

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)、及び ROFA 曝露の後にアレルギーの曝露 (session C)。各曝露は、ROFA (目標濃度は 1.0 mg/m^3 だったが、実際は $0.96 \mu\text{g/m}^3$) または清浄空気への安静下で 1 時間の鼻マスクを介しての鼻曝露に続けて、3 時間後に穀物花粉かプラセボのチャレンジを受けた。ROFA は、ボストン発電所から入手したものを Wright Dust Feed Aerosol Generator を用いて再浮遊させ、 $2.5 \mu\text{m}$ 以上の粒子を除去するために Harvard Marple Impactor を通過させた。MMD は、 $1.55 \mu\text{m}$ であった。花粉アレルギーは、6 種類の吸入性アレルギー [*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、及び、花粉チャレンジ後 4、18、及び 42 時間後に行われた。各鼻洗浄液について、細胞数、分画、及びサイトカインの測定を行った。粒子に続いてアレルギーが投与されたとき、花粉チャレンジ直後の鼻洗浄液中の白血球と好中球の有意な増強 (それぞれ、 29.7×10^3 細胞/mL と 25.4×10^3 細胞/mL) が、アトピーではみられたが、非アトピーの被験者ではみられなかった。これは、それぞれ、143%と 130%の増強を示している。IL-4 の増強反応は、 3.23 pg/mL ($p=0.06$) で 395%の増強であった。アトピー性の被験者では、清浄空気に比し粒子がアレルギー曝露に先行する場合には反応が増強される証拠があると述べている。

Tunnicliffe ら (2001)は、粒子状 H_2SO_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 $\text{FEV}_{1.0}$ 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 $1,000 \mu\text{g/m}^3$ H_2SO_4 (ネブライザーで発生 : MMD 300 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、 $100 \mu\text{g/m}^3$ 、及び $1,000 \mu\text{g/m}^3$ H_2SO_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 $\text{FEV}_{1.0}$ の最大のパーセンテージ変化) は、それぞれ、-14.1%、-16.7%、及び -18.4%であった。 $1,000 \mu\text{g/m}^3$ H_2SO_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 $100 \mu\text{g/m}^3$ H_2SO_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 \times 10³ 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(10~20 \times 10⁴ 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 及び IL-2 等が 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 及び気道の好酸球浸潤レベルと、IL-2 は IgE 及び 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 及び 3.0mg/m³ の DE を吸入させ、この間、16 週目に 10µg 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(-、±、+、++、+++、++++)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等の指標は 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ゲン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 マウス及び C57BL/6 マウスを用いて、DEP(粒径：0.4µm、曝露濃度：0.25mg/ml DEP in 40µl 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 β_2 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及び呼吸抵抗は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及び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、アレルギー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、 $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ 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: $1\mu\text{g}$ 及び DEP : $50\mu\text{g}$ 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た。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($1, 5, 25\mu\text{g}$)と OVA($0.025, 0.25, 2.5, 25\mu\text{g}$)の混合物を点鼻投与し、最少の組み合わせである DEP $1\mu\text{g}$ +OVA $0.25\mu\text{g}$ 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 $20.0 \text{mg}/\text{kg}$ (体重)の DEP を $300\mu\text{L}/\text{kg}$ (体重)鼻腔投与し、その後 1.0mM 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($30\mu\text{g}$ カビ抗原+ $100\mu\text{g}$ 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} : $63.5\sim 1,568.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、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及び炎症所見についての BALF 及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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)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 μm (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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)と低用量(1.6~133.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)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、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(100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ につき 0.86%上昇)。②300~500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 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。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+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 μg)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 及び ROFA に含まれる金属の水溶液で、ROFA の粒径は 1.95 μm 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 μg 、④FeSO₄: 58.49 μg 、⑤VSO₄: 98.2 μg 、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 μg 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、水溶性及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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)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 等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 CAP s 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。

5.2.2.3. 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 (年齢等、記載なし) を DE に 1 時間曝露し曝露前及び曝露後 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 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 mg/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、マクロファージの貪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 : $2.6 \times 10^6 / \text{cm}^3$ 、NO₂ : 1.3 ppm、NO : 3.4 ppm、HC : 4.2 ppm、ホルムアルデヒド : 0.32 mg/m^3)、及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 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、気管支及び気管支肺胞領域からの洗浄液について、細胞及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 (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等であった。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}、65~90µg/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、及び粒子中の 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、Kuronos strain) を感染させ、感染から 7 週間後に肺の病変部の大きさ計測、及び肺、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(5mg/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 $6.4\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で、 NO_2 の平均は 2.8ppm であった。曝露後、*Streptococcus pyogenes*、あるいは A/PR8-34 インフルエンザウイルスに感染を行いその致死率への影響を 2 週間にわたり調べた。その結果、*Streptococcus pyogenes* 感染に対しては、すべての曝露期間で、清浄空気群にくらべ致死率の増加がみられた。しかしながら、A/PR8-34 インフルエンザウイルス感染に対しては曝露群と対照群とで差はみられなかったと報告している。

Saito ら (2002)は、DEP(粒径:90%以上が $<2.5\mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$)、60%が $0.33\mu\text{m}$ 以下、曝露濃度:低濃度 DEP 群 : $95.4\pm 18.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、高濃度 DEP 群 : $3.15\pm 0.49\text{mg}/\text{m}^3$)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-1 β 、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-4 mRNA 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-10 mRNA 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 $40\mu\text{g}$ /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。

5.2.2.4. 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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (3 日平均)、73.5~733.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (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 及び Br と組織所見、正常ラットにおいては Pb、Cl、元素状炭素、及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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、2 回目 : 733 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、3 回目 : 607 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)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)及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、リンパ球及びタンパク質含量の増加、及び炎症組織所見)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 Glucosaminidase)活性、及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、及び#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 で曝露した正常及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、及び 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、気管支炎等の呼吸器系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 µg/m³)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 µg/m³ 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、126.5µg/m³(対照群)、315.6 µg/m³ (低曝露群)、684.5µg/m³ (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) μ g/m³)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、肺の機能検査及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-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、好酸球及び 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。

Kodavanti ら (2000b)は、WKY ラット及び SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) に ROFA(15mg/m³)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、呼吸器系・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、こ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) - β mRNA 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して述べている。

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^3) 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_4 、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。肺胞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胞炎がみられた。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曝露と心血管系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、若齢ラットと高齢ラットを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80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、2日目170 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、3日目50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 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。高齢ラットでは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高齢ラットと若齢ラットの影響の比較では、高齢ラットで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。高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高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ヶ月齢の高齢ラットに、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1,050 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。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:25nm、100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、ヒトでは50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ に相当)とO₃(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及びO₃曝露開始、UCP及び

O₃ : 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。若齢ラットでは UCP、O₃、LPS の肺炎症作用が認められ、また O₃ 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。高齢ラットでは LPS と O₃ のみ有意な炎症作用が認められ、UCP と O₃ 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、若齢ラットでは LPS プライミングした UCP 及び O₃ 曝露群でオキシダント遊離が減少していた。高齢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 O₃ との混合曝露は肺の炎症及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 O₃ 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高齢の肺気腫マウス(TSK マウス)を用いた。8週齢または22月齢の F344 ラット (SPF)(雄)、及び 14~17 月齢の TSK マウス(雄、肺気腫)に UCP(CMD : 25nm、110 µg/m³)及び O₃(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 及び O₃ 曝露開始、UCP 及び O₃:6 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 O₃ 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 O₃ 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、若齢ラットでは UCP と O₃ 混合曝露では活性酸素種活性は抑えられたが、高齢ラット及び 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。

5. 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 ; 皮膚プリック・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)、O₃、O₃ とオフィス粉塵の混合 (オフィス粉塵 ; 75 µg/m³、O₃ ; 300 ppb、O₃ とオフィス粉塵の混合 ; 300 ppb + 75 µg/m³) をチ

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及び細胞数、肺機能、気管支のメタコリン反応性、rhinometry 徴候及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) ($p<0.05$) 及び目の乾燥や肌への刺激等の不快症状 ($p<0.03$) 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_3 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_3 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_3 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_3 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 μm (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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)と低用量(1.6~133.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)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_3 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(100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ につき 0.86%上昇)。②300~500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ CAPs と O_3 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_3 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_3 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 0.23~0.28 μm (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_3 、c 群:0.6ppm O_3 、d 群:0.48 mg/m^3 H_2SO_4 、e 群:1.00 mg/m^3 H_2SO_4 、f 群 :0.31ppm O_3 +0.41 mg/m^3 H_2SO_4 、g 群 :0.31ppm O_3 +1.04 mg/m^3 H_2SO_4 、h 群:0.6ppm O_3 +0.52 mg/m^3 H_2SO_4 、i 群:0.6ppm O_3 +0.86 mg/m^3 H_2SO_4 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_2SO_4 単独吸入で変化無し、 O_3 吸入で増加し、 H_2SO_4 濃度が濃いほど、その程度が低下、②DNA 合成は、鼻では O_3 0.6ppm+ H_2SO_4 吸入により増加。気管ではどの群も変化無し。肺では、 O_3 0.6ppm+ H_2SO_4 吸入により増加。 H_2SO_4 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。貪食能は H_2SO_4 吸入群のすべてで低下した。 O_3 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 O₃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/m³、高濃度 : 48 mg/m³、MMAD = 4.6 μm、O₃ : 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_{2.5}を反映していた(硫酸塩の量等から推測)。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、フェナンスレン等の低分子量の 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、O₃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 O₃の複合曝露群では、O₃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 O₃等のガス状都市大気汚染物質の呼吸器系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 O₃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/m³、O₃ : 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貪食活性を測定した。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 O₃単独曝露群と複合曝露群においてのみ上昇が見られた。マクロファージの貪食活性は、O₃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 (NH₄)HSO₄ (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 :O₃0.198±0.004ppm、3 群 :EC 51.35±12.15μg/m³+ABS 76.25±18.36μg/m³+O₃ 0.194±0.004ppm、4 群 :EC 92.35±18.51μg/m³+ABS 136.29±27.61μg/m³+O₃ 0.197±0.003ppm であった。結果として、① BrdU (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(O₃)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。O₃単独よりも O₃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 : 25 nm、100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、ヒトでは 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ に相当)と O_3 (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 及び O_3 曝露開始、UCP 及び O_3 : 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。若齢ラットでは UCP、 O_3 、LPS の肺炎作用が認められ、また O_3 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。高齢ラットでは LPS と O_3 のみ有意な炎症作用が認められ、UCP と O_3 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、若齢ラットでは LPS プライミングした UCP 及び O_3 曝露群でオキシダント遊離が減少していた。高齢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_3 との混合曝露は肺の炎症及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_3 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高齢の肺気腫マウス(TSK マウス)を用いた。8 週齢または 22 月齢の F344 ラット (SPF)(雄)、及び 14~17 月齢の TSK マウス(雄、肺気腫)に UCP(CMD : 25nm、110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)及び O_3 (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 及び O_3 曝露開始、UCP 及び O_3 : 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_3 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_3 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、若齢ラットでは UCP と O_3 混合曝露では活性酸素種活性は抑えられたが、高齢ラット及び 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_3 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_3 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_3 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。O₃曝露したDEPは、O₃曝露しないDEPに比べ好中球、総タンパク質及びLDH活性を増加させた。O₃曝露によるDEP活性の上昇は、空気による変質ではなくO₃曝露期間中によるものであった。高濃度O₃(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、0.1ppmのO₃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。18OでラベルしたO₃で調べると、DEPと取り込まれるO₃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O₃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、VSO₄、NiSO₄、及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、VSO₄、NiSO₄、VSO₄+NiSO₄を吸入曝露した。粒径は平均0.65µm(GSD 2.11)であった。清浄空気群と、曝露濃度をVSO₄曝露で0.3、0.6、0.9、1.7mg/m³、NiSO₄曝露で0.37、0.49、1.3、2.1mg/m³、VSO₄+NiSO₄曝露で各0.5、1.3mg/m³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。VSO₄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。NiSO₄では1.3mg、2.1mg/m³で体温の低下と不整脈を認めたが、低濃度(0.37、0.49mg/m³)ではこれらに影響は認めず、1.3mg/m³で心拍数は最大75bpm、深部体温は2°C低下、2.1mg/m³ではそれぞれ100bpm、3.3°C低下した。肺障害及び炎症の指標に関しては、NiSO₄曝露の濃度に従い増加傾向を認めたが、この傾向はVSO₄と比較し顕著であった。VSO₄+NiSO₄ではVSO₄及びNiSO₄単独曝露で影響を認めなかった0.5mg/m³で、曝露3日目より心拍が50bpm、深部体温が1.0°C低下し、その影響は30時間持続した。VSO₄+NiSO₄混合1.3mg/m³では、より顕著な低下が認められ(心拍160bpm、深部体温4.0°C)、NiSO₄単独の最高曝露濃度時(2.1mg/m³)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VSO₄、NiSO₄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、VSO₄とNiSO₄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。

5.2.3. 論文による仮説の検証

5.2.3.1. 肺障害及び炎症を誘導する

ヒト志願者の研究では、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 等の炎症性サイトカインの増加、気道壁の IL-8、GRO- α (growth-related oncogene- α)、P-selectin、ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)等の発現増加、NF- κ B(nuclear factor- κ B)や AP-1(activator protein-1)等の炎症関連転写因子や p38MAPK (mitogen-activated protein kinase)、JNK(c-Jun NH₂-terminal kinase)の活性化等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 Fe₂O₃ 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 PM₁₀ 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 PM₁₀ 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等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 等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等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 β や IL-6、MIP-2(macrophage inflammatory protein-2)等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 等) 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 (O₃、NO_x、SO_x) の影響 (Schins ら (2004)、Gilmour ら (2004))、5) ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase1/2)、p38-MAPK、JNK 等の細胞内シグナル伝達因子の活性化 (Madden ら (1999)、Silbajoris ら (2000)) 等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及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 CAPs 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。

5.2.3.2. 気道反応性の亢進及び喘息の悪化がみられる

ヒト志願者の研究では、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)等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 H₂SO₄ 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）、Tunncliffe 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 の産生増強等が報告されている（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 及びその金属成分（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及び喘息、

鼻アレルギー症状を悪化させる可能性がある。

5.2.3.3. 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貪食能低下やアポトーシス増加等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。

5.2.3.4. 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

SO₂ 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) 高齢動物モデル

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高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 O₃ の複合曝露実験では、若齢ラットに比べて高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))。

以上のように疾患モデル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モデル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。

5.2.3.5. 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。O₃ (300 ppb) を曝露されたヒト志願者では、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、O₃ 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 O₃ と H₂SO₄ 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 O₃ 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))、O₃ 曝露が炭素粒子と NH₄HSO₄ 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 O₃ 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。