

- 2 粒子状物質による生体影響評価手法の開発に関する研究

代表者：内山 巖雄

【研究内容 1】

- 2 - (1) 大気中粒子状物質による生体影響評価手法に関する研究

1 研究従事者

- | | |
|---------------------|--------------------|
| ○内山巖雄（京都大学工学研究科） | 村山留美子（京都大学工学研究科） |
| 酒井亮二（スイス連邦工科大学） | 川本俊弘（産業医科大学医学部） |
| 松本明子（産業医科大学医学部） | 嵐谷奎一（産業医科大学産業保健学部） |
| 保利 一（産業医科大学産業保健学部） | 樺田尚樹（産業医科大学産業保健学部） |
| 石田尾 徹（産業医科大学産業保健学部） | 平野英保（産業医科大学医学部） |
| 加藤貴彦（宮崎医科大学公衆衛生学教室） | 岸本卓巳（岡山労災病院） |

2 平成13年度の研究目的

近年、人の社会的移動が多く、大気汚染の健康影響調査が難しくなっている。このような状況下では個人の暴露量をより正確に把握し、生体影響を評価することが必要である。

そこで本小課題の目的を達成するために13年度は、（内山班）個人サンプラーによる粒子付着多環芳香族炭化水素（PPAH）濃度の道路沿道からの水平、垂直減衰の確認と個人暴露量と循環器症状の変化との関連の検討、（川本班）大気中粒子状物質とバイオマーカーとしての尿中1-hydroxypyrene、2-hydroxynaphthaleneとの間に成り立つ関係を把握するためにパーソナルサンプラーを用いて、粒子状物質（PM_{2.5}）の個人暴露量を求め、同時に両者の尿中排泄量を調べ、両者の関係についての検討、および防塵マスク等を用いて、暴露を抑制したときの尿中の両物質を測定し、気道を介した暴露の関与についての検討、（嵐谷班）大気中の浮遊粒子状物質（SPM）濃度、特にPM₁₀とPM_{2.5}の関連、粒径特性および粒子中の多環芳香族炭化水素濃度（PAHs）推移および粒径特性についての検討、冬期のNO₂および揮発性有機化合物（VOCs）の個人暴露濃度と環境因子との関連についての検討、また室内汚染の代表的化学物質であるホルムアルデヒドの環境中の濃度特性と血液のヘモグロビン付加体量についての検討を行う。

3 平成13年度の研究の対象および方法

1) 内山班

PPAHをリアルタイムで測定できる個人サンプラー（PAS2000CE、米国ecochem社製）を用いて、道路沿道住民の暴露量を推定するため、4台の装置を用いて京都市内の幹線道路から水平に5、10、20、50mの地点で平日の朝（7:30～9:30）、夕（16:30～18:30）に延べ8日間測定し、同時に車種別交通量を計測した。また道路から20m離れた4階建て建物の各階（2.8、5.6、9.4、14.1m）の壁から1m離れた大気中濃度を同時測定しPPAHの水平、垂直減衰を検討した。また一部で、PM_{2.5}との同時測定を行いPPAH濃度との関連を検討した。さらに健康男子12名を対象にPAS2000CEとホルター心電計（フクダ電子製）を24時間、1人2回装着してもらい、行動記録に記入してもらった。R-R間隔スペクトル分析により、高周波成分（HF）、低周波成分（LF）を10分間隔で求め、交感神経機能（LF/HF比）、副交感神経機能（HF）とし、経時的PPAH暴露量と自律神経機能の変化との関連を検討した。

2) 川本班

ボランティアに、PM10 - PM2.5 個人サンプラーNWPS-35 型(柴田科学株式会社)を装着してもらい、粒子状物質への暴露を3日間連続測定した。ポンプはMP-Σ300(柴田科学株式会社)を用いて、毎分2.5 liter の速度で捕集し、24 時間毎に捕集用のフィルターを交換して、重量の測定を行った。同時に蓄尿を行い、1-hydroxypyrene、2-hydroxynaphthalene の尿中への排泄量を8時間ごとに求めた。また、同じボランティアに防塵マスク(DR-28-7 重松製作所)を3日間連続装着してもらい、PM10 - PM2.5 個人サンプラーNWPS-35 型を用いた大気中粒子状物質の気中濃度測定と8時間毎の蓄尿を同時に行った。フィルターはL3AH(重松製作所、捕集効率:99.9%)を使用し、8時間おきに交換した。さらに、防毒マスク(GM-287 重松製作所)の3日間連続装着実験も行い、大気中粒子状物質の気中濃度測定と8時間毎の蓄尿も同時に行った。吸収缶はCA-104N(重松製作所、有機ガス用)を使用し、8時間おきに新しい吸収缶に交換した。

尿中の1-hydroxypyrene の定量は、尿200 μl を酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)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 ODS80Tm、移動層:60%アセトニトリル、1.0ml/min、測定波長:Ex=242nm,Em=338nm)にて行った。尿中2-hydroxynaphthalene の測定は、1-hydroxypyrene の定量と同様に前処理を行い、蛍光検出器付きHPLC(カラム:TOSOH TSKgel ODS80Tm、移動層:38%アセトニトリル、1.2ml/min、測定波長:Ex=227nm,Em=355nm)により行った。

3) 嵐谷班

- (1) 浮遊粒子状物質および化学物質の測定: 粒径2.5 μm 以下、粒径2.5~10 μm の2段に分級捕集できるサンプラーによる粒子濃度特性、また浮遊粒子状物質がPAHs の粒径特性を調べるため、8段に粒子を分級できるAndersen Sampler を用いて捕集を行った。粒子状物質中のPAHs は超音波抽出→ろ過・濃縮→蛍光検出方法を用いる高速液体クロマトグラフィーによって分離・定量した。気中HCHO 濃度はDNPA 含浸シリカゲルを用い吸引捕集し、HPLC にて分離・定量した。
- (2) 個人暴露濃度: 2001 年冬期一般家庭を対象としてNO₂、VOCs の個人暴露量を計測した。NO₂ はパッシブガスサンプラーで捕集後、吸光光度にて定量した。VOCs はパッシブガスチューブで捕集後、GC/MC 法で定量した。HCHO-ヘモグロビン(Hb)付加体量は健康人よりヘパリン加採血し、血漿と赤血球液を分離し、赤血球は生食液で3回洗浄後、四塩化炭素でdebris の除去処理をした。この血漿と赤血球液の両試料を蒸留水で4倍希釈し、これに反応液(1.3-シクロヘキサジオン酸性溶液、90、15分間もしくはジニトロフェニルヒドラジン酸性溶液、60、30分)を加え反応後、冷却し上澄液中のホルムアルデヒドをHPLC で分離・定量した。

4 平成13年度の研究成果

1) 内山班

- (1) 水平、垂直距離によるPPAH の減衰: 朝の測定では、沿道から5、10、20m 地点ではディーゼル車の走行によりPPAH はピーク値を示したが、50m 地点ではピークはみられず、道路沿道の影響はないと考えられた。また朝、夕の比較では、いずれの日も朝の方がPPAH 濃度は高かった。8日間の平均PPAH 濃度は距離に比例して減少し、朝、夕の5m 地点では130ng/m³、100ng/m³、50m 地点ではそれぞれ60ng/m³、50ng/m³ であっ

た。交通量調査により調べた日別、朝夕別、車種別交通量から、日別、朝夕別の測定時間 2 時間におけるディーゼル車総台数、全走行車由来またはディーゼル車由来の粒子状物質排出量をそれぞれ求め、日別、朝夕別の平均 PPAH 濃度との関連を検討した結果、いずれの指標とも有意な正の相関を示したが、ディーゼル車総台数との相関係数が最も高かった ($r=0.68$)。鉛直距離別の PPAH 濃度は 24 時間、平日の延べ 9 日間に行った。24 時間では朝と夕のラッシュ時にほぼ 2 つの山ができており、深夜から早朝にかけては PPAH 濃度は一般的に低かった。朝、夕のラッシュ時の平均値および日平均値でみると、いずれも 1 階より 2 階の方が PPAH 濃度は高く、2 階より上では減衰を示した。これは 1 階と道路の間に約 2 m の高さの障害物があったために、2 階部分の大気中濃度が最も高くなったと考えられた。また PM2.5 との同時測定では、PPAH とほぼ同じ濃度パターンを描くとき、夕方から夜にかけて PM2.5 濃度が高く推移する 2 つのパターンが認められた。

- (2) PPAH 暴露と自律神経機能の変化：健康な大学生で非喫煙者 12 名には、通常の生活をしてもらい、主な動作を行動記録に記入してもらった。ホルター心電計の記録はフクダ電子解析センターに依頼し一般的診断および、心拍変動解析用のデータを得た。このデータを HRS—RRA (Win) プログラムにて解析した。まず心拍数と PPAH 濃度を比較すると、睡眠中あるいは屋内では PPAH 濃度はほとんど 50ng/m³ 以下であり、1 日のうち数カ所で PPAH のピークが見られた。従って PPAH 暴露と自律神経機能の変化を検討するのは、このピーク暴露の見られる時間帯に限って行った。PPAH 濃度が 100ng/m³ 以上のピーク出現時の被験者の居場所および行動をみると、延べ 131 回のうち、79% が戸外、そのうちの 75% が道路沿道であり、そのときの行動は歩行、または自転車による移動中であった。

心拍数と HF/LF、HF の 1 日の典型的な推移は、日中の活動期には心拍数と交感神経の活動レベルを表す HF/LF の値はほぼ比例して推移し、夜間の睡眠中は逆に心拍数の低下、副交感神経の活動レベルを表す HF の値が上昇し、両者が自律神経機能のバランスを表現していることが確かめられた。

PPAH 濃度と心拍数、HF/LF、HF との関係を、PPAH 濃度の 10 分間平均値が 100ng/m³ を超えた 20 カ所についてみたところ、心拍数の増加と HF/LF の増加、HF の減少が一般的には有意に見られるが、この関係が PPAH 濃度の上昇によって修飾されているか否かの判定は今回はできなかった。ただ、被験者の 1 人はこのような関連が認められず、PPAH 暴露の影響であるのか、今後の研究が必要であると思われた。

2)(川本班)

PM2.5 の個人暴露量は 7 ~ 80 μg/m³ で、日により約 10 倍程度の差が認められた。この値はボランティア居住地域 (北九州市八幡西区) における過去の PM2.5 測定値にほぼ近い値であった。本サンプラーにより採取した PM10 は、どの程度正確かわからないが、PM2.5 の PM10 に占める割合も約半分と、一般大気測定値に類似した値となった。捕集フィルターの色は薄い灰白色から、濃い灰色まで捕集日により異なっていた。しかし、フィルターの色の変化と粉塵重量には関係は認められなかった。

1-hydroxypyrene の一日あたりの尿中排泄量は、約 20 ~ 180ng と、日により最大 10 倍程度の差が認められた。PM2.5 の個人暴露量と 1-hydroxypyrene の一日あたりの尿中排泄量との関係について検討したが、相関関係は認められなかった。2-hydroxynaphthalene の一日あたりの尿中排泄量は約 0.2 ~ 4.1 μg で、日により 20 倍程度の差が認められた。PM2.5

の個人暴露量と 2-hydroxynaphthalene の一日あたりの尿中排泄量との間にも関係は認められなかった。

防塵マスク装着時の尿中 1-hydroxypyrene 排泄量は低下する傾向が認められた。しかしながら、検討例数も少なく、統計学的に有意でもなく、今後さらに検討する必要があると考える。一方、2-hydroxynaphthalene 排泄量には特に変化はなかった。また、防毒マスク装着では、1-hydroxypyrene および 2-hydroxynaphthalene の尿中排泄量の低下は認められなかった。

3) 嵐谷班

(1) 気中濃度

北九州市の学園地区(田園地帯)での浮遊粒子状物質の粒径特性およびPM10 中のPM2.5 の含有率、PAHs 濃度および粒径特性について、年間を通して調べた。PM10 の浮遊粒子状物質濃度は季節によって変動し、春と秋が高濃度であり、夏と冬に低濃度であった。PM10 に占める PM2.5 の割合は月により若干変動があるが、約 70 ~85%で昨年度と同様な推移を示した。特に春の2月はPM2.5 の割合は低く、大陸からの黄砂の影響を受けて粗大粒子濃度が高いことが認められた(図1)。8段に分級できる Andersen Sampler を用いて粒子濃度の粒径特性を調べた。試料採取月により粒径分布特性は若干違っているが、共通して2峰性を示した(図2、図3)。粒径1.1 ~2.1 μm 谷をもち、0.6 ~1.1 μm と3.3 ~4.7 μm 付近にピークを持っていた。

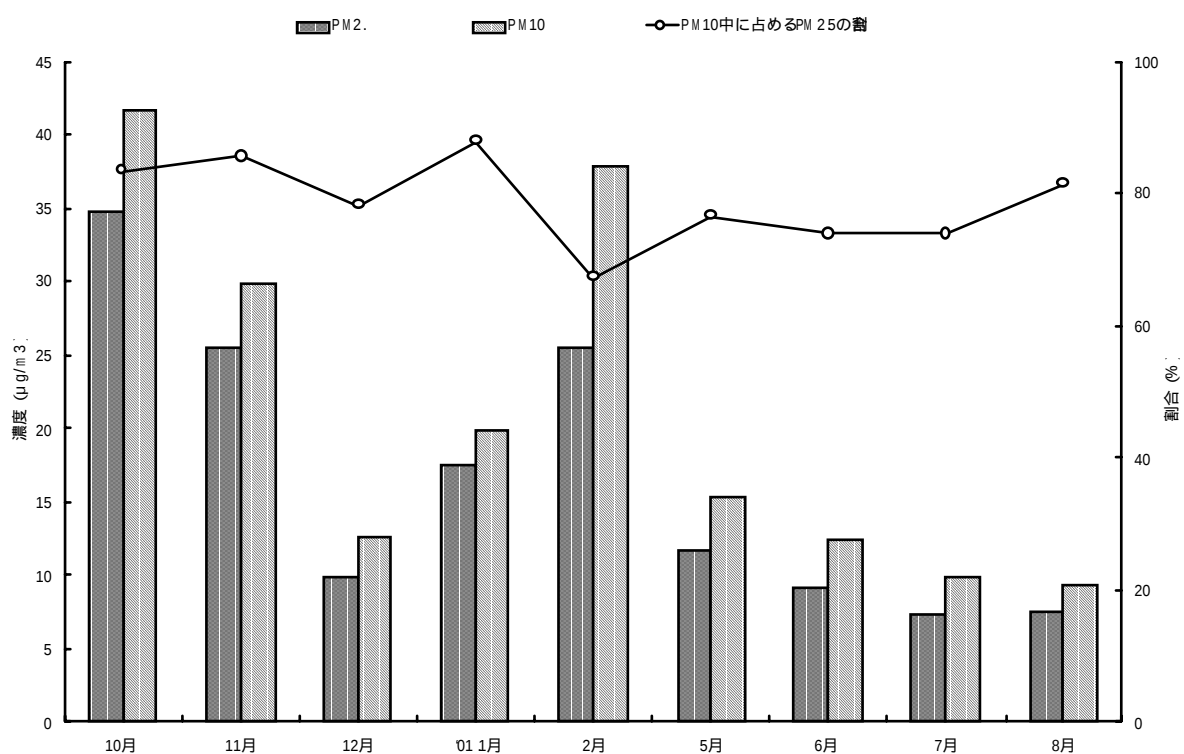


図1 粉塵濃度推移とPM10 中に占めるPM2.5 の割合
(産業医科大学 正門 2000.10 ~ 2001.8)

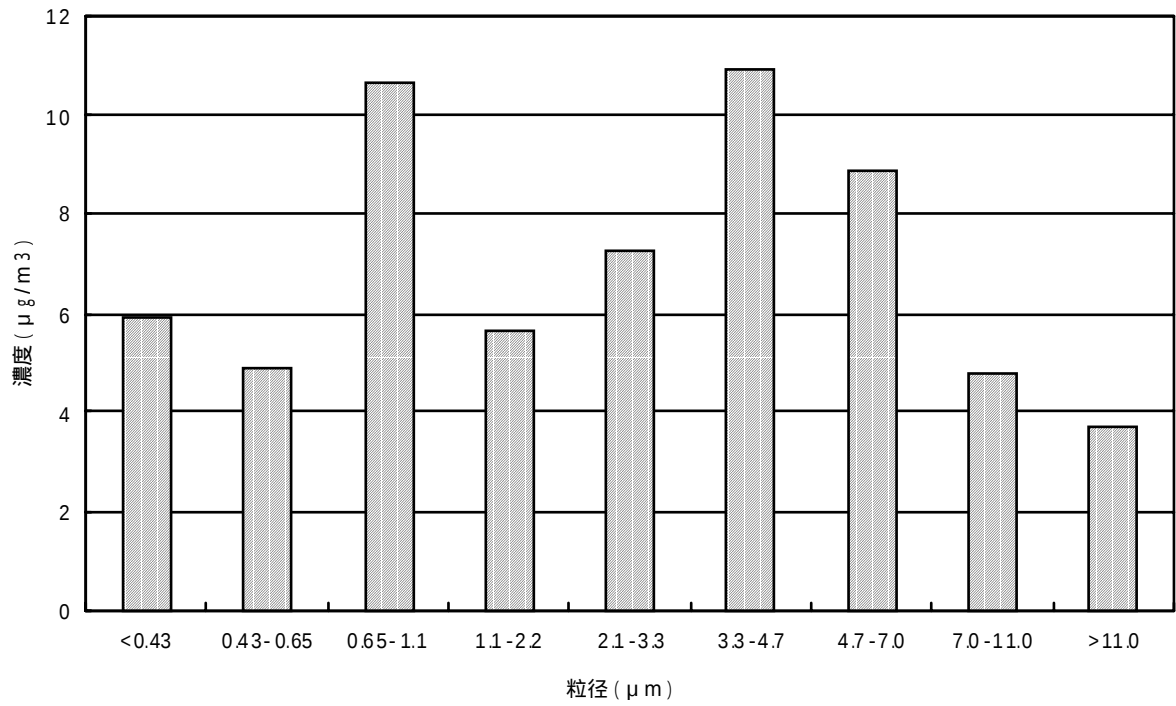


図2 大気浮遊粉塵の粒径分布
(産業医科大学正門横 2001.1)

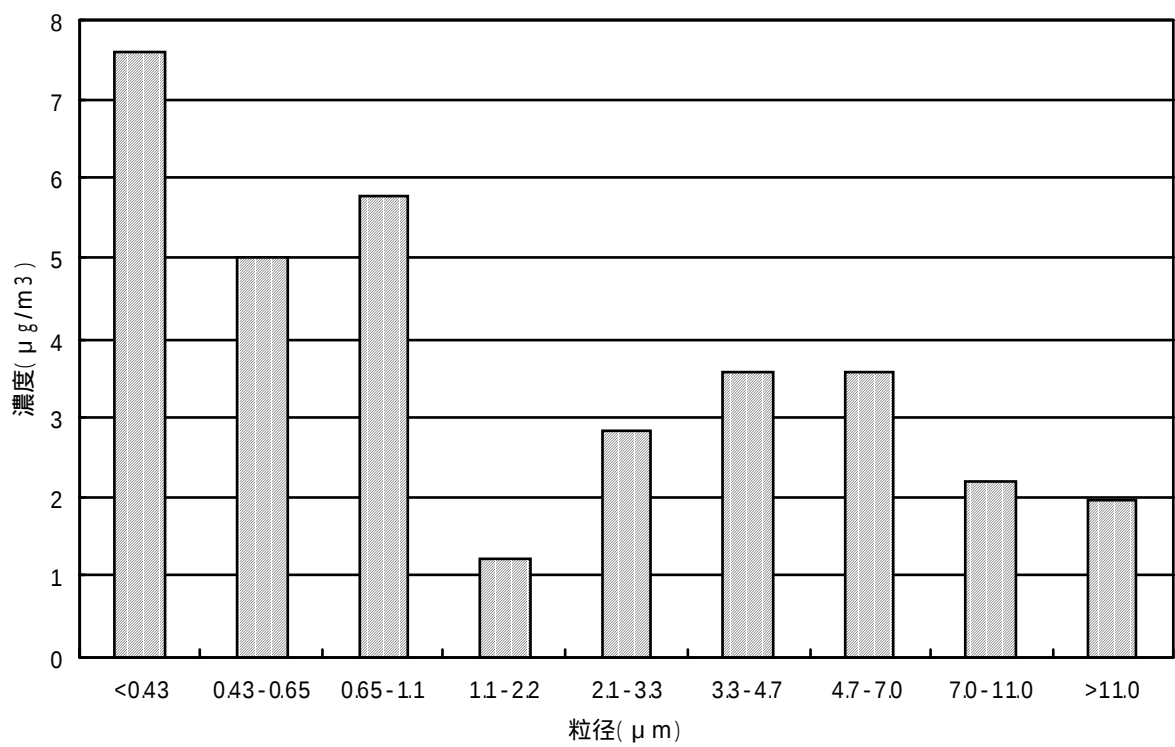


図3 大気浮遊粉塵の粒径分布
(産業医科大学正門横 2001.10)

某大学解剖学実習室、屋外・内および一般家庭のホルムアルデヒド気中濃度について調べた。屋外は約 20ppb、一般家庭は約 30ppb で、WHO の基準より低い濃度レベルであった。大学の解剖学実習室は解剖開始前が約 100ppb、解剖中は1000ppb を超す高い濃度レベルであった（図 4）。

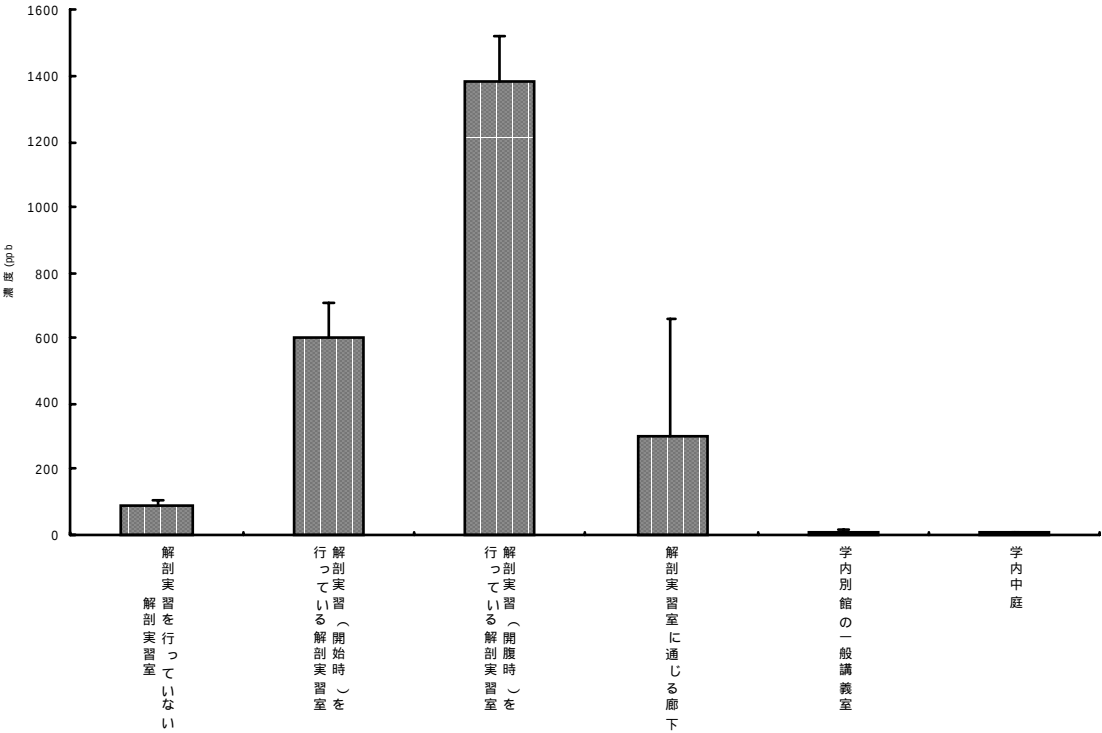


図 4 解剖実習室と校内各所のホルムアルデヒド濃度
(産業医科大学 2001.10)

(2) 個人曝露濃度

北九州市八幡西区2002年1月冬のNO₂およびVOCs 個人濃度への影響について検討した。

NO₂ 濃度は台所 居間 > 寝室 > 屋外であり、個人曝露濃度は寝室の濃度と同程度であった（図 5）。個人曝露濃度は台所と居間の濃度と比較的高い相関が認められた。八幡西区のVOCs はベンゼンを含む十数種を検出した。

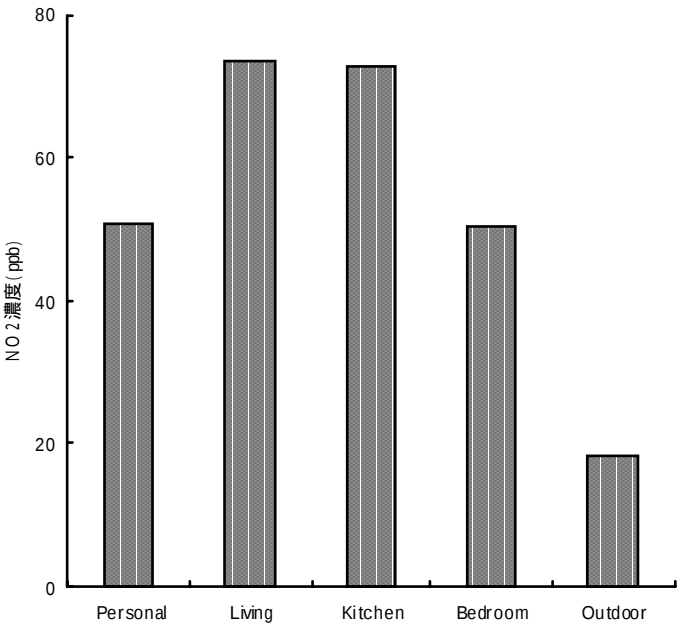


図 5 冬期NO₂濃度 (2002.1 北九州市八幡西区)

(3) HCHO-Hb 濃度

特異的にホルムアルデヒドを暴露されない集団と解剖に携わる学生から得た血液を用いて、HCHO-Hb 付加体量を計測した。解剖に携わる学生の集団の中で、比較的高い HCHO-Hb 付加体濃度の学生がいることが認められた。

5 考察

1) 内山班

昨年の東京都市街地での道路沿道の PPAH 濃度に比べて、京都市市街地の PPAH 濃度は約半分であり、ディーゼル車の走行台数の差が大きな原因であると思われた。しかし道路から 50m 地点の濃度はいずれも 50ng/m³ であり、ほとんど変わらなかった。また、道路沿道でもマンションなどの集合住宅では、4 ~ 5 階までは徐々に PPAH の暴露濃度が減少することが確かめられた。

また、心拍変動スペクトル分析を用いた自律神経機能のバランスの変化に対する PPAH 急性暴露の影響は今回の調査では確かめられなかったが、評価手法はほぼ確立したので、今後もう少し高い暴露濃度の地域で高齢者、呼吸器疾患患者、循環器疾患患者を対象に同様の調査を行う必要がある。

2) 川本班

今回の調査は、一般大気あるいは室内空気レベルの PM_{2.5} 暴露と 1-hydroxypyrene あるいは 2-hydroxynaphthalene 尿中排泄量との関係を調べたものである。さらに防塵マスク、防毒マスクによる暴露の低減と 1-hydroxypyrene あるいは 2-hydroxynaphthalene との間の関係についても調べたものである。本研究班では以前、ストーブを室内で燃焼させ、多環芳香族炭化水素暴露量を増やした時には、尿中の 1-hydroxypyrene および 2-hydroxynaphthalene が上昇し、両代謝物が暴露のバイオマーカーとして有用であることを報告した。しかし、今回の調査のように暴露濃度が低いと PM_{2.5} および 1-hydroxypyrene、2-hydroxynaphthalene の測定が定量下限あたりとなり、正確な測定が難しかった。また、暴露が低いと食事などの交絡因子の影響が相対的に大きくなる。

したがって、大気汚染物質の暴露レベルの異なる地域で本調査を行い、暴露とバイオマーカーとの関係を調査する必要がある。

3) 嵐谷班

環境中の代表的な化学物質である VOCs、NO₂、PAHs、HCHO および浮遊粒子状物質の濃度とその特徴、また個人暴露濃度について計測した。その結果、北九州市での浮遊粒子状物質の粒径特性は 2 峰性を示し、かつ春先に黄砂の影響を受け高濃度であった。NO₂ 個人暴露は冬期室内暖房の影響を大きく受けることが認められた。HCHO は医学上の解剖時の特殊な場合で、気中濃度が 1000ppb を超す値で、目とのどに刺激を受けている学生が見受けられた。一般家庭屋外に於いては WHO 基準値 80ppb 以下の濃度であった。

解剖時に高い HCHO 暴露を受ける集団の中で HCHO-Hb 濃度は個人差があり、高い濃度レベルが認められた学生もあり、気中濃度の反映があることが示唆された。

6 今後の課題

1) 内山班

PPAH のパーソナルサンプラーである PAS2000CE は重量が 1.5kg あり、バッテリーの作動時間が 5 時間であるので、何とか実用性を良くする改良をメーカーと交渉中である。また、

今年度はPPAH 暴露濃度があまり高くなかったこと、被験者が健康な大学生であったことから、PPAH 暴露による循環器系への影響のメカニズム解明には至らなかったため、今後はもう少し PPAH 濃度が高い地域、高齢者または呼吸器疾患患者等のハイリスクグループを対象に調査を進める必要がある。

2) 川本班

都市部、山間部、工場地帯など様々な大気汚染レベルの地域において、PM10、PM2.5、pyrene および naphthalene への個人暴露量と、1-hydroxypyrene および 2-hydroxynaphthalene の尿中排泄量を調べ、大気汚染暴露のバイオマーカーとしての 1-hydroxypyrene および 2-hydroxynaphthalene の有用性について検討を行う。また、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1 の pyrene から 1-hydroxypyrene への代謝への K_m 値、 V_{max} 等を求めるとともに、naphthalene から 2-hydroxynaphthalene への代謝に関与する cytochrome P-450 isoform についても検討を行う。

3) 嵐谷班

粒子物質の生体影響を検討するためには気中濃度、粒径特性だけでなく、個人暴露量を計測し、生活習慣、季節変動などとの関係を検討する必要がある。NO₂、VOCs、PAHs、HCHO などの化学物質の個人暴露に関しては、今後も継続した計測を行うと共に生体試料（尿・血液）を用いた生物学的モニタリング、VOCs については尿および血液中の VOCs およびその代謝物質、PAHs については尿中の 3-OH ベンゾ[*a*]ピレンの定量、また HCHO-Hb と尿中の HCHO の測定などの検討を実施する必要がある。

7 社会的貢献

PPAH を指標とした粒子状物質のリアルタイムの個人暴露量と高齢者、呼吸器疾患、循環器疾患等のハイリスクグループへの影響およびそのメカニズムを解明することによって、疫学的に明らかになった、粒子状物質暴露による急性影響に対する予防的対策を提言することができる。

粒子状物質および PAH への暴露の推定が尿中 1-hydroxypyrene、2-hydroxynaphthalene 濃度を測定することにより、比較的簡単にできるようになり、疫学調査の暴露評価が個人レベルでできるようになる。生体影響を評価するために必要な量—反応関係、量—影響関係をより正確に求めることができる。

粒子状物質、NO₂、VOCs、PAHs の計測は個人暴露濃度および環境濃度の実態を知る上で重要なデータとなりうると思われる。また、浮遊粒子状物質の粒子特性と PM10 と PM2.5 の濃度推移について、昨年度より年間を通して実施し有益な情報が得られてきている。化学物質の生体内取り込み量と生体内運命の検索に必要な HCHO-Hb 付加体量の測定に関して、若干の知見が得られてきている。今後測定方法の精度管理と多数の検体と長期間に渡っての追跡による測定が必要で、これによって有益な知見が得られることが期待される。

以上の3つの研究を統合することにより、粒子状物質を中心とした健康影響評価を行う上での新たな手法、バイオマーカーを提供することが期待される。

【研究内容 2】

- 2 - (2) 大気中粒子状物質の呼吸器系に及ぼす実験的研究

1 研究従事者

- 工藤翔二（日本医科大学第四内科） 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）
小池 英子（筑波大学大学院 医学研究科） 滝沢 始（東京大学附属病院検査部）
河崎 伸（東京大学医学部） 岡崎 仁（東京大学医学部）
出崎真志（東京大学医学部） 橋本 修（日本大学医学部）
権 寧博（日本大学医学部） 吾妻安良太（日本医科大学第四内科）
平松久弥子（日本医科大学第四内科） 斉藤好信（日本医科大学第四内科）
菅原 勇（結核研究所分子病理）

2 平成13年度の研究目的

1) ラットの肺胞マクロファージを用いた実験

大気汚染物質が喘息や花粉症などのアレルギー性疾患や気管支炎の発症・増悪に及ぼす影響について総合的に評価することが求められている。これより、簡便かつ迅速な毒性評価の手法と包括的な影響指標の開発が必要である。ディーゼル排気粒子（DEP）は、IgE 抗体産生におけるアジュバント作用によりアレルギー反応を誘発することなどが示唆されており、喘息や慢性気管支炎のような呼吸器系疾患を悪化させる可能性がある。肺胞マクロファージは免疫システムに重要な役割を果たしており、肺における DEP の主要な標的細胞であるとも考えられる。本研究は、DEP 等の粒子状物質による生体影響のメカニズムを解明するため、遺伝子レベルでの変化を包括的に検討することを目的としている。

前年度は、cDNA Expression Array を用いてラットの肺上皮細胞において、heme oxygenase（HO）をはじめ、thioredoxin peroxidase2（TDPX-2）、glutathione S-transferase P subunit（GST）、NAD(P)H dehydrogenase、PCNA の mRNA の発現が動的に変化することを、各種遺伝子発現状況を包括的に評価する中でとらえることができた。そこで、今年度は、前年度に認められた遺伝子発現レベルの変化が、実際にタンパクのレベルでも観察されるかを解析する。

2) マウスの暴露実験

これまでの、in vitro および in vivo における知見は、各種の大気中粒子状物質が、呼吸器系細胞を活性化して、気道領域の炎症をひき起こすことを示している。こうした成果を呼吸器健康被害の対策と予防に役立てるためには、さらに実験動物を用いて、生体に暴露されうる条件下でどのような炎症性変化が惹起されるかを遺伝子レベルで明らかにする必要がある。前年度は純系マウスに1カ月間ディーゼル由来粒子状物質の暴露を行い、IL-4、IL-10 というTh2 サイトカインの遺伝子発現の増強を認めたので、今年度はさらに、3、6カ月と長期間の暴露の影響を検討した（滝沢グループ）。以上の研究を通して、これまで試験管内で明らかにされてきた影響が生体内でどのように発現しうるかが明らかとなり、呼吸器健康被害の対策と予防に役立つ各種の知見が得られると期待される。

3 平成13年度の研究の対象および方法

1) ラットの肺胞マクロファージを用いた実験

(1) 動物

6週令の雄性SD系ラットをチャールズリバーより購入し、清浄空気環境下で通常の餌と滅菌水を与えて飼育した。実験には8 - 10週令の動物を使用した。

(2) 肺胞マクロファージの採取、タンパク解析

ラットは、ペントバルビタールナトリウム (50mg/kg 体重) を腹腔内注射し、麻酔下で脱血死させた。開胸により肺を虚脱させた後、37℃ に温めた10ml のPBS (-) を気管より注入し、10回肺胞腔を洗浄した。この肺胞洗浄液を、1000rpm、4℃ で7分間遠心し、上清を除去した。細胞は、10%非働化ウシ胎児血清、100U/ml ペニシリン、100µg/ml ストレプトマイシンを添加したRPMI-1640培地(R10)に再懸濁させた。生細胞数はトリパンブルー色素排除法により求めた。後述のDEP抽出物でin vitroで刺激の後、細胞からタンパクを抽出し、2次元電気泳動、自動プロテオーム解析により、誘導されたタンパクを同定した。

(3) DEP抽出物の調製

DEPにジクロロメタン (1g/10ml) を加え、Tomy Ultrasonic Disruptor (UD201)を用い、Duty 60、Output 2にて5分間超音波処理した。1500rpmで10分間遠心し、上清を採取した。沈殿物にはジクロロメタンを加え、同様の操作をさらに3回繰り返した。上清はエバポレーターによりジクロロメタンをとばし、真空ポンプで処理した。採取した抽出物はDMSOを加えて溶解し、500mg/mlの濃度で-80℃にて保存した。実験には、DMSOで希釈した目的の1000倍濃度のDEP抽出物を使用した。

2) マウスの暴露実験

粒子状物質の呼吸器系に及ぼす影響を遺伝子レベルで包括的にとらえることを目的に、マウスの系では、ディーゼル由来粒子状物質 (diesel exhaust particles, DEP) の吸入を経時間的に6カ月まで行い、肺にもたらされる変化を、組織学的に検討すると共に、炎症性反応に重要な各種サイトカイン分子の遺伝子発現に与える影響を検討した。

すなわち、純系マウス (Balb-c) をDEP暴露チャンバー (結核研究所内) で環境中에서도あり得る濃度 (100µg/m³) で反復暴露を行う (斉藤、菅原)。動物のDEP暴露にあたっては、実際の環境汚染状況になるべく近似した条件で行うようにする。すなわち、一日の暴露時間を7時間、週5日行った。

- (1) 経時的に気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage, BAL) と組織学的検索を行う。BAL液中の細胞からのサイトカイン産生状況をELISAにより測定する。
- (2) サイトカインおよびケモカインの遺伝子発現を肺組織からRNAを抽出し、RT-PCRにより検出する。
- (3) さらに、肺組織を粉碎後、核タンパクを抽出し、ゲルシフトアッセイを用いて、各種転写因子 (NF-κB、AP-1 など) の活性化が起こっているかを検討する。

4 平成13年度の研究成果

1) ラットの肺胞マクロファージを用いた実験

DEP抽出物 (10µg/ml) を24時間暴露したラット肺胞マクロファージからタンパクを抽出した。

2次元電気泳動法に引き続き、自動プロテオーム解析を行ったところ、thioredoxin peroxidase 2、glutathione S-transferase P subunitのタンパクレベルの

発現が増加していることを確認できた。

2) マウスの暴露実験

純系マウスに一日7時間、週5日、100ug/m³の条件で6カ月吸入を持続した。肺の組織学的検討では、肺胞マクロファージに軽度の粒子の貪食像がみられたほか、明らかな変化は観察されなかった。この肺組織をすりつぶして、mRNAを抽出し、各種のサイトカインの遺伝子発現状況を検討した。その結果、ヒト気道上皮の *in vitro* の実験でみられた IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインの増強は認められず、むしろ吸入期間の持続につれ、減弱の傾向がみられた。IL-1、TNF α についても同様の傾向であった。そして、アレルギー性炎症においては、Th2 タイプのサイトカインと呼ばれ、気管支喘息などの病態において、重要な役割を果たすと考えられているサイトカイン群である IL-4、IL-10 の遺伝子発現が明らかに誘導された。これは、期間が長いほど増強する傾向が示唆された点が重要である。一方、Th1 サイトカインであり、生体防御の上で大きな役割を果たすことがわかっているインターフェロン γ の遺伝子発現レベルが明らかに減弱したことは興味深い。

5 考察

1) ラットの肺胞マクロファージを用いた実験

DEP 抽出物中には様々な有機化合物が含まれており、これらはマクロファージの活性酸素の放出を誘導することが知られている。これによりマクロファージは活性化され、サイトカイン産生などが促進される。このような DEP 抽出物によって誘導された酸化ストレスに対しては、抗酸化性の防御機構が必要とされると考えられる。

昨年度の cDNA Expression Array による解析の結果、10 μ g/ml DEP 抽出物の6時間暴露は、肺胞マクロファージにおける HO、TDPX-2、GST-P、NAD(P)H dehydrogenase などの抗酸化系酵素の遺伝子の発現を誘導した。これは炎症の初期段階ではこれらの酵素が肺胞マクロファージから肺胞内に放出され、DEP による酸化ストレスに対する防御機構が作動することが示唆された。GST-P に関しては明白ではなかったが、HO および TDPX-2、NAD(P)H dehydrogenase、PCNA の mRNA の発現は、DEP 抽出物の濃度依存的に増加することがノーザンブロット法により明らかとなった。このように、cDNA Expression Array は、その結果がノーザンブロット法からも確定されたことから、多くの遺伝子解析を簡便かつ迅速に評価できる有用な手法であるといえる。

生体内において実際における抗酸化酵素が役割を果たすためには、タンパクレベルでその発現が増加している必要がある。今年度は、その点に着目して検討を行った。DEP 抽出物 (10 μ g/ml) を24時間暴露したラット肺胞マクロファージにおいて、2次元電気泳動法に引き続き、自動プロテオーム解析を行ったところ、thioredoxin peroxidase 2、glutathione S-transferase P subunit のタンパクレベルの発現が増加していることを確認できた。このことは、DEP の暴露によって、肺胞マクロファージでの抗酸化酵素が実際に活性を示すことを示唆しており、その生体防御反応上の意義を意味するものと思われた。

2) マウスの暴露実験

従来の実験的知見は大きく、個々の呼吸器系細胞への影響 (*in vitro*) と動物実験 (*in vivo* で気道の炎症性変化を解析したもの) に分けられる。今回の研究では、*in vitro* で明らかとなった分子レベルでの知見が、*in vivo* においても同様に起こるか否かを明らかにできると期待した。その結果、前年度の1カ月暴露に引き続き、最大6カ月までマウス

の DE の長期暴露を行い、1 カ月暴露群と基本的には同様に、IL-6、IL-1、TNF などの炎症初期に重要なサイトカイン群の発現はむしろ低下し、いわゆる Th2 サイトカインである IL-4、IL-10 の遺伝子発現が上昇した。一方、Th1 サイトカインであり、生体防御の上で大きな役割を果たすことがわかっているインターフェロン γ の遺伝子発現レベルが明らかに減弱したことは、6 カ月間という長期暴露によって、肺組織レベルで、Th2/Th1 バランスが Th2 側にシフトすることが明らかになった。これによって、気管支喘息などのアレルギー性肺炎症につながるサイトカインの変化が、持続的に認められることが初めて明らかになったといえよう。

6 今後の課題

1) ラットの肺胞マクロファージを用いた実験

今回の実験条件は、炎症時の肺胞マクロファージに誘導される iNOS や IL-1 の遺伝子の発現に影響を及ぼさなかった。しかし、これらを含み、炎症性のサイトカインやケモカインまたはそれに関わる遺伝子の発現が暴露時間を変えることで変化する可能性もある。本実験では DEP 抽出物による影響について検討したが、微小粒子状物質やその他の大気汚染物質の暴露でも同様の反応を示す可能性が考えられる。今後、cDNA Expression Array を用いて、DEP 抽出物の濃度および暴露時間を変えた検討や微小粒子状物質を含めその他の大気汚染物質の影響についても検討していく必要がある。また、気道を被覆する上皮細胞を対象にしても、同様の検討を行う必要があると考えられた。

2) マウスの暴露実験

6 カ月というマウスとしてはかなりの長期暴露で再現性のある Th2 > Th1 というサイトカイン発現様式の変化が見いだせたことから、今後、気道・肺胞系のどこに優位にみられているのかを究明する必要がある。また、暴露への反応性の個体差を検討する観点から、マウスの遺伝的背景によるこうした反応の相違も検討する必要がある。以上のことにより大気中粒子状物質によって惹起される呼吸器系での変化を、遺伝子レベル・タンパクレベル双方で包括的にとらえることができ、呼吸器健康被害の予防策に理論的な根拠をあたえるものとなりうる。

7 まとめ および社会的貢献

特に粒子の影響は、低い濃度からも観察され、危険性が高いことから、粒子状物質の生体影響に関する研究と基準値の制定の必要性が挙げられている。さらに簡便かつ鋭敏な影響評価手法を見いだすことは、大気環境汚染の危険性を迅速に明らかにすることが可能となり、予防学的観点からも重要なことである。cDNA Expression Array とプロテオーム解析を用いたラットでの研究は、大気汚染物質等の毒性物質に対する包括的な暴露指標を見いだす上で非常に有用である。また、この評価手法と影響指標を確定することで、実験の簡略化に伴い迅速な毒性評価を行うことが可能となる。

また、マウスの実験系ではなるべくヒトでありうる条件下で、比較的長期間の吸入暴露の影響を組織学的のみならずサイトカイン遺伝子発現レベルでとらえることで、より早期かつ機能的な段階での変化を評価できるものと期待される。

以上述べたようなふたつの異なるアプローチによって、大気中粒子状物質によって惹起される呼吸器系での変化を、サイトカインをはじめとする遺伝子レベルでの変化として動的にかつ

包括的に捉えることができ、適切な暴露指標をみいだせる可能性がある。これらの成果により、従来の急性暴露での影響や in vitro での実験成果を、よりの確にヒトへ外挿するためのデータを充実させ、呼吸器健康被害の予防策に理論的かつより適切な根拠をあたえるものとなる。