

実験を行った。老齢イヌ(ビーグル犬、n=4、10.5歳)に対して、平均粒径 2.22 μm の ROFA を、3mg/m³ の濃度で 3 時間/日×3 日間の吸入曝露を行った。曝露中は心電図を連続記録(鎮静剤投与下)した。その結果、ROFA 曝露では心電図の ST 分節の高さ、T 波の形状や高さに変化を与えず不整脈もみられなかった。したがって ROFA 曝露はイヌの心臓の電気生理学的変化をもたらすことはないことが示された。

Chen と Hwang(2005)は、CAPs 曝露による心拍変動(自律神経機能)の変化を観察することを目的として、慢性曝露実験を行った。C57 マウス、ApoE^{-/-}マウスに対して、CAPs(ニューヨーク州由来)を 10 倍濃縮、平均濃度 110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ で吸入曝露した。曝露期間は、6 時間/日、5 日/週の条件で 5 ヶ月間であった。心拍変動は、SDNN(心拍間隔の標準偏差)および RMSSD(RR 間隔の分散)の両者の異常(曝露期間の最初の 6 週間：心拍間隔の延長、その後の 12 週間に短縮、その後のわずかな期間の再度の延長)が見られた。これは心臓自律調節系の曝露初期の亢進およびその後の調節系機能低下を示唆した。汚染物質の濃度レベルの上昇によって心血管系への有害作用をもたらさしめる心臓自律神経機能の攪乱を導くことが示唆された。

Hwang ら(2005)は、粒子径平均 389 \pm 2 nm(ニューヨーク州由来)の CAPs を ApoE^{-/-}マウスに 6 時間/日曝露で 5 ヶ月間曝露した。曝露濃度は、133 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (範囲 52 ~153 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)であった。正常マウス(C57)とアテローム性動脈硬化症を発症する傾向がある ApoE^{-/-}マウスに心電図、深部体温、および運動送信機を移植して、CAPs に曝露した。CAPs と模擬空気曝露群の間で毎日の時間における心拍、体温、および身体的活動の有意差を調べるために最近開発されたノンパラメトリック法を使用した。その結果、午前 1 時 30 分と午前 4 時 30 分の間の CAPs の曝露が心拍に最も影響し、体温の変動もみられた。5 ヶ月以上の CAPs 曝露において ApoE^{-/-}マウスでは心拍、体温、および身体的活動の有意な減少パターンが見られたが、C57 マウスでは、より小さく、有意差は見られなかった。ApoE^{-/-}マウスの心拍、体温、および身体的活動の 3 つの応答変数の慢性影響は最後の 2、3 週間で最大になった。また曝露期間中、ApoE^{-/-}マウスで、CAPs 曝露濃度と心拍の短期変化との間に有意な相関があった。ApoE^{-/-}マウスの結果は、より長い期間で心拍変動が曝露の終わりまでに 1.35 倍に増加し、15 分以内の心拍数は 0.7 倍に減少したことを示した。今回用いた心拍変動解析方法は慢性的な心疾患の観察に応用しうる優れた方法であることが明らかになった。

Lippmann ら(2005b)は、CAPs 曝露による動脈硬化疾患モデル動物の循環器影響を明らかにするため、亜慢性曝露実験を行った。ApoE^{-/-}マウスとダブルノックアウトマウス(ApoE^{-/-}LDLr^{-/-})に対して、CAPs(ニューヨーク州由来、10 倍濃縮)を、110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の曝露濃度で、6 時間/日×5 回/週で 5 または 6 ヶ月間曝露した。ApoE^{-/-}マウス(大動脈プ

ラーク)、ApoE^{-/-}LDLr^{-/-}DK マウス(大動脈と冠動脈プラーク)の動脈硬化疾患モデル動物を用いてCAPsの亜慢性曝露を行った。ApoE^{-/-}マウスにおいて、CAPsの日間変動は循環機能の変化(心拍数の低下)と関連があった。CAPsを曝露したApoE^{-/-}マウスにおいて、曝露終了後の循環機能、動脈硬化様プラーク、冠動脈変化、脳の黒質の細胞密度が除じん空気曝露群に比べて有意に見られた。ApoE^{-/-}LDLr^{-/-}DK マウスにおいて、サーカディアンリズムに関する遺伝子発現の変化の兆候がみられた。ApoE^{-/-}マウスでは、循環機能やプラーク形成において亜慢性曝露したCAPsの影響が見られた。本研究で得られた結果は、過剰死亡に関する疫学データに生物学的妥当性を与えるものであると述べている。

Welleniusら(2004)は、心筋梗塞モデル動物において不整脈などの心機能異常が発現するかどうかを調べるため、急性実験を行った。曝露物質は、CAPs(ホストン由来)であり、PM_{2.5}を350.5 µg/m³、CO(一酸化炭素)を35ppm、CAPsを348.4µg/m³の濃度とした。SDラット、心筋梗塞モデル(SDラットの左冠状動脈の分枝の1~2を手術用焼灼器を用いて閉塞)を用い、個体ごとの曝露チャンバー(流量15L/分)にジアゼパム(12mg/kg(体重) i.p.)で鎮静化したラットを収容して吸入曝露した。曝露時間は、心筋梗塞術処置後、CAPs、COともに1時間であった。CAPs単独曝露、あるいはCOとの混合曝露を実施し、心臓への影響指標として不整脈の発現性を解析した。その結果、心室期外収縮の増加傾向がCAPs単独曝露では認められたが、統計的な有意差は示されなかった。COとの混合曝露では相乗効果は見られなかった。

Welleniusら(2002)は、心筋梗塞作成ラットについてROFA吸入にともなう自律神経系の活動の変化や不整脈について検討するため、急性実験を行った。テレメトリー送信機を体内装着した心筋梗塞モデルラット(SDラットの冠動脈を凝固閉塞)に対し、粒子径平均1.81µmのROFAを3.42mg/m³の濃度で1時間の吸入曝露を行った。ROFA吸入を行った心筋梗塞群では心室性不整脈の増加(41%)と心拍変動の減少が示されたが、目だった徐脈は認められなかった。sham群では不整脈の増加や心拍変動の変化は認められなかった。

Nadziejkoら(2002)は、血圧の発信装置を外科的に植え込んだSHR(Spontaneously Hypertensive Rat:高血圧自然発症ラット)にCAPsを4時間曝露して、CAPsの吸入の即時影響があるかどうかを調べた。用いたのはCAPs、硫酸エアロゾル(MMAD:160nm)、およびUltrafine硫酸粒子(MMAD:50~75nm)であった。曝露濃度はそれぞれ、CAPs:平均73µg/m³、硫酸エアロゾル:平均225µg/m³、硫酸微小粒子:468µg/m³であった。酸はひとつの粒子成分として、刺激的な受容体を活性化して影響する可能性があるため、硫酸エアロゾルもラットに曝露した。CAPs曝露をはじめた直後に顕著に呼吸数が減少

したが、CAPs の曝露停止により回復した。呼吸数の減少に伴い、心拍も減少した。同じラットに微小粒子サイズの硫酸エアロゾルを曝露しても CAPs の影響と同様の呼吸数の減少を引き起こした。CAPs と比べて、Ultrafine の硫酸粒子曝露では、呼吸数は上昇した。酸はげっ歯類で知覚刺激反応を引き起こすが、微小粒子サイズの酸のエアロゾルと CAPs の影響が類似していることから、CAPs も気道刺激受容体を活性化することが示唆された。

Campen ら(2003)は、DEP の SHR の心血管系への影響を明らかにするために亜急性実験を行った。SHR に対し、粒径 $0.1\sim 0.2\mu\text{m}$ (空気力学的直径)の DE を、0、30、100、300、 $1,000\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で、6 時間/日の条件で 7 日間連続曝露し、心血管系への影響を検討した。明期の心拍数は、対照群では実験開始前から低い値を示していたが、曝露群では曝露中に有意に高値を示した。ラット(雌)の対照群の明期の心拍数は平均 $265\pm 5\text{bpm}$ で、曝露群のそれは $290\pm 7\text{bpm}$ であった。ラット(雌)で観察されたこの群間差は、曝露期間中の夜間(22:00~02:00)まで観察されたが、曝露前及び曝露終了後の期間では観察されなかった。房室結節の感受性の指標である PQ 間隔は、曝露濃度に依存して有意な延長を認めた。PQ 間隔の延長を伴う心拍数の増加は、心室性不整脈の存在を示している。心病理所見では、幾つかの心標本で散在する筋細胞の変質病巣と組織球性炎症を認めたが、対照群と高濃度群で比較した場合には類似した軽度な所見であった。光顕的には、心病変内や肺外に粒子は認めなかった。以上の結果は、これまで報告されている実際の大气中濃度の曝露が、ラットの心拍調節機能に影響を与える可能性を示している。

Kodavanti ら(2000)は、WKY ラット及び SHR に ROFA($15\text{mg}/\text{m}^3$)を、6 時間/日、3 日連続で鼻部吸入により急性曝露する事によって、呼吸器・循環器系の炎症性反応や気道反応性・心電図波形の変化を観察した。

清浄空気曝露時の WKY ラット、SHR の相違では、同週齢で比較した体重当たりの肺・左室重量は SHR の方が WKY ラットよりも重かった。WKY ラットと比較して SHR では、アセチルコリンに対する気道反応性が低く、肺組織中に活性化したマクロファージ、好中球、出血を認め、BALF 中のタンパク質量、マクロファージ、好中球、赤血球、チオバルビタール酸反応物質、肺サイトカイン mRNA の発現量が高かった。加えて、SHR では、左心室心筋組織の炎症所見(心筋症と単球細胞浸潤)とサイトカイン mRNA 発現量の亢進が見られ、心電図波形で ST が低下していた。

ROFA 曝露効果では、SHR の方が肺組織の炎症所見が WKY ラットよりやや強く、BALF 中タンパク質、アルブミン量は有意に増加した。また、SHR においては BALF 中赤血球数の増加が見られ、このことは肺実質において障害が引き起こされていることを示していた。肺胞マクロファージ数は、WKY ラット、SHR で清浄空気時に比較して

有意に増加したが、WKY に比較して SHR で有意に多かったが、好中球数の増加は両ラットで同程度であった。グルタチオン、アスコルビン酸、尿酸は ROFA 曝露で有意な増加が見られたが、その増加の程度は WKY ラットに比べて SHR では小さかった。肺サイトカイン IL-6 mRNA 発現量、フィブロネクチン、G6PD は WKY、SHR で同様に増加していたが、MIP-2 mRNA 発現量は WKY ラットで増加したのに対して、SHR では減少した。左室心筋 IL-6、TGF- β mRNA 発現量は、非曝露時では WKY ラットに比較して SHR で明らかに高かったが、ROFA 曝露による亢進は認めなかった。重油燃焼排気中の粒子状物質の吸入が、心機能の異常の発生と関連している可能性があるとして述べている。

Vincent ら (2001) は、オタワ標準粉じん (EHC-93) (48 mg/m^3) とそれを水ろ過した EHC-93L (49 mg/m^3)、Diesel soot (DS) (4.2 mg/m^3)、CBP (4.6 mg/m^3) を 4 時間吸入 (鼻部) 曝露した。EHC-93 曝露後 2 日で血圧が、32 時間でエンドセリン (ET)-1 が 2、32、48 時間で ET-3 がそれぞれ曝露前と比較して有意に上昇した。これに対して EHC-93L では血圧に明確な影響はなかったが、ET-1 及び ET-2 が曝露後 2 時間で曝露前と比較して有意に増加し、ET-3 が有意ではないが 2、24 時間後に増加しその後減少した。DS 曝露では曝露後 32 時間で ET-3 が有意に増加したが血圧への影響はなかった。CBP 曝露ではいずれの指標に関しても明確な影響は見られなかった。EHC-93 粒子の吸入が血漿中の ET-1 及び ET-3 レベルに影響を与え、急性の肺障害がなくても血管収縮が生じる可能性が示された。水ろ過により極性有機化合物や可溶性成分を取り除く (EHC-93L) と、血行力学的影響が認められなかった。大気浮遊粒子の曝露による血漿 ET-1、ET-3 量の上昇について、血圧上昇との明確な相関関係は得られていないものの、ラットで EHC-93 曝露による血清エンドセリン量の上昇と血圧上昇が併行して起こることが示された。

Kang ら (2002) は、心筋梗塞モデルラットに PM 曝露 (気管内投与) を行った場合に誘発される心臓毒性にエンドセリンの変動が関与しているかどうかを調べる目的で、急性実験を行った。心筋梗塞モデル動物として、エーテル麻酔下で SD ラットの左冠状動脈を結紮により閉塞して急性心筋梗塞群を作出した。開胸を施しただけの sham 群を対照として用いた。曝露物質は、工業地帯の大気をサンプラーにて採取しテフロン処理ガラスファイバーに集め濃縮した PM_{2.5} であり粒子サイズは $2.5 \mu\text{m}$ より小さかった。ハローセン麻酔下で PM_{2.5} を $2.0 \text{ mg}/0.3 \text{ mL saline}$ の量で単回投与した。PM_{2.5} を気管内投与 (単回) したところ、10 分後に計測した心電図において、sham 群に比較してより強い心拍数の低下および心室期外収縮などの不整脈が出現した (有意差あり)。また、PM_{2.5} の気管内投与により、いずれの群 (心筋梗塞群、PM 曝露群、心筋梗塞 + PM 曝露群) のラットにも血中エンドセリン濃度の有意な上昇が見られた。しかし、心筋組織においてエンドセリン A 受容体を発現した心筋線維は心筋梗塞動物への PM_{2.5} 曝露のみで増加した。心筋梗

塞ラットにおいてPMで誘発される心拍数低下や異常波形の発現にはエンドセリン系の upregulation が関与していることが示唆された。

Campenら(2000)は、ラットにROFAを気管内投与し、体温や循環系への影響を調べた。ラットの飼育環境温度および曝露条件は、1群(22°C環境飼育、各n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA投与、2群(10°C環境飼育、各n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA投与、3群(22°C環境飼育、O₃曝露はn=4、対照はn=3):1ppmO₃の曝露(6時間)後、0、2.5mgROFA投与、4群(22°C環境飼育、各n=4):モノクロタリン処置後、0、0.25、1.0、2.5mgROFA投与とした。モノクロタリンは腹腔内投与した。すべての条件下で対照群は生理食塩水の気管内投与で深部体温が上昇したが、ROFA投与した22°C環境下群は濃度依存的に低下した。高濃度ROFAでは遅発性の低体温症も誘発した。10°C環境下群も深部体温は同様の濃度依存性を示したが、22°C環境下よりも深刻だった。O₃曝露群でも同様であったが、回復には18時間ほど要し、遅発性の低体温症は誘発しなかった。モノクロタリン投与群では濃度依存的に持続的に体温が下がり続け、致死率も高頻度であった。心拍数パターンはすべての群における深部体温のパターンに酷似していた。

ROFA曝露によりすべての群でAVブロック等の不整脈発生頻度が濃度依存的に増大し、高濃度曝露では48時間もそれが続いた。O₃曝露群では不整脈は消失した。モノクロタリン処置群ではROFA曝露後の不整脈は増大し、4日以上続いた。さらに低体温や頻脈も、STセグメントの持続的抑制や伝導異常による急性心筋障害といった心電図異常と共に観察され、致死率も増大した。すべての群でROFA投与後に肺重量の増加と炎症、壊死、浮腫が観察された。本研究では、ROFAは心機能や体温調節機構に重大な影響を与えることが示唆された。また、それは心肺ストレス下において、さらに重篤な症状を示すことが明らかになった。

Watkinsonら(2000)は、ROFAの気管内投与及び吸入による循環機能の変化(不整脈など)を明らかにする目的で、急性～亜急性実験を行った。曝露物質として、オタワ粉じん(OTT)、燃焼に伴って発生する粒子状物質(ROFA)、ヘレナ山の火山灰(MSH)、主要遷移金属成分(Primary transition metal constituents)を用いた。

ROFA気管内投与:0.0、0.25、1.0、2.5 mg/0.3 ml salineを下記の3条件のSDラットに投与した。

①寒冷(4°C、4日間)環境飼育ラット(n=16)、②気管内投与の18時間前にO₃に曝露(1ppm、6時間)(n=16)、③気管内投与の12日前にモノクロタリン投与(60mg/kg(体重) i.p.)(n=16)の条件で気管内投与を行った。

投与後0~6時間、12~72時間後に不整脈、低体温、肺の炎症を伴う徐脈を量依存性に認めた。寒冷ストレス、O₃曝露、モノクロタリン投与(肺血管炎/肺高血圧モデル)により作製された心肺ストレス/疾患モデルSDラットでも心反応の増悪が認められ、モノク

ロタリン処理ラットでは50%の死亡率であった。

ROFA 吸入：健康なSDラット、モノクロタリン投与SDラット(n=8)、SHR(n=8)、WKYラット(SHRの遺伝的対照ラット、n=8)にROFA(15mg/m³×6時間/日×3日)を吸入曝露した。この実験でも気管内投与と同様の傾向が認められたが、死亡例はROFA吸入では認められなかった。

老齢SHRにおける気管内投与：OTT 2.5mg、ROFA 0.5mg、MSH 2.5mg、対照群(生理食塩水)を15ヶ月齢のSHRに気管内投与後96時間の観察を行った。心電図、心拍数、不整脈などの悪影響はOTT>ROFA>>MSHの順であった。

モノクロタリン処置ラットにおける金属成分の気管内投与：モノクロタリン処置SDラットに粒子状物質の重要な金属成分であるFe、V、Niを単独あるいは混合で、Fe₂(SO₄)₃(105 μg)、NiSO₄(263 μg)、VSO₄(245 μg)を0.3 mlの生理食塩水(pH=2)に溶解し気管内投与した。投与後0~6時間、12~72時間後に心拍数および深部体温の低下、不整脈や死亡率(30%)の増加が認められた。最も著しい影響はNiとV曝露により起こった。

以上の結果から、粒子状物質やその酸性金属成分の気管内投与や吸入曝露による心肺系への明確な毒性が証明された。粒子状物質曝露に引き続いて観察される悪影響は個々の金属の複合的影響、さらに宿主の感受性により修飾されたものと考えられると述べている。

Campanら(2002)は、ROFAの曝露が心機能および体温調節に及ぼす影響を明らかにする目的で急性~亜急性実験を行った。健康SDラット、モノクロタリン処置(60mg/kg(体重)、i.p.)SDラットにテレメトリー埋め込み手術を行った。モノクロタリン処理ラットは14日目以降に気管内投与(単回投与)を行った。曝露物質は、Fe₂(SO₄)₃、NiSO₄、VSO₄であった。曝露濃度や実験条件は、以下の通りであった。

1群(モノクロタリン非処置群、各n=4)：①生理食塩水投与、②0.105mg Fe₂(SO₄)₃、③0.263mg NiSO₄、④0.245mg VSO₄、2群(モノクロタリン処置群、各n=10)：①生理食塩水投与、②0.105mg Fe₂(SO₄)₃、③0.263mg NiSO₄、④0.245mg VSO₄、3群(モノクロタリン処置・金属混合群、各n=6)：①Fe₂(SO₄)₃+VSO₄、②Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄、③NiSO₄+VSO₄、④Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄+VSO₄とした。

Vは健康ラットおよびモノクロタリン処置ラットで明瞭な徐脈(90bpmの減少)、不整脈、体温低下(2.5℃低下)を招き、Feによる変化は小さかった。一方、生理食塩水投与では全ての群において心拍数と深部体温の上昇が見られた。Ni投与では遅発性に頻脈・低体温・不整脈がみられ、心拍数・深部体温は減少した。NiとVの同時投与により、致死率は上昇した。これらはFeの投与によりある程度抑制された。またモノクロタリン処置群では右心肥大が見られ、BALFでは高濃度のタンパク質・LDH・NAGが観察された。さらに対照群においてVとNiはLDHやMIAレベルの上昇を引き起こし、Ni

と他の金属を組み合わせて投与するとさらなる上昇を引き起こした。モノクロタリン処置群においても Ni 投与により LDH レベルが上昇した。ROFA に含まれる V と Ni は健康ラットや肺高血圧ラットに体温上昇、徐脈、不整脈源性をもたらすが、Fe による保護作用の可能性も併せて、これらの金属の相互作用を研究することが ROFA の生体影響を評価する上で重要であると述べている。

3.2.8. 複合大気汚染により影響の増悪が生じる

Ulrich ら (2002) は、O₃ で前処理した Wistar ラット (雄) に濃縮したオタワ標準粉じん (EHC-93、平均粒径 0.5 μ m) を気管内投与した。O₃ による前処理の条件は、0.8ppm、8 時間とした。O₃ 処理の 16 時間後に EHC-93 の暴露を行った。曝露後 2、4、7 日後の気管肺胞洗浄液、血液検査 (炎症に関する指標：白血球数、各種サイトカイン、フィブリノゲン値など)、肺・心臓組織中の各種サイトカイン mRNA (リアルタイム PCR) を調べた。結果として、1) 炎症の指標とした BALF 中のタンパク質濃度は、2、4、7 日後のいずれの観察においても 3 倍に増加した。曝露 2 日後の BALF 中の TNF- α は、4 倍に上昇した。2) 肺組織障害の指標として、エンドセリン mRNA の 60% 低下 (肺内の血管内皮障害)、曝露 2 日後の iNOS mRNA の 3.5 倍増加 (肺組織における曝露後の NO 産生メカニズムを示唆) などが認められた。3) 血液中のフィブリノゲン値の 20% 上昇 (血液濃縮および血流障害を示唆) が見られた。

Watkinson ら (1997) のレビューによると、Watkinson らによる多くの研究において、げっ歯動物を生体内異物薬剤に曝露することによって観察される核心温と関連機能パラメータの低下は、毒性反応を緩和することが示されている。さらに、それらの研究結果は、多くの実験条件が、低体温反応の大きさを変化させることを示した。約 2 $^{\circ}$ C の体温降下で特徴付けられた適度の低体温反応は、有害物質に対する最適の保護となっているようである。有害ガス、または粒子状物質などの吸入曝露実験では、実験動物が曝露される有害物質の用量は、有害物質の大気中濃度と実験動物の毎分換気量によって決定される。実験では、一般に曝露濃度は一定に保たれるが、毎分換気量は新陳代謝によって変動し、これらのパラメータが、実験条件全般を変化させる可能性がある。しかしながら、曝露期間中の低体温反応の発現は、新陳代謝や毎分換気量などのパラメータと、用量の低下と直接関連している。一般的に、吸入曝露による毒物研究では、安静状態の動物に曝露させるか、または運動を行っているヒトに対して曝露させる。動物実験では、運動時の呼吸を模倣し、ヒトでの研究により近似させるため、同時に CO₂ を曝露する。本レビューでは、吸入曝露実験で使われた実験的プロトコルに従って、(1) 動物種や動物の大きさの影響、ハンドリングによるストレスの影響、低体温反応、これらに付随する肺毒性への影響、(2) オゾン急性毒性への運動ストレスの付加的な影響、(3) 正常ラットと肺炎を誘発したラットに対する環境中粒状物質の毒性などに関する検討

を行った。これらの研究の結果は、低体温反応の大きさが肺における有害物質の摂取量に正比例し、実験動物の現存量と曝露する際の周囲温度に反比例していることを示した。低体温反応は、実験動物の取り扱いやケージの条件変化などのストレスに対して敏感に反応を示す。運動が低体温反応を減衰させる。一方、運動の代替として通気中の CO₂ を増加させると反応は増強される。正常動物に対しては穏やかな反応を引き起こす有害物質の曝露量であっても、肺疾患、もしくは肺機能に障害を起こしている実験動物に対しては、顕著な低体温反応を誘導することもある。一般に、環境中に有害物質が存在する条件では、低体温反応は動物の毎分換気量を減少させ、大気中の有毒物質の摂取量を制限する。これらの吸入試験の結果は、毒性発現における低体温反応の影響に関する結論を支持し、体温変動をモニターし、毒性学的なデータの分析に組み込む必要性を強調している。一方、人間は有害物質の曝露による低体温反応を示さないため、動物の毒性研究で得られた結果をヒトに外挿することや、ヒトと動物の研究データを比較することは、かなり複雑である。

Watkinson ら (2001) は、O₃ および PM 曝露が心機能と体温調節に及ぼす影響を正常動物と自然発症高血圧モデル、肺高血圧モデルの動物を用いて明らかにすることを目的とした。動物は、F344 ラット、SD ラット、SHR、WKY ラット、C57BL/6J マウス、C3H/HeJ マウス、Hartley モルモットを用いた。モノクロタリン処置による肺高血圧症ラットに対し、O₃(0.25~2.0ppm)、PM(ROFA、オタワ粉じん、ヘレナ火山の火山灰、金属成分、0.3ml の酸性溶液にて溶解)を気管内に投与した。O₃(0.25~2.0ppm)曝露や各種 PM の曝露により、概ね濃度に依存して心拍数と体温が低下した。ラットでは、0.5ppmO₃ 曝露で心拍数は 75~100bpm 減少し、深部体温は 2.5~4℃ 低下した。しかしこれらの反応は曝露中の生体のストレスなどの環境条件の影響を強く受けた。ROFA など PM の気管内投与によって、初期の急性反応(投与後 0~6 時間)と後から現れる遅発反応(投与後 12~72 時間)が誘発された。これらの反応には徐脈、低体温に加え高頻度の不整脈および肺炎を伴っていた。健康な SD ラットに対して高濃度の ROFA(2.5mg)を気管内投与すると、心拍数は 50bpm 程度減少し、深部体温は 2℃ 低下した。これらの変化は 6 時間以内に回復したが、その後 3 日間にわたって散発的な低下が起こった。モノクロタリン処置ラットでは、このような心機能および体温の変化がより誇張されて出現した。これらの反応の少なくとも一部には肺刺激受容体の刺激や副交感神経系を介する機序が働いている可能性が示唆される。

Campen ら (2000) は、ROFA が肺高血圧症モデルラット(モノクロタリンで作製)および正常ラットに及ぼす影響と、異なる飼育環境温度における体温反応への影響を明らかにする目的で、急性~亜急性実験を行った。ROFA(Dreher ら (1997) に記載)を各種の条件下で気管内投与した。4 群では術後 12 日目にモノクロタリン(60mg/kg(体重))を腹腔

内投与し、肺高血圧症状が現れるまでさらに 12 日間を置いた。ラットの飼育環境温度および曝露条件は、1 群(22°C環境飼育):0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与(各 n=4)、2 群(10°C環境飼育):0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与(各 n=4)、3 群(22°C環境飼育):1ppmO₃ の曝露(6 時間)後、0、2.5mg ROFA 投与(各 n=4)、4 群(22°C環境飼育):モノクロタリンを腹腔内投与後、0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与(各 n=4)とした。

深部体温：すべての条件下で対照群は生理食塩水の気管内投与で深部体温が上昇したが、ROFA を投与した 22°C環境下群は濃度依存的に低下した。高濃度 ROFA では遅発性の低体温症も誘発した。10°C環境下群も深部体温は同様の濃度依存性を示したが、22°C環境下よりも影響が大きかった。O₃ 曝露群でも同様であったが、回復には 18 時間ほど要し、遅発性の低体温症は誘発しなかった。モノクロタリン処置群では濃度依存的に持続的に体温が下がり続け、致死率も高かった。

心拍数：心拍数の変化はすべての群における深部体温の変化に酷似していた。

不整脈と心電図変化：ROFA 曝露によりすべての群で AV ブロック等の不整脈発生頻度が濃度依存的に増大し、高濃度曝露では 48 時間もそれが続いた。O₃ 曝露群では不整脈は消失した。モノクロタリン処置群は ROFA 曝露後の不整脈は増大し、4 日以上続いた。さらに低体温や頻脈も、ST セグメントの持続的抑制や伝導異常による急性心筋障害といった心電図異常と共に観察され、致死率も増大した。

臓器重量：すべての群で ROFA 投与後に肺重量の増加と炎症、壊死、浮腫が観察された。

ROFA は心機能や体温調節機構に重大な影響を与えることが示唆された。またそれは心肺ストレス下においてさらに重篤な症状を示すことが明らかになった。

3.3. 論文による仮説の検証

3.3.1. 微小粒子状物質の曝露によって不整脈が誘発されやすくなる

CAPs、粒子状物質、ROFA、金属粒子の曝露実験に関する報告では、これらの物質の気管内投与および吸入によって、清浄空気曝露に比べて不整脈や徐脈を生じやすいとする報告や心電図波形の変化を生じやすいとする報告が多く示されている。

冠動脈閉塞による心筋梗塞モデルラットの実験 (Kang ら (2002)) では、自発的に徐脈と期外収縮を起こしているが、PM_{2.5} (2mg/0.3 mL saline) の気管内投与によって徐脈の悪化と心室期外収縮の悪化が誘発されている。この研究報告では心筋梗塞モデルラットは正常な sham ラットに比べて明らかに心機能異常を起こしやすいといえるが、PM_{2.5} を含まない対照液の投与実験がなされていないため、上記の変化が微小粒子状物質によるものか否かの確定を下すことはできない。別の心筋梗塞モデルラットの実験 (Wellenius ら (2004)) では、CAPs (350.5 mg/m³) への吸入曝露は、清浄空気および CO への曝露とは異なり、心室期外収縮の発現頻度が有意差には至らないものの増大することを報告している。正常犬に対する CAPs の吸入曝露実験 (Godleski ら (2000))

では、心拍変動解析の低周波 (LF) パワーおよび高周波 (HF) パワーの値が対照空気曝露にくらべて CAPs 曝露では有意に増大したが、自律神経バランスおよび心拍数には有意な変化が認められていない。自然発症高血圧症ラット (SHR、Spontaneously Hypertensive Rats) にオタワ由来の粒子状物質および生理食塩水、LPS(LipoPolySaccharide)を予め気管内投与した後に心臓を摘出し灌流標本を作製して虚血再灌流の影響を観察した実験がある (Bagate ら (2006))。この実験では、冠動脈閉塞前の左室内圧は、生理食塩水群>LPS 群>粒子状物質群の順に高いが、35 分間の冠動脈閉塞直後はいずれの群も同じレベルに左室内圧が低下した後、回復過程に差が認められ、生理食塩水群は回復に向かったのに比べて、LPS 群および粒子状物質群は回復しなかった。SHR に CAPs を吸入曝露した実験 (Nadziejko ら (2002)) では、CAPs 曝露開始直後から呼吸数の減少と心拍数の減少が観察されている。これらの減少は CAPs の気道刺激受容器の刺激による効果であると考察している。SHR に清浄空気および DE (30、100、300、1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) を 6 時間/日 \times 7 日間曝露した実験 (Campen ら (2003)) では、曝露中の明期の心拍数が清浄空気群では減少するのに対して、DE 曝露群では曝露期間中は心拍数が高く維持された。また心電図 PQ 間隔が DE 曝露群では用量依存性に延長することが示されている。正常動物およびモノクローリン誘発肺高血圧症ラットなどに、ROFA (0.25、1.0、2.5mg) または対照液を気管内投与した実験 (Campen ら (2000)) では、これらの動物で投与後に用量依存性の徐脈が現れることが示されている。別の実験で ROFA (0.25、1.0、2.5mg) または対照液を正常ラットに気管内投与した実験 (Watkinson ら (2000)) では、投与後の 6 時間以内の急性期と 12~72 時間後の遅延期において徐脈と不整脈が 2 相性に現れることを述べている。この研究では、同時に SHR、モノクローリン誘発肺高血圧症ラット、正常ラットに対して ROFA (15mg/m³ \times 6 時間/日 \times 3 日間) の吸入実験を行っており、上記と同様の心機能変化を観察している (SHR は正常ラットよりも異常が強い)。正常ラットおよびモノクローリン誘発肺高血圧症ラットに ROFA (Fe₂(SO₄)₃、NiSO₄、VSO₄) を気管内投与した実験 (Campen ら (2002)) では、VSO₄ で顕著な徐脈と不整脈が急性期に現れ、NiSO₄ では同様の変化が遅れて現れることを明らかにしている。正常マウスおよび先天性にアテローム性動脈病変を有するマウス (ApoE^{-/-}マウス、ApoE^{-/-}LDLr^{-/-}DK マウス) に CAPs (52~153 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) を吸入曝露 (6 時間/日 \times 5 日/週 \times 5 ヶ月) した実験 (Hwang ら (2005)) では、CAPs の曝露によって上記の疾患モデルマウスにおいて徐脈が明瞭に発現し心拍変動も大きくなった。

冠動脈閉塞による心筋梗塞モデルのイヌに CAPs (345.25 \pm 194.30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、6 時間/日 \times 3~4 日) を曝露した実験 (Wellenius ら (2003)) では、CAPs に曝露された心筋梗塞モデルイヌにおいて清浄空気に曝露した群よりも心電図 ST 上昇が顕著であったが、不整脈および徐脈はみられなかった。また、正常ラット (WKY ラット) および SHR に ROFA (15mg/m³) を吸入曝露した実験 (Kodavanti ら (2000)) では、ROFA に曝露された

SHR にのみ心電図波形の変化 (ST の低下) が認められている。一方、ROFA (3mg/m³) を高齢のビーグル犬に曝露した実験 (3 時間/日×3 日間) では、軽度の徐脈がみられたものの、不整脈は観察されず、T 波の波形、振幅に変化がみられなかった (Muggenburg ら (2000))。

また、Gordon ら (2000) は、ニューヨークで捕集された CAPs (実際の大气中濃度の約 10 倍) を正常ラット、正常ハムスターおよびモノクロタリン誘発肺高血圧症ラット、心筋症ハムスターに 3 時間単回または 6 時間/日×3 日の条件で曝露したが心電図変化は観察されていない。

微小粒子状物質曝露影響調査研究報告において、麻酔下でキニン投与したモルモット、加齢ラット及び高血圧ラットに CAPs を曝露した動物実験の結果を見ると、CAPs 曝露中に心拍数を減少させる効果は明らかではないものの、曝露後に心拍数が上昇する等、吸入曝露により実験動物の循環機能に何らかの変化が生じることが否定できないとされている。

数多くの研究で利用されて確立された疾患モデル動物を用いた研究において、微小粒子状物質の吸入あるいは気管内投与によって、期外収縮や徐脈など心機能に明瞭な (統計的に有意な) 変化が観察されている。一部の報告では、疾患モデル動物に対応する正常動物との比較がなされていなく、国内の調査研究においても欧米の研究と比較して明瞭な変化は観察されないものの、ほとんどの報告で疾患モデル動物は対照の正常動物に比べて心機能の異常所見が多い。

これらの実験結果を俯瞰すると、心血管系に対する微小粒子状物質の影響について、影響が見られない知見も存在するが、それにもまして期外収縮や徐脈など心機能に明瞭な変化を示す根拠が多く存在する。この知見による影響の違いが何によって生じているものかについては依然不明な点が多いものの、微小粒子状物質の吸入により、実験動物の循環機能について不整脈に関連する変化が生じやすくなるといえる。

3.3.2. 微小粒子状物質の曝露によって、心血管系器官の構造や機能の変化をきたし、そのことが不整脈の発現性に影響を及ぼす

CAPs、粒子状物質、ROFA、金属粒子の曝露実験に関する研究について、これらの物質の気管内投与および吸入によって、不整脈の発現性に、血中エンドセリン濃度の上昇、心拍変動の増大等の生理学的、形態学的変化が影響を及ぼすとする報告が多く示されている。

気管内投与実験では、冠動脈閉塞ラットへの PM_{2.5} 曝露による血中エンドセリン濃度の上昇が不整脈の発現に関与すると考察している報告 (Kang ら (2002))、正常ラットへの CAPs 曝露では心拍変動のばらつきが増大 (標準偏差値増加、HF/LF 値の増加=副交感神経亢進) が生じ、そのような変化に自律神経活動による心臓の過酸化物質の増加が関与しているという報告 (Rhoden ら (2005)) がある。また、正常ラットへの粒子状物