

PDGF は重要な役割をしていることが示唆される。

まとめ(非アレルギー性気道炎症)

アレルギーを投与せず、DEP の気管内投与あるいは DE 吸入のみの実験による気道での炎症反応に関する報告をまとめた。F-344 系ラットでは $3.5\text{mg}/\text{m}^3$ の DE 吸入で、好酸球浸潤を誘発する LTB₄ やプロスタグランジンの増加が起こり、B6C3F₁ 系マウスでは好酸球の浸潤が報告されている。一方、Wistar 系ラットでは $3.1\text{mg}/\text{m}^3$ の DE の 24 ヶ月間の吸入でも好酸球浸潤は認められていない。また、ICR 系マウスでは $3.0\text{mg}/\text{m}^3$ でも好酸球の浸潤や粘液産生細胞の増生などは全く認められておらず、ラットとマウスとも系統の違いによって影響は異なることが報告されている。

一方、DEP の気管内投与では、ICR 系マウスに毎週 1 回ずつ、1 匹当たり 0.1mg の DEP を 10 回以上繰り返し投与することで気道粘膜下への好酸球の浸潤や粘液産生細胞の増生、あるいは気道過敏性などが有意に増加したことが報告されている。これらの病態は活性酸素消去酵素や NOS 阻害剤等の投与で消失したことから、その病態の発現には O_2^- 、NO、ONOO⁻ 等の活性酸素種の関与が示唆されている。また、DEP 投与により起きるリモデリングの過程に血小板由来増殖因子が関与していることが示唆されている。

3.2.3.3.3. アレルギー性気道炎症

3.2.3.3.3.1. 喘息

アレルギー性喘息様病態には即時型あるいは遅発型アレルギー反応、気道過敏性の亢進(気道平滑筋の収縮)、抗原特異的抗体産生の亢進、好酸球の浸潤、杯細胞の増生などがある。ヒトにおいては非アレルギー性の喘息も知られている。ヒトの喘息様病態全てを再現できる動物モデルはない。実験動物を使い、DEP の気管内投与あるいは DE 曝露がアレルギー性喘息様病態に及ぼす影響に関する報告を表 3-18 にまとめた。

(1) DEP の気管内投与による研究:

Takano ら(1997) は ICR 系雄マウスに 0.1mg の DEP を懸濁溶液として 1 週間に 1 回ずつ 16 週間にわたって気管内投与し、さらにこの間 3 週間ごとに卵白アルブミン(OA) $1\mu\text{g}$ を気管内投与した実験を行っている。その結果、OA+DEP 群のマウスの気道粘膜下への好酸球浸潤は対照(vehicle)群の 330 倍、OA 単独投与群の 7 倍、DEP 単独投与群より 35 倍増加していた。気道上皮の粘液産生細胞(杯細胞)の増生も各々 42 倍、13 倍、3.3 倍に増加していた。リンパ球浸潤は好酸球浸潤と類似の変化であった。また、好酸球浸潤を誘導したり、好酸球を活性化するサイトカインである IL-5 は OA+DEP 群でのみ対照群の 8 倍に増加し、他の群では対照群と全く変りがなかった。IL-5 産生は Th2 リンパ球に由来することが免疫染色法で確かめられている。GM-CSF も OA+DEP 群で若干増加していた。一方、このとき IL-4 と IgE 値は全く変化していなかったが、IgG1 抗体価が 8 倍以上に増加していた。これらの結果から、顕著な好酸球浸潤を伴う気道炎症は Th2 リンパ球に由来する IL-5 や GM-CSF によって誘導され、さらには IgG1 が好酸球に作用したり結合して、好酸球を活性化する

表 3-18 アレルギー性喘息様病態の発現に関する研究

粒子濃度	曝露期間	動物種	影 響	出 典
0.1 mg の DEP を毎週気管内投与 (it)(1 μ g OA も 3 週間に 1 回ずつ it)	1 回/週, 6 週間	ICR 系雄マウス	OA+DEP 群の気道への好酸球浸潤は OA 群の 7 倍増, 杯細胞増生は 14 倍増 IL-5 は 7.3 倍増, IL-4 は変わらず。IgG1 値も 8 倍増, IgE は変わらず。	Takano ら (1997)
0.1 mg DEP を毎週気管内投与, (1 μ gOA も 3 週間に 1 回ずつ it)	1 回/週, 6 週間	ICR 系雄マウス	呼吸抵抗 (Rrs) は, OA+DEP 群でのみ有意に上昇。OA 群, DEP 群は対照群と変わらず。	Takano ら (1998a)
0.025 mg DEP を毎週気管内投与 (it), (1 μ g OA も 3 週間に 1 回ずつ it)	1 回/週, 5 週間	C3H/He 系雄マウス BALB/c 系雄マウス	すべての指標の変化で C3H/He>BALB/c。OA 特異的 IgG1 は C3H/He が 30 倍高い, 気道への好酸球浸潤 4.6 倍高い, 杯細胞の増生は 18 倍。呼吸抵抗は 2~3 倍強い。IL-5 と IL-2 も 20 倍強い。	Miyabara ら (1998a)
1 μ g OA, 50 μ g DEP 1 μ g OA + 50 μ g DEP (1 μ g OA も 3 週間に 1 回ずつ it)	DEP は 毎 週 1 回, 12 週間,	5 系統の雄マウス	好酸球浸潤と杯細胞増生は各マウスの IgG1 値と有意に相関。肺への好酸球浸潤は C3H/He>C57BL/6>ICR>BDF/1>CBA/2N の順, OA 対 OA+DEP 間の有意差は C3H/He 以外であり。	Ichinose ら (1997)
1 mg/m ³ , 3 mg/m ³ (10 μ g OA ip 後 DE 曝露, その後 1%OA ミストを 3 週に 1 回ずつ吸入)	12 時間/日, 7 日/週, 3 ヶ月間	C3H/He 系 雄マウス	呼吸抵抗(Rrs)は DE 濃度に依存して有意に上昇, BALF 中の好酸球, 好中球とも DE 濃度に依存して増加。IgE, IgG1 ともに増加。	Miyabara ら (1998b)
0.35, 3.5, 7.1 mg/m ³ (ヒッジ赤血球 SRBC の気管内投与で免疫処理)	7 時間/日, 5 日/週, 6, 12, 18, 24 ヶ月	F-344 雌ラット CD-1 雌マウス	ラット, マウスともに免疫抑制は起こらず, 抗-SRBC IgM 抗体産生細胞 (AFCs) 総数は 3.5mg/m ³ 以上でラットでのみ増加。リンパ節の 10 ⁶ 個リンパ細胞当りの AFCs 数とラットの血清中 SRBC 特異的 IgM, IgG, IgA レベルに有意な変化なし。	Bice ら (1985)
3 mg/m ³ (1 μ g OA を 3 週間に 1 回ずつ ip)	12 時間/日, 7 日/週, 5 週間	C3H/He 系 雄マウス	気道への好酸球浸潤と杯細胞, 呼吸抵抗(Rrs)は OA+DE 群でのみ有意に増加。肺の IL-5 が有意に増加。	Miyabara ら (1998c)
3 mg/m ³ (1 μ gOA を 3 週間に 1 回ずつ ip)	12 時間/日, 7 日/週, 6 週間	ICR 系雄マウス	最終 OA 投与後, 好酸球浸潤と杯細胞増生の経時変化を調べ, OA+DE 群は 3~7 日目で最高に。肺の IL-2 と IL-5 は顕著に増加。	Miyabara ら (1998d)

表 3-18 アレルギー性喘息様病態の発現に関する研究 (続き)

粒子濃度	曝露期間	動物種	影	響	出典
0, 0.3, 1.0, 3.0 mg/m ³ (16 週目に 10µg OA を ip,その後 1%OAミストを 3 週間に 1 回ずつ吸入)	12 時間/日, 7 日/週, 34 週間	ICR 系雄マウス	OA+DE 群でのみ, DEP 濃度に依存して気道の好酸球浸潤増加と杯細胞の増生が 1.0 mg/m ³ 以上で有意差あり。リンパ球浸潤と肺胞上皮過形成は 0.3mg/m ³ 以上で有意に増加。OA を吸入させない DE だけの曝露では両指標に変化なし。		Ichinose ら (1998)
0, 0.3, 1.0, 3.0 mg/m ³ (16 週目に 10µg OA を ip,その後 1%OAミストを 3 週に 1 回ずつ吸入)	12 時間/日, 7 日/週, 40 週間	ICR 系雄マウス	OA+DE 群で気道への好酸球浸潤, 杯細胞増生, 呼吸抵抗は DEP 濃度に依存して増, 3.0 mg/m ³ 群 で有意。IL-5 著増, IgG1, IgE とも増加し OA 群との間に差なし。		Takano ら (1998b)
0.35, 3.5, 7.1 mg/m ³ (ヒツジ赤血球 SRBC の気管内投与で免疫処理)	7 時間/日, 5 日/週, 6, 12, 18, 24 カ月	F-344 雌ラット CD-1 雌マウス	ラット, マウスともに免疫抑制は起こらず, 抗-SRBC IgM 抗体産生細胞 (AFCs) 総数は 3.5mg/m ³ 以上でラットでのみ増加。リンパ節の 10 ⁶ 個リンパ細胞当りの AFCs 数とラットの血清中 SRBC 特異的 IgM, IgG, IgA レベルに有意な変化なし		Bice ら (1985)
3 mg/m ³ (1µg OA を 3 週間に回ずつ ip)	12 時間/日, 7 日/週, 5 週間	C3H/He 系雄 マウス	気道への好酸球浸潤と杯細胞, 呼吸抵抗(Rrs)は OA+DE 群でのみ有意に増加。肺の IL-5 が有意に増加		Miyabara ら (1998c)
3 mg/m ³ (1µgOA を 3 週間に 1 回ずつ ip)	12 時間/日, 7 日/週, 6 週間	ICR 系雄マウス	最終 OA 投与後, 好酸球浸潤と杯細胞増生の経時変化を調べ, OA+DE 群は 3~7 日目で最高に。肺の IL-2 と IL-5 は顕著に増加		Miyabara ら (1998d)
0, 0.3, 1.0, 3.0 mg/m ³ (16 週目に 10µg OA を ip,その後 1%OAミストを 3 週間に 1 回ずつ入)	12 時間/日, 7 日/週, 34 週間	ICR 系雄マウス	OA+DE 群でのみ, DEP 濃度に依存して気道の好酸球浸潤増加と杯細胞の増生が 1.0 mg/m ³ 以上で有意差あり。リンパ球浸潤と肺胞上皮過形成は 0.3mg/m ³ 以上で有意に増加。OA を吸入させない DE だけの曝露では両指標に変化なし。		Ichinose ら (1998)
0, 0.3, 1.0, 3.0 mg/m ³ (16 週目に 10µg OA を ip,その後 1%OAミストを 3 週に 1 回ずつ吸入)	12 時間/日, 7 日/週, 40 週間	ICR 系雄マウス	OA+DE 群で気道への好酸球浸潤, 杯細胞増生, 呼吸抵抗は DEP 濃度に依存して増, 3.0 mg/m ³ 群 で有意。IL-5 著増, IgG1, IgE とも増加し OA 群との間に差なし。		Takano ら (1998b)
3 mg/m ³	12 時間/日 8 週間	モルモット	卵白アルブミンの吸入チャレンジで即時型と遅発型の気道過敏性増強, 気道粘液もチャレンジ群で増強, BALF 中の好酸球と粘液も有意に増加		Hashimoto ら (2001)

といらメカニズムで生じた可能性が示唆されている。

Takano ら(1998a) は上記と同様の実験系で呼吸抵抗(R_{rs})の変化を調べ、OA + DEP 群でのみ有意に亢進したことを認め、また OA 群、DEP 群では対照群との間に全く相違がないことを認め、DEP は OA による、呼吸抵抗に及ぼす影響を亢進し増強左折作用があることを示している。

Miyabara ら(1998) は好酸球浸潤と IgG 抗体との関連を調べるために、IgG 抗体産生能が高い C3H/He 系マウス(IgG high responder)と低い BALB/c 系マウス(IgG low responder)に 0.025mg の DEP を毎週 1 回ずつ 5 週間にわたって気管内投与し、この間に 3 週間に 1 回ずつ 1 μ g の OA を気管内投与し、気道の炎症反応を調べている。OA 特異的 IgG1 抗体産生は C3H/He で BALB/c より 30 倍高い。気道粘膜下への好酸球浸潤は両系統マウスとも OA+DEP 群でのみ顕著に増加しているが、C3H/He の値は BALB/c の値より 4.6 倍高い。リンパ球浸潤は両系統間で差はみられないが、OA+DEP 群の粘液産生細胞の増生は C3H/He が BALB/c より 18 倍高い。呼吸抵抗(R_{rs})も C3H/He 系マウスの OA+DEP 群でのみ 2~3 倍高く有意に増加しているが、BALB/c マウスの R_{rs} は OA 群、DEP 群、OA+DEP 群とも対照群と比べて全く変化していない。炎症性サイトカインの IL-5 と IL-2 も C3H/He の値が BALB/c の値より 20 倍高い。これらの結果から、好酸球性気道炎症は IgG1 との関連が深く、かつ IL-5 と IL-2 が気道炎症の重要な因子であることが示唆されている。

Ichinose ら(1997) は好酸球浸潤と IgG1 抗体産生との関連をさらに別の角度から確認するため、5 系統の 10 週齢雄マウスに 0.05mg の DEP を毎週 1 回ずつ 6 週間にわたって気管内投与すると共に 3 週間ごとに 1 μ g の OA を気管内投与している。その結果、各系統マウスの OA+DEP 群ならびに OA 群で認められた OA 特異的 IgG1 抗体価と好酸球浸潤の程度との間には統計的に有意な相関が得られている。また、気道上皮の粘液産生細胞増生の程度と IgG1 値との間にも有意な相関が認められている。なお、気道粘膜下への好酸球浸潤の多い順番は C3H/He > C57BL/6 > ICR > BDF1 > CBA2N である。また、OA 群と OA+DEP 群間の相違に関しては C3H/He 以外の系統で有意差が認められている。これらの結果から、好酸球浸潤を伴う気道炎症には IgG1 が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

なお、これまで、DEP の点鼻投与などによって IgE 抗体の増加を報告した研究は多い。しかし、DEP の気管内投与では IgE 増加はほとんど認められず、吸入実験で若干の増加が認められ、IgG1 の増加が顕著に認められている。これらの結果から、DEP による IgE 合成は鼻粘膜のリンパ組織 (NALT, nasal-associated lymphoid tissue) の刺激による可能性が考えられる。なお最近の基礎医学では IgE、IgG および IgA のいずれの抗体も好酸球の脱顆粒を起こすことが知られており、いずれの抗体の増加も喘息様病態の増悪に関与しうると考えられる。

Ohta ら(1999) は気道反応性に及ぼす DEP の影響を明らかにするため、DEP を A/J 系マウスと C57BL/6 系マウスに、2 週間にわたって点鼻投与して全身プレチスモグラフで呼吸機能を調べている。DEP 投与でアセチルコリンに対する気道反応性は両系統マウスで増加し、粘液分泌性クララ細胞が線毛上皮細胞に置きかわっていた。アセチルコリンによる気道狭窄は、ヒトのぜん息の特徴でもある β 2-アドレナリン拮抗薬のテルブタミン投与で回復した。DEP の点鼻投与で GM-CSF mRNA 発現を促進し、GM-CSF の抗体の点鼻投与で DEP 誘発性気道反応性の亢進が消失した。また、IL-4 抗

体の点鼻投与も、抗 GM-CSF 抗体ほどではないが、DEP 誘発性気道気道反応性亢進を抑制した。これらのことから、彼らは DEP は GM-CSF 合成を促進することにより気道反応性の亢進が誘起されているものと結論づけている。

Walters ら(2001)は、気道反応性や肺胞洗浄液(BAL)中の細胞分布などに及ぼす実際の大気中浮遊粒子(PM)の影響を調べるために、ナイーブマウスに大気中粒子(PM)、石炭フライアッシュ、DEPを0.5mg粒子をマウスに1回投与し、PMが気道反応性(AHR)を亢進し、BAL中炎症細胞分布の増加を見出したが、DEPはBAL中炎症細胞の有意な増加を示したが、AHRの増加は有意でなかったといふ。一方、石炭フライアッシュはそれらのいずれの変化も引き起こさなかった。また、各粒子投与後のAHR、BALおよび肺内サイトカインの変化を調べたところ、PMによるAHRは7日持続し、これはBAL内好酸球の劇的増加と相関していることが判明した。一方、7日以降のAHRの低下はマクロファージの増加と相関していた。Th2型サイトカイン(IL-5, IL-13, エオタキシン)も初期に観察され、その後Th1型パターンにシフトしていった。さらに、追加の実験で、PMの活性画分は水溶性ではなく、AHRとBALの変化はPM依存性であった。これらのことから、Waltersらは、大気中粒子(PM)はナイーブマウスでぜん息様指標を増加させ、ぜん息罹患率の増加に重要な役割を果たしていると示唆している。

(2) DE 吸入実験:

Miyabara ら(1998a)はC3H/He系雄マウス(6週齢)に1mgのOA含有アラムを腹腔内注射して感作した後、1日12時間、7日/週、5週間にわたってDEP濃度として $3\text{mg}/\text{m}^3$ のDEを吸入させ、さらに、3週間に1回ずつ、1%OA溶液から発生させたミストを15分間ずつ吸入させ、呼吸抵抗(R_{rs})と気道炎症指標ならびに各種サイトカイン濃度の変化を調べている。肺胞洗浄液(BALF)中の好酸球数はOA+DE曝露群でのみ増加(1×10^3 個/総BALF)し、好中球数はDE曝露群とOA+DE曝露群で顕著に増加($10 \sim 20 \times 10^4$ 個/総BALF)している。OA+DE曝露群の気道粘膜下への好酸球の浸潤は対照群の80倍で、OA群の4.4倍に増加し、粘液産生細胞の増生はOA+DE曝露群とOA曝露群で対照群の各々66倍と6倍に増加している。 R_{rs} もOA+DE曝露群とOA群は対照群のそれぞれ2.4倍、1.5倍へと上昇している。血清中のIgEとIgG1の抗体価はOA群よりOA+DE群で顕著に増加している。サイトカイン類はIL-5、IL-4、GM-CSFおよびIL-2などがOA+DE群でOA群より有意に増加し、特にIL-5の増加が顕著である。また、IL-5はIL-2および気道の好酸球浸潤レベルとの間に有意な相関があり、IL-2はIgEおよびIgG1抗体価との間に有意な相関が認められている。

Miyabara ら(1998d)はICR系雄マウスに1日12時間ずつ、一週間DEを吸入させた後、1mgのOA含有アラムを腹腔内注射で感作し、その後さらに1日12時間ずつ、7日/週、5週間にわたってDEP濃度として $3\text{mg}/\text{m}^3$ のDEを吸入させ、さらにこの間、3週間に1回ずつ、1%OAから発生させたミストを15分間吸わせ、OA最終吸入後より1、2、3および7日目に堵殺し、気道炎症指標の経時的变化を調べている。気道への好酸球の浸潤と粘液産生細胞の増生はOA+DE群で3~7日目に顕著に増加し、OA投与群では緩やかに増加している。血清中のIgE抗体価も3~7日目にわず

かに増加している。アラムを使わずに OA を投与した実験では IgE は全く増加しなかったことと文献上の事実から考え、この増加はアラムを使用したことによるものと考えられている。IgG1 抗体価は 1 日後ですでに著しく高いレベルに増加し、その後は若干の増加傾向を示している。

Miyabara ら (1998c) は C3H/He 系雄マウスに、人工物質(ヒトが体内に摂取することはない、実験でのみ用いる物質)であるアラムの使用をやめ、10 μ g の OA のみを腹腔内注射して感作し、その後 1 日 12 時間ずつ、7 日/週、12 週間にわたって DEP 濃度として 1mg/m³ あるいは 3mg/m³ の DE を吸入させ、さらに、3 週間に 1 回ずつ 1%OA から発生させたミストを 6 分間吸入させ、呼吸抵抗 (Rrs) と気道炎症指標の変化を調べている。BALF 中の好酸球数、好中球数とも DEP 濃度に依存して増加している。気道への好酸球の浸潤は 1mg/m³ と 3mg/m³ で OA ミストのみの群の 2 倍、4.7 倍と有意に増加し、Rrs も DEP 濃度に依存して 2 倍、4.4 倍と上昇している。マスト細胞数は極めて少ないが、その増加率は好酸球の増加率に類似している。粘液産生細胞の増生はそれぞれ OA ミスト群の 2.8 倍と 6.6 倍である。血清中の IgE と IgG1 の抗体価は OA 群の値より DE 吸入群で 30 倍以上高く、かつ 1mg/m³ 群のほうが 3mg/m³ 群の値より増加している。これらの結果から、アラム投与による感作ではなくても C3H/HeN 系マウスでは OA+DE 群で IgE と IgG1 がともに増加し、かつ好酸球の浸潤や粘液産生細胞の増生が起こることを示している。

Ichinose ら (1998) は ICR 系雄マウスに 1 日 12 時間ずつ、7 日/週、34 週間にわたって、DEP 濃度として 0mg/m³、0.3mg/m³、1.0mg/m³ および 3.0mg/m³ の DE を吸入させ、この間、16 週目に 10 μ g OA を腹腔内注射して感作し、その後 3 週間ごとに 1%OA のミストを 6 分間吸入させ、気道炎症指標の変化を 6 段階 (-, \pm , +, ++, +++, +++) の病理学的スコアーにより調べている。気道粘膜下への好酸球浸潤と粘液産生細胞の増生は OA+DE 群でのみ DEP 濃度に依存して増加し、DEP 濃度が 1.0mg/m³ 以上で OA ミストのみを吸わせた群に比べて有意に増加している。また、DE だけを吸入させた群では上記 2 つの指標は全く増加していない。一方、気道粘膜下へのリンパ球の浸潤、気道上皮の肥大ならびに無線毛上皮の増殖などの指標は DE のみの群でも濃度に依存して 1mg/m³ 以上で有意に増加しているが、OA+DE 群ではさらに増加する傾向にあり、無線毛上皮増殖と上皮細胞肥大は対照群に比べて 0.3mg/m³ でも有意に増加していることが認められている。

Takano ら (1998b) は、上記の Ichinose らと同様の実験条件で、DE 吸入期間をさらに 6 週間延長して 40 週間の DE 吸入を行い、気道炎症指標、呼吸抵抗 (Rrs)、サイトカイン産生等を調べている。気道粘膜下への好酸球浸潤、粘液産生細胞の増生および呼吸抵抗 (Rrs) は OA + DE 群でのみ増加し、3.0mg/m³ 群で有意差を認められている。IL-5 産生も DE 濃度に依存して増加し、3.0mg/m³ 濃度の OA+DE 群で OA のみの群の 3.3 倍に有意に増加している。GM-CSF も同様の傾向で増加し、3.0mg/m³ 群で OA のみの群の 60% 強の、有意な増加を示している。IgG1 は 10 万タイター以上に、IgE は 10 タイター前後に増加しているが、DEP 濃度の違いによる変化は全く認められていない。

Hashimoto ら (2001) はアレルギー性ぜん息におよぼす DE の影響を明らかにするために、モルモットに 3mg/m³ の DE を 1 日 12 時間ずつ、8 週間吸わせ、卵白アルブミン (OVA) / アラムで感作した動物としない動物の気道過敏性の 2 相性変化を調べ、OVA の吸入チャレンジによって、DE 非曝露群に比べて、DE 曝露群では即時型気道過敏性 (IAR) と遅発型気道過敏性 (LAR) とも増悪した。気

気道の粘液も、IAR の間に、感作 - DE 曝露動物で顕著に蓄積していた。肺胞洗浄液(BALF)中の好酸球数と粘液の指標であるシアル酸濃度もまた、DE 非曝露動物に比べて、OVA 感作 - DE 曝露動物で有意に増加していた。LAR の間には、気道上皮の細胞間スペースが、OVA 感作 - DE 曝露群で、好酸球の顕著な浸潤によって拡張されていることを見いだした。また、BALF 中のアルブミン濃度も有意に増加していた。これらの結果から、彼らは、DE 曝露が IAR の間には、粘液の過剰分泌と好酸球性炎症を増強し、DE 曝露が LAR の間には、気道の透過性や気道炎症を増強し、モルモットのアレルゲン - 誘発性気道過敏性を増悪するとしている。

まとめ(喘息)

DEP の繰り返し気管内投与を行いながら、抗原(卵白アルブミン, OA)を気管内投与すると気道粘膜下への好酸球浸潤や粘液産生細胞(杯細胞)の増生あるいはリンパ球浸潤等のアレルギー性喘息様病態が短期間に発現することが見出されている。

感作した動物に抗原を吸入させて、アレルギー性喘息様病態を起こす手法は広く用いられている。マウスを使用し、DEP の 1 時間平均濃度として 0, 0.3, 10 および 3.0mg/m³ の DE を 1 日 12 時間ずつ吸入させ、この間に抗原(OA)を腹腔内注射して感作し、その後 3 週間ごとに OA のミストを吸入させたアレルギー性喘息病態モデルでは気道粘膜下への好酸球及びリンパ球浸潤並びに粘液産生細胞の増生が OA + DE 曝露群でのみ DEP 濃度に依存して増加し、1.0mg/m³ 以上で対照群より有意に増加することが観察されている。また、気道の無線毛上皮増殖と上皮細胞肥大のような病変は OA + DE 曝露群でのみ増加し、0.3mg/m³ の濃度レベルから対照群より有意に増加しているのが認められている。

3.2.3.3.3.2. アレルギー性鼻炎

アレルギー性鼻炎は代表的な Ⅰ型アレルギー疾患であり、抗原抗体反応を基調として起こる発作性のくしゃみ、水様性鼻漏、鼻閉、鼻粘膜の蒼白性腫脹を特徴とする疾患である。したがって、ここでは主に経鼻的な抗原投与による鼻腔での症状、変化および抗原特異的な抗体産生についてまとめた。DE(粒子)曝露とアレルギー性鼻炎との関連を記載した報告例を表 3-19 に整理した。

DEP あるいは DE が潜在的にアレルギー性鼻炎の症状を誘発する可能性を示した報告がある。Kobayashi ら(1995)は、懸濁した DEP(1.0, 10.0, 20.0mg/kg 体重)をモルモットに点鼻投与し、鼻腔内圧や血管透過性が高まることを見出した。また、同様に DEP を点鼻投与した動物に、ヒスタミンエアロゾルで誘発される鼻腔内圧、血管透過性の増大および分泌鼻汁の増加を観察した。さらに、1, 3.2mg/m³ の DE に 3 時間および 28 日間曝露されたモルモットにも同様な反応が認められたことから、DE は鼻粘膜の反応性を亢進すると考えている(Kobayashi ら(1997, 1998)) Hruma ら(1999)も、モルモットに 1, 3.2mg/m³ の DE を 28 日間曝露し、DE は鼻上皮からの抗原の吸収を増加させて鼻粘膜の反応性を亢進することを報告した。

Muranaka ら(1986)が抗原と DEP の混合物を腹腔内に投与したマウスの方が、抗原のみを投与したマウスに比べ抗原特異 IgE 抗体の産生が高まることを報告して以来、DEP および DE のアジュバ

表 3-19 アレルギー性鼻炎への影響

実験処置条件	動物種	影響	結論	出典
抗原(OA, スギ花粉抗原)のみと混合物(抗原 + DEP)を腹腔内投与.	雌, BDF1マウス	抗原特異IgE抗体価は, 抗原のみ < 混合物.	DEPは, 抗原特異IgE抗体産生を亢進するアジュバント作用を有する.	Muranaka ら (1986)
1, 5, 25µg DEP / 匹と0.025, 0.25, 2.5, 25µg OA / 匹の組み合わせで, 投与頻度を変えて点鼻投与.	雌, BDF1マウス	最少でDEP 1µg + OA 0.25µgの組み合わせで抗原特異IgE抗体産生が亢進.	アジュバント作用の閾値を示唆する.	Takafuji ら (1987)
OAのみと混合物(OA + ビレン or DEP)を腹腔内投与.	雌, BDF1マウス	抗原特異IgE抗体価は, 抗原のみ < 混合物.	DEPに含まれるビレンは, 抗原特異IgE抗体産生を亢進するアジュバント作用を有する.	Suzuki ら (1993)
10µgOAのみと混合物(10µgOA or 1mgスギ花粉 + 0.3mgDEP)を3週間間隔で3回気管内投与.	雄, BALB/cマウス	室内実験系での縦隔リンパ節細胞の増殖反応, IL-4, 抗原特異IgE抗体は, 抗原のみ < 混合物.	DEPの気管内投与は, IL-4産生を亢進し, 局所のT細胞を活性化して抗原特異IgE抗体の産生に影響する.	Fujimaki ら (1994)
1µgOAのみと混合物(1µgOA + 5µgDEP)を3週間間隔で3回点鼻投与.	雄, BALB/cマウス	OAに対する頸部リンパ節細胞の増殖反応と特異IgE抗体, および室内実験系培養液中のIL-4は, OAのみ < 混合物. 室内実験系培養液中のIFN-γは, OAのみ > 混合物.	DEPは, サイトカイン産生のバランスを変化させるとともに, IgE抗体産生も亢進する.	Fujimaki ら (1995)
1.0, 10.0, 20.0 mg/kg体重のDEPを点鼻投与し, 30分後に測定.	雄, Hartleyモルモット	DEPの点鼻投与投与のみで, 鼻腔内圧や血管透過性が増加した. また, ヒスタミンアロゾルによる鼻腔内圧, 鼻汁分泌物, 血管透過性も亢進.	DEPは, 鼻腔での気流抵抗やヒスタミンによる鼻汁分泌物を増加させることから, DEPの持つこれらの作用は, 粒子状物質による血管透過性亢進の一部を説明しうる.	Kobayashi ら (1995)
3.0, 6.0 mg/m ³ : 3週間曝露.	雄, BALB/cマウス	6.0 mg/m ³ で脾臓重量とOA特異IgE抗体が有意に増加. 室内実験系培養液中のIL-4, IL-10が増加し, IFN-γが減少.	DEPは, サイトカインネットワークの変化を誘発して, 抗原特異IgE抗体産生を亢進する.	Fujimaki ら (1997)
抗原のみと混合物(抗原 + 0.3 mgDEP)をブタクサ花粉症患者に点鼻投与.	ヒト	抗原特異IgE抗体とIgG4抗体は, 抗原のみ < 混合物. 鼻汁中の細胞でのサイトカインmRNAの発現は, Th2タイプのIL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, で増加, Th1タイプのIFN-γで抑制.	DEPは, 花粉症患者の鼻腔局所において, サイトカインネットワークの変化を誘発して, 抗原特異IgE抗体産生を亢進する.	Diaz-Sanchez ら (1997)
実験1: 5種類の粒子(関東ローム粉, フライアッシュ, カーボンブラック, DEP, アラム)を点鼻投与し, 直後に花粉の粗抗原アロゾル吸入投与. 実験2: 粒子の投与は実験1と同じに行い, 直後に花粉粒を点鼻投与.	雌, BDF1マウス	実験1: アロゾル感作のみでは, スギ特異IgE抗体価は上昇しなかったが, 粒子を点鼻した群ではいずれも同じ程度に上昇. 実験2: 花粉のみの点鼻に比べ, 粒子を点鼻した群では, いずれもスギ特異IgE抗体価の上昇が早期に見られた.	粒子状物質によるIgE抗体産生亢進には, 粒子の性状や抗原蛋白の吸着能などの要因はあまり関連がない.	Maejima ら (1997)

DE: ディーゼル排気, DEP: ディーゼル排気粒子, OA: 卵白アルブミン

表 3-19 アレルギー性鼻炎への影響(続き)

実験処置条件	動物種	影響	結論	出典
1, 3.2 mg/m ³ : 3時間曝露.	雄, Hartleyモルモット	DE曝露のみでは、くしゃみ、鼻汁分泌、鼻鬱血は誘発されなかったが、ヒスタミンで誘発されるくしゃみ回数と鼻汁分泌は増加.	DEの短時間曝露は、鼻粘膜の反応性を亢進する.	Kobayashi ら (1997)
1, 3.2 mg/m ³ : 3, 7, 28日間曝露.	雄, Hartleyモルモット	いずれのDE曝露濃度でも曝露のみでは、くしゃみ、鼻汁分泌、鼻鬱血は誘発されなかったが、高濃度曝露ではヒスタミンで誘発されるくしゃみ回数、鼻汁分泌および鼻腔内圧は増加.	高濃度DEの4週間曝露は、鼻粘膜の反応性を亢進する.	Kobayashi ら (1998)
1, 3.2 mg/m ³ : 28日間曝露.	雄, Hartleyモルモット	上皮細胞と間質でのホースラディッシュペロキシダーゼ反応産物は濃度に依存して、また、好酸球浸潤は高濃度群で有意に増加.	DEは、鼻上皮からの抗原の吸収を増加させて鼻粘膜の反応性を亢進するのみならず、好酸球浸潤も誘発する.	Hiruma ら (1999)
カビ抗原30μgのみと混合物(カビ抗原30μg + DEP100μg)を2週間間隔で10回点鼻投与.	雄, BALB/cマウス	カビ特異IgE抗体と室内実験系培養液中のIL-2, IL-4は、カビ抗原のみ<混合物.	DEPは、カビ抗原特異IgE抗体産生に対するアジュバント作用を有する.	Ohyama ら (1998)
10人のアトピー患者には、最初、抗原として1mgのkeyhole limpet hemocyanin (KLH)を点鼻投与し、その後、2週間間隔で0.1 mgのKLHを2回点鼻投与。他の15人のアトピー患者にも同様なKLH処置をして、さらにKLH投与の24時間前に0.3 mgのDEPを点鼻投与.	ヒト	KLHのみを投与したグループでは、鼻腔洗浄液中に抗KLHIgE抗体は検出されなかったが、DEP処置したグループでは15人中9人に抗KLHIgE抗体が検出された.	DEPは、アレルギー患者の粘膜アジュバント作用を有し、アレルギー感作を亢進する.	Diaz-Sanchez ら(1999)
ヒトの鼻腔上皮細胞や粘膜微小血管内皮細胞にDEP抽出物を暴露.	ヒト	ヒスタミンレセプターの発現を増加させ、培養液中のIL-8とGM-CSFも増加した.	DEPは、ヒスタミンレセプターを直接アップレギュレートするのみならず、ヒスタミン誘発性IL-8とGM-CSF産生を増加させることで炎症性変化を促進する.	Terada ら (1999)
0.3および1.0mg/m ³ の粒子を含むDE曝露下抗原(OVA)を1週間に1回点鼻投与し、くしゃみ回数、鼻汁量、好酸球数、抗原特異的IgG、IgEを測定.	雄, Hartleyモルモット	抗原投与によるくしゃみ回数、鼻汁量、好酸球の浸潤数は、0.3mg/m ³ のDE曝露から増加することが見いだされた。また、抗原特異的IgGとIgE産生は1.0mg/m ³ のDE曝露で増加することが見いだされた.	0.3および1.0 mg/m ³ の粒子を含むDE曝露は、鼻アレルギー反応を濃度依存的に増悪する.	Kobayashi (2000)

DE: ディーゼル排気, DEP: ディーゼル排気粒子, OA: 卵白アルブミン

ント作用に関する研究が多く行われた。Takafujiら(1987)は、マウスに種々の量の DEP (1, 5, 10 μ g) と卵白アルブミン(OA, 0.025, 0.25, 2.5, 25 μ g) の混合物を点鼻投与し、最少の組み合わせである DEP 1 μ g + OA 0.25 μ g で OA 特異 IgE 抗体の産生が亢進したことから DEP のアジュバント作用の閾値を示唆する結果を報告した。Suzukiら(1993)は、DEP にも含まれるピレンと OA との混合物をマウスの腹腔内に投与し、OA のみを投与した動物に比べ混合物を投与した動物の方が OA 特異 IgE 抗体の産生が高まったことからピレンにアジュバント作用がある可能性を指摘した。Fujimakiら(1994, 1995)は、抗原と DEP の混合物を気管内および点鼻投与し、近接するリンパ節細胞の抗原特異的増殖反応と培養液中のサイトカインを試験管内試験で測定した。その結果、DEP は局所の T 細胞を活性化し、Th1 サイトカインの産生抑制、TH2 サイトカインの産生亢進を促すことで抗原特異的 IgE 抗体の産生を亢進することを見出した。さらに、これらの知見は DE (6 μ g/m³)を曝露したマウスにも観察され、DE にも DEP と同じ作用がある可能性を指摘した。Ohyamaら(1998)は、OA に比べより現実的なカビ抗原 (30 μ g カビ抗原 + 100 μ g DEP) を用いて Fujimaki らと同様な実験を行い、DEP がカビ抗原に対してもアジュバント作用を有することを示した。Maejimaら(1997)は、性状の異なる 5 種類の粒子(関東ローソク粉、カーボンブラック、フライアッシュ、DEP、アラム)をマウスの鼻腔に点鼻投与し、直後にスギ花粉抗原エアロゾルおよびスギ花粉粒を経鼻的に投与した結果、いずれの粒子にも同程度に抗原特異 IgE 抗体の産生を早期に亢進する作用があることを報告した。

一方、Diaz-Sanchezら(1997, 1999)(前出 p.106)は、Fujimaki らがマウスの実験で得た知見をヒトで実証した。

Kobayashi(2000)は、雄性モルモットに 0.3 および 1.0 μ g/m³ の粒子を含む DE 曝露下に抗原(OVA)を1週間に1回点鼻投与し、くしゃみ回数、鼻汁量、好酸球数、抗原特異的 IgG、IgE を測定した。抗原投与によるくしゃみ回数、鼻汁量、好酸球の浸潤数は 0.3 μ g/m³ の DE 曝露から増加することが見いだされた。また、抗原特異的 IgG と IgE 産生は 1.0 μ g/m³ の DE 曝露で増加することが見いだされた。これらのことより、0.3 および 1.0 μ g/m³ の粒子を含む DE 曝露は鼻アレルギー反応を濃度依存的に増悪すると報告している。

Teradaら(1999)は、ヒスタミンによるヒトの鼻腔上皮細胞(HNECs)および粘膜微小血管内皮細胞(HMMECs)でのヒスタミン H1 レセプター(H1R)発現や、IL-8 と GM-CSF 産生に及ぼす DEP の影響を調べた。ヒスタミンは、鼻アレルギーの病因として最も重要なケミカルメディエーターである。ディーゼルエンジンから排出される DEP は、慢性気道疾患の原因物質である。最近、著者らは DE 曝露したモルモットにヒスタミンに対する鼻の反応性が亢進することを観察した。また、気道の上皮および内皮細胞がヒスタミンに反応して種々のサイトカインを産生することも見いだした。HNECs と HMMECs は、ヒトの鼻腔粘膜試料から分離した。HNEC と HMMEC の単層は、DEP 抽出物の存在下あるいは非存在下で培養した。H1R mRNA の発現変化は、RT-PCR 法とサザンブロット法で評価した。ヒスタミン誘発性サイトカイン産生への DEP 抽出物の影響を調べるために、HNEC と HMMEC の単層は DEP 抽出物の存在下あるいは非存在下で 3 ~ 24 時間培養した。PBS で 3 回洗浄した後、10⁻⁶ mol/l のヒスタミンと共に 24 時間インキュベートした。培養液中の IL-8 と GM-CSF 量は、ELISA 法で測定した。その結果 DEP 抽出物は、HNECs と HMMECs のいずれでも H1R mRNA の発現を

増加させた。ヒスタミンによって誘発される IL-8 と GM-CSF 量は、DEP 抽出物を処置した HNECs と HMMECs の方が有意に高かった。これらの結果は、DEP がヒスタミンレセプターを直接アップレギュレートするのみならずヒスタミン誘発性 IL-8 と GM-CSF 産生を増加させることで炎症性変化を促進することを強く示唆した。

まとめ(アレルギー性鼻炎)

アレルギー性鼻炎様病態も花粉症にみられるようにくしゃみ、鼻水、鼻づまりの症状や鼻過敏、抗原特異的抗体産生の亢進、好酸球の浸潤などが見られる。

ヒトの鼻腔上皮細胞(HNECs) および粘膜微小血管内皮細胞(HMMECs)を用いた検討ではDEPがヒスタミンレセプターを直接アップレギュレートするのみならずヒスタミン誘発性 IL-8 と GM-CSF 産生を増加させることで炎症性変化を促進することが観察されている。

0.3 および 1.0mg/m³ の DEP を含む DE にモルモットを曝露しながら抗原を点鼻投与して惹起させるアレルギー性鼻炎様病態は DEP 濃度に依存して 0.3 および 1.0mg/m³ で有意に増悪することが観察された。DE は抗原特異的抗体産生の亢進、鼻過敏、好酸球の浸潤の増加をさせることから、これらが鼻アレルギー反応を濃度依存的に増悪させる要因と考えられる。

3.2.3.4. 気道及び肺組織への影響

DE曝露が気道及び肺組織への影響(非発がん影響)を表3-20に整理した。典型的な所見は、肺胞マクロファージの集合体の増加、組織炎症、多形核白血球の増加、細気管支および肺胞の型細胞の過形成、肺胞中隔の肥厚、浮腫、線維症、肺気腫などである。特に気管支-肺胞接合部に集積して集合体を形成する肺胞マクロファージが炎症性変化の初期指標として測定されている。DEPで充満した肺胞マクロファージの集合体は、ラットを用いた慢性曝露実験で0.4mg/m³の濃度から組織標本中で観察されている。また、気管および気管支の傷害についてもいくつか報告されている。これらの組織変化と相関して、肺のDNA、総蛋白、アルカリ性および酸性フォスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素の増加、また、コラーゲン合成の増加やロイコトリエン、プロスタグランジンなどの炎症性メディエーターの遊離など多くの肺の組織化学的变化も報告されている。動物実験の結果を総括的に眺めると、DE曝露動物の肺における組織変化や化学的变化は長期曝露で観察されるが、いくつかの報告では、形態的变化が起こらない閾値の存在を示唆している。すなわち、7~20時間/日、5~5.5日/週の頻度で104~130週曝露の条件で、

- (1) カニクイザルでは、1 濃度のみの結果ではあるが線維症、炎症、肺気腫などが観察されなかったとして 2mg/m³ (Lewis ら (1989))
- (2) ラットでは、炎症反応、線維症、気管および気管支上皮の線毛の短縮、消失などの形態学的変化が認められなかったとして 0.11 ~ 0.35mg/m³ (Mauderly ら(1987a), Research Committee for HERP Studies(1988))
- (3) モルモットでは、肺胞膜の肥厚、細胞増殖、線維症などの微小構造の最小の反応が認められたとして 0.25mg/m³ 以下 (Barnhart ら (1981, 1982))

表 3-20 気道及び肺組織への影響

曝露濃度 (mg/m ³)	総曝露量 (mg.h/m ³)	曝露期間	実験動物	影 響	出 典
1.5	2,520~2,730	20時間/日, 7日/週 12-13週	雄, F344ラット 雌, A/Jマウス 雄, Cyrianハムスター	炎症性変化. 肺重量と肺胞壁厚の増加.	Kaplan ら (1982)
2.0	7,280	7時間/日, 5日/週 104週	雄, カニクイザル	肺胞マクロファージの凝集. 線維症, 炎症, 肺気腫は観察されない.	Lewis ら (1989)
2.0	3,640	7時間/日, 5日/週 104週	雌雄, F344ラット	多病巣性組織球増殖症. 炎症性変化. 型細胞増殖.	Bhatnagarら (1980) Pepelkoら (1982a)
6.0	13,104	8時間/日, 7日/週 39週	雄, SDラット 雄, A/HEJマウス	両種とも肺の蛋白含量とコラーゲン合成は増加したが, 肺全体の蛋白合成は減少.	Bhatnagarら (1980) Pepelkoら (1982a)
6.0, 12.0	6,240 12,480	8時間/日, 5日/週 26週	雄, Chineseハムスター	炎症性変化. 肺胞マクロファージの蓄積. 肺胞壁厚の増加. 型細胞の過形成. 浮腫. コラーゲンの増加.	Pepelkoら (1982b)
3.9	16,380-18,720	7-8時間/日, 5日/週 120週	雌雄, Cyrianハムスター	炎症性変化. 腺腫細胞増殖.	Heinrich ら (1982)
8.3	21,663	6時間/日, 5日/週 87週	雄, Wistarラット	炎症性変化. 肺胞マクロファージの凝集. 肺胞の肥厚. 間質性線維症, 肺気腫(診 断方法は記載されず).	Karagjanes ら (1981)
4.9	28,538	8時間/日, 7日/週 104週	雌, F344ラット	型細胞の増殖. 炎症性変化. 気管支過形成. 線維症.	Iwai ら (1986)
0.35 3.5 7.0	1,592 15,925 31,850	7時間/日, 5日/週 130週	雌雄, F344ラット 雌雄, CD-1マウス	3.5mg/m ³ 群と7.0mg/m ³ 群のラットの肺胞および気管支上皮の化生. 7.0mg/m ³ 群の ラットとマウスで線維症. 炎症性変化.	Mauderlyら(1987a) Hendersonら(1988)
0.8 2.5 7.0	7,400 21,800 61,700	18時間/日, 5日/週 24か月	雌, Wistarラット 雌, NMRIマウス	気管支肺胞の過形成. 全群で間質性線維症. 濃度依存的にこれらの所見は頻度と重度が増加.	Heinrich ら (1995)
7.0	35,500-NMRI 38,300-C57	18時間/日, 5日/週 13.5か月(NMRI) 24か月(C57BL/N)	(7mg/m ³ のみ) 雌, NMRIマウス 雌, C57BL/Nマウス	腫瘍の増加はない. 非発がん影響については言及なし.	Heinrich ら (1995)
0.1 ^a 0.4 ^a 1.1 ^a 2.3 ^a 3.7 ^b	1,373 5,117 13,478 28,829 46,336	16時間/日, 6日/週 130週	雌雄, F344ラット	炎症性変化. 型細胞の過形成と腫瘍が0.4 mg/m ³ 群以上で観察. 気管および気 管支の線毛の短縮と消失.	Research Committee for HERP studies (1988)

a: Light-duty engine, b: Heavy-duty engine

を組織病理学的な無影響レベルと報告された。

Kato ら(1999)は、DE のラット呼吸器への影響の量・反応関係を形態学的に調べた。実験群は、DE を希釈し、二酸化窒素(ppm)と粒子(mg/m^3)を指標に高濃度(H群: 3ppm, $3\text{mg}/\text{m}^3$),中濃度(M群: 1 ppm, $1\text{mg}/\text{m}^3$),低濃度(L群: 0.2 ppm, $0.2\text{mg}/\text{m}^3$)の3群とM群から粒子を除去したガス成分の中濃度ガス(MG群: 1 ppm, $0\text{mg}/\text{m}^3$)および清浄空気の対照群とし、雄性ウイスター・ラット(5週齢)を1日16時間、週6日、24ヶ月間、間欠曝露した。6ヶ月毎に各群6匹のラットを用いて呼吸器の組織標本を作製し、気道の炎症性変化、杯細胞内の粘液顆粒の酸性化および肺胞腔の断面積と肺胞孔数を光学顕微鏡、走査型および透過型電子顕微鏡で半定量的および定量的に観察と計測を行った。

- (1) 気道の炎症性変化: 線毛の短縮およびクララ細胞の増生が曝露濃度(濃度)および曝露期間(期間)依存性に増強したが、その程度は、L群では軽微な変化を、M群とMG群は同程度の変化を示した。また、MG群以外の群では、肺内気管支上皮下に粒子を貪食した肺胞マクロファージ、肥満細胞、形質細胞、好中球、リンパ球の浸潤が濃度および期間依存性に増強して認められ、細胞間接触もみられた。また、同様の実験群の気管支肺胞接合部では上皮の細気管支化が濃度および期間依存性に増強して認められた。
- (2) 杯細胞の変化: 細気管支の杯細胞の増生や化生性変化は認められなかったが、細胞内の粘液顆粒の増加や粘液の酸性化が濃度および期間依存性に増強して認められた。これらの変化はLおよびMG群では軽微であった。
- (3) 肺胞腔の断面積と肺胞孔数: 肺胞腔の断面積は、HおよびM群が24ヶ月で対照群に対して有意に増加した。肺胞孔数は、H群が他の曝露群に対し12~24ヶ月で有意に増加し、12ヶ月では濃度依存性がみられた。L、MおよびMG群では軽度な変化にとどまり、M群は24ヶ月のみMG群に対し有意に増加した。

DE曝露により、ラットの肺は炭粉沈着を呈するとともに、ラットの肺内気管支には各種の炎症細胞が浸潤し、細気管支の杯細胞内の粘液顆粒が酸性化を示した気道の炎症性変化は、主にDEPに起因するものと考えられ、その程度は濃度および期間に依存した。また、肺胞破壊にはガス成分の影響が関与する可能性も認められた。DEの24ヶ月間曝露を受けたラットの肺では、DEP沈着による組織反応が主体で、粒子除去により反応は軽減あるいは認められなくなる。

Nagai ら(2000)は、高濃度(H群: 3ppm, $3\text{mg}/\text{m}^3$),中濃度(M群: 1 ppm, $1\text{mg}/\text{m}^3$),低濃度(L群: 0.2 ppm, $0.2\text{mg}/\text{m}^3$)の希釈DEと、M群から粒子を除去したガス成分の中濃度ガス(MG群: 1 ppm, $0\text{mg}/\text{m}^3$)および清浄空気(対照群)をモルモットに1日16時間、週6日、24ヶ月間曝露した。肺胞壁中の小孔数(肺胞孔数)と肺胞のサイズを走査型電子顕微鏡で測定した。12ヶ月曝露後では、肺胞壁に対する肺胞孔面積比率と肺胞当たりの肺胞孔数は曝露濃度と曝露期間に依存して増加した。肺胞のサイズには差異を認めなかった。MG群では、M群に比べ肺胞孔数の増加は少なかった。これらの知見は、DEが曝露濃度、曝露期間に依存した肺胞サイズの拡大を伴わない肺胞破壊の原因になりうることを示唆した。粒子状物質は、これらの障害に何らかの役割を担っているであろう。

まとめ(気道及び肺組織への影響)

DE曝露が呼吸器組織への影響(非発がん影響)について整理すると、典型的な所見は、肺泡マクロファージの集合体の増加、組織炎症、多形核白血球の増加、細気管支および肺泡の型細胞の過形成、肺泡中隔の肥厚、浮腫、線維症、肺気腫などである。また、肺泡壁に対する肺泡孔面積比率と肺泡当たりの肺泡孔数が曝露濃度と曝露期間に依存して増加することも見いだされている。特に炎症性変化の初期指標として測定されている肺泡マクロファージの集合体は、ラットを用いた慢性曝露実験で $0.4\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度から観察されている。動物実験の結果を総括的に眺めると、DE曝露動物の肺における組織変化や組織化学的变化は長期曝露で観察されるが、いくつかの報告では、形態的变化が起こらない閾値の存在を示唆している。これらの報告では、形態学的な無影響レベルとして、7~20時間/日、5~5.5日/週の頻度で104~130週曝露の条件で、カニクイザルでは $2\text{mg}/\text{m}^3$ 、ラットでは $0.11\sim 0.35\text{mg}/\text{m}^3$ 、モルモットでは $0.25\text{mg}/\text{m}^3$ であった。

3.2.3.5. 感染抵抗性・免疫系・血液成分への影響

3.2.3.5.1. 感染抵抗性への影響

感染抵抗性に関して報告されている DE 曝露の影響を表 3-21 にまとめた。Campbellら(1981)は、4~8週齢の雌 CR/CD-1 マウス(一群 20 匹)を用いて、DE 曝露を行いその後の感染抵抗性について検討した。DE 曝露は、急性(2時間と6時間)、亜急性(1日8時間で8、15、16日間)、慢性(44/46週間)を行い、TSP として平均 $6.4\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で、 NO_2 の平均は 2.8ppm であった。曝露後、*Streptococcus pyogenes*、あるいは A/PR8-34 インフルエンザウイルス感染を行いその致死率への影響を2週間にわたり調べた。その結果、*Streptococcus pyogenes* 感染に対しては、すべての曝露期間で、清浄空気群にくらべ致死率の増加がみられた。しかしながら、A/PR8-34 インフルエンザウイルス感染に対しては曝露群と対照群とで差はみられなかった。

Hahon ら(1985)は、感染抵抗性への粒子状物質の影響を調べる目的で、雌 CD-1 マウスを $2\text{mg}/\text{m}^3$ 炭粉群、 $2\text{mg}/\text{m}^3$ DE 曝露群、 $1\text{mg}/\text{m}^3$ DE + $1\text{mg}/\text{m}^3$ 炭粉の混合群、清浄空気曝露群の4群にわけ、1日7時間、週5日の曝露条件で1、3、6ヶ月曝露を行った。マウスは1群150匹で、それぞれの期間に600匹を用いて実験を行った。曝露後のインフルエンザウイルス感染による致死率には1、3、6ヶ月曝露で群間での差はみられなかったが、インターフェロンレベルでは、肺において3ヶ月曝露ですべての群でその抑制がみられ、血清中でも混合曝露群で抑制がみられた。6ヶ月曝露では、肺と血清において DE 単独、あるいは DE と炭粉混合群でインターフェロンの産生抑制がみられた。6ヶ月の曝露ではすべての曝露群で血中の凝集抗体価の低下が認められた。

Lewisら(1989)は、地下炭坑における DE の影響を評価するために、雌の CD-1 マウスに7時間/日、5日/週の頻度で1、3、6ヶ月曝露した。実験群は、 $2\text{mg}/\text{m}^3$ 炭粉群、 $2\text{mg}/\text{m}^3$ DE 曝露群、 $1\text{mg}/\text{m}^3$ DE + $1\text{mg}/\text{m}^3$ 炭粉の混合曝露群、清浄空気曝露群の4群を設定した。DE を曝露したマウスにインフルエンザをチャレンジしたところ、インターフェロン産生の減少がみられた。

表 3-21 感染抵抗性への影響

粒子濃度	曝露期間	動物種	影 響	出 典
6~7mg/m ³	急性 (2,6時間) 亜急性 8時間/日 8, 15, 16日 慢性 8時間/日 44~46週	雌, CR/CD-1マウス	<i>Streptococcus p.</i> 感染では致死率が増加 インフルエンザ感染では変化なし	Campbellら(1981)
2mg/m ³ 炭粉 2mg/m ³ DE 1mg/m ³ 炭粉 + 1mg/m ³ DE	7時間/日 5日/週 1, 3, 6ヶ月	雌, CD-1マウス	インフルエンザウィルス感染で致死率変化なし IFNレベルの抑制 凝集抗体価の低下	Hahonら(1985)
2mg/m ³ 炭粉 2mg/m ³ DE 1mg/m ³ 炭粉 + 1mg/m ³ DE	7時間/日 5日/週 24週	雌, CD-1マウス	DE曝露群でインフルエンザウィルス感染 によりIFN産生の低下	Lewisら(1989)

3.2.3.5.2. 免疫系への影響

免疫系への DE 曝露の影響に関する報告を表 3-22 にまとめた。

Dziedzic(1981)は、モルモット(一群7匹)を用いて、1.5mg/m³のDE曝露(平均粒径:0.2μm)を4週間、及び8週間行い、免疫臓器のリンパ球の変動を調べた。その結果、今回の曝露条件では、脾臓、胸部リンパ節、血中のT、Bリンパ球の比率において対照群と比べ差はみられなかった。

Mentnechら(1984)は、F-344雄ラットを2mg/m³炭粉曝露群、2mg/m³DE曝露群、1mg/m³DE+1mg/m³炭粉の曝露群、清浄空気曝露群の4群にわけ、1日7時間、週5日間で12ヶ月、24ヶ月曝露を行った。SRBCを抗原として用いプラーク形成を調べた実験では11~20匹を各群用いたが、対照群とくらべ差はみられなかった。また、各群18~22匹を用いてのphytohemagglutinin(PHA)、concanavalin A(Con A)によるリンパ球増殖反応においても差はみられず、今回の曝露条件ではラットの免疫反応に影響は認められなかった。抗原を静脈投与にして全身的な影響を調べたが、全身影響はあまりないことが明らかとなった。

Biceら(1985)は、DE曝露の肺の免疫機能への影響を検索するために、F-344ラットとCD-1マウス(各群16匹)を用いて1日7時間、週5日の条件で7mg、35mg、0.35mg/m³の濃度(それぞれのMMADは、0.23、0.25、0.26μm)で6、12、18、24ヶ月曝露を行った。曝露後にSRBC抗原を気管内投与して肺門部リンパ節でのリンパ球数、抗体産生を調べると7mg/m³を曝露されたすべてのラットとマウスでリンパ節細胞数の増加がみられ、3.5mg/m³ではラットの12、18、24ヶ月曝露でリンパ節細胞数の増加がみられた。ラットを用いての7mg/m³と3.5mg/m³の曝露では抗体産生細胞数の増加がみられたが、血清中の抗原特異的IgM、IgG、IgAの抗体価では差はなかった。

Fujimakiら(1997)は、マウスのIgE抗体産生に及ぼす影響を調べるために、0、30、60mg/m³濃度のDEで3週間曝露し、OA抗原感作を3週間間隔で3回行った。体重、胸腺重量に差はなかったが、脾臓重量の増加が高濃度曝露でみられた。血清中の抗OA特異的IgE抗体価は、6.0mg/m³群で有意に高かった。脾臓細胞を試験管内でOA刺激して誘導したサイトカイン産生では、6.0mg/m³曝露群で対照群と比べIL-4、IL-10は高く、IFN-γは低い結果であった。DEの吸入は、サイトカインネットワークの変化を誘発して抗原特異的IgE産生に悪影響を及ぼすことが示された。

DEPの免疫系への影響

DEPの免疫系への影響に関する報告を表3-23にまとめた。

Muranakaら(1986)は、DEPとスギ花粉症発症との関連について明らかにするために、雌BDF1マウス(各群5匹)に種々の濃度のDEPと抗原(卵白アルブミン:OVA;DNP標識OVA;スギ花粉抗原JCPA)を腹腔内に投与して、抗原特異的なIgE産生について受身皮膚アナフィラキシー(PCA)で調べた。DEP濃度は、20、200、2000μg/mouseで、この粒子の52%は1μm以下の粒径であった。その結果、DEP粒子を抗原と同時投与すると抗原単独投与群に比べすべての抗原特異的IgE産生を有意に亢進させる作用がみられ、スギ花粉症の増加にDEPのアジュバント作用が関連する可能性が示唆された。アジュバント効果がみられる至適抗原量が水酸化アルミニウム(アラム)では1~1000μgと広いのに対してDEPでは10~100μgと狭いことはメカニズムを探るうえで重要な知見と考

表 3-22 免疫系への影響

粒子濃度 (mg/m ³)	曝露期間	動物種	影 響	出 典
1.5 0.19µmMMD	20時間/日 5.5日/週 4, 8週	モルモット	脾臓, 胸部リンパ節, 血中リンパ球で変化なし	Dziedzic (1981)
2.0 0.23-0.36µmMMD	7時間/日 5日/週 52, 104週	雄F344ラット	抗SRBC PFCやPHA, ConAに対する反応で影響みられず	Mentnechら(1984)
0.35 3.5 7.0 0.25µmMMD	7時間/日 5日/週 104週	F344ラット CD-1マウス	3.5と7.0mg/m ³ 曝露のラットと7.0mg/m ³ 曝露のマウスで肺門部リンパ節細胞数の増加 ラットの高濃度曝露群で抗SRBC抗体産生の増加がみられたが血中抗体価では差はなし	Biceら(1985)
3.0 6.0 0.4µm	12時間/日 7日/週 3週	BALB/Cマウス	6mg/m ³ 曝露で脾臓重量の増加, 脾細胞からの抗原刺激によるIL-4, IL-10産生の亢進, IFN-γ産生の抑制, 抗OVA IgE抗体産生の亢進	Fujimakiら(1997)

表 3-23 DEP の免疫系への影響

粒子濃度	投与回数	動物種	影 響	出 典
20 200 2,000µg/mouse	単回 5回	雌BDF1マウス	抗原特異的IgE産生の亢進	Muranakaら(1986)
DEP 1mg/mouse ピレン 1mg/mouse	6回	BDF1マウス	DEP, ピレンともに抗原特異IgE産生を亢進	Suzukiら(1993)
0.3mg/mouse	3回	BALB/Cマウス	リンパ節細胞の増殖促進 IL-4産生の亢進	Fujimakiら(1994)
0.1mg/mouse	単回	BALB/Cマウス	リンパ節重量、細胞数の増加 抗OVA IgE産生亢進	Løvikら(1997)
0.01 0.1 1.0µg/mouse	5回	DBA/IJマウス	抗HEL抗体価の濃度依存的増加(免疫寛容の阻止) DTH反応抑制の解除、サイトカイン産生抑制の解除	Yoshinoら(1999)
0.1 0.3 1.0µg/mouse	10回	DBA/IJマウス	コラーゲン誘導関節炎の悪化 抗CII抗体価の増加 脾細胞からのIFN-γ, IL-2, IL-4産生増加	Yoshino & Sagai (1999)
0.01 0.1 1.0µg/mouse	5回	DBA/IJマウス	抗原HEL, IgG1, IgG2a, の濃度依存的増加 脾細胞からのIL-4, IFN-γ産生の増加	Yoshino&Sagai (1999b)
1.0mg/mouse	単回	BALB/Cマウス	リンパ節細胞の増殖促進 IL-4産生CD4 + T細胞の増加	van Zijverdenら(2000a)
1.0mg/mouse	単回	BALB/Cマウス	TNP-OVA抗原に対するIgE, IgG1産生の亢進	van Zijverden & Granum(2000b)

える。

Suzuki ら(1993)は、初めの実験では BDF1 マウス(一群5匹)を3群に分け2週間間隔で6回腹腔内注射して免疫した。1群はOVAのみ、2群はOVAとピレン、3群はOVAとDEPを投与している。抗OVA IgE抗体産生はOVA単独投与と比較しピレン、DEP添加群では増強が見られた。二番目の実験では1群に10 μ gのJCPAのみ、2群に10 μ gのJCPAとピレンを初めの実験と同様に免疫した。JCPAとピレン投与群では単独投与群と比較して強いIgE抗体産生が認められた。腹腔のマクロファージの化学発光分析の結果ピレンにより試験管内試験で明らかに活性化がみられた。この結果は、DEPに含まれるピレンは抗原で感作されたマウスのIgE産生においてアジュバントとして働くことを示唆している。

Fujimaki ら(1994)は、DEPとIgE産生との関連について明らかにするために、BALB/cマウスにDEPとOA抗原を気管内投与して縦隔リンパ節細胞での細胞増殖、サイトカイン産生を調べた。細胞増殖反応は、OA群に比べDEP+OA群で明らかに亢進し、IL-4産生、抗OA IgE抗体価共にDEP+OA群で高い値を示した。

Løvik ら(1997)は、BALB/cマウス(一群8匹)を用いて、DEPとカーボンブラック(CB)の局所リンパ節での免疫応答への影響について検索した。DEPは平均粒径0.03 μ mで0.1mg/マウスを卵白アルブミン(OVA)抗原と共に足蹠に皮下注射し経時的に20週後まで膝窩リンパ節の種々のインデックス(湿重量、細胞数、細胞増殖)を測定した。DEP+OVA投与後4~6週後まではリンパ節の指標で有意な増加がみられ、CBをOVAと共に投与するとやはりDEPには劣るものの増加がみられた。抗OVA IgE抗体価もDEP+OVAで高い値が得られた。今回の結果から、DEPとCBの局所への投与でアジュバント効果がみられ、CBでの結果から、DEPの効果は芳香族炭化水素類のみならず核としてのカーボン分画にもあることが示唆された。DEPの効果が、呼吸器、腹腔内投与以外でも観察できたことは新しい知見である。

Yoshino ら(1998)は、食事アレルギーと環境汚染物質との関連について明らかにするために、経口トレランスの誘導にDEP粒子が及ぼす影響について検討した。DBA/1Jマウス(一群5~8匹)を用いて、hen egg lysozyme (HEL)の10mgを経口で5日間連続投与し1日後に100 μ gを皮下投与して経口トレランス誘導の系を作成した。種々のDEP(平均粒径0.4 μ m)をHELの経口投与直前に消化管内投与して影響を検索した。その結果、抗HEL IgG1、IgG2a抗体価はHEL投与時に対照として生理食塩水を投与した群に比べ、HEL経口投与群で有意に低下した。しかしながら、経口時に0.1、1.0mg DEPを投与した群では抗体価の濃度-依存的な増加がみられた。また、遅延型過敏反応の誘導抑制においてもDEPの抑制解除の作用がみられた。鼠蹠部のリンパ節におけるIL-4とIFN- γ 産生においては、トレランスの誘導により低下がみられたが、DEP投与はその低下を抑えた。以上の結果より、DEPが経口トレランスの誘導を抑制する働きのあることが示された。

Yoshino と Sagai(1999)は、Collagen-induced Arthritis へのDEPの影響について検討した。雄のDBA/1Jマウス(一群5匹)に子牛関節軟骨から抽出したtype II コラーゲン(C_{II})と complete Freund's adjuvant を尾に皮下注射し21日後に再度同量注射した。DEPは0.1、0.3、10mg/mlの濃度で50 μ lのPBSに分散し2日間隔で20日まで点鼻した。組織学的診断からCollagen-induced Arthritisの発

症頻度、重症度ともに DEP 点鼻群で増加していた。血清中の抗体検査ではこの疾患の増強は抗 C IgG 抗体と IgG2a 抗体の増加と関連していた。DEP 点鼻群では脾臓細胞の C に対する増殖反応も亢進していた。DEP 点鼻群の脾臓細胞から IFN- γ 、IL-2、IL-4、の産生が増加していた。Collagen-induced Arthritis 発症後から DEP を点鼻した場合でも同様の結果であった。この結果は DEP 曝露が自己免疫疾患を増悪することを示唆している。以上の報告に加え、免疫系への影響としては、carbonyl iron、chrysotile asbestos、crocidolite asbestos、iron-coated chrysotile asbestos、fiberglass、wollastonite fiber が補体系を活性化してマクロファージを引き寄せること(Warheit ら(1988))、ヒト血清補体の溶血活性について DEP が補体系の選択的な経路の活性化を誘導すること(Kanemitsu ら(1998))などの報告がある。

DEP のアジュバント効果に関する報告がいくつかあり、Yoshino と Sagai (1999)は、DEP の経口投与による免疫系への影響について雄 DBA/1J マウスを用いて検討した。その結果、抗原 HEL のみの経口投与では誘導されない抗体産生が DEP と HEL の投与により認められ、抗原特異的 IgG1 と IgG2a の抗体価の上昇がみられた。また、脾臓細胞によるサイトカイン産生では、IFN- γ と IL-4 の Th1 と Th2 の両タイプのサイトカイン分泌増加が認められ、DEP が消化管での免疫機能にアジュバント効果を示すことが明らかとなった。

van Zijverden ら(2000a)は、粒子状物質成分の一次免疫応答、二次免疫応答への影響について雌の BALB/c マウスを用いて検討した。一次応答では、DEP (粒径<0.5 μm)、カーボン粒子(CBP、粒径<0.5 μm)、シリカ粒子(SIP、粒径 1~5 μm)の 1mg を抗原 TNP-OVA と共に皮下に投与してリンパ節でのサイトカイン産生細胞数や産生能について測定すると、DEP と CBP を抗原と共に投与した群で IL-4 産生の増加がみられた。二次免疫応答は一次免疫の 4 週後に抗原を点鼻投与して誘導し、抗体産生細胞数や血清中の抗体価を調べた。その結果、DEP 投与は IgG1 と IgE レベルを上昇させ、CBP は IgG1、IgE、IgG2a の抗体価を上昇させた。ところが、SIP は IgG2a のみを上昇させ、粒子成分の違いにより Th1 と Th2 タイプの反応誘導に差のあることが明らかとなった。また、同じく van Zijverden と Granum(2000b)は、粒子成分の違いによる免疫応答の誘導の違いを明らかにするために雌の BALB/c と NIH/Ola マウスに DEP、CBP、あるいは SIP を抗原 TNP-OVA と共に皮下に投与し、ポリスチレン粒子(PSP、粒径 0.2 μm)は抗原 OVA と共に気管内、あるいは腹腔内投与を行い抗体価を比較した。その結果、SIP は Th1 タイプの誘導を、DEP は Th2 タイプの誘導を、また CBP と PSP は Th1/Th2 タイプの混合反応を誘導した。したがって、粒子の大きさや化学成分組成の違いがアジュバント効果に関与していると考えている。

Granum ら(2001a)は、粒子状物質のアジュバント効果における核となる物質の関与を明らかにするために、0.1 μm の粒径のポリスチレン粒子(PSP)を 6~8 週齢の雌 NIH/Ola マウスに点鼻投与、気管内投与、腹腔内投与してその後の抗原投与に対する抗原特異的反応を測定した。その結果、卵白アルブミン(OVA)抗原に対する IgE 産生、総 IgE 抗体価ともに PSP を抗原と共に投与した群で投与経路に関係なく増強がみられた。また、PSP を抗原投与前に投与して抗原との投与間隔をあけても抗体価の上昇が認められた。このことは、粒子が抗原と同時に吸入されなくても抗原特異的な反応が増強することを示唆している。同じく、Granum ら(2001b)は、粒子状物質の中で核となる成分によ

よる IgE 産生増強効果を検討するために、粒径 0.5 μm のポリスチレン (PS) ,粒径 0.05~0.5 μm の polytetrafluoroethylene (テフロン), 粒径 0.2 μm の酸化チタンと無定形のシリカ粒子の 4 種を OVA とともに雌の NIH/Ola マウスの腹腔内に投与して抗体産生を調べた。その結果、いずれの粒子も抗原特異的 IgE, IgG2a 産生と総 IgE 抗体価を増強した。同様の結果は、点鼻投与、気管内投与でもみられている。

3.2.3.5.3. 血液成分への影響

DE 曝露の血液成分への影響について表 3-24 にまとめた。

Penney ら(1981)は、ラットとモルモットの 1 ヶ月齢のものを用いて、心臓、血液への DE 曝露の影響について検討した。DE 曝露は、250, 750, 1500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で、20 時間/日、5.5 日/週の条件で、ラットは 13, 16.7, 25.7, 42, 52, 78 週間、モルモットは 6, 13, 17, 26, 42, 52, 78 週間行った。平均粒径は、 $0.19 \pm 0.03 \mu\text{m}$ であった。各実験に供した動物数は、バラツキがあり 2~13 匹を用いた。その結果、ラットとモルモットとともに、清浄空気群に比べすべての曝露で心臓の湿重量、右心室、左心室、あるいは体重換算重量でも有意な差はみられず、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血球数などの血液指標においても影響は認められなかった。

Karagianes ら(1981)は、雄 Wistar ラットを用いて、DE と炭粉曝露の生体影響を調べた。曝露条件は、6 時間/日、5 日/週で最長 20 ヶ月間行い、曝露群としては DE 曝露のみは 8.3 mg/m^3 の濃度で、炭粉のみの曝露は低濃度が 6.6 mg/m^3 、高濃度が 14.9 mg/m^3 で行い、混合曝露では DE 曝露は 8.3 mg/m^3 の濃度、炭粉曝露は 5.8 mg/m^3 で行った。粒径は、DE では 0.71 μm MMAD、炭粉では 2.1 μm MMAD であった。その結果、4, 8, 16 ヶ月曝露ラットのヘマトクリット値、赤血球、白血球数に清浄空気曝露の対照群と比べ差はみられなかった。また、CO ヘモグロビンレベルは 4 ヶ月 DE 曝露で 3.7%、20 ヶ月曝露で 5%増加がみられ、混合曝露群の 4 ヶ月曝露で 4.1%、20 ヶ月曝露で 5.6%の増加がみられた。

Heinrich ら(1982)は、Syrian Golden ハムスターに粒子濃度 3.9 mg/m^3 (MMD 0.1 μm) の DE 曝露を 1 日 8 時間、週 5 日で 2 年間にわたり行った。血液・生化学検査は、曝露 29 週目に検索し、GOT, LDH, AP, 尿素の値は高値を示したが、赤血球数は減少がみられた。

Brightwell ら(1986)は、F344 ラットを用いて 0.7, 2.2, 6.6 mg/m^3 の粒子濃度で 1 日 16 時間、週 5 日の条件で 2 年間 DE 曝露を行った。その結果、高濃度曝露で血中尿窒素上昇、AP と γ -GTP の上昇、コレステロール値の低下がみられた。また、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、赤血球と白血球の増加、リンパ球数の減少もみられた。

まとめ(感染抵抗性・免疫系・血液成分への影響)

感染に対する応答においては、2 mg/m^3 の粒子濃度の DE 曝露でインターフェロンレベルでの抑制が認められている。免疫系への DE 曝露の影響としては、3.5 mg/m^3 の DEP 濃度でラットのリンパ節細胞数の増加がみられている。DEP によるアジュバント効果はそれを構成するカーボンのみでも、PAH 類のみでもみられている。また、ポリスチレン、テフロン、酸化チタン、無定形のシリカ粒子のい

表 3-24 血液成分への影響

粒子濃度 (mg/m ³)	曝露期間	動物種	影 響	出 典
0.25 0.75 1.5 0.19µm MMD	20時間/日 5.5日/週 78週	F344 ラット Hartleyモルモット	ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値 血球数に影響みられず	Penneyら(1981)
DE 8.3 (0.71µm MMD) 炭粉 6.6, 14.9 (2.1µmMMD)	6時間/日 5日/週 78週	雄 Wistarラット	ヘマトクリット値 赤血球 白血球数に差なし COHbに4~5%の増加あり	Karagianesら(1981)
DE 8.3 +炭粉 5.8				
3.9 0.1 µm MMD	7-8時間/日 5日/週 29週	Syrianハムスター	赤血球減少 GOT, LDH, AP, 尿素は上昇	Heinrichら(1982)
0.7 2.2 6.6	16時間/日 5日/週 104週	F344ラット	血中尿酸素上昇、コレステロール低下、AP上昇 γ-GTP上昇、ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球、白血球上昇 リンパ球減少	Brightwellら(1986)

れの粒子においても抗原特異的IgE, IgG2a産生と総IgE抗体価を増強する作用があることが見いだされてきている。

血液成分での変動は、粒子濃度 $3.9\text{mg}/\text{m}^3$ の DE 曝露で認められた。

3.2.3.6. 循環器への影響

DE 曝露が循環器(心臓)に及ぼす影響について記載した報告例を表 3-25 に整理したが、DE 曝露と循環器との関係を示唆する知見は非常に少ない。

Wiesterら(1980)は、雌雄の Hartley モルモットに 20 時間/日、7 日/週の頻度で $6\text{mg}/\text{m}^3$ の DE を 8 週間曝露した。DE は、紫外線照射したものとしないものの 2 種類を用いた。その結果、紫外線照射の有無に関わらず、心臓重量や心電図に影響は認められなかったが、照射排気に曝露された動物の心拍数がわずかに減少した。Brightwellら(1986)は、雌雄の F344 ラットに 16 時間/日、5 日/週の頻度で 0.7, 2.2, $6.6\text{mg}/\text{m}^3$ の DE を 2 年間曝露した結果、 $6.6\text{mg}/\text{m}^3$ 群の心臓/体重、右心室/心臓の重量比が上昇し、左心室の収縮性が低下したことを報告している。

一方、Kaplanら(1982)、Penneyら(1981)、Greenら(1983)、Vallyathanら(1986)の報告では、F344 ラットや Hartley モルモットを含む種々の動物種に DE 曝露による心臓重量の変化を認めていない。

まとめ(循環器への影響)

DE 曝露が循環器に及ぼす影響について検討した報告は少なく知見の充実が必要。雌雄の F344 ラットや雌雄の Hartley 系モルモットを用いた場合 $6\sim 7\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度の近辺で心臓/体重、右心室/心臓の重量比の上昇、左心室の収縮性の低下、心拍数のわずかな低下が観察されている。

3.2.3.7. 生殖器への影響

DE 曝露が生殖器に及ぼす影響に関する報告を表 3-26 にまとめた。

Leeら(1980)は、SD 系雄ラットに 13 倍に希釈した DE を 20 時間/日ずつ、42 日間曝露し、肺、肝、精巣および前立腺の aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性とエポキシサイド・ヒドロラーゼ(EH) 活性の変化を調べている。肝臓が最大の AHH 活性を示し、対照群の 1.3 ~ 1.4 倍に増加していた。一方、対照群に比べて最も増加率が高かったのは前立腺で、曝露 15 日目で 4.5 倍に増加し、全曝露期間を通じて高い値を維持していた。精巣での活性変化は認められていない。EH 活性もすべての臓器で有意な変化はなかった。本実験は吸入実験で生殖器系にも影響が及んでいることを認めた研究としての意義は大きい。しかし、DE 濃度が総炭化水素濃度 14.2ppm と示されているだけで、DEP、 NO_x 等の濃度は測定されていない。

Pereiraら(1981)は、DE 中の化学変異原物質が精巣に到達するかどうかを調べるために、DEP 濃度として $6\text{mg}/\text{m}^3$ の DE を A 系雄マウスに 1 日 8 時間ずつ、31 ~ 39 週間曝露させて精子の形態異常を調べている。エオジン Y 染色をほどこして精子の頭部異常を数量化しているが、対照群との間に有意な変化はなかったと報告している。

Pepelko と Peirano(1983)は、CD-1 系マウスの雌雄各 100 匹に、 $12\text{mg}/\text{m}^3$ という極めて高濃度の軽

表 3-25 循環器への影響

曝露濃度 (mg/m ³)	曝露期間	実験動物	影 響	出 典
短期曝露				
6.3 (非照射DE) 6.8 (照射DE)	20時間/日, 7日/週, 8週	雌雄, Hartlyモルモット	心臓重量, 心電図に影響なし. 照射DEに曝露した動物のみ心拍数が僅かに減少.	Wiesterら(1980)
1.5	20時間/日, 7日/週, 3か月 曝露終了後, 6か月回復	雄, F344ラット 雄, A/Jマウス 雄, Cyrianハムスター	心臓重量に影響なし.	Kaplanら(1982)
長期曝露				
0.25, 0.75, 1.5	20時間/日, 5.5日/週, 78週	雄, F344ラット 雄, Hartlyモルモット	心臓重量に影響なし.	Penneyら(1981)
2.0	7時間/日, 5日/週, 52週	雌雄, F344ラット	心臓重量に影響なし.	Greenら(1983)
0.7, 2.2, 6.6	16時間/日, 5日/週, 2年	雌雄, F344ラット	6.6 mg/m ³ 群の心臓/体重, 右心室/心臓の重量比が 増大. 左心室の収縮性が低下.	Brightwellら(1986)
2.0	7時間/日, 5日/週, 104週	雌, F344ラット	心臓重量に影響なし.	Vallyathanら(1986)
その他: DEPのdimethyl sulfoxide抽出物をHartleyモルモットに致死量静脈注射した結果, 不整脈の出現および心電図の変化を認めた.				Minamiら(1999)

表 3-26 生殖器系への影響

粒子濃度	曝露期間	動物種	影 響	出典
(総炭化水素濃度 14.2 ppm とのみ記載)	20 時間/日, 42 日間	SD 系雄ラット	10 週令から曝露開始し、前立腺の Aryl hydrocarbon hydroxylase 活性が 4.5 倍に増加、精巣 では変化なし。	Lee ら (1980)
6mg/m ³	8 時間/日, 31 ~ 39 週	A 系雄マウス	精子頭部の異常を調べたが変化なし。	Pereia(1981)
12 mg/m ³ (LD) ^{*1}	8 時間/日, 7 日/週 交配前に 100 日間 曝露	CD-1 系雄雌 マウス	繁殖能力、生存率に著しい変化なし。	Pepelko と Periano (1983)
6 mg/m ³ 7 週間	8 時間/日, 7 日/週	T 系雄マウス	優性的致死影響なし。 卵巣黄体数が顕著に減少。	Pepelko と Periano (1983)
50, 100, 200mg/kg B.W 注射	5 日間連続腹腔内	C57BL/6 系雄 マウスと C3H 系雄マウス	精子数の減少、睪丸重量の減少、 精子奇形等。	Quinto と DeMarinis (1984)
6 mg/m ³ (HD) ^{*2}	8 時間/日, 7 日/週 妊娠 5 ~ 16 日目或いは 6 ~ 18 日目曝露	SD 系雌ラット ニュージーランド 系雌白ウサギ	胎児死亡率、吸収胎児率、胎児の体重等無 変化 胎児死亡率 2 倍、吸収胎児数 40% 増 しかし、対照群との間に有意差なし。	Pepelko と Periano (1983)
2 mg/m ³	7 時間/日, 5 日/週 6 ヶ月	F-344 系雄 ラット	無処置正常雌マウスとの交配で胎児の着床 胚子と着床前胚子の喪失が認められた。	Lewis ら(1989)
2 mg/m ³	7 時間/日, 5 日/週 2 年間	カニクイザル	精子の運動能と運動速度に変化なし。	Lewis ら(1989)

表 3-26 生殖器系への影響 (続き)

粒子濃度	曝露期間	動物種	影 響	出典
		ヒトの精子	試験管内でヒトの精子と DEP 抽出液を接触させ、精子の運動能力を 25% 低下させる量がフタル酸エステル類の 1/10。	Fredericson ら (1993)
ジクロロメタン抽出物 使用 0.046 ~ 460ng/μl			MCF-7 ヒト乳ガン細胞等で DEP 抽出物が Ah 受容体を活性化したり、エストロゲン受容体への結合ならびに遺伝子発現を増加。	Meek(1998)
5.63 mg/m ³ (NO ₂ 4.16 ppm NO 8.10ppm)	6 時間/日, 5 日/週, 3 ヶ月間 (妊娠 19 日目の母獣 に曝露)	ラット	妊娠 19 日目の雌に曝露。生まれた子供(雄)の生能低下。血清中のテストステロンとエストラジオール濃度増加、卵胞刺激ホルモン(FSH)濃度が低下。	Watanabe と Onuki(1999)
0.3, 1.0, 3.0 mg/m ³	12 時間/日, 7 日/週, 1 ~ 10 ヶ月間 (6 週令より曝露)	TCR 系雄 マウス	0.3 mg/m ³ より有意に濃度依存的に精子産生能力が低下。6 ヶ月目で最も顕著。精巣重量の変化なし。精巣ライデッヒ細胞の形態的变化顕著。LH の受容体の mRNA 発現の低下。	Yoshida ら(1999)
5.63 mg/m ³	1 日 6 時間 20 日 (交配から 20 日間)	ラット雄	出生児の性器 - 肛門間の距離は長かった。DEP を除いたガス群でも延長が認められた。組織学的には精巣、卵巣、胸腺の分化遅れが観察された。	Watanabe N ら (2001)

*¹,LD は light duty engine 使用 ; *²,HD は heavy duty engine 使用。

量級 DE を、8 時間/日、7 日/週ずつ吸入させた実験で次世代に及ぼす影響が調べられている。曝露による次世代への影響は軽微であり、全体の繁殖能力と生存率にも著しい変化はなかったとしている。

Lewis(1989)らは、優性致死突然変異試験において、F-344 雄ラットに、DEP として $2\text{mg}/\text{m}^3$ の DE を、7 時間/日、5 日/週、6 ヶ月間吸入させた後に、正常無処理の雌と交配させた実験を行っている。妊娠 19 ~ 20 日目に、生存していたマウスと死亡したマウスに着床胚子と着床前胚子の喪失が認められている。

Pepelko と Peirano(1983)は、 $6\text{mg}/\text{m}^3$ の DE を、T 系雄マウス 100 匹、雌 54 匹に、8 時間/日、7 日/週、7 週間吸わせた実験を行い雌雄いずれにも著しい優性致死影響はなく、唯一、卵巣黄体数の顕著な減少を認めている。

Quinto と De Marinis(1984)は、DEP を体重 kg 当り 50、100、200mg ずつ、5 日間続けて、腹腔内に注射後、C57B1/6 マウスと C3H マウスの第 1 代 F_1 マウスで、精子数の減少と睾丸重量の減少、精子奇形等を認めている。200mg 投与群においては、対照に比べ 8 倍の奇形増加を示し、精子数の著しい減少も認めている。

Lewis ら(1989)は、15 匹のカニクイザル(cynomolgus monkey)に DEP として $2\text{mg}/\text{m}^3$ の DE を、7 時間/日、5 日/週、2 年間曝露させた実験を行っている。その結果、精子の運動性(motility)と運動速度は対照と類似していたと報告されている。

Pepelko と Peirano(1983)は、粒子状物質濃度として $6\text{mg}/\text{m}^3$ の重量級ディーゼルエンジンからの排気を、SD 系ラットおよびニュージーランド系シロウサギに 8 時間/日、7 日/週ずつ吸入させた実験を行っている。実験は、妊娠 5 ~ 16 日のラット(20 匹)、妊娠 6 ~ 18 日のウサギ(20 羽)を用いて行ない、同じ母親から生まれた仔の生存胎仔数、死亡胎仔数、体内に吸収され子宮に吸収痕を残す胚吸収、着床部位、黄体、胎仔の平均体重などは、対照群との間に著しい差が認められなかったとしている。

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

Meek(1998)は、DEP のジクロロメタン抽出物(DEP-E)が Ah 受容体の活性化やエストロゲン受容体(ER)への結合ならびに遺伝子発現を誘導することを報告している。DEP-E と結合した Ah 受容体タンパク質が DNA 上のダイオキシン応答エレメントに結合する活性は 22 倍に増加した。また、DEP-E はラットの子宮からのエストロゲン受容体(ER)へのエストラジオール(E_2)結合を量 反応依存的に阻害した。この研究は、DEP-E は AhR および ER を活性化し、またこれら受容体の DNA 応答エレメントによって調節されるレポーター遺伝子の転写を増加させることを示している。

WatanabeとOonuki(1999)は,DEが成長期のラットの生殖系,内分泌系に及ぼす影響を調べられている。実験は粒子濃度として $5.63\text{mg}/\text{m}^3$ (4.1ppm NO_2 , 8.10ppm NO)の濃度の総排気ガス(群)と粒子をフィルターで除いた除粒子排気ガス成分(群)および清浄空気(群)について行われている。血清中の男性ホルモン(テストステロン)と女性ホルモン(エストラジオール)濃度は,群で有意に増加し,卵胞刺激ホルモン(FSH)濃度は逆に,群でとも有意に低下している。精巣重量は3群間で変化はないが,精子産生数と精巣の透過性指標であるヒアルロニダーゼ活性は有意に低下している。FSH濃度と精子産生能力との間に直接的相関が認められているが,精巣のライディッヒ細胞やセルトリ細胞に形態的異常は認められていない。

これらの結果は,DEは副腎ホルモンの分泌を促進し,ゴナドトロピン遊離ホルモンを抑制して,ラットの精子産生を阻害していることを示唆している。なお,これらの影響は,除粒子排気ガス成分群で若干弱まる傾向はあるが,明瞭に認められていることから,DEのガス成分のほうが粒子状成分より内分泌系攪乱に寄与していると述べている。

Yoshidaら(1999)は,DEP濃度として1時間平均値が 0.3 , 1.0 および $3.0\text{mg}/\text{m}^3$ のDEを1日12時間ずつ1~10ヶ月間ICR系雄マウスに吸わせ,精子の運動能力,精子産生能力および精巣の形態変化などを調べている。その結果,試験管内でのFredericsonらのデータとは異なり,精子の運動能力が低下することは認められていない。しかし,1日当たりの精子産生能力はDEの曝露期間につれて低下傾向を示し,6ヶ月目で最も顕著になり,対照群の各々 29% , 36% および 53% まで低下し,いずれの値も対照群より有意に低下している。この精子産生能力の低下は,1ヶ月間清浄空気に戻すと回復する傾向が認められているが, $3.0\text{mg}/\text{m}^3$ 群ではなお 29% 低下していた。なお,体重,精巣重量,精巣上体重量などに有意な低下は認められていない。しかし,精巣組織の光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察では,男性ホルモンを産生するライディッヒ細胞の形態異常が観察されている。さらに,DE吸入マウスでは,黄体形成ホルモン(LH)受容体のmRNAの発現量もDEP濃度に依存して低下している。これらの結果から,男性ホルモンの合成能力が低下していることとLHのホルモン作用発現不全などが関与して精子産生能力が低下したことが示唆されている。これまでに $6\sim 12\text{mg}/\text{m}^3$ の高濃度では精子産生能力に影響がないとする報告もあり,生殖器への影響として必ずしも濃度依存的でない傾向がある可能性がある。環境ホルモンの作用の場合,濃度との間に逆U字型影響を示す例があるとの報告もあり,濃度反応関係について今後より詳しい検討が必要とされる。

Watanabeら(2001)は,Fisherラットを用い妊娠期間中のDE(粒子, NO_2 , NO 濃度: $5.63\text{mg}/\text{m}^3$, 4.10ppm , 8.10ppm),粒子を除いたディーゼル排気ガスおよび清浄空気に生殖時から妊娠20日まで1日6時間曝露を行った。性器-肛門間距離はDEおよびDEPを除いたディーゼル排気ガス群でいずれも清浄空気群に比べ長かった。組織学的な検討から精巣,卵巣および胸腺の分化が遅れかつ乱れていることが見いだされた。妊娠した母獣の血清中のテストステロン濃度はDEおよびDEPを除いたディーゼル排気ガス群のいずれにおいても有意に増加することが見いだされた。

Tanedaら(2000)は,DEPがヒトのエストロゲン受容体および受容体の発現を制御する部分を発現させている酵母を用い抗エストロゲン活性について検討した。DEPの懸濁液ではエストロゲン活性はなかったがエストロゲンの活性を低下させる作用($> 20\mu\text{g}/\text{ml}$)があることが見いだされた。

DEP はヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタン、メタノールおよび 1M のアンモニアで抽出しその活性について検討した。それぞれの分画にエストロゲン活性はなかった。エストロゲンにヘキサン画分を加えるとエストロゲンの活性をわずかに低下させる作用 ($> 20\mu\text{g/ml}$) があることが見いだされた。このことから、DEP は抗エストロゲン活性を有しているとした。

まとめ(生殖器への影響)

DEP抽出物が試験管の中で非常に微量でヒトの精子の運動能力を低下させることが報告されている。0.3mg/m³のような低濃度曝露で精子産生能力が有意に低下するという報告がある一方で12mg/m³のような高濃度曝露では影響がないとする報告もあり、今後さらに濃度 - 反応関係についての詳細な検討が必要とされる。また、ラットでDEPを除いたガス状成分だけでも精子産生能力等の低下が弱いながらも認められている。性器 - 肛門間距離はDEおよびDEPを除いたディーゼル排気ガス群でいずれも清浄空気群に比べ長くなることや組織学的に精巣、卵巣に影響があることが見いだされた。また、DEPに抗エストロゲン活性のあることが報告されている。

3.2.3.8. 神経・行動への影響

DE曝露が神経・行動に及ぼす影響に関する報告を表 3-27 にまとめた。

Laurieら(1980)は、新生仔期に6mg/m³のDEPを含むDEに曝露され(分娩後17日間,20時間/日),その後清浄空気下で飼育された15ヶ月齢の動物ではバーを押して食餌を取る行動の習得率が対照よりも有意に遅くなるが見いだされた。これが学習行動に影響があったためか他の原因によるものなのかは今後の課題である。

また、Laurieら(1978)は6mg/m³のDEPを含むDEに1日20時間,1週間に7日間で6週間曝露すると自発的な運動の減少が見られることを明らかにした。Laurieら(1980)は6mg/m³のDEPを含むDEに1日8時間と短い時間曝露した場合においても,1週間に7日間で6週間曝露すると自発的な運動の減少が見られることを明らかにした。さらに,Laurieら(1980)は新生仔期に曝露したとき(分娩後17日間,20時間/日,または分娩後28日から42日間)5週後の成獣を用いた結果では有意な自発的な運動の低下が見られた。

まとめ(神経・行動への影響)

行動および神経生理学的影響に関する研究は少ないこと,これまでの研究は6mg/m³と高濃度であることなどから,今後さらに検討が必要と考えられる。また,濃度 - 影響関係の検討も必要と考えられる。

表 3-27 神経・行動に及ぼす影響

粒子濃度(C) (mg/m ³)	曝露期間 (T)	C × T (mg.h/m ³)	NO ₂ (ppm)	SO ₂ (ppm)	CO (ppm)	動物種	影 響	出 典
6	20 時間/日, 7 日/週, 6 週間	5,040	2.5	1.8	19	SD ラット, 雌	自発的行動の低下 新生仔の旋回運動の低下	Laurie ら(1978)
6	8 or 20 時間/日 7 日/週, 3,4,6 or 16 週間	1,008~13,440	2.5	1.8	19	SD ラット, 雌	成獣での SLA の低下, 新生仔への 20 または 8 時間/日の曝露で SLA の低下, 新生仔への 20 時間/日で 17 日間の曝露はバー押し食餌を取る学習速度が低下する.	Laurie ら(1980)

3.2.4. 有害性（非発がん影響）の同定のまとめ

3.2.4.1. 有害性（非発がん影響に関する人への実験的負荷研究）の同定のまとめ

人への実験的負荷研究では数名から十数名の志願者（非喫煙者）に対して DE への曝露を行い、粘膜刺激症状、呼吸器症状、呼吸機能、鼻腔洗浄液ないし肺胞洗浄液中の各種免疫学的指標について検討している。DEP の点鼻曝露実験によって、鼻腔洗浄液中の IgE 濃度、IgE 産生細胞、IgEmRNA、及びアレルギー反応に重要な各種サイトカインが増加することが認められた。さらに、ブタクサ抗原との同時点鼻により抗原特異的な IgE、IgG4 の増加、Th2 タイプのサイトカインの発現増強と Th1 タイプのサイトカインの発現低下が示された。人健常成人に DE を吸入させた後の下気道および肺胞レベルへの影響が報告されていた。0.3mg/m³ の DE を運動負荷下で 1 時間曝露した場合、通常の呼吸機能検査には異常はみとめられなかったものの、気道洗浄液中の好中球と B リンパ球、及びヒスタミンとフィブロンネクチンが増加していた。気管支粘膜生検では好中球、肥満細胞、CD4+T リンパ球、CD8+T リンパ球の増加がみられ、また接着分子の発現増強が観察された。呼吸機能の低下を示した報告もあったが、その程度は小さく、呼吸機能に対する影響は明確ではなかった。これらの研究では眼、鼻、気道などに対する粘膜刺激症状がみられていた。人への実験的負荷研究からは DE 曝露によって気道に急性炎症がもたらされる可能性は示唆されるが、それらの炎症が呼吸機能にもたらす影響については明確な成績が得られていない。

3.2.4.2. 有害性（非発がん影響に関する疫学研究）の同定のまとめ

DE の人への急性の非発がん影響では、眼、喉、気管支などへの粘膜刺激症状、頭痛などの神経生理学的症状の訴えおよび臭い知覚などが鉱山労働者やカートラックフェリーの船内作業員、バス整備士、ディーゼル機関車整備工等の職業上の DE 曝露で報告されていた。DE 曝露に関連する作業中の呼吸器症状、粘膜刺激症状、頭痛などの神経生理学的症状の増加や DE 高濃度曝露後に喘息を発症した症例を報告しているものがあつた。これらの職業集団を対象として交代勤務の前後での呼吸器症状と呼吸機能が比較されているが、一般に変化はわずかなものであつた。呼吸器症状の増加を報告しているものもあるが、その場合にも呼吸機能の低下はみられておらず、呼吸機能低下を報告した研究においても、数日後には正常値に戻っており、変化は可逆的なものと考えられた。

DE への慢性曝露に関わる職業集団の呼吸器症状や呼吸機能に関する研究がいくつか報告されている。そのうち、咳や痰などの呼吸器症状は DE への曝露がある職業集団で高率であることが多くの研究で報告されているが、呼吸機能については結果に一貫性はみられなかった。DE への曝露に関連する職業集団の肺気腫、慢性気管支炎、ぜん息などのがん以外の呼吸器系疾患による死亡率の比較研究においても一貫した傾向は見られなかった。これらの研究のうち一部では粒子状物質をはじめとする大気汚染物質の測定が実施されている。しかしながら、長期的な曝露評価としては不十分であり、これによって長期曝露濃度を推計することは困難である。

我が国およびヨーロッパ諸国において、道路沿道住民（子供ないし成人）の呼吸器症状、喘息、呼吸機能等に関する多くの研究が報告されている。これらの調査による知見は職業上の曝露によ

る影響と異なり、一般住民を対象としている点で重要なものである。これらの研究の大部分は曝露の程度を居住地周辺道路の交通量や道路からの距離、もしくは両者を組み合わせた指標を用いて分類している。道路からの距離については自動車排気の影響が及ぶと想定している範囲として20m～数百m程度まで様々である。また、交通量については1日数万台程度の道路を対象としているものが多い。ヨーロッパ諸国におけるいくつかの調査では対象者への質問に基づいて交通量を評価しており、その客観性について慎重に評価する必要がある。我が国での調査では成人の呼吸器症状有症率と道路からの距離との関連性が報告されている。小児の喘息や喘鳴症状については多数の断面研究や症例対照研究などが行われている。曝露指標との関連性が指摘されている呼吸器疾患・症状は調査間で必ずしも一致してはいないが、多くの研究で交通量が多く、もしくは道路からの距離が近いほど呼吸器疾患有病率・呼吸器症状の有症率が高いことが示されており、一貫性がみられていた。呼吸機能についてはこれらの曝露指標の関連性を報告している研究もあるが、呼吸機能を検討している研究が少なく、結論を下すことは困難である。また、近年の研究では種々のアレルギー検査や炎症マーカー等との関連性を検討しているものもある。これら客観的な影響指標と自動車排ガス曝露との関連性に関する疫学研究は有用なデータを今後提供する可能性を持っているが、現状では必ずしも一貫した結果は得られていない。交通量との関連性を検討している研究の中では概ねディーゼルエンジン車と考えられるトラックの交通量を示しているものは少なく、一部の研究では粒子状物質などの大気汚染物質の測定結果が示されているが、DEPの寄与を示しているものはなかった。オランダの研究グループによる一連の報告ではトラック交通量やDEPの代替として黒煙濃度が測定され、これらと小児の呼吸機能、呼吸器症状との関連性を示唆していた。これらの研究報告の多くはDEを含む自動車排出ガスを主体とした都市大気汚染の健康影響を示唆するものと考えられる。しかしながら、これらの多くの報告ではSPM、PM₁₀、PM_{2.5}、黒煙等で表されている粒子濃度に対するDEPの寄与や濃度の相関などのデータが不十分であった。

さらに近年、一般人口集団を対象とした研究によって、PM_{2.5}やPM₁₀などの粒子状物質濃度の短期的変動と死亡、呼吸器や循環器系疾患による入院数、受診数、救急外来受診数、呼吸機能検査値、呼吸器症状との関連性に関する数多くの報告が諸外国から出されており、多くの研究で粒子状物質濃度とこれらの影響指標との間の統計的な関連性をみとめている。現在のところ、粒子状物質濃度の短期的変動に対してDEがどのように関与しているかについてはほとんど明らかになっていない。したがってDEの急性影響の観点からこれらの知見を評価することは困難である。

3.2.4.3. 有害性（非発がん影響に関する実験的研究）の同定のまとめ

一般毒性

慢性の曝露においては1.5mg/m³のDEの曝露が体重減少をもたらすことや肺重量を増加させることが報告されている。粒子濃度が1.5mg/m³以上、1日の曝露時間が8時間以上、1週間の曝露日数が5日以上、全曝露期間が2年以上の条件で成長への影響が見られることが示唆された。

呼吸機能への影響

呼吸機能への影響については、急性曝露の場合、DE そのものの曝露では $6\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度において 4 週間の曝露においても影響はほとんど示されなかった。それ以下の濃度の知見はない。亜慢性曝露の場合、 $4.4\text{mg}/\text{m}^3$ の DEP を含む DE にラットを曝露(7 時間/日, 5 日/週, 19 週間)したときにおいても、呼吸機能に影響がないことが報告されている。慢性曝露の場合、 $0.7\text{mg}/\text{m}^3$ 以下の DEP を含む DE は呼吸機能には影響を及ぼさないと考えられる。 $1.5\text{mg}/\text{m}^3$ の DEP を含む DE に 87 週間(20 時間/日, 5.5 日/週) 曝露した場合、機能的残気量が増加することと 40%および 20%FVC における最大呼気流量と $\text{FEV}_{0.1}$ が増加することが見いだされた。この変化は機能的残気量の増加と互いに整合性がとれない可能性があるが影響が観察された最低の濃度である。サルを用いた実験では ($2.0\text{mg}/\text{m}^3$ の DEP を含む DE, 7 時間/日, 5 日/週, 104 週間, $7,280\text{mg} \times \text{h}/\text{m}^3$) 8%の肺活量のところでの努力性呼気流量の減少など呼吸機能に影響が見られたが肺の体積、拡散能または換気の分布(ventilation distribution)には影響は見られなかった。それ以上の濃度の慢性曝露では概ね呼吸機能に影響がでてくるとい報告である。全体として 1.5 から $2.0\text{mg}/\text{m}^3$ の DEP を含む DE は肺実質の弾性の低下させ呼吸機能に影響を及ぼす可能性が示唆される。

気道への影響

気道炎症の機構

気道炎症の誘導メカニズムとしては、第一に気道上皮細胞を用いた研究報告から、生体内に取り込まれた DEP に結合、付着している PAH 類が気道上皮細胞、肺胞上皮細胞や肺胞マクロファージなどに作用してそれらの細胞内での情報伝達シグナル、核内転写因子を活性化することにより炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着分子などを発現する経路があると考えられる。DEP の核としての元素状炭素画分には気道上皮細胞などからの炎症性因子を誘導する活性はみられないが、IgE 抗体産生の亢進作用は有していることから、粒子としての物理的特徴が IgE 産生の別の経路を活性化している可能性が考えられる。第二に、DEP からの活性酸素、あるいは粒子を取り込んだ肺胞マクロファージが産生する活性酸素が、気道や肺の上皮細胞、肺胞マクロファージなどの構成細胞に傷害を与え、その傷害に起因して産生される炎症性サイトカインが炎症誘導に一役買っていることが明らかにされている。

非アレルギー性気道炎症

アレルゲンを投与せず、DEP の気管内投与あるいは DE 吸入のみの実験による気道での炎症反応に関する報告をまとめた。F-344 系ラットでは $3.5\text{mg}/\text{m}^3$ の DE 吸入で、好酸球浸潤を誘発する LTB_4 やプロスタグランジンの増加が起こり、B6C3F1 系マウスでは好酸球の浸潤が報告されている。一方、Wistar 系ラットでは $3.1\text{mg}/\text{m}^3$ の DE の 24 ヶ月間の吸入でも好酸球浸潤は認められていない。また、ICR 系マウスでは $3.0\text{mg}/\text{m}^3$ でも好酸球の浸潤や粘液産生細胞の増生などは全く認められておらず、ラットとマウスとも系統の違いによって影響は異なることが報告されている。

一方、DEP の気管内投与では、ICR 系マウスに毎週 1 回ずつ、1 匹当たり 0.1mg の DEP を 10

回以上繰り返し投与することで気道粘膜下への好酸球の浸潤や粘液産生細胞の増生、あるいは気道過敏性などが有意に増加したことが報告されている。これらの病態は活性酸素消去酵素や NOS 阻害剤等の投与で消失したことから、その病態の発現には O_2^- 、NO、ONOO⁻ 等の活性酸素種の関与が示唆されている。また、DEP 投与により起きるリモデリングの過程に血小板由来増殖因子が関与していることが示唆されている。

アレルギー性気道炎症

(喘息)

アレルギー性喘息病態には即時型あるいは遅発型アレルギー反応、気道過敏性の亢進(気道平滑筋の収縮)、抗原特異的抗体産生の亢進、好酸球の浸潤、杯細胞の増生などがある。ヒトにおいては非アレルギー性の喘息も知られている。ヒトの喘息様病態全てを再現できる動物モデルはない。DEPの気管内投与を行いながら、抗原(卵白アルブミンOA)を繰り返し気管内投与するとアレルギー性喘息様病態が起きてくることが見いだされている。DEPは抗原の繰り返し気管内投与による気道粘膜下への好酸球浸潤はや粘液産生細胞(杯細胞)の増生やリンパ球浸潤を増加させること気道をより過敏な状態にさせることが見いだされた。抗原(OA)を腹腔内注射して感作したマウスにDE曝露を行いながら、OAを吸入させ惹起させる喘息様病態モデルでは気道粘膜下への好酸球浸潤と粘液産生細胞の増生がOA+DE曝露群でのみDEP濃度に依存して増加し、 $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ 以上で対照群より有意に増加することが観察されている。

(アレルギー性鼻炎)

DEが花粉症様病態におよぼす影響についてであるが、ヒトの花粉症にみられるようなくしゃみ、鼻水、鼻づまりの症状や鼻過敏、抗原特異的抗体産生の亢進、好酸球の浸潤などがモルモットを使ったアレルギー性鼻炎様病態でも見られた。ヒトの鼻腔上皮細胞(HNECs)及び粘膜微小血管内皮細胞(HMMECs)を用いた検討では、DEPがヒスタミンレセプターを直接アップレギュレートするのみならず、ヒスタミン誘発剤IL-8とGM-CSF産生を増加させることで炎症性変化を促進することが観察されている。 0.3 および $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ のDEPを含むDEにモルモットを曝露しながら抗原を点鼻投与して惹起させるアレルギー性鼻炎様病態はDEP濃度に依存して 0.3 および $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ で有意に増悪することが観察された。DEは抗原特異的抗体産生の亢進、鼻過敏、好酸球の浸潤の増加をさせることから、これが鼻アレルギー反応を濃度依存的に増悪させる要因と考えられる。また、アレルギー性結膜炎についても 0.3 および $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ で同様のDEP濃度に依存した増悪作用が観察されている。

気道及び肺組織への影響

DE曝露が気道及び肺組織への影響(非発がん影響)について整理すると、典型的な所見は、肺胞マクロファージの集合体の増加、組織炎症、多形核白血球の増加、細気管支および肺胞の型細胞の過形成、肺胞中隔の肥厚、浮腫、線維症、肺気腫などである。また、肺胞壁に対する肺胞孔面積比率と肺胞あたりの肺胞孔数が曝露濃度と曝露期間に依存して増加することも見いだされてい

る。気管および気管支の傷害についてもいくつか報告されている。これらの組織変化と相関して、肺のDNA、総蛋白、アルカリ性および酸性フォスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素の増加、また、コラーゲン合成の増加やロイコトリエン、プロスタグランジンなどの炎症性メディエーターの遊離など多くの肺の組織化学的变化も報告されている。動物実験の結果を総括的に眺めると、DE曝露動物の肺における組織変化や組織化学的变化は長期曝露で観察されるが、いくつかの報告では、形態的变化が起こらない閾値の存在を示唆している。これらの報告では、組織病理学的な無影響レベルとして、7~20時間/日、5~5.5日/週の頻度で104~130週曝露の条件で、カニクイザルでは $2\text{mg}/\text{m}^3$ 、ラットでは $0.11\sim 0.35\text{mg}/\text{m}^3$ 、モルモットでは $0.25\text{mg}/\text{m}^3$ であった。

感染抵抗性・免疫系・血液成分への影響

感染に対する応答、免疫系へのDE曝露の影響、血液成分の変動のいずれにおいても粒子濃度 $2\sim 3.9\text{mg}/\text{m}^3$ といった比較的高濃度のDE曝露で認められている。また、ポリスチレン、テフロン、酸化チタン、無定形のシリカ粒子のいずれの粒子においても抗原特異的IgE、IgG2a産生と総IgE抗体価を増強する作用があることが見いだされてきている。

循環器への影響

DE曝露が循環器に及ぼす影響について検討した報告は少なく、知見の充実が必要である。雌雄のF344ラットや雌雄のHartley系モルモットを用いた場合 $6\sim 7\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度の近辺で心臓/体重、右心室/心臓の重量比の上昇、左心室の収縮性の低下、心拍数のわずかな低下が観察されている。

生殖器への影響

DEの生殖や発生におよぼす影響については、DEは副腎ホルモンの分泌を促進し、ゴナドトロピン遊離ホルモンは抑制してラットの精子産生を阻害していることを示唆している。これらの影響は除粒子群でも、若干弱まる傾向はあるが、明瞭に認められていることから、DEのガス状成分のほうが粒子状成分より内分泌系攪乱に寄与しているとした報告もある。

また、ICR系雄マウスに $0.3, 1.0, 3.0\text{mg}/\text{m}^3$ のDE曝露(12時間/日、1~10ヶ月間)を行うと1日当たりの精子産生能力は低下したことが報告、精巣組織の男性ホルモンを産生するライディッチ細胞の形態異常が観察された。これらの結果から、男性ホルモンの合成能力が低下していることとLHのホルモン作用発現不全などが関与して精子産生能力が低下したことが示唆された。一方、 $12\text{mg}/\text{m}^3$ のような高濃度曝露では影響がないとする報告もあり、濃度反応関係についての詳細な検討が必要とされる。性器-肛門間距離はDE及びDEPを除いたディーゼル排気ガス群で、いずれも清浄空気群に比べ長くなることや組織学的に精巣、卵巣に影響があることが見いだされた。また、DEPに抗エストロゲン活性のあることが報告されている。

神経・行動への影響

6mg/m³と高濃度であるが、DEの行動および神経生理学的影響については、自発的な運動の減少が見られることや新生仔期にDEに曝露されると学習行動に影響があることが報告されている。