

大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究報告書

平成15年度から平成19年度までの5年間のまとめ

東京都福祉保健局

大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究報告書

目 次

大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究報告書の概要	1
第一章 病態発生に関する研究（次世代暴露への影響研究）	
．ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が免疫機能に及ぼす影響	7
．ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が生後の呼吸機能に及ぼす影響	17
．ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が肺機能に及ぼす影響	38
．ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が肝機能に及ぼす影響	46
．ディーゼル排出ガスの胎児期暴露による免疫系への影響	55
第二章 大気中微小粒子の健康影響に関する研究	
．大気中微小粒子 $PM_{2.5}$ のラジカル生成能について	58
．大気中微小粒子 $PM_{2.5}$ 中の金属と血液成分との反応実験	73
．大気中微小粒子暴露によるラジカル生成とヒト血漿への影響に関する基礎的研究	87
．大気中微小粒子暴露によるヒト血漿の凝固反応への影響	103
．ディーゼル排出ガス中の揮発性有機化合物、準揮発性化合物、アルデヒド類及び多環芳香族炭化水素の分析	116
用語解説	126

大気保健対策に係る基礎的実験的研究報告書の概要

研究要旨 ラットを用いて胎仔期のディーゼル排出ガス暴露(全排出ガス暴露、除塵ガス暴露)が生後の免疫機能、呼吸機能、肝臓解毒機能等に及ぼす影響を研究した。また、PM_{2.5} の健康影響指標として活性酸素生成に着目してヒト血漿への粒子の直接的作用を検討した。

第一章 病態発生に関する研究(次世代暴露への影響研究)

I. ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が免疫機能に及ぼす影響

生活環境の約 5 倍濃度の排出ガスに胎仔期暴露すると、仔の花粉に対する IgE 抗体価が上昇した。また、妊娠ラットを野外飼育し、大気環境の影響について検討した結果、同様の結果を得た。

II. ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が生後の呼吸機能に及ぼす影響

ディーゼル排出ガスに妊娠中に暴露されると、胎仔の肺細胞増殖や機能分化に影響を与える遺伝子の発現量減少や肺胞 II 型細胞の機能分化遅延が起こり、生後の呼吸機能が低下する可能性が示唆された。

III. ディーゼル排出ガスのラット胎仔期暴露が肺機能に及ぼす影響

肺のクリアランス機能に着目し検討した結果、排出ガスに胎仔期に暴露されたラットではリンパ流の低下及び肝リン脂質量の増加、また、生後 1 年の再暴露により肺重量増加が認められた。

IV. ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が肝機能に及ぼす影響

排出ガスを胎仔期に暴露されたラットにニコチンを腹腔内投与したところ、生後 6 ヶ月では尿中ニコチン代謝物コチニン量の増加をもたらしたが、10 ヶ月では減少した。肝臓の脂質代謝障害や解毒機能低下等の加齢とともに生じてくる臓器障害の発生を早めることが示された。

V. ディーゼル排出ガスの胎児期暴露による免疫系への影響

妊娠ラットに排出ガスを暴露し、生まれた仔ラットの血清中サイトカイン IL-12 濃度を検討したが、排出ガス暴露による有意な影響は見られなかった。

第二章 大気中微小粒子の健康影響に関する研究

I. 大気中微小粒子 PM_{2.5} のラジカル生成能について

PM_{2.5} により生成する活性酸素の検出方法として蛍光試薬を用いる方法を検討した。さらに Fe(II) を標準物質とした直線状の検量線から、間接的に PM_{2.5} による活性酸素種を定量することが可能となった。

II. 大気中微小粒子 PM_{2.5} 中の金属と血液成分との反応実験

活性酸素検出試薬である APF 及び HPF の性質の差異を利用して PM_{2.5} から活性酸素種の生成を確認した。

III. 大気中微小粒子暴露によるラジカル生成とヒト血漿への影響に関する基礎的研究

PM_{2.5} によるラジカル生成量の季節変動を調べたところ、夏季に高く、冬季に低い傾向が見られた。また PM_{2.5} による血液への直接的影響を検討するため、ヒト血漿を用いた凝血反応時間モデルを作成した。

IV. 大気中微小粒子暴露によるヒト血漿の凝固反応への影響

都内で毎月採取した PM_{2.5} 試料によるヒト血漿の凝固反応を検討した。外因系凝固時間の月別変動は 9 月を最低値とする変化を示したが、PM_{2.5} 質量濃度の変動から予想されるパターンとは異なっていた。

V. ディーゼル排出ガス中の揮発性有機化合物、準揮発性化合物、アルデヒド類及び多環芳香族炭化水素の分析

ディーゼル排出ガス暴露チャンバー内の空気を採取し、炭素数 C₂~C₂₀ の揮発性有機化合物(VOC)、準揮発性化合物(SVOC)、アルデヒド類及び 3 環~6 環の多環芳香族炭化水素(PAH)、合計 98 物質を分析した。VOC、SVOC 及びアルデヒド類の分析では 62 物質が検出、PAH の分析では 12 物質が検出された。

今後の課題 都内ではディーゼル車規制が進められていることから、大気汚染の状況変化に留意しながら、排気微粒子除去装置(DPF)を装着して暴露実験を行い、生体への影響を検証する必要がある。気管支ぜん息の誘発・増悪因子に関する研究を進め、実際の疫学調査へ応用していくことが今後の課題である。

大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究

都市の大気汚染の主要な原因として自動車排出ガスが挙げられる。中でもディーゼル排出ガスによる汚染は、含まれるガス状成分及び粒子状物質による健康影響の懸念から問題視されてきた。また、近年は粒径 $2.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒子成分(PM_{2.5})の及ぼす健康影響が危惧されている。東京都では大気汚染保健対策事業の一環として、昭和62年以降、都民を対象とした健康影響調査(疫学調査)と平行して動物暴露実験等により健康への影響の解明に向けた基礎的実験的研究を実施してきた。本報告書は平成15年度から19年度までの研究成果を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
東京都健康安全研究センター 環境保健部
環境衛生研究科

栗田 雅行、大山 謙一、大久保智子、
斉藤 育江、榎田 隆一、福田 雅夫、
矢口久美子、上原 眞一、
渡辺 伸枝(元 環境衛生研究科)、
大沢 誠喜(元 環境衛生研究科)、
瀬戸 博(元 環境衛生研究科)

【研究目的】

都市の大気汚染の主な原因は自動車の排気ガスであり、中でもディーゼル車によるところが大きい。ディーゼル車の排出ガスには窒素酸化物などのガス状成分及び発ガン性、変異原性が認められる化合物を吸着した粒子状物質が含まれ、ヒトへの健康影響が危惧されている。当研究科では、大気汚染保健対策事業の一環として、疫学調査と平行して動物暴露実験を中心とした研究を実施しており、これまでに排出ガスと発ガンの関係、呼吸器系への影響などを調査してきた。平成12年度からは妊娠時期に排気ガスに

暴露することによる母親及び胎仔への生体影響についての研究を進め、生殖機能に及ぼす影響、発生と分化に及ぼす影響などを検討した。また、疫学調査に利用可能な健康影響指標の開発も行ってきた。

今回は、ディーゼル排出ガスとぜん息との関係を考える際の基礎的な情報を提供する目的で、ディーゼル排出ガスのラット胎仔期暴露による仔への影響について、免疫機能及び呼吸器機能などに関して検討を加えた。また、近年、問題視されているディーゼル排出ガス中の粒径 $2.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒子成分(PM_{2.5})の健康影響について、活性酸素種の生成に着目し検討を行なった。

【研究要旨】

第一章 病態発生に関する研究(次世代暴露への影響研究)

I. ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が免疫機能に及ぼす影響

スギ花粉感作に対する反応(15年度)

これまでに、排出ガスを胎仔期に暴露すると仔の花粉に対するIgE抗体の上昇が起こりやすいことを報告した。この実験に使われた排出ガス濃度は、通常の都市部における濃度の約100倍であった。本研究では、さらに低濃度の排出ガスを胎仔期に暴露したラットの免疫機能に及ぼす影響を検討した。通常環境濃度の約5倍と概算される排出ガスを胎仔期に暴露したラットにおいて抗原量を増すと花粉に対するIgE抗体価が上昇した。また、妊娠ラットを野外で飼育し、通常の大気環境の影響について検討した結果、同様の結果を得たが、さらに繰り返し実験を行い、再現性の確認が必要である。

II. ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が生後の呼吸機能に及ぼす影響(16年度)

胎仔期に暴露されたラットを用いて、胎仔肺

の生化学的・形態学的検討並びに生後の呼吸機能について解析した。ディーゼル排出ガスの妊娠ラットへの暴露により、胎仔の肺で、細胞増殖並びに機能分化に影響を与える遺伝子に関する TGF- β 1、3 の発現量が変動した結果、胎仔の肺胞 II 型細胞の機能分化が遅延し、肺表面活性物質の主成分であるリン脂質の合成が低下することが明らかになった。また、肺胞虚脱と気道過拡張が観察された。全排出ガス暴露群、除塵群ともに同様の変化が見られたことから、排出ガス中のガス状成分、あるいは $0.05 \mu\text{m}$ 以下の超微粒子の関与が考えられた。本研究の結果より、妊娠中にディーゼル排出ガスを暴露されると、母体の内分泌環境の変化が起こり、間接的にその仔の肺の発達段階に影響を与え、生後の呼吸機能が低下する可能性が示唆された。

III. ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が肺機能に及ぼす影響（平成 17 年度）

ディーゼル排出ガスを妊娠した動物に暴露すると、次世代である胎仔にも影響が及び、生後における加齢現象が早期に出現する可能性を示唆してきた。しかし、排出ガスと加齢性変化の係りに関してはこれまでほとんど研究されていない。

肺のクリアランス機能に着目し検討した結果、胎仔期に排出ガスを暴露したラットではリンパ流の低下及び肝リン脂質量の増加が明らかに認められた。また、生後 1 年における排出ガスへの再暴露により、肺重量増加がみられた。これらのことから胎仔期における排出ガスの暴露は臓器障害を発生しやすくすることが考えられた。

IV. ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が肝機能に及ぼす影響（平成 18 年度）

前年度に引き続き、排出ガスの胎仔期暴露と加齢性変化の係りについて検討した。今年度は肝臓の解毒作用に焦点をあてた。投与薬物は

ニコチンとした。排出ガスに胎仔期にのみ暴露された生後 6 ヶ月、10 ヶ月のラットにニコチンを腹腔投与し、血中・尿中ニコチン量を測定した。その結果、胎仔期に暴露されたラットでは成熟期までは肝臓の解毒に関わる酵素が誘導されやすいが、成熟期以降になると肝の解毒機能が急速に低下することが示された。排出ガスの胎仔期における暴露は、肝臓の脂質代謝障害や解毒機能低下等の加齢とともに生じてくる臓器障害の発生を早めることが示された。

V. ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露による免疫系への影響（平成 19 年度）

ディーゼル車排出ガスの生体への影響を調べるため、妊娠ラットに排出ガスを暴露し、生まれた仔ラットの免疫系への影響を検討した。その結果、サイトカイン IL-12 の血清中濃度は雌の除塵群で高い傾向がみられたが、有意差はなかった。一方、体重についてみると、雌では排出ガス暴露群は対照群に比べ、体重が有意に軽くなる結果が得られた。今後、さらに測定項目を増やし、排出ガス暴露の免疫系への影響について検討をすすめる。

第二章 大気中微小粒子の健康影響に関する研究

I. 大気中微小粒子 $\text{PM}_{2.5}$ のラジカル生成能について:aminophenyl fluorescein (APF)を用いた検出法による検討(平成 15 年度)

大気汚染物質である粒径が $2.5 \mu\text{m}$ 以下の微小粒子($\text{PM}_{2.5}$)による健康影響として、心臓血管系に関する疫学的調査研究が増加している。こうした背景を踏まえ、生体影響への関与が顕著であり、 $\text{PM}_{2.5}$ に含まれる遷移金属との関連が指摘されている活性酸素種(ROS)のひとつであるヒドロキシルラジカルを本研究の中心的な対象とした。ROS に対する特異性が dichlorofluorescein より高いとされる蛍光試薬

aminophenyl fluorescein (APF)を用いて、PM_{2.5}のROS生成を検討した。また、典型的な遷移金属としてPM_{2.5}中に含まれるFe(II)の定量において、酸化されやすいFe(II)の性質によるモル吸光係数への影響や試料の保存温度による影響等について検討した。その結果、Fe(II)を標準物質とした直線状の検量線から、PM_{2.5}によるROS生成を定量することが可能となった。

II. 大気中微小粒子PM_{2.5}中の金属と血液成分との反応実験(平成16年度)

ROSを検出するための蛍光試薬であるAPFとやや性質の異なるhydroxyphenyl fluorescein (HPF)とを併用することにより、生体と密接な関係がある過酸化水素や血清アルブミンとPM_{2.5}との関連を検討した。その結果、PM_{2.5}によるFerrozine溶液の呈色反応と、過酸化水素の添加の有無によるHPFの蛍光強度の差異から、生体への影響が強いとされるヒドロキシルラジカルの生成がPM_{2.5}によって生じることが示唆された。また、APFとHPFとの並行試験結果から、PM_{2.5}によって生じる活性酸素種は、ヒドロキシルラジカルの他に次亜塩素酸やペルオキシナイトライトが予測されたが、monochlorodimedonの吸光度分析から次亜塩素酸でないことが示唆された。さらに、生体における抗酸化物質モデルとしてのウシ血清アルブミンの添加量を増加させるに伴い、PM_{2.5}による蛍光強度の増加が抑制されたことから、PM_{2.5}によって活性酸素種が生成されることが示唆された。

III. 大気中微小粒子暴露によるラジカル生成とヒト血漿への影響に関する基礎的研究(平成17年度)

PM_{2.5}に含まれる遷移金属としてFe(II)をより効率的に検出する試験条件を検討した。さらに、実態把握の例として、大田区で採取したPM_{2.5}によるラジカル生成量に相当するAPFの蛍光強度

について、その季節変動を検討した。その結果、PM_{2.5}によるラジカル生成は夏季に高く、冬季に低い傾向を示したが、PM_{2.5}に含まれるV・Mn・Fe・Co・Cuの遷移金属の増減と一致しなかった。一方、PM_{2.5}による血液への直接的影響を検討するため、凝血試験検査においてコントロールとして一定の品質管理がなされているヒト血漿に注目し、ヒト血漿への微小粒子暴露による凝血反応時間モデルを検討した。その結果、都市大気から採取された粒子状物質の標準物質であるSRM 1648(濃度4 mg/mL)を、37°Cで30分間ヒト血漿に暴露することで、外因系及び内因系における顕著な凝血時間短縮が生起され、それは2 mg/mLの濃度においても短縮の傾向がみられた。

IV. 大気中微小粒子暴露によるヒト血漿の凝固反応への影響(平成18年度)

実験に用いたSRM 1648の溶液濃度を都内で実際に観測されるPM_{2.5}レベルまで下げて暴露すると、ヒト血漿であるControl Plasma Normal (CPN)の凝固時間に明確な短縮がみられなかった。そのため、血漿の活性率に注目して行った暴露実験によって凝固時間の変化を確認し、ヒト血漿モデルの感度を高めることができた。さらに、実験に用いる血漿をCPNからVerify Reference Plasma (VRP)に変更することにより、検出感度をさらに上げることができた。実際のPM_{2.5}の暴露影響をみるため、約1年間にわたり足立区内において毎月採取したPM_{2.5}試料を用いた。このときのPM_{2.5}質量濃度は8月を最小値、6月と12月をピークとした変動を示した。PM_{2.5}に含まれる21元素濃度の変動は、Na・Mg・Ca・Co・Agを除くとPM_{2.5}質量濃度の変動と類似したパターンを示した。採取したPM_{2.5}に30分間暴露した75%及び50%活性のVRP血漿において、その外因系凝固時間の月別変動は9月を最小値とする変化を示したが、PM_{2.5}質量濃度の変動

を反映していなかった。一方、同一試料の PM_{2.5} による APF の蛍光強度変化は9月をピークとする変化を示したが、PM_{2.5} 質量濃度の変動を反映していなかった。しかし、PM_{2.5} 試料によるヒト血漿凝固時間変化と APF の蛍光強度変化は対称的であった。以上から、PM_{2.5} によって生起するヒト血漿の外因系凝固反応の短縮と蛍光強度の増加は、PM_{2.5} 質量濃度やそこに含まれる多くの元素以外のなんらかの同一的影響を示唆するものであった。

V. ディーゼル排出ガス中の揮発性有機化合物、準揮発性有機化合物、アルデヒド類及び多環芳香族炭化水素の分析

ディーゼル排出ガス暴露チャンバー内の空気を採取し、炭素数 C₂~C₂₀ の揮発性有機化合物 (VOC)、準揮発性化合物 (SVOC)、アルデヒド類及び3環~6環の多環芳香族炭化水素 (PAH)、合計98物質を分析した。VOC、SVOC 及びアルデヒド類の分析では、チャンバー内空気から62物質が検出され、そのうち炭素数 C₁₅ 以下のガス状物質については、全ガス暴露群 (H 群) よりも除塵群 (ND 群) の方が濃度の高い物質が多かった。最も高濃度に検出されたのは、硫酸ジメチル (654 μg/m³)、次いでホルムアルデヒド (647 μg/m³) であった。また、PAH の分析では12物質が検出され、H 群の方が ND 群よりも高濃度の物質が多く、最も濃度が高かったのは、アセナフレン (736ng/m³)、次いでフルオレン (623ng/m³) であった。

【まとめ】

従来より、大気汚染物質による健康影響が指摘されている気管支ぜん息は、発作性の呼吸困難、ぜん息を特徴とする疾患で、気道過敏性、炎症が要因となっており、長期患者では気道壁リモデリングが不可逆的に進行している。また、ぜん息の多くの患者は室内塵や花粉等のなん

らかの環境アレルゲンに対する IgE 抗体を持ち、これらの病因アレルゲンに暴露されるとぜん息発作が起こることから、ぜん息はアトピー性疾患の側面もある。

今回は、ディーゼル排出ガスとぜん息との関係を考える際の基礎的な情報を提供する目的で、胎仔期にディーゼル排出ガスに暴露した場合の生後のラットへ及ぼす影響等を調べた。本研究で観察された多くの変化は、動物への高濃度暴露実験の結果であるが、ぜん息の発作の誘発や増悪因子になるものと推察された。すなわち、胎仔期にディーゼル排出ガスに暴露された生後のラットのスギ花粉に対するアレルギー抗体価上昇、肺の成長因子である TGF-β1、3 の遺伝子発現量の低下、肺リン脂質の低下等肺表面活性物質の欠乏、肺クリアランス低下、肺胞虚脱と気道過拡張、及び再暴露による肺重量増加、並びに PM_{2.5} の活性酸素生成による組織障害等は、気道過敏性、炎症の一因となる可能性も考えられる。

【今後の課題】

今回、ディーゼル排ガスの高濃度暴露実験等により前述のような成果が得られた。一方、東京都はディーゼル車に対して、排出ガス規制を平成15年10月から実施し、排出ガス基準を満たさないディーゼル車の走行を禁止している。現在の都内の大気汚染の状況を実験に反映させるため、今後は、排気微粒子除去装置 (DPF) を装着し、新しい排出基準に適合させた排出ガスによる暴露実験を実施する必要がある。実施結果はこれまでの結果と比較し、DPF 装着の効果を検証すると共に、DPF で除去できない成分を明らかにし、それらの生体への影響を検討することにより、気管支ぜん息の発作の誘発や増悪因子に関する研究を進め、実際の疫学調査へ応用していくことが今後の課題である。

第一章 病態発生に関する研究(次世代暴露への影響研究)

- . ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が免疫機能に及ぼす影響
- . ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が生後の呼吸機能に及ぼす影響
- . ディーゼル排出ガスのラット胎仔期暴露が肺機能に及ぼす影響
- . ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が肝機能に及ぼす影響
- . ディーゼル排出ガスの胎児期暴露による免疫系への影響

ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が免疫機能に及ぼす影響 スギ花粉感作に対する反応

研究要旨

先に、胎仔期に排出ガスを暴露すると花粉に対する IgE 抗体の上昇が起こりやすいことを報告したが、この時使用された排出ガス中の浮遊粒子状物質濃度は、都市部における浮遊粒子状物質の約4割がディーゼル車由来であることを考慮すると約 100 倍であった。本研究では、排出ガスの暴露濃度をさらに下げた低濃度暴露実験を新たに実施し、胎仔期における排出ガス暴露の免疫機能に及ぼす影響の閾値について検討した。また、妊娠ラットを野外で飼育し、通常の大気環境の影響について検討した。胎仔期に排出ガス暴露された場合、通常的生活環境の約 5 倍の濃度による暴露条件においても抗原量を増すと花粉に対する IgE 抗体価が上昇した。また、野外暴露実験でも同様の結果を得たが、さらに繰り返し実験を行い、再現性の確認が必要である。

研究の目的

ディーゼル車からの排出ガスが、スギ花粉症の発症に關与していることが注目されている。石山らは、日光地方における疫学調査において、花粉症発症率は花粉飛散数が同様な地区においても自動車交通量の多少により異なること^{1,2)}、小泉は、いろは坂の自動車交通量と日光地方の花粉症頻度とがあい伴って増加していることから花粉症の発症に自動車からの排出ガスが關与していることを示唆した³⁾。実験的には、スギ花粉抗原を投与時にディーゼル排出粒子を混合すると特異的 IgE 抗体の産生が増強されたことから、ディーゼル車排出粒子はアレルギー反応を増強するアジュバント作用を持つことが報告されている⁴⁻⁸⁾。

当研究科では、昭和 54 年以降、大気汚染保健対策事業の一環として疫学調査と並行して動物実験を中心とした基礎的研究を実施しており^{9,10)}、平成7年度から、「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」として、主に呼吸器への影響を調査してきた^{11,12)}。平成 12 年度からは、特に、ディーゼル排気ガスを妊娠動物に暴露し、母親並びにその胎仔への生体影響について研究を

進め、母体の血中テストステロン濃度の上昇、胎仔の生殖器形成の遅延が起こることを報告した¹³⁾。

免疫機能の中核的器官である胸腺はステロイドホルモンに対する感受性が高く、ステロイド剤の投与は免疫機能の低下を起こす。特に妊娠動物にステロイド剤を投与した場合、その影響は母体ばかりでなく胎仔にも及び、胸腺上皮細胞の機能を抑制し胸腺リンパ球の分化を阻害することが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。これらのことから、排出ガスの妊娠動物への暴露、すなわち胎仔期における暴露は、胎仔の免疫担当臓器の発達を抑制することによって、アレルギーを起こしやすい体質にする可能性が考えられた。

ディーゼル排出ガスに胎仔期・哺乳期・離乳後に暴露されたラットを用いて、スギ花粉に対する免疫応答反応を比較し、排出ガスに胎仔期に暴露されたラットは花粉症を発症しやすい体質になること、離乳後における暴露では花粉に対する IgE 価が対照群と同様であること、また雌雄の仔ラットのスギ花粉に対する反応に大きな違いはないことを報告した。本研究では、排出ガスの暴露濃度を

さらに下げた低濃度暴露の条件を新たに設定し、排出ガス暴露の免疫機能に及ぼす影響の閾値について検討した。また、野外暴露実験は、ヒトの疫学調査と動物を用いた実験的研究とを結びつける有効な手段であることから、妊娠ラットを野外で飼育し、通常の大気環境の免疫機能に及ぼす影響について検討した。

実験方法

1 ディーゼル排出ガス低濃度暴露実験

1) 暴露方法・暴露条件

ディーゼル排出ガスの暴露は、図1に模式的に示した方法で行った。暴露源として、排気量309ccの小型のディーゼルエンジン(ヤマハディーゼルエンジン NFAD-50-EX)、燃料には軽油(JIS2号相当,日本石油)を用い、回転数2,600 rpmで運転した。その排気ガスを清浄空

気で希釈し、暴露チャンバー内に導入した。チャンバーの容量は1.6m³、換気回数は15回/時、換気容量は405ℓ/minであった。全排気ガス暴露チャンバーには希釈したディーゼル排気ガスを導入した。除塵排気ガス暴露チャンバーには、希釈排気ガスをヘパフィルター(ATM 3QA,日本無機)に通し、0.05μm以上の粒子状成分を除去して導入した。対照群には活性炭層(SX, HC-6:ツルミコール)とヘパフィルターを通した清浄空気を導入した。各チャンバー内の環境濃度は、粉塵濃度計(β線式質量濃度計 BAM-102型、SHIBATA)と、窒素酸化物測定器(9841型 Monitor Lobs Co.)で常時モニターした。本実験で用いた全排気ガス暴露群、除塵暴露群並びに対照群のチャンバー内の暴露時間内平均粉塵濃度と二酸化窒素濃度を表1に示した。

図1 暴露実験模式図

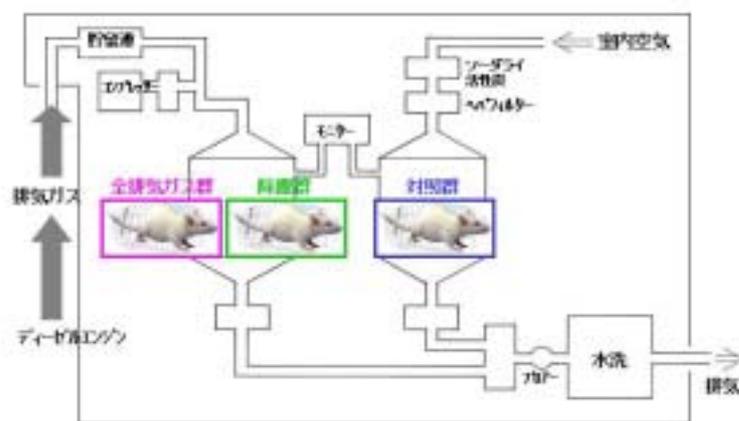


表1 暴露条件

		粒子状物質(mg/m ³)	二酸化窒素(ppm)
対照群		<0.01	0.02
全排出ガス暴露群	中濃度群	0.17	0.10
	低濃度群	0.10	0.05
除塵排出ガス暴露群	中濃度群	<0.01	0.10
	低濃度群	<0.01	0.05

2) 動物の暴露と免疫のスケジュール

図2に動物の暴露と免疫のスケジュールを示した。72匹の妊娠ラット(F344/DuCrj)を日本チャールスリバーから購入し、実験はこれらの妊娠ラット由来の仔ラットを用いて行った。実験群は、胎仔期中濃度全排出ガス暴露群(MT-C-C)、胎仔期低濃度全排出ガス暴露群(LT-C-C)、胎仔期中濃度除塵排出ガス暴露群(MF-C-C)、胎仔期低濃度除塵排出ガス暴露群(LF-C-C)、哺乳期中高濃度全排出ガス暴露群(C-MT-C)、哺乳期低濃度全排出ガス暴露群(C-LT-C)、哺乳期中濃度除塵排出ガス暴露群(C-MF-C)、哺乳期低濃度除塵排出ガス暴露群(C-LF-C)並びに対照群(Control)の9群である。群の呼称は、胎仔期における暴

露状況(胎生7日目から出生まで)→哺乳期における暴露状況(生後2日目から17日目まで)→その後の暴露状況の順に記載しており、MT(Middle dose Total exhaust)は中濃度全排出ガス暴露、LT(Low dose Total exhaust)は低濃度全排出ガス暴露、MF(Middle dose Filtered exhaust)は中濃度除塵排出ガス暴露、LF(Low dose Filtered exhaust)は低濃度除塵排出ガス暴露、C(Clean air)は清浄空気の略称である。暴露時間は午前10時から午後4時まで1日6時間、週5日間行い、暴露日数は12日間であった。各群のラットは、温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ に維持されたチャンバー内で飼育した。飼料はラット用標準飼料を与えた(MF, オリエンタ

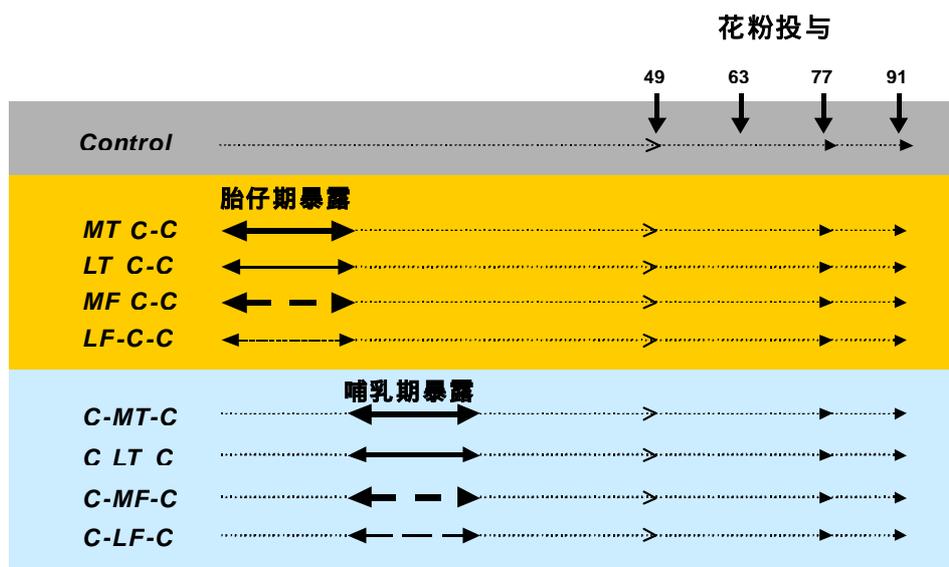


図2 ディーゼル排出ガス暴露とスギ花粉感作のスケジュール

Control ; 実験期間中清浄空気下で飼育。生後49日目から3,4回花粉投与。

MT-C-C & LT-C-C ; 胎生7日目から出生まで 高濃度・中濃度の全排出ガスに暴露され、生後は清浄空気下で飼育。生後49日目から3,4回花粉投与。

MF-C-C & LF-C-C ; 胎生7日目から出生まで 高濃度・中濃度の除塵排出ガスに暴露され、生後は清浄空気下で飼育。生後49日目から3,4回花粉投与。

C-MT-C & C-LH-C ; 生後2日から17日目まで高濃度・中濃度の全排出ガスに暴露され、この期間以外は清浄空気下で飼育。生後49日目から3,4回花粉投与。

C-MF-C & C-LF-C ; 生後2日から17日目まで高・中濃度の除塵排出ガスに暴露され、この期間以外は清浄空気下で飼育。生後49日目から3,4回花粉投与。

ル酵母)。仔ラットは生後 23 日目の離乳時まで親ラットと共に飼育し、その後、同群の仔ラットを雌雄に分け、無作為に 1 ケージ当たり 6-8 匹収容して飼育した。

生後 49 日目から 2 週間ごとに、スギ花粉を抗原として腹腔内投与した。感作実験前と、3 回及び 4 回目感作の 5 日後にエーテル麻酔下にて全採血した。花粉は一回につき粗抗原量として 5mg を水酸化アルミゲル 4mg(Pierce, USA)とともに NaHCO_3 (0.125M, 0.3mL) に加え投与した。実験に使用した花粉粗抗原は、タンパク 100 μg につきスギ花粉の主要抗原である Cry j 1、Cry j 2 を各々 26.7 μg 、2.7 μg 含有していた。

3) P-K 反応によるスギ花粉に特異な IgE の測定

スギ花粉抗原に特異な IgE 抗体価を高濃度・中濃度暴露実験と同様に P-K 反応によって測定した。スギ花粉抗原に特異な IgE 抗体価を P-K 反応によって測定した。3 回あるいは 4 回花粉感作したラットから採取した血清を 2 倍段階希釈し、それぞれ 0.1mL ずつ、日本チャールスリバーから購入した 9 週齢の雄ラット (F344/DuCrj) の背部皮内に接種した。48 時間後にスギ花粉精製抗原である 0.5 μg の Cry j 1 と 0.25 μg の Cry j 2 (林原生物化学研究所) の混合液 0.02mL を血清を接種した部位に皮内注射するとともに、0.5% のエバンスブルー液を 1mL 静注し、30 分後に出現する青いスポットを皮膚の裏面から計測した。スポットの直径 5mm 以上のものを陽性とした。

2. 野外暴露実験

1) 動物の暴露方法

日本チャールスリバーから購入した 3 匹の妊娠ラット (F344/DuCrj) を、3 匹とも同一のステンレスケージ入れ集合住宅三階のベランダに設置した。妊娠 7 日目から 18 日目まで野外で

飼育した。飼料はラット用標準飼料 (MF, オリエンタル酵母)、飲料水は給水瓶で自由摂取とした。野外暴露実験実施は平成 15 年の 4 月 14 日から 4 月 25 日まで 11 日間であった。この後は、妊娠ラットを当研究センターの動物飼育施設の前室 (温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$) で飼育し、出産させた。仔ラットは生後 23 日目の離乳時まで親ラットと共に飼育し、その後、同群の仔ラットを雌雄に分け、無作為に 1 ケージ当たり 6-8 匹収容して飼育した。実験はこれらの妊娠ラット由来の仔ラット (雌雄) を用いて行った。

2) 環境調査

ア 窒素酸化物 簡易拡散法である PTIO 測定法によって行った。本法は空気中の NO および NO_2 を捕集フィルター上に受動的に捕集して、比色分析により濃度を定量する方法である。 NO_x のうち、NO は捕集剤であるトリエタノールアミンに直接吸着しないため、PTIO により NO_2 に酸化してトリエタノールアミンに吸着捕集する。よって NO_x 捕集エレメントには、NO が酸化されたものと、元々の NO_2 が捕集される。一方、 NO_2 捕集エレメントには、 NO_2 がトリエタノールアミンに吸着捕集される。NO 捕集量は NO_x 捕集量から NO_2 捕集量を差し引くことによって求めた。PTIO によって測定した野外暴露期間中の平均二酸化窒素濃度は 0.032ppm、一酸化窒素濃度は 0.012ppm であった。

イ PTIO 測定法について

ア) 測定原理 本法は空気中の NO および NO_2 を捕集フィルター上に受動的に捕集して、比色分析により濃度を定量する方法である。サンプラーの分解写真を図 3 に示す。NO は捕集剤であるトリエタノールアミンに直接吸着しないため、PTIO により NO_2 に酸化してトリエタノールアミンに吸着捕集する。よって NO_x 捕集エレメントには、NO が酸化されたものと、元々の NO_2 が捕集

される。一方、NO₂捕集エレメントには、NO₂がトリエタノールアミンに吸着捕集される。NO捕集量はNO_x捕集量からNO₂捕

集量を差し引くことによって求める。

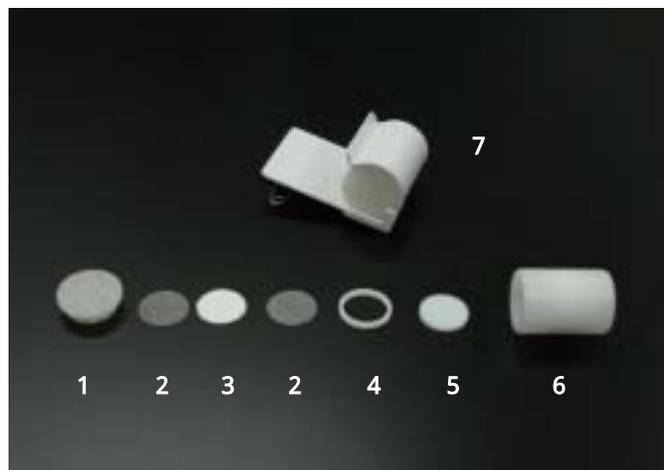


図3 NO、NO₂同時測定用サンプラー(分解写真)

1 : 多孔栓、2 : メッシュ、3 : 捕集エレメント、4 : リング、5 : テフロン板、6 : ケース (右側にも1から5のパーツを対称にセットする。図では省略した)、7 : ホルダー

イ) サンプラーの作製法と分析法

1 捕集エレメントの作製試薬

NO₂吸収液 (10% v/v TEA・アセトン溶液) トリエタノールアミン (特級) 2mlをアセトン (特級) に溶かし、20mlとする。

NO_x吸収液 (30mg/ml PTIO・TEA溶液) PTIO 0.3gをNO₂吸収液に溶かし10mlとする。

2 NO₂及びNO_x捕集エレメントの調整

直径14.5mmに打ち抜いたセルロース繊維ろ紙 (東洋No.50) をテフロン網の上に置き、マイクロピペットを用いてNO₂及びNO_x吸収液50μlをそれぞれのろ紙上に担持させ、NO₂及びNO_x捕集エレメントとする。

3 分析試薬の調整

スルファニル溶液 スルファニルアミド (特級) 80gをリン酸 (特級) 200ml

と水約700mlを混合した溶液に溶かし、さらに水を加えて1000mlとする。冷暗所に保存する。

NEDA溶液 N - (1 - ナフナル) エチレンジアミンニ塩酸塩0.56gを水100mlに溶かす。冷暗所に保存する。

発色試薬 スルファニル溶液10容とNEDA溶液1容を混合し、用時調整する。

NO₂標準溶液 1000 μg/mlのNO₂標準原液を水で100倍に希釈し、さらにその1、2、4、6、8mlをとり、それぞれを水で100mlにメスアップし標準液 (0~0.8 μgNO₂⁻/ml) とする。

4 分析操作

NO₂及びNO_x捕集部の捕集エレメントを金網と共にピンセットで取り出し、それぞれ25mlの共栓試験管に入れる。水8mlを加え、30分間抽出後、軽く振り混ぜる。

これを2~6 に冷却後、発色試薬2mlを加えると同時に速やかに攪拌し、冷却したまま30分間放置する。

室温に戻し、波長545nm付近の最大吸収波長で吸光度を測定する。

暴露しなかった捕集エレメントについて同様の操作を行い、空試験値を測定する。

NO₂標準溶液8mlを正確にとり、発色試薬2mlを加え、同様の発色操作を行い検量線を作製する。

NO_x溶液は、ジアゾカプリング反応と同時に発色試薬によるPTIOの分解反応が生じ、その後、さらに吸光度を経時的に上昇させるような反応が起こる。したがって、発色試料は短時間に分析する必要がある。

分析検体が多数(30検体以上)ある場合は、対照セルに空試験試料液を入れ検体の吸光度を測定する。

ウ) 暴露濃度と捕集速度の関係及びppb濃度の算出

暴露濃度 c (ppb) と捕集速度 v (ng/min) はNO及びNO₂と共に良好な正比例の関係がある。これを $c = v$ で表せば、傾き (ppb濃度換算係数) の値は、温度20℃、湿度70%のとき NO = 60, NO₂ = 56, となり、NO及びNO₂の濃度 (ppb) は次式より求まる。

NO濃度(ppb) =

$$NO \times (W_{NOx} - W_{NO_2}) / t \times 8 \times 1000$$

NO₂濃度(ppb) = NO₂ × W_{NO₂} / t × 8 × 1000

ウ) 浮遊粒子状物質 NWPS-35型サンプラーにPM2.5用テフロン加工ガラス繊維フィルター(パルフレクスT60A20)を設置した。吸引流量を毎分2.5リットルに設定し(柴田科学MP-Σ500型)、浮遊粒子状物質を捕集した。本調

査では、平日2日間の測定値をもって、実験期間中の平均暴露量に代えた。浮遊粒子状物質の濃度は、0.0415mg/m³ そのうち

PM2.5は0.0318mg/m³であった。

3) 免疫のスケジュール

低濃度暴露実験と同様に、生後49日目から2週間ごとに、スギ花粉を抗原として腹腔内に3回及び4回目投与した。

4) P-K 反応によるスギ花粉に特異な IgE の測定

スギ花粉抗原に特異な IgE 抗体価を低濃度暴露実験の場合と同様の P-K 反応によって測定した。

実験結果

1 低濃度暴露実験

1) P-K 反応によるスギ花粉に特異な IgE 抗体価

図4にスギ花粉で3回あるいは4回感作した後のP-K反応で測定したIgE抗体価の幾何学的平均値を対数目盛で示した。花粉感作3回後では、胎仔期中濃度の全排出ガス・除塵排出ガスに暴露されたMT-C-C、MF-C-C群と、哺乳期中濃度全排出ガスに暴露されたC-LT-C群のIgE抗体価は対照群に比べ有意に高かった(各々P<0.05, 表2)。また、哺乳期中濃度の排出ガス暴露されたC-MT-C群のIgE抗体価は対照群に比べ有意に低かった(P<0.01, 表2)。4回感作後のIgE抗体価は、胎仔期中濃度の全排出ガス・除塵排出ガスに暴露されたLT-C-C、LF-C-C群では対照群に比べ有意に高かった(各々P<0.05、P<0.01、表2)。また、哺乳期中濃度の除塵排出ガスに暴露されたC-MF-C群では対照群に比べ有意に高かった(P<0.05, 表2)。

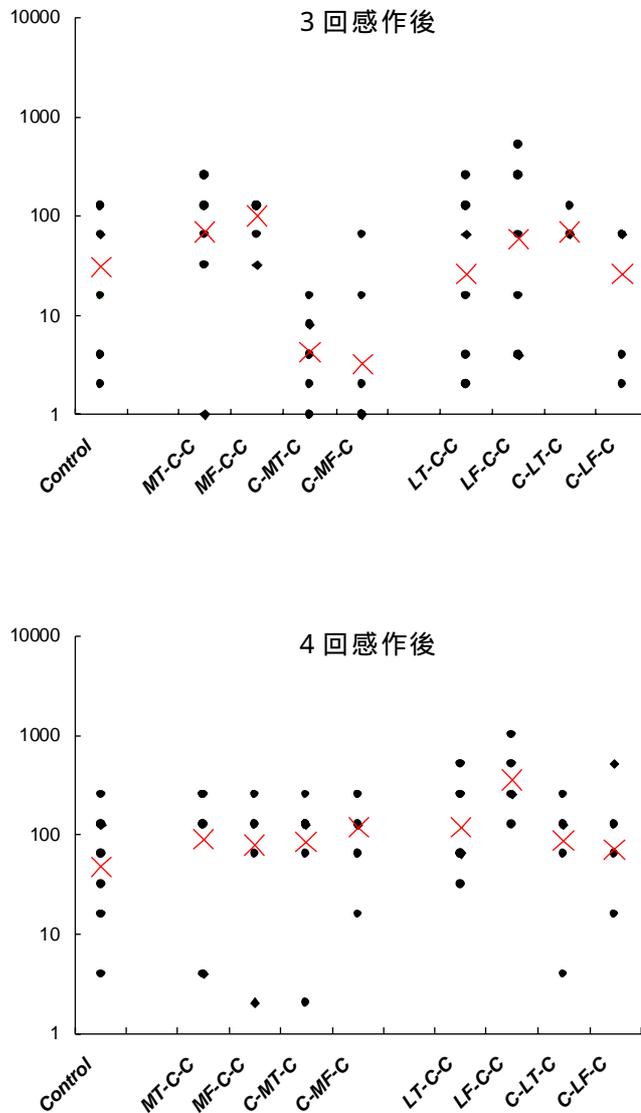


図4 スギ花粉3,4回感作後のP-K反応で測定したIgE値
個々のラットのIgE値; ×群内の幾何学的平均値

2 野外暴露実験

1) P-K 反応によるスギ花粉に特異な IgE 抗体価

図5にスギ花粉で3回あるいは4回感作した後のP-K反応で測定したIgE抗体価の幾何学的平均値を対数目盛で示した。花粉感

作3回後では、胎仔期に野外に暴露されたField群のIgE抗体価は対照群と同等であった(表3)。4回感作後の胎仔期に野外に暴露されたField群のIgE抗体価は、対照群に比べ有意に高かった($P < 0.05$ 、表3)。

表2 P-K 反応で測定した IgE 価

	Immunized three times			Immunized four times			
	(n)	log ₂ P-K IgE titers		(n)	log ₂ P-K IgE titers		
<i>Control</i>	13	4.9 ±	2.2	10	5.6 ±	1.8	
<i>MT-C-C</i>	9	6.8 ±	1.2 *	10	6.5 ±	2.4	
<i>MF-C-C</i>	8	6.6 ±	0.7 *	7	6.3 ±	2.4	
<i>C-MT-C</i>	8	2.6 ±	1.0 **	10	6.4 ±	2.0	
<i>C-MF-C</i>	6	4.3 ±	2.4	10	6.9 ±	1.3	*
<i>LT-C-C</i>	10	4.7 ±	2.7	10	6.9 ±	1.5	*
<i>LF-C-C</i>	8	5.9 ±	2.8	7	8.5 ±	1.0	**
<i>C-LT-C</i>	8	6.1 ±	0.4 *	7	6.4 ±	2.1	
<i>C-LF-C</i>	7	4.7 ±	2.2	7	6.2 ±	1.9	

Values are expressed as mean ± S.E.

* Different from *Control*, p<0.05; ** different from *Control*, p<0.01

表3 P-K 反応で測定した IgE 価

	Immunized three times			Immunized four times			
	(n)	log ₂ P-K IgE titers		(n)	log ₂ P-K IgE titers		
<i>Control</i>	9	4.9 ±	1.3	11	6.2 ±	1.5	
<i>Field</i>	6	4.8 ±	2.1	6	7.8 ±	1.7	*

Values are expressed as mean ± S.E.

* Different from *Control*, p<0.05; ** different from *Control*, p<0.01

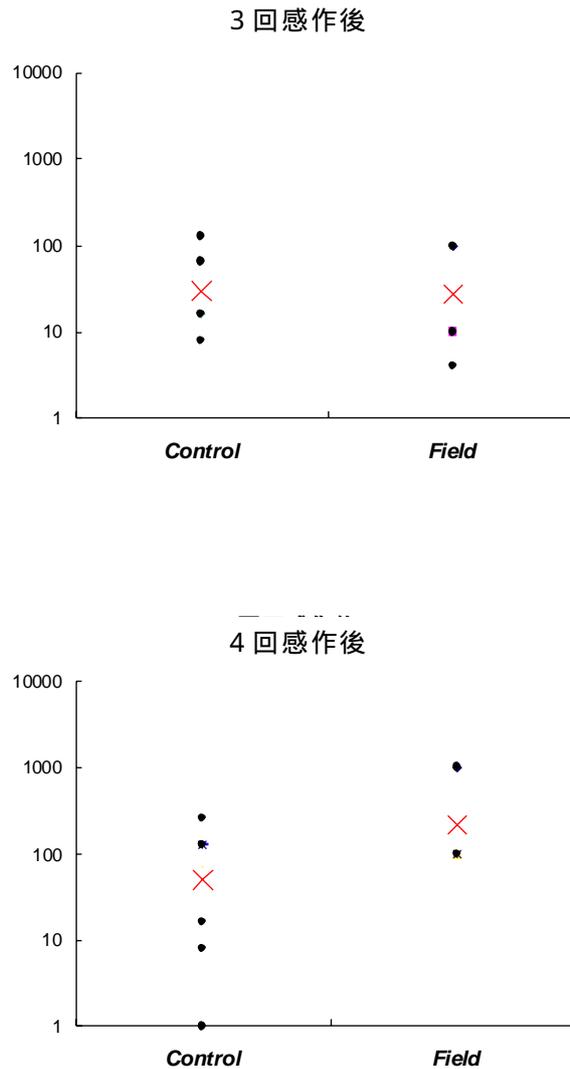


図5 スギ花粉 3,4 回感作後の P-K 反応で測定した IgE 価
 個々のラットの IgE 価; ×群内の幾何学的平均値

考察

ディーゼル排出ガスの胎仔期における中濃度暴露では、三回感作後では IgE 価の上昇がみられたが四回感作の後では対照群との差が明らかではなかった。この結果は、前回の中濃度暴露の場合と同様であり、実験の再現性が確認された。暴露濃度は活性化した免疫反応の持続に関与することが考えられた。

低濃度暴露の場合は、三回感作後では IgE は対照群と同等であったが、四回感作の後では有意に上昇していた。本実験で実施し

た低濃度暴露実験の濃度は、大気中 SPM 濃度とディーゼル車排出ガスの寄与率(約4割)から、通常的环境濃度の約 5 倍と概算される。花粉に対する IgE 抗体の産生に関する胎仔期暴露実験における濃度の閾値は、本実験の条件よりさらに低いものと考えられた。

野外暴露実験の結果、四回感作の後に IgE の有意な上昇がみられた。野外暴露実験は、ヒトの疫学調査と動物を用いた実験的研究とを結びつける有効な手段である。さらに実験を繰り返し再現性の確認を行う必要がある。

文献

1. 石山康子,池森亨介,小泉一弘,石崎 達. 大気汚染のスギ花粉症に及ぼす影響:アレルギー, 35, 892, 1986.
2. Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y, Kushibiki E. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy*. 1987; 58: 265-270.
3. 村中正治,小泉一弘,石田房子,宮本睦子,鈴木修二,奥村 浩,竹田浩洋. 花粉アレルギーの増加と大気汚染-ディーゼル排出微粒子の関与についての作業仮説とその検討. 日本医事新報. 1985; 3180: 26-32.
4. Diaz-Sanchez D, Garcia MP, Wang M, Jyrala M, Saxon A. Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104: 1183-1188.
5. Fujimaki H, Saneyoshi K, Shiraishi F, Imai T, Endo T: Inhalation of diesel exhaust enhances antigen-specific IgE antibody production in mice. *Toxicology*. 1997; 116: 227-233.
6. Granum B, Gaarder PI, Lovik M. IgE adjuvant effect caused by particles - immediate and delayed effects. *Toxicology*. 2001; 156: 149-159.
7. Steerenberg PA, Dormans JA, van Doorn CC, Middendorp S, Vos JG, van Loveren H. A pollen model in the rat for testing adjuvant activity of air pollution components. *Inhal Toxicol*. 1999; 11: 1109-1122.
8. Steinsvik TE, Ormstad H, Gaarder PI, Aaberge IS, Bjonness U, Lovik M. Human IgE production in hu-PBL-SCID mice injected with birch pollen and diesel exhaust particles. *Toxicology*. 1998; 128: 219-230.
9. 複合大気汚染に係る健康影響調査 基礎的実験的研究総合解析報告書 昭和61年 東京都衛生局
10. 大気汚染保健対策に係る健康影響調査 基礎的実験的研究報告書 平成3年 東京都衛生局
11. 大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究報告書 平成8年 東京都衛生局
12. 大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究報告書 平成13年 東京都衛生局
13. Watanabe N, Kurita M. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect*, 2001;109, 111-119.
14. Kumar N, Shan LX, Hardy MP, Bardin CW, Sundaram K. Mechanism of androgen-induced thymolysis in rats. *Endocrinology*. 1995; 136: 4887-4893.
15. Leposavic G, Micic M. Testosterone binding sites in the rat thymus during late embryonal and postnatal period. *Thymus*. 1992; 20: 77-88.
16. Olsen NJ, Olson G, Viselli S, Gu X, Kovacs XJ. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology*. 2001; 142: 1278-1283.

ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が生後の呼吸機能に及ぼす影響

研究要旨

東京都が実施した疫学調査では、交通量が多く、二酸化窒素および浮遊粒子状物質の濃度が高い地区の住民は、それらが低い地区の住民に比べて、肺機能値が低い傾向があることが示されている。排出ガスの呼吸器に及ぼす影響について基礎的な研究が求められている。すでに、排出ガスに新生児期から暴露された動物では肺の形成・成熟過程が障害を受けることをすでに報告した。本研究では、胎仔期に暴露されたラットを用いて、胎仔肺の生化学的・形態学的検討並びに生後の呼吸機能について解析した。

ディーゼル排出ガスの妊娠ラットへの暴露により、胎仔の肺で TGF- β 1, 3 の発現量が変動した結果、胎仔の肺胞 II 型細胞の機能分化が遅延し、肺表面活性物質の主成分であるリン脂質の合成が低下することが明らかになった。全排出ガス暴露群、除塵群ともに同様の変化が見られたことから、排出ガス中のガス状成分、あるいは $0.05 \mu\text{m}$ 以下の超微粒子の関与が考えられた。

本研究結果より、妊娠期にディーゼル排出ガスを暴露されると、母体の内分泌環境の変化が起こり、間接的にその子の肺の発達段階に影響を与え、生後の呼吸機能が低下する可能性が示唆された。

目的

ディーゼル車からの排出ガスを妊娠期の動物に暴露すると、次世代である胎児・子の生殖機能や免疫機能に影響を及ぼすことを報告してきた^{1,2,3}。この原因として、排出ガスに暴露された妊娠動物における内分泌機能の変調が胎児・子の諸臓器の形成過程に作用するためと考えられた。

東京都が実施した疫学調査では、交通量が多く、二酸化窒素および浮遊粒子状物質の濃度が高い地区の住民は、それらが低い地区の住民に比べて、肺機能値が低い傾向があることが示されている⁴。肺の形成は胎仔期に始まり、肺胞形成や肺機能の発達は生後 8 歳ころまで続くこと、臨界期に充分発達しない場合には未熟な肺構造のまま留まること、肺の形成・発達過程にはホルモンも深く関与することが知られている^{5,6,7,8,9,10,11}。汚染濃度の高い地区に居住するヒトの呼吸機能の低下には、肺の形成・発育期における大気環境が関わっている可能性が考えられる。

排出ガスに新生児期から暴露された動物では肺の形成・成熟過程が障害を受けることをすでに

報告した^{12,13}。本研究では、胎仔期に暴露されたラットを用いて、胎仔肺の生化学的・形態学的検討並びに生後の呼吸機能について解析した。

実験方法

1 ディーゼル排出ガスの暴露

ディーゼル排出ガス発生源として、発電用ディーゼルエンジン(NFAD-6 型、ヤンマーディーゼル、排気量 309cc)を用いた。暴露は、動物暴露チャンバー内(内容量 1.6m^3)で、妊娠 7 日目から 1 日 6 時間行った。対照群は、HEPA フィルター($0.05 \mu\text{m}$ 、99.99%除去、日本無機)を通した室内空気を、ソーダライム(和光純薬)と 2 種類の活性炭(HC-6、SX ツルミコール)に通過させ、更に HEPA フィルターを通しチャンバー内に導入した。全排出ガス暴露群は、ディーゼル排出ガスを清浄空気で希釈し、チャンバー内に導入した。除塵群は、ディーゼル排出ガスを HEPA フィルターに通過させ、チャンバー内に導入した。

2 暴露チャンバー内の環境測定

各暴露チャンバー内の粒子状物質およびガス

状成分の濃度測定には、粉塵濃度計(β線式質量濃度計 BAM-102、柴田科学器械工業)と、窒素酸化物測定機(9841、Monitar. Lobs. Co)を用いた。粒子状物質および窒素酸化物濃度の平均値は全排出ガス暴露群(粉塵濃度:1.73mg/m³, NO₂濃度:0.76ppm)、除塵群(NO₂濃度:0.80ppm)であった。

3 胎仔肺の生化学的検査

1) 実験動物

45匹のラット(F344/DuCrj)を、全排出ガス暴露群、除塵群、対照群の3群に分け、妊娠7日目からチャンバー内で1日6時間暴露した。妊娠18, 20, 21日目に子宮から胎仔を取り出し、雌雄の判別、胎仔の体重測定を行った後、氷上で肺を摘出し重量を測定した。肺は直ちに-20°Cで凍結保存した。胎生18日目の肺については、各妊娠ラットと同腹仔を雌雄に分け、肺をプールし3分割した。胎生20, 21日目のラットについては個々の肺を4葉に分け同様に保存した。表1に実験に供した妊娠ラットの数、並びに各胎齢の胎仔の総数を示した。一腹当たりの胎仔の数は7-11匹であった。

2) リン脂質の定量

Bligh-Dyer法を一部改変し肺の脂質を抽出した。リン脂質の定量はPL-ENカイノス(株式会社カイノス、東京)で行った。

3) グリコーゲンの定量

Shibko et al. (1967)の分画法23)に準じ肺のグリコーゲンを抽出した。グリコーゲンの定量はアンスロン法に従った。

4) DNAおよびタンパクの定量

Alfanzo et al. (1996)の方法21)に準じてDNA、タンパクを分画した。DNAはPico Green dsDNA Quantitation Kit(Molecular Probes, Inc., USA)を用い、Ex=490 nm, Em=530 nmの蛍光強度により定量した。タンパク量はDC Protein Assay(Bio-Rad, USA)を用い、700nmの吸光度より求めた。

4 RT-PCRによるTGF-β1, TGF-β3遺伝子発現の解析

1) 実験動物

胎生16, 18, 19日目の肺について、細胞増殖並びに機能分化に影響を与える遺伝子(TGF-β1, 3)の発現をRT-PCRにより解析した。表2に実験に供した妊娠ラットの数、並びに各胎齢の胎仔の総数を示した。胎生19日目の除塵群については、PCR産物の定量値が異常だったため今回の解析から除外した。

表1 各群の供試動物数

	妊娠18日目	妊娠20日目	妊娠21日目
対照群	6 (23, 31)	5 (17, 26)	4 (18, 11)
全排出ガス群	6 (22, 27)	4 (24, 15)	4 (18, 15)
除塵群	6 (23, 29)	4 (21, 13)	5 (13, 22)

表 2 遺伝子発現実験に供した妊娠ラットの数と胎仔の数

		妊娠ラット数	胎仔数
胎生 16 日目	対照群	3	3
	全排出ガス群	3	3
	除塵群	3	3
胎生 18 日目	対照群	3	6
	全排出ガス群	3	4
	除塵群	3	4
胎生 19 日目	対照群	3	4
	全排出ガス群	3	5

2) Total RNA の抽出と定量

肺を摘出した直後に、1.0mL の ULTRASPECTM RNA(BIOTEX)を加えてホモジナイズし、チューブに移して RNA の抽出まで -60°Cで保存した。RNA の抽出は、0.2mL のクロロホルムを加え 15 秒間強く振り、氷上で 5 分間放置、12000g、15 分間遠心した。水層を新しいチューブに移し、RNA を沈殿させるために水層と等量のイソプロパノール(和光純薬)を加え、氷上で 10 分間放置、更に 12000g、10 分間遠心した。沈殿を洗うために 1.0mL の 75%エタノールを加え、攪拌、7500g、5 分間遠心し、この操作をもう一度繰り返した後、引圧下でエタノールを蒸発させた。100 μ L の DEPC 水(製造元:株式会社日本ジーン)に沈殿を溶かし、Total RNA とした。

RNA の定量は Ribo Green RNA Quantitation Kit(Molecular Probes, Inc., USA)で行った。

3) RT-PCR 反応

Total RNA の 2 μ g をテンプレートとして RT-PCR を行った。反応試薬は TitanTM One

Tube RT-PCR System(Roche Diagnostics)を用い、サーマルサイクラー(Astec)を以下の条件に設定した。

1. 逆転写酵素反応 50 , 30 分間
2. 逆転写酵素の失活 94 , 2 分間
3. テンプレート DNA の変性 94°C, 1 分間
4. アニーリング 58 , 2 分間
5. 伸長反応 72 , 3 分間
(3 から 5 を 21 サイクル)
6. 伸長反応の終了 72 , 7 分間

PCR 産物は 2%アガロースゲルで分離し、SYBR Green Nucleic Acid Gel Stain(Molecular Probes, Inc., USA)で蛍光標識し検出した。使用した遺伝子のプライマー塩基配列以下の通りである。

Gene		Sequence of Primers	PCR 産物(bp)
TGF- 1	Forward	5'-CGAGGTGACCTGGGCACCATCCATGAC-3'	405
	Reverse	5'-CTGCTCCACCTTGGGCTTGCACCCAC-3'	
TGF- 3	Forward	5'-GCCATTAGGGGACAGATC-3'	592
	Reverse	5'-CAGTATGTCTCCATTGGG-3'	

5 リアルタイム PCR による TGF- β 1 発現量の測定

1) 逆転写反応

1st cDNA 鎖の合成試薬は SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (InvitrogenTM) を用いた。20.0 μ L の PCR チューブに、胎生 16, 18, 19 日目の肺から前述と同様に抽出・調整した RNA の溶液を 500ng~1.0 μ g 分取し、ランダムヘキサマー (50ng/mL) を 1.0 μ L、dNTPs (10mM) を 1.0 μ L それぞれ加え、DEPC 水で液量を 10.0 μ L とした。サーマルサイクラーを 70°C にセットし、10 分間反応させた後、氷上で 2 分間放置した。これをチューブ①とした。チューブ②には、10×RT 反応バッファーを 2.0 μ L、MgCl₂ (25mM) を 4.0 μ L、DTT (0.1mM) を 2.0 μ L、RNaseOUT を 1.0 μ L、Super Script II を 1.0 μ L 加え RT プレミックスとした。チューブ①と②を合し、42°C、50 分間の逆転写酵素反応の後、70°C、15 分間で逆転写酵素を失活させた。

2) リアルタイム PCR

サイクラーTM DNA マスター SYBR グリーン I (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) を用い、PCR 反応を行った。キャピラリーに鋳型 DNA 1 μ L、10×SYBR グリーン溶液 2 μ L、プライマーを各々 1 μ L、25mM MgCl₂ を 1.8 μ L 追加して終濃度 3mM とし、dH₂O 13.2 μ L でトータル 20 μ L とした。ライトサイクラー クイックシステム 350S (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) を用い、以下のとおりに条件で反応を行った。

1. 初期変性 95 , 10 分間
2. アニーリング 58 , 15 秒間
3. 伸長反応 72 , 15 秒間
(40 サイクル)
4. 伸長反応の終了 72 , 7 分間

続いて GAPDH, TGF β -1 の融解曲線分析を行い PCR 増幅産物の同一性を確認した。陽性スタンダードから PCR 産物のコピー数を求め、GAPDH で補正し比較定量した。GAPDH、TGF- β 1 のプライマー配列は以下の通りに設計した。

Gene		プライマー配列	PCR 産物 (bp)
GAPDH	Forward	5'-GTTTGTGATGGGTGTGAAC-3'	169
	Reverse	5'-CTTCTGAGTGGCAGTGATG-3'	
TGF- β 1	Forward	5'-AAGGAGACGGAATACAGGG-3'	154
	Reverse	5'-ATGAGGAGCAGGAAGGG-3'	

リアルタイム PCR の試薬は PCR 用キット、ライト

6 胎仔肺の形態学的検査

肺の形成過程のどの段階で影響を受けているかを明らかにするため、胎生 14, 20 日目に肺の形態学的観察を行った。胎仔は対照群・全排出ガス群の各々の日数につき 2 匹の妊娠ラット由来であった。胎生 14 日目の肺で、気管支分岐の様子を、実体顕微鏡 (×40) で観察した。胎生 20 日目の肺の切片をヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色し、

光学顕微鏡 (×100) で観察した。また、胎生 21 日目に帝王切開を行い自発性呼吸後の肺についてトルイジン・ブルー染色し組織学的検査を行った。対照群・全排出ガス群・除塵群の妊娠ラット各 2 匹から得た雄ラットを用いた。

7 呼吸機能の測定

胎仔期にのみ暴露し(全排出ガスあるいは除塵

排出ガス) 生後は清浄空気下で飼育したラット、常時清浄空気下で飼育した雄ラットの生後 12 ヶ月後の呼吸様式について写真 1 に示した装置(生体用空気圧マルチセンサー)を用いて各群 6 匹について測定した。

8 統計解析

各群の測定値について、スミルノフ・グラブス検定を行い外れ値を棄却した。全ての値は相対平均値±標準誤差で示した。対照群と暴露群の群間の比較には、統計 JSTAT 6.9 for Windows を用い、t-検定を行った。

結果

1 胎仔肺の生化学的検査

表 3 に雄胎仔の生化学的検査の結果を示した。雄胎仔では、体重、肺重量は胎生 21 日目の全排出ガス暴露群、除塵群ともに対照群に対して有意に低かった(図 1,2)。胎仔 1 匹当たりの肺の DNA 量は暴露によって減少せず(図 3)、DNA 量に対するタンパク量の比が、胎生 20 日目の全排出ガス暴露群、除塵群とも、対照群に対して有意に減少した(図 4)。DNA 当たりのリン脂質の量は胎生 21 日目に全排出ガス暴露群、除塵群ともに対照群に対して有意に低下していた(図 5)。リン脂質の前駆物質であるグリコーゲン量は暴露により変化しなかった(図 6)。

表 4 に雌胎仔の生化学的検査の結果を示した。雌胎仔では、体重は胎生 21 日目の全排出ガス暴露群、除塵群ともに対照群に対して有意に低かった(図 1)。胎生 21 日目の肺重量は暴露によって変化しなかった(図 2)。リン脂質が低下したのは胎生 18 日目の除塵群、胎生 20 日目の全排出ガス暴露群で、21 日目では差がなかった(図 5)。グリコーゲンは胎生 21 日目の全排出ガス群のみ低下した(図 6)。

雌雄を比較すると、胎生 18-21 日目までグリコーゲンの量は雌の方が多く、リン脂質も多かった(図 5,6)。なお、暴露により胎仔の吸収の増加は見ら

れなかった。



写真 1 生体用空気圧マルチセンサー

表3 雄胎仔 生化学的測定結果

胎齡 (日)	雄胎仔 群	雄胎仔 供試数	体重 (g)	肺重量 (mg)	1肺当たり DNA(mg)	タンパク/DNA (μg/μg)	リポ脂質/DNA (μg/μg)
18	対照群	23	1.3 ± 0.07	35.1 ± 4.4	0.22 ± 0.04	14.4 ± 2.1	0.33 ± 0.21
	全排ガス群	22	1.3 ± 0.11	34.8 ± 3.5	0.20 ± 0.03	18.3 ± 5.5	0.27 ± 0.10
	除塵群	23	1.4 ± 0.10 *	34.4 ± 1.7	0.23 ± 0.07	18.5 ± 3.2 *	0.23 ± 0.07
20	対照群	17	3.4 ± 0.14	81.8 ± 5.2	0.56 ± 0.12	19.3 ± 3.9	0.77 ± 0.17
	全排ガス群	24	3.3 ± 0.23	79.3 ± 6.0	0.62 ± 0.12 *	16.7 ± 3.7 *	0.74 ± 0.17
	除塵群	21	3.4 ± 0.25	79.7 ± 5.9	0.60 ± 0.08	15.4 ± 2.4 **	0.71 ± 0.15
21	対照群	18	4.7 ± 0.22	97.7 ± 5.1	0.57 ± 0.04	21.4 ± 2.9	1.12 ± 0.16
	全排ガス群	18	4.3 ± 0.22 **	87.7 ± 6.7 **	0.59 ± 0.04	20.1 ± 1.9	0.94 ± 0.08 **
	除塵群	13	4.5 ± 0.16 *	92.7 ± 6.2 **	0.57 ± 0.10	21.0 ± 5.2	0.89 ± 0.17 **

値は平均値 ± 標準誤差で示した。 * p<0.05 v.s. 対照群 ** p<0.01 v.s. 対照群

表4 雌胎仔 生化学的測定結果

胎齡 (日)	雌胎仔 群	雌胎仔 供試数	体重 (g)	肺重量 (mg)	1肺当たり DNA(mg)	タンパク/DNA (μg/μg)	リポ脂質/DNA (μg/μg)	グルーゲン/DNA (μg/μg)
18	対照群	31	1.3 ± 0.09	33.0 ± 7.2	0.18 ± 0.04	18.2 ± 1.0	0.60 ± 0.20	7.9 ± 1.5
	全排ガス群	27	1.3 ± 0.10	34.2 ± 5.1	0.15 ± 0.03	27.0 ± 3.3 **	0.46 ± 0.25	6.2 ± 3.2
	除塵群	29	1.3 ± 0.09 †	31.2 ± 2.1	0.14 ± 0.03 *	25.0 ± 5.2 *	0.37 ± 0.12 *	8.5 ± 4.5
20	対照群	23	3.2 ± 0.24	76.4 ± 5.8	0.30 ± 0.04	20.7 ± 5.4	0.84 ± 0.28	5.1 ± 2.7
	全排ガス群	15	3.0 ± 0.15 †	71.1 ± 5.7 **	0.28 ± 0.04	19.8 ± 5.2	0.68 ± 0.31 **	5.3 ± 1.7
	除塵群	13	3.2 ± 0.23	75.4 ± 7.6	0.28 ± 0.04	19.7 ± 2.8	0.76 ± 0.18	4.6 ± 2.0
21	対照群	11	4.4 ± 0.14	89.5 ± 7.0	0.21 ± 0.06	43.7 ± 13.3	1.51 ± 0.42	3.4 ± 1.9
	全排ガス群	15	4.3 ± 0.16 *	86.3 ± 4.4	0.21 ± 0.03	39.0 ± 11.4	1.70 ± 0.80	2.0 ± 1.9 *
	除塵群	14	4.2 ± 0.19 †	86.1 ± 6.2	0.23 ± 0.06	37.6 ± 8.0	1.99 ± 0.87	3.3 ± 1.5

値は平均値 ± 標準誤差で示した。 * p<0.05 v.s. 対照群 ** p<0.01 v.s. 対照群

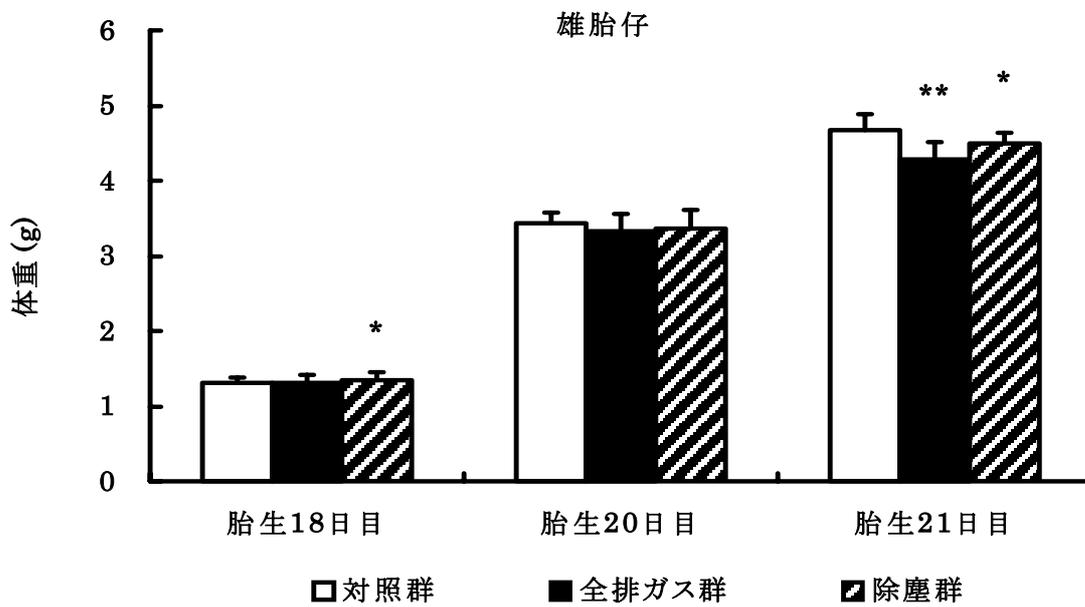
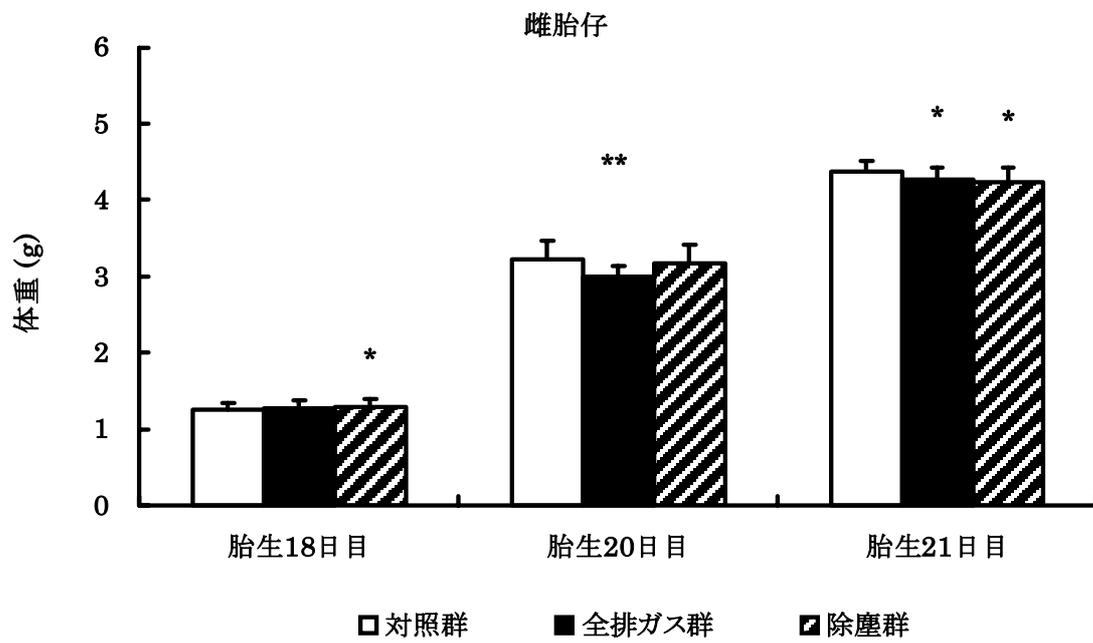


図1 胎生 18, 20, 21 日目 雌雄胎仔の体重 (g)

値は平均値±標準誤差で示した。

* $p < 0.05$ v.s. 対照群, ** $p < 0.01$ v.s. 対照群

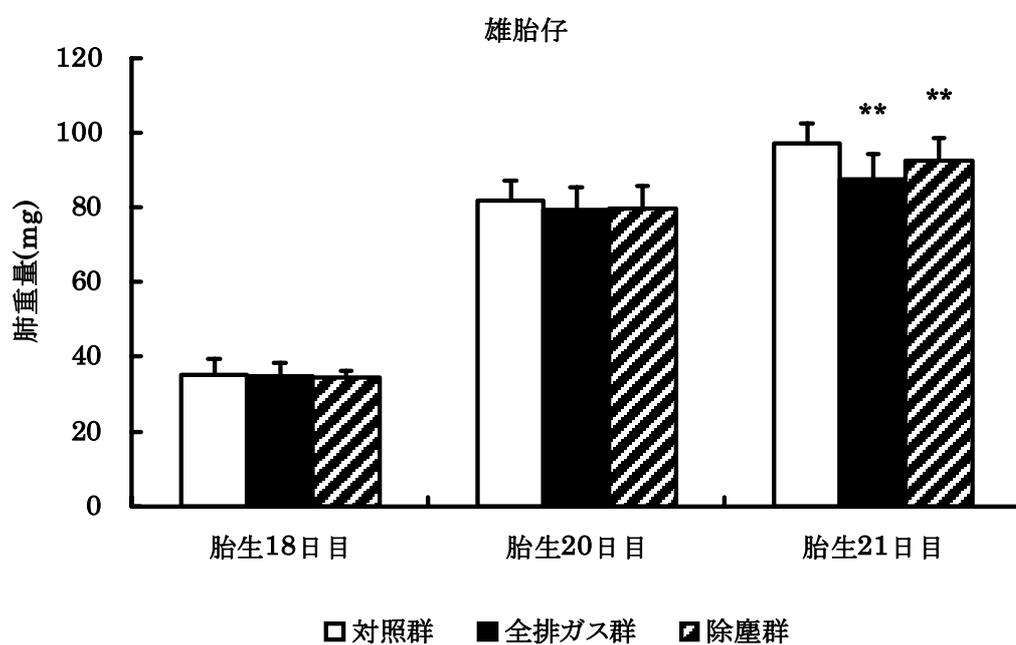
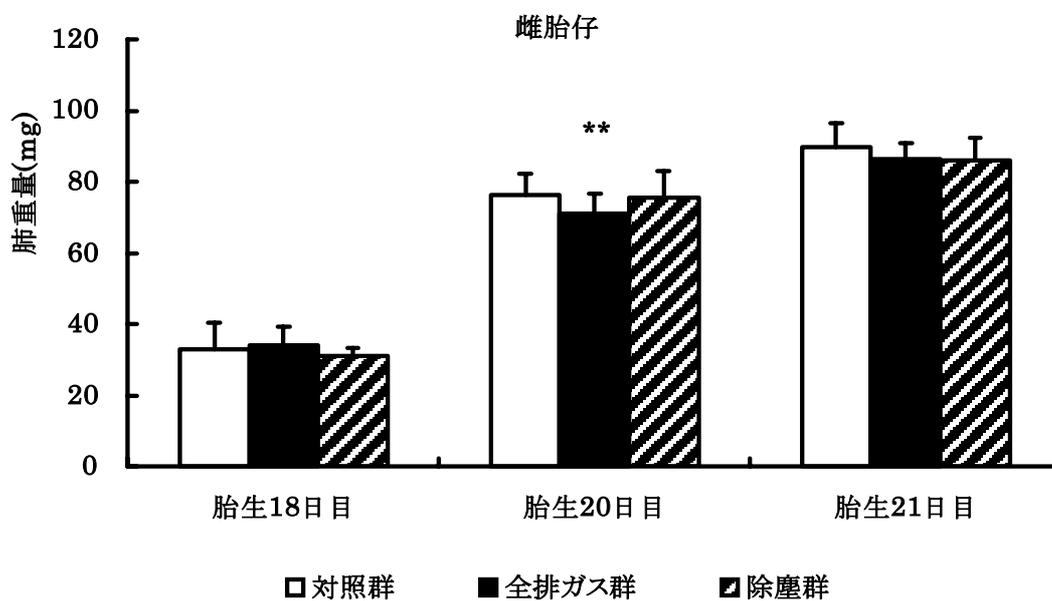


図2 胎生18, 20, 21日目雌雄胎仔の肺重量 (mg)
 値は平均値±標準誤差で示した。
 * $p < 0.05$ v.s. 対照群, ** $p < 0.01$ v.s. 対照群

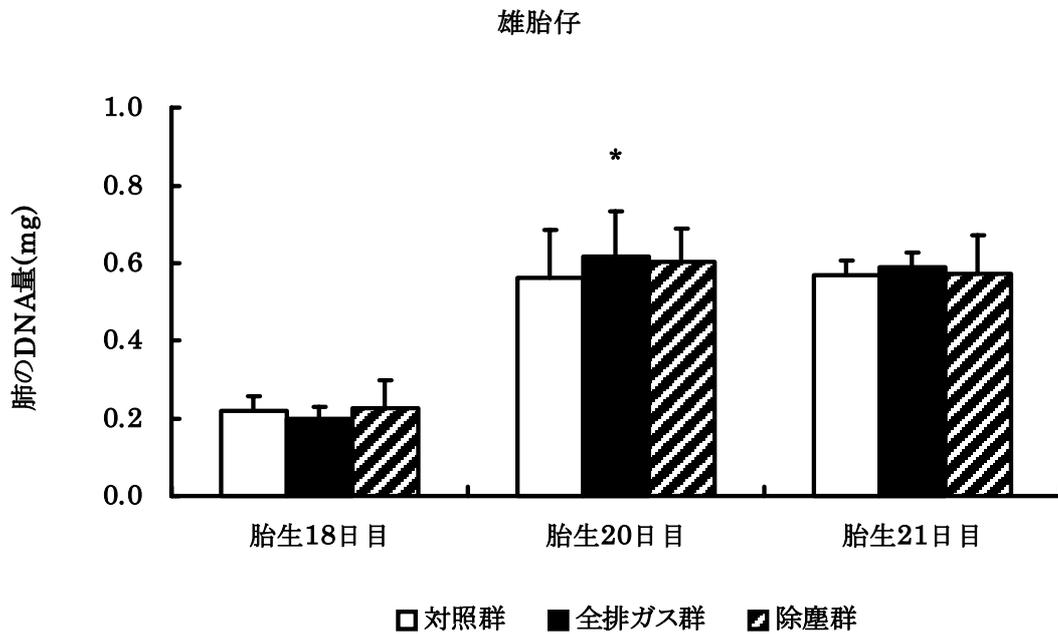
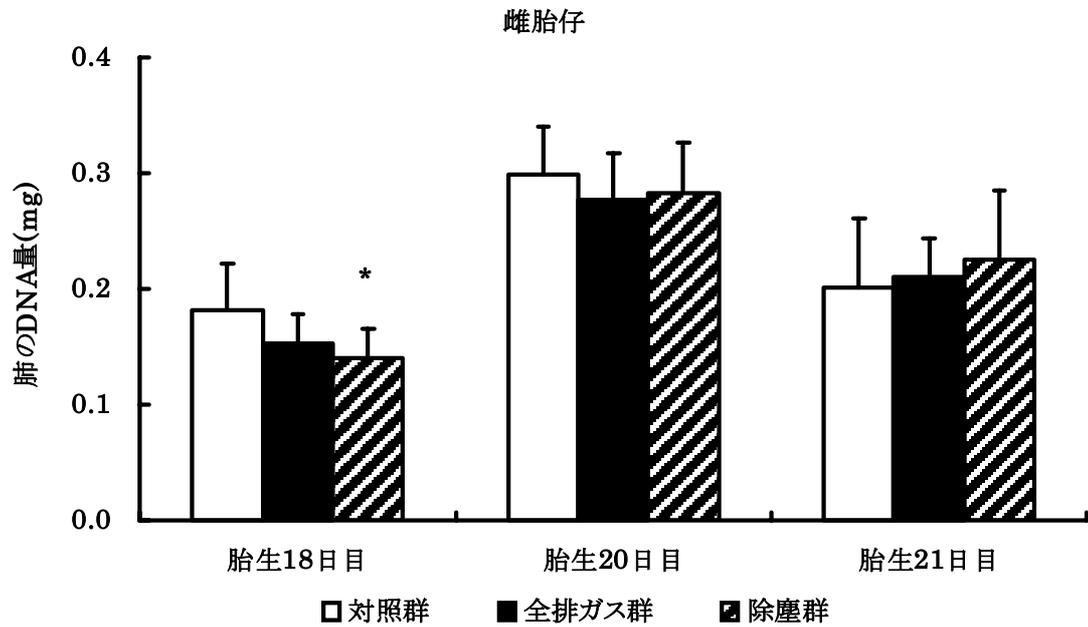


図3 胎生18,20,21日目雌雄胎仔1匹あたりの肺のDNA量(mg)

値は平均値±標準誤差で示した。

* $p < 0.05$ v.s. 対照群, ** $p < 0.01$ v.s. 対照群

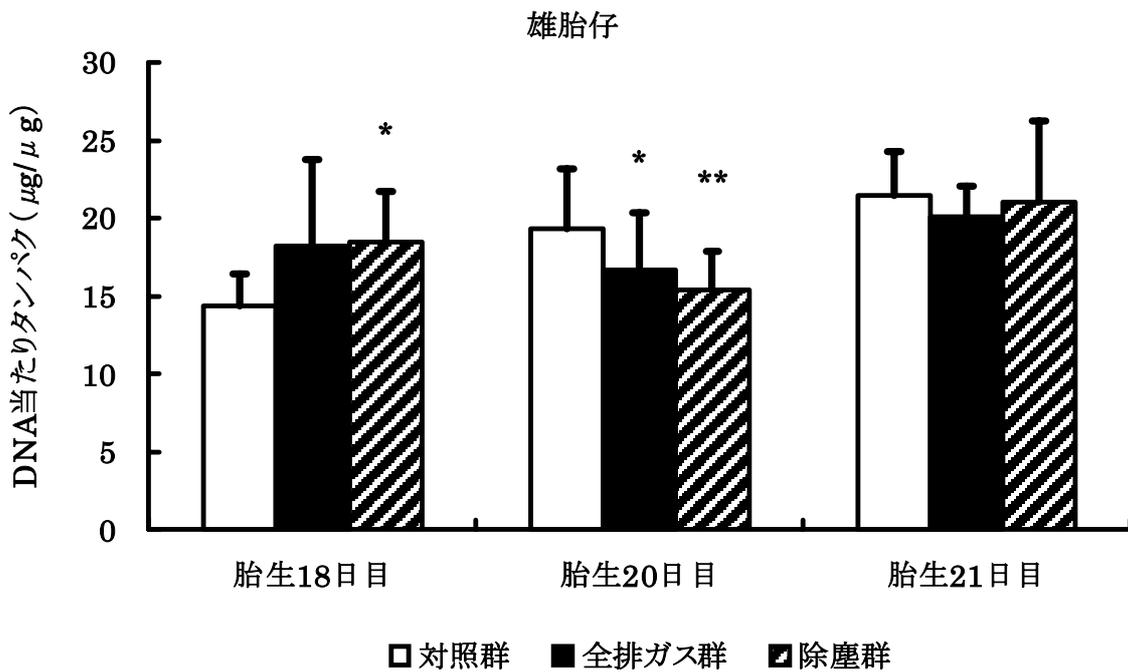
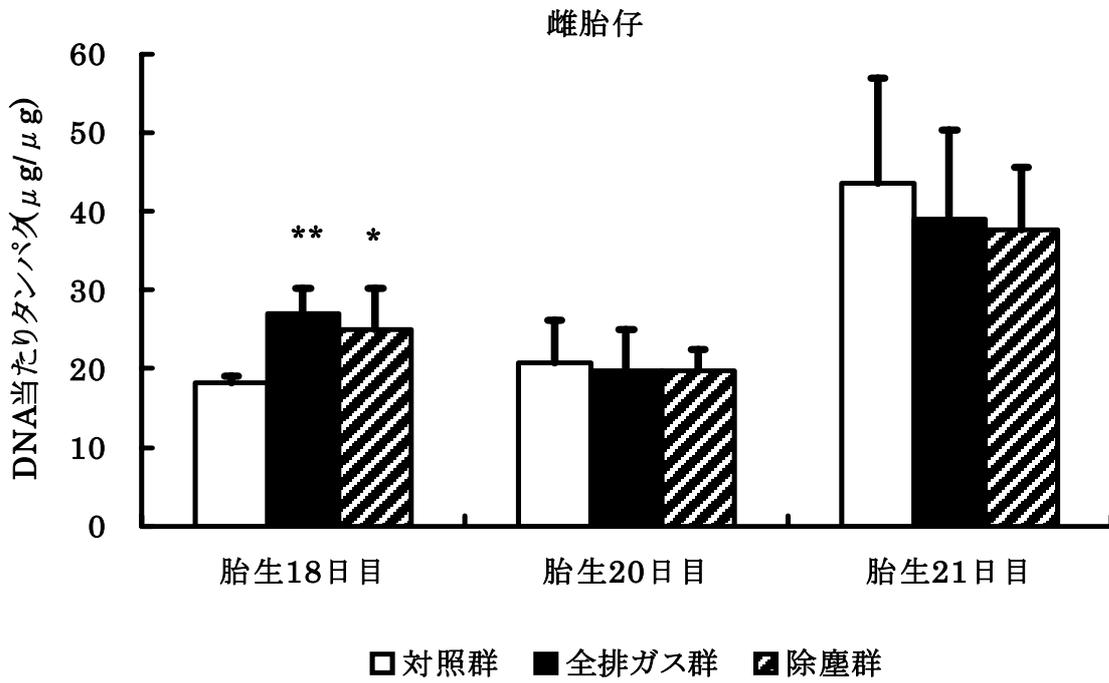


図4 胎生18, 20, 21日目雌雄胎仔のDNA当たりのタンパク量 (μg/μg)
 値は平均値±標準誤差で示した。

*p < 0.05 v.s. 対照群, ** p < 0.01 v.s. 対照群

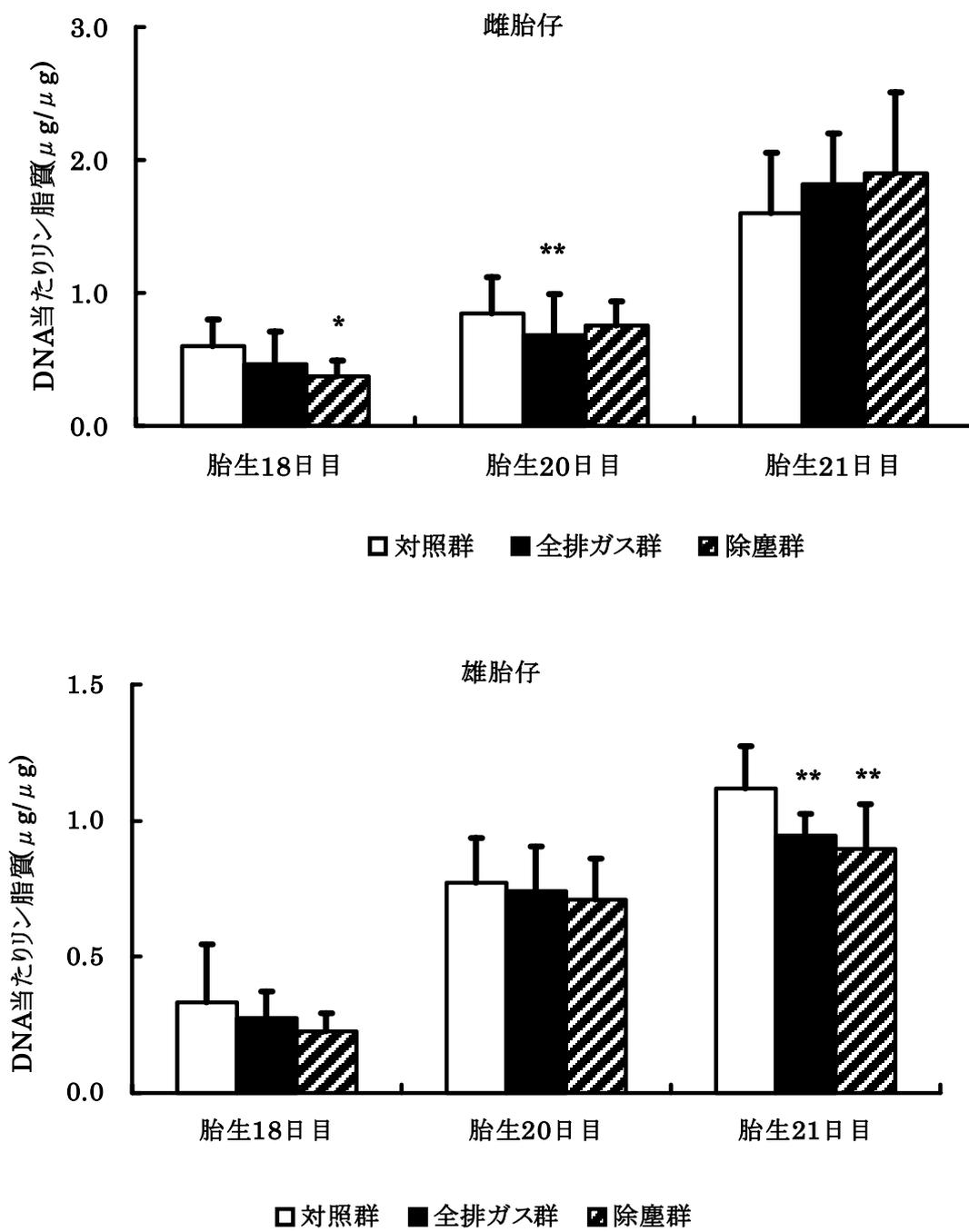


図5 胎生 18, 20, 21 日目 雌雄胎仔のリン脂質 (μg/μg)
 値は平均値±標準誤差で示した。
 * p < 0.05 v.s. 対照群, ** p < 0.01 v.s. 対照群

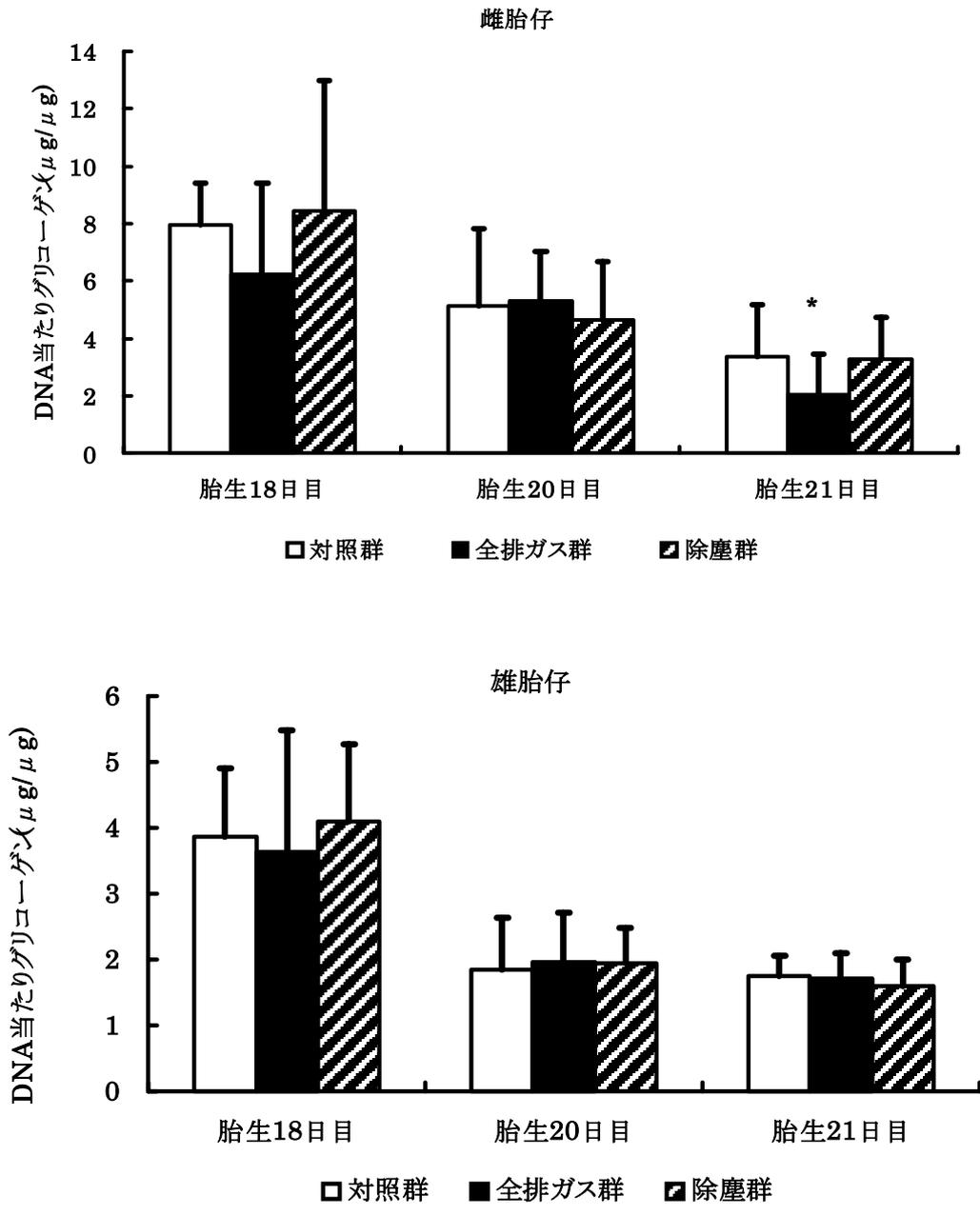
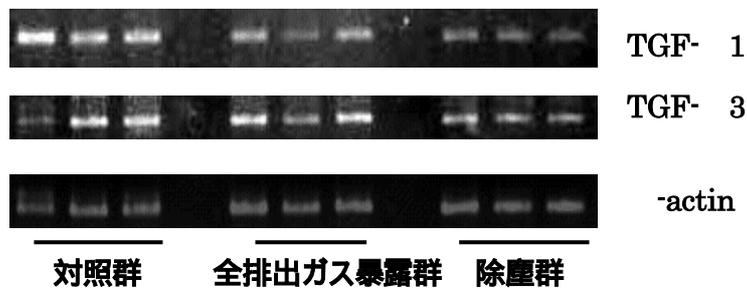


図6 胎生18,20,21日目雌雄胎仔のグリコーゲン(μg/μg)
 値は平均値±標準誤差で示した。

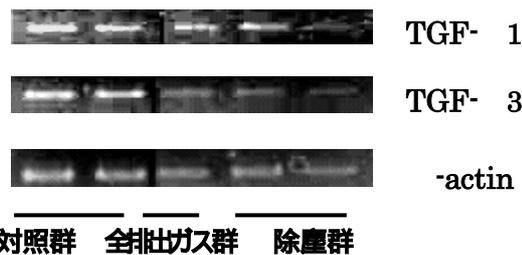
* p < 0.05 v.s. 对照群, ** p < 0.01 v.s. 对照群

2 RT-PCR による胎仔肺の TGF- 1, 3 mRNA 発現量の解析
胎生 16, 18, 19 日目の肺の、成長因子である

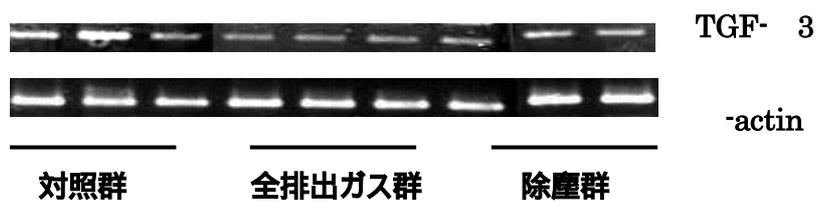
TGF- β の遺伝子発現を解析した結果、対照群に比べて全排出ガス暴露群、除塵群では、TGF- β 1, 3 ともに発現が弱い傾向が見られた(写真 2)。



胎生 16 日目胎仔肺 TGF- 1, 3 の発現量の解析



胎生 18 日目胎仔肺 TGF- 1, 3 の発現量の解析



胎生 19 日目胎仔肺 TGF- 3 の発現量の解析

写真 2 RT-PCR による胎仔肺の TGF- 1, 3 mRNA 発現量の解析

3 TGF- β 1 の発現量

リアルタイムPCRによってTGF- β 1 の発現を定量的に解析した結果、胎生 18 日目の全排出ガス

群、除塵群ともに対照群に比べ TGF- β 1 の発現量が低下した(図 7)。

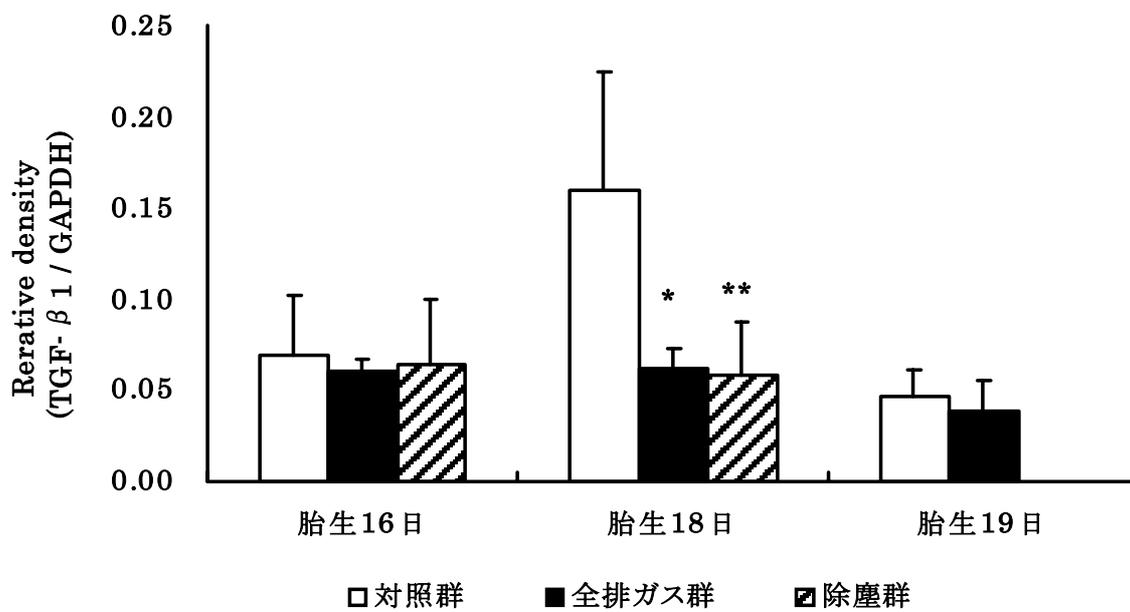
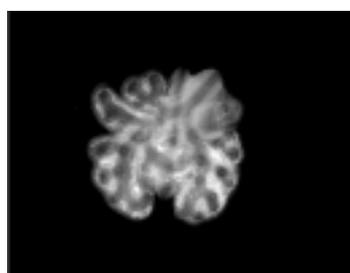


図 7 胎生 16, 18, 19 日目 胎仔肺の TGF- β 1 発現量解析
値は平均値±標準誤差で示した。 * $p < 0.05$ v.s. 対照群, ** $p < 0.01$ v.s.

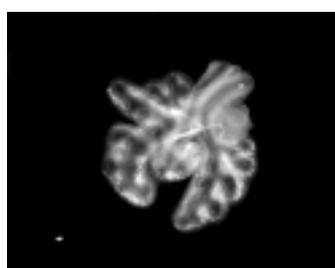
4 胎仔肺の形態学的検査

胎生 14 日目の肺を実体顕微鏡($\times 40$)で観察した

ところ、気管支分岐の様子には違いが見られなかった。



対照群

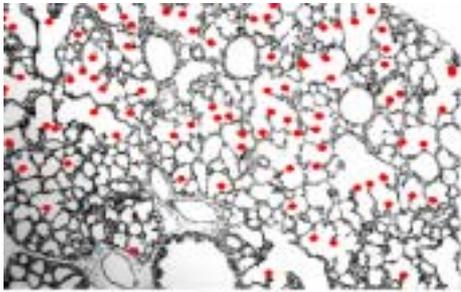


全排出ガス暴露群

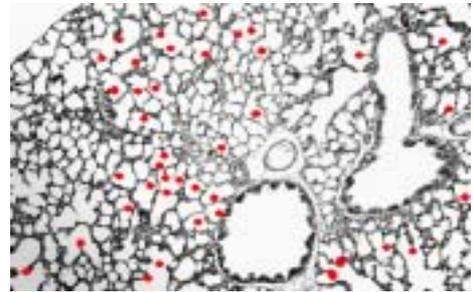
写真 3 胎生 14 日目の気管支分岐の様子

H-E染色後、光学顕微鏡(×100)で観察した。赤くマークしたのが二次中隔の見られる箇所、

暴露群で二次中隔がまばらであった。つまり肺胞の形成が不十分な状態と言える。



対照群

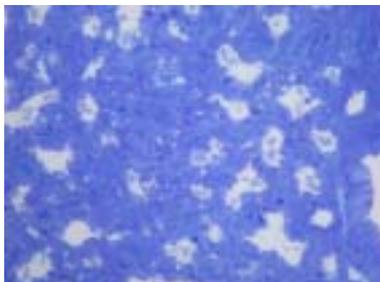


全排出ガス暴露群

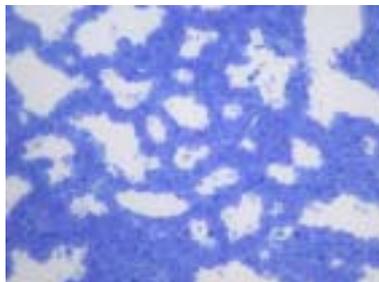
写真4 胎生20日目の肺胞領域

排出ガスに暴露された胎仔では、気管支分岐、芽状突起の形成、肺胞上皮細胞の増殖等、肺胞形成の初期段階には影響がみられないが、それに次ぐ肺胞上皮細胞への分化の段階で影響を受

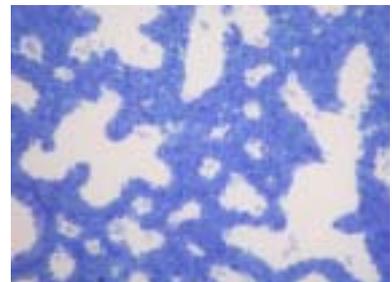
け、肺表面活性物質の欠乏を起こすことが明らかになった。自発性呼吸後の肺の組織学的所見では、肺胞虚脱と気道過拡張が顕著に認められた。



対照群



全排出ガス暴露群



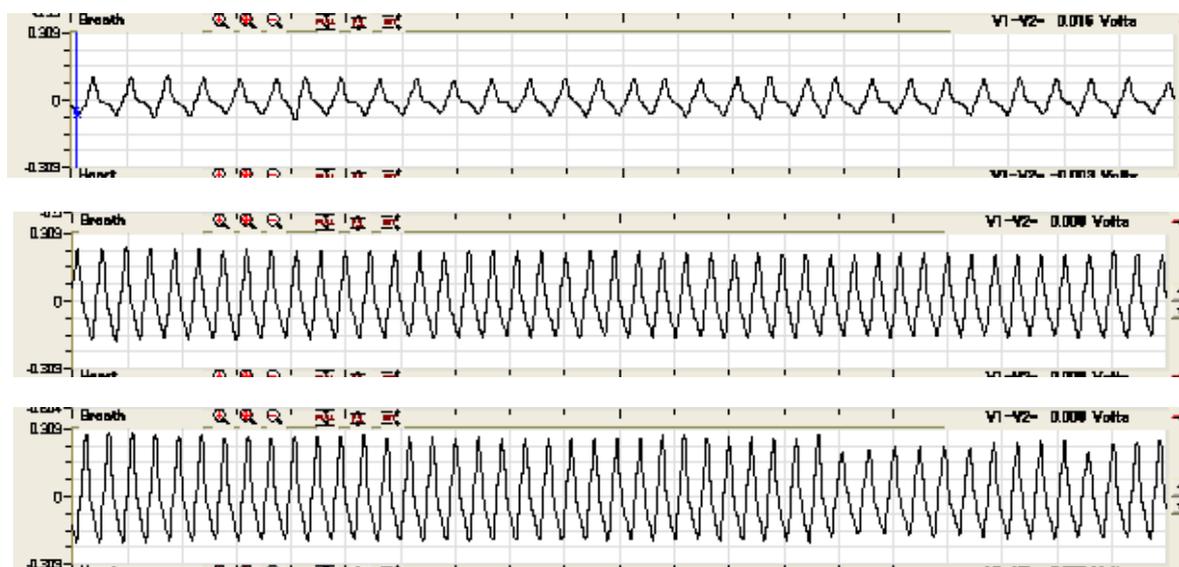
除塵排出ガス暴露群

写真5 帝王切開によって自発呼吸させた後の肺(胎生21日目)

5 呼吸機能の変化

生後 12 ヶ月目の呼吸状況(20 秒間の呼吸数と呼吸時の空気圧の動き)をチャートに示した。胎仔期に暴露されたラットでは、呼吸時の体の動きが大きい(努力して呼吸すること、時間当たりの呼吸数

が多い(一呼吸にかかる時間が短い)ことがわかった。胎仔期後半の肺表面活性物質の欠乏は、出生時における呼吸困難のみならず生後の肺の発育を阻害し呼吸機能の低下を起こすことが示唆された。



胎仔期曝露と呼吸様式の変化

考察

この研究では、ディーゼル排出ガスの妊娠ラットへの曝露により、胎仔の肺で TGF- β 1, 3 の発現量に変動した結果、胎仔の肺胞 II 型細胞の機能分化が遅延し、肺表面活性物質の主成分であるリン脂質の合成が低下することが明らかになった。また、全排出ガス曝露群、除塵群ともに同様の変化が見られたことから、排出ガス中のガス状成分、あるいは $0.05 \mu\text{m}$ 以下の超微粒子の関与が考えら

れた。さらに、排出ガスに妊娠期に曝露されると、次世代である胎仔の生後における呼吸機能の変化を起こすことが示唆された。本研究の結果は、排出ガスの曝露について従来とは異なる側面から解析し、排出ガスの影響は直接吸入した動物のみならず次世代にも及ぶことを明らかにしたものである。

胎生 7 日目からディーゼル排出ガスに曝露されたラットで、胎生 18, 20, 21 日目に胎仔 1 匹当たり

の肺の DNA 量は減少しなかった。しかし、胎生 20 日目に雄の暴露群の肺で二次中隔の形成が少なく、胎生 20 日目で DNA 当たりのタンパク量が減少し、胎生 21 日目にリン脂質の量が減少していた。ラットの場合、呼吸器系の形成は妊娠 13-14 日目から始まる。前腸の一部が膨隆し、ついで肺芽が形成され先端が 2 分岐し左右の主気管支となる。妊娠 15-18 日目は腺様期と呼ばれ、気管支の分岐が続き終末気管支が形成される。細胞質には多量のグリコーゲン顆粒とポリリボゾームが認められるが、ミトコンドリアは少なく、粗面小胞体は小型で細胞周辺部に散在している。この時点ではガス交換に必要な構造はできていない。妊娠 18-20 日目は管状期と呼ばれ、気管支や終末細気管支の管腔が広がり、終末細気管支が分岐し呼吸細気管支を形成する。呼吸細気管支の終末に、肺胞管の原基となる終末囊が形成される。I 型細胞が出現し、II 型細胞に分化する細胞が認められるようになる。妊娠 19 日目から出生までは終末囊期と呼ばれ、さらに多くの終末囊と、終末囊の壁に肺胞が形成される。この時期には II 型細胞としての形態が整い、肺表面活性物質の産生が盛んに行われ、グリコーゲン顆粒は消失する。生後は肺胞の増殖と伸展を繰り返す。肺表面活性物質の主成分であるリン脂質は肺胞 II 型細胞の小胞体で合成され、ゴルジ装置を経てラメラ封入体に蓄積する(付図)。この過程は、肺表面活性物質を構成する特異的な成分が他の成分と区別され、選択的に集積していく過程である。成熟ラメラ封入体形成の前段階に、多胞体、小型ラメラ封入体など未成熟な過程がある。ラットの胎生 18-21 日目は管状期から終末囊胞期にあたり、肺胞 II 型細胞の分化、肺表面活性物質の産生が行われている^{5,6,7,8,9,10,11}。

以上のことからディーゼル排出ガスの暴露は肺の細胞増殖に影響がないと考えられ、肺表面活性物質を合成する肺胞 II 型細胞の細胞内小器官の分化が遅延し、肺表面活性物質の主成分であるリン脂質の合成が低下したことが考えられた。

ディーゼル排出ガスに暴露されたラットの胎仔で肺胞形成の遅延が起こった機序に関して、まず、母体の内分泌環境の変化を介したディーゼル排出ガスの間接的な影響が考えられる。

胎仔期にニトロフェンに暴露されたラットでは、肺表面活性物質が低下し、先天性横隔膜ヘルニア(CDH)が引き起こされる。CDH の場合、肺は形成不全で気管支が伸展しないため、生後も肺胞の機能分化が十分でなく、死亡率は高い。DNA 量が減少したことから細胞数が減少し、タンパク/DNA 比低下したことから細胞の大きさも小さかった^{14,15}。カドミウムに胎仔期に暴露されたラットの肺は、リン脂質合成の前駆物質であるグリコーゲン、肺表面活性物質の主成分であるホスファチジルコリンが減少し、これが呼吸窮迫症候群(RDS)の原因となり、生後まもなく死亡する率が高い。DNA 量が減少したことから細胞は減少したが、タンパク/DNA 比は暴露によって変化せず、細胞の大きさは影響を受けなかった¹⁶。ニトロフェン、カドミウムの胎仔期暴露によって、肺表面活性物質の合成が低下するメカニズムの詳細は報告されていないが、これらの物質はいずれも内分泌攪乱作用を持つことが疑われており、母体の内分泌の攪乱と、胎仔の肺胞形成遅延、肺表面活性物質の不足に、密接な関係があることを示唆している。

窒素酸化物は強い酸化力を持ち、生体内で容易に膜を破壊し、ラジカルを発生する。これらのガス状成分の酸化的ストレスにより、細胞が傷害され、母体での内分泌環境が変化すると考えられた。窒素酸化物、特に NO は、生体内でチトクロム P450 の鉄部分に結合すること、またはチトクロム P450 の mRNA 発現を低下させることで、酵素活性を阻害することが報告されている^{17,18,19}。ディーゼル排出ガスを妊娠ラットに暴露すると血中テストステロン濃度が上昇すること^{1,2}、排出ガスのガス状成分のうち、NO がアロマターゼを阻害したとする報告²⁰があり、これらの結果は母体でのテストステロンの蓄積がアロマターゼ活性の低下に基

づくことを示唆している。我々が以前行った研究で、妊娠ラットの卵巣アロマターゼ活性が低い傾向が見られ²¹⁾、母体中に蓄積したテストステロンが肺の成熟を遅延させたのではないかと考えられた。また、ディーゼル排出ガスに含まれる、多環芳香族炭化水素類(PAHs)が抗アンドロゲン作用や抗エストロゲン作用を持つという報告^{22,23,24,25)}も、これらの物質の作用によって母体の内分泌環境の変化を起こすことを示唆している。

肺の細胞増殖、機能分化に影響を与える遺伝子に関し、TGF- β 1, 3 の発現量を、腺様期である胎生 16 日目の肺で検討したところ、暴露群ではこれらの遺伝子の発現が弱い傾向が見られた。さらにラットの腺様期にあたる胎生 16, 18 日目、および管状期の初期である胎生 19 日目に、TGF- β 1 の mRNA を定量的に解析したところ、mRNA 発現量が胎生 18 日目の全排出ガス群および除塵群で、対照群に比べ低下した。胎生 19 日目においても全排出ガス群では TGF- β 1 の発現量の上昇は見られなかったことから、ディーゼル排出ガスに暴露によって TGF- β 1 の発現は遅延するのではなく、阻害されることが示唆された。TGF- β 1 の発現量は、ラットの腺様期に肺繊維芽細胞で最大となり、妊娠後期に減少するが、このことは、TGF- β 1 が腺様期において肺胞上皮細胞の分化を促進するという報告²⁴⁾と関連すると考えられた。ヒトの培養胎児肺繊維芽細胞で、TGF- β 1 は肺の弾性線維である、エラスチンの mRNA の安定性を強めることが報告されている²⁶⁾。TGF- β 3 ノックアウトマウスの肺は、腺様期、管状期の始めまで形態学的に異常でないが、終末囊胞期で明らかに未熟であると報告されている²⁷⁾。TGF- β 3 はそれ自身が肺繊維芽細胞、肺胞上皮細胞の分化を促進することや、糖質コルチコイドの肺への反応性を増強することにより、肺の成熟を促進すると考えられており、アンドロゲンはその作用を阻害すると報告されている^{28,29)}。また、TGF- β とステロイドホルモンのクロストークが研究されている。エストロゲンは核内レセ

プターを介して生理活性を示し、TGF- β はレセプターキナーゼを介して転写因子 Smad を活性化することが知られている。Smad タンパクがエストロゲンレセプターと相互作用し、TGF- β の作用を制御し、エストロゲンレセプター活性を増強する。ディーゼル排出ガスに胎仔期に暴露されたラットでは、母体のホルモン環境の変化を受け、TGF- β 1, 3 の発現が阻害され、ステロイドホルモンの核内レセプターを介した生理作用と、TGF- β の Smad を介した情報伝達が負に調節され、肺胞 II 型上皮細胞の細胞内小器官の機能分化が遅延し、肺表面活性物質の中心であるリン脂質の産生が低下したことが考えられた。

また、ディーゼル排出ガスの暴露の胎仔への直接的影響も考えられた。我々と同一の暴露条件下で、母体へのディーゼル排出ガスの暴露により、多環芳香族炭化水素(PAHs)は、全排出ガス暴露群および除塵群で胎仔に移行することが報告されている³⁰⁾。PAHs の胎仔への影響については報告されていないが、母体から胎仔へ移行した PAHs により、胎仔肺の形成が阻害されたことが考えられた。あるいは、生体内に吸収された PAHs は、チトクロム P450 等により代謝されヒドロキノン PAHs となり、さらに抱合体として尿中に排泄されることが知られているが、妊娠ラットの場合、代謝物が胎盤を通じて胎仔に移行し、肺の形成に影響を及ぼした可能と考えられた。今回の実験に際して、チャンバー内での PAHs の測定を行ったところ、2 環のナフタレンは除塵群でもフィルターで取り除かれず、3 環の成分についても通過することがわかり³⁰⁾、これらが胎仔にどの程度移行し影響を与えるのか検討する必要がある。

本研究で得られた結果のうち、特にディーゼル排出ガスに暴露された胎仔の肺のリン脂質には性差があった。このことは、疫学的に、男児の方が女児に比べ呼吸器疾患の罹患率が高いという調査報告と関連する可能性もある。雄胎仔では胎生 18, 20 日目は暴露による差がなく、胎生 21 日目の暴

露群で肺のリン脂質が低下した。雌の胎仔では、リン脂質が低下したのは胎生 18 日目の除塵群、胎生 20 日目の全排出ガス暴露群のみで、21 日目では差がなかった。このことは胎生期に雄の精巣から分泌されるアンドロゲンの影響で、雄の方が雌に比べて肺の形成が遅延する^{31,32,33)} という報告と関連しているのではないかと考えられた。雄胎仔の精巣では胎生 15 日目頃からテストステロンが分泌されている。また、胎生期の肺は、糖質コルチコイドレセプターが他の臓器に比べて多く存在しているが、アンドロゲンが糖質コルチコイドレセプターの感受性を低下させることも、雌に比べて雄の方が肺の成熟が遅延する要因の一つである³⁴⁾。あるいは、アポトーシスの促進が雌で肺の成熟を促す要因の一つとして考えられた。胎仔肺の DNA 量は雌の方が低かったが、アポトーシスによるものと考えられた。Scavo et al. (2003) によれば、正常な胎仔の肺は形態学的な成熟の過程で、空気との接触面を広げるため妊娠後期にアポトーシスが起こる。母体へのデキサメタゾン投与によって、胎仔肺でのアポトーシスが促進され、DNA 量が減少することが報告されている³⁵⁾。

東京都によると、平成 14 年 10 月の大気中の浮遊粒子状物質 (SPM) は、住宅地での平均濃度で 0.036mg/m³、交通の激しい地域の平均濃度で 0.046 mg/m³ であった。平成 15 年 6 月の二酸化窒素濃度は、東京都全域の平均値で 0.041ppm であった。このうちディーゼル排出ガスの SPM (二次生成粒子を含む) への寄与率は平均で 35%、同様に窒素酸化物 (NO_x) への寄与率は平均で 51.2% であった。今回の暴露濃度は、環境中のディーゼル由来の SPM、および二酸化窒素の濃度と比べ 100 倍程度高濃度であるが、ヒトの妊娠期間を考慮すると累積暴露量として同程度と考えられる。本実験で得られた結果が必ずしも人間に当てはまるものではないが、胎生期は種々の臓器の形成過程にあたり、環境汚染によってその発達が阻害される可能性は無視できない。人間では妊娠

30 週目頃に胎児の肺表面活性物質が産生され始め、35 週目以降急激に増加する。胎児期に汚染された環境に曝された児童では、肺表面活性物質の欠乏によって肺胞形成が阻害され生後の呼吸機能の低下が起こっている可能性が考えられた。

参考文献

1. Watanabe N, Kurita M. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect.* 109: 111-119 (2001)
2. Watanabe N, Oonuki Y. Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environ Health Perspect.* 107: 539-544 (1999)
3. Nobue Watanabe: Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicology Letters*, **155**, 51-58, 2005.
4. 複合大気汚染に係る健康影響調査 基礎的実験的研究総合解析報告書 昭和 61 年 東京都衛生局
5. Thurlbeck, W.M.: Postnatal growth and development of the lung. *Am. Rev. Respirat. Diseases*, 111, 803-844, 1975.
6. Boyden, E.A.: Development and growth of the airways. In: *Development of the Lung* (ed. by Hodson, W.A.), Marcel Dekker, New York, 1977.
7. Thurlbeck, W.M.: In: *Developmental Pathology of the Embryo and Fetus* (ed. by Dimmick, J.E. and Kalousek, D.K.), J.B. Lippincott, Philadelphia, 1992.
8. Burri, P.H., Dbaly, J. and Weibel, E.R.: The postnatal growth of the rat lung.

- .Morphometry.
Anat.Rec.,178:711-730,1973.
9. Burri,P.H.: The postnatal growth of the rat lung. .Morphology. Anat.Rec.,180:77-98,1974.
 10. Angus,G.E. and Thurbeck,W.M.: Number of alveol in the human lung. J.Applied Physiol.,32,483-485,1972.
 11. Zeltner,T.B.,Caduff,J.H.,Gehr,P.,Pfenniger,J. and Burri,P.H.: The postnatal development and growth of the human lung. .Morphometry. Respiration Physiology,67,247-267,1987.
 12. 渡辺伸枝, 加藤俊, 浜井昭夫, 桜井勝清: デイ - ゼル排ガスに暴露されたラットの肺におけるヒアルロン酸の局在 . ビオチン化ヒアルロン酸結合タンパクによる染色 . Connective Tissue, 22: 71-78, 1991.
 13. 渡辺伸枝, 池田真悟, 加藤 俊, 桜井勝清: デイ - ゼルエンジン排気ガスに暴露されたラットの肺の病理学的・免疫組織化学的变化、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの局在と弾力線維・膠原線維の変化、Connective Tissue, 23: 71-78, 1992.
 14. Alfonso LF, Arnaiz A, Alvarez FJ, Qi B, Diez-Pardo JA, Vallis-i-Soler A, Tovar JA. Lung hypoplasia and surfactant system immaturity induced in the fetal rat by prenatal exposure to nitrofen. Biol Neonate. 69: 94-100 (1996)
 15. Jesudason EC, Connell MG, Fernig DG, Lloyd DA, Losty PD. Early lung malformations in congenital diaphragmatic hernia. J Pediatr Surg. 35: 124-128 (2000)
 16. Daston GP. Toxic effects of cadmium on the developing rat lung. II. Glycogen and phospholipid metabolism. J Toxicol Environ Health. 9: 51-61 (1982)
 17. Donato MT, Guillen MI, Jover R, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P450 by interferon- γ in human hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther. 281: 484-490 (1997)
 18. Gergel D, Misik V, Riesz P, Cederbaum AI. Inhibition of rat and human cytochrome P4502E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide. Arch Biochem Biophys. 337: 239-250 (1997)
 19. Khatsenko O, Kikkawa Y. Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. J Pharmacol Exp Ther. 280: 1463-1470 (1997)
 20. Snyder GD, Holmes RW, Bates JN, Van Voorhis BJ. Nitric oxide inhibits aromatase activity: mechanisms of action. J Steroid Biochem Mol Biol. 58: 63-69 (1996)
 21. 千倉知子, 池野谷美奈, 佐藤かな子, 長井二三子, 武田 健, 渡辺伸枝. デイ - ゼル排出ガスの暴露が妊娠ラットの卵巣アロマターゼ活性に及ぼす影響. フォーラム 2001. 衛生薬学・環境トキシコロジー要旨集: (2001)
 22. Taneda S, Hayashi H, Sakata M, Yoshino S, Suzuki A, Sagai M, Mori Y. Anti-estrogenic activity of diesel exhaust particles. Biol Pharm Bull. 23: 1477-1480 (2000)
 23. Taneda S, Hayashi H, Sakushima A, Seki K, Suzuki AK, Kamata K, Sakata M, Yoshino S, Sagai M, Mori Y. Estrogenic and anti-estrogenic activities of two

- types of diesel exhaust particles. *Toxicology*. 170: 153-161 (2002)
24. Furuta C, Suzuki AK, Taneda S, Kamata K, Hayashi H, Mori Y, Li C, Watanabe G, Taya K. Estrogenic Activities of Nitrophenols in Diesel Exhaust Particles. *Biol Reprod*. Epub ahead of print (2004)
 25. Okamura K, Kizu R, Toriba A, Murahashi T, Mizokami A, Burnstein KL, Klinge CM, Hayakawa K. Antiandrogenic activity of extracts of diesel exhaust particles emitted from diesel-engine truck under different engine loads and speeds. *Toxicology*. 195: 243-254 (2004)
 26. Wang J, Kuliszewski M, Yee W, Sedlackova L, Xu J, Tseu I, Post M. Cloning and expression of glucocorticoid-induced genes in fetal rat lung fibroblasts. *Transforming growth factor-beta 3. J BIO CHEM*. 274: 2722-2728 (1994)
 27. Beers MF, Solarin KO, Guttentag SH, Rosenbloom J, Kormilli A, Gonzales LW, Ballard PL. TGF- β 1 inhibits surfactant component expression and epithelial cell maturation in cultured human fetal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 275: 950-960 (1998)
 28. Shi W, Heisterkamp N, Groffen J, Zhao J, Warburton D, Kaartinen V. TGF- β 3-null mutation does not abrogate fetal lung maturation in vivo by glucocorticoids. *Am J Physiol*. 272: L1205-1213. (1999)
 29. Shibko S, Koivistoinen P, Tratnyek CA, Newhall AR, Friedman L. A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid, and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Anal Biochem*. 19: 514-528 (1967)
 30. Yoshiko Tozuka, Nobue Watanabe, Masanobu Osawa, Akira Toriba, Ryoichi Kizu and Kazuichi Hayakawa: Transfer of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Fetuses and Breast Milk of Rats Exposed to Diesel Exhaust. *J. Health Sci.*, 50, 497-502, 2004.
 31. Nielsen HC. Testosterone regulation of sex differences in fetal lung development. *Proc Soc Exp Biol Med*. 199: 446-452 (1992)
 32. Rodriguez A, Viscardi RM, Torday JS. Fetal androgen exposure inhibits fetal rat lung fibroblast lipid uptake and release. *Exp Lung Res*. 27: 13-24 (2001)
 33. Torday JS. Androgens delay human fetal lung maturation in vitro. *Endocrinology*. 126: 3240-3244 (1990)
 34. Khosla SS, Smith GJ, Parks PA, Rooney SA. Effects of estrogen on fetal rabbit lung maturation: morphological and biochemical studies. *Pediatr Res*. 15: 1274-1281 (1981)
 35. Scavo LM, Newman V, Ertsey R, Chapin CJ, Kitterman JA. Maternally administered dexamethasone transiently increases apoptosis in lungs of fetal rats. *Exp Lung Res*. 29: 211-226 (2003).

ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が肺機能に及ぼす影響

研究要旨

ディーゼル排出ガスを妊娠した動物に暴露すると、次世代である胎仔にも影響を及ぼし、生後における加齢現象が早期に出現する可能性を示唆してきた。生涯健康で生き生きとした人生を過ごすためには、加齢による臓器障害の発生をできる限り抑制し、健康寿命を長くすることが求められている。排出ガスと加齢性変化の関わりに関してはこれまでほとんど研究されておらず、環境改善を推進する科学的根拠を提示する必要がある。

本研究では、肺のクリアランス機能等に着目し検討した結果、排出ガスに胎仔期に暴露されたラットではリンパ流の低下及び肝リン脂質量の増加が明らかに認められた。また、生後1年における排出ガスへの再暴露により、肺重量増加がみられた。これらのことから排出ガス胎仔期暴露は臓器障害を発生させやすくしていることが考えられた。

目的

ディーゼル排出ガスを妊娠した動物に暴露すると、諸臓器・機能の形成過程にある胎仔にも影響を及ぼし、生後の生殖機能・免疫機能・呼吸機能を低下させることを報告した。また、諸臓器の機能低下の他、抗原侵入に対する過剰反応、自己成分に対する抗体産生が上昇することが確認された。これらの結果は、排出ガスの暴露はいわゆる加齢現象とされている病態の発生に関わっている可能性を示唆するものである。

生涯健康で生き生きとした人生を過ごすためには、加齢に伴って生じてくる種々の臓器障害の発症を予防し健康寿命を長くすることが求められている。生体の機能は遺伝子のみならず個を取り巻く環境因子によって決定づけられるが、排出ガスの胎仔期あるいは哺乳期における暴露は生体機能を不可逆的に損なう環境因子の一つと考えられる。これまで報告されていない排出ガスと加齢性変化の関わりを検討し、環境改善を推進する科学的根拠を提示する必要がある。

排出ガス暴露は加齢性変化を加速させることを明らかにするため、今年度は、クリアランス機

能に着目し検討した。すなわち、排出ガスに胎仔期に暴露されたラットを用いて、リンパ流の計測、肝の脂質代謝の測定、肺に吸入された排出ガス中粒子状物質の沈着と残留について検討した。

実験方法

1 ディーゼル排出ガスの暴露

ディーゼル排ガス発生源として、発電用ディーゼルエンジン(NFAD-6型、ヤンマーディーゼル、排気量309cc)を用いた。暴露は、東京都健康安全研究センターの右写真に示したチャンバー内(内容量1.6m³)で、妊娠7日目から1日6時間行った。対照群は、HEPAフィルター(0.05μm、99.99%除去、日本無機)を通した室内空気を、ソーダライム(和光純薬)と2種類の活性炭(HC-6、SX ツルミコール)に通過させ、更にHEPAフィルターを通しチャンバー内に導入した。全排ガス暴露群は、ディーゼル排ガスを清浄空気で希釈し、チャンバー内に導入した。除塵群は、ディーゼル排ガスをHEPAフィルターに通過させ、チャンバー内に導入した。



写真1 暴露チャンバー

2 暴露チャンバー内の環境測定

各暴露チャンバー内の粒子状物質およびガス状成分の濃度測定には、粉塵濃度計(β線式質量濃度計 BAM-102、柴田科学器械工業)と、窒素酸化物測定機(9841、Monitar. Lobs. Co)を用いた。粒子状物質および窒素酸化物濃度の平均値は全排ガス暴露群(粉塵濃度: 1.73mg/m³, NO₂濃度: 0.76ppm)、除塵群(NO₂濃度: 0.80ppm)であった。

3 実験動物

45匹のラット(F344/DuCrj)を、全排ガス暴露群、除塵群、対照群の3群に分け、妊娠7日目から出産までチャンバー内で1日6時間暴露した。出産後(生後)は全群とも清浄空気下で飼育し各時期に各々の実験に用いた。

4 リンパ流の測定

胎仔期にのみ暴露し生後は清浄空気下で飼育した仔ラットと常時清浄空気下で飼育した9-13週齢の雄雌仔ラットを用いた。①背部を剃毛後、1%パテント・ブルー含有生理食塩水を皮内注射し、リンパ管の出現時間の測定と分岐を観察した。②スルファミン剤を腹腔内注射し、血流中に排泄される初期時間をアルデヒド試薬によって測定した。



写真2 血圧測定装置

5 血圧測定

リンパ流圧・流速にはリンパ管の自律能の他、血圧が大きく関与するとされていることから、胎仔期に暴露されたラットの生後12週齢の血圧を非観血式血圧測定装置(ソフトロン BP-98A)を用いて各群6匹ずつ測定した。

6 肝機能の測定

1) 脂質代謝

脂質の抽出:胎仔期にのみ暴露し(全排出ガス・除塵排出ガス)、生後12ヶ月までは清浄空気下で飼育、その後3ヶ月間全排出ガスに暴露した雄ラット、並びに終始清浄空気下で飼育した雄ラットの肝臓を用いた。Bligh-Dyer法を一部改変し、肝臓の脂質を抽出した。すなわち、肝臓に0.01Mのリン酸緩衝液(PBS; SIGMA, St. Louis, MO)1.0mLを加え、ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。組織粉碎液を10mLの共栓付き遠心管に移し、トータル3.0mLのメタノール(和光純薬)、1.5mLのクロロホルム(和光純薬)で洗い込んだ。共栓をして2分間攪拌し、続いて10分間室温放置した。1.5mLのクロロホルムを加え、30秒間攪拌、更にPBS1.25mLを加え、30秒間攪拌した。2500rpm, 5分間遠心し、クロロホルム層をパスツールピペットで分取、濾紙(ADVANTEC, No. 2S)を用いて濃縮用の試験管に濾取した(①)

液)。残った水層にクロロホルム 1.5 mL を加えて攪拌、2500rpm, 5 分間遠心、濾過し、①液に合した。これをもう一度繰り返した。適量のクロロホルムで濾紙を洗い込み、抽出液の液量を揃えた。抽出液をロータリーエバポレーターで約 1 時間かけて減圧乾固し、PBS 500 μ L に溶解させた。

2) リン脂質の測定

リン脂質の定量は、PL-EN カイノス(株式会社カイノス、東京)を用いた。本法は酵素法による。検体液、標準液、試薬ブランク(イオン交換水)をそれぞれ 20 μ L ずつ試験管に取り、反応試液を 3 mL 加え、混和し、37°C、10 分間加熱した。石英セルに移し、分光光度計(UV-2500PC、島津)で 500 nm の吸光度を測定し、比色定量によりリン脂質量を求めた。

3) 肝臓機能検査

血中 TG, GOT, GPT の測定にはテストワコー臨床検査試薬を使用した。血清サンプルはリン脂質の分析に用いた胎仔期暴露群とその対照群のラット並びに 9 週齢の若齢雄ラットから得た。

7 肺の炭粉沈着量の測定・組織学的検査

胎仔期にのみ暴露し(全排出ガス・除塵排出ガス)、生後 12 ヶ月までは清浄空気下で飼育、その後 3 ヶ月間全排出ガスに暴露した雄ラット、並びに終始清浄空気下で飼育した雄ラットの肺を用いた。なお、肺内炭粉量の測定方法については現在検討中である。

結果及び考察

1 リンパ流の測定

胎仔期に暴露されたラットでは、雌雄とも対照群のラットに比べリンパ管の出現時間が遅く、また、検出されるリンパ管網が少なかった。なお、予備実験で 12 ヶ月齢のラットについても検討したが皮膚が厚くリンパ管の検出が困難であった。加齢ラットのリンパ管流の検出は今後の課題である。また、皮膚等の末梢のリンパ流と肺や肝臓等中心部のリンパ流との相関についても検討を要する課題である。



対照群雄ラット



排出ガス胎仔期暴露群雄ラット

写真3 1%パテント・ブルー皮内注射後のリンパ管出現観察



写真4 1%パテント・ブルー皮内注射後のリンパ管出現観察
 対照群・胎仔期全排出ガス暴露群・胎仔期除塵排出ガス暴露群雌ラット

2 リンパ流を含めた血流循環機能測定

末梢を含めた全身のリンパ流の速度を求めるためスルファミン剤を腹腔内注射し、血流中に

排泄される初期時間を測定した。結果は予備実験段階であるが、対照群では19分、胎仔期暴露群では32分要した。

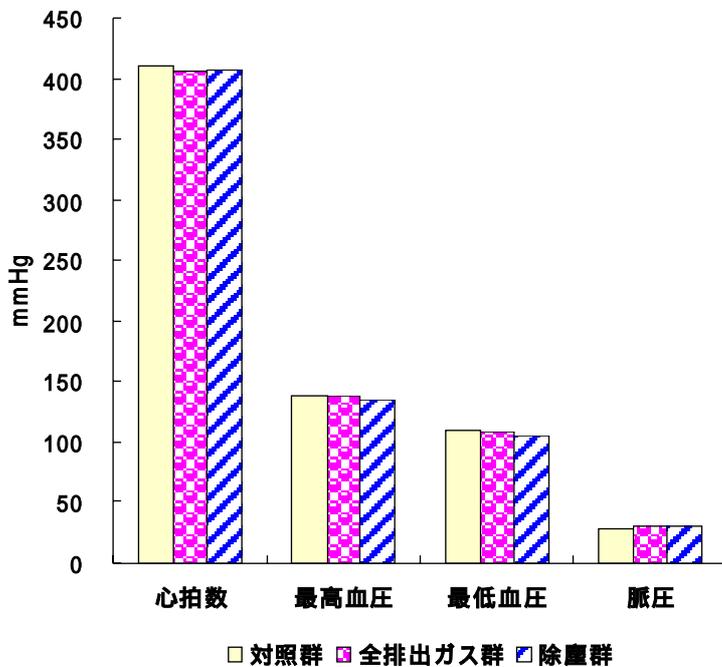


図1 心拍数及び血圧

3 血圧測定

心拍数、血圧には暴露の影響はみられなかった。上記した暴露群と対照群のリンパ流の速度の違いに、血圧は関与していないことが明らかになった。

4 肝脂質代謝

肝臓中のリン脂質含有量測定結果を下図に示した。実験期間中清浄空気下で飼育されたラット(C-C-C)に比べ、胎仔期に暴露されその後清浄空気下で飼育されたラット(H-C-C)ではリン脂質量が高く、胎仔期暴露は脂質代謝に影響を及ぼすことが示唆された。また、実験期間中

清浄空気下で飼育されたラット(C-C-C)に比べ、生後 12 ヶ月目までは清浄空気その後排出ガスに暴露されたラット(C-C-H)ではリン脂質量が高かった。胎仔期に暴露されその後清浄空気下で飼育されたラット(H-C-C)に比べ、胎仔期に暴露され生後 12 ヶ月目までは清浄空気その後排出ガスに暴露されたラット(H-C-H)ではリン脂質量が高かった。これらのことから生後の暴露は肝臓の脂質代謝を低下させることが示唆された。肝臓解毒機能について今後薬物代謝に係わる酵素の測定等を行いさらに解析を行う。

リン脂質/肝重量

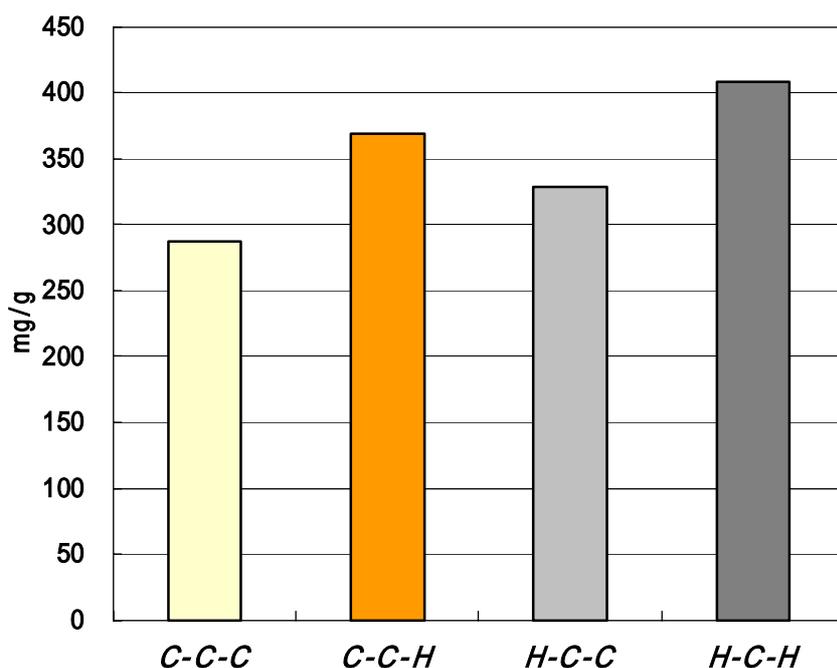


図2 肝臓中リン脂質含有量

5 血液検査による肝臓機能測定

血液検査の結果、暴露の影響は明らかではなかった。しかし、除塵群の TG (トリグリセライド) は対照群並びに全排出ガス群に比べやや高か

った。また、9 週齢の若齢ラットに比べると 15 ヶ月齢のラットの方が高く加齢の影響が考えられた。

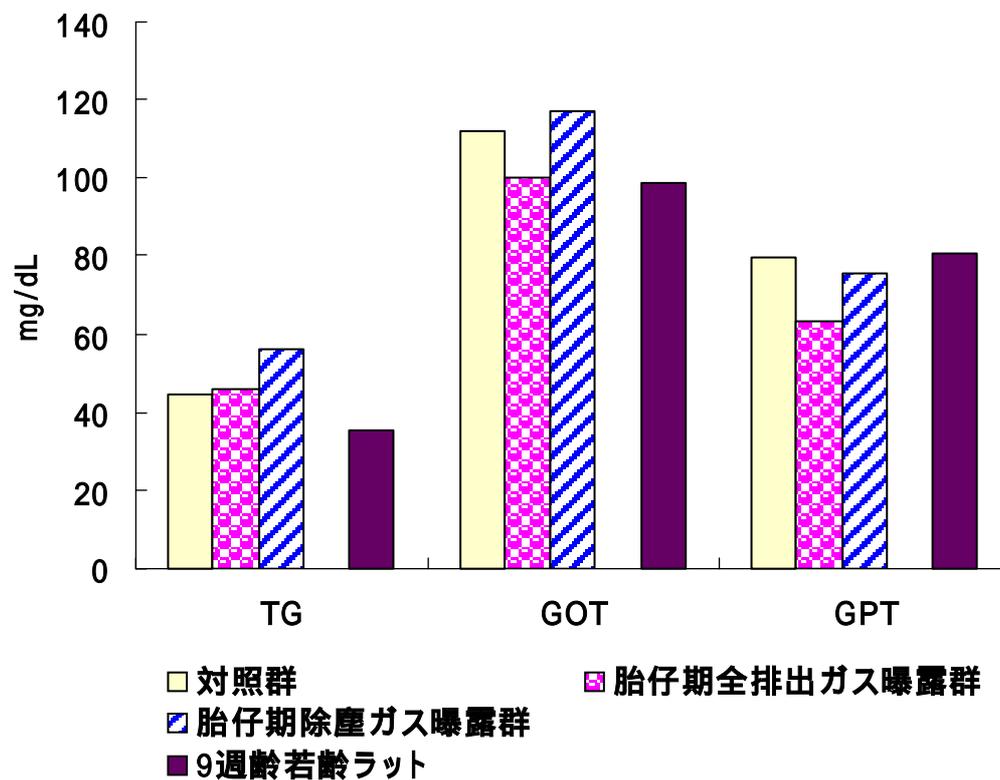


図4 15ヶ月齢並びに9週齢若齢ラットの血液検査結果

TG: triglyceride GOT: glutamic oxaloacetic transaminase

GPT: glutamic pyruvic transaminase

6 肺の炭粉沈着量の測定・組織学的検査

胎仔期に全排出ガスあるいは除塵排出ガスに暴露し、生後 12 ヶ月までは清浄空気下で飼

育、その後 3 ヶ月間全排出ガスに暴露した雄ラット(H-C、並びに終始清浄空気下で飼育した雄ラットの肺重量を下図に示した。

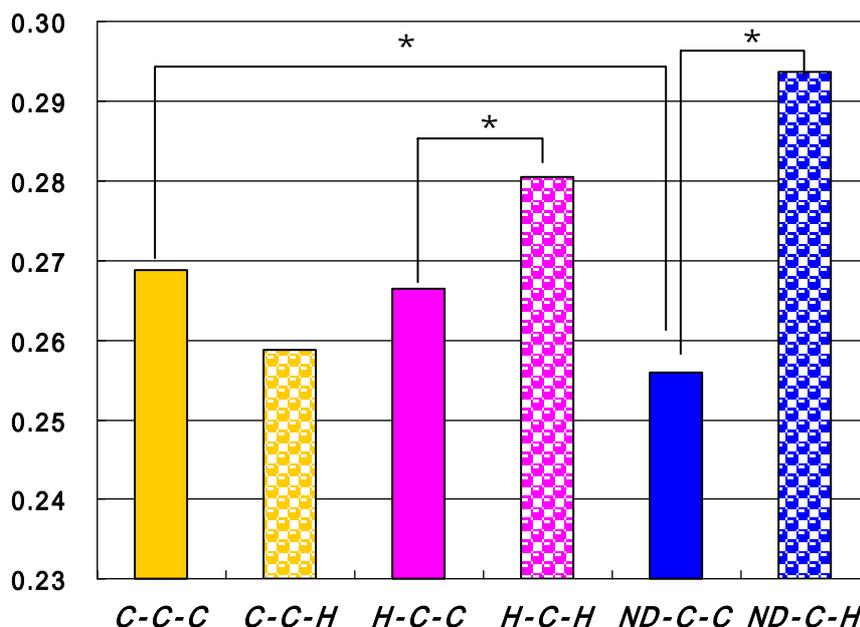


図5 生後 15 ヶ月目の各群の肺重量(単位はグラムで表示)

*: $p < 0.05$

生後 12 ヶ月までは清浄空気下で飼育、その後 3 ヶ月間全排出ガスに暴露されたラット(C-C-H)の肺重量は、実験期間中清浄空気下で飼育されたラット(C-C-C)に比べ有意ではないが低い傾向がみられた。

胎仔期に全排出ガスに暴露され生後 12 ヶ月までは清浄空気下で飼育、その後 3 ヶ月間全排出ガスに暴露されたラット(H-C-H)の肺重量は、胎仔期に全排出ガスに暴露されその後清浄空気下で飼育されたラット(H-C-C)に比べ有意に高かった。

胎仔期に除塵排出ガスに暴露され生後 12 ヶ月までは清浄空気下で飼育、その後 3 ヶ月間全

排出ガスに暴露されたラット(ND-C-H)の肺重量は、胎仔期に除塵排出ガスに暴露されその後清浄空気下で飼育されたラット(ND-C-C)に比べ有意に高かった。リン脂質量が高く、胎仔期暴露は脂質代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

これらのことから、胎仔期における排出ガスの暴露(全排出ガス・除塵排出ガス)は、肺のクリアランス能の低下を起こすため、生後直接排出ガスに暴露された場合、吸入した粉塵の排出能力が低く、肺内に蓄積しやすいことが示された。今後、炭粉量の測定、細胞数、タンパク量測定、組織学的検査を行い、今回観察された肺重量

の変化が肺に蓄積した炭粉による障害であることを確認する必要がある。

また、胎仔期に除塵排出ガスに暴露されその後清浄空気下で飼育されたラット(ND-C-C)の肺重量は、実験期間中清浄空気下で飼育されたラット(C-C-C)に比べ有意に低かった。胎仔期に全排出ガスに暴露されその後清浄空気下で飼育されたラット(H-C-C)の肺重量は、実験期

間中清浄空気下で飼育されたラット(C-C-C)に比べ低い傾向がみられた。すでに報告したように、胎仔期における排出ガスの暴露は肺の形成過程を阻害し生後における呼吸機能の低下を起こす。これらのことから、胎仔期における全排出ガスあるいは除塵排出ガスの暴露は、肺の形成・発育を阻害し、生後も追いつくことなく継続していることが考えられた。

ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露が肝機能に及ぼす影響

研究要旨

胎仔期における排出ガスの暴露は加齢現象とされている病態の発生に関わっている可能性がある。肝臓は栄養分の分解、合成、解毒、貯蔵などを行う生命維持に不可欠な器官であり、肝臓の加齢に伴う機能低下は種々の疾病の原因となる。しかし、排出ガスの暴露と肝臓の加齢現象に関する研究はなされていない。前年度、肝臓の加齢現象の指標とされている脂質代謝について報告した。今年度は肝臓の解毒作用に焦点をあて検討した。

排出ガスに胎仔期にのみ暴露された生後 6 ヶ月、10 ヶ月のラットにニコチンを腹腔投与し血中・尿中コチニン量を測定した。対照群のラットの尿中コチニン量は生後 6 ヶ月、10 ヶ月とも同程度であった。胎仔期に暴露されたラットの尿中コチニン量は生後 6 ヶ月では対照ラットの約二倍高かったが、生後 10 ヶ月では対照群と同様であった。血中コチニン量には対照群と暴露群の間に違いはなかった。胎仔期に暴露されたラットでは成熟期までは肝臓の解毒に関わる酵素が誘導されやすいが、成熟期以降になると肝の解毒機能が急速に低下することが示された。

排出ガスの胎仔期における暴露は、肝臓の脂質代謝障害や解毒機能低下等の加齢とともに生じてくる臓器障害の発生を早めることが示された。今後、加齢に伴って著しく減少する蛋白質 SMP30(Senescence Marker Protein-30/加齢指標蛋白質 30)等の定量を行い、排出ガスの暴露が肝臓の加齢性変化を加速するメカニズムをさらに明らかにする必要がある。

研究の目的

ディーゼル排出ガスを妊娠した動物に暴露すると、諸臓器・機能の形成過程にある胎仔にも影響を及ぼし、生後の生殖機能・免疫機能・呼吸機能を低下させることを報告した^{1,2,3,4}。また、諸臓器の機能低下の他、抗原侵入に対する過剰反応、自己成分に対する抗体産生が上昇することが確認された⁴。これらの結果は、排出ガスの妊娠した動物への暴露は、次世代である胎仔の生後の様々な臓器の機能低下の他、いわゆる加齢現象とされている病態の発生にも関わっている可能性を示唆している。

肝臓は体の中で最大、最重量の臓器であり、吸収した栄養分の分解、合成、貯蔵、解毒、腸内の消化・吸収を助ける胆汁の生産などを行う生命維持に不可欠な器官である。また、排出ガスに由来する化学物質など外来性有毒物質の侵入に対しても解毒作用を行う主要な臓器である。肝臓の代謝障害は高脂血症や動脈硬化な

ど種々の疾患の誘因となることが知られている。また、解毒作用の低下は体内に吸収された化学物質の毒性発現の閾値を下げる結果になる。肝臓は加齢とともに、代謝障害、特に脂質代謝障害が起こりやすくなり、また、病原菌に対する防御能低下や有害物の解毒機能低下が生じることが報告されている^{5,6}。こうした肝臓の加齢現象を加速する要因として食餌性カロリーの過剰摂取が知られている^{5,6}。二酸化窒素に暴露されたラットでは肝臓機能が低下した報告^{7,8,9}はあるものの加齢現象をターゲットにした研究はなされていない。また、排出ガスなどの大気汚染物質の次世代への肝臓における遅発性の生体影響に関しては知見がない。

排出ガスの胎仔期における暴露と肝臓の加齢性変化の関わりについて研究を進め、胎仔期に排出ガスに暴露されたラットの肝臓のリン脂質含有量は、清浄空気下で飼育されたラットに比べ高かったことを報告した。今年度は、排出ガス

の胎仔期における暴露が肝臓の解毒機能に及ぼす影響を明らかにするため、代謝経路や化学構造についてすでに多くの研究報告^{10,11)}のあるニコチンをモデルとして用いて検討した。

実験方法

1 ディーゼル排出ガスの暴露

ディーゼル排ガス発生源として、発電用ディーゼルエンジン(NFAD-6 型、ヤンマーディーゼル、排気量 309cc)を用いた。暴露は、東京都健康安全研究センターの写真 1 に示したチャンバー内(内容量 1.6m³)で、妊娠 7 日目から 1 日 6 時間行った。対照群は、HEPA フィルター(0.05 μm、99.99%除去、日本無機)を通した室内空気を、ソーダライム(和光純薬)と 2 種類の活性炭(HC-6、SX ツルミコール)に通過させ、更に HEPA フィルターを通しチャンバー内に導入した。全排ガス暴露群は、ディーゼル排ガスを清浄空気で希釈し、チャンバー内に導入した。除塵群は、ディーゼル排ガスを HEPA フィルターに通過させ、チャンバー内に導入した。

2 暴露チャンバー内の環境測定

各暴露チャンバー内の粒子状物質およびガス状成分の濃度測定には、粉塵濃度計(β線式質量濃度計 BAM-102、柴田科学器械工業)と、窒素酸化物測定機(9841、Monitar. Lobs. Co)を用いた。粒子状物質および窒素酸化物濃度の平均値は全排ガス暴露群(粉塵濃度: 1.73mg/m³, NO₂ 濃度: 0.76ppm)、除塵群(NO₂ 濃度: 0.80ppm)であった。

3 実験動物

45 匹のラット(F344/DuCrj)を、全排出ガス暴露群、除塵群、対照群の 3 群に分け、妊娠 7 日目から出産までチャンバー内で 1 日 6 時間暴露した。出産後(生後)は清浄空気下で飼育し各実験に用いた。

4 肝解毒機能の測定

ニコチン投与:滅菌生理食塩水で希釈したニ

コチン(Sigma-aldrich, Japan) 0.1mg/mL, 0.01mg/mL を各々 2mL ネンプター麻酔したラットに腹腔内投与した。ニコチンの投与量は、ラットの LD50 (50-60mg/kg)の高濃度投与の場合ではほぼ 100 分の 1、低濃度投与の場合で 1000 分の 1 相当であった。所定時間経過の後、膀胱から注射器を用いて直接採尿、腹大静脈から採血した。尿中・血中成分の測定には下記試薬を使用した。

尿中ニコチン並びにその代謝産物の測定:試験紙 NicCheck I Test STRIPS (Mossman)

尿中コチニン量測定:Urine Cotinine Microplate EIA (Cozart Bioscience Ltd. UK)

血中コチニン量測定:Serum Cotinine Microplate EIA (Cozart Bioscience Ltd. UK)

尿中クレアチニン測定:Creatinine Assay Kit (Cayman Chemical Company, USA)



写真 1 動物暴露チャンバー

結果

実験 尿中ニコチン及びその代謝産物の測定法の検討

1 ニコチン検出試験紙による方法

ニコチン溶液 0.1mg/mL あるいは 0.01mg/mL を対照群、胎仔期全排出ガス暴露

群及び胎仔期除塵排出ガス暴露群のラットの腹腔内に 2mL 投与し、60 分後に膀胱に蓄積している尿を注射器で採取し、ニコチン検出試験紙を用いて尿中ニコチンおよびその代謝産物を検出した。

ニコチン 0.1mg/mL (200 μ g) を投与された全排出ガス暴露群(H)と除塵排出ガス暴露群(N)のラットの尿では、写真2に示したように試験

紙が赤色に色づき強陽性であった。対照群©のラットの尿は弱陽性であった。一方、ニコチン 0.01mg/mL (20 μ g) を投与されたラットの尿では、写真3に示したように着色が不明瞭で検出不可能であった。

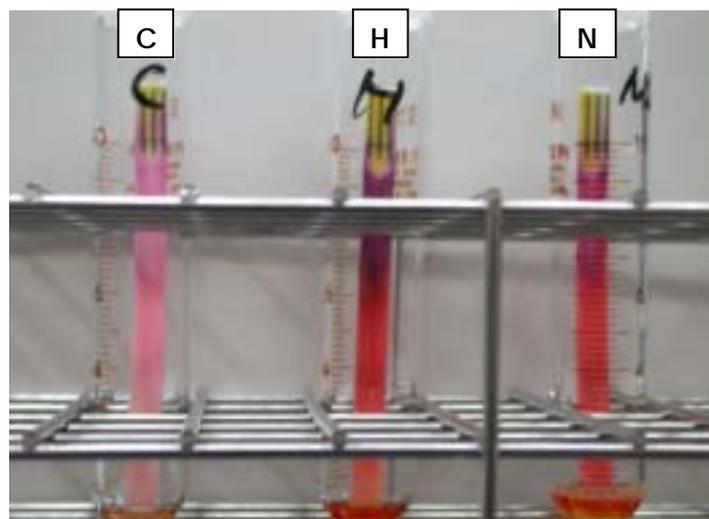


写真2 ニコチン 200 μ g 投与 60 分後の尿中ニコチン及びその代謝産物の検出



写真3 ニコチン 20 μ g 投与 60 分後の尿中ニコチン及びその代謝産物の検出

2 尿中コチニン量 EIA キットによる方法

ニコチン検出試験紙では検出不可能であったニコチン 0.01mg/mL (20 μ g) を投与されたラットの尿について、尿中コチニン量 EIA キットを用いてニコチンの代謝産物の一つであるコチニンを測定した。図 1 に示したように、対照群に比べ胎仔期全排出ガス暴露群と胎仔期除塵排

出ガス暴露群の尿中コチニン量は約二倍であった。ニコチン検出試験紙のニコチン、コチニンの検出感度は各々 5 μ g/mL, 2.5 μ g/mL, EIA キットのコチニンの検出感度は 5ng/mLとされている。ニコチンを投与されたラットの代謝速度を検討する場合、EIA キットを用いる方法が有用であることが示された。

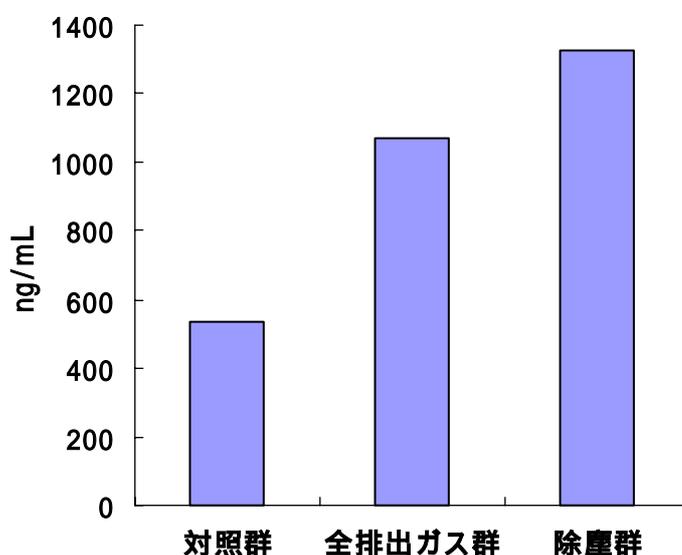


図 1 ニコチン 20 μ g 投与 60 分後の酵素抗体法で測定した尿中コチニン量

実験 尿中コチニン量測定時間の検討

図 2 にニコチン 0.01mg/mL を 2mL 腹腔内投与された 6 ヶ月齢雌ラットの EIA 法で測定した尿中コチニン排泄量の経時的変化を示した。尿中のコチニンは、ニコチン投与 10 分後では

検出されず、15 分から 20 分後に著しく高くなり、それ以降は比較的低い値で推移することがわかった。ニコチンの代謝については、投与 20 分後の尿を用いて比較検討する方法が良いことが示された。

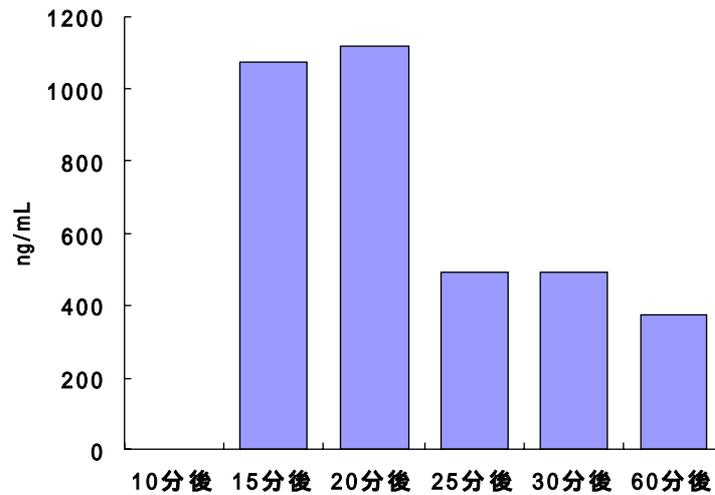


図2 尿中コチニン排泄量の経時的変化

実験

1 ディーゼル排ガスを暴露したラットの尿中コチニン排泄量

図3に、胎仔期のみ全排出ガスあるいは除塵排出ガスを暴露されたラット(妊娠している母親ラットに暴露)並びに清浄空気下で飼育された対照群の雄ラット(各群6匹)を用いて、生後6ヶ月あるいは10ヶ月目にニコチンを腹腔内に投与した場合の20分後の尿中コチニン排泄量を示した。

生後6ヶ月では、胎仔期のみ暴露されたラット(全排出ガスあるいは除塵排出ガス)にニコチンを高濃度投与(200 μ g)した場合の尿中コチニン排泄量は、対照群に比べて有意に高かった。また、ニコチンを低濃度投与(20 μ g)した

場合では、胎仔期に全排出ガスに暴露されたラットの尿中コチニン排泄量は対照群・除塵暴露群に比べて高かった。

生後10ヶ月目は、暴露群と対照群との違いが明瞭であった高濃度のニコチン投与実験を行った。尿中コチニン排泄量は、両暴露群と対照群の間に違いがなかった。時系列で見ると、対照群では生後6ヶ月目と同様の値であったが、胎仔期暴露群(全排出ガスあるいは除塵排出ガス)の尿中コチニン排泄量は生後6ヶ月目に比べおよそ二分の一に減少していた。

各ラットによって蓄尿量がことなることから尿中のクレアチニンを測定し、クレアチニン補正後のコチニン排泄量についても比較したが結果は上記と同様であった。

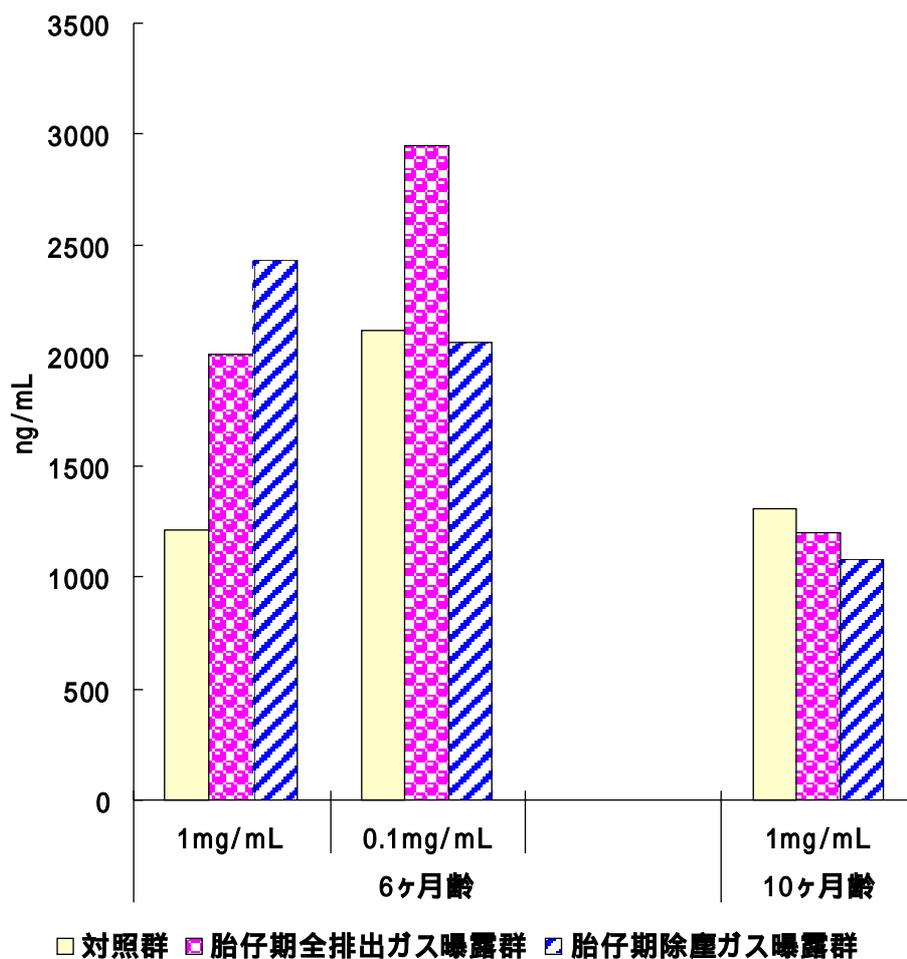


図3 ニコチン 200、20 μ g 投与 20 分後のラット(6,10ヶ月齢) の尿中コチニン量

2 ラットの血中コチニン量

図4に、胎仔期のみ全排出ガスあるいは除塵排出ガスに暴露されたラット並びに清浄空気下で飼育された対照群の雄ラット(各群6匹)を用いて、生後6ヶ月あるいは10ヶ月目にニコチンを腹腔内に投与した場合の20分後の血中コチニン量を示した。

対照群と胎仔期暴露群(全排出ガスあるいは除塵排出ガス)の血中コチニンの量は生後6ヶ月あるいは10ヶ月とも同様であった。また、ニコチンの投与量の影響はみられなかった。生後10ヶ月目におけるニコチン投与後の血中コチニンの量は、生後6ヶ月目に比べて対照群と両暴露群とも低かった。

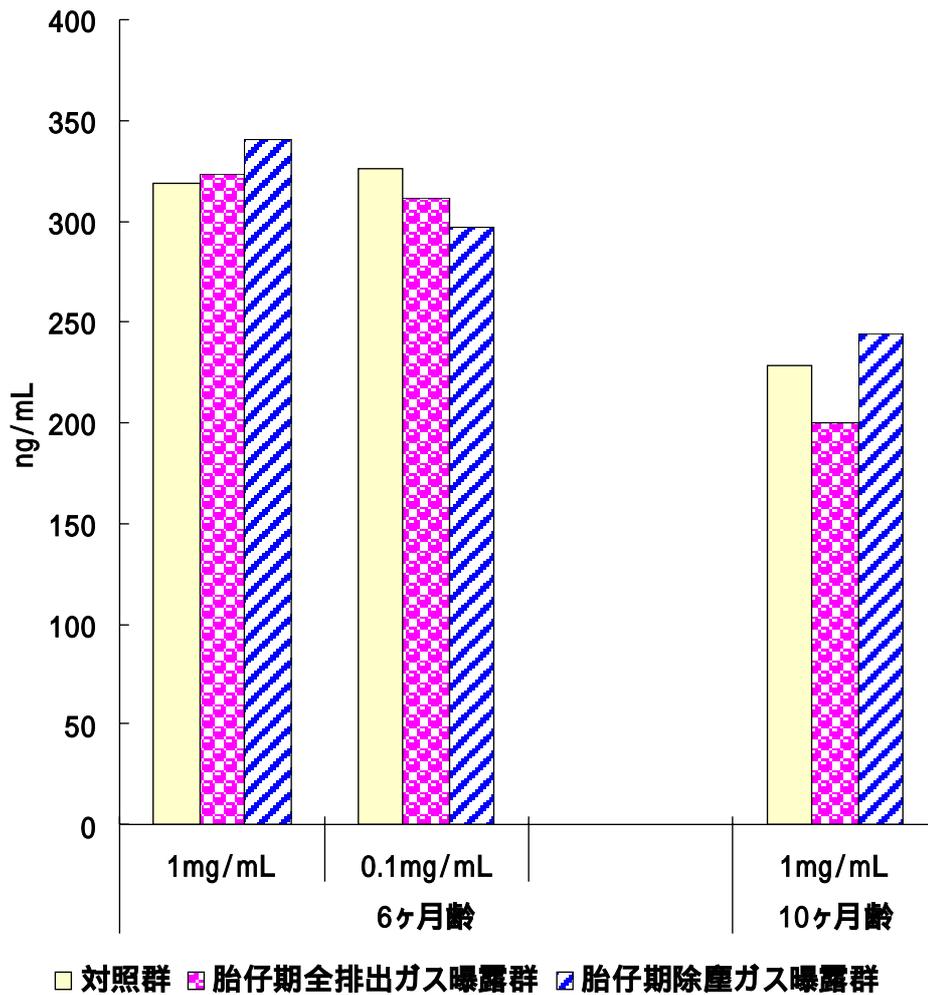


図4 ニコチン 200、20 μg 投与 20 分後のラット(6,10 ヶ月齢) の血中コチニン量

考察

本実験では、胎仔期にのみ排出ガスに暴露(全排出ガスあるいは除塵排出ガス)されたラットと実験期間中清浄空気下で飼育された対照群のラットについて、肝臓のニコチンに対する解毒機能を比較検討した。ニコチンは吸収が速く、吸収されたニコチンは血流に入り、主に肝臓内で大半が無毒であるコチニンに変えられ腎臓から排泄される。ニコチンの生物学的半減期は約2時間、コチニンは17時間とされていることから^{10,11)}、受動喫煙の健康影響調査など日常的な検査には尿中コチニンが指標として使われてい

る。

胎仔期に暴露されたラットの生後6ヶ月目では、ニコチンを高濃度投与(200 μg)した場合の尿中コチニン排泄量は対照群に比べて有意に高かった。ニコチンの主代謝経路であるコチニンへの反応は薬物代謝酵素チトクロム P450 の一分子種である CYP2A6 が触媒する^{10,11)}。基本的な生体や生物細胞の機能として暴露ないし吸収された化学物質を濃度にあわせて排泄する能力をもっている。一方、戸塚らは妊娠ラットを排出ガスに暴露し、その胎仔組織中には多環芳香族炭化水素が有意に高かったこと

から、排出ガスを直接吸入した母親ラットに取り込まれた化学物質は血流に入り、胎盤を介して胎仔に移行し蓄積することを報告している¹²⁾。チトクローム P-450 系の薬物代謝酵素は脂溶性の高い化合物の代謝に係わるが、基質特異性が低く非特異的に種々の化合物を代謝することが知られており、多環芳香族炭化水素もチトクローム P-450 系の酵素によって代謝される。これらのことから、胎仔期に排出ガスに暴露されたラットでは、体内に化学物質が蓄積していることによって肝臓の解毒に係わる機構が発達し、代謝酵素活性が高まりやすくなっていることが考えられた。

また、ニコチンを低濃度投与(20 μ g)した場合は、胎仔期に全排出ガスに暴露されたラットの尿中コチニン排泄量は対照群・除塵暴露群に比べて高かった。胎仔への多環芳香族炭化水素の蓄積量は全排出ガスに暴露された場合の方が除塵排出ガスに暴露された場合より高かった¹²⁾ことが関連していると推察された。なお、コチニンの血中濃度は両暴露群・対照群とも同様であったことから、ニコチンの腹腔から血中への吸収には差はないと考えられた。

胎仔期に暴露されたラットの生後 10 ヶ月目では、尿中コチニン排泄量は対照群と同様であった。しかし、10 ヶ月目の尿中コチニン排泄量を 6 ヶ月目と比較してみると、対照群では生後 6 ヶ月目と同様の値であったが、胎仔期に暴露された群の尿中コチニン排泄量はおよそ二分の一に減少していた。肝臓は加齢に伴って脂質代謝、特にリン脂質代謝が低下することが知られている^{5,6)}。胎仔期に暴露されたラットの生後 12 ヶ月目における肝臓のリン脂質含有量は清浄空気下で飼育されたラットに比べ高かったことを報告した。これらのことから、胎仔期に暴露されたラットでは肝臓の加齢性変化が前倒しに進行し、肝臓の解毒機能低下が生じていることが考えられた。解毒機能の低下は体内に吸収された化学物質の毒性発現の閾値を下げる結果になる。胎仔期に暴露されたラットでは、加齢とともに発癌リスクが高まることも推察される。また、発癌のみでなく、肝臓の代謝障害

は高脂血症や動脈硬化など種々の疾患の誘因となることが知られており、胎仔期に起因する成人病といった概念が今後重要になってくると考えられる。

生涯健康で生き生きとした人生を過ごすためには、加齢による臓器障害の発生をできる限り低く抑え健康寿命を長くすることが求められている。今後、加齢に伴って著しく減少する蛋白質 SMP30(Senescence Marker Protein-30/加齢指標蛋白質 30)^{5,6,13,14,15)}等の定量を行い、排出ガス暴露が肝臓の加齢性変化を加速するメカニズムを明らかにし、環境改善を推進する科学的根拠を提示していく必要がある。

参考文献

1. Watanabe, N., Kurita, M., 2001. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environ. Health Perspect.* 109, 111-119.
2. Nobue Watanabe: Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicology Letters*, 155, 51-58, 2005.
3. Watanabe, N. and Ohasawa, M.: Elevated serum immunoglobulin E to *Cryptomeria japonica* pollen in rats exposed to diesel exhaust during fetal and neonatal periods. *B.M.C. Pregnancy Childbirth*, 2,1-9,2002.
4. 重要施策研究報告書『ディーゼル車排出ガス暴露が次世代に及ぼす健康影響』東京都健康安全研究センター 平成 16 年 3 月
5. Fujita T, Shirasawa T, Maruyama N. Expression and structure of senescence marker protein-30 (SMP30) and its biological significance. *Mech Ageing Dev.* 1999 Mar 15;107(3):271-80.
6. Fujita T, Shirasawa T, Inoue H, Kitamura T, Maruyama N. Hepatic and renal

- expression of senescence marker protein-30 and its biological significance. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998 Sep;13 Suppl:S124-31.
7. NO₂の生体影響における生化学諸指標の検討。鈴木孝人、大澤誠喜、狩野文雄、福田雅夫、笠原利英、寺田伸枝、溝口勲 東京都立衛生研究所研究年報 30-1,183-188, 1979.
 8. ラットの肺及び肝中の酵素に対する NO₂ 暴露の影響。鈴木孝人、大澤誠喜、狩野文雄、福田雅夫、笠原利英、寺田伸枝、溝口勲 東京都立衛生研究所研究年報 31-1,219-225,1980.
 9. NO₂ の長期暴露ラットに及ぼす生化学的影響。鈴木孝人、大澤誠喜、狩野文雄、福田雅夫、笠原利英、寺田伸枝、溝口勲 東京都立衛生研究所研究年報 32-1,238-245,1981.
 10. Benowitz, N.L., Jacob, P., III, Fong, I., and Gupta, S.: Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 268, 296, 1994.
 11. McKennis, H., Jr., Schwartz, S.L., and Bowman, E.R., Alternate routes in the metabolic degradation of the pyrrolidine ring of nicotine, *J. Biol. Chem.*, 239, 3990, 1964.
 12. Yoshiko Tozuka, Nobue Watanabe, Masanobu Osawa, Akira Toriba, Ryoichi Kizu and Kazuichi Hayakawa: Transfer of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Fetuses and Breast Milk of Rats Exposed to Diesel Exhaust. *J. Health Sci.*, 50, 497-502, 2004.
 13. Ishii K, Tsubaki T, Fujita K, Ishigami A, Maruyama N, Akita M. Immunohistochemical localization of senescence marker protein-30 (SMP30) in the submandibular gland and ultrastructural changes of the granular duct cells in SMP30 knockout mice. *Histol Histopathol.* 2005 Jul;20(3):761-8.
 14. Ishigami A, Fujita T, Handa S, Shirasawa T, Koseki H, Kitamura T, Enomoto N, Sato N, Shimosawa T, Maruyama N. Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol.* 2002 Oct;161(4):1273-81.
 15. Fujita T, Shirasawa T, Uchida K, Maruyama N. Gene regulation of senescence marker protein-30 (SMP30): coordinated up-regulation with tissue maturation and gradual down-regulation with aging. *Mech Ageing Dev.* 1996 Jun 25;87(3):219-29.

ディーゼル排出ガスの胎仔期暴露による免疫系への影響

研究要旨

ディーゼル排出ガスの生体への影響を調べるため、妊娠ラットに排出ガスを暴露し、生まれた仔ラットの免疫系への影響を検討した。その結果、サイトカイン IL-12 の血清中濃度は雌の除塵群で高い傾向がみられたが、有意差はなかった。一方、体重についてみると、雌では排出ガス暴露群は対照群に比べ、体重が有意に軽くなる結果が得られた。今後、測定項目を増やし、排出ガス暴露の影響について検討を実施する予定である。

研究の目的

これまでに、妊娠した実験動物(ラット)にディーゼル排出ガスを暴露すると、胎仔の臓器、器官も分化形成段階に排出ガスに間接暴露されることにより、出生した仔はアレルギー反応を起こしやすい体質になるなど免疫系を中心とした生体影響を受けることを報告してきた^{1,2)}。しかし、これまでの実験では検討した因子は特異的 IgE と胸腺ホルモンのみであり、複雑な免疫系への影響を解明するためにはさらに他の因子についても考察する必要がある。そこでサイトカイン(IL-4、IL-12、IFN- γ)など他の因子についても測定を行い、排出ガスの免疫機能への影響を解明することを目的として本研究を行った。

実験方法

1 妊娠ラットへのディーゼル車排出ガスの暴露 全排出ガス群:

排気量 309cc の小型ディーゼルエンジン(NFAD6)から排出するガスを、清浄空気で希釈後、暴露チャンバー内に導入し、妊娠ラットに1日6時間、週5日暴露し全排出ガス群とした。

除塵群:

ディーゼルエンジン排出ガスをヘパフィルター(0.05 μ m, 99.99%除去, 日本無機)に通し、0.05 μ m 以上の粒子状成分を除去し、清浄空気で希釈したガスを暴露した群を除塵群とした。

対照群:

清浄空気のみを暴露した群を対照群とした。

各暴露チャンバー内の環境条件は表1に示した。

表1 各暴露チャンバー内の環境条件

	粉塵濃度 (mg/m ³)	NO ₂ (ppm)
対照群	-	0.02
全排出ガス群	1.71	0.79
除塵群	-	0.80

2 実験動物

妊娠 F344 ラット 9 匹を各群 3 匹に分け、妊娠 7 日目から 20 日目まで上記に示したそれぞれの条件で暴露実験を行った。仔ラットは生後 3 週間まで母ラットと共に清浄空気で飼育した。離乳後は、雌雄を分け飼育し、生後 10 週で採血した。

3 血清中サイトカインの測定

血清中サイトカイン(IL-4、IL-12、IFN- γ)濃度はELISAキット(BioSource International, Inc. USA)を用いて測定した。

結果

IL-12 濃度は、雌の除塵群で高い傾向が見られたが、有意差はなかった(表 2)。IL-4、IFN- γ 濃度は測定キットの検出限界(IL-4 2pg/mL、IFN- γ 13pg/mL)以下であり、各群の差を比較することは出来なかった。また仔ラットの体重を生後 10 週で見ると、雌では全排出ガス群が対照群より少なかった(表 3)。雄は全排出ガス群が 1 匹であることから、比較はできなかった。

表2 各群の生後10週の血清中IL-12濃度

	雄 (pg/mL)		雌 (pg/mL)	
対照群	215 ± 47	(n=10)	119 ± 28	(n=10)
全排出ガス群	212	(n=1)	124 ± 17	(n=12)
除塵群	201 ± 43	(n=12)	140 ± 23	(n=14)

表3 各群の生後10週の体重

	雄 (g)		雌 (g)	
対照群	201 ± 8	(n=10)	128 ± 5	(n=10)
全排出ガス群	192	(n=1)	119 ± 6*	(n=12)
除塵群	195 ± 7	(n=12)	126 ± 5	(n=14)

*: p<0.01

考察

アレルギー反応には免疫応答に関与する免疫担当細胞のT細胞、B細胞が深くかかわっている。T細胞の1つにヘルパーT細胞(Th細胞)があり、Th細胞はTh1細胞とTh2細胞に分化する。Th1細胞は、IL-12、IFN- γ 、TNF- α などを産生し、T細胞や単球など貪食細胞の活性を高め、細胞性免疫に関与する。Th2細胞は、IL-3、IL-4、IL-5などを産生し、液性免疫(抗体産生)に関与する。IL-12、IFN- γ はTh1細胞の分化を制御し、IL-4はTh2細胞分化を制御し、IgE抗体産生を増加させる。したがってTh1細胞よりTh2細胞が優位に働き、Th1とTh2のバランスが崩れると、IgE抗体産生が増加し、アレルギー体質になりやすいと考えられる。そこで、今回影響を受けやすい胎仔期に排出ガスを暴露された仔ラットの血清中サイトカインを測定したが、暴露による影響は確認できなかった。アレルギー反応は免疫に関する因子や血管透過性など様々な要素が絡み合っている。今後、測定項目(IL-1 β 、IL-2、胸腺ホルモンなど)を増やし、また抗原を感作させる実験などを行う予定である。

平成15年10月から“都民の健康と安全を確保する環境に関する条例”により首都圏では基準に適合しないディーゼル車(トラック、バス)は走行出来なくなり、所有者は適合車へ買換えるか、エンジンに粒子状物質減少装置(DPF)を装着しなければならなくなった。したがって、今後は全排出ガスではなく、DPFを装着したディーゼルエンジン排出ガス暴露実験を行い、その影響を調べる必要がある。

参考文献

- 1) ディーゼル車排出ガス暴露の世代を超えた生殖機能に及ぼす影響, p7-27, 大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究報告書(平成12年度から14年度まで), 東京都健康局, 平成16年3月発行.
- 2) ディーゼル車排出ガスとスギ花粉症, p47-60, 大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究報告書(平成12年度から14年度まで), 東京都健康局, 平成16年3月発行.

第二章 大気中微小粒子の健康影響に関する研究

- . 大気中微小粒子 $PM_{2.5}$ のラジカル生成能について
- . 大気中微小粒子 $PM_{2.5}$ 中の金属と血液成分との反応実験
- . 大気中微小粒子暴露によるラジカル生成とヒト血漿への影響に関する
基礎的研究
- . 大気中微小粒子暴露によるヒト血漿の凝固反応への影響
- . ディーゼル排出ガス中の揮発性有機化合物、準揮発性化合物、
アルデヒド類及び多環芳香族炭化水素の分析

大気中微小粒子 PM_{2.5} のラジカル生成能について

Aminophenyl Fluorescein (APF) を用いた検出法による検討

研究要旨

大気汚染物質として近年注目されている粒径が 2.5 μm 以下の微小粒子(PM_{2.5})による健康影響については、心肺疾患に関する疫学的調査研究が増加し、その影響要因のひとつとして活性酸素種(ROS)への関心が高まり、細胞や小動物を扱う実験的研究が増えつつある。しかし、この疫学的調査研究と実験的研究の関連性をより明確にするため PM_{2.5} による ROS 生成量をモニタリングする研究はほとんどなく、その必要性は高い。本研究の意図は、こうした疫学的調査研究が増加している背景を踏まえ、その作用機作解明への実験的研究に通じる基礎資料とすることである。生体影響への関与がより顕著であり、PM_{2.5} に含まれる遷移金属との関連が示唆されている ROS のひとつであるヒドロキシルラジカルを中心的な対象とした。電子スピン共鳴法に比べより一般的な分析環境において定量できる方法として、dichlorofluorescein より特異性が高く、開発されて間もない蛍光試薬 aminophenyl fluorescein (APF)を用いて、PM_{2.5} の ROS 生成を検討した。その結果、操作条件として、試薬調整時や採取したフィルター上から抽出する際は遮光が重要であり、フィルターを浸潤するために添加するエタノールは ROS 生成を阻害することなどが判明した。これらの条件により、Fe(II)を標準物質とした直線状の検量線から、PM_{2.5} による ROS 生成を定量することが可能となった。一方、PM_{2.5} の ROS 生成において重要な位置を占める PM_{2.5} 中の Fe(II)の定量では、Fe(II)の酸化されやすい性質によるモル吸光係数への影響や試料の保存温度の検討から、今回用いた方法より優れた定量法を探る必要が明らかとなった。

はじめに

粒子状物質による大気汚染が健康に与える悪影響を対象とした疫学的調査研究は、肺がんや心肺疾患の死亡率を扱った米国 6 都市調査 (Dockery *et al.*, 1993)を代表のひとつとして、死亡率・罹患率・救急外来者数などをエンドポイントにここ十年ほどの間に着実に増加している (de Hartog *et al.*, 2003; Dusseldorp *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 2001; Pope *et al.*, 2002)。とくに近年では、粒子状物質のうち粒径が 2.5 μm 以下である微小粒子、いわゆる PM_{2.5} の重要性に注目が集まり、また影響の視点が呼吸器の肺から循環器の心臓に移動拡大して、さらには心電図・心拍数・血液指標など心血管系に関する調査研究が増えつつある (Dockery, 2001; Liao *et al.*,

1999; Pope *et al.*, 2004)。しかし、死亡率はもとより、心血管系への影響についてその作用機構は依然不明のままであり、粒子状物質を起因とするフリーラジカルなど酸化ストレスが要因のひとつとしてあげられている (Donaldson *et al.*, 2001, 2003)。反応性が高く生体関連でも重要なヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドアニオンなどのフリーラジカルは、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)とも呼ばれ、都市大気やディーゼル排気から採取された粒子状物質によっても生成し、DNA の損傷との関連でも報告されている (Arimoto *et al.*, 1999; Dellinger *et al.*, 2001; Donaldson *et al.*, 1996, 1997; Gilmour *et al.*, 1996; Squadrito *et al.*, 2001)。

表1 生体に関連する主な活性酸素種 (服巻・池田, 2001 を一部改変)

ラジカル種		非ラジカル種	
O ₂ ⁻ ·	スーパーオキシドアニオン	¹ O ₂	一重項酸素
HO·	ヒドロキシルラジカル	H ₂ O ₂	過酸化水素
HOO·	ヒドロペルオキシラジカル	LOOH	脂質ヒドロペルオキシド
LOO·	ペルオキシラジカル	HOCl	次亜塩素酸
LO·	アルコキシルラジカル	O ₃	オゾン
NOO·	二酸化窒素	Fe O ₂ complex	
NO·	一酸化窒素		

都市大気中の PM_{2.5} には種々の金属元素が含まれ、なかでも鉄はアルミニウムやカルシウムと並ぶ量が含まれ、遷移金属としては最も多い (Brook *et al.*, 2002 ; Chan *et al.*, 1999; Chow *et al.*, 1996 ; Kang *et al.*, 2004; 栗田ら, 2003)。また、粒子状物質中の金属による毒性については多くの報告があり (Adamson *et al.*, 2000; Costa & Dreher, 1997; Dye *et al.*, 2001; Frampton *et al.*, 1999), なかでも ROS との関連 (Ball BR *et al.*, 2000; Ball JC *et al.*, 2000; Donaldson *et al.*, 2003; Frampton *et al.*, 1999; Ghio *et al.*, 1999; Gilmour *et al.*, 1996; Goldsmith *et al.*, 1998), とくに Fenton 反応に代表される鉄と ROS との関連 (Ball BR *et al.*, 2000; Ghio *et al.*, 1999; Gilmour *et al.*, 1996) が指摘されている。

ROS のうちとくにヒドロキシルラジカルは、その寿命も短いことから直接測定することは現状では無理であり、粒子状物質との関連で比較的よく用いられている測定方法は次の数種類である。一つは、電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR, または電子常磁性共鳴: EPR と呼ばれる) 装置を使用し、スピントラップ剤として 5, 5-dimethylpyrroline-N-oxide (DMPO) などとの反応生成から測定するもの (ESR スピントラップ法という) で、粒子状物質との関連では以下の方法に比べ多く報告されている (Dellinger *et al.*,

2001; Shi *et al.*, 2003; Squadrito *et al.*, 2001; Valavanidis *et al.*, 2000)。二つめは、チオバルビタール酸 (TBA) を用いた吸光度法 (Ball JC *et al.*, 2000; Ghio *et al.*, 1999;)。三つめは、プラスミド DNA と反応させコイル状になったもの定量化する方法 (Donaldson *et al.*, 1996, 1997; Gilmour *et al.*, 1996)。また、細胞内 DNA においてヒドロキシルラジカルの特異的損傷物質である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) を検出する方法 (Arimoto *et al.*, 1999)。最後に、ラジカルによって修飾基が変化して蛍光性をもつ物質となる蛍光試薬、例えば dichlorofluorescein (DCF) などによる方法 (Hung & Wang, 2000) などがある。このうち ESR スピントラッピング法はより直接的で優れているが、ESR そのものがラジカル専用の装置であり、分析機器の環境として分光光度計などに比べあまり一般的ではない。ESR 以外の方法は、どちらかといえば細胞など生体試料との関連で用いられことが多く、反対に疫学的調査研究に用いられることはそれほど多くない。とくに、蛍光試薬である DCF は薬品として入手しやすく、また取り扱いもそれほど難しくないので、食品など環境以外の分野でむしろよく使用されている。しかし、DCF は、ヒドロキシルラジカルをはじめ、スーパーオキシドアニオンなど種々の ROS によって蛍光する非特異性であり、その上最大の欠点といえる自己酸化の程度が大きい性質が

ある。それらを解決するため、新しい蛍光試薬として aminophenyl fluorescein (APF) [2-[6-(4'-amino) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid]が開発され(Setsukinai *et al.*, 2003), 2003年8月に第一化学薬品から市販された(長野ら, 2003)。このような特性をもった APF を用いて大気中微小粒子のラジカル生成を扱った調査研究はこれまでになく, 本研究により, APF を用いた定量方法を検討する意義がある。

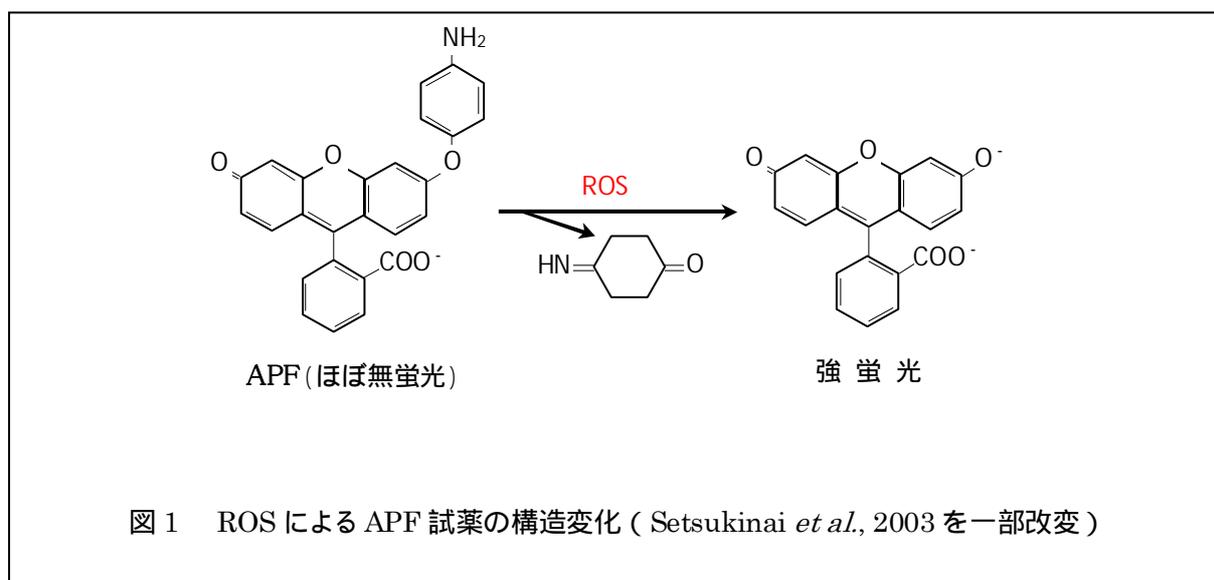
大気汚染物質として注目される微小粒子 PM_{2.5} による健康影響について疫学的調査研究が増加し, 心肺影響を引起す要因の一つとして ROS への関心がそれに応じて高まり, 細胞や小動物を扱う曝露実験が増えつつある中, PM_{2.5} による ROS 生成量をモニタリングとして捉える研究は, Shi *et al.*(2003)を除けばほとんどなく, 疫学的調査研究と実験的研究の関連性をより明確にする調査研究の必要性は高い。本研究の意図は, PM_{2.5} による健康影響を主題とした疫学的調査研究が増加している背景を踏まえ, それらを支持しかつその作用機作解明への基礎資料とするため, 生体影響への関与がより顕著であり, PM_{2.5} 中の遷移金属などとの関連が示唆されている ROS の一つであるヒドロキシルラジカルを中

心に扱い, ESR 法に比べより一般的な分析環境において, DCF 法より特異性の高い定量法として, 開発されて間もない蛍光試薬 APF を用いて PM_{2.5} のラジカル(ROS)生成を検討することである。

材料と方法

1 PM_{2.5} 試料の採取

大気中微小粒子の試料採取には, 粒径 2.5 μm 以下の粒子を選別するインパクター(50%カット特性)と捕集フィルターがセットされた一体型の NILU フィルターホルダー(東京ダイレック社製 PCI)を全天候型のシェルターに入れ使用した。本装置を本センター内の地上約5mの屋上(3号館動物舎屋上)に設置し, 毎分 20 L の流量で 72 時間吸引する条件により平成 16 年 1 月から 3 月の期間に試料採取した。捕集用のフィルターは, テフロン材質で孔径 2 μm, 直径 47 mm のサポートタイプであるゼフロア(Pall 社製 Zefluor)を使用した。試料採取前後のフィルターは, ペトリスライド(Millipore 社製 PD15047)内に一時的に保管にした。後述する保存時の温度条件を検討する場合を除き, PM_{2.5} 採取後のフィルターは, 以下の実験に基づく操作に直ちに用いた。



2 試薬及び器具

ROS の検出に用いた蛍光試薬は、第一化学薬品社製の aminophenyl fluorescein (APF) [2-[6-(4'-amino) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid] を使用した。ROS 発生や Fe(II) の定量に関連して用いた標準試薬として、硫酸第一鉄、過塩素酸第一鉄、及び過塩素酸第二鉄、そして APF の溶解や採取した微小粒子の溶出に用いたリン酸緩衝液 (pH7.4) は Aldrich 社製を使用した。過酸化水素は和光純薬社製の原子吸光分析用のものを、エタノールは関東化学社製の蛍光分析用をそれぞれ使用した。また、Fe(II) の比色定量においては、錯生成試薬である 2-nitroso-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]phenol (PSAP) (同仁化学社製) を使用した。

採取した PM_{2.5} 試料を超音波抽出する際に用いた、ポリプロピレン製の 15 mL 遠沈管 (キャップ付) は、Kendall 社製の金属フリーのものを使用した。

試薬の溶解や希釈、及び器具の洗浄などには、蒸留水を再度イオン交換した高純度水 (Milli-Q) を用いた。

3 ROS の定量

採取した PM_{2.5} の ROS 生成量を定量することを目的に、まずフィルター上から溶液に抽出する操作から開始し、以下の手順に従った。なお、従来は抽出の終了後に抽出液と蛍光試薬を混合するのに対し、ここでは後述の理由から蛍光試薬を抽出のための溶液として直接用いている。N,N-dimethylformamide 0.47 mL に溶解した 1 mg APF (濃度 5 mM 相当) を 100 µM 過酸化水素を含む 0.1 M リン酸緩衝液中に希釈して最終濃度 5 µM の APF 溶液を抽出操作の直前に調製した。二連の実験とするため、PM_{2.5} 採取後直ちにフィルターを半分に裁断してそれぞれ別の 15 mL 遠沈管に入れ、この APF 溶液を 14 mL 添加して密栓し、暗所で超音波抽出を行った。

必要な抽出時間を明らかにするため、所定の時間ごとに一部の抽出液をディスポーザルの PMMA 製セミマイクロセルにピペット採取し、励起波長 490 nm、蛍光波長 515 nm で分光蛍光光度計 (日本分光社製 FP-777) により測定した。APF が ROS により構造変化する図式は図1のとおりである (Setsukinai *et al.*, 2003)。測定は試料ごとに3回行い、その平均値を使用した。比較のため、APF 溶液のみ (ブランク)、未使用フィルターに APF 溶液を添加したもの (フィルターブランク)、及び APF 溶液に 1 µM の Fe(II)、または Fe(III) 溶液も併せて測定した。Fe(II) は、過酸化水素との反応により、式(1)に示すヒドロキシルラジカルが生成するため (Fenton 反応)、標準物質の役割とした。Fe(III) は、式(2)に示すスーパーオキシドアニオンが生成する (Henle & Linn, 1997) ため、比較の物質とした。



さらに、0 から 1 µM 程度の範囲内で Fe(II) を標準溶液として数種類用意し、上記と同様に蛍光強度を測定して検量線を作成した。したがって、PM_{2.5} 等の ROS 濃度は、この検量線に基づき Fe(II) 相当の濃度として求めた。ただし、本報告では抽出時の経時的変化を重視したため、蛍光強度の数値をそのまま記載し Fe(II) 相当の各 ROS 濃度を表示してないが、同時測定した 1 µM Fe(II) の蛍光強度からおよその ROS 濃度が判断できるとした。

採取したフィルターの抽出液の妥当性を検討するため、上記の APF 溶液の代わりに、高純度水あるいはリン酸緩衝液で超音波抽出し、所定の時間ごとに採取した抽出液と APF 溶液とを混合してから、上記の蛍光強度を測定した実験についても行った。しかし、これらを抽出液とする方法は今後使用していく上で良好な結果でなかったため、ここでは高純度水の実験についてだけを結果に示した。また、操作条件において最

最終的に重要となった超音波抽出時などにおける遮光の重要性についても、併せて結果の項で記述する。

4 Fe(II)の定量

Fe(II)は、粒子状物質に含まれていることが知られている(Donaldson *et al.*, 1996; Valavanidis *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2003)。そのため、前述した式(1)のとおりROSの重要な発生源のひとつであり、Fe(II)を定量することはROS生成を間接的に把握することでもある。そこで、Fe(II)を定量するため、以下の操作を行った。ROSの定量操作と同様、ここでも抽出液として発色試薬であるPSAPを直接使用した。

二分割した採取後のフィルターを別々に15 mL遠沈管に入れ、直前に調製した500 μM PSAP溶液を加え超音波抽出を行った。必要な抽出時間を明らかにするため、所定の時間ごとに一部の抽出液をディスポーザルのPMMA製セミマイクロセルにピペット採取し、分光光度計(島津製作所社製UV-2500PC)により756 nmの波長を比色定量した。比較のため、PSAP溶液の

み(ブランク)、未使用フィルターにPSAP溶液を添加したもの(フィルターブランク)、及びPSAP溶液に20 μM Fe(II)を添加したものを併せて測定した。また、標準溶液として0から20 μM程度の範囲内でFe(II)溶液を数種類用意し、同様に測定して作成した検量線からFe(II)濃度を求めた。

加えて、Fe(II)が酸化されやすいことから、PM_{2.5}を採取したフィルターの保存温度を検討するため、フィルターを二分割してそれぞれペトリスライドに入れさらにアルミフォイルで包んで、片方は室温で放置し、もう片方はマイナス20°C以下のフリーザー内に保管して、6日間経過した試料を使ってFe(II)量を比較測定した。

結果

1 遮光していない条件でのROS量変化

2 試料のPM_{2.5}採取フィルターを各二分割したもの、ブランクフィルター、及び1 μMのFe(II)溶液をそれぞれ入れた遠沈管にAPF溶液14 mLずつを加え、APF溶液のみを入れた遠沈管

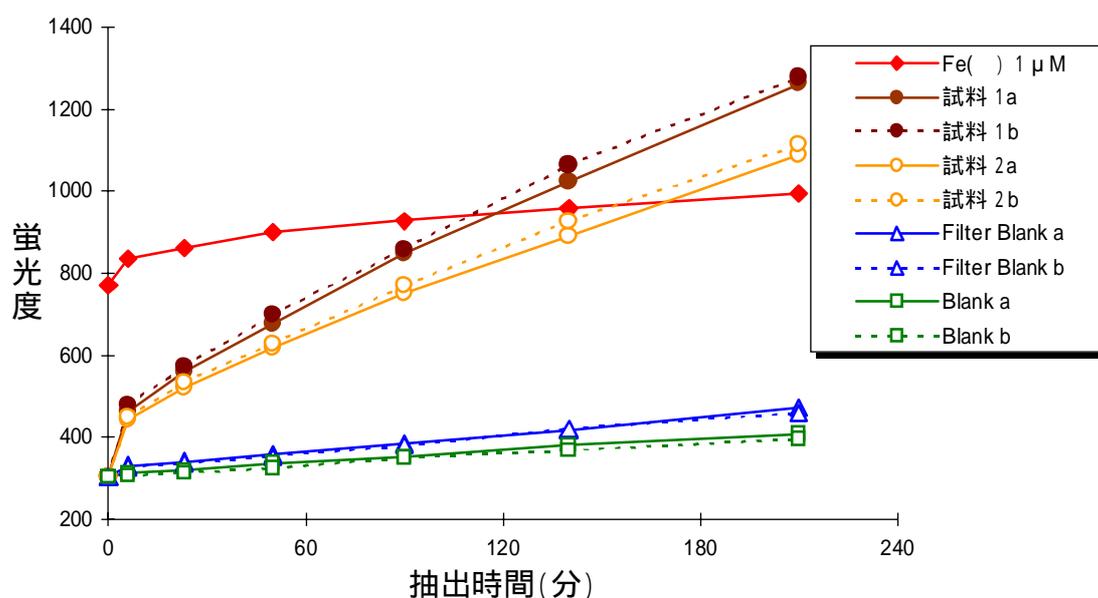


図2 超音波抽出に伴う5 μM APF溶液(100 μM H₂O₂を含む)の経時的蛍光度変化

(ブランク)とともに室温で超音波抽出した。この抽出液を時間ごとに 1 mL ずつ採取してその蛍光強度を測定した(図 2)。二分割した 2 試料の計 4 つの蛍光強度(図 2 の試料 1a, 1b, 2a, 2b)は抽出時間とともに急速に増加した。二分割した試料における蛍光強度の差は、試料 1 が最大 4%弱、そして試料 2 が最大 20%弱であった。一方、ブランク及びフィルターブランクは、試料に比べれば明らかに緩い傾きをもって直線的に増加している。しかし、この相対的に緩やかな蛍光強度の増加を、初期値(抽出 0 分)に対する最終的な増加の割合としてみると、試料それぞれ 30%以上と 50%以上となり、小さいものではない。また、抽出開始直後に 1 μ M Fe(II)の蛍光強度は 770 を示し、ブランクの初期値 305 に比べはるかに高くなったが、その後ゆるやかな勾配に落ち着いている。これは、APF 溶液を暗所で調製していないこと、そして抽出に使用した遠沈管がポリプロピレン製のため半透明であるものの、長時間にわたる超音波抽出時に遮光していないことによる APF の自己励起が原因と考えられる。その理由のひとつは、1 μ M Fe(II)における抽出後

半の蛍光強度の傾きと、ブランク及びフィルターブランクにおけるそれとが非常に似通っていることである。どちらもフィルター上の ROS 生成とはほとんど、あるいはまったく無縁であるため、増加の勾配が互いに類似していると考えられる。とりわけ、APF 溶液における蛍光強度の初期値が 300 以上であるのに対し、以下に示す遮光した条件下における実験の場合(蛍光強度の初期値は高々 50 程度)に比べ、6 倍以上高くなっている。したがって、APF 溶液の調製時や時間を要する超音波抽出の間など、可能な限り遮光した条件において ROS 定量を検討する必要がある。以下に示すすべての結果は、遮光した条件において行ったものである。

2 高純度水抽出による ROS 量変化

捕集したフィルターからの超音波抽出に APF 溶液ではなく高純度水を用いて、前述とおり遮光して抽出を行い、時間ごとに抽出液の一部を採取した後に APF 溶液と混合し、その蛍光強度を測定した。ここでは、試料、フィルターブランク、及びブランクについて、それぞれ 2 本の平均値をプロットした(図 3)。抽出 10 分から 180 分まで

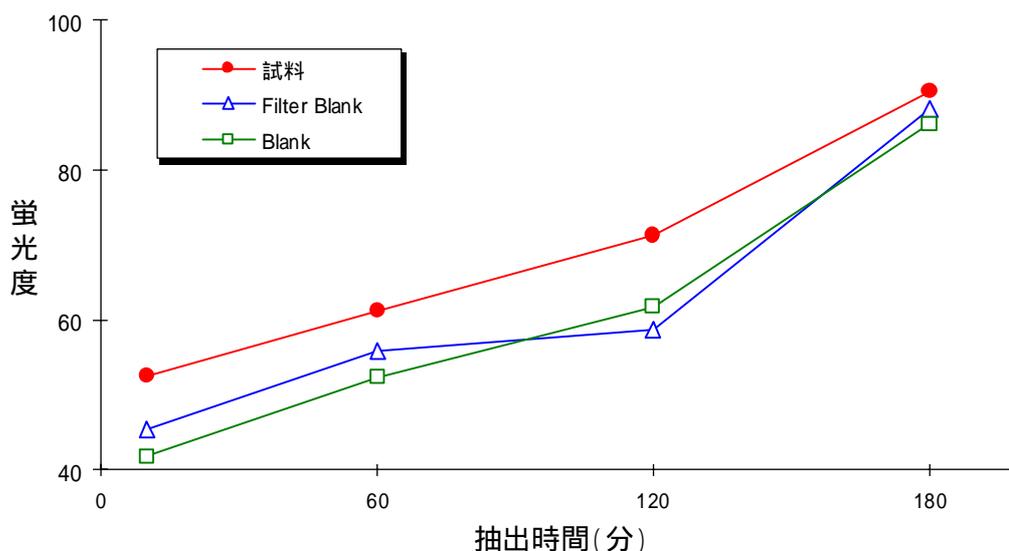


図 3 高純度水を用いた超音波抽出における各抽出時間の抽出液に APF 溶液を添加した直後の蛍光度変化(遮光した条件のもと) 最終濃度 5 μ M APF (100 μ M H₂O₂を含む)

にかけ、3者すべての蛍光強度がほぼ同様な傾きで上昇している。試料の蛍光強度は、ブランクとフィルターブランクに比べ高い値を示すが、抽出の最後(抽出180分)でその差はむしろ小さくなっている。全体としてグラフ変化に図2のような滑らかさがない一因は、抽出液とAPF溶液の混合による誤差と考えられる。したがって、試料の蛍光強度に匹敵するほどのブランクやフィルターブランクの高い数値、及びAPF溶液との混合によると思える誤差から判断すると、高純度水を抽出に用いるのは適当でないと考えられ、材料と方法で記載したとおりAPF溶液を直接抽出液とし、以下の実験では使用した。

3 ROS量と反応時間、過酸化水素濃度、Fe()との関連

試薬調製や抽出などの操作過程において、遮光の重要性やAPF溶液との混合誤差などの問題点がこれまでに明らかとなった。ここでは、PM_{2.5}から生成するROSに対してAPFがどう反応していくかを経時的にみるための理想モデルとして、Fe(II)と過酸化水素によるFenton反応

から生成するヒドロキシルラジカルとAPFとの反応を追跡した。加えて、Fe(II)に添加する過酸化水素濃度による反応の違い、及び式(2)で示したFe(III)と過酸化水素による生じるスーパーオキシドアニオンとAPFとが反応しないこと(Setsukinai *et al.*, 2003)についても検討した。

したがって、上記の1)と2)と異なり、超音波抽出でなく静置した20 mLメスフラスコ内における反応(遮光した条件)について、時間を追ってその蛍光強度の変化を調べた(図4)。Fe(II)との反応では、10 μMと100 μM過酸化水素どちらの蛍光強度もAPFとの混合後すぐに上昇し、その後ゆっくりと増加しながら反応時間120分頃にほぼ一定となっている。詳細にみると、混合直後から120分までの蛍光強度の変化は、10 μM過酸化水素が51.6から72.8であるの対し、100 μMの場合は101から114とより急速に増加して安定化する傾向が強く、最終の蛍光強度も100 μMの方が約1.6倍高かった。一方、Fe(III)とブランクとの反応では、時間経過に伴いどちらもやや増加の傾向にはあるがその程度は大きくなかつ

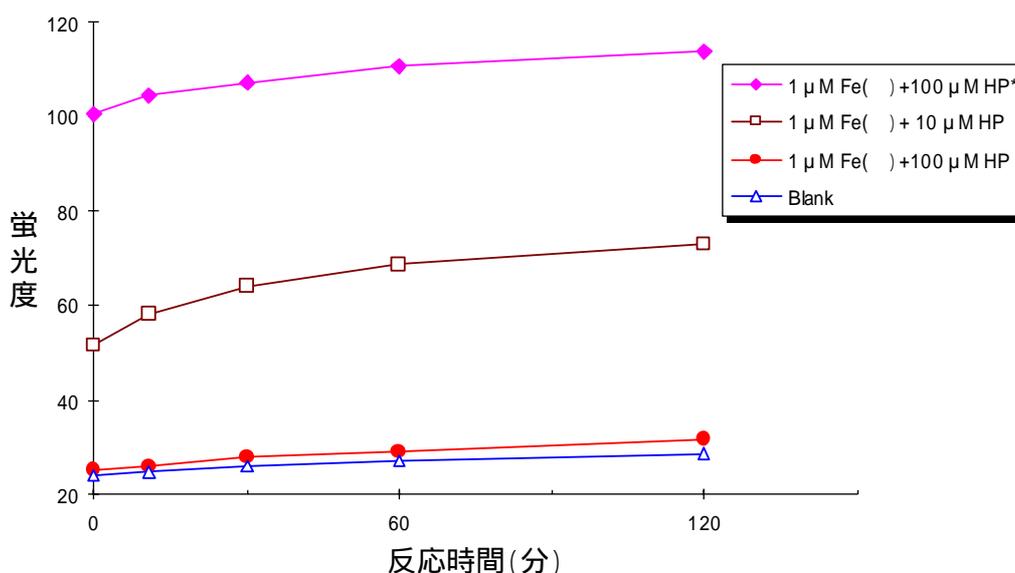


図4 10 μM または 100 μM 過酸化水素の存在下で 1 μM Fe()あるいは Fe()と反応した 5 μM APF 溶液の蛍光強度変化(遮光・静置条件) * HP:過酸化水素

た。Fe(III)の最終の蛍光強度もブランクに比べ、大きく異なることはなかった。これらのことから、過酸化水素濃度は10 μMより100 μMが適当であり、Fe(III)によるROS生成はほとんど無視することができ、APFによる蛍光強度測定には反応に120分間以上が必要なことが明らかとなった。

4 ROS生成におけるエタノールの影響

一般的に、疎水性であるテフロンフィルターから捕集した試料を容易に溶出させるため、微量のエタノールでフィルターを浸潤してから、高純度水や水溶液で抽出する方法がある。しかし、添加したエタノールによって、PM_{2.5}のROS生成に影響があるか検討する必要がある。そこで、半分にカットしたフィルターを浸潤させる程度の量である140μLのエタノールをフィルター全体になじませ、すぐにAPF溶液を加えて、超音波抽出した。そして、時間を追ってその蛍光強度の変化について、エタノール処理をしていないAPF溶液と比較した。

蛍光強度の経時的変化はここに示していないが、これまでの図2や図4とほぼ同様であった。超音

波抽出4時間後の蛍光強度について比較したものを図5に示す。エタノールの添加によって、すべてにおいて蛍光強度が添加しない場合に比べ高くならなかった。その減少の程度は、1 μM Fe(II)の場合がとくに顕著で60%弱、試料1と2で10%弱、そしてブランクとフィルターブランクとともに約11%であった。したがって、抽出のためにエタノールを事前に添加することは、APFを用いた実験系では不適であることが判った。

5 ROS定量の検量線

これまで試料であるフィルター上のPM_{2.5}に対する超音波抽出に必要な時間とそのROSの生成量との関係を主に把握するため、測定値として蛍光強度について検討してきた。本テーマの目標のひとつは、このROSの生成を定量的に把握することであり、そのためには物差しとなる検量線が必要であり、その一例を図6に示す。ここでは、Fe(II)の濃度が1 μM以下で直線となる検量線を示したが、これまでの実験では5 μM以上になると直線的でなくなる傾向があり、試料の濃度によっては希釈などの必要性が生じることが判明している。

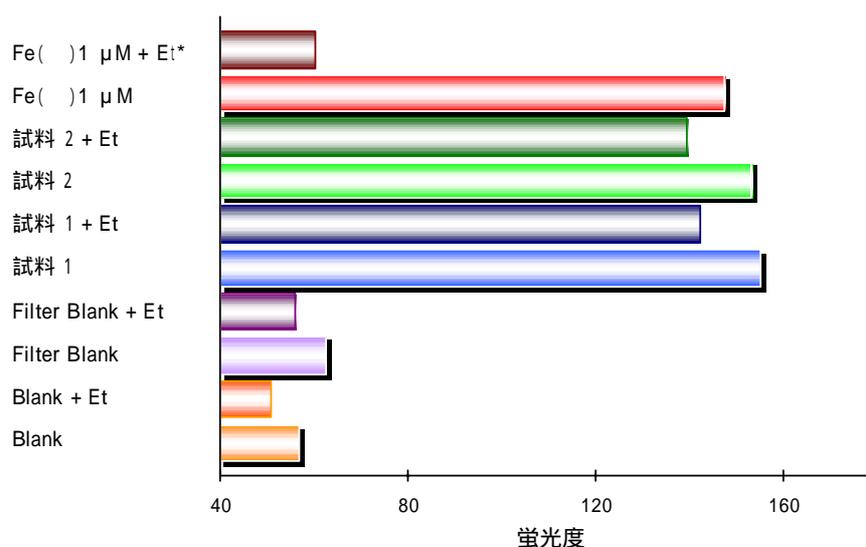


図5 100 μM 過酸化水素を含む5 μM APF溶液で4時間にわたり超音波抽出したときの蛍光度に与えるエタノールの影響 *Et:エタノール

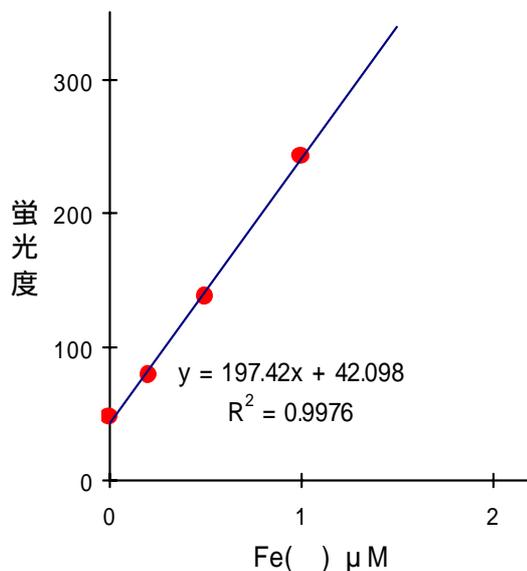


図 6 各濃度の Fe()と反応した 5 μM APF 溶液(100 μM 過酸化水素を含む)の蛍光度による検量線

6 Fe()の定量及びフィルター保存条件

本報告では、PM_{2.5} の ROS の生成について Fe(II)を標準物質とした観点でみている。そこで、実際 PM_{2.5} 中にどれほどの Fe(II)が含まれているかを知ることは、ROS 生成に密接した発生源を把握するだけでなく、それ以外の物質から起因した ROS 生成を探る手掛かりともなる。そこで、PSAP 試薬を用いて、ROS の定量と同様、超音波抽出における経時的変化を検討した。併せて、試料の保管条件が ROS 生成に影響するとの報告もある(Hung & Wang, 2000)ことから、PM_{2.5}を採取したフィルターを二分割しペトリスライドに入れアルミ фольで包み、片方は室温で、他方はマイナス 20℃以下のフリーザー内にそれぞれ 6 日間保存した試料についても比較を行った。

保存温度の異なる PM_{2.5} 採取フィルターとブランクフィルター、及び 20 μM Fe(II)溶液を入れたそれぞれの遠沈管に PSAP 試薬を加え、PSAP 試薬のみを入れた遠沈管とともに密栓して超音

波抽出した。この抽出液を時間ごとに 1 mL ずつ採取してその吸光度を測定した(図 7)。ブランク及びフィルターブランクの吸光度は、抽出 240 分までほとんど変化なく、保存温度に依存していない。一方、試料 1 と 2 の吸光度は、抽出 30 分位まで急激に増加し、抽出 180 分以降はほぼ横這いとなった。これらの吸光度における経時的変化の様子は、保存温度に依存しないで同様であった。しかし、室温で保存した試料は 2 試料ともその吸光度が、フリーザー内で保管した試料の吸光度に比べ明らかに低く、抽出直後を除けば、試料 1 で 4.0~8.2%、そして試料 2 では 13~18%低下している。また、注目すべきは 20 μM Fe(II)の吸光度変化であり、抽出時間が進むに従いゆるやかな勾配であるものの直線的に減少(240 分で約 6%)したことである。これは、PSAP 試薬と Fe(II)で生成した錯体のわずかな不安定さを示す問題点と考えられる。

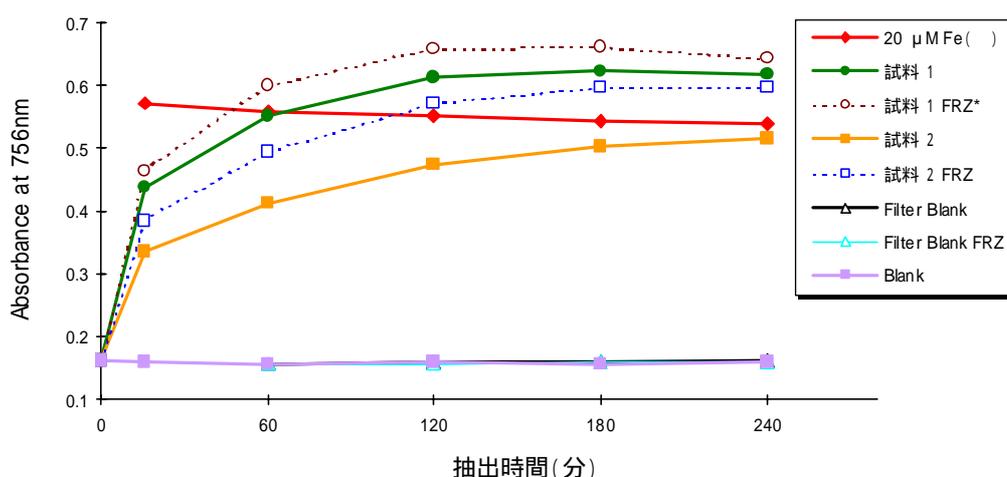


図7 室温またはマイナス20℃で6日間保存したフィルター上のPM2.5試料を500 μM PSAP溶液で超音波抽出したときのFe(II)相当の吸光度変化 *FRZ: -20℃保存

PSAP試薬におけるもうひとつの問題点として、検量線にかかわるものがある。今回の条件における0 μMから20 μM範囲のFe(II)は、その吸光度との関係が良好な直線状の検量線を示し、モル吸光係数は $2.1 \times 10^4 \text{ dm}^3/\text{mol} \cdot \text{cm}$ であった。しかし、PSAP試薬を開発した斉藤ら(1981)が報告している $4.5 \times 10^4 \text{ dm}^3/\text{mol} \cdot \text{cm}$ に比べると半分以下であり、検討の余地を与えるものである。

考察

大気中微小粒子PM_{2.5}から生成するROSの定量について、ESRによる方法(Shi *et al.*, 2003; Valavanidis *et al.*, 2000)に比べより一般的な分析環境で実施でき、かつDCFによる方法(Hung & Wang, 2000)に比べより特異的にROSと反応する方法として、APF蛍光試薬(Setsukinai *et al.*, 2003)を用いて検出できることがはじめて判明した。しかし、いくつかの考慮すべき点も明らかになった。そのひとつはAPFの自己酸化についてであり、蛍光灯下で2時間半放置したAPF蛍光強度の上昇(自己酸化)は1

未満とする報告(Setsukinai *et al.*, 2003)に対し、日射や蛍光灯がある通常的环境下で行った本実験においてAPF溶液の蛍光強度は経時的に上昇することが確認され(図2)、APF溶液の調製時やROS生成の反応時などにおける遮光の重要性が明らかとなった。

もうひとつの問題点は、抽出液と反応時間に関連する。日射や蛍光灯を遮光した条件下であっても、大気中微小粒子を採取したフィルターから高純度水を使って超音波抽出し、APF溶液と反応させた試験では、安定した蛍光強度は得られなかった(図3)。そして、APF溶液と標準物質としたFe(II)溶液とによる理想的な反応モデルにおける反応時間に関する実験結果(図4)から、図1に示す蛍光物質の生成には静置した状態で2時間以上の反応時間が必要であり、APF試薬との混合直後では蛍光強度の不安定性が明らかとなった。これら、蛍光試薬との混合による希釈誤差と蛍光強度の安定性を考慮すると、APF溶液を直接抽出液としない高純度水などを用いた抽出操作方法は、遮光した条件下でも適当ではない。その結果、遮光した条件下でAPF

溶液を直接抽出液とすることが、フィルター上に採取した PM_{2.5} による ROS 生成を定量するために不可欠と言える。

代表的な ROS のひとつであるスーパーオキシドアニオンは、式(2)に表した Fe(III)と過酸化水素の反応において生成する(Henle & Linn, 1997)。一方、大気中の粒子状物質には、Fe(II)に比べ Fe(III)が多く含まれているので(Donaldson *et al.*, 1996; Valavanidis *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2003), Fe(III)と APF 溶液による蛍光について検討した(図 4)。暗所で溶液を混合し静置した(超音波抽出ではない)実験において、スーパーオキシドアニオンの生成による APF との反応はほとんど無視できるレベルであり、既報(Setsukinai *et al.*, 2003)による APF の特性を支持するものであった。したがって、広範囲な種類の ROS に反応する DCF に比べ、APF 試薬は ROS をより特異的に定量できることが確認できた。

次に、抽出に用いる高純度水や APF 溶液などの抽出液の添加に先立って加えるエタノールが、ROS 発生に与える影響を検討した(図 5)。これは、微量のエタノールでテフロンフィルターを浸潤した後、高純度水などを加えて効率的に抽出する方法の可否を考慮したからである。その結果、ブランク、フィルターブランク、試料、そして Fe(II)溶液のすべてにおいて、程度の差はあるがエタノールの添加によって APF の蛍光が阻害されることが判明した。中でも Fe(II)溶液を添加している場合、阻害の割合が最も大きかった。エタノールの添加により、スピントラップ剤である DMPO を用いた ESR 法ではヒドロキシルラジカルが別のラジカルになり DMPO と反応して阻害することが指摘されている(Shi *et al.*, 2003; Yamazaki & Piette, 1990)。本研究では DMPO を用いてないが、APF との反応においてもエタノールが ROS の生成を妨害していることが推察された。したがって、疎水性であるテフロンフィル

ターを用いる場合は、エタノールを使用しない抽出法を選択する必要がある。

本テーマの目標は、大気中の微小粒子による ROS 生成を定量的に把握することである。そのためには、通常分析法と同じく標準となる物質が必要であり、測定によって得た強度とそれに対応する濃度から表される検量線から未知濃度を推定するのが一般的である。したがって、本研究では、前述してきたように Fe(II)溶液を標準物質として、過酸化水素との Fenton 反応に基づいた APF の蛍光強度による検量線とした(図 6)。一方、大気中の粒子状物質には Fe(II)が含まれている(Donaldson *et al.*, 1996; Valavanidis *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2003)。そこで、この Fe(II)量を把握することは、その ROS 生成を理解するための重要な証拠の一つとなることから、ここでは PSAP 試薬を用いた Fe(II)濃度の定量を試みた(図 7)。PSAP 試薬は、都市大気中の PM_{2.5} において鉄と併に存在する銅・ニッケル・コバルト(Brook *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 1999; Chow *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 2004; 栗田ら, 2003)が共存しても、影響をほとんど受けず感度が高い試薬である(斉藤ら, 1981)。PSAP 試薬を抽出液としてその吸光度の経時変化と併せ、採取したフィルターの保存温度(室温と -20℃以下)についても検討した。その結果、Fe(II)濃度を代弁する吸光度変化の様子は、前述した ROS 生成の蛍光強度変化の様子におよそ近かった。しかし、注目すべきは 20 μM Fe(II)の吸光度変化であり、抽出時間が進むに従い直線的にやや減少した。また、本条件における検量線のモル吸光度係数は、原著(斉藤ら, 1981)の半分以下であった。これらは、PSAP 試薬と Fe(II)とによって生成した錯体の不安定さを示すと考えられる。

得られたもうひとつの結果は、室温で保存した試料は 2 試料ともその吸光度が、フリーザー内で保管した試料の吸光度に比べ明らかに低く、

その低下の割合は 4~18%であった。Hung & Wang(2000) は、採取 1 時間後における粒子状物質の ROS に対し、同 115 時間後のそれは 27 から 38%であったとしている。Fe(II)自体は反応性が高く、空気中の酸素などで簡単に酸化されてしまう。そのために、より温度の高い条件で長期間の保存は避けなければならないことをこれは示す。斉藤ら(1981)は、アスコルビン酸を Fe(II)の標準溶液における還元剤として添加していることから、粒子中の Fe(II)を定量することを意図していたとは思えない。その理由は、PM_{2.5}中には Fe(III)が Fe(II)より多く含まれている(Donaldson *et al.*, 1996; Valavanidis *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2003)からである。標準溶液に還元剤を用いない場合、20 μM Fe(II)の吸光度は 3 時間後に 55%減少したとする報告がある(橋本, 1982)。ROS 生成を定量するために用いた超音波抽出に 3~4 時間が必要であった本研究結果を加味すれば、PSAP 試薬を使用する妥当性が損なわれたといえ、さらに、吸光分光分析に関する最近の総説(杉岡ら, 2004)において Fe(II)イオンの項に PSAP の記載はないことから、他の定量法を今後検討する必要がある。

今回、Fe(II)とヒドキシルラジカルによる Fenton 反応を取上げ、さらに Fe(III)によるスーパーオキシドアニオンを検討した。しかし、Yamazaki & Piette(1990) は、Fe(II)とヒドキシルラジカルとの反応には、Fenton 反応を含め 3 つの反応系の存在を指摘し、かつそのうちのひとつの反応系で Fe(III)が反応を阻害することを指摘している。また、これらのラジカル以外に、PM_{2.5}にはセミキノンラジカルが存在(Dellinger *et al.*, 2001; Squadrito *et al.*, 2001)し、数ヶ月それは安定している(Squadrito *et al.*, 2001)という報告がある。その上、PM_{2.5}より粒径の大きい粗大粒子、いわゆる PM_{2.5-10}との比較において、その水溶性と不溶性物質のどちらがより生物活性を低下させるか、まだ決着がつかない。ROS

に関する研究は古くからある一方で、粒子状物質の ROS における比較的最近のテーマにおいてまだ解決していない問題は数多く、さらに今後の取り組みが必要と思われる。

参考文献

Adamson IY , Prieditis H , Hedgecock C , Vincent R : Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. *Toxicol Appl Pharmacol* 166(2): 111-9, 2000

Arimoto T , Yoshikawa T , Takano H , Kohno M : Generation of reactive oxygen species and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation from diesel exhaust particle components in L1210 cells. *Jpn J Pharmacol* 80(1): 49-54, 1999

Ball BR , Smith KR , Veranth JM , Aust AE : Bioavailability of iron from coal fly ash: mechanisms of mobilization and of biological effects. *Inhal Toxicol* 12 Suppl 4: 209-25, 2000

Ball JC , Straccia AM , Young WC , Aust AE : The formation of reactive oxygen species catalyzed by neutral, aqueous extracts of NIST ambient particulate matter and diesel engine particles. *J Air Waste Manag Assoc* 50(11): 1897-903, 2000

Brook JR , Lillyman CD , Shepherd MF , Mamedov A : Regional transport and urban contributions to fine particle concentrations in southeastern Canada. *J Air Waste Manag Assoc* 52(7): 855-66, 2002

Burkitt MJ , Gilbert BC : The control of iron-induced oxidative damage in isolated rat-liver mitochondria by respiration state and

- ascorbate. *Free Radic Res Commun* 5(6): 333-44, 1989
- Burkitt MJ , Gilbert BC : Model studies of the iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Radic Res Commun* 10(4-5): 265-80, 1990
- Chan YC , Simpson RW , Mctainsh GH , Vowles PD , Cohen DD , Bailey GM : Characterisation of chemical species in PM_{2.5} and PM₁₀ aerosols in Brisbane, Australia. *Atmos Environ* 31(22): 3773-85, 1997
- Chow JC , Watson JG , Lu Z , Lowenthal DH , Frazier CA , Solomon PA , Thuillier RH , Magliano K : Descriptive analysis of PM_{2.5} and PM₁₀ at regionally representative locations during SJVAQS/AUSPEX. *Atmos Environ* 30(12): 2079-112, 1996
- Costa DL , Dreher KL : Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5: 1053-60, 1997
- de Hartog JJ , Hoek G , Peters A , Timonen KL , Ibald-Mulli A , Brunekreef B , Heinrich J , Tiittanen P , van Wijnen JH , Kreyling W , Kulmala M , Pekkanen J : Effects of fine and ultrafine particles on cardiorespiratory symptoms in elderly subjects with coronary heart disease: the ULTRA study. *Am J Epidemiol* 157(7): 613-23, 2003
- Dellinger B , Pryor WA , Cueto R , Squadrito GL , Hegde V , Deutsch WA : Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem Res Toxicol* 14(10): 1371-7, 2001
- Diociaiuti M , Balduzzi M , De Berardis B , Cattani G , Stacchini G , Ziemacki G , Marconi A , Paoletti L : The two PM_{2.5} (fine) and PM_{2.5-10} (coarse) fractions: evidence of different biological activity. *Environ Res* 86(3): 254-62, 2001
- Dockery DW : Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4: 483-6, 2001
- Dockery DW , Pope CA 3rd , Xu X , Spengler JD , Ware JH , Fay ME , Ferris BG Jr , Speizer FE : An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 329(24): 1753-9, 1993
- Donaldson K , Beswick PH , Gilmour PS : Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol Lett* 88(1-3): 293-8, 1996
- Donaldson K , Brown DM , Mitchell C , Dineva M , Beswick PH , Gilmour P , MacNee W : Free radical activity of PM₁₀: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5: 1285-9, 1997
- Donaldson K , Stone V , Borm PJ , Jimenez LA , Gilmour PS , Schins RP , Knaapen AM , Rahman I , Faux SP , Brown DM , MacNee W : Oxidative stress and calcium signaling in the adverse

- effects of environmental particles (PM(10)). *Free Radic Biol Med* 34(11): 1369–82, 2003
- Donaldson K , Stone V , Seaton A , MacNee W : Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4: 523–7, 2001
- Dusseldorp A , Kruize H , Brunekreef B , Hofschreuder P , de Meer G , van Oudvorst AB : Associations of PM10 and airborne iron with respiratory health of adults living near a steel factory. *Am J Respir Crit Care Med* 152(6 Pt 1): 1932–9, 1995
- Dye JA , Lehmann JR , McGee JK , Winsett DW , Ledbetter AD , Everitt JI , Ghio AJ , Costa DL : Acute pulmonary toxicity of particulate matter filter extracts in rats: coherence with epidemiologic studies in Utah Valley residents. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 3: 395–403, 2001
- Frampton MW , Ghio AJ , Samet JM , Carson JL , Carter JD , Devlin RB : Effects of aqueous extracts of PM(10) filters from the Utah valley on human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): L960–7, 1999
- Ghio AJ , Stoneheurner J , McGee JK , Kinsey JS : Sulfate content correlates with iron concentrations in ambient air pollution particles. *Inhal Toxicol* 11(4): 293–307, 1999
- Gilmour PS , Brown DM , Lindsay TG , Beswick PH , MacNee W , Donaldson K : Adverse health effects of PM10 particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup Environ Med* 53(12): 817–22, 1996
- Goldsmith CA , Imrich A , Danaee H , Ning YY , Kobzik L : Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health A* 54(7): 529–45, 1998
- Greenwell LL , Moreno T , Richards RJ : Pulmonary antioxidants exert differential protective effects against urban and industrial particulate matter. *J Biosci* 28(1): 101–7, 2003
- Henle ES , Linn S : Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 272(31): 19095–8, 1997
- Hung HF , Wang CS : Experimental determination of reactive oxygen species in Taipei aerosols. *J Aerosol Sci* 32: 1201–11, 2000
- Kang C , Sunwoo Y , Lee HS , Kang B , Lee S : Atmospheric Concentrations of PM2.5 Trace Elements in the Seoul Urban Area of South Korea *J Air & Waste Manage Assoc* 54(4) : 432–9, 2004
- Liao D , Creason J , Shy C , Williams R , Watts R , Zweidinger R : Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environ Health Perspect* 107(7): 521–5, 1999
- Peters A , Dockery DW , Muller JE , Mittleman MA : Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation*

103(23): 2810-5, 2001

Pope CA 3rd , Burnett RT , Thun MJ , Calle EE , Krewski D , Ito K , Thurston GD : Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. JAMA 287(9): 1132-41, 2002

Pope CA 3rd , Hansen ML , Long RW , Nielsen KR , Eatough NL , Wilson WE , Eatough DJ : Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. Environ Health Perspect 112(3): 339-45, 2004

Setsukinai K , Urano Y , Kakinuma K , Majima HJ , Nagano T : Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. J Biol Chem 278(5): 3170-5, 2003

Shi T , Schins RP , Knaapen AM , Kuhlbusch T , Pitz M , Heinrich J , Borm PJ : Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. J Environ Monit 5(4): 550-6, 2003

Squadrito GL , Cueto R , Dellinger B , Pryor WA : Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. Free Radic Biol Med 31(9): 1132-8, 2001

Valavanidis A , Salika A , Theodoropoulou A : Generation of hydroxyl radicals by urban suspended particulate air matter. The role of iron ions Atmos Env 34 (15): 2379-86 , 2000

Yamazaki I , Piette LH : ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe²⁺ ions with H₂O₂-reactive species in oxygen toxicity in biology. J Biol Chem 265(23): 13589-94, 1990

栗田雅行, 大橋則雄, 上原眞一: 東京都内 6 地点における大気中微小粒子 PM_{2.5} の有害元素について. 東京東京都健康安全研究センター年報 54:315-8, 2003

斉藤幹彦, 堀口大吉, 嘉納兼勇: 新規水溶性ニトロソフェノール誘導体による微量鉄(II)の吸光度定量. 分析化学 30:635-9, 1981

杉岡幹生, 村上幸雄, 安保寛一, 鈴木康志: 吸光分光分析—装置と応用. ぶんせき 1: 38-43, 2004

長野哲雄, 瀬月内健一, 浦野泰照: 活性酸素イメージングプローブ. 実験医学 21(15):2144-6, 2003

橋本啓二: 二価鉄誘導脂質過酸化反応溶液中の二価鉄の定量. 岡山医学会雑誌 94:349-57, 1982

服巻信也, 池田久雄: 生体における酸化ストレス測定法. CARDIAC PRACTICE 12(4):371-8, 2001

大気中微小粒子 PM_{2.5} 中の金属と血液成分との反応実験

研究要旨

大気汚染物質である粒径が 2.5 μm 以下の微小粒子(PM_{2.5})によって生成するフリーラジカルや活性酸素種に着目した。これらは、最近報告が増加している心肺疾患に関する疫学的調査研究や実験的研究の主要テーマのひとつである。しかし、疫学的調査研究と実験的研究の関連性をより明確にするために必要なことは、PM_{2.5} によるこれらの生成に関するモニタリング研究と考えられるが、実際に行われている調査研究がほとんどないのが現状である。本研究の意図は、モニタリングへの応用を目指し、遷移金属が PM_{2.5} に含まれてるという事実を踏まえ、それによって生成するフリーラジカルや活性酸素種を蛍光試薬である aminophenyl fluorescein (APF)と、APF とはやや性質の異なる hydroxyphenyl fluorescein (HPF)を併せて用いることによって、生体と密接な関係がある過酸化水素や血清アルブミンなどの血液成分と PM_{2.5} がどのように関連するか検討することである。本研究の結果では、PM_{2.5} による Ferrozine 溶液の呈色反応と、HPF における過酸化水素の添加の有無による蛍光強度の差異から、生体への影響が強いヒドロキシルラジカルの生成が PM_{2.5} によって生じることが示唆された。また、APF と HPF との並行試験結果から、ヒドロキシルラジカルの他に次亜塩素酸やペルオキシナイトライトの生成が予測されたが、monochlorodimedon による吸光度分析から次亜塩素酸でないことが示唆された。生体における抗酸化物質モデルとして採用したウシ血清アルブミンの添加量を変え、PM_{2.5} による蛍光強度の変化を調べると、ウシ血清アルブミン添加量が増加するに従い、フリーラジカルや活性酸素種の生成を示す蛍光強度の増加が抑制された。これらの結果から、ヒドロキシルラジカルを代表とするフリーラジカルや活性酸素種が PM_{2.5} から生成し、生体へ悪影響を及ぼすことが示された。

はじめに

近年、大気汚染物質のひとつである粒子状物質のうち、粒径が 2.5 μm 以下である微小粒子、いわゆる PM_{2.5} の重要性に注目が集まっている。これは、粒子状物質の健康影響への視点が、呼吸器としての肺から心臓をはじめとする循環器に移行拡大しており、心電図・心拍数・血液指標など心血管系に関する調査研究の増加にもみとれる(Dockery, 2001; Liao *et al.*, 1999; Pope *et al.*, 2004)。心血管系への影響についてその作用機構は未解明のままであるが、粒子状物質を起因とするフリーラジカルや活性酸素種(reactive oxygen species)による酸化ストレスが要因のひとつとしてあげられている(Donaldson *et al.*, 2001, 2003)。反応性が高く生体との関連でも重要であるフリーラジカルや活性酸素種は、

生体内での発生だけでなく都市大気やディーゼル排気から採取された粒子状物質によっても生成し、DNA の損傷などが報告されている(Arimoto *et al.*, 1999; Dellinger *et al.*, 2001; Donaldson *et al.*, 1996, 1997; Gilmour *et al.*, 1996; Squadrito *et al.*, 2001)。代表的なフリーラジカルであるヒドロキシルラジカルの生成は、Fenton 反応として Fe(II)と過酸化水素との反応によることがよく知られている(式 1)。



この他、生体影響との関連でよく知られている活性酸素種を含め、表 1 に掲げる。

一方、都市大気中の PM_{2.5} には種々の金属元素が含まれ、なかでも鉄はアルミニウムやカルシウムと並ぶ量が含まれ、遷移金属としては最も多い(Brook *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 1999;

表1 生体に関連する主な活性酸素種（服巻・池田, 2001 を一部改変）

ラジカル種		非ラジカル種	
O ₂ ⁻ ·	スーパーオキシドアニオン	¹ O ₂	一重項酸素
HO·	ヒドロキシルラジカル	H ₂ O ₂	過酸化水素
HOO·	ヒドロペルオキシラジカル	LOOH	脂質ヒドロペルオキシド
LOO·	ペルオキシラジカル	HOCl	次亜塩素酸
LO·	アルコキシラジカル	O ₃	オゾン
NOO·	二酸化窒素	Fe O ₂ complex	
NO·	一酸化窒素		

Chow *et al.*, 1996 ; Kang *et al.*, 2004; 栗田ら, 2003)。また, 粒子状物質中の金属とフリーラジカルや活性酸素種との関連 (Ball BR *et al.*, 2000; Ball JC *et al.*, 2000; Donaldson *et al.*, 2003; Frampton *et al.*, 1999; Ghio *et al.*, 1999; Gilmour *et al.*, 1996; Goldsmith *et al.*, 1998)のうち, とくに Fenton 反応に代表される鉄との関連が報告されている (Ball BR *et al.*, 2000; Ghio *et al.*, 2003)が, 2003 年 8 月に第一化学薬品から市販された (長野ら, 2003)。特に APF と HPF では, 表 2 に示すように蛍光試薬の特性が異なり, 両方を同時に用いることで活性酸素種のひとつである次亜塩素酸等の検出が可能となった。このような特徴をもった蛍光試薬を用いて大気中微小粒子のフリーラジカルや活性酸素種の生成を扱った調査研究はこれまでになく, 本研究によって検討する意義がある。

大気汚染物質として注目される微小粒子 PM_{2.5}による健康影響について疫学的調査研究が増加し, 細胞や小動物を扱う曝露実験が増えつつある中, 心肺への悪影響を引起す要因の一つとしてフリーラジカルや活性酸素種への関心が高まっている。しかし, PM_{2.5}によるフリーラジカルや活性酸素種の生成をモニタリングとして捉える研究は, Shi *et al.*(2003)以外にはなく, 疫学的調査研究と実験的研究の関連性をより明確にする

al., 1999; Gilmour *et al.*, 1996)。

最近, フリーラジカルや活性酸素種の生成を把握するために新たに開発された蛍光試薬である aminophenyl fluorescein (APF)

[2-[6-(4'-amino) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid]と hydroxyphenyl fluorescein (HPF)[2-[6-(4'-hydroxy) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid] (Setsukinai 調査研究の必要性は高い。本研究の意図は, 平成 15 年度に続き, PM_{2.5}中の遷移金属などとの関連が示唆されているフリーラジカルや活性酸素種を対象とし, 今年度の特徴として, 蛍光試薬である APF に加えて HPF を用い, 生体と密接な関係がある過酸化水素や血清アルブミンなど血液成分との関連から検討することである。

材料と方法

1 PM_{2.5}試料の採取

大気中微小粒子の試料採取には, 粒径 2.5 μm 以下の粒子を選別するインパクトター(50%カット特性)と捕集フィルターを共にセットできる一体型のフィルターホルダー (柴田科学社製 NWPS-35HS)と吸引ポンプ (柴田科学社製 Σ-500)をシリコンチューブで最短距離でつなぎ, 全天候型のシェルターに収容して使用した (写真 1)。

表 2 蛍光試薬の特性比較 (Setsukinai *et al.*, 2003)

TABLE I
Fluorescence increase of HPF, APF, and DCFH in various ROS generating systems

Dyes (final 10 μM , 0.1% DMF as a cosolvent) were added to sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The fluorescence intensities of HPF, APF, and DCFH were measured at 515, 515, and 520 nm with excitation at 490, 490, and 500 nm, respectively. DCFH was obtained by the hydrolysis of DCFH-DA with base as mentioned under "Experimental Procedures."

ROS	HPF	APF	DCFH
$\cdot\text{OH}^a$	730	1200	7400
ONOO^{-b}	120	560	6600
OCl^-c	6	3600	86
$^1\text{O}_2^d$	5	9	26
$\text{O}_2^{\cdot e}$	8	6	67
H_2O_2^f	2	<1	190
NO^g	6	<1	150
ROO^h	17	2	710
Autoxidation ⁱ	<1	<1	2000

^a Ferrous perchlorate (100 μM) and H_2O_2 (1 mM) were added at room temperature.

^b ONOO^- (final 3 μM) was added at 37 °C.

^c NaOCl (final 3 μM) was added at 37 °C.

^d 3-(1,4-Dihydro-1,4-epidioxy-1-naphthyl)propionic acid (100 μM) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min.

^e KO_2 (100 μM) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min.

^f H_2O_2 (100 μM) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min.

^g 1-Hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene (100 μM) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min.

^h 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (100 μM) was added and the mixtures were stirred at 37 °C for 30 min.

ⁱ Dye solutions were placed under a fluorescent lamp for 2.5 h.

本装置を本センター内の地上約 5 mの屋上(3号館動物舎屋上)に設置し、毎分 2.5 L の流量で 72 時間吸引して試料採取した。捕集用のフィルターは、テフロンで補強されたグラスファイバー材質である直径 35 mm のもの(Pall 社製 T60A20)を使用した。試料採取前後のフィルタ

ーは、ペトリスライド(Millipore 社製 PD15047)内に一時的に保管して、 $\text{PM}_{2.5}$ の質量濃度を得るため秤量を行った。

2 試薬及び器具

フリーラジカルや活性酸素種の検出に用いた蛍光試薬は、第一化学薬品社製の



写真 1 全天候型シェルター内の一体型フィルターホルダーと吸引ポンプ

Aminophenyl fluorescein (APF)及び hydroxyphenyl fluorescein (HPF)を使用した。蛍光試薬の溶解や採取した微小粒子の溶出に用いたリン酸緩衝液(pH7.4)は Aldrich 社製を使用した。また、Fe(II)の比色定量において、標準溶液として硫酸アンモニウム第一鉄6水塩(モール塩)の 0.25 M 溶液(関東化学社製)を、錯生成試薬である Ferrozine [3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid] (Sigma 社製)を使用した。この他、過酸化水素は和光純薬社製の原子吸光分析用を、次亜塩素酸ナトリウムは Sigma-Aldrich Japan 社製の 10%溶液を、monochloro-Dimedon (MCD) [2-chloro-5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione] は Sigma 社製を、ウシ血清アルブミンは Merck 社製を使用した。

採取した PM_{2.5} 試料を超音波抽出する際に用いた、ポリプロピレン製の 15 mL 遠沈管(キャップ付)は、Kendall 社製の金属フリーのものを使用した。

試薬の溶解や希釈、及び器具の洗浄などには、蒸留水を再度イオン交換した高純度水

(Milli-Q)を用いた。

3 PM_{2.5}からの抽出操作

PM_{2.5}の採取後秤量してPM_{2.5}の質量濃度を求め、直ちにフィルターを裁断して 15 mL 遠沈管に入れ、後述する蛍光試薬や呈色試薬を 5 mL 添加して密栓し、暗所で 3 時間超音波抽出を行った。その抽出液からディスポーザルの PMMA 製セミマイクロセルにピペット採取し、後述する所定の測定条件による蛍光強度や吸光度分析用の試料とした。

4 フリーラジカルと活性酸素種の定量

採取した PM_{2.5} によるフリーラジカルや活性酸素種の生成量を定量するため、N,N-dimethylformamide 0.47 mL に溶解した 1 mg APF または HPF (各濃度 5 mM 相当)を 0.1 M リン酸緩衝液中に希釈し、最終濃度 5 μM の APF または HPF 溶液の蛍光試薬として試験直前に用意した。ただし、目的とする試験に応じて、過酸化水素、ウシ血清アルブミンなどを所定の濃度となるように蛍光試薬に添加して用いた。PM_{2.5} の採取フィルターを上記3)の操作手順による抽出後、励起波長 490 nm, 蛍光波長 515 nm で分光蛍光光度計(日本分光社製 FP-777)により蛍光強度を測定した。APF または HPF がフリーラジカルや活性酸素種と反応し蛍光を発する分子構造変化は、図1のとおりである (Setsukinai *et al.*, 2003)。測定は試料ごとに3回行い、その平均値を使用した。PM_{2.5} による蛍光強度の増減を比較するため、未使用フィルターについても PM_{2.5} を採取したフィルターと同様に処理し、蛍光試薬を添加しフィルターブランクとして併せて測定した。さらに、0 から 1 μM 程度の範囲内で Fe(II)を標準溶液として数種類用意し、上記と同様に蛍光強度を測定して検量線を作成した。PM_{2.5} 等のフリーラジカルや活性酸素種の生成濃度は、この検量線に基づき Fe(II)相当の濃度として求めた。

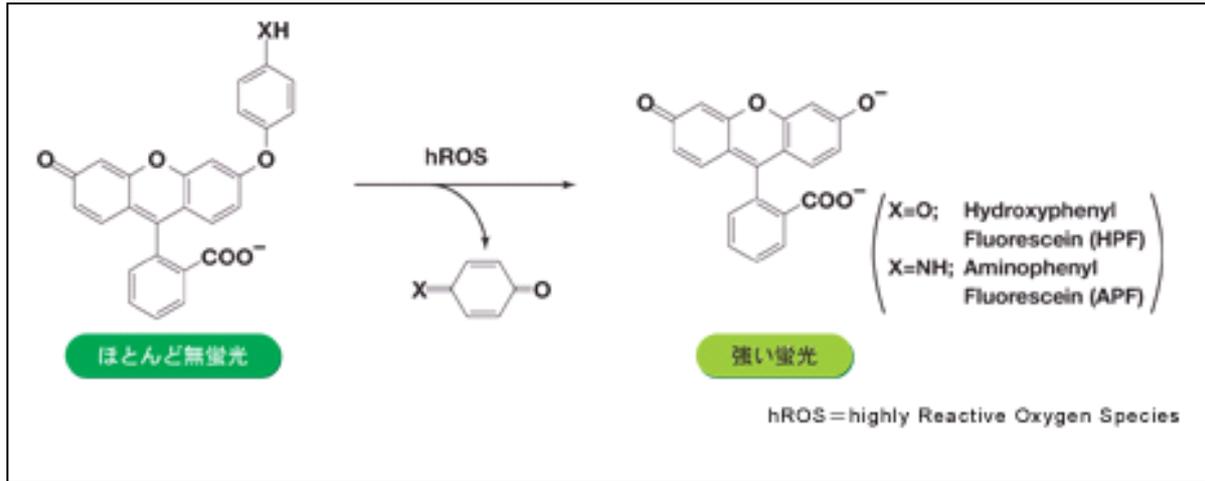


図1 ROSによる蛍光試薬の構造変化 (Setsukinai *et al.*, 2003)

5 Fe(II)の定量

Fe(II)は、粒子状物質に含まれていることが知られている (Donaldson *et al.*, 1996; Valavanidis *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2003)。そのため、前述した式(1)のとおりフリーラジカルや活性酸素種の重要な発生源のひとつであり、Fe(II)を定量することはフリーラジカルや活性酸素種の生成を間接的に把握することでもある。そこで、Fe(II)を定量するため、以下の操作を行った。採取したPM_{2.5}フィルターに発色試薬を直接添加して超音波抽出し、吸光度分析によって数種類の濃度のFe(II)標準溶液による検量線から定量した。前年度では、発色試薬として2-nitroso-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl) amino]phenol (PSAP) を用いたが呈色後の退色が判明したので、今年度は代わりにFerrozineを使用した。すなわち、PM_{2.5}採取後のフィルターを15 mL遠沈管に入れ、直前に調製した40 μM Ferrozine溶液を加え、3時間の超音波抽出後、分光光度計(島津製作所社製UV-2500PC)により562 nm波長において測定した。

6 次亜塩素酸の検討

PM_{2.5}からの生成が予測された次亜塩素酸については、MCDを用いて検討した。このうち、

MCDとの反応による定量についてはCarr & Winterbourn (1997)に従い、40 μM濃度のMCD溶液を用いて上記3)の操作手順による抽出後、290 nmの波長において分光光度計により測定した。

7 ウシ血清アルブミンによる試験

抗酸化物質のモデルとしてウシ血清アルブミンが共存する場合において、PM_{2.5}によるフリーラジカルや活性酸素種の生成に与える影響を調べるため、APF溶液にウシ血清アルブミンを0~0.14 g/Lを添加して、上記4)の測定条件による蛍光強度の増減を検討した。

結果

1 APFとHPFの比較

フィルター上に採取したPM_{2.5}試料を二分し、ともに過酸化水素を含まない2.5 μMのAPF溶液とHPF溶液でそれぞれ超音波抽出した。未使用のフィルターについて同様に処理したコントロール群との蛍光強度を比較したものを図2に示す。

APF溶液とHPF溶液におけるコントロール群の蛍光強度は、平均値±S.E(以下同じ)としてそ

れぞれ 36.2 ± 1.3 , 343.6 ± 0.2 とベースになる蛍光強度が APF より HPF の方が 9 倍以上高い特徴があった。PM_{2.5} における蛍光強度は、同じ順でそれぞれ 83.5 ± 2.3 , 345.9 ± 0.3 であり、コントロール群と比較して有意の増加が認められた。この蛍光強度の増分が HPF に比べ APF の方ではるかに大きかった理由は、表 2 (Setsukinai *et al.*, 2003) に示されているように、HPF にはない APF の特徴であるところの次亜塩素酸等に対する反応と予想される。

2 過酸化水素添加による HPF 溶液の蛍光強度変化

フィルター上に採取した PM_{2.5} 試料に対して、100 μM 過酸化水素を含まない 5 μM HPF 溶液とそれを含む HPF 溶液それぞれによって抽出したとき、それらの蛍光強度を PM_{2.5} 未採取フィルターであるコントロール群と比較した図を図 3 に示す。過酸化水素を含まない HPF 溶液の場合の蛍光強度は、コントロール群 632.4 ± 0.9 , PM_{2.5} 試料 637.4 ± 0.2 とわずかであるが有意差

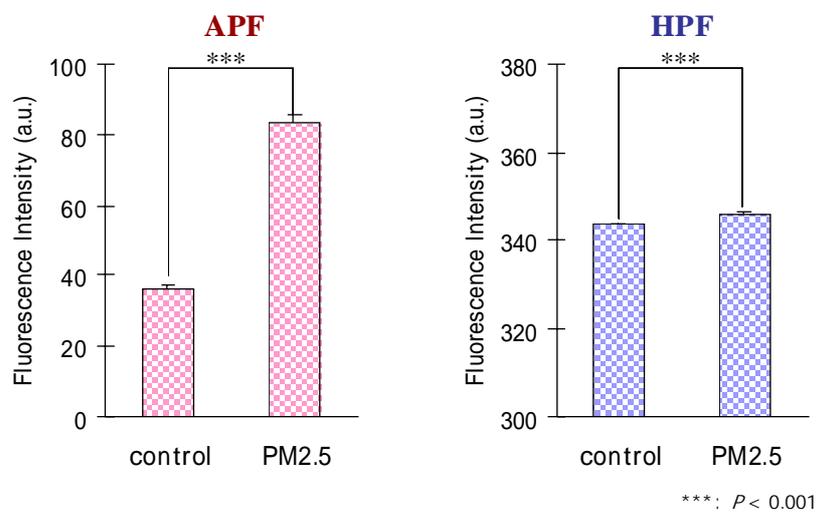


図2 APF / HPF 溶液 (H₂O₂ 含まず) の蛍光度比較

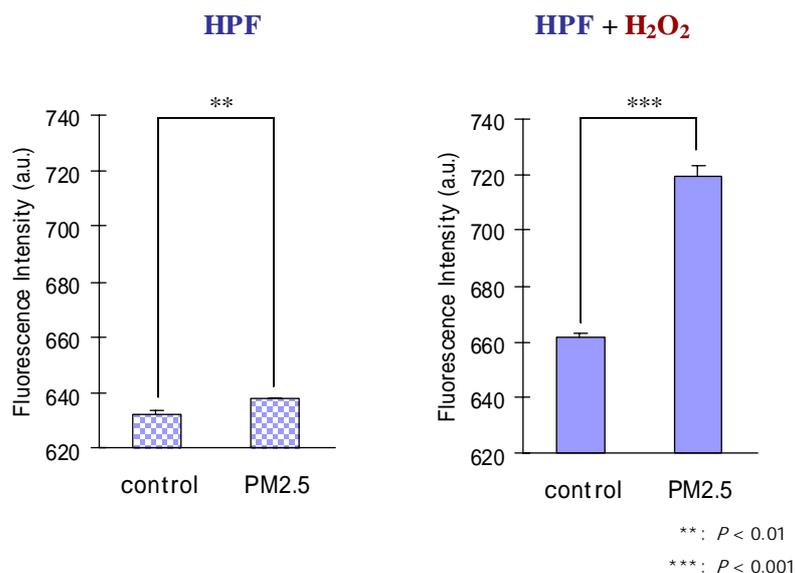


図3 100 μM H₂O₂ 添加による 5 μM HPF 溶液の蛍光度比較

がみられた($P < 0.05$)。一方、過酸化水素を含む場合の蛍光強度は、それぞれ 661.7 ± 1.5 と 719.3 ± 3.8 となり、その差がより一層顕著となった ($P < 0.01$)。過酸化水素を添加したことによって蛍光強度が増加した結果から、PM_{2.5}に含まれる鉄などの金属、とくにFe(II)と過酸化水素が反応するFenton反応によるラジカル生成(ヒドロキシルラジカル)をHPF溶液が捕らえたものと推測できる。

3 蛍光試薬とFerrozine

上記 2)の結果から、PM_{2.5} 試料によるラジカル生成の要因のひとつが Fe(II)であると考えられ、Fe(II)と錯生成するFerrozineの添加によって、PM_{2.5}中のFe(II)がマスクングできないかどうか、蛍光試薬であるAPF溶液とHPF溶液とのそれぞれにおいて、100 μM 過酸化水素を含む条件下で検討した(図 4, 5)。

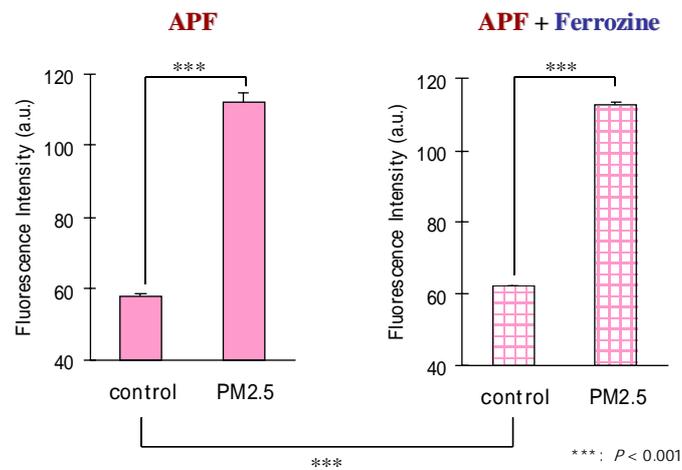


図 4 200 μM Ferrozine 添加による 5 μM APF 溶液(H₂O₂ 含)の蛍光度比較

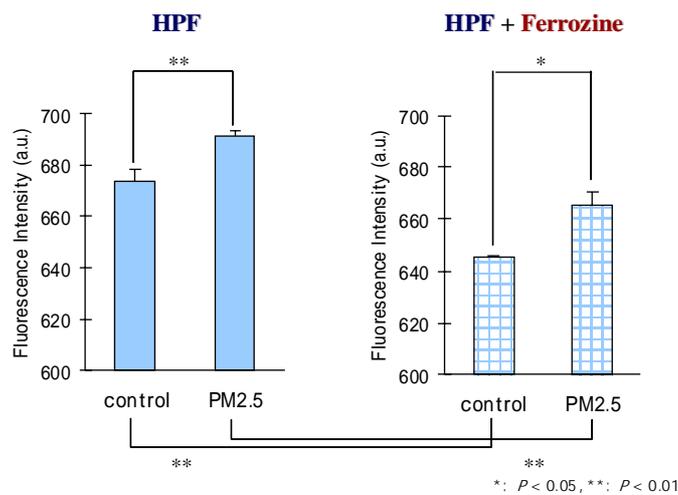


図 5 200 μM Ferrozine 添加による 5 μM HPF 溶液(H₂O₂ 含)の蛍光度比較

図中では200 μM Ferrozine を含まない蛍光試薬による蛍光強度(各図の左側)と比較した。APF 溶液では, Ferrozine の有無にかかわらず, コントロール群の蛍光強度が60 前後であるのに対して $\text{PM}_{2.5}$ 試料のそれは約 112 と顕著に高いものの, Ferrozine の共存によってその増減が認められなかった(図 4)。また, HPF 溶液では, Ferrozine を含まない HPF 溶液による抽出では, コントロール群の蛍光強度が 673.5 ± 4.4 に対して $\text{PM}_{2.5}$ 試料のそれが 691.5 ± 1.9 と有意に高く ($P < 0.01$), Ferrozine を含む HPF 溶液では, それぞれ 645.2 ± 0.7 , 665.3 ± 5.3 と Ferrozine によって蛍光強度のベースが平均の差で 30 近く下降しているものの, $\text{PM}_{2.5}$ 試料の蛍光強度を顕著に減少させる効果は APF 溶液の場合と同様に認められなかった(図 5)。

一方, $\text{PM}_{2.5}$ 中の $\text{Fe}(\text{II})$ を定量するのに Ferrozine が使用できる可能性がある。そこで,

Ferozine を $0.1 \mu\text{M}$ 及び $0.01 \mu\text{M}$ リン酸緩衝液, あるいは Milli-Q に溶解した溶液 ($200 \mu\text{M}$) を抽出液としてフィルター上の $\text{PM}_{2.5}$ 試料を抽出し, 562 nm の吸光度を比較した。その結果, 吸光度は先の順に, 2 試料の平均で 0.126, 0.102, 0.084 となった。しかし, それぞれの吸収スペクトルを比較すると, 濃度の異なるふたつのリン酸緩衝液を用いた場合は, どちらも最大吸収を示すピークがなく(図6), Ferrozine による定量では $\text{pH}7.4$ のリン酸緩衝液はふさわしくないことが判明した。

このことから, 図4と5では蛍光試薬の使用条件である $0.1 \mu\text{M}$ リン酸緩衝液中 ($\text{pH}7.4$) で Ferrozine を用いているが, $\text{Fe}(\text{II})$ と錯生成する Ferrozine の定量を検討する上で, 蛍光強度への Ferrozine の影響と $\text{Fe}(\text{II})$ の定量を目的とする Ferrozine 錯体の吸光度測定は, 別条件で行なう必要があることが判明した。

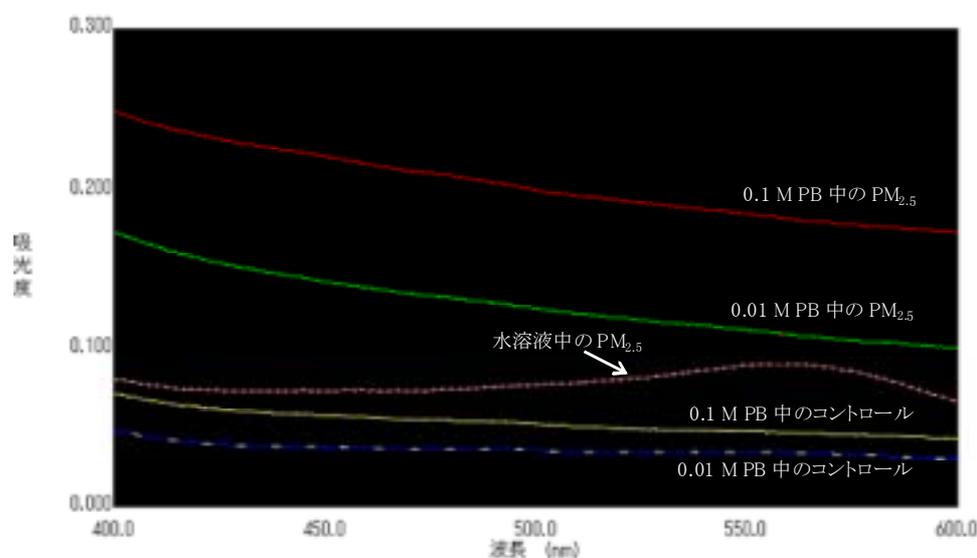


図 6 200 μM Ferrozine 溶液の吸収スペクトル比較

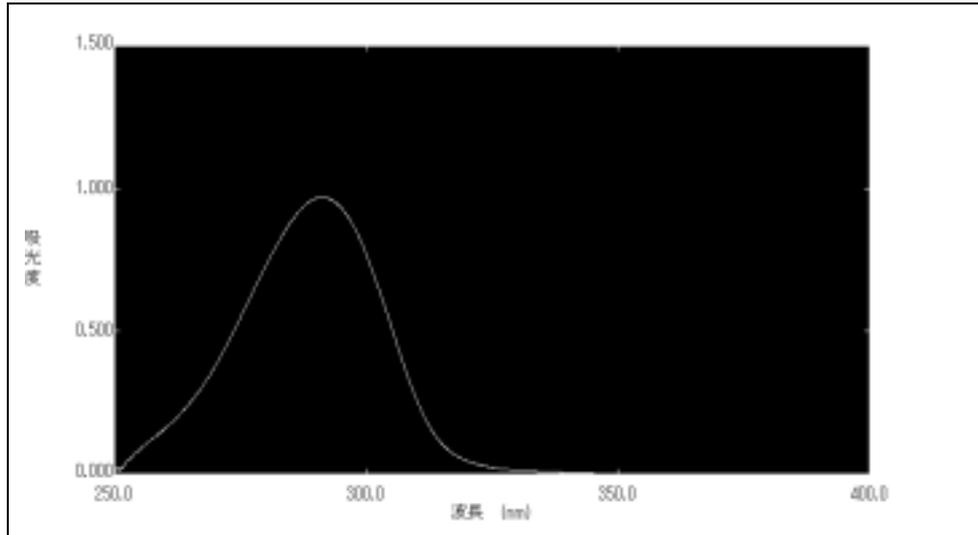


図7 40 μM MCD 溶液の吸収スペクトル

4 MCDによる次亜塩素酸の検討

図2において、過酸化水素を加えていない場合に APF 溶液ではコントロールに対し PM_{2.5} 試料の蛍光強度は大きく増加したが、HPF 溶液ではわずかな増加であった。このことは、蛍光試薬の特徴の違い、すなわち、APF には次亜塩素酸やペルオキシナイトライトにも反応する性質があることから(表2)、次亜塩素酸の生成があるかどうか、40 μM 濃度の MCD を用いて検討した。

図7に、290 nm 付近を最大値とする 40 μM 濃度の MCD の吸収スペクトルを示した。MCD は、次亜塩素酸から塩素をとって結合するため、次亜塩素酸が存在する場合は 290 nm の吸光度が減少する性質がある。しかし、PM_{2.5} 試料と MCD の反応では、過酸化水素の有無にかかわらず 290 nm の吸光度は、むしろコントロールに対し増加していた(図8)。したがって、PM_{2.5} 試料により吸光度が増加した原因は不明だが、PM_{2.5} 試料から次亜塩素酸の生成は確認できなかった。このことから、APF 溶液による蛍光強度の増加(図2)は、ペルオキシナイトライトによる可能性があるため、今後の検討課題としたい。

5 血清アルブミン共存下の影響

血液中の主要成分として生理学的にも重要なひとつに血清アルブミンがある。ここでは、ウシ血清アルブミンを生体モデルとして、PM_{2.5} 試料により生じていた蛍光強度増分にあたるフリーラジカルや活性酸素種相当の生成量が、ウシ血清アルブミンの共存下でどう変化するかを検討した。

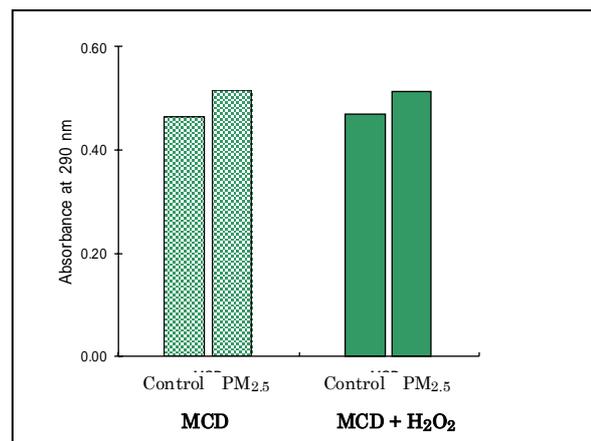


図8 40 μM MCD による吸光度比較

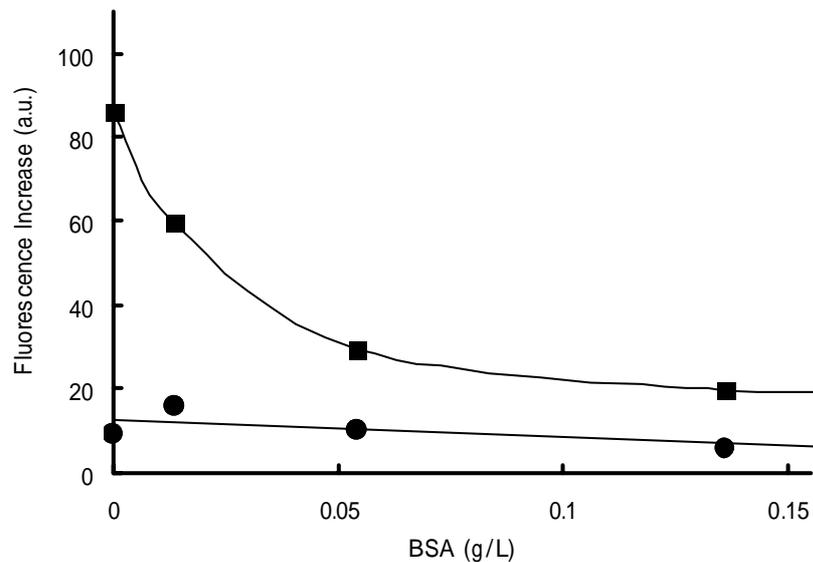


図9 ウシ血清アルブミンの濃度変化にともなう5 μ M APF 溶液による蛍光度変化

PM_{2.5}, control

ウシ血清アルブミンがそれぞれ 0, 0.014, 0.054, 0.14 g/L 共存したとき, APF 溶液による蛍光強度の変化を調べた(図 9)。その結果, 共存するウシ血清アルブミン濃度が 0 g/L から次第に上昇するにつれ, APF による蛍光強度は減少し, 0.14 g/L 以上のウシ血清アルブミン濃度では横ばいの傾向が認められた。このことは, PM_{2.5} 試料から生成するラジカルが共存するウシ血清アルブミンを阻害し, 阻害できずに残った分が APF と反応したものと考えられる。

考 察

大気中微小粒子 PM_{2.5} から生成するフリーラジカルや活性酸素種の定量について, ESR による方法に比べより一般的な分析環境で実施できる方法として, APF と HPF のふたつの蛍光試薬 (Setsukinai *et al.*, 2003) を用いた。そして, APF と HPF の性質の違いから, PM_{2.5} から生成すると思われるフリーラジカルや活性酸素種の特徴に

ついて, いくつかの焦点に絞り込むことができた。

その第1は, HPF 溶液によるもので, 過酸化水素の有無によって HPF による蛍光強度の増加が著しく増加したこと(図 3)。すなわち, コントロールとの比較において PM_{2.5} の蛍光強度は, 過酸化水素が無くてもわずかであるが増加を示したのに対し, 過酸化水素が添加されたことによって, 顕著に蛍光強度の増加が認められた。これは PM_{2.5} 中の Fe(II) との Fenton 反応によるヒドロキシルラジカルの生成によるものと考察される。過酸化水素は細胞毒性物質であり, 生体内では通常そのレベルは酵素により最小限に抑えられているが, ヒト組織への過酸化水素暴露は, インスタントコーヒーや尿・呼気中にかなりの量が含まれるので想像以上に大きいとされる (Halliwell *et al.*, 2000)。呼気を採取して分析した結果のレビュー (Mutlu *et al.*, 2001) において, 呼気中の過酸化水素量が喫煙者は非喫煙者の

5 倍多く、ぜん息患者では一秒量(FEV₁)の減少につれて呼気中の過酸化水素量が増加している、その他、慢性閉塞気管支炎患者や急性肺障害で呼気中に過酸化水素が検出されていることが報告されている。これらから、肺胞まで到達される PM_{2.5} が、過酸化水素と Fenton 反応によってヒドロキシルラジカルを生成することは十分考えられ、しかもハイリスクグループの増悪因子となりうることは見逃せない点である。

第 2 は、Fenton 反応における材料のひとつとなる PM_{2.5} 中の Fe(II) についてである。この Fe(II) の定量については、平成 15 年度報告において PSAP を使用し定量が可能であったにもかかわらず、時間経過に伴う退色が分かり、本研究においては適当でなかった。しかし、PSAP の代わりに Ferrozine を用いることによって退色もなく定量が可能となった。しかし、蛍光試薬の使用条件である 0.1 M のリン酸緩衝液では、波長 562 nm 付近の最大吸収ピークを得ることができず(図 6)、蛍光試薬の場合とは別条件として超純水 (Milli-Q) での抽出が必要であった。この 0.1 M リン酸緩衝液が Ferrozine に影響していると考えられる結果が Ferrozine による Fe(II) のマスキング試験であり、APF と HPF ともに Ferrozine によるマスキング効果は認められなかった(図 4, 5)。このことは、次の実験報告を追認した。Gibbs (1976) は、25 μM Fe(II) と Ferrozine の吸光度を 6 種類の緩衝液による pH で比較し、一般に pH3~6 が最良の結果を与えるだろうとしている。また、Dorey *et al.* (1993) は、pH7.4 における硫酸第一鉄溶液による Ferrozine の効果が 30 分足らずで消失したとしている。

第 3 は、過酸化水素が添加されていない条件で、APF と HPF 溶液による蛍光強度の増加を調べた試験である(図 2)。どちらもコントロールの蛍光強度に対し有意となったが、HPF に対し APF における増加が顕著であった。これは、その後の試験である HPF に過酸化水素を添加したもの

(図 3)において、過酸化水素の添加が Fenton 反応によるヒドロキシルラジカルの生成と予測される蛍光強度増加の結果と併せて考えれば、APF の特性である次亜塩素酸かペルオキシナイトライト、あるいはその両方によると予測される。そこで、次に次亜塩素酸の生成があるかどうか、MCD による吸光度分析を行なった結果(図 8)、次亜塩素酸の生成がないことが確認された。したがって、今後の課題のひとつとして、ペルオキシナイトライトの生成を確認する問題が残る。

最後の焦点は、生体モデルとしてのウシ血清アルブミンが、PM_{2.5} による APF の蛍光強度を減少させたことである(図 9)。血清アルブミンは重要な抗酸化物質で、そこに配位されるチオール基は活性酸素種のひとつである次亜塩素酸の生体内での標的とされている(Hu *et al.*, 1993)。血漿中のフィブリノーゲンはアルブミン、セルロプラスミン、トランスフェリンと同様、炎症から生じる酸化ストレスに対する補助的な抗酸化防御機構として働く(Olinescu & Kummerow, 2001)。また、BSA へのヒドロキシルラジカルによる攻撃モデルから、粥状動脈硬化プラークにおける蛋白質酸化を比較した研究(Fu *et al.*, 1998)など、血液とフリーラジカルや活性酸素種との密接な関係を調べた研究は少なくないが、血液と PM_{2.5} との関係についてはまだ緒に就いたばかりである。

以上を踏まえ、より複雑である血液成分と PM_{2.5} によるフリーラジカルや活性酸素種との関連を今後さらに検討していく必要がある。

参考文献

- Arimoto T , Yoshikawa T , Takano H , Kohno M : Generation of reactive oxygen species and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation from diesel exhaust particle components in L1210 cells. *Jpn J Pharmacol* 80(1): 49-54, 1999
- Ball BR , Smith KR , Veranth JM , Aust AE :

- Bioavailability of iron from coal fly ash: mechanisms of mobilization and of biological effects. *Inhal Toxicol* 12 Suppl 4: 209–25, 2000
- Ball JC , Straccia AM , Young WC , Aust AE : The formation of reactive oxygen species catalyzed by neutral, aqueous extracts of NIST ambient particulate matter and diesel engine particles. *J Air Waste Manag Assoc* 50(11): 1897–903, 2000
- Brook JR , Lillyman CD , Shepherd MF , Mamedov A : Regional transport and urban contributions to fine particle concentrations in southeastern Canada. *J Air Waste Manag Assoc* 52(7): 855–66, 2002
- Carr AC , Winterbourn CC : Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Biochem J* 327 (Pt 1):275–81, 1997.
- Chan YC , Simpson RW , Mctainsh GH , Vowles PD , Cohen DD , Bailey GM : Characterisation of chemical species in PM_{2.5} and PM10 aerosols in Brisbane, Australia. *Atmos Environ* 31(22): 3773–85, 1997
- Chow JC , Watson JG , Lu Z , Lowenthal DH , Frazier CA , Solomon PA , Thuillier RH , Magliano K : Descriptive analysis of PM_{2.5} and PM10 at regionally representative locations during SJVAQS/AUSPEX. *Atmos Environ* 30(12): 2079–112, 1996
- Dellinger B , Pryor WA , Cueto R , Squadrito GL , Hegde V , Deutsch WA : Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem Res Toxicol* 14(10): 1371–7, 2001
- Dockery DW : Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4: 483–6, 2001
- Donaldson K , Beswick PH , Gilmour PS : Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol Lett* 88(1–3): 293–8, 1996
- Donaldson K , Brown DM , Mitchell C , Dineva M , Beswick PH , Gilmour P , MacNee W : Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5: 1285–9, 1997
- Donaldson K , Stone V , Borm PJ , Jimenez LA , Gilmour PS , Schins RP , Knaapen AM , Rahman I , Faux SP , Brown DM , MacNee W : Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM(10)). *Free Radic Biol Med* 34(11): 1369–82, 2003
- Donaldson K , Stone V , Seaton A , MacNee W : Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4: 523–7, 2001
- Dorey C , Cooper C , Dickson DP , Gibson JF , Simpson RJ , Peters TJ : Iron speciation at physiological pH in media containing ascorbate and oxygen. *Br J Nutr* 70(1):157–69, 1993.

- Frampton MW , Ghio AJ , Samet JM , Carson JL , Carter JD , Devlin RB : Effects of aqueous extracts of PM(10) filters from the Utah valley on human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): L960-7, 1999
- Fu S , Davies MJ , Stocker R , Dean RT : Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J* 333 (Pt 3):519-25, 1998.
- Ghio AJ , Stoneheurner J , McGee JK , Kinsey JS : Sulfate content correlates with iron concentrations in ambient air pollution particles. *Inhal Toxicol* 11(4): 293-307, 1999
- Gibbs CR : Characterization and application of FerroZine iron reagent as a ferrous iron indicator. *Anal Chem* 48(8): 1197-1201, 1976.
- Gilmour PS , Brown DM , Lindsay TG , Beswick PH , MacNee W , Donaldson K : Adverse health effects of PM10 particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup Environ Med* 53(12): 817-22, 1996
- Goldsmith CA , Imrich A , Danaee H , Ning YY , Kobzik L : Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health A* 54(7): 529-45, 1998
- Halliwell B , Clement MV , Long LH : Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 486(1):10-3, 2000.
- Hu ML , Louie S , Cross CE , Motchnik P , Halliwell B : Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 121(2):257-62, 1993.
- Kang C , Sunwoo Y , Lee HS , Kang B , Lee S : Atmospheric Concentrations of PM_{2.5} Trace Elements in the Seoul Urban Area of South Korea *J Air & Waste Manage Assoc* 54(4) : 432-9, 2004
- Liao D , Creason J , Shy C , Williams R , Watts R , Zweidinger R : Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environ Health Perspect* 107(7): 521-5, 1999
- Mutlu GM , Garey KW , Robbins RA , Danziger LH , Rubinstein I : Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 164(5):731-7, 2001.
- Olinescu RM , Kummerow FA : Fibrinogen is an efficient antioxidant. *J Nutr Biochem* 12(3):162-169, 2001.
- Pope CA 3rd , Hansen ML , Long RW , Nielsen KR , Eatough NL , Wilson WE , Eatough DJ : Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ Health Perspect* 112(3): 339-45, 2004
- Setsukinai K , Urano Y , Kakinuma K , Majima HJ , Nagano T : Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem* 278(5): 3170-5, 2003
- Shi T , Schins RP , Knaapen AM , Kuhlbusch T ,

Pitz M , Heinrich J , Borm PJ : Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. J Environ Monit 5(4): 550-6, 2003

Squadrito GL , Cueto R , Dellinger B , Pryor WA : Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. Free Radic Biol Med 31(9): 1132-8, 2001

Valavanidis A , Salika A , Theodoropoulou A : Generation of hydroxyl radicals by urban suspended particulate air matter. The role of iron

ions Atmos Env 34(15): 2379-86 , 2000

栗田雅行, 大橋則雄, 上原眞一: 東京都内 6 地点における大気中微小粒子PM_{2.5}の有害元素について. 東京東京都健康安全研究センター年報 54:315-8,2003

長野哲雄, 瀬月内健一, 浦野泰照: 活性酸素イメージングプローブ. 実験医学 21(15):2144-6, 2003

服巻信也, 池田久雄: 生体における酸化ストレス測定法. CARDIAC PRACTICE 12(4):371-8, 2001

大気中微小粒子暴露によるラジカル生成とヒト血漿への影響に関する基礎的研究

研究要旨

大気汚染物質である粒径が 2.5 μm 以下の微小粒子(PM_{2.5})による健康影響については、呼吸器系にとどまらず心臓血管系や神経系など全身への作用をテーマとした疫学研究が増加している。さらに、これらの機構を解明しようと実験系の報告も増えつつあるが、未解明のままである。栗田は、PM_{2.5} による心臓血管系への影響において重要な要因のひとつとされるフリーラジカルであるヒドロキシルラジカルに注目し、PM_{2.5} によって生成することをこれまでに報告した。この検出には、最新の蛍光試薬である aminophenyl fluorescein (APF)と、APF とはやや性質の異なる hydroxyphenyl fluorescein (HPF)を併せて用いるものであった。ただし、PM_{2.5}に含まれる遷移金属の代表としてFe(II)を検討すると、蛍光試薬のみならずFe(II)をより効率的に検出する使用条件の再確認が必要となった。さらには、蛍光試薬による検出法によって、PM_{2.5}によるラジカル生成が実際にどう変化しているかを把握することも本研究の目的のひとつであることから、その季節変動を検討した。その結果、PM_{2.5}によるラジカル生成は夏季に高く、冬季に低い傾向を示す結果を得た。この結果は、今後も場所や期間を変えて確認していく必要がある。そして、粒子状物質が血液に与える直接的な影響を把握するため、ヒト血漿への暴露による凝血反応時間を検討した。その結果、外因性及び内因性凝血試験において 4 mg/mL 濃度の SRM 1648 を 37°C で 30 分暴露することで顕著な凝血時間短縮が生じ、2 mg/mL 濃度でも短縮の傾向がみられた。これは、疫学研究で指摘されている微小粒子が及ぼす血液への影響を裏付ける結果を示唆する。

はじめに

米国 6 都市調査(Dockery et al., 1993)は、大気汚染物質のひとつである粒子状物質のうち、粒径が 2.5 μm 以下である微小粒子、いわゆる PM_{2.5} による健康影響の重要性を認識させるきっかけのひとつとなった。それ以来、疫学研究報告は着実にその数を増すとともに、粒子状物質による健康影響への視点が、呼吸器系から循環器系に移行してきている。ごく最近の報告例として、全米 51 都市、30 万人余りを対象としたコホート研究(Pope et al., 2004)では、喫煙の影響を除外した上で PM_{2.5} が 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 増加することによって、呼吸器疾患による死亡ではなく、主に循環器疾患(心筋梗塞・心不全・不整脈・心停止)による死亡とに強い関連があったとしている。また、Dominici らによる報告(2006)では、1999 年から 2002 年にかけて全米 204 都市における 65 歳以上の 1150 万人を対象に、循環器系及び呼吸器系の疾患による 1 日あたりの受診数と PM_{2.5}

との関連を評価したところ、その関連が最大であったのは心不全で、同日の PM_{2.5} 濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 増加すると、リスクが 1.28% (95% CI 0.78-1.78%) 増加したとしている。この他、PM_{2.5} 濃度が 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 増加するとその 2 時間以内の心筋梗塞を発症するオッズ比が 1.48 となる (Peters et al., 2001)、また循環器系における指標として頸部エコーによる内膜中膜比を用いた疫学調査で、PM_{2.5} が 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 増加するとその比が 5.9% 増加した (Kunzli et al., 2005) などがある。さらには、微小粒子が循環器に及ぼす機構を検証し、そのための手段を検討するために、疫学者・心臓学者・毒性学者によるワークショップが開催され、微小粒子が循環器に及ぼす機構やその把握方法について、自律神経系への影響、心筋細胞のイオンチャンネル変化、心筋の虚血反応、内皮の機能不全・粥状化・血栓症への引き金となる炎症反応が議論された (Utell et al., 2002)。これらが示すように、PM_{2.5} が循環

器系に及ぼす影響をテーマとすることは最先端の話題であり、解決への糸口を与えるための一端を担うのが本報告の目標である。

栗田は、PM_{2.5} が心肺系に与える影響の要因として、Donaldson ら(2001, 2003)が指摘するところの粒子状物質に起因するフリーラジカルとしてヒドロキシルラジカルをとりあげてきた。ヒドロキシルラジカルの典型的な生成は、Fe(II)と過酸化水素による Fenton 反応による。これらの背景にある事実として、都市大気中のPM_{2.5}には鉄や銅などの遷移金属が含まれ(Brook et al., 2002 ; Chan et al., 1999; Chow et al., 1996 ; Kang et al., 2004; 栗田ら 2003, 2004)、加えて生体内で生成する過酸化水素(Halliwell et al., 2000; Mutlu et al., 2001)との反応が推測される。事実、採取したPM_{2.5}に過酸化水素を添加することによりラジカルが生成することを栗田は平成 16 年度報告書(栗田 2005)において報告してきた。本年度は、これまで用いてきた蛍光試薬 aminophenyl fluorescein (APF)[2-[6-(4'-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-y] benzoic acid] と hydroxyphenyl fluorescein (HPF) [2-[6-(4'-hydroxy) phenoxy- 3H-xanthen-3-on-9- y]benzoic acid] (Setsukinai et al., 2003)の使用条件を効率化するために再検討し、PM_{2.5}によるラジカル生成の季節変動を実際に把握するための第一歩を踏み出すとともに、ヒト血液に及ぼす影響を凝血という点から検討した。具体的には、1) 蛍光試薬や呈色溶液などの溶解において基本のひとつとなるリン酸緩衝液を見直し、酢酸アンモニウムを取り上げたこと。2) 蛍光試薬による検査方法を用いて、PM_{2.5}によるラジカル生成の季節変動を捉えようとしたこと。その際、都市大気中の粒子状物質であり、かつ米国で認定された標準物質(「材料と方法」において記述)をひとつの外部尺度として取り上げた。3) 疫学研究で多く指摘されている血液への影響(Seaton et al., 1995 ;Peters et al., 1997;

Koenig, 1998; Petrovic et al., 2000; Ghio et al., 2000;Schwartz, 2001)を踏まえ、ヒト血漿に及ぼす影響をin vitroでより直接的に捉えるために凝血反応に着目して検討したことである。この血液への影響とは、Koenig (1998)が、高濃度のフィブリノゲンや凝固因子Ⅶのような血液凝固因子に起因する心臓発作や心臓麻痺のリスク増加に粒子状物質が関与すると疫学的根拠から端的に指摘していることを受けている。本研究は、凝血反応の主要なふたつのルート、すなわち外因性と内因性の血液凝固に着目した。本年度の報告においては、本手法の妥当性を評価するため、以下に示すヒト血漿(ここで用いたのは凝血反応の精度管理に使用される検査用薬品)に粒子状物質である前述した米国の標準物質を直接暴露し、その凝固反応を検討したもので、これまでに例をみないものである。

材料と方法

1 PM_{2.5}試料の採取

PM_{2.5}の試料採取は、前年度の報告書(栗田 2005)で記述した方法と同様とした。要約すると、粒径 2.5 μm 以下の粒子を選別する 50%カット特性インパクターをつけた一体型のフィルターホルダー(柴田科学社製 NWPS-35HS)と吸引ポンプ(柴田科学社製 Σ-500)を全天候型のシェルターに収容して採取した。本装置を本センター内の地上約 5 mの屋上(3号館動物舎屋上)に設置し、毎分 2.5 Lの流量で72時間以上吸引して試料採取した。捕集フィルターには、テフロンで補強されたグラスファイバー材質であるT60A20(Pall 社製)を使用した。試料採取前後のフィルターは、ペトリスライド(Millipore 社製 PD15047)内に一時的に収納し、20℃の恒温室内に保管した。

2 試薬及び器具等

1) 試薬

フリーラジカルや活性酸素種の検出に用いた

蛍光試薬は、第一化学薬品社製の APF 及び HPF を使用した。蛍光試薬の溶解や採取した微小粒子の溶出には、1 M リン酸緩衝液(pH7.4, Aldrich 社製)または 50%酢酸アンモニウム(和光純薬社製)を所定濃度に希釈して使用した。また、Fe(II)の比色定量において、標準溶液として硫酸アンモニウム第一鉄6水塩(モール塩)の 0.25 M 溶液(関東化学社製)を、その錯生成試薬には Ferrozine [3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid] (Sigma 社製)を使用した。試薬の溶解や希釈、及び器具の洗浄などには、蒸留水を再度イオン交換した高純度水(Milli-Q)を用いた。

血液の凝固試験試薬はすべて Axis-Shield 社製である次のものを使用した。粒子状物質の暴露対象モデルとしての 3.2%クエン酸ナトリウム加プール血漿であるヒト標準血漿正常域(Control Plasma Normal)、凝血試験のひとつである外因性凝血試験試薬に Nycoplastin、そしてもうひとつの内因性凝血試験試薬には Cephotest を用いた。血液凝固試験における、ヒト標準血漿の溶解や希釈などには、エンドトキシン試験済のフィルター除菌水(Sigma 社製)を用いた。また、内因性凝血試験試薬においては、1 M 塩化カルシウム溶液(Fluka 社製)を使用した。

2) SRM 1648

上記 1)で採取した PM_{2.5} 試料との比較のため、米国 National Institute of Standards and Technology より提供される標準物質のひとつとして都市大気中粒子状物質である Standard Reference Matter #1648(SRM 1648)を使用した。

3) 器具等

採取した PM_{2.5} 試料を超音波抽出する際に用いたポリプロピレン製の 15 mL 遠沈管(キャップ付)は、Kendall 社製の金属フリーのものを使用した。

PM_{2.5} 及び SRM 1648 の質量は、0.1 µg まで秤

量可能な上皿電子天秤(SC2-F, Sartorius 社製)を用いて、20°Cの恒温室内で秤量した。

溶液等の pH 測定には、温度センサ内蔵の複合電極を備えた pH 計(F-52, 堀場製作所製)を用いた。

後述する PM_{2.5} 試料中の元素濃度の分析では、鉄は誘導結合型プラズマ発光分析法(ICP-AES)による装置(IRIS 1000, 日本 Jarrell-Ash 社製)、その他の元素は誘導結合型プラズマ質量分析法(ICP-MS)による装置(4500, HP 社製)を用いた。

凝血試験においては、滅菌済である 4 mL の PS 製試験管(Sarstedt 社製)及びピペットチップ(Biohit 社製)を使用した。

3 PM_{2.5} からの抽出操作

PM_{2.5} の採取後秤量して PM_{2.5} の質量濃度を求め、直ちにフィルターを裁断して 15 mL 遠沈管に入れ、後述する蛍光試薬や呈色試薬を 5 mL 添加して密栓し、暗所で超音波抽出を行った。その抽出液からディスポーザルの PMMA 製セミマイクロセルにピペット採取し、後述する所定の測定条件による蛍光強度や吸光度分析用の試料とした。

4 フリーラジカルの検出

採取した PM_{2.5} によるフリーラジカル生成の検出には、N,N- dimethylformamide 0.47 mL に溶解した 1 mg APF または HPF (各濃度 5 mM 相当)を試験直前にリン酸または酢酸アンモニウム緩衝液中に希釈し、最終濃度 5 µM の APF または HPF 溶液の蛍光試薬として使用した。PM_{2.5} の採取フィルターを上記 3) の操作手順による抽出後、励起波長 490 nm、蛍光波長 515 nm で分光蛍光光度計(日本分光社製 FP-777)により蛍光強度を測定した。このとき、未使用フィルターを同様に処理してコントロールとし、併せて蛍光強度を測定して比較し、試料との差を蛍光強度増加量とした。測定は試料ごとに3回行い、その平均値を使用した。

5 Fe()の定量

Fe(II)は、粒子状物質に含まれていることが知られ(Donaldson et al., 1996; Valavanidis et al., 2000; Shi et al., 2003), Fenton 反応によるヒドロキシルラジカル生成の重要な要因のひとつである。そのため、Fe(II)の定量には Ferrozine を使用し、分光光度計(島津製作所社製 UV-2500PC)により 562 nm 波長において測定した。

6 PM_{2.5} 試料中の元素濃度分析

PM_{2.5} に含まれる遷移金属のうち、バナジウム・マンガン・鉄・コバルト・銅の各濃度については、2002年6月から2003年3月までの期間中、毎月第3月曜日から木曜日の3日間にわたり大田区内で採取し保存しておいた PM_{2.5} 試料を用いた。試料採取したフィルターを小片に裁断し専用のテフロン容器に入れ、濃硝酸 5mL を加えて、マイクロ波反応加速装置(MARS5, CEM 社製)により 180°C で 15 分間分解した。分解後の溶液を専用容器に密閉したまま3日間室温で放置したのち、分解液をディスクフィルター(25HP020AN, ADVANTEC 社製)によりメスフラスコ内にろ過し、さらに高純度水を加えて 50 mL に調整し、ICP-AES 及び ICP-MS 分析用の試料とした。併せて、未使用のフィルターを同条件で処理し、ブランクとした。なお、フラスコなど試料調製に用いた器具類は、清浄なものを事前に 15%硝酸溶液に 3 日間以上浸潤させ、高純度水で洗浄してから使用した。

内標準元素としてイットリウムを用い、ICP-AES では 10 µg/L、また ICP-MS では 1 µg/L を含む 5%硝酸溶液として、その一定量をペリスタルポンプの回転と同期して試料に添加する内標準法により、対象元素を定量分析した。検量線によるこの分析値から総量を換算し、ブランク値を差引きさらに総吸引量で除して、各元素濃度(ng/m³)とした。

7 凝血試験

ヒト血漿 1 バイアルに対し、試験直前にフィル

ター除菌水を 0.48 mL 加えて溶解後 15 分間室温静置し、さらにコントロールにはフィルター除菌水を、または暴露対象にはフィルター除菌水に溶解した SRM 1648 をそれぞれ 0.12 mL 添加した。この SRM 1648 溶解液は、60 mg を秤量して 3 mL フィルター除菌水を加えて攪拌し、5 分間超音波処理したのちに再度攪拌して 30 分間室温静置したものの中から 1 mL 採取し、所定の濃度に希釈して用いた。

外因性凝血試験では、1 バイアルの Nycoplastin にフィルター除菌水 2 mL を試験直前に加えて溶解後、37°C で 10 分間加温しおき、準備したヒト血漿 0.1 mL に対し、0.2 mL の Nycoplastin を添加して、直後の凝血時間を測定した。また、内因性凝血試験では、37°C で保温したヒト血漿 0.1 mL に対し、0.1 mL の Cephotest 試薬を添加し、1 回軽く攪拌してから 37°C で 6 分間インキュベートした。これに、フィルター除菌水で 0.02 M に調整した 37°C の塩化カルシウム溶液 0.1 mL を添加して、直後の凝血時間を測定した。

結 果

1 PM_{2.5} とリン酸緩衝液の pH

粒子状物質の水溶液は、硫酸イオンや硝酸イオンに代表される酸性を示すことが知られている。一方、蛍光試薬である APF や HPF の使用説明書には pH7.4 の 0.1 M リン酸緩衝液で使用し、それ以外では事前に検討した上で用いることが明記されている。そこで、フィルター上に採取した PM_{2.5} を水とリン酸緩衝液で抽出した場合の pH を比較した。その結果、水抽出の pH は、未使用フィルターであるコントロールが 6.04、PM_{2.5} が 5.76 と弱酸性であるのに対し、0.1 M リン酸緩衝液抽出の pH ではそれぞれ 7.46 と 7.48 と弱アルカリ性で、緩衝液そのものの pH 値 7.45 と同じであった。

しかし、Fe(II) 定量に用いる試薬である

Ferrozine をリン酸緩衝液で用いると、その吸収スペクトルが平坦になることでこの組合せが適当でないことが前年度の結果で明らかになっている。そのため、リン酸以外の緩衝液として酢酸アンモニウムを取上げ、以下においてリン酸緩衝液と比較検討した。

2 酢酸アンモニウムにおける pH と吸光度

リン酸緩衝液と酢酸アンモニウム緩衝液を用いて濃度を変化させた場合の Fe(II) と Ferrozine との反応における pH と吸光度の変化を図 1 に示す。2 μM Fe(II) 水溶液の pH が 6.31 に対し、2 mM Ferrozine 水溶液とそれとの混合液の pH は 3.56 であった。緩衝液の濃度を高くしていくと、リン酸あるいは酢酸アンモニウムの緩衝液濃度が 0.05 M では、pH がそれぞれ 7.46 と 6.44 であり、緩衝液濃度を 0.25M と 5 倍にまで増加しても、リン酸の場合は 7.4 前後、酢酸アンモニウムでは 6.75 と微増はしても、pH はどちらもほぼ横ばいであった(図 1A)。一方、Fe(II) と Ferrozine との錯体における最大吸収波長である 562 nm の吸光度は、緩衝液濃度が増加するに従い、リン酸の場合は 0.0396 から 0.25 M の 0.0192 と半分以下にまで低下したが、酢酸アンモニウムでは 0.0395 から 0.0390 と一定であった(図 1B)。このことから、Fe(II) と Ferrozine との反応における緩衝液として、酢酸アンモニウムは、リン酸よりも pH がやや低いものの吸光度の安定性という点でより優れていた。

3 酢酸アンモニウムにおける蛍光試薬

蛍光試薬の使用書に明記されているリン酸の代わりに酢酸アンモニウムを使用した場合について、Fe(II) 試薬による実験系と PM_{2.5} 試料とのふたつの系を検討した。

一つ目の実験系として、酢酸アンモニウムに溶解した HPF 溶液に Fe(II) を混合し、さらに過酸化水素を添加することによる蛍光強度の変化を比較した(図 2)。実験に用いた薬品の最終濃度は、酢酸アンモニウムから上記の順に 0.2 M、

5 μM 、2.4 μM 、2 mM とした。その結果は、過酸化水素の添加の有無、及び Fe(II) の添加にかかわらず、pH は 6.78 から 6.91 とほとんど変化がみられなかった(図 2A)。しかし、蛍光強度の変化を比較すると、過酸化水素を添加していない場合は Fe(II) の添加にかかわらず蛍光強度はどちらも 1500 近くであるのに対し、過酸化水素の添加によって蛍光強度は 1500 から 3200 へと 2 倍以上にまで増加した(図 2B)。このことは、過酸化水素の添加により Fenton 反応が生じてヒドロキシルラジカルが生成したことによる蛍光強度の増加を検知したと推測される。

二つ目の系として、採取した PM_{2.5} 試料 221 μg (採取期間中の平均質量濃度 17.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) を用いて、その蛍光強度を比較した例を図 3 に示す。酢酸アンモニウムに溶解した APF 試薬による蛍光強度は、コントロール 210 に対し PM_{2.5} 試料は 340 と明らかに増加した。また HPF 試薬に過酸化水素を添加した場合は、コントロール 940 に対し PM_{2.5} 試料は 960 とわずかではあるが増加を示した。

Fe(II) 試薬による実験系と実際の PM_{2.5} 試料による以上の結果から、使用書に指定されたリン酸に替えて酢酸アンモニウムを蛍光試薬に用いても、蛍光強度の検出、すなわちフリーラジカルの検出が可能であることが示唆された。

4 PM_{2.5} によるラジカル生成の季節変動

保存しておいた PM_{2.5} 試料を用いて、そのラジカル生成の季節的変動例を検討した。2002 年 6 月から 2003 年 3 月まで期間中、毎月第 3 月曜日から木曜日の 3 日間にわたり大田区内で採取し保存しておいた PM_{2.5} 試料を用いた。採取期間中の毎月の質量濃度及び含有するバナジウム・マンガン・鉄・コバルト・銅の各濃度を図 4 に示す。フリーラジカルの生成に関連する遷移金属であるバナジウム以下の 5 元素とも、それぞれの濃度はオーダーや変動幅に違いはあるものの、夏季に濃度が低く冬季に高い傾向は、PM_{2.5}

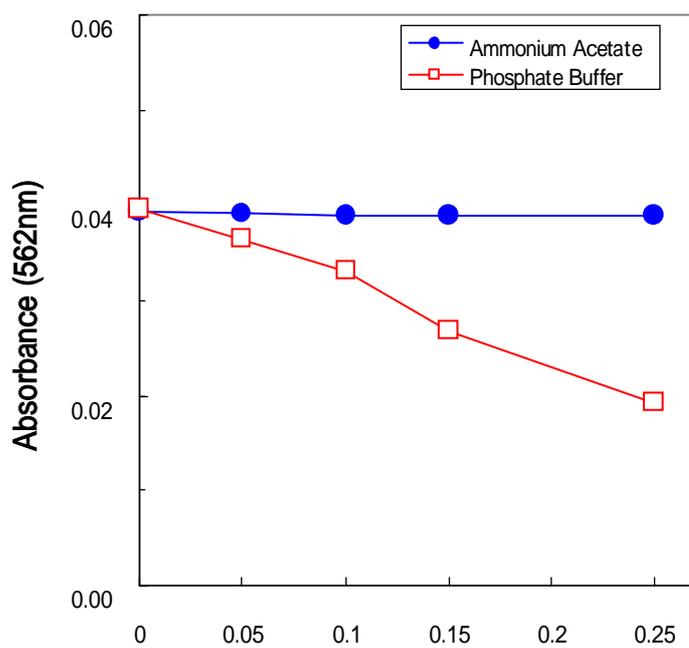
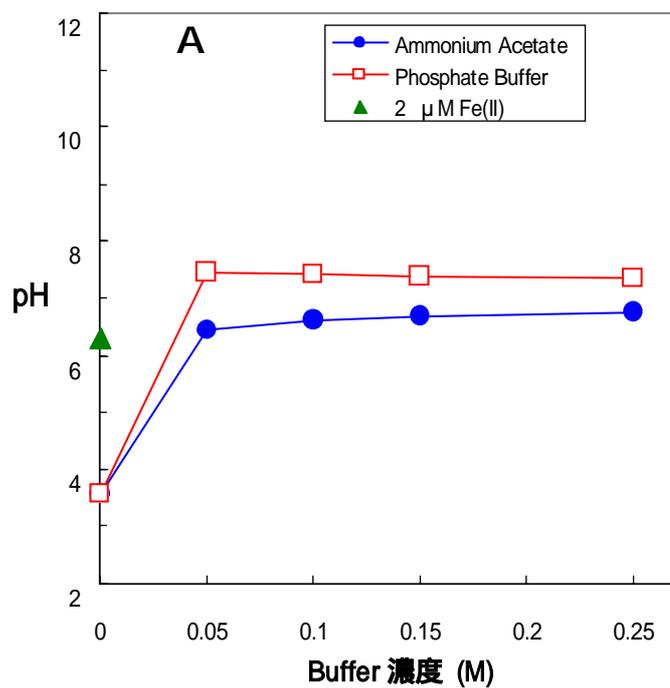


図1 リン酸または酢酸アンモニウム緩衝液の濃度を变化させたときの2 μ M Fe()
 と2 mM Ferrozine 混合溶液の変化
 A) pH, B) 562 nm における吸光度

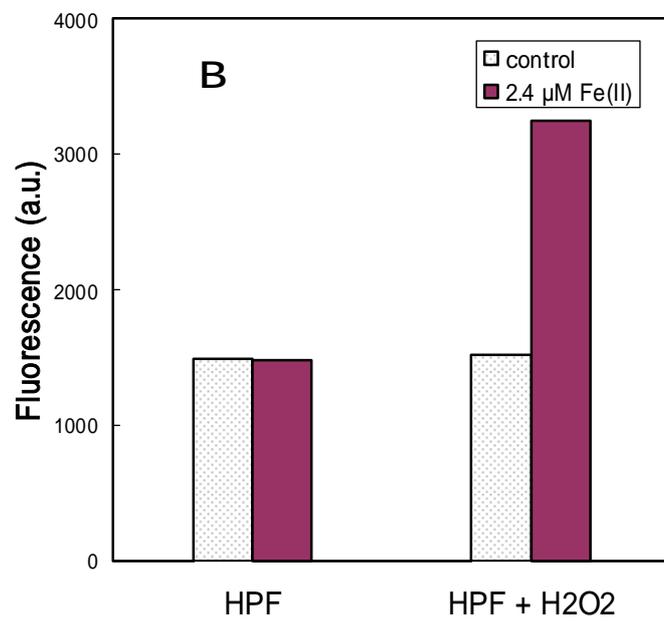
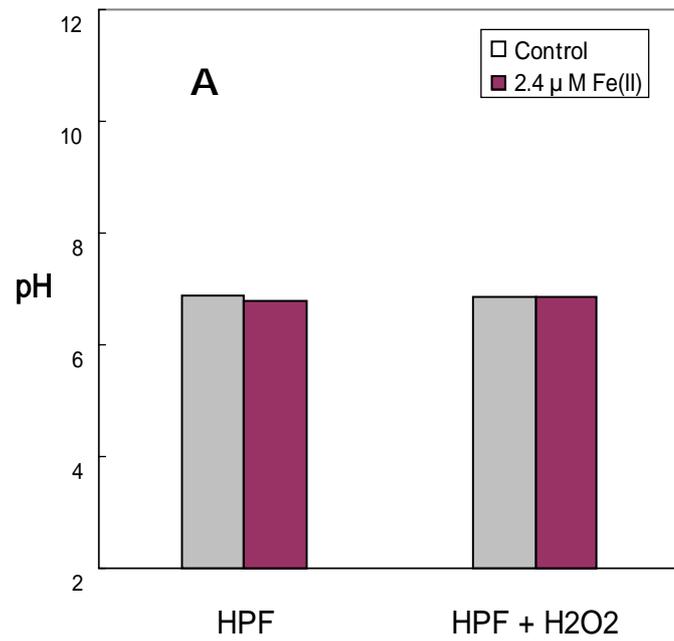


図 2 2.4 μM Fe()を含む 0.2 M 酢酸アンモニウムに溶解した 5 μM HPF 蛍光試薬と 2mM 過酸化水素の添加の有無による比較
A) pH, B) 蛍光強度

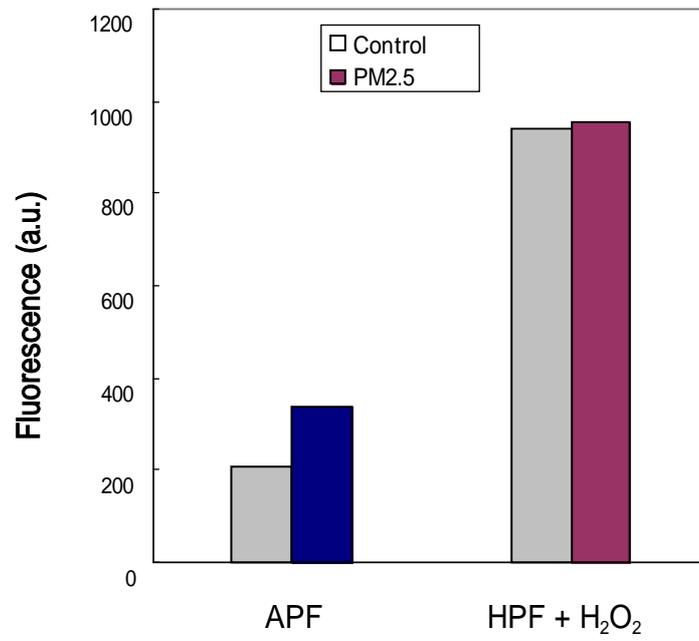


図3 2005年12月に採取したPM_{2.5}試料(質量濃度17.6 μg/m³)を酢酸アンモニウムに溶解した5 μM APFまたはH₂O₂を含むHPF蛍光試薬による蛍光強度

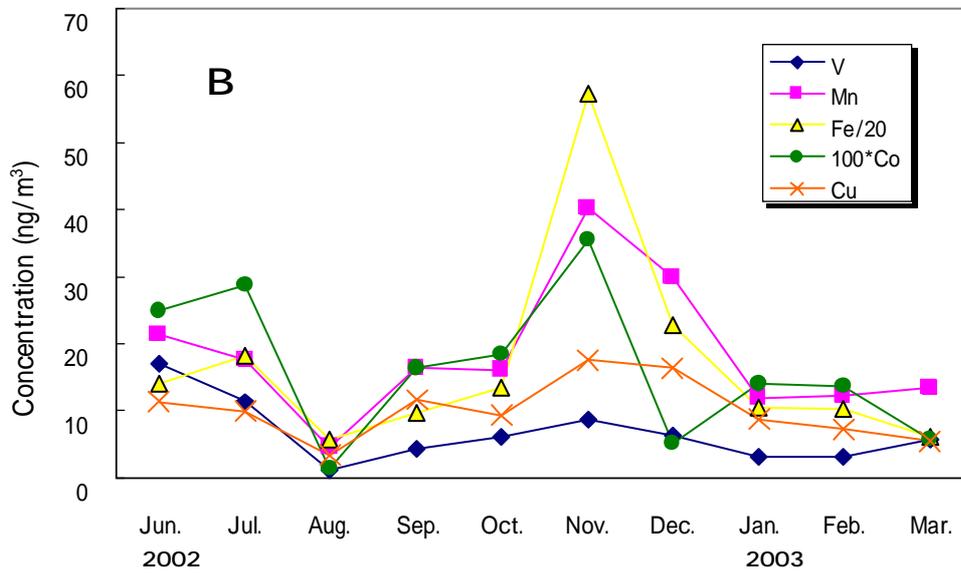
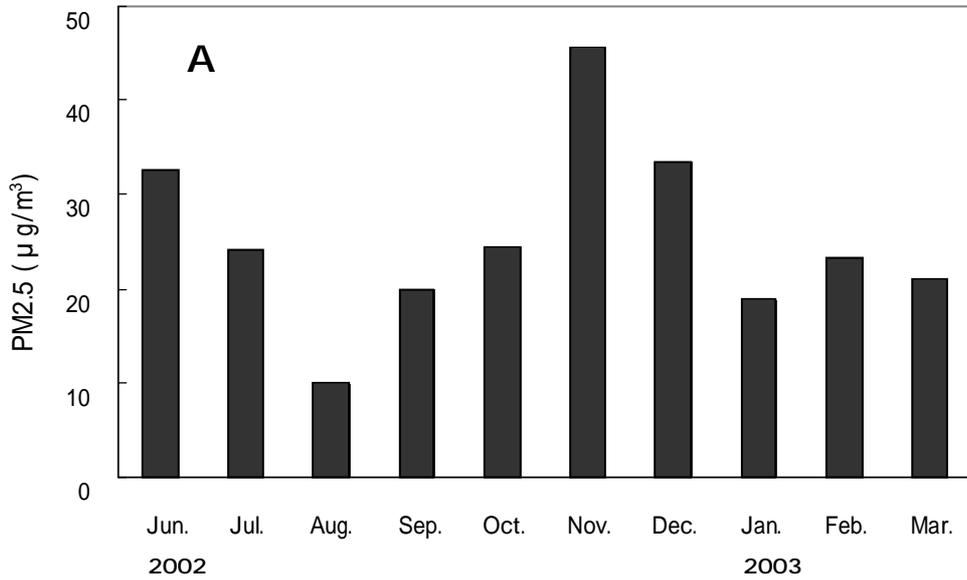


図4 2002年6月から2003年3月に大田区で採取し保存しておいたPM_{2.5}試料の濃度変化 A) 質量濃度(μg/m³), B) 含有されたバナジウム・マンガン・鉄・コバルト・銅の濃度 スケールをあわせるために、鉄は 1/20 倍、コバルトは 100 倍して表示。

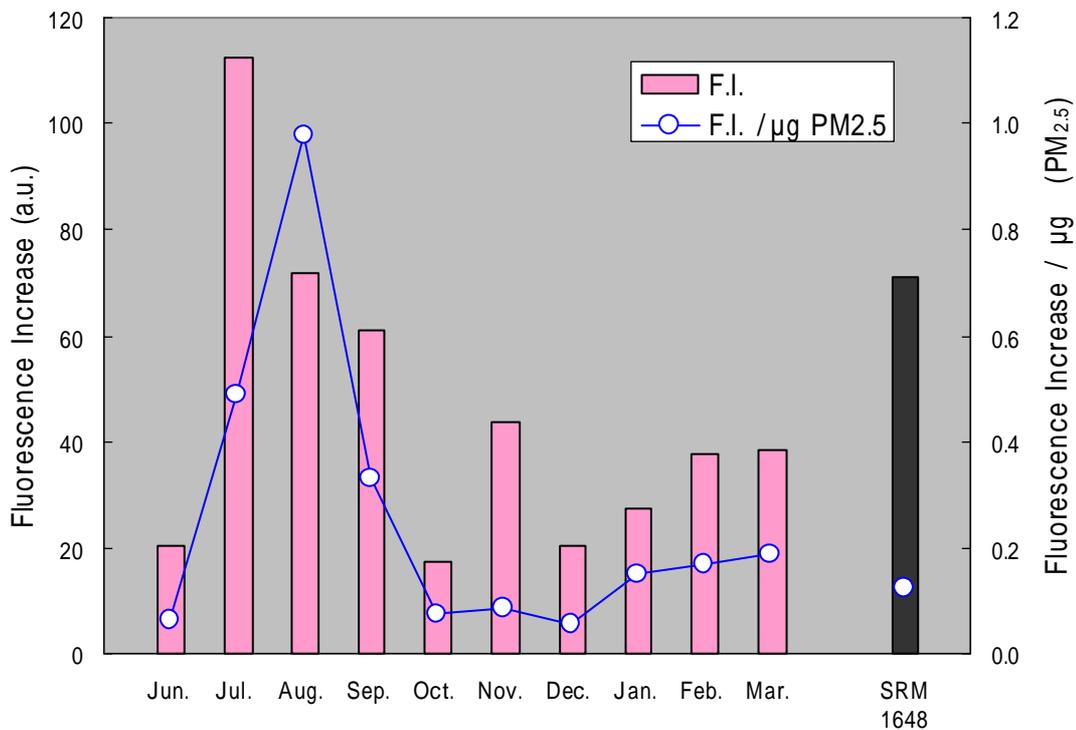


図5 2002年6月から2003年3月に大田区で採取し保存しておいたPM_{2.5}試料の5 μM APF 蛍光試薬による検出変化
 A) 蛍光強度増加量 左軸,
 B) 採取したPM_{2.5}試料の単位質量あたりに換算した蛍光強度増加量 右軸.
 570 μg のSRM 1648を参考として表示.

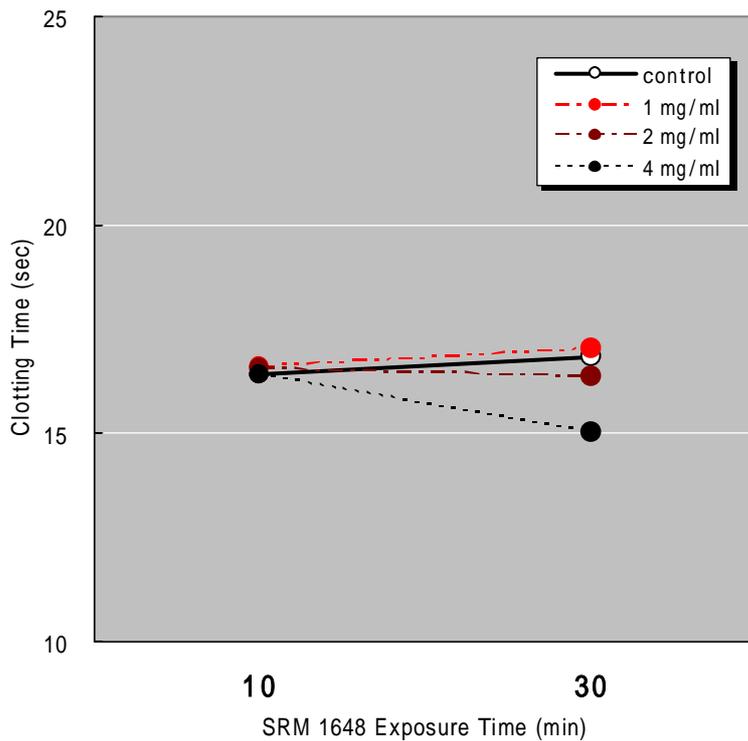


図6 ヒト正常血漿を SRM 1648 の各濃度に 10 分または 30 分 37 でインキュベートしたときの Nicoplastin 試薬によるプロトロンビン時間(秒)の比較

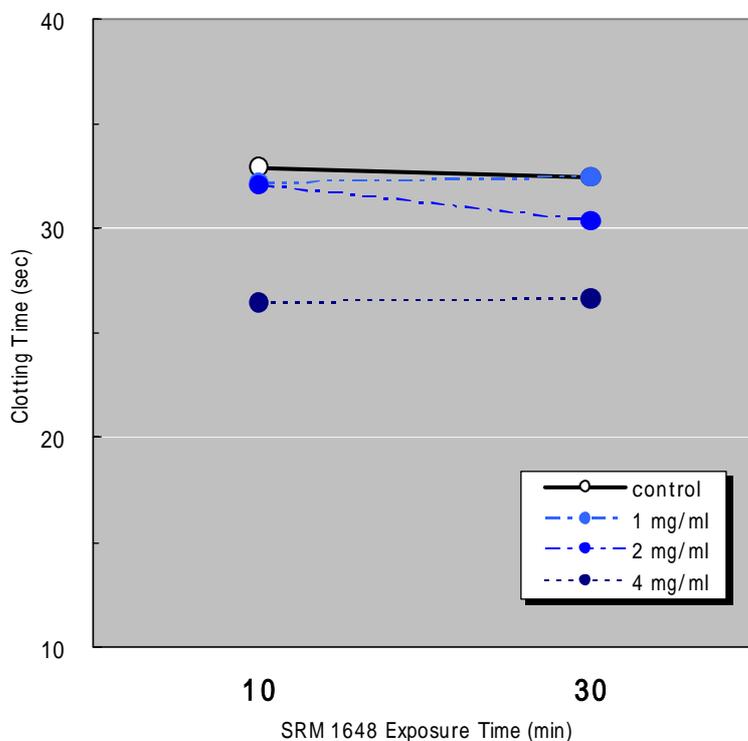


図7 ヒト正常血漿を SRM 1648 の各濃度に 10 分または 30 分 37 でインキュベートしたときの Cephatest 試薬による活性化部分トロンボプラスチン時間(秒)の比較

の質量濃度の季節変動とほぼ同様な変化を示している。そして、同時に採取した $PM_{2.5}$ における APF 試薬の蛍光強度増加量、及び $PM_{2.5}$ の単位重量あたりの蛍光強度の季節変動を図 5 に示す。ここでは、参考として 570 μg の SRM 1648 による蛍光強度の結果についても併記した。その結果、蛍光強度増加量(図中の棒グラフ)は夏季に高く冬季に低い傾向がみられ、これは $PM_{2.5}$ の単位重量あたりの蛍光強度(図中の折れ線グラフ)でみても 7 月と 8 月における量の逆転があるものの、季節の増減傾向は同様であった。これらから、フリーラジカルなどによる蛍光強度の増加は、単に $PM_{2.5}$ の質量濃度や遷移元素濃度とは関連しない他の要素が関連することが予測される。

5 ヒト血漿の凝血試験

Nycoplastin 試薬を用いた外因性凝血試験においては、SRM 1648 水溶液の 1・2・4 mg/mL の各濃度への 10 分及び 30 分暴露による正常ヒト血漿の凝固時間(3 試料の平均値)は、図 6 に示す結果となった。SRM 1648 の 10 分暴露においては、この凝固時間は、コントロールと同じ 16.4 - 16.6 秒であった。これに対し、同 30 分暴露においては、コントロールの凝固時間 16.8 秒に比べ、SRM 1648 の 2 mg/mL においては 16.3 秒と凝固時間の短縮傾向が、そして 4 mg/mL においては 15.0 秒と明確な時間短縮がみられた。

一方、Cephotest 試薬を用いた内因性凝血試験においては、外因性凝血試験と同じ暴露条件で行い、図 7 に示す結果となった。すなわち、SRM 1648 の 10 分暴露においては、コントロールの凝固時間 32.9 秒に対し、SRM 1648 の 1・2 mg/mL 濃度は、それぞれ 32.1・32.0 秒とわずかながら短い傾向にあり、4 mg/mL においては 26.4 秒と顕著な時間短縮がみられた。さらに、同 30 分暴露においては、コントロールの凝固時間 32.4 秒に比べ、SRM 1648 の 2 mg/mL にお

いては 30.3 秒と時間短縮が明瞭になり、4 mg/mL では 26.6 秒と 10 分暴露と変わらないまま短時間の結果であった。

考 察

栗田はこれまで、 $PM_{2.5}$ が心肺系に与える影響の要因として Donaldson らが指摘した(2001, 2003) 粒子状物質に起因するフリーラジカルについて、Donaldson らとは異なる手法により検討してきた(栗田 2004, 2005)。そして、検討を進める中で、用いてきた蛍光試薬の条件となるリン酸緩衝液が、代表的なフリーラジカルであるヒドロキシルラジカルの生成において代表的な成分である Fe(II)を捕捉する Ferrozine には適さないことが判明した。その理由は、吸収スペクトルが平坦になること(栗田 2005)、リン酸緩衝液の濃度に依存してその吸光度が直線的に低下することによる(図 1B)。これを踏まえ、リン酸緩衝液に替えて酢酸アンモニウムを用いた場合、蛍光試薬への影響が無いことを、一つは Fe(II)溶液を用いた実験系(図 2)と、もう一つは採取した $PM_{2.5}$ 試料を用いた系(図 3)の二つについて確認し、緩衝液を替えてもこれまでどおり蛍光試薬が使用できることが判明した。

一連の本研究における目標のひとつは、蛍光試薬を用いてより簡便に日々変化する $PM_{2.5}$ によるラジカル生成を捉え、健康調査や疫学調査への基礎資料を提供するための手法とすることであった(栗田 2004)。この手法の確立は、室内実験系だけでなく、実際の $PM_{2.5}$ 試料によるラジカル生成の挙動も把握しながら手法の妥当性を検討していくことが実用面でも望まれる。そこで、毎月第 3 月曜日から木曜日の 3 日間にわたり大田区内で採取し保存しておいた $PM_{2.5}$ 試料のラジカル生成の挙動を検討した。この $PM_{2.5}$ 試料における毎月の質量濃度及びそこに含まれる遷移金属としてのバナジウム・マンガン・鉄・コバ

ルト・銅の各濃度は、オーダーや変動幅に違いはあるものの、夏季に濃度が低く冬季に高い傾向でほぼ同様な変化を示していた(図4)。そして、肝心なPM_{2.5}によるAPF試薬の蛍光強度増加量、あるいはPM_{2.5}の単位重量あたりに換算した蛍光強度は、夏季に高く冬季に低い傾向がみられた(図5)。

これに関連した数少ない報告をみてみると、Shiとその共同研究者による報告(2003)では、夏季6週にわたるPM_{2.5}試料について電子スピン共鳴法によるヒドロキシルラジカル生成量を週単位で比較し、週によって最大で約3倍異なる結果を示している。また、HungとWang(2001)は、7月から9月にかけて歩道で115時間にわたる微小粒子(1-3.2 μm)の採取を繰返し、蛍光試薬としては恐らく最も使用されているdichlorofluoresceinを用いて測定した。そして、過酸化水素換算量として31データを要約した結果において、最小値と最大値に9倍以上の違いがみられる。これらの報告例と本研究結果とを単純に比較することはできないが、微小粒子によるラジカル生成量の増減が小さくないことは明らかであろう。

さらに、図4及び図5を比較すると、APF試薬の蛍光強度増加量、とくにPM_{2.5}の単位重量あたりに換算した蛍光強度の変動は、PM_{2.5}の質量濃度や含有する遷移金属濃度とは単純に対応しないことが分かる。これは、鉄には2価と3価があるように遷移金属にはそれぞれ価数が数種類あり、価数によってフリーラジカル生成への関与が異なってくること、最近報告されている粒子状物質中のキノン類のラジカル生成(Xia et al., 2004)などが関与しているかもしれないが、現段階では不明である。栗田が行ったようなラジカル生成の季節変動を捉えた報告はほとんどなく、さらには本研究で用いている蛍光試薬による報告はこれまでのところまったくない。こうしたラジカル生成量の季節変動が、PM_{2.5}の採取場所

や採取年度によってどの程度変化していくのか、今後データの蓄積をしていく必要がある。

本年度の報告から新たに加えた研究項目として、ヒト血漿の凝固試験がある。これは、PM_{2.5}によるフリーラジカルの生成が生体影響である循環器系に及ぼすきっかけとなる要因の一つと考える(Donaldson et al., 2001; 2003)のとは対極的に、PM_{2.5}によるより積極的な、直接的な作用として凝血に注目したことによる。これは、疫学研究においてPM_{2.5}による血液の粘性増加が指摘されたこと(Peters et al., 1997)や、濃縮した粒子状物質をボランティアに暴露した実験において、暴露前などに比べ血中フィブリノゲンが高くなることが示されたこと(Ghio et al., 2000; Petrovic et al., 2000)などが背景の理由としてある。しかし、血液の凝固をテーマとした報告例の中には、積極的な結果が得られなかったものもある。60歳以上の高齢者112人とPM₁₀との関連についての疫学調査報告(Seaton et al., 1999)では、フィブリノゲンあるいは凝固因子VIIにおいて変化はみられなかった。高齢者1592人のコホート調査において、粒子状物質濃度と血漿フィブリノゲンとの相互作用を示す証拠は得られなかった(Prescott et al., 2000)。とりわけ動物実験について象徴的なものは、Health Effects InstituteのレポートであるNadziejkoら(2002)によるもので、「暴露研究や疫学研究が大気汚染に関連して血球数・血小板数・フィブリノゲン濃度・因子VII濃度における変化を報告しているが、他のヒト対象実験やほとんどの動物実験ではこのような変化を発見できてない」と要約した上で、次の結果を報告している。すなわち、濃縮した粒子状物質300 μg/m³をラットに6時間暴露した実験で、血液凝固の6因子(血小板数、血球数、フィブリノゲン・トロンビン-アンチトロンビン複合体・組織プラスミノゲン活性化因子・プラスミノゲン活性化阻害因子・因子VII)の各濃度)に一貫した差異はみられなかったと結論

している。

これらの報告例のように、血液凝固を対象とした研究は容易でないことを考慮しつつ、本研究の第一段階として PM_{2.5} の代わりに用いた SRM 1648 による暴露実験を行った。栗田が今回得た結果は、Nycoplastin 試薬を用いた外因性凝血試験におけるプロトロンビン時間においても、かつ Cephotes 試薬を用いた内因性凝血試験における活性部分トロンボプラスチン時間においても、4 mg/mL 濃度の SRM 1648 を 37°C で 30 分暴露することで顕著な凝血時間短縮が生起し、2 mg/mL 濃度でも短縮の傾向がみられた(図 6, 7)。ただここで注意すべきは、これらの短縮した凝固時間は、あくまでも正常域の範囲内であるというので、逆に凝血試験の難しさが浮き彫りになる。加えて今回結果を示していないが、この暴露時間を延長していくと、見かけ上凝血時間がコントロール値に近づいて回復していくケースがみられたことも凝血試験の難しさを象徴する。見かけ上というのは、30 分より長時間暴露した場合凝固した血漿はコントロールに比べ明らかに流動性がみられるため、この理由については不明である。本研究では、通常は輸血のためなどに行うスクリーニング検査として実施される凝血検査手法を応用し、とくに精度管理のために用いられる検査値が正常域にある品質管理されたヒト血漿を暴露対象として用いている点が、従来の報告ではみられない新しい視点である。今後は、研究の第二段階として実際の PM_{2.5} 試料による凝血時間への影響や凝固因子との関連を検討したい。

参考文献

Brook JR , Lillyman CD , Shepherd MF , Mamedov A : Regional transport and urban contributions to fine particle concentrations in southeastern Canada. J Air Waste Manag Assoc 52(7): 855-66, 2002

Chan YC , Simpson RW , Mctainsh GH , Vowles PD , Cohen DD , Bailey GM : Characterisation of chemical species in PM_{2.5} and PM10 aerosols in Brisbane, Australia. Atmos Environ 31(22): 3773-85, 1997

Chow JC , Watson JG , Lu Z , Lowenthal DH , Frazier CA , Solomon PA , Thuillier RH , Magliano K : Descriptive analysis of PM_{2.5} and PM10 at regionally representative locations during SJVAQS/AUSPEX. Atmos Environ 30(12): 2079-112, 1996

Dockery DW , Pope CA 3rd , Xu X , Spengler JD , Ware JH , Fay ME , Ferris BG Jr , Speizer FE : An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. N Engl J Med 329(24): 1753-9, 1993.

Dominici F , Peng RD , Bell ML , Pham L , McDermott A , Zeger SL , Samet JM : Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. JAMA 295(10):1127-34, 2006.

Donaldson K , Beswick PH , Gilmour PS : Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? Toxicol Lett 88(1-3): 293-8, 1996

Donaldson K , Brown DM , Mitchell C , Dineva M , Beswick PH , Gilmour P , MacNee W : Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. Environ Health Perspect 105 Suppl 5: 1285-9, 1997

- Ghio AJ, Kim C, Devlin RB : Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 162:981–988, 2000.
- Halliwell B , Clement MV , Long LH : Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 486(1):10–3, 2000.
- Hung HF , Wang CS : Experimental determination of reactive oxygen species in Taipei aerosols. *J Aerosol Sci* 32: 1201–11, 2000
- Kang C , Sunwoo Y , Lee HS , Kang B , Lee S : Atmospheric Concentrations of PM_{2.5} Trace Elements in the Seoul Urban Area of South Korea *J Air & Waste Manage Assoc* 54(4) : 432–9, 2004
- Koenig W : Haemostatic risk factors for cardiovascular diseases. *Eur Heart J* 19(Suppl C): C39–43, 1998.
- Kunzli N , Jerrett M , Mack WJ , Beckerman B , Labree L , Gilliland F , Thomas D , Peters J , Hodis HN : Ambient air pollution and atherosclerosis in los angeles. *Environ Health Perspect* 113(2):201–6, 2005.
- Mutlu GM , Garey KW , Robbins RA , Danziger LH , Rubinstein I : Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 164(5):731–7, 2001.
- Nadziejko C , Fang K , Chen LC , Cohen B , Karpatkin M , Nadas A : Effect of concentrated ambient particulate matter on blood coagulation parameters in rats. *Res Rep Health Eff Inst* (111):7–29, 2002.
- Peters A , Dockery DW , Muller JE , Mittleman MA : Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 103(23):2810–5, 2001.
- Peters A , Doring A , Wichmann HE , Koenig W : Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet* 349(9065):1582–7.,1997.
- Petrovic S , Urch B , Brook, J , Datema J , Purdham J , Liu L , Lukic Z , Zimmerman B , Tofler G , Downar E , Corey P , Tarlo S , Broder I , Silverman DF : Cardiorespirotory effects of concentrated ambient PM_{2.5}- A pilot study using controlled human exposures. *Inhal Toxicol* 12(Suppl 1):173–88, 2000.
- Pope CA 3rd , Burnett RT , Thurston GD , Thun MJ , Calle EE , Krewski D , Godleski JJ : Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 109(1):71–7, 2004.
- Prescott GJ , Lee RJ , Cohen GR , Elton RA , Lee AJ , Fowkes FG , Agius RM : Investigation of factors which might indicate susceptibility to particulate air pollution. *Occup Environ Med* 57(1):53–7, 2000
- Schwartz J : Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ Health Perspect* 109 (Suppl 3):405–409, 2001.

Seaton A , MacNee W , Donaldson K , Godden D : Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 345(8943):176-8., 1995.

Seaton A, Soutar A, Crawford V, Elton R, McNerlan S, Cherrie J, Watt M, Agius R, Stout R.: Particulate air pollution and the blood. *Thorax* 54(11):1027-1032, 1999.

Setsukinai K , Urano Y , Kakinuma K , Majima HJ , Nagano T : Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem* 278(5): 3170-5, 2003

Shi T , Schins RP , Knaapen AM , Kuhlbusch T , Pitz M , Heinrich J , Borm PJ : Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. *J Environ Monit* 5(4): 550-6, 2003

Utell MJ , Frampton MW , Zareba W , Devlin RB , Cascio WE : Cardiovascular effects associated with air pollution: potential mechanisms and methods of testing. *Inhal Toxicol* 14(12):1231-47, 2006.

Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A. : Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect* 112(14):1347-58, 2004.

栗田雅行:大気中微小粒子PM_{2.5}のラジカル生成能について—aminophenyl fluorescein (APF)を用いた検出法による検討. 平成 15 年度基礎的実験的研究報告書, 2004.

栗田雅行:大気中微小粒子 PM_{2.5} 中の金属と血液成分との反応実験. 平成 16 年度基礎的実験的研究報告書, 2005.

栗田雅行, 大橋則雄, 上原眞一:東京都内 6 地点における大気中微小粒子PM_{2.5}の有害元素について. 東京東京都健康安全研究センター年報 54:315-8,2003

栗田雅行, 大橋則雄, 上原眞一:大気中微小粒子 PM_{2.5}の有害元素に関する順位化法による測定地点評価. 東京東京都健康安全研究センター年報 55:227-33,2004

大気中微小粒子暴露によるヒト血漿の凝固反応への影響

研究要旨

本研究は、PM_{2.5}による血液への影響を検討するため、一定の品質管理がなされコントロールとして凝血試験に用いられているヒト血漿に注目し、PM_{2.5}暴露によるその凝固時間変化という視点から、PM_{2.5}による直接的な影響を調べることを目的とした。Control Plasma Normal 血漿を用いた外因系及び内因系凝血試験において、比較的高濃度のSRM 1648を暴露することによって凝固時間の短縮がどちらの凝固系でも生じることを前年度報告した。しかし、SRM 1648の濃度を都内で実際に観測されるPM_{2.5}レベルまで下げると凝固時間の明確な短縮がみられないことから、本年度では血漿の活性率に注目して行った暴露実験により、ヒト血漿モデルの感度を高めることができた。また、実験に用いる血漿をVerify Reference Plasma (VRP)に変更することによって、検出感度をさらに上げることができた。次に、実際のPM_{2.5}の暴露影響をみるため、約1年間にわたり足立区内において毎月採取したPM_{2.5}試料を用いた。このときのPM_{2.5}質量濃度は8月を最小値、6月と12月をピークとした変動を示した。PM_{2.5}に含まれる21元素濃度の変動は、Na・Mg・Ca・Co・Agを除くとPM_{2.5}質量濃度の変動と類似したパターンを示した。採取したPM_{2.5}に30分暴露した75%及び50%活性のVRP血漿において、その外因系凝固時間の月別変動は、9月を最低値とする変化を示したが、PM_{2.5}質量濃度の変動を反映していなかった。一方、同一試料のPM_{2.5}による活性酸素検出試薬であるaminophenyl fluorescein (APF)の蛍光強度変化は9月をピークとする変化を示したが、PM_{2.5}質量濃度の変動を反映していなかった。しかし、PM_{2.5}によるヒト血漿凝固時間変化とAPFの蛍光強度変化は対称的であった(50%活性の場合相関係数 -0.87)。以上から、PM_{2.5}によって生起するヒト血漿の外因系凝固時間の短縮とAPF蛍光強度の増加は、PM_{2.5}質量濃度やそこに含まれる多くの元素以外のなんらかの同一的影響を示唆するものであった。

はじめに

栗田は、大田区内の小学校で毎月採取した粒径が2.5 µm以下である大気中微小粒子、いわゆるPM_{2.5}によって、活性酸素検出試薬であるaminophenyl fluorescein (APF)の蛍光強度の月別変化が夏季に高く冬季に低い傾向があり、PM_{2.5}質量濃度やそこに含まれる遷移金属元素濃度の変化とは一致しないことを指摘した(栗田2006)。また、ヒト血漿の凝固モデルを応用して、PM_{2.5}試料の代用として、米国National Institute of Standards and Technology (NIST)が提供する都市大気中粒子状物質であるStandard Reference Matter #1648(以下、SRM 1648)による外因系及び内因系凝固時間の短縮を報告した(栗田2006)。これまでも粒子状物質による健康影響のひとつとして血液の凝固系に注目し、濃

縮した大気粒子(CAPs)を使って、ボランティア実験(Ghio et al., 2000; Petrovic et al., 2000; Gong et al., 2003)や動物実験(Nadziejko et al., 2002)が報告されているが、明確な結果が得られていない。

栗田は、これまでの知見を踏まえ、SRM 1648ではなく東京都内で実際に採取したPM_{2.5}試料によるヒト血漿モデルにおける凝固時間変化を中心に検討し、微小粒子による血液系へ影響を知るためさらなる知見を得ることを本研究の目的とした。

材料と方法

1 PM_{2.5}試料の採取

PM_{2.5}の試料採取は、前々年度の報告書(栗田2005)で記述した方法と同様とした。要約すると、

粒径 2.5 μm 以下の粒子を選別する 50%カット特性インパクターを内蔵する一体型のフィルターホルダー(柴田科学社製 NWPS-35HS)と吸引ポンプ(柴田科学社製 Σ -500)を全天候型のシェルターに収容し、毎分 2.5 L の流量で 72 時間以上吸引して試料採取した。捕集フィルターには、テフロンで補強されたグラスファイバー材質である T60A20(Pall 社製)を使用した。試料採取前後のフィルターは、ペトリスライド(Millipore 社製 PD15047)内に一時的に収納し、20°Cの恒温室内に保管した。

2 試薬及び器具等

1) 試薬

血液の凝固試験試薬は Axis-Shield 社製で、凝血試験のひとつである外因性凝血試験試薬に Nycoplastin、そして内因性凝血試験試薬には Cephotest を用いた。粒子状物質の暴露対象モデルとして、同社の 3.2%クエン酸ナトリウム加プール血漿であるヒト標準血漿正常域(Control Plasma Normal, CPN)と、結果の項目で後述する理由から Biomerieux 社の血液凝固能測定用標準血漿 Verify Reference Plasma (VRP) を用いた。血液凝固試験における、ヒト標準血漿の溶解や希釈などには、エンドキシン試験済のフィルター除菌水と 0.9%生理食塩水(ともに Sigma 社製)を用いた。また、内因性凝血試験試薬においては、1 M 塩化カルシウム溶液(Fluka 社製)を使用した。

フリーラジカルや活性酸素種の検出に用いた蛍光試薬は、前年度までと同様に第一化学薬品社製の APF とし、50%酢酸アンモニウム(和光純薬社製)を所定濃度にまで希釈したものに溶解して使用した。

2) SRM 1648

PM_{2.5} 試料との代替えのため、米国 NIST より提供される標準物質のひとつとして、ミズーリ州セントルイスで採取された都市大気中粒子状物質である Standard Reference Matter #1648(SRM

1648)を使用した。

3) 器具・分析装置等

PM_{2.5} 及び SRM 1648 の質量は、0.1 μg まで秤量可能な上皿電子天秤(SC2-F, Sartorius 社製)を用いて、20°Cの恒温室内で秤量した。

凝血試験においては、滅菌済である 4 mL の PS 製試験管(Sarstedt 社製)及びピペットチップ(Biohit 社製)を使用した。

後述する PM_{2.5} 試料中の元素濃度の分析では、Na、Mg、Al、K、Ca、Fe、Zn は誘導結合型プラズマ発光分析法(ICP-AES)による装置(IRIS 1000, 日本 Jarrell-Ash 社製)、Ti、V、Cr、Co、Mn、Ni、Cu、As、Se、Mo、Ag、Cd、Sb、Pb、Ba は誘導結合型プラズマ質量分析法(ICP-MS)による装置(4500, HP 社製)を用いた。

活性酸素検出試薬 APF による蛍光強度の測定には、8 穴ごとのスプリットモジュールである UV Star(Greiner Bio-One 社製)をプレートにして、Micro Plate Reader MTP-100F(コロナ電気社製)により計測した。

3 PM_{2.5} からの抽出操作

PM_{2.5} の採取後秤量して PM_{2.5} の質量濃度を求め、半分に裁断したフィルターを PS 製試験管に入れ、フィルター除菌水または 0.9%生理食塩水を 1 mL 添加して密栓し、暗所で 5 分間超音波抽出し、よく攪拌したのち室温で 30 分間静置し、さらに攪拌して試料とした。

4 血漿凝固試験

試験直前、CPN 血漿または VRP 血漿 1 バイアルに対しフィルター除菌水を加えて溶解後 15 分間室温静置し、秤量した SRM 1648 または採取した PM_{2.5} を 0.9%生理食塩水に溶解して添加し、室温または 37°Cで静置した。

外因系凝血試験では、1 バイアルの Nycoplastin にフィルター除菌水 2 mL を試験直前に加えて溶解後、37°Cで 10 分間加温しておき、準備したヒト血漿 0.1 mL に対し、0.2 mL の

Nycoplastin を添加して、直ちに凝固時間を測定した。また、内因系凝血試験では、37°Cで保温したヒト血漿 0.1 mL に対し、0.1 mL の Cephotest 試薬を添加し、1 回軽く攪拌してから 37°C で 6 分間インキュベートした。これに、フィルター除菌水で 0.02 M に調整した 37°C の塩化カルシウム溶液 0.1 mL を添加して、直ちに凝固時間を測定した。

5 PM_{2.5} 試料中の元素濃度分析

PM_{2.5} に含まれる各元素濃度については、2002 年 5 月から 2003 年 3 月までの期間中、毎月第 3 月曜日から木曜日の 3 日間にわたり足立区内のある小学校校庭で採取し保存しておいた PM_{2.5} 試料を用いた。試料採取したフィルターを小片に裁断し専用のテフロン容器に入れ、濃硝酸 5mL を加えて、マイクロ波反応加速装置 (MARS5, CEM 社製) により 180°C で 15 分間分解した。分解後の溶液を専用容器に密閉したまま 3 日間室温で放置したのち、分解液をディスクフィルター (25HP020AN, ADVANTEC 社製) によりメスフラスコ内にろ過し、さらに高純度水を加えて 50 mL に調整し、ICP-AES 及び ICP-MS 分析用の試料とした。併せて、未使用のフィルターを同条件で処理し、ブランクとした。なお、フラスコなど試料調製に用いた器具類は、清浄なものを事前に 15% 硝酸溶液に 3 日間以上浸潤させ、高純度水で洗浄してから使用した。

内標準元素としてイットリウムを用い、ICP-AES では 10 µg/L、また ICP-MS では 1 µg/L を含む 5% 硝酸溶液として、その一定量をペリスタルポンプの回転と同期して試料に添加する内標準法により、対象元素を定量分析した。検量線によるこの分析値から総量を換算し、ブランク値を差引きさらに総吸引量で除して、各元素濃度 (ng/m³) とした。

6 フリーラジカルの検出

採取した PM_{2.5} によるフリーラジカル生成の検出には、N,N- dimethylformamide 0.47 mL に溶

解した 1 mg APF (5 mM 相当濃度) を試験直前に酢酸アンモニウム緩衝液中に希釈し、PM_{2.5} の採取フィルターからの抽出液に最終濃度 24 µM の APF となるように添加した。所定の時間経過後、前述した Micro Plate Reader により励起波長 490 nm、蛍光波長 530 nm で蛍光強度を測定した。

III 結果

1 CPN 血漿の活性率と SRM 1648

前年度の報告では、SRM 1648 によって外因系及び内因系ともにヒト血漿の凝固時間は短縮した (栗田 2006)。しかし実験で用いた SRM 1648 の溶液濃度は、明確な凝固時間短縮を生じた場合 2 mg/mL 以上であり、現状の汚染レベルと比べ高濃度であった。その理由は、後述する大気汚染度の比較的高い地点である足立における PM_{2.5} 質量濃度の最大値を上回る濃度である 50 µg/m³ の大気を、本研究で用いている採取装置により毎分 2.5 L で 3 日間採取すると PM_{2.5} の総量は 0.504 mg であり、抽出に必要な最少量の 1 mL に対して 0.50 mg/mL の溶液濃度にしかならないからである。したがって、ヒト血漿凝固時間の短縮を検出するための方策としてヒト血漿における変更が必要となり、その具体的方法としてヒト血漿の活性率に注目した。

凝固対象としている CPN 血漿に対し、生理食塩水を一定量添加して希釈し、活性率 100%、75% 及び 50% の血漿に対する 1.0 mg/mL 濃度の SRM 1648 による凝固時間を検討した。実験に用いた CPN 血漿の活性率の逆数 (それぞれ 1, 1.33, 2.0) に対する凝固時間 (秒) を図 1 に示す。Nycoplastin 試薬による外因性凝固試験では、ヒト血漿の活性率の逆数に対し、コントロールと SRM 1648 ともに直線的な変化であり、活性率の減少に依存して凝固時間の短縮が明瞭にはみられず、ほぼ平行した結果を示した (図 1 A)。一方、Cephotest 試薬による内因性凝固試

験では、ヒト血漿の活性率の逆数に対し、コントロールとSRM 1648ともに直線的な変化ではあったが、SRM 1648によって直線の傾きが小さく、すなわち活性率の減少とともに凝固時間のコントロールとの差がより大きくなった(図1B)。

次に、今年度の主目的である都内で採取したPM_{2.5} 試料に対する凝固時間の短縮について、前述した CPN 血漿の活性率との関係で検討したが、凝固時間の明瞭な短縮は認められなかった(図表なし)。そこで、ヒト血漿自体を再考し、結論的に CPN 血漿とは異なる VRP 血漿を用いることにした。VRP 血漿を採用したいくつかの理由として、1 バイアル当たりの容量が2倍であること、血漿中の各種成分が判明していることがあり、今後の実験の拡張性がより適していると考えたからである。はじめに、VRP 血漿の基礎的性質を把握するため、37°Cで保温した際の活性率と Nycoplastin 試薬による凝固時間の関係を検討した(これ以降、結果に示す実験はすべて、VRP 血漿に対する Nycoplastin 試薬による凝固試験である)。活性率 100%、75%、50%及び 25% (逆数として、それぞれ 1, 1.33, 2.0, 4.0) に対する凝固時間を 37°C保温 10 分と 30 分とで比較した(図2)。活性率が下がる(図中ではその逆数が上がる)に従い、凝固時間は長くなり、全体として直線的に増加し、かつ保温時間の長さによる差は認められない。そして、留意すべきものとして、凝固時間の数値結果には表現されないが、凝固の質的なみかけにおいて、活性率 25%では凝固の程度が低く(柔らかく)、本実験のように凝固を目視している場合には活性率 25%のヒト血漿を用いることはあまり適してない。そのため、以降の実験では、活性率 75%と 50%を用いることにした。

2 VRP 血漿の活性率と SRM 1648

活性率が 75%と 50%の VRP 血漿に対し、SRM 1648 の最終溶液濃度が 0~2.0 mg/mL の範囲において 37°Cで 30 分間インキュベートした

ときの凝固時間を検討した(図3)。SRM 1648 濃度によるヒト血漿の凝固時間変化は、その活性率により顕著に異なった。すなわち、ヒト血漿の活性率 75%では、SRM 1648 の最終濃度が 0.1 mg/mL を超える辺りから急激に凝固時間が短くなり、1 mg/mL 以上で横ばいとなっている。一方、活性率 50%では、SRM 1648 の最終濃度が増加するとともにおよそ直線的に減少している。凝固時間のバラツキとして活性率 75%と 50%を比較すると、50%の方がバラツキが大きい場合がみられるのが特徴的である。

3 採取した PM_{2.5} の特徴

以下の実験では、2002 年 5 月から 2003 年 3 月まで期間中、毎月第 3 月曜日から木曜日の 3 日間にわたり足立区内の小学校校庭で採取し、保存しておいた PM_{2.5} 試料を用いた。採取期間中の毎月の PM_{2.5} 質量濃度は図4のとおりである。期間を通して僅差ながら最高値 48.6 µg/m³ を示したのは 12 月の試料で、続いて 6 月(47.5 µg/m³)であった。試料中最低値を示した 8 月(10.6 µg/m³)と、濃度としては中央値相当の 7 月(29.7 µg/m³)には、通過径路が同一でないにしても東京都を台風が通過したことにより、内容は不明だが特別な影響を受けたかもしれないことを特筆しておく。また、PM_{2.5} 中に含まれる各元素濃度は、機器分析の結果、図5の変動のとおりで、元素濃度をレベルによって便宜上 A から D までの 4 群に区分して示した。A 群の Na・Ca・Mg は 7 月に、A 群の Fe、C 群の V・Ni、及び D 群の Se・As・Co は 6 月に、そして D 群の Ag は 9 月にそれぞれ最高値を示した。一方、最低値は、Na・Mg・K・Se が 1 月、Co が同じ値で 11・12 月に、それ以外である 21 元素中 16 元素が 8 月に観察されている。採取期間中の変動パターンを比較すると、K・Fe・Zn・Ni・Cr が PM_{2.5} の変動パターンとよく類似しており、PM_{2.5} に対する相関係数では、それぞれ 0.85・0.80・0.85・0.88・0.84 と比較的高い値が特徴的であった。反対に、Na・

Mg・Ca・Co・AgとPM_{2.5}の相関係数は、それぞれ -0.06・0.27・0.39・0.16・-0.01 であり、ほとんど相関はみられなかった。これら 10 元素を除く 11 元素とPM_{2.5}の相関係数は 0.50～0.78 の範囲内であった。

4 PM_{2.5}によるヒト血漿凝固時間への影響

PM_{2.5}によるヒト血漿モデルの凝固時間変化への影響を検討するため、上記3)と同じPM_{2.5}試料を 0.9%生理食塩水で抽出し、抽出液を活性率 75%と50%のヒト血漿と混合して37℃で30分間静置した後、それぞれのプロトロンビン時間を測定し、3回測定の平均値変動として図6に示した。活性率 75%と50%におけるコントロールの凝固時間(平均±SD)は、それぞれ 19.0±0.3 秒と 24.2±0.8 秒であった。毎月採取したPM_{2.5}によるヒト血漿への影響として得られた凝固時間は、活性率 75%に比べ 50%の変動幅が大きかったが、コントロールの数値と同等かそれ以下であり、9月にはどちらの活性率でも最短時間を示している。これらから、PM_{2.5}はヒト血漿のプロトロンビン時間を短縮させる作用を及ぼすことが明示された。

次に、上記3)で掲げたPM_{2.5}質量濃度と各元素濃度がこの凝固時間との間にどの程度の相関があるか検討すると、Alと75%活性、50%活性のそれぞれの相関係数が0.65、0.63と最も高く、それ以外の元素とは相関係数の絶対値で0.6を超えるものはなかった。ただし、NaとAgだけは負の相関を示した、(それぞれ75%活性 -0.36, 50%活性 -0.27; 75%活性 -0.27, 50%活性 -0.46)。これら正の相関を示した意義を考えると、元素濃度が高いときに凝固時間がコントロールと同じ(正常値を示す)ことになり相関の意味はなくなる。よって、元素濃度が高い方が凝固時間が短くなる負の相関を取上げると、NaとAgのうちNaについては、PM_{2.5}中の濃度よりはるかに高い濃度である0.9%生理食塩水を凝固試験に用いていることを考慮すると、Naと

の相関の意義はなくなり、数値としては大きくないがAgと凝固時間との間に唯一の関連が示唆される。

5 PM_{2.5}によるAPFの蛍光強度への影響

採取したPM_{2.5}からの抽出液とAPF試薬の混合したものの蛍光強度が、室温の暗所に静置した時間の経過に伴いどのように変化していくかを検討した(図7)。混合後3分間と10分間では、この蛍光強度に採取月の違いはほとんど認められずほぼ平坦であり、時間の経過とともに蛍光強度が全体的にわずかに上昇しているだけである。しかし、30分経過すると、全体の蛍光強度が同じように増加するだけでなく、採取月による違いがみられるようになり、60分経過ではその差異が明瞭になって9月をピークとする形状が確認される。

次に、上記3)で掲げたPM_{2.5}質量濃度と各元素濃度がこの蛍光強度との間にどの程度の相関があるか検討した。PM_{2.5}質量濃度あるいは各元素濃度の上昇に伴いAPF試薬の蛍光強度も上昇するため、正の相関が予測される。しかし、正の相関を示したのはNa・Cd・Ag・Sbの4元素だけで、相関係数はそれぞれ0.06・0.07・0.71・0.19であった。すなわち、APF試薬の蛍光強度とAgとの間に他の元素とは異なる関連の強さが示唆された。

加えて、前述した60分経過した蛍光強度の月別変動パターン(図7)は、上記4)で検討した50%活性のヒト血漿凝固時間の変動が9月を谷とするパターン(図6)に対し対称性が認められる。このことから、各月の50%活性のヒト血漿凝固時間とこの蛍光強度における相関計数を算出すると、-0.87と比較的高い数値が確認された(75%活性の場合-0.70)。したがって、ヒト血漿凝固時間を短縮させるPM_{2.5}中の何がしかの成分は、それに応じて蛍光強度をも増加させることを示唆するものであった。

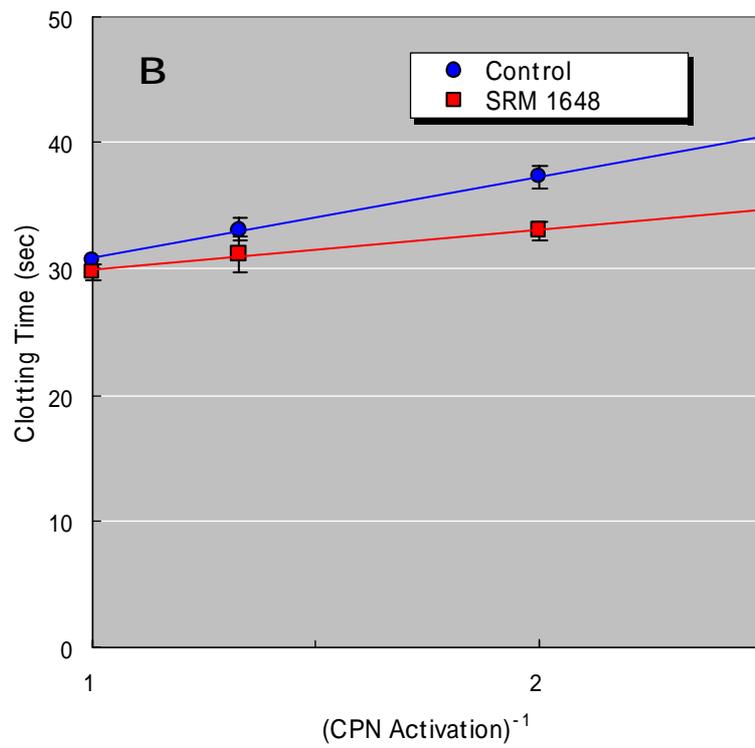
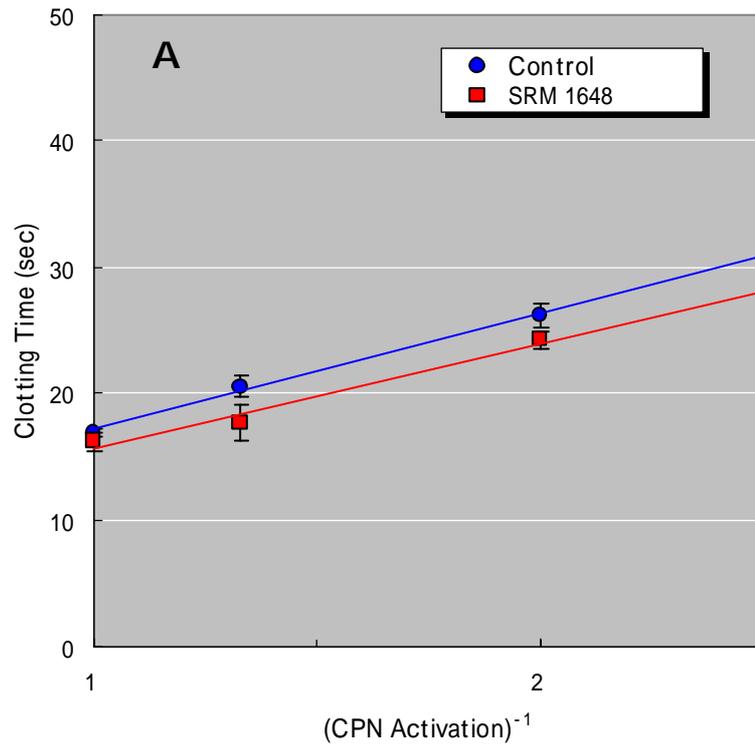


図1 1.0 mg/mL 濃度の SRM 1648 に 37 °C で 30 分暴露したヒト正常血漿 (CPN) の活性率の逆数とその時の凝固時間の関係
 A Nycoplastin 試薬による PT 時間, B Cephotest 試薬による APTT 時間

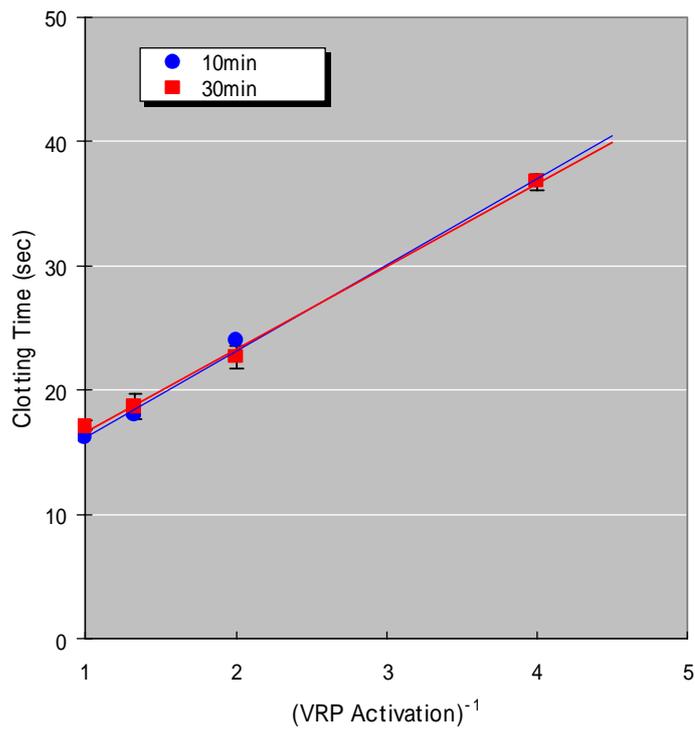


図2 37 10分及び30分保温したヒト正常血漿(VRP)の活性率の逆数と Nycoplastin 試薬によるプロトンピン凝固時間の関係(平均±SD, n=3)

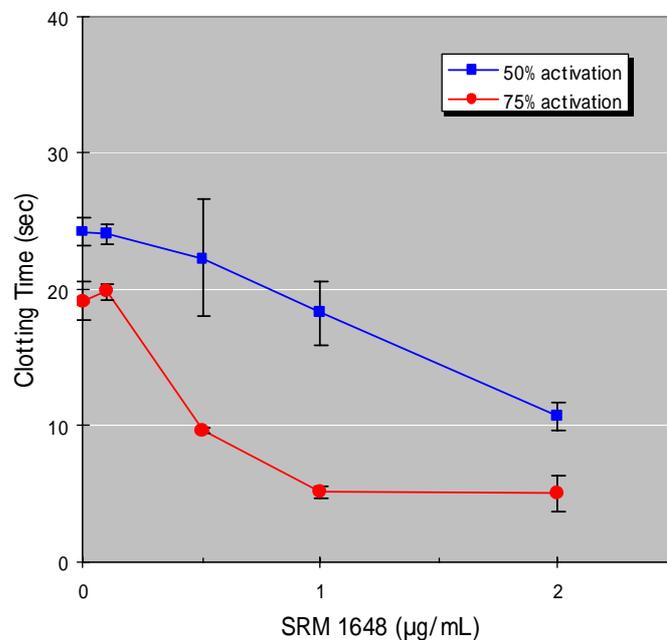


図3 50%及び75%活性のヒト正常血漿(VRP)に対し37 30分暴露したSRM 1648濃度とNycoplastin 試薬によるプロトンピン凝固時間変化(平均±SD, n=3)

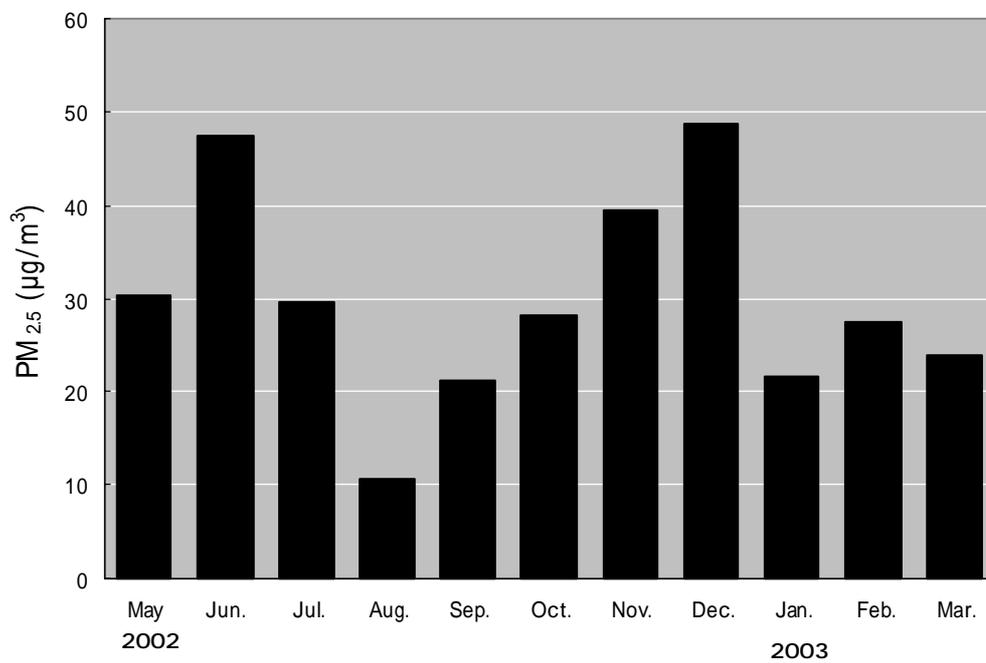


図4 2002年5月から2003年3月に足立区で毎月採取したPM_{2.5}質量濃度変化

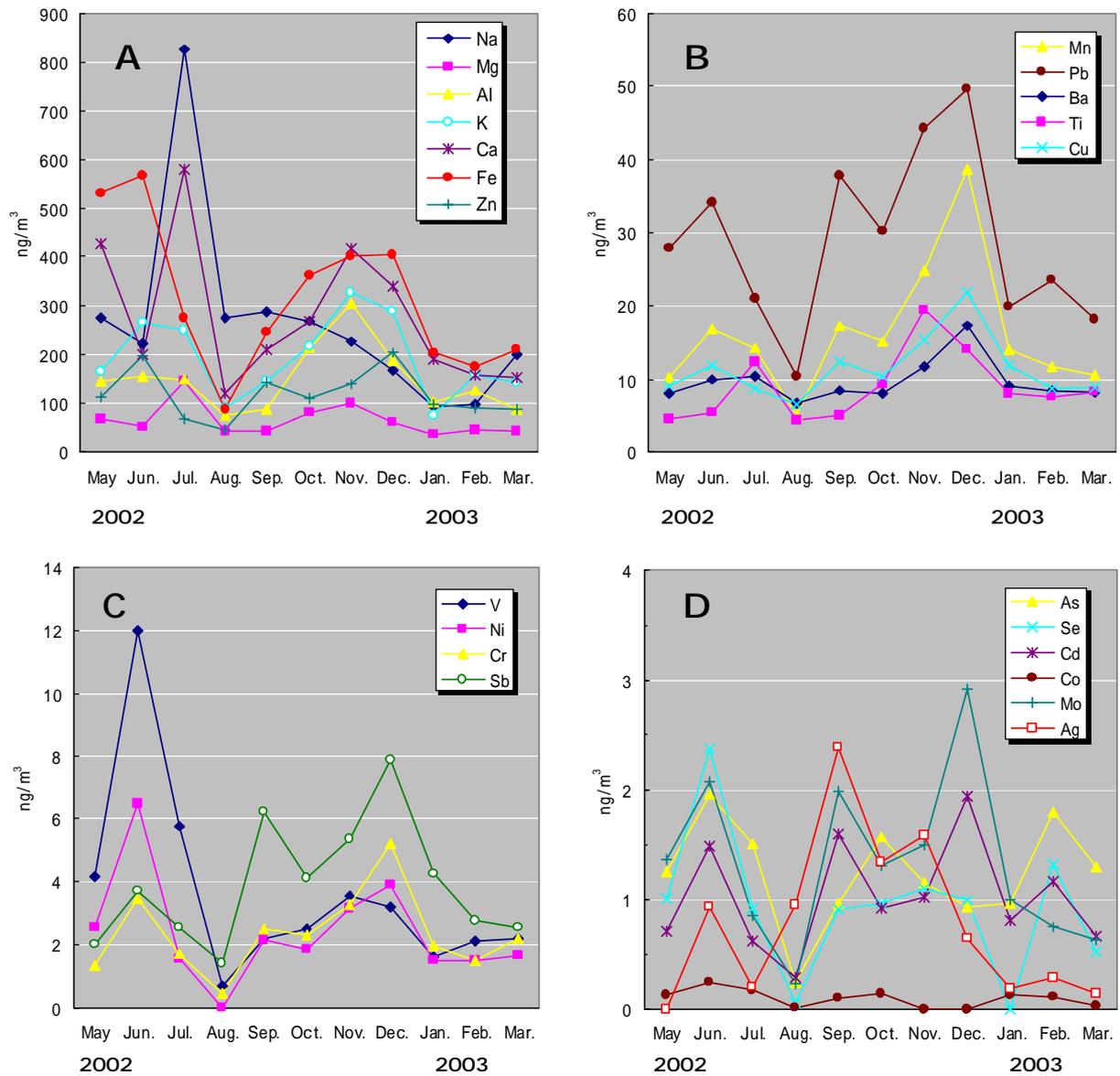


図5 2002年5月から2003年3月に足立区で毎月採取したPM_{2.5}試料中の各元素濃度変動

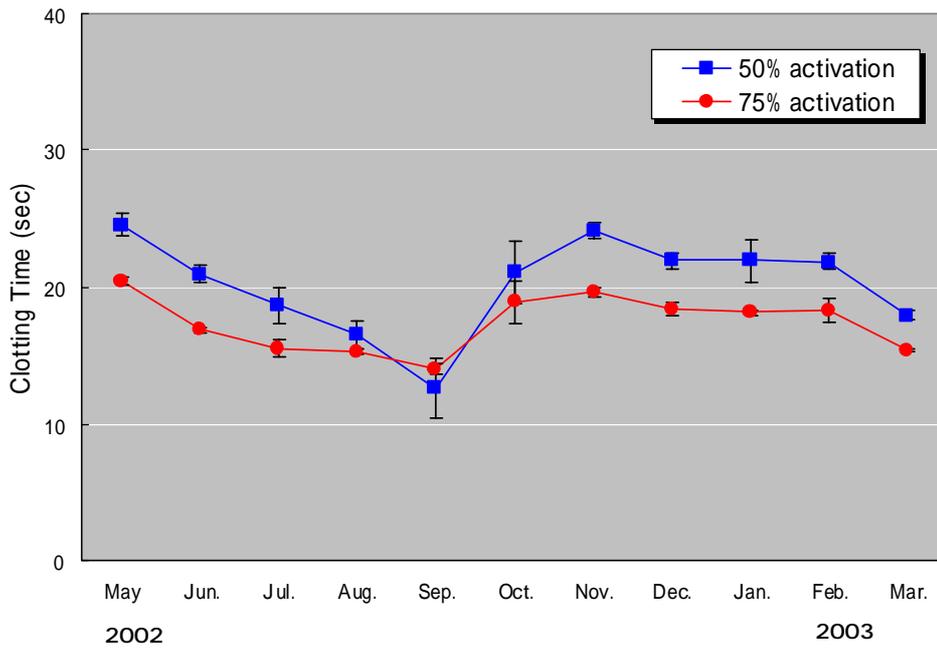


図6 毎月採取したPM_{2.5}試料を37℃で30分暴露したときの50%及び75%活性のヒト正常血漿におけるNycoplantin試薬によるプロトロンビン時間変動(平均±SD, n=3)

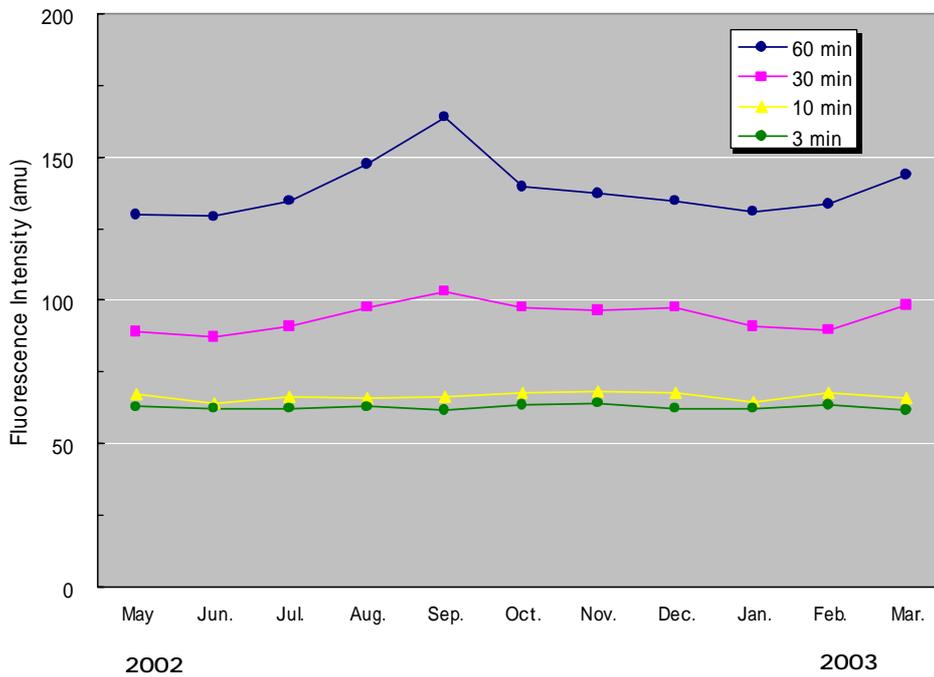


図7 毎月採取したPM_{2.5}試料に対する活性酸素検出試薬(APF)による経過時間別の蛍光強度変化

考 察

血液の凝固線溶系は、心不全や脳梗塞へ発展するものとして心臓血管医学においてその重要性が指摘されており(Braunwald, 1997; Brook et al., 2004) 大気中の微小粒子による生体影響における対象のひとつとして注目されている(Ghio et al., 2000; Petrovic et al., 2000; Gong et al., 2003; Nadziejko et al., 2002)。しかし、血液凝固線溶系に関連した血液の粘性、凝固因子 VII やフィブリノゲンなどにおいて、現状ではPM_{2.5}による明確な影響が出てきていない。これらの研究はボランティアや動物における in vivo の研究であり、残念ながら今のところ疫学的調査研究の裏付けとなっていない。本研究は、in vitro でより直接的で単純明快な PM_{2.5} の実験をデザインした。具体的には、プロトロンビン時間検査においてコントロールやリファレンスとして臨床で使用されているヒト血漿である VRP 血漿を PM_{2.5} の暴露モデルとして応用し、その外因系(組織因子経路)凝固時間の変化をもとに、PM_{2.5} による生体影響の程度を比較した(図6)。これまで使用してきた CPN 血漿に替えて用いた VRP 血漿は、凝固因子などの成分が定量表示されているだけでなく、実験の趣旨に沿ったより感度が高いものであり、かつ活性率を工夫することで粒子による影響をより明瞭化させた(図1~3)。

採取した PM_{2.5} 試料の質量濃度は、採取期間中 10.6~48.6 µg/m³ と変動幅が大きくな変動パターンを示した(図 4)。また、そこに含まれる Na・Mg・Ca・Co・Ag 以外のほとんどの元素濃度は、PM_{2.5} 質量濃度と比較的似た変動を示した(図 5)。そのことは、相関係数が 0.80 以上であった K・Fe・Zn・Ni・Cr に典型的に認められる。このような特徴をもつ PM_{2.5} 試料がプロトロンビン時間に与える影響として、ヒト血漿凝固時間はコントロールの数値以下となる短縮を示し、端的には

9 月の採取試料で最短値となった(図 6)。加えて、PM_{2.5} 及びそこに含まれる元素の大気中濃度と、この凝固時間との間における相関では、見かけ上 Al 濃度と 75% 活性血漿との間で相関係数 0.65 を最高とし、それ以外では 0.6 以下であった。しかし、元素濃度の高低と凝固時間の長短との関係を考慮し、PM_{2.5} の抽出に生理食塩水を使用したことを考慮すれば、負の相関係数を示す Ag に唯一注目すべきである。粒子状物質にみられる Ag の主要な発生源は、廃棄物処理場であるとされている(真室ら, 1979; Germani & Zoller, 1994)。Ag が、血液凝固に直接影響することは報告されていないが、いくつかの興味深い報告がある。微小粒子中の Ag については、高分解能電子顕微鏡と組合わせた走査透過電子顕微鏡像の X 線分析からデトロイト都市大気中の Ag 粒子の大きさが 20 nm 以下であること(Utsunomiya et al., 2004)が報告されている。Takenaka ら(2001)は、15 nm の Ag 粒子をラットに吸入暴露させ、暴露直後に Ag を血液中で確認している。また、山中ら(2005, 2006)は、銀イオンが大腸菌の細胞膜周辺(ペリプラズマ空間)に存在する呼吸鎖酵素のチオール基と結合するだけでなく、30 分で細胞質にまで到達し、リボソームを失活しているとプロテオーム解析により報告している。抗菌剤として使用されている Ag (Lansdown, 2006) の生体影響については代表的な報告がいくつかある(ATSDR 1990; Hollinger 1996)が、とりわけ Ag 微粒子と血液との関連については安全性の確認がとれているとは言えず、今後の知見の集積が急務である。

一方、採取した同じ PM_{2.5} による APF 試薬の蛍光強度の月別変化は、9 月をピークとする変動を示した(図 7)。この 9 月をピークとする蛍光強度変化と前述した 9 月を谷とする凝固時間の変動(図 6)との対称性に注目し、この二者間の相関を検討すると 50% 活性血漿で相関係数-0.87

と比較的高い数値となった。残念なことに、蛍光強度を増加させる PM_{2.5} 中の物質が、ヒト血漿のプロトロンビン時間を短縮させる直接的な証拠は現状ではない。しかし、本報告から得られた限られた情報の中から総括すると、PM_{2.5} 質量濃度に依存しない PM_{2.5} 中の何らかの成分が、それは蛍光強度を増加させるもの (APF 試薬の特徴 (Setsukinai et al., 2003) から少なくともそれは直接的にはスーパーオキシドアニオンでない何らかの活性酸素種) で、かつ、血漿の凝固を短縮させる成分で、生体に悪影響を与える可能性があることを示唆する。栗田 (2005) は、PM_{2.5} によって APF 試薬の蛍光強度が増加するのをウシ血清アルブミンが抑制することを報告した。アルブミンは重要な抗酸化物質 (Halliwell, 1988) で、そこに配位されるチオール基は活性酸素種の標的とされている (Hu et al., 1993)。血漿中のフィブリノゲンは凝固因子として不可欠であるだけでなく、アルブミン、セルロプラスミン、トランスフェリンと同様、炎症から生じる酸化ストレスに対する補助的な抗酸化防御機構として働くことが報告されている (Olinescu & Kummerow, 2001)。以上から、PM_{2.5} による健康影響のひとつとして、血液凝固や活性酸素種との関連を今後さらに研究していくことの重要性が支持されるものである。

参考文献

Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR)、 U.S. Public Health Service : Toxicological profile for silver. 1990.

Brook RD , Franklin B , Cascio W , Hong Y , Howard G , Lipsett M , Luepker R , Mittleman M , Samet J , Smith SC Jr , Tager I : Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the

American Heart Association. *Circulation* 109(21):2655-71, 2004.

Germani MS , Zoller WH : Solubilities of elements on in-stack suspended particles from a municipal incinerator. *Atmos Environ* 28(8): 1393-400, 1994.

Ghio AJ, Kim C, Devlin RB : Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 162:981-988, 2000.

Gong H Jr , Linn WS , Sioutas C , Terrell SL , Clark KW , Anderson KR , Terrell LL : Controlled exposures of healthy and asthmatic volunteers to concentrated ambient fine particles in los angeles. *Inhal Toxicol* 15:305-25, 2003.

Halliwell B : Albumin-an important extracellular antioxidant?. *Biochem Pharmacol.* 37(4):569-71, 1988.

Hollinger MA : Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals. *Crit Rev Toxicol* 26(2): 255-60, 1996.

Hu ML , Louie S , Cross CE , Motchnik P , Halliwell B : Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 121(2):257-62, 1993.

Lansdown ABG : Silver in health care -Antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol* 33 : 17-34, 2006.

Nadziejko C , Fang K , Chen LC , Cohen B , Karpatkin M , Nadas A : Effect of concentrated

ambient particulate matter on blood coagulation parameters in rats. Res Rep Health Eff Inst (111):7-29, 2002.

Olinescu RM , Kummerow FA : Fibrinogen is an efficient antioxidant. J Nutr Biochem 12(3):162-169, 2001.

Setsukinai K , Urano Y , Kakinuma K , Majima HJ , Nagano T : Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. J Biol Chem 278(5): 3170-5, 2003.

Takenaka S , Karg E, Roth C , Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J : Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. Environ Health Perspect 109 Suppl 4: 547-51, 1997.

Utsunomiya S, Jensen KA, Keeler GJ, Ewing RC : Direct identification of trace metals in fine and ultrafine particles in the Detroit urban atmosphere. Env Sci Tech 38:2289-97, 2004.

栗田雅行:大気中微小粒子 PM2.5 中の金属と血液成分との反応実験.平成 16 年度基礎的実験的研究報告書, 2005.

栗田雅行:大気中微小粒子暴露によるラジカル生成とヒト血漿への影響に関する基礎的研究.平成 17 年度基礎的実験的研究報告書, 2006.

真室哲雄, 溝旗朗, 久保田寅英:都市廃棄物焼却炉より放出される浮遊粒子の元素組成. 14: 190-196, 1979.

山中幹宏, 原圭太, 工藤淳:エネルギーフィルタ型透過型電子顕微鏡による銀イオンと生体との相互作用メカニズム解析.シャープ技報 91: 45-49,2005.

山中幹宏, 松井紀江, 原圭太, 工藤淳:プロテオーム解析による銀イオンと生体との相互作用メカニズム解析. シャープ技報 94:30-34,2005.

ディーゼル排出ガス中の揮発性有機化合物、準揮発性有機化合物、アルデヒド類及び多環芳香族炭化水素の分析

研究要旨

ディーゼル排出ガス暴露チャンバー内の空気を採取し、炭素数 $C_2 \sim C_{20}$ の揮発性有機化合物(VOC)、準揮発性化合物(SVOC)、アルデヒド類及び3環～6環の多環芳香族炭化水素(PAH)、合計98物質を分析した。VOC、SVOC及びアルデヒド類の分析では、チャンバー内空気から62物質が検出され、そのうち炭素数 C_{15} 以下のガス状物質については、全ガス暴露群(H群)よりも除塵群(ND群)の方が濃度の高い物質が多かった。最も高濃度に検出されたのは、硫酸ジメチル($654 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、次いでホルムアルデヒド($647 \mu\text{g}/\text{m}^3$)であった。また、PAHの分析では12物質が検出され、H群の方がND群よりも高濃度の物質が多く、最も濃度が高かったのは、アセナフチレン($736\text{ng}/\text{m}^3$)、次いでフルオレン($623\text{ng}/\text{m}^3$)であった。

研究目的

ディーゼル排出ガス中には、多環芳香族炭化水素(PAH)だけでなく、揮発性有機化合物(VOC)、準揮発性有機化合物(SVOC)、アルデヒド類など、ガス状成分を含む多くの化学物質が存在する^{1,2)}。そこで、これらによる健康影響を把握するため、暴露チャンバー内空気について、VOC、SVOC、アルデヒド類及びPAHを分析し、ディーゼル排出ガスの化学的組成に関する知見を得ることを目的とした。

研究方法

VOC、SVOC、アルデヒド類、PAHの各物質群について測定方法を検討した後、全ガス暴露群(H群)、粉塵濃度 $1.3 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、 NO_2 0.6ppm 、除塵群(ND群)、コントロール群(C群)の各チャンバー内空気について、以下の方法で分析を行った。

1 暴露チャンバー内 VOC の測定

捕集管に Carbotrap317(Carbopack-C/Carbopack-B/Carboxen 1000、スペルコ製)を用い、 $100\text{mL}/\text{分}$ の流速で30分間の空気採取を行った($n=2$ 、採取空気量: 3L)。なおH群のチャンバー内空気を採取する際には、捕集管の前に石英フィルターを装着して粉塵を除去し、ガス状成分のみを採取した。空気採取後の捕集管は、内部標準としてトルエン-d8を $0.1 \mu\text{g}$ 添加し、加熱脱着装置

(ATD-400、パーキンエルマー製)によりガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)(GC17A/GC5000、島津製作所製)に導入し分析した。分析条件を表1に示す。測定対象は炭素数 $C_2 \sim C_{16}$ の化合物、56物質とし、標準物質を用いて定量した。

2 暴露チャンバー内アルデヒド類の測定

捕集管に Sep-Pack DNPH XPoSure (日本ウオーターズ製)を用い、H群及びND群については $200\text{mL}/\text{分}$ の流速で、C群については $1\text{L}/\text{分}$ の流速で、30分間の空気採取を行った($n=2$ 、採取空気量:H群及びND群 6L 、C群 30L)。なおH群のチャンバー内空気を採取する際には、VOCと同様に捕集管の前に石英フィルターを装着して粉塵を除去し、ガス状成分のみを採取した。空気採取後の捕集管はアセトニトリル 5mL で溶出し、試験管の目盛りで 5mL にメスアップして分析用試料とした。分析には高速液体クロマトグラフ(HPLC)(LC10、島津製作所製)を用いた。分析条件を表2に示す。測定対象はホルムアルデヒド～デカナールまでの20物質とし、標準物質を用いて定量した。

3 暴露チャンバー内 PAH 及び SVOC の測定

捕集剤には直径 47mm の石英フィルター(2500QAT-UP、東京ダイレック製)及びオクタデシルシリカゲル(ODS)フィルター(Empore Disk C_{18} Fast Flow、3M製)を用いた。石英フィルターは粒子状物質採取用、ODSフィルターはガス状物質採

取用とした。各フィルターはブランク低減のため、石英フィルターは 400℃、3時間の加熱処理、ODS フィルターはアセトンによる浸漬洗浄を行った。また、空気採取中の NO_x 及び SO_x 等による PAH の酸化分解を防ぐため、酸化防止剤としてアスコルビン酸を各フィルター1枚あたり 500 μg 添加した。空気採取は、石英フィルター1枚と ODS フィルター2枚を重ねてる紙ホルダー(EMO-47、GLサイエンス製)にセットし(1 段目:石英、2、3 段目:ODS)、15L/分の流速で 90 分間空気を採取した(採取空気量:1000L)。空気採取後のフィルターは、石英フィルターと ODS フィルターを別の試験管に入れ、それぞれにアセトン 10ml を加えて 10 分間の超音波抽出を行い、遠心分離した(2500rpm、10 分)。次に上清 5ml を濃縮管に取り、内部標準としてフルオランテン d10 を 50ng 添加して、窒素気流下で 10 倍濃縮し、GC/MS(GCMS-QP2010、島津製作所)の分析用試料とした。分析条件を表 3 に示す。測定対象は 3 環～6 環の PAH18 物質、SVOC は炭素数 C₁₇～C₂₀ の脂肪族炭化水素 4 物質とし、標準物質を用いて定量した。なお、GC/MS の検出モードについては、PAH は SIM モード、脂肪族炭化水素は SCAN モードで分析した。

結果

1 暴露チャンバー内 VOC、SVOC 及びアルデヒド類の濃度

図 1 に ND 群チャンバー内 VOC の GC/MS クロマトグラムを示す。エタノール(C₂)からヘキサデカン(C₁₆)まで、多種類の VOC が検出された。図中に物質名を示したピークのうち、硝酸メチル(保持時間4分のピーク)については、GC/MS のライブラリー検索により硝酸メチルであることが推定されたが、標準物質が入手できなかったため、確認・定量することができなかった。

図 2 に ND 群チャンバー内アルデヒド類の HPLC クロマトグラムを示す。多種類のアルデヒド類が検出され、ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドなど

の揮発性の高いアルデヒド類が主な成分であった。

表4に VOC、SVOC 及びアルデヒド類の分析結果を示す。数値は2回行った測定の平均値を表す(C₁₇～C₂₀ の脂肪族炭化水素については 1 回の測定値)。暴露チャンバー内からは 62 物質が検出された。それらのうち、炭素数 C₁₅ 以下の VOC、アルデヒド類については、H 群、ND 群とも共通した物質が検出され、H 群よりも ND 群の方が高濃度の物質が多かった。ヘキサデカン(C₁₆)～エイコサン(C₂₀)の脂肪族炭化水素については、いずれも ND 群よりも H 群の濃度の方が高かった。また、これらの SVOC については、ガス状だけでなく、粒子状としても存在することが考えられたため、粒子状/ガス状濃度を比較したところ、ほとんどがガス状として検出された(表 6)。

VOC の中で最も高濃度だったのは硫酸ジメチルで、H 群:654 μg/m³、ND 群:530 μg/m³であった。その他、100 μg/m³ 以上の濃度で検出された主な物質は、ノナン、デカン、トルエン、アセトン及び酢酸であった。アルデヒド類では、ホルムアルデヒドが最も高濃度で H 群、ND 群ともに約 600 μg/m³、次いでアセトアルデヒドが約 350 μg/m³、アクロレインが約 100 μg/m³であった。

以上の結果より、ディーゼル排出ガス中には、硫酸ジメチル、ホルムアルデヒド等、刺激性を有するガス状物質が高濃度に含まれていることが判明した。

2 暴露チャンバー内 PAH 濃度

表5に暴露チャンバー内 PAH の分析結果を示す。暴露チャンバー内で検出された 12 種の PAH について、H 群と ND 群とを比較すると H 群の方が高濃度に検出された物質が多かった。最も濃度が高かったのは、H 群のアセナフチレンで 736ng/m³、次いで H 群のフルオレン 623 ng/m³、フェナンスレン 538 ng/m³ の濃度が高かった。

表 6 に PAH の粒子状/ガス状別濃度を示す。H 群の測定値について、粒子状及びガス状濃度を

比較すると、3環の化合物(アセナフチレン、アセナフテン、フルオレン、フェナンスレン及びアントラセン)は、主にガス状として検出された。これに対し、4~6環の化合物及び酸素を有する2~3環の物質(アントラキノン及び1,8-ナフタル酸無水物)は、主に粒子状として検出され、これらの物質は粉塵に吸着して存在する割合が高いと考えられた。また、コントロール群及びND群については、4環の物質のうち、フルオランテン及びピレンについては、主にガス状として検出されたが、他の物質については、H群と同様に、3環の物質はガス状、含酸素化合物は粒子状として検出された。なお、粒子状/ガス状比を算出するにあたり、粒子状・ガス状のいずれかの濃度が定量下限値未満であった場合は、定量下限値の1/2を用いて比率を計算した。また、H群については、粉塵濃度をモニターしており、空気採取中のH群の粉塵濃度平均値は1.3mg/m³であった。

考察

今回の調査では、これまでディーゼル排出ガスにおける報告がほとんど無い硫酸ジメチルが検出された。硫酸ジメチルの測定法を検討した結果では、この物質は捕集管中での減少が早く、チャンバー内の空気採取後、直ちにGC/MS分析する必要があることがわかった。また、標準物質の調製における検討では、アルコールを希釈溶媒に使用した場合、硫酸ジメチルは溶媒と反応し、急速に濃度が減少することも判明した。したがって、今後、安定した捕集が可能な採取方法を検討するなどして測定法の改良を行い、排出ガス中の硫酸ジメチルの実態を把握する必要があると考えられた。

アルデヒド類の分析では、HPLCクロマトグラムのアセトアルデヒドの近くに大きなピークが出現したが、標準物質の中には相当する保持時間の物質が無かった。そこで追加実験を行ったところ、このピークはアルデヒド類ではなく、捕集剤のシリカゲルに含浸されたDNPH(2,4-ジニトロジニトロフェ

ニルヒドラジン)がチャンバー内の酸化性ガスにより分解し、生成した妨害物質であると推定された。

今回の調査では、揮発性の高いC₁₅以下の物質については、H群に比べND群の方が濃度の高い物質が多かった。したがって、これまで報告されてきた除塵ガス暴露における動物への影響については、これらのガス成分の寄与が推察された^{3,4)}。

今後の課題

今回の調査で、ディーゼル排出ガス中には多くの揮発性物質が含まれることが判明した。現在、首都圏等の都市域を走行するディーゼル車には粒子の排出規制が導入され、基準を満たさない車はDPFを装着する必要がある。規制の成果として都内大気中粒子状物質の濃度減少が報告されている。しかし、DPFでは粒子状物質を除去できるが、ガス状物質の除去効果については不明な点も多い。したがって、今後は実際にDPFを装着したディーゼルエンジンの排出ガスについても分析を行い、装着の有無によるガス状物質の濃度比較を行う予定である。

また、今回、高濃度に検出されたガス状物質には、ホルムアルデヒド等、刺激性を有する物質が多く含まれていた。そこで、これらのガス吸入時の肺への影響を調査するため、ガス状物質についての酸化ストレス能の検出手法を検討し、ディーゼル排出ガス中で酸化ストレス能に寄与する物質の検索を行う予定である。

今回検出された物質のうち、ディーゼル排出ガス中に主に含有され、東京都内においては、他からの排出の寄与が少ない物質として、ガス状物質では硫酸ジメチル、粒子状物質では1,8-ナフタル酸無水物⁵⁾が推察された。したがって、これらの物質については、ディーゼル排出ガスの暴露指標として使用可能かどうかの評価を行うことが、今後の課題と考えられた。

文献

- 1) 村上雅彦、横田久司:東京都環境科学研究所年報 2004、49-56 (2004)
- 2) 木下輝昭、横田久司、岡村 整、村上雅彦:東京都環境科学研究所年報 2006、25-32 (2006)
- 3) 渡辺伸枝、大沢誠喜、池野谷美奈、竹田健:東京都立衛生研究所年報、53、261-264 (2002)
- 4) 渡辺伸枝、大沢誠喜、西中彩菜、玉田智佳:東京都立衛生研究所年報、54、332-336 (2003)
- 5) 瀬戸 博、斎藤育江、大貫 文、竹内正博、土屋悦輝:第 40 回大気環境学会年会講演要旨集、606、津(1999)

表1 VOC 分析用 ATD-400 及び GC/MS 条件

ATD-400 分析条件	
オープン温度	: 350
脱着時間	: 10min
脱着流量	: 50ml/min
2次トラップ	: Carbo-pack-C +Carbo-pack-B+Carboxen 1000
2次トラップ温度	: 30
2次脱着温度	: 350
2次脱着時間	: 5min
2次スプリット比	: 1 : 10
トランスファライン	: 200
バルブ温度	: 200
GC/MS 分析条件	
カラム	: DB-1(30m×0.25mm i.d.、1µm)
カラム温度	: 40 (3min)-12 /min-220 (2min)-20 /min-300 (1min)
キャリアーガス	: He(カラムヘッド圧 40kPa)
インターフェース温度	: 250
検出モード	: SCAN(m/z 40-400)

表2 アルデヒド分析用 HPLC 条件

カラム	: ZORBAX Bonus RP 4.6mm i.d. × 250mm
流速	: 1.0ml/min
カラム温度	: 40
注入量	: 10µl
検出波長	: 360nm
移動相 A	: 0.1%テトラヒドロフラン含有 50%アセトニトリル/水
移動相 B	: 0.1%テトラヒドロフラン含有 80%アセトニトリル/水
グラジエント条件	
	Time(min) A(%) B(%)
	0 70 30
	14 70 30
	17 0 100
	26 0 100
	27 70 30
	35 70 30

表3 PAH 及び SVOC 分析用 GC/MS 条件

カラム	: DB-1(30m×0.25mm i.d.、1μm)
カラム温度	: 90 (2min)-15 /min-300 (12min)
キャリアーガス	: He(カラムヘッド圧 70kPa)
インターフェース温度	: 250
イオン源温度	: 260 度
検出モード	: SIM(PAH 分析)あるいは SCAN(SVOC 分析)

物質名	定量用イオン	確認用イオン
アセナフチレン	152	153
アセナフテン	154	155
フルオレン	166	167
フェナンスレン	178	179
アントラセン	178	179
フルオランテン	202	203
ピレン	202	203
ベンゾ(a)アントラセン	228	229
クリセン	228	229
ベンゾ(b)フルオランテン	252	253
ベンゾ(k)フルオランテン	252	253
ベンゾ(a)ピレン	252	253
ジベンゾ(ah)アントラセン	278	279
インデノ[123-cd]ピレン	276	277
ベンゾ(ghi)ペリレン	276	277
アントラキノ	180	208
フェナントラキノ	180	208
1,8-ナフタル酸無水物	198	154

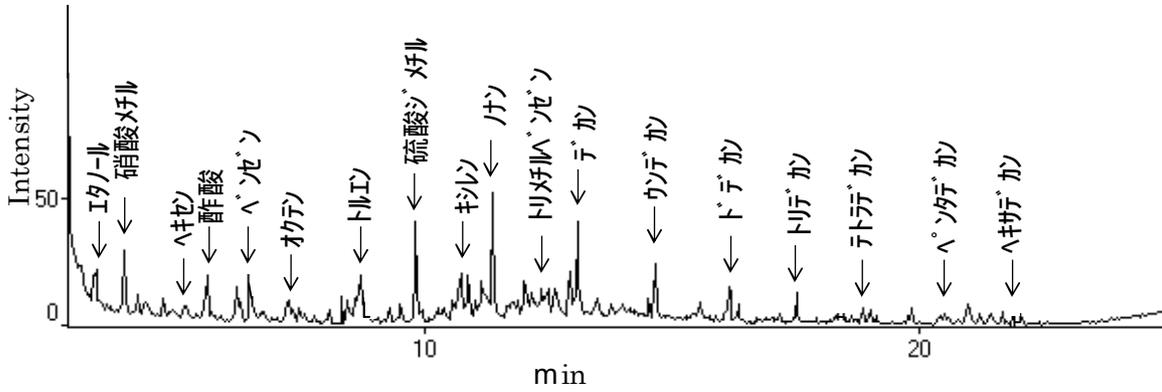


図1 暴露チャンバー(ND群)内 VOC の GC/MS クロマトグラム

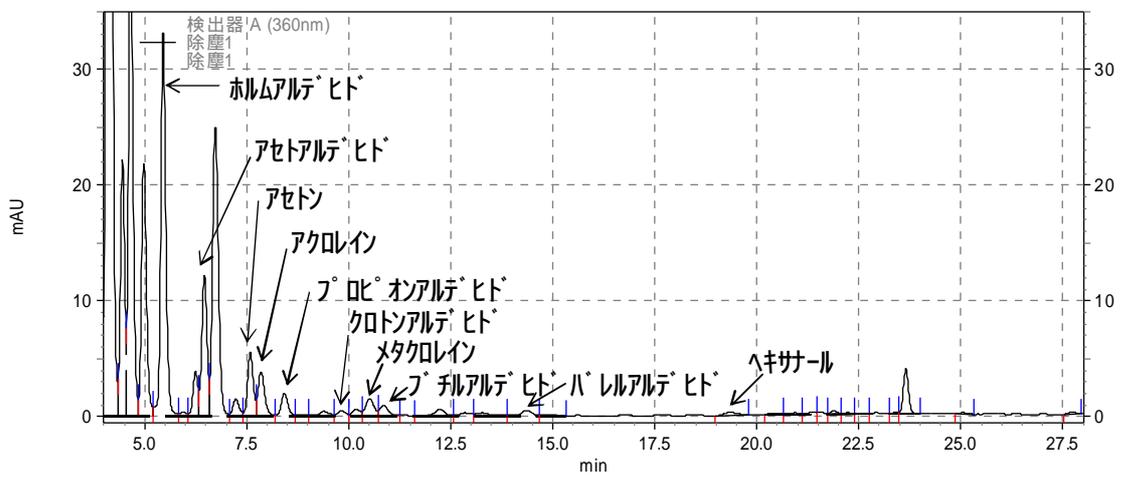


図2 暴露チャンバー(ND群)内アルデヒド類の HPLC クロマトグラム

表 4-1 ディーゼル暴露チャンバー内 VOC、SVOC 及びアルデヒド類分析結果 μg/m³

物質名		コントロール	全ガス	除塵	
脂肪族	ヘキサン	18.0	28.0	25.6	
炭化水素	ヘプタン	0.75	10.0	14.2	
	オクタン	0.76	23.0	47.7	
	ノン	2.5	142	247	
	デカン	2.2	117	154	
	ウンデカン	1.0	53.4	81.8	
	ドデカン	0.74	31.4	58.6	
	トリデカン	0.72	18.5	41.7	
	テトラデカン	<0.50	14.8	37.8	
	ペンタデカン	<0.50	13.5	13.7	
	ヘキサデカン	<0.50	15.7	4.9	
	ヘプタデカン	<0.50	20.7	2.8	
	オクタデカン	<0.50	11.5	0.94	
	ノナデカン	<0.50	6.4	<0.50	
	エイコサン	<0.50	3.1	<0.50	
	2,4-ジメチルペンタン	0.84	2.1	2.5	
	2,2,4-トリメチルペンタン	<0.50	3.6	7.2	
	シクロヘキサン	13.9	8.1	8.0	
	メチルシクロヘキサン	1.2	16.6	22.6	
	ヘキセン	11.9	44.8	86.1	
	ヘプテン	1.0	52.6	110	
オクテン	3.3	37.8	56.8		
芳香族	ベンゼン	4.3	63.5	98.1	
炭化水素	トルエン	11.4	115	120	
	キシレン	3.2	45.0	69.0	
	エチルベンゼン	3.1	27.5	34.3	
	スチレン	1.1	13.4	14.8	
	エチルトルエン	1.8	57.3	84.5	
	1,3,5-トリメチルベンゼン	<0.50	11.4	15.4	
	1,2,4-トリメチルベンゼン	1.3	34.7	45.5	
	1,2,3-トリメチルベンゼン	<0.50	12.4	17.9	
	1,2,4,5-テトラメチルベンゼン	<0.50	3.7	5.1	
	p-シメン	<0.50	4.0	3.6	
	4-エチル-1,2-ジメチルベンゼン	<0.50	6.0	7.2	
	ナフタレン	1.9	46.3	69.1	
	エステル類	酢酸エチル	13.7	3.0	1.6
		酢酸ブチル	<0.50	4.0	4.8
硫酸ジメチル		<0.50	654	530	

表 4-2 ディーゼル暴露チャンバー内 VOC、SVOC 及びアルデヒド類分析結果 μg/m³

	物質名	コントロール	全ガス	除塵	
ハロゲン類	ジクロロメタン	21.3	2.8	7.3	
	クロロホルム	19.5	9.3	6.4	
	1,2-ジクロロエタン	<0.50	<0.50	<0.50	
	1,1,1-トリクロロエタン	0.78	<0.50	<0.50	
	四塩化炭素	3.1	<0.50	<0.50	
	1,2-ジクロロジメチルエタン	<0.50	<0.50	<0.50	
	ブromoジクロロメタン	9.9	8.6	15.4	
	トリクロロエチレン	5.7	<0.50	<0.50	
	ジブromoジクロロメタン	3.4	<0.50	<0.50	
	テトラクロロエチレン	1.9	<0.50	<0.50	
	p-ジクロロベンゼン	1.7	4.8	4.6	
アルコール類	エタノール	55.3	96.4	96.9	
	2-プロパノール	19.5	4.7	2.8	
	1-プロパノール	0.87	<0.50	<0.50	
	ブタノール	4.6	10.2	10.5	
	2-エチル-1-ヘキサノール	0.71	0.81	1.4	
アルデヒド類	ホルムアルデヒド	6.9	647	581	
	アセトアルデヒド	7.4	333	387	
	プロピオンアルデヒド	0.56	73.1	88.4	
	クロトンアルデヒド	<0.50	16.8	22.2	
	ブチルアルデヒド	<0.50	51.3	63.0	
	ペンタンアルデヒド	0.94	19.7	24.1	
	ヘキシルアルデヒド	<0.50	38.9	48.0	
	イソヘキシルアルデヒド	<0.50	<0.50	<0.50	
	トルアルデヒド	<0.50	<0.50	<0.50	
	ヘキサアルデヒド	<0.50	<0.50	36.8	
	2,4-ジメチルペンタンアルデヒド	<0.50	<0.50	<0.50	
	ヘプタアルデヒド	<0.50	<0.50	<0.50	
	オクタアルデヒド	<0.50	<0.50	<0.50	
	ノナール	1.3	36.2	42.8	
	デカール	1.2	15.9	19.0	
	アクリレイン	<0.50	99.6	116	
	メタクロレイン	<0.50	72.6	84.3	
	酸類	酢酸	10.3	111	202
	ケトン類	2-ブタノン	0.57	23.2	27.1
アセトン		12.4	114	153	
シクロヘキサノン		<0.50	<0.50	<0.50	
4-メチル-2-ヘキサンオン		<0.50	0.69	<0.50	

表5 ディーゼル暴露チャンバー内 PAH 分析結果 ng/m³

	物質名	コントロール	全ガス	除塵
多環芳香族	アセナフレン	1.6	736	51.7
炭化水素	アセナフテン	10.0	20.3	37.2
	フルレン	12.1	623	314
	フェナンスレン	17.7	538	67.3
3環	アントラセン	<0.50	18.8	<0.50
	フルオランテン	1.1	30.7	1.3
	ピレン	<0.50	64.6	1.1
	ベンゾ(a)アントラセン	<0.50	2.1	<0.50
4環	クリセン	<0.50	7.8	1.1
	ベンゾ(b)フルオランテン	<0.50	0.88	<0.50
	ベンゾ(k)フルオランテン	<0.50	<0.50	<0.50
	ベンゾ(a)ピレン	<1.0	<1.0	<1.0
5環	ジベンゾ(ah)アントラセン	<1.0	<1.0	<1.0
	インデノ(123-cd)ピレン	<1.0	<1.0	<1.0
6環	ベンゾ(ghi)ペリレン	<5.0	<5.0	<5.0
	アントラキノン	<1.0	64.1	<1.0
	フェンアントラキノン	<5.0	<5.0	<5.0
含酸素	1,8-ナフタ酸無水物	3.4	281	1.0

表6 ディーゼル暴露チャンバー内 PAH, SVOC の粒子状/ガス状別濃度(粒子状/ガス状比) ng/m³

	物質名	コントロール	全ガス	除塵
多環芳香族	アセナフレン	<0.50/1.6 (0.16)	1.3/734 (0.002)	<0.50/51.7(0.004)
炭化水素	アセナフテン	<0.50/10.0(0.03)	<0.50/20.3(0.01)	<0.50/37.2(0.007)
	フルレン	<0.50/12.1(0.02)	2.4/620 (0.004)	<0.50/314(0.0008)
	フェナンスレン	<0.50/17.7(0.01)	22.3/516 (0.04)	<0.50/67.3(0.004)
	アントラセン	-	3.5/15.3(0.22)	-
	フルオランテン	<0.50/1.1 (0.27)	25.1/5.7 (4.4)	<0.50/1.3 (0.19)
	ピレン	-	56.7/7.9 (7.1)	<0.50/1.1 (0.23)
	ベンゾ(a)アントラセン	-	2.1/<0.50(8.4)	-
	クリセン	-	7.8/<0.50(31.2)	1.1/<0.50 (4.4)
	ベンゾ(b)フルオランテン	-	0.88/<0.50(3.5)	-
	ベンゾ(k)フルオランテン	-	-	-
	ベンゾ(a)ピレン	-	-	-
	ジベンゾ(ah)アントラセン	-	-	-
	インデノ(123-cd)ピレン	-	-	-
	ベンゾ(ghi)ペリレン	-	-	-
	アントラキノン	-	64.1/<1.0 (128)	-
	フェンアントラキノン	-	-	-
	1,8-ナフタ酸無水物	3.4/<0.50(13.6)	281/<0.50(1130)	1.0/<0.50 (4.0)
脂肪族炭化水素	ヘプタカ	-	<0.50/20.7(0.01)	<0.50/2.8 (0.09)
	オクタカ	-	<0.50/11.5(0.02)	<0.50/0.94 (0.27)
	ノナカ	-	<0.50/6.4 (0.04)	-
	イコサン	-	0.67/2.4 (0.28)	-

用語解説

項目	説明
APF	<p>活性酸素検出試薬であるaminophenyl fluoresceinの略称。 化学名は2-[6-(4'-amino) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid。</p>
CPN血漿	<p>血液の凝固試験に用いられる標準血漿のひとつ。Axis-Shield社製のControl Plasma Normalの略称。</p>
DPF	<p>Diesel Particulate Filter ディーゼルエンジンの排出ガス中の粒子を減少させるフィルター装置。セルフクリーニング機能を組み込んだり、触媒を添加することで一酸化炭素や炭化水素を減少させる装置もある。再生方式には、交互再生方式、連続再生方式、間欠再生方式、添加剤再生方式等がある。</p>
EIA	<p>Enzyme Imunoassayの略 酵素免疫定量法</p>
ELISA	<p>Enzyme-Linked Immunosorbent Assayの略。 酵素で標識した抗原や抗体を用い、試料中の抗原や抗体を検出・定量する方法。EIAと同義語に使われることが多い。</p>
HEPAフィルタ	<p>High Efficiency Particulate Air filter エアフィルター的一种。粒径が0.3 μmの粒子に対して99.97%以上の粒子捕集率を持つ。</p>
HPF	<p>活性酸素検出試薬であるhydroxyphenyl fluoresceinの略称。 化学名は2-[6-(4'-hydroxy) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid。</p>
IgE抗体	<p>免疫グロブリンの一種で、マスト細胞に作用してヒスタミン等の脱顆粒を引き起こす。</p>
IL-12	<p>インターロイキン12。マクロファージなどから産生されるサイトカイン。分子量約70,000の糖タンパク質。ナチュラルキラー細胞、T細胞からIFN-γの産生を誘導し、ナチュラルキラー細胞、T細胞の細胞傷害性を高め、ナイーブT細胞に抗原提示細胞と共に作用してTh1細胞への分化を促進するなど、免疫反応に重要な働きをしている。</p>
IL-4	<p>インターロイキン4。Th2細胞、肥満細胞から産生されるサイトカイン。分子量約20,000の糖タンパク質。ナイーブT細胞からTh2細胞への分化を促進する。IgE産生には必須のサイトカインである。</p>
IFN-	<p>インターフェロンガンマ。Th1細胞より産生されるサイトカイン。分子量約20,000の糖タンパク質。細胞性免疫の促進に働く。抗ウイルス作用、免疫系に対する作用、細胞増殖抑制作用、マクロファージ活性化作用、ナチュラルキラー細胞活性化作用、抗腫瘍作用などがある。</p>
MCD	<p>次亜塩素酸と反応する化学物質Monochlorodimedon (2-chloro-5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione) の略称。</p>
PM _{2.5}	<p>大気中の粒子状物質のうち大きさが2.5ミクロン以下のもの</p>
RT-PCR	<p>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応のことでRNAの証明に用いる。</p>
SM P30	<p>Senescence Marker Protein-30, 加齢指標蛋白質30。加齢に伴い著しく減少する分子量34,000Daのタンパク質である。</p>
SRM1648	<p>アメリカ国立標準技術研究所(NIST)が提供する標準試料(SRM)のひとつでリスト番号1648であるミズーリ州セントルイスで採取された都市大気中の粒子状物質</p>
SVOC	<p>Semi-volatile Organic Compounds 準揮発性有機化合物。WHOの定義では、沸点が240-260 ~ 380-400 の範囲の有機化合物。VOCよりも沸点が高く、蒸気圧は低い。</p>
TGF-1,3	<p>Transforming Growth Factor, 形質転換成長因子。細胞を形質転換させ増殖を促進させる因子。</p>

VOC
<p>Volatile Organic Compounds 揮発性有機化合物。WHOの定義では、沸点が50-100 ~ 240-260 の範囲の有機化合物。</p>
VRP血漿
<p>血液の凝固試験に用いられる標準血漿のひとつ。Biomerieu社製のVerify Reference Plasmaの略称。</p>
アクロレイン
<p>分子式:CH₂CHCHO、分子量:56.07、CAS:107-02-8、沸点:52.5 【特徴】常温で黄色または無色の液体。揮発性があり、強い刺激臭を有する。不快な息の詰まるような臭気。光に不安定。 【用途】主に栄養強化剤や飼料添加物、医薬品に使われるメチオニンの製造原料として用いられるほか、アクリル酸エステル(アクリル繊維などの原料)の製造原料、繊維処理剤などとして使われる。 【毒性・影響】吸入:鼻、喉への刺激、咳、呼吸困難、眼:炎症、刺激、皮膚:痛み、炎症、経口摂取:腹痛、吐き気 【基準・評価】OSHA許容濃度:0.1ppm、NIOSH許容濃度:0.1ppm、短時間(15分以下)暴露:0.3ppm、ACGIH許容濃度(天井値):0.1ppm、IARC:グループ3(発がん性を分類できない)、1ppm=2.29mg/m³、環境省:「有害大気汚染物質」、PRTR:第一種指定化学物質</p>
アジュバント作用
<p>抗体産生や細胞免疫の強化。</p>
オッズ比
<p>罹患率などある事象がおこる確率と起こらない確率の比(オッズ)について、対照となるグループ(非曝露群)のオッズに対する患者グループ(曝露群)のオッズの比率をさす。</p>
外因性凝血試験
<p>2系列ある凝血を起こす仕組みのうち、外部刺激によって起こる(外因性)とされる仕組みで凝血を起こさせる試験。</p>
活性酸素種
<p>酸素分子より活性の高い酸素をもつ分子の総称。広義にはフリーラジカルを含む場合もある。Reactive Oxygen Speciesの訳でROSと略称される。</p>
活性トロンボプラスチン時間
<p>血液が凝固するときの内因系因子の異常を調べる検査に用いる凝固時間(秒)</p>
感作
<p>生体に特定の抗原を与え、同じ抗原の再刺激に感じやすい状態にすること。</p>
凝固線溶系
<p>生体もつ血液が凝固するためのしくみと凝固した血液を溶かすためのしくみの両方をさす用語。</p>
クリアランス
<p>浄化、清掃。注目している臓器・場所等から外部への排除・除去。</p>
クレアチニン
<p>生体内で生成され尿中へ排出される。その尿中排出量は体重当たりほぼ一定しており食事性因子や尿量などにはほとんど影響されない。</p>
血漿の活性率
<p>粉末化された血漿を所定の濃度になるよう精製水で溶解した場合を100%としたとき、さらに生理食塩水で薄めた場合の、例えば2倍に薄めた場合は50%となる割合を示す。</p>
コチニン
<p>ニコチンの代謝産物。</p>
サイトカイン
<p>細胞が産生するタンパク質で、それに対する受容体を持つ細胞に働く。免疫、炎症反応の制御作用、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、細胞増殖・分化の調節作用などがある。</p>
心筋細胞のイオンチャンネル変化
<p>心臓の筋肉細胞におけるその生理的变化を左右するカルシウムなどイオン量の変化。</p>
スーパーオキシドアニオン
<p>活性酸素でもありフリーラジカルでもある酸素原子2個からなる分子。</p>
チトクロムP450
<p>ミクロソームおよびミトコンドリアに存在し、主として薬物代謝を行う。</p>

<p>内因性凝血試験</p> <p>2系列ある凝血を起こす仕組みのうち、外因性でない(内因性)仕組みで凝血を起こさせる試験。</p>
<p>内膜中膜比</p> <p>頸動脈など血管を形成する内膜と中膜の厚さの比で循環器系疾患の指標。高コレステロールなどで内膜は肥厚する。</p>
<p>肺胞 型細胞</p> <p>肺胞に存在する扁平な上皮細胞で、呼吸機能をつかさどる。</p>
<p>肺胞 型細胞</p> <p>肺胞に存在する立方型の大型上皮細胞で、リン脂質を分泌している。</p>
<p>ヒドロキシラジカル</p> <p>活性酸素でもありフリーラジカルでもある酸素と水素からなる分子。鉄などと過酸化水素が反応して生成するフェントン反応が有名である。</p>
<p>フリーラジカル</p> <p>不対電子とよばれる反応性の高い電子をもった分子の一般名。</p>
<p>プロトンピン時間</p> <p>外因性による血液の凝固が血液中のプロトンピンという物質がトロンピンに変化することによる検査において、その凝固するまでに要する時間(秒)をさす。</p>
<p>ホルムアルデヒド</p> <p>分子式:HCHO、分子量:30.03、CAS:50-00-0、沸点:-19.2</p> <p>【特徴】刺激臭を有する無色の気体(窒息性)。水に可溶で35%~37%の水溶液はホルマリンと呼ばれる。</p> <p>【用途】フェノール樹脂、尿素樹脂、メラミン樹脂の原料。防腐剤、繊維の縮み防止加工剤など、さまざまな用途の材料として用いられる。</p> <p>【毒性・影響】吸入:鼻、喉への刺激、咳、呼吸困難、ぜん息の引き金、動物で発がん性、眼:炎症、刺激、皮膚:炎症、アレルギー症状</p> <p>【基準・評価】OSHA許容濃度:0.75ppm、短時間(15分以下)暴露:2ppm、NIOSH許容濃度:0.016ppm、短時間(15分以下)暴露:0.1ppm、ACGIH許容濃度(天井値):0.3ppm、厚生労働省室内空気濃度指針値:0.08ppm、IARC:グループ1(発がん性がある)、1ppm=1.23mg/m³、環境省:「有害大気汚染物質」、PRTR:第一種指定化学物質、医薬外用劇物</p>
<p>リアルタイムPCR</p> <p>ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅を経時的(リアルタイム)に測定することで、増幅率に基づいて鋳型となるDNAの定量を行なう。</p>
<p>硫酸ジメチル</p> <p>分子式:(CH₃O)₂SO₂、分子量:126.13、CAS:77-78-1、沸点:188 (分解を伴う)</p> <p>【特徴】無色の油状液体。タマネギに似た弱い悪臭を有する。冷時徐々に、熱または酸の存在により速やかに分解する。分解生成物はモノメチル硫酸、硫酸、メタノールなどである。</p> <p>【用途】フェノール類、アミン、チオールメチル化剤として、有機合成に用いられる。</p> <p>【毒性・影響】吸入:焦燥感、咳、頭痛、喉の炎症、眼:充血、痛み、かすみ、皮膚:痛み、炎症、水泡、経口摂取:腹痛、焦燥感、痙攣、下痢、ショック、虚脱</p> <p>【基準・評価】日本産業衛生学会:許容濃度:0.1ppm、OSHA許容濃度:0.1ppm(皮膚)、ACGIH許容濃度(天井値):0.1ppm、IARC:グループ2A(おそらく発がん性がある)、1ppm=5.16mg/m³、環境省:「有害大気汚染物質」、米国、イギリス、カナダ、韓国でPRTR対象物質</p>
<p>リンパ流</p> <p>リンパ液の流れ。</p>
<p>海外の毒性評価機関</p> <p>OSHA Occupational Safety and Health Administration</p> <p>NIOSH National Institute for Occupational Safety and Health</p> <p>ACGIH American Conference of Government Industrial Hygienist</p> <p>IARC International Agency for Research on Cancer</p>