7	(100)	341 ±46.0	(107)
7-Ethoxycoumarin O-deethylase ^d	2035± 165	(100)	2361± 253*	(116)
Coumarin hydroxylase ^d	91.5±17.6	(100)	91.0±15.4	(99)

^amg protein/whole lung. ^bpmole/whole lung. ^cnmole/min/whole lung.
^dpmole/min/whole lung. *p < 0.05, **p < 0.01 (mean±SD, n=12)

Table 4

Effects of 4-Week Exposures to 0.1 and 0.2 ppm O₃ on Cyt. P-450 Content and Xenobiotic Metabolizing Activities of Lung Microsomes

	Exposure concentration of O ₃		
	control	0.1 ppm	0.2 ppm
		(%)	(%)
Cytochrome P-450 ^a	855±216	(100)	1502±318** (176)
		(%)	(%)
Benzphetamine N-demethylase ^b	59.2±11.2	(100)	106.1±24.1** (182)
		(%)	(%)
Benzo(a)pyrene hydroxylase ^c	88 ± 12	(100)	111 ± 18* (126)
		(%)	(%)
7-Ethoxycoumarin O-deethylase ^c	2584±348	(100)	3612±512** (140)
		(%)	(%)
Coumarin hydroxylase ^c	161± 27	(100)	163 ± 17 (101)
		(%)	(%)
		(%)	(%)
		(%)	(%)

^apmole/whole lung. ^bnmole/min/whole lung. ^cpmole/min/whole lung.
 *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (mean±SD, n=6)

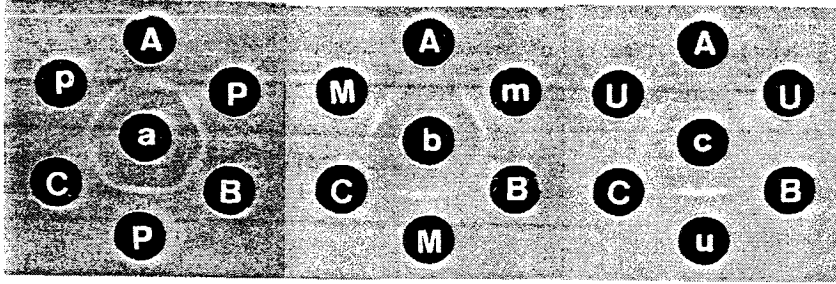


Fig. 2 Ouchterlony Double Diffusion Analysis of Pulmonary Cyt. P-450 with Anti-hepatic Cyt. P-450 Antibodies

Center wells:

- a, anti P-450b antibody 100 μ g
- b, anti P-450c antibody 100 μ g
- c, anti P-450h antibody 100 μ g

Surrounding wells:

- A, lung Ms from PB-treated rat 156 μ g
- B, lung Ms from MC-treated rat 150 μ g
- C, lung Ms from untreated rat 145 μ g
- P, liver Ms from PB-treated rat 28 μ g
- M, liver Ms from MC-treated rat 20 μ g
- U, liver Ms from untreated rat 21 μ g
- p, purified P-450b 1 μ g
- m, purified P-450c 1 μ g
- u, purified P-450h 1 μ g

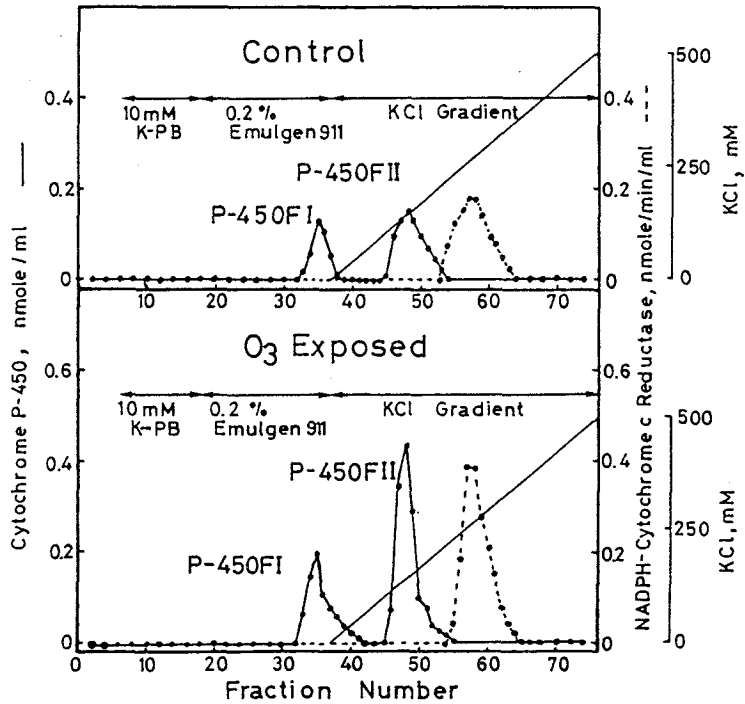


Fig. 3

Separation of Two Isozymes of Cyt. P-450 and NADPH-Cyt. P-450 Reductase on DE-52 Column

Table 5 Partial Purification of Pulmonary Cytochrome P-450

	Protein		Cytochrome P-450			
	(mg)		Total content (nmol)		Specific content (nmol/mg protein)	
			Cont.	O ₃	Cont.	O ₃
Microsomes	180	180	12.3	24.2	0.068	0.134
Solubilized supernatant	115	109	14.1	27.6	0.122	0.253
DE-52 column chromatography						
fraction I	2.88	3.12	2.92	4.98	1.01	1.60
fraction II	22.1	33.2	5.28	10.1	0.239	0.305

Table 6 Catalytic Activities of Pulmonary Cytochrome P-450 Partially Purified from Rat Lungs

Substrate	Turnover number (nmol of products/min./nmol of P-450)			
	P-450FI		P-450FII	
	Control	O ₃ -exposed	Control	O ₃ -exposed
7-Ethoxy-coumarin	3.81	3.09	13.6	13.3
Coumarin	0.173	0.165	N.D.	N.D.

N.D.; not detected

Coumarin hydroxylation 7-Ethoxycoumarin O-deethylation

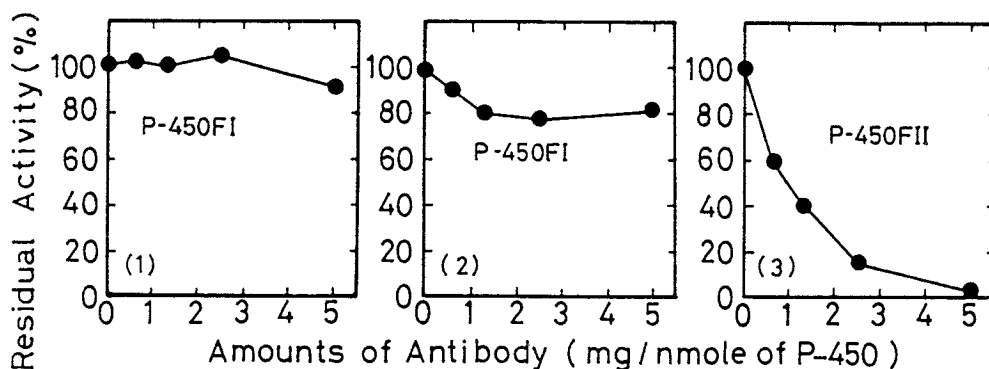


Fig. 4 EFFECTS OF ANTI HEPATIC P-450b ANTIBODY ON COUMARIN HYDROXYLATION AND 7-ETHOXYCOUMARIN O-DEETHYLATION CATALYZED BY RECONSTITUTED ENZYME SYSTEM
(1) AND (2) P-450FI, 12 PMOLE; (3) P-450FII, 3 PMOLE

Table 7

Effects of 2-Week Exposure to 0.4 ppm O₃ on P-450b Positive Cells in Lung

Area	Control	O ₃ -Exposure
Small bronchiole		
total cells ^a	185 ± 18	201 ± 26
P-450b positive cells ^a	71 ± 10	92 ± 6**
ratio ^b	0.385 ± 0.039	0.460 ± 0.051*
Alveolar duct		
ratio ^c	0.043 ± 0.031	0.233 ± 0.044***
Alveolus		
ratio ^c	0.016 ± 0.003	0.024 ± 0.008

^aNumbers of epithelial cells/mm of bronchiole.

^bP-450 positive cells/total cells.

^cP-450 positive cells/alveolar cells without macrophages.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (mean±SD, n=5).

Changes in ³H-Thymidine Uptake and Concentrations of DNA and RNA during O₃ Exposures

Fig. 5

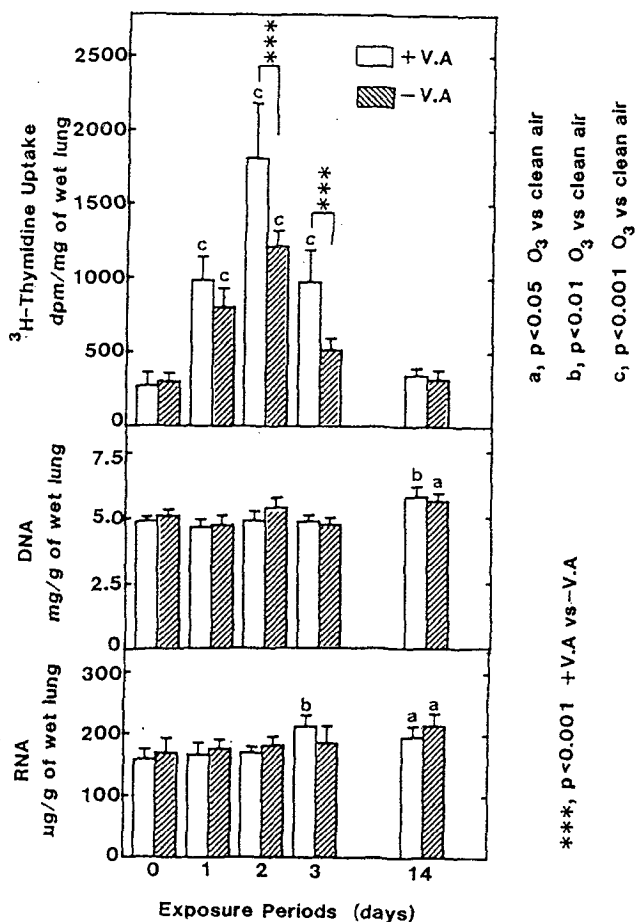


Table 8

Effects of Exposures to 0.4 ppm O₃ on Labeling Index of Lung Cells

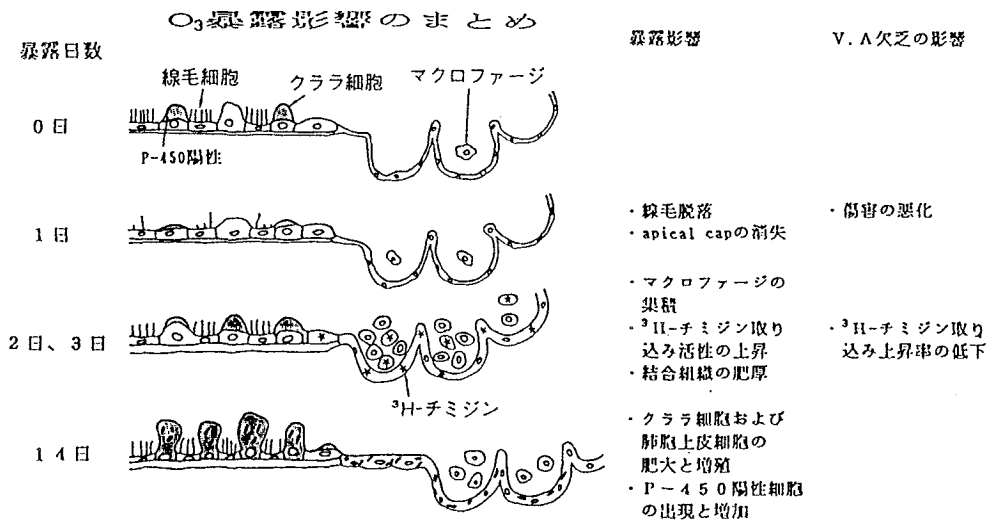
Area	Clean Air	Exposure Periods	
		2 days	3 days
Terminal bronchiole	labeling index of epithelial cells		
	V.A suf	3.38±1.51	7.22±2.17*
	V.A def	2.26±0.81	4.01±1.75**
Alveolar duct	labeling index of alveolar cells		
	V.A suf	2.95±1.84	82.0±1.72***
	V.A def	3.42±1.04	49.9±1.49***#
	labeling index of macrophages		
	V.A suf	< 10	13.9±4.89
	V.A def	< 10	10.58±4.66
	macrophages per 100 of total cells		
V.A suf	1.93±0.18	18.3±5.83***	
V.A def	0.95±0.24	13.8±4.70***	
Alveolus	labeling index of alveolar cells		
	V.A suf	3.30±1.05	2.61±0.71
	V.A def	2.37±0.95	2.41±0.89
	macrophages per 100 of total cells		
	V.A suf	12.5±1.7	9.4±2.4
V.A def	10.7±6.39	13.7±6.1	

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; clean air VS. ozone (mean±SD, n=5)

#p < 0.05, ##p < 0.01; V.A suf VS. V.A def (mean±SD, n=5).

Labeling indexes were expressed as labeled cells numbers per 1000 of total cells.

Fig. 6



審査結果の要旨

オゾンは光化学オキシダントの主成分であり、大気汚染物質の中で最も健康への影響が懸念されるものの一つである。

本研究は、オゾン暴露が他の大気汚染物質の影響を修飾する可能性、およびオゾンに対する抵抗性を低める個体側の因子を明らかにすることを目的として、正常あるいはビタミンA欠乏ラットに及ぼすオゾン暴露の影響、とくに異物代謝系に及ぼす影響とその機構に関して検討を行ったものである。

本論文は4章から成り、各章で以下の点を明らかにしている。

1. ラット肺のチトクロムP-450（以下P-450と略す）はオゾン暴露によって増加し、P-450の増加は異物代謝活性の増加をもたらした。その反応様式の検討から、ラット肺には基質特異性の異なる複数のP-450イソ酵素が存在することが示唆された。
2. ラット肺には、少なくとも2種類の主要P-450イソ酵素が常在し、その1つはP-450 bであることが明らかになった。さらにオゾン暴露によってP-450 bの増加が認められた。
3. オゾン暴露によって、細気管と肺胞道の上皮細胞の肥大と増加が認められた。また、抗P-450 bを用いた免疫学的手法により、P-450 b陽性細胞は、細気管支上皮細胞のクララ細胞であることが明らかとなった。オゾン暴露によってクララ細胞の肥大と増加が起き、さらに肺胞道にP-450 b陽性細胞が出現した。したがって、これらの変化がオゾン暴露によるP-450の増加をもたらしたと考えられた。
4. ビタミンA欠乏ラットは、オゾン暴露初期の傷害が正常食ラットと比較して強く現れ、傷害の修復能力も低下していることが示された。したがってVA欠乏ラットはオゾンに対する抵抗性が減少していると考えられた。

以上のように、本論文は光化学オキシダントの作用機作の解明と、それを防御するための栄養条件を知る上で一つの手がかりを与えたものといえる。よって著者に農学博士の学位を授与するに値すると判定した。