

## 1. 毒性学研究と健康影響

### 1. 導入

1997年、米国大気中粒子状物質基準 (PMNAAQS) が改訂されたが、その大部分は「米国の地域で測定された大気中粒子状物質の環境濃度と死亡率および有症率の相関」という新たな疫学的知見に基づいている。一方、粒子状物質による死亡率および有症率の増加を説明しうる病態生理学的メカニズムに関しても、多くの仮説および毒性学的知見が提唱されてきた。多くの粒子状物質に関連する毒性学的研究は、主に、次の課題を解決することをめざしている。

- (1) 大気中の粒子状物質およびその構成成分により、いかなる病態生理学的影響が惹起されるのか。また、その発現メカニズムはいかなるものか。
- (2) 粒子状物質の性質 (サイズ、化学組成など) のうち、健康影響を支配するものはなにか。
- (3) 粒子状物質の健康影響に関し、感受性は存在するのか。また、いかなる集団が高感受性を示すのか。さらに、感受性はいかなる要因に規定されるのか。
- (4) 粒子状物質とガス状共存汚染物質の間で複合的影響はありうるのか。

これらの課題に関し、病態生理学的メカニズムに関する仮説を提唱し、それらを検証し、疫学的研究で示唆された粒子状物質の健康影響の生物学的妥当性を検証するために、種々の毒性学的研究が行われてきた。これには、粒子状物質に曝露されたヒトの志願者、霊長類、イヌ、ウサギ、げっ歯類といった実験動物を対象とした*in vivo*における研究や、組織、細胞、タンパク質、遺伝子、生化学系などを対象とした*in vitro*における研究が含まれている。

また、疫学的には、障害や他の要因の存在により粒子状物質の健康影響を受けやすい、いわゆる「高感受性」集団 (例えば慢性の呼吸器疾患などを持つ者) の存在がしばしば示唆されている。これを踏まえ、大気中の粒子状物質の影響を強く受けやすいヒト集団を想定し、その性質を高度に再現できる障害 (疾患) を持つ動物モデルを用いた研究が数多く含まれている。これらの毒性学的研究は、多くの場合、毒性学的影響に関する量-反応関係を特定することを主な目的とするものではなく、疫学的に観察されている健康影響の生物学的妥当性を検証することを意図しているため、用いられている曝露濃度および用量は環境濃度と比較すると一般に高濃度である。比較的高濃度の粒子状物質への曝露を動物や細胞に適用した場合には、その結果の解釈、および、ヒトの現実的な大気中の曝露条件における作用メカニズムへの外挿を行う際に注意を要する。一方、ヒトの現実的な大気中の曝露と比較すると毒性学的研究において適用される曝露期間は一般に短期間であること、粒子の吸入能力、体内沈着及び動態などの性質においてヒトと実験動物に差異があること、毒性学的研究において観測される反応、たとえば炎症反応等は、通常の生理学的な反応から有害な毒性反応に至るまでの幅があること等にも留意する必要がある。

しかし、これらの制約がある一方、毒性学的研究は、仮説の提唱およびメカニズムの解明において重要な役割を果たすことができる。

粒子状物質への曝露条件としては、CAPs(Concentrated Ambient Particles)や実験室で人為的に作成した粒子の全身や経鼻的な吸入曝露、また、鼻腔内、気管内、肺内への投与、さらには、溶液および懸濁液の状態での*in vitro*実験などが列挙される。

検討された粒子状物質の種類としては、CAPs、ROFA(Residual Oil Fly Ash)、ディーゼル排気(DE, Diesel Exhaust)とその粒子状成分(DEP, Diesel Exhaust Particles)、TSP(Total Suspended Particles)、金属成分、金属粒子、石炭フライアッシュ(CFA, Coal Fly Ash)、EPM(Emission Particulate Matter)、CB(Carbon Black)、超微小CB粒子、ナノ粒子、元素炭素や有機炭素、硫酸塩、Si、TiO<sub>2</sub>、多環芳香族炭化水素(PAH, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)などのDEP抽出物などが列挙される。特に、都市大気中の粒子状物質を用いた研究として、動物やヒトに一般の環境濃度よりも高濃度に濃縮したCAPsを吸入曝露させる手法がしばしばとられている。しかし、曝露するCAPsに関する化学組成の詳細な同定は不足していること、濃縮器は0.1 μm以下の粒子状物質を効率的に濃縮することができないこと、粒子状物質のガス状成分は濃縮が行われないことにも留意が必要である。一方、実際の大気環境に近似した曝露実験を行うことができるため、その研究の意義は高いものと考えられる。燃焼に関連し発生する粒子状物質に関しては、大規模工業(石油火力発電所等)由来のROFA、石油炉のアッシュ(DOFA, Fly Ash from a Domestic Oil-burning furnace)、CFAが多く用いられている。多くのROFAサンプルには高濃度の金属が含まれ、大気中粒子状物質のヒトへの曝露影響へと外挿するにあたっては、この点に留意する必要がある。また、ディーゼルやガソリン車などから発生する排出物にも多くの種類の成分が含まれ、かつ、それらは経時的に変化することにも留意する必要がある。一方、燃焼起因の生成物に関する作用メカニズムを直接見ることができるため、その研究の意義は高いものと考えられる。

本毒性分野の知見の整理については、微小粒子状物質の影響メカニズムに関する検討に資するため、毒性に関する影響メカニズムの解明を中心に知見を整理し、それらの知見を踏まえた影響に関する評価を行う。

各器官における粒子状物質の影響に関する想定しうる障害の仮説を列挙し、その仮説を検証するため、粒子状物質の健康影響に関する文献調査によりレビューされた動物実験及びヒトボランティア実験の文献等から、研究内容や研究対象物質が適切である等、優れた科学的知見を列挙し、吸入曝露、気管内投与による実験の種類や対象粒子の種類(一般大気、ROFA、DEP等)毎に整理をしたうえで、これらの知見により障害の仮説の確からしさの程度に関する評価を行う。

仮説については、粒子状物質の器官に対する障害に関する影響の仮説以外に、高感受性

モデルを用いた知見や共存汚染物質を含めた知見に基づき、高感受性群への影響や共存汚染物質の相互作用に関する事項も含めて、仮説の確からしさの評価を行う。

本章の構成は以下の通りである。

- 1) 呼吸器への影響について、炎症、障害、炎症以外のメカニズム、感受性の相違、粒子の種類による影響の相違等につき考察する。
- 2) 心血管系(循環器系)への影響について、心臓への酸化作用による障害のメカニズム、自律神経系の変化による影響、不整脈への影響、感受性の相違、粒子の種類による影響の相違等につき考察する。
- 3) その他の影響として、感染抵抗性・免疫系・血液成分への影響(感染抵抗性の低下、アレルギー性炎症の増悪、血液成分の凝固等)、生殖系への影響、神経・行動への影響、感受性の相違、粒子の種類による影響の相違等につき考察する。
- 4) 発がん影響について、粒子の種類による影響も含めて考察する。
- 5) 特定の粒子成分と健康影響の関心に注目し、異なる成分の粒子を用いて同一の実験条件で実施し、比較が可能な知見を対象とし、大気粒子に含まれる構成成分に関する健康影響から、構成成分による毒性発現の程度について考察する。
- 6) 粒径と健康影響の関心に注目し、異なる粒径の粒子を用いて同一の実験条件で実施し、比較が可能な知見を対象とし、微小粒子、粗大粒子、超微小粒子(環境ナノ粒子)の粒径の違いによる毒性発現の程度について考察する。

最後に、まとめとして、各器官の評価内容を整理し、大気粒子状物質による影響メカニズムに関する評価を記述し、高感受性や共存汚染物質との相互作用の影響要因について記述する。

## 2. 肺および呼吸器への影響

### 2.1. 仮説の紹介

ヒトおよび実験動物における微小粒子状物質の吸入による一般的な呼吸器疾患の発現機序を解明するため、これまで世界中で基礎研究と臨床研究がなされて、膨大な科学的知見が蓄積されてきている。

今般、大気中の粒子状物質の曝露による肺への毒性学的影響を考察するために、以下の仮説をたて、その仮説に関する科学的知見に基づき、仮説の確からしさの程度に関する検証を行なう。

- (1) 肺障害および炎症を誘導する
- (2) 気道反応性の亢進および喘息の悪化がみられる
- (3) 呼吸器感染に対する感受性が亢進する
- (4) 疾患モデル動物では粒子状物質の曝露による影響に差異が生じる
- (5) 複合大気汚染により影響の増悪が生じる

### 2.2. 論文の紹介

#### 2.2.1. 肺障害および炎症を誘導する

Rudellら(1990)は8人の健康な非喫煙者(年齢など記載なし)をDEに1時間曝露し曝露前および曝露後18時間目にBALFを採集した。DE濃度は、曝露チャンパー内の被験者の呼吸ゾーンでNO<sub>2</sub>の平均濃度が4.6ppmになるように希釈した(そのときの粒子濃度は4.3×10<sup>6</sup>/cm<sup>3</sup>、NOは3.7ppm、COは27ppm、ホルムアルデヒドは0.5mg/m<sup>3</sup>)。その結果、気管支肺胞洗浄液(BALF、BronchoAlveolar Lavage Fluid)中のマスト細胞の総数の有意な減少、好中球は僅かだが有意に増加した。T-helper/Suppressor-Cytotoxic細胞比の上昇、マクロファージの食食能の有意な減少がみられた。

Salviら(1999)は、15人の健康な非喫煙者の志願者(男11人、女4人;平均年齢24歳;21~28歳)を間欠的運動下(分時換気量が20L/min/m<sup>2</sup>体表面積の負荷で15分運動、15分安静の繰り返し)で1時間、空気および希釈されたDEに曝露した。DEは、VolvoTD45-1991エンジンで発生させた。曝露は、PM<sub>10</sub>濃度が300µg/m<sup>3</sup>になるようにした。各成分濃度は、NO<sub>2</sub>:1.6ppm、NO:4.5ppm、CO:7.5ppm、総炭化水素:4.3ppm、ホルムアルデヒド:0.26mg/m<sup>3</sup>、浮遊粒子状物質(SPM、Suspended Particulate Matter):4.3×10<sup>6</sup>/cm<sup>3</sup>であった。各曝露の前後に肺機能(最大呼気流量(PEF、Peak Expiratory Flow)、努力性肺活量(FVC、Forced Vital Capacity)、1秒量(FEV1.0、Forced Expiratory Volume in one second)、FVCの25~75%の平均努力呼気流量(FEF<sub>25-75%</sub>、Forced Expiratory Flow between 25% and 75% of FVC))を測定した。肺の炎症性反応を調べるために、採血および気道洗浄液と気管支粘膜の生検を得るために気管支鏡を各曝露の6時間後に行った。標準的な肺機能検査はDE曝露後変化しなかったが、気道洗浄液では、ヒスタミンとフィブロネクチンの増加と共に好中球とBリンパ球の有意な増加がみられた。DE曝露後6時間後に得られた気管支生検は、気管支組織におけるLFA(Lymphocyte Function Associated Antigen)-1+細胞の数の増加と共に、内皮接着分子であるICAM-1(InterCellular Adhesion Molecule-1)とVCAM-1(Vascular Cell Adhesion Molecule-1)のupregulationと共に好中球、マスト細胞、CD4+(Cluster of Differentiation 4+)とCD8+Tリンパ球の有意な増加を

示した。好中球と血小板の有意な増加が、DE 曝露後末梢血で観察された。この研究は、高濃度で、急性の短期間の DE 曝露は、健康な志願者の標準的な肺機能測定では過小評価されるが、顕著な全身性および肺の炎症反応をひき起こすことを実証していると述べている。

Rudell ら (1999) は、DE の正常な健康者における気管支肺胞細胞への影響と溶解性成分への影響を明らかにするために、アイドリング・エンジン (Volvo TDIF-1990) からの排気管出口における粒子捕集が気道炎症の指標を減少させるかどうかを評価した。研究は、10 人の健康な非喫煙者 (男 8 人、女 2 人、平均年齢 27 歳; 22~35 歳) を対象に、空気、希釈された DE (粒子数:  $2.6 \times 10^6/\text{cm}^3$ 、 $\text{NO}_2$ : 1.3 ppm、 $\text{NO}$ : 3.4 ppm、炭化水素: 4.2 ppm、ホルムアルデヒド:  $0.32 \text{ mg}/\text{m}^3$ )、およびセラミックの粒子捕集装置でろ過された希釈された DE の曝露を行った。被験者に、軽度の運動 (75W で、 $15 \text{ L}/\text{min}/\text{m}^2$  体表面積の分時換気量) を 10 分間、安静を 10 分間繰り返しながら 1 時間曝露した。曝露後 24 時間目に、BAL を行い、気管支および気管支肺胞領域からの洗浄液の細胞および溶解成分について分析した。結果は、粒子捕集は、平均粒子数を 50% 減少させたが、他の測定成分の濃度は、殆ど変わらなかった。DE は、*in vitro* で肺胞マクロファージによる貪食に悪影響を及ぼすと共に気道洗浄液中の好中球の増加を引き起こすことがみいだされた。さらに、DE は、 $\text{CD}3+\text{CD}25+$  細胞の減少を伴って、肺胞マクロファージの気腔への移動を引き起こすことがみいだされた。排気管の出口に特定のセラミックの粒子捕集を用いても、アイドリング車からの排気と相互作用してこれらの影響を完全に除去できるほど十分ではなかった。結論として、本研究は、DE への曝露は、気道への好中球と肺胞マクロファージの補充を引き起こし、肺胞マクロファージの機能を抑制することを示した。粒子捕集装置によってろ過された DE は、ろ過されない DE に比べ、DE によって引き起こされる影響を有意に減少させなかった。DE の気道における悪影響を減少させるためにもっと効率的な処理装置を評価するための研究が更に必要であると述べている。

Nordenhäll ら (2000) は、健康な志願者における最近の気管支鏡による研究では、DE への曝露に続いて気道の炎症がはっきり検出されているので、健康な志願者による誘発された痰を用いて、DE への曝露に続く炎症性反応の time kinetics を評価するために以下の研究を行った。15 人の健康な非喫煙者の志願者 (男 13 人、女 2 人、平均年齢 25 歳: 22~33 歳) を 50% カットオフの空気力学径が  $10 \mu\text{m}$  の粒子 ( $\text{PM}_{10}$ ) の濃度が  $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$  の DE 粒子とろ過空気に、間欠的運動下 (分時換気量が  $20 \text{ L}/\text{min}/\text{m}^2$  体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 1 時間曝露した。DE は、Volvo BM TD45-1991 を使用して発生させ、曝露チャンバーの入口部濃度が、 $\text{PM}_{10}$ :  $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $\text{NO}_2$ : 1.6 ppm になるように調整した。各曝露後 6 時間と 24 時間目に、 $\beta_2$ -agonist を吸入後、7 分間隔で高張性食塩水 (3、4 および 5%) の濃度をあげながらエアロゾルを吸入させ、痰を誘発した。痰の細胞分画数や溶解性タンパク質濃度の分析を行った。DE への曝露後 6 時間では、ろ過空気曝露に比し、IL (InterLeukin)-6 濃度 ( $12.0$  対  $6.3 \text{ pg}/\text{mL}$ 、 $p=0.006$ ) と methylhistamine ( $0.11$  対  $0.12 \text{ } \mu\text{g}/\text{L}$ 、 $p=0.024$ ) 濃度の増加を伴った痰中の好中球のパーセンテージ (37.7 対 26.2%、 $p=0.002$ ) の有意な増加がみられた。曝露にかかわらず、痰中の好中球のパーセンテージは、6 時間に比べ 24 時間では有意な増加がみられたことは、痰誘発そのものの処置が痰の構成成分を変えるかもしれないことを示した。この研究は、DE への曝露は、健康なヒトの気道で、IL-6 と methylhistamine 濃度と好中球のパーセンテージの初期の増加で示

されるような炎症性反応を引き起こすことを示した。痰の誘発は、DEの炎症性影響の研究の安全な手段を提供しているが、痰の誘発を繰り返した結果の評価には注意を払わなければならないと述べている。

Nightingaleら(2000)は、正常な志願者における Diesel exhaust particles (DEP:ディーゼル排気粒子)の吸入に対する炎症性反応を調べた。DEPは、ディーゼル・エンジンの排気から捕集され、市販の粒子分散器で再浮遊させ曝露チャンバーに導入した。10人の健康な非喫煙者(男3名、女7名、平均年齢28歳)を空気力学径が $10\mu\text{m}$ 以下( $\text{PM}_{10}$ )の粒子濃度を $200\mu\text{g}/\text{m}^3$ にコントロールしたDEPに、または清浄空気に、チャンバー内で、安静下で2時間曝露した。曝露後4時間に至る痰の誘発と静脈切開と同様に一連のスパイロメトリー、脈拍、血圧、呼出一酸化炭素(CO)およびメサコリン反応を測定し、曝露後24時間目にこれら全ての手技を繰り返した。DEPへの曝露後、心血管系パラメーターや肺機能に変化はみられなかった。呼気COレベルはDEP曝露後に増加し、1時間目に最高となった(空気: $2.9\pm 0.2\text{ ppm}$  [平均 $\pm$ SEM]; DEP: $4.4\pm 0.3\text{ ppm}$ ,  $p<0.001$ )。空気曝露後4時間と比較するとDEP曝露後4時間では痰中の好中球( $41\pm 4\%$  対  $32\pm 4\%$ )とmyeloperoxidase (MPO) ( $151\text{ ng/ml}$  対  $115\text{ ng/ml}$ ,  $p<0.01$ )の増加がみられたが、末梢血中のIL-6、TNF(Tumor Necrosis Factor)- $\alpha$ およびP-selectinの濃度に変化がみられなかった。以上の結果から、高濃度でのDEPへの曝露は、正常な志願者で気道の炎症性反応をおこすと述べている。

Holgateら(2003a)は、38人の健康な非喫煙者(18~40歳)をろ過空気に12人(男8人、女4人)、Chapel Hillの大気を6~10倍に濃縮したCAPs( $\text{PM}_{2.5}$ : $23.1\sim 311.1\mu\text{g}/\text{m}^3$ )の平均値が低い群( $47.2\pm 5.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ )、中等度群( $107.4\pm 9.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ )および高濃度群( $206.7\pm 19.2\mu\text{g}/\text{m}^3$ )の各群に10人ずつ(1名性別不明で残り全員男)間欠的運動下(分時換気量が $25\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で15分の運動と15分の安静の繰り返し)で2時間曝露した。曝露前および曝露後18時間目に採血し、また曝露後18時間目に気管支生検とBALFを採集した。肺機能(スパイロメトリーとプレチスモグラフィ)は、CAPs曝露による影響がみられなかった。曝露後、血中フィブリノゲンは、CAPs曝露の各群では平均して $38.8\sim 43.3\text{ mg/dL}$ 増加したが、濃度依存性はみられなかった。BALFでは、好中球の細胞数、または総細胞数に対するパーセンテージの両方で濃度依存性の増加がみられた。気管支生検では、細胞数や接着分子表現への影響はみられなかった。これらのことから、CAPsではBALFで軽度の気道炎症がみられるが気管支生検組織に反映されるようなものではないと述べている。

Holgateら(2003b)は、38人の健康な非喫煙者(18~40歳)をろ過空気に12人(男8人、女4人)、Chapel Hillの大気を6~10倍に濃縮したCAPs( $\text{PM}_{2.5}$ : $23.1\sim 311.1\mu\text{g}/\text{m}^3$ )の平均値が低い群( $47.2\pm 5.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ )、中等度群( $107.4\pm 9.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ )および高濃度群( $206.7\pm 19.2\mu\text{g}/\text{m}^3$ )の各群に10人ずつ(1名性別不明で残り全員男)間欠的運動下(分時換気量が $25\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で15分の運動と15分の安静の繰り返し)で2時間曝露した。曝露前および曝露後18時間目に採血し、また曝露後18時間目に気管支生検とBALFを採集した。肺機能(スパイロメトリーとプレチスモグラフィ)は、CAPs曝露による影響がみられなかった。曝露後、血中フィブリノゲンは、CAPs曝露の各群では平

均して 38.8~43.3mg/dL 増加したが、濃度依存性はみられなかった。BALF では、好中球の細胞数、または総細胞数に対するパーセンテージの両方で濃度依存性の増加がみられた。気管支生検では、細胞数や接着分子表現への影響はみられなかった。これらのことから、CAPs では BALF で軽度の気道炎症がみられるが気管支生検組織に反映されるようなものではないと述べている。

Stenfors ら (2004) は、25 人の健康な非アトピー性の者 (男 16 人、女 9 人：平均年齢 24 歳；19~42 歳) および 15 人の B<sub>2</sub> 作動薬の吸入のみしている軽症の喘息患者 (女 5 人：平均年齢 30 歳；22~52 歳) を大気レベルの DE [10 $\mu$ m の空気力学径の 50% カット・オフの粒子 (PM<sub>10</sub>) 濃度が 108 $\mu$ g/m<sup>3</sup> (94~124)、CO は 1.7 ppm (0.6~2.5)、NO<sub>2</sub> は 0.2 ppm (0.1~0.3)] に中等度の間欠的運動下 (分時換気量が 15-20L/min/m<sup>2</sup> の負荷で 15 分間の運動と安静の繰り返し) で 2 時間曝露し、肺機能と気道炎症を評価した。DE は、Volvo のディーゼル・エンジンで発生させた。肺機能は Body plethysmograph で sRaw (特異的気道抵抗)、FVC および FEV<sub>1</sub> を測定した。曝露後、6 時間目に気管支鏡を行い、気管支生検、気管支洗浄液 (BW) および BALF を採集した。粘膜生検については、特異的細胞マーカー、血管内皮接着分子および細胞内接着分子、サイトカインや転写因子を測定した。BW および BALF については、細胞分画、アルブミン、総タンパク質、IL-6、IL-8、GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)、methyl-histamine、MPO および ECP を測定した。DE 曝露後、FEV<sub>1</sub> や FVC は、どのグループも影響がみられなかった。sRaw は、空気曝露に比し、健康者では 4.1% (p<0.01)、喘息患者では 6.5% (p<0.01) の増加を示したが、グループ間では反応の大きさに統計的な差はみられなかった。健康な被験者は、DE 曝露後、気道炎症を起こし、気道洗浄液における IL-6 と IL-8 タンパク質の増加、気管支粘膜における IL-8 mRNA の増加と内皮の接着分子 (P-selectin と VCAM-1) の upregulation を伴った気道の好中球増加とリンパ球増加を示した。喘息患者では、DE 曝露は、好中球性反応を引き起こしたり、既存の好酸球性気道炎症を増悪させたりすることはなかった。サイトカインの IL-10 の上皮染色は、喘息グループでは DE 後に増加していた。DE による IL-10 の誘発は、喘息患者の気道炎症の増強に寄与するかもしれない。現在の WHO の大気質基準以下の濃度で 50% カット・オフの空気力学径が 10 $\mu$ m の粒子が、健康者と喘息患者で異なる影響がみられることが、この研究で観察された。これらの異なる反応の意味を解明するには更に研究が必要であると述べている。

Pourazar ら (2005) は、15 人の健康な非アトピー性の非喫煙者 (男 11 人、女 4、平均年齢 24 歳；21-28 歳) について、Volvo 社のディーゼル・エンジンで供給された DE [DEP が MMD (Mass Median dynamic Diameter) で 10  $\mu$ m 以下の粒径 (PM<sub>10</sub>) 濃度：300  $\mu$ g/m<sup>3</sup>、NO<sub>2</sub>：1.6 ppm、NO：4.5 ppm、CO：7.5 ppm、総炭化水素：4.3 ppm、ホルムアルデヒド：0.26 mg/m<sup>3</sup>、浮遊粒子：4.3 $\times$ 10<sup>6</sup>/cm<sup>3</sup>]、または空気に曝露チャンバーで 1 時間、間欠的運動下 (分時換気量が 20 L/min/m<sup>2</sup> の負荷で 15 分間の運動と安静の繰り返し) で吸入させた。曝露後 6 時間目に、気管支鏡で気管支内膜の生検を行い、気管支上皮細胞の免疫組織化学的染色を行い、転写因子の NF- $\kappa$ B (p65) および AP-1 (c-jun および c-fos) と upstream stress-related MAPKs [p38 および JNK )] の発現量とチロシン残基のリン酸化量を調べた。その結果、DE への短期間曝露は、リン酸化された p38 の総免疫染色 (cytoplasmic + nuclear) の増加と同様に、NF- $\kappa$ B、AP-1、リン酸化 JNK および p38 の nuclear translocation

の有意な増加をもたらした。Nuclear リン酸化 tyrosine の有意な増加もみられた。これらの観察は、DE は、proinflammatory サイトカインの合成の増加を引き起こすことと一致して redox-sensitive 転写因子を活性化させることを示している。著者は、これらの経路の upregulation は、DEP が誘発する細胞外の酸化ストレスと proinflammatory サイトカインの誘発を関連づける分子機構であると考えている。

\*MAPKs, Mitogen-Activated Protein Kinase

\*JNK, c-Jun N-terminal kinase

\*NF- $\kappa$ B, Nuclear Factor kappa B

Ghio ら (2000) は、38 人の健康な非喫煙者 (男 36 人、女 2 人：平均年齢 26.2 歳) をノース・カロライナ州の Chapel Hill にある EPA の Human Studies Facility の近くの環境大気から濃縮された Concentrated ambient particles (CAPs：濃縮大気浮遊粒子状物質) またはろ過空気に曝露した。曝露中のチャンパー内の粒子濃度は、 $23.1 \sim 311.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  の範囲 [MMAD (Mass Median Aerodynamic Diameter) は  $0.65 \mu\text{m}$ ] であったが、これらを四分位に分類した [PM<sub>2.5</sub> のそれぞれの粒子濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) は、Quartile-1 (Q-1)：清浄空気 (被験者数 8 人)、Q-2： $47.2 \pm 5.3$  (10 人)、Q-3： $107.4 \pm 9.3$  (10 人)、Q-4： $206.7 \pm 19.2$  (10 人)]。曝露チャンパー内で、被験者は、間欠的運動下 (分時換気量が  $25 \text{L}/\text{min}/\text{m}^2$  体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 2 時間曝露された。曝露後、症状は認められなかった。同様に、肺機能 [スパイロメトリー (FVC、FEV<sub>1</sub>、PEF) および plethysmography (Raw)] の低下もみられなかった。曝露後 18 時間での BAL から得られた細胞と液の分析では、CAPs に曝露されたこれらの被験者における気管支および肺胞分画の両方で、ろ過空気 (それぞれ  $2.69 \pm 0.55$  と  $0.75 \pm 0.28\%$ ) に比較して好中球の軽度の増加 (最大の曝露を受けた者達で、それぞれ  $8.44 \pm 1.99$  と  $4.20 \pm 1.69\%$ ) がみられた。CAPs への曝露後 18 時間の血液は、曝露前のサンプルに比べ、有意に多くのフィブリノゲンを含んでいたが、量反応関係はみられなかった。以上の結果から、大気粒子は、血液中のフィブリノゲン濃度の増加と同様に下気道での軽度の炎症を引き起こしうると結論できると述べている。

Harder ら (2001) は、38 人の健康な非喫煙者の志願者 (男 36 人、女 2 人：平均年齢 26.2 歳；18~40 歳) をノース・カロライナ州の Chapel Hill にある EPA の Human Studies Facility の近くの環境から濃縮された粒子またはろ過空気に間欠的運動下 (分時換気量が  $25 \text{L}/\text{min}/\text{m}^2$  体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 2 時間曝露した。曝露中のチャンパー内の粒子濃度は、 $23.1 \sim 311.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  の範囲であった。最初のろ過空気に曝露された 8 人を四分位数の最初の quartile を quartile 1 (Q-1) とし、残りの 30 人の曝露を PM 濃度の増加に伴い分割し 10 人のグループに分けた [PM<sub>2.5</sub> の平均濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) は、Q-2： $47.2 \pm 5.3$ 、Q-3： $107.4 \pm 9.3$ 、Q-4： $206.7 \pm 19.2$ ]。ヒトと動物の両方の研究から、粒子への曝露後 18 時間と 24 時間の間に炎症性反応がみられることが示されているため、空気または CAPs への曝露後 18 時間目に気管支鏡を行い、気管支と BALF を採集した。曝露による症状は認められなかった。曝露後 18 時間に、BAL で得られた細胞の分析は、ろ過空気に曝露された者の液中の好中球 (気管支分画  $2.7 \pm 0.6\%$ ；肺胞分画  $0.8 \pm 0.3\%$ ) に比べ CAPs の最高濃度に曝露された被験者における気管支 ( $8.4 \pm 2\%$ ) と肺胞分画 ( $4.2 \pm 1.7\%$ ) の両方で好中球の軽度の増加を示した。最高の粒子レベル (平均  $207 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) の吸入後、洗



浄で回収されたリンパ球や肺胞マクロファージのパーセンテージに変化はみられなかった。CD3、CD4、CD8、CD19 や活性マーカーの CD25 を表す BALF 中のリンパ球の割合にも変化はみられなかった。粒子吸入は、肺胞マクロファージ上の CD11b、CD64、CD16、CD14 の表現に影響を与えなかったし、zymosan A で刺激後の食食能やオキシダント発生にも影響がみられなかった。ELISA によって検出された BALF 中の IL-6 と IL-8 レベルは、吸入された粒子レベルには関係していなかった。CAPs への曝露後 18 時間で採集された血液のリンパ球サブセットの分布は、曝露前の分布と異なっていなかった。以上の結果から、本条件下では、大気粒子は、下気道で軽度の炎症を引き起こしうるが、免疫表現型やマクロファージ機能に影響を及ぼさないと結論している。

Lay ら (1999) は、34 人の健康な非喫煙者の志願者 (男 27 人、女 7 人；平均年齢 25.8 歳、19.6~35.5 歳) に、気管支鏡を用い、最初の気管支鏡の時に、SPSS に浮遊された  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  の microspheres [CMD (Count Median Diameter) が  $2.6\mu\text{m}$  で、非放射性、10 ml SPSS 中に  $3 \times 10^8$  粒子] を肺舌状部に注入し、コントロールとして粒子を含まない SPSS を右中葉に注入した。注入後、1、2、4、28 または 91 日目に、肺細胞と生化学的成分を採集するために BAL を行った。 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  は、毒性が無く、非発癌性および非繊維化性であるという証拠に基づいて選択した。粒子の注入は、注入後の最初の日は一時的な急性炎症を引き起こし、BALF のタンパク質、LDH (Lactic DeHydrogenase)、および IL-8 の増加と同様に好中球と肺胞マクロファージ数の増加で特徴付けられていた。この反応は、無症状で、注入後 4 日以内に消滅した。同じ粒子の気管内注入後 1 日目のラットで類似の量依存性の反応がみられた。粒子は、少量の溶解性 Fe ( $240\text{ng/mg}$ ) を含み、*in vitro* でオキシダント発生に触媒作用を及ぼす能力をもっていた。これらの知見は、粒子曝露後の急性炎症は、少なくとも部分的には、粒子に関連した Fe イオン、水酸化鉄や oxyhydroxides の残留量の存在によって触媒されたオキシダント発生の結果であるかもしれないことを示しており、粒子状大気汚染レベルの増加に関連した急性健康影響に関連しているかもしれないと述べている。

Kuschner ら (1997) は、15 人の健康な志願者 (男 8 人、女 7 人；平均年齢 31.3 歳) について ZnO フェームを顔面マスクをつけ口呼吸で吸入させ、3 時間後に BAL 中のサイトカイン濃度を調べた。ZnO フェームは、溶鉱炉システムを利用して発生させた [MMD:  $0.17\mu\text{m}$ 、濃度の中央値:  $33\text{mg/m}^3$  ( $20 \sim 42\text{mg/m}^3$ )]。曝露時間は、2 人が 10 分、5 人が 15 分、8 人が 30 分であった。14 人の異なる被験者 (男 8 人、女 6 人；平均年齢 35.6 歳) について類似の濃度に曝露後、20 時間後に BALF を採集した。その結果、3 時間後の BALF 中の TNF、IL-6 および IL-8 の量依存性の統計的に有意な増加がみられた。TNF は、曝露後 20 時間目に比し、3 時間目で有意に大きかった。これらのデータは、TNF が、金属熱の媒介で重要な初期の役割をしていることを示していると述べている。

Ghio と Devlin (2001) は、PM を含むフィルターが、Utah Valley にある製鉄工場の閉鎖前 (1986 年)、閉鎖中 (1987 年)、および再開後 (1988 年) に捕集されていたので、フィルターの水溶性抽出物を作成した。これらの抽出物の一つ ( $500\mu\text{g}$ ) を含む 10 ml の食塩水を気管支鏡で 24 人の健康な非喫煙者 (男 21 人、女 3 人、平均年齢 26.4 歳) の左肺舌区の区域気管支に注入し、さらに 10 ml の食塩水を注入した。同様に、粒子を含まない 20 ml

の食塩水を右中葉の亜区域に注入した(対照)。本研究で注入した500 $\mu\text{g}$ は、Utah Valleyで冬季の気温逆転時にPM<sub>10</sub>が100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超えることがあり、このような状態で24時間呼吸し、その10%が肺の舌区に分布し、そのうちの42%が沈着すると仮定すると91 $\mu\text{g}$ のPM<sub>10</sub>が沈着することになり、注入量は、この約5倍に相当する。24時間後に、同じ領域を洗浄し、BALFを採集した。製鉄工場の閉鎖前と再開後に捕集されたPMの水溶性抽出物への曝露は、工場の閉鎖中に捕集されたPM抽出物に比較し、より大きな炎症性反応をもたらした。抽出物の注入後のBALF中の生存細胞の総数は、食塩水に比べて増加した。好中球のパーセンテージは、1987年のPM抽出物と食塩水に比べ、1986年と1988年のPM抽出物の注入後に増加した。BALF中のタンパク質、アルブミン、fibronectin、 $\alpha$ 1-antitrypsin、IL-8、TNF、IL-18も類似の傾向を示した。さらに1986年の抽出物の100 $\mu\text{g}$ を注入すると、好中球、タンパク質および炎症性サイトカインの上昇がみられた。これらは、PMへの人の実験的曝露後の肺への影響が、通常の曝露条件下での同じ材料に関する疫学研究で観察された健康影響と相関していることを示した最初の報告である。このことは、曝露量は、PM曝露後の健康影響を評価するために使用する最も適切なものではなく、むしろ特異的な成分を同定し、評価しなければならないことを示唆していると述べている。

Huangら(2003)は、CAPs中の硫酸塩/Fe/Se因子がBALF中の好中球の増加、Cu/Zn/V因子が血中フィブリノゲン増加と関連している、PMの特異的成分の重要性を指摘している。健康者、喘息患者やCOPD(Chronic Obstructive Pulmonary Disease)患者で、HRVの変化や収縮期血圧への影響が報告されているが、COPD患者よりも健康者の方で影響がより強く観察されている。

Leiら(2004a)は、ラットにモノクロタリン60mg/kg(体重)を腹腔内投与し肺高血圧を惹起させた。その14日後にCAPs(dust storm forecast system of Taiwan Environmental Protection Administration using a modified ultrafine particle concentrator developed by Sioutas et al.を使用)を、126.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (対照群)、315.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (低曝露群)、684.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (高曝露群)の3群で吸入曝露した。黄砂の季節に、低曝露群と対照群の1匹は6時間、高曝露群と対照群の3匹は4.5時間曝露した。高曝露群は呼吸困難をきたしたため、4.5時間の曝露で終了した。末梢血中の白血球数は、粒子の濃度に依存して増加した。赤血球やヘモグロビン、ヘマトクリットには有意な変化は見られなかった。BALF中の総細胞数と好中球数も粒子濃度に依存して増加した。BALF中の総タンパク質、LDH、IL-6タンパク質濃度に関しても同様な結果が得られた。

Leiら(2004b)は、CAPs(PM<sub>2.5</sub>)(台北(台湾)由来、曝露濃度:PM<sub>2.5</sub>( $\pm$ SD):371.5( $\pm$ 208.3) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )の急性影響を知るために、モノクロタリン処理を行ったラット(ヒトの肺高血圧症モデルを想定)にCAPsを6時間/日、3日間連続曝露し、肺の機能検査および炎症所見について解析した。その結果、気道狭窄の指標としてのPenh: enhanced pause(肺気流抵抗)の有意な上昇、呼吸数の減少、一回換気量の増加が認められた。また、BALF内の好中球の増加、タンパク質及びLDH濃度の増加、IL-6値の増加が認められた。

Kodavantiら(1999)は、SDラット(60日齢、体重250~300g)にモノクロタリン60mg/kg(体重)を腹腔内投与して肺障害/肺高血圧を引き起こした。対照群には生理食塩水(正