

- 3 生活環境中の汚染物質の健康影響に関する研究

代表者 工藤翔二

- 3 - 1 粒子状物質中の主に微小粒子による健康影響に関する疫学的研究

1. 研究従事者

- 牧野国義（東京都立衛生研究所）
- 中井里史（横浜国立大学）
- 平野耕一郎（横浜市環境科学研究所）
- 栗田雅行（東京都立衛生研究所）
- 市川 勇（国立公衆衛生院）
- 清水哲茂（早稲田大学）
- 工藤翔二（日本医科大学）

2. 平成 11 年度の研究目的

大気中の粒子状物質（PM）による健康影響に関する疫学調査について、初年度は疫学的研究の現状を把握すること、PM の性状や実態およびその測定法について知見を整理し、検討すること、予備的な粒子状物質と健康影響との関連性を検討すること、文献による健康影響の知見を整理することなどを行った。続いて前年度は文献的研究を重視した毒性学的知見（実験的研究成果）からの疫学的研究への活用可能性についての展望や限界を検討し、我が国で疫学調査を行う上での指標と統計モデルの妥当性についても検討した。具体的にも集団曝露量の代表性に関する高濃度地点からの距離減衰を調査し、測定点が高濃度でも高濃度領域はかなり限定された地域であることを明かにした。また、増加し続けている東京都の喘息認定患者への PM の影響を初年度調査結果を踏まえ、6 地点を選定して検討したが、有効な指標との結果は得られなかった。そこで、今年度は、この 6 地点に居住する家庭婦人を対象に呼吸器症状に関するアンケート調査を行い、PM による健康影響について検討した。さらに、3 年間の研究のまとめとして、PM による健康影響に関する疫学的研究を行うに際しての課題や方向性、今後我が国でこの研究を目的とした疫学調査を行う際の具体的な方法論について検討することを目的とした。同時に、これらの検討の多くは文献的研究を通して得られた知見を基本としており、文献の役割が大きい。そこで、3 年間で収集した文献を項目ごとに整理し、疫学的研究による知見活用の向上を図った。

3. 平成 11 年度の研究の対象及び方法

1) 家庭婦人を対象とした呼吸器症状に関するアンケート調査

初年度の成果で、東京都の一般環境測定局（以下一般局と略記する）の大気汚染物質常時測定報告（平成 6 ～ 8 年度）より、NO₂ 濃度が同程度（高中低の 3 ペア）で浮遊粒子状物質（SPM）濃度が異なる東京都の 6 地点（板橋 > 文京、清瀬 > 小平、東大和 > 青梅）が選定された。この測定地点から 200m 程度の距離範囲に居住する地域の家庭婦人を対象とした呼吸器症状に関するアンケート調査を 1 地域 300 名を目途に行うため、町会長、自治会長に協力を仰いだところ、清瀬では協力が得られなかったことから、同程度の濃度であった多摩測定局に地点を変更した。その濃度傾向は平成 9 年度も変わらず、板橋、文京、小平、東大和、青梅の年平均濃度は、SPM がそれぞれ 67、37、54、38、52、30（ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）、NO₂ がそれぞれ 38、

38、28、26、23、19 (ppb) であった。このように作為的に地域を抽出すると、SPM と NO₂ は必ずしも同一傾向にならない。ここで行ったアンケート用紙は B 4 版 1 枚に ATS-DLD 標準質問表を簡略化した。呼吸器症状質問項目は、せき、持続性せき、たん、持続性たん、喘鳴、慢性の喘鳴、息切れ、喘息であり、他の質問項目は、7 疾患の既往歴 (肺炎、アレルギー性鼻炎、肺気腫、気管支拡張症、慢性気管支炎、心疾患、高血圧)、喫煙習慣、家の形態、職業の有無、幹線道路近接の有無、粉塵工場近接の有無、居住歴、さらに年齢層 (20 歳代まで、30 歳代、40 歳代、50 歳代、60 歳代以上) である。解析の対象要因としては SPM と NO₂ および喫煙習慣と年齢層を重視し、解析手法はロジスティック回帰分析を利用した。この際、SPM と NO₂ については年平均値を用い、喫煙習慣については非喫煙、既喫煙、喫煙の 0、1、2 に、年齢層については 1 ~ 4 のカテゴリカルデータとした。

2) 疫学的研究の課題、方向性、方法論

初年度と前年度の報告で健康指標や濃度設定などに課題が残されていることを述べた。ここでは 3 年間のまとめの意味もあり、今後我が国で大気中の PM 特に微小粒子による健康影響に関する疫学的研究を行うに際しての現状の課題や方向性及び疫学調査の具体的な方法例について検討した。微小粒子としては現在 PM₂ (2 μm 以下の粒子で 100%または 50%カット) と PM_{2.5} (2.5 μm 以下の粒子で 50%カット) であり、我が国でもこれにならっているので、米国の基準測定は PM_{2.5} を主とした。また、方法論として、解析の技術論的な視点 (解析の信頼性に影響する要因) と測定論的な視点 (測定値の信頼性に影響する要因) でも併せて検討した。

3) 文献の整理検討

文献を整理し、検討することは重要であるが、得られる情報価値は文献によって一様でなく、大量の文献があるとき、これを整理する労力、時間を考えると容易でない。そこで、文献内容の把握と評価に役立つ表の作成のために、項目を大項目と小項目に分けた。大項目は分野の分類で疫学、総説、方法論、モニタリング、生理学実験とし、小項目は大項目により異なるが、健康指標、粒子状物質の濃度範囲、対象者、調査期間、調査地域、調査条件、結果の概要などとした。さらに、文献の研究目的、結果が容易に理解できるように、概要を掲載した文献の一覧表も別に掲載した。この結果に関しては報告書に詳述する。

4. 平成 11 年度の研究成果

1) 家庭婦人を対象とした呼吸器症状に関するアンケート調査

前述のように、対象地域を小さく限定したところ、6 地域の協力姿勢にはかなりの温度差があり、そのため回収率が大きくばらついた (最高は文京の 78%、最低は板橋の 33%)。全調査数は 855 名 (回収率約 48%) で、回答数の年齢分布は、20 歳代まで、30 歳代、40 歳代、50 歳代、60 歳代以上がそれぞれ 26 (3.0%)、72 (8.4%)、150 (17.5%)、225 (26.3%)、379 (44.3%) と若年層ほど回答数が少なかった。うち居住歴 1 年未満は 28 名で、解析から削除した。また、20 歳代までは 8 症状中 5 症状で他の年齢層よりも有症率が高く、解答協力者に偏りのある恐れがあるため解析から削除し、解析に利用した調査数は 804 名であった。

各症状の全体の有症率は、せき 16.4%、持続性せき 4.3%、たん 14.3%、持続性たん 5.0%、喘鳴 6.3%、慢性の喘鳴 5.5%、息切れ 16.0%、喘息 6.7% であった。また、就業率 41.9%、喫煙率 14.0%、幹線道路近接率 52.5%、粉塵工場近接率 2.1% で、粉塵工場近接の有無については解析に適しなかった。また、解答協力者の約 78% が一戸建て居住者であった。さらに、多くの症状や既往症について有症率の年齢や喫煙の依存性が認められたが、就業者が有症率を増加させる症状は特に見当たらなかった。幹線道路の近接は、

喘息についてのカイ 2 乗検定では 5 %未満で有意に増加した。

次に、各症状について	症状	要因	推定値	標準誤差	t値	Odd比	95%信頼区間
SPM、NO ₂ 、喫煙習慣、年齢層を要因としたロジスティック回帰分析の結果から、SPM と NO ₂ について右表に示した。	せき	SPM	0.419	0.111	1.773 ***	1.52	1.22 1.90
		NO2	-0.159	0.118	-1.349	0.85	0.67 1.08
	持続性せき	SPM	0.047	0.198	0.283	1.05	0.71 1.56
		NO2	-0.071	0.210	-0.339	0.93	0.61 1.42
	たん	SPM	0.319	0.120	2.655 **	1.38	1.08 1.75
		NO2	-0.001	0.128	-0.009	1.00	0.77 1.29
	持続性たん	SPM	0.137	0.183	0.750	1.15	0.80 1.66
		NO2	0.116	0.197	0.588	1.12	0.76 1.67
	喘鳴	SPM	0.652	0.178	3.664 ***	1.92	1.34 2.74
		NO2	-0.033	0.186	-0.177	0.97	0.67 1.40
SPM は 5 症状（せき、たん、喘鳴、慢性の喘鳴、喘息）と有意の関連性がみられたが、NO ₂ は息切れのみ t 値が SPM よりも大であったが、いずれの症状とも有意の関連性はみとめられなかった。	慢性喘鳴	SPM	0.713	0.192	3.716 ***	2.04	1.39 3.00
		NO2	0.010	0.201	0.048	1.01	0.67 1.51
	息切れ	SPM	0.061	0.112	0.542	1.06	0.85 1.33
		NO2	0.170	0.119	1.438	1.19	0.94 1.50
	喘息	SPM	0.278	0.141	1.988 *	1.32	1.00 1.75
		NO2	0.243	0.180	1.351	1.28	0.89 1.83

***: p<0.001, **: p<0.01, *: p<0.05

なお、ほとんどの症状で最高有症率は板橋、最低有症率は青梅であった。

同様の解析は 7 種の既往症についても行ったが、SPM、NO₂ と有意の関連性はみられず、むしろ年齢や喫煙との関連が密接であった。

2) 疫学的研究の課題、方向性、方法論

a. 疫学的研究の現状の課題

第 1 に、微小粒子（主に PM2.5）の測定法に関して、わが国においては PM2.5 の測定法自体はいまだに確立されていない（PM の測定値の信頼性に関しては後述する）。疫学研究における曝露評価という観点から見た PM2.5 測定法（すなわち地域、対象、測定原理や機器種類）を確立し、かつデータを蓄積する必要がある。また、PM2.5 に焦点を絞って検討を進めるべきか、SPM のような他のカットポイントを利用した検討を進めるべきか検討する必要がある。

第 2 に、汚染地域の考え方として、諸外国で行われている研究は、主に年ごとのようにある程度広域の地域汚染に関する研究である。健康影響指標として何かを考えるかにも関わるが、近年 PM2.5 の影響として重要視されている死亡データなどは、データ源の点から考えると局地汚染というよりも地域汚染の影響を考える際に意味あるものである。汚染問題の考え方について検討・整理を行わないと、調査方法論などが不明確なものになる危険性がある。

b. 研究の方向性

第 1 に、大気汚染の面からは、既存 SPM 測定データの活用に関して、PM による健康影響が多方面から指摘されているので、PM2.5 測定法の確立を待ちながら、既存の SPM データを利用しながら粒子状物質による健康影響を検討していくことが現実的であろう。

第 2 に、健康影響の面からは、急性影響と慢性影響に分けて考える必要があり、急性影響調査に関しては、近年の PM 研究の流れから、日別死亡者数などを調べる調査が急務であろう。その際は、少なくともすでに行われているレベルの統計解析を行い、その上でわが国独自の検討を加えるようにする必要がある。

また、慢性影響に関しては、従来わが国の大気汚染による健康影響調査は断面調査によるものが多かったが、今後は時間軸に沿った検討が重要視されるであろう。

c. 具体的調査方法例

以下に実現可能性があり、上記検討会で触れられていない後向き研究の調査方法例を挙げる。

汚染レベルの異なる数地域で、同じ職業（たとえば地方公務員）の人のさかのぼった追跡（エンドポイントとして死亡および何らかの疾病発生の両方のが可能）

人間ドックや健康診断を継続して受けている人の肺機能値（他の指標も考慮可）について、ベースライン値とその後の変化を汚染レベルと併せた検討

喘息患者（小児、成人ともに）の REF 値の変化

なお、いずれの例においても PM_{2.5} の直接的健康影響研究とはならないが、既存データを利用することで、関係機関の全面的な協力が得られれば、多汚染物質をも考慮に入れた粒子状物質健康影響を検討できる。

3) 疫学的研究の解析技術論的方法論

PM の健康影響を統計学的に検出する際に、解析技術論的視点からみると、PM の健康影響を有意に検出するには統計学的検出力を上げること、言い換えれば SN 比（signal/noise）が大きいほど可能性が高くなる。すなわち、SN 比を大きくする条件とは、健康指標データ間の領域を広くすること、PM データ間の領域を広くすることであり、noise を小さくする条件とは、調査人数を大きくする、時間的または地理的集団のデータ数を増やす、集団間の調査人数の差を小さくする、当該健康指標値に影響を及ぼす PM 以外のできるだけ多くの要因データを利用する、その健康指標値に影響を及ぼす要因が集団内で均一になるようにし、均一にならないときは補正する、PM 濃度で代表される地域を小さくする、データの精度を上げる、指標の性質に合った統計モデルを使用する、などである。このように、noise を小さくする条件のほうが多種になるが、留意すべき事項である。

4) 疫学的研究の測定論的方法論

PM 濃度を与える測定方法について測定論的方法論から見てみよう。我が国において SPM は、全国の 1776 箇所（平成 9 年度）の大気汚染常時監視測定局において測定されている。SPM 自動計測器には β 線吸収法、光錯乱法及び圧電天秤法の 3 種類の測定原理のものが公定法として採用され、β 線吸収法のものが多く用いられている。しかし、β 線吸収法自動計測器の測定精度の JIS の規定では $\pm 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、PM_{2.5} の環境基準濃度からみて測定感度について検討する必要がある。さらに、測定値の誤差要因として流量とろ紙の問題がある。以下に留意点を述べるが、これらが正しく取り扱わなければ濃度の信頼性は得られない。

a. 流量測定

試料大気のサンプリング流量が変動すると測定精度に大きな影響をもたらすことから、従来のフロート型面積流量計（フロートメーター）に加え、質量流量計（マスフローメーター）等のような電気的な流量制御装置が併用されている。しかし、質量流量計も誤差要因として、試料大気中の水分によって測定流量が影響されることから絶対的な流量計ではない。そこで、少しでもサンプリング流量の測定精度を増すために、除湿機を流量ラインに装着し、湿度影響による流量変動を低減させるなど対策も必要である。また、測定時の流量変動はフローコントローラーによって測定流量が安定化されるが、フローメーターも質量流量計も定期的な流量校正が必要であり、その流量校正の有無が測定精度に大きな影響を与えている。さらに標準測定法である重量法において SPM 濃度を測定する場合、低濃度においての SPM 捕集用フィルターの選定とその秤量は測定精度に非常に影響することから国際的な整合性を踏まえた基準的な方法について

検討する必要がある。

b. ろ紙の選定、秤量、保存

一般にろ紙の基本的な捕集原理として、慣性衝突効果、さえぎり効果、拡散効果、重力効果(沈降)効果、静電効果の5種類がある。粒子状物質の捕集効果は、粒径が $0.2\mu\text{m}$ 前後の微小粒子では拡散作用が、約 $2\mu\text{m}$ 以上の粗大粒子では慣性衝突効果、さえぎり効果及び重力効果が有効になる。また、粒径が約 $0.1\mu\text{m}$ 以下の微小粒子では拡散効果が、 $0.1\sim 0.5\mu\text{m}$ の粒径範囲では拡散効果とさえぎり効果が、 $0.5\mu\text{m}$ 以上では慣性衝突効果とさえぎり効果が有効に働くことが知られている。測定対象とする物質の性質及び分析方法によってろ紙の選定が異なる。

秤量には、測定前と測定後の捕集ろ紙を恒温恒湿の天秤室等に一昼夜放置した後、測定感度が 0.1mg 以上の直示天秤を用いて秤量する。ろ紙は破損しやすいのでろ紙の取り扱いと秤量操作には十分注意し、秤精度を上げるために同じ試料について2回以上の秤量し、それらの秤量値がほぼ一致することを確認する必要がある。そのためには秤量にあたる場所の温度湿度が一定に制御され、振動にも配慮された天秤室であることが測定精度を向上させるために重要である。

試料採取したろ紙は直ちに秤量し分析することが理想であるが、実際には数多くの試料をまとめて処理することが合理的であり、ろ紙の材質と分析目的に応じて保存しなければならない。

例えば、重金属成分は室内汚染を避けるためにビニール袋等に入れ、常温保存でも構わない。陰イオンや有機質の成分は、常温では揮発および変質を招きやすい物資があるため、冷蔵あるいは冷凍保存の必要がある。また、ベンゾ(a)ピレンのように常温、室内光下で明かに濃度減少する物質もあるため、多種類の成分を分析する目的で得られた試料は冷凍遮光下で保存するのが望ましい。このように、測定目的に応じた保存時間や保存方法について十分に検討する必要がある。

5. 考察

家庭婦人を対象とした呼吸器症状に関するアンケート調査から興味深い調査結果が得られた。従来の我が国の大気汚染による健康影響に関する疫学調査で、 NO_2 による健康影響を認めた報告は数多いが、SPMの健康影響を認めた報告は少ない。一方、動物実験などではガスよりも粒子の影響の強いことが多く報告されている。今回の調査結果は、 NO_2 よりもむしろSPMの方が呼吸器症状有症率と強く関連し、健康影響のあることを示唆した。今回の調査の特徴は、調査地区の選び方が NO_2 濃度が3段階でSPM濃度が異なる各2地区であることと、従来の疫学調査が測定地点から 1km 以上の距離まで認める研究が多いのに対し、この調査では 200m 程度と距離が小さいことである。また、局地汚染としての沿道住民への調査で距離がさらに小さい場合の報告があるが、対象住民のかなりの割合が集合住宅居住者であるのに対し、この調査は約78%が一戸建て居住者であった。集合住宅では居住階による有症率への関与が示唆されており、この調査ではそのような影響は小さいと推察される。ただし、この調査での最も大きな問題点は調査数の少なさであった。調査数は板橋で100名、最大の文京でも233名の6地区で、有症率の偶然変動の影響は軽視できない。上記の解析技術論で述べたように、SN比が大きいとは言えない。従来の疫学調査で NO_2 と関連が認めれた持続性せき、持続性たん、息切れなどの有症率は、ここでは有意の関連が認められなかった。また、回収率の地区による相違が解析にどのような影響を及ぼしたか明確でない。これも解析技術論から好ましくないことであった。ただし、調査数を大きくするために測定地点からの範囲をも広くすると、地点濃度の代表性が低くなるので、実際には回収率を上げる努力をするとともに両者のバランスを取らざるを得ないであろう。

PM 疫学の問題点の一つは欧米報告との比較である。我が国では大都市の PM 発生源は主として移動発生源の自動車であるが、欧米報告の多くは火力発電プラントなど固定発生源で、当然成分が異なる。また、医療水準などの違いから上記の解析技術論での signal も異なることが推察される。したがって、影響の程度も異なることが予想されるが、それでも比較できる調査は必要であろう。

さらに、上述の測定論的問題以上に大きな問題点として、PM 濃度とは何かが現在も明確でないことである。特に PM_{2.5} においては測定法自体が確立せず、また、重量測定だけで良いのか明らかでない。健康影響から環境基準を考えるためには PM 測定法の確立がまず急務である。

6．今後の課題

本研究は大気中の PM 特に微小粒子に健康影響に関する今後の疫学的研究の進展に資することを目的としたので、その意味では現段階での目的をほぼ達成したと考えている。しかしながら、この疫学的研究においては、最終的には PM 濃度と健康影響との量反応関係を明らかにすることであり、そのためには、上述したような PM 測定法の確立が必須条件であり、量的確定が急務と言える。さらに、我が国との PM 発生源の違いはあれ、欧米での報告の多い死亡率などの指標との関連についても比較するための調査、解析は必要で、今後の課題である。また、健康影響調査においても、本研究が行った調査は調査数が少なく、パイロット調査的な性格を有するので、十分な調査数を確保した PM に関する健康影響調査が今後望まれる。加えて、直接疫学的研究では困難であるが、PM 曝露によりヒトに健康障害が発現するメカニズムが不明である。PM 中の原因物質、形状などがより特定されれば、疫学的研究のさらなる進展に有用になるので、この特定も今後の課題と言えよう。さらに言及すると、PM による健康影響を追及するためには、PM の構成要素の特定が望ましい。その第 1 は微小粒子のような粒子サイズの特定で、第 2 として、PM 濃度の構成要素（炭素、硫黄イオン、気象要素など）との合成指標の開発も今後期待される。

なお、本研究では大気中の PM に限定した。しかし、PM は室内空気中でも存在し、また発生源があり、その成分構成は野外大気と異なると考えられる。したがって、室内の PM 曝露についても考慮する必要があるが、室内発生による粒子状物質の性状と濃度、さらにその健康影響については現在のところ明らかでなく、今後に残されている。

7．社会的貢献

PM の健康影響の検討方法として粒子の性状、変動の特徴、健康指標、調査方法のように個々の要素について分析した本研究のアプローチは、複雑な要素の絡み合った疫学的研究に適しており、今後の微小粒子の健康影響に関する疫学的研究に役立つものと思われる。本研究では我が国で明確でなかった PM の健康影響を欠席率、呼吸器症状有症率を用いて示唆した。この健康影響の検出には、従来の一般的な解析手法に誤差を小さくする工夫が必要であることを示した。また、本研究は文献からの知見を重視して文献を項目で整理するとともに、解明するために考慮すべき調査や解析の条件を検討した。数多くの文献を調査することは必要と認識されながらも、手間のかかることであり、容易でない。したがって、ここで得られた知見は、今後粒子状物質の健康影響に関する疫学調査を本格的に行う際の調査デザインや解析のための有効な参考資料となる。なお、調査デザインを十分に検討することは、粒子状物質の健康影響を検討する上でまず最初に行うべき事項であり、重要である。

8．3 年間のまとめ

PM の健康影響に関して、平成 9 年度には、まず PM の性状、健康影響を表現する指標、健康影響を及ぼす機序、現在の測定手法についての知見を整理した。健康指標については、PM の健康影響は NO_2 などと同様に非特異的で、特定の疾患に限定し難いので、健康指標については、健康指標の性質を知悉する必要があることが確認された。横断的研究においては、PM₁₀ や PM_{2.5} と密接に変動する要因 (NO_2 など) がある場合、多変量解析を利用しても多重共線性により両者の寄与を分離することは困難になるので、調査地域の選定方法を検討したところ、 NO_2 に差がなく、PM₁₀ 濃度差が明確な NO_2 濃度群別の 3 組のペアが得られた。PM₁₀ に対する PM_{2.5} の割合は、幹線道路周辺では後背地点よりも沿道地点、郊外よりも都市部が高く、降雨の多い夏季よりも少ない冬季の方が高い傾向が認められた。また、 NO_2 と PM₁₀ は、都市部の高汚染地域では密接で、夏季よりも冬季に関連が強い。時系列データでは気象要素をも関与すると推察された。次に、米国を中心に統計モデルによる解析方法が提案され、その特徴をまとめた。さらに、SPM 高濃度地点の測定局近傍にある小学校学童の急性影響としての欠席率調査から SPM は NO_2 よりも寄与し、曜日も影響することが推察された。

平成 10 年度には、第 1 に、PM に関する実験的成果が疫学調査などに活用された報告を検討し、発がん寄与率を評価する方法に将来利用できると推察された。第 2 に、健康指標について、選定された 6 地域において近年急増している喘息認定患者率で解析したが、この指標は健康影響指標として適さなかった。また、PM の健康影響が日本の疫学調査で認められず、米国などで認められた理由について、現状では死亡率や罹患率などの健康指標が日本よりも米国のほうが高いことが健康影響の検出のしやすさに影響すると推察された。第 3 に、PM の地域代表性を交差点周辺の濃度分布を推定し、検討した。夏季と冬季の交差点周辺の推定 PM₁₀ 濃度の両 50m 地点での減衰率は夏季が 75.9 ~ 64.9%、冬季が 78.6 ~ 54.4% で、夏季は沿道の東西間で差が大きく、冬季は沿道の南北間で差が大きいと推察された。また、後背地点と沿道地点の PM₁₀ 濃度変動は密接に関連するが、後背 / 沿道の回帰係数は冬季より夏季の方が高かった。第 4 に、統計モデルの紹介とその効果について検討した。最適な統計モデルは疫学調査の内容に依存するので、一律的な表現はできないが、解析誤差を小さくする意味で検討すべきであることが推察された。第 5 に、複合物質である PM の組成物質による健康影響を考慮して地域により組成物質パターンに共通性があるか検討した。その結果、発生源が異なる用途地域間だけでなく、類似用と地域間でも物質によっては粒子状物質の組成比が異なり、季節によっても組成比が変化して、簡便な地域区分は適切でないことが示唆された。

まとめの年度である平成 11 年度には、疫学調査として平成 9 年度の成果で得られた大気汚染一般測定局の近傍に限定した範囲の 6 地域で、家庭婦人の呼吸器症状アンケート調査を行った。年齢、喫煙習慣、SPM、 NO_2 を変数としたロジスティック回帰分析で、 NO_2 はいずれの症状有症率とも有意に関連しなかったが、SPM はせき、たん、喘鳴、慢性の喘鳴、喘息と有意に関連し、 NO_2 よりも有症率との関連が密接であることを示唆した。この結果からも、今後粒子状物質の健康影響に関する疫学的研究を行う際に調査条件やデータ精度の重要性が重要であると考えられた。また、推奨される疫学調査方法の調査デザインについて、解析手法においては前年度に概ね報告したが、調査条件、健康指標、濃度においてはいずれもデータ精度が重要であること、統計モデルの工夫が必要であることが再確認された。その一方、微小粒子測定手法の確立も今後の急務の課題であることを確認した。なお、本研究では文献を重視し、3 年間に亘り、粒子状物質に関する文献を活用しやすいよう項目別に分類し、概説して粒子状物質の健康影響に関する研究報告のまとめを作成した。

-3-(2)大気中粒子状物質の呼吸器系に及ぼす影響に関する文献的、実験的研究

1 研究従事者（○印は研究リーダー）

- | | |
|-----------------------|-------------------|
| ○滝沢 始（東京大学医学部附属病院検査部） | 河崎 伸（東京大学医学部物療内科） |
| 阿部信二（日本医科大学第四内科） | 橋本 修（日本大学医学部第一内科） |
| 菅原 勇（結核研究所分子病理） | 権 寧博（日本大学医学部第一内科） |
| 高橋卓夫（日本医科大学第四内科） | 吾妻安良太（日本医科大学第四内科） |
| 工藤翔二（日本医科大学第四内科） | |

2 平成 11 年度の研究目的

大気中粒子状物質、とくに DEP は近年呼吸器系への健康障害との関連で注目されている。従来、動物実験による報告はみられたものの、細胞レベルでの詳細な検討は少なかった。そこで、DEP の呼吸器系への影響をあきらかにする目的で、その実験的知見の現状を文献的に整理するとともに、ヒト気道上皮細胞を主な標的細胞として、気道炎症への影響に力点を置き、DEP による細胞生物学的影響すなわち、細胞障害性、サイトカイン遊離への影響さらに酸化ストレスに対するこれらの細胞の防御系への作用を検討する。この際、従来からの DEP のけん濁液を添加する方法に加え、新たに確立した暴露システムにて、より生体に近い条件を設定すること、および遺伝子発現への作用を分子生物学的手法で解明しようとする点が本研究の特色である。

3 平成 11 年度の研究の対象及び方法

1) ヒト気道上皮細胞はヒト気道上皮細胞の細胞株（BEAS-2B、NCI-H292、BET-1A）、および手術で得られる正常気管支や気管支鏡下生検体から分離後、純化培養を行う。この際、生体での気道粘膜の状態になるべく近づけるために、一部の実験では上層を気相、下層を液相とした（二相性培養法）状態で用いる。細胞培養液はこの目的に適した無血清培養液（ホルモン・成長因子を添加）である。

2) DEP 暴露システム：

a) 従来法：気相側から様々な濃度に調整した DEP けん濁液を添加し、その細胞障害性とサイトカイン産生への影響を検討する。

b) 新システム：初年度に確立した新しい DEP 暴露システムによる検討をさらに前進させる。すなわち、ディーゼルエンジンを運転したときに発生する排気を希釈トンネル内で清浄気と混合、冷却し、一部を培養器内に導き、培養細胞の気相側から刺激した。排気中の粒子濃度、SO_x、NO_x、CO 濃度をモニターし、また排気中のエンドトキシンや pH も測定しつつ実験を進めた。今年度は排気中の粒子濃度を、希釈トンネル内だけでなく、培養器内のレベルでも測定した。

3) 気道炎症に関連の深いサイトカイン遺伝子発現への影響：初年度、2 年度の成果をふまえ、さらに検討を進めた。すなわち、

a) 従来法では、好中球や好酸球の局所浸潤において影響な作用を持つ接着分子の一つである intercellular adhesion molecule(ICAM)-1 の遺伝子およびタンパクの細胞表面での発現への影響を、タンパクレベルと遺伝子発現レベルで調べる。

b) 同じく従来法において、DEP の有機化合物の生物活性を調べる目的で以下の検討を行った。DEP は多種の有機化合物が炭素粒子表面に付着しており、これらが DEP が示す生物活性の少なくとも一部を担って

いる可能性がある。そこで、各種有機溶媒により DEP から抽出を行い、各分画を上皮細胞に添加して、その IL-8 およびその遺伝子発現に重要な役割を持つ転写因子の一つ NF κ B への影響を検討した。

c) 一方、新システムでは、前年度に発見した DEP によるアポトーシス誘導に関してより詳細に検討した。すなわち、アポトーシスに関連の深いカスパーゼ群、Bax タンパク群の遺伝子発現につき、RT-PCR 法で検討した。

4) マウスでの DE 暴露：

純系マウスを用いて、新システムを応用し、反復吸入を行い、これらの群と非暴露群とで結核菌に感染させて、肺における炎症反応を比較した。

4 平成 11 年度の研究成果

1) 従来法において、DEP は、ヒト気道上皮細胞の炭層細胞培養系において、IL-8 や GM-CSF といった炎症性サイトカインへの産生増強作用に加え、気道炎症に関連の深い接着分子の一つである ICAM-1 においても、DEP の非毒性濃度において明らかな遺伝子発現増強作用が認められた。さらに、フローサイトメトリ法により細胞表面に ICAM-1 分子が発現していること、培養液中に遊離される可溶性の ICAM-1 分子も増加していることを見いだした。抗オキシダントである N-acetylcysteine、PDTC や mitogen-activated protein kinase のひとつである p38 MAPkinase の阻害薬で明かに、その効果が激弱した。以上から、気道局所への炎症細胞浸潤に重要な分子である ICAM-1 の増強作用も、DEP 由来のオキシダントが関与している可能性が示された。

2) 同じく従来法において、DEP の有機化合物の生物活性を調べる目的で以下の検討を行った。DEP は多種の有機化合物が炭素粒子表面に付着しており、これらが DEP が示す生物活性の少なくとも一部を担っている可能性がある。初年度の成果で、活性炭やグラファイト単独で気道上皮細胞に添加しても、少なくとも低容量では何の効果もみられなかったことから、粒子表面の付着物質が、活性の鍵を握っていると我々は推定している。そこで、各種有機溶媒により DEP から抽出を行い、各分画を上皮細胞に添加して、その IL-8 およびその遺伝子発現に重要な役割を持つ転写因子の一つ NF κ B への影響を検討した。その結果、ベンゼンで抽出した有機分画においてのみ、再現性をもってかつ IL-8 mRNA、タンパクおよび NF κ B の活性化が証明された。他の抽出分画においても、一部の活性化はみられたものの、ここ 3 つの活性すべてを示すものはなかった。したがって、少なくともヒト気道上皮細胞のサイトカイン発現増強効果においては、ベンゼン分画に含まれる成分が重要であると考えられる。目下、その成分について検討中である。(以上、青森県立保健大学 嵯峨井 勝先生との共同研究)

3) 新しい DEP 暴露系において、細胞暴露装置内での DEP 濃度を実測し、希釈トンネル内の 1/10-1/30 の濃度 (100 μ g/m³ 程度) であることを認めた。細胞はさらに培養ふたで隔てられており、細胞への暴露濃度が、大気環境中の濃度に匹敵するものと推定され、この実験系の有用性を確認できたと思われる。

4) この系で、前年度、ヒト気管支上皮細胞にアポトーシスが誘導されることが認められた。近年、アポトーシスは、気道障害とそれに引き続く再生・修復さらにリモデリングといわれる慢性の気道の組織改変につながる出来事として、各種気道疾患での重要性が認識されている。さらに、これに一致して、アポトーシス関連分子群、すなわちカスパーゼ群や Bax 群の遺伝子増強も確認された。カスパーゼ群ではカスパーゼ 3、8 および 9 が、Fas、Fas Ligand とともに活性化されることが、免疫組織学的手法と RT-PCR 法により確かめられた。また、抗オキシダントの N-acetyl cysteine は DEP によるアポトーシスを有意に抑制した。以上から、DEP およびそれに起因するオキシダントが Fas-Fas Ligand 経路、およびチトクロ-

ムc放出経路を介して、細胞のアポトーシスを惹起するものと類推される。現在、両者の経路のうちどちらが主に重要な、特異的中和抗体を用いた実験で検証中である。

5) DEPのマクロファージへの影響：

DEPが最初に生物学的影響を及ぼしうる細胞として、第二にあげられるのは、肺マクロファージである。昨年度から、マクロファージの細胞株を用いて、主にサイトカインの産生への影響を検討してきたが、今年度は新システムにおいて、より長期の暴露を行った。その結果、6時間までの暴露ではIL-8などのサイトカイン遊離増強を、より長時間の暴露ではむしろ抑制作用を認めた。DEP暴露によるマクロファージのアポトーシス誘導が最近報告されており、この実験系でも長期暴露でアポトーシスが誘導された結果である可能性がある。目下、その点についても検討中である。

6) DE暴露による結核菌感染への影響： 純系マウスを用いて、新システムを応用し、反復吸入を行い、これらの群と非暴露群とで結核菌に感染させて、肺における炎症反応を比較した。その結果、DE暴露群は優位に結核病巣が重症化していた。以上の結果は、DE暴露がなんらかの機序により宿主の感染防御機構を低下せしめることを示唆している。

5 考察

大気中の浮遊粒子状物質、とくに DEP は従来慢性気道疾患への影響が推定されてきたものの十分には解明されておらず、その実際の細胞レベルでの作用も明らかでなかった。近年、DEP が気道の炎症を引き起こし、気管支ぜん息などの慢性気道疾患の発症や増悪に関与する可能性が主として動物実験において報告されている。これら粒子状物質が吸入され気道系に侵入したのち最初に接触するのは気道・肺胞系の粘膜上皮である。この細胞は気道および肺胞領域において、外界からの刺激に対して反応し、サイトカインや脂質メディエーターを遊離することにより肺の炎症・免疫応答に重要な役割を演じている。

DEP は、ヒト気道上皮細胞の単層細胞培養系において、IL-8、IL-6 や GM-CSF、さらにエオタキシンといった炎症性サイトカインやケモカインの遊離と遺伝子発現を、非毒性濃度で刺激増強することが認められた。また ICAM-1 などの炎症の発症に重要な他の分子群をも誘導することが分かった。この点につき、さらに遺伝子工学的手法で検討したところ、これら分子群に共通して重要な転写調節因子の NF- κ B が DEP により活性化されていることを、初めて明らかにした。さらに抗オキシダントを作用する N-acetylcysteine や PDTC によって明らかに阻害されたことより、DEP は、何らかの機転で、オキシダントを増加させて細胞内の PKC-NF- κ B 系を活性化することで、サイトカインの転写レベルを増大させている可能性が示唆された。また、ストレス応答性キナーゼのひとつとして、サイトカイン産生に重要な役割を演じるとされる p38MAPK も活性化されることがわかった。今後、さらに、詳細な細胞内シグナルを検討したい。DEP は多種の有機化合物が炭素粒子表面に付着しており、これらが DEP が示す生物活性の少なくとも一部を担っている可能性がある。その結果、ベンゼン分画に含まれる成分が DEP の生物活性に重要であると考えられる。新システムでは、ディーゼルエンジンからの排気中の粒子 (DEP) 濃度を細胞暴露容器のレベルで測定し得、実際の大気汚染レベルとほぼ匹敵するものであることを明らかにした。この条件で気道炎症とそのリモデリングに重要なアポトーシス現象を明らかにすることもできた。

6 今後の課題

この3年間の研究により、DEP がヒト気道上皮細胞に作用して、炎症性サイトカインやケモカインの発現誘導をもたらすこととその分子機構の一部が解明された。また、新システムでの暴露条件が現実的なも

のであることが確かめられ、以上の結果をヒトに外挿する上での有力な足がかりとなったと思われる。今後は、サイトカイン誘導能、アポトーシス誘導能、抗酸化物質誘導能に関連する細胞内シグナル伝達経路をより詳細に、かつそれぞれに共通する経路と相違する経路を明らかにしたいと考える。また、動物（マウス）を用いた研究は、時間的制約もあり十分でなかったもので、以上明らかにした試験官内で知見を動物実験でも検証してゆきたい。とくに、DE 暴露群と非暴露群とで比較したい、DE 暴露群は有意に結核病巣が重症化していたことは、DE 暴露が何らな機序により宿主の感染防御機構を低下せしめることを示唆しており、今後さらに詳細に検討する必要がある。

7 社会的貢献

我が国を含む先進諸国において気管支喘息やアレルギー性鼻炎などの呼吸器疾患が増加しており、その原因が多方面で追求されている。大気汚染は中でも最も重視されているもののひとつであり、各種の汚染物質の規制にもかかわらず、これら疾患はむしろ急増している。大気中の浮遊粒子状物質、とくにディーゼルエンジンから排出されるディーゼル由来粒子状物質（diesel exhaust particled, DEP）は従来生体に与える影響が十分には解明されておらず、その呼吸器疾患への関与も明らかでなかった。われわれは、これら粒子状物質が吸入され気道系に侵入したのち最初に接触する気道・肺胞系の粘膜上皮に着目し、それに及ぼす DEP の作用をふたつの異なる系にて検討している。本研究により大気中の粒子状物質、とくに DEP が気道系の炎症反応を増強する作用について、分子レベルで解明されてきたといえよう。これら大気汚染物質の呼吸器系への健康被害のリスク評価を行う上で貴重な実験的データとなることと思われる。より効果的な予防や治療薬の開発にも多大な貢献が予想される。宿主が本来もつ気道系の防御機構に対して、DE は抑制的に作用する可能性があり、大気汚染と感染免疫防御との関わりあいで、注目される。

8 3年間のまとめ

従来、動物実験やヒトボランティアによって示されてきた DEP の気道炎症への影響を、DEP の重要な標的細胞である気道上皮細胞への活性としてまずとらえ、IL-8 などの炎症性サイトカイン、TGF β などの成長因子、および ICAM-1 などの接着分子などの遺伝子発現増強作用としてとらえられることができた。これらはいずれも気道炎症に必須の細胞浸潤や活性化、粘膜障害と修復、リモデリングなどに重要な役割をはたしている分子群であり、DEP の活性の主体をしめるものと思われる。また、それらの細胞内過程として、ストレス応答性 MAP キナーゼや NF κ B などの転写因子の活性化が関与することも明かにできた。DEP に起因するオキシダントの重要性や、有機分画ではベンゼン分画が重要であることも、健康被害予防対策の立案に重要な意義を持つと考える。また、上皮細胞のアポトーシス誘導や、マウスでの感染防御機構での抑制作用などは、DEP のもつ新しい生物活性である可能性が強く、今後そのメカニズムを検討していく必要がある。新システムは実際の大気環境汚染に類似の条件下で細胞暴露ができる点で、従来の方法より優れており、今後の環境政策上も有益な知見を生み出すものと思う。