

5. 毒性学研究の健康影響に関する知見の整理

5.1. 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及び有症率の相関」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及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、多くの仮説及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及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、化学組成等）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、生化学系等を対象とした *in vitro* における研究が含まれている。

また、疫学研究の知見において、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系疾患等を持つ者）の存在が示唆されている。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及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、及び、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、体内沈着及び動態等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、仮説の提唱及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、溶液及び懸濁液の状態での *in vitro* 実験等が列挙される。

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、元素状炭素 (EC) や有機炭素 (OC)、硫酸塩、Si、TiO₂、多環芳香族炭化水素(PAH、Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)等の DEP 抽出物等が列挙される。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等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志願者実験の文献等から、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）ごと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とおりである。

- 1) 呼吸器系への影響について、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) 免疫系その他への影響として、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係に注目し、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係に注目し、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。

5.2. 呼吸器系への影響

5.2.1. 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系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

5.2.2. 論文の紹介

5.2.2.1. 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 (年齢等、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、曝露チャンバー内の被験者の呼吸ゾーンで NO₂ 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、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、マクロファージの貪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 $20 \text{ L} / \text{min} / \text{m}^2$ 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、PM₁₀ 濃度が $300 \mu\text{g} / \text{m}^3$ になるようにした。各成分濃度は、NO₂ : 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 : $0.26 \text{ mg} / \text{m}^3$ 、浮遊粒子状物質 (SPM、Suspended Particulate Matter) : $4.3 \times 10^6 / \text{cm}^3$ 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 (FEV_{1.0}、Forced Expiratory Volume in one second)、FVC の 25~75% の平均努力呼気流量 (FEF_{25-75%}、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 : $2.6 \times 10^6 / \text{cm}^3$ 、 NO_2 : 1.3 ppm、 NO : 3.4 ppm、炭化水素 : 4.2 ppm、ホルムアルデヒド : 0.32 mg/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 L/min/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、CD3+CD25+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装置を用いても、アイドリング車からの排気の影響を完全に除去できるほど十分な効果はなかった。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 DE をろ過しても、DE によって引き起こされる影響は有意に減少しなかった。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 (PM_{10}) の濃度が $300 \mu\text{g/m}^3$ の DE 粒子とろ過空気に、間欠的運動下 (分時換気量が 20 L/min/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、 PM_{10} : $300 \mu\text{g/m}^3$ 、 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、 β_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 pg/mL、 $p=0.006$) と methylhistamine (0.11 対 0.12 $\mu\text{g/L}$ 、 $p=0.024$) 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 (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)- α 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 $38.8\sim 43.3\text{mg}/\text{dL}$ 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 ($PM_{2.5}$: $23.1\sim 311.1\mu\text{g}/\text{m}^3$) 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 $38.8\sim 43.3\text{mg}/\text{dL}$ 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 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 [$10\mu\text{m}$ の空気力学径の 50%カット-オフの粒子 (PM_{10}) 濃度が $108\mu\text{g}/\text{m}^3$ (94~124)、CO は 1.7 ppm (0.6~2.5)、 NO_2 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 $15\text{-}20\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 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 $FEV_{1.0}$ 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、 $FEV_{1.0}$ 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。

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 μ m 以下の粒径 (PM₁₀) 濃度 : 300 μ g/m³、NO₂ : 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/m³、浮遊粒子 : 4.3 \times 10⁶/cm³]、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/m² 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- κ 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- κ 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- κ 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。曝露中のチャンバー内の粒子濃度は、23.1~311.1 μ g/m³ の範囲 [MMAD (Mass Median Aerodynamic Diameter) は 0.65 μ m] であったが、これらを四分位に分類した [PM_{2.5} のそれぞれの粒子濃度 (μ g/m³) 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)]。曝露チャンバー内で、被験者は、間欠的運動下 (分時換気量が 25L/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_{1.0}、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 ± 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 ± 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の間欠的運動下（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_{2.5} の平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) は、Q-2 : 47.2 ± 5.3 、Q-3 : 107.4 ± 9.3 、Q-4 : 206.7 ± 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 $2.7 \pm 0.6\%$ ；肺泡分画 $0.8 \pm 0.3\%$ ）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 ($8.4 \pm 2\%$) と肺泡分画 ($4.2 \pm 1.7\%$) 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泡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、肺泡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 で刺激後の貪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 Fe₂O₃ の microspheres [CMD (Count Median Diameter)が $2.6 \mu\text{m}$ で、非放射性；10 ml SPSS 中に 3×10^8 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。Fe₂O₃ 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 (Lactate 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 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 フュ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 フュームは、溶鉱炉システムを利用して発生させた [MMD : 0.17 μ m、濃度の中央値 : 33 mg/m³ (20~42mg/m³)]。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 μ 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 μ g は、Utah Valley で冬季の気温逆転時に PM₁₀ が 100 μ g/m³ 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 μ g の PM₁₀ 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、 α 1-antitrypsin、IL-8、TNF、IL-1 β も類似の傾向を示した。さらに 1986 年の抽出物の 100 μ 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 へのヒト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て、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_{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 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/m³)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/m³ × 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 PM₁₀ (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 中の総タンパク質及び 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。PM₁₀ には *in vivo* 及び *in vitro* においてフリーラジカルの活性が確認された。PM₁₀ 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、PM₁₀ 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 $1.95 \pm 1.61\mu\text{m}$ 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・肺胞領域の浮腫及び出血性変化、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に 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-1β、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-1β、IL-6、TNF-α、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-α

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 両者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 μ 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 cNOS 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等に由来する O_2 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、NO あるいは ONOO $^-$ 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 LD₅₀ 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等に由来する O₂⁻、H₂O₂、[•]OH、NO あるいは ONOO[•] 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 倍の亢進等を認めた。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_{2.5})を 300±60 µg/m³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/m³、30 分)において認められたが CB(300 µg/m³、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±300µg/m³ で 5 時間曝露し、肺組織の生化学的及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 内の好中球浸潤及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 ± 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・肺泡領域の浮腫及び出血性変化、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に 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に比較して増加した。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 1.99~2.59 μm 、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 の吸入が肺性及び全身性の細胞プロフィー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) 0.32mg/個体をラット気管内に投与し、18 時間後の BALF 及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 μm (モンタナ産石炭由来)、fine 2.5 μm 、coarse >2.5 μm (西ケンタッキー産由来)で、投与量は 2mg/ml 原液から 50 μl 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 μm 以下の ultrafine > 2.5 μm 以下の fine > 2.5 μm 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 μg ROFA in 0.5 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、炎症等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 1,050 mg/m^3 (範囲 128~4,103)、そのうち PM_{2.5} は 31 mg/m^3 (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 (4 $\mu\text{g}/\text{body}$) 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 (4 $\mu\text{g}/\text{body}$) 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-1 β 、MIP-1 α 、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。

5.2.2.2. 気道反応性の亢進及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 ; $2.6 \times 10^6 / \text{cm}^3$, NO_2 ; 1.9 ppm, NO ; 2.7 ppm, CO ; 27 ppm, 総炭化水素 ; 4.5 ppm, ホルムアルデヒド ; $0.4 \text{ mg}/\text{m}^3$) 及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 分ごとに、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ィで測定した。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 $20 \text{ L}/\text{min}/\text{m}^2$ 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、空気及び希釈された 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_{10} 濃度が $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ になるようにした。各成分濃度は、 NO_2 : 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 : $0.26 \text{ mg}/\text{m}^3$, 浮遊粒子状物質 : $4.3 \times 10^6 / \text{cm}^3$ であった。各曝露の前後に肺機能 (PEFR, FVC, $\text{FEV}_{1.0}$, $\text{FEF}_{25-75\%}$) を測定した。肺の炎症性反応を調べるために、採血及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、顕著な全身性及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。

Nordenhäll ら (2001)は、喘息患者の気道の過反応性、肺機能及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及び短期間作用の β_2 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、曝露チャンバー内に入る DE は、50%カットオフの空気力学径が $10\mu\text{m}$ (PM_{10}) の粒子濃度が $300\mu\text{g}/\text{m}^3$ (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_2 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 $20\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 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、曝露チャンバー内の平均濃度は PM_{10} : $108.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、CO : 1.7 ppm 、NO : 0.6 ppm 、 NO_2 : 0.2 ppm 、HC : 1.4 ppm 、HCHO : $43.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。被験者は間欠的運動下 (分時換気量が $15\sim 20\text{ L}/\text{min}/\text{m}^2$ 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 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・グループ及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) 中の好中球の増加及び 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 タンパク質濃度及び 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) 及び 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 及び FEV_{1.0} 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) 及び BALF を採集した。粘膜生検については、特異的細胞マーカー、血管内皮接着分子及び細胞内接着分子、サイトカインや転写因子を測定した。BW 及び 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 及び ECP を測定した。DE 曝露後、FEV_{1.0} 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。

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 μ 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及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 及び 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 μ 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 及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)- γ 、IL-2 及び 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 及び IFN- γ 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系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- 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系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、及び 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 (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 μ 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 及び 24 時間後の鼻洗浄液中の RANTES、MIP-1 α 及び 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 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、及び 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。