

常ラットと以下表記)を同様に投与した。10日後に清浄空気または ROFA(15 mg/m<sup>3</sup>)を気管内投与(生理食塩水、0.83 あるいは 3.33 mg/kg(体重))、あるいは鼻部吸入曝露(15 mg/m<sup>3</sup> × 6 時間/日 × 3 日)を行い、肺の組織像、サイトカイン遺伝子発現、BALF を調べた。正常ラットでは ROFA 吸入により、肺浮腫、炎症細胞浸潤、肺胞壁の肥厚が認められた。BALF の炎症マーカーの上昇や IL-6、MIP (Macrophage Inflammatory Protein) -2 発現増加も認められた。モノクロタリン処理したラットでは、炎症細胞の血管周囲への浸潤、大きいマクロファージの存在、肺胞壁の肥厚が認められた。BALF 中タンパク質や炎症マーカー(マクロファージ数、好中球数)も上昇し、肺障害を示していた。モノクロタリン処理後に ROFA を気管内投与されたラットの 58%が 96 時間以内に死亡したのに対し、吸入曝露群では死亡例はなかった。モノクロタリン処理後に ROFA 吸入曝露したラット群では肺損傷の増悪が見られた。すなわち、肺水腫、肺胞壁の肥厚、炎症細胞浸潤であった。BALF 中のマクロファージ、好中球、好酸球および IL-6 発現は、モノクロタリン、ROFA それぞれ単独投与による増加の相加作用を上回る増加を示した。結論として、ROFA の気管内投与は肺障害/肺高血圧モデルラットの死亡率を引き上げたと述べている。

Li ら (1996)は、ラットで PM<sub>10</sub> (0.2mL PBS (Phosphate Buffered Saline) に 50~125µg の粒子を懸濁)および対照 CBP(Carbon Black Particle; fine, ultrafine を各 125µg/個体)を気管内に単回投与した。投与から 6 時間後では肺胞内への好中球の遊走、上皮細胞の透過性の亢進、BALF 中の総タンパク質および LDH の増加が観察された。Ultrafine CBP の投与により、より強い炎症反応が観察された。PM<sub>10</sub>には *in vivo* および *in vitro* においてフリーラジカルの活性が確認された。PM<sub>10</sub>に曝露されたラットから得られた白血球の NO と TNF の産生能は対照動物に比べて増大していた。これらの結果から、PM<sub>10</sub> はフリーラジカル活性を有し肺の炎症や上皮組織の障害に関与していることが明らかとなった。

Kodavanti ら (1997)は、ROFA または ROFA に含有される金属(Fe、V、Ni)をラットの気管内に 1 回投与した。ROFA の粒径は 1.95 ± 1.61µm で、投与量は ROFA(2.5 mg/個体)、Fe (0.54 µM/個体)、V(1.66 µM/個体)、Ni(1.0 µM/個体)であった。いずれも 0.3 ml の生理食塩水(pH 2.5)に溶解した。投与 1 時間後から気道・肺胞領域の浮腫および出血性変化、炎症細胞(好酸球、好中球、マクロファージ)の浸潤が出現し、24 時間後にピークに達した後 96 時間後まで継続した。同様の変化は金属の投与によっても惹起されたが、Fe や V に比べて Ni による肺の炎症や障害が高度であった。金属を混合した場合にはむしろ炎症・障害の誘導作用は減弱した。ROFA 投与 3 時間後には一過性に MIP-2、IL-1B、IL-5、IL-6、VCAM-1、E-selectin の遺伝子発現が増加した。これら炎症性遺伝子は金属の投与でも観察されたが、特に Ni の影響が強く見られた。本研究では、ROFA に含有される金属による肺の炎症作用は、Ni > V > Fe の順に大きいことが示された。

Win-Shwe ら (2005)は、マウスに、14nm と 95nm の 2 種の CB 超微小粒子(投与濃度 0µg/個体、25µg/個体、125µg/個体、625µg/個体)を 4 回反復して気管内投与した際の肺とリンパ節での炎症性サイトカイン・ケモカインと粒子サイズ、粒子濃度との関係について検討した。①免疫関連臓器である胸腺重量、脾臓重量と脾臓細胞数には粒子サイズ、粒子濃度の影響は認められなかった。②最終投与 24 時間後の BALF 中の総細胞数、肺胞マクロファージ数、リンパ球数、好中球数は、14nm では濃度に依存して明らかに増加した。95nm

でも同様な増加傾向を認めたが、肺胞マクロファージ数には明らかな量反応関係を認めなかった。好中球数と粒子面積との間には相関関係が見られた。③最終投与 24 時間後の BALF 中サイトカインは、14nm では IL-16、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CCL (CC chemokine Ligand)-2、CCL-3 が濃度依存性に増加し、95nm でも同様な傾向を認めたが、IL-6、TNF- $\alpha$  の変動は少なかった。④縦隔リンパ節で粒子を少なくとも 3 個以上貪食している細胞数は、14nm、95nm 両方で濃度に依存して増加し、その程度は 95nm に比較して 14nm で大であった。⑤125 $\mu$ g 粒子最終投与 4 時間後の肺組織ケモカイン CCL-2 と CCL-3mRNA 量は 14nm、95nm で増加したが、リンパ節では 14nm が CCL-2、CCL-3mRNA 量の増加を示したのに対し、95nm では CCL-2mRNA のみ増加傾向を示した。⑥超微小粒子 CB の反復投与は、粒子サイズに依存した肺の炎症、縦隔リンパ節への粒子の移動、肺及びリンパ節での各種サイトカイン mRNA 発現の増加を引き起こし、その結果、より微小な粒子ほど縦隔リンパ節への移動を介して免疫調節機構に影響を与えている可能性があることが示唆された。

Lim ら (1998) は 8 週齢の ICR マウス(雄)に毎週 1 回ずつ 10 週間にわたって 0.1mg あるいは 0.2mg の DEP を気管内投与し、気道粘膜下への好酸球浸潤の程度と気道炎症に関与するメカニズムについて検討した。気道粘膜下への好中球浸潤は濃度依存性であるが、好酸球浸潤は 0.1mg 投与群のほうが 0.2mg 群の値より高かった。また、好酸球浸潤は PEG-SOD (PolyEthylene Glycol conjugated SuperOxide Dismutase) 前投与で 1/4 以下に低下した。一方、0.1mg DEP の繰り返し気管内投与で活性酸素を産生させる酵素である肺の NADPH (reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) シトクロム P-450 reductase 活性は有意に増加し、逆に活性酸素を消去する酵素である CuZn-SOD と Mn-SOD 活性は有意に低下し、特に Mn-SOD 活性は顕著に低下した。これら酵素は気道上皮細胞とクララ細胞内に存在していることが確認されている。このことは、DEP 投与は気道内で活性酸素産生を増加傾向にかたむけ、酸化ストレスを亢進することを示唆している。また、気道上皮での NO 合成酵素(NOS、NO Synthase)の誘導も免疫組織染色法で調べ、気道上皮内の eNOS とマクロファージ内の iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) が顕著に誘導されていることと共に、呼気中の NO が DEP 投与群で有意に増加していることが認められた。さらに、DEP 投与で呼吸抵抗が 2.5 倍に増加し、NOS 阻害剤の投与で呼吸抵抗増加は完全に抑制された。これらの結果から、DEP による気道炎症の発現には、気道上皮細胞や肺胞マクロファージなどに由来する  $O_2$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ 、NO あるいは ONOO $\cdot$  等の活性酸素が深くかかわっている可能性が示唆されている。

Madden ら (1999) は、ROFA の気管内投与が肺の過酸化脂質(アセトアルデヒド)を増加させることを報告した。用いた ROFA の粒径は  $1.95 \pm 0.18 \mu m$  で投与量は 500~1,000mg であった。ラット気管内に ROFA を投与したところ、濃度依存性に BALF のアセトアルデヒド濃度が増加した。アセトアルデヒドの増加は ROFA 投与後 15 分から観察され、1 時間後にピークとなり、24 時間後には消失した。ROFA に含有される Fe や V の気管内投与によっても BALF のアセトアルデヒドが増加した。また ROFA を曝露した気道上皮細胞からもアセトアルデヒドが産生されることを確認した。

Sagai ら (1993) は、DEP の毒性メカニズムを調べる目的で DEP を 0.5% Tween80 を含むリン酸緩衝液(pH7.4)に懸濁して、0~1.0mg を ICR マウス(雄)に 1 回気管内投与した。

この結果、DEPの気管内投与によるLD<sub>50</sub>は0.6mg/個体(20mg/kg(体重))であり、このマウスにポリエチレングリコールを結合させて体内半減期を長くするようにしたSOD(PEG-SOD)酵素を前投与すると死亡率が著しく低下することを見いだした。このことは、DEPが肺内でマクロファージによる貪食作用を受けたり、DEP中の有機化合物が薬物代謝酵素等によって代謝されることによってスーパーオキシドをはじめとする活性酸素が多量に放出され、それらが血管内皮細胞を損傷して肺水腫を引き起こしたことによると述べている。

Limら(1998)は8週齢のICRマウス(雄)に毎週1回ずつ10週間にわたって0.1mgあるいは0.2mgのDEPを気管内投与し、気道粘膜下への好酸球浸潤の程度と気道炎症に関与するメカニズムについて検討した。気道粘膜下への好中球浸潤は濃度依存的であるが、好酸球浸潤は0.1mg投与群のほうが0.2mg群の値より高かった。また、好酸球浸潤はPEG-SOD前投与で1/4以下に低下した。一方、0.1mg DEPの繰り返し気管内投与で活性酸素を産生させる酵素である肺のNADPHシトクロムP-450 reductase活性は有意に増加し、逆に活性酸素を消去する酵素であるCuZn-SODとMn-SOD活性は有意に低下し、特にMn-SOD活性は顕著に低下した。これら酵素は気道上皮細胞とクララ細胞内に存在していることが確認されている。このことは、DEP投与は気道内で活性酸素産生を増加傾向にかたむけ、酸化ストレスを亢進することを示唆している。また、気道上皮でのNO合成酵素(NOS)の誘導も免疫組織染色法で調べ、気道上皮内のcNOSとマクロファージ内のiNOSが顕著に誘導されていることと共に、呼気中のNOがDEP投与群で有意に増加していることが認められた。さらに、DEP投与で呼吸抵抗が2.5倍に増加し、NOS阻害剤の投与で呼吸抵抗増加は完全に抑制された。これらの結果から、DEPによる気道炎症の発現には、気道上皮細胞や肺泡マクロファージなどに由来するO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、 $\cdot$ OH、NOあるいはONOO $\cdot$ 等の活性酸素が深くかかわっている可能性が示唆されている。

Sagaiら(1996)は6週齢のICRマウス(雄)に、0.1mgあるいは0.2mgのDEPを週に1回ずつ16週間にわたって気管内投与し、気道周囲への好酸球の顕著な浸潤、粘液産生細胞の増生ならびに気道過敏性の4~10倍の亢進などを認めた。なお、これら3つの喘息様病態はPEG-SODの気管内への前投与で効果的に抑制された。これらのことから、DEPは0.1mg/個体レベルの濃度から喘息様病態を発現させることと共に、この気道炎症の発現に活性酸素が深く関与している可能性が示唆されている。

Gurgueiraら(2002)は、心臓の酸化ストレスと浮遊粒子状物質との関連を明らかにするため急性実験を行った。正常SDラットに対し、CAPs(PM<sub>2.5</sub>)を300±60 µg/m<sup>3</sup>の濃度で、曝露時間を1時間、3時間、5時間として吸入曝露し、人工呼吸下で観察した。肺、心臓、肝臓の化学発光量(酸化ストレスの指標を示す。臓器の活性酸素種の濃度を推定する方法)を調べたところ、肺と心臓において有意な上昇が認められた。同様の結果がROFAの曝露(1.7 mg/m<sup>3</sup>, 30分)において認められたがCB(300 µg/m<sup>3</sup>, 5時間)では変化は認められなかった。肺の化学発光量は、CAPs中のCa、Mn、Cu、Fe、Znと、心臓の化学発光量は、Si、Al、Ti、Feと相関が見られた。また、肺の障害指標としての乾湿重量比、組織障害指標としての血清LDH、クレアチンホスホキナーゼ活性、肺のMn-SODとカタラーゼ活性、心臓のCu/Zn-SODとMn-SOD活性がCAPsの曝露により上昇した。これらの結果から、

CAPs の 5 時間曝露は肺と心臓に軽度の障害をもたらすことが示唆された。

Rhoden ら (2004) は、ラットに CAPs (ボストン由来) を曝露濃度  $1,060 \pm 300 \mu\text{g}/\text{m}^3$  で 5 時間曝露し、肺組織の生化学的および病理学的解析を実施した。その結果、酸化反応物の 2 倍量の増加 (チオバルビツール酸反応物質、酸化タンパク質) が認められた。また、炎症の指標としての BALF 中の好中球数の増加、肺湿重量の増加、軽度の気管支炎像が認められた。抗酸化剤としての N-アセチルシステイン前処置により、酸化脂質産生、肺の湿重量増加、BALF 内の好中球浸潤および気管支炎の抑制効果が見られた。チオバルビツール酸反応物質と CAPs 中の Al、Si、Fe との有意な関連が認められた。本報告では CAPs 曝露により、活性酸素種の反応を介した生体影響が起こることが示唆されたと報告している。

Kodavanti ら (1997) は、ROFA または ROFA に含有される金属 (Fe、V、Ni) をラットの気管内に 1 回投与した。ROFA の粒径は  $1.95 \pm 1.61 \mu\text{m}$  で、投与量は ROFA (2.5 mg/個体)、Fe ( $0.54 \mu\text{M}/\text{個体}$ )、V ( $1.66 \mu\text{M}/\text{個体}$ )、Ni ( $1.0 \mu\text{M}/\text{個体}$ ) であった。いずれも 0.3 ml の生理食塩水 (pH 2.5) に溶解した。投与 1 時間後から気道・肺胞領域の浮腫および出血性変化、炎症細胞 (好酸球、好中球、マクロファージ) の浸潤が出現し、24 時間後にピークに達した後 96 時間後まで継続した。同様の変化は金属の投与によっても惹起されたが、Fe や V に比べて Ni による肺の炎症や障害が高度であった。金属を混合した場合にはむしろ炎症・障害の誘導作用は減弱した。ROFA 投与 3 時間後には一過性に MIP-2、IL-18、IL-5、IL-6、VCAM-1、E-selectin の遺伝子発現が増加した。これら炎症性遺伝子は金属の投与でも観察されたが、特に Ni の影響が強く見られた。本研究では、ROFA に含有される金属による肺の炎症作用は、Ni > V > Fe の順に大きいことが示された。

Molinelli ら (2002) は、TSP の水溶性抽出物 1mg をラットの気管内に単回投与した。TSP 抽出物の気管内投与した場合の BALF 中のタンパク質や LDH は、生理食塩水の気管内投与と比較して増加した。金属類を除去した TSP 抽出物では、BALF 中のタンパク質や LDH の増加量は有意に減弱していた。金属類除去 TSP 抽出物に金属類を加えると、増悪効果は復活した。金属類でもタンパク質量は軽度に増加していた。TSP 抽出物、金属類除去 TSP 抽出物、金属類除去 TSP 抽出物 + 金属類の気管内投与により好中球性炎症が惹起されたが、群間で有意な差は見られなかった。本研究は、一般環境における粒子に含まれる水溶性の金属成分が、量によっては、肺の障害に関与している可能性があることを示している。

Kodavanti ら (1998) は、ROFA の金属含量の違いが肺の炎症と障害作用に影響するかについて検討するために、火力発電所の異なる部位から採集された ROFA をラットの気管内に投与した。ROFA 粒径は  $1.99 \sim 2.59 \mu\text{m}$ 、投与量は 0.83、0.33、8.3 mg/kg (体重) を単回投与であった。24 時間の BALF 中のタンパク質、ヘモグロビン、LDH 量は Ni や Fe の含量と関連していた。一方、BALF 中の好中球数は V 含量と関連していた。マクロファージの活性化 (活性酸素の産生) は V 含量の高い ROFA で観察された。ROFA による肺の炎症作用やマクロファージの活性化は V 含量と関連し、障害作用については Ni 含量と関連することが示された。

Clarke ら (2000b) は、CAPs を曝露されたイヌにおける肺の炎症や血液学的な反応につ

いて検討した。肺の炎症変化検索と血液学的な検索のために、正常イヌを CAPs やろ過空気に曝露した。血液学的な検索では、CAPs( $360.80 \pm 266.60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )またはろ過空気に 6 時間/日、3 日間連続曝露の後、次の週には、清浄空気曝露群は CAPs 曝露へ、CAPs 曝露群は清浄空気へとクロスオーバー曝露し、CAPs の 1 日の組成の変化と血液成分の変化との関連を調べた。次の週にはクロスオーバー曝露を行い、CAPs の 1 日の組成の変化と血液成分の変化との関連を調べた。全ての CAPs や全ての擬似曝露を比較したところ、生物学的な反応において統計的な有意差はみられなかった。しかしながら、CAPs 曝露における生物学的な反応の変動が大きかった。すなわち、日ごとの曝露量と成分のばらつきが大きく、それに対する生物学的な反応も変動も大きくなっていった。そこで、統計学的に、CAPs の成分と生物学的な反応の間の関連性を解析した。BALF 中の好中球の割合、末梢血の総白血球数、好中球、リンパ球の増加が Al や Si の増加と関連していた。血中の好中球と肺胞洗浄のマクロファージの増加は V や Ni 因子と関連していた。BALF の好中球の増加は、Br/Pb と CAPs 曝露の 3 日目のデータのみで関連性がみられた。赤血球の数やヘモグロビンレベルの有意な減少がイオウと相関があった。BALF と血液学的なパラメータは総計 CAPs の質量濃度の増加とは関連がなかった。これらのデータは CAPs の吸入が肺性および全身性の細胞プロファイルの変化と微妙に関連して、CAPs の特異的な成分はその生物学的な反応の原因である可能性を示唆している。

Schins ら (2004) は、工業地帯(都市部)と郊外より採集した PM(coarse, fine の 2 サイズ)  $0.32\text{mg}/\text{個体}$  をラット気管内に投与し、18 時間後の BALF および血中の炎症指標を測定した。その結果、fine より coarse の PM が、さらに、工業地帯よりも郊外の PM がより強い毒性を示した。その背景に、金属(組成、含有量)ではなく、エンドトキシン量が関与していることが示唆された。

Gilmour ら (2004) は、CD1 マウスに CFA 気管内投与 18 時間後の BALF(各種炎症性指標；好中球の浸潤、生化学的指標、炎症性サイトカイン)を解析した。粒径は ultrafine  $0.2 \mu\text{m}$ (モンタナ産石炭由来)、fine  $2.5 \mu\text{m}$ 、coarse  $> 2.5 \mu\text{m}$ (西ケンタッキー産由来)で、投与量は  $2\text{mg}/\text{ml}$  原液から  $50 \mu\text{l}$  を投与( $100 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ )した。毒性はより小さいサイズの粒子の方が大きい( $0.2 \mu\text{m}$  以下の ultrafine  $> 2.5 \mu\text{m}$  以下の fine  $> 2.5 \mu\text{m}$  以上の coarse)ことが示された。この結果から、サイズの粒子が小さいほど CFA の毒性は大きく、また、毒性には、イオウ成分と微量元素成分の増加が関連することが示唆されると報告している。

Silbajoris ら (2000) は、ラットに対し ROFA( $500 \mu\text{g}$  ROFA in  $0.5 \text{ ml}$  saline)気管内投与した後に肺を摘出して免疫組織染色を行ない、炎症などに重要な細胞内シグナル経路として、MAPK(ERK1/2、p38-MAPK、JNK(c-Jun NH2-terminal kinase))のリン酸化について検討した。ROFA 投与 4 時間後から気道上皮、肺胞上皮、肺胞マクロファージの ERK1/2、p38-MAPK、JNK リン酸化が観察され、24 時間後まで持続した。ROFA による MAPK のリン酸化は培養気道上皮細胞に ROFA を曝露しても生じた。ROFA の投与により、肺の上皮細胞やマクロファージにおける MAPK の活性化が示された。

環境省 (2007a) は、都市沿道における CAPs の吸入曝露が細菌毒素に関連する肺障害に与える影響について、その増悪メカニズムとしてサイトカインやケモカインに及ぼす影響

に注目し、検討を行った。ICR 雄性マウスを以下の4群に分け、約5時間に及ぶCAPs曝露実験を行った。平成15年度より18年度まで、曝露日を変えて同じプロトコールを計8回行なった。CAPsの曝露濃度は、平均1,050mg/m<sup>3</sup>(範囲128~4,103)、そのうちPM<sub>2.5</sub>は31mg/m<sup>3</sup>(範囲6~74)であった。気管内投与直後よりCAPs又は除粒子対照の曝露を開始し、気管内投与の24時間後に諸検討を行った。

① vehicle (対照溶液)気管内投与 + 除粒子対照曝露、②. 細菌毒素 (4µg/body) 気管内投与 + 除粒子対照曝露、③. vehicle (対照溶液) 気管内投与 + CAPs 曝露、④. 細菌毒素 (4µg/body) 気管内投与 + CAPs 曝露

その結果、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞浸潤では、毎実験において細菌毒素の経気道曝露により好中球の有意な増加と好酸球の増加傾向を示した。全8回の実験中6回で、CAPs曝露により除粒子対照曝露と比較して好中球数の増加傾向を示し、そのうち2回は有意な差も認められた。炎症性サイトカイン及びケモカインとして、肺組織中のIL-18、MIP-1α、MCP (Monocyte Chemoattractant Protein) -1、KC (Keratinocyte Chemoattractant) を測定した。細菌毒素の経気道曝露により、これらの炎症性タンパクの増加が認められたが、CAPs曝露による炎症性タンパクの発現への影響は曝露日によって様々であった。CAPs構成成分と炎症のパラメーターとの相関においては、好酸球にのみ相関を認めた。

以上より、CAPs曝露はそれ自体で肺に明らかな炎症等の障害は与えないが、細菌毒素に関連する肺障害を増悪しうる可能性が示唆された。一方、CAPs曝露は、細菌毒素との併存で好酸球性炎症を惹起することが示された。また、CAPs曝露は、肺において細菌毒素で誘発される炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を曝露条件によっては増強することが示された。しかしながら、肺での炎症増悪に寄与しているCAPsの成分を同定することは出来なかった。

## 2.2.2. 気道反応性の亢進および喘息の悪化がみられる

Rudellら(1996)は、アイドリング状態のディーゼル・エンジン (Volvo 1990) の排気筒における粒子捕集が、ろ過していない排気への曝露に比べ、ディーゼル排気で起こる症状や肺機能への影響を減少させるかどうかを評価した。12人の健康な非喫煙者で、かつ喘息に罹患していない被験者(男8人、女4人:20~37歳)を75W相当の軽運動を10分、次いで10分間の安静のサイクルを繰り返しながら1時間曝露チャンバーで曝露させた。被験者は、3つの別々の曝露を受けた[空気、ろ過しないディーゼル排気(粒子数;2.6×10<sup>6</sup>/cm<sup>3</sup>、NO<sub>2</sub>;1.9ppm、NO;2.7ppm、CO;27ppm、総炭化水素;4.5ppm、ホルムアルデヒド;0.4mg/m<sup>3</sup>)および排気筒に粒子捕集を付けたディーゼル排気]。症状は、曝露中は10分毎に、曝露後30分にBorgのスケールで記録した。肺機能は、コンピューター化した全身ボディープレチスモグラフで測定した。セラミック・フィルターの気流粒子捕集により、粒子数は46%減少したが、他の化合物の濃度はあまり変化しなかった。DEへの曝露中の最も顕著な症状は目や鼻の刺激と曝露中の不快な臭いの増加であることが示された。DEへの曝露中の肺機能の変化は、気道抵抗(Raw)と特異的気道抵抗(sRaw)の両方が有意に増加した。捕集で粒子数は46%減少したにも拘わらず、症状や肺機能への影響は有意に減衰しなかった。結論として、ディーゼル排気への曝露は症状や気管支収縮を引き起こし、これらは粒子の捕集で有意に減少しなかったと報告している。

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 20 L/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、Volvo TD45-1991 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> : 1.6 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>、浮遊粒子状物質 : 4.3×10<sup>6</sup>/cm<sup>3</sup> であった。各曝露の前後に肺機能 (PEFR、FVC、FEV<sub>1</sub>、FEF<sub>25-75%</sub>) 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後の 6 時間目に行った。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 fibronectin 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-1+ 細胞の数の増加と共に、内皮接着分子である ICAM-1 と VCAM-1 の upregulation と共に好中球、マスト細胞、CD4+ 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おこすことを実証していると述べている。

Nordenhäll ら (2001)は、喘息患者の気道の過反応性、肺機能および気道炎症への影響を評価することにより、DE への短期間曝露の影響を調べた。被験者は、14 人の非喫煙者のアトピー性喘息患者 (男女各々 7 人、平均年齢 26 歳；22~57 歳) で、コルチコステロイドの継続的な吸入治療および短期間作用の β<sub>2</sub> 作動薬を吸入している安定した状態にあった。DE は Volvo TD45-1991 エンジンで発生させ、曝露チャンパー内に入る DE は、50% カットオフの空気力学径が 10µm (PM<sub>10</sub>) の粒子濃度が 300µg/m<sup>3</sup> (主要都市の交通頻繁な道路でみられる高濃度を代表) になるようにし、NO<sub>2</sub> 濃度は 1.2 ppm であった。各被験者は、DE と空気に別々に間欠的運動下 (分時換気量が 20L/min/m<sup>2</sup> 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 1 時間曝露された。DE への曝露後 24 時間では、空気に比べメサコリンに対する過反応性の程度が有意に増加した。また、気道抵抗と喀痰中の IL-6 の有意な増加がみられた。この研究は、高レベルの DE への短期間曝露は、コルチコステロイドの吸入療法を受けていても、喘息患者の気道における悪影響に関連していることを示している。気道反応性亢進は、粒子状物質への曝露に続いて喘息の増悪という疫学的知見との重要な関連を提供していると述べている。

Holgate ら (2003b)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、曝露チャンパー内の平均濃度は PM<sub>10</sub> : 108.3µg/m<sup>3</sup>、CO : 1.7 ppm、NO : 0.6 ppm、NO<sub>2</sub> : 0.2 ppm、HC : 1.4 ppm、HCHO : 43.5µg/m<sup>3</sup> であった。被験者は間欠的運動下 (分時換気量が 15~20 L/min/m<sup>2</sup> 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亢進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。

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  $\beta_2$  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 $\mu$ 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、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。

Diaz-Sanchez ら (1994) は、11 人の健康な非喫煙者 (男 6 人、女 5 人；23~48 歳) に対し、DEP の 1.0、0.3、0.15 または 0 mg を 200 $\mu$ L の食塩水に浮遊させたものの何れかを鼻腔内に噴霧し、経時的に鼻腔洗浄を行い洗浄液中の各種免疫グロブリンおよびその遺伝子発現を解析した。DEP は、light-duty ディーゼル乗用車の排気を捕集したもので、全て



の被験者は DEP の 4 つの量 (1.0、0.3、0.15、0 mg) の全てに曝露された。その結果、0.3 mg の DEP 投与後 4 日には IgE (Immunoglobulin E) 濃度の有意な増加が認められたが、0.15 mg および 1.0 mg DEP 投与ではみられなかった。また、0.3 mg DEP 投与後 4 日目には IgE の増加がみられたが、7 日目と 10 日目にはみられなかった。0.3 mg の DEP は、ロサンジェルスの大気の 24 時間吸入量に相当する。しかし、IgG、IgA、IgM、アルブミンは不変であった。0.3 mg DEP 投与では、洗浄液中の IgE 産生細胞の数は 20 倍以上に増加し、また遺伝子レベルでは異なる IgE タンパク質をコードする 5 種類の epsilon mRNA (CH4-M1'-M2、CH4-M2'、CH4-M2"、CH4-S、CH4'-CH5) のうち CH4'-CH5 を除いた全ての発現が亢進した。これらの所見は、DEP が、ヒトの B 細胞分化を増強し、IgE 抗体の産生を増強させることによってアレルギー性疾患の反応を増大させることを示唆していると述べている。

Diaz-Sanchez ら (1996) は、健康な非喫煙者 14 人 (男 8 人、女 6 人、23~48 歳) に対し DEP 0.15 mg を 200 $\mu$ L の食塩水に浮遊したものを鼻腔内に噴霧し、総量 0.3 mg の DEP を投与した。DEP は、light-duty のディーゼル乗用車の排気から採集した。18 時間後に鼻腔洗浄を行い洗浄液中のサイトカインの mRNA およびタンパク質の発現を検討した。その結果、DEP 投与前の被験者の鼻洗浄液中の細胞から、IFN (Interferon)  $\gamma$ 、IL-2 および IL-13 の mRNA が検出できたが、DEP 投与後では、細胞は、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 および IFN  $\gamma$  の mRNA を産生し、全てのサイトカイン mRNA レベルが増加した。また洗浄液中の IgE 濃度の有意な上昇もみられた。したがって、DEP への曝露後のこれらのサイトカインの発現の増加が、IgE 産生の増強に寄与し、アレルギー性呼吸器疾患の増加に関連している可能性があるとして述べている。

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 Th (T helper cells) 1 タイプのサイトカイン (IFN  $\gamma$  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 $\mu$ 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  $\mu$  から  $\epsilon$  への switching を示す deleted switch circular DNA (Se/Sp) 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 (2000a) は、DEP がヒトの鼻粘膜細胞による CC ケモカインの産生に影響を与えるかどうかを、10 人の健康な非喫煙者 (男 3 人、女 7 人: 23~31 歳) の鼻腔に DEP を曝露して調べた。DEP は、light-duty のディーゼル乗用車から得られたもので、0.3 mg を 200 $\mu$ l の食塩水に含めたものをスプレーして投与した。投与後、2、4、6 および 24 時間後の鼻洗浄液中の RANTES、MIP-1 $\alpha$  および MCP-3 レベルは、経時的に有意に上昇し、6 時間または 24 時間後に最高値に達した。反対に DEP は、eotaxin レベルを増強させなかったことから、DEP は、全ての CC ケモカインに一樣に影響を与えていないことを示していた。DEP は、また鼻洗浄液中の総細胞数を増加させ、リンパ球、単球、マクロファージや好中球の増加も観察されたが、好酸球数は変化しなかった。ECP タンパク質レベルは有意に増加した。DEP の曝露後に特定の鼻のケモカイン表現が上昇することは、アレルゲンがなくても、炎症、細胞浸潤や IgE の増加に関与しているようであると述べている。

Diaz-Sanchez ら (2000b) 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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/ $\alpha$ -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、

$\beta$ -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ギー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  $1.0 \text{ mg/m}^3$  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 [*D. 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、 $29.7 \times 10^3$  細胞/mL と  $25.4 \times 10^3$  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、 $3.23 \text{ pg/mL}$  ( $p=0.06$ ) 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。

Tunnicliffe ら (2001) は、粒子状  $\text{H}_2\text{SO}_4$  への曝露の grass 花粉アレルギー (Cocksfoot and Timothy、Bayer) に対する初期の喘息反応への影響を 13 人の軽症の喘息の成人患者 (男 4 人、女 9 人：17~54 歳) について調べた。各被験者について  $\text{FEV}_1$  が 15% 低下するアレルギーの誘発量 (PD15) を確立した後、被験者は、頭部ドーム供給システムを通して、空気、 $100 \mu\text{g/m}^3$  または  $1,000 \mu\text{g/m}^3$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ネブライザーで発生：MMD  $300 \text{ nm}$ ) に 1 時間曝露された後 14 時間目に、決められた量のアレルギー・チャレンジ (PD15) を受けた。10 人の被験者が研究を終了した。空気、 $100 \mu\text{g/m}^3$ 、および  $1,000 \mu\text{g/m}^3$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  曝露後の初期喘息反応の平均値 (チャレンジ後最初の 2 時間間の  $\text{FEV}_1$  の最大のパーセンテージ変化) は、それぞれ、-14.1%、-16.7%、および -18.4% であった。 $1,000 \mu\text{g/m}^3$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  と空気との差 [差の平均：-4.3%、95% 信頼区間 (CI)：-1.2~-7.4%、 $p=0.013$ ] は有意であった。空気と  $100 \mu\text{g/m}^3$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  との間の差 [差の平均：-2.6%、95% 信頼区間 (CI)：0.0~-5.3%、 $p=0.051$ ] は有意に近かった。これらの結果は、少なくとも高濃度では、硫酸は、影響は限定されているが、grass 花粉アレルギーに対する軽症喘息患者に対する初期喘息反応を強めることができることを示唆していると述べている。

Muranaka ら (1986) は、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