

Environment Research and Technology Development Fund

## 環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

5-2007 PM2.5の脳循環および脳梗塞予後に及ぼす影響の解析  
(JPMEERF20205007)

令和2年度～令和4年度

Effects of PM2.5 Exposure on Cerebral Circulation and Prognosis of Ischemic Stroke.

<研究代表機関>  
広島大学

<研究分担機関>  
慶應義塾大学  
徳島文理大学

<研究協力機関>  
該当なし

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「Ⅱ. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和5年5月

## 目次

I. 成果の概要	・・・・・・・・・・	1
1. はじめに（研究背景等）		
2. 研究開発目的		
3. 研究目標		
4. 研究開発内容		
5. 研究成果		
5-1. 成果の概要		
5-2. 環境政策等への貢献		
5-3. 研究目標の達成状況		
6. 研究成果の発表状況		
6-1. 査読付き論文		
6-2. 知的財産権		
6-3. その他発表件数		
7. 国際共同研究等の状況		
8. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
II-1 PM2.5の脳循環および脳梗塞予後に及ぼす影響の解析 （広島大学、慶應義塾大学、徳島文理大学）	・・・・・・・・・・	10
要旨		
1. 研究開発目的		
2. 研究目標		
3. 研究開発内容		
4. 結果及び考察		
5. 研究目標の達成状況		
6. 引用文献		
III. 研究成果の発表状況の詳細	・・・・・・・・・・	27
IV. 英文Abstract	・・・・・・・・・・	30

## I. 成果の概要

課題名 5-2007 PM2.5の脳循環および脳梗塞予後に及ぼす影響

課題代表者名 石原 康宏 (広島大学大学院統合生命科学研究科生命医科学プログラム 准教授)

重点課題 主：【重点課題⑮】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

副：なし

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） (5-10) 成分組成の差異を踏まえた微小粒子状物質 (PM2.5) 等大気汚染物質の循環器系への健康影響に関する毒性学的研究

研究実施期間 令和2年度～令和4年度

研究経費

84,035千円（合計額）

（令和2年度：38,685千円、令和3年度23,260千円、令和4年度：22,090千円）

研究体制

他のサブテーマはない。

研究協力機関

研究協力機関はない。

本研究のキーワード PM2.5、脳梗塞、浮腫、炎症、ミクログリア

### 1. はじめに（研究背景等）

微小粒子状物質（以下、「PM2.5」という）に代表される大気中微粒子は呼吸器系に影響することが広く知られており、気管支喘息などのアレルギー疾患を増悪させる。一方、最近の研究より、吸入したPM2.5は鼻腔上皮層を介して脳に達し（Inhal Toxicol 16:437,2004）、脳梗塞罹患後12ヶ月間の致死率の上昇や（Stroke 50:563,2019）脳梗塞発症後の入院期間の延長を引き起こす（Stroke 48:2052,2017）ことが報告された。これらの報告の中で、大気中のPM2.5濃度が10 µg/m<sup>3</sup>増えると致死や入院長期化のリスクも増加するとあるため、本邦においても考慮すべき事案である。

脳梗塞の予後は脳循環不全（脳浮腫）の程度で決まるが、PM2.5の脳循環への影響は知見がほとんど得られていない。私たちは、過年度に微小粒子状物質中の多環芳香族炭化水素（PAHs）が免疫細胞を活性化し炎症を引き起こすこと（Toxicol Sci 170:404, 2019）、神経系の炎症が脳循環障害を起こして脳浮腫を悪化させること（BBRC 496:582, 2018）を報告した。本研究では、これらの知見を基に、PM2.5曝露で生じる炎症が脳浮腫を重篤化・遷延化することにより、脳梗塞の予後を悪化させるとの仮説に立脚し、PM2.5曝露の脳循環への影響について、PM2.5に含まれるPAHsに着目し、PM2.5曝露が脳梗塞予後悪化のリスクとなることを明らかにする。

### 2. 研究開発目的

本研究の目的は、PM2.5の地域性や季節性について考慮して、PM2.5曝露と全身・神経系の炎症、脳循環、さらに脳梗塞予後の関連を示すことである。また、PM2.5に含まれるどの成分が炎症を惹起し得

るかについて、多環芳香族炭化水素（PAHs）に着目して検討し、成分組成を踏まえたPM2.5毒性発現機序を解明することである。

### 3. 研究目標

全体目標	サイクロン型捕集機を用いて都市型と越境型PM2.5をそれぞれ採取し、成分組成を解析する。これらPM2.5をマウスに曝露し、実験的脳梗塞を誘導した後に脳循環や感覚・運動障害を調べることによって、PM2.5の成分組成を踏まえた脳循環や脳梗塞予後への影響を毒性学的見地から明らかにする。
サブテーマ1	PM2.5の脳循環および脳梗塞予後に及ぼす影響の解析
サブテーマリーダー/所属機関	石原 康宏/広島大学
目標	サイクロン型捕集機を用い、夏季と冬季に横浜（都市型）および福岡（越境型）でPM2.5を採取し、水溶性イオン、金属、多環芳香族炭化水素およびエンドトキシンを定量する。成分分析を終えたPM2.5をマウスに曝露し、実験的脳梗塞を誘導した後に脳循環や感覚・運動障害を調べることによって、PM2.5の成分組成を踏まえた脳循環や脳梗塞予後への影響を毒性学的見地から明らかにする。
令和2年度	<p>（研究内容）</p> <p>① PM2.5の採取と成分分析 慶應義塾大学（横浜）屋上、および福岡大学（福岡）屋上に設置した大流量PM2.5粒子サンプラー（サイクロン型）により、粒子径が2.5<math>\mu</math>m以下の粒子を選択的に捕集する。年に1ヶ月×2回捕集する計画である。 PM2.5に含まれる水溶性イオンをイオンクロマトグラフィーにより、金属および多環芳香族炭化水素を質量分析により、エンドトキシンをリルムス試薬により定量する。</p> <p>② PM2.5曝露による炎症状態と循環動態の変化 マウスに捕集したPM2.5を慢性的経鼻投与する。全身性炎症は血液中C反応性タンパク質とサイトカイン量により評価する。神経炎症は、脳内免疫担当細胞であるミクログリアの形態変化観察、炎症性サイトカイン量、末梢炎症細胞の中樞神経系への浸潤により評価する。 また、脳循環は全身の循環動態に影響を受けるため、循環動態をミラーカテーターによる観血式測定により評価する。具体的な測定項目は、血圧、心拍数、心室圧、心収縮力とする。</p> <p>③ PM2.5曝露の脳循環への影響 PM2.5曝露期間終了後、光誘発性血栓モデルにより脳梗塞を誘導する。光感受性色素であるローズベンガルを投与し、頭蓋骨上より黄緑色光を照射して照射部において血栓を形成させる。レーザードップラー血流系により照射部の血流量低下を確認する。MRIによりT2強調画像を撮像し、TTC染色により梗塞巣を測定する。これらの画像の重ね合わせにより脳浮腫領域を画像化する。</p> <p>研究開始当初は曝露実験に用いるPM2.5が捕集できていないため、組成既知の都市大気粉塵NIES CRM 28を用いて曝露実験を遂行する。</p>
令和3年度	<p>（研究内容）</p> <p>① PM2.5の採取と成分分析 2020年度と同様に実施する。</p> <p>② PM2.5曝露の脳循環と脳梗塞予後への影響 マウスをPM2.5に曝露し、炎症状態と循環動態を測定する。また、光誘発性血栓モデルにより脳梗塞を誘発する。これらの方法は2020年度に準ずる。 MRIとTTC染色により脳浮腫領域を画像化する。ガドリニウムを末梢から投与し、脳内に移行したガドリニウムをMRI T1強調画像により検出することによ</p>

	<p>て、血液脳関門の破綻箇所を同定する。また、マウスの運動機能および知覚機能について、<b>modified neurological severity score (mNSS)</b>、ロータロッド試験、握力測定、ワイヤーハング試験を経時的に実施することにより調べる。神経炎症については、2020年度と同様の手法で測定する。</p> <p><b>③ PM2.5曝露量、成分と脳梗塞予後の関係の考察</b></p> <p>PM2.5成分分析とマウス曝露実験より得られたデータを解析し、PM2.5の炎症と脳梗塞予後に及ぼす影響につて、曝露量、成分、季節性、都市型・越境型の別から考察する。</p>
令和4年度	<p>(研究内容)</p> <p><b>① PM2.5の採取と成分分析</b> 2020年度と同様に実施する。尚、採取・分析は2022年度前期のみとする。</p> <p><b>② PM2.5に含まれる多環芳香族炭化水素と神経炎症の関連</b> 2021年度後期より芳香族炭化水素受容体ノックアウトマウス (AhR KOマウス) の繁殖数を増やし、実験に使用する動物量を確保する。 AhR KOマウスにPM2.5を投与し、炎症状態と循環動態を測定する。測定方法は2020年度に準ずる。脳梗塞を誘導し、浮腫や血液脳関門、運動・感覚機能を測定する。測定方法は、2020年、2021年と同様である。 ここで得られた結果より、PM2.5に含まれる多環芳香族炭化水素の炎症と脳梗塞予後に及ぼす影響について考察する。</p> <p><b>③ PM2.5の嗅神経系への影響の解析</b> PM2.5を曝露したマウスの嗅電図を測定する。マウス脳を正中線に沿って切り出し、嗅上皮を露出させる。嗅上皮に電極をおき、酢酸ペンチルを吹きかけたときの活動電位を測定することによって嗅神経系の機能を評価する。また、2020年度と同様に嗅球の炎症状態を測定する。これらの結果から、PM2.5が嗅神経および嗅球へ影響しているか否かを明らかにし、PM2.5の脳移行経路を考察する。</p> <p><b>④ 総合考察</b> 得られた成果をすべて取り纏め、関係者が一堂に会して科学的視点から考察し、さらに、行政面での貢献(データの利用)について議論する。</p>

#### 4. 研究開発内容

##### 【サブテーマ1】PM2.5の脳循環および脳梗塞予後に及ぼす影響の解析

研究開始当初、コロナ禍による移動自粛、大学閉鎖などの要因によって、サイクロンの設置およびPM2.5の収集ができなかった。アドバイザーボードおよびプログラムオフィサーに相談し、国立環境研究所より購入可能な北京市大気粉塵 (CRM28)、および奥田分担研究者が過去に採取したPM2.5を使用して研究を開始することとした。過去に採取したPM2.5は量に限りがあるため、北京市大気粉塵を用いた研究を先行し、採取したPM2.5を効率的に使用する計画として、研究を進めた。

##### 4-1. PM2.5の収集とその成分の解析

奥田分担研究者が開発した、インパクターとサイクロンを組み合わせた微小粒子の大流量採取装置を横浜 (慶應義塾大学矢上キャンパス屋上) および福岡 (福岡大学理学部18号館屋上) に設置してPM2.5を採取し、これらPM2.5およびCRM28に含まれる水溶性イオン成分、重金属類、PAHsおよびエンドトキシンを定量した。

エンドトキシンの定量を目的に、東広島市 (広島大学東広島キャンパス屋上) と呉市 (広島大学実習船基地) にMCIサンプラーを設置し、PM2.5を収集した。

##### 4-2. PM2.5曝露による炎症状態と循環動態の変化

動物実験は、“動物の愛護及び管理に関する法律”、“実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準”に加えて、広島大学動物実験等規則を順守して遂行した。

雄性ICRマウス (7週齢) を日本クレアより購入し、1週間順化させてから実験に使用した。また、

AhR KOマウスを東北大学名誉教授 藤井義明博士より提供していただき、広島大学動物実験施設で繁殖させて実験に使用した。PM2.5またはCRM28を10 および100  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ の曝露濃度で、7日間または28日間経鼻曝露した。収縮期血圧、平均血圧、拡張期血圧および心拍数を測定した。血液を採取し、血液凝固能の指標としてプロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間およびフィブリノゲン濃度を測定した。マウス血清中のサイトカイン類を定量し、また脳スライスを抗Iba1抗体（和光純薬）と抗CD68抗体で蛍光抗体染色し、ミクログリア活性を測定した。

#### 4-3. PM2.5曝露の脳梗塞後脳循環および神経障害への影響

マウス頭皮を切開して頭蓋骨を露出した後、腹腔内にローズベンガル（Sigma: 50 mg/kg）を投与した後、左側体性感覚野、運動野 8 mm×8 mmの領域にLEDライト（波長565 nm, 出力LED 170 mW）を照射して光誘発性血栓を作製し、脳梗塞を誘導した。

冠状面に沿って1mm幅でMRI T1強調画像およびT2強調画像を撮像し、脳浮腫を定量化した。また、脳梗塞巣の大きさをTTC染色により定量した。脳梗塞後、運動能力、握力および神経学的重症度スコア（mNSS: modified neurological severity score）を測定した。

#### 4-4. 骨髄由来マクロファージの調製と炎症反応の評価

マウス（10週齢）大腿骨より骨髄細胞を単離し、FBSおよびGM-CSFを含むDMEMで7日間培養して、マクロファージに分化させた。骨髄由来マクロファージをPM2.5で刺激した後、細胞を回収してRNAを抽出し、real-time PCRにより炎症性分子のmRNAを定量した。

#### 4-5. 曝露したPM2.5の嗅覚影響の測定

鼻甲介を露出させたスライスを調製し、Ringer Solution中dishに固定した。鼻甲介に測定電極を留置した。ピコスプリッターを用いて酢酸アミルより生じる蒸気を嗅上皮付近に曝露し、このときの電位変化を記録した。

## 5. 研究成果

### 5-1. 成果の概要

本研究では、サイクロン型捕集機を用いてPM2.5を採取し、これらをマウスに曝露した後に脳梗塞を誘導し、PM2.5曝露により脳梗塞の予後がどのように変化するか調べることを目的とした。尚、研究開始当初、コロナ禍によりPM2.5の採取ができなかったため、北京大気粉塵CRM28を用いて研究を遂行した。まず、本研究の成果を以下4つに分けて概説する。

#### ① PM2.5曝露と脳梗塞予後の関連

PM2.5の短期間（7日間）曝露により、脳梗塞によって生じる運動機能障害が悪化した。PM2.5の長期間（28日間）曝露により、脳梗塞後1週間以内の致死率が増大した。短期曝露、長期曝露で表現型は異なるものの、PM2.5曝露は脳梗塞予後を悪化させるとの結果を得た。

#### ② PM2.5曝露による脳梗塞予後悪化メカニズム

PM2.5曝露により、大脳皮質においてミクログリアが活性化し、神経炎症が生じた。また、PM2.5曝露後に脳梗塞を誘発したところ、神経炎症の亢進および脳浮腫の増悪が認められた。神経炎症は、タイトジャンクションを弱めて血液脳関門の物質透過性を上げることが報告されているため、PM2.5曝露により生じる神経炎症が、脳梗塞によって生じる神経炎症と相加的に作用し、その結果脳浮腫が悪化、運動機能障害が増悪したと考えられる（図0-1）。

#### ③ 脳梗塞予後悪化と関連するPM2.5成分の同定

PM2.5には水溶性イオンや金属類、PAHsなど、多種多様な化学物質が含まれる。これらの中でも炎症を惹起することが明らかとなっているPAHsに着目し、PAHsの受容体であるAhRを欠失したAhR KOマウスを用いてPAHsの作用を検討した。AhR KOマウスにPM2.5を曝露しても神経炎症は生じず、また、脳梗塞後の運動機能障害にも影響しなかった。従って、PM2.5に含まれるPAHsが脳梗塞予後悪化に関与する(図0-1)。PAHsは化石燃料の燃焼により生じるため、冬季に大気中濃度が高く、夏季は低くなる。従って、PAHsの神経影響を考える際は季節性を加味する必要があると考えられる。

#### ④ PM2.5に含まれるエンドトキシンの地域差と脳梗塞予後への影響

PM2.5の成分分析より、エンドトキシン含有量に地域性が認められた。エンドトキシンは横浜で多く、福岡で少なかった。また、呉で福岡と同程度であり、東広島では呉と比較して少なかった。横浜で採取したPM2.5を曝露した後に脳梗塞を誘導すると脳梗塞後の運動機能障害が悪化し、福岡で採取したPM2.5は脳梗塞予後に影響しなかった。エンドトキシンを不活性化するポリミキシンBを横浜PM2.5と混合した後に曝露すると、脳梗塞予後への影響は低減した。従って、PAHsに加えてエンドトキシンも脳梗塞予後に影響し得るが(図0-1)、その大気中濃度には地域性があるため、地域性も含めた検討が必要であると考えられる。

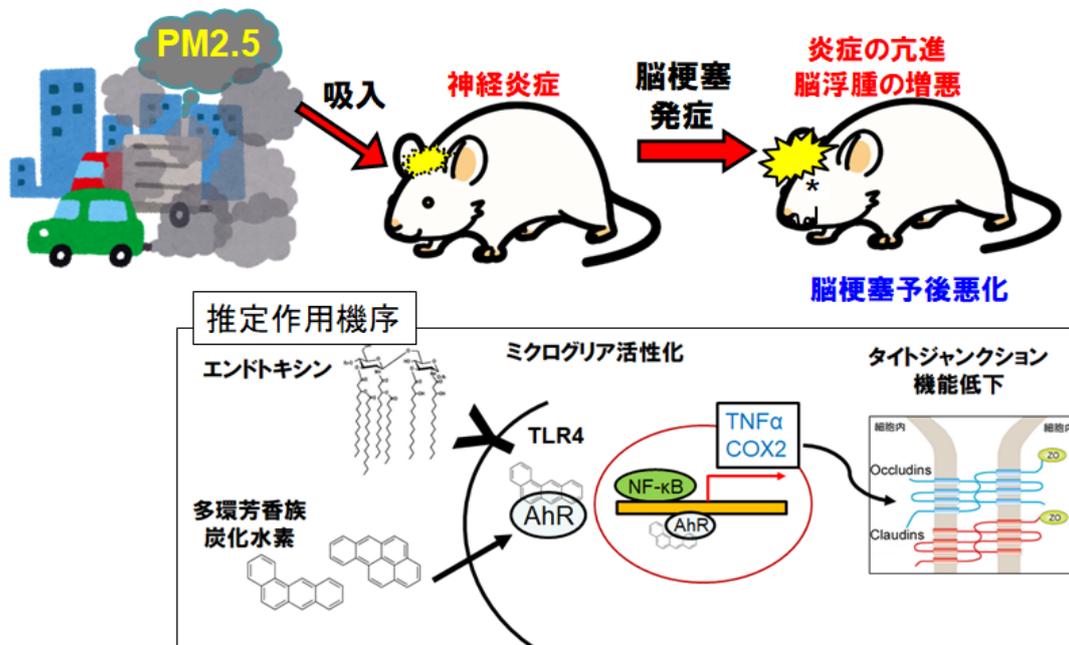


図0-1. PM2.5曝露による脳梗塞予後悪化における推定メカニズム

①～③は当初の研究計画に沿って得られた成果である。「5-3. 研究目標の達成状況」においても述べるが、計画した実験はすべて遂行し、結果を得ることができた。④については、2020年、2021年に得られた結果を考慮して追加した計画であり、PM2.5に含まれるエンドトキシンの地域性および神経影響評価も明らかにすることができた。

## 5-2. 環境政策等への貢献

### <行政等が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

### <行政等が活用することが見込まれる成果>

世界保健機関(WHO)は、大気環境に関するガイドラインとして、令和3年9月に「WHO global air quality guidelines」を公表し、PM2.5の厳しいガイドライン値を示している。このガ

イドライン値は、近年公表された諸外国の科学的知見をもとに策定されているが、PM2.5は構成する成分によって異なる影響を引き起こすことが示唆されており、このことは、本邦におけるPM2.5による健康影響を適切に評価するためには、国内を対象とした知見を充実させる必要があることを指し示している。また、令和元年に米国環境保護庁（EPA）が公表した評価書（Integrated Science Assessment (ISA) for Particulate Matter）では、近年諸外国で研究が進められている神経系疾患（脳梗塞、アルツハイマー病等）への影響について新たに言及しているが、本邦におけるPM2.5曝露による神経影響の知見は乏しい状況にある。加えて、中央環境審議会大気環境部会微小粒子状物質環境基準専門委員会報告（平成21年9月）「3.1. 毒性学知見に基づく影響メカニズム」の項に「微小粒子状物質健康影響評価検討会報告書以降の文献レビューでも、粒子状物質曝露と神経系との関連性に関する報告は増加してきた。しかし、微小粒子物質が、神経系や行動に影響を及ぼすメカニズムについては明確ではなく、科学的知見の蓄積が必要である。」とある。以上より、PM2.5の神経影響を調べることはPM2.5の健康リスクを評価するうえで極めて重要であり、本邦における知見を充実されることがリスク評価に重要であることが教示されている。本研究は、本邦におけるPM2.5曝露と脳梗塞予後との関連を毒性学的な視点から検討し、微小粒子状物質の神経系への作用メカニズムを明らかにすることにより、上記報告に答えるものである。

本研究では、げっ歯類レベルであるが、PM2.5を鼻から曝露すると、神経系で炎症が生じること、またPM2.5曝露は脳梗塞の予後を悪化させ、長期曝露においては脳梗塞後の死亡率を上昇させることが示された。PM2.5による脳梗塞予後の増悪は疫学研究により示唆されてきたことであり（Stroke 50:563,2019; Stroke 48:2052,2017）、本研究で得られた知見は、毒性学的な見地から疫学研究を支持する成果である。

AhR KOマウスを用いた解析により、PM2.5に含まれるPAHsが脳梗塞予後悪化に関与することが明らかとなった。PAHsは主として化石燃料の燃焼により生じることから、大気中濃度に季節性があり、冬季にPAH濃度が上昇し、夏季には減少する。また、横浜で採取したPM2.5は福岡採取したそれと比較して、脳梗塞予後悪化作用が強いことが明らかになった。横浜と福岡とのPM2.5の組成を比較すると、大きな差が認められる構成物質はエンドトキシンであった。エンドトキシンの作用を中和するポリミキシンBは、横浜PM2.5による脳梗塞予後悪化作用を減弱したことから、PAHsに加えてエンドトキシンも脳梗塞予後悪化に寄与し得る。これらの成果は、PM2.5の脳梗塞予後に対する影響の季節性、および地域性を示唆する成果である。従って、今後の脳梗塞に係る疫学研究においては、これら成分に着目しつつ、その季節性、地域性を加味してリスク評価する必要があると考えられる。

本研究ではリムルス試薬を用いてPM2.5に含まれるエンドトキシンを定量する方法を確立し、横浜、福岡、呉、東広島の4市における大気中エンドトキシン濃度を測定して、その地域性を明らかにした。エンドトキシンは神経炎症や脳梗塞予後へのリスクを有するため、その由来の解明も重要となる。この点は今後取り組む必要がある課題であろう。

### 5-3. 研究目標の達成状況

全体目標	目標の達成状況
<p>サイクロン型捕集機を用いて都市型と越境型PM2.5をそれぞれ採取し、成分組成を解析する。これらPM2.5をマウスに曝露し、実験的脳梗塞を誘導した後に脳循環や感覚・運動障害を調べることによって、PM2.5の成分組成を踏まえた脳循環や脳梗塞予後への影響を毒性学的見地から明らかにする。</p>	<p><u>目標を上回る成果をあげた。</u></p> <p>1. CRM28を用いて研究を先行し、CRM28に含まれるPAHsが原因で神経炎症や脳浮腫が増悪し、脳梗塞予後の運動障害が悪化することを明らかにした。また、横浜で採取したPM2.5でも同様の予後悪化が生じることを示した。（図1-7～1-10, 1-15）</p>

	<p>2. PM短期曝露と長期曝露の脳梗塞予後への影響の違いを明らかにした。短期曝露においては運動障害が悪化し、長期曝露では致死率が増加する。(図1-7, 1-11)</p> <p>3. PAHsに加えてPM2.5に含まれるエンドトキシンも脳梗塞予後悪化を引き起こすことを示した。また、横浜と福岡で採取したPM2.5の脳梗塞予後への影響の違いが、PM2.5に含まれるエンドトキシン濃度の違いに因る可能性を提示した。(表1-2, 図1-15, 1-16)</p> <p>4. 横浜、福岡に加えて、呉、東広島でPM2.5を採取し、エンドトキシンの地域性を示した。(図1-18)</p> <p>上記1は研究開始時の目的に沿った成果である。本研究では1に加えて、2~4の成果をあげることができたため、自己評価を「目標を上回る成果をあげた」とした。</p>
--	---

サブテーマ1 目標	目標の達成状況
<p>サイクロン型捕集機を用い、夏季と冬季に横浜（都市型）および福岡（越境型）でPM2.5を採取し、水溶性イオン、金属、多環芳香族炭化水素およびエンドトキシンを定量する。成分分析を終えたPM2.5をマウスに曝露し、実験的脳梗塞を誘導した後に脳循環や感覚・運動障害を調べることによって、PM2.5の成分組成を踏まえた脳循環や脳梗塞予後への影響を毒性学的見地から明らかにする。</p>	<p><u>目標を上回る成果をあげた。</u></p> <p>自己評価の根拠については全体目標の項目に記載したとおりである、</p> <p>コロナ禍でPM2.5収集ができなかったため、本課題は当初、CRM28を使用して研究を開始した。CRM28は購入可能であり、使用量の制限がほぼなかったため、多くの実験を並列で進めることができた。CRM28を用いてメカニズムを追求した後、収集したPM2.5で起こる現象を比較検討する形で研究が進み、結果として効率的、かつ、多くの成果を得ることができた。</p>

## 6. 研究成果の発表状況

### 6-1. 査読付き論文

<件数>

14 件

<主な査読付き論文>

- 1) Tanaka M, Okuda T, Itoh K, Ishihara N, Oguro A, Fujii-Kuriyama Y, Nabetani Y, Yamamoto M, Vogel CFA, Ishihara Y. Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban particle matter exacerbate movement disorder after ischemic stroke via potentiation of neuroinflammation. *Particle Fibre Toxicol.* 20:6 (2023). (IF=9.112)
- 2) Kono M, Okuda T, Ishihara N, Hagino H, Tani Y, Okochi H, Tokoro C, Takaishi M, Ikeda H,

- Ishihara Y. Chemokine expression in human 3-dimensional cultured epidermis exposed to PM2.5 collected by cyclonic separation. *Toxicol Res.* 39(1):1-13 (2023). (IF=2.680)
- 3) Jing W, Nakano K, Shen Z, Okuda T. Optimization of the QuEChERS extraction method to determine Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in powder aerosol particles collected by cyclone. *Environ. Technol. Innov.* 31:103141 (2023). (IF=7.758)
- 4) Ishihara N, Okuda T, Hagino H, Oguro A, Tani Y, Okochi H, Tokoro C, Fujii-Kuriyama Y, Itoh K, Vogel CFA, Ishihara Y. Involvement of polycyclic aromatic hydrocarbons and endotoxin in macrophage expression of interleukin-33 induced by exposure to particulate matter. *J Toxicol Sci.* 47(5):201-210 (2022). (IF=1.792)
- 5) Alimov ZB, Youn H, Iwata A, Nakano K, Okamoto T, Sasaki A, Katori T, Okuda T. Comparison of the chemical characteristics and toxicity of PM2.5 collected using different sizes of cyclones. *Asian J. Atmospheric Environ.* 16(3):103-121 (2022). (IF=1.60)
- 6) Tanaka M, Fujikawa M, Oguro A, Itoh K, Vogel CFA, Ishihara Y. Involvement of the microglial aryl hydrocarbon receptor in neuroinflammation and vasogenic edema after ischemic stroke. *Cells.* 10:718 (2021). doi:10.3390/cells10040718 (IF=7.666)

## 6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

## 6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	14件
その他誌上発表（査読なし）	0件
口頭発表（学会等）	15件
「国民との科学・技術対話」の実施	4件
マスコミ等への公表・報道等	5件
本研究費の研究成果による受賞	2件
その他の成果発表	0件

## 7. 国際共同研究等の状況

研究計画名：芳香族炭化水素受容体の免疫・アレルギーに果たす役割の解明

共同研究参加者（所属）：Christoph F.A. Vogel（米国カリフォルニア大学デービス校）、Norman Kado（米国カリフォルニア州環境保護庁）、Thomas Haarmann-Stemann（ドイツライプニッツ研究所）

研究代表者がカリフォルニア大学デービス校への留学（2017年～2018年）した際に共同研究を開始し、現在は日本-アメリカ-ドイツの三カ国間国際共同研究に発展した。Kado博士は化学が専門であり、大気中微粒子からの化学物質の抽出と同定を、Haarmann-Stemann博士は細胞を用いた解析を、Vogel博士と石原は初代細胞や動物を用いた解析を中心に行う形で分担し、face to faceあるいはメール等で連絡をとりながら研究を遂行している。ディーゼル排気微粒子に含まれるPAHsがIL-33の発現亢進を介してアレルギーを引き起こすことを明らかにするなど（*Toxicol Sci* 170:404-414, 2019: 広島大学よりプレスリリースされ、*Science Daily*により世界中に配信された）顕著な成果を上げ、論文引用件数も堅調で高い評価を得ている。また、2022年にはAhRによるIL-22を介した炎症惹

起機構を明らかにした (Front Toxicol. 3:787360, 2022)。本研究では、PM2.5に含まれるPAHsがAhRを介して神経炎症を引き起こすことを示したが、その詳細なメカニズムの追求までは至っておらず、これらの成果を組み合わせることによって、PM2.5の成分、表現型、そして分子メカニズムまで、PM2.5の生体への作用を詳細に考察することができる。

また、Kado博士はCalifornia Environmental Protection Agencyに勤めていた経歴を有し、PM2.5規制やその科学的根拠についても議論できる。

## 8. 研究者略歴

研究代表者：石原 康宏

大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了、博士（理学）

徳島文理大学香川薬学部 助教

広島大学大学院総合科学研究科 助教

米国カリフォルニア大学デービス校 博士研究員

現在 広島大学大学院統合生命科学研究科 准教授

研究分担者：

### 1) 奥田 知明

東京農工大学大学院連合農学研究科博士後期課程修了、博士（農学）

慶應義塾大学理工学部 助手、専任講師

米国ウィスコンシン大学マディソン校 客員講師

慶應義塾大学理工学部 准教授

現在 慶應義塾大学理工学部 教授

### 2) 伊藤 康一

昭和薬科大学大学院薬学研究科修士課程修了、医学博士（群馬大学）

株式会社津村順天堂薬理研究所 研究員

米国シンシナティ小児病院・基礎生物学研究所 博士研究員

米国国立衛生研究所 博士研究員

東京都臨床医学総合研究所 研究員

現在 徳島文理大学香川薬学部 教授

### 3) 大黒 亜美（研究期間：2020年4月～2022年3月）

関西学院大学大学院理工学研究科博士後期課程修了、博士（理学）

関西学院大学理工学部 助教

現在 広島大学大学院統合生命科学研究科 助教（2022年3月末日）

## II. 成果の詳細

### II-1 PM2.5の脳循環および脳梗塞予後に及ぼす影響の解析

広島大学大学院統合生命科学研究科	石原 康宏
広島大学大学院統合生命科学研究科	大黒 亜美（令和2～令和3年度）
慶應義塾大学理工学部	奥田 知明
徳島文理大学香川薬学部	伊藤 康一

#### [要旨]

最近の疫学研究によると、大気汚染地域では脳梗塞後の入院日数が遅延し、1年内の致死率が増加する。また、吸入したPM2.5が脳内に移行することを示唆する報告が増えてきた。このような背景から、本研究では、PM2.5曝露の脳梗塞予後への影響について毒性学的見地から明らかにすることを目的とした。脳梗塞急性期には炎症および浮腫が認められ、多環芳香族炭化水素（PAHs）は炎症を惹起することが知られていることから、PM2.5に含まれるPAHsに着目した。

マウス到北京大気粉塵CRM28を経鼻曝露すると、大脳皮質でミクログリアが活性化し、神経炎症が生じた。このとき、光誘発性血栓により脳梗塞を誘導すると、脳梗塞後の神経炎症および脳浮腫が増悪し、運動機能障害が悪化した。即ち、CRM28曝露は脳梗塞に付随する神経炎症と浮腫を増悪し、脳梗塞予後を悪化させることが明らかとなった。横浜で採取したPM2.5曝露は、CRM28と同様に脳梗塞予後を悪化させた。芳香族炭化水素受容体（AhR）KOマウスにCRM28を曝露すると、大脳皮質で炎症は生じず、また、脳梗塞後の運動機能悪化も認められなかった。AhRはPAHsの受容体であることを鑑みると、CRM28に付着しているPAHsが脳梗塞予後の増悪と関連していると考えられる。

PM2.5に含まれるPAHsには地域差は見られなかった一方、横浜で採取したPM2.5には福岡で採取したPM2.5と比較してエンドトキシンが多く含まれていた。横浜PM2.5と福岡PM2.5の脳梗塞予後への影響を調べたところ、横浜PM2.5は脳梗塞後の運動障害を悪化させた一方、福岡PM2.5の脳梗塞予後への作用はほとんど見られなかった。エンドトキシンの作用を中和するポリミキシンBと横浜PM2.5を混合し、マウスに曝露すると、横浜PM2.5で認められた脳梗塞予後悪化作用は大きく抑制された。従って、PM2.5に含まれるエンドトキシンも脳梗塞予後悪化に関わると考えられる。

以上の研究より、PM2.5曝露は神経炎症を引き起こし、脳梗塞予後を増悪させることが明らかになった。また、増悪因子としてPM2.5に含まれるPAHsとエンドトキシンを同定した。PM2.5に含まれるPAHs量には季節性があることが知られており、また、本研究により、PM2.5に含まれるエンドトキシン量には地域性があることが明らかとなった。PM2.5の神経影響を評価する際、PAHsやエンドトキシン含有量、すなわち、PM2.5の地域性、季節性を加味して考える必要がある。

#### 1. 研究開発目的

微小粒子状物質（以下、「PM2.5」という。）に代表される大気中微粒子は呼吸器系に影響することが広く知られており、気管支喘息などのアレルギー疾患を増悪させる。一方、最近の研究より、吸入したPM2.5は鼻腔上皮層を介して脳に達し<sup>1)</sup>、脳梗塞罹患後12ヶ月間の致死率の上昇<sup>2)</sup>や脳梗塞発症後の入院期間の延長を引き起こす<sup>3)</sup>ことが報告された。これらの報告の中で、大気中のPM2.5濃度が10 µg/m<sup>3</sup>増えると致死や入院長期化のリスクも増加するとあるため、本邦においても考慮すべき事案である。

脳梗塞の予後は脳循環不全（脳浮腫）の程度で決まるが、PM2.5の脳循環への影響は知見がほとんど得られていない。私たちは、過年度に微小粒子状物質中の多環芳香族炭化水素（PAHs）が免疫細胞を活性化し炎症を引き起こすこと<sup>4)</sup>、神経系の炎症が脳循環障害を起こして脳浮腫を悪化させること<sup>5)</sup>を報告した。本研究では、これらの知見を基に、PM2.5曝露で生じる炎症が脳浮腫を重篤化・遷延化することにより、脳梗塞の予後を悪化させるとの仮説に立脚し、PM2.5曝露の脳循環への影響について、PM2.5に含まれるPAHsに着目し、PM2.5曝露が脳梗塞予後悪化のリスクとなることを明らかにする。

## 2. 研究目標

サブテーマ1	PM2.5の脳循環および脳梗塞予後に及ぼす影響の解析
実施機関	広島大学、慶應義塾大学、徳島文理大学
目標	サイクロン型捕集機を用い、夏季と冬季に横浜（都市型）および福岡（越境型）でPM2.5を採取し、水溶性イオン、金属、多環芳香族炭化水素およびエンドトキシンを定量する。成分分析を終えたPM2.5をマウスに曝露し、実験的脳梗塞を誘導した後に脳循環や感覚・運動障害を調べることによって、PM2.5の成分組成を踏まえた脳循環や脳梗塞予後への影響を毒性学的見地から明らかにする。
令和2年度	<p>（研究内容）</p> <p>① PM2.5の採取と成分分析 慶應義塾大学（横浜）屋上、および福岡大学（福岡）屋上に設置した大流量PM2.5粒子サンプラー（サイクロン型）により、粒子径が2.5<math>\mu</math>m以下の粒子を選択的に捕集する。年に1ヶ月×2回捕集する計画である。 PM2.5に含まれる水溶性イオンをイオンクロマトグラフィーにより、金属および多環芳香族炭化水素を質量分析により、エンドトキシンをリルムス試薬により定量する。</p> <p>② PM2.5曝露による炎症状態と循環動態の変化 マウスに捕集したPM2.5を慢性的経鼻投与する。全身性炎症は血液中C反応性タンパク質とサイトカイン量により評価する。神経炎症は、脳内免疫担当細胞であるミクログリアの形態変化観察、炎症性サイトカイン量、末梢炎症細胞の中樞神経系への浸潤により評価する。 また、脳循環は全身の循環動態に影響を受けるため、循環動態をミラーカテーテルによる観血式測定により評価する。具体的な測定項目は、血圧、心拍数、心室圧、心収縮力とする。</p> <p>③ PM2.5曝露の脳循環への影響 PM2.5曝露期間終了後、光誘発性血栓モデルにより脳梗塞を誘導する。光感受性色素であるローズベンガルを投与し、頭蓋骨上より黄緑色光を照射して照射部において血栓を形成させる。レーザードップラー血流系により照射部の血流量低下を確認する。MRIによりT2強調画像を撮像し、TTC染色により梗塞巣を測定する。これらの画像の重ね合わせにより脳浮腫領域を画像化する。 研究開始当初は曝露実験に用いるPM2.5が捕集できていないため、組成既知の都市大気粉塵NIES CRM 28を用いて曝露実験を遂行する。</p>
令和3年度	<p>（研究内容）</p> <p>① PM2.5の採取と成分分析 2020年度と同様に実施する。</p> <p>② PM2.5曝露の脳循環と脳梗塞予後への影響 マウスをPM2.5に曝露し、炎症状態と循環動態を測定する。また、光誘発性血栓モデルにより脳梗塞を誘発する。これらの方法は2020年度に準ずる。 MRIとTTC染色により脳浮腫領域を画像化する。ガドリニウムを末梢から投与し、脳内に移行したガドリニウムをMRI T1強調画像により検出することによって、血液脳関門の破綻箇所を同定する。また、マウスの運動機能および知覚機能について、modified neurological severity score (mNSS)、ロータロッド試験、握力測定、ワイヤーハング試験を経時的に実施することにより調べる。神経炎症については、2020年度と同様の手法で測定する。</p> <p>③ PM2.5曝露量、成分と脳梗塞予後の関係の考察 PM2.5成分分析とマウス曝露実験より得られたデータを解析し、PM2.5の炎症と脳梗塞予後に及ぼす影響につて、曝露量、成分、季節性、都市型・越境型の別から考察する。</p>

令和4年度	<p>(研究内容)</p> <p>① <b>PM2.5の採取と成分分析</b> 2020年度と同様に実施する。尚、採取・分析は2022年度前期のみとする。</p> <p>② <b>PM2.5に含まれる多環芳香族炭化水素と神経炎症の関連</b> 2021年度後期より芳香族炭化水素受容体ノックアウトマウス (AhR KOマウス) の繁殖数を増やし、実験に使用する動物量を確保する。 AhR KOマウスにPM2.5を投与し、炎症状態と循環動態を測定する。測定方法は2020年度に準ずる。脳梗塞を誘導し、浮腫や血液脳関門、運動・感覚機能を測定する。測定方法は、2020年、2021年と同様である。 ここで得られた結果より、PM2.5に含まれる多環芳香族炭化水素の炎症と脳梗塞予後に及ぼす影響について考察する。</p> <p>③ <b>PM2.5の嗅神経系への影響の解析</b> PM2.5を曝露したマウスの嗅電図を測定する。マウス脳を正中線に沿って切り出し、嗅上皮を露出させる。嗅上皮に電極をおき、酢酸ペンチルを吹きかけたときの活動電位を測定することによって嗅神経系の機能を評価する。また、2020年度と同様に嗅球の炎症状態を測定する。これらの結果から、PM2.5が嗅神経および嗅球へ影響しているか否かを明らかにし、PM2.5の脳移行経路を考察する。</p> <p>④ <b>総合考察</b> 得られた成果をすべて取り纏め、関係者が一堂に会して科学的視点から考察し、さらに、行政面での貢献（データの利用）について議論する。</p>
-------	--

### 3. 研究開発内容

#### 【サブテーマ1】PM2.5の脳循環および脳梗塞予後に及ぼす影響の解析

コロナ禍による移動自粛、大学閉鎖などの要因によって、研究開始当初、福岡大学屋上へのサイクロンの設置できない状況であり、また、2020年度においては横浜でも予定通りにPM2.5が採取できなかった。(2020年春に福岡大学にサイクロン設置予定であったが大きく遅延し、2021年1月に設置を完了して2021年3月よりPM2.5の採取を開始した)。そこで、2020年度スタートアップ会合において、プログラムオフィサーやアドバイザーボードからの助言を受け、購入可能な北京市大気粉塵や奥田分担研究者が過去に採取したPM2.5も使用して研究を遂行することと決定した。しかし、過去に採取したPM2.5は研究にすでに使用されており量に制限があったため、北京市大気粉塵を用いた研究を先行し、過去に採取したPM2.5を要所で効率的に使用する計画とした。また、北京市大気粉塵を蒸留水、アセトン、ジクロロメタンで洗浄することによって付着する化学物質を取り除き、これをコア粒子として本研究に使用した。本研究で用いた大気中微粒子およびPM2.5は表1-1の通りである。

表1-1. 供試サンプル情報一覧

Year	Place	Period	Sampling Time [min]	Total Air Volume [m <sup>3</sup> ]	Particle Mass [mg]	PM conc [μg/m <sup>3</sup> ]	Code	
2018	Yokohama	2018/01/16 ~ 02/09	28,800	47,299	334	7.1	Y2018_1-2	
2018	Yokohama	2018/05/15 ~ 06/05	30,225	39,771	308	7.7	Y2018_5-6	
2020	Yokohama	2020/04/02 ~ 06/02	87,800	108,159	765	7.1	Y2020_4-5	
2021	Yokohama	2021/4/19 ~ 6/18	86,593	105,015	1,146	10.9	Y2021_4-6	
2021-2022	Yokohama	2021/11/29 ~ 2022/2/8	101,898	96,096	568	5.9	Y2021_11-2	
2018	Fukuoka	2018/05/11 ~ 06/07	37,296	50,436	259	5.1	F2018_5-6	
2021	Fukuoka	2021/4/21 ~ 7/2	103,830	124,948	358	2.9	F2021_4-7	
1996-2005	Beijing		国立環境研究所より購入					CRM28
1996-2005	Beijing		CRM28を水、アセトン、ジクロロメタンで洗浄					CRM Core

#### 3-1. PM2.5の採取と成分分析

##### 1) サイクロンによるPM2.5の採取と水溶性イオン、金属の分析

奥田分担研究者が開発した、インパクターとサイクロンを組み合わせた微小粒子の大流量採取装置により採取されたPM2.5の化学成分分析を行った<sup>6,7)</sup>。本研究には、横浜（慶應義塾大学矢上キャンパ

ス屋上) および福岡 (福岡大学理学部18号館屋上) に設置したサンプラーにより採取されたPM2.5を用いた (表1)。元素分析は酸分解/誘導結合プラズマ質量分析法 (Agilent 7500cx ICP-MS) を、また水溶性イオン成分分析は超純水抽出後イオンクロマトグラフィー (Shimadzu, LC-10ATvp series および Dionex ICS-2100/1100 series) を用いて行った。尚、国立環境研究所より購入したCRM28、CRM28を蒸留水、アセトン、ジクロロメタンで洗浄して作製したCRM Coreも併せて分析した。

また、エンドトキシンの定量を目的に、東広島市 (広島大学東広島キャンパス屋上) と呉市 (広島大学実習船基地) にMCIサンプラーを設置し、PM2.5を収集した。このPM2.5に含まれるエンドトキシンを定量した。

## 2) PM2.5に含まれるPAHsの定量

採取したPM2.5およびCRM28をジクロロメタンで抽出し、固相カラム (ISOLUTE SI SPE, 100 mg/3mL, 460-0010-B, BioTage) により精製した後、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS; Agilent 7890A) によりPAHsを分離、定量した。Chrysene-d12を内部標準として使用した。分析条件は以下の通りである。

カラム: Agilent HP-5ms, 内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25 $\mu$ m, 型番19091S-433

注入口温度: 280 $^{\circ}$ C

ヘリウム流速: 1.0 mL/min

カラム温度: 0-2 min, 60 $^{\circ}$ C; 2-32 min, 60 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 300 $^{\circ}$ C; 32-47 min, 300 $^{\circ}$ C

## 3) PM2.5に含まれるエンドトキシンの定量

採取したPM2.5およびCRM28よりエンドトキシンフリー水を用いてエンドトキシンを抽出した。エンドトキシンは、Associates of Cape Cod社のE.coli O113由来エンドトキシン (Control Standard Endotoxin) を検量線として用い、エンドスペシー(R) ES-50Mキット (生化学工業) により定量した。

## 3-2. PM2.5曝露による炎症状態と循環動態の変化

### 1) マウスへのPM2.5曝露

動物実験は、“動物の愛護及び管理に関する法律”、“実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準”に加えて、広島大学動物実験等規則を順守して遂行した。

雄性ICRマウス (7週齢) を日本クレアより購入し、1週間順化させてから実験に使用した。また、AhR KOマウスを東北大学名誉教授 藤井義明博士に提供していただき、広島大学動物実験施設で繁殖させて実験に使用した。PM2.5またはCRM28を生理食塩水に1 mg/mLおよび10 mg/mLの濃度で懸濁し、超音波処理を10Wで10秒間行った。懸濁液10  $\mu$ Lをピペットマンでとり、マウスの鼻先にチップの先をあてて、呼吸とともに懸濁液を吸入させた。PM2.5またはCRM28は毎日8:00~10:00の間に投与し、7日間または28日間投与を継続した。尚、上述の手順で投与すると、投与量は10 および100  $\mu$ g/mouse/dayとなる。

### 2) 炎症の評価

マウスより血液を採取し、血清を分離した。血清中のサイトカインをLEGENDplex<sup>TM</sup> Mouse Inflammation Panel (BioLegend #740150) を用いて定量した。

脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した後に50  $\mu$ m厚の凍結切片を作製した。抗Iba1<sup>21</sup>抗体 (和光純薬) と抗CD68<sup>22</sup>抗体 (Bio-Rad) を用いて蛍光抗体染色を行い、共焦点顕微鏡により可視化した。Image Jソフトウェアを用いてIba1染色画像からミクログリア細胞全体の面積における突起を除いた細胞体の面積を計算し、Amoeboid score (%)として、ミクログリア形態変化の指標とした。さらに、Iba1染色面積におけるCD68染色面積を計算し、CD68-stained Area (%)として、食食能の指標とした。

注1 ミクログリア特異的に発現するCa結合タンパク質：ミクログリアマーカーとして使用

注2 リソソーム/エンドソームに局在する膜貫通タンパク質であり食食能と発現が相関する

### 3) 血液凝固能の評価

2)で採血した血液から血漿を分離し、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間およびフィブリノゲン濃度を測定した。測定には、半自動血液凝固測定装置CA-101（シスメックス）およびトロンボレルS、アクチンFSL、マルチフィブリンU（いずれもシスメックス）を使用した。

### 4) 循環動態の測定

マウス非観血血圧測定装置（Softron BP-98）を使用し、マウス尾に装着したカフセンサーより収縮期血圧、平均血圧、拡張期血圧および心拍数を測定した。心筋障害のマーカーである血液中脳性ナトリウム利尿ペプチド（NBP）と心筋トロポニンI（TnI）をELISA法により測定した。

## 3-3. PM2.5曝露の脳梗塞後脳循環および神経障害への影響

### 1) 光誘発性血栓モデルの作製

イソフルラン（導入4%、維持2%）によりマウスを吸入麻酔し、頭部固定装置（成茂SR-9M）によりマウスを固定した。頭皮を切開して頭蓋骨を露出した後、腹腔内にローズベンガル（Sigma: 50 mg/kg）を投与した。左側体性感覚野、運動野 8 mm×8 mmの領域にLEDライト（波長565 nm, 出力LED 170 mW）を20分間照射した。マウス頭皮を縫合し、生理食塩水を10 μL/gで皮下に投与した。照射の前後にレーザードップラー血流計（ユニークメディカル）を用いて照射部位の血流を測定し、70～85 % 血流が減少した個体のみを以後の実験に使用した。

### 2) 脳浮腫の評価

イソフルランによりマウスを吸入麻酔し、冠状面に沿って1mm幅でMRI T1強調画像およびT2強調画像<sup>注3</sup>を撮像した（1.5T MRmini DS ファーマバイオメディカル）。また、脳を摘出し、冠状面に沿って1mm厚にスライスした後、TTC染色<sup>注4</sup>を行った。Image Jソフトウェアにより染色面積を定量した。

注3 スピン-スピン緩和時間（横緩和時間）を測定し画像化する撮像法。脂肪や水が高信号として検出され、梗塞巣も高信号で描出される。

注4 トリフェニルテトラゾリウムクロライド（TTC）は脱水素酵素によって還元され、不溶性の赤色ホルマザンを生成するため、還元能がある生組織のみでホルマザンが生じる。従って、生組織は赤色に、梗塞巣は白色に描出される。

### 3) 運動機能、感覚機能の測定

協調運動をロータロッドテスト（5分間で回転数を4rpmから40rpmに上げる加速モード）により測定した。T字バーを装着した小動物用握力メータ（Bioseb）を用いて握力を測定した。神経学的重症度スコア（mNSS: modified neurological severity score）を用いて運動機能と感覚機能を評価した。

## 3-4. 骨髄由来マクロファージの調製と炎症反応の評価

雄性ICRマウス（10週齢）の大腿骨より骨髄細胞を単離し、10% FBSおよび20 ng/mL GM-CSFを含むDMEMで7日間培養し、マクロファージに分化させた。骨髄由来マクロファージをPM2.5で刺激した後、細胞を回収してRNAを抽出し、real-time PCRにより炎症性分子のmRNAを定量した。

## 3-5. 曝露したPM2.5の嗅覚影響の測定（図1-1）

マウスを麻酔した後に断頭し、正中線にそって頭部を2つに切り分けた。実体顕微鏡下、鼻柱を注意深く取り除き、鼻甲介を露出させた。厚めのろ紙を敷いた3cm dishにRinger Solutionを加え、マウス

検体をおいた。接地電極をRinger Solutionに浸し、測定電極を鼻甲介に軽く接するように留置した。100mM 酢酸アミルより生じる蒸気をピコスプリッターにより10psi、200msec条件で送り出して（5-10mL程度の蒸気を送られる）鼻甲介を刺激し、A-M system Model 3000により電位変化を増幅させて嗅電位<sup>註5</sup>を記録した<sup>8)</sup>。

<sup>註5</sup> 鼻腔内嗅上皮に存在する嗅覚受容体に匂い物質が結合した際に生じる電位変化。本課題では、PM2.5の嗅上皮影響を指標として用いた。

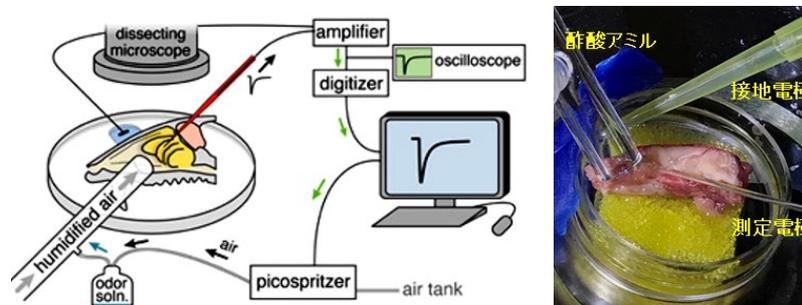


図1-1. 嗅電位測定の概要

#### 4. 結果及び考察

##### 4-1. PM2.5、CRM28およびCRM Coreの化学成分

PM2.5、CRM28およびCRM Coreに含まれる水溶性イオン、重金属類、カーボン、PAHsおよびエンドトキシンをそれぞれ測定した。表1-2に季節性あるいは地域性が認められたPAHsとエンドトキシン量を示す。

表1-2. PM2.5およびCRM28に含まれるPAHsとエンドトキシン量

	Y2018_1-2	Y2018_5-6	Y2020_4-5	Y2021_4-6	Y2021_11-2	F2018_5-6	F2021_4-7	CRM28	CRM Core
Naphthalene	ND	ND	ND	ND	0.07	ND	ND	ND	ND
Acenaphthylene	0.02	0.02	0.01	ND	0.05	0.01	ND	0.01	ND
Acenaphthene	ND	0.01	ND	ND	0.19	ND	ND	ND	ND
Fluorene	0.02	0.04	0.03	ND	0.03	0.01	ND	0.01	ND
Phenanthrene	0.51	0.40	0.23	0.10	1.45	0.19	0.30	0.41	0.12
Anthracene	0.06	0.07	0.04	0.01	0.39	0.01	0.17	0.05	0.01
Fluoranthene	1.58	0.55	0.30	0.74	2.02	0.72	0.49	1.32	0.17
Pyrene	1.28	0.42	0.23	0.83	1.98	0.51	0.85	0.84	0.10
Benzo[a]anthracene	1.00	0.41	0.31	0.59	5.20	0.41	0.58	0.76	0.14
Chrysene	2.60	1.39	0.89	2.19	5.02	1.63	1.04	3.23	0.31
Benzo[b+j]fluoranthene	4.07	3.74	2.39	3.26	10.30	3.69	2.94	8.80	0.78
Benzo[k]fluoranthene	3.36	2.16	1.18	2.19	10.29	2.48	1.30	3.36	0.31
Benzo(e)pyrene	3.54	2.69	1.09	2.35	12.19	2.60	1.30	3.37	0.34
Benzo(a)pyrene	1.50	0.70	0.43	2.01	7.40	1.25	0.59	1.01	0.13
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	2.57	1.48	0.71	2.39	3.20	2.28	0.75	2.48	0.22
Dibenz[a,h]anthracene	0.69	0.34	0.24	1.22	0.93	0.80	0.84	0.73	0.06
Benzo[ghi]perylene	2.59	1.26	0.72	1.79	4.33	2.04	1.05	2.08	0.22
Coronene	1.18	0.57	0.41	0.49	3.01	0.84	0.10	1.42	0.20
total PAHs	26.58	16.25	9.21	20.19	68.06	19.48	12.30	29.88	3.11 (ppmw)
Endotoxin	7.4	3.5	7.1	6.3	4.8	0.1	1.3	0.7	0.3 (IU/mg)

\* ND: not detected

PAHはY2018\_1-2およびY2021\_11-2に多く含まれており、冬場の燃焼の寄与率が高いと推定される。CRM28も多くのPAHsを含んでいた。一方、エンドトキシンは、福岡と比較して横浜で多く含まれることが明らかとなり、明確な季節性は観察されなかった。CRM28にはエンドトキシンはほとんど含まれていなかったが、CRM28がおおよそ20年前に採取されたことを考えると、エンドトキシンは失

活しているか、分解し消失していると考えられる。

#### 4-2. CRM28短期曝露（7日間）による炎症状態の変化

雄性ICRマウス（8週齢）にCRM28を10および100  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ の用量で鼻腔内に投与した。投与開始後60日までマウスの様子を観察したが、CRM28投与による体重減少や死亡は認められなかった。

雄性ICRマウスにCRM28を10および100  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ の用量で7日間鼻腔内に投与し、炎症を評価した。ヒトにおいて、急性期炎症は血清中C反応性タンパク質（CRP）量で評価されるが、マウスCRPは発現レベルが非常に低く、急性期タンパク質として扱うことはできない。そこで、血清中のサイトカイン（IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, TNF $\alpha$ ）を定量して全身の炎症状態を評価した。これらサイトカイン濃度は、10および100  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$  CRM28の7日間曝露により変化はしなかった（図. 1-2）。次に肺のスライスを作製し、マクロファージの浸潤をF4/80染色により、好中球の浸潤をミエロペルオキシダーゼ（MPO）染色により評価した。vehicle群と比較して、10 $\mu\text{g}/\text{day}$  CRM28を7日間投与した群では染色像に大きな違いは認められなかったが、100 $\mu\text{g}/\text{day}$  CRM28を7日間投与した群においてF4/80およびMPO陽性細胞数が増加しており、マクロファージおよび好中球が浸潤していると考えられた（図 1-3）。さらに、神経炎症を評価するために、脳スライスをIba1抗体とCD68抗体を用いて共染色を行った。CRM28を7日間曝露したマウス的大脑皮質においてミクログリアのアメーバ様形態変化が観察され、また、CD68発現が増加した（図. 1-4）。このアメーバ様変化とCD68発現を定量したところ、100 $\mu\text{g}/\text{day}$ の用量で7日間曝露することによりアメーバ様形態変化が有意に進行し、また、CD68発現も有意に増加した（図. 1-4）。

以上より、CRM28の短期曝露では全身性の炎症は生じていない一方、肺や脳で局所的な炎症が起こっていることが明らかとなった。

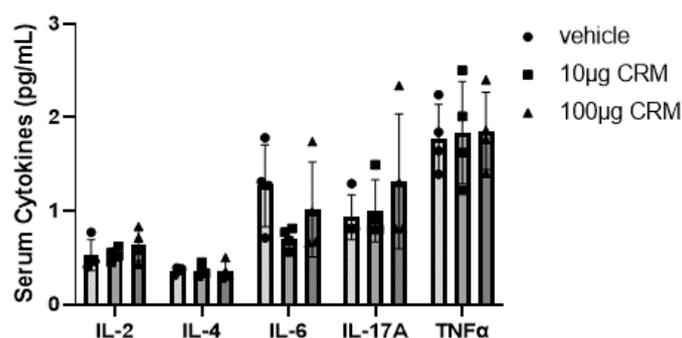


図1-2. CRM28短期曝露の全身性炎症に及ぼす影響

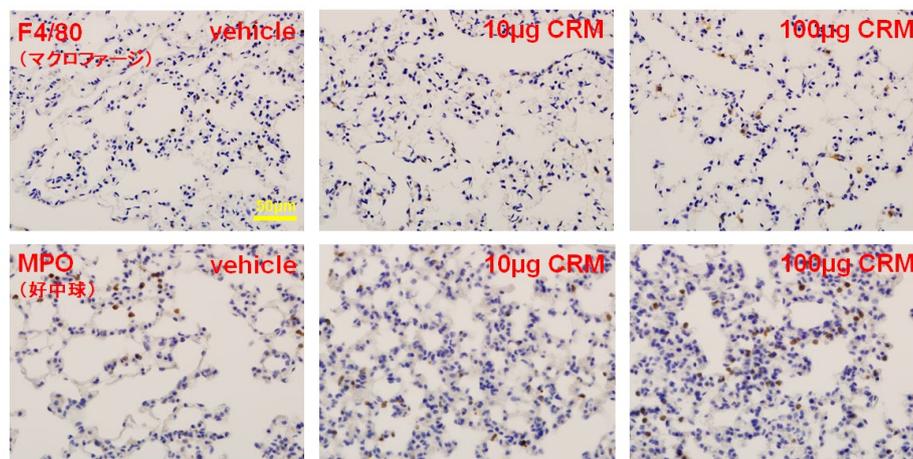


図1-3. CRM28短期曝露の肺免疫細胞に及ぼす影響

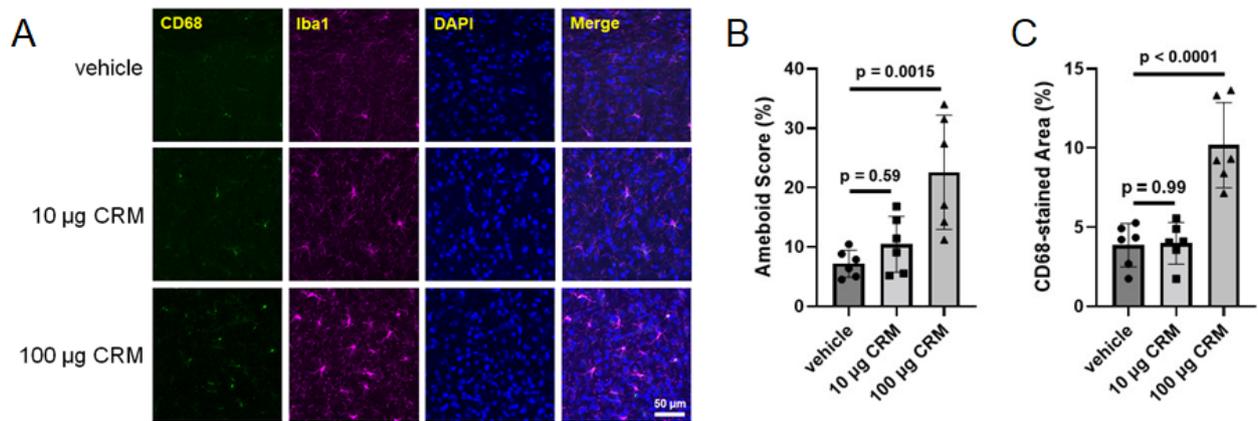


図1-4. CRM28曝露によるミクログリア形態変化とCD68発現の上昇（7日間曝露、大脳皮質）

#### 4-3. CRM28短期曝露（7日間）の循環動態への影響

CRM28曝露7日後の血圧を測定したところ、収縮期血圧（SBP）、平均血圧（MBP）、拡張期血圧（DBP）は処置群間で変化は認められなかった（図1-5）。データは示さないが、このとき心拍数も処置群間で差はなかった。また、血液凝固の指標であるプロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間およびフィブリノゲン濃度についても、CRM28処置で変化は認められず（図1-6）、CRM28の短期曝露は循環動態には影響しないと考えられる。

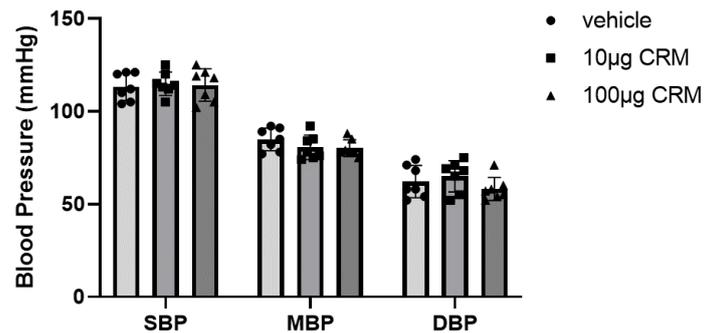


図1-5. CRM28短期曝露の血圧に及ぼす影響

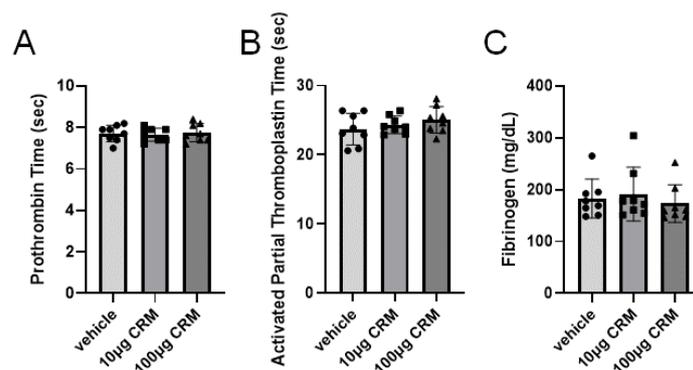


図1-6. CRM28短期曝露の血液凝固に及ぼす影響

#### 4-4. CRM28短期曝露の脳梗塞予後への影響

脳梗塞モデルマウスとして、光誘発性血栓モデルを使用した<sup>9)</sup>。このモデルは、光増感剤であるローズベンガルを投与した後に、頭蓋骨を露出してLED光を照射し、照射した部位で血小板の凝集を誘発するモデルである。脳梗塞モデルとして、中大脳動脈閉塞術（MCAO）がしばしば用いられるが<sup>10)</sup>、

MCAOでは人工のフィラメントを用いるため病変部で血栓は生じず、手技による実験誤差が大きくなる。この点で光誘発性血栓モデルに優位性がある。頭蓋骨を露出し、レーザードップラー血流計プローブを頭蓋骨にあて、血流を測定した。ローズベンガルを投与し、LEDを照射した後に同様に血流を測定し、血流が70~85%減少した個体を実験に使用した。なお、本研究における平均血流減少率は79.5 ± 2.6%であった。

CRM28を10または100 µg/mouse/dayの用量で7日間経鼻曝露した後に光誘発性血栓法により脳梗塞を誘導した。脳梗塞後28日までマウスの様子を観察したが、体重減少および死亡数について処置群間で有意な差は認められなかった。CRM28曝露による脳梗塞後の運動機能や知覚機能を調べるため、CRM28を7日間曝露したマウスに脳梗塞を誘発した。Vehicle処置マウスにおいて、脳梗塞1日後にロータロッド上滞在時間が大きく減少し、その後日を追うに従って滞在時間は長くなった(図1-7)。つまり、脳梗塞急性期に大きな運動障害が生じ、その後徐々に回復する過程が観察された。CRM28を7日間曝露した後に脳梗塞を誘導すると、10µg/dayの曝露では脳梗塞急性期の運動障害およびその回復に影響しなかった一方、100µg/dayの曝露により脳梗塞急性期の運動障害が増悪し、さらに、回復も遅れることが明らかとなった(図1-7)。握力は群間で変化が見られなかったが、mNSSにより、運動機能に加えて、感覚と反射を評価したところ、100µg/day CRM28の7日間曝露により、脳梗塞後の感覚、ビームバランス、反射に異常が生じ、mNSSが悪化した(Data not shown)。従って、運動機能だけでなく、知覚や感覚も影響を受けていると考えられる。

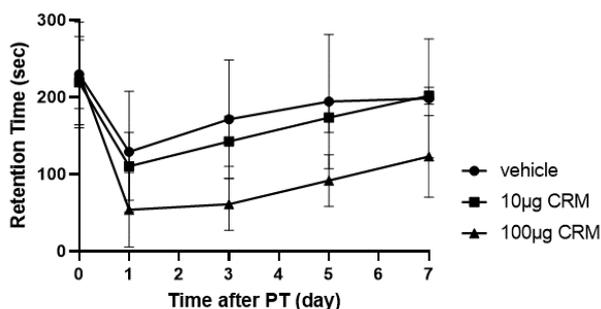


図1-7. CRM28短期曝露の脳梗塞後運動機能に及ぼす影響

CRM28にはPAHsや金属類を始めとして多くの化学物質が付着している。そこで、水系溶媒、有機溶媒抽出によりこれら化学物質を除いたCore粒子を曝露し、付着する化学物質の作用を検討した。特に、Core粒子のPAHs量はCRM28と比較して1/10程度まで減少しており(表1-2)、一連の抽出操作により付着化学物質が除けていることが確認できた。

マウス骨髄由来マクロファージにCRM28およびCoreを曝露したところ、CRM28によって増加するCYP1A1、TNFαおよびCOX-2の発現がいずれも大きく抑制された(図8A-C)。さらに、図1-4と同様にミクログリア活性を測定したところ、CRM28と比較してミクログリア活性化が抑制されており、vehicle群と同程度の活性であった(図1-8D-E)。したがって、CRM28と比較してCore粒子では炎症誘導能が大きく低下していることが明らかとなった。100µg/dayの用量でCoreを7日間マウスに曝露した後に脳梗塞を誘導し、運動機能を測定したところ、CRM28曝露により悪化した急性期の運動障害が有意に改善した(図1-8F)。従って、CRM28曝露による脳梗塞後の運動機能障害は、CRM28に付着している化学物質によって引き起こされると考えられ、神経炎症の運動機能障害への関与が示唆された。

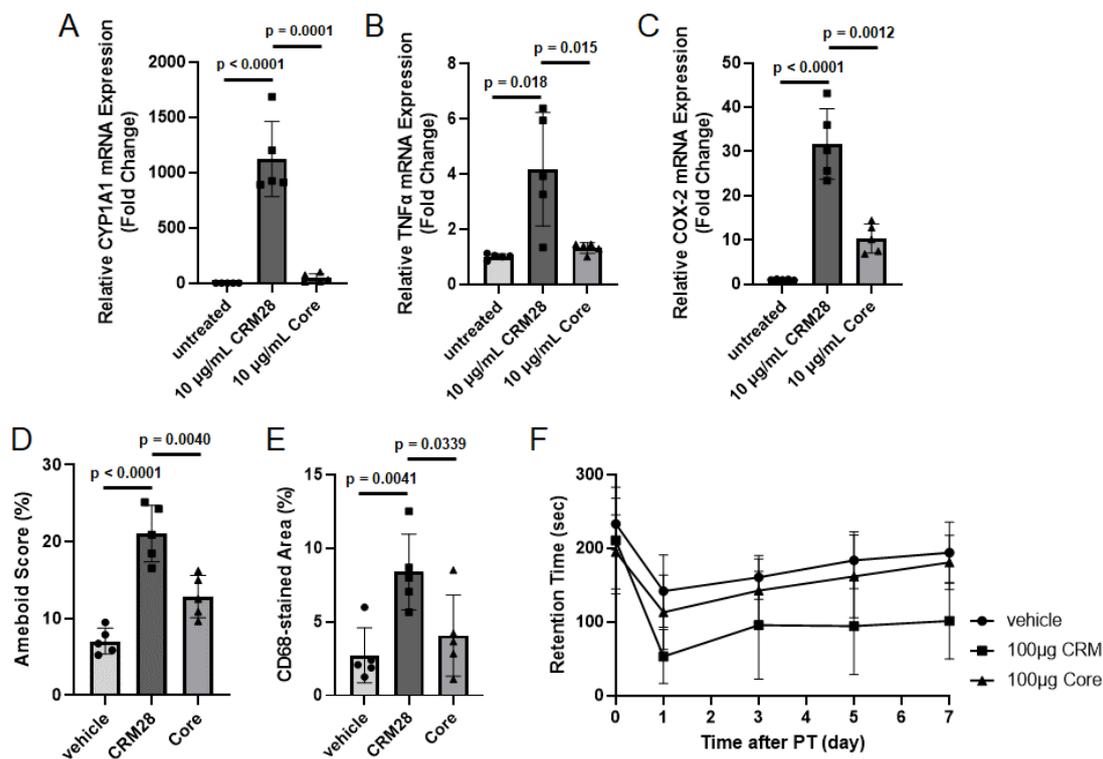


図1-8. CRM28 Core粒子曝露の炎症と脳梗塞後運動機能に及ぼす影響

脳梗塞の病態において、血管閉塞部あるいはその周辺部で循環不全が生じ、水分が滞留する脳浮腫が生じる。脳浮腫は、ATPaseなどの細胞内外のイオン輸送に関連する機能が不全となって細胞が膨潤する細胞障害性浮腫と血液脳関門が障害され、血漿成分が脳実質に流入する血管原性浮腫に大別される<sup>11)</sup>。血管原性浮腫は脳体積の増大、脳ヘルニアの原因となり、ときに致死的となる。炎症反応で生じるTNF $\alpha$ やIL-6などの炎症性サイトカインは、細胞間のタイトジャンクションタンパク質であるオクルーディンやクローディン5、ZO-1の発現を低下させ、脳実質への水の移動を促進することが報告されている<sup>12-14)</sup>。そこで、CRM28曝露により脳梗塞予後が悪化したマウスについて、脳浮腫と梗塞巣の大きさを調べた。

CRM28を10または100 $\mu$ g/dayの用量で7日間曝露し、脳梗塞を誘導した。脳梗塞1日後のマウスについて、MRIによりT1およびT2強調画像を撮像し、また脳を摘出してTTC染色を行った。T2強調画像は水分含量が多い領域、すなわち梗塞巣と脳浮腫を高信号で描出し、TTC染色では生細胞が赤く染色されるため、相対的に梗塞巣が描出される。従って、T2強調画像高信号領域と梗塞巣領域との差が浮腫となる<sup>5)</sup>。T2強調画像を比較すると、100 $\mu$ g/day CRM28を曝露した群において、大脳皮質に加えて線条体の尾状核まで高信号が観察された(図. 1-9)。また、TTC染色において、vehicle群と100 $\mu$ g/day CRM28曝露群に差は認められなかったことから、100 $\mu$ g/day CRM28曝露群において脳浮腫が進行していると考えられる(図. 1-9)。

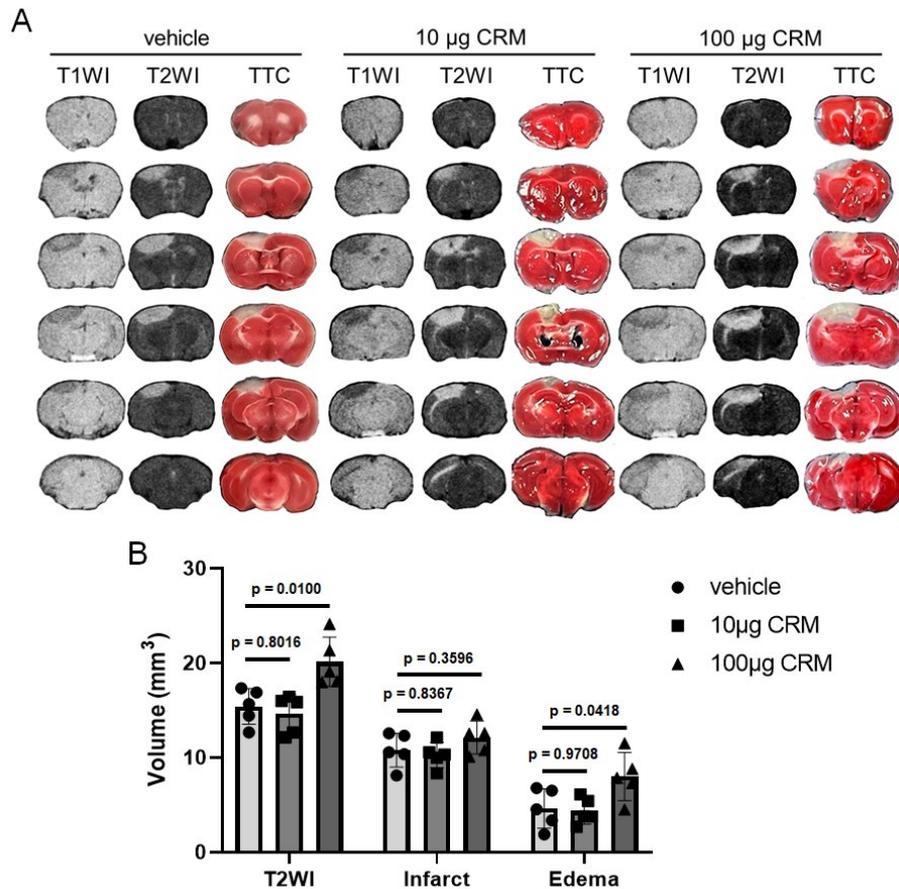


図1-9. CRM28短期曝露による脳浮腫の増悪

CRM28にはPAHsが多く含まれる一方で、エンドトキシンの含有量は少ない。PAHsの標的は多環芳香族炭化水素受容体 (AhR) であり、AhRは炎症反応を惹起、亢進することが知られている<sup>15)</sup>。そこで、AhR KOマウスを用い、CRM28に含まれているPAHsが神経炎症や脳梗塞の予後増悪に関与するかどうかを調べた。

C57BL6Jマウス (野生型) およびAhR KOマウスより骨髓由来マクロファージを調製し、CRM28で処置したところ、CRM28によって増加する野生型マクロファージのCYP1A1、TNF $\alpha$ およびCOX-2の発現がAhR KOによりいずれも大きく抑制された (図1-10A-C)。さらに、図1-4と同様にミクログリア活性を測定したところ、野生型と比較してAhR KOマウスではCRM28によるミクログリア活性化がvehicle群と同程度まで抑制されていた (図1-10D-F)。さらに、野生型マウスとAhR KOマウスにCRM28を100 $\mu$ g/dayの用量で7日間曝露して運動機能を調べたところ、CRM28曝露は野生型マウスの脳梗塞後運動機能を悪化させた一方、AhR KOマウスの脳梗塞後運動機能には影響しなかった (図1-10G)。以上より、CRM28に含まれるPAHsが神経炎症を引き起こし、脳梗塞予後を増悪させることが明らかとなった。

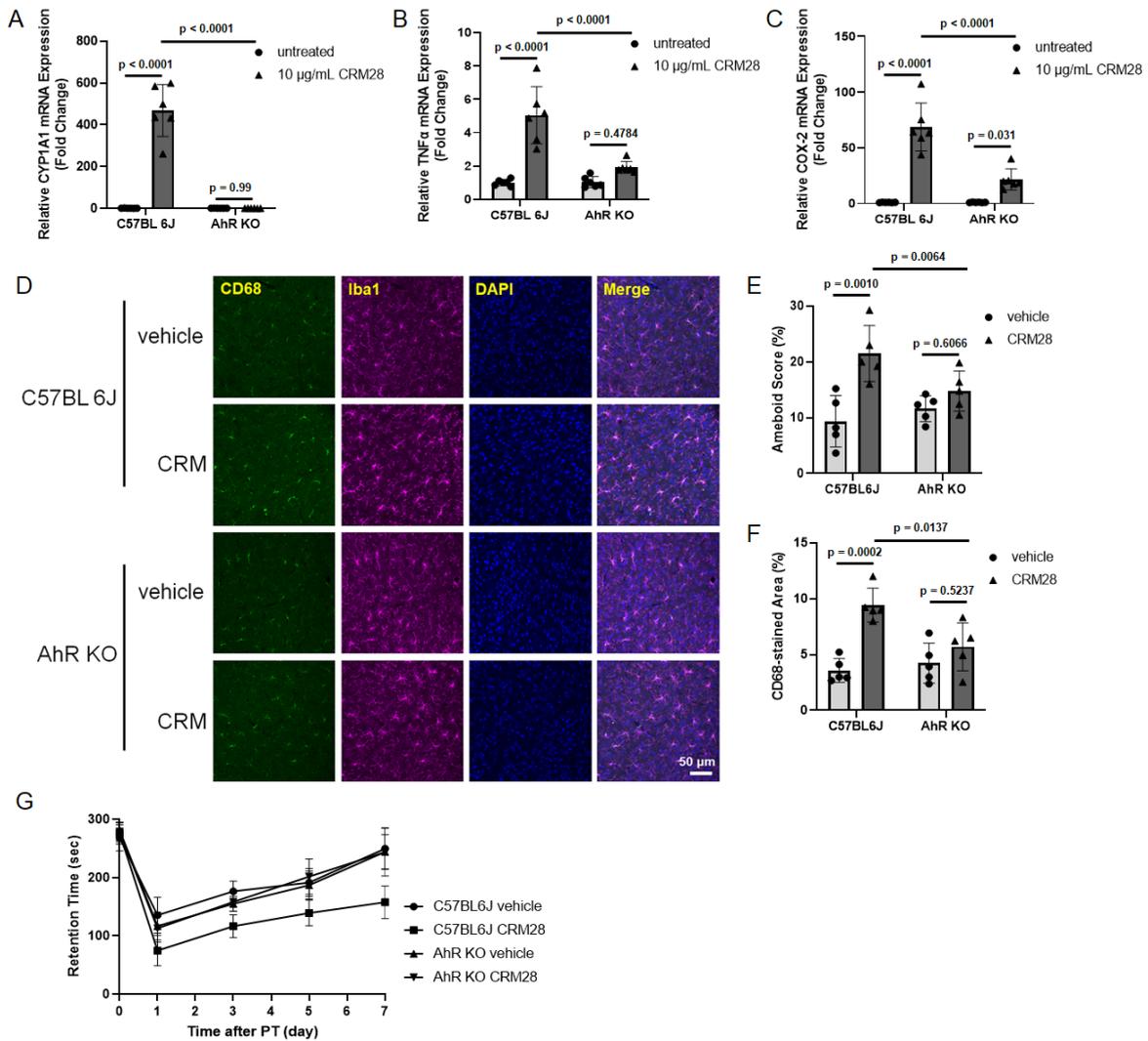


図10. CRM28に含まれるPAHsにより引き起こされる炎症と脳梗塞後運動機能悪化

#### 4-5. CRM28長期曝露（28日）の脳梗塞予後への影響

CRM28長期曝露の脳梗塞予後への影響を調べた。CRM28を10または100 μg/mouse/dayの用量で28日間経鼻曝露した後に光誘発性血栓法により脳梗塞を誘導し、脳梗塞7日目までマウスを観察した。10 μg/mouse/dayの用量ではマウス生存率に影響しない一方、100 μg/mouse/day CRM28曝露群において、マウス生存率が大きく低下した（図1-11）。従って、CRM28の長期曝露は、脳梗塞後の致死率を増加させることが明らかとなった。

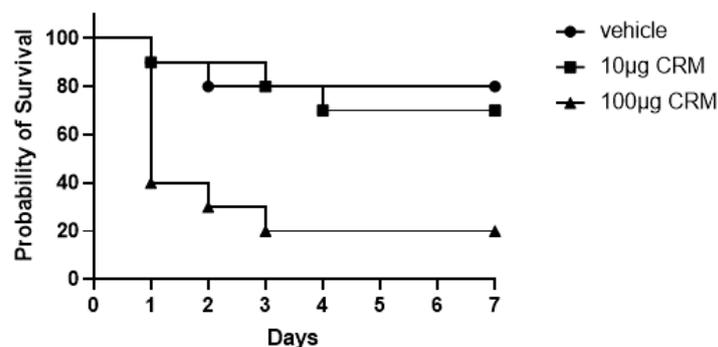


図1-11. CRM28長期曝露の脳梗塞予後への影響

この致死率増加の原因を調べるため、CRM28を28日間曝露したマウスの生理機能や病理を解析した。CRM28曝露は血圧、心拍数、血液凝固能に影響せず、血清中サイトカイン量にも変化は認められなかった。しかし、CRM28短期曝露と同様、100 µg/mouse/day CRM28曝露群において大脳皮質のミクログリア活性化が認められた（図1-12）。さらに血液中マーカーの検討を進め、心筋障害の指標である脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）と心筋トロポニンI（TnI）が血清中で有意に増加していることが明らかとなった（図1-13）。従って、CRM28の長期曝露により心機能に異常が生じている可能性が示された。以上の結果より、検討が必要であるものの、CRM28長期曝露による脳梗塞予後悪化は神経炎症或いは循環障害が関わりと考えられる。血清中BNPとTnI量の増加は、CRM28短期曝露では観察されない一方、短期曝露によりミクログリアは活性化される。従って、PMを経鼻曝露した際、神経系は極めて鋭敏に（感度高く）反応することが明らかとなった。

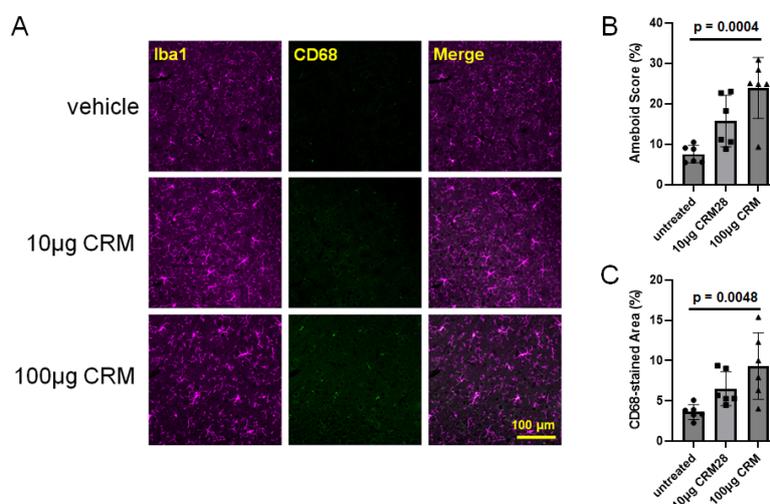


図1-12. CRM28曝露によるミクログリア形態変化とCD68発現の上昇（28日間曝露、大脳皮質）

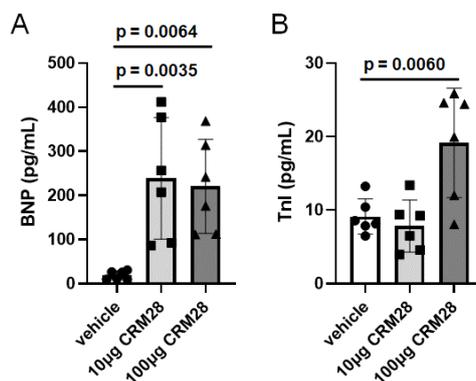


図1-13. CRM28長期曝露の血液中心機能マーカーへの影響

#### 4-5. CRM28の嗅上皮への影響

吸入したPM2.5は、肺の毛細血管から血液中に取り込まれることに加えて、鼻腔上皮層から軸索輸送を介して脳に達することが示唆されている<sup>1)</sup>。本研究では、PMを鼻腔内に投与していることから、PMの神経影響について嗅上皮の関与が疑われる。そこで、CRM28曝露によって嗅上皮機能が影響を受けるか否かを嗅電位測定により評価した。

ICRマウスにCRM28を10および100 µg/mouse/dayの用量で鼻腔内に7日間投与した後、嗅上皮を含む切片を調節し、酢酸アミル蒸気で刺激したときの嗅電位を測定した。vehicle群において、大きな嗅電位変化が観察された（図1-14A）。CRM28を7日間曝露しておく、嗅電位変化は曝露量依存的に抑

制され、100  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ の用量だとvehicle群と比較して有意に低かった（図1-14B）。CRM28により嗅上皮が障害を受けていることを示しており、CRM28の中樞神経影響のメカニズムとして、嗅覚経路が示唆された。しかしながら、この評価法は直接的ではないため、PMやその化学成分の測定などを通してPMが中枢神経系に影響するメカニズムを探索する必要がある。

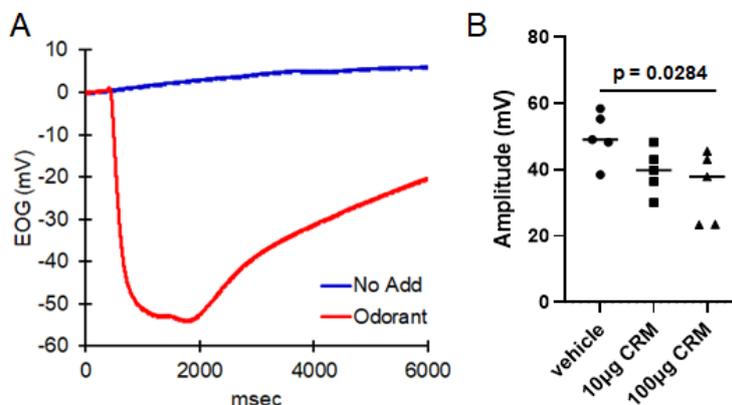


図1-14. CRM28短期曝露による嗅電位の変化

#### 4-6. 横浜および福岡で採取したPM2.5の脳梗塞予後への影響

横浜および福岡で採取したPM2.5を100  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ の用量で7日間マウスに経鼻曝露し、脳梗塞を誘導した。脳梗塞後の運動機能を測定したところ、冬季横浜で採取したPM2.5（Y2018\_1-2）において運動機能増悪がもっとも大きく、次に春季横浜PM2.5（Y2018\_5-6）、春季に福岡で採取したPM2.5（F2018\_5-6）曝露は脳梗塞後の運動機能に影響しなかった（図1-15）。これらPM2.5に含まれるPAHsを比較すると、F2018\_5-6に含まれるPAHs量はY2018\_1-2やCRM28よりも少ない一方でY2018\_5-6よりは多く（表1-2）、PAHs含量だけではこの作用は説明できない。これらPMのエンドトキシン量を比較すると、横浜で採取したPM2.5には多くのエンドトキシンが含まれており、CRM28に含まれるエンドトキシンはF2018\_5-6よりも多い。そこで、PM2.5に含まれるエンドトキシンの脳梗塞予後への影響について、ポリミキシンB（PMB）を用いて検討した。

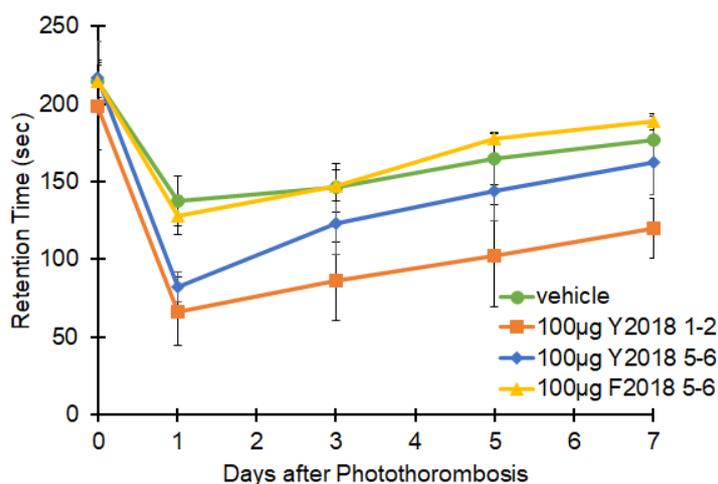


図1-15. PM2.5短期曝露の脳梗塞後運動機能に及ぼす影響

PMBはエンドトキシンと特異的に結合し、その作用を中和する。そこで、PM2.5とポリミキシンBを混合してエンドトキシンの作用を中和した後にマウスに曝露し、脳梗塞後の運動機能への影響を調べた。春季に横浜で採取したPM2.5（Y2020\_4-5）を100  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ の用量で7日間マウスに経鼻曝露し脳梗塞を誘導したところ、脳梗塞後の運動機能はvehicle群と比較して悪化した（図1-16）。

Y2020\_4-5とPMBを混合した後にマウスに曝露すると、脳梗塞後の運動機能の増悪が抑制された（図1-16）。Y2020\_4-5はPAHsの含量は少ない一方、多くのエンドトキシンを含んでいる。従って、PM2.5に含まれるエンドトキシンも脳梗塞予後を悪化させる作用を有すると考えられる。

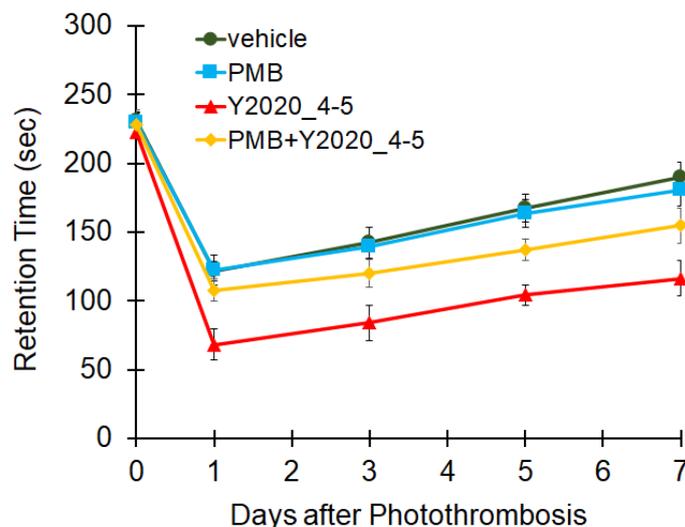


図1-16. ポリミキシンB前処置による脳梗塞後運動機能悪化の抑制

次にPM2.5の長期曝露影響についても調べた。横浜で採取したPM2.5（Y2021\_4-6およびY2021\_11-2）を100  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ の用量で28日間曝露し、脳梗塞を誘導した。誘導後1週間の生存率は、PM2.5曝露群で大きく低下し、CRM28と同様の結果を得た（図1-17）。従って、横浜におけるPM2.5の長期曝露は、生存率の低下という形で脳梗塞予後を悪化させることが明らかとなった。PM長期曝露実験においては、脳梗塞誘導前後の病態評価や、脳梗塞予後を悪化させるPM2.5に含まれる化学成分の同定はまだ行っていない。この点は今後の課題である。

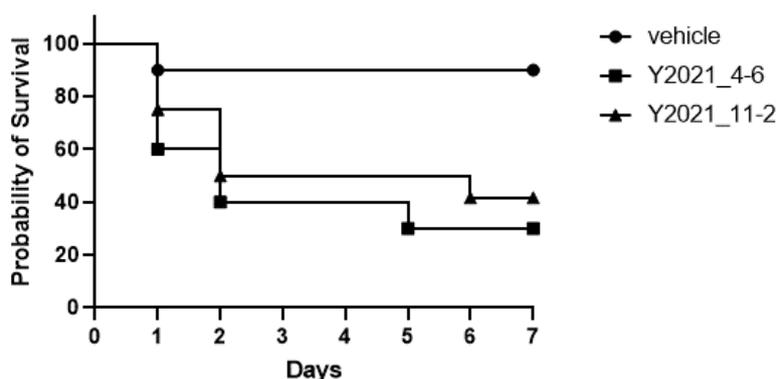


図1-17. PM2.5長期曝露の脳梗塞予後への影響

#### 4-7. PM2.5に含まれるエンドトキシンの地域性の検討

横浜と福岡で採取したPM2.5に含まれるエンドトキシン含量に地域性が認められた。即ち、横浜でエンドトキシンが多く、福岡で少ない傾向があった。この地域性について考察するため、東広島市（広島大学東広島キャンパス）および呉市（広島大学練習船基地）においてMCIサンプラーを用いてPM2.5を収集し、エンドトキシン量を測定した。測定したどの月においても東広島市と比較して呉市で収集したPM2.5により多くのエンドトキシンが含まれていた（図1-18）。呉市のPM2.5に含まれるエンドトキシン量は、福岡のそれと同程度であり、横浜と比べると少なかった（表1-2、図1-18）。

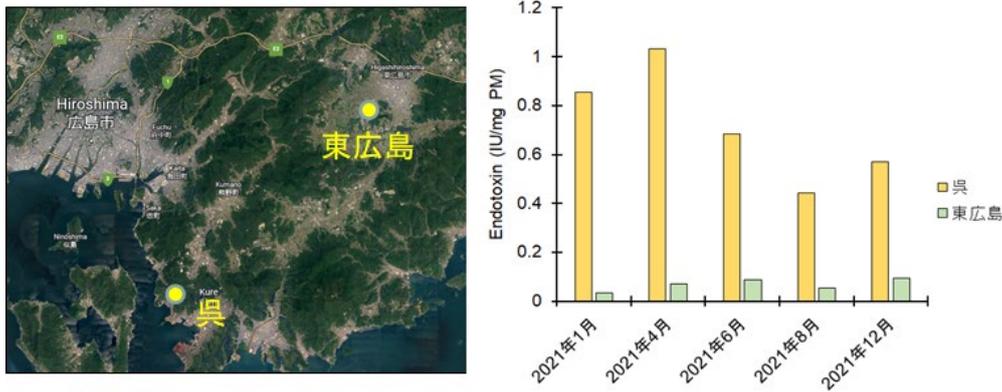


図1-18. 呉および東広島で収集したPM2.5に含まれるエンドトキシン量

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁の主要な成分である。他グループからの報告によると、農場では、 $10^3-10^5$  CFU/m<sup>3</sup>の浮遊細菌が検出された<sup>16)</sup>。また、排水処理施設、埋立地の浮遊細菌濃度は、それぞれ $5.1 \times 10-6.9 \times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup>、 $7.9 \times 10^2-5.6 \times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup>であり、観察された細菌の中には、グラム陰性菌であるシェドモナス属や肺炎桿菌が含まれていた<sup>17,18)</sup>。本研究で検出されたエンドトキシンの由来は不明であるが、都市域で濃度が大きくなっていることから人間生活に由来すると考えられ、排水処理施設や埋立地はその候補となるかもしれない。

## 5. 研究目標の達成状況

全体目標	目標の達成状況
サイクロン型捕集機を用いて都市型と越境型PM2.5をそれぞれ採取し、成分組成を解析する。これらPM2.5をマウスに曝露し、実験的脳梗塞を誘導した後に脳循環や感覚・運動障害を調べることによって、PM2.5の成分組成を踏まえた脳循環や脳梗塞予後への影響を毒性学的見地から明らかにする。	<p>目標を上回る成果をあげた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>CRM28を用いて研究を先行し、CRM28に含まれるPAHsが原因で神経炎症や脳浮腫が増悪し、脳梗塞予後の運動障害が悪化することを明らかにした。また、横浜で採取したPM2.5でも同様の予後悪化が生じることを示した。(図1-7~1-10, 1-15)</li> <li>PM短期曝露と長期曝露の脳梗塞予後への影響の違いを明らかにした。短期曝露においては運動障害が悪化し、長期曝露では致死率が増加する。(図1-7, 1-11)</li> <li>PAHsに加えてPM2.5に含まれるエンドトキシンも脳梗塞予後悪化を引き起こすことを示した。また、横浜と福岡で採取したPM2.5の脳梗塞予後への影響の違いが、PM2.5に含まれるエンドトキシン濃度の違いに因る可能性を提示した。(表1-2, 図1-15, 1-16)</li> <li>横浜、福岡に加えて、呉、東広島でPM2.5を採取し、エンドトキシンの地域性を示した。(図1-18)</li> </ol> <p>上記1は研究開始時の目的に沿った成果であ</p>

	る。本研究では1に加えて、2～4の成果をあげることができたため、自己評価を「目標を上回る成果をあげた」とした。
--	---

サブテーマ1 目標	目標の達成状況
サイクロン型捕集機を用い、夏季と冬季に横浜（都市型）および福岡（越境型）でPM2.5を採取し、水溶性イオン、金属、多環芳香族炭化水素およびエンドトキシンを定量する。成分分析を終えたPM2.5をマウスに曝露し、実験的脳梗塞を誘導した後に脳循環や感覚・運動障害を調べることによって、PM2.5の成分組成を踏まえた脳循環や脳梗塞予後への影響を毒性学的見地から明らかにする。	<p>目標を上回る成果をあげた。</p> <p>自己評価の根拠については全体目標の項目に記載したとおりである、</p> <p>コロナ禍でPM2.5収集ができなかったため、本課題は当初、CRM28を使用して研究を開始した。CRM28は購入可能であり、使用量の制限がほぼなかったため、多くの実験を並列で進めることができた。CRM28を用いてメカニズムを追求した後、収集したPM2.5で起こる現象を比較検討する形で研究が進み、結果として効率的、かつ、多くの成果を得ることができた。</p>

## 6. 引用文献

- 1) Inhal Toxicol 16:437, 2004.
- 2) Stroke 50:563, 2019.
- 3) Stroke 48:2052, 2017.
- 4) Toxicol Sci 170:404, 2019.
- 5) Biochem Biophys Res Commun. 496:582, 2018.
- 6) Aerosol Air Qual Res. 15:759, 2015.
- 7) Asian J. Atmospheric Environ. 12:78, 2018.
- 8) J Vis Exp 37:e1850, 2010.
- 9) J. Neurosci. Methods 117:43-49, 2002.
- 10) Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 1866:165260, 2020.
- 11) Neurotherapeutics 16:1133-1148, 2019.
- 12) J Surg Res 104:118-123, 2002.
- 13) Neuroimmunomodulation 20:264-273, 2013.
- 14) PLoS ONE 9:e101815-13, 2014.
- 15) Redox Biol. 34:101530, 2020.
- 16) Ann Occup Hyg 54:217, 2010.
- 17) Int J Environ Sci Technol 14:2181, 2017.
- 18) Arch Environ Occup Health 73:107, 2018.

### Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

#### (1) 誌上発表

#### <査読付き論文>

##### 【サブテーマ1】

- 1) Tanaka M, Okuda T, Itoh K, Ishihara N, Oguro A, Fujii-Kuriyama Y, Nabetani Y, Yamamoto M, Vogel CFA, Ishihara Y. Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban particle matter exacerbate movement disorder after ischemic stroke via potentiation of neuroinflammation. *Particle Fibre Toxicol.* 20:6 (2023). (IF=9.112)
- 2) Jing W, Saito K, Okamoto T, Saito H, Sugimoto K, Nishita-Hara C, Hara K, Hayashi M, Hasegawa S, Okuda T. Characterization of Elemental Composition and Valence State of Cyclone-collected Aerosol Particles Using EDXRF and XAFS at Three Sites in Japan. *Asian J. Atmospheric Environ.* 16(2):2021137 (2023). (IF=1.60)
- 3) Jing W, Nakano K, Shen Z, Okuda T. Optimization of the QuEChERS extraction method to determine Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in powder aerosol particles collected by cyclone. *Environ. Technol. Innov.* 31:103141 (2023). (IF=7.758)
- 4) Kono M, Okuda T, Ishihara N, Hagino H, Tani Y, Okochi H, Tokoro C, Takaishi M, Ikeda H, Ishihara Y. Chemokine expression in human 3-dimensional cultured epidermis exposed to PM<sub>2.5</sub> collected by cyclonic separation. *Toxicol Res.* 39(1):1-13 (2023). (IF=2.680)
- 5) Ishihara Y, Itoh K. Microglial inflammatory reaction regulated by oxidative stress. *J Clin Biochem Nutr.* 72(1): 23-27 (2023). (IF=3.179)
- 6) Youn H, Miki K, Iwata A, Okuda T. Estimation of particle size distributions in the atmosphere - analysis of Fe and Ca particles as the representative examples. *Asian J. Atmospheric Environ.* 17(2):12 (2023). (IF=1.60)
- 7) Ishihara Y, Kado S, He Y, Pouraryan AA, Urban A, Bein KJ, Haarmann-Stemmann T, Sweeney C, Vogel CFA. Aryl hydrocarbon Receptor signaling synergizes with TLR/NF- $\kappa$ B-signaling for induction of IL-22 through canonical and non-canonical AhR pathways. *Front Toxicol.* 3:787360 (2022).
- 8) Ishihara N, Okuda T, Hagino H, Oguro A, Tani Y, Okochi H, Tokoro C, Fujii-Kuriyama Y, Itoh K, Vogel CFA, Ishihara Y. Involvement of polycyclic aromatic hydrocarbons and endotoxin in macrophage expression of interleukin-33 induced by exposure to particulate matter. *J Toxicol Sci.* 47(5):201-210 (2022). (IF=1.792)
- 9) Kono M, Okuda T, Takaishi M, Ikeda H, Ishihara N, Ishihara Y. Leaf extracts from the *Camellia sinensis* and the *Argania spinosa* suppressed oxidative stress and chemokine release in human 3-dimensional cultured epidermis exposed to PM<sub>2.5</sub> collected with cyclonic separation. *Fundam. Toxicol. Sci.* 9:117-122 (2022).
- 10) Alimov ZB, Youn H, Iwata A, Nakano K, Okamoto T, Sasaki A, Katori T, Okuda T. Comparison of the chemical characteristics and toxicity of PM<sub>2.5</sub> collected using different sizes of cyclones. *Asian J. Atmospheric Environ.* 16(3):103-121 (2022). (IF=1.60)
- 11) Kajino M, Hagino H, Fujitani Y, Morikawa T, Fukui T, Onishi K, Okuda T, Igarashi Y. (2021) Simulation of the transition metal-based cumulative oxidative potential in East Asia and its emission sources in Japan. *Sci Rep.* 11:6550 (2021) (IF=4.379)
- 12) Alimov ZB, Kusakari H, Okuda T. Development of a low-cost simultaneous low volume air sampler controlled with sonic venturi. *Asian J Atmospheric Environ.* 15:2020072 (2021). doi:10.5572/ajae.2020.072. (IF=1.60)
- 13) Tanaka M, Fujikawa M, Oguro A, Itoh K, Vogel CFA, Ishihara Y. Involvement of the microglial aryl hydrocarbon receptor in neuroinflammation and vasogenic edema after

ischemic stroke. *Cells*. 10:718 (2021). doi:10.3390/cells10040718 (IF=7.666)

- 14) 杉本 和貴, 奥田 知明, 長谷川 就一, 西田 千春, 原 圭一郎, 林 政彦 (2021) アスコルビン酸アシッセイを用いた酸化能測定におけるアスコルビン酸の酸化メカニズムの解明, 大気環境学会誌. 56 巻 5 号 p. 96-107.

#### <その他誌上発表 (査読なし) >

特に記載すべき事項はない。

#### (2) 口頭発表 (学会等)

##### 【サブテーマ1】

- 1) Nakano, K., Youn, H., Iwata, A., Okuda, T. (2022) Development of an openable small cyclone device and its application to particle toxicity assessment, American Association for Aerosol Research 40th Annual Conference, Raleigh, USA, October 4, 2022.
- 2) 石原 康宏、大河内 博、奥田 知明. 道路粉塵の健康影響評価：都市型 PM2.5 との比較. 第63回大気環境学会年会. 2022年9月14-16日 (大阪公立大学中百舌鳥キャンパス) .
- 3) 齊藤響、岡本拓真、奥田知明 (2022) A549細胞への大気粒子の曝露による遺伝子発現のRT-qPCR解析、第63回大気環境学会年会、大阪公立大学、大阪府堺市、2022年9月14日
- 4) 大金栞子、岩田歩、奥田知明 (2022) 細胞曝露実験に用いる懸濁液中粒子の遠心分級法の確立、第39回エアロゾル科学・技術研究討論会、慶應義塾大学、神奈川県横浜市、2022年8月3日
- 5) 河野まおり、高石雅之、木下和彦、池田英史、奥田 知明、**石原康宏**. 大気中微小粒子PM2.5の三次元皮膚モデル気相曝露系の構築. 第49回日本毒性学会学術年会. 2022年6月30日-7月2日 (札幌コンベンションセンター) .
- 6) 石原波、奥田知明、萩野浩之、大黒亜美、谷悠人、大河内博、所千晴、藤井-栗山義明、伊藤康一、Christoph F.A. Vogel、**石原康宏**. Involvement of polycyclic aromatic hydrocarbons and endotoxin in macrophage expression of interleukin-33 induced by exposure to particulate matter. 第49回日本毒性学会学術年会. 2022年6月30日-7月2日 (札幌コンベンションセンター) .
- 7) Okuda, T., Takano, H., Ishihara, Y. (2022) Cyclone collected particles for exposure experiments. 12th Asian Aerosol Conference, Online, June 14, 2022.
- 8) **石原 康宏**. PM2.5曝露により生じる神経炎症と脳梗塞予後の増悪. 日本薬学会第142年会2022年3月25日～28日 (オンライン) .
- 9) **石原 康宏**. 微小粒子状物質による神経炎症の誘導と脳梗塞予後の増悪. 第95回日本薬理学会年会 2022年3月7日～9日 (福岡国際会議場・福岡サンパレス) .
- 10) 田中 美樹、大黒 亜美、鍋谷 悠、奥田 知明、伊藤 康一、**石原 康宏**. 微小粒子状物質 (PM2.5) 曝露による虚血性炎症の亢進と脳梗塞予後の増悪. 第48回日本毒性学会学術年会 2021年7月7日～7月9日 (神戸国際会議場) .
- 11) 田中 美樹、伊藤 康一、鍋谷 悠、石原 康宏. マウスへの微小粒子状物質 (PM2.5) 曝露による炎症誘発と脳梗塞予後の増悪. 第93回日本生化学会大会 2020年9月14日～16日 (Web開催) .
- 12) 齋藤克知、奥田知明、長谷川就一、西田千春、原圭一郎、林政彦 (2020) サイクロン法で採取された粒子中遷移金属のXAFSによる化学状態解析、第37回エアロゾル科学・技術討論会、オンライン、2020年8月27日.
- 13) 杉本和貴、奥田知明、長谷川就一、西田千春、原圭一郎、林政彦 (2020) AA (ascorbic acid) assay を用いた酸化能測定におけるアスコルビン酸の酸化メカニズムの解明、第37回エアロゾル科学・技術討論会、オンライン、2020年8月27日.
- 14) Tanaka M, Fujikawa M, Itoh K, Ishihara Y. Activated microglia in ischemic stroke aggravate brain edema in Mice. GLIA IN HEALTH & DISEASE Cold Spring Harbor

Laboratory Meetings & Courses Jul 15-19, 2020 (Online Meeting).

15) 田中 美樹、伊藤 康一、鍋谷 悠、石原 康宏. Effects of airborne particle exposure on prognosis of ischemic stroke. 第47回日本毒性学会学術年会 2020年6月29日～7月1日（オンライン）.

### (3) 「国民との科学・技術対話」の実施

#### 【サブテーマ1】

- 1) 広島大学総合科学部オープンラボ（2020年8月23日）  
高校生向けのバーチャル（オンライン）研究室見学を複数の研究室と合同で実施し、PM2.5の神経影響やその研究手法について説明した。
- 2) HPによる研究概要の発信  
PM2.5の神経影響を分かりやすく説明したHPを開設した。  
<https://www.biomed.hiroshima-u.ac.jp/ishihara/pm.html>
- 3) 高大連携講座（2022年8月4日）  
高校生向けの講義「環境中微粒子の実態と健康—今を理解して未来を考える—」を実施した。
- 4) 体験化学教室（2022年8月9日、10日）  
小学生向けの化学実験教室を2日間に渡って実施し、その中で大気汚染も含めて環境化学に関連する講義も行った。

### (4) マスコミ等への公表・報道等

#### 【サブテーマ1】

- 1) 日本経済新聞（2021年5月20日「大気に漂う微細プラ 健康への影響、本格調査へ」）
- 2) まるっと！サタデー（TBS）（2022年8月13日）  
マイクロプラスチックが血液中から検出されたとの海外からの報告を受けて、大気中微粒子の体内胴体について、神経系も含めて解説した。
- 3) THE TIME（TBS）（2022年8月15日）  
マイクロプラスチックが血液中から検出されたとの海外からの報告を受けて、大気中微粒子の体内胴体について、神経系も含めて解説した。
- 4) 日本経済新聞(2022年10月16日「微粒子の脅威 換気か遮断か」)
- 5) 広島大学よりプレスリリース（2023年3月2日「大気汚染による脳梗塞予後の悪化 —PM2.5の中枢神経系への影響を実験的に証明—」）

### (5) 本研究費の研究成果による受賞

#### 【サブテーマ1】

- 1) 第47回日本毒性学会学術年会 学生ポスター発表賞 田中 美樹、伊藤 康一、鍋谷 悠、石原 康宏. 大気中微粒子曝露マウスを用いた脳梗塞予後への影響の解析. 2020年6月30日.
- 2) 2021年度日本酸化ストレス学会 学術賞 石原 康宏. 主たる業績題目：グリア細胞による酸化ストレスの制御と病態. 2021年5月20日.

### (6) その他の成果発表

特に記載すべき事項はない。

## IV. 英文Abstract

**Effects of PM2.5 Exposure on Cerebral Circulation and Prognosis of Ischemic Stroke.**

Principal Investigator: Yasuhiro ISHIHARA

Institution: Hiroshima University, 1-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, JAPAN

Tel: +81-82-424-6529 / Fax: +81-82-424-0759

E-mail: ishiyasu@hiroshima-u.ac.jp

Cooperated by: Keio University, Tokushima Bunri University

[Abstract]

Key Words: PM2.5, ischemic stroke, edema, inflammation, microglia

It has recently become epidemiologically clear that exposure to PM2.5 exacerbates the prognosis of cerebral infarction. PM2.5 exposure has been reported to increase poststroke hospital stay by 2-5 days or increase mortality within 1 year after ischemic stroke. The purpose of this study was to clarify the effect of PM2.5 exposure on stroke prognosis from a toxicological point of view and to challenge the mechanistic insight. Because inflammation and edema are observed in the acute stage of cerebral infarction and because polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are known to induce inflammation, we focused on PAHs contained in PM2.5.

Nasal exposure of mice to Beijing air dust CRM28 activated microglia in the cerebral cortex, leading neuroinflammation. Neuroinflammation, edema and motor dysfunction after ischemic stroke was exacerbated by CRM28 exposure. Exposure to PM2.5 collected in Yokohama also exacerbated the prognosis of ischemic stroke. Exposure of aromatic hydrocarbon receptor (AhR) KO mice to CRM28 did not induce inflammation as well as motor dysfunction after ischemic stroke. Given that PAHs attached to CRM28 are associated with exacerbation of prognosis of ischemic stroke.

PM2.5 collected in Yokohama contained more endotoxin than that collected in Fukuoka. Exposure to PM2.5 collected in Yokohama exacerbated the prognosis of ischemic stroke, while exposure to PM2.5 collected in Fukuoka did not. When Yokohama PM2.5 was mixed with an endotoxin-neutralizing reagent, polymyxin B, the aggravation of the prognosis observed with Yokohama PM2.5 exposure was greatly suppressed. Therefore, endotoxin contained in PM2.5 is also considered to be involved in worsening the prognosis of ischemic stroke as similar to PAHs.

Collectively, PM2.5 exposure causes neuroinflammation and aggravates the prognosis of ischemic stroke. We identified PAHs and endotoxins in PM2.5 as aggravating factors. It is known that the PAH concentration in PM2.5 has seasonality, and in addition, this study revealed that the endotoxin concentration in PM2.5 has regional characteristics. To evaluate the neurological effects of PM2.5, it is necessary to consider the PAHs and endotoxin contents in PM2.5; the regional and seasonal characteristics of PM2.5 can determine the neuronal health impact.