

- 2 生活環境中の汚染物質の暴露量の把握に関する研究

代表者：内山 巖雄

- 2 - (1) 粒子状物質の健康影響評価モデルの作成に関する研究

1 研究従事者

○ 小林隆弘（国立環境研究所 環境健康部），平野 靖史郎（国立環境研究所 地域環境研究グループ），樺島 麻里子（筑波大学 バイオシステム科）

2 平成 11 年度の研究目的

大気中には窒素酸化物，粒子状物質，有害大気汚染物質，生物由来の物質など多数の物質が含まれている．特定地域の大気環境全体が気管支喘息，花粉症などのアレルギー疾患や気管支炎等の発症・増悪にどのような影響を及ぼすかを総合的に評価することが求められている．このため，一定の精度を持ち，簡便かつ迅速な影響評価手法とそれを用いたモニタリングシステムの開発と包括的な影響指標の開発が必要とされる．本研究は粒子状物質を中心にこれらの発症および症状への影響を予測，評価するためのモデルをどのように作成し，健康影響モニタリングシステムに導入するかについて検討する．

気道の炎症は気道過敏性，抗体産生の亢進，アレルギー反応の増悪など，気道の疾患の重要な要因である．本研究はこの気道の炎症に焦点を当て，粒子状物質が気道の炎症を起こすかいないかをどのような手法を用いると簡便あるいは包括的に評価できるか検討することを目的とする．

主に東京の中心部で捕集された都市大気粒子の影響について以下の 2 項目について，平成 11 年度は（ 2 ）に重点をおいた研究を行った．

（ 1 ）簡便な影響評価方法としては東京の中心部で捕集された都市大気粒子の皮内および気道における血管透過性の亢進について検討しこれまで行ってきた粒子状物質の皮内および気道における血管透過性の亢進と関係について検討した．

（ 2 ）前年度、繊維状粒子状物質に暴露した肺胞マクロファージにおいて特異的に krox-20/egr-2 の遺伝子発現量が増加することを、デファレンシャル-ディスプレイ法を用いて見いだしているが、今年度は東京の中心部で捕集された都市大気粒子やアスベストに暴露した肺胞マクロファージにおける krox-20/egr-2 の遺伝子の発現について検討した．

3 平成 11 年度の研究の対象及び方法

動物

6 週から 8 週令の雄性 SD ラット(日本クレア)を血管透過性および炎症細胞の浸潤と肺胞マクロファージの遺伝子発現の検討に用いた．

細胞

8 週令の雄性 SD ラットから得た肺胞マクロファージを、遺伝子発現の実験に用いた．ネンブタール麻酔下にラットを脱血死せしめ，気管支肺胞洗滌を行うことにより肺胞マクロファージを取り出した． 10 % の非働化牛胎児血清を添加した RPMI1640 培地でマクロファージを洗浄した後，同じ組成の培地に 1×10^6 cells/ml となるように懸濁し、実験に用いた．

試薬および粒子状物質

皮内および気管内投与の血管透過性の検討に用いた硫酸銅は和光純薬製を使用した。また粒子状物質は東京目黒区にある国立公衆衛生院の屋上において電気集塵器で捕集したもの（後藤純雄先生より供与）を使用した。肺胞マクロファージを用いた遺伝子発現レベルの検討は陰性対照用としてチタン工業社から頂いた微小酸化チタン粒子（STT-65C, 平均粒径 0.059 μm , S-TiO₂）, ならびに繊維状物質研究会（JFM）から提供された繊維状酸化チタン粒子（T01, 平均繊維長 2.1 μm , 平均幅 0.14 μm , F-TiO₂）を摂氏 250 度で 2 時間加熱し、エンドトキシンを除去した後用いた。都市大気粒子は、前述の国立公衆衛生院屋上において電気集塵器で捕集したものをオートクレーブで滅菌した後用いた。また、陽性対照用として UICC のアスベスト標品であるクロシドライトを同様に乾熱処理した後用いた。これらの粒子状物質は、培地に懸濁し、使用前には超音波により良く分散させた後、細胞に添加した。

実験 - 1. 血管透過性

皮内反応

ラットをネンブータル麻酔下背部の毛を刈り、10, 3, 1, 0.3 mg/ml になるよう 0.9%NaCl 水溶液に懸濁させた都市大気粒子を皮内に 100 μl 投与した。投与後大腿静脈より、3%エバンズブルー-生理食塩水溶液を投与し、30 分後腹部大動静脈より放血致死後、皮を採取し、各スポットに分割後ホルムアミド 5ml に皮膚片を浸し、60 °C にて 48 時間放置し、色素を抽出した。620 nm における吸光度を測定し血管透過性の指標とした。

気管内投与

ラットをネンブータル麻酔下、気管に挿管し、10mg/ml になるよう生理食塩水に懸濁させた都市大気粒子を気管内に 200 μl /250g 体重となるように投与した。投与後、人工呼吸器に接続し 1.5ml / 回、70 回 / 分となるように換気を行った。人工呼吸器に接続後ただちに 2%エバンズ-ブルーを大腿静脈より投与し、投与 1 時間後に腹部大動静脈よりラットを放血致死させた。肺は還流後採取した。肺をホルムアミド 5ml に浸し、60 °C にて 48 時間放置し、色素を抽出した。620 nm における吸光度を測定し気管の血管透過性の指標とした。

実験 - 2. 粒子状物質に暴露した肺胞マクロファージの krox-20/egr-2 遺伝子発現

無処理ラットから得た肺胞マクロファージを RPMI1640 培地で 20 時間培養し、100 mg/ml の濃度の S-TiO₂, 都市大気粒子、F-TiO₂、あるいはクロシドライト存在下、あるいは非存在下でさらに 3 時間培養した後、RNA を抽出した。抽出した RNA を、ホルマリン変性アガロースゲル電気泳動で RNA を分離した後ナイロンメンブレンに転写し、[³²P] dCTP を用いて放射化ラベルした遺伝子（krox 20/egr-2）をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。cDNA プローブは krox 20/egr-2 をクローニングした pBluescript ベクターを、XhoI 制限酵素で限定分解し、得られたフラグメントをアガロースゲルから精製して用いた。ナイロンメンブレンを洗浄し、ラジオアイソトープの非特異的吸着を除去した後、バイオイメージアナライザー BAS2000 でマクロファージにおける krox-20/egr-2 の遺伝子発現を解析した。ナイロンメンブレンよりストリッピングバッファーを用いて放射ラベルされたプローブを除去した後、同様に放射化したラットの

アクチン cDNA をプローブとしてリハイブリダイゼーションを行い、アクチンの遺伝子発現量をイメージアナライザーで解析した。krox-20/egr-2 の遺伝子発現量をアクチンの遺伝子発現量で除することにより、krox-20/egr-2 の発現量を規格化した。また、200、500、1000、2000 µg/ml の濃度の都市大気粒子に暴露した肺胞マクロファージから、RNA を抽出して同様の実験を行った。

統計処理

S-TiO₂、都市大気粒子、F-TiO₂、あるいはクロシドライトに暴露した群、あるいは対照群との krox-20/egr-2 発現量の変化については一元分散分析を行い、各群間における統計的有意差は Bonferroni のポストホック処理を行い求めた。

4 平成 11 年度の研究成果

実験-1.血管透過性

皮内反応

ラットの皮内への都市大気粒子の投与(100ml)による血管透過性(色素の漏出)は投与濃度との間により直線関係が見られた(図1)。

皮内反応と気管内投与による血管透過性誘起の相関

皮内反応と気管内投与による血管透過性誘起の相関をこれまでに行われたの結果も併せて検討した。皮内反応と気管内投与による血管透過性誘起の間に高い正の相関が見い出された(図2)。

実験-2.肺胞マクロファージにおける krox-20/egr-2 の遺伝子発現

図3に、100 mg/ml の濃度の S-TiO₂、都市大気粒子、F-TiO₂、あるいはクロシドライトに3時間暴露した肺胞マクロファージにおける krox-20/egr-2 の発現量(アクチンの遺伝子発現量で規格化)を示した。都市大気粒子を暴露した群では、対照群や S-TiO₂ 暴露群に比べやや上昇していたものの有意な変化は見られなかった。これに対し、繊維状の酸化チタン粒子である F-TiO₂ を暴露した肺胞マクロファージにおいては、他のすべての群に対し有意に krox-20/egr-2 の発現量が上昇していた。クロシドライトを暴露した肺胞マクロファージにおける krox-20/egr-2 の発現量も対照群や S-TiO₂ 暴露群に比べ有意に上昇していたが、クロシドライトより細胞毒性が低い F-TiO₂ に比べると krox-20/egr-2 の発現量は有意に低下していた。図4に、200、500、1000、2000 µg/ml の濃度の都市大気粒子に暴露した肺胞マクロファージにおける krox-20/egr-2 の発現量を示した。高濃度粒子の暴露ではあるが、都市大気粒子の用量依存的に krox-20/egr-2 の発現量が上昇していた。

5 考察

東京で集められた粒子状物質の皮内反応における血管透過性を検討し、濃度に依存し直線的に血管透過性を上げることが見いだされた。同じ都市大気粒子を気管内に投与した場合も血管透過性をあげることが見いだされた。皮内反応と気管内投与による反応の相関は高い濃度においては非常に良い相関が観察された。このことは、皮内反応で気管内投与における血管透過性を予測しうる可能性が示唆される。また、都市大気粒子の血管透過性惹起はディーゼル粒子よりも低いことが観察された。

今回の実験で、繊維状の酸化チタンである F-TiO₂ を暴露した肺胞マクロファージでは、他の粒子を貪食した肺胞マクロファージ比べ、krox-20/egr-2 の発現量が有意に高いことが分かった。これらの粒子の中でも細胞毒性が最も高いクロシドライトを暴露した肺胞マクロファージにおいては、やはり他の微小粒子に比べ krox-20/egr-2 の発現量が高いものの、F-TiO₂ に比べると krox-20/egr-2 の発現量は低下していた。これらのことは、肺胞マクロファージにおける krox-20/egr-2 は細胞毒性よりも、むしろ粒子状物質の形状に依存して発現していると推定され、繊維状粒子状物質の暴露指標として有用であるものと考えられる。東京の都心部で採取された粒子状物質を暴露した肺胞マクロファージと、他の粒子状物質を暴露した肺胞マクロファージとにおいて krox-20/egr-2 の発現の比較したところ、陰性対照として用いた S-TiO₂ より高い発現が見られ、また陽性対照として行ったクロシドライトや F-TiO₂ より低いという、予想通りの結果が得られた。また、都市大気粒子を暴露した肺胞マクロファージでは、用量依存的に krox-20/egr-2 の発現量の上昇が観察され、粒子状物質の暴露指標として用いることが可能であると考えられる。

6 今後の課題

簡便な影響評価方法としての皮内反応における血管透過性が気管内投与の指標になりうることを示唆された。さらに鋭敏な指標や機構の検討をする必要がある。また、今回、実際の都市大気中で捕集した粒子状物質を用いた検討を行ったが、粒子状物質の粒径による成分の違いと影響の関係などについても検討をしていくことが必要。

粒子状物質に暴露した肺胞マクロファージにおいて、krox-20/egr-2 の遺伝子発現が粒子の形状を反映した毒性指標として用いることが可能であることを示した。近年、炎症等に関する cDNA アレーが開発され、遺伝子の発現パターンを一度に解析することが可能となった。この方法では新しい遺伝子の発現を調べることはできないものの、ゲノムが次々と明らかにされてゆく過程で、ほとんどの遺伝子について発現量を調べるのが可能になるものと期待される。今後は、cDNA アレーを用いて、粒子状物質に暴露した肺胞マクロファージや肺の上皮細胞における、他の遺伝子の発現パターンも合わせて明らかにしてゆく必要がある。

7 社会的貢献

都市の微小粒子の健康影響について、粒子の性状の違いにより分類することは毒性評価の観点から重要な課題である。簡便かつ迅速な影響評価手法の可能性を追求することにより、大気環境の汚染の危険性をいち早く知ることが可能になることは予防的観点からも重要と考えられる。さらに簡便かつ鋭敏な手法の開発が求められていると考えられる。米国が微小粒子 (PM_{2.5}) に関す

る環境基準を定めたことから、これまで浮遊粒子状物質の環境基準しか定めていなかったわが国においても、微小粒子状物質の生体影響に関する研究の必要性が強調されている。しかし、アスベストやアスベストの代替品として用いられているチタンウィスカーなど粒子の形状に関する研究報告に関しては希薄であるといえる。本研究課題においては、前年度までに、微小酸化チタンと繊維状酸化チタンに暴露した肺胞マクロファージにおいて、発現量の差の大きい遺伝子をスクリーニングして krox-20/egr-2 が粒子の形状、特に繊維状粒子を認識して強く発現することを見いだしている。本年度は、この krox-20/egr-2 の遺伝子発現量を指標として、実際都市大気中に存在する粒子状物質の評価を行った。本遺伝子の発現が生理学的、あるいは病理学的にどのような意味があるか今のところ定かではないが、この遺伝子産物が転写因子として働くことから、krox-20/egr-2 の遺伝子発現量の増大は、その後の細胞の機能に影響してくるものと考えられる。ここで示したように、krox-20/egr-2 の遺伝子発現量は、都市大気粒子に対し用量依存的に上昇することから、粒子状物質の影響指標として用いることが可能である。

8 3年間のまとめ

簡便な影響評価手法では、各種の粒子状物質（ディーゼル粒子、酸化チタン、硫酸アンモニウム等）および刺激性物質（ホルムアルデヒド）による皮内、および気道における血管透過性の亢進とそれらの相関の検討を行い、投与濃度と血管透過性の間により直線関係が見られた。また、皮内反応と気管内投与による血管透過性誘起の相関を検討した。皮内反応と気管内投与による血管透過性の反応は高い濃度においては良い相関が観察された。このことは、多くの試料を一度に試験することが可能な皮内反応で気管内投与における血管透過性を予測しうる可能性が示唆された。このような簡便な影響評価手法の開発や限界を明らかにすることにより迅速な影響の一次スクリーニングが可能になるものと考えられる。

包括的な影響指標の開発では、ラット肺胞マクロファージにおいて粒子状物質を作用させたときの反応に関わる遺伝子のメッセージ全体の解析を例に検討した。繊維状 TiO₂ を暴露した際に特異的に強く発現する mRNA があることを見いだした。また、強く発現する mRNA をクローニングし、これが krox-20/egr-2 であることを明らかにした。また、ノーザンハイブリダイゼーション法を用いて本遺伝子発現の経時変化を調べたところ、肺胞マクロファージにおける krox-20/egr-2 の発現量は、繊維状 TiO₂ 暴露開始8時間後まで増加していることが観察された。また、krox-20/egr-2 の発現は都市大気粒子を暴露した群では繊維状 TiO₂ ほどの上昇が見られなかったが、用量依存的に発現上昇が見られることを明らかにした。このように遺伝子のメッセージ全体を解析することによりどのような反応がどのような時点で発現するかなどが明らかになるものと思われる。

- 2 - (2) 汚染物質の肺内沈着・吸収量と曝露量との関連に関する研究

1. 研究従事者

- 嵐谷 奎一、保利 一、二渡 了、吉川 正博、石松 維世、石田尾 徹
(産業医科大学産業保健学部)
- 加藤 貴彦(宮崎医科大学公衆衛生学)
- 西村 正治、辻野 一三(北海道大学医学部第一内科)

2. 目的

近年、先進諸国において、呼吸器系疾患の発症の増加は社会的にも強い関心が示されて来ている。呼吸器系疾患発病は、浮遊粒子状物質・揮発性有機化合物・NO_x・SO_xなどの物質が複雑に係り、また呼吸器系へのこれらの物質の侵入、蓄積に深く関係すると考えられる。そこで、本研究は ヒト肺内の元素含量とその他の沈着成分量との関係、 ヒト肺内の沈着成分量と生活習慣、疾患との関係、 NO₂・揮発性有機化合物の個人曝露濃度の把握、 大気中の浮遊粒状物質の粒径特性と濃度、種々のガス状大気汚染物質の気道・肺内動態を確立した数学的シミュレーション法を用いて解析を行うことを目的とする。

3. 対象および方法

3-1 ヒト肺内の元素測定

ホルマリン液に固定された右肺上葉の非病変部を出来るだけ細く刻み乾燥後、約 1g を用い、硫酸・硝酸溶液を用い、湿式分解後、誘導結合プラズマ原子吸光度法(ICP-AES)にて各元素の測定を行った。

3-2 個人曝露濃度測定

1999 年 2 月、北九州市在住の 13 人と札幌市在住の 20 人のボランティアによる NO₂ と揮発性有機化合物(VOCs)の個人曝露濃度を測定した。NO₂ はパッシブガスサンプラー(東洋濾紙社製)で捕集後、吸光度法にて定量した。VOCs はパッシブガスチューブ(柴田科学社製)で捕集し、GC/MS 法にし定量した。

3-3 浮遊粒子状物質の測定

浮遊粒子状物質の粒子特性を調べるため、8 段に分級できるアンダーセンサンプラ、粒径 2.5 μm 以下、粒径 2.5-10 μm に分級捕集できるサンプラー(PM10/2.5 DICHOTOMOUS)、また、粒径 2.5 μm を分級させるサンプラー(PM2.5)を用いて浮遊粒子状物質を捕集した。これらの装置はすべて柴田科学社製である。分級した粒子に吸着している多環芳香族炭化水素は超音波抽出-高速液体クロマトグラフィーを用いて分離・定量した。

3-4

質量保存の法則に基づくシミュレーションの基本式とヒト及び動物の解剖学的・生理学的データとを用い吸入されたガス状大気汚染物質(O₃、NO₂、He)の気動内濃度を解析する。

4. 結果

4-1 ヒト肺内元素成分

ヒト剖検肺 24 例(男 16 例、女 8 例)の肺内元素成分を測定した。その結果、肺内より 18 種の

元素を検出し、17 元素を定量した。乾燥肺 1 g 中の元素の算術平均値は $\text{Ca} > \text{Fe} > \text{Mg} > \text{Al} > \text{Zn} > \text{Sn} > \text{Si} > \text{Ti} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ni} > \text{Cr} > \text{Mn} > \text{Pb} > \text{V} > \text{Mo} > \text{Co}$ であり、元素により測定値の範囲（最高/最低）は異なり、Si が最も大きく、約 900 倍、Mn が約 80 倍、Cd が約 40 倍、Ca が約 30 倍、それ以外は 15 倍以下であることが認められた。鉄鋼関連職場従事者と主婦について肺内元素成分の算術平均濃度を比較した（図 1）。その結果、Cr、Ni、は鉄鋼関連職場従事者が主婦に比べ高い傾向が示された。タバコ喫煙量と元素間には、関連が認められなかった（図 2）。また、鉄とスズの間では、有意の相関（ $p < 0.01$ ）が認められたが、それ以外の多くの元素間、他の汚染物質間との間には、関連が認められなかった。

4 - 2 個人曝露濃度

1999 年冬期に北九州市、札幌市での NO_2 の個人曝露濃度、室内及び屋外の気中濃度を測定した（図 3）。北九州市の冬期の NO_2 個人曝露濃度は 34.8ppb で、室内濃度と同レベルであり、屋外より 2 倍高く、北九州市の夏期に比べ 3.4 倍、札幌市の冬期に比べ 1.3 倍それぞれ高値を示した。札幌市の冬期の NO_2 個人曝露濃度は 25.5ppb で、室内、屋外の濃度レベルと同じであり、北九州市冬期の傾向とは違っていた。なお、北九州市冬期の個人曝露濃度及び室内濃度の約 1/4 が大気環境基準の上限値（60ppb）を上廻った。北九州市では、札幌市に比べ、冬期石油系暖房器具使用時間と NO_2 個人曝露濃度で高い相関を示した。北九州市では室内排気であるが、札幌市では室外排気であり、この排気の方法の違いが大きく個人曝露濃度に影響していると考えられる。VOCs の測定では室内空気環境中より 20 種以上を検出し、ベンゼン、トルエン、p-キシレン、エチルベンゼン、デカン、ドデカン、メチルイソブチルケト（MIBK）の 7 種類を定量した。冬期の両市ではベンゼン、MIBK、エチルベンゼン、トルエンが比較的高い濃度であった（図 4、図 5）。北九州市の夏期のベンゼンは、検出限界以下であったが、両市とも冬期のベンゼン濃度は大気環境基準（ $3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 1ppb）を上廻っていた。北九州市冬期の TVOCs 濃度は、85.1ppb で、これも室内・屋外濃度と同レベルと同じであり、夏期に比べると若干高いレベルであった。札幌市冬期の TVOCs 濃度は、96.4ppb で、屋外の濃度レベルと同じで、室内濃度の 1.5 倍の高値を示した。

4 - 3 浮遊粒子状物質濃度と特性

アンダーセンサンプラーを用いて粒径分布を測定し、 $1 \mu\text{m}$ 以下の濃度が最も高く、 $2 \mu\text{m}$ 程度を境にして二峰性分布傾向を示した（図 6）。また、分級捕集された粒子に含有されている多環芳香族炭水素含量は $0.43 \sim 0.65 \mu\text{m}$ 粒子に最も多く含まれ、粒径 $2.1 \mu\text{m}$ 以下に約 90% 以上が含有している。1998 年 9 月～1999 年 9 月までの $\text{PM}_{2.5}$ μm 以下（ $\text{PM}_{2.5}$ ）と PM_{10} μm 以下（ PM_{10} ）の濃度推移を測定した結果、 $\text{PM}_{2.5}$ の濃度範囲は $6.0 \sim 54.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 PM_{10} のそれは $8.4 \sim 117.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ で、 PM_{10} の濃度に占める $\text{PM}_{2.5}$ 濃度の割合は 41.0%～97.8% で、道路近傍での含有率が若干高い傾向を示した（図 7）。捕集した浮遊粉じんの $\text{PM}_{2.5}$ 及び PM_{10} 中の BaP の濃度範囲は、 $\text{PM}_{2.5}$ では、 $0.04 \sim 0.68 \text{ng}/\text{m}^3$ 、 PM_{10} では $0.05 \sim 0.75 \text{ng}/\text{m}^3$ であり、ほとんど $\text{PM}_{2.5}$ 中に含有されていることが認められた。

4 - 4 ガス状大気汚染物質の生体内動態

$\delta M / \delta t = u \cdot s \cdot C' - u \cdot s \cdot C - \gamma \left(\gamma = \text{Ab} \left(\alpha \cdot D \cdot Q \cdot A \cdot \text{SP} / \{ (X \cdot Q + D \cdot A) \cdot 760 \} \right) \right)$ の基本シュミレーション式を用いて、 O_3 、 NO_2 、He、 SO_2 （初期濃度 10、100、1000ppm）の生体内濃度を求めた。3

種のガス (O₃、NO₂、He) の生体内濃度は呼吸周期に一致し (図 7)、末梢ほど低いことが認められた。動物間の比較では種が異なると気道内濃度が異なり、平均濃度では上・下気道では逆にヒトの方がラット、イヌより高い傾向があり、肺胞では逆にヒトが低かった。一方、SO₂ は大部分が上気道で吸収され、上記道内濃度は 3 種ガス (O₃、NO₂、He) と同様。ヒトで高く、肺胞領域ではいずれの動物とも濃度はゼロになった。初期濃度を 100ppm、1000ppm に設定すると、得られた値は 10ppm の結果のそれぞれ 10 倍、1000 倍となり気道内濃度分布のパターンには変化がなかった。

5. 考察

呼吸器系癌発症には、空気環境中の発癌関連物質の生体内侵入量に関係し、また慢性閉塞性肺疾患には、揮発性有機性物質、微量元素などが、複雑に係りあっている。従って、予防対策上、ヒト生涯での有害成分の生体内侵入量、有害化学物質の個人曝露濃度、発生機序、発生源を明らかにする必要がある。また、最近米国での疫学調査の結果から、微粒子 (PM_{2.5}) が健康障害に大きく係っていることが明らかにされた。我が国においても微粒子による健康障害の実態、粒子の特性・濃度、発生源などを明らかにする必要がある。また、ヒト曝露濃度と環境因子との係りの他、ガス状大気汚染物質、粒子状物質の生体影響を評価する上には、どうしても実験動物によらなければならない。そのためには、適正な吸入濃度により正しい結果の評価を行う必要がある。本研究では、ヒト肺内の元素分析、NO₂・VOCs 個人曝露濃度、浮遊粒子状物質の特性・濃度及びコンピュータシミュレーションの手法を用いて、吸入されたガス状大気汚染物質の気道内濃度が解剖学的・呼吸生理学的種差による違いについて検討した。

その結果、ヒト生体内侵入量として 17 元素の測定を実施し、これまでに測定した総粉じん、炭素成分、灰成分、多環芳香族炭化水素とあわせて、ヒト生体内侵入成分濃度、生活習慣との関係などについての知見が得られつつある。

NO₂・VOCs の個人曝露濃度の程度、環境影響因子についての多くの知見が得られた。北九州市での浮遊粒子状物質の粒径特性、濃度分布を 1 年間に渡って計測し、多くの知見が得られつつある。

一方、吸入されたガス状大気汚染物質の気道・肺内動態の数学的なシミュレーション法を確立し、これを、複数の吸入物質と動物において適用することを目的として、呼吸器のモデル作成・基本的解析方法の確立と、対象動物の解剖学的・呼吸生理学的データの収集を行い、SO₂・NO₂・O₃・He が人の動物の生体内濃度分布を算出し、多くの有益な知見を得た。

6. 今後の課題

本研究は 有害成分の個人曝露濃度、生体内侵入量の評価、 数学的シミュレーションによるガス状物質の生体内挙動の基本式の確立と生体内濃度を目的として行った。前者の研究についてはヒト剖検肺の例数をより多くし、また、元素、多環芳香族炭化水素以外の化学物質の分析も加え、電子顕微鏡による形態学な研究を新しく取り入れるなどして、より詳細な研究が行われることが望まれる。

NO₂、VOCs の個人曝露濃度に関しては、今後も継続した測定を実施すると共に呼吸器系疾患及び化学物質過敏症の発生との関連について、より詳細な調査、研究がなされ、呼吸器系疾患の発症への外因性と内因性の原因の解明がなされることが望まれる。

粒子状物質の個人曝露濃度測定ではガス状物質の測定に用いられるような超軽量で小型のサンプラーの開発と生体内変化を用いるモニタリングの手法の開発、粒子状物質の個人曝露濃度の長

期的な計測と影響因子との関連の調査がなされることが必要である。数学的シミュレーション法によるガス状大気汚染物質の生体内濃度分布の算出を行い知見を得たが、実際の実験動物での実測値、複合曝露したときの濃度分布、粒子状物質でのシミュレーションなどの研究が今後なされる必要がある。

7．社会的貢献

先進諸国で、呼吸器系疾患の発症の増加は、社会的に強い関心がなされて、我々をとりまく環境因子のヒト健康障害について注目がなされてきている。従って、有害化学物質のヒト曝露濃度、生体内侵入量の実態を把握することが強く望まれている。一方、実験動物とヒトは解剖学的・生理学的にも様々な点で異なり、実験動物でのデータをヒトに外挿するには多くの問題がある。本研究はこの様な観点から、生体内侵入量（粉じん、炭素粒子、灰成分、多環芳香族炭化水素、元素）の測定を実施し、生体内の汚染物質の種数、含量、また、相互関係や死亡原因を含む生活歴との関連について検討し、多くの知見が得られつつある。また、ベンゼンを含む VOCs の個人曝露濃度測定は、年間を通して調査し、個人曝露濃度及び環境濃度の実態を知る上で重要なデータとなっていると考えられる。粒子の粒径特性と化学物質濃度との関連、PM2.5 と PM10 の濃度推移の調査も年間を通して実施され多くの有益な情報を得た。新しく確立した数学的シミュレーションは、ヒトを含めて若干の動物でのガス状大気汚染物質の生体内濃度分布が算出され、今後の動物実験での曝露濃度の設定や、ヒトへの外挿への評価が有用になることが考えられる。

- 2 - (3) 生物学的曝露マーカーを用いた汚染物質の曝露量把握に関する研究

1 . 研究従事者

○ 内山巖雄 (国立公衆衛生院労働衛生学部) , 川本俊弘 (産業医科大学医学部) , 松野康二 (産業医科大学共同利用研究センター) , 永倉俊和 (永倉クリニック) , 小幡徹 (東京慈恵医科大学DNA医学研究所) , 荒川はつ子 , 村山留美子 (国立公衆衛生院労働衛生学部) , 後藤純雄、渡辺征夫 (国立公衆衛生院地域環境衛生学部) , 荒記俊一 , 酒井亮二 (東京大学医学部)

2 平成11年度の研究目的

本小課題では、生活環境中の有害大気汚染物質への生物学的曝露マーカーとして、尿や血液等の生体試料中におけるピレンやナフタレン等の代謝物等を測定する方法を開発し、またオキシダントストレスによりプロスタグランディンから非酵素的酸化作用により誘導されるイソプラスタンの測定法を開発し、これを用いて有害大気汚染物質の個人曝露量を把握することを目的とする。また微小粒子に付着した多環芳香族炭化水素とPM2.5の個人曝露量の把握の可能性を試みた。

とくに平成11年度は、冬季暖房器具使用時の尿中 1-pyrenol および 2-naphthol 濃度を測定し、2-naphthol の生物学的曝露マーカーとしての有用性について 1-pyrenol と比較検討した。具体的には平成10年度に引き続き、モデルルームを使った室内暖房器具の使用によるPAH曝露の実験と学生を対象とした冬季の断面調査の2つを行い、暖房器具の使用と尿中 2-naphthol 濃度との関係を調べ、尿中 1-pyrenol および 2-naphthol との関係について検討した。

浮遊粒子状物質のうち、粒径の小さい微小粒子状物質の健康影響が注目されてきているが、そのメカニズムはまだ明らかではない。最近スイスで燃焼時に発生する微小粒子に付着した多環芳香族炭化水素 (Particles-bounded Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PPAH) 濃度を測定する個人サンプラーが開発された。本年度はPPAHとPM2.5を同時に走行中自家用車、道路後背地、屋内等で測定し、

個人サンプラーとしての有用性を検討した。また個人の1日のPPAH曝露量を推計し、尿中の各種バイオマーカーと関連があるか否かを検討する予備調査を行った。

3 平成11年度の研究の対象及び方法

モデルルームにて反射式石油ストーブを8時間燃焼させ、その間ボランティアに室内でデスクワークをしてもらい、ピレンの代謝物である 1-pyrenol およびナフタレンの代謝物である 2-naphthol の尿中濃度の変化を経時的に観察した。曝露は5名のボランティア (非喫煙者) が、一人づつ3日間連続で曝露した。採尿は曝露開始前 (午前9時頃) 、曝露中 (午後12時頃) 、曝露終了時 (午後5時頃) の3回行った。また、対照は同じ部屋で、石油ストーブを使わずに同様に3日間連続で過ごした時の尿を用いた。

また、喫煙習慣のない大学生59名を対象とし、試験期間にあたる冬季暖房時期 (1月～2月) に昼食前の尿を採取した。また、同時に使用している暖房器具の種類 (クリーンヒーター、石油ファンヒーターおよび石油ストーブ) と採尿前24時間における使用時間について質問票を用いて調べた。また、クリーンヒーターを使用している喫煙習慣のある大学生 13名についても、同様に尿を採取し、暖房器具使用、喫煙の尿中 1-pyrenol および 2-naphthol 濃度に及ぼす影響について調べた。

尿中 1-pyrenol の測定は、尿 200 μ l を酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 下で、 β - グルクロニダーゼ処理したのち、アセトニトリルを加え、遠心後上清を蛍光検出器付き HPLC (カラム :

TOSOH TSKgel ODS 80Tm、移動相：60% アセトニトリル、1.0 ml/min、測定波長：Ex = 242 nm, Em = 388 nm) により行った。尿中 2-naphthol の測定は、尿 3.0 ml を酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 下で、 β -グルクロニダーゼ処理 (約 16 時間) したのち、アセトニトリルを加え、遠心後上清を蛍光検出器付き HPLC (カラム：TOSOH TSKgel ODS 80Tm、移動相：38% アセトニトリル、1.2 ml/min、測定波長：Ex = 227 nm, Em = 355 nm) により行った。なお、尿中クレアチニン濃度は Ogata and Taguchi (1986) の方法により測定し、尿の濃淡の補正に用いた。

PPAH個人モニターはPAS2000CE (EcoChem Analytics社製、米国) を購入した。測定原理は、ポンプ (1l/min) で吸引したPAHの付着した粒子に紫外線を照射すると、陰イオンが放出され粒子自体はプラスに荷電する。これらの粒子は粒径 1 μ m以下の微粒子が主であるが個数濃度はPM2.5の中に占める割合は多いので、重要と考えられている。この荷電率を計算し、モデル式からPAH濃度を推計する。このモデル式から求めたエアロゾルからの放出電子の測定値と、実際のPAHの化学分析による値は良く相関することが確かめられている。

本体は大きさ68×175×124mm、重さ1.5kgで10～120秒毎の連続測定が可能であり、記憶容量は8000データであるが、バッテリー容量が約5時間という制約があり、それ以上の測定を行う場合にはAC電源を用いなければならない欠点がある。今回は60秒毎の値を測定した。PM2.5はDust Trak Model 8520 (カノマックス社製、米国) を用いて測定した。

測定は平成11年10月4日(火)から11日(月)及び平成12年4月12日(金)から17日(月)で国立公衆衛生院の屋上(目黒通りより約100m)で行った。また個人モニターとして、国立公衆衛生院院内居室ー通勤(自家用車)ー自宅ー通勤(自家用車)ー国立公衆衛生院院内居室のPPAH濃度を測定した。また、その後PPAHモニターが雨天の測定によって水を吸い込んでしまい、故障し、修理に時間がかかってしまった結果、その後の個人暴露量が測定できず、尿中のバイオマーカーの測定は継続実施中である。

4 平成11年度の研究成果

4-1) モデルルームを使った室内暖房器具の使用によるPAH曝露の実験 石油ストーブを使わなかった場合の尿中 1-pyrenol濃度は、幾何平均で約 0.1 μ g/g creat. であった。石油ストーブ使用した場合、第一日目の12:00、17:00の尿では 1-pyrenol 濃度がやや上昇する傾向が認められたものの、石油ストーブ非使用時の濃度との間に差は認められなかった。曝露2日目、3日目のストーブ使用前にあたる9:00の尿ではとくに 1-pyrenol 濃度の上昇は認められなかったが、12:00、17:00と曝露時間が長くなるとともに尿中 1-pyrenol 濃度は上昇し、とくに2日目および3日目の17:00の尿では石油ストーブ非使用時の尿と比較し、幾何平均で約2倍となり、統計学的に有意に上昇していた。一方、尿中 2-naphthol 濃度の変化は石油ストーブを使わなかった場合は、幾何平均で約 1.3 μ g/g creat. であった。石油ストーブ使用した場合、第一日目の12:00、17:00の尿において、統計学的に有意でないものの幾何平均で2倍近くの2-naphthol 濃度上昇をみとめた。曝露2日目、3日目のストーブ使用前にあたる9:00の尿ではとくに2-naphthol 濃度の上昇は認められなかったが、12:00、17:00の尿では幾何平均で約2～3倍となり、統計学的に有意に上昇していた。

4-2) 学生を対象とした冬季の断面調査

石油ストーブ使用している学生の尿中 1-pyrenol 濃度はクリーンヒーターを使用している学生と比較し、濃度幾何平均で2倍弱と統計学的に有意に高い値を示した。石油ファンヒーターを使用している学生の尿は両者の中間的な値を示した。尿中 2-naphthol 濃度も同様に石油ストーブ使

用している学生の尿中濃度はクリーンヒーターを使用している学生と比較し、濃度幾何平均で約2倍と統計学的に有意に高い値を示し、石油ファンヒーターを使用している学生の尿は両者の中間的な値を示した。一方、喫煙者では尿中 1-pyrenol 濃度が非喫煙者でクリーンヒーターを使用している学生の尿の2倍程度の上昇したのに対して、尿中 2-naphthol 濃度は約10倍の高値を示した。

4 - 3) PPAHおよびPM2.5の測定

平日の10月6日(水)、7日(木)は朝6:30頃から10時頃までのラッシュアワーの時間帯にPPAH濃度は上昇し、最高50~100ng/m³に達したが夕方のラッシュアワーはそれほど目立った上昇はなく、20~30ng/m³であった。また、5日(火)は目立ったピークの時間帯はなく、終日ほぼ10~30ng/m³の値を示していた。一方9日の土曜日は朝のラッシュ時のピークは見られるものの、午後12時以降はほぼ10ng/m³推移し、特に夜10時以降は5ng/m³以下であった。また10日(日)は終日PPAH濃度は低く日中もほぼ15ng/m³以下であった。また11日(月)は振り替え休日であり、朝の8時頃を除いて20ng/m³以下であった。

図1は4月14日(金)の0時から正午までのPM2.5とPPAHの同時測定の結果である。PM2.5濃度は夜間の1時頃からほぼ0.13mg/m³であり、朝のラッシュに上昇し、その後減少した。一方PPAH濃度は、夜間は低値であり、ラッシュ時に上昇する平日の典型的パターンを示し、夜間はPM2.5とPPAH濃度が乖離した。

これらの結果からは道路後背地ではPPAHの暴露濃度の平均は約15ng/m³であり、呼吸量を15m³/日とするとPPAHの1日平均暴露量は225ng/と推計された。

一方、1日約1時間の自家用車通勤では、走行中の車中のPPAH濃度は朝のラッシュ時の目黒通りでは約300~400ng/m³、高速道路では500~1000ng/m³、前方をトラックやバスが走っていると急増し、1000~2000ng/m³にも達した。また夕方のラッシュを過ぎた7:30以降の一般道では200ng/m³前後。高速道路では400ng/m³であったが、やはりバス、トラックの工法では、1000~1300ng/m³にまで上昇した。

図2は夜間の帰宅時、図3は朝のラッシュ時の車内のPM2.5とPPAH濃度のトレンドである。屋内のPM2.5濃度はほぼ0.05mg/m³であったが、夜間の路上では0.75mg/m³であった。19時30頃高速道路工事渋滞中は0.3mg/m³に上昇した。一方PPAH濃度は良くPM2.5濃度のパターンに一致して上下し、渋滞時は最高1600ng/m³にまで上昇した。また朝のラッシュ時はPM2.5、PPAH濃度は高く、特に前方をディーゼル車が走行している場合は両者とも高濃度になることが確認された。今回の走行ではPPAH濃度の平均値は約60ng/m³であり、1日約3時間の自動車の運転により、1日暴露量は900ng/日と道路後背地の約4倍に達した。

5 考察

非排気型暖房器具(石油ストーブや石油ファンヒーター)の使用により、ピレンおよびナフタレンの代謝物である1-pyrenol および 2-naphthol の尿中濃度が上昇したことから、尿中 1-pyrenol および 2-naphthol はPAH(とくにピレンおよびナフタレン)の生物学的暴露マーカーとして非常に有用であると考えられた。これらのマーカーは室内汚染レベルで有意に上昇することから、大気汚染レベルの曝露指標としても有効であると考えられた。しかしながら、1-pyrenol は食事からのPAH摂取の影響を受け、2-naphthol は食事による影響は少ないものの喫煙者で高値を示すなど大気汚染

以外の影響因子の存在も判った。

PPAHおよびPM2.5濃度の測定では、十分個人曝露量測定として利用できる可能性が示唆されたが、前述したように重量の軽減化、電源がより長時間連続使用できるようにするなどの改良が加えられることが望まれる。両者の関係は、PPAHの発生源とPM2.5の発生源がほぼ車と考えられる走行中車内や、道路沿道ではよく相関し、特にディーゼル排気ガスの中に含まれるPPAHの割合が高いことが確認された。しかし、道路後背地ではPM2.5とPPAH濃度は特に夜間に乖離が見られた。これはPM2.5の発生源が他にある場合、夜間に2次生成粒子の寄与が高くなる場合、風向の変化などの要因が考えられ、さらにデータの集積が必要であると考えられた。また、PM2.5またはPPAHの曝露は自動車の運転や乗車中の曝露が無視できないこと、道路沿道の曝露濃度が高くなることが予想され、ライフスタイル等を考慮した場合に個人差が大きいことが予想された。従って、今後このようにリアルタイムに曝露トレンドが記録できれば、曝露濃度の変化による呼吸機能の変化、心電図変化などを同時に測定することにより、現在問題になっている死亡率と関連する比較的急性の影響のメカニズム解明に役立つことが期待される。

6 今後の課題

バイオマーカーを用いて曝露評価を行うためには、個人曝露量（今回の研究では粒子状物質およびPAH曝露）とバイオマーカーとの間に成り立つ関係を把握することが不可欠である。そこで今後の課題としては、ボランティアを対象として個人曝露量と尿中1-pyrenolおよび2-naphtholの関係について検討し、曝露量と尿中代謝物との間の回帰式を求めることが必要と考える。また、この関係に影響を及ぼす季節変化、地理的差異、ライフスタイルなどの把握も必要である。したがって、大気汚染のレベルの異なる地域での集団を対象とし、PAHの気中濃度と尿中1-pyrenolおよび2-naphtholの関係について検討が必要と考える。さらに尿中1-pyrenolおよび2-naphtholとの関係について、比較検討を行うとともに、DNA付加体やヘモグロビン付加体などの新しいバイオマーカーの開発も必要である。

PPAH個人モニターが、使用可能となったので、今後はさらにPM2.5とPPAH濃度の関連を様々な場所で検討し、データを集積するとともに、喘息患者に装着してもらい、自覚症状の変化、ピークフロー値の変化と、PPAH曝露量の変化の相関の有無を検討する。また、これらの患者から採取した尿中のバイオマーカーの変化を分析して、より長期間の曝露マーカーとなりうるか否かを検討する必要がある。さらに喘息との関連のみではなく、現在問題になっているハイリスクグループと考えられる心疾患、脳血管疾患患者の生理学的変化との関連を明らかにすることが重要であると思われる。

7 社会的貢献

尿を採取することにより比較的簡単に個人個人の有害大気汚染物質への曝露量を把握することができ、疫学調査における有用な手段となる。また、曝露量が個人毎にわかるため、リスク評価に必要な量・影響関係、量・反応関係をより正確に求めることができる。また、遺伝子多型の分析と組み合わせることにより、大気汚染に関する遺伝的高感受性群を見いだすことも可能である。

また現在問題になっているPM2.5の健康影響のうち、特に発がん性に関してはその粒子に付着しているPAHによるものと考えられるので、その曝露量を個人モニターによって把握し、発がん以外の様々な臨床症状や疫学調査に生かすことができることを確認した意味で社会的貢献は大きいと思われる。

8 3年間のまとめ

有害大気汚染物質への生物学的暴露マーカーとして、ピレンやナフタレン等の代謝物である 1-pyrenol、 1-naphthol および 2-naphthol が有用であるかどうかについての検討を行った。1-pyrenol および 2-naphthol は HPLC にて簡便に測定ができ、疫学調査などの多数のサンプルの分析も可能であった。1-naphthol は分析が煩雑であり、2-naphthol とほぼ相関していることから、必ずしも有用ではないと考えた。モデルルームにて石油ストーブを燃焼させ、在室者の尿中 1-pyrenol および 2-naphthol 濃度を調べたところ、1-pyrenol 濃度は曝露 2、3 日目の 17:00 の尿で有意に高値を示した。一方、尿中 2-naphthol は曝露 2、3 日目の 12:00、17:00 の尿で非曝露時の 2 倍に上昇していた。学生を対象に冬季の使用暖房器具と尿中 1-naphthol および 2-naphthol 濃度との関係を調べたところ、石油ストーブ使用している学生の尿中濃度はクリーンヒーターを使用している学生と比較し、濃度幾何平均で約 2 倍と統計学的に有意に高い値を示した。石油ファンヒーターを使用している学生の尿は両者の中間的な値を示した。以上の結果から、1-pyrenol および 2-naphthol とともに暖房器具使用レベルの室内汚染でその尿中濃度が上昇し、大気汚染レベルの生物学的暴露マーカーとしての有用であると考えた。しかし、尿中 1-pyrenol は食事の影響を受けること、2-naphthol は喫煙者で非常に高くなることなども判った。

オキシダントストレスの指標として尿中のイソプラスタン量の測定手法を確立し、どのような場合に上昇するかを確認した。特に喫煙者では非喫煙者に比較して有意に尿中イソプラスタン量が高いことを初めて確認できた。また、その要因を分析したところ、喫煙行為そのもののみがイソプラスタン量に関与していることがわかった。現在は生活環境中に存在するオキシダントストレスによって尿中イソプラスタン量が変化するか、またこれがバイオマーカーとして使用する可能性があるか検討中である。

最近問題になっている PM2.5 の中で主に粒径 1 μm 以下の粒子に付着している PAH 濃度を測定することが可能な PPAH 個人モニターが開発されたので、それを用いて、基礎的な調査を行った。その結果、都内及び近郊の PPAH の濃度は、屋外では道路沿道、高速道路渋滞時、高速道路トンネル内で高く、屋内では喫煙により上昇し、屋外では最高 2 000 ng/m³ 程度に上昇することもあったが、屋内の喫煙室では平均 94 ~ 112 ng/m³ であり、自動車由来の曝露の方が圧倒的に高かった。従って PPAH は自動車内での曝露量が非常に高く、短時間であっても無視できないことが確認された。またリアルタイムに曝露量が記録できるこのような個人モニターを用いれば、比較的短期間の呼吸機能、心電図変化との関連を検討することができ、健康影響のメカニズムを解明する有力な手段となることが期待された。