

2003年7月10日

「ヒト肺胞モデルを用いた浮遊粒子状物質(SPM)の新規毒性評価法」

助教授・酒井康行(臓器・生体システム工学)*

教授・迫田章義(環境・化学工学)

*TEL 03-5452-6352, FAX 03-5452-6353, E-MAIL sakaiyas@iis.u-tokyo.ac.jp

ポイント:

- ・ディーゼル排ガス中の SPM の健康影響が懸念
- ・動物実験を代替する培養細胞を使う手法
- ・気液界面培養を用いることで, *in vivo* の曝露形態を忠実に模倣
- ・洗練された実験系となるためリスク評価数理モデル構築への活用が容易

背景

ディーゼル車から排出される浮遊粒子状物質(SPM)は, 都市大気汚染の元凶となっている. 特に直径が2.5マイクロメートル以下のもの(PM2.5)はヒトの気道で捕捉されず肺胞まで到達する. これらの人体への影響を評価するためには, 一般には小動物への曝露試験が行われるが, その実施には多大のコストがかかる. そこで, ヒト肺胞由来の細胞を半透膜上で気液界面培養する *in vitro* 肺胞モデルの利用を考えた. この培養形態を取ることで, ガス中に懸濁されている SPM 粒子が肺胞内壁に沈着し, そこから吸着している化学物質が徐々に溶出し, 肺胞を障害すると共に体内に摂取されるプロセスを, 動物を使わずに評価することができる.

肺胞モデルの利用・その1 - 肺への障害 -

国内で採取された実 SPM 試料を直接モデル肺胞に曝露すると, 48 時間後の細胞生存率が負荷量に応じて低下したことから, この手法で毒性評価が可能であることが分かった. 今後, さらに鋭敏な指標に着目したり, マイクロ化を行うことで, 現場で評価可能なデバイスとして発展させていきたい.

肺胞モデルの利用・その2 - 肺経由の取り込み -

一方、肺胞には障害を与えないが、長時間の曝露で徐々に体内に取り込まれた物質が他の臓器に影響を与えることがある。そこで、本肺胞モデルを使用して、内壁への負荷量に対する体内への取り込みを時間に対して評価することを考えた。SPMには様々な物質が吸着しているが、その中で多環芳香族類に着目した。この生体に対する影響は、培養した肝臓細胞のある種のチトクローム P450 という酵素量によって、個別の化学物質を定量することなく、総括的に評価できる。これはたとえば外洋のイルカやクジラに PCB などの多環報告族化学物質がどれだけ曝露されているかを評価するのにも使用されている。そこで、この酵素活性基準で、肺胞モデル下側(体内)への透過を速度論的に検討した。その結果、例えば 48 時間後でも 10-20% 程度の化学物質が体内に取り込まれていた。

肺がんリスク評価への利用 - 数理モデルとのリンク -

さらに、連続的に希薄濃度の SPM に曝露されるという実際の曝露状況下での影響予測を行うため、これら一連の過程を数理モデル化し、その時間軸をヒトの一生にも渡るような長時間に強引に拡張した。肺での発ガンにこの検討を適用すると、例えばマウスで 10% の発ガンを起こす肺胞内化学物質総蓄積量と単位肺胞面積当たりで等しくなった際にヒトでも 10% の生涯発ガンリスクを与えると仮定すると、それを与える大気中濃度は 0.695 mg/m³ 程度となり、わが国での基準値 0.1 mg/m³、米国環境保護庁のヒト発ガン予測環境濃度 0.5-1.0 mg/m³ などと比べて、妥当な値を得ることができた。

(参考資料として、発表パワーポイントファイルを添付)

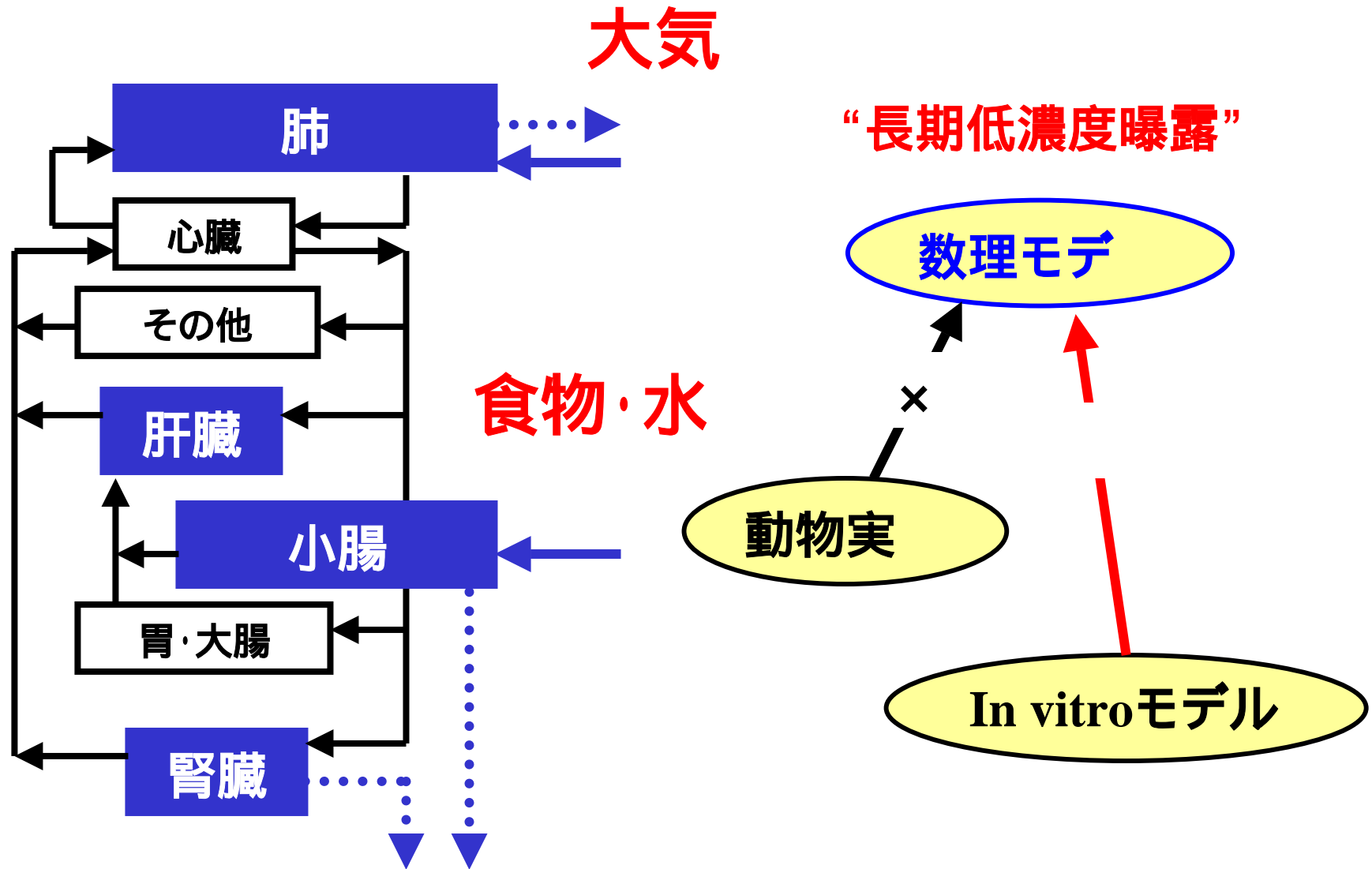
ヒト肺胞モデルを用いた浮遊粒子状物質 (SPM)の新規毒性評価法

酒井康行(臓器・生体システム工学)
迫田章義(環境・化学工学)

東京大学・生産技術研究所

**sakaiyas@iis.u-tokyo.ac.jp*

環境中化学物質の人体摂取と代



大気環境汚染問題

ディーゼル排ガス、ダイオキシン、シックハウス

浮遊粒子状物質(SPM) : 10 μm 以下の浮遊粉塵

肺ガンやアレルギーなどの報告

特に大気からの曝露に着目

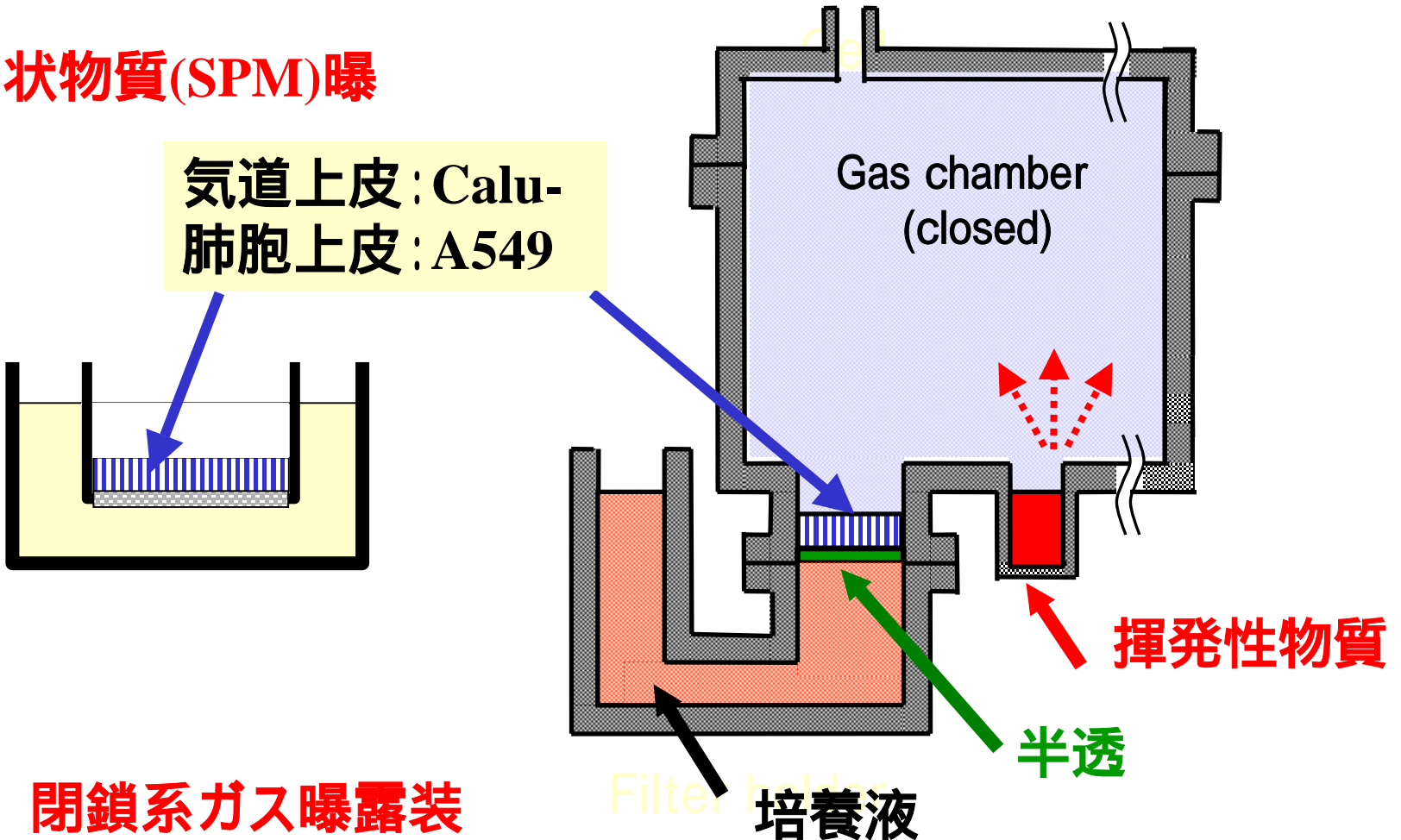
「*in vitro* 肺上皮 (気道・肺胞) モデル」

- ・ 実際の曝露形態を模倣 (気液界面培養)
- ・ 障害と透過 (他臓器への影響)

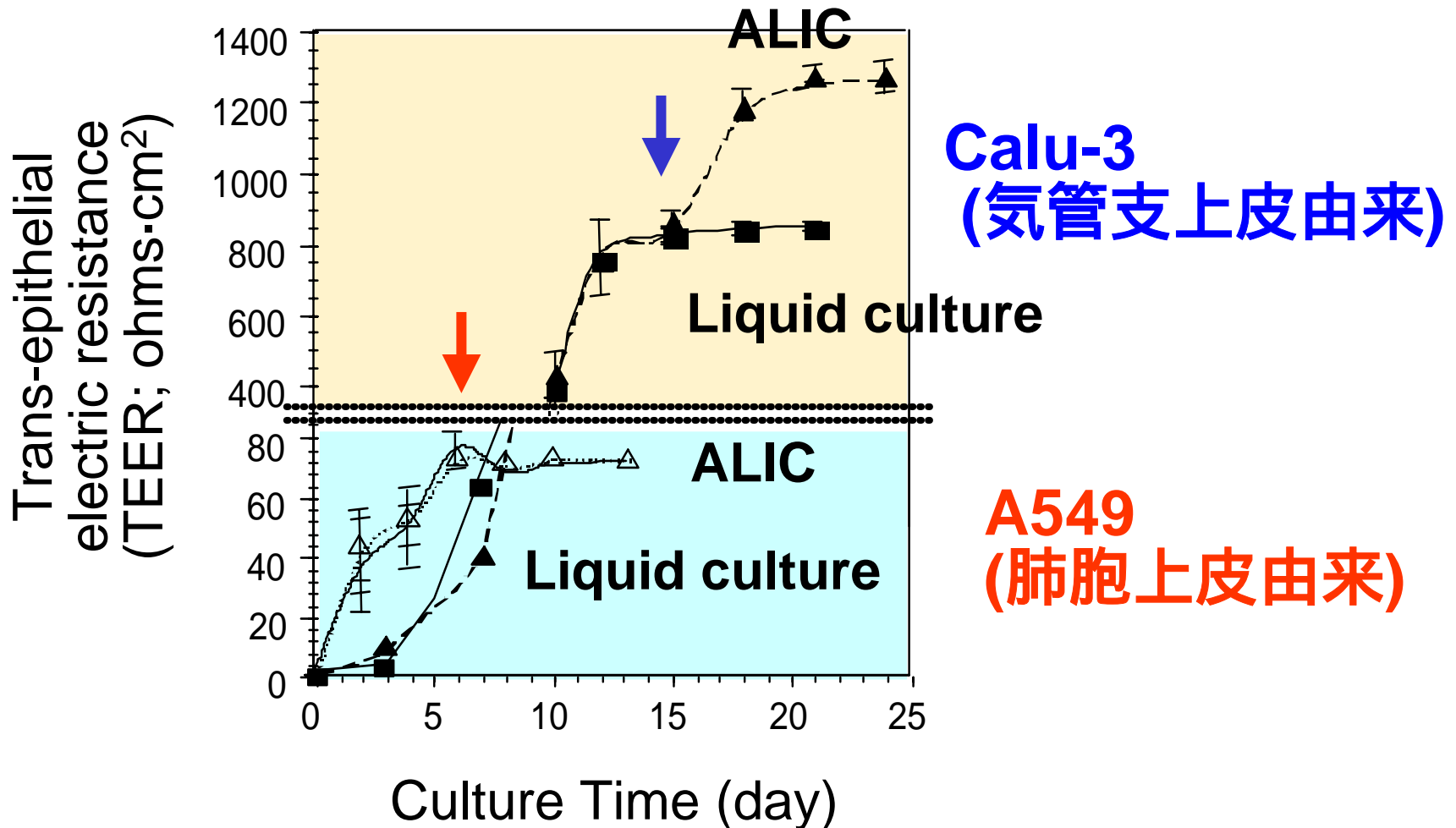
肺上皮モデルを活用する評価系

半透膜上に肺上皮細胞を気液界面培

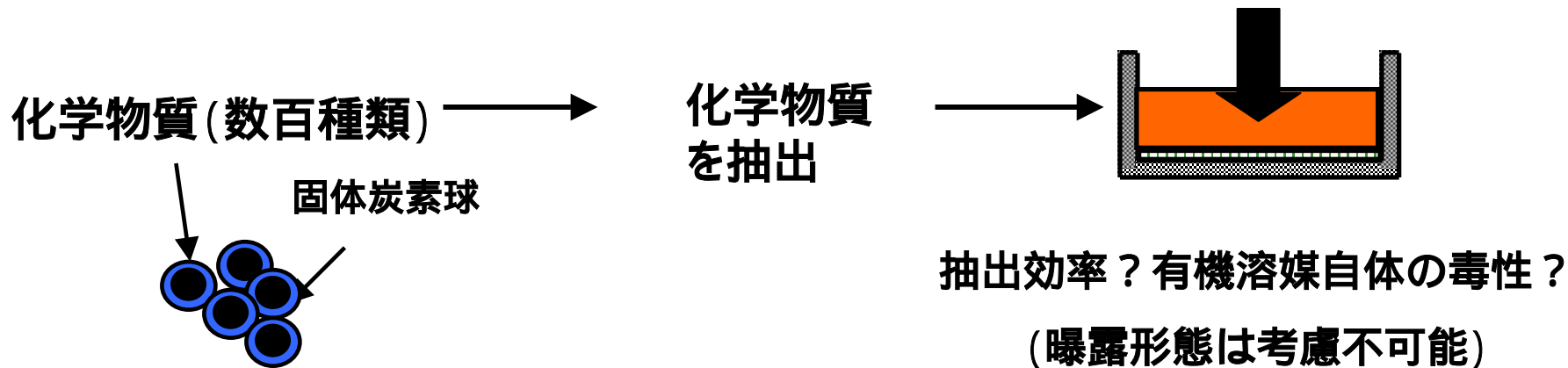
粒子状物質(SPM)曝



気液界面培養による経上皮電気抵抗の変化



既存の*in vitro*バイオアッセイ手法



SPMの毒性発現部位

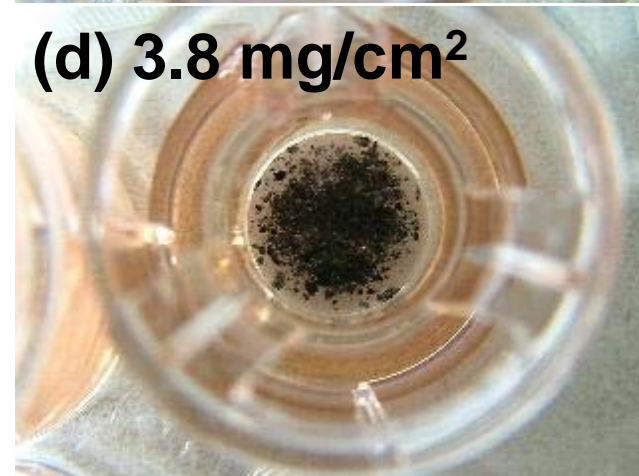
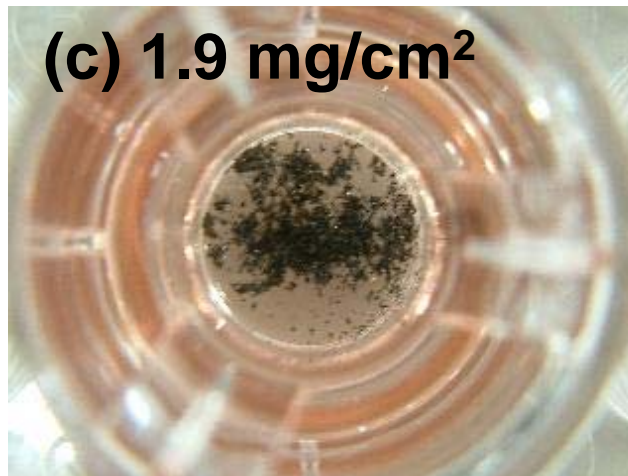
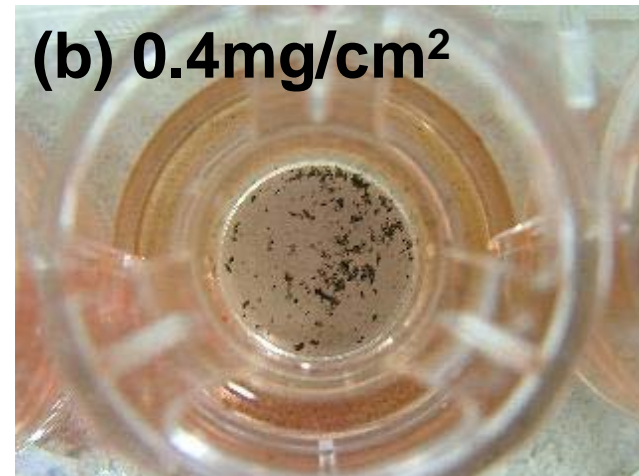
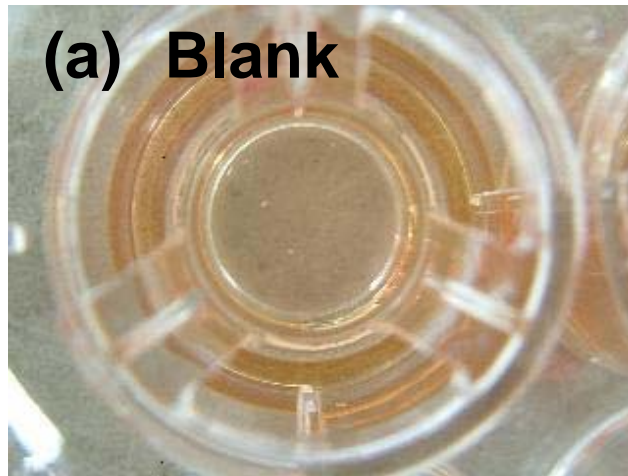
粒径[μm]	気管支まで到達	肺胞まで到達
1	97.1	97.1
2	94.3	91.4
5	85.4	30.0
10	50.0	1.3

[単位:%]

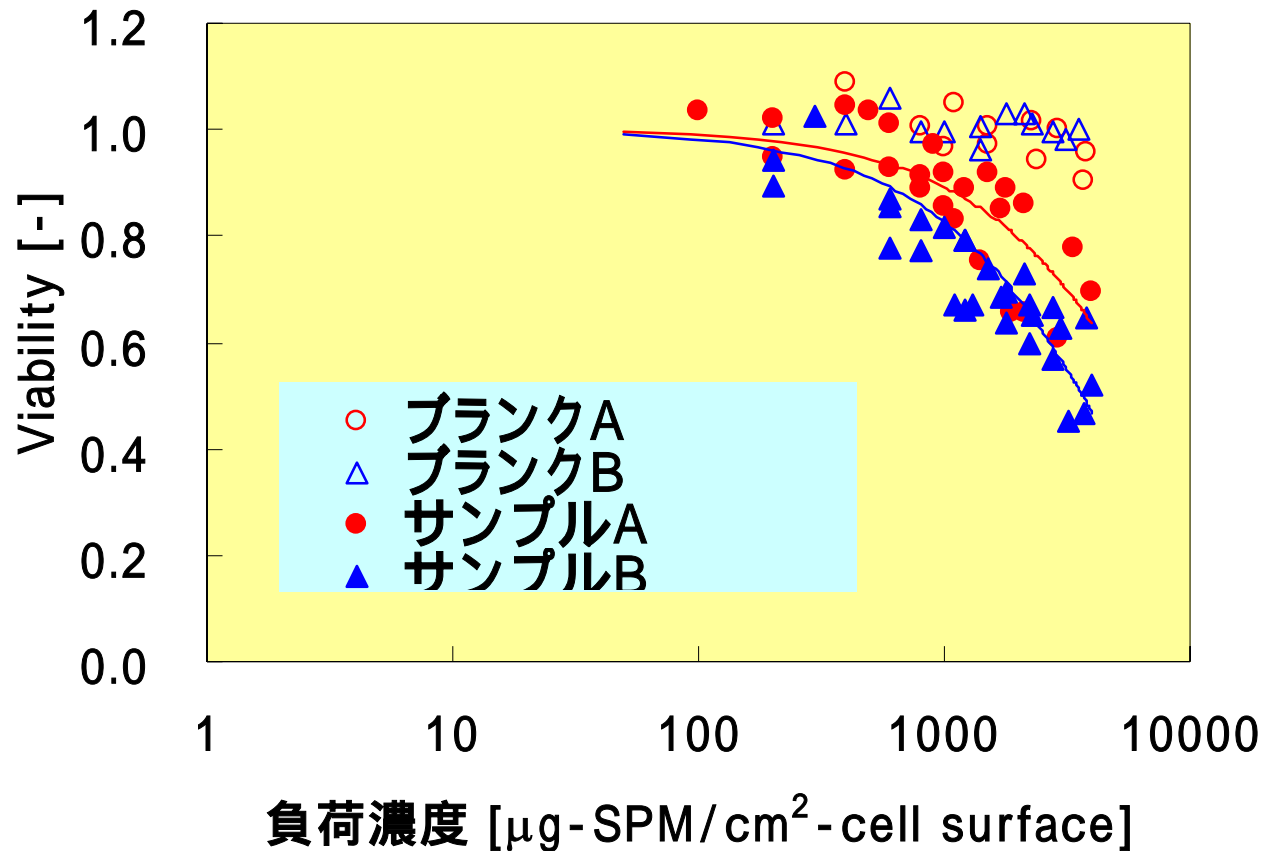
微小粒子の健康影響が深刻化
(80~90%は0.1 μm から1 μm)

ヒト肺胞ガン上皮系由来細胞株(A549)を用いた評価系の確立

気液界面培養された肺胞モデルへの 浮遊粒子状物質(SPM)の直接曝露



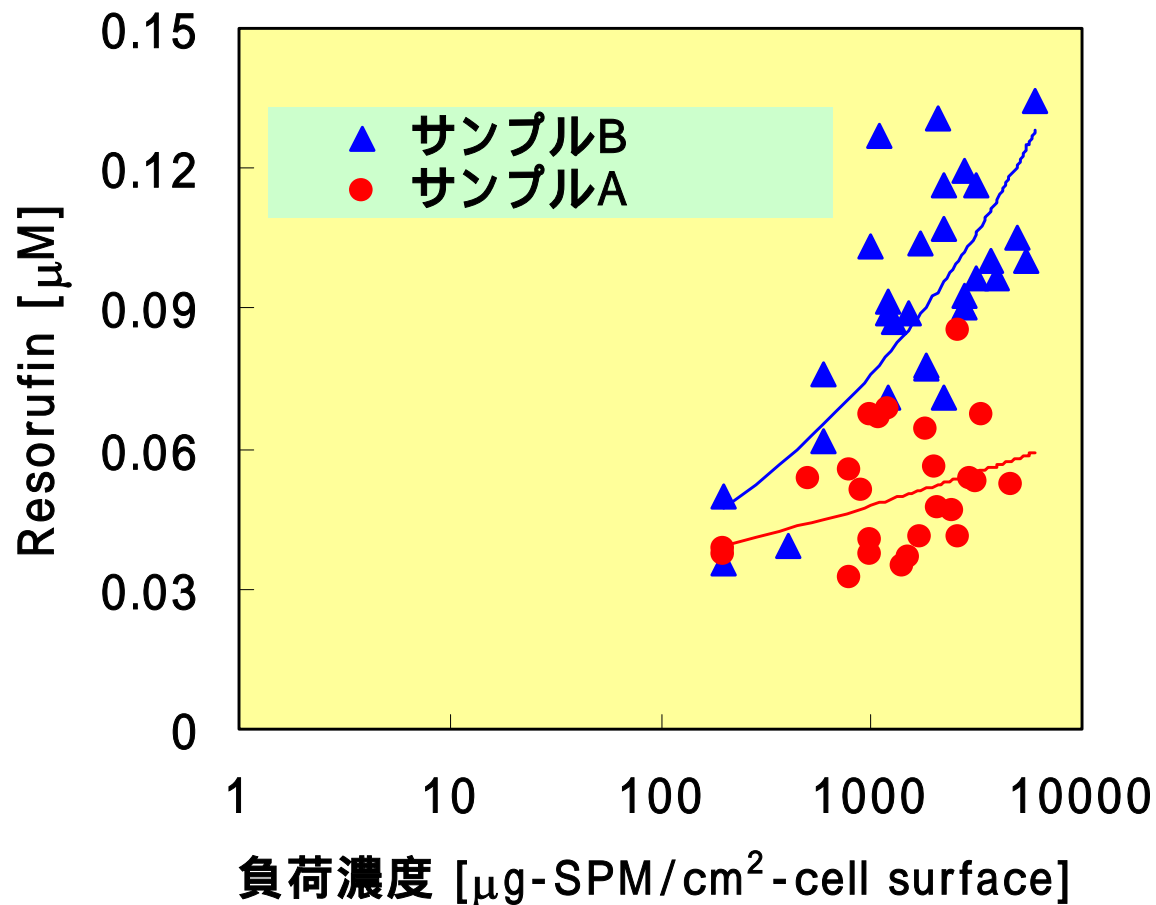
気液界面培養を用いたSPMの毒性評価 (負荷時間 48 hr)



実際の曝露形態を模倣した毒性評価が可能

吸収臓器としての解析

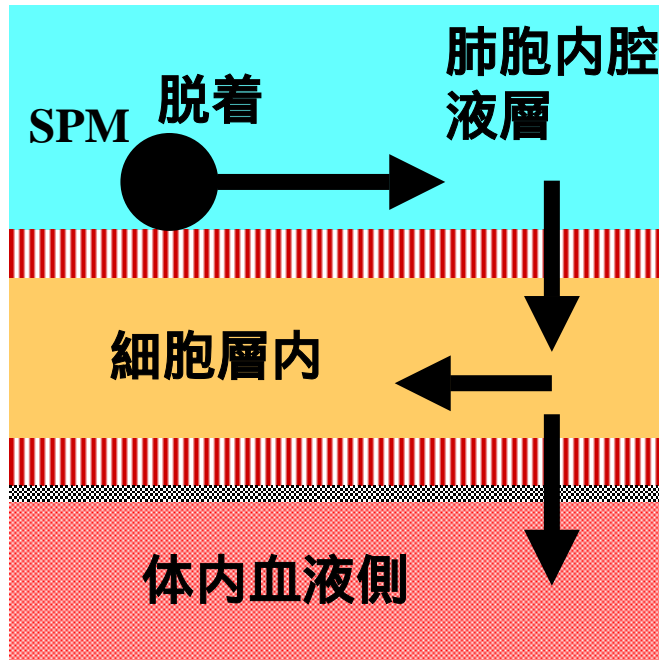
多環芳香族類(PAHs)に着目した体内側への透過



肝細胞のチトクロームP450 1A1/2誘導活性でPAHsを総括的に評価

本モデル系では、最大10-20%程度の透過

In vitro系の上皮内蓄積と体内透過を記述するモデル



$$\text{Flux} = L \cdot k_f \cdot a_p \cdot (C_{AP}^i - N_{AP}/V_{AP})$$

$$(1/q_{AP} = 1/q_{AP \text{ max}} + (1/a \cdot q_{AP \text{ max}})(1/C_{AP}^i))$$

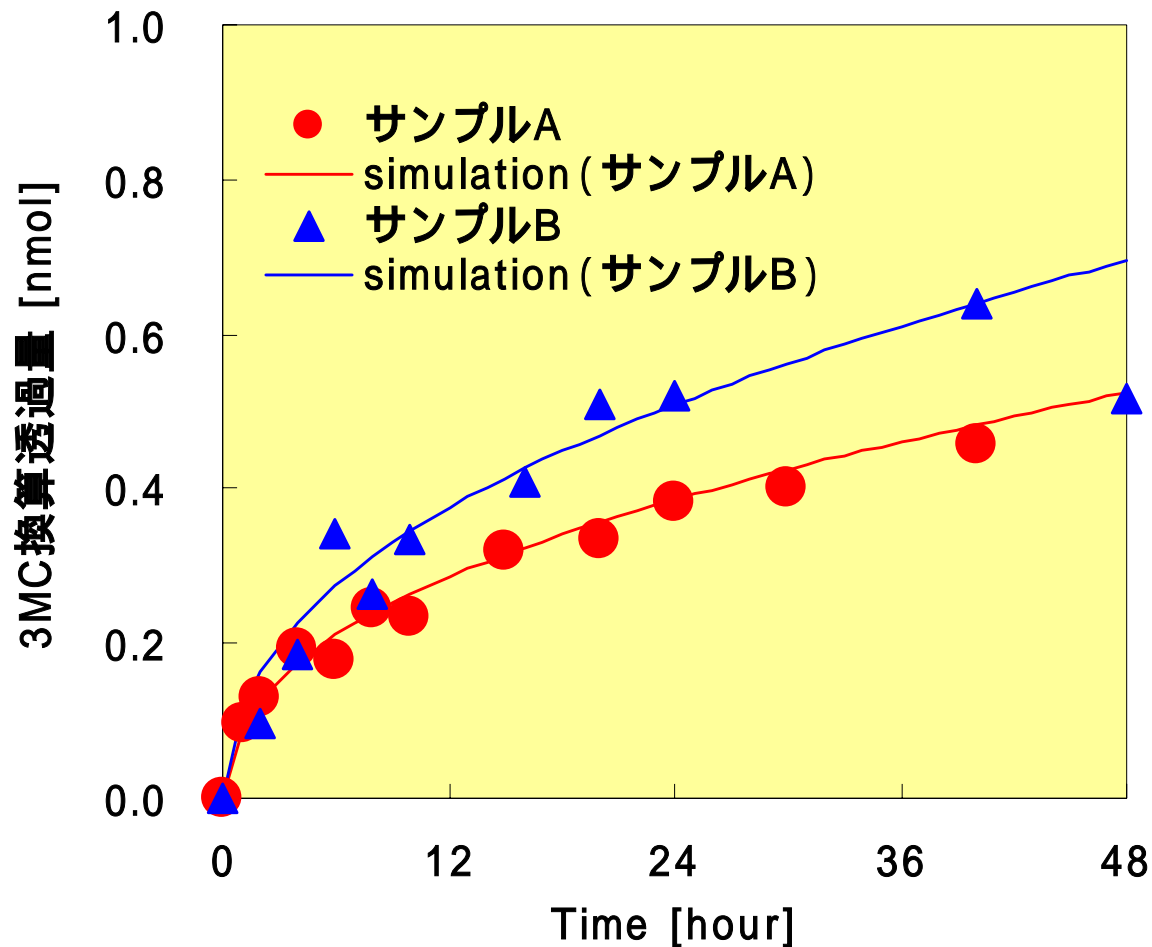
$$\text{Flux} = k_{\text{cell}} \cdot A \cdot (N_{AP}/V_{AP} - N_{\text{cell}}/V_{\text{cell}})$$

$$\text{Flux} = k_b \cdot TP_{\text{cell}} \cdot (N_{\text{cell}}/V_{\text{cell}} - N_{\text{cell-a}}/V_{\text{cell-a}})$$

$$\text{Flux} = K \cdot A \cdot (C_{\text{cell}}/V_{\text{cell}} - C_{BL}/V_{BL})$$

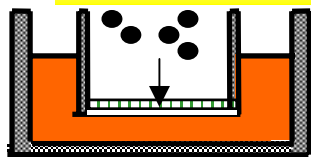
d_{AP} = 脱着量 [mol]、 N_{AP} = 膜上濃度 [mol]、 C_{AP}^i [mol/cm³] = 粒子表面濃度、
 V_{AP} = Apical側液量 [cm³]、 s = 粒子密度[g/cm³]、 k_f = 境膜物質移動係数[cm/hr]、
 a_p = 粒子外表面積[cm²/cm³]、 L = 負荷量 [g]、 a = 吸着平衡定数、
 k_{cell} = リン脂質二重層の物質移動係数 [cm/hr]、 V_{cell} = 細胞内液量、
 k_b = 細胞内タンパクへの反応速度定数 [mol/g-protein·hr·mol of PAH]、
 TP = 細胞内タンパク量 [g-protein]、 K = 総括物質移動係数 [cm/hr]

*In vitro*結果とのフィッティングによるパラメータ決定



吸着PAHs量のみを変えることで、異なる
実サンプルの透過挙動を説明可能

in vitro 評価系から *in vivo* 状況への外挿



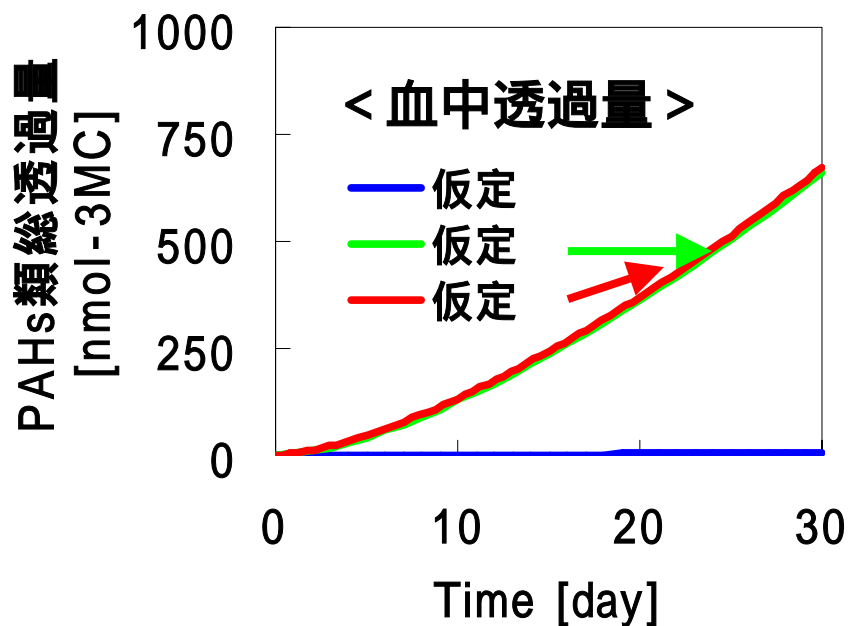
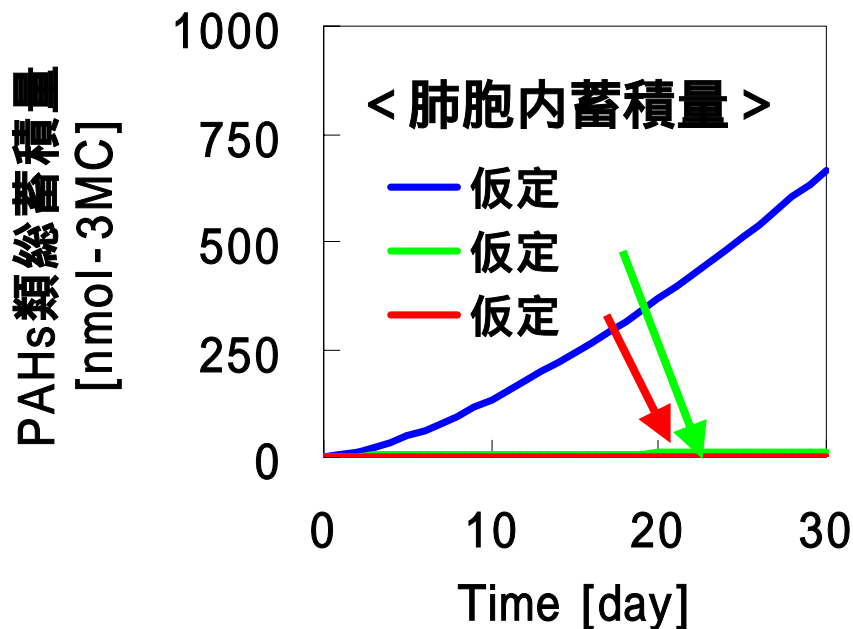
肺胞表面積、長期間曝露(呼吸量など)を加える



仮定 : *in vitro* 評価系をそのまま拡張

: 血中濃度を常にゼロにする (zero sink condition)

: 肺胞膜を非常に薄く設定する ($0.5 \mu\text{m}$) (の状況下)



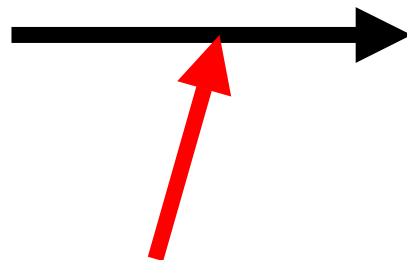
肺胞内に蓄積するか透過するかは血中濃度に依存する

In vivo 評価への拡張利用・その1

ラット生涯肺発ガンリスクとの対応

境界条件:

- ・肺胞表面積
- ・血中濃度 = 0.0



44.1 mg-SPM

247 nmol

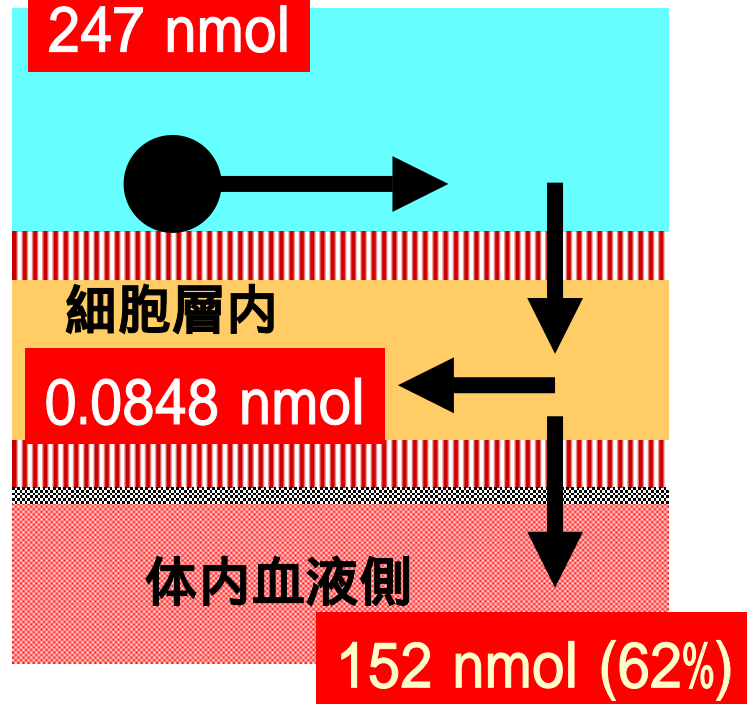
ラット生涯肺発ガンリスク10% =
週間曝露 $200 \text{ mg} \cdot (\text{SPM}/\text{m}^3) \times \text{hr}$
(HEI, US-EPA, 1999)

細胞層内

0.0848 nmol

体内血液側

152 nmol (62%)



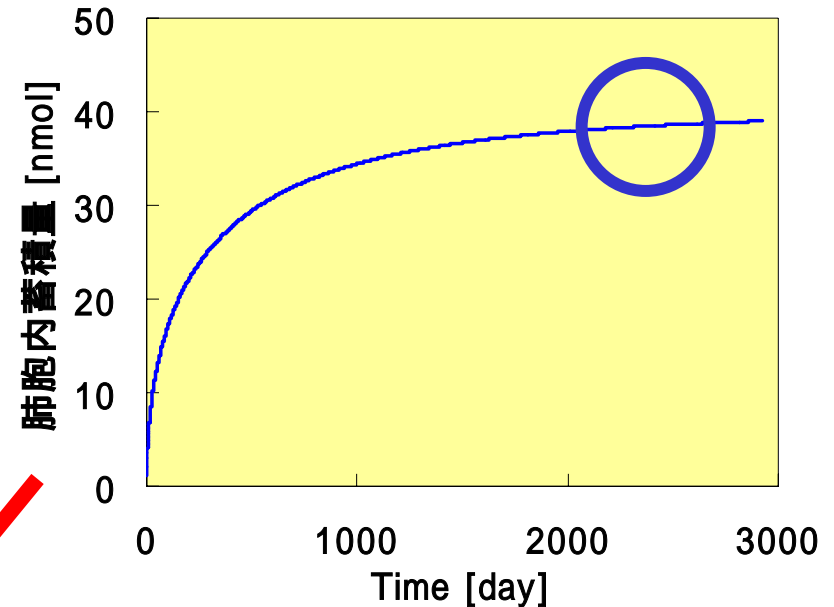
In vivo 評価への拡張利用・その2

ヒト生涯10%肺発ガン曝露濃度推定

ヒトでの仮定:

“肺胞単位面積当たりの蓄積量が、ラット10%発ガンと同じに達すると、ヒト10%肺発ガン？
(生涯リスク基準)“

$$= 1.70 \times 10^{-5} \text{ [nmol/cm}^2\text{]}$$



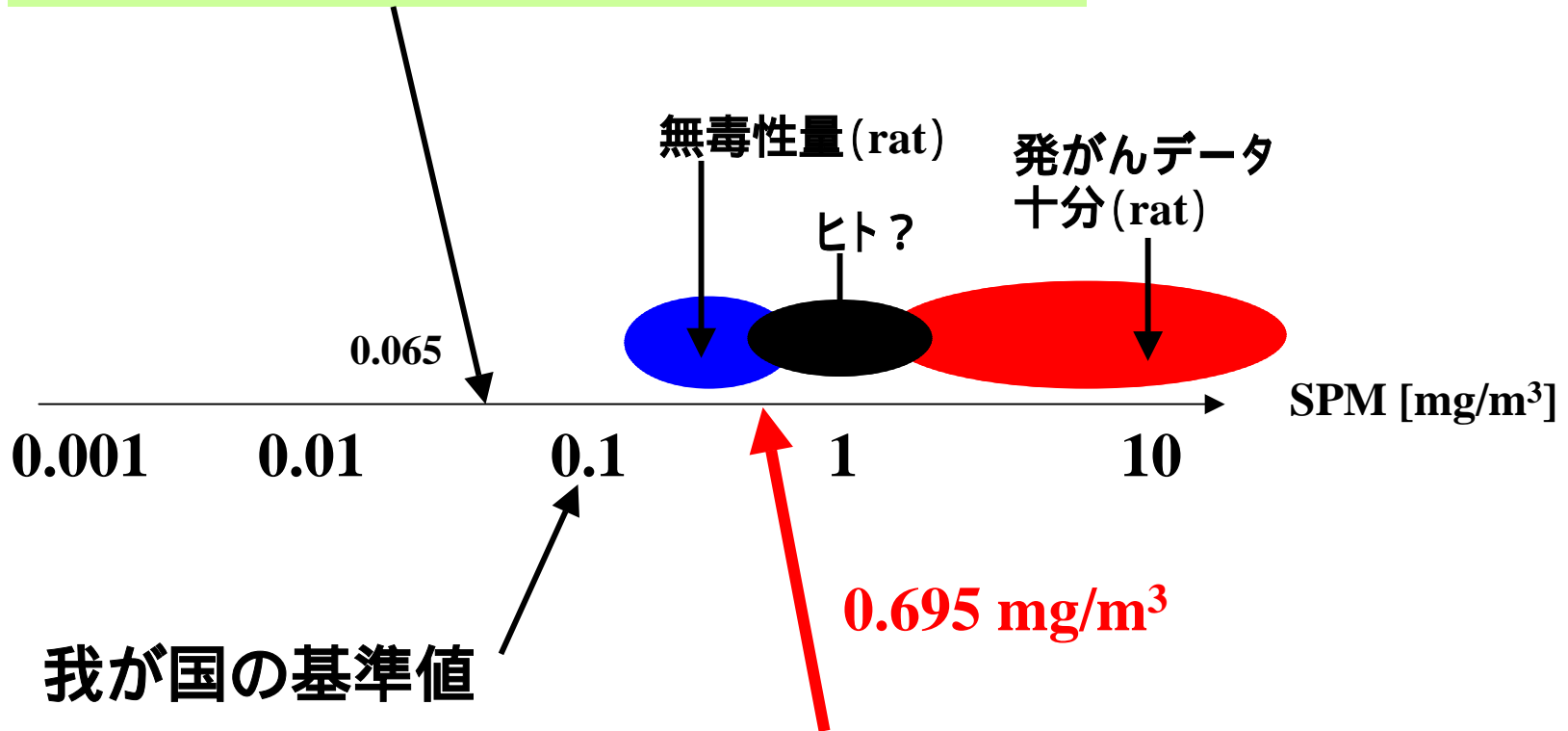
ヒト生涯肺発ガンリスク10%
 $= 0.695 \text{ mg/m}^3$

・わが国での基準値: 0.1 mg/m^3

・US-EPAによる“ヒト発ガン予測環境濃度”: $0.5 \sim 1.0 \text{ mg/m}^3$

慢性毒性影響予測の可能性検証

アメリカでの環境基準 (PM2.5、日平均)



今回の毒性評価予測 (10%発ガン)

まとめ “*in vitro*肺胞モデル”

- ・動物実験を代替する肺胞モデル構築
- ・気液界面培養で曝露形態を模倣
- ・実SPMサンプルの直接曝露による肺毒性評価
- ・別のバイオアッセイ(肝細胞P450誘導試験)を用いた肺胞膜透過の評価
- ・モデル系でのSPM挙動を記述する数理モデル構築とその*in vivo*への拡張.