

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293034

研究課題名(和文) 過去の大気浮遊粒子曝露が現在の肺がん発症等の健康リスクに及ぼす影響の評価

研究課題名(英文) Assessment of current lung cancer and related health risk by past-exposure of particulates suspended in air

研究代表者

青木 康展 (Aoki, Yasunobu)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・フェロー

研究者番号：20159297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：東京都内で採取された大気浮遊粒子の抽出物(Tar)をgpt deltaマウスの肺内に投与して突然変異誘発を調べ、さらに、Tar中の多環芳香族炭化水素(PAH)濃度を分析し、過去の浮遊粒子曝露の肺がん発症リスクへの寄与を検討した。2010年試料のTar重量当たりの変異頻度は、対照群に比べ0.3 mgで1.5倍増加した。1980年試料もほぼ同様の変異頻度の増加であった。2010年試料の投与は酸化ストレスが誘発するG>T塩基置換を有意に上昇し、突然変異誘発への酸化ストレスの関与が示唆された。また、高発がん性のcyclopenta[c,d]pyrene等のPAH総体の発がん性への大きな関与が示された。

研究成果の概要(英文)：We have intended to assess quantitatively the cancer risk of past-inhaled airborne particles suspended in air. We have collected particulate samples from air in Tokyo annually, and prepared the extracts of particulate samples (hereinafter tar). We administered tar intratracheally to gpt delta mice, and analyzed in vivo mutagenicity in the lung. At 0.3 mg of tar per mouse, the mutation frequency was 1.5 times that in the vehicle control with the 2010 sample, and the similar level of enhancement was also observed with the 1980 sample. The frequency of G>T base substitutions, which are induced by oxidative stress, was significantly higher than with the vehicle with the 2010 sample. These results suggest that oxidative stress contributes to enhanced mutagenesis in lung tissues exposed to tar. Analysis of tar indicates that polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with high carcinogenic potency, eg. cyclopenta[c,d]pyrene, are major fractions in carcinogenic potency of whole PAHs.

研究分野：毒性学

キーワード：大気汚染物質 環境変異原物質 リスク評価 突然変異 in vivoアッセイ 肺がん 規制効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人男性の肺がんの年齢調整罹患率は10万人あたり約50人と近年増加傾向にある(がん研究振興財団「がんの統計」)。大気中の浮遊粒子には多くの変異原物質が含まれ、肺がんの原因の一つは、過去数10年間の大気からの浮遊粒子曝露の影響と考えられる。現在より高いレベルにあった過去の変異原物質曝露の累積影響を考慮することで、現在の発がんリスクの正確な評価が可能になるはずであるが、過去の影響を考慮した健康リスク評価研究はほとんど行われていない。

(2) 本研究班では、東京都内の定点で過去30年間以上大気浮遊粒子を採取し、超低温冷凍庫内で保存してきた。この試料の抽出物が肺中で示す変異原性や含有される変異原物質濃度などの経年変化を明らかにし、過去の曝露とその影響が現在に比べてどの程度高いかを実証的に示すことで、過去の曝露が現在の肺がん発症などの健康リスクに寄与する程度の推定が可能になると考えた。

2. 研究の目的

(1) 都市大気中の浮遊粒子には、ディーゼルエンジン排気等の化石燃料の燃焼により生成するベンゾ[a]ピレンをはじめ多種多様な多環芳香族炭化水素(PAH)やその誘導体が存在する。これらの化合物の一部は強い変異原性を示し、都市域での肺がんの原因の一つと考えられており、また次世代への影響が懸念されている。しかし、現時点で肺がんの発症は、過去数10年にわたる変異原物質曝露の累積効果によるものである。本研究では、都市大気中の浮遊粒子から被る健康リスクを定量的に評価するために、浮遊粒子の抽出物が体内で示す変異原性(in vivo mutagenicity)や、そこに含まれる変異原物質の濃度の経年変化を明らかにする。これにより、過去の変異原物質の曝露が現在の肺がん発症などの健康リスクにどの程度寄与しているかを評価する。

(2) 本研究では、複数の化学物質の同時曝露による影響を定量的に解析するための2つの手法、混合物全体アプローチ(Whole mixture approach):混合物まるごとの影響を評価し、全体のリスクを推定する手法、および組成物アプローチ(Component-based approach):混合物中の主要な有害作用を示す成分を同定・定量し、混合物のリスクを評価する手法を活用して、過去の浮遊粒子曝露による健康に関わる影響が、現在の曝露影響に比べてどの程度高いかを明らかにする。さらに、突然変異スペクトルなどを解析し、曝露による影響の経年変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) 都市大気浮遊粒子抽出物の調製 東京都内の定点(1980年から港区・旧公衆衛生院

構内、2001年から新宿区・東京理科大学構内)で30年間にわたりハイボリューム・エアサンプラーを用いて、6日に1回の頻度で、浮遊粒子を石英繊維フィルター上に採取し、超低温庫内(-80℃)に保管してきた。また、現時点での変異原物質のデータを得るために、サンプリングを夏季と冬季に行い、新規に浮遊粒子を収集した。これらの浮遊粒子から、ソーレックス抽出器等を用いて、ジクロロメタンにより可溶性の炭化水素を抽出し、この画分を浮遊粒子抽出物とした。

(2) *gpt delta* マウスを用いた in vivo アッセイ系による浮遊粒子抽出物が生体内で示す変異原性の評価(混合物全体アプローチ) 突然変異検出用の標的遺伝子(大腸菌 *gpt*, guanine phosphoribosyltransferase)を導入したマウス(*gpt delta* マウス、9週齢)の肺中へ、界面活性剤(0.05% tween-80 in Phosphate buffered saline, PBS)に溶解した浮遊粒子抽出物(最大0.6 mg、1群5個体3用量)などの試料溶液を気管内投与した。投与後、突然変異が発現する期間(2週間)飼育した後、肺などの臓器を採取し、超低温冷凍庫に保存した。臓器から高分子状態でゲノムDNAを抽出し、λファージ・パッケージング法により *gpt* 遺伝子は大腸菌に回収した。変異体 *gpt* 遺伝子が回収された大腸菌は6-チオグアニン(6-TG)耐性となり、この6-TG耐性コロニーの発生頻度から、試料が示す突然変異頻度(Mutant Frequency、もしくは Mutation Frequency)*を求めた。また、変異体 *gpt* 遺伝子のDNA配列を決定し、*gpt* 遺伝子上で高頻度に突然変異が発生する塩基(ホットスポット)を同定し、ホットスポットでの突然変異頻度の経年変化を調べた。

*Mutant Frequency: 突然変異体頻度、1個体から回収された変異体 *gpt* 遺伝子数/Titer: Mutation Frequency; 突然変異頻度、1個体から回収された *gpt* 遺伝子の突然変異数/Titer

(3) 1,2-ベンゾナフトキノン(1,2-NQ)肺内投与により誘発された突然変異の解析 1,2-NQ(PBS 50 μLに溶解)を *gpt delta* マウス(9週齢、1群5-6匹)の肺内に2週間の期間を空けて2回気管内投与した(低用量群、1回300 ng;高用量群、1回600 ng)。2回目の投与2週間後に解剖して肺を得て、(2)と同様に *gpt* 遺伝子上の突然変異を解析した。

(4) 浮遊粒子抽出物中の既知多環芳香族炭化水素(PAH)類の含量分析とその経年変化の解析(組成物アプローチ) 浮遊粒子抽出物に含まれるベンゾ[a]ピレンなどの発がん性が知られるPAHや、ニトロ化PAHなどの既知の多環芳香族炭化水素類について、ガスクロマトグラフ/質量分析計などを用い定量し

た。

4. 研究成果

(1) Tar が示す変異原性 (Ames 試験) の経年変化 大気中の浮遊粒子濃度は 1980 年の $94.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と比べて、2010 年には $35.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ に半減していた。大気体積当たりの Ames 試験による変異原性 (Number of revertants/ m^3) も TA98、TA100 とともに 1980 年に比べてほぼ半減した。また、ともに S9(-) で高い変異原性が見られた。(雑誌論文)

(2) Tar が *gpt delta* マウス肺内で示す変異原性 本研究では、東京都内で 1980 年および 2010 年に採取された大気浮遊粒子の抽出物試料 (以下 Tar) を中心に肺内への投与による突然変異の解析を進めた。

1980 年試料: Tar の投与により Total Mutation frequency は増加したものの (0.3 mg で 1.4 倍、0.6 mg で 1.6 倍) 有意な増加ではなかった (図 1A)。Mutant frequency の増加も同様に有意ではなかった。

2010 年試料: Total Mutation frequency は用量 (最高用量) に依存して増加した。0.3 mg の用量でのみ有意な増加であったが、対照群に比べ 0.3 mg で 1.5 倍、0.6 mg で 2.1 倍増加した。G to T Mutation frequency は、対照群 0.096×10^{-5} に比べて、0.6 mg で 0.30×10^{-5} へと有意に増加した (図 1B)。Mutant frequency も対象群に比べて 2.4 倍増加したが、有意な増加ではなかった (学会発表)。

なお、0.6 mg のタール量は 1980 年で 46 m^3 、2010 年では 124 m^3 の大気に含まれる量に相当し、前者はマウスの約 3 年間の換気量に相当する。

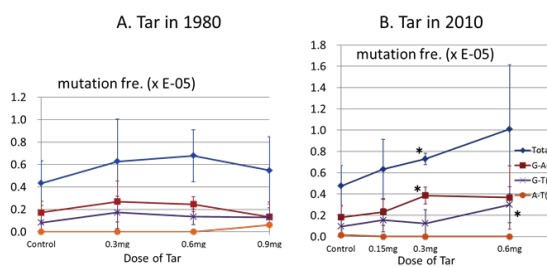


図 1 Tar を気管内投与した *gpt delta* マウス肺の突然変異頻度 (学会発表)

さらに、大気中に存在する酸化ストレス誘導能をもつ変異原物質である芳香族キノン 1,2-NQ が肺内で示す突然変異を解析した結果、酸化ストレスにより特徴的に誘導される突然変異である G to T transversion の発生頻度が有意に増加していた (図 2) (学会発表)。

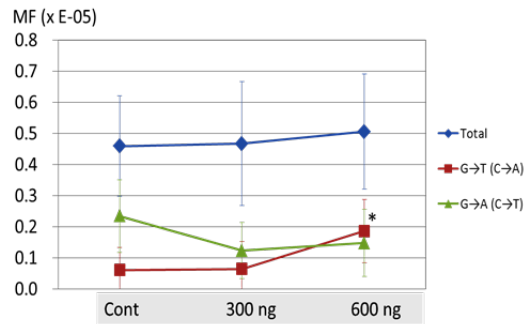


図 2 1,2-NQ が肺中に誘導する突然変異発生頻度 (学会発表)

(3) Tar により誘発される突然変異ホットスポット (Mutation Hotspot) *gpt* 遺伝子上で、1 群 5 匹のうち 3 匹以上のマウスに突然変異が発生した塩基を突然変異ホットスポットとした。(Fig. 3)

2010 年試料: *gpt* 遺伝子の #64, #110, #115 塩基が G to A transition の突然変異ホットスポットであった。これらは、1,6-ジニトロピレンの突然変異ホットスポット (但し、自然突然も発生しやすい塩基) であったが、ベンゾ[a]ピレンのホットスポットとは異なった。さらに特徴ある突然変異として、#406 (GAA) に G to T transversion が誘導され突然変異ホットスポットとなっていた。

1980 年試料: #64, #110 塩基が G to A transition の突然変異ホットスポットとなっていた (学会発表)。

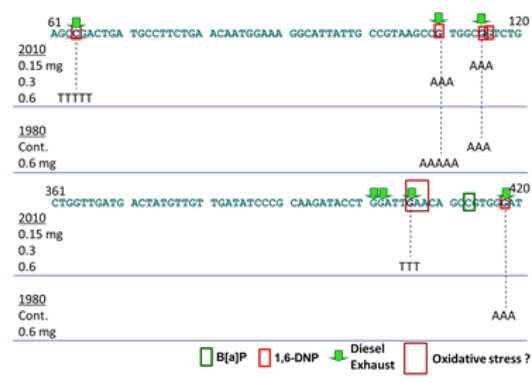


図 3 Tar の気管内投与による *gpt* 遺伝子上の突然変異ホットスポット (学会発表)

(4) Tar が肺内で示す変異原性に関する考察 Tar の Ames 試験の結果、TA98 では S9(-)の方が S9(+)よりも変異原性が高かったこと (前述) また、*gpt* assay により、1,6-ジニトロピレンと同じ塩基での突然変異ホットスポットの誘発が確認されたことより、ニトロピレン類が都市大気浮遊粒子中の主要な変異原物質である可能性が示唆される。

また、1,2-NQ を投与した肺では、2010 年試料と同様に、*gpt* 遺伝子の #406 塩基に G to T transversion が誘導され突然変異ホットスポットとなっていた (前述) ことから、Tar 曝露 (特に 2010 年試料) による突然変異頻

度の増加に、1,2-NQ のような肺中で酸化ストレスを誘導する化学物質が関与していると示唆される。

(5) 高発がん性 PAH およびニトロ化 PAH の大気中存在量の分析 発がん性が高い semi-volatile な PAH である benzo[c]fluorene (BcFE), cyclopenta[c,d]pyrene (CPcdP), and benzo[j]fluoranthene (BjF) の大気中濃度を、2011-2012 年に全国 11 都市で測定した。その結果、BcFE は 0.16、0.23 ng/m³ (夏季、冬季)、CPcdP 0.13、0.29 ng/m³ (BjF 0.13、0.26 ng/m³ と、BaP の 0.15、0.29 ng/m³ と比べて遜色のない濃度であった(図 4)。ユニットリスクから換算すると、BcFE の発がんリスクは夏季 6.8 倍、冬季 5.1 倍 BaP に比べて高かった(雑誌論文、学会発表)。

また、大気中のニトロ化 PAH の指標となる 1-nitropyrene の大気中の濃度を経時的に調べたところ、1997 年に比べて、2007 年には概ね 1/4 に減少していた。ニトロ化 PAH はディーゼルエンジン排気から多く排出されていることから、2000 年の東京都におけるディーゼル排気規制は一定の効果があったと考えられる。

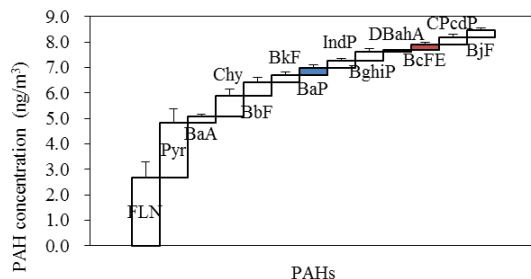


図 4 全国 11 都市における大気中平均 PAH 濃度 (冬季)(雑誌論文)

(6) 大気浮遊粒子に含まれる Tar の発がんリスク評価 経験的に体内突然変異の発生頻度と発がん性には相関性があると考えられてきた。我々は、マウス肺内で化学物質が示す変異原性(総投与量(Total dose)/Increased mutant frequency $\times 10^5$: T/I)と生涯曝露により 50%の発がん率を示す用量(TD50)の間には

$$\log TD50 = 1.81 \log T/I - 0.194$$

の相関性があることを見出した。マウスへ 2010 試料の Tar 0.3 mg を単回投与した際の Increased mutant frequency $\times 10^5$ は 0.25 であることから、マウスの体重を 0.03 kg とすると、投与量は 10 mg/kg であり、T/I は 40 mg/kg となる。上記の相関式にあてはめると、Tar の TD50 は 510 mg/kg/日と算定された。

本研究から Tar が体内で示す Tar 重量当たりの変異原性は、1980 年試料と 2010 年試料では大きな差が見られないことが示された。

大気中の浮遊粒子濃度は概ね 1/2 に低下しており、大気中の浮遊粒子が体内で示す変異原性も単位体積当たり 1/2 に低下しているものと予測される。発がんリスクも同様に低下していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Endo O, Goto S, Nakajima D, Matsushita H. Mutagenic activity of airborne particles in center of metropolitan Tokyo over the past 20 years. *J. Environ. Chem.*, 査読有 26, 1-7 (2016) URL <http://id.ndl.go.jp/bib/027199277/eng>

Yagishita M, Kageyama S, Ohshima S, Matsumoto M, Aoki Y, Goto S, Nakajima D. Atmospheric concentration and carcinogenic risk of polycyclic aromatic hydrocarbons including benzo[c]fluorene, cyclopenta[c,d]pyrene, and benzo[j]fluoranthene in Japan. *Atmospheric Environment*, 査読有 115, 263-268 (2015) doi:10.1016/j.atmosenv.2015.05.050

Masumura K, Sakamoto Y, Kumita W, Honma M, Nishikawa A, Nohmi T. Genomic integration of lambda EG10 transgene in gpt delta transgenic rodents. *Genes and Environment*, 査読有 37, 24-36 (2015) doi:10.1186/s41021-015-0024-6

Aoki Y, Hashimoto A, Sugawara Y, Hiyoshi-Arai K, Goto S, Masumura K, Nohmi T. Alterations in the mutagenicity and mutation spectrum induced by benzo[a]pyrene instilled in the lungs of gpt delta mice of various ages. *Genes and Environment.*, 査読有 37, 7-17 (2015) doi:10.1186/s41021-015-0004-x

Takumi S, Aoki Y, Sano T, Suzuki T, Nohmi T, Nohara K. In vivo mutagenicity of arsenite in the livers of gpt delta transgenic mice. *Mutat. Res.*, 査読有 760, 42-47 (2014) doi:10.1016/j.mrgentox.2013.12.001

青木康展, 松本理 有害大気汚染物質の発がん影響 - 化学物質のリスク評価・管理の観点から - 呼吸器内科, 査読無 23, 492-498 (2013) <http://www.kahyo.com/item/KO201305-235>

[学会発表](計 23 件)

Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ukai A, Gondo Y, Honma M, Nohmi T: Analysis of inherited germline mutations of ENU-treated mice by whole exome sequencing. Society of Toxicology 55th Annual meeting 2016.3.14 New Orleans (USA)

青木康展, 中島大介, 松本みちよ, 松本理, 柳澤利枝, 後藤純雄, 増村健一, 能美健彦: 都市大気浮遊粒子抽出物が gpt delta マウス肺で示す変異原性と突然変異スペクトル. 日本環境変異原学会第 44 回大会 2015.11.28 九州大学馬出キャンパス(福岡県福岡市)

増村健一: アクリルアミドの生殖細胞における変異原性の検討 日本環境変異原学会第 44 回大会(招待講演)2015.11.28 九州大学馬出キャンパス(福岡県福岡市)

増村健一, 鶴飼明子, 豊田尚美, 権藤洋一, 能美健彦, 本間正充: マウス全エキソーム解析による ENU 誘発生殖細胞変異スペクトルの解析 日本環境変異原学会第 44 回大会 2015.11.27 九州大学馬出キャンパス(福岡県福岡市)

増村健一, 森田健, 本間正充: トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験における in vivo 変異原性と発がん性の関係に関する研究 第 74 回日本癌学会学術総会 2015.10.10 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

青木康展: 有害大気汚染物質の指針値策定ガイドラインについて 日本衛生学会第 85 回学術総会(招待講演) 2015.3.27 和歌山県民文化会館(和歌山県和歌山市)

青木康展: 環境中に存在する化学物質のリスク評価の現状と今後の考え方 化学物質の安全管理に関するシンポジウム(招待講演) 2015.2.6 中央合同庁舎第 8 号館(東京都千代田区)

Yasunobu Aoki: Transgenic model animal as a tool for risk assessment of environmental mutagens. 4th Asian Conference on Environmental Mutagens.(招待講演) 2014.12.12 インド化学生物研究所(コルカタ、インド)

Masumura K, Toyoda-Hokaiwado N, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nishikawa A, Nohmi T: Point mutations and deletions induced by aging in liver of gpt delta transgenic

rats. 4 th Asian Conference on Environmental Mutagens 2014.12.10 インド化学生物研究所(コルカタ、インド)

青木康展, 橋本顕子, 菅原良樹, 荒井孝子, 後藤純雄, 増村健一, 能美健彦: ベンゾ[a]ピレンを気管内投与した gpt delta マウス肺中に誘導された突然変異の加齢に伴う変化 日本環境変異原学会第 43 回大会 2014.12.5 学術総合センター(東京都千代田区)

Yagishita M, Ikemori F, Kumagai K, Kinoshita M, Nguyen Quang Trung, Thao Thanh Nguyen, Kadokami K, Nakajima D: Measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons in PM2.5 collected by impactor for high volume air sampler. International Conference of Asian Environmental Chemistry 2014 2014.11.25 Convention Center, Chulabhorn Research Institute (Bangkok, Thailand)

増村健一, 豊田尚美, 石井雄二, 梅村隆志, 能美健彦, 西川秋佳, 本間正充: gpt delta ラットの加齢により誘発される点突然変異および欠失変異の解析 第 37 回日本癌学会学術総会 2014.9.26 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

青木康展, 松本みちよ, 柳澤利枝, 松本理, 中島大介: 1,2-ナフトキノンがマウス肺中で示す変異原性 フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジーシンポジウム 2014.9.19 つくば国際会議場(茨城県つくば市)

増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 能美健彦, 本間正充: gpt delta マウスを用いた加齢に伴い蓄積する遺伝子突然変異の解析 日本進化学会第 16 回大会 2014.8.23 高槻現代劇場(大阪府高槻市)

増村健一: トランスジェニック動物を用いた遺伝子突然変異試験の動向 MMS 研究会第 64 回定例会 2014.6.21 森の温泉ホテル(静岡県熱海市)

柳下真由子, 影山志保, 白石不二雄, 大島茂, 王青躍, 後藤純雄, 青木康展, 中島大介: 大気中の高懸念 PAHs; ベンゾ[c]フルオレンの大気中濃度と国内分布 日本環境変異原学会第 42 回大会 2013.11.29-30 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

Goto S, Yagishita M, Kageyama S,

Shiraishi F, Aoki Y, Wang Q, Mineki S, Ohshima S, Nakajima D. Contribution of benzo[a]pyrene to mutagenicity in ambient air collected at 11 sites in Japan from 2007 to 2009. 2013 International Symposium of Polycyclic Aromatic Compounds 2013.9.8-12 オレゴン (米国)

Yagishita M, Kageyama S, Shiraishi F, Terasaki M, Aoki Y, Wang Q, Ohshima S, Goto S, Nakajima D. Concentrations of PAHs, O-PAHs and PASHs in total suspended particulate and gaseous phase in Japan. 2013 International Symposium of Polycyclic Aromatic Compounds 2013.9.8-12 オレゴン (米国)

Aoki Y. Environmental and human health impacts of pollutants generated by energy production. Harvard Project for Asia and International Relations 2013 Asia Conference(招待講演) 2013.8.23 ドバイ (UAE)

Aoki Y. Risk Assessment of Environmental Chemicals ILSI HESI Workshop (招待講演) 2013.7.5 TKP 大手町カンファレンスセンター (東京都千代田区)

「図書」(計2件)

増村健一:(公社)日本薬学会編,金原出版(株)衛生試験法・注解 2015, 1300(159-161)

青木康展、松本理 東京大学出版会 毒性の科学 2014, 200(180-185)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 康展 (AOKI, Yasunobu)
国立研究開発法人国立環境研究所・環境
リスク研究センター・フェロー
研究者番号: 20159297

(2) 研究分担者

中島 大介 (NAKAJIMA, Daisuke)
国立研究開発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

増村 健一 (MASUMURA, Kenichi)

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝
部・室長

研究者番号: 40291116

野原 恵子 (NOHARA, Keiko)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境
健康研究センター・研究センター長

研究者番号: 50160271

松本 理 (MATSUMOTO, Michi)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境
リスク研究センター・研究調整主幹

研究者番号: 60132867

柳澤 利枝 (YANAGISAWA, Rie)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境
健康研究センター・主任研究員

研究者番号: 70391167

後藤 純雄 (GOTO, Sumio)

麻布大学・生命環境学部・元教授

研究者番号: 30112890

(3) 連携研究者

なし