

- 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（国立公衆衛生院）

【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（国立公衆衛生院労働衛生学部）、荒川はつ子（国立公衆衛生院労働衛生学部）、
村山留美子（国立公衆衛生院労働衛生学部）、酒井 亮二（東京大学医学部）、
川本 俊弘（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）、
北川 恭子（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）、
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 12 年度の研究目的

近年、転居や遠距離通勤など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各個人個人の曝露量を地域（居住地）のみで比較することは無意味であり、より個人に対応した曝露モニタリングが必要になる。そこで最近開発された個人サンプラーや尿、血液等の生体試料中の大気汚染物質やそれらの代謝物を測定し、個人の曝露量を推定することが重要である。以上の目的を達成するため、今年度は3つのグループを設けた。まず、個人サンプラーによる微小粒子に付着した多環芳香族炭化水素（PPAH）の個人曝露量を測定するための予備調査により道路沿道からの汚染物質の減衰状況とその要因を検討した（内山班）。2番目に、尿中 1-hydroxypyrene, 2-hydroxynaphthalene を用いて、大気中粒子状物質への曝露評価を行うために、個人曝露量（今回の研究では粒子状物質および PAH 曝露）とこれらのバイオマーカーとの間に成り立つ関係を把握することを目的として、尿中 1-hydroxypyrene, 2-hydroxynaphthalene の変動について調べた。また、pyrene, naphthalene から、1-hydroxypyrene, 2-hydroxynaphthalene への代謝はこの関係に大きな影響を与えるので、pyrene 代謝に関与している cytochrome P-450 isoform の同定を行った（川本班）。3番目には、呼吸器系疾患の発症が、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ことから、ヒト肺内の元素含量と生活習慣、疾患との関係、大気中浮遊粒子状物質 NO_x、多環芳香族炭化水素濃度の測定、揮発性有機化合物の個人曝露濃度の把握、生体試料を用いるバイオモニタリング手法の検討を行った（嵐谷班）。

3. 平成 12 年度の研究の対象及び方法

(1) (内山班) : 粒径 1 μm 以下の微小粒子に付着した多環芳香族炭化水素(PPAH)の個人サンプラー(PAS2000CE、米国 Ecochem 社製)4台を、主要都道交差点近くの道路から 5、10、20、50mの地点に地上 75cm の高さに設置し、PPAH 濃度の同時測定を行った。測定は平成 12 年 9 月～10 月の平日の 6 日間で、測定時間は朝、夕のラッシュ時間帯を選び、8:30～10:30、16:30～18:30 の各 2 時間行った。測定開始前に、機器による測定値の誤りの補正を行うために測定機 4 台を 30 分間 10m地点で作動させて測定した後、所定の位置に設置した。道路沿道からの距離によって PPAH 濃度が経時的に変化する要因を検討するために、測定時間帯にビデオ撮影による交通量調査、風向、風速の連続測定を行った。交通量はビデオテープを後日再生し、測定時間中の車種ごとの通過台数を計数した。

(2) (川本班) : 尿中 1-hydroxypyrene, 2-hydroxynaphthalene 濃度の経時的変化についてボランティアを対象

に調査するとともに、同時に活動状況（戸外、室内）や食事、受動喫煙などの曝露因子の影響についても検討した。また、ヒト cytochrome P-450 isoform を発現させたリンバ球様細胞株のマイクロゾームを用いて、pyrene から 1-hydroxypyrene への代謝を調べた。マイクロゾームを NADPH 産生系存在下で、CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 をそれぞれ発現しているリンバ球様細胞株のマイクロゾームと pyrene をインキュベーションした。一定時間後、反応液にアセトニトリルを添加し、HPLC にて 1-hydroxypyrene の測定を行った。高濃度（5 μM ）と低濃度（50 nM）における pyrene 代謝を調べ、cytochrome P-450 isoform のそれぞれの濃度における代謝活性を測定した。

（３）（嵐谷班）： 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（86 例）の非病変部を細く刻み充分乾燥後、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にて各元素の測定を行った。浮遊粒子状物質の多環芳香族炭化水素濃度及び NO_2 の測定：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、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ー（柴田科学製）を用いて行った。大気浮遊粒子中の多環芳香族炭化水素（PAHs）は超音波抽出-高速液体クロマトグラフィーによって分離・定量した。窒素酸化物濃度は化学発光方式の計測器（大気 窒素酸化物計、GLN-32 型、電気化学計器）を用いて、経時的に濃度推移を計測した。個人曝露濃度測定：

2000 年 11 月、北九州市若松区幹線道路（199 号線）の 18 人のボランティアによる NO_2 と揮発性有機化合物（VOCs）の個人曝露濃度を測定した。 NO_2 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。HCHO-ヘモグロビン付加体測定：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 3 回洗浄後、四塩化炭素で debris の除去を行った。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）を加え、90、15 分間反応された後、冷却し反応を停止させた。遠心分離（20,000g $\times$ 10min）し、上澄中のホルムアルデヒドを高速液体クロマトグラフィーにて分離・定量を行った。

4．平成 12 年度の研究成果

（１）PAS2000ES の 4 台の同一地点での測定値は、ほぼ同じ値が得られたため、機器の違いによる補正は行わなかった。PPAH の濃度は、5 m 地点ではトラック、バスなどのディーゼル車の通過によって大きく変動し、ピーク値の最大で 1,800ng/ m^3 にまで上昇したが、10m 地点では 1,000ng/ m^3 程度であり、50m 地点ではほとんどピーク値は認められず、平坦な値を示した（図 1）。朝、夕 2 時間の PPAH の 6 日間の平均値を図 2 に示した。朝のラッシュ時は道路からの距離によって大きな減衰を示したが、夕方のラッシュ時は、同様傾向であるがそれほど大きな減衰は示さなかった。50m 地点では朝、夕の PPAH 濃度は 50ng/ m^3 程度でほとんど変わらなかった。朝、夕の違いの要因を検討するために車種ごとの交通量を比較すると、バス、タクシー、乗用車の数はほとんど変わらないが、夕方の方が多かったが、PPAH の最も大きな排出源と思われる大型、中型のトラックの交通量は朝は夕方の約 3 倍の交通量であった（図 3）。測定期間中に風速、風向を測定した 3 日間では、特に道路沿道からの距離の減衰にその影響はほとんど認められなかった。

（２）尿中 1-hydroxypyrene, 2-hydroxynaphthalene 濃度はかなりの変動があることがわかった。また、活動状況（戸外、室内）や食事、受動喫煙などの曝露因子がすぐに尿中 1-hydroxypyrene, 2-hydroxynaphthalene 濃度に影響を与えるものではなかった。次に、ヒト cytochrome P-450 isoform による pyrene から 1-hydroxypyrene への代謝を図 4 に示した。Pyrene は retention time 約 40 分のところに認めるが、pyrene を P-450 および NADPH 産生系とともに反応させると、1-hydroxypyrene が retention time 約 14 分のところに現れてくる。この反応は酵素量及び反応時間と 1-hydroxypyrene 産生量との間に直線性を認めた。図 5 は、高濃度（5 μM ）と低濃度（50 nM）の pyrene を基質としたとき、ヒト cytochrome P-450 isoform それぞれの活性を示したものである。Pyrene 5 μM を基質としたときは、CYP1A1 > CYP1B1 > CYP1A2 の順で高い活性が認められ、CYP2A6, CYP2E1, CYP3A4 もわずかでるが、活性を示した。Pyrene 50 nM を基質としたときは CYP1B1 > CYP1A1 > CYP1A2 の順となり、

CYP2A6, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 の活性は検出限界以下であった

(3)

ヒト肺内元素成分

ヒト剖検肺 68 例 (男: 19~81 歳 [48 例] 女: 43~84 歳 [20 例]) の肺内元素成分を測定した。その結果、肺内より 17 種の元素を検出し、16 元素を定量した。乾燥肺 1 g 中の元素の算術平均値は $\text{Ca} > \text{Fe} > \text{Mg} > \text{Sn} > \text{Al} > \text{Cu} > \text{Si} > \text{Ti} > \text{Cd} > \text{Ni} > \text{Cr} > \text{Mn} > \text{V} > \text{Pb} > \text{Mo} > \text{Co}$ であった。元素により測定値の範囲 (最高/最低) はかなり広く、Si が最も大きく、約 1000 倍、Cr、Co、Al が、300~500 倍、Ni、Cd、Sn、Fe、Ca が 40~90 倍、それ以外は 30 倍以下であった。得られた元素濃度レベルは既報とほぼ同程度であった。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 6)。その結果、Cr、Ni、Fe、Al 濃度は鉄鋼関連職場従事者が主婦に比べ高い傾向が認められた。喫煙者 (31 人)、非喫煙者 (34 人) とに分け元素濃度の比較を行った結果、Ni、Sn、Zn、Fe、Cr は喫煙者群で比較的高い濃度レベルであった。なお、タバコ喫煙量 (Brinkman Index) と元素濃度間には、関連が認められなかった。元素相互の関係を求めた結果、約 1/3 で相関が認められ、その一例を

図 7 に示す。また 16 元素と肺内沈着粉じんとの関係は Ti、V、Fe、Al、Mo で相関が認められた。

個人曝露濃度

北九州市若松区の幹線道路で自動車からの NO_2 個人曝露濃度への影響について検討した。この幹線道路の交通量は、平均通行台数 22,601 台 / 12h (平成 10 年) で、道路際から住宅や店が並んでいる。測定は幹線道路沿い (0m)、50m、100m 地点で行った。 NO_2 濃度測定結果を図 8 に示す。若松区では、室外、室内、個人曝露濃度のすべてにおいて、幹線道路際が最も高く、距離減衰はみられなかった。0m、100m 地点での NO_2 濃度は、室外 > 台所 > 個人 > 居間であった。若松区的全サンプルを対象に個人曝露濃度に及ぼす因子について検討し、個人曝露濃度は室外濃度と高い相関が認められた。

若松区の VOCs はベンゼンを含む 13 種を検出し、トルエン、m,p-キシレンが比較的高い濃度レベルであり、室外のそれは、幹線道路からの距離減衰に伴って濃度の減少がみられた。個人曝露濃度については、0m 地点で VOCs 濃度は比較的高い濃度レベルであり、距離減衰に伴う VOCs 濃度の明らかな減少は認められなかった。

浮遊粒子状物質濃度と特性

2000 年 4 月と 11 月に産業医科大学正門横にて、Andersen Sampler によって捕集した浮遊粉塵の粒径分布と濃度の関係を図 9 に示す。両者とも粒径が $1.1 \sim 2.1 \mu\text{m}$ を境に二峰性を示し、他の月でも同様の分布を示した。 $1 \mu\text{m}$ 以下の粒子は移動発生源から発生由来、 $2.1 \sim 7.0 \mu\text{m}$ の粒子は大気中に排出される一次粒子と大気中のガス状物質が反応して生成した二次粒子であると推定できる。なお、 $11 \mu\text{m}$ 以上は土壌由来の粗大粒子である。

2000 年 3 月、10 月に産業医科大学正門横にて Andersen Sampler を用い 8 段に分級捕集した粉塵中の PAHs 濃度粒径との関係を図 10 に示す。粒径が $2.1 \sim 3.3 \mu\text{m}$ 以下の微少粒子の中に 90% 以上が含有されていることが認められた。

1999 年 3 月~2000 年 7 月に産業医科大学正門横にて、Dichotomous Sampler を用いて得られた大気中の浮遊粒子状物質濃度を図 11 に示す。冬期の粉塵濃度は夏期より高く、明らかな季節変動があることが認められた。また、 PM_{10} と $\text{PM}_{2.5}$ の濃度は同様な濃度推移傾向を示し、 PM_{10} 中に占める $\text{PM}_{2.5}$ の割合は 45% から 80% 程度で推移した。3 月から 4 月に $\text{PM}_{2.5}$ の割合は低く 50% 程度で、粗大粒子濃度が高く、この季節に大陸からの黄砂の影響を受けていることが考えられる。

2000 年 10 月に産業医科大学 6 号館 6 階でパーティクルカウンターで粉塵濃度の日間変動を調べた結果を図 12 に示す。 PM_{10} と $\text{PM}_{2.5}$ はほとんど同じ濃度推移で、また、4 段階の分級とも濃度推移は類似し、6~9 時、15~18 時頃にピークがあり、人間の生活活動によく一致していることが認められた。

血液中の HCHO-ヘモグロビン付加体量

作成した血中 HCHO-ヘモグロビン付加体の測定法を用いて、健康な成人男女計 9 人より採取した血液を血漿と

赤血球液とに分離し、血漿中 HCHO 量と赤血球液の中の HCHO-ヘモグロビン付加体量をそれぞれ測定した。赤血球液中から得られた HCHO のクロマトグラムの例を図 13 に示す。約 2 分後に単一で、標準の HCHO に一致したピークが得られた。血漿中及び赤血球液の中 HCHO-ヘモグロビン付加体量を表 1 に示す。血漿中に HCHO は 0.14 ~ 0.46 $\mu\text{g/ml}$ 、ヘモグロビン 1 g 当たりの HCHO は 258 ~ 719 nmol であった。両測定結果で、個人によって 2 倍以上の濃度差が認められた。

5. 考察

(1) 主にディーゼル排気粒子に付着している PPAH 濃度はトラックの走行量に大きく関連して変化するが、都心部では朝 6 時から環状 8 号線以内に乗り入れが許可されるため、朝のラッシュ時の濃度が高い傾向が認められた。また道路沿道から 50m 以上離れれば、PPAH 濃度はほぼ一定であると考えて良い。

(2) 曝露因子を経時的に記述するだけでは正確な粒子状物質 (あるいは pyrene, naphthalene) への曝露量を知るのは難しく、個人サンプラーを用いた曝露量調査が不可欠と考えた。また、pyrene から 1-hydroxypyrene への代謝は組織中では CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 が重要な役割を果たし、特に低濃度では、CYP1B1 の果たす役割が大きいと示唆された。

(3) 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、バイオマーカーの開発などについて検討した。

その結果、ヒト生体内から 16 元素を定量し、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合わせて、ヒト生体内侵入成分濃度、生活習慣などの関係についての知見を得た。NO₂・VOCs の個人曝露濃度の程度、環境影響因子について、特に季節との関連について検討し若干の知見を得た。北九州市での浮遊粒子状物質の粒径特性、濃度分布を 2 年間に渡って計測し、多くの知見を得られつつある。大気中の有害物質の生体内侵入量を評価するための、生体試料 (血液) を用い HCHO-ヘモグロビン付加体の測定方法について検討し、比較的簡易な分析方法を確立した。

6. 今後の課題

PPAH 濃度がディーゼル車からの寄与が大きいこと、道路沿道からの距離による違いがわかったので、PPAH の個人曝露量と生体試料中のバイオマーカーとの関連、呼吸器疾患、循環器疾患の症状の変化との関連を調査することが必要である。また、CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 の pyrene から 1-hydroxypyrene への代謝への Km 値、Vmax 等を求めるとともに、naphthalene 2-hydroxynaphthalene への代謝に関与する cytochrome P-450 isoform についても検討をすすめる。

有害成分の個人曝露濃度、生体内侵入量の評価については今後ヒト剖検肺の例数を増やし、元素、多環芳香族炭化水素以外の化学物質の分析、電子顕微鏡による形態学上の検索、また遺伝子解析などを新しく取り入れて、より詳細な研究が行われる必要がある。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、研究を行い呼吸器系疾患の発症への外因性と内因性の原因の解明をすることが必要である。粒子状物質濃度、挙動については多くの知見が得られているが、今後個人曝露濃度と気中濃度との関連など個人曝露濃度生体内の残存量などの検討、また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を調査することも重要である。HCHO-ヘモグロビン付加体量を求める測定方法を検討したが、今後これを用いてヒト血中のホルムアルデヒド量を求め、生活習慣などの関連を検討する必要がある。

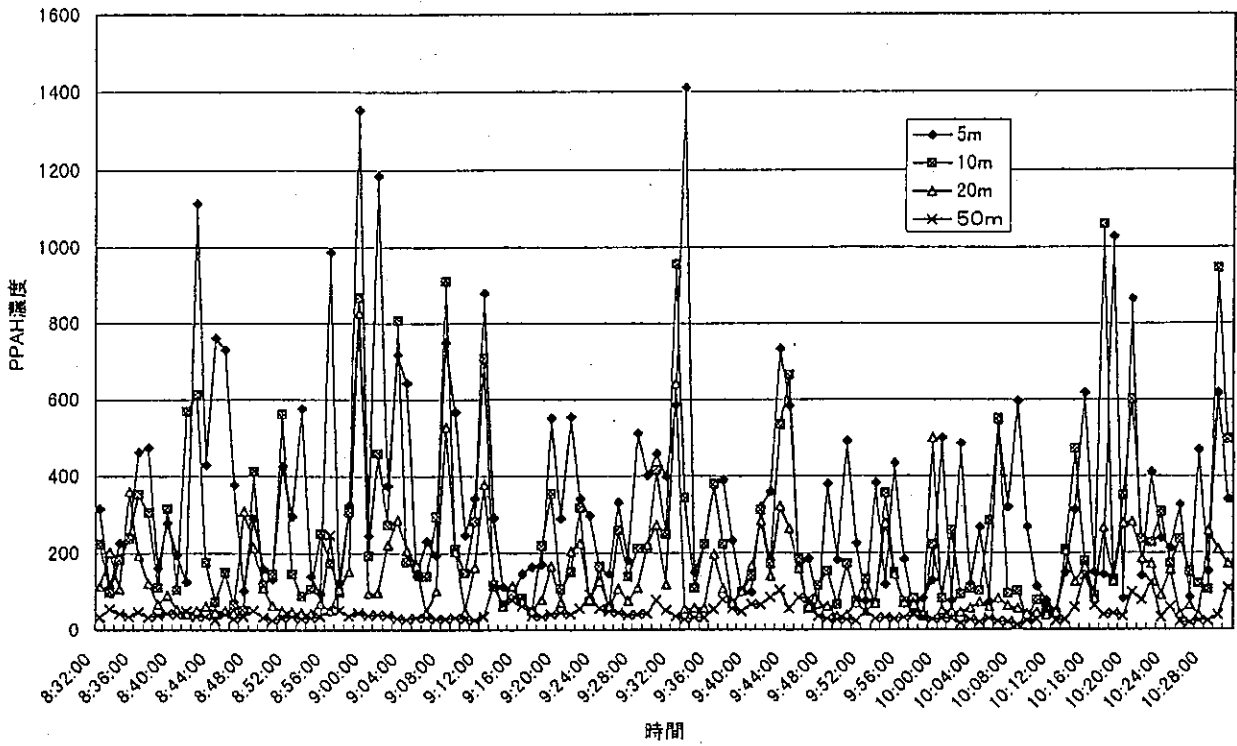
7. 社会的貢献

ディーゼル排気粒子に付着した PPAH の個人曝露量とバイオマーカーの関連各種疾患の症状悪化との関連性が示されれば、より効果的な予防的対策がとれるようになり、その社会的貢献は大きい。また粒子状物質および PAH への曝露の推定が尿中 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、疫学調査の曝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。

また、生体内の汚染物質の種類、量、およびその相互関係などが判明し、これらと生活環境中の汚染物質の曝露量が推計できればその意義は大きい。また NO_2 、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。さらに大気浮遊粒子状物質について調査を実施し、2年に渡って粒子の粒径特性と化学物質濃度との関連、 $\text{PM}_{2.5}$ と PM_{10} 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ている。有害化学物質の生体内取り込み量、また、生体内運命などを求めるため、ホルムアルデヒドのヘモグロビン付加体量の測定法の確立を行ったが、今後多くの検体を用いることによって有益なデータが得られることが期待される。

2000年9月21日午前



2000年9月21日午後

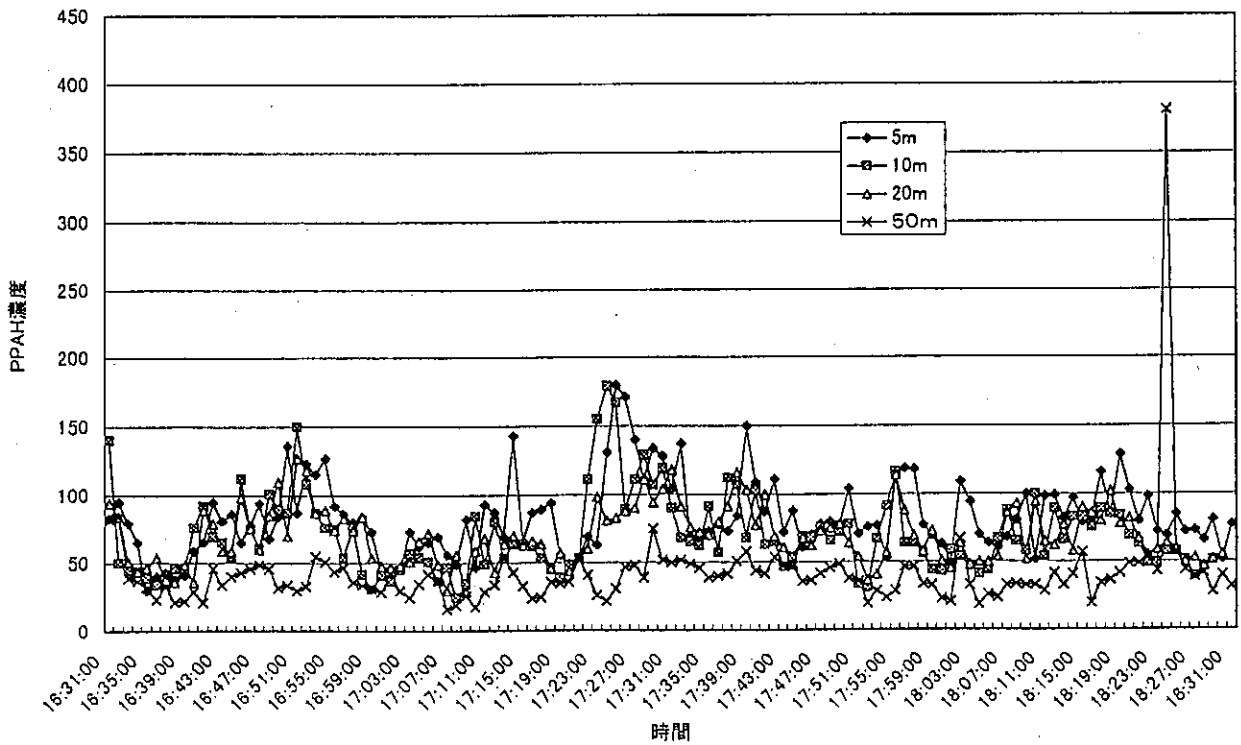


図1 道路沿道からの距離の違いによる PPAH 濃度の経時的変化

2000年9月～10月平日6日間における午前・午後比較

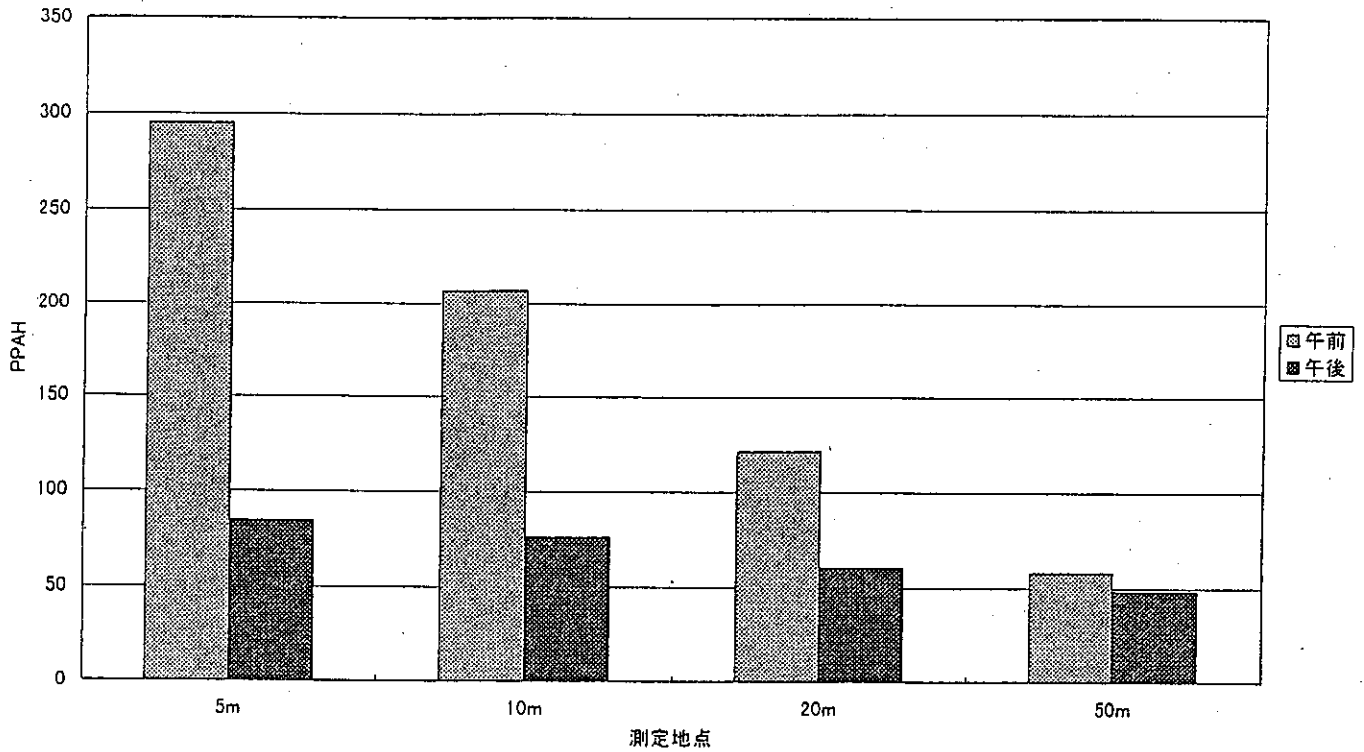


図2 道路沿道からの距離の違いによる PPAH 濃度の平均値 (平日 6 日間)

交通量の比較(10月19日午前・午後)

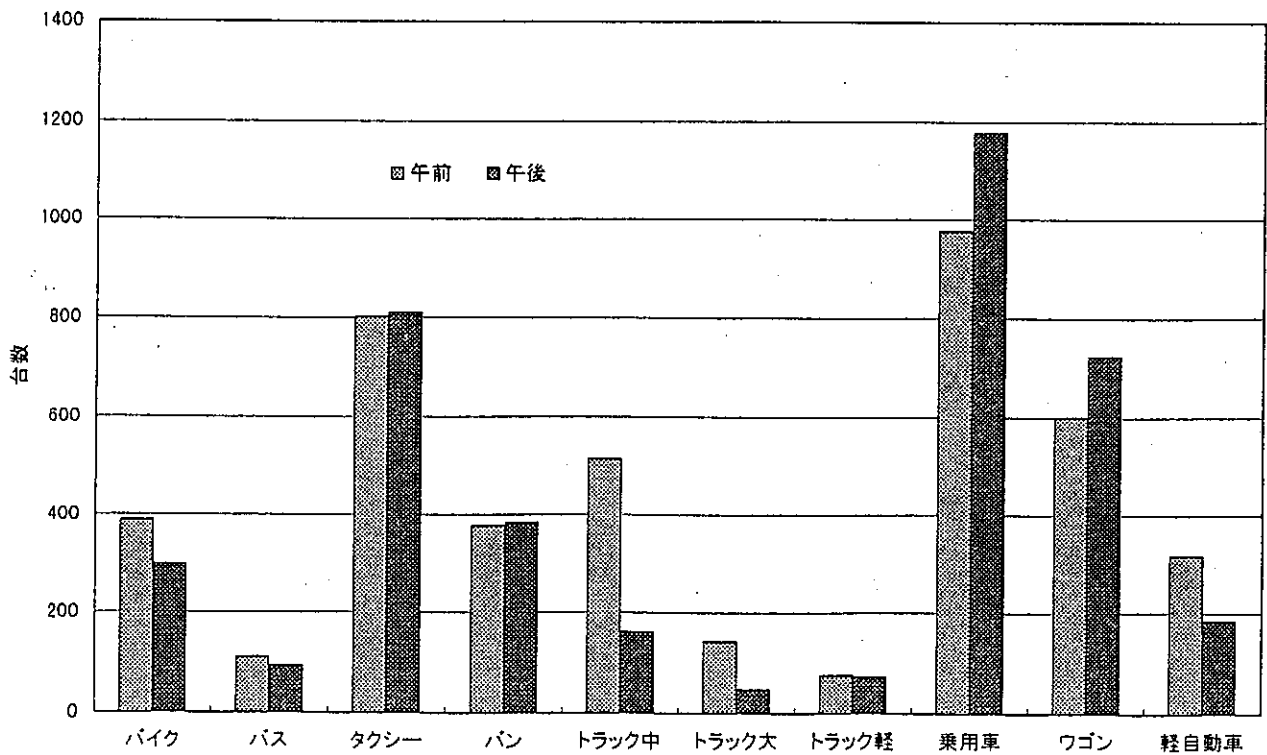
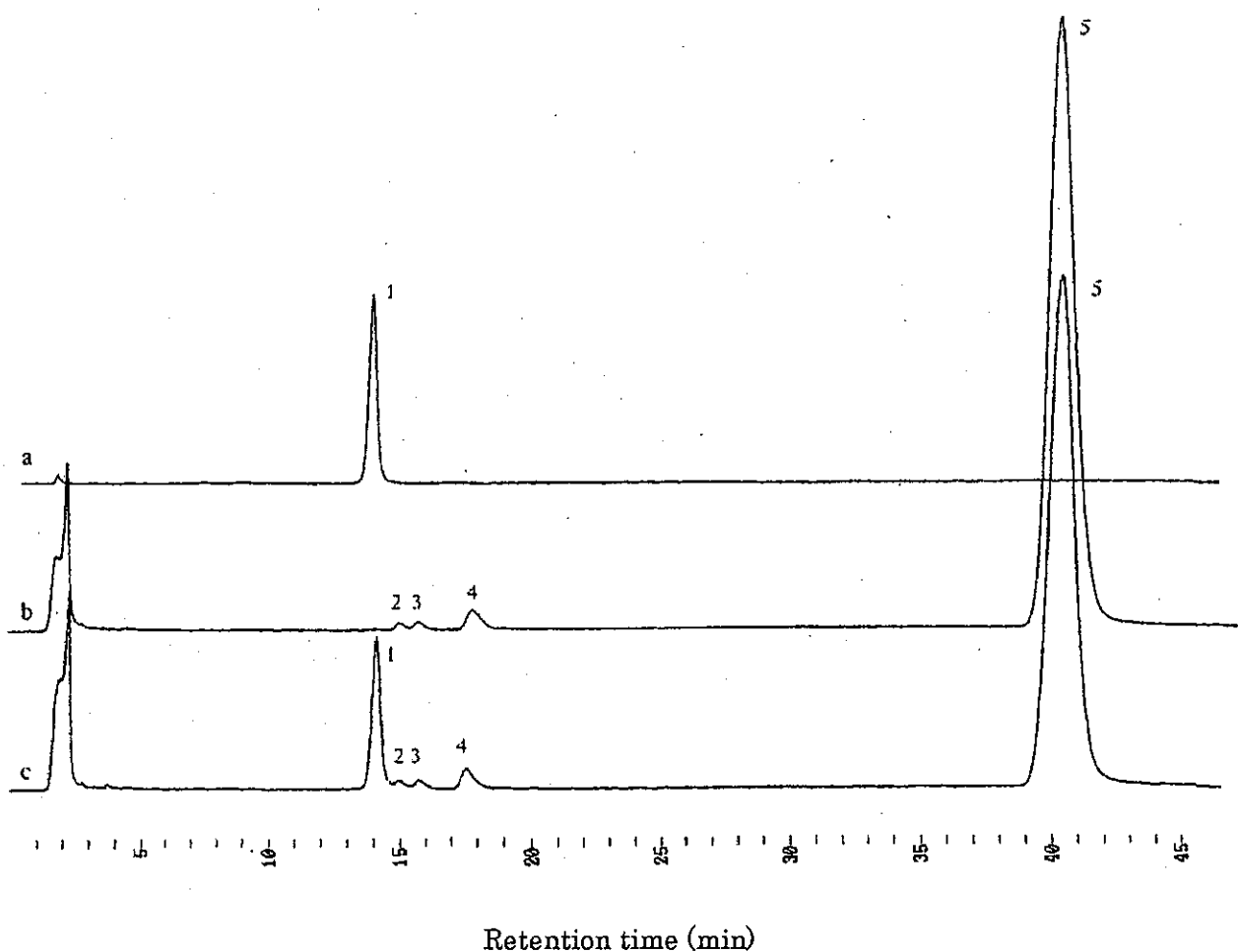


図3 車種別の交通量 (2時間の走行台数) の比較



☒ 4 Representative chromatograms obtained from the 80 nM of 1-hydroxypyrene as a standard (a), and from the reaction mixtures including 5 μ M of pyrene and 50 mg/ml of cDNA-expressed system which were incubated for 0 min (b) and 20 min (c)

1: 1-hydroxypyrene

2, 3 and 4: unknown contaminants in the pyrene reagent

5: pyrene

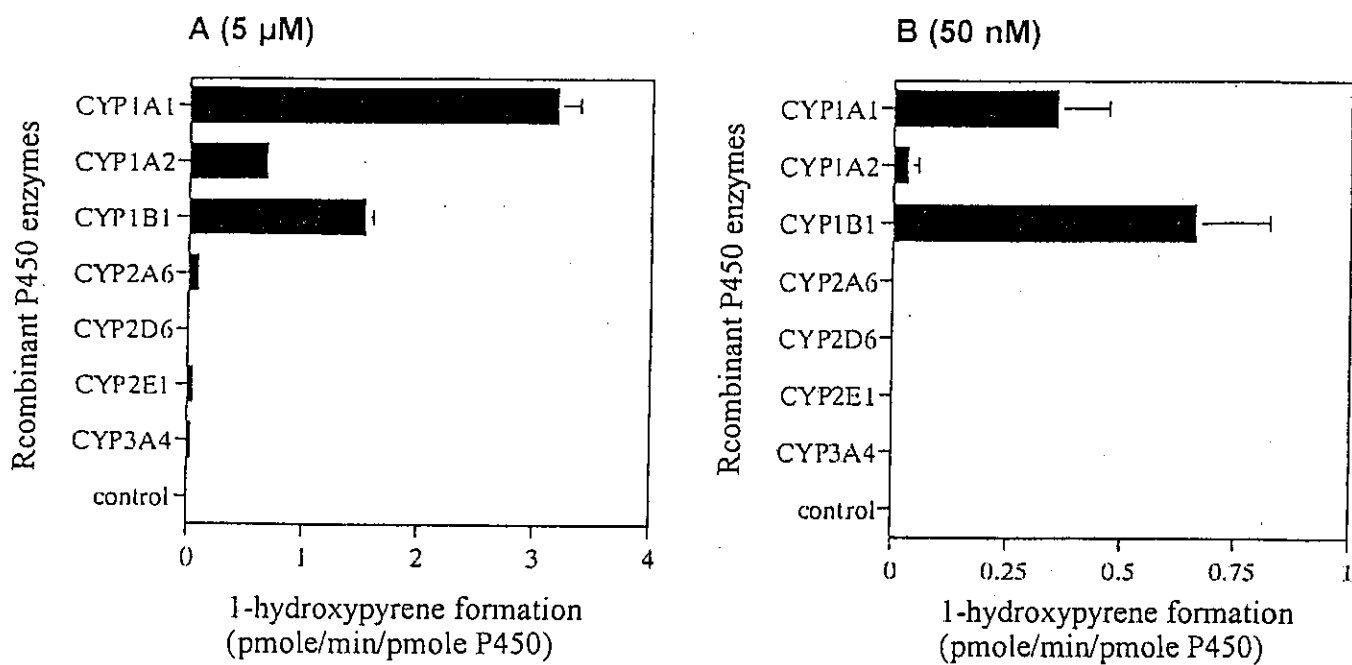


図 5 Effects of substrate concentrations on pyrene 1-hydroxylation by recombinant human P450 enzymes.
Mean $\pm$ S.E (n=6) are represented.

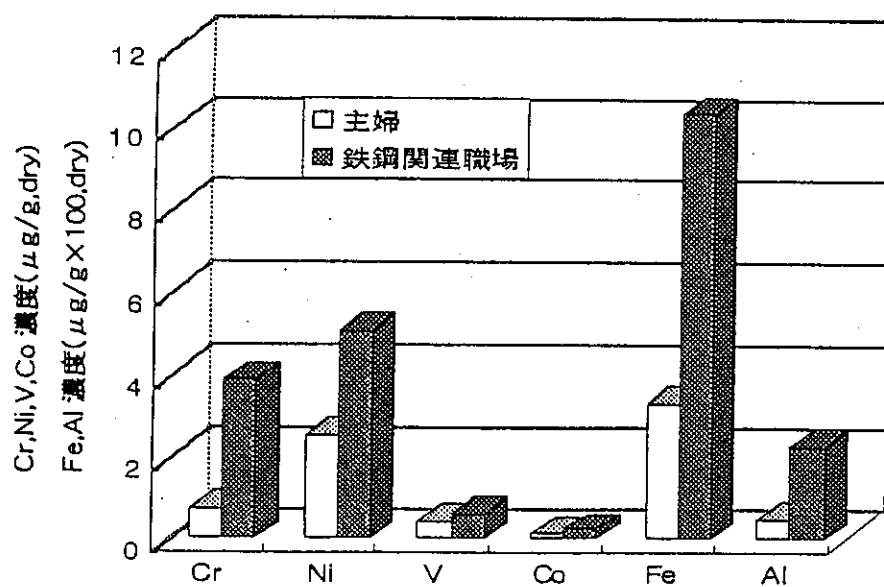


図 6 鉄鋼関連職場従事者と主婦の肺内元素濃度の比較

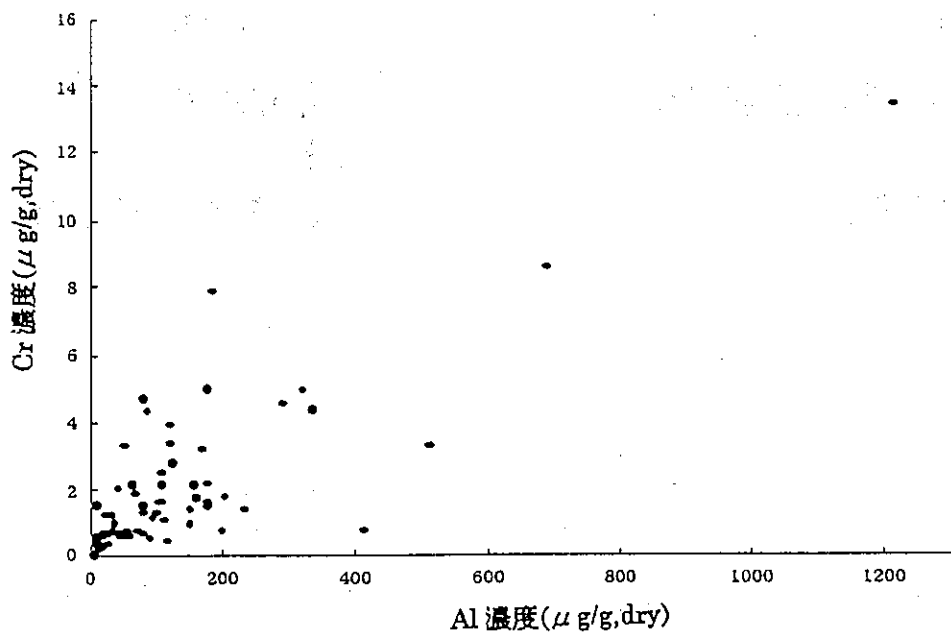


図 7 肺内のクロムとアルミニウム濃度との関係

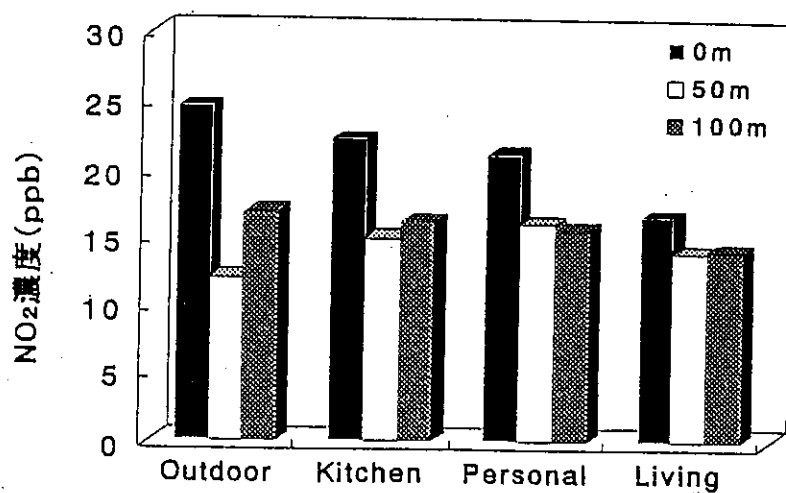


図 8 若松区の道路からの距離と NO_2 濃度

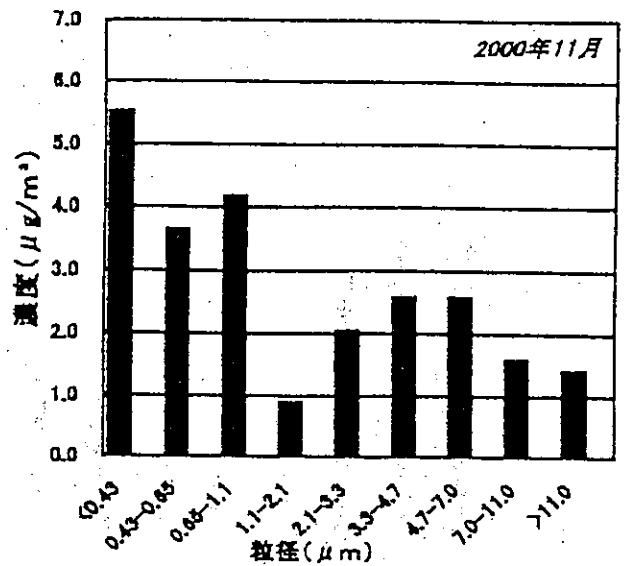
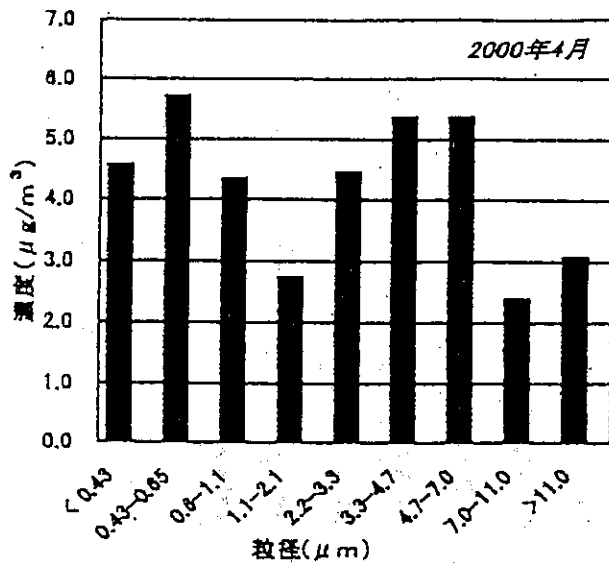


図9 大気浮遊粉塵の粒径分布

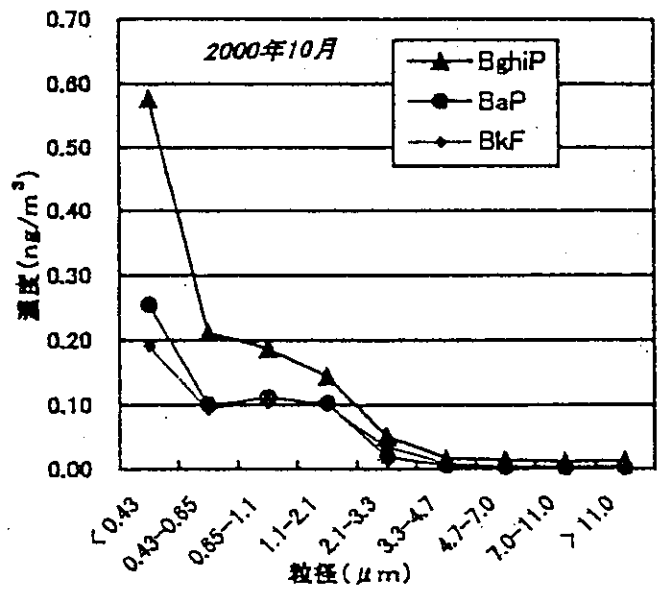
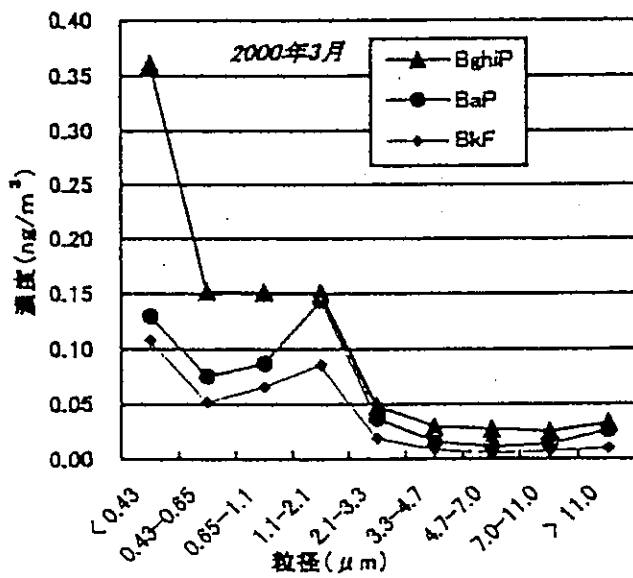


図10 多環芳香族炭化水素濃度と粒径との関係

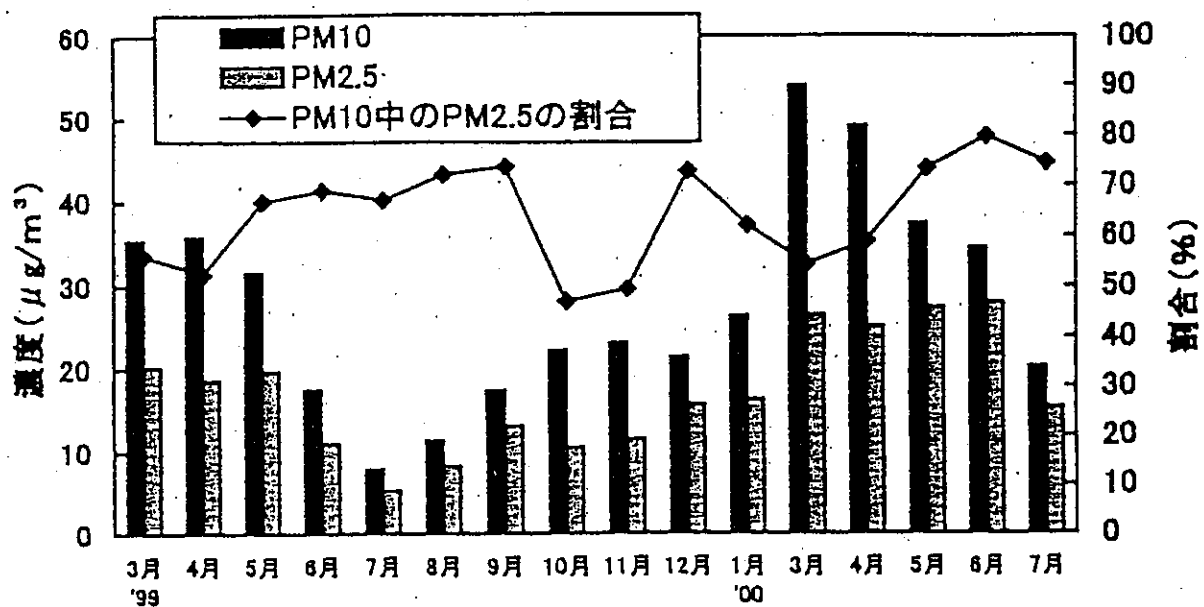


図 11 粉塵濃度推移と PM10 中に占める PM2.5 の割合

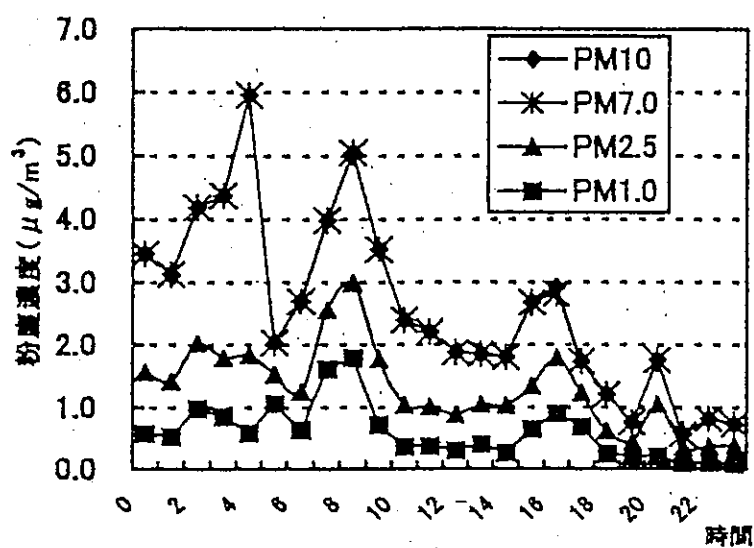


図 12 粉塵濃度の日間変動

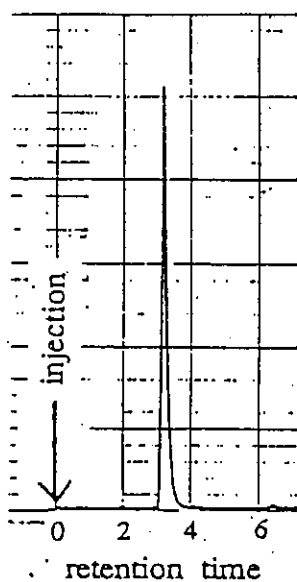


表 1 血液中のホルムアルデヒド濃度

ボランティア	血漿($\mu\text{g/ml}$)	赤血球(nmol/g)
A	0.46	461
B	0.36	687
C	0.46	416
D	0.24	417
E	0.36	719
F	0.36	260
G	0.32	313
H	0.14	258
I	0.32	325

図 13 赤血球中のホルムアルデヒドのクロマトグラム

【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）、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）、阿部 信二（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）、

（ラットの肺胞マクロファージを用いた実験）

2. 平成12年度の研究目的

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。ここでは、*in vitro* におけるDEP抽出物の曝露が肺胞マクロファージの遺伝子の発現に及ぼす影響についてcDNA Expression Arrayを用いて解析した。

3. 平成12年度の研究の対象及び方法

（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

ラットは、ペントバルビタールナトリウム（50 mg/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10 ml 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、1000 rpm、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、100 U/ml ペニシリン、100 µg/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。cDNA Expression Arrayの実験には、10匹のラットから採取した肺胞マクロファージをプールして2等分し、コントロールとDEP抽出物曝露群の実験に用いた。ノーザンブロッティングの実験は、別群のラットから得た肺胞マクロファージを用いてduplicateで行った。

（3）DEP抽出物の調製

DEPにジクロロメタン（1 g/10 ml）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。1500 rpm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、500 mg/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。

(4) cDNA Expression Array

DEP抽出物への曝露

肺胞マクロファージ ($1 \times 10^6/\text{ml}$) は、直径100 mmのディッシュにてR10で20時間前培養した後、DEP抽出物 (最終濃度: $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 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6時間培養した。

Total RNAの抽出

細胞培養液を回収し、1000 rpm, 4℃ で5分間遠心し、上清を除去した。細胞のペレットにTRIZOL (GIBCO BRL, Rockville, MD) を加えて懸濁させ、1 ml ずつエッペンチューブに分注し、1/5量のchloroformを加えて撹拌した後、15000 rpm, 4℃ で5分間遠心した。透明層を採取し、これと等量のisopropanolを加え、15000 rpm, 4℃ で15分間遠心した。上清を除去し、ペレットを75% ethanolで洗浄した後、乾燥させた。得られたRNAペレットに、diethyl pyrocarbonateで処理した精製水 (DEPC処理水) を適量加えて、56℃ で2, 3分間インキューベートし、氷冷した。各サンプルをそれぞれ1つにまとめ、100 μl のRNA抽出液とした。抽出液のRNA含量は、波長260nmにおける吸光度から算出し、コントロール群が610 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、曝露群が630 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

cDNA probeの合成

Total RNAは、Atlas Pure Total RNA Labeling System, Atlas Rat Toxicology Array II (CLONTECH, Palo Alto, CA, USA) のキットを用いて、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP-labeled cDNA probeを調製した。

Total RNAはDNase Iで37℃, 30分間処理した後、Termination Mixを加えて混和させ、phenolとchloroformを加えてvortex, 15000 rpm, 4℃ で10分間遠心した。上層を回収し、chloroformを加えてvortex, 15000 rpm, 4℃ で10分間遠心した。上層を回収し、1/10量のNaOAcと2.5倍量の100% ethanolを加えて良く混和し、氷上で10分間インキューベートした。15000 rpm, 4℃ で15分間遠心して上清を除去し、乾燥させ、100 μl のDEPC処理水に懸濁した。

10-50 μg のtotal RNA (45 μl) に1 μl のBiotinylated Oligo (dT)を加えて70℃ で2分間インキューベートし、室温に10分間放置した。2 × Binding Bufferを加えて良く混ぜ、1 × Binding Bufferで洗浄したStreptavidine Magnetic Beadsを加えて、撹拌しながら室温で30分間インキューベートした。Magnetic Separatorにセットして上清を除去し、beadsを1 × Wash Bufferで2回洗浄した後、1 × Reaction Bufferに再懸濁させた。その後、上清を除去し、6 μl のDEPC処理水に再懸濁させ、1 μl のCDS Mixを加えて65℃ で2分間、50℃ で2分間インキューベートした。そこにMaster Mix (5 × Reaction Buffer, 10 × dNTP Mix, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP; 5 μl , 100 mM DTT; 0.5 μl , MMLV Reverse Transcriptase; 2 μl) を加えて、50℃ で25分間インキューベートした後、10 × Termination Mixを加えてよく混和した。

beadsを除去して上清を採取し、これを180 μl のNT2 Bufferに入れた。2 mlのcollection tubeにNucleoSpin Extraction Spin Columnをのせ、サンプルをカラムに入れて10000 rpmで1分間遠心した。溶出した液を捨て、新しいcollection tubeにカラムをのせ、400 μl のNT3 Bufferで2回洗浄した。1.5 mlのmicrocentrifuge tubeにカラムをのせ、NE Bufferを100 μl 加えて2分間浸透させ、10000 rpmで1分間遠心して溶出してきたprobeを採取した。

ハイブリダイゼーション

Atlas array membrane (Atlas Rat Toxicology Array II, CLONTECH) をハイブリバックに入れ、ExpressHyb solutionを加えて68℃ に温めた。そこに変性させた2 mgのsalmon testes DNAを加えて68℃ で30分間、プレハイブリダイゼーションを行った。5 μl のCot-1 DNAを ^{32}P -labeled cDNA probeに加えて変性させた後、氷冷し、膜に直接付かないようにハイブリダイゼーションの溶液に溶かして混和させ、68℃ , overnightでハイブリダイゼーションを行った。膜はWash Solution 1 (2 × SSC, 1% SDS) 中に入れ、68℃ に温めた。膜を取り出し、Wash Solution 1を用いて68℃ で5分間洗浄した。これを2回繰り返した後、2 × SSCで2回リンスした。膜上の ^{32}P -labeled cDNA probeは、Bioimaging Analyzer (Bas2000, Fuji Film, Tokyo)を用いて映像化し、Array Gauge (Fuji Film, Tokyo) により解析した。遺伝子の発現レベルは、同じメンブレンに含まれているハウスキープ遺伝子により標準化して評価した。

(5) ノーザンブロッティング法

肺胞マクロファージ ($5 \times 10^5/\text{ml}$) は、直径100 mmのディッシュにてR10で20時間前培養した後、DEP抽出物 (最終濃度: 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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6時間培養した。

Total RNAは、上記と同様にTRIZOLを用いて抽出した。そのRNAサンプルを、formaldehyde変性アガロースゲル (1%) にロードし、電気泳動した。UV下にゲルの写真を撮り、18S rRNA, 28S rRNAのバンドを確認した。ゲルからナイロンメンブレン (Hybond-N; Amersham Japan, Tokyo) へのサンプルのトランスファーには、Vacuum Blotter (Model 785; Bio-Rad, Hercules, CA) を用いた。プロットしたメンブレンは、DEPC処理水で洗い、自然乾燥させた後、UV-クロスリンカーでUV照射し、使用時までハイブリバックに入れて-20℃で保存した。

メンブレンを入れたハイブリバックに、ExpressHyb solutionを加えて68℃で30分間、プレハイブリダイゼーションを行った後、heme oxygenase (HO)またはthioredoxin peroxidase 2 (TDPX-2), glutathione S-transferase P subunit (GST-P), NAD(P)H dehydrogenase, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)のmRNAを検出するために、それぞれ³²P-labeled cDNA probeでハイブリダイゼーションを行った。³²P-labeled probeがハイブリダイゼーションした放射活性をもったバンドは、Bioimaging Analyzerにより解析した。また、それぞれのmRNAの発現レベルは、b-actinのmRNAにより標準化して評価した。

cDNAクローンは、それぞれのcDNAがpBR322由来のpAtlas1Aプラスミドに組み込まれたものを使用した (Atlas cDNA Clone Custom Order, CLONTECH)。このプラスミドDNAを大腸菌 (competent cells) に導入して増やし、QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen, Tokyo) を用いてプラスミドを抽出した。これを制限酵素KpnIとSacIで処理し、アガロースゲルにロードして電気泳動した。UV下で目的のバンドを切り出し、GENECLEAN Spin Kit (BIO 101, Inc., Vista, CA) を用いて、アガロースゲル中のcDNAを抽出した。

4. 平成12年度の研究成果

本研究では、DEP抽出物により誘導される遺伝子を包括的に検討するため、cDNA Expression Arrayを用いて解析した。肺胞マクロファージはRNA抽出の前に、20時間前培養した後、DEP抽出物 (最終濃度: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) またはコントロールとしてDMSO (最終濃度: 0.1%) を加え6時間培養した。コントロールと比較し、DEP抽出物により発現が増加した遺伝子を特定した。cDNA expression arrayによる解析の結果、DEP抽出物の曝露は、肺胞マクロファージのHO-1, HO-2, TDPX-2, GST-P, NAD(P)H dehydrogenase, PCNAの遺伝子の発現を増加させた。曝露細胞におけるこれらの遺伝子の発現レベルは、コントロールに対して、それぞれ6.01, 1.56, 1.42, 1.88, 2.25, 2.11倍であった。

cDNA Expression Arrayで発現の増加が観察された遺伝子においては、ノーザンブロッティング法によりmRNAの発現レベルを確認した。肺胞マクロファージはRNA抽出の前に、20時間前培養した後、DEP抽出物 (最終濃度: 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) またはコントロールとしてDMSO (最終濃度: 0.1%) を加え6時間培養した。HOおよびTDPX-2, GST-P, NAD(P)H dehydrogenase, PCNAのmRNAの発現は、DEP抽出物の濃度依存的に増加した。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DEP抽出物に曝露した細胞におけるHOおよびTDPX-2, NAD(P)H dehydrogenase, PCNAのmRNAの発現レベルは、コントロールに対して、それぞれ4.44, 2.45, 2.78, 1.56倍であった。

5. 考察

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。

本研究のcDNA Expression Arrayによる解析の結果、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DEP抽出物の6時間曝露は、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

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。

また、10 µg/ml DEP抽出物の6時間曝露は、肺胞マクロファージにおけるPCNA遺伝子の発現も増加させた。これはDNAの複製と修復に関わる因子であり、DNA damageやその他のストレスにより誘導されることが知られている。本実験で観察されたPCNAの活性化は、DEP抽出物によるDNA damageに対する修復と細胞増殖に寄与すると考えられる。

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ング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ング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。

6. 今後の課題

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曝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曝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曝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。

(マウスの曝露実験)

2. 平成12年度の研究目的

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、生体に曝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。本年度は、前回研究班までの知見を生かして、マウスの系では実際の環境になるべく近い条件でディーゼルエンジン微粒子を吸入曝露させて、その際惹起される気道の炎症性変化を、転写因子調節、細胞内シグナル伝達系の変化からとらえることを目的とする(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12年度の研究の対象及び方法

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転写因子、およびシグナル伝達系について検討を加える。また、その吸入曝露が、重要かつ頻度の高い呼吸器感染症(ウイルス感染症や結核症)の発症に及ぼす影響についても、分子生物学的な手法により究明する。

本年度は、今までにin vitroで明らかにした、DEPの気道上皮細胞への細胞生物学的影響が、曝露動物においても見いだされるかを検討する。すなわち、純系マウス(C57B6, Balb-c, など)をDEP曝露チャンバー(結核研究所内)で種々の濃度で反復曝露を行う(斉藤、菅原)。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する。すなわち、一日の曝露時間、曝露密度をさまざまに設定して、その影響の基礎的データを得るために、以下の検討を行う。

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液中の細胞からはRNA抽出を行いRT-PCR法で、またBAL液ではELISAにより各種サイトカイン/ケモカインの検出を行う。組織学的に

は免疫組織学的な手法でサイトカイン/ケモカインの検出を行う。

2) サイトカインおよびケモカインの遺伝子発現に重要と推定される転写因子、特にNF- κ Bについて、曝露および対照群から肺組織切片を作成し、免疫組織学的な手法で検出を行う。

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- κ B, AP-1など) の活性化が起こっているかを検討する。

4) アポトーシス誘導の評価は組織染色法 (アポタッグキット) と電子顕微鏡的観察にて調べる。今年度はまず、曝露マウスの肺において、アポトーシスが起こっているかを、明らかにする。

4. 平成12年度の研究成果

純系マウスに一日6時間、週5日、0.1 ~ 1.0 mg/m³の条件で1~3ヶ月吸入を継続した。肺の組織学的検討では、低濃度群ではほとんど変化を認めず、高濃度群では、肺胞マクロファージに著明な粒子の貪食像がみられたほか、肺胞II型上皮細胞の過形成が観察された。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、低濃度群でもみられ、かつ用量依存性が示唆された点が重要である。この結果は、ヒト気道上皮細胞の*in vitro*の系とは異なるものであったが、マウスマクロファージにおいてみられた知見とは比較的一致するものであった。また、このマウスのDE曝露系において、Th1サイトカインが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BCG肺病変を作成したところ、明らかにDE曝露群の方が、病変が重症化した。この事実、結核感染におけるDE吸入曝露の影響を示唆するものとしても興味深い。

5. 考察

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、マウスのDEの比較的長期曝露によって、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。ヒト気道上皮で*in vitro*でみられたDE短期・急性曝露でのIL-6などの誘導がみられなかった点については、1) 文字どおり*in vitro*の実験は短期・急性曝露であるのに比較して、マウスは1~3カ月と比較的長期の曝露であったこと、2) 今回は肺組織全体をすりつぶしてmRNAを抽出したことがあげられよう。すなわち、肺には多種多様の細胞が存在するが、気道肺胞の上皮系細胞よりも血管系やマクロファージなどの影響が強く反映されたものと理解される。今回の実験の特徴としては、1~3カ月という、これまででは(発ガン実験を除くと)長期の吸入を行った点にある。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言えよう。また、こうしたTh2へのTリンパ球機能の偏りが、ヒト結核症のモデルともいわれるBCG惹起性肺病変を悪化させたことは、健康予防上も大きな示唆を与える知見である。

6. 今後の課題

今後の課題としては、ラットの系においては、粒子状物質のサイズや形状による遺伝子発現プロファイルの変化をとらえること、気道上皮細胞など他の気道・肺胞系細胞への影響も検討することなどが挙げられる。一方、マウスの系では、曝露条件、特に期間をさらに長期にした時の変化を検討することや、今回肺組織全体でみられたサイトカイン発現様式の変化が、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。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、遺伝子レベルで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呼吸器健康被害の予防策に理論的な根拠を与えるものとなりうる。

7. まとめ及び社会的貢献

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を用いた本研究は、大気汚染物質等の毒性物質に対する包括的な毒性評価の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、適切な曝露指標を見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、より的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与えるものとなりうる。