

【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) 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、アンダーセンハイボリウムサンプラを用いて捕集された大気中PM_{2.5}抽出物を用いて気管内投与及び細胞を用いた実験を行い、呼吸器系及び循環器系に及ぼす影響を検討してきた。その結果、気管内投与実験から、定性的ではあるが、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、高血圧ラットにおいて心拍数の減少や副交感神経を介した影響をもたらすことが確認された。

気管内投与は吸入曝露に比較して一時に高濃度の投与物質が気道に入ることや、気道内での分布も吸入曝露の場合と異なるため、吸入曝露と影響が異なる可能性がある。よって、現実大気におけるPM_{2.5}曝露による呼吸器系及び循環器系への影響やその機序を検討するには、気管内投与に加えて、現実大気中のPM_{2.5}を実験動物に吸入曝露させてどのような影響を及ぼす可能性があるか検討することが重要である。

そこで、第2期では、第1期での成果を踏まえつつ、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。

CAPs曝露システムは、一般に大気中の粒子状物質がガス状物質より重量が大きいこと (粒子状物質の持つ慣性) を利用し、バーチャルインパクトによる濃縮を繰り返すことにより、大気中PM_{2.5}を高濃度に濃縮し、曝露チャンバーで動物への吸入曝露を実施するシステムで、ハーバード大学で開発され、米国等で吸入曝露実験などの目的で活用されている。粒径が非常に小さい0.1 μm以下の超微小粒子は濃縮できないものの、現状ではこのCAPs曝露システムが高濃度PM_{2.5}の吸入曝露を実現する最適な方法と考え、本実験に採用することとした。

第2期では、以下の(1. 1)～(1. 4)の調査・実験を行った。

なお、CAPs曝露システムの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(1. 3)及び(1. 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。

(1. 1) CAPs 曝露システムの製作

米国等での稼働状況及び国内での稼働上の問題点等を踏まえてCAPs曝露システムを設計・製作(The Harvard Air Particle Concentrator (HAPC))し、横浜市(滝頭会館)に設置した。CAPs曝露システム設置後、濃縮粒子の質量・成分・個数濃度等を測定してシステムの濃縮特性・性能を把握し、動物実験時の曝露条件の設定を行った(各回の曝露実験期間中の濃縮率は12～64倍)。

また、各CAPs曝露実験において、実験動物に曝露したCAPs粒子及びガス状物質の質量濃度及び成分分析を行い、CAPs曝露と実験動物の影響との関係解析に関する検討・考察に活用した。

(1. 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

上述のとおり、以下の(1. 3)及び(1. 4)の各種曝露実験は、複数年(4年間)にわたり実験時期を変えて計6～8回繰り返し実験を行った。

これらの実験結果の評価にあたっては、各実験回別にCAPs曝露と生体影響指標との関連性を検討

するだけでなく、全実験回を統合させ解析することが有用である。また、CAPs に関する様々な種類の曝露データがあることも踏まえ、各種実験間での結果比較を容易にするため、各実験共通の解析手順を定めた上で実験結果の整理・解析を行うことにも配慮する必要がある。

(1. 3) 及び (1. 4) の実験に係る CAPs 曝露と生体影響指標の関連性に関する解析では、上記の点を踏まえた統計解析方法を検討し、可能なかぎり共通のプロトコルで解析を行うこととした。

(1. 3) CAPs 吸入曝露が肺傷害に及ぼす影響に関する研究

(1. 3. 1) 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

米国等の疫学調査では、PM_{2.5}に対する高感受性群として呼吸器疾患患者が挙げられている。また、呼吸器疾患患者の急性増悪に呼吸器感染症が関与することは、臨床的にもしばしば経験される。一方、感染症の傷害形成には、感染性生物から産生あるいは遊離される毒素が重要な役割を演じることも知られている。

第1期に正常雄性マウス(6週齢)を用いて実施した気管内投与実験では、PM_{2.5}抽出物単独では正常マウスの肺への炎症を惹起する可能性が低い場合でも、細菌毒素により肺の炎症を誘発したマウスにおいては、細菌毒素受容体や炎症性サイトカインやケモカインの発現増強あるいは抗炎症性サイトカインの発現減弱等を介し、炎症を増悪する可能性があることが示唆された。しかしながら、PM_{2.5}の吸入曝露による肺傷害への影響に関する研究はあまり行われておらず、日本国内の大気中PM_{2.5}を用いた動物吸入曝露実験は皆無であった。

そこで、呼吸器系の炎症性傷害に着目し、第1期と同じ正常雄性マウス(6週齢)を用い、細菌毒素及び vehicle を気管内投与後に CAPs 吸入曝露を行い、マウスの細菌毒素による肺(の炎症性)傷害に及ぼす影響について検討した。

(1. 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

循環器系に疾患を持つ人や高齢者等がPM_{2.5}曝露に対して高感受性群であることが米国等での疫学調査の結果から報告されている。PM_{2.5}曝露が循環機能に及ぼす影響のメカニズムについては、心筋細胞等への直接的作用や自律神経系への影響に起因する作用、血中に浸出した粒子の血液凝固系を介した間接的作用などの仮説が示唆されている。しかしながらこれらを裏付けるための動物実験研究の成果は十分得られておらず、日本国内では大気中PM_{2.5}を用いた動物吸入曝露実験は皆無であった。

そこで、第1期における成果も踏まえつつ、PM_{2.5}曝露に対して高感受性と考えられる病態である不整脈・高血圧や老齢に着目し、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、以下のI～IIIのCAPs吸入曝露実験を行った。

本研究では、様々な指標を用いてPM_{2.5}曝露の呼吸・循環機能に及ぼす影響を検討した。PM_{2.5}曝露の循環機能に及ぼす影響の指標としては、心電図(心拍変動(HRV: Heart Rate Variability)、心電図波形(RR間隔、QRS波形、ST高さ))、期外収縮の頻度、血圧等を用いた。また、循環機能に影響を及ぼす自律神経系への影響指標として、心電図のRR間隔から周波数解析を行いLF(Low Frequency)、HF(High Frequency)解析等を行った。また、呼吸機能の指標としては、肺抵抗(Penh)等を用いた。

(1. 4. 1) モルモットのキニジン誘発不整脈に及ぼす影響

ヒトの不整脈死は、心腎肝疾患等の基礎疾患や心筋細胞イオンチャネルの先天性異常などが基礎要因として存在し、その上に薬物や大気汚染、ストレスなどが作用して発現すると考えられている。よって、大気汚染物質の不整脈誘発作用を動物実験により評価する場合は、実験動物の選択が重要となる。

キニジンは急速活性化遅延整流カリウムチャネル(IKr)及び緩徐活性化遅延整流カリウムチャネル(IKs)に対する抑制を通じて心筋細胞の再分極過程を延長させ、大量投与によりヒトやモル

モットなどの動物で QT 延長を伴う明瞭な不整脈を誘発することから、キニジンの投与により不整脈を誘発したモルモットは、ヒトの QT 延長症候群に類似した病態と考えられる。

そこで、キニジン投与による不整脈誘発モルモットを用い、CAPs 吸入曝露がモルモットの不整脈の易誘発性に及ぼす影響を検討した。

(1. 4. 2) 老齢ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響

第1期の若齢及び老齢ラットを用いて実施した実験では、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、いずれも初期に軽度の局所炎症を引き起こしたが、その程度は心肺機能（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。

そこで、第1期と同様に老齢ラット（22～24ヶ月齢）を用い、CAPs 吸入曝露が老齢ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響について検討した。

(1. 4. 3) 高血圧ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響

第1期の自然発症高血圧ラット（SHR）を用いた実験では、SHRにおいてPM_{2.5}抽出物の期間内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。その一方、対照群（WKY）ではPM_{2.5}抽出物投与後に肺抵抗が増加したが心拍数及び副交感神経活動の有意な変化はなかった。

そこで、第1期同様 SHR 及び WKY を用い、CAPs 吸入曝露が高血圧ラットの呼吸・循環機能に及ぼす影響を検討した。