

- 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 )
小山倫浩 ( 産業医科大学医学部 )	一瀬豊日 ( 産業医科大学医学部 )
末永玲子 ( 産業医科大学医学部 )	樺田尚樹 ( 産業医科大学産業保健学部 )
原 邦夫 ( ( 財 ) 労働科学研究所・研究部 )	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 )	二渡 了 ( 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 )	岸本卓巳 ( 岡山労災病院 )

2 . 平成 14 年度の研究目的

1 ) 内山班

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。特にこのような状況下では、曝露評価は大気中濃度のみでなく、個人の曝露量をより精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小課題 1 では 3 つのサブグループに分かれて研究調査を行ってきた。内山班では、14 年度は昨年ある程度 DEP の曝露評価に使用できることを確認した個人サンプラーによる粒子付着多環芳香族炭化水素 ( PPAH ) 濃度を用いて、PPAH 曝露濃度と心拍変動分析から得た自律神経バランスの変化との関連を、健常者を用いて検討することを目的とした。

2 ) 川本班

粒子状物質 (  $PM_{2.5}$  )、ピレンおよびナフタレンの個人曝露量と 1-hydroxypyrene, 2-hydroxynaphthalene の尿中排泄量との関係を、首都圏の交通量の多い道路沿線、地方都市の住宅地および郡部の 3 箇所調べ、1-hydroxypyrene, 2-hydroxynaphthalene のバイオマーカーとしての有用性について評価を行う。

また、ヒトリコンピナント P450 を用いてピレンから 1-hydroxypyrene への代謝を調べ、チトクロム P450 の各分子種ごとの  $V_{max}$ 、 $K_m$  値を求める。この結果からピレン代謝に最も関与していると考えられるチトクロム P450 分子種を同定する。

3 ) 嵐谷班

近年、先進諸国において呼吸器系疾患の発症の増加があり、社会的にも強い関心が示されてきている。呼吸器系疾患の発症は、浮遊粒子状物質・揮発性有機化合物・ $NO_x$  などの物質が複雑に係り、また呼吸器系への物質の侵入、蓄積に関与すると考えられる。

そこで、本研究は 大気中浮遊粒子状物質、多環芳香族炭化水素及び金属元素の大気中での挙動及び濃度変動、二酸化窒素及び揮発性有機化合物の個人曝露濃度の把握、気中ホルムアルデヒド濃度についてそれぞれ調査することを目的とする。

3 . 平成 14 年度の研究の対象及び方法

1 ) 内山班

調査内容と趣旨を説明し、同意が得られた健常な男性の非喫煙者 6 名(22~27 歳)を被験者とした。被験者に PPAH 個人サンプラーである PAS2000CE (米国 Ecochem 社製) とホルター心電計(フクダ電子製)を装着してもらった。PPAH 濃度の比較的高い京都市内の国道 1 号線沿道と対照地区として道路沿道から 50m 以上離れた京都大学構内広場で、座位安静(40 分)、一定の速さでの歩行(25 分)、座位安静(35 分)の測定を各人につき同日の午前、午後を 1クールとして 3クールおこなった。測定は平成 14 年 10 月 24 日から 12 月 9 日までの平日に行った。分析は、最初の座位安静の後半 20 分間(Rest1)、運動(歩行)の後半 20 分間(Walking)、運動後の座位安静の後半 20 分間(Rest2)を分析対象とした。各期間の PPAH 濃度、心拍数、R-R 間隔スペクトル分析により、高周波成分(HF)を 10 分間隔で求めて副交感神経機能とし、経時的 PPAH 曝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 3 名に、首都圏の交通量の多い道路沿線(東京都板橋区、環状 7 号線沿線)、地方都市の住宅地(福岡県北九州市八幡西区および若松区、産業医科大学およびその近辺)、郡部(兵庫県淡路島、島根県大原郡あるいは熊本県松橋市のいずれか)に 76 時間以上滞在してもらい、PM10 - PM2.5 個人サンプラー-NWPS-35 型(柴田科学株式会社)を用いて粒子状物質(PM2.5)個人曝露量を測定した。また、同時に PTFE フィルターおよび XAD-2 サンプラーを用いて粒子状物質およびガス状物質を捕集し、米国 NIOSH 法におおよそ準拠して、ピレンおよびナフタレンへの個人曝露量を求めた。さらに同時に蓄尿を行ない、1-hydroxypyrene, 2-hydroxynaphthalene の尿中への排泄量を求めた。

また、ヒト P450 各分子種を発現させたマイクロソームを用いて、ピレンから 1-hydroxypyrene への代謝を調べた。

## 3) 嵐谷班

### (1) 浮遊粒子状物質、多環芳香族炭化水素濃度及び金属濃度

粒径 2.5  $\mu\text{m}$  以下、粒径 2.5-10  $\mu\text{m}$  に分級捕集できるサンプラー(PM10/2.5 DICHOTOMOUS) 8 段に分級できるアンダーセンサンプラー(柴田科学製)を用いて大気中の浮遊粒子を捕集した。

大気浮遊粒子中の多環芳香族炭化水素(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によって分離・定量した。大気浮遊粒子中の金属元素は加圧容器を用い酸分解抽出し、誘導結合プラズマ質量分析によって濃度測定を行った。

### (2) 個人曝露濃度測定

2002 年、夏期、冬期、北九州市八幡西区の一般家庭を対象として NO<sub>2</sub> と揮発性有機化合物(VOCs)の個人曝露濃度を測定した。NO<sub>2</sub> 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、ガスクロマトグラフ質量分析法にて定量した。

### (3) ホルムアルデヒド(HCHO)濃度

気中 HCHO は p-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH) 含浸シリカゲル(Waters 製)を用いて吸引捕集し、アセトニトリルで溶出後、高速液体クロマトグラフにて分離・定量した。

## 4. 平成 14 年度の研究成果

### 1) 内山班

1 分間ごとの HF を求めたが、HF はばらつきが大きいために自然対数に変換し(lnHF)、各状態 20 分間の HR, ln HF の平均値をその状態の代表値として HR20, ln HF20 と定義し、各

状態および状態の変化における自律神経バランスを両地点で比較した。PAS2000CE で測定された PPAH 濃度は PM2.5(B 線)連続測定値と比較した結果、PM2.5 濃度と有意に正の相関を認めた。但し、測定地点の PM2.5 濃度は最大 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。道路沿道の PPAH 濃度は約 95ng/m<sup>3</sup>、道路後背地は約 15ng/m<sup>3</sup> であった。HR と ln HF との関係には強い負の相関が認められ、心拍数の増加にともなって副交感神経が抑制されることが確認された。安静時、運動時ともに道路沿道の HR20 は道路後背地の HR20 よりも高くなる傾向があった。また運動時は両地点において HR20 の値が増加するが、道路沿道において、道路後背地に比べて副交感神経がより強く抑制される傾向があり、PPAH 濃度による影響の可能性が考えられた。すなわち、道路沿道では、心拍数が変化する際に、道路後背地に比べて HR20 に対する ln HF20 の変化量が大きくなる傾向があり、自律神経の活動レベルがより高まっていることが示唆された。また 1 名の被験者においては、心拍数が変化する際に、有意に自律神経の活動レベルが高まり、その程度は PPAH 濃度との間に量 反応関係が認められた。

以上より、PPAH 濃度の異なる道路沿道と道路後背地において、同じプロトコールで安静、運動、安静を繰り返し、PPAH 濃度と HR、lnHF の変化を検討した結果、PPAH 濃度が高い場所において運動を行うと、副交感神経のより強い抑制がみられ、PPAH、PM2.5 の曝露により、特に運動時には自律神経機能のバランスに影響を与える可能性があることが示唆された。

## 2) 川本班

72 時間の捕集後のフィルターの色は、淡路島、島根あるいは熊本では薄い灰白色、東京では黒色を呈しており、北九州は、その中間であった。粒子状物質 (PM2.5) への個人曝露量は淡路島、島根、熊本ではおよそ 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、北九州ではおよそ 20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、東京では 30  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。捕集されたピレンの半分以上がガス相であり、粒子相のピレン個人曝露に占める割合は 8 ~ 57% であった。地域ごとに比較すると北九州市が最も低く、PM2.5 重量とは異なる結果となった。ナフタレンの個人曝露量は、個人ごとの比較では大きなばらつきがみられた。PM2.5 の個人曝露量とピレンおよびナフタレンの個人曝露量の間には関係が認めなかった。

PM2.5 個人曝露量と尿中 1-hydroxypyrene および 2-hydroxynaphthalene 排泄量と間には有意な相関関係は認められなかったが、ピレン個人曝露量と 1-hydroxypyrene の尿中排泄量との間には有意な相関関係を認めた。しかし、高濃度の 1 点が相関を強くしているので、例数を増やして確認する必要があると考える。また、ナフタレン曝露量と 2-hydroxynaphthalene の尿中排泄量との間には、有意な相関関係を認めなかった。

リコンビナントヒト Cytochrome P450 isoform を用いて、ピレンから 1-hydroxypyrene への代謝を調べたところ、CYP1A1 > CYP1B1 > CYP1A2 > CYP2C19 の順で、高い活性が認められた。ピレンから 1-hydroxypyrene への代謝は主として、CYP1A1、CYP1B1、CYP1A2 によって行われると考えられた。

## 3) 嵐谷班

### (1) 浮遊粒子状物質濃度

1999 年 3 月 ~ 2002 年 7 月に産業医科大学正門横の大気中の浮遊粒子状物質濃度は、冬から春にかけて粉じん濃度は高く、明らかな季節変動があることが認められた。PM10 濃度は約 60  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  以下とすべて環境基準以下であった。PM10 と PM2.5 濃度変動は類似傾向を示し、PM10 中に占める PM2.5 の割合は 45% から 80% 程度で推移し季節により異なり、3 月から 4 月に PM2.5 の割合は低く約 50% で、粗大粒子濃度が高かった。浮遊粉じんの粒径分布と濃度の関係を見ると、両者とも粒径が 1.1 ~ 2.1  $\mu\text{m}$  を境に二峰性を示し、また他の月

でも同様の分布を示した。

## (2) 多環芳香族炭化水素濃度

10 $\mu$ m 以下の大気浮遊粉じん粒子に付着した PAHs 濃度は夏に低い値であった。いずれの期間とも PAHs 濃度はベンゾ [ghi] ペリレン > ベンゾ [a] ピレン > ベンゾ [k] フルオランテンであった。また、発癌性物質のベンゾ [a] ピレン濃度はいずれの時期とも 1ng/m<sup>3</sup> 以下で、同地域に於ける 1984 年ごろまでの濃度に比べ半減した。8 段に分級捕集した粉じん中の PAHs 濃度と粒径との関係はこれまでの傾向と一致し、いずれの季節とも、粒径が 2.1~3.3 $\mu$ m 以下の微小粒子の中に 90%以上が含有されていることが認められた。

PAHs の垂直濃度分布について、産業医科大学 1 号館 (8 階建) のベランダ (2 階、4 階、6 階、8 階) で捕集した 1 日の浮遊粉じん中の PAHs 濃度を測定した。PAHs の濃度は気象的因子により影響を受けるが、地上近いほど濃度が高く、4 階~8 階間ではほぼ同程度であった。

## (3) 元素濃度

大気浮遊粉じん中の多数の元素分析を、石英フィルターに既知量の 15 元素を添加し、加圧分解にて抽出を行ない、ICP/MS で定量し回収率を求めた。多種の元素は 95%以上の抽出率を得た。また、標準偏差も比較的小さく、良好な回収率を得た。本分析法を用いて、9 段階に分級捕集し、粒径ごとの元素濃度を測定した。元素により粒径分布に以下のような特徴がみられた。

- ・ Cr は中程度・微小粒子に存在する二峰性示し、As が似た分布であった。
- ・ V は微小粒子になるほどその濃度は高くなり、Ni が似た分布であった。
- ・ Mn は中程度の粒子に多く分布し、Cu もこれに似た分布であった。
- ・ Pb は中程度微小粒子に存在し、粗大粒子には微量であった。

約 1 年間の代表的な金属濃度の推移は、冬期から春期にかけて高値を示す傾向があった。

## (4) NO<sub>2</sub> 気中濃度及び個人曝露濃度

北九州市八幡西区学園地区の NO<sub>2</sub> 個人曝露濃度について検討した。なお、昨年度 (2001 年) の家庭を対象とし、夏期、冬期について調査した。NO<sub>2</sub> 濃度は冬期が夏期に比べ高値であり、夏期は台所、個人、ベッドルーム、室外ともほぼ同程度であったが、冬期は室外に比べ室内、個人濃度が高値を示し、NO<sub>2</sub> 発生源が室内に存在し、特に都市ガス、灯油暖房使用家庭は、電気暖房使用家庭に比べ、約 10~20 倍の高値を示した。NO<sub>2</sub> 測定と同条件で夏期、冬期の VOCs を計測し、22 種類の VOCs を検出した。夏期は、トルエン、デカン、ウンデカンが、冬期は、1.2.4-トリエチルベンゼンが比較的高い濃度で、季節により異なっていた。

## (5) 気中ホルムアルデヒド (HCHO) 濃度

HCHO を取り扱う特殊な状態、大学医学部解剖学実習 (432m<sup>3</sup>) での HCHO の気中濃度の調査を昨年度に引き続き行った。24 の解剖台のそれぞれその上で検体の系統解剖が行われた。この解剖室の解剖前と解剖の進行に合わせて数日間 HCHO 測定を行った。解剖室の環境測定は、作業環境測定基準に従い、縦横それぞれ等間隔の測定点 (12 点) をとって気中の HCHO を捕集後、分光学的手法で定量した。また実習中、特に高濃度に汚染される場所と時間を選び平均濃度とは別に HCHO の高濃度測定 (作業環境測定では B 測定) した。解剖前の HCHO 平均濃度は約 20ppb、解剖開始と共に HCHO 濃度は上昇し約 1000ppb に達し、解剖前に比べ 50 倍以上、また対照とした学内の一般講義室に比べ 50 倍以上の高値であった。解剖中の最も高濃度となる場所と時間 (B 測定) での HCHO 濃度は約 1300ppb であった。解剖室の近

傍では HCHO 濃度は比較的高く、解剖室からの漏洩があり、また近傍の階段を各階ごとに測定したところ、30ppb を越す値を示す箇所が認められ、階段及びエレベーターを通じて HCHO の拡散がなされていると推定された。解剖実習中に目がチカチカし、のどの痛みを訴える学生があり、工学的な対策、保護具の装着などの指導がなされる事が必要と考えられる。

## 5 . 考察

### 1 ) 内山班

昨年度は PPAH 濃度が PM2.5 の相対的な曝露指標となりうるかについての疑問が出されたので、今年度は PM2.5 との同時測定を行ったところ、少なくとも PM2.5 濃度が 25  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  以下では両者の間に相関が認められ、PPAH は PM2.5 曝露の相対的指標となることが確かめられた。また昨年度は同様の実験を 24 時間の通常の生活で観察したところ、PPAH 曝露濃度が高くなる場所はほとんど道路沿道を歩行、あるいは自転車走行中であり、自律神経バランスの変化との関連が分析できなかったため、今年度は PPAH 濃度の異なる 2 地点において同じプロトコールで安静、運動を繰り返す実験的調査を行った。その結果、PPAH 濃度が高い場所において運動を行うと、副交感神経のより強い抑制がみられ、PPAH、PM2.5 の曝露により、特に運動時には自律神経機能のバランスに影響を与える可能性があることが示唆された。しかし、道路沿道において自律神経に影響を与える他の要因（心理的ストレス、気象条件、他のガス状汚染物質）も考えられることも考慮しなければならず、今後これらの要因も同時に測定して除外する必要があるが、PPAH 濃度のみが高く、他のガス状汚染物質濃度が同じという場所は実験室以外には考えられず、この条件を除外するのはなかなか困難である。

さらに、本研究では PPAH の曝露と同時に起こる影響を調べたが、PM2.5 の曝露後、数時間経ってから影響が発現する可能性もあるため、このことについても今後検討すべきである。

### 2 ) 川本班

今回の調査では、大気汚染レベルが大きく異なると考えられる 3 地域で調査を行ったが、実際には PM2.5 の重量ではわずか 2 および 3 倍の差、ピレン・ナフタレンの個人曝露濃度では個人差の方が地域差よりも大きいという結果となった。ピレンやナフタレンは一般環境中ではほとんどガス相に存在しており、ガス相における汚染物質や、PM2.5 のような微細粒子の日本における地域差は以外に小さいのかもしれない。尿中ピレン排泄量が地域との関係は認められなかったが、ピレンへの個人曝露との間に相関関係を認めた。例数が少ないので断定的なことはいえないが、このことは大気汚染の健康影響調査の際の曝露評価に個人曝露を考慮する必要性を示すものと考えられる。

### 3 ) 嵐谷班

大気中の浮遊粒子の粒径特性は約 2  $\mu\text{m}$  を境に二峰性を示すことが認められ、PM10 に占める PM2.5 の濃度の割合は 45 ~ 80% であった。浮遊粒子状物質の濃度は月別に大きく変動し、冬 ~ 春にかけて高濃度を示し、中国からの黄砂、冬期の暖房等からの影響があると考えられる。

冬期のいずれの NO<sub>2</sub> 濃度とも夏期に比べ高値を示した。昨年度と同じ対象家庭で比較すると NO<sub>2</sub> 濃度傾向、濃度レベルは類似していた。冬期、暖房を使用するため、特に石油系燃料を用いる家庭では、個人曝露濃度、室内の各室の濃度は石油系暖房を用いない家庭に比べ高値であったと考えられる。VOCs 個人曝露濃度はベンゼン、トルエン、キシレン濃度が比較的高く、個人曝露濃度への影響はトルエン、キシレン等は室内空気汚染と関係する傾向がある

が、ベンゼンのみは全くその関係が認められず、屋外濃度または喫煙の影響も考えられる。HCHO は、大学での解剖学実習では 1000ppb を超す極めて高い値であり、教育上何らかの対策が是非とも必要であると考えられる。

## 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

今回の調査では、個人曝露レベルの日本国内における地域差が非常に小さいことがわかった。1-hydroxypyrene および 2-hydroxynaphthalene のバイオマーカーとしての有効性を検討するには、さまざまな個人曝露レベルで検討する必要がある。また、対象者数をさらに増やすことも必要である。

### 3) 嵐谷班

本研究は 大気環境中の浮遊粒子状物質及び PAHs の特性・濃度、NO<sub>2</sub>、VOCs の個人曝露濃度、バイオマーカーの開発などについて検討した。今後の研究として、VOCs 及び HCHO の生体内曝露量及び生体内排泄、浮遊粒子の個人曝露濃度の計測が不可欠と考えられる。

NO<sub>2</sub>、VOCs の個人曝露濃度に関しては、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必要である。

## 7 社会的貢献

### 1) 内山班

PPAH を指標とした粒子状物質のリアルタイムの個人曝露量と高齢者、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及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、粒子状物質曝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。

### 2) 川本班

今回の調査は大気汚染の健康影響調査を行う際に、個人曝露や尿中代謝物測定の有用性を示した。

### 3) 嵐谷班

大気中の浮遊粒子の物理的特性、気中濃度、また代表的な発癌性物質のベンゾ[a]ピレンの粒子吸着特性や、年間の濃度レベルを調べ多くの知見が得られてきている。

HCHO のヘモグロビン付加体量の測定法の確立を行った。今後多くの測定を行いデータを蓄積することで、化学物質過敏症との関連を調べる上で重要な手段となると考えられる。

## 【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 (国立環境研究所 PM2.5・DEP 研究プロジェクト)  
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 14 年度の研究目的

#### 1) ラットの肺胞上皮細胞を用いた実験

ディーゼル排気中の微小粒子 (DEP) などの大気汚染物質は、呼吸器疾患やアレルギー疾患を悪化させる可能性が示唆されている。大気汚染物質は呼吸により肺に侵入し、まず肺の細胞に様々な影響を及ぼす。そこで本研究では、DEP に対する肺の構成細胞の初期反応を包括的に解析し、鋭敏な指標と簡便な評価手法を見出すことを目的とした。平成 14 年度は、DNA マイクロアレーを用いて、肺胞上皮細胞の遺伝子の発現について解析を行い、発現レベルに顕著な変化がみられた遺伝子については情報を収集して、機能的分類を行った。

#### 2) マウスの曝露実験

これまでの、in vitro 及び 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お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、3、6 カ月間低濃度 (100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) ディーゼル由来粒子状物質の曝露を行い、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。今年度はさらに、3、6 カ月間にわたって、低濃度 (100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) と高濃度 (3mg/ $\text{m}^3$ ) の曝露の影響を検討した。また、2 系統のマウスで曝露実験を行い、比較検討した。

### 3 . 平成 14 年度の研究の対象及び方法

#### 1) ラットの肺胞上皮細胞を用いた実験

##### ( 1 ) DNA マイクロアレーによる遺伝子の解析

細胞は、株化ラット肺胞上皮 II 型細胞 (SV40T2) を使用し、10% 非働化 ウシ胎児血清 (FBS)、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地 (GIBCO BRL, Rockville, MD) で培養した。細胞が confluent になったところで培養上清を除去、FBS 未添加の DMEM 培地でディッシュを洗浄した後、ジクロロメタンにより抽出した DEP 抽出物 (最終濃度: 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) またはコントロールとして DMSO (最終濃度: 0.1%) を加えて 6 時間培養した。肺胞上皮細胞の遺伝子の発現の変化は、曝露後の細胞から RNA を抽出し、1 万個の遺伝子がプロットされた Motorola CodeLink Bioarray (KURABO, Japan) を用いて解析した。また、発現レベルに顕著な変化がみられた遺伝子について情報を収集し、機能的分類を行った。この DNA マイクロアレーによる解析は、同じ条件で 2 回行った。

## (2) ウェスタンブロット法による H0-1 蛋白質の解析

肺胞上皮細胞は、DEP 抽出物 (最終濃度: 1, 4, 16, 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) またはコントロールとして DMSO (最終濃度: 0.1%) に 12 または 24 時間曝露した。培養終了後、ディッシュを PBS(-) で洗浄し、蛋白抽出用の試料緩衝液 (150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 2% CHAPS, 2% Protease inhibitor cocktail) を加えて懸濁し、その懸濁液を攪拌棒により 1 分間破碎した。肺胞マクロファージ ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) は、20 時間前培養した後、DEP 抽出物 (最終濃度: 3, 10, 30, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) またはコントロールとして DMSO (最終濃度: 0.1%) を加えさらに 24 時間曝露した。培養終了後、同様に細胞から蛋白質を抽出した。これらのサンプルを 10% Bis-Tris NuPAGE gel (Invitrogen, US) で電気泳動を行いウェスタンブロット法により、H0-1 蛋白質の発現レベルを解析した。

## 2) マウスの曝露実験

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, C57BL/6) を DEP 曝露チャンバー (結核研究所内) で環境中でもあり得る濃度 (100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) および高濃度 (3mg/ $\text{m}^3$ ) とで反復曝露を行った。動物の DEP 曝露にあたっては、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、1 日の曝露時間を 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。
- (2) 肺胞マクロファージの貪食能を評価するため、BAL 液中の Mac-1 陽性細胞比率をフローサイトメトリーにより測定する。
- (3) サイトカイン等の遺伝子発現につき、肺組織から RNA を抽出し、RT-PCR により検出する。
- (4) さらに、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 B など) の活性化がおこなっているかを検討する。

## 4. 平成 14 年度の研究成果

### 1) ラットの肺胞上皮細胞を用いた実験

2 回の DNA マイクロアレーによる解析において、どちらかが 2 倍以上でかつもう一方も 1.7 倍以上に増加したものを抽出したところ、60 個の遺伝子が検出された。それぞれの機能を調べた結果、薬物代謝系酵素、抗酸化系酵素、セルサイクル・細胞増殖・癌に関わる因子、その他、EST に分類された。また逆に、どちらかが 0.5 倍以下でかつもう一方も 0.6 倍以下に減少したものを抽出したところ、26 個の遺伝子が検出された。それらは、抗酸化系酵素、その他、EST に属する遺伝子であった。顕著な変化が観察された全ての EST について、相同性の高い遺伝子を検索するため、BLAST 検索を行った。

発現が増加した遺伝子の例としては、Aldose reductase-like protein、これは芳香族のアルデヒドを還元する作用を持つもので、脂質の酸化を防ぐ働きも知られている。また抗酸化系酵素である H0-1 や GST、Heat shock protein (HSP)、そして細胞外マトリックスの調節因子である Plasminogen activator inhibitor (PAI2A) などが挙げられる。さらに EST においては、Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP-3) や HSP22 と推察される因子の増加が観察された。発現が減少した遺伝子の例としては、Glutamine synthetase や細胞外マトリックスの調節因子である Tissue-type transglutaminase 2 (TGM2) が挙げられる。また EST

においては、抗酸化系酵素であるRetinal short-chain dehydrogenase/reductase 1や細胞骨格に関係するLIM and cysteine-rich domains 1, DNA傷害に関係するL-FILIP, 感染抵抗性に関係するInterferon-inducible GTPaseと推察される因子が観察された。

DEP抽出物の曝露による変化の中で最も顕著であったのは、HO-1遺伝子の発現の増加であった。また、ウェウタンプロットによる解析から、肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージの細胞において、DEP抽出物の濃度依存的にHO-1蛋白質の発現が増加することも明らかとなった。

## 2) マウスの曝露実験

純系マウスに一日7時間、週5日、100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ および3mg/ $\text{m}^3$ の条件で3、6ヶ月吸入を継続した。肺の組織学的検討では、低濃度曝露では肺胞マクロファージに軽度な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が、高濃度曝露では低濃度曝露時と比較しより多くのDEP沈着が認められた他、その近傍に気管支関連リンパ組織( bronchus-associated lymphoid tissue, BALT )の増生が認められ、その程度はC57BL/6マウスに比しBALB/cマウスでより高度であった。BAL液中のMac-1陽性細胞比率は3ヶ月低濃度曝露ではコントロール群と比較し有意差は認められなかったが、高濃度曝露では有意に増加し、その程度はC57BL/6マウスに比しBALB/cマウスでより高度であった。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。前年度の研究では、1ヶ月曝露ではIL-1、TNF- $\beta$  は減弱の傾向がみられ、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が、3ヶ月曝露では、BALB/cマウスではTNF- $\beta$ 、iNOSは変化がみられず、IL-12は発現が軽度増強し、IL-1 $\beta$ 、INF- $\gamma$  は減弱した。C57BL/6マウスでは、TNF- $\beta$ 、iNOSは変化がみられず、IL-12、INF- $\gamma$  は発現が軽度増強し、IL-4は低濃度曝露では軽度増強、高濃度曝露では逆に軽度減弱した。さらには6ヶ月曝露では、TNF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12、INF- $\gamma$  は濃度依存性に発現が増強し、IL-4、IL-10は低濃度曝露では軽度増強、高濃度曝露では逆に軽度減弱した。期間が長くなると環境中でもあり得る濃度( 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  )でTh2サイトカインの発現が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分かっているインターフェロンの遺伝子発現レベルが3ヶ月高濃度曝露で系統差がみられたことは興味深い。NF- $\kappa$ Bについては、1ヶ月および3ヶ月曝露で活性化が認められ、これまでin vitroでDEP曝露にて認められていたNF- $\kappa$ Bの活性化が、今回in vivoでも示された。

## 5. 考察

### 1) ラットの肺胞上皮細胞を用いた実験

平成14年度は、肺胞上皮細胞の遺伝子発現の変化を解析した。その結果、薬物代謝系酵素や抗酸化系酵素、セルサイクル、細胞増殖、癌に関わる因子などの増加が観察された。特に強い増加が認められたのは、抗酸化系酵素のHO-1、GST-alpha, HSP70-1, そして細胞外マトリックスの調節因子であるPAI2AとESTから検出されたTIMP-3 と推定される因子であった。TIMP-3も細胞外マトリックスの調節因子であり、アポトーシスの促進や細胞の増殖活性を持つものである。HOとGSTは肺胞マクロファージを用いた検討でも、遺伝子レベルで顕著な増加が観察されている。逆に減少したのはほとんどがESTであったが、抗酸化系酵素、その他に分類される因子も含まれていた。特に強い減少が認められたのは、TGM2とESTから検出されたRetinal short-chain dehydrogenase/reductase 1と推定される因子であった。このようにDEPに対する肺胞上皮細胞の初期反応としては、防御系の因子と細胞外マトリックスの制御に寄与する因子が動く可能性が示唆された。また肺胞マクロファージと肺胞上皮細胞の

いずれにおいても、最も鋭敏であった変化はH0-1遺伝子の発現の増加であった。更に、いずれの細胞においても、DEP抽出物の濃度依存的にH0-1蛋白質の発現が増加することも明らかとなった。これまでの検討から、DEPなどの毒性物質の強い影響要因としては、酸化的ストレスが挙げられ、その影響に対してH0-1が鋭敏な指標となることが示唆された。

## 2) マウスの曝露実験

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。今年度は、6カ月間までマウスのDE長期曝露を、低濃度(100 µg/m<sup>3</sup>)と高濃度(3mg/m<sup>3</sup>)で実施し、かつ免疫炎症応答の異なる2系統のマウスで、比較検討した。まず、組織学的検討、気管支肺胞洗浄液(BAL液)の検討を行った。肺の組織学的検討では、低濃度曝露では肺胞マクロファージに軽度な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が、高濃度曝露では低濃度曝露時と比較し多くのDEP沈着が認められた他、その近傍に気管支関連リンパ組織(bronchus-associated lymphoid tissue, BALT)の増生が認められ、その程度はC57BL/6マウスに比しBALB/cマウスでより高度であった。BAL液中のMac-1陽性細胞比率は3ヶ月低濃度曝露ではコントロール群と比較し有意差は認められなかったが、高濃度曝露では有意に増加し、その程度はC57BL/6マウスに比しBALB/cマウスでより高度であった。さらに、各種サイトカイン遺伝子発現の変化では、全体としてはアレルギー性気道炎症で重要視されるTh2サイトカインの発現が増強する傾向が示唆された点が重要である。一方で、その発現強度は暴露濃度、期間、系統により複雑な変化がみられ、これら諸因子がDEPの生体に及ぼす影響の多様性を説明する要因である可能性が示唆された。各種炎症性分子の発現に重要な役割を演じ、最近、気管支喘息の気道粘膜上皮において増強が報告されている転写因子NF- $\kappa$ Bについては、1ヶ月および3ヶ月曝露で活性化が認められ、これまで*in vitro*でDEP曝露にて認められていたNF- $\kappa$ Bの活性化が、今回*in vivo*でも示された。

## 6. 今後の課題

### 1) ラットの肺胞上皮細胞を用いた実験

肺胞上皮細胞の遺伝子の発現において、特に大きな変化のあったものの中に、細胞外マトリックスの調節に寄与する蛋白分解酵素とそのインヒビターがあった。これらは組織を構成する細胞間物質を制御する重要な因子であり、これらの因子のバランスの崩れは、肺の傷害や炎症につながることを示唆されている。現在これらの因子について、ウェスタンブロットによる蛋白質の発現レベルの解析や活性についての検討を行っている。またこれまでの研究から、DEPなどの毒性物質の影響に対して鋭敏に反応する遺伝子はH0-1であることが示唆されたことから、これを用いた簡便な評価方法を確立させたいと考えている。

### 2) マウスの曝露実験

今回のマウスの系では、6カ月というマウスとしてはかなりの長期曝露で再現性のあるTh2優位なサイトカイン発現様式の変化が見いだされたことから、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。さらに、マウスの遺伝的背景によるDEP曝露への反応性の差を詳細に検討し、個人による反応性の相違のメカニズム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、特にDEP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捉える基礎的なデータが得られた。今後は、呼吸器疾患モデル動物における同様の研究と比較対比することで、高感受性群における

発症、増悪のメカニズムを追及する必要がある。

## 7. 社会的貢献

### 1) ラットの肺胞上皮細胞を用いた実験

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、大気汚染物質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。本研究のDNAマイクロアレーを用いた解析から、DEPなどの毒性物質に対して鋭敏に反応する遺伝子を見出すことが出来た。これらの遺伝子発現の変化は、毒性影響を評価する上で有用な指標となるものである。

### 2) マウスの曝露実験

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曝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た。その結果は、全体的にみると肺組織におけるTh2系サイトカインの優位な発現ととらえることができた。さらに、今年度は、免疫・アレルギー反応性の異なる純系マウスで比較することにより、遺伝的背景によって、免疫・炎症反応に差があることが明らかにされた。今後は、このメカニズムをさらに詳細に検討することにより、大気汚染の健康被害で観察される個体差の原因を追求する上で重要な知見が得られるものと期待される。

### 【3年間のまとめ】

#### - 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

小課題1では、粒子状物質の個人曝露量をリアルタイムに計測する手法として粒子付着多環芳香族炭化水素（PPAH）を測定する PPAH 個人サンプラーを用いて、PPAH が相対的な DEP 曝露量の指標となること、PPAH 濃度が道路沿道からの水平、鉛直距離による減衰すること、PPAH 濃度と心拍変動スペクトル分析から得られた自律神経機能の活動との関連から、運動時には PPAH 曝露が、自律神経バランスを修飾する可能性が示唆されることが判明した。また大気汚染物質のバイオマーカーとしてはピレン個人曝露量と 1-hydroxypyrene 排泄量との関係を除き、PM<sub>2.5</sub>、ピレンおよびナフタレンの個人曝露量と 1-hydroxypyrene あるいは 2-hydroxynaphthalene 尿中排泄量との間には有意な相関関係は認められなかった。リコンビナントヒトチトクロム P450 isoform を用いた検討から、ピレンから 1-hydroxy-pyrene への代謝は、主として CYP1A1、CYP1B1、CYP1A2 によって行われると考えられた。さらに、ホルムアルデヒドのヘモグロビン付加体量を計測する手法を確立し、予備的測定を行い HCHO 量はヒトにより約 5 倍の差が認められたがさらに検討する必要がある。汚染物質の環境中濃度の測定では、浮遊粒子状物質は、どの季節も 1.1~2.1 μm を境に二峰性を有し、PM<sub>2.5</sub> / PM<sub>10</sub> は 45~80% であること、PAHs 濃度は 2.1~3.2 μm 以下の粒子に 90% 以上含有することが確認された。また浮遊粉じん中の元素分析手法を確立し、測定した結果、元素の粒径は元素により特性が異なり、金属濃度は冬から春にかけて高値を示すことが認められた。

#### - 2 - (2) 大気中粒子状物質の呼吸器系に及ぼす影響に関する研究

小課題2の cDNA Expression Array とプロテオーム解析を用いたラット肺マクロファージ及び肺胞上皮細胞での研究は、大気汚染物質等の毒性物質に対する包括的な曝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低濃度条件下で、比較的長期間の吸入曝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ができた。3年間の研究で、以上の条件下で組織学的変化が起こるよりもより早期かつ機能的な段階での変化を評価できたと考えられる。また、遺伝的背景の差による反応性の相違も観察され、大気汚染に認められる個体差を追及する手がかりとなるものと期待される。このような二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、適切な曝露指標をみいだせる可能性がある。これらの成果により、従来の急性曝露での影響や 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りうる。

以上のように中課題としては、実験的研究からは細胞・免疫学的アプローチによる大気汚染物質の早期の影響指標の開発、疫学的研究からは、個人曝露濃度やバイオマーカーの影響指標としての可能性が指摘できたと考えられ、今後さらにこれらを発展させる必要があると考える。