

1. 研究目標及び研究成果の概要

課題名：ダイオキシン類と多環芳香族炭化水素類の複合毒性の評価に関する研究

研究機関名：独立行政法人 国立環境研究所

任期付研究員氏名：宮原 裕一

【研究目標】

既に、我々は実験動物にディーゼル排気ガス(DE)を曝露し、多様な生体影響が生じることを明らかにしている。その生体影響のうち幾つかには、活性酸素産生に伴う酸化ストレスの増大が症状の悪化に関与していると考えられている。一方、我々はディーゼル排気微粒子(DEP)にダイオキシン類および多環芳香族炭化水素類(PAHs)が存在することを明らかにしているが、これら化合物と上記生体影響との因果関係の解明は遅れている。さらに、化学成分によるDEの一般化は未だなされていない。近年、DEPにも含まれるダイオキシン類のヒト健康影響に関する関心が集まっているが、ダイオキシン類同様、燃焼により生じるPAHsなどの他の化合物については、その発生量の多さにも関わらず、その曝露評価と複合作用の解明が遅れている。そこで、本研究では、DEの組成を明らかにし、ダイオキシン類とPAHsの生体内動態と酸化ストレスとの因果関係を解明するとともに、それらの曝露評価に必要な簡易大気モニタリング手法を開発することを試みた。

【研究成果】

DEP中のダイオキシン類濃度は、865pg/g・粒子(10.6pg-TEQ/g・粒子)であった。一方、DEP中のPAHs14種の合計濃度は、207μg/g・粒子(2.82～202ng-TEQ/g・粒子)であった。実験動物をディーゼル排気曝露施設内で飼育し、その生体中に含まれるダイオキシン類含量の測定を行った結果、DE曝露による肝臓や脂肪組織でのダイオキシン類の蓄積は認められず、肺は試料量が不足したためダイオキシン類の定量が不可能であった。一方、PAHsは粒子とともに肺に沈着し、経時的・用量依存的な蓄積が観察された。また、一部のPAHsは内蔵脂肪にも移行・蓄積する傾向が見られたが、肝臓では顕著な蓄積傾向が認められなかった。さらに、DE曝露動物とダイオキシンを経口投与した動物を用意し、その臓器中ダイオキシン濃度と酸化ストレスとの関係を観察したが、いずれも8-OHdG量の増加は観察されず、DNAの修復機能を超えるような酸化ストレスが生じていないことが明らかとなった。しかし、DE曝露した動物肝臓中のレチノイド含量を測定したところ、DE曝露群で有意な減少が観察され、DE曝露によって確かに酸化ストレスを受けていることが明らかとなった。動物実験と平行して毛糸を用いた大気汚染物質のモニタリングについて検討を行なったところ、化合物の蒸気圧あるいは存在形態によって毛糸への吸着特性は異なるが、曝露期間やその大気中濃度に応じダイオキシン類やPAHsが毛糸に吸着されることが明らかとなった。

2. 研究実施計画

課題名：ダイオキシン類と多環芳香族炭化水素類の複合毒性の評価に関する研究

研究機関名：独立行政法人 国立環境研究所

任期付研究員氏名：宮原 裕一

①研究の意義・目的・必要性

既に、我々は実験動物にディーゼル排気ガス(DE)を曝露し、発ガン、アレルギー性疾患の増強、精子数の減少あるいは催奇形性といった多様な生体影響が生じることを明らかにしている。生体影響のうち幾つかは、活性酸素産生に伴う酸化ストレスの増加がその症状の悪化に関与していると考えられている。さらに、中西ら(1996)によると有害大気汚染物質に起因する年間発ガン推定数のほとんどがDEに起因している。一方、我々はディーゼル排気微粒子(DEP)にダイオキシン類および多環芳香族炭化水素類(PAHs)が存在することを明らかにしているが、これら化合物と上記生体影響との因果関係の解明は遅れている。さらに、DE曝露量は通常その粒子濃度で表されており、その構成成分によるDEの一般化は未だなされていない。近年、DEPにも含まれるダイオキシン類は、発ガン性、免疫機能の低下作用および生殖毒性等を有することから、そのヒト健康影響について関心が集まっている。しかし、燃焼によりダイオキシン類と同時に発生するPAHsなど他の化合物については、その発生量の多さにも拘わらず、その曝露評価と複合作用の解明が遅れている。

そこで、本研究では、まずDEを一般化するため、そのダイオキシン類とPAHsの組成を明らかにし、次いで両化学物質の生体内動態と酸化ストレスとの因果関係を解明と、簡易な大気モニタリング手法の開発を試みた。そして、燃焼によって生じるダイオキシン類とPAHsのリスク評価を行なうために必要な、酸化ストレスとの用量—反応関係や、ダイオキシン類とPAHsのヒト曝露量調査に必要な知見を得ることを目的とした。

本研究を遂行することで、ダイオキシン類とPAHsの複合影響や相互比較が可能になるだけではなく、既知のDE曝露による生体影響についても化学成分との因果関係を検証することが可能となる。またDEの化学成分の比較から、異なるDE曝露装置による実験結果の相互比較も可能となる。さらに、本研究の波及効果として、DEの多様な生体影響のメカニズム解明に必要な知見が得られる可能性がある。さらには、国立環境研究所として独自に、これら化合物の環境中への放出を規制するためのデータを国内外に発信することが可能になると考えた。

②研究計画・内容(方法も含む)

本研究では、1. DEがダイオキシン類とPAHsの両方を含むこと、2. 過去の国立環境研究所におけるDE曝露実験の結果を検証することが可能になることから、実験動物にDEを曝露し、その毒性発現における複合作用の解明を以下の手順で試みた。

1. DE中のダイオキシン類とPAHsの定量

DEの毒性発現に関与すると思われるDE中のダイオキシン類とPAHsの組成およびその含量を、高分解能GC/MSおよび蛍光検出器付HPLCを用いて測定した。

2. DE曝露した実験動物でのダイオキシン類とPAHsの体内動態の解明

DE曝露により生体に取り込まれたダイオキシン類およびPAHsについて、その生体内での挙動を解明する。具体的には、DEを長期間曝露し、臓器中のダイオキシン類およびPAHs両化合物について、その経時的な濃度変化と用量依存的な蓄積を上述のGC/MSおよびHPLCで測定した。

3. ダイオキシン類とPAHsの毒性発現における複合作用の解明

ダイオキシン類とPAHsの毒性発現における相互作用を明らかにする。具体的には、ダイオキシン

類とPAHsを単独あるいは混合して実験動物に投与し、DEの毒性発現に大きく関与すると考えられている酸化ストレスの定量およびダイオキシン類とPAHs曝露量との相互比較を行なう。酸化ストレスの指標であるDNA塩基の酸化的障害産物である8-OHdGと、抗酸化ビタミンであるレチノイド(ビタミンA)を臓器より抽出し、それぞれ、電気化学検出器付きHPLCと蛍光検出器付きHPLCで定量を行なった。

4. ダイオキシン類とPAHsの曝露評価(大気モニタリング)

ダイオキシン類とPAHsのリスク評価にあたり、その大気中濃度の測定は欠かせない。しかし、それらの捕集には高価な機器が必要であり、個人レベルでの詳細な曝露評価は困難である。本研究の過程で実験動物の体毛からダイオキシン類やPAHsが検出され、毛糸を用いた大気汚染物質の中～長期モニタリングの可能性が見えてきた。そこで、毛糸を用いた簡易モニタリングの可能性について詳細な検討を行なった。

③研究の目標

1. DE中のダイオキシン類とPAHsの定量を行なうことで、異なるDE曝露条件を一般化し比較する際の基礎データを得る。
2. DE曝露した実験動物でのダイオキシン類とPAHsの体内動態を解明し、それら化学物質曝露と既知の生体影響との因果関係を検討する。
3. 酸化ストレスを指標として、ダイオキシン類とPAHsの複合曝露の影響を明らかにする。
4. ダイオキシン類とPAHsのヒト曝露評価のため、毛糸を用いた両化合物の簡易的なモニタリング方法を開発する。

④ポンチ絵(研究概要)

(別紙)

3. 所要経費の推移

課題名：ダイオキシン類と多環芳香族炭化水素類の複合毒性の評価に関する研究

研究機関名：独立行政法人 国立環境研究所

任期付研究員氏名：宮原 裕一

(単位:百万円)

11年度	12年度	13年度	合計
14	12	11	37

4. 研究成果

課題名：ダイオキシン類と多環芳香族炭化水素類の複合毒性の評価に関する研究

研究機関名：独立行政法人 国立環境研究所

任期付研究員氏名：宮原 裕一

①研究成果

1. DE中のダイオキシン類とPAHsの測定

DE中のダイオキシン類は粒子(DEP)に吸着しており、その濃度は 865pg/g・粒子(10.6pg·TEQ/g・粒子)であった。一方、DE中の主要なPAHsは、ナフタレン、フルオレン、フェナンスレンで、その大部分はガス態であった。また、DEPには難揮発性のPAHsが吸着しており、測定対象とした14種のPAHsの粒子中合計濃度は、207 μg/g・粒子であった。さらに、近年報告されたPAHsのTEF(ダイオキシン等価係数)を用いて、このPAHs量をダイオキシン量に換算すると、用いた等価係数によって差があるが、2.82～202ng·TEQ/g・粒子となつた。

2. DE曝露した実験動物におけるダイオキシン類とPAHsの体内動態

実験動物をディーゼル排気曝露施設内で飼育し、その生体中に含まれるダイオキシン類とPAHs含量の測定を行った。その結果、肝臓や脂肪中のダイオキシン類濃度はDE曝露群に比べ对照群の方が高いなど、DE曝露によるダイオキシン類の蓄積は認められなかった。さらに、肺では試料量不足のためダイオキシン類の定量が不可能であった。一方、PAHsは粒子とともに肺に沈着し、経時的・用量依存的な蓄積が観察された。また、一部のPAHsは内蔵脂肪にも移行・蓄積する傾向が見られたが、肝臓では顕著な蓄積傾向が認められなかった。以上の結果から、肝臓ではPAHsにより代謝酵素が誘導され、PAHsとともにダイオキシン類の排泄が促進されていると考えられた。さらに、実験動物のダイオキシン類およびPAHs曝露源として動物飼料に着目し、そのダイオキシン類およびPAHs含量の測定を行った。その結果、それぞれ少ないながらも検出され、動物の餌摂取量と呼吸量との比較や、代謝酵素の誘導等を考慮すると、DE曝露による肝臓や脂肪組織(肺を除く)へのこれら化学物質の蓄積を観察するのは困難と考えた。

3. ダイオキシン類とPAHsの曝露量と酸化的ストレス

上述の通り、DE曝露ではダイオキシンの曝露量がPAHsの曝露量よりも極端に少ないことが明らかとなつたため、ダイオキシンを経口投与した動物(800ng·TCDD/kg·bw)を用意し(経気道投与は不可能)、その臓器中ダイオキシン濃度と酸化ストレスとの関係を観察した。一方、DE曝露動物についても同様な観察を行なつた。その結果、ダイオキシン投与動物において臓器中8-OHdG量の増加は観察されず、またDE曝露動物においても、肺と肝臓において8-OHdG量の増加は観察されず、いずれもDNAの修復機能を超えるような酸化ストレスは生じていないことが明らかとなつた。一方、DE曝露した動物肝臓中のレチノイド含量を測定したところ、DE曝露群で有意な減少が観察され、臓器の恒常性は保たれてはいるものの、DE曝露によって肝臓が酸化ストレスを受けていることが明らかとなつた。

4. 大気中ダイオキシン類およびPAHsの簡易モニタリング

本研究の最終目的のひとつは、我々ヒトへの両化合物の曝露量を知ることであるが、本研究の過程で実験動物の体毛からかなりのダイオキシン類やPAHsが検出された。これは大気中に存在する両化合物が体毛に吸着するためと考え、毛糸を室内外に放置したところ、そのダイオキシン類およびPAHs含量が経時的に増加することが明らかとなつた。そこで、動物実験と平行して毛糸を用いた大気汚染物質のモニタリングについて検討を行なつた。まず、毛糸にDEを曝露したところ、毛糸のダイオキシン類吸着量が曝露期間に応じ、ほぼ直線的に増加したが、DE中のダイオキシン類濃度

が低いためか、DEP濃度に応じたダイオキシン類吸着量の増加は観察されなかった。一方、毛糸に吸着したPAHs量は、1、2または4週間の曝露期間いずれにおいても、DEP濃度に対応し増加していた。しかし、蒸気圧が高く主にガス態で存在するフェナンスレンは、比較的短時間でその吸着が平衡に達するためか、曝露期間の増加にともなう吸着量の増加は見られなかった。一方、DEPに吸着し存在するベンゾ[k]フルオランセンは、曝露期間に応じ、その吸着量が徐々に増加する傾向が見られた。以上により、化合物の蒸気圧あるいは存在形態によって毛糸への吸着特性が異なることが明らかとなった。さらに、大気中ダイオキシン類のモニタリングのため、毛糸を外気に曝露したところ、曝露期間に応じ、そのダイオキシン類吸着量は増加した。以上より、ダイオキシン類およびPAHsが大気中濃度に応じ毛糸に吸着されることが明らかとなつたが、その吸着特性から毛糸を用いたPAHsのモニタリングには2週間、ダイオキシン類に関しては1ヶ月間の曝露期間が最適と判断した。

②波及効果、発展方向、改善点等

本研究により、DEの組成の一部が明らかになり、DE曝露装置の運転状況や異なる曝露装置を比較するための基礎データが得られた。また、DE中にはPAHsがダイオキシン類よりもTEQ換算で数桁多く含まれていることが確認された。従って、DE曝露は、ダイオキシン類とPAHsの複合曝露というよりもPAHsの単独曝露に近いことが明らかとなった。しかし、実際の環境に置き換えてみると、大気中に放出されるダイオキシン量を減らすだけでなく、同時に放出されるPAHs量も削減する必要があることを示唆している。一方、PAHs量をダイオキシン換算し毒性量として表すことで、DE中のダイオキシン類(PCDDs+PCDFs+Co-PCB)およびPAHsといった多種の化学物質を一元化して表すことが可能となり、異なるDEを比較する際、この方法は有効であると考えた。さらに、DE曝露による肺でのPAHs蓄積量が明らかとなったことから、PAHsと因果関係の明らかなDEの生体影響について、その量—反応関係を導くことが可能となった。

当初、酸化ストレスとして臓器中8-OHdG量をエンドポイントとして、ダイオキシン類とPAHsの複合作用を観察する予定であったが、DE曝露では8-OHdG量は有意な増加を見せず、またダイオキシン投与動物においても同様であったことから、臓器中8-OHdG量が酸化ストレスの適切な指標であるとは言い難い。今後可能であれば、臓器中ではなく、DNAが修復され血液中または尿中に切り出された8-OHdGを測定することが望まれる。また、毛糸を用いた簡易モニタリングの可能性が示唆されたので、今後、大気中濃度と毛糸吸着量との量的な関係を明らかにし、気温や湿度等の気候条件の影響を明らかにして、実際に有害化学物質のモニタリングに役立てたいと考えている。

最後に、DE曝露がダイオキシン類とPAHsの複合曝露にはなり得なかつたので、経気道曝露にこだわらず、さらにダイオキシン類とPAHsの複合影響を観察する必要がある。また、in vitro の実験でPAHsに与えられたTEFに相当する反応が実際の動物個体で観察できるかどうか確認する必要がある。

5. 研究成果公表等の状況

課題名 : ダイオキシン類と多環芳香族炭化水素類の複合毒性の評価に関する研究
 研究機関名 : 独立行政法人 国立環境研究所
 任期付研究員氏名 : 宮原 裕一

1. 研究発表等

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	0	2	17	19
国外	3	0	14	17
合計	3	2	31	36

注) 件数は既発表分及び投稿中のものを合計した数を記入

(2) 原著論文による発表の内訳

1) 国内[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年等)]

(計 0 件)

2) 国外[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年等)]

(計 3 件)

1: Induction of metallothionein in the livers of female Sprague-Dawley rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Nishimura N, Miyabara Y, Suzuki JS, Sato M, Aoki Y, Satoh M, Yonemoto J, Tohyama C., *Life Sci.* **69**(11):1291-303 (2001).

2: Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5alpha-reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. Ohsako S, Miyabara Y, Nishimura N, Kurosawa S, Sakaue M, Ishimura R, Sato M, Takeda K, Aoki Y, Sone H, Tohyama C, Yonemoto J., *Toxicol Sci.* **60**(1):132-43 (2001).

3: The effects of perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune organs in rats. Nohara K, Fujimaki H, Tsukumo S, Ushio H, Miyabara Y, Kijima M, Tohyama C, Yonemoto J., *Toxicology*. **154**(1-3):123-33 (2000).

(3) 原著論文以外による発表の内訳

1) 国内[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年等)]

(計 2 件)

1: ダイオキシン類の内分泌攪乱作用と毒性、宮原裕一、遠山千春、月刊エコインダストリー **4**(8):5-12

(1999). 総説

2: 特集: 内分泌攪乱化学物質 ポリ塩化ビフェニール、宮原裕一、米元純三、日本臨牀
58(12):2422-7(2000). 総説

2)国外[発表題名、発表者名、発表誌名等(雑誌名、巻、号、頁、年 等)]

(計 0 件)

2. 特許出願等[件名、出願者氏名、出願年月日、特許番号 等]

(計 0 件)

3. 受賞等[件名、受賞者氏名、受賞年月日 等]

(計 0 件)