

「物理的・化学的特性に基づいた環境中ナノ粒子
の健康影響に関する研究」

課題番号 14580574

平成14年—15年度科学研究費補助金(基盤C)研究報告書

平成16年3月



研究代表者 石原陽子
(東京女子医科大学医学部助教授)

「物理的・化学的特性に基づいた環境中ナノ粒子
の健康影響に関する研究」

課題番号 14580574

平成14年—15年度科学研究費補助金(基盤C)研究報告書

平成16年3月

研究代表者 石原陽子
(東京女子医科大学医学部助教授)

[研究組織]

研究代表者：石原陽子（東京女子医科大学・医学部・助教授）
研究分担者：萩原啓実（東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター・助教授）
研究分担者：富田幸子（東京女子医科大学・医学部・助手）
研究分担者：中島 徹（財日本自動車研究所・エンジン環境部・主幹）

研究協力者：越智眞理子（東京女子医科大学・医学部）
研究協力者：宮崎滋昭（呉羽化学工業生物医学研究所）
研究協力者：西川俊郎（東京女子医科大学・病院病理・助教授）
研究協力者：八名和夫（法政大学・理工学部・教授）
研究協力者：石島正之（武蔵工業大学・工学部・教授）
研究協力者：京相雅樹（武蔵工業大学・工学部・助手）
研究協力者：高橋庸介、森岡健志（武蔵工業大学・工学部・院生）
研究協力者：岸田英理、窪菌洋輔、三井幸一郎、水田博久（法政大学・理工学部・院生）
研究協力者：伊藤剛、田村久美子、前島一仁、鈴木忠男（財日本自動車研究所）
研究協力者：新関 満（柴田科学・開発部長）
研究協力者：Paul S Satoh（ミシガン州立大学客員教授）

研究経費

平成 14 年度直接経費	2600 千円	間接経費	0 円	合計	2600 千円
平成 15 年度直接経費	1000 千円	間接経費	0 円	合計	1000 千円
総計	直接経費 3600 千円	間接経費	0 円	総計	3600 千円

[研究発表]

(1) 学会誌等

1. Naruse M, Otsuka E, Naruse M, Ishihara Y, Tomita S, Hagiwara H: 3-Methylcholanthrene, a ligand for arylhydrocarbon receptor, inhibits the formation of osteoclasts through the inhibition of RANKL expression in osteogenic cells. *Biochem Pharmacol*, 67: 119-127, 2004
2. Ishihara Y, Iijima H, Yagi Y, Hoshi H, Matsunaga K: Inhibition of decrease in natural killer cell activity in repeatedly restraint-stressed mice by a biological response modifier derived from cultured mycelia of a basidiomycete *tricholoma matsutake*. *Neuroimmunomodulation*, 11:41-48, 2004
3. Ishihara Y, Iijima H, Yagi Y, Matsunaga K: Enhanced recovery of NK cell activity in mice under restraint stress by the administration of a biological response modifier derived from the mycelia of the basidiomycete *tricholoma matsutake*. *Stress* 6:141-148, 2003
4. Ishihara Y, Nishikawa T, Iijima H, Matsunaga K: Expression of matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of metalloproteinase and adhesion molecules in silicotic mice with lung metastasis. *Toxicol Letters*, 142:71-75, 2003
5. Ishihara Y, Kagawa J: Chronic diesel exhaust exposures of rats demonstrate concentration and time dependent effects on pulmonary inflammation. *Inhal Toxicol*, 15:473-492, 2003
6. Ishihara Y, Kagawa J: Dose-response assessment and effect of particles in guinea pigs exposed chronically to diesel exhaust: Analysis of various biological markers in pulmonary alveolar lavage fluid and circulating blood. *Inhal Toxicol*, 14: 1049-1067, 2002
7. Ishihara Y, Kyono H, Kohyama N, Otaki N, Serita F, Toya T: Effects of surface characteristics of potassium titanate whisker samples on acute lung injury induced by a single transtracheal administration in rats. *Inhal Toxicol*, 2002, 14: 503-519, 2002
8. Ishihara Y, Kyono H, Serita F, Toya T, Kawashima H, Miyasaka M: inflammatory responses and mucus secretion in rats with acute bronchiolitis induced by nickel chloride. *Inhal Toxicol* 14:101-114, 2002
9. Ishihara Y, Iijima H, Matsunaga K, Fukushima T, Nishikawa T, Takenoshita S: Expression and mutation of p53 gene in the lung of mice intratracheal injected with crystalline silica. *Cancer Letters* 177:125-128, 2002
10. Naruse M, Ishihara Y, Miyagawa-Tomita S, Koyama A, Hagiwara H: 3-Methylcholanthrene, which binds to the arylhydrocarbon receptor, inhibits proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro and ossification in vivo. *Endocrinology*, 143: 3575-3581, 2002
11. Ishihara Y, Matsubara I, Nakagawa K, Nishikawa T, Kagawa J: Comparison of susceptibility of immunological response in matured and aged mice with acute bronchiolitis exposed to ozone. *International Inhalation Symposium Series*, ILSI Press, 91-102, 2002
12. 石原陽子: 大気中粒子状物質と肺がん、自動車研究、24: 203-212, 2002
13. Ishihara Y, Yasuhara T, Ishiyama S, Kawashima H, Miyasaka M, Miyazaki Y: The role of leukocytes during acute phase inflammation in crystalline silica-induced lung injury. *Exp Lung Res* 27:589-603, 2001
14. Ishihara Y, Iijima H, Matsunaga K: Natural killer cell tumoricidal activity and

- deterioration of lung tumor metastasis in silicotic mice and stressed silicotic mice. *Cancer Letters*, 163:11-15,2001
15. 石原陽子: 粒子状物質(PM)の生体内動態とその健康影響、自動車研究、23: 503-517, 2001
 16. Adachi C, Naruse H, Ishihara Y, Tanabe A, Takagi S, Yoshimoto T, Naruse K, Kagawa J, Takano K. Effects of acute and chronic cigarette smoking on the expression of endothelin-1 mRNA of the cardiovascular tissues in rats. *J Cardiovas Pharm* 36(suppl.): s198-200, 2000
 17. Ishihara Y, Nishikawa T, Kagawa J: Expression of cytokines in the lungs of normal and sensitized mice single transtracheally injected with diesel exhaust particles or its organic solvent extracted particles, *International Inhalation Symposium Series*, ILSI Press, 393-396, 2000

[口頭発表]

1. Ishihara Y, Nishikawa T, Kyoso M, Ishijima M, Yana K, Tanazawa S, Ochi M, Kobayashi T: Effects of single transtracheal Injection of organic solvent extracted diesel particles or ambient particulate matters on cardiopulmonary functions In Dahl-Iwai salt-sensitive hypertension rats exposed to 0.4 ppm ozone. *International Conference American Lung Association and American Thoracic Society*, 2004
2. 石原陽子: 微小粒子状物質の生体影響について。シンポジウム「これからの PM 測定とその評価」。自動車技術会、2004
3. Ishihara Y: Relationships between in vitro and in vivo research on biological effects of fibre. *Symposium of International Conference Occupational Health*, 2003
4. Ishihara Y: Health effects of diesel particulates. *International Workshop of Diesel Particulate Matters*, 2003
5. 石原陽子、越智眞理子、棚澤静香、西川俊郎、京相雅樹、石島正之、八名和夫、小林隆弘。微小粒子状物質の生体影響 (8) 大気中粒子有機成分を気管内投与した Dahl 食塩感受性高血圧ラットでの 0.4ppm オゾン暴露の心機能への影響、大気環境学会総会、2003
6. Ishihara Y, Nishikawa T, Hagiwara H, Naruse M, Kagawa J: Effects of low protein neutriment on cigarette smoke-induced respiratory changes. *International Conference American Lung Association and American Thoracic Society*, 2002
7. Ishihara Y, Iijima H, Matsunaga K: Effect of cigarette smoke on expression of P450 subfamily in the lung of mice with silicosis. *International Conference American Lung Association and American Thoracic Society*, 2002
8. Kyoso M, Ishihara Y, Aoki Y, Yana K, Ito T, Ishijima M, Uchiyama A: Effects of Kanto-loam soil as a component of particle air pollution on the heart rate variability in rats. *International Workshop on Biological Interpretation*, 2002
9. Ishihara Y, Matsubara I, Nakagawa K, Nishikawa T, Kagawa J: Comparison with susceptibility on immunological response in mature and aged mice with acute bronchiolitis after ozone exposure, *International Inhalation Symposium*, 2001
10. Ishihara Y, Nishikawa T, Kagawa J: Modulation of airway reactivity in mice lacking nitric oxide synthase II exposed to 0.8 ppm ozone. *International Conference American Lung Association and American Thoracic Society*, 2001
11. Ishihara Y, Ishiyama S, Nishikawa T, Kagawa J: Lung function and expression of nitric oxide synthase in the lung of rats exposed with 0.8 ppm ozone. *International Conference American Lung Association and American Thoracic Society*, 2001

12. Ishihara Y, Iijima H, Matsunaga K, Nishikawa T, Fukushima T, Takenoshita S: P53 mRNA expression and mutations in P53 gene in mice with silicosis. International Conference American Lung Association and American Thoracic Society, 2001
13. Ishihara Y, Yasuhara T, Ishihyama S, Kawahima H, Miyasaka M: Administration of anti L-selectin antibody cause pulmonary granuoma formation in rat with transtracheal injection of crystalline silica, International Conference American Lung Association and American Thoracic Society, 2000
14. Ishihara Y, Iijima H, Matusnaga K, Nishikawa T: Expression of matrix metallo-proteinase and lung metastasis in mice with silicosis, International Conference American Lung Association and American Thoracic Society, 2000

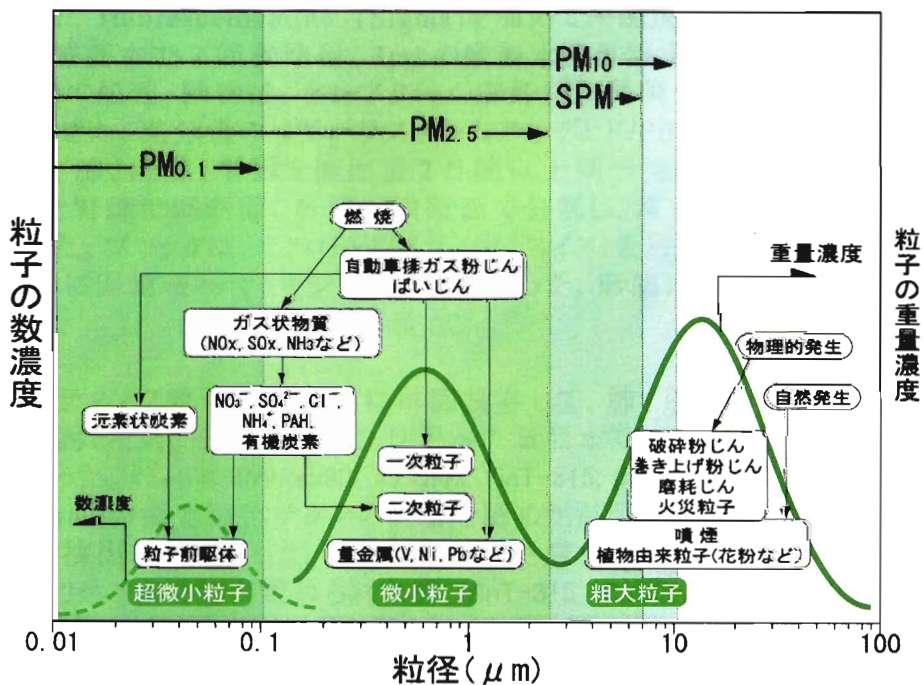
[研究成果]

1. 研究目的

国内外の疫学研究は、大気中粒子状物質が罹患率や死亡率に深く関与していることを示唆しているが、大気中の2.5から1ミクロンの濃縮粒子を用いたヒト及び動物実験ではまだ確証がえられておらず、この結果はマイクロ粒子よりも濃縮装置より逸脱したナノ粒子の関与を強く示唆するものと考えられている。

最近、本領域の先達者である Oberdorster らは動物実験で、マイクロ粒子よりもナノ粒子で炎症作用が強く、その毒性発現には粒子の表面積が関与している可能性を報告している。この背景には、マイクロ粒子とは異なり肺胞マクロファージに貪食されにくく、表面積が膨大で毒性物質の運搬役として感受性の高い肺深部まで到達・滞留するナノ粒子が、体循環系にも容易に移行して其の毒性を発現している可能性を強く示唆している。最近の Wichmann らの疫学研究でも、ナノ粒子の心肺疾患超過死亡率への明らかな影響が示唆されている。しかしながら、ナノ粒子の毒性を評価する上で重視すべき、成分、物性、生体内動態、生理機序についての研究はまだ緒についたばかりであり、最適な粒子測定手法や評価指標も確立されていない。そこで、本研究では、今後益々重視せざるを得ないナノ粒子のリスク評価とそのリスクマネジメントの問題点を明確にするために動物実験を行った。

大気中の粒子状物質の種類と濃度



[実験結果]

実験 1 気管内投与後の粒子の体内動態(マウス)

実験 1-1

実験方法:10 週齢♂BALB/C マウスにエーテル麻酔下で、PBS 浮遊蛍光色素コーティング粒子試料を気管内に単回投与した。投与後、経時的に屠殺して、肺、肝臓、腎臓を 4%パラフォルムアルデヒド/PBS 液で固定し、蛍光顕微鏡で蛍光粒子の臓器への移行を観察した。

粒子試料:

試料	粒径(nm)	表面積(m ² /g)
TiO ₂	20	50
YinT-315	200-250	6
Printex90	14	300

蛍光コーティング粒子の作成:酸化チタン類は、300mg の粒子に 3ml の PAMAM-Dendrimer G-2(3700 dalton,Michigan Molecular Institute)を加え、2 時間室温に放置してデンドリマーで表面をコーティングした。余分なデンドリマーは、50mM の炭酸水素ナトリウムを加えて 3000 回転 5 分で、2 回洗浄を行うことによって除去した。沈殿粒子は、50mM 炭酸水素ナトリウム、pH8.5 に再浮遊させ Fluorescein isothiocyanate(Sigma) 1 mg/ml 6ml を添加して 12 時間シェーカーで混和した後、滅菌 PBS で 3 回洗浄した。粒子は最終的に 100mg/ml に調整した。炭素粒子は、40ml の滅菌蒸留水に浮遊後、acetone に溶解した fluoresceinamine (Sigma)を加えて一晚反応させた。コーティング粒子は、滅菌水で 2 回洗浄後、3ml の滅菌水に再浮遊させた。

病理組織の処理:動物は、ネブタール麻酔後に開胸し、右心室より採血して脱血死させた。充分量の 4%パラフォルムアルデヒド/PBS を右心室と気管内に注入して、肺、肝臓、腎臓を摘出後 2 日間以上同一溶液中で保存し浸透させた。右肺と腎臓は縦断面、肝臓は横断面で分割し、常法に従ってパラフィン包埋を行った。ブロックは、マイクローム(ライカ、スイス)を用いて 3 μ で薄切し、スライドガラスに固定後ヘマトキシリン染色を行った。形態は、蛍光顕微鏡下で観察した。

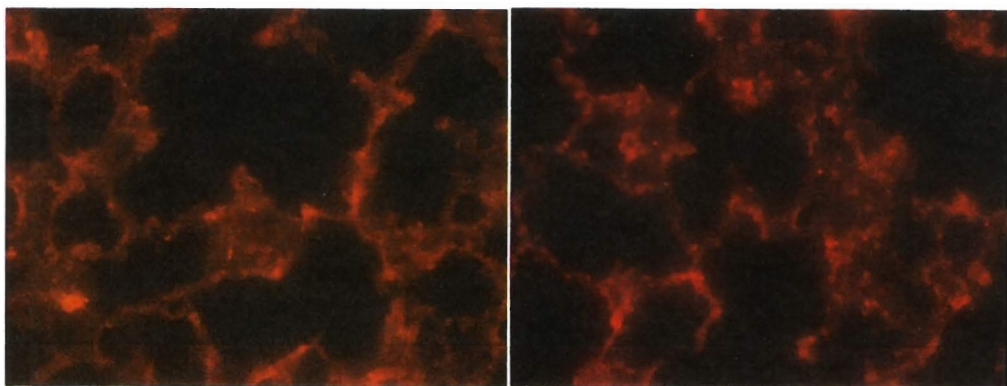
結果

蛍光コーティング粒子を気管内に単回投与して、肺、肝臓、腎臓への移行について検討したところ、気管内 1 日目~7 日目まで粒子を検出した臓器は肺のみであった。#1-1 は Printex90、#2-2 は YinT-315、#3-3 は TiO₂ 粒子投与肺で、粒径 20nm の蛍光酸化チタンの沈着を認めたが、粒径 14nm のナノ粒子の Printex90 検出は難しかった。YinT-315 粒子と酸化チタ粒子は、肺胞マクロファージで取り込まれる像が認められたが、YinT-315 に比較して粒系の小さい酸化チタンでより I 型肺胞上皮細胞内に取り込まれる傾向が強かった。この結果は、これまで報告されている微小粒子が肺胞マクロファージよりもむしろ肺胞 I 型上皮に取り込まれやすいという報告を裏付ける成績であった。肺胞マクロファージよりも肺胞上皮内で検出されたことは、肺末梢部位まで到達した微小粒子が間質から血管内皮細胞を通過して、循環血液中に移行する可能性や、貪食細胞で体外除去されずに沈着部位に滞留する時間が延長している可能性が示唆された。

#1-1

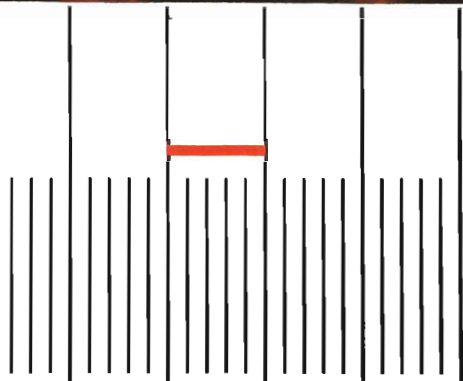
N3

TX2



x400

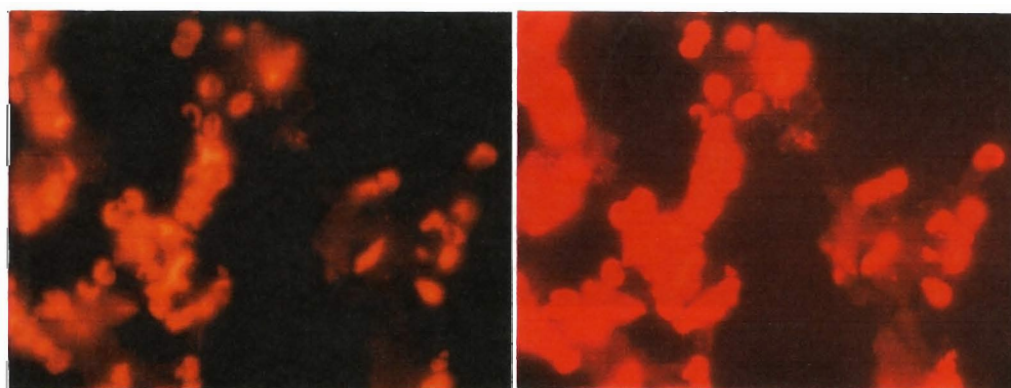
Printex90 粒径 14nm



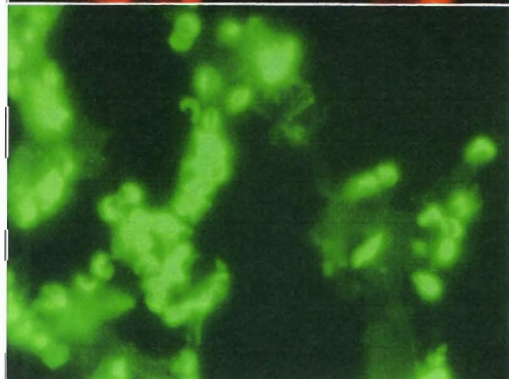
5目盛り = 50μm

N3

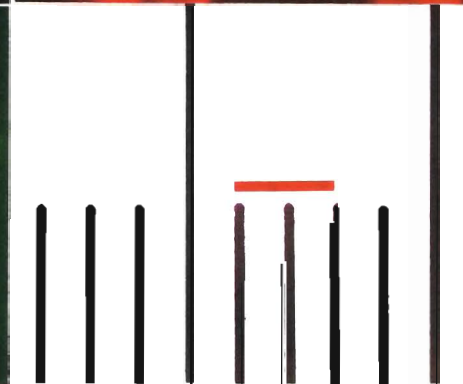
TX2



x1000



L5

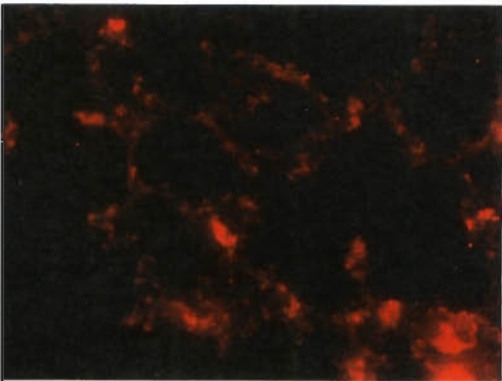
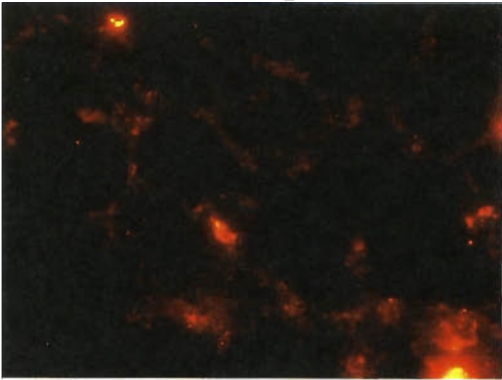


2目盛り = 20μm

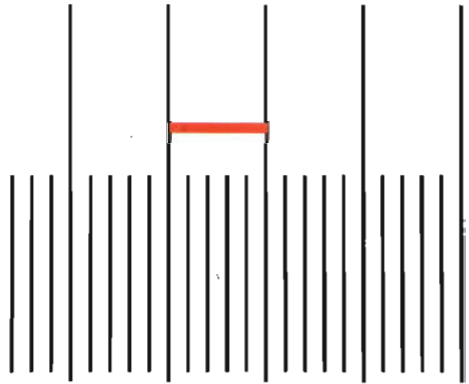
#2-2

N3

TX2



x400

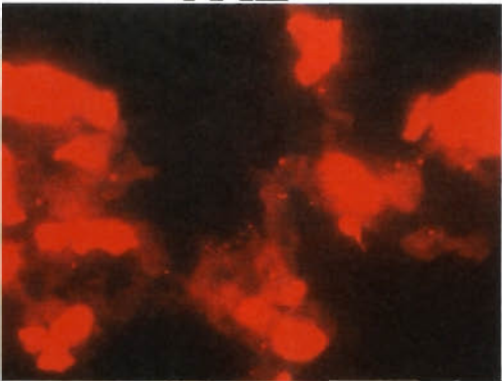
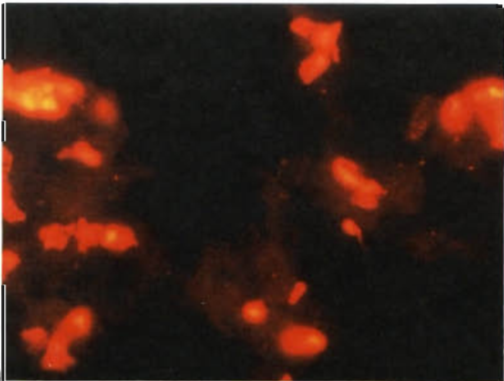


5目盛り = 50 μ m

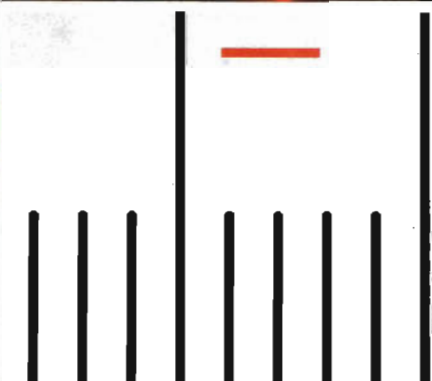
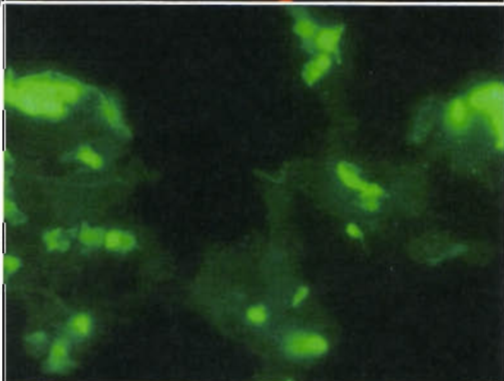
YinT-315 粒径 200-250nm

N3

TX2



x1000



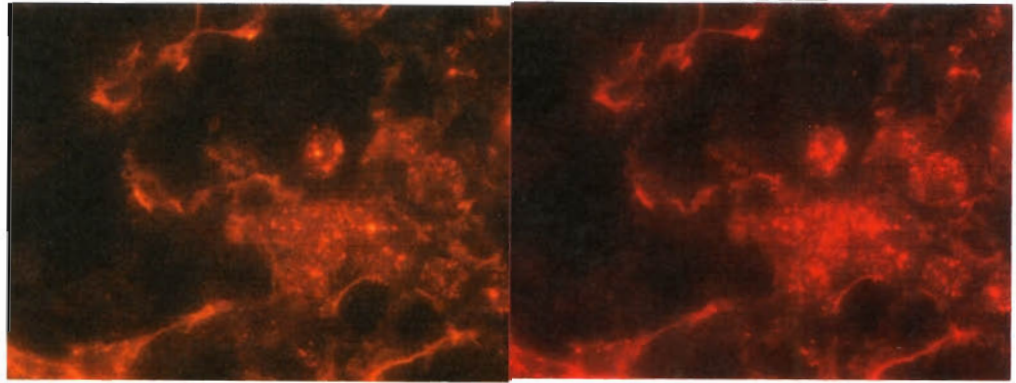
L5

2目盛り = 20 μ m

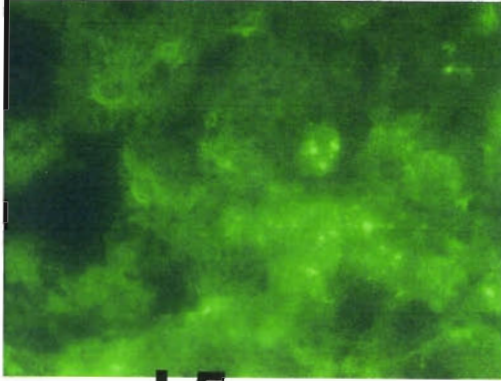
3-2

N3

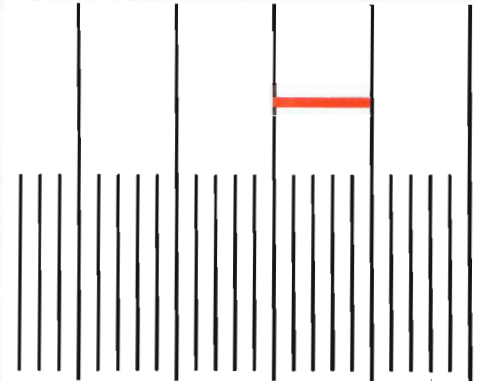
Tx2



x400



L5

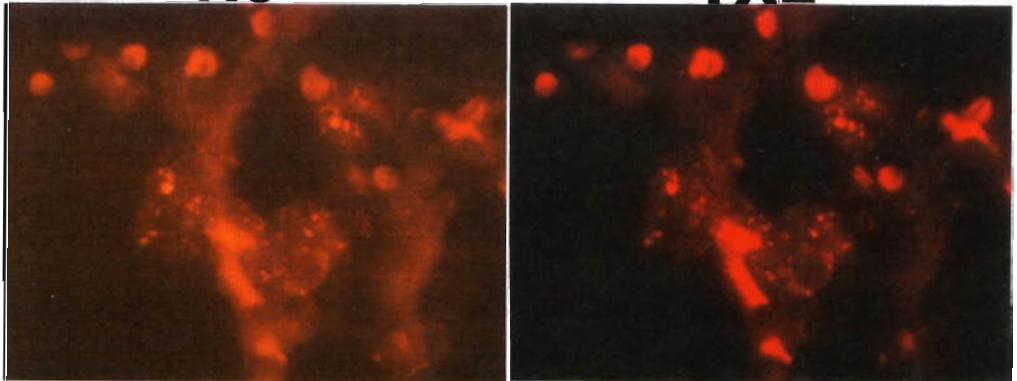


5目盛り=50μm

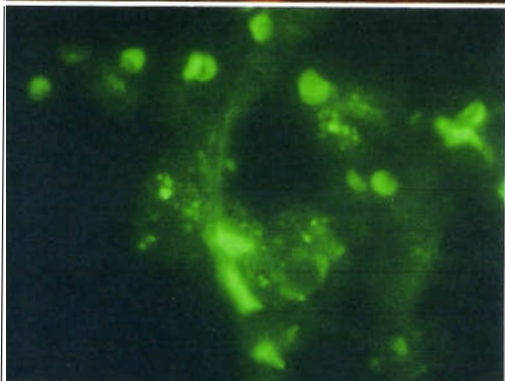
TiO₂ 粒径 20nm

N3

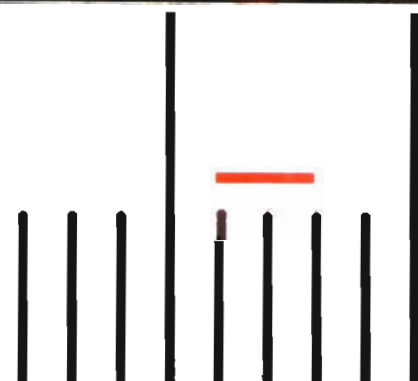
TX2



x1000



L5



2目盛り=20μm

実験 1-2

10 週齢♂BALB/C マウスにエーテル麻酔下で、PBS に浮遊させた無蛍光の Printex90 を気管内と鼻腔に単回投与した。投与後、経時的に屠殺して、嗅球、脳組織、肺、肝臓、腎臓を 2.5%グルタルアルデヒド/PB 液で還流固定した。脳組織は 5%CMC で凍結して、凍結マイクロームで薄切した。他の組織は、細切して 2.5%グルタル/PB 液中で 24 時間以上冷蔵保存した後、電顕用試料作成方法に従って処理を行った。

試料：ナノ粒子曝露マウス (ナノ粒子：カーボントナー サイズ：14nm)

- 1-1) ナノ粒子曝露後 3 日目 肺
- 1-2) ナノ粒子曝露後 3 日目 肝臓
- 1-3) ナノ粒子曝露後 3 日目 脳：嗅球
- 2-1) ナノ粒子曝露後 7 日目 肺
- 2-2) ナノ粒子曝露後 7 日目 肝臓
- 2-3) ナノ粒子曝露後 7 日目 脳：嗅球
- 3-1) ナノ粒子曝露後 10 日目 肺
- 3-2) ナノ粒子曝露後 10 日目 肝臓
- 3-3) ナノ粒子曝露後 10 日目 脳：嗅球

方法

準備として、0.2mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を調製した。この緩衝液を用いて、

洗浄液 (5% 蔗糖, 0.1mol/L リン酸緩衝液)

後固定液 (1% オスミウム酸, 0.1mol/L リン酸緩衝液) を調製した。

※ 試料は 2.5%グルタルアルデヒド固定を行ったのもをもらい受け、以下の操作を行った。

洗 浄 4°C 10min×6

↓

後固定 4°C 2h 固定

↓

洗 浄 4°C 10min×3 (蒸留水)

↓

アルコール脱水 50% 4°C 10min

↓

70% //

↓

80% //

↓

90% //

↓

95% 室温 10min

↓

100% // 10min×3

置 換 プロピレンオキサイド：エポン = 2：1 1h

↓

= 1：1 2h

↓

= 1：2 4h

↓

= pure Epon Over night

エポン包埋 (Qetol 812：日新 EM)

硬化後、ウルトラマイクローム (ULTRACUT N：Reichert-Nissei) で超薄切片を作製し、ウランおよび鉛による二重電子染色を行った。

観察は透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX II：日本電子) で、加速電圧 100KV で行った。

観察目的は2つあり、一つ目は口や鼻から取り込まれたナノ粒子が肺組織内でどのように体内へ取り込まれ、また他の組織へ移行するのか、二つ目はナノ粒子が鼻腔から嗅神経を經由し、脳へ取り込まれるのかであった。

1-1) ナノ粒子曝露後3日目 肺【写真 1-1-1,1-1-2】

ナノ粒子曝露後3日目において、肉眼観察で肺表面に黒点がいくつか見られた。これはナノ粒子が蓄積しているものと考えられ、この部位を採取し電顕観察を行った。肺組織内では肺胞腔内に大量のナノ粒子が蓄積しており(写真 1-1-1)、肺胞大食細胞に貪食されていた。また、肺胞上皮細胞内に取り込まれた像はほとんど見られなかったが、I型肺胞上皮細胞においてナノ粒子が取り込まれかかっている像が観察された(写真 1-1-2: 矢印)。

1-2) ナノ粒子曝露後3日目 肝臓

ナノ粒子は観察されなかった。

1-3) ナノ粒子曝露後3日目 脳: 嗅球

試料調製不良により観察不可。

2-1) ナノ粒子曝露後7日目 肺【写真 2-1-1, 2-1-2】

ナノ粒子曝露後7日目の肺は、3日目に肉眼観察で見られた黒点はまったく観察されなかった。電顕観察でも肺胞腔内にナノ粒子はほとんど観察されなかったが、いくつかの部位でナノ粒子と思われる形態が観察された。それはI型肺胞上皮細胞内に25~50nm程度の黒点が数個観察され、ベジクルに包まれた様子ではなく直接細胞内に入っているようであった(写真 2-1-1: 矢印)。また、別の部位ではI型肺胞上皮細胞、基底膜および血管内皮細胞の3層部に写真 1-1-1と同様の状態で多角形のもので数十個内在しているのが観察された。そして血管腔内にもナノ粒子と思われる形態が観察された(写真 2-1-2: 矢印)。

肺胞腔内にも同様のものが明瞭に観察された。形態はほぼ正六角形で大きさは35~65nm程度で曝露されたナノ粒子の表記された大きさよりも大きく観察された(写真 2-1-3: 矢印)。

2-2) ナノ粒子曝露後7日目 肝臓

ナノ粒子は観察されなかった。

2-3) ナノ粒子曝露後7日目 脳: 嗅球

試料調製不良により観察不可。

3-1) ナノ粒子曝露後10日目 肺【写真 3-1-1~3-1-4】

ナノ粒子曝露後10日目の肺は、7日目と同様に肉眼観察で見られた黒点はまったく観察されなかった。電顕観察では肺包帯食細胞内のライソソーム中に大きさ35~125nm程度の六角形もしくは多角形のもので観察され(写真 3-1-1: 矢印, 3-1-2: 矢印の拡大写真)、I型肺胞上皮細胞内では大きさ25~50nm程度の多角形のもので数個、膜に包まれたように観察され、おそらくライソソーム内に観察されたと思われる(写真 3-1-3: 矢印)。また血管腔内にも35~150nm程度の多角形のもので観察された(写真 3-1-4: 矢印)。

3-2) ナノ粒子曝露後10日目 肝臓【写真 3-2-1,3-2-2】

ナノ粒子曝露後7日目までナノ粒子は観察されなかったが、10日目で観察されるようになった。観察された部位はクッパー細胞内のライソソーム中で、大きさ35~150nm程度で六角形もしくは多角形のもので観察された(写真 3-2-2: 矢印)。

3-3) ナノ粒子曝露後 10 日目 脳：嗅球【写真 3-3-1~3-3-7】

今回の観察では上述したようにナノ粒子が脳に取り込まれるかであり、嗅上皮の嗅神経が最初に脳に接する部位が嗅球である。嗅球は一番外側から神経線維層、糸球体層、外顆粒層、分子層、僧帽細胞層、内顆粒層の6層からなる嗅覚に關与する嗅脳の一部である。

嗅球においては、一番外側の層である神経線維層でナノ粒子と思われる形態が多く観察され、無髄神経内にベジクルのようなものに包まれずに直接内在していた。形態は肺や肝臓で観察された六角形や多角形のものが多かったが、大きさは15~25nm程度であり、肺や肝臓で観察されたものよりも微小で比較的粒径が揃っていた(写真 3-3-1, 3-3-2: 各矢印)。また、今回の観察では神経線維層の内側にある糸球体層が明瞭に観察されなかったため断言はできないが、神経線維層よりも内部でベジクル様の構造物に包まれたナノ粒子と思われる形態が観察された(写真 3-3-3~3-3-7: 各矢印, 写真 3-3-4: 3-3-3 の拡大写真, 写真 3-3-6: 3-3-5 の拡大写真)。

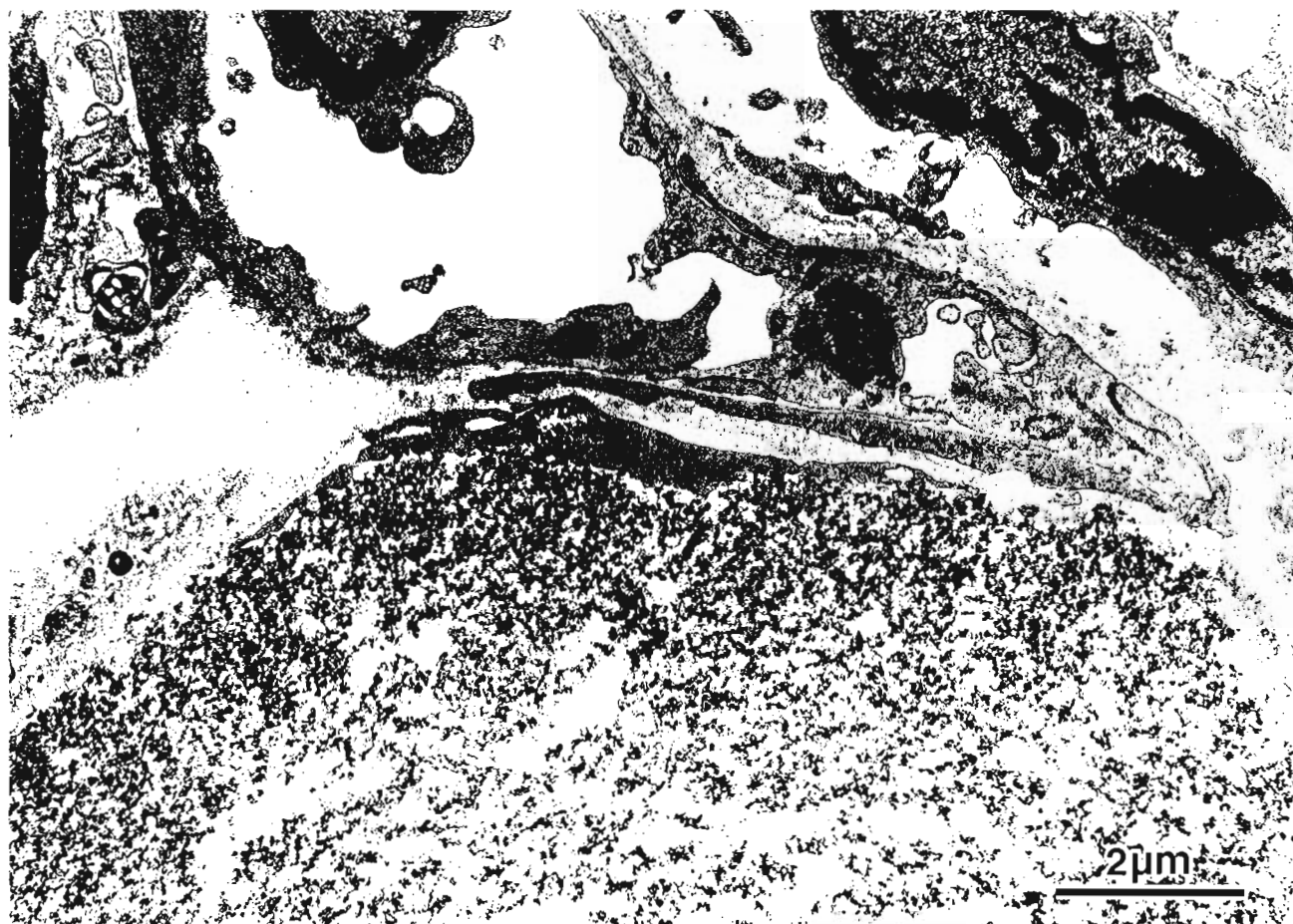
以上の結果から、ナノ粒子曝露後3日目では体内には取り込まれておらず、肺胞腔内に留まっていたが7日目から10日目になるとI型肺胞上皮細胞、基底膜、血管内皮細胞を通り血管腔にナノ粒子様の形態が取り込まれていることが分かった。また、10日目には肝臓内でクッパー細胞に貪食され、ライソソーム中であるのが観察された。このことから、肺から肝臓に達するまでの時間差が妥当な時期で観察されたこととなり、また、他の組織にも移行していることが示唆された。

取り込まれ方に関しては、I型肺胞上皮細胞やII型肺胞上皮細胞において飲み込み現象として取り込まれたり、細胞間の接着装置の緩和により間隙を通して血管腔へ移動すると言われている。今回の観察ではI型肺胞上皮細胞のみで飲み込み現象での取り込みは観察されたが、細胞間隙を通っての取り込みは観察されなかった。また、ベジクルとしての取り込みではなく、直接的な入り方をしている像が観察されたので、物理的損傷を与えて血管腔内に入った可能性もあると考えられた。

嗅球に関しては、10日目で神経線維層にナノ粒子様の形態が観察されたことから嗅上皮の嗅神経を經由して嗅球内に到達し、大きさが肺や肝臓で観察されたものよりも微小であることが分かった。神経線維層は嗅神経の神経突起で構成される層であり正確には脳に取り込まれたとはいえない。この嗅神経突起は糸球体層で脳内の僧帽細胞の樹状突起とシナプス形成をしており、ここから樹状突起内に取り込まれて初めて脳内に入ったといえよう。今回の観察では嗅神経内にあるナノ粒子様の構造物とは明らかに異なる取り込まれ方をした像(ベジクル様の構造物に包まれた形態)が神経線維層より内部で観察された。上述したように糸球体層であるという明瞭な観察が行えなかったが、これは糸球体層部での僧帽細胞の樹状突起内にある可能性が高く、10日でナノ粒子が脳内に取り込まれたことになる。今後は嗅球内の形態を明瞭に観察するための改良をするとともに、曝露後の日数を伸ばしナノ粒子の嗅球深部への移行を観察する予定である。

大気中のナノ粒子における体内動態の形態学的検討

1-1) ナノ粒子曝露後3日目 肺 (I型肺胞上皮細胞)



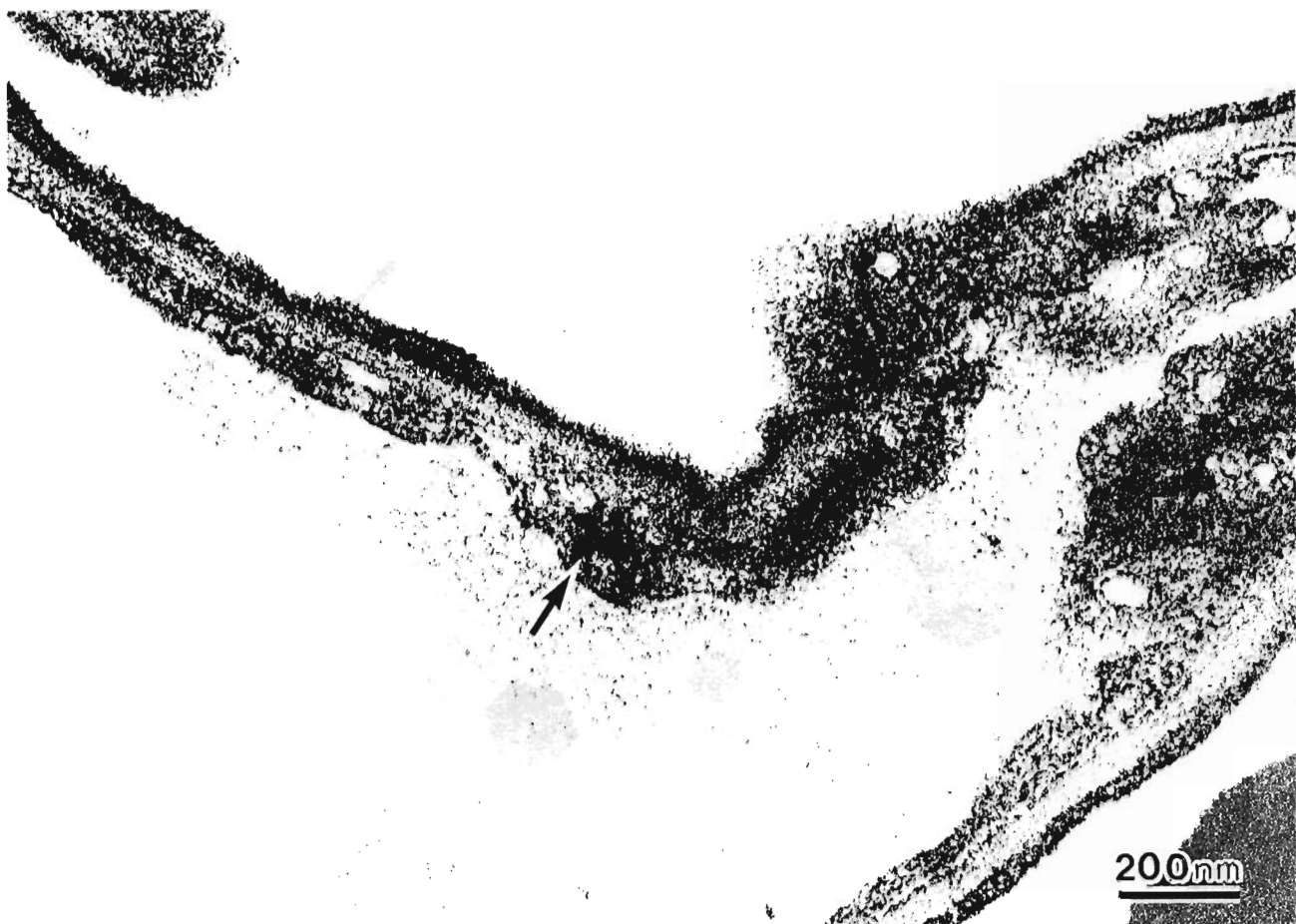
1-1-1) $\times 12,500$ (Film No : 035569)



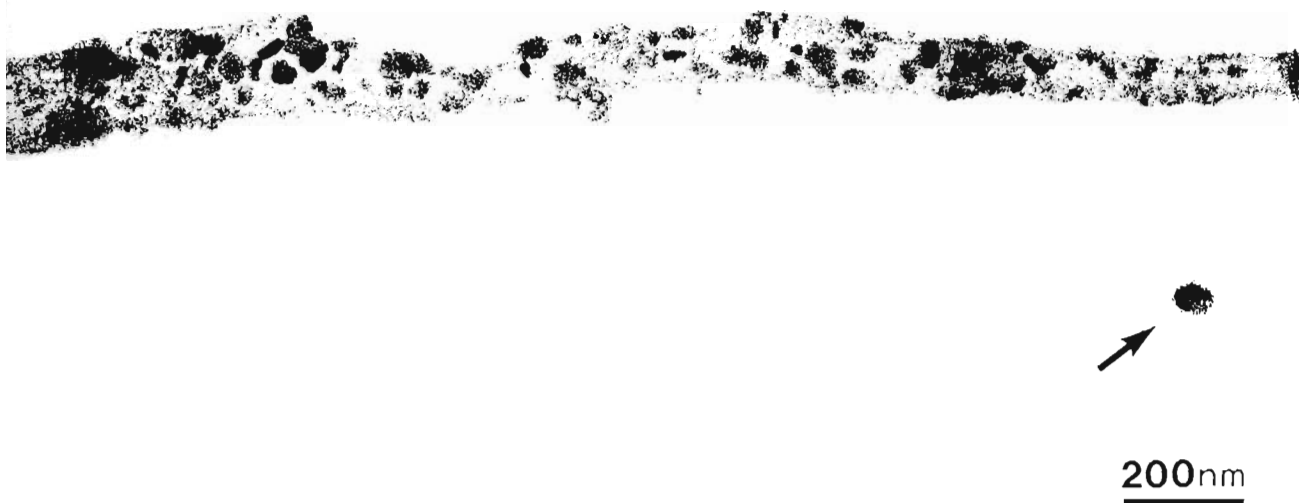
1-1-2) $\times 80,000$ (Film No : 035570)

大気中のナノ粒子における体内動態の形態学的検討

2-1) ナノ粒子曝露後7日目 肺 (I型肺胞上皮細胞)



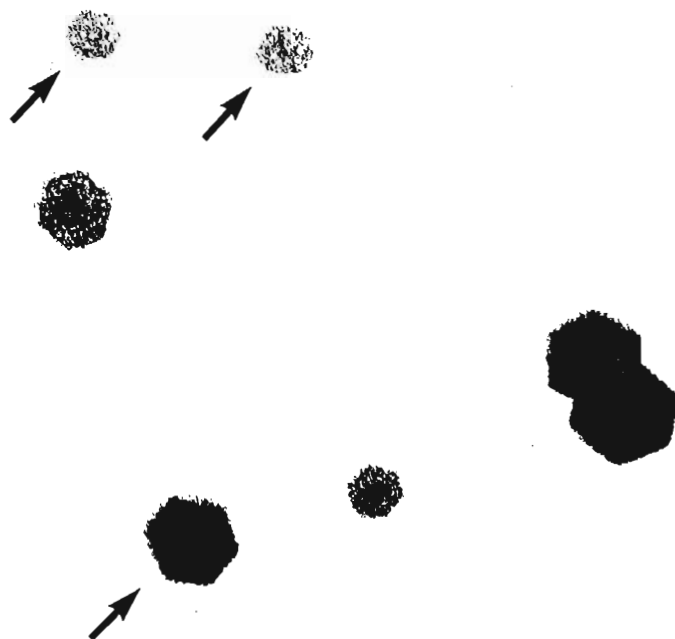
2-1-1) $\times 80,000$ (Film No : 045740)



2-1-2) $\times 80,000$ (Film No : 045743)

大気中のナノ粒子における体内動態の形態学的検討

2-1) ナノ粒子曝露後7日目 肺（肺胞内に観察されたナノ粒子）

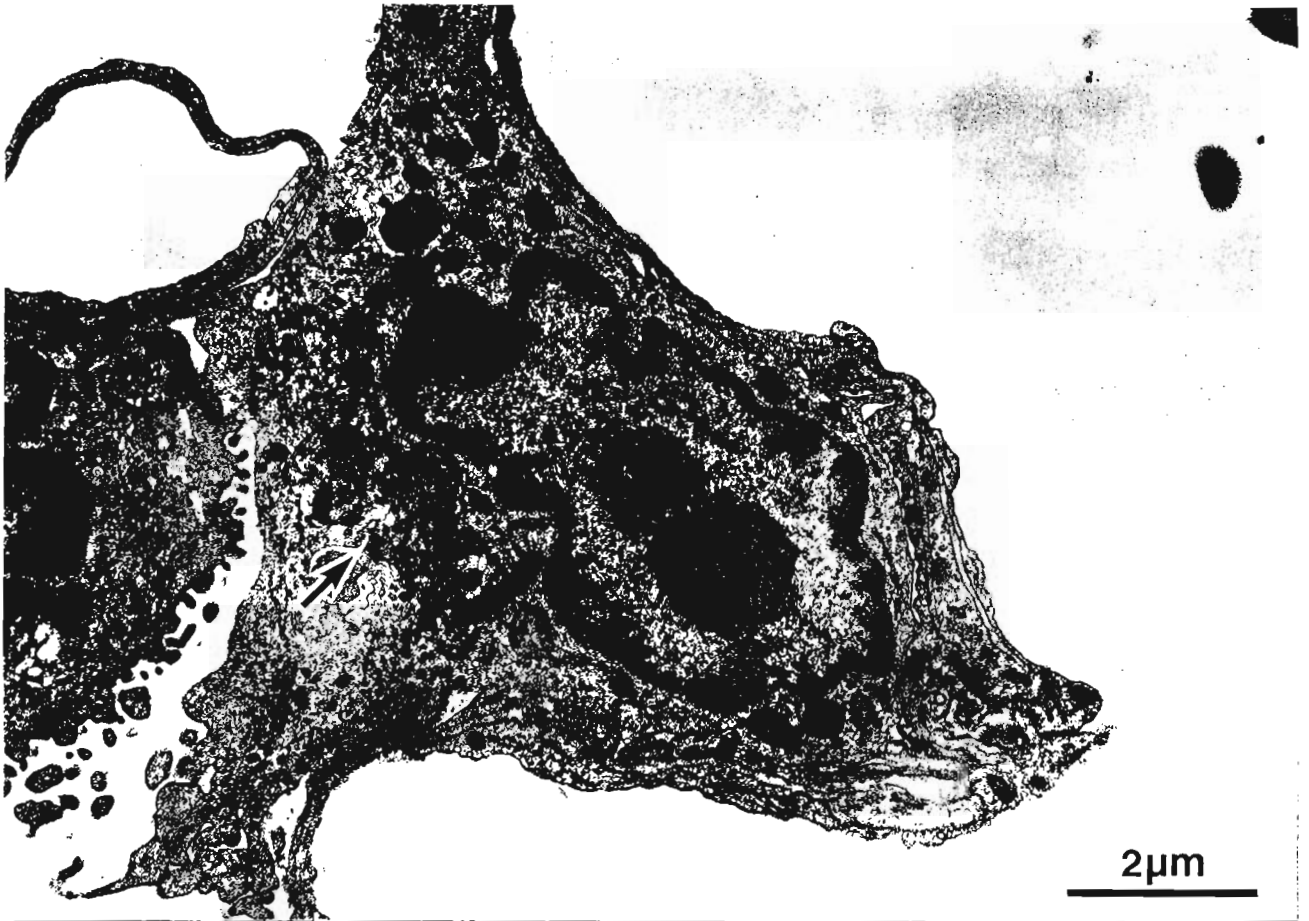


100nm

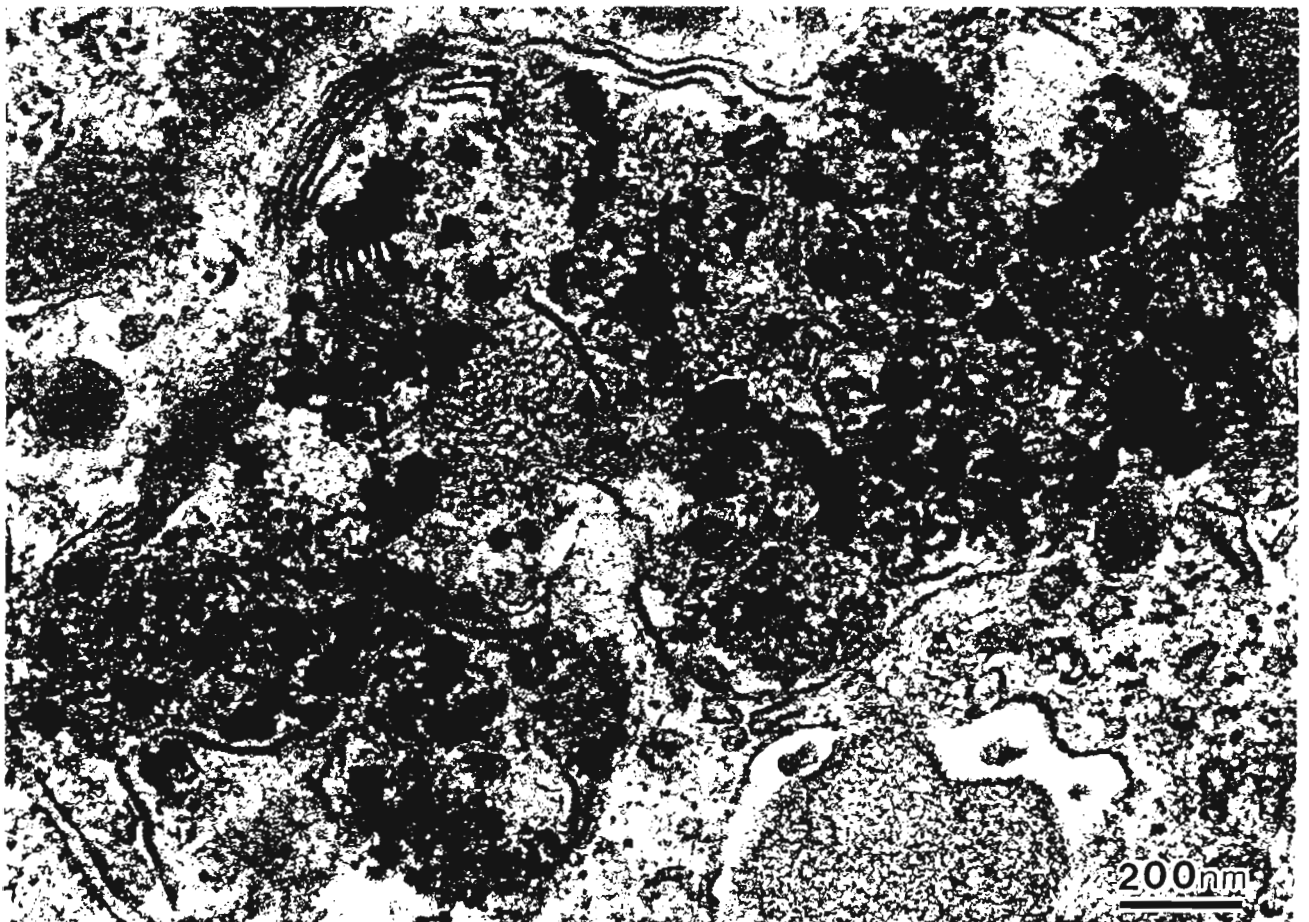
2-1-3) $\times 200,000$ (Film No : 045744)

大気中のナノ粒子における体内動態の形態学的検討

3-1) ナノ粒子曝露後10日目 肺 (肺胞大食細胞)



3-1-1) $\times 12,500$ (Film No : 045757)



3-1-2) $\times 80,000$ (Film No : 045758)

3-1) ナノ粒子曝露後10日目 肺

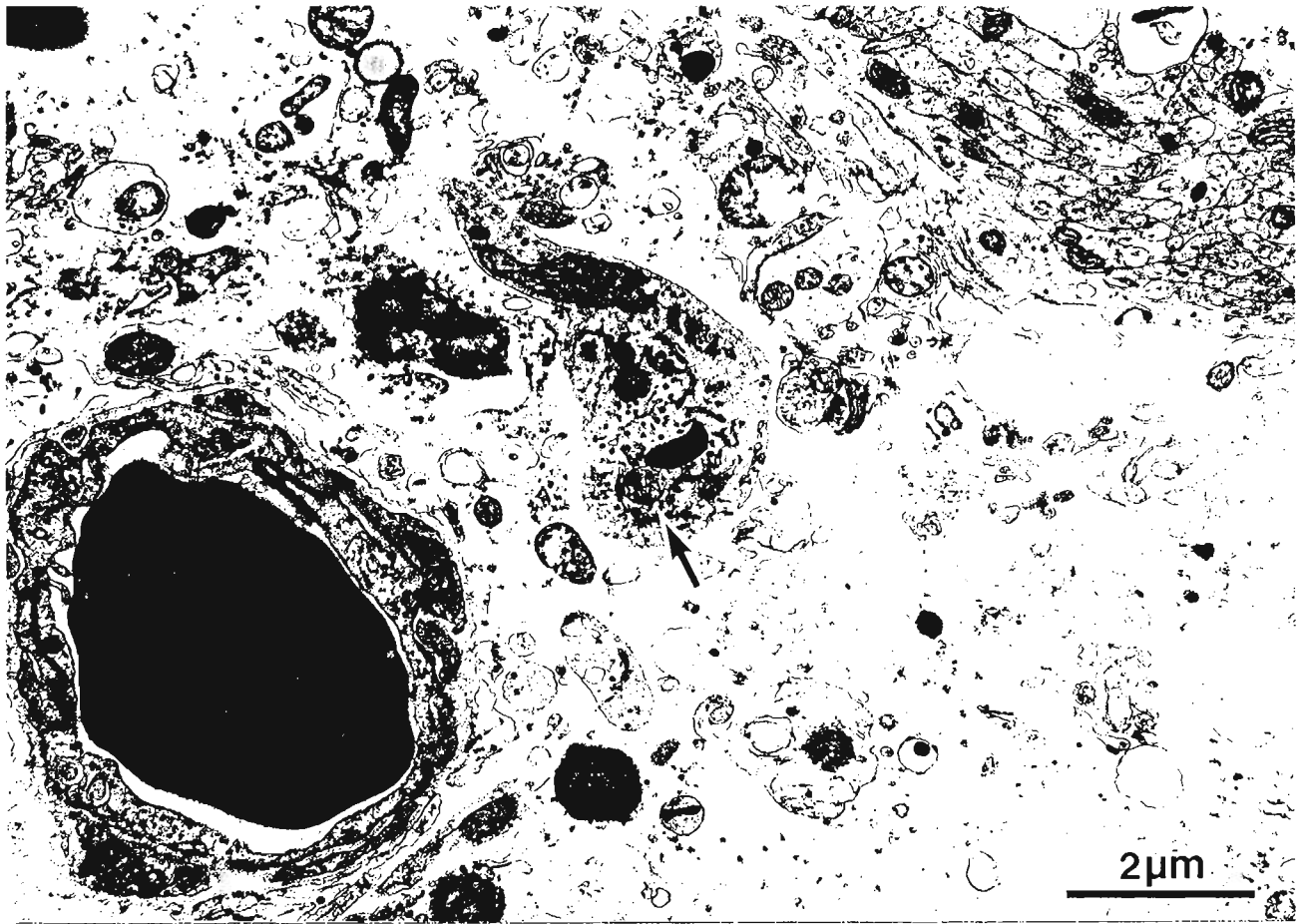


3-1-3) I型肺胞上皮細胞 ×80,000 (Film No : 045759)

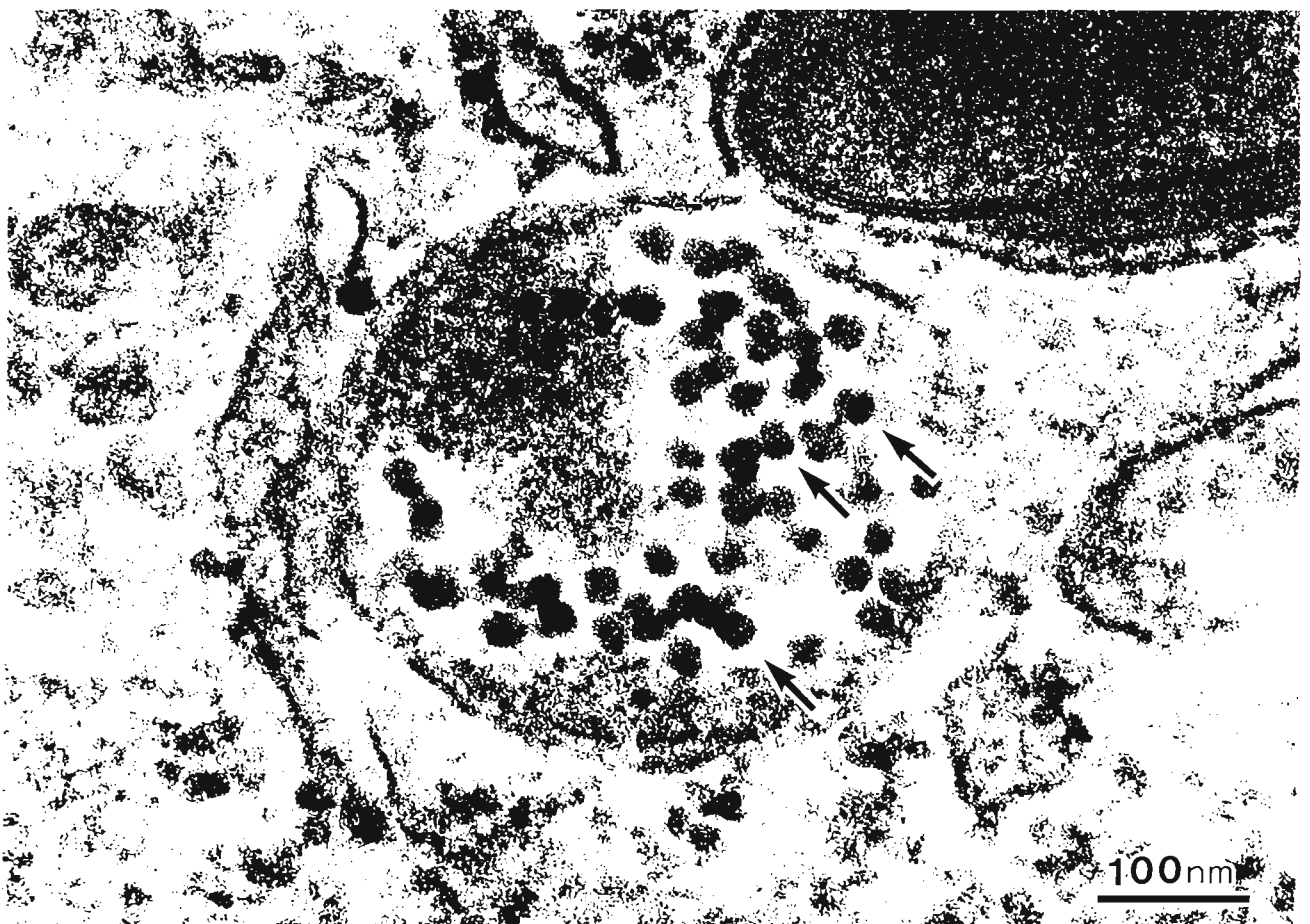


3-1-4) 血管腔内に観察されたナノ粒子 ×80,000 (Film No : 045762)

3-3) ナノ粒子曝露後10日目 脳：嗅球（神経線維層～糸球体層）

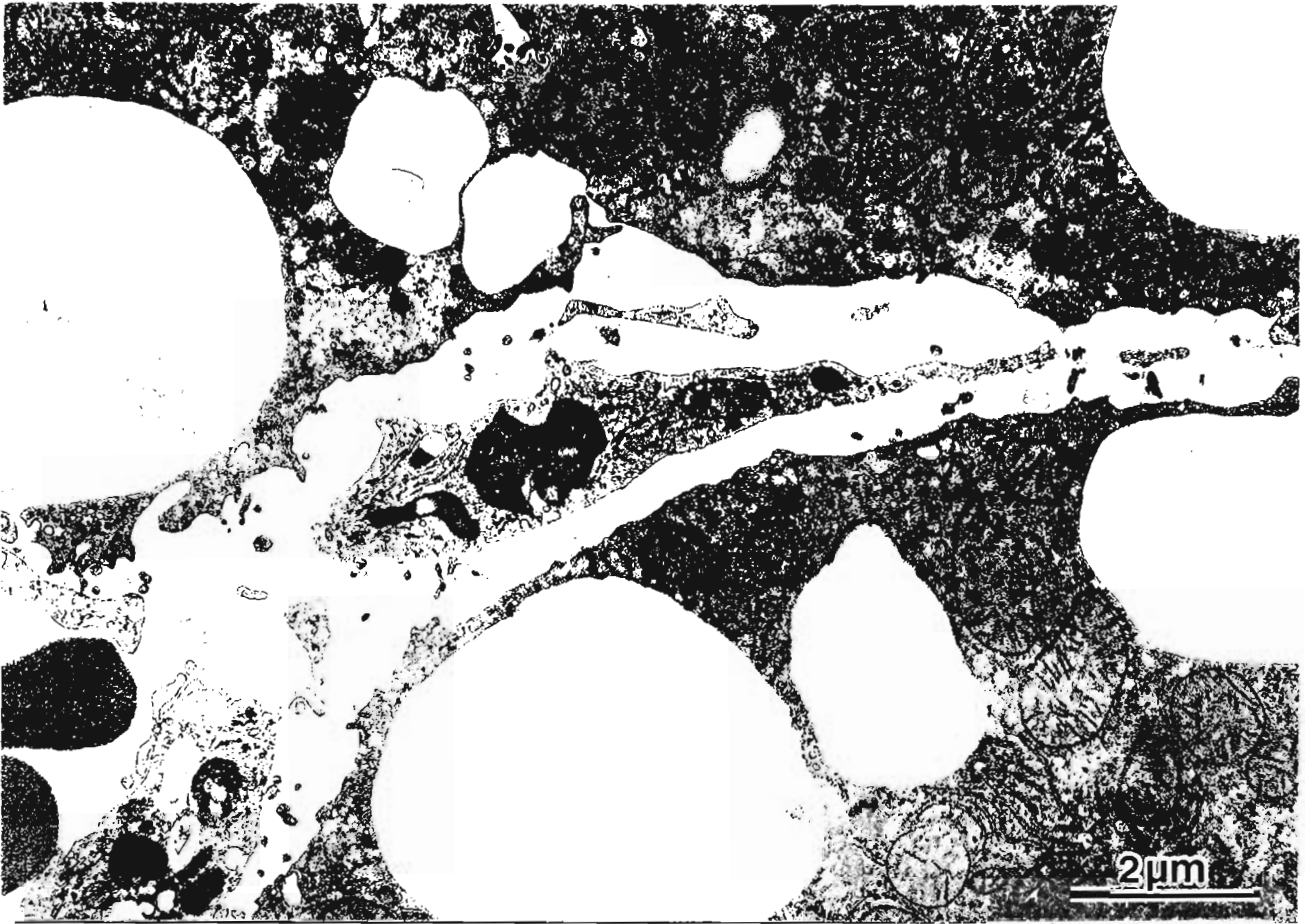


3-3-3) ×12,500 (Film No : 045787)

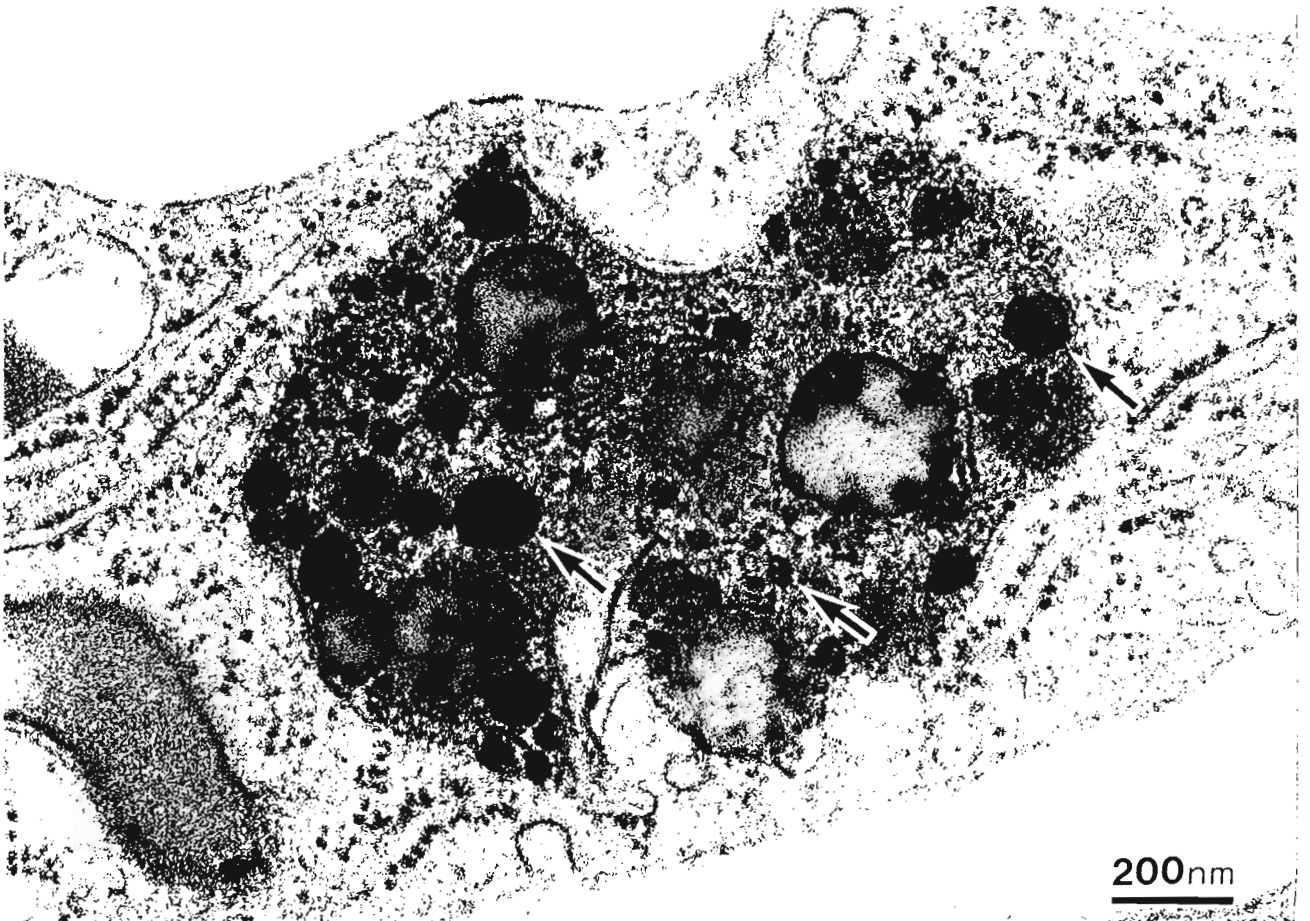


3-3-4) ×200,000 (Film No : 045788)

3-2) ナノ粒子曝露後10日目 肝臓 (クッパー細胞)

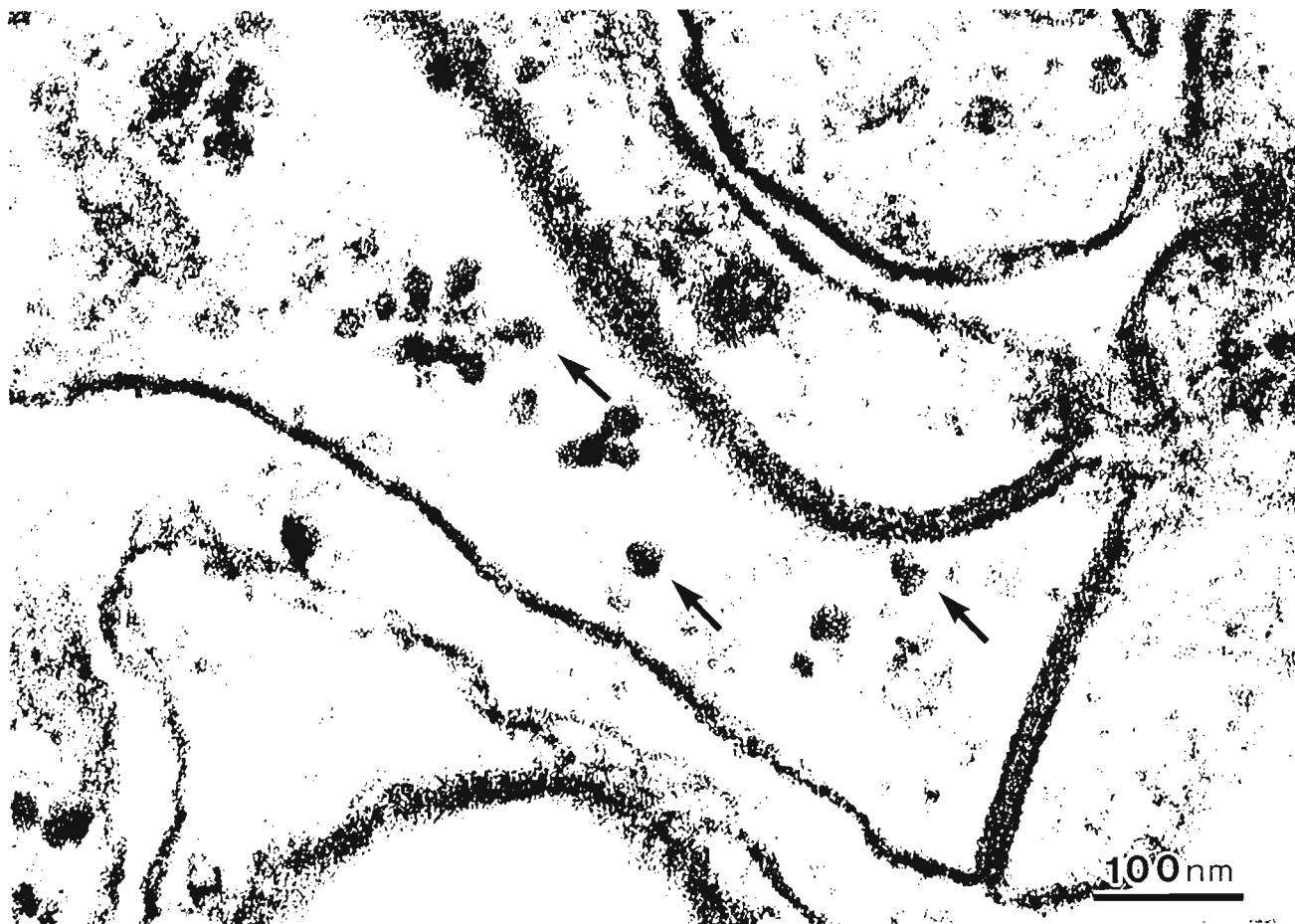


3-2-1) $\times 12,500$ (Film No : 045769)

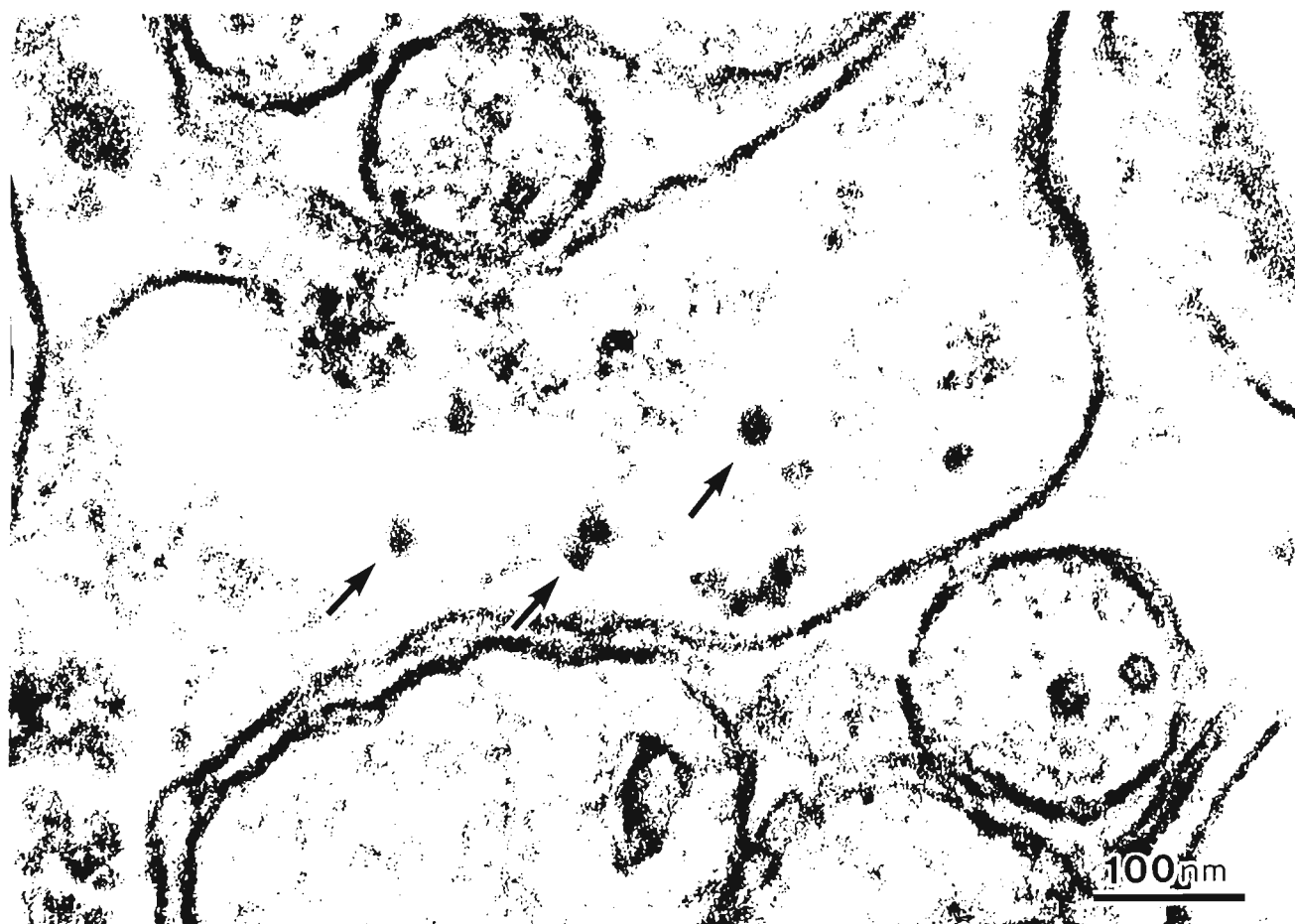


3-2-2) $\times 80,000$ (Film No : 045770)

3-3) ナノ粒子曝露後10日目 脳：嗅球（神経線維層）

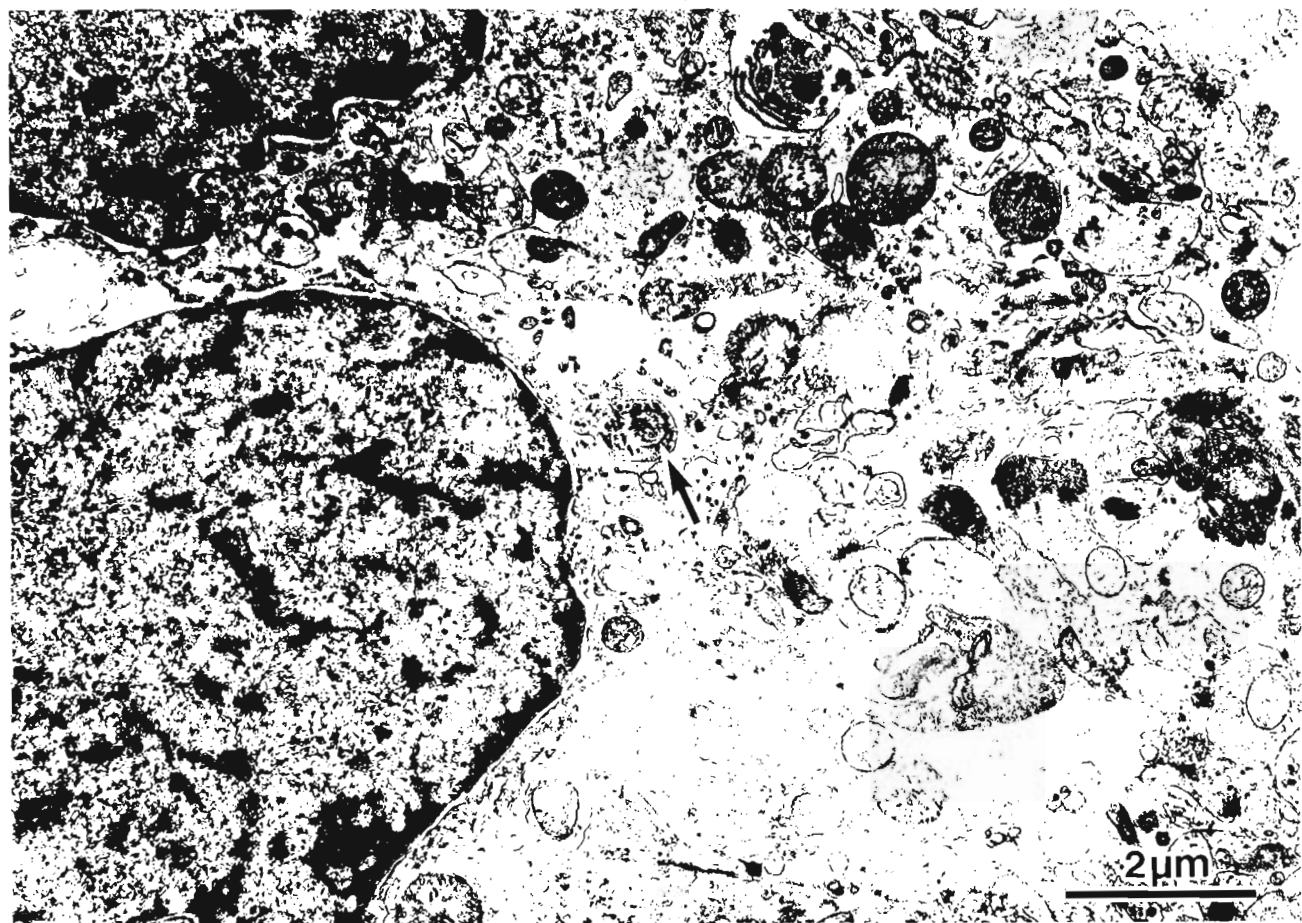


3-3-1) ×200,000 (Film No : 045781)

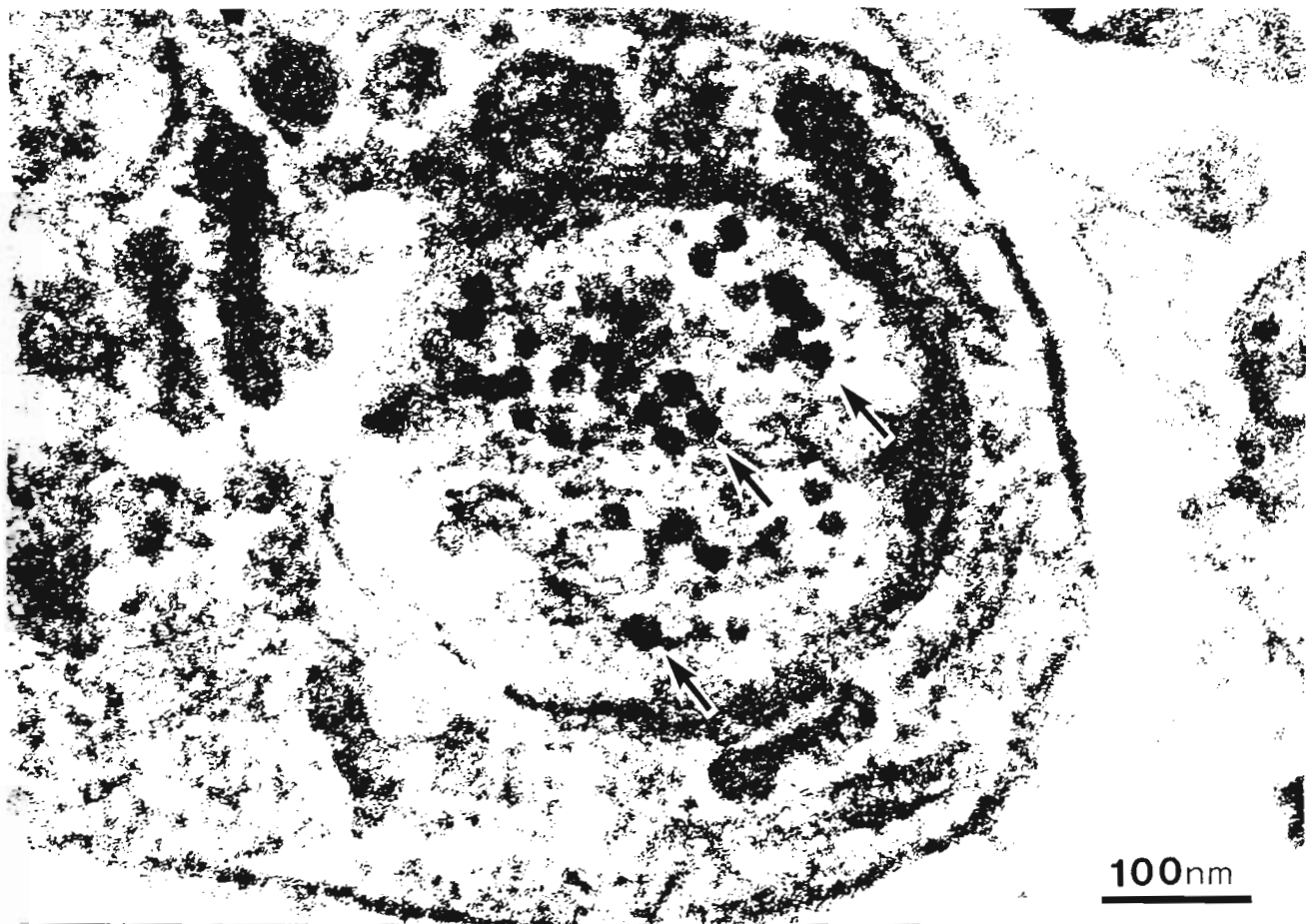


3-3-2) ×200,000 (Film No : 045782)

3-3) ナノ粒子曝露後10日目 脳：嗅球（神経線維層～糸球体層）

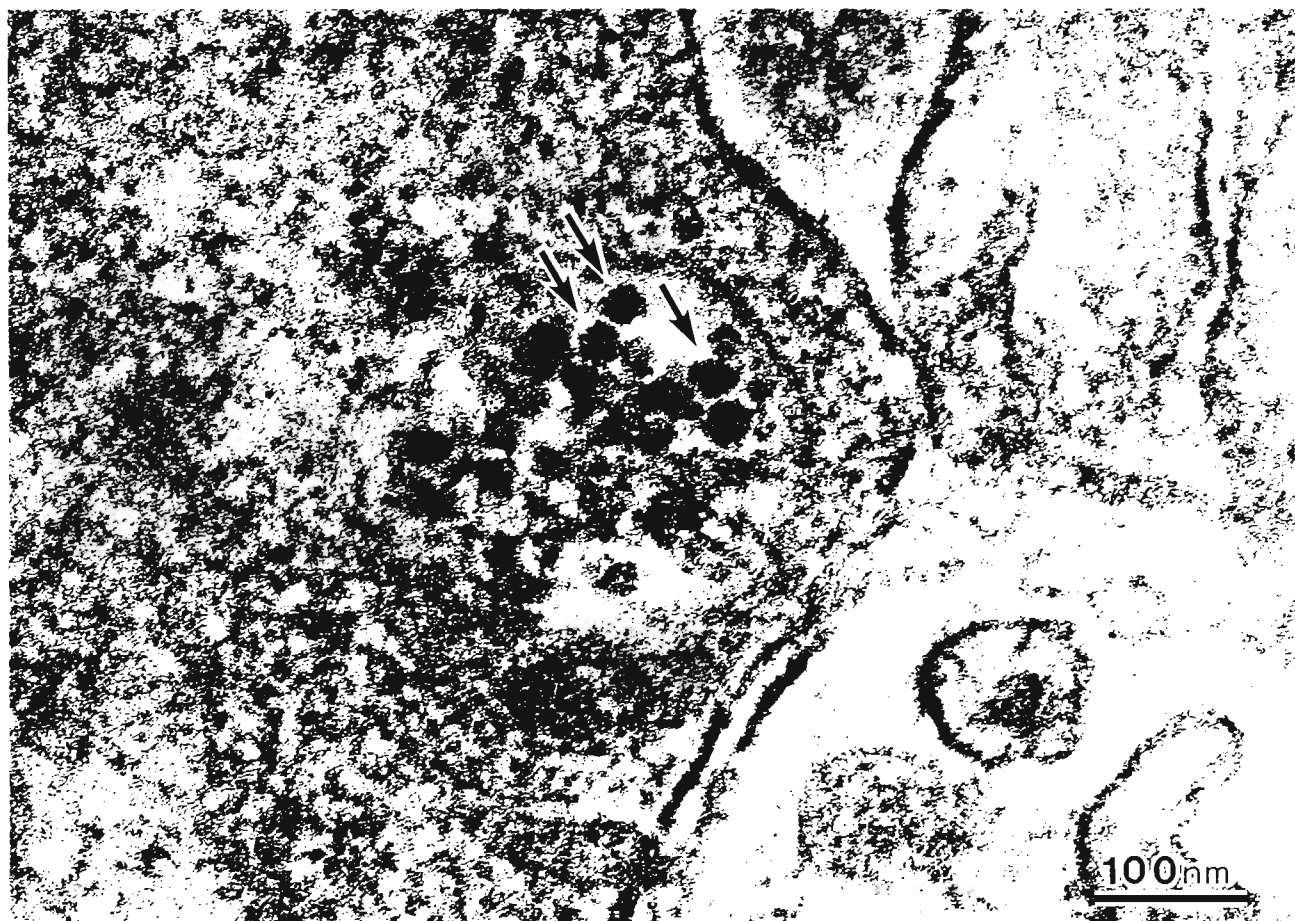


3-3-5) ×12,500 (Film No : 045791)



3-3-6) ×200,000 (Film No : 045792)

3-3) ナノ粒子曝露後10日目 脳：嗅球（神経線維層～糸球体層）



3-3-7) $\times 200,000$ (Film No : 045786)

実験2 粒子状物質有機溶剤抽出物の単回気管内投与実験(ラット)

実験 2-1 粒径 2.0ミクロン以上の大気中粒子状物質とディーゼル粒子の有機成分の影響—若齢ラット

実験方法：実験動物：9 週齢♂F344,SPF ラットを日本チャールズブリバーより購入し、1 群8匹となるように無作為に群分けを行い実験に供した。

試験試料の気管内投与：テレメリーセンサー装着動物は、halothane 麻酔下で各種試験試料を 3 mg/kg 体重で気管内投与した。Control 動物には、抽出溶媒を同様な手法で気管内投与した。

心肺機能の測定：9 週齢の F344 ラットを1週間の予備飼育後、腹部下行大動脈に血圧測定用のカニューレを、右肩と左足部の皮下に ECG 電極を固定し、腹部に核心温度センサーと送信機の埋め込みを行った。術後 10-14 日間安静状態で飼育し、縫合部の回復を確認後、暴露チャンバー内で1匹/1ケージで飼育した。照明のサイクルは、午前7時に ON、午後7時に OFF とした。ラットの生体信号は、気管内投与前から投与1週間後まで継続的に受信機を介してコンピュータに送信し、ハイエンドデータ取得、実時間解析システム等によって HRV, FFT 解析、R-R 間隔などの計測を、また不整脈数は心波形と血圧変動から目視で確認し、18:00-19:00 と 12:00-13:00 の各1時間の発生数を目測した。

呼吸パターンの測定：回復が確認されたテレメリーセンサー装着動物は、試験試料気管内投与前、投与 24 時間後、7日後の3回、無麻酔、無拘束下で body plethysmography によって呼吸数、一回換気量、分時換気量を測定した。

心肺組織・血管系の病理検討：形態学的検討-気管内投与7日目又は9日目に屠殺動物の心肺組織を 10%ホルマリン緩衝液で 20cmH₂O 圧で固定し、肺及び心臓について病理学的検討を行った。

血液・気管支肺胞洗浄液の生化学的検討：気管内投与7日後と9日後に、気管支肺胞洗浄液(BALF)と右心室血液の採取を行い、BALF 中の細胞数、細胞分画像、総蛋白量及び血液中の細胞数を測定した。

炎症及び心疾患関連指標の生化学的、分子生物学的検討：心および肺組織で RNA 抽出を行い、心疾患および炎症関連指標の遺伝子レベルでの発現量について RT-PCR 法によって検討した。血中エンドセリン (ET-1)濃度は、Radioimmuno Assay Kit によって測定した。

実験結果

核心温度、血圧(図1~20)：いずれの指標も FFT 解析で、明確な 24 時間サイクルの日内変動を示した。核心温度、血圧の気管内投与前後48時間の変動には E-DEP,E-PM の明確な影響は認めなかった。

心機能(図 21~45)、不整脈数：自律神経系への影響については、HRV 解析によって検討した。High frequency (HF)値は副交感神経系の、Low frequency(LF)値は交感神経系とその他の成分、LF/HF 比は交感及び副交感神経間の自律神経バランスを示していると考えられる。本実験では LF, HF 及び LF/HF 比の試験試料気管内投与前後48時間での変動には、E-DEP 群、E-PM 群でも明確な差は認めなかった。また、R-R 間隔及び SDR-R 値(R-R 間隔の SD 値)にも明確な影響を認めなかった。不整脈数は、E-DEP,

E-PM 群共に対照群と比較して著しい出現数の増加は認めず、昼夜間での発生頻度にも群間差は認められなかった。

不整脈数

Exp.	測定時間 測定日	18:00-19:00				12:00:13:00			
Exp.1	2001.1.4	9 (C)	3 (C)	1(C)	2(C)	1(C)	0(C)	0(C)	N.A.
気管内投与(2001.1.9)	1.9	0(C)	4(C)	0(C)		N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	1.14	0(C)	9(C)	0(C)	0(C)	1(C)	0(C)	9(C)	N.A.
Exp.2	2001.1.17	0(D)	4(D)	0(D)	2(P)	0(D)	2(D)	8(D)	4(P)
気管内投与(2001.1.23)	1.21	0(D)	0(D)	0(D)	2(P)	4(D)	0(D)	0(D)	4(P)
	1.25	7(D)	3(D)	0(D)	0(P)	16(D)	9(D)	0(D)	37(P)
Exp.3	2001.2.3	0(P)	0(D)	0(P)	0(D)	12(P)	0(D)	2(P)	1(D)
気管内投与(2001.2.5)	2.8	0(P)	0(D)	0(P)	0(D)	0(P)	6(D)	8(P)	13(D)
	2.12	4(P)	0(D)	0(P)	13(D)	3(P)	0(D)	17(P)	21(D)

C:Control group, P: E-PM group, D: E-DEP group, N.A.:No data

呼吸パターン:E-DEP, E-PM, Control 群の3群で共に、気管内投与前後の呼吸パターンには有意な変動は認めず、又群間差も認めなかった。

Baseline of ventilation, tidal volume and respiratory minute volume

Group	Day	n	Body weight (g)	Ventilation (breaths/min)	Tidal volume (ml BTSP/100g B.W.)	Respiratory minute volume (ml BTSP/min/100g B.W.)
Control	Day 0	8	217.6±8.76	140.0±15.5	1.303±0.105	182.4±25.1
	Day 1	8	223.4±13.6	137.5±14.7	1.342±0.267	182.4±26.6
	Day 7	8	238.7±15.3	103.3±52.1	1.078±0.103	128.3±17.3
E-DEP	Day 0	8	232.9±22.7	138.8±15.5	1.033±0.136	144.0±27.9
	Day 1	8	239.6±20.0	129.4±15.9	1.237±0.232	137.6±64.5
	Day 7	8	257.9±21.5	120.0±13.9	1.140±0.184	135.7±19.3
E-PM2.0	Day 0	8	237.4±16.1	146.3±26.3	1.061±0.131	153.2±21.1
	Day 1	8	247.6±9.8	128.1±37.8	1.237±0.126	174.6±36.0
	Day 7	8	263.8±7.4	135.0±22.7	1.238±0.134	166.5±29.3

BAL および血液分析:気管内投与7日後と9日後の気管支肺胞洗浄液(BALF)中の総蛋白量にも群間差は認めなかったが、BALF の細胞数が気管内投与7日後にE-PM群とE-DEP群でやや高値を示した。BALF 細胞分画像では炎症細胞の明らかな増減は認めなかった。循環血液細胞分析では、気管内投与9日後のE-DEP群とE-PM群でControl群に比しやや血小板数の増加傾向を認めた。

Analysis of bronchoalveolar lavage fluid and blood

Group	Day	n	Recovery (%)	Total cell (x100/u1)	Total protein (mg/ml)	Cell differential (%)			Blood cell count		
						Alveolar macrophage	Neutrophil	Lymphocyte	WBC (x100/u1)	RBC (x10000/u1)	Platelet (x10000/u1)
Control	Day 7	4	80.0±0.0	4.5±1.0	0.241±0.06	99.3±1.5	0.3±0.5	0.8±1.0	32.0±9.8	792.8±182.6	66.5±19.8
	Day 9	4	80.0±0.0	4.0±1.5	0.222±0.02	99.3±1.0	0.8±1.0	0.0±0.0	38.5±10.3	890±167.5	70.5±15.7
E-DEP	Day 7	4	70.0±0.0	10.5±1.9	0.222±0.01	99.9±0.5	0.5±1.0	0.0±0.0	38.0±11.2	754.2±167.9	55.6±28.7
	Day 9	4	67.5±5.0	3.8±2.4	0.233±0.04	99.3±0.5	0.0±0.0	0.8±0.5	44.8±5.5	910.8±96.95	89.4±1.9
E-PM2.0	Day 7	4	70.0±0.0	9.0±1.8	0.245±0.04	100.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	33.0±1.8	761.0±38.7	56.4±8.7
	Day 9	4	67.5±9.5	2.5±1.0	0.228±0.01	95.3±7.2	4.3±6.7	0.3±0.6	52.3±12.7	919.5±94.5	90.8±21.1

心疾患および心肺組織と血管系の炎症指標:気管内投与7日後の血液中ET-1濃度は、Control群に比しE-DEPとE-PM群で高値を示したが、有意な変動ではなかった。気管内投与7日目の肺組織RNATES mRNA発現量には明らかな影響を認めなかったが、TNF-α mRNA発現量がE-PM群で高値を示す傾向が認められたが有意な変動ではなかった。一方、心房ANP,BNP mRNA発現量への影響では、BNP mRNA発現量がE-DEP群とE-PM群で抑制される傾向が認められ、その傾向はE-PM群で顕著であった。

Concentration of plasma endotherin-1

Group	n	ET-1 (pg/ml)
Control	5	39.1±9.3
E-DEP	5	46.6±7.0
E-PM2.0	5	45.1±8.5

肺病理所見:気管内投与7日後の肺病理所見では、E-DEP群の一部の動物で気管支粘膜下にごく軽度の繊維化が認められた点を除いては、Control、E-DEP、E-PM群で気管、気管支及び肺胞組織像の著しい変化は認めなかった。

图1 腹温在对照组的

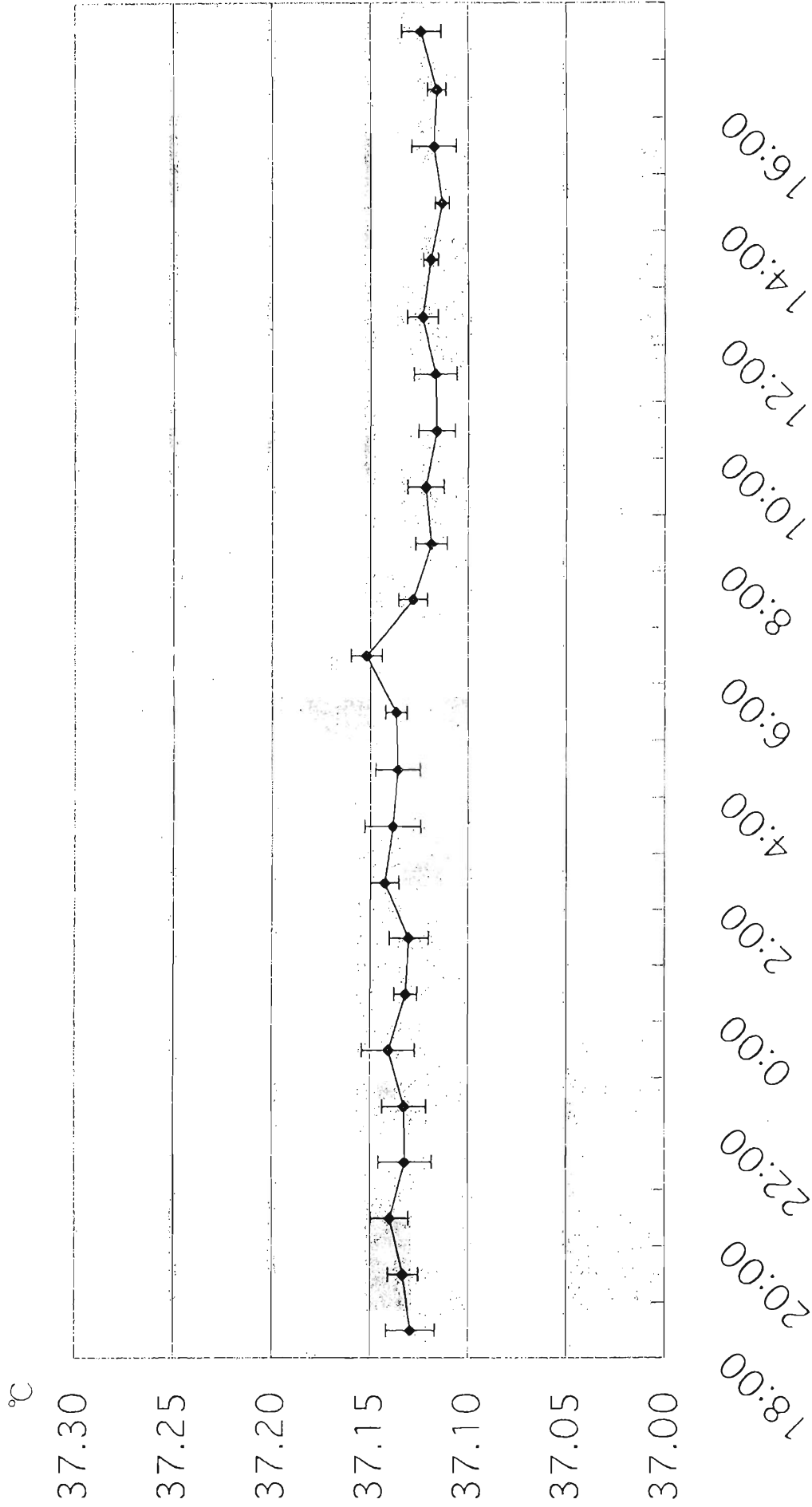


Figure 2 Abdominal Temp. in the E-DEP (Exp.2)

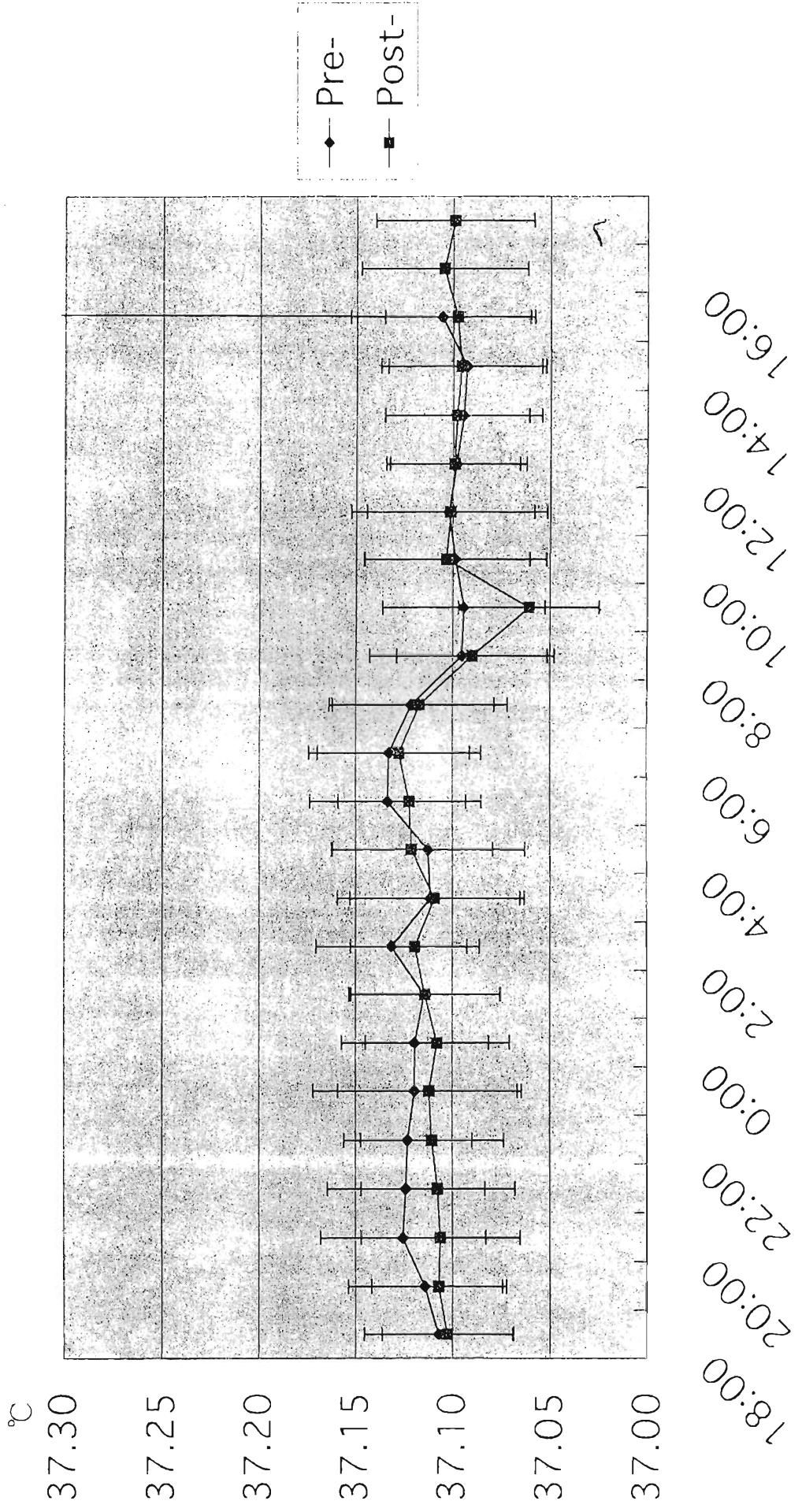


Figure 3: Abdominal Temp. in the E-DEP group (Exp.3)

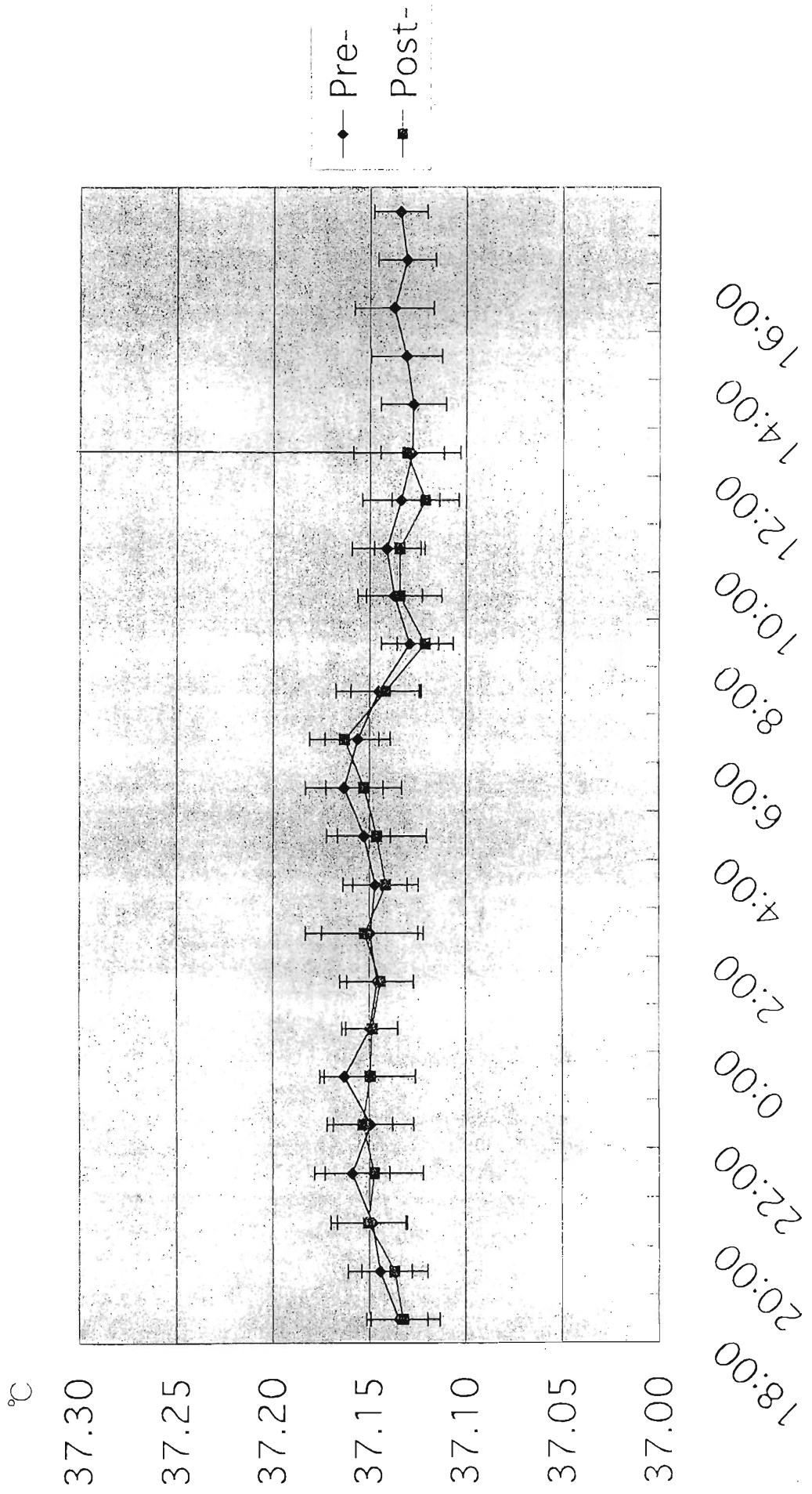


图4 Abdominal Temp. in the E-PM group (Exp.2)

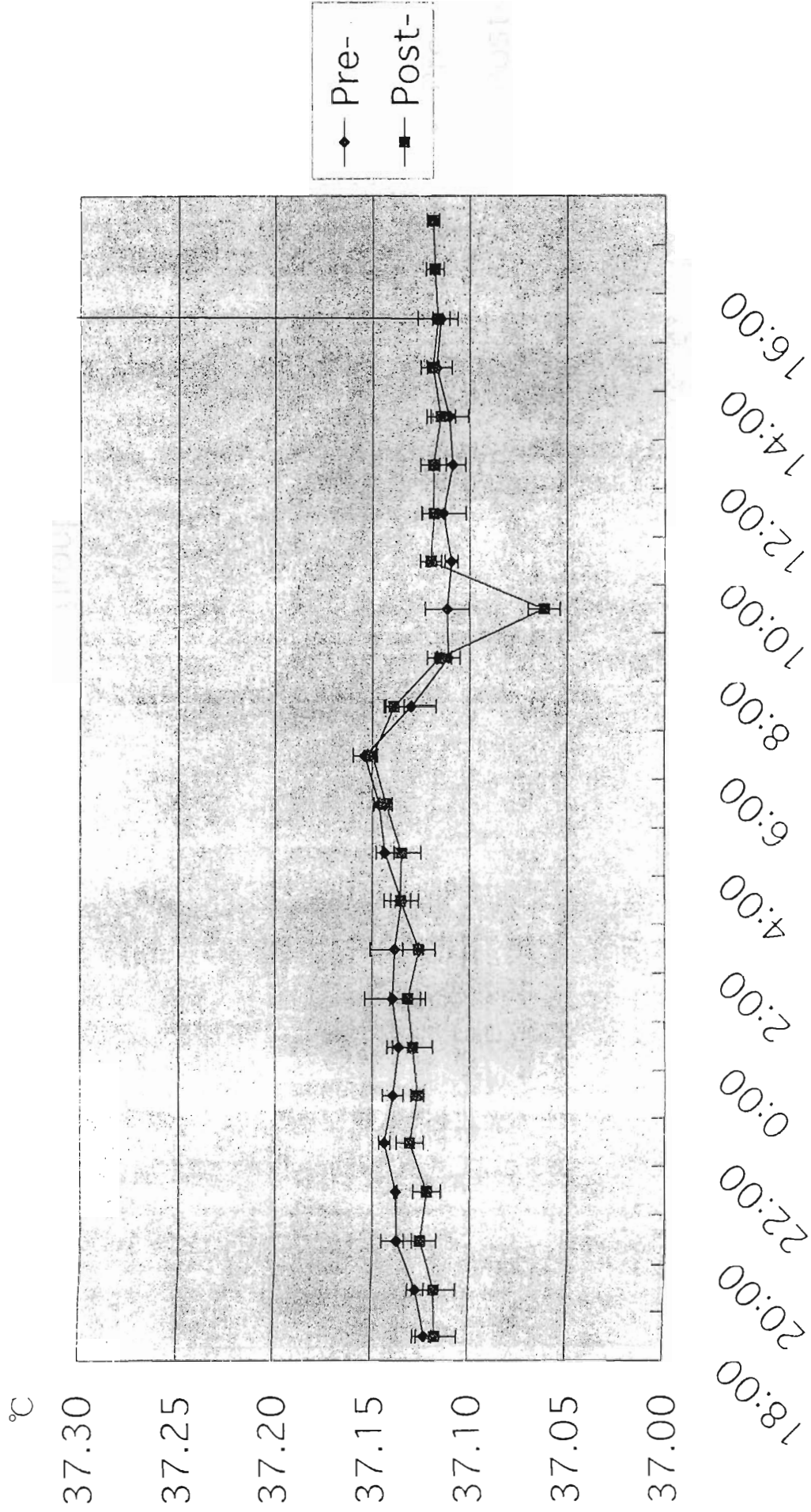


图5 Abdominal Temp. in the E-PM group (Exp.3)

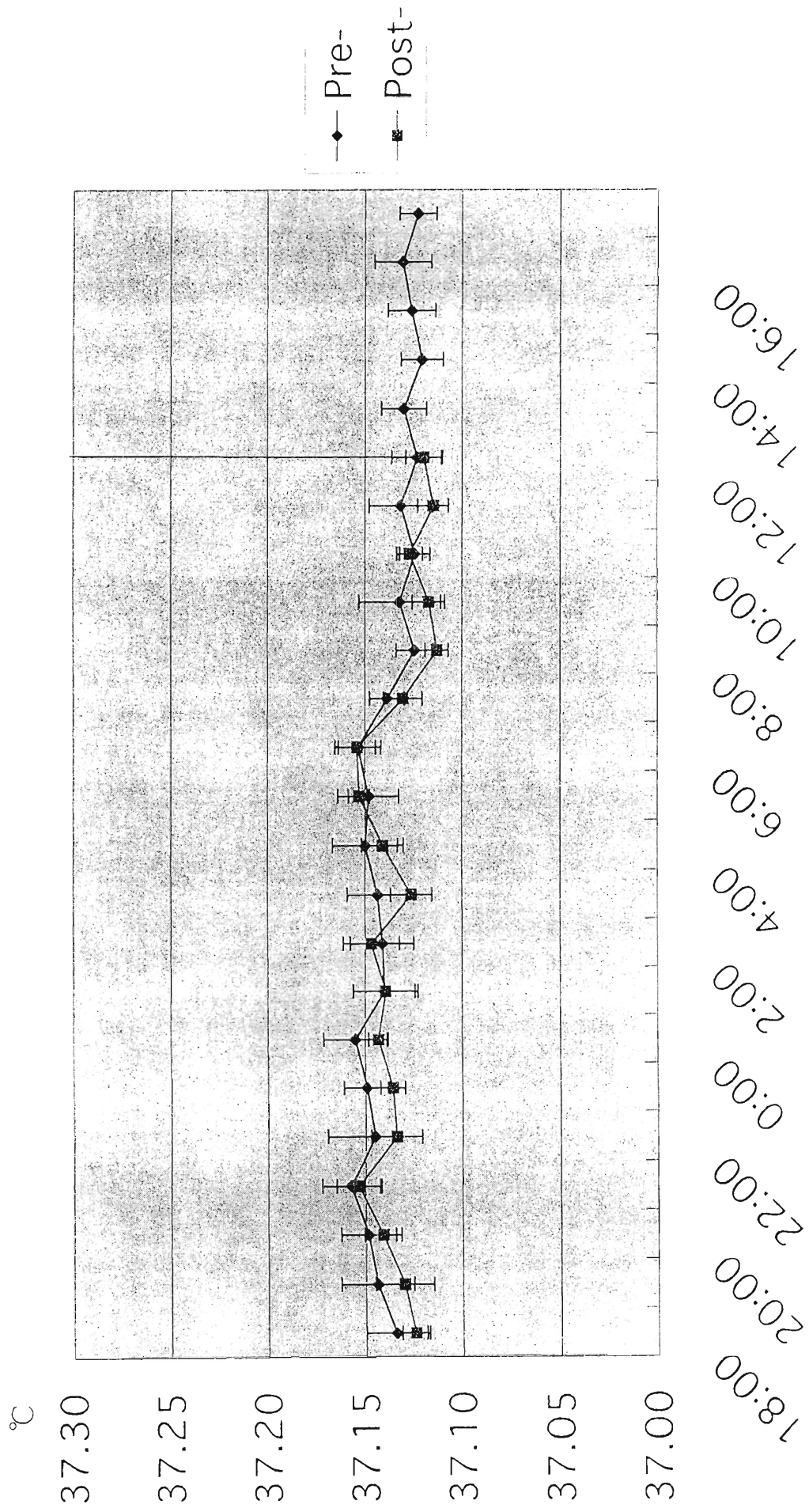


图6 BP (Sys.) in the Control group

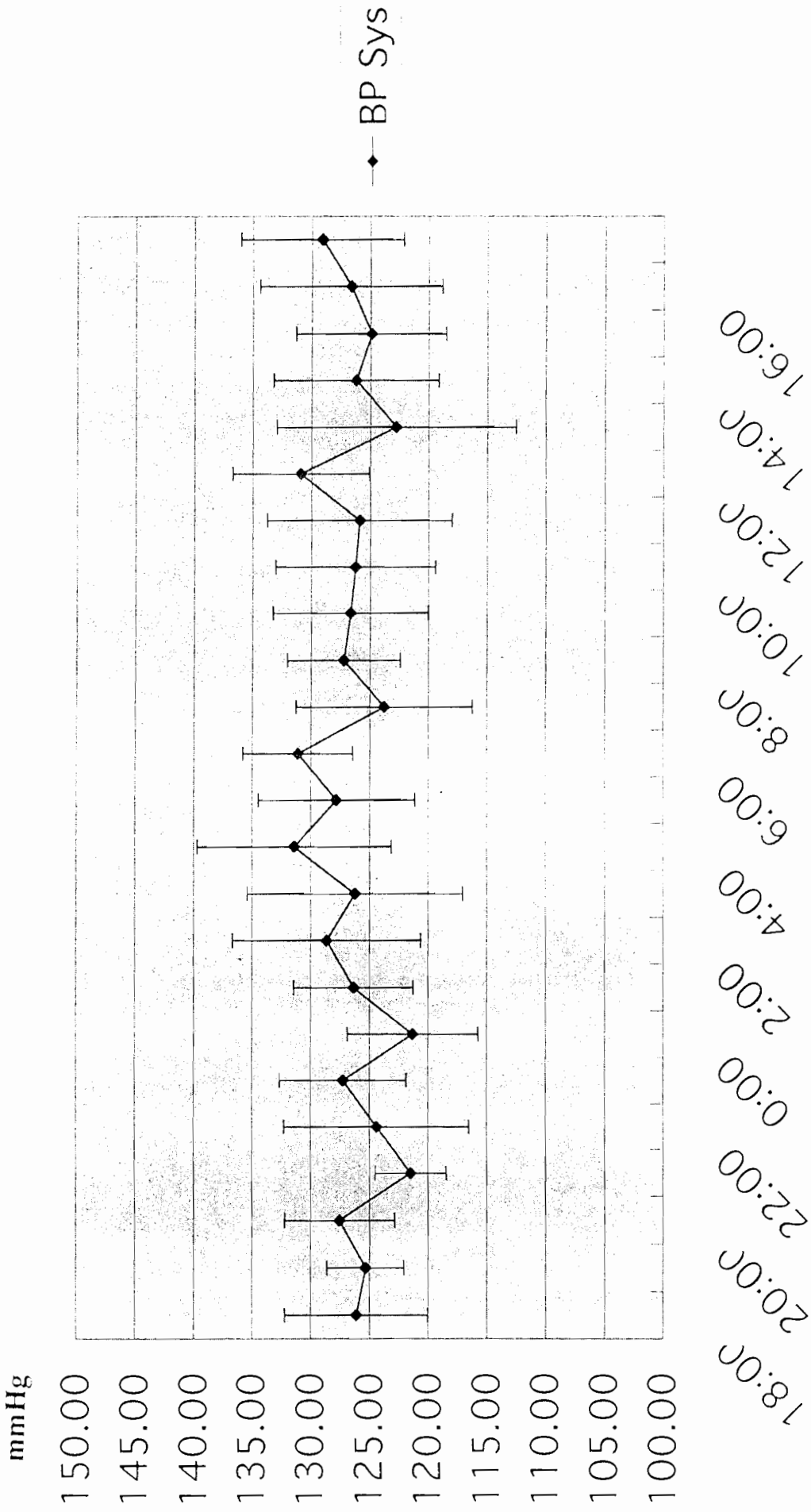


图7 BP(Sys.) in the E-DEP group (Exp.2)

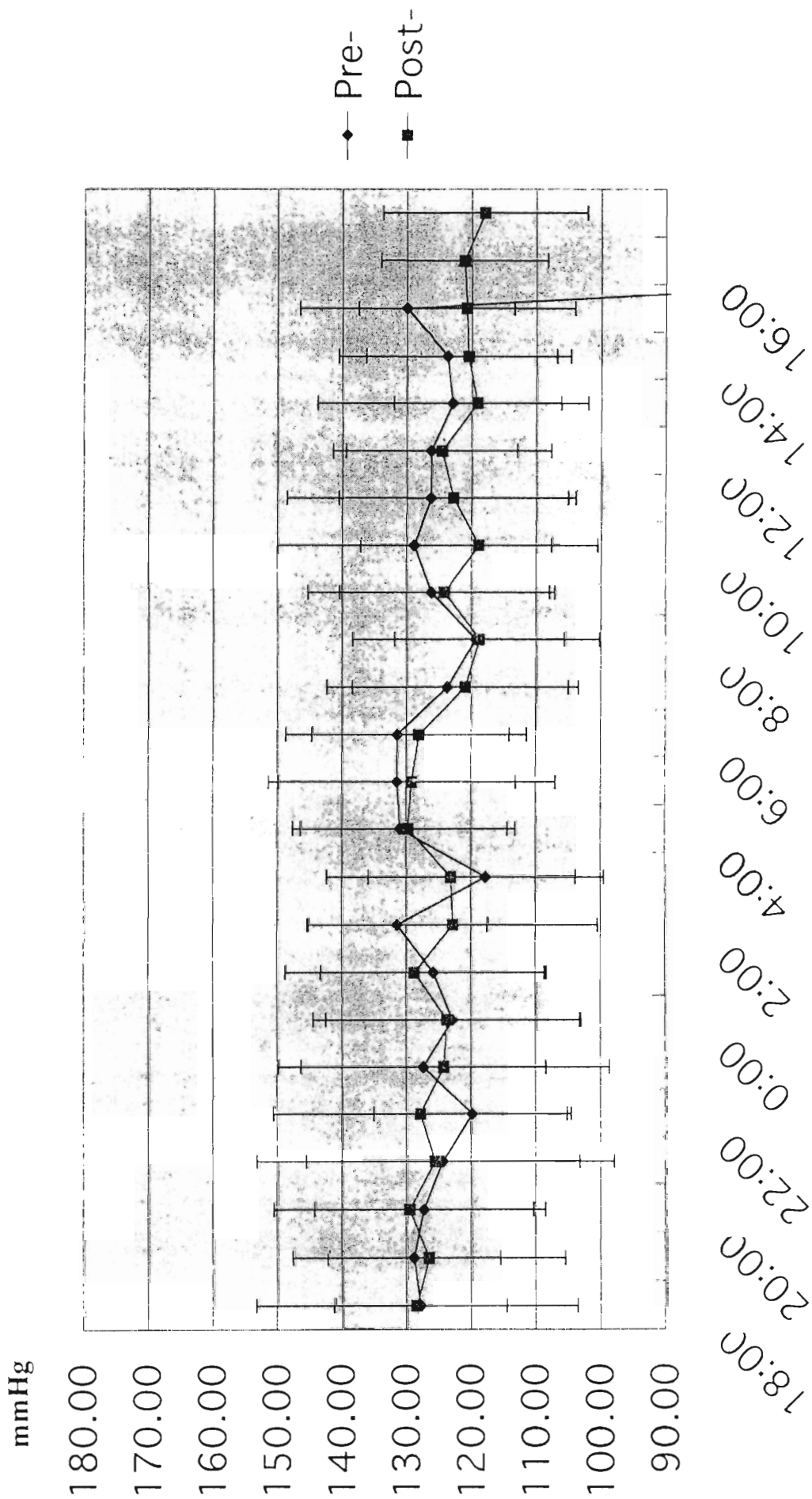


Figure 8 BP (Sys.) in the E-DEP group (Exp.3)

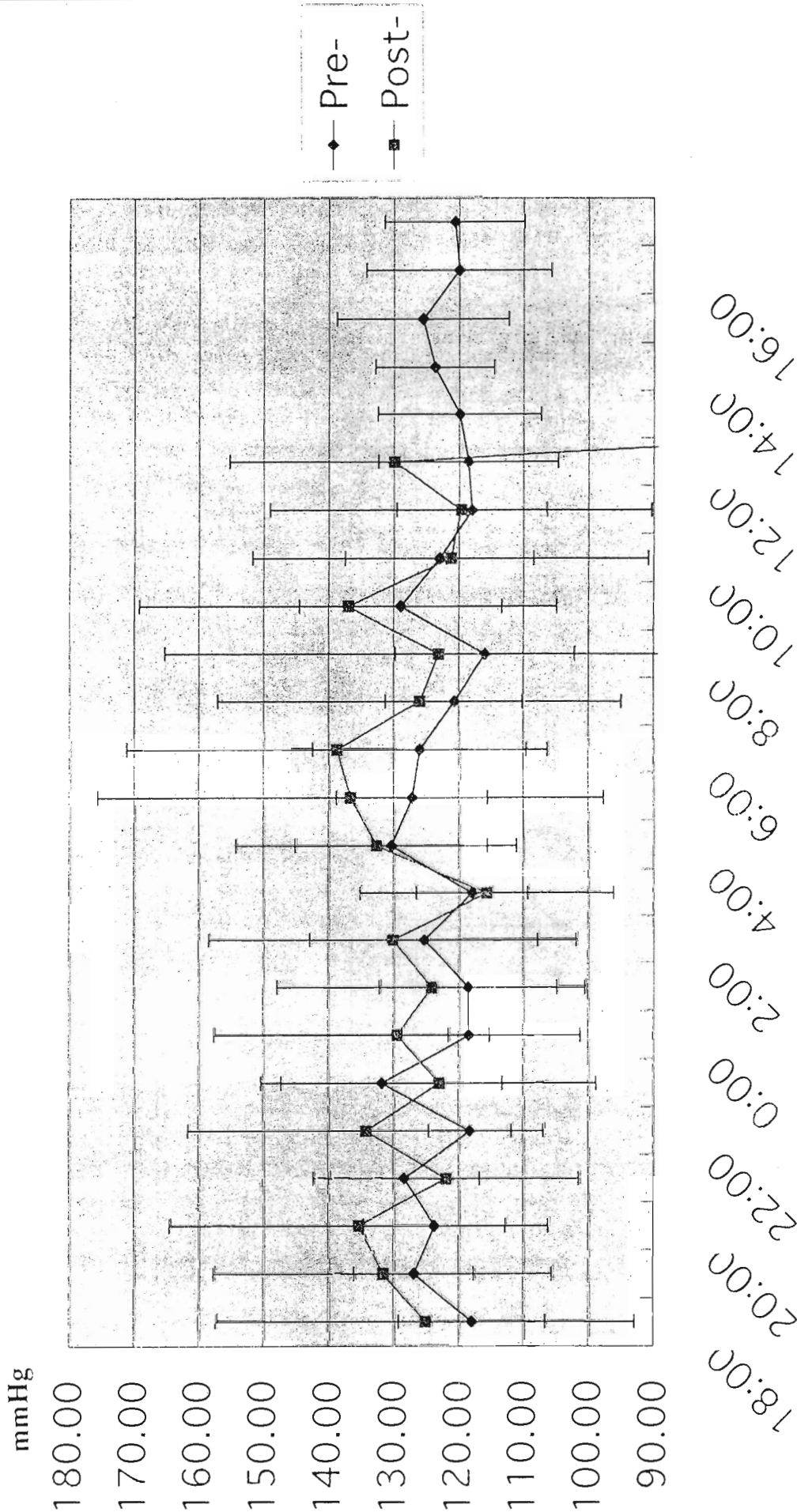


Figure 9 BP (Sys.) in the E-PM group (Exp 2)

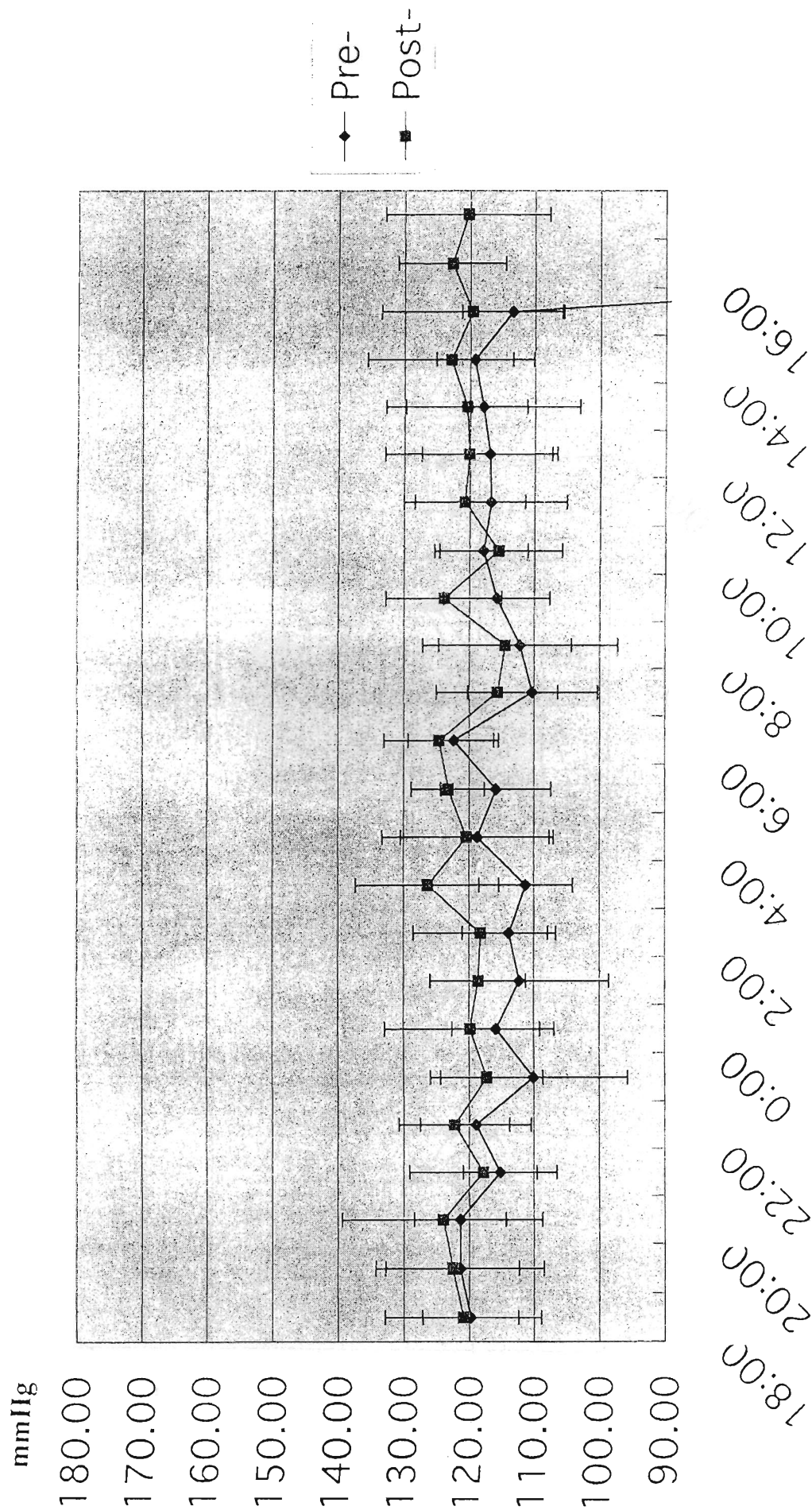


Figure 10 BP (Sys.) in the E-PM group (Exp.3)

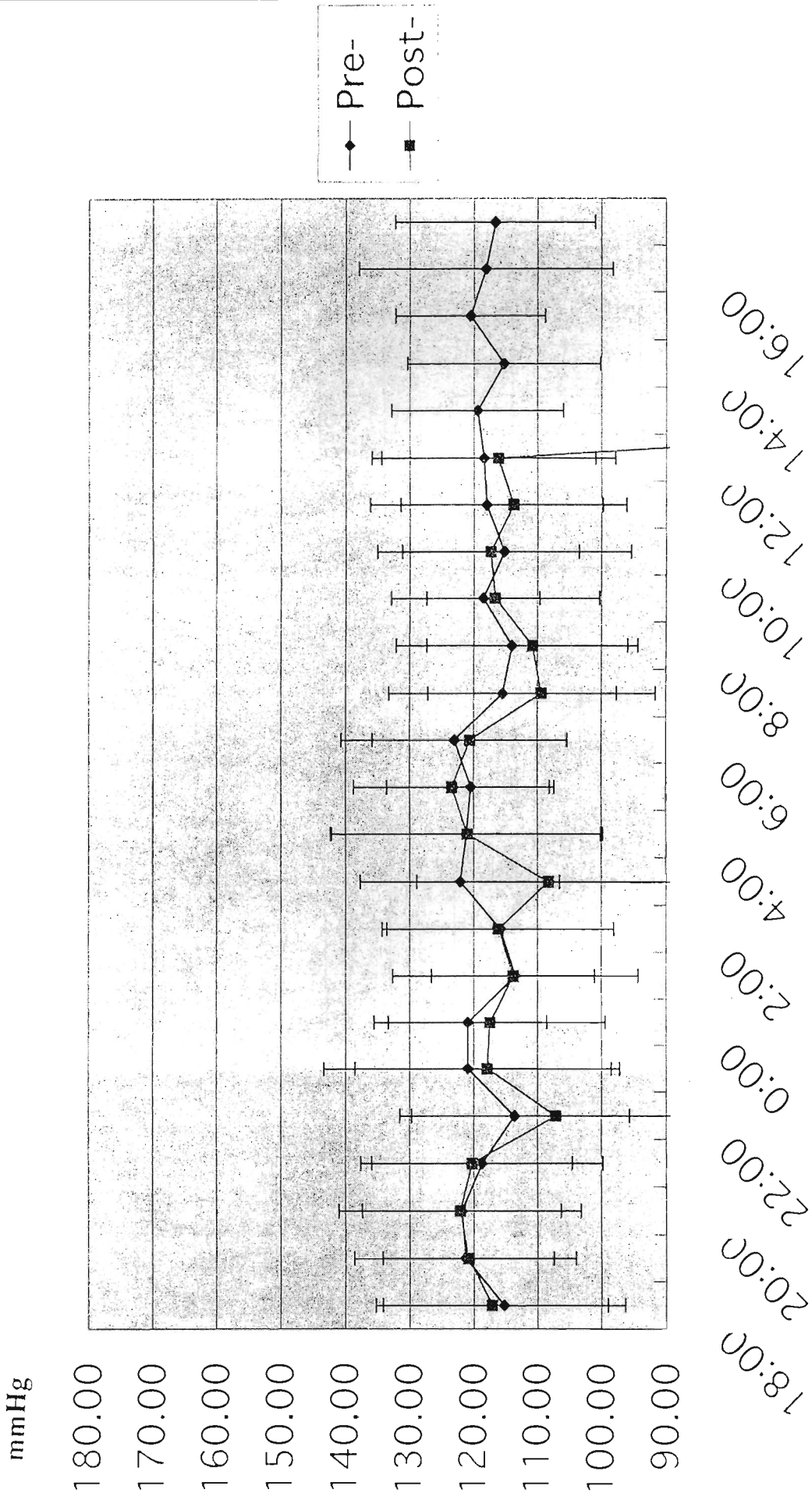


图 11 BP (Mean) in the Control group

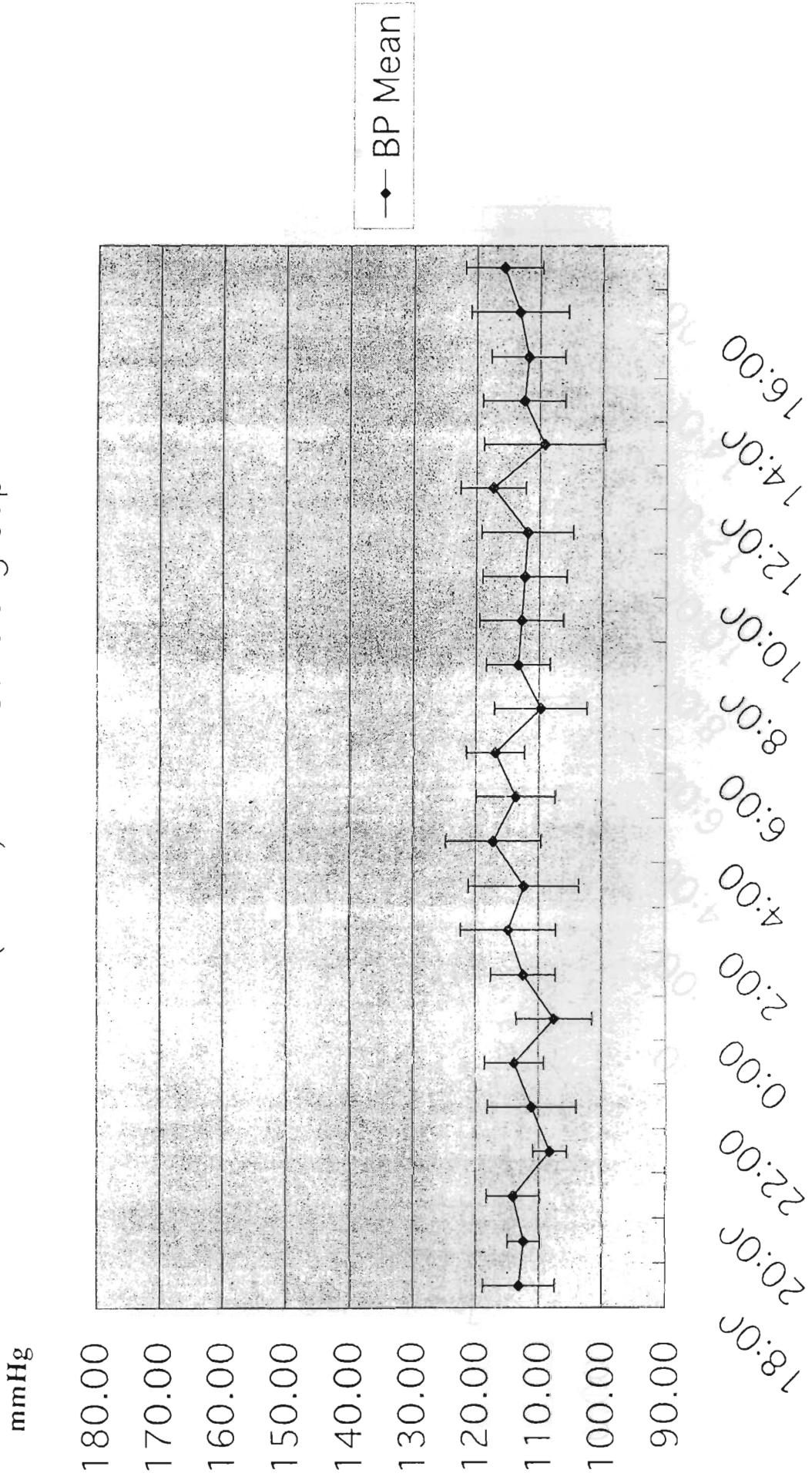


Figure 12 BP (Mean) in the E-DEP group (Exp.2)

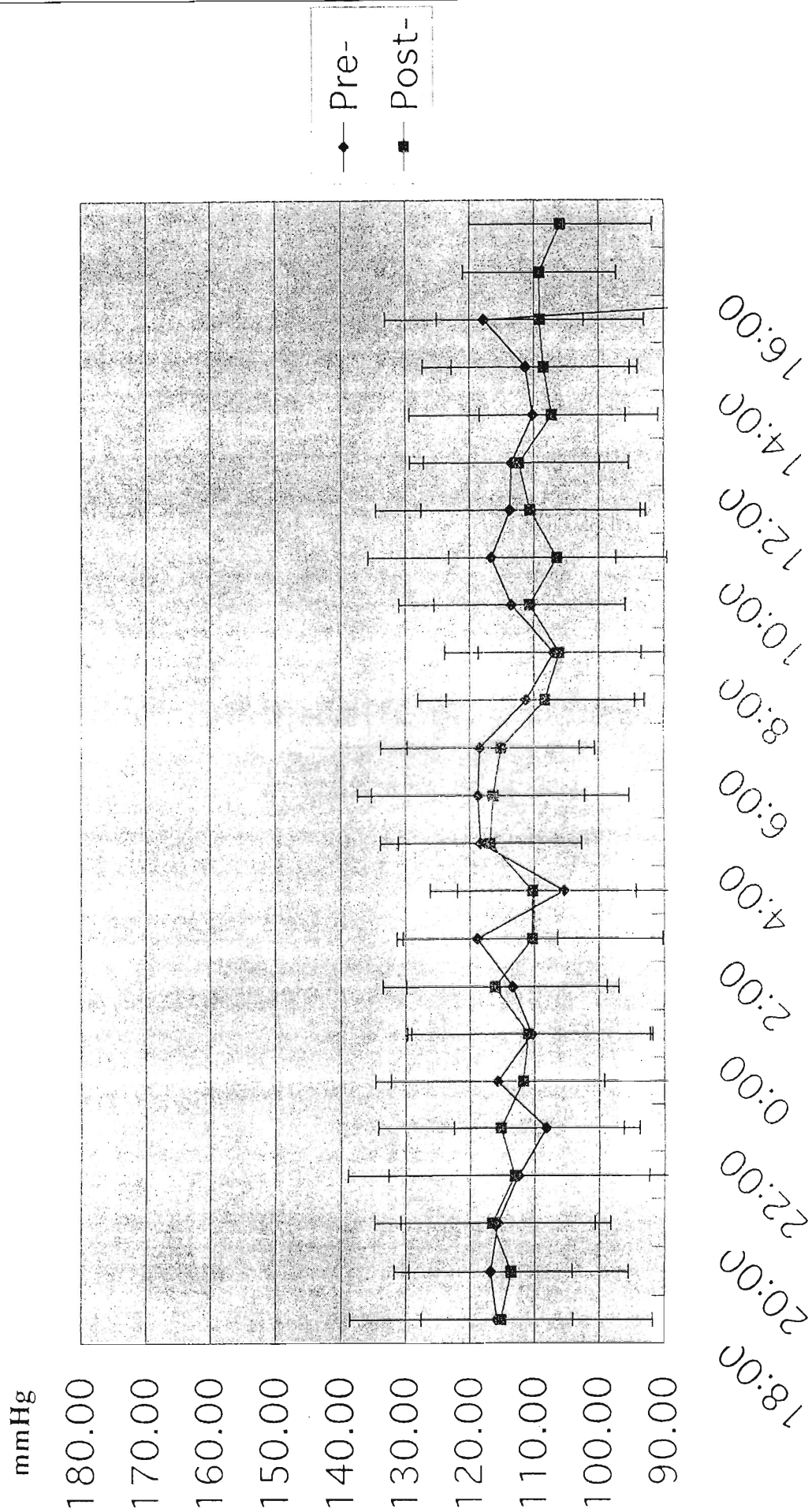


图 13 BP (Mean) in the E-DEP group (Exp.3)

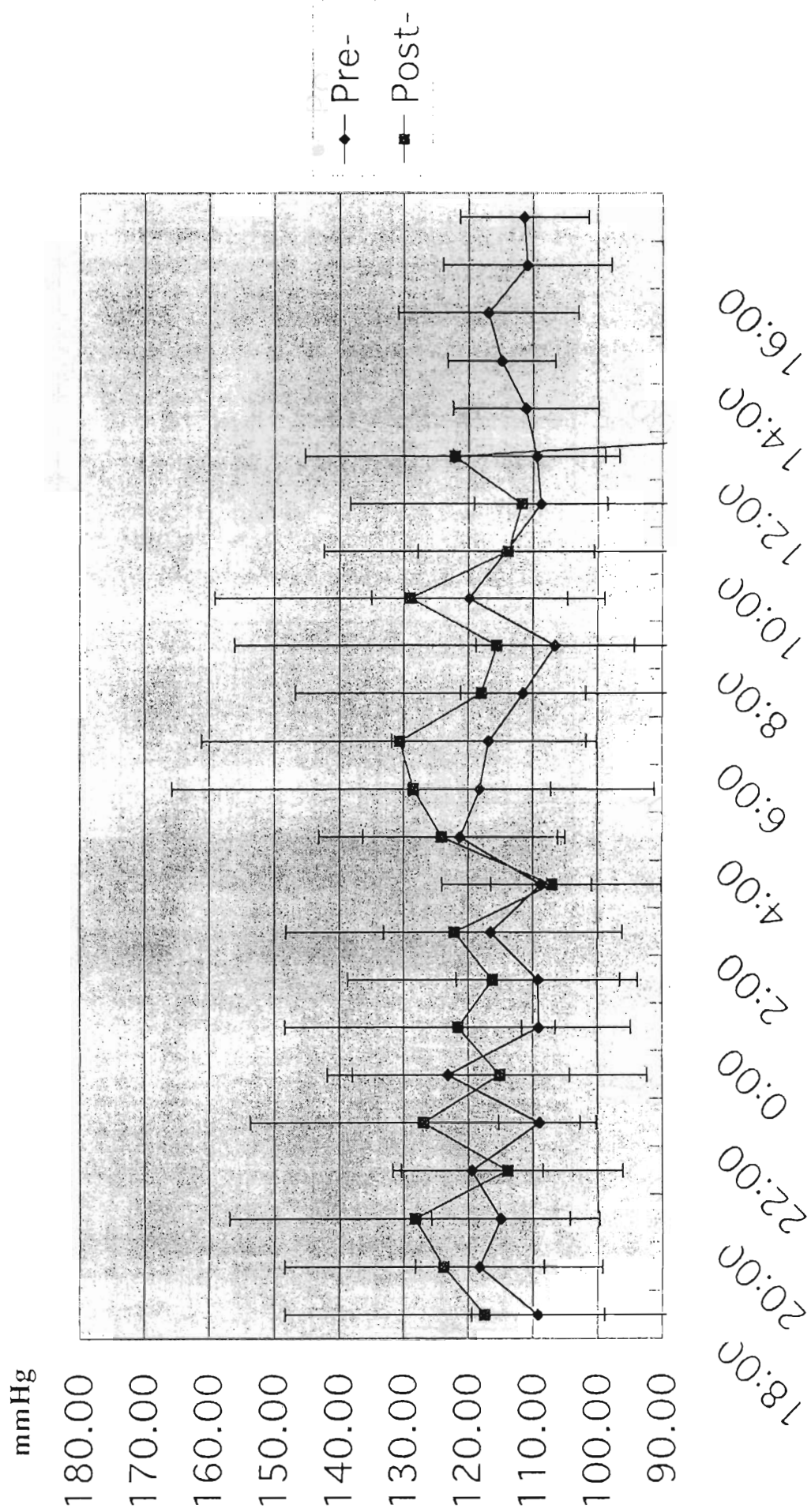


图 14 BP (Mean) in the E-PM group (Exp.2)

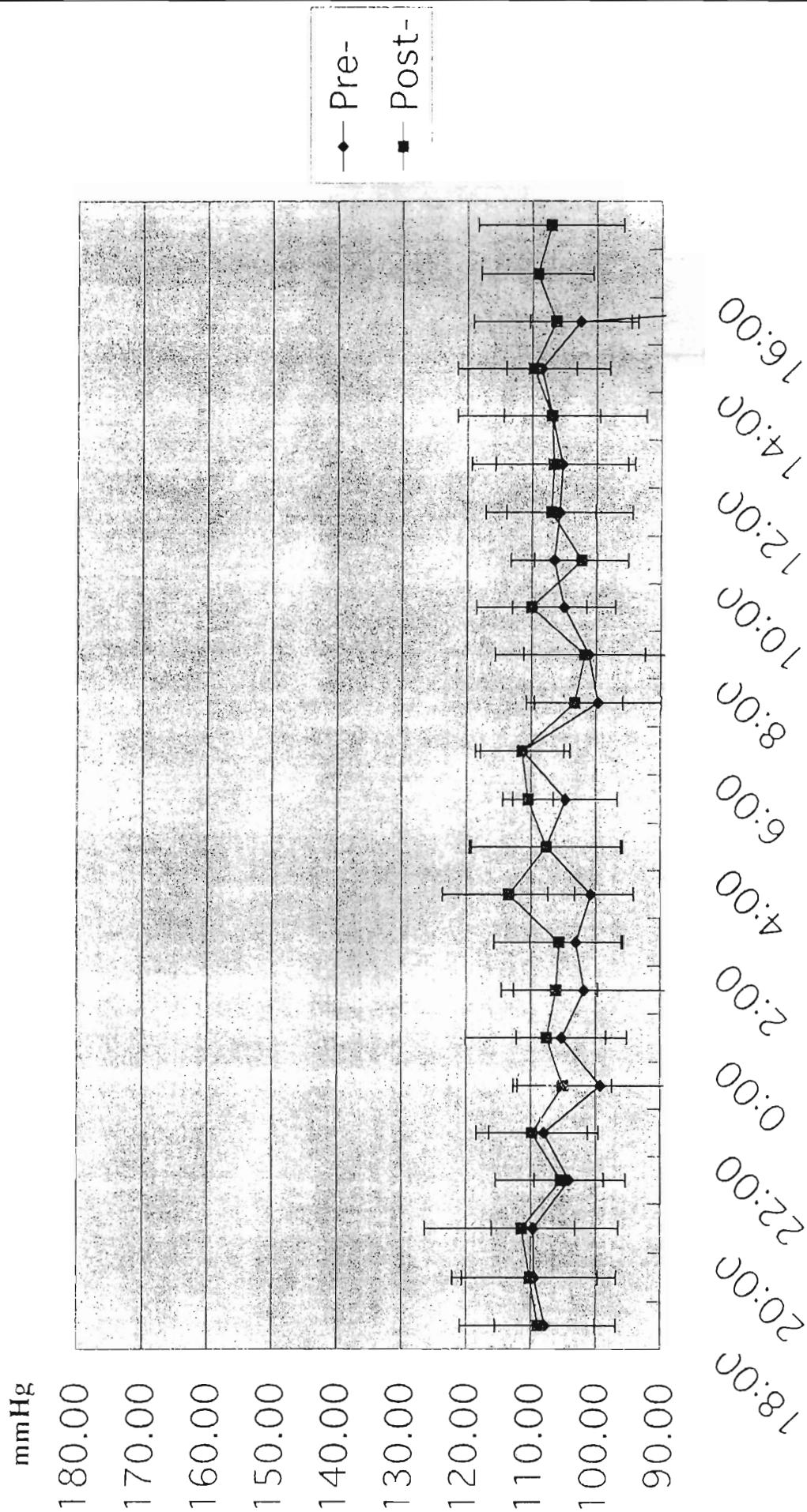


Figure 15 BP (Mean) in the E-PM group (Exp.3)

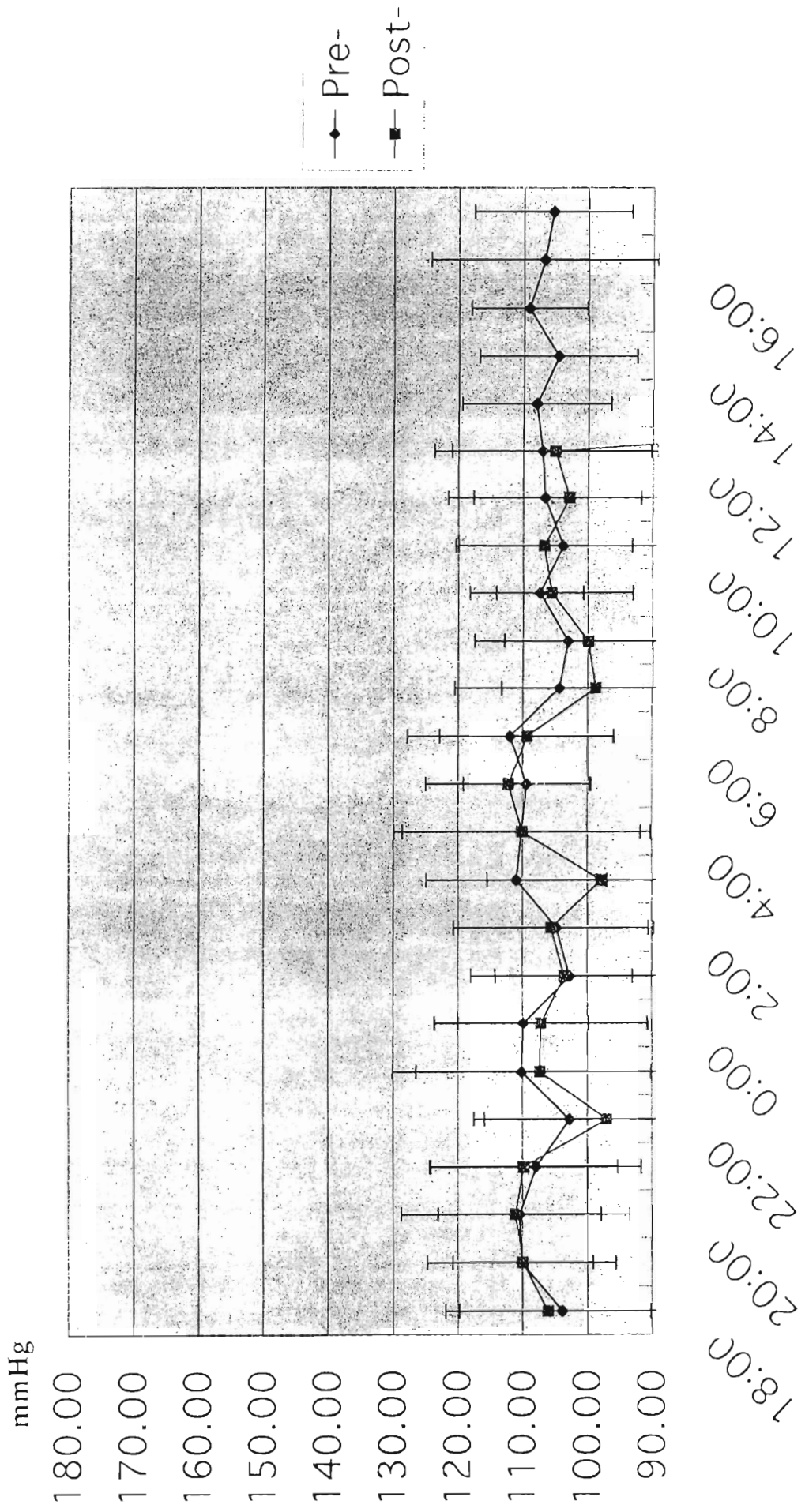


图 16 BP (Dia.) in the Control group

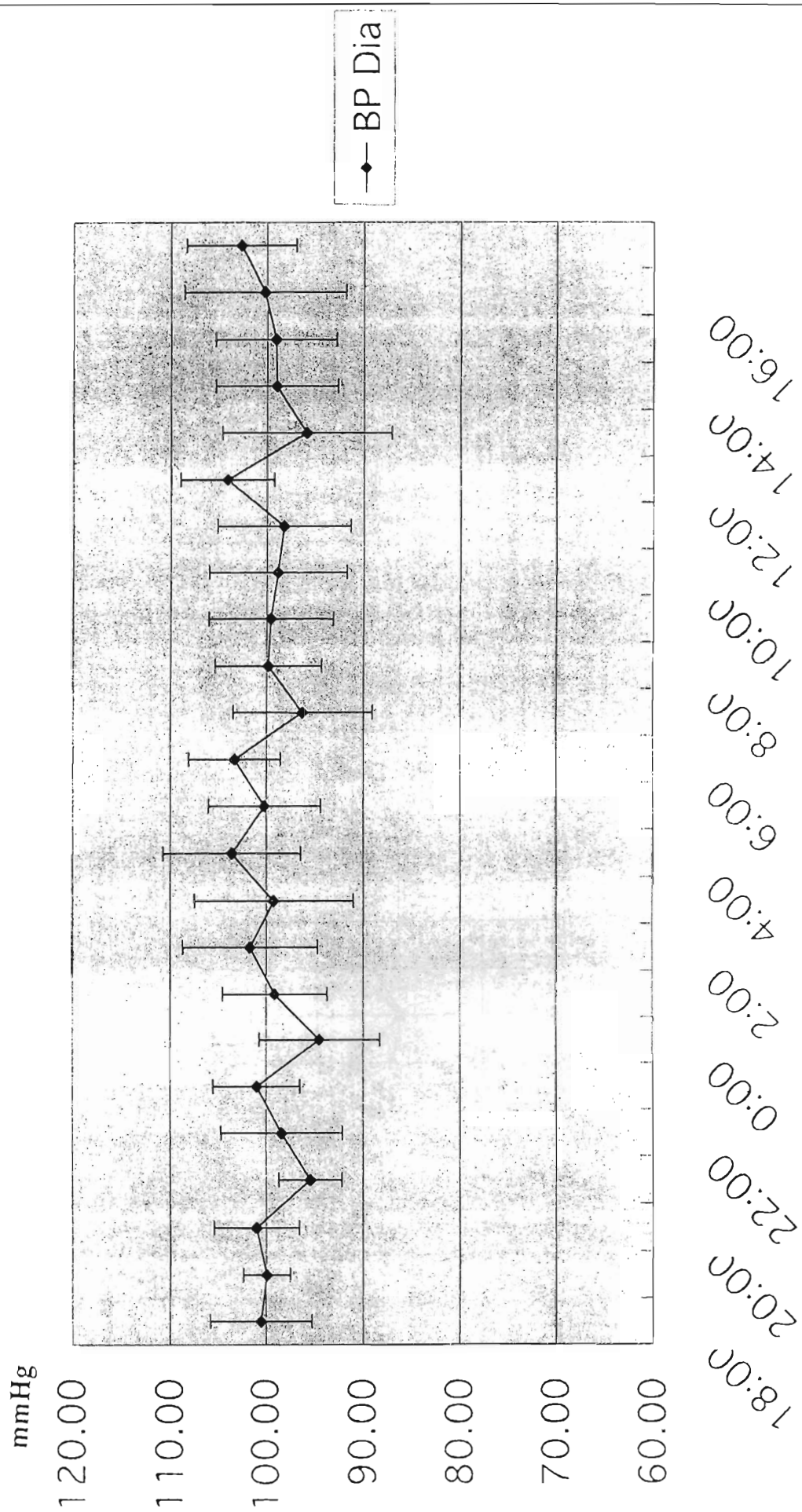


图 17 BP (Dia.) in the E-DEM group (Exp.2)

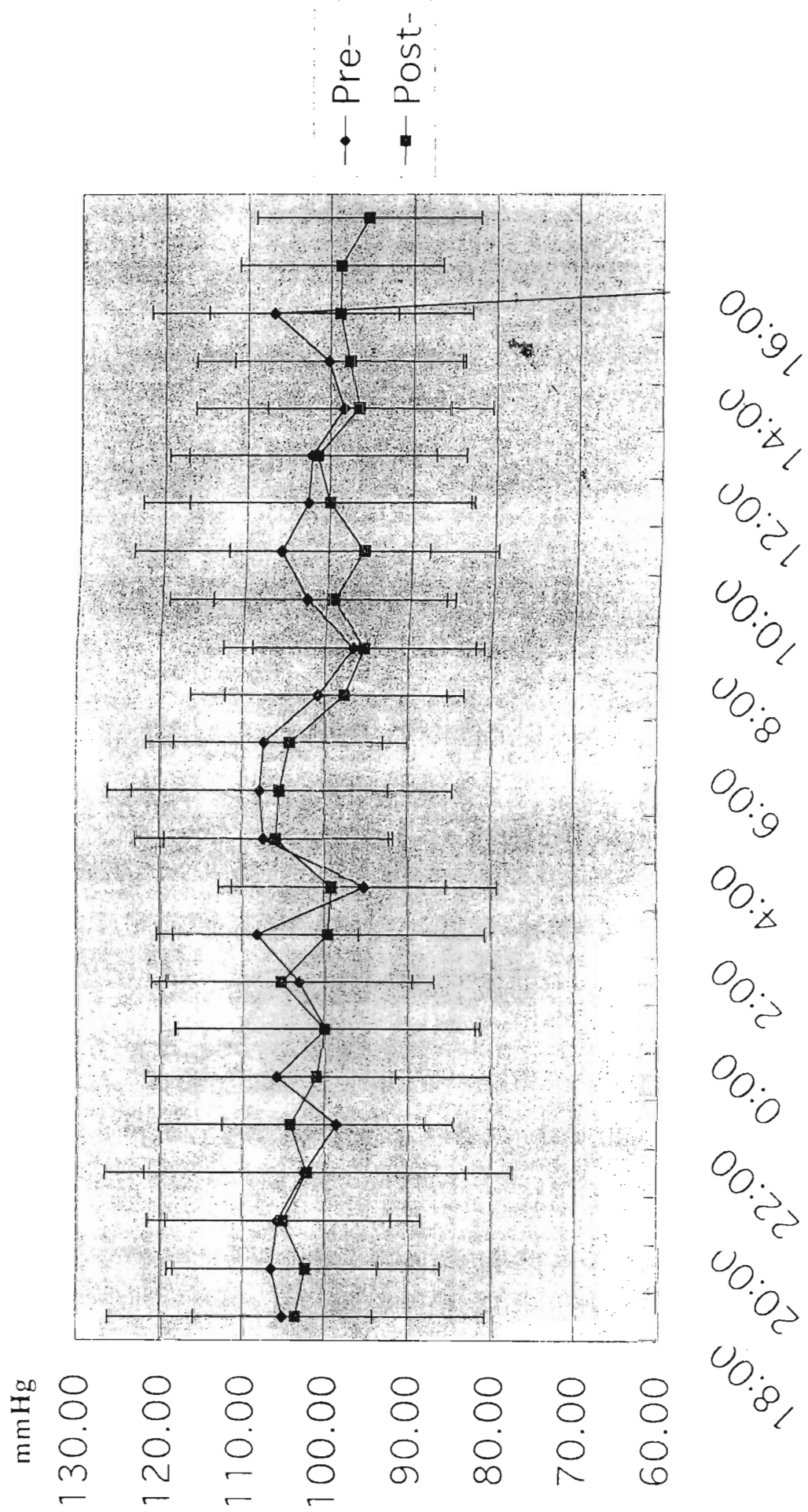


图 18 BP(Dia) in the E-DEP group (Exp.3)

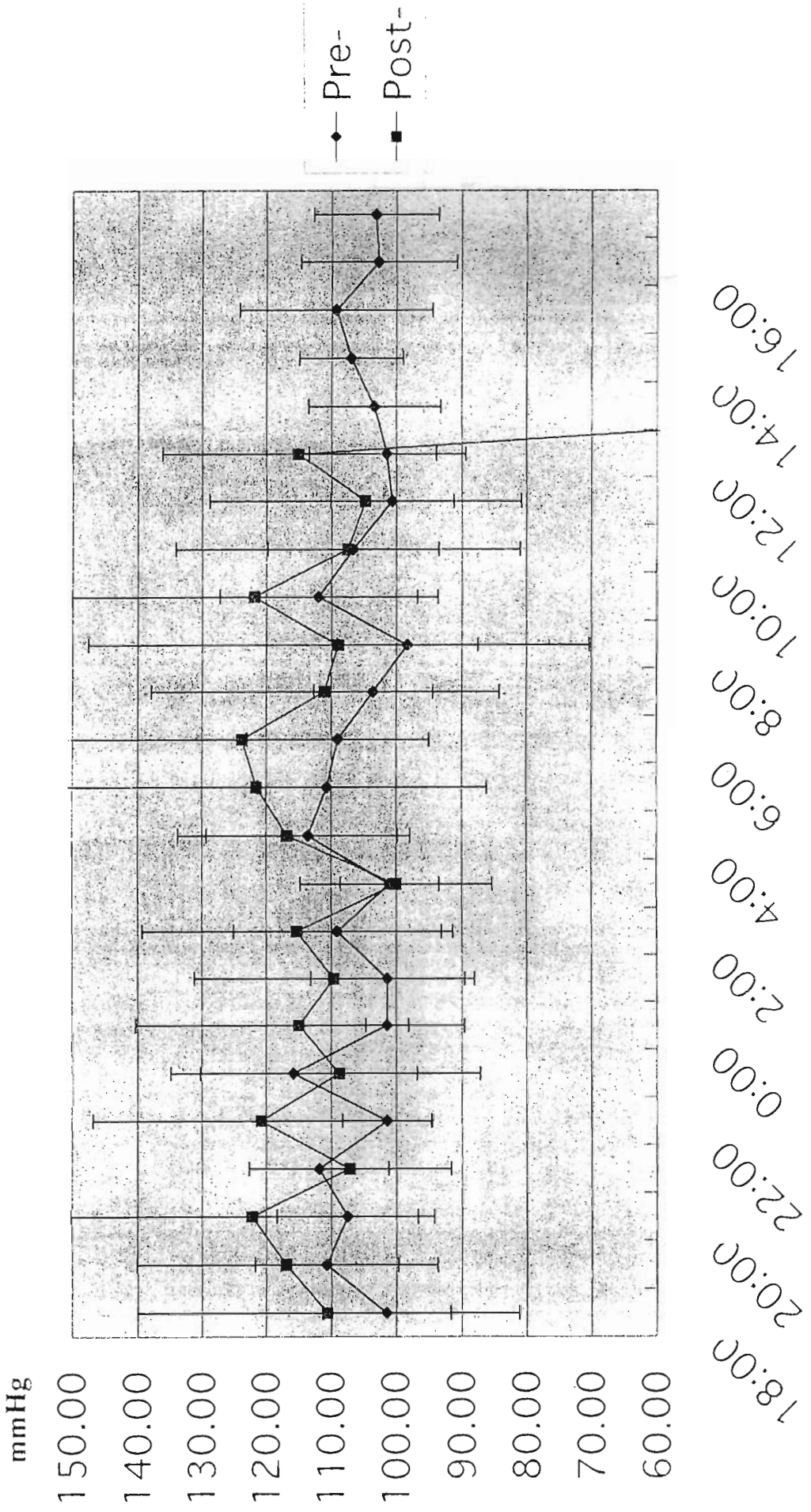


图 19 BP (Dia) in the E-PM group (Exp.2)

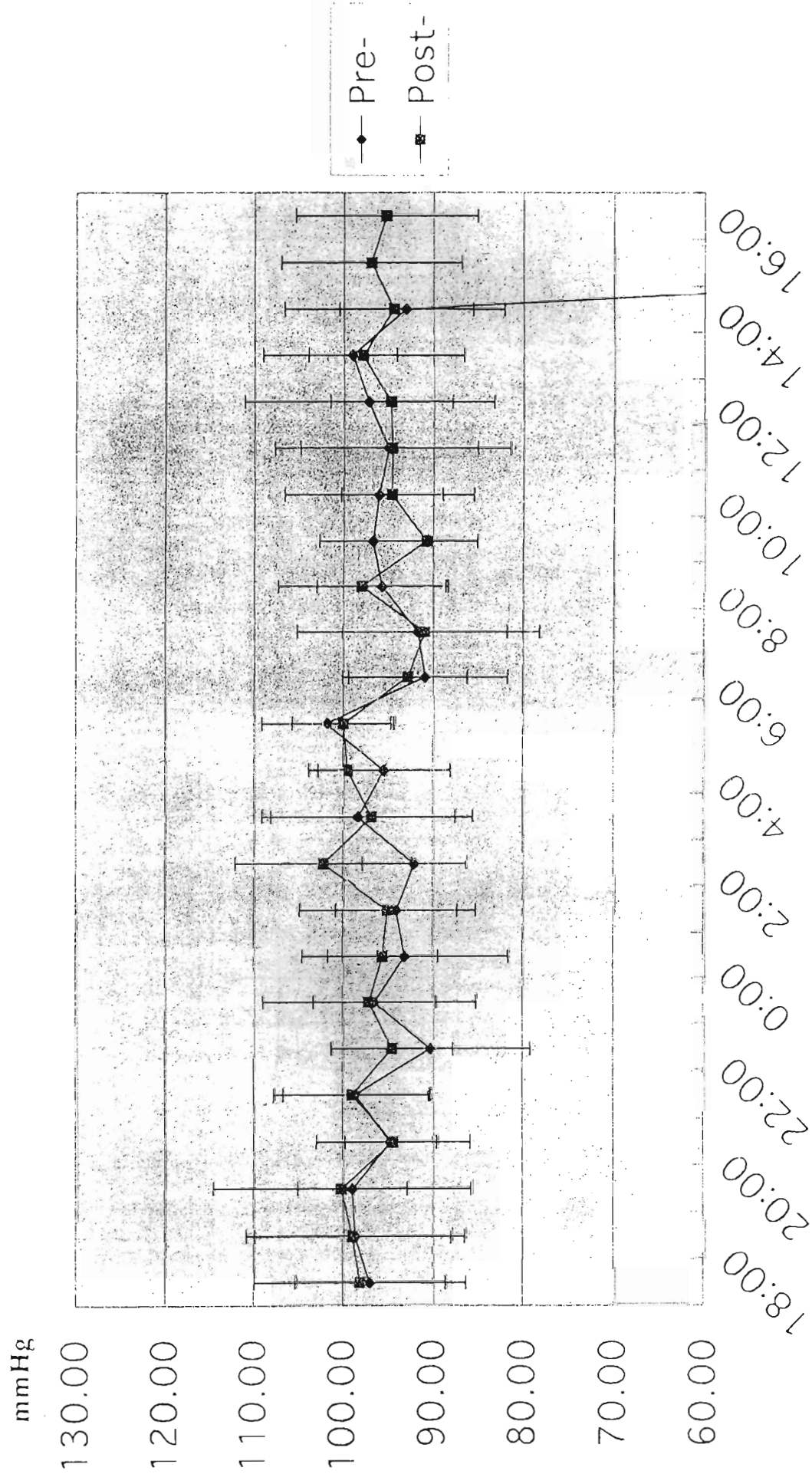


図 20 BP(Dia.) in the E-PM group (Exp.3)

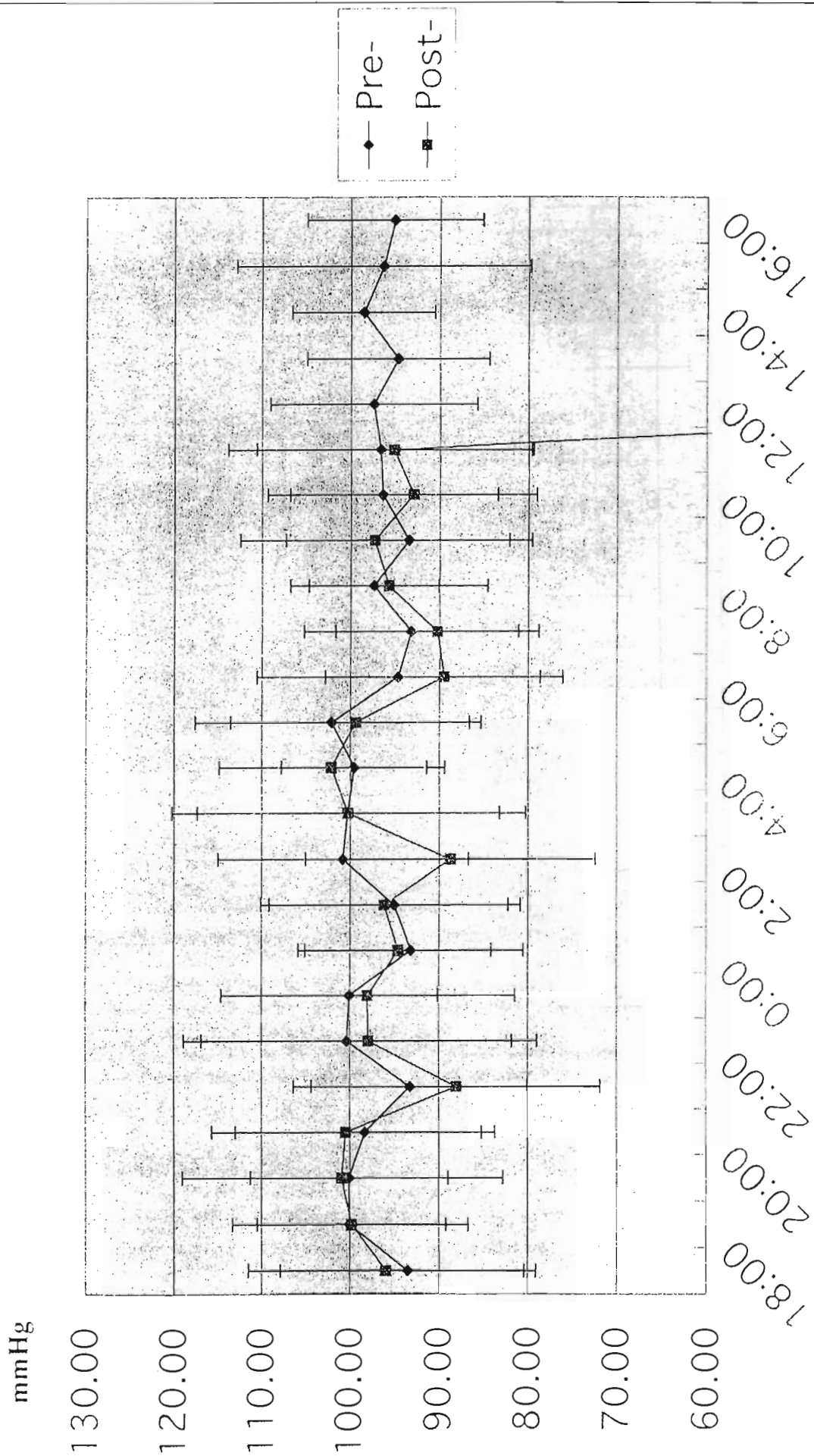


图 21 LF/RF in the Control group

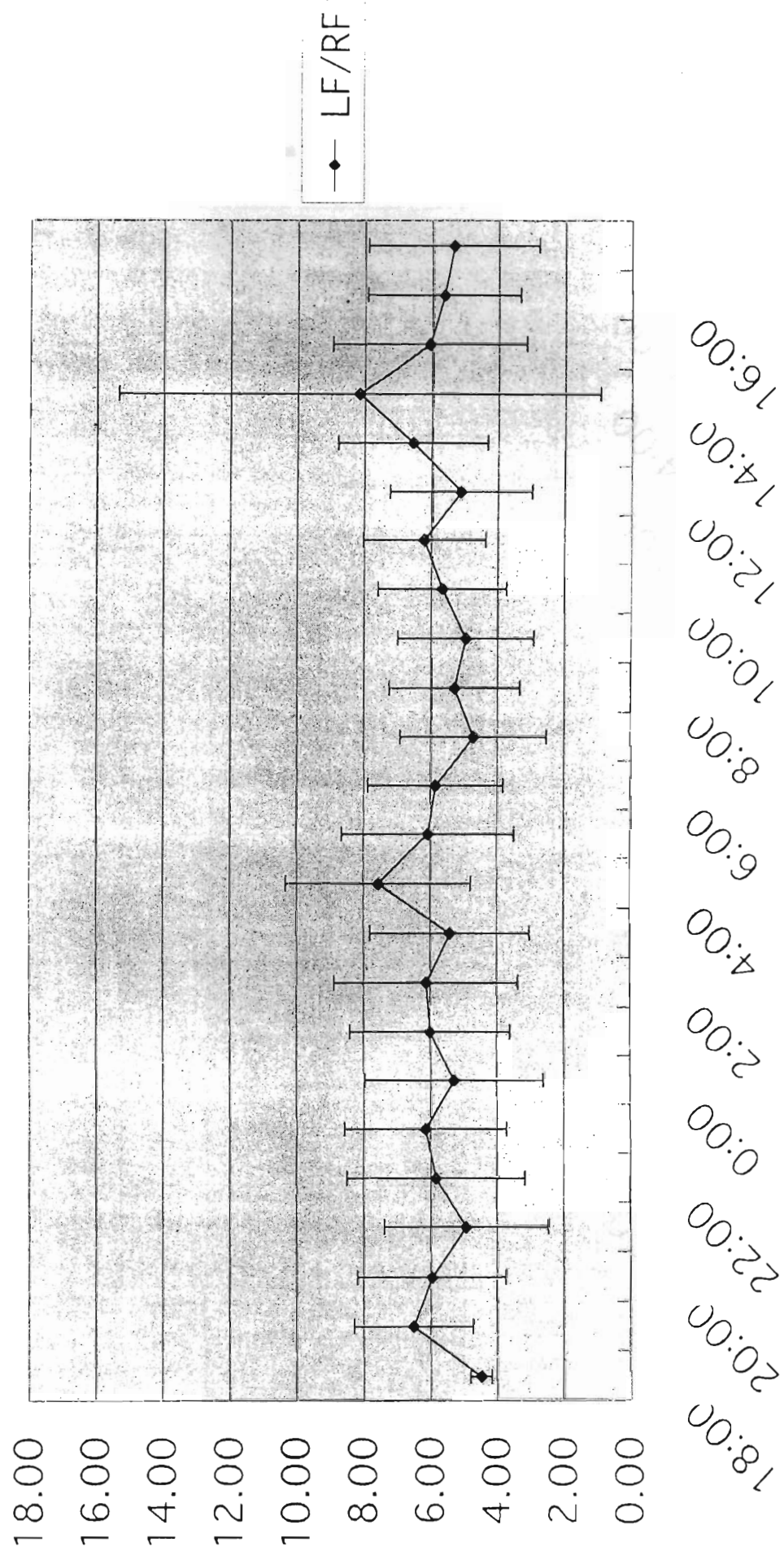


图 22 LF/HF in the E-DEP group (Exp.2)

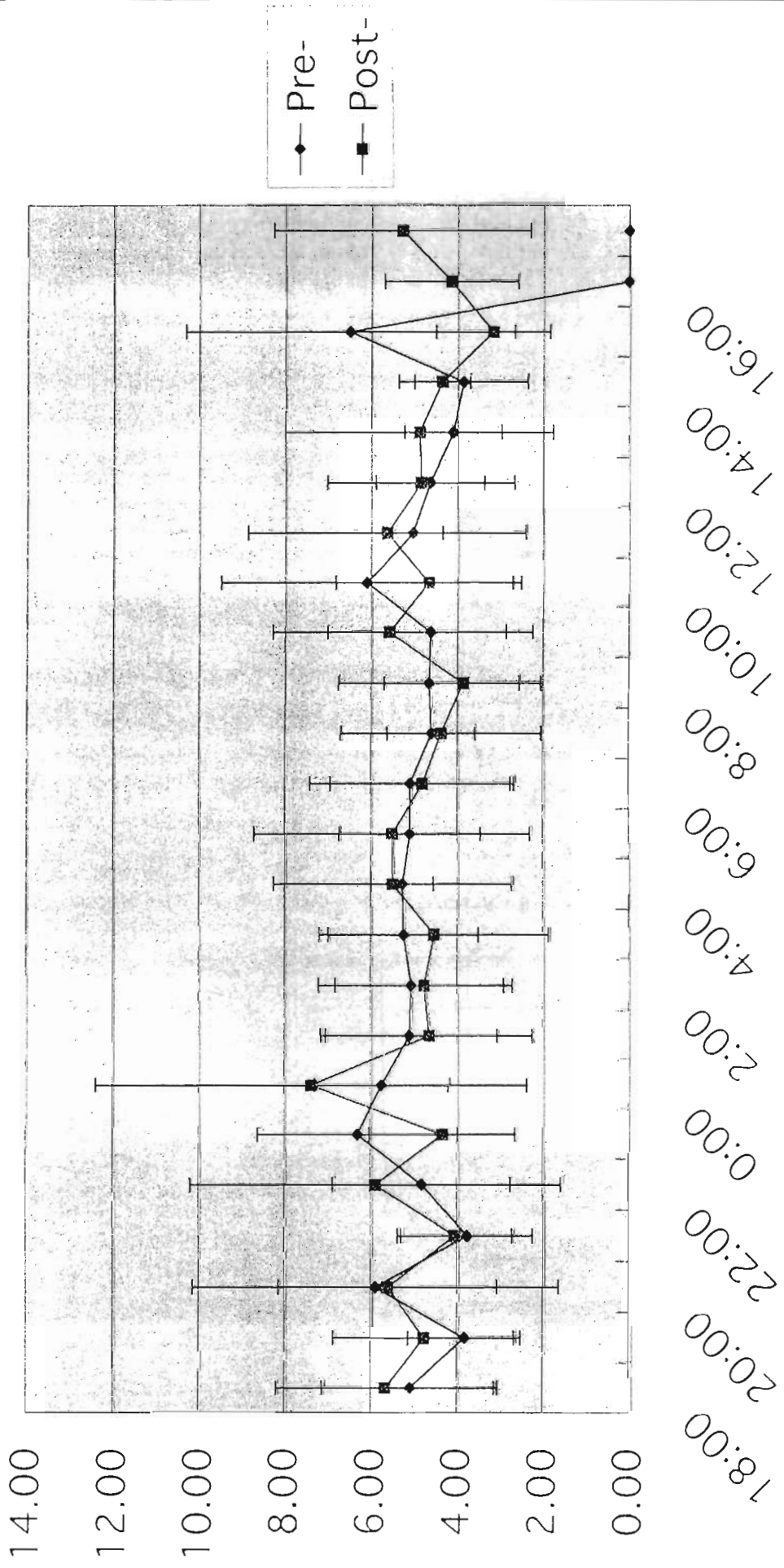


图 23 LF/HF in the E-DEP group (Exp.3)

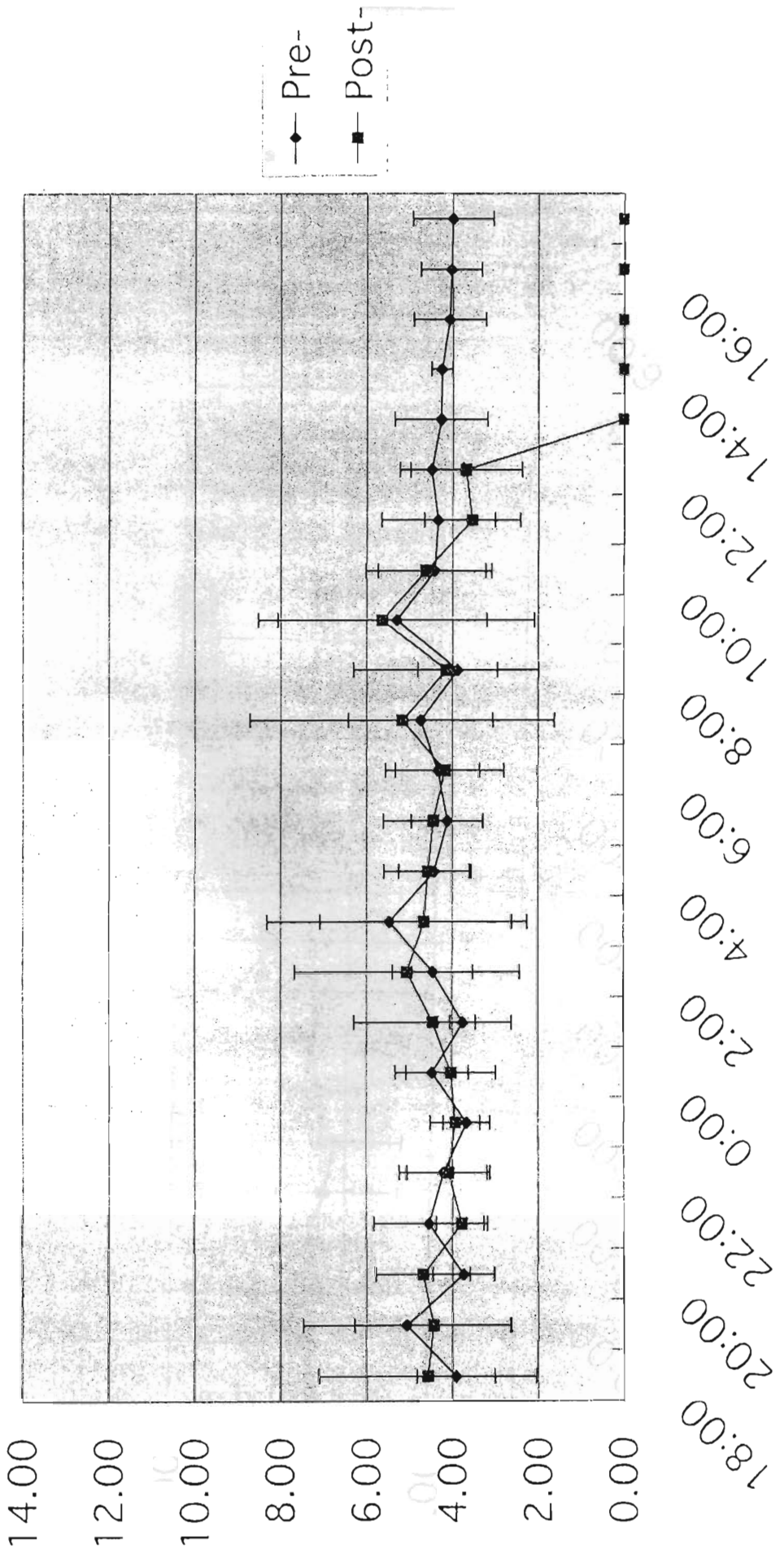


图 24 LF/HF in the E-PM group (Exp.2)

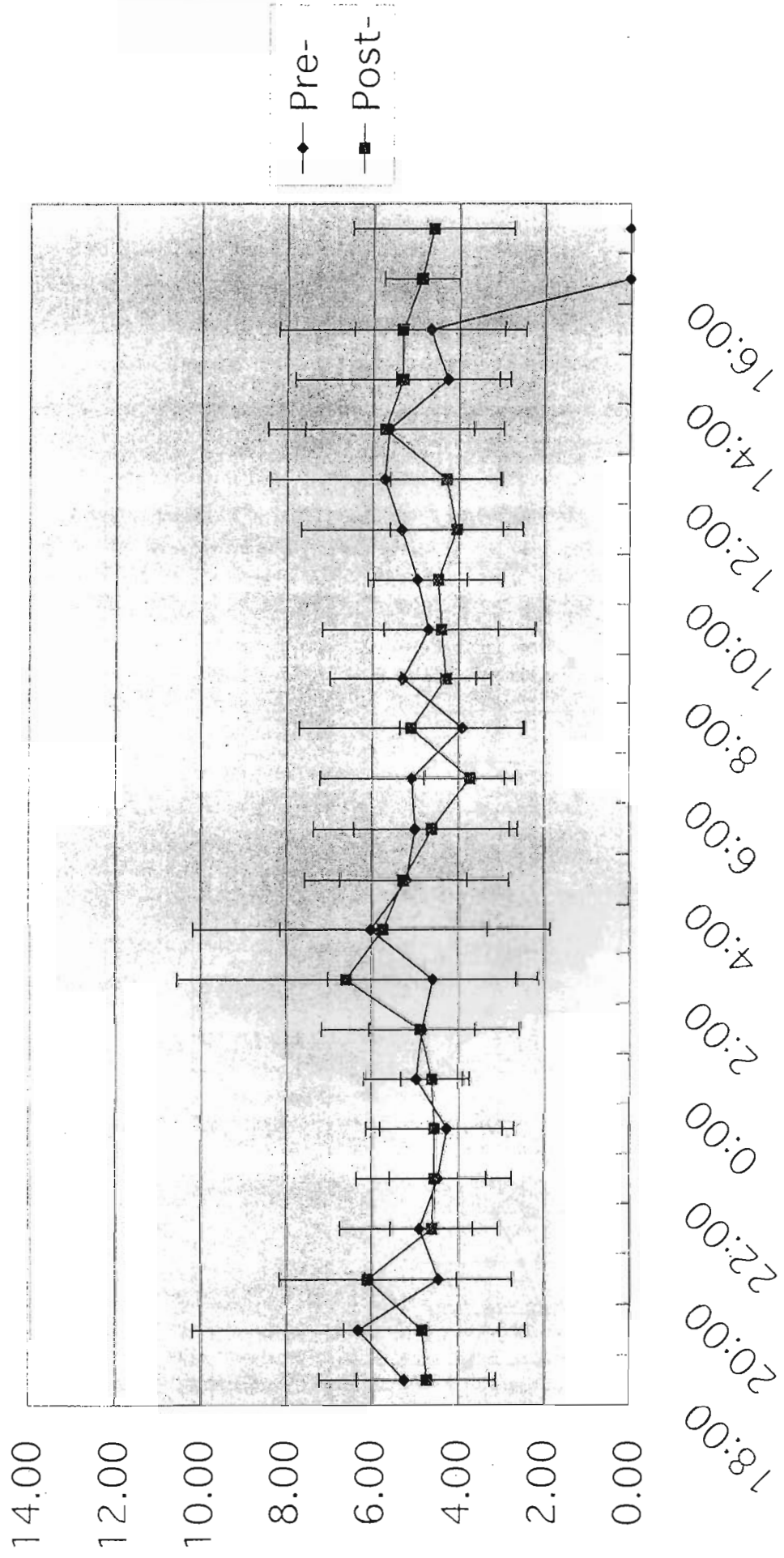


图 25 LF/HF in the E-PM group (Exp.3)

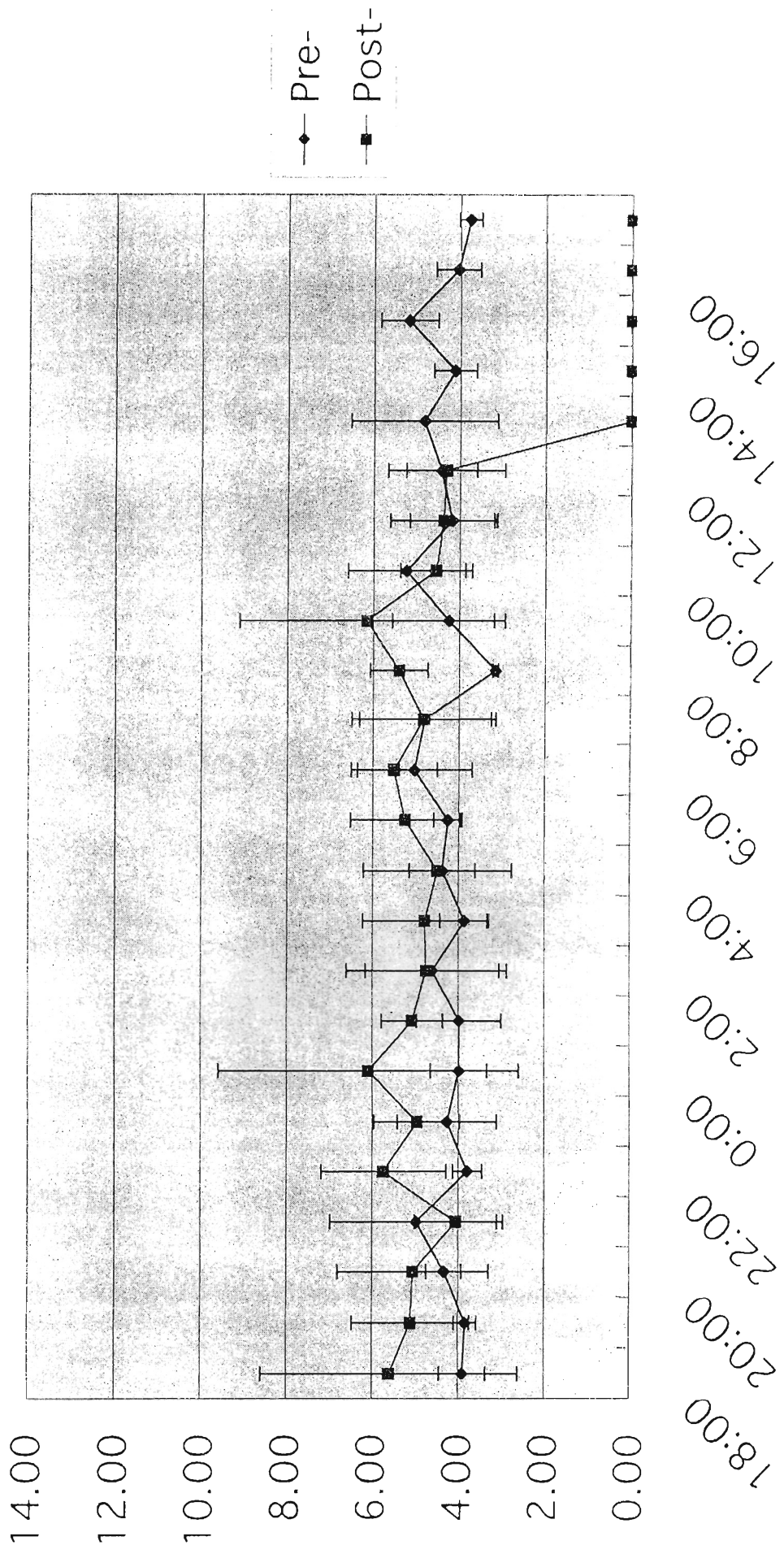


图 26 HF in the Control group

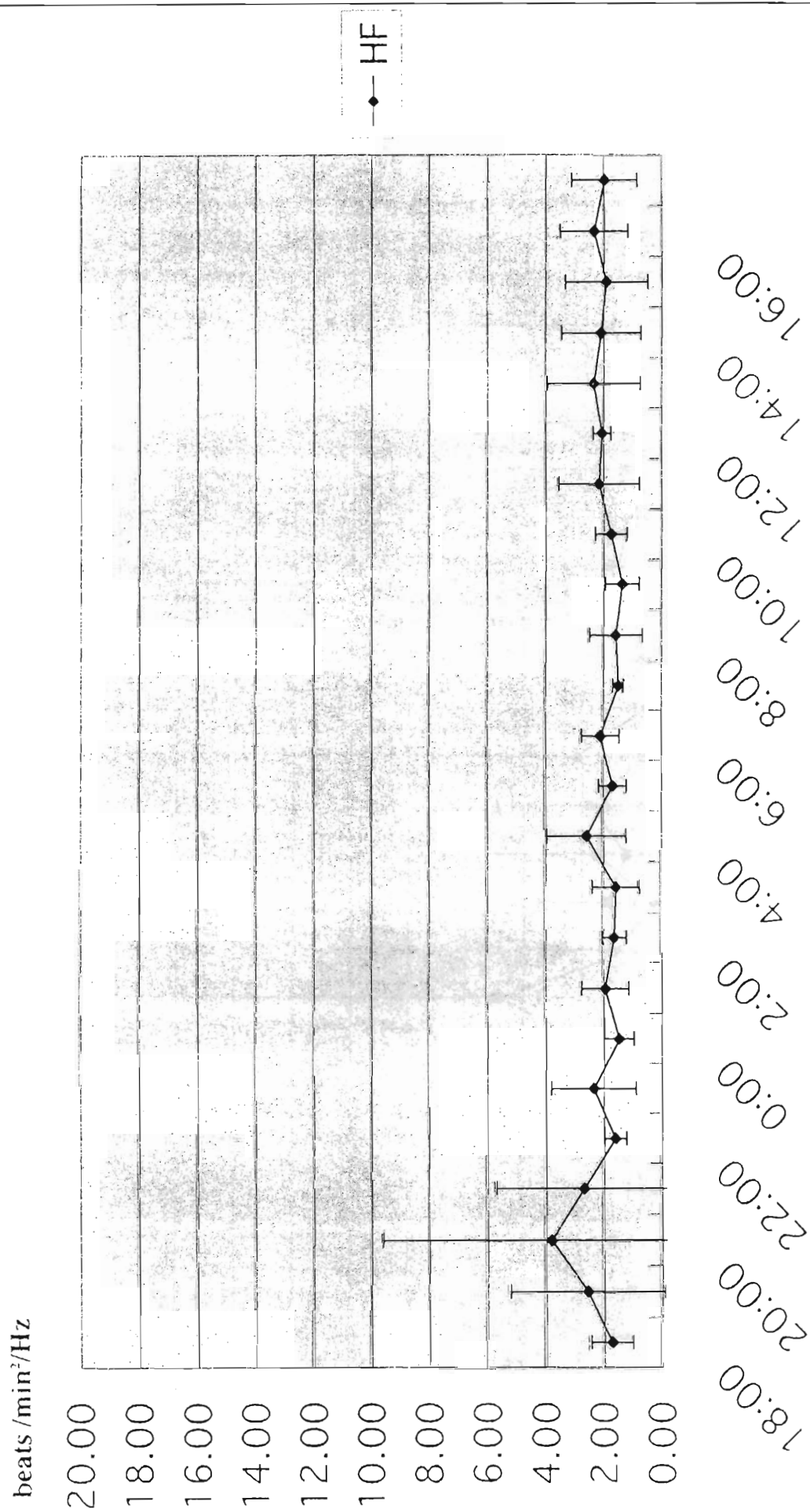


图 27 HF in the E-DEP group (Exp.2)

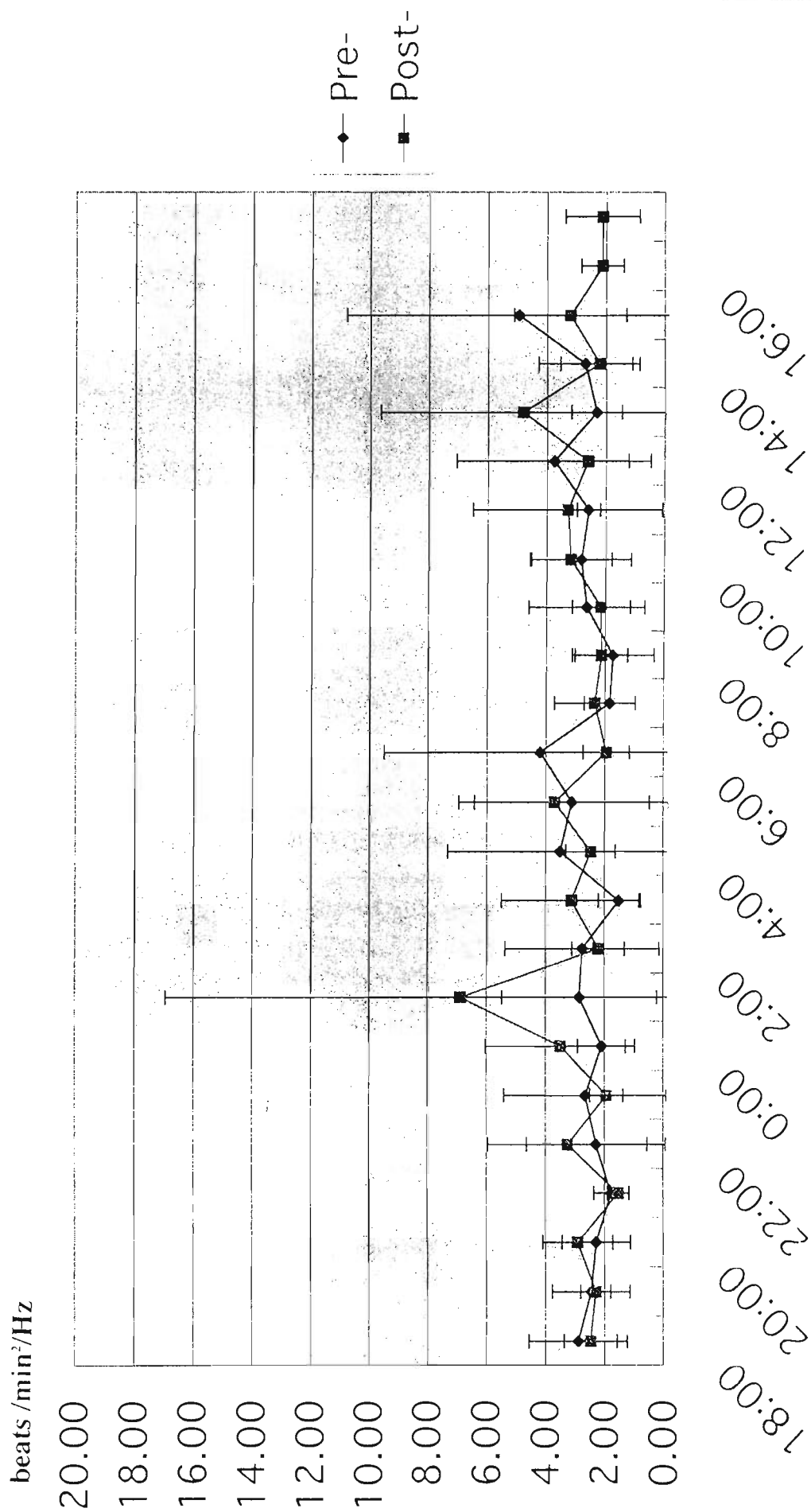


图 28 HF in the E-DEP group (Exp.3)

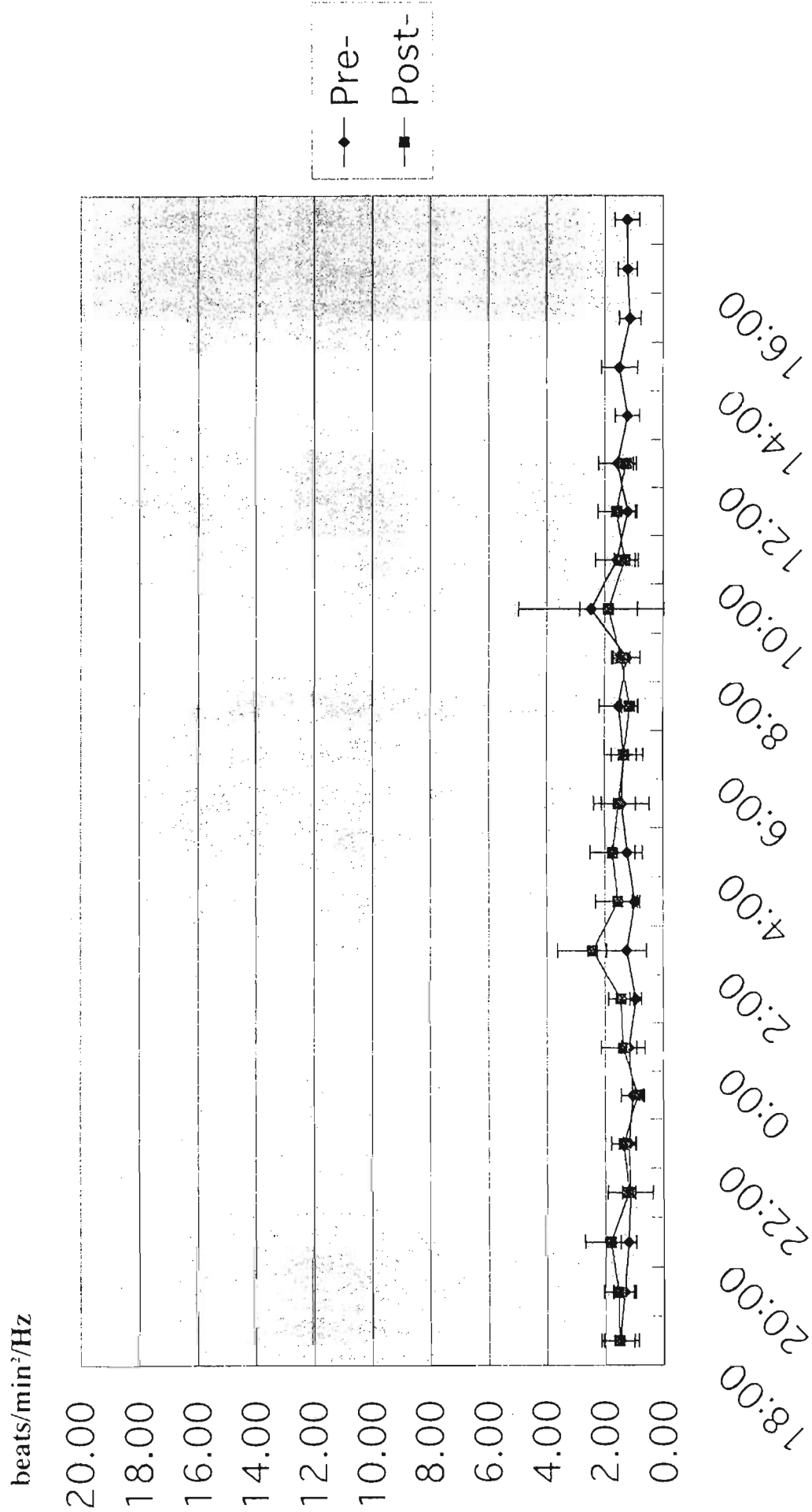


图 29 HF in the E-PM group (Exp.2)

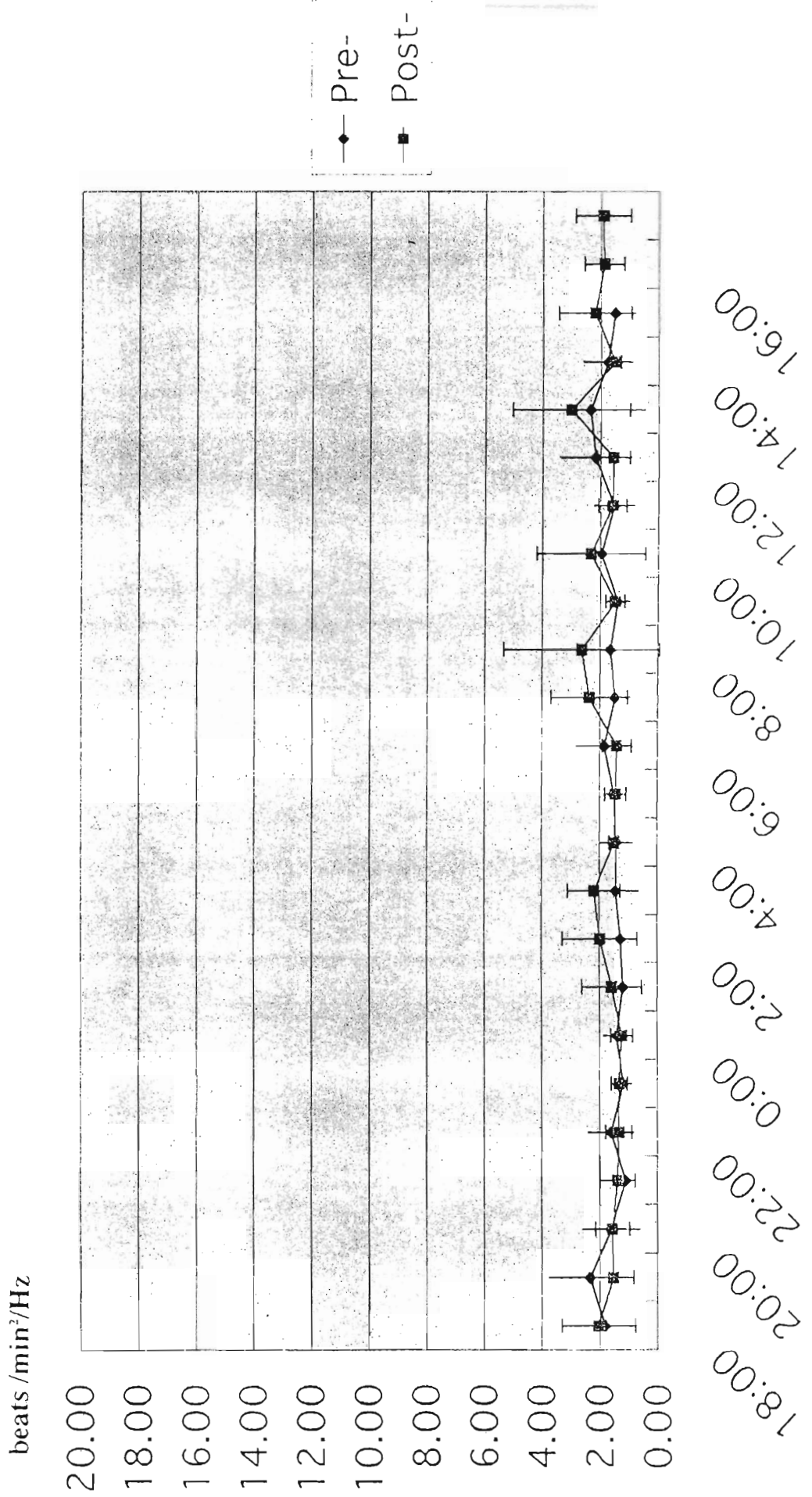


Figure 30 HF in the E-PM group (Exp.3)

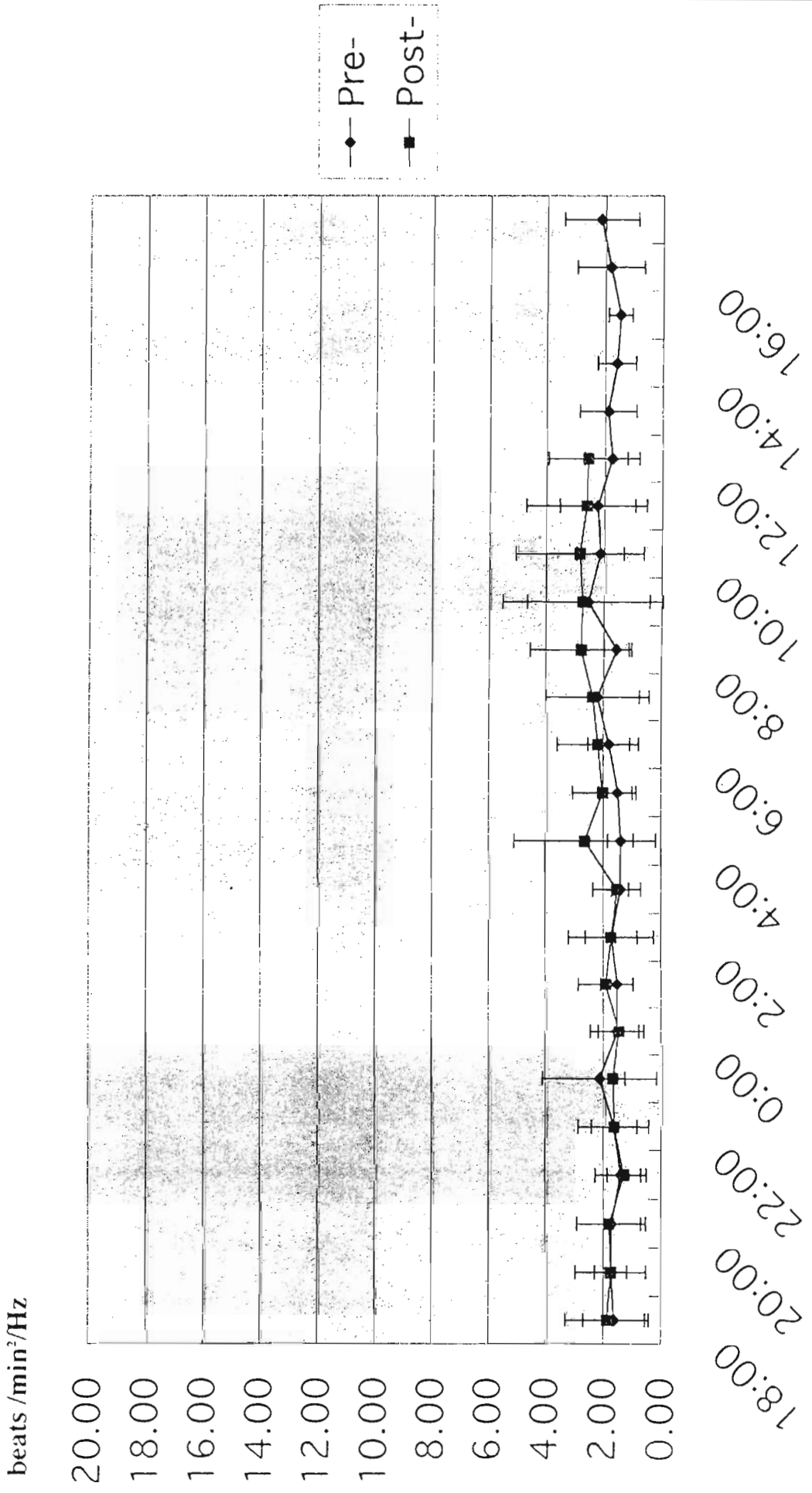


图 31 LF in the Control group

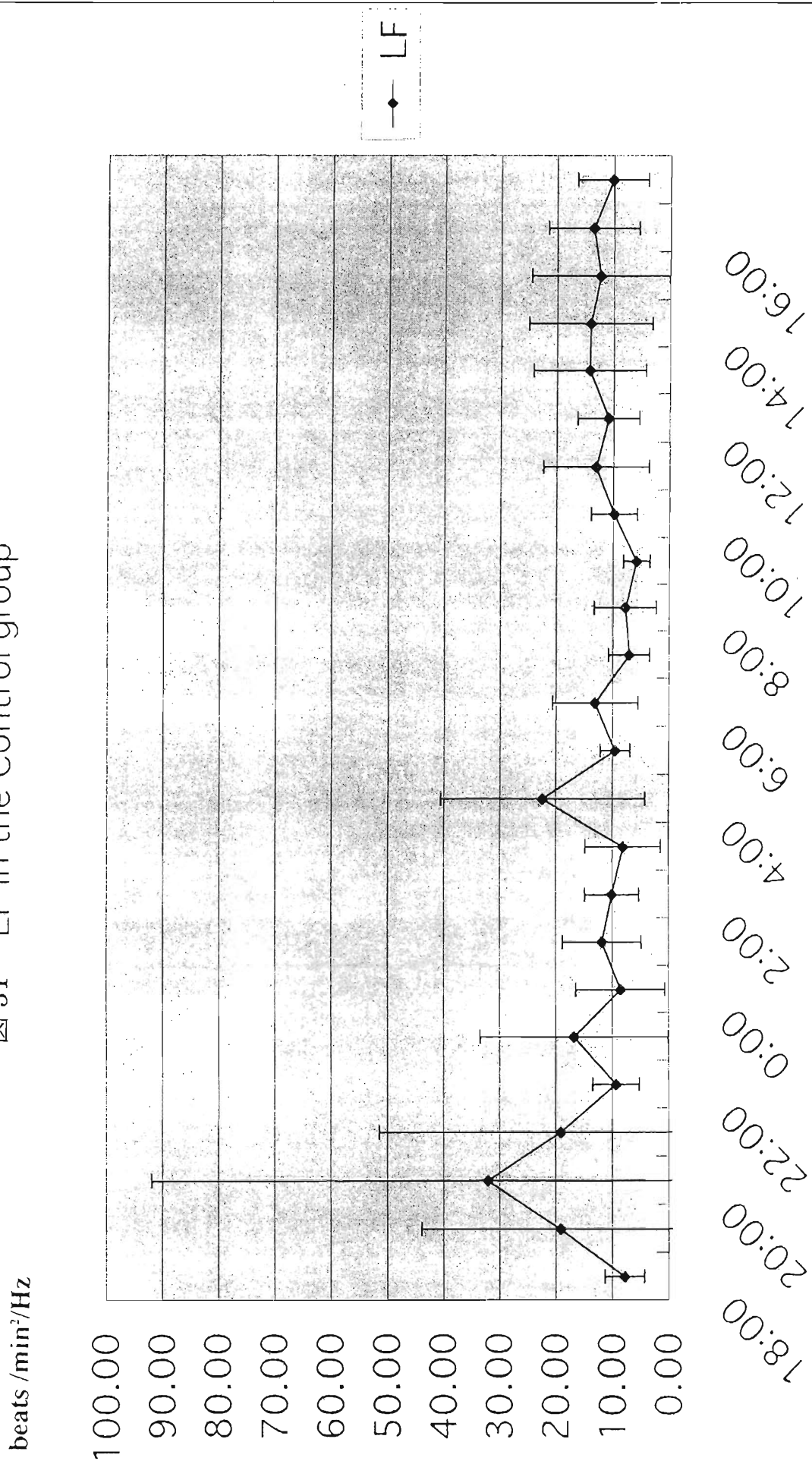


Figure 32 LF in the E-DEP group (Exp.2)

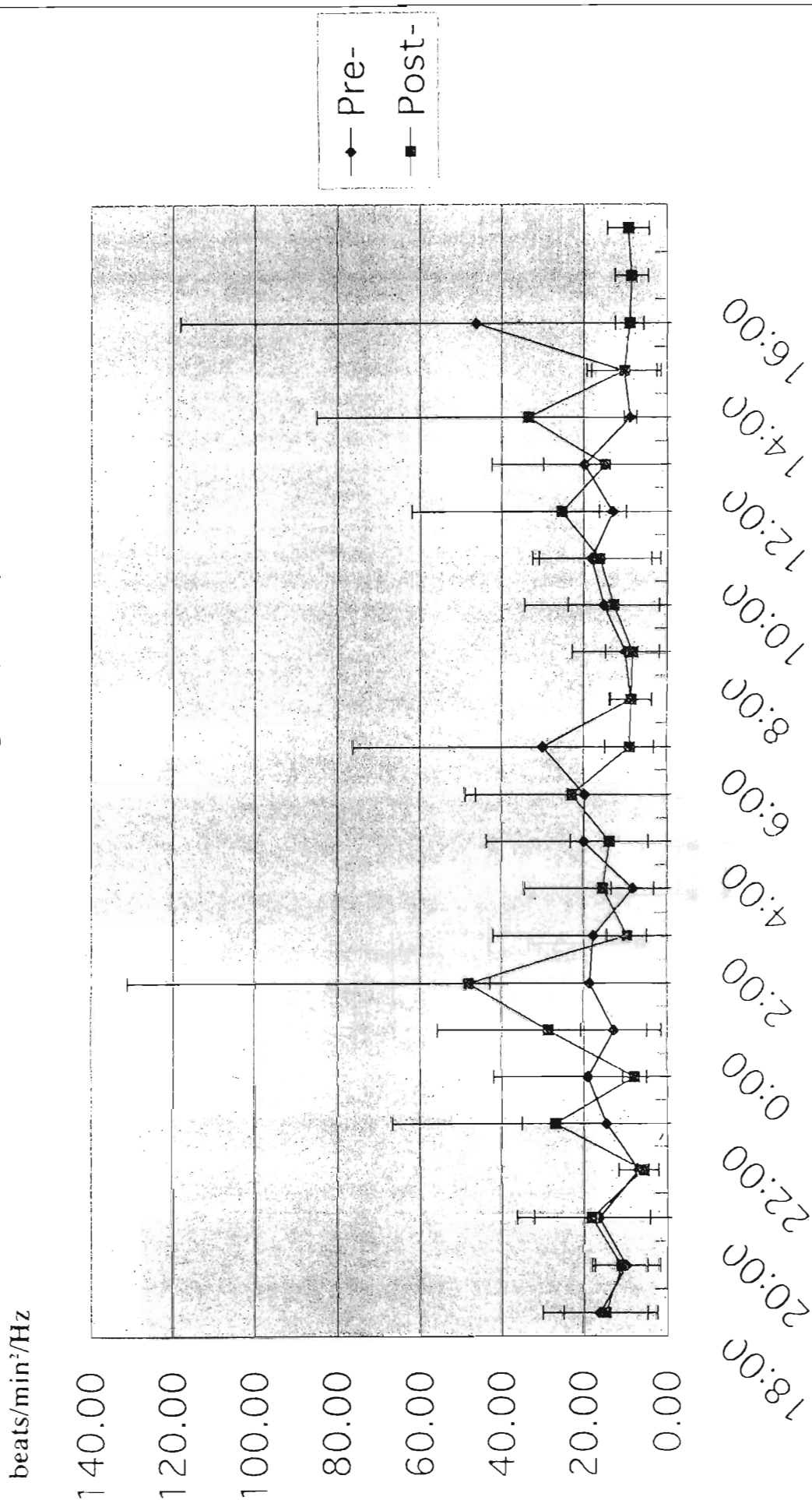


图 33 LF in the E-DEP group (Exp.3)

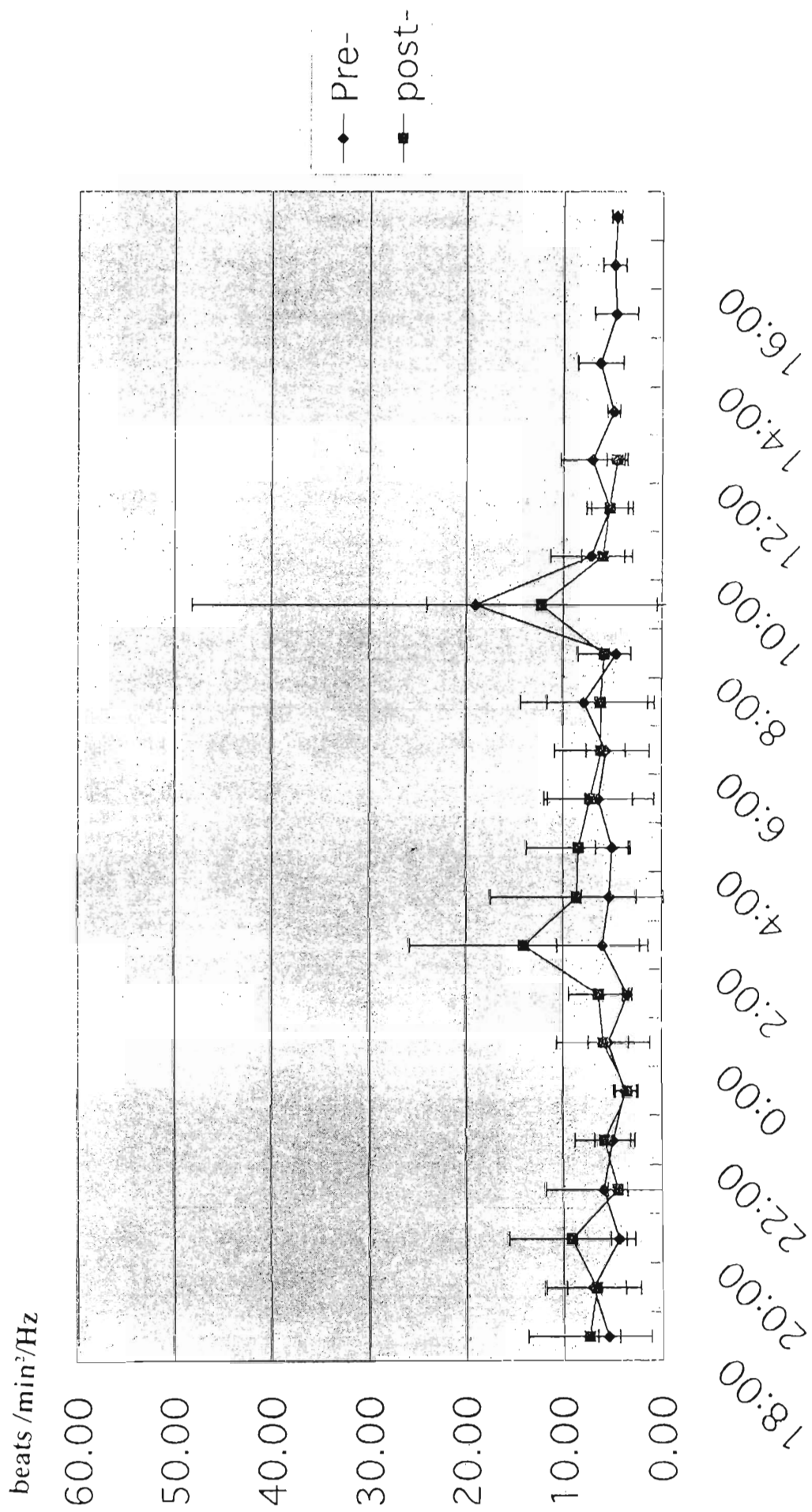


Figure 34 LF in the E-PM group (Exp.2)

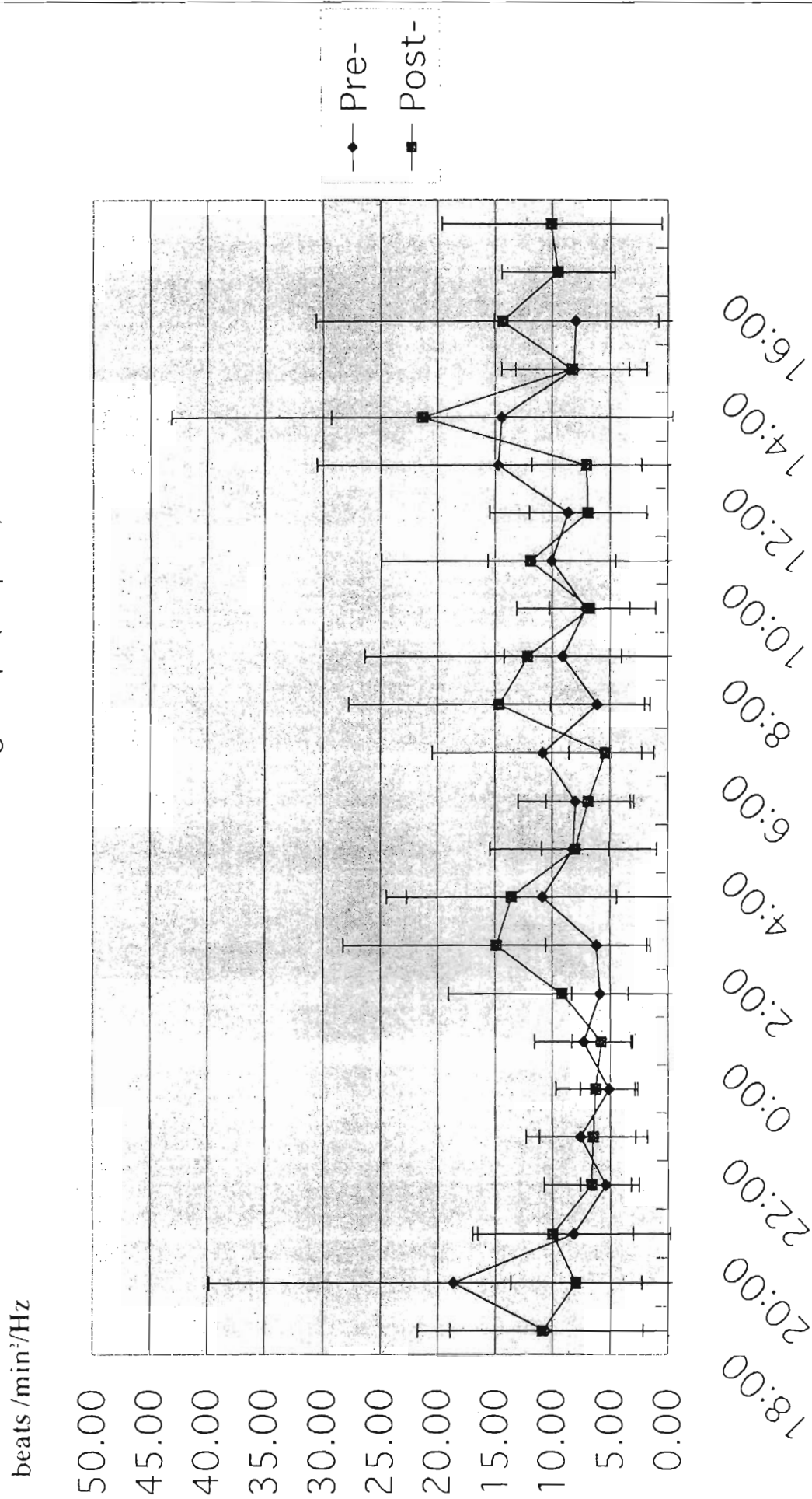


图 35 LF in the E-PM group (Exp.3)

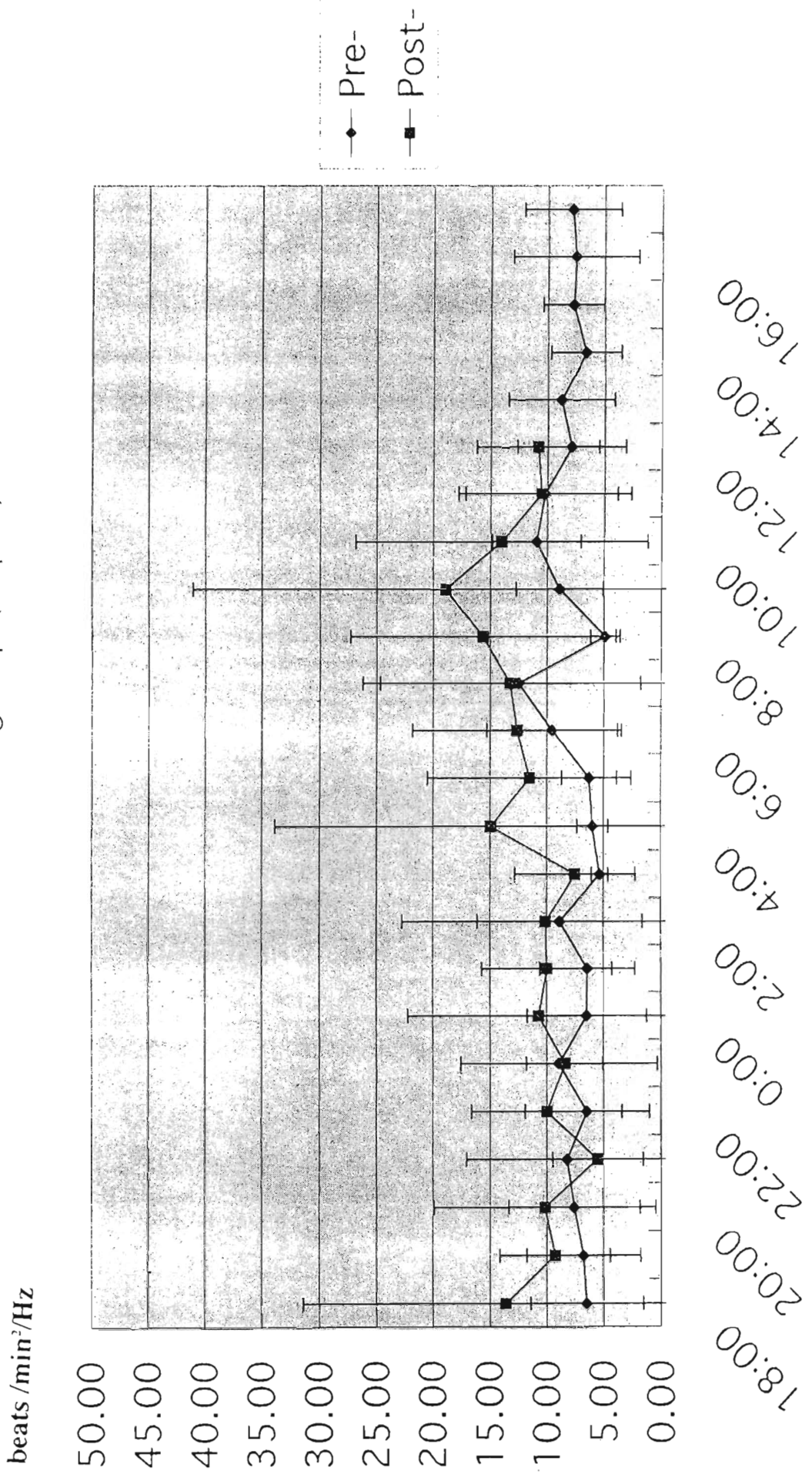


图 36 R-R Int. in the Control group

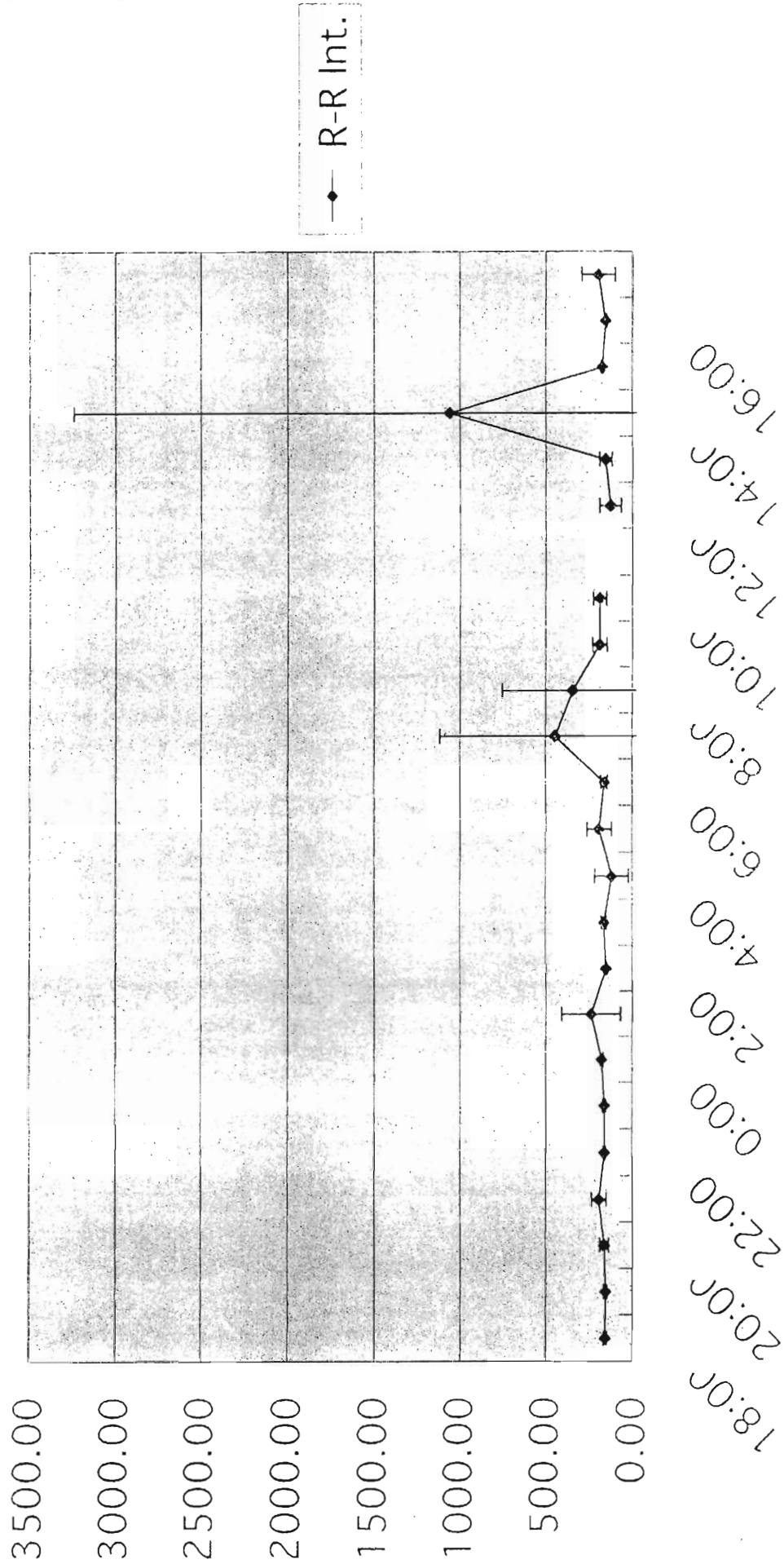


Figure 37 R-R Int. in the E-DEP group (Exp.2)

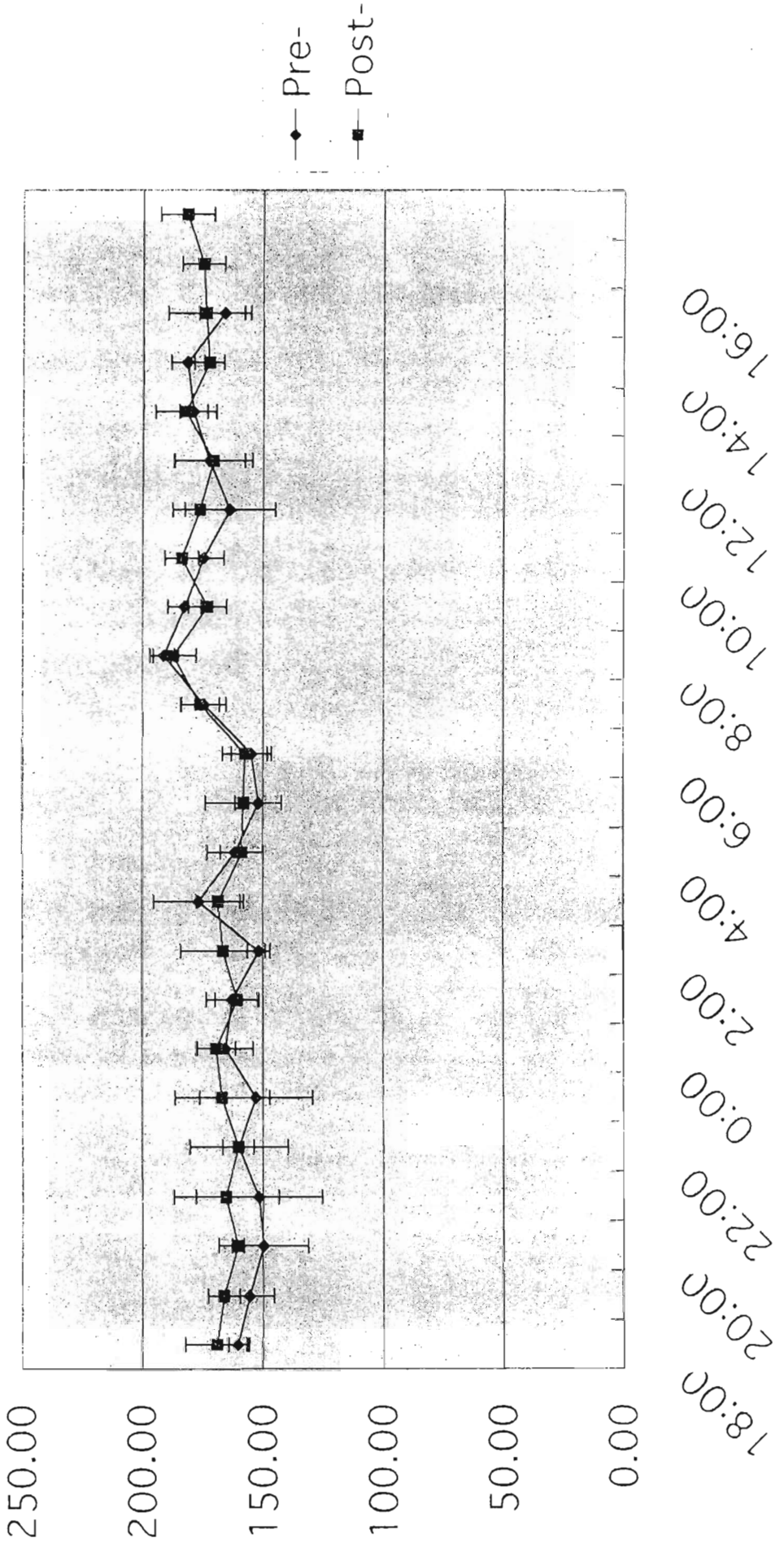


图 38 R-R Int. in the E-DEP group (Exp.3)

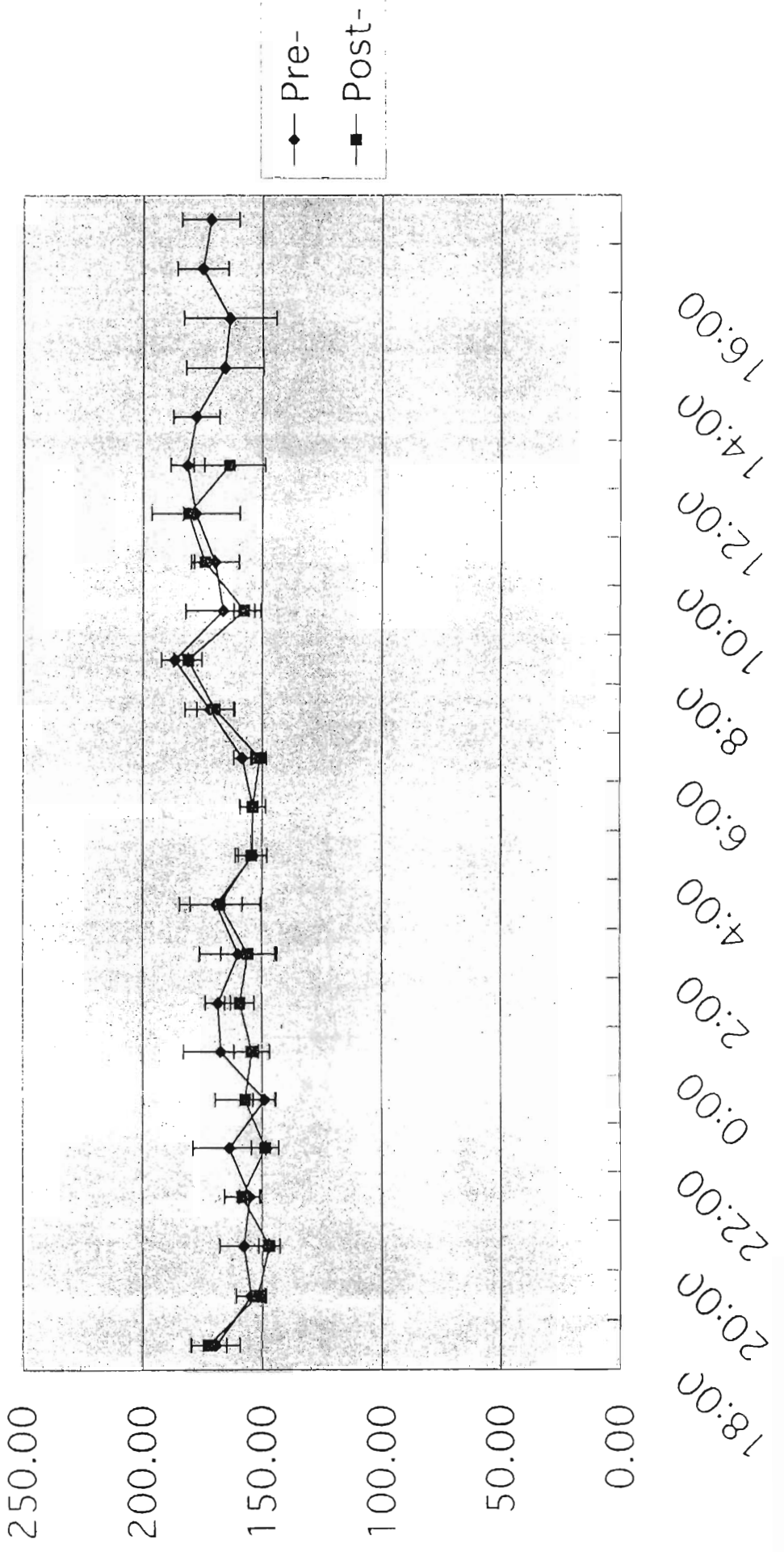


图 39 R-R Int. in the E-PM group (Exp.2)

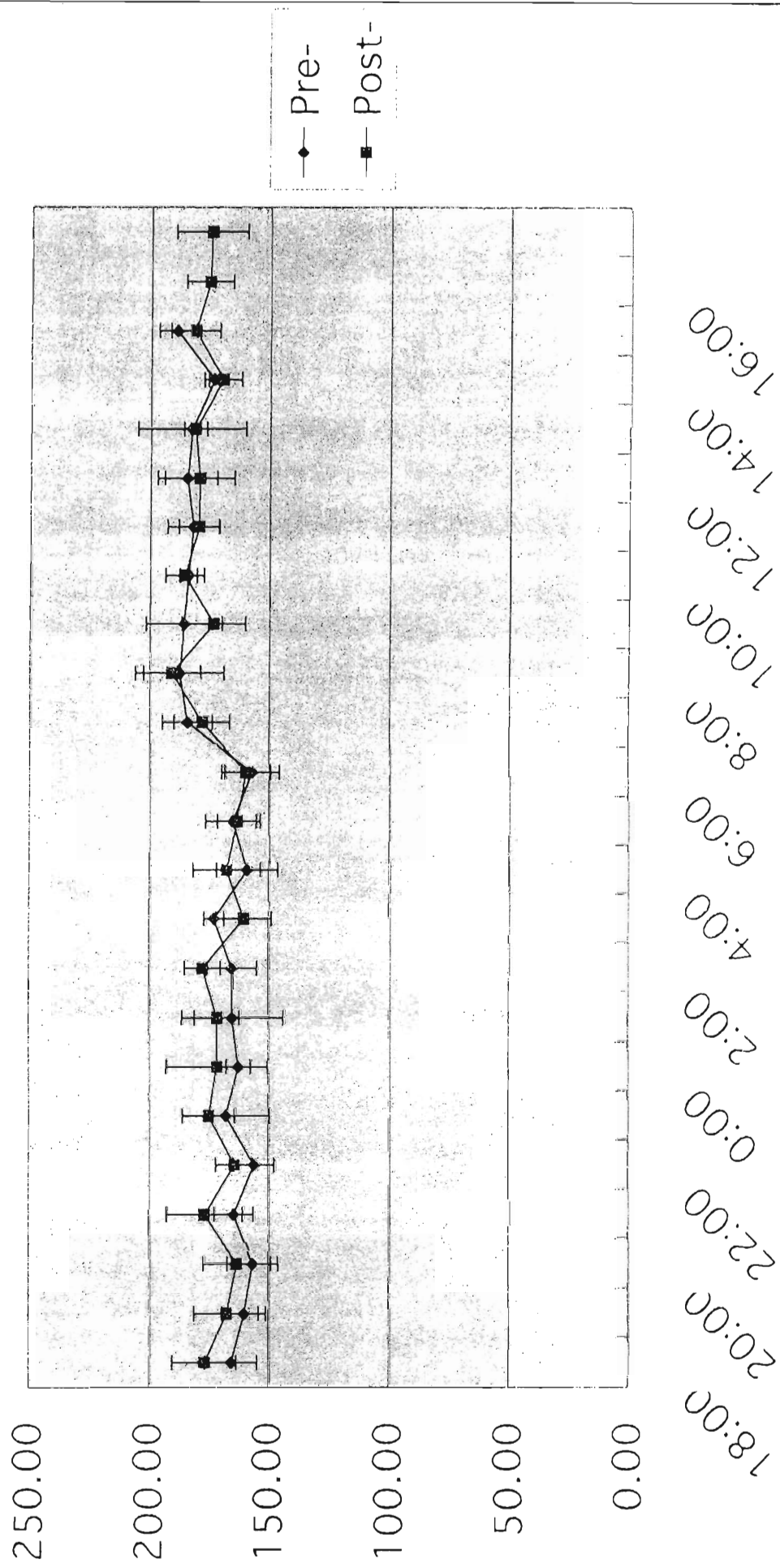


Figure 40 R-R Int. in the E-PM group (Exp.3)

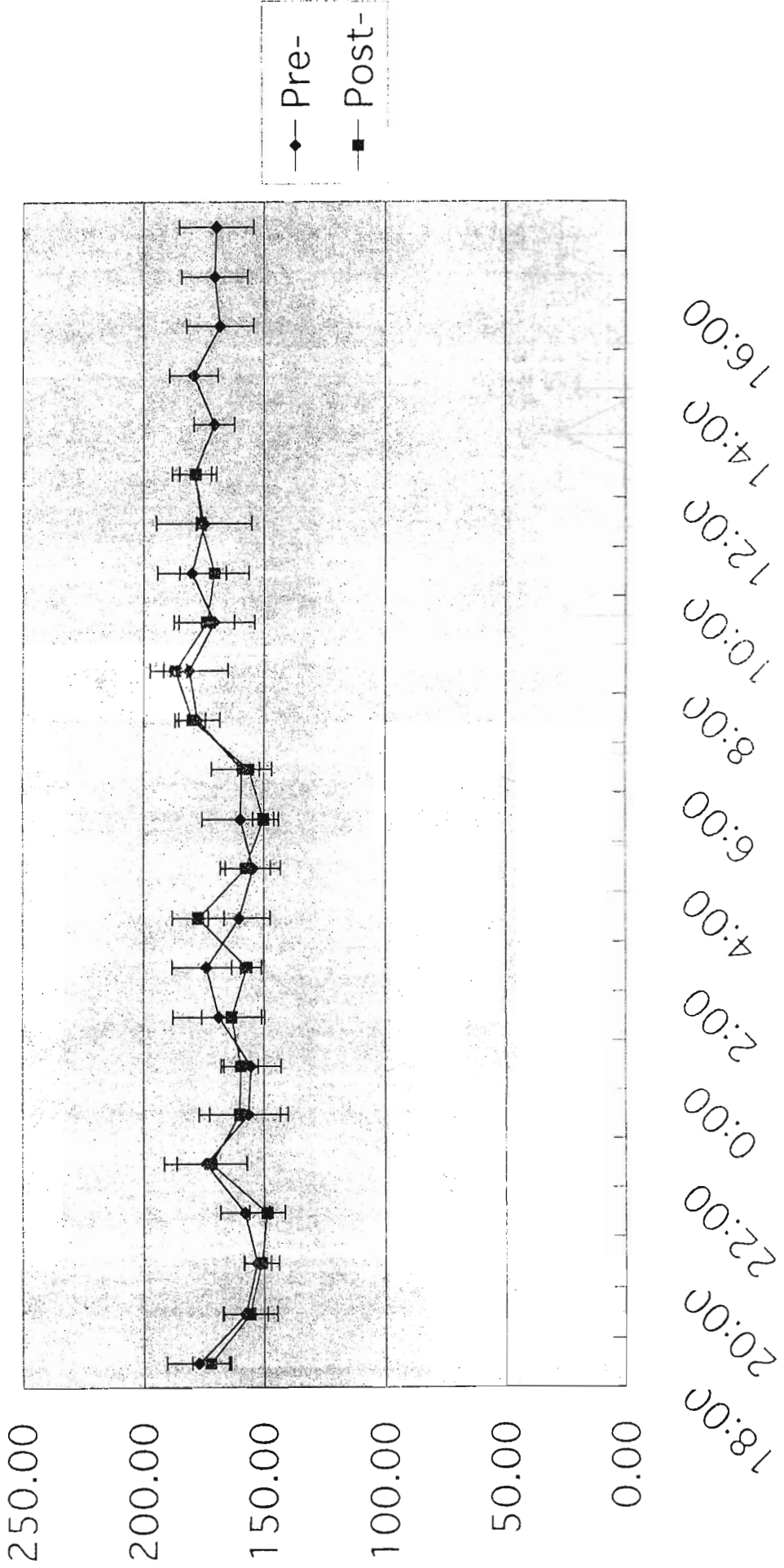


图 41 SD of R-R Interval in the control group

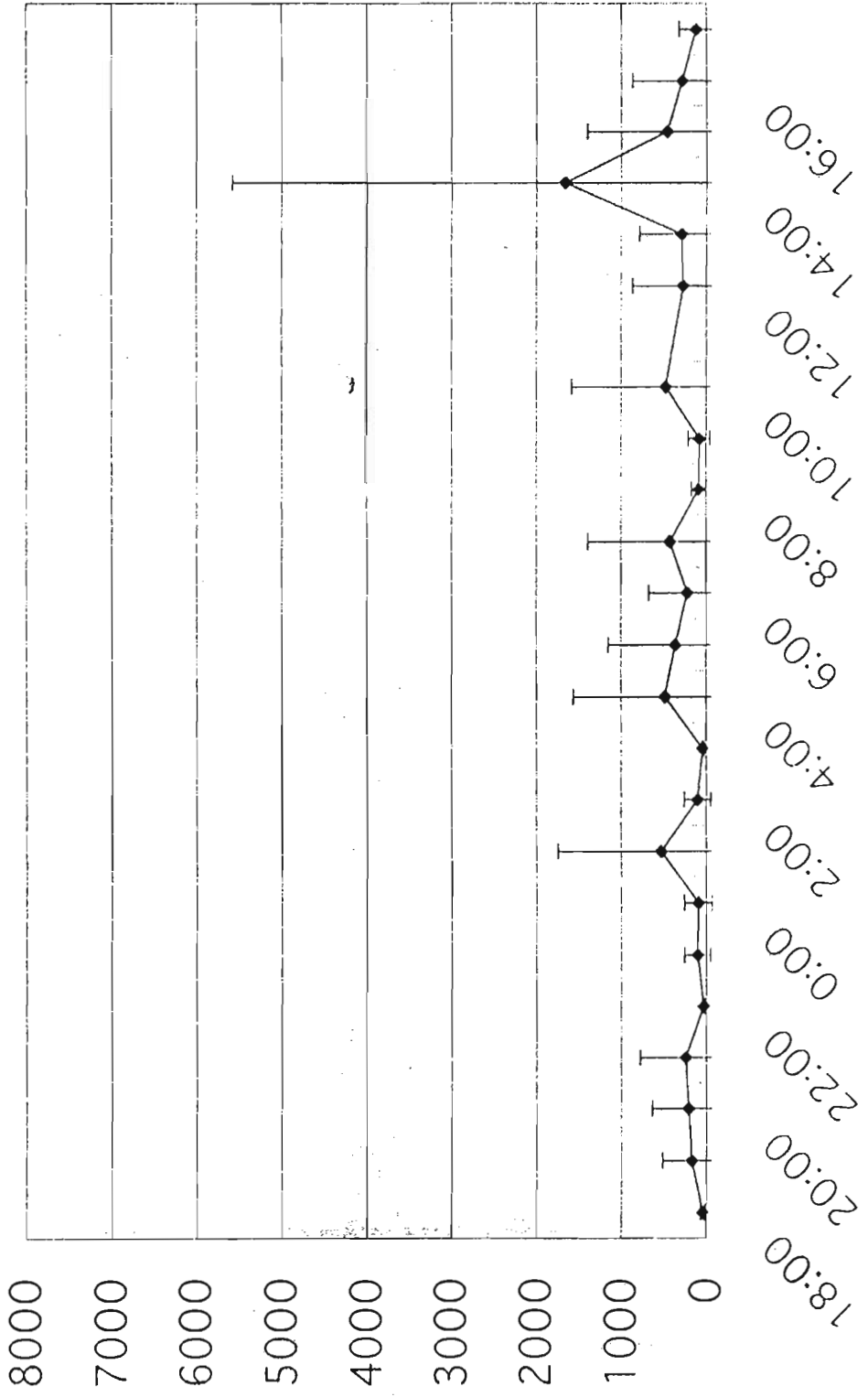


图 42 SD of R-R Interval in the E-DEP group (Exp.2, n=4)

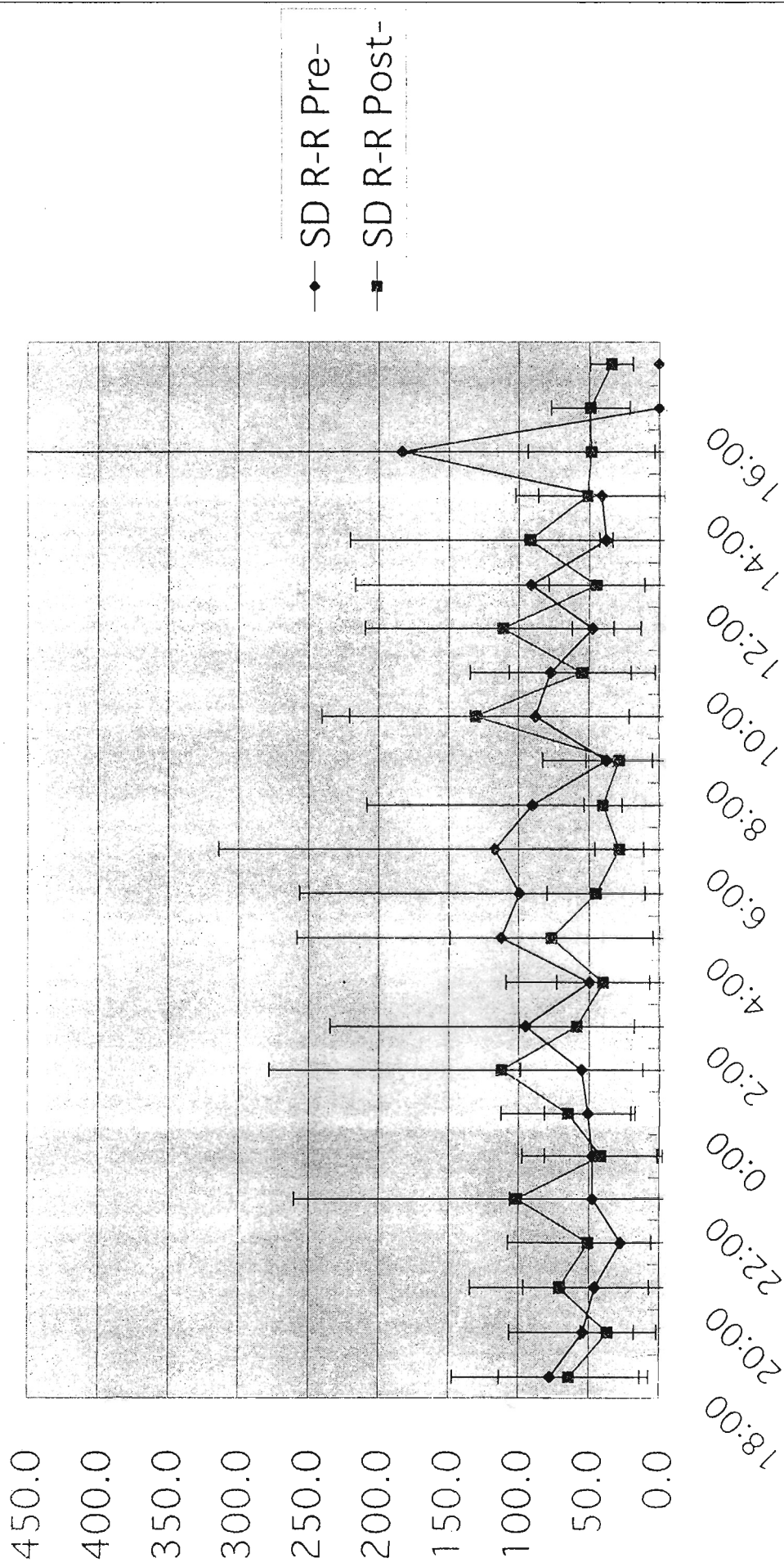


图 43 SD of R-R Interval in the E-DEP group (Exp.3, n=4)

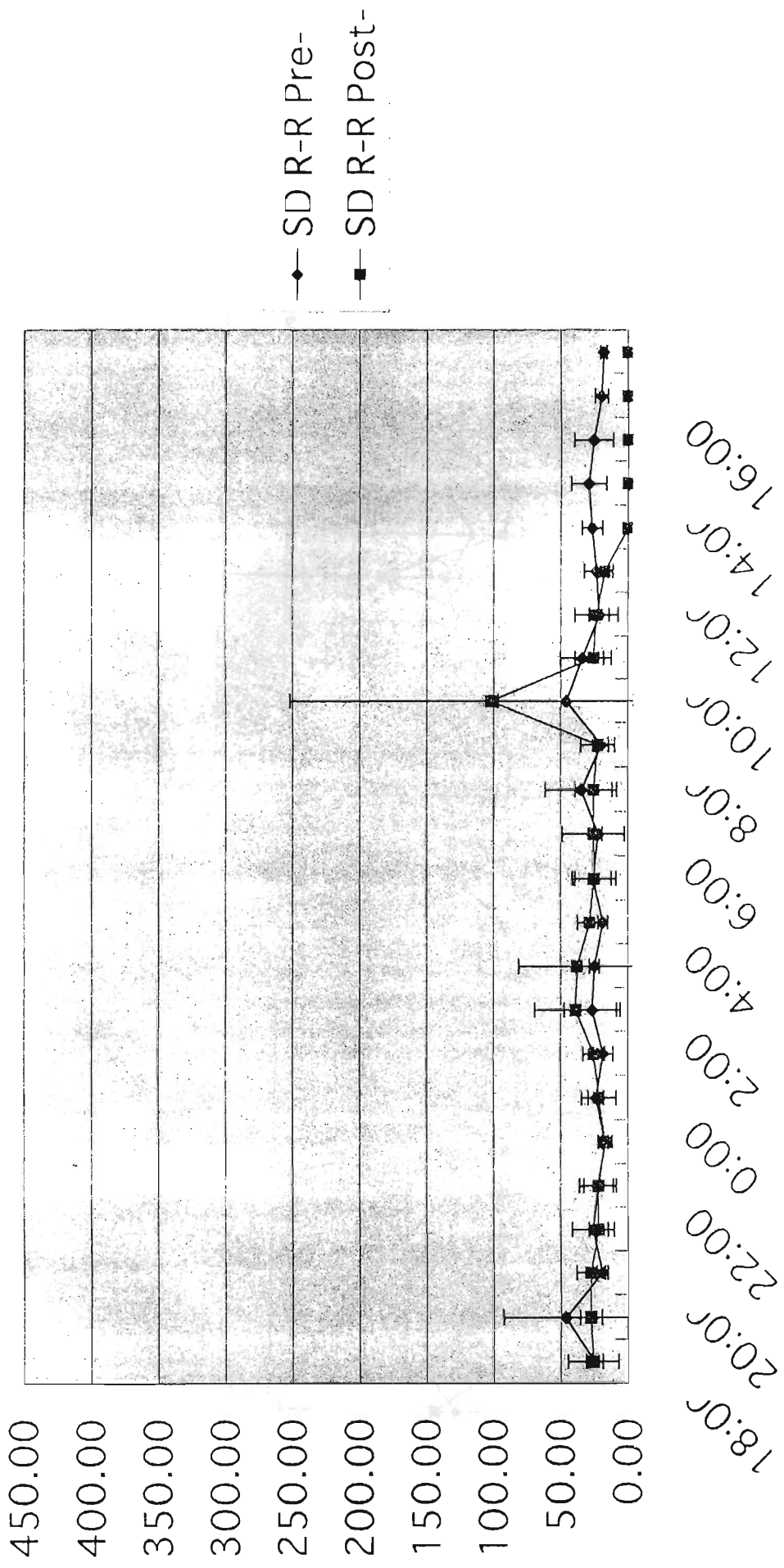


图 44 SD of R-R Interval in the E-PM group (Exp.2, n=4)

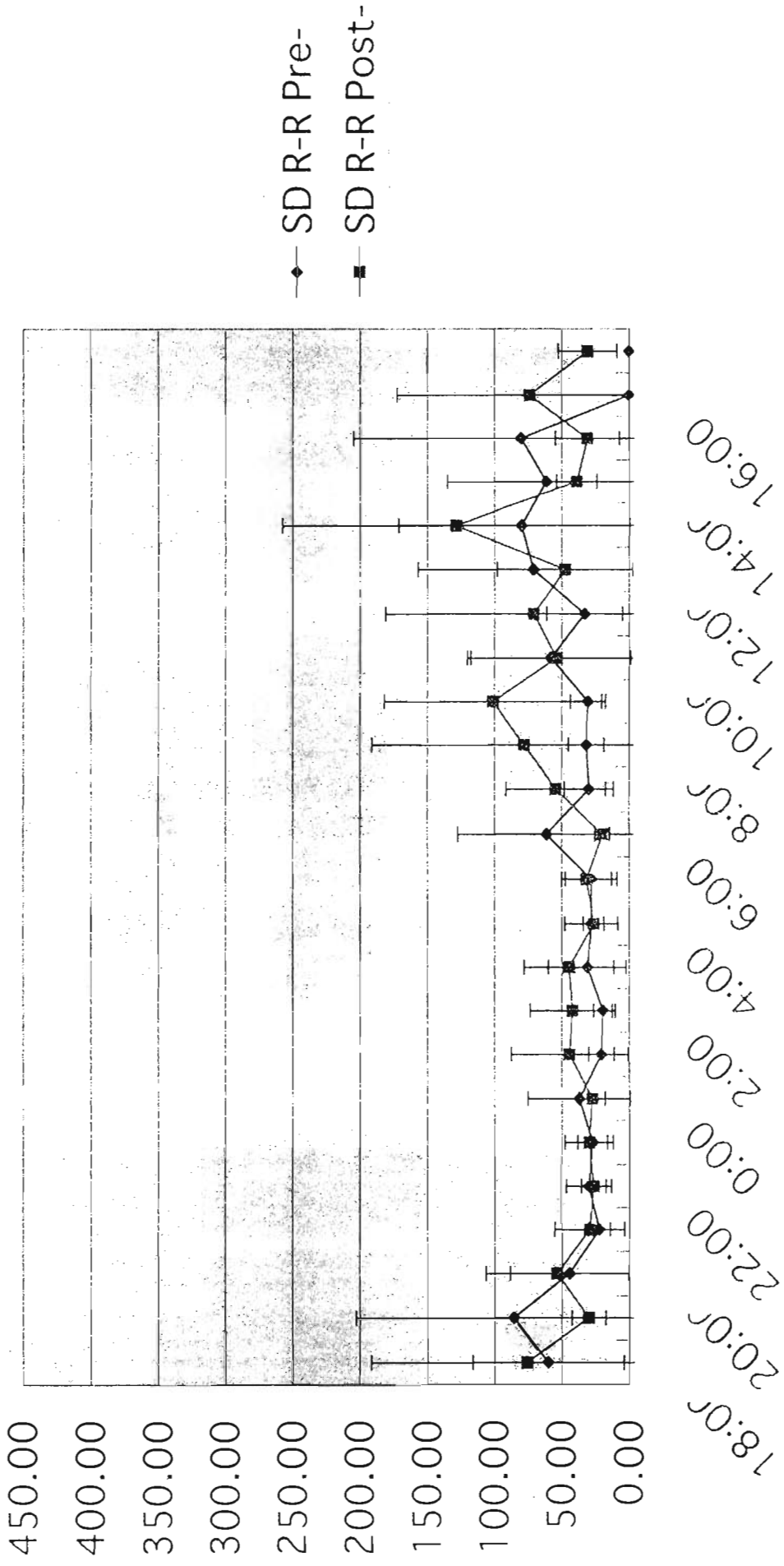
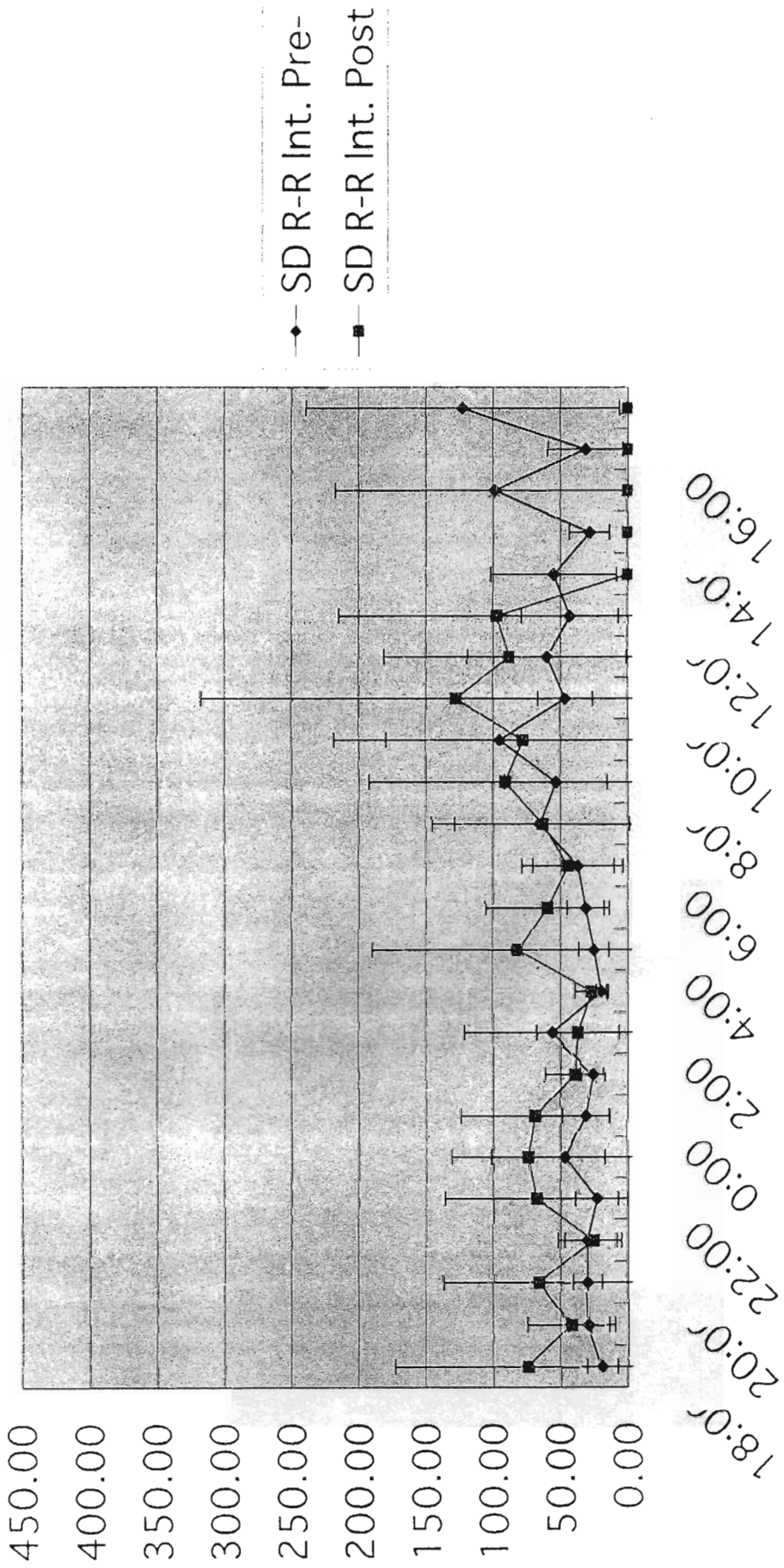
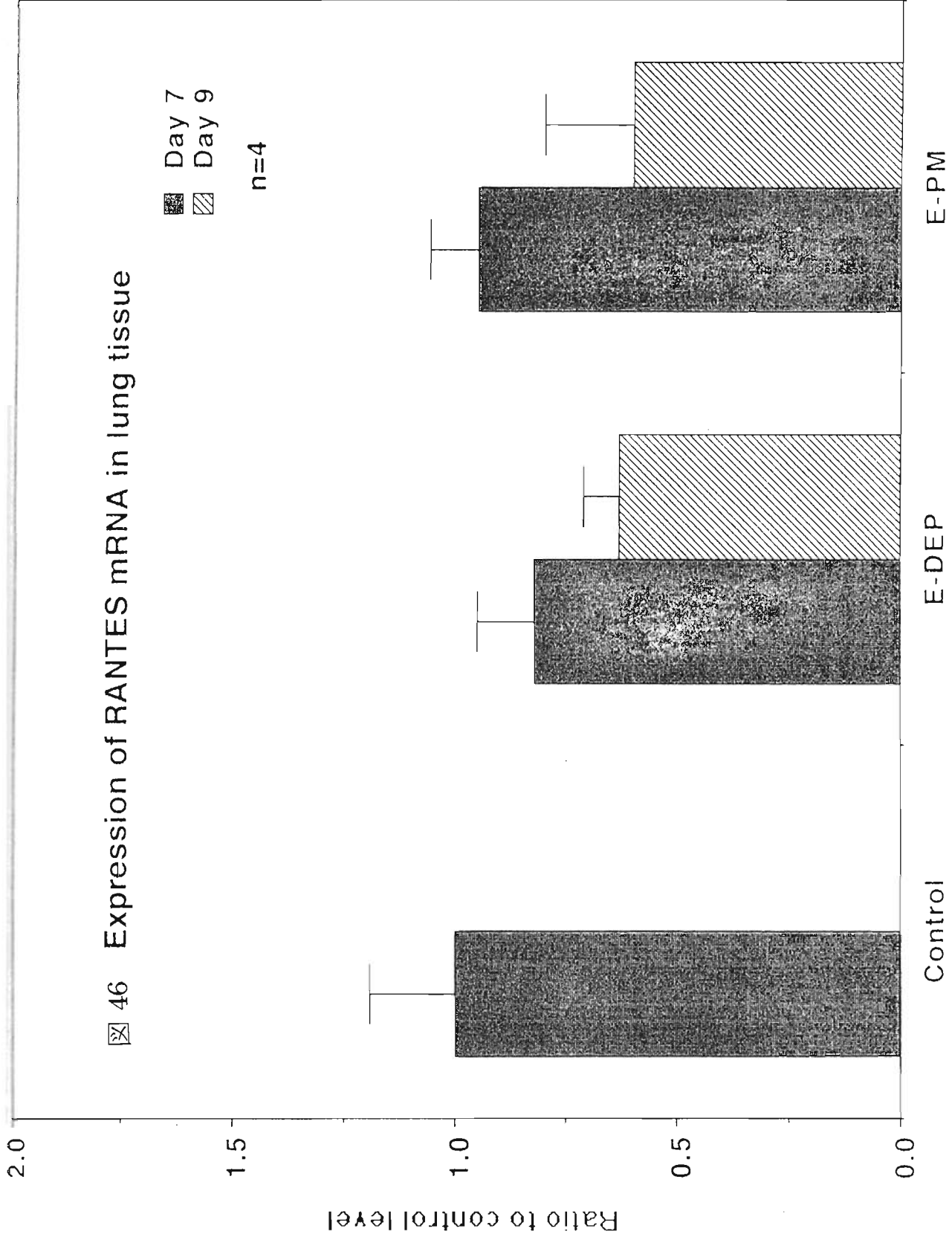


图 45 SD of R-R Interval in the E-PM group (Exp.3, n=4)



46 Expression of RANTES mRNA in lung tissue



Ratio to control level

2

1

0

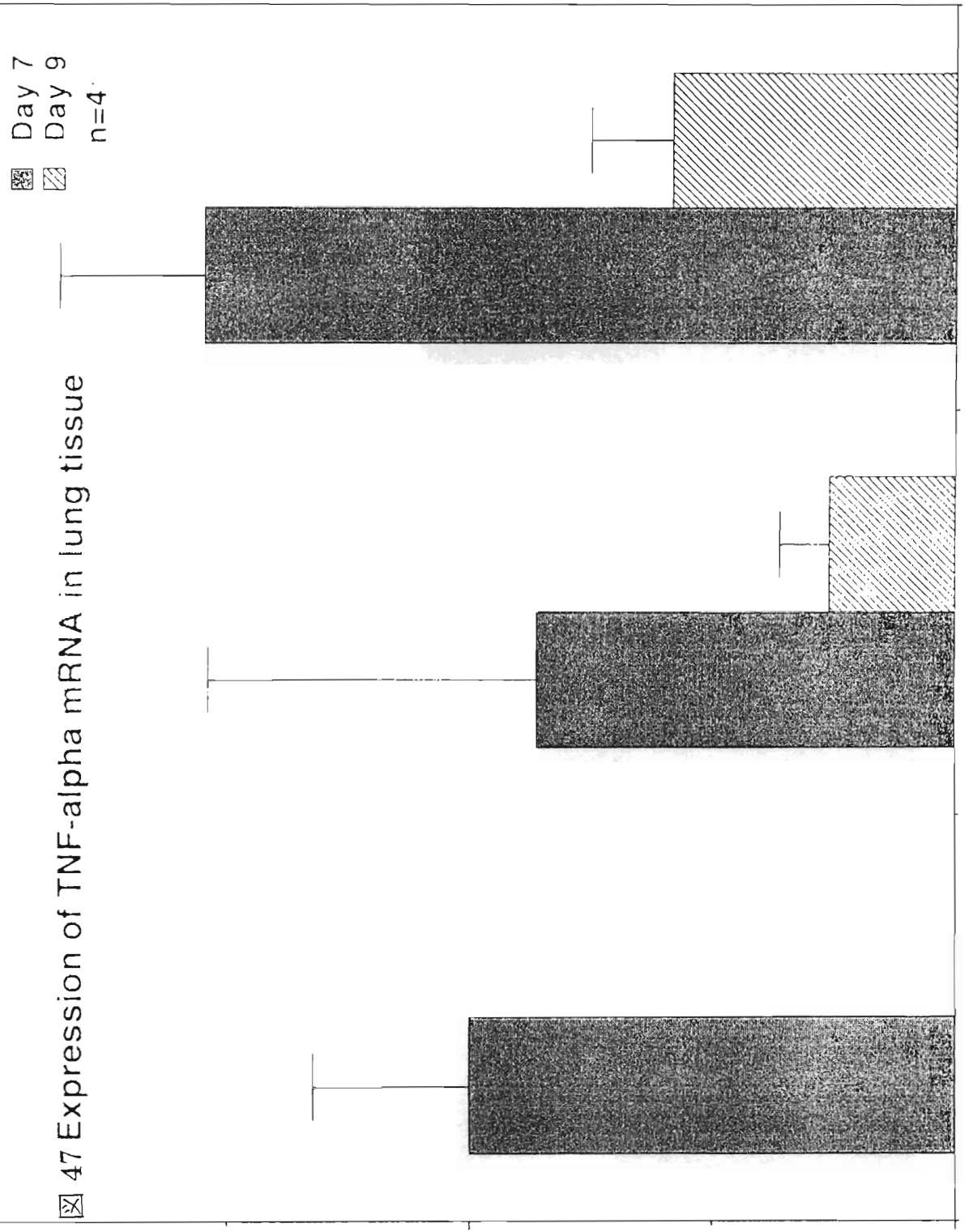
47 Expression of TNF-alpha mRNA in lung tissue

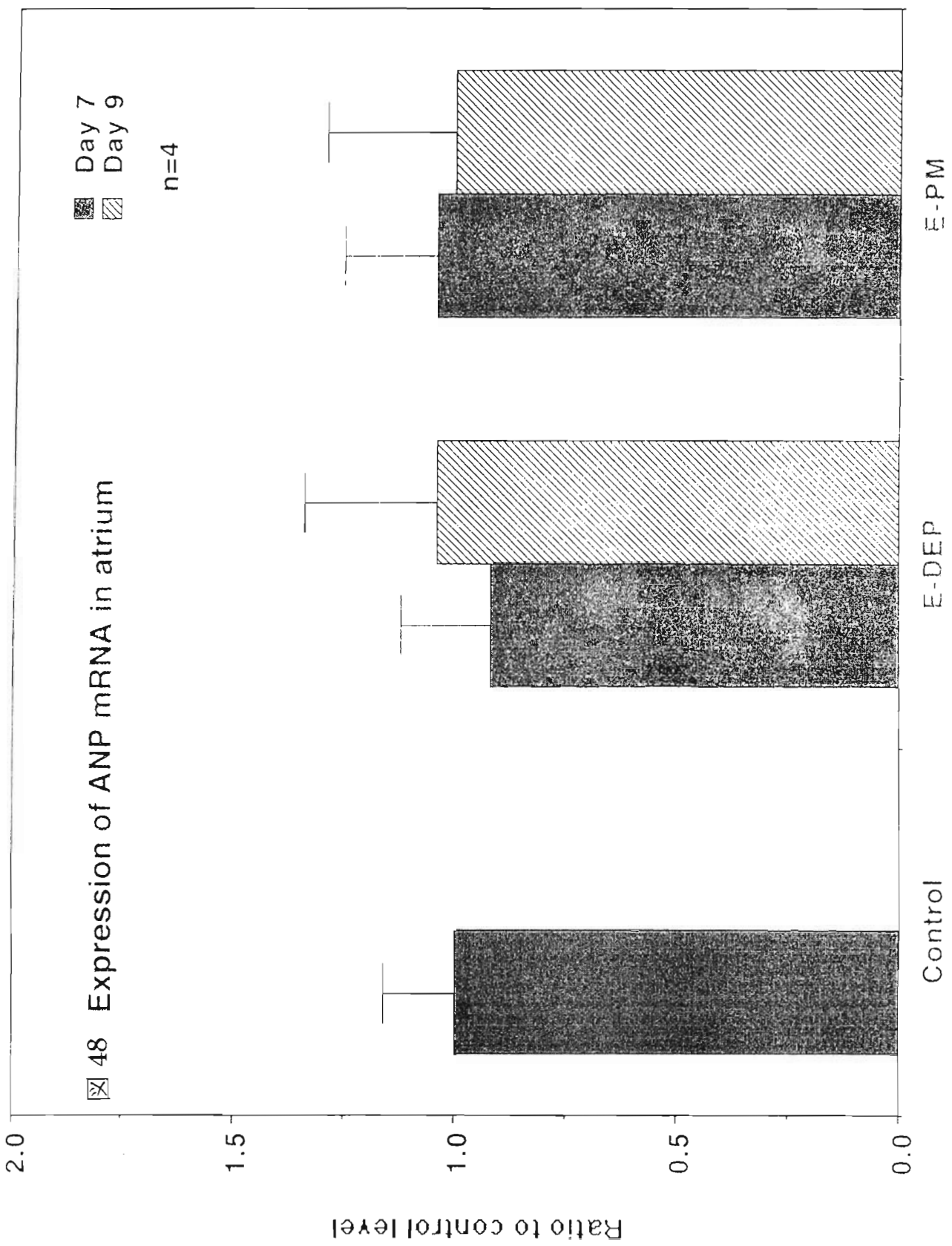
Day 7
Day 9
n=4

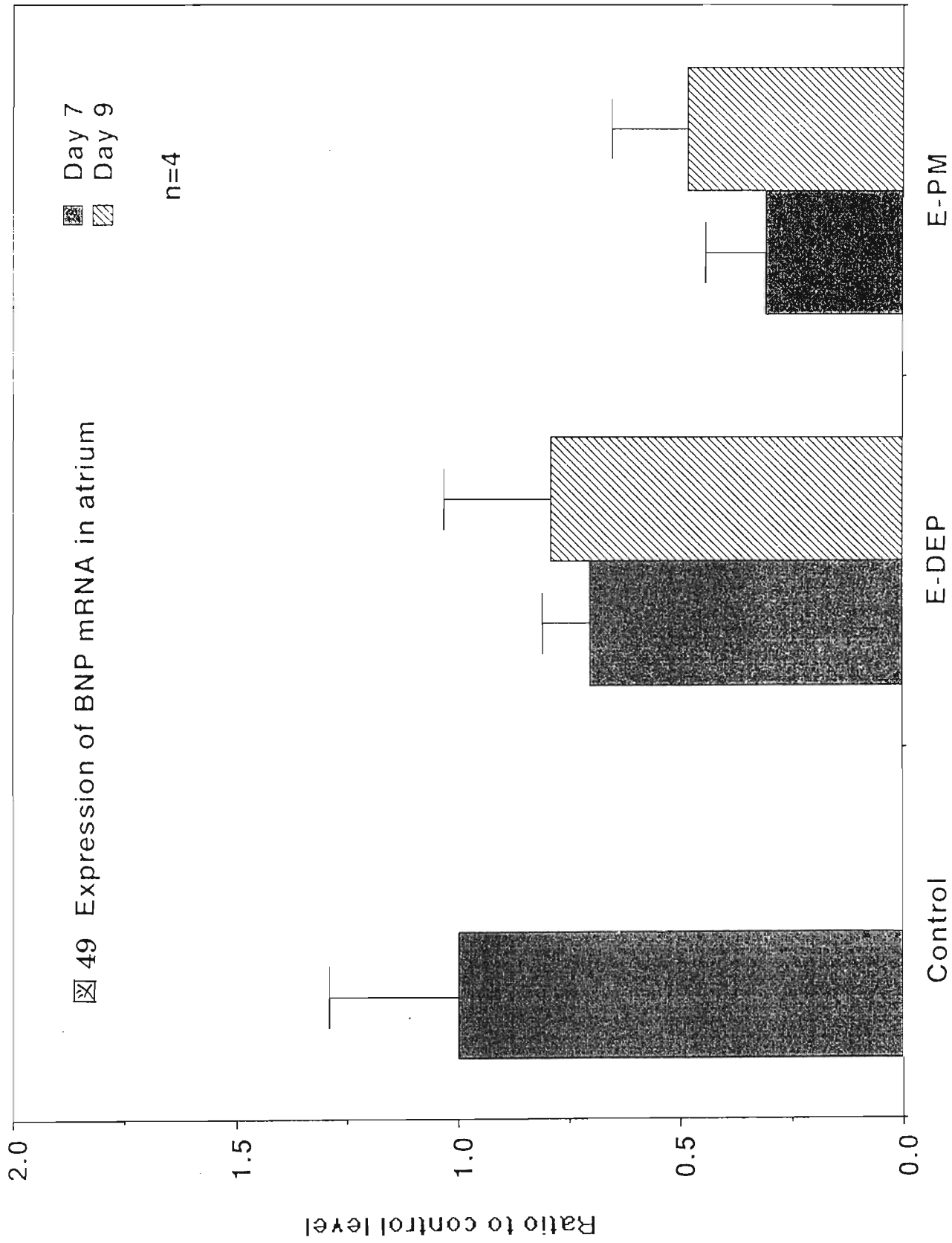
Control

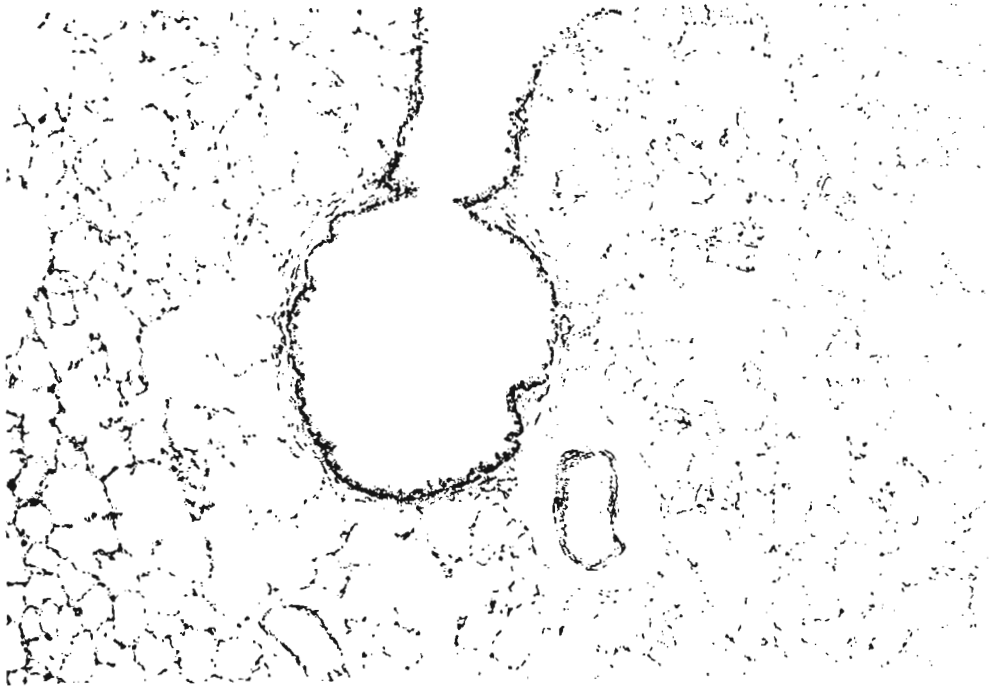
E-DEP

E-PM

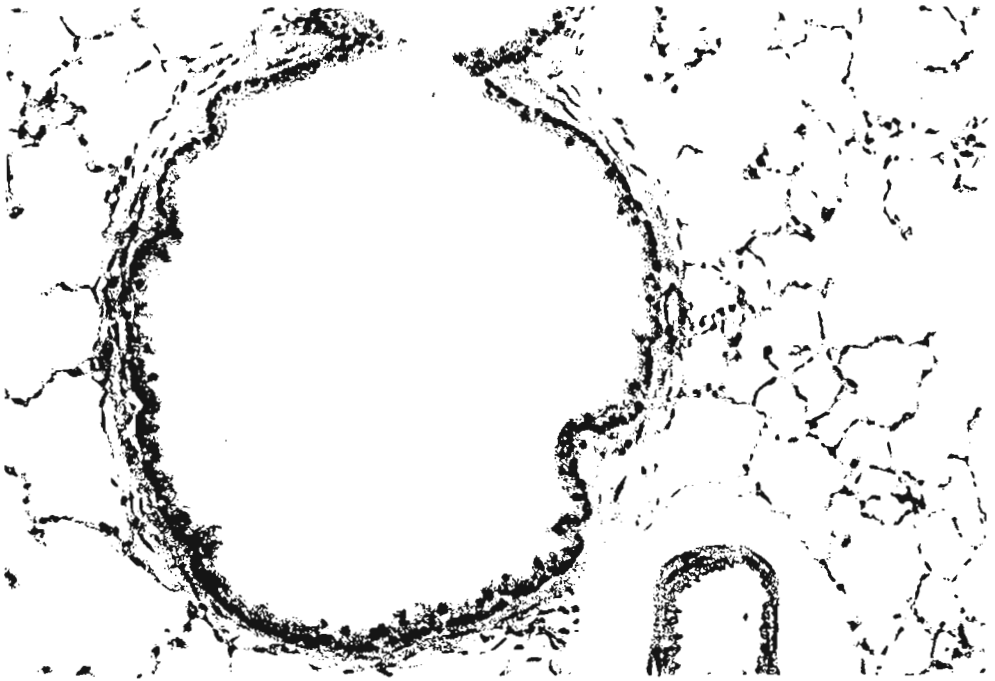








x 40



x 100

图 50 正常气管支



图 51 正常肺胞像

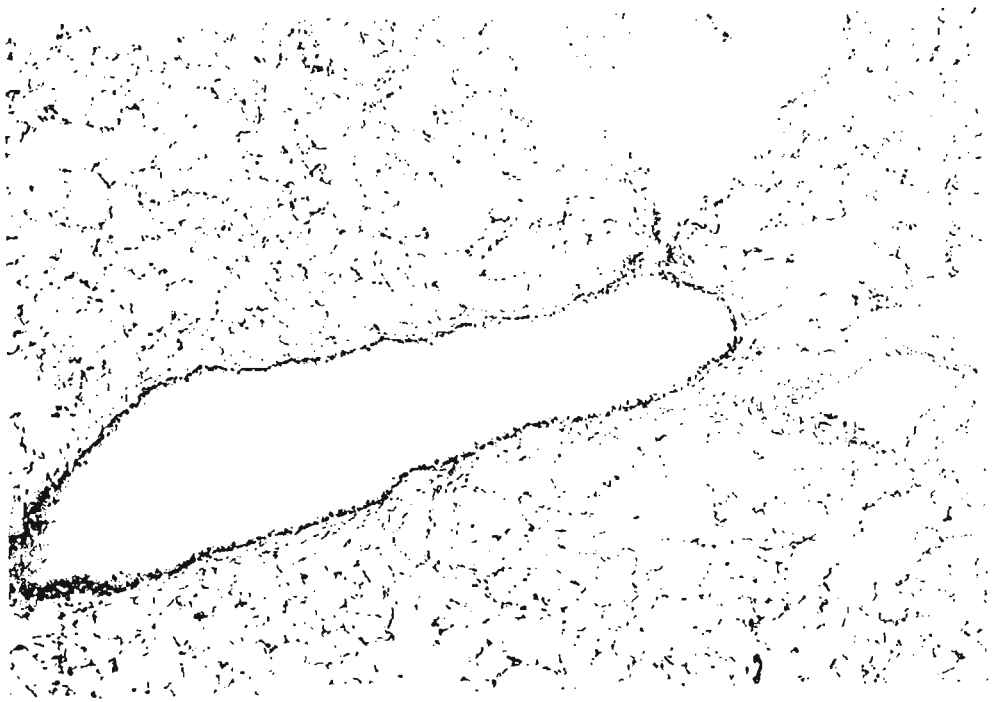


图 52 正常气管支像

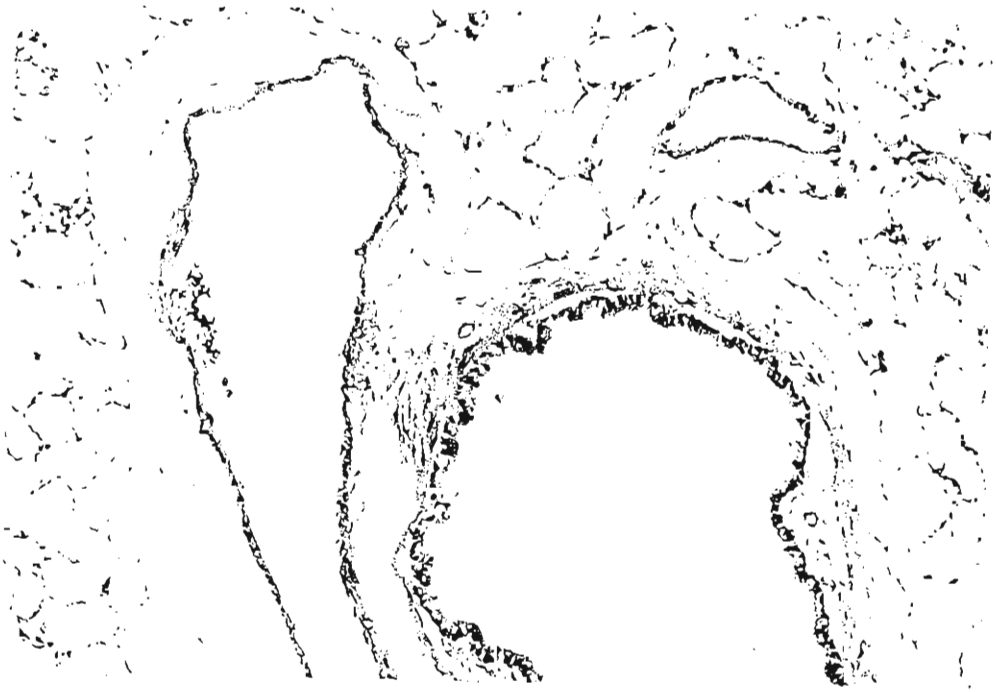


図 53 E-PM 気管内投与ラットの気管支像。気管支粘膜の肥厚などの異常は認められない。

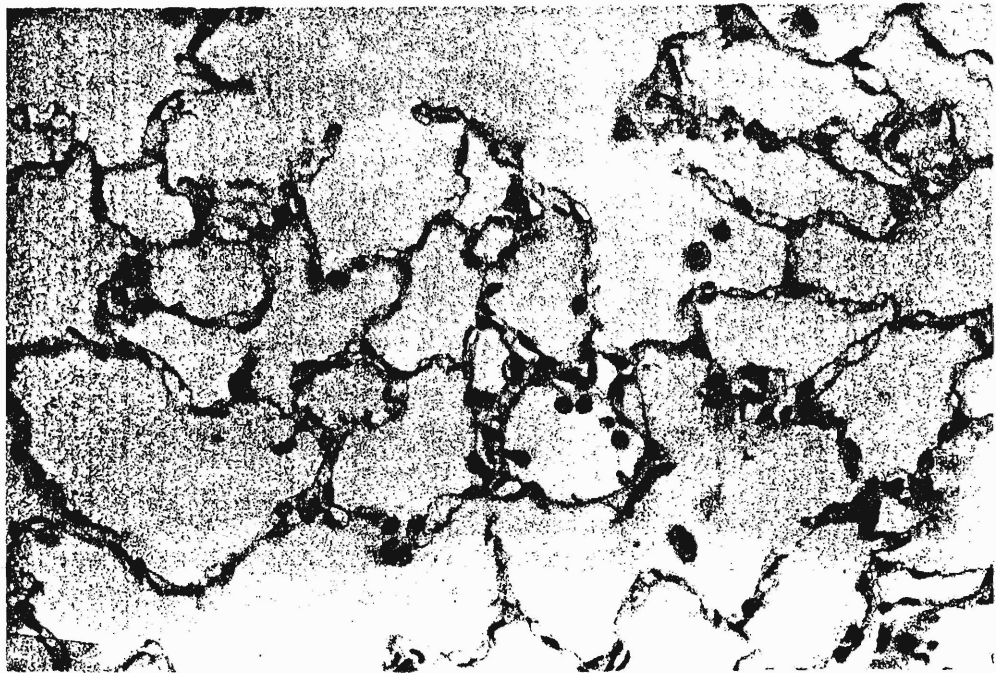
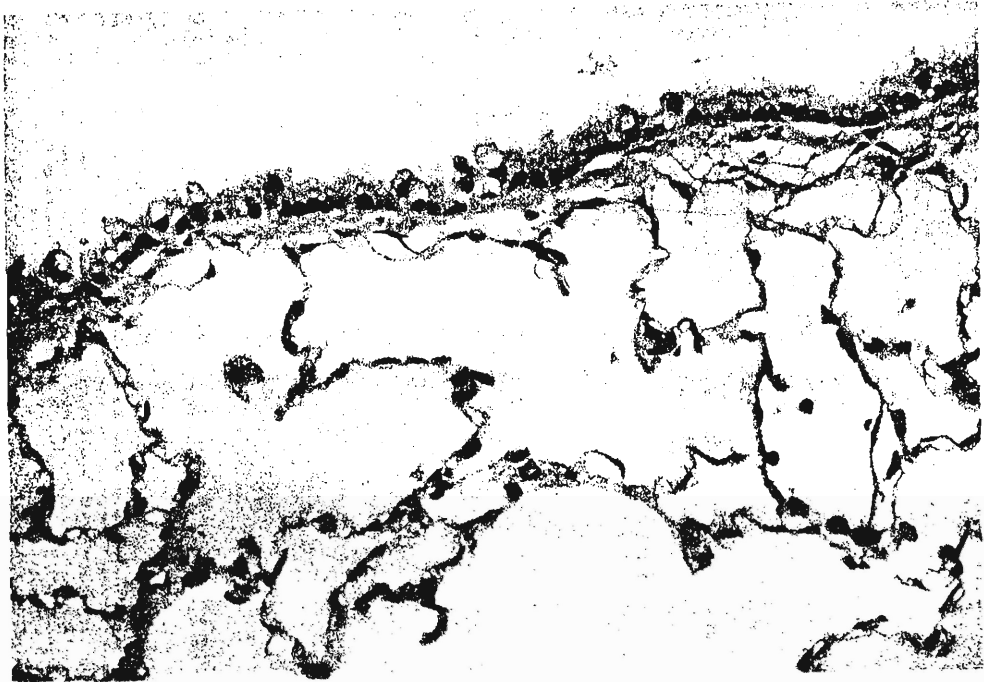


図 54 Buffer 気管内投与ラットの肺胞像。気管支粘膜の肥厚や炎症像は認めない。



E-PM 気管内投与ラットの肺胞像。気管支粘膜の異常は認めない。



図 55 E-PM 気管内投与ラットの肺胞像。肺胞壁の肥厚や炎症は認めない。

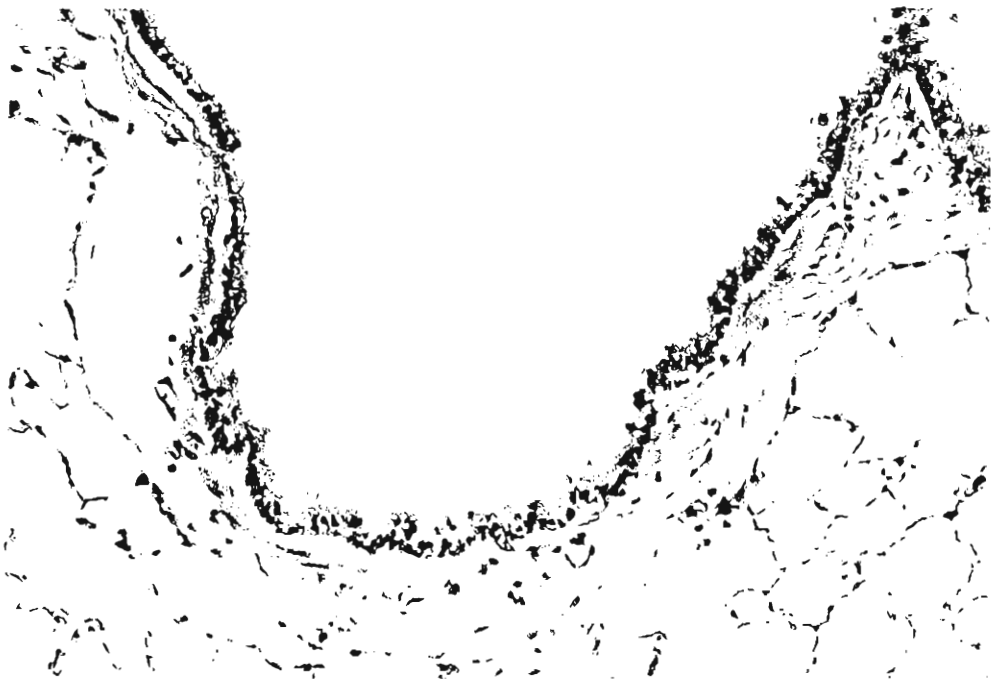
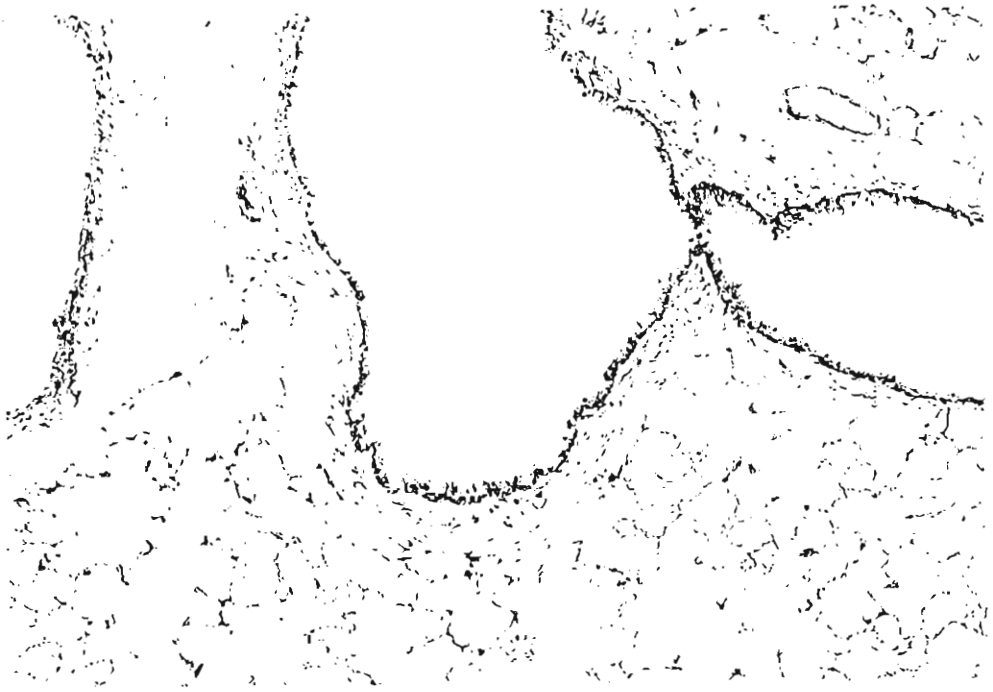


図 56 E-PMI 気管内投与ラットの気管支、粘膜には異常を認めない。

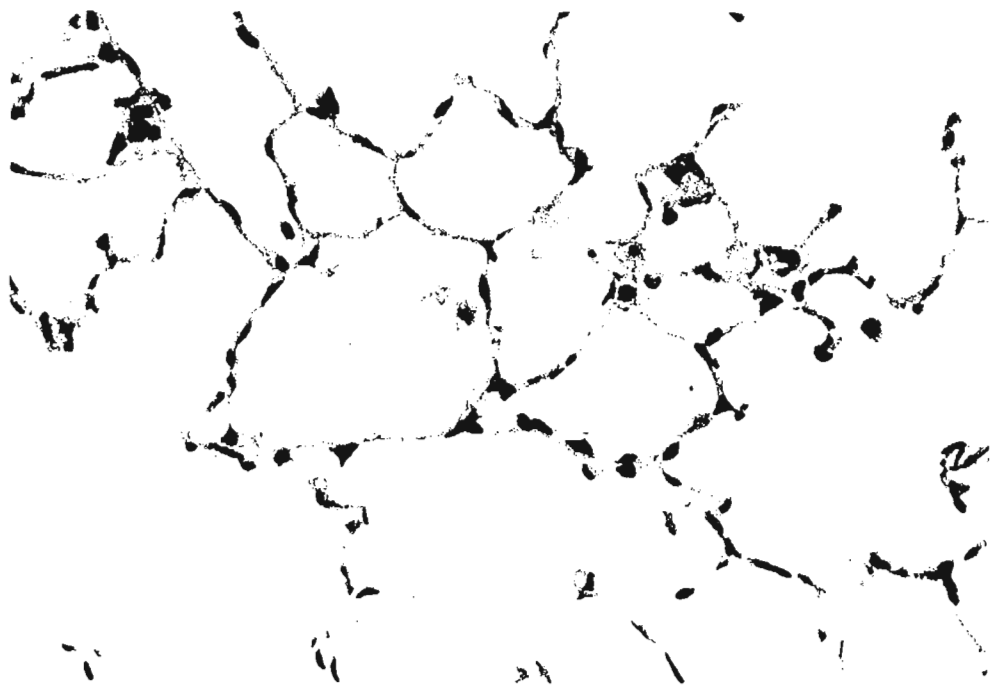
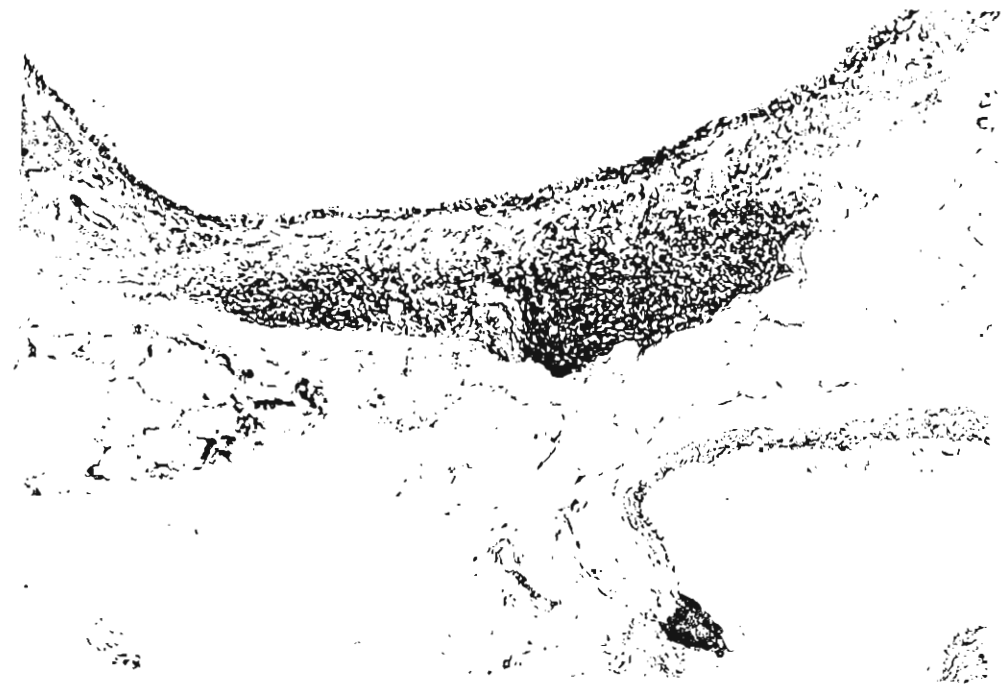


図 57 E-PM 気管内投与ラットの気管支粘膜（上）、肺胞壁〔下〕には異常は認められない。



58 気管支粘膜下にリンパ節が認められるが、ろ胞構造がみられ、基本構造の乱れはない。(E-PM 気管内投与ラット)



図 59 気管支粘膜下にごく軽度の繊維化が観察される。(E-DEP 気管内投与ラット)

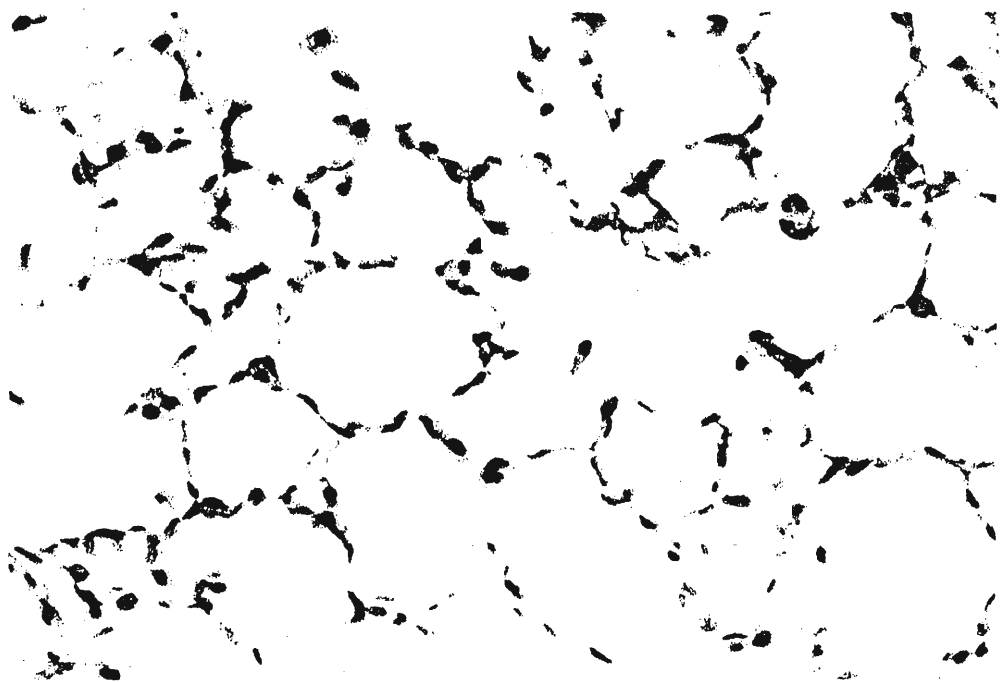


図 60 気管支粘膜下にごく軽度の繊維化を認めるが、炎症細胞はあまり目立たない〔上〕。肺胞壁には著変は認めない〔下〕。(E-DEP 気管内投与ラット)

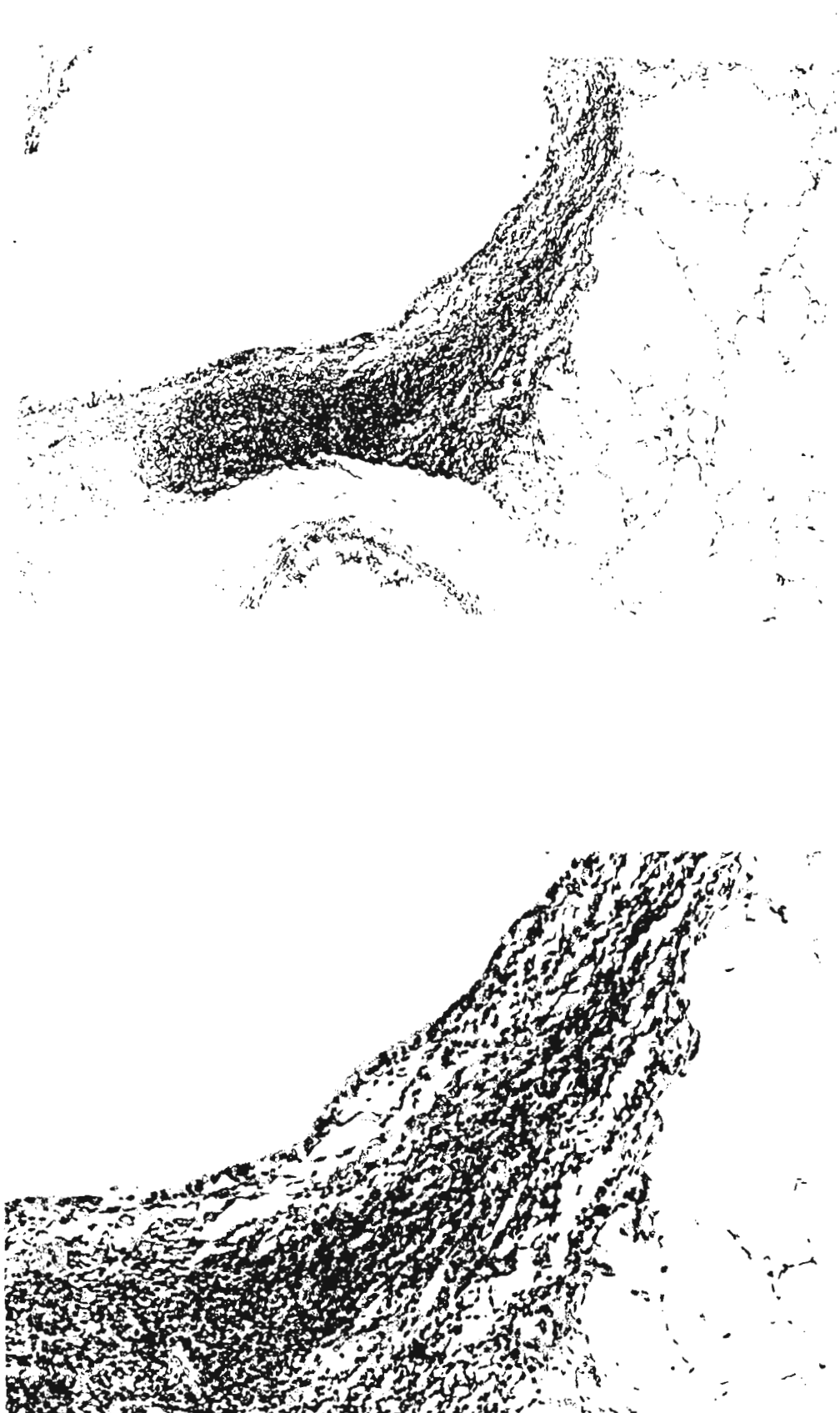


図 61 気管支粘膜下のリンパ節組織像。基本構造の乱れはない。(E-DEP 気管内投与ラット)。

実験 2-2 粒径 2.0ミクロン以上の大気中粒子状物質とディーゼル粒子の有機成分の影響—老齢ラット

実験方法:

実験動物: 雄性 18 ヶ月齢以上の F344, SPF ラットを日本チャールズリバーより購入し、清浄空気下の特別動物飼育施設で、20 ヶ月齢まで飼育した。テレメリー装着動物は、1 群 8 匹となるように無作為に群分けを行い実験に供した。個々の加齢動物の状態を把握するために、屠殺時に体重、脾臓、左右腎臓を摘出し、目視下で観察すると共に、体重当たりの臓器重量を算出した。その結果、3 群間には有意差は認めなかった。

老齢ラットでの体重と体重当たりの臓器重量割合

Group		体重	右腎/体重	左腎/体重	脾臓/体重	心臓/体重
Control (n=6)	実験前	384.3±31.0				
	Day 1	373.8±27.7				
	Day 6	383.7±31.0	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.001	0.003±0.000
PM (n=8)	実験前	388.1±23.8				
	Day 1	377.5±29.9				
	Day 6	384.3±23.6	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.000
DEP (n=7)	実験前	422.6±26.1				
	Day 1	391.0±24.8				
	Day 6	383.0±45.7	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.000	0.003±0.001

試験試料の気管内投与: テレメリーセンサー装着動物又は、気管内投与 24 時間後屠殺動物は、halothane 麻酔下で各種試験試料 (E-DEP, E-PM2.0) を 3 mg/kg 体重で気管内投与した。Control 動物には、抽出溶媒を同様な手法で気管内投与した。全実験動物は、午前 9 時から 12 時の間に試験試料又は抽出溶液を気管内投与された。

心肺機能の測定: 20 ヶ月齢の F344 ラットを 1 週間の予備飼育後、麻酔下で無菌的に腹部下行大動脈に血圧測定用カニューレを、右肩と左足部の皮下に ECG 電極を固定し、腹部に核心温度センサーと送信機の埋め込みを行った。術後 14 日間以上安静状態で飼育し、縫合部の回復を確認後、暴露チャンバー内で 1 匹/1 ケージで飼育した。照明のサイクルは、明期が午前 7 時から午後 7 時まで、暗期が午後 7 時から翌朝午前 7 時までの 12 時間サイクルとした。ラットの生体信号は、気管内投与前約 1 週間から投与 6 日後まで継続的に受信機を介してコンピュータに送信し、ハイエンドデータ取得、実時間解析システム等によって HRV, FFT 解析、R-R 間隔などの計測を行なった。

呼吸パターンの測定: 回復が確認されたテレメリーセンサー装着動物は、試験試料気管内投与前、投与 24 時間後、6 日後の 3 回、無麻酔、無拘束下で body plethysmography によって呼吸数、一回換気量、分時換気量を測定した。

肺組織の病理検討: 気管内投与 1 日目又は 6 日目に、屠殺動物の肺組織を 10% ホルマリン緩衝液で 20 cmH₂O 圧で固定し、HE 染色によって肺の病理学的検討を行った。

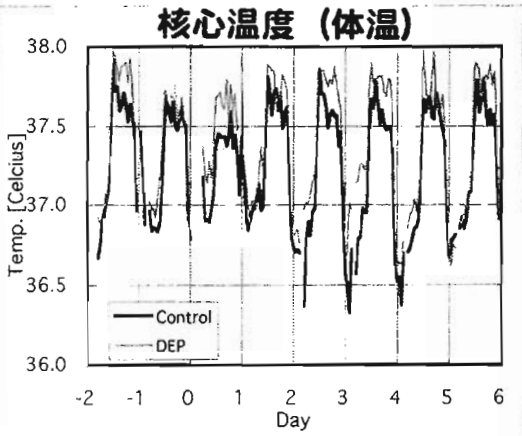
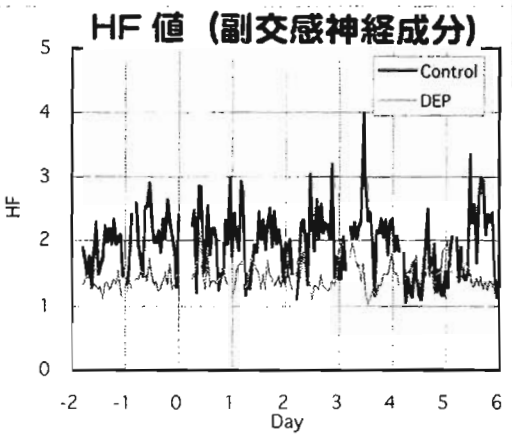
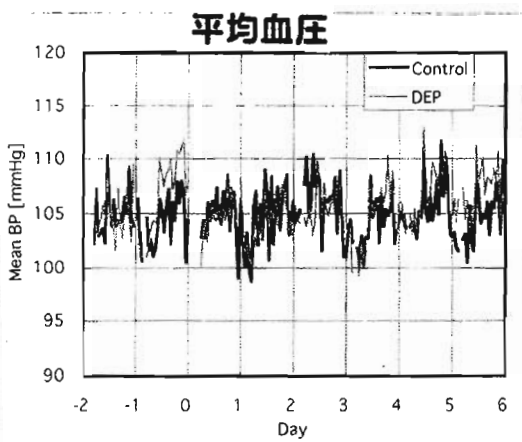
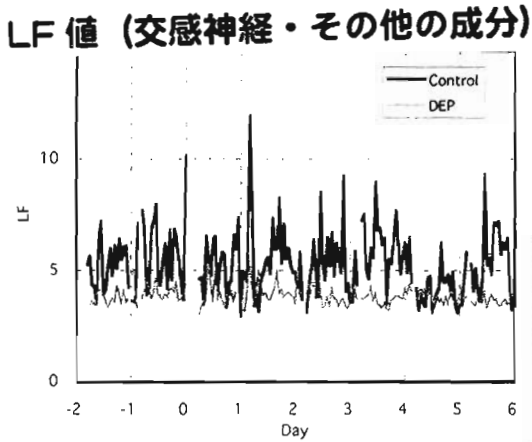
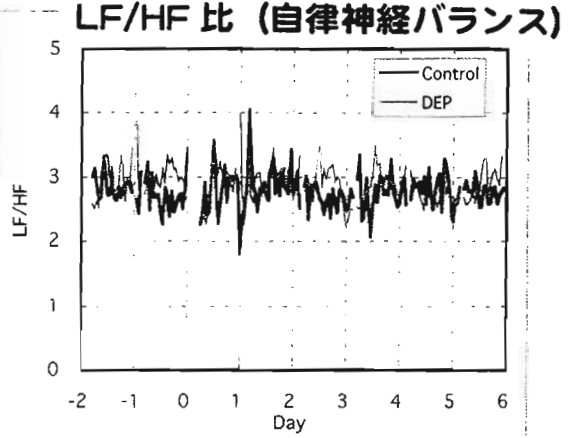
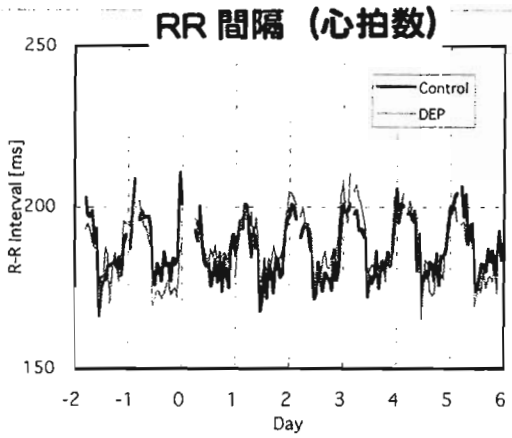
血液・気管支肺胞洗浄液の生化学的検討: 気管内投与 1 日後と 6 日後に、気管支肺胞洗浄液 (BALF) と右心室血液の採取を行い、BALF 中の細胞数、細胞分画像、総蛋白量及び血液中の細胞数、細胞分画像を検討した。

心肺疾患関連指標の分子生物学的検討:心および肺組織で RNA 抽出を行い、心疾患および肺炎症関連指標の遺伝子レベルでの発現量について RT-PCR 法によって検討した。発現量は、Agilent 2100 Bioanalyzer を用いて定量した。

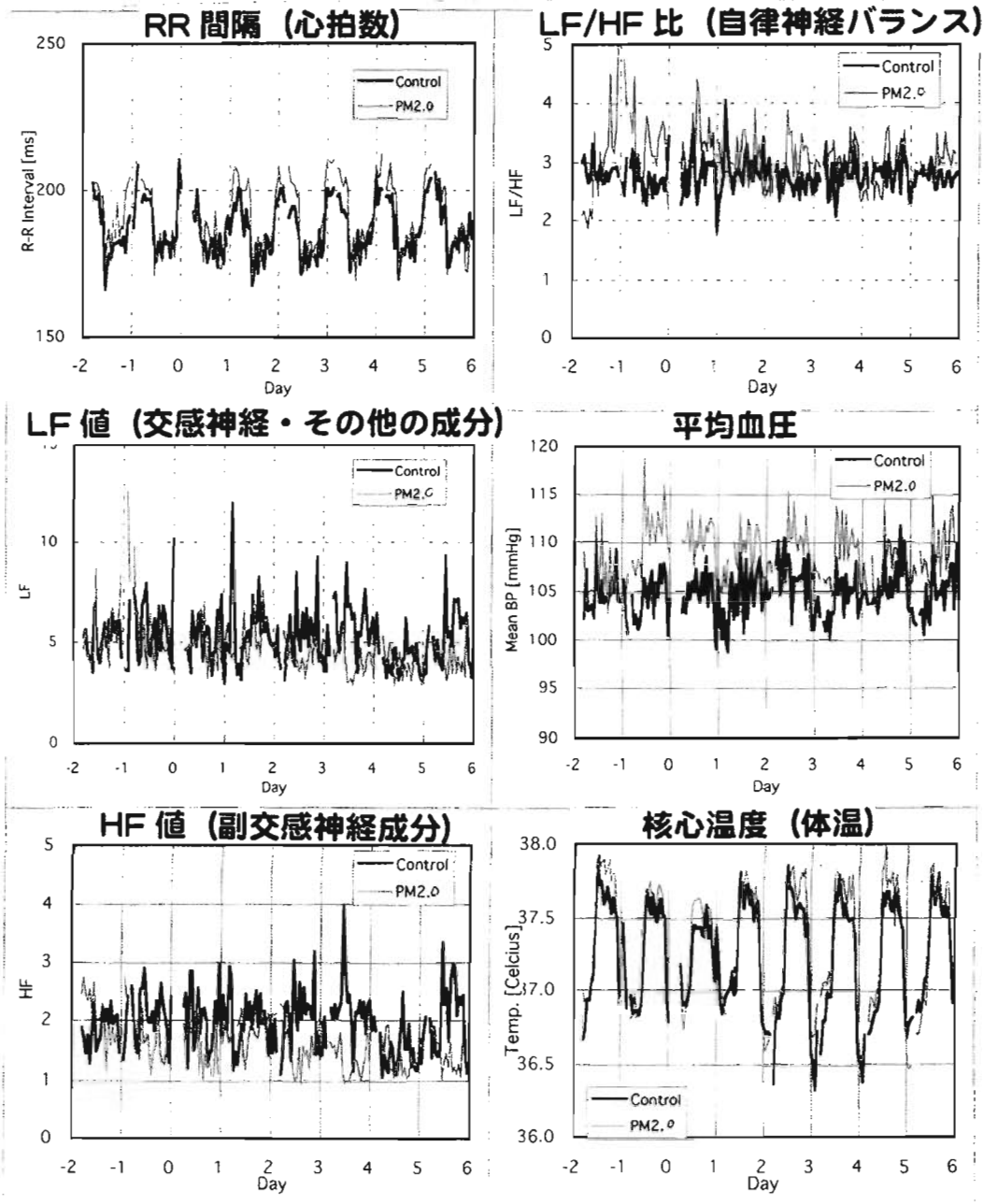
実験結果

心機能への影響:心拍数の評価は R-R 間隔とその標準偏差値を指標とした。自律神経系への影響については、HRV 解析によって1Hz 以上の High frequency (HF)値は副交感神経系の、1Hz 以下の Low frequency(LF)値は交感神経系とその他の成分の、LF/HF 比は交感と副交感神経のバランスを示す指標として検討した。対照群と比較して E-DEP 群、E-PM 群共に R-R 間隔、HF/HL 値、核心温度、血圧には著しい影響は認めなかった。

Control 群と E-DEP 群の気管内投与 2 日前から投与 6 日後までの、RR 間隔、LF、HF 及び LF/HF 比、平均血圧、核心温度の変動



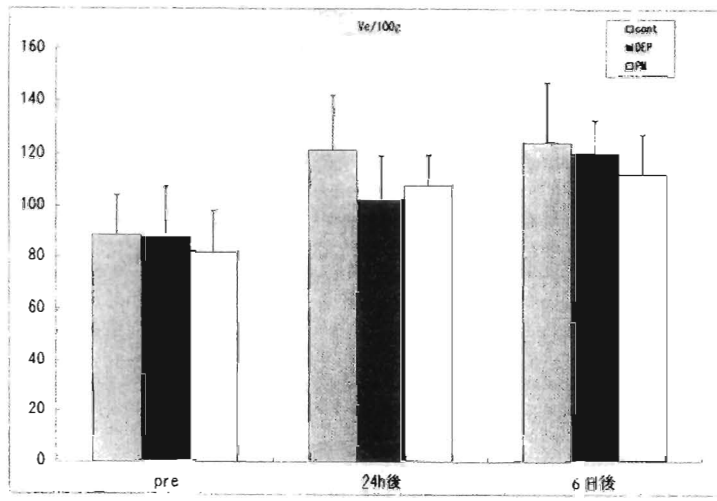
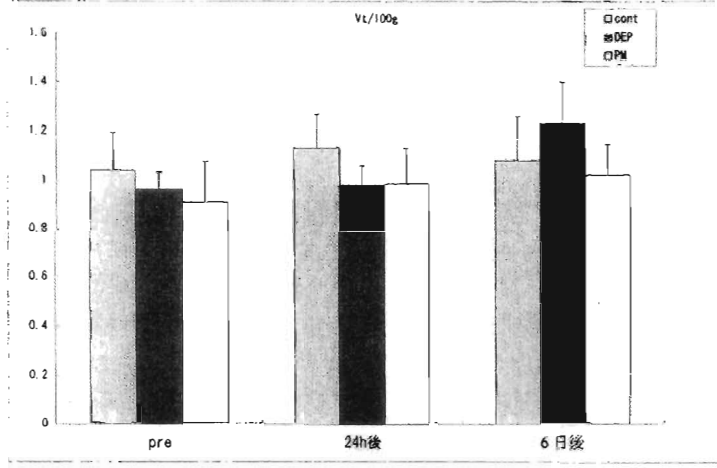
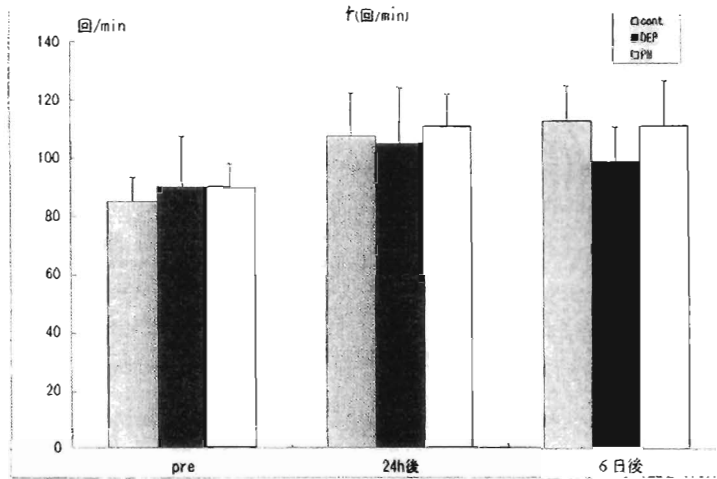
Control 群と E-PM2.0 群の気管内投与 2 日前から投与 6 日後までの、RR 間隔、LF、HF 及び LF/HF 比、平均血圧、核心温度の変動



呼吸パターン への影響:気管内投与前、投与 24 時間後、投与 6 日後の体重、分時呼吸数、一回換気量、分時換気量には、E-DEP, E-PM, 対照群間に明確な差は認めなかった。

肺呼吸パターンの変動

f: 呼吸数、Vt: 一回換気量、
Ve: 分時換気量



血液及びBALの分析：血液の血球分析では、WBC数には3群間に明確な差は認めなかった。RBCとplatelet数は、E-DEP群の投与6日目に高値を示した点を除けば、Control群と比較して3群間に明らかな変動は認めなかった。

Hematology

Group	Day	n	WBC (x100/ul)	RBC (x10000/ul)	Platlet (x10000/ul)
Control	Day 1	9	32.8±10.5	865.5±109.8	61.8±8.0
	Day 6	6	44.7±15.5	719.2±59.8	59.9±13.1
E-DEP	Day 1	9	28.2±7.1	817.9±56.6	68.1±16.1
	Day 6	3	33.3±6.5	935.0±125.0*	88.2±13.4*
E-PM2.0	Day 1	8	37.9±6.4	833.5±51.8	60.6±12.3
	Day 6	4	44.8±12.9	751.0±22.4	57.1±13.3

*: vs the relative control group

気管支肺胞洗浄液(BALF)中の総蛋白量には、実験期間を通して3群間に明らかな差は認めなかった。BAL中総細胞数には、3群間に有意差を認めなかったが、全ての群で気管内投与1日後のBAL中に好中球とリンパ球を認め、特に好中球は対照群と比較してE-DEP群とE-PM群で高値を示した。しかしながら、投与6日後にはBAL中に3群ともに炎症細胞は認めなかった。

Analysis of bronchoalveolar lavage fluid

Bronchoalveolar lavage fluid

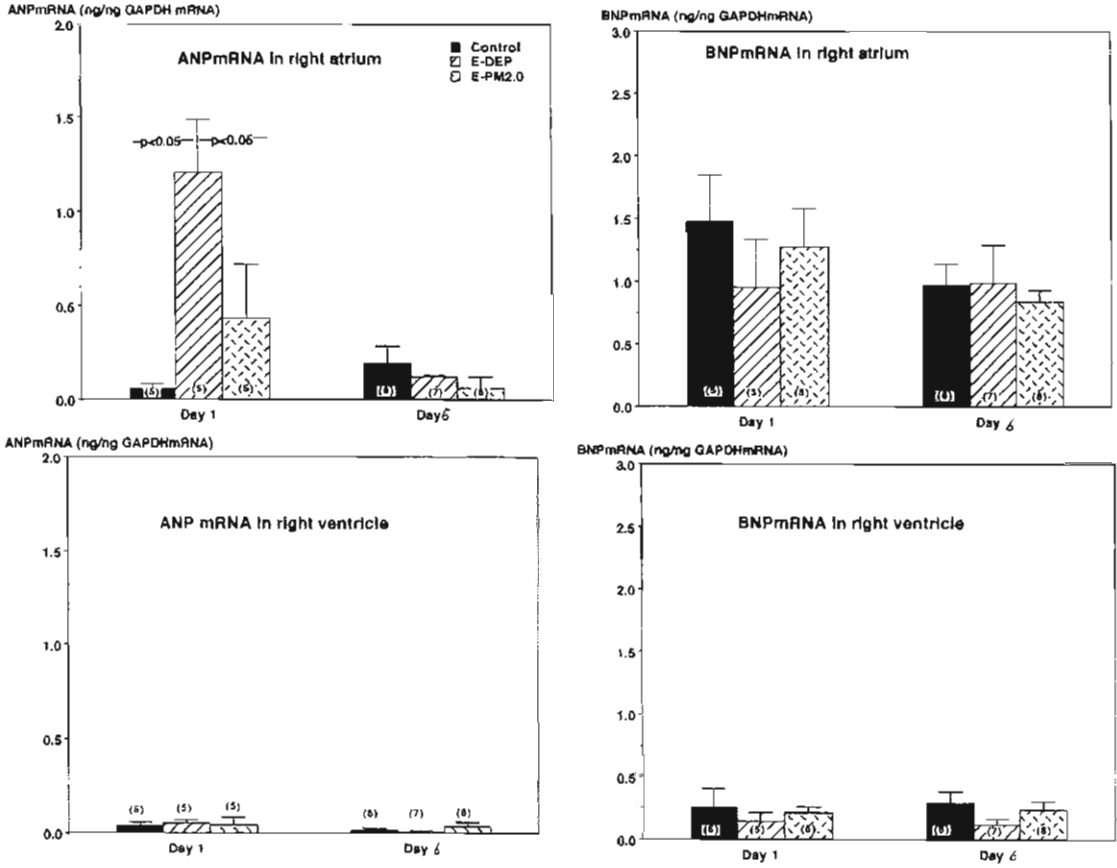
Group	Day	n	Recovery (%)	Total cell (x100)	Cell differential (%)				Protein (mg/ml)
					AM	PMN	Lym	Eo	
Control	Day 1	9	68.4±5.0	3.4±1.4	93.9±6.7	5.1±7.3	1.1±1.2	0.0±0.0	0.246±0.045
	Day 6	6	66.8±4.4	4.8±1.2	100.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.168±0.013
E-DEP	Day 1	9	70.9±6.5	4.3±0.9	81.7±16.6	16.7±15.6	1.5±1.4	0.0±0.0	0.302±0.085
	Day 6	7	65.0±6.7	5.0±1.4	100.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.198±0.044
E-PM2.0	Day 1	8	65.5±10.6	4.3±0.9	80.2±14.8*	19.0±14.8*	1.1±0.8	0.0±0.0	0.277±0.047
	Day 6	8	70.3±6.2	4.0±1.2	100.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.166±0.025

AM:Alveolar macrophage, PMN:Neutrophil, Lym: Lymphocyte, Eo:Eosinophil

*: vs the relative control group

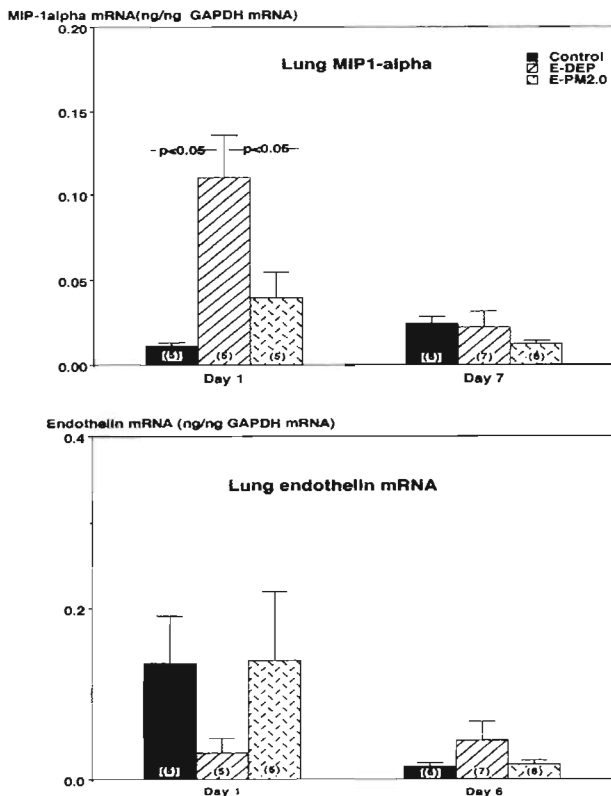
心肺疾患関連指標の遺伝子レベルでの発現：心房 ANP(Atrial natriuretic peptide)mRNA 発現量は、E-DEP群とE-PM2.0群で投与1日後に高値を示し、E-DEP群で有意差を認めたが、投与6日後では3群間に差は認めなかった。心室 ANP mRNA, 心房及び心室のBNP (Brain natriuretic peptide) mRNA 発現量には、3群間に有意差は認めなかった。

右心房、右心室での ANP, BNP mRNA 発現量への影響



気管内投与 1 日及び6日後の肺組織 TNF- α , MCP-3, IL-6, MCP-1, MCP-3, RANTES, endothelin-1 mRNA 発現量には、3 群間に有意差を認めなかった。MIP-1 α mRNA 発現量は E-DEP 群と E-PM2.0 群で、投与 1 日後に高値を示す傾向を認めたが、投与6日後には3群間に明確な差は認めなかった。

肺組織での MIP-1 α と endothelin mRNA の発現

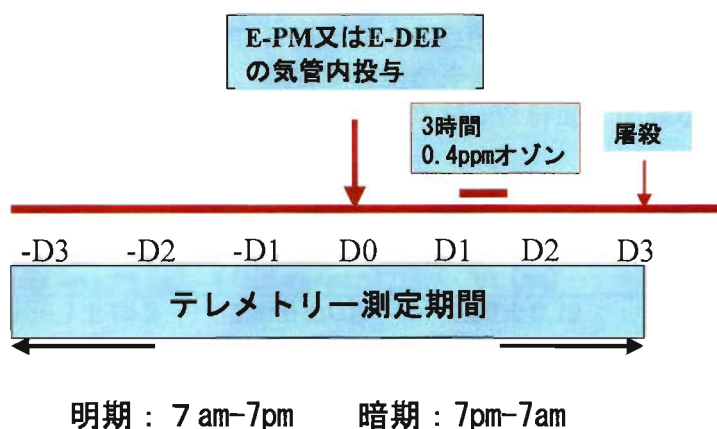


肺病理所見:気管内投与1日目の所見では、Control群、E-DEP群、E-PM群共に気道収縮と粘液上皮の増生および粘膜下の軽度のリンパ浸潤、周囲肺胞腔内にマクロファージを認めたが、肺胞、肺血管系には特に著変は認めなかった。E-DEP群では、肺胞道の局所的肥厚を認めた。Control群に比較して、E-DEP群とE-PM群で炎症傾向がやや強く認められた。投与6日後の所見では、Control群では気管支及び肺胞、肺血管系には特に著変は認めず、リンパ浸潤や肺胞腔内にマクロファージも認めなかった。E-DEP群とE-PM群では、気管支粘膜下の一部に軽度のリンパ浸潤を認めたが、肺胞及び肺血管系には特に著変は認めなかった。

実験 2-3 粒径 2.0ミクロン以上の大気中粒子状物質とディーゼル粒子の有機成分の影響—食塩感受性ラット

実験方法：同一ロットの5週齢 Dahl-Iwai 食塩感受性ラットは、予備飼育後6週齢より8%食塩飼料を用いて特別動物飼育施設の清浄空気下で飼育した。1群4匹とした。7週齢に、麻酔下で無菌的にテレメトリーセンサーの装着手術を行い、腹部下行大動脈に血圧測定用カニューレを、右肩と左足部の皮下に ECG 電極を固定し、腹部に核心温度センサーと送信機の埋め込みを行った。術後4週間安静状態で飼育し、縫合部の回復を確認後、11週齢から暴露チャンバー内で1匹/1ケージで飼育した。照明のサイクルは、明期が午前7時から午後7時まで、暗期が午後7時から翌朝午前7時までの12時間サイクルとした。測定開始3日後に、エーテル麻酔下で気管内に試験試料 3mg/kg body weight/0.2 ml で肺の両側に注入した。試験試料投与14時間後からオゾン発生装置(柴田科学)を用いて 0.4ppm オゾンを3時間暴露した。ラットの生体信号は、気管内投与前3日前から投与3日後まで継続的に受信機を介してコンピュータに送信し、ハイエンドデータ取得、実時間解析システム等によって HRV、R-R 間隔などの計測を行なった。測定項目としては、心拍数、血圧、呼吸数、核心温度および自律神経系への影響を把握するために HRV 解析を行った。HRV 解析では、LF power は 0-0.6Hz、HF power は 0.9-1.6Hz とした。測定終了後、速やかにネンブター麻酔下で右肺の気管支肺胞洗浄および左肺の4%ホルマリン・緩衝液での固定を行った。

プロトコール



方法

- 実験動物：♂11週齢食塩感受性高血圧ラット
- 1群4匹
- Control群：溶媒のみ気管内投与
- E-PM群：E-PM₂ 3mg/kg 気管内投与
- E-DEP群：E-DEP 3mg/kg 気管内投与

評価指標

血圧(収縮期、拡張期、平均血圧)

R-R間隔(心拍数)

HRV分析(自律神経系)

LF:0~0.6 Hz

HF:0.9~1.6Hz

LF/HF

核心温度

呼吸数

実験結果

実験1：実験動物の呼吸パターンの結果と左右の心房の ANP, BNP mRNA 遺伝子発現の結果を示した。体重、呼吸数(f)、1回換気量(Vt)、分時換気量(VE)には、3群間に差は認めなかった。試験試料気管内投与24時間後の心房 ANP, BNP mRNA 発現量は、Control 群に比較して E-DEP 群で右心房 ANP mRNA 値が高値示したが、3群間に有意差は認めなかった。気管支肺胞洗浄液中の細胞分画像の観察では、好中球の出現を、肺病理では炎症所見を認めたが、3群間で明確な差は認めなかった。

呼吸パターン

Group	Body weight (g)	f (times/min)	Vt (ml)	VE (ml/min)
Control	256.7±15.3	120.0±0.0	2.89±0.79	385.5±30.9
E-DEP	255.0±31.6	120.0±0.0	3.69±0.36	442.2±43.3
E-PM	266.0±17.8	120.0±0.0	3.46±0.36	415.0±44.4

心房ANP, BNP mRNA 発現量の比較

Group/ (ng/ μ l)	Right Atrium			Left Atrium	
	β -actin	ANP	BNP	β -actin	ANP
Control	14.08 \pm 5.06	24.46 \pm 4.42	29.78 \pm 6.58	14.82 \pm 3.27	34.15 \pm 6.65
E-DEP	16.55 \pm 0.68	36.34 \pm 21.10	35.58 \pm 5.68	15.02 \pm 3.61	33.84 \pm 10.75
E-PM	14.00 \pm 4.22	25.34 \pm 10.18	32.80 \pm 6.73	16.04 \pm 2.56	39.02 \pm 5.94

下記に実験終了時の体重と実験開始時の血圧（収縮期）を示したが、3群間に有意差は認めなかった。

Dahl-Iwai ラットの体重と最高血圧

Group	Body weight (g)	Body Pressur (Sys mmHg)
Control	323.8 \pm 25.9	165.8 \pm 4.4
E-DEP	332.5 \pm 13.2	178.0 \pm 16.7
E-PM	328.7 \pm 14.4	175.0 \pm 5.8

図1~3は、血圧の変動を示している。収縮期、拡張期、平均血圧は、いずれも暗期に上昇する明確な日内変動を示した。図4~6は、試験試料投与日から測定終了日までの波形を示している。気管内投与の影響は、いずれの群でも認めず、オゾン暴露では血圧低下を示す個体が認められたが、群間比較では明確な差は認めなかった。図7~9は、3群のR-R間隔（心拍数）の変動を示している。暗期に上昇する明確な日内変動を示し、気管内投与直後に一過性の心拍数の上昇を観察した（図10~12）。気管内投与後に日内変動が消失したControl群の1個体を除いては、3群共にオゾン暴露による波形や心拍数の著しい変動は認めなかった。

図13は、上段から順にLF, HF, LF/HF比の平均値を、図14にはそれぞれのSD値の変動を示した。夜間に数値の変動が大きくなる傾向とGroup D (E-DEP)群, Group P (E-PM)群に比較してGroup C (Control)群で、LFとHF値の変動が大きい傾向が認められたが、LF/HF比の明確な群間差は認めなかった。図15~23に、気管内投与日から実験終了日までの個体別のLF, HF, LF/HF比の変動を示した。Control群に比較してE-PM, E-DEP群でオゾン暴露日にLF, HF値の大きな変動を示す個体を認めたが、LF/HF比の比較では3群間に明らかな差は認めなかった。

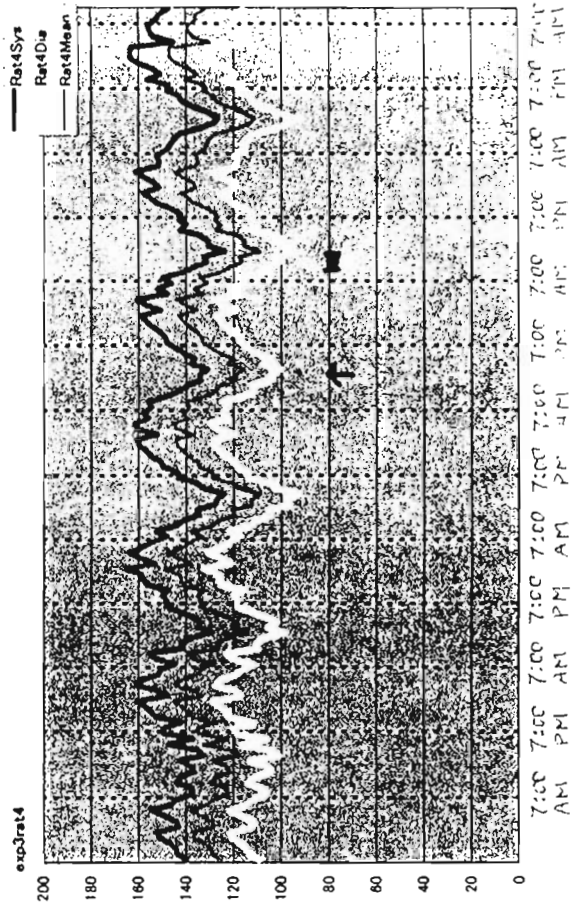
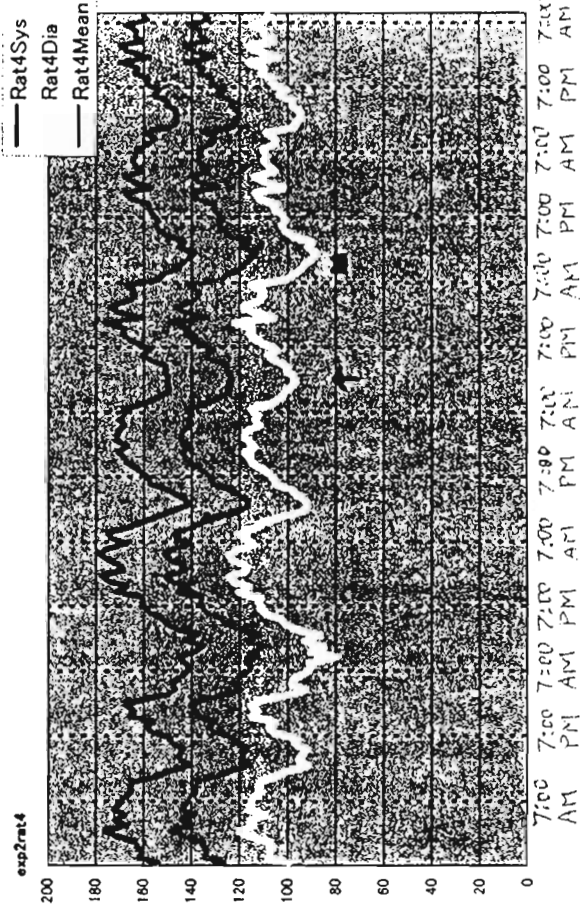
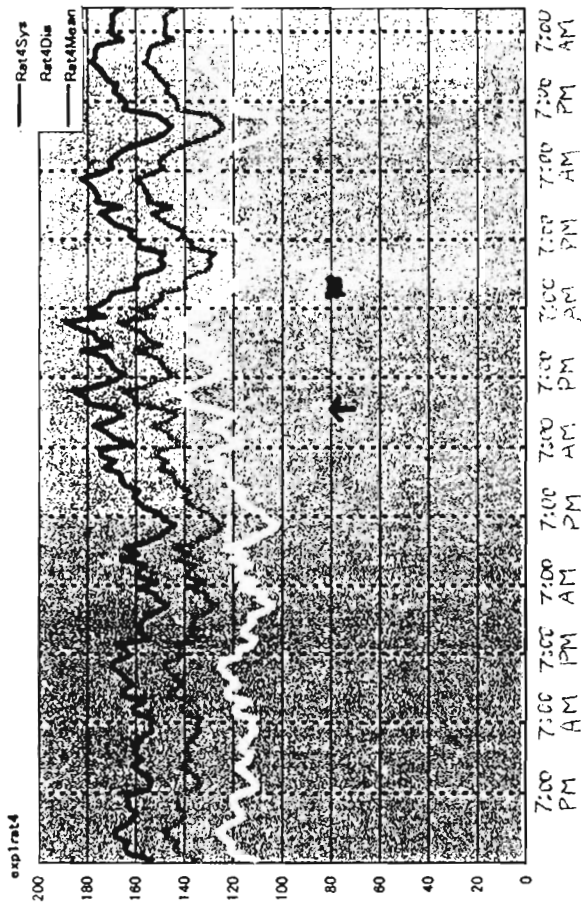
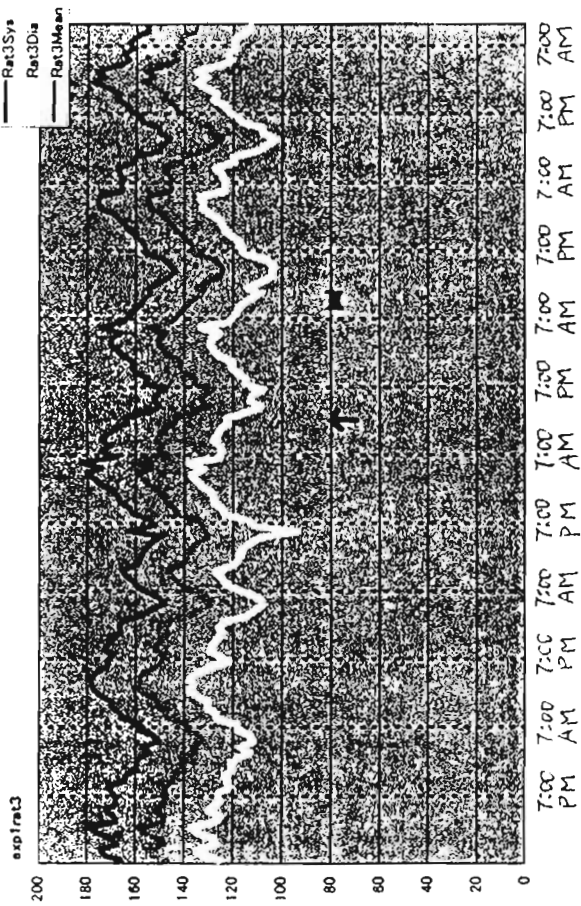
呼吸数は、明確な日内変動を示し（図24~26）、3群で気管内投与により呼吸数の乱れが認められたが、群間での明確な差は認めず、またオゾン暴露の日内変動への影響も認めなかった。図27-29に、核心温度の変動を示した。気管内投与による一過性の核心温度の低下や、E-DEP群で気管内投与後速やかな低下や上昇を示した個体が認められたが、これはアーチファクトな変動と考えられた。それらの要因を除けば、3群共に気管内投与やオゾン暴露による核心温度の著しい変動は認めなかった。

実験終了日の気管支肺胞洗浄液と末梢血液の所見：気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞は 1-2%以下でそのほとんどは肺胞マクロファージであり、3群間に明確な差は認めなかった。血液中細胞では、WBC が E-DEP, E-PM 群でやや高値を示したが、Control 群と比較して有意差は認めなかった。細胞分画像にも 3群間に明確な差は認めなかった。

気管支肺胞洗浄液と血液中の細胞数

Group	Cells/ BAL μ l	WBC ($\times 10^2/\mu$ l)	RBC ($\times 10^4/\mu$ l)	PL ($\times 10^4/\mu$ l)	Blood	
					Lym (%)	PMN (%)
Control	5.5 \pm 3.0	66.0 \pm 17.1	828.8 \pm 78.2	100.4 \pm 6.9	62.0 \pm 6.4	38.0 \pm 6.4
E-DEP	6.5 \pm 2.9	84.8 \pm 21.7	790.1 \pm 38.7	87.0 \pm 9.7	58.0 \pm 7.1	42.2 \pm 7.1
E-PM	6.0 \pm 1.4	82.8 \pm 17.6	855.0 \pm 91.9	102.9 \pm 10.1	60.8 \pm 10.0	39.3 \pm 10.0

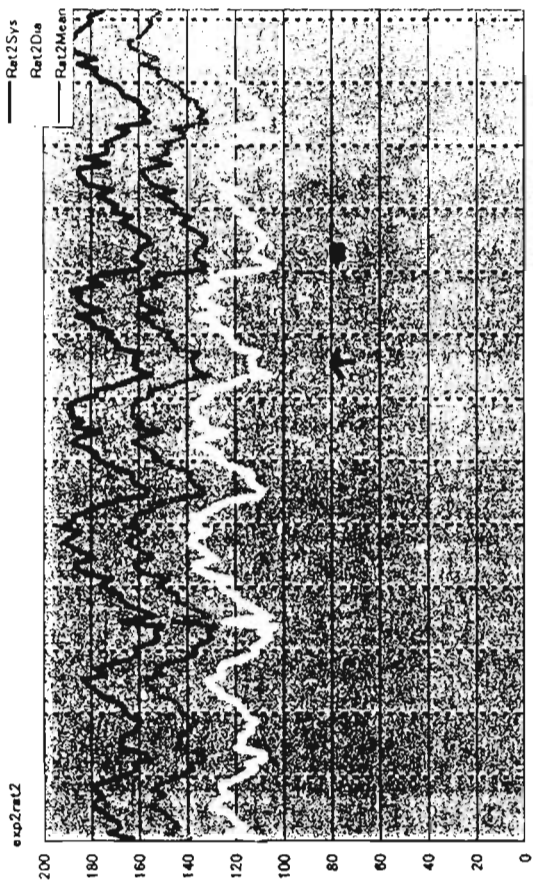
肺病理所見：肺病理所見では、3群共に著しい肺病変は認めず、やや局所的に軽度の炎症細胞浸潤を認めた固体もあったが、3群間に明らかな差は認めなかった。



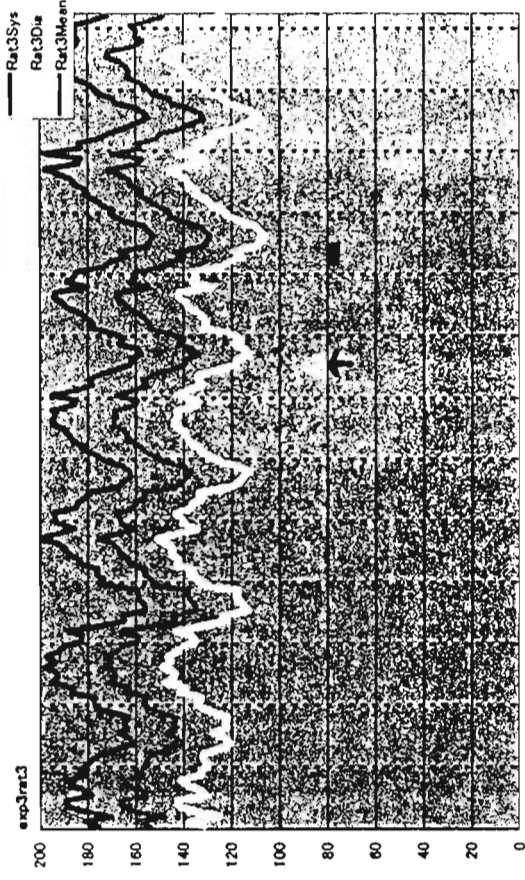
↑ 気管内投与

■ 3時間オゾン暴露

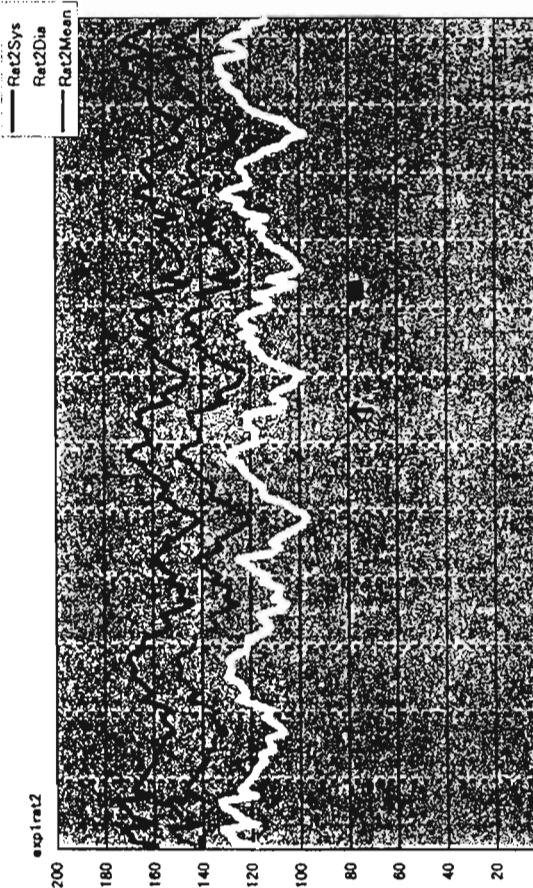
図2 収縮期、拡張期、平均血圧の変動 (E-PM 群)



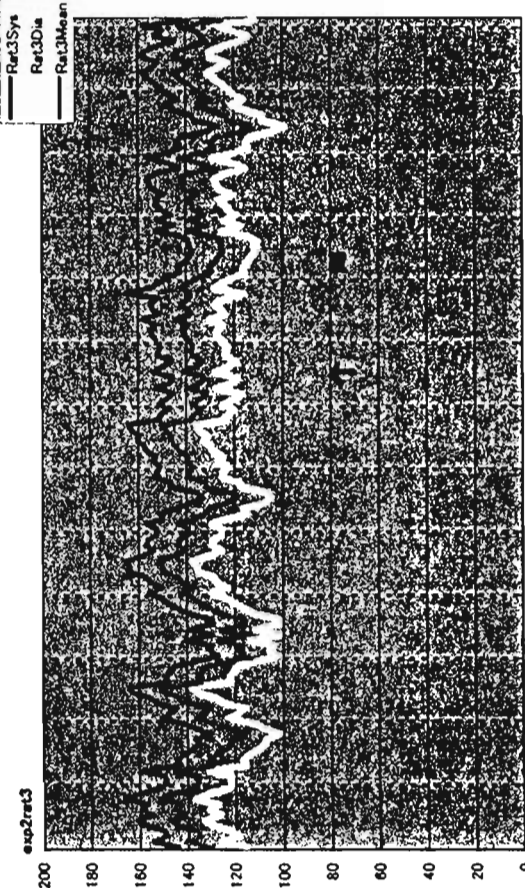
7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM



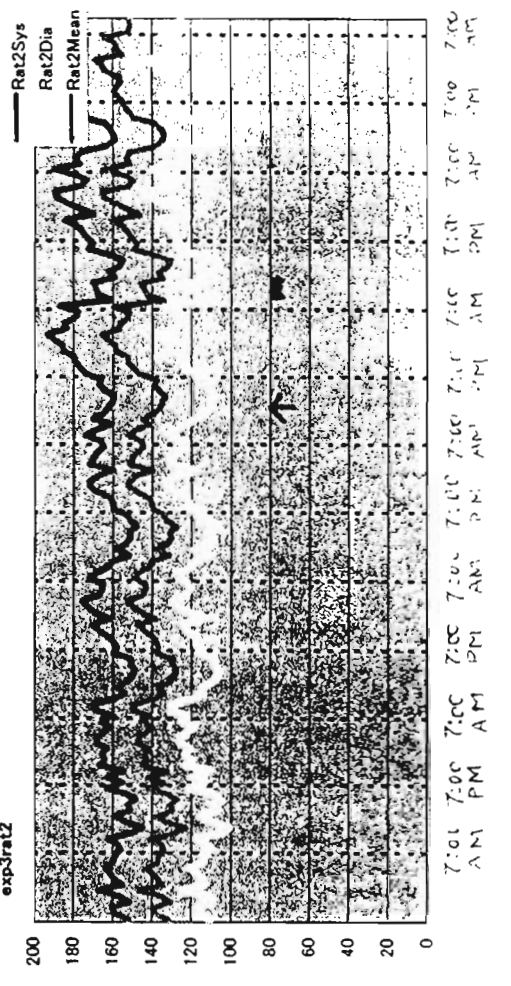
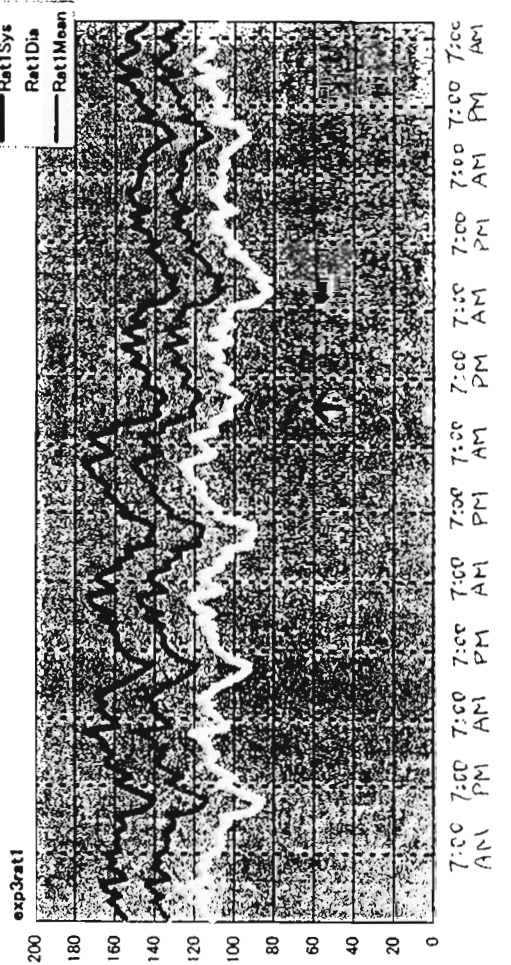
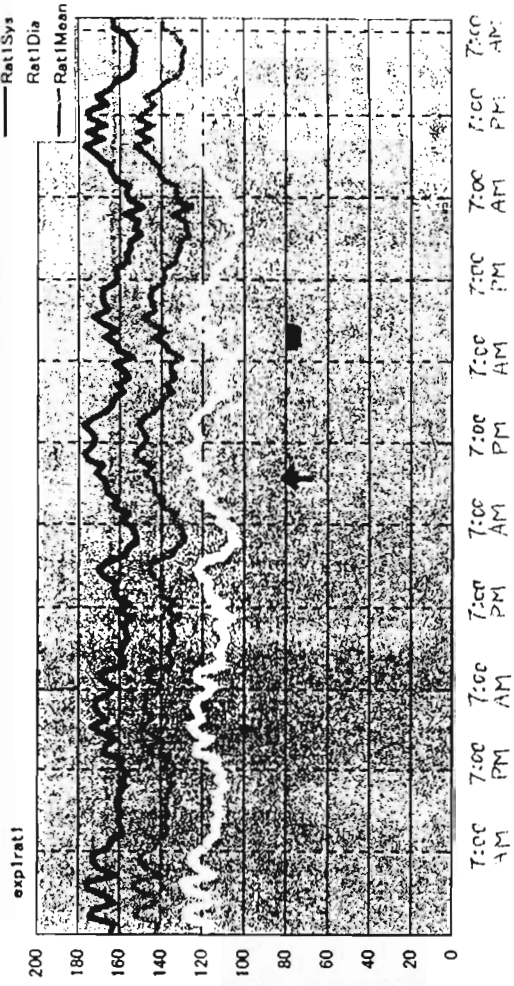
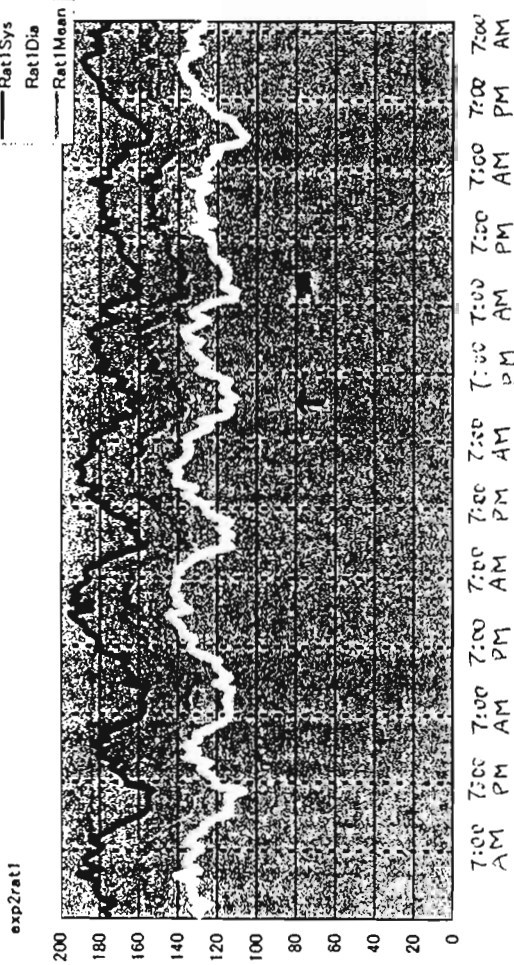
7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM



7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM



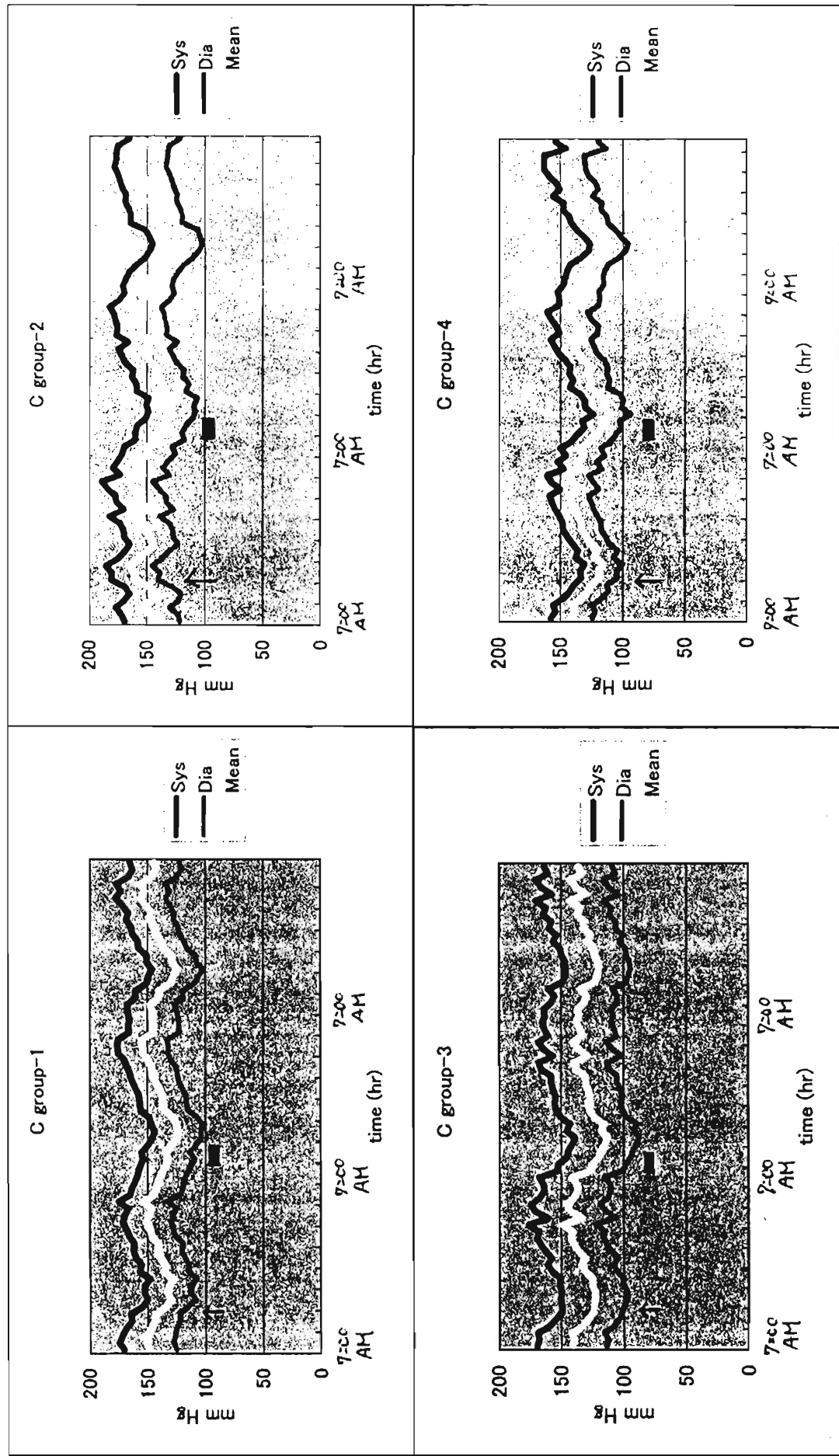
7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM 7:00 AM 7:00 PM



↑ 気管内投与

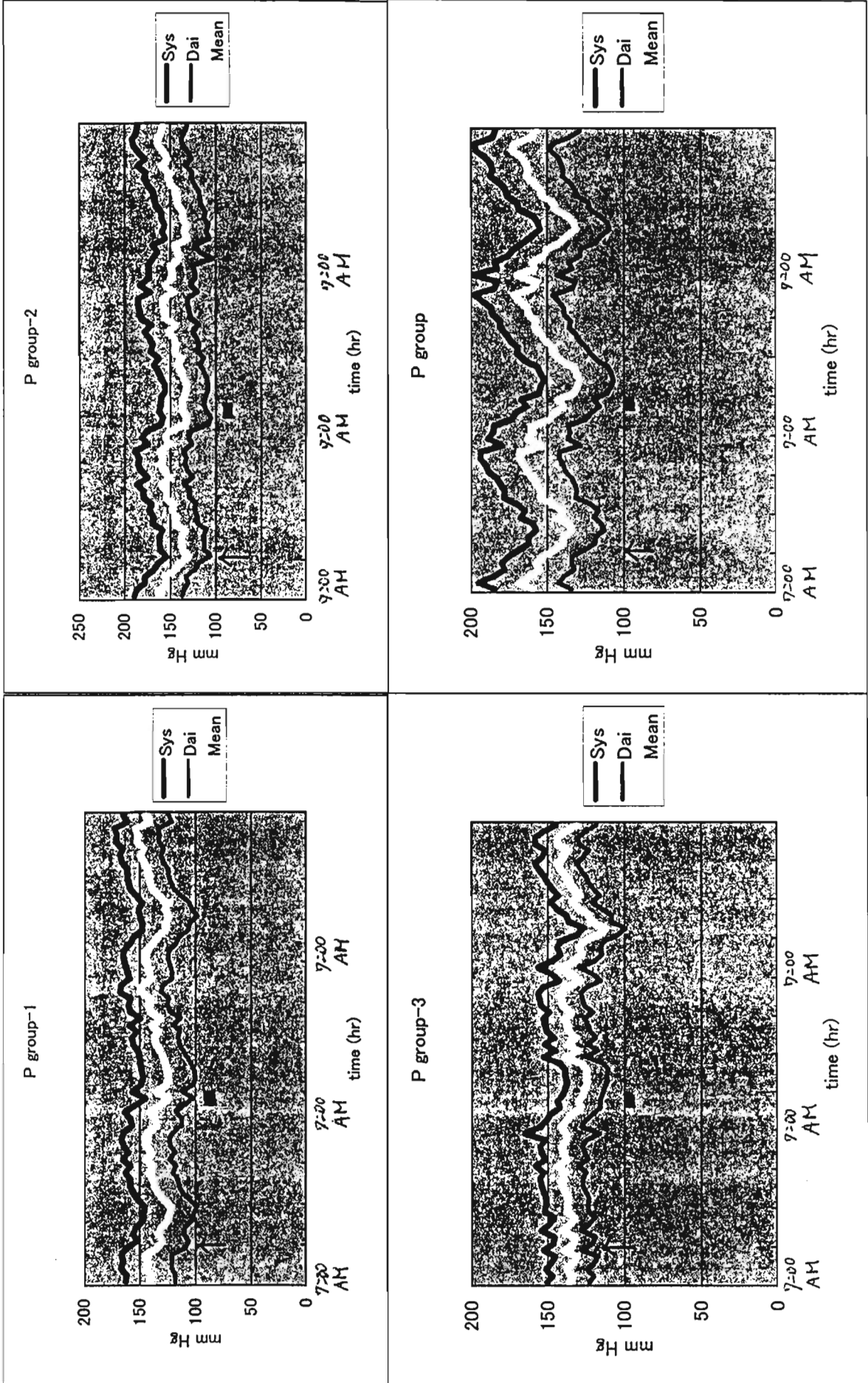
■ 3時間オゾン暴露

図4 気管内投与日から最終日までの収縮期、拡張期、平均血圧の変動 (Control群)



↑ 気管内投与

■ 3時間オゾン暴露



↑ 気管内投与

■ 3時間オゾン暴露

図6 気管内投与日から最終日までの収縮期、拡張期、平均血圧の変動 (E-DEP 群)

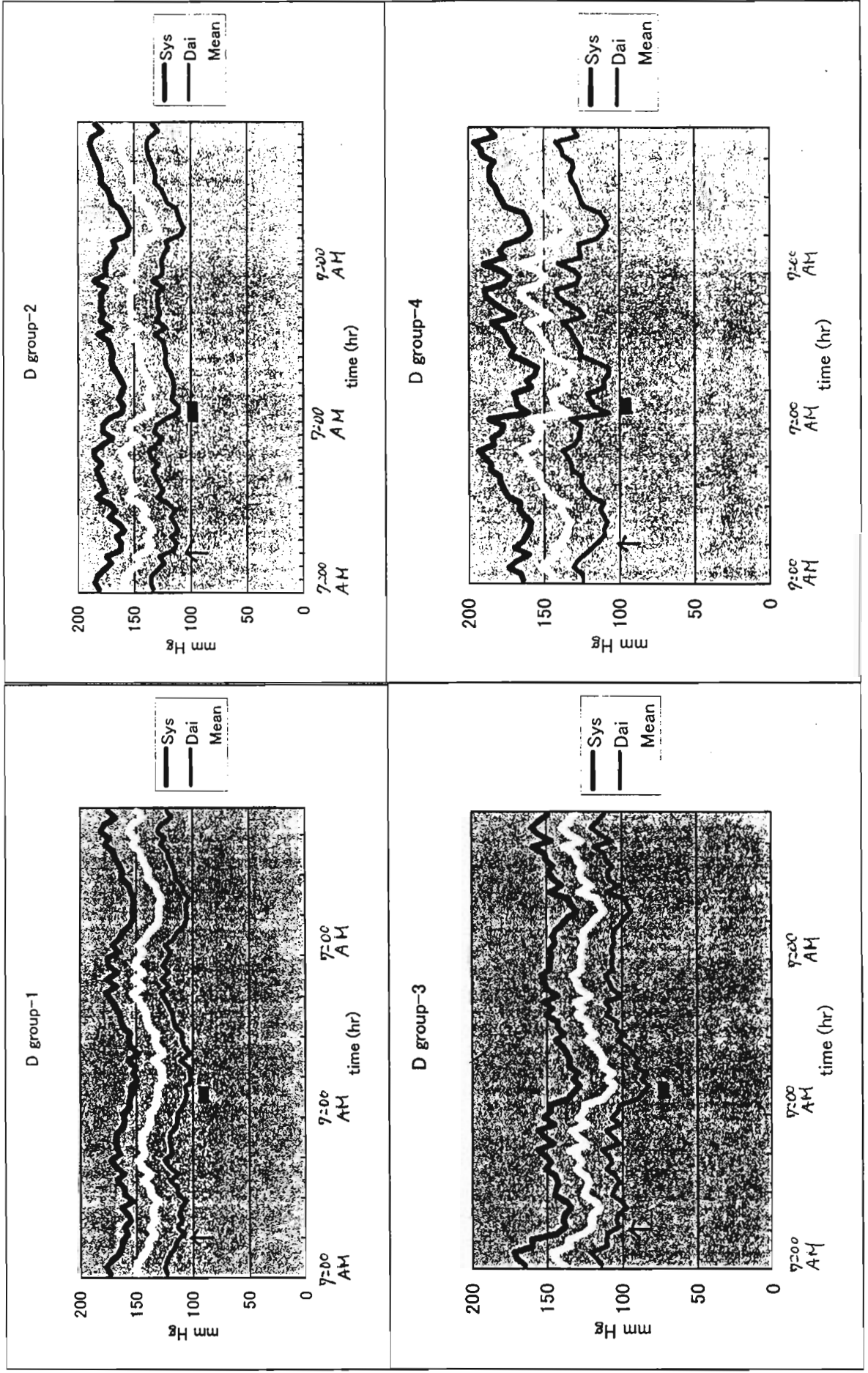


図8 R-R間隔の変動 (E-PM群)

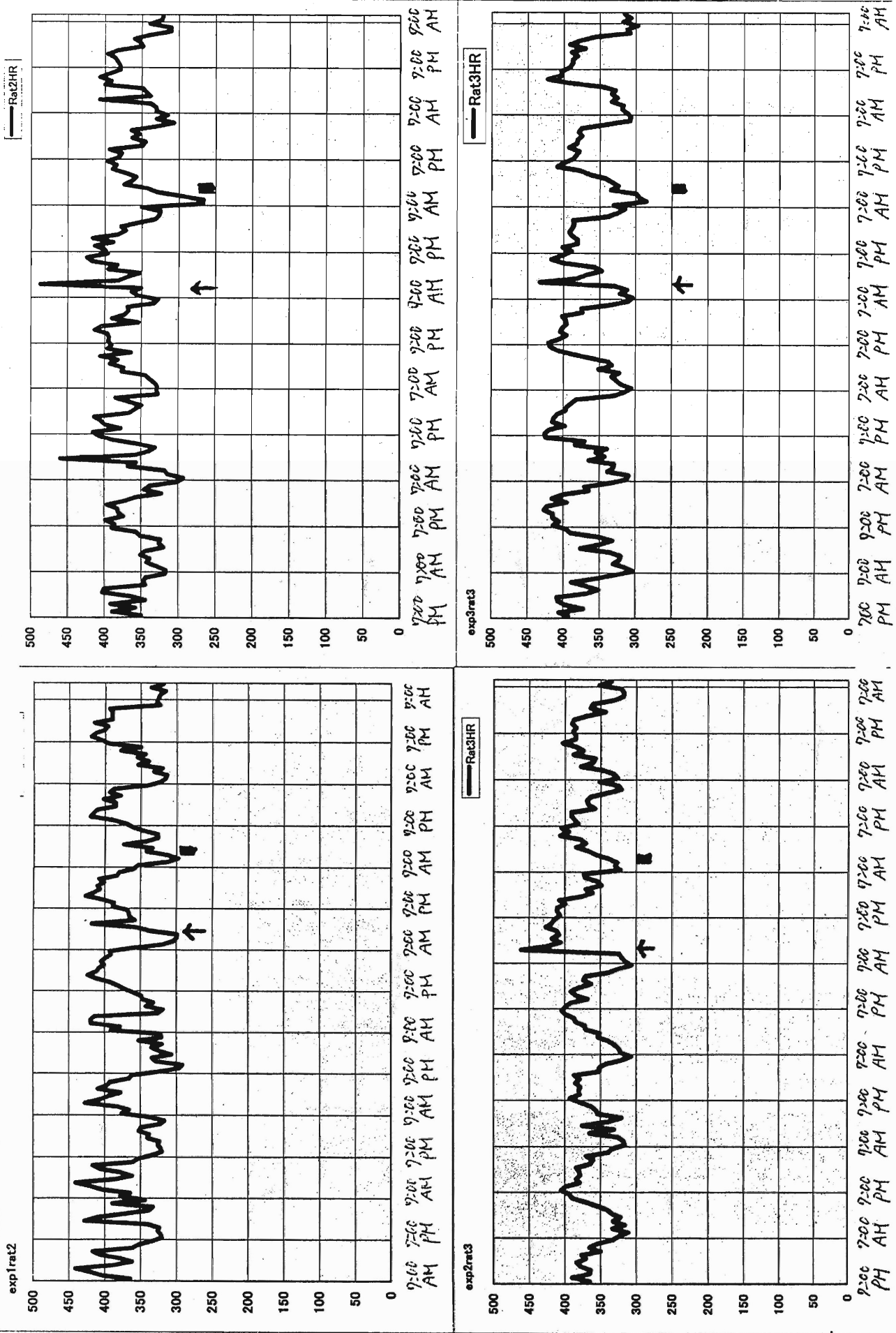
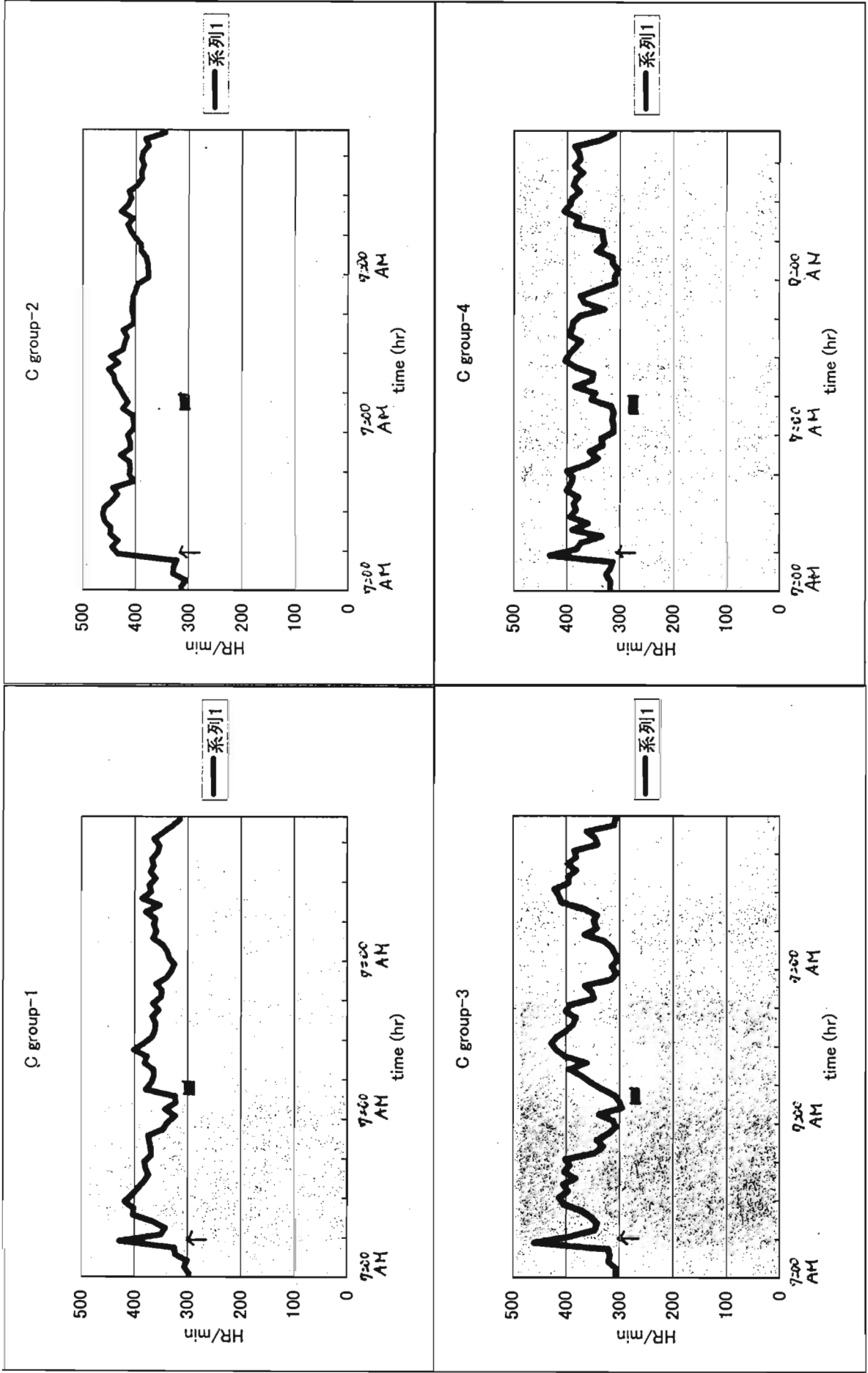


図 10 気管内投与日から最終日までの R-R 間隔の変動 (Control 群)



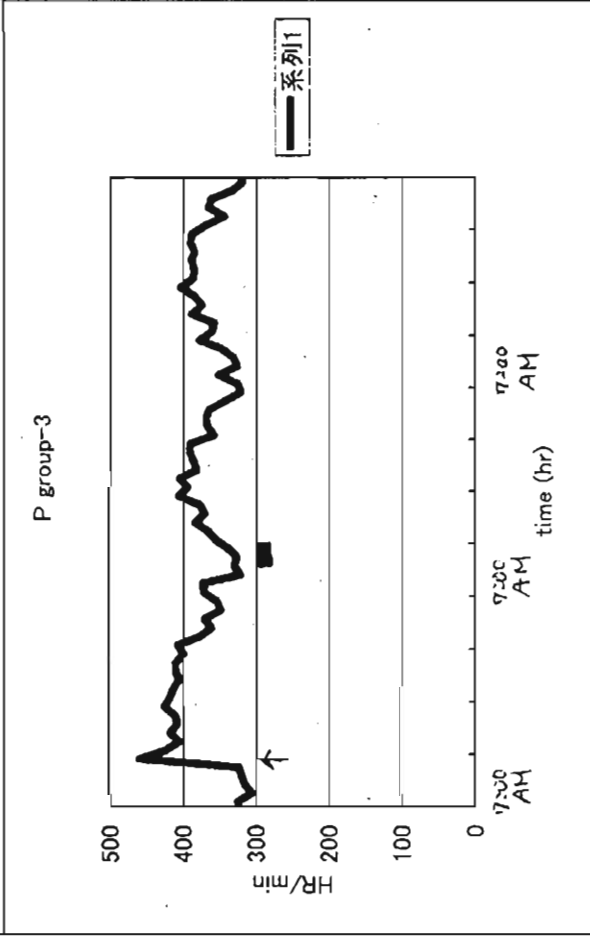
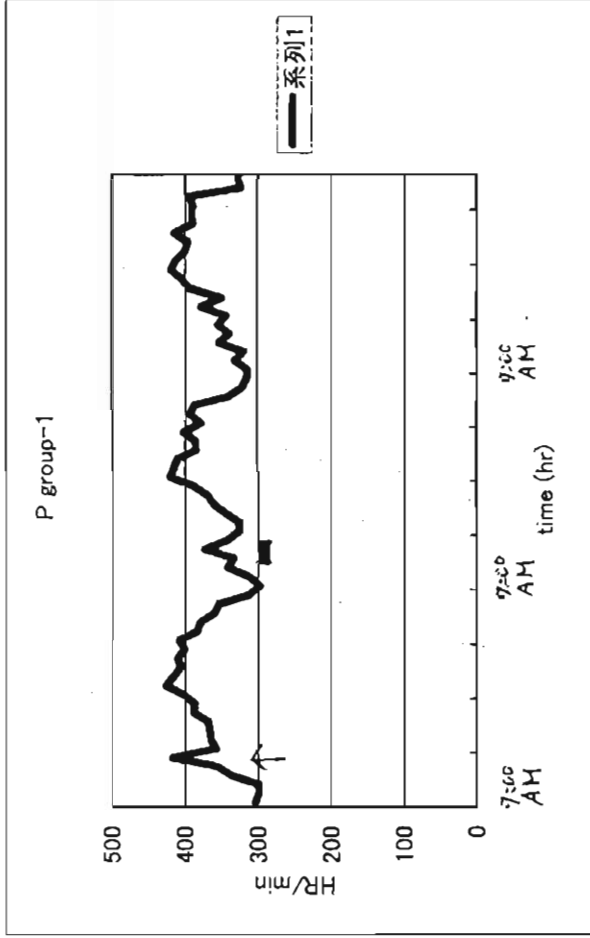
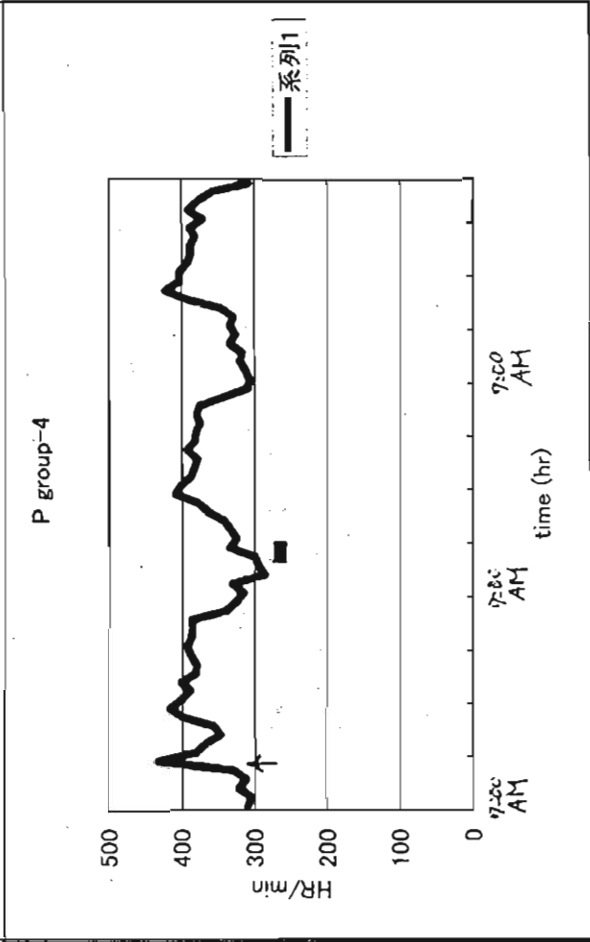
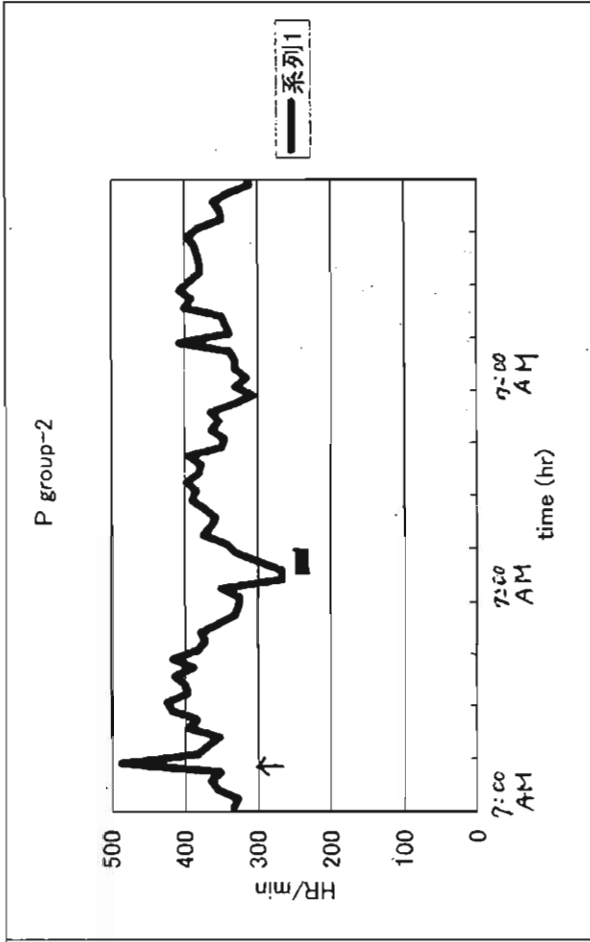
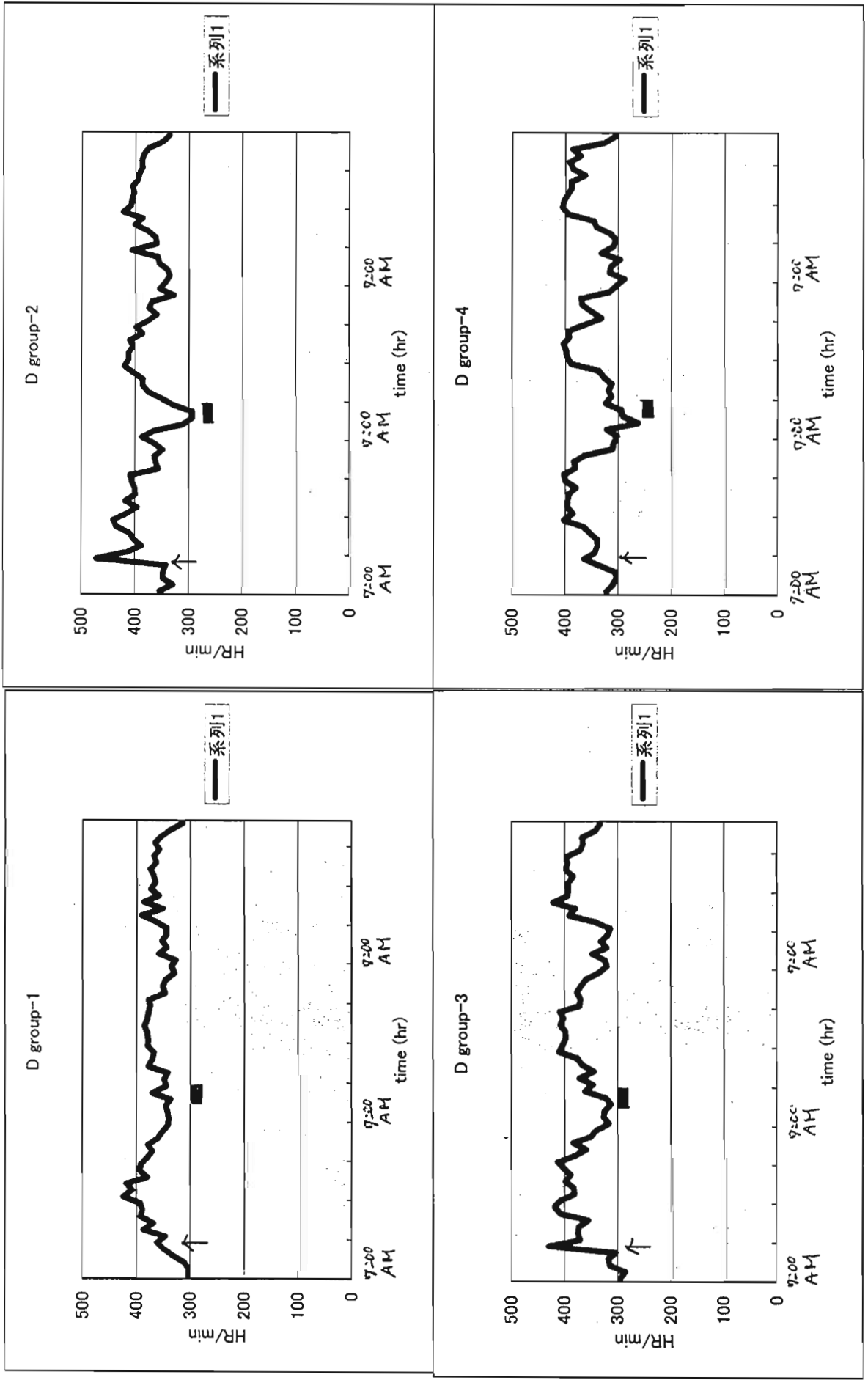
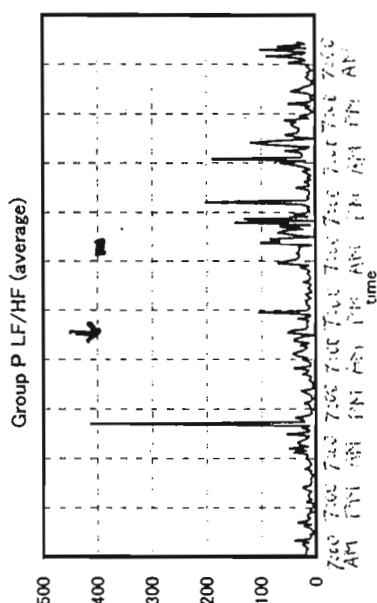
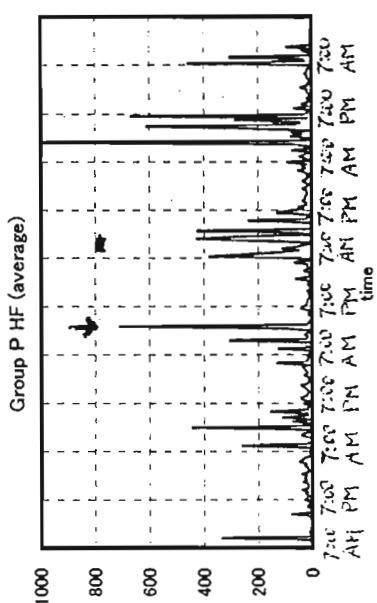
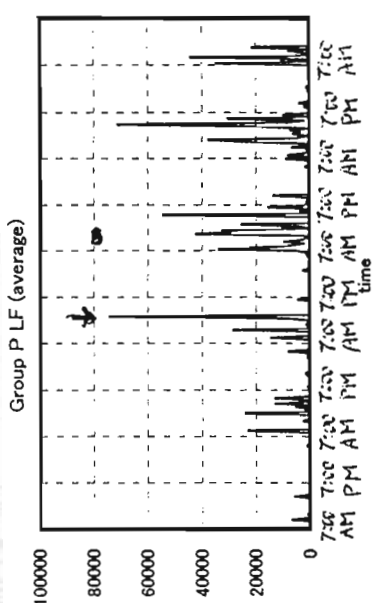
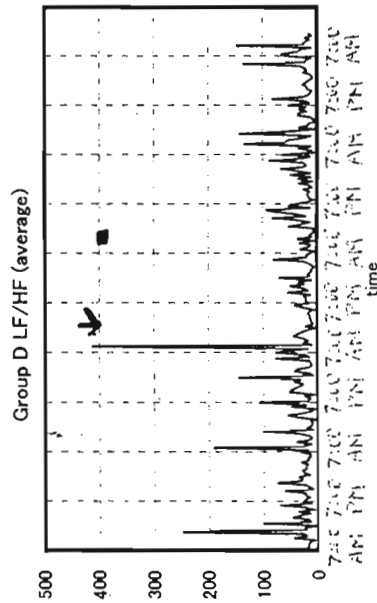
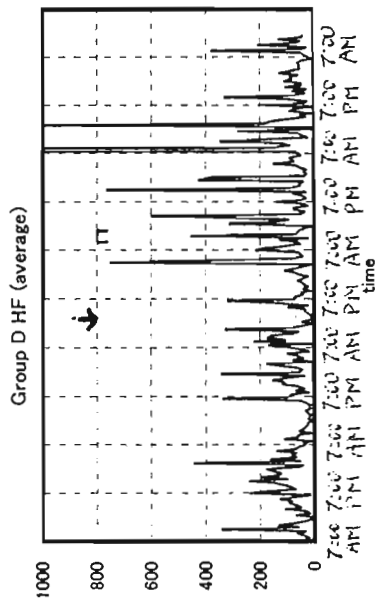
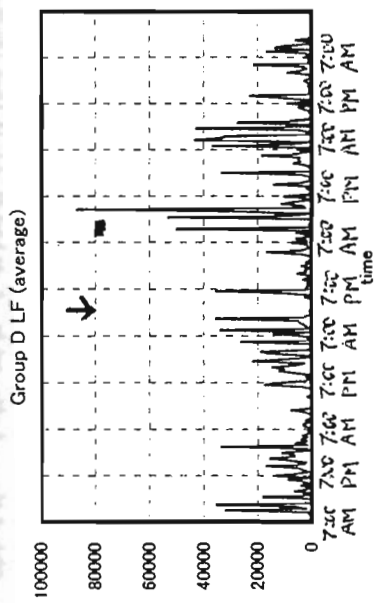
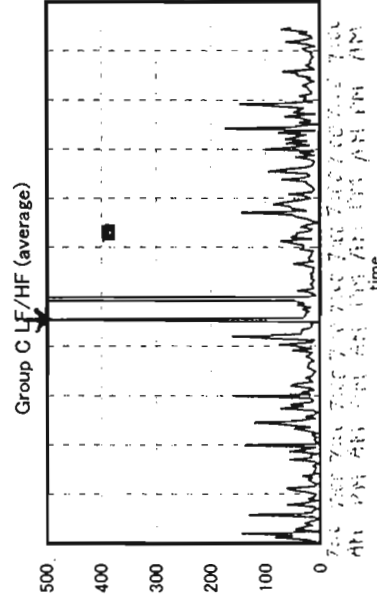
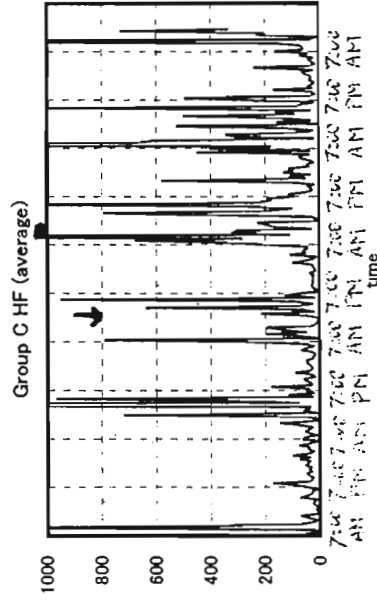
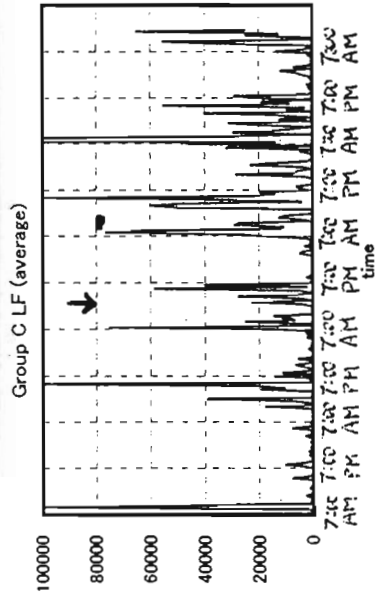


図 12 気管内投与日から最終日までの R-R 間隔の変動 (E-DEP 群)



↑ 気管内投与

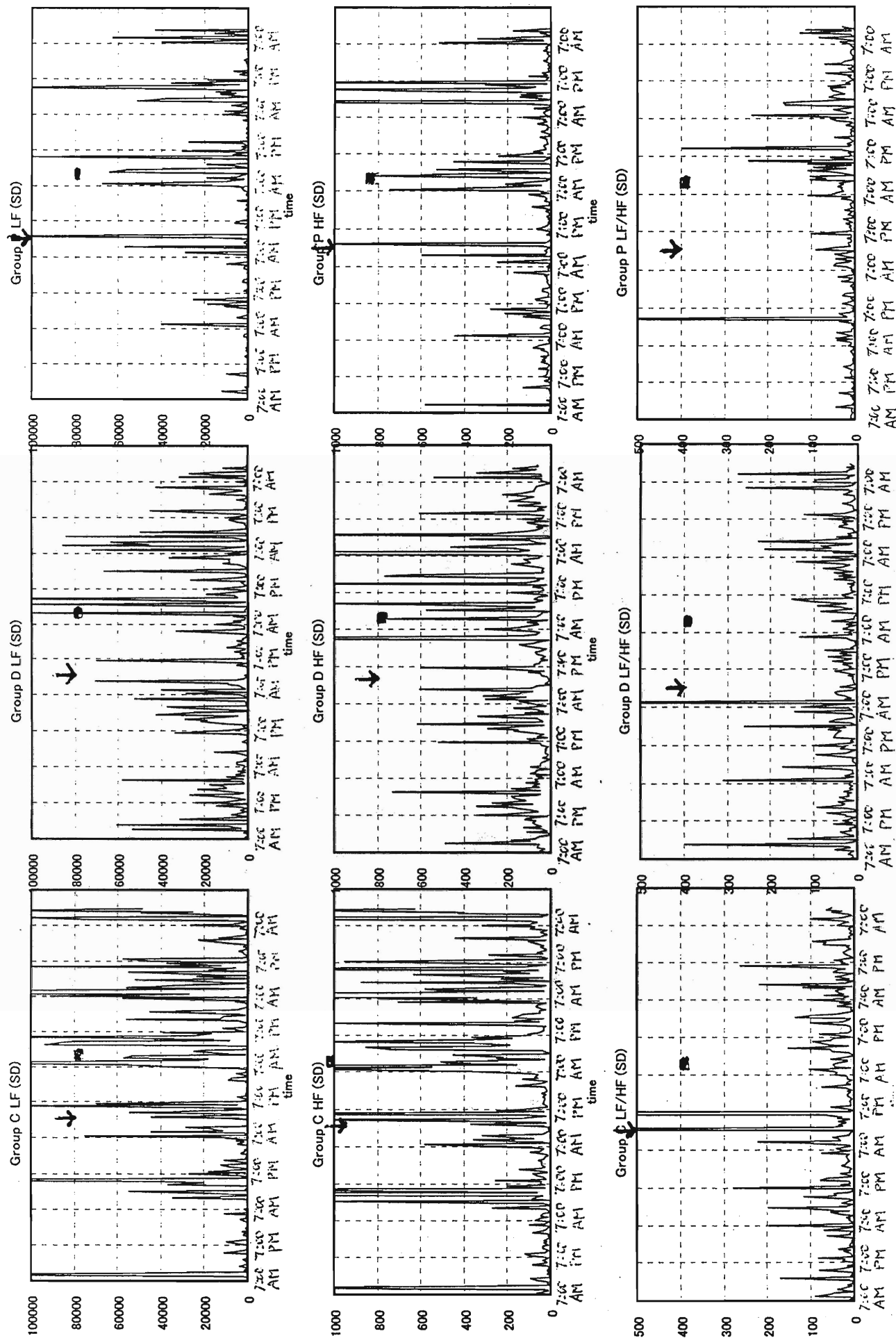
■ 3時間オゾン暴露



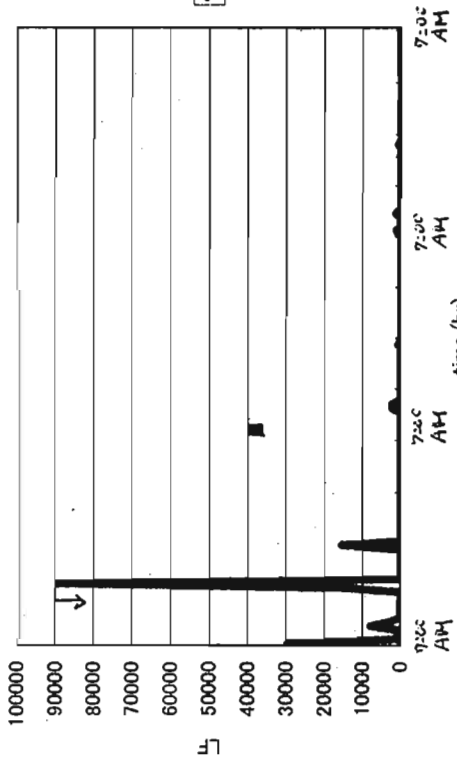
↑ 気管内投与

■ 3時間オゾン暴露

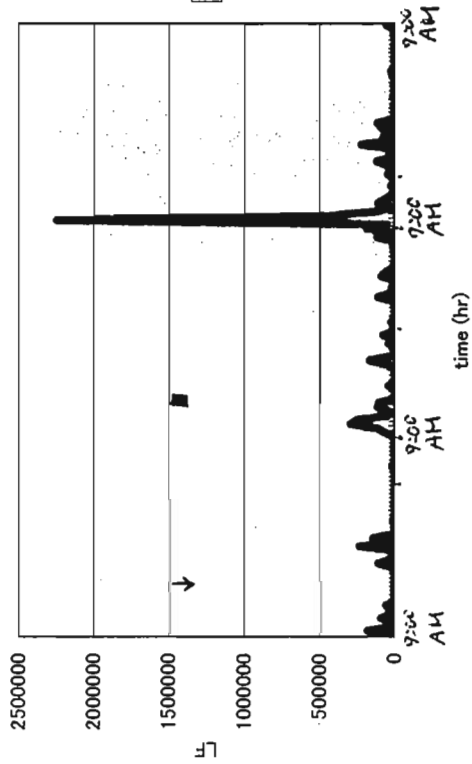
図 14 LF, HF, LF/HF 比の標準誤差の変動



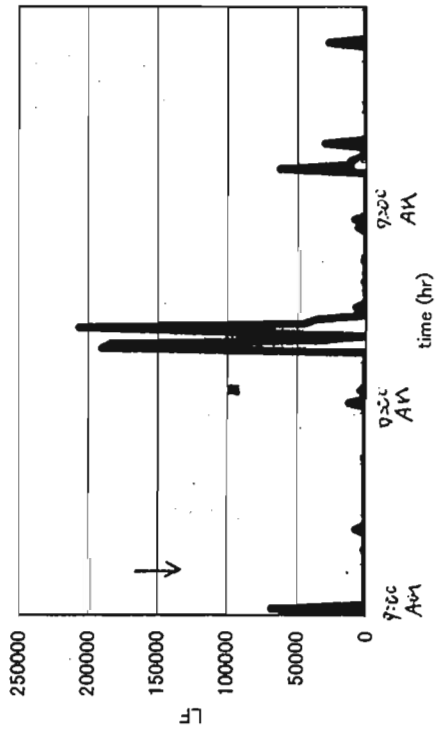
C group-1



C group-2



C group-3



C group-4

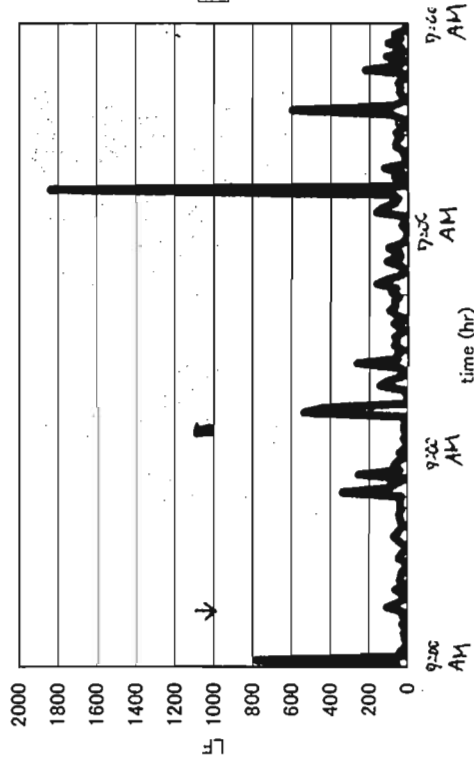
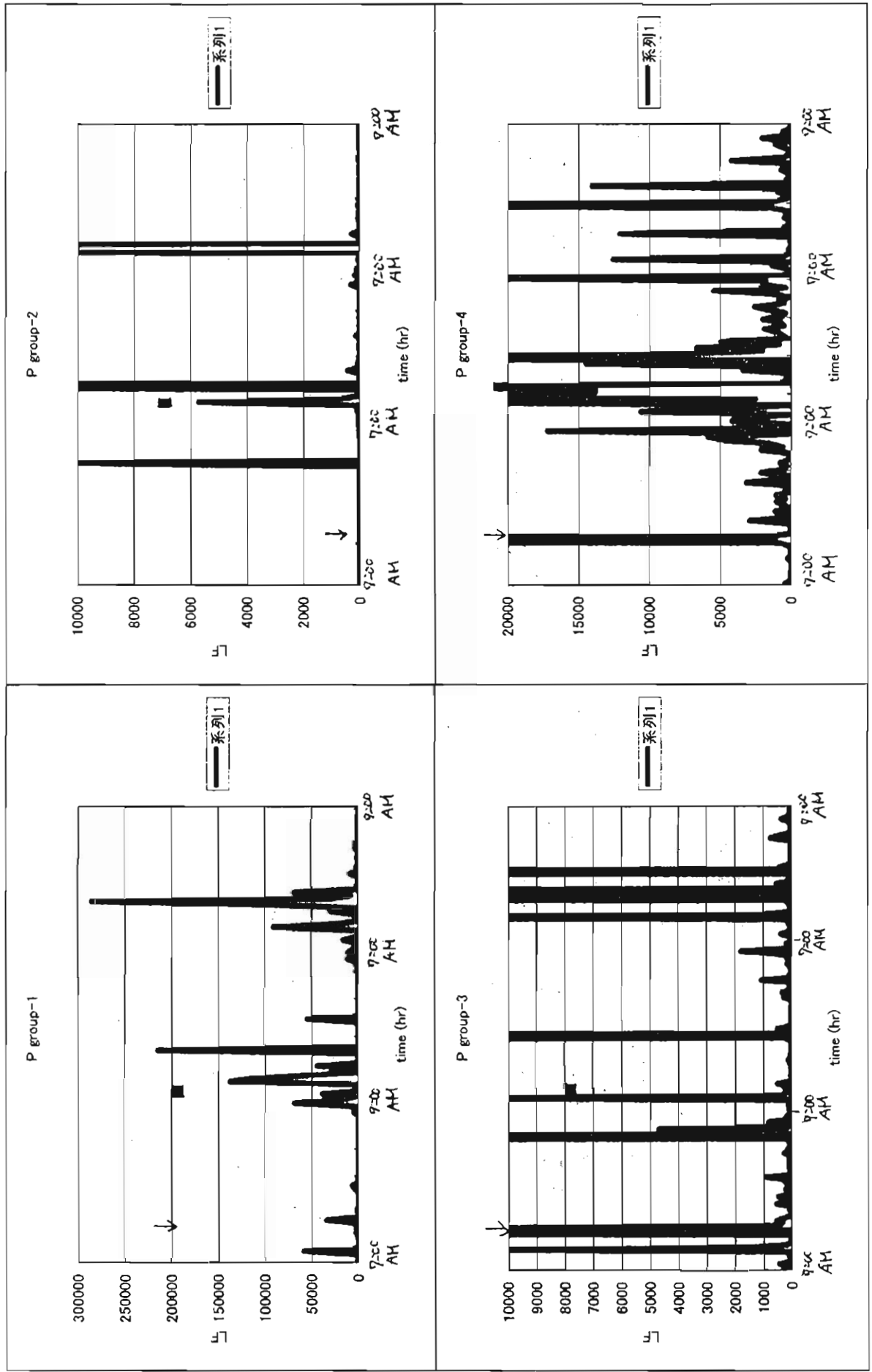


図 16 気管内投与日から最終日までの LF の変動 (E-PM 群)



↑ 気管内投与

■ 3時間オゾン暴露

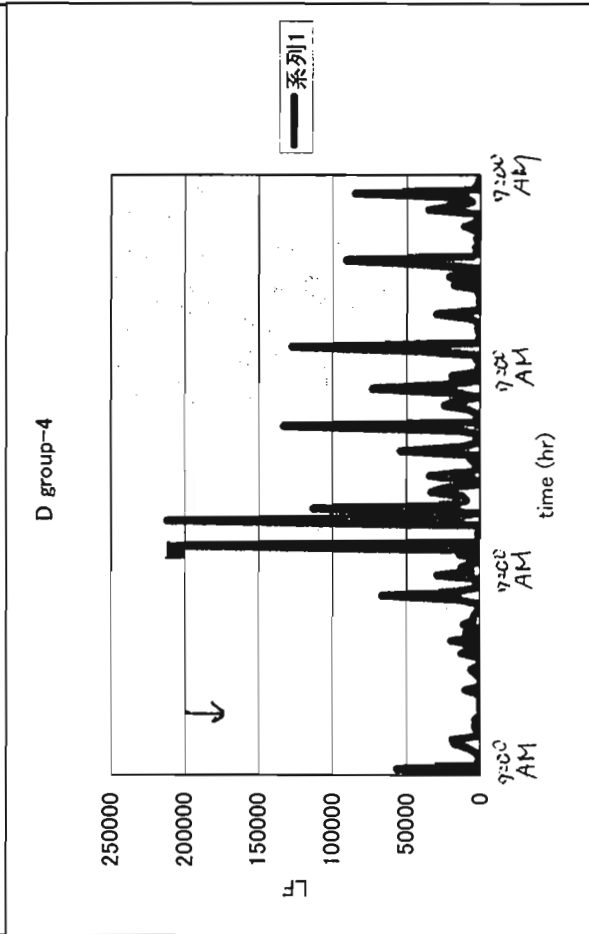
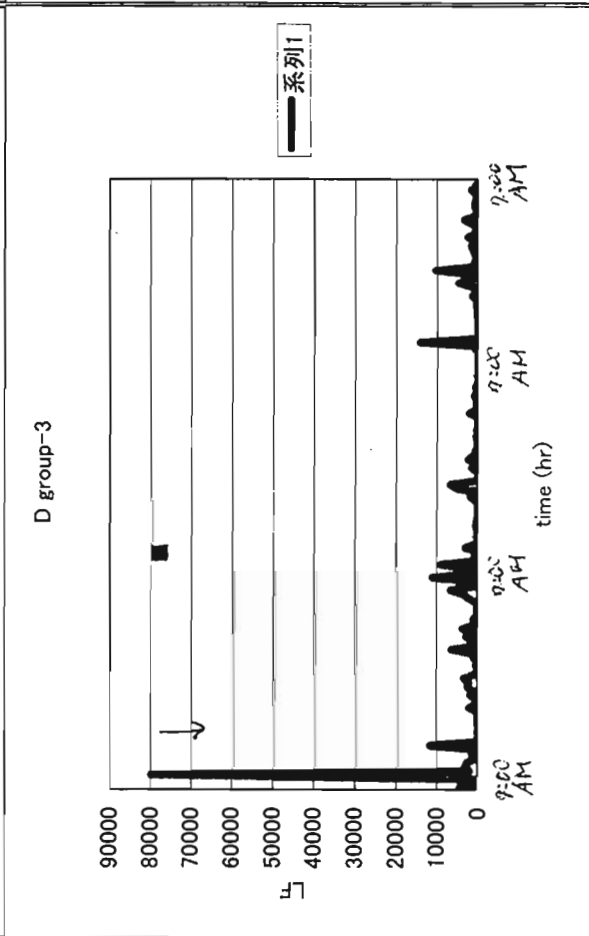
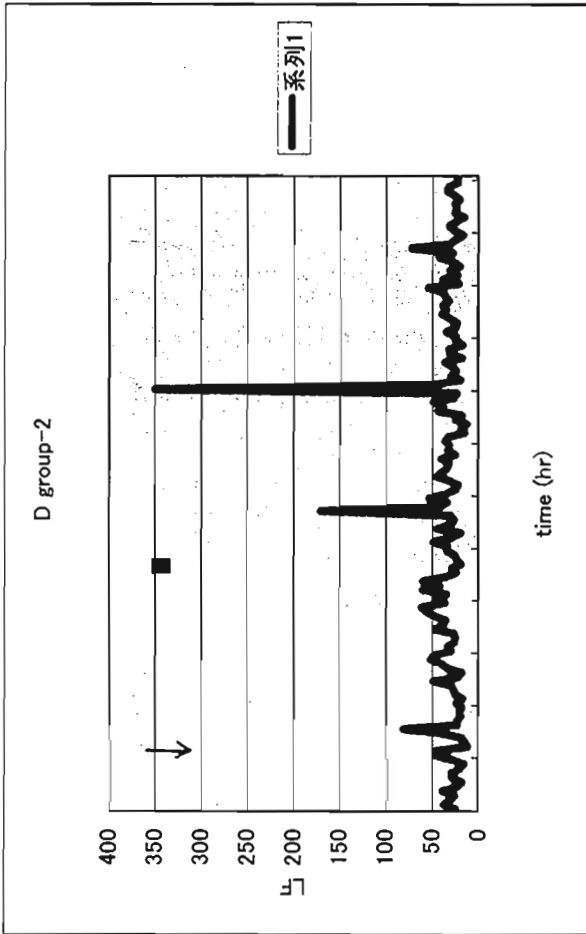
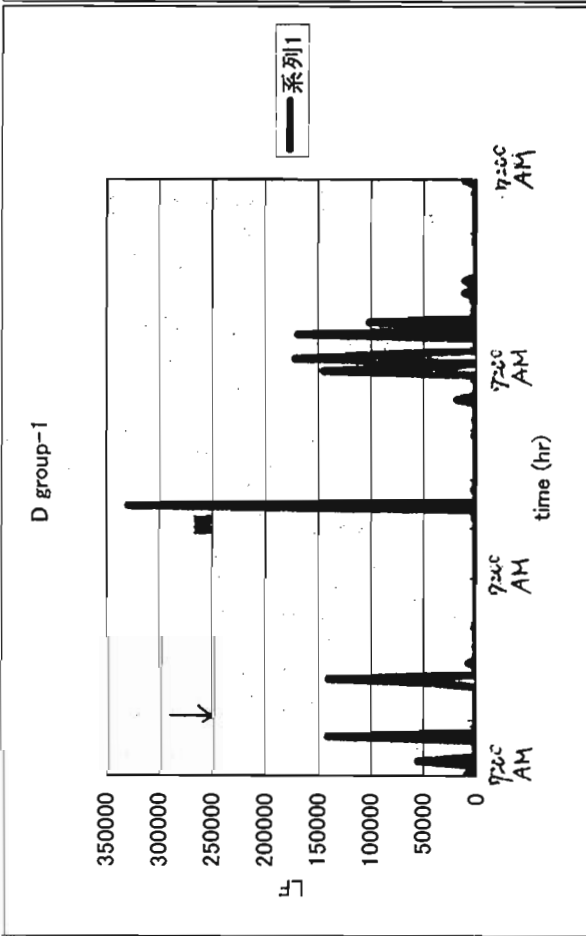
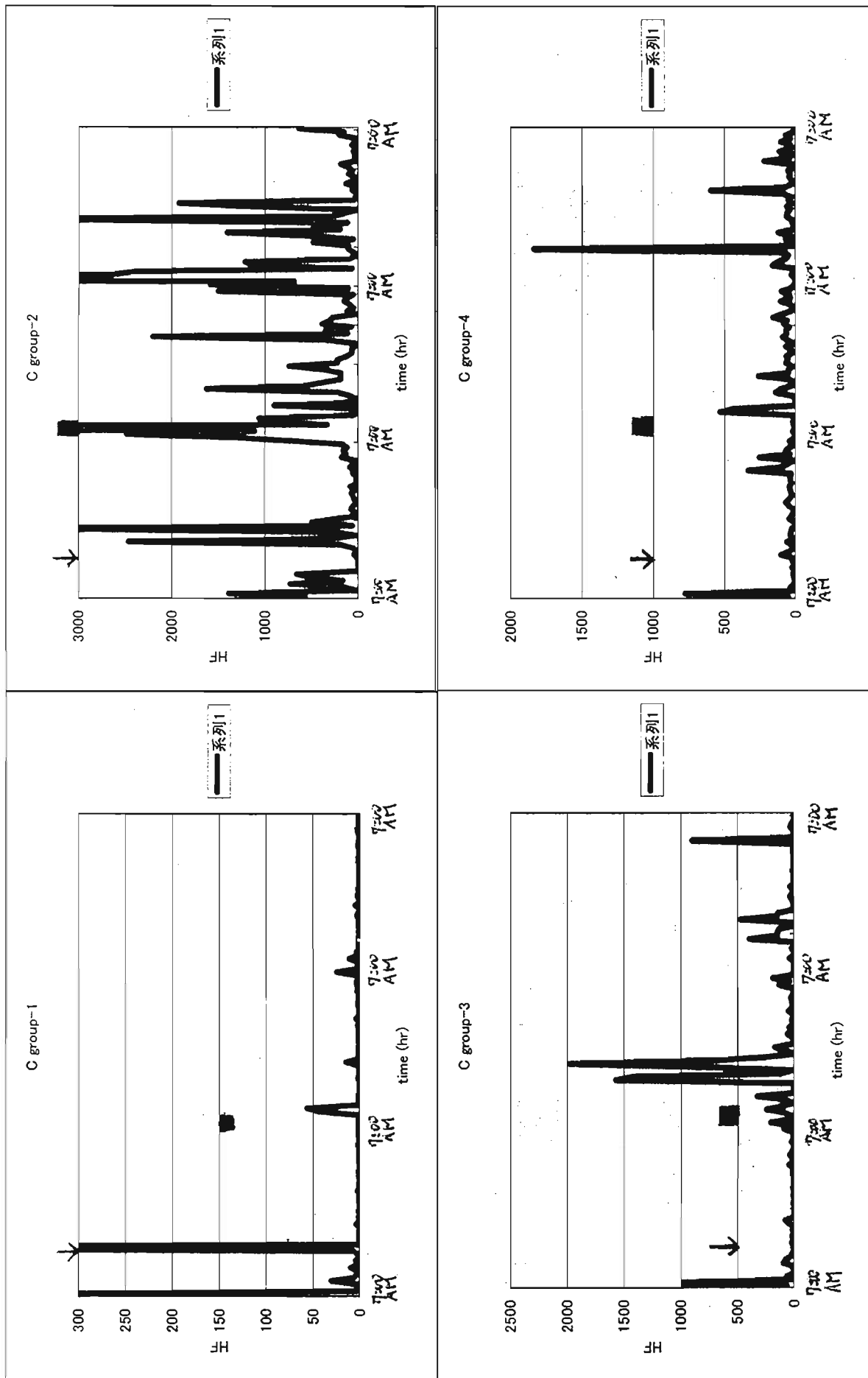


図 18 気管内投与日から最終日までの HF の変動 (Control 群)



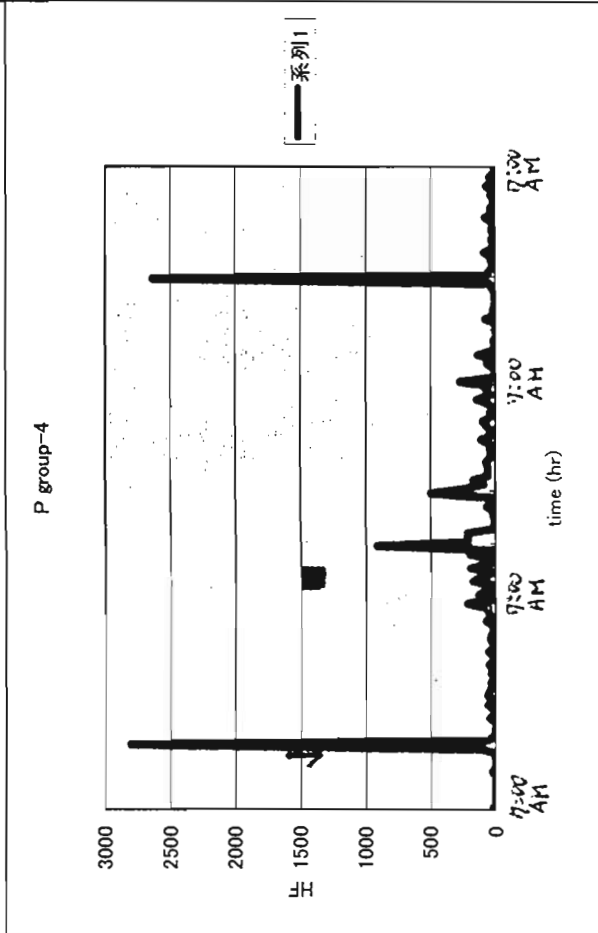
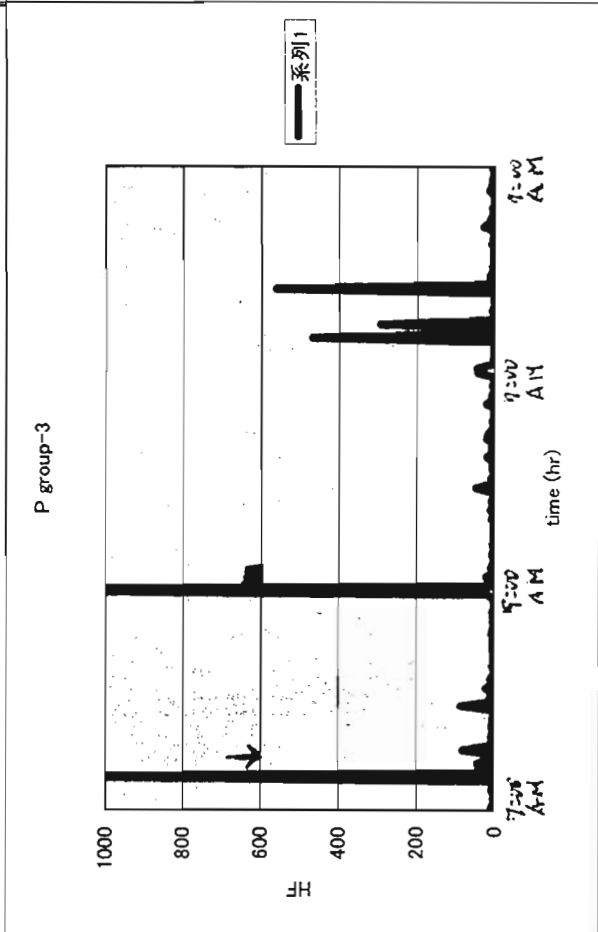
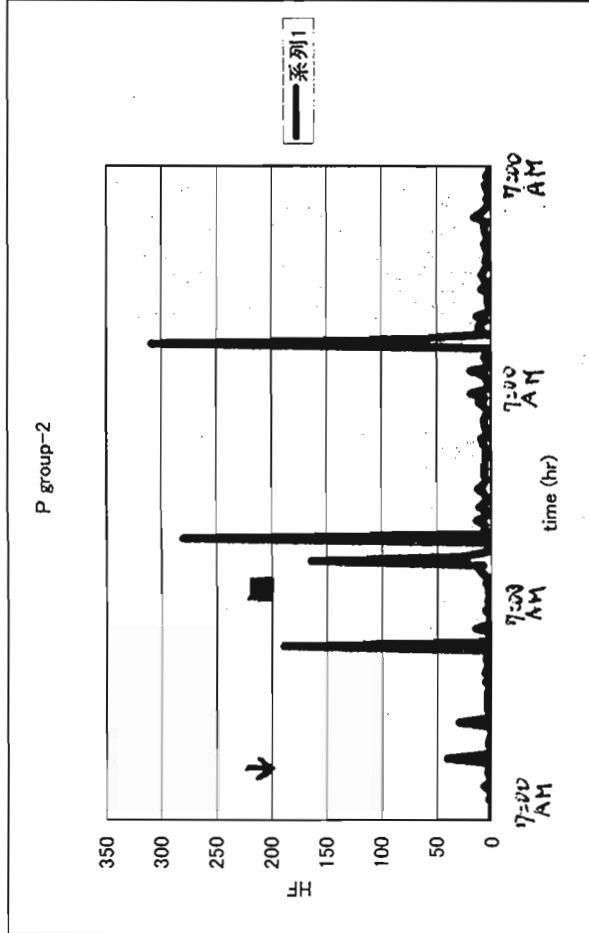
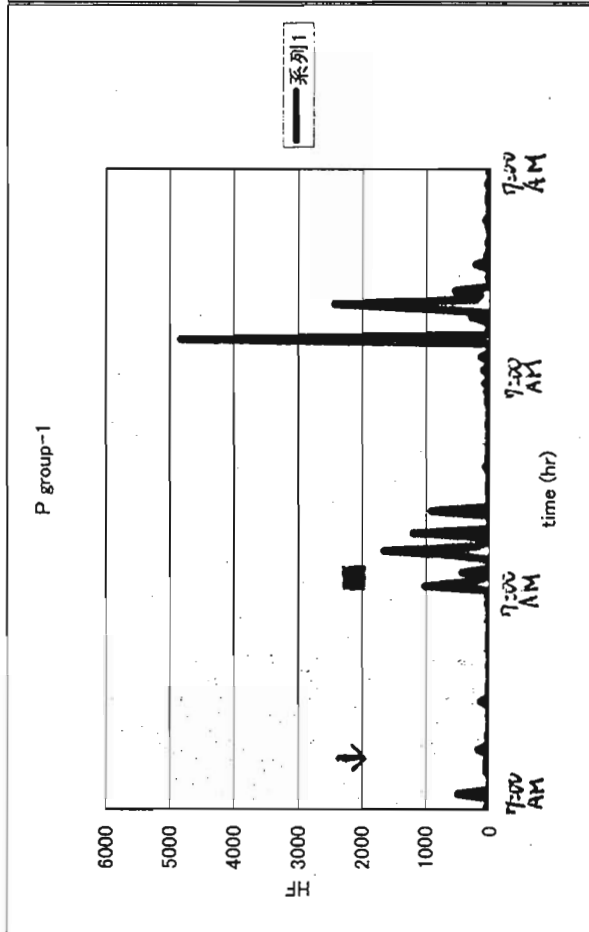


図 20 気管内投与日から最終日までの HF の変動 (E-DEP 群)

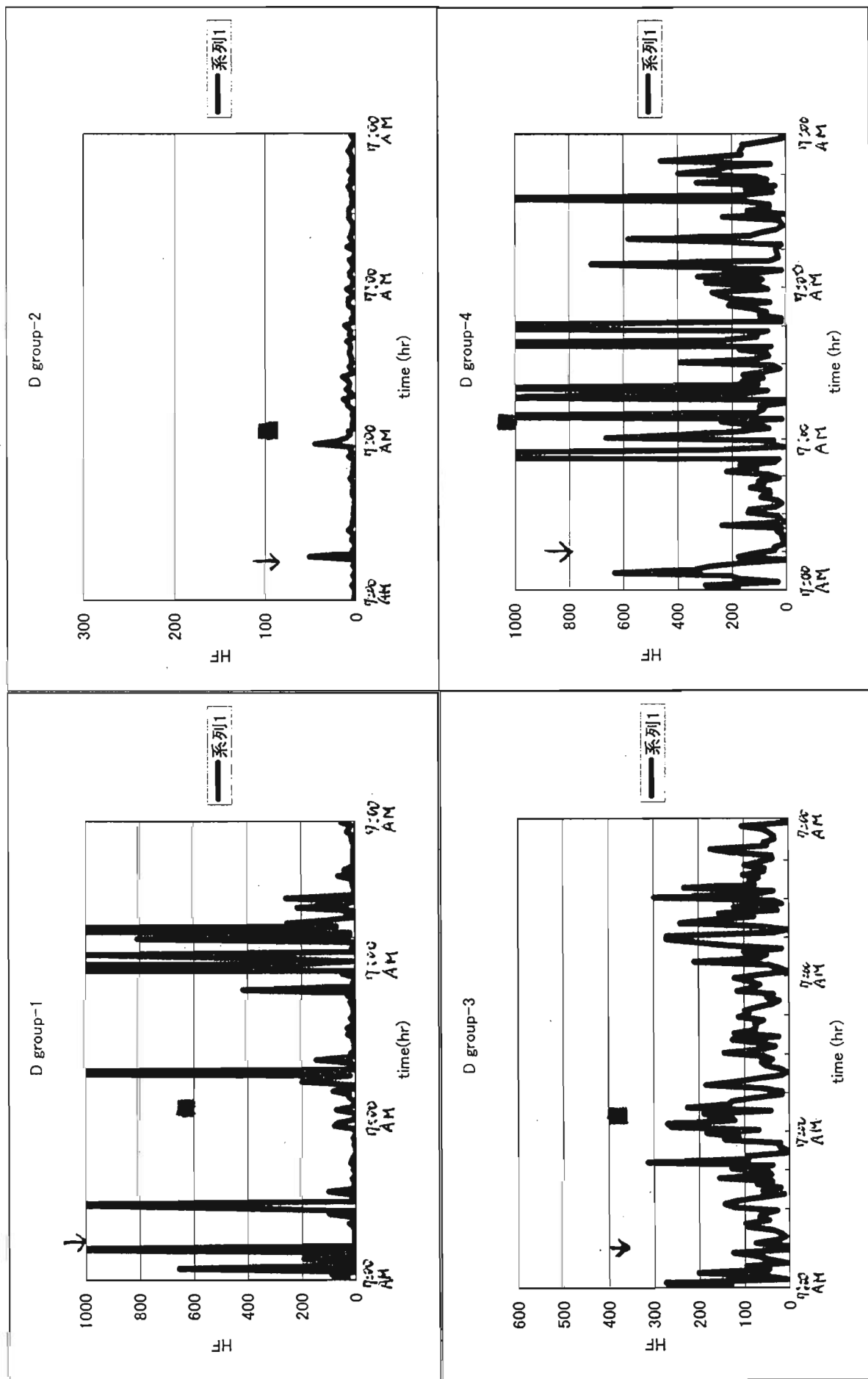
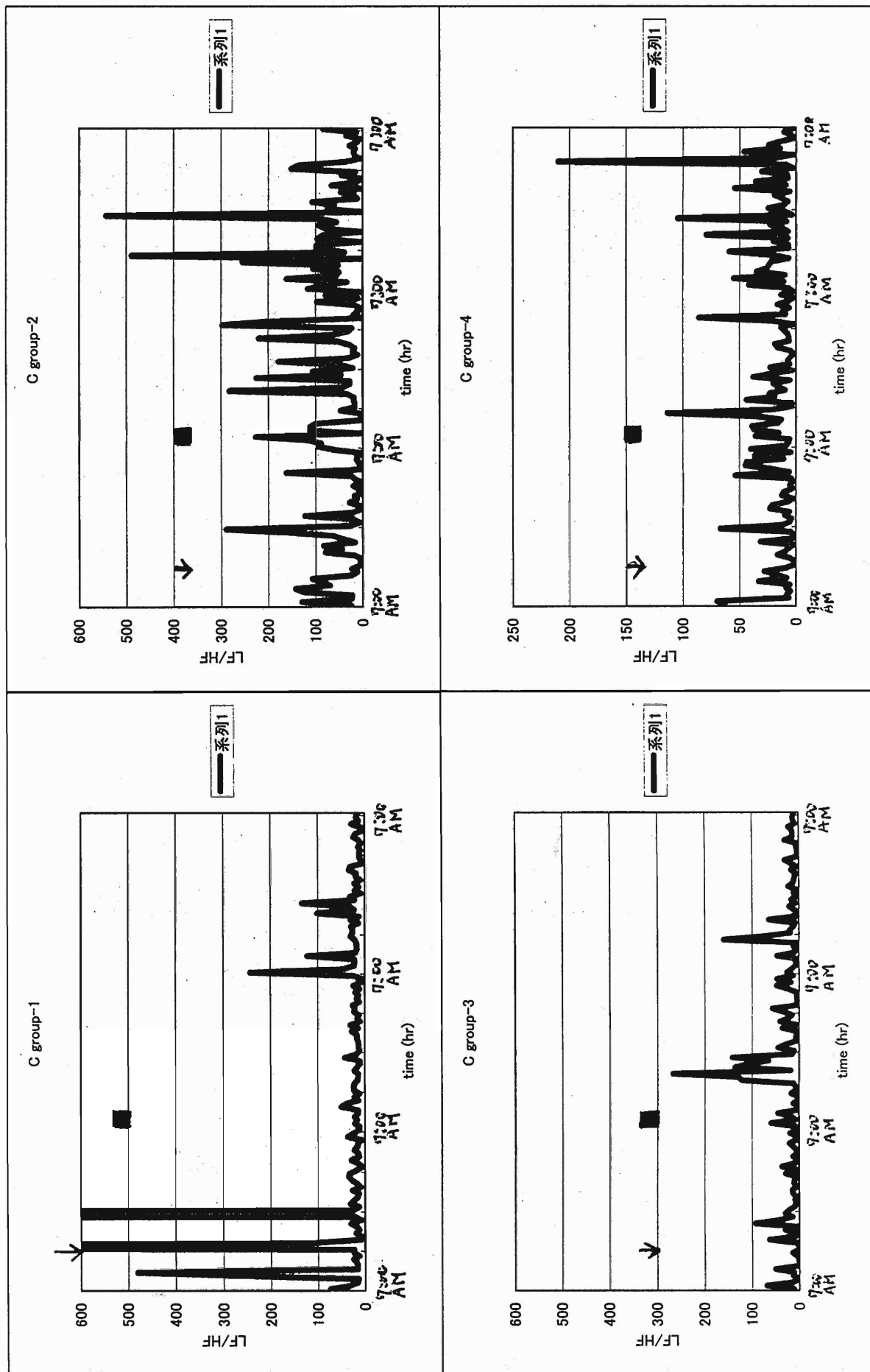


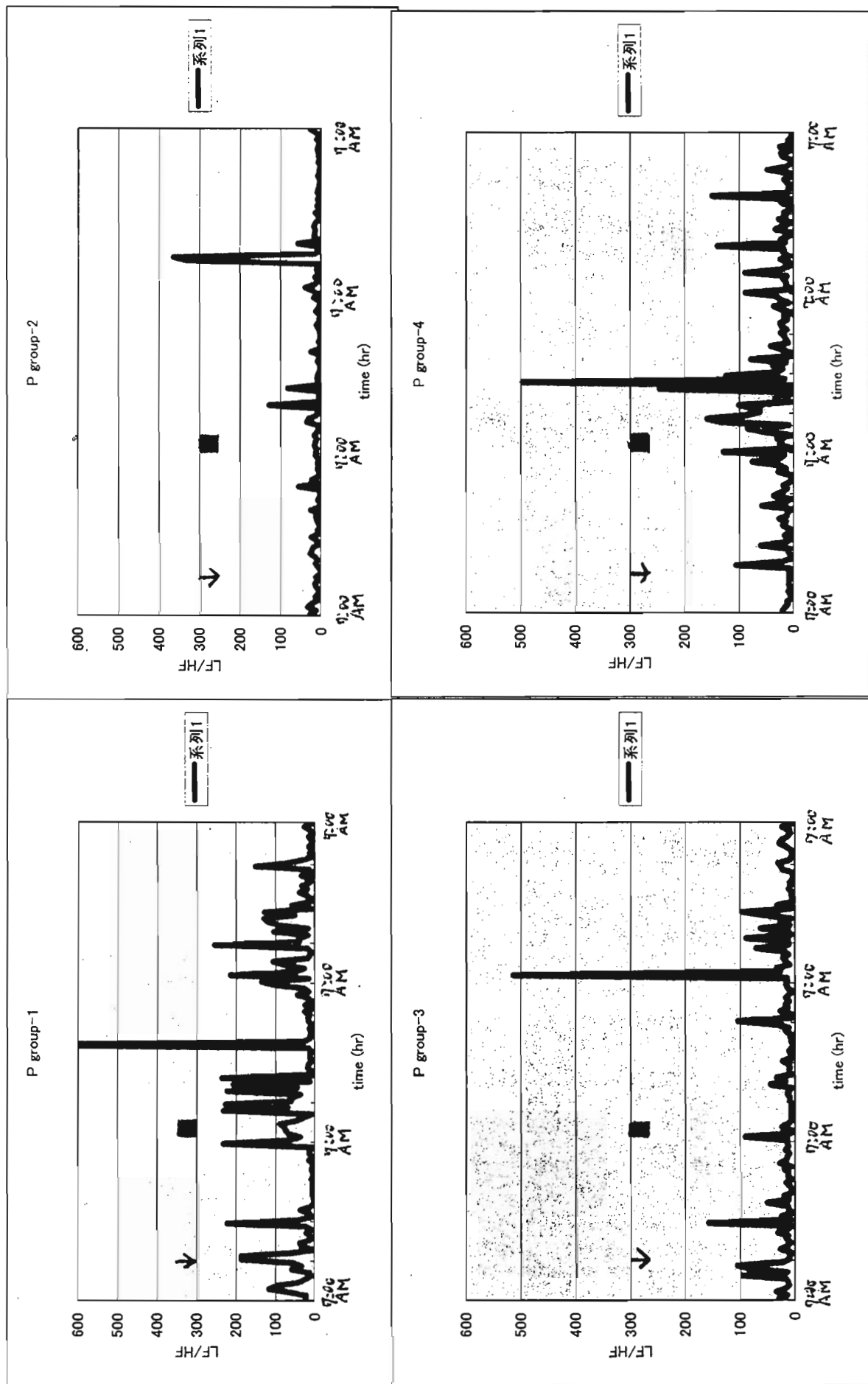
図 21 気管内投与日から最終日までの LF/HF の変動 (Control 群)



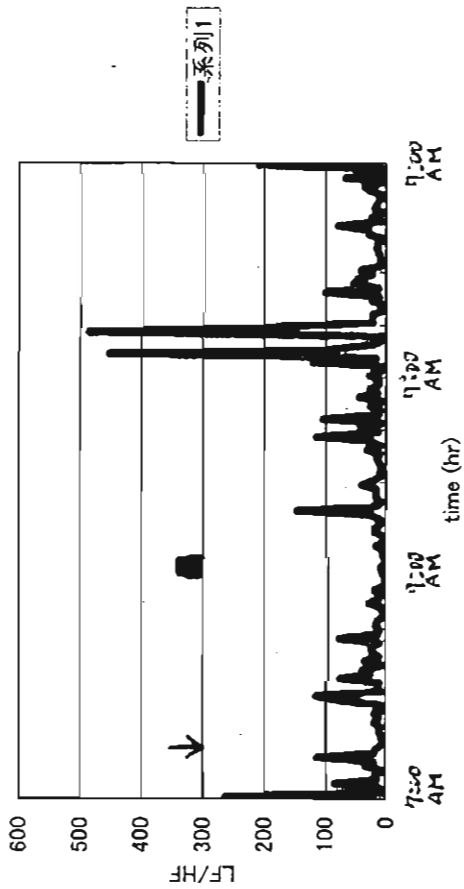
↑ 気管内投与

■ 3時間オゾン暴露

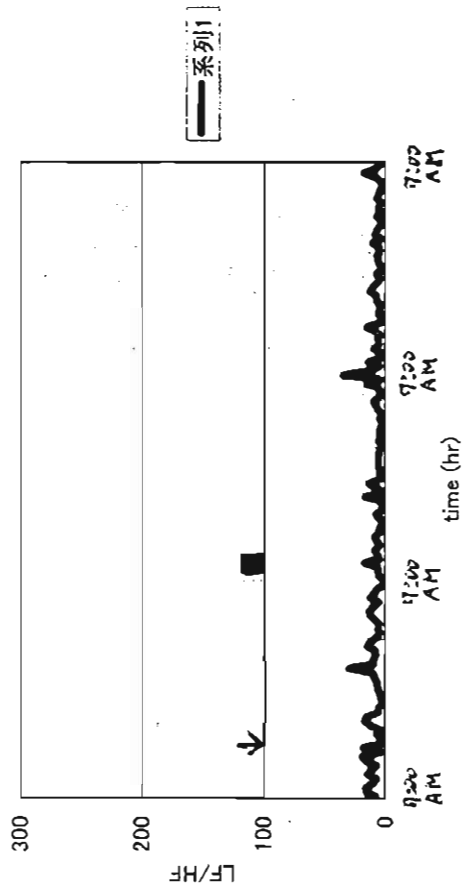
図 22 気管内投与日から最終日までの LF/HF の変動 (E-PM 群)



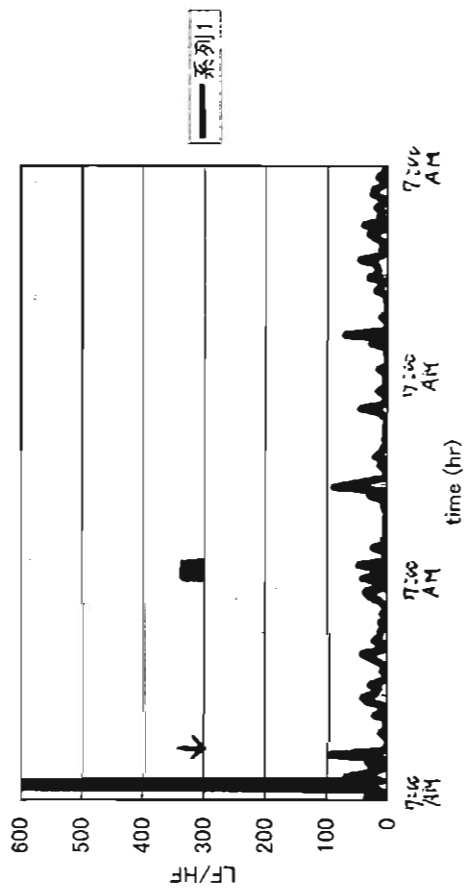
D group-1



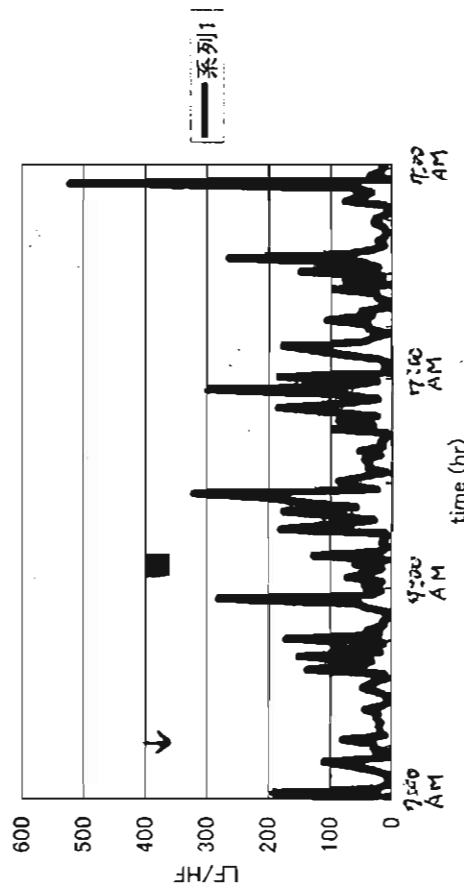
D group-2



D group-3



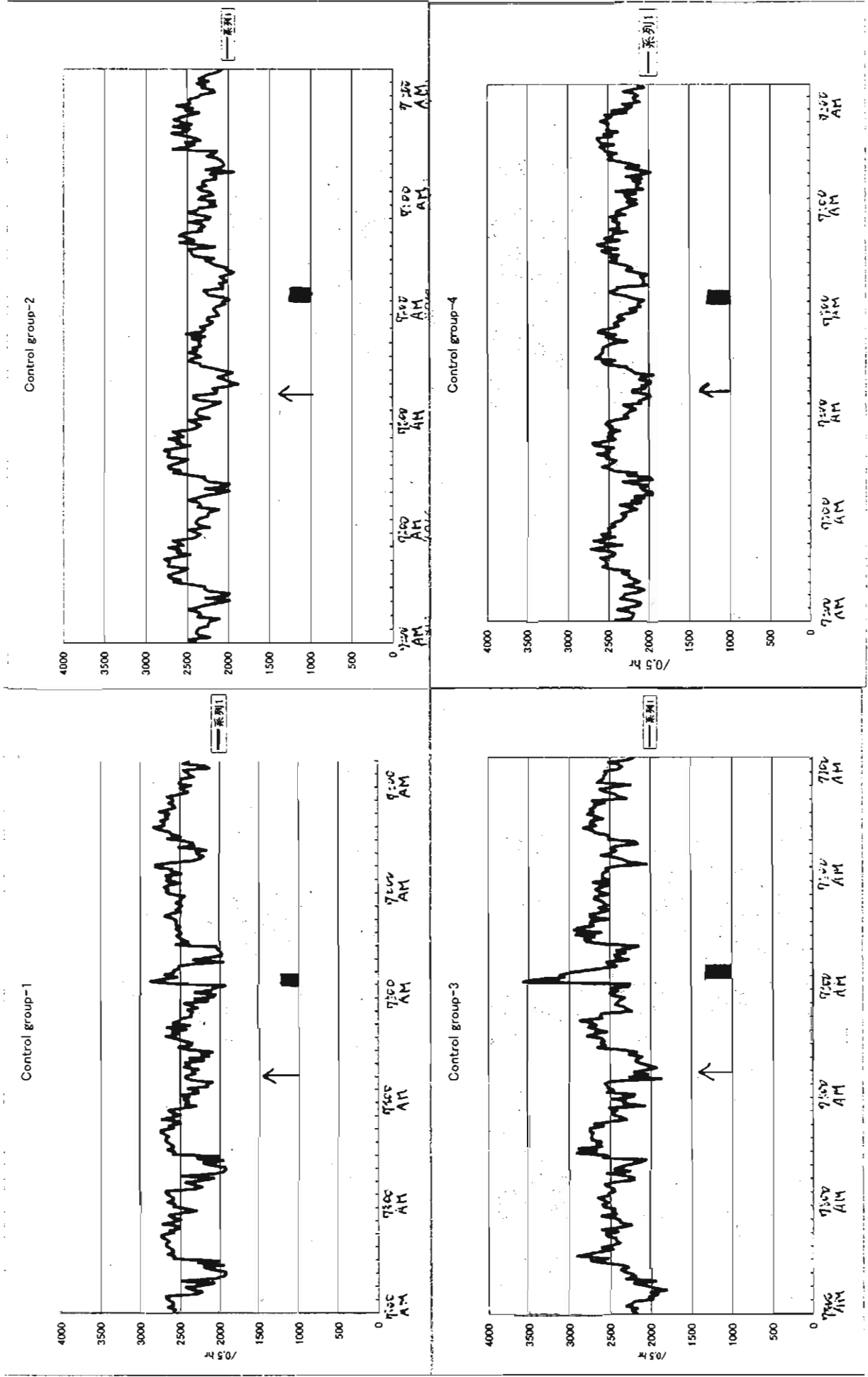
D group-4

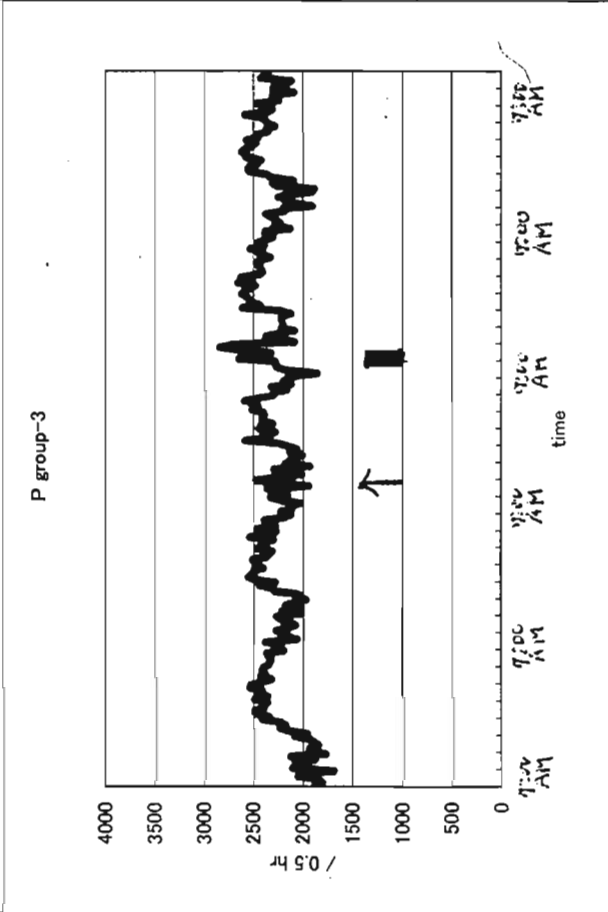
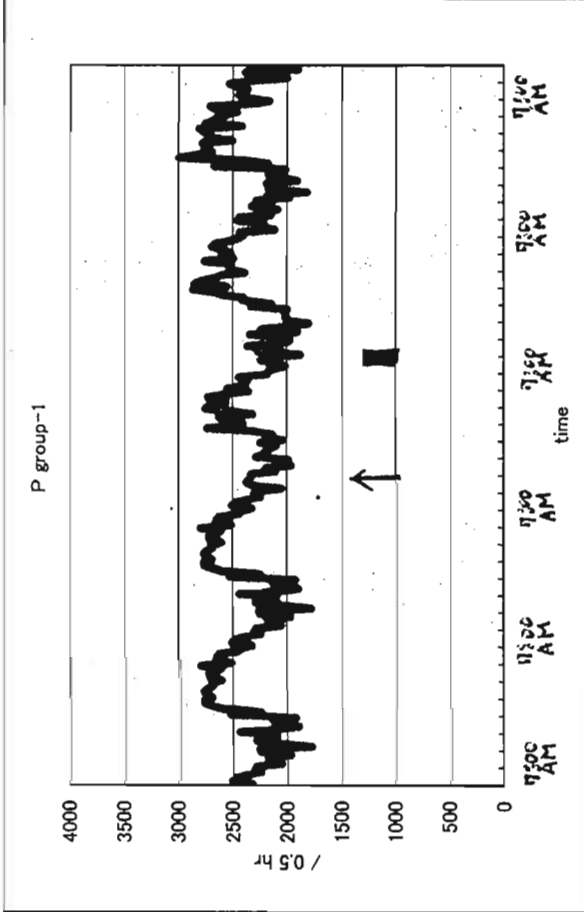
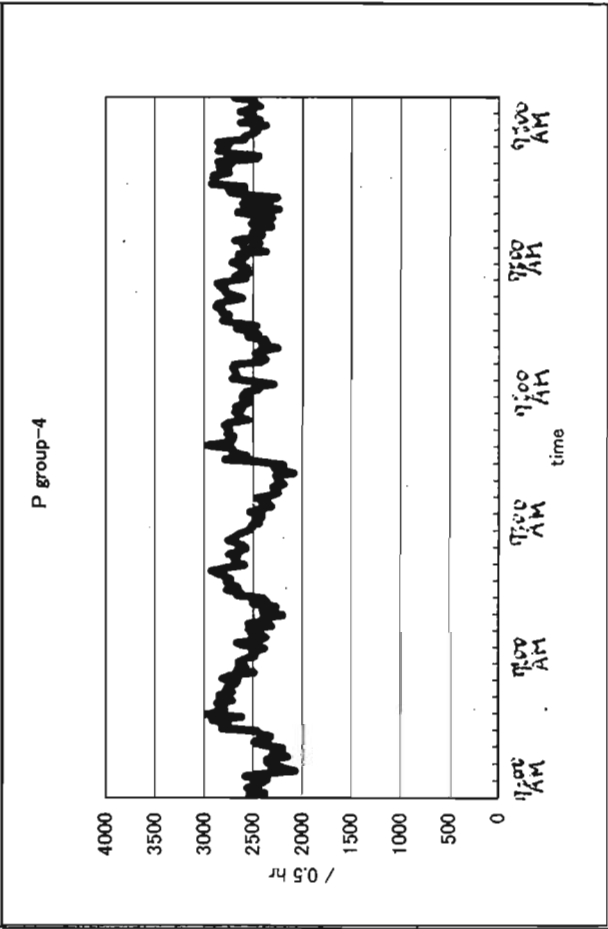
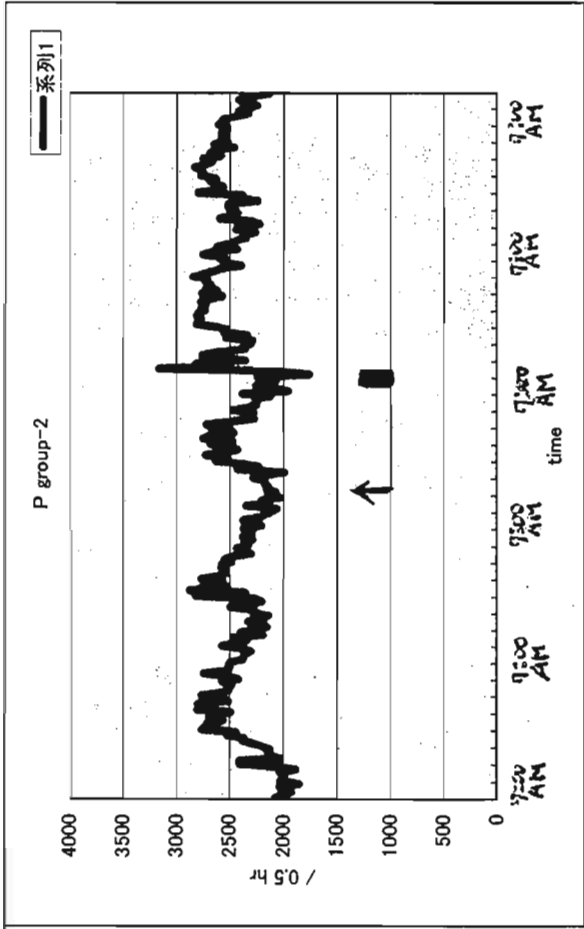


↑ 気管内投与

■ 3時間オゾン暴露

図 24 呼吸数の変動 (Control 群)

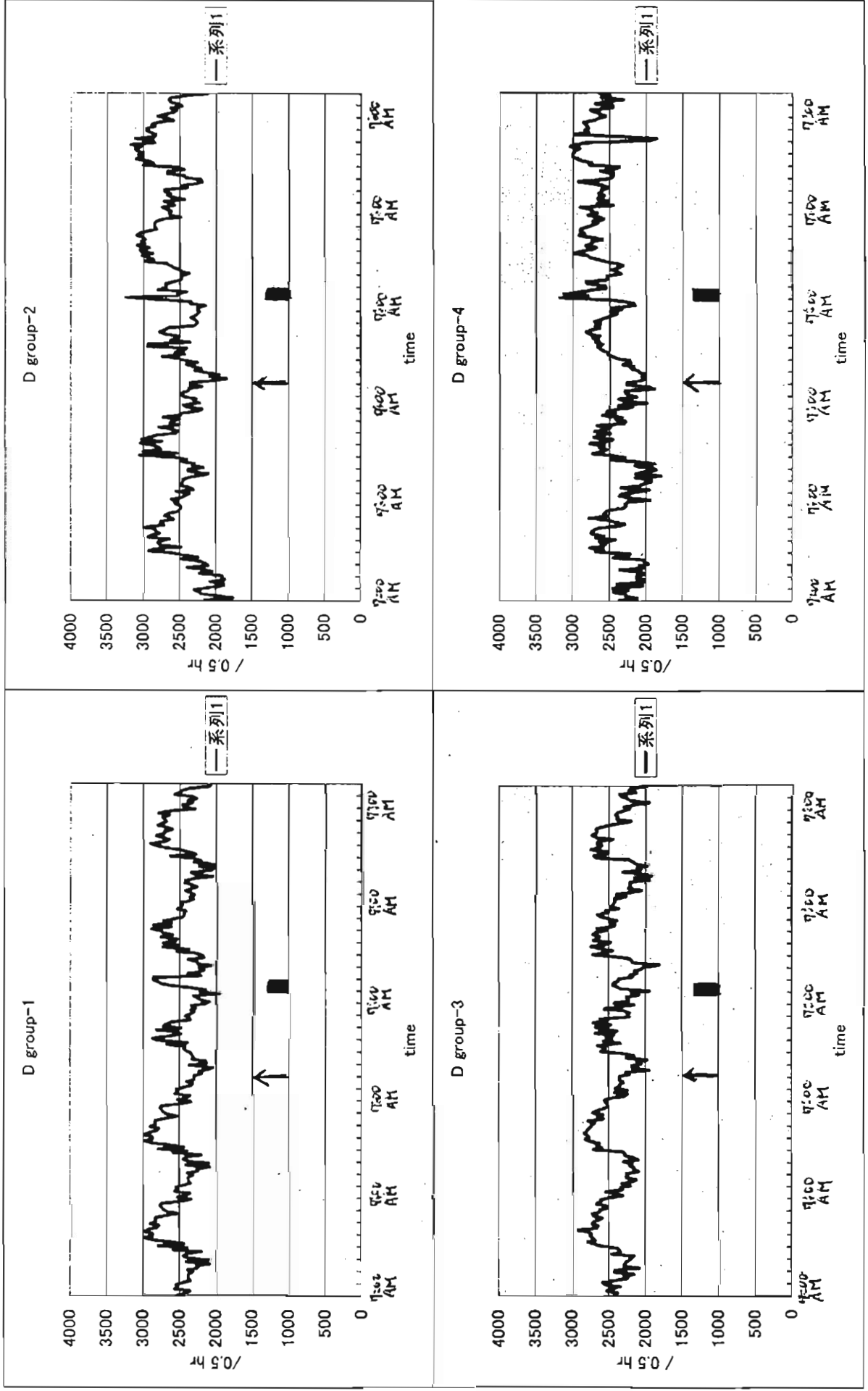




↑ 気管内投与

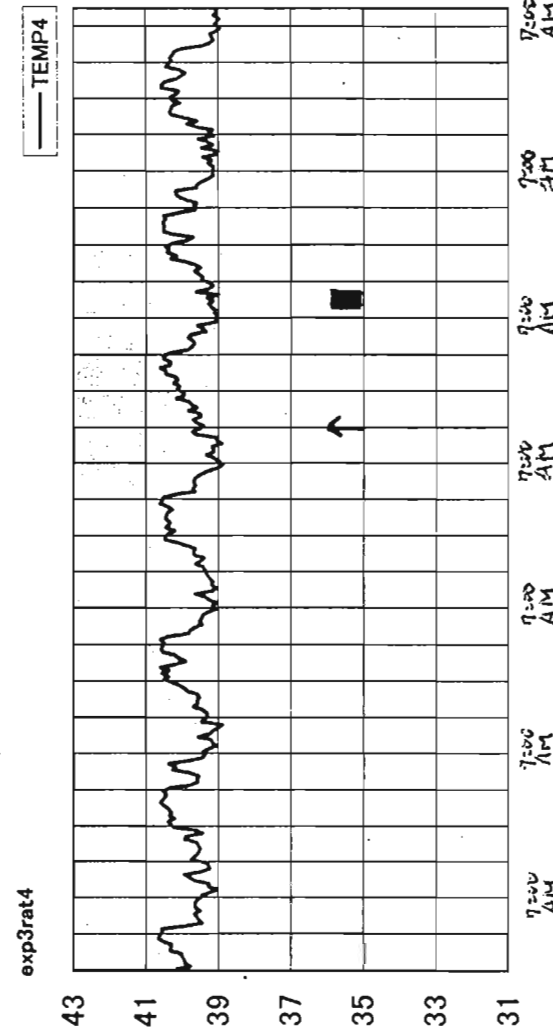
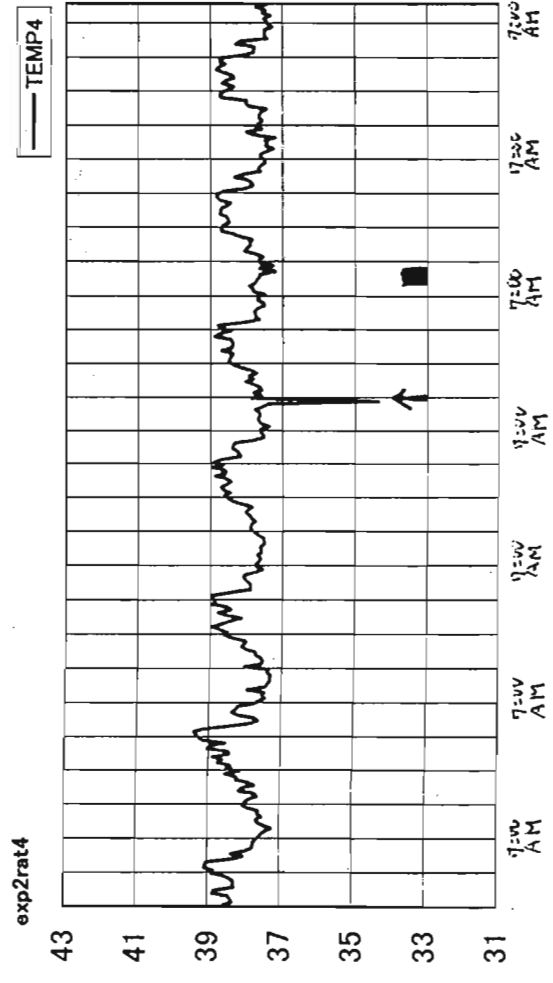
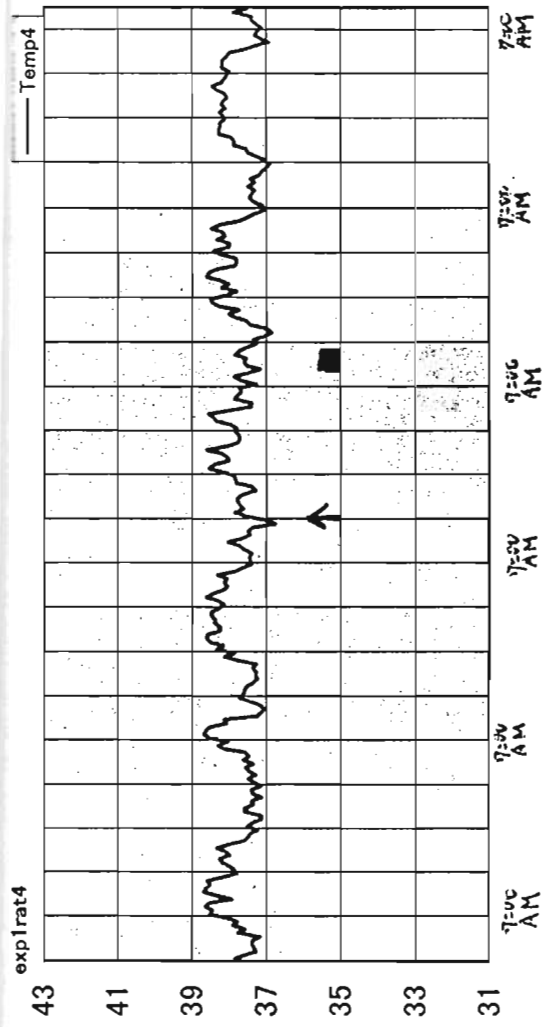
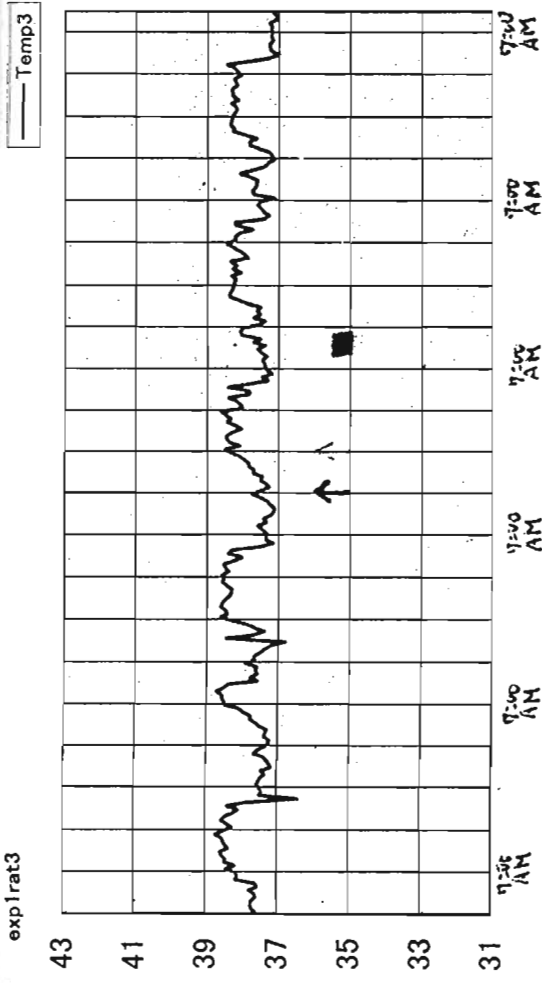
■ 3 時間オゾン暴露

図 26 呼吸数の変動 (E-DEP 群)



↑ 気管内投与

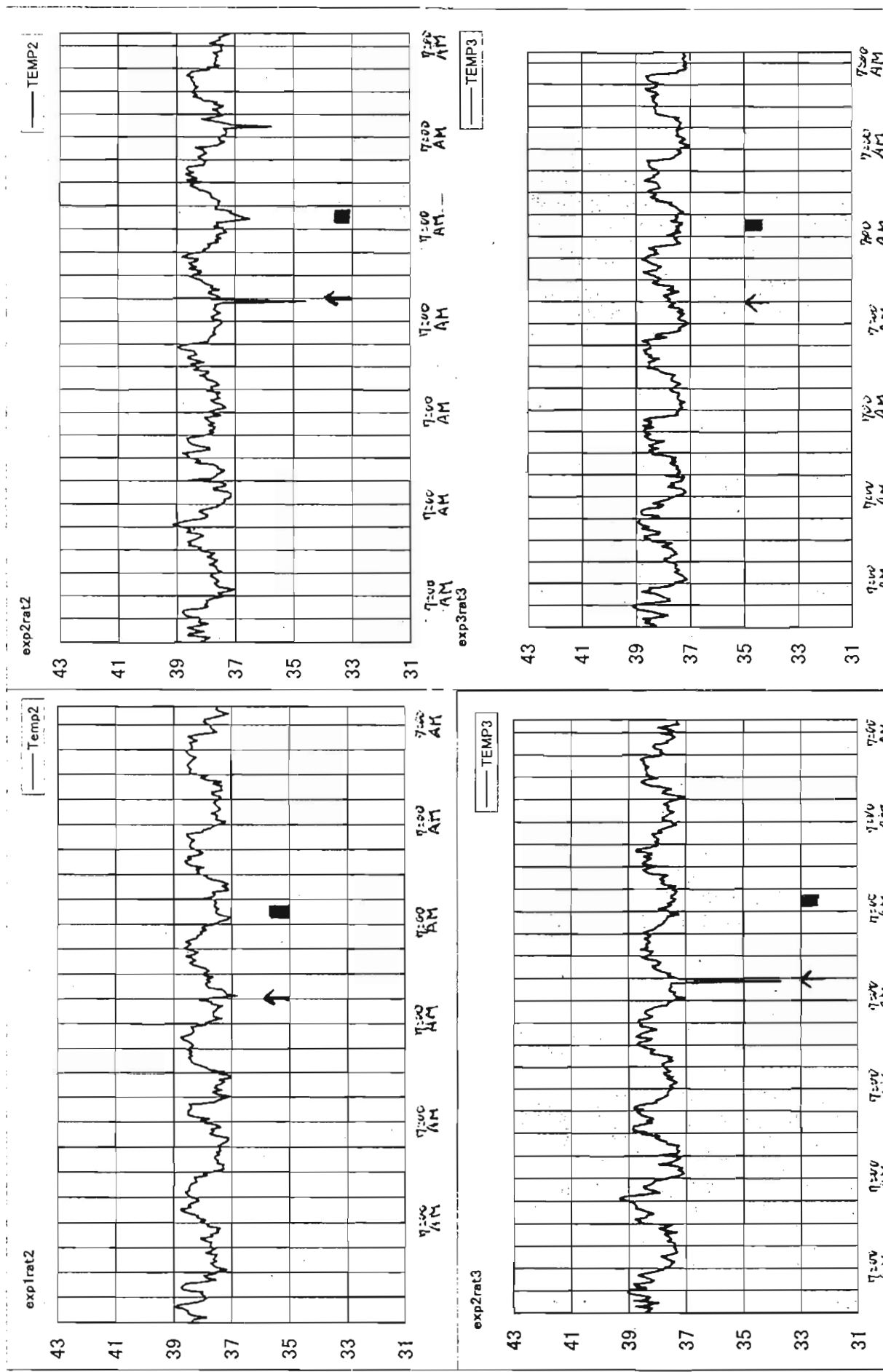
■ 3 時間オゾン暴露



↑ 気管内投与

■ 3時間オゾン暴露

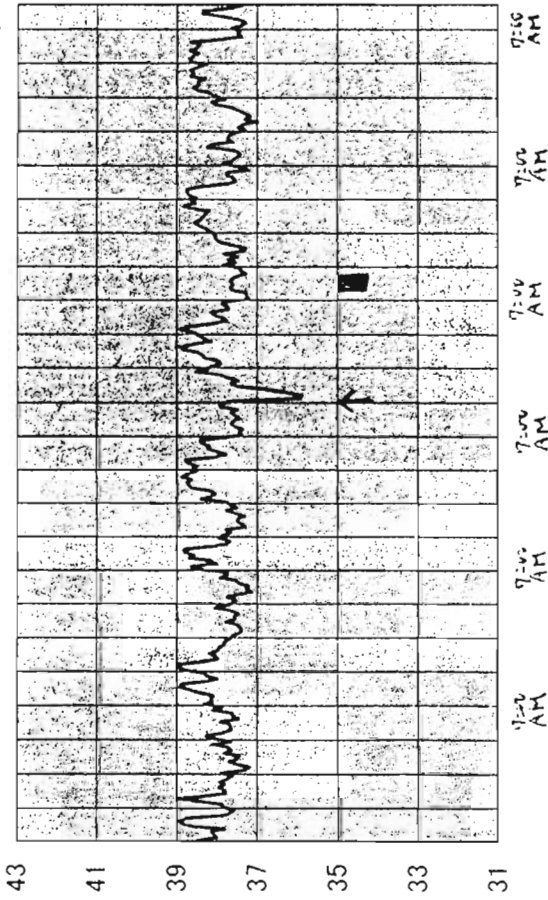
図 28 核心温度の変動 (E-PM 群)



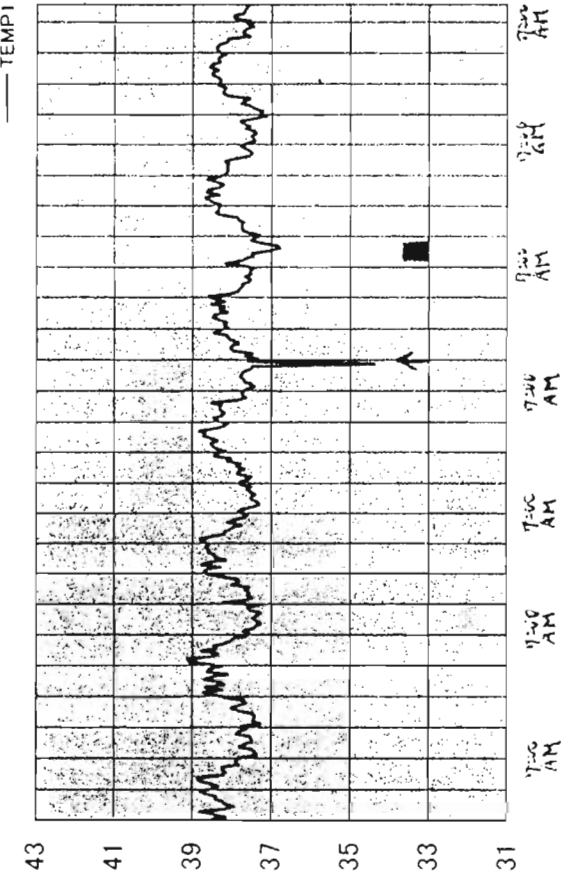
↑ 気管内投与

■ 3時間オゾン暴露

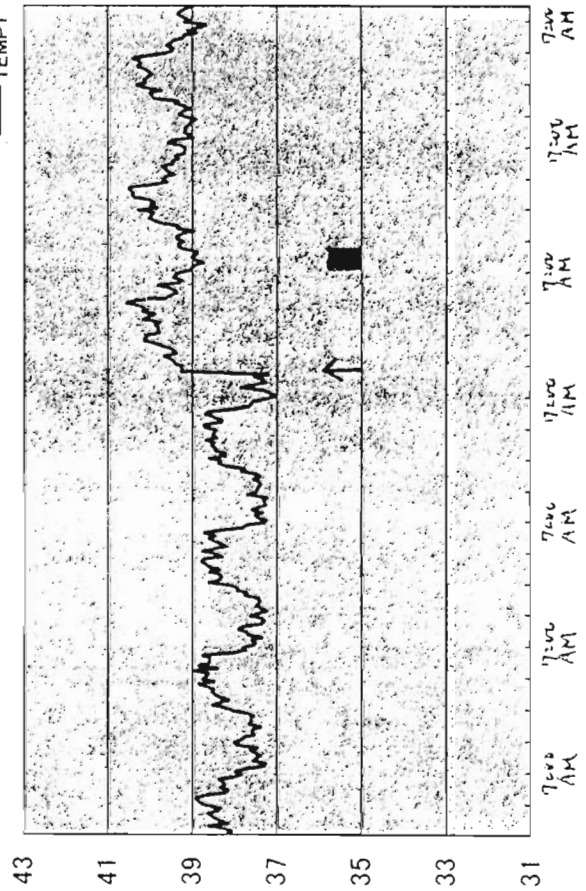
exp1rat1



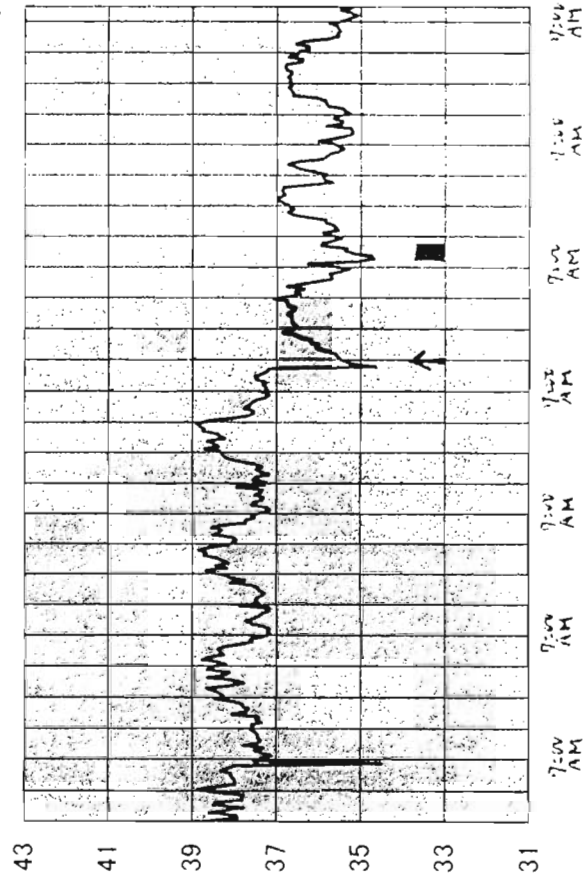
exp2rat1



exp3rat1



exp3rat2



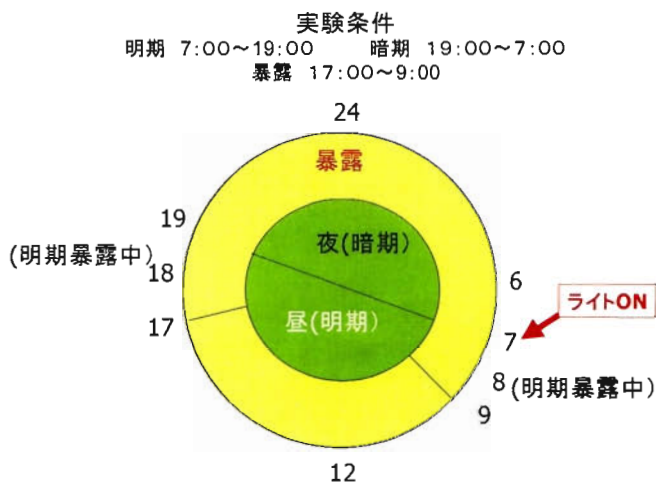
気管内投与

3時間オゾン暴露

4. 15 ヶ月齢 WKY ラットへのディーゼル粒子 1 週間暴露、6 ヶ月暴露実験

方法

14 ヶ月齢のWKY ラットに、麻酔下で無菌的にテレメトリーを装着し、15 ヶ月齢より暴露を開始した。暴露時間は、午後 5 時から翌朝 9 時までの 16 時間とし、午前 7 時から午後 7 時までライト ON に(明期)、午後 7 時から翌朝 7 時までライト OFF 時期(暗期)とした。テレメトリーを装着した 39 匹の動物はランダムに、対照群(C 群)、低濃度群(L 群)、中濃度群(M 群)、高濃度群(H 群)、高濃度徐粒子群(HG 群)の 5 群にわけた。

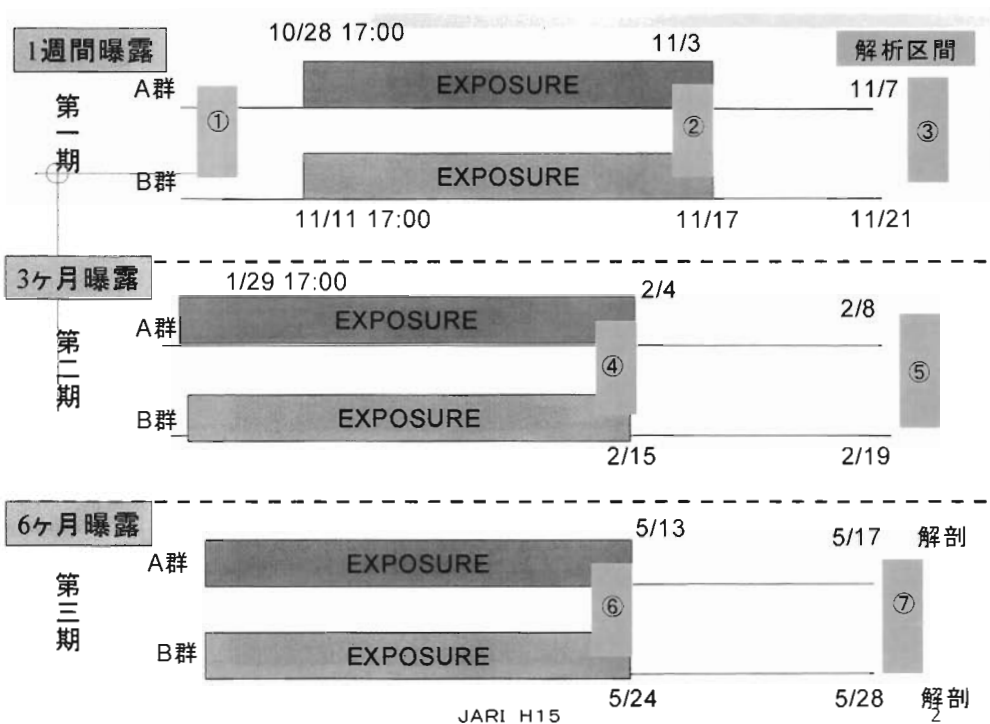


A 群	C 群	4 匹
	L 群	4 匹
	M 群	4 匹
	H 群	4 匹
	HG 群	4 匹

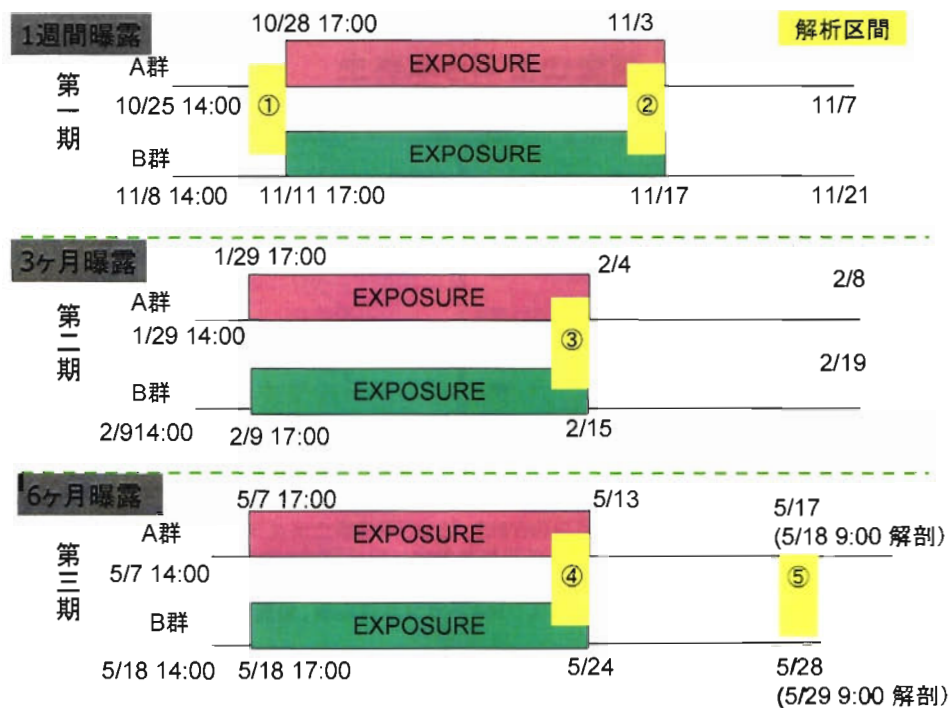
B 群	C 群	4 匹
	L 群	3 匹
	M 群	4 匹
	H 群	4 匹
	HG 群	4 匹

計 39 匹の 15 ヶ月齢 WKY ラットを 2 群にわけ、さらに PM の濃度に応じて血圧を指標にランダムに 4 匹ずつ 5 群にわけた。

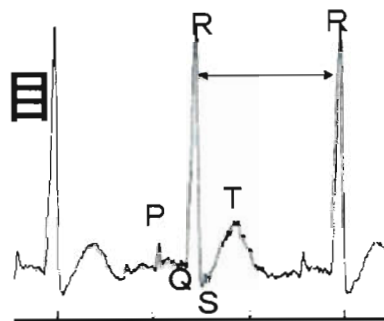
呼吸パターンの測定: 無拘束下で body plethysmography によって、呼吸数、一回換気量、分時換気量を測定した。測定時期は、下記の実験プロトコールに示す 7 ポイントで行い、測定時間は午後 1 時 5 分から 55 分までの 50 分間とした。



心機能測定:テレメリーシステムによって心電図(第 II 誘導)、腹部核心温度、血圧を測定した。生体信号は、下記に示した実験計画に沿って、第一期は暴露前から 1 週間暴露中と暴露停止後 4 日間、第二期は 3 ヶ月暴露終了 1 週間前から暴露停止後 4 日間、第三期は 6 ヶ月暴露終了 1 週間前から暴露停止後 4 日間、午後 1 時 5 分から 55 分までを除いた時間帯で継続測定した。生体信号は、受信機を介してコンピュータに送信しハイエンドデータで取得後、実時間解析システムなどによって、RR 間隔、拡張期血圧、収縮期血圧、平均血圧、核心温度、heart rate variability (low frequency, high frequency) を計測した。不整脈は、血圧波形と心波形を元に異常波形を抽出するソフトを独自に作成して計測した。



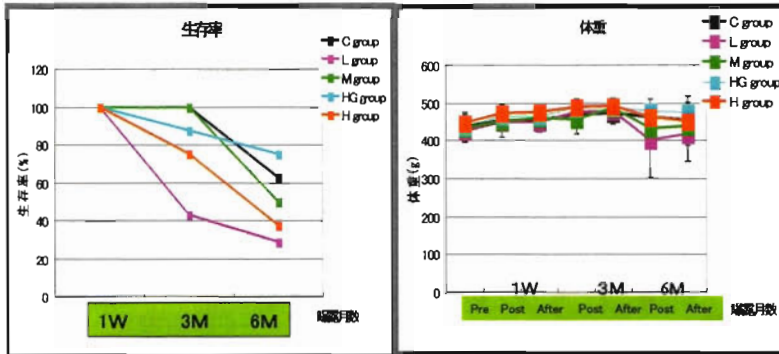
測定項目



- R-R間隔: 心拍数
- 血圧: 平均血圧、収縮期、拡張期
- 核心温度
- HRV: 自律神経系への影響
 - HF(副交感神経)
 - LF(交感神経+副交感神経)

下記に 6 ヶ月間曝露での生存率を示した。L 群では曝露初期に死亡例が多く見られたが、6 ヶ月曝露終了時での生存率には 5 群間に有意差は認めなかった。体重の変動については、全群で曝露 3 ヶ月まで増加傾向を認め、曝露 6 ヶ月で減少傾向を示したが、5 群間で有意差は認めなかった。

生存率と体重の変動



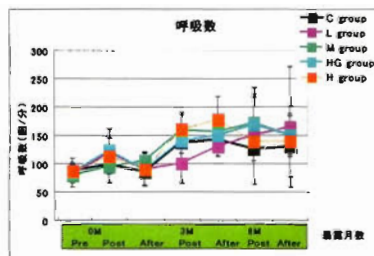
曝露初期にC群で高死亡率を示したが、6Mでの生存率はL群を除いた曝露群と対照群間に有意差は認めなかった。
 体重は3M曝露時までやや増加傾向を示し、6Mでは減少傾向を示した。
 体重の標準偏差値は、曝露前半に比べ6Mで大きくなる傾向を示した。

実験結果

I. 呼吸パターンへの影響

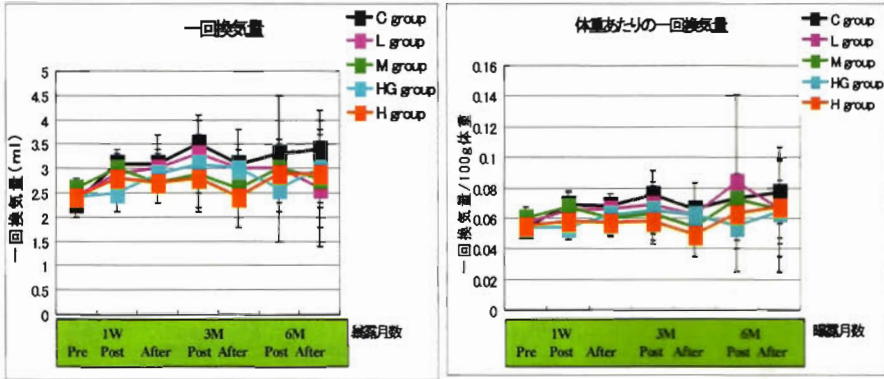
呼吸数、一回換気量、分時換気量を下記に示した。呼吸数は第I期の1週間曝露で増加する傾向を示したが、曝露停止4日間で回復した。3ヶ月、6ヶ月曝露では曝露停止4日間での回復効果は認めず、対照群に比較して曝露群でやや高い値を示した。一回換気量は、全実験期間を通して、明確な曝露影響は認めなかったが、曝露群では実験前半に比較して後半でバラツキが大となる傾向が認められた。分時換気量は、曝露により増加し、曝露停止により回復傾向を示すパターンを示したが、対照群と曝露群の間には有意差は認めなかった。以上の結果から、第1期の急性曝露では、曝露により一過性の呼吸数、分時換気量の変動が認められたが、其の変化は曝露終了後速やかに回復する変化であった。6ヶ月曝露の影響では、対照群と比較して曝露群で呼吸数の増加や換気量の減少傾向を認めたが、濃度依存性や曝露期間依存性の変動は認めず、対照群に比較して曝露群でバラツキが大きい傾向を示した。

呼吸数



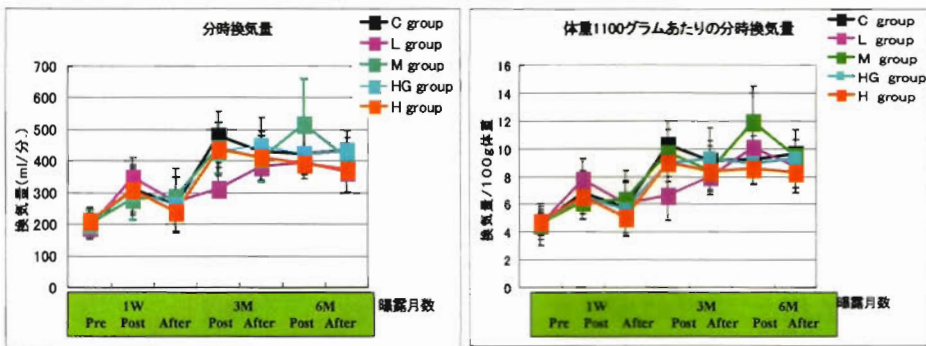
呼吸数は1Wで、曝露により増加する傾向を示したが、3ヶ月曝露、6ヶ月曝露では同様な変動を認めなかった。
 対照群に比較して曝露群でやや高い値を示した。

一回換気量



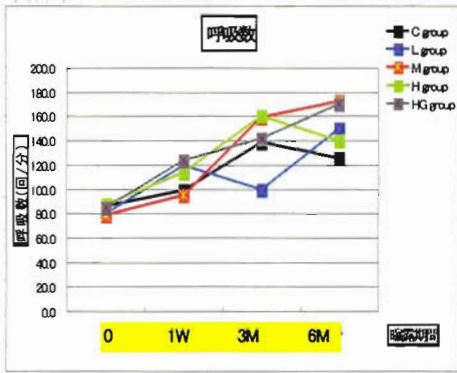
一回換気量は、全実験期間を通して、明確な曝露影響を認めなかったが、実験前半と比べて後半で標準偏差値が大となる傾向が認められた。対照群と比較して曝露群で高い値を示す傾向が見受けられた。

分時換気量

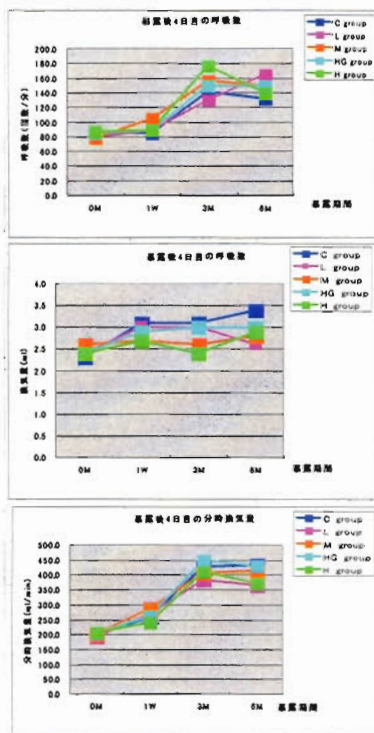
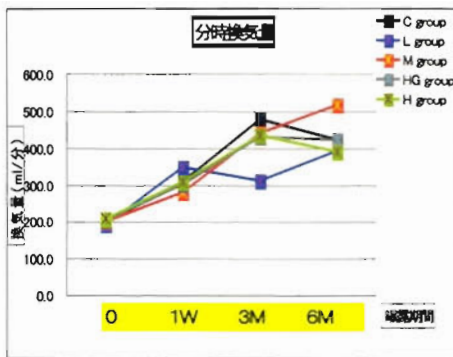
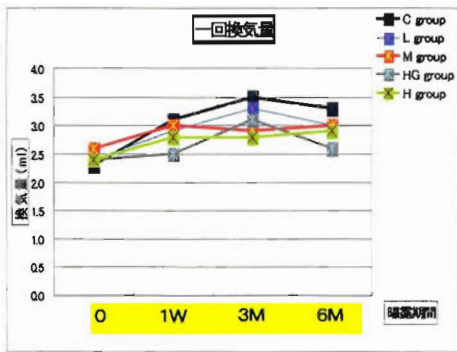


分時換気量は曝露により増加し、曝露停止により回復傾向を示すパターンを示し、対照群と曝露群で明確な差は認めなかった。

経時的变化



呼吸数はL群を除いて、曝露群で経時的に増加傾向を示したが、濃度依存性は認めなかった。
換気量は、対照群よりも曝露群で低下傾向を示した。
H群とHG群での明確な差は認めなかった。



暴露後4日目の呼吸パターン

呼吸数は全群で曝露前と比べて曝露3M、6Mで増加し、其の程度は対照群と比較して曝露群で増加傾向を示したが、有意差は認めなかった。

換気量は対照群に比較して曝露群で低値を示す傾向があった。

II. 心機能への影響

① 第1期の急性暴露影響

1. 暴露前、暴露中、暴露後の Kruskal-Wallis 検定比較

暴露前、暴露中、暴露後のデータ変動について Kruskal-Wallis 検定では1%水準で差を認めた指標は殆どなかった。暴露時間外と暴露中の比較では、暴露時間外に比較して暴露中で有意差(5%水準)が見られた項目が多いことから、暴露中に何らかの変化がおきていることが推定された。特に RR 間隔と体温に何らかの変化があったことが推測されたが、環境変化の要因も無視できないものと考えられた。暴露開始直前と暴露開始直後の比較では、顕著な変化は認めなかった。上記の結果から、短期暴露では暴露影響による変化と其の回復が日々繰り返されていることが推測された。

2. 暴露前と暴露中、暴露中と暴露終了後の Scheffe 検定

暴露による変化は穏やかではあるが、結果として暴露前後で変化している可能性が推測された。

3. 全体的な考察

1週間暴露中の変動は、1日の中での暴露による変化とその速やかな回復の繰り返しであった。測定した項目の中で特に、暴露時間帯の RR 間隔と体温が比較的大きい変化を示した。変動が認められた項目では暴露期間(前半3日間)と暴露終了後(4日間)に差を認めることが多いことから、暴露による影響が穏やかに蓄積していることが推測された。

②—長期暴露影響

1. 長期的な変化—概要

RR 間隔はどの群でも減少傾向を示すが、其の傾向は暴露群でより強かった。H 群で RR 間隔の標準偏差値が後半大きくなった原因として不整脈の増加が挙げられた。HRV 解析では、LF と HF が全体的にやや減少傾向を示したが、H と M 群で HF が後半増加した。これは、H 群では不整脈の影響で時系列データに不連続が生じたために上昇したものと考えられた。血压には殆ど変化は認めず、体温は全体的に上昇傾向にあった。

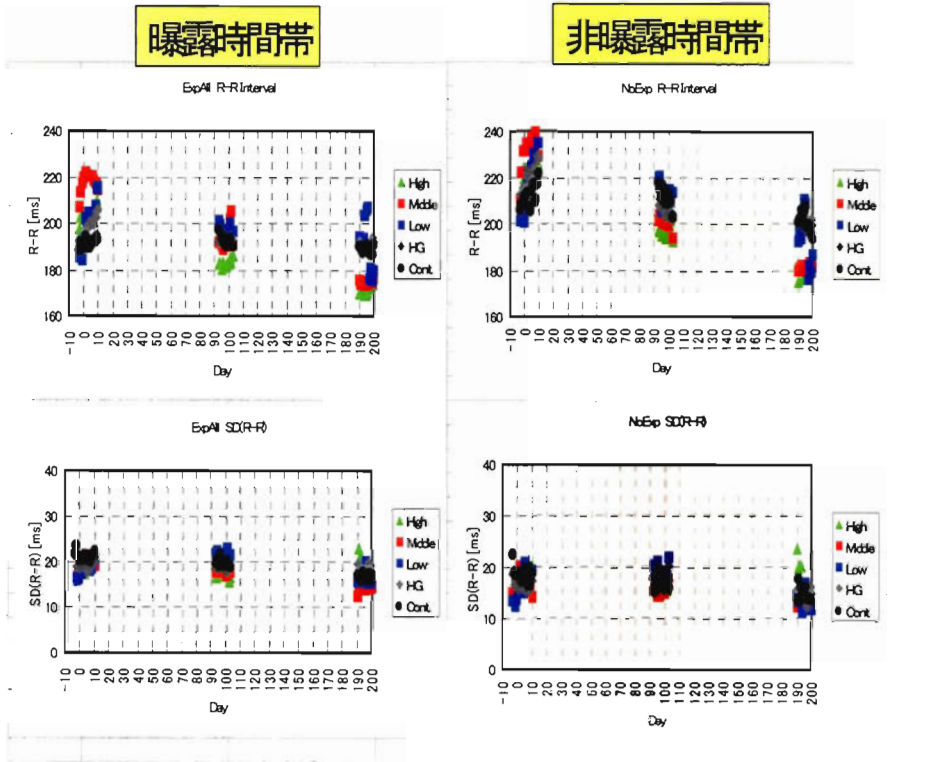
2. 検定結果

Kruskal-Wallis 検定結果では、5%水準で全ての、1%水準でも殆どの実験データの間に差が認められた。Scheffe 検定結果(2群間の検定)では、多くの組み合わせで変動していると判定されたが、暴露群に比較して対照群とL群ではデータ変動は少なかった。RR 間隔のデータは全実験過程で有意な変動を認めたことから、実験期間中に何らかの変動をきたしていることが推測された。RR 間隔以外のデータについては実験期間全体を通した変化量は少ないと考えられた。

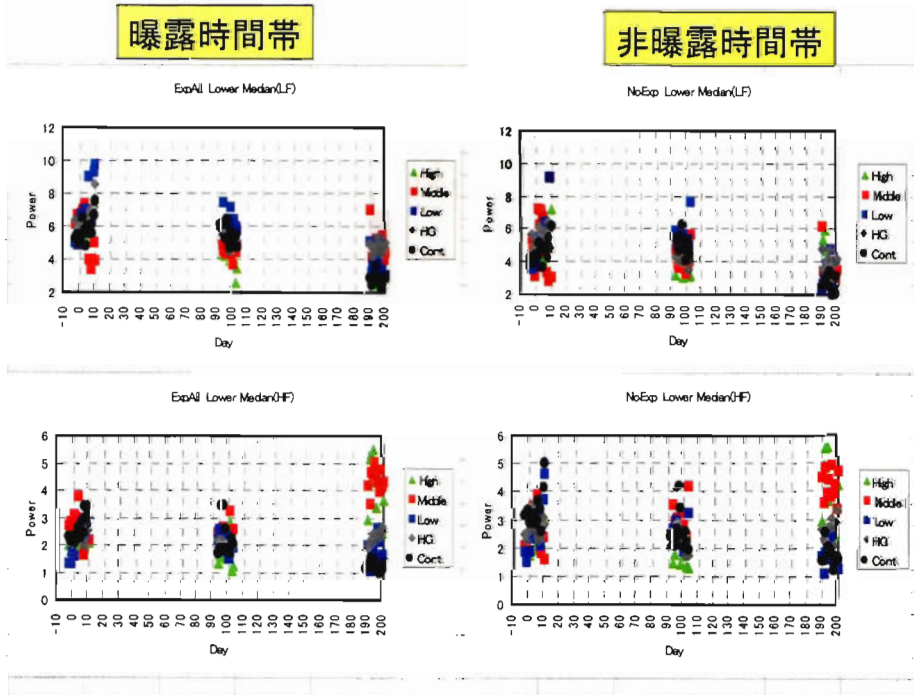
3. 回帰分析による暴露及び非暴露時間帯の平均値の変動

RR 間隔は暴露濃度依存性及び暴露時間依存性に減少した。HG 群は L 群と同程度の変化に留まった。HF は、HG 群以外は濃度依存性、暴露時間依存性に増加する割合が増えた。H 群では実験後半で不整脈を頻発する動物の数が増加しているために、HF 値を押し上げているものと考えられた。LF/HF に対しても暴露影響が疑われたが、H 群の変化には不整脈の影響が含まれた。一般に暴露中は動物の活動量が減少することから、RR 間隔の減少(心拍数増加)は暴露ストレス、血中酸素飽和度の低下などの要因によるものと考えられた。

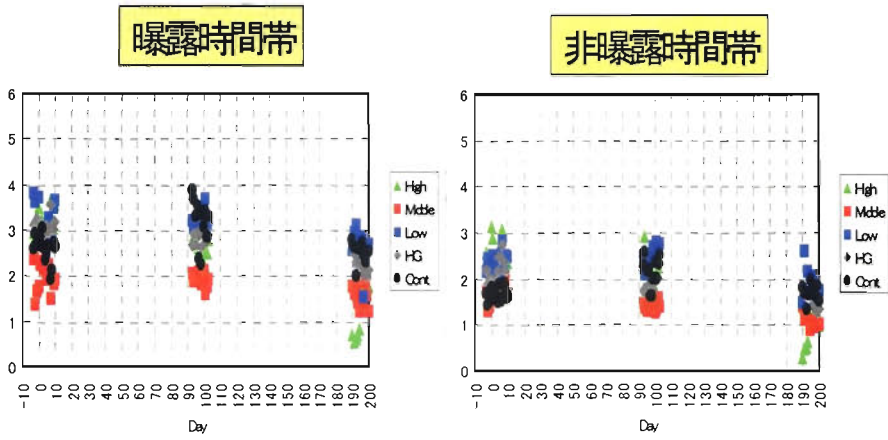
R-R間隔



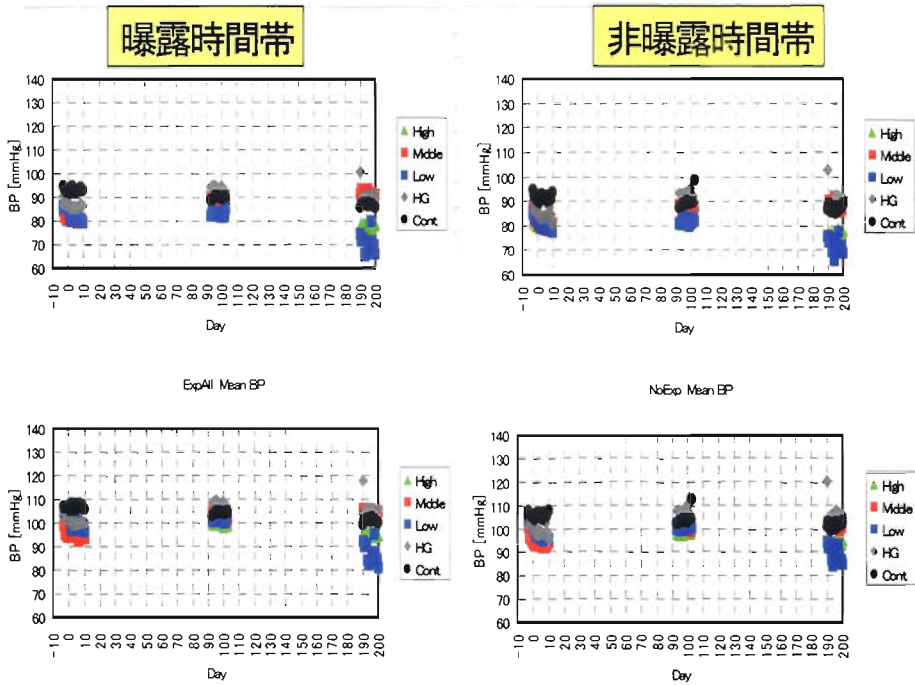
LFとHF



LF/HF



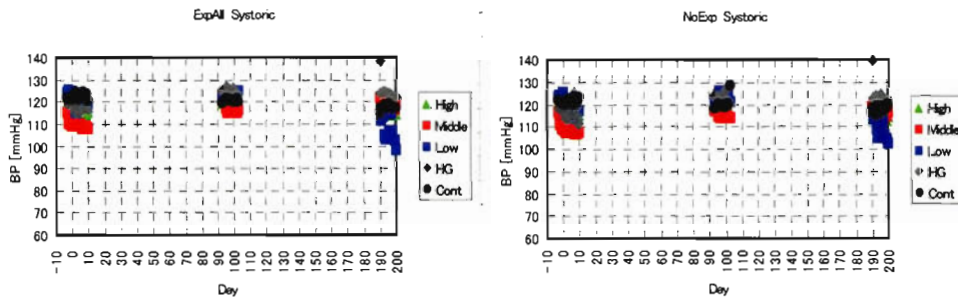
拡張期血圧と平均血圧



収縮期血圧

曝露時間帯

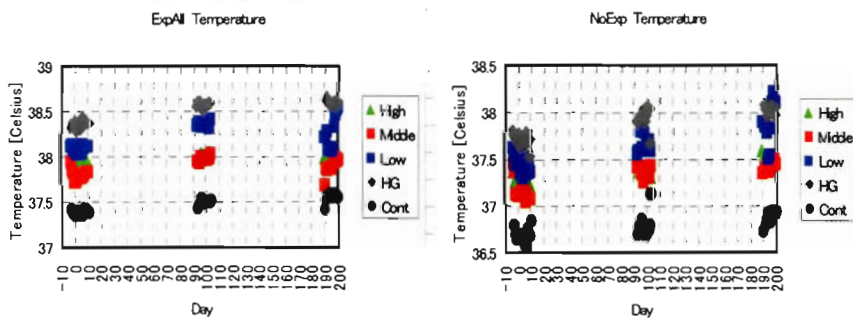
非曝露時間帯



核心温度

曝露時間帯

非曝露時間帯



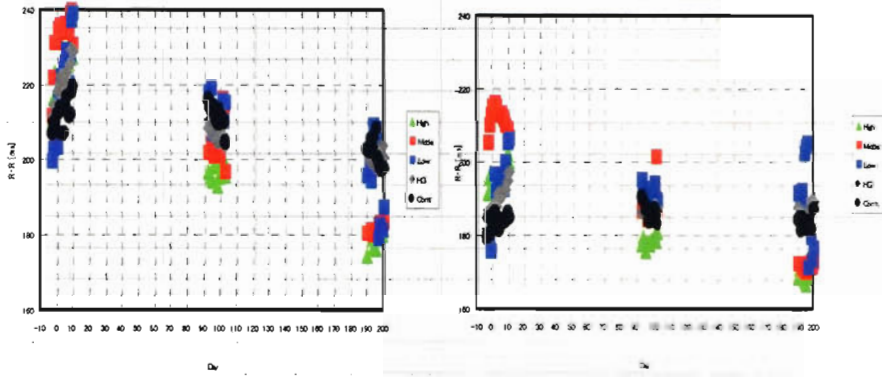
4. 回帰分析による暗期と明期の相違

明期のRR間隔は曝露量依存性に減少し、暗期よりも明期のほうが減少の変動は大であった。LFは群を問わず、かつ昼夜を問わず下降傾向があり、加齢因子の関与が考えられた。体温は、群、昼夜を問わず上昇傾向を示し、RR間隔の上昇に関連するものと考えられた。夜間の時間的体温上昇は曝露により抑制され、日中の上昇の方が大きい傾向にあった。

RR間隔

明期

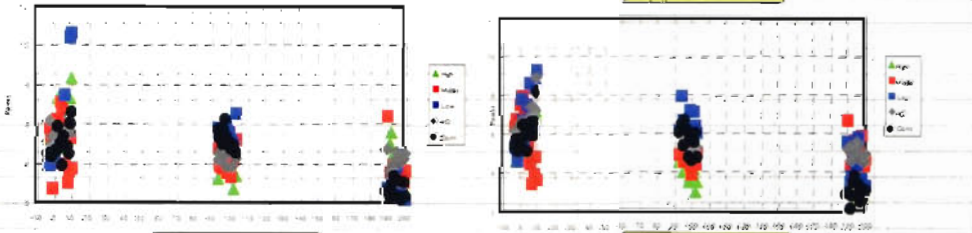
暗期



LF、HF

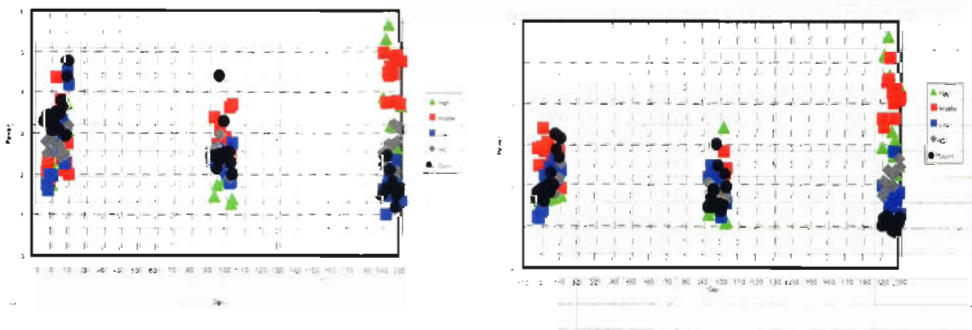
明期 LF

暗期 LF

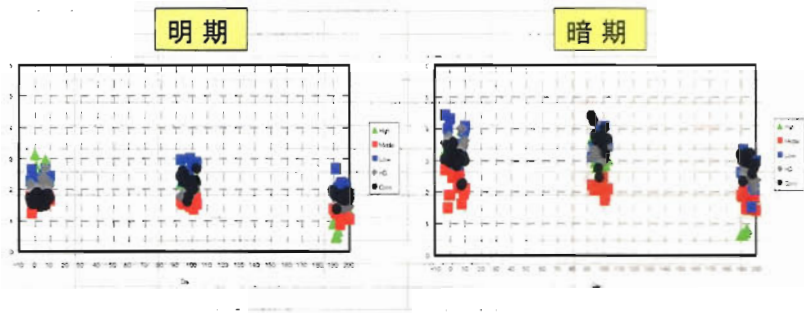


明期 HF

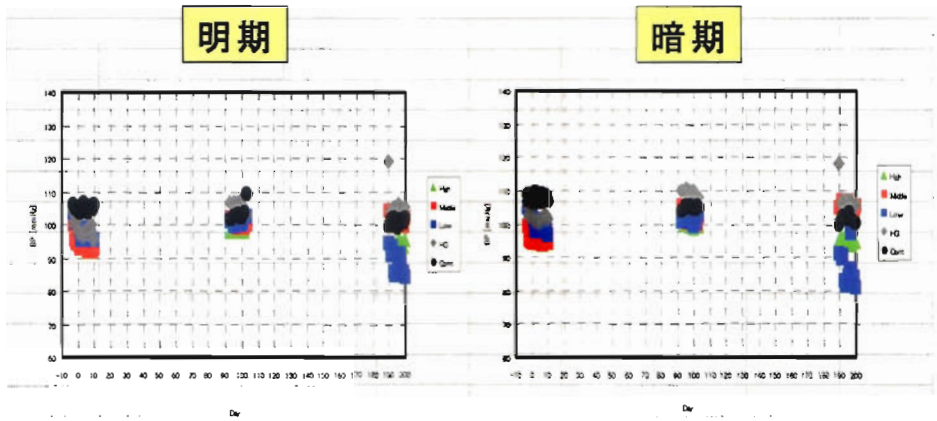
暗期 HF



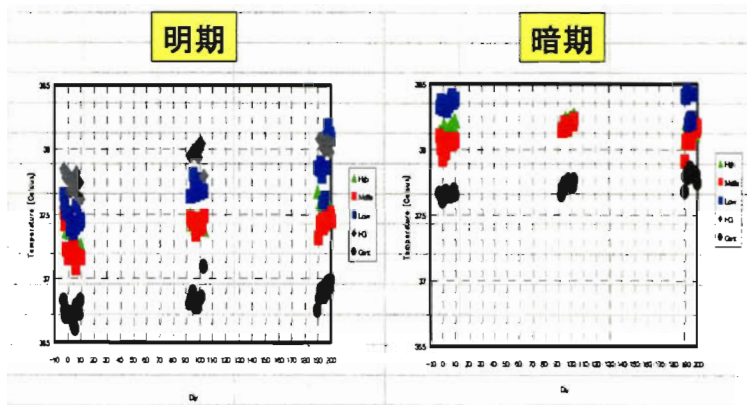
LF/HF



平均血压



体温



5. 明期と暗期のデータ差分の回帰分析結果

暴露により活動量が低下し、その結果 RR 間隔などの明暗期格差が小さくなると予測されることから明暗期のデータ差の回帰分析を行った。

RR 間隔は暴露により明暗期の差が減少した。LF は対照群では時間がたつにつれて明暗期の差が増加したが、HG 群以外の暴露群では時間がたつにつれて減少した。HG 群は対照群と暴露群の中間的な変化(ほとんど変化なし)であった。体温は、対照群と HG 群で、明暗期差は時間がたつにつれてやや増加する傾向を示したが、HG 群を除く暴露群では時間経過と共に明らかな増加傾向を示した。

6. 長期暴露実験の回帰分析結果のまとめ

RR 間隔の明暗期の差は M 群をのぞき、暴露により減少傾向にあり、その減少傾向は、暗期よりも明期の減少度が大であった。LF の明暗期差は対照群では増加傾向を示すが、暴露群では減少傾向を示し、HG 群の明暗期差は対照群と暴露群の中間的変化であった。体温の明暗期差は暴露によって増加する傾向を示した。

7. 波形解析 解析結果(その1)スペクトル解析・RRIモード値・不整脈の変化の概要

ライト ON 時の呼吸性変動の波長は、活動性が低い安静状態(副交感神経優位)では呼吸性変動が現れるが、活動性状態では交感神経優位となり呼吸性変動が消失する。RR 間隔も暴露群で減少している(心拍数大)ことから、スペクトル解析結果から暴露動物では本来安静状態になるべきところ交感神経活動が優位である可能性が考えられた。暴露群で不整脈が多く見られたが、直接死因の要因とは考えにくかった。不整脈頻発の機序は不明であるが、可能性として冠動脈の血流低下による心筋への影響、容量負荷、心拍数増大による酸素需要の増加やこれらの要因による心筋への負荷などが考えられた。

RR間隔異常値検出法

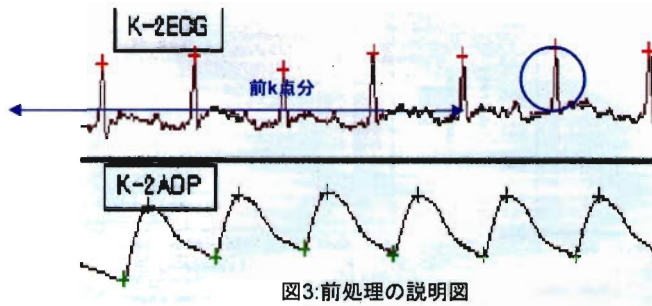


図3:前処理の説明図

前k点分のメディアンフィルタ出力とRRI値を比較する。
式(1)を用いて x を算出し式(2)の範囲外の点は取り除いて詰める。

$$x = \frac{\text{現時点のRRI値}}{\text{median filter値(前k点分)}} \quad \dots(1)$$

$$\min < x < \max \quad \dots(2)$$

$$k = 5, \min = 0.8, \max = 1.2$$

2.不整脈解析

期外収縮性不整脈を取り上げPM暴露の影響を検証した。

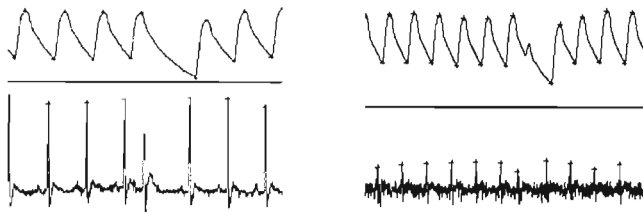


図5:対象とした期外収縮性不整脈の例

心拍波形のみでは、図6のようなアーチファクトを誤検出してしまいうため、血圧波形との対応を考慮した方法で、期外収縮性不整脈のカウントを行った。カウント法については次のスライドで示す。

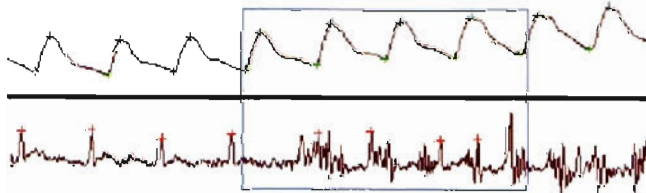


図6:ノイズの影響で心電図のみからでは不整脈と誤ってカウントしてしまう例
(血圧波形を同時に検討すれば不整脈ではないことがわかる)

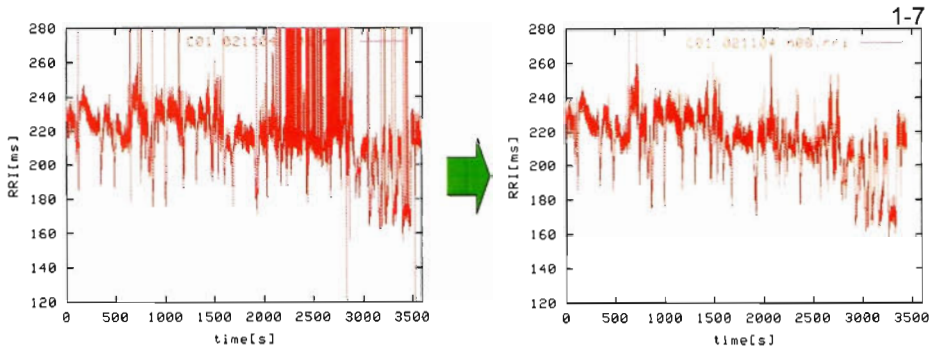


図4:原データ

図5:前処理後

解析条件

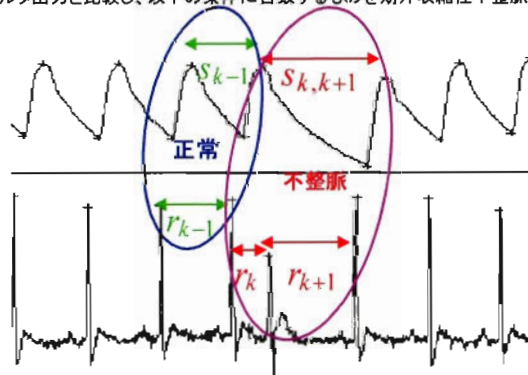
DCSI法を用いて瞬時心拍数を推定した後、以下の条件でパワースペクトルを推定した。

- FFT点数: 8192点
- サンプリング周波数: 16Hz
- 周波数分解能: 0.00195Hz
- 窓関数: ハミング窓
- 加算平均: 10回
- ハーフオーバーラップあり

1-9

下図に示すようにRR間隔と最高血圧関係が並行して同時に不整脈パターンを示す場合のみ不整脈としてカウントした。

具体的には、RRI時系列データ、および最高血圧間隔 (SSI) 時系列データをともにメディアンフィルタ出力と比較し、以下の条件に合致するものを期外収縮性不整脈としてカウントする。



$$r_i = \frac{\text{RRI値}}{\text{メディアン値}}$$

$$s_i = \frac{\text{SSI値}}{\text{メディアン値}}$$

$r_k < 0.9$ であり、かつ

不整脈前後の最高血圧間隔が

$$0.8 < s_{k-1} < 1.2 \quad , \quad 1.3 < s_{k,k+1} < 2.2$$

1. スペクトル解析 アーチファクト混入とその対策

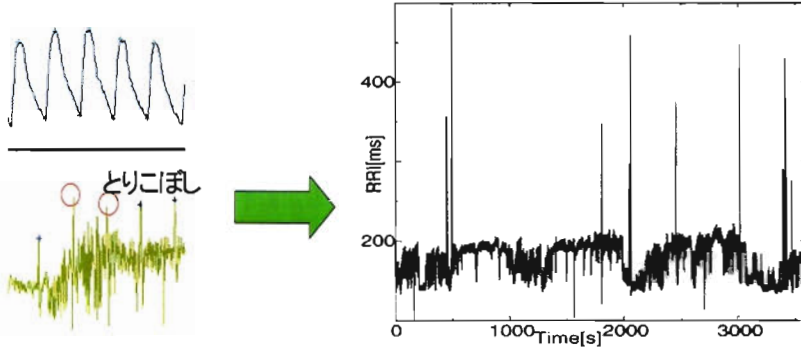


図1: 雑音によりR波をとりこましている例
(上段血圧波形、下段同時に記録された心電図のそれぞれ原波形)

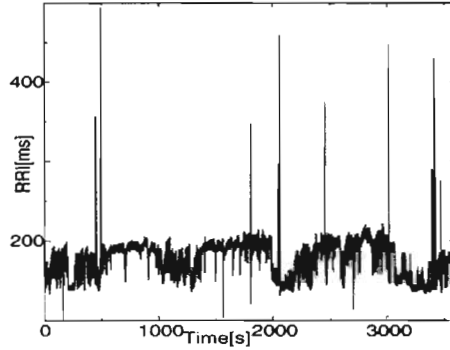


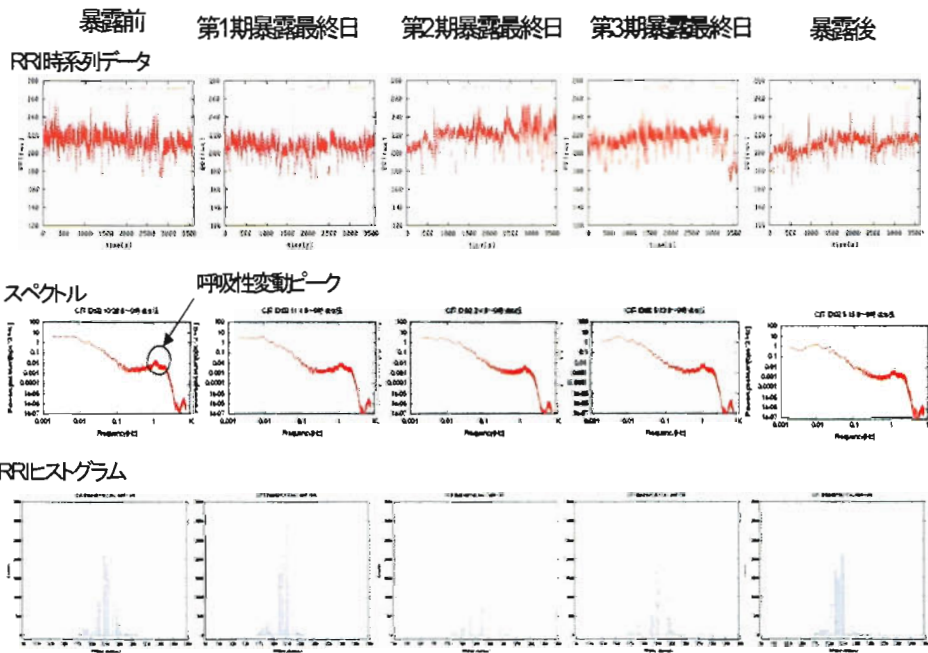
図2: 誤検出を含むRRI時系列例
(ランダムに現れるパルス状の大きな値はR波の取りこまし、パルス状の小さな値は雑音をR波と誤認識したためのアーチファクトと認められる)

アーチファクトの影響を最小限に抑えるため、本解析では次ページのような前処理を施した後スペクトル解析を行った。

解析結果の例

(心拍呼吸性変動の変化に着目し影響が最も大きく現れたLight ONかつ暴露中午前8時から9時の間について解析を行った)

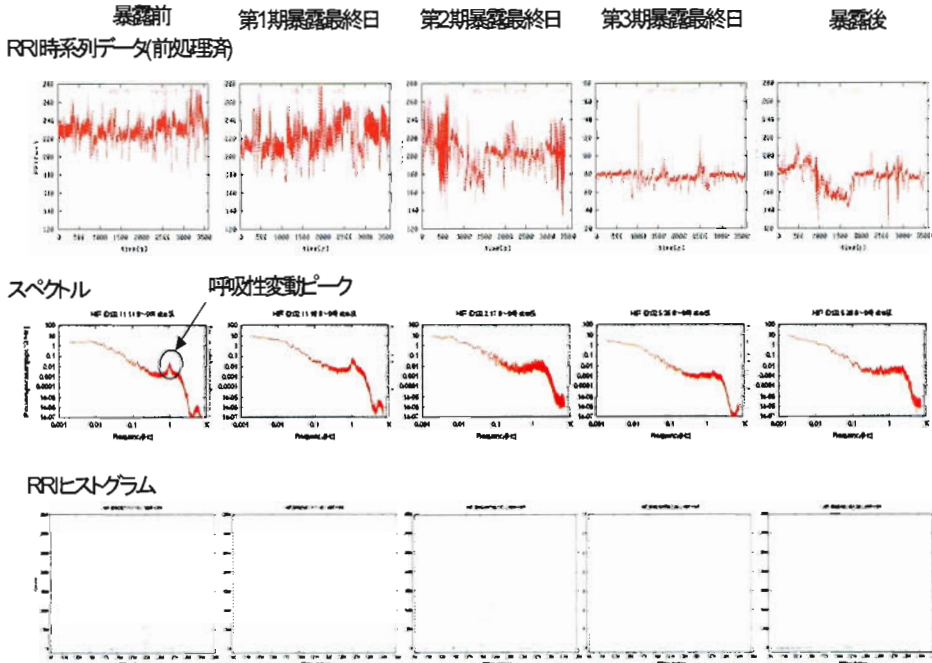
1. C群(CO2) いずれも解析時期による変化は認められない



解析結果

2. H群(H06)

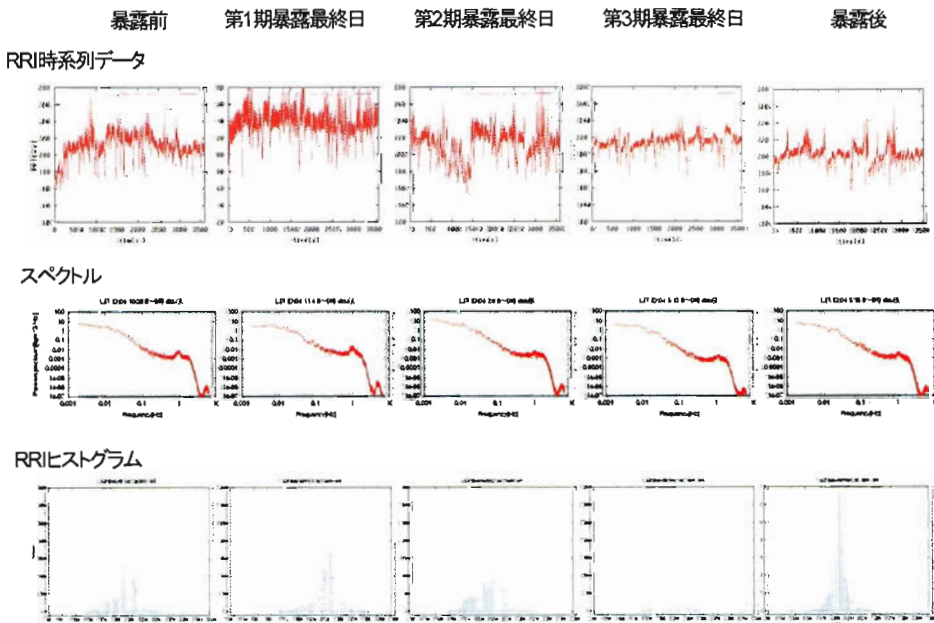
呼吸性変動の消失が認められる(下記の例では第二期において消失している)
 RRI平均及び変動の減少が認められる。



解析結果

2. L群(L04)

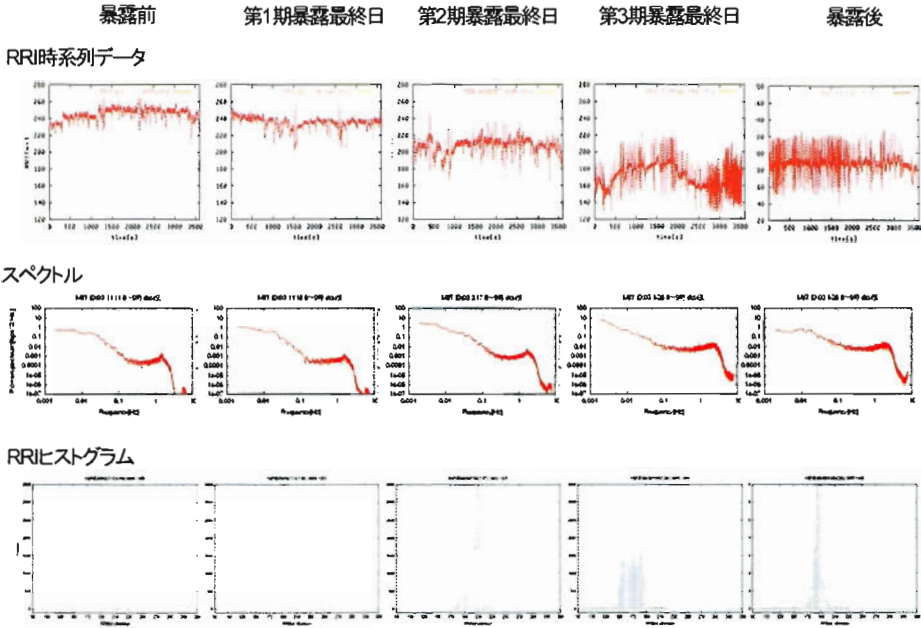
呼吸性変動の消失が認められる
 RRI平均及び変動の減少が認められる。RRI平均の減少は暴露濃度依存がみられる(HGを除き濃度が高い程変化が大きい)



解析結果

2. M群(M07)

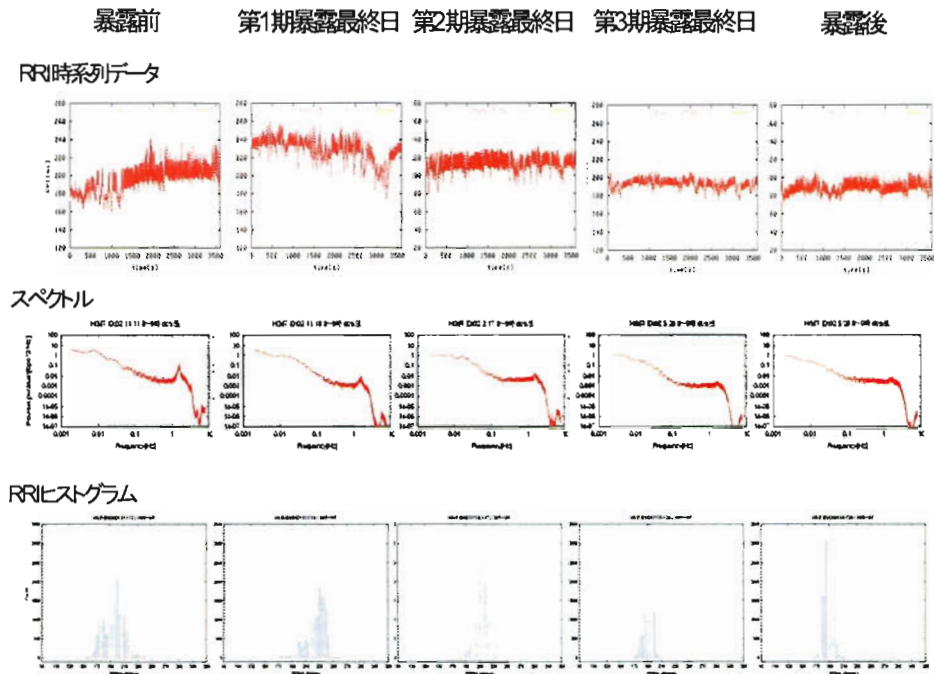
呼吸性変動の消失が認められる
 RRI平均及び変動の減少が認められる。RRI平均の減少には暴露濃度依存がみられる(HGを除き濃度が高い程変化が大きい)



解析結果

2. HG群(HG06)

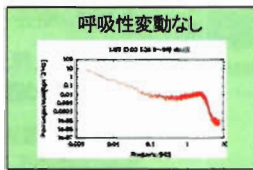
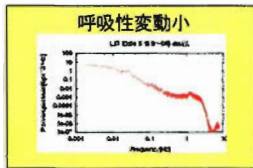
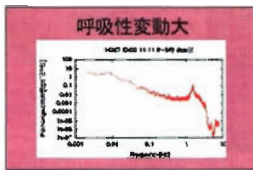
HG群では一割のRRI平均はC群と同じ変化がない。
 呼吸性変動もおおむねC群と同じ変化はないが消失するものもある。



呼吸性変動の変化

C, HG群では変化がみられない。HLM群では減少。

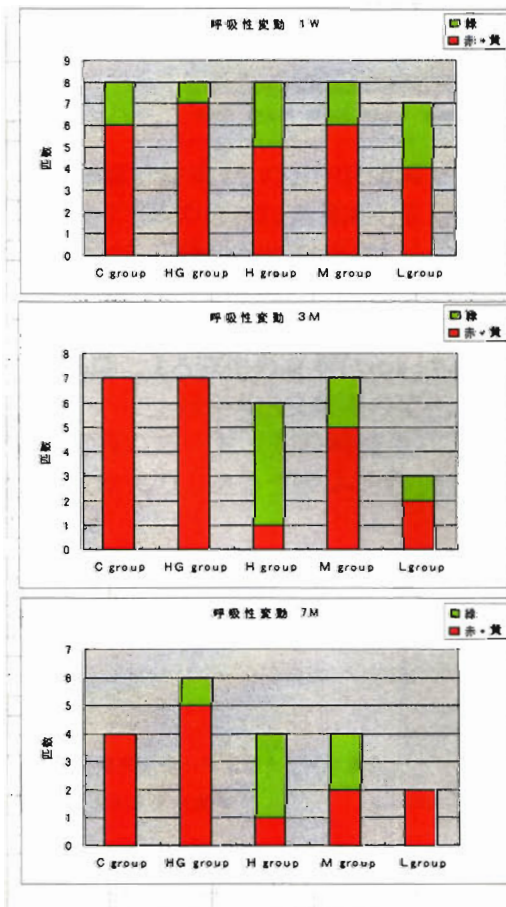
スペクトル波形より、呼吸性変動の有無を3段階に分類した。



	Id	①	②	③	④	⑤
C	01	緑	黄	赤	黄	赤
	02	赤	黄	赤	黄	赤
	03	赤	黄	赤	黄	赤
	04	赤	黄	赤	黄	赤
	05	赤	黄	赤	黄	赤
	06	赤	黄	赤	黄	赤
	07	赤	黄	赤	黄	赤
	08	赤	黄	赤	黄	赤
H	01	赤	黄	赤	黄	赤
	02	赤	黄	赤	黄	赤
	03	赤	黄	赤	黄	赤
	04	赤	黄	赤	黄	赤
	05	赤	黄	赤	黄	赤
	06	赤	黄	赤	黄	赤
	07	赤	黄	赤	黄	赤
	08	赤	黄	赤	黄	赤
HG	01	赤	黄	赤	黄	赤
	02	赤	黄	赤	黄	赤
	03	赤	黄	赤	黄	赤
	04	赤	黄	赤	黄	赤
	05	赤	黄	赤	黄	赤
	06	赤	黄	赤	黄	赤
	07	赤	黄	赤	黄	赤
	08	赤	黄	赤	黄	赤

	Id	①	②	③	④	⑤
L	01	赤	黄	赤	黄	赤
	02	赤	黄	赤	黄	赤
	03	赤	黄	赤	黄	赤
	04	赤	黄	赤	黄	赤
	05	赤	黄	赤	黄	赤
	06	赤	黄	赤	黄	赤
	07	赤	黄	赤	黄	赤
	08	赤	黄	赤	黄	赤
M	01	赤	黄	赤	黄	赤
	02	赤	黄	赤	黄	赤
	03	赤	黄	赤	黄	赤
	04	赤	黄	赤	黄	赤
	05	赤	黄	赤	黄	赤
	06	赤	黄	赤	黄	赤
	07	赤	黄	赤	黄	赤
	08	赤	黄	赤	黄	赤

- ①第1期暴露前
- ②第1期暴露最終日
- ③第2期暴露最終日
- ④第3期暴露最終日
- ⑤第3期暴露後

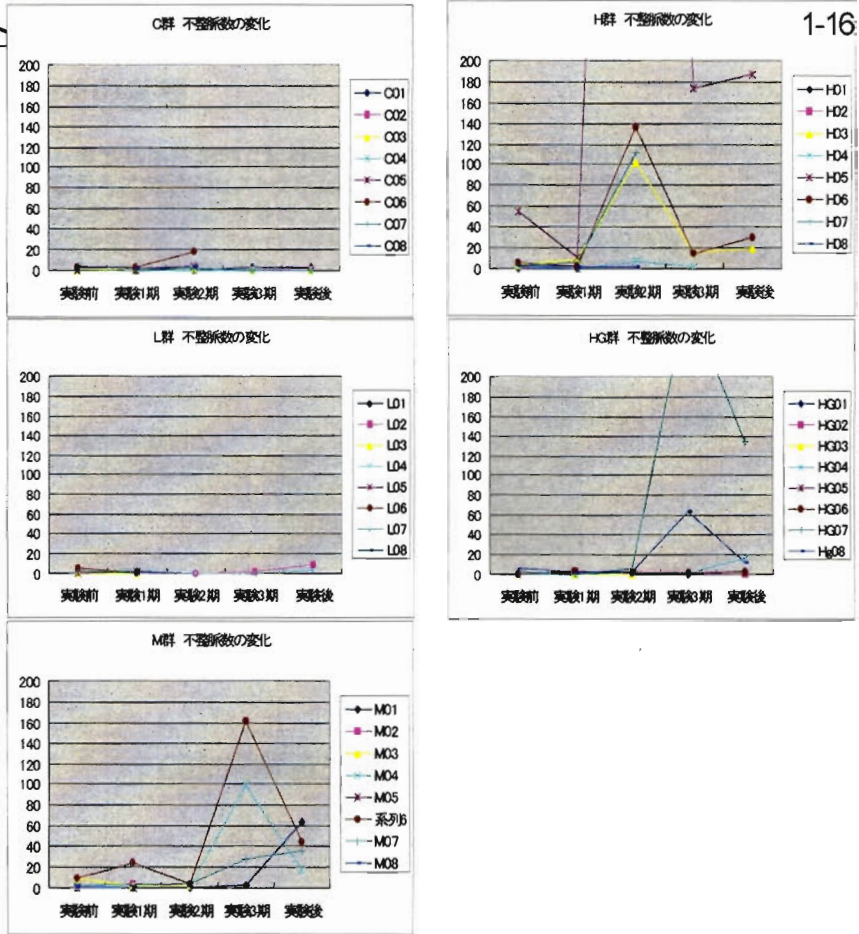


呼吸性変動消失と暴露期間

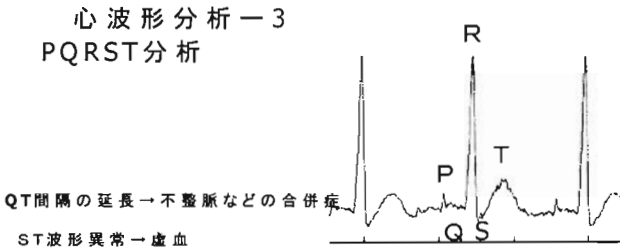
呼吸性変動消失ラット
呼吸性変動ラット

不整脈カウント

C群: 不整脈は認められない
 H群: 第2期から不整脈が増える。
 M群: 第3期から不整脈が増える。
 L群: 不整脈は認められない。
 HG群: 第3期から不整脈が増加する例があった。

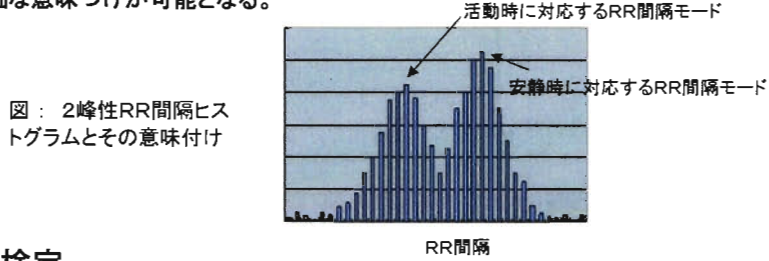


7. 波形解析結果(その2)RR間隔モード値の減少(統計的検定の結果)
 RR間隔ヒストグラムの形状は活動時と安静時に対応づけられる二峰性のものが多く見られる。すなわち二峰性のヒストグラムにおいて、比較的長いRR間隔をモードとしてもつヒストグラム要素が安静時、比較的短いRR間隔をモードとして持つものが活動時に対応する。ここではライトON時に本来見られるべき安静時のピークを比較対象として最頻値の暴露による変化の有無について統計的検定を行った。このようにモードを分類して解析することは平均RR間隔の変化をより詳細に理解することができる。比較的長いRR間隔のモード(安静時発生)と比較的短いRR間隔のモード(活動期発生)の二峰性のヒストグラムを解析した。



最頻値解析とその意義

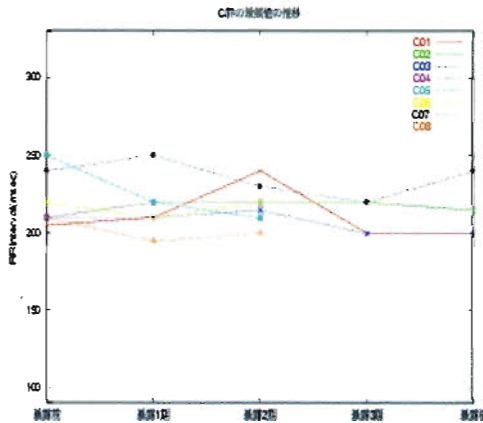
RR間隔ヒストグラムの形状は活動時と安静時に対応づけられる二峰性のものが多く見られる。すなわち二峰性のヒストグラムにおいて、比較的長いRR間隔をモードとしてもつヒストグラム要素が安静時、比較的短いRR間隔をモードとして持つものが活動時に対応する。ここではライトON時に本来見られるべき安静時のピークを比較対象として最頻値の暴露による変化の有無について統計的検定を行った。このようにモードを分類して解析することにより単なる平均RR間隔の変化より詳細な意味づけが可能となる。



統計的検定

帰無仮説を暴露の影響は最頻値に影響を与えない、対立仮説を暴露の影響で最頻値が下がるとし、統計的検定(t検定)を行った。

C群の最頻値の推移

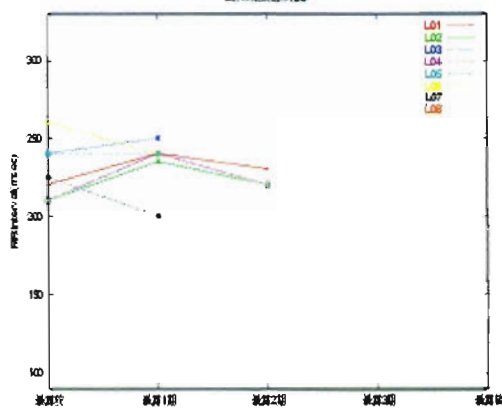


暴露前を基準としたとき、全ての期間において統計的に優位な差は認められなかった。

RR間隔モード値(全データ単位(ms))

C	rat-1	rat-2	rat-3	rat-4	rat-5	rat-6	rat-7	rat-8
暴露前	205	210	210	210	250	220	240	210
暴露1期	210	220	210	220	220	210	250	195
暴露2期	240	220	215	220	210	220	230	200
暴露3期	200	220	200	*	*	*	220	*
暴露後	200	215	200	*	*	*	240	*

L群の最頻値の推移

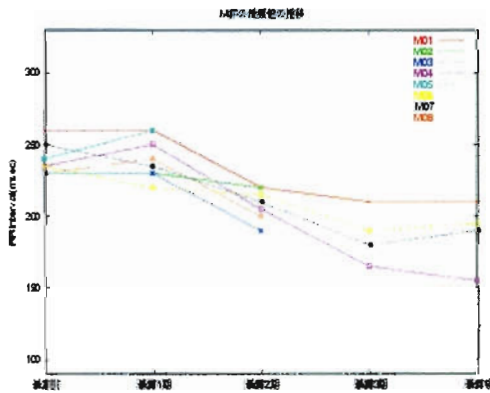


データ数の関係で暴露前を基準とした暴露1期との比較のみ行っただけで統計的有意差は認められなかった。

RR間隔モード値(全データ 単位(ms))

L	rat-1	rat-2	rat-3	rat-4	rat-5	rat-6	rat-7	rat-8
暴露前	220	210	240	210	240	260	225	*
暴露1期	240	235	250	240	240	240	200	*
暴露2期	230	220	*	220	*	*	*	*
暴露3期	*	*	*	*	*	*	*	*
暴露後	*	*	*	*	*	*	*	*

M群の最頻値の推移

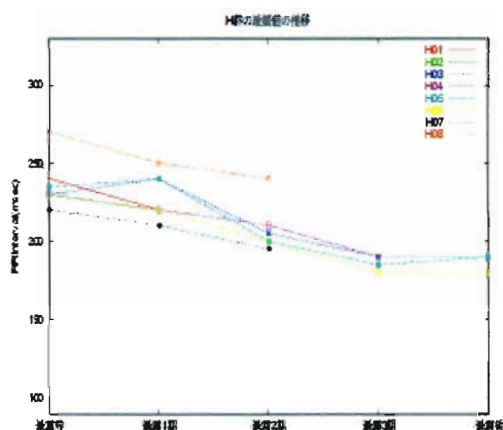


暴露前を基準とし、暴露第一期で有意な差は見られなかったが、それ以降全て1%の有意水準でRRモード値の有意な減少が認められた。図からも明らかな減少が見られる。

RR間隔モード値(全データ 単位(ms))

M	rat-1	rat-2	rat-3	rat-4	rat-5	rat-6	rat-7	rat-8
暴露前	260	230	230	235	240	235	250	230
暴露1期	260	230	230	250	260	220	235	240
暴露2期	220	220	190	205	*	215	210	200
暴露3期	210	*	*	165	*	190	180	*
暴露後	210	*	*	155	*	195	190	*

H群の最頻値の推移

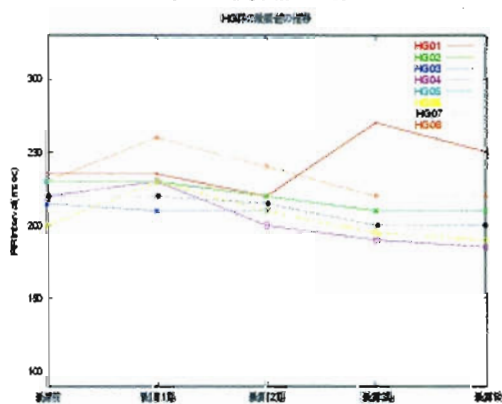


暴露前を基準とし、暴露第一期で5%が、それ以降全て1%の有意水準でRRモード値の有意な減少が認められた。M群に比べて早期から影響が見られる。

RR間隔モード値(全データ単位(ms))

H	rat-1	rat-2	rat-3	rat-4	rat-5	rat-6	rat-7	rat-8
暴露前	240	230	230	230	235	230	220	270
暴露1期	220	220	240	220	240	220	210	250
暴露2期	*	*	205	210	200	200	195	240
暴露3期	*	*	190	190	185	180	*	*
暴露後	*	*	190	*	190	180	*	*

HG群の最頻値の推移



図からは若干減少傾向が見られるが、C群と同様、暴露前を基準とし、全ての期間において統計的に優位な差は認められなかった。

RR間隔モード値(全データ単位(ms))

HG	rat-1	rat-2	rat-3	rat-4	rat-5	rat-6	rat-7	rat-8
暴露前	235	230	215	220	230	200	220	230
暴露1期	235	230	210	230	*	230	220	260
暴露2期	220	220	210	200	*	210	215	240
暴露3期	270	210	*	190	*	195	200	220
暴露後	250	210	*	185	*	190	200	220

暴露前を基準としたとき、モード値は C, L, HG群では全ての期間において統計的に有意差は認められなかったが、HG群ではやや減少傾向を示した。M群では暴露第一期で有意な差は見られなかったが、それ以降全て1%の有意水準でRRモード値の有意な減少が認められた。H群では暴露第一期で5%の有意水準で、それ以降全て1%の有意水準でRRモード値の有意な減少が認められ、M群に比べて早期から影響が見られた。ライトON時のRR間隔の二峰性ヒストグラムは、暴露濃度と暴露期間に依存した変化であり暴露によって安静期モードから活動性モードに移行していることが示唆された。

9. データ取得中に死亡したラットの RR 間隔についての所見

データ取得中に死亡したラットの死亡直前の心電図の所見について下記にまとめた。

共通所見としては、

- ・RRInterval の変動が極めて小さい。
- ・スペクトルの低周波成分が下がる。
- ・スペクトルの傾きがフラットに近くなる。
- ・RR間隔ヒストグラムが単峰性となり急峻になる。

個体による相違としては、

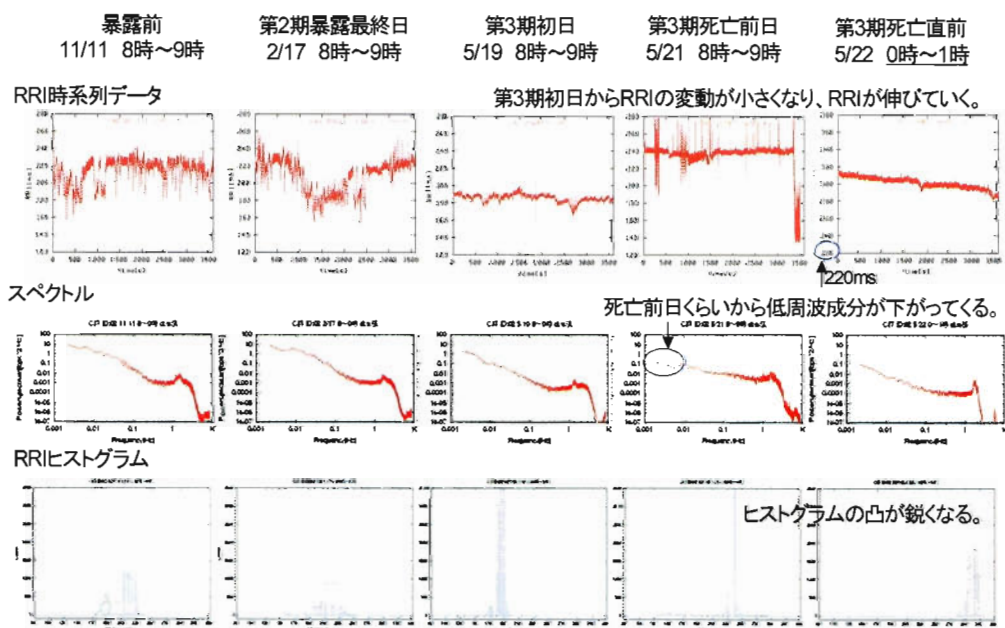
- ・C群 06, H群 04 は徐々に徐脈となり死に至った。
- ・M群 03, M群 05, M群 08: 平均RR間隔は変化せず不規則な突発性徐脈が混入していた。
- ・HG群 03: 死亡前日、平均RR間隔は変化しないが、死の直前に期外性不整脈が多発し死に至った。対照動物と曝露動物の死亡所見には、明確な差は認めなかった。

2-1

死亡ラット所見

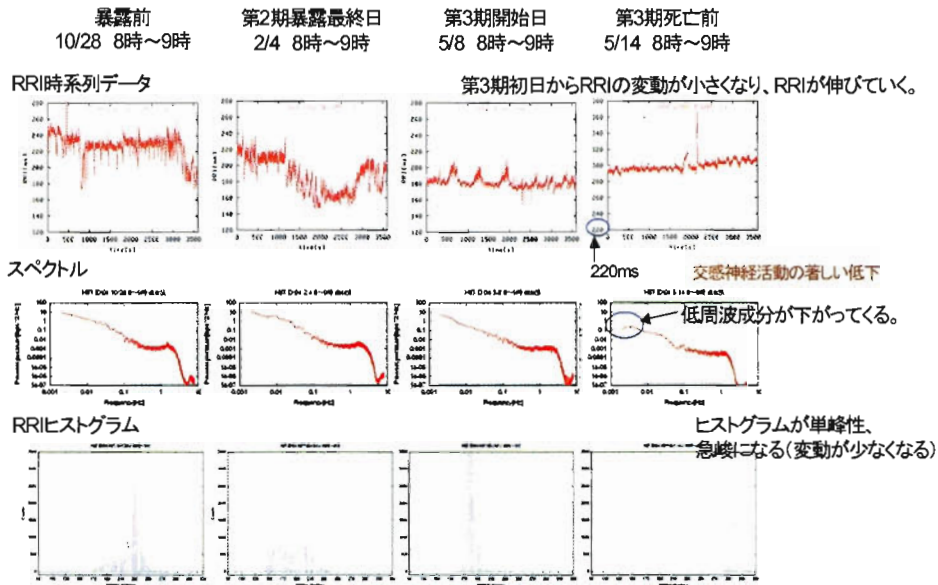
データ取得中に死亡した6匹のラットについてRR間隔系列に関する変化を示す

1. C06(5/21深夜に死亡) 徐脈となり死亡



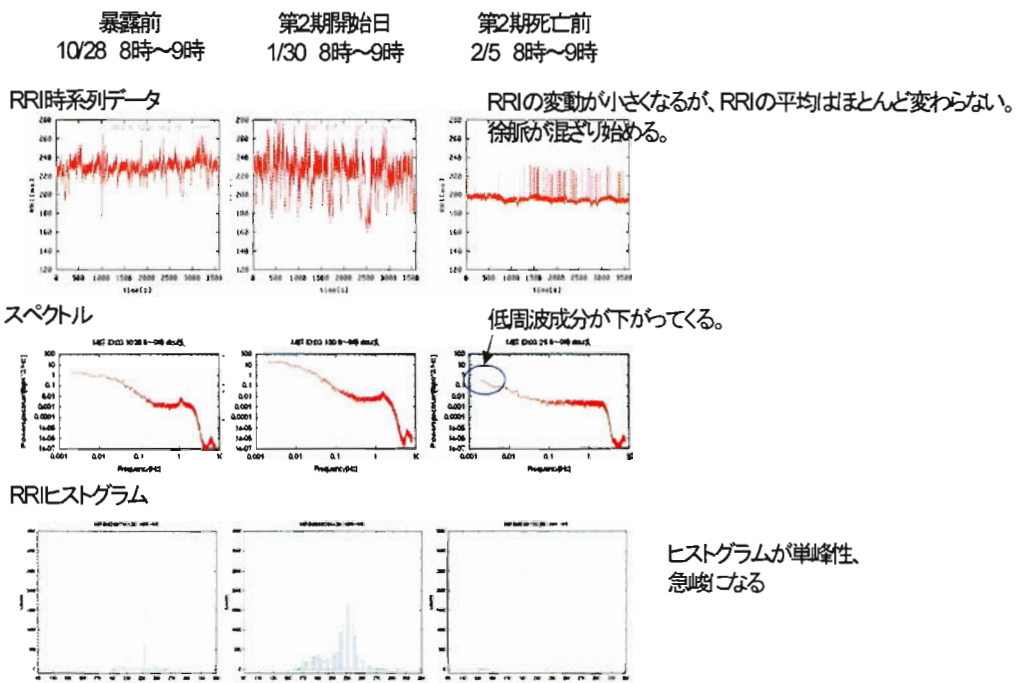
死亡ラット評価

2. H04(5/14 15時頃死亡) 徐脈となり死亡



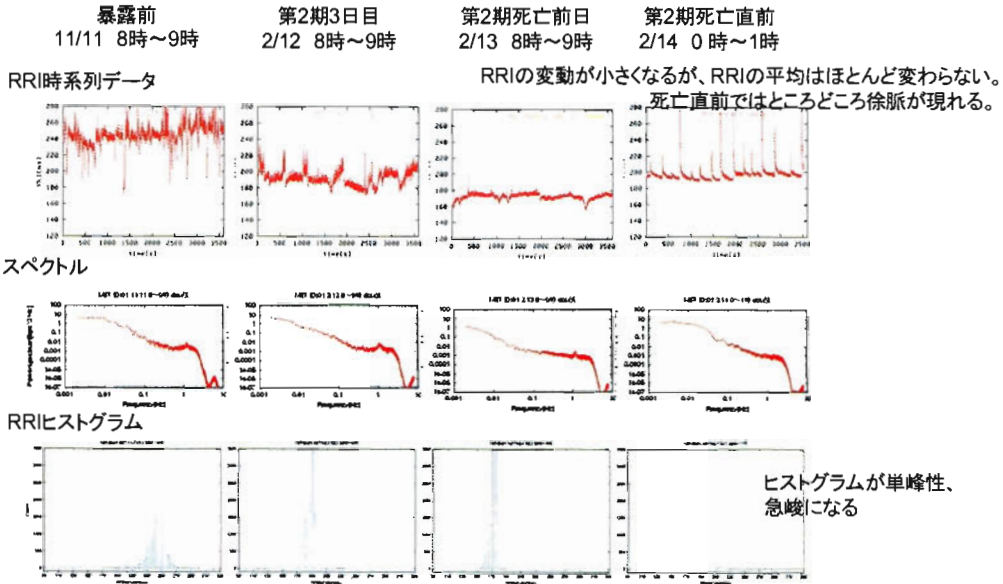
死亡ラット評価

3. M03(2/6深夜に死亡) 突発性徐脈、死亡直前の心拍変動増大



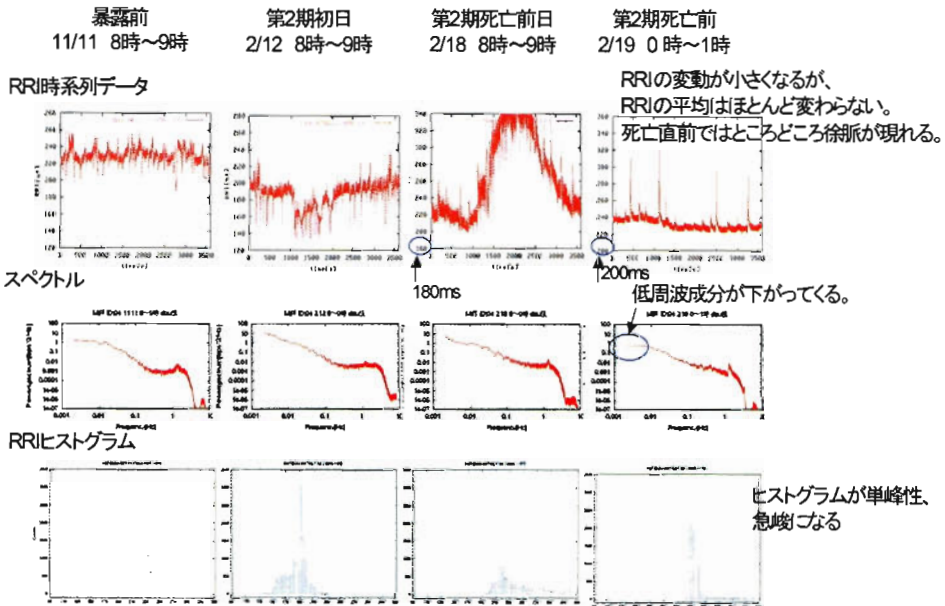
死亡ラット評価

4. M05(2/13 深夜に死亡) 突発性徐脈、死亡直前の心拍変動増大



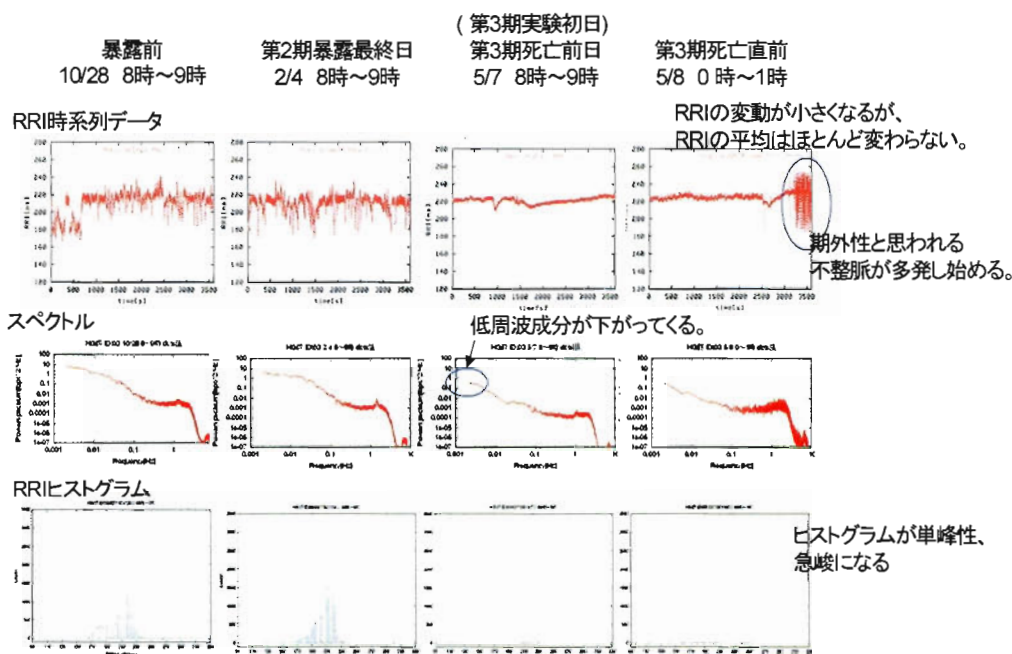
死亡ラット評価

5. M08(2/19 早朝に死亡) 突発性徐脈、死亡直前の心拍変動増大



死亡ラット評価

5. HG03(5/8 深夜に死亡) 突発性徐脈、死亡直前の心拍変動増大、不整脈による死



考察

15ヶ月齢WKYラットへのディーゼル排気ガス暴露の心肺機能に及ぼす影響を検討した。肺機能への影響では、1週間暴露では一過性的変動を認めたものの、暴露停止4日間で暴露前値に殆ど回復した。6ヶ月間長期暴露では、6ヶ月暴露終了時に暴露群でやや変動を認めたものの前実験過程を通して著しい暴露影響は認めなかった。一方、心機能への影響では、1週間暴露で心拍数と体温に暴露影響を認め、特に暴露中の心拍数の増加が明確であったが、この変動は暴露期間中に暴露停止後速やかに回復傾向を示した。然しながら、測定項目の検定で、暴露前半と暴露終了後の4日間で変動差を認めることが多いことから、暴露による影響は穏やかに蓄積していることが推定された。長期暴露では、暴露による心拍数の変動は著しく、体温の上昇、自律神経系への影響や不整脈の出現も認めた。これらの変動の多くは、暴露濃度と暴露期間に依存した変化であった。心波形の解析では、暴露動物で本来安静状態にあるべきときに交感神経優位の状態である可能性が認められ、ライトON時のRR間隔の二峰性ヒストグラムでは、暴露期間と濃度に依存して動物が安静モードから活動性モードにより移行していることが示唆された。H群とHG群の比較では、暴露により変動が認められた項目の多くでHG群はL群やC群に近い値を示したことから、心機能に対する粒子の影響が大きいことが推測された。Fig. 43に、今回得られた結果を基に、ディーゼル排気ガスの心肺機能への影響についての模式図を示した。ディーゼル排気ガス暴露によって明らかに心拍数に影響を認めるが、短期暴露ではその影響は速やかに回復し、長期暴露ではその影響が蓄積され、其の変動に環境要因や自律神経系の影響も加わり、不整脈の発現に導いている可能性がある。

動物でのディーゼル排気ガス長期暴露の心機能への影響についての報告は未だ見られない。高血圧ラットへのディーゼル排気ガス 1 週間暴露の心機能への影響を検討した Campen らの報告(Campen MJ, et al, *Cardiovasc Toxicol*, 3, 353-361, 2003)では、暴露中に心拍数とPQ間隔の上昇を認め、暴露後4日間のクリーンエアでの飼育では全く影響を認めなかったと報告している。本実験においても暴露中に心拍数の増加を認めたが、短期暴露でもまた長期暴露においても暴露群で特に PQ 間隔が延長しているという所見は認めなかった。Campen らは、短期暴露での PQ 延長を伴う心拍数の増加が不整脈を導く可能性を示唆している。本実験の長期暴露動物で濃度と暴露期間に依存した不整脈の出現時期や増加を認めた。しかしながら、不整脈発現時期が早い動物や頻度が高い動物が必ずしも早期に死に至るわけではなかった。従って、ディーゼル暴露によって引き起こされる心停止は、不整脈のみならず他の要因が複雑に関与することによって引き起こされている可能性が考えられた。

5. 単体ナノ粒子暴露実験の条件設定—超微小粒子の発生方法の検討

超微小粒子の発生飛散方法の検討

1. はじめに

近年、大都市の交通量の多い道路沿道に、粒径 50nm以下の極めて微小な粒子(ナノ粒子)が観測され、個数濃度は 10^5 個/cm³のオーダーと非常に高値を示している。この超微小粒子は重量では極くわずかであっても個数や表面積は大きくなることから、吸入による健康への影響が懸念されており、呼吸器から他の臓器への移行や嗅覚神経系を介して脳へ移行することも述べられている。このような超微小粒子の吸入影響を評価するために、ここでは超微小粒子の発生飛散方法を検討した。

2. 超微小粒子の発生方法

ここでは超微小粒子として、炭素粒子と酸化チタン粒子の発生飛散を試みた。一般的に固形粒子の発生は、直接粒子そのものを飛散させる方法と懸濁液を利用する方法とがある。粒子そのものをドライな状態で発生飛散させるためには、粒子を空気エジェクタで吸い上げて飛散させる方法、粒子化する固体を機械的に破碎する方法、金属粒子に用いられるアーク放電の利用、あるいは高温下で気化する方法など多くの方法がある。懸濁液を利用する方法は、粒子懸濁液を噴霧して乾燥空気と混合すると溶媒は蒸発気化し、懸濁液中の粒子が残る。それぞれ目的に応じて用いられている。

炭素粒子は市販の炭素電極を用いアーク放電による発生飛散を、酸化チタン粒子は、既知粒径の粒子をドライな状態と懸濁液噴霧で飛散させる方法を検討した。使用した酸化チタン粒子は、(a)Amorphous,粒径 $0.05 \mu\text{m}$ 以下,和光純薬工業製,(b)P25,粒径 20nm, Degussa 社製,(c)T-315,粒径 200~250nm, Fisher Tin 社製の3種を用いた。飛散粒子の粒径分布は走査型モビリティ粒径分析器(SMPS)を用いて計測した。用いた発生装置と計測器の概要を以下に示す。

(1) 炭素粒子発生装置

炭素粒子の発生には、カーボンロッドを不活性ガス(Ar)雰囲気下でスパーク放電して粒子を発生させる炭素粒子発生装置(GFG-1000, Palas)を用いた。発生部の構造を図1に、主な仕様を表1に、装置概観を図3に示す。

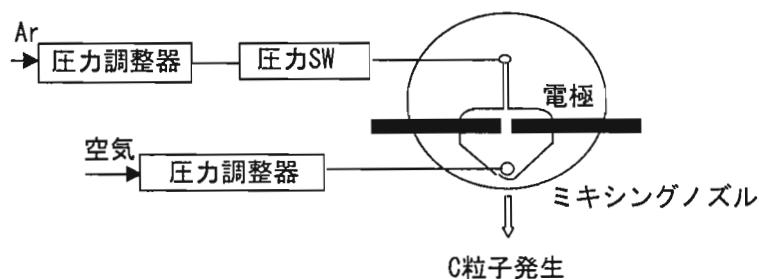


図 1 炭素粒子発生装置の概要

表 1 炭素粒子発生装置の主な仕様

発生粒子	炭素
粒子径	20-100nm
粒子個数濃度	$>10^7/cm^3$
粒子重量濃度	0.1-25mg/m ³
発生時間	数時間
キャリアーガス	アルゴン(2-8L/min), min 3.5bar 精製空気(0-50L/min), min 3.5bar



図 2 炭素粒子発生装置の概観

(2) 粉体発生装置

市販の粉体発生装置(ダストフィーダー, DF-3 型, 柴田科学)を用いた. 装置概要を図3, 外観を図4に示す. 本装置の発生原理は, ターンテーブル内の溝上の粒子を空気エジェクターで吸引して, 希釈空気と混合して飛散させる方法である. ターンテーブルの回転速度やテーブル内の溝の容積を変えることにより粒子飛散量を変えることができる. ここでは, 溝の径5mmで

4個の溝を有するテーブルを用い、エジェクター空気流量20L/分とした。飛散した粒子を内容積約1m³の容器内に導入してこの容器内の個数濃度分布を計測した。

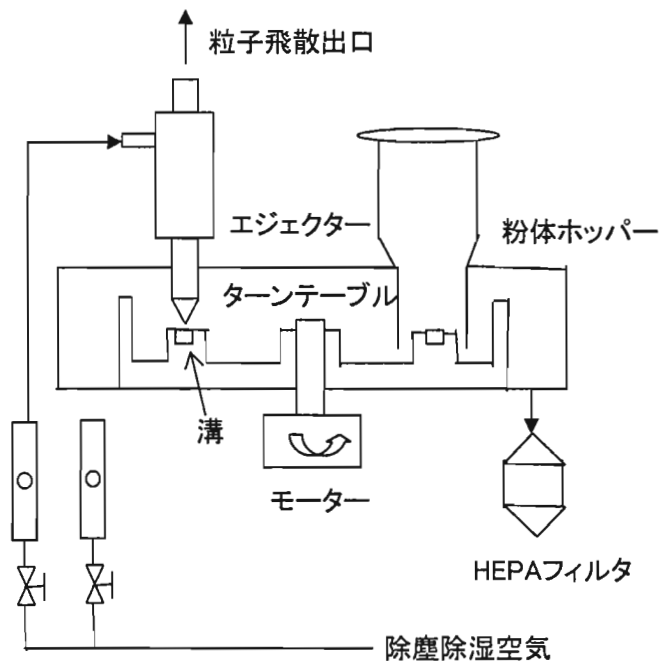


図3 ダストフィーダーの概要



図4 ダストフィーダーの概観

(3)エアロゾルジェネレーター

乾燥分散式の発生装置 (RGB-1000, Palas 製) を用いた。本装置はシリンダー内に粒子を円柱上に圧縮充填し、この粒子をピストンで押し上げてその先端を回転ブラシにより一定の率で削り取り、圧縮空気にて分散させる機構である。シリンダー内容積やピストン押し上げ速度を変えることにより発生量を変えることができる。本装置の概要を図5, 装置外観を図6に示す。

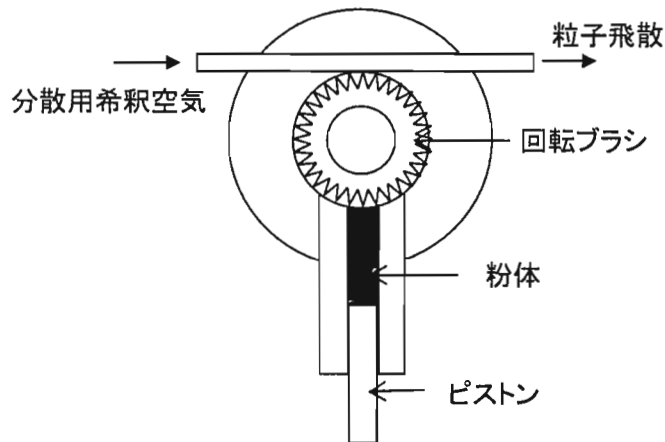


図5 エアロゾルジェネレーターの概要

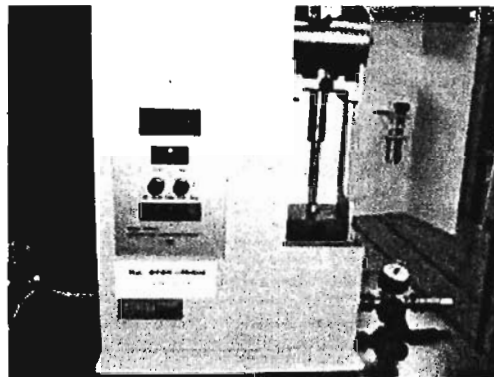


図6 エアロゾルジェネレーターの概観

(4)アトマイザー

アトマイザーの概要を図7に, 装置概観を図8に示す。まず, アトマイザーの性能を調べるために NIST トレサブルな PSL 標準粒子 (STADDEX SC-011S JSR 製, 粒径 $100\text{nm} \pm 6\text{nm}$) を用いて, 発生飛散した粒子の粒径分布を調べた。発生飛散した PSL の測定結果を図9に示す。粒径 100nm を中心に非常に幅の狭い粒径分布を示しており, この値は用いた粒子の公称値に近いことから, アトマイザーによって微小な粒子の発生飛散が可能である。

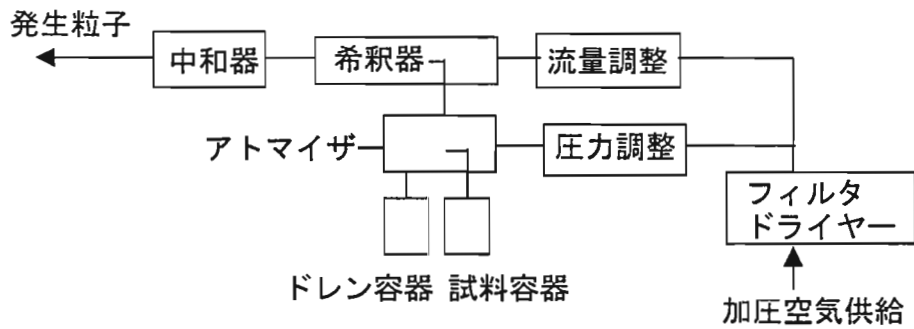


図7 アトマイザーの概要

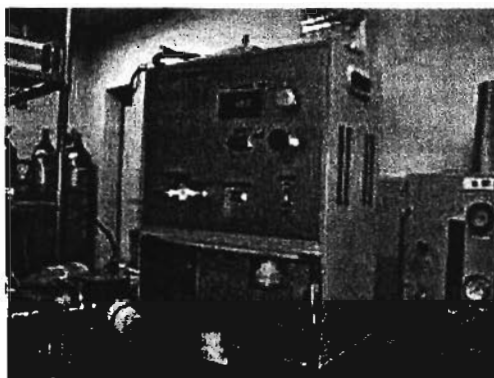


図8 アトマイザーの概観

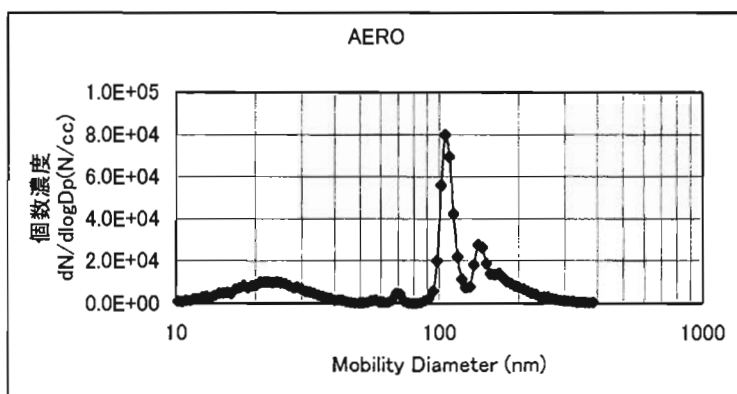


図9 PSL 標準粒子によるアトマイザー性能確認

(5) 走査型モビリティ粒径分析器(SMPS)

SMPS は電気移動度検出技術を用いており、粒子を分級するための静電式分級器(DMA;Differential Mobility Analyzer)と粒子を検出するための凝縮粒子カウンター(CPC;Condensation Particle Counter)から構成される。装置の外観を図10に示す。粒子は分級部に導入されるが、入口のインパクターにより測定範囲外の大粒子を除去して多重荷電によるデータ変換誤差の要因を排除する。次に、粒子は両極イオン中和器で平衡荷電分布に達した後、DMA を通ることにより、それぞれの粒子のもつ電気移動度に従い分級される。DMA 内部に形成される電場によって荷電粒子の軌跡が影響を受け、幅の狭い電気移動度の範囲にある粒子だけが集塵ロッドに設けられたスリットを通過して DMA から出る。DMA から出た単分散の粒子は CPC に導入されて、アルコール蒸気雰囲気内で核凝縮により大きな粒子となり、光学的に粒子個数が測定される。

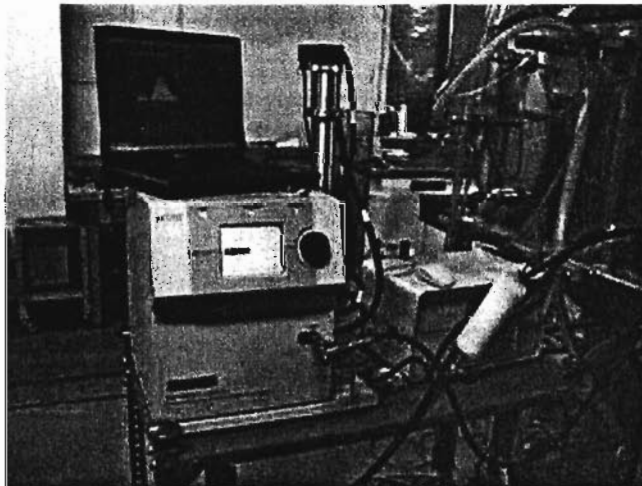


図10 粒子個数濃度分布測定器(SMPS)の概観

(6) 鼻部暴露チャンバー

マウスを実験小動物とした小型の鼻部暴露チャンバーを設計製作した(図11)。本体は透明アクリル製として内容積は約1リットルである。被験粒子は上部より供給されて鼻部を通過後排出される。毎分10リットルの通気速度でチャンバー上部から鼻部までの滞留時間は約3秒となり、微小粒子のチャンバー内滞留による凝集を低値となるようにした。上記の粒子発生装置から発生飛散した粒子をこの鼻部暴露チャンバーに導入して、チャンバー内の粒子個数濃度をSMPSで測定した。

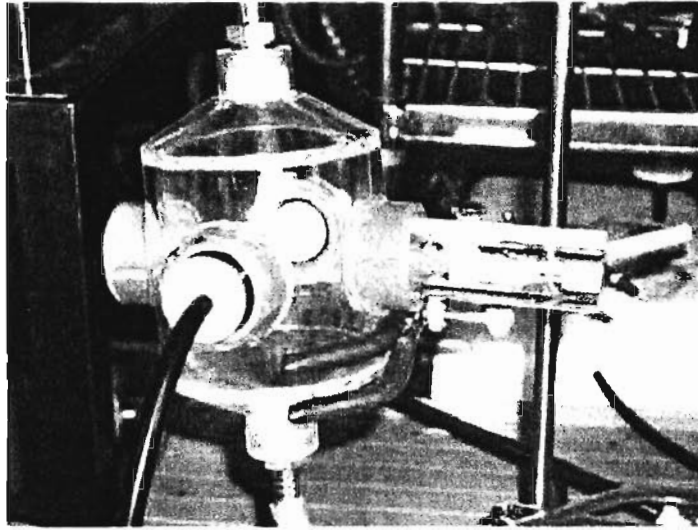


図11 試作マウス用鼻部暴露チャンバー

3. 実験結果

3.1 炭素粒子

アーク放電により発生した粒子を希釈空気で希釈後に、発生装置から取り出す。この希釈空気流量を変えた場合の粒子個数濃度分布を図 3.1 に示す。希釈空気の供給の有無時の発生粒子の粒径分布を比較すると、希釈空気がない場合にはモード径は 30nm 程度大きくなる。希釈空気の供給があれば流量による粒径変化は少なくなる。発生装置の放電周波数を変えた時の粒子個数濃度と粒径分布を図 3.2 に示す。高周波数の場合にはモード径は大きく、粒子個数濃度は高値となるが、いずれの場合も 100nm 以下のモード径を示し、発生装置出口濃度換算で 10^6 個/cc レベルが得られた。

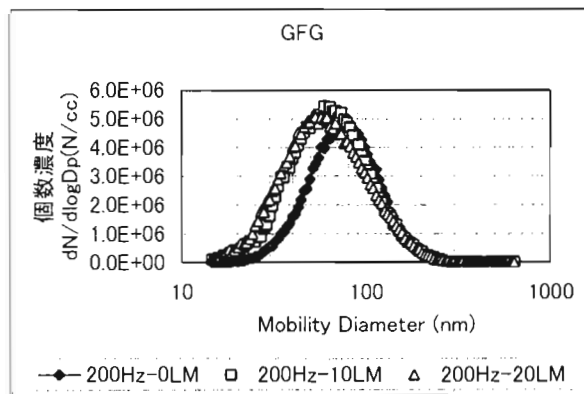


図 3.1 炭素粒子発生結果(希釈空気流量の影響)

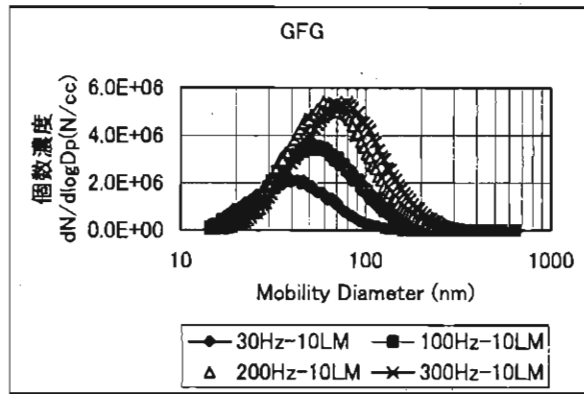


図 3.2 炭素粒子発生結果(放電周波数の影響)

3.2 酸化チタン

ダストフィーダーDF-3 による酸化チタン粒子(a)の発生飛散結果を図 3.3 に示す。チャンバー内のバックグラウンド濃度に対して 80nm 以上の濃度増加を示し、酸化チタン粒子が浮遊する条件の作成は可能であると思われる。しかし、用いた酸化チタン粒子の表示粒度分布よりは大きな粒径を示しており、乾燥状態の粉体は元は超微小粒子であっても凝集している場合が多いため、超微小粒子として飛散させることは困難な部分がある。

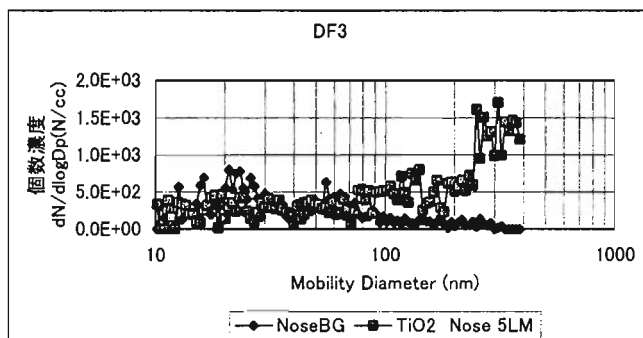


図 3.3 ダストフィーダーによる酸化チタン粒子(a)の発生飛散

次に、この凝集した状態を回避する手段の一つとして、粉体を高速回転するブラシで削り取り発生飛散する方法がある。この手法を用いた RGB1000による酸化チタンの発生飛散結果を図 3.4 に示す。粉体を押し上げるピストンの速度(50,100mm/H)が早いほど発生飛散粒子濃度は高値となるが、粒径分布はさほど微細化せず、本法によっても乾燥粒子のまま発生飛散することは困難であった。

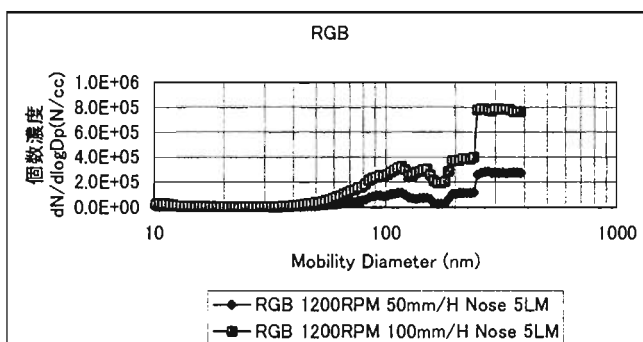


図 3.4 エアゾルジェネレーターによる酸化チタン粒子(a)の発生飛散

凝集した酸化チタン粒子を水中に懸濁して発生飛散させる方法を試みた。所定量の酸化チタン粒子を秤量して超純水中に懸濁後、アトマイザーを用いて噴霧した結果を図 3.5, 図 3.6, 図 3.7 に示す。図 3.5 より溶液濃度に依存して発生粒子濃度は高値となり、モード径も大きくなる方向にある。乾燥粒子としての発生飛散結果と比較すると、モード径 200nm 以下の微小な

粒子として発生飛散していることがわかる。また、鼻部暴露チャンバー内の換気流量を変化させた場合(図 3.6)でも個数濃度分布に大きな相違はなく、チャンバー内での粒子の凝集は起きていないことがわかる。

同様に呼称 20nm の酸化チタン粒子(b)を発生飛散させた場合(図 3.7), 20nm 付近にモード径を示す分布が得られたが, 100nm 以上にもモード径をもつバイモーダルな個数濃度分布となっており, この大粒径部分が懸濁前の乾燥状態で既に存在して十分懸濁されていないか, あるいは発生飛散した粒子の凝集によるものか判別は今後の課題である。呼称 200~250nm の酸化チタン粒子(c)の場合(図 3.8)は, 呼称粒径相当には分布が見られず発生飛散方法の更なる検討が課題として残った。

本手法により明確な個数濃度分布を示した発生飛散条件下での, 個数濃度分布の安定性を調べた結果を図 3.9 に示す。図は発生飛散開始直後から 2.5 時間までの分布変化を 10 分毎に示したが, 個数濃度分布は安定していることから鼻部暴露に十分適用可能であることがわかった。

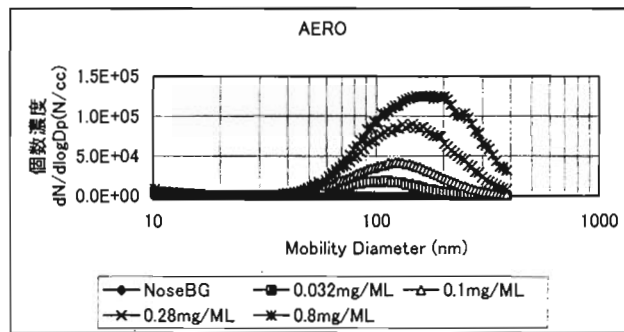


図 3.5 酸化チタン粒子(a)懸濁液の発生飛散結果(溶液濃度と発生粒子濃度)

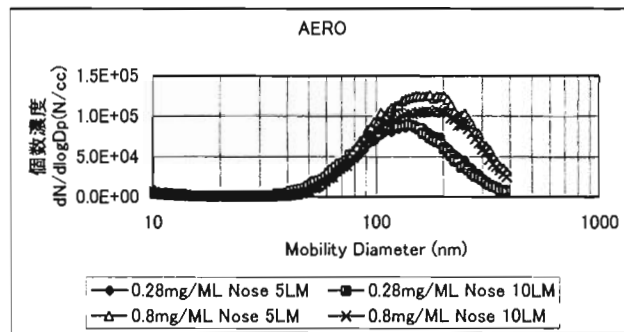


図 3.6 酸化チタン粒子(a)懸濁液の発生飛散結果(チャンバー換気流量と粒子濃度)

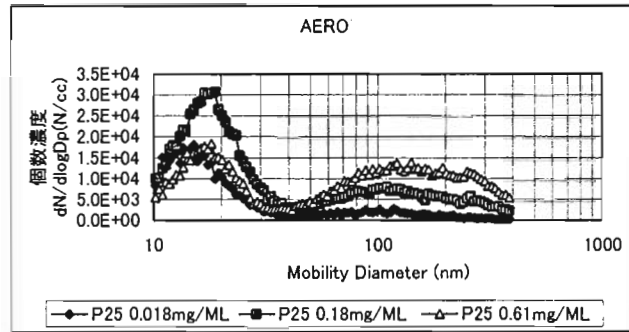


図 3.7 酸化チタン粒子(b)懸濁液の発生飛散結果(溶液濃度と粒子濃度)

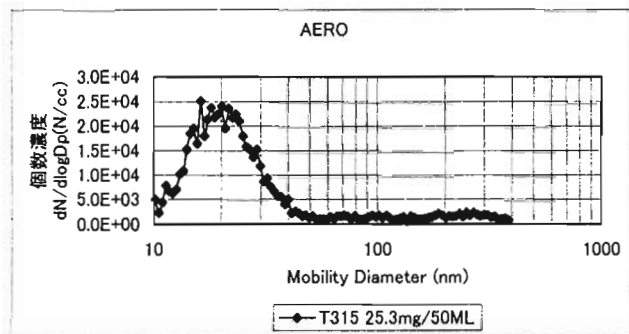


図 3.8 酸化チタン粒子(c)懸濁液の発生飛散結果

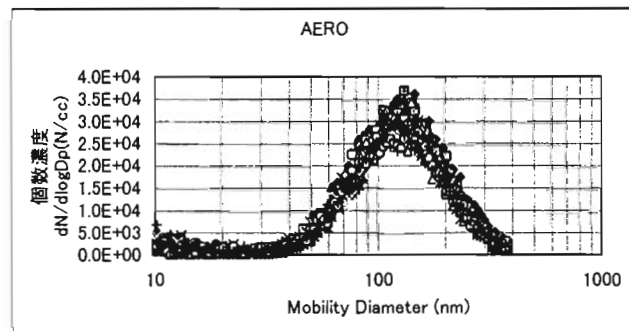


図 3.9 酸化チタン粒子(a)発生飛散の経時安定性(0~2.5 時間)

4. まとめ

超微小粒子の吸入影響を調べることを目的として、粒子の発生飛散方法を検討した結果、以下のことがわかった。

- (1) 炭素粒子はカーボンロッドのアーキ放電により、100nm以下のモード径粒子が発生飛散可能であり、発生装置出口濃度換算で 10^6 個/ccレベルが得られた。
- (2) 酸化チタン粒子は、乾燥状態で発生飛散させた場合には呼称粒径よりも大粒子が飛散し、

乾燥状態の粒子の発生にはなお検討を要する。

(3) 酸化チタン粒子を懸濁液として噴霧した場合には相応の個数濃度分布が得られたが、呼称粒径とは異なっていることから、なお発生飛散方法の検討が必要である。

(4) 懸濁液噴霧による発生飛散粒子濃度の経時安定性は比較的良好であり、吸入暴露に利用可能である。

超音波ネブライザー スパイラル 3612 マーク 5

(メディソニック社、USA) の性能についての検討

超音波ネブライザーの性能				
FILENAME: NAACL1%		SCAN(V):	10	10833
NOTEFILE:		SCAN(nm):	15.96	964.66
CHAN/DECADE:	32	VIEW(nm):	15.96	897.69
TIME:	14:39:45	tf,td(s)	8.8	6.7
DATE:	28 Oct 2003	tup,tdwn(s):	240	60
SAMPLE#:	1	SCANS/SAMPLE	1	
Qsh,Qa(lpm)	2.5	0.25		
CHARGE CORRECTION: on		D50(nm):	893	
Particle Size Statistics:	No Assumption	Lognormal Assumption		
Number Count:				
median(nm)	75.744		75.744	
mean(nm)	98.478		96.227	
geometric mean(nm)	76.484			
mode(nm)	77.737		46.93	
standard deviation	84.081			
geo. standard deviation	1.997		1.997	
skewness	0.247			
coeff. of variation(%)	85.381			
Total Concentration(#/cm3)	2.07E+03			
Surface Area:				
median(nm)	224.667		197.307	
mean(nm)	290.187			
geometric mean(nm)	225.656		250.664	
mode(nm)	626.434			
standard deviation	197.666			
geo. standard deviation	2.097			
dia. of average surface(nm)			122.249	
Total Concentration(nm2/cm3)	1.09E+08			
Volume:				
median (nm)	427.929		318.449	
mean (nm)	424.831			
geometric mean (nm)	362.745		404.565	
mode (nm)	626.434			
standard deviation	204.039			
geo. standard deviation	1.855			
dia. of average surface (nm)			155.308	
Total Concentration (nm3/cm3)	5.28E+09			

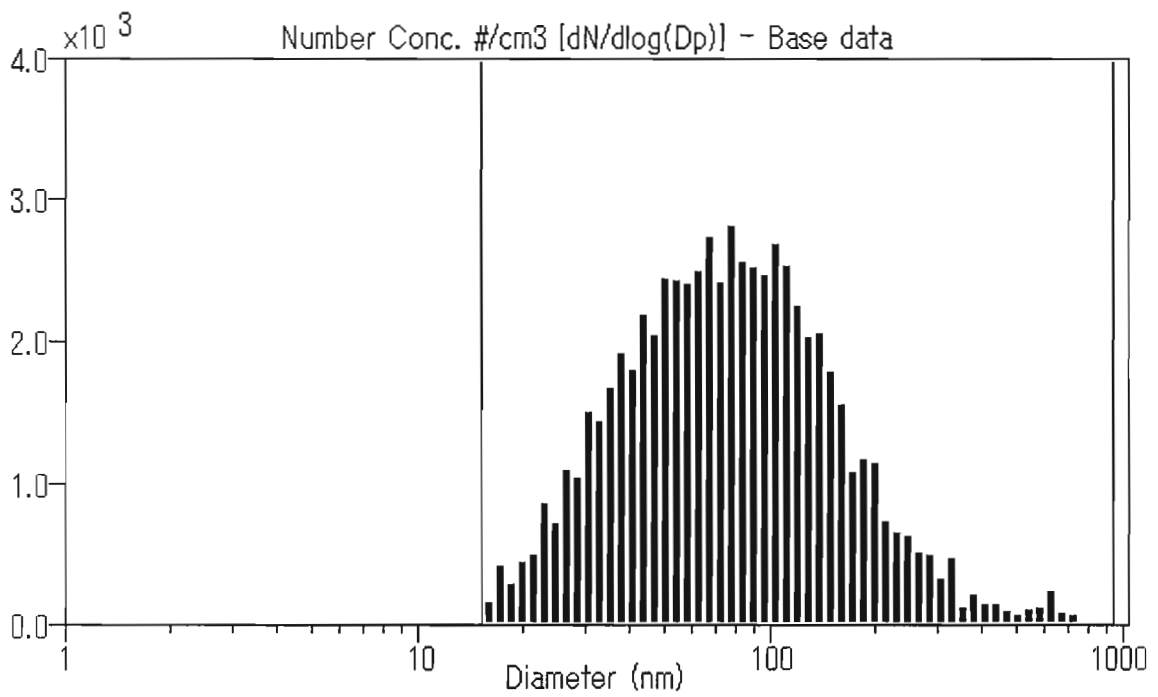
File: NACL1%

Sample number: 1

Scan number: 1

Tue 28 Oct 2003

14:39:45



[考察とまとめ]

1. 微小粒子気管内投与後の体内動態

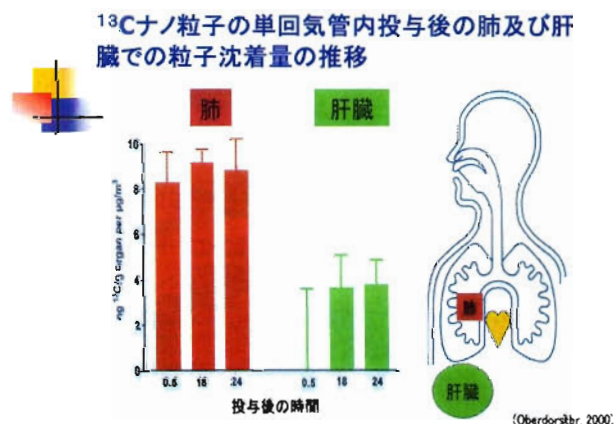
サイズの異なる蛍光コーティング粒子を気管内に投与して検討したところ、気管内7日目までは、検出が出来た臓器は肺のみであった。蛍光コーティング粒子を用いた実験では、蛍光粒子を検出したが、細胞内よりもむしろ肺胞上皮表面で観察された。超微小粒子が肺胞マクロファージよりもむしろ肺胞I型上皮に取り込まれやすいという報告を裏付ける結果であった。この結果は、肺末梢部位まで到達した微小粒子が肺胞腔から血管系に移動する可能性や、沈着部位での滞留時間が延長される可能性が示唆された。

ナノ粒子を検出するために電顕技術を適用して観察を行った結果、投与1週間目に肝臓では検出されなかったが10日目に肝臓クッパー細胞中に粒子を検出した。

ナノ粒子の体内動態 (まとめ)

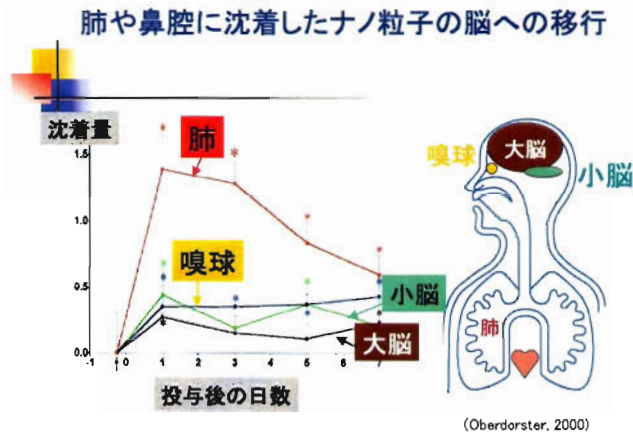
日数	3日	7日	10日
肺	肺胞腔内での粒子沈着 肺胞マクロファージによる貪食	I型肺胞上皮細胞、基底膜 血管内日細胞内での沈着	I型肺胞上皮細胞、 血管内日細胞内での沈着
肝臓	検出されず	検出されず	クッパー細胞内ライソゾーム で検出
嗅球(脳)	検出されず	?	神経線維層から上部で検出
血管	検出されず	血管腔内に観察	血管腔内に観察

Oberdorster らによるラットへの ^{13}C ナノ粒子の暴露実験の成績を下記に示した。この成績は、暴露後に短時間で肝臓に粒子が移行することを示している。我々の成績と時間的な部分で相違があるが、これは気管内投与と全身暴露による投与方法の違いによるものと考えられた。全身暴露では消化器系を介して肝臓に移行する経路も無視できないものと思われ、この点については、今後鼻腔暴露による確認実験が必要である。

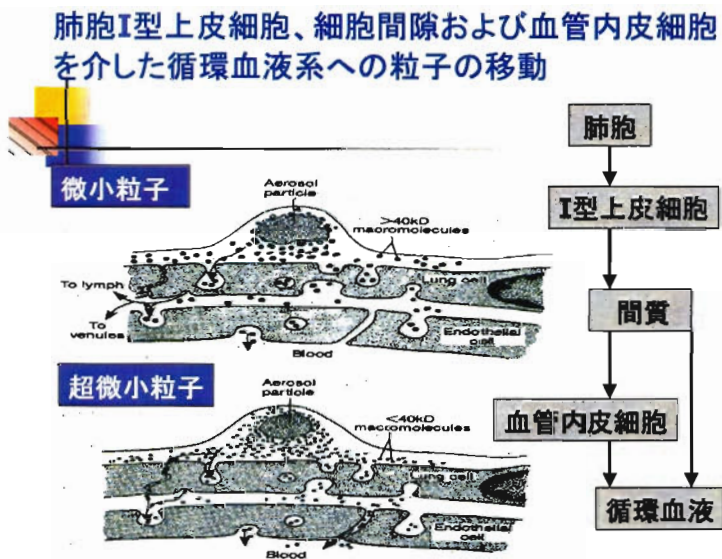


微小粒子の脳への移行では、投与10日目に嗅神経が嗅球に入り込んだ神経線維層部分に粒子が検出された。この結果は、嗅神経を介してナノ粒子が脳に移行できる可能性を強く示唆する所見であった。加えて、肺や肝臓に沈着した粒子と比較して嗅球に移行した粒子はサイズが揃ったものを検出したことから、神経の粒子の取り込みには粒径が影響している可能性が考えられた。

Oberdorster らのナノ粒子暴露実験での嗅球、大脳、小脳への粒子の経時的な沈着についての実験成績を下記に示した。単回投与後、速やかに粒子の嗅球、小脳、大脳に沈着することを示しているが、嗅神経を介した嗅球への粒子移動には少なくとも1週間以上の時間が必要とされており、投与1日後での脳への移行には疑問が残る。

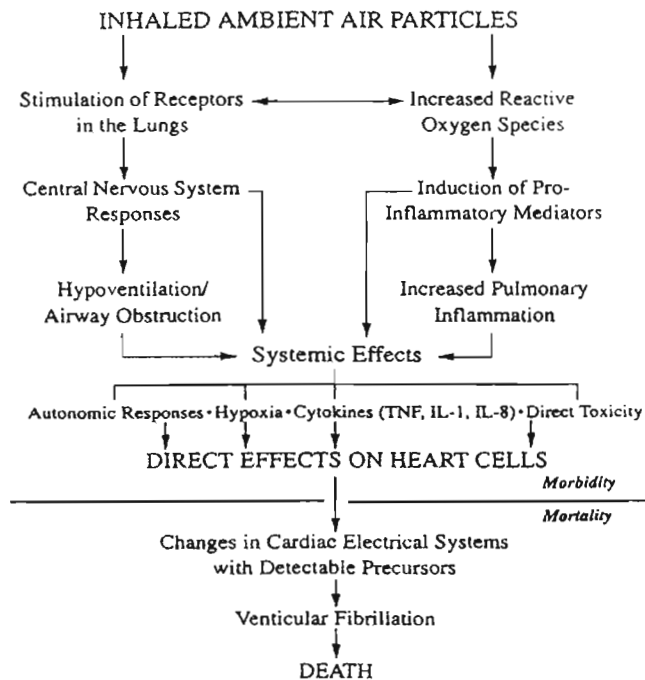


肺組織でのナノ粒子の動態についての観察では、肺泡マクロファージによる貪食よりむしろ肺泡上皮細胞内に粒子が多く認められた。気管内投与7日後で血管腔内に粒子を認めたことは、ナノ粒子が肺泡側から血液循環系に移行できることを示していた。肺泡側から血管側への移行機序は未だ不明であるが、I型肺泡上皮細胞や基底膜で粒子沈着を認めたことから、下記に示すようなI型肺泡上皮細胞を介したメカニズムと炎症反応による血管内皮細胞間隙の拡大による移動が考えられた。



2. 粒子表面付着有害物質の影響

これまでの疫学研究から、心肺疾患罹患率と死亡率への大気中微小粒子の短期暴露影響が示唆されている。特に心不全による超過死亡率が問題視されているが、その機序については未だ解明されていない。Harvard大のDockeryらは、下記に示すような粒子暴露による自律神経系を介した心不全のメカニズムを示唆している。そこで、動物実験でその点を検討するためにラットにテレメトリー埋め込み実験を行った。特に、粒子構成成分の中でも生体影響に深く関与しているであろう粒子状物質表面に付着している有機成分について、粒径 2μ 以上の大気中粒子状物質、 1μ 以下の粒径をもつディーゼル排気ガス中粒子状物質を用いて比較した。その結果、若齢、老齢ラットでは投与24時間後に軽度な炎症所見を認めたが、心不全に起因するような心機能や肺機能の変化は認めなかった。



大気粒子状物質のハイリスク群として心肺疾患患者、高齢者が挙げられている。そこで、食塩感受性高血圧ラットを用いて同じ試験試料で実験を行った。その結果、単回気管内投与では著しい自律神経系も含む心機能への影響を示唆するような所見は認めなかった。

Brookら (Circulation 105:1534-1536, 2002) は、健常者でCAPs ($150 \cdot \text{g}/\text{m}^3$) とオゾンの混合暴露の影響を検討し、清浄空気吸入時に比較して粒子暴露時の明らかな腕動脈収縮を報告している。この結果は、腕動脈と冠動脈の反応には強い相関が見られることから、健常者で心不全を起こさない程度の影響でも、高感受性である心(肺)疾患有症者で突発性冠動脈収縮によって虚血性心疾患を引き起こす可能性を示唆している。そこで、粒子有機成分気管内投与を行った食塩感受性

高血圧ラットに、気管内投与 21 時間後に 0.4ppm オゾンの 3 時間暴露を行い心肺機能への影響について検討したが、ヒトでの結果を裏付けるような心機能への影響は認めなかった。

3. ディーゼル粒子コア部分の影響

粒子コア部分の影響を検討するために、ディーゼル粒子を有機溶媒で洗浄したコア粒子と非洗浄粒子の肺組織での各種サイトカインの発現量について検討した。その結果、気管内単回投与 3 日目で TNF- α mRNA が、投与一ヵ月後に MCP-3 mRNA の発現量が対照群に比較して、粒子群、有機溶媒処理粒子群で有意に増加した。その程度は粒子群よりも有機溶媒処理粒子群で高い値を示した。MCP-3 はマクロファージ発現サイトカインであることから、肺深部に沈着した粒子により肺胞マクロファージが活性化されている可能性が示唆された。有機溶媒処理粒子が処理されない粒子よりも炎症関連サイトカイン遺伝子発現に強く影響した理由として、表面有機成分が除去されたために、貪食細胞による異物認識が低下して除去効率が低下した可能性や有機成分除去により粒子凝集力が低下して、より多くの微小粒子が肺深部まで到達した可能性などが考えられた。この点については、今後さらに詳細な実験が必要である。

4. 粒子除去によるディーゼル排出ガス長期暴露の影響評価

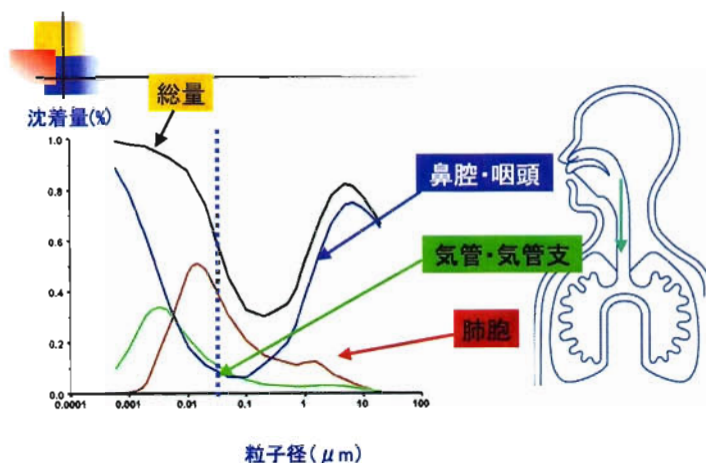
長期ナノ粒子暴露影響による心肺機能への影響を把握し、心不全をエンドポイントとしたリスク評価を行う際の問題点を明らかにするために、ディーゼル 6 ヶ月間暴露を行った。その結果、ディーゼル排ガス暴露により心拍数に影響が認められ、1 週間暴露では暴露停止後に速やかに回復したが、長期暴露では非暴露時以外でも明らかな心拍数増加が姪止められ、暴露濃度や暴露期間に依存した影響であった。この心拍数に対する影響は、粒子を除いた粒子除去群で有意に抑制されたことから、粒子の影響であることが示唆された。加えて、長期暴露による影響は、動物の行動にも影響している可能性があり、今後サーカディアンリズムへの影響についても検討する必要があるものと考えられた。

一方、不整脈数に関しては、独自にソフトを開発して頻度を測定したが、不整脈が早期に出現あるいは頻発しても死亡時期との間に関連性を認めないことから、不整脈頻度よりもむしろ波形解析が心不全状態を把握する際に重要な指標である可能性が示唆された。

5. 粒子暴露実験の条件設定—超微小粒子の発生方法についての検討

動物実験で粒子状物質の生体影響を明確にするために、粒子を直接動物に暴露する方法を用いた実験が望まれる。特に、微小粒子は、発生源から大気中に放出されると速やかに凝集して大きな粒子を形成するが、最近、微小粒子の大気中での滞空時間がヒトの肺に吸入沈着する

に十分な時間を有することが示唆されている。



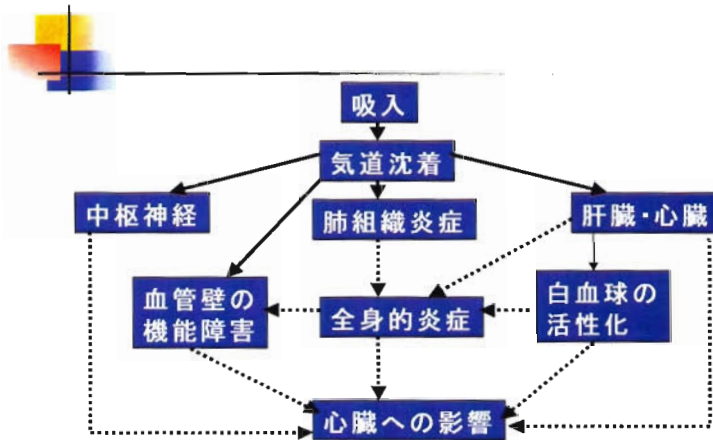
疫学研究などから、大気中粒子状物質の心肺疾患罹患率や死亡率への影響が示唆されているが、どのような成分に毒性が関与しているのか未だ不明である。今後原因物質を特定するために、大気成分の分析と共に原因物質と考えられる成分の単独暴露による影響確認が必須となる。暴露は、微小粒子がより大気中に存在している状態に酷似した条件での実験条件が求められる。

そこで、マウスへの粒子暴露装置を作成して其の性能や条件を検討したところ、大気中の粒子と挙動が類似した暴露が可能な物質と難しい物質があることが判明した。この結果を基にさらに改良することによって、原因物質推定されている各種金属粒子やガス状物質の複合暴露が可能であることが確認された。一方、微小粒子状物質の一形状であるミストは、超音波発生装置を用いて発生させるが、発生装置により粒径には大きなバラツキがみられる。そこで、ヒトネブライザーとして開発され最も微細な超音波発生器とされる米国製のスパイラル 3612 マーク 5 の性能について検討した。その結果、平均粒径 60nm の安定したミストが得られた。試験試料として用いた NaCl 以外の物質でも同様な粒径が得られるか今後検討する必要がある。

6. リスク評価とリスクマネジメントを行うための条件

これまでの大気中有害物質の健康影響評価は呼吸器系に重点が置かれ、全身影響については詳細に検討されていない。特に、国内では粒子状物質よりも喘息・慢性呼吸器疾患に関連性が高いガス状物質の生体影響に重点が置かれ、粒子状物質については有機成分の発ガン性を除いてリスク評価はまだ行われていない。従って、行政面でも浮遊粒子状物質のみ規制対象とされている。

最近 10 年の疫学研究から、大気中粒子状物質が呼吸器疾患のみならず心疾患にも関与している可能性が高いことが示唆されていることから、今後の大気中粒子状物質のリスク評価では、肺のみならず心機能を加えた全身影響を考慮する必要がある。



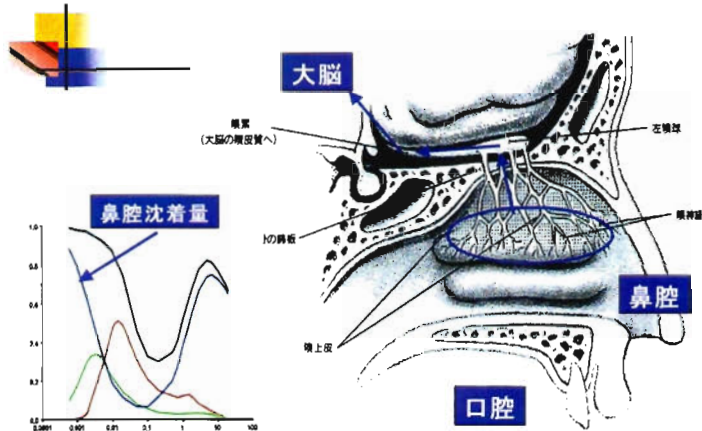
粒子状物質の心肺疾患への関与を明確にするためのリスク評価を行う際の適切な指標について選択して、その有用性を検討した。その結果、心機能では心拍数が、血液・生化学指標では炎症性指標が最も鋭敏に反応していることが示された。然しながら、心不全をエンドポイントとした際の不整脈や BNPmRNA, ANPmRNA の発現量は必ずしも適切な指標ではなかった。今後、さらに適切な指標を探索する必要がある。

吸入粒子の体内動態と生体影響

粒径	超微粒子・ナノ粒子 <100 nm	超微粒子凝集粒子・微粒子 100-1000 nm
沈着部位と割合		
鼻腔	5-90%	5-25%
気管気管支	5-35%	<10%
肺胞	<20-50%	10-20%
移動部位		
気道	I型肺胞上皮細胞 間質 血管上皮細胞 一部は粘液線毛クリアランス 一部は肺胞マクロファージ	粘液線毛クリアランス 肺胞マクロファージ 一部は間質
肺外	循環血液 神経	凝集溶解/肺にOverload
標的臓器	気道 心臓血管 中枢神経?	気道 心臓血管

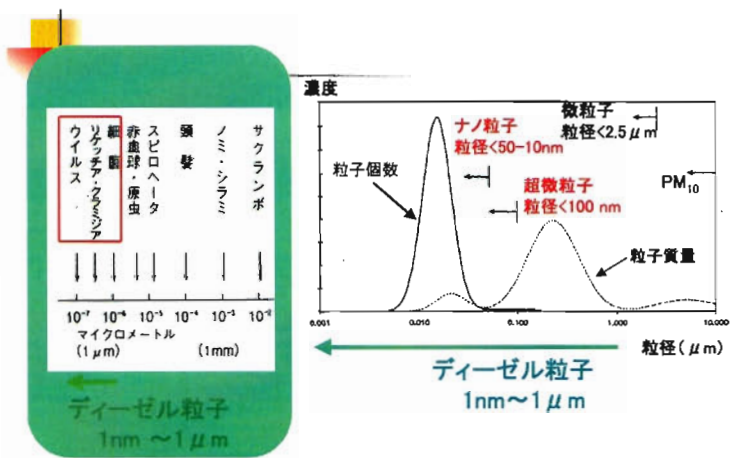
粒子の化学的・物理的特性

本研究成績から、これまで最も肺に沈着しやすいとされてきた 5μ 粒子よりもさらに微小なナノ粒子が肺胞レベルまで到達し、かつ肺胞マクロファージのみならず I 型肺胞上皮や基底膜に取り込まれていることが判明した。また、肺以外にも肝臓や脳の嗅球に取り込まれていることも明らかになった。



今後、ナノ粒子の体内動態や毒性についての必要^{検討}と考える。特に沈着部位で、ナノ粒子がどのような作用を^{検出}発現しているのかリスク評価を行う上では重要である。

粒子状物質の生体影響では、粒子表面に付着している有機成分が其の主因であろうと推測されている。本研究で、ディーゼル粒子を有機溶剤で洗浄した粒子と非洗浄粒子で其の作用を比較したところ、洗浄粒子で炎症性サイトカインの発現量が有意に上昇していた。この結果は、粒子のサイズや数もリスク評価で重要な因子であることを示唆していた。



国内では現在、疫学調査や動物暴露実験が進行中であり、大気中粒子状物質の生体影響について未だ十分な知見は蓄積されていない。しかしながら、欧米特にナノ粒子を排出するディーゼル車の走行量が高い欧州では、行政面すでに微少粒子の規制が問題となっている。大気中での微小粒子状物質の重量当たりで換算した場合に占める量は非常に少ないが、単位重量で比較した表面積や粒子数では圧倒的に大きいことから、粒子サイズや粒子数での規制の必要性が指摘されている。国内でも今後、粒子の特性(表面積、粒子数、物性など)を考慮した規制や行政指導が必要となり、其の前提には適切なリスク評価とリスクマネジメントが要求される。