

平成21年5月1日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17310039

研究課題名（和文）大気浮遊微小粒子およびその主要成分の生体影響メカニズムとリスク評価

研究課題名（英文） Risk evaluation and toxicity mechanism of air-borne particulate matter and its major chemical components.

研究代表者

八木 孝司（YAGI TAKASHI）

大阪府立大学 産学官連携機構・教授

研究者番号：80182301

研究成果の概要：

堺市で採取した大気浮遊粒子の変異原性および内分泌攪乱性（ダイオキシン受容体およびエストロゲン受容体リガンド活性）を確認した。その主たる成分であるベンゾ（a）ピレン、1, 8-ジニトロピレン、3, 6-ジニトロベンゾ（e）ピレン、3-ニトロベンズアントロン、4-アミノビフェニルの突然変異誘発機構を分子・細胞生物学的方法で調べ、それらに共通した細胞周期特異的な DNA 損傷応答、および損傷に特異的な DNA ポリメラーゼの関与と突然変異誘発性を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	4,800,000	0	4,800,000
2006年度	3,800,000	0	3,800,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
総計	15,400,000	2,040,000	17,440,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：大気汚染、粒子状物質、環境変異原、がん、リスク

1. 研究開始当初の背景

我が国では大気中に浮遊する $10\mu\text{m}$ 以下の粒子状物質 (PM) を大気汚染物質として環境基準が定められているが、大都市域では基準が達成されていない地点が多くある。米国では 1997 年環境保護局 (EPA) によって、粒径 $2.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒子 (PM_{2.5}) を対象とする新たな基準が導入された。これは疫学研究によって微小粒子濃度と推定死亡率や肺がん罹患率との間に有意な相関が認められたためである。そのため米国ではその健康影響評価プロジェクトが進行している。一方、我

が国でも平成 12 年度より環境省が曝露影響調査や疫学的方法によるリスク評価を進めている。文科省においても平成 13～16 年度、特定領域研究「微粒子の環境影響」が行われたが、環境工学的研究に限られた。このような状況では、今なお微小粒子のヒトの健康に対する影響は十分明らかにはなっていない。微小粒子の主たる起源はディーゼル車排ガスで、その主成分は炭化水素であるが、組成は各国によって異なり複雑である。また発がん性のみがその健康影響ではない。動物発がん実験データをヒトへ外挿する上で、感

受性の動物種差も明らかでない。最近ではカーボンナノ粒子と呼ばれる $0.1\mu\text{m}$ 以下の粒子が肺胞より短時間で血流に入り、脳に蓄積することが報告され、粒径とリスクとの関係がいっそう複雑になった。このように今後さらなる研究が必要とされている。

2. 研究の目的

申請者らは日本国内（大阪）で大気浮遊粒子をサンプリングして、その粒径分布とその化学組成を分析し、微小（炭素）粒子およびその主要成分の健康影響、特に変異原性と内分泌攪乱性を、細胞生物学・分子生物学的方法によって定量的解析・メカニズム解析することを目的とした。具体的には次の4つのことを明らかにすることを目標とした。

(1) 都市（大阪府堺市）における大気浮遊粒子の粒径分布と化学組成、およびそれらの経時変化の解明。

(2) 微小粒子の突然変異原性、内分泌攪乱性の定量的解析と新規成分の同定。

(3) 微小粒子主要成分によるヒト細胞とマウス細胞における突然変異メカニズムの解明、およびそのヒトとマウスにおける種差の解明。

(4) 微小粒子のヒト健康リスク評価の試み。

これらの研究結果は生理的薬物動態法によるリスク評価のパラメーターとなり、環境基準の策定に役立ち、また大気浮遊粒子の発生源での改善や、肺がん罹患率低下に貢献すると考える。

3. 研究の方法

(1) 大気浮遊粒子の採取と化学組成の分析

大阪府堺市の実大気についてロープレッシャインパクトで粒径別に分取した大気浮遊粒子試料を2週間ごとに連続して採取し、分析用試料を蓄積した。また、同時にハイボリュームエアサンプラで粒径分離しないフィルター試料を採取した。結果はChemical Mass Balance法で解析した。採取した大気微小粒子の化学成分分析は必要に応じて中性子放射化システム、蛍光X線分析装置、PIXE分析装置、イオンクロマト分析装置、炭素分析装置等を用いて行い、粒子粒径と化学成分との関係を求めた。

(2) 大気中微小粒子の突然変異原性と内分泌攪乱性の測定

大気微小粒子はジメチルスルホキシドに溶解し、突然変異誘発能を、ヒスチジン要求性からの復帰変異コロニー数を指標にしてサルモネラ菌 TA98、TA100、YG1024、YG1029株を用いたAmes Testで調べた。変異原性について微小粒子の粒径別、年次ごとに調べた。大気中微小粒子およびその成分を2種類の内

分泌攪乱性、すなわちアリルヒドロカーボンレセプター (Ahr) に結合する活性、およびエストロゲン受容体 (ER) に結合する活性について、出芽酵母を用いたレポーターアッセイ法で調べた。

(3) 大気中微小粒子主成分の突然変異特性・突然変異機構の解析

成分解析によって明らかになった大気中微小粒子に特徴的な成分（ジニトロピレン類、ニトロベンズアントロン類、ベンツピレン類）について詳しく解析した。DNA塩基配列レベルでの突然変異特性を比較するために動物細胞と大腸菌で複製できるシャトルベクタープラスミドを用いた。さらに突然変異機構を解析するために、ニトロベンツアントロン類、アミノビフェニル類による塩基付加体が lacZ 遺伝子に部位特異的に1個だけ入ったプラスミドを作成し、大腸菌および動物細胞で複製させて損傷乗り越え DNA 複製による突然変異機構を検討した。

(4) 大気浮遊粒子のリスク評価

大気に浮遊する土壌粒子に多く含まれる重金属や塩素系有機化合物の中には神経毒性を有するものが存在する。本研究では、in vitro blood brain barrier モデルを用いて、これらの物質の血液-脳関門透過率を決定し、生理的薬物動態 (PBPK) モデルに組み込むことで、脳への移行率を推定した。また神経細胞 C6、PC12、CCF-STTG1、NT2 等の培養細胞を用いた細胞毒性試験等から、神経毒性リスクを評価する方法について検討した。

4. 研究成果

大気中に浮遊する粒径 $2.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒子 (PM_{2.5}) 濃度は推定死亡率や肺がん罹患率との間で有意な相関が認められている。微小粒子の主たる起源はディーゼル車排ガスであり、その主成分は多環芳香族炭化水素である。

堺市で捕集した大気浮遊粒子の粒径分布は $2\mu\text{m}$ 付近と $10\mu\text{m}$ 付近を中心とした2つのピークを持ち、変異原性は $2\mu\text{m}$ 以下の粒子が強かった。大気浮遊粒子には変異原性の他に AhR 受容体に結合する活性と、弱い ER 受容体に結合する活性があった。すなわち大気浮遊粒子は内分泌攪乱活性も有する可能性が示された。季節ごとの推移では、単位大気量あたりの変異原活性が冬に高く、夏に低いことがわかった。このことは化石燃料の使用量と大気の滞留が影響していると考えられた。

大気浮遊粒子中に近年発見された強力な変異原物質 3-ニトロベンズアントロン (NBA) をヒト細胞に処理し、DNA 中の NBA 付加体を高速液体クロマトグラフ・タンデム質量計で定量した。dG-C8-C2-ABA 付加体および dG-C8-N-ABA 付加体は 10^7 グアニン当たり 100

〜1000 個、dA-N6-C2-ABA 付加体は 10〜100 個であった。また dA-N6-C2-ABA 付加体は損傷部位で DNA 合成が停止しないことから、NBA による突然変異誘発や致死にはほとんど関与していないことがわかった。

NBA は主になが G→T のトランスバージョンをひき起こした。これらの付加体はヌクレオチド除去修復 (NER) により修復されることがわかった。グアニン付加体のうち、dG-N⁶-ABA が突然変異に対する寄与度の高い付加体であり、dG-N⁶-ABA は大腸菌では SOS 誘導によって誘導される DNA ポリメラーゼ IV, V で TLS されることがわかった。突然変異頻度は低かった。

近年大気浮遊粒子中に発見された強力なエームス試験陽性変異原物質 3,6-ジニトロベンゾ e ピレン (3,6-DNB[e]P) の細胞に対する遺伝毒性を 1,8-ジニトロピレン (1,8-DNP) と比較した。ヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞に 3,6-DNB[e]P または 1,8-DNP を処理し、姉妹染色分体交換 (SCE)、小核誘導、 γ H2AX 誘導、突然変異誘発を調べた。3,6-DNB[e]P はほぼ飽和濃度の 1 μ g/mL 処理で、SCE、小核、 γ H2AX を有意に誘導したが、そのレベルはわずかであった。また突然変異誘発も起こすかどうかの境界レベルであった。一方、1,8-DNP はいずれの指標によっても高くはないが有意に genotoxicity を示した。この結果はヒトとサルモネラの種差を示しており、ヒト細胞ではニトロ基が還元されにくく活性体になりにくいために毒性が低いと考えられた。

4 アミノビフェニル (4-ABP) がプラスミドの p53 遺伝子コドン 248 配列のグアニンにある場合、TLS 率は 36% であり、強い DNA 合成阻害が見られた。大腸菌では 80% が乗り越えられるという以前の結果とは大きく異なった。この結果は大腸菌とヒトとの生物種差を反映しているものと考えられる。TLS されたプラスミドのうち 4% に変異を生じていた。変異のパターンは G→T が最も多く見られた。一方、コドン 249 配列のグアニンにある場合、TLS 率は 77% であり、強い DNA 合成阻害は見られなかった。また、変異誘発も 1% と低くなることがわかった。このように dG-ABP の TLS は周辺配列に大きく影響を受けることがわかった。

in vitro blood brain barrier エンドサルファンについては 10 μ M において 0.47 \pm 0.09 $\times 10^3$ cm/min と求められ、構築された PBPK モデルでは血液脳分配率は 1.45 にて動物実験データと良好に適合することが確認された。また、神経細胞毒性試験の結果からは、LC50 は 10〜50 μ M と求められた。

エンドサルファンの一般人の血中濃度は ND〜0.6 ng/L (=1.4 $\times 10^{-9}$ μ M) と報告されており、この一般環境中エンドサルファンの曝

露による神経毒性リスクはきわめて低いと推測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Kawanishi, M., Watanabe, T., Hagio, S., Ogo, S., Shimohara, C., Jouchi, R., Takayama, S., Hasei, T., Hirayama, T., Oda, Y. and Yagi, T. Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells in vitro and in vivo. Mutagenesis, in press, 2009. (査読有)
- ② Sawai, T., Kawanishi, M., Takamura-Enya, T. and Yagi, T. Establishment of a method for analyzing translesion DNA synthesis across a single bulky adduct in human cells. Genes Environ., 31 (1), 24-30, 2009. (査読有)
- ③ Shimohara, C., Sawai, T. and Yagi, T. Polyaromatic hydrocarbons cause histone H2AX phosphorylation in the S-phase of the cell cycle. Genes Environ., 30 (3), 92-99, 2008. (査読有)
- ④ Nishida, H., Kawanishi, M., Takamura-Enya, T., Yagi, T. Mutagenic specificity of N-acetoxy-3-aminobenzanthrone, a major metabolically activated form of 3-nitrobenzanthrone, in shuttle vector plasmids propagated in human cells. Mutat Res., 654, 82-87, 2008. (査読有)
- ⑤ Takamura-Enya, T., Kawanishi, M., Yagi, T. and Hisamatsu, Y. Structural identification of DNA adducts derived from 3-Nitrobenzanthrone, a potent carcinogen present in the atmosphere. Chem. Asian J., 2, 1174 - 1185, 2007. (査読有)
- ⑥ Kanno, T., Kawanishi, M., Takamura-Enya, T., Arlt, V. M., Phillips, D. H., Yagi, T. DNA adduct formation in human hepatoma cells treated with 3-nitrobenzanthrone: analysis by the ³²P-postlabeling method. Mutat. Res., 634, 184-191, 2007. (査読有)
- ⑦ Lee, H.M., Okuyama, K., Mizohata, A., Kim, T.O., Koyama, H. Fabrication of reference filter for measurement of EC (elemental carbon) and OC (Organic carbon) in aerosol particles. Aerosol Sci. Technol., 41, 281-294 2007. (査読有)
- ⑧ Arlt, V. M., Schmeiser, H. H., Osborne, M. R., Kawanishi, M., Kanno, T., Yagi, T., Phillips D. H. and Takamura-Enya, T. Identification of three major DNA adducts

formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in rat lung at the C8 and N2 position of guanine and at the N6 position of adenine. *Int. J. Cancer*, 118(9): 2139-2146, 2006. (査読有)

⑨ 伊藤憲男、溝畑朗. 堺で観測した大気エアロゾル粒子の長期(1986-2004)観測結果. *エアロゾル研究*, 21, 297-304, 2006. (査読有)

⑩ Chan M. P., Morisawa, S., Nakayama, A., Kawamoto, Y., Yoneda, M., Development of an in vitro blood-brain barrier model to study the effects of endosulfan on the permeability of tight junctions and a comparative study of the cytotoxic effects of endosulfan on rat and human glial and neuronal cell cultures, *Environ. Toxicol.*, 21 (3), 223-235, 2006. (査読有)

⑪ Chan, M. P., Morisawa, S., Nakayama, A., Kawamoto, Y., Sugimoto, M., Yoneda, M. A physiologically based pharmacokinetic model for endosulfan in the male Sprague-Dawley rats, *Environ. Toxicol.*, 21(5), 464-478, 2006. (査読有)

[学会発表] (計13件)

① 西田裕, 川西優喜, 高村岳樹, 八木孝司. 3-ニトロベンズアントロン-DNA 付加体の損傷乗り越えと突然変異. 日本環境変異原学会第37回大会. 2008年12月4-6日. 那覇市.

② 萩尾宗一郎, 尾後早耶佳, 川西優喜, 渡辺徹志, 小田美光, 八木孝司. ヒト細胞を用いた、3,6-Dinitrobenzo [e] pyrene の遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第37回大会. 2008年12月4-6日. 那覇市.

③ 椎崎一宏, 川西優喜, 八木孝司. TCDD は HepG2 細胞におけるベンゾ [a] ピレンの DNA 付加体形成を抑制する. 日本環境変異原学会第37回大会. 2008年12月4-6日. 那覇市.

④ 川西優喜, 西田裕, 八木孝司. 大気汚染物質 3-ニトロベンズアントロンによる DNA 付加体の生成と TLS・突然変異. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会. 2008年12月9-12日, 神戸市.

⑤ Sawai T., Kawanishi, M., Kanno T., Takamura T., Yagi, T. Consequence of Translesion DNA Synthesis across Site-specific 4-Aminobiphenyl Adducts in Human Cells. The 1st Asian Conference on Environmental Mutagens, and the 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagens Society. Kitakyushu. Nov. 29-30, 2007.

⑥ 中山亜紀, 友松千晴, 谷修介, 森澤眞輔, 大川克也, 米田稔. 神経系培養細胞 PC12 における酢酸鉛のタンパク質発現変動, 日本トキシコロジー学会第35回学術年会. 2008年

6月26-28日. 東京.

⑦ 伊藤憲男、溝畑朗. 硫酸塩エアロゾル粒子濃度変化の季節変化の推移. 大気環境学会第48回大会. 2007年9月5日-7日. 岡山.

⑧ 伊藤憲男、溝畑朗. 堺での大気エアロゾル粒子の長期観測結果. 大気環境学会第48回大会. 2007年9月5日-7日. 岡山.

⑨ Mizohata, A., Ito, N. and Matsumoto, J. Long-term continuous observation of the carbon component concentration in the atmospheric aerosol particles in Osaka, Japan. Symposium on air quality measurement methods and technology by air and waste management association. April 30-May 3, 2007. San Francisco, USA.

⑩ 森澤眞輔, 北神理紗子, 中山亜紀, 米田稔. 鉛曝露による幼児・小児の健康リスク評価-PBPKモデルを適用した評価の試み-, 日本リスク研究学会第20回研究発表会. 2007年11月17-18日. 徳島.

⑪ 大腸菌における 3-ニトロベンズアントロン-DNA 付加体の損傷乗り越え合成」西田裕, 川西優喜, 高村岳樹, 八木孝司. 日本環境変異原学会第35回大会. 2006年11月20-21日. 堺市.

⑫ 伊藤憲男、溝畑朗. 堺で観測した大気エアロゾル粒子の19年間(1986-2004)の濃度変化. 大気環境学会第47回大会. 2006年9月20-22日. 東京.

⑬ 中島徹、溝畑朗. 沿道塵粒子の性状と自動車排出寄与率の推移. 大気環境学会第47回大会. 2006年9月20-22日. 東京.

[図書] (計2件)

① 溝畑朗、笠原三紀夫・東野達「大気と微粒子の話」京都大学出版会、2008年.

② 溝畑朗「含炭素粒子測定と評価」笠原三紀夫・東野達(編)、エアロゾルの大気環境影響、pp. 90-99、京都大学出版会、2007年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 孝司 (YAGI TAKASHI)

大阪府立大学・産学官連携機構・教授

研究者番号: 80182301

(2) 研究分担者

溝畑 朗 (MIZOHATA AKIRA)

大阪府立大学・産学官連携機構・教授

研究者番号: 80090439

川西 優喜 (KAWANISHI MASANOBU)

大阪府立大学・産学官連携機構・助教

研究者番号: 70332963

中山 亜紀 (NAKAYAMA AKI)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 10335200