

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た。

Miyabara ら (1998c) 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 マウス (IgG high responder) と低い BALB/c 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 OVA (OVAalbumin) を気管内投与し、気道の炎症反応を調べた。OVA 特異的 IgG1 抗体産生は C3H/He マウスで BALB/c マウスより 30 倍高かった。気道粘膜下への好酸球浸潤は両系統マウスとも OVA+DEP 群でのみ顕著に増加しているが、C3H/He マウスの値は BALB/c マウスの値より 4.6 倍高かった。リンパ球浸潤は両系統間で差はみられなかったが、OVA+DEP 群の粘液産生細胞の増生は C3H/He マウスが BALB/c マウスより 18 倍高かった。呼吸抵抗も C3H/He マウスの OVA+DEP 群でのみ 2~3 倍高く有意に増加したが、BALB/c マウスの呼吸抵抗は OVA 群、DEP 群、OVA+DEP 群とも対照群と比べて全く変化していなかった。炎症性サイトカインの IL-5 と IL-2 も C3H/He マウスの値が BALB/c マウスの値より 20 倍高かった。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。

Miyabara ら (1998a) は C3H/He マウス (雄) 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) である水酸化アルミニウムゲルの使用をやめ、10 μ g の OVA のみを腹腔内注射して感作し、その後 12 時間/日、7 日/週、12 週間にわたって DEP 濃度として 1mg/m³ 曝露群あるいは 3mg/m³ 曝露群の DE を吸入させ、さらに、3 週間に 1 回ずつ 1% OVA から発生させたミストを 6 分間吸入させ、呼吸抵抗と気道炎症指標の変化を調べた。BALF 中の好酸球数、好中球数ともに DEP 濃度に依存して増加した。気道への好酸球の浸潤は 1mg/m³ と 3mg/m³ で OVA ミストのみの群の 2 倍、4.7 倍と有意に増加し、呼吸抵抗も DEP 濃度に依存して 2 倍、4.4 倍と上昇した。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た。粘液産生細胞の増生はそれぞれ OVA ミスト群の 2.8 倍と 6.6 倍であった。血清中の IgE と IgG1 の抗体価は OVA 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 群の値より増加した。これらの結果から、水酸化アルミニウムゲル投与による感作ではなくても C3H/HeN マウスでは OVA+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。

Miyabara ら (1998b) は C3H/He マウス (雄 6 週齢) に OVA を含有する水酸化アルミニウムゲル 1mg を腹腔内注射して感作した後、12 時間/日、7 日/週、5 週間にわたって DEP 濃度として 3mg/m³ の DE を吸入させ、さらに、3 週間に 1 回ずつ、1% OVA 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た。BALF 中の好酸球数は OVA+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 OVA+DE 曝露群で顕著に増加 ($10 \sim 20 \times 10^4$ 個/総 BALF) した。OVA+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、OVA 群の 4.4 倍に増加し、粘液産生細胞の増生は OVA+DE 曝露群と OVA 曝露群で対照群の各々 66 倍と 6 倍に増加した。呼吸抵抗も OVA+DE 曝露群と OVA 群は対照群のそれぞれ 2.4 倍、1.5 倍へと上昇した。血清中の IgE と IgG1 の抗体価は OVA 群より OVA+DE 群で顕著に増加した。サイトカイン類は IL-5、IL-4、GM-CSF および IL-2 などが OVA+DE 群で OVA 群よ

り有意に増加し、特に IL-5 の増加が顕著であった。また、IL-5 は IL-2 および気道の好酸球浸潤レベルと、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た。

Ichinose ら (1998) は ICR マウス(雄)に 12 時間/日、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 OVA を腹腔内注射して感作し、その後 3 週間ごとに 1%OVA 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(一、 \pm 、+、++、+++、++++)の病理学的スコアにより調査して、気道粘膜下への好酸球浸潤と粘液産生細胞の増生は OVA+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 OVA ミストのみを吸わせた群に比べて有意に増加した。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なかった。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繊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たが、OVA+DE 群ではさらに増加する傾向にあり、無繊毛上皮増殖と上皮細胞肥大は対照群に比べて 0.3mg/m³ でも有意に増加したことが認められた。

Hashimoto ら (2001) はアレルギー性喘息におよぼす 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 12 時間/日、8 週間吸入し、OVA を含有する水酸化アルミニウムゲルで感作した動物としない動物の気道過敏性の 2 相性変化を調べた。その結果、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、Immediate Airway Responses)と遅発型気道過敏性(LAR、Late Airway Responses)ともに増悪した。気道粘液も、即時型気道過敏性反応時に、DE 曝露感作動物で顕著に蓄積していた。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、DE 曝露感作動物で有意に増加していた。遅発型気道過敏性反応時には、気道上皮の細胞間隙が、DE 曝露感作群で、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、DE 曝露が即時型気道過敏性反応時(IAR)には、粘液の過剰分泌と好酸球性炎症を増強し、DE 曝露が遅発型気道過敏性反応時(LAR)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ギー誘発性気道過敏性を増悪する作用があるとした。

Ohta ら (1999) は、A/J マウスおよび C57BL/6 マウスを用いて、DEP(粒径: 0.4 μ m、曝露濃度: 0.25mg/ml DEP in 40 μ l saline)の影響を調べた。DEP の鼻腔内投与により、A/J 群ではアセチルコリンに対する気道反応性が上昇した。C57BL/6 群では DEP 投与後 2 週間後に気道反応性の上昇が確認された。これらの反応性の上昇は 13 日以上持続し、M3 受容体を介しアドレナリン B2 作動薬によって抑制された。GM-CSF 抗体投与によりこれらの気道反応性の上昇は抑制された。IL-4 に対する抗体においても弱いながらも同様の現象がみられた。また DEP 投与後では BALF 中のマクロファージ数が上昇した。さらに DEP 投与は上皮細胞のクララ細胞への置換を誘発したが、これらも GM-CSF 抗体の投与により抑制された。さらに DEP は肺における GM-CSF の mRNA 発現を高めることが示された。

Takano ら (1997) は ICR マウス(雄)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 OVA1 μ g を気管内投与した実験を行った。その結果、OVA+DEP 群のマウスの気道粘膜下への好酸球浸潤は対照(溶媒)

群の330倍、OVA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、好酸球を活性化するサイトカインであるIL-5はOVA+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OVA+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、結合して、好酸球を活性化するというメカニズムで生じた可能性が示唆されている。

Takanoら(1998a)は、上記のIchinoseら(1998)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、サイトカイン産生等を調べた。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はOVA+DE群でのみ増加し、3.0mg/m³群で有意差を認めた。IL-5産生もDE濃度に依存して増加し、3.0mg/m³濃度のOVA+DE群でOVAのみの群の3.3倍に有意に増加した。GM-CSFも同様の傾向で増加し、3.0mg/m³群でOVAのみの群の60%強の、有意な増加を示した。IgG1は10万タイター以上に、IgEは10万タイター前後に増加したが、DEP濃度の違いによる変化は全く認められなかった。

Takanoら(1998b)は上記と同様の実験系で呼吸抵抗の変化を調べ、OVA+DEP群でのみ有意に亢進したこと、またOVA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OVAによる、呼吸抵抗に及ぼす影響を亢進し増強させる作用があることを示した。

Ichinoseら(1997)は、DEP濃度として0、0.3、1.0および3.0mg/m³のDEをICRマウス(雄)に8ヵ月間吸入させる実験を行い、アレルゲン非吸入時には気道粘膜下への好酸球の浸潤や粘液産生細胞の増生をどの濃度群でも認めなかったと報告している。一方、DE曝露では、気道粘膜下へのリンパ球の浸潤や無繊毛上皮細胞の増殖や肥大が、1.0mg/m³以上の濃度群で対照群より有意に増強されているとした。なお、この検討は病理学的変化を6段階に点数化し、ANOVA解析で群間の有意差検定を行った。

Ichinoseら(2004)は、ハウスダストの抗原となるダニ(*Dermatophagoides farinae*, Der f)投与による肺炎症に対して、DEPの気管内投与の影響を検討した。Der f: 1 μ gおよびDEP: 50 μ gを2週間隔で4回投与した。各マウスにDer fを与えた群では、肺組織に好酸球とリンパ球の浸潤がみられ、好酸球の浸潤程度はBALB/cマウス<ICRマウス<C3H/Heマウスであった。肺組織のeotaxinとIL-5は好酸球浸潤の程度と相関していた。Der f+DEP投与群では好酸球浸潤が増加し杯細胞の増加がみられ、eotaxinならびにIL-5の発現が増加した。またDer f特異的IgG1量はBALB/cマウス<ICRマウス<C3H/Heマウスの順であった。C3H/HeマウスではDEPによるアジュバント効果が認められた。これらの結果からマウス種の違いによる好酸球性炎症の程度の違いは肺局所のIL-5、eotaxinの発現の違いによると思われる。DEPによる反応増強は局所のサイトカインを介して起こっている可能性

がある。抗原特異的 IgG₁ は DEP により増強されるアレルギー喘息の病因に重要であると考えられたと述べている。

Takafuji ら (1987) は、マウスに種々の量の DEP (1, 5, 25 μ g) と OVA (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 + OVA 0.25 μ g で OVA 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。

Kobayashi と Ito (1995) は、DEP が鼻部過敏反応に及ぼす影響を調べるため Hartley モルモット (雄) に PBS あるいは濃度が 1.0, 10.0 または 20.0 mg/kg (体重) の DEP を 300 μ L/kg (体重) 鼻腔投与し、その後 1.0 mM ヒスタミンを 10 分間曝露して鼻腔内圧、鼻汁分泌を測定した。また血管透過性を皮膚で見た。その結果、DEP、ヒスタミンの濃度に依存していずれも増加した。このことから DEP によってヒスタミンへの感受性が高まり、過敏反応が引き起こされることがわかった。

Ohyama ら (1998) は、OVA 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。

Goldsmith ら (2002) は、CAPs (ボストン由来、PM_{2.5}) の急性曝露効果を検討するために、OVA 感作若齢マウス (ヒトの喘息モデルを想定) に CAPs と O₃ (PM_{2.5}: 63.5 ~ 1,568.6 μ g/m³、O₃: 0.3%) を 5 時間/日、3 日間連続 (生後 21, 22, 23 日目) 曝露し、24 時間後の肺機能検査および炎症所見についての BALF および肺組織の形態学的検討を行った。その結果、一過性かつわずかであるが (0.9%/100 μ g/m³) CAPs 曝露群で気道狭窄の指標としての Penh: enhanced pause (肺気流抵抗) の有意な上昇が認められた。炎症性変化は認められなかった。CAPs の元素組成のうち、Al-Si の影響が示唆された。

Kobzik ら (2001) は、OVA 誘発性喘息モデルマウスにおける CAPs と 0.3ppm O₃ の急性曝露影響について検討した。用いられた粒径は 0.15 ~ 2.5 μ m (粒子採集装置及びフィルターの性能からの予測値であり、測定値は記載なし) で曝露濃度は高用量 (63.3 ~ 1,568.6 μ g/m³) と低用量 (1.6 ~ 133.1 μ g/m³) の 2 種類であった。7 日齢及び 14 日齢に OVA 感作後、21 日齢より実験を開始した。OVA 誘発性喘息モデル群及び対照群に対し、5 時間/日で、3 日間連続し、CAPs (Harvard Ambient Particle Concentrator を使用) 及び O₃ 又は清浄空気を吸入させた。その結果、① CAPs 単独曝露により、メサコリン応答性 Penh: enhanced pause (メサコリン誘導肺気流抵抗) の濃度依存的な上昇が認められた (100 μ g/m³ につき 0.86% 上昇)。② 300 ~ 500 μ g/m³ CAPs と O₃ の複合曝露により、メサコリン誘導肺気流抵抗の上昇が認められた。①と②は CAPs 曝露直後にのみ認められ、曝露 24 時間後では認めなかった。③ CAPs 中の元素組成と Penh との相関を検討した結果、CAPs 中の Al-Si 含有率に相関して Penh (ベースライン: メサコリン刺激無し) の上昇が認められた。④ CAPs 単独曝露又は CAPs + O₃ 複合曝露 48 時間後において、BALF 中の全細胞数及びマクロファージ数の減少が認められた。

さらに本研究では、LPS (LipoPolySaccharide) と IFN- γ で前刺激した肺胞マクロファージ

による TNF- α 及び MIP-2 産生量に対する CAPs の影響を *in vitro* で検討したが、CAPs の元素組成と産生量の変化との間に相関は認めなかった。CAPs 曝露の直後において、比較的小さな気道反応性の亢進が短時間(<24 時間)見られることが示された。また、明瞭ではなかったものの、気道反応性亢進の程度は CAPs 中の Al-Si 含有率と正相関することが示された。

Hamada ら (1999) は、マウス喘息モデルにおける ROFA 曝露の曝露時間 30 分/日の急性影響を調べた。ネブライザー曝露の曝露濃度は 50mg/ml。新生マウスの生後 3, 7 日に OVA (5 μ g) を含有する水酸化アルミニウムゲル [Al(OH)₃] (1 mg) を腹腔内投与した。1 週間後にアレルゲン (3% OVA in PBS, 10 分/日、生後 14~16 日) をネブライザー投与した。その結果、処理マウスでは、メサコリンに対する気道過敏性の上昇、BALF 中の好酸球増加、気道の組織学的炎症像、抗 OVA IgE 増加を認めた。次にこの喘息のモデル動物を用いて、生後 15 日に OVA の代わりに ROFA 溶出液 (supernatant of 50 mg/ml, 30 分) を曝露すると、気道過敏性と炎症を認めた。なお、OVA 感作をしていないマウスでは ROFA 溶出液曝露による変化はなかった。感作マウスにおける ROFA による変化は抗酸化物質である DMTU (DiMeThylthioUrea; 3mg/kg 個体, i.p.) により抑えられた。

*i.p. 腹腔内 (intraperitoneal)

Lambert ら (2000) は、ハウスダストの抗原となるダニをアレルゲンとして使用し、これによる呼吸器・免疫影響に ROFA やそれに含まれる金属が及ぼす影響を検討した。用いた粒子は ROFA および ROFA に含まれる金属の水溶液で、ROFA の粒径は 1.95 μ m であった。Brown Norway ラットへの投与量は、①生理食塩水: 0.3ml、②ROFA: 1mg、③NiSO₄: 105.12 μ g、④FeSO₄: 58.49 μ g、⑤VSO₄: 98.2 μ g、⑥金属混合: Ni+Fe+V であった。抗原特異的 IgE 産生は、ROFA、Ni、V、金属混合の気管内投与により増悪した。気道反応性は Ni により増悪した。BALF 所見では、好酸球浸潤は ROFA と Fe により増悪した。肺における遺伝子発現に関しては、好酸球の活性化に関わる IL-5 は ROFA、Ni、V で増加が認められた。

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 CAPs (coarse, fine) を曝露し、対照群: NaCl、OVA、OVA+オタワ標準粉じん (EHC-93) を曝露した。投与パターンは、OVA+PM により感作 (0 日、14 日、9mg/ml、450 μ g PM/個体) 後、35、38、41 日に OVA でチャレンジし、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 の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。

Harkema ら (2004) は OVA で感作してアレルギー炎症を誘導しておいた Brown Norway (BN) ラットへの CAPs (81~755 μ g/m³)、10 時間/日、5 日間曝露 (9 月実施) において、気道粘液産生と気管支炎の増加を認めた。7 月の曝露 (16~895 μ g/m³) では OVA 感作したラットへの影響は少なかった。9 月の曝露による影響には、人間活動起源の La、V、S などを曝露したラットで多かったことから、これらの組成による影響が疑われた。次に、CAPs 中の原因物質を探るため、9 月の曝露で集めた粒子を可溶性、難溶性画分にわけ、OVA 感

作した BN ラットに気管内投与して炎症増悪と物質との関連について調べたが、全身曝露でみられた結果が再現できず、同定はできなかった。以上の結果から、9月に曝露した CAPs では正常ラットへの悪影響はみられなかったと報告している。しかし、喘息モデルのラットでは気道粘液産生や気管支炎の増悪がみられていることから、デトロイトの南西部の粒子中に重量濃度に依存しない喘息の悪化にかかわる粒子の存在、及び沈着が明らかにされたものと考えられる。

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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (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。

2.2.3. 呼吸器感染に対する感受性が亢進する

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。Diesel exhaust (DE: ディーゼル排気) 濃度は、曝露チャンバー内の被験者の呼吸ゾーンで NO_2 の平均濃度が 1.6 ppm になるように希釈した (そのときの粒子濃度は $4.3 \times 10^6/\text{cm}^3$ 、NO は 3.7 ppm、CO は 27 ppm、ホルムアルデヒドは $0.5 \text{ mg}/\text{m}^3$)。その結果、BALF 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能の有意な減少がみられた。

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: $2.6 \times 10^6/\text{cm}^3$ 、 NO_2 : 1.3 ppm、NO: 3.4 ppm、HC: 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ディーゼル排気の曝露を行った。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について、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食能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、CD3+CD25+細胞 (CD=cluster of differentiation: 分化抗原群) 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。

Soukup ら (2000) は、Utah Valley 粉塵 (UVD) の PM₁₀ フィルターを 1986 年から 1988 年にかけて捕集した期間のなかで、製鉄工場が操業中のものを UVD1、閉鎖中のものを UVD2、再開したものを UVD3 とした。総金属量が UVD1 (yr 1) = UVD3 (yr 3) > UVD2 (yr 2) と変わる 3-yr (年) 間にわたりフィルターに捕集された一連の UVD PM₁₀ の抽出物を用いた。18~35 歳の正常な健康な非喫煙者 (被験者数記載なし) の男女の各々の右区域気管支にコントロールとして 0.9% の食塩水 20 ml を注入し、左肺に 10 ml 食塩水に UVD1、2 または 3 の抽出物 500 µg を浮遊させたものを注入し、続けて 10 ml の食塩水を注入した。注入 24 時間後に二度目の気管支鏡を用い、貪食細胞を採集した。肺胞マクロファージの貪食活動と酸化反応を UVD の肺区域への注入後 24 時間目に、また、肺胞マクロファージと抽出物の *in vitro* での培養後一夜後に調べた。フロー・サイトメトリー分析を用いた fluorescein isothiocyanate dye に接合させた *Saccharomyces cerevisiae* の肺胞マクロファージ貪食能は、UVD1 の注入後抑制されたが (61%)、yr 2 と yr 3 では抑制されなかった。ベースラインの酸化活性や phorbol ester-induced oxidant 発生の何れも、*in vivo* では粉塵抽出物によって影響されなかった。UVD1 と肺胞マクロファージの一夜の培養は、粒子を貪食する肺胞マクロファージのパーセンテージの有意な減少 (30%) を起こしたが、他の二つの抽出物では、この機能への有意な影響はみられなかった。さらに、UVD1 と UVD3 の両方は、肺胞マクロファージを抽出物と一緒に一夜培養すると肺胞マクロファージの酸化活性を抑制したけれども、UVD1 のみは、肺胞マクロファージで即時の酸化性反応を引き起こした。肺胞マクロファージの宿主防御への有害な影響は、apoptosis によるもので、UVD1 に曝露された細胞において明らかで、yr 2 と 3 に曝露された肺胞マクロファージでは、その程度はずっと低かった。*in vitro* での肺胞マクロファージへの毒性影響をおこす成分は、polycation chelating resin の chelex-100 で UVD 抽出物を予め処理することにより除去された。しかし、yr 1 と 3 は、溶解性金属成分が類似しているが、肺胞マクロファージ貪食能への影響は異なるので、金属は、粒子状物質の肺胞マクロファージ宿主防御への影響の要因ではない可能性もあると述べている。

Zelikoff ら (2003) は、CAPs (ニューヨーク由来) を、F344 ラット (雄、7~8 ヶ月齢) を第 1 群 : 345 µg/m³、第 2 群 : 107 µg/m³ の 2 群に分けて鼻部曝露を行い易感染性の実験を行った。第 1 群は CAPs を 3 時間曝露した後に肺炎球菌を気管内投与した。第 2 群には、肺炎球菌を投与してから 48 時間後に CAPs を 5 時間曝露した。影響としては、BALF 中のサイトカイン (TNF-α、IL-1α/β、IL-6)、肺炎球菌の肺クリアランスなどであった。第 1 群は清浄空気曝露群に比べ大きな変化は見られなかったが、第 2 群では、CAPs 曝露群においてサイトカインの産生の有意な減少、肺炎球菌のクリアランスの遅延、血中好中球数の上昇が見られた。これらのことから CAPs の単回曝露は、感染状態を悪化させることが示唆された。

Zelikoff ら (2002) は、CAPs (粒径 PM_{2.5}、65~90 µg/m³) 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。

Yin ら (2005) は、ラット(雄)に 4 時間/日、5 日間連続して過空気(対照群)もしくは DEP(標準試料 2975、曝露濃度: $21.2 \pm 2.3 \text{ mg/m}^3$) を鼻腔より吸入させ、最終曝露から 7 日後にリステリア菌を気管内投与した。肺組織内のリステリア菌増殖は対照群では感染 7 日後に収束したが、DEP 曝露群では 7 日目でも維持されていた。リステリア菌感染させると、分離した肺胞マクロファージの IL-1 β 、TNF- α 、IL-12 産生能あるいは CD4 $^+$ 、CD8 $^+$ 陽性リンパ球数とリンパ球の IL-10、IL-2、IFN- γ 産生能が増加するが、DEP 曝露群ではそれらが有意に抑制された。これらより、DEP の曝露は肺胞マクロファージの免疫機能や T リンパ球介在型の免疫反応の抑制によって、細菌感染に対する肺の感受性を増加させる可能性が示された。DEP の曝露は肺胞マクロファージの免疫機能や T リンパ球介在型の免疫反応を抑制することによって、細菌感染に対する肺の感受性を増加させる可能性が示されたと述べている。

Hiramatsu ら (2005) は、マウスに DE(約 3 mg/m^3 、 $3.1 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$) 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 (1×10^6 CFU、Kurono 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。

Yang ら (2001) は、SD ラット(雄)に生理食塩水または CB(5 mg/kg (体重))、DEP(5 mg/kg (体重))を曝露後、リステリア菌を感染させ、1 週間観察した。感染させたリステリア菌のクリアランスは CB 投与では影響なかったが DEP 投与群で遅延し、DEP の曝露がリステリア菌感染の感受性を高めることが示された。BALF 中のマクロファージ、好中球の割合は DEP、CB 投与共に感染 3 日後に増加したが、リステリア菌感染により増加する BALF 中の活性酸素や NO 産生は、DEP 前投与では阻害されていた。感染 3 日後に肺胞マクロファージを分離培養し、TNF の産生能を調べたところ DEP 曝露群では CB 投与群に比べ産生能が低かった。DEP 気管内投与により、肺胞マクロファージの抗細菌活性物の産生能が減少し、肺感染症にかかりやすくなる可能性が示された。また、DEP と CB の結果に明らかな違いが見られることから、DEP に付着した化学物質が影響している可能性

を示した。

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/m³の濃度で、NO₂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。

Saitoら (2002)は、DEP(粒径:90%以上が<2.5µm(PM_{2.5})、60%が0.33µm以下、曝露濃度:低濃度DEP群:95.4±18.8µg/m³、高濃度DEP群:3.15±0.49mg/m³)の慢性曝露影響(曝露時間7時間/日、5日/週、4週間)を検討した。BALB/cマウスへのDEP曝露影響について、肺病理と肺組織サイトカイン発現量により検討した。曝露終了1日後の低濃度曝露群では、DEPを内包した肺胞マクロファージが認められ、さらに、高濃度曝露群ではその数が増加し、DEP内包マクロファージの周囲で肺胞上皮細胞の過形成が観察された。BALF中のリンパ球と好中球の割合は、対照群の1.5%と1.4%に対し、低濃度曝露群で4.9%と3.3%、高濃度曝露群で19.8%と16.2%と増加した。DEP曝露により、肺組織では炎症性サイトカインであるTNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12p40、IFN-γ、iNOSのmRNA発現量が減少し、特にIL-6、IFN-γ、iNOSのmRNA発現量の減少の程度が大きく、かつ量反応関係を認めた。IL-4mRNA発現量は低濃度曝露群で増加し、高濃度曝露群ではむしろ減少傾向を示したが、IL-10mRNA発現は低濃度、高濃度群で共に増加した。採取したBALF肺胞マクロファージの培養上清中TNF-α量は、清浄空気曝露群と比較し高濃度曝露群で有意に減少し、IL-10量は低濃度及び高濃度曝露群で共に有意に増加した。培養細胞上清中のTNF-αとIL-10の増減と、培養肺胞マクロファージ細胞のmRNA発現量は類似した挙動を示した。以上の結果は、DEP慢性曝露がマウス肺のサイトカイン発現に影響を及ぼしていることを示しており、DEPの免疫応答への影響や、DEPに対する感受性の亢進、更には低濃度曝露によるIL-4発現量の増加は喘息のようなアレルギー反応を誘発する可能性を示唆していた。

Lambertら (2003)は、マウスにCBを40µg/個体の量で気管内投与後、RSV (Respiratory Syncytial Virus)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。

2.2.4. 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

Saldiva ら (2002) は、SD ラットを 4 群に分け、正常ラット(1、3 群)と慢性気管支炎ラット(2、4 群)に、清浄空気(1、2 群)もしくは CAPs(3、4 群: Harvard Ambient Particle Concentrator を使用)を吸入曝露した。慢性気管支炎は SO₂ を吸入させることにより惹起した。CAPs の曝露濃度は、126.1~481.0 µg/m³ (3 日平均)、73.5~733.0 µg/m³ (1 日平均)であり、曝露時間を 5 時間/日として 3 日間連続曝露を行った。CAPs の曝露は、正常動物においても、慢性気管支炎動物においても BALF 中の好中球を増加させた。6 回にわたる実験のうち、正常ラットでは 4 回、慢性気管支炎ラットでは 5 回、BALF 中の好中球の増加がみられた。好中球の増加は、粒子、V、Br、Pb、H₂SO₄、元素状炭素、有機炭素、Si 濃度と相関したが、Cl 濃度とは相関しなかった。この結果は、特に、慢性気管支炎動物において顕著であった。また、BALF 中のタンパク質濃度も、Pb、H₂SO₄、元素状炭素、有機炭素、Si 濃度と相関した。組織学的には、正常ラットに CAPs を曝露すると、好中球やマクロファージの肺胞への集積や肺胞上過形成が観察された。慢性気管支炎動物では炎症や粘液増加等が観察されたが、CAPs による増悪は見られなかった。総じて、組織上は、全体あるいは正常ラットでは CAPs による増悪効果が観察されたが、慢性気管支炎ラットでは顕著とはいえなかった。粒子と所見の間にも相関は認められなかった。しかし、全体においては V および Br と組織所見、正常ラットにおいては Pb、Cl、元素状炭素、および有機炭素と組織所見の間に相関を認めた。慢性気管支炎ラットでは有意な相関を認めなかった。正常ラットにおいては、V 濃度と組織所見の間に量反応関係が認められた。

Clarke ら (1999) は、慢性気管支炎罹患ラット(250ppm SO₂ 吸入による)12 匹に CAPs(1 回目: 206 µg/m³、2 回目: 733 µg/m³、3 回目: 607 µg/m³)を、18 時間/日、連続 3 日間の条件で曝露したところ、健康群(対照群)および慢性気管支炎罹患群の曝露個体に、呼吸機能異常(深い呼吸運動の出現: increased peak expiratory flow and/or tidal volume)及び肺における炎症(BALF 中の好中球、リンパ球およびタンパク質含量の増加、および炎症組織所見)が見られた。それらの所見は、慢性気管支炎罹患群で程度が有意に強かった。CAPs の健康影響(肺における炎症)が認められ、炎症の程度としては、健康群に比べ慢性気管支炎誘発群で高いことが示されたと述べている。

Kodavanti ら (2000a) らは、気管支炎ラットモデルで CAPs 曝露による肺への影響を検索するため、SD ラット(雄)に SO₂ を曝露して気管支炎を誘導した。SO₂ 最終曝露の翌日、正常または気管支炎の両方のラットを清浄空気(正常 3 匹、気管支炎 4 匹)、あるいは、CAPs(ノースカロライナ州リサーチトライアングルパーク)、(正常 5 匹、気管支炎 4 匹)で 6 時間/日、3 日もしくは 2 日連続で全身吸入曝露させた。最終的な CAPs 曝露後に肺の損傷を調べた。0 時間を含む手順を 4 回繰り返したが(study #A、1997 年 11 月; #B、1998 年 2 月; #C and #D、1998 年 5 月)、18 時間のものは一度(#F)だけ実験した。曝露濃度は、それぞれ、1 回目(#A): 約 650 µg/m³、2 回目(#B)約 475 µg/m³、3 回目(#C): 約 869 µg/m³、4 回目(#D): 約 907 µg/m³であった。追加研究(#E)では CAPs プロトコル(1998 年 2 月)の模擬実験として、ラットを ROFA に曝露した。

18 時間(#F)後の検索では BALF 中で炎症マーカーに違いは見られなかった。4 回の CAPs(0 時間ポイント)の検索では、最初(#A)の実験で CAPs 曝露したラットでは BALF 中タンパク質、アルブミン、NAG (N-Acetyl Glucosamide)活性、および好中球数が増加した。2 番目(#B)の実験では BALF のパラメーターに有意な影響は見られなかった。実験#Cまたは、実験#D では、気管支炎のラットで上記のパラメーターが少し増加した。研究#A、#C、#D、および#F の肺の組織学的評価では、CAPs 曝露した気管支炎のラットでわずかなうっ血と血管周囲の細胞浸潤がみられた。ROFA で曝露した正常および気管支炎のラットでは明確な肺の損傷を示さなかった(#E)。CAPs の基本的構成要素は S、Zn、Mn、および Fe であったが、肺の損傷と CAPs 濃度、硫酸塩または基本的構成要素にはまったく関連が見られなかった。正常ラットに関しては、CAPs 曝露の明らかな影響は見られなかった。組織学的検討でも、正常ラットに関しては、CAPs 曝露の影響は見られなかった。慢性気管支炎ラットでは、うっ血、粘液産生細胞増加、炎症細胞浸潤が、CAPs 曝露により増悪しているようであったが、有意差検定は施行されていない。

以上のことから、大気中の PM は感受性モデルの肺の損傷をもたらすかもしれないが、季節により CAPs の構成要素が異なることと関連して曝露影響も異なることや、気管支炎などの呼吸器疾患が潜在しているときには、PM 自体の毒性だけを明確にすることは困難かもしれないと報告している。

Gordon ら (1998)は、モノクロタリンにより肺高血圧症を発症させたラットにニューヨークの CAPs(110~360 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)を、3 時間鼻部曝露させた。モノクロタリンを投与したラットにおいて曝露終了 3 時間後に血中好中球数の上昇が見られたが、24 時間後には対照群との差はなくなった。モノクロタリンを投与したラットを 360 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の CAPs に曝露したところ、BALF 中の総細胞数、タンパク質、LDH 活性が約 2 倍に上昇した。

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_{2.5})(台北(台湾)由来、曝露濃度:PM_{2.5}(\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 250~300 g)にモノクロタリン 60