

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成9年度博士課程 入学

氏名 戸田 典子

指導教官名 局 博一

論文題目 ディーゼル排気微粒子の循環器作用に関する実験的研究

今日、日本をはじめ世界中の都市部の大気汚染は改善の兆しがみられず、特に、浮遊粒子状物質（SPM）の汚染は深刻である。東京都内のSPMの約半分はディーゼル排気微粒子（Diesel Exhaust Particles; DEP）であり、このDEPは肺がんやアレルギー性鼻炎の原因として知られ、動物実験においては、気管支喘息様の病態や精子数の著しい低下などが報告されており、DEPの生体影響は極めて深刻であるといえる。これまでDEPは、主に呼吸器系疾患との関連性について調べられてきたが、近年、アメリカやイギリスからの疫学的研究報告により、粒径が $2.5\mu\text{m}$ 以下の微粒子であるPM<sub>2.5</sub>と心肺疾患による過剰死亡率との間に非常に高い相関性が存在することが示唆された。

しかし、大気汚染物質の心臓循環器系に及ぼす影響に関しては、これまで本格的な研究は着手されておらず、今後の重要な研究分野であることが指摘されている。そこで、本研究では、DEPを対象物質として、組織標本を含む *in vitro* 実験とディーゼル排気の曝露実験の実験を組み合わせることにより、DEPのどのような物質（成分）が心肺循環器系にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。

はじめに、DEPはディーゼル排気（DE）とともに呼吸器を介して体内に取り込まれる経路が一般的であり、吸入曝露における循環器影響を検討する必要がある。そこでDEPを含むディーゼル排気（DE）に曝露させたラットの心電図測定を行い、循環器系への影響の有無を調べた。ラットをチャンバー内で1ヶ月から12ヶ月間DE（0.3、1.0、3.0 mg/m<sup>3</sup>；それぞれ環境基準値0.1 mg/m<sup>3</sup>の3、10、30倍）、および清浄空気（対照群）に曝露させ、3ヶ月ごとに心電図の測定および体重測定を行った。さらに、12ヶ月曝露後のラットは心電図測定後、剖検を行い臓器重量の測定を行った。

DE曝露群では対照群に比べ異常心電図を発現する個体が有意に多かった。また、心拍数も曝露群が対照群に比べて増加する傾向が認められた。3.0 mg/m<sup>3</sup>曝露群の体重は対照群に比べ有意に減少し、12ヶ月曝露後の臓器重量測定では対照群に比べて心臓、肝臓、腎臓、生殖器系臓器重量が有意に増加した。上記の成績から、DEの吸入曝露は、異常心電図などの循環器異常を起こしうることや、その他の全身臓器に対しても影響を及ぼすことが示唆された。

次いで、DEP の循環器系への影響についてより詳細な検討を行うため、DEP の全ての成分を含む溶液 (Whole DEP) を、麻酔下のラットの静脈内に投与し、血圧や心電図に及ぼす影響を検討した。Whole DEP (120 mg/kg) を投与することにより、血圧の一過性の低下および異常心電図の発現を認めた。この血圧低下は自律神経遮断薬の前処置によって消失した。さらに胸部大動脈と右心室の摘出標本を用いた実験において、Whole DEP は、血管に対しては収縮および弛緩作用、心筋に対しては収縮力の減少や心筋全体の強縮作用を有することを確認した。これらの結果から、DEP には血管や心筋に対する作用物質が含まれることが示唆された。一方、DEP には約数百から数千種類の物質が含まれているといわれ、その循環器系への影響評価を行い、また作用機序を解明するには、DEP をより純粋化することが必要と考えられた。そこで分析化学的手法を用いて、DEP を有機溶媒により 極性の異なる Hexane、Benzene、Dichloromethane、Methanol および Ammonia 分画に分離し、血管および心筋に対する作用を検討した。その結果、血管に対しては Hexane、Benzene 分画で弛緩反応が、Dichloromethane、Methanol 分画においては収縮および弛緩反応が認められ、Ammonia 分画では主に収縮反応が確認された。一方、心筋の強縮作用は Hexane、Benzene、Dichloromethane および Methanol 分画で観察された。これらの成績から、血管の弛緩および収縮作用は広範囲に分布しているが、心筋に対する作用物質は難水性成分からなることが示唆された。

このように 5 分画で反応性の相違が認められたが、反応が多く分画にまたがって存在していたことから、さらに細分化された分画における作用を検討することとした。

そこで、有機溶媒によって分離された 5 分画のうち、血管と心筋の両方に作用が認められた Hexane、Benzene、Dichloromethane および Methanol 分画をさらに酸塩基抽出法により  $\text{HCO}_3^-$  分画（酸性）、中性分画および NaOH 分画（アルカリ性）に分離した。

Hexane および Benzene 分画の  $\text{HCO}_3^-$  可溶分画、NaOH 可溶分画においては、血管の弛緩作用が、Methanol 分画の両分画では収縮作用が認められた。Dichloromethane 分画の  $\text{HCO}_3^-$  可溶分画、NaOH 可溶分画には収縮作用が、中性成分には弛緩作用が出現した。心筋への強縮作用は Hexane および Benzene 分画の  $\text{HCO}_3^-$  可溶分画、NaOH 可溶分画にのみ出現した。酸塩基抽出法を用いてさらに細分化したことで、分画ごとの心臓や血管に対する反応性の違いがより明らかなものとなった。しかし、作用物質のある分画にはなお数十種類の化学物質が含まれることが考えられた。そこで、血管と心筋の両方に対して作用をもち、反応が明瞭で、かつ分析化学的に性質をトレースしやすい Benzene 分画の NaOH 可溶分画に注目した。Benzene NaOH 可溶分画を、シリカゲル吸着クロマトグラフィー法を用いてさらに 15 分画に分離し、それぞれの分画における血管および心筋への作用を検討した。その結果、第 1 分画では血管に対し、弛緩作用のみが認められた。第 2～第 4 分画では低濃度で収縮作用、高濃度で弛緩作用が認められ、第 5 分画以降では収縮作用のみが認められた。また、心筋の強縮作用は第 2、3 分画におい

て出現した。よってこれらの結果から、Benzene NaOH 可溶分画中の血管作用物質および心筋作用物質の存在部分は、化学的性質によって分離されていると思われた。

血管作用物質と心筋作用物質の化学的性質をさらに絞り込むために、Benzene NaOH 可溶分画の 15 分画のうち、血管と心筋に対する作用が認められた第 3 分画を吸着クロマトグラフィー法により、5 つの分画 (Fraction; Fr. 1~5) に細分画した。血管への弛緩作用はすべての分画において認められたが、Fr. 4 の弛緩は PE 収縮前のレベルまで戻らなかった。また、Fr. 3 では非常に微妙ではあるが収縮作用が認められた。心筋に対し強縮作用が確認されたのは Fr. 1 のみであった。

以上のように、Whole DEP から 3 段階の分離過程を経て、血管および心筋に対する作用物質を含むと考えられる Benzene NaOH 分画の第 3 分画を得た。この分画が Whole DEP の静脈内投与でみられた血圧の低下と類似性があるかどうかを確認するため、再びラットの静脈内投与実験を行った。第 3 分画溶液を静脈内に投与すると、Whole DEP 投与時と同様な血圧の一過性の低下が認められた。Whole DEP 溶液では 120mg/kg 以上で反応が出現していたのに対し、第 3 分画では 45mg/kg の低濃度で反応が出現した。さらに 5mg/kg では Whole DEP 単独投与では不明瞭であった血圧の上昇反応も明瞭に認められた。これらの結果は低濃度では収縮作用、高濃度では弛緩作用が出現する摘出標本実験結果と一致した。Whole DEP を細分画することで、各分画に含まれる化学物質の数が減少するとともに純粋化し、より反応性が明瞭になったものと考えられた。ま

た、第 3 分画投与時にも、Whole DEP 投与時と同様、一過性の心室性期外収縮の出現を認めた。これらの結果から、第 3 分画は Whole DEP と同様の生体反応を引き起こすこと、すなわち生体に対し血圧低下や異常心電図の出現の原因となる物質を含んでいることが明らかとなった。

以上を要約すると、吸入曝露実験では、DE 曝露群において異常心電図の発現、体重減少および臓器重量の増加などの影響が認められた。Whole DEP の静脈内投与実験の成績からは、DEP は血圧低下や異常心電図を誘発すること、摘出標本実験においては、Whole DEP の細分画 Benzene NaOH 分画の第 3 分画中に、血管や心筋に対して直接作用を有する化学物質が含まれることが確認された。さらに、Benzene NaOH 分画の第 3 分画の静脈内投与実験では、Whole DEP 投与時と同様の血圧低下や異常心電図の出現が認められ、Whole DEP による血圧および心電図への影響は、少なくともこの分画に含まれる化学物質が原因となっていることが明らかとなった。

本研究においては、生理学的実験による DEP の生体および臓器への影響の検索と、それに基づいた分析化学的手法による DEP の分離・精製を組み合わせることによって、これまで不明とされていた DEP の循環器系に及ぼす作用の性状、ならびに循環器作用をもたらす化学物質群の性状が明らかとなった。