

mg/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-2 発現増加も認めた。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言っている。

Kodavanti ら (2000b)は、WKY ラット及び SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) に ROFA(15mg/m<sup>3</sup>)を、6 時間/日、3 日連続で鼻部吸入により急性曝露する事によって、呼吸器・循環器系の炎症性反応や気道反応性・心電図波形の変化を観察した。

清浄空気曝露時の WKY ラット、SHR の相違では、同週齢で比較した体重当たりの肺・左室重量は SHR の方が WKY ラットよりも重かった。WKY ラットと比較して SHR では、アセチルコリンに対する気道反応性が低く、肺組織中に活性化したマクロファージ、好中球、出血を認め、BALF 中のタンパク質量、マクロファージ、好中球、赤血球、チオバルビタール酸反応物質、肺サイトカイン mRNA の発現量が高かった。加えて、SHR では、左心室心筋組織の炎症所見(心筋症と単球細胞浸潤)とサイトカイン mRNA 発現量の亢進が見られ、心電図波形で ST が低下していた。

ROFA 曝露効果では、SHR の方が肺組織の炎症所見が WKY ラットよりやや強く、BALF 中タンパク質、アルブミン量は有意に増加した。また、SHR においては BALF 中赤血球数の増加が見られ、そのことは肺において実際実質において障害が引き起こされていることを示していた。肺胞マクロファージ数は、WKY ラット、SHR で清浄空気時に比較して有意に増加したが、WKY に比較して SHR で有意に多かったが、好中球数の増加は両ラットで同程度であった。グルタチオン、アスコルビン酸、尿酸は ROFA 曝露で有意な増加が見られたが、その増加の程度は WKY ラットに比べて SHR では小さかった。肺サイトカイン IL-6mRNA 発現量、フィブロネクチン、G6PD (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase) は WKY、SHR で同様に増加していたが、MIP-2mRNA 発現量は WKY ラットで増加したのに対して、SHR では減少した。左室心筋 IL-6、TGF (Transforming Growth Factor) -βmRNA 発現量は、非曝露時では WKY ラットに比較して SHR で明らかに高かったが、ROFA 曝露による亢進は認めなかった。重油燃焼排気中の粒子状物質の吸入が、心機能の異常の発生と関連している可能性があると言っている。

Kodavanti ら (2002)は、WKY ラットと SHR に ROFA(MMAD 1.3 μm 以下、曝露時間 WKY ラット: 6 時間/日、3 日/週、1 週間、4 週間、SHR:6 時間/日、3 日/週、1 週間、2 週

間、4週間、曝露濃度 15 mg/m<sup>3</sup>)を鼻部吸入及び気管内投与し、心肺血管系への影響を検討した。ROFAはSO<sub>4</sub>、Zn、Ni、Fe、Vを含んでいた。

鼻部吸入及び気管内投与いずれにおいても ROFA 曝露による体重変動は認めなかった。肺病理は重傷度を数値化した指標で評価した。肺泡マクロファージの集積は肺の病巣や肺の広い範囲でみられ、中隔肥厚と関連した肺肺炎がみられた。気管支上皮の肥大と単核細胞の血管周囲への浸潤を認めた。BALF の評価では、気管内投与では、WKY ラット及び SHR 共に投与量の増加に従いアルブミン、LDH 活性、好中球数は有意に増加したが、5mg 投与群では投与後 2 日目でも有意な高値を示した。グルタチオンは WKY ラットのみ 5mg 投与群で有意に増加し、投与後 2 日目でも有意な高値を示した。鼻部吸入では、WKY ラット及び SHR 共にアルブミン、LDH 活性、好中球数は清浄空気群に比べ曝露群で有意に増加し、曝露期間が長くなるに従い増加傾向が認められ、WKY ラットに比べ SHR でアルブミンの有意な増加を観察した。グルタチオンは 1 週間曝露の WKY ラットでのみ有意に増加した。

血液の評価では、気管内投与では、血漿フィブリノゲンが WKY ラット、SHR 共に 5mg 投与群で有意に増加し、投与後 1~2 日間高値を示したがその後減少した。鼻部吸入では、血漿フィブリノゲンは SHR のみ曝露群で有意に増加したが、曝露期間が長くなるに従い減少傾向が認められた。白血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、好中球数は、気管内投与及び鼻部吸入いずれにおいても非曝露群では WKY ラットに比べ SHR で高い傾向を示した。ヘマトクリット値は、気管内 5mg 投与 WKY ラットでのみ最初の 2 日間、非曝露群と比較し有意な増加を示したが、その他の指標には曝露影響を認めなかった。血小板数は WKY ラット及び SHR で有意な変化を認めなかった。血漿粘度は、清浄空気群では WKY ラットと SHR で類似した値を示したが、気管内 5mg 投与群では WKY ラットに比べ SHR で有意に増加した。

これらの結果から、SHR では PM 曝露が肺障害及び酸化ストレスと関連する急性の血栓形成反応を引き起こす可能性が示唆された。この結果は、心臓に疾患を持つヒトにおける PM 曝露と心血管疾患との関連性を示唆する疫学的結果と一致するものであると述べている。

Clarke ら (2000a)は、年配者は高いレベルの大気中粒子状物質への曝露により有害な影響を受けやすいと報告されているので、毒物学的なモデルでこの調査結果を検証するために、若齢ラットと老齢ラットを CAPs、あるいは清浄空気に 5 時間/日、連続して 3 日間曝露した。曝露濃度は、1 日目 80µg/m<sup>3</sup>、2 日目 170µg/m<sup>3</sup>、3 日目 50 µg/m<sup>3</sup>であった。曝露期間中の動物の死亡例はなかった。最終曝露後に心臓穿刺により採血し、気管支肺胞洗浄 (BAL)も行なった。若齢ラットは、かなり高い BALF 中の総細胞数を示し、CAPs 曝露後に多核白血球 (PMN、PolyMorphoNuclear)の有意な増加が見られた。老齢ラットでは BALF 中の総細胞数、LDH、総白血球数、総白血球と PMN のパーセント、リンパ球、単核球の間に CAPs 関連の顕著な変化はみられなかった。CAPs またはろ過空気曝露による老齢ラットと若齢ラットの影響の比較では、老齢ラットで BALF 中の総細胞数、総白血球数、血液中のリンパ球の比と血液ヘモグロビンでの有意な減少が見られ、また、血液中 PMN の割合では増加が見られた。老齢と若齢で各曝露による差を求め、それを比較した結果は、①若齢 Fisher ラットは CAPs 曝露による肺の炎症反応を調べる研究で敏感なモデルとなりうる。②老齢ラットで血液中の好中球の割合が高いのにも関わらず肺の炎症反応が小さいのは吸

入粒子に対する感受性の低さを反映しているのかもしれないと述べている。

環境省 (2007b)は、テレメトリー装置を装着した22~24ヶ月齢の老齢ラットに、大気中濃縮微小粒子状物質 (CAPs) の3日間曝露を行った。平成15年10月~18年9月まで8回の実験を行い、得られた結果をプール解析した。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 31 mg/m<sup>3</sup>(範囲6~74)であった。8回の実験でデータが取得された動物数は、CAPs 曝露群23 匹、除粒子対照群23 匹で、プール解析では統計学的に有意差を認める結果は得られなかったが、CAPs 曝露群で心拍数が曝露1 日後と2 日後の非曝露時間帯にやや高い傾向を示した。血圧 (収縮期、拡張期、平均)、核心温度及び自律神経系には、全実験期間を通してCAPs 曝露の明確な影響は認めなかった。また、CAPs 成分と心機能指標との濃度反応関係の検討では、十分に検討するだけの例数も少ないこともあり、関連性を予測させる成分は認めなかった。

Elder ら (2000a)は、F344 ラット(雄、10 週齢、20 月齢)に UCP (Ultrafine Carbon Particles, CMD : 25 nm, 100 µg/m<sup>3</sup>, ヒトでは 50 µg/m<sup>3</sup>に相当)と O<sub>3</sub>(1 ppm)に、6 時間単独曝露あるいは混合曝露(LSP : 12 分、30 分後に UCP および O<sub>3</sub> 曝露開始、UCP および O<sub>3</sub> : 6 時間曝露)した。

気道感染のモデルとして低濃度のエンドトキシン(LPS)吸入によるプライミングを行った。BALF の炎症指標と BALF 細胞からのオキシダント遊離を曝露 24 時間後に調べた。若年ラットでは UCP、O<sub>3</sub>、LPS の肺炎作用が認められ、また O<sub>3</sub> と LPS の混合曝露では炎症が抑えられることが認められた。老年ラットでは LPS と O<sub>3</sub> のみ有意な炎症作用が認められ、UCP と O<sub>3</sub> の混合曝露ではそれぞれの単独曝露以上の肺の炎症が認められた。BALF 細胞からのオキシダント遊離は一般的に多核白血球(PMN)反応と一致していたが、若年ラットでは LPS プライミングした UCP および O<sub>3</sub> 曝露群でオキシダント遊離が減少していた。老年ラットではこの混合曝露では逆にオキシダント遊離が増加していた。

著者らはこの結果から都市の UCP は感受性のあるヒト集団の罹患率上昇に関与し、また、加齢、高濃度 O<sub>3</sub> などの混合曝露は肺の炎症および炎症細胞活性化に影響を及ぼすと述べている。

Elder ら (2000b)は、大気中粒子状物質濃度の増加と高齢者における心肺疾患罹患率との間に関係があるといういくつかの疫学報告に基づいて、UCP と O<sub>3</sub> が協働して肺の酸化ストレスや炎症を引き起こしており、さらに損傷を有する肺や老化した肺ではそれが増強するという仮説を立て、以下の実験を行った。損傷を有する肺のモデルとしてエンドトキシン曝露マウスと老化した肺気腫マウス(TSK マウス)を用いた。8 週齢または 22 月齢の F344 ラット (SPF)(雄)、および 14~17 月齢の TSK マウス(雄、肺気腫)に UCP(CMD : 25nm、110 µg/m<sup>3</sup>)および O<sub>3</sub>(1 ppm)を単独あるいは混合で 6 時間曝露(エンドトキシン : 12 分、30 分後に UCP および O<sub>3</sub> 曝露開始、UCP および O<sub>3</sub> : 6 時間曝露)した。エンドトキシン (Estimated alveolar deposited dose; 70 unit/個体 and 7.5 units/個体)の吸入は呼吸器感染のモデルとして用いた。曝露 24 時間後に BALF を調べた。肺腔内への炎症細胞の浸潤は両方の種、年齢で認められた。エンドトキシン処理に続く UCP と O<sub>3</sub> の混合曝露群がもっとも高い BALF 中好中球数を示した。BALF 中の炎症細胞からの活性酸素種遊離は刺激の有無にかかわらず好中球反応とよく相関していた。ANOVA 解析によると UCP と O<sub>3</sub> の相互関係と同様に UCP の有意な影響が認められた。しかしながら、若年ラットでは UCP と

O<sub>3</sub>混合曝露では活性酸素種活性は抑えられたが、老年ラットおよびTSKマウスでは活性酸素種活性が増強していた。すなわち肺の炎症細胞遊離の機序が年齢依存的に異なるといえる。以上の結果から、UCPの短期間曝露で有意な肺の炎症や酸化ストレスが引き起こされ、この炎症や酸化ストレスは年齢や他の物質の同時曝露、さらには呼吸器の損傷により修飾されることが示された。

#### 2.2.5. 複合大気汚染により影響の増悪が生じる

Molhaveら(2005)は、健康だがアトピーの8人(男4人、女4人;23~35歳;皮膚ブリック・テストで一般的な吸入性アレルゲンに少なくとも一つ陽性、但しハウスダスト・ダニに陽性の者は除外)について、3種類の被験物質、すなわちオフィスの粉塵(オフィスにおける掃除機のバッグからの粉塵を再浮遊)、O<sub>3</sub>、O<sub>3</sub>とオフィス粉塵の混合(O<sub>3</sub>粉塵;75 µg/m<sup>3</sup>、O<sub>3</sub>;300 ppb、O<sub>3</sub>とオフィス粉塵の混合;300 ppb+75 µg/m<sup>3</sup>)をチャンバーで、180分間曝露し、鼻洗浄(NAL)液中のインターロイキンおよび細胞数、肺機能、気管支のメタコリン反応性、rhinometry 徴候および一般的な刺激のスコアを観察した。曝露タイプ間の相互作用が、最大呼気流量(PEF)(p<0.05)および目の乾燥や肌への刺激などの不快症状(p<0.03)でみられた。NAL液中のIL-8濃度では有意な相互作用はみられなかった。複合曝露では、O<sub>3</sub>曝露や粉塵曝露の何れよりも有意により多くの影響を引き起こすことがみられ、粉塵とO<sub>3</sub>への混合曝露によって引き起こされる増強効果を示していると考えられるが、さらに被験者数が限定されているので拡大解釈されるべきではないが、比較的高濃度のO<sub>3</sub>は、粉塵曝露と相互作用し、PEFの減少や不快感を増加させるという仮説を支持していると述べている。

Kobzikら(2001)は、OVA誘発性喘息モデルマウスにおけるCAPsと0.3ppm O<sub>3</sub>の急性曝露影響について検討した。用いられた粒径は0.15~2.5µm(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(63.3~1,568.6µg/m<sup>3</sup>)と低用量(1.6~133.1µg/m<sup>3</sup>)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O<sub>3</sub>又は清浄空気を吸入させた。その結果、①CAPs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(100µg/m<sup>3</sup>につき0.86%上昇)。②300~500µg/m<sup>3</sup> CAPsとO<sub>3</sub>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。③CAPs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。④CAPs単独曝露又はCAPs+O<sub>3</sub>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。

KleinmanとPhalen(2006)は、ラットでO<sub>3</sub>ガスと硫酸エアロゾルの混合物の急性曝露効果(曝露時間4時間)を検討した。粒径は0.23~0.28µm(硫酸粒子MMD、GSD(Geometric Standard Deviation)=2.1~2.3)であった。曝露濃度はa群:空気のみ、b群:0.3ppm O<sub>3</sub>、c群:0.6ppm O<sub>3</sub>、d群:0.48mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、e群:1.00mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、f群:0.31ppm O<sub>3</sub>+0.41mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、g群:0.31ppm O<sub>3</sub>+1.04mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、h群:0.6ppm O<sub>3</sub>+0.52mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、i

群:0.6ppmO<sub>3</sub>+086mg/m<sup>3</sup>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>であった。

結果として、①肺組織学：Type1病変は全群で変化無し、Type2病変はH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>単独吸入で変化無し、O<sub>3</sub>吸入で増加し、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>濃度が濃いほど、その程度が低下、②DNA合成は、鼻ではO<sub>3</sub>0.6ppm+H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>吸入により増加。気管ではどの群も変化無し。肺では、O<sub>3</sub>0.6ppm+H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>吸入により増加。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>濃度による影響は無し。③マクロファージのFcレセプター発現はどの群でも変化無し。食食能はH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>吸入群のすべてで低下した。O<sub>3</sub>と酸性微小粒子の吸入が相乗的に肺の障害を起こすという仮説は支持されなかったと報告している。

Vincentら(1997)は、ラットにオタワ標準粉じん(EHC-93)とO<sub>3</sub>に、4時間/日、1日、それぞれの単独、または複合曝露(EHC-93：低濃度：5~6 mg/m<sup>3</sup>、高濃度：48 mg/m<sup>3</sup>、MMAD=4.6 mm、O<sub>3</sub>：0.8 ppm)させ、曝露終了32時間後に[3H]-チミジンを投与して90分後の組織のラベル率(細胞増殖)を調べた。EHC-93の約20%はPM<sub>2.5</sub>を反映していた(硫酸塩の量などから推測)。一度捕集した粒子を吸入実験のために分散させてエアロゾル化したので、吸入チャンバー内の空気をフィルターで捕集し分析すると、アントラセン、フェナンスレンなどの低分子量のPAHが揮発してフィルターに吸着されるため、見かけ上は吸入チャンバー内のアントラセン、フェナンスレン濃度が高まっているような測定値となった(18~19.2倍)。粒子単独曝露群では変化はみられなかったが、O<sub>3</sub>単独曝露群では終末細気管支と第一肺胞道のラベル率が有意に上昇した。粒子(低濃度、高濃度ともに)とO<sub>3</sub>の複合曝露群では、O<sub>3</sub>の影響がさらに強く見られた。第一肺胞道より抹消の気道に影響は見られなかった。粒子状物質がO<sub>3</sub>などのガス状都市大気汚染物質の呼吸器への影響を増悪させていることがはっきり示された。

Bouthillierら(1998)は、ラットに一度捕集したオタワ標準粉じん(EHC-93)とO<sub>3</sub>に、4時間/日、1日、3日、それぞれの単独、または複合曝露(EHC-93：40 mg/m<sup>3</sup>、O<sub>3</sub>：0.8ppm)させ、肺の病理組織、BALF中の炎症性細胞やフィブロネクチン、BALF中に回収したマクロファージを培養した上清の亜硝酸(LPS誘導)、TNF-α、MIP-2、エンドセリン(ET、EndoThelin)1ならびにマクロファージの食食活性を測定した。また、血清中のET-1も測定した。隔壁ならびに2型上皮細胞の形態計測学的変化(表面に対する体積)は複合曝露群においてのみ上昇した。BALF中の炎症パラメーターはO<sub>3</sub>単独曝露群と複合曝露群においてのみ上昇が見られた。マクロファージの食食活性は、O<sub>3</sub>単独曝露群と複合曝露群においてのみ低下が認められた。マクロファージ培養上清中のMIP-2ならびに血清中のET-1は、粒子単独曝露群、ならびに複合曝露群に於いて上昇が認められた。

Kleinmanら(2003)は、ラットを用いてカーボン粒子(EC:elementary carbon)と(NH<sub>4</sub>)HSO<sub>4</sub>(ABS:Ammonium BiSulfate)との混合物の長期効果(曝露時間4時間/日、3日連続/週、4週間)を検討した。粒径MMADは0.3μmであった。各群の曝露濃度は、1群:清浄空気、2群:O<sub>3</sub>0.198±0.004ppm、3群:EC 51.35±12.15μg/m<sup>3</sup>+ABS 76.25±18.36μg/m<sup>3</sup>+O<sub>3</sub> 0.194±0.004ppm、4群:EC 92.35±18.51μg/m<sup>3</sup>+ABS 136.29±27.61μg/m<sup>3</sup>+O<sub>3</sub> 0.197±0.003ppmであった。結果として、①BrdU(5'-BromodeoxyUridine)ラベリングによる細胞再生の指標は、1群を100として2群(O<sub>3</sub>)で120%、3群で310~340%、4群で200~290%②BALF中のアルブミンからみた透過性は

3群でのみ有意に増加、しかし細胞の生存、回収率、細胞分画に影響なし、③マクロファージのFcレセプター発現は3、4群で低下、呼吸バーストは3群、4群で低下した。O<sub>3</sub>単独よりもO<sub>3</sub>と微小粒子の混合物の方が、毒性があることが報告されている。

Elderら(2000a)は、F344ラット(雄、10週齢、20月齢)にUCP(CMD: 25nm、100µg/m<sup>3</sup>、ヒトでは50µg/m<sup>3</sup>に相当)とO<sub>3</sub>(1ppm)に、6時間単独曝露あるいは混合曝露(LSP: 12分、30分後にUCPおよびO<sub>3</sub>曝露開始、UCPおよびO<sub>3</sub>: 6時間曝露)した。

気道感染のモデルとして低濃度のエンドトキシン(LPS)吸入によるプライミングを行った。BALFの炎症指標とBALF細胞からのオキシダント遊離を曝露24時間後に調べた。若年ラットではUCP、O<sub>3</sub>、LPSの肺炎作用が認められ、またO<sub>3</sub>とLPSの混合曝露では炎症が抑えられることが認められた。老年ラットではLPSとO<sub>3</sub>のみ有意な炎症作用が認められ、UCPとO<sub>3</sub>の混合曝露ではそれぞれの単独曝露以上の肺の炎症が認められた。BALF細胞からのオキシダント遊離は一般的に多核白血球(PMN)反応と一致していたが、若年ラットではLPSプライミングしたUCPおよびO<sub>3</sub>曝露群でオキシダント遊離が減少していた。老年ラットではこの混合曝露では逆にオキシダント遊離が増加していた。

著者らはこの結果から都市のUCPは感受性のあるヒト集団の罹患率上昇に関与し、また、加齢、高濃度O<sub>3</sub>との混合曝露は肺の炎症および炎症細胞活性化に影響を及ぼすと述べている。

Elderら(2000b)は、大気中粒子状物質濃度の増加と高齢者における心肺疾患罹患率との間に関係があるといういくつかの疫学報告に基づいて、UCPとO<sub>3</sub>が協働して肺の酸化ストレスや炎症を引き起こしており、さらに損傷を有する肺や老化した肺ではそれが増強するという仮説を立て、以下の実験を行った。損傷を有する肺のモデルとしてエンドトキシン曝露マウスと老化した肺気腫マウス(TSKマウス)を用いた。8週齢または22月齢のF344ラット(SPF)(雄)、および14~17月齢のTSKマウス(雄、肺気腫)にUCP(CMD: 25nm、110µg/m<sup>3</sup>)およびO<sub>3</sub>(1ppm)を単独あるいは混合で6時間曝露(エンドトキシン: 12分、30分後にUCPおよびO<sub>3</sub>曝露開始、UCPおよびO<sub>3</sub>: 6時間曝露)した。エンドトキシン(Estimated alveolar deposited dose: 70unit/個体 and 7.5units/個体)の吸入は呼吸器感染のモデルとして用いた。曝露24時間後にBALFを調べた。肺腔内への炎症細胞の浸潤は両方の種、年齢で認められた。エンドトキシン処理に続くUCPとO<sub>3</sub>の混合曝露群がもっとも高いBALF中好中球数を示した。BALF中の炎症細胞からの活性酸素種遊離は刺激の有無にかかわらず好中球反応とよく相関していた。ANOVA解析によるとUCPとO<sub>3</sub>の相互関係と同様にUCPの有意な影響が認められた。しかしながら、若年ラットではUCPとO<sub>3</sub>混合曝露では活性酸素種活性は抑えられたが、老年ラットおよびTSKマウスでは活性酸素種活性が増強していた。すなわち肺の炎症細胞遊離の機序が年齢依存的に異なるといえる。以上の結果から、UCPの短期間曝露で有意な肺の炎症や酸化ストレスが引き起こされ、この炎症や酸化ストレスは年齢や他の物質の同時曝露、さらには呼吸器の損傷により修飾されることが示された。

Maddenら(2000)は、O<sub>3</sub>が直接粒子の生物活性と反応するのか、あるいは影響を及ぼすのかを検証するために、cell-free *in vitro* システムでDEPにO<sub>3</sub>を曝露し、肺障害のラットモデルに対するDEPの生物活性を調べた。DEPの標準試料2975に0.1ppmのO<sub>3</sub>を48時間曝露し、SDラットに気管内投与した。24時間後にBALFを用いてラット肺の炎症と

障害を調べた。O<sub>3</sub>曝露した DEP は、O<sub>3</sub>曝露しない DEP に比べ好中球、総タンパク質および LDH 活性を増加させた。O<sub>3</sub>曝露による DEP 活性の上昇は、空気による変質ではなく O<sub>3</sub>曝露期間中によるものであった。高濃度 O<sub>3</sub>(1ppm)の DEP への曝露は、粒子の生物活性を低下させた。これに対し、DEP に比べ有機物成分の低い CB では、0.1 ppm の O<sub>3</sub>曝露後に調べた如何なる生物活性をも増加させなかった。<sup>18</sup>O でラベルした O<sub>3</sub>で調べると、DEP と取り込まれる O<sub>3</sub>の量は、直線関係にあった。これらのデータは、大気濃度レベルの O<sub>3</sub>が DEP の生物学的効果を増加せしめることを示唆する。

Campen ら (2001)は、VSO<sub>4</sub>、NiSO<sub>4</sub>、およびその複合曝露による心機能と肺障害に対する影響を SD ラットを用いて検討するため、急性実験を行った。SD ラットに対し、VSO<sub>4</sub>、NiSO<sub>4</sub>、VSO<sub>4</sub>+NiSO<sub>4</sub>を吸入曝露した。粒径は平均 0.65 μm(GSD 2.11)であった。清浄空気群と、曝露濃度を VSO<sub>4</sub>曝露で 0.3、0.6、0.9、1.7mg/m<sup>3</sup>、NiSO<sub>4</sub>曝露で 0.37、0.49、1.3、2.1 mg/m<sup>3</sup>、VSO<sub>4</sub>+NiSO<sub>4</sub>曝露で各 0.5、1.3 mg/m<sup>3</sup>とした群を設けた。曝露時間を 6 時間/日とし、4 日間の曝露を行った。VSO<sub>4</sub>は最も高い濃度でも心拍数と深部体温の変化は認められず、徐脈及び体温の低下もわずかであった。しかし、肺障害及び炎症の指標に関しては、最終曝露 24 時間及び 96 時間後で曝露濃度に依存した増加傾向を認めた。NiSO<sub>4</sub>では 1.3mg、2.1mg/m<sup>3</sup>で体温の低下と不整脈を認めたが、低濃度(0.37、0.49mg/m<sup>3</sup>)ではこれらに影響は認めず、1.3mg/m<sup>3</sup>で心拍数は最大 75bpm、深部体温は 2.0℃低下、2.1mg/m<sup>3</sup>ではそれぞれ 100bpm、3.3℃低下した。肺障害及び炎症の指標に関しては、NiSO<sub>4</sub>曝露の濃度に従い増加傾向を認めたが、この傾向は VSO<sub>4</sub>と比較し顕著であった。VSO<sub>4</sub>+NiSO<sub>4</sub>では VSO<sub>4</sub>および NiSO<sub>4</sub>単独曝露で影響を認めなかった 0.5mg/m<sup>3</sup>で、曝露 3 日目より心拍が 50bpm、深部体温が 1.0℃低下し、その影響は 30 時間持続した。VSO<sub>4</sub>+NiSO<sub>4</sub>混合 1.3mg/m<sup>3</sup>では、より顕著な低下が認められ(心拍 160bpm、深部体温 4.0℃)、NiSO<sub>4</sub>単独の最高曝露濃度時(2.1mg/m<sup>3</sup>)より変化が大きく、不整脈の頻度も増加した。肺障害の指標(LDH、タンパク質、MIA (MicroAlbumin)、NAG)は最終曝露 24 時間後で VSO<sub>4</sub>、NiSO<sub>4</sub>単独曝露の和よりも大きかったが、96 時間後ではその影響は明確ではなかった。以上のことから、VSO<sub>4</sub>と NiSO<sub>4</sub>の複合曝露がそれぞれの単独曝露と比較して、心機能と肺障害に相乗的な影響を及ぼすことが示唆された。

## 2.3. 論文による仮説の検証

### 2.3.1. 肺障害および炎症を誘導する

ヒトボランティアの研究では、粒子状物質曝露により気道や肺に軽度の炎症が生じることが確認されている。例えば健常者にDEやDEP(100~300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )またはCAPs、CCPs(100~300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )を短時間曝露した研究では、呼吸器症状や肺機能検査値の異常はみられなかったが、気管支肺胞洗浄液(BALF、bronchoalveolar lavage fluid)や喀痰中の好中球数増加やIL-6(interleukin-6)、IL-8などの炎症性サイトカインの増加、気道壁のIL-8、GRO- $\alpha$ (growth-related oncogene- $\alpha$ )、P-selectin、ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)などの発現増加、NF- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B)やAP-1(activator protein-1)などの炎症関連転写因子やp38MAPK(mitogen-activated protein kinase)、JNK(c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase)の活性化などの炎症反応が観察されている(Rudellら(1990)、Salviら(1999)、Rudellら(1999)、Nordenhällら(2000)、Nightingaleら(2000)、Holgateら(2003a)、Holgateら(2003b)、Stenforsら(2004)、Pourazarら(2005)、Ghioら(2000)、Harderら(2001))。このような気道や肺の炎症反応は、健常者に対するFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>粒子の気管内投与や超微小粒子(ZnO-フューム)の吸入曝露においても再現されている(Layら(1999)、Kuschnerら(1997))。さらにユタバレーの製鉄工場の操業中に捕集されたPM<sub>10</sub>を気管内投与されたヒトでは製鉄工場の閉鎖中に捕集されたPM<sub>10</sub>の気管内投与に比べて高度の気道や肺の炎症をもたらしたことも報告されている(GhioとDevlin(2001))。このような粒子状物質による炎症の誘導作用については、粒子状物質に含まれる硫酸塩や金属成分などの重要性を指摘した研究成績もみられる(Huangら(2003))。

動物実験においては、CAPs、ROFA、DEP、EPM、CFA、石炭と乾燥下水汚泥の燃焼由来粒子(MSS/coal ash、municipal-sewage sludge/coal ash)、CBなどのさまざまな粒子状物質吸入曝露や気管内投与により気道や肺の炎症が生じるだけでなく、より高濃度の曝露条件においては肺水腫などの組織障害が生じることが確認されている。粒子状物質の曝露により肺の炎症や組織障害が生じる機序としては、1) IL-1 $\beta$ やIL-6、MIP-2(macrophage inflammatory protein-2)などの炎症性サイトカインの産生(Leiら(2004a)、Leiら(2004b)、Kodavantiら(1999)、Liら(1996)、Kodavantiら(1997)、Win-Shweら(2005))、2) 酸化ストレスや窒素化ストレスの増加(Limら(1998)、Liら(1996)、Maddenら(1999)、Sagaiら(1993)、Limら(1998)、Sagaiら(1996)、Gurgueiraら(2002)、Rhodenら(2004))、3) 金属成分(Ni、V、Fe、Znなど)の関与(Kodavantiら(1997)、Molinelliら(2002)、Kodavantiら(1998)、Clarkeら(2000b))、4) エンドトキシンや他の共存物質(O<sub>3</sub>、NO<sub>x</sub>、SO<sub>x</sub>)の影響(Schinsら(2004)、Gilmourら(2004))、5) ERK1/2(extracellular signal-regulated kinase1/2)、p38-MAPK、JNKなどの細胞内シグナル伝達因子の活性化(Maddenら(1999)、Silbajorisら(2000))などの関与が報告されている。粒子状物質のなかでもROFAについては高度の肺炎症および障害作用が知られているが、その機序としては含有される溶解性金属の影響が大きいとされている。一方、国内大気のカAPsをマウスに曝露した実験では、CAPs単独による肺炎症作用は小さいが、細菌毒素による肺炎症を増強させる作用のあることが報告されている(環境省(2007a))。



以上のように粒子状物質曝露はヒトの気道や肺に炎症反応を誘導する。動物実験においては、より高濃度の粒子状物質曝露により肺障害が生じることが認められている。

### 2.3.2. 気道反応性の亢進および喘息の悪化がみられる

ヒトボランティアの研究では、DE や DEP 曝露が気道反応性を亢進させて喘息を悪化させる可能性が指摘されている。例えば健常者に DE を吸入させた研究では気道抵抗の増大や気道洗浄液中のヒスタミン濃度の上昇が観察されている (Rudell ら (1996)、Salvi ら (1999))。また喘息患者に DE や DEP を吸入させた研究では、メサコリンに対する気道反応性の亢進も認められている (Nordenhäll ら (2001))。DE や DEP の曝露が喘息の原因となるアレルギー性炎症を悪化させるかについては不明であるが、気道の IL-10 発現を増加させたという報告もある (Holgate ら (2003b)、Stenfors ら (2004))。一方、喘息患者に DE を曝露したが気道の好酸球性炎症には影響がみられなかったという成績も公表されている (Stenfors ら (2004))。

健常者や鼻アレルギー患者の鼻腔内に DEP を曝露した研究では、鼻腔洗浄液中の総 IgE (Immunoglobulin E) や抗原特異的 IgE、IgG4、ヒスタミン、RANTES (Regulated on Activation in Normal T cells Expressed and Secreted) などのアレルギー性鼻炎のメディエーター濃度の増加が観察されている (Diaz-Sanchez ら (1994)、Diaz-Sanchez ら (1996)、Diaz-Sanchez ら (1997)、Fujieda ら (1998)、Diaz-Sanchez ら (2000a)、Diaz-Sanchez ら (2000b))。さらに ROFA や H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> エアロゾルの鼻腔曝露においてもアレルギー性鼻炎の悪化が報告されている (Hauser ら (2003)、Tunnicliffe ら (2001))。以上のようにヒトにおける研究成績は限定的ではあるが、DE や DEP の曝露が気道反応性を亢進させて喘息やアレルギー性鼻炎を悪化させる可能性が示唆されている。

動物実験では粒子状物質曝露による喘息やアレルギー性鼻炎の悪化作用を示唆するより多くの証拠が得られている。例えば DE や DEP の吸入曝露、点鼻あるいは気管内投与を受けた動物では、抗原曝露により誘発される喘息 (気道抵抗や気道過敏性の増加) やアレルギー性鼻炎が悪化し、その機序として気道の好酸球浸潤や杯細胞の過形成、IL-5 やエオタキシンの発現、抗原特異的 IgE や IgG1 の産生増強などが報告されている (Muranaka ら (1986)、Miyabara ら (1998a)、Miyabara ら (1998b)、Miyabara ら (1998c)、Ichinose ら (1998)、Hashimoto ら (2001)、Ohta ら (1999)、Takano ら (1997)、Ichinose ら (1997)、Takano ら (1998a)、Takano ら (1998b)、Ichinose ら (2004)、Takafuji ら (1987)、Kobayashi と Ito (1995)、Ohyama ら (1998))。また CAPs、CB、ROFA およびその金属成分 (Ni、Fe、V) の吸入動物においても気道アレルギー反応の悪化が認められた (Goldsmith ら (2002)、Kobzik ら (2001)、Hamada ら (1999)、Lambert ら (2000)、Steerenberg ら (2005)、Harkema ら (2004)、Alessandrini ら (2006))。以上のように動物実験においては、さまざまな種類の粒子状物質が気道の抗原反応性を増強する粘膜アジュバントとして働き、喘息やアレルギー性鼻炎を悪化させる作用のあることが認められている。ヒトにおける研究成績は限定的ではあるが、DE や DEP については気道反応性の亢進および喘息、鼻アレルギー症状を悪化させる可能性がある。

### 2.3.3. 呼吸器感染に対する感受性が亢進する

ヒトにおいては粒子状物質が呼吸器感染に対する感受性を増加させるという明確な証拠はない。しかし間接的な証拠としては、DEの吸入やユタバレー粉じんの気管内投与によりヒトの肺胞マクロファージの食能低下やアポトーシス増加などの感染防御能の低下が観察されている(Rudellら(1990)、Rudellら(1999)、Soukupら(2000))。

一方、DEPやCAPsを曝露された動物では肺炎球菌、リステリア菌、連鎖球菌、結核菌に対する呼吸器感染の感受性が亢進することが報告されている(Zelikoffら(2003)、Zelikoffら(2002)、Yinら(2005)、Hiramatsuら(2005)、Yangら(2001)、Campbellら(1981))。粒子状物質曝露により呼吸器感染の感受性が亢進する機序としては、粒子状物質による肺胞マクロファージやTリンパ球の抑制作用が考えられている(Saitoら(2002))。また粒子状物質のウイルス感染に対する影響については、CBを気管内投与された動物ではRSV(respiratory syncytial virus)感染による肺の炎症が増強したという成績も公表された(Lambertら(2003))。

以上のようにヒトにおいては証明されていないが、動物実験においては粒子状物質曝露による呼吸器感染の感受性の増加が認められている。

### 2.3.4. 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

#### 1) 慢性気管支炎モデル

SO<sub>2</sub>の曝露により作製した慢性気管支炎のモデルラットにCAPsを吸入させた研究では、気道炎症が増悪したという成績とほとんど影響しなかったという成績とがある(Saldivaら(2002)、Clarkeら(1999)、Kodavantiら(2000a))。

#### 2) 肺高血圧症モデル

モノクロタリン投与により作製した肺高血圧症のモデルラットにCAPsやROFAを吸入曝露または気管内投与した実験では、肺の炎症や障害の程度が悪化して死亡率も増加したことが報告されている(Gordonら(1998)、Leiら(2004a)、Leiら(2004b)、Kodavantiら(1999))。

#### 3) 高血圧モデル

自然発症高血圧症ラット(SHR、spontaneously hypertensive rats)では正常血圧ラットに比べてROFAの吸入や気管内投与による肺の炎症や障害が悪化し、血漿フィブリノゲン値や血漿粘度もより高値となったことが報告されている(Kodavantiら(2000b)、Kodavantiら(2002))。

#### 4) 加齢動物モデル

CAPs吸入による肺の炎症反応については、若齢ラットに比べて老齢ラットで低下していたという成績や差がなかったという成績が報告されている(Clarkeら(2000a)、環境省(2007b))。一方、UCP(Ultrafine carbon particles)とO<sub>3</sub>の複合曝露実験では、若齢ラットに比べて老齢ラットの炎症細胞からのオキシダント産生が増加していたという研究成績もある(Elderら(2000a)、Elderら(2000b))。

以上のように疾患感受性動物によっては粒子状物質曝露による影響や既存の病態が悪化する可能性が指摘されている。しかしながらこれらの疾患感受性動物がヒトの疾患モデルとして適切であるかについては議論がある。

### 2.3.5. 複合大気汚染により影響の増悪が生じる

複合大気汚染による呼吸器系への影響については一定の成績はない。O<sub>3</sub> (300 ppb) を曝露されたヒトボランティアでは、オフィス由来粉じんの吸入による最大呼気流量の低下が増強したことが報告されている (Molhave ら (2005))。一方、卵白アルブミン誘発喘息マウスの気道過敏性を検討した研究では、O<sub>3</sub> と CAPs の複合曝露によっても相乗的な気道過敏性の亢進作用は認められなかった (Kobzik ら (2001))。また O<sub>3</sub> と H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 微小粒子を複合曝露したラットにおいても相乗的な肺障害作用は認められなかった (Kleinman と Phalen (2006))。しかし EHC-93(オタワ標準粉じん)の吸入が O<sub>3</sub> 曝露したラットの細気管支や肺胞上皮の増殖を増加させたという報告や (Vincent ら (1997)、Bouthillier ら (1998))、O<sub>3</sub> 曝露が炭素粒子と NH<sub>4</sub>HSO<sub>4</sub> 混合物や UCP による肺の炎症や障害を増強したという成績も公表されている (Kleinman ら (2003)、Elder ら (2000a)、Elder ら (2000b))。さらに、*in vitro* で O<sub>3</sub> 処理した DEP は未処理の DEP に比べてラットの肺の炎症と障害を増強したという成績もある (Madden ら (2000))。また金属の複合曝露では、V と Ni の複合曝露が単独曝露よりも高度の肺障害を引き起こしたという報告もある (Campen ら (2001))。以上のように複合大気汚染により呼吸器系への影響が増悪するかについては研究成績が定まっていない。