
悪臭および大気汚染物質 (主として SO_x , NO_x) の生物学的作用機構に関する研究

Studies on the mechanisms of biological actions of malodours and air polluting substances (mainly NO_x and SO_x)

代表研究者	群馬大学医学部教授 Prof., Gunma Univ.	高本貞敬 Sadayuki TAKAGI
協同研究者	群馬大学医学部助教授 Assoc., Prof., Gunma Univ.	小野田法彦 Norihiko ONODA
	群馬大学医学部講師 Assist., Prof., Gunma Univ.	森憲作 Kensaku MORI
	群馬大学医学部助手 Instructor, Gunma Univ.	飯野昌枝 Masae IINO
	群馬大学医学部専攻生 Postgraduate Student, Gunma Univ.	鎗田宏 Hiroshi YARITA
	群馬大学医学部大学院生 Postgraduate Student, Gunma Univ.	田沢洋一 Yōichi TAZAWA
	日本医科大学助手 Instructor, Nihon Med. College	木暮信一 Shinichi KOGURE

The actions of NO_x upon the various areas of the olfactory nervous system were studied in rabbits and monkeys.

A specially designed small apparatus for dilution of NO_x was devised under the principle of a dynamic olfactometer. NO_x with a concentration of 100 ppm in a cylinder was selected as an original gas. Pure air was made by means of a dehydrater and a deodorizer. By mixing the NO_x gas with purified air, NO_x gases of various concentrations were produced. It was found that relatively constant concentrations of NO_x were obtained with this apparatus. The diluted NO_x gases were applied to the nose of a rabbit. Experiments were performed on anaesthetized and unanaesthetized animals.

Brain waves were recorded in the olfactory bulb (OB), applying various odours. The actions of NO_x on these waves were examined. Application of NO_x of over 50 ppm for about 20 min was found to produce depressive actions.

Single unit discharges of neurons in the OB, the prepyriform cortex (PC) and the lateral hypothalamus (LHA) were recorded by means of microelectrodes.

Dose responses of OB, PC and LHA neurons to dilute NO_x gases with concentrations of four steps (5, 10, 15, 20 ppm) were examined. After double cannulation, artificial sniffs were given through a postnasal cannula, using a respirator. According to the patterns of the neural responses to the NO_x gases, OB, PC and LHA neurons were separated into the two groups: One group of neurons increased their discharge rates, and the other one decreased their spike frequencies. With increasing NO_x concentrations, the spike frequencies increased or decreased monotonically in some of the units. Temporal courses of stimulating effects of NO_x gases on the unit activities differed among units: Two types of effects, transient and sustained ones were found. The biological significance of these responses waits for further studies.

研究目的

悪臭公害というのは、感覚を通しての公害である。嗅覚はすぐに疲労して、人は悪臭の中でも平気でいられるから時々かぐと悪臭による公害が問題となるが、悪臭現場で働く人はあまりその苦痛を訴えないことが多い。そこで悪臭により頭痛、吐気、嘔吐、精神集中度低下などが起こるのは悪臭物質が肺より血中に入り体内を循環することが主として原因であると考えられる。したがって悪臭の人体に対する反応も、大気汚染物質の人体に対する作用として本質的には同じと考えることができよう。さて、大気汚染物質の有害作用の研究をみると、生体全体に対するそれらの反応を捉えたものが大半である。そして主としてマウスやラットを用いて、それら有害物質の致死量 (LD 50) を計るという方法が採られてきた。しかしこれら有害物質が微量の場合には、身体のある特定の部分に慢性的な変化を起こし、それが死、または機能障害につながる場合が多いと考えられ、致死量を主として計る研究は、あまりにも飛躍しすぎていて、非現実的であると考えられる。

人間の生活にとり、最も重要な脳活動に対する有害物質の作用については、これまで全く調べられていない。脳は極めて複雑な構造をもっており、身体の各部の運動と感覚を支配する部分や、思考、創造、情動、記憶などに関連した部分などに分かれているが、微量物質の有害作用がつづく場合に、脳の上記のどの場所の機能がまず犯されるのかを明らかにしなければならない。これは脳生理学の研究者によって初めて明らかにできることであると思われるが、今日まで脳生理学者は公害の問題に全く研究の手をのぼしていなかった。

代表研究者らは長年にわたり嗅覚系の脳神経生理学を研究してきた。そこで本研究の目的はその経験と研究方法を用いてガス体の有害物質に対する脳の各中枢の活動を捉え、悪臭および大気汚染物質が嗅覚系の脳活動に及ぼす作用機構を究明することにある。

実験方法

1. NO_x ガスの希釈装置の製作

100 ppm の NO_x を含有するポンペを購入し、

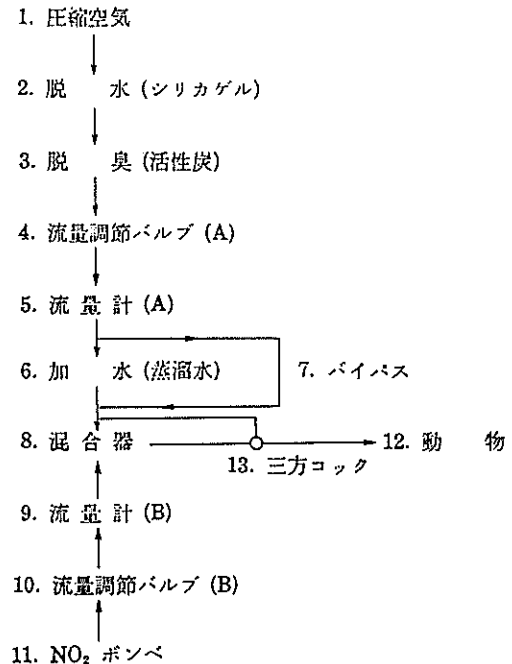


図 1. NO_x 希釈装置略図

NO_x を適宜に希釈する装置を考案した (図 1)。これにより得られる NO_x の濃度 (C) は次式で与えられる。

$$C(\text{ppm}) = C_0 \times \frac{\text{NO}_x \text{ の流量}}{(\text{純空気の流量}) + (\text{NO}_x \text{ の流量})}$$

ただし、C₀: 原 NO_x の濃度

そして、計算値と実測値とを照合して、投与するのに適当な濃度を研究した結果、5, 10, 15, 20 ppm を主として用いることにした。しかし、それ以上 100 ppm までの NO_x を投与したこともあった。また純空気の流量は 1,500 ml/min とした。

実際の濃度 (C) の測定には、二酸化窒素用検知管 (ガステック) を用いた。我々の方法では、1 ppm 以下の NO_x ガス発生および測定は不可能であるので、生体への投与には 1 ppm 以下の濃度を用いる実験は行なわなかった。また、NO_x による腐蝕変性を防ぐため、硬質ガラス、テフロン、シリコン、ステンレス鋼材を使用した。

2. 嗅覚系の脳活動の研究のため第 1 歩としてそ

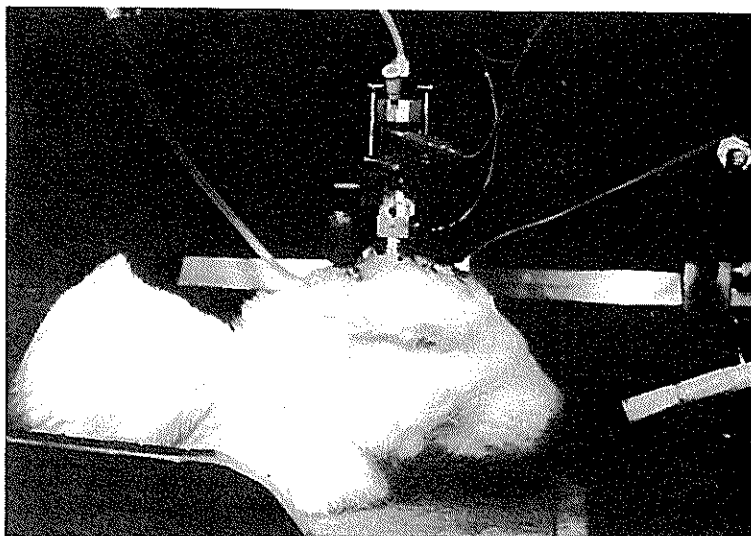


図 2. 慢性実験用に手術され頭部に記録用電極を装着されたウサギ

れに最も適したウサギを用いた。嗅覚系には麻酔薬が特に著明な反応を与えるので、無麻酔下で実験を行なう必要があり、そのため頭部の固定法を工夫した。あらかじめ麻酔下で頭部に手術を行ない、頭皮を切開して頭蓋骨を露出し、目的とする嗅覚領の直上で頭蓋骨に穴をあけ、それをかこんで記録用電極の保持装置（シリンダー）を取りつけ、また、頭頂骨にステンレス鋼製ネジを植え込み、その近くに頭部固定用の台座を置き、歯科用セメントにより台座とシリンダーをネジとともに頭蓋骨に固定した。これによって、ウサギの頭部を固定して脳活動を無麻酔下で記録することが可能となった（図 2）。脳活動の記録部位として、さしあたり第 1 次中枢の嗅球と第 2 次中枢の梨状皮質、第 3 次中枢の視床下部外側野を選んだ。本実験は上記の予備的手術の約 1 週間後から開始された。なお、ウサギによる実験後、サルを用い同じ方法で実験を計画した（図 3）。しかし、技術上の困難と時間の不足でデータを取得するまでに至らなかった。

3. ニオイの投与方法は、注射筒に貯えられたニオイを鼻孔に噴射させ、自然呼吸でかがせる方法と、気管を切断し、頭側の断端にカニューレを取りつけて人工呼吸器により空気を吸引して鼻腔にニオイを引き込む方法（図 4）と 2 通りの方法を

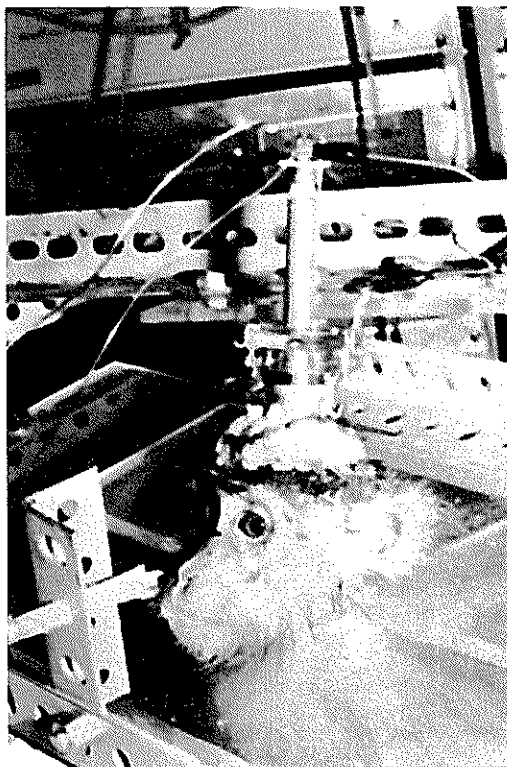


図 3. 慢性実験用に手術され頭部に記録用電極を装着されたサル

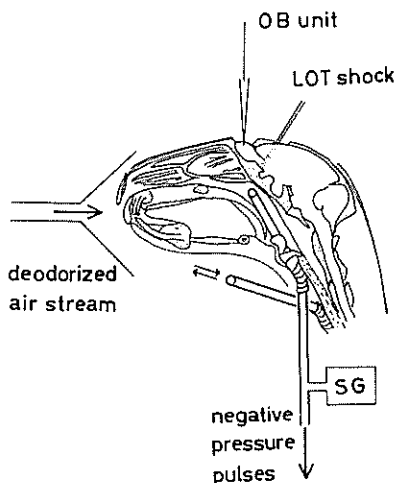


図 4. 動物実験方法の略図。気管切断後、気管カニューレを肺側の気管に入れ、また陰圧負荷用に後鼻腔へも別のカニューレを入れた。SG: 圧モニター。鼻前には、マスクを置きコントロールとして脱臭空気を流した。嗅球の神経細胞活動の記録 (OB unit) のため微小電極を上部から刺入した。ニオイにตอบสนองする細胞層を決めるため外側嗅索に刺激電極を刺入し、その電気刺激 (LOT shock) を行った。

用いた。

ニオイとしては酢酸アミル (AA), ベンゼン (BZ), イソ酢酸 (VA), ウンデカラクトン (UD-L), ボルネオール (BL), カンファー (CM) などを用いた。

実験結果

1. 脳波による嗅球の研究

嗅球は嗅上皮よりニオイの情報を受ける第1次中脳で、ウサギでは脳の先端にとび出している

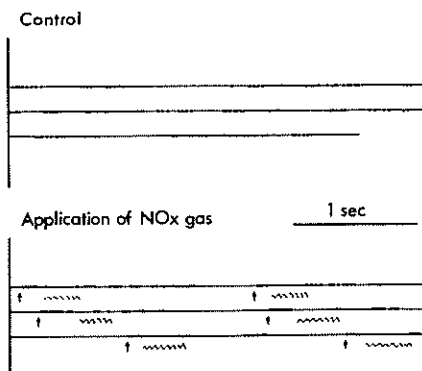


図 5. 嗅球単一僧帽細胞活動 (黒点表示) と嗅球表面脳波との関係。NO_x 投与 (矢印) により著明な誘起脳波が現われる。

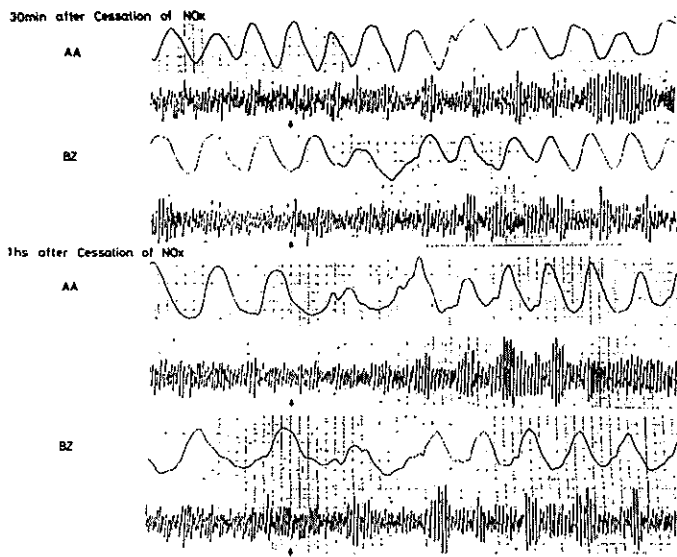


図 6. ウサギ嗅球の固有脳波 (矢印より左側) とニオイ (AA, BZ) の投与 (矢印で示す) 後に現われる誘起脳波—NO_x の作用 (投与後の 30 分および 60 分後の反応)

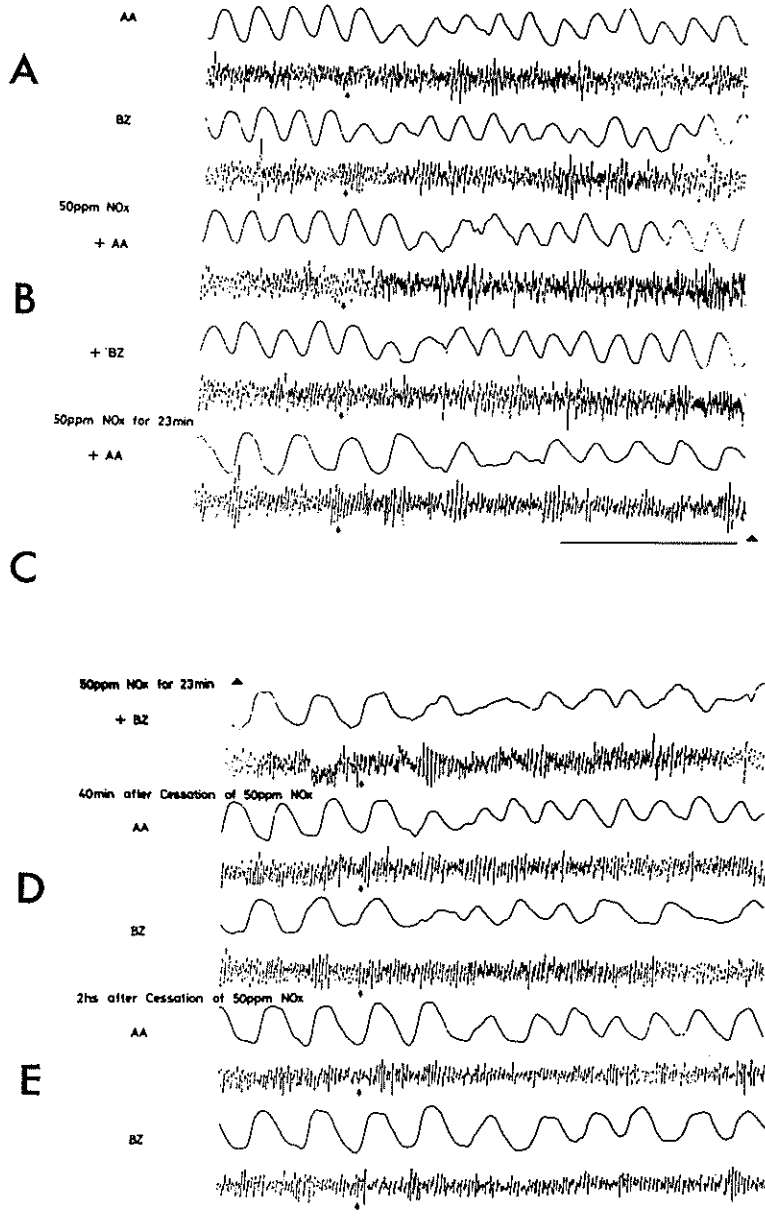


図 7. AA および BZ 投与 (矢印) により現われるウサギ嗅球の誘起脳波と、それに対する NO_x の作用. A: 対照, 矢印からニオイを与えると誘起脳波が認められる. B: 50 ppm NO_x の投与の開始直後の脳波. ニオイ刺激 (矢印) でなお誘起脳波が認められる. C: 50 ppm NO_x を 23 分間投与し終えた直後の脳波. D: NO_x 投与後 40 分経過したあとで記録した脳波. E: NO_x 投与後 2 時間たつて経過したあとで記録した脳波. D と E ではニオイ刺激に対する反応は認められない. B と E の右下の横線は 1 秒間を示す.

れいな層構造を形成している。したがって脳の研究には極めて好都合な部分である。嗅覚受容細胞より送られるニオイ情報は主に僧帽細胞層に受け継がれる。そこで、嗅球表面で脳波を記録するとともに、その内部にあとで述べる微小電極を刺入して単一僧帽細胞の活動を記録したのが図5である。NO_x投与前の脳波および神経発射(図の上段)には、一定の規則性は見いだされず、また、はっきりした律動波も現われなかったが、NO_xを与えると図の下段に見られるように、呼吸の吸気相に一致して(矢印で示すように)神経発射が群落的に現われ、それに引き続き、明らかに律動的な誘起脳波の出現が見られた。そこでNO_xに対する反応をさらに詳しく調べた。

嗅球の脳波を記録しながら10, 20, 30 ppmのNO_xをそれぞれ30分間投与し、そのあとで酢酸アミル、ベンゼンのニオイをかかせ、これらのニオイによる誘起脳波がいかに変化するかを調べた。その結果、これらの濃度では嗅球に特別な反応の現われなことが分かった(図6)。

しかし、50 ppmのNO_xを約20分間かかせるると、ニオイに対する反応が嗅球では認められなくなり、投与の2時間後にも回復は認められなかった。従って50 ppmのNO_xは嗅覚系に対して著明な有害反応を及ぼすことが結論された(図7)。このような反応は、嗅球に対してというよりも嗅上皮(嗅覚受容器)を傷害したための感覚器傷害である可能性が大きい。

さらに濃度を上げて100 ppmのNO_xをかかせてみた。するとウサギは間もなく全身痙攣を起こしたので投与を中止した。この場合は20秒後になってもなお呼吸は停止したままで、嗅球の脳波もほとんど消失した。この結果について考察すると、このような高濃度の場合にはNO_x吸入により、血行性に呼吸中枢にNO_x(これが血中で変化してHNO₃)が働き、呼吸麻痺を起こしたのか、多量のNO_xのため吸気中のO₂が不足したためであったのか結論できなかつた。50~100 ppmというような高濃度のNO_xに曝露されるといような場合は、常識では考えられないので、このような高濃度の実験は少数例で中止した。

100 ppm NO_x投与により呼吸が停止した場合は、ただちに人工呼吸を施し、自発性呼吸が回復した場合に再びニオイ刺激を行なったが、ニオイに対する応答はもはや見られなかった。この場合も嗅上皮を傷害したためと考えられた。

2. 単一細胞活動の研究

a. 脳波の研究は嗅球の多数の細胞活動の総和であるため、個々の細胞がNO_xに対してどのような反応を示すか全く分からない。そこで個々の細胞への反応を調べるために嗅球に微小電極を刺入して単一細胞のインパルス発射活動を記録した。

i) 嗅球の神経細胞発射頻度がNO_xにより増加する例

自然呼吸では、NO_x投与により呼吸のリズムがくずれることが多いので、結果の判定が困難な場合があった。そこで次に、図4に示す方法で人工呼吸器により気管から空気を吸引した場合の反応を研究した。図8に、NO_x投与前と投与時の単一神経活動の変化を示してある。三つの掃引が一组で、上からそれぞれ、神経発射活動、人工かき込みの圧モニター、NO_x投与時のマークである。NO_x投与マークの各掃引は、左から1/3ぐらいのところ段が上っているが、これは三方コックが回転されてNO_xが与えられた時点を示す。その左方の段が下っているところはコントロールを示す。上から4組の図は5, 10, 15, 20 ppmの

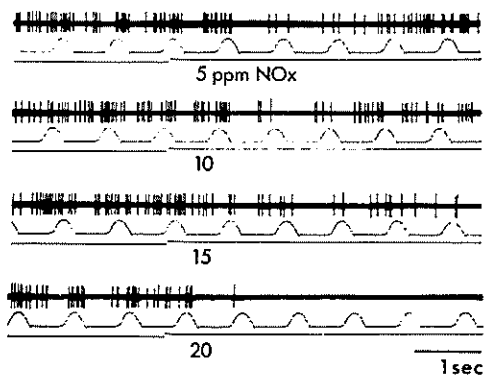


図8. NO_xに対する嗅球単一神経活動. 上から神経発射, 圧モニター, NO_x投与のマークと三つの掃引が一组になっている. 投与したNO_xは上から5, 10, 15, 20 ppmである.

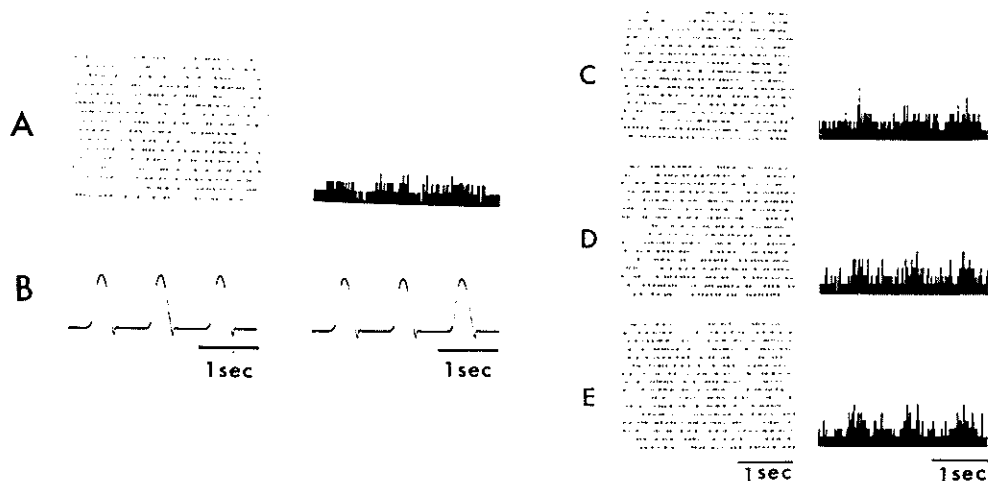


図 9. 持続的に嗅球の神経細胞発射頻度が増加する例. A: 脱臭空気を吸引の場合. B: 圧モニターの曲線, 上向きが陰圧. C: 5 ppm の NO_x . D: 10 ppm の NO_x . E: 15 ppm の NO_x をそれぞれ吸引させた場合. 結果を点ラスタ表示 (左側) と PST (post-stimulus time) ヒストグラムの表示 (右側) で示す. それぞれ 16 回掃引の結果である.

NO_x が与えられた結果を示している。

NO_x 投与前 (図の左方 1/3 ぐらい) では, 神経発射は人工かぎ込みの相にあまり関係なく出現しているが, NO_x 投与により, 人工かぎ込みの相に一致した群落的な神経発射の増加が見られる。5, 10 ppm では投与後 3 番目の相から群落的増加が見られ, 15, 20 ppm では, 2 番目から増加が見られる。即ち, 神経発射の頻度は, NO_x の濃度が高くなるに従い, 大きくなり, さらに群落の始まりは早く出現してくるのが, はっきりと分かる。

神経発射頻度が増加するものには, いろいろのタイプがあり, 図 8 では NO_x 投与後の増加がいくらか持続しているが, NO_x 投与後一過性に発射頻度の増加を示し, すぐに投与前の頻度にもどる例も多い。

次に図 9 に示す例では, 脱臭空気を流している時にすでに人工かぎ込みの相に一致して, 神経活動にわずかな群落的な周期性が見られている。この図は単一神経の活動を 16 回の平均的処理で描いたものである。左側の列には点ラスタを表示し, 右側には PST ヒストグラムを示している。

A (コントロール) では明らかに, 圧モニターと一致した三つの山が見える。5, 10 ppm (C, D)

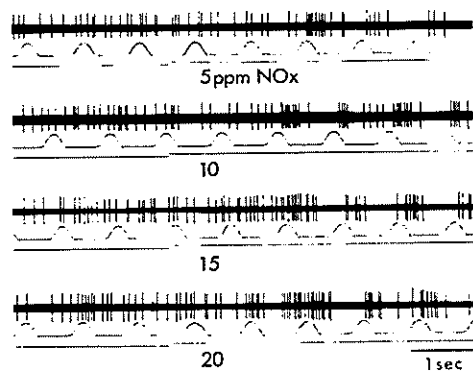


図 10. NO_x による嗅球細胞発射の減少効果. 上より 5, 10, 15, 20 ppm の NO_x の投与例を示す. 図 8 と同様に三つの掃引が一组である.

で, 群落の密度が増し山の高さも増している。15 ppm (E) になると, 山の高さ, 密度はさらに増している。この図は神経発射頻度が持続的に増加している例である。

ii) 嗅球の神経細胞の発射頻度が NO_x によって減少する例

まず, 図 10 の最上段では, NO_x 投与前 (5 ppm NO_x の字の左側で横線の下っている部分) より, 人工かぎ込みの相に一致した神経発射の群落を観察される。そして NO_x を投与すると, 人

工かぎ込みの2番目の相から発射頻度の減少が見られる。5 ppm の NO_x の投与に対して3, 4番目のかぎ込み相まで発射が抑制されており、次の10 ppm では5番目の相まで抑制がはっきりしている。さらに15 ppm では、6番目の相より以降も発射が抑制されている。そして、最下段の20 ppm では非常に強い抑制で、3番目のかぎ込みよりあとはまったく神経発射が見られない。この例では NO_x 投与により、一過性に強く、抑制が見られ、その後、徐々に発射頻度が回復して行くことが示された。しかし、 NO_x の投与を止めないと投与前の状態にもどらない例であった。

図11の処理方式は図9と全く同様である。B(5 ppm)をコントロール(A)と比較してみると分かるように、発射は約60秒間強く抑えられており、60秒後にわずかに発射頻度が投与直後と比べて増えているが、コントロールにまでは回復していない。Bの右側のグラフをAの右側のグラフと比べると、発射頻度の減少が著明であることに気づく。20 ppm(C)では一層はっきりと抑制効果が認められる。増加する例と同様に、減少す

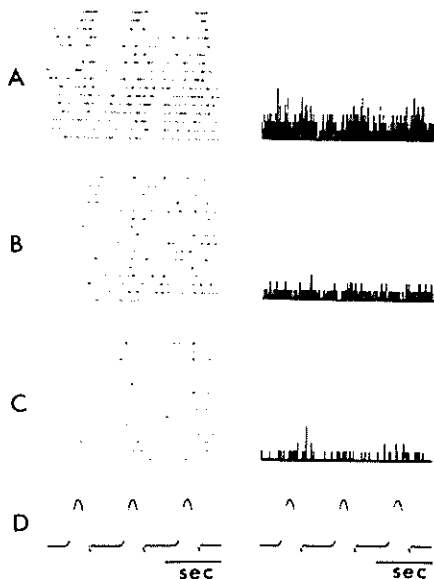


図11. 発射頻度が持続的に減少する例. A: 脱臭空気. B: 10 ppm の NO_x . C: 15 ppm の NO_x をそれぞれ吸引させた場合. D: 圧モニターの曲線. 左側は点ラスタ、右側は PST ヒストグラム. それぞれ16回掃引の結果を示す.

る例にも種々のタイプがある。

以上のことから、 NO_x に対する嗅球神経細胞応答にはいろいろのパターンがあるが、その神経発射頻度が増加するものと、減少するものとに二大別できる。時間経過からみると、一過性に変化するものと、持続的に変化するものがある。濃度の効果については、発射頻度が濃度の変化に相関を持つものと、持たないものとがみられる。その他に、我々が用いた濃度の NO_x に対して全く応じないものも多くあることも分かった。

b. 次に第二次嗅覚領である梨状皮質において

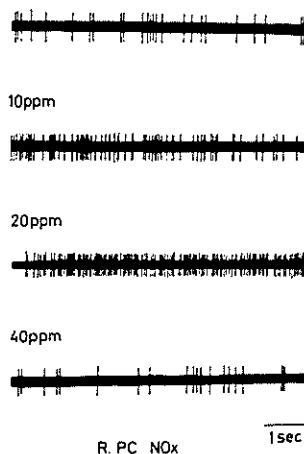


図12. ウサギ梨状皮質の単一細胞発射に対する NO_x の作用. 10, 20 ppm の NO_x によっては発射は増加するが、40 ppm の NO_x では逆に減少している.

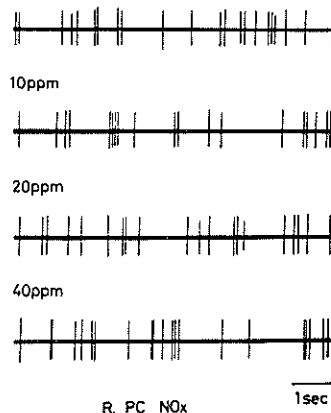


図13. ウサギ梨状皮質の単一細胞発射に対する NO_x の作用. 影響の全く認められなかった例.

同じ研究を行なった。10, 20 ppm の NO_x を投与するとインパルス数が増大し、中には吸気に一致した群発発射を示すものが見られた。しかし、40 ppm では逆にインパルス数は減少した (図 12)。これらの結果は嗅球脳波の変化から予想できるものであった。中には、10~40 ppm の NO_x に対して、なんら特別な反応を示さない細胞もあった (図 13)。

5 ppm の NO_x を 5 分間投与した後で酢酸アミル (AA) を与えた実験では、インパルス発射の抑制されるもの (図 14 の大きいインパルス) と、逆に増加するもの (図 14 の小さいインパルス) とが認められ、脳活動の複雑さと、 NO_x 効果の判定の困難さが明らかとなった。

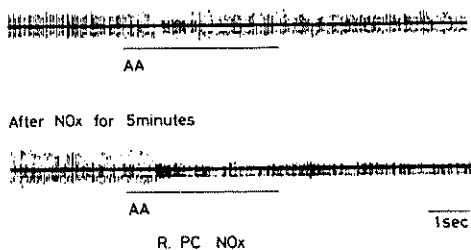


図 14. ウサギ梨状皮質の単一細胞発射に対する NO_x の作用。上は対照。下は NO_x を 5 分間投与したあとの反応。(本文参照のこと)

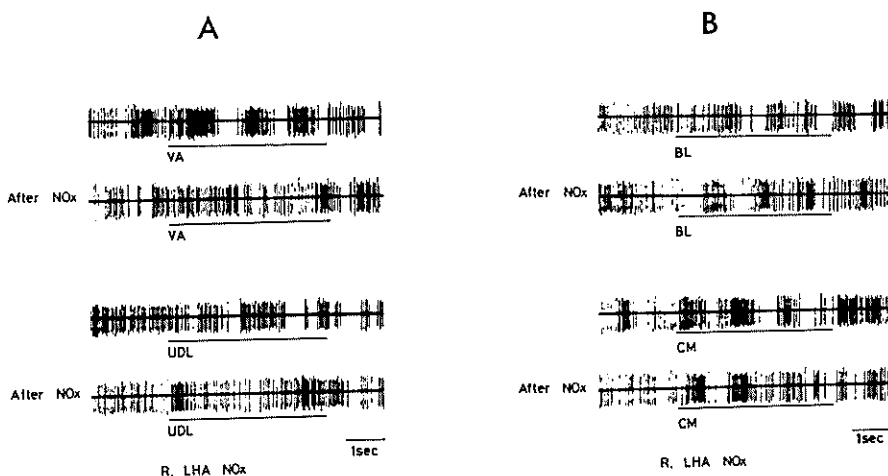


図 16. ウサギ視床下部外側野の細胞発射に対する NO_x の作用。A はニオイの投与によりインパルス発射のパターンが変化し、減少の傾向を示す。B はインパルス発射の増加と群化の傾向を示す。VA, UDL, BL, CM については本文参照のこと。

c. 第三次嗅中枢としての視床下部でニオイの情報を受け取るのは外側野である。図 15 は外側野の単一神経発射をレートメーターを通して描記したものである。上向き矢印をつけたところで NO_x を与えたが、そのとき、明らかに神経発射の頻度の増加が認められた。図 15 の下向き矢印のところでは NO_x の投与を止めると、発射頻度は徐々に投与前の状態に戻る事が分かる。この神経細胞は嗅球の電気刺激に応じたから、嗅覚系に属するものである。

第三次嗅中枢として視床下部外側野は、また、摂食中枢としての働きも持つことが知られ、空腹時には細胞のインパルス発射数が増加し、満腹時には

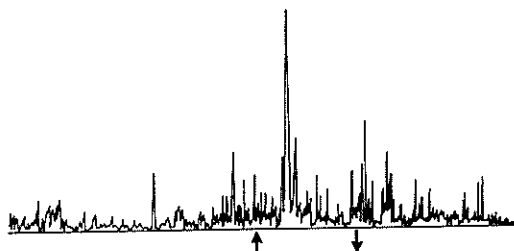


図 15. レートメーターを通して描記した視床下部外側野の単一神経発射の変化。上向き矢印は NO_x 投与開始。下向き矢印は投与停止を示す。

には逆に減少する。したがって摂食活動に重要な働きをもっている。

そこで、5 ppm の NO_x を 5 分間投与した後で、ニオイに対する反応を調べた。ニオイとしてはイソ酪酸 (VA) やウンデカラクトン (UDL), ボルネオール (BL), カンフェー (CM) などを与えた。この実験においても、インパルス発射のパターンが変化し、抑制される傾向を示す細胞 (図 16A) と、逆に増加する傾向を示す細胞 (図 16B) とが認められた。増加する場合は、吸気に一致した群化現象が認められた例と、そうでない例があった。

考察と結論

本研究は、 NO_x が嗅覚系の嗅球、梨状皮質、視床下部外側野の活動に及ぼす反応を定性的に電気的に捉えようとして行なわれた。脳細胞活動の集合である脳波の変化と、1 個の細胞の活動の変化との両面から研究を行なった結果から判定すると、短時間の投与であれば、ウサギでは、 NO_x は 30 ppm 以上という高濃度にならない限り、結果は可逆性で特に著明な反応を残さないことが示さ

れた。

神経生理学の本実験は、 NO_x の投与時間が長くても 30 分以内であり、他方、効果の判定も投与直後から数時間以内に限られて、まず、その状態での結果を明らかにすることに終始した。したがって、長期的に NO_x の反応を追跡することを行っていない。個々の動物の状態とその反応の多様性、そして脳細胞数の極めて多いことを考えると、 NO_x の脳に対する反応の全般を云々するには、我々のデータは、なお、あまりにも不十分である。

他方、脳細胞の生理学は日進月歩の勢いで解明されているが、未知の問題は無限とってよく、 NO_x の効果の判定には脳生理学の進歩と発展に待たなければならないことは明白である。その意味で、 NO_x の脳に対する影響の研究は、今後も時間をおいて時々行なうことが必要である。

同じ実験を、 SO_x について行なう計画であったが、嗅覚系の正常状態の研究と、それに対する NO_x の研究に予想以上の時間がかかり、 SO_x の実験まで手をのばすことができなかった。