

## (5) ディーゼル排気曝露の鼻アレルギー反応およびアレルギー性結膜炎に及ぼす影響の閾値の推定

小林隆弘(国立環境研究所 環境健康研究領域), 細川友和(星薬科大学薬学教育センター), 飯嶋麻里子(筑波大学医学系)

### 要旨

これまでに 300 および 1,000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  の DEP を含む DE にモルモットを曝露しながら抗原を点鼻あるいは点眼投与して惹起させるアレルギー性鼻炎様病態およびアレルギー性結膜炎様病態は DEP 濃度に依存して増悪することを観察してきた。また、50 および 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  の DEP を含む DE にモルモットを曝露した場合についても影響の検討が行われていることからこれらの結果を併せて解析し、影響のする閾値の推定を行った。解析には Crump らの統計学的手法を用いて Most Likely Estimate (最尤推定値, MLE)、Benchmark-Concentration (基準濃度, BMC) を算出した。最小毒性量 LOAEL (lowest observed adverse effect level ある影響指標に関して有害影響が認められた最低の投与量) や、無毒性量 NOAEL (no observed adverse effect level ある影響指標に関して有害影響が認められない最高の投与量) も併記した。その結果 3, 4, 5, 6 回目の抗原投与によるくしゃみ回数と鼻汁量増加の BMC はそれぞれ 98, 13, 49, 102 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  および 50, 39, 13, 12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。また、アレルギー性結膜炎様病態を増悪させる (6 回目の抗原点眼後の結膜からの血漿の漏出を指標) BMC はそれぞれ 63 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。今後、実験動物に DE 曝露し観察された生体影響からヒトへの DE 曝露による健康影響の予測をすることが必要となる。

### 背景と目的

非発がん影響についての実験動物を使った知見は年々蓄積されてきている。非発がん影響についても、疫学研究においてヒトへの影響の曝露量(濃度) - 反応関係が明確である場合はそのデータを用いて評価することが重要である。疫学研究において曝露に関する情報が限られていることや、交絡因子の影響を完全に排除することが難しいなどの問題を抱えているのが現状である。DE の非発がん影響においては呼吸器疾患や呼吸器症状については疫学調査が比較的進んでいる。一方、アレルギー疾患やアレルギー症状と DE との関連については十分なデータが得られていない。また、これら以外の疾患や症状との関連の調査についてはほとんど行われていないのが現状である。動物実験の場合、種々の曝露濃度や曝露期間を変えた実験が可能なこと、均一な対照群を容易に設定できること、抗原の吸入や投与などといった負荷をかけた実験が可能なこと、病理組織学的な検討が可能なこと、鋭敏ではあるが生体への侵襲が必要となるような指標を使った影響観察が可能なこと、など多くの利点があり、実験動物を使用した DE 曝露の生体影響のデータをヒトの健康リスクの評価の際に使用することは必要なことと考えられる。US-EPA, CA-EPA, WHO といった米国および国際的な機関においても同様な考え方により、動物の毒性データを用いた非発がん影響のリスクの検討を行っている。

定量的評価を行うには、影響の観察に用いた曝露濃度ができるだけ多いこと、1 群の曝露匹数ができるだけ多いこと、多種および多系統での影響の検討が行われていることなどが評価の信頼性を増すという点から望ましいが、投与実験に比べ吸入曝露実

験には高価な曝露装置などの設備と運転のための費用などが必要とされることから、曝露濃度を対照以外に4濃度以上にして影響を観察した例は非発がん研究だけを対象とした研究の場合ほとんどないのが現状である。本研究では300および1,000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ のDEPを含むDEにモルモットを曝露しながら抗原を点鼻あるいは点眼投与して惹起させるアレルギー性鼻炎様病態およびアレルギー性結膜炎様病態はDEP濃度に依存して増悪することを観察した。また、50および100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ のDEPを含むDEにモルモットを曝露した場合についても影響の検討が行われていることからこれらの結果を併せて解析した。解析にはCrumpらの統計学的手法を用いてMost Likelyhood Estimate (最尤推定値, MLE) Benchmark-Concentration (基準濃度, BMC) を算出した。最小毒性量LOAEL (lowest observed adverse effect level ある影響指標に関して有害影響が認められた最低の投与量) や、無毒性量NOAEL (no observed adverse effect level ある影響指標に関して有害影響が認められない最高の投与量) も併記した。

## 方法

動物実験のデータから生体影響のレベルとして、最小毒性量LOAEL (lowest observed adverse effect level ある影響指標に関して有害影響が認められた最低の投与量) や、無毒性量NOAEL (no observed adverse effect level ある影響指標に関して有害影響が認められない最高の投与量) や、用量 (濃度) - 反応関係を考慮しNOAELを数学的に求めるBenchmark-Dose (Concentration) (基準量 (濃度), BMD (BMC)) が用いられている。LOAELは実験で計画した用量水準の濃度に強く依存し、実験の設計の仕方によってLOAEL値が異なる値となること、用量 (濃度) - 反応曲線の問題が取り入れられていないことなどの問題がある。また、従来のNOAELの求め方は実験で計画した用量水準の濃度に強く依存し、実験の設計の仕方によってNOAEL値が異なる値となること、ある曝露水準のサンプルサイズが大きいほど有意になりやすく、サンプルサイズが小さければ有意になりにくいこと、用量 (濃度) - 反応曲線の問題が取り入れられていないことなどの問題がある。BMD (BMC) は実験で計画した用量水準の濃度にNOAELほどは強く依存しないこと、実験のサンプル数が増えて精度が上がるほど信頼区間の幅が小さくなり影響指標のリスク値に対応する濃度の推定下限値は、安全な用量の推定値、が大きくなる傾向になること、用量 (濃度) - 反応曲線の問題が取り入れられていることなどの長所を持っている一方、影響指標の何パーセントまでの変化をリスクの限界と考えるかの値を決める根拠がはっきりしないことなどの問題がある。また、BMD (C) を算定するときの回帰曲線からのMost Likelyhood Estimate (最尤推定値, MLE) は、個々のばらつきを考慮し信頼限界の上限曲線の下限をとり安全側にふっているBMD (C), と比較しこの点の考慮がなされないことになる。これらのことから、本報告では曝露濃度 - 反応関係に基づき、Benchmark-Concentration (基準濃度, BMC) を算出する一方MLE, LOAEL, NOAELの値も併記することとした。BMCの計算はCrumpらの統計学的手法により行った。

以下の式を用いて濃度-反応の回帰曲線を最尤法にて推定した。

$$F(c) = q_0$$

$$F(c) = q_0 + \text{sign} \cdot (q_1 (c - c_0) + \dots + q_k (c - c_0)^k)$$

上式においてFは濃度cにおける平均的な反応で、 $k, q_0, \dots, q_k$ は $c_0$ を閾値とした場合のパラメーター、*sign*は濃度依存的に反応が増加するときを1、反応が減少するときを-1とする。

影響の閾値は存在するとの仮定に立ち，急性毒性，亞慢性・慢性毒性，発がん等の評価で通常用いられている影響が10%となる95%の信頼限界の上限曲線との交点をBMCとして計算した。

また，影響機構の点でもできるだけ人に類似した指標の変動が見られるかどうかに着目し解析した。

## 結果

### 1 アレルギー性鼻炎様病態に及ぼす影響

#### アレルギー性鼻炎様病態に及ぼす影響

モルモットを用いたアレルギー性鼻炎様病態も花粉症にみられるようなくしゃみ，鼻水，鼻づまりの症状や鼻過敏，抗原特異的抗体産生の亢進，好酸球の浸潤などが見られる。Kobayashiら（2000）は，300および1,000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ のDEPを含むDEにモルモットを曝露しながら抗原を点鼻投与して惹起させるアレルギー性鼻炎様病態はDEP濃度に依存して増悪することを観察した。50および100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ のDEPを含むDEにモルモットを曝露した場合の結果も併せて解析すると3，4，5，6回目の抗原投与によるくしゃみ回数増加のBMC，MLE，LOAEL，NOAELを算出し，表1に示した。

表1 モルモットのDE曝露におけるくしゃみ回数に関するBMC等

	BMC ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	MLE ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	LOAEL ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	NOAEL ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
3回目	98	103	1,000	300
4回目	13	19	1,000	300
5回目	49	98	300	100
6回目	102	102	1,000	300

また，同実験における鼻汁量増加のBMC，MLE，LOAEL，NOAELを算出し，表2に示した。

表2 モルモットのDE曝露における鼻汁量増加に関するBMC等

	BMC ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	MLE ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	LOAEL ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	NOAEL ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
3回目	50	51	ND	1,000
4回目	39	91	300	100
5回目	13	77	1,000	300
6回目	12	113	1,000	300

### 2 アレルギー性結膜炎様病態に及ぼす影響

モルモットを用い 300 および 1,000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  の DEP を含む DE にモルモットを曝露しながら抗原を点眼投与して惹起させるアレルギー性結膜炎様病態は DEP 濃度に依存

して増悪することを6回目の抗原投与による結膜からの血漿の漏出を指標に観察した。50および100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ のDEPを含むDEにモルモットを曝露した場合の結果も併せて解析しBMC, MLE, LOAEL, NOAELを算出し, 表3に示した。

	BMC ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	MLE ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	LOAEL ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	NOAEL ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )
6回目	63	155	300	100

### 考察

これまでの検討からDEがアレルギー性鼻炎様病態であるくしゃみや鼻水を増加させることを見だし3, 4, 5, 6回目の抗原投与によるくしゃみ回数と鼻汁量増加のBMCはそれぞれ98, 13, 49, 102 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ および50, 39, 13, 12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。DEが鼻アレルギー反応を増悪させる機構としてはDEが直接上皮を傷害したり, 浸潤した好酸球より出される物質群により上皮が傷害され鼻が過敏になり鼻において起きるアレルギー反応により放出されるヒスタミンなどのケミカルメディエーターに対し強く反応する可能性や, 抗原特異的抗体産生が亢進し抗原に対し強く反応する可能性がある。これらのヒトの鼻アレルギー反応を増悪させる機構を考える上で重要な指標についても影響があるとの結果が出ることは鼻アレルギー反応を増悪させることを支持する上で重要と考えられる。モルモットのモデルにおいては, 炎症において好酸球の浸潤がしやすいモデルであることがあり, この点はマウスやラットの系とは異なっている。DEがアレルギー反応においてモルモットの鼻上皮および上皮下の好酸球の浸潤を亢進することは, ヒトやマウスでも観察されていることからモルモットにのみ観察されることではないものと考えられる。また, モルモットの鼻アレルギー反応はIgG1を介したものであり, IgEを主に介しているヒトの場合と異なるとの見方もある。ヒト, マウス, ラットにおいてIgG1 およびIgEのいずれもTh2と呼ばれるヘルパーT細胞の2型への分化が重要である。モルモットのこの系ではIgG1とともにわずかではあるがIgEの上昇も観察されており, Th2への分化が亢進しているものと考えられる。また, モルモットのIgE様の抗体価(皮内反応を希釈血清の皮内投与の1週間後にみる)の上昇がみられていることや, マウスやラットの吸入抗原に対する抗体産生の系でもIgE産生は増加あるいは増加傾向がみられることから, このモデルにおいてもTh2への分化が促進されているものと推察される。したがって, DEが鼻アレルギー反応を増悪させる機構についてもヒトで観察される鼻アレルギー反応増悪の機構と同様の機構があると推察された。くしゃみ回数と鼻汁量は鼻アレルギーの症状を観察していることから, 鼻重量を増加させる濃度まで(BMC(12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ))を鼻アレルギー様病態の増悪と関係する可能性を持つものとするのが妥当と思われる。DEPの鼻部への沈着が非常に少ないと考えられる点から, ガス状成分が増悪の原因とみて, 粒子状物質の関与を否定する考えも成り立つものと考えられる。しかし, 粒子状成分を取り除いたDE曝露では影響の出方が低下することから, 粒子状成分の関与はあるものと思われる。今後, DEPのみの曝露において鼻アレルギーの増悪が起きるかについての検討が必要である。また, モルモットの鼻部でのDEPの曝露量の推定も重要である。

これらのことから, DEは喘息や鼻アレルギー様病態を比較的低い濃度(BMCが約10

~ 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) で増悪する可能性が示唆された。

一方、モルモットを用い300および1,000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ のDEPを含むDEにモルモットを曝露しながら抗原を点眼投与して惹起させるアレルギー性結膜炎様病態はDEP濃度に依存して増悪することを6回目の抗原投与による結膜からの血漿の漏出を指標に観察されたが、50および100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ のDEPを含むDEにモルモットを曝露した場合の結果も併せて解析すると、BMC, MLE, LOAEL, NOAELはそれぞれ63, 155, 300, 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。客観的指標としては定量性に欠けるが300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ で結膜の炎症性のスコア値も上昇することからDEがアレルギー性結膜炎を増悪させていると考えられる。今後、モルモットの眼部でのDEPの曝露量の推定も重要と考えられる。

次に、実験動物にDE 曝露し観察された生体影響からヒトへのDE 曝露による健康影響の予測をすることが必要となる。この場合に多くの限界がある。実験動物とヒトは類似している一方で解剖学的に大きく異なっている(体重, 肺の重量, 気道の直径, 分枝数, 肺胞の大きさや表面積など)。また, 構成細胞の機能や細胞を構成する分子群などにおいても異なっている。また, 生理学的, 化学的な観点からも, 呼吸回数, 吸気や呼気の体積, 流量, 気道の抵抗, 酸素消費量, 肺のクリアランス, 代謝, 心拍数, 血圧, 体温, 血液凝固時間, 血液成分, 酵素活性など多くの点で異なっている。これらの種による違いが, 外から入ってきた粒子やガスなどの沈着部位, クリアランス機能, 負荷量, 血中濃度, 生物学的半減期などや, 感受性, 致死量, 致死率など多くの点で異なる要因となる。そのため実験動物からヒトへの外挿を行う際には動物モデルの限界について明示する必要がある。また, 同時にこれらの限界をできるだけ少なくする手法をとることが健康リスク評価を行う場合に必要となる。

これまで、動物実験のデータからヒトの参照濃度(Reference Concentration)の算出には以下の手法がとられている。

1. ヒトへの健康影響からみて妥当と思われるヒトまたは動物での調査または実験結果からの有害性の同定
2. 動物実験のデータから曝露濃度 - 反応関係に基づき濃度(用量) - 反応曲線からBMC, NOAEL, LOAELを算出する。
3. 動物実験のデータを用いたときはヒトの場合においてDEPの負荷量が同じになる等価の曝露濃度(HEC: Human Equivalent Concentration)を算出する。
4. 個体差, 種間差といった不確定因子(UF: Uncertainty Factor)を使用し, HECから参照濃度(RfC: Reference Concentration)を算出する。

$$\text{RfC} = (\text{BMC, NOAEL or LOAEL})_{\text{HEC}} / \text{UF}$$

この過程においていくつかの問題がある。まず, 肺でのDEPの負荷量が同じ(単位肺胞面積あたりのDEP量)であれば, 毒性など生体の反応が種を越えてほぼ変わらないという仮定の問題である。同種のマウスで同じ粒子濃度のDEに曝露した場合, 肺までの気道の構造の類似性が高いことから負荷量はほぼ同等と仮定した場合においても系統による影響の差は非常に大きいことからこのような仮定は成り立ちにくいと考えられる。滞留している粒子が影響に関係する場合は負荷量が同じ前提のもとに比較すれば, 負荷量の違いを考慮にいれずに検討ができるということで, 影響までの過程における個体差, 系統差, 種差は依然としてあると考えるべきである。分岐など気道の三次元的構造上の違いや呼吸数, 呼吸量など呼吸生理学的違い, 線毛運動やマクロファージなどによるクリアランスなどの違いからDEPの気道における沈着量, クリアランス, 負荷量が動物種により大きく異なってくる。DEPの長期曝露による負荷量の計算では, 沈着効率における種差, 正常と過負荷のときのクリアランス速度, 呼吸のガス交換速度, 粒子の肺に関連するリンパ節への移動が考慮されたYuのモ

デル(1991)がラットやヒトにおいて使われ、負荷量の推定が行われている。一方、マウスやモルモットを用いた肺負荷量の計算については各種パラメーターの吟味も含めこれからの課題として残っている。アレルギー関連の動物実験はこれらの動物が主に使われていることもあり、定量評価を行うために、早急に解明されることが求められている。

また、比較的短い期間の曝露による負荷量の推定についても未解明であり今後の課題である。さらに、ある種の刺激により影響が生じるようなものを比較する場合は生体影響として負荷量よりも沈着量を曝露の指標とすることが望ましい場合やクリアランスによるリンパ節や生殖器への移行が重要な場合も考えられる。したがって、対象となる影響指標によりこれらの点についても考慮すべきと考えられるが体内動態についても十分な知見が得られていないのが現状である。今後これらの課題について検討する必要があると考えられる