

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℃、4日間)環境飼育ラット(n=16)、②気管内投与の18時間前にO<sub>3</sub>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、O<sub>3</sub>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/m<sup>3</sup>×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。

高齢SHRにおける気管内投与：OTT 2.5 mg、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、不整脈等の悪影響は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、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(105 μg)、NiSO<sub>4</sub>(263 μg)、VSO<sub>4</sub>(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時間後に心拍数及び深部体温の低下、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。

Campenら(2002)は、ROFAの曝露が心機能及び体温調節にいかなる影響を及ぼすか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、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、NiSO<sub>4</sub>、VSO<sub>4</sub>であった。曝露濃度や実験条件は、以下のとおりであった。

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 Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、③0.263mg NiSO<sub>4</sub>、④0.245mg VSO<sub>4</sub>、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 Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、③0.263mg NiSO<sub>4</sub>、④0.245mg VSO<sub>4</sub>、3群(モノクロタリン処置・金属混合群、各n=6):①

Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>+VSO<sub>4</sub>、② Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>+NiSO<sub>4</sub>、③ NiSO<sub>4</sub>+VSO<sub>4</sub>、④ Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>+NiSO<sub>4</sub>+VSO<sub>4</sub>とした。

Vは健康ラット及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。

Chengら(2003)は、肺高血圧症モデルラットにおけるCAPs曝露の循環器影響を調べるために急性曝露実験を行った。モノクロタリン(60mg/kg(体重))投与による肺高血圧ラット(SD)に、テレメトリー送信機を装着し、CAPsを108~338μg/m<sup>3</sup>(9日平均240±77μg/m<sup>3</sup>)の濃度で、5時間/日、3連続日の条件で曝露した。ラットにモノクロタリンを腹腔内投与し肺高血圧を惹起させた。その14日後に、テレメトリーシステムをラットに移植し、CAPsを吸入曝露した。継続的に、心拍数、血圧、深部体温を記録した。CAPs曝露時の心拍数は、曝露開始後の早期には清浄空気曝露時と比較して低くなり、その後徐々に増加し、清浄空気曝露時よりも高くなった。1時間後には14.9bpm、2時間後には11.7bpmの心拍数低下が見られた。血圧も同様の経過を示し、1時間後には3.3mmHg、2時間後には4.1mmHgの低下が認められた。しかし、これらの変化と粒子濃度の間には有意な相関は得られなかった。本研究では大気微小粒子は血圧及び心拍数に影響することが明らかになった。

Hwangら(2005)は、粒子径平均389±2nm(ニューヨーク州由来)のCAPsをApoE<sup>-/-</sup>マウスに6時間/日曝露で5ヶ月間曝露した。曝露濃度は、133μg/m<sup>3</sup>(範囲52~153μg/m<sup>3</sup>)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<sup>-/-</sup>マウスに心電図、深部体温、及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、及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

において ApoE<sup>-/-</sup>マウスでは心拍、体温、及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<sup>-/-</sup>マウスの心拍、体温、及び身体的活動の 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<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>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。

Wellenius ら (2003)は、6 匹のイヌに開胸手術を試行し、冠動脈の左前下行枝にバルーンを用いた閉塞作成装置を取り付けた。二匹を一組とし、CAPs (Harvard Ambient Particle Concentrator を使用 ;  $345.25 \pm 194.30$  ( $161.34 \sim 957.32$ )  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) もしくは清浄空気を 6 時間/日、3 日間連続で吸入させた。曝露終了直後に、5 分間バルーンを膨張させ、冠動脈閉塞状態を作成し心電図を持続的にモニターし、ST 部分の上昇を高さの最大値と面積から判定した。冠動脈閉塞による V4、V5 誘導における ST 上昇は、清浄空気曝露個体に比較し、CAPs 曝露個体において顕著であった。しかし、単回帰解析において、ST 上昇と粒子濃度には相関はなく、ST 上昇と Si もしくは Pb の濃度との間に相関を認めた。多変量解析では、ST 上昇と Si 濃度との間のみ相関を認めた。冠動脈閉塞により頻脈が惹起されたが、CAPs 曝露の影響は認められなかった。冠動脈閉塞により心室性不整脈はあまり惹起されず、CAPs の影響も見られなかった。以上の結果から、浮遊粒子状物質は、冠動脈狭窄や閉塞に基づく心疾患を増悪する可能性が示唆された。

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。肺泡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- $\beta$  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」と述べている。

Godleski ら (2000) は、ヒトの心筋梗塞に類似した病態をイヌで作製し、CAPs 曝露による循環機能(心電図)変化、自律神経機能の変化、BALF の変化を調べるため、急性実験を行った。CAPs を冠動脈無処置動物(6 匹)、冠動脈閉塞犬(6 匹)に最高で 30 倍に濃縮して吸入曝露を行った。曝露濃度は、冠動脈無処置動物で  $93.7\sim 1,055.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、冠動脈閉塞動物で  $71.8\sim 741.2\mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。曝露条件は、6 時間/日、3 日間連続であった。冠動脈無処置動物は、CAPs 曝露により心電図の心拍変動の低周波成分と高周波成分が、清浄空気曝露に比較し、有意に上昇した。高周波成分と低周波成分が上昇しているときには、脈拍数が低下し、呼吸数、一回換気量も低下していた。CAPs 曝露により T 波の低下も観察された。CAPs 曝露により、BALF 中の好中球の占有比率が、清浄空気曝露に比較し、増加していた。CAPs 曝露により末梢血の白血球数に変動はなかったが、曝露開始後、3 日目までフィブリノゲンの経時的増加傾向が認められた。冠動脈閉塞動物に関しては、冠動脈無処置動物に比較し、CAPs 曝露による高周波成分上昇がより顕著であった。また、CAPs 曝露群では、清浄空気曝露群に比較し、冠動脈閉塞による ST 上昇がより早期に出現した。

Wellenius ら (2003) は、6 匹のイヌに開胸手術を試行し、冠動脈の左前下行枝にバルーンを用いた閉塞作成装置を取り付けた。二匹を一組とし、CAPs (Harvard Ambient Particle Concentrator を使用 ;  $345.25\pm 194.30$  ( $161.34\sim 957.32$ )  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) もしくは清浄空気を 6 時間/日、3 日間連続で吸入させた。曝露終了直後に、5 分間バルーンを膨張させ、冠動脈閉塞状態を作成し心電図を持続的にモニターし、ST 部分の上昇を高さの最大値と面積から判定した。冠動脈閉塞による V4、V5 誘導における ST 上昇は、清浄空気曝露個体に比較し、CAPs 曝露個体において顕著であった。しかし、単回帰解析において、ST 上昇と粒子濃度には相関はなく、ST 上昇と Si もしくは Pb の濃度との間に相関を認めた。多変量解析では、ST 上昇と Si 濃度との間のみに相関を認めた。冠動脈閉塞によ

り頻脈が惹起されたが、CAPs 曝露の影響は認められなかった。冠動脈閉塞により心室性不整脈はあまり惹起されず、CAPs の影響も見られなかった。以上の結果から、浮遊粒子状物質は、冠動脈狭窄や閉塞に基づく心疾患を増悪する可能性が示唆された。

Muggenburg ら (2000) は、イヌの心血管系への ROFA の影響を検討するため、急性実験を行った。高齢イヌ(ビーグル犬、 $n=4$ 、10.5 歳)に対して、平均粒径  $2.22\mu\text{m}$  の ROFA を、 $3\text{mg}/\text{m}^3$  の濃度で 3 時間/日  $\times$  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)及び 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及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う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  $389 \pm 2\text{nm}$ (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  $52 \sim 153\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) 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、及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、及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、及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、及び身体的活動の 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<sup>-/-</sup>マウスとダブルノックアウトマウス(ApoE<sup>-/-</sup> LDLr<sup>-/-</sup>)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<sup>-/-</sup>マウス(大動脈プラーク)、ApoE<sup>-/-</sup> LDLr<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup> LDLr<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>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等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(ボストン由来)であり、PM<sub>2.5</sub>を 350.5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、CO(一酸化炭素)を 35ppm、CAPs を 348.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$  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 1.81 $\mu\text{m}$  の ROFA を 3.42 $\text{mg}/\text{m}^3$  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)、及び 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  $225\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸微小粒子:  $468\mu\text{g}/\text{m}^3$  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気中濃度の曝露が、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-6mRNA 発現量、フィブロンectin、G6PD は WKY、SHR で同様に増加していたが、MIP-2mRNA 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- $\beta$  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」と述べている。

Vincent ら (2001)は、オタワ標準粉じん(EHC-93)(48 mg/m<sup>3</sup>)とそれを水ろ過した EHC-93L (49 mg/m<sup>3</sup>)、Diesel soot(DS)(4.2 mg/m<sup>3</sup>)、CBP(4.6 mg/m<sup>3</sup>)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グラスファイバーに集め濃縮した PM<sub>2.5</sub> であり粒子サイズは 2.5 $\mu$ m より小さかった。ハローセン麻酔下で PM<sub>2.5</sub> を 2.0mg/0.3 mL saline の量で単回投与した。PM<sub>2.5</sub> 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及び心室期外収縮等の不整脈が出現した(有意差あり)。また、PM<sub>2.5</sub> 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<sub>2.5</sub> 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及び曝露条件は、1 群(22 $^{\circ}$ C 環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与、2 群(10 $^{\circ}$ C 環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与、3 群(22 $^{\circ}$ C 環境飼育、O<sub>3</sub> 曝露は n=4、対照は n=3): 1ppmO<sub>3</sub> の曝露(6 時間)後、0、2.5mg ROFA 投与、4 群(22 $^{\circ}$ C 環境飼育、各 n=4): モノクロタリン処置後、0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 環境下よりも深刻だった。O<sub>3</sub> 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。O<sub>3</sub> 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(不整脈等)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℃、4日間)環境飼育ラット(n=16)、②気管内投与の18時間前にO<sub>3</sub>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、O<sub>3</sub>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/m<sup>3</sup>×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。

高齢SHRにおける気管内投与：OTT 2.5 mg、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、不整脈等の悪影響は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、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(105 μg)、NiSO<sub>4</sub>(263 μg)、VSO<sub>4</sub>(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時間後に心拍数及び深部体温の低下、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。

Campen ら (2002)は、ROFA の曝露が心機能及び体温調節にいかなる影響を及ぼすか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、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、NiSO<sub>4</sub>、VSO<sub>4</sub>であった。曝露濃度や実験条件は、以下のとおりであった。

1 群(モノクロタリン非処置群、各 n=4): ① 生理食塩水投与、② 0.105mg Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、③ 0.263mg NiSO<sub>4</sub>、④ 0.245mg VSO<sub>4</sub>、2 群(モノクロタリン処置群、各 n=10): ① 生理食塩水投与、② 0.105mg Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、③ 0.263mg NiSO<sub>4</sub>、④ 0.245mg VSO<sub>4</sub>、3 群(モノクロタリン処置・金属混合群、各 n=6): ① Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>+VSO<sub>4</sub>、② Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>+NiSO<sub>4</sub>、③ NiSO<sub>4</sub>+VSO<sub>4</sub>、④ Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>+NiSO<sub>4</sub>+VSO<sub>4</sub>とした。

Vは健康ラット及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。

#### 5.3.2.8. 複合大気汚染により影響の増悪が生じる

Ulrichら(2002)は、O<sub>3</sub>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0.5μm)を気管内投与した。O<sub>3</sub>による前処理の条件は、0.8ppm、8時間とした。O<sub>3</sub>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、フィブリノゲン値等)、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)等が認められた。3)血液中のフィブリノゲン値の20%上昇(血液濃縮及び血流障害を示唆)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ーの低下は、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°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、または粒子状物質等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ーが、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等のパラメーターと、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 CO<sub>2</sub> 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等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等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 CO<sub>2</sub> 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、O<sub>3</sub> 及び 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、O<sub>3</sub>(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。O<sub>3</sub>(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、0.5ppmO<sub>3</sub> 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等の環境条件の影響を強く受けた。ROFA 等、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及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、このような心機能及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器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)及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及び曝露条件は、1 群(22℃環境飼育):0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与(各 n=4)、2 群(10℃環境飼育):0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与(各 n=4)、3 群(22℃環境飼育):1ppmO<sub>3</sub> の曝露(6 時間)後、0、2.5mg ROFA 投与(各 n=4)、4 群(22℃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℃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℃環境下群も深部体温は同様の濃度依存性を示したが、22℃環境下よりも影響が大きかった。O<sub>3</sub> 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。モノクロタリン処理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。O<sub>3</sub> 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。

### 5.3.3. 論文による仮説の検証

#### 5.3.3.1. 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及び吸入によって、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<sub>2.5</sub> (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<sub>2.5</sub> 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/m<sup>3</sup>) への吸入曝露は、清浄空気及び 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) パワー及び高周波 (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、自律神経バランス及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及び生理食塩水、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 群及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 に清浄空気及び DE (30、100、300、1000µg/m<sup>3</sup>) を 6 時間/日 × 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。正常動物及びモノクロタリン誘発肺高血圧症ラット等に、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、モノクロタリン誘発肺高血圧症ラット、正常ラットに対して ROFA (15mg/m<sup>3</sup>×6 時間/日×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)。正常ラット及びモノクロタリン誘発肺高血圧症ラットに ROFA (Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、NiSO<sub>4</sub>、VSO<sub>4</sub>) を気管内投与した実験 (Campen ら (2002)) では、VSO<sub>4</sub> で顕著な徐脈と不整脈が急性期に現れ、NiSO<sub>4</sub> 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。正常マウス及び先天性にアテローム性動脈病変を有するマウス (ApoE<sup>-/-</sup>マウス、ApoE<sup>-/-</sup>LDLr<sup>-/-</sup>DK マウス) に CAPs (52~153 µg/m<sup>3</sup>) を吸入曝露 (6 時間/日×5 日/週×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±194.30µg/m<sup>3</sup>、6 時間/日×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、不整脈及び徐脈はみられなかった。また、正常ラット (WKY ラット) 及び SHR に ROFA (15mg/m<sup>3</sup>) 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/m<sup>3</sup>) 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、正常ハムスター及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、麻酔下でキニジン投与したモルモット、高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、期外収縮や徐脈等、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等、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。

### 5.3.3.2. 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及び吸入によって、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の増大 (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質の曝露により肺動脈内腔/壁厚比の減少、心臓湿重量/乾重量比の増加が生じるという報告がある (Rivero ら (2005))。モノクロタリン処理による肺高血圧症モデルラットでは、ROFA の曝露によって期外収縮、房室ブロック、徐脈が明瞭に認められたが、これらの曝露動物では右心肥大、肺重量増加、肺の炎症像が生じている (Campen ら (2000))。

これらの実験報告を全体的に考察すると、CAPs や粒子状物質の気管内投与は、心臓内部での生理活性物質の増加や過酸化物質の増加を起こし、さらに肺動脈の狭窄や肺炎の進行による心臓への圧負荷等の要因が加わることによって、不整脈を誘発しやすくなるものと考えられる。

一方、吸入実験においても多くの生理的、形態的指標に変化が出現することが報告されている。すなわち、1) 正常ラットへの CAPs 及び ROFA の吸入曝露によって、心臓及び肺における酸化ストレス指標が正常レベルの約 2 倍に速やかに上昇する (Gurgueira ら (2002)) こと、2) 高齢ラットへの道路微小粒子の曝露は血漿エンドセリン-2 濃度の上昇をもたらさず (Elder ら (2004)) こと、3) アテローム性動脈病変を有す DK マウスでは、CAPs 曝露により血管細胞の増殖性が促進され、大動脈プラークの大きさ、重症度に悪影響をもたらさず (Chen と Nadziejko (2005)) こと、4) 先天性に動脈病変を有すマウス (ApoE<sup>-/-</sup>) への CAPs 曝露によって動脈病変が悪化する (Chen と Hwang (2005)) こと、5) 同様のマウスへの  $PM_{2.5}$  の長期曝露によって心拍変動への影響と動脈病変



の悪化が認められる(Lippmann ら (2005a)) こと、6) 遺伝性高脂血症(WHHL、Watanabe Heritable HyperLipidemic)ラビットへの PM<sub>10</sub> の曝露により全身の動脈及び冠動脈の動脈硬化病変を悪化させる (Suwa ら (2002)) こと、7) 高脂肪食の apoE<sup>-/-</sup>マウスへの PM<sub>2.5</sub> 曝露によって、大動脈の粥状病変の悪化と血管収縮薬に対する収縮反応の亢進が認められる (Sun ら (2005)) こと、8) WKY ラットへの ROFA の長期の曝露によって心筋組織における多発性的変性像、線維化が生じる (Kodavanti ら (2003)) こと、等である。さらに、血液性状に関する報告もみられる。Gordon ら (1998)は、正常ラット及び肺高血圧症ラットへの CAPs の吸入曝露によって末梢血の血小板及び好中球が増加することを報告したが、常に増加するわけではない。

これらの実験結果を俯瞰すると、CAPs や ROFA の吸入曝露によって主に血管系の形態的な変化を促進する傾向が存在し、とくに潜在的に血管系に異常を持っている動物では血管病変の悪化がより促進されるといえる。このような血管系の異常は、心臓に対する圧負荷を増大させ、不整脈を誘発しやすくするものと考えられる。

#### 5.3.3.3. 微小粒子状物質の曝露によって、自律神経機能に影響を及ぼす

微小粒子状物質の曝露によって自律神経機能に影響が現れることがいくつかの文献で報告されている。エンドトキシン処理を行った SHR に道路上大気を吸入させた実験では副交感神経の活動亢進による心拍数の減少と交感神経の活動の低下が示されており、道路上大気の吸入により自律神経系の活動に影響が生じることが明確に述べられている (Elder ら (2007))。一方、ROFA (3.42mg/m<sup>3</sup>) を心筋梗塞モデルラットに 1 時間吸入曝露した研究では、心拍間隔のばらつきの減少 (副交感神経緊張の低下) がみられている (Wellenius ら (2002))。

正常ラットに CAPs (750 µg/300 µL saline) を気管内投与すると、投与直後～60 分間に心拍間隔のばらつきの増大、主に副交感神経活動を反映する高周波成分 (HF) /主に交感神経活動を反映する低周波成分 (LF) の増大が生じている (Rhoden ら (2005))。

微小粒子状物質曝露影響調査研究報告において、SHR に CAPs を曝露した動物実験の結果を見ると、副交感神経活動の指標となる HF の増加や心拍数の減少傾向が認められている。多くの動物実験の研究は副交感神経の活動の亢進を示したが、心拍数の増加を示した報告も少数存在する (Vincent ら (2001)、Campen ら (2003))。

一方、ヒト志願者実験では、PM<sub>2.5</sub> や PM<sub>10</sub> の曝露で心拍数や心電図への影響が観察されないとする報告 (Nightingale ら (2000)、Petrovic ら (2000)、Gong ら (2003)) もみられるが、心拍変動解析結果には影響が現れるとする報告もある (Park ら (2005))。それらの多くは、PM<sub>2.5</sub> の曝露 (Liao ら (1999)、Creason ら (2001)、Holguin ら (2003)、Park ら (2005)) または PM<sub>10</sub> (Liao ら (2004))

の曝露によって、心拍変動が全体的に低下することを示しているが、主に交感神経活動を反映する低周波成分と副交感神経活動を反映する高周波成分とを比較した場合、高周波成分の低下の方が低周波成分の低下よりも強く生じる傾向があることを明らかにしている。また、このような心拍変動の低下は健常者に比べて高血圧患者 (Holguin ら (2003))、心血管系患者 (Liao ら (2004)) あるいは糖尿病患者 (Park ら (2005)) でより強く生じる傾向がみられている。これらのヒトの研究で得られた自律神経機能影響に関する傾向は上述の動物実験による傾向とは必ずしも一致しないが、ヒトにおいても動物においても PM<sub>2.5</sub> 及び PM<sub>10</sub> の曝露が自律神経機能に影響を及ぼすことが示唆される。

#### 5.3.3.4. 血液の凝固線溶系への影響がみられる

CAPs、DEP 等の粒子状物質の曝露によって、凝固線溶系の変化が観察されるとする報告が比較的多く認められる (Sjogren (1997)、Gardner ら (2000)、Kodavanti ら (2002)、Ulrich ら (2002)、Ghio と Huang (2004)、Petrovic ら (2000)、Gong ら (2003))。

いくつかの文献で、ROFA の気管内投与による血漿フィブリノゲンの増加、DEP の気管内投与による静脈及び動脈の血栓形成の増大、血小板の活性化が起こることが示されている。DEP の気管内投与実験では、数種の動物種において静脈内の血栓形成の促進が投与量依存性に認められている点は注目される。

ヒト志願者の研究では、健康な非喫煙者への CAPs 曝露で、BALF 中の好中球の増加や血中フィブリノゲンの増加が認められており、Huang ら (2003) は、CAPs 中の硫酸塩/Fe/Se 因子が BALF 中の好中球の増加、Cu/Zn/V 因子が血中フィブリノゲン増加と関連していて、粒子状物質の特異的成分の重要性を指摘している。健康な志願者の間欠運動下での CAPs の曝露は、白血球数や LDH (Lactate DeHydrogenase) の両方の減少及びフィブリノゲン濃度の増加と関連していると結論している。

以上、粒子状物質や DEP の曝露に関する動物実験の結果から、一部の報告を除き血液成分に影響が現れるとする報告が多いといえる。多くの実験では高濃度の粒子状物質への曝露ではあるが、血液凝固系が活性化し、血栓の形成を誘導していくことが示唆された。このような結果は、ヒト志願者の研究における CAPs 曝露による血中フィブリノゲンの増加に関する報告や大気汚染物質の曝露による血栓症が起こる臨床的報告と傾向が一致している。このような血液性状の変化は、冠動脈閉塞や肺塞栓症を起こしやすくし、また末梢血管抵抗を増大することで心臓への圧負荷を高める可能性がある。

### 5.3.3.5. 心機能変化において呼吸器系の刺激が影響する

微小粒子状物質は気管支や肺実質を刺激し炎症性影響をもたらすことが知られている。一般に気管支や肺実質の炎症性変化が生じた場合に、心臓や血管系に及ぼす影響メカニズムとしては次の経路が考えられる。① 炎症部位からのサイトカインや生理活性物質の産生と血流への放出、② 気道知覚神経（気管支 C 線維、肺泡 C 線維、刺激受容器）の刺激による心血管系への自律神経反射、③ 炎症による肺循環障害である。① では心臓や血管の増殖性変化、血管収縮または弛緩等が、② では徐脈と血圧低下、③ では肺鬱血、肺高血圧症、右心負荷等が結果としてもたらされる。

ラットへの PM<sub>2.5</sub> の気管内投与で誘発された不整脈の発現には心肺反射が主要な要因とは考えられないと考察した文献がある (Kang ら (2002))。しかしながら、気道の知覚神経終末、とくに C 線維の刺激は迷走神経反射による徐脈や血圧低下を誘発することが生理学的に広く知られている。したがって、呼吸器内に侵入した物質に気道刺激性が存在する場合には、迷走神経中の求心性神経（C 線維）を介した遠心性神経（副交感神経）の活性化による心臓影響を無視することはできないものと推測される。実際、PM<sub>2.5</sub>、CAPs、ROFA の気管内投与実験の多くで投与直後から徐脈が出現している (Kang ら (2002)、Campen ら (2000)、Watkinson ら (2000)、Campen ら (2002))。また、これらの物質の吸入実験でも多くの例で徐脈が認められている (Godleski ら (2000)、Nadziejko ら (2002)、Hwang ら (2005)、Nadziejko ら (2004)、Muggenburg ら (2000)、Elder ら (2007))。上述の実験にはラットやマウスが多く使われており、これらの動物は本来的に交感神経緊張が高い動物であるため、気道刺激が存在する場合の心拍反応は副交感神経側に現れやすいものと考えられる。以上の動物実験の研究報告から呼吸器刺激は少なからず心血管系へ影響を及ぼすものと思われる。

### 5.3.3.6. 微小粒子（粒子中成分）は血液中に浸出し心血管系に影響を及ぼす

微小粒子が循環器系に浸出する過程としては、① 肺泡に沈着した可溶性粒子の一部が上皮細胞から吸収される経路、② 肺泡マクロファージの食作用によって取り込まれた粒子がマクロファージとともにリンパ系に移行した後に血流に入る経路、③ 沈着した粒子中の可溶性成分が溶解し血液中に移行する経路が考えられる。血液中に移行した超微小粒子の一部は血管系や中枢神経系へと侵入する可能性が示唆されている。これらの微小粒子が血流中に多量に存在する場合は、それらが血管内皮細胞を障害することで血栓形成を促進する可能性が考えられる。上述したように粒子状物質や DEP は血液凝固系を促進しうることを示唆されているが、血液中の微小粒子状物質と血液凝固系及び血管内皮障害との因果関係については機序を含めて直接的な証明を行った研究は乏しい。また、気管内投与実験等では、心臓内の酸化ストレス指標が増加することが報告

(Gurgueira ら (2002)) されている。これらの変化が血液内に侵入あるいは溶解した粒子成分による直接作用なのか、あるいは自律神経系 (Rhoden ら (2005)) や他の生体内内因性物質 (Kang ら (2002)) による二次的な影響なのかについても正確なことはまだわかっていない。

#### 5.3.3.7. 疾患モデル動物は正常動物に比べて循環機能変化に差異が生じる

心筋梗塞モデル (Kang ら (2002)、Wellenius ら (2004)、Godleski ら (2000))、高血圧症モデル (Bagate ら (2006)、Nadziejko ら (2002)、Campen ら (2003))、肺高血圧症モデル (Campen ら (2000)、Watkinson ら (2000)、Campen ら (2002)、Cheng ら (2003)) 及び動脈硬化症モデル (Hwang ら (2005)) が、CAPs、粒子状物質、ROFA、金属粒子の曝露による心血管系影響の評価に有効に使用されている。これらの実験では、正常動物に比べて疾患モデル動物では期外収縮や徐脈等の心機能変化を起こしやすいか、あるいは心電図波形の変化を起こしやすい (Wellenius ら (2003)、Kodavanti ら (2000)) ことを述べた報告が多い。とくに心筋梗塞モデルのラットやイヌ、肺高血圧症モデルのラットでは曝露による不整脈や心電図変化が比較的明瞭に現れている。

心筋梗塞モデル犬を使った実験 (Godleski ら (2000)) では、ボストンの CAPs 吸入曝露によって心電図 ST 上昇がより速やかに発現すること、徐脈が出現すること、心拍変動のパワー (低周波成分と高周波成分) が増大することが示されている。一方、同じ研究で、正常犬では T 波交互脈が CAPs 曝露によって抑制されることから、正常個体では不整脈をむしろ抑制する方向の変化であるとみている。別の心筋梗塞モデル犬の CAPs 曝露実験 ( $345.25 \pm 194.30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、6 時間  $\times$  3~4 日) では、心電図 ST 上昇が明瞭に出現したが不整脈及び徐脈はみられなかった (Wellenius ら (2003))。また、正常な高齢ビーグル犬 (平均 10.5 歳) に ROFA ( $3\text{mg}/\text{m}^3$ 、3 時間/日  $\times$  3 日間) を曝露した実験では、徐脈が認められたが、期外収縮等の不整脈は出現せず T 波の波形・振幅にも変化がみられなかった (Muggenburg ら (2000))。

アテローム性動脈病変を先天性に有す ApoE<sup>-/-</sup>マウスに CAPs を曝露 ( $110 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、6 時間  $\times$  5/週  $\times$  ~5 ヶ月) した実験では、心臓自律神経系活動の曝露初期の亢進とその後の低下が示されている (Chen と Hwang (2005))。同じモデルマウスに CAPs を曝露 ( $133 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、6 時間/日  $\times$  5 日/週  $\times$  5 ヶ月) した実験では、明瞭な徐脈が出現した (Hwang ら (2005))。また、同様の実験系で心拍数の減少は CAPs の日間変動に連動して変化している (Lippmann ら (2005b))。

冠動脈凝固閉塞による心筋梗塞モデルラットでは、PM<sub>2.5</sub> ( $350.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) の吸入曝露後 10 分で期外収縮や房室ブロックが出現したが、とくに曝露前から期外収縮が多い個体は曝露によって期外収縮の発現が明らかに多くなった (Wellenius ら (2004))。同様の他の心筋梗塞モデルラットの実験では、ROFA の曝露 ( $3.42\text{mg}/\text{m}^3$ 、1 時間) によって期外収縮の著明な増加 (141%) が認め

られている (Wellenius ら (2002))。

CAPs ( $73\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) の SHR への曝露によって、曝露開始後 4 時間以内の観察で軽度の血圧低下がみられている (Nadziejko ら (2002))。高齢 F344 ラット (18 ヶ月齢) への CAPs 曝露 ( $160, 200\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; 4 時間) によって、期外収縮と徐脈が明瞭に出現している。SHR に DE を曝露 (0, 30, 100, 300,  $1,000\mu\text{g}/\text{m}^3$ ; 6 時間/日  $\times$  7 日間) した実験では、軽度の期外収縮と明瞭な頻脈、PQ 間隔の延長が認められている (Campen ら (2003))。SHR 及び正常ラット (WKY ラット) に ROFA ( $15\text{mg}/\text{m}^3$ ) を曝露した実験では、WKY ラットでは曝露による心電図影響はなかったが、SHR では ST 分節の低下が現れた (Kodavanti ら (2000))。正常 Wistar ラットにオタワ標準粉じん (EHC-93  $48\text{mg}/\text{m}^3$ ) を曝露した実験では、曝露中及び曝露終了後に心拍数増加 (頻脈) 及び血圧上昇が認められた (Vincent ら (2001))。

循環機能の変化は、気管内投与実験においてより明瞭に出現している。PM<sub>2.5</sub> ( $2.0\text{mg}/0.3\text{ mL saline}$ ) を心筋梗塞モデルラットに投与すると、10 分後に明瞭な期外収縮と徐脈が出現している (Kang ら (2002))。モノクロタリン肺高血圧症ラットに ROFA ( $0.25\sim 2.5\text{mg}$ ) を投与した実験では期外収縮、房室ブロック、徐脈が明瞭に発現している (Campen ら (2000))。高濃度曝露では投与後 24 時間目においても心拍数の減少は回復していない。モノクロタリン肺高血圧症ラット及び SHR に ROFA ( $0.25, 1.0, 2.5\text{ mg}/0.3\text{ mL saline}$ ) を投与した実験では、SHR で明瞭な期外収縮と徐脈が出現している (Watkinson ら (2000))。この実験では正常ラットにおいても徐脈と期外収縮が出現したが、発現性は疾患モデルラットで強く生じており、肺高血圧症ラットでは死亡率が上昇した (50% 上昇)。SHR の心臓障害は肺高血圧症ラットよりも弱かった。Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、NiSO<sub>4</sub>、VSO<sub>4</sub> の肺高血圧症ラットへの投与では明瞭な期外収縮と NiSO<sub>4</sub>、VSO<sub>4</sub> では明瞭な徐脈が認められている (Campen ら (2002))。

日本国内の実験では、正常ラットのほかに SHR、高齢ラット、ドキシソルビシン投与心不全マウス、ラット等が疾患モデル動物として用いられ、PM<sub>2.5</sub> あるいは DE の吸入曝露実験がなされている。また正常モルモットに対するキニジン誘発不整脈の発現性も観察している。キニジン誘発不整脈実験では、一部の実験の曝露群では QT 間隔の延長傾向が認められたが、再現性が乏しい。これらの国内研究報告では、曝露によると思われる特異的な循環機能 (心電図、血圧) 変化はほとんど見出されていない。

上記の各種の疾患モデル動物を用いた実験成績を俯瞰した場合、冠動脈の閉塞による心筋梗塞モデル動物及びモノクロタリン誘発肺高血圧症モデルにおいてとくに徐脈や不整脈といった心機能異常が現れやすいように見受けられる。心筋梗塞モデル動物では、虚血心筋部位と正常心筋部位との間で不整脈誘発の受感性が異なることや心不全による酸素供給能の低下等が感受性亢進の要因として考えられ、肺高血圧症モデル動物では右心負荷による心臓への負担の増大

やそれに伴う心臓内の各種の内因性物質（サイトカインやエンドセリン等）の変化が関与する可能性が考えられる。

#### 5.3.3.8. 複合大気汚染により影響の増悪が生じる

Ulrich ら (2002)はオタワ標準粉じん (EHC-93) を  $O_3$  曝露したラットまたは  $O_3$  曝露を行っていないラットに気管内投与 (0.1、1.5、5mg) し、生理食塩水の投与との比較を行っている。その結果、 $O_3$  曝露の有無にかかわらず、投与の2日後に血漿フィブリノゲンが20%増加したことを報告している。Watkinson 一派 (Watkinson ら (1997)、Watkinson ら (2001)、Campen ら (2000)) は、ROFA の気管内投与による生体反応が  $O_3$  の前曝露や寒冷環境飼育のストレスによってどのような修飾を受けるかについて研究を行っている。これらの前処置を行った動物では ROFA の気管内投与によって徐脈、不整脈及び体温低下が無処置にくらべてより強く起こることを明らかにしている。微小粒子状物質以外の要因による複合影響に関する研究は少ないが、肺への  $O_3$  や寒冷ストレス（交感神経緊張亢進）が ROFA 等の心血管系作用を高める可能性は否定できない。