

4. 免疫系その他の影響

4.1. 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感染抵抗性やアレルギー反応など免疫系への影響に関する発現機序を解明する研究が、呼吸器への影響に関する機序の解明と併せて行われている。また、近年、生殖器への影響や神経・行動に対する影響に関してもその機序を解明する研究が行われ始めている。

大気中の粒子状物質およびその成分による免疫系への影響に関して、2つの機構について仮説の検証を行う。

- (1) 呼吸器における感染抵抗性が低下する
- (2) アレルギー性疾患が増悪する

また、その他の影響として、2つの機構の仮説の検証を行う

- (3) 生殖器への影響が生じる
- (4) 神経・行動への影響が生じる

4.2. 論文の紹介

4.2.1. 呼吸器における感染抵抗性が低下する

Zelikoffら(2002)は、CAPs(粒径 $PM_{2.5}$ 、 $65\sim 90\mu g/m^3$)の曝露時間5時間の急性曝露影響を検討し、 $PM_{2.5}$ 曝露は感染ラット肺からの菌排出を遅らせること、および粒子中のFeが関与していることを示唆する結果を得た。肺炎球菌に感染したラットへCAPsを曝露すると18時間後、24時間後には清浄空気曝露群に対して有意な細菌負荷率(relative bacterial burdens)の増加を認めている。金属塩(Fe, Ni, Mnの塩化物)曝露では、とくにFe(2価)の曝露後に回収したBALFのマクロファージから産生されるスーパーオキシドアニオン($\cdot O_2^-$)が清浄空気曝露群より有意に高く、同じくBALF中の好中球やリンパ球は有意に下がるがマクロファージは増加し、感染ラットでの細菌負荷は増加している。これらの結果から、ニューヨークでの大気粒子曝露とFe塩化物曝露の肺炎や免疫能に対して類似した影響を及ぼし、大気粒子の免疫毒性にはFeが関与していると考えられると述べている。

Campbellら(1981)は、4~8週齢のCR/CD-1マウス(雌 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(8時間/日で8、15、16日間)、慢性(44、46週間)を行い、TSPとして平均 $6.4mg/m^3$ 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に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と報告している。

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、CD-1 マウス(雌)を 2mg/m³炭粉群、2mg/m³DE 曝露群、1mg/m³ DE + 1mg/m³炭粉の混合群、清浄空気曝露群の 4 群にわけ、7時間/日、5日/週の曝露条件で 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。

Hiramatsu ら (2005)は、マウスに DE(約 3mg/m³、3.1±0.2mg/m³)または清浄空気(対照群)を 1ヶ月、2ヶ月、6ヶ月間 (7時間/日、5日間/週) 曝露させた。それぞれ曝露終了日の翌日に結核菌 (1×10⁶ CFU、Kuronos strain) を感染させ、感染から 7週間後に肺の病変部の大きさ計測、および肺、脾臓組織中の結核菌を培養しコロニーを数えた。病変部の大きさは対照群に比べ DE 6ヶ月曝露群で有意に大きく、肺組織中の結核菌によるコロニー生成は DE 6ヶ月曝露群で有意に増加した。また肺組織における TNF- α 、IL-1 β 、IL-12p40、IFN- γ 、iNOS の mRNA 発現量は DE 2ヶ月間曝露群でわずかに上昇したが、DE 6ヶ月間曝露群では、IL-1 β 、IL-12p40、IFN- γ 、iNOS の mRNA 発現量が減少した。結核菌感染における DE 曝露は、肺胞マクロファージの持つ結核菌を殺す能力を低下させ、結核菌感染の感受性を高める可能性が示唆された。

Harrod ら (2005)は、DE を 30~1,000 μ g/m³の曝露濃度で、6時間/日の条件で、1週間あるいは 6ヶ月間マウスに吸入曝露し、肺の微生物感染に対するクリアランスと肺の病理組織像を解析した。1週間の DE の吸入により、緑膿菌のクリアランスは低下し、その低下は低濃度領域(30~100 μ g/m³)では濃度依存的であった。1,000 μ g/m³の DE 濃度におけるクリアランスは 100 μ g/m³と同程度であった。また、6ヶ月間 DE 吸入を行い、同様の解析をしたところ、肺のクリアランスの低下は認められなかった。1週間の DE 吸入曝露マウスの肺病理像を解析したところ、緑膿菌感染により炎症像が認められ、炎症症状は 30~100 μ g/m³の DE 濃度領域で濃度依存的な悪化が認められた。DE の免疫系への影響を微生物感染防御の視点から解析し、短期曝露後による免疫能の低下を微生物のクリアランス能が落ちていることから証明した。

Lambert ら (2003)は、マウスに CB を 40 μ g/個体の量で気管内投与後、RSV を感染し、曝露後 1~10日間の期間で観察を行い、炎症反応への影響を検討した。CB 処理により BALF 中炎症細胞数に誘導が認められた。処理直後では好中球が強く誘導された。また、CB+RSV 併用処理により、処理 7日後に好中球の強い誘導が認められ、処理 2~10日後ではリンパ

球のCBによる誘導がRSV処理により若干抑制された。TNF産生量はRSV単独処理に比較し、CB+RSV処理で処理1~2日後では抑制され、4~7日後では促進された。CB及びRSVの併用処理4~10日後のIL-13産生量が誘導された。また、IP-10 mRNA発現量はCB処理により抑制され、RSVにより誘導されるIP-10 mRNA発現量もCB併用処理により抑制された。その他、Th2タイプのサイトカイン・ケモカイン産生量はCB処理により誘導されたが、Th1タイプのサイトカイン・ケモカイン産生量は抑制された。感染前の微小粒子投与は、その後の免疫応答をアレルギー増強に導く可能性を示唆している。本研究結果より、カーボンナノ粒子の気管内投与により、炎症症状が誘導され、獲得免疫系のうち細菌感染防御に関与するTh1ではなく、アレルギー応答であるTh2が有意になることを示した。

4.2.2. アレルギー性疾患が増悪する

Kleinmanら(2005)は、OVA感作したマウスをCAPsに曝露しアレルギー反応への影響を各種指標(IL-5、IL13、OVA特異的IgE、IgG1、好酸球、多核白血球)を用いて検討した。実験は、道路沿道から50m、150m離れた地点で集めたCAPsを用いて行われた。曝露濃度は、50m離れた地点で集めたCAPsは、fine (<2.5 μ m)で498 μ g/m³、ultrafine(<0.15 μ m)で433 μ g/m³、150m離れた地点で集めたCAPsは、fineで442 μ g/m³、ultrafineで283 μ g/m³であった。

曝露群でのアレルギー反応指標の増加および道路からの距離が近いほど強い影響を認め、自動車排気粒子は気道アレルギー反応を引き起こすことを示唆した。道路からの距離が近いほど超微小粒子を多く含むことから、より粒径の小さい粒子の方がアレルギー反応を増悪する作用が強いことが示唆された。

Steerenbergら(2005)は、OVA感作マウスモデルを用い、ヨーロッパ各都市で採集したPMのアレルギー反応におけるアジュバント効果を調べた。5都市で採取したPM(coarse2.5~10 μ m、fine<2.5 μ m)を3mg/ml、9mg/mlで気管内投与し、対照群:NaCl、OVA、OVA+オタワ標準粉じん(EHC-93)を気管内投与した。投与パターンは、OVA+PMにより感作(0日、14日、9mg/ml、3mg/ml PM/個体)後、35、38、41日にOVAでチャレンジ、42日目に殺処分、観察した。その結果、ウッチ(Lodz、ポーランド)、ローマ、オスロ、アムステルダム順にアジュバント効果が高いことが示された。また、fine PMの方がcoarse PMより増強効果が高いこと、PMを採集した季節ごとに効果が異なること、水溶性および不溶性の成分のいずれも効果を有することが示された。

Campbellら(2005)は、アレルギー感作(肺、OVA)の状態のマウスにロサンゼルス交通量の多い場所でのCAPsを曝露した。曝露濃度を20倍濃縮とし、0.18 μ m以下の粒子を282.5 μ g/m³で、2.5 μ m以下の粒子を441.7 μ g/m³で、4時間/日、5日/週、2週間曝露し

た。その後に OVA 再曝露により肺での炎症を惹起させ、その時の脳における炎症性サイトカインおよび転写因子の増減を測定した。その結果、曝露群では炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 α)および転写因子(NF- κ B)の有意な増加が認められ、微小粒子成分が脳内での神経変性を誘導すると報告している。

Hamada ら (2000)は、新生児マウスに ROFA と OVA をエアロゾル投与して抗原感作への影響を調べた。3% OVA のエアロゾル投与は、生後 3 日目より 11 日間と 25 日目より 3 日間の計 14 回行い、ROFA のエアロゾル投与(50 mg/mL、30 分/日)は生後 6 日、8 日、10 日の 3 回行った。その結果、BALF 中の炎症性細胞においては大きな変動はみられなかったが、メサコリンに対する気道反応性の亢進が ROFA+OVA 群でみられた。また、抗原特異的な IgE と IgG 産生の増強も ROFA+OVA 群でみられたと報告している。

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、3.0、6.0mg/m³濃度の DE で 12 時間/日、7 日/週で 3 週間曝露し、OVA 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 OVA 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 OVA 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。

Alessandrini ら (2006)は、BALB/c マウスを用いて超微小カーボン粒子のアレルギー性気道炎症への影響を調べた。曝露濃度は、119、332、526 μ g/m³(平均)であった。カーボン粒子の曝露時間は 24 時間であるが、抗原感作とのタイミングを検討し、その影響メカニズムを解析した。その結果、最終の抗原感作より 24 時間前、及び 4 日間前にカーボン粒子を曝露した群でより炎症反応やサイトカイン産生が増強しており、抗原感作後の曝露では炎症反応の遅れやサイトカイン産生の低下がみられた。抗原感作前のカーボン粒子曝露は、強力なアジュバント効果を生じることが示された。

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 OVA 抗原とともに DEP を 0.3mg/個体の投与量で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、OVA 群に比べ DEP+OVA 群で明らかに亢進し、IL-4 産生、抗 OVA IgE 抗体価共に DEP+OVA 群で高い値を示した。DEP による免疫増強効果を示唆している。

Diaz-Sanchez ら (1997)は、13 人のブタクサの皮内テストで陽性の非喫煙者 (男 6 人、女 7 人：21~49 歳) に対して DEP (0.30 mg) とブタクサ抗原の両者を組み合わせて、ヒ

トの鼻内にチャレンジを行い、局所の液性免疫に与える影響を検討した。DEPは、light-dutyのディーゼル乗用車の排気から採集した。ブタクサ抗原単独のチャレンジと比較して、DEPとブタクサ抗原の組み合わせは抗原特異的IgEの著明な増加をもたらしたが、総IgEやIgE分泌細胞数は変化しなかった。総IgG4や抗原特異的IgG4も増加したが、総IgGは変化しなかった。両者の共同作用は alternative splicing による epsilon mRNA (CH4-M1'-M2, CH4-M2', CH4-M2'', CH4-S, CH4'-CH5) のレベルにおいてもCH4'-CH5を除いて観察された。さらにブタクサ抗原単独では、低レベルのサイトカイン mRNA が検出されたにすぎなかったが、ブタクサ抗原と DEP の組み合わせは Th1 タイプのサイトカイン (IFN- γ や IL-2) の表現の減少をもたらしたが、他のサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) の mRNA の表現の増加をもたらした。DEP とアレルゲン曝露の相乗作用はアレルゲン誘導性の呼吸器疾患の増加を示唆する重要な所見と考えられると述べている。

Fujieda ら (1998) は、8 人の健康な非喫煙者 (男 4 人、女 4 人: 21~36 歳・全員がブタクサの皮内反応テストが陽性) 全員に、異なった日に、ブタクサ・アレルゲンのみ、DEP のみ、および DEP+ブタクサ・アレルゲンのチャレンジを受けさせた。被験者は、ブタクサ・アレルゲン (Amb a I) を 10 AU から始めて即時アレルギー症状がでるまで 10 倍ずつ濃度をあげるか、1,000 AU まで鼻にスプレーすることによりチャレンジした。8 週間あけて、DEP (0.3 mg) とブタクサ・アレルゲンの両方あるいは DEP のみに、無作為にチャレンジされた。100 μ l の食塩水に DEP (0.15 mg) を含んだものを鼻孔にスプレーし、総量 0.3 mg の DEP を曝露した。各被験者は、チャレンジ前の三つの異なった日と、チャレンジ後 4 日目に 5 ml の生理食塩水で鼻洗浄を行い、鼻洗浄液について分析を行った。新しい nested polymerase chain reaction-based approach (ポリメラーゼ連鎖反応に基づいたアプローチ) による deleted switch circular DNA (switch circles) の検出を、IgE isotype switching が起こっているという明確な分子的証拠として採用した。DEP にブタクサ抗原を加えてヒトの鼻にチャレンジすると、局所的な IgE 産生を増強し、局所的なサイトカイン産生を刺激し、ブタクサ・アレルゲンに対する粘膜の IgE 抗体を顕著に増加させることが示された。DEP+ブタクサ・アレルゲンのチャレンジ後 4 日目に、鼻洗浄細胞中に μ から ϵ への switching を示す deleted switch circular DNA (S_{ϵ}/S_{μ}) のクローンを検出した。DEP のみあるいはブタクサ・アレルゲンのみでのチャレンジでは、鼻洗浄細胞中に switch circular DNA は検出されなかった。これらの結果は、DEP とブタクサ・アレルゲンの粘膜刺激の複合は、ブタクサ・アレルギーのヒトで in vivo の IgE isotype への switching を引き起こしうることを示している。これらの結果は、ヒトでの in vivo の IgE isotype の switching を直接的に初めて示したものであると述べている。

Diaz-Sanchez ら (1999) は、DEP が新抗原に対する粘膜 IgE 反応に対して粘膜アジュバントとして作用するかどうかを調べた。新抗原は、ヒトではクロス反応する既知の抗体

をもたない marine mollusk (*Megathura crenulata*: 海の軟体動物) の血液から分離した糖タンパク質の keyhole limpet hemocyanin (KLH) を用いた。DEP は、ディーゼル乗用車からの排気を捕集したものである。被験者は、25 人の健康な非喫煙者 (男 11 人、女 14 人; 21~55 歳) で、全ての被験者は、塵ダニ・アレルゲンを除いて、少なくとも一つの空中アレルゲンに対して陽性の皮膚プリック・テストを示した。さらに全被験者は、季節性の気道アレルギーの既往があるが無症状であった。10 人のアトピーの被験者を、1 mg の KLH で鼻を最初に免疫して、次いで 100 μ g の KLH で隔週に 2 回鼻にチャレンジした。また、15 人の異なるアトピーの被験者に DEP を各 KLH 曝露の 24 時間前に投与し、全く同じ鼻の KLH 免疫を行った。DEP は 0.3 mg を 200 μ L の食塩水に浮遊させ鼻にスプレーした。最初の KLH 投与後、14、28、29 および 32 日目に鼻洗浄を行い KLH に対する抗体を調べた。その結果、32 日目では、KLH のみへの曝露は、鼻洗浄液中で、抗 KLH IgG は全ての被験者に、IgA は 10 人中 8 人に、IgG4 は 10 人中 4 人に検出されたが抗 KLH IgE は誰にも検出されなかった。反対に、KLH に先立ち DEP でチャレンジすると、15 人のうち 9 人が抗 KLH 特異的 IgE を産生した。KLH のみでみられたのと同様のレベルで抗 KLH 特異的 IgG と抗 KLH 特異的 IgA も検出された。DEP と KLH を受けた被験者では、鼻洗浄液中の IL-4 レベルを有意に増加させたが、IFN- γ レベルは増加しなかった。一方、これらのレベルは、KLH のみを受けた被験者では変化がみられなかった。これらの研究は、DEP が新しい IgE 反応に粘膜アジュバントとして作用し、アレルギー感作を増加させるかもしれないことを示していると述べている。

Diaz-Sanchez ら (2000) は、プリック・テストでハウスダスト・ダニに陽性の 11 人の非喫煙者 (男 6 人、女 5 人; 21~55 歳) に、既知の量の *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) を含むハウスダスト・ダニの抽出物を鼻にスプレーして、症状スコア (鼻搔痒感、鼻閉、鼻汁、くしゃみ) が 5 になるまで増量した。その後、被験者は、300 μ L の食塩水に 0.3 mg の DEP (Isuzu のディーゼル・エンジンの排気から捕集したもの) または CB を同様に含むもの、および 300 μ L の食塩水の何れかを鼻に噴霧し、次いでダスト・ダニ抗原で症状スコア 5 が得られるアレルゲン量を調べた。その結果、アレルゲンのみの症状スコアは 3.7、DEP のみは症状を誘発しなかったが、DEP+アレルゲンはスコアが 9.9、CB では症状スコアは増強しなかった。鼻洗浄液中のヒスタミン濃度は、アレルゲンのみに比し、DEP+アレルゲンでは約 3 倍近く増加した。DEP 中の化学物質がマスト細胞に直接作用するかどうかを調べるために、マウスの肥満細胞系 (MMC-34) を用いて、高親和性 IgE 受容体の IgE/ α -IgE クロスリンクのもとで、DEP の溶解性有機化学物質と一緒に培養すると、 β -hexosaminidase とヒスタミンの放出が増強され、DEP 濃度との間に量-反応関係がみられた。これらの結果は、DEP への曝露はマスト細胞の脱顆粒を増強することによりアレルゲンに対する臨床症状の重症度を増強させることを示唆していると述べている。

Hauserら(2003)は、5人のアトピー(男2人、女3人:23~39歳)と3人の非アトピー(男2人、女1人:27~38歳)の8人の被験者に対し、鼻マスクを介して以下の曝露を行った。即ち、residual oil fly ash (ROFA) 粒子曝露の後にアレルギーなしのプラセボへの曝露(session A)、清浄空気曝露の後にアレルギー曝露(session B)、およびROFA曝露の後にアレルギーの曝露(session C)。各曝露は、ROFA(目標濃度は 1.0 mg/m^3 だったが、実際は $0.96 \mu\text{g/m}^3$)または清浄空気への安静下で1時間の鼻マスクを介しての鼻曝露に続けて、3時間後に穀物花粉かプラセボのチャレンジを受けた。ROFAは、ボストン発電所から入手したものをWright Dust Feed Aerosol Generatorを用いて再浮遊させ、 $2.5 \mu\text{m}$ 以上の粒子を除去するためにHarvard Marple Impactorを通過させた。MMDは、 $1.55 \mu\text{m}$ であった。花粉アレルギーは、6種類の吸入性アレルギー[*Dermatophagoides pteronyssinus*(ダニ抗原)、mixed grasses、ragweed(ブタクサ)、birch tree(カバノキ)、oak tree(オーク)、*Alternaria*(アルテルナリア属のカビの一種)]で皮膚テストを行い、一つ以上に陽性であれば、アトピーとした。この皮膚テストの結果をもとにチャレンジに使用する空中アレルギーを決めた。鼻洗浄が、粒子または清浄空気曝露前に、そして曝露直後、および、花粉チャレンジ後4、18、および42時間後に行われた。各鼻洗浄液について、細胞数、分画、およびサイトカインの測定を行った。粒子に続いてアレルギーが投与されたとき、花粉チャレンジ直後の鼻洗浄液中の白血球と好中球の有意な増強(それぞれ、 29.7×10^3 細胞/mLと 25.4×10^3 細胞/mL)が、アトピーではみられたが、非アトピーの被験者ではみられなかった。これは、それぞれ、143%と130%の増強を示している。IL-4の増強反応は、 3.23 pg/mL ($p=0.06$)で395%の増強であった。アトピー性の被験者では、清浄空気に比し粒子がアレルギー曝露に先行する場合には反応が増強される証拠があると述べている。

Alexisら(2006)は、9人の健康な非喫煙者(男3人、女6人:年齢18~35歳)に以下に示す3種類の被験物質をそれぞれネブライザーで、調整された500 mLの一回換気量で25吸入/分の頻度で、約30分間経口吸入させた。被験物質は、対照群としてネブライズされた食塩水(0.9%)、ノースカロライナ州のChapel Hillでサンプリングした $\text{PM}_{10-2.5}$ で、生物学的物質を不活性化するために 120°C で20時間熱処理した $\text{PM}_{10-2.5}$ ($\text{PM}_{10-2.5}^-$) (3 mgの $\text{PM}_{10-2.5}$ を4 mLの0.9%の無菌食塩水に再浮遊したもので、MMADは $5 \mu\text{m}$) または熱処理をしていない $\text{PM}_{10-2.5}$ ($\text{PM}_{10-2.5}^+$)で、これらを別々の日に同様に吸入した。食塩水吸入時に、 $\text{Tc}99\text{m-sulfur}$ コロイド(SC)粒子を食塩水に混合し、 $\text{PM}_{10-2.5}$ が気管支に供給されていることをガンマ・カメラで確認した。各々の吸入後3時間目に、痰を誘発させ、痰について炎症細胞とサイトカイン、炎症性サイトカインのmRNA、細胞表面の表現型および食食機能を調べた。その結果、 $\text{PM}_{10-2.5}^+$ 吸入で、食塩水吸入に比して、炎症マーカーである好中球%とマクロファージの $\text{TNF-}\alpha$ のmRNA発現量が有意($p<0.05$)に誘発された。また、eotaxinが増加し、マクロファージの表現型で免疫調節能が増加し、単球の食食能も増加した。生物活性がマイナスの $\text{PM}_{10-2.5}$ 吸入では好中球増加への影響はみられなかった

が、TNF- α の mRNA、eotaxin レベル、細胞表面マーカーの反応および貪食能を有意 ($p<0.05$) に弱めた。以上より、PM_{10-2.5}の生物学的構成要素は、必ずしも好中球の反応を誘発しないが、マクロファージの反応調節には必要であると述べている。また、単球の細胞を活性化し、潜在的に、eotaxin レベルを増強することによりアレルギー患者におけるアレルギーあるいは細菌に対する反応を増強する可能性が示唆されたと報告している。

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 β_2 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 μ m の空気力学径の 50%カット・オフの粒子 (PM₁₀) 濃度が 108 μ g/m³ (94~124)、CO は 1.7 ppm (0.6~2.5)、NO₂ 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/m² 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 FEV₁ 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、methyl-histamine、MPO および ECP を測定した。DE 曝露後、FEV₁ 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 μ 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。

Holgate ら (2003)は、DEP への曝露による臨床的感受性が、急性の好中球性炎症あるいはアレルギー性気道炎症の増加で説明できるかどうかを、15 人の非喫煙者の喘息グループ (男 10 人、女 5 人、平均年齢 30 歳；23~52 歳) と 25 人の非喫煙者のコントロール・グループ (男 16 人、女 9 人、平均年齢 25 歳；19~42 歳) について調べた。DE は、Volvo TDIF-1990 で発生させ、曝露チャンバー内の平均濃度は PM₁₀:108.3 μ g/m³、CO:1.7 ppm、NO:0.6 ppm、NO₂:0.2 ppm、HC:1.4 ppm、HCHO:43.5 μ g/m³ であった。被験者は

間欠的運動下（分時換気量が 15~20 L/min/m² 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、曝露前後に鼻洗浄液採集、曝露終了後 6 時間目に気管支鏡を行った。コントロール・グループおよび喘息グループでは、気道抵抗の有意な増加がみられた。この増加は、コントロール・グループでは気管支洗浄液（BW）中の好中球の増加および BAL 中のリンパ球の増加と関連していた。コントロール・グループの気管支生検組織では、内皮接着分子 P-selectin の upregulation がみられ、また BALF 中の IL-8 タンパク質濃度および IL-8 mRNA 遺伝子発現量の有意な増加がみられた。末梢血中の赤血球や白血球数には変化がみられなかった。喘息グループの気道粘膜の生検組織は、空気曝露後に好酸球性気道炎症がみられたが、DE は、気道の好中球、好酸球やその他の炎症性細胞、またサイトカインや炎症のメディエーターの有意な変化をもたらさなかった。唯一の明確な影響は、生検組織の IL-10 染色で有意な増加がみられたことである。この研究は、あまり高くない濃度の DE であっても、コントロール被験者の気道に明白な炎症効果を及ぼすこと、IL-8 産生に直接影響し内皮接着分子の upregulation を起こすことを示している。DE に対する喘息患者の感受性が増加するという臨床報告があるが、この感受性は好中球性の炎症や既存の喘息の気道炎症の悪化によるものではなさそうである。喘息患者で DE への曝露後 IL-10 の増加がみられたことは、気道炎症に何らかの影響を引き起こすかもしれないことを示唆していると述べている。

4.2.3. 生殖器への影響が生じる

Lee ら (1980) は、SD ラット(雄)に 13 倍に希釈した DE を 20 時間/日ずつ、42 日間曝露し、肺、肝臓、精巣および前立腺の AHH (Aryl Hydrocarbon Hydroxylase) 活性と EH (Epoxide Hydrolase) 活性の変化を調べた。その結果肝臓が最大の 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なかった。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。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しての影響を調べるために、DEP 濃度として 6mg/m³ の DE を A マウス(雌)に 8 時間/日、31~39 週間曝露させて精子の形態異常を調べた。エオジン Y 染色をほどこして精子の頭部異常を定量化し、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 マウスの雌雄各 100 匹に、12mg/m³ という極めて高濃度の軽量級ディーゼルエンジンからの 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を調査した。その結果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報告している。また、 $6\text{mg}/\text{m}^3$ のDEを、Tマウス雄100匹、雌54匹に、8時間/日、7日/週、7週間吸入させる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た。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DEを、SDラットおよびウサギ(ニュージーランドホワイトラビット)に8時間/日、7日/週ずつ吸入させる実験を行った。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報告している。

Quintoとde Marinis(1984)は、DEPを体重kg当り50、100、200mgずつ、5日間続けて、腹腔内に注射した実験を行い、C57B1/6マウスとC3Hマウスの第1代F₁マウスで、精子数の減少と睾丸重量の減少、精子奇形等が認められた。200mg投与群においては、対照群に比べ8倍の奇形増加を示し、精子数の著しい減少も認められた。

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た。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(I群)と粒子をフィルターで除いた除粒子排気ガス成分(II群)および清浄空気(III群)について行われた。曝露条件は、6時間/日、5日/週であり、3ヶ月間曝露した。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I、II群で有意に増加し、卵胞刺激ホルモン濃度は逆にI、II群でともに有意に低下した。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た。卵胞刺激ホルモン濃度と精子産生能力との間に直接的相関が認められたが、精巣のライディッシュ細胞やセルトリ細胞に形態的異常は認められなかった。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と考えられる。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、明瞭に認められたことから、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12時間/日で1~10ヶ月間ICRマウス(雌)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た。その結果、精子の運動能力が低下することは認められなかった。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た。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たが、 $3.0\text{mg}/\text{m}^3$ 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なかった。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た。さらに、DE 吸入マウスでは、黄体形成ホルモン受容体の mRNA の発現量も DEP 濃度に依存して低下した。これらの結果から、男性ホルモンの合成能力が低下したこと、黄体形成ホルモン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。

Watanabe と Kurita (2001)は、Fisher ラットを用い妊娠期間中の DE(濃度は粒子:5.63mg/m³、NO₂:4.10ppm、NO:8.10ppm)、粒子を除いた DE および清浄空気に生殖時から妊娠 20 日まで 6 時間/日で曝露を行った。性器-肛門間距離は DE および DEP を除いた DE 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 DE 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。

4.2.4. 神経・行動への影響が生じる

Laurie ら (1978)は、SD ラット(雌)に対し、6mg/m³ の DEP を含む DE に 20 時間/日、7 日/週で 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 と Boyes (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ことを見いだした。

Liu ら (2002)は、ラット(雄)(20 匹)にガソリン二輪車排気ガス(ME, Motorcycle Exhaust)を吸入処理(2 時間/日、2 週間または 4 週間の吸入曝露、濃度の詳述はなし)、あるいはガソリン二輪車排気ガス中微小粒子(MEP)を 0.1g/kg(体重)の投与量で気管内投与し、最終投与の翌日に行動薬理的探索を行った。その結果、運動機能(回転棒からの落下時間で評価)が ME の 4 週間吸入曝露処理及び MEP の気管内投与により低下した。また、運動神経伝導速度の低下、神経におけるナトリウムカリウム ATPase 活性の低下が認められた。これらの結果は、MEP や BaP (benzo[a]pyrene) を経口投与したマウスにおいて同様であった。排気ガスあるいは排気微小粒子の処理により、運動機能の低下、さらに運動神経伝導速度の低下が引き起こされ、神経・行動に影響が生じる可能性が示唆されたと報告している。

Veronesi ら (2005)は、Apo E (アポリポrotein E)は脳内で脂質のトランスポート分子として神経の栄養や防御機能に関わっており、Apo E -/-マウスへのニューヨークの CAPs 曝露が脳に神経病理学的障害を生じさせると報告している。曝露濃度はニューヨークの風

上、西北西およそ 50km に位置するニューヨーク州タキシード(Tuxedo)における濃度の 10 倍であった。曝露中の平均 PM_{2.5} 濃度は 110 μg/m³ で、長期の濃度平均は 19.7 μg/m³ であった。曝露条件は、6 時間/日、5 日/週であった。この遺伝子組み換えマウスは脳での高いレベルの酸化ストレスによって特徴付けられた。脳の冠状切片のドーパミンニューロンを免疫細胞化学的染色した結果では、黒質緻密核からのニューロンが曝露された Apo E^{-/-}マウスで Apo E^{-/-}対照群に比較して有意に 29%減少した。さらに、免疫細胞化学的に染色された星状細胞は統計的に有意に増加した。黒質緻密核のドーパミン作動性ニューロンはパーキンソン病で特異的な病変を示す場所である。この研究では、粒子状物質によって影響される系を脳まで拡大して検討し、酸化ストレス感受性の高い人における神経変性の誘導に環境が役割を果たしている可能性が示唆されたと報告している。

Sung ら (2007)は、6 頭のカニクイザル(*cynomolgus monkey*)に、メタルアークステンレス鋼溶接蒸気を低濃度群(30mg/m³)と高濃度群(60mg/m³)を設け、2 時間/日の曝露時間で 6 ヶ月間曝露した。血中 Mn 濃度は曝露開始後 2 ヶ月は有意な上昇はなかったが、曝露 90 日以後に上昇して一定値を示す様になった。大脳基底核の MRI (Magnetic Resonance Imaging) T1 relaxation time が曝露後 60 日以後減少していくことが示された。すなわち長期にわたり溶接蒸気を吸入し続けると、血中 Mn 濃度が上昇し、MRI により大脳基底核の T1 シグナルの増強がみられたことから、Mn の中枢神経への移行が示唆された。また、この事象に関し他の金属は影響を与えないと考えられると述べている。

4.3. 論文による仮説の検証

4.3.1. 呼吸器における感染抵抗性が低下する

粒子状物質の曝露による呼吸器における感染防御機能への影響について、感染モデルを用いた実験動物曝露実験の知見がある。

CAPs や都市大気中の粒子状物質の影響に関して、PM_{2.5} 曝露は感染ラット肺からの菌排出を遅らせ、Fe や Ni 粒子曝露でもクリアランス機能を低下させた (Zelikoff ら (2002))。

マウスへの DE 曝露により、*Streptococcus pyogenes* 感染に対して致死率の増加がみられ、インフルエンザウイルス感染に対しては肺のインターフェロンレベルの抑制がみられた (Campbell ら (1981)、Hahon ら (1985))。

マウスに DE を曝露し、結核菌を感染させたところ、肺組織中の結核菌によるコロニー生成が増加した (Hiramatsu ら (2005))。

DE の短期間曝露では緑膿菌のクリアランスは低下し、その低下は低濃度領域では濃度依存性であった (Harrod ら (2005))。

マウスに CB を気管内投与後 RSV (Respiratory Syncytial Virus)を感染し炎症反応への影響を検討したところ、CB 処理により BALF 中炎症細胞誘導が認められた (Lambert ら (2003))。

Th2 タイプのサイトカイン・ケモカイン産生量は感染前 CB 処理により誘導されたが、Th1 タイプのサイトカイン・ケモカイン産生量は抑制され、感染前の微小粒子投与はその後の免疫応答をアレルギー増強に導く可能性が示唆された。

以上、CAPs や DE 曝露は、肺胞マクロファージの持つ細菌を殺す能力を低下させ、インターフェロン産生を抑制し、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、緑膿菌、結核菌感染の感受性を高める可能性が示唆された。また、感染要因が Th2 応答性に関与する知見が得られた。全身性の影響として、血中の凝集抗体価の低下がみられている。しかしながら、肺からの細菌クリアランス能は、6ヶ月間の低濃度 DE 曝露において影響がないことも報告されており、さらに解明に向けた研究の実施が望まれる。

4.3.2. アレルギー性疾患が増悪する

粒子状物質によるアレルギー性疾患の増悪についてはいくつか知見がある。

マウスに浴道で集めた CAPs を曝露したところ、アレルギー反応への影響 (IL-5(InterLeukin-5)、IgE(Immunoglobulin E)、好酸球)は道路からの距離が近いほど強いことが示唆された (Kleinman ら (2005))。

ヨーロッパ各都市で採集した粒子状物質のアレルギー反応におけるアジュバント効果を調べた検討では、粒子状物質 (fine) の方が粒子状物質 (coarse) より増強効果が高いこと、粒子状物質を採集した季節ごとに効果が異なること、水溶性および不溶性の成分のいずれも効果を有することが示唆された (Steerenberg ら (2005))。

アレルギー感作状態のマウスにロサンゼルス CAPs を曝露したところ、曝露群では炎症性サイトカイン(TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)、IL-1 α)および転写因子(NF- κ B(Nuclear Factor- κ B))の有意な増加が認められた (Campbell ら (2005))。

新生児マウスに ROFA-アレルギーを曝露すると、メサコリンに対する気道反応性の亢進がみられ、抗原特異的な IgE と IgG 産生も増強した (Hamada ら (2000))。

DE 曝露とアレルギー感作を併用したところ、脾臓重量の増加が DE 高濃度曝露(6 mg/m³)でみられ、血清中のアレルギー特異的 IgE 抗体価も高かった (Fujimaki ら (1997))。

脾臓細胞のサイトカイン産生では IL-4、IL-10 は高く、IFN- γ (Interferon- γ)は低い結果であった。アレルギー性炎症モデルに関しては、超微小カーボン粒子をマウスに曝露しアレルギー感作とのタイミングを検討したところ、最終のアレルギー感作より 1 日及び 4 日間前にカーボン粒子を曝露した群で、炎症反応やサイトカイン産生がより増強していた (Alessandrini ら (2006))。

マウスへのアレルギーと DEP の気管内投与により縦隔リンパ節細胞での細胞増殖の亢進と IL-4 の産生上昇が観察された (Fujimaki ら (1994))。

以上、動物実験では CAPs や DE 曝露を抗原感作と併用すると、肺における炎症性サイトカインの誘導だけでなく、脾臓における Th2 タイプのサイトカイン産生を増強させ、血中での IgE や IgG 抗体価の上昇をもたらす。また、曝露と抗原感作とのタイミングが免疫