

## 【2】都市大気中の微小粒子状物質抽出物（PM<sub>2.5</sub>抽出物）を用いたPM<sub>2.5</sub>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）実験概要

第1期では、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<sub>2.5</sub>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、アンダーセンハイボリウムエアサンプラを用いて捕集された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。

実験に使用する動物については、これまでの疫学調査等によりPM<sub>2.5</sub>曝露に対して高感受性群とされている病態（肺の炎症、不整脈、高血圧症等）及び老齢等に着眼し、これらの病態等を持つ動物又は類似する病態を誘発させた動物を用いて実験を実施した。

また、投与物質については、PM<sub>2.5</sub>の中の主要な成分の一つであるディーゼル排気粒子（Diesel Exhaust Particles：DEP）に関し、これまでの毒性研究でDEPに吸着されている物質のうち有機成分の毒性が高い可能性があることが報告されていたことも踏まえ、本研究ではPM<sub>2.5</sub>の有機成分に着目し、フィルタ捕集された微小粒子を有機溶媒抽出した成分（以下「PM<sub>2.5</sub>抽出物」という。）を用いて実験を実施した。また、DEPの有機成分による影響との比較のため、別途捕集したDEPを同様に有機溶媒抽出した成分（以下「DEP抽出物」という。）を用いた実験も併せて行った。なお、実験に用いた抽出物は、捕集した粒子を有機溶媒にて成分抽出したものであるため、微小粒子状物質の有機成分のみを含んでおり、イオンや金属成分、元素状炭素などが含まれていないこと、また、捕集サンプラの分級特性の制約により、用いた微小粒子は粒径2.0μm以下であることに留意する必要がある。

第1期においては、上記の点を踏まえて実験デザインを設計し、以下の（1. 1）～（1. 3）の調査研究を行った。

#### （1. 1）PM<sub>2.5</sub>抽出物等の作成

埼玉大学内及び日本自動車研究所内にて、アンダーセンハイボリウムエアサンプラ（5段分級）を用いて大気中浮遊粉じんをフィルタ捕集し、微小粒子に相当するフィルタ試料（2.0μm以下の粒子）を有機溶媒ジクロロメタンで抽出してPM<sub>2.5</sub>抽出物を作成し、性状把握のため成分分析を行った。また、国立環境研究所内（つくば市）のディーゼル排気吸入曝露装置の希釈トンネル内に沈着したディーゼル排気粒子ダストを同様にジクロロメタン抽出してDEP抽出物を作成した。

下記（1. 2）及び（1. 3）の細胞実験及び気管内投与実験では、PM<sub>2.5</sub>抽出物及びDEP抽出物を曝露用試料に供した（一部実験では、DEPを有機溶媒抽出した後の残渣物（以下「抽出後DEP粒子」という。）も用いた）。

#### （1. 2）細胞を用いたPM<sub>2.5</sub>抽出物の影響に関する研究

##### （1. 2. 1）ラットの血管内皮微小環境に及ぼす影響に関する研究

本研究では、PM<sub>2.5</sub>抽出物の有機成分が内皮細胞や内皮細胞を取り巻く微小環境に影響を及ぼすのかについて明らかにすることを目的とし、培養実験系を用いた実験を実施した。PM<sub>2.5</sub>を吸入することによる心疾患の発症機序が明らかではない中、本研究では、いくつかのリスクファクターとなり得る因子を選択してその変化を検討した。具体的には、大気中微小粒子状物質が循環器系に及ぼす影響の一機序として、PM<sub>2.5</sub>の有機成分が直接血管内皮細胞に酸化ストレスを与えることによってヘムオキシゲナーゼ1（HO-1）を誘導し、また血液の凝固・線溶系や白血球の粘着性を変化

させるという作用がある、という仮説のもとに検討を進めた。

### (1. 3) PM<sub>2.5</sub>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

#### (1. 3. 1) 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

本研究では、粒子状物質に対する高感受性群の多くのケースに易感染性が共通して存在することが示唆されているものの、微小粒子状物質が気管支喘息以外の呼吸器疾患に及ぼす急性かつ顕著な影響のメカニズムが明らかにされていなかったことに着目し、正常雄性マウス(6週齢)を用いて、PM<sub>2.5</sub>抽出物並びにDEP抽出物及び抽出後DEP粒子成分が細菌毒素による肺傷害を増悪するか否かについて検討した。また、炎症性サイトカインとケモカインの局所発現、細菌毒素受容体の発現や抗炎症性サイトカインに及ぼす影響について遺伝子発現のレベルで検討し肺傷害に及ぼす影響機構について検討した。

#### (1. 3. 2) 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

本研究では、PM<sub>2.5</sub>による影響に関して、循環機能に障害があることが高感受性の要因になり得ることに着目し、心筋傷害モデルの一種であるドキシソルビシン(アドレマイシン)及びイソプロテノールの中用量～大用量をラット及びマウスに投与して心機能異常モデル(心不全マウス及びラット)を作製し、PM<sub>2.5</sub>抽出物及びDEP抽出物の気管内投与実験等を行い、心電図及び血圧に及ぼす影響を検討した。

#### (1. 3. 3) 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

本研究では、PM<sub>2.5</sub>に対する高感受性群とされている乳幼児、高齢者、心肺疾患有症者に着目し、PM<sub>2.5</sub>の病態生理との関連性やその作用機序について明らかにすることを目的とし、高感受性群として若齢ラット(10～11週齢)、老齢ラット(23～24ヶ月齢)及び食塩感受性高血圧ラットを用いて、PM<sub>2.5</sub>抽出物及びDEP抽出物の気管内投与が呼吸・循環機能に及ぼす影響について検討した。

#### (1. 3. 4) 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

本研究では、ヒトの自律神経と虚血性心疾患及び心臓突然死のリスクに密接な関係があるとされていることに着目し、正常血圧ラットと比較して心臓血管系への影響が鋭敏に現れる可能性がある自然発症高血圧ラット(SHR)を用いて、PM<sub>2.5</sub>による高血圧ラットの呼吸循環器系への影響を検討した。呼吸循環器系への麻酔の影響を除くため、無麻酔、無拘束を条件にSHRと対照群であるWistar/Kyotoラット(WKY)に対するPM<sub>2.5</sub>抽出物とDEP抽出物の急性効果について気管内投与を行い、呼吸パターン、肺抵抗及び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。

本ワーキンググループでは、PM<sub>2.5</sub>曝露に対する高感受性群に着目し、病態を有する動物又は類似する病態を誘発した動物を用いてPM<sub>2.5</sub>曝露の影響を検討することを目的としていたが、第1期の開始当初、どのような病態が影響評価に適しているかについて明らかになっていない状況であった。

そこで、本格的なPM<sub>2.5</sub>吸入曝露による影響の解析を行う予備的な検討として、上記2)及び3)の各種実験に加え、いくつかの高感受性群に類似する病態動物(動静脈吻合心不全ラット、ドキシソルビシン誘発心不全マウス、アジドチミジン誘発心筋症ラット)を用いた気管内投与実験や、ヒト血管内皮細胞や肺泡マクロファージを用いたPM<sub>2.5</sub>抽出物の影響の検討も行ったが、これら予備実験では明確な影響が観察されなかったこともあり、本報告書では実験詳細は示さず予備的な実験を実施したことを記すにとどめた。