

前回検討会における文献調査指摘事項について

第 3 回検討会において指摘があった以下の事項に関する毒性学研究の知見について、文献レビューの実施状況と知見の概要を別紙のとおり示す。

毒性学研究

- 1) $100 \mu\text{g}/\text{m}^3 \sim 300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度での動物実験による知見
- 2) 粒子状物質とオゾンとの複合曝露に関する知見
- 3) 粒子状物質とガス状物質（オゾン以外）との複合曝露に関する知見
- 4) 沿道・道路上大気の影響に関する知見
- 5) 動脈硬化に対する微小粒子状物質の作用機序に関する知見

1. 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ~ 300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度での動物実験による知見

1. 件数

吸入曝露実験のうち、粒子状物質の曝露濃度 300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下の条件を含む文献は、レビュー文献中 56 件あった。

臓器別にみると、呼吸器について、肺組織の変化、BALF に関する各指標、炎症反応、アレルギー反応等を検討した調査は 40 件であった。このうち大気中から捕集した粒子状物質 (CAPs 等) を曝露した調査は 11 件、DE または DEP を曝露した調査が 17 件、金属粒子、炭素粒子、硫酸エアロゾルなどその他の粒子を曝露した調査は 13 件であった。

循環器 (心拍数、心拍変動、血圧、心電図の指標、組織的な変化等) に関する調査は 15 件であり、このうち大気中から捕集した粒子状物質を曝露した調査は 11 件、DE または DEP が 2 件、炭素粒子が 2 件であった。

その他の非がん影響に関する調査は 8 件、DEP の発がん性に関する調査が 1 件あった。

実験動物としては、正常なラット、マウス、イヌのほか、モノクロタリン処置した肺高血圧症ラット、SHR、ApoE^{-/-}マウス、OVA 感作マウスなどが用いられていた。循環器系に関する研究では、ApoE^{-/-}マウスを使用した事例が多かった。

2. 結果の概要

300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下の CAPs 曝露によって、BALF 中の総細胞数、タンパク質、LDH の増加、肺炎球菌の肺クリアランスの低下、酸化ストレスの上昇など呼吸器に関連した反応が認められた(7 件)。低濃度の DE や DEP の曝露によって、上皮細胞の増殖・肥大、肺組織における IL-10 の mRNA 発現量の減少、炎症反応に関連する酵素活性の低下、細菌類のクリアランスの低下などが報告されていた(6 件)。炭素の超微小粒子の曝露によって、肺の炎症やアレルギー反応などを示す反応が報告されていた(4 件)。また、soot と Fe の混合物の曝露によって、肺胞形成阻害や酸化ストレスの増加などの影響を及ぼすことが報告されていた(2 件)。

循環器系への影響としては、CAPs や道路上大気中の粒子状物質の曝露によって、心拍数、心拍変動、大動脈プラークの形成、遺伝子発現の変動などの反応が報告されていた(8 件)。このうち、病態モデル動物 (ApoE^{-/-}マウス等) の方が、正常動物よりも影響を受けやすいことを示す調査があった(4 件)。DEP による循環器系への影響としては、心拍数の増加、PQ 間隔の濃度依存的な延長等の不整脈の存在が報告されていた(1 件)。炭素粒子の曝露による心拍数調整の変動が報告されていた(2 件)。

神経系に関しては、CAPs 曝露が、脳内での神経変性を誘導するという報告があった(2 件)。DEP による肺がん影響に関する調査によると、DEP 曝露群と対照群との明らかな差は認められなかったと報告している(1 件)。

II. 粒子状物質とオゾンとの複合影響に関する知見

1. 件数

粒子状物質と O₃ を同時に曝露した調査は、11 件あった。粒子状物質としては、CAPs、オタワ標準粉じん(EHC-93)等の大気中の微小粒子状物質や、硫酸エアロゾル、炭素粒子、ROFA、DEP 等が用いられている。いずれも呼吸器系の影響に関する調査であった。これらの調査とは別に、O₃ を曝露して誘導した肺高血圧モデル動物に粒子状物質を曝露した調査が 2 件あった。

実験動物の種類は、正常動物のほか OVA で感作した喘息モデルマウス、肺を損傷したモデルとしてエンドトキシン曝露マウス、老化した肺気腫マウス、SHR、モノクロタリン処置による肺高血圧ラット等が用いられていた。

2. 結果の概要

呼吸器系については、粒子状物質と O₃ の複合曝露によって相加的な影響があるとする調査は、6 件であった。CAPs やオタワ標準粉じん(EHC-93)等大気中の粒子状物質と O₃ の複合曝露によって、それぞれの単独曝露よりも肺機能の低下、喘息時炎症反応の亢進、組織の再生、肺への炎症反応など、呼吸器への毒性が増したという報告があった。

一方、粒子状物質と O₃ の複合曝露を行っても、気道狭窄、preproET-1mRNA、preproET-3mRNA の発現量やエンドセリンの血中濃度、マクロファージの貧食能などの指標に関して相加的な影響の増加は認められなかったとする報告もあった。(5 件)

III. 粒子状物質とガス状物質（オゾン以外）との複合影響に関する知見

1. 件数

粒子状物質と SO₂、NO₂、NO、CO 等のガス状物質 (O₃ を除く) との複合曝露について述べている調査が 6 件あった。ガス状物質の種類でみると、SO₂(4 件)、NO₂(1 件)、NO(1 件)、CO(1 件)であった。NO については、その前駆体物質である L-アルギニンを飲料水に混ぜて与えていた。これらの文献等は別に、慢性気管支炎モデル動物を誘導するため、粒子状物質の曝露を行う前に SO₂ に曝露している調査が、3 件あった。

2. 結果概要

硫酸エアロゾル、CAPs、カーボンブラック(CB)などの粒子状物質と、SO₂ を複合曝露した調査では、肺機能、肺胞マクロファージの貧食能、不整脈の発生などを指標としており、これらの指標に対して粒子状物質と SO₂ の相加的な影響があると明示している文献を確認することはできなかった。

CB と SO₂ をマウスに混合曝露すると、湿度 85% で CB の表面に付着する硫酸塩が増加

し、この硫酸塩濃度に依存して肺胞マクロファージの貪食能が低下したという報告があった(1件)。

DEP 抽出物でコーティングした CB 粒子と NO₂ および SO₂ を長期曝露すると、肺腫瘍形成および DNA 付加物の形成が認められ、NO₂ や SO₂ が DEP 抽出物による肺腫瘍の誘導を促進していると推定されていた(1件)。

これらの研究とは別に、粒子状物質を曝露する前に SO₂ を曝露することで誘導された慢性気管支炎モデル動物と正常な動物を比較した調査があった。ラットに CAPs を曝露した調査では、慢性気管支炎モデル動物において、呼吸機能異常や肺の炎症が、正常な動物よりも強く認められたという報告があった(1件)。

IV. 沿道・道路上大気の影響に関する知見

1. 件数

「道路」「路上」「沿道」等、道路に関連する用語で検索した結果、沿道・道路上の大気から捕集した粒子状物質の影響に関する文献は 4 件あった。これらは呼吸器系と循環器系への影響(2件)、呼吸器系と免疫系への影響(1件)、粒子状物質の変異原性(1件)に関する文献であった。

2. 結果の概要

道路上及び道路沿道の大気や、それらの大気から捕集した粒子を老齢ラット、易感染性ラット、SHR、マウスに対して吸入曝露する実験を行った。その結果、血漿エンドセリン(ET-2)の増加、炎症性細胞の活性化、自律神経系への影響と心拍数の変動、アレルギー反応指標(IL-5、IgE、好酸球)の増加などの影響が認められた。(3件)また、製鋼所と高速道路に近い場所から採取した CAPs を曝露したマウスを交配させて生まれたマウスにおいて遺伝子の変異を検出したという報告があった(1件)。

V. 動脈硬化に対する微小粒子状物質の作用機序に関する知見

1. 件数

微小粒子状物質の曝露によるフィブリノゲンの増加やアテローム性動脈硬化症を悪化させるように作用することについて述べた文献は 8 件であった。このうち、吸入曝露が 7 件、気管内投与が 2 件であった。

これらの調査のうち、3 件では動脈硬化疾患モデルマウスの一種である ApoE^{-/-}マウスを用いていた。また、別の 3 件の調査では SHR を用いていた。曝露した粒子状物質として、CAPs や PM_{2.5} などの大気中粒子状物質(6 件)、ROFA(2 件)を曝露させていた。

2. 結果の概要

アテローム性動脈硬化を起こしやすい ApoE^{-/-}マウスに対して CAPs などを曝露することによって、大動脈内膜表面におけるアテローム性動脈硬化型病変などの変化が認められた。また、血管運動に変化を与えて血管炎症を招き、動脈硬化を増強した(3件)。正常ラットや SHR に対して ROFA、炭素粒子、CAPs などを曝露した結果、血中フィブリノゲンの増加が認められた(3件)。また、SHR に ROFA を気管内投与したところ、血漿粘度の増加が報告された。(1件)

一方で、PM_{2.5} の気管内投与によって、フィブリノゲンの値が減少したという報告もあった(1件)

VI. 参考資料

1. $100 \mu\text{g}/\text{m}^3 \sim 300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度での動物実験による知見

1) 呼吸器系

Gordon ら(1998)は、モノクロタリンにより肺高血圧症を発症させたラットにニューヨークの CAPs($110 \sim 360 \mu\text{g}/\text{m}^3$)を、3時間鼻部曝露させた。モノクロタリンを投与したラットにおいて曝露終了3時間後に血中好中球数の上昇が見られたが、24時間後には対照群との差はなくなった。モノクロタリンを投与したラットを $360 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の CAPs に曝露したところ、BALF 中の総細胞数、タンパク質、LDH 活性が約2倍に上昇した。

Clarke ら(2000a)は、若齢ラットと老齢ラットを CAPs もしくは、清浄空気で5時間/日で連続して3日間曝露した。用いた大気粒子状物質(ボストン大気、平均粒径： $0.18 \mu\text{m}$)の曝露濃度は、平均で1日目： $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、2日目： $170 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、3日目： $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。最終曝露後に心臓穿刺により採血し、気管支肺胞洗浄(BAL)も行なった。若齢ラットは老齢ラットと比べ、かなり高い BALF 中の総細胞数を示し、CAPs 曝露後に多核白血球(PMN)の有意な増加が見られた。老齢ラットでは BALF 中の総細胞数、LDH、総白血球数、総白血球と PMN のパーセント、リンパ球、単核球の間に CAPs 曝露による顕著な変化はみられなかった。CAPs またはろ過空気曝露による老齢ラットと若齢ラットの影響の比較では、老齢ラットで BALF 中の総細胞数、総白血球数、血液中のリンパ球の比と血液ヘモグロビンにおいて有意な減少が見られ、また、血液中 PMN の割合では増加が見られた。以上のことから①若齢 Fisher ラットは CAPs 曝露による肺の炎症反応を調べる研究で敏感なモデルとなりうる。②老齢ラットで血液中の好中球の割合が高いのにも関わらず肺の炎症反応が小さいのは吸入粒子に対する感受性の低さを反映しているのかもしれないことを示唆している。

Clarke ら(2000b)は、CAPs(ボストン由来、曝露濃度： $200 \sim 360 \mu\text{g}/\text{m}^3$)を用いて、CAPs を曝露されたイヌにおける肺の炎症や血液学的な反応について検討した。肺の炎症変化検索と血液学的な検索のために、正常イヌを CAPs やろ過空気に6時間/日、3日間連続曝露した。血液学的な検索では、CAPs またはろ過空気の曝露後、次の週にはクロスオーバー曝露を行い、CAPs の1日の組成変化と、血液成分の変化との関連を調べた。全ての CAPs や全ての擬似曝露を比較したところ、生物学的な反応において統計的な有意差はみられなかった。しかしながら、CAPs 曝露における生物学的な反応の変動がかなり大きかった。そこで、統計学的に、CAPs の成分と生物学的な反応の間の関連性を解析した。BALF 中の好中球の割合、末梢血の総白血球数、好中球、リンパ球の増加が Al や Si 因子 の増加と関連していた。血中の好中球と肺胞洗浄のマクロファージの増加は V や Ni 因子 と関連していた。BALF の好中球の増加は、Br/Pb 因子 と CAPs 曝露の3日目のデータのみで関連性がみら

れた。赤血球の数やヘモグロビンレベルの有意な減少がイオウと相関があった。BALF と血液学的なパラメータは総計 CAPs の質量濃度の増加とは関連がなかった。これらのデータは CAPs の吸入が肺性および全身性の細胞プロファイルの変化と微妙に関連して、CAPs の特異的な成分はその生物学的な反応の原因であるかもしれないということを示唆している。

Zelikoffら(2003)は、CAPs (ニューヨーク由来)を、F344 ラット(雄、7~8ヶ月齢)を第1群：345 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、第2群：107 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の2群に分けて鼻部曝露を行い易感染性の実験を行った。第1群は CAPs を3時間曝露した後に肺炎球菌を気管内投与した。第2群には、肺炎球菌を投与してから48時間後に CAPs を5時間曝露した。影響としては、BALF 中のサイトカイン(TNF- α 、IL-1 α/β 、IL-6)、肺炎球菌の肺クリアランスなどであった。第1群は清浄空気曝露群に比べ大きな変化は見られなかったが、第2群では、CAPs 曝露群においてサイトカインの産生の有意な減少、肺炎球菌のクリアランスの遅延、血中好中球数の上昇が見られた。これらのことから CAPs の単回曝露は、感染状態を悪化させることが示唆された。

Gurgueiraら(2002)は、ラットに CAPs(曝露濃度：300(\pm 60) $\mu\text{g}/\text{m}^3$)を1、3、5時間/日、1日吸入させ、人工呼吸下に肺、心臓、肝臓の化学発光量(酸化ストレスの指標)を調べたところ、肺と心臓において有意な上昇が認められた。同様の結果が ROFA の曝露において認められたが CB では変化は認められなかった。肺の化学発光量は、CAPs 中の Ca、Mn、Cu、Fe、Zn と、心臓の化学発光量は、Si、Al、Ti、Fe と相関が見られた。また、肺の障害指標としての乾湿重量比、組織障害指標としての血清 LDH、クレアチンホスホキナーゼ活性、肺の Mn-SOD とカタラーゼ活性、心臓の Cu/Zn-SOD と Mn-SOD 活性が CAPs の曝露により上昇した。

Nadziejkoら(2002b)は、血圧の発信装置を外科的に植え込んだ SHR 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 73 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸エアロゾル：平均 225 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸微粒子：468 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 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