

(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

要旨

大気環境中の微小粒子状物質濃度が虚血性心疾患と関連性があるとの報告があることから、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。

実験動物は、11 週齢の雄性ラットで SHR の対照群として Wistar/Kyoto ラット (WKY) を用いた。CAPs 曝露の少なくとも 5 日間前に心電図測定用に第 II 誘導が行えるよう皮下に電線の植え込みを行った。曝露は 5 時間の連続曝露で、同時に除粒子対照群と比較した。Penh は曝露前、曝露終了後、曝露終了 24 時間後に測定し、心電図は曝露前より 5 時間の曝露中、曝露終了後、さらに曝露終了 24 時間後に測定を行った。一回の曝露は、CAPs 曝露チャンバー内に SHR、WKY を各 2 匹ずつ入れて行い、コントロールチャンバーも同様のラットを用いて比較した。測定はすべて無麻酔、無拘束下で行った。血液凝固系の指標に関しては、すべての測定終了後、腹腔静脈より採血を行い血液凝固系の指標である APTT (活性トロンボプラチン時間)、PT (プロトロンビン時間)、PT 活性、フィブリノゲンの測定を行った。

各実験回での CAPs 曝露結果では、心電図測定から R-R 間隔の延長すなわち心拍数の減少、副交感神経活動の指標である HF (High Frequency) 成分の増加、Penh の上昇が観察されたが、これまでの各実験をまとめてプール解析 (重回帰分析) を行い、CAPs 曝露の有無と生体影響指標の関連性について検討を行った。

循環器への影響を検討するために用いた指標のうち、副交感神経活動の指標とされている HF 成分は、曝露開始 30 分後から時間経過にかかわらず CAPs 曝露群で高い傾向を示し、曝露開始 5 時間後で除粒子対照群に対して明らかに高値を示した。交感神経活動の指標とされている LF (Low Frequency) /HF 成分の変化は、曝露との関連性が見いだされなかった。心拍数は、CAPs 曝露群が除粒子対照群に対してより減少傾向を示した。Penh は、CAPs 曝露群が高い傾向を示した。

以上より、SHR と WKY を用いた CAPs 曝露の影響は、副交感神経活動を増加させ、心拍数を減少させる可能性があることが示された。これらの結果は、CAPs 曝露前に行った、気管内投与の結果と同様の傾向を示した。

(7. 1) 背景・目的

大気環境中の微小粒子状物質の濃度と虚血性心疾患による死亡率に関連性があることが示唆されており、もともと循環器疾患を持つヒトが、こうした物質に対する感受性が高いとの報告もある。そこで、循環器にリスクを持つモデル動物として SHR とその対照群である WKY を用いて、微小粒子状物質の影響について検討した。SHR は成長とともに高血圧を呈する疾患動物モデルであり、生後しばらくは、正常血圧ラットと同程度の血圧値を示すが、生後 8 週を過ぎる頃より血圧上昇を認めるようである。したがって、正常血圧ラットと比較して、心臓血管系への CAPs 曝露の影響が鋭敏に現れることが予測された。すでに、病態モデル動物として確立され広く使用されていることから正常血圧ラットとの比較も容易であった。

一方、ヒトにおいてはすでに自律神経と虚血性心疾患及び心臓突然死のリスクは関連性があるとされており、突然死をもたらす重要な誘因の一つが自律神経のバランスにあるといわれている。このような自律神経のバランスの指標として心拍変動スペクトル解析 (HRV) が有効である。これより SHR を用いて心電図を測定し、R-R 間隔から HRV の解析を行い、自律神経活動の変化を検討することが適切であると考えた。また、CAPs 曝露により気道炎症反応の増悪の報告がされていることから呼吸器の指標として Penh も測定した。

呼吸器、循環器への麻酔の影響を除くため、曝露及び測定はすべて無麻酔、無拘束下で行うこととした。

(7. 2) 方法

(7. 2. 1) 曝露実験

SHR と対照群である WKY をそれぞれ 10 週齢で購入し、少なくとも 1 週間の観察を行った後、ネンプター麻酔 (45mg/kg ip) 下で皮下に第 II 誘導で心電図測定ができるよう電線を埋め込んだ。少なくとも 5 日間の回復期間をおいた後、CAPs 曝露施設において連続 5 時間の曝露を無麻酔、無拘束で行った。平成 15 年度より開始し平成 18 年度まで 16 回行った CAPs 曝露の時期は 11 月から 1 月であり、常に午前 11 時前後から連続 5 時間曝露を開始した。

各実験で行った動物群は以下の 4 種であり、曝露チャンバー内に SHR、WKY をそれぞれ 2 匹ずつ入れて曝露を行った。対照群のチャンバーは清浄空気を同様の動物に吸入させて比較した。

- ①SHR CAPs 曝露群
- ②SHR 除粒子対照群
- ③WKY CAPs 曝露群
- ④WKY 除粒子対照群

心電図測定は曝露チャンバー内で行い、R-R 間隔を測定した。また、R-R 間隔の短縮あるいは延長は、心拍数の変化として表現されることから心拍数も指標として検討を行った。測定した心電図の R-R 間隔から周波数解析を行い、0.27~0.7Hz 成分を LF、0.75~3Hz 成分を HF とし、HF 成分を副交感神経活動、LF/HF を交感神経活動の指標として評価した (フラクレット Jr.2 大日本製薬社) (図 3.7.2-1)。心電図測定は曝露開始 30 分前から開始し、5 時間の曝露中、曝露終了後 30 分間まで連続的に測定し、曝露終了後 24 時間目の測定を翌日に行い解析した。曝露中の解析は、曝露開始後 30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、4.5 時間、5 時間目の連続した 5 分間の心電図測定をもとに行った (図 3.7.2-2)。また、心電図測定において、QRS 波の延長は心室内伝導時間の延長を意味し、脚ブロックや心室内ブロック、心室性機外収縮などでみられることから、QRS 波の解析も行った。

呼吸器の指標として、Penh を曝露前後及び曝露終了 24 時間後の 3 回、Whole Body Plethysmograph で測定した (Baxco 社製)。測定はラットが環境に慣れるのを待ち、原則として 5 分間の呼吸を連続測定して解析を行った (図 3.7.2-3)。また、平成 16、17 年度には、血液凝固系の指標として、APTT(活性トロンボプラチン時間)、PT (プロトロンビン時間)、PT 活性、フィブリンの測定を行った。心電図ならびに Penh の測定終了後、復腔静脈より採血を行い、それぞれ分析を行った。

(7. 2. 2) 統計解析

上記で示した各生体影響指標別に、CAPs 曝露群と除粒子対照群間の生体影響指標差に着目し、各実験回ごとの解析及び全実験回 (平成 15 年度から 18 年度までの計 16 回) をプールした解析 (共分散解析) を行い、CAPs 曝露有無と各生体影響指標との関連性について検討した。

さらに CAPs 曝露時の CAPs 粒子濃度、炭素濃度、重金属濃度、イオン濃度を分析し、各濃度と HF 成分及び心拍数変化との関連性についても検討を行った。

(7. 3) 結果

(7. 3. 1) CAPs 曝露濃度

本 CAPs 曝露実験時の CAPs 質量濃度及び主要成分濃度は表 3.7.3-1 に示すとおりである。

本調査の CAPs 曝露濃度は $128 \sim 3,388 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、各曝露実験時の CAPs 質量濃度は平成 15 年度から 17 年度にかけて低下傾向であったが、平成 18 年度は増加した。

(7. 3. 2) CAPs 曝露時の運転状況

本 CAPs 曝露実験時の CAPs 曝露時間等の運転状況は表 3.7.3-2 に示すとおりである。

本調査では 10 時前後より 5 時間連続曝露を基本としているが、CAPs 曝露システムのトラブル

等はなく、ほぼ連続運転が行えた。

なお、CAPs 曝露実験時は CAPs 曝露チャンバー及び除粒子対照群チャンバーを設置している動物曝露室は照明を使用している。また、曝露実験にあたって実験動物の明期・暗期のコントロールは行っていない。

(7. 3. 3) 生体影響指標変化

循環器の指標としての HRV について、HF 成分は呼吸によって生じる副交感神経活動が原因と考えられ、LF 成分は交感神経活動と副交感神経活動の両方に影響を受けるため、両者の比である LF/HF を交感神経活動の指標として用いることとした。

第 1 回目から第 4 回目まで（平成 15 年 11 月 5 日・7 日、18 日・21 日、平成 16 年 11 月 16 日・18 日、平成 17 年 1 月 18 日・20 日）の実験の HF 成分と心拍数の変化について示す（図 3.7.3-1～2）。副交感神経活動の指標とされている HF 成分は、SHR、WKY とも曝露開始 2 時間経過する頃より対照群に比べ増加傾向を示したが、SHR への影響が強く出る可能性が認められた。R-R 間隔も HF 同様、SHR において曝露開始 2 時間を経過する頃から明らかな延長を示した。計 16 回の実験をプールした結果、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 が高値を示した（図 3.7.3-3）。また、心拍数についてみると、CAPs 曝露群が除粒子対照群よりやや減少する傾向があることが示された（図 3.7.3-4）。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（図 3.7.3-5）。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 3.7.3-6）。

以上の結果は、CAPs 曝露前に行った微小粒子状物質の気管内投与の結果と同様の傾向を示すものであった。

さらに CAPs 曝露時の CAPs 粒子濃度、炭素濃度、重金属濃度、イオン濃度を分析し、濃度と HF 成分、心拍数の変化について検討した。曝露濃度と生体影響指標に明らかな関連性は認められなかったが、曝露開始 5 時間後と曝露終了直後に曝露濃度が高いほど HF が増加する可能性が考えられる例が見られた（図 3.7.3-7～11）。

なお、第 3 回目から第 6 回目まで（平成 16 年 11 月 16 日・18 日、平成 17 年 1 月 18 日・20 日、12 月 13 日・15 日、平成 18 年 1 月 24 日・26 日）の実験で、血液凝固系の指標として APTT、PT、PT 活性、フィブリノゲンの測定を行ったが、SHR、WKY ともいずれの測定値も基準値内の値で、曝露による影響は認められなかった（表 3.7.3-3）。

(7. 4) 考察

これまでの検討から、微小粒子状物質が気道内へ実験的に直接投与された場合においても、心電図への影響として、わずかではあるが R-R 間隔の延長すなわち心拍数の減少の傾向、副交感神経活動の指標である HF 成分の増加、Penh の増加する傾向が観察された。

動物は連続曝露中、同一の環境下で落ち着いた状態にあることを観察した。また、除粒子対照群も HF の増加と R-R 間隔の延長が認められ、動物が安定した状態にあることが予測できた。

SHR に CAPs 曝露をさせた例として Nadziejko らの報告[1]があるが、今回の結果と同様の心拍数の減少を報告している。正常マウスを用いた Hwang ら[2]、ノックアウトマウスを用いて長期曝露した Chen LC ら[3]の報告も曝露初期に心拍数の減少が認められたと報告している。また、犬を用いた Godleski の報告[4]においても曝露による脈拍数の減少を観察しており、動物の種類によらずわれわれと同様の結果を示している。一般に、気道内へ異物が吸入されると気道内に存在する irritant receptor を刺激して引き起こされる肺迷走神経反射の結果、呼吸数の増加あるいは一回換気量の増加、心拍数の減少などが生じることが知られている。今回の CAPs 曝露により生じた HF 成分の増加、さらに心拍数の減少は、気道内へ吸入された微小粒子状物質が気管内の irritant receptor を刺激して引き起こした肺迷走神経反射の影響を受けた可能性も考えられる。しかし同時に肺胞毛細血管から血液に移行した微小粒子が、到達した心臓あるいは神経系に影響を与えている可能性も否定できず、今回の実験から経路について言及することには困難がある。

一般的に副交感神経が緊張することにより、洞房結節や房室結節など心臓の刺激伝導系への抑制をもたらす、徐脈性不整脈を誘発する可能性があると言われてしている。しかしこの副交感神経の緊張は、心室性不整脈には通常抑制的に働き、交感神経に拮抗する形で致死性不整脈を抑制していることが予測される。今回の結果から、副交感神経活動が増加を示したことはラットの自律神経系にある程度予備能力がある状態と推測されたが、これは動物の週齢が比較的若いことが影響しているものと考えられる。加齢により予備力が失われると不整脈を頻発するなど、これまで報告されている変化につながる可能性もあり今後検討する必要がある。

いずれにしても副交感神経活動の指標である HF 成分の増加、R-R 間隔の延長による心拍数の減少、Penh の増加は、気道内投与と同様の結果が観察され、CAPs 曝露が自律神経活動に影響をおよぼす可能性があることがみいだされた。

われわれのこれまでの気管内投与の検討から、明らかに SHR が影響を受けやすい結果が得られている。CAPs 曝露は気管内投与と実験条件は異なるが、同様の物質が気道に入ることから、副交感神経活動を介し、心拍数や Penh への影響を受けやすい可能性も推測される。

CAPs 曝露成分濃度と曝露により生じた影響との関連性については、明らかではなかった。しかし、CAPs 曝露により HF が増加した曝露開始後 5 時間目の CAPs 曝露粒子濃度と HF の関連に粒子濃度が高いほど HF が増加する可能性が考えられた。計 16 回行われた CAPs 曝露粒子濃度は、全般的に高い濃度とは言えず、また実験は単回 5 時間の急性曝露であったことから、今回の結果になったものと考えられた。さらに、曝露が長期にわたる場合、あるいは濃度が高い場合などでの検討が必要と考えられる。

(7. 5) 結論

循環器に与える影響について心電図測定を行い、R-R 間隔から HRV について検討し、CAPs 曝露により、副交感神経活動の指標である HF の増加、心拍数の減少傾向が認められた。交感神経活動の指標である LH/HF には曝露の影響は認められなかった。呼吸器の指標である Penh は曝露により増加傾向を示した。以上の影響は、SHR に強く出る可能性があった。血液凝固系の指標には CAPs 曝露の影響は出なかった。上記の指標と曝露粒子濃度との関連性については、明らかとは言えなかった。しかし、濃度が高いほど影響が出る可能性が考えられる例もあった。今回の検討は、5 時間の単回急性曝露であり、長期曝露により CAPs 曝露影響がさらに明らかになる可能性があると考えられた。

引用文献

- 1 Nadziejko C, Fang K, Nadziejko E, Narciso SP, Zhong M, Chen LC, Immediate effects of particulate air pollutants on heart rate and respiratory rate in hypertensive rat. *Cardiovascular Toxicology* 2002; 2:4:245-252
- 2 Hwang JS, Nadziejko C, Chen LC Effect of subchronic exposure to concentrated ambient particles (CAPs) in mice, III, Acute and chronic effects of CAPs on heart rate, heart-rate fluctuation, and body temperature. *Inhalation Toxicology* 2005; 17:4-5:199-207
- 3 Chen LC, Hwang JS, Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. IV Characterization of acute and chronic effects of ambient air fine particulate matter exposures on heart-rate variability. *Inhalation Toxicology* 2005; 17:4-5:209-216
- 4 Godleski JJ, Verrier RL, Koutrakis P, Catalano P, Coull B, Reinisch U, Lovett EG, Lawrence J, Murth GG, Wilfson JM, Clarke RW, Nearing BD, Killingsworth C, Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient particles. *Res Rep Health Eff Inst* 2000; 91:5-88

表 3.7.3-1 CAPs 曝露濃度 (質量濃度及び主要成分濃度)

単位: $\mu\text{g}/\text{m}^3$

年度	月日	質量濃度		炭素濃度		主要イオン成分		
		PM2.5	CAPs	有機炭素	元素状炭素	NO_3^-	SO_4^{2-}	NH_4^+
15	11月5日	46	1,495					
	11月7日	81	3,388					
	11月18日	36	661					
	11月21日	33	893					
	平均	49	1,609					
16	11月16日	24	784	78	98	210	110	56
	11月18日	34	1,081	220	130	220	89	70
	1月18日	10	204	84	50	300	140	98
	1月20日	8	372	90	28	27	61	17
	平均	19	610	118	77	189	100	60
17	12月13日	9	128	(32)	26	16	15	8.9
	12月15日	18	316	65	47	62	44	35
	1月24日	16	192	(54)	55	29	21	15
	1月26日	18	444	63	56	46	140	62
	平均	15	270	64	46	38	55	30
18	11月28日	12	453	(49)	53	51	69	25
	11月30日	21	1,065	130	81	160	180	110
	12月12日	22	995	200	85	120	57	91
	12月14日	33	1,298	150	110	280	190	140
	平均	22	953	160	82	153	124	92
4年間平均		26	861	120	68	127	93	61

※: 定量下限値未満は()表示、検出下限値未満は<表示。なお、これらの数値は平均値算出に含めない。

表 3.7.3-2 CAPs 曝露実験時の運転状況

年度	月日	CAPs曝露時間		運転状況
平成15年度	11月5日	10:20~15:20	5:00	流量調整5回
	11月7日	10:20~16:40	5:00	メンテ1回、流量調整4回
	11月18日	10:15~15:15	5:00	流量調整3回
	11月21日	10:50~15:50	5:00	連続
平成16年度	11月16日	11:25~16:25	5:00	連続
	11月18日	10:20~15:20	5:00	流量調整2回
	1月18日	11:10~16:10	5:00	連続
	1月20日	11:15~16:15	5:00	連続
平成17年度	12月13日	11:20~16:20	5:00	流量調整1回
	12月15日	10:50~15:50	5:00	連続
	1月24日	10:45~15:45	5:00	連続
	1月26日	10:50~15:50	5:00	連続
平成18年度	11月28日	10:40~15:40	5:00	連続
	11月30日	10:20~15:45	5:00	流量調整2回
	12月12日	10:30~15:30	5:00	流量調整1回
	12月14日	10:40~16:10	5:00	流量調整3回

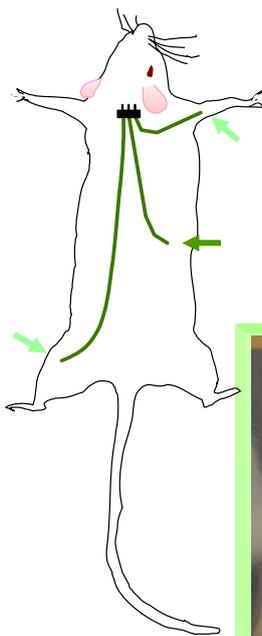
表 3. 7. 3-3 SHR 及び WKY における PM_{2.5} が血液凝固系に及ぼす影響

項目	SHR		WKY	
	除粒子対照群	CAPs曝露群	除粒子対照群	CAPs曝露群
APTT (sec)	27.3 ± 9.3 (18.0 ± 0.7)	31.3 ± 8.8 (30.9 ± 13.0)	20.4 ± 1.2 (19.2 ± 0.35)	38.9 ± 28.5 (20.0 ± 2.6)
PT (sec)	17.6 ± 1.0 (16.3 ± 1.7)	18.2 ± 1.4 (17.9 ± 2.2)	16.5 ± 0.6 (15.2 ± 0.65)	16.9 ± 0.4 (15.0 ± 0.3)
PT活性値 (%)	35.4 ± 3.1 (39.9 ± 2.2)	33.6 ± 3.8 (32.6 ± 8.1)	39.2 ± 2.5 (40.9 ± 3.1)	37.7 ± 1.5 (41.8 ± 1.5)
フィブリノゲン (mg/dl)	327.8 ± 203.0 (502.5 ± 126.6)	194.0 ± 140.0 (130 ± 80.5)	317.7 ± 27.1 (347 ± 57.4)	302.5 ± 126.6 (254 ± 110.5)

Mean ± SD

※第3～6回実験結果 (n=16)

Operation



Low frequency (LF) range
; 0.27 ~ 0.75 Hz

High frequency (HF) range
; 0.75 ~ 3 Hz

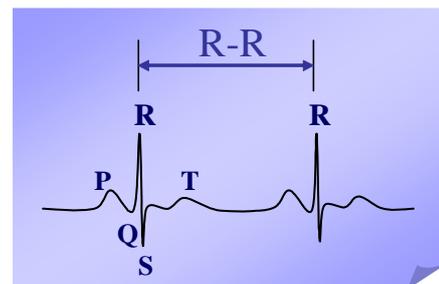


図 3. 7. 2-1 心電図測定方法

Protocol

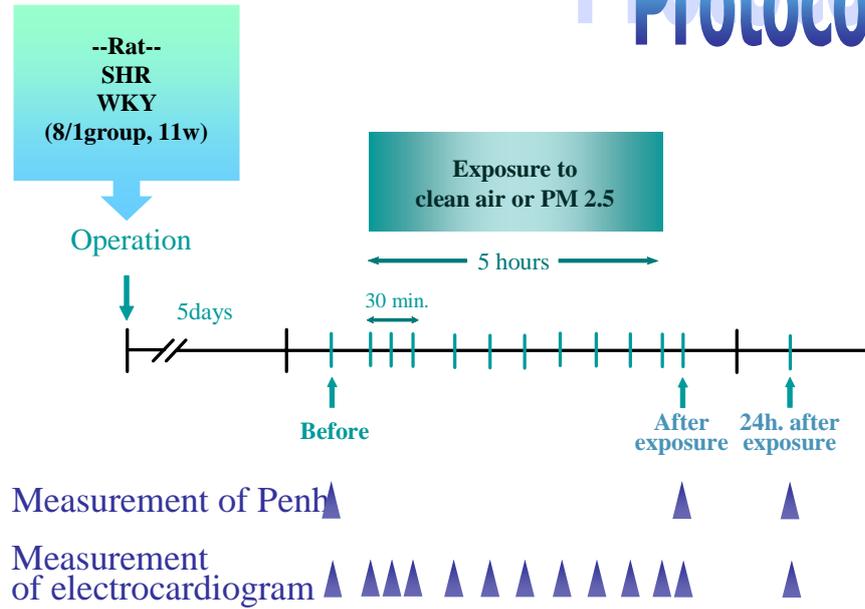
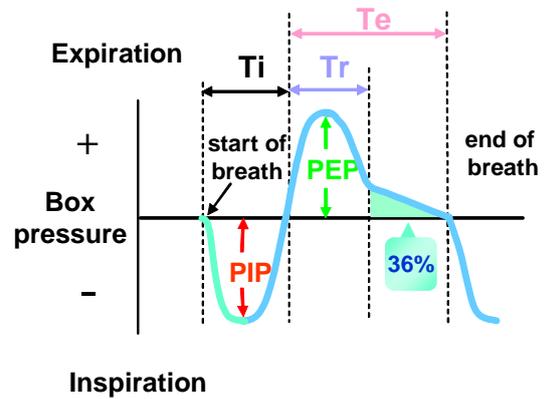
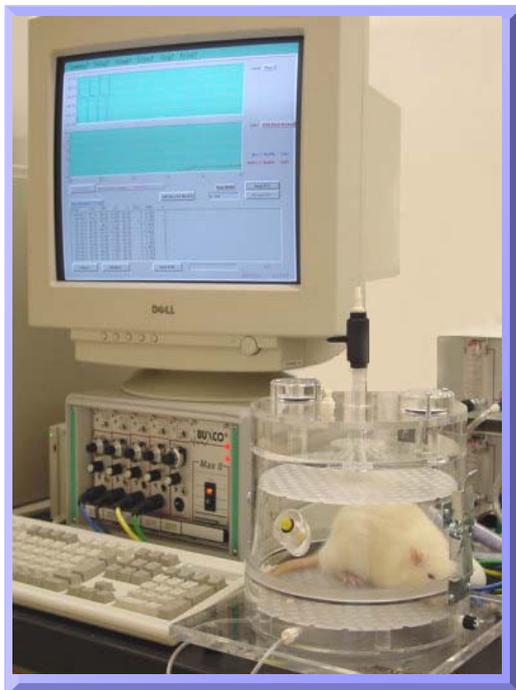


図 3. 7. 2-2 実験プロトコール



$$\text{Penh (Enhanced Pause)} = \text{Pause} \times \left(\frac{\text{PEP}}{\text{PIP}} \right)$$

$$\text{Pause} = \frac{(T_e - T_r)}{T_i}$$

図 3. 7. 2-3 肺抵抗測定方法

SHR HF WKY

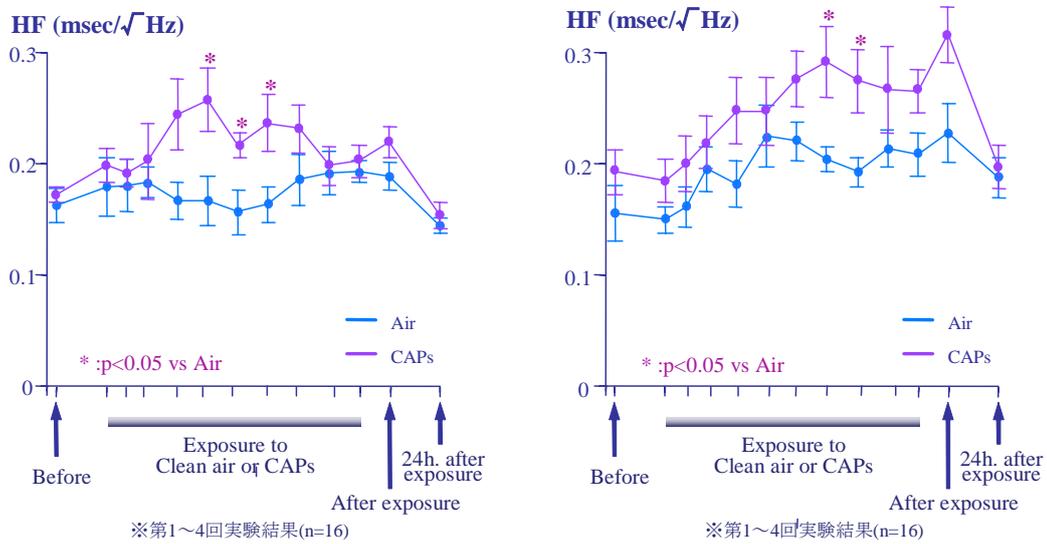


図 3. 7. 3-1 CAPs 曝露による HF 成分の影響

SHR R-R WKY

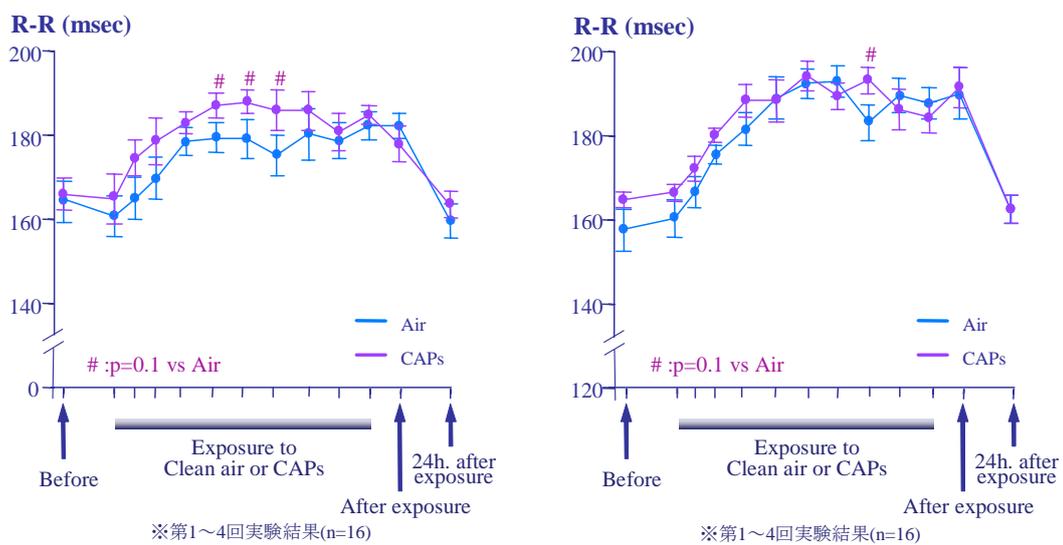


図 3. 7. 3-2 CAPs 曝露による R-R 間隔の影響

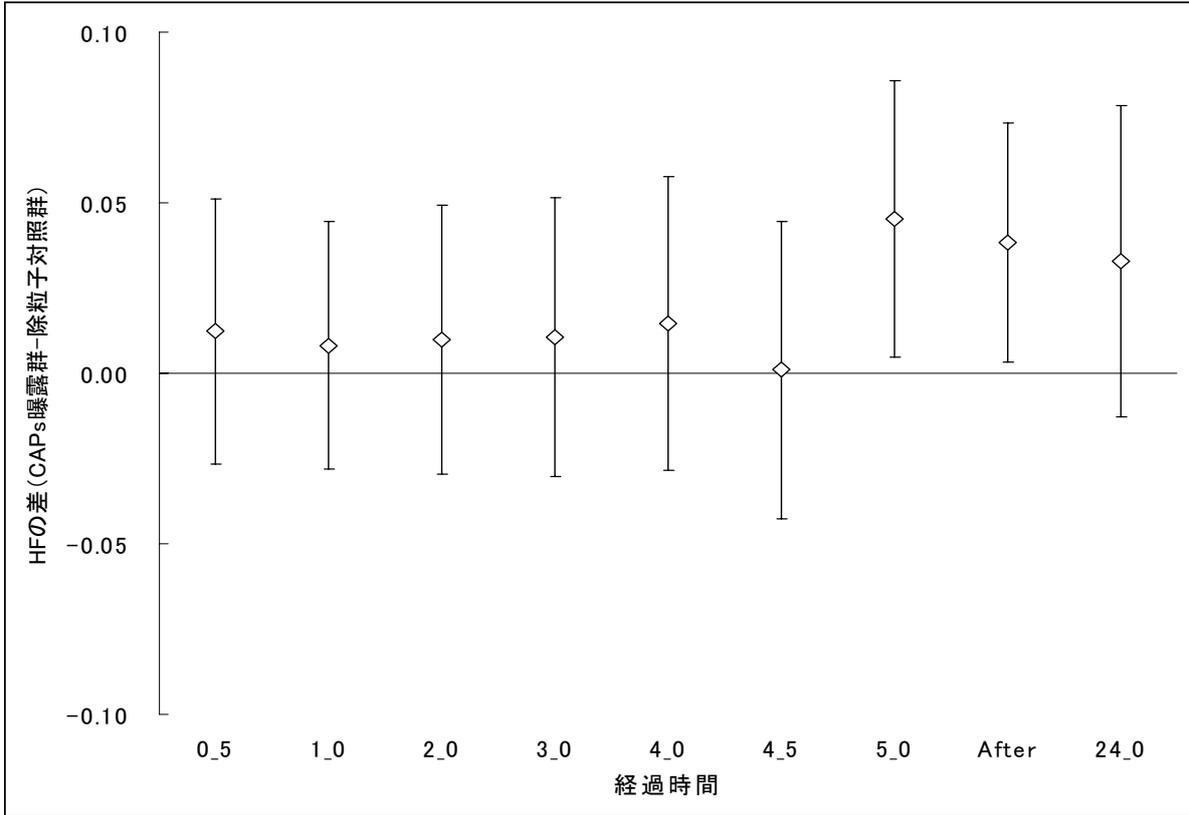


図 3.7.3-3 HF 成分の変動

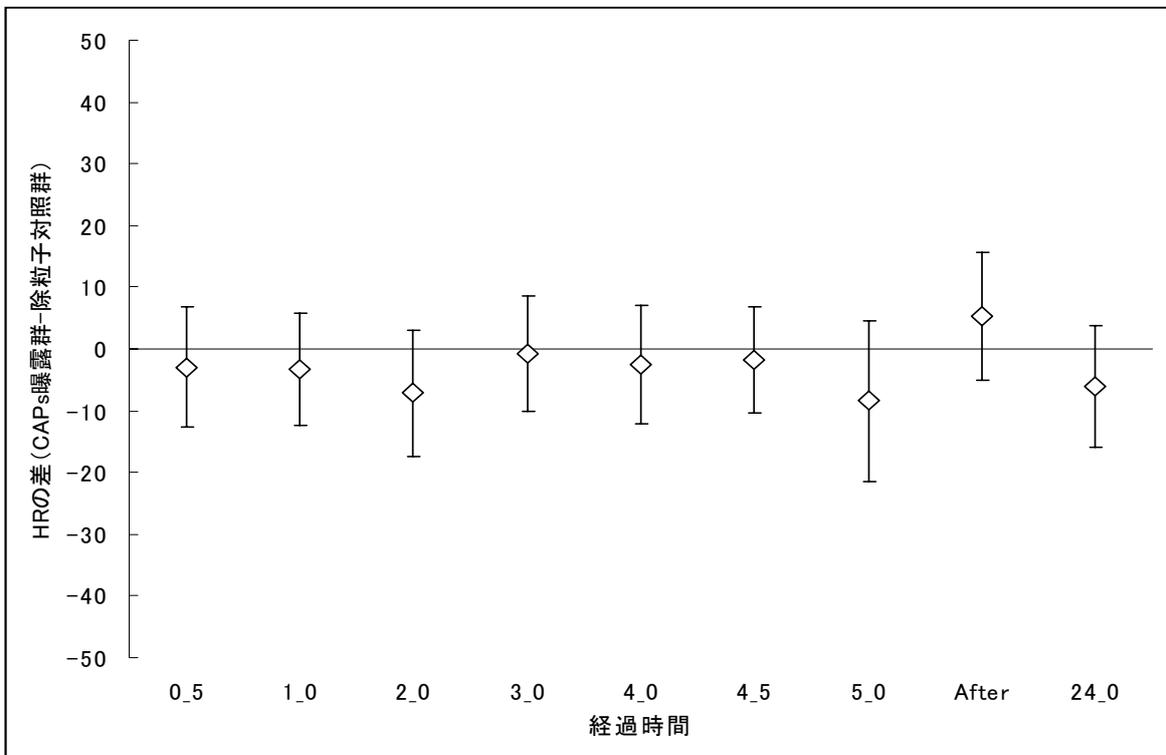


図 3.7.3-4 心拍数 (HR) の変動

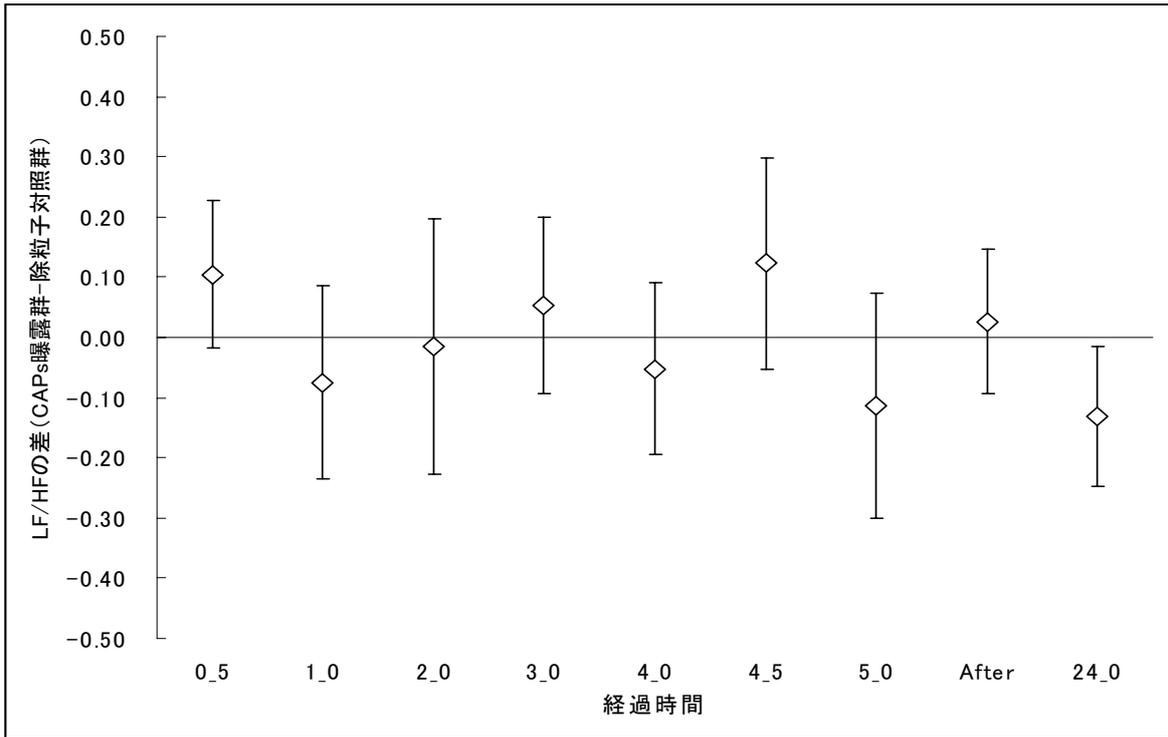


図 3.7.3-5 LF/HF の変動

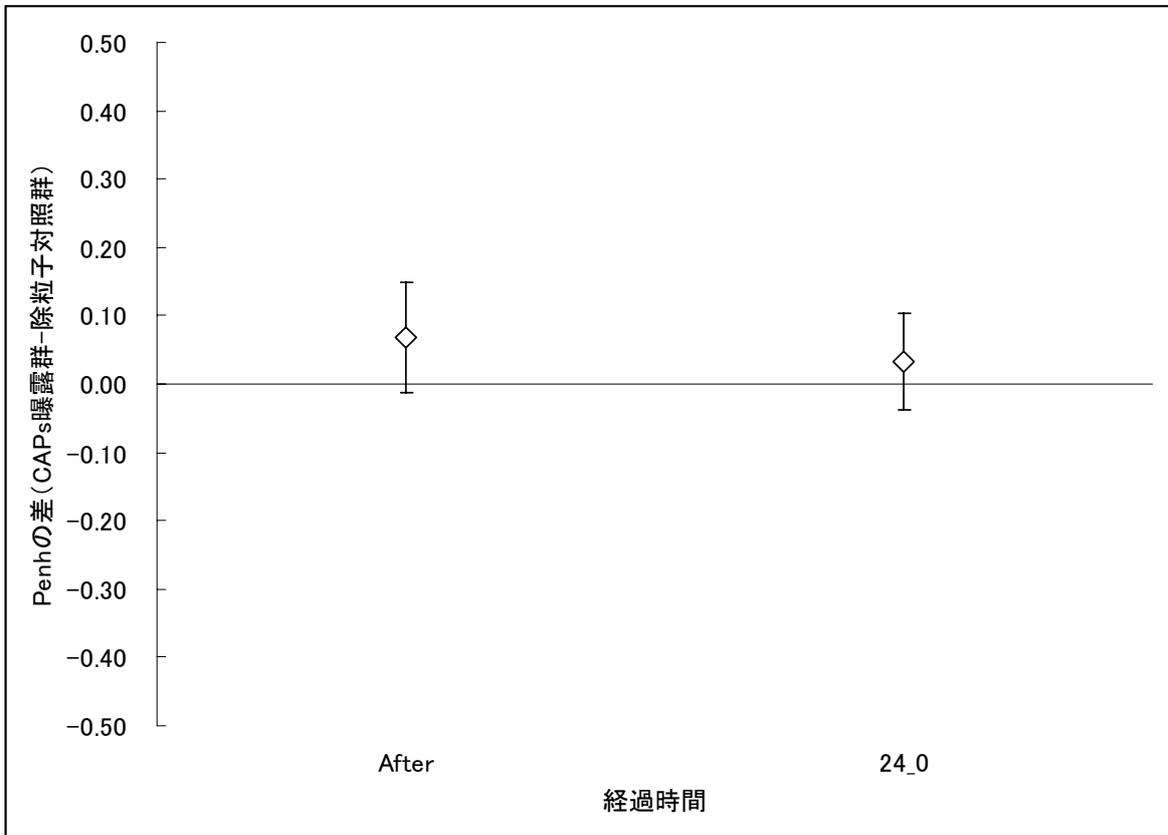


図 3.7.3-6 肺抵抗 (Penh) の変動

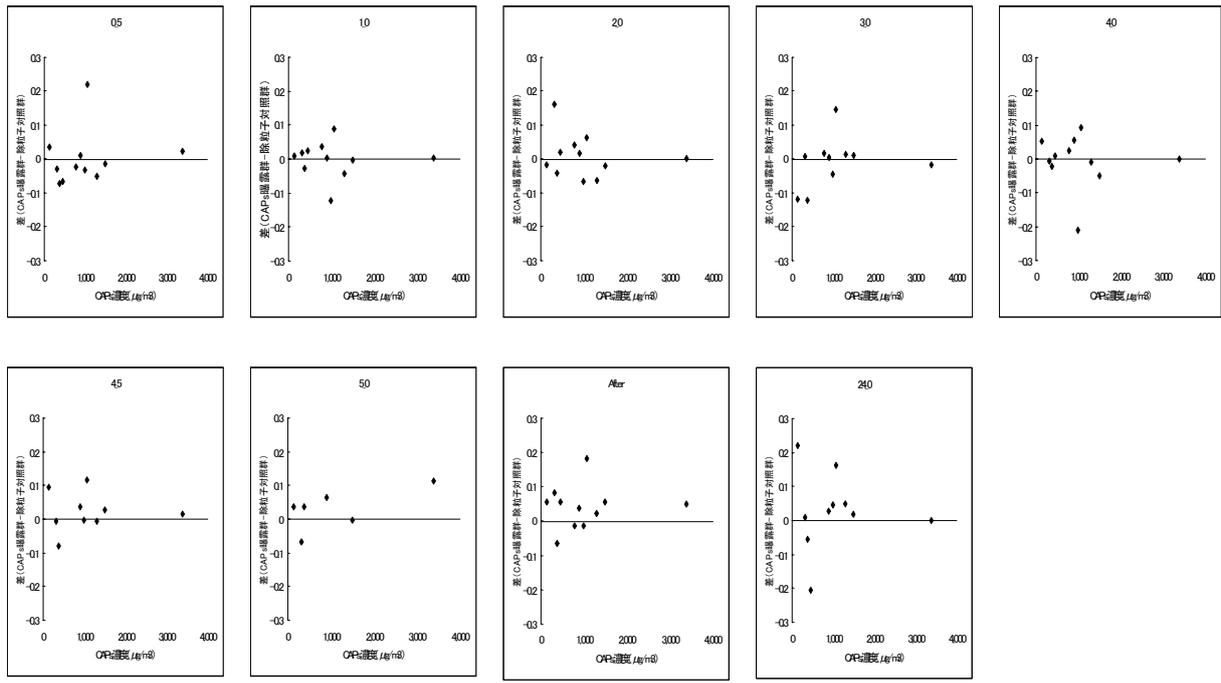


図 3.7.3-7 CAPs 濃度と HF の関係

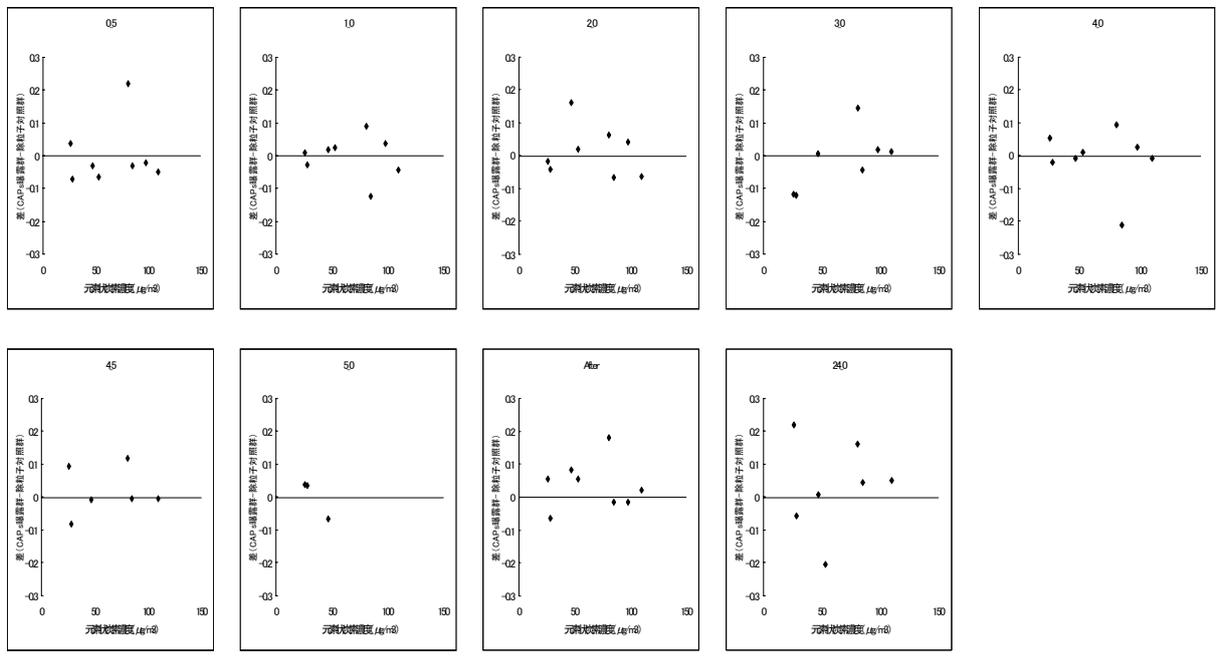


図 3.7.3-8 元素状炭素濃度と HF の関係

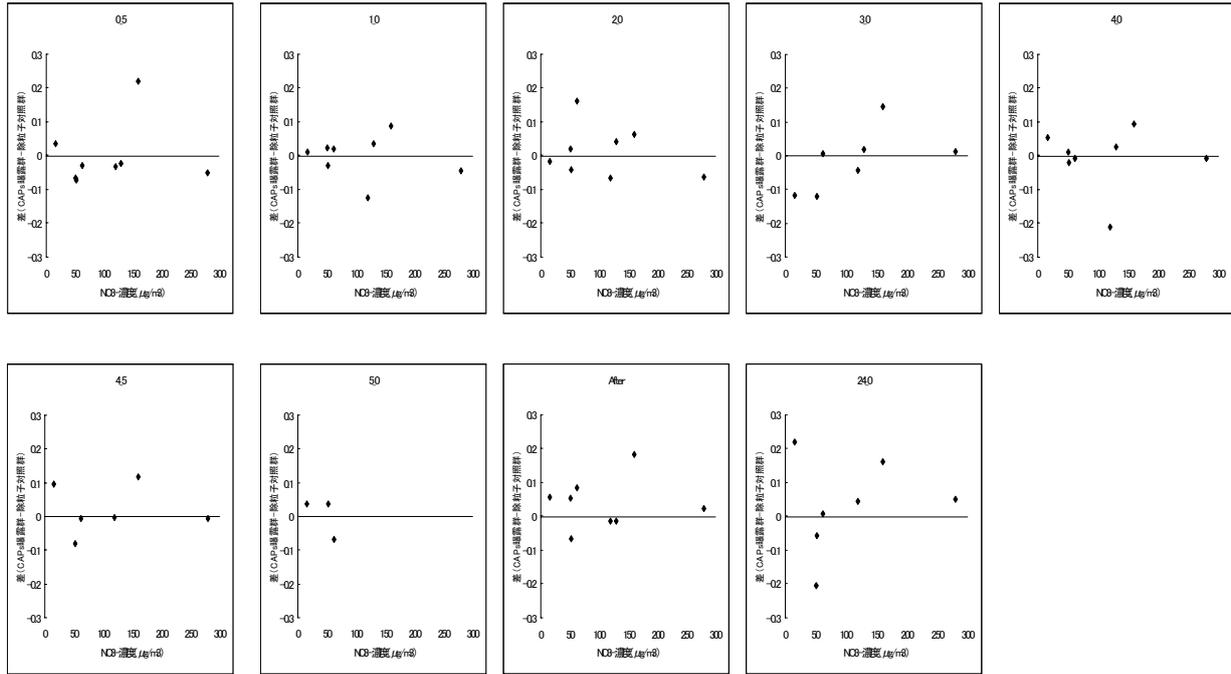


図 3.7.3-9 NO₃⁻濃度とHFの関係

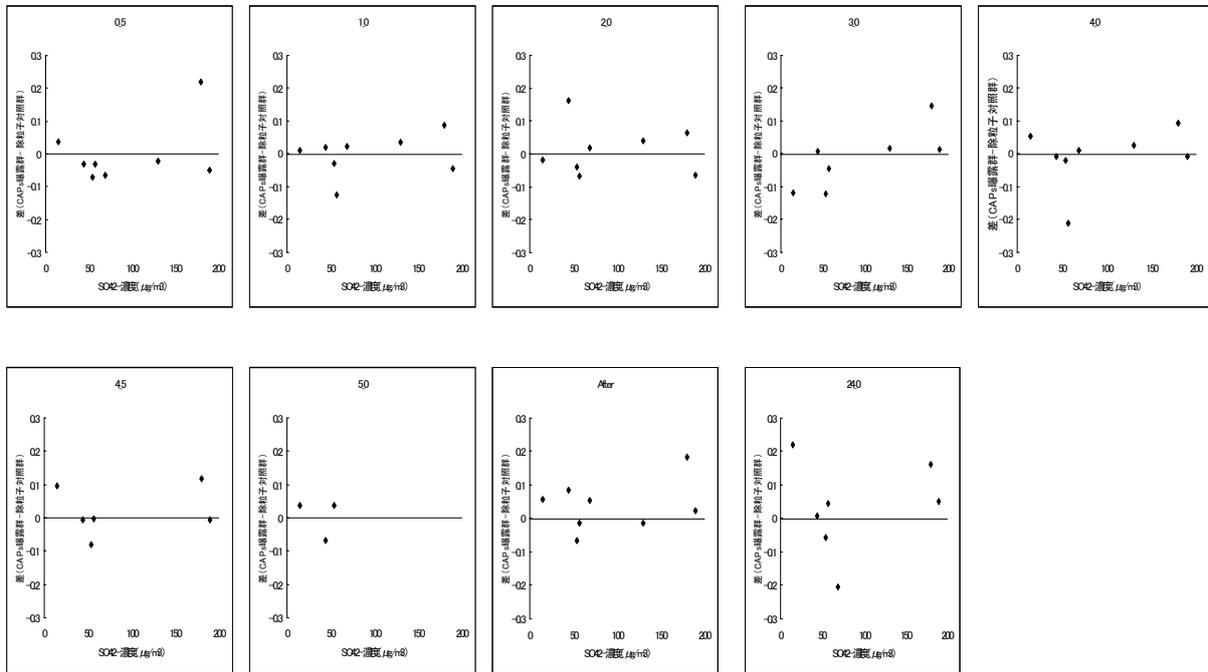


図 3.7.3-10 SO₄²⁻濃度とHFの関係

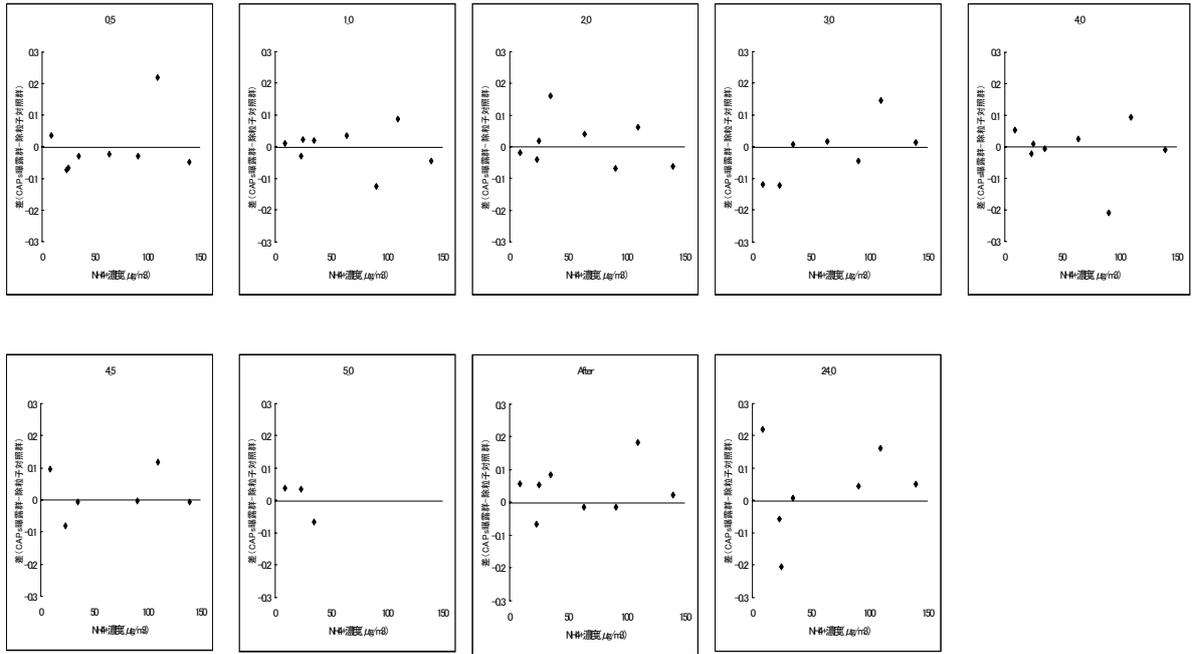


図 3.7.3-11 NH₄⁻濃度と HF の関係

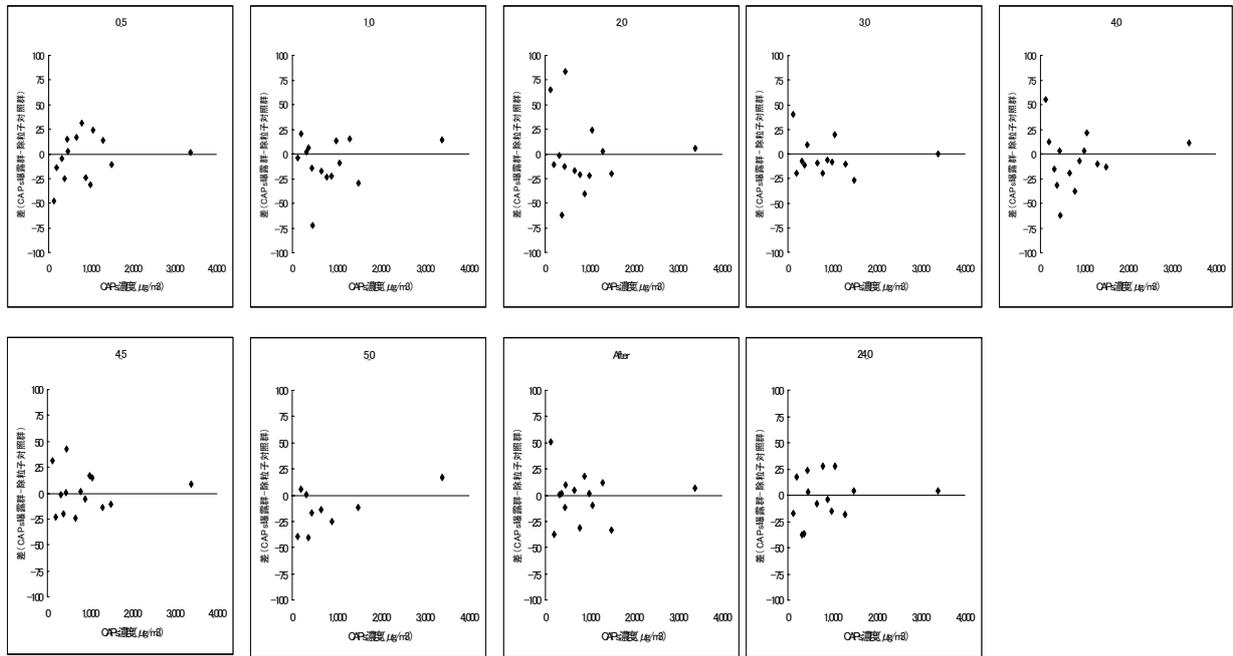


図 3.7.3-12 CAPs 濃度と心拍数 (HR) の関係

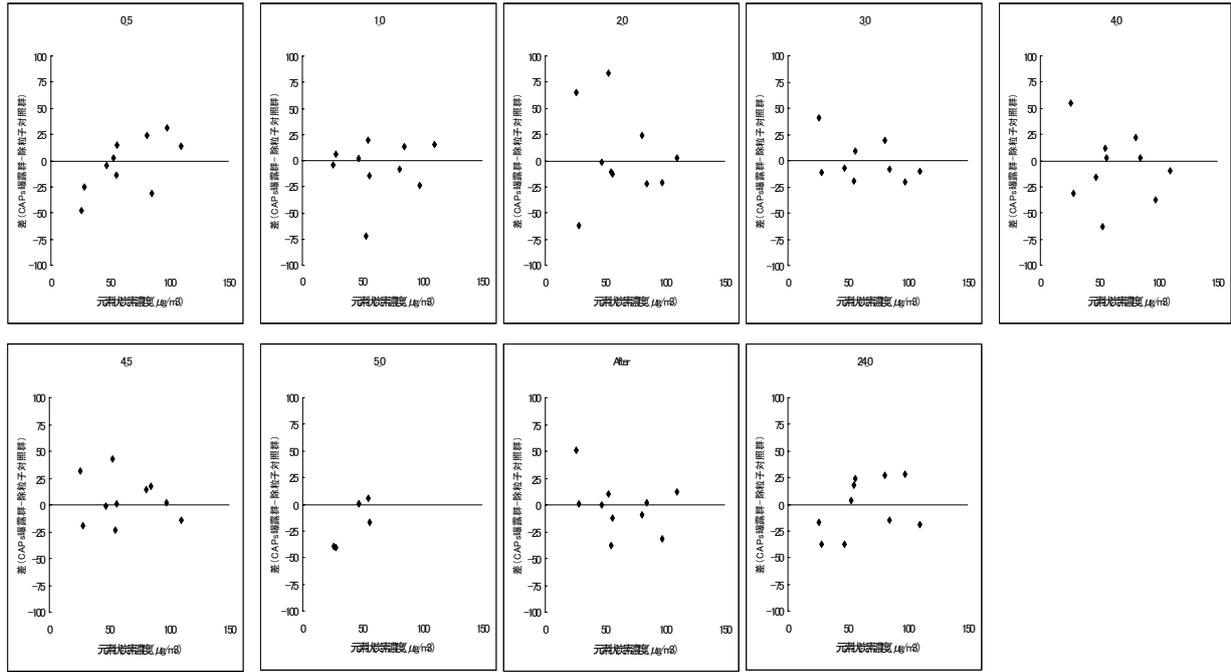


図 3.7.3-13 元素状炭素濃度と心拍数 (HR) の関係

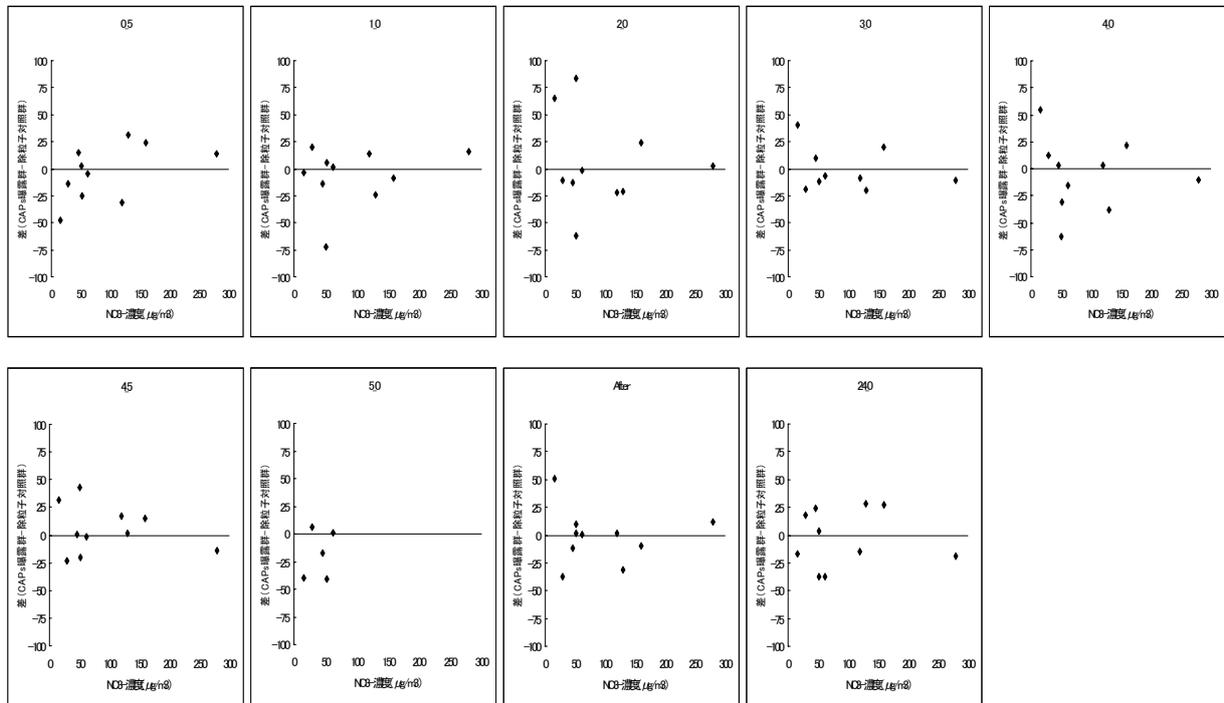


図 3.7.3-14 NO₃⁻濃度と心拍数 (HR) の関係

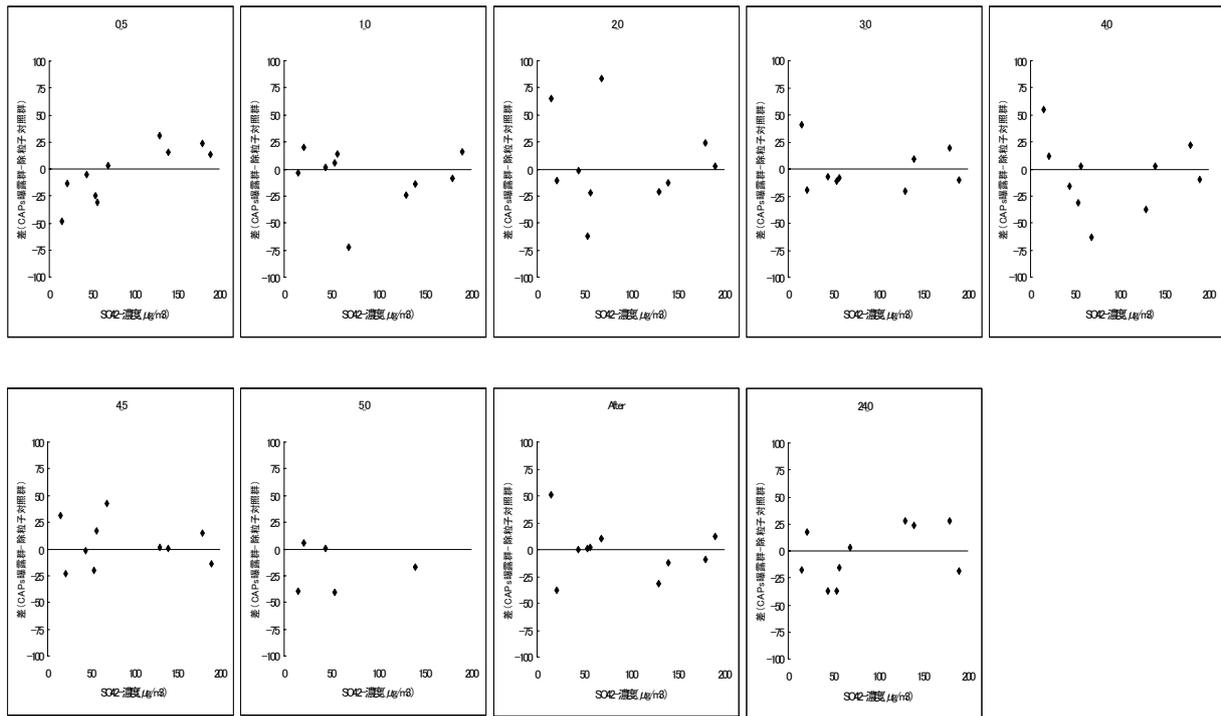


図 3.7.3-15 SO₂²⁻濃度と心拍数 (HR) の関係

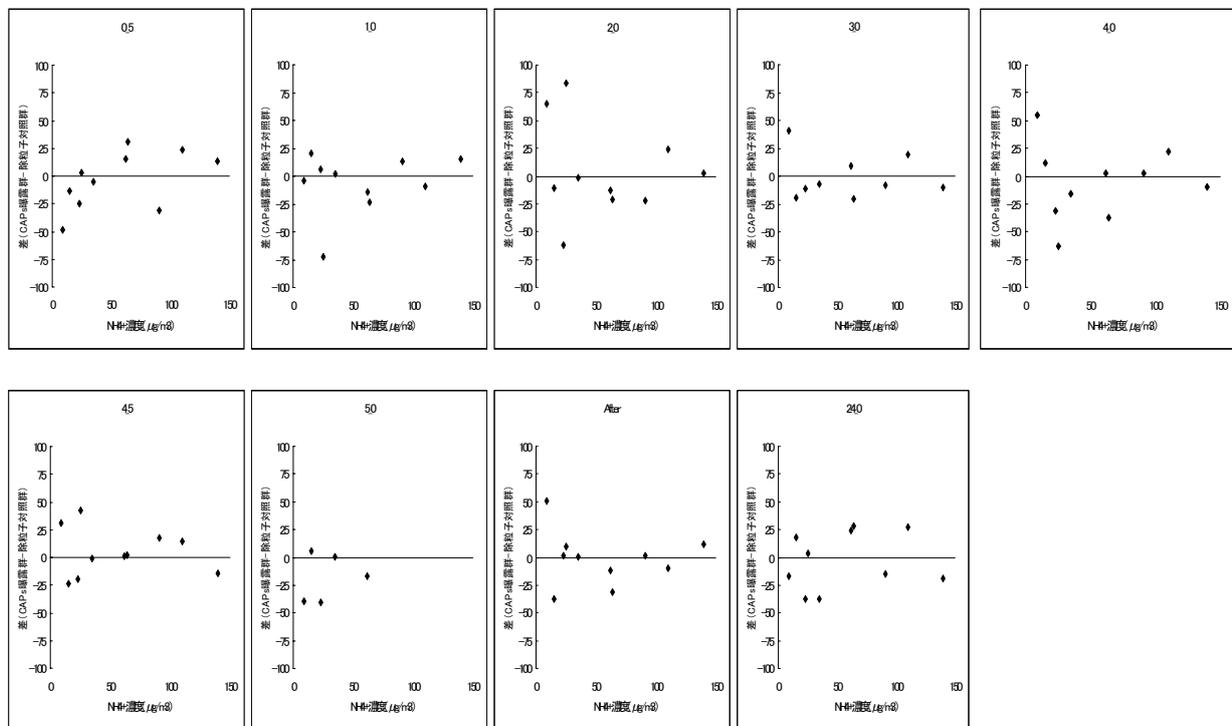


図 3.7.3-16 NH₄⁻濃度と心拍数 (HR) の関係