

(TMI)を動告した。算定根拠となる体内負荷量としてもSCFの評価と同様に最低毒性発現体内負荷量(Faqiら⁹⁾のデータと無毒性体内負荷量(Ohsakoら¹¹⁾のデータを基に計算を行ったが、その際の慢性投与に対する補正を行った体内負荷量の計算方法は、Linear fit model(直線回帰モデル)とPower fit model(べき乗回帰モデル)という2つの方法を試みている。それらの結果をもとにSCFと同様のTMIを算出すると40~100 pg TEQ/kg/monthの範囲になり、暫定TMIとしては中間値を取って、70 pgTEQ/kg/monthを動告した¹⁹⁾。

英国のUK-Food Standards Agency (FSA)ではEC-SCF¹⁰⁾及びJECFA¹⁰⁾の考え方を基本的に採用した、最も感受性の高いエンドポイントとして、ラット雄への生殖機能の発生異常(特に精子形成への影響)を用いているが、体内負荷量の算定は、EC-SCF¹⁰⁾やJECFA¹⁰⁾とは異なり、最も感受性が高い時期を妊娠16日とし、この時期の胎児の体内負荷量と母体の体内負荷量との比を用いて単回投与と反復投与で得られる体内負荷量の値の補正を行った。その結果、Faqiらのデータに基づいて得られた妊娠16日の母体の体内負荷量は33 ng/kg/dayと見積もられた。この値からEC-SCF及びJECFAと同様の不確実係数(9.6)を用いてTDIとして2 pgTEQ/kg/dayを動告した。EC-SCF¹⁰⁾やJECFA¹⁰⁾では1週間や1ヶ月あたりの耐容量として動告しているが、TDIとして表現する方が適切で、わかりやすいとする理由で、TDIでの動告値を採用しているが、仮に短期間でTDIを超える暴露があっても体内負荷量が大きく変動することはなく、長期間に

例えば、SCF¹⁰⁾には低い体内負荷量で発現するTCDDの影響として、Holtzmanラットの雄児において64 ng/kg以上の投与量で観察された1日精子産生低下及び精巣上体精子数の減少²¹⁾、Long Evansラットの雄児において50 ng/kg以上の投与量で観察された開眼促進及び射精精子数減少²²⁾、Wistarラットの雄児において25/5 ng/kg以上の投与量で観察された1日精子産生低下及び性行動の変化⁹⁾、Holtzmanラットの雄児において50 ng/kg以上の投与量で観察されたAGD短縮¹¹⁾が記載されている。

Grayら²³⁾の報告した開眼促進は1日程度の遅れであり、毒性学的意義は弱いと考えられる。また、射精精子数についてはこの実験結果で有意な減少は最高投与量の800 ng/kgだけに認められたものであり、前報²³⁾の成績と合わせて統計処理すると50 ng/kg以上で有意差が認められたと云う結果である。これらの成績をTDI設定の根拠とすることは不適切と考えられる。

Faqiら⁹⁾の報告した雄児の性行動の変化には用量-反応関係は認められない。

Ohsakoら^{9,11)}により雄児のAGD短縮が報告されている。AGDの体重による補正值(AGD/cube root of body weight)は示されておらず、AGD短縮の程度は軽度であり、児の生後63日⁹⁾と生後120日¹¹⁾に断続的に認められた変化であり、毒性学的な意義は弱いと考えられる。

TCDDの精子細胞、精子に対する影響については多くの報告があるが、TCDDの精子細胞、精子に対するTCDDの影響には報告間で差がみられる。Ohsakoら^{9,10,11)}は精子指標及び精巣の病理組織学的所見には800 ng/kgまでのTCDD投与の影響は認められなかったとしている。米元ら¹⁴⁾は1000 ng/kgのTCDD投与でも精子検査においてTCDDの影響は認められず、同様なプロトコールによるHoltzmanラット^{21,24,25)}及びLong Evansラット^{22,26)}を用いて行われた実験結果を再現できなかったと述べている。Grayら²³⁾は精巣の精子産生はTCDDの鋭敏な指標ではないと述べており、また、TheobaldとPeterson²⁷⁾はラット、ハムスター、マウスの3種の動物で観察される唯一の生殖発生毒性のエンドポイントは精巣上体の精子数減少であると述べている。このように、低用量のTCDDの精子指標(1日精子産生、精巣上体精子数)に対する影響については実験間で整合性のある結果は得られていない。

一方、JECFA¹⁰⁾の評価でもFaqiら⁹⁾やOhsakoら¹¹⁾の両報告を用いて様々な体内負荷量の計算を試みているが、結局、どちらか単一の報告を基にするのではなく、両報告から得られた体内負荷量のレンジの中央値をTDI算定の出発点としたことから、この両報告に対する毒性学的意義付けは必ずしも確定していないと考えられる。また、Rierら²⁸⁾およびScantz & Bowman²⁹⁾のアカゲザルにたいする影響も、1999年以後、未だにその実験の信頼性に関する問題は依然解決されておらず、EC、JECFA、UKにおける耐容摂取量

Table 2. Summary of tolerable intake derivations for TCDD in the assessment agencies

Assessment Agency	Endpoint or category	Body weight (kg)	Exposure (ng/kg/day)	Uncertainty factor	Tolerable intake (pg/kg/day)
WHO/EC	Reproductive system effects, decreased sperm production in female rats, decreased sperm production in female mice, decreased sperm production in female rats	20-75	10 ng/kg/day 25 pg/kg/day 25 pg/kg/day 25 pg/kg/day	10	1.0-10.0 pg/kg/day
JFA	Reproductive system effects, decreased sperm production in female rats, decreased sperm production in female mice	60-80	4 pg/kg/day	10	1.0-10.0 pg/kg/day
EC/SCF	Reproductive system effects, decreased sperm production in female rats	70	20 pg/kg/day	10	1.0-10.0 pg/kg/day
JECFA	Reproductive system effects, decreased sperm production in female rats, decreased sperm production in female mice	20-75 10-20	112 or 120 pg/kg/month 157 or 170 pg/kg/month	10	1.0-10.0 pg/kg/day
WHO/FSA	Reproductive system effects, decreased sperm production in female rats	31	17 pg/kg/day	10	1.0-10.0 pg/kg/day

わたった平均値がTDIを下回れば有害影響が現れることはないであろうということが付け加えられている²⁰⁾。

まとめ

最近のEC、JECFA、UKのダイオキシン類評価では使用されているデータセットは、1999年に我が国で行われた再評価で用いられたものとはほぼ同じであるが、Faqiら⁹⁾の1日精子産生低下やOhsakoら¹¹⁾の雄児のAGD短縮の報告が最も感受性の高いエンドポイントであるとして体内負荷量を計算し、TDI算定のための出発点として使用している。た

算定のための定量的評価にも実質的には使用されていない。

以上のことから、TDI算定の出発点となる最低の毒性発現体内負荷量の算定のために Faqiら⁸⁾ や Ohsakoら¹¹⁾ の両報告結果を用いる積極的な理由は現在のところなく、1999年の我が国のTDI再評価に用いた Grayら^{22,26)} および Gehrsら²⁰⁾ の報告で母動物にTCDDを投与した場合に児動物に見られる開眼促進、精巣上体精子数の減少、雌性生殖器官形態異常、遅延型過敏症の抑制最低の毒性発現体内負荷量：86ng/kgを出発点としてTDIを算定することは現在でも妥当であると考えられる。

参考文献

- 1) WHO-IPCS(1998)WHO European Centre for Environment and Health International Programme on Chemical Safety EXECUTIVE SUMMARY Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI) WHO Consultation, May 25-29 1998, Geneva, Switzerland (1998)
- 2) 日本(1999)ダイオキシンの耐容1日摂取量(TDI)について、中央環境審議会環境保健部会、生活環境審議会、食品衛生調査会、平成11年6月
- 3) Cooke, G.M., Price, C.A., Oko, R.J. (1998) Effects of *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on serum androgens and steroidogenic enzyme activities in the male rat reproductive tract. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 67, 347-354
- 4) Loeffler, I.K., Peterson, R.E. (1999) Interactive effects of TCDD and p,p'-DDE on male reproductive tract development in utero and lactationally exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 154, 28-39
- 5) Dienhart, M.K., Sommer, R.J., Peterson, R.E., Hirshfield, A.N., Silbeigeld, E.K. (2000) Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces developmental defects in the rat vagina. *Toxicol. Sci.*, 56, 141-149
- 6) Hamm, J.T., Sparrow, B.R., Wolf, D., Birbaum, L.S. (2000) In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters postnatal development of seminal vesicle epithelium. *Toxicol. Sci.*, 54, 424-430
- 7) Wolf, C.J., Ostby, J.S., Gray, L.E. (1999) Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicol. Sci.*, 51, 259-264
- 8) Faqi, A.S., Dalsenter, P.R., Marker, H.J., Chahoud, I. (1998) Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 150, 383-392
- 9) Ohsako, S., Miyabara, Y., Sakaue, M., Kurosawa, S., Nishimura, N., Aoki, Y., Tohyama, C., Sone, H., Ishizuka, M., Jana, N.R., Sarkar, S., Yonemoto, J. (1999a) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the development of male reproductive organs in the rats. *Organohalogen Compounds*, 42, 19-21
- 10) Ohsako, S., Nishimura, N., Miyabara, Y., Ishizuka, M., Aoki, Y., Tohyama, C., Sone, H., Yonemoto, J. (1999b) Changes in the reproductive organs of the male rats exposed maternally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicol. Sci.*, 48 (1-S), 148
- 11) Ohsako, S., Miyabara, Y., Nishimura, N., Kurosawa, S., Sakaue, M., Ishimura, R., Sato, M., Takeda, K., Aoki, Y., Sone, H., Tohyama, C., Yonemoto, J. (2001) 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 5 α -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol. Sci.*, 60, 132-143
- 12) Nohara, K., Fujimaki, H., Tsukumo, S., Ushio, H., Miyabara, Y., Kijima, M., Tohyama, C., Yonemoto, J. (2000) The effects of perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune organs in rats. *Toxicology*, 154, 123-133
- 13) 掛山正心, 遠山千春, 曾根秀子 (2000) 雄ラットの性行動に対する2,3,7,8-四塩化ダイオキシンの経胎盤及び経母乳曝露による影響, 第3回環境ホルモン学会研究発表会要旨集, p. 225
- 14) 米元純三, 遠山千春, 尾根田暁, 永田良一 (2001) 妊娠期2,3,7,8-TCDD投与ラットの多世代影響, 第4回環境ホルモン学会研究発表会要旨集, p. 347
- 15) Markowski, V.P., Zareba, G., Stern, S., Cox, C., Weiss, B. (2001) Altered operant responding for motor reinforcement and the determination of benchmark doses following perinatal exposure to low-level of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environ. Health Perspect.*, 109, 621-627
- 16) US Environmental Protect Agency (EPA) (2000) Dioxin reassessment (draft documents on "Exposure and human health reassessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds". September 2000
- 17) EC Scientific Committee (SCF) (2000) Opinion of the SCF on the risk assessment of dioxin and dioxin-like PCBs in food. SCF/CS/CNTM/DIOXIN/8 Final, 23 November, 2000.
- 18) EC Scientific Committee (SCF) (2001) Opinion of the SCF on the risk assessment of dioxin and dioxin-like PCBs in food ?update based on new scientific information available since the adoption of the SCF opinion of 22nd November 2000-. SCF/CS/CNTM/DIOXIN/20 Final, 30 May 2001.
- 19) JECFA (2001) Summary of the fifty-seventh meeting of the

- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, 5-14 June 2001.
- 20) UK Food Standards Agency (2001) Statements on the tolerable daily intake for dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls. Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment, October 2001, COT/2001/7.
 - 21) Mably, T.A., Bjerke, D.L., Moore, R.W., Gendron-Fitzpatrick, A., Peterson, R.E. (1992c) In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114, 118-126
 - 22) Gray, L.E., Ostby, J.S., Kelce, E.R. (1997a) A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 11-20
 - 23) Gray, L.E., Kelce, W.R., Monosson, E., Ostby, J.S., Birnbaum, L.S. (1995) Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory glands weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 131, 108-118
 - 24) Mably, T.A., Moore, R.W., Goy, R.W., Peterson, R.E. (1992b) In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114, 108-117
 - 25) Mably, T.A., Moore, R.W., Peterson, R.E. (1992a) In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 1. Effects on androgenic status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114, 97-107
 - 26) Gray, L.E., Wolf, C., Mann, P., Ostby, J.S. (1997b) In utero exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 146, 237-244
 - 27) Theobald, H.M., Peterson, R.E. (1997) In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: effects on development of the male and female reproductive system of the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 145, 124-135
 - 28) Rier, S. E., Martin, D. C., Bowman, R. E., Dmowski, W. P., Becker, J. L. (1993) Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21, 433-441
 - 29) Schantz, S. L., Bowman, R. E. (1989) Learning in monkeys exposed perinatally to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol. Teratol.*, 11, 13-19
 - 30) Gehrs, B.C., Riddle, M.M., Williams, W.C., Smialowicz, R.J. (1997) Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. II. Effects on the pup and adult. *Toxicology*, 122, 229-24

Research Article

In Vivo Mutagenesis Induced by Benzo[a]pyrene Instilled Into the Lung of *gpt* delta Transgenic Mice

Akiko H. Hashimoto,¹ Kimiko Amanuma,¹ Kyoko Hiyoshi,^{1,2}
Hirohisa Takana,¹ Ken-ichi Masumura,³ Takehiko Nohmi,³
and Yasunobu Aoki^{1*}

¹Research Center for Environmental Risk, National Institute for Environmental Studies, Ibaraki, Japan

²Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan

³Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Benzo[a]pyrene (B[a]P) is a ubiquitous airborne pollutant whose mutagenicity has been evaluated previously by oral and intraperitoneal administration to experimental animals. In this study, mutagenesis in the lungs, the target organ of air pollutants, was examined after a single intratracheal instillation of 0–2 mg B[a]P into *gpt* delta transgenic mice. Intratracheal injection of B[a]P resulted in a statistically significant and dose-dependent increase in *gpt* mutant frequency as measured by 6-thioguanine selection. The mutant frequencies at B[a]P doses of 0.5, 1, and 2 mg were 2.8, 4.2, and 6.8 times higher than the frequency seen in nontreated mice ($0.60 \pm 0.13 \times 10^{-5}$). The most frequent mutations induced by B[a]P treatment were

G:C→T:A transversions, which are characteristic of B[a]P mutagenesis in other models, and single-base deletions of G:C base pairs. To characterize the hotspots of B[a]P-induced mutations in the *gpt* gene, we analyzed sequences adjacent to the mutated G:C base pairs. Guanine bases centered in the nucleotide sequences CGT, CGA, and CCG were the most frequent targets of B[a]P. Our results indicate that intratracheal instillation of B[a]P into *gpt* delta mice causes a dose-dependent increase in *gpt* mutant frequency in the lung, and that the predominant mutation induced is G:C→T:A transversion. Environ. Mol. Mutagen. 45:000–000, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: benzo[a]pyrene; *gpt* delta transgenic mouse; 6-thioguanine selection

INTRODUCTION

Benzo[a]pyrene (B[a]P), one of the most potent mutagens in ambient air, is generated by the combustion of fossil fuels such as occurs in diesel engines and industrial settings. This polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), also a component of cigarette smoke and burned foods, is carcinogenic in rodent cancer bioassays [Singh et al., 1998; Iwagawa et al., 1989]. B[a]P is converted to reactive intermediates, B[a]P diol epoxides. Of these intermediates, benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE) is the most mutagenic [Miller et al., 2000], but all of the B[a]P diol epoxide enantiomers are carcinogenic in mammals [Buening et al., 1978]. The metabolism of B[a]P is catalyzed in various tissues by mono-oxygenases of the cytochrome P-450 (CYP) 1A family. Expression of the genes encoding these mono-oxygenases is mediated by the arylhydrocarbon receptor, a ligand-dependent transcription factor to which B[a]P and related PAHs bind. BPDE and other reactive metabolites are known to form

DNA adducts, predominantly by binding to the exocyclic amino groups of guanine and adenine [Cosman et al., 1992; Bartsch, 1996]. The metabolites produced in the lung are qualitatively similar to those found in the liver and other tissues [Cohen et al., 1976; Prough et al., 1979; International Programme on Chemical Safety, 1998].

DNA adducts can cause mispairing of DNA bases, leading to the induction of mutations through the DNA

Grant sponsor: The Japan Society for the Promotion of Sciences; Grant number: 14207100.

*Correspondence to: Yasunobu Aoki, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan. E-mail: ybaoki@nies.go.jp

Received 21 May 2004; provisionally accepted 26 June 2004; and in final form 10 October 2004

DOI 10.1002/em.20098

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

B[a]P administration. Their lungs were removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until the DNA was isolated.

DNA Isolation and In Vitro Packaging of DNA

High-molecular-weight genomic DNA was extracted from the lungs using the RecoverEase DNA Isolation Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Lambda EG10 phages were rescued using Transpack Packaging Extract (Stratagene).

gpt Mutation Assay

The *gpt* mutagenesis assay was performed according to previously described methods [Nohmi et al., 2000]. To convert the phage DNA into plasmids, *E. coli* YG6020 expressing Cre recombinase was infected with the rescued phage. The bacteria were then spread onto M9 salts plates containing Cm and 6-TG [Nohmi et al., 2000], which were incubated for 72 hr at 37°C for selection of the colonies harboring a plasmid carrying the chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene and a mutated *gpt* gene. The 6-TG-resistant colonies were streaked onto selection plates for confirmation of the resistant phenotype. The cells were then cultured in LB broth containing $25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ of Cm at 37°C and collected by centrifugation. The bacterial pellets were stored at -80°C until DNA sequencing analysis was performed. Mutant frequencies for the *gpt* gene were calculated by dividing the number of colonies growing on M9 + Cm + 6-TG agar plates by the number of colonies growing on M9 + Cm agar plates.

PCR and DNA Sequencing Analysis of 6-TG-Resistant Mutants

A 739 bp DNA fragment containing the *gpt* gene was amplified by PCR using primer 1 (forward primer: 5'-TACCACCTTATCCCGCTCAGG-3') and primer 2 (reverse primer: 5'-ACAGGGTTTCGCTCAGGTTTGC-3') [Nohmi et al., 2000]. The reaction mixture contained 5 pmole of each primer and 200 mM of each dNTP. PCR amplification was carried out using Ex Taq DNA polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) and performed with a Model PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, MA). After the PCR products were purified, sequencing reactions were performed by using a DYEnamic ET Terminator kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The sequencing primers were primer A (forward primer: 5'-GAGGCA-GTGGCTAAAAAGAC-3') and primer C (reverse primer: 5'-CTATTG-TAACCCGCTGAAG-3') [Nohmi et al., 2000]. The sequencing reaction products were analyzed on an Applied Biosystems model 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm SD. Statistical significance was evaluated using ANOVA and the Scheffe test. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. To evaluate the linearity of the mutant frequency dose-response, a simple linear regression was performed. A statistical comparison of mutational spectra was performed using the Adams-Skopek test [Adams and Skopek, 1987; Cariello et al., 1994].

RESULTS

gpt Mutant Frequency in Lung of B[a]P-Treated Mice

To determine the mutagenic effects of B[a]P in the lung, *gpt* delta transgenic mice were exposed to increasing doses of B[a]P by intratracheal instillation. The body weights of mice given 0, 0.5, 1, and 2 mg B[a]P were 23.3 ± 0.9 ,

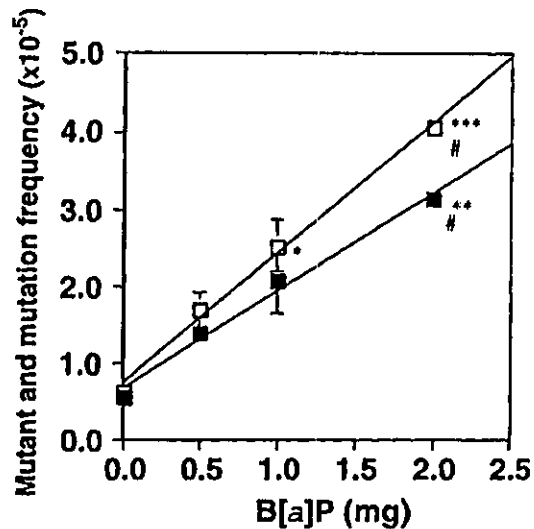


Fig. 1. 6-TG-induced mutant (open square) and mutation (filled square) frequency in the lungs of B[a]P-treated *gpt* delta mice. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$ for the control, 0.5 mg, and 1 mg groups; $n = 2$ for the 2 mg group). Number sign, average data of two animals. Statistical significance was determined using ANOVA and the Scheffe test. Significant differences between the control and B[a]P-induced groups are indicated: asterisk, $P < 0.05$; double asterisk, $P < 0.01$; triple asterisk, $P < 0.001$.

25.0 ± 0.0 , 25.0 ± 0.6 , and 24.5 ± 0.5 g, respectively, and there were no significant differences between the assay groups. The mutant frequency in the lungs of the control mice (0 mg B[a]P) was $0.60 \pm 0.13 \times 10^{-5}$ ($n = 3$). Single injections of 0.5, 1, and 2 mg resulted in increases in the mutant frequency of approximately 2.8-, 4.2-, and 6.8-fold ($1.7 \pm 0.22 \times 10^{-5}$, $n = 3$; $2.5 \pm 0.33 \times 10^{-5}$, $n = 3$; and 4.1×10^{-5} , $n = 2$), respectively, compared with the control mice (Table I). Mutation frequencies calculated from the mutant frequencies displayed similar fold increases. Significant differences were observed in the mutant and mutation frequencies between untreated and treated mice at the 1 and 2 mg doses but not at the 0.5 mg dose. The B[a]P treatment resulted in a significant linear dose-dependent increase in mutant frequency ($r^2 = 0.88$; $P < 0.001$; Fig. 1) and mutation frequency ($r^2 = 0.82$; $P < 0.01$; Fig. 1).

Characteristics of *gpt* Mutation Spectrum

To determine the spectrum of mutations caused by B[a]P instilled into the lung, 131 *gpt* mutants from the lungs of treated and control mice were subjected to DNA sequence analysis (Tables II and III). In control mice, 92% (12/13) of total mutations were base substitutions; G:C \rightarrow C:G and G:C \rightarrow T:A transversions and G:C \rightarrow A:T transitions occurred at nearly equal frequencies. In the

TABLE III. DNA Sequence Analysis of *gpt* Mutations Obtained From the Lung of B[a]P-Treated and Untreated Control *gpt* delta Mice

Type of mutation	Nucleotide	Sequence change	Amino acid change	Total number of mutants (independent)*		Number of mutants											
				Control		B[a]P		B[a]P 0.5 mg		B[a]P 1 mg		B[a]P 2 mg		B[a]P 2 mg			
				Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number		
Base substitution				Control	B[a]P	Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number	Number	
Transition																	
G:C→A:T	64	Cga→Tga	CpG	Arg→Stop	2 (1)												
	86	IG→tAg		Trp→Stop	2			2									
	110	cGt→cAt	CpG	Arg→His	3 (2)	1											
	115	Ggt→Agt	CpG	Gly→Ser	1												
	128	gGt→gAt		Gly→Asp	1											2	
	262	Gat→Aat		Asp→Asn	1												
	274	Gat→Aat		Asp→Asn	1												
	352	Cgt→Agt		Gly→Ser	1												
	402	IG→tGA		Trp→Stop	1												
	409	Cag→Tag		Gln→Stop	1												
	418	Gat→Aat		Asp→Asn	1												
A:T→G:C	25	Tgg→Cgg		Trp→Arg	1												
	56	cTc→cCc		Leu→Pro	1												
	415	Tgg→Cgg		Trp→Arg	2 (1)												
Transversion																	
G:C→T:A	7	Gaa→Taa	CpG	Glu→Stop	3 (1)												
	108	agC→agA		Ser→Arg	2 (1)												
	110	cGt→cTt	CpG	Arg→Leu	3 (2)												
	115	Ggt→Tgt	CpG	Gly→Cys	4 (3)												
	116	gGt→gTt		Gly→Val	1												
	140	gCg→gAg	CpG	Ala→Glu	3												
	143	cGt→cTt	CpG	Arg→Leu	10 (4)												
	176	tGt→tTt		Cys→Phe	1												
	185	aGc→aTc		Ser→Ile	1												
	186	agC→agA		Ser→Arg	1												
	189	taC→taA		Tyr→Stop	1												
	208	Gag→Tag	CpG	Glu→Stop	4 (3)												
	244	Gaa→Taa	CpG	Glu→Stop	4 (2)												
	304	Gaa→Taa		Glu→Stop	10 (2)												
	402	IG→tGT		Trp→Cys	1												
	409	Cag→Aag		Gln→Lys	2												
	413	cGt→cCt	CpG	Pro→Gln	1												
G:C→C:G	50	cGt→cCt	CpG	Arg→Pro	3												
	108	agC→agG		Ser→Arg	1												
	112	Ggc→Cgc	CpG	Gly→Arg	1												
	125	cGt→cGg	CpG	Pro→Arg	2												
	143	cGt→cCt	CpG	Arg→Pro	1												
	186	agC→agG		Ser→Arg	2 (1)												
	206	cGt→cCt	CpG	Arg→Pro	1												

B[a]P Spectrum in *gpt* delta Mice

(Continued)

B[a]P-treated group, 44% of the mutations (52/118) were G:C→T:A transversions, and 14% (16/118) were one-base deletions. A dose-dependent increase in base deletions was observed in the range of 0–2 mg B[a]P, while G:C→T:A transversions increased with dose at 0.5–1 mg B[a]P, but decreased slightly at 2 mg B[a]P.

The mutational analysis data were used to estimate mutation frequency. Mutations that were isolated more than once from an individual mouse were considered to be the result of clonal expansion and counted as a single independent mutation. Using this correction, 92% (12/13) of control mutations were independent, while 74% (87/118) of mutations from treated mice were independent. For most types of mutations, independent mutations and total mutations displayed very similar distributions (Table II), and mutant frequency and mutation frequency had very similar dose-response relationships (Fig. 1, Table I). Marked differences between mutant frequency and mutation frequency, however, were observed for G:C→T:A transversions. The mutant frequency for G:C→T:A transversion was estimated to be 0.11×10^{-5} (control), 0.61×10^{-5} (0.5 mg B[a]P), 1.4×10^{-5} (1 mg B[a]P), and 1.3×10^{-5} (2 mg B[a]P), as shown in Figure 2. On the other hand, the mutation frequency for G:C→T:A transversion was estimated to be 0.11, 0.41, 0.69, and 0.82 $\times 10^{-5}$ for 0, 0.5, 1, and 2 mg of B[a]P, respectively. Although different, both the mutation frequency and mutant frequency for G:C→T:A transversion increased dose-dependently.

There was a significant difference between the mutation spectra shown in Table II for untreated mice and mice treated with 1 mg B[a]P ($P < 0.05$). The spectra for mice treated with 0.5 and 2 mg B[a]P, however, were not significantly different from the control spectrum ($P = 0.60$ and 0.056). Also, there was no significant difference between the control mutation spectrum and the spectrum of total B[a]P-induced mutations ($P = 0.10$) or between the spectrum of independent control mutations and either the spectrum of total B[a]P-induced independent mutations ($P = 0.09$) or the spectrum of independent mutations produced by each of the different doses of B[a]P ($P = 0.86, 0.30, \text{ and } 0.15$).

The positions of *gpt* mutations induced by B[a]P are listed in Table III. Among the G:C→T:A transversions isolated from B[a]P-treated mice, five *gpt* mutations (at nucleotides 115, 140, 143, 189, and 413) were each observed in three or more mice; these positions therefore are potential hotspots for B[a]P mutation. Significant differences were observed for the hotspots in untreated and treated mice ($P < 0.05$, Adams-Skopek test).

The predominant frameshift mutation in B[a]P-treated mice was single-base pair deletion of G:C base pairs (15/16; 94%). Thirty-eight percent of single-base deletions (6/16) occurred at G:C sites in 5'-TGG-3' sequences, and the deletion of G:C from a run of G:Cs occurred in 63% of -1 frameshifts (10/16; Table III). There were, however, no apparent hotspots for deletion.

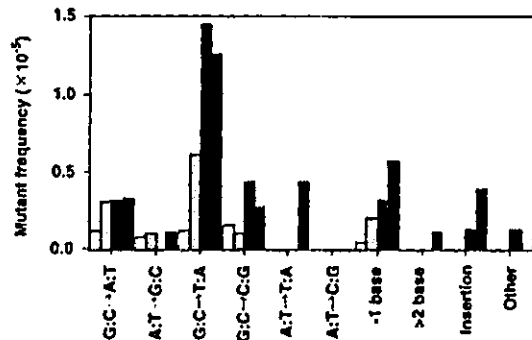


Fig. 2. Comparison of 6-TG-induced mutation spectra (not corrected for clonality) in control and B[a]P-treated *gpt* delta mice. Open bar, control; light gray bar, 0.5 mg; dark gray bar, 1 mg; closed bar, 2 mg.

DISCUSSION

To determine the mutant frequency and mutation spectrum induced by B[a]P in the lung, B[a]P was administered directly into the lungs of *gpt* delta mice. The mutagenicity of B[a]P has previously been determined in the liver, spleen, forestomach, and bone marrow using oral administration or i.p. injection in the Big Blue mouse [Skopek et al., 1996; Shane et al., 1997, 2000], Muta Mouse [Mientjes et al., 1996; Rompelberg et al., 1996; Hakura et al., 1998; Kosinska et al., 1999], and the *rpsL* transgenic mouse [Muto et al., 1999]. In these reports, the authors did not determine whether the mutant frequency depended on the dose of B[a]P except for one study using spleen T-cells [Skopek et al., 1996]. Our results indicate that the mutant frequency in the lung increases linearly with the dose of B[a]P. Therefore, when this compound is directly administered to a target organ, the amount of B[a]P bound to DNA in the form of a BPDE-DNA adduct appears to be proportional to the dose of B[a]P administered.

B[a]P administered by intratracheal injection also causes lung tumors in direct proportion to the total dose (0–8 mg) [Yoshimoto et al., 1983; Ide et al., 2000; Tchou-Wong et al., 2002]. For instance, the incidence of lung tumors was 39% at a dose of 4 mg B[a]P [Tchou-Wong et al., 2002]. These data indicate that lung tumors are induced under the same conditions and with a similar dose response as *gpt* mutations in *gpt* delta mice. Human B[a]P intake from air was estimated by Raiyani et al. [1993]. On the basis of an average inhalation of 15 m³ air per day, exposure to B[a]P was calculated to be 0.19 $\mu\text{g}/\text{day}$ in industrial areas [International Programme on Chemical Safety, 1998]. Therefore, the 1 mg dose of B[a]P used in this report is equivalent to the total intake of B[a]P received through inhalation over 14.4 years (5,263 days).

To analyze the spectrum of mutations caused by B[a]P in the lung, we determined the sequences of mutated *gpt* genes.

- Cariello NF, Piegorsch WW, Adams WT, Skopek TR. 1994. Computer program for the analysis of mutational spectra: application to *p53* mutations. *Carcinogenesis* 15:2281-2285.
- Cohen GM, Hawa SM, Moore BP, Bridges JW. 1976. Benzo(a)pyrene-3-yl hydrogen sulphate, a major ethyl acetate-extractable metabolite of benzo(a)pyrene in human, hamster and rat lung cultures. *Biochem Pharmacol* 25:2561-2570.
- Cosman M, de los Santos C, Fiala R, Hingerty BE, Singh SB, Ibanez V, Margulis LA, Live D, Geacintov NE, Brody S. 1992. Solution conformation of the major adduct between the carcinogen (+)-anti-benzo(a)pyrene diol epoxide and DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1914-1918.
- Denissenko MF, Pao A, Tang MS, Pfeifer GP. 1996. Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in *P53*. *Science* 274:430-432.
- Hakura A, Tsutsui Y, Sonoda J, Kai J, Imade T, Shimada M, Sugihara Y, Mikami T. 1998. Comparison between *in vivo* mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo(a)pyrene in the *lacZ* transgenic mouse (Muta Mouse). *Mutat Res* 398:123-130.
- Hakura A, Tsutsui Y, Sonoda J, Tsukidate K, Mikami T, Sagami F. 2000. Comparison of the mutational spectra of the *lacZ* transgene in four organs of the Muta Mouse treated with benzo(a)pyrene: target organ specificity. *Mutat Res* 447:239-247.
- Ide F, Iida N, Nakatsuru Y, Oda H, Tanaka K, Ishikawa T. 2000. Mice deficient in the nucleotide excision repair gene *XPA* have elevated sensitivity to benzo(a)pyrene induction of lung tumors. *Carcinogenesis* 21:1263-1265.
- International Programme on Chemical Safety. 1998. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental health criteria 202. Geneva: World Health Organization. p267-276.
- Iwagawa M, Maeda T, Izumi K, Otsuka H, Nishifuji K, Ohnishi Y, Aoki S. 1989. Comparative dose-response study on the pulmonary carcinogenicity of 1,6-dinitropyrene and benzo(a)pyrene in F344 rats. *Carcinogenesis* 10:1285-1290.
- Kosinska W, von Prezentin MdM, Guttenplan JB. 1999. Mutagenesis induced by benzo(a)pyrene in *lacZ* mouse mammary and oral tissues: comparisons with mutagenesis in other organs and relationships to previous carcinogenicity assays. *Carcinogenesis* 20:1103-1106.
- Masumura K, Matsui K, Yamada M, Horiguchi M, Ishida K, Watanabe M, Ueda O, Suzuki H, Kanke Y, Tindall KR, Wakabayashi K, Sofuni T, Nohmi T. 1999. Mutagenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) in the new *gpt* delta transgenic mouse. *Cancer Lett* 143:241-244.
- Masumura K, Matsui K, Yamada M, Horiguchi M, Ishida K, Watanabe M, Wakabayashi K, Nohmi T. 2000. Characterization of mutations induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the colon of *gpt* delta transgenic mouse: novel G:C deletions beside runs of identical bases. *Carcinogenesis* 21:2049-2056.
- Masumura K, Horiguchi M, Nishikawa A, Umemura T, Kanke K, Kanke Y, Nohmi T. 2003. Low dose genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in *gpt* delta transgenic mice. *Mutat Res* 541:91-102.
- Mientjes EJ, Steenwinkel MJST, van Delft JHM, Lohman PHM, Baan RA. 1996. Comparison of the X-gal- and P-gal-based systems for screening of mutant λ *lacZ* phages originating from the transgenic mouse strain 40.6. *Mutat Res* 360:101-106.
- Miller ML, Vasunia K, Talaska G, Andringa A, de Boer J, Dixon K. 2000. The tumor promoter TPA enhances benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene diol epoxide mutagenesis in Big Blue mouse skin. *Environ Mol Mutagen* 35:319-327.
- Monroe JJ, Kort KL, Miller JE, Marino DR, Skopek TR. 1998. A comparative study of *in vivo* mutation assays: analysis of *hprt*, *lacI*, and *chlI* as mutational targets for *N*-nitroso-*N*-methylurea and benzo(a)pyrene in Big Blue mice. *Mutat Res* 421:121-136.
- Mullin AH, Nataraj D, Ren JJ, Mullin DA. 1998. Inhaled benzene increases the frequency and length of *lacI* deletion mutations in lung tissues of mice. *Carcinogenesis* 19:1723-1733.
- Muto S, Yokoi T, Gondo Y, Katsuki M, Shioyama Y, Fujita K, Kamataki T. 1999. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mutagenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the lung of *rpsL* transgenic mice. *Carcinogenesis* 20:421-424.
- Nohmi T, Kato M, Suzuki H, Matsui M, Yamada M, Watanabe M, Suzuki M, Horiya N, Ueda O, Shibuya T, Ikeda H, Sofuni T. 1996. A new transgenic mouse mutagenesis test system using *Spi⁺* and 6-thioguanine selections. *Environ Mol Mutagen* 28:465-470.
- Nohmi T, Suzuki T, Masumura K. 2000. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays. *Mutat Res* 455:191-215.
- Prough RA, Pairizi VW, Okita RT, Masters BSS, Jakobsson SW. 1979. Characteristics of benzo(a)pyrene metabolism by kidney, liver and lung microsomal fractions from rodents and humans. *Cancer Res* 39:1199-1206.
- Raiyani CV, Jani JP, Desai NM, Shah JA, Kashyap SK. 1993. Levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient environment of Ahmedabad City. *Ind J Environ Prot* 13:206-215.
- Rempelberg CJM, Steenwinkel MJST, van Asten JG, van Delft JHM, Baan RA, Verhagen H. 1996. Effect of eugenol on the mutagenicity of benzo(a)pyrene and the formation of benzo(a)pyrene-DNA adducts in the λ -*lacZ*-transgenic mouse. *Mutat Res* 369:87-96.
- Shane BS, Lockhart AMC, Winston GW, Tindall KR. 1997. Mutant frequency of *lacI* in transgenic mice following benzo(a)pyrene treatment and partial hepatectomy. *Mutat Res* 377:1-11.
- Shane BS, de Boer J, Watson DE, Haseman JK, Glickman BW, Tindall KR. 2000. *LacI* mutation spectra following benzo(a)pyrene treatment of Big Blue mice. *Carcinogenesis* 21:715-725.
- Singh SV, Benson PJ, Hu X, Pal A, Xia H, Srivastava SK, Awasthi S, Zarek HA, Orchard JL, Awasthi YC. 1998. Gender-related differences in susceptibility of A/J mouse to benzo(a)pyrene-induced pulmonary and forestomach tumorigenesis. *Cancer Lett* 128:197-204.
- Skopek TR, Kort KL, Marino DR, Mittal LV, Umbenhauer DR, Laws GM, Adams SP. 1996. Mutagenic response of the endogenous *hprt* gene and *lacI* transgene in benzo(a)pyrene-treated Big Blue B6C3F1 mice. *Environ Mol Mutagen* 28:376-384.
- Swiger RR, Cosentino L, Masumura K, Nohmi T, Heddle JA. 2001. Further characterization and validation of *gpt* delta transgenic mice for quantifying somatic mutations *in vivo*. *Environ Mol Mutagen* 37:297-303.
- Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Inoue K, Yoshida S, Takeda K, Yoshino S, Yoshikawa T, Morita M. 2002. Lung expression of cytochrome P450 1A1 as a possible biomarker of exposure to diesel exhaust particles. *Arch Toxicol* 76:146-151.
- Tchou-Wong KM, Jiang Y, Yee H, LaRosa J, Lee TC, Pellicer A, Jagirdar J, Gordon T, Goldberg JD, Rom WN. 2002. Lung-specific expression of dominant-negative mutant *p53* in transgenic mice increases spontaneous and benzo(a)pyrene-induced lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:186-193.
- Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Heddle JA, Heflich RH, Lambert I, Martus HJ, Mirzalis JC, Suzuki T, Yajima N. 2003. *In vivo* transgenic mutation assays. *Mutat Res* 540:141-151.
- Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Hayashi M, Hakura A, Mizutani T, Sasaki K. 2002. Effect of 10-aza-substitution on benzo(a)pyrene mutagenicity *in vivo* and *in vitro*. *Mutat Res* 521:187-200.
- Yoshimoto T, Inoue T, Iizuka H, Nishikawa H, Sakatani M, Ogura T, Hirao F, Yamamura Y. 1980. Differential induction of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas in mouse lung by intratracheal instillation of benzo(a)pyrene and charcoal powder. *Cancer Res* 40:4301-4307.

【研究論文】

大気中の化学物質の複合曝露による発がんリスクの評価*

Carcinogenic Risk Assessment for Exposure to Chemical Mixtures in the Air

松本 理**, 丸山 若重**, 平野 靖史郎***,
青木 康展**, 松本 幸雄****, 中杉 修身**

Michi MATSUMOTO, Wakae MARUYAMA, Seishiro HIRANO,
Yasunobu AOKI, Yukio MATSUMOTO and Osami NAKASUGI

Abstract: In this study, we proposed a method for the carcinogenic risk assessment of exposure to chemical mixtures in the air. We assumed the action of each chemical in the mixture is separate, when the mechanism of carcinogenesis and the target organs are different among chemicals, and/or when the concentration of each chemical is low enough to neglect the interactive action. Accordingly the total risk of mixtures was expressed as the sum of the risk of each chemical. We selected 10 chemicals released in large quantities to the atmosphere based on PRTR data, and calculated their unit risks for carcinogenesis. We estimated the carcinogenic risk using the monitoring data of toxic air pollutants by municipal corporations in 2001. The carcinogenic risk in areas with a large population was higher than that in areas with a small population, which was due to high concentration of benzene and formaldehyde in urban areas.

Key words: chemical mixtures, complex exposure, carcinogenic risk assessment, unit risk, PRTR

1. はじめに

一般環境中に存在している有害物質に人が曝露されることによる健康影響を考える場合、実際には単一の有害物質の曝露という状況はあり得ない。環境中の有害物質による健康リスクの評価を行うためには、それぞれの物質によるリスクの評価も重要であるが、複数の物質の同時曝露によるリスク評価も必要である。しかし、一般環境における複数の物質の曝露による健康リスクの評価は、これまでほとんど行われていない。本研究では複合曝露リスク評価における問題点の整理を行

い、複合曝露による健康リスク評価の一手法を提示する。

複合曝露リスク評価の最初の取り組みとして、排出先として最大の媒体である大気環境中の化学物質の複合曝露による健康リスクの評価手法を検討した。一般環境中で多くの人が意識しないうちに大気中に存在する物質に曝露されているということも、大気環境中の化学物質の曝露によるリスクを最初に取り上げる理由である。

健康影響のエンドポイントとして、社会的関心が高く、リスク評価に利用できる研究報告の多い

* 2003年12月25日受付, 2004年9月8日受理 (改訂版受理)

** 国立環境研究所化学物質環境リスク研究センター (Research Center for Environmental Risk, National Institute for Environmental Studies)

*** 国立環境研究所環境健康研究領域 (Environmental Health Sciences Division, National Institute for Environmental Studies)

**** 国立環境研究所PM2.5・DEP研究プロジェクト (PM2.5&DEP Research Project, National Institute for Environmental Studies)

発がんに着目し、複合曝露による発がんリスク評価を試みた。1999年に公布された「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」に基づく環境汚染物質排出・移動登録 (PRTR) 制度により、354の化学物質の環境中への排出量が集計されている。そこで、PRTR制度において公表されているデータより化学物質の大気中への排出量を集計し、大気中への排出量の多い物質の複合曝露による健康リスクの評価について検討した。

2. PRTR公表データに基づく大気中への排出量の多い化学物質の抽出

2. 1 平成12年度パイロット事業報告に基づく集計

1999 (平成11) 年に公布された「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」、いわゆるPRTR法に基づき、第一種指定化学物質として、354物質の環境中への排出量が集計され、公表されている。日本では、環境省及び経済産業省により、平成9年度より平成13年度まで試験的にパイロット事業が実施されてきた。正式には平成13年度より始まり、平成14年度から第1回目の届出が開始された。集計結果は平成13年度 PRTRデータの概要として経済産業省及び環境省 (2003) より平成15年3月に公表されている。

本研究を開始した時点で利用できる最新の集計結果は平成12年度 PRTRパイロット事業報告書 (経済産業省・環境省、2001) のデータであったため、これより実際に大気中への排出量の多い化学物質を選び出し、排出量上位の物質について複合曝露のリスク評価を行うこととし、大気中への排出量の多い物質を抽出するための集計を行った。大気中への排出量上位11位までの集計結果を図1に示す。この結果より、大気中の化学物質による複合曝露のリスク評価のモデル化合物として10物質を取り上げること考えた。テトラクロロエチレンの排出量は、12年度のパイロット事業報告では540 t / 年であり、上位の物質に比べれば少なかったが、ハロゲン化エチレンとして8位のトリクロロエチレン、9位のテトラフルオロエチレンと同様の挙動を示すと考えられるため、上位の9物質にテトラクロロエチレンを合わせて10物質の複合リスク評価について検討することとした。

2. 2 平成13年度PRTRデータ集計結果に基づく集計

前述のように、化学物質の環境中への排出量についてのPRTR法に基づく届出が開始され、第1回目の集計結果が公表された。本研究の目的である、平成12年度パイロット事業報告などに基づき選択した10のモデル化合物の大気中の化学物質の複合曝露によるリスク評価は終了していたが、参考のために、全国のPRTRデータに基づき、同様に大気中への排出量の多い物質の推定を行った。

大気への排出量は、大気への届出排出量と、届出外排出量のうち発生源、用途、使用方法から大気への排出と推定した量との和として計算した。大気への排出量上位10物質の推計結果を図2に示す。12年度のパイロット事業の集計結果と比較すると、トルエン、キシレン、ジクロロメタンの上位3物質は同じであるが、そのほかの物質については若干順位が入れ替わった。モデル化合物として選択した10物質の中では、7物質が全国レベルでのPRTRデータでも大気中への排出量の多い物質となっていた。

3. 化学物質の発がんユニットリスクの算出

化学物質の複合健康影響を考えるにあたっては、化学物質の相互作用を考慮しなければならない。独立の作用の和とみなすことができない狭義の相互作用は、相乗作用と阻害作用である。これらの作用に関する研究報告の多くが取り上げているのは2つ、あるいはせいぜい数種の物質の相互作用であり、現実の環境における複合曝露のモデルとはならない。しかしこれらの相互作用が観察されるのは、非常に高濃度の物質の曝露による動物実験の報告においてであり、低濃度曝露では観察されない。例えば動物に対するトルエンとキシレンの複合曝露実験で、ともに50 ppm以上の濃度において相互作用が観察されること (Tardif et al., 1993)、また、ボランティアの人に対するトルエンとキシレンの複合曝露実験でも50 ppm以下の濃度では血中濃度、呼気中および尿中排泄に対する影響がないこと (Tardif et al., 1991) が報告されている。トルエンとキシレンはPRTRデータによると大気中への排出量が最も多い2つの物質である。対象物質の実際の大気環境中の濃度は、動物実験において相互作用が観察される曝露濃度よりは非常に低いと推測される。平成9-10年度に当時の厚生省により、居住環境中の揮発性有機

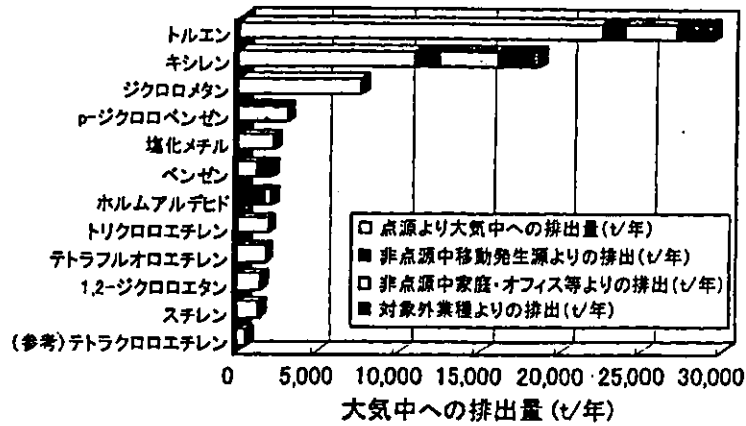


図1 大気中への排出量の多い物質
(平成12年度PTR/パイロット事業結果より集計)

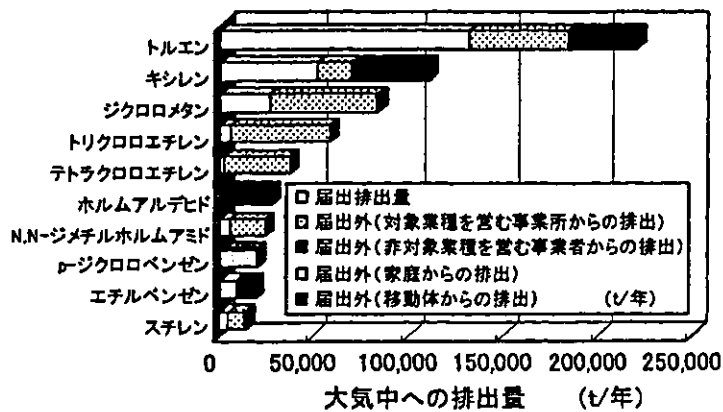


図2 大気中への排出量の多い物質
(平成13年度PTRデータより集計)

化合物の全国実態調査（厚生省 報道発表資料、1999）が実施されており、トルエン、キシレン、ベンゼン、ジクロロメタン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、*p*-ジクロロベンゼンなどの室内及び室外濃度が測定されている。この測定結果によると最も濃度の高い揮発性有機化合物は、室内ではトルエン、*p*-ジクロロベンゼン、室外ではトルエンである。これらの化合物の濃度は、最大値でも、トルエンが3 mg/m³（室内）、0.5 mg/m³（室外）、*p*-ジクロロベンゼンが6 mg/m³（室内）であり、これらはそれぞれ、0.80 ppm、0.13 ppm、1.00 ppm に相当し、相互作用が観察される濃度よりはかなり低い。そこで、ここでは物質間の相互作用は考慮せず、各物質によるリスクの和が全体のリスクであると仮定して考えることにした。各物質によるリスクは物質そのものによる毒性（ここでは発がん性）の強さと存在量に依

存する。
即ち、

$$R_c = \sum_{i=1}^n UR_i \cdot C_i$$

R_c ：複合曝露による発がんリスク
（生涯曝露に伴う生涯がん発症確率）

UR_i ：化学物質 i のユニットリスク

C_i ：化学物質 i の大気濃度

発がん性の評価に関しては、国際がん研究機関（IARC）を始めとする各機関が分類を行っている。閾値がないと仮定した場合、発がんの強さはユニットリスクとよばれる値により表すことができる。ユニットリスクとは、ある物質を単位濃度で生涯曝露したと仮定したときの影響（エンドポイント）の発生確率の増加分をいう。いくつかの物質の発がんのユニットリスクについては、WHO（1999）やUS EPA（IRIS）などの機関が独

計算の基本手順：

1. 動物実験のデータより、動物の発がんに関するベンチマーク用量(Benchmark dose: BMD)を求める。
2. 動物実験から計算されたBMDを、ヒトの曝露量に換算する。
3. 求めたヒトの同等BMD (大気中濃度) よりユニットリスクを求める。

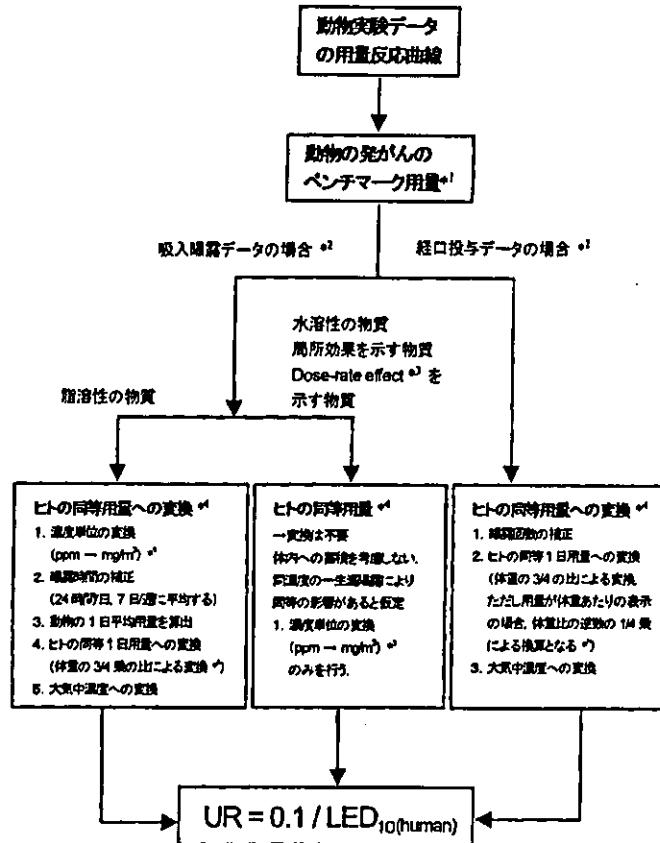


図3 動物実験のデータより大気中の化学物質による発がんのユニットリスク (UR) を求める手順

- *1 ここでのベンチマーク用量は10% 急性発現推定値の下側95%信頼限界 (LED10) とする。
- *2 ヒト及び動物の吸収率のデータが利用できる場合は、吸収率の比について考慮する。不明の場合は同じであると仮定して計算する。
- *3 放射線の影響における線量率効果と同様の効果。同じ線量 (用量) の曝露を受けても、線量 (用量) 率が低い場合 (即ち長い時間をかけて曝露された場合) ほど生物効果が小さくなる現象。
- *4 このチャートに従いヒトの同等用量を求めるのはデフォルトの方法である。PBPKモデルなどの適当な換算モデルがある場合は、モデルを用いて求める。ヒトの同等用量への変換に用いる体重及び呼吸量の値は、ヒト (日本人)、ラット、マウスの順に、50 kg, 15 m³, 0.35 kg, 0.26 m³, 0.03 kg, 0.05 m³ とした。
- *5 分子量と気温の値を用いて大気濃度単位を ppm から mg/m³ に変換する。25℃の場合、(分子量 / 24.45) を乗じることで変換できる。
- *6 従来EPAなどでも、用量の動物種間外挿の scaling factor として、代謝が表面積に比例するという考え方より、2/3 が用いられてきたが、近年は代謝率に依存するとして3/4 が用いられるようになってきている。

自に算出している。我々は上記の10物質について日本人の発がんのユニットリスクを求めることとし、これらの国際機関や各国の評価文書および元の文献を詳細に調査し、ユニットリスクを求める方法を独自に検討した。参照した評価文書及びデータベースを文末に示す。US EPA (1992) では、ユニットリスクを求めるためのデータの選択に際し、データの質とともに、動物種や曝露経路などに関するいくつかの基準を提示している。これによると、データとして最も適当なものはヒトのデ

ータである。他の動物のデータからの外挿が不要であるため、多くの仮定を含まず、ヒトのリスク評価に用いるには最も望ましい。しかし、発がんに関する良い疫学データが存在する化学物質は非常に少ない。我々もこれに準拠してデータを選択したが、今回選択した10物質の中で、十分な発がんの疫学データが存在するのはベンゼンのみであった。そのため、他の物質については動物実験のデータを用いざるを得なかった。そこで、動物実験のデータより大気中の化学物質による発がんの

表1 大気中に存在する10の化学物質の発がんユニットリスクと大気環境基準値、室内濃度指針値

Chemical	CAS No.	IARC 発がん性 評価	Air Unit Risk* (NIES) (per $\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Air Unit Risk (EPA) (per $\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Air Unit Risk (WHO Europe) (per $\mu\text{g}/\text{m}^3$)	大気環境基準値 (日本) ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	室内濃度指針値 (日本) (ppm)/($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
トルエン	108-88-3	3	0	-	-	-	0.07/ 260
キシレン	1330-20-7	3	0	-	-	-	0.20/ 870
ジクロロメタン	75-09-2	2B	1.2×10^6	4.7×10^7	-	150	-
パラジクロロ ベンゼン	106-46-7	2B	2.0×10^6	-	-	-	0.04/ 240
塩化メチル	74-87-3	3	0	-	-	-	-
ベンゼン	71-43-2	1	(5.0×10^5)	2.2×10^6 $- 7.8 \times 10^6$	6.0×10^4	3	-
ホルム アルデヒド	50-00-0	2A	1.3×10^6	1.3×10^6	-	-	0.08/ 100
トリクロロ エチレン	79-01-6	2A	2.8×10^6	-	4.3×10^7	200	-
テトラフルオロ エチレン	116-14-3	2B	2.4×10^6	-	-	-	-
テトラクロロ エチレン	127-18-4	2A	6.3×10^6	-	-	200	-

- 本研究において算出したユニットリスクの値、ユニットリスクを算出するのに用いた実験データの文献は以下の通り。
 ジクロロメタン: US NTP (1986a), パラジクロロベンゼン: 日本バイオアッセイ研究センター (1995),
 ホルムアルデヒド: Kerns et al. (1983), トリクロロエチレン: Henschler et al. (1980),
 テトラフルオロエチレン: US NTP (1997), テトラクロロエチレン: Mennear et al. (1986), US NTP (1986b).
 計算の詳細については本文に記した。
 ベンゼンについては、疫学データより US EPA が算出したユニットリスクの範囲の中央の値を用いた。

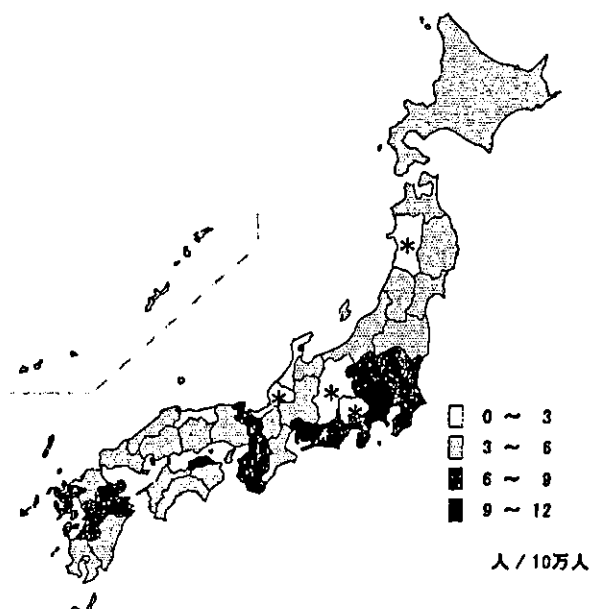


図4 大気中のベンゼン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、ジクロロメタン、ホルムアルデヒドによる都道府県別の複合発がんリスク (生涯曝露に伴う生涯がん発症確率)
 各物質の大気中濃度は平成13年度地方公共団体等における有害大気汚染物質モニタリング調査結果を使用した。
 (注: *印の秋田、福井、山梨、長野の各県はホルムアルデヒドの測定値がないため、発がんリスクが低めの試算となっている。)

ユニットリスクを求める手順について検討した。動物実験の用量反応データをモデル化し、ベンチマーク用量（ある影響の発生確率を一定分だけ増加させる用量）として10%毒性発現推定量の下側95%信頼限界値（LED₁₀）を求めた。この際のモデルは、線形多段階モデルを用いた。ベンチマーク用量の計算には、US EPAのBenchmark dose software (ver. 1.3.2)を使用した。

整理した手順を図3に、求めた10物質の日本人の発がんユニットリスクを表1に示す。動物実験における発がんデータが存在した6物質について、ユニットリスクの算出に用いたデータと算出過程を文末に付録として記した。

ベンゼンについては、EPAの公表値を採用した。EPA (1998)、WHO (1999)などの各国機関、国際機関がベンゼンによる発がんの疫学データ（主要な研究は米国オハイオ州におけるPliofilm製造工場労働者に関する疫学研究、Crump et al., 1984, Crump, 1994, Paustenbach et al, 1992, 1993, Rinsky et al., 1981, 1987）の検討を詳細に行っている。しかし、計算過程に複数の意見があり、EPAもユニットリスクに幅を持たせて公表している。これらの過程を再検証し、さらに独自にユニットリスクを計算しても、新しい知見が得られるとは考えられないため、EPAの公表値を採用することとし、範囲の中央の値（ 5.0×10^{-6} per $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）を計算に用いた。WHO (1999)の算出したユニットリスクは、 $4.4 \sim 7.5 \times 10^{-6}$ per $\mu\text{g}/\text{m}^3$ で、範囲の中央の値で 6.0×10^{-6} per $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と公表されており、また、平成9年に日本で現在のベンゼンの環境基準が設定された際に、その根拠として採用されたユニットリスクも $3.0 \sim 7.0 \times 10^{-6}$ per $\mu\text{g}/\text{m}^3$ （中央環境審議会、1996、1997）であり、いずれも近い値であるので、妥当な値であると考えられる。

4. 大気中濃度を用いた5物質の複合曝露による発がんのリスク

前項において求めたユニットリスクの値を用いて複合発がんリスクを算出するためには、対象とする化学物質の大気中濃度の測定値が必要である。ここでの発がんリスクとは、大気中の化学物質の生涯にわたる曝露に伴う生涯がん発症率率のことを示す。現時点で利用できる大気中濃度の値は、環境省による平成13年度地方公共団体等における有害大気汚染物質モニタリング調査結果で、19物質の測定が実施されている。選択した10物質

の中で、この調査で濃度が測定されているのは、ジクロロメタン、ベンゼン、ホルムアルデヒド、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンの5物質であった。そこでこの5物質による複合発がんリスクを計算した。前項でも考察したように、複合リスクはユニットリスクと大気中濃度の積を足し合わせた数字で考えることとして、国内各都道府県の測定地点の平均濃度を計算に用いた。図4に結果を地図に表示したものを示す。この都道府県別の発がんリスクマップより、人口の多い都府県とその周辺地域のリスクが高いことがわかる。また、香川、大分、長崎、熊本各県のリスクが比較的高いのは、ホルムアルデヒド及びベンゼンの濃度が都市圏と同程度に高いことによる。一方、総リスクの低かった秋田、鳥取、福井、長野、山梨、石川の各県のうち、秋田、福井、長野、山梨の場合は、ホルムアルデヒドの測定値がないため、濃度を0としてリスクを計算したために低くなっているもので、5物質すべてを合わせた10万人あたりの発がんリスクが3人以下であったのは、鳥取と石川のみである。山梨はベンゼンの平均濃度が高く、5物質すべてを合わせたリスクは都市圏と同様に高い可能性がある。以上の結果からもわかるように、この5物質による複合発がんリスクでは、ホルムアルデヒドとベンゼンの寄与が他の3物質よりも大きい。これは、ホルムアルデヒドのユニットリスクが他の物質よりも高くなっていることと、ホルムアルデヒドとベンゼンの実際の大気中の濃度が高いことによる。大気中の化学物質による発がんリスクに関しては、この2つの物質が重要であると考えられる。

5. 考察

本研究において、我々が独自に発がんのユニットリスクを計算して求めた10物質の中で、有害大気汚染物質モニタリング調査結果を利用して、曝露評価が可能であったのは5物質であった。この中で、ベンゼン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、ジクロロメタンの4物質については大気環境基準が定められている。この4物質の中で、発がん性をエンドポイントとして基準値が定められた物質はベンゼンのみであり、他の3物質は神経系への影響から環境基準が設定された。異なるエンドポイントに基づき設定された基準値をそのまま比較することはできないが、ベンゼンの大気環境基準値と他の3物質の大気環境基準値

は、およそ2桁違っている。ベンゼン以外の3物質の濃度に関しては、有害大気汚染物質モニタリング調査の結果では、すべての測定地点において環境基準を下回っている。ベンゼンについては、環境基準を超えている地点があるため、排出削減の取り組みが行われており、平成13年度PRTRデータより我々が計算した大気中への排出量の上位10物質(図2)にもベンゼンは入っていない。しかし、ジクロロメタン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンの排出量はかなり多い。測定地点における実際の濃度は環境基準よりかなり低く、急性の健康影響は無視しうる程度と見なせるが、発がんなどの慢性影響に対して現在の基準値が十分であるかどうか検討する余地が残されている。

実際にこの3物質にヒトに対する発がん性があるか否か、ユニットリスクの計算に適したデータがあるか、動物実験データのヒトへの外挿方法は適切か、など議論すべき点は多々あると考える。しかしこの3物質はIARCによっていずれも「おそらく発がん性がある」あるいは「発がん性である可能性がある」と評価された物質であり、複合曝露による発がんリスクを考える際にこれらの物質の寄与を全く考慮しないのは適当でない。

さらに深刻なのはホルムアルデヒドである。我々が求めたホルムアルデヒドの発がんユニットリスクは 1.3×10^5 per $\mu\text{g}/\text{m}^3$ で、US EPAの提示するユニットリスクの値と同じである。これは、ベンゼンの約2.6倍である。もっともホルムアルデヒドのユニットリスクを求めるにあたっては、今回取り上げた他の物質と異なり、水溶性の物質であることや、放射線の影響の場合に観察されるような線量率効果を示す物質であることから、種間外挿や曝露時間の補正を行わないなどの多くの仮定を前提としており、ユニットリスクが高めの値となっている可能性がある。しかし、ホルムアルデヒドの大気中濃度は他の物質と比べると高い。ホルムアルデヒドの一般大気中における環境基準はまだ設けられていない。室内曝露によるシックハウス症候群あるいは化学物質過敏症の原因物質のひとつと考えられている物質であり、厚生労働省から室内濃度指針値が提案されているが、これはヒト曝露における鼻咽頭粘膜への刺激を毒性の指標としており、短期間の曝露によって起こる毒性に基づいたものである。ホルムアルデヒドの大気中への排出量は、実は家庭内での排出よりも、移動体即ち自動車等からの排出が大半を占め

ている。大気への排出量の内、ベンゼンは75%以上、ホルムアルデヒドは90%以上が移動発生源よりの排出であると推測される。自動車排出ガスそのものの低減対策も進められてはいるが、発がんリスクへの寄与の大きさから考えると、ベンゼンと同様に、ホルムアルデヒドについてもリスクを低減するための指針値を早急に設定すべきであろう。

6. まとめ

今回我々は、化学物質の発がんユニットリスクを求め、さらにその物質の大気中濃度の測定値があれば、複合曝露による発がんリスクの計算が可能であることを示すことができた。同様の考え方により、他の物質や発がん性以外の毒性についても複合曝露のリスクを考えることができると思われる。

現時点における問題点は、ユニットリスクを求めるのに必要な疫学あるいは動物実験のデータが入手可能である物質がそれほど多くないこと、曝露量の推定に必要な大気中の濃度が測定されている物質数が少ないこと、測定地点が均一に分布していないため、地域内の測定点における測定値の平均値がその地域の濃度を代表しているとは必ずしもいえないことなどである。また排出量の多い化学物質には、室内濃度/室外濃度比が高く、大気中よりも室内における曝露量のほうが多いと推定される物質が多く、室内曝露と大気中の曝露のリスク評価を併せて考える必要がある。これらは今後の検討課題であると考ええる。

現在大気中の濃度が測定されていない化学物質で、排出量が多く、リスクが高い可能性のある物質のモニタリングを実施する必要もあるかもしれない。リスク評価には大きな不確かさが存在する。本研究におけるリスク評価もユニットリスクの算出などの点で多くの不確かさを含んでいるが、このような評価を示すことは今後のリスク評価研究や規制における優先度を見通すための役割を果たすと考える。

(付録)

ジクロロメタン、パラジクロロベンゼン、ホルムアルデヒド、トリクロロエチレン、テトラフルオロエチレン、テトラクロロエチレンのユニットリスクの算出過程を記す。

ベンチマーク用量 (LED10, 以下 BMDLと略記), ユニットリスク (UR) の計算には US EPA の Benchmark dose software (ver. 1.3.2) (線形多段階モデル) を用いた。ヒトの同等用量への換算に用いる体重及び呼吸量の値は、ヒト、50 kg / 15m³, マウス、0.03 kg / 0.05m³とした。

1. ジクロロメタン

ジクロロメタンは揮発性の液体で、脂溶性の物質である。EPAは、IRISデータベースにおいて、マウス(雌)の発がん実験データからPB-PKモデルにより臓器負荷用量を求めてユニットリスクを計算しているが、臓器負荷用量からユニットリスクの算出方法、あるいは臓器負荷用量から大気中濃度への換算方法が評価文書では不明である。そのため、ここではまずデフォルトの方法により、ユニットリスクを求めた。ジクロロメタンの発がん性には種差があり、マウスのデータをヒトのリスク評価に利用するのは適当でないとの意見もあるが、マウス以外に利用できるデータがないことから、ここではマウスの発がん実験データを用いた。

動物実験における発がんのベンチマーク用量を算出するにあたり、US NTP (1986a) のデータを用いた。このデータは、24か月の吸入曝露によるマウスの肝臓及び肺における癌腫及び腺腫の発症の報告である。我々は、性別、臓器別、腫瘍の種類別、及びそれらを合わせたものについて詳細にデータを検討した結果、雌雄、肝臓及び肺、癌腫及び腺腫を併せたユニットリスクを算出することが適当であるとの結論を得た。データ及び算出過程について以下に記す。(Data 1)

Data 1

Tumor: combined adenomas and carcinomas (liver and lung)

Animal: mouse/B6C3F1, 50 males and 50 females

Route: inhalation

Exposure time:6 hrs/day, 5 days/week, for 24 months (102 weeks + no-exposure 2 weeks),

Reference: US NTP (1986a)

male

Dose (ppm)	Survival	(a) Liver Adenoma Incidence	(b) Liver Carcinoma Incidence	(c) Liver Combined Incidence	(d) Lung Adenoma Incidence	(e) Lung Carcinoma Incidence	(f) Lung Combined Incidence
0	39/50	10/50	13/50	22/50	3/50	2/50	5/50
2000	24/50	14/49	15/49	24/49	19/50	10/50	27/50
4000	11/50	14/49	26/49	33/49	24/50	28/50	40/50

female

Dose (ppm)	Survival	(g) Liver Adenoma Incidence	(h) Liver Carcinoma Incidence	(i) Liver Combined Incidence	(j) Lung Adenoma Incidence	(k) Lung Carcinoma Incidence	(l) Lung Combined Incidence
0	25/50	2/50	1/50	3/50	2/50	1/50	3/50
2000	25/49	6/48	11/48	16/48	23/48	13/48	30/48
4000	8/49	22/48	32/48	40/48	28/48	29/48	41/48

male & female

Dose (ppm)	Survival	(m) Liver Adenoma Incidence	(n) Liver Carcinoma Incidence	(o) Liver Combined Incidence	(p) Lung Adenoma Incidence	(q) Lung Carcinoma Incidence	(r) Lung Combined Incidence
0	64/100	12/100	14/100	20/100	5/100	3/100	8/100
	0	0	0	0			
2000	49/99	20/97	26/97	40/97	42/98	23/98	57/98
4000	19/99	36/97	58/97	73/97	52/98	57/98	81/98

上表中の(o)及び(r)のデータよりBMDLを求めると、

$$\text{Liver: } 519.367 \text{ ppm} = 519.367 \times 84.93 / 24.45 \text{ mg/m}^3 = 1804 \text{ mg/m}^3 \text{ (degree: 2)}$$

$$\text{Lung: } 219.833 \text{ ppm} = 219.833 \times 84.93 / 24.45 \text{ mg/m}^3 = 763.6 \text{ mg/m}^3 \text{ (degree: 1)}$$

曝露時間の補正、呼吸量による補正及び体重の3/4乗による換算を行い、大気中濃度に変換すると、肝臓の場合は、

$$1804 \times (6/24) \times (5/7) \times 0.05 \times (50/0.03)^{3/4} / 15 = 280.1 \text{ mg/m}^3$$

ユニットリスクは、

$$\text{UR} = 0.1/280.1 = 3.57 \times 10^{-4} \text{ (per mg/m}^3\text{)}$$

肺の場合も同様に、

$$763.6 \times (6/24) \times (5/7) \times 0.05 \times (50/0.03)^{3/4} / 15 = 118.6 \text{ mg/m}^3$$

$$\text{UR} = 0.1/118.6 = 8.43 \times 10^{-4} \text{ (per mg/m}^3\text{)}$$

両方のユニットリスクを足し合わせると、

$$1.2 \times 10^{-3} \text{ per mg/m}^3 = \underline{1.2 \times 10^{-4} \text{ per } \mu\text{g/m}^3}$$

2. パラジクロロベンゼン

パラジクロロベンゼンは昇華性、脂溶性の物質である。マウスの吸入曝露実験のデータを用いてユニットリスクを求めた。2年間の吸入曝露によるマウスの肝臓における肝細胞がん、腺腫、肉腫などの報告があるが、このデータのうち、雌雄のデータが揃っており、用量反応関係が認められる肝細胞がんのデータを計算に使用した。(Data 2)

Data 2

Tumor: hepatocellular carcinomas (liver)

Animal: mouse/ Crj: BDF1, 50 males and 50 females

Route: inhalation

Exposure time: 6 hrs/day, 5 days/week, for 104 weeks

Reference: 日本バイオアッセイ研究センター (1995)

Dose (ppm)	male		female			male and female
	a.肝細胞がん	b.組織性肉腫	c.肝細胞がん	d.肝細胞腺腫	e.細気管支-肺胞上皮がん	f.肝細胞がん
0	12/49	0/49	2/50	2/50	1/50	14/99
20	17/49	3/49	4/50	10/50	1/50	21/99
75	16/50	1/50	2/49	6/49	1/49	18/99
300	38/49	6/49	41/50	41/50	41/50	20/99

上表中のfのデータよりBMDLを求めると、

$$52.8221 \text{ ppm} = 52.8221 \times 147 / 24.45 \text{ mg/m}^3 = 317.6 \text{ mg/m}^3 \text{ (degree: 2)}$$

曝露時間の補正、呼吸量による補正及び体重の3/4乗による換算を行い、大気中濃度に変換すると、

$$317.6 \times (6/24) \times (5/7) \times 0.05 \times (50/0.03)^{3/4} / 15 = 49.31 \text{ mg/m}^3$$

ユニットリスクは、

$$\text{UR} = 0.1/49.31 = 2.0 \times 10^{-3} \text{ per mg/m}^3 = \underline{2.0 \times 10^{-6} \text{ per } \mu\text{g/m}^3}$$

3. ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドは水溶性であり、体内における蓄積は少なく、また、鼻腔におけるがんが認められていることから局所で発がん性を示すと考えられる。また、線量率効果を示すといわれていることより、身体の大きさや吸収率の違いによる曝露濃度の換算や、曝露時間の補正には意味がないと考えられる。そこ

で、ヒトの同等曝露濃度も動物の場合と同じであるとして、BMDL を求めた。データはラットの吸入曝露実験のデータを使用した。(Data 3)

Data 3

Tumor: squamous cell carcinoma in the nasal cavity
 Animal: rat/F344, male
 Route: inhalation
 Exposure time: 6 hrs/day, 5 days/week,
 for 24 months
 Reference: Kerns et al. (1983)
 (modified by US EPA)

Dose (ppm)	Tumor	
	Dose (ppm)	Incidence
0	0	0/156
2	0	0/159
5.6	2	2/153
14.3	94	94/140

BMDL は、

$$6.34674 \text{ ppm} = 6.34674 \times 30.03 / 24.45 \text{ mg/m}^3 = 7.79 \text{ mg/m}^3 \text{ (degree: 3)}$$

ユニットリスクは、

$$UR = 0.1 / 7.79 = 0.013 \text{ per mg/m}^3 = 1.3 \times 10^5 \text{ per } \mu\text{g/m}^3$$

4. トリクロロエチレン

トリクロロエチレンは脂溶性の液体である。発がん実験のデータは、NMRI マウスのリンパ腫、ICR マウスの肺の腺癌、Swiss マウスの肺及び肝の腫瘍、B6C3F1 マウスの肺腫瘍、SD ラットの精巣ライディッヒ細胞の腫瘍など、多く存在するが、用量反応関係が有意でないといわれるもの、モデルに適合しないものなどを除くと、NMRI マウスのリンパ腫または B6C3F1 マウスの肺腫瘍のデータを用いるのが適当であると考えられた。2つのデータセットより求めたユニットリスクの値を比較した結果、NMRI マウスのリンパ腫のデータから求めた値の方が高く、安全側に見積もるために、こちらを採用した。以下にデータ及び計算過程を示す。(Data 4)

Data 4

Tumor: lymphoma
 Animal: mouse/NMRI, females
 Route: inhalation
 Exposure time: 6 hrs/day, 5 days/week,
 for 18 months
 Reference: Henschler et al. (1980)

Dose (ppm)	Liver Tumor	
	Dose (ppm)	Incidence
0	9	9/29
100	17	17/30
500	18	18/28

BMDL は、

$$42.9402 \text{ ppm} = 42.9402 \times 131.39 / 24.45 \text{ mg/m}^3 = 230.75 \text{ mg/m}^3 \text{ (degree: 1)}$$

曝露時間の補正、呼吸量による補正及び体重の3/4乗による換算を行い、大気中濃度に変換すると、

$$230.75 \times (6/24) \times (5/7) \times 0.05 \times (50/0.03)^{3/4} / 15 = 35.83 \text{ mg/m}^3$$

ユニットリスクは、

$$UR = 0.1 / 35.83 = 2.8 \times 10^3 \text{ per mg/m}^3 = 2.8 \times 10^6 \text{ per } \mu\text{g/m}^3$$

5. テトラフルオロエチレン

テトラフルオロエチレンは水に溶けにくい気体である。米国 NTP によるマウス及びラットの発がん実験のデータがあるが、ラットのデータは明確な用量反応関係が認められないため、マウスのデータをユニットリスクの算出に用いた。下記にマウスのデータを示す。このデータの中でも肝臓の血管肉腫以外の腫瘍のデータは用量反応関係がはっきりしないため、雄と雌をあわせた血管肉腫のデータを用いて計算した。(Data 5)

Data 5

Tumor: Liver haemangiosarcoma, Hepatocellular adenoma and carcinoma, Histiocytic sarcoma (all organs)
 Animal: mouse/B6C3F1, 58 males and 58 females, 7 w (10 male and 10 female mice from each group were evaluated at 15 months.)

Route: inhalation

Exposure time: 6 hrs/day, 5 days/week, for 95-96 weeks

Reference: US NTP (1997)

male

Dose (ppm)	Number of Survivors at 90 weeks	Haemangio-sarcomas (liver)	Hepato-cellular Adenoma	Hepato-cellular Carcinoma	Histiocytic Sarcomas (all organs)
0	41/48	0/48	17/48	11/48	0/48
312	17/48	21/48	17/48	20/48	12/48
625	9/48	27/48	12/48	33/48	7/48
1250	7/48	37/48	20/48	26/48	7/48

female

Dose (ppm)	Number of Survivors at 90 weeks	Haemangio-sarcomas (liver)	Hepato-cellular Adenoma	Hepato-cellular Carcinoma	Histiocytic Sarcomas (all organs)
0	38/48	0/48	15/48	4/48	1/48
312	20/48	27/48	17/48	28/48	21/48
625	18/48	27/47	20/47	22/47	19/47
1250	10/48	34/47	15/47	20/47	18/47

male & female

Dose (ppm)	Number of Survivors at 90 weeks	Haemangio-sarcomas (liver)
0	79/96	0/96
312	37/96	48/96
625	27/96	54/96
1250	17/96	71/96

BMDL は,

$$66.3272 \text{ ppm} = 66.3272 \times 100.02 / 24.45 \text{ mg/m}^3 = 271.33 \text{ mg/m}^3 \text{ (degree: 1)}$$

曝露時間の補正, 呼吸量による補正及び体重の3/4乗による換算を行い, 大気中濃度に変換すると,

$$271.33 \times (6/24) \times (5/7) \times 0.05 \times (50/0.03)^{3/4} / 15 = 42.13 \text{ mg/m}^3$$

ユニットリスクは,

$$\text{UR} = 0.1/42.13 = 2.4 \times 10^{-3} \text{ per mg/m}^3 = \underline{2.4 \times 10^{-5} \text{ per } \mu\text{g/m}^3}$$

6. テトラクロロエチレン

テトラクロロエチレンは脂溶性の液体である。発がん実験のデータはMennearら (1986), US NTP (1986b) による Fischer344/N ラットの白血病と B6C3F1 マウスの肝腫瘍のデータがある。ラットのデータは用量反応関係が不明確であるので, ここでは雌雄のマウスの肝臓の腺腫及び癌腫を合わせたデータを用いて, ユニットリスクの計算を行った。(Data 6)

Data 6

Tumor: Hepatocellular adenoma and carcinoma Animal: mouse/B6C3F1, 50 males and 50 females, 8-9 w

Route: inhalation

Exposure time: 6 hrs/day, 5 days/week, for 103 weeks

Reference: Mennear et al. (1986), US NTP (1986b)

Dose (ppm)	male		female		male and female	
	Carcinoma	Combined Adenoma or Carcinoma	Carcinoma	Combined Adenoma or Carcinoma	Carcinoma	Combined Adenoma or Carcinoma
0	7/49	17/49	1/48	4/48	8/97	21/97
100	25/49	31/49	13/50	17/50	38/99	48/99
200	26/50	41/50	36/50	38/50	62/100	79/100

BMDLは,

$$15.0458 \text{ ppm} = 15.0458 \times 165.83 / 24.45 \text{ mg/m}^3 = 102.05 \text{ mg/m}^3 \text{ (degree: 1)}$$

曝露時間の補正, 呼吸量による補正及び体重の3/4乗による換算を行い, 大気中濃度に変換すると,

$$102.05 \times (6/24) \times (5/7) \times 0.05 \times (50/0.03)^{3/4} / 15 = 15.84 \text{ mg/m}^3$$

ユニットリスクは,

$$UR = 0.1 / 15.84 = 6.3 \times 10^{-3} \text{ per mg/m}^3 = 6.3 \times 10^{-6} \text{ per } \mu\text{g/m}^3$$

謝辞

本稿の執筆にあたり, 京都大学大学院工学研究科 内山巖雄教授に丁寧なご助言をいただきました。また, 投稿にあたり, 二名の査読者の方より適切なご指摘をいただきました。ここに記して感謝いたします。

引用文献

- 中央環境審議会 (1996) 今後の有害大気汚染物質対策のあり方について (第二次答申)
- 中央環境審議会大気部会 (1997) ベンゼンにかかる環境基準専門委員会報告, 大気環境学会誌, 32, 4, 17-33.
- Crump, K. S. and Allen, B. C. (1984) Quantitative estimates of risk of leukemia from occupational exposure to benzene, Prepared for the Occupational Safety and Health Administration by Science Research Systems, Inc., Ruston, LA, (OSHA Docket H059B) .
- Crump, K. S. (1994) Risk of benzene-induced leukemia: A sensitivity analysis of the Pliofilm cohort with additional follow-up and new exposure estimates, *J. Toxicol. Environ. Health*, 42, 219-242.
- Henschler, D., Romen, W., Elsasser, H.M., Reichert, D., Eder, E. and Radwan, Z (1980) Carcinogenicity study of trichloroethylene by longterm inhalation in three animal species. *Arch. Toxicol.*, 43, 237-248.
- 経済産業省・環境省 (2001) 平成12年度 PRTRバイロット事業報告書

経済産業省・環境省 (2003) 平成13年度 PRTRデータの概要

- Kerns, W. D., Pavkov, K. L., Donofrio, D. J., Gralla, E. J. and Swenberg J. A. (1983) Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Res.* 43: 4382-4392.
- 厚生省 (1999) 報道発表資料, 居住環境中の揮発性有機化合物の全国実態調査について
- Mennear, J., Maronpot, R., Boorman, G., Eustis, S., Huff, J., Haseman, J., McConnell, E., Ragan, H. and Miller, R. (1986) Toxicologic and carcinogenic effects of inhaled tetrachloroethylene in rats and mice. In: Chambers, P.L., Gehring, P. and Sakai, F., eds, *New Concepts and Developments in Toxicology*, Amsterdam, Elsevier, pp. 201-210.
- 日本バイオアッセイ研究センター (1995) p-ジクロロベンゼンのラットおよびマウスを用いた吸入によるがん原性試験報告書, 日本バイオアッセイ研究センター, 神奈川, 1995, 1-44.
- Paustenbach, D. J., Price, P. S., Ollison, W., Jernigan, J. D., Bass, R. D., Blank, C. and Peterson, H. D. A. (1992) Reevaluation of benzene exposure for the Pliofilm (rubber worker) cohort (1936-1976), *J. Toxicol. Environ. Health*, 36, 177-231.
- Paustenbach, D. J., Bass, R. D. and Price, P. (1993) Benzene toxicity and risk assessment, 1972-1992: implications for future regulation, *Environ. Health Perspect.*, 101 (Suppl. 6), 177-200.
- Rinsky, R.A., Young, R. J. and Smith, A. B. (1981)