

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR - 47 - 2002

空中浮遊微粒子(PM_{2.5})の心肺循環器系に及ぼす
障害作用機序の解明に関する実験的研究
(特別研究)

Clarification of the mechanism of lungs and cardiovascular
dysfunction due to suspended particular matters (PM_{2.5})

平成 11 ~ 13 年度

FY 1999 ~ 2001

NIES



独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/index-j.html>

空中浮遊微粒子(PM_{2.5})の心肺循環器系に及ぼす
障害作用機序の解明に関する実験的研究
(特別研究)

Clarification of the mechanism of lungs and cardiovascular
dysfunction due to suspended particular matters (PM_{2.5})

平成 11 ~ 13 年度

FY 1999 ~ 2001

独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「空中浮遊微粒子 (PM_{2.5}) の心肺循環器系に及ぼす障害作用機序の解明に関する実験的研究」
(期間 平成 11 ~ 13 年度)

特別研究責任者：森田昌敏 (平成 11 年度), 若松伸司 (平成 13 年度), 小林隆弘 (平成 12 ~ 13 年度)
特別研究幹事：鈴木 明・高野裕久
報告書編集担当：鈴木 明

序

本報告書は平成 11 年度から 13 年度にかけて実施した特別研究「空中浮遊微粒子 (PM_{2.5}) の心肺循環器系に及ぼす障害作用機序の解明に関する実験的研究」をとりまとめたものである。

国内の車の総台数は平成 14 年度で 7,400 万台に達し、昭和 42 年度からの過去 35 年間に 3.5 倍に増加した。また、この増加と共にトラック、バスはもとより最近では自家用車からレクリエーション用の RV 車まで、燃料が安いため、ディーゼルエンジンを搭載する車が多くなってきた。ディーゼル車の微粒子、NO_x、SO_x の排出量はガソリン車などに比べて著しく多い。そのため、年々単体規制の強化にもかかわらず、大都市部の大気汚染は一向に改善されておらず、また浮遊粒子状物質 (SPM) の中に占めるディーゼル車由来の微粒子 (DEP) の割合が増加している。

最近になって、粒径が 2.5 μm 以下の SPM、すなわち PM_{2.5} と心疾患による死亡率との間に非常に高い相関性が存在することがアメリカやイギリスからの多くの疫学研究によって示され、その健康影響の重大性がにわかにクローズアップされてきた。しかし、この両者間の因果関係の実験的証明はまだなされておらず、その証明はこれからの研究にかかっている。そのため、PM_{2.5} と心肺循環器疾患との間の因果関係を実験的に明らかにすることは微粒子汚染の健康影響をより明確にしうることになる。特に、大気汚染が心臓・循環器系に及ぼす研究はこれまで、全くと言って良いほどなされていない。

そこで、このような背景を踏まえ、本研究では日本の大都市部の PM_{2.5} の主要部分を占める DEP を対象物質としてディーゼル排気の暴露実験と組織培養を含む *in vitro* の実験を組み合わせることにより、その DEP 中の物質がどのような機序で心肺循環器系に障害を及ぼしているかを明らかにすることを目的とした。このことにより、大都市部における PM_{2.5} (DEP) 汚染を低減することの緊急性と重要性を理解してもらう科学的知見を示し、環境保全のための科学的資料を提供したい。さらにディーゼル車の燃費の良さは CO₂ 削減に寄与する面があり、清浄なディーゼル車の開発普及は重要であるので、大局的にみた環境保全のためにも現在のディーゼル排気の問題点を正確に把握報告し、PM_{2.5} (DEP) ・汚染の低減のためクリーンなディーゼル機関 (エンジン) の開発をうながす助けとしたい。

なお、本研究は、最終年度の平成 13 年 4 月に、研究所の独立行政法人化に伴う大幅な機構改革に伴い、重点特別研究の「PM_{2.5}・DEP 研究プロジェクト (通称)」の毒性・影響評価研究チームに編入され、今後の研究は同プロジェクトの中で行われる予定である。

終わりに、本研究を進める上で研究所外の方々の多くの御協力と御助言を頂いた。ここに、深く感謝の意を表す。

平成 14 年 9 月

独立行政法人 国立環境研究所
理事長 合 志 陽 一

目 次

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | 研究の目的と経緯 | 1 |
| 1.1 | 研究の目的と経緯 | 1 |
| 1.2 | 研究の構成 | 2 |
| 1.3 | 大都市部における大気環境の現状ならびに粒子状物質の現状について | 2 |
| 1.4 | 浮遊粒子状物質 (SPM) および二酸化窒素 (NO ₂) の個人曝露量の推定に関する研究 | 5 |
| 2 | 研究の成果 | 8 |
| 2.1 | 循環器への影響 | 8 |
| 2.1.1 | はじめに | 8 |
| 2.1.2 | ディーゼル排気 (DE) 吸入曝露ラットにおける心電図記録および臓器の病理組織学的検索 | 9 |
| 2.1.3 | DEP の静脈内投与による血圧および心電図の変化 | 17 |
| 2.1.4 | DEP の心血管系に対する薬理学的作用 | 21 |
| 2.1.5 | DEP の摘出血管標本および摘出心筋標本に対する直接作用 | 23 |
| 2.1.6 | DEP 中のどのような物質が血管と心臓にどのような作用を持つか - 化学物質の抽出と単離 | 25 |
| 2.1.7 | DEP から抽出, 単離された化学物質 B の静脈内投与による反応 | 26 |
| 2.1.8 | DEP から抽出, 単離された化学物質 B の血管弛緩作用および心臓強縮作用の特徴 | 28 |
| 2.1.9 | 培養細胞系 血管内皮細胞に及ぼす傷害作用 | 29 |
| 2.1.10 | 肺胞上皮細胞と肺微少血管内皮細胞, 肺線維芽細胞への影響 | 30 |
| 2.2 | 免疫系に対する影響 | 32 |
| 2.2.1 | DEP 曝露マウス由来肺胞マクロファージに関する免疫学的研究 | 32 |
| 2.2.2 | DEP 曝露マウスと結核感染との関係に関する基礎的研究 | 33 |
| 2.2.3 | DEP のマクロファージ・リンパ球機能の障害 | 34 |
| 2.2.4 | DEP 中の化学成分による肥満細胞機能の障害 | 35 |
| 2.2.5 | ディーゼル排気粒子により誘導される肺胞マクロファージの遺伝子の解析 | 36 |
| 2.2.6 | ディーゼル排気曝露が花粉症に及ぼす影響 | 39 |
| 2.2.7 | ディーゼル排気微粒子による感染性肺傷害の増悪とメカニズムの解明に関する研究 | 41 |
| 2.3 | 生殖器への影響 | 44 |
| 2.4 | まとめと謝辞 | 46 |
| [資 料] | | |
| | 研究の組織と研究課題の構成 | 55 |
| 1 | 研究の組織 | 55 |

| | |
|------------------|----|
| 2 研究課題と担当者 | 56 |
| 研究成果発表一覧 | 57 |
| 1 誌上发表 | 57 |
| 2 口頭発表 | 63 |

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の目的と経緯

近年、我が国の大気汚染は従来の硫黄酸化物 (SO_x) や降下煤塵を中心とした固定発生源型汚染から大都市、幹線道路沿いなどにおける二酸化窒素 (NO₂) や浮遊粒子状物質 (SPM) を主体とした移動発生源型汚染に移りつつある。特に近年、ディーゼル車の増加が著しく、大都市部の浮遊粒子状物質 (SPM) と NO₂ の環境基準の達成率は依然低い状態にある。

特に、浮遊粒子状物質 (SPM) の汚染は深刻である。例えば東京都内の自動車沿道排気測定局 (自排局) では環境基準を満たしているところは少ない (平成 8 年度から 12 年度までの達成率は 9.3 ~ 63.4%)。また、東京都内の SPM の総排出量は年間 1 万トン以上にもなり、その約半分は粒径 2.5 μm 以下のディーゼル排気微粒子 (DEP = PM_{2.5}) である。

この SPM 中の大部分を占める DEP (PM_{2.5} 粒子) は肺がんやアレルギー性鼻炎を起こすことはよく知られている。また、先の特別研究で、DEP が実験動物に気管支ぜん息様の病態を引き起こすことが明らかになった。

一方、近年の日本人の死因は、1 位ががん、2 位が心疾患、3 位が脳血管疾患である。これらのうち、がんと SPM あるいはがんと DEP との関連はよく研究されており、年間 1000 人近い人がディーゼル排気によって肺がんで死亡している可能性が指摘されている。また、最近になって、粒径が 2.5 μm 以下の SPM、すなわち PM_{2.5} と心疾患による死亡率との間に非常に高い相関性が存在することがアメリカやイギリスからの多くの疫学研究によって示され、その健康影響の重大性がにわかにクローズアップされてきた。しかし、この両者間の因果関係の実験的証明はまだなされておらず、その証明はこれからの研究にかかっている。

そのため、PM_{2.5} と心肺循環器疾患との間の因果関係を実験的に明らかにすることは微粒子汚染の健康影響をより明確にしうることになる。特に、大気汚染が心臓循環器系に及ぼす研究はこれまで、全くと言って良いほどなされておらず、今後の重要な研究分野であることが指摘されている。

そこで、このような背景を踏まえ、本研究では日本の大都市部の PM_{2.5} の主要部分を占める DEP を対象物質と

してディーゼル排気の曝露実験と組織培養を含む *in vitro* の実験を組み合わせることにより、その DEP の中の物質がどのような機序で心肺循環器系に障害を及ぼしているかを明らかにすることを目的とした。このことにより、大都市部における PM_{2.5} (DEP) 汚染を低減することの緊急性と重要性を理解してもらおう科学的知見を示し、環境保全のための科学的資料を提供する。

本特別研究は平成 11 年度から 13 年度までの 3 カ年計画でスタートした。本研究に先立って、昭和 63 年度から平成 4 年度の特別研究 (仮の名称として; 第一次ディーゼル特別研究) の後半において、ディーゼル排気発生装置を作成し、ディーゼル排気微粒子 (DEP) を手にすることができた。それまで DEP については発がん性と一部の抗体産生を増強すること以外、その毒性の強さや、なぜ有毒なのかもわかっていなかった。そこでまず、この DEP の毒性メカニズムから調べた。その結果、DEP から多量の活性酸素が生成し、それらが肺に損傷を与えることを生化学的、病理学的に明らかにした。

その後、DEP のみを長期間にわたってマウスに繰り返し気管内投与することによって、気管支ぜん息の基本病態である 気管支粘膜下への好酸球の浸潤を伴う慢性気道炎症 気管支での粘液の過剰合成、分泌 気道過敏性の亢進などに相当する病態が明瞭に発現することを示した。

次に、アレルギー性鼻炎、肺がんの発症メカニズムと食事因子の影響の解明および現実の生活の中ではヒトはどのくらいの SPM を吸い込んでいるのかという個人曝露量の推定等にかかわる研究課題について、平成 5 ~ 9 年度に、特別研究「ディーゼル排気による慢性呼吸器疾患発症機序の解明とリスク評価に関する研究」(仮の名称として; 第二次ディーゼル特別研究) を行い、その結果、大都市部の浮遊粒子状物質 (SPM) の中のかなりの部分を占める DEP がアレルギー性のぜん息様病態を増悪すること、そのメカニズムとして好酸球の浸潤に基づくアレルギー反応の亢進が考えられることをマウスを用いた実験的研究で見つけた。

したがって、本研究は、前述の第一次、第二次の 2 つの特別研究で行った呼吸器系疾患およびアレルギー性疾

患等の成果に基づき、最近の疫学的調査で重要視されている循環器系に対する影響の解明と免疫系に対する影響を解明することに主眼がおかれている。

そこで、本報告では主にDEあるいはDEPの心電図の解析および薬理作用を中心とした循環器影響と、DEP中に心臓あるいは血管に作用する物質があるか、あるとすればどのような化学物質か、について *in vivo* と *in vitro* の実験を交えて報告する。さらに、DEPの免疫系に及ぼす影響、アレルギー性鼻炎、DEPによる呼吸器炎症の憎悪についての研究成果も述べる。また、その他の健康影響として、DEがマウスの雌性生殖器および第2世代に対する影響についての研究成果についても記載した。

なお、本研究は、最終年度の平成13年4月に、研究所の独立行政法人化に伴う大幅な機構改革により、重点特別研究の「PM_{2.5}・DEP研究プロジェクト（通称）」の毒性・影響評価研究チームの研究に編入された。

1.2 研究の構成

空中浮遊微粒子（PM_{2.5}）の心肺循環器系に及ぼす障害作用を明らかにするためには、(1) PM_{2.5} (DEP) の曝露を受けた動物の心電図解析をはじめとする電気生理学的解析、および(2) 心臓と肺の病理組織学的変化の解析 (*in vivo* 実験)、ならびにそれら組織にとって重要な(3) 各種構成細胞に対するPM_{2.5} (DEP) の影響を解析 (*in vitro* 実験) する(図1)とともに、呼吸循環影響に関する(4) 肺泡マクロファージの反応や炎症反応、鼻アレルギー反応等の免疫学的解析 (*in vivo* 実験) を行い、ヒトのリスク評価に資する研究とした。

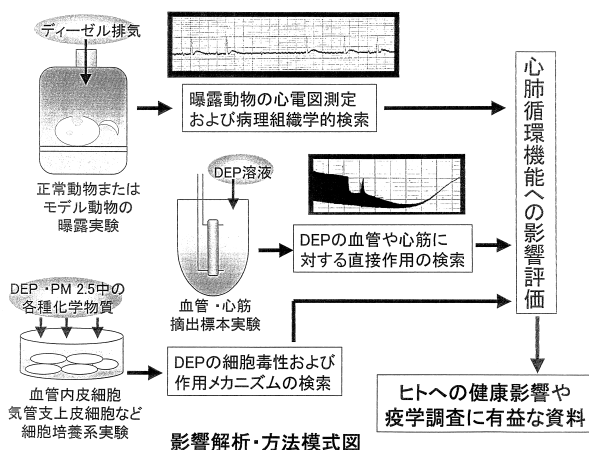


図1 PM_{2.5}・DEPの循環器影響の解析方法の模式図

以上のような観点にたつて、本研究においては以下の項目について実験を行った。

- 1) 心電図による心筋および循環機能異常に関する電気生理学的解析
- 2) 心肺循環器系の病理組織と機能的異常の解析
- 3) PM_{2.5} (DEP) の薬理学的作用
- 4) DEPの構成成分による心臓、血管に対する作用
- 5) 血管内皮細胞および気道上皮細胞等の培養細胞系に及ぼす障害作用機序の解析
- 6) 免疫系を介した組織障害作用の解析

1.3 大都市部における大気環境の現状ならびに粒子状物質の現状について

(1) はじめに

本節では大都市部における最近の大気環境について簡単に紹介し、本特別研究が必要とされている背景の理解に役立てたい。

近年、大都市部の大気環境は改善されつつあるが、依然として大きな問題を抱えている、この主な原因は自動車の排気ガスによると考えられている。東京都内ではNO₂総排出量の5～7割は自動車に由来しているという。とりわけ最近では、燃料が安くて馬力があるという理由でディーゼル車が増えており、都市大気汚染の主要な汚染源になっている。

ディーゼル車は自動車総数の約11%に過ぎないが、NO_xの総排出量の約75%を占めている。ちなみに、ディーゼル車のNO_x排出量は大型車になるにつれてガソリン乗用車の2～30倍になり、浮遊粒子状物質(SPM)についてみるとガソリン乗用車の30～100倍も多いという。図2には、先の特別研究で測定した、東京都内の板橋区と世田谷区内の約80地点におけるNO₂と浮遊粒子状物質(SPM)の相関を示した。この図からわかるように、NO₂汚染の高い所はSPM汚染も高く、両者の間には高い相関性があることが認められた。このことから、SPMの主な汚染源はNO₂と同じ自動車の排気ガスであることが示唆された。なかでも後にも述べるようにSPMの圧倒的部分はディーゼル車由来の微粒子(DEP)である。

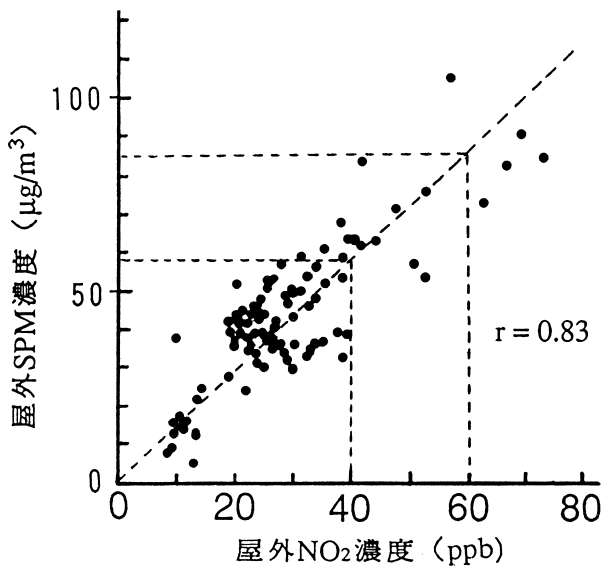


図2 東京都内各地域における屋外のNO₂濃度とSPM濃度との間の相関
相関係数(r)は0.83であり両者間には統計的に意味のある非常に高い相関性が認められた。

(2) 大都市大気中の浮遊粒子状物質(SPM)とディーゼル排気微粒子(DEP)との関連について、大気中の浮遊粒子状物質(SPM)は、図3に示すよ

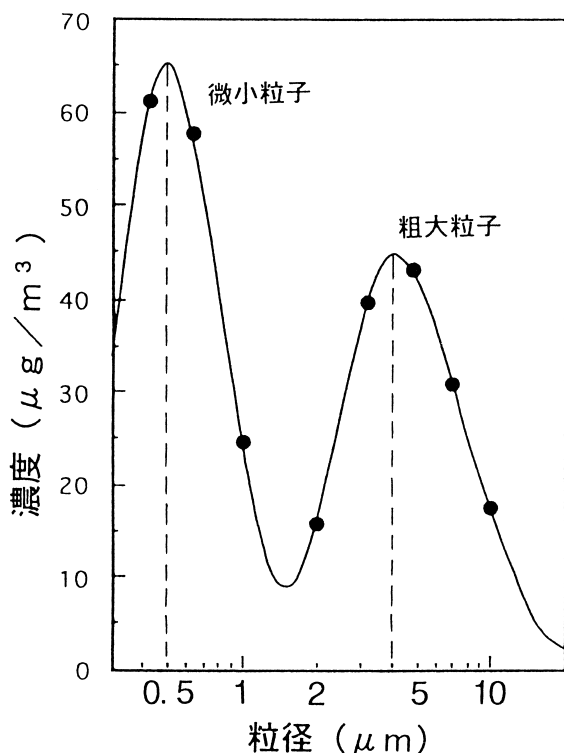


図3 日本の大都市部における浮遊粒子状物質(SPM)の2峰性分布
道路沿道の場合には、健康に悪影響を及ぼす微粒子のDEPが多い。粗大粒子は土壌由来などの物質が多く、健康に悪影響を及ぼす物質の割合は低い。

うに、粗大粒子と微小粒子の二峰性に分布している。粗大粒子の粒径は2.5~10 μmであり土壌由来の物質が圧倒的に多く、ヒトの健康に有害な物質の量は少ない。一方、微小粒子は粒子が2.5 μm以下でPM_{2.5}とも呼ばれ、主に自動車等から排出されたものである。東京都内で1987年(昭和62年)に測定されたSPMの発生源寄与率を図4の円グラフに示した。ディーゼル車由来の微粒子

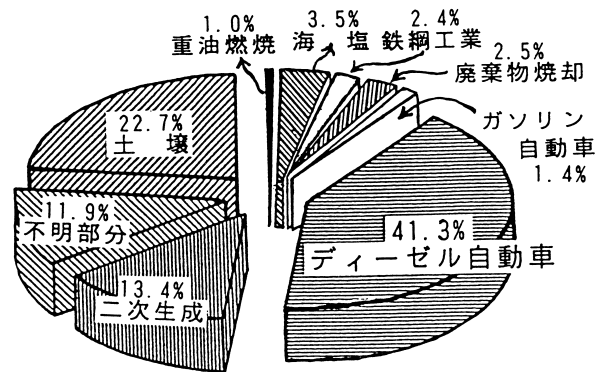


図4 東京都内における浮遊粒子状物質(SPM)全体に対する発生源寄与率(1987~88年の測定データ)

(DEP)の割合は41.3%で圧倒的に多い。ガソリン車由来のSPMはわずかに1.4%で自動車由来粒子全体(41.3%+1.4%=42.7%)の3.3%でしかない。さらに、二次生成(13.4%)とはSO₂やNO_xから光化学反応によって二次的に生成した酸性微粒子であり、それらの約7割近くは自動車由来であると言われている。また、環境省の平成6年度のデータによる推計では、自動車からの発生源別寄与割合は一般局で関東地方22%、関西地区で27%であるが、自排局では43%と高く、ディーゼル車種別PM排出割合もトラック87%、乗用車7%、バス6%となり、トラックからの排出が多いことを示している。そのため、自動車由来の浮遊粒子状物質(SPM)は過半数を越えるとみなされている。

なお、東京都は、平成8年4月に「東京都浮遊粒子状物質削減計画」を発表した。その中で、平成4年(1992年)に測定された全浮遊粒子状物質(SPM)中の自動車排出ガス由来の粒子は47.7%で、二次生成粒子は18.2%と報告しており、図4の値を測定した後の5年間で各々5%ずつ合計で約10%増加していることを示している。この結果を表1にまとめた。なお、表1には全浮遊粒子状物質(SPM)と、その中味を微小粒子と粗大粒子に分けた値も示した。表からわかるように、

表1 東京都内の浮遊粒子状物質の発生源寄与率

| | 自動車排ガス | 二次生成粒子 | 土 壤 系 | 不 明 | 固定発生源 | 海 塩 |
|-------------------------------|--|--------|-------|-------|-------|------|
| 1987年 ^{a)} (S62年) | 全浮遊粒子状物質 (SPM) 中の割合 | | | | | |
| | 42.7% (56.1%) | 13.4% | 22.7% | 11.9% | 5.9% | 3.5% |
| 1992年 ^{b)} (H4年) | 全浮遊粒子状物質 (SPM) 中の割合 | | | | | |
| | 47.7% (65.9%) | 18.2% | 15.2% | 13.8% | 2.6% | 2.5% |
| 1992年 ^{b)} (H4年) | 微小粒子 (PM _{2.5}) 中の割合 | | | | | |
| | 56.1% (78.2%) | 22.1% | 2.7% | 14.2% | 4.2% | 0.7% |
| 1992年 ^{b)} (H4年) | 粗大粒子 (PM ₁₀ -PM _{2.5}) 中の割合 | | | | | |
| | 25.6% (35.3%) | 9.7% | 30.5% | 28.7% | — | 5.5% |

a) 東京都環境科学研究所年報 pp. 3-10 (1989)
 b) 東京都浮遊粒子状物質削減計画 (平成8年4月)

自動車に由来する微小粒子の割合は増加傾向を示しており、自動車台数も増加し続けていることを考えると、浮遊粒子中の自動車排ガス由来粒子の割合はさらに増え続けることが予測される。

DEP等の微小粒子の中にはベンゾ[a]ピレンやニトロアレーンをはじめとする多くの発がん性物質や内分泌を攪乱することが知られている物質、鉄や銅のような重金属をはじめとする様々な有害物質が含まれている。この微小粒子の平均粒径は、図3に示したように、0.5 μm前後と極めて小さいため肺の奥の肺胞まで入り、その約半分は肺内に沈着すると言われている。また、図5からわかるように、これらの微小粒子は、特にその中のDEPは秋から冬にかけて多くなる傾向がみられている。

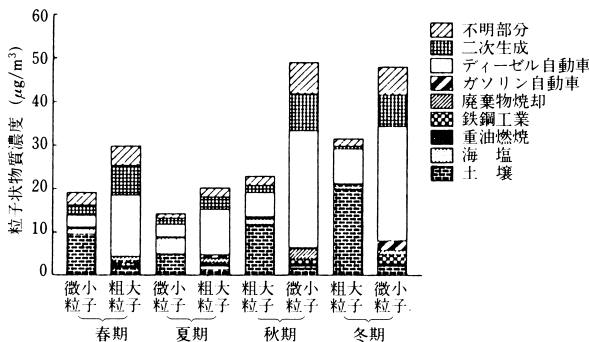


図5 東京都内の粗大粒子および微小粒子の発生源寄与率とその季節変動

(3) ディーゼル排気微小粒子 (DEP) 中の多環芳香族炭化水素類とその化学物質について

1) はじめに

DEPは約千種類にも及ぶ様々な化学物質を含んでいる。それらの中にはベンゾ[a]ピレン (BaP) に代表される多環芳香族炭化水素 (PAHs) やそれらのニトロ化合物であるニトロアレーンのような突然変異原や発がん性物質として知られているものが多い。

一方近年、ダイオキシンをはじめとする様々な環境ホルモン (外因性内分泌攪乱物質) が動物の生殖器系に様々な異常を起こすことが知られ、公衆衛生的観点から注目を集めている。そのダイオキシンの毒性はダイオキシンを受け止める「受容体」との結合によって発現すると考えられている。この発現によって、BaPのような多環芳香族炭化水素等を代謝し、真の発がん物質に変える酵素が誘導されたり、奇形を起こしたり、性ホルモンの合成に影響を及ぼすなど、様々な作用が発現することが知られている。

このような報告に加えて、DE曝露が雌マウスの生殖器系の異常をおこし、さらに2世代目の子供の発育に影響することを本研究で見いだした。このことは、ディーゼル排気が環境ホルモン用の作用を有していることを示している。

2) DEPおよび大気粉じん (AAP) 中のPAHsとニトロアレーン濃度比較

ディーゼル排気曝露装置の動物曝露チャンバー内での

捕集日を変えて5回サンプリングしたDEP中のPAHsとニトロアレーンの濃度を検討した。それぞれのPAHsはサンプリング時間の違いにより1.7倍から2.1倍の違いが認められた。また、ニトロアレーンも1.5倍から2.5倍の違いが認められた。これは、粒子濃度としては常に一定であったが、燃焼条件の微妙な違いでPAHsやニトロアレーンの生成の変化が起きることを示している。

また、先の報告によると、上記のDEPと金沢市内の大気中粉じん(AAP)中のPAHsとニトロアレーン濃度を比較した結果、国立環境研究所のDEP中のピレン(PYR)、ベンゾ[a]アントラセン(BaA)、ベンゾ[a]ピレン(BaP)等は大気中粉じん中の濃度より低めであった。一方、1-ニトロピレン(1-NP)、1,3-ジニトロピレン(1,3-DNP)、1,6-ジニトロピレン(1,6-DNP)および1,8-ジニトロピレン(1,8-DNP)等は大気粉じん中のものより若干高めの傾向を示し、個々の物質の濃度についてみると上記のような傾向が認められたが、全体的にみると国立環境研究所のDEPの化学組成は一般大気環境中の化学組成と類似していると言える。このことは、多環芳香族炭化水素はDEPあるいは大気環境中ともに類似していることを示している。

また、全粒子中に占める有機化合物の割合はSOF(soluble organic fraction)として表され、粒子の特性を比較する上で重要な指標であり、TEOM(Tapered Element Oscillating Microbalance)法によって測定すると、一般大気環境中のSOFの比率はおおよそ40~50%といわれている。国立環境研究所のディーゼル排気曝露チャンパー内のDEPのSOFの割合もTEOMで測定すると48~50%の間にあり、一般大気中の粒子特性と類似したものであった。(東京ダイレック(株)の好意によって行われた。)

3) DEP中のアニオン濃度

ダイオキシン生成の原因にもなる塩素イオンは1.06~3.20 µg/g程度含まれている。硝酸イオンは49.6~93 µg/gでサンプリング時間の違いで2倍ほどの違いがあり、硫酸イオンは230~374 µg/gで、サンプリング時間の違いで1.6倍くらいの差があった。また、DEP中の硫酸イオンは硝酸イオンより2~3倍多い傾向であった。

4) DEP中の金属類の濃度

DEP中の重金属濃度を分析した。最も多い金属はNa, Ca, K, Zn, Mg, Al等の軽金属で続いてFe, Cu, Cr,

Ni, Mn, V, Co等の遷移微量金属が存在していた。これらの遷移微量金属はスーパーオキシド(O_2^-)、過酸化水素(H_2O_2)等の活性酸素と反応して、最も活性の強いヒドロキシラジカル($\cdot OH$)を生成し、細胞組織に重篤な傷害をもたらすことが既に示されている。

1.4 浮遊粒子状物質(SPM)および二酸化窒素(NO_2)の個人曝露量の推定に関する研究

大都市部においては NO_2 とSPMが大気汚染の主要な部分を占めている。中でもSPM汚染が深刻でその多くの部分を占めているディーゼル排気微粒子(DEP)がヒトの健康にとって有害であることは推測される。そこで、都市部の住民はどのくらいの NO_2 やSPMを吸入しているのかを知ることは都市住民の健康影響を考えるうえで重要であるといえる。この研究は、先の研究で行われたものであるが、ここでは、その後の研究結果からわかったことを付け加え、要点をまとめた(田村憲治氏の協力による)。

6年間にわたって沿道周辺住宅の室内外でSPMと NO_2 濃度等の測定を行い(表2)、それらの結果より、次の結論を得た。

- (1) SPM, NO_2 ともに道路からの距離減衰が認められ、道路から5mと55~140mとでは全平均でSPMでは15~18%, NO_2 では約15%であった(表3)
- (2) 外気濃度と室内濃度との相関は、SPMでは高く、 NO_2 では低かった。また、居間のSPM濃度は外気濃度のおおよそ70%に相当していた(図6)。 NO_2 は居間濃度と台所濃度の相関が高いことから、外気よりも燃焼器具が使用される台所の影響を受けやすいことが示唆された。
- (3) 個人曝露濃度と外気濃度、室内濃度との相関については、SPMは外気濃度、居間濃度とも高い相関が認められ、個人曝露濃度は外気濃度のおおよそ60~70%に相当していた(図7)。また、外気と居間の間で相関が高いのは2-10 µm, 2 µm以下及びPM10であった(図8)。一方、外気あるいは居間の濃度と個人曝露量との間で相関が高いのは2 µm以下の粒子がPM10であることが判明した(図9)。

さらに、 NO_2 は居間との相関は高かったが、外気との相関は低かった。もともとSPMは外気と居間濃度との間に相関が認められるので、個人曝露濃度は、居間などの室内濃度の影響が大きいと考えられる。

表2 沿道周辺住宅における空気汚染調査の概要

| | 1990年 | 1991年 | 1992年 | 1993年 | 1994年 | 1995年 |
|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 地区 | K地区 | A地区 | I地区 | I地区 | A地区 | K地区 |
| 幹線道路 | 国道A号線 | 府道B線 | 府道C線 | 府道C線 | 府道B線 | 国道A号線 |
| 道路交通量(7:00~19:00) | 約30,000台 | 約40,000台 | 約40,000台 | 約40,000台 | 約40,000台 | 約40,000台 |
| 調査時期 | 11月13~17日 (火)~(土) | 11月12~16日 (火)~(土) | 11月10~16日 (火)~(月) | 11月9~15日 (火)~(月) | 11月5~11日 (火)~(月) | 10月17~21日 (火)~(土) |
| 調査件数 | 東側10軒 | 東側5軒 西側4軒 | 東側4軒 西側5軒 | 東側4軒 西側5軒 | 東側4軒 西側4軒 | 東側8軒 |
| 調査家屋備考 | 喫煙住宅含む | | 8階の住宅含む 暖房住宅含む | 8階の住宅含む | 喫煙住宅含む | 喫煙住宅含む |
| SPM測定 | | | | | | |
| 居間, 外気 | 2日間を2回 | 1日間を4回 | 2日間を3回 | 2日間を3回 | 2日間を3回 | 1日間を4回 |
| 個人暴露 | 2日間を1回 | 2日間を1回 | 2日間を2回 | 2日間を2回 | 2日間を2回 | 1日間を2回 |
| NO ₂ 測定 | | | | | | |
| 居間, 台所, 寝室, 外気 | 1日間を4回 | 1日間を4回 | 2日間を3回 | 2日間を3回 | 2日間を3回 | 1日間を4回 |
| 個人暴露 | 1日間を2回 | 1日間を4回 | 2日間を2回 | 2日間を3回 | 2日間を3回 | 1日間を2回 |
| HCHO測定 | | | | | | |
| 居間, 寝室, 外気 | | | | | 2日間を1回 | 1, 2日間を1回 |
| 個人暴露 | | | | | | 1, 2日間を1回 |
| 測定備考 | 寝室測定せず | | 昼夜別にサンプリング | 昼夜別にサンプリング | 昼夜別にサンプリング | 昼夜別にサンプリング |

表3 道路からの距離別平均SPM, CO₂濃度

| | 道路からの距離 (m) | | | |
|----------------------------------|------------------|----------------|----------------|------------------|
| | 5 | 10~15 | 20~30 | 55~140 |
| SPM ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) | 63.2±30.0 (44) | 55.7±31.5 (24) | 57.4±24.0 (26) | 53.5±33.0 (57) |
| 2 μm 以下 | 38.6±20.4* | 34.0±21.9 | 34.0±17.0 | 31.5±21.6* |
| 2~10 μm | 24.6±10.2 | 21.6±10.8 | 23.4±8.0 | 22.0±12.4 |
| NO ₂ (ppb) | 39.9±7.4 (54)*** | 37.9±8.7 (28) | 36.2±6.2 (32) | 34.2±8.3 (68)*** |

() 内はデータ数 '90~'95年調査より

*p<0.1, ***p<0.001

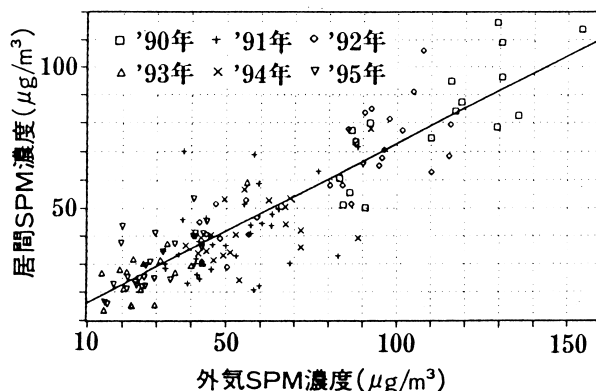


図6 外気と居間の総浮遊粒子状物質 (SPM) 濃度の相関

(4) 各測定場所でのSPMとNO₂濃度の相関をみると、外気では高い相関が認められ、それらが同一の発生源(自動車)に由来することが示唆された。居間濃度と個人曝露濃度についてはSPMとNO₂濃度の間に相関が認められなかった。その理由として、NO₂が燃焼器具を使用する台所の影響を強く受けるためと考えられる。

(5) 計算による個人曝露濃度と実測した個人曝露濃度との間には、SPM、NO₂とも高い相関が得られた。こ

のことは、在室時間が長い居間、寝室などの濃度が個人曝露濃度と高い相関関係にあることから妥当と考えられる。

(6) これらの結果から、外気の個人曝露はSPMについては高い相関があるが、NO₂にはないことから、外気の影響を論じるためにはSPMの測定が、中でも2 μm以下の粒径の粒子濃度の測定が重要であることが示唆された。

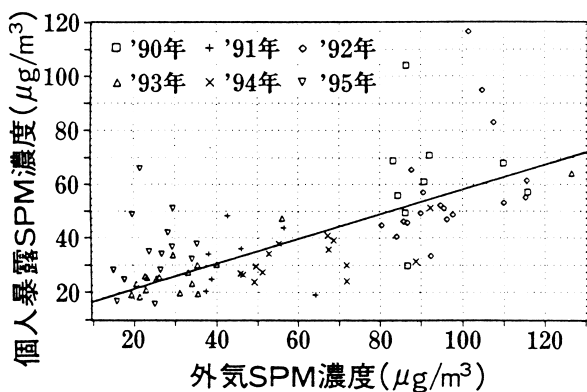


図7 外気と個人曝露の総浮遊粒子状物質 (SPM) 濃度の相関

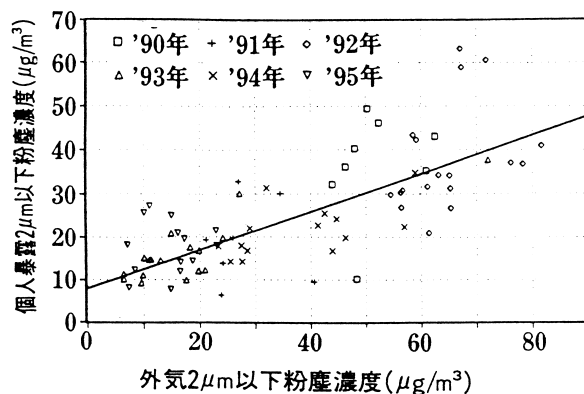


図9 外気と個人曝露の2 μm以下の浮遊粒子状物質 (PM2) 濃度の相関

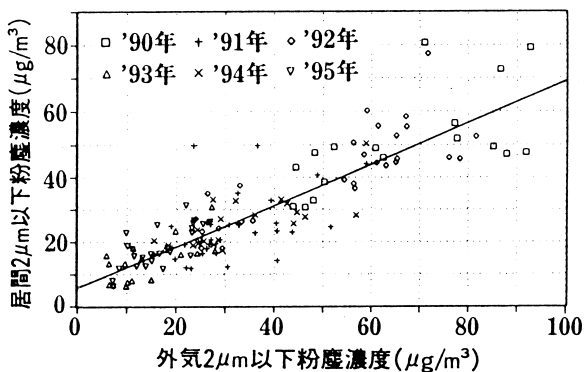


図8 外気と居間の2 μm以下の浮遊粒子状物質 (PM2) 濃度の相関

2 研究の成果

2.1 循環器への影響

2.1.1 はじめに

ディーゼル排気 (DE), その粒子 (DEP) および PM_{2.5} の循環器系に対する影響に関する最近の研究を表 4 にまとめたが, DE や PM_{2.5} の曝露と循環器影響との関係を明確に示す報告は非常に少ない。

これまで DEP は呼吸器系疾患の原因として注目されていたため, 第一次, 第二次ディーゼル特別研究においても呼吸器疾患の解明が主なものであった。しかし, 日本においては, 高齢者の増加や成人病などの心血管系疾患の増加などを考えると, DEP の循環器系に及ぼす影響を早急に明らかにする必要があると考えられる。

さらに, Dockery ら (1993) によって, 微粒子 (PM_{2.5}) と心臓・循環器障害の関連が疫学的に報告されて以来, アメリカをはじめヨーロッパ諸国において種々の研究が開始されたが, DEP と強い関連を持っているのは現在のところ日本だけである。しかし, 中国, 韓国や東南アジアの開発途上国にも日本と同様な問題が生じる可能性は極めて高いと言える。

そこで, 本研究では, DEP を対象物質としてディー

ゼル排気の曝露実験と動物の組織を用いた *in vitro* の実験を組み合わせることにより, DEP が循環器系にどのような作用を持ち, さらに, その DEP 中のどのような化学物質が循環器系にどのような障害を及ぼしているかを実験的に明らかにすることを目的とした。

また, どのような化学物質がどのように循環器系に作用するかを見いだすことは大変な困難を伴う研究である。これまでの多くの研究では, どのようにあるいはどのような作用を持つかに焦点が当てられ, どのような化学物質かには焦点が当たらなかった。これは, DEP 中に数百種類から数千種類の化学物質が混在することから, その中から数十種あるいは数個しかない作用物質を見つけることを困難だとあきらめている感じがあった。

本研究では, あえてこの困難な作業にも手を触れることとした。これには 2 つの理由がある。第一は, 優秀でしかも粘り強い分析化学チームと共同研究が可能となったこと。そして第二は, 目的に沿ったバイオアッセイが可能となったことである。はじめに, DEP 溶液で生体の全体反応をとらえ, その結果を分析チームに伝え, 分析チームは DEP を分析化学手法を用いて系統的に分画

表 4 ディーゼル排気ガス, ディーゼル排気粒子, PM_{2.5} の循環器影響研究のまとめ

| 粒子濃度 | 曝露期間 | 動物種 | 影響 | 文献 |
|---------------------------------------|---|--|--|-----------------------------|
| 10-5~10-3g/ml | 心筋 摘出標本実験 | モルモット 雄 | DEP 溶液 5×10-4g/ml 以上の濃度において, 負の変力作用が生じ心停止に至った。 この DEP の作用は, atropine, propranolol, verapamil, diltiazem, diphenhydramine, indomethacin, catalase を前投与しても抑制されなかった。 | Sakakibara ら(1994) |
| 1, 10, 100 μg/ml | 胸部大動脈 摘出標本実験 | SD系ラット 雄 | 10 μg/ml 以上の DEP は phenylephrine によって収縮させた血管の acetylcholine による弛緩作用を抑制した。 DEP の弛緩抑制作用は SOD によって一部阻害された。 | Ikedo ら(1995) |
| 1, 10, 30, 100 μg/ml | 胸部大動脈 摘出標本実験 気管支 摘出標本実験 | New Zealand White ウサギ 雄 | 30 および 100 μg/ml の DEP は phenylephrine によって収縮させた血管の acetylcholine に 弛緩作用を抑制した。 100 μg/ml の DEP を作用させると, 血管からの NO の産生は阻害された。 100 μg/ml の DEP を作用させると, acetylcholine による気管支の収縮が増強された。 100 μg/ml の DEP を作用させると, 気管からの NO の産生は阻害された。 | Muto ら(1996) |
| | 静脈内投与 | Hartley系 モルモット 雄 | DEP 溶液の累積投与によって不整脈が誘発され, 最終的には A-V block により死亡し 不整脈誘発濃度は 75.53±11.65 mg/ml で, 致死濃度は 132.0±7.22 mg/ml であった。 | Minami ら(1999) |
| 5, 50, 120mg/ml/head | 静脈内投与 | Wistar系ラット 雄 | 50mg/ml/head 以上の濃度の DEP 溶液を静脈内に投与すると, 投与開始直後から一過 血圧の低下が認められた。 この血圧低下反応は atropine, propranolol の前投与によって抑制された。 | Toda ら(2001) |
| PM:132~919 μg/m ³ | a single 3-hour exposure 3 daily 6-hour exposure | F344系ラット 雄 同上+monocrotaline (40mg/kg) i.p. | 132 μg/m ³ 濃度では, 曝露後 6 時間において軽度な増加。 184 μg/m ³ 濃度では曝露後 において軽度な増加。 曝露群において軽度な増加。 | Gordon ら (2000) HEI 報告 |
| (spontaneous cardiomyopathy) | | Bio-To-2系ハムスター | 心拍数, 波形ともに曝露群との間に有意な変化は認められなかった。 8ヶ月齢, 10ヶ月齢個体を用いたが, それぞれ曝露群との間に有意な差は認められなかった。 | |
| CAPs 93.7~1055.8 μg/m ³ | 6 hours / day 3 days | 犬 nomal | 曝露群における HF, LF 成分は有意に高値を示し, 心拍数は減少傾向を示した。 曝露群の T 波の波形にはばらつきが多く, 逆転(-)するものも認められた。 | Godleski ら (2000) HEI 報告 |
| 4.2~27.4 μg/m ³ | | 犬 coronary occlusion | 曝露群の HF 成分は有意に高値を示し, nomal 犬の曝露群の HF 成分よりも増加する傾向が みられた。 T 波が大きくなったり小さくなったりとばらつきがみられた。 control 群に比べ, S-T の上昇が有意に早くなった。 曝露群の曝露後における ST segment は曝露前よりも有意に上昇した。 | |

し、バイオアッセイチームは、その分画を用いて心筋や血管の作用を確認し、作用のあった分画を分析チームに伝えると言う方法で何回も繰り返し、作用物質を含む分画や細分画を絞り込むという方法をとっていった。

次に研究成果について述べる。

2.1.2 ディーゼル排気 (DE) 吸入曝露ラットにおける心電図記録および臓器の病理組織学的検索

(1) 目的

前節で述べたように、DEPの循環器に及ぼす影響に関する研究は始まったばかりである。これまでに、DEPは摘出心筋標本に対し収縮力を減衰させる作用を有すること (Sakakibara *et al.*, 1994) がわかっていたが、本当に、DEP溶液中に心臓や血管に作用する物質が存在するか疑問があった。その理由は、心臓および血管は生体の中でも生命維持のために極めて重要な機能を営んでいるため、中枢神経系、末梢神経系 (機能的には自律神経系、神経反射)、さらに内分泌系などの多くの調節機序が関与して、心臓と血管の状態を常に一定の状態に保とうとするためである。そのため、循環器影響の指標を適切に選ばないと、どこの影響を検索しているのかわからなくなる恐れがある。

そのような中で、前述の心筋標本の結果を確認するような実験を行い、共同研究者がDEP溶液の静脈内投与によって不整脈および心停止が誘発されること (Minami *et al.*, 1999) を報告した。この報告は、DEP溶液が心臓に対する作用があることを強く示唆するとともに、心電図の変化を有効な指標として使えることを示した。

しかし、それらの実験では、DEPの曝露は臓器への直接作用である静脈内投与などで行われている。現実的に我々がDEPを体内に取り込むのは呼吸器系を介した経路が一般的であるので、吸入曝露において循環器に対し、どのような影響を持つのかを検討する必要がある。そこで本節では、DEPの循環器に及ぼす影響を明らかにするための第一段階として、チャンバー内でDEPを含むディーゼル排気 (DE) に曝露させたラットの心電図測定、体重測定、臓器重量測定および臓器の病理組織学的検索を行い、DEPの吸入曝露による循環器および臓器への影響を調べることを目的とした。

1) DEの吸入曝露方法と曝露環境

DEの吸入曝露実験は国立環境研究所内に設置されている大型吸入曝露システム (図10) を用いて行った。

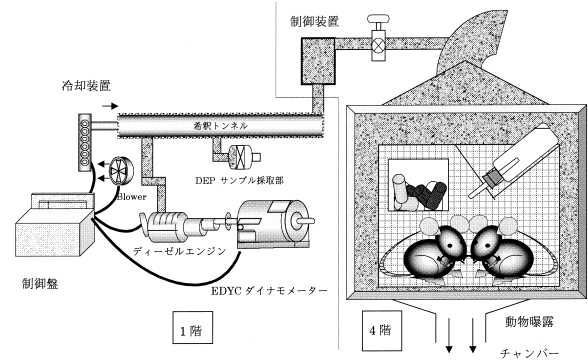


図10 ディーゼル排気ガス曝露システム

吸入曝露のためのチャンバーは4台使用した。各チャンバー内の平均DEP濃度は粒子重量濃度として0.3, 1.0および3.0 mg/m³になるように設定しネズミの活動期である夜10時から明朝10時までの12時間曝露した (図11)。これらの濃度は日本のSPMに関する環境基準値0.1 mg/m³のそれぞれ3, 10, 30倍に相当する (実際の曝露時間は12時間なので、1日の平均曝露濃度はそれぞれ0.15, 0.5および1.5 mg/m³の濃度になる)。また、これらとは別に対照として清浄空気のみでの曝露も行った (対照群)。吸入チャンバー内は温度22 ± 1℃, 湿度55 ± 10%に維持し、換気回数は25 ~ 30回/時、明暗周期は12:12とした。餌および水は自由摂取とした。曝露期間は最長で12ヵ月であり、フィッシャーF344ラットを用いた。また、曝露開始年齢は8週齢とし、1ケージに5 ~ 6匹を収容した。なお、曝露実験を2回行い、随時検査に供した。

また、ここで使用したエンジン特性と希釈トンネルの特性を表5と表6に示した。本実験中の主なガス成分の濃度を表7に示した。曝露群でNO₂濃度とCO濃度が高い値を示した。

図12はELPI測定装置で測定した曝露チャンバー内の

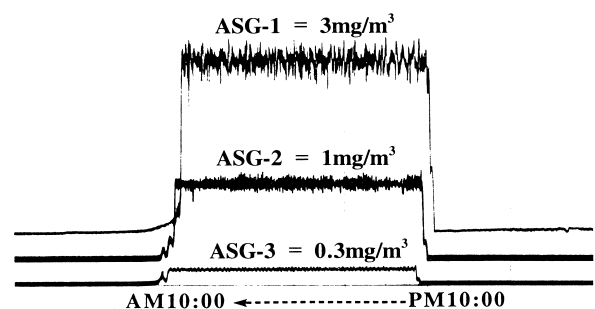


図11 ディーゼル排気微粒子 (DEP) 濃度として0.3 mg/m³ (ASG-3) 群, 1 mg/m³ (ASG-2) 群および3 mg/m³ (ASG-1) 群のDEP濃度制御

表5 本研究で使用した‘いすゞ’エンジンの特性

| | |
|-------------|--------------------|
| 形式とタイプ | 形式A4JB1-type, 軽負荷用 |
| 排気量 | 2.740 L |
| 燃焼システム | 直噴方式 |
| 吸引方式 | 自然 |
| 最大トルク (rpm) | 1500 rpm |
| トルク (kg・m) | 10 kg・m |

表6 希釈トンネルの特性

| | |
|------------|-------------------------|
| 使用目的 | ディーゼル排気ガス希釈 |
| 材質 | 304 ステンレス鋼 |
| 直径 | 0.300 m |
| サンプル口までの距離 | 8.4 m |
| 総流量 | 4.0 m ³ /min |
| 滞留時間 | 8.48 sec |
| レイノルズ数 | 1980 |

表7 ディーゼル排気 (DE) 中の微粒子 (DEP) およびガス成分の濃度

| ディーゼル 排気成分 | 曝露群 | | | |
|-----------------------|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Air群 | 0.3mg/m ³ 群 | 1.0mg/m ³ 群 | 3.0mg/m ³ 群 |
| DEP濃度 | 0.005±0.0015 | 0.33±0.006 | 0.99±0.029 | 3.24±0.18 |
| ガス成分 | | | | |
| NO _x (ppm) | 0.07±0.01 | 3.53±0.22 | 9.86±0.64 | 28.07±1.28 |
| NO(ppm) | 0.06±0.01 | 2.06±0.09 | 5.77±0.27 | 16.61±0.56 |
| NO ₂ (ppm) | 0.04±0.01 | 0.59±0.04 | 1.68±0.13 | 5.15±0.31 |
| SO ₂ (ppm) | 0.01±0.01 | 0.05±0.01 | 0.13±0.01 | 0.32±0.05 |
| CO ₂ (ppm) | 454.9±16.22 | 1012.9±62.07 | 1805.1±113.68 | 3635.6±115.57 |
| CO(ppm) | 0.01±0.02 | 1.55±0.11 | 4.61±0.28 | 14.13±0.73 |

各濃度は 34 週間の慢性曝露期間中の平均値 ± SD で示した。

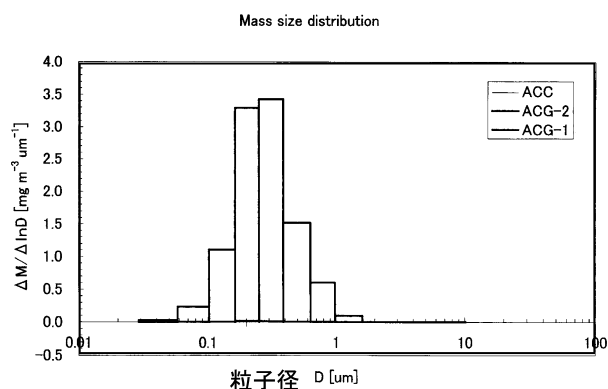


図12 チャンバー内の粒径と質量の関係図

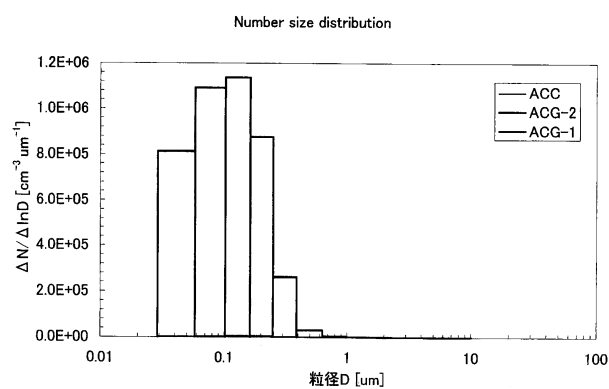


図13 チャンバー内の粒径と粒子数の関係図

粒径と粒子の重さ（質量）の関係を示した粒度分布図である。これによると粒径の平均値は0.28 ~ 0.32 μmと推定された。しかし、同じ装置で、粒径と粒子数の関係を示すと図13のように、粒子数は0.1 μmのいわゆるサブミクロンより小さい粒子が多く出ていることが判明した。この両図は、軽くて小さい粒子が多く曝露チャンパー内に入り、動物に曝露されていることを示している（(株)東京ダイレックのご好意により測定した）。また、当研究所のエンジン室と動物曝露チャンパーは約40 mと離れているので、エンジン室の希釈トンネル末部と

チャンパー内で、粒子数と粒径との関係について測定した（同プロジェクト、長谷川就一氏の測定による）。希釈トンネル部（エンジン室）では、ほぼ30 ~ 400 nmの範囲で鐘形の分布を示し、最頻値は100 ~ 200 nmにありエンジン始動直後でも次の日の早朝（12時間後）でも大きな変化は認められないが、チャンパー部では、分布範囲が50 ~ 700 nmと広く、最頻値の粒径が150 ~ 300 nmと経時的に大きくなることが判明した（図14, 15）。この理由として、長い導入管を通っている間に、温度や湿度の変化によって粒子の凝集が起こって

ることが考えられた。また、この結果からだけでは、実際の環境中のどのような曝露環境にあるか断定できないが、将来的に、沿道などの曝露環境がより一層明確にな

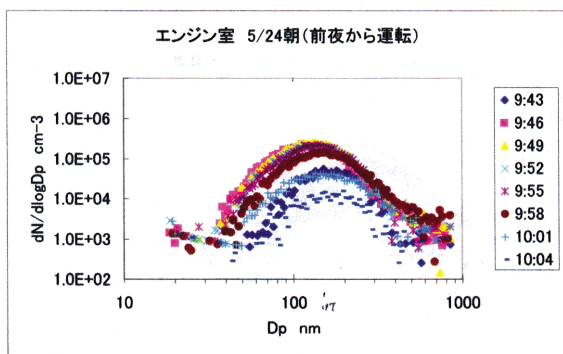
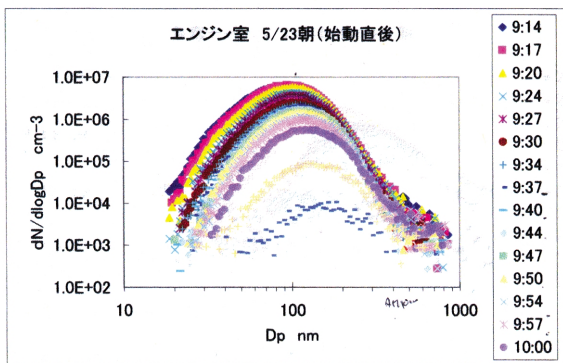


図14 エンジン室の希釈トンネル末部における粒径と粒子数の関係

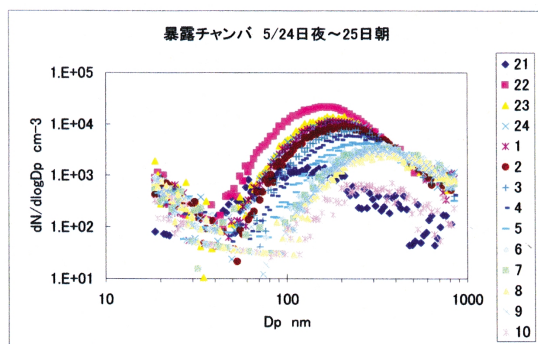
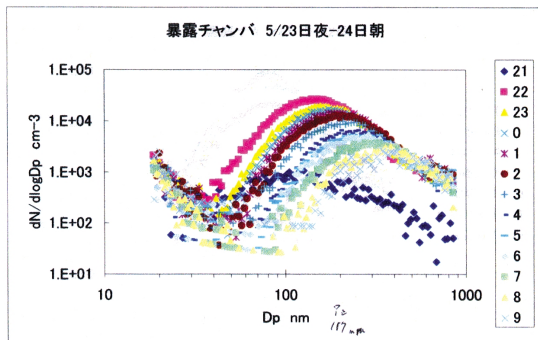


図15 曝露チャンバ内における粒径と粒子数の関係

れば、当てはめることも可能と推測される。

2) 心電図記録と臓器採材・検索方法

心電図の測定は、曝露開始から1, 3, 6, 9, 12ヵ月後にチャンバーの搬出口で行った。1, 3, 6ヵ月曝露後の測定は同一個体を経時的に記録した。ラットを無麻酔下で、標準肢誘導(Ⅱ, Ⅲ, aVF)法を用いた(図16)。

12ヵ月間の曝露を行ったラットで、上記の心電図記録を終了したラットについて、各曝露群につき10匹を全身麻酔を施し、体重測定後に放血死させた。各臓器は摘出後に重量を測定し、10%緩衝ホルマリンにて固定した。固定後の臓器は定法に従い組織切片を作製し、HE染色を行い、光学顕微鏡にて組織検索を行った。

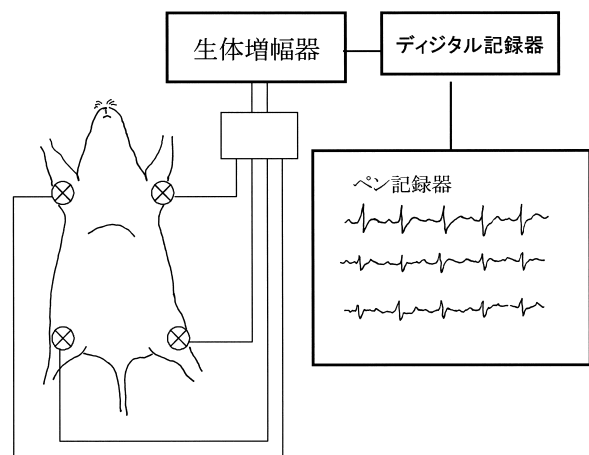


図16 心電図記録の模式図

(2) 結果

1) 異常心電図波形および不整脈の出現

各曝露群の心電図記録を行い、心電図波形および出現間隔を詳細に観察したところ、異常心電図波形および不整脈の出現が認められた(表8)。対照群に比べて、異常心電図を示した個体数は3.0 mg/m³群の3ヵ月曝露群において有意に多かった(p < 0.05)。また、12ヵ月曝露群では、異常心電図を呈した個体数は、0.3 mg/m³(p < 0.01)および3.0 mg/m³群(p < 0.05)で有意に多かった(図17)。本実験で認められた異常心電図のほとんどは心室性期外収縮であったが、QRS群が脱落する房室ブロックなども認められた。(図18)。対照群で認められた心室性期外収縮は、保定されているラットが急激に身体を動かした直後に単発的に出現する性状のものであったが、DE曝露群では、身体の動揺が出現していないときにも心室性期外収縮を発現する個体が多く認められた。また、3.0 mg/m³の曝露群で、QRS群の脱落を

表8 DE 曝露による心室性期外収縮などの不整脈を示したラットの数と百分率

| | 1M | 3M | 6M | 9M | 12M |
|----------------------|------------|-------------|------------|------------|--------------|
| Control | 2/16 (13%) | 1/16 (6%) | 2/16(13%) | 1/15 (7%) | 3/15 (20%) |
| 0.3mg/m ³ | 0/15 (0%) | 5/15 (33%) | 3/15 (20%) | 4/15 (27%) | 9/15 (60%)** |
| 1.0mg/m ³ | 0/16 (0%) | 2/16(13%) | 4/16(25%) | 3/15(20%) | 3/15(20%) |
| 3.0mg/m ³ | 1/16 (6%) | 6/16(38%)** | 3/16 (19%) | 4/15(27%) | 7/15 (47%)* |

1M～12M は 曝露した期間(月数)を示し、0.3 mg/m³ ～ 3.0 mg/m³ は 曝露濃度を示す。
*: p<0.05, **: p<0.01 は 対照との有意差を示す。

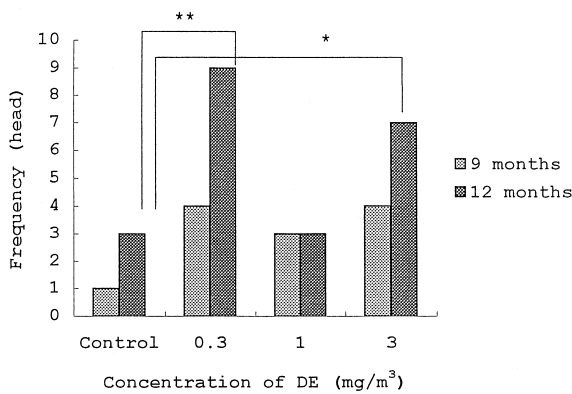


図17 異常心電図を現した個体数
* : p<0.05 * * : p<0.01 は対照との有意差を示す。

伴う第 度房室ブロック (図 19), 徐脈および心室性期外収縮を示すラットを認めた。心拍数は, 1 ~ 6 カ月の曝露期間では各群に差は認められなかったが, 9 および 12 カ月曝露では, 対照群に比べて曝露群の方が心拍数が高く, 9 カ月曝露では 0.3 mg/m³ 曝露群, 12 カ月曝露では 0.3 mg/m³ 曝露群と 3.0 mg/m³ 曝露群にそれぞれ有意な (p < 0.05) 増加が認められた (図 20)。

2) 体重および臓器重量の変化

体重の変化に関しては 1, 3, 6 カ月曝露群, および 12 カ月曝露において, いずれも 3.0 mg/m³ 曝露群で対照

群に比べて有意な減少を示した (図 21)。

各臓器重量を測定した結果, DE 曝露群の心臓重量が対照群に比べて有意に増加していた (表 9)。臓器重量を体重比に換算した値では, 3.0 mg/m³ 曝露群の脳, 心臓, 肝臓, 腎臓, 精巣, 精嚢, 凝固腺の臓器で有意な増加が認められた。また, 0.3 mg/m³ 曝露群, 1.0 mg/m³ 曝露群でも一部の臓器で重量の有意な増加が認められた。

3) 心室壁の厚さの変化

また, 心臓については, 冠状動脈に平行に心室壁の最大部を切断し, 左心室と右心室の室壁の厚さを測定した。左心室の壁の厚さは異常心電図波形および不整脈の出現に差はなかったが, 右心室の壁の厚さは曝露群で有意に厚くなった (図 22)。

4) 肺および気管支の組織の変化

剖検時の肺の肉眼写真を図 23 に示す。組織学的検査では, 曝露群の肺胞内において多数の黒色粒子状物質およびそれらを取り込んだ肺胞マクロファージを多数認めた。それらのマクロファージは肺全体に散在していたが, DE 濃度が高い群ほど肺辺縁に集簇する傾向を認めた (図 24)。肺における高度な炎症反応や水腫などはいずれの曝露群でもみられなかったが, 0.3 mg/m³ および 1.0 mg/m³ 曝露群の気管支粘膜上皮細胞には多層性の増生と剥離がみられた (図 25)。

5) 動脈血 pH, ガス分圧の変化と肺におけるガス交換能の変化

安静時にカテーテル法によって採取した動脈血の pH とガス分圧の変化を図 26 に示す。pH は 3 mg 曝露で有意に低下し, 二酸化炭素濃度と酸素濃度は 1 mg と 3 mg 曝露群で有意に低下した。これらの pH と動脈血ガス分圧の変化は, 肺による換気機能の低下を示唆した。そこで, 次に, 呼気ガス分析の酸素濃度と二酸化炭素濃度を同時に分析し, 肺における動脈血と肺胞間の較差につい

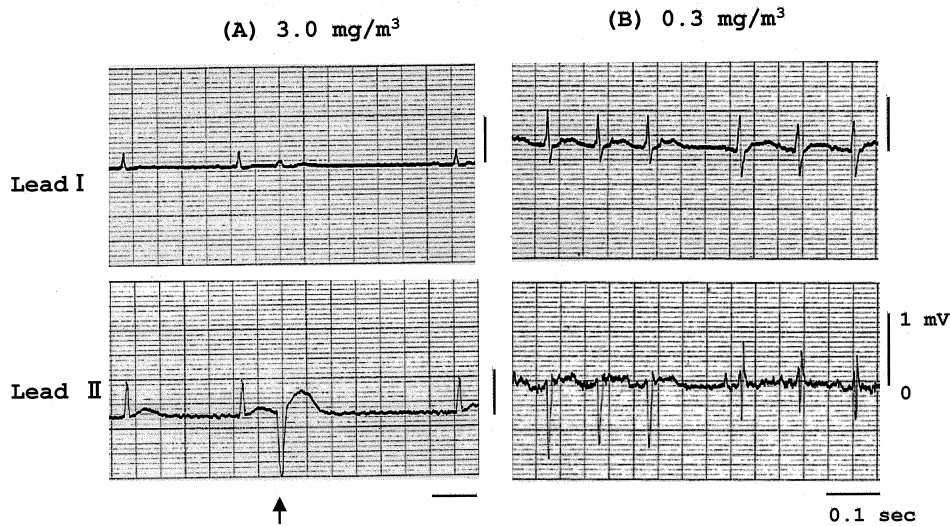


図18 DE 曝露で観察された異常心電図
 A は心室性の期外収縮 (矢印) を示し, B は不完全房室かい離を示す (心房と心室の収縮が連動しない)。Lead I, II は心電図の標準肢誘導, 1 mV, 0.1 sec を示す。

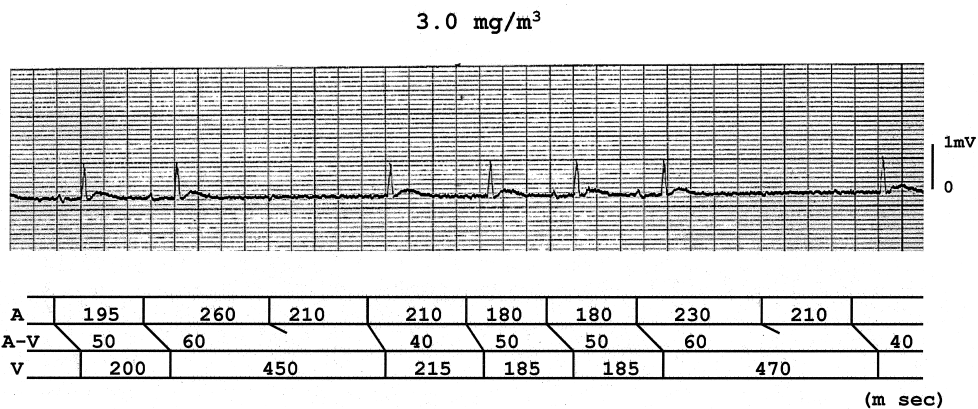


図19 DE 曝露で観察された第二度の房室ブロックで, 正常な心電図は小さい波 (P 波: 心房の放電) の後に大きな電位 (QRS 波: 心室の放電) が出るが, 房室ブロックでは小さい波は出るがその後の大きな波が出ない。これは心房と心室の間で電気刺激が阻止されたことを示す。

表9 DE を 12 カ月間曝露したラットの主要臓器の重量 (g)

| 主要臓器 | DE 曝露濃度 | | | |
|--------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Control | 0.3 mg/m ³ | 1.0 mg/m ³ | 3.0 mg/m ³ |
| 体重 | 371.9±15.8 | 374.2±12.2 | 375.8±15.9 | 346.8±11.8 ** |
| 脳 | 2.00±0.08 | 2.01±0.04 | 2.04±0.03 | 1.98±0.05 |
| 心臓 | 0.91±0.035 | 0.98±0.015 * | 1.01±0.073* | 0.96±0.018 * |
| 肺 | 0.98±0.02 | 1.90±0.88 | 1.51±0.88 | 1.55±1.33 |
| 肝臓 | 11.0±0.7 | 12.1±0.1 | 12.0±0.7 | 11.4±0.1 ** |
| 脾臓 | 0.723±0.043 | 0.680±0.057 | 0.734±0.047 | 0.715±0.026 |
| すい臓 | 0.455±0.232 | 0.527±0.048 | 0.558±0.077 | 0.606±0.093 |
| 腎臓(右) | 1.12±0.06 | 1.17±0.06 | 1.17±0.06 | 1.13±0.07 |
| 腎臓(左) | 1.15±0.07 | 1.20±0.10 | 1.20±0.08 | 1.22±0.06 |
| 副腎(右)(単位:mg) | 21.7±2.0 | 22.8±2.1 | 20.1±1.7 | 20.8±4.2 |
| 副腎(左)(単位:mg) | 23.2±2.2 | 24.6±3.2 | 22.3±2.7 | 22.0±3.7 |
| 精巣(右) | 1.88±0.98 | 1.63±0.07 | 1.60±0.07 | 1.61±0.07 |
| 精巣(左) | 1.60±0.04 | 1.66±0.16 | 1.63±0.08 | 1.59±0.06 |

データは平均±標準偏差で示した。* はP<0.05, **はP<0.01の有意差を示す。

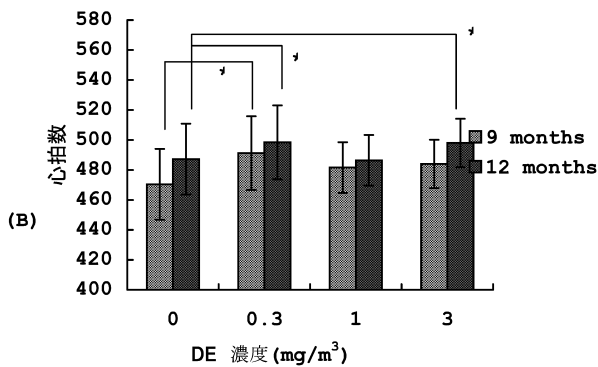
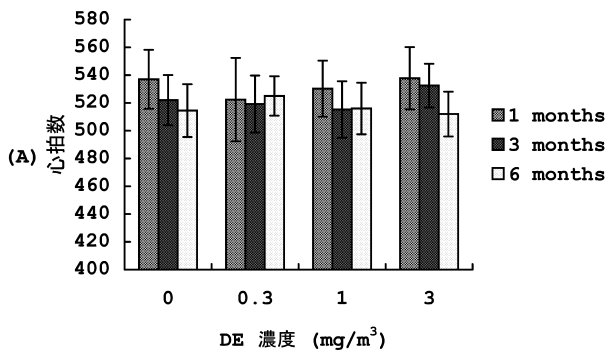


図20 心拍数の変化
* は曝露群間で $p < 0.05$ の有意差を示す。

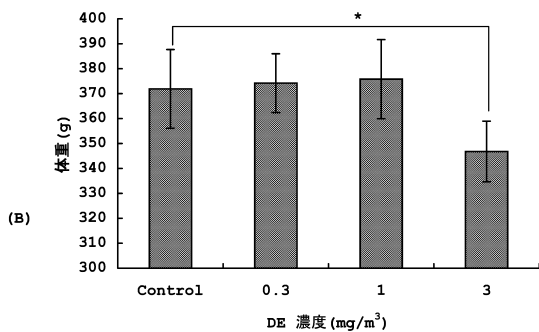
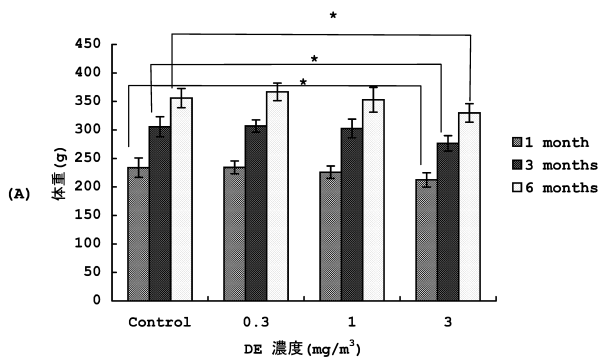


図21 曝露ラットの体重の変化
* は各群間で $p < 0.05$ の有意差を示す。(A)は1, 3, 6カ月間, (B)は12カ月間曝露。

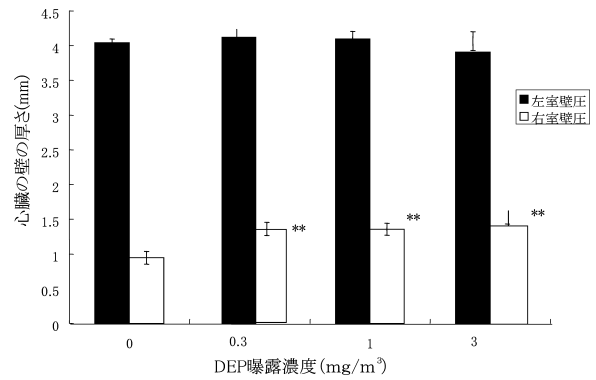


図22 心室壁の厚さの変化
曝露群の動物の右心室で心壁の肥厚傾向が見られる。
** は $p < 0.01$ で対照との有意差を示す。

て定法に基づき計算してみると、二酸化炭素の較差 (Diff.PA-aco2) はコントロールと比較して、曝露群で高い傾向を示し、高換気するとき $0.3 \sim 3.0 \text{ mg/m}^3$ 群で有意であった (図 27)。また酸素の較差 (Diff.PA-aO2) は 60 回換気では有意差がなかったが、120 回換気では、dose-dependently に曝露群で高くなり $0.3 \sim 3.0 \text{ mg/m}^3$ 群では有意に高くなった。このことは、肺におけるガス交換機能が低下していることを示し、動脈血の状態と一致した。これらの動脈血ガス分圧の変化は、換気回数が増加するとガス交換機能が低下することを示し、矛盾する変化ではないと考えられた。

(4) 考察

DE に 1, 3, 6, 9, および 12 カ月間曝露させたラットの心電図を測定した結果、曝露群で異常心電図の発現数の増加がみられた。その異常心電図のほとんどは心室性期外収縮であり、曝露期間が延長するほど、この不整脈の発現数および不整脈を発現する個体数に増加する傾向が認められた。心拍数は曝露期間が長期化すると曝露群において有意な増加が認められた。本実験における心電図測定は、ラットを無麻酔下で保定した条件で行ったことから、負荷心電図を測定している場合と同様の状況と考えられる。対照群で認められた異常心電図は身体を激しく動かした後に単発的に出現しており、これは激しく抵抗したことで一時的な自律神経系緊張の変化が起こり、異常心電図が発現した可能性が考えられる。それに対して曝露群では動揺していない状態でも異常心電図が出現しており、DE 曝露によって異常心電図が発現しやすくなった状態がつけられているものと考えられる。また、12 カ月曝露群では第一度房室ブロックを呈する個

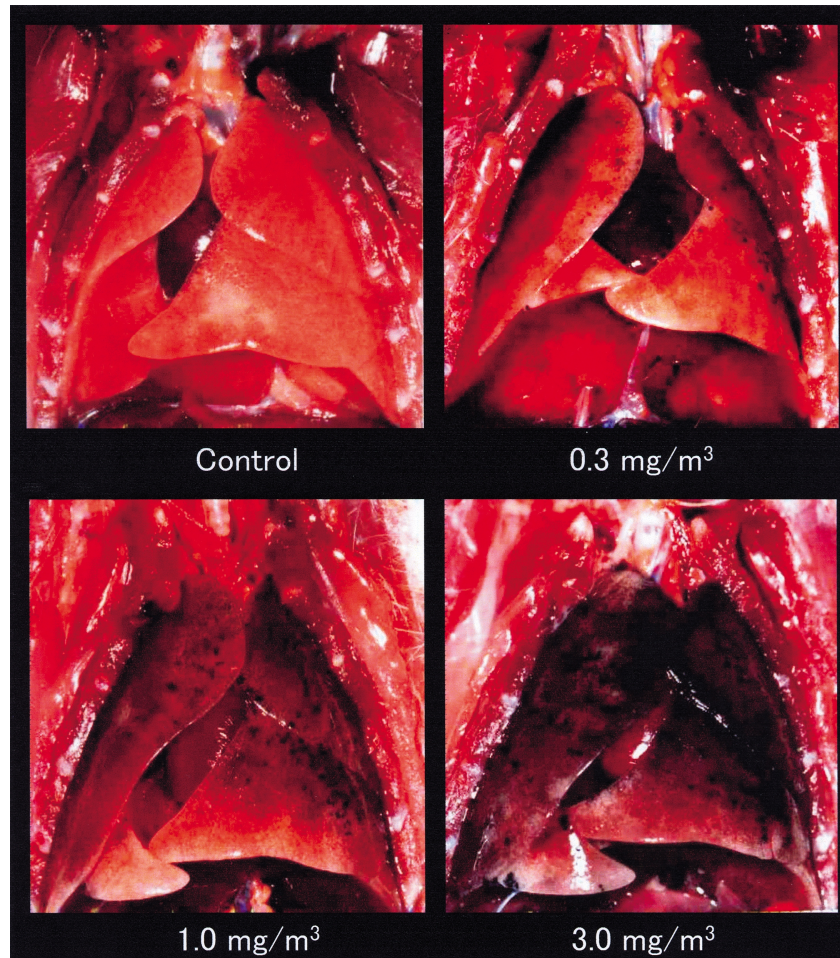


図23 DEを6ヵ月間曝露したラットの肺の外観

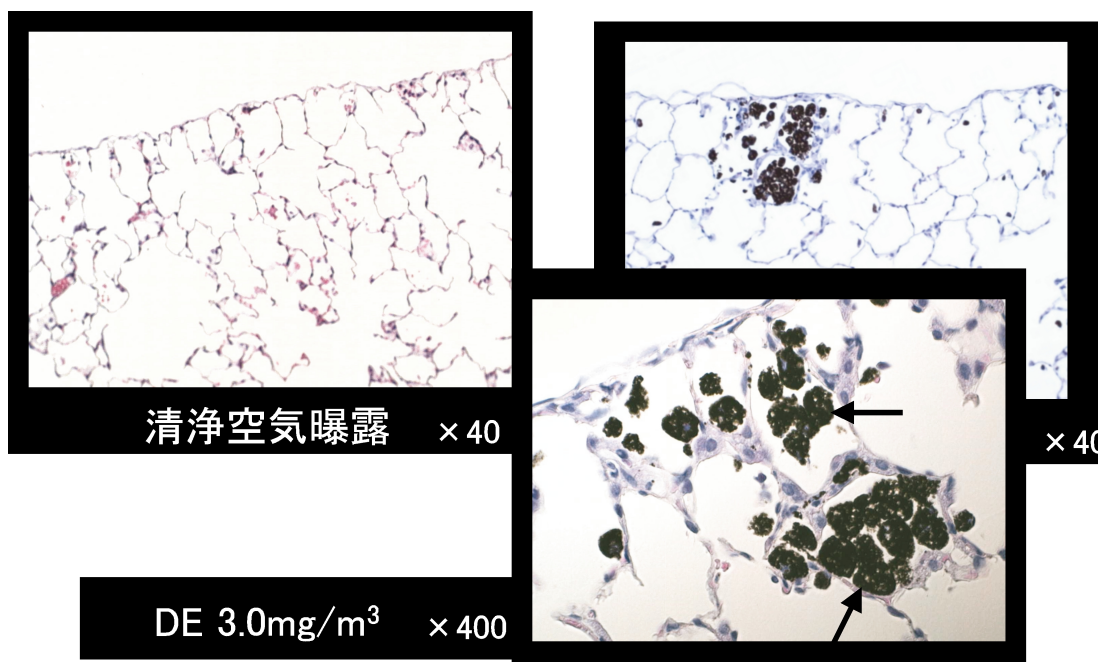


図24 DE曝露ラットの肺組織像(HE染色)
 3.0 mg/m^3 の曝露では, 肺胞マクロファージが黒色のDEP粒子を体内に蓄積しているのが明確に分かる(矢印)。

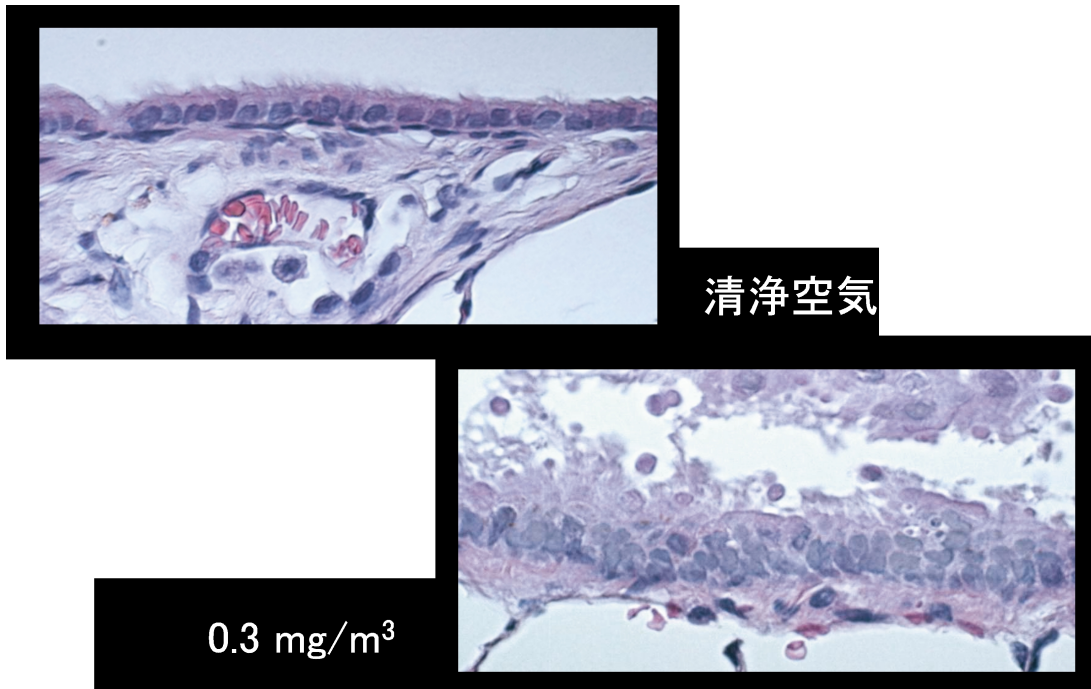


図25 細気管支組織像 (HE 染色 × 400)
 清浄空気曝露では単層の繊毛を持った上皮がきれいに並んでいるが、0.3 mg/m³ 6 ヶ月曝露では、上皮細胞は重なり繊毛は消失している。

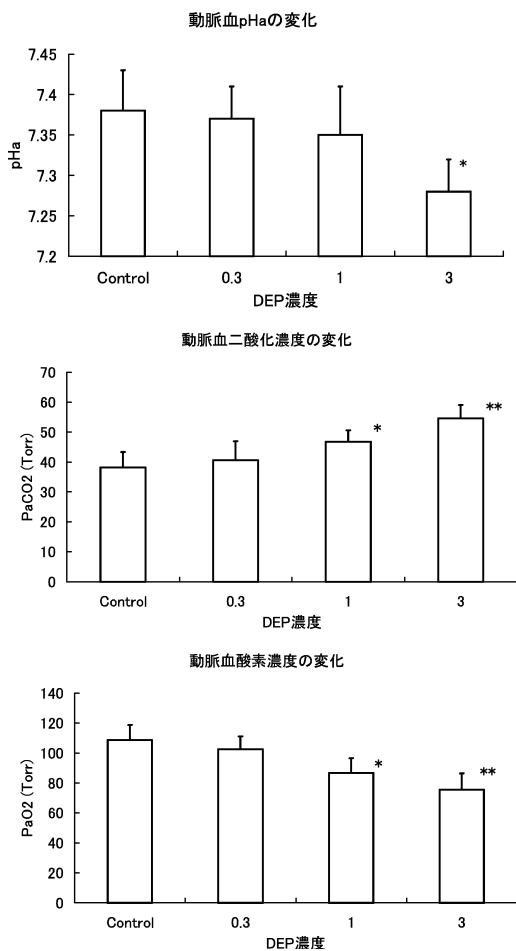


図26 安静時の動脈血中の pH, 二酸化炭素濃度, 酸素濃度の変化
 *p < 0.05, **p < 0.01

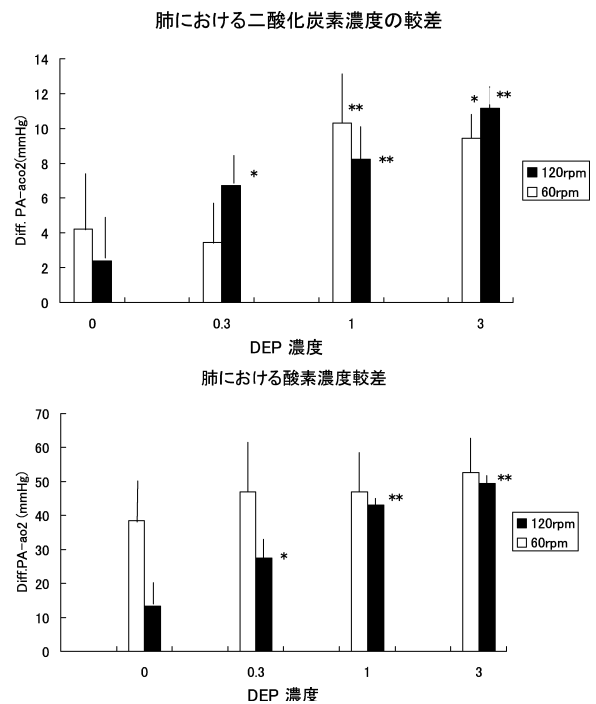


図27 肺におけるガス交換能の変化
 二酸化炭素濃度, 酸素濃度共に, 肺胞空気と肺動脈血との間の濃度の差を示す。したがって差が大きいことはガス交換が十分行われないことを示す。*p < 0.05, **p < 0.01

体が認められたが、この房室ブロックはPQ間隔が徐々に延長しQRSが脱落するタイプで、ヒトで言われるWenckebach型に相当するものと思われた。この個体は房室ブロックを呈した後に、心室性期外収縮を多発した。房室ブロックや心室性期外収縮の原因としては、自律神経系の亢進、もしくは心臓の形態的变化などが考えられる(Carre *et al.*, 1992, Lee *et al.*, 1998)。12ヵ月曝露個体は、年齢も1年を越えており、加齢による心臓の機能的および形態的な変化も生じてくるため(Delp *et al.*, 1998)、異常心電図は加齢による影響も考慮すべきである。しかし、12ヵ月DE曝露後の心臓重量は対照群に比べ有意に増加しており、組織学的検索では曝露群の心臓に著しい変化は認められず、重量増加の原因は不明であるが、DE曝露が心臓の形態に影響を及ぼしたことが推察される。対照群と比べ、DE曝露群における心拍数は増加しており、このことはDE曝露群の交感神経系の亢進が考えられる。これらの結果から、本実験におけるDE曝露群の異常心電図は、DE曝露が自律神経系や心臓になんらかの影響を及ぼした結果生じたものであると考えられた。

DEの12ヵ月曝露後の体重は曝露群で減少を示し、特に30mg/m³曝露群では著しい減少が認められた。Brightwellら(1989)も、本実験よりも濃度の高いDEではあるが、チャンバー内で吸入曝露したラットの体重の減少を報告している。臓器重量を体重比に換算した値では、心臓をはじめとして肝臓や腎臓、生殖器系臓器重量が、対照群に比べて有意に増加していた。曝露動物の臓器重量の測定や組織学的検索に関する報告は少なく、生殖器に関して若干の報告があるが、それらの結果もまちまちである。本実験では体重および臓器重量の変化から、DE曝露が全身臓器へ何らかの影響を及ぼすことが示唆されたが、組織学的検索においては顕著な変化は認められず、重量変化の原因に関しては不明である。

(5) まとめ

DEに1, 3, 6, 9, および12ヵ月間曝露させたラットの心電図を測定した結果、DE曝露群では異常心電図の発現が増加していることが明らかとなった。その異常心電図のほとんどは心室性期外収縮で、曝露期間が延長するほどそれらを発現する個体数および異常波形の発現数も増加する傾向が認められた。また、30mg/m³曝露群のラットでは、第1度房室ブロックおよび心室性期外

収縮が示された。心拍数は曝露群の方が高い傾向が認められた。さらに、DEの12ヵ月曝露後の臓器重量を測定したところ、DE曝露群の心臓重量が対照群に比べ有意に増加しており、これらの結果からDE曝露は心機能や心臓形態に影響を及ぼすことが示唆された。また、臓器重量を体重比に換算した値では肝臓や腎臓、生殖器系臓器重量が、対照群に比べ有意に増加していた。これらの結果から、DE曝露は呼吸循環器系臓器を含む全身臓器にも何らかの影響を及ぼすことが明らかとなった。

2.1.3 DEPの静脈内投与による血圧および心電図の変化 (1) 目的

前節におけるDEの吸入曝露実験において、DEに曝露された個体は高頻度で異常心電図を発現した。このことから、DEもしくはその中に含まれるDEPが循環機能に対し、何らかの影響を及ぼしていることが推察された。我々の生活においてDEPを取り込むのは呼吸器系を介した経路が一般的である。吸入によって取り込まれたDEPが循環器系に侵入するかどうかは証明されていないが、DEPの循環器系への影響についてより詳細な検討を行うため、DEP溶液を麻酔下のラットの静脈内へ投与したときの血圧および心電図変化を観察した。

(2) 材料および方法

1) 供試動物

SPFのWistar: JCLラット(20~30週齢、体重410g~510g)を使用した。ラットは導入時に体重測定を行い、1週間の検疫後、動物飼育室で飼育した。動物飼育室は気温22±1℃、湿度50±5%、換気25~30回/時、12:12の明暗周期(L7:00~19:00)の条件で維持されており、餌および水は自由摂取とした。

2) 心電図および血圧記録方法

DEPの投与に先立って、ラットを麻酔薬で全身麻酔した後、仰臥位に保定した。その後、調整されたDEP溶液を大腿静脈に挿入したカテーテルから20秒間で投与し、投与前後の心電図および血圧を同時記録した。心電図は標準肢誘導 および により、血圧は頸動脈に挿入したカテーテルから測定した。

3) DEP溶液の投与方法

DEP溶液は5mg/ml(12mg/kg BW)、50mg/ml(120mg/kg BW)および160mg/ml(384mg/kg BW)の濃度になるように生理食塩水を用いて調整した。これ

らの DEP 溶液は投与の直前に 0.22 μm のフィルターでろ過を行い、1 個体当たり 1 ml を 20 秒間の速さで投与した。対照群として DEP 溶液の溶媒である PBS-Tween 80 (0.05%) 液を用いた。

4) 自律神経遮断薬の投与

DEP が循環機能に及ぼす作用機序を検討するために、DEP 投与に先立って、副交感神経遮断薬であるアトロピン (0.25 mg/kg)、または交感神経遮断薬であるプロプラノロール (0.50 mg/kg) を投与し、前述と同様に DEP 投与による循環指標の変化を測定した。

5) DEP 採取方法

DEP は前述の 4JB1 型ディーゼルエンジン (Isuzu Motor Co., Japan), light-duty (2740 cc), 4 気筒の稼働により生じた排ガスを採取することで得た。エンジンは市販のディーゼル燃料を用いて 1500 回転, 10 トルク (kg・m) 負荷のもとで運転させた。

6) DEP 溶液の作成方法

乾燥した DEP 18 g を、0.15% Tween 80 を含むリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) 30 ml に加え、1 回につき 3 分間の超音波破碎 (最大出力の 70%) を 20 回を行い、遠心分離後上澄み液を採取し、-76℃ に保存した。

(3) 結果

1) 血圧の変化

ラットの静脈内に DEP 溶液を投与し、投与後 15 分間にわたり血圧および心電図を観察した。12 mg/kg の DEP 溶液の投与では血圧に変化は生じなかったが、120 mg/kg の投与では、一過性の血圧低下が認められた (図 28)。この血圧低下は収縮期および拡張期の両方で認められ、投与開始から 25 ~ 35 秒後に最も低下し、およそ 1 分後には投与前の値に戻った。DEP 濃度 120 mg/kg では、最大反応時に収縮期圧 (SBP) で投与前の 91%, 拡張期圧 (DBP) では 80.3% を示した (図 29)。投与開始から 25 秒後における 120 mg/kg 投与群の収縮期圧および拡張期圧の低下は対照群および 12 mg/kg 投与群に比べ有意な差が認められた (図 30)。さらに、血圧の低下反応には、収縮期圧、拡張期圧ともに濃度依存性が認められた (図 31)。

2) 自律神経の関与と血圧の変化

上記の血圧反応に自律神経機能がどの程度関与しているかを明らかにするために、前投与薬としてアトロピン (0.25 mg/kg) の単独投与またはアトロピンとプロプラ

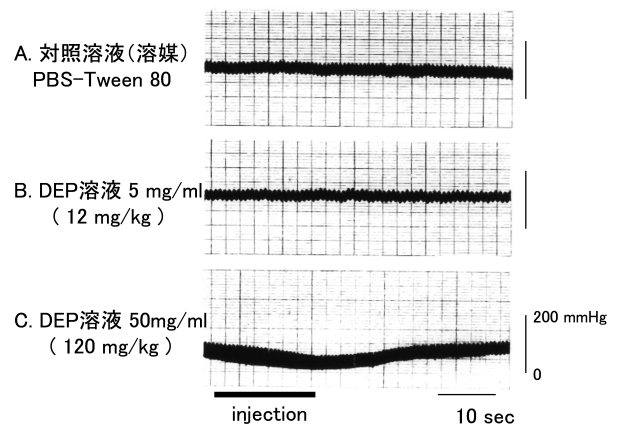


図 28 麻酔したラットに DEP 溶液を静脈内に投与した時の血圧変化
50 mg/ml の投与では一過性の血圧の低下が明確に見られる。

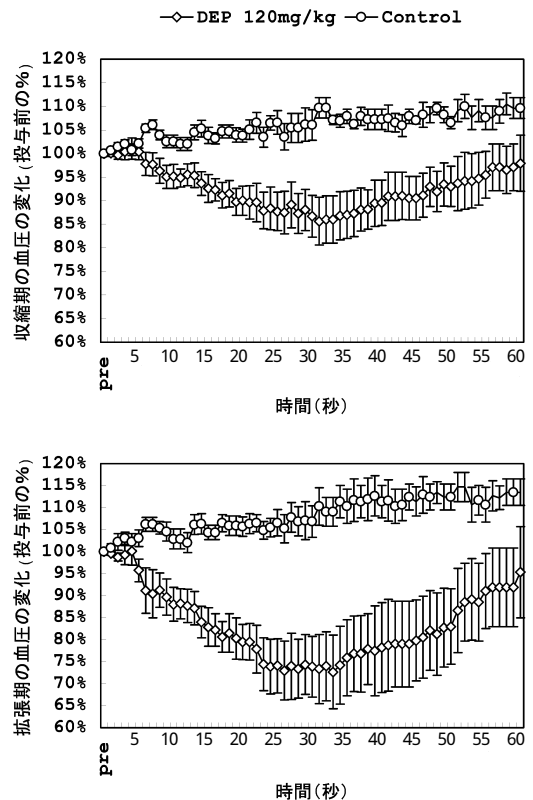


図 29 DEP 溶液 (50 mg/ml/head: 120 mg/kg) を投与したときの収縮期血圧と拡張期血圧の変化 (このデータは平均 ± 標準誤差を示す。)

ノロール (0.50 mg/kg) の複合投与によって、副交感神経系および交感神経系の遮断を行った。アトロピン (0.25 mg/kg) 投与後の DEP (120 mg/kg) 投与では、DEP 単独投与時にみられた一過性の血圧低下は出現せず、次第に血圧が上昇する傾向がみられた。また、アトロピンとプロプラノロール (0.50 mg/kg) の前投与によっても同様の傾向が認められた (図 32)。

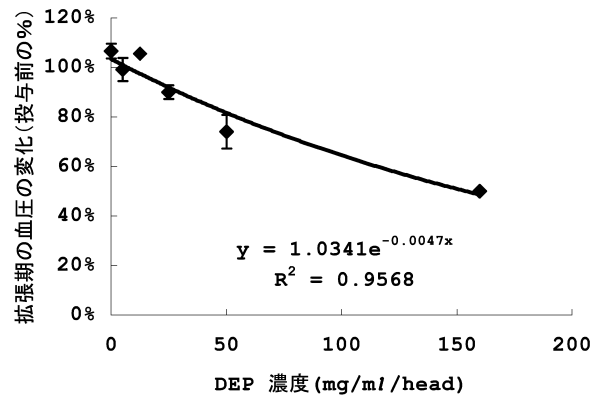
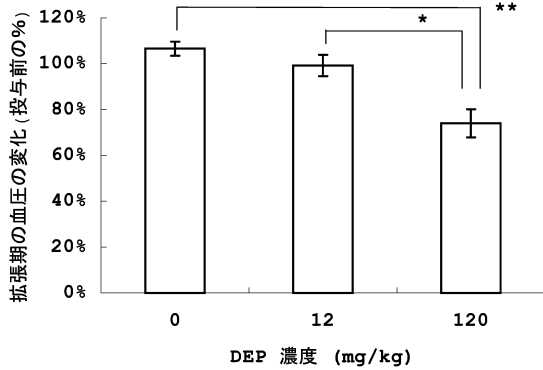
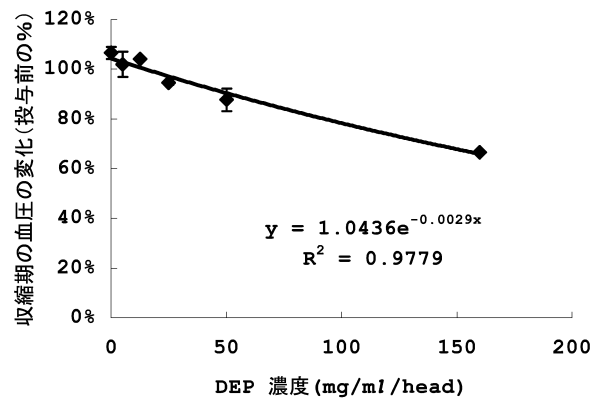
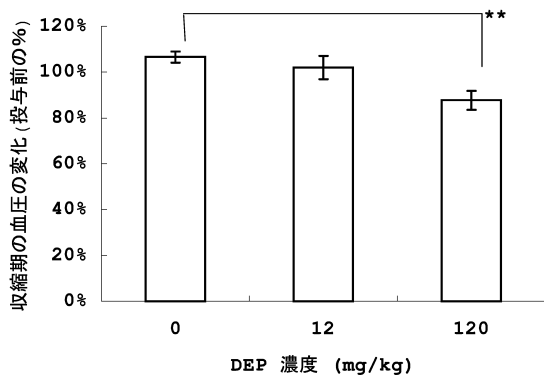


図30 投与後 25 秒時における血圧の変化
平均値 ± 標準誤差で示し, * は $p < 0.05$, ** は $p < 0.01$ での有意差を示す。

図31 DEP 投与後 25 秒の時における収縮期血圧および拡張期血圧と DEP 溶液濃度の関係

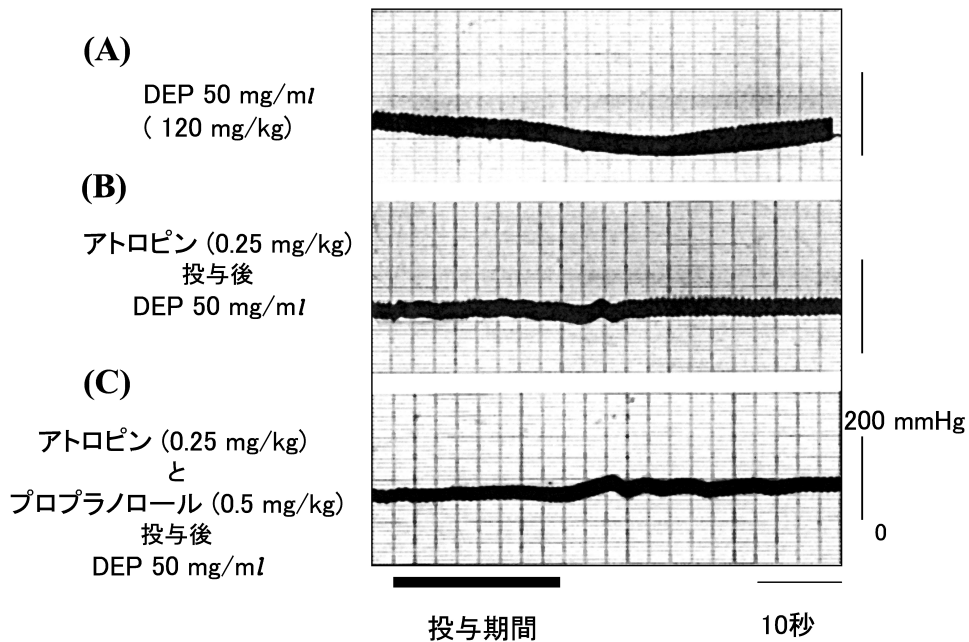


図32 副交感神経ブロック (B) あるいは副交感神経と交感神経を同時にブロック (C) した後に DEP 溶液を投与した時の血圧の変化
副交感神経をブロックすると DEP 溶液を投与しても (A) のような血圧の低下は起こらない。また、交感、副交感神経を同時にブロックすると、血圧の低下は起こらず、投与前より血圧が高くなる傾向を示した。

3) 異常心電図の出現

また、120 mg/kg 投与群 6 例に、DEP 溶液投与直後の 1 分の間に、単発的な心室性期外収縮の出現を認めた。また、別の 2 例には房室ブロックと心室性期外収縮が出現した (図 33)。房室ブロックは単発的な発生で、これは自然に消失し、心室性期外収縮は長時間断続的に出現した。この心室性期外収縮は DEP 溶液の溶媒である PBS-Tween 80 (0.05%) 液を投与しても消失せず、アトロピン (0.25 mg/kg) の投与により正常な心電図に回復した。

4) 心拍数の変化

DEP 投与開始から 1 分間の心拍数はほとんど変化せず、投与前に比べて約 5% ほどの変化にとどまった (図 34)。

(4) 考察

DEP の循環器系に対する作用を明らかにする目的で、麻酔下のラットの静脈内に DEP 溶液を投与し、血圧と心電図の変化を観察した。DEP 溶液の投与により末梢血圧の一過性の低下が認められた。DEP 溶液の溶媒である PBS-Tween 80 (0.05%) では血圧の変化は認められず、血圧の低下には DEP の濃度依存性の反応が認められた。血圧の変化は自律神経系の活動や末梢血管平滑筋の収縮性および、心拍出量の変化などさまざまな原因が考えられるが、DEP が心機能に何らかの作用を及ぼ

すとするならば、血圧に対しても影響があると考えられる。

本実験から得られた血圧反応に関して、血管への直接作用あるいは自律神経系を介する作用の有無を確認するため、交感神経遮断薬であるプロプラノロールおよび副交感神経遮断薬であるアトロピンで前処置したところ、いずれにおいても上述の血圧低下は出現しなかった。このことから、DEP による血圧低下は自律神経系によるものと考えられた。しかし、DEP 溶液投与開始から 1 分間の心拍数は、投与前と比べてほとんど変化しなかったことから、DEP は自律神経系のバランスを大きく変化させる作用はないことが推察される。よって本実験において観察された血圧低下は、DEP の心臓や血管への直接的な作用によるものと考えられる。さらに、アトロピン単独投与、またはアトロピンとプロプラノロールの両方を前投与した後に DEP 溶液を投与すると、軽度ではあるが血圧の上昇が認められた。このことから、DEP の血管に対する直接的な作用が強く示唆される。

また、本実験において DEP 溶液の投与によりさまざまな異常心電図の出現が認められた。DEP 溶液投与直後に認められた心室性期外収縮は、出現が投与直後であることや、単発的な出現であったことなどから、DEP の心筋への直接作用か、自律神経系を介した作用による出現と考えられた。

このように、DEP は心臓や血管に対し、直接的あるいは自律神経系を介した作用があることが明らかとなっ

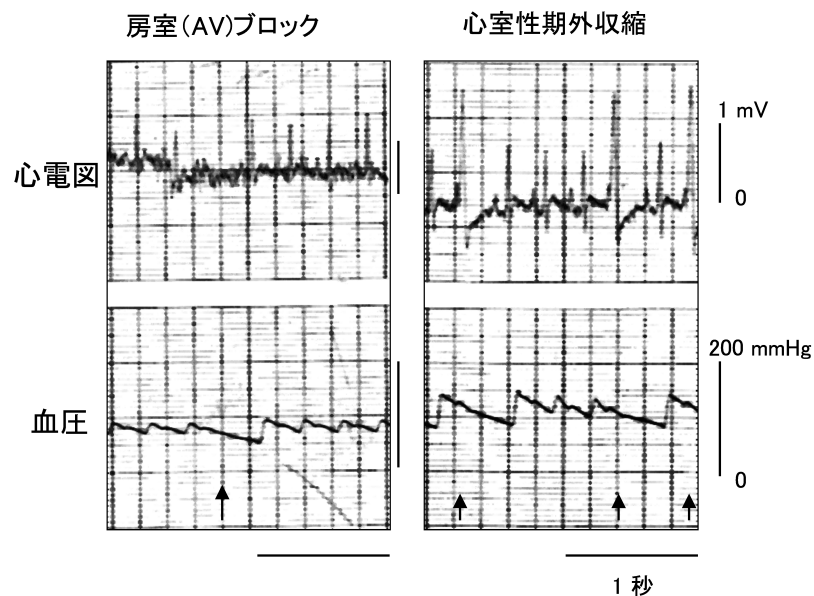


図33 DEP 溶液投与により出現した異常心電図 (矢印で示す)
左は第二度の房室 (AV) ブロックを示し、右は心室性期外収縮を示す。両者とも、異常心電図の発現時には血圧の上昇がなく (矢印)、心臓は血液を押し出すことができない。

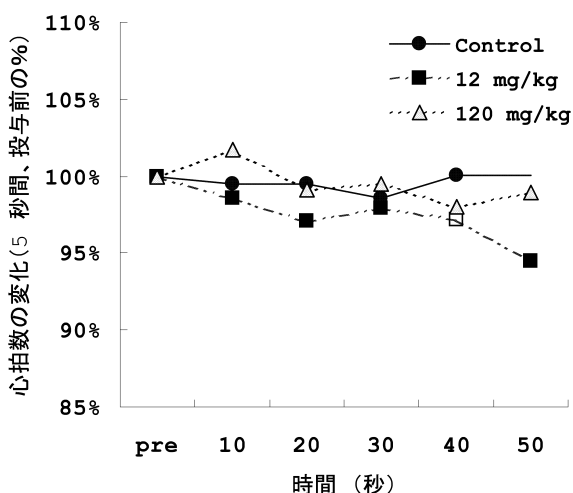


図34 5秒間当たりの心拍数の変化
12 mg/kg 投与で減少傾向を示したが、有意な差はなかった。

た。しかし、本実験では麻酔下で影響を観察しているため、自律神経系の緊張の変化を的確にとらえることは困難であると考えられ、DEPの自律神経系を介した作用は抑制されている可能性も考慮する必要がある。

本実験に用いたDEP溶液の濃度は50 mg/ml/head (120 mg/kg)と非常に高い。大気中のDEPの吸入、またはDEP溶液やエアロゾルを経口的に投与した場合、肺に入ったDEPが、どのような様式で肺胞-毛細血管壁を通過し循環血流中に侵入するのかについての具体的な証明はまだなされていない。しかし、DEPは化学変化により活性酸素である O_2^{\cdot} や OH^{\cdot} を産生し、さらにそれら活性酸素は血管内皮細胞や肺胞上皮を傷害するという報告がある(Sagai *et al.*, 1993; Ichinose *et al.*, 1995)。それゆえ、DEPは少なくとも組織傷害を通じて肺胞壁を通過し、血管内に侵入することは可能であると考えられる。

このようにさまざまな作用を持つと考えられるDEPには、数百から数千種類の化学物質が含まれているといわれている。本実験で得られた血圧の変化や異常心電図の発現も、血管や心筋に対する直接作用か、もしくは自律神経系を介した作用が疑われた。これらの作用機序を解明するには、さらに詳細な検討が必要と思われた。

(5) まとめ

DEP溶液の静脈内投与により血圧低下および異常心電図の出現が認められた。それらはDEPの心臓や血管に対する直接的作用、および自律神経系を介した間接的

作用によるものと考えられた。しかし、本実験における自律神経遮断薬の効果から考えると、DEPの直接的作用が強く推測された。一方、DEPは数千種類からの化学物質から構成されているとも言われており、その化学物質の中には、心臓や血管に対し直接的に作用する物質が含まれている可能性が示唆された。

2.1.4 DEPの心血管系に対する薬理学的作用

(1) はじめに

前節で、DEP溶液が循環器に作用することが判明した。そこで、DEPは毒性物質を持っているのか、あるいは毒性作用を示すのかを、持っているとしたらその発現容量はどのくらいなのかを、心電図を指標にして、より詳細に薬理的に明らかにすることを目的とした。

(2) 材料および方法

Hartley系雄モルモットを使用し、麻酔後に、DEPを溶媒であるDMSO液に懸濁し、0.4ミクロンのフィルターでろ過した溶液をジギタリス法に従って累積的に静脈内に投与を行い、標準技法により誘導した心電図の変化を検討し、毒性量と致死量を計算した。また、死亡時に肺の病理組織を観察した。

(3) 結果

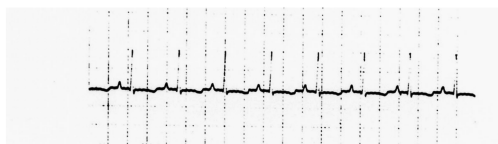
1) 不整脈誘発濃度と致死濃度

DEP懸濁溶液の累積投与によって不整脈が誘発された(図35)。不整脈は心電図に異常な心臓の活動として現れ、心房の電氣的な刺激が心室に正常に伝わらないいわゆる心房-心室電気伝導障害(A-V block)が出現し、投与量の増加によって、より重度の伝導障害に陥り、最終的には心活動の停止により死亡した(図36)。このときの不整脈誘発濃度と致死濃度を計算してみると、不整脈誘発濃度は 75.53 ± 11.65 mg/mlで、致死濃度は 132.0 ± 7.22 mg/mlであることが明らかとなった。

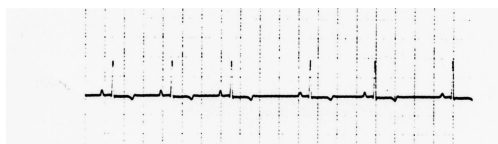
2) 病理組織学的変化

死亡時の肺の病理組織像は図37に示したように、肺胞毛細血管内にDEP粒子が見られ、血管の外には浸潤していないことが判明した。さらに、肺内の血管に軽度の収縮とうっ血像が見られ、心・循環障害が生じたものと判断された。

A) DEP投与前



B) 不整脈(徐脈)の出現



C) 死ぬ直前の心電図(房室かい離)

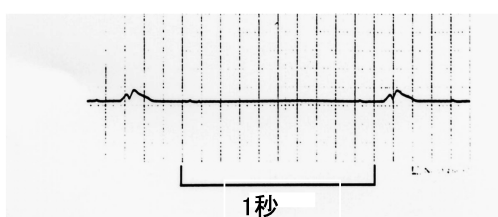
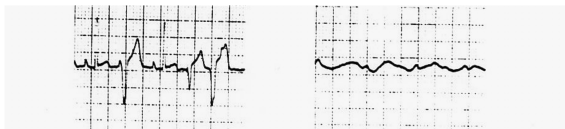


図35 モルモットに DEP を静脈に累積投与した時の心電図の変化 (1)
A ; 投与前の心電図, B ; 不整脈発現時の心電図 (徐脈), C ; 死亡直前の心電図 (房室かい離)

モルモット#4

毒性作用量 (DEP74.4mg/kg) 死亡前 (DEP123.5mg/kg)



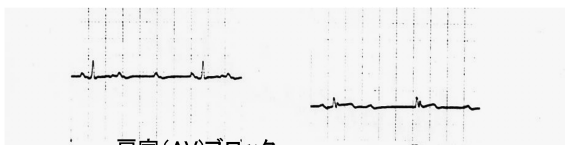
心室性期外収縮

モルモット#5

死亡前 (DEP141.6mg/kg)

モルモット#6

死亡前 (DEP151.3mg/kg)



房室 (AV) ブロック

モルモット#9

死亡前 (DEP139.8mg/kg)

モルモット#12

死亡前 (DEP101.1mg/kg)

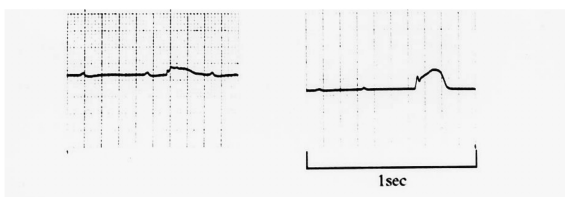
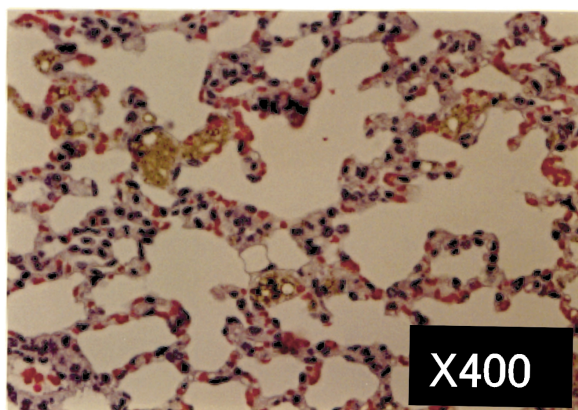
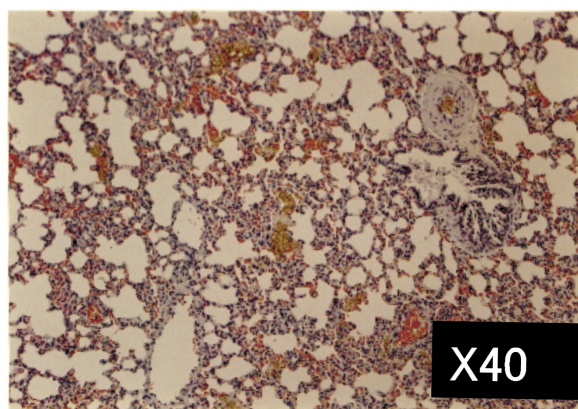


図36 DEP 溶液を静脈内に累積投与した時の心電図の変化 (2)



X400



X40

HE染色

図37 静脈内に DEP を投与したモルモットの肺の組織像
肺胞の毛細血管のなかに DEP 溶液が滲入し、
DEP 粒子と肺のうっ血像が観察される。

(4) 考察とまとめ

モルモットを使用し、心電図を指標にして、ジグタリス法による静脈内投与によって毒性量 (Toxic dose) と致死量 (Lethal dose) を求めると、不整脈誘発濃度は $75.53 \pm 11.65 \text{ mg/ml}$ で、致死濃度は $132.0 \pm 7.22 \text{ mg/ml}$ であることが明らかとなった。これによると DEP の致死量は 132 mg/kg であり、毒性成分が 10 分の 1 含まれていると仮定すると 13.2 mg/kg であり、毒物の基準である 30 mg/kg 以下を満たしていることになる。

しかしながら、現段階では毒性成分の含有率が明らかではないので、化学物質の同定が必要になるかもしれない。いずれにしても今回の結果から考えると、DEP が心臓機能に影響すること、DEP 中に作用物質が存在することが判明し、前節で述べた DEP の心臓・血管作用の結果を強く支持するものである。

2.1.5 DEPの摘出血管標本および摘出心筋標本に対する直接作用

(1) 目的

前述したように、DEPの曝露実験やDEPの静脈内投与実験によって、DEPが血管や心臓に対して機能的な変化をもたらすことが示された。

Sakakibaraら(1994)は、モルモットの心臓摘出標本を用いて、DEP溶液が心筋の収縮力を減少させ(負の変力作用)、収縮回数を減少(負の変時作用)させることを報告した。一方、Ikedaら(1995)は、血管摘出標本を用いて、DEPが血管の弛緩反応を鈍くすることを報告し、そのメカニズムとして、DEPによる血管内皮細胞のNO産生の減少、あるいは産生されたNOがDEPのスーパーオキシドと結合し、減少するためと考えた。また、著者ら(Baiら, 2001)は、培養したヒトの肺動脈血管内皮細胞を用いて、DEP溶液によるNO産生を証明している。このように、DEPの血管や心臓に対する作用についての実験報告は少なく、その反応や解釈にも統一した見解が得られていない。DEPが心臓や血管に対してどのような作用を持つのかを明らかにすることは、DEPの健康に及ぼす影響を明らかにする上で非常に重要なことである。そこで本節では、心臓と血管の摘出標本を用いて、DEPの血管および心臓に対する直接的作用を明らかにすることを目的として実験を行った。

(2) 材料および方法

本実験にはSPFラット(F344:JCL)雄、週齢7~10ヵ月、体重340~410gを用いた。ラットをPentobarbital sodium(50mg/kg BW. ip.)で麻酔し、動脈を切断し放血した後、胸部大動脈を摘出した。胸部大動脈は大動脈弓から約1cm以降の末梢部分をリング状(輪)に切り開き、標本とした。また、右心室の遊離壁を短冊状に切り取り、心筋標本とした。標本はロックリンガー液で満たしたオルガンバス(浴槽)内に吊り下げた。オルガンバスは37℃に保ち、95%O₂と5%CO₂の混合ガスを供給した(図38)。初期条件として血管には1g、心筋には1.5gの負荷をかけ、約1時間、安定させた。前の静脈内投与実験においてDEPは血圧低下作用を有することが明らかとなり、血管に対し弛緩作用があることが推察された。よって弛緩反応を明らかにするために血管を収縮させる薬物であるフェニレフリン(以下PE)

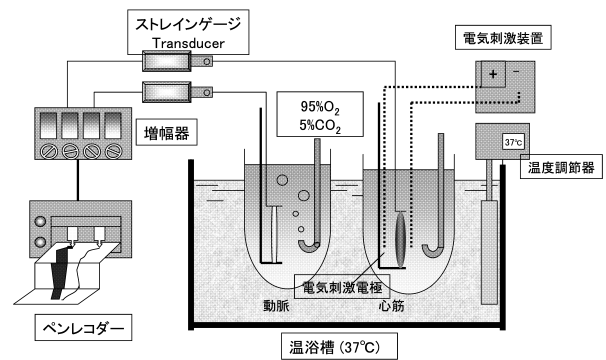


図38 心筋と動脈標本の薬物試験の実験模式図

材料:ラット(F344)胸部大動脈,右心室遊離壁,初期条件:血管には1g,心筋には1.5gの負荷をかけて約1時間安定させる。血管にはPE(10⁻⁵M)にて収縮させた後にDEPを投与。

(10⁻⁵M)にて血管を収縮させ、収縮が安定した時点でDEP溶液を累積的に添加した。心筋は定電流型電気刺激装置で、1Hzの電気刺激を行って単収縮を誘発し、収縮が安定した時点でDEP溶液を添加した。DEPに含まれるすべての成分を含んだ溶液(全分画混合:以下全DEP分画とする)は、前述した方法と同様に作成した。DEP溶液は薬槽内の濃度が0.1mg/ml, 1mg/ml, 10mg/mlになるように低濃度から高濃度へ順次段階投与した。また、対照としてDEP溶液の溶媒であるPBS-Tween 80(0.05%)の添加を行った。血管および心筋標本の張力測定はストレインゲージトランスデューサーとひずみセンサー用多チャンネル増幅器を用いた。

(3) 結果

1) 全DEP分画の摘出血管標本に対する作用

PEの作用によって収縮中の血管にDEP溶液を0.1mg/mlの濃度から段階的に投与したところ、高濃度の10mg/mlでは明瞭な弛緩作用が出現した(図39)。一方、低濃度の0.1mg/mlでは軽微な収縮が生じる場合があるほかは、弛緩反応は認められなかった。1mg/ml濃度では収縮も弛緩反応も認められなかった。DEP濃度10mg/mlによる弛緩反応は、作用後1時間以上経てPE投与前のレベルに至った。また、対照液であるPBS-Tween 80の投与では上記の弛緩ないし収縮反応は認められなかった。

2) 全DEP分画の摘出心筋標本に対する作用

電気刺激(1Hz)によって一定の収縮振幅をもった単収縮を繰り返す心筋に、DEP溶液0.1~10mg/mlを累積的に投与した際の記録図を図39に示す。0.1mg/ml

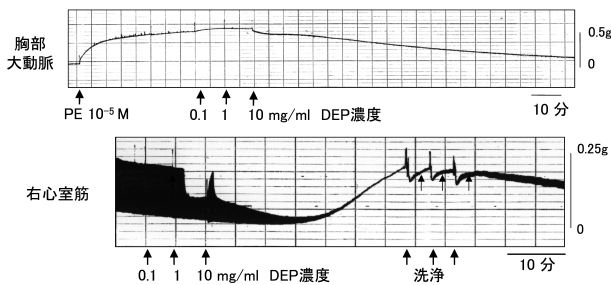


図39 WholeDEP 抽出溶液の胸部大動脈（上段）および心筋（下段）に対する作用

胸部大動脈は、低濃度（0.1 mg）では僅かに収縮するが、高濃度（10 mg/ml）では弛緩反応を示した。また、心筋は中濃度（1 mg/ml）で収縮力を減弱し、高濃度（10 mg/ml）で一時的に収縮力を増加させるが、次第に減弱し、最終的に心筋は固縮して収縮が止まった。

の濃度では収縮に変化は生じなかった。1 mg/mlでは振幅に明瞭な減少が出現した。10 mg/mlでは、いったん振幅が増加した後、再び減少しはじめ、DEP 10 mg/ml作用の約 20 分後には DEP 作用前の収縮力のおよそ 8%にまで減少した。その後、単収縮が消失したままで、張力レベルが著しく上昇した（以後、“強縮”と表現）。薬槽内の DEP 溶液をロックリンガー液で洗い流すと拍動は再開したが、DEP 作用前に比べて振幅は減少した。

（4）考察

本章における実験結果によって、10 mg/mlの濃度の Whole DEP は、ラットの胸部大動脈を弛緩させる作用を有することが明らかとなった。血管の弛緩作用を調べる場合、受容体作動薬あるいは KCl 溶液による収縮に対する抑制作用を観察することが一般的に行われている。高濃度 KCl 溶液による収縮は、脱分極に基づく細胞外 Ca^{2+} の流入に依存した平滑筋収縮を誘発するが、受容体作動薬ではプロテインキナーゼ C など、多くの細胞内情報伝達機構も動員される。本来は KCl と受容体作動薬の両方の収縮に対しての弛緩作用を観察すべきであるが、本研究ではより多くの情報伝達機構が動員される PE 収縮に対する弛緩反応を観察した。DEP による血管の弛緩はムスカリン受容体、あるいは受容体への作用、または血管内皮細胞における NO の産生増加などが原因として考えられる。一方、低濃度（0.1 mg/ml）の DEP の投与において、PE 収縮を軽度 to 増強する作用が存在することも確認された。この成績は、2.1.3 の静脈内投与実験において、副交感神経遮断薬であるアトロピ

ンと交感神経遮断薬であるプロプラノロールを投与した後に DEP 溶液（120 mg/kg）を静脈内に投与した場合、軽度の血圧の上昇が出現したと矛盾しない。このような収縮増強の機序に関しては血管内皮細胞で生成された血管弛緩因子の NO が DEP が生じるスーパーオキシドと結合するために NO の量が減少し、収縮を起こすという説が有力である。本実験結果も自律神経系を介在しない血管に対する直接的な反応を示唆しているため、NO とスーパーオキシドとの反応を推測させている。

一方、心筋作用に関しては、心筋単収縮の抑制とそれに続く強縮が出現することが明らかになった。心筋の興奮時にみられる脱分極および再分極過程では、 Na^+ チャンネル、 K^+ チャンネルや Ca^{2+} チャンネルが働き、また心筋収縮では L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外 Ca^{2+} の流入過程や、それが引き金となって生じる小胞体からの Ca^{2+} の放出が関与している。本実験でみられた心筋標本の強縮において、これらの興奮収縮連関がどのように影響を受けるかについてはまだ明らかにされていない。また DEP は心筋細胞膜を損傷する可能性も考えられ、この点も含めて考慮する必要がある。これらの組織標本を用いた実験結果から、高濃度の DEP の循環器系に対する作用は、血管の弛緩と心拍動の抑制による血圧低下ならびに心拍出量の減少をもたらすものと解釈される。

これらの血管の弛緩作用は、2.1.3 で述べた DEP 溶液の静脈内投与による血圧の低下を裏づける結果であると考えられる。また、一部の個体に心室性期外収縮や房室ブロックの出現が認められていることから、DEP の心筋直接作用との関連性が考えられた。心筋標本では高濃度の DEP で強縮にまで至ったが、前述の心電図所見ではそれほど激しい心機能障害を示唆する成績は得られていない。また、摘出血管に対する弛緩作用や心筋の強縮作用は長時間持続したのに対し、静脈内投与による血圧の低下は一過性であった。これは、生体内では DEP は代謝作用を受け、血中の一定濃度を維持できないことが一因と思われる。また、血圧の一過性の反応に関しては、フィードバック機構による血圧低下の抑制が働いたことなども考えられる。

ところで、DEP は千種類以上の物質から構成されているともいわれているが、どのような物質が含まれているのかなど、具体的な分析はまだされていない。本実験で用いた DEP にも多数の物質が混入していることが考

えられ、そのためそれぞれの物質の相互作用が働き、反応が相殺されたり不活性化していた可能性がある。血管や心筋に対する反応が一定でないのはこれらが原因として考えられた。よって、DEPの循環器に対する作用および作用機序を解明するには、DEP全体ではなく、系統的に分画したものをを用いることが必要であると思われる。

(5) まとめ

胸部大動脈と心臓の右心室壁の摘出標本を用いて、DEPの直接作用を確認した。血管は低濃度(0.1 mg/ml)のDEP投与によって軽度に収縮し、高濃度(10 mg/ml)のDEPでは弛緩を呈した。心筋はDEP濃度が10 mg/mlになると、振幅が徐々に減少するとともに、心筋全体が収縮(強縮)していく反応が認められた。これらのことからDEPは血管や心臓に対して直接的な作用を持つことが明らかになった。DEP中の循環器に対する作用および作用機序を解明するには、DEP全体ではなく、系統的に分画したものをを用いることが必要であると考えられた。

2.1.6 DEP中のどのような物質が血管と心臓にどのような作用を持つか - 化学物質の抽出と単離

(1) はじめに

前節までの実験において、DEPは血管に対して弛緩反応や心臓に対して強縮反応などの直接的な作用を持つことが明らかになった。しかしながら、DEP中の循環器に対する作用および作用機序を解明するには、DEP全体ではなく、系統的に分画したものをを用いることが必要であると思われる。そこで、DEP溶液を系統的に抽出し分画し、血管反応と心臓反応を指標に、さらに細分画していく方法で、DEP中のどのような物質が心・血管にどのような作用を持つのかを明らかにしようとした。

(2) 方法

DEPをヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタン、メタノールおよびアンモニアの5種類の有機溶媒によって極性の異なる分画に分離した(図40)。これらの分画のうち主要な5分画およびその細分画それぞれについて、前節と同様に血管と心筋の摘出標本に対する作用の検索を行った。

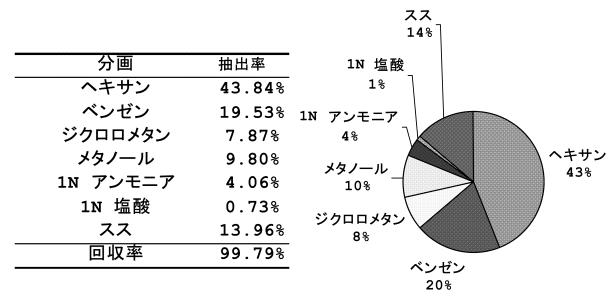


図40 DEPの溶媒抽出法による主要分画とその構成割合(北海道医療大学, 林 英幸 1999)

(3) 結果

1) 5分画に対する心臓と血管の反応

5分画のうち、血管に対してはヘキサンとベンゼン分画では弛緩反応が、ジクロロメタン、メタノール分画では収縮および弛緩反応が認められ、アンモニア分画では主に収縮反応が確認された。全DEPで認められた心筋の強縮作用はヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタン、メタノール分画で観察され、アンモニア分画では認められなかった。これらの結果から、血管の弛緩および収縮作用はまだ広い範囲に分布しているが、心筋に対する作用物質はアンモニア分画では認められなかったことから、水に溶けにくい成分からなることが疑われた。このように5分画で反応性の相違が認められたが、作用物質の存在が推定された分画には、まだ数百種類の化学物質が混在することや、血管や心筋の反応が多く分画にまたがって存在していることから、さらに細分化された分画について作用を検討する必要があることが示唆された。

2) 5分画の酸、塩基、中性分画に対する心臓と血管の反応

そこで、有機溶媒によって分離された5分画のうち、血管と心筋の両方に作用が認められたヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタンおよびメタノール分画をさらに酸塩基抽出法により HCO_3^- 分画(酸性)、中性分画およびNaOH分画(アルカリ性)に分離し(図41)、それぞれの血管および心筋に対する作用を検索した。血管の弛緩作用、および心筋への作用はヘキサンおよびベンゼン分画の HCO_3^- 可溶分画、NaOH可溶分画のみに存在した(図42)。ジクロロメタン分画では HCO_3^- 可溶分画、NaOH可溶分画では血管の収縮作用が、中性分画では弛緩作用が認められた。メタノール分画においても HCO_3^- 可溶分画、NaOH可溶分画に収縮作用のみがみられ、明確な弛緩反応はいずれの分画にも認められなかつ

- 1)有機溶媒抽出→ヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタン、メタノール、アンモニアの5分画
- 2)上記の5分画に分けたものをさらに、
 - (1)酸塩基抽出→ NaHCO_3 (有機酸成分)、
 - (2) NaOH (フェノール性化合物)、
 - (3)中性(最後まで塩基で可溶化しなかった成分)分画
- 3)上記のフェノール性化合物をさらに、
 - (1)シリカゲル吸着クロマトグラフィー法によりベンゼン NaOH 分画 →15分画-第3分画を
 - ベンゼン NaOH 分画 第3分画→5分画 (Fr.1~5)

図41 DEP の分画方法と分画過程

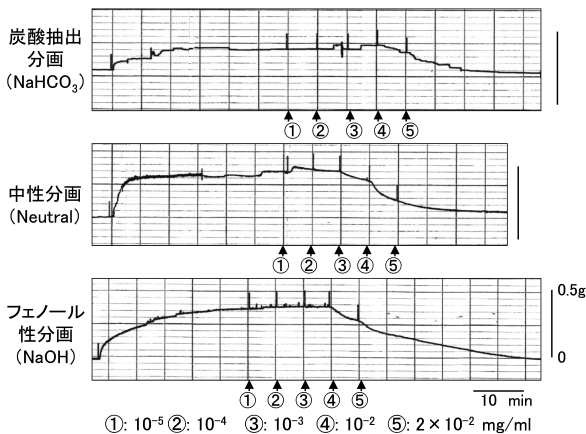


図42 ベンゼン 3分画溶液の血管に対する作用
3分画のいずれの溶液でも弛緩反応が観察されたが、 NaOH 分画が反応が明瞭であった。

た。酸塩基抽出によって、有機溶媒抽出よりもさらに細分化したことで、分画によって心臓や血管に対する作用の有無や、反応性の違いがより詳細に確認された。しかし、作用物質のある分画にはなお数十種類の化学物質が含まれることが考えられた。

3) ベンゼン NaOH 可溶画分の反応

続いて、血管と心筋に対し両方に作用をもち、反応が明瞭で、かつ分析化学的に性質をトレースしやすいベンゼン分画の NaOH 可溶画分に注目した。シリカゲル吸着クロマトグラフィー法を用いて、ベンゼン分画の NaOH 可溶画分をさらに15分画に分離し、それぞれの分画における血管および心筋への反応性の有無を確認した(図43)。第1分画では血管に対し、弛緩反応のみが出現した。第2~4分画では低濃度で収縮作用、高濃度で弛緩作用が認められた。第5分画以降の分画においては、収縮作用のみが確認された。これまでの実験でみられた心筋の強縮作用は、第2および第3分画にのみ認め

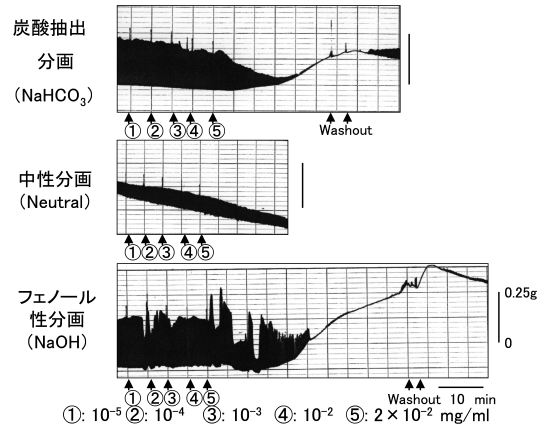


図43 ベンゼン 3分画溶液の心筋に対する作用
酸性、アルカリ性分画液では心臓に対して強縮が見られるが、中性分画は反応を示さない。

られた。これらの結果から、血管収縮作用に関してはまだ広い範囲に存在しているものの、弛緩作用および心筋に対し強縮作用を有する化学物質は、その性質により存在部位が限られたと思われた。

4) ベンゼン NaOH 可溶画分の第3分画の反応

そこでさらに、血管や心筋に作用を有する化学物質の性状をさらに絞り込むために、血管および心筋の両方に対し作用が認められた、ベンゼン NaOH 可溶画分の第3分画を、再度シリカゲル吸着クロマトグラフィー法を用いて5つの分画(Fraction 以下 Fr. と記す)に分離し、さらに細かい分画に分離していった(図44)。

さらに細分化を2段階進めた時点で、血管および心筋作用をもつ化学物質の単離に成功した。ここでは仮称としABCDE物質とする。これらの物質については現在、構造の決定や生物学的反応の再確認が行われている(図45, 46)。

2.1.7 DEP から抽出、単離された化学物質 B の静脈内投与による反応

(1) はじめに

このように数段階の分離・精製を経て、DEP中の血管および心筋作用物質の化学的性状が明らかになってきた。そこで、全DEPの静脈内投与によって認められた一過性の血圧低下が、これらのDEPから抽出・単離された化学物質(仮称ABCDE)の影響であるかどうかを確認するため、再びラットの静脈内投与と実験を行った。

(2) 材料および方法

前述のとおりであるので省略する。

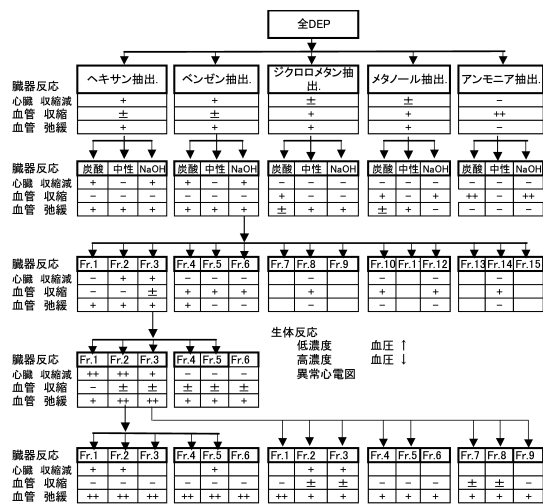


図44 DEPの抽出過程の系統図

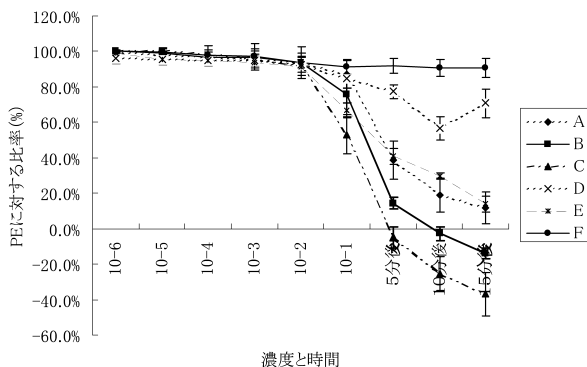


図45 DEPから抽出分離された化学物質(仮称; ABCDEF)の血管弛緩反応
Fは分離されなかったが, ABCの構造類似体である。10⁻⁶は10⁻⁶mモル濃度を示す。

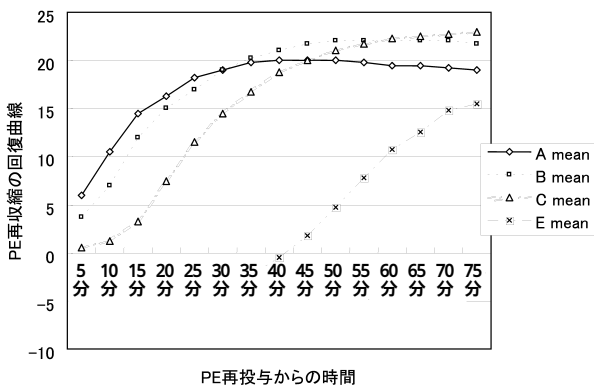


図46 DEPから抽出分離された化学物質(仮称; ABCE)投与後のPEによる血管の再収縮反応
Eは他の化学物質に比較して回復が遅いことを示す。

(3) 結果

1) 血圧の低下と異常心電図の出現

前節で分離された化学物質Bの静脈内投与実験では、全DEPの静脈内投与実験のときと同様の、一過性の血圧低下が認められた(図47)。全DEPにおいては120 mg/kgで血圧低下が認められたが、化学物質Bではより低濃度の45 mg/kgで反応が出現した。さらに、全DEPのときには明瞭ではなかった血圧上昇反応が、5 mg/kgの投与によって認められた(図48)。さらに、全DEP投与時にみられたような一過性の心室性期外収縮が認められた。

(4) 考察とまとめ

この低濃度で血圧が上昇し高濃度で血圧が低下するという結果は、摘出標本を用いた実験における、低濃度における血管収縮、および高濃度による弛緩作用といった結果と同じである。ここで、血圧の低下反応が出現した。また全DEP投与時にみられたような一過性の心室性期外収縮が認められた。これらの結果から、化学物質Bは全DEPと同様の生体反応を引き起こすこと、すな

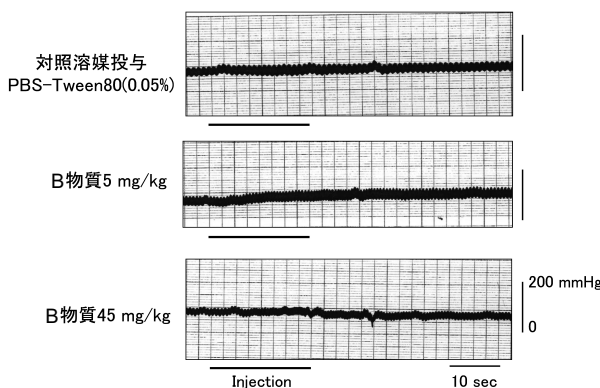


図47 DEPから抽出分離された化学物質B(仮称)を麻醉ラットの静脈に投与した時の血圧の変化

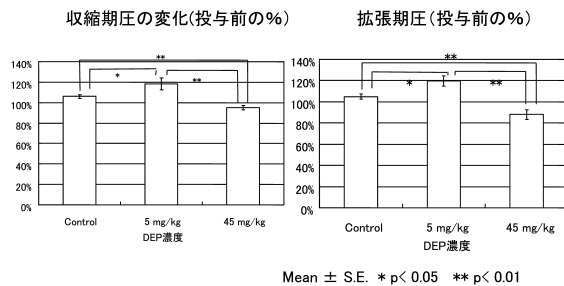


図48 DEPから抽出分離された化学物質B(仮称)を麻醉ラットの静脈に投与後25秒時における血圧の変化
平均±標準誤差で示す。*は有意差を示す。

わち生体に対し血圧低下や異常心電図の出現の原因となる物質を含んでいることが明らかとなった。

2.1.8 DEP から抽出，単離された化学物質 B の血管弛緩作用および心臓強縮作用の特徴

(1) はじめに

これまでの実験で，化学物質 B が DE 曝露や DEP の静脈投与実験で観察される現象を引き起こす一つの要因になっていることが明確になってきた。

そこで，この化学物質 B を使用して，作用機序について検討した。

(2) 実験材料と方法

方法は前述のとおり，試薬として，スーパーオキシドをとらえて過酸化水素にし無害化する SOD とそこで生じた過酸化水素を分解して水にするカタラーゼ，さらに，血管内皮細胞から作られる血管弛緩物質の NO の産生を阻害する L-NAME を組み合わせて使用して，DEP の弛緩反応のメカニズムを検討した。

(3) 結果

血管の反応を図 49 に示した。この分画の 10^{-1} mg/ml の化学物質 B は単独で，強い弛緩反応を示すが，SOD とカタラーゼの前投与によって，この弛緩反応は抑制された。さらに，L-NAME によって NO の産生を抑えると，弛緩の程度は小さくなった (図 50)。この反応は，化学物質 B による血管の弛緩に NO が関与していることと NO が関与しない弛緩反応が存在することが推測された。

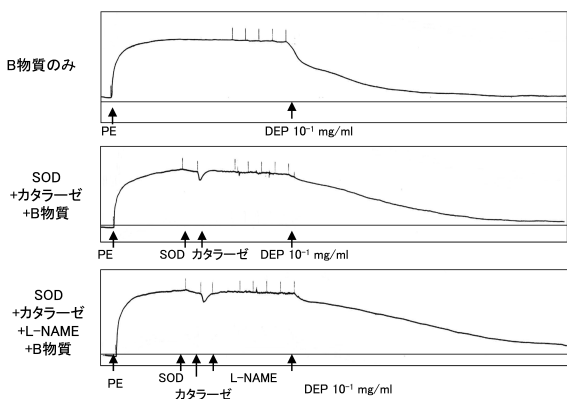


図49 DEP から抽出分離された化学物質 B (仮称) の血管に対する作用
弛緩作用に活性酸素が関与しているか，あるいは NO 産生による弛緩であるかを知るために，SOD, カタラーゼ，NO 産生阻害剤の L-NAME を投与した。

一方，心筋に対しては，交感神経のレセプターをプロプラノロールとベラパミルで完全に遮断すると，収縮力の軽度の減少が現れるが，そこに化学物質 B を投与すると，化学物質 B による収縮力の減少と強縮は引き起こされ，交感神経のレセプターは心筋の反応に関与していないことが判明した。(図 51)

したがって，DEP の作用として，図 52 に示したように，HEI (米国の健康影響研究所) が提唱した作用模式図に DEP の直接的な心臓と血管に対する影響を付け加えることを提唱した。

(4) まとめ

生理学的実験による DEP の生体および臓器への影響の検索と，それに基づいた分析化学的手法による DEP の分離・精製を組み合わせることによって，これまで不明とされていた DEP の循環器系に及ぼす作用の性状な

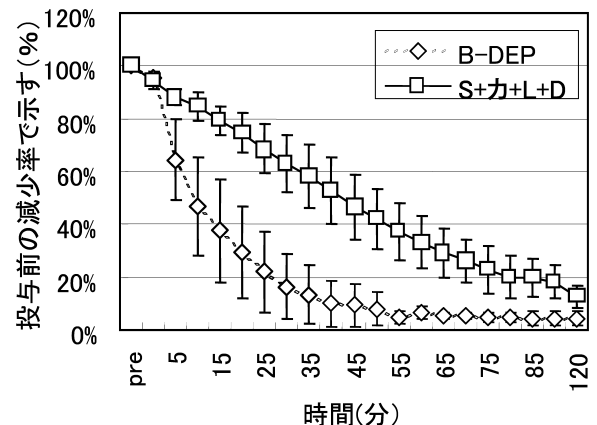


図50 DEP から抽出分離された化学物質 B (仮称) の血管に対する作用
弛緩に影響する NO 産生をブロック (S + カ + L-NAME + D (B) しても，弛緩が起きることを示す。

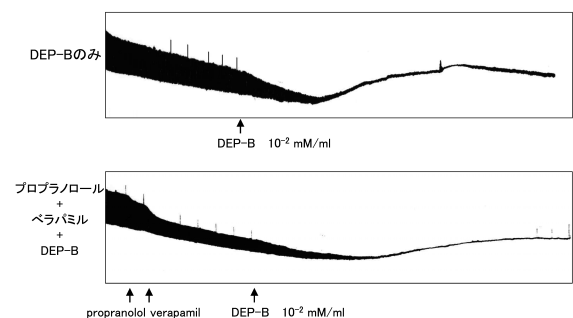


図51 DEP から抽出分離された化学物質 B (仮称) の心臓に対する作用
交感神経遮断薬であるプロプラノロールとベラパミルを投与しても，減力作用と心筋停止を起こした。

らびに循環器作用をもたらす化学物質群の性状が明らかとなった。

2.1.9 培養細胞系 - 血管内皮細胞に及ぼす傷害作用

(1) はじめに

培養細胞を使用して、作用のよくわからない化学物質の作用を判断することは、よく使用されている手段であり、実験系の簡素化や反応の純粋さにおいて優れている実験方法と言える。

前節までの *in vivo* と *in vitro* の実験で、DEP が血管内皮細胞に作用して、血管を弛緩させることが判明した。そこで、血管内皮細胞が実際に血管の弛緩因子である NO を産生するのか、また、その毒性はどのレベルなのかを知る目的で、血管内皮細胞に対する障害作用について検討した。

(2) 材料と方法

培養細胞はヒトの肺動脈内皮細胞 (HPAEC) を用いた。数世代培養して増殖が安定した後、特別な培養液に 15 μg , 30 μg の Tween 溶液に懸濁した DEP を入れて増殖の過程を 3 日間観察した。さらに、内皮細胞で産生された NO と DEP によって産生された活性酸素による細胞傷害の仕組みを解明するために、活性酸素を結びつけて過酸化水素にする SOD と過酸化水素を分解して無害な水に変換するカタラーゼ酵素を使用した。

(3) 結果

DEP はヒトの肺動脈内皮細胞の成長を 15 μ および 30 μg で抑制し、1 日目から 3 日目で量-反応関係があった (図 53)。また、15 μg の DEP に 5 μg の SOD あるいは 400 U/ml のカタラーゼ (CAT) を入れると、1 ない

し 2 日目の成長抑制は 30 % ほど緩和され、SOD と CAT を入れたものでは 40 % ほど緩和され、SOD と CAT が内皮細胞の傷害作用を減少させることが判明した (図 54, 55)。DEP を 30 μg に増やして、同様な試験をすると、SOD と CAT が成長抑制を強く抑制した。

(4) 考察

15 μg という少量の DEP でも、血管内皮細胞の増殖成長を抑制するが、SOD や CAT が入るとその抑制作用が緩和されること、そして SOD と CAT の混合液は成長抑制をもっともつよく阻止することから、DEP が産生した活性酸素が SOD と CAT によって無害化され、内皮細胞への傷害を減少させたことが考えられた。

さらに、血管内皮細胞が産生する NO の作用を考えると、図 56 のような DEP の血管内皮細胞への毒性のメカニズムが考えられた。つまり、DEP が含有する金属類

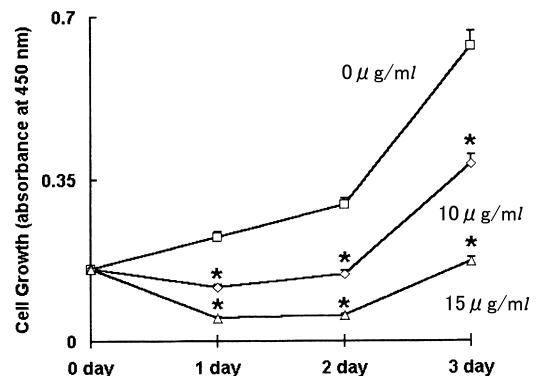


図 53 DEP に曝露したヒトの動脈内皮細胞の成長曲線 15 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$ の DEP を 15 時間曝露し、細胞の成長を観察した。* は 0 $\mu\text{g/ml}$ との有意差を示す。

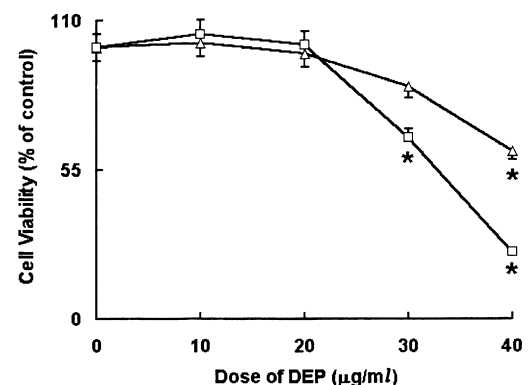


図 54 DEP がヒトの動脈内皮細胞の生存に及ぼす影響 () は 2 時間, () は 24 時間後を示す。* は曝露前との有意差を示す。

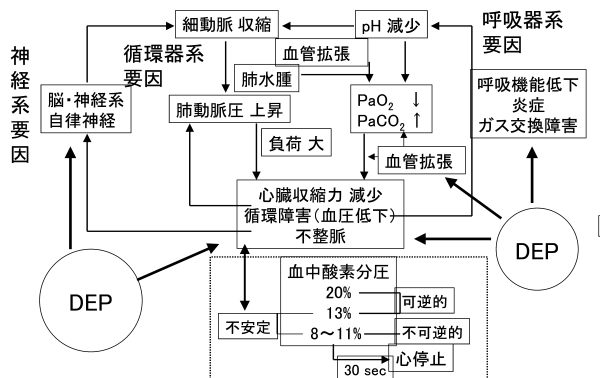


図 52 循環器障害のメカニズムの想定図

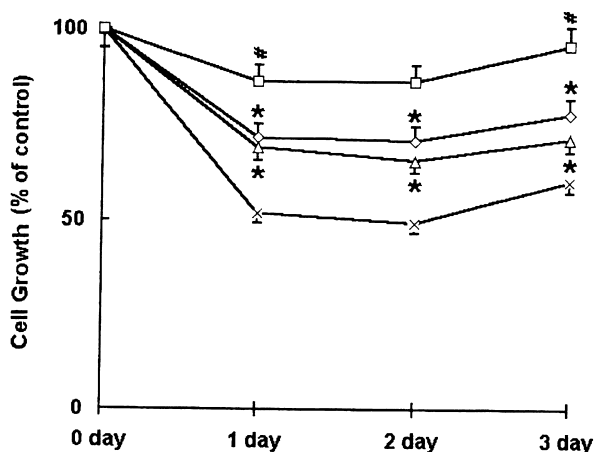


図55 SOD とカタラーゼが DEP に曝露したヒトの動脈内皮細胞の成長曲線に及ぼす影響 (□): 対照, (◇); DEP + SOD, (△); DEP + カタラーゼ, (X); DEP + SOD + カタラーゼ。

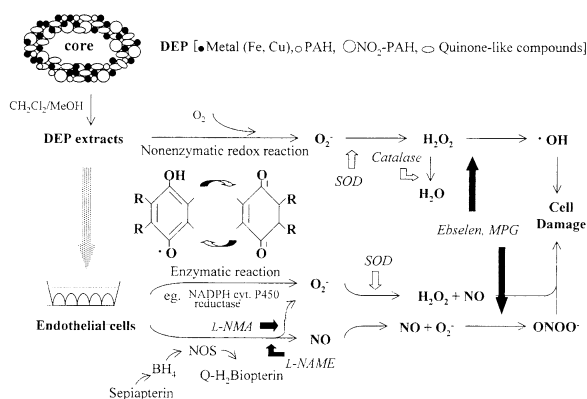


図56 細胞傷害のメカニズムの模式図

やキノン様化合物が酵素反応により、活性酸素を産生し、この活性酸素は細胞内の SOD と CAT によって代謝され無害な水になるが、一部の残った OH ラジカルは細胞に傷害を及ぼすと考えられる。一方、血管内皮細胞で産生された NO は活性酸素と結合したり、過酸化水素と反応して毒性の高いパーオキシナイトライト (ONOO⁻) を生成して細胞傷害を起こすことが推測された。

2.1.10 肺胞上皮細胞と肺微小血管内皮細胞、肺線維芽細胞への影響

(1) はじめに

ディーゼル排気粒子 (DEP) の毒性を簡便に評価し、心肺循環機能に及ぼす障害作用機序を解明するために、培養細胞への DEP 抽出物曝露を行った。肺胞に沈着した DEP 粒子は、肺胞表面を覆うサーファクタント層に

吸着し、そのほとんどが肺泡マクロファージに貪食されるが、DEP を構成する様々な化学物質や金属の一部は、サーファクタント中に溶解する。これらの化学物質は肺胞上皮細胞に傷害を与えることにより肺胞上皮細胞を通過して、線維芽細胞や血管内皮細胞に傷害を及ぼす可能性がある。そこで、培養肺胞上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞への影響評価を行うこととした。

一方、上皮細胞や線維芽細胞にとって、力学的情報を伝える足場である細胞外マトリックスの存在は、細胞の正常な形態・機能を発現させるために不可欠である。しかしながら、これまでのプラスチック上での培養は、細胞外マトリックスの機能を考慮しないものであった。図 57 は、ラット肺胞上皮細胞を上皮細胞直下に存在する細胞外マトリックスである基底膜上 (A) とプラスチック上 (B) で培養し、細胞骨格を比較したものである。基底膜上では、細胞周囲を取り巻いてアクチンの束が観察される。生体内の上皮細胞はこれと同じような細胞骨格を示す。一方、プラスチック上では、肺胞上皮細胞のアクチンはストレスファイバーを形成する。このような細胞の状態は、正常組織では観察されないことから、正常状態の細胞機能を発現しているとは考えにくい。そこで、DEP の細胞毒性評価を生体へのリスク評価に外挿するために、細胞外マトリックスを考慮したより生体に近い細胞培養系を作製し、DEP の細胞毒性評価を行った。

(2) 結果

1) DEP 抽出物の細胞毒性

DEP 抽出物の調整は DEP のジクロロメタン抽出物をジメチルスルホキシドに 300 mg/ml の濃度に溶解した。細胞は、ラット肺胞型上皮細胞、ラット肺線維芽細胞

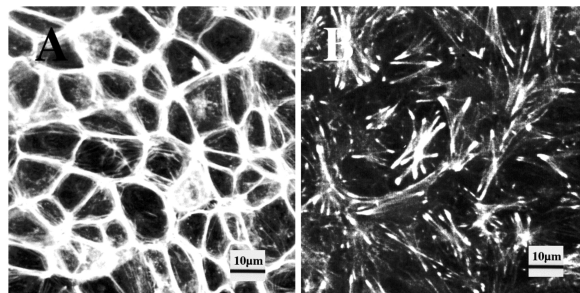


図57 培養肺胞上皮細胞の細胞骨格像 肺胞上皮細胞を基底膜上 (A) プラスチック上 (B) で1日培養後、ローダミン-ファロイジンで染色し顕微鏡観察。

胞，ラット肺微小血管内皮細胞を用いた。肺胞上皮細胞と肺微小血管内皮細胞は，基底膜培養基質，または従来培養である型コラーゲンをコートしたプラスチック上で培養し，培地に DEP 抽出物を添加した。肺線維芽細胞は，従来のプラスチック上での培養と結合組織を模して型コラーゲンゲルに包埋した場合の DEP 抽出物の毒性を比較した。

ネクローシス型の細胞死は，各種分解酵素による組織破壊や免疫反応の活性化を引き起こす。気管内投与で認められるネクローシスの惹起は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で認められたが，低濃度では影響の少ないアポトーシス型の細胞死であった。DEP 抽出物を 24 時間曝露して生細胞数を半減させる濃度 (LC_{50}) は，肺胞上皮細胞が基底膜上で 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，プラスチック上で 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり，肺毛細血管内皮細胞が基底膜上で 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，プラスチック上で 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり，肺線維芽細胞がコラーゲンゲル中で 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，プラスチック上で 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。しかしながら，10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で有意に細胞増殖を促進したことから，微量の DEP 抽出物曝露で肺の線維化が促進する可能性が示唆された。

DEP による細胞毒性の原因のひとつとしてラジカルによる酸化が予測される。3 種の細胞において抗酸化剤である 5 mM の N-アセチルシステイン処理により DEP 抽出物曝露の細胞毒性が軽減した。

以上の結果から，1) 生体組織を模して基底膜や型コラーゲンゲル中で培養した場合，従来のプラスチック上での培養よりも DEP 抽出物曝露に対する細胞の抵抗性が強いこと 2) 低濃度の DEP は肺線維芽細胞の増殖を引き起こすこと 3) DEP による細胞障害作用機序として酸化的ストレスが関与していることが示された。

2) DEP 抽出物の物質透過性への影響

肺胞上皮細胞や肺毛細血管内皮細胞の細胞間接着構造への傷害は，肺腔への血漿成分と外部から侵入してくる細菌や抗原物質の透過性を亢進するとともに，DEP に含まれる化学物質が血管を通過しやすくと考えられる。そこで肺のバリア機能の指標として，培養組織透過電気抵抗を測定した。DEP 抽出物の曝露は濃度依存的に上皮細胞や内皮細胞層透過電気抵抗を減少させた (図 58)。また，DEP 曝露による物質透過性の亢進は，基底膜上で培養した場合に軽減された。電気抵抗の減少は炎症性サイトカインの添加では認められなかった。細

胞間接着構造を形成する ZO-1 に対する抗体で肺毛細血管内皮細胞と肺胞上皮細胞を組織染色すると，基底膜上で培養した場合に明瞭な接着構造が形成されることが示された (図 59)。以上の結果から，1) 細胞接着構造が DEP による細胞障害作用の標的であり，2) 物質透過性の亢進を引き起こすことが示された。

基底膜等の細胞外マトリックスの存在が，DEP 抽出物による細胞傷害の軽減に貢献していることが明らかになったことから，これまでの培養法では LC_{50} 値を低く算出している可能性が示唆された。今後は，DEP による酸化的ストレスが上皮細胞や内皮細胞の細胞間接着構造に傷害を与えて物質透過性を亢進させ，細胞毒性を示

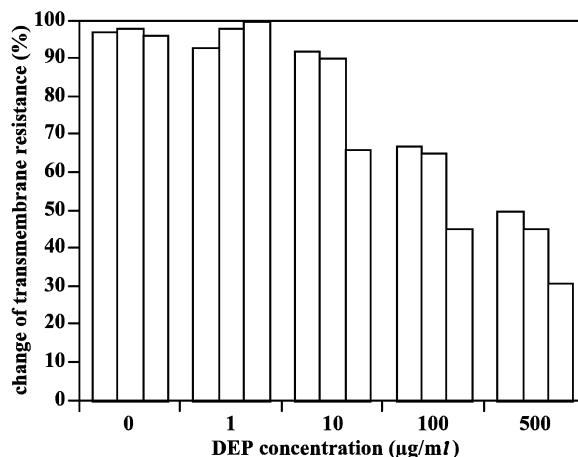


図 58 肺微小血管内皮細胞層の電気抵抗への影響
基底膜 (白)，線維状コラーゲン (斜線)，プラスチック (黒) 上で培養し，DEP 4 時間曝露後の電気抵抗値を測定し，曝露前の値と比較。

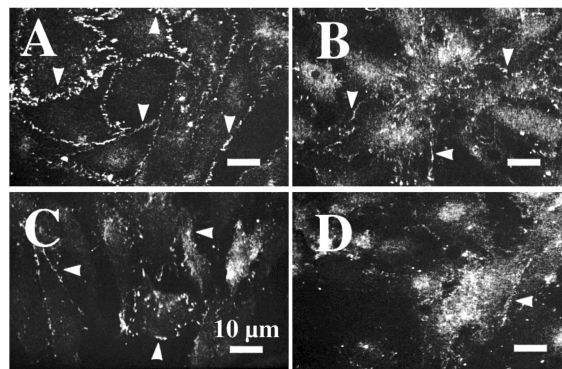


図 59 肺微小血管内皮細胞の細胞接着構造への影響
基底膜 (A, C)，プラスチック (B, D) 上で培養した肺微小血管内皮細胞に 0 (A, B) または 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DEP 抽出物を 4 時間曝露後，ZO-1 を染色。

すことを証明するとともに、細胞外マトリックス上での培養細胞でのサイトカイン・ケモカインの産生の変化、細胞接着分子の発現、抗酸化系酵素の誘導について検討し、DEP が呼吸循環系に与える影響を評価する上で有用なマーカーをさらに検索する必要があると思われる。

2.2 免疫系に対する影響

2.2.1 DEP 曝露マウス由来肺胞マクロファージに関する免疫学的研究

(1) はじめに

DEP が呼吸器系のみならず生殖系にも影響を及ぼすことが報告されてきて世間の関心が高まってきている。我々は、DEP と肺胞マクロファージの関係をj知るために肺胞マクロファージを採取し、様々の性質を調べたので報告する。

(2) 材料と方法

1) 3 mg/m³, 1 mg/m³, 0.3 mg/m³の濃度で4, 5, 5, 6, 7 ヶ月曝露されたICR マウスを用いた。対照として非曝露 ICR マウスを用いた。

23 ゲージエラスト針を用いて麻酔を施した後、肺胞洗浄により肺胞マクロファージを得た。貧食能、免疫染色により98%以上マクロファージであった。完全に細胞質が黒くなった肺胞マクロファージ (= DEP 貧食マクロファージ) を計数した。

貧食能は、BCG Tokyo 50 µg/ml 培養チャンパー (1 × 10⁵/ml) に加えて、一晚培養した後、Ziehl-Neelsen 染色を行い BCG 貧食能の強さを判定した。

また、肺胞マクロファージの活性化の程度を知るため、ABC-PO により Mac-1, Mac-3 抗原の発現程度を調べた。

サイトカインの定量は 1 × 10⁶ の肺胞マクロファージを 24 穴培養プレートにまき、100 µg BCG を加え一晚培養した。翌日培養上清を集め IL-1, IL-12, TNF- α を ELISA で測定した。測定キットは Biosource International 社製のを用いた。

抗原提示能の検索では、正常 ICR マウス脾細胞を得て、培養シャーレにまき、6 時間以上培養した後付着細胞 (= マクロファージ) を除去した。1 × 10⁵ を 96 穴培養プレートにまきそこに、それぞれ DEP 曝露マウス由来 5 × 10⁴, 1 × 10⁵ の肺胞マクロファージ、各種マイトゲン (ConA, LPS, PPD, BCG) を加え 2 日間培養し

た。3.7 × 10³ Bq/ウエルのトリチウムチミジンを加えさらに一晚培養後、セルハーベスターでグラスファイバー上に細胞を集め、乾かした後ベータカウンタで測定した。

同様に、DNA 合成能、および NO 産生能を BCG を 1 × 10⁵ にして 96 穴培養プレートにまき一晚培養した後、翌日 100 µl を採取して Grisee 試薬により NO を測定した。

(3) 結果

1) DEP 貧食細胞数

完全に黒くなった DEP 貧食肺胞マクロファージは曝露期間が増すとともに、有意に増加した。いずれの群の肺胞マクロファージもよく BCG を貧食した。ほぼ完全に赤く染色された肺胞マクロファージ (BCG 貧食マクロファージ) を数えたところ有意差は認められなかった。

2) 肺胞マクロファージの活性化

Mac-1, Mac-3 抗原は曝露期間の短い群で強く染色される傾向があったが、同じく有意差がなかった。

3) サイトカイン活性

IL-1, IL-12, TNF は 7 ヶ月曝露群で有意に減少していた。4, 5, 5 ヶ月群では差が認められなかった。

4) DNA 合成機能の低下

抗原提示能実験では 7 ヶ月曝露群で有意に DNA 合成能が低下していた。とくに BCG, LPS, ConA で目立った。

各群の脾細胞を用いた DNA 合成能実験について。7 ヶ月曝露マウスでトリチウムチミジンのとりこみが有意に抑制された。次いで、6 ヶ月曝露群で中等度に抑制された。

5) NO 産生能

やはり、7 ヶ月曝露群の肺胞マクロファージでかつ 3 mg/m³ 曝露された群で NO 産生が有意に減少していた。

(4) 考察

我々は種々のパラメータを用いて肺胞マクロファージの性質を調べた。

DEP を長期間曝露されたマウス由来の肺胞マクロファージはサイトカイン産生、NO 産生が低下していた。しかも 3 mg/m³ 曝露群で顕著だった。これは DEP が一定以上だと細胞に悪影響を与えることを意味する。

また、脾細胞を用いた DNA 合成実験では、やはり高濃度 DEP 曝露群、長期間曝露群で有意にチミジンの取り込みが抑制されていた。これは血中に何らかの抑制物

質が増加していることを意味する。

2.2.2 DEP 曝露マウスと結核感染との関係に関する基礎的研究

(1) はじめに

大気汚染に置かれた個体は抵抗性、免疫能が低下していると推定される。我々は、曝露期間、曝露量を考慮して得られた DEP 曝露マウスが結核菌に感染されたとき、どのように病態が変化するかを調べた。同時に *Mycobacterium bovis* 関連抵抗性遺伝子である N-ramp mRNA 発現と病変形成との関係をも調べた。

(2) 材料と方法

1) マウス

BALB/c, DBA/2 雌マウスを曝露チャンバー内において 3 mg/m^3 の濃度で、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月曝露した。対照として、対応する週齢の合致した非曝露マウスを用意した。DBA/2 マウスは *M. bovis* 感染抵抗性であり、BALB/c マウスは *M. bovis* 感染感受性である。

2) 感染実験

H 37 Rv 結核菌を $106 \text{ CFU}/100 \mu\text{l}$ 尾静脈から注射した。7 週間後、マウスを解剖し、主要な臓器を摘出し、ホルマリンにて固定した。型のごとくパラフィン包埋し、HE 標本を作成した。また Ziehl-Neelsen 染色を行い結核菌を同定した。臓器の一部は RT-PCR 用に凍結保存し、電子顕微鏡的検索のために 2% グルタ - ルアルデヒド固定をした。

3) RT-PCR

脾臓における N-ramp mRNA 発現を調べるために RT-PCR を行った。詳細は割愛する。

4) PCR

主要な臓器における結核菌の存在を調べるために PCR を行った。用いたプライマーは 19 kDa 抗原, IS 6110 である。詳細は割愛する。

5) DNA 合成実験

脾臓から脾細胞を得て、培養してトリチウムチミジンの取り込みを調べた。

6) サイトカイン

脾細胞を 24 穴培養プレートで一晩培養した後、培養上清を得た。ELISA により $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ 量を測定した。

(3) 結果

脾臓、肺病変に注目して病変の解析を行った。曝露 1, 3 ヶ月では対照と比べて病変に差異が見られなかった。すなわち中心性壊死を欠如する肉芽腫が見られた。6 ヶ月, 9 ヶ月曝露マウスでは肉芽腫が不著明になり対照群では芽腫が見られたのと対照的だった。Ziehl-Neelsen 染色でも曝露群により多くの結核菌が認められた (図 60)。

N-ramp mRNA の発現を調べたが BALB/c, DBA/2 感染マウスで差異がみとめられなかった。

$\text{IFN-}\gamma$ は 9 ヶ月曝露マウスで減少傾向にあった。

トリチウムチミジンの取り込みは曝露期間が長いと少し減少する傾向が見られたが、群間で有意差がなかった。

脾、肺組織を用いて結核の遺伝子診断を行ったところ、曝露、対照マウスとも結核菌関連遺伝子産物が認められた。

(4) 考察

我々のデータから長期 DEP 曝露マウスは結核にかか

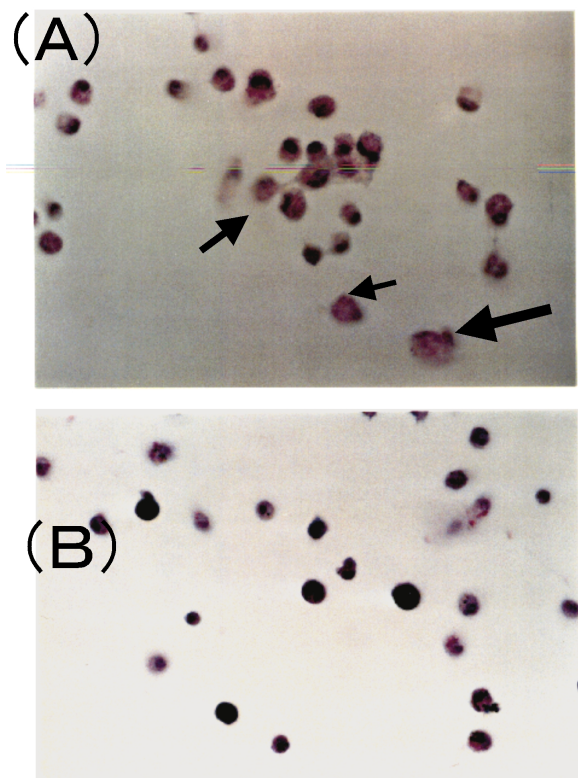


図60 DEPのマクロファージに対する影響
(A): 7 ヶ月曝露 (3 mg/m^3) マウスの肺胞マクロファージ X 600, Z-N 染色, 結核菌は赤く染まる。(B) は対照 (清浄空気曝露) を示す。

りやすいといえそうである。しかも肉芽腫形成が長期曝露マウスで認めにくくなる。従って、大気汚染の程度のひどい地域では細菌による呼吸器感染に十分に注意を払う必要がある。M. bovis 関連結核抵抗性遺伝子である N-ramp mRNA 発現は曝露群，対照群で有意差が認められなかった。ヒト結核では別の抵抗性遺伝子が存在すると推定しても間違いではなからう。現在のところ，そのような遺伝子はまだ見いだされていない。

IFN- γ は長期 DEP 曝露マウスで低下する傾向があった。このサイトカインはマクロファージの活性化と関係するので長期曝露マウスでは IFN- γ 産生が低下するらしい。IFN- γ を産生するヘルパー T 細胞，NK 細胞の機能を調べる必要がある。

2.2.3 DEP のマクロファージ・リンパ球機能の障害

DEP はラジカルや活性酸素の発生とともに，カーボン粒子に結合している多種類の炭化水素類をはじめとする化学物質の作用により呼吸器その他の免疫系への影響を介して，心臓や血管系への影響を誘導している可能性が考えられる。そこで，DEP によるリンパ球，中でも T リンパ球機能への影響について特異抗体処理によってそのリンパ球を除いた系に DEP を投与して T 細胞亜集団の変動や抗原提示細胞（マクロファージ等）との相互作用について解析した。初回投与のために BALB/c マウスを以下の 6 群に分け，投与はすべて腹腔内投与で行った。A 群：卵白アルブミン（OVA）抗原投与のみの群，B 群：抗 CD 4 抗体処理し OVA 抗原投与の群，C 群：抗 CD 8 抗体処理し OVA 抗原投与の群，D 群：OVA 抗原と DEP 投与の群，E 群：抗 CD 4 抗体処理し OVA 抗原と DEP 投与の群，F 群：抗 CD 8 抗体処理し OVA 抗原と DEP 投与の群。3 週間後に，追加免疫として OVA 抗原のみを全群に投与して，その 1 週後に影響を検索した。脾臓の細胞数においては，DEP 投与による増加はみられず，特異抗体処理によっても E 群で低下の傾向がみられたが他の群では変化はなかった。脾臓におけるリンパ球亜集団の変動を初回投与から 1 週後と 4 週後に FACS を用いて測定すると，1 週後の結果では，特異抗体処理による T リンパ球削除の効果がみられたが，OVA + DEP 投与群と OVA 投与群の比較では，CD 4 と CD 8 陽性細胞の比率に差はみられなかった。4 週後の結果では，それぞれ特異抗体処理群における比率の増加がみられたが，OVA + DEP 投与群と OVA 投与群との間に差は

みられていない。これらの結果から，DEP 投与は，リンパ球亜集団の比率には大きな影響を及ぼさないことが示唆された。

次に，腹腔内での抗原提示細胞の数や細胞表面上の共刺激補助因子の発現への影響について調べた。IA 抗原陽性細胞は DEP 投与で有意に増加し（D 群），抗 CD 4，あるいは抗 CD 8 抗体処理によっても増加はみられた（図 61）。共刺激補助因子である CD 80 と CD 86 陽性細胞

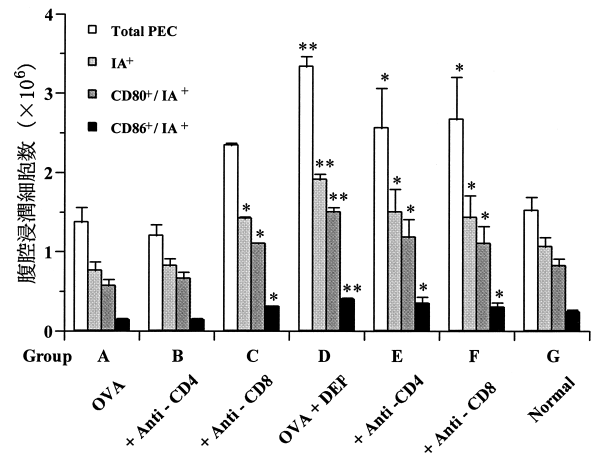


図61 DEP あるいは DEP + OVA を投与したマウスの腹腔内細胞数の変動

も DEP 投与により顕著な増加がみられ，DEP による抗原提示細胞の活性化が示唆された。しかしながら，特異抗体処理によりあまり影響がみられなかったことから，この活性化には，CD 4 や CD 8 T 細胞はあまり関与していないことが示唆された。

リンパ性器官である脾臓における活性化の指標としてのサイトカイン産生について検索した。それぞれの群から脾臓細胞を取り出し *in vitro* で抗原刺激することにより誘導したサイトカイン量を測定した結果，アレルギー産生の亢進に働く，いわゆる Th 2 タイプの IL-4 産生では，DEP 投与により有意な増加がみられ（D 群），抗 CD 4 抗体処理群の比較でもその増加が認められた（図 62 a）。抗 CD 8 抗体処理群では，さらに増強する結果が得られた（F 群）。アレルギー産生の抑制に関与する，いわゆる Th 1 タイプの IFN- γ 産生においては，抗 CD 4 抗体処理群の比較で DEP による低下がみられ，抗 CD 8 抗体処理群の比較でも低下の傾向であった（図 62 b）。さらに，Th 0 からの分化に関与する IL-2 産生では DEP 投与により増加がみられた（図 62 c）が，抗 CD 4 抗体処理による有意な低下は DEP 投与群で認め

られなくなった。Th1タイプとTh2タイプの互いの制御に關与しているIL-10産生は、DEPによる増加傾向がみられ、抗CD8抗体処理群ではより増加の傾向を示した(図62d)。

血漿中の抗体価について抗OVA IgE抗体価以外はELISAにより測定した。PCA反応により測定した抗OVA IgE抗体価はDEP投与により有意に上昇し(図63a)、抗CD4抗体処理により完全に抑制された。総IgE抗体価においてもDEP投与による有意な上昇がみられたが、特異抗体処理群間には大きな影響はみられなかった(図63b)。DEP投与による抗OVA IgG1抗体価の上昇が観察され(図63c)、抗CD8抗体処理によっても顕著な上昇はみられた。ところが、抗OVA IgG2a抗体価においては有意な差はみられなかった(図63d)。

抗原特異的IgG3抗体価においては、DEP投与による上昇が認められ抗CD4抗体処理による阻害はみられなかった(図63e)。

これらの結果から、DEPの投与は、マクロファージやリンパ球への影響を通じて局所での炎症の増悪に關与し、血中での抗体レベルにも影響を与えることにより血管系への障害にも關与する可能性が示唆された。

2.2.4 DEP中の化学成分による肥満細胞機能の障害

肥満細胞は、従来のヒスタミン、キマーゼ、ロイコトリエンなどのメディエーター以外にもインターロイキン(IL)-1、-3、-4、-5、-6、-8、-10、GM-CSF、TNF- α 、MIP-1、TGF- β などのサイトカイン、ケモカインを産生してアレルギー症状の発症のみならず免疫系の調

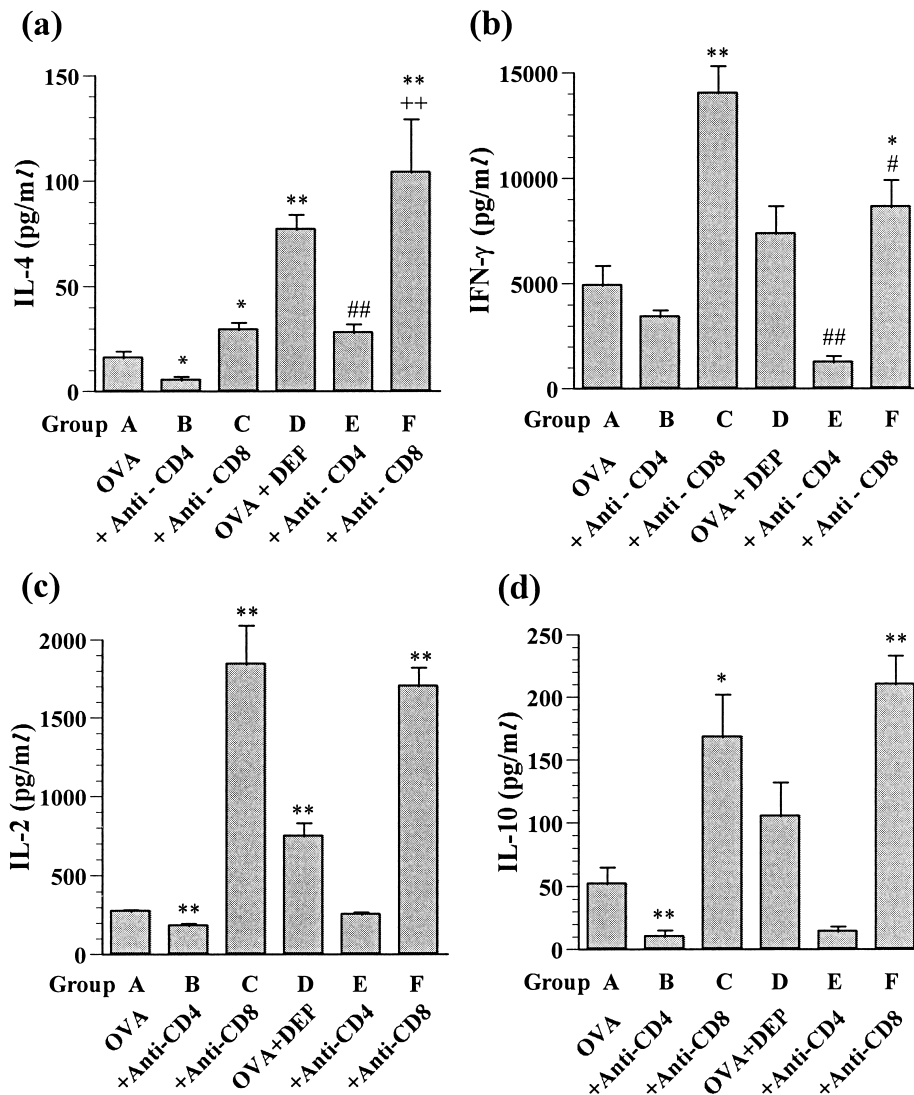


図62 DEPあるいはDEP + OVAを投与したマウスの脾臓細胞でのサイトカイン産生
a: IL-4, b: IFN- γ , c: IL-2, d: IL-10
* vs A, # vs B, + vs C

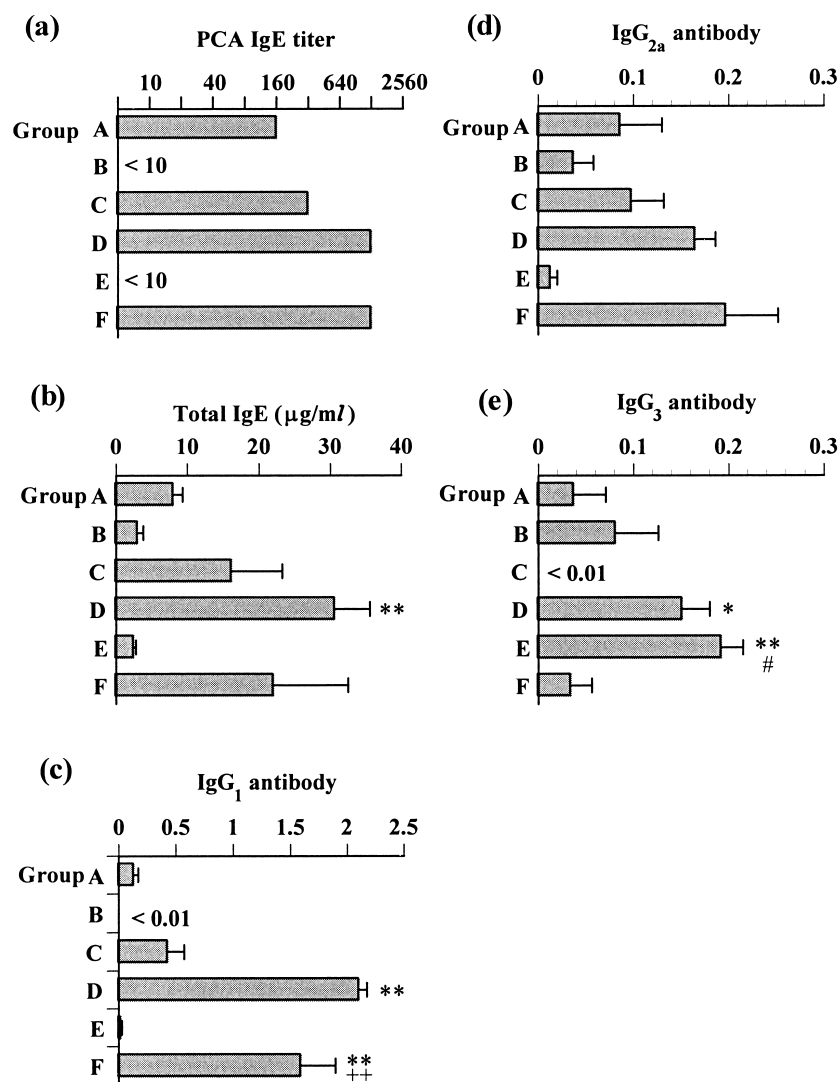


図63 DEPあるいはDEP + OVAを投与したマウス血漿中の抗体価の変動
a: 抗原特異的IgE, b: 総IgE, c: 抗原特異的IgG₁, d: 抗原特異的IgG_{2a}, e: 抗原特異的IgG₃
* vs A, # vs B, + vs C

節, 心血管系の組織リモデリングなどの作用にも関与している。これまでに, マウス骨髄由来の培養肥満細胞を用いてDEPの影響を検索したところ, IL-4やIL-6産生を増強することを明らかにした。今回は, DEP成分にふくまれるベンゾ[a]ピレンと1-ニトロピレンの肥満細胞機能への影響について検討した。

まず, 細胞毒性の見られない濃度のベンゾ[a]ピレン, あるいは1-ニトロピレンと肥満細胞を培養して上清中へのIL-4産生の誘導を調べたが, 産生はみられなかった。つぎに, 肥満細胞刺激薬としてのカルシウムイオノフォアA 23187と肥満細胞を培養して上清中のIL-4を測定した。図64aに見られるように時間依存的に増加がみられた。そこで, 0.1, 0.5, 1.0 µg/mlのベンゾ[a]ピレンを加えてカルシウムイオノフォア刺激し3時間後のIL-4産生を調べると, 0.1と0.5 µg/mlの濃度で有意

な増加がみられたが, 1.0 µg/mlのベンゾ[a]ピレンでは差はみられなかった(図64b)。次に, 0.1, 0.5, 1.0 µg/mlの1-ニトロピレンを加えてカルシウムイオノフォア刺激し3時間後のIL-4産生を調べると1-ニトロピレンを加えたすべての群で増加が認められた(図64c)。これらの結果から, ベンゾ[a]ピレンと1-ニトロピレンは低濃度で活性化した培養肥満細胞からのサイトカイン産生を亢進させることが示唆された。

2.2.5 ディーゼル排気粒子により誘導される肺胞マクロファージの遺伝子の解析

(1) はじめに

疫学研究の結果から, 大気汚染物質が呼吸器疾患の増加と関連がある可能性が示唆されており, 大気汚染物質が生体に及ぼす影響についての総合的な評価が求められ

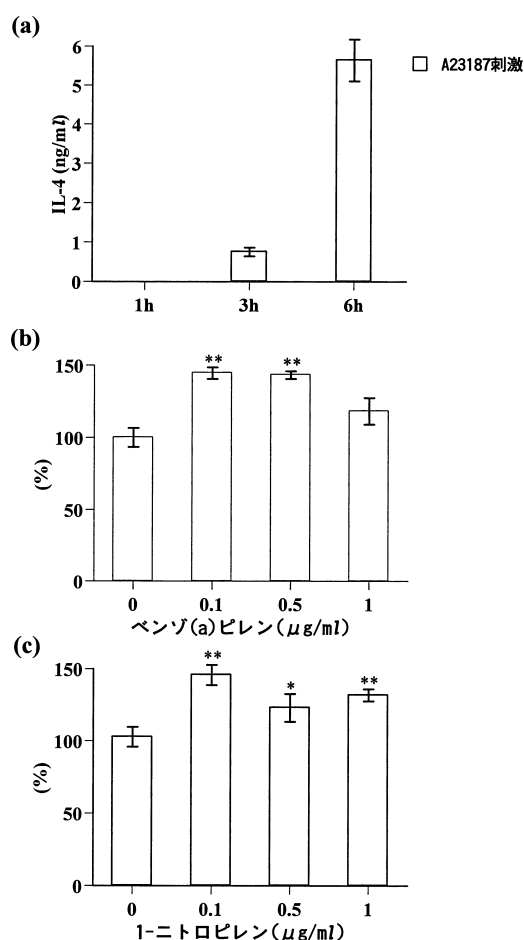


図64 培養肥満細胞へのベンゾ(a)ピレンと1- ニトロピレンの影響
* P < 0.05 ** P < 0.01

ている。これより、簡便かつ迅速な毒性評価の手法と有用な影響指標を見いだす必要がある。

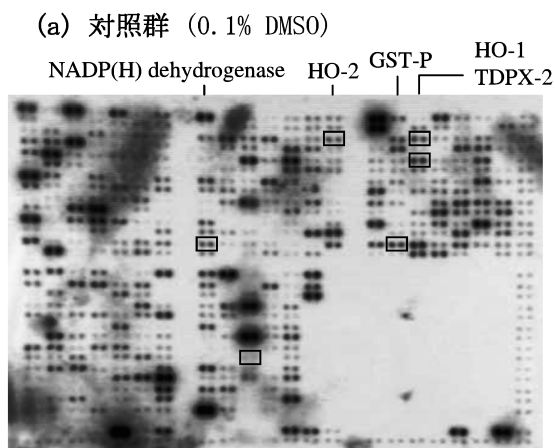
大気汚染物質として問題となっているディーゼル排気は、アレルギー反応を誘発することが示唆されている。また肺胞マクロファージは免疫系に重要な役割を果たしており、肺に侵入した異物の主要な標的細胞であると考えられる。本研究は、ディーゼル排気粒子 (DEP) に付着した成分が生体に及ぼす影響を解明するため、遺伝子レベルでの変化を検討することを目的とした。そこで、DEP 抽出物が肺胞マクロファージの遺伝子の発現に及ぼす影響について検討するため、450 個の毒性にかかわる遺伝子がプロットされた cDNA Expression Array (Atlas Rat Toxicology Array II, CLONTECH) を用いて解析を行った。

(2) 結果

動物は雄の SD 系ラットを用い、肺胞腔を洗浄することにより肺胞マクロファージを採取した。DEP 抽出物

はジクロロメタンで抽出したものをを使用した。肺胞マクロファージ ($1 \times 10^6/ml$) は、RPMI-1640 培地で 20 時間前培養した後、DEP 抽出物 (最終濃度: $10 \mu g/ml$) または対照として DMSO (最終濃度: 0.1%) を加えさらに 6 時間培養した。これらの細胞から RNA を抽出し、Atlas Pure Total RNA Labeling System (CLONTECH) により、放射ラベルした cDNA プローブを調製した。そのプローブを Array の膜に 68 °C で一晩ハイブリダイゼーションさせた。膜に結合したプローブは、Bioimaging Analyzer (Bas 2000, Fuji Film, Tokyo) を用いて映像化し、対照群と比較して、DEP 抽出物により発現が増加した遺伝子を特定した。図 65, 66 に示したように、DEP 抽出物への曝露は、肺胞マクロファージの heme oxygenase 1 (HO-1), HO-2, thioredoxin peroxidase 2 (TDPX-2) gultathione S-transferase P subunit (GST-P) NAD(P)H dehydrogenase, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の遺伝子の発現を増加させることが明らかとなった。曝露群におけるこれらの遺伝子の発現強度は、対照群に対してそれぞれ 6.1, 1.6, 1.4, 1.9, 2.3, 2.1 倍であった。発現の増加が観察された遺伝子については、DEP 抽出物の曝露濃度の変化による mRNA の発現強度の変化をノーザンブロッティング法により解析した。

肺胞マクロファージ ($5 \times 10^5/ml$) は、RPMI-1640 培地で 20 時間前培養した後、DEP 抽出物 (最終濃度: 2.5, 5, $10 \mu g/ml$) または対照として DMSO (最終濃度: 0.1%) を加えさらに 6 時間培養した。これらの細胞から採取した RNA サンプルを、ホルムアルデヒドで変性させたアガロースゲル (1%) を用いて電気泳動を行った後、ゲルからナイロン膜 (Hybond-N, Amersham) へサンプルを転写した。HO-1, TDPX-2, GST-P, NAD(P)H dehydrogenase, PCNA の mRNA を検出するため、それぞれの放射ラベルした cDNA プローブを用いて膜にハイブリダイゼーションさせた。図 67 に示したように、HO-1 および TDPX-2, GST-P, NAD(P)H dehydrogenase, PCNA mRNA の発現は DEP 抽出物の濃度依存的に増加した。 $10 \mu g/ml$ の DEP 抽出物に曝露した細胞における mRNA の発現強度は、対照群に対して、それぞれ 7.2, 3.1, 2.3, 2.8, 1.5 倍であった。



(b) 曝露群 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DEP抽出物)

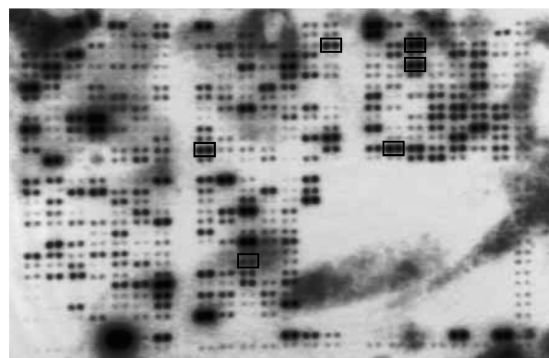


図65 Atlas Rat Toxicology Array におけるラット肺胞マクロファージの遺伝子の発現パターン

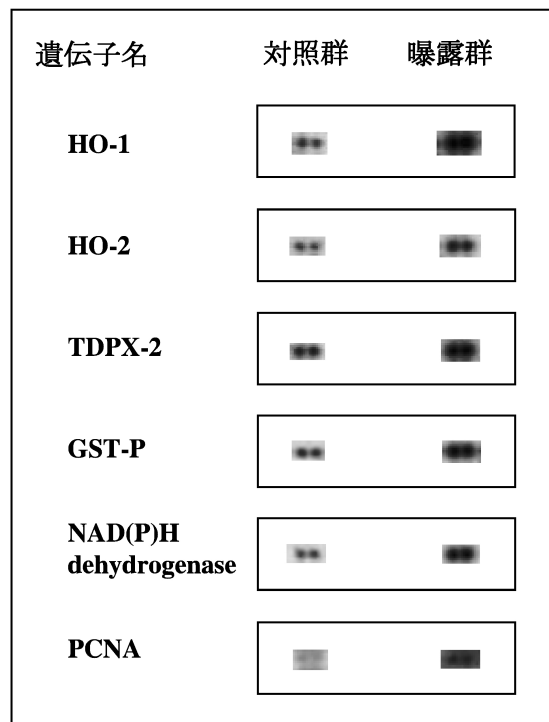


図66 発現の増加がみられた遺伝子のハイブリダイゼーション・シグナルの拡大図

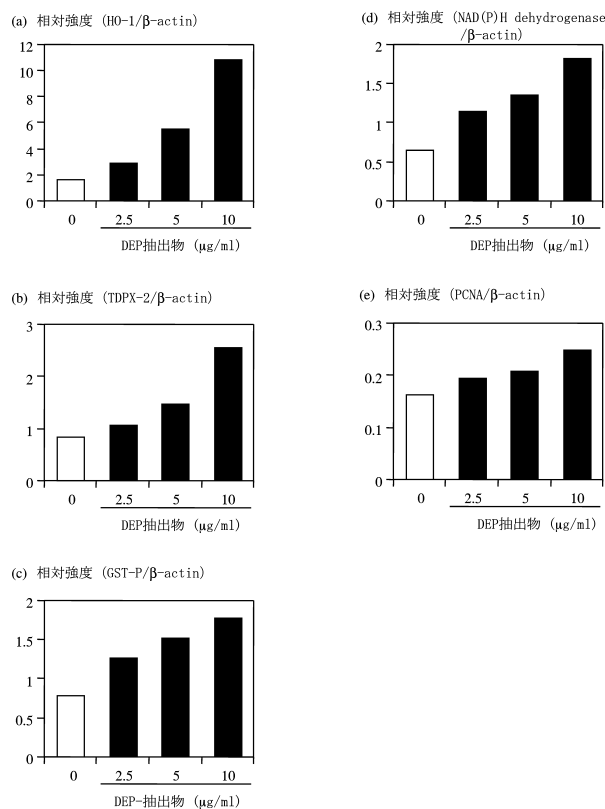


図67 DEP抽出物に曝露したラット肺胞マクロファージのHO-1, TDPX-2, GST, NAD(P)H dehydrogenase, PCNA mRNAの発現

ノーザンブロットング法によりそれぞれの遺伝子の発現強度を定量化した。棒グラフは、HO-1 (a), TDPX-2 (b), GST-P (c), NAD(P)H dehydrogenase (d), PCNA (e) の β -actin に対する相対的な遺伝子の発現強度を示している。

(3) 考察

DEP抽出物の中には様々な有機化合物が含まれており、それ自体の酸化作用も強いが、これらはマクロファージの活性酸素の放出を誘導することも知られている。これによりマクロファージは活性化され、サイトカインなどの産生が促進される。このようなDEP抽出物によって誘導された酸化ストレスに対しては、生体を守るための抗酸化性の防御機構が必要であると考えられる。

本研究による解析の結果、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のDEP抽出物への6時間曝露は、肺胞マクロファージにおけるHO-1, TDPX-2, GST-P, NAD(P)H dehydrogenaseなどの抗酸化系酵素の遺伝子の発現を誘導した。炎症の初期段階ではこれらの酵素が肺胞マクロファージにおいて誘導され、DEPによる酸化ストレスに対する防御機構が作動する可能性が示唆された。また10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のDEP抽出物への6時間曝露は、肺胞マクロファージにおけるPCNA

遺伝子の発現も増加させた。これはDNAの修復と複製に関わる因子であり、DNAの傷害やその他のストレスにより誘導されることが知られている。本実験で観察されたPCNAの活性化は、DEP抽出物によるDNAの傷害に対する修復と細胞増殖に寄与すると考えられる。

またHO-1, TDPX-2, GST-P, NAD(P)H dehydrogenase, PCNAのmRNAの発現は、DEP抽出物の濃度依存的に増加することが明らかとなった。これより、HO-1などの抗酸化系酵素類やPCNAは毒性物質に対する鋭敏な指標となる可能性がある。さらにcDNA Expression Arrayは、多くの遺伝子解析を簡便かつ迅速に評価できる有用な手法であるといえる。

(4) おわりに

DEP抽出物への短時間の曝露は、ラット肺胞マクロファージの抗酸化系酵素およびDNAの修復と複製に関わる遺伝子の発現を誘導した。DEPのような毒性物質に対する初期の反応では生体の防御機構が作動すると考えられ、これらの因子は毒性影響の鋭敏な指標となる可能性がある。

2.2.6 ディーゼル排気曝露が花粉症に及ぼす影響

(1) 背景

ぜん息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎などアレルギー関連疾患が近年多くの国々特に工業化した国々で増加しているといわれている。近年におけるアレルギー関連疾患の増加傾向に関与する因子は多くある。代表的なものは室内におけるダニやゴキブリなど、室外における花粉などの大気中の抗原、食習慣、遺伝的な要因、感染など、また、室内、室外における大気汚染物質などがある。花粉症としてよく知られているものとしてくしゃみ、鼻水、鼻づまりといったアレルギー性鼻炎、目の充血、目のかゆみなどのアレルギー性結膜炎がある。大気汚染とこれらのアレルギー関連疾患との間になんらかの関係があるかどうかが問題となる。アレルギー性鼻炎と大気汚染との関係について、慈恵医大のグループは東京都の大気汚染地区と岩手県の非大気汚染地域の児童などのアレルギー性鼻炎の罹患率を比較した。大気汚染地域の29%に対し、非大気汚染地域では7%であった。また、大都市、工業都市、小都市および農業地区におけるアレルギー性鼻炎の調査においても、大都市が多くついで工業都市、小都市および農業地区の順であ

ることも見いだされた。これらのことは大気汚染地域の方が非大気汚染地域よりもアレルギー性鼻炎が起きやすいことを示唆している。

一方、大気汚染濃度が高い東ドイツの方が低い西ドイツに比較して喘息やアレルギー関連疾患の罹患率が低いことや、欧米諸国や日本において大気汚染濃度が経年的に減少傾向あるいは減少後あまり変わらない状態にあるがアレルギー関連疾患は増加していることである。これらのことから、アレルギー関連疾患と大気汚染は関係がないとする見解がある。東西ドイツや経年変化の場合、食事内容、住環境、衛生環境などが大きく変化してきていることを考えると、これらを含めた因子のなかにアレルギー関連疾患の増加を説明できるものがあるものと考えられる。しかし、同様の生活様式や住環境や衛生環境下において大気汚染地域と非大気汚染地域を比べた場合、大気汚染地域の方がアレルギー関連疾患の罹患率が高いという結果が多いことも事実である。生活様式や住環境や衛生環境が大きく違う地域や時代を比較する場合は交絡因子の罹患率への寄与について十分な検討が必要と考えられる。疫学調査の結果から、大気汚染物質はアレルギー性疾患の増加と関係がある可能性が考えられるが、動物を用いた実験においても、大気汚染物質がほんとうにアレルギー反応を起こしやすくするかどうか明らかにすることが重要である。そこで、自動車の排気由来の大気汚染物質のなかでも問題となっているディーゼル排気がアレルギー関連疾患の一つである花粉症に及ぼす影響について検討した。

(2) ディーゼル排気曝露が花粉症様病態に及ぼす影響

1) アレルギー性鼻炎

アレルギー性鼻炎がディーゼル排気の曝露により増悪するかどうかを、くしゃみや鼻汁分泌を指標として検討した。雄のモルモットを用い清浄空気またはディーゼル排気に5週間を曝露し、その間1週間おきに計6回抗原である卵アルブミン(OVA)を点鼻投与し、投与後20分間に誘発されるくしゃみ回数および鼻汁量を測定した。図68は抗原点鼻投与によるくしゃみ回数がディーゼル排気曝露下では清浄空気下より、粒子濃度に依存して増加することを示している。図69は抗原点鼻投与による鼻汁分泌がディーゼル排気曝露下では清浄空気下より、粒子濃度に依存して増加することを示している。

以上のことから、0.3および1.0 mg/m³の微粒子を含

むディーゼル排気への曝露は鼻アレルギー反応を増悪させることを示唆している。また、 0.1 mg/m^3 の微粒子を含むディーゼル排気への曝露はくしゃみ反応を増悪するが鼻汁分泌には有意な影響がみられなかった。このことは、 0.1 mg/m^3 の微粒子を含むディーゼル排気の鼻アレルギー反応の増悪作用は弱いながらあることを示唆している。

2) アレルギー性結膜炎

アレルギー性結膜炎に及ぼすディーゼル排気曝露の影響を検討した。雄性モルモットを用い清浄空気またはディーゼル排気に5週間曝露し、その間1週間おきに計6回抗原であるOVAを点眼投与し、アレルギー性結膜炎の症状をスコア化し点数をつけた。また、6回目の抗原投与の24時間後に結膜における血漿の漏出を測定した。繰り返し点眼投与によるアレルギー性結膜炎の症状を点数化すると清浄空気曝露群に比べ症状の点数が増加した(図70)。 0.3 および 1.0 mg/m^3 の微粒子を含むディーゼル排気曝露下ではディーゼル排気の濃度に依存して血漿の漏出が増加することが明らかになった

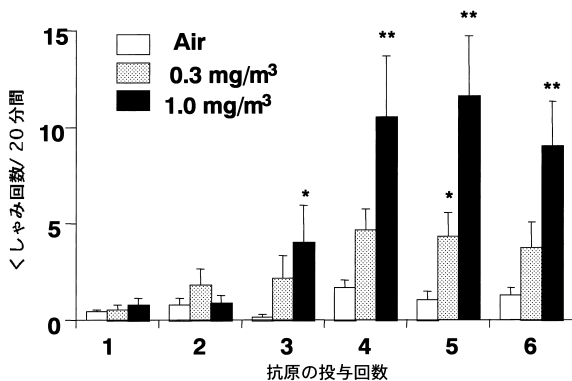


図68 ディーゼル排気曝露による繰り返し抗原投与によるくしゃみ反応の亢進

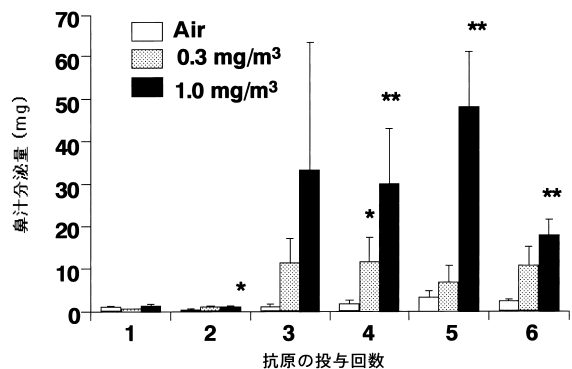


図69 ディーゼル排気曝露の繰り返し抗原投与による鼻汁分泌への影響

(図71)。また、 0.1 から 1.0 mg/m^3 のディーゼル排気の濃度に依存してアレルギー性結膜炎症状の点数が増加すること、 0.3 から 1.0 mg/m^3 のディーゼル排気の濃度に依存して血漿の漏出が増加することから、ディーゼル排気曝露はアレルギー性結膜炎を増悪する作用があることが明らかになった。

(3) ディーゼル排気曝露のアレルギー反応増悪作用の機構

ディーゼル排気曝露が花粉症様の病態を増悪させる機構として、鼻や結膜が刺激に対して過敏な状態にすること、アレルギー反応の元となる抗原に対する抗体産生が亢進すること、好酸球の浸潤による炎症反応の増悪などが挙げられる。

1) 鼻および眼過敏

ディーゼル排気曝露により鼻や結膜が刺激に対して過敏な状態になるか検討すると、ディーゼル排気曝露群ではアレルギー反応のとき放出されるヒスタミンによるくしゃみの回数を指標とした反応性が亢進することが見

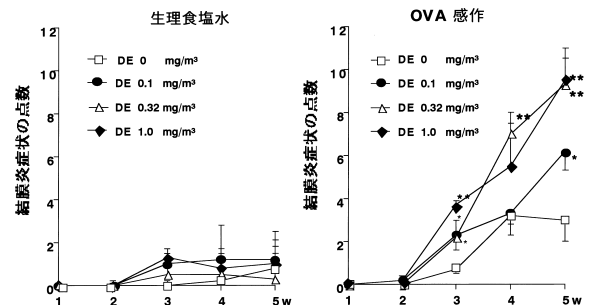


図70 抗原の繰り返し点眼投与による結膜炎症状に及ぼすディーゼル排気曝露の影響

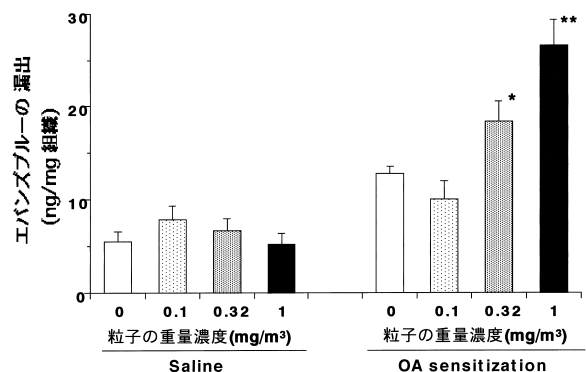


図71 ディーゼル排気曝露が繰り返し抗原投与による結膜への血漿漏出に及ぼす影響

だされたが、ヒスタミンによる鼻汁分泌量を指標とした反応性の亢進は見いだされなかった。

同様にディーゼル排気曝露は結膜を刺激に対して過敏な状態にするか検討した。ディーゼル排気に28日間曝露後ヒスタミンに対する反応性を静脈内投与した色素の漏出を指標に検討すると、1および3 mg/m³のディーゼル排気曝露群ではヒスタミンに対する反応性が亢進するのが見いだされた。

以上のことから、ディーゼル曝露は鼻粘膜や結膜の透過性を亢進し、刺激が知覚神経に伝わりやすい状態や抗原が侵入しやすい状態にすること、好酸球の上皮および上皮下への浸潤数を増加させることなどが鼻や眼の過敏が起きる要因となるものと考えられる。

2) 抗体産生の亢進

ディーゼル排気曝露が抗原に対する特異的抗体産生を亢進するか検討した。6回目の抗原を投与24時間後の血清中のIgGおよびIgE抗体価を受け身皮内アナフィラキシー反応により測定した。ディーゼル排気曝露が抗原点鼻投与によるOVA特異的IgGおよびIgE抗体価に及ぼす影響の結果を示している。ディーゼル排気粒子濃度に依存した形で抗体価が増加し1.0 mg/m³で有意に増加することが見いだされた。点眼投与の場合も同様にディーゼル排気粒子濃度に依存した形で抗体価が増加し0.3~1.0 mg/m³で有意に増加することが見いだされた。

以上のことから、ディーゼル排気は粒子濃度に依存して抗原に対する特異的抗体の産生を亢進することが明らかになった。抗体産生が亢進する機構はインターロイキン4産生の増加などを介しTH2タイプの反応が亢進することが報告されている。

3) 好酸球浸潤の増加

好酸球の鼻粘膜上皮や上皮下への浸潤はアレルギー反応の増悪につながる事が報告されている。そこで抗原の繰り返し点鼻投与による好酸球の鼻粘膜上皮や上皮下への浸潤に及ぼすディーゼル排気曝露の影響を検討した。

図72は抗原の繰り返し点鼻投与による好酸球の鼻粘膜上皮や上皮下への浸潤に及ぼすディーゼル排気曝露の影響のこれまでの結果をまとめたものである。0.1 mg/m³の微粒子を含むディーゼル排気曝露では有意な差は見られなかった。0.3-1.0 mg/m³のディーゼル排気曝露は抗原の繰り返し点鼻投与による好酸球の鼻粘膜上皮や上皮下への浸潤を有意に増加させることが見いだ

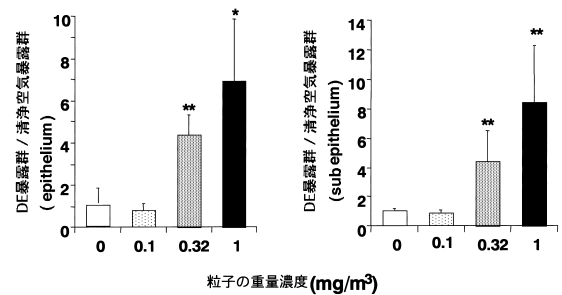


図72 ディーゼル排気曝露が鼻粘膜上皮および上皮下への好酸球浸潤に及ぼす影響

された。

図73に鼻アレルギーを例に大気汚染物質の曝露が鼻アレルギーに及ぼす影響とその機構についてまとめたものを示す。

(4) おわりに

以上のことから、ディーゼル排気をはじめとした大気汚染物質の曝露下に抗原が投与されるとくしゃみや鼻水といった鼻アレルギー、結膜の充血等の眼のアレルギーの症状を増悪させる。また、増悪作用の要因として鼻や眼の過敏、抗体産生の増加、好酸球の浸潤の増加などが示唆された。

2.2.7 ディーゼル排気微粒子による感染性肺傷害の増悪とメカニズムの解明に関する研究

(1) はじめに

これまでの多くの疫学研究は、大気中の浮遊粒子状物質濃度の上昇と呼吸器疾患の有症率、有病率、死亡率が、短い潜時で正の相関を示すことを報告している。これらの疫学報告の特徴は、浮遊粒子状物質の呼吸器系に対する健康影響が、特定の高感受性群に出現しやすいという点にある。浮遊粒子状物質の影響を受けやすい高感受性群は、気管支ぜん息、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎、肺炎、糖尿病、免疫不全状態、高齢者、入院患者あるいは老人施設入所者等を含む。われわれは、大都市における浮遊粒子状物質の多くの部分を占めるディーゼル排気微粒子 (DEP) が、マウスの気管支ぜん息モデルを増悪することを以前に示した。しかし、この実験結果だけでは、浮遊粒子状物質が上記の高感受性群に対し急性かつ重篤な健康影響をきたすことは、十分には説明しきれない。一方、高感受性群としてあげた諸疾患を有する個人は、感染症、特に細菌感染をしばしば被り、重症化をきたすことがしばしば経験される。以上より、浮

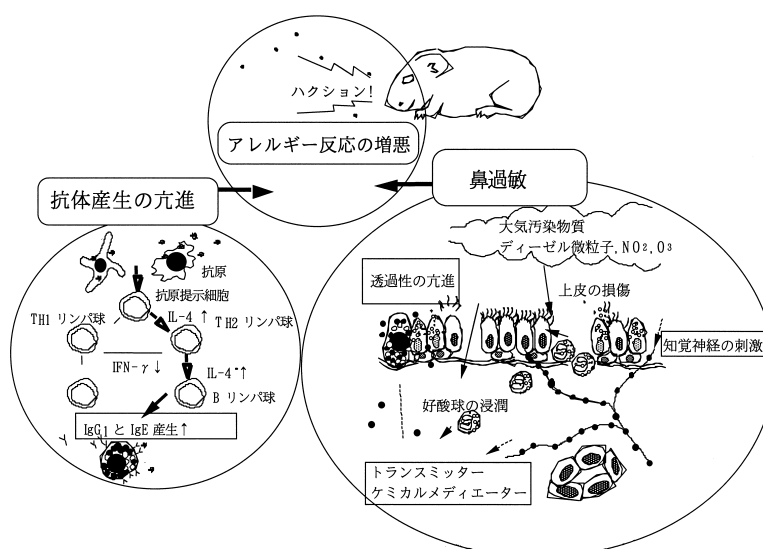


図73 ディーゼル排気曝露が鼻アレルギーを増悪させる機構

遊粒子状物質が細菌感染に関連する肺傷害に影響を及ぼしうるか否かを、実験的に明らかにする必要があると考えるに至った。そこで、われわれは、DEPが細菌の毒素である lipopolysaccharide (LPS) による肺傷害に及ぼす影響を、動物モデルを用いて検討した。また、DEPの毒性影響発現のメカニズムを、動物とヒトの間で共通あるいは類似するタンパクと遺伝子のレベルで明らかにすることを試みた。

(2) 方法

6週齢のICR系雄性マウスを以下の4群に分けハロセン麻酔下に気管内投与を行った。

1) vehicle群 (DEPやLPSを溶かすための溶液のみを投与: 0.1 ml)

2) LPS群 (大腸菌由来細菌毒素: 100 µg/匹, 0.1 mlのvehicleに溶解)

3) DEP群 (250 µg/匹, 0.1 mlのvehicleに溶解)

4) DEP + LPS併用群 (3と4の併用, 0.1 mlのvehicleに溶解)

24時間後に、肺の病理組織学的所見 (Hematoxylin and eosin 染色), 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞所見 (Diff-Quik 染色), 肺水分量 (肺水腫の指標), 炎症の原因となるタンパク質であるサイトカインおよびケモカインの濃度 (ELISA 法, interleukin (IL)-1, keratinocyte chemoattractant (KC) macrophage chemoattractant protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP-1)) と血中の soluble intercellular

adhesion molecule (s-ICAM)-1濃度を検討した。

(3) 結果

組織学的検討では、vehicle群 (図74) の肺には、特に異常は認められなかった。DEP群では、粒子の沈着と共に、血管や気管支の周囲に好中球という炎症をきたす白血球の浸潤がわずかに認められた (図75)。LPS群では、より多くの好中球の浸潤が観察された (図76)。しかし、DEP + LPS併用群では、非常に多くの好中球が肺胞腔にまで浸出し、著明な出血や肺水腫も観察された (図77)。

次に、肺の浮腫性変化を定量的に比較検討するために、肺の水分量を各群の各個体において測定した。図78に示すように、DEPの単独投与では、vehicle投与に比較し有意な変化は見られなかったが、LPS投与により肺水腫はvehicle群に比較し有意に増悪した。DEPとLPSが共に存在すると、肺水腫はさらに顕著に増悪し、DEPとLPSを各々2倍量で単独投与した場合に比較しても有意に高度であった。肺水腫の相乗的増悪は、10 µg/匹のDEPと4 µg/匹のLPSを用いて行った実験でも観察された。

さらに、肺の炎症性変化を定量的に比較するために、BALF中の細胞所見を検討した。図79に示すように、DEP単独投与ではほとんど好中球は見られなかったが、LPS投与によりvehicleに比較し有意な好中球増加が観察された。DEPとLPSが共に存在すると、好中球の浸出はさらに顕著であった。

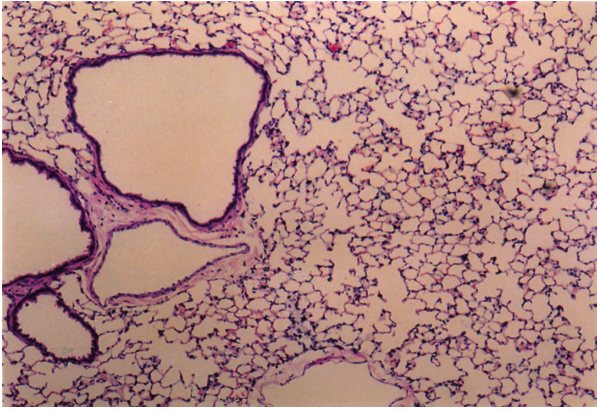


図74 vehicle 投与群の肺組織像

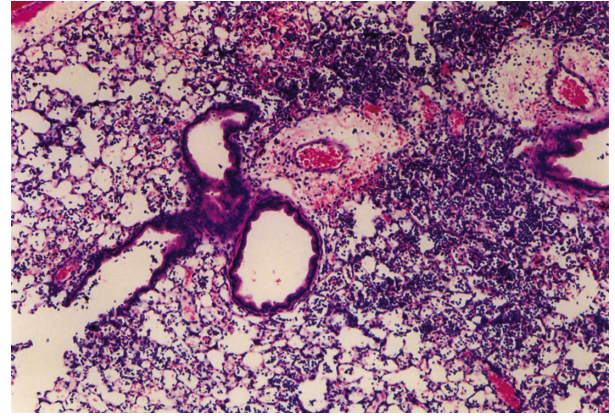


図77 LPS + DEP 併用投与群の肺組織像

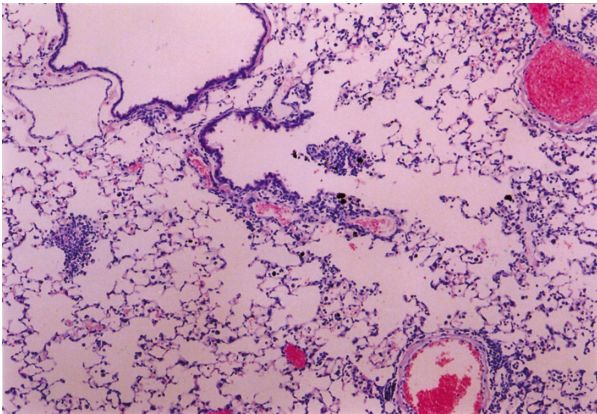


図75 DEP 投与群の肺組織像

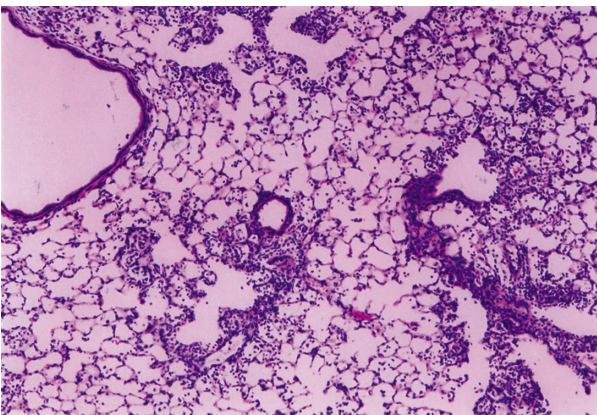


図76 LPS 投与群の肺組織像

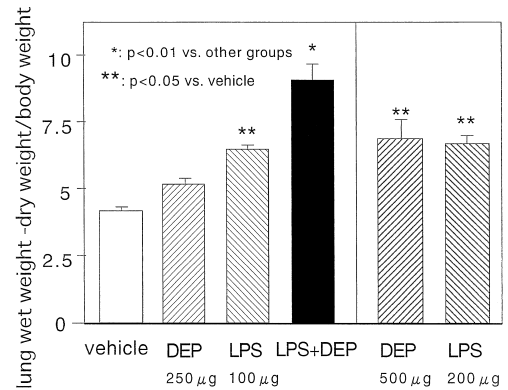


図78 肺水腫の定量的比較

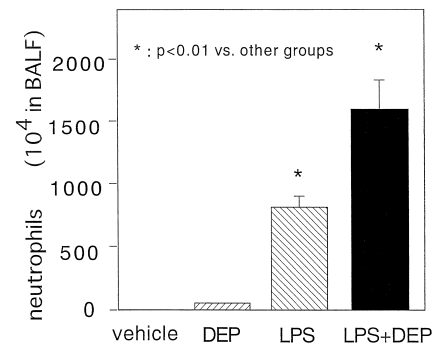


図79 好中球性炎症の定量的比較

細菌毒素が、好中球から産生される「活性酸素」などにより肺傷害を起こすためには、サイトカインやケモカインあるいは細胞接着分子という炎症に関連するタンパク質が重要な働きを演じている。そこで、これらのタンパク質やその産生を誘導する遺伝子の変化を検討した。MIP-1 というタンパク質に代表されるように(図80)、炎症に関連するタンパク質は、vehicle群に比較しDEP単独群でわずかに上昇し、LPS単独群で有意

な上昇が認められた。DEP + LPS 併用群では相乗的な上昇が認められ、肺水腫や肺の炎症のパターンと並行していた。遺伝子の変化もほぼ同様であった。

(4) 考察と結語

DEPは細菌毒素(LPS)による肺傷害を相乗的に増悪した。肺傷害は、間質性肺水腫、肺胞出血を伴う好中球性炎症であった。この増悪効果は、炎症性タンパク質の上昇とよく相関した。

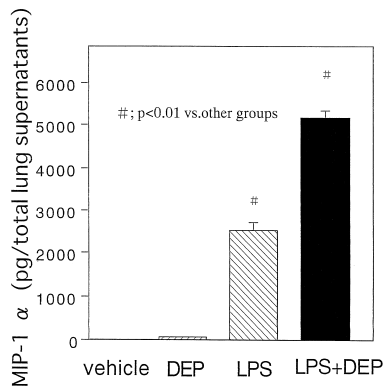


図80 肺組織内のマクロファージ炎症性蛋白の濃度

IL-1, KC, MCP-1, MIP-1, ICAM-1などの炎症性タンパク質に対する抗体は、LPSによる急性肺傷害を効果的に抑制することが報告されている。DEPによる細菌毒素に関連する肺傷害の増悪作用においては、これらの炎症性タンパクの増加が中心的役割を果たしていると考えられる。

以上の結果より、大気中の浮遊粒子状物質の増加は感染性の肺傷害を増悪する可能性があることが示唆された。本研究は、これまでの高感受性群の存在に言及した疫学的知見に、少なくとも部分的に、実験的論拠を与えうものと考えられる。

2.3 生殖器への影響

前の特別研究で、Yoshidaら(1999)は、DEP濃度として1時間平均値が0.3, 1.0および3.0 mg/m³のDEを1日12時間ずつ1~10ヵ月間ICR系雄マウスに吸わせ、精巣の運動能力、精子産生能力および精巣の形態変化などを調べた。その結果、1日当たりの精子産生能力はDEの曝露期間につれて低下傾向を示し、6ヵ月目で最も顕著になり、対照群の各々29%, 36%および53%まで低下し、いずれの値も対照群より有意に低下した。この精子産生能力の低下は、1ヵ月間清浄空気に戻すと回復する傾向が認められているが、3.0 mg/m³群ではなお29%低下していた。なお、体重、精巣重量、精巣状態重量などに有意な低下は認められていない。しかし、精巣組織の光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察では、男性ホルモンを産生するライディッヒ細胞の形態異常が観察されている。さらに、DE吸入マウスでは、黄体形成ホルモン(LH)受容体のmRNAの発現量もDEP濃度に依存して低下している。これらの結果から、男性ホルモンの合成能力が低下していることとLHのホルモ

ン作用発現不全などが関与して精子産生能力が低下したことが示唆されている。

WatanabeとOonuki(1999)は、DEが成長期のラットの生殖系、内分泌系に及ぼす影響を調べるため、粒子濃度として5.63 mg/m³(4.1 ppm NO₂, 8.1 ppm NO)の濃度の総排気ガス(群)と粒子をフィルターで除いた除粒子排気ガス成分(群)および清浄空気(群)について行った。血清中のテストステロンとエストラジオール濃度は、群で有意に増加し、卵巣刺激ホルモン(FSH)濃度は逆に、群でとも有意に低下している。精巣重量は3群間で変化はないが、精子産生数と精巣の透過性指標であるヒアルロニダーゼ活性は有意に低下していた。FSH濃度と精子産生能力との間に直接的相関が認められているが、精巣のライディッヒ細胞やセルトリ細胞に形態学上的変化は認められていない。

Fredericssonら(1993)は、ヒトの精子に、試験管内でフタル酸エステル類あるいはDEP抽出物を添加し、精子の運動能力を25%低下させるに要する濃度を調べている。フタル酸エステル類の5分以内の即時的作用は強くないが、精子と長時間接触させておくとジエチルヘキシルフタル酸(DETHXP)とジエチルフタル酸(DMEP)の運動能力低下効果が強かった。しかし、DEP抽出物はそれらの1/10~1/20量で同様の作用を示しており、10~20倍も精子運動能力低下作用が強いことを示している。本実験は試験管内で精子とDEP抽出物を直接接触させているので、影響が強くなる可能性が高いが、吸入実験でも同様のことが起こるかどうかが興味焦点となっていた。

そこで本研究では、まずDE曝露が雄の生殖器系に及ぼす影響の有無を検索するためにFischer 344雄ラットに高脂肪食を摂取させた後、8ヵ月間のDE吸入曝露を行った。その結果、精巣自体には影響がみられなかったが副生殖腺重量の低下や血清テストステロン値の増加といった内分泌系に変化が観察された。次いで、DE中には多くの多環芳香族炭化水素が含まれることに着目し、Aryl hydrocarbon receptor(AhR)の感受性が高いといわれているC57BL/6N雌マウスを用いて、DEによる生体影響として重要視される次世代への影響あるいは繁殖機能に対する影響を明らかにするために、雌性生殖器および繁殖機能に及ぼす影響について検討した。

DE吸入曝露は、DE中の粒子濃度が0.3, 1.0および3.0 mg/m³の3群と対照群(清浄空気のみ)をおき、曝

露期間は約4ヵ月間(午後10時から午前10時まで12時間/日, 7日/週)とした。さらに次世代影響を調べるために上記の曝露終了後, 曝露されていない10週齢の雄と一週間同居交配させた。

その結果, 母マウスの流産や娩出不全等の繁殖異常が認められたが有意ではなかった。また, 新生子の外貌異常についても曝露群と対照群との間に有意な差はみられなかった。しかし, 親の営巣行動の評点は, 正常出産雌の3.0 mgDEP/m³群では有意に低下した。また, 出生子の体重変化は, 成長するにしたがって雌雄ともに高濃度曝露群で有意に減少した。雄子マウスは, 30日齢では0.3 mgDEP/m³群で生殖突起肛門間距離(AGD)が有意に短くなった。一方, 雌子マウスでは, 70日齢における頭臀長の有意な短縮(1.0 mgDEP/m³群, 3.0 mgDEP/m³群)が示された。一方, 雌子マウスにおける腔開口時期については, 0.3および1.0 mgDEP/m³群で有意に早まった。

このように親の繁殖機能への影響については行動学的な変化以外はほとんどみられなかったが, 出生子に関しては臓器重量や腔開口時期の早期化といった次世代にわたる間接的な影響がみられた。そこで, このようなDEの生体影響の根源と考えられているディーゼル排気微粒子(DEP)を直接同系統の妊娠マウスに皮下投与した際にどのような変化が現れるかについて詳細に検討することにした。

C57BL/6Nマウス雌145匹(10週齢)を同系統同週齢の雄と一週間同居交配後, 妊娠8, 10, 12日目にDEP抽出物(DEPE)を皮下投与(計0.006, 0.06, 0.6, 6.0あるいは60 mg/mouse)して, 生殖機能および出生マウスの生後発育に及ぼす影響を調べた。交配後毎日体重計測を行ったが, 分娩までほぼ順調に体重が増加したマウスは正常出産する一方, 非妊娠マウスはごくわずかな通常の体重増加しか示さないことから, 妊娠と非妊娠の区別が可能であった。また, 妊娠後途中まで体重が増加したが, ある時点で急激に体重が減少した個体は流産が生じたものとみなされ, DEPE投与群に多かった。すなわち, 0.006, 0.06, 0.6, 6.0あるいは60 mg/mouseの全曝露濃度で有意な流産率の増加が認められた。流産率は高用量投与群よりも低用量投与群に高い傾向がみられた。DEPE皮下投与群では出生子の体重減少および雌マウスの腔開口時期に対する影響がみられた。この現象は上述したDEの吸入曝露実験による成績

に類似した。また, 特に低用量投与群で頭臀長に変化が観察され, 雄の副生殖腺重量の減少も低用量投与群でより明瞭であった。これらの成績により, DEPEの皮下投与によってDEの吸入曝露と同様に出生子(第二世代)への影響, 特に生後発達に異常が生じることが明らかとなった。

上述の流産や娩出不全などの生殖機能異常が生じる要因には, 子宮筋, 胎盤および胎子の側における様々な因子が考えられる。それらの一部として子宮筋の収縮感受性の変化も挙げることができる。そこで, DEあるいはDEP曝露による子宮収縮反応の変化の有無を明らかにするために以下の実験を行った。子宮収縮反応はオキシトシン(OT)に対する収縮反応の相違を比較する方法で行った。この実験においては, 卵巢ホルモンの関与による影響を考慮して, まずC57BL雌マウスを卵巢摘出(OVX)群と卵巢非摘出(無処置)群に分け, それぞれDEに1ヵ月間または4ヵ月間吸入曝露し, 上記のマウスの子宮収縮反応を調べた。

その結果, DE4ヵ月間曝露の無処置群において, 0.3および3.0 mgDEP/m³曝露群で有意な体重の減少が生じたが, 子宮重量および子宮収縮反応には有意な変化は示されなかった。しかしながら, 3.0 mgDEP/m³群でOT間滴下による収縮頻度の有意な減少がみられた。1ヵ月DEを吸入曝露させたOVX群において, 0.3および1.0 mgDEP/m³群では有意な体重の増加が生じたものの, 子宮重量には変化が認められなかった。しかしながら, 3.0 mgDEP/m³群のOTに対する子宮収縮反応は有意に増加した。このように, 卵巢存在下のマウスではDEによるOT誘発子宮収縮への影響は見られなかったことから, 卵巢機能が維持されている個体ではDEによる子宮筋影響が何らかの機序によって緩衝されている可能性が示唆された。

次いで, OVXマウスにDEPE(0.006, 0.6あるいは60 mg/mouse)を皮下投与した実験において, 対照群と比較して有意な収縮の増強が示された。その結果, 非経気道的に投与された個体においてもDEPは子宮のOT収縮反応を増強することが明らかになった。さらに, DEPEを子宮筋に対して短時間または長時間直接作用させたときのOT収縮反応を検討した。その結果, OVXマウスの子宮にDEPE $3 \times 10^{-4} \sim 3$ mg/mlを滴下したときの投与直後および投与後の最大収縮反応は, DEPEを滴下しない標本と比べて有意な収縮の増加を示した。

OVX マウスの子宮標本で OT 収縮反応を確認した後、DEPE (0.3 mg/ml) を 24 時間持続的に作用させたときの OT に対する収縮反応は有意な変化を示さなかった。以上の成績により、DEPE は体内の血液循環を介して子宮筋に対する収縮増強効果を与えること、その場合このような変化は内分泌系に対する影響のほかに DEPE が直接的にも子宮に影響する可能性が示唆された。このような子宮筋収縮反応変化の詳細な機序は不明であるが、流産や娩出不全などの生殖機能障害をもたらす一因となる可能性は否定できない。DEPE 皮下投与では出生子の成長にも影響を与えるなど次世代に及ぶ影響が生じることとも明らかになったことから、DEPE あるいはその代謝物質は胎盤を介して胎子へと移行するか、また母マウスの生理学的状態の変化が発生段階にある胎子の細胞に何らかの異常を来たすことが推測される。

2.4 まとめと謝辞

(1) 研究の目的

近年、我が国の大気汚染は従来の硫黄酸化物 (SO_x) や降下煤塵を中心とした固定発生源型汚染から大都市、幹線道路沿いなどにおける二酸化窒素 (NO₂) や浮遊粒子状物質 (SPM) を主体とした移動発生源型汚染に移りつつある。近年、ディーゼル車の増加が著しく、大都市部の浮遊粒子状物質 (SPM) と NO₂ の環境基準の達成率は依然低い状態にある。特に、浮遊粒子状物質 (SPM) の汚染は深刻である。例えば東京都内の自動車沿道排気測定局 (自排局) では環境基準を満たしているところは少ない (平成 8 年度から 12 年度までの達成率は 9.3 ~ 63.4%)。また、東京都内の SPM の総排出量は年間 1 万トン以上にもなり、その約半分は粒径 2.5 μm 以下のディーゼル排気微粒子 (DEP = PM_{2.5}) である。

最近になって、粒径が 2.5 μm 以下の SPM、すなわち PM_{2.5} と心疾患による死亡率との間に非常に高い相関性が存在することがアメリカやイギリスからの多くの疫学研究によって示され、その健康影響の重大性がにわかにクローズアップされてきた。しかし、この両者間の因果関係の実験的証明はまだなされておらず、その証明はこれからの研究にかかっている。

そのため、PM_{2.5} と心肺循環器疾患との間の因果関係を実験的に明らかにすることは微粒子汚染の健康影響をより明確にすることになり緊急性の高い重要な研究分野であることが指摘されている。そこで、このような背景

を踏まえ、本研究では日本の大都市部の PM_{2.5} の主要部分を占める DEP を対象物質としてディーゼル排気の曝露実験と組織培養を含む *in vitro* の実験を組み合わせることにより、その DEP 中の物質がどのような機序で心肺循環器系に障害を及ぼしているかを明らかにすることを目的とした。このことにより、大都市部における PM_{2.5} (DEP) 汚染を低減することの緊急性と重要性を理解してもらう科学的知見を示し、環境保全のための科学的資料を提供する。

(2) 研究の概要

本研究に先立って、昭和 63 年度から平成 4 年度の特別研究 (仮の名称として; 第一次ディーゼル特別研究) の後半において、ディーゼル排気発生装置を作成し、ディーゼル排気微粒子 (DEP) を手にすることができた。そこでまず、この DEP の毒性メカニズムから調べた。その結果、DEP のみを長期間にわたってマウスに繰り返し気管内投与することによって、気管支ぜん息の基本病態である 気管支粘膜下への好酸球の浸潤を伴う慢性気道炎症 気管支での粘液の過剰合成、分泌 気道過敏性の亢進などに相当する呼吸器系の病態が明瞭に発現することを示した。

次に、平成 5 ~ 9 年度に、特別研究「ディーゼル排気による慢性呼吸器疾患発症機序の解明とリスク評価に関する研究」(仮の名称として; 第二次ディーゼル特別研究) を行い、その結果、大都市部の浮遊粒子状物質 (SPM) の中のかなりの部分を占める DEP がアレルギー性のぜん息様病態を増悪すること、そのメカニズムとして好酸球の浸潤に基づくアレルギー反応の亢進が考えられることを見つけた。

したがって、本研究は、前述の第一次、第二次の 2 つの特別研究で行った呼吸器系疾患およびアレルギー性疾患等の成果に基づき、最近の疫学的調査で重要視されている循環器系に対する影響の解明とそれに関する免疫系に対する影響を解明することに主眼がおかれている。

そこで、本報告では、空中浮遊微粒子 (PM_{2.5}) の心肺循環器系に及ぼす障害作用を明らかにするために、1. 循環器に対する影響の解明研究として、(1) PM_{2.5} (DEP) の曝露を受けた動物の心電図解析をはじめとする電気生理学的解析、および (2) 心臓と肺の病理組織学的変化の解析 (*in vivo* 実験)、ならびにそれら組織にとって重要な (3) 各種構成細胞に対する PM_{2.5} (DEP)

の影響を解析 (*in vitro* 実験) するとともに、2. 呼吸循環影響に関する免疫学的研究として、(4) 肺泡マクロファージの反応、(5) 鼻アレルギー反応および(6) 感染性肺傷害の憎悪とメカニズムの解明 (*in vivo* 実験) の実験を行った。

(3) 研究成果の概要

1) 循環器系に対する影響

ディーゼル排気 (DE) 吸入曝露ラットにおける心電図記録および臓器の病理組織学的検索

DEP の循環器に及ぼす影響を明らかにするための第一段階として、チャンパー内で DEP を含むディーゼル排気 (DE) に曝露させたラットの心電図測定、体重測定、臓器重量測定および臓器の病理組織学的検索を行い、DEP の吸入曝露による循環器系および臓器への影響を調べることを目的とした。

DE の吸入曝露実験は本研究所内に設置されている大型吸入曝露システムを用いて行った。吸入曝露のためのチャンパーは4台使用した。各チャンパー内の平均 DE 濃度は 0.3, 1.0 および 3.0 mg/m³ になるように設定した。これらの濃度は日本の SPM に関する環境基準値 0.1 mg/m³ のそれぞれ 3, 10, 30 倍に相当する (実際の曝露時間は 12 時間なので、1 日の平均曝露濃度はそれぞれ 0.15, 0.5 および 1.5 mg/m³ の濃度になる)。また、対照として清浄空気のみを吸入させるチャンパー内での曝露も行った (対照群)。

A. 異常心電図波形および不整脈の出現

DE に 1, 3, 6, 9 および 12 ヶ月間曝露させたラットの心電図を測定した結果、曝露群で異常心電図の発現数の増加がみられた。その異常心電図のほとんどは心室性期外収縮であり、曝露期間が延長するほど、この不整脈の発現数および不整脈を発現する個体数に増加する傾向が認められた。心拍数は曝露期間が長期化すると曝露群において有意な増加が認められた。DE 曝露によって異常心電図が発現しやすくなった状態がつくられているものと考えられる。また、12 ヶ月曝露群では第 1 度の房室ブロックを呈する個体が認められたが、この房室ブロックは PQ 間隔が徐々に延長し QRS が脱落するタイプで、ヒトで言われる Wenckebach 型に相当するものと思われた。

B. 体重および臓器重量の変化

体重は 1, 3, 6 ヶ月曝露群、および 12 ヶ月曝露にお

いて、いずれも 3.0 mg/m³ 曝露群で対照群に比べて有意な減少を示した。各臓器重量を測定した結果、12 ヶ月曝露後の DE 曝露群の心臓重量は対照群に比べて有意に増加しており、組織学的検索では曝露群の心臓に著しい変化は認められず、重量増加の原因は不明であるが、DE 曝露が心臓の形態に影響を及ぼしたことが推察される。

C. 心室壁の厚さの変化

心臓について、冠状動脈に平行に心室壁の最大部を切断し、左心室と右心室の室壁の厚さを測定した。左心室の壁の厚さは異常心電図波形および不整脈の出現に差はなかったが、右心室の壁の厚さは曝露群で有意に厚くなり、心筋内の刺激の伝導の仕方が変化していることを推測させた。

D. 肺および気管支の組織の変化

組織学的検索では、曝露群の肺胞内において多数の黒色粒子状物質およびそれらを取り込んだ肺泡マクロファージを多数認めた。それらのマクロファージは肺全体に散在していたが、DE 濃度が高い群ほど肺辺縁に集簇する傾向を認めた。0.3 mg/m³ および 1.0 mg/m³ 曝露群の気管支粘膜上皮細胞には多層性の増生と剥離がみられた。また、曝露群の肺門リンパ節において、黒色粒子様物質の沈着を認めた。それ以外の臓器では顕著な変化は認められなかった。

E. 動脈血 pH、ガス分圧の変化と肺におけるガス交換能の変化

安静時にカテーテル法によって採取した動脈血の pH とガス分圧を測定した。pH は 3 mg/m³ 曝露で有意に低下し、二酸化炭素濃度と酸素濃度は 1 mg/m³ と 3 mg/m³ 曝露群で有意に低下した。これらの pH と動脈血ガス分圧の変化は、肺による換気機能の低下を示唆した。そこで、次に、呼気ガス分析の酸素濃度と二酸化炭素濃度を同時に分析し、肺における動脈血と肺胞間の差について定法に基づき計算してみると、二酸化炭素の肺胞動脈間の差はコントロールと比較して、曝露群で高い傾向を示し、高換気するとき 0.3 ~ 3.0 mg/m³ 群で有意であった。また酸素の差も高換気では、dose-dependently に曝露群で高くなり、0.3 ~ 3.0 mg/m³ 群では有意に高くなった。このことは、肺におけるガス交換機能が低下していることを示し、動脈血の状態と一致した。これらの動脈血ガス分圧の変化は、換気回数が増加するとガス交換機能が低下することを示し、矛盾する変化ではないと考えられた。

DEPの静脈内投与による血圧および心電図の変化
DEの吸入曝露実験において、DEに曝露された個体は高頻度で異常心電図を発現した。このことから、DEもしくはその中に含まれるDEPが循環機能に対し、何らかの影響を及ぼしていることが推察された。そこで、DEPの循環器系に対する作用を明らかにする目的で、麻酔下のラットの静脈内にDEP溶液を投与し、血圧と心電図の変化を観察したところ、DEP溶液の投与により末梢血圧の一過性の低下が認められた。血圧の低下にはDEPの濃度依存性の反応が認められた。また、この血圧低下は交感神経遮断薬および副交感神経遮断薬で前処置したところ、いずれにおいても上述のは出現しなかった。しかし、このときの1分間の心拍数は、投与前と比べてほとんど変化しなかったことから、本実験において観察された血圧低下は、DEPの心臓や血管への自律神経を介する作用と血管に対する直接的作用によるものと考えられた。

また、本実験において、DEP溶液の投与により吸入曝露と同様の心室性期外収縮が出現し、これはDEPの心筋への直接作用か、自律神経系を介した作用によるものと考えられた。

PM_{2.5}(DEP)の心血管系に対する薬理学的作用

前節で、DEP懸濁液が循環器に作用することが判明した。そこで、DEPは毒性物質を持っているのか、あるいは毒性作用を示すのかを、持っているとしたらその発現量はどのくらいなのかを、心電図を指標にして、より詳細に薬理学的に明らかにすることを目的とした。

(1) 不整脈誘発濃度と致死濃度

DEP懸濁液をモルモットの静脈に累積投与することによって、心房の電氣的な刺激が心室に正常に伝わらないいわゆる房室ブロック(A-V block)が誘発され、最終的には心活動の停止した。このときの不整脈誘発濃度は $75.53 \pm 11.65 \text{ mg/ml}$ で、致死濃度は $132.0 \pm 7.22 \text{ mg/ml}$ であることが明らかとなった。

(2) 病理組織学的変化

死亡時の肺の病理組織像に、肺泡毛細血管内にDEP粒子が見られ、血管の外には浸潤していないことが判明した。さらに、肺内の血管に軽度の収縮とうっ血像が見られ、心・循環障害によるものと判断された。

DEPの摘出血管標本および摘出心筋標本に対する直接作用

前述したように、DEの曝露実験やDEPの静脈内投与実験によって、DEPが血管や心臓に対して機能的な変化をもたらすことが示された。そこで、DEPが心臓や血管に対してどのような作用を持つのかを明らかにすることは、DEPの健康に及ぼす影響を明らかにする上で非常に重要なことである。ここでは、心臓と血管の摘出標本を用いて、DEPの血管および心臓に対する直接的作用を明らかにすることを目的として実験を行った。

(1) 全DEP分画の摘出血管標本に対する作用

血管を収縮させる薬物(PE)の作用によって収縮中の血管にDEP溶液を低濃度から段階的に投与したところ、高濃度では明瞭な弛緩作用が出現した。一方、低濃度のDEPの投与において、PE収縮を軽度に増強する作用が存在することも確認された。この成績は、前の静脈内投与実験において、自律神経作用を遮断した後にDEP溶液を静脈内に投与した場合、軽度の血圧の上昇が出現したと矛盾しない。一方、心筋作用に関しては、心筋単収縮の抑制とそれに続く強縮が出現することが明らかになった。これらの組織標本を用いた実験結果から、高濃度のDEPの循環器系に対する作用は、血管の弛緩と心拍動の抑制による血圧低下ならびに心拍出量の減少をもたらすものと解釈される。

DEP中のどのような物質が血管と心臓にどのような作用を持つか

これまでの実験において、DEPは血管に対して弛緩や心臓に対して強縮反応などの直接的な作用を持つことが明らかになった。しかし、そこで、DEP溶液を系統的に抽出分画し、血管反応と心臓反応を指標に、さらに細分画していく方法で、DEP中のどのような物質が心・血管にどのような作用を持つのかを明らかにしようとした。

まず、DEPをヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタン、メタノールおよびアンモニアの5種類の有機溶媒によって極性の異なる5つの分画に分離し、その後、酸・塩基抽出など5段階、延べ83分画について、前節と同様に血管と心筋の摘出標本に対する作用の検索を行った。

このバイオアッセイと細分画を繰り返し行うことによって、最終的に、血管・心臓作用を持つ細分画から5種類の化学物質が抽出、単離された。この化学物質を

A, B, C, D, E と仮の名前を付け、これらの化学物質が、これまでと同様な作用を持つか確認する必要があった。

化学物質 B の静脈内投与による反応

そこで、全 DEP の静脈内投与によって認められた一過性の血圧低下が、これらの化学物質の影響であるかどうかを確認するため、再びラットの静脈内投与実験を行った。前節で分離された化学物質 B (A-E の代表として) の静脈内投与実験で、全 DEP の静脈内投与実験のときと同様の、一過性の血圧低下と心室性期外収縮が認められた。よって、この化学物質 B は全 DEP の投与と同様の生体反応を引き起こすこと、すなわち生体に対し血圧低下や異常心電図の出現の原因となる物質であることが明らかとなった。

化学物質 B の血管弛緩作用および心臓強縮作用の特徴

この物質は、 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ mg/ml の単独で、強い弛緩反応を示すが、SOD とカタラーゼの前投与によって、この弛緩反応は抑制された。さらに、L-NAME によって NO の産生を抑えると、弛緩の程度は小さくなった。この反応は、血管の弛緩に NO が関与していることと、NO が関与しない弛緩反応が存在することが推測された。心筋に対しては、交感神経のレセプターを薬物で完全に遮断しても、この化学物質 B によって、収縮力の減少と強縮は引き起こされ、交感神経のレセプターは心筋の反応に関与していないことが判明した。

培養細胞系 血管内皮細胞に及ぼす傷害作用

前節までの *in vivo* と *in vitro* の実験で、DEP が血管内皮細胞に作用して、血管を弛緩させることが判明した。そこで、血管内皮細胞が実際に血管の弛緩因子である NO を産生するのか、また、その毒性はどのレベルなのかを知る目的で、血管内皮細胞に対する傷害作用について検討した。

その結果、DEP の血管内皮細胞への毒性のメカニズムが考えられた。つまり、DEP が含有する金属類やキノン様化合物が酵素反応により、活性酸素を産生し、この活性酸素は細胞内の SOD と CAT によって代謝され無害な水になるが、一部の残った OH ラジカルは細胞に傷害を及ぼすと考えられる。一方、血管内皮細胞で産生された NO は活性酸素と結合し、過酸化水素と反応して毒

性の高いパーオキシナイトライト (ONOO⁻) を生成して細胞傷害を起こすことが推測された。

肺胞上皮細胞と肺微小血管内皮細胞、肺線維芽細胞への影響

DEP を構成する様々な化学物質や金属の一部は、サーファクタント中に溶解する。これらの化学物質は肺胞上皮細胞に傷害を与えることにより肺胞上皮細胞を通過して、線維芽細胞や血管内皮細胞に傷害を及ぼす可能性がある。そこで、培養肺胞上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞への影響評価を行うこととした。

その結果、1) 生体組織を模して基底膜や型コラーゲンゲル中で培養した場合、従来のプラスチック上での培養よりも DEP 抽出物曝露に対する細胞の抵抗性が強いこと 2) 低濃度の DEP は肺線維芽細胞の増殖を引き起こすこと 3) DEP による細胞障害作用機序として酸化的ストレスが関与していることが示された。

2) 免疫学的影響研究

DEP 曝露マウス由来肺胞マクロファージに関する免疫学的研究

DEP と肺胞マクロファージの関係を知るために肺胞マクロファージを採取し、様々な性質を調べた。DEP を長期間曝露されたマウス由来の肺胞マクロファージはサイトカイン産生、NO 産生が低下していた。しかも 3 mg/m^3 曝露群で顕著だった。これは DEP が一定以上だと細胞に悪影響を与えることを意味する。また、脾細胞を用いた DNA 合成実験では、高濃度 DEP 曝露群、長期間曝露群で有意にチミジンの取り込みが抑制されていた。これは血中に何らかの抑制物質が増加していることを示唆した。

DEP 曝露マウスと結核感染との関係に関する基礎的研究

DEP 曝露マウスが結核菌に感染されたとき、どのように病態が変化するかを調べた。結果から長期 DEP 曝露マウスは結核にかかりやすいといえそうである。しかも肉芽腫形成が長期曝露マウスで認めにくくなる。従って、大気汚染の程度のひどい地域では細菌による呼吸器感染に十分に注意を払う必要がある。

DEPのマクロファージ・リンパ球機能の障害

DEPはラジカルや活性酸素の発生とともに、カーボン粒子に結合している多種類の炭化水素類をはじめとする化学物質の作用により呼吸器その他の免疫系への影響を介して、心臓や血管系への影響を誘導している可能性が考えられる。そこで、DEPによるリンパ球、中でもTリンパ球機能への影響について特異抗体処理によってそのリンパ球を除いた系にDEPを投与してT細胞亜集団の変動や抗原提示細胞（マクロファージ等）との相互作用について解析した。また、肥満細胞へのDEP成分の影響についても検討した。その結果、DEPの投与は、マクロファージやCD4あるいはCD8陽性Tリンパ球への影響を通じて局所での炎症の増悪に関与し、血中での抗体レベルにも影響を与えることにより血管系への障害にも関与する可能性が示唆された。

DEP中の化学成分による肥満細胞機能の障害

DEP成分にふくまれるベンゾ[a]ピレンと1-ニトロピレンの肥満細胞機能への影響について検討した。まず、肥満細胞刺激薬としてのカルシウムイオノフォアA23187と肥満細胞を培養して上清中のIL-4を測定した。ベンゾ[a]ピレンを加えてカルシウムイオノフォア刺激し3時間後のIL-4産生を調べると、0.1と0.5 µg/mlの濃度で有意な増加がみられた。次に、1-ニトロピレンを加えてカルシウムイオノフォア刺激し、IL-4産生を調べると1-ニトロピレンを加えたすべての群で増加が認められた。これらの結果から、ベンゾ[a]ピレンと1-ニトロピレンは低濃度で活性化した培養肥満細胞からのサイトカイン産生を亢進させることが示唆された。

ディーゼル排気粒子により誘導される肺胞マクロファージの遺伝子の解析

これまでの研究から、大気汚染物質と呼吸器疾患の関連性が示唆されており、大気汚染物質が生体に及ぼす影響についての総合的な評価が求められている。しかしながら、大気汚染物質の曝露によりどのような因子が変化するのかについての包括的な検討はなされていない。遺伝子の発現レベルの変化はタンパクに比べて非常に鋭敏であること、またDNAマイクロアレイは一度に多数の遺伝子を解析することができることから包括的な検討を行うのに適している。大気汚染物質の主要な標的となる

のは肺の構成細胞であると考えられることから、本研究では、ディーゼル排気粒子（DEP）がラット肺胞マクロファージの遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。解析は450個の毒性にかかわる遺伝子がプロットされたDNAマイクロアレイを用いて行った。

その結果、DEP抽出物の曝露は、抗酸化系酵素のHO、TDPX2、GST-P、NADPH dehydrogenaseとDNAの修復と複製にかかわるPCNA遺伝子の発現を増加させることを明らかにした。これよりDEPに対する肺胞マクロファージの初期反応としては、生体の防御機構が作動する可能性が示唆された。またこれらの因子は大気汚染物質に対する鋭敏な指標となる可能性がある。

ディーゼル排気曝露が花粉症に及ぼす影響

大気汚染物質がほんとうにアレルギー反応を起こしやすくするかどうか明らかにすることが重要である。そこで、自動車の排気由来の大気汚染物質のなかでも問題となっているディーゼル排気がアレルギー関連疾患の一つである花粉症に及ぼす影響について検討した。DEの曝露は鼻アレルギー反応を増悪させることを示唆している。また、DE曝露はくしゃみ反応を増悪するが鼻汁分泌には有意な影響がみられなかった。また、DEの微粒子濃度に依存してアレルギー性結膜炎症状の点数が増加し、濃度に依存して血漿の漏出が増加することから、ディーゼル排気曝露はアレルギー性結膜炎を増悪する作用があることが明らかになった。

以上のことから、ディーゼル排気をはじめとした大気汚染物質の曝露下に抗原が投与されるとくしゃみや鼻水といった鼻アレルギー、結膜の充血等の眼のアレルギーの症状を増悪させる。また、増悪作用の要因として鼻や眼の過敏、抗体産生の増加、好酸球の浸潤の増加などが示唆された。

3) ディーゼル排気微粒子による感染性肺傷害の増悪とメカニズムの解明に関する研究

過去の疫学研究は、大気中の浮遊粒子状物質濃度の上昇と呼吸器疾患の有症率、有病率、死亡率が、短い潜時間で正の相関を示すことを示している。これらの報告の特徴は、浮遊粒子状物質の呼吸器系に対する健康影響が、特定の感受性群に出現しやすいという点にある。興味深いことに、高感受性群は、易感染性というキーワード

を共有している。本研究では、大都市における浮遊粒子状物質の多くの部分を占めるディーゼル排気微粒子 (DEP) が、細菌の毒素である lipopolysaccharide (LPS) による肺傷害に及ぼす影響を、動物モデルを用いて検討した。

DEP は細菌毒素 (LPS) による肺傷害を相乗的に増悪した。肺傷害は、間質性肺水腫、肺胞出血を伴う好中球性炎症であった。この増悪効果は、炎症性タンパク質の上昇とよく相関した。これらの炎症性タンパクの増加が増悪メカニズムの中心的役割を果たしていると考えられる。

以上より、大気中の浮遊粒子状物質の増加が、感染性の肺傷害を増悪する可能性があることが示唆された。本研究は、これまでの高感受性群の存在に言及した疫学的知見に、少なくとも部分的に、実験的論拠を与えうるものと考えられる。

4) リスク評価 (ベンチマークの計算) に関する研究
これまでの実験で得られた量-反応曲線から、リスク評価のためのベンチマークについて計算した。

まとめ

DE あるいは DEP の曝露によって、ガス交換障害を主とする呼吸機能の低下が起こり、それに伴い、動脈血液中の酸素濃度の低下および二酸化炭素濃度の増加が起こることが確認された。また、これらの変化は、心臓負荷を増大させ、循環機能の低下をもたらすことが、右心室壁の肥厚や不整脈の出現によって明らかにされた。さらに、DEP 曝露は、生体の免疫力を低下させ、細菌感染を起こりやすくし、細菌の出す毒素を増悪させることが判明した。細菌毒素による炎症の悪化は肺水腫や肺での

循環障害を引き起こすことから、心臓と血管の負荷を大きくするため、循環器障害は極めて大きくなることが推察され、DE 曝露は死亡率を高める重要な要因になりうるものと考えられた。

謝辞

本研究の半ばに、国立環境研究所は独立行政法人国立環境研究所となり、大幅の組織改革があり、不安の中での研究の継続ということになった。しかしながら、多くの方に支えられ、薄明かりの中、一筋の明かりが見えてきた感じがある。DEP の呼吸・循環器影響という観点から出発し、呼吸器影響についてはこれまでの研究の発展という意味で成果が上がっているが、循環器影響に関しては、まだ初歩的な段階で解決すべき問題点をはっきりしてきた段階のようである。今後、より詳細な研究が必要とされ、それらは、新組織の PM_{2.5}・DEP 研究プロジェクトに継承され、その中で行われることを期待したい。

最後に、本特別研究は、これまでご協力いただいた客員研究員、その他所外の多くの方々に加えて、歴代所長、副所長、理事長、理事、研究企画官および地域環境研究グループ統括研究官、その他の管理部門の方々、動物施設専門官、アニマルケア、日興酸素 KK、小糸工業 KK、東京ダイレック KK、明電舎等の担当者をはじめとする多くの方々の協力、励ましによって、遂行することが可能となった。特に、実際に大気影響評価研究チームのメンバー、準構成員あるいは大学院生、学生等共同研究員として参加いただいた方々の協力は何者にも代え難いものであった。このことを記し、関係各位のご協力、ご支援に心から感謝の意を表する次第である。

[資 料]

研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織（当時）

[A 研究担当者]

地域環境研究グループ

| | | |
|---------------------|-------|----------------------|
| 統括研究官 | 森田昌敏 | （平成 11 ～ 12 年度） |
| PM 2.5・DEP 研究プロジェクト | 若松伸司 | （平成 13 年度） |
| 大気影響評価研究チーム | | |
| 総合研究官 | 森田昌敏 | （平成 11 年度（併任）） |
| 〃 | 高野裕久 | （平成 12 年度，13 年度（併任）） |
| | 鈴木 明 | （平成 11 ～ 13 年度） |
| | 古山昭子 | （平成 12 ～ 13 年度） |
| 科学技術特別研究員 | 美留町潤一 | （平成 11 ～ 13 年度） |
| STA フェロー | バイウイシ | （平成 12 ～ 13 年度） |
| ポスドクフェロー | 戸田典子 | （平成 13 年度） |

環境健康部

| | | |
|---------|------|-----------------|
| 上席研究官 | 小林隆弘 | （平成 11 ～ 13 年度） |
| 生体機能研究室 | 藤巻秀和 | （平成 11 ～ 13 年度） |

（平成 13 年 4 月の独立行政法人化に伴い，同上チームは PM 2.5・DEP 研究プロジェクト毒性・影響評価研究チームに，環境健康部は環境健康研究領域に名称が変更になった。）

[B 客員研究員]

| | |
|------------------------|-----------------|
| 嵯峨井勝（青森県立保健大学健康科学部） | （平成 11 ～ 12 年度） |
| 南 勝（北海道医療大学薬学部） | （平成 11 ～ 12 年度） |
| 森 洋樹（北海道医療大学薬学部） | （平成 11 ～ 12 年度） |
| 林 英幸（北海道医療大学薬学部） | （平成 11 ～ 12 年度） |
| 早川和一（金沢大学薬学部） | （平成 11 ～ 12 年度） |
| 武田 健（東京理科大学薬学部） | （平成 11 ～ 12 年度） |
| 局 博一（東京大学大学院農学生命科学研究科） | （平成 11 ～ 12 年度） |
| 田谷一善（東京農工大学農学部） | （平成 11 ～ 12 年度） |
| 市瀬孝道（大分県立看護科学大学） | （平成 11 ～ 12 年度） |

[C 研究協力員]

| | |
|------------------------|-----------------|
| 戸田典子（東京大学大学院農学生命科学研究科） | （平成 11 ～ 12 年度） |
| 机 直美（東京大学大学院農学生命科学研究科） | （平成 11 ～ 13 年度） |
| 桑原正貴（東京大学大学院農学生命科学研究科） | （平成 11 ～ 13 年度） |
| 菅原 勇（（財）結核研究所） | （平成 11 ～ 12 年度） |
| 関 興一（北海道医療大学薬学部） | （平成 12 ～ 13 年度） |
| 鎌田和之（北海道医療大学薬学部） | （平成 12 ～ 13 年度） |
| 佐久島明世（北海道医療大学薬学部） | （平成 12 ～ 13 年度） |
| 種田晋一（北海道医療大学薬学部） | （平成 12 ～ 13 年度） |

| | |
|----------------------|-----------------|
| 渡辺 元 (東京農工大学農学部) | (平成 12 ~ 13 年度) |
| 小池英子 (筑波大学大学院医学研究科) | (平成 11 ~ 13 年度) |
| 樺島麻里子 (筑波大学大学院医学研究科) | (平成 11 ~ 13 年度) |

2 研究課題と担当者 (* 客員研究員)

- (1) 心電図による心筋および循環機能異常に関する電気生理学的解析
鈴木 明・戸田典子・美留町潤一・局 博一 *
- (2) 心肺循環器系の病理組織と機能的異常の解析
鈴木 明・戸田典子・机 直美・美留町潤一・局 博一 *
- (3) PM_{2.5} (DEP) 中の各成分の過度の薬理学的作用による心肺循環機能異常の解析
南 勝*・戸田典子・森 洋樹*・林 英幸*・鈴木 明
- (4) 心筋, 血管内皮細胞および気道上皮細胞等の培養細胞系に及ぼす障害作用機序の解析
白 兔詩・鈴木 明・森 洋樹*・林 英幸*・嵯峨井勝*
- (5) 肺胞上皮細胞と肺微小血管内皮細胞, 肺線維芽細胞への影響
古山昭子
- (6) DEP のマクロファージ・リンパ球機能の障害
藤巻秀和
- (7) DEP 中の化学成分による肥満細胞機能の障害
藤巻秀和・実吉健策 (東京慈恵医科大学)
- (8) DEP 暴露マウス由来肺胞マクロファージに関する免疫学的研究
菅原 勇 ((財)結核研究所)・嵯峨井勝*
- (9) DEP 暴露マウスと結核感染との関係に関する基礎的研究
菅原 勇 ((財)結核研究所)・鈴木 明・嵯峨井勝*
- (10) ディーゼル排気粒子により誘導される肺胞マクロファージの遺伝子の解析
小林隆弘・平野靖史郎・小池英子 (筑波大学大学院医学研究科)
- (11) ディーゼル排気曝露が花粉症におよぼす影響
小林隆弘
- (12) ディーゼル排気微粒子による感染性肺傷害の増悪とメカニズムの解明に関する研究
高野裕久・柳澤利枝・市瀬孝道*・定金香里 (大分県立看護科学大学)
- (13) ディーゼル排気の生殖器への影響
机 直美・戸田典子・森 洋樹*・林 英幸*・局 博一*・鈴木 明

研究成果発表一覧

1 誌上発表

| 発表者 | 題目 | 掲載誌 | 巻(号) | ページ | 刊年 |
|---|---|--|--------|-----------|------|
| Minami M., Endo T., Hamaue N., Hirafuji M., Mori Y., Hayashi Y., Sagai S., Suzuki A.K. | Electrocardiographic changes induced by diesel exhaust particles (DEP) in guinea pigs | Res. Com. Molecul. Pathol. Pharmacol. | 105 | 55-66 | 1999 |
| Ushio H., Nohara K., Fujimaki H. | Effect of environmental pollutants on the production of pro-inflammatory cytokines by normal human dermal keratinocytes | Toxicol. Lett. | 105 | 17-24 | 1999 |
| 藤巻秀和 | 空気の汚れとアレルギー | 臨床と薬物治療 | 18(12) | 1120 | 1999 |
| Shi F.X., Mochida K., Ogura A., Matsuda J., Suzuki O., Watanabe G., Hutz R.J., Tsonis C.G., Suzuki A.K., Taya K. | Follicles selection in cyclic guinea pigs with active immunization against inhibin -subunit | Life Sci. | 66 | 2489-2497 | 2000 |
| Shi F.X., Mochida K., Suzuki O., Matsuda J., Ogura A., Ozawa M., Watanabe G., Suzuki A.K., Taya K. | Ovarian localization of immunoglobulin G and inhibin -subunit in guinea pigs after passive immunization against the inhibin -subunit | J. Reprod. & Dev. | 46 | 293-299 | 2000 |
| Taneda S., Hayashi H., Sakata M., Yoshino S., Suzuki A.K., Sagai M., Mori Y. | Anti-estrogenic activity of diesel exhaust particles | Biol. Pharma. Bull. | 23 | 1477-1480 | 2000 |
| Abe S., Takizawa H., Sugawara I., Kudoh S. | Diesel exhaust (DE)-induced cytokine expression in human bronchial epithelial cells: a study with a new cell exposure system to freshly generated DE in vitro | Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. | 22 | 296-303 | 2000 |

| 発 表 者 | 題 目 | 掲 載 誌 | 巻(号) | ページ | 刊年 |
|---|---|---------------------|-------|-----------|------|
| Takizawa H., Abe S., Ohtoshi T., Kawasaki S., Takami K., Desaki M., Sugawara I., Hashimoto S., Azuma A., Nakahara K., Kudoh S. | 21. Diesel exhaust particles up-regulate expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human bronchial epithelial cells | Clin. Exp. Immunol. | 120 | 356-362 | 2000 |
| Takizawa H., Ohtoshi T., Kawasaki S., Abe S., Sugawara I., Nakahara K., Matsushima K., Kudoh S. | Diesel exhaust particles activate human bronchial epithelial cells to express inflammatory mediators in the airways: a review | Respirology | 5 | 197-203 | 2000 |
| Iwai K., Adachi S., Takahashi M., Moller L., Udagawa T., Mizuno S., Sugawara I. | Early oxidative DNA damages and late development of lung cancer in diesel exhaust-exposed rats | Environ. Res. | 84 | 255-264 | 2000 |
| 藤巻秀和 | アレルギーと環境 | ファルマシア | 36(3) | 207-210 | 2000 |
| 藤巻秀和 | ディーゼル排気微粒子と Th1/Th2 バランス | 臨床免疫 | 34(6) | 747-751 | 2000 |
| 藤巻秀和 | 大気汚染物質の免疫系への影響 | アレルギー・免疫 | 7(4) | 70-76 | 2000 |
| Bai Y., Suzuki A.K., Sagai M. | The cytotoxic effects of diesel exhaust particles on human pulmonary artery endothelial cells in vitro: role of active oxygen species | Free Rad. Bio. Med. | 30 | 555-562 | 2001 |
| Herath C.B., Watanabe G., Katsuda S., Yoshida M., Suzuki A.K., Taya K. | Exposure of neonatal female rats to P-tert-Octylphenol disrupts afternoon surges of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone prolactin secretion, and interferes with sexual receptive behavior in adulthood | Biol. Repro. | 64 | 1216-1224 | 2001 |

| 発 表 者 | 題 目 | 掲 載 誌 | 巻(号) | ページ | 刊年 |
|--|---|-----------------------------|--------------|------------------------------|------|
| Tsukue N., Toda N., Tsubone H., Sagai M., Wan Z. Jin, Watanabe G., Taya K., Birumachi J., Suzuki A.K. | Diesel Exhaust (DE) affects the regulation of testicular function in male rats. | J. Toxicol. Environ. Health | A, 63 (2) | 115-126 | 2001 |
| Toda N., Tsukue N., Tsubone H., Sagai M., Birumachi J., Suzuki A.K. | The effects of diesel exhaust particles (DEP) on blood pressure in rats | J. Toxicol. Environ. Health | A, 63 (6) | 429-435 | 2001 |
| Birumachi J., Suzuki A.K., Ito K., Hioki K., Maruyama C., Ohnishi Y. | Diesel exhaust induced air way hypersensitivity in c-Ha-ras transgenic mice | Toxicol. | 163 | 145-152 | 2001 |
| Taneda S., Hayashi H., Sakushima A., Seki K., Suzuki A.K., Kamata K., Sakata M., Yoshino S., Sagai M., Mori Y. | Estrogenic and anti-estrogenic activities of two types of diesel exhaust particles | Toxicol. | 170 | 153-161 | 2001 |
| Herath C.B., Yamashita M., Watanabe G., W. Jin, Tangtrongsup S., Kojima A., Groom N.P., Suzuki A.K., Taya K. | Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol and dimetric inhibins in the female rat | Biol. Repro. | 65 | 1623-1633 | 2001 |
| Birumachi J., Suzuki A.K., Ito K., Hioki K., Maruyama C., Oshima Y. | Diesel exhaust induced air way hypersensitivity in c-Ha-ras transgenic mice, Amr. J. Respir. Crit | Care Med. | 163(5) | A 170 | 2001 |
| Toda N., Tsukue N., Tsubone H., Suzuki A.K. | Inhalation of diesel exhaust (DE) induces arrhythmia in rats | Inhalation Toxicol. | | (accepted on Dec. 30, 2001). | 2001 |

| 発 表 者 | 題 目 | 掲 載 誌 | 巻(号) | ページ | 刊年 |
|--|---|--------------------------------|-------|-----------|------|
| Iwai K., Udagawa T., Mizuno T., Kawabata Y., Sugawara I., Goto S., Seto H., Adachi S. | Mutagenicity and tumorigenicity of diesel exhausts of high- and low-sulfur fuels: Inhalation and particle instillation studies in rats. | J. Jpn. Soc. Atmos. Environ. | 37 | 216-229 | 2001 |
| Hashimoto K., Ishii Y., Uchida Y., Kimura T., Masuyama K., Morishima Y., Hirano K., Nomura A., Sakamoto T., Takano H., Sagai M., Sekizawa K. | Exposure to diesel exhaust exacerbates allergen-induced asthmatic responses in guinea pigs. | Am. J. Respir. Crit. Care Med. | 164 | 1957-1963 | 2001 |
| 高野裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 | ディーゼル排気微粒子はエンドトキシンによる急性肺傷害を増悪する | 「エンドトキシン研究」 | 4 | 139-144 | 2001 |
| 藤巻秀和 | スギ花粉による感作と環境因子 | アレルギー科 | 11(2) | 103-108 | 2001 |
| Fujimaki H., Ushio H., Nohara K., Ui N. | Induction of the imbalance of helper T-cell functions in mice exposed to diesel exhaust. | The Sci. Total Environ. | 270 | 113-121 | 2001 |
| Fujimaki H., Ui N., Ushio H., Nohara K. | Roles of CD4+ and CD8+ T cells in adjuvant activity of diesel exhaust particles in mice. | Int. Arch. Allergy Immunol. | 124 | 485-496 | 2001 |
| Fujimaki H., Ui N., Endo T. | Induction of inflammatory response of mice exposed to diesel exhaust is modulated by CD4+ and CD8+ T cells. | Am. J. Respir. Crit. Care Med. | 164 | 1867-1873 | 2001 |
| 藤巻秀和 | ディーゼル排気吸入によるケモカイン産生パターンの変化 | 臨床免疫 | 36 | 924-929 | 2001 |
| 藤巻秀和 | 環境因子と免疫グロブリン 環境化学物質と抗体 | 職業アレルギー学会誌 | 8 | 21-26 | 2001 |
| 藤巻秀和 | ディーゼル排気粒子とダイオキシン | 治療学 | 35 | 521 | 2001 |
| Mori Y., Taneda S., Hayashi H., Sakushima A., Kamata K., Suzuki A.K., Yoshino S., Sakata M., Sagai M., Seki K. | Estrogenic activities of chemicals in diesel exhaust particles | Biol. Pharm Bull. | 25 | 251-258 | 2002 |

| 発 表 者 | 題 目 | 掲 載 誌 | 巻(号) | ページ | 刊年 |
|--|--|------------------------------------|------|---------|------|
| Taneda S., Hayashi H., Sakushima A., Seki K., Kamata K., Suzuki A.K., Sakata M., Yoshino S., Sagai M., Mori Y. | Estrogenic and anti-estrogenic activities of acidic, phenolic and neutral fractions of hexane extract of diesel exhaust particles | Environ. Sci. | 9 | 188-193 | 2002 |
| Tsukue N., Suzuki A.K. | Diesel exhaust (DE) affects the abnormal delivery in pregnant mice and the growth of young born from them | Inhalation Toxicol. | 14 | 635-651 | 2002 |
| Tsukue N., Toda N., Birumachi J., Sagai M., Watanabe G., Taya K., Tsubone H., Suzuki A.K. | Diesel exhaust particulate extracts (DEPE) induce abnormal parturition associated with increased myometrial contractility in C57BL mice | Environ. Sci. | 9 | 355-367 | 2002 |
| Saito Y., Azuma A., Kudo S., Takizawa H., Sugawara I. | Effects of diesel exhaust on murine alveolar macrophages and a macrophage cell line | Exp. Lung Res. | 28 | 201-217 | 2002 |
| Saito Y., Azuma A., Kudoh S., Takizawa H., Sugawara I. | Long-term inhalation of diesel exhaust affects cytokine expression in murine lung tissues: comparison between low- and high-dose diesel exhaust exposure | Exp. Lung Res. | 28 | 325-331 | 2002 |
| Yoshino S., Hayashi H., Taneda S., Takano H., Sagai M., Mori Y. | Effects of diesel exhaust particle extracts on TH1 and TH2 immune response in mice. | Int. J. Immunopathol Pharmacol. | 15 | 13-18 | 2002 |
| Yoshino S., Hayashi H., Taneda S., Takano H., Sagai M., Mori Y. | Effect of diesel exhaust particle extracts on induction of oral tolerance in mice | Toxicol. Sci. | 66 | 293-297 | 2002 |

| 発 表 者 | 題 目 | 掲 載 誌 | 巻(号) | ページ | 刊年 |
|---|--|--------------------------------|------|-----------|------|
| Takano H., Yanagisawa R., Ichinose T., Sadakane K., Inoue K., Yoshida S., Takeda K., Yoshino S., Yoshikawa T., Morita M. | Lung expression of cytochrome P450 1A1 as a possible biomarker of exposure to diesel exhaust particles | Arch. Toxicol. | 76 | 146-151 | 2002 |
| Takano H., Yanagisawa R., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Yoshikawa T., Morita M. | Diesel exhaust particles enhance lung injury related to bacterial endotoxin through expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and ICAM-1. | Am. J. Respir. Crit. Care Med. | 165 | 1329-1335 | 2002 |
| Sadakane K., Ichinose T., Takano H., Yanagisawa R., Sagai M., Yoshikawa T., Shibamoto T. | Murine strain differences in airway inflammation induced by Diesel exhaust particles and house dust mite allergen | Int. Arch. Allergy Immunol. | 128 | 220-228 | 2002 |
| Koike E., Hirano S., Shimojo N., Kobayashi T. | cDNA microarray analysis of gene expression in rat alveolar macrophages in response to organic extract of diesel exhaust particles. | Toxicol. Sci. | 67 | 241-246 | 2002 |

2 口頭発表

| 発表者 | 題目 | 学会等名称 | 開催都市名 | 年月 |
|---|---|--|--------|-------|
| 戸田典子, 鈴木 明, 机 直美, 美留町潤一, 局 博一 | ディーゼル排気微粒子の血圧に及ぼす影響について | 第70回日本獣医循環器学会 | 東京 | 11.4 |
| 鈴木 明, 戸田典子, 机 直美, 美留町潤一, 局 博一 | ディーゼル排気微粒子の循環器に及ぼす影響について - 異常心電図 - | 第70回日本獣医循環器学会 | 東京 | 11.4 |
| Fujimaki H., Ushio H., Nohara K., Ui N. | Induction of cytokine profile imbalance in mice exposed to particulate air pollutants | II Int. Symp. Occup. & Environ. Allergy & Immune. Dis. | Chieti | 11.4 |
| 宇井直也, 藤巻秀和, 遠藤朝彦 | スギ花粉点鼻投与マウスにおける上気道免疫系へのディーゼル排気暴露の影響 | 第40回大気環境学会年会 | 津 | 11.9 |
| 鈴木 明, 戸田典子, 机 直美, 美留町潤一, 嵯峨井勝 | ディーゼル排気微粒子による不整脈の出現 | 第40回大気環境学会年会 | 津 | 11.10 |
| 美留町潤一, 戸田典子, 机 直美, 嵯峨井勝, 局 博一, 鈴木 明 | ディーゼル排気微粒子気管内投与による気道収縮反応への影響 | 第40回大気環境学会年会 | 津 | 11.10 |
| 戸田典子, 鈴木 明, 机 直美, 美留町潤一, 嵯峨井勝, 局 博一 | ディーゼル排気微粒子の心血管系に及ぼす影響 | 第40回大気環境学会年会 | 津 | 11.10 |
| 机 直美, 鈴木 明, 戸田典子, 美留町潤一, 渡辺 元, 田谷一善, 局 博一, 嵯峨井勝 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) 投与による流産について | 第40回大気環境学会年会 | 津 | 11.10 |
| 机 直美, 鈴木 明, 戸田典子, 美留町潤一, 局 博一, 渡辺 元, 田谷一善, 嵯峨井勝 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) がF344雄ラットの生殖器系に及ぼす影響 | 第40回大気環境学会年会 | 津 | 11.10 |
| 戸田典子, 鈴木 明, 机 直美, 美留町潤一, 局 博一 | DEPの心筋および大動脈に及ぼす直接的影響について | 第71回日本獣医循環器学会 | 京都 | 11.10 |

| 発 表 者 | 題 目 | 学会等名称 | 開催都市名 | 年月 |
|--|--|------------------------------------|---------|--------|
| 宇井直也, 藤巻秀和, 今井 透, 森山 寛 | スギ花粉点鼻マウスの頸部リンパ節中の リンパ球分画に対するガス暴露の影響 | 第 49 回日本アレルギー 学会総会 | 広 島 | 11 .10 |
| 鈴木 明, 机 直美, 嵯峨井勝 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) が F344 雄 ラットの生殖器系に及ぼす影響について | 第 58 回日本公衆衛生学 会総会 | 大 分 | 11 .11 |
| 白 兎詩, 鈴木 明, 嵯峨井勝 | ディーゼル排気微粒子の <i>in vitro</i> における ヒト肺動脈内皮細胞に及ぼす細胞障害作 用について: 活性酸素類の役割の検討 | 日本過酸化脂質フリーラ ジカル学会第 23 回大会 | 横 浜 | 11 .12 |
| 細谷順子, 鈴木 明, 熊谷嘉人, 下條信弘, 井澤弘美, 嵯峨井勝 | 老化動物の心臓内に生じる生物ラジカル の計測と食品成分による消去作用の解析 | 日本過酸化脂質・フリー ラジカル学会第 23 回大 会 | 横 浜 | 11 .12 |
| 机 直美, 戸田典子, 美留町潤一, 嵯峨井勝, 金 万洙, 渡辺 元, 局 博一, 田谷一善, 鈴木 明 | ディーゼル排気 (DE) が雄ラットの精巢 機能に及ぼす影響 | 日本内分泌攪乱化学物質 学会第二回研究発表会 | 神 戸 | 11 .12 |
| 種田晋二, 林 英幸, 阪田正勝, 佐久島明世, 関 興一, 森 洋樹, 吉野 伸, 鈴木 明, 嵯峨井勝 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) 中の内分 泌かく乱作用化学物質の検索 | 日本薬学会北海道支部 114 例会 | 北海道 | 12 . 3 |
| 机 直美, 戸田典子, 美留町潤一, 渡辺 元, 田谷一善, 局 博一, 鈴木 明 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) 皮下投与 と流産について | 第 129 回日本獣医学会学 術集会 | つくば | 12 . 4 |
| 宇井直也, 藤巻秀和, 今井 透, 森山 寛 | スギ花粉点鼻マウスへの LPS 投与の影響 | 第 12 回日本アレルギー 学会春季臨床大会 | 福 岡 | 12 . 4 |
| Birumachi J., Sagai M., Morita M., Suzuki A.K. | The relationship of hypertension and endothelial nitric oxide by Diesel exhausts | ATS 2000, the 96th Inter. Conf. | Toronto | 12 . 5 |
| 戸田典子, 局 博一, 鈴木 明 | DEP の胸部大動脈に及ぼす影響について | 第 72 回日本獣医循環器 学会 | 東 京 | 12 . 6 |
| 藤巻秀和 | 環境因子と免疫グロブリン | 第 8 回日本職業アレル ギー学会総会 | 東 京 | 12 . 7 |
| 小林隆弘, 遠藤直紀, 藤巻秀和, 永井博弐, 田中宏幸, 大塚不二雄 | ディーゼル排気および排気中ガス状成分 暴露がマウスの即時型アレルギー反応に 及ぼす影響 | 第 41 回大気環境学会年 会 | 浦 和 | 12 . 9 |

| 発 表 者 | 題 目 | 学会等名称 | 開催都市名 | 年月 |
|---|---|--|--------|-------|
| 鈴木 明, 戸田典子, 机 直美, 美留町潤一 | 高齢化に伴って増加する二酸化窒素曝露による不整脈の出現 | 第 41 回大気環境学会年会 | 浦 和 | 12.9 |
| 机 直美, 戸田典子, 渡辺 元, 局 博一, 田谷一善, 鈴木 明 | ディーゼル排気 (DE) 曝露期間の違いによる C57BL 雄マウスの臓器重量の変化について | 第 41 回日本大気環境学会 | 浦 和 | 12.9 |
| 戸田典子, 鈴木 明, 局 博一 | ディーゼル排気 (DE) を曝露させたラットに出現した異常心電図について | 第 41 回大気環境学会年会 | 浦 和 | 12.9 |
| 美留町潤一, 高野裕久, 鈴木 明 | マウスにおけるディーゼル排気に誘発される血圧変動について | 第 41 回大気環境学会年会 | 浦 和 | 12.9 |
| 市瀬孝道, 定金香里, 高野裕久, 嵯峨井勝 | ダニ抗原と DEP 併用投与による気道炎症のマウスの系統差について | 第 41 回大気環境学会年会 | 浦 和 | 12.9 |
| 定金香里, 市瀬孝道, 高野裕久 | ダニ抗原誘発性気道炎症に対するホルムアルデヒドの影響 | 第 41 回大気環境学会年会 | 浦 和 | 12.9 |
| 藤巻秀和, 宇井直也, 遠藤朝彦 | ディーゼル排気曝露による NC/Nga マウスの免疫応答修飾 | 第 41 回大気環境学会年会 | 浦 和 | 12.9 |
| 藤巻秀和, 宇井直也, 遠藤朝彦 | 大気汚染物質曝露によるマウスケモカイン産生の亢進 | 第 41 回大気環境学会年会 | 浦 和 | 12.9 |
| 鈴木 明, 戸田典子, 机 直美, 美留町潤一 | 二酸化窒素急性曝露がラットの血圧に及ぼす影響 | 第 130 回日本獣医学会学術集会 | 大 阪 | 12.10 |
| 戸田典子, 机 直美, 局 博一, 鈴木 明 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) の心臓に及ぼす影響について | 第 130 回日本獣医学会学術集会 | 大 阪 | 12.10 |
| 机 直美, 戸田典子, 渡辺 元, 田谷一善, 局 博一, 鈴木 明 | ディーゼル排気 (DE) 吸入曝露マウスにおける繁殖への影響 | 第 130 回日本獣医学会学術集会 | 大 阪 | 12.10 |
| 林 英幸, 種田晋二, 佐久島明世, 関 興一, 阪田正勝, 鈴木 明, 吉野 伸, 嵯峨井勝, 森 洋樹 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) 成分のエストロゲン作用 | フォーラム 2000: 衛生薬学・環境トキシコロジー | 東 京 | 12.10 |
| Fujimaki H., Ui N., Fujimiya Y., Endo T. | Allergic inflammation of the airways in mice exposed to diesel exhaust. | 17 Inst. Cong. Allergol. & Clinical Immunol. | Sydney | 12.10 |
| 高野裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 | ディーゼル排気微粒子はエンドトキシンによる急性肺傷害を増悪する | 第 6 回エンドトキシン研究会 | 宇都宮 | 12.11 |

| 発 表 者 | 題 目 | 学会等名称 | 開催都市名 | 年月 |
|--|---|--|----------|--------|
| Herath C.B., Watanabe G., Katsuda S., Yoshida M., Suzuki A.K., Taya K. | Exposure of neonatal female rats to p-tert-Octylphenol disrupts estrus cyclicity, afternoon surges of luteinizing hormone and prolactin secretion, and interferes with sexual receptive behavior in adult hood. | Jpn. Endocrine. Disrupt., the 3rd conf. | Yokohama | 12 .12 |
| 机 直美, 戸田典子, 渡辺 元, 田谷一善, 局 博一, 鈴木 明 | ディーゼル排気 (DE) 曝露がマウスの子 の成長に及ぼす影響 | 日本内分泌攪乱化学物質 学会 | 横 浜 | 12 .12 |
| 種田晋二, 林 英幸, 佐久島明世, 関 興一, 鈴木 明, 吉野 伸, 鎌田和之, 阪田正勝, 嵯峨井勝, 森 洋樹 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) のエスト ロジェン作用 | 日本内分泌攪乱化学物質 学会 | 横 浜 | 12 .12 |
| 宇井直也, 藤巻秀和, 野原 修, 今井 透, 遠藤朝彦, 森山 寛 | マウスの杉花粉抗原に対する耐性誘導の 検討 | 第 50 回日本アレルギー 学会総会 | 横 浜 | 12 .12 |
| 藤巻秀和, 宇井直也, 遠藤朝彦 | ディーゼル排気曝露の CC ケモカイン産 生に及ぼす影響 | 第 50 回日本アレルギー 学会総会 | 横 浜 | 12 .12 |
| 藤巻秀和 | アレルギーと大気汚染物質 | 日本薬学会第 3 回市民衛 生薬学フォーラム | 名古屋 | 12 .12 |
| 種田晋二, 林 英幸, 佐久島明世, 関 興一, 鈴木 明, 吉野 伸, 鎌田和之, 阪田正勝, 嵯峨井勝, 森 洋樹 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) のエスト ロジェン作用 2 | 第 121 回日本薬学会 | 札 幌 | 13 . 3 |
| 机 直美, 戸田典子, 渡辺 元, 田谷一善, 局 博一, 鈴木 明 | ディーゼル排気 (DE) を吸入した母マウ スから生まれた子の成長への影響 | 第 131 回日本獣医学会学 術集会 | 府 中 | 13 . 4 |
| 鈴木 明, 机 直美, 戸田典子, 局 博一, 渡辺 元, 田谷一善 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) のエスト ロゲン様作用物質 (<i>in vivo</i> のアッセイに て) | 第 131 回日本獣医学会学 術集会 | 府 中 | 13 . 4 |
| 藤巻秀和 | ディーゼル排気ガス曝露によるマウスケ モカイン産生の亢進 | 第 71 回日本衛生学会総 会 | 福 島 | 13 . 4 |

| 発 表 者 | 題 目 | 学会等名称 | 開催都市名 | 年月 |
|--|---|------------------------------------|-----------|--------|
| Birumachi J., Suzuki A.K., Ito K., Hioki K., Maruyama C., Ohnishi Y. | Diesel exhaust induced hypersensitivity in c-Ha-ras transgenic mice | ATS 2001, the 97th Inter. Conf. | Boston | 13 . 5 |
| 高野裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) によるエ ンドトキシン (LPS) 惹起性急性肺傷害 の増悪 | 第 16 回日本 Shock 学会 総会 | 広 島 | 13 . 5 |
| 高野裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 | DEP による LPS 惹起性急性肺傷害の増悪 におけるサイトカイン, 核内転写因子, LPS レセプターの役割 | 第 16 回日本 Shock 学会 総会 | 広 島 | 13 . 5 |
| Mori Y., Taneda S., Hayashi H., Sakushima A., Seki K., Kamata K., Suzuki A.K., Sakata M., Yoshino S., Sagai M. | Estrogenic and anti-estrogenic activities of diesel exhaust particles, IXth Interna- tional Cong | Toxicol. | Brisbane | 13 . 7 |
| Minami M., Abe Y., Machida T., Endo T., Hirafuji M., Mori Y., Hayashi H., Komiyama Y., Takahashi Y., Sagai M., Suzuki A.K. | Cardiac toxicity of diesel exhaust particles in guinea pigs and rats, IX th International Cong | Toxicol. | Brisbane | 13 . 7 |
| Fujimaki H., Kurokawa Y. | Pulmonary inflammatory cells and che- mokine environment in mice after inhalation of diesel exhaust | 11th Int. Congr. Immu- nol. | Stockholm | 13 . 7 |
| 高野裕久 | ディーゼル排ガスと喘息・アレルギー | 第 4 回環境化学学会 | 東 京 | 13 . 8 |
| 机 直美, 戸田典子, 渡辺 元, 田谷一善, 局 博一, 鈴木 明 | ディーゼル排気 (DE) 曝露による子宮収 縮への影響について | 第 42 回大気環境学会年 会 | 北九州 | 13 .10 |
| 机 直美, 戸田典子, 渡辺 元, 田谷一善, 局 博一, 鈴木 明 | ディーゼル排気微粒子抽出物 (DEPE) 投与による子宮収縮への影響について | 第 42 回大気環境学会年 会 | 北九州 | 13 .10 |
| 美留町潤一, 鈴木 明, 伊東喜久治, 日置恭司, 丸山千佳, 大西保行 | C-Ha-ras マウスにおけるディーゼル排 気誘発性気道反応について | 第 42 回大気環境学会年 会 | 北九州 | 13 .10 |

| 発 表 者 | 題 目 | 学会等名称 | 開催都市名 | 年月 |
|--|--|-----------------------------------|-------|--------|
| 美留町潤一， 鈴木 明，中島 徹， 鈴木忠男，小林隆弘 | モノクロタリン投与による肺高血圧が DEP の気管内投与の毒性に及ぼす影響 | 第 42 回大気環境学会年 会 | 北九州 | 13 .10 |
| 鈴木 明，戸田典子， 机 直美， 美留町潤一 | ディーゼル排気長期曝露がガス交換機能 に及ぼす影響 | 第 42 回大気環境学会年 会 | 北九州 | 13 .10 |
| 鈴木 明 | 微小粒子が病態モデル動物の循環器に及 ぼす影響 | 第 42 回大気環境学会年 会 | 北九州 | 13 .10 |
| 鈴木 明， 美留町潤一， 飯島麻里子， 柳澤利枝，小林隆弘 | 病態モデル（AZT 投与ラット）を用いた PM 2.5 の心電図および呼吸機能に及ぼす 影響に関する電気生理学的研究 | 第 42 回大気環境学会年 会 | 北九州 | 13 .10 |
| 戸田典子，机 直美， 鈴木 明 | DEP 分各溶液の血管に対する作用（in vitro 実験） | 第 42 回大気環境学会年 会 | 北九州 | 13 .10 |
| 美留町潤一， 鈴木 明， 伊東喜久治， 日置恭司，丸山千佳， 大西保行 | C-Ha-ras トランスジェニックマウスにお けるサイトカイン類に対するディーゼル 排気曝露の影響 | 第 132 回日本獣医学会学 術集会 | 盛 岡 | 13 .10 |
| 机 直美，林 英幸， 種田晋二，森 洋樹， 局 博一，鈴木 明 | ディーゼル排気微粒子抽出物（DEPE） はオキシトシンによる子宮収縮を変化さ せた | フォーラム 2001，衛生 薬学・環境トキシコロ ジー | 金 沢 | 13 .10 |
| 森 洋樹，種田晋二， 林 英幸， 佐久島明世， 関 興一，鎌田和之， 鈴木 明，阪田正勝， 吉野 伸，嵯峨井勝 | ディーゼル排気微粒子（DEP）のエスト ロゲン作用物質および抗エストロゲン作 用物質の検索 | フォーラム 2001，衛生 薬学・環境トキシコロ ジー | 金 沢 | 13 .10 |
| 高野裕久 | 微小粒子の疫学的知見への実験的アプ ローチはいかにあるべきか | 第 42 回大気環境学会年 会（分科会） | 北九州 | 13 .10 |
| 市瀬孝道，定金香里， 高野裕久，柳澤利枝， 嵯峨井勝 | ダニ抗原誘発性気道炎症に対するディー ゼル粒子の増悪作用とサイトカイン類の 関連性について | 第 42 回大気環境学会年 会 | 北九州 | 13 .10 |
| 飯嶋麻里子， 丸山良子，柳澤利枝， 高野裕久，小林隆弘 | 病 態 モデル（SHR ラット）を用いた PM 2.5 気管内投与が呼吸循環機能に及ぼ す影響 | 第 42 回大気環境学会年 会 | 北九州 | 13 .10 |

| 発 表 者 | 題 目 | 学会等名称 | 開催都市名 | 年月 |
|--|---|-----------------------|-------|-------|
| 柳澤利枝, 高野裕久, 定金香里, 市瀬孝道, 井上健一郎, 吉川敏一 | PM 2.5 気管内投与が細菌毒素に関連する肺傷害に及ぼす影響 | 第 42 回大気環境学会年会 | 北九州 | 13.10 |
| 吉田成一, 野口浩平, 小野なお香, 柳澤利枝, 高野裕久, 武田 健 | ディーゼル排気微粒子のストレスタンパク質 mRNA 発現への影響 | 第 42 回大気環境学会年会 | 北九州 | 13.10 |
| 市瀬孝道, 高野裕久, 柳澤利枝, 嵯峨井勝 | ダニ抗原による好酸球性気道炎症のマウス系統差とディーゼル排気微粒子の影響 | 第 51 回日本アレルギー学会総会 | 福 岡 | 13.10 |
| 小池英子, 平野靖史郎, 小林隆弘 | ディーゼル排気粒子の抽出物により誘導されるラット肺胞マクロファージの遺伝子の解析 | 第 51 回日本アレルギー学会 | 福 岡 | 13.10 |
| 宇井直也, 藤巻秀和, 山元昭二, 野原 修, 今井 透, 遠藤朝彦, 森山 寛 | スギ花粉感作マウスへの黄色ブドウ球菌点鼻の影響 | 第 51 回日本アレルギー学会総会 | 福 岡 | 13.10 |
| 藤巻秀和 | 大気汚染のバイオマーカー (3) 影響マーカー (動物実験) | 第 42 回大気環境学会年会 | 北九州 | 13.10 |
| 藤巻秀和, 黒河佳香, 宇井直也 | スギ花粉抗原感作とディーゼル排気曝露によるマウスケモカイン産生の変動 | 第 42 回大気環境学会年会 | 北九州 | 13.10 |
| 机 直美, 戸田典子, 渡辺 元, 田谷一善, 局 博一, 鈴木 明 | ディーゼル排気微粒子 (DEPE) を投与したマウスから生まれた子の成長に及ぼす影響 | 第 4 回環境ホルモン学会 | つくば | 13.12 |
| 鈴木 明, 机 直美, 林 英幸, 戸田典子, 局 博一, 田谷一善, 森 洋樹 | ディーゼル排気微粒子 (DEP) から抽出されたフタル酸エステルの子宮収縮特性 | 第 4 回環境ホルモン学会 | つくば | 13.12 |
| 藤巻秀和, 黒河佳香 | ディーゼル排気曝露によるマウス頸部リンパ節でのケモカイン産生の亢進 | 第 31 回日本免疫学会総会, 学術集会 | 大 阪 | 13.12 |
| 井上健一郎, 高野裕久, 柳澤利枝, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 | エンドトキシン (LPS) による肺内サイトカイン, ケモカイン産生に及ぼすディーゼル排気微粒子 (DEP) の影響 | 第 14 回日本アレルギー学会春期臨床大会 | 幕 張 | 14.3 |
| 柳澤利枝, 高野裕久, 井上健一郎, 市瀬孝道, 定金香里, 吉川敏一 | エンドトキシン (LPS) による肺内サイトカイン, ケモカイン産生にディーゼル排気微粒子 (DEP) の構成成分が及ぼす影響 | 第 14 回日本アレルギー学会春期臨床大会 | 幕 張 | 14.3 |

| 発 表 者 | 題 目 | 学会等名称 | 開催都市名 | 年月 |
|--------------------------------------|---|----------------------------------|-----------|--------|
| Koike E., Hirano S., Kobayashi T. | Analysis of gene expression in rat alveolar macrophages after exposure to extract from diesel exhaust particles using cDNA microarray | 41th US Congr. Toxicol. (SOT) | Nashville | 14 . 3 |

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告

SR- 47 - 2002

平成 14 年 9 月 30 日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会

発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2

電話 0298-50-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 株式会社 イ セ ブ

〒305-0005 茨城県つくば市天久保 2 丁目 11-20

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

September 2002

無断転載を禁じます