

2. 循環器系への影響

2.1 吸入曝露

2.1.1 CAPs 都市大気の粒子状物質の曝露

Wellenius ら (2004)は、心筋梗塞モデル動物において不整脈などの心機能異常が発現するかどうかを調べるため、急性実験を行った。曝露物質は、CAPs(ボストン由来)であり、PM_{2.5}を 350.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、CO(一酸化炭素)を 3.5ppm、CAPs を 348.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度とした。SD ラット、心筋梗塞モデル(SD ラットの左冠状動脈の分枝の 1~2 を手術用焼灼器を用いて閉塞)を用い、個体ごとの曝露チャンバー(流量 15L/分)にジアゼパム(12mg/kg(体重) i.p.)で鎮静化したラットを収容して吸入曝露した。曝露時間は、心筋梗塞術処置後、CAPs、CO ともに 1 時間であった。CAPs 単独曝露、あるいは CO との混合曝露を実施し、心臓への影響指標として不整脈の発現性を解析した。その結果、心室期外収縮の増加傾向が CAPs 単独曝露では認められたが、統計的な有意差は示されなかった。CO との混合曝露では相乗効果は見られなかった。

Godleski ら (2000) は、ヒトの心筋梗塞に類似した病態をイヌで作製し、CAPs 曝露による循環機能(心電図)変化、自律神経機能の変化、BALF の変化を調べるため、急性実験を行った。CAPs を冠動脈無処置動物(6 匹)、冠動脈閉塞犬(6 匹)に最高で 30 倍に濃縮して吸入曝露を行った。曝露濃度は、冠動脈無処置動物で 93.7~1,055.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、冠動脈閉塞動物で 71.8~741.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。曝露条件は、6 時間/日、3 日間連続であった。冠動脈無処置動物は、CAPs 曝露により心電図の心拍変動の低周波成分と高周波成分が、清浄空気曝露に比較し、有意に上昇した。高周波成分と低周波成分が上昇しているときには、脈拍数が低下し、呼吸数、一回換気量も低下していた。CAPs 曝露により T 波の低下も観察された。CAPs 曝露により、BALF 中の好中球の占有比率が、清浄空気曝露に比較し、増加していた。CAPs 曝露により末梢血の白血球数に変動はなかったが、曝露開始後、3 日目までフィブリノゲンの経時的増加傾向が認められた。冠動脈閉塞動物に関しては、冠動脈無処置動物に比較し、CAPs 曝露による高周波成分上昇がより顕著であった。また、CAPs 曝露群では、清浄空気曝露群に比較し、冠動脈閉塞による ST 上昇がより早期に出現した。

Gordon ら (2000)は、肺高血圧症モデル動物における CAPs の循環器、呼吸器影響を調べるため、急性実験を行った。F344 ラットにモノクロタリンを前投与して右心肥大と肺高血圧のモデルを作成し、CAPs(ニューヨーク由来)を、134~400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で、Gerber 遠心エアロゾル濃縮器を用いて吸入曝露した。曝露条件を 3~6 時間/日とし、1 日の曝露を行った。呼吸機能、心電図、BALF 中の炎症性細胞と LDH 活性を測定した結果、モノクロタリンを前投与したラットに於いて、ニューヨークの CAPs の 6 時間曝露により BALF 中の好中球が有意に上昇したケースも見られたが、一定した傾向が見られず、心肺機能においても特筆すべき変化は見られなかった。

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 $300 \pm 60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 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 ($1.7 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、30 分)において認められたが CB($300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、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。

Nadziejko ら (2002b)は、SHR に CAPs を曝露して、CAPs の吸入の即時影響があるかどうかを調べるため、急性実験を行った。テレメトリー送信機を装着した SHR に対し、CAPs、硫酸エアロゾル(MMAD:160nm)と Ultrafine 硫酸粒子(MMAD:50~75nm)を吸入曝露した。曝露濃度は、CAPs 平均 $73 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸エアロゾル平均 $225 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸微粒子 $468 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。曝露時間を 4 時間とした。酸はひとつの粒子成分として、刺激的な受容体を活性化して影響する可能性があるため、硫酸のエアロゾルもラットに曝露した。CAPs の曝露をはじめた直後に顕著に呼吸数が減少したが、CAPs の曝露停止により回復した。呼吸数の減少に伴い、心拍も減少した。同じラットに微粒子サイズの硫酸エアロゾルを曝露しても CAPs の影響と同様の呼吸数の減少を引き起こした。CAPs と比べて、超微小粒子の硫酸粒子では呼吸数は上昇した。酸はげっ歯類で知覚刺激反応を引き起こすが、微粒子サイズの酸のエアロゾルと CAPs の影響が類似していることから、CAPs も気道刺激受容体を活性化することが示唆された。

Wellenius ら (2003)は、CAPs 曝露直後に冠動脈閉塞による心筋梗塞を誘発し、その際の心電図変化が清浄空気曝露個体と異なるかどうかを調べるため、急性実験を行った。イヌ(n=6)に対し、CAPs を $345.25 \pm 194.30(161.34 \sim 957.32) \mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で、6 時間/日、3 日間連続で吸入曝露した。イヌ 2 匹を一組として、それぞれのイヌに CAPs または清浄空気を吸入させた。実験に供試したイヌには開胸手術を試行し、冠動脈の左前下行枝にバルーンを用いた閉塞作成装置を取り付けた。曝露終了直後に、5 分間バルーンを膨張させ、冠動脈閉塞状態を作成し心電図を持続的にモニターし、ST 部分の上昇を高さの最大値と面積から判定した。冠動脈閉塞によって出現した心電図 V4、V5 誘導における ST 上昇は、清浄空気曝露個体に比較し、CAPs 曝露個体において顕著であった。しかし、単回帰解析において、ST 上昇と粒子濃度には相関はなく、ST 上昇と Si もしくは Pb の濃度との間に相関を認め

た。多変量解析では、ST 上昇と Si 濃度との間のみに相関を認めた。冠動脈閉塞により頻脈が惹起されたが、CAPs 曝露の影響は認められなかった。冠動脈閉塞により心室性不整脈はあまり惹起されず、CAPs の影響も見られなかった。

Elder ら (2004a)は、F344 ラットに対し、超微小粒子(UFP)と高速道路上の大気を曝露した。平均粒子濃度は 37~106 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。また、高速道路上に設置された曝露システムを使用してエアロゾル(<1mm)/気相、気相のみ、またはろ過空気を曝露した。UFP が悪影響を引き起こす可能性を調べるために F344 ラットをこれらの UFP に曝露した。老齢ラットは、何匹かのラットは、前もって炎症を誘導するため低投与量の菌体内毒素もしくはインフルエンザ・ウイルスで処置した。全身チャンバーでの曝露はロチェスターとバッファローの間で Interstate90 号上の 6 時間の運転期間を一度または 3 日間連続で行われた。肺の炎症に関連する指標、炎症性細胞の活性化、および急性反応は曝露後に測定された。道路上の曝露システムではろ過空気を曝露しているラットでは測定指標に影響をあたえなかった。血管内皮細胞活性化の変化を示す血漿エンドセリン(ET-2)の粒子関連の増加を見いだした。さらに、急性反応と炎症性細胞の活性化に関連する粒子による影響を認めた。また、前もって炎症誘導したラットで高速道路上の粒子との相互作用も見いだされた。これらの結果は、道路上の粒子混合物の曝露は易感染性の老齢ラットの肺と心血管系に影響があることを示した。

Chen と Nadziejko (2005) は、PM への長期曝露がアテローム性動脈硬化症を悪化させることによって有害な心臓血管効果を引き起こすと仮定して、慢性実験を行った。C57 マウス、ApoE-/-マウス (動脈硬化疾患モデルマウス的一种)、DK マウスに対して、CAPs (PM_{2.5})(ニューヨーク州タキシード(Tuxedo)由来)を、平均曝露濃度 110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (C57:110±79 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、ApoE-/-:120±90 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、DK(雄):131±99 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、DK(雌):131±99 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)の濃度で、6 時間/日、5 日/週間の条件で 5 ヶ月間、吸入曝露した。DK マウスの大動脈根の横断面について病変の重症度、細胞性の範囲、および脂質含量を形態学的に検討した。曝露にかかわらず全ての DK マウスにおいて大動脈洞領域の広い範囲に病変を生じ、全領域の 79%以上をカバーした。DK マウス(雄)では、大動脈洞領域の障害は CAPs 曝露によって高められるように見え、その変化は統計的な有意差(p=0.06)に近かった。全体の大動脈を縦(長軸方向)に切開して調べたところ、ApoE-/-マウス、DK マウスの両方に、内腔表面の 40%以上をカバーする重篤なアテローム性動脈硬化症の顕著な部位がみられた。量的測定では、CAPs 曝露が ApoE-/-マウスにおいて識別可能なアテローム性動脈硬化型病変に覆われた大動脈内膜表面の割合を 57%まで増加させた。この研究で、アテローム性動脈硬化型病変を起こしやすいマウスの CAPs への亜慢性曝露が重大な影響を大動脈プラークのサイズ、重症度、および構成成分に与えることを示した。

Chen と Hwang (2005)は、CAPs 曝露による心拍変動(自律神経機能)の変化を観察することを目的として、慢性曝露実験を行った。C57 マウス、ApoE^{-/-}マウスに対して、CAPs(ニューヨーク州由来)を 10 倍濃縮、平均濃度 110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ で吸入曝露した。曝露期間は、6 時間/日、5 日/週の条件で 5 ヶ月間であった。心拍変動は、SDNN(心拍間隔の標準偏差)および RMSSD(RR 間隔の分散)の両者の異常(曝露期間の最初の 6 週間：心拍間隔の延長、その後の 12 週間に短縮、その後のわずかな期間の再度の延長)が見られた。これは心臓自律調節系の曝露初期の亢進およびその後の調節系機能低下を示唆した。汚染物質の濃度レベルの上昇によって心血管系への有害作用をもたらさうる心臓自律神経機能の攪乱を導くことが示唆された。

Gunnison と Chen (2005)は、動脈硬化マウスにおける CAPs 曝露の影響を明らかにする目的で慢性曝露実験を行った。ApoE^{-/-}マウスと DK マウスに対して、CAPs(ニューヨーク州由来、10 倍濃縮)を 131(± 99) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (曝露期間の平均濃度(\pm SD)、日平均濃度範囲は 13 ~ 441 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)と、清浄空気を 6 時間/日、5 日/週、約 4 ヶ月連続の条件で吸入曝露した。動脈硬化をきたしやすいマウス(ApoE^{-/-}マウス)を用い曝露終了後に、心臓と肺を摘出し、発現遺伝子を Affymetrix 社の GeneChip を用い、網羅的に解析した。対照群に比較し、CAPs 曝露群で 1.5 倍以上の有意な変化が見られた遺伝子は、肺に関しては存在しなかった。心臓に関しては、Rex3 遺伝子が、有意な変動を示した。解析法を修飾すると、心臓において 10 程度、肺において 30~40 の遺伝子が軽度に変動していた。PM 曝露に関連した肺や心臓の病態にいくつかの遺伝子発現が示されたが、それらの関連性を確定するにはより詳細な研究が必要であると述べている。

Hwang ら (2005) は、粒子径平均 389 \pm 2 nm(ニューヨーク州由来)の CAPs を ApoE^{-/-}マウスに 6 時間/日曝露で 5 ヶ月間曝露した。曝露濃度は、133 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (範囲 52~153 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)であった。正常マウス(C57)とアテローム性動脈硬化症を発症する傾向がある ApoE^{-/-}マウスに心電図、深部体温、および運動送信機を移植して、CAPs に曝露した。CAPs と模擬空気曝露群の間で毎日の時間における心拍、体温、および身体的活動の有意差を調べるために最近開発されたノンパラメトリック法を使用した。その結果、午前 1 時 30 分と午前 4 時 30 分の間の CAPs の曝露が心拍に最も影響し、体温の変動もみられた。5 ヶ月以上の CAPs 曝露において ApoE^{-/-}マウスでは心拍、体温、および身体的活動の有意な減少パターンが見られたが、C57 マウスでは、より小さく、有意差は見られなかった。ApoE^{-/-}マウスの心拍、体温、および身体的活動の 3 つの応答変数の慢性影響は最後の 2、3 週間で最大になった。また曝露期間中、ApoE^{-/-}マウスで、CAPs 曝露濃度と心拍の短期変化との間に有意な相関があった。ApoE^{-/-}マウスの結果は、より長い期間で心拍変動が曝露の終わりまでに 1.35 倍に増加し、15 分以内の心拍数は 0.7 倍に減少したことを示した。今回用いた心拍変動解析方法は慢性的な心疾患の観察に応用しうる優れた方法であることが明らかになっ

た。

Lippmann ら (2005a) は、PM_{2.5} 曝露による循環器影響を明らかにするために慢性曝露実験を行った。正常 C57 マウスに対して、CAPs(PM_{2.5}) (ニューヨーク州タキシード(Tuxedo)由来)を、平均 110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、長期平均 19.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の曝露濃度で、6 時間/日、5 日/週の条件で 6 ヶ月間曝露した。急性反応としては、① PM 曝露されたマウスと対照群の短期の心電図、深部体温、および身体的活動差と、②同時に収集された PM_{2.5} サンプルの *in vitro* での肺上皮細胞への毒性があった。長期 PM_{2.5} への累積反応は心拍数、心拍変動、心拍数分散、大動脈プラーク密度、遺伝子マーカー発現、および脳細胞分布の変化として特徴づけられた。正常なマウスでは有意な変化は全くみられなかった。

Lippmann ら (2005b)は、CAPs 曝露による動脈硬化疾患モデル動物の循環器影響を明らかにするため、亜慢性曝露実験を行った。ApoE^{-/-}マウスとダブルノックアウトマウス (ApoE^{-/-} LDLr^{-/-})に対して、CAPs(ニューヨーク州由来、10 倍濃縮)を、110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の曝露濃度で、6 時間/日×5 回/週で 5 または 6 ヶ月間曝露した。ApoE^{-/-}マウス(大動脈プラーク)、ApoE^{-/-} LDLr^{-/-}DK マウス(大動脈と冠動脈プラーク)の動脈硬化疾患モデル動物を用いて CAPs の亜慢性曝露を行った。ApoE^{-/-}マウスにおいて、CAPs の日間変動は循環機能の変化(心拍数の低下)と関連があった。CAPs を曝露した ApoE^{-/-}マウスにおいて、曝露終了後の循環機能、動脈硬化様プラーク、冠動脈変化、脳の黒質の細胞密度が除じん空気曝露群に比べて有意に見られた。ApoE^{-/-} LDLr^{-/-}DK マウスにおいて、サーカディアンリズムに関する遺伝子発現の変化の兆候がみられた。ApoE^{-/-}マウスでは、循環機能やプラーク形成において亜慢性曝露した CAPs の影響が見られた。本研究で得られた結果は、過剰死亡に関する疫学データに生物学的妥当性を与えるものであると述べている。

Cheng ら (2003) は、肺高血圧症モデルラットにおける CAPs 曝露の循環器影響を調べるために急性曝露実験を行った。モノクロタリン(60mg/kg(体重))投与による肺高血圧ラット(SD)に、テレメトリー送信機を装着し、CAPs を 108~338 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (9 日平均 240±77 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)の濃度で、5 時間/日、3 連続日の条件で曝露した。ラットにモノクロタリンを腹腔内投与し肺高血圧を惹起させた。その 14 日後に、テレメトリーシステムをラットに移植し、CAPs を吸入曝露した。継続的に、心拍数、血圧、深部体温を記録した。CAPs 曝露時の心拍数は、曝露開始後の早期には清浄空気曝露時と比較して低くなり、その後徐々に増加し、清浄空気曝露時よりも高くなった。1 時間後には 14.9bpm、2 時間後には 11.7bpm の心拍数低下が見られた。血圧も同様の経過を示し、1 時間後には 3.3mmHg、2 時間後には 4.1mmHg の低下が認められた。しかし、これらの変化と粒子濃度の間には有意な相関は得られなかった。本研究では大気微粒子は血圧および心拍数に影響することが明らかになった。

Nadziejko ら (2004)は、老齢ラットにおける CAPs 急性曝露の心機能影響を明らかにするため、F344 ラット(18 ヶ月齢)に対し、CAPs(ニューヨーク州由来)、超微小カーボン粒子と SO₂を曝露した。曝露濃度は、CAPs で 161 μg/m³、200 μg/m³、超微小カーボン粒子で 500 μg/m³、1,280 μg/m³、SO₂で 1.2 ppm であった。曝露時間を 4 時間とした。18 ヶ月齢を超えた老齢ラットは、若いラットに比べ不整脈が頻発するようになった。ここでは老齢ラットにテレメーターを埋め込み、CAPs の影響を調べた。曝露前に心電図を記録し、曝露終了後 24 時間の心電図と比較することにより曝露した物質の直接的影響を調べた。CAPs を曝露したラットに於いて遅延あるいは不規則性拍動が有意に認められた。しかし、超微小カーボン粒子や SO₂ の曝露では自発性の不整脈の発現頻度には影響がみられなかった。一方、心室性不整脈はどの曝露群においても変化は見られなかった。本研究の結果は、濃度レベルが上昇している PM への急性曝露によって不整脈の発生が高まるということを支えた。

Rhoden ら (2005)は、CAPs の吸入および都市大気粒子(UAP)の気管内投与による心臓の酸化ストレスの変化と自律神経機能との関連を調べるため、急性実験を行った。SD ラットに対し、CAPs を吸入曝露し、UAP として標準試料 1649(The National Institute of Standards and Technology, Washington, USA)を気管内投与した。CAPs の曝露濃度は 700 μg/m³であった。SD ラットに CAPs を吸入曝露(700 μg/m³、5 時間)すると心臓の乾湿重量比が有意に増大したが、抗酸化剤の N-アセチルシステインを前処置するとこの増大は見られなかった。また、CAPs 吸入前に自律神経遮断薬を投与すると、CAPs で誘発される心臓の酸化物量のレベル増加が抑制された。これらの成績から、PM 曝露は、自律神経活動を介して心臓の酸化物を増加させること、そして結果的に酸化ストレスが心臓の有意な機能的変化をもたらすことが明らかになった。

Lippmann ら (2005c)は、PM_{2.5}の成分と心拍数、心拍変動との関連性を明らかにする目的で、慢性実験を行った。ApoE^{-/-}と C57 マウス(対照群)に対して、CAPs(粒子径 2.5 μm 以下)を 113 μg/m³の濃度で、6 時間/日×5 日/週の条件で吸入曝露した。C57 マウスでは心拍数、心拍変動に変化はなかった。ApoE^{-/-}マウスでは、PM_{2.5} 曝露の影響が認められた。すなわち、一部の時間帯(明期)では心拍変動パワー値の減少が RO 成分(residual oil)に強く相関して認められた。また、イオウ二次生成物は心拍数の減少に強く相関した。動脈病変マウスの心拍変動における CAPs 曝露の影響が認められたが、今後さらに詳細な研究が必要であると述べている。

Vincent ら (2001)は、都市大気微粒子の循環器、呼吸器影響をレビューした。ラットなどに対して、オタワ標準粉じん(EHC-93)とそれを水ろ過した EHC-93L、Diesel soot (DS)、CBP を吸入曝露した。曝露濃度は EHC-93: 48mg/m³、EHC-93L: 49mg/m³、DS: 4.2mg/m³、

CBP: 4.6mg/m³ で、4 時間の単回曝露を行った。全ての曝露群で肺病理及びチミジンの取り込みに違いは見られなかった。

EHC-93 曝露では曝露 2 日後で血圧が、32 時間で ET-1 が、2、32、48 時間で ET-3 がそれぞれ曝露前と比較して有意に上昇した。これに対して EHC-93L では血圧に明確な影響はなかったが、ET-1 及び ET-2 が曝露後 2 時間で曝露前と比較して有意に増加し、ET-3 が有意ではないが 2、24 時間後に増加し、その後減少した。DS 曝露では曝露後 32 時間で ET-3 が有意に増加したが血圧への影響はなかった。CBP 曝露ではいずれの指標に関しても明確な影響は見られなかった。本研究では、都市部大気中の EHC-93 粒子の吸入が血漿中の ET-1 及び ET-3 レベルに影響を与え、急性の肺障害がなくても血管収縮が生じる可能性が示された。更に、極性有機化合物や可溶性成分を取り除くことにより粒子が血行力学的変化に影響を与える可能性が示唆された。

Sun ら (2005)は、ApoE-/-マウスに PM_{2.5} を 6 ヶ月吸入させ、大動脈のアテローム性動脈硬化について検討した。ApoE-/-マウスに対し、PM_{2.5} を 85mg/m³ の曝露濃度で、6 時間/日、5 日/週の条件で 6 ヶ月間吸入曝露した。高脂食群では大動脈の粥腫面積率は PM_{2.5} 群で 41.5%、脂肪面積率 30%で、それぞれ対照群より有意に大きかった。正常食群では PM_{2.5} の影響はなかった。フェニレフリン、セロトニンによる動脈収縮率は高脂食群で PM_{2.5} 群が対照群に比べて有意に高い値を示した。正常食群では有意差はなかった。アセチルコリンによる動脈弛緩率は高脂食群で PM_{2.5} 群が対照群に比べて有意に減少した。これらの実験から、動脈病変をもつ ApoE-/-マウスでは低濃度 PM_{2.5} の長期曝露によって血管運動緊張を変化させ、血管炎症を招き動脈硬化を増強することが示唆された。

Elder ら (2007)は、SHR にエンドトキシン処理を行い、実際の道路上大気 (ORA)を吸入曝露し、心臓血管系への影響を検討するため、急性実験を行った。SHR に対して、Interstate90 号のロチェスター-バッファロー間の 320 マイルの区間の浮遊粒子状物質(粒径 1 μ m 以下、15~20nm)を吸入曝露した。ORA 濃度が 1.95~5.62×10⁵ 粒子/cm³ (チャンバー内ではなく、導入前の大気濃度)であり、曝露濃度の計算値は、37~106 μ g/cm³であった。曝露時間は 6 時間/日であった。ORA 処理による心拍数への影響を検討したところ、エンドトキシン(LPS)の併用処理を行うと心拍数の低下が曝露終了から 14 時間程度認められ、心拍数のサーカディアンリズムをかく乱した。ORA 単独処理群では曝露終了直後に心拍数の低下は認められたが、その影響は 2~3 時間と LPS 併用処理と比べて短かった。また、副交感神経の活動も ORA 処理により高くなっており、心拍数同様 LPS 併用処理群でその影響は大きかった。さらに、交感神経の活動は反対に低下していた。これらの神経活動が心拍数に影響したと考えられる。以上のことから、本研究では ORA の吸入により自律神経系の活動に影響が生じることが明らかになった。

2.1.2 ROFA・燃焼に伴って発生する粒子状物質の影響

Killingsworth ら (1997)は微小粒子によって引き起こされるヒトの死亡率の増加のメカニズムを探る目的でモノクロタリンによる心肺疾患モデルラットを用いて以下の実験を行った。正常ラット(対照群)とモノクロタリン(50 mg/kg、皮下)投与ラット(モノ群)に燃料油灰(ボストン地区石油火力発電所の飛灰を収集)、または清浄室内空気を 6 時間/日、11～13 日吸入曝露した。BALF を採取し、細胞数、細胞分画、BALF 中細胞中の各種メディエータを測定した。右心室収縮期圧は 2 匹のラットを鼻吸入ケージに入れて 3 時間/日の曝露を行い、臍帯カテーテルを挿入して測定した。吸入曝露濃度は $580 \pm 110 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、粒径は 2.06 μm であった。

対照群に死亡例は無かったが、モノ群は 3 日間に 12 匹中 5 匹が死亡した。モノ群は COPD と同様に肺高血圧をきたすので、曝露中に急性に肺高血圧が進行し、右心不全をおこして死亡に至るといふ仮説を立てたが、右心室収縮期圧は曝露中対照群と変わらず、むしろ低下する傾向にあった。

Kodavanti ら (2000b)は、WKY ラット及び SHR に ROFA(15mg/m³)を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、チオバルビツール酸反応物質、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ていた。また、SHR においては BALF 中赤血球数の増加が見られ、このことは実質肺に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、WKY ラットに比較して SHR で有意に多かった。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、フィブネクチン、G6PD は WKY ラット、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 では減少していた。左室心筋 IL-6、TGF- 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られなかった。

Muggenburg ら (2000)は、イヌの心血管系への ROFA の影響を検討するため、急性実験を行った。老齢イヌ(ビーグル犬、n=4、10.5 歳)に対して、平均粒径 $2.22 \mu\text{m}$ の ROFA を、 $3\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で 3 時間/日×3 日間の吸入曝露を行った。曝露中は心電図を連続記録(鎮静剤投与下)した。その結果、ROFA 曝露では心電図の ST 分節の高さ、T 波の形状や高さに変化を与えず不整脈もみられなかった。したがって ROFA 曝露はイヌの心臓の電気生理学的変化をもたらすことはないことが示された。

Wellenius ら (2002)は、心筋梗塞作成ラットについて ROFA 吸入にともなう自律神経系の活動の変化や不整脈について検討するため、急性実験を行った。テレメトリー送信機を体内装着した心筋梗塞モデルラット(SD ラットの冠動脈を凝固閉塞)に対し、粒子径平均 $1.81 \mu\text{m}$ の ROFA を $3.42\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で 1 時間の吸入曝露を行った。ROFA 吸入を行なった心筋梗塞群では心室性不整脈の増加(41%)と心拍変動の減少が示されたが、目だった徐脈は認められなかった。sham 群では不整脈の増加や心拍変動の変化は認められなかった。

Kodavanti ら (2002a)は、高血圧モデルにおいて ROFA の曝露が心肺血管系にいかなる影響を及ぼすかを明らかにするため、WKY ラットと SHR に対し、粒子径 $1.3 \mu\text{m}$ 以下の ROFA を $15 \text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で、経鼻的に吸入曝露(鼻部にのみ曝露)した。曝露条件は、6 時間/日×3 日/週×1、2、4 週間とした。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：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：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：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由来の反応による血行動態の変化を引き起こす可能性が示唆された。

Watkinsonら(2000)は、健康なSDラットに対し、オタワ粉じん(OTT)、燃焼に伴って発生する粒子状物質(ROFA)、ヘレナ山の火山灰(MSH)、主要遷移金属成分を、15 mg/m³の濃度で曝露した。曝露時間を、6時間/日、3日間とした。SDラットにテレメトリー送信機を装着し、心電図、心拍数、深部体温を曝露前48時間から曝露後96時間にわたりモニターした。投与後0~6時間、12~72時間後に不整脈、低体温、肺の炎症を伴う徐脈を量依存性に認めた。死亡例はROFA吸入では認められなかった。これらの研究成果はPMの気管内投与や吸入曝露はラットにおいて心肺毒性をもたらす潜在性を有しており、PM曝露による有害作用は様々な金属類の複合的な効果として現れる可能性を示唆した。

Watkinsonら(2001)は、PMの吸入による循環機能および体温変化を明らかにするために行った実験をレビューした。SDラット、SHR、WKYラットに対し、O₃、PM(オタワ粉じん、ROFA、ヘレナ山の火山灰、金属成分)を曝露した。曝露濃度は、PM(0.25、1.0、2.5mg/kg(体重))、O₃(0.25~2ppm)であり、曝露条件は、6時間/日×4日間であった。O₃や各種PMの曝露により、概ね濃度に依存して心拍数と体温が低下し、これらの反応は生体のおかれたストレスなどの環境により増悪した。これらの反応の少なくとも一部には肺刺激受容体の刺激や副交感神経系を介する機序が働いている可能性が示唆された。

Kodavantiら(2003)は、金属組成が都市部の大気中PMと類似したoil combustion emission particulate matter (EPM)を曝露し、重油燃焼排気による大気汚染の健康影響を調べるため、急性および慢性実験を行った。SDラット、WKYラット、SHRに対し、重油燃焼排気中の粒子状物質(EPM、粒径1.2μm、幾何標準偏差2.6)を吸入曝露した。連続曝露群では、曝露濃度を2、5、10mg/m³、6時間/日として4日間の曝露を行った。間欠曝露群では、曝露濃度を10mg/m³、1回の曝露を6時間/日とし、1回/週×4週間又は16週間の曝露を行った。このEPMで主要な水溶性の生物活性を持つ金属はZnのみであった。3系統ともに肺組織中に粒子を貪食した肺胞マクロファージが認められた。WKYラットの間欠16週曝露群では、清浄空気曝露群と比較して、6匹中5匹で顆粒肥満細胞の減少及び心筋組織に多発性の変性、慢性活動性炎症、および線維化を認めた。SDラット及びSHRでは、清浄空気とEPM曝露間での心臓病変に明確な違いは認めなかった。本研究では、Znを含むPMに長期曝露することにより高感受性ラットで心筋障害が生じる可能性を示唆した。

但し、SHR では、心筋組織の変化が曝露群と対照群で明確な差を認めなかったが、その理由としては遺伝的素因によるものと思われたと述べている。

2.1.3 DEP やガソリン排気による影響

Wiester ら (1980)は、Hartley モルモット (雌と雄)に 20 時間/日、7 日/週の頻度で $6\text{mg}/\text{m}^3$ の DE を 8 週間曝露した。DE は、紫外線照射したものとしいないものの 2 種類を用いた。その結果、紫外線照射の有無に関わらず、心臓重量や心電図に影響は認められなかったが、照射排気に曝露された動物の心拍数がわずかに減少した。

Brightwell ら (1986)は、F344 ラット(雌と雄)に 16 時間/日、5 日/週の頻度で 0.7、2.2、 $6.6\text{mg}/\text{m}^3$ の DE を 2 年間曝露した結果、 $6.6\text{mg}/\text{m}^3$ 群の心臓/体重、右心室/心臓の重量比が上昇し、左心室の収縮性が低下したことを報告している。

Kaplan ら (1982)、Penney ら (1981)、Green ら (1983)、Vallyathan ら (1986)の報告では、F344 ラットや Hartley モルモットを含む種々の動物種に DE 曝露による心臓重量の変化を認めなかったと報告している。

Campen ら (2003)は、DEP の SHR の心血管系への影響を明らかにするために亜急性実験を行った。SHR に対し、粒径 $0.1\sim 0.2\ \mu\text{m}$ (空気力学的直径)の DE を、0、30、100、300、 $1,000\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で、6 時間/日の条件で 7 日間連続曝露し、心血管系への影響を検討した。明期の心拍数は、対照群では実験開始前から低い値を示していたが、曝露群では曝露中に有意に高値を示した。ラット(雌)の対照群の明期の心拍数は平均 $265\pm 5\text{bpm}$ で、曝露群のそれは $290\pm 7\text{bpm}$ であった。ラット(雌)で観察されたこの群間差は、曝露期間中の夜間(22:00~02:00)まで観察されたが、曝露前及び曝露終了後の期間では観察されなかった。房室結節の感受性の指標である PQ 間隔は、曝露濃度に依存して有意な延長を認めた。PQ 間隔の延長を伴う心拍数の増加は、心室性不整脈の存在を示している。心病理所見では、幾つかの心標本で散在する筋細胞の変質病巣と組織球性炎症を認めたが、対照群と高濃度群で比較した場合には類似した軽度な所見であった。顕微鏡的には、心病変内や肺外に粒子は認めなかった。以上の結果は、これまで報告されている実際の大气中濃度の曝露が、ラットの心拍調節機能に影響を与える可能性を示している。

2.1.4 酸性物質・炭素などによる影響

Elder ら (2004b)は、炭素微粒子の生体影響(肺、血液)に対する影響を明らかにする目的で急性実験を行った。F344 ラットと SHR に対し、粒径 36nm の超微小カーボン粒子(UCP)を曝露濃度 $150\mu\text{g}/\text{m}^3$ で 6 時間の吸入曝露を行った。一部のラットでは LPS($2\text{mg}/\text{kg}$ (体重))を投与した。LPS は肺胞間隙の好中球には変化をあたえないが、血液還

流中の好中球の割合を増加させた。F344 ラット、SHR とも UCP で肺の炎症は起こらなかった。UCP は血中の好中球を減少させ、細胞内が蛍光染色の酸化が増加した。また血清中のトロンビン-アンチトロンビン複合体とフィブリノゲンの値は増加した。2 種類のラットでトロンビン-アンチトロンビン複合体のレベルが異なっていた。都市大気中に時々生じる高濃度の粒子のモデルとして吸入された UCP は、高齢ラットの肺以外への影響と炎症性刺激の反応性に変化を与えることが示唆された。

Harder ら (2005)は、循環器系への影響を検討するため、急性実験を行った。ラットに対して、粒径の中央値が 37.6 ± 0.7 nm の超微小カーボン粒子 (UCP) を吸入曝露した。曝露濃度は $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、曝露時間は、2 時間と 24 時間であった。UCP 曝露により心拍数が増加したが、回復期における心拍数は対照群と UCP 処置群で差は認められなかった。UCP の吸入により、BALF 中の多核白血球(PMN)数に増加が認められ、肺に軽度の炎症が認められた。以上のことから、本研究では UCP は心臓機能に悪影響を与えることを示し、さらに心臓機能への影響には自律神経系活動が関与している可能性が考えられたと述べている。

Tankersley ら (2004)は、カーボン粒子の心臓影響を高齢マウスで調べるため、急性実験を行った。マウスにテレメトリー送信機を装着し、CB を吸入曝露した。CB(Regal660;density $1.95\text{g}/\text{cm}^3$ surface area $112\text{m}^2/\text{g}$)の曝露濃度は $160 \pm 22 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、曝露時間を 3 時間/日とし、3 日間の反復曝露を行った。①健康な高齢マウスに比べ、終末期高齢マウスは体重、体温が低下した。②健康な高齢マウスの心拍数、心拍変動は FA(ろ過空気)、CB 曝露最終時間の心電図を見ると、FA、CB の吸入で減少したが、終末期にある高齢マウスには一定の傾向が認められなかった。③FA、CB 曝露中の心拍数変化を見ると、健康な高齢マウスは FA の吸入で心拍数が減少し、4 日目の CB 吸入でさらに心拍数は減少した。一方、終末期にある高齢マウスは、健康なマウスに比較して FA 吸入時でも心拍数の低下の程度が大きかった。CB 吸入時の心拍数低下では生命の危機的な減少が認められた。④終末期の高齢マウスは、健康な高齢マウスよりも副交感神経活動のインプットが大きいことを示した。⑤健康な高齢マウスは、RMSSD(RR 間隔の分散)と心拍数の関係性が FA、CB 曝露ともに強かったが、終末期の高齢マウスには関係性が認められなかった。⑥健康な高齢マウスは、PM 曝露中の交感神経活動が増加したが、終末期の高齢マウスは心拍数を調整する副交感神経活動の増加が見られた。これらの結果から、PM によって引き起こされる心拍数の調節変化が究極的に生理的な加齢の影響を受けている可能性が示唆された。

2.1.5 土壌による影響

伊藤と田村(2002)は、関東ローム粉の心血管系、肺のメディエータ発現に及ぼす影響を明らかにするため、Wistar ラットに対し、関東ローム粉(粒径 $1.6 \sim 2.3 \mu\text{m}$)を曝露濃度 15

mg/m³で、16時間/日、7日間の条件で吸入曝露した。51週齢のWistarラットでは、曝露による心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳性ナトリウム利尿ペプチドのmRNA発現に影響はみられなかった。心室では、心房性ナトリウム利尿ペプチドのみにmRNA発現の増加傾向が見られた。12週齢F344ラットでは、曝露により血中のEF-1濃度に影響がなかった。肺ET-mRNAに影響が見られた。循環器疾患のマーカーである心臓ホルモンの遺伝子発現にわずかながらも変化が認められた。

2.1.6 金属成分による影響

Campenら(2001)は、VSO₄、NiSO₄、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、VSO₄、NiSO₄、VSO₄+NiSO₄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VSO₄曝露で0.3、0.6、0.9、1.7mg/m³、NiSO₄曝露で0.37、0.49、1.3、2.1 mg/m³、VSO₄+NiSO₄曝露で各0.5、1.3 mg/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℃低下、2.1mg/m³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、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および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℃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℃)、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、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。

Moyerら(2002)は、InP、CoSO₄、V₂O₅、GaAsの4種の化学物質に動脈炎が生じるか詳細な検討を行うことを目的として、亜慢性～慢性実験を行った。B6C3F1マウスに対し、InP(粒径1.1~1.3 μm)、CoSO₄(粒径1.5~1.8 μm)、V₂O₅(1.0 μm)、GaAs(1.0 μm)を90日間と2年間吸入曝露した。曝露濃度はI-1: 0.3mg/m³、I-2: 3.0mg/m³、I-3: 4.0mg/m³、I-4: 1.0mg/m³、II-1: 100mg/m³、II-2: 30mg/m³、II-3: 16mg/m³、II-4: 75mg/m³であった。低濃度(0.3~4mg/m³、化学物質によって濃度は異なる。化学物質一種類につき一濃度)を2年間吸入曝露し、病理組織学的解析を行った。InP曝露により心臓の筋性動脈(細動脈)

において動脈炎が観察された。また、 CoSO_4 においても動脈炎が観察された。しかし、90 日間の高濃度曝露においては、マウス(雄)、マウス(雌)ともに対照群と比較して有意に動脈炎発症が増加する知見は得られなかった。本研究の結果、低濃度金属粒子の長期慢性曝露は動脈炎など血管系疾患の誘導や増悪に関与していることが示唆された。

2.2 気管内投与

2.2.1 CAPs 都市大気の粒子状物質の曝露

Kang ら (2002)は、心筋梗塞モデルラットに PM 曝露(気管内投与)を行った場合に誘発される心臓毒性にエンドセリンの変動が関与しているかどうかを調べる目的で、急性実験を行った。心筋梗塞モデル動物として、エーテル麻酔下で SD ラットの左冠状動脈を結紮により閉塞して急性心筋梗塞群を作出した。開胸を施しただけの sham 群を対照として用いた。曝露物質は、工業地帯の大気をサンプラーにて採取しテフロン処理グラスファイバーに集め濃縮した $\text{PM}_{2.5}$ であり粒子サイズは $2.5 \mu\text{m}$ より小さかった。ハローセン麻酔下で $\text{PM}_{2.5}$ を $2.0\text{mg}/0.3\text{ml}$ saline の量で単回投与した。 $\text{PM}_{2.5}$ を気管内投与(単回)したところ、10 分後に計測した心電図において、sham 群に比較してより強い心拍数の低下および心室期外収縮などの不整脈が出現した(有意差あり)。また、 $\text{PM}_{2.5}$ の気管内投与により、いずれの群(心筋梗塞群、PM 曝露群、心筋梗塞+PM 曝露群)のラットにも血中エンドセリン濃度の有意な上昇が見られた。しかし、心筋組織においてエンドセリン A 受容体を発現した心筋線維は心筋梗塞動物への $\text{PM}_{2.5}$ 曝露のみで増加した。心筋梗塞ラットにおいて PM で誘発される心拍数低下や異常波形の発現にはエンドセリン系の upregulation が関与していることが示唆された。

Rhoden ら (2005)は、曝露物質に都市大気粒子(UAP)として標準試料 1649(The National Institute of Standards and Technology, Washington, USA)を用いた曝露実験を実施した。粒径は不明である。テレメーター送信機(心電図、第 I 誘導)を麻酔下で体内に予め埋め込み、回復後の SD ラットに、UAP: $750 \mu\text{g}/300 \mu\text{l}$ saline を気管内投与した(別途 CAPs 吸入も行った)。心臓内の酸化物に対する自律神経興奮の影響を調べるために、イソプロテレノール($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (体重)、i.v.)、アセチルコリン($3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (体重)、i.v.)、またはムスカリン($3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (体重)、i.v.)を静脈内投与して、心筋の酸化物量を化学的発光法またはチオバルビツール酸反応物質で計測した。曝露直後に心臓の酸化物の増加と心拍数増加、回復期における心拍変動の増大が認められた。活性酸素種の関与を確認する目的で抗酸化剤である N-アセチルシステインを前処置するとこれらの変化は消失した。UAP による心臓の影響に、交感・副交感神経の経路が関与していることを確認する目的で神経遮断薬を処置したところこれらの変化は消失した。CAPs 吸入曝露によっても同様の変化が見られた。PM 曝露によって自律神経を介した心臓の酸化物の増加による酸化ストレスが心機能の変化に関与していると考えられると述べている。

Rivero ら (2005)は、PM_{2.5}がラットの全身における炎症や肺と心臓における血管系の狭窄をもたらすか否かについて明らかにする目的で、急性実験を行った。曝露物質としてサンパウロ(ブラジル)市内の交通量の極めて多い中心部の上空 15m から大気を採取、2.5 μm 以下のものを選別した。PM_{2.5}は S、As、Br、Cl、Co、Fe、La、Mn、Sb、Sc、Th などの構成要素から成っていた。蒸留水 1ml に PM_{2.5}を 100μg 希釈したもの(PM100)または蒸留水 1ml に PM_{2.5}を 500μg 希釈したもの(PM500)を投与した。気管内投与は 38 匹の健康な Wistar ラットにペントバルビタールで麻酔(30mg/kg(体重) i.p.)をかけたのち、上記の溶液を各々気管内投与した。網状赤血球総数は PM100 群と PM500 群の両方で有意に増加し(p<0.05)、ヘマトクリット値は PM500 群でのみ増加した(p<0.05)。分葉核好中球(segmented neutrophils)やフィブリノゲンの定量値は大きく減少を示し、リンパ球数は PM100 群で有意に増加した(p<0.05)。細葉間小動脈の L/W(内腔/壁)比の投与量依存的減少が PM 群で観察された(p<0.001)。細気管支周囲動脈の管腔/壁の割合(L/W 比)は PM500 群で大きく減少した(p<0.001)。心臓における乾湿重量比の有意な増加は PM500 群で観察された(p<0.001)。結論として、サンパウロにおける環境中の微小粒子状物質は肺と心臓の組織学的変化を引き起こすことが分かった。肺の脈管構造は明らかに粒子状物質の気管内投与により影響を受け、健康なラットにおいて明瞭な血管狭窄を示した。

Bagate ら (2006)は、PM 曝露による影響における肺の炎症の役割と心臓の虚血、再灌流標本における PM の影響を明らかにすることを目的とした。曝露物質は、オタワ標準粉じん(EHC-93)を用いた。粒径は平均 0.8~0.4nm でレンジは<3nm であり(Bagate ら (2004))、構成は Gerlofs-Nijland ら (2005)に記載されている。SHR(11~12 週齢)に、EHC-93(10mg/kg(体重))を 5mg/ml に希釈し気管内(単回)投与した。また LPS:350endotoxin units、0.5ml を炎症性刺激として、対照として生理食塩水を投与した。これらの投与は短時間の 4%ハローセン吸入麻酔下で行った。気管内投与の 4 時間後に心臓を摘出し、ラングンドルフ標本にして灌流し安定化を行った(ベースライン)。その後 35 分間の虚血と 120 分間の再灌流を行い、再灌流中 5 分、60 分、120 分に観察を行った。PM の気管内投与によって心臓の灌流標本ではベースラインの左室弛緩期圧(LVDP)が低下した。虚血後の再灌流中では、生理食塩水投与の LVDP は一時的に低下したが 60 分以内に 90%まで回復した。PM 投与・LPS 処理の LVDP は生理食塩水に比較し有意に低下しており、回復が非常に遅延した。再灌流中の冠循環は、LPS・生理食塩水では低下したが、PM では全く低下しなかった。心拍数では、PM・LPS・生理食塩水とも有意な変化はなかった。心筋細胞(H9C2)への影響については、Zn²⁺(50 μM)、PM(100 μg/ml)は KCl と ATP による心筋への Ca 流入を抑制した。以上から、虚血後の心臓の回復期における観察指標に対して PM の気管内投与は一時的で可逆的な影響を及ぼした。この影響は、心臓におけるカルシウムホメオスターシスに対する可溶性金属類の直接的な作用による可能性があるが、一方で肺の炎症反応が明らかな影響を及ぼしているものかもしれないと述べている。

Goto ら (2004)は、粒子状物質のウサギ気管内投与による骨髄からの単球の放出とその放出に関与する肺胞マクロファージの役割および粒子の質的差を明らかにするために急性実験を行った。ウサギに対して、大気、オタワ標準粉じん(EHC-93)、inert carbon (CC)を曝露した。粒径は EHC-93 が $0.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (99% は $3.0 \mu\text{m}$ よりも小さい粒子)、CC は $1 \mu\text{m}$ 以下であった。対照群は生理食塩水 1ml/個体、EHC-93 群は $500 \mu\text{g/ml}$ を 1ml/個体、CC 群は 10mg/ml を 1ml/個体の量で気管内投与した。また、ヒト肺胞マクロファージ(AM)投与実験では、対照群はAMのみを 0.6ml/kg (体重)、曝露群では EHC-93+AM 群 0.6ml/kg (体重)、CC+AM 群 0.6ml/kg (体重)とした。EHC-93、CC 投与により、両者で約 20%の肺胞マクロファージが粒子を貪食していた。投与 12 時間後から血液中細胞の増加を認め、単球数では 3 群間に有意差を認めなかったが、白血球総数と杆状核白血球が EHC-93 群で著増した。BrdU でラベルした単球の骨髄から血液中への放出は、EHC-93 と CC 群で投与後 8~12 時間後に速やかに増加した。EHC-93 と AM の 24 時間培養した上清では、GM-CSF、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、MCP-1 が増加した。また、上清をウサギ気管内に投与したところ、EHC-93 群で白血球数と杆状核白血球が増加し、また BrdU ラベル化単球の血液中への速やかな放出を認めた。単球の骨髄での移行時間は、対照群に比較して EHC-93 群、CC 群で短縮 ($p < 0.05$)したが、培養上清投与では EHC-93+AM 群でのみ有意に短かった。これらの結果から、大気中粒子状物質(EHC-93)は肺胞マクロファージのメディエータの産生放出を促し、それらに含まれるサイトカインが骨髄からの単球の放出を促進していることを報告している。この結果は、肺細胞の粒子貪食が単球応答に関与し、粒子の成分が全身性炎症反応の強度に寄与していることを示唆している。大気中粒子曝露後の骨髄からの単球の放出とメディエータの産生が、局所並びに全身性の病態で重要な役割を演じている可能性を示したと述べている。

2. 2. 2 ROFA・燃焼に伴って発生する粒子状物質の影響

Watkinson ら (1998)は、ROFA(径 $1.9 \mu\text{m}$ 、フロリダ火力電気会社から採取、高濃度の可溶性 V、Fe、Ni を含む)の心臓不整脈への影響を心肺系疾患モデルラットを用いて検討した。90 日齢の SD ラットに、無線型心電計を埋め込み、これを対照群とした($n=6$)。更に、同様のラットにモノクロタリン 60mg/kg (体重)を皮下投与し、肺血管系の炎症と肺高血圧を作成し、これを心肺疾患モデル動物群とした。それぞれのラットを更に 4 群に分け 0.0、0.25、1.0、2.5 mg の ROFA を経気道的に注入投与し、96 時間心電図をモニタリングした。対照群においては、ROFA の投与により用量依存的に重篤な不整脈の発現とその持続時間が増加したが、これは房室調節の障害と心筋虚血と関連があると考えられた。死亡例はなかった。一方、疾患モデル動物群は、不整脈の頻度と影響はより強く現れ、低、中等、高濃度の ROFA 投与群はそれぞれ 1、3、2 匹が死亡した。これらの結果は、正常ラット、或いは心肺疾患モデルラットに ROFA を投与すると心臓への影響があることを示しており、

死亡例は、伝導系と低酸素症による心臓関連の死亡であることを示唆している。

Campan ら (2000)は、ROFA が肺高血圧症モデルラット(モノクロタリンで作製)および正常ラットに及ぼす影響と、異なる飼育環境温度における体温反応への影響を明らかにする目的で、急性～亜急性実験を行った。ROFA(Dreher ら (1997)に記載)を各種の条件下で気管内投与した。4 群では術後 12 日目にモノクロタリン(60mg/kg(体重))を腹腔内投与し、肺高血圧症状が現れるまでさらに 12 日間を置いた。ラットの飼育環境温度および曝露条件は、1 群(22℃環境飼育):0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与(各 n=4)、2 群(10℃環境飼育):0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与(各 n=4)、3 群(22℃環境飼育):1ppmO₃ の曝露(6 時間)後、0、2.5mg ROFA 投与(各 n=4)、4 群(22℃環境飼育):モノクロタリンを腹腔内投与後、0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与(各 n=4)とした。

深部体温：すべての条件下で対照群は生理食塩水の気管内投与で深部体温が上昇したが、ROFA を投与した 22℃環境下群は濃度依存的に低下した。高濃度 ROFA では遅発性の低体温症も誘発した。10℃環境下群も深部体温は同様の濃度依存性を示したが、22℃環境下よりも影響が大きかった。O₃ 曝露群でも同様であったが、回復には 18 時間ほど要し、遅発性の低体温症は誘発しなかった。モノクロタリン処理群では濃度依存的に持続的に体温が下がり続け、致死率も高かった。

心拍数：心拍数の変化はすべての群における深部体温の変化に酷似していた。

不整脈と心電図変化:ROFA 曝露によりすべての群で AV ブロック等の不整脈発生頻度が濃度依存的に増大し、高濃度曝露では 48 時間もそれが続いた。O₃ 曝露群では不整脈は消失した。モノクロタリン処置群は ROFA 曝露後の不整脈は増大し、4 日以上続いた。さらに低体温や頻脈も、ST セグメントの持続的抑制や伝導異常による急性心筋障害といった心電図異常と共に観察され、致死率も増大した。

臓器重量：すべての群で ROFA 投与後に肺重量の増加と炎症、壊死、浮腫が観察された。

ROFA は心機能や体温調節機構に重大な影響を与えることが示唆された。またそれは心肺ストレス下においてさらに重篤な症状を示すことが明らかになった。

Campan ら (2002)は、ROFA の曝露が心機能および体温調節にいかなる影響を及ぼすかを明らかにする目的で急性～亜急性実験を行った。健康 SD ラット、モノクロタリン処置(60mg/kg(体重)、i.p.)SD ラットにテレメトリー埋め込み手術を行った。モノクロタリン処理ラットは 14 日目以降に気管内投与(単回投与)を行った。曝露物質は、Fe₂(SO₄)₃、NiSO₄、VSO₄ であった。曝露濃度や実験条件は、以下の通りであった。

1 群(モノクロタリン非処置群、各 n=4):①生理食塩水投与、②0.105mg Fe₂(SO₄)₃、③0.263mg NiSO₄、④0.245mg VSO₄、2 群(モノクロタリン処置群、各 n=10):①生理食塩水投与、②0.105mg Fe₂(SO₄)₃、③0.263mg NiSO₄、④0.245mg VSO₄、3 群(モノクロタリン処置・金属混合群、各 n=6):①Fe₂(SO₄)₃+VSO₄、②Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄、③NiSO₄+VSO₄、④

Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄+VSO₄とした。

Vは健康ラットおよびモノクロタリン処置ラットで明瞭な徐脈(90bpmの減少)、不整脈、体温低下(2.5℃低下)を招き、Feによる変化は小さかった。一方、生理食塩水投与では全ての群において心拍数と深部体温の上昇が見られた。Ni投与では遅発性に頻脈・低体温・不整脈がみられ、心拍数・深部体温は減少した。NiとVの同時投与により、致死率は上昇した。これらはFeの投与によりある程度抑制された。またモノクロタリン処置群では右心肥大が見られ、BALFでは高濃度のタンパク質・LDH・NAGが観察された。さらに対照群においてVとNiはLDHやMIAレベルの上昇を引き起こし、Niと他の金属を組み合わせるとさらなる上昇を引き起こした。モノクロタリン処置群においてもNi投与によりLDHレベルが上昇した。ROFAに含まれるVとNiは健康ラットや肺高血圧ラットに体温上昇、徐脈、不整脈源性をもたらすが、Feによる保護作用の可能性も併せて、これらの金属の相互作用を研究することがROFAの生体影響を評価する上で重要であると述べている。

Kodavantiら(2002a)は、ROFAによる肺障害を明らかにするため急性～亜急性実験を行った。曝露したROFAの粒径は、吸入曝露においては1.3 μm MMAD以下であった。ROFA中にはSO₄、Zn、Ni、Fe、Vが含まれていた。SHRとその対照動物(WKYラット)に対して、ROFAの0.0 mg/kg(体重)、1.0 mg/kg(体重)、5.0 mg/kg(体重)を単回、鼻部吸入または気管内投与した。鼻部吸入及び気管内投与いずれにおいてもROFA曝露による体重変化は認めなかった。

肺病理：重症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見られ、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：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：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。

Suwa ら (2002)は、動脈病変をもつ動物(ウサギ)における PM₁₀ の影響を調べた。曝露物質は、オタワ標準粉じん(EHC-93)であり、粒径は PM₁₀ 0.8±0.4 μm であった。ウサギ(遺伝性高脂血症(WHHL)ラビット PM₁₀ 投与群(n=10)、対照溶液群(n=6))に対して、気管内投与を 4 週間行った。PM₁₀ の投与により循環血における多核白血球(PMN)数の増加と骨髄での貯蔵量の増加が観察された。動脈硬化病変の進行と PM₁₀ を貪食した肺胞マクロファージ数の増加が見られた。

Watkinson ら (2000)は、ROFA の気管内投与及び吸入による循環機能の変化(不整脈など)を明らかにする目的で、急性～亜急性実験を行った。曝露物質として、オタワ粉じん(OTT)、燃焼に伴って発生する粒子状物質(ROFA)、ヘレナ山の火山灰(MSH)、主要遷移金属成分(Primary transition metal constituents)を用いた。

ROFA 気管内投与 : 0.0、0.25、1.0、2.5 mg/0.3 ml saline を下記の 3 条件の SD ラットに投与した。

①寒冷(4°C、4 日間)環境飼育ラット(n=16)、②気管内投与の 18 時間前に O₃ に曝露(1ppm、6 時間)(n=16)、③気管内投与の 12 日前にモノクロタリン投与(60mg/kg(体重) i.p.)(n=16)の条件で気管内投与を行った。

投与後 0～6 時間、12～72 時間後に不整脈、低体温、肺の炎症を伴う徐脈を量依存性に認めた。寒冷ストレス、O₃ 曝露、モノクロタリン投与(肺血管炎/肺高血圧モデル)により作製された心肺ストレス/疾患モデル SD ラットでも心反応の増悪が認められ、モノクロタリン処理ラットでは 50%の死亡率であった。

ROFA 吸入 : 健康な SD ラット、モノクロタリン投与 SD ラット(n=8)、SHR(n=8)、WKY ラット(SHR の遺伝的対照ラット、n=8)に ROFA(15mg/m³×6 時間/日×3 日)を吸入曝露した。この実験でも気管内投与と同様の傾向が認められたが、死亡例は ROFA 吸入では認められなかった。

老齢 SHR における気管内投与 : OTT 2.5 mg、ROFA 0.5mg、MSH 2.5mg、対照群(生理食塩水)を 15 ヶ月齢の SHR に気管内投与後 96 時間の観察を行った。心電図、心拍数、不整脈などの悪影響は OTT>ROFA>>MSH の順であった。

モノクロタリン処置ラットにおける金属成分の気管内投与 : モノクロタリン処置 SD ラットに粒子状物質の重要な金属成分である Fe、V、Ni を単独あるいは混合で、Fe₂(SO₄)₃(105 μg)、NiSO₄(263 μg)、VSO₄(245 μg)を 0.3 ml の生理食塩水(pH=2)に溶解し気管内投与

した。投与後 0～6 時間、12～72 時間後に心拍数および深部体温の低下、不整脈や死亡率(30%)の増加が認められた。最も著しい影響は Ni と V 曝露により起こった。

以上の結果から、粒子状物質やその酸性金属成分の気管内投与や吸入曝露による心肺系への明確な毒性が証明された。粒子状物質曝露に引き続いて観察される悪影響は個々の金属の複合的影響、さらに宿主の感受性により修飾されたものと考えられると述べている。

Watkinson ら (2001)は、O₃ および PM 曝露が心機能と体温調節に及ぼす影響を正常動物と自然発症高血圧モデル、肺高血圧モデルの動物を用いて明らかにすることを目的とした。動物は、F344 ラット、SD ラット、SHR、WKY ラット、C57BL/6J マウス、C3H/HeJ マウス、Hartley モルモットを用いた。モノクロタリン処置による肺高血圧ラットに対し、O₃(0.25～2.0ppm)、PM(ROFA、オタワ粉じん、ヘレナ火山の火山灰、金属成分、0.3mlの酸性溶液にて溶解)を気管内に投与した。O₃(0.25～2.0ppm)曝露や各種 PM の曝露により、概ね濃度に依存して心拍数と体温が低下した。ラットでは、0.5ppmO₃ 曝露で心拍数は 75～100bpm 減少し、深部体温は 2.5～4℃低下した。しかしこれらの反応は曝露中の生体のストレスなどの環境条件の影響を強く受けた。ROFA など PM の気管内投与によって、初期の急性反応(投与後 0～6 時間)と後から現れる遅発反応(投与後 12～72 時間)が誘発された。これらの反応には徐脈、低体温に加え高頻度の不整脈および肺炎を伴っていた。健康な SD ラットに対して高濃度の ROFA(2.5mg)を気管内投与すると、心拍数は 50bpm 程度減少し、深部体温は 2℃低下した。これらの変化は 6 時間以内に回復したが、その後 3 日間にわたって散発的な低下が起こった。モノクロタリン処置ラットでは、このような心機能および体温の変化がより誇張されて出現した。これらの反応の少なくとも一部には肺刺激受容器の刺激や副交感神経系を介する機序が働いている可能性が示唆される。

Nurkiewicz ら (2004)は、SD ラット(雄、7～8 週齢)77 匹に対して、生理食塩水、あるいは ROFA(平均 2.2 μ m)0.1mg、0.25mg、1mg、2mg/個体、TiO₂ 粒子 0.25mg/個体を生理食塩水 300 μ l に懸濁させたものを気管内投与した。その結果、ROFA 投与群で BALF 中の多核白血球数とアルブミン・LDH 濃度の上昇(ROFA=1、2mg)、肺胞マクロファージによる活性酸素産生量の増加(ROFA=2mg)が認められた。次に細動脈直径を測定するため、ラットに麻酔をかけた後に気道を確保し、脊柱僧帽筋を灌流した。脊柱僧帽筋細動脈の直径を測定する部位の上流からマイクロピペットで動脈内にカルシウムイオノフォア(A23187)を注入し、intravital microscopy で血管の直径を測定した。その結果、気管内 ROFA 投与量の増大とともに血管内皮依存性の血管拡張阻害が認められた。同濃度の ROFA と TiO₂ では血管拡張阻害効果は同程度であった。また、一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤である L-NMMA を加えたときの血管拡張阻害効果に比べて、ROFA 投与群ではより大きな阻害がみられたことから、ROFA は NO 依存性と非依存性の血管拡張作用を示した。NO ドナーであるニトロプルシドナトリウムを電氣的に僧帽筋にイオン導入したところ、ROFA 投与

群と生理食塩水投与群で平滑筋の NO に対する感受性に差は認めなかった。Intravital microscopy の結果、ROFA 投与群では細静脈内皮での白血球の接着およびローリングが顕著に認められた。以上の結果は、肺炎症が認められない濃度の ROFA 曝露 24 時間後でも、血管内皮依存性の細動脈拡張阻害が起こることを示していた。これにより、全身性の微小血管機能の阻害が引き起こされている可能性が示唆された。

2.2.3 DEP やガソリン排気による影響

Nemmar ら (2003a)は、DEP をハムスターの気管内に投与し、肺の炎症、血栓形成及び血小板の活性化(Closure time)を調べるため、急性実験を行った。曝露物質である DEP 粒子径は 20~50nm の範囲であり、大きい粒子でもほとんどが 2.5 μ m 未満であった。ハムスターに対し、BALF・血栓形成実験：DEP 群(5、50、500 μ g/個体)、生理食塩水群(0 μ g/個体(Tween80 120 μ l))、血小板活性化実験(Ex vivo)：DEP 群(50 μ g/個体)、生理食塩水群(0 μ g/個体(Tween80 120 μ l))、血小板活性化実験(In vitro)：DEP 群(0.1、0.5、1、5 μ g/ml)を血液に添加、生理食塩水群(0 μ g/ml)の各条件で気管内投与(単回投与)した。

DEP 投与群(5、50、500 μ g)では、LDH を除いて BALF 中の多核白血球(PMN)、タンパク質及びヒスタミンが生理食塩水群に比べて有意に増加した。タンパク質及びヒスタミン濃度と DEP 投与量との間に量反応関係が認められた。同じ投与量の DEP を用いた in vivo 実験では、DEP 群で静脈及び動脈の血栓形成が増大し、静脈では DEP 投与量との間に量反応関係が認められた。動脈での血栓形成及び閉塞は静脈よりも早く起こり、一方、静脈での血栓は動脈に比べ徐々に現れ徐々に消失した。血小板活性化能を測定した ex vivo (体外) 実験では、DEP50 μ g 投与群で 30 分、60 分の時点で closure time (血栓形成による閉塞までの時間)の短縮が認められた。また、in vitro 実験では、DEP 非処理の動物から得られた血液に DEP を添加すると、0.5 μ g/ml 以上の DEP 群で closure time の有意な短縮がみられ、その短縮は DEP 濃度依存性であった。本研究の結果、DEP による肺の炎症、静脈及び動脈における血栓の形成及び血小板の活性化が起こることが明らかになった。この DEP への曝露による血小板の活性化は、大気汚染物質への曝露後、血栓症が起こるとされる臨床的報告と一致した。従って、この研究結果は、都市部での大気中粒子状物質が心血管疾患の罹患率及び死亡率の増加に寄与している可能性を示すものである。

2.2.4 その他の粒子による影響

Nemmar ら (2002)は、ポリスチレンの超微小粒子(60 nm)が血栓形成に及ぼす影響を明らかにする目的で急性実験を行った。ハムスター(ペントバルビタール麻酔下で投与)に、3 種類のポリスチレン(unmodified polystyrene、carboxylate-polystyrene、amine-polystyrene particles)(粒径:60 nm)の気管内投与、または静脈内投与を行った。Unmodified粒子は5mg/kg(体重)まで血栓形成に影響を及ぼさなかった。Carboxylate粒子

は50 μ g/kg(体重)では効果は無かったが、100と500 μ g/kg(体重)では有意に血栓の形成を抑制した。一方、Amine粒子は5 μ g/kg(体重)では影響が無かったものの50と500 μ g/kg(体重)では有意に血栓形成を促進した。気管内投与では、Amine粒子が5,000 μ gで有意に血栓形成を増強したもののその他の粒子では影響は認められなかった。1.25 μ Mのadenosine diphosphate (ADP)により誘発される血小板凝集反応に対して、Unmodified粒子は100 μ g/mlまで影響は示さず、Carboxylate粒子は25と100 μ g/mlで弱いながらも増強が見られた。Amine粒子はそれ自体50と100 μ g/mlで凝集を示しADP誘発性の凝集をさらに増強した。これらの結果から、循環血中に存在する(超)微粒子は止血に影響を及ぼし、Amine粒子のin vivoで観察された血栓形成傾向は少なくともその一部は血小板の活性化によるものと考えられる。

3. 免疫系、血液への影響

3.1 吸入曝露

3.1.1 CAPs 都市大気の粒子状物質の曝露

Clarke ら (2000b)は、CAPs(ボストン由来、曝露濃度: $361 \pm 267 \mu\text{g}/\text{m}^3$)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 またはろ過空気に6時間/日、3日間連続曝露の後、次の週には、清浄空気曝露群は CAPs 曝露へ、CAPs 曝露群は清浄空気へとクロスオーバー曝露し、CAPs の1日の組成の変化と血液成分の変化との関連を調べた。次の週にはクロスオーバー曝露を行い、CAPs の1日の組成の変化と血液成分の変化との関連を調べた。全ての CAPs や全ての擬似曝露を比較したところ、生物学的な反応において統計的な有意差はみられなかった。しかしながら、CAPs 曝露における生物学的な反応の変動が大きかった。すなわち、日ごとの曝露量と成分のばらつきが大きく、それに対する生物学的な反応も変動も大きくなっていった。そこで、統計学的に、CAPs の成分と生物学的な反応の間の関連性を解析した。BALF 中の好中球の割合、末梢血の総白血球数、好中球、リンパ球の増加が Al や Si の増加と関連していた。血中の好中球と肺胞洗浄のマクロファージの増加は V や Ni 因子と関連していた。BALF の好中球の増加は、Br/Pb と CAPs 曝露の3日目のデータのみで関連性がみられた。赤血球の数やヘモグロビンレベルの有意な減少がイオウと相関があった。BALF と血液学的なパラメータは総計 CAPs の質量濃度の増加とは関連がなかった。これらのデータは CAPs の吸入が肺性および全身性の細胞プロファイルの変化と微妙に関連して、CAPs の特異的な成分はその生物学的な反応の原因である可能性を示唆している。

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 $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、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)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。

Nadziejko ら (2002a)は、ラット 9 匹にニューヨーク由来 CAPs を、異なる濃度(1 回目:341 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、2 回目:295 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、3 回目:205 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、4 回目:155 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、5 回目:95 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)で、6 時間/日、5 日/8 週の頻度で 5 回曝露した。血液凝固因子(フィブリノーゲン、第 VII 因子、組織プラスミノゲン賦活剤、プラスミノゲン活性化因子、トロンビン-アンチトロンビン複合体)、白血球、赤血球に対して、曝露群では対照群(ろ過空気吸入)に比べて影響は認められなかった。

Zelikoff ら (2002)は、*Streptococcus pneumoniae* 感染 F344 ラットをニューヨーク由来 PM_{2.5} および金属エアロゾル(Fe²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺)の 65~90 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 濃度で 5 時間曝露して、BALF 中の LDH、肺病理組織、肺組織中菌数を検索した。その結果、PM_{2.5} 曝露は感染ラット肺からの菌排出を遅らせ、Fe や Ni 粒子曝露でもクリアランス機能低下がみられた。Fe は、感染なしのラットでの曝露でも免疫機能に影響を認め、PM_{2.5} 中の Fe が呼吸器免疫機能への影響に関与していることを示唆している。

Morishita ら (2004)は、2000 年 7 月と 9 月に下記の 4 群を設定し曝露実験を行った。曝露時間を 10 時間/日とし、7 月に 4 日間連続で、9 月には 5 日間連続で、CAPs(Harvard Ambient Particle Concentrator を使用)もしくは清浄空気を正常ラットと抗原感作ラットに吸入曝露した(1 群:生理食塩水感作+清浄空気曝露、2 群:生理食塩水感作+CAPs 曝露、3 群:抗原感作+清浄空気曝露、4 群:抗原感作+CAPs 曝露)。CAPs の曝露濃度は、一日平均 437~1,123 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (4 日平均 676±288 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、もしくは、一日平均 90~555 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (5 日平均 313±119 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)であった。

抗原は、生理食塩水に溶解した OVA(0.5%)を鼻腔内に 2 回にわけて投与した。最終抗原投与の 4 日後(第 20 日目)から CAPs の曝露を開始した。9 月の 5 日間曝露では、肺における La の元素濃度は、抗原投与の有無にかかわらず、CAPs 曝露群で清浄空気曝露群に比較し高かった。肺における V の元素濃度も、CAPs 曝露群で清浄空気曝露群に比較し高かった。特に、抗原投与群において V の濃度はより高かった。リンや Fe には有意な差を認めなかった。7 月の 4 日間曝露では、これらの元素は検出限界以下であった。BALF 中の好酸球数は、7 月の 4 日間曝露では 4 群の間に有意な差は見られなかった。9 月の 5 日間曝露では、抗原により上昇傾向を示した好酸球は、CAPs 曝露により有意な増加を示した。BALF 中のタンパク質濃度も同様の結果であった。本研究は、抗原に関連する炎症に CAPs が影響を及ぼしうる可能性を示唆している。肺における元素は、曝露期間がわずかに長い、平均濃度がかかなり低い 9 月に検出された。Lei ら (2004a)は、ラットにモノクロタリンを腹腔内投与し肺高血圧を惹起させ、その 14 日後に CAPs を対照群、低曝露群、高曝露群の 3 群を設定して吸入曝露した。曝露時間および曝露濃度を 6 時間(315.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)と 4.5 時間(684.5

$\mu\text{g}/\text{m}^3$)とした。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濃度に関しても同様な結果が得られた。これらの結果から、黄砂の時期の粒子曝露によって、肺高血圧ラットにおける肺炎症と肺障害の増加がみられた。

Campbellら(2005)は、アレルギー感作(肺、OVA)の状態のマウスにロサンゼルス交通量の多い場所でのCAPsを曝露した。曝露濃度を20倍濃縮とし、 $0.18\mu\text{m}$ 以下の粒子を $282.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ で、 $2.5\mu\text{m}$ 以下の粒子を $441.7\mu\text{g}/\text{m}^3$ で、4時間/日、5日/週、2週間曝露した。その後、OVA再曝露により肺での炎症を惹起させ、その時の脳における炎症性サイトカインおよび転写因子の増減を測定した。その結果、曝露群では炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 α)および転写因子(NF- κB)の有意な増加が認められ、微粒子成分が脳内での神経変性を誘導すると報告している。

Kleinmanら(2005)は、BALB/cマウスに道路沿道から50m、150m離れた地点で集めたCAPsを曝露した。実験は、2001年と2002年に実施され、曝露濃度は、2001年の50m離れた地点で集めたCAPsで $361\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、150m離れた地点で集めたCAPsで $313\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。2002年の50m離れた地点で集めたCAPsは、fineで $498\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、ultrafineで $433\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、150m離れた地点で集めたCAPsは、fineで $442\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、ultrafineで $283\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。曝露時間は、4時間/日、5日/週、2週間曝露した。その結果、曝露群でのアレルギー反応指標(IL-5、IgE、好酸球)の増加および道路からの距離が近いほどその影響が強いことを認め、自動車排気粒子は気道アレルギー反応を引き起こすことを示唆した。

Kodavantiら(2005)は、1日曝露実験(1-day exposure study)ではSHRをランダムに2群に分け4時間/日で1日、清浄空気もしくはCAPsを吸入させ、同様の実験を6回繰り返した(2000年10月～11月)。2日曝露実験(2-day exposure study)では、SHR及びWKYラットを各2群に分け4時間/日で2日間、清浄空気もしくはCAPsを吸入させ、同様の実験を7回繰り返した(2001年8月～10月)。曝露濃度の範囲は、1日曝露実験では、 $1,138\sim 1,765\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、6回の実験とも一貫した高濃度の粒子曝露であったが、清浄空気群とCAPs曝露群との間で影響に差はなかった。2日曝露実験では、 $144\sim 2,758\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、7回の実験でそれぞれCAPs濃度が異なっていた。最も高濃度の1回目を除いては、WKYラットでBALF中総細胞数及びマクロファージが減少し、好中球が増加した。SHRでは γ -GTP活性及び血漿中フィブリノゲンの増加が見られた。吸気及び呼気時間の延長がSHRでは見られたが、WKYラットでは見られなかった。CAPs濃度は硫酸塩、有機炭素、Znとの間

に有意な相関がみられたが、生体影響との間に相関はみられなかった。7回の実験の初回以外は濃度が低かったが、Zn、Cu、Al量には数倍の違いがあり、CAPs mg当たりの有機炭素は増加していた。6回の実験では生理的影響を認めた。本研究では、CAPsの濃度ではなく化学物質構成に依存した種特異的な肺(WKY ラット)及び全身(SHR)影響を認めた。

Steerenberg ら (2005)は、OVA 感作マウスモデルを用い、ヨーロッパ各都市で採集したPMのアレルギー反応におけるアジュバント効果を調べた。5都市で採取したCAPs(coarse、fine)を曝露し、対照群：NaCl、OVA、OVA+オタワ標準粉じん(EHC-93)を曝露した。投与パターンは、OVA+PMにより感作(0日、14日、9mg/ml、450 μ g PM/個体)後、35、38、41日にOVAでチャレンジし、42日目に殺処分、観察した。その結果、ウッチ(Lodz、ポーランド)、ローマ、オスロ、アムステルダム順にアジュバント効果が高いことが示された。また、fine PMの方がcoarse PMより増強効果が高いこと、PMを採集した季節ごとに効果が異なること、水溶性および不溶性の成分のいずれも効果を有することが示された。

Steerenberg ら (2003)は、抗原と粒子の投与経路の違いによるアジュバント効果についてBALB/cマウスを用いて検証した。抗原の点鼻投与による初期感作とエアロゾルチャレンジは、腹腔内感作とエアロゾルチャレンジと同様に、有意にIgE反応を増強し、肺の炎症変化とBALF中好酸球の増加を誘導した。しかし、点鼻投与の感作とチャレンジでは反応はより低かった。ところが、DEPあるいはオタワ標準粉じん(EHC-93)を抗原とともに点鼻投与で感作とチャレンジすると、有意に高いIgE反応増強、炎症性変化やBALF中好酸球増加がみられ、気道過敏性も増強したと報告している。

Steerenberg ら (2004)は、OVAに対する免疫反応がオタワ標準粉じん(EHC-93)の同時投与により増強されたので、そのメカニズムについて機能欠損マウスで検討した。その結果、①マクロファージ活性化欠損マウスでは血清OVA特異的IgE、IgG1、IgG2や肺の組織学的変化は対照と差がなかった。②抗酸化薬のN-アセチルシステイン投与マウスではIgG2a以外は比較対照と差がなかった。③iNOS欠損マウスでは、IgEでは差がなかったが、IgG1、IgG2は有意に増加した。④IL-4欠損マウスでは、IgE、IgG1が低下しており、肺組織の炎症性変化が有意に軽度であった。これらのことから、EHC-93の同時投与による免疫増強には、IL-4が重要であることが示唆された。

3.1.2 ROFA・燃焼に伴って発生する粒子状物質の影響

Dormans ら (1999)は、CFA吸入曝露による呼吸器、免疫系への影響を報告している。ラットにCFA(0、10、30、100 mg/m³)を4週間(6時間/日、5日/週)吸入曝露した。また、回復試験としてCFA(0、100 mg/m³)を1週間曝露し、その後3週間清浄空気を吸わせた。肺重量は30 mg/m³以上の曝露濃度で濃度依存性に増加した。100 mg/m³曝露後、肺への遊

離粒子の沈着、肺泡マクロファージによる CFA 粒子の貪食が観察された。組織学的検討では単核細胞の浸潤、II 型上皮細胞の増殖、軽度の線維化による肺泡隔壁の細胞数増加が認められた。3 週間の回復試験では、有意な回復は認められなかった。組織学的・臨床化学的検討、尿検査では毒性学的に有意な変化を認めなかった。非特異的防御機構と特異的免疫反応の両者を認めた。肺リンパ節では T および B リンパ球の増加を観察した。T/B 比はいずれの曝露濃度でも変化がなかった。曝露群では血清 IgA 濃度が最大 150% 上昇を示した。BALF 中マクロファージの貪食能は増加したが、細胞一個あたりの殺菌能に変化はなかった。ナチュラルキラー活性に有意な変化はなかった。

Hamada ら (1999) は、新生マウスの生後 3、7 日に OVA (5 μ g) と水酸化アルミニウムゲル (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 抗体増加を認めた。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 (3mg/kg 個体、i.p.) により抑えられた。

Hamada ら (2000) は、新生児マウスに ROFA と OVA をエアロゾル投与して抗原感作への影響を調べた。3% OVA のエアロゾル投与は、生後 3 日目より 11 日間と 25 日目より 3 日間の計 14 回行い、ROFA のエアロゾル投与 (50 mg/mL、30 分/日) は生後 6 日、8 日、10 日の 3 回行った。その結果、BALF 中の炎症性細胞においては大きな変動はみられなかったが、メサコリンに対する気道反応性の亢進が ROFA+OVA 群でみられた。また、抗原特異的な IgE と IgG 産生の増強も ROFA+OVA 群でみられたと報告している。

Smith ら (2006) は、肺と全身的炎症と障害における CFA の影響を SD ラット (雄) に 4 時間/日 \times 3 日の期間、清浄空気または CFA を曝露することにより測定した。2.5 μ m (PM_{2.5}) 以下の CFA 平均濃度は 1,400 μ g/m³ であり、600 μ g/m³ は PM₁ であった。動物は曝露 18 時間、36 時間後に調べた。CFA を化学的に分析した結果、主要な構成要素は Si、Ca、Al、Fe であった。有意に増加した血液白血球と共に、曝露後、BALF 内の総好中球数も増加していた。CFA の曝露は MIP-2 をわずかに上昇させ、BALF 内のトランスフェリンも上昇を示した。肺組織における IL-1 β や抗酸化ポテンシャル (Total antioxidant potential) もまた CFA を曝露させたラットで上昇した。肺の組織学的検査では肺泡隔壁の肥厚と終末細気管支を越えて直接肺泡で増加した細胞質が明示された。それらの反応は、職業的に関連性のあるレベルで短時間の曝露により肺と血液中における軽度好中性炎症を導く CFA の能力に一致した。しかしながら、CAPs の影響と CFA の影響を比較したとき、CFA には肺の変性

を引き起こす多大な作用はみられなかったと報告している。

3.1.3 DEP やガソリン排気による影響

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。

Dziedzic (1981)は、モルモット(一群 7 匹)を用いて、 $1.5\text{mg}/\text{m}^3$ の DE 曝露(平均粒径： $0.2\mu\text{m}$)を 4 週間、及び 8 週間行い、免疫臓器のリンパ球の変動を調べた。その結果、今回の曝露条件では、脾臓、胸部リンパ節、血中の T、B リンパ球の比率において対照群と比べ差はみられなかったと報告している。

Mentnech ら (1984)は、F344 ラット(雄)を $2\text{mg}/\text{m}^3$ 炭粉曝露群、 $2\text{mg}/\text{m}^3$ DE 曝露群、 $1\text{mg}/\text{m}^3$ DE + $1\text{mg}/\text{m}^3$ 炭粉の曝露群、清浄空気曝露群の 4 群にわけ、7 時間/日、5 日/週で 12 ヶ月、24 ヶ月曝露を行った。SRBC を抗原として用いプラーク形成を調べた実験では 11~20 匹を各群用いたが、対照群とくらべ差はみられなかった。また、各群 18~22 匹を用いての植物性血球凝集素(phytohemagglutinin、PHA)、コンカナバリン A によるリンパ球増殖反応においても差はみられず、今回の曝露条件ではラットの免疫反応に影響は認められなかった。抗原を静脈投与して全身的な影響を調べたが、全身影響はあまりないことを報告している。

Bice ら (1985)は、DE 曝露の肺の免疫機能への影響を検索するために、F344 ラットと CD-1 マウス (各群 16 匹)を用いて 7 時間/日、5 日/週の条件で 7mg、3.5mg、0.35mg/m³ の濃度(それぞれの MMAD は、0.23、0.25、0.26 μ m)で 6、12、18、24 ヶ月曝露を行った。曝露後に SRBC 抗原を気管内投与して肺門部リンパ節でのリンパ球数、抗体産生を調べると 7mg/m³ を曝露されたすべてのラットとマウスでリンパ節細胞数の増加がみられ、3.5mg/m³ではラットの 12、18、24 ヶ月曝露でリンパ節細胞数の増加がみられた。ラットを用いての 7mg/m³と 3.5mg/m³の曝露では抗体産生細胞数の増加がみられたが、血清中の抗原特異的 IgM、IgG、IgA の抗体価では差はなかったと報告している。

Hahon ら (1985)は、感染抵抗性への粒子状物質の影響を調べる目的で、CD-1 マウス(雌)を 2mg/m³炭粉群、2mg/m³DE 曝露群、1mg/m³ DE + 1mg/m³炭粉の混合群、清浄空気曝露群の 4 群にわけ、7 時間/日、5 日/週の曝露条件で 1、3、6 ヶ月曝露を行った。マウスは 1 群 150 匹で、それぞれの期間に 600 匹を用いて実験を行った。曝露後のインフルエンザウイルス感染による致死率には 1、3、6 ヶ月曝露で群間での差はみられなかったが、インターフェロンレベルでは、肺において 3 ヶ月曝露ですべての群でその抑制がみられ、血清中でも混合曝露群で抑制がみられた。6 ヶ月曝露では、肺と血清において DE 単独、あるいは DE と炭粉混合群でインターフェロンの産生抑制がみられた。6 ヶ月の曝露ではすべての曝露群で血中の凝集抗体価の低下が認められた。

McClellan ら (1986)は、DE 曝露後、粒子の肺における沈着量は曝露濃度に依存して増加したことを報告した。曝露濃度を 0mg/m³、0.35mg/m³、3.5mg/m³、7mg/m³とした。7 時間/日、5 日/週、30 ヶ月の条件で曝露を行った。気管関連リンパ節では、抗体産生細胞は、高濃度曝露では曝露 6 ヶ月より、中濃度曝露では 12 ヶ月より増加していた。BALF 所見では、濃度と曝露期間に依存し、好中球の増加が観察された。BALF 中の β グルクロニダーゼ、LDH も同様の結果であった。組織学的所見では、高濃度群で発がんが確認された。曝露 24 ヶ月後では、曝露濃度に依存し、肺の線維化が進行していた。曝露 24 ヶ月後の呼吸機能検査では、全肺気量は濃度依存性に低下し、中濃度、高濃度曝露群ではコンプライアンスの低下や拡散能の低下も観察された。

Lewis ら (1989)は、地下炭坑における DE の影響を評価するために、CD-1 マウス(雌)に 7 時間/日、5 日/週の頻度で 1、3、6 ヶ月曝露した。実験群は、2mg/m³炭粉群、2mg/m³DE 曝露群、1mg/m³DE + 1mg/m³炭粉の混合曝露群、清浄空気曝露群の 4 群を設定した。DE を曝露したマウスにインフルエンザをチャレンジしたところ、インターフェロン産生の低下がみられた。その他、死亡率、体重増加、臓器重量、臨床指数などで示される明らかな慢性毒性影響は、ラットやサルで認められなかった。DE と炭粉の共同作用(相加作用)は、見られなかった。

Fujimaki ら (1997)は、マウスの IgE 抗体産生に及ぼす影響を調べるために、0、3.0、6.0mg/m³濃度の DE で 12 時間/日、7 日/週で 3 週間曝露し、OVA 抗原感作を 3 週間間隔で 3 回行った。体重、胸腺重量に差はなかったが、脾臓重量の増加が高濃度曝露でみられた。血清中の抗 OVA 特異的 IgE 抗体価は、6.0mg/m³群で有意に高かった。脾臓細胞を試験管内 で OVA 刺激して誘導したサイトカイン産生では、6.0mg/m³曝露群で対照群と比べ IL-4、IL-10 は高く、IFN- γ は低い結果であった。DE の吸入は、サイトカインネットワークの変化を誘発して抗原特異的 IgE 産生に悪影響を及ぼすことが示された。

Finch ら (2002)は、F344 ラットに 13 週間 DE 曝露をおこなった。曝露濃度を低濃度(0.04 ± 0.03 mg/m³)、中濃度(0.2 ± 0.1 mg/m³)、高濃度(0.5 ± 0.1 mg/m³)とし、6 時間/日、5 日/週の条件で曝露した。用量依存性に肺マクロファージ数の増加がみられたが、曝露終了 4 週間後には回復した。中濃度および低濃度で観察された唯一の所見は、粒子貪食マクロファージの増加であった。骨髄小核、末梢リンパ球 SCE、催奇形性などには有意な変化はみられなかった。ラット(雌)の高濃度曝露群には、軽度の病理組織学的変化(末梢気管支の化生性変化)を認めたが、雄や低濃度群では曝露に関連する変化はほとんどなかった。

Hiramatsu ら (2003)は、マウスに DE を低濃度(約 100 μ gDEP/m³、103.1 ± 9.2 μ gDEP/m³)、高濃度(3mgDEP/m³、3.1 ± 0.2mgDEP/m³)、または清浄空気を 1 ヶ月、3 ヶ月間(7 時間/日、5 日間/週)曝露させた。その後の肺の病理組織学的検討では、高濃度曝露群で気道系リンパ組織の形成が観察された。肺組織における炎症誘発性サイトカイン及び iNOS の mRNA 発現量の測定では、DE 3 ヶ月曝露で低濃度、高濃度ともに TNF- α 、IL-12p40、IL-4、IL-10 の mRNA 発現量がやや増加した一方、IL-1 β 、iNOS の mRNA 発現量はわずかに減少した。また、BALF 中の Mac-1 陽性細胞をフローサイトメトリーにより計測したところ高濃度曝露群で有意な増加が認められた。

Hiramatsu ら (2005)は、マウスに DE(約 3mg/m³、3.1 ± 0.2mg/m³)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 × 10⁶ 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、および肺、脾臓組織中の結核菌を培養しコロニーを数えた。病変部の大きさは対照群に比べ DE 6 ヶ月曝露群で有意に大きく、肺組織中の結核菌によるコロニー生成は DE 6 ヶ月曝露群で有意に増加した。また肺組織における TNF- α 、IL-1 β 、IL-12p40、IFN- γ 、iNOS の mRNA 発現量は DE 2 ヶ月間曝露群でわずかに上昇したが、DE 6 ヶ月間曝露群では、IL-1 β 、IL-12p40、IFN- γ 、iNOS の mRNA 発現量が減少した。結核菌感染における DE 曝露は、肺胞マクロファージの持つ結核菌を殺す能力を低下させ、結核菌感染の感受性を高める可能性が示唆された。

Ishihara と Kagawa (2002)は、モルモットを用いてろ過空気群(C)、低濃度群(L ; 0.18~0.21 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、中等度濃度群(M ; 0.92~1.18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、中等度濃度群で粒子除去群(MG ; 0.01 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、高濃度群(H ; 2.57~2.94 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)の DE 曝露を行った。曝露条件を 16 時間/日、6 日/週とし、6、12、18、24 ヶ月間の曝露を行った。その結果、①死亡率には、曝露濃度による有意な影響はなかった (C: 38%、L: 41%、M: 42%、MG: 40%、H: 40%)。②体重変化にディーゼルによる影響はなかった。③好酸球数、総タンパク質、LDH が M、H 群では C 群と比較して有意に増加(12 ヶ月)した。L 群は C 群と有意な差はなかった。④M 群では 18 ヶ月から、H 群では 12 ヶ月から、BALF 中のフコースが有意に上昇した。M 群では 24 ヶ月から、H 群では 12 ヶ月から、BALF 中のシアル酸が有意に上昇した。M 群では 18 ヶ月から、H 群では 12 ヶ月から、BALF 中リン脂質が有意に上昇した。M 群では 24 ヶ月から、H 群では 18 ヶ月から、血液中 LTC₄が有意に上昇した。BALF 中 LTC₄では両群で 24 ヶ月後に上昇した。本論文内容は、DEP の 3 濃度で長期曝露を行った成績であり、DEP の呼吸器影響の量反応関係を示唆した。

Ishihara と Kagawa (2003)は、Wistar ラットを用いてろ過空気群(C)、低濃度群(L ; 0.18~0.21 mg/m^3)、中等度濃度群(M ; 0.92~1.18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、中等度濃度群、粒子除去群(MG ; 0.01 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、高濃度群(H ; 2.57~2.94 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)の DE 曝露を、16 時間/日、6 日/週の条件で 6、12、18、24 ヶ月間行った。その結果、①死亡率は高濃度群で有意に他の群より高かった(C: 8%、L: 12%、M: 15%、MG: 12%、H: 23%)。②体重では高濃度群で有意な変化がみられた。③L 群では C 群と比較して有意な変化はなかった。④M、H 群では、BALF のパラメータ(細胞数、細胞分画、総タンパク質、フコース、シアル酸、リン脂質、ヒスタミン、LTB₄、LTC₄、PGF_{2 α} 、6-Keto PGF_{1 α} 、11-D TxB₂、13,14D-15-Keto PGF_{2 α})の有意な増加を認め、さらに H 群では M 群より高かった。一方、血漿のパラメータに影響はなかった。⑤PGE₂は M、H 群の 6 ヶ月吸入で有意に低下した。⑥MG 群(中等度濃度で粒子除去群)では、以上の反応が有意に軽かった。DEP の 3 濃度で長期曝露を行った成績であり、DEP の呼吸器影響の量反応関係を示した。

Burchiel ら (2004)は、DE を 6 ヶ月連続吸入曝露したマウスの脾臓を摘出、分散培養を行った後、植物性血球凝集素(PHA)あるいは LPS 刺激を行い、T 細胞、B 細胞数の変化を検討した。曝露時間を 6 時間/日とし、6 ヶ月連続で曝露した。その結果、DE 曝露により、PHA 処理に対する T 細胞の増殖が抑制された。しかし、その応答は濃度に依存するものではなく、最低濃度の DE を曝露したマウス由来の脾細胞が最も抑制されていた。また、LPS 処理による B 細胞の増殖は最低濃度の DE を曝露したマウス由来の脾細胞のみにて細胞数の増加が確認された。最低濃度以外の DE 曝露マウスの脾細胞では特に影響は観察されなかった。脾細胞に各種 PAH を処理後、同様に PHA あるいは LPS 処理を行い、T 細胞、B

細胞数の変化を検討した結果、BaP の代謝物である BP-7,8-ジオール処理した脾細胞にて LPS 処理による B 細胞数が増加した。一方、BaP 代謝物処理した脾細胞において、PHA 処理による T 細胞数が増加した。以上の結果、DE 曝露による T 細胞の増殖抑制には BaP は関与していないと考えられる。

Yokota ら (2004)は、モルモットに DE および除じん排ガスを 0.2mg~3.0mg の曝露濃度で、16 時間/日、6 日/1 週間の条件で、6、12、18、24 ヶ月間の吸入曝露を行い、BALF 中炎症細胞数、各種生化学指標の解析を行った。その結果、BALF 中の好酸球数は曝露 12 ヶ月後から増加し、濃度依存性が 12 ヶ月、24 ヶ月曝露で認められた。また、除じん群では好酸球数の変動は認められなかった。BALF 中の LDH 量の結果も同様であった。粘液の成分であるフコース濃度、シアル酸濃度も中濃度・高濃度曝露群で有意に高く、除じん群は対照群と同程度であり、中濃度曝露群と比較して有意な低下が認められた。肺泡 II 型細胞が産生するリン脂質濃度も同様な傾向であった。気管支収縮作用を有する LTC₄ の血中濃度は DE 高濃度 18 ヶ月および 24 ヶ月曝露により有意な上昇が、また 24 ヶ月曝露では中濃度、除じん群においても有意な上昇が認められた。一方 BALF 中の LTC₄ 濃度は 24 ヶ月曝露の中・高濃度曝露群にて上昇が認められた。本研究結果から、モルモットに対する DE の吸入により、粘液構成成分やリン脂質濃度、さらに LTC₄ 濃度が上昇することが明らかにされ、一部は COPD の症状に一致することが示唆された。

Harrod ら (2005)は、DE を 30~1,000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の曝露濃度で、6 時間/日の条件で、1 週間あるいは 6 ヶ月間マウスに吸入曝露し、肺の微生物感染に対するクリアランスと肺の病理組織像を解析した。1 週間の DE の吸入により、緑膿菌のクリアランスは低下し、その低下は低濃度領域(30~100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)では濃度依存的であった。1,000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の DE 濃度におけるクリアランスは 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と同程度であった。また、6 ヶ月間 DE 吸入を行い、同様の解析をしたところ、肺のクリアランスの低下は認められなかった。1 週間の DE 吸入曝露マウスの肺病理像を解析したところ、緑膿菌感染により炎症像が認められ、炎症症状は 30~100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の DE 濃度領域で濃度依存的な悪化が認められた。DE の免疫系への影響を微生物感染防御の視点から解析し、短期曝露後による免疫能の低下を微生物のクリアランス能が落ちていることから証明した。

Fujimaki ら (2005)は、IgE 低応答の C57BL/6 マウスを用いて DE あるいはフィルター処理ガス曝露前日にスギ花粉抗原を腹腔投与した後、曝露を 5 週間行った。曝露は、1.0mg /m³ の DE と、1.0mg /m³ の DEP をフィルター処理した排気ガスを用い、12 時間/日の条件で行った。曝露開始 14 日目および 35 日目(5 週間目、排気ガス吸入曝露最終日)にスギ花粉抗原を点鼻投与した。翌日、頸部リンパ節及び血液を採取し、頸部リンパ節は分散後培養した。頸部リンパ節細胞培養時にスギ花粉抗原添加・無添加群とし、各種実験に供した。

サイトカイン発現量は DE 曝露群では変動はなかったが、除じん排ガス曝露群で MIP-1 α および TARC(thymus and activation-regulated chemokine)発現量が対照群に比べ有意に増加した。また、血漿中スギ花粉特異的 IgG2a 抗体価が DE 曝露群、除じん排ガス曝露群ともに対照群と比較し、有意に増加し、スギ花粉特異的 IgG1 抗体価は両者とも有意に低下した。DE の花粉症増悪を検討した研究であり、排ガス全体と除じん排ガスとの影響の差異を評価しているが、全排ガス曝露群より除じん排ガス曝露群のほうで影響が強く出ている。この点に関し、ガス状成分が影響すると述べている。

Penney ら (1981)は、ラットとモルモットの 1 ヶ月齢のものを用いて、心臓、血液への DE 曝露の影響について検討した。DE 曝露は、250、750、1,500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で、20 時間/日、5.5 日/週の条件で、ラットは 13、16.7、25.7、42、52、78 週間、モルモットは 6、13、17、26、42、52、78 週間行った。平均粒径は、 $0.19 \pm 0.03 \mu\text{m}$ であった。各実験に供した動物数は、バラツキがあり 2~13 匹を用いた。その結果、ラットとモルモットとともに、清浄空気群に比べすべての曝露で心臓の湿重量、右心室、左心室、あるいは体重換算重量でも有意な差はみられず、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血球数などの血液指標においても影響は認められなかった。

Karagianes ら (1981)は、Wistar ラット(雄)を用いて、DE と炭粉曝露の生体影響を調べた。曝露条件は、6 時間/日、5 日/週で最長 20 ヶ月間行い、曝露群としては DE 曝露のみは 8.3 mg/m^3 の濃度で、炭粉のみの曝露は低濃度が 6.6 mg/m^3 、高濃度が 14.9 mg/m^3 で行い、混合曝露では DE 曝露は 8.3 mg/m^3 の濃度、炭粉曝露は 5.8 mg/m^3 で行った。粒径は、DE では 0.71 μm MMAD、炭粉では 2.1 μm MMAD であった。その結果、4、8、16 ヶ月曝露ラットのヘマトクリット値、赤血球、白血球数に清浄空気曝露の対照群と比べ差はみられなかった。また、CO ヘモグロビンレベルは 4 ヶ月 DE 曝露で 3.7%、20 ヶ月曝露で 5%増加がみられ、混合曝露群の 4 ヶ月曝露で 4.1%、20 ヶ月曝露で 5.6%の増加がみられた。

Heinrich ら (1982)は、Syrian Golden ハムスターに粒子濃度 3.9 mg/m^3 (MMD 0.1 μm) の DE 曝露を 8 時間/日、5 日/週で 2 年間にわたり行った。血液・生化学検査は、曝露 29 週目に実施し、GOT、LDH、ALP、尿素の値は高値を示したが、赤血球数は減少がみられた。

Brightwell ら (1986)は、F344 ラットを用いて 0.7、2.2、6.6 mg/m^3 の粒子濃度で 16 時間/日、5 日/週の条件で 2 年間 DE 曝露を行った。その結果、高濃度曝露で血中尿窒素上昇、ALP(alkaline phosphatase)と γ -GTP の上昇、コレステロール値の低下がみられた。また、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、赤血球と白血球の増加、リンパ球数の減少もみられた。

3.1.4 酸性物質、炭素などによる影響

Ziegler ら (1994)は、 NH_4NO_3 エアロゾルが肺胞マクロファージに及ぼす影響について検討した。F344 ラットへ $90 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の NH_4NO_3 ($0.6 \mu\text{m}$ MMAD)、あるいは $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の道路粉じん ($0.6 \mu\text{m}$ MMAD) を 4 時間/日、4 日/週の条件で 8 週間の鼻部曝露を行った。その後、肺胞マクロファージを採取し、細胞表面上での Fc レセプターの発現をコンフォーカルサイトメーターで測定したところ、道路粉じん曝露では発現の抑制がみられたが、 NH_4NO_3 曝露では対照群と差がなかった。

Zelikoff ら (1994)は、ウサギ(New Zealand White ラビット 雄)に 500、750 あるいは $1,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の硫酸エアロゾル ($0.3 \mu\text{m}$ MMAD) で 2 時間/日、4 日間の鼻部曝露を行った。BALF 中の細胞数、マクロファージ数、多核白血球(PMN)数には曝露群と対照群との間に差はみられなかった。In vitro での肺胞マクロファージへの *Staphylococcus aureus* の取り込みは、 $1,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 硫酸エアロゾル曝露群での培養 24 時間後に有意な減少がみられ、細胞内での殺菌活性においてもやはり 24 時間後に 750 あるいは $1,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 硫酸エアロゾル群で減少がみられた。肺胞マクロファージからの $\text{TNF-}\alpha$ と $\text{IL-1}\alpha$ 産生においては、硫酸エアロゾルのみでは産生への影響はみられなかった。LPS 刺激による $\text{TNF-}\alpha$ 産生は 750 あるいは $1,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 硫酸エアロゾル群で抑制がみられ、 $\text{IL-1}\alpha$ 産生は $1,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 硫酸エアロゾル群で抑制がみられた。

Jakab ら (1996)は、大気中の SO_2 が一定の湿度のもとで硫酸塩に変化して影響を及ぼすことを明らかにするために、 SO_2 と CB エアロゾルを種々の湿度のもとで混合曝露して肺胞マクロファージの Fc レセプターを介した貪食能への影響について調べた。スイスマウス(雌)へ 10 ppm SO_2 と $10 \text{mg}/\text{m}^3$ の CB を種々の湿度のもとで 4 時間鼻部曝露して CB 上での硫酸塩濃度を測定した結果では、湿度 85%のときに有意に増加した。次に、湿度 85%のときに SO_2 濃度を変えて CB 上の硫酸塩濃度と貪食能との関連を調べると、硫酸塩濃度に依存した貪食能の低下がみられた。また、10 ppm SO_2 、 $10 \text{mg}/\text{m}^3$ の CB、85%の湿度条件で 4 時間曝露後の時間経過による変動を調べると、曝露 1 日後から 7 日後まで貪食能の有意な低下が認められた。

Ohtsuka ら (2000)は、上記 Jakab ら (1996)と同様の曝露条件で、マウス系統間での差異、 O_3 や NO_2 曝露での影響との関連性について検討した。BALF 中での炎症性細胞の比較では、マクロファージ数については AKR/J マウスで硫酸塩コートされた CB による有意な増加がみられ、多核白血球(PMN)数においては C3H/HeJ マウスと C3H/HeOuJ マウスにおいて曝露による有意な増加がみられた。マクロファージによる貪食能への影響については、C57BL/6J マウスでもっとも低下がみられ、C3H/HeJ マウスでは影響がみられなかつ

た。この食食能でみられた感受性のランクは、O₃曝露による PMN 数のランクとの類似性が認められた。

Kleinman ら (2003)は、ラットに 1 群:清浄空気、2 群:0.2ppmO₃、3 群:低濃度カーボン粒子+低濃度(NH₄)HSO₄+O₃、4 群:高濃度カーボン粒子+高濃度(NH₄)HSO₄+O₃ を曝露して複合影響を検討した。その結果、①BrdU 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 群、4 群で低下、呼吸バーストは 3 群、4 群で低下が認められた。O₃ 単独より O₃ と微小粒子の混合物のほうが毒性があることを示した。

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 μg/m³(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。

3.2 気管内投与

3.2.1 CAPs 都市大気の粒子状物質の曝露

Gavett ら (2003)は、マウスを用いてヘットシュテット(Hettstedt) (アレルギー体質の子供数が多い都市)とツェルブスト(Zerbst) (対照)由来の粒子を気管内投与し、その影響を比較検討した。投与量は、10 μg/50 μl saline とした。その結果、ヘットシュテット由来 PM_{2.5} 前処置(感作)マウスの方が 14 日後の OVA 抗原チャレンジ後により強い気道の反応性所見(気道閉塞による減少した流入空気量)、メサコリンへの反応、肺の炎症所見を示した。両粒子の組成では、Zn、Mg、Pb、Cu、Cd などの含量に違いがみられており、これら成分の違いがアレルギー反応の違いに関与していることを示唆した。二つの異なる都市由来の PM_{2.5}(金属の含有量の違いに注目)の肺への影響を動物実験により比較したところ、疫学データと同様の結果が得られ、そのメカニズムとして、PM_{2.5} の金属組成が肺のアレルギー性炎症に影響を与えていると述べている。

Rivero ら (2005)は、38 匹の健康な Wistar ラットに麻酔をかけたのち、挿管し、blank filter、1ml の蒸留水にサンパウロ由来 PM_{2.5} を 100μg と 500 μg 希釈した溶液(PM100、

PM500)を各々気管内投与した。気管内投与の 24 時間後に、形態学および乾湿重量比分析のため、血液、心臓、肺のサンプルを採取した。PM_{2.5}は次の構成要素：S、As、Br、Cl、Co、Fe、La、Mn、Sb、Sc、Th から成っていた。総網状赤血球はPM100 群と PM500 群で大きく増加し(p<0.05)、一方ヘマトクリット値は PM500 群で増加した(p<0.05)。区分された好中球やフィブリノゲンの定量値は大きく減少を示し、一方、リンパ球の数値はPM100 群で増加した(p<0.05)。肺胞内肺細動脈の管腔/壁の割合(L/W 比)の投与量依存的減少がPM 群で観察された(p<0.001)。細気管支周囲動脈の L/W 比は PM500 群で大きく減少していた(p<0.001)。心臓における乾湿重量比の大きな増加は PM500 群で観察された(p<0.001)。結論として、サンパウロ由来の環境粒子状物質は肺と心臓の組織学的変性を引き起こした。肺の脈管構造は明らかに粒子状物質の気管内投与に影響され、健康なラットにおいて重大な血管収縮に至った。本研究は、急性期において組織炎症の細胞マーカーが明らかな変化を示さない場合でさえも、環境粒子状物質の曝露が肺と心臓の変性を引き起こす可能性を示唆していた。

Liu と Meng (2005)は、山西省太原市(中国)で採取した PM_{2.5}を 1.5~37.5 mg/kg(体重)の投与量でラットに単回、気管内投与し、各種抗酸化物質の組織濃度と過酸化物質を測定した。その結果、肺において、検討した全ての抗酸化物質(SOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオン)の量が PM_{2.5}の濃度に依存して低下した。また、肝臓、腎臓中の全ての抗酸化物質濃度が低下した。心臓および脾臓ではグルタチオン濃度の低下が、脳では SOD、カタラーゼ、グルタチオン濃度の低下が、精巣ではグルタチオンペルオキシダーゼ及びグルタチオン濃度の低下が認められた。さらに各種組織の過酸化物質を測定した結果、心臓、肝臓、肺、精巣においてチオバルビツール酸反応物質の上昇が認められた。本研究結果から、PM は全身の各種組織内抗酸化物質の濃度を低下させ過酸化脂質量を増加させることを示し、呼吸器、心血管系だけでなく、免疫系や生殖系に影響を与えることが示唆された。

3.2.2 ROFA・燃焼に伴って発生する粒子状物質の影響

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。Brown Norway ラットへ、生理食塩水(0.3ml)、ROFA(1mg)、NiSO₄(105.12 μg)、FeSO₄(58.49 μg)、VSO₄(98.2 μg)、金属混合(Ni+Fe+V)、アレルゲン：ダニ(5~10 μg)を気管内投与した。ROFA や金属は単回投与し、アレルゲンは反復投与した。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。ROFA やそれに含まれる金属成分(V、Ni、Fe、それらの混合)の水溶液は、ダニ抗原によるアレルギー性喘息を

悪化する可能性がある。

Lambert ら (2001)は、ROFA あるいは TNF 処理したラットではハウスダスト特異的 IgE 抗体価が上昇し、また、気管支収縮も ROFA あるいは TNF 処理により亢進することを報告した。各物質の投与量は、ROFA で 1,000 μ g/個体、TNF で 2 μ g/個体、ダニ抗原で 5 μ g/個体、抗 TNF 抗体で 50 μ g/個体であった。さらに、BALF 中の細胞分化を検討したところ、刺激 16 日後で、ROFA、TNF 処理群で細胞分裂が活発になっていたが、刺激 21 日後では特に変動は認められなかった。さらに BALF 中の好酸球数の変化を検討したところ ROFA、TNF 処理 2、16 日後に増加が認められた。BALF 中のサイトカイン量を検討したところ、IL-13 量が ROFA、TNF 処理により増加した。また、抗 TNF 抗体処理により ROFA による好酸球誘導が抑制され、IL-5 産生量、IL-13 産生量も抑制された。これらのことから、ROFA 処理が好酸球の誘導、Th2 タイプサイトカインの誘導、ハウスダスト特異的 IgE 抗体価の亢進を惹起し、アレルギー性炎症を増悪すること、さらに TNF が大気汚染物質のアジュバント作用と関与していることを本研究では示した。

Kodavanti ら (2002a)は、WKY ラットと SHR に ROFA を鼻部吸入及び気管内投与(0、1.0、5.0 mg/kg(体重))し、心肺血管系への影響を検討した。ROFA は SO₄、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。肺病理では、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広い範囲でみられ、中隔肥厚と関連した肺炎がみられた。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 の評価において、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。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。Plasma viscosity 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。

Hollingsworth ら (2004)は、C57BL/6TLR4+/+マウス、C57BL/6TLR4-/-マウスに環境毒素(ROFA、LPS、O₃)を気管内投与(20 ng/個体)して、肺機能、炎症について解析した。LPS 曝露に対しては、明らかに C57BL/6TLR4-/-マウスでは炎症誘導や気道抵抗上昇に反応がみられずマウス間で差があった。ところが、ROFA や急性 O₃ 曝露に対しては C57BL/6TLR4+/+マウスと C57BL/6TLR4-/-マウス間で差がみられなかった。次に、2ppm、3 時間の O₃ 急性曝露から 0.3ppm、72 時間の亜急性曝露に条件をかえて実験すると、気道抵抗の上昇に差がみられ、炎症にかかわる TLR4 の働きが曝露条件で変化することが示された。

Nurkiewiczら (2004)ら(2004)は、ラットへのROFA気管内投与24時間後の、細動脈への影響を検討した。SDラットにROFA(0.1、0.25、1、2mg/個体)、TiO₂(0.25mg/個体) および生理食塩水を気管内投与した結果、ROFA投与群でBALF中の多核白血球数とアルブミン・LDH濃度の上昇(ROFA=1、2mg)、肺泡マクロファージによる活性酸素産生量の増加(ROFA=2mg)が認められた。次に細動脈直径を測定するため、ラットに麻酔をかけた後に気道を確保し、脊柱僧帽筋を灌流した。脊柱僧帽筋細動脈の直径を測定する部位の上流からマイクロピペットで動脈内にカルシウムイオノフォア(A23187)を注入した時の血管の直径をintravital microscopyで測定した。その結果、気管内ROFA投与量の増大とともに血管内皮依存性の血管拡張阻害が認められた。同濃度のROFAとTiO₂では血管拡張阻害効果は同程度であった。また、一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤であるL-NMMAを加えたときの血管拡張阻害効果に比べて、ROFA投与群ではより大きな阻害がみられたことから、ROFAはNO依存性と非依存性の血管拡張作用を示した。NOドナーであるニトロプルシドナトリウムを電氣的に僧帽筋にイオン導入したところ、ROFA投与群と生理食塩水投与群で平滑筋のNOに対する感受性に差は認めなかった。Intravital microscopyの結果、ROFA投与群では細静脈内皮での白血球の接着およびローリングが顕著に認められた。以上の結果は、肺炎症が認められない濃度のROFA曝露24時間後でも、血管内皮依存性の細動脈拡張阻害が起こることを示していた。これにより、全身性の微小血管機能の阻害が引き起こされている可能性が示唆された。

3.2.3 DEP やガソリン排気による影響

Fujimaki ら (1994)は、DEP と IgE 産生との関連について明らかにするために、BALB/c マウスに OVA 抗原とともに DEP を 0.3mg/個体の投与量で気管内投与して縦隔リンパ節細

胞での細胞増殖、サイトカイン産生を調べた。細胞増殖反応は、OVA 群に比べ DEP+OVA 群で明らかに亢進し、IL-4 産生、抗 OVA IgE 抗体価共に DEP+OVA 群で高い値を示した。DEP による免疫増強効果を示唆している。

Yang ら (2003)は、B6C3F1 マウス(雌)に DEP を 2 週間あたり 3 回気管内投与後、最初の投与から 2、4 週間後に解剖し、毒性と免疫応答について調べた。15 mg/kg(体重) DEP 曝露群で 2、4 週間後に肺重量が増加した。DEP 曝露後 2 週間で SRBC 応答性 IgM 抗体産生細胞の数が減少した。また、CD4+、CD8+ T 細胞の両方とも数及び脾細胞あたりの割合が減少した。DEP 曝露後 2 週間で T 細胞マイトジェンであるコンカナバリン A 応答性、IL-2、IFN- γ が減少した。以上から、DEP を短期間呼吸器系曝露したマウスでは、T 細胞とおそらくマクロファージを介した免疫抑制反応が認められた。

Nemmar ら (2003a)は、DEP をハムスターの気管内に投与し、肺の炎症、血栓形成及び血小板の活性化(Closure time)を調べた。DEP 投与群(5、50、500 μ g)では、LDH を除いて BALF 中の多核白血球(PMN)、タンパク質及びヒスタミンが生理食塩水群に比べ有意に増加し、更にタンパク質及びヒスタミン濃度と DEP 投与量との間に量反応関係が認められた。同じ投与量の DEP を用いた *in vivo* 実験では、DEP 群で静脈及び動脈の血栓形成が増大し、静脈では DEP 投与量との間に量反応関係が認められた。動脈での血栓形成及び閉塞は静脈よりも早く起こり、一方、静脈での血栓は動脈に比べ徐々に現れ徐々に消失した。血小板活性化能を測定した *ex vivo* 実験では、DEP 50 μ g 投与群で 30 分、60 分の時点で closure time の短縮が認められた。また、*in vitro* 実験では、DEP 非処理の動物から得られた血液に DEP を添加すると、0.5 μ g/mL 以上の DEP 群で closure time の有意な短縮がみられ、その短縮は DEP 濃度に依存していた。本研究の結果は DEP による肺の炎症、静脈及び動脈における血栓の形成及び血小板の活性化が起こることを示している。この DEP への曝露による血小板の活性化は、大気汚染物質への曝露後、血栓症が起こると言う臨床的報告と一致した。従って、この研究結果は、都市部での大気中粒子状物質が心血管疾患の罹患率及び死亡率の増加に寄与している可能性を示唆している。

Nemmar ら (2004)は、微小粒子曝露と血栓症との関連について明らかにするために、DEP(粒子量 5、50、500 μ g)をハムスターに気管内投与し、10 分後ローズベンガル溶液を静脈内へ投与し、大腿静脈を 2 分間グリーンライトで照射し、血栓を顕微鏡カメラで 10 秒ごとに 40 分間記録した。血小板機能アナライザー PFA-100 で closure time を解析した。DEP 投与では、静脈血栓は曝露量とともに増加し、動脈血栓は 50 μ g で増加した。closure time は DEP 50 μ g 投与で、投与なしに比べ投与後 30 分、60 分で短縮した。DEP 曝露後の BALF では、多核白血球(PMN)・総タンパク質・ヒスタミンがいずれも有意に増加していた。この結果は、疫学的に説明されている大気汚染と急性の循環器への影響への関係性

のメカニズムについて説明するものであると述べている。

Singh ら (2004)は、DEP の肺毒性の要因を知る目的で異なる 2 種の DEP を、 $25 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ saline、または $100 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ saline の投与量で、マウスの咽頭内に単回投与し、BALF 中の急性炎症マーカーを解析した。いずれの DEP も急性炎症を引き起こした。化学、物理学的性状の異なる 2 種類の DEP により、それぞれ異なる肺毒性結果が得られた。以上より、DEP 毒性実験のデータは、用いた DEP の由来(組成)により異なることが示された。

Goto ら (2004)は、粒子状物質のウサギ(ラビット)気管内投与による骨髄からの単球の放出とその放出に関与する肺胞マクロファージの役割について検討した。粒子の質的差についても言及している。対照群では生理食塩水を $1\text{ml}/\text{個体}$ で投与し、EHC-93 群では $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の生理食塩水を $1\text{ml}/\text{個体}$ で投与し、Inert carbon(CC)群では $10\text{mg}/\text{ml}$ の濃度の生理食塩水を $1\text{ml}/\text{個体}$ で投与した。また、ヒト肺胞マクロファージ(AM)対照群では $0.6\text{ml}/\text{kg}$ (体重)、EHC-93+AM 群では $0.6\text{ml}/\text{kg}$ (体重)、CC+AM 群では $0.6\text{ml}/\text{kg}$ (体重)を投与した。EHC-93、CC 投与により、両者で約 20%の肺胞マクロファージが粒子を貪食していた。投与 12 時間後から血液中細胞の増加を認め、単球数では 3 群間に有意差を認めなかったが、白血球総数と杆状核白血球が EHC-93 群で著増した。骨髄からの BrdU でラベルした単球の血液中への放出は、EHC-93 と CC 群で投与後 8~12 時間後に速やかに増加した。EHC-93 とヒト肺胞マクロファージの 24 時間培養した上清では、GM-CSF、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、MCP-1 が増加した。また、上清をウサギ気管内に投与したところ、EHC-93 群で白血球数と杆状核白血球が増加し、また BrdU ラベル化単球の血液中への速やかな放出を認めた。単球の骨髄での移行時間は、対照群に比較して EHC-93 群、CC 群で短縮 ($p<0.05$)したが、培養上清投与では EHC-93+AM 群でのみ有意に短かった。これらの結果から、大気中粒子状物質(EHC-93)は肺胞マクロファージのメディエータの産生放出を促し、それらに含まれるサイトカインが骨髄からの単球の放出を促進していることを報告している。この結果は、肺細胞の粒子貪食が単球応答に関与し、粒子の成分が全身性炎症反応の強度に寄与していることを示唆している。大気中粒子曝露後の骨髄からの単球の放出とメディエータの産生が、局所並びに全身性の病態で重要な役割を演じている可能性を示していた。

Yokota ら (2005)は、ラットに DEP を単回気管内投与し、処理後の活性酸素産生量、炎症細胞数、サイトカイン濃度(血中、BALF 中)の変動を検討した。その結果、好中球数の変化が 1mg 投与群では認められず、 5mg 投与群で誘導が認められた。好中球数の誘導は DEP 投与 6 時間後から 24 時間後まで認められ、48 時間後に投与前のレベルに低下した。さらに BALF から好中球を単離し、TPA にて刺激し活性酸素産生量を検討したところ、DEP 処理 12 時間後に活性酸素産生量は増加し、48 時間後には有意に低下した。CINC-1、MIP-2、

TNF 産生量は DEP 処理により血中、BALF 中ともに増加した(TNF は BALF のみ)。DEP 処理による炎症細胞数の経時変化を検討したところ、投与 0.5 時間後ではとくに変動が認められず、1 時間後にマクロファージ及びリンパ球数が増加した。リンパ球の誘導は検討した 4 時間後まで時間依存的に増加した。本研究結果から、DEP の処理により、炎症細胞数、活性酸素産生量、サイトカイン濃度が増加するが、その変動は処理時間により異なるものもあることが示唆され、酸化ストレスに関連する全身性障害が起きる可能性を示した。

3.2.4 酸性物質、炭素などによる影響

Lambert ら (2003b)は、マウスに CB を $40 \mu\text{g}$ /個体の量で気管内投与後、Respiratory syncytial virus(RSV)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。

Win-Shwe ら (2005)は、マウスに、14nm と 95nm の 2 種の超微小粒子を 4 回反復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。投与濃度を $0 \mu\text{g}$ /個体、 $25 \mu\text{g}$ /個体、 $125 \mu\text{g}$ /個体、 $625 \mu\text{g}$ /個体とし、曝露の頻度を 1 回/週とし、4 回曝露した。最終注入 24 時間後、または 4 時間後に観察を行った。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-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL-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。⑤ $125 \mu\text{g}$ 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CCL2、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。以上、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。

3.2.5 その他の粒子による影響

Granumら(2001b)は、粒子状物質の中で核となる成分によるIgE産生増強効果を検討するために、粒径0.5 μm のポリスチレン(PSP)、粒径0.05~0.5 μm のpolytetrafluoroethylene(テフロン)、粒径0.2 μm のTiO₂と無定形のシリカ粒子の4種をOVAとともにNIH/Olaマウス(雌)の腹腔内に投与して抗体産生を調べた。その結果、いずれの粒子も抗原特異的IgE、IgG2a産生と総IgE抗体価を増強した。同様の結果は、点鼻投与、気管内投与でも見られた。

Granumら(2001a)は、粒子状物質のアジュバント効果における核となる物質の関与を明らかにするために、0.1 μm の粒径のポリスチレン粒子(PSP)を6~8週齢のNIH/Olaマウス(雌)に点鼻投与、気管内投与、腹腔内投与してその後の抗原投与に対する抗原特異的反応を測定した。その結果、OVA抗原に対するIgE産生、総IgE抗体価ともにPSPを抗原と共に投与した群で投与経路に関係なく増強がみられた。また、PSPを抗原投与前に投与して抗原との投与間隔をあけても抗体価の上昇が認められた。このことは、粒子が抗原と同時に吸入されなくても抗原特異的な反応が増強することを示唆している。

Yokohiraら(2007)は、ラットに石英、hydrotalcite、potassium octatitanate fibers、palladium oxide、CBを気管内投与(粒子4mg/個体を0.2ml生理食塩水に溶解、CBはPG-CMC(10% propylene glycol and 1% sodium carboxymethyl cellulose in saline)で溶解)し、1日後、肺重量は石英、hydrotalcite、potassium octatitanate群で増加を報告した。28日後ではすべての微小粒子状物質の群で増加した。potassium octatitanate、palladium oxide、CBで投与後1日目、さらに28日後の石英投与群の肺胞でマクロファージに顆粒様変化が見られた。石英投与群は、1日後好中球の浸潤の程度が強く、potassium octatitanate、palladium oxideが類似した結果を示した。BrdU陽性細胞の数とエリアは石英投与群で高かった。potassium octatitanate投与群では1日後は高かったが、28日後には全ての群で低下した。iNOSは、石英投与群が1日後、28日後とも他の群より高い値を示した。

3.3 その他の曝露経路

Muranakaら(1986)は、DEPとスギ花粉症発症との関連について明らかにするために、

BDF1 マウス(雌)に種々の濃度の DEP と抗原(OVA ; DNP 標識 OVA ; スギ花粉抗原)を腹腔内に投与して、抗原特異的な IgE 産生について受身皮膚アナフィラキシーで調べた。DEP 濃度は、20、200、2,000 μg /個体で、この粒子の 52%は 1 μm 以下の粒径であった。その結果、DEP 粒子を抗原と同時投与すると抗原単独投与群に比べすべての抗原特異的 IgE 産生を有意に亢進させる作用がみられ、スギ花粉症の増加に DEP のアジュバント作用が関連する可能性が示唆された。

Suzuki ら (1993)は、初めの実験では BDF1 マウスを 3 群に分け 2 週間間隔で 6 回腹腔内注射して免疫した。1 群は OVA のみ、2 群は OVA とピレン、3 群は OVA と DEP を粒子濃度 1mg/個体で投与した。抗 OVA IgE 抗体産生は OVA 単独投与と比較し、ピレン、DEP 添加群では増強が見られた。二番目の実験では 1 群に 10 μg のスギ花粉抗原のみ、2 群に 10 μg のスギ花粉抗原とピレンを初めの実験と同様に免疫した。スギ花粉抗原とピレン投与群では単独投与群と比較して強い IgE 抗体産生が認められた。腹腔のマクロファージの化学発光分析の結果、ピレンにより試験管内試験で明らかに活性化がみられた。この結果は、DEP に含まれるピレンは抗原で感作されたマウスの IgE 産生においてアジュバントとして働くことを示唆している。

(1999)は、DEP の鼻腔内投与により、A/J マウス群ではアセチルコリンに対する気道反応性の上昇を報告した。C57BL/6 マウス群では DEP 投与 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。

Løvik ら (1997)は、BALB/c マウスを用いて、DEP と CB の局所リンパ節での免疫応答への影響について検索した。DEP は平均粒径 0.03 μm で 0.1mg/個体を OVA 抗原と共に足蹠に皮下注射し経時的に 20 週後まで膝窩リンパ節の種々のインデックス(湿重量、細胞数、細胞増殖)を測定した。DEP+OVA 投与後 4~6 週後まではリンパ節の指標で有意な増加がみられ、CB を OVA と共に投与するとやはり DEP には劣るものの増加がみられた。抗 OVA IgE 抗体価も DEP+OVA で高い値が得られた。今回の結果から、DEP と CB の局所への投与でアジュバント効果がみられ、CB での結果から、DEP の効果は PAH 類のみならず核としてのカーボン分画にもあることが示唆された。

Yoshino ら (1998)は、食事アレルギーと環境汚染物質との関連について明らかにするた

めに、経口トレランスの誘導に DEP 粒子が及ぼす影響について検討した。DBA/1J マウスを用いて、ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) の 10mg を経口で 5 日間連続投与し 1 日後に 100 μ g を皮下投与して経口トレランス誘導の系を作成した。種々の DEP(平均粒径 0.4 μ m) を HEL の経口投与直前に消化管内投与して影響を検索した。その結果、抗 HEL IgG1、IgG2a 抗体価は HEL 投与時に対照として生理食塩水を投与した群に比べ、HEL 経口投与群で有意に低下した。しかしながら、経口時に 0.1、1.0mg DEP を投与した群では抗体価の濃度依存的な増加がみられた。また、遅延型過敏反応の誘導抑制においても DEP の抑制解除の作用がみられた。鼠蹊部のリンパ節における IL-4 と IFN- γ 産生においては、トレランスの誘導により低下がみられたが、DEP 投与はその低下を抑えた。以上の結果より、DEP が経口トレランスの誘導を抑制する働きのあることが示された。

Yoshino と Sagai (1999a)は、コラーゲン誘導関節炎への DEP の影響について検討した。DBA/1J マウス(雄)に子牛関節軟骨から抽出した type II コラーゲン(CII)とフロイント完全アジュバントを尾に皮下注射し 21 日後に再度同量注射した。DEP は 0.1、0.3、1.0mg/ml の濃度で 50 μ l の PBS に分散し 2 日間隔で 20 日まで点鼻した。組織学的診断からコラーゲン誘導関節炎の発症頻度、重症度ともに DEP 点鼻群で増加していた。血清中の抗体検査ではこの疾患の増強は抗 CII IgG 抗体と IgG2a 抗体の増加と関連していた。DEP 点鼻群では脾臓細胞の CII に対する増殖反応も亢進していた。DEP 点鼻群の脾臓細胞から IFN- γ 、IL-2、IL-4、の産生が増加していた。コラーゲン誘導関節炎発症後から DEP を点鼻した場合でも同様の結果であった。この結果は DEP 曝露が自己免疫疾患を増悪することを示唆している。

Yoshino と Sagai (1999b)は、DEP の経口投与による免疫系への影響について DBA/1J マウス(雄)を用いて検討した。DEP を 0.01、0.1、1.0 μ g/個体の量で投与した。その結果、抗原 HEL のみの経口投与では誘導されない抗体産生が DEP と HEL の投与により認められ、抗原特異的 IgG1 と IgG2a の抗体価の上昇がみられた。また、脾臓細胞によるサイトカイン産生では、IFN- γ と IL-4 の Th1 と Th2 の両タイプのサイトカイン分泌増加が認められ、DEP が消化管での免疫機能にアジュバント効果を示すことが明らかとなった。

van Zijverden ら (2000)は、粒子状物質成分の一次免疫応答、二次免疫応答への影響について BALB/c マウス(雌)を用いて検討した。一次応答では、DEP(粒径<0.5 μ m)、CBP (粒径<0.5 μ m)、シリカ粒子(SIP、粒径 1~5 μ m)の 1mg を抗原 TNP-OVA と共に皮下に投与してリンパ節でのサイトカイン産生細胞数や産生能について測定すると、DEP と CBP を抗原と共に投与した群で IL-4 産生の増加がみられた。二次免疫応答は一次免疫の 4 週後に抗原を点鼻投与して誘導し、抗体産生細胞数や血清中の抗体価を調べた。その結果、DEP 投与は IgG1 と IgE レベルを上昇させ、CBP は IgG1、IgE、IgG2a の抗体価を上昇させた。

ところが、SIPはIgG2aのみを上昇させ、粒子成分の違いによりTh1とTh2タイプの反応誘導に差のあることが明らかとなった。

van Zijverden と Granum (2000)は、粒子成分の違いによる免疫応答の誘導の違いを明らかにするためにBALB/cマウス(雌)とNIH/Olaマウス(雌)にDEP、CBP、あるいはシリカ粒子(SIP)を抗原TNP-OVAと共に、それぞれ1.0mg/個体を皮下に投与し、ポリスチレン粒子(PSP、粒径 $0.2\mu\text{m}$)は抗原OVAと共に気管内、あるいは腹腔内投与を行い、抗体価を比較した。その結果、SIPはTh1タイプの誘導を、DEPはTh2タイプの誘導を、またCBPとPSPはTh1/Th2タイプの混合反応を誘導した。これらのことから、粒子の大きさや化学成分組成の違いがアジュバント効果に関与していると述べている。

Dybing ら (2004)は、4都市(アムステルダム、ウッチ(Lodz、ポーランド)、オスロ、ローマ)の大気粒子をOVA($50\mu\text{g}$)とともにマウス足蹠に注射($100\mu\text{g}$)すると、膝窩リンパ節の細胞増殖係数が増加することを示した。血中の-OVA特異的IgEも増加を示した。PM_{2.5}の方がPM₁₀より強いアジュバント効果を示した。抗原特異的IgG2aがPM_{2.5}とPM₁₀の一部で有意に増加した。都市によるアジュバント効果の差はなかった。MIP-2の誘導はPM₁₀の方がPM_{2.5}より強かった。

4. その他(非発がん)の影響

4.1 生殖器への影響

Lee ら (1980)は、SD ラット(雄)に 13 倍に希釈した DE を 20 時間/日ずつ、42 日間曝露し、肺、肝臓、精巣および前立腺の aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)活性と epoxide hydrolase(EH)活性の変化を調べた。その結果肝臓が最大の AHH 活性を示し、対照群の 1.3 ~1.4 倍に増加していた。一方、対照群に比べて最も増加率が高かったのは前立腺で、曝露 15 日目で 4.5 倍に増加し、全曝露期間を通じて高い値を維持していた。精巣での活性変化は認められなかった。EH 活性もすべての臓器で有意な変化はなかった。本実験は吸入実験で生殖器系にも影響が及んでいることを認めた。しかし、DE 濃度が総炭化水素濃度 14.2ppm と示されているだけで、DEP、NO_x等の濃度は測定されていない。

Pereira ら (1981)は、DE 中の化学変異原物質が精巣に到達しての影響を調べるために、DEP 濃度として 6mg/m³の DE を A マウス(雌)に 8 時間/日、31~39 週間曝露させて精子の形態異常を調べた。エオジン Y 染色をほどこして精子の頭部異常を定量化し、対照群との間に有意な変化はなかったと報告している。

Pepelko と Peirano (1983)は、CD-1 マウスの雌雄各 100 匹に、12mg/m³という極めて高濃度の軽量級ディーゼルエンジンからの DE を、8 時間/日、7 日/週ずつ吸入させた実験で次世代に及ぼす影響を調査した。その結果曝露による次世代への影響は軽微であり、全体の繁殖能力と生存率にも著しい変化はなかったと報告している。また、6mg/m³の DE を、T マウス雄 100 匹、雌 54 匹に、8 時間/日、7 日/週、7 週間吸入させる実験を行い雌雄いずれにも著しい優性致死影響はなく、唯一、卵巣黄体数の顕著な減少を認めた。粒子状物質濃度として 6mg/m³の重量級ディーゼルエンジンからの DE を、SD ラットおよびウサギ(ニュージーランドホホワイトラビット)に 8 時間/日、7 日/週ずつ吸入させる実験を行った。実験は、妊娠 5~16 日のラット(20 匹)、妊娠 6~18 日のウサギ(20 羽)を用いて行い、同じ母親から生まれた仔の生存胎仔数、死亡胎仔数、体内に吸収され子宮に吸収痕を残す胚吸収、着床部位、黄体、胎仔の平均体重などは、対照群との間に著しい差が認められなかったと報告している。

Quinto と de Marinis (1984)は、DEP を体重 kg 当り 50、100、200mg ずつ、5 日間続けて、腹腔内に注射した実験を行い、C57B1/6 マウスと C3H マウスの第 1 代 F₁ マウスで、精子数の減少と睾丸重量の減少、精子奇形等が認められた。200mg 投与群においては、対照群に比べ 8 倍の奇形増加を示し、精子数の著しい減少も認められた。

Lewis ら (1986)は、15 匹のカニクイザル(cynomolgus monkey)に DEP として 2mg/m³の DE を、7 時間/日、5 日/週、2 年間曝露させる実験を行った。その結果、精子の運動性

(motility)と運動速度は対照群と類似していたと報告されている。

Watanabe と Oonuki (1999)は、DE が成長期のラットの生殖系、内分泌系に及ぼす影響を調べた。実験は粒子濃度として 5.63mg/m³(4.1ppm NO₂、8.10ppm NO)の濃度の総排気ガス(I 群)と粒子をフィルターで除いた除粒子排気ガス成分(II 群)および清浄空気(III 群)について行われた。曝露条件は、6 時間/日、5 日/週であり、3 ヶ月間曝露した。血清中の男性ホルモン(テストステロン)と女性ホルモン(エストラジオール)濃度は I、II 群で有意に増加し、卵胞刺激ホルモン濃度は逆に I、II 群でともに有意に低下した。精巣重量は 3 群間で変化はないが、精子産生数と精巣の透過性指標であるヒアルロニダーゼ活性は有意に低下した。卵胞刺激ホルモン濃度と精子産生能力との間に直接的相関が認められたが、精巣のライディッヒ細胞やセルトリ細胞に形態的異常は認められなかった。これらの結果は、DE は副腎ホルモンの分泌を促進し、ゴナドトロピン遊離ホルモンを抑制して、ラットの精子産生を阻害していることを示唆していると考えられる。なお、これらの影響は、除粒子排気ガス成分群で若干弱まる傾向はあるが、明瞭に認められたことから、DE のガス成分のほうが粒子状成分より内分泌系攪乱に寄与していると述べている。

Yoshida ら (1999)は、DEP 濃度として 1 時間平均値が 0.3、1.0 および 3.0mg/m³の DE を 12 時間/日で 1~10 ヶ月間 ICR マウス(雌)に吸わせ、精子の運動能力、精子産生能力および精巣の形態変化などを調べた。その結果、精子の運動能力が低下することは認められなかった。しかし、1 日当たりの精子産生能力は DE の曝露期間につれて低下傾向を示し、6 ヶ月目で最も顕著になり、対照群の各々 29%、36%および 53%まで低下し、いずれの値も対照群より有意に低下していた。この精子産生能力の低下は、1 ヶ月間清浄空気に戻すと回復する傾向が認められたが、3.0mg/m³群ではなお 29%低下していた。なお、体重、精巣重量、精巣上体重量などに有意な低下は認められなかった。しかし、精巣組織の光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察では、男性ホルモンを産生するライディッヒ細胞の形態異常が観察された。さらに、DE 吸入マウスでは、黄体形成ホルモン受容体の mRNA の発現量も DEP 濃度に依存して低下した。これらの結果から、男性ホルモンの合成能力が低下したこと、黄体形成ホルモンのホルモン作用発現不全などが関与して精子産生能力が低下したことが示唆されている。

Watanabe と Kurita (2001)は、Fisher ラットを用い妊娠期間中の DE(濃度は粒子:5.63mg/m³、NO₂:4.10ppm、NO:8.10ppm)、粒子を除いた DE および清浄空気に生殖時から妊娠 20 日まで 6 時間/日で曝露を行った。性器-肛門間距離は DE および DEP を除いた DE 群でいずれも清浄空気群に比べ長かった。組織学的な検討から精巣、卵巣および胸腺の分化が遅れかつ乱れていることが見いだされた。妊娠した母獣の血清中のテストステロン濃度は DE および DEP を除いた DE 群のいずれにおいても有意に増加することが見い

だされた。

4.2 神経・行動への影響

Laurie ら (1978)は、SD ラット(雌)に対し、6mg/m³の DEP を含む DE に 20 時間/日、7 日/週で 6 週間曝露すると、自発的な運動の減少が見られることを明らかにした。

Laurie と Boyes (1980)は、新生仔期に 6mg/m³の DEP を含む DE に曝露され(分娩後 17 日間、20 時間/日)、その後清浄空気下で飼育された 15 ヶ月齢の動物では、バーを押して食餌を取る行動の習得率が対照よりも有意に遅くなることを見いだした。

Liu ら (2002)は、ラット(雄)(20 匹)にガソリン二輪車排気ガス(ME)を吸入処理(2 時間/日、2 週間または 4 週間の吸入曝露、濃度の詳述はなし)、あるいはガソリン二輪車排気ガス中微粒子(MEP)を 0.1g/kg(体重)の投与量で気管内投与し、最終投与の翌日に行動薬理学的探索を行った。その結果、運動機能(回転棒からの落下時間で評価)が ME の 4 週間吸入曝露処理及び MEP の気管内投与により低下した。また、運動神経伝導速度の低下、神経におけるナトリウムカリウム ATPase 活性の低下が認められた。これらの結果は、MEP や BaP を経口投与したマウスにおいて同様であった。排ガスあるいは排気微粒子の処理により、運動機能の低下、さらに運動神経伝導速度の低下が引き起こされ、神経・行動に影響が生じる可能性が示唆されたと報告している。

Dorman ら (2004)は、CD(SD)BR ラット(雄、6 週齢、各群 8 匹)に対し、Mn 粒子(平均直径 1.03 ~ 1.12 μ m)を、1 群:0mgMn/m³、2 群:0.01mgMn/m³(0.01 \pm 0.001)、3 群:0.1mgMn/m³(0.098 \pm 0.009)、4 群:0.5mgMn/m³(0.478 \pm 0.042)、5 群:0.1mgMn/m³(hureaulite)の曝露濃度で吸入曝露した。曝露時間は、6 時間/日、5 日間/週、13 週間であった。曝露終了直後および曝露終了後 45 日目で嗅球、線条体、小脳の glial fibrillary acidic protein(GFAP)量と Mn 濃度の測定を行った。GFAP 量は、いずれの部位でも変化は認められなかった。Mn 濃度は、嗅球で曝露直後に増加し、曝露から 45 日経過した後では、4 群(0.5mgMn/m³)以外では濃度差は認められなくなった。小脳では 4 群で曝露直後に、線条体では 3、4 群で曝露直後に増加が認められた。より溶解性の低い hureaulite 型との比較(3 群と 5 群)では、嗅球と線条体で通常型でのみ有意な増加が見られたことから、粒子の溶解性が Mn の脳移行性に重要と示唆された。病理学的検討では、呼吸上皮に穏やかな炎症が認められた。しかし、曝露後 45 日経過した後は、炎症反応の衰退が認められた。

Veronesi ら (2005)は、Apo E (アポリポプロテイン E)は脳内で脂質のトランスポート分子として神経の栄養や防御機能に関わっており、Apo E -/-マウスへのニューヨークの CAPs 曝露が脳に神経病理学的障害を生じさせると報告している。曝露濃度はニューヨークの風上、西北西およそ 50km に位置するニューヨーク州タキシード(Tuxedo)における濃度の 10

倍であった。曝露中の平均 PM_{2.5} 濃度は 110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ で、長期の濃度平均は 19.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。曝露条件は、6 時間/日、5 日/週であった。この遺伝子組み換えマウスは脳での高いレベルの酸化ストレスによって特徴付けられた。脳の冠状切片のドーパミンニューロンを免疫細胞化学的染色した結果では、黒質緻密核からのニューロンが曝露された Apo E^{-/-}マウスで Apo E^{-/-}対照群に比較して有意に 29%減少した。さらに、免疫細胞化学的に染色された星状細胞は統計的に有意に増加した。黒質緻密核のドーパミン作動性ニューロンはパーキンソン病で特異的な病変を示す場所である。この研究では、粒子状物質によって影響される系を脳まで拡大して検討し、酸化ストレス感受性の高い人における神経変性の誘導に環境が役割を果たしている可能性が示唆されたと報告している。

Sung ら (2007)は、6 頭のカニクイザル(cynomolgus monkey)に メタルアークステンレス鋼溶接蒸気を低濃度群(30mg/m³)と高濃度群(60mg/m³)を設け、2 時間/日の曝露時間で 6 ヶ月間曝露した。血中 Mn 濃度は曝露開始後 2 ヶ月は有意な上昇はなかったが、曝露 90 日以後に上昇して一定値を示す様になった。大脳基底核の MRI T1 relaxation time が曝露後 60 日以後減少していくことが示された。すなわち長期にわたり溶接蒸気を吸入し続けると、血中 Mn 濃度が上昇し、MRI により大脳基底核の T1 シグナルの増強がみられたことから、Mn の中枢神経への移行が示唆された。また、この事象に関し他の金属は影響を与えないと考えられると述べている。