

称号及び氏名 博士（工学） 大山 正幸

学位授与の日付 平成 25 年 9 月 25 日

論文名 「**Biological effects of various dusts based on macrophage responses to release reactive oxygen species and nitrous acid based on animal exposure experiments**
(種々の粉塵に対するマクロファージの活性酸素放出反応および動物曝露実験による亜硝酸の生体影響に関する研究)」

論文審査委員 主査 竹中 規訓

副査 河野 健司

副査 坂東 博

論文要旨

大気中にはガス状物質やエアロゾルなど様々な汚染物質が含まれている。様々な汚染物質に対して規制が設けられているものの、大気汚染物質による生体影響の問題は十分に解決・解明がされていないわけではない。例えば、喘息の有病率は大気汚染がひどかった昭和の時代より緩やかな増加傾向にある。その有病率は数%から **10%**程度の範囲で報告されており、現在でも大気汚染物質の関与が懸念されている。また、中国からの越境大気汚染に対し、**2013** 年に環境省が暫定的に注意喚起を行う指針をまとめたように、生体影響の疑いがあれば対応するということが行われている。従って、未規制の汚染物質に対しては当然だが、規制されている汚染物質に対しても、それらの生体影響やその機序および生体影響に関連する因子を調べることで規制の妥当性や何を改善すべきかなどを検討する必要がある。

生体影響を調べる手法には、人での疫学調査、動物を用いた実験、細胞などを用いた試験管内実験などがある。規制する場合に重視されるのは疫学調査であるが、生体影響や許容濃度を検討するには動物実験が必要であり、機序の検討には種々の試験管内実験が行われている。

本研究では、大気中に含まれる様々な汚染物質の生体影響に関する動物曝

露実験や疫学調査および試験管内実験に取り組んだ。汚染物質としては、石綿代替鉱物繊維や鉱物粉塵、大気粉塵、亜硝酸ガスを研究対象とした。以下、本研究で得られた成果を要約する。

第1章では、大気中に含まれる汚染物質の生体影響に関する研究の背景と、本論文がどのような目的で、かつ、どのような実験手法により実施したかを述べた。

第2章では、先ず、種々の石綿代替鉱物繊維に対するマクロファージの活性酸素放出反応を調べた結果を述べた。石綿は例外的に猶予されているものを除き全面的に使用が禁止されているが、石綿代替鉱物繊維は、石綿と同様の繊維形状をしており、石綿同様の発がん性が懸念されている。石綿の発がん性は、肺に吸入された石綿をマクロファージが不完全に貪食することにより、マクロファージが異物処理時に放出する活性酸素が細胞外に漏れ出し、生体組織に傷害を与えるためと考えられている。実験の結果、各繊維1本当たりに対するマクロファージの活性酸素放出量は、繊維の種類に関わらず長さが6 μm 以上の繊維において、繊維の長さとは比例関係にあることがわかった。また、長さの異なる石綿代替鉱物繊維に対する活性酸素放出反応の経時的な推移は類似し、かつ、短い繊維はマクロファージの中心に向かって繊維が刺さる様に貪食され、長い繊維はマクロファージに繊維が接する様に貪食されることより、マクロファージの活性酸素放出反応は、鉱物繊維を貪食している状態が完全か不完全かということに依存するのではなく、マクロファージに貪食される繊維の向きに依存すると考察した。

次に、鉱物粉塵の生体影響を疫学調査の種類の中でも信頼性の高いコホート調査により調べた結果を述べた。調査の結果、日本人の肺がんによる死亡率を基に、鉱山で働く男性の肺がんの相対危険度を求めたところ、約2倍となることを示した。但し、その鉱山はカオリナイトとゼオライトを採掘し、労働者はクリノプチオライトやクオーツおよびモルデナイトの曝露も受けており、どの鉱物の影響かを特定することは困難だった。

第3章では、シリカ粉塵の吸入で起きる珪肺症（線維化など）でもマクロファージが放出する物質の関与が考えられていることから、マクロファージの活性酸素放出反応を指標とし、大気粉塵のどのような成分が活性酸素の放出を亢進させるのかを検討した結果を述べた。調査に当たり、大気粉塵の捕集方法を検討した。実験に必要な量の大気粉塵を短時間に集めるにはハイボリ

ウムエアサンプラーを使用する必要がある。通常使用される石英フィルターで捕集すると、大気粉塵試料にフィルターの石英繊維が混入する。従って、ポリテトラフルオロエチレン製フィルターで大気粉塵を捕集し、水洗いにより大気粉塵試料を得る方法を考案した。実験の結果、シリカ粒子に対しては試料投与量の増加に伴い活性酸素放出量も増加することがわかった。大気粉塵に対しては、少ない試料投与量でシリカ粒子の最大投与量による活性酸素放出量に匹敵する放出量が観察されたが、試料投与量の増加に伴い活性酸素放出量が低下した。大気粉塵の投与量の増加に伴い活性酸素放出量が低下した原因はわからないが、この結果は、少量の吸入では大気粉塵の方が珪肺症を起こすシリカ粒子より生体影響は強い可能性を示唆した。大気粉塵と比較的類似の反応性を示した粒子は、一般的に大気粉塵のモデル粒子として用いられているディーゼル排気粒子試料ではなく、変異原性物質の **3-Nitrobenzantrone** をカーボン粒子にコーティングした試料であった。カーボン粒子単体では、この反応性を示さなかったことから、大気粉塵が示すこの反応性発現の原因物質としては、変異原性などの化学的要因が重要であることを示唆した。

第4章では、動物曝露実験による生体影響の報告が無かった亜硝酸について、先ず、動物曝露実験用に開発した亜硝酸ガス発生装置について述べ、次に、モルモットとマウスに対して亜硝酸曝露実験を実施し、亜硝酸の生体影響について調査した結果を述べた。

大気中の窒素酸化物では二酸化窒素が疫学調査により喘息影響があるとして **1978** 年に規制されている。しかし、亜硝酸ガスが大気中に存在することが **1980** 年に報告され、二酸化窒素の測定では亜硝酸も二酸化窒素として検出されることが知られるようになった。従って、二酸化窒素規制の検証のために、亜硝酸の生体影響の検討が必要である。

亜硝酸の生体影響に関する報告は少なく、**1995** 年の **2** 報の人体吸入実験と **2005** 年の疫学調査しか影響を認めた報告は無かった。人体吸入実験では、室内濃度の百倍程度の濃度の亜硝酸吸入で呼吸機能の低下や刺激性症状の誘導などが認められた。また、二酸化窒素と亜硝酸を分離測定した疫学調査では、呼吸機能低下は二酸化窒素より亜硝酸との関連が強く、従来二酸化窒素の影響とされていた喘息症状は亜硝酸が原因だったと示唆している。本研究ではこれまでに報告例がない亜硝酸の動物曝露実験を実施することによ

り、亜硝酸の生体影響を調べた。

これまでに亜硝酸の動物暴露実験の報告がなかった理由として、動物暴露実験用の亜硝酸ガスの発生が難しいことが考えられる。実際、既存の亜硝酸ガス発生方法では動物暴露実験用としては発生量が不十分であり、長時間の連続発生も困難であった。そこで、多孔性ポリテトラフルオロエチレンチューブを用い、既存の発生法に比べて二酸化窒素や一酸化窒素の副生成物の発生割合は高いが大量の亜硝酸を長時間連続して発生させることができる方法を開発した。

次に、副生成物の生体影響は無視できる濃度で、できるだけ高濃度の亜硝酸をモルモットに曝露した。モルモットは、実験動物種の中では肺の構造が比較的人間に近く、喘息影響を調べる実験で良く用いられる実験動物種である。**3.6 ppm**の亜硝酸を**4**週間モルモットに連続曝露した結果、肺気腫様変化や気管支拡張や平滑筋細胞を伴う気管支上皮細胞の肺胞道への伸展や肺胞道の湾曲を認めた。さらに、亜硝酸の致死影響を検討する目的で、二酸化窒素による致死濃度に近い濃度の亜硝酸をマウスに曝露した。マウスは遺伝形質を均一化させた実験動物種だが、肺の構造は人間と異なり、喘息と関連する気管支平滑筋や好酸球が乏しく、実験的に喘息発作を起こすことができない動物種である。**8.4 ppm**の亜硝酸を**3**週間マウスに連続曝露した結果、体重低下や肺重量への影響、肺での線維化および致死影響は認められず、亜硝酸は致死影響や肺での傷害性が弱いことを認めた。これらの結果は、亜硝酸は気管支平滑筋や好酸球に作用し、喘息患者でみられる肺気腫様変化に至ることを示唆した。

第5章では、本研究で得られた成果を総括した。

審査結果の要旨

本論文は、動物暴露実験や疫学調査および試験管内実験により、大気中に含まれる石綿代替鉍物繊維や鉍物粉塵、大気粉塵、亜硝酸ガスによる生体影響をについて述べたものであり、以下の成果を得ている。

- (1) 種々の石綿代替鉍物繊維に対し、発がんの原因と考えられているマクロファージの活性酸素放出反応を調べ、発がん性の危険性があることを明らかにしている。繊維の種類に関わらず、活性酸素放出量が線維の長さと同比例関係にあり、さらにマク

ロファージに貪食される繊維の向きが重要であることを見出している。この結果は、石綿代替繊維に発がんの危険があることを示唆した重要な知見を提示するものである

- (2) 鉍物粉塵の生体影響を疫学調査の一つであるコホート調査により調べ、鉍山労働者の肺がんの相対危険度は、一般と比べ約2倍であることを明らかにしている。その原因がどの鉍物の影響によるものかを特定するまでには至らなかったが、労働環境の改善に非常に重要な示唆を与える結果として評価できる。
- (3) 粒子捕集にポリテトラフルオロエチレン製フィルターを用いる新たな方法を考案し、大気粉塵の吸入で起きる珪肺症に関与する成分を検討し、変異原性物質の **3-Nitrobenzantrone** を含む試料が、実際の大気粉塵と同様の反応性を示すことを明らかにしている。この結果は、変異原性などの特性が珪肺症に重要であることを示した重要な知見として評価できる。
- (4) 動物曝露実験に適した新規の亜硝酸ガス連続発生法を開発した上で亜硝酸の動物曝露実験を行い、亜硝酸の生体影響を報告している。喘息と関連する気管支平滑筋が乏しいマウスでは、亜硝酸の影響はなかったが、肺の構造が比較的人間に近いモルモットでは影響があったことから、亜硝酸は喘息の原因としては二酸化窒素よりも重要である可能性を示唆している。この結果は、生活環境改善、環境基準の見直しなど、安全で快適な生活に密接した結果を示すものであり、非常に重要な知見として評価できる。

以上の諸成果は、様々な大気中の物質の生体影響を明らかにするとともに、新規の粒子の採取法や亜硝酸ガスの発生法を開発したものであり、大気汚染物質による生体影響の分野の学術的進歩に貢献し、安全で快適な生活を送る環境対策に貢献するところが大きい。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。