

微小粒子状物質等曝露影響調査研究報告

毒性評価ワーキンググループ

【報告】

【1】緒言

○大気汚染の健康影響について

1. 米国等における疫学研究において、微小粒子状物質が循環器系への影響に伴う過剰死亡と関連があることが示され、細胞や小動物を用いた実験的研究において微小粒子状物質の循環器系への影響に関する研究ニーズが高まる。
2. PM_{2.5}は肺泡領域に沈着しやすいことは知られている。循環器系に及ぼす影響の機序については不透明。
3. PM_{2.5}と死亡率や有症率の上昇との関連性に関するメカニズムの実験的証明は十分なされていない。

○微小粒子状物質を吸入することによって引き起こされる循環器系への影響

1. 呼吸器内に沈着した粒子により誘発される肺の炎症を介した作用
2. 組織透過性が高い微小粒子、あるいは粒子成分が循環器系に浸出したことによる作用
3. 生理活性の高い粒子成分によって起こる血液の凝固線溶系の変化
4. 呼吸器に沈着した微小粒子が交感神経・副交感神経のバランスを変化させ、自律神経系の変調を介して循環器系へ影響を及ぼす作用

【1】緒言

○毒性評価WGにおける研究の目的

- 着目:疫学研究で報告されているPM_{2.5}曝露に対する高感受性群
目的:実際に大気環境中に存在する微小粒子状物質の短期間曝露の実施による呼吸器系及び循環器系に与える影響
動物:①細菌毒素投与により肺の炎症を起こしたマウス
②薬剤投与により不整脈を誘発したモルモット
③老齢ラット
④自然発症高血圧ラット

○毒性評価WGにおける調査研究

- 第1期:CAPs曝露システムによる調査の前段階として、大気中微小粒子状物質の有機抽出物を用いた動物への気管内投与実験や血管内皮細胞実験
第2期:高濃度の大气環境中PM_{2.5}吸入曝露を実現する手法としてCAPs曝露システムを製作・設置し、同システムを用いた各種動物実験

【2】都市大気中の微小粒子状物質抽出物(PM_{2.5}抽出物)を用いたPM_{2.5}による呼吸器系及び循環器系への影響に関する調査研究

(1)調査概要

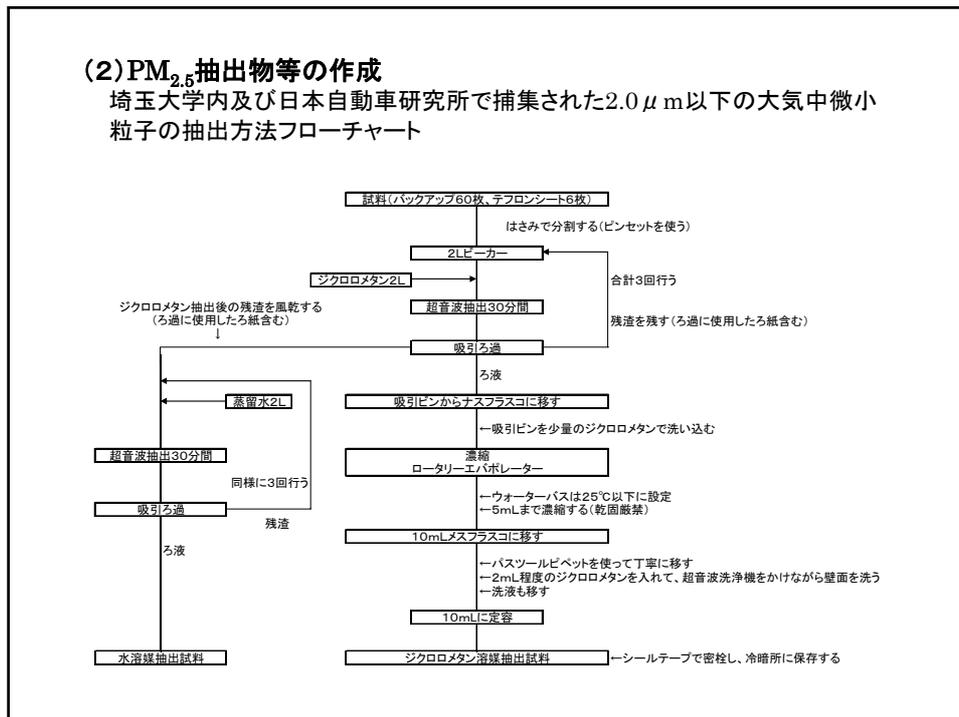
CAPs曝露システムが製作・稼動される前段階の予備的研究として、PM_{2.5}が呼吸器系及び循環器系に及ぼす影響や機構の検討に資することを目的とし、平成11年度から15年度にかけて、大気中微小粒子状物質の有機抽出物等を用いて、動物への気管内投与実験や細胞実験を行った。

○調査研究

- 1) PM_{2.5}抽出物等の作成
- 2) 細胞を用いたPM_{2.5}抽出物の影響に関する研究
 - I. ラットの血管内皮微小環境に及ぼす影響に関する研究
- 3) PM_{2.5}抽出物の気管内投与が呼吸器系及び循環器系に及ぼす影響に関する研究
 - I. マウスの細菌毒素に関連する肺傷害に与える影響及びメカニズムに関する研究
 - II. 心不全マウス及びラットの心電図及び血圧変化に及ぼす影響に関する研究
 - III. 若齢、老齢及び心肺疾患ラットの心肺機能及び肺組織・血管系に及ぼす影響に関する研究
 - IV. 高血圧ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響に関する研究

(2) PM_{2.5}抽出物等の作成

埼玉大学内及び日本自動車研究所で捕集された2.0 μm以下の大気中微小粒子の抽出方法フローチャート



(3) PM_{2.5}抽出物がラットの血管内皮微小環境に及ぼす影響に関する研究

PM_{2.5}抽出物に含まれる有機成分が内皮細胞等の微小環境に及ぼす影響の研究を進めた。

(4) PM_{2.5}抽出物がマウスの細菌毒素に関連する肺傷害に与える影響及びメカニズムに関する研究

PM_{2.5}の構成成分が、細菌毒素による肺傷害を増悪するか明らかにするとともに、肺傷害を増悪する影響について遺伝子発現のレベルで検討した。

(5) PM_{2.5}抽出物が心不全マウス及びラットの心電図及び血圧変化に及ぼす影響に関する研究

ドキシソルビシン等を投与した心機能異常モデルのラット及びマウスを作製し、PM_{2.5}抽出物の気管内投与を行い、心電図及び血圧に及ぼす影響を検討した。

(6) PM_{2.5}抽出物が若齢、老齢及び高血圧ラットの心肺機能及び肺組織・血管系に及ぼす影響に関する研究

高感受性群としての若齢ラット、老齢ラット及び食塩感受性高血圧ラットを用いて、PM_{2.5}抽出物を気管内投与を行い、心肺機能と肺組織・血管系の炎症反応について検討した。

(7) PM_{2.5}抽出物が高血圧ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響に関する研究

自然発症高血圧ラット(SHR)を用いてPM_{2.5}抽出物の気道内投与を行い、呼吸パターン、肺抵抗、心拍変動解析から自律神経活動の変化について検討した。

(8)まとめ

○実験結果

- ・ PM_{2.5}抽出物がラットの血管内皮微小環境に及ぼす影響に関する研究
PM_{2.5}抽出物は血管内皮細胞に酸化ストレスを与え、凝固線溶系に影響を及ぼすことが示唆された。
- ・ PM_{2.5}抽出物がマウスの細菌毒素に関連する肺傷害に与える影響及びメカニズムに関する研究
PM_{2.5}抽出物は、細菌毒素により肺の炎症を誘発したマウスにおいて炎症を増悪する可能性があることを示唆された。
- ・ PM_{2.5}抽出物が心不全マウス及びラットの心電図及び血圧変化に及ぼす影響に関する研究
正常ラット及び心不全ラットともにPM_{2.5}抽出物の気管内投与によって特異的な心電図影響は認められなかった。
- ・ PM_{2.5}抽出物が若齢、老齢及び高血圧ラットの心肺機能及び肺組織・血管系に及ぼす影響に関する研究
若齢及び老齢ラットへのPM_{2.5}抽出物の気管内単回投与により、初期に軽度の局所炎症を引き起こしたが、その影響は心肺機能(自律神経系も含む)及び肺構築に影響を及ぼすほどのものではなかった。
- ・ PM_{2.5}抽出物が高血圧ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響に関する研究
自然発症高血圧ラット(SHR)においてPM_{2.5}抽出物の投与後に明らかな肺抵抗の増加、心拍数の減少及び副交感神経活動の増加が認められた。

(8)まとめ

○PM_{2.5}抽出物投与による影響

- ・ 気管内投与及び細胞を用いた実験から、定性的であるが、以下の内容が確認された。
- ・ ラットの血管内皮細胞に酸化ストレスを与え凝固線溶系に影響を及ぼしうること。
- ・ マウスにおいて細菌毒素により誘発した肺の炎症を増悪する作用をもたらしうること。
- ・ 自然発症高血圧ラットにおいて心拍数の減少、副交感神経を介した影響をもたらしうること。

○PM_{2.5}抽出物とDEP抽出物の影響比較

- ・ 多くの実験で両者の影響は類似したものであったが、異なる影響を示したものもあった。
- ・ ラットの血管内皮微小環境を用いた実験では、PM_{2.5}抽出物がDEP抽出物より細胞障害性がやや低く抗酸化系酵素の遺伝子発現量の上昇が少ないことが示唆された。
- ・ 高血圧ラットを用いた実験では、DEP抽出物で見られない心拍数及び副交感神経活動の有意な変化がPM_{2.5}抽出物の気管内投与で認められた。
- ・ 細菌毒素により肺の炎症を誘発したマウスを用いた実験では、非有機成分から構成される抽出後DEP粒子が有機成分であるPM_{2.5}抽出物やDEP抽出物と異なる肺の炎症への増悪メカニズムを介している可能性が示唆された。

○気管内投与実験の考慮事項

- ・ 気管内投与は、吸入曝露に比較して高濃度の投与物質が気道に入りうること、気道内分布も吸入曝露の場合と異なるため、吸入曝露の場合と異なる可能性もある点を念頭に置く必要があり、CAPS曝露システムによる吸入曝露実験の成果と比較評価することが重要。

【3】 CAPs曝露システムを用いたPM_{2.5}による呼吸器系及び循環器系への影響に関する調査研究

(1) 調査概要

第1期に各種実験の実施と並行して設計・製作・設置したCAPs(Concentrated Air Particles:濃縮大気粒子)曝露システムを用いて、平成15年度から18年度にかけて、PM_{2.5}の高濃度短期吸入曝露実験を実施した。
 吸入曝露チャンバー容積の制約上、1回の曝露実験で使用できる動物個体数が限られることから、以下の3)及び4)の各種CAPs曝露実験は、複数年(4年間)にわたり実験時期を変えて計6~8回繰り返し行うこととした。
 また、各研究課題によって病態の誘発する手法や着目する影響内容等が異なることを踏まえ、研究課題ごとにその特性等に応じた実験デザイン(使用動物、CAPs曝露時間、心電図測定、麻酔の有無等)を設計することとし、各種実験間でデザインを完全に統一させた形では行わなかった。

○調査研究

- 1) CAPs曝露システムの製作
- 2) CAPs曝露と生体影響指標の関連性に関する統計解析方法の検討
- 3) CAPs吸入曝露が肺傷害に及ぼす影響に関する研究
 - I. マウスの細菌毒素による肺傷害に及ぼす影響及びメカニズム
- 4) CAPs吸入曝露が呼吸・循環機能に及ぼす影響に関する研究
 - I. モルモットのキニジン誘発不整脈に及ぼす影響
 - II. 老齢ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響
 - III. 高血圧ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響

(2) CAPs曝露システムの製作

CAPs(Concentrated Air Particles)曝露システムとは、ハーバード大学のSchool of public Healthにおいて開発されたもので、サンプリングされた大気中の微小粒子(PM_{2.5})をパーティクルインパクターによって粒径0.1μm以下と0.1μm~2.5μmの粒子に分粒し、これを繰り返すことによりPM_{2.5}を濃縮し高濃度にするシステムで、吸入曝露研究などのために用いられる。

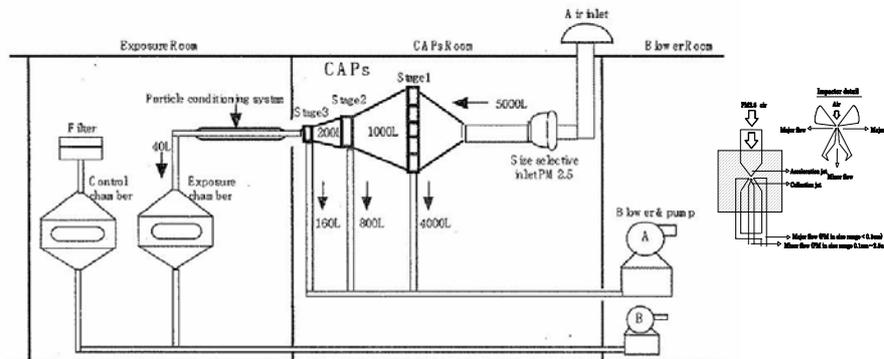
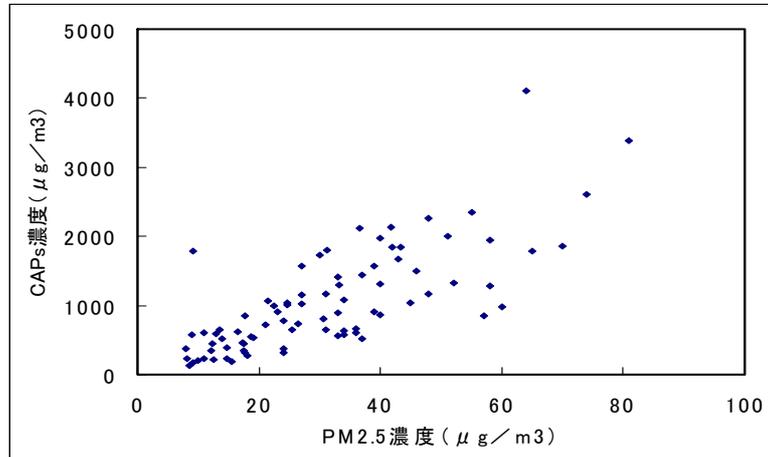


Fig.1 Construction of CAPs and Inhalation Chambers

CAPs曝露システム

(2) CAPs曝露システムの製作

CAPs曝露実験時のPM_{2.5}濃度とCAPs濃度の散布図は以下に示すとおりである。



PM_{2.5}濃度とCAPs濃度の散布図

(3) CAPs曝露と生体影響指標の関連性に関する統計解析方法の検討

①CAPs曝露有無と各生体指標との関連性

実験回ごとの解析と全実験回をプールした解析(プール解析)を行い、CAPs曝露群の生体影響指標と除粒子対照群のそれとの間に有意な差が認められた場合、以下②の解析を行った。

②CAPs曝露濃度と各生体影響指標との関連性

x軸にCAPs曝露濃度、y軸に曝露群における生体影響指標と非曝露群における生体影響指標の差(CAPs曝露群－除粒子対照群)として、各実験回の結果をプロットし、その関連性について検討した。

③CAPs曝露成分別濃度と各生体影響指標との関連性

x軸にCAPs曝露成分濃度、y軸に曝露群における生体影響指標と非曝露群における生体影響指標の差(CAPs曝露群－除粒子対照群)として、各実験回の結果をプロットし、その関連性について検討した。

◎多変量解析にあたっての調整因子

- ①曝露前の生体影響指標
- ②各実験特有の調整因子
- ③実験回(プール解析のみ)

(4)CAPs曝露がマウスの細菌毒素に関連する肺傷害に与える影響とメカニズム解明に関する研究

都市沿道におけるCAPsの吸入曝露が細菌毒素に関連する肺傷害に与える影響について、その増悪メカニズムとしてサイトカインやケモカインに及ぼす影響に注目し、検討を行った。

○実験方法

ICR♂ 6 week



Group

1. vehicle (PBS) + clean air
2. lipopolysaccharide (LPS: 4 µg) + clean air
3. vehicle + CAPS
4. LPS + CAPS

↓ 100 µl i. t.

Inhalation (clean air or CAPS)
for 5 hours

→ 24 hours

気管支肺胞洗浄(細胞分画)、
サイトカイン濃度(IL-1β,
MIP-1α, MCP-1, KC for ELISA)

○統計解析結果

細菌毒素曝露とCAPs曝露の相乗効果により、好酸球数が有意に増加することを認めた。

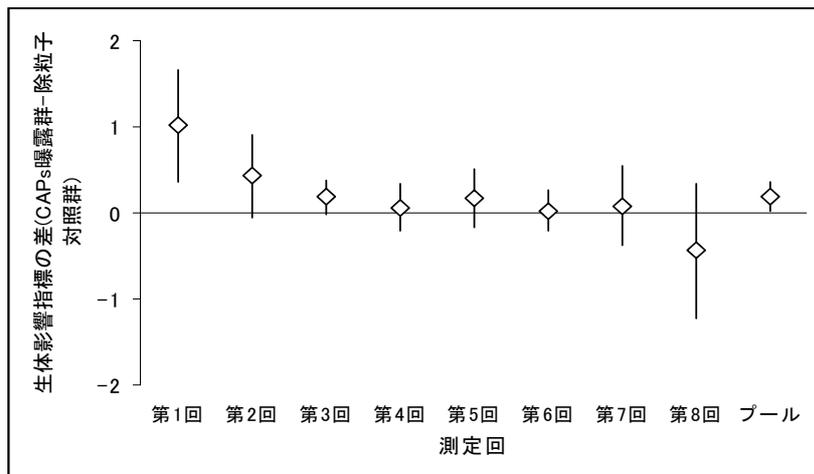
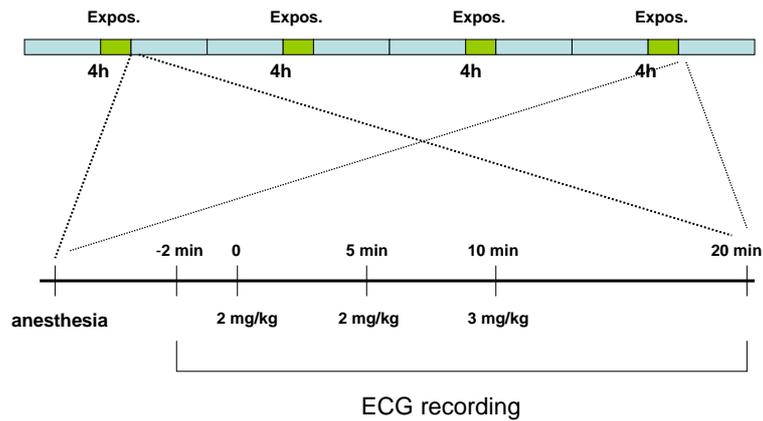


図 好酸球数の変動

(5) CAPs曝露がキニジン投与モルモットの心電図変化に与える影響に関する研究

ヒトやモルモットにおいて心筋細胞の脱分極過程と再分極過程(高用量)を抑制する作用のあるキニジンを用いて心電図変化を実験的に誘導し、不整脈の原因となる心電図変化がCAPs曝露で現れやすいかどうかについて検討した。

○実験方法



○統計解析結果

心拍数は第2～6回の曝露実験の3日間曝露で、t3及びt13における生体影響指標の差(CAPs曝露群-除粒子対照群)はほとんどが正側に分布したことから、CAPs曝露群の心拍数は除粒子対照群に比べて多いことがわかる。

3日間曝露実験のQTcは3回目キニジン投与後(キニジン投与後0～10分目)でCAPs曝露群が除粒子対照群にくらべて短いことを示している。

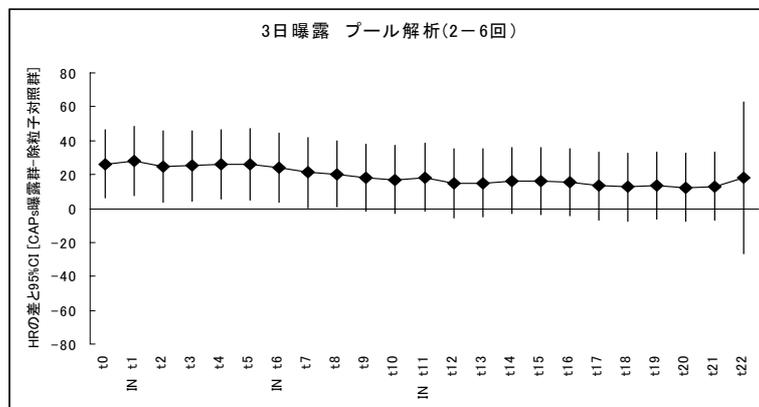
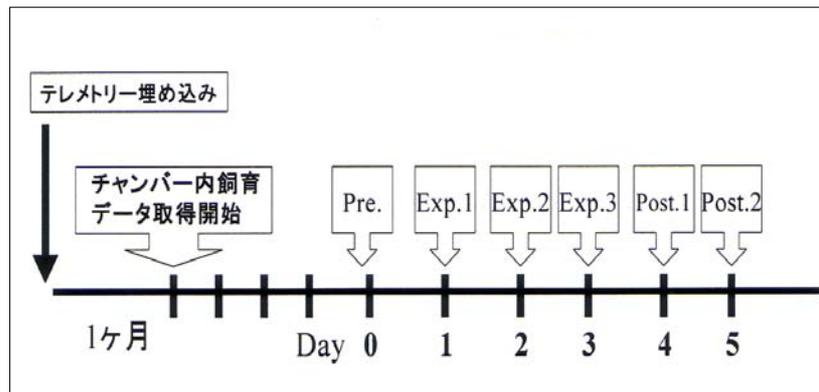


図 心拍数の変動

(6) CAPs曝露が老齢ラットの心機能に与える影響に関する研究

微小粒子状物質の心機能と自律神経系への影響を明確にするために、高感受性群とされる加齢動物にテレメリーを埋め込み24時間継続して心電図、血圧、核心温度を測定し、CAPsの心機能への影響と血液凝固系への影響について検討した。

○実験方法



○統計解析結果

CAPs曝露群で心拍数が曝露1日後と2日後の非曝露時間帯にやや高い傾向を示した。血圧(収縮期、拡張期、平均)、核心温度及び自律神経系には、全実験期間を通してCAPs曝露の明確な影響は認めなかった。

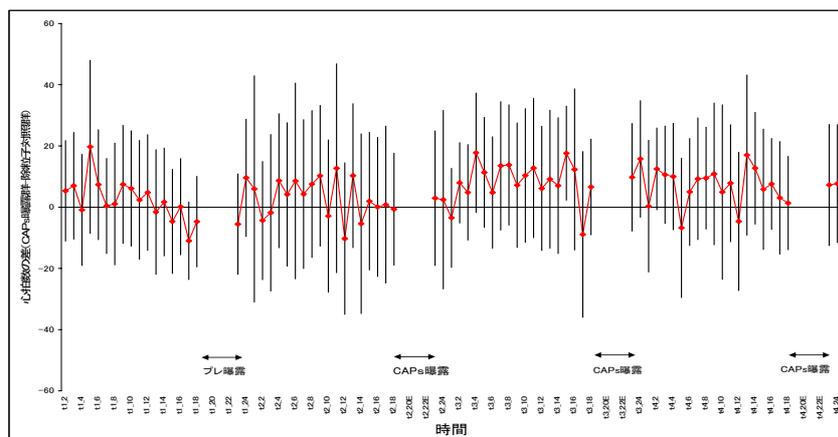
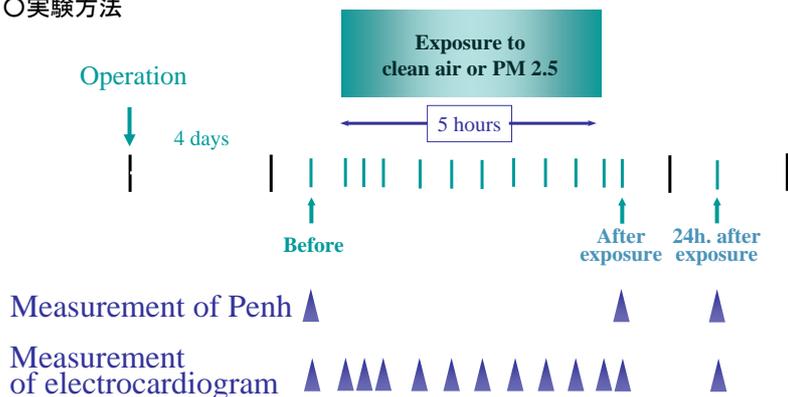


図 心拍数の変動

(7) CAPs曝露が自然発症高血圧ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響に関する研究

CAPs曝露が循環器に与える影響を明らかにするために、循環器疾患の病態モデルとして自然発症高血圧ラット(SHR: Spontaneous Hypertensive Rat)を用い、呼吸の指標として肺抵抗(Penh)測定、循環器の指標として心電図測定を行い、R-R間隔から心拍変動スペクトル解析(HRV: Heart Rate Variability)を行った。

○実験方法



○統計解析結果

CAPs曝露群で曝露開始30分後からHF成分が高い傾向を示し、曝露5時間目、曝露終了後においてHFが明らかに高値を示した。また、心拍数の変化についてみると、CAPs曝露群が除粒子対照群より減少の程度が大きいことが示された。一方、交感神経活動の指標であるLF/HFには、曝露による一定の傾向は認められなかった。QRS波には変化は見いだされなかった(data not shown)。呼吸器の指標であるPenhはCAPs曝露で上昇する傾向があった。

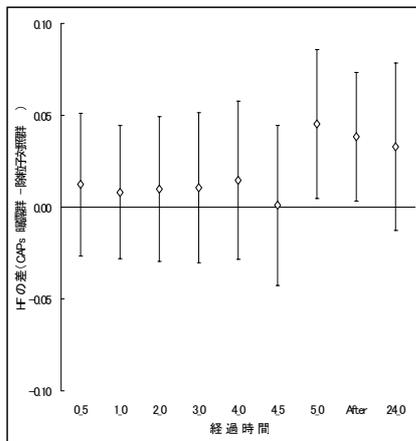


図 HFの変動

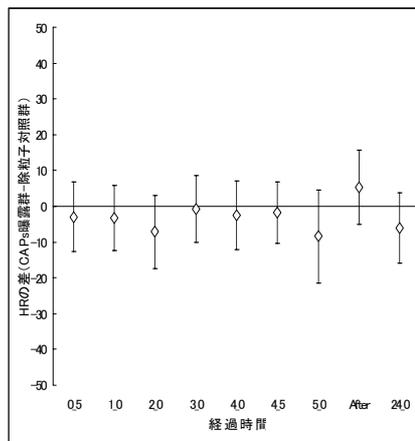


図 心拍数の変動

(8)まとめ

○統計解析結果

- ・ マウスの細菌毒素による肺傷害に及ぼす影響及びメカニズム解明に関する研究
細菌毒素を気管内投与して肺の炎症を誘発したマウスにCAPsを曝露することにより気管支肺胞洗浄液中の細胞性炎症指標である好酸球数が上昇し、また、同じく炎症の指標である好中球数も上昇する傾向が見られた。
- ・ キニジン投与モルモットの心電図変化に与える影響に関する研究
キニジンを投与したモルモットにおいて、CAPs曝露は心拍数を上げる傾向を示し、また心拍数で補正したQT間隔が減少する傾向があった。
- ・ 老齢ラットの心機能に与える影響に関する研究
CAPsの曝露終了後に心拍数が上昇する傾向が見られている。
- ・ 自然発症高血圧ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響に関する研究
CAPs曝露中に副交感神経活動の指標であるHF成分の軽度の増加と、それに伴うと考え得る肺気流抵抗の上昇と心拍数の低下傾向がみられた。また、CAPsの曝露終了後に心拍数が上昇する傾向が見られている。

(8)まとめ

○CAPs曝露が循環機能に及ぼす影響

- ・ モルモットにキニジンを投与した実験から、CAPs曝露が不整脈誘発に何らかの影響を与えている可能性は否定できない。
- ・ 老齢ラット及びSHRラットを用いた実験から、CAPs曝露によりラットの自律神経系に変調をきたした可能性は否定できない。
- ・ SHRを用いた実験ではCAPs曝露中に心拍数の減少、CAPs曝露終了後に心拍数の増加。モルモットにキニジンを投与した実験及び老齢ラットを用いた実験ではCAPs曝露終了後に心拍数が増加していることから、CAPsの吸入曝露により循環機能に何らかの変化が生じることは否定できないと考えられる。

【4】まとめ及び今後の課題

第1期のPM_{2.5}抽出物の気管内投与実験と第2期のCAPs吸入曝露実験ともに見られた変化

- PM_{2.5}曝露が細菌毒素による肺の炎症性変化を増悪させる(気管支肺胞洗浄液中の炎症性細胞、肺組織中サイトカインの上昇)。
- 高血圧ラットについて、高濃度のPM_{2.5}を曝露することにより、副交感神経優位となり心拍数が減少することが示唆される。しかしながら、依然として循環器系に及ぼす影響に関して明確な結果は得られず。



呼吸器内に沈着した粒子により誘発される肺の炎症を介した作用や、呼吸器に沈着した微小粒子が自律神経系の変調を介して循環器系へ影響を及ぼす作用は、微小粒子状物質の吸入曝露によって引き起こされる循環器系への影響メカニズムとして重要な役割を担っていると考えられ、これらの課題について、今回の成果や諸外国での研究動向を踏まえ、今後更に検討を進める必要あり

- マウスの細菌毒素による肺傷害に及ぼす影響や自然発症高血圧ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響の実験でPM_{2.5}曝露による高感受性群の存在の可能性を示唆するものであり、疫学研究の結果を否定するものではなかった。
- しかし、今回の実験が様々な制約の中で実施されたものであり、高感受性群と非高感受性群の影響差を明らかにするのは困難。



ヒトでのCAPs曝露の場合、交感神経支配が高まる傾向があることが報告されている。ヒトと動物の実験での結果を比較する際には、心拍数の違いやサーカディアンリズムなどの種差を考慮する必要がある。この点について、毒性学研究により影響メカニズムを検討したうえでその結果を確認することは、PM_{2.5}による健康影響を明らかにするための重要なプロセスであり、PM_{2.5}曝露に対する高感受性群に着目した毒性学研究の更なる進展が望まれる

(参考)

