

大気汚染に係る基礎的実験的研究

この研究は、大気汚染物質の長期暴露が生体に与える影響を解明することを目的として、実験動物に対するディーゼル排出ガス(排気ガス)の暴露及びディーゼル粉塵や大気浮遊粉塵の経気道投与を行い、それらの生理学、生化学的及び病理学的影響を解析した。また、ディーゼル粉塵中の変異原性(発がん性)物質の検索、疫学調査に利用可能な生体影響指標の開発を行った。なお、本研究の報告書は、都立衛生研究所に執行委任して実施したものと、東邦大学への委託研究として実施したものの2章立ての構成とし、平成7年度から平成11年度の研究成果を取りまとめたものである。

基礎的実験的研究における研究報告者

斎藤 育江 (環境保健部)
渡邊 伸枝 (同上)
大山 謙一 (同上)
瀬戸 博 (同上)
大澤 誠喜 (同上)
大久保 智子 (現衛生研究所・毒性部)
加納 いつ (同上)
竹内 正博 (同上)
鈴木 孝人 (現衛生研究所・精度管理室)
池田 眞悟 (現食品環境指導センター)
大西 和夫 (元衛生研究所・理化学部)
鈴木 重任 (元衛生研究所所長)
土屋 悦輝 (元衛生研究所・環境保健部)

東邦大学・医学部

森 憲二

自治医科大学

杉山 幸比古

[研究目的]

都市型の大気汚染の主因は自動車の排気ガスであり、なかでもディーゼル自動車によるところが大きい。ディーゼルエンジンの排気ガス中には高濃度の窒素酸化物や他種類の発がん性のある化学物質を吸着した粒子が含まれている。しかし、ガソリンエンジンと違い、排気ガス中

の有毒成分を効率的に除去する方法がディーゼルエンジンでは未だ確立されていない状況にある。東京都衛生局では昭和62年以降、大気汚染保健対策事業の一環として、学童や在宅の主婦を対象にした疫学調査と平行して動物実験を中心にした基礎的実験的研究を実施し、その中間報告を平成3年3月と平成8年3月に発表した。本報告書はそれ以後に実施した基礎的実験的研究に関するものである。

その研究目的は、(1)希釈したディーゼル排気ガスをラットに吸入させて、病理学的、生化学的及び生理学的な影響を動物実験により検討すること、(2)疫学調査に利用可能な生体影響指標を開発すること、(3)ディーゼル排気ガス中の変異原性物質を検索することなど、大気汚染物質が生体へ及ぼす影響を多角的に検討することにある。

[研究要旨]

第一章 大気汚染物質の生体影響の解明

第1 基礎研究

ディーゼル排気ガス中の未知変異原物質の同定

ディーゼル排気ガス粒子から抽出したタール状物質は強い変異原性を示し、これを液液分配により分画すると中性及び酸性分画に強い変異原性がみられる。

本研究では酸性分画を中心にディーゼル排気ガス粒子に含まれる未知の変異原物質を同定することを目的として検討を行った。

酸性分画について、高速液体クロマトグラフィーによる分取とAmesテストを繰り返し、高変異原分画を特定した。ガスクロマトグラフ/質量分析計による分析の結果、単環から3環構造を持つカルボン酸類・ジカルボン酸類・フェノール類及びケトン類等の24物質が同定された。これらに関連する21の標準物質及びそのニトロ化物についてAmesテストを行った結果、9-フルオレノン、ベンゾ[c]シノリン等のニトロ化物は高い変異原性を示した。原子発光検出器付ガスクロマトグラフによる分析の結果、酸性分画中にこれらニト

ロ化物の存在が示唆され、含有量は微量であっても酸性分画の変異原性に対する寄与率が大きいと推察された。

第2 病理学的研究

1 排気ガス暴露による発がんに関与する要因の検討

ディーゼル排気ガスは肺に発がん性のあることが、動物実験において、また、ヒトの疫学調査によって示されている。排気ガスによる発がんには、排気ガス中の発がん性・変異原性を示す物質を吸着した粒子状物質が関与すると考えられてきた。しかし、生物学的活性のない炭粉の暴露によっても、腫瘍性病変を生じたことから、排気ガス暴露による発がんは粒子状物質に吸着された物質の遺伝子毒性によるものではないことが示唆されている。

低濃度の排気ガスに12ヶ月間暴露されたラットに、アポトーシス抑制剤を投与したところ肺腺腫が発生した。通常肺の腫瘍性病変は24ヶ月以上排気ガスに暴露された後起こることから、(1) 排気ガスによる発がんには、アポトーシスが関与すること (2) 暴露によって異常の生じた細胞はアポトーシスを起こして死滅すること (3) アポトーシスは、酸化作用で促進され、抗酸化作用で抑制されることが知られており、長期暴露の過程で抗酸化作用の亢進する時期があることが考えられた。

今後、アポトーシスの促進あるいは抑制過程に特異的に発現するマーカー物質に焦点をあて、大気汚染による健康影響指標としての可能性を検討する。

2 排気ガスの暴露が骨代謝に影響を及ぼす機序について

排気ガスの暴露の影響は肺等の呼吸器のみならず全身的なものであるとの視点から研究を進めてきた。すでに、暴露は骨代謝に影響を及ぼすし、骨代謝の変化は尿中代謝物質の測定で検出できることを報告した。

本研究では、ラットの血中性ホルモンの測定を行い、暴露が骨代謝の変化を起こす機序について検討をすすめ暴露の生体に及ぼす影響をさらに

明らかにした。

すなわち、排気ガスの新生仔期から3ヶ月間の暴露は、(1) 副腎皮質の機能の亢進・性ホルモンの上昇を起こし (2) 骨量の増大を起こす (3) 下垂体の機能に負のフィードバックをかけ (4) 性腺刺激ホルモンの分泌低下 (5) 生殖器の機能低下を起こすことが示唆された。

今後、副腎機能の測定並びに暴露が副腎の分化・発生に及ぼす影響について検討し、疫学調査に有用な新たな指標物質を探る。

3 大気汚染物質暴露が発がんに関与する要因の解析

ディーゼル排気ガス暴露は、発がんに関与する一方、担がん生体では免疫反応、特に遅延型反応の低下が見られる。そこで、本研究では排気ガスの暴露が、免疫機能の発現に及ぼす影響を検討した。すなわち胎仔期からの排気ガス暴露が、胸腺の分化・発達に及ぼす影響についてラットを用いて検討した (胸腺重量の測定、組織学的検査及びPhytohemagglutininによる皮内反応)。

その結果、排気ガスの妊娠ラットへの暴露は、胎仔における胸腺細胞の分化を阻害し、胸腺の形成段階に影響を及ぼすこと、生後においても成熟胸腺細胞の出現の阻害あるいは遅延、細胞性免疫機能の低下として継続していることが示唆された。原因としては、排気ガス暴露により、テストステロンをエストロゲンに変換する過程が阻害され、母獣の血中にテストステロンが蓄積し、胎仔の免疫機能が低下することが考えられた。今後、細胞性免疫機能の定量的測定、胸腺細胞のうちどのような機能を持った細胞の形成が阻害されているのか、胸腺機能の低下と排気ガス暴露による障害との関連について検討を加える。

第3 生化学的研究

1 大気汚染物質による肺腫瘍発生に及ぼす影響

大気浮遊粉じん (SPM) の肺腫瘍発生に及ぼす影響を解明するために、東京都内の幹線道路沿道でハイボリュームエアサンプラーによりテフロンフィルター上に採取した25ミリグラムのSPMをオスF344ラットに経気道的に投与

し、24 か月後の肺について病理組織学的に観察した。その結果、腫瘍性病変である肺腺腫が12%で発生し、非腫瘍性病変の肺胞上皮細胞の過形成が32%の発生率で有意 ($p < 0.01$) に観察された。また、肺胞マクロファージの浸潤を伴った肺胞炎及び細気管支化生も認められた。

今回の実験結果から、SPMの吸入により肺腫瘍が発生することが示唆され、その肺腫瘍発生メカニズムは粒子による炎症から発展するものと粒子に含有される発がん物質によるものとの両方が共存していると考えられた。

第3 生化学的研究

大気汚染物質のアレルギー疾患に及ぼす影響

カビ抗原による抗体産生におけるディーゼル粉じん (DEP) のアジュバント作用について検討するために、カビ (*Alternaria kikuchiana*) 抗原 30 μ g と DEP 100 μ g をマウスに2週間に1回連続して10回点鼻投与した。経時的に採血し、血清中 IgE 抗体価を PCA テストで測定した結果、IgE 抗体値は実験開始後10週から上昇し、カビ抗原のみを点鼻した動物の抗体値よりも高い値を示した。DEPはカビ抗原に対するIgE抗体産生に対してアジュバント作用があることが示された。

第4 健康影響指標の開発

1 排気ガス暴露による健康影響を表す指標物質の開発

1- (1) ディーゼル排気ガスに暴露されたラットの副腎皮質機能の測定

排気ガスの暴露はラットの骨代謝の影響を及ぼすことを報告した。この骨代謝の変化には、副腎皮質からのホルモンの分泌が関与していることが示唆されており、本研究では、暴露による副腎皮質機能の変化を検討した。

副腎皮質からの性ホルモン分泌機能を、尿中17-KSの排泄量によって測定したところ、暴露されたラットの尿中17-KSは、性成熟前では対照群に比べて低かった。性成熟時から成熟期は、対照群に比べて高かった。また、副腎皮質のコルチゾール分泌機能の指標である尿中

17-OHCSについても17-KSと同様の結果を得た。

尿中17-KS、17-OHCSによる副腎皮質機能測定は、排気ガス暴露の生体影響を示す指標物質として有用であること、これらの指標物質の測定に際しては、成長段階を考慮する必要があることが示唆された。

1- (2) 排気ガス暴露による健康影響を表す指標物質の検討

ディーゼル排気ガスに長期間暴露された場合どのような健康影響が生じるかラットを用いて検討した。本研究は大気汚染による健康障害、特に心疾患・循環障害に関わる指標の開発を行うことを目的としている。胎仔期から10ヶ月間ディーゼル排気ガスに暴露されたラットについて体重、肝重量、腹部の脂肪重量及び血中レプチン量の測定を行った。その結果、暴露群では腹部の脂肪重量及び血中レプチン濃度が対照群に比べ著しく高く、ディーゼル排気ガスに長期間暴露されることにより、腹部に脂肪の蓄積が起こることが示された。肥満のうち、腹空内の内臓脂肪が多いタイプは糖尿病や高脂血症が起きやすい他、血液凝固因子であるプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI1) の分泌が増加し動脈硬化が生じやすくなると言われている。したがって、今後は脂肪量の測定法の確立、腹部脂肪蓄積の指標の測定、ディーゼル排気ガス暴露によって脂質代謝障害の起こる機序について研究を進める必要がある。

2 ディーゼル排気ガス暴露指標の開発

2- (1) ディーゼル粒子とタバコ煙抽出物成分の比較研究

ディーゼル排気ガスの疫学調査においては特異的な暴露指標 (マーカー) を用いることが望ましい。

本研究では、ヒトの肺内に吸入されるディーゼル排気ガス由来の大気汚染物質の寄与を見積もるため、ディーゼル排気ガス中に含まれる特異的なマーカーを検索することを目的とする。

ディーゼル粒子及びタバコ煙抽出物を同一条件で抽出、分析することにより、成分の種類及び

その相対存在量について比較検討した。その結果、酸性分画に含まれる 1,8-ナフタル酸無水物がディーゼル粒子を特徴づける有力な指標物質の一つであることが示唆された。

2- (2) ディーゼル粒子及び大気浮遊粉塵中の 1,8-ナフタル酸無水物の分析

本研究では、ヒトの肺内に吸入されるディーゼル排気ガス由来の大気汚染物質の寄与を見積もるため、1,8-ナフタル酸無水物 (NA) に着目し、その分析法を確立する、さらに大気浮遊粉じん等の試料について分析を行い指標としての有効性を検討することを目的とする。NA は塩基に溶解し、酸として安定に存在する。一方、酸性においては無水物として有機溶媒に可溶となる。この性質を利用し、液液分配を組み合わせたクリーンアップ法を考案し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて検出、定量する分析法を確立した。本分析法を応用し、各種試料について NA を測定したところディーゼル粒子、大気浮遊粉じんからそれぞれ 52-120 $\mu\text{g/g}$ 、17 $\mu\text{g/g}$ 検出された。一方、実験動物用飼料、食品の焦げからそれぞれ 0.05 $\mu\text{g/g}$ 、0.01-1.0 $\mu\text{g/g}$ 検出された。NA はディーゼル粒子を特徴づける物質の一つで大気浮遊粉じんにも存在することが明らかになった。

2- (3) ディーゼル排気ガス暴露の影響を反映する呼気指標の開発

ディーゼル排気ガスに暴露された動物は、肺等の臓器に酸化的ダメージ (DNA 損傷や脂質過酸化) を受け、過酸化脂質由来の炭化水素を呼気中に多く放出することが知られている。本研究は、ヒトの肺に吸入されるディーゼル排気ガスの健康影響を見積もるための基礎研究として、排気ガス暴露によって生体内中に特異的に発生する呼気中炭化水素類 (エテン、エタン、プロペン、プロパン、イソブタン、ブタン及びペンタン) の分析法を開発し、疫学調査への応用を目指すことを目的とした。確立した方法は、ヒト呼気を 2 リットルのテドラーバックに採取し、乾燥管 (dorierite)、捕集管 (carbosieve SIII) に通気・濃縮後、加熱脱着装置付きガスクロマ

トグラフ質量分析計で分析するもので、精度の良い方法である。本法を用いてボランティア [男 2 名、女 3 名 (喫煙者 1 名)] の呼気を分析したところ、濃度的には個人差があるが、いずれもエテンを除く炭化水素類 6 種が検出された。しかし、喫煙者の場合、喫煙直後ではエテンを含めた炭化水素類すべてが検出されると共に、炭化水素濃度も極めて高くなり、非喫煙時の約 15 倍に増加することが確認された。またイソブタンやペンタンでは吸気よりも呼気濃度が高まる例があった。

3 ディーゼル排気ガス暴露によるラット肺、肝組織 DNA 中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシンレベルの変動

ディーゼル排気ガスの発がん要因としての DNA の酸化的損傷について検討するため、ラットにディーゼル排気ガスを 2 年間暴露し、肺及び肝 DNA 中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) のレベルの変化を観察した。また、脂質過酸化への影響をみるため、尿中及び臓器中のチオバルビツール酸反応性物質 (TBAR) についても測定した。その結果、暴露後 6 ヶ月目で暴露群の肺、肝 DNA 中の 8-OH-dG レベルが上昇したが、その後は対照レベルに戻った。暴露群の臓器中 TBAR 値には影響はみられなかったが、粒子のみを除いた除塵群では対照群よりも低値を示した。尿中 TBAR 値は暴露後 3 ヶ月目で対照群に比べて低かったが、その後逆転し、24 ヶ月目では高くなった。以上の結果から、ディーゼル排気ガス、特に粒子成分が一時的に DNA の酸化的損傷を引き起こすものの、防御機構が活性化されることによって定常状態を保持するように生体側が反応することが示唆された。

4 血液中及び臓器中の有害物質の検出とその作用

F-344 フィッシャーラットを全排気ガス暴露群 (H 群)、除塵群 (ND 群)、及び対照群 (C 群) の三群に分け、18 ヶ月間ディーゼル排気ガスに暴露し、1、3、6、9、12、18 ヶ月ごとに採血、臓器の摘出を行い、血清、肺、肝臓中のチオバルビツール酸反応物質 (TBAR)、及びビ

タミン A (レチノール) と E (α -トコフェロール) を測定した。又、妊娠した F-344 ラットを用い、妊娠中 2 週間、及び出産後 3 週間の計 5 週間ディーゼル排気ガスに暴露し、母獣の血清と乳汁中の多環芳香族炭化水素 (PAH アントラセン、ピレン、ベンゾ (a) ピレン、ベンゾ (b) フルオランテン、ベンゾ (g,h,i) ペリレン) を分析した。血清中の TBAR は各群の間に差はなかった。肺、及び肝臓中の TBAR は暴露 9 ヶ月以降に C 群に対して増加する傾向を示した。血清中レチノールは多少の増減が期間中に見られたが TBAR との間に明確な関係を見出せなかった。 α -トコフェロールは暴露 12 ヶ月目以降減少を示し、 α -トコフェロールが消費され血清中 TBAR が抑制されたものと思われる。

一方、PAH は C 群に比べ H 群では血清、乳汁中ともに増加を示し、ND 群ではアントラセンのみに有意の差が見られた。乳汁中 PAH は H 群においてベンゾ (g,h,i) ペリレンを除き他の PAH では有意の増加を示した。

第二章 生理学的及び病理学的研究

ディーゼル排出ガス暴露動物における生理学的及び病理学的研究 (平成 7 年度)

24 ヶ月に亘るディーゼルエンジン排気ガスの暴露をラットに施し、体重変化、血液ガスの変動、呼吸機能、換気・ガス交換機能、気道反応性変化、マクロファージや好中球機能と病理変化とを観察して以下の所見を得た。体重変化、血液ガスでは全排気ガス暴露群 (H 群) で低く現れた。アセチルコリン (Ach) 噴霧投与による気道反応では、呼吸数や換気量の呼吸指標は暴露群で増加を示した。

気管支肺胞洗浄液 (BALF) の細胞では 24 ヶ月の H 群でマクロファージの割合が少なく好中球がその分増加していた。末梢血の好中球の貪食能は 6、12、24 ヶ月の期間に亘って暴露によって低下を示し、かつ ND 群の方で H 群より障害が強かった。24 ヶ月の病理形態変化 (光顕) は、気道上皮下の粘膜への炎症細胞浸潤は軽度であり、炭粉沈着と貪食による変化が目立った。ディーゼル排気ガス暴露による呼吸器への影響の観察から、病理変化は末梢ほど所見や条件の差

が乏しかった。肺胞マクロファージや、末梢血好中球の貪食能力は早期から傷害されていたことは、排気ガスのガス状成分による傷害作用や吸収による影響と考えられ、形態変化との乖離が目立った。

大気汚染物質暴露が肺機能、免疫系等に及ぼす生理学的及び病理学的研究 (平成 8 年度)

ラットにディーゼル排気ガスを 24 ヶ月に亘り暴露を行い、呼吸機能と免疫防御機能への傷害について観察した。血液ガスでは暴露 3 ヶ月後から低下傾向を示し、排気ガス暴露群 (H 群) でより著明な低酸素血を示した。気道収縮反応は H 群に強い反応が確認され、貪食能力は除塵群 (ND 群) でも 24 ヶ月で強い障害を示した。CT による形態変化は個々の肺胞領域の障害は病理変化に及ばないと思われるが、ガス交換障害との対比には有意義と考えられた。

大気汚染物質暴露が肺機能、免疫系等に及ぼす生理学的及び病理学的研究 (平成 9 年度)

ディーゼル排気ガス暴露条件を低濃度暴露に変えて 6 ヶ月まで暴露し、ガス交換障害、遊走細胞成分、気道粘膜障害などの観察を行った。ガス交換障害と気道粘膜障害では有意な変化は見られなかった。しかし、遊走細胞成分では特に ND 群において細胞に、中でも好中球とリンパ球に増加が見られた。その他、体重変化では排気ガス暴露群に低い傾向を示し、代謝要因が働く可能性が示唆された。

大気汚染物質暴露が肺機能、免疫系等に及ぼす生理学的及び病理学的研究 (平成 10 年度)

18 ヶ月の低濃度排気ガス暴露群と、低濃度除塵群の影響について検討した。体重をはじめとする代謝への影響、ガス交換障害に差異は見られなかった。肺胞洗浄液所見では細胞数の増加、中でも肺胞マクロファージ、好中球、リンパ球に増加が見られ、L 群だけでなく ND 群においても暴露 3 ヶ月目で既に変化を生じていることを示した。長期にわたる微量の汚染物質による健康障害、これは当然急性中毒とは様相が異なり、ある物質による中毒性疾患としての特異性

が失われ、より一般的な症状、いわゆる不定愁訴として現れることが予想される。それ故、指標の開発はきわめて困難でもある。

大気汚染物質暴露が肺機能、免疫系等に及ぼす生理学的及び病理学的研究（平成 11 年度）

ラットに低濃度ディーゼル排気ガスを暴露した群、フィルターを通して吸入させた群、通常の空気を吸入させた群との比較を行った。肺胞マクロファージの貪食能の変化をみた系では 24 ヶ月で貪食能の低下がみられ、防御能低下の可能性が示された。肺組織における NO 産生酵素 iNOS の検討では経時的な iNOS 発現の増強がみられ、肺末梢での炎症の拡大が低濃度ディーゼル暴露でもおきていることが示された。組織学的な検討では、12 ヶ月暴露の一部のラットで人の respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease (RB-ILD) 類似の像がみられ、間質性肺疾患発症の可能性も示唆された。24 ヶ月の像では結局大きな形態変化はなかったが、排気ガスそのものの暴露群で塵埃細胞の肺胞腔への集積と軽度の・型肺胞上皮の過形成がみられ、明らかに対照群との差がみられた。

関連調査

健康影響指標の検証調査

1 汚染濃度の異なる地区に居住する学童における疫学調査

ディーゼル排気ガスを用いた動物暴露実験の結果から示唆された骨代謝に関わる指標の、ヒトの疫学調査における有用性について検討した。

骨の吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン・ピリジノリンは、大気汚染濃度の高い地区に居住する学童では高い値を示し、また、尿中カルシウムの排泄量は抑えられていたことから、大気汚染物質は成長期にあるヒトの骨代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

また、1-ヒドロキシピレンは、大気汚染濃度の高い地区に居住する学童では、低い地区に居住する学童に比べ、有意に高い値を示した。こ

のことから、1-ヒドロキシピレンは、地域に居住する人々の大気汚染物質中の多環芳香族炭化水素の暴露量の指標として有用なことが示された。

2 汚染濃度の異なる地区に居住する学童の副腎皮質機能の測定

汚染濃度の異なる地域に居住する学童の尿を用いて、骨代謝と関わりのある副腎皮質からの性ホルモン分泌機能を、尿中 17-ケロステロイド (17-KS) の排泄量によって測定した。大気汚染濃度の高い地区に居住する学童の尿中 17-KS は清浄地区の学童に比べて有意に低かった。また、副腎皮質のコルチゾール分泌に関連する尿中 17-ヒドロキシコルチコステロイド (17-OHCS) 排泄量についても同様の結果を得た。汚染濃度の高い地区に居住する学童では、副腎皮質機能が抑制されていることが示唆された。副腎機能の測定は、先に報告した骨代謝マーカーである尿中ピリジノリン・デオキシピリジノリンの測定、並びに多環芳香族の暴露量のマーカーである 1-ヒドロキシピレンの測定と共に、大気汚染による健康影響指標として有用であることが示された。

大気汚染による健康影響調査をさらに意義あるものにしていくためには、(1) 複数の指標物質を用いた疫学調査 (2) 骨量・骨強度、小児の骨折発生頻度等の調査 (3) 指標物質と臨床症状との関連の検討が必要である。