

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390038

研究課題名（和文） 都市大気中の浮遊粒子成分が動物体内で示す変異原性と次世代影響の評価

研究課題名（英文） Assessment of in vivo mutagenicity and trans-generational effect of compounds contained in suspended particulate matter in urban air

研究代表者

青木 康展（AOKI YASUNOBU）

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・副センター長

研究者番号：20159297

研究成果の概要（和文）：大気環境中に存在する浮遊粒子（TSP）の曝露により、肺などの標的臓器内に誘導される変異原性を、突然変異検出用遺伝子導入動物 *gpt delta* マウスへの気管内投与により検出した。その結果、つくば市内で採取された浮遊粒子抽出物（Tar）の *in vivo* 変異原性は $0.76 \times 10^{-5}/\text{mg}$ と算定された。Tar の *in vivo* 変異原性の原因物質は同定されていないが、いくつかの知見から、大気中には主要な変異原物質と考えられている多環芳香族炭化水素以外にも強い変異原性を示す物質が存在すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated mutagenesis induced in the target organs, such as the lung, by exposure of total suspended particulate matter (TSP) in ambient air using a model transgenic rodent for detecting in mutations, named *gpt delta* mouse. Consequently, *in vivo* mutagenicity of TSP extract obtained in Tsukuba City was estimated as $0.76 \times 10^{-5}/\text{mg}$. Compounds causing *in vivo* mutagenesis in Tar have not been identified, but several observations suggest that any potent mutagens other than polycyclic aromatic hydrocarbons exist in ambient air.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学

キーワード：環境系薬学

1. 研究開始当初の背景

都市大気中の浮遊粒子には、ディーゼルエンジンをはじめとした化石燃料の燃焼により非意図的に生成されたベンゾ[a]ピレンやニトロピレン類など、細菌を用いたエイムス試験で強い変異原性を示す多種多様な多環芳香族化合物が成分として含まれている。これらの多環芳香族化合物が体内に取り込ま

れるとゲノムDNAに結合して突然変異を引き起こし、発がん作用等の有害作用を示すことは概念的にはよく理解されている。しかし、実際の大气環境中に存在する浮遊粒子の成分が、肺や精巣（精子）などの標的臓器で、どの程度の変異原性（体細胞や生殖細胞での突然変異頻度）の上昇を示すかは「実証的に」明らかにされていない。この知見は環境から

被る肺がん等の健康リスク評価に必須であり、次世代影響のリスクを評価する上でも重要な課題である。

2. 研究の目的

変異原性検出用遺伝子導入マウス (*gpt delta* マウス; 標的遺伝子・大腸菌 *gpt* 遺伝子を載せたシャトルベクターをゲノム DNA に導入したマウス) を用い、都市大気から採取した浮遊粒子より得た抽出物 (浮遊粒子抽出物) などの試料が示す体内変異原性 (in vivo 変異原性) を評価する。特に本研究では、実際の曝露経路を想定し、試供化合物のマウスへの曝露は主に肺中への経気道投与により行う。さらに、ディーゼル排気由来ナノ粒子のマウスへの曝露など浮遊粒子曝露のモデル実験も実施しつつ、大気浮遊粒子中の多環芳香族化合物等が肺などの標的器官のゲノム上で引き起こす突然変異の発生頻度や、突然変異スペクトル (塩基置換の種類や欠失の大きさなど突然変異の性質) の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 都市大気浮遊粒子抽出物の調製とエイムス試験

2009 年夏季および冬季に、東京都内とつくば市内の国立環境研究所構内で大気浮遊粒子 (TSP) をハイボリューム・エアサンプラーを用いて採取した。これらの TSP をジクロロメタンでソックスレー抽出して抽出物 (Tar) を得た。また当初の計画にはなかったが、タイ国バンコック市内で 1989 年に採取した TSP についても同様に Tar (Bangkok) を得た。

一部の Tar については、シリカゲルカラムカートリッジを用いて、ヘキサン、ジクロロメタン/ヘキサン混液、酢酸エチルにより順次抽出し、極性ごとに分画した。

これらの Tar について、エイムス試験により in vitro 変異原性を確認した。

(2) Tar の *gpt delta* マウスへの気管内投与

2009 年夏季および冬季に、国立環境研究所構内で採取した TSP より得た Tar (NIES summer、および NIES winter) と、バンコック市内の TSP から得た Tar (Bangkok) を、*gpt delta* マウス (9W、♂、1 群 5 匹) に気管内投与した。用量は低用量群 (L 群、0.6 mg Tar in vehicle, 100 μ l)、高用量群 (H 群、1.2 mg Tar in vehicle, 100 μ l) とした。対照群 (Control 群) には vehicle のみ (1%DMSO + 0.05% Tween80 in PBS, 100 μ l) を投与した。気管内投与 2 週間後、肺を摘出し、 -80°C 保存した。

(3) ディーゼル排気由来ナノ粒子 (ディーゼルナノ粒子) の *gpt delta* マウスへの曝露

国立環境研究所内に設置されている曝露装置内で、*gpt delta* マウスにディーゼルナノ粒子 (DNP) を 1 年間曝露 (5 時間/1 日、5 日/1 週) した。曝露濃度及び個体数 (n) は以下の通り: 対照群 (清浄空気、cont (n=4))、除粒子群 (DeP、100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の排気より粒子を除いたガス成分 (n=4))、低濃度群 (粒子濃度 30 mg/m^3 (n=3))、高濃度群 (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (n=4))。

(4) ゲノム DNA 抽出、および *gpt* 変異体頻度の測定と変異スペクトル解析

マウス臓器から RecoverEase DNA isolation kit (Stratagene) を用いてゲノム DNA を採取した。Transpack (Stratagene) を用いた in vitro パッケージング反応を行い、ゲノム DNA から λ EG10 をファージ粒子として回収した。ファージは大腸菌 YG6020 に感染させ、6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上に播種し耐性となったコロニー (*gpt* 変異体候補コロニー) を検出した。検出したコロニーは、再度、6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上にストリークして、真の *gpt* 変異体を検出した。回収したファージの一部は適宜希釈した後 YG6020 に感染させ、クロラムフェニコールのみを含む培地上に播種し、耐性コロニー数を計測して回収したレポーター遺伝子の総数を求めた。変異体頻度 (MF) は、真の *gpt* 変異体数を回収したレポーター遺伝子数で除して算出した。また、変異体 *gpt* 遺伝子は PCR で増幅した後、DNA シークエンス解析を行い、発生した突然変異の性質 (塩基置換、欠失など) を同定した。

4. 研究成果

(1) 都市大気浮遊粒子抽出物の in vitro 変異原性

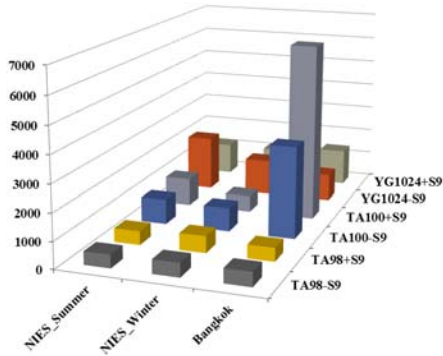
東京都内 4 ヶ所、国立環境研究所構内 1 ヶ所およびバンコック市内の大気からそれぞれ約 1 g の TSP を採取して、Tar を抽出し、その変異原性をエイムス試験により確認した。

東京都内、夏季、冬季とも地区により変異原性に大きな差は認められず、TA100 (S9+) 系では 80-200 rev/mg TSP、1000-1600 rev/mg Tar であった。他のエイムス試験系 (TA98 (S9+, S9-), TA100 (S9-), YG1024 (S9+, S9-)) においても、地域により大きな違いは認められなかった。冬季の浮遊粒子状物質の変異原性は、110-150 rev/mg 粒子状物質 (TA100 (S9+)) であり、夏季に比べて幾分低い傾向にあった。

(図 1)

バンコック市内については、TA100 (S9+ および S9-) の値が著しく高く、TA100 (S9+) では 1000 rev/mg TSP、6000 rev/mg Tar であった。(図 1)

図1 国立環境研究所およびバンコック市内で採取した Tar の in vitro 変異原性 (rev/mg Tar)

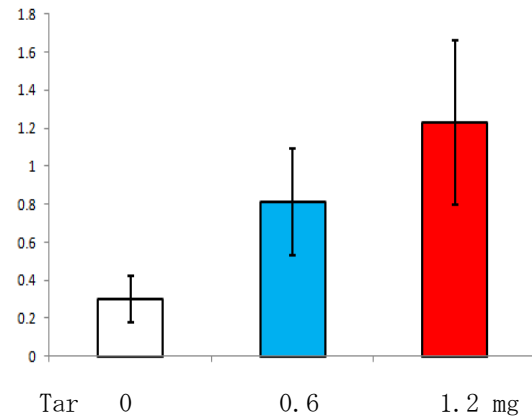


(2) 都市大気浮遊粒子抽出物の in vivo 変異原性

国立環境研究所構内で夏季に採取した TSP (NIES summer) から得た Tar を gpt delta マウスの気管内投与したところ、肺の突然変異頻度は用量に依存して統計的に有意に増加した。最大用量 (1.2 mg) では 1.5×10^{-5} になり、コントロール (0.4×10^{-5}) と比べて約 4 倍の突然変異頻度の上昇が認められ (図2)、Tar 単位重量当たりの in vivo 変異原性上昇率は $0.76 \times 10^{-5}/\text{mg}$ と算定された。また、最高用量のマウス肺中では多環芳香族炭化水素 (PAH) 曝露により発現され、PAH を代謝活性化するモノオキシゲナーゼ・CYP1A1 と CYP1A2 mRNA の誘導が認められた。都市大気中の粒子状物質成分は肺内で代謝活性化され、変異原性を示すことが明らかになった。

さらに、NIES winter および Bangkok の Tar についても同様に in vivo 変異原性を評価した。突然変異頻度は濃度依存的に増加する傾向が認められ、最大用量 (1.2 mg) では、 $0.47 \times 10^{-5}/\text{mg}$ (NIES winter)、および $0.28 \times 10^{-5}/\text{mg}$ (Bangkok) に上昇した。また、東京都内で採取した TSP の Tar の in vivo 変異原性も、これらの値とほぼ同様であった。Bangkok の Tar の in vitro 変異原性は、東京都内やつくば市内と比べて高かったが、in vivo 変異原性はほぼ同様であった。in vitro 変異原性を示す成分と in vivo 変異原性を示す成分は必ずしも同一ではない可能性がある。

図2 NIES summer の Tar が肺で示す in vivo 変異原性 (MF $\times 10^5$)



NIES summer の Tar が肺で示す in vivo 変異原性は、抽出物中の既知の高い変異原性を示す変異原物質であるベンゾ [a] ピレン (BaP) の値 ($1.7 \times 10^{-5}/\text{mg}$) と比べても遜色なく高かった。Tar 中の BaP 含量は 0.002% 程度であり、都市大気中には BaP 以外にも高い in vivo 変異原性を示す化学物質が存在することが示唆された。

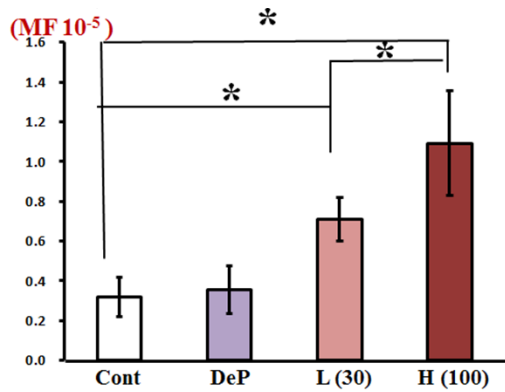
(3) 都市大気浮遊粒子抽出物の突然変異スペクトル

都市大気由来の Tar により誘導された主要な変異は G:C→A:T transition であった。また、gpt 遺伝子上の突然変異ホットスポットは、塩基番号 110, 115, 418 の G:C→A:T transition、および塩基番号 64 の G:C→T:A tranversion であった。これらの突然変異ホットスポットは典型的なニトロアレーンである 1,6-dinitropyrene の気管内投与やディーゼル排気曝露による突然変異発生位置とよく一致し、大気中浮遊粒子に存在する類似成分が動物体内で突然変異を誘導することが示唆された。

(4) ディーゼルナノ粒子の in vivo 変異原性

大気浮遊粒子のモデル物質としてディーゼルナノ粒子 (DNP) を長期曝露し、DNP が肺と肝臓で示す変異原性を検討した。その結果、肺の突然変異頻度は、対照 (Cont) 群、除粒子 (DeP) 群に比べて、DNP 曝露により濃度依存的に有意に増加した (低濃度 (L) 群 0.71×10^{-5} 、高濃度 (H) 群 1.65×10^{-5} 、図3)。しかし、肝臓では DNP 曝露による突然変異頻度の有意な増加は認められなかった。

図3 ディーゼルナノ粒子が肺で示す *in vivo* 変異原性



また、DNPにより誘導された主要な突然変異は、G:C→A:T transitionであり、その突然変異ホットスポットは *gpt* 遺伝子の塩基番号 64 であった。このホットスポットは TSP の気管内投与でも観察されるものである。浮遊粒子の曝露による肺における突然変異誘発に、DNP に含まれる成分が関与している可能性がある。

DNP 中に含まれる BaP など強い変異原性を示す多環芳香族炭化水素の含量は、極めて低いことが明らかにされている。ディーゼル排気は酸化ストレスを誘導することが知られているが、この酸化ストレス誘導と突然変異誘導の関連は十分に明らかにされていない。DNP に含まれる未知の変異原成分の同定は、都市環境が健康に及ぼす影響を明らかにするうえで、重要な課題である。

(5) 大気浮遊粒子抽出物からの変異原成分の分画

シリカゲルカラムカートリッジを用いて、Tar 成分を極性（ヘキサン、ジクロロメタン/ヘキサン混液、酢酸エチル）ごとに分画した。これらの変異原性を TA98 株及び TA100 株を用いたエイムス試験に供したところ、既知のニトロアレーン、多環芳香族炭化水素及びその酸化体よりも極性の強い画分（主として酢酸エチル分画）から主な活性が認められた。以上の知見から、大気浮遊粉じんの変異原性には未同定の変異原物質の寄与が大きいことが示唆された。今後その同定が必要である。

(6) 精子における *in vivo* 突然変異

ディーゼル排気を曝露した *gpt* delta マウス精巣で突然変異頻度の上昇が観察されたことから、Tar を気管内投与したマウス精子での突然変異発生の検出を試みた。しかしながら、突然変異を検出するのに十分な量の DNA を精子から抽出することができず、Tar ばかりでなくモデル化合物である BaP の次世代影響を評価することもできなかった。

(7) 大気浮遊粒子成分の肺がんリスクの評価

NIES summer Tar 試料の *in vivo* 変異原性はその用量反応のデータから 41.7 mg/MF (mutant frequency, 10⁻⁵) と算定される。In vivo 変異原性と TD50 (50%の発がん率をもたらす用量) は相関性の知見から、Tar の TD50 は 3.18 (mg/kg)/日と推定される。これを、マウス個体当たり (x 30 g/1 kg) に換算すると 0.0954 mg/日となる。マウスの1日換気量は 0.0432 m³/日なので、TD50 を与える大気中の Tar 濃度は 0.0954 (mg/day)/0.0432 (m³/day) = 2.21 mg/m³ と算定される。

従って、NIES summer を採取した大気 (0.0052 mg Tar/m³) 中の Tar による肺がんの過剰発症率は 50% x 0.0052 (mg/m³)/2.21 (mg/m³) = 0.11% = 1.1 x 10⁻³ と算定される。

Tar の利用効率(0.248)を考慮すると NIES summer の Tar による肺がんの過剰発症率は 1.1 x 10⁻³ x 0.248 = 0.00027 (2.7 x 10⁻⁴) と算定される。

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5件)

- ① Kawahara J, Tanaka S, Tanaka C, Aoki Y, Yonemoto J, Estimation of daily inhalation rate in preschool children using a tri-axial accelerometer: a pilot study. *Sci Total Environ* 査読有 409, 2011, 3037-3077.
- ② Kamigaito T, Noguchi T, Narumi K, Takashima R, Hamada S, Sanada H, Hasuko M, Hayashi H, Masumura K, Nohmi T, Evaluation of the *in vivo* mutagenicity of nickel subsulfide in the lung of F344 *gpt* delta transgenic rats exposed by intratracheal instillation: A collaborative study for the *gpt* delta transgenic rat mutation assay. *Genes Environ* 査読有 34, 2011, 34-44.
- ③ Sui H, Ohta R, Shiragiku T, Akahori A, Suzuki K, Nakajima M, Hayashi H, Masumura K, Nohmi T, Evaluation of *in vivo* mutagenicity by 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene in liver of F344 *gpt* delta transgenic rat dosed for 28 days: a collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assay. *Genes Environ* 査読有 34, 2011, 25-33.
- ④ Kawahara J, Tanaka S, Tanaka C, Aoki Y, Yonemoto J, Estimation of the respiratory ventilation rate of preschool children in daily life using

accelerometers. J. Air Waste Manag. Assoc. 査読有 61, 2011, 46-54.

[学会発表] (計14件)

- ① Aoki Y, Matsumoto Y, Matsumoto M, Comparative study on the utilities of animal experimental data for risk assessment of inhalation exposure of chemicals. 51st Annual Meeting, Society of Toxicology. 2012年3月12日 Moscon Convention Center (San Francisco)
- ② 青木康展, 松本理, 能美健彦, 大気汚染物質によるgpt deltaマウス肺中の突然変異とヒト肺がん組織中p53遺伝子の突然変異の比較 日本環境変異原学会第40回大会2011年11月21日一橋記念講堂 (東京都)
- ③ Aoki Y, Health risk assessemnt of air pollutants: Air pollutant genotoxicity and its enhancement on suppression of phase II drug-metabolizing enzymes. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenicity Thresholds 2011年11月23日 一橋記念講堂 (東京都)
- ④ 影山志保, 稲葉洋平, 佐藤陽美, 松本理, 青木康展, 嵐谷奎一, 矢島博文, 中島大介, 後藤純雄, 国内5地点で採取した都市大気浮遊粉じんの変異原性 第16回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 2010年9月2日 つくば研究支援センター (茨城県)
- ⑤ 松本理, 青木康展, 大気中の発がん物質のリスク評価 一疫学研究データと動物実験データに基づく評価値の比較 日本環境変異原学会第39回大会 2010年11月17日 つくば国際会議場 (茨城県)
- ⑥ 青木康展, 佐藤陽美, 中島大介, 影山志保, 阪下由香利, 柳澤利枝, 後藤純雄, 松下秀鶴, 増村健一, 能美健彦, 大気中の粒子状物質抽出物がgpt deltaマウス肺中に示す変異原性; 2009年つくば市内, 1989年バンコク市内の試料について 日本環境変異原学会第39回大会 2010年11月17日 つくば国際会議場 (茨城県)
- ⑦ 佐藤陽美, 阪下由香利, 増村健一, 古山昭子, 平野靖史郎, 能美健彦, 青木康展, ディーゼルナノ粒子長期曝露によりgpt deltaマウス肺・肝臓に誘導される突然変異 日本環境変異原学会第39回大会 2010年11月17日 つくば国際会議場 (茨城県)
- ⑧ 河原純子, 田中千晶, 田中茂穂, 青木康展, 米元純三, 日本人幼児の1日肺換気量 日本リスク研究学会第23回年次大会 2010年11月28日明治

大学駿河台キャンパス (東京都)

- ⑨ Sato H, Nakajima D, Kageyama S, Sakashita Y, Yanagisawa R, Masumura K, Nohmi T, Aoki Y, In vivo mutagenicity of ambient air in the lungs of gpt delta transgenic mice; A case study in Tsukuba city, Japan. 2nd Asian Conf. Environ. Mutagens 2010年12月16日 Dusit Thani Hotel (Pattaya, Thailand)
- ⑩ 佐藤陽美, 中島大介, 影山志保, 後藤純雄, 松下秀鶴, 渡辺 徹志, 青木康展, 遺伝子発現プロファイルと分子ネットワークによる都市大気成分の毒性寄与予測手法の開発 日本薬学会第131年会 2011年3月30日 グランシップ (静岡県)
- ⑪ Aoki Y, In vivo bioassays for assessing the total environmental risk. Environmental Health 2011 2011年2月9日 Bahia Othon Palace Hotel (Salvador, Brasil)
- ⑫ Aoki Y, Enhanced in vivo mutations in the lung of phase II enzyme-suppressed mice. X International Conference on Environmental Mutagens 2009年8月22日 Congress Center (Firenze, Italy)
- ⑬ Aoki Y, Hashimoto AH, Amanuma K, Matsumoto M, Masumura K, Nohmi T, In vivo mutagenesis induced by the air pollutants in the testis of gpt delta transgenic mice. 21st Cent. Adv. Mol. Toxicol. Environ. Chem. Pathog. Dis. 2009年10月26日 東京大学医学部鉄門講堂 (東京都)
- ⑭ Aoki Y, Assessment of in vivo mutagenesis induced by environmental chemicals using transgenic animals for detecting mutagens. 2nd International Conference on Environmental Health Science 2009年10月30日 Korea Institute of Science and Technology (Seoul, Korea)

[図書] (計1件)

- ① Aoki Y, Hashimoto AH, Amanuma K, Matsumoto M, Nova Science Publishers Inc. Potency of air pollutants at DNA adduct formation and assessment by in vivo mutagenesis. In DNA adduct formation, detection and mutagenesis. 2010, 143-153

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 康展 (AOKI YASUNOBU)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク

研究センター・副センター長
研究者番号：20159297

(2) 研究分担者

能美 健彦 (NOUMI TAKEHIKO)
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部・
部長
研究者番号：30150890
影山 志保 (KAGEYAMA SHIHO)
郡山女子大学・家政学部・講師
研究者番号：00514316
松本 理 (MATSUMOTO MICHI)
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク
研究センター・主任研究員
研究者番号：60132867
中島 大介 (NAKAJIMA DAISUKE)
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク
研究センター・主任研究員
研究者番号：10281411

(3) 連携研究者

該当なし