

課題番号: 5-2007



Keio University



# PM2.5の脳循環および脳梗塞予後に及ぼす影響の解析

研究代表者 石原 康宏(広島大学)  
研究分担者 奥田 知明(慶應義塾大学)  
研究分担者 伊藤 康一(徳島文理大学)  
研究分担者 大黒 亜美(広島大学, 2022年3月まで)

## 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

## 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

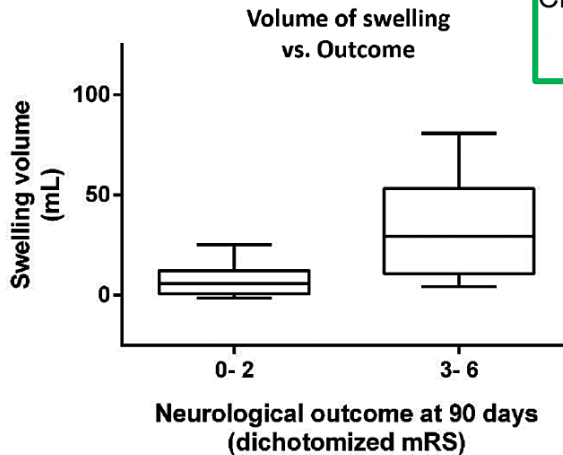
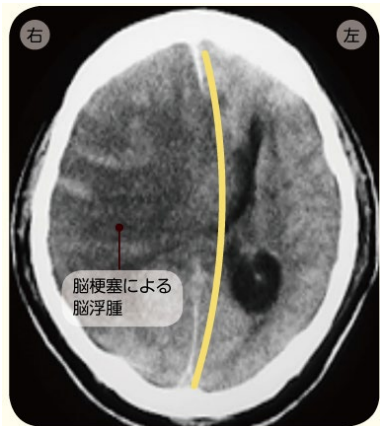
# 脳梗塞の予後を決定する脳循環障害(浮腫)

脳梗塞: 脳の血管が詰まり、血液の供給ができなくなる(虚血)疾患

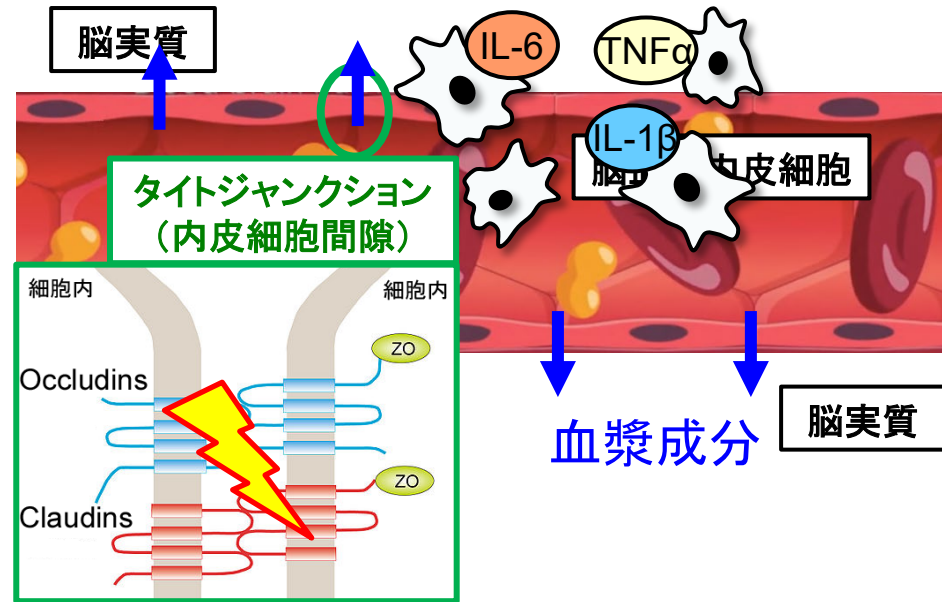
- ・ 本邦の死因第3位  
(脳血管疾患, H29 厚生労働省11万人)
- ・ 寝たきりになる原因第1位
- ・ 年間総医療費 1兆8,000億円  
(H26 厚生労働省)

## 脳浮腫が脳梗塞の予後を決める

脳浮腫: 血液脳関門の障害により、  
脳実質に水分が貯留する

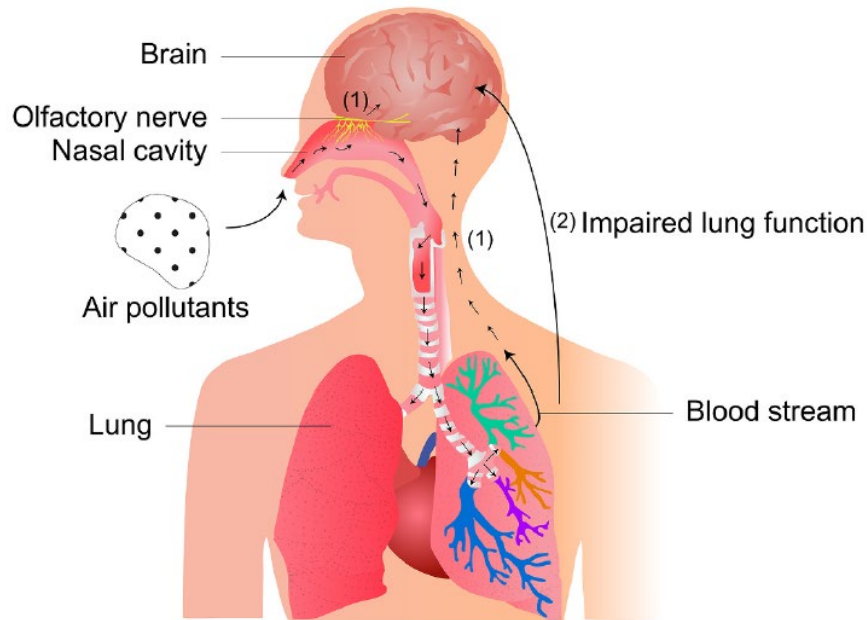


## なぜ浮腫が起こるのか: 炎症仮説



1. 炎症性細胞の集簇  
(**ミクログリア**、マクロファージ)
2. 炎症性サイトカインを放出
3. タイトジャンクション機能が低下
4. 血漿成分が脳実質に漏出

# 吸入した微粒子が脳に影響する



(1) 嗅神経を介して脳に移行、または、肺の気液バリアを透過して血液中に移行し、さらに、血液脳関門を透過して脳に移行（超微小粒子のみ可能な経路）

(2) 微粒子により呼吸器が障害され、血液中の酸素濃度低下、炎症、酸化ストレスなどにより、微小血管の透過性が変化し、炎症関連物質が脳に到達する

Environ Res 201;111533, 2021.

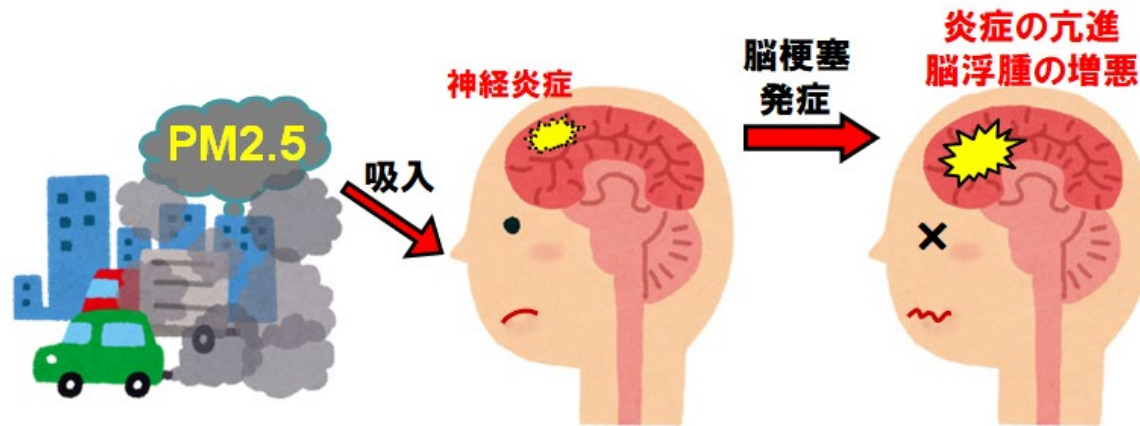
- PM2.5 曝露により、**脳梗塞後の入院日数が 2-5 日延びる** (278,980例, 中国, Stroke 48:2052, 2017)
- PM1 や PM2.5 への曝露は、**脳梗塞発症後 1 年以内の致死率を増加させる** (12,291例, 中国, Stroke 50:563, 2019)
- 緑地に囲まれている地域では脳梗塞の重篤度(NIHSS)が軽減し、交通量が多い地域では重症化する** (2,761例, スペイン, Environ Res 179:108725, 2019)



# 本研究の仮説と目的

## 仮説

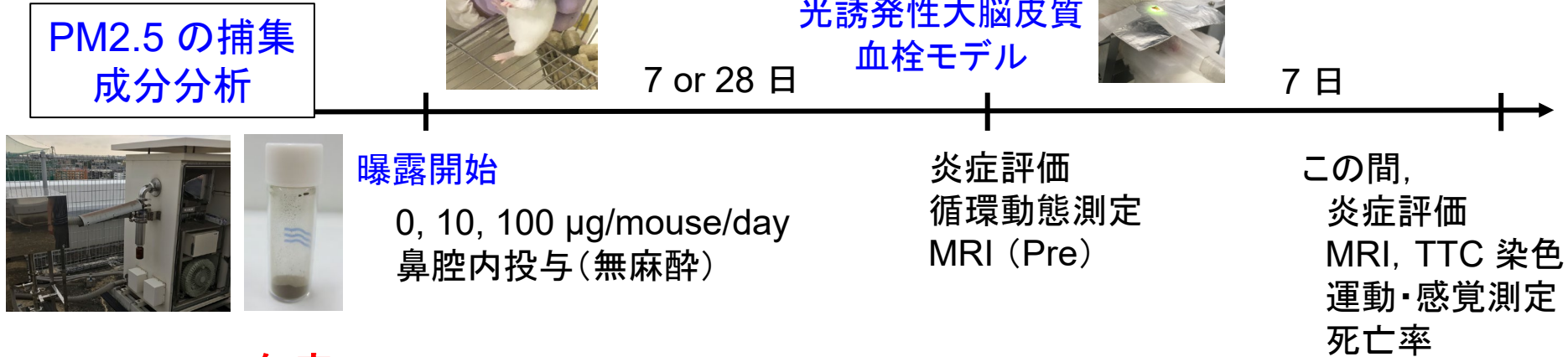
1. PM2.5 は**神経系に炎症を誘導し、脳梗塞の予後を悪化させる**
2. PM2.5 の作用には、**季節性や地域性**がある



**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
- ・ 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

# 研究計画



## 2020年度

- ① PM2.5 の採取と成分分析
- ② PM2.5 曝露による炎症状態と循環動態の変化
- ③ PM2.5 曝露の脳循環への影響

## 2021年度

- ① PM2.5 の採取と成分分析
- ② PM2.5 曝露の脳循環と脳梗塞予後への影響
- ③ PM2.5 曝露量、成分と脳梗塞予後の関係の考察

## 2022年度

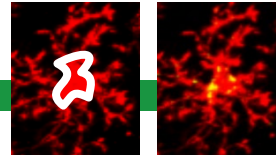
- ① PM2.5 の採取と成分分析
- ② PM2.5 に含まれる多環芳香族炭化水素と神経炎症の関連  
芳香族炭化水素受容体 KO マウス
- ③ PM2.5 の嗅神経系への影響の解析

# 大気中微粒子経鼻曝露の 脳梗塞予後への影響

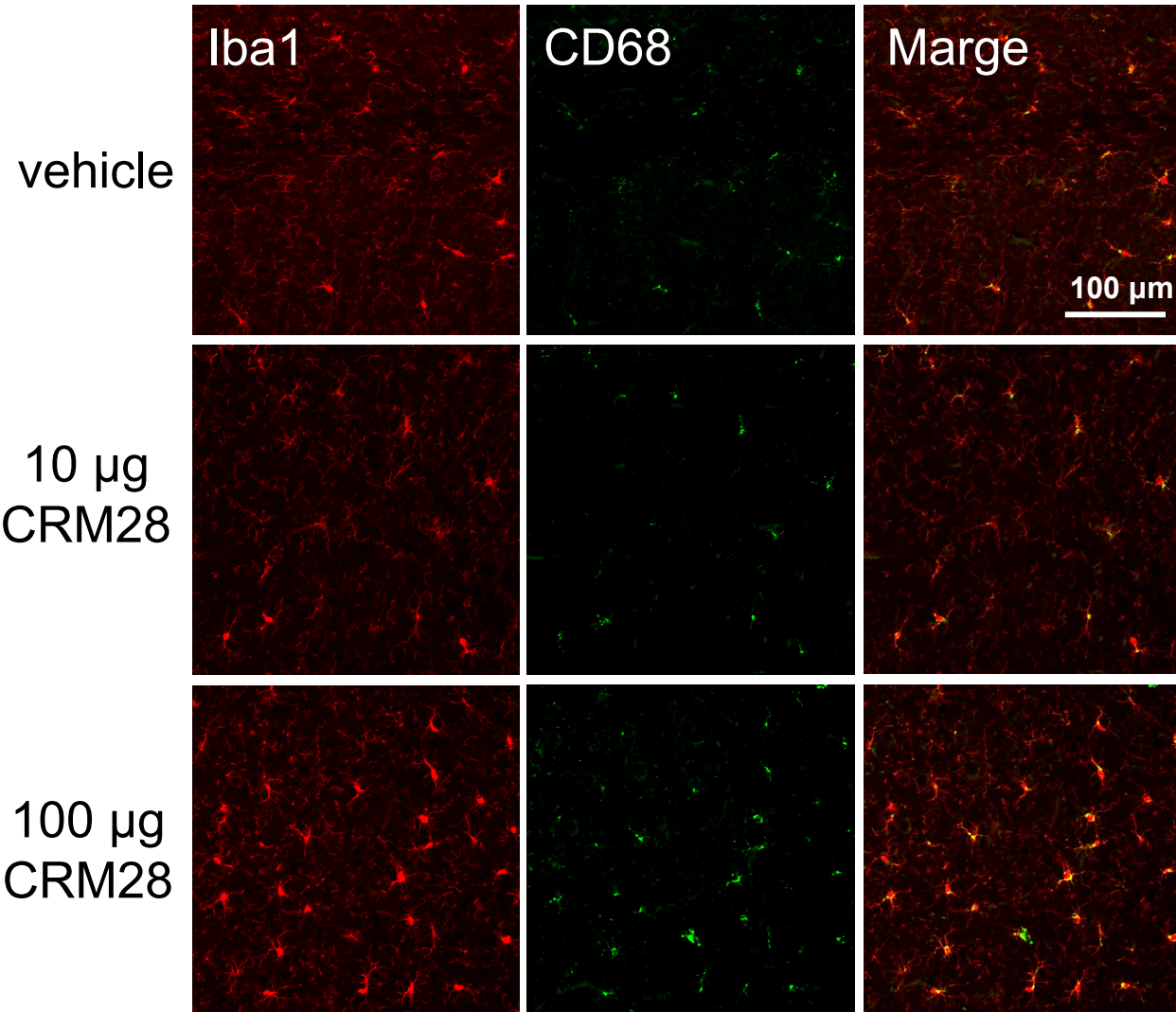
---



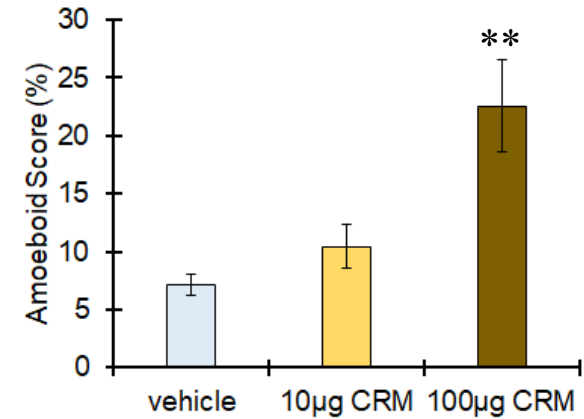
# CRM28 短期曝露による神経炎症



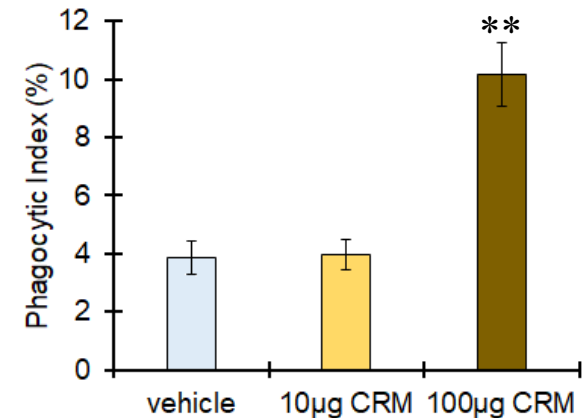
## CRM28 7日間曝露後の大脳皮質組織染色



Ameboid score (%)  
= (cell body / whole cell) x 100



Phagocytic Index (%)  
= (CD68 area / whole cell) x 100



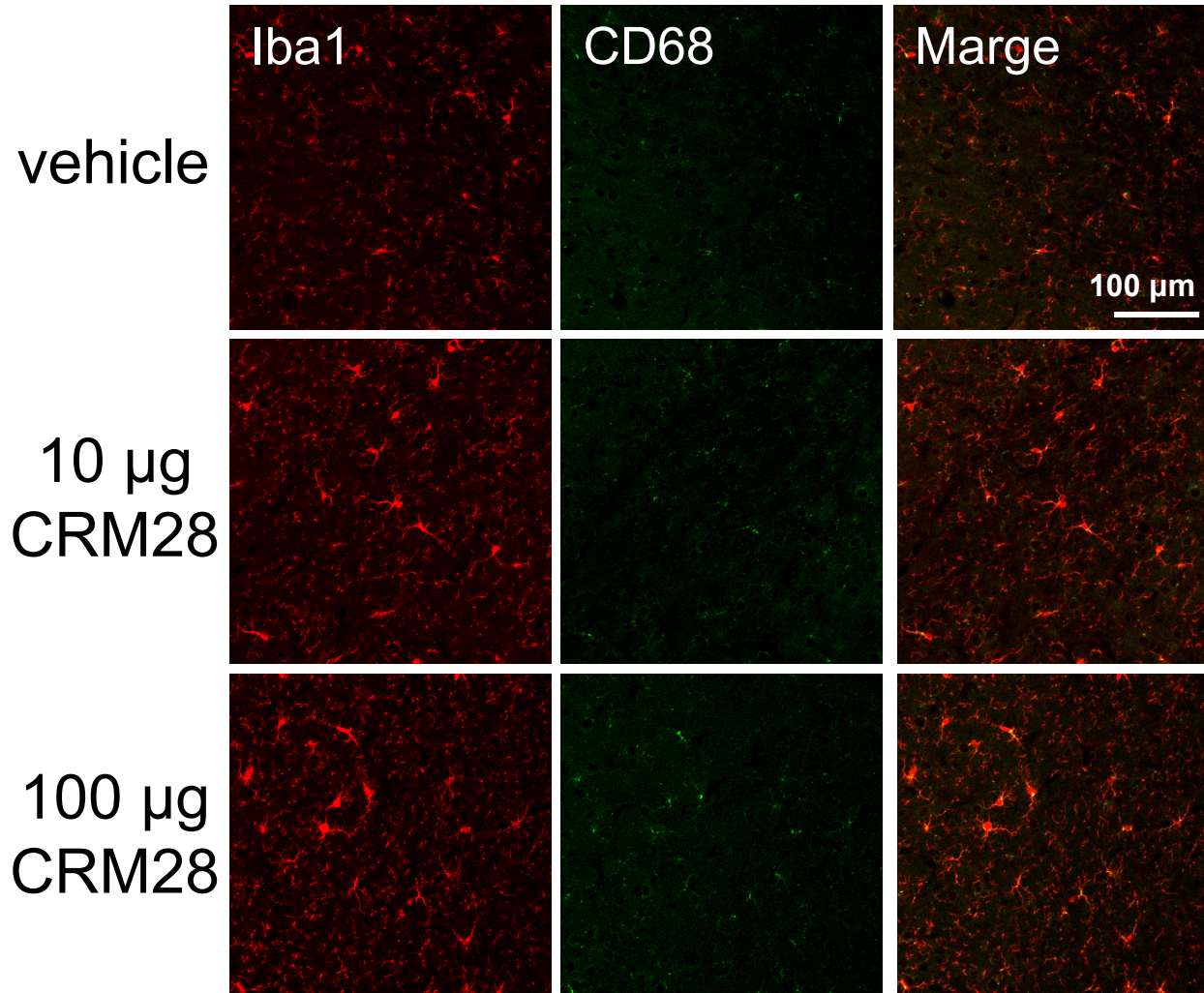
Dunnett's test, \*\*P < 0.01 vs. vehicle

100 μg/day CRM28 7日間曝露により、大脳皮質でミクログリアが活性化した

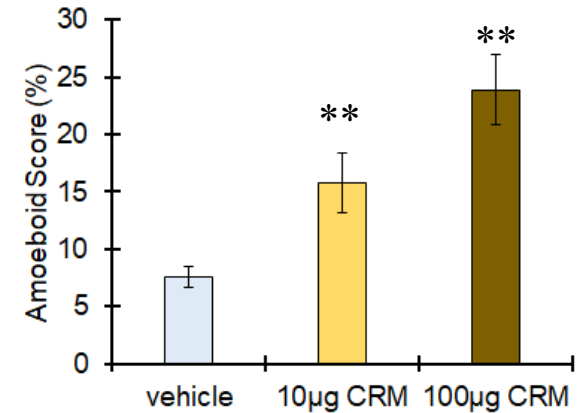


# CRM28 長期曝露による神経炎症

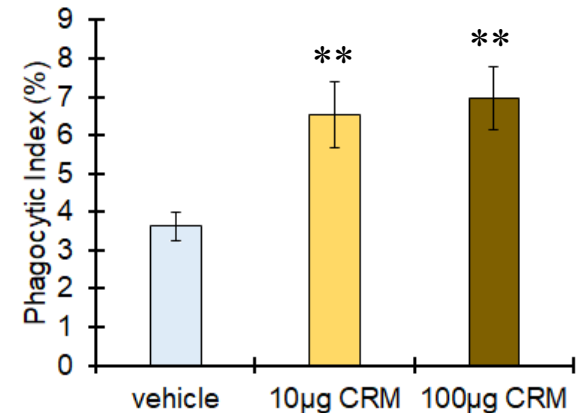
## CRM28 28日間曝露後の大脳皮質組織染色



Ameboid score (%)  
 $= (\text{cell body} / \text{whole cell}) \times 100$



Phagocytic Index (%)  
 $= (\text{CD68 area} / \text{whole cell}) \times 100$



CRM28 長期(28日)曝露により、大脳皮質でミクログリアが活性化した

Dunnett's test, \*\*P < 0.01 vs. vehicle



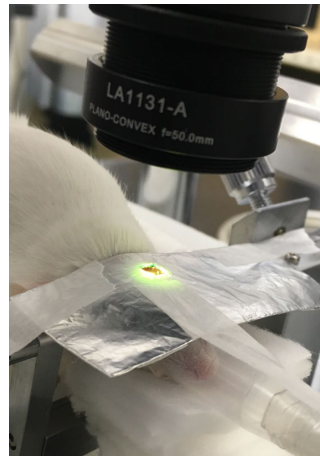
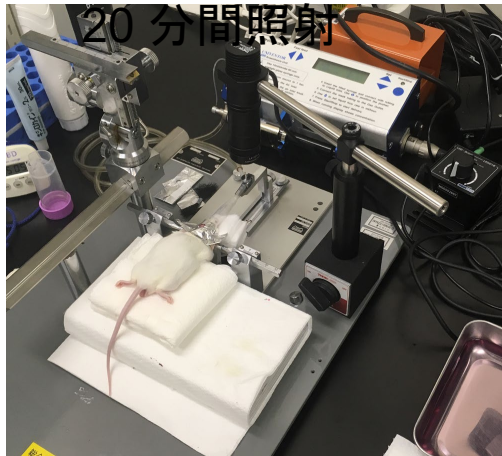
# 虚血モデルの作製と検証

## 脳梗塞モデルマウス

: 光誘発性大脳皮質血栓モデル

1. 50 mg/kg ローズベンガル in saline, i.p.
2. 565 nm LED light (170 mW) を左側体性感覚野、運動野領域 8mm x 8mm に

20 分間照射



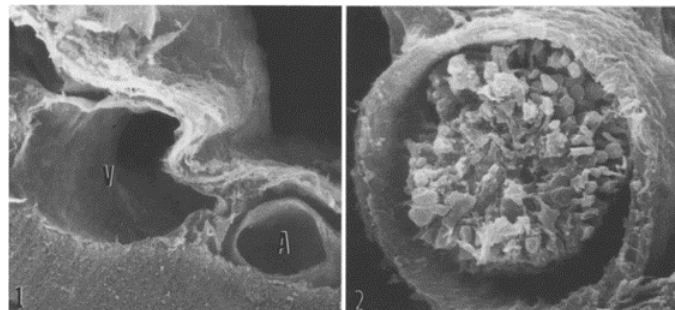
## レーザードップラー血流計

光が運動する物体に照射された場合、物体の移動速度に応じて散乱光の周波数が変化(ドップラー効果)  
→ 赤血球による散乱を利用



半導体レーザー発振  
& フォトダイオード

接触型プローブ

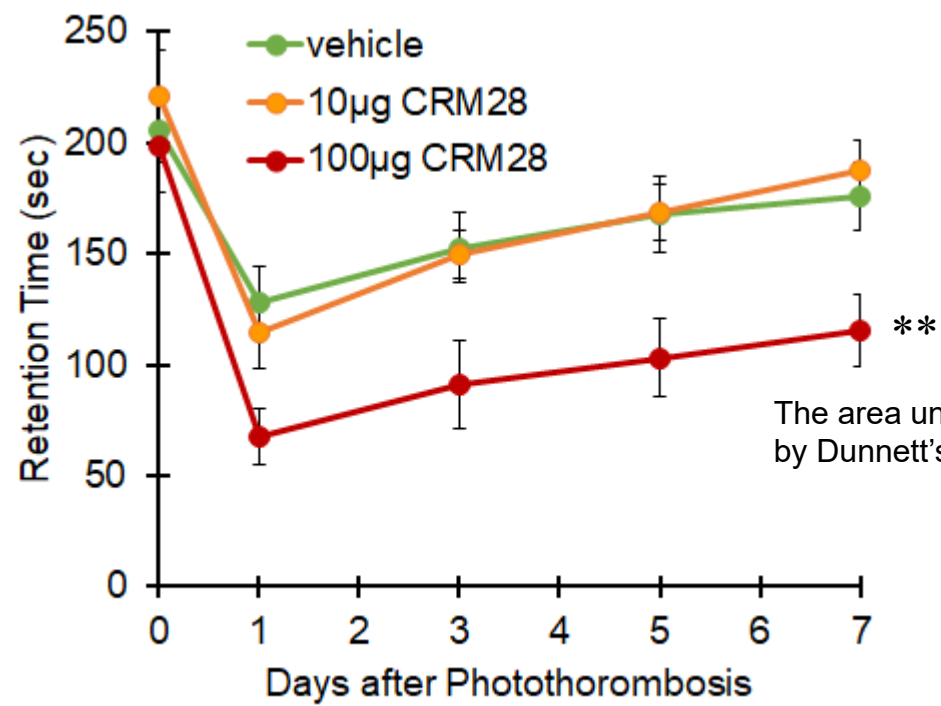
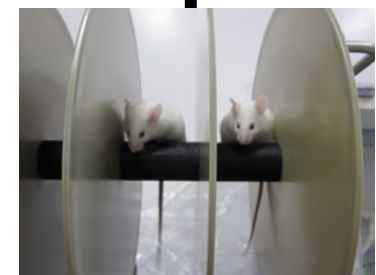
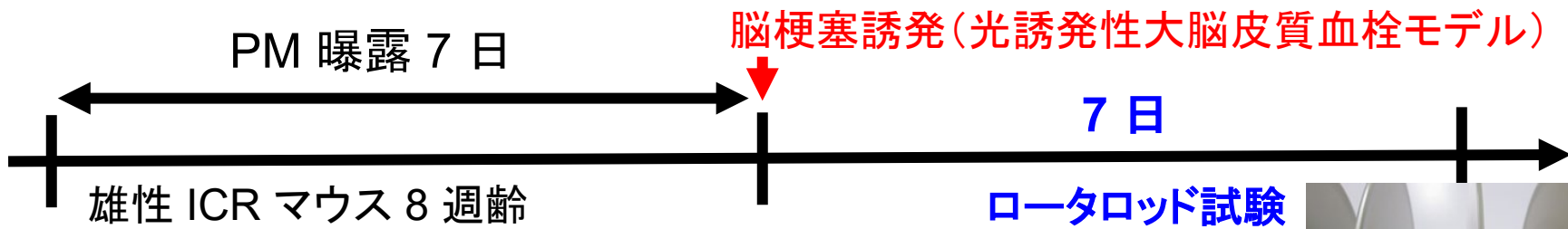


Acta Neuropathol  
72:315, 1987.

照射前後で 70 - 85 % 血流が  
減少した個体のみを使用

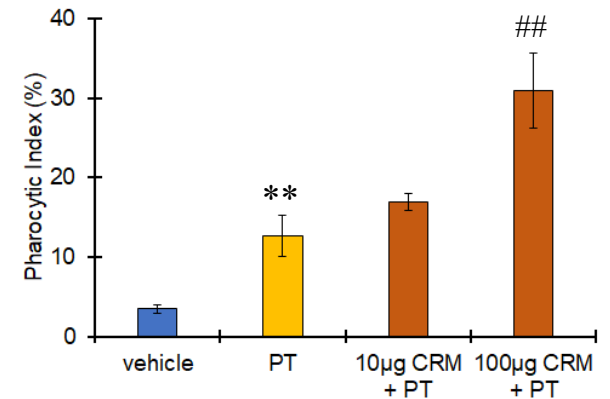
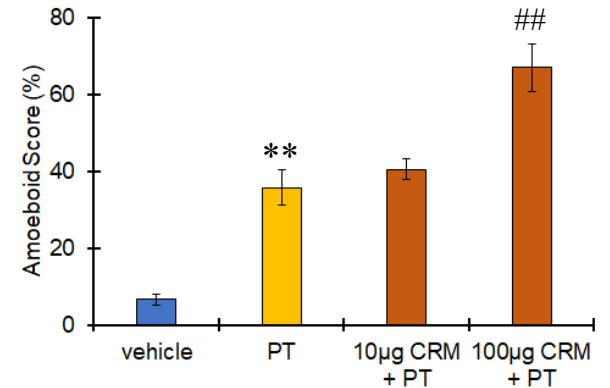
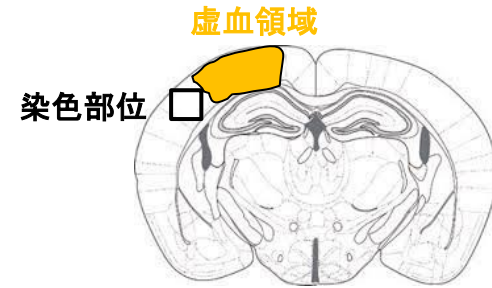
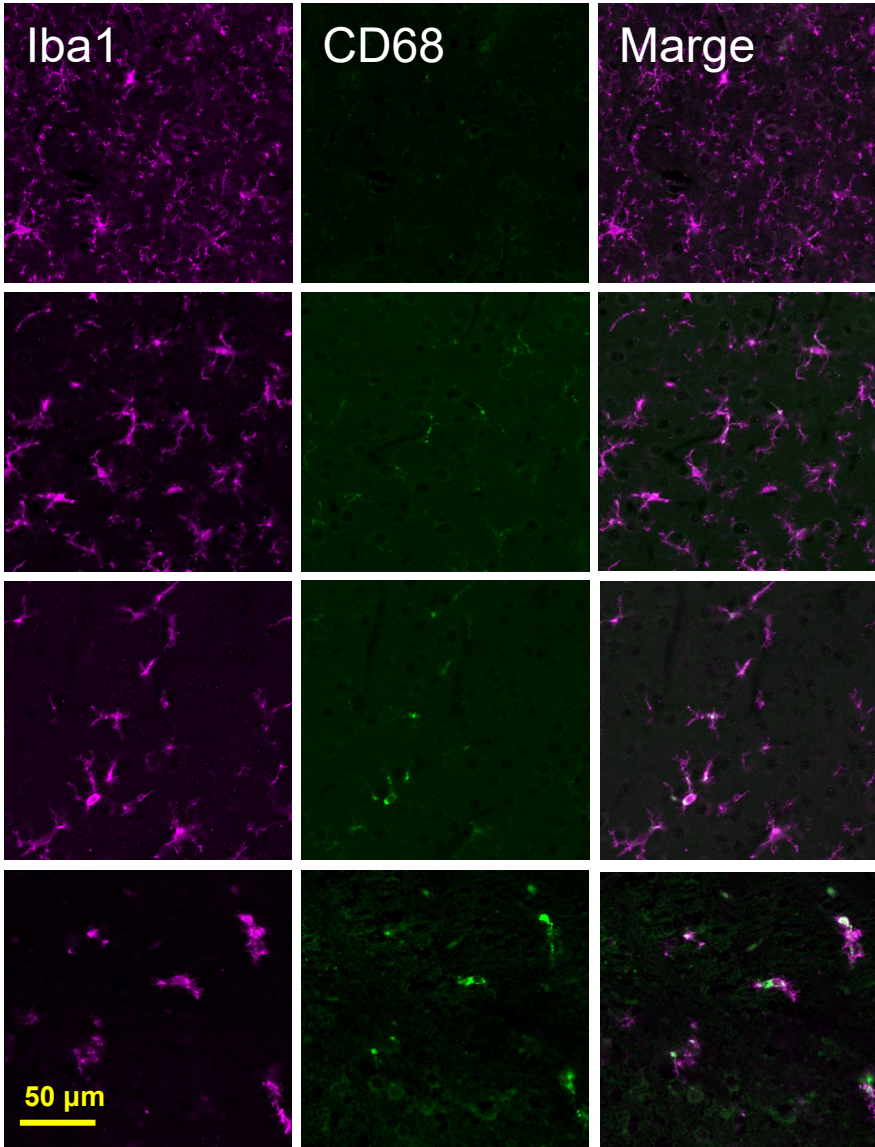
平均血流減少率:  $79.5 \pm 2.6 \%$

# CRM28 曝露の脳梗塞後運動機能に及ぼす影響



CRM28 7日間曝露により、脳梗塞後の運動機能が悪化した

# CRM28 7日間曝露の脳梗塞後炎症への影響

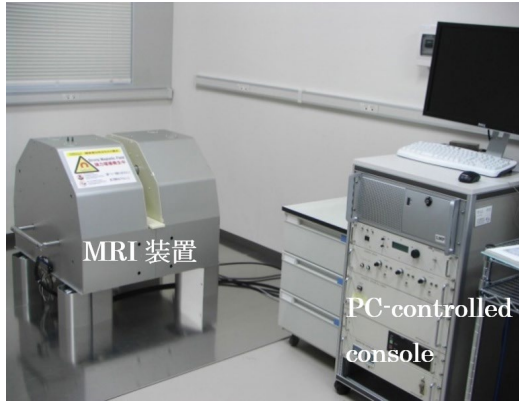


Student's t test, \*\*P < 0.01 vs. vehicle, ##P < 0.01 vs. PT group

CRM28 7日間曝露により、脳梗塞後の神経炎症が悪化した

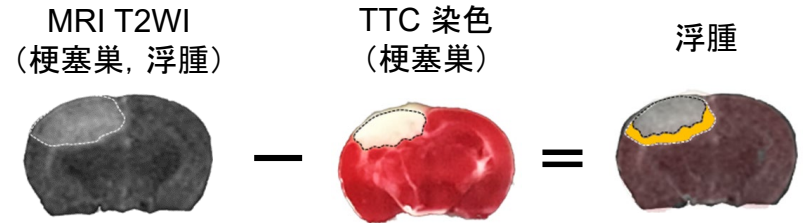


# CRM28 曝露の虚血性浮腫に及ぼす影響

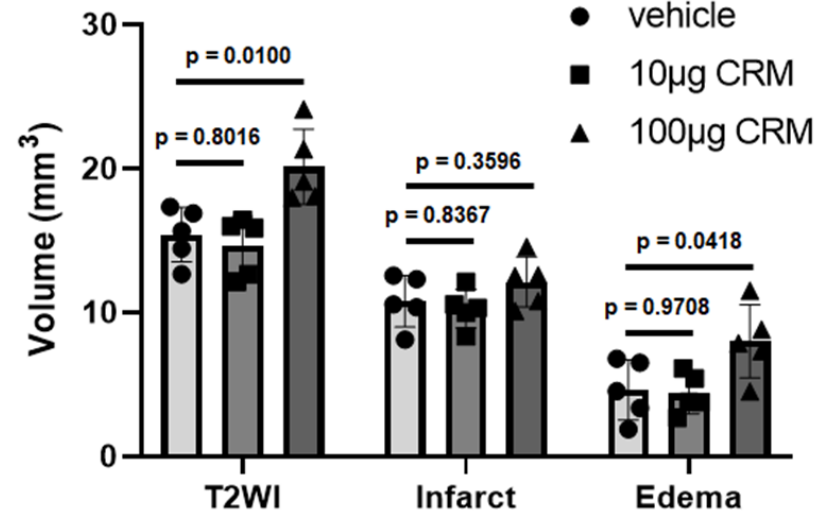
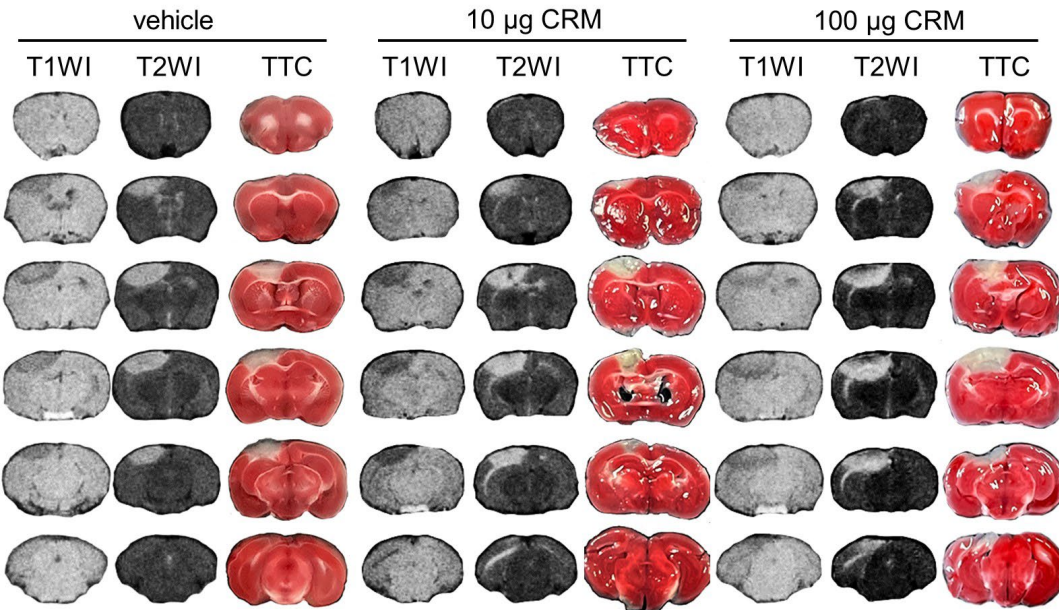


T2 強調画像 (T2WI) : 滞留する水を高信号で描出  
 → 梗塞巣と浮腫が高信号となる

TTC 染色 : 生細胞を赤、死細胞を白に描出  
 → 梗塞巣が白色となる



## 虚血 24 時間後



CRM28 7日間曝露により、脳梗塞後の浮腫が亢進した

Dunnett's multiple comparisons test



# 大気中微粒子成分と 神経炎症、脳梗塞予後

---



# PM2.5 の成分の炎症誘発能

微粒子に含まれる炎症誘発性物質：

多環芳香族炭化水素 (PAHs)、重金属類、エンドトキシンなど

**PAHs** は、

石炭の燃焼により発生、石油製品に含有

大気中濃度は『冬季＞夏期』

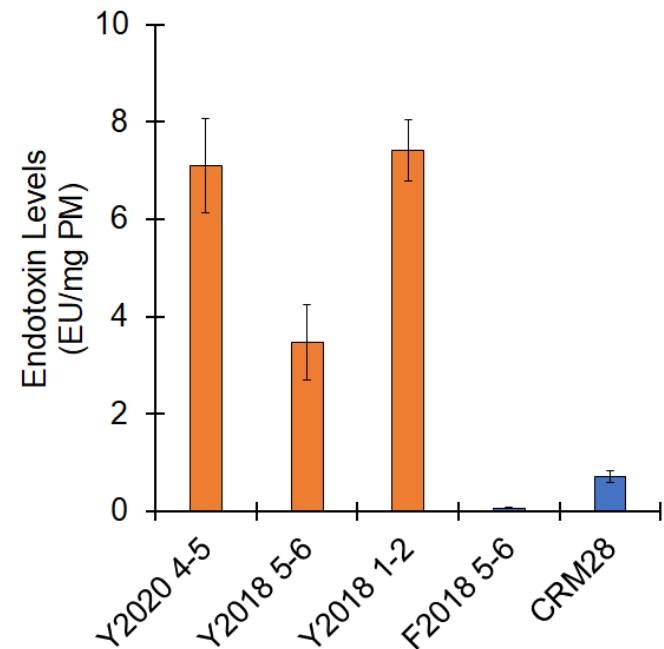
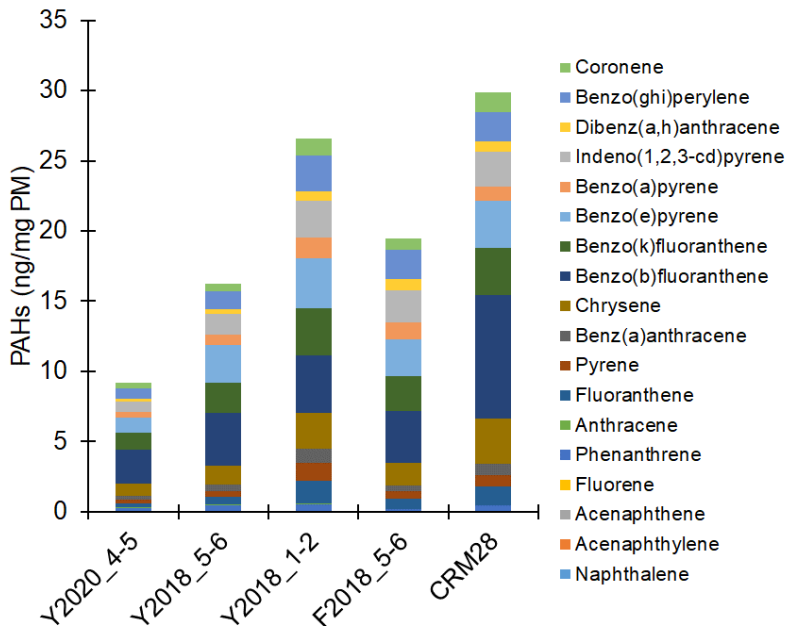
芳香族炭化水素受容体 (AhR) を介した炎症反応

**エンドトキシン** は、

グラム陰性菌の細胞壁成分

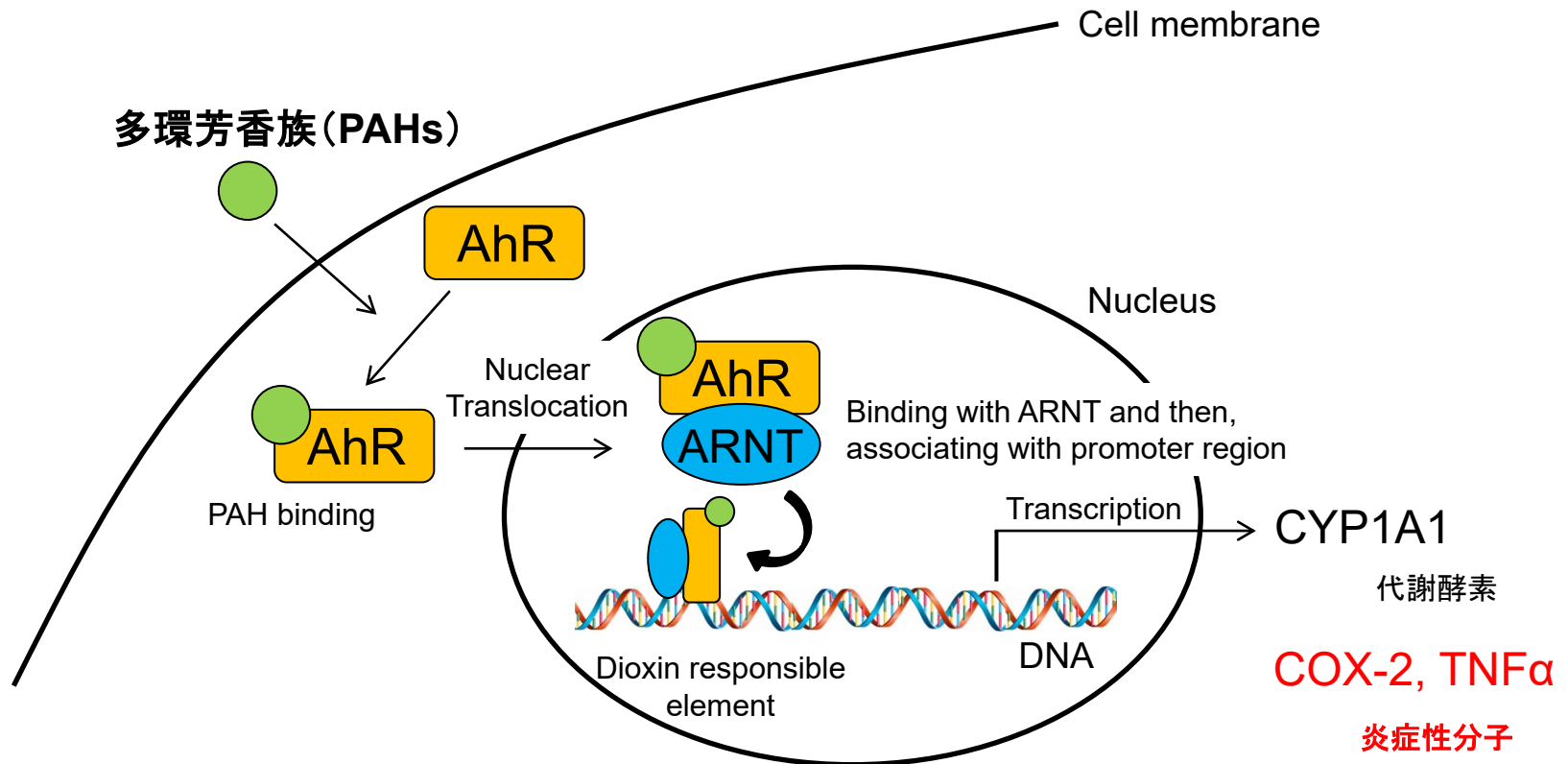
季節性、地域性は不明

Toll 様受容体 4 (TLR4) を介した炎症反応

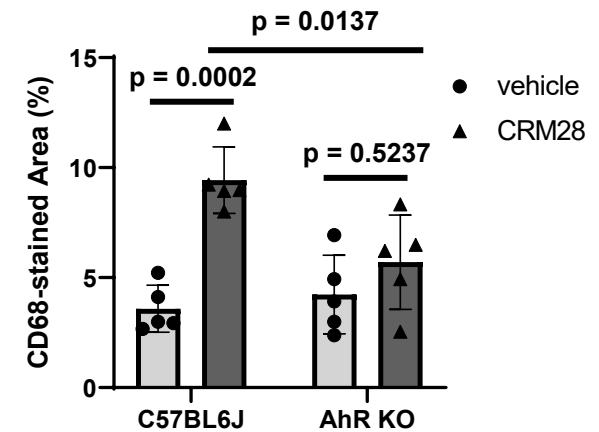
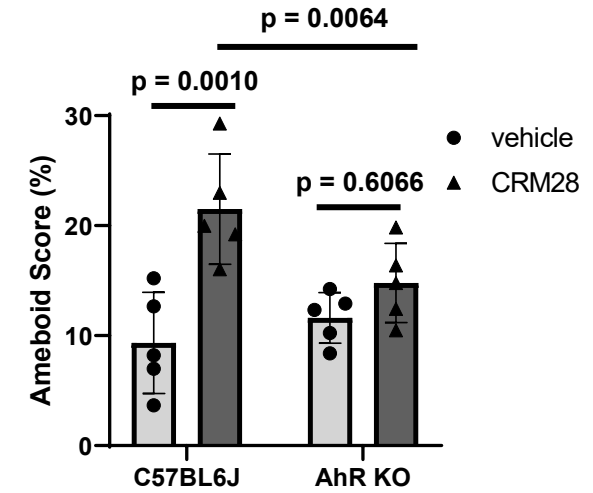
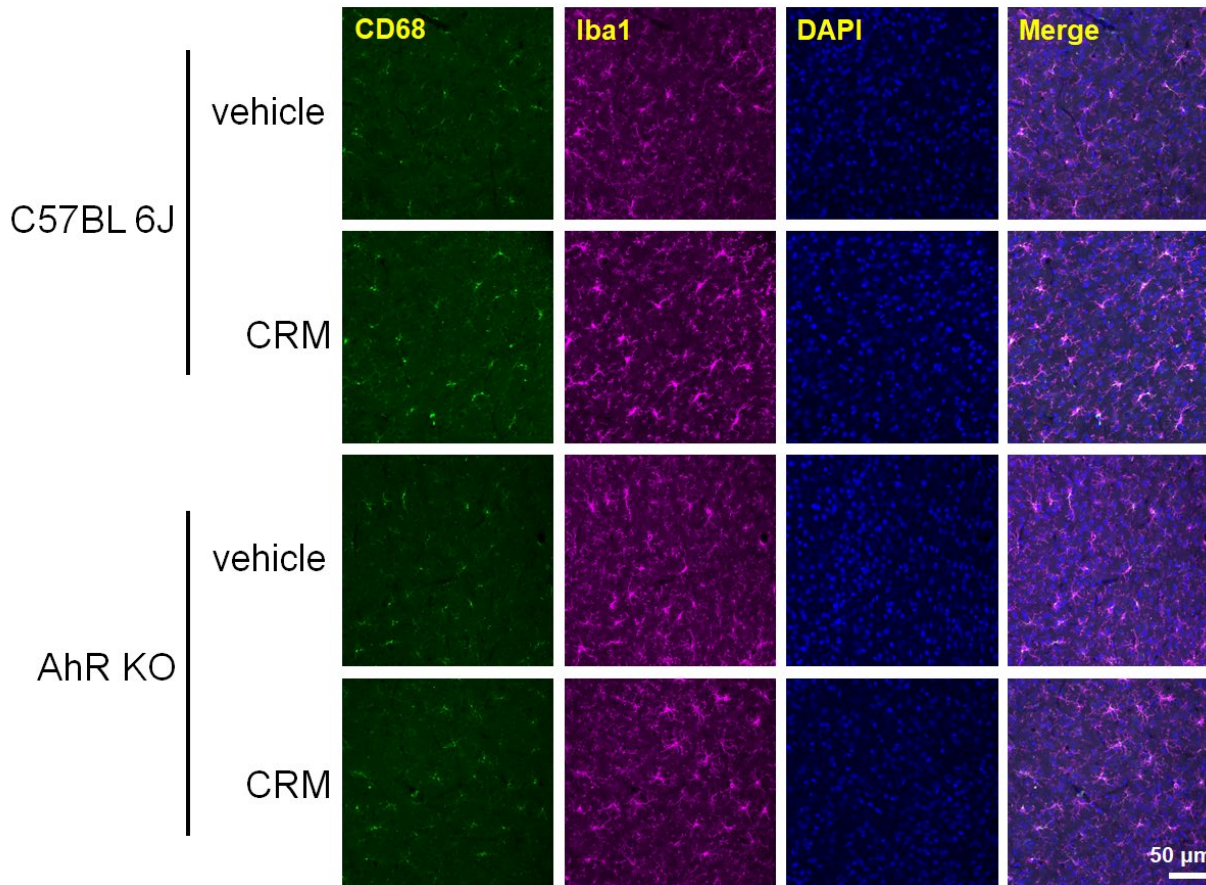
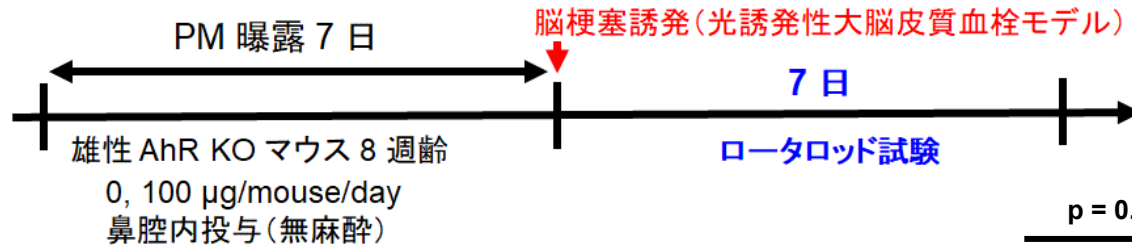


# 芳香族炭化水素受容体 (AhR) シグナル

AhR: Aryl Hydrocarbon Receptor

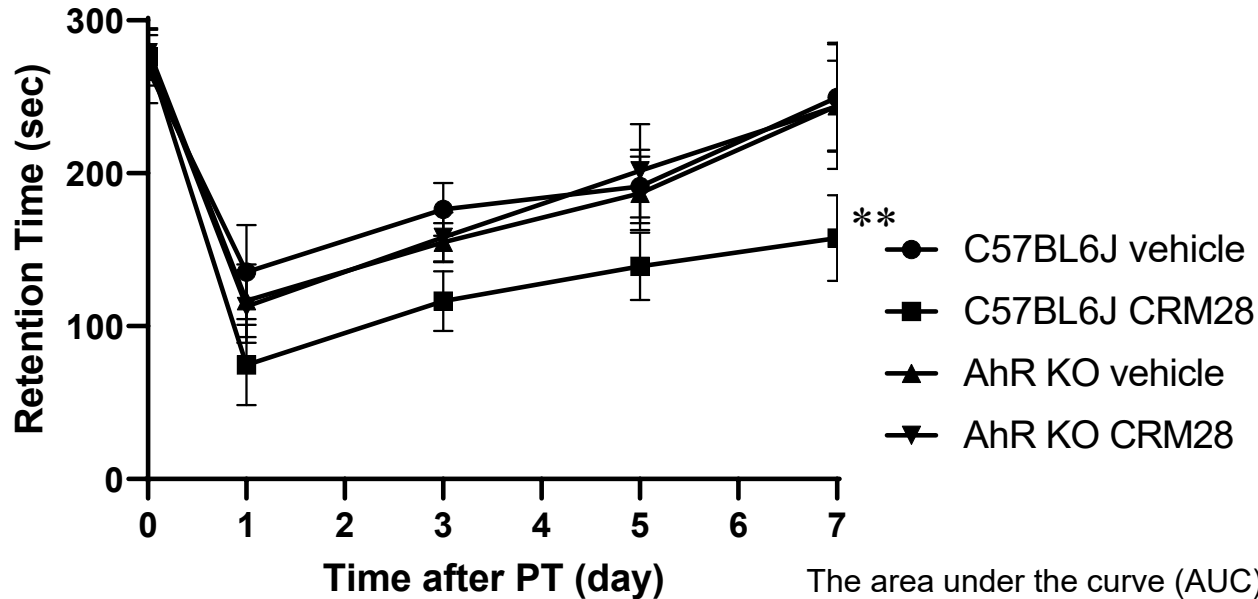
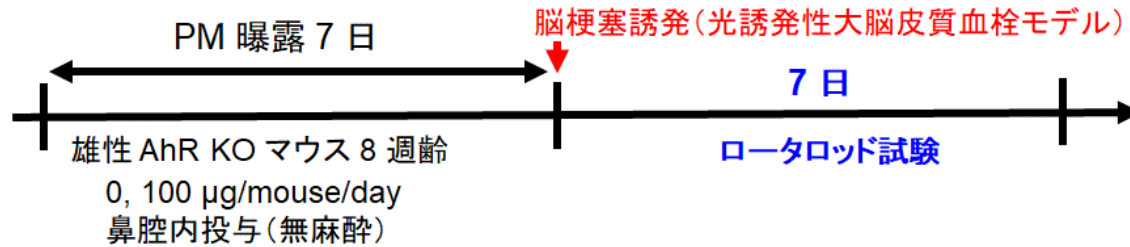


# AhR KO マウスにおける神経炎症の減弱





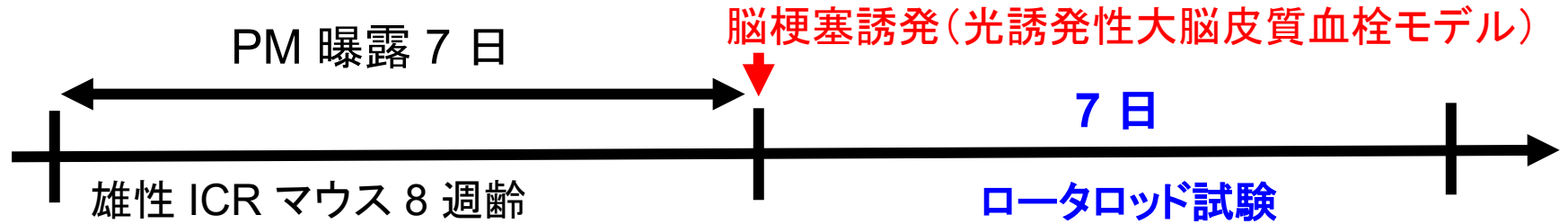
# AhR KO による脳梗塞予後の改善



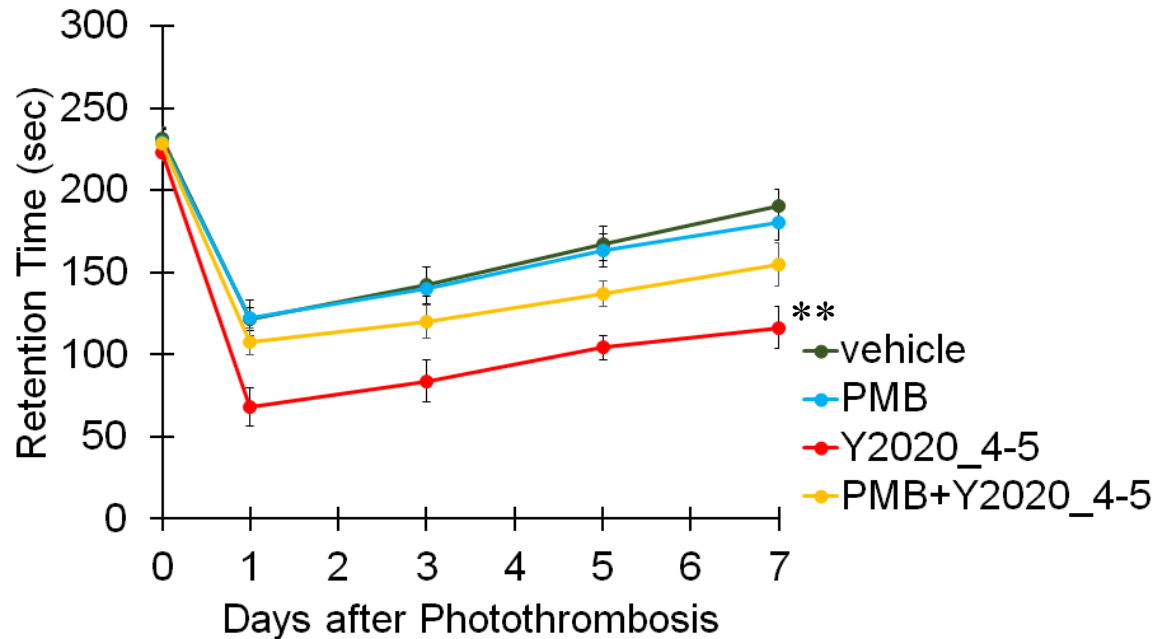
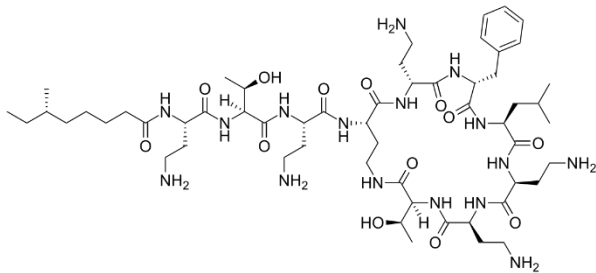
The area under the curve (AUC) was analyzed by Tukey's corrected multiple comparison test.

CRM28 に含まれる PAHs は、神経炎症と脳梗塞予後の悪化に関与する

# ポリミキシン B を用いたエンドトキシン作用の検討

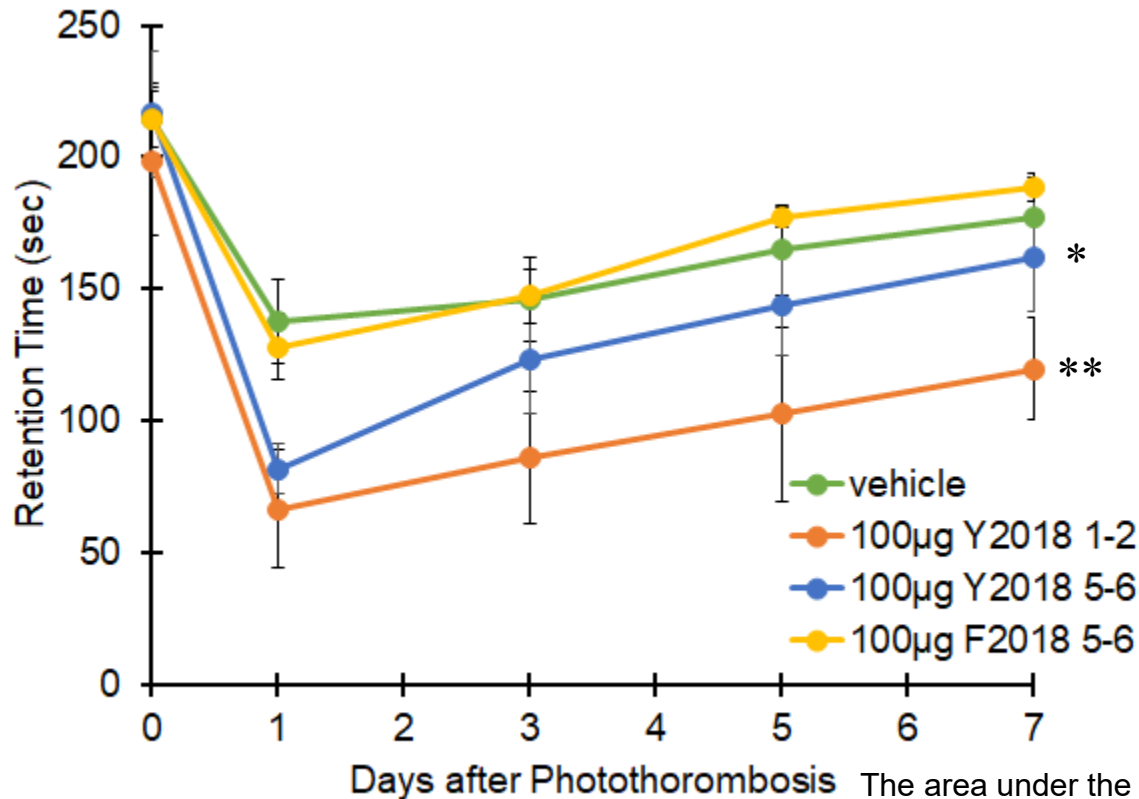
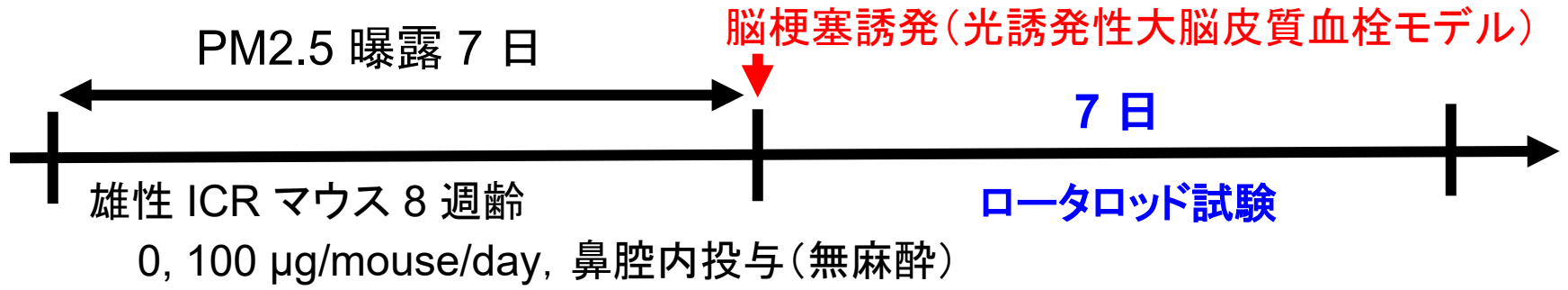


ポリミキシン B: エンドトキシンと結合し、  
その作用を中和する



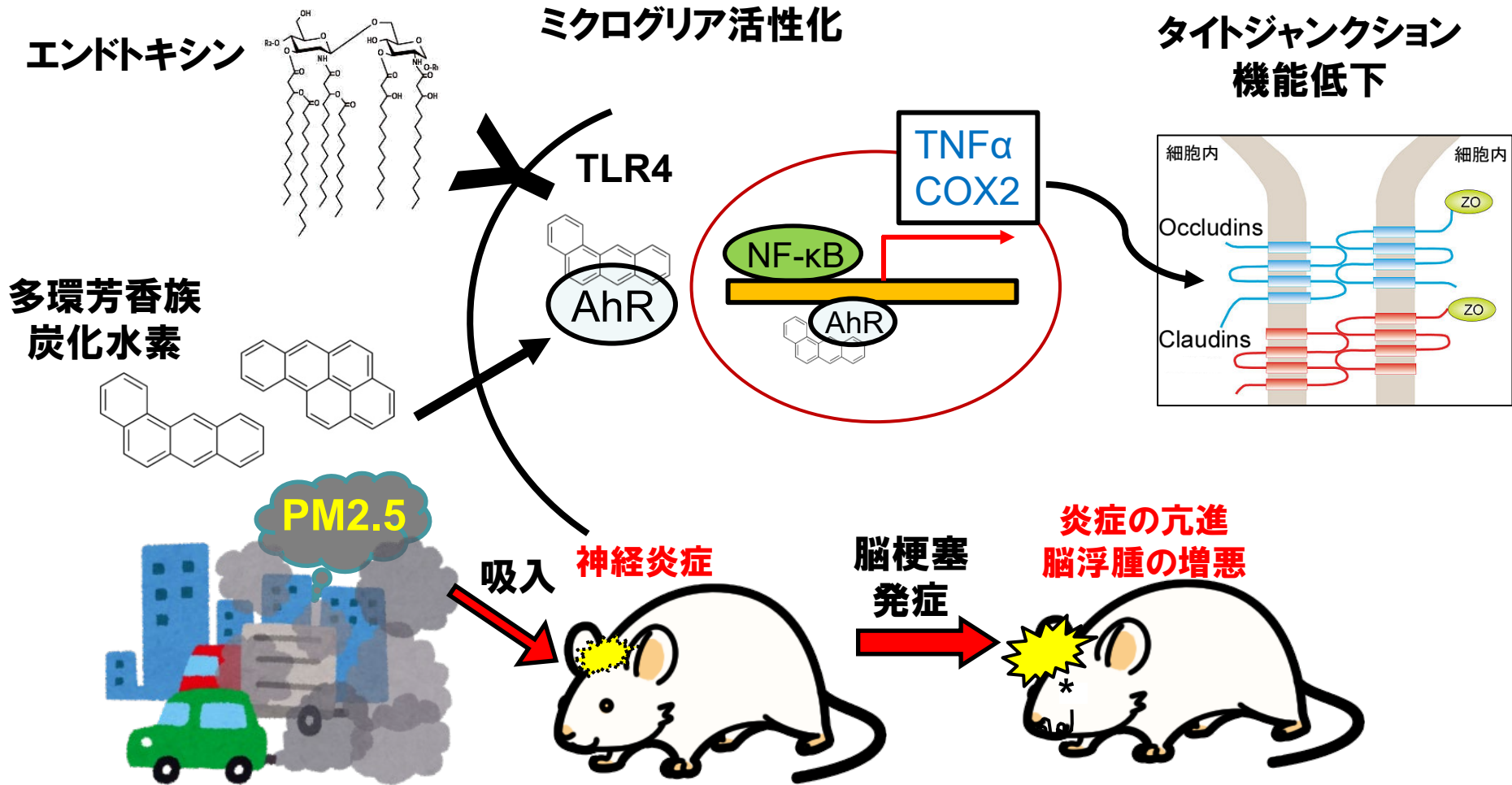
The area under the curve (AUC) was analyzed by Tukey's corrected multiple comparison test.

# 横浜と福岡 PM2.5 の脳梗塞予後への影響



The area under the curve (AUC) was analyzed by Dunnett's multiple comparisons test.

# PM2.5 の推定作用機序



1. PM2.5 に含まれる PAHs はAhR に作用して神経炎症を引き起こす
2. PM2.5 に含まれるエンドトキシンは TLR4 に作用して神経炎症を引き起こす
3. PM2.5 による炎症が虚血性の炎症と相加的に作用し、運動機能障害を増悪する



# 環境政策への貢献

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)

「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。」

米国環境保護庁評価書(Integrated Science Assessment for Particulate Matter)  
(令和元年)

「The limited assessment of copollutant confounding introduces some uncertainty in interpreting the epidemiologic studies, but this uncertainty is addressed, in part, by the direct evidence of effects provided by experimental animal studies.」

## 1. PM2.5 環境基準再評価のための神経影響に係る知見

## 2. 疫学研究を支持する毒性学的知見とメカニズム

PM2.5 による脳梗塞予後の増悪: Stroke 50:563,2019; Stroke 48:2052,2017 など

## 3. 大気中エンドトキシンの地域性と脳梗塞予後への寄与

# 研究目標の達成状況

## 2020年度

- ① PM2.5の採取と成分分析 → 測定済
- ② PM2.5曝露による炎症状態と循環動態の変化  
→ 神経炎症を誘導, 循環動態は変化がない(長期曝露は心筋障害の可能性)
- ③ PM2.5曝露の脳循環への影響  
→ 脳浮腫に影響しない

## 2021年度

- ① PM2.5の採取と成分分析 → 測定済
- ② PM2.5曝露の脳循環と脳梗塞予後への影響  
→ 神経炎症、脳浮腫、脳梗塞後の運動機能障害が悪化  
(長期曝露により脳梗塞後の致死率が上昇)
- ③ PM2.5曝露量、成分と脳梗塞予後の関係の考察  
→ PAH および エンドトキシンが神経炎症および脳梗塞予後のリスクとなる

## 2022年度

- ① PM2.5の採取と成分分析 → 測定済
- 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  
→ AhR KO マウスにおいて神経炎症が抑制され予後が改善する
- ③ PM2.5の嗅神経系への影響の解析  
→ 嗅細胞の脱分極が抑制される

# 研究目標の達成状況

## 「目標を上回る成果をあげた」

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。
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。
3. PAHsに加えてPM2.5に含まれる**エンドキシン**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**エンドキシン**濃度に因る可能性を提示した。
4. 横浜、福岡に加えて、呉、東広島でPM2.5を採取し、**エンドキシンの地域性**を示した。

# 研究成果の発表状況

## 査読付国際誌発表

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)(広島大学より海外、国内にプレスリリース)
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. **Ishihara Y**, **Itoh K**. Microglial inflammatory reaction regulated by oxidative stress. *J Clin Biochem Nutr.* 72(1): 23-27 (2023). (IF=3.179)

## 受賞

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. 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