

5. 毒性学研究の健康影響に関する知見の整理

5.1. 導入

1997年、米国大気中粒子状物質基準（PMNAAQS）が改訂されたが、その大部分は「米国の地域で測定された大気中粒子状物質の環境濃度と死亡率及び有症率の相関」という新たな疫学的知見に基づいている。一方、粒子状物質による死亡率及び有症率の増加を説明しうる病態生理学的メカニズムに関しても、多くの仮説及び毒性学的知見が提唱されてきた。多くの粒子状物質に関連する毒性学的研究は、主に、次の課題を解決することをめざしている。

- 1) 大気中の粒子状物質及びその構成成分により、いかなる病態生理学的影響が惹起されるのか。また、その発現メカニズムはいかなるものか。
- 2) 粒子状物質の性質（サイズ、化学組成等）のうち、健康影響を支配するものはなにか。
- 3) 粒子状物質の健康影響に関し、感受性は存在するのか。また、いかなる集団が高感受性を示すのか。さらに、感受性はいかなる要因に規定されるのか。
- 4) 粒子状物質とガス状共存汚染物質の間で複合的影響はありうるのか。

これらの課題に関し、病態生理学的メカニズムに関する仮説を提唱し、それらを検証し、疫学的研究で示唆された粒子状物質の健康影響の生物学的妥当性を検証するために、種々の毒性学的研究が行われてきた。これには、粒子状物質に曝露されたヒトの志願者、霊長類、イヌ、ウサギ、げっ歯類といった実験動物を対象とした *in vivo* における研究や、組織、細胞、タンパク質、遺伝子、生化学系等を対象とした *in vitro* における研究が含まれている。

また、疫学研究の知見において、障害や他の要因の存在により粒子状物質の健康影響を受けやすい、いわゆる「高感受性」集団（例えば慢性の呼吸器系疾患等を持つ者）の存在が示唆されている。これを踏まえ、大気中の粒子状物質の影響を強く受けやすいヒト集団を想定し、その性質を高度に再現できる障害（疾患）を持つ動物モデルを用いた研究が数多く含まれている。これらの毒性学的研究は、多くの場合、毒性学的影響に関する量－反応関係を特定することを主な目的とするものではなく、疫学的に観察されている健康影響の生物学的妥当性を検証することを意図しているため、用いられている曝露濃度及び用量は環境濃度と比較すると一般に高濃度である。比較的高濃度の粒子状物質への曝露を動物や細胞に適用した場合には、その結果の解釈、及び、ヒトの現実的な大気中の曝露条件における作用メカニズムへの外挿を行う際に注意を要する。一方、ヒトの現実的な大気中の曝露と比較すると毒性学的研究において適用される曝露期間は一般に短期間であること、粒子の吸入能力、体内沈着及び動態等の性質においてヒトと実験動物に差異があること、毒性学的研究において観測

される反応、たとえば炎症反応等は、通常の生理学的な反応から有害な毒性反応に至るまでの幅があること等にも留意する必要がある。

しかし、これらの制約がある一方、毒性学的研究は、仮説の提唱及びメカニズムの解明において重要な役割を果たすことができる。

粒子状物質への曝露条件としては、CAPs(Concentrated Ambient Particles)や実験室で人為的に作成した粒子の全身や経鼻的な吸入曝露、また、鼻腔内、気管内、肺内への投与、さらには、溶液及び懸濁液の状態での *in vitro* 実験等が列挙される。

検討された粒子状物質の種類としては、CAPs、ROFA(Residual Oil Fly Ash)、ディーゼル排気 (DE、Diesel Exhaust)とその粒子状成分(DEP、Diesel Exhaust Particles)、TSP(Total Suspended Particles)、金属成分、金属粒子、石炭フライアッシュ(CFA、Coal Fly Ash)、EPM(Emission Particulate Matter)、CB(Carbon Black)、超微小CB粒子、ナノ粒子、元素状炭素(EC)や有機炭素(OC)、硫酸塩、Si、TiO₂、多環芳香族炭化水素(PAH、Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)等のDEP抽出物等が列挙される。特に、都市大気中の粒子状物質を用いた研究として、動物やヒトに一般の環境濃度よりも高濃度に濃縮したCAPsを吸入曝露させる手法がしばしばとられている。しかし、曝露するCAPsに関する化学組成の詳細な同定は不足していること、濃縮器は0.1 μm以下の粒子状物質を効率的に濃縮することができないこと、粒子状物質のガス状成分は濃縮が行われないことにも留意が必要である。一方、実際の大気環境に近似した曝露実験を行うことができるため、その研究の意義は高いものと考えられる。燃焼に関連し発生する粒子状物質に関しては、大規模工業(石油火力発電所等)由来のROFA、石油炉のアッシュ(DOFA、Fly Ash from a Domestic Oil-burning furnace)、CFAが多く用いられている。多くのROFAサンプルには高濃度の金属が含まれ、大気中粒子状物質のヒトへの曝露影響へと外挿するにあたっては、この点に留意する必要がある。また、ディーゼルやガソリン車等から発生する排出物にも多くの種類の成分が含まれ、かつ、それらは経時的に変化することにも留意する必要がある。一方、燃焼起因の生成物に関する作用メカニズムを直接見ることができるため、その研究の意義は高いものと考えられる。

本毒性分野の知見の整理については、微小粒子状物質の影響メカニズムに関する検討に資するため、毒性に関する影響メカニズムの解明を中心に知見を整理し、それらの知見を踏まえた影響に関する評価を行う。

各器官における粒子状物質の影響に関する想定しうる障害の仮説を列挙し、その仮説を検証するため、粒子状物質の健康影響に関する文献調査によりレビューされた動物実験及びヒト志願者実験の文献等から、研究内容や研究対象物質が適切である等、優れた科学的知見を列挙し、吸入曝露、気管内投与による

実験の種類や対象粒子の種類（一般大気、ROFA、DEP 等）ごとに整理をしたうえで、これらの知見により障害の仮説の確からしさの程度に関する評価を行う。

仮説については、粒子状物質の器官に対する障害に関する影響の仮説以外に、高感受性モデルを用いた知見や共存汚染物質を含めた知見に基づき、高感受性群への影響や共存汚染物質の相互作用に関する事項も含めて、仮説の確からしさの評価を行う。

本章の構成は以下のとおりである。

- 1) 呼吸器系への影響について、炎症、障害、炎症以外のメカニズム、感受性の相違、粒子の種類による影響の相違等につき考察する。
- 2) 心血管系（循環器系）への影響について、心臓への酸化作用による障害のメカニズム、自律神経系の変化による影響、不整脈への影響、感受性の相違、粒子の種類による影響の相違等につき考察する。
- 3) 免疫系その他への影響として、感染抵抗性・免疫系・血液成分への影響（感染抵抗性の低下、アレルギー性炎症の増悪、血液成分の凝固等）、生殖系への影響、神経・行動への影響、感受性の相違、粒子の種類による影響の相違等につき考察する。
- 4) 発がん影響について、粒子の種類による影響も含めて考察する。
- 5) 特定の粒子成分と健康影響の関係に注目し、異なる成分の粒子を用いて同一の実験条件で実施し、比較が可能な知見を対象とし、大気粒子に含まれる構成成分に関する健康影響から、構成成分による毒性発現の程度について考察する。
- 6) 粒径と健康影響の関係に注目し、異なる粒径の粒子を用いて同一の実験条件で実施し、比較が可能な知見を対象とし、微小粒子、粗大粒子、超微小粒子（環境ナノ粒子）の粒径の違いによる毒性発現の程度について考察する。

最後に、まとめとして、各器官の評価内容を整理し、大気粒子状物質による影響メカニズムに関する評価を記述し、高感受性や共存汚染物質との相互作用の影響要因について記述する。

5.2. 呼吸器系への影響

5.2.1. 仮説の紹介

ヒトおよび実験動物における微小粒子状物質の吸入による一般的な呼吸器系疾患の発現機序を解明するため、これまで世界中で基礎研究と臨床研究がなされて、膨大な科学的知見が蓄積されてきている。

今般、大気中の粒子状物質の曝露による肺への毒性学的影響を考察するために、以下の仮説をたて、その仮説に関する科学的知見に基づき、仮説の確からしさの程度に関する検証を行なう。

- (1) 肺障害および炎症を誘導する
- (2) 気道反応性の亢進および喘息の悪化がみられる
- (3) 呼吸器感染に対する感受性が亢進する
- (4) 疾患モデル動物では粒子状物質の曝露による影響に差異が生じる
- (5) 複合大気汚染により影響の増悪が生じる

5.2.2. 論文の紹介

5.2.2.1. 肺障害および炎症を誘導する

Rudell ら (1990) は 8 人の健康な非喫煙者 (年齢等、記載なし) を DE に 1 時間曝露し曝露前および曝露後 18 時間目に BALF を採集した。DE 濃度は、曝露チャンバー内の被験者の呼吸ゾーンで NO₂ の平均濃度が 1.6 ppm になるように希釈した (そのときの粒子濃度は $4.3 \times 10^6 / \text{cm}^3$ 、NO は 3.7 ppm、CO は 27 ppm、ホルムアルデヒドは $0.5 \text{ mg} / \text{m}^3$)。その結果、気管支肺胞洗浄液 (BALF、BronchoAlveolar Lavage Fluid) 中のマスト細胞の総数の有意な減少、好中球は僅かだが有意に増加した。T-helper/Suppressor-Cytotoxic 細胞比の上昇、マクロファージの貪食能の有意な減少がみられた。

Salvi ら (1999) は、15 人の健康な非喫煙者の志願者 (男 11 人、女 4 人; 平均年齢 24 歳; 21~28 歳) を間欠的運動下 (分時換気量が $20 \text{ L} / \text{min} / \text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分運動、15 分安静の繰り返し) で 1 時間、空気および希釈された DE に曝露した。DE は、Volvo TD45-1991 エンジンで発生させた。曝露は、PM₁₀ 濃度が $300 \mu\text{g} / \text{m}^3$ になるようにした。各成分濃度は、NO₂ : 1.6 ppm、NO : 4.5 ppm、CO : 7.5 ppm、総炭化水素 : 4.3 ppm、ホルムアルデヒド : $0.26 \text{ mg} / \text{m}^3$ 、浮遊粒子状物質 (SPM、Suspended Particulate Matter) : $4.3 \times 10^6 / \text{cm}^3$ であった。各曝露の前後に肺機能 (最大呼気流量 (PEF、Peak Expiratory Flow)、努力性肺活量 (FVC、Forced Vital Capacity)、1 秒量 (FEV_{1.0}、Forced Expiratory Volume in one second)、FVC の 25~75% の平均努力呼気流量 (FEF_{25-75%}、Forced Expiratory Flow between 25% and 75% of FVC)) を測定した。肺の炎症性反応を調べるために、採血および気道洗浄液と気管支粘膜の生検を得るために気管支鏡を各曝露の 6 時間後に行った。標準的な肺機能検査は DE 曝露後変化しなかったが、気道洗浄液では、ヒスタミンとフィブロンネクチンの増加と共に好中球と B リンパ球の有意な増加がみられた。

DE 曝露後 6 時間後に得られた気管支生検は、気管支組織における LFA(Lymphocyte Function Associated Antigen)-1+ 細胞の数の増加と共に、内皮接着分子である ICAM-1(InterCellular Adhesion Molecule-1)と VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)の upregulation と共に好中球、マスト細胞、CD4+(Cluster of Differentiation 4+)と CD8+ T リンパ球の有意な増加を示した。好中球と血小板の有意な増加が、DE 曝露後末梢血で観察された。この研究は、高濃度で、急性の短期間の DE 曝露は、健康な志願者の標準的な肺機能測定では過小評価されるが、顕著な全身性および肺の炎症反応をひき起こすことを実証していると述べている。

Rudell ら (1999)は、DE の正常な健康者における気管支肺胞細胞への影響と溶解性成分への影響を明らかにするために、アイドリング・エンジン (Volvo TDIF-1990) からの排気管出口における粒子捕集が気道炎症の指標を減少させるかどうかを評価した。研究は、10 人の健康な非喫煙者 (男 8 人、女 2 人、平均年齢 27 歳 ; 22~35 歳) を対象に、空気、希釈された DE (粒子数: $2.6 \times 10^6/\text{cm}^3$, NO_2 : 1.3 ppm, NO : 3.4 ppm, 炭化水素: 4.2 ppm, ホルムアルデヒド: $0.32 \text{ mg}/\text{m}^3$)、およびセラミックの粒子捕集装置でろ過された希釈された DE の曝露を行った。被験者に、軽度の運動 (75W で、 $15 \text{ L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の分時換気量) を 10 分間、安静を 10 分間繰り返しながら 1 時間曝露した。曝露後 24 時間目に、BAL を行い、気管支および気管支肺胞領域からの洗浄液の細胞および溶解成分について分析した。結果は、粒子捕集は、平均粒子数を 50%減少させたが、他の測定成分の濃度は、殆ど変わらなかった。DE は、*in vitro* で肺胞マクロファージによる貪食に悪影響を及ぼすと共に気道洗浄液中の好中球の増加を引き起こすことがみいだされた。さらに、DE は、CD3+CD25+細胞の減少を伴って、肺胞マクロファージの気腔への移動を引き起こすことがみいだされた。排気管の出口に特定のセラミックの粒子捕集装置を用いても、アイドリング車からの排気の影響を完全に除去できるほど十分な効果はなかった。結論として、本研究は、DE への曝露は、気道への好中球と肺胞マクロファージの補充を引き起こし、肺胞マクロファージの機能を抑制することを示した。粒子捕集装置によって DE をろ過しても、DE によって引き起こされる影響は有意に減少しなかった。DE の気道における悪影響を減少させるためにもっと効率的な処理装置を評価するための研究が更に必要であると述べている。

Nordenhäll ら (2000)は、健康な志願者における最近の気管支鏡による研究では、DE への曝露に続いて気道の炎症がはっきり検出されているので、健康な志願者による誘発された痰を用いて、DE への曝露に続く炎症性反応の time kinetics を評価するために以下の研究を行った。15 人の健康な非喫煙者の志願者 (男 13 人、女 2 人、平均年齢 25 歳 : 22~33 歳) を 50%カットオフの空気力学径が $10\mu\text{m}$ の粒子 (PM_{10}) の濃度が $300\mu\text{g}/\text{m}^3$ の DE 粒子とろ過空気に、間欠的運動下 (分時換気量が $20\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 1 時間曝露した。DE は、Volvo BM TD45-1991 を使用して発生させ、曝露チャンバーの入口部濃度が、 PM_{10} : $300\mu\text{g}/\text{m}^3$, NO_2 : 1.6 ppm に

なるように調整した。各曝露後 6 時間と 24 時間目に、 β_2 -agonist を吸入後、7 分間隔で高張性食塩水 (3、4 および 5%) の濃度をあげながらエアロゾルを吸入させ、痰を誘発した。痰の細胞分画数や溶解性タンパク質濃度の分析を行った。DE への曝露後 6 時間では、ろ過空気曝露に比し、IL (InterLeukin)-6 濃度 (12.0 対 6.3 pg/mL、 $p=0.006$) と methylhistamine (0.11 対 0.12 $\mu\text{g/L}$ 、 $p=0.024$) 濃度の増加を伴った痰中の好中球のパーセンテージ (37.7 対 26.2%、 $p=0.002$) の有意な増加がみられた。曝露にかかわらず、痰中の好中球のパーセンテージは、6 時間に比べ 24 時間では有意な増加がみられたことは、痰誘発そのものの処置が痰の構成成分を変えるかもしれないことを示した。この研究は、DE への曝露は、健康なヒトの気道で、IL-6 と methylhistamine 濃度と好中球のパーセンテージの初期の増加で示されるような炎症性反応を引き起こすことを示した。痰の誘発は、DE の炎症性影響の研究の安全な手段を提供しているが、痰の誘発を繰り返した結果の評価には注意を払わなければならないと述べている。

Nightingale ら (2000)は、正常な志願者における Diesel exhaust particles (DEP: ディーゼル排気粒子) の吸入に対する炎症性反応を調べた。DEP は、ディーゼル・エンジンの排気から捕集され、市販の粒子分散器で再浮遊させ曝露チャンバーに導入した。10 人の健康な非喫煙者 (男 3 名、女 7 名、平均年齢 28 歳) を空気力学径が $10\mu\text{m}$ 以下 (PM_{10}) の粒子濃度を $200\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ にコントロールした DEP に、または清浄空気に、チャンバー内で、安静下で 2 時間曝露した。曝露後 4 時間に至る痰の誘発と静脈切開と同様に一連のスパイロメトリー、脈拍、血圧、呼出一酸化炭素 (CO) およびメサコリン反応を測定し、曝露後 24 時間目にこれら全ての手技を繰り返した。DEP への曝露後、心血管系パラメーターや肺機能に変化はみられなかった。呼気 CO レベルは DEP 曝露後に増加し、1 時間目に最高となった (空気: $2.9\pm 0.2\ \text{ppm}$ [平均 \pm SEM]; DEP: $4.4\pm 0.3\ \text{ppm}$; $p<0.001$)。空気曝露後 4 時間と比較すると DEP 曝露後 4 時間では痰中の好中球 ($41\pm 4\%$ 対 $32\pm 4\%$) と myeloperoxidase (MPO) ($151\ \text{ng/ml}$ 対 $115\ \text{ng/ml}$ 、 $p<0.01$) の増加がみられたが、末梢血中の IL-6、TNF(Tumor Necrosis Factor)- α および P-selectin の濃度に変化がみられなかった。以上の結果から、高濃度での DEP への曝露は、正常な志願者で気道の炎症性反応をおこすと述べている。

Holgate ら (2003a)は、38 人の健康な非喫煙者 (18~40 歳) をろ過空気に 12 人 (男 8 人、女 4 人)、Chapel Hill の大気を 6~10 倍に濃縮した CAPs ($\text{PM}_{2.5}$: $23.1\sim 311.1\ \mu\text{g}/\text{m}^3$) の平均値が低い群 ($47.2\pm 5.3\ \mu\text{g}/\text{m}^3$)、中等度群 ($107.4\pm 9.3\ \mu\text{g}/\text{m}^3$) および高濃度群 ($206.7\pm 19.2\ \mu\text{g}/\text{m}^3$) の各群に 10 人ずつ (1 名性別不明で残り全員男) 間欠的運動下 (分時換気量が $25\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 2 時間曝露した。曝露前および曝露後 18 時間目に採血し、また曝露後 18 時間目に気管支生検と BALF を採集した。肺機能 (スパイロメトリーとプレチスモグラフィ) は、CAPs 曝露による影響がみられなかった。曝露後、血中フィブリノゲンは、CAPs 曝露の各群では平均して $38.8\sim 43.3\text{mg}/\text{dL}$ 増加したが、濃度依存性はみられなかった。BALF では、好中

球の細胞数、または総細胞数に対するパーセンテージの両方で濃度依存性の増加がみられた。気管支生検では、細胞数や接着分子表現への影響はみられなかった。これらのことから、CAPs では BALF で軽度の気道炎症がみられるが気管支生検組織に反映されるようなものではないと述べている。

Holgate ら (2003b)は、38 人の健康な非喫煙者 (18~40 歳) をろ過空気に 12 人 (男 8 人、女 4 人)、Chapel Hill の大気を 6~10 倍に濃縮した CAPs ($PM_{2.5}$: $23.1\sim 311.1\mu\text{g}/\text{m}^3$) の平均値が低い群 ($47.2\pm 5.3\mu\text{g}/\text{m}^3$)、中等度群 ($107.4\pm 9.3\mu\text{g}/\text{m}^3$) および高濃度群 ($206.7\pm 19.2\mu\text{g}/\text{m}^3$) の各群に 10 人ずつ (1 名性別不明で残り全員男) 間欠的運動下 (分時換気量が $25\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 2 時間曝露した。曝露前および曝露後 18 時間目に採血し、また曝露後 18 時間目に気管支生検と BALF を採集した。肺機能 (スパイロメトリーとプレチスモグラフィ) は、CAPs 曝露による影響がみられなかった。曝露後、血中フィブリノゲンは、CAPs 曝露の各群では平均して $38.8\sim 43.3\text{mg}/\text{dL}$ 増加したが、濃度依存性はみられなかった。BALF では、好中球の細胞数、または総細胞数に対するパーセンテージの両方で濃度依存性の増加がみられた。気管支生検では、細胞数や接着分子表現への影響はみられなかった。これらのことから、CAPs では BALF で軽度の気道炎症がみられるが気管支生検組織に反映されるようなものではないと述べている。

Stenfors ら (2004)は、25 人の健康な非アトピー性の者 (男 16 人、女 9 人: 平均年齢 24 歳; 19~42 歳) および 15 人の β_2 作動薬の吸入のみしている軽症の喘息患者 (女 5 人: 平均年齢 30 歳; 22~52 歳) を大気レベルの DE [$10\mu\text{m}$ の空気力学径の 50%カット-オフの粒子 (PM_{10}) 濃度が $108\mu\text{g}/\text{m}^3$ (94~124)、CO は 1.7 ppm (0.6~2.5)、 NO_2 は 0.2 ppm (0.1~0.3)] に中等度の間欠的運動下 (分時換気量が $15\text{-}20\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ の負荷で 15 分間の運動と安静の繰り返し) で 2 時間曝露し、肺機能と気道炎症を評価した。DE は、Volvo のディーゼル・エンジンで発生させた。肺機能は Body-plethysmograph で sRaw (特異的気道抵抗)、FVC および $FEV_{1.0}$ を測定した。曝露後、6 時間目に気管支鏡を行い、気管支生検、気管支洗浄液 (BW) および BALF を採集した。粘膜生検については、特異的細胞マーカー、血管内皮接着分子および細胞内接着分子、サイトカインや転写因子を測定した。BW および BALF については、細胞分画、アルブミン、総タンパク質、IL-6、IL-8、GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)、methyl-histamine、MPO および ECP を測定した。DE 曝露後、 $FEV_{1.0}$ や FVC は、どのグループも影響がみられなかった。sRaw は、空気曝露に比し、健康者では 4.1% ($p<0.01$)、喘息患者では 6.5% ($p<0.01$) の増加を示したが、グループ間では反応の大きさに統計的な差はみられなかった。健康な被験者は、DE 曝露後、気道炎症を起こし、気道洗浄液における IL-6 と IL-8 タンパク質の増加、気管支粘膜における IL-8 mRNA の増加と内皮の接着分子 (P-selectin と VCAM-1) の upregulation を伴った気道の好中球増加とリンパ球増加を示した。喘息患者では、DE 曝露は、好中球性反応を引き起こしたり、既存の好酸球性気道炎症を増悪させたりするこ

とはなかった。サイトカインの IL-10 の上皮染色は、喘息グループでは DE 後に増加していた。DE による IL-10 の誘発は、喘息患者の気道炎症の増強に寄与するかもしれない。現在の WHO の大気質基準以下の濃度で 50%カット-オフの空気力学径が 10 μ m の粒子が、健康者と喘息患者で異なる影響がみられることが、この研究で観察された。これらの異なる反応の意味を解明するには更に研究が必要であると述べている。

Pourazar ら (2005)は、15 人の健康な非アトピー性の非喫煙者 (男 11 人、女 4、平均年齢 24 歳 : 21-28 歳) について、Volvo 社のディーゼル・エンジンで供給された DE [DEP が MMD (Mass Median dynamic Diameter) で 10 μ m 以下の粒径 (PM₁₀) 濃度 : 300 μ g/m³、NO₂ : 1.6 ppm、NO : 4.5 ppm、CO : 7.5 ppm、総炭化水素 : 4.3 ppm、ホルムアルデヒド : 0.26 mg/m³、浮遊粒子 : 4.3 \times 10⁶/cm³]、または空気に曝露チャンバーで 1 時間、間欠的運動下 (分時換気量が 20 L/min/m² の負荷で 15 分間の運動と安静の繰り返し) で吸入させた。曝露後 6 時間目に、気管支鏡で気管支内膜の生検を行い、気管支上皮細胞の免疫組織化学的染色を行い、転写因子の NF- κ B (p65) および AP-1 (c-jun および c-fos) と upstream stress-related MAPKs [p38 および JNK)] の発現量とチロシン残基のリン酸化量を調べた。その結果、DE への短期間曝露は、リン酸化された p38 の総免疫染色 (cytoplasmic+nuclear) の増加と同様に、NF- κ B、AP-1、リン酸化 JNK および p38 の nuclear translocation の有意な増加をもたらした。Nuclear リン酸化 tyrosine の有意な増加もみられた。これらの観察は、DE は、proinflammatory サイトカインの合成の増加を引き起こすことと一致して redox-sensitive 転写因子を活性化させることを示している。著者は、これらの経路の upregulation は、DEP が誘発する細胞外の酸化ストレスと proinflammatory サイトカインの誘発を関連づける分子機構であると考えている。

*MAPKs, Mitogen-Activated Protein Kinase

*JNK, c-Jun N-terminal kinase

*NF- κ B, Nuclear Factor kappa B

Ghio ら (2000)は、38 人の健康な非喫煙者 (男 36 人、女 2 人 : 平均年齢 26.2 歳) をノースカロライナ州の Chapel Hill にある EPA の Human Studies Facility の近くの環境大気から濃縮された Concentrated ambient particles (CAPs : 濃縮大気浮遊粒子状物質) またはろ過空気に曝露した。曝露中のチャンバー内の粒子濃度は、23.1~311.1 μ g/m³ の範囲 [MMAD (Mass Median Aerodynamic Diameter) は 0.65 μ m] であったが、これらを四分位に分類した [PM_{2.5} のそれぞれの粒子濃度 (μ g/m³) は、Quartile-1 (Q-1) : 清浄空気 (被験者数 8 人)、Q-2 : 47.2 \pm 5.3 (10 人)、Q-3 : 107.4 \pm 9.3 (10 人)、Q-4 : 206.7 \pm 19.2 (10 人)]。曝露チャンバー内で、被験者は、間欠的運動下 (分時換気量が 25L/min/m² 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 2 時間曝露された。曝露後、症状は認められなかった。同様に、肺機能 [スパイロメトリー (FVC、FEV_{1.0}、PEF) および plethysmography (Raw)] の低下もみられなかった。曝露後 18 時間での BAL から得られた細胞と液の分析では、CAPs に曝露されたこれらの被験者における気管支および肺胞

分画の両方で、ろ過空気（それぞれ 2.69 ± 0.55 と $0.75 \pm 0.28\%$ ）に比較して好中球の軽度の増加（最大の曝露を受けた者達で、それぞれ 8.44 ± 1.99 と $4.20 \pm 1.69\%$ ）がみられた。CAPs への曝露後 18 時間の血液は、曝露前のサンプルに比べ、有意に多くのフィブリノゲンを含んでいたが、量反応関係はみられなかった。以上の結果から、大気粒子は、血液中のフィブリノゲン濃度の増加と同様に下気道での軽度の炎症を引き起こしうると結論できると述べている。

Harder ら (2001)は、38 人の健康な非喫煙者の志願者（男 36 人、女 2 人；平均年齢 26.2 歳；18~40 歳）をノースカロライナ州の Chapel Hill にある EPA の Human Studies Facility の近くの環境から濃縮された粒子またはろ過空気の間欠的運動下（分時換気量が $25\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し）で 2 時間曝露した。曝露中のチャンパー内の粒子濃度は、 $23.1 \sim 311.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲であった。最初のろ過空気に曝露された 8 人を四分位数の最初の quartile を quartile 1 (Q-1) とし、残りの 30 人の曝露を PM 濃度の増加に伴い分割し 10 人のグループに分けた [PM_{2.5} の平均濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) は、Q-2 : 47.2 ± 5.3 、Q-3 : 107.4 ± 9.3 、Q-4 : 206.7 ± 19.2]。ヒトと動物の両方の研究から、粒子への曝露後 18 時間と 24 時間の間に炎症性反応がみられることが示されているため、空気または CAPs への曝露後 18 時間目に気管支鏡を行い、気管支と BALF を採集した。曝露による症状は認められなかった。曝露後 18 時間に、BAL で得られた細胞の分析は、ろ過空気に曝露された者の液中の好中球（気管支分画 $2.7 \pm 0.6\%$ ；肺胞分画 $0.8 \pm 0.3\%$ ）に比べ CAPs の最高濃度に曝露された被験者における気管支 ($8.4 \pm 2\%$) と肺胞分画 ($4.2 \pm 1.7\%$) の両方で好中球の軽度の増加を示した。最高の粒子レベル（平均 $207 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ）の吸入後、洗浄で回収されたリンパ球や肺胞マクロファージのパーセンテージに変化はみられなかった。CD3、CD4、CD8、CD19 や活性マーカーの CD25 を表す BALF 中のリンパ球の割合にも変化はみられなかった。粒子吸入は、肺胞マクロファージ上の CD11b、CD64、CD16、CD14 の表現に影響を与えなかったし、zymosan A で刺激後の貪食能やオキシダント発生にも影響がみられなかった。ELISA によって検出された BALF 中の IL-6 と IL-8 レベルは、吸入された粒子レベルには関係していなかった。CAPs への曝露後 18 時間で採集された血液のリンパ球サブセットの分布は、曝露前の分布と異なっていなかった。以上の結果から、本条件下では、大気粒子は、下気道で軽度の炎症を引き起こしうるが、免疫表現型やマクロファージ機能に影響を及ぼさないと結論している。

Lay ら (1999)は、34 人の健康な非喫煙者の志願者（男 27 人、女 7 人；平均年齢 25.8 歳、19.6~35.5 歳）に、気管支鏡を用い、最初の気管支鏡の時に、SPSS に浮遊された Fe₂O₃ の microspheres [CMD (Count Median Diameter)が $2.6 \mu\text{m}$ で、非放射性；10 ml SPSS 中に 3×10^8 粒子] を肺舌状部に注入し、コントロールとして粒子を含まない SPSS を右中葉に注入した。注入後、1、2、4、28 または 91 日目に、肺細胞と生化学的成分を採集するために BAL を行った。Fe₂O₃ は、毒性が無く、非発癌性および非繊維化性であるという証拠に基づいて選択した。粒子の注入は、注入後の最初の日は一時的な急性炎症を引き起

こし、BALF のタンパク質、LDH (Lactate DeHydrogenase)、および IL-8 の増加と同様に好中球と肺胞マクロファージ数の増加で特徴付けられていた。この反応は、無症状で、注入後 4 日以内に消滅した。同じ粒子の気管内注入後 1 日目のラットで類似の量依存性の反応がみられた。粒子は、少量の溶解性 Fe (240 ng/mg) を含み、*in vitro* でオキシダント発生に触媒作用を及ぼす能力をもっていた。これらの知見は、粒子曝露後の急性炎症は、少なくとも部分的には、粒子に関連した Fe イオン、水酸化鉄や oxyhydroxides の残留量の存在によって触媒されたオキシダント発生の結果であるかもしれないことを示しており、粒子状大気汚染レベルの増加に関連した急性健康影響に関連しているかもしれないと述べている。

Kuschner ら (1997) は、15 人の健康な志願者 (男 8 人、女 7 人：平均年齢 31.3 歳) について ZnO フュームを顔面マスクをつけ口呼吸で吸入させ、3 時間後に BAL 中のサイトカイン濃度を調べた。ZnO フュームは、溶鉱炉システムを利用して発生させた [MMD : 0.17 μ m、濃度の中央値 : 33 mg/m³ (20~42mg/m³)]。曝露時間は、2 人が 10 分、5 人が 15 分、8 人が 30 分であった。14 人の異なる被験者 (男 8 人、女 6 人：平均年齢 35.6 歳) について類似の濃度に曝露後、20 時間後に BALF を採集した。その結果、3 時間後の BALF 中の TNF、IL-6 および IL-8 の量依存性の統計的に有意な増加がみられた。TNF は、曝露後 20 時間目に比し、3 時間目で有意に大きかった。これらのデータは、TNF が、金属熱の媒介で重要な初期の役割をしていることを示していると述べている。

Ghio と Devlin (2001) は、PM を含むフィルターが、Utah Valley にある製鉄工場の閉鎖前 (1986 年)、閉鎖中 (1987 年)、および再開後 (1988 年) に捕集されていたので、フィルターの水溶性抽出物を作成した。これらの抽出物の一つ (500 μ g) を含む 10 ml の食塩水を気管支鏡で 24 人の健康な非喫煙者 (男 21 人、女 3 人、平均年齢 26.4 歳) の左肺舌区の区域気管支に注入し、さらに 10 ml の食塩水を注入した。同様に、粒子を含まない 20 ml の食塩水を右中葉の亜区域に注入した (対照)。本研究で注入した 500 μ g は、Utah Valley で冬季の気温逆転時に PM₁₀ が 100 μ g/m³ を超えることがあり、このような状態で 24 時間呼吸し、その 10% が肺の舌区に分布し、そのうちの 42% が沈着すると仮定すると 91 μ g の PM₁₀ が沈着することになり、注入量は、この約 5 倍に相当する。24 時間後に、同じ領域を洗浄し、BALF を採集した。製鉄工場の閉鎖前と再開後に捕集された PM の水溶性抽出物への曝露は、工場の閉鎖中に捕集された PM 抽出物に比較し、より大きな炎症性反応をもたらした。抽出物の注入後の BALF 中の生存細胞の総数は、食塩水に比べて増加した。好中球のパーセンテージは、1987 年の PM 抽出物と食塩水に比べ、1986 年と 1988 年の PM 抽出物の注入後に増加した。BALF 中のタンパク質、アルブミン、fibronectin、 α 1-antitrypsin、IL-8、TNF、IL-1 β も類似の傾向を示した。さらに 1986 年の抽出物の 100 μ g を注入すると、好中球、タンパク質および炎症性サイトカインの上昇がみられた。これらは、PM へのヒトの実験的曝露後の肺への影響が、通常の曝露条件下での同じ材料に関する疫学研究で観察された健康影響と相関していることを示した最初の報告である。

このことは、曝露量は、PM 曝露後の健康影響を評価するために使用する最も適切なものではなく、むしろ特異的な成分を同定し、評価しなければならないことを示唆していると述べている。

Huang ら (2003)は、CAPs 中の硫酸塩/Fe/Se 因子が BALF 中の好中球の増加、Cu/Zn/V 因子が血中フィブリノゲン増加と関連していて、PM の特異的成分の重要性を指摘している。健康者、喘息患者や COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) 患者で、HRV の変化や収縮期血圧への影響が報告されているが、COPD 患者よりも健康者の方で影響がより強く観察されている。

Lei ら (2004a)は、ラットにモノクロタリン 60mg/kg(体重)を腹腔内投与し肺高血圧を惹起させた。その 14 日後に CAPs (dust storm forecast system of Taiwan Environmental Protection Administration using a modified ultrafine particle concentrator developed by Sioutas et al.を使用)を、126.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (対照群)、315.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (低曝露群)、684.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (高曝露群)の 3 群で吸入曝露した。黄砂の季節に、低曝露群と対照群の 1 匹は 6 時間、高曝露群と対照群の 3 匹は 4.5 時間曝露した。高曝露群は呼吸困難をきたしたため、4.5 時間の曝露で終了した。末梢血中の白血球数は、粒子の濃度に依存して増加した。赤血球やヘモグロビン、ヘマトクリットには有意な変化は見られなかった。BALF 中の総細胞数と好中球数も粒子濃度に依存して増加した。BALF 中の総タンパク質、LDH、IL-6 タンパク質濃度に関しても同様な結果が得られた。

Lei ら (2004b)は、CAPs(PM_{2.5})(台北(台湾)由来、曝露濃度:PM_{2.5}(\pm SD) : 371.5(\pm 208.3) $\mu\text{g}/\text{m}^3$)の急性影響を知るために、モノクロタリン処理を行ったラット(ヒトの肺高血圧症モデルを想定)に CAPs を 6 時間/日、3 日間連続曝露し、肺の機能検査および炎症所見について解析した。その結果、気道狭窄の指標としての Penh: enhanced pause(肺気流抵抗)の有意な上昇、呼吸数の減少、一回換気量の増加が認められた。また、BALF 内の好中球の増加、タンパク質及び LDH 濃度の増加、IL-6 値の増加が認められた。

Kodavanti ら (1999)は、SD ラット(60 日齢、体重 250~300 g)にモノクロタリン 60 mg/kg(体重)を腹腔内投与して肺障害/肺高血圧を引き起こした。対照群には生理食塩水(正常ラットと以下表記)を同様に投与した。10 日後に清浄空気または ROFA(15 mg/m³)を気管内投与(生理食塩水、0.83 あるいは 3.33 mg/kg(体重))、あるいは鼻部吸入曝露(15 mg/m³ × 6 時間/日 × 3 日)を行い、肺の組織像、サイトカイン遺伝子発現、BALF を調べた。正常ラットでは ROFA 吸入により、肺浮腫、炎症細胞浸潤、肺胞壁の肥厚が認められた。BALF の炎症マーカーの上昇や IL-6、MIP (Macrophage Inflammatory Protein) -2 発現増加も認めた。モノクロタリン処理したラットでは、炎症細胞の血管周囲への浸潤、大きいマクロファージの存在、肺胞壁の肥厚が認められた。BALF 中タンパク質や炎症マーカー(マクロファージ数、好中球数)も上昇し、肺障害を示していた。モノクロタリン処理後

に ROFA を気管内投与されたラットの 58%が 96 時間以内に死亡したのに対し、吸入曝露群では死亡例はなかった。モノクロタリン処理後に ROFA 吸入曝露したラット群では肺損傷の増悪が見られた。すなわち、肺水腫、肺胞壁の肥厚、炎症細胞浸潤であった。BALF 中のマクロファージ、好中球、好酸球および IL-6 発現は、モノクロタリン、ROFA それぞれ単独投与による増加の相加作用を上回る増加を示した。結論として、ROFA の気管内投与は肺障害/肺高血圧モデルラットの死亡率を引き上げたと述べている。

Li ら (1996)は、ラットで PM₁₀ (0.2mL PBS (Phosphate-Buffered Saline) に 50~125µg の粒子を懸濁)および対照 CBP(Carbon Black Particle ; fine ,ultrafine を各 125µg/個体)を気管内に単回投与した。投与から 6 時間後では肺胞内への好中球の遊走、上皮細胞の透過性の亢進、BALF 中の総タンパク質及び LDH の増加が観察された。Ultrafine CBP の投与により、より強い炎症反応が観察された。PM₁₀ には *in vivo* 及び *in vitro* においてフリーラジカルの活性が確認された。PM₁₀ に曝露されたラットから得られた白血球の NO と TNF の産生能は対照動物に比べて増大していた。これらの結果から、PM₁₀ はフリーラジカル活性を有し肺の炎症や上皮組織の障害に関与していることが明らかとなった。

Kodavanti ら (1997)は、ROFA または ROFA に含有される金属(Fe、V、Ni)をラットの気管内に 1 回投与した。ROFA の粒径は $1.95 \pm 1.61\mu\text{m}$ で、投与量は ROFA(2.5 mg/個体)、Fe (0.54 µM/個体)、V(1.66 µM/個体)、Ni(1.0 µM/個体)であった。いずれも 0.3 ml の生理食塩水(pH 2.5)に溶解した。投与 1 時間後から気道・肺胞領域の浮腫及び出血性変化、炎症細胞(好酸球、好中球、マクロファージ)の浸潤が出現し、24 時間後にピークに達した後に 96 時間後まで継続した。同様の変化は金属の投与によっても惹起されたが、Fe や V に比べて Ni による肺の炎症や障害が高度であった。金属を混合した場合にはむしろ炎症・障害の誘導作用は減弱した。ROFA 投与 3 時間後には一過性に MIP-2、IL-1β、IL-5、IL-6、VCAM-1、E-selectin の遺伝子発現が増加した。これら炎症性遺伝子は金属の投与でも観察されたが、特に Ni の影響が強く見られた。本研究では、ROFA に含有される金属による肺の炎症作用は、Ni>V>Fe の順に大きいことが示された。

Win-Shwe ら (2005)は、マウスに、14nm と 95nm の 2 種の CB 超微小粒子(投与濃度 0µg/個体、25µg/個体、125µg/個体、625µg/個体)を 4 回反復して気管内投与した際の肺とリンパ節での炎症性サイトカイン・ケモカインと粒子サイズ、粒子濃度との関係について検討した。①免疫関連臓器である胸腺重量、脾臓重量と脾臓細胞数には粒子サイズ、粒子濃度の影響は認められなかった。②最終投与 24 時間後の BALF 中の総細胞数、肺胞マクロファージ数、リンパ球数、好中球数は、14nm では濃度に依存して明らかに増加した。95nm でも同様な増加傾向を認めたが、肺胞マクロファージ数には明らかな量反応関係を認めなかった。好中球数と粒子面積との間には相関関係が見られた。③最終投与 24 時間後の BALF 中サイトカインは、14nm では IL-1β、IL-6、TNF-α、CCL (CC chemokine Ligand)-2、CCL-3 が濃度依存性に増加し、95nm でも同様な傾向を認めたが、IL-6、TNF-α

の変動は少なかった。④縦隔リンパ節で粒子を少なくとも3個以上貪食している細胞数は、14nm、95nm 両者で濃度に依存して増加し、その程度は95nm に比較して14nm で大であった。⑤125 μ g 粒子最終投与4時間後の肺組織ケモカイン CCL-2 と CCL-3mRNA 量は14nm、95nm で増加したが、リンパ節では14nm が CCL-2、CCL-3mRNA 量の増加を示したのに対し、95nm では CCL-2mRNA のみ増加傾向を示した。⑥超微小粒子 CB の反復投与は、粒子サイズに依存した肺の炎症、縦隔リンパ節への粒子の移動、肺及びリンパ節での各種サイトカイン mRNA 発現の増加を引き起こし、その結果、より微小な粒子ほど縦隔リンパ節への移動を介して免疫調節機構に影響を与えている可能性があることが示唆された。

Lim ら (1998)は8週齢の ICR マウス(雄)に毎週1回ずつ10週間にわたって0.1mg あるいは0.2mg の DEP を気管内投与し、気道粘膜下への好酸球浸潤の程度と気道炎症に関するメカニズムについて検討した。気道粘膜下への好中球浸潤は濃度依存的であるが、好酸球浸潤は0.1mg 投与群のほうが0.2mg 群の値より高かった。また、好酸球浸潤は PEG-SOD (PolyEthylene Glycol conjugated SuperOxide Dismutase) 前投与で1/4 以下に低下した。一方、0.1mg DEP の繰り返し気管内投与で活性酸素を産生させる酵素である肺の NADPH (reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) シトクロム P-450 reductase 活性は有意に増加し、逆に活性酸素を消去する酵素である CuZn-SOD と Mn-SOD 活性は有意に低下し、特に Mn-SOD 活性は顕著に低下した。これら酵素は気道上皮細胞とクララ細胞内に存在していることが確認されている。このことは、DEP 投与は気道内で活性酸素産生を増加傾向にかたむけ、酸化ストレスを亢進することを示唆している。また、気道上皮での NO 合成酵素(NOS、NO Synthase)の誘導も免疫組織染色法で調べ、気道上皮内の cNOS とマクロファージ内の iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) が顕著に誘導されていることと共に、呼気中の NO が DEP 投与群で有意に増加していることが認められた。さらに、DEP 投与で呼吸抵抗が2.5倍に増加し、NOS 阻害剤の投与で呼吸抵抗増加は完全に抑制された。これらの結果から、DEP による気道炎症の発現には、気道上皮細胞や肺胞マクロファージ等に由来する O₂、H₂O₂、 \cdot OH、NO あるいは ONOO⁻等の活性酸素が深くかかわっている可能性が示唆されている。

Madden ら (1999)は、ROFA の気管内投与が肺の過酸化脂質(アセトアルデヒド)を増加させることを報告した。用いた ROFA の粒径は $1.95 \pm 0.18 \mu\text{m}$ で投与量は 500~1,000mg であった。ラット気管内に ROFA を投与したところ、濃度依存性に BALF のアセトアルデヒド濃度が増加した。アセトアルデヒドの増加は ROFA 投与後15分から観察され、1時間後にピークとなり、24時間後には消失した。ROFA に含有される Fe や V の気管内投与によっても BALF のアセトアルデヒドが増加した。また ROFA を曝露した気道上皮細胞からもアセトアルデヒドが産生されることを確認した。

Sagai ら (1993)は、DEP の毒性メカニズムを調べる目的で DEP を 0.5% Tween80 を含

むリン酸緩衝液(pH7.4)に懸濁して、0~1.0mg を ICR マウス(雄)に 1 回気管内投与した。この結果、DEP の気管内投与による LD₅₀ は 0.6mg/個体(20mg/kg(体重))であり、このマウスにポリエチレングリコールを結合させて体内半減期を長くするようにした SOD(PEG-SOD)酵素を前投与すると死亡率が著しく低下することを見いだした。このことは、DEP が肺内でマクロファージによる貪食作用を受けたり、DEP 中の有機化合物が薬物代謝酵素等によって代謝されることによってスーパーオキシドをはじめとする活性酸素が多量に放出され、それらが血管内皮細胞を損傷して肺水腫を引き起こしたことによると述べている。

Lim ら (1998)は 8 週齢の ICR マウス(雄)に毎週 1 回ずつ 10 週間にわたって 0.1mg あるいは 0.2mg の DEP を気管内投与し、気道粘膜下への好酸球浸潤の程度と気道炎症に関するメカニズムについて検討した。気道粘膜下への好中球浸潤は濃度依存的であるが、好酸球浸潤は 0.1mg 投与群のほうが 0.2mg 群の値より高かった。また、好酸球浸潤は PEG-SOD 前投与で 1/4 以下に低下した。一方、0.1mg DEP の繰り返し気管内投与で活性酸素を産生させる酵素である肺の NADPH シトクロム P-450 reductase 活性は有意に増加し、逆に活性酸素を消去する酵素である CuZn-SOD と Mn-SOD 活性は有意に低下し、特に Mn-SOD 活性は顕著に低下した。これら酵素は気道上皮細胞とクララ細胞内に存在していることが確認されている。このことは、DEP 投与は気道内で活性酸素産生を増加傾向にかたむけ、酸化ストレスを亢進することを示唆している。また、気道上皮での NO 合成酵素(NOS)の誘導も免疫組織染色法で調べ、気道上皮内の cNOS とマクロファージ内の iNOS が顕著に誘導されていることと共に、呼気中の NO が DEP 投与群で有意に増加していることが認められた。さらに、DEP 投与で呼吸抵抗が 2.5 倍に増加し、NOS 阻害剤の投与で呼吸抵抗増加は完全に抑制された。これらの結果から、DEP による気道炎症の発現には、気道上皮細胞や肺胞マクロファージ等に由来する O₂⁻、H₂O₂、[•]OH、NO あるいは ONOO[•] 等の活性酸素が深くかかわっている可能性が示唆されている。

Sagai ら (1996)は 6 週齢の ICR マウス(雄)に、0.1mg あるいは 0.2mg の DEP を週に 1 回ずつ 16 週間にわたって気管内投与し、気道周囲への好酸球の顕著な浸潤、粘液産生細胞の増生ならびに気道過敏性の 4~10 倍の亢進等を認めた。なお、これら 3 つの喘息様病態は PEG-SOD の気管内への前投与で効果的に抑制された。これらのことから、DEP は 0.1mg/個体レベルの濃度から喘息様病態を発現させることと共に、この気道炎症の発現に活性酸素が深く関与している可能性が示唆されている。

Gurgueira ら (2002) は、心臓の酸化ストレスと浮遊粒子状物質との関連を明らかにするため急性実験を行った。正常 SD ラットに対し、CAPs(PM_{2.5})を 300±60 µg/m³の濃度で、曝露時間を 1 時間、3 時間、5 時間として吸入曝露し、人工呼吸下で観察した。肺、心臓、肝臓の化学発光量(酸化ストレスの指標を示す。臓器の活性酸素種の濃度を推定する方法)を調べたところ、肺と心臓において有意な上昇が認められた。同様の結果が ROFA の曝露

(1.7 mg/m³、30 分)において認められたが CB(300 µg/m³、5 時間)では変化は認められなかった。肺の化学発光量は、CAPs 中の Ca、Mn、Cu、Fe、Zn と、心臓の化学発光量は、Si、Al、Ti、Fe と相関が見られた。また、肺の障害指標としての乾湿重量比、組織障害指標としての血清 LDH、クレアチンホスホキナーゼ活性、肺の Mn-SOD とカタラーゼ活性、心臓の Cu/Zn-SOD と Mn-SOD 活性が CAPs の曝露により上昇した。これらの結果から、CAPs の 5 時間曝露は肺と心臓に軽度の障害をもたらすことが示唆された。

Rhoden ら (2004)は、ラットに CAPs(ボストン由来)を曝露濃度 1,060±300µg/m³ で 5 時間曝露し、肺組織の生化学的及び病理学的解析を実施した。その結果、酸化反応物の 2 倍量の増加(チオバルビツール酸反応物質、酸化タンパク質)が認められた。また、炎症の指標としての BALF 中の好中球数の増加、肺湿重量の増加、軽度の気管支炎像が認められた。抗酸化剤としての N-アセチルシステイン前処置により、酸化脂質産生、肺の湿重量増加、BALF 内の好中球浸潤及び気管支炎の抑制効果が見られた。チオバルビツール酸反応物質と CAPs 中の Al、Si、Fe との有意な関連が認められた。本報告では CAPs 曝露により、活性酸素種の反応を介した生体影響が起こることが示唆されたと報告している。

Kodavanti ら (1997)は、ROFA または ROFA に含有される金属(Fe、V、Ni)をラットの気管内に 1 回投与した。ROFA の粒径は 1.95 ± 1.61µm で、投与量は ROFA(2.5 mg/個体)、Fe (0.54 µM/個体)、V(1.66 µM/個体)、Ni(1.0 µM/個体)であった。いずれも 0.3 ml の生理食塩水(pH 2.5)に溶解した。投与 1 時間後から気道・肺泡領域の浮腫及び出血性変化、炎症細胞(好酸球、好中球、マクロファージ)の浸潤が出現し、24 時間後にピークに達した後に 96 時間後まで継続した。同様の変化は金属の投与によっても惹起されたが、Fe や V に比べて Ni による肺の炎症や障害が高度であった。金属を混合した場合にはむしろ炎症・障害の誘導作用は減弱した。ROFA 投与 3 時間後には一過性に MIP-2、IL-18、IL-5、IL-6、VCAM-1、E-selectin の遺伝子発現が増加した。これら炎症性遺伝子は金属の投与でも観察されたが、特に Ni の影響が強く見られた。本研究では、ROFA に含有される金属による肺の炎症作用は、Ni>V>Fe の順に大きいことが示された。

Molinelli ら (2002)は、TSP の水溶性抽出物 1mg をラットの気管内に単回投与した。TSP 抽出物の気管内投与した場合の BALF 中のタンパク質や LDH は、生理食塩水の気管内投与に比較して増加した。金属類を除去した TSP 抽出物では、BALF 中のタンパク質や LDH の増加量は有意に減弱していた。金属類除去 TSP 抽出物に金属類を加えると、増悪効果は復活した。金属類でもタンパク質量は軽度に増加していた。TSP 抽出物、金属類除去 TSP 抽出物、金属類除去 TSP 抽出物+金属類の気管内投与により好中球性炎症が惹起されたが、群間で有意な差は見られなかった。本研究は、一般環境における粒子に含まれる水溶性の金属成分が、量によっては、肺の障害に関与している可能性があることを示している。

Kodavanti ら (1998)は、ROFA の金属含量の違いが肺の炎症と障害作用に影響するかについて検討するために、火力発電所の異なる部位から採集された ROFA をラットの気管内に投与した。ROFA 粒径は 1.99~2.59 μm 、投与量は 0.83、0.33、8.3 mg/kg(体重)を単回投与であった。24 時間の BALF 中のタンパク質、ヘモグロビン、LDH 量は Ni や Fe の含量と関連していた。一方、BALF 中の好中球数は V 含量と関連していた。マクロファージの活性化(活性酸素の産生)は V 含量の高い ROFA で観察された。ROFA による肺の炎症作用やマクロファージの活性化は V 含量と関連し、障害作用については Ni 含量と関連することが示された。

Clarke ら (2000b)は、CAPs を曝露されたイヌにおける肺の炎症や血液学的な反応について検討した。肺の炎症変化検索と血液学的な検索のために、正常イヌを CAPs やろ過空気に曝露した。血液学的な検索では、CAPs(360.80 \pm 266.60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)またはろ過空気に 6 時間/日、3 日間連続曝露の後、次の週には、清浄空気曝露群は CAPs 曝露へ、CAPs 曝露群は清浄空気へとクロスオーバー曝露し、CAPs の 1 日の組成の変化と血液成分の変化との関連を調べた。次の週にはクロスオーバー曝露を行い、CAPs の 1 日の組成の変化と血液成分の変化との関連を調べた。全ての CAPs や全ての擬似曝露を比較したところ、生物学的な反応において統計的な有意差はみられなかった。しかしながら、CAPs 曝露における生物学的な反応の変動が大きかった。すなわち、日ごとの曝露量と成分のばらつきが大きく、それに対する生物学的な反応も変動も大きくなっていった。そこで、統計学的に、CAPs の成分と生物学的な反応の間の関連性を解析した。BALF 中の好中球の割合、末梢血の総白血球数、好中球、リンパ球の増加が Al や Si の増加と関連していた。血中の好中球と肺胞洗浄のマクロファージの増加は V や Ni 因子と関連していた。BALF の好中球の増加は、Br/Pb と CAPs 曝露の 3 日目のデータのみで関連性がみられた。赤血球の数やヘモグロビンレベルの有意な減少がイオウと相関があった。BALF と血液学的なパラメータは総計 CAPs の質量濃度の増加とは関連がなかった。これらのデータは CAPs の吸入が肺性及び全身性の細胞プロフ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。

Schins ら (2004)は、工業地帯(都市部)と郊外より採集した PM(coarse、fine の 2 サイズ) 0.32mg/個体をラット気管内に投与し、18 時間後の BALF 及び血中の炎症指標を測定した。その結果、fine より coarse の PM が、さらに、工業地帯よりも郊外の PM がより強い毒性を示した。その背景に、金属(組成、含有量)ではなく、エンドトキシン量が関与していることが示唆された。

Gilmour ら (2004)は、CD1 マウスに CFA 気管内投与 18 時間後の BALF(各種炎症性指標 ; 好中球の浸潤、生化学的指標、炎症性サイトカイン)を解析した。粒径は ultrafine 0.2 μm (モンタナ産石炭由来)、fine 2.5 μm 、coarse >2.5 μm (西ケンタッキー産由来)で、投与量は 2mg/ml 原液から 50 μl を投与(100 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$)した。毒性はより小さいサイズの粒子の方

が大きい(0.2 μ m 以下の ultrafine > 2.5 μ m 以下の fine > 2.5 μ m 以上の coarse)ことが示された。この結果から、サイズの粒子が小さいほど CFA の毒性は大きく、また、毒性には、イオウ成分と微量元素成分の増加が関連することが示唆されると報告している。

Silbajoris ら (2000)は、ラットに対し ROFA(500 μ g ROFA in 0.5 ml saline)気管内投与した後に肺を摘出して免疫組織染色を行ない、炎症等に重要な細胞内シグナル経路として、MAPK(ERK1/2、p38-MAPK、JNK(c-Jun NH2-terminal kinase))のリン酸化について検討した。ROFA 投与 4 時間後から気道上皮、肺胞上皮、肺胞マクロファージの ERK1/2、p38-MAPK、JNK リン酸化が観察され、24 時間後まで持続した。ROFA による MAPK のリン酸化は培養気道上皮細胞に ROFA を曝露しても生じた。ROFA の投与により、肺の上皮細胞やマクロファージにおける MAPK の活性化が示された。

環境省 (2007a)は、都市沿道における CAPs の吸入曝露が細菌毒素に関連する肺障害に与える影響について、その増悪メカニズムとしてサイトカインやケモカインに及ぼす影響に注目し、検討を行った。ICR 雄性マウスを以下の 4 群に分け、約 5 時間に及ぶ CAPs 曝露実験を行った。平成 15 年度より 18 年度まで、曝露日を変えて同じプロトコールを計 8 回行なった。CAPs の曝露濃度は、平均 1,050mg/m³(範囲 128~4,103)、そのうち PM_{2.5} は 31 mg/m³(範囲 6~74)であった。気管内投与直後より CAPs 又は除粒子対照の曝露を開始し、気管内投与の 24 時間後に諸検討を行った。

① vehicle (対照溶液)気管内投与 + 除粒子対照曝露、②. 細菌毒素 (4 μ g/body) 気管内投与 + 除粒子対照曝露、③. vehicle (対照溶液) 気管内投与 + CAPs 曝露、④. 細菌毒素 (4 μ g/body) 気管内投与 + CAPs 曝露

その結果、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞浸潤では、毎実験において細菌毒素の経気道曝露により好中球の有意な増加と好酸球の増加傾向を示した。全 8 回の実験中 6 回で、CAPs 曝露により除粒子対照曝露と比較して好中球数の増加傾向を示し、そのうち 2 回は有意な差も認められた。炎症性サイトカイン及びケモカインとして、肺組織中の IL-1 β 、MIP-1 α 、MCP (Monocyte Chemoattractant Protein) -1、KC (Keratinocyte Chemoattractant) を測定した。細菌毒素の経気道曝露により、これらの炎症性タンパクの増加が認められたが、CAPs 曝露による炎症性タンパクの発現への影響は曝露日によって様々であった。CAPs 構成成分と炎症のパラメーターとの相関においては、好酸球にのみ相関を認めた。

以上より、CAPs 曝露はそれ自体で肺に明らかな炎症等の障害は与えないが、細菌毒素に関連する肺障害を増悪しうる可能性が示唆された。一方、CAPs 曝露は、細菌毒素との併存で好酸球性炎症を惹起することが示された。また、CAPs 曝露は、肺において細菌毒素で誘発される炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を曝露条件によっては増強することが示された。しかしながら、肺での炎症増悪に寄与している CAPs の成分を同定することは出来なかった。

5.2.2.2. 気道反応性の亢進及び喘息の悪化がみられる

Rudell ら (1996)は、アイドリング状態のディーゼル・エンジン (Volvo 1990) の排気筒における粒子捕集が、ろ過していない排気への曝露に比べ、ディーゼル排気で起こる症状や肺機能への影響を減少させるかどうかを評価した。12 人の健康な非喫煙者で、かつ喘息に罹患していない被験者 (男 8 人、女 4 人 : 20~37 歳) を 75W 相当の軽運動を 10 分、次いで 10 分間の安静のサイクルを繰り返しながら 1 時間曝露チャンバーで曝露させた。被験者は、3 つの別々の曝露を受けた [空気、ろ過しないディーゼル排気 (粒子数 ; $2.6 \times 10^6 / \text{cm}^3$ 、 NO_2 ; 1.9 ppm、 NO ; 2.7 ppm、 CO ; 27 ppm、総炭化水素 ; 4.5 ppm、ホルムアルデヒド ; $0.4 \text{ mg}/\text{m}^3$) 及び排気筒に粒子捕集を付けたディーゼル排気]。症状は、曝露中は 10 分ごとに、曝露後 30 分に Borg のスケールで記録した。肺機能は、コンピューター化した全身ボディープレチスモグラフィで測定した。セラミック・フィルターの気流粒子捕集により、粒子数は 46%減少したが、他の化合物の濃度はあまり変化しなかった。DE への曝露中の最も顕著な症状は目や鼻の刺激と曝露中の不快な臭いの増加であることが示された。DE への曝露中の肺機能の変化は、気道抵抗 (Raw) と特異的気道抵抗 (sRaw) の両方が有意に増加した。捕集で粒子数は 46%減少したにも拘わらず、症状や肺機能への影響は有意に減衰しなかった。結論として、ディーゼル排気への曝露は症状や気管支収縮を引き起こし、これらは粒子の捕集で有意に減少しなかったと報告している。

Salvi ら (1999)は、15 人の健康な非喫煙者の志願者 (男 11 人、女 4 人 ; 平均年齢 24 歳 ; 21~28 歳) を間欠的運動下 (分時換気量が $20 \text{ L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分運動、15 分安静の繰り返し) で 1 時間、空気及び希釈された DE に曝露した。DE は、Volvo TD45-1991 エンジンで発生させた。曝露は、 PM_{10} 濃度が $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ になるようにした。各成分濃度は、 NO_2 : 1.6 ppm、 NO : 4.5 ppm、 CO : 7.5 ppm、総炭化水素 : 4.3 ppm、ホルムアルデヒド : $0.26 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、浮遊粒子状物質 : $4.3 \times 10^6 / \text{cm}^3$ であった。各曝露の前後に肺機能 (PEFR、FVC、 $\text{FEV}_{1.0}$ 、 $\text{FEF}_{25-75\%}$) を測定した。肺の炎症性反応を調べるために、採血及び気道洗浄液と気管支粘膜の生検を得るために気管支鏡を各曝露後の 6 時間目に行った。標準的な肺機能検査は DE 曝露後変化しなかったが、気道洗浄液では、ヒスタミンと fibronectin の増加と共に好中球と B リンパ球の有意な増加がみられた。DE 曝露後 6 時間後に得られた気管支生検は、気管支組織における LFA-1+ 細胞の数の増加と共に、内皮接着分子である ICAM-1 と VCAM-1 の upregulation と共に好中球、マスト細胞、 CD4^+ と CD8^+ T リンパ球の有意な増加を示した。好中球と血小板の有意な増加が、DE 曝露後末梢血で観察された。この研究は、高濃度で、急性の短期間の DE 曝露は、健康な志願者の標準的な肺機能測定では過小評価されるが、顕著な全身性及び肺の炎症反応をひき起こすことを実証していると述べている。

Nordenhäll ら (2001)は、喘息患者の気道の過反応性、肺機能及び気道炎症への影響を評価することにより、DE への短期間曝露の影響を調べた。被験者は、14 人の非喫煙者のアトピー性喘息患者 (男女各々 7 人、平均年齢 26 歳 : 22~57 歳) で、コルチコステロイ

ドの継続的な吸入治療及び短期間作用の β_2 作動薬を吸入している安定した状態にあった。DE は Volvo TD45-1991 エンジンで発生させ、曝露チャンバー内に入る DE は、50%カットオフの空気力学径が $10\mu\text{m}$ (PM_{10}) の粒子濃度が $300\mu\text{g}/\text{m}^3$ (主要都市の交通頻繁な道路でみられる高濃度を代表) になるようにし、 NO_2 濃度は 1.2 ppm であった。各被験者は、DE と空気に別々に間欠的運動下 (分時換気量が $20\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 1 時間曝露された。DE への曝露後 24 時間では、空気に比べメサコリンに対する過反応性の程度が有意に増加した。また、気道抵抗と喀痰中の IL-6 の有意な増加がみられた。この研究は、高レベルの DE への短期間曝露は、コルチコステロイドの吸入療法を受けていても、喘息患者の気道における悪影響に関連していることを示している。気道反応性亢進は、粒子状物質への曝露に続いて喘息の増悪という疫学的知見との重要な関連を提供していると述べている。

Holgate ら (2003b) は、DEP への曝露による臨床的感受性が、急性の好中球性炎症あるいはアレルギー性気道炎症の増加で説明できるかどうかを、15 人の非喫煙者の喘息グループ (男 10 人、女 5 人、平均年齢 30 歳 ; 23~52 歳) と 25 人の非喫煙者のコントロール・グループ (男 16 人、女 9 人、平均年齢 25 歳 ; 19~42 歳) について調べた。DE は、Volvo TDIF-1990 で発生させ、曝露チャンバー内の平均濃度は PM_{10} : $108.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、CO: 1.7 ppm 、NO: 0.6 ppm 、 NO_2 : 0.2 ppm 、HC: 1.4 ppm 、HCHO: $43.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。被験者は間欠的運動下 (分時換気量が $15\sim 20\text{ L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 2 時間曝露され、曝露前後に鼻洗浄液採集、曝露終了後 6 時間目に気管支鏡を行った。コントロール・グループ及び喘息グループでは、気道抵抗の有意な増加がみられた。この増加は、コントロール・グループでは気管支洗浄液 (BW) 中の好中球の増加及び BAL 中のリンパ球の増加と関連していた。コントロール・グループの気管支生検組織では、内皮接着分子 P-selectin の upregulation がみられ、また BALF 中の IL-8 タンパク質濃度及び IL-8 mRNA 遺伝子発現量の有意な増加がみられた。末梢血中の赤血球や白血球数には変化がみられなかった。喘息グループの気道粘膜の生検組織は、空気曝露後に好酸球性気道炎症がみられたが、DE は、気道の好中球、好酸球やその他の炎症性細胞、またサイトカインや炎症のメディエーターの有意な変化をもたらさなかった。唯一の明確な影響は、生検組織の IL-10 染色で有意な増加がみられたことである。この研究は、あまり高くない濃度の DE であっても、コントロール被験者の気道に明白な炎症効果を及ぼすこと、IL-8 産生に直接影響し内皮接着分子の upregulation を起こすことを示している。DE に対する喘息患者の感受性が亢進するという臨床報告があるが、この感受性は好中球性の炎症や既存の喘息の気道炎症の悪化によるものではなさそうである。喘息患者で DE への曝露後 IL-10 の増加がみられたことは、気道炎症に何らかの影響を引き起こすかもしれないことを示唆していると述べている。

Stenfors ら (2004) は、25 人の健康な非アトピー性の者 (男 16 人、女 9 人 : 平均年齢 24 歳 ; 19~42 歳) 及び 15 人の β_2 作動薬の吸入のみしている軽症の喘息患者 (女 5 人 :

平均年齢 30 歳 ; 22~52 歳) を大気レベルの DE [10 μ m の空気力学径の 50%カット-オフの粒子 (PM₁₀) 濃度が 108 μ g/m³ (94~124)、CO は 1.7 ppm (0.6~2.5)、NO₂ は 0.2 ppm (0.1~0.3)] に中等度の間欠的運動下 (分時換気量が 15-20L/min/m² の負荷で 15 分間の運動と安静の繰り返し) で 2 時間曝露し、肺機能と気道炎症を評価した。DE は、Volvo のディーゼル・エンジンで発生させた。肺機能は Body-plethysmograph で sRaw (特異的気道抵抗)、FVC 及び FEV_{1.0} を測定した。曝露後、6 時間目に気管支鏡を行い、気管支生検、気管支洗浄液 (BW) 及び BALF を採集した。粘膜生検については、特異的細胞マーカー、血管内皮接着分子及び細胞内接着分子、サイトカインや転写因子を測定した。BW 及び BALF については、細胞分画、アルブミン、総タンパク質、IL-6、IL-8、GM-CSF、methyl-histamine、MPO 及び ECP を測定した。DE 曝露後、FEV_{1.0} や FVC は、どのグループも影響がみられなかった。sRaw は、空気曝露に比し、健康者では 4.1% (p<0.01)、喘息患者では 6.5% (p<0.01) の増加を示したが、グループ間では反応の大きさに統計的な差はみられなかった。健康な被験者は、DE 曝露後、気道炎症を起こし、気道洗浄液における IL-6 と IL-8 タンパク質の増加、気管支粘膜における IL-8 mRNA の増加と内皮の接着分子 (P-selectin と VCAM-1) の upregulation を伴った気道の好中球増加とリンパ球増加を示した。喘息患者では、DE 曝露は、好中球性反応を引き起こしたり、既存の好酸球性気道炎症を増悪させたりすることはなかった。サイトカインの IL-10 の上皮染色は、喘息グループでは DE 後に増加していた。DE による IL-10 の誘発は、喘息患者の気道炎症の増強に寄与するかもしれない。現在の WHO の大気質基準以下の濃度で 50%カット-オフの空気力学径が 10 μ m の粒子が、健康者と喘息患者で異なる影響がみられることが、この研究で観察された。これらの異なる反応の意味を解明するには更に研究が必要であると述べている。

Diaz-Sanchez ら (1994) は、11 人の健康な非喫煙者 (男 6 人、女 5 人 ; 23~48 歳) に対し、DEP の 1.0、0.3、0.15 または 0 mg を 200 μ L の食塩水に浮遊させたものの何れかを鼻腔内に噴霧し、経時的に鼻腔洗浄を行い洗浄液中の各種免疫グロブリン及びその遺伝子発現を解析した。DEP は、light-duty ディーゼル乗用車の排気を捕集したもので、全ての被験者は DEP の 4 つの量 (1.0、0.3、0.15、0 mg) の全てに曝露された。その結果、0.3 mg の DEP 投与後 4 日には IgE (Immunoglobulin E) 濃度の有意な増加が認められたが、0.15 mg 及び 1.0 mg DEP 投与ではみられなかった。また、0.3 mg DEP 投与後 4 日目には IgE の増加がみられたが、7 日目と 10 日目にはみられなかった。0.3 mg の DEP は、ロサンジェルスの大気の 24 時間吸入量に相当する。しかし、IgG、IgA、IgM、アルブミンは不変であった。0.3 mg DEP 投与では、洗浄液中の IgE 産生細胞の数は 20 倍以上に増加し、また遺伝子レベルでは異なる IgE タンパク質をコードする 5 種類の epsilon mRNA (CH4-M1'-M2、CH4-M2'、CH4-M2"、CH4-S、CH4'-CH5) のうち CH4'-CH5 を除いた全ての発現が亢進した。これらの所見は、DEP が、ヒトの B 細胞分化を増強し、IgE 抗体の産生を増強させることによってアレルギー性疾患の反応を増大させることを示唆していると述べている。

Diaz-Sanchez ら (1996)は、健康な非喫煙者 14 人 (男 8 人、女 6 人 : 23~48 歳) に対し DEP 0.15 mg を 200 μ L の食塩水に浮遊したものを鼻腔内に噴霧し、総量 0.3 mg の DEP を投与した。DEP は、light-duty のディーゼル乗用車の排気から採集した。18 時間後に鼻腔洗浄を行い洗浄液中のサイトカインの mRNA 及びタンパク質の発現を検討した。その結果、DEP 投与前の被験者の鼻洗浄液中の細胞から、IFN (Interferon)- γ 、IL-2 及び IL-13 の mRNA が検出できたが、DEP 投与後では、細胞は、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 及び IFN- γ の mRNA を産生し、全てのサイトカイン mRNA レベルが増加した。また洗浄液中の IgE 濃度の有意な上昇もみられた。したがって、DEP への曝露後のこれらのサイトカインの発現の増加が、IgE 産生の増強に寄与し、アレルギー性呼吸器系疾患の増加に関連している可能性があるとして述べている。

Diaz-Sanchez ら (1997)は、13 人のブタクサの皮内テストで陽性の非喫煙者 (男 6 人、女 7 人 : 21~49 歳) に対して DEP (0.30 mg) とブタクサ抗原の両者を組み合わせて、ヒトの鼻内にチャレンジを行い、局所の液性免疫に与える影響を検討した。DEP は、light-duty のディーゼル乗用車の排気から採集した。ブタクサ抗原単独のチャレンジと比較して、DEP とブタクサ抗原の組み合わせは抗原特異的 IgE の著明な増加をもたらしたが、総 IgE や IgE 分泌細胞数は変化しなかった。総 IgG4 や抗原特異的 IgG4 も増加したが、総 IgG は変化しなかった。両者の共同作用は alternative splicing による epsilon mRNA (CH4-M1'-M2、CH4-M2'、CH4-M2"、CH4-S、CH4'-CH5) のレベルにおいても CH4'-CH5 を除いて観察された。さらにブタクサ抗原単独では、低レベルのサイトカイン mRNA が検出されたにすぎなかったが、ブタクサ抗原と DEP の組み合わせは Th(T helper cells)1 タイプのサイトカイン (IFN- γ や IL-2) の表現の減少をもたらしたが、他のサイトカイン (IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13) の mRNA の表現の増加をもたらした。DEP とアレルゲン曝露の相乗作用はアレルゲン誘導性の呼吸器系疾患の増加を示唆する重要な所見と考えられると述べている。

Fujieda ら (1998)は、8 人の健康な非喫煙者 (男 4 人、女 4 人 : 21~36 歳 : 全員がブタクサの皮内反応テストが陽性) 全員に、異なった日に、ブタクサ・アレルゲンのみ、DEP のみ、及び DEP+ブタクサ・アレルゲンのチャレンジを受けさせた。被験者は、ブタクサ・アレルゲン (Amb a I) を 10 AU から始めて即時アレルギー症状がでるまで 10 倍ずつ濃度をあげるか、1,000 AU まで鼻にスプレーすることによりチャレンジした。8 週間あけて、DEP (0.3 mg) とブタクサ・アレルゲンの両方あるいは DEP のみに、無作為にチャレンジされた。100 μ l の食塩水に DEP (0.15 mg) を含んだものを鼻孔にスプレーし、総量 0.3 mg の DEP を曝露した。各被験者は、チャレンジ前の三つの異なった日と、チャレンジ後 4 日目に 5 ml の生理食塩水で鼻洗浄を行い、鼻洗浄液について分析を行った。新しい nested polymerase chain reaction-based approach (ポリメラーゼ連鎖反応に基づいたアプローチ) による deleted switch circular DNA (switch circles) の検出を、IgE

isotype switching が起こっているという明確な分子的証拠として採用した。DEP にブタクサ抗原を加えてヒトの鼻にチャレンジすると、局所的な IgE 産生を増強し、局所的なサイトカイン産生を刺激し、ブタクサ・アレルゲンに対する粘膜の IgE 抗体を顕著に増加させることが示された。DEP+ブタクサ・アレルゲンのチャレンジ後 4 日目に、鼻洗浄細胞中に μ から ϵ への switching を示す deleted switch circular DNA (S ϵ /S μ) のクローンを検出した。DEP のみあるいはブタクサ・アレルゲンのみでのチャレンジでは、鼻洗浄細胞中に switch circular DNA は検出されなかった。これらの結果は、DEP とブタクサ・アレルゲンの粘膜刺激の複合は、ブタクサ・アレルギーのヒトで *in vivo* の IgE isotype への switching を引き起こしうることを示している。これらの結果は、ヒトでの *in vivo* の IgE isotype の switching を直接的に初めて示したものであると述べている。

Diaz-Sanchez ら (2000a) は、DEP がヒトの鼻粘膜細胞による CC ケモカインの産生に影響を与えるかどうかを、10 人の健康な非喫煙者 (男 3 人、女 7 人 : 23~31 歳) の鼻腔に DEP を曝露して調べた。DEP は、light-duty のディーゼル乗用車から得られたもので、0.3 mg を 200 μ l の食塩水に含めたものをスプレーして投与した。投与後、2、4、6 及び 24 時間後の鼻洗浄液中の RANTES、MIP-1 α 及び MCP-3 レベルは、経時的に有意に上昇し、6 時間または 24 時間後に最高値に達した。反対に DEP は、eotaxin レベルを増強させなかったことから、DEP は、全ての CC ケモカインに一樣に影響を与えていないことを示していた。DEP は、また鼻洗浄液中の総細胞数を増加させ、リンパ球、単球、マクロファージや好中球の増加も観察されたが、好酸球数は変化しなかった。ECP タンパク質レベルは有意に増加した。DEP の曝露後に特定の鼻のケモカイン表現が上昇することは、アレルゲンがなくても、炎症、細胞浸潤や IgE の増加に関与しているようであると述べている。

Diaz-Sanchez ら (2000b) は、プリック・テストでハウスダスト・ダニに陽性の 11 人の非喫煙者 (男 6 人、女 5 人 : 21~55 歳) に、既知の量の *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) を含むハウスダスト・ダニの抽出物を鼻にスプレーして、症状スコア (鼻搔痒感、鼻閉、鼻汁、くしゃみ) が 5 になるまで増量した。その後、被験者は、300 μ L の食塩水に 0.3 mg の DEP (Isuzu のディーゼル・エンジンの排気から捕集したもの) または CB を同様に含むもの、及び 300 μ L の食塩水の何れかを鼻に噴霧し、次いでダスト・ダニ抗原で症状スコア 5 が得られるアレルゲン量を調べた。その結果、アレルゲンのみの症状スコアは 3.7、DEP のみは症状を誘発しなかったが、DEP+アレルゲンはスコアが 9.9、CB では症状スコアは増強しなかった。鼻洗浄液中のヒスタミン濃度は、アレルゲンのみに比し、DEP+アレルゲンでは約 3 倍近く増加した。DEP 中の化学物質がマスト細胞に直接作用するかどうかを調べるために、マウスの肥満細胞系 (MMC-34) を用いて、高親和性 IgE 受容体の IgE/ α -IgE クロスリンクのもとで、DEP の溶解性有機化学物質と一緒に培養すると、 β -hexosaminidase とヒスタミンの放出が増強され、DEP 濃度との間に量-反応関係がみられた。これらの結果は、DEP への曝露はマスト細胞の脱顆粒を増強することによりアレルゲンに対する臨床症状の重症度を増強させることを示唆していると述べている。

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 (OVALubumin)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(一、±、+、++、+++、++++)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β2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OVA1μg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る。DEP による反応増強は局所のサイトカインを介して起こっている可能性がある。抗原特異的 IgG₁ は DEP により増強されるアレルギー喘息の病因に重要であると考えられたと述べている。

Takafuji ら (1987)は、マウスに種々の量の DEP(1、5、 $25\mu\text{g}$)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 1.0 mM ヒスタミンを10分間曝露して鼻腔内圧、鼻汁分泌を測定した。また血管透過性を皮膚で見た。その結果、DEP、ヒスタミンの濃度に依存していずれも増加した。このことから DEP によってヒスタミンへの感受性が高まり、過敏反応が引き起こされることがわかった。

Ohyama ら (1998)は、OVA に比べより現実的なカビ抗原($30\mu\text{g}$ 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 CAPs では正常ラットへの悪影響はみられなかったと報告している。しかし、喘息モデルのラットでは気道粘液産生や気管支炎の増悪がみられていることから、デトロイトの南西部の粒子中に重量濃度に依存しない喘息の悪化にかかわる粒子の存在、及び沈着が明らかにされたものと考えられる。

Alessandrini ら (2006)は、BALB/c マウスを用いて超微小カーボン粒子のアレルギー性気道炎症への影響を調べた。曝露濃度は、119、332、526 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均)であった。カーボン粒子の曝露時間は 24 時間であるが、抗原感作とのタイミングを検討し、その影響メカニズムを解析した。その結果、最終の抗原感作より 24 時間前、及び 4 日間前にカーボン粒子を曝露した群でより炎症反応やサイトカイン産生が増強しており、抗原感作後の曝露では炎症反応の遅れやサイトカイン産生の低下がみられた。抗原感作前のカーボン粒子曝

露は、強力なアジュバント効果を生じることが示された。

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/m² 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 6.4mg/m³ の濃度で、NO₂ の平均は 2.8ppm であった。曝露後、*Streptococcus pyogenes*、あるいは A/PR8-34 インフルエンザウイルスに感染を行いその致死率への影響を 2 週間にわたり調べた。その結果、*Streptococcus pyogenes* 感染に対しては、すべての曝露期間で、清浄空気群にくらべ致死率の増加がみられた。しかしながら、A/PR8-34 インフルエンザウイルス感染に対しては曝露群と対照群とで差はみられなかったと報告している。

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

Lambert ら (2003)は、マウスに CB を 40µg/個体の量で気管内投与後、RSV (Respiratory Syncytial Virus)を感染し、曝露後 1~10 日間の期間で観察を行い、炎症反応への影響を検討した。CB 処理により BALF 中炎症細胞数に誘導が認められた。処理直後では好中球が強く誘導された。また、CB+RSV 併用処理により、処理 7 日後に好中球の強い誘導が認められ、処理 2~10 日後ではリンパ球の CB による誘導が RSV 処理により若干抑制された。TNF 産生量は RSV 単独処理に比較し、CB+RSV 処理で処理 1~2 日後では抑制され、4~7 日後では促進された。CB 及び RSV の併用処理 4~10 日後の IL-13

産生量が誘導された。また、IP-10 mRNA 発現量は CB 処理により抑制され、RSV により誘導される IP-10 mRNA 発現量も CB 併用処理により抑制された。その他、Th2 タイプのサイトカイン・ケモカイン産生量は CB 処理により誘導されたが、Th1 タイプのサイトカイン・ケモカイン産生量は抑制された。感染前の微小粒子投与は、その後の免疫応答をアレルギー増強に導く可能性を示唆している。本研究結果より、カーボンナノ粒子の気管内投与により、炎症症状が誘導され、獲得免疫系のうち細菌感染防御に関与する Th1 ではなく、アレルギー応答である Th2 が有意になることを示した。

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}(±SD) : 371.5(±208.3) µg/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、フィブロンネクチン、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 : 25 nm、100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、ヒトでは 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ に相当)と O₃(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 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。肺胞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 ; 皮膚ブリック・テストで一般的な吸入性アレルゲンに少なくとも一つ陽性、但しハウスダスト・ダニに陽性の者は除外) について、3 種類の被験物質、すなわちオフィスの粉塵 (オフィスにおける掃除機のバッグからの粉塵を再浮遊)、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 の肺炎症作用が認められ、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。肺胞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）、Tunnicliffe ら（2001））。以上のようにヒトにおける研究成績は限定的ではあるが、DE や DEP の曝露が気道反応性を亢進させて喘息やアレルギー性鼻炎を悪化させる可能性が示唆されている。

動物実験では粒子状物質曝露による喘息やアレルギー性鼻炎の悪化作用を示唆するより多くの証拠が得られている。例えば DE や DEP の吸入曝露、点鼻あるいは気管内投与を受けた動物では、抗原曝露により誘発される喘息（気道抵抗や気道過敏性の増加）やアレルギー性鼻炎が悪化し、その機序として気道の好酸球浸潤や杯細胞の過形成、IL-5 やエオタキシンの発現、抗原特異的 IgE や IgG1 の産生増強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。

5.3. 循環器系（心血管系）への影響

5.3.1. 仮説の紹介

米国等の疫学研究の知見において、微小粒子状物質の曝露と循環器系疾患による死亡増加の関連性が示されてから、細胞や小動物等を用いた実験的研究においても微小粒子状物質の循環器系への影響に関する研究が蓄積されてきた。

ヒト及び実験動物における微小粒子状物質の吸入による一般的な循環器系疾患の発現機序については、これまで世界中で膨大な数の基礎研究と臨床研究がなされている。

循環器系疾患の原因の一つとなる不整脈の発生については、健常者よりも虚血性心疾患患者（冠動脈閉塞等による心筋梗塞）、動脈硬化症や高脂血症を伴う高血圧患者、先天性・後天性QT延長症候群患者等に現れやすい。また、運動時や起立時等、循環器への機能的負荷が増大する際に不整脈が生じやすい。この発生には、自律神経バランスの変化が密接に関与していると考えられる。

また、粒子状物質が心血管系に作用を及ぼすと考えられる他の経路として、粒子状物質が血管内皮細胞を障害することで血小板の活性化、フィブリノゲンの増加、血栓形成が促進される可能性が挙げられる。このような凝固線溶系の変化は塞栓症を起こしやすくし、血管抵抗の上昇や冠動脈閉塞による心血管系影響が現れやすくなると考えられる。

さらに、微小粒子状物質が気管支や肺実質を刺激し炎症性影響をもたらすことが知られているが、その結果として炎症性の内因性物質による心臓への直接的影響や気道粘膜の知覚神経刺激による心臓への反射性影響が生じうるという可能性もある。また、肺に沈着した粒子状物質中の成分が血液中に吸収される場合には、それらの成分の心血管系に対する直接作用（酸化作用等）の可能性も否定できない。

国内外の文献的知見あるいは学術集会における議論等から、微小粒子状物質を吸入することによって引き起こされる循環器系への影響は、自律神経系を介した影響あるいは肺の炎症、血液の凝固線溶系の変化、粒子状物質成分の血管内への浸出を介した影響のいずれか、あるいはこれらの組み合わせによるものと推察される。

以上の背景を踏まえ、影響評価に関する以下の仮説を設け、それぞれの仮説項目について概要を述べる。

- (1) 微小粒子状物質の曝露によって不整脈が誘発されやすくなる
- (2) 微小粒子状物質の曝露によって、心血管系器官の構造や機能の変化をきたし、そのことが不整脈の発現性に影響を及ぼす
- (3) 微小粒子状物質の曝露によって、自律神経機能に影響を及ぼす
- (4) 血液の凝固線溶系への影響がみられる
- (5) 心機能変化において呼吸器系の刺激が影響する
- (6) 微小粒子（粒子中成分）は血液中に浸出し心血管系に影響を及ぼす

- (7) 疾患モデル動物は正常動物に比べて循環機能変化に差異が生じる
- (8) 複合大気汚染により影響の増悪が生じる

5.3.2. 論文の紹介

5.3.2.1. 微小粒子状物質の曝露によって不整脈が誘発されやすくなる

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ガラスファイバーに集め濃縮した PM_{2.5} であり粒子サイズは 2.5 μ m より小さかった。ハローセン麻酔下で PM_{2.5} を 2.0mg/0.3mL saline の量で単回投与した。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及び心室期外収縮等の不整脈が出現した(有意差あり)。また、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 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。

Wellenius ら (2004)は、心筋梗塞モデル動物において不整脈等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 μ g/m³、CO(一酸化炭素)を 35ppm、CAPs を 348.4 μ g/m³ 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(Bronchoalveolar Lavage Fluid)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 $93.7\sim 1,055.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、冠動脈閉塞動物で $71.8\sim 741.2\mu\text{g}/\text{m}^3$ 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。

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 $0.8\sim 0.4\mu\text{m}$ でレンジは $< 3\mu\text{m}$ 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($10\text{mg}/\text{kg}$ (体重))を $5\text{mg}/\text{mL}$ に希釈し気管内(単回)投与した。また LPS: $350\text{endotoxin units}$ 、 0.5 mL 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、ランゲ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、Left Ventricular Developing Pressure)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、 Zn^{2+} ($50\mu\text{M}$)、PM($100\mu\text{g}/\text{mL}$) 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。

Nadziejko ら (2002) は、血圧の発信装置を外科的に植え込んだ SHR(Spontaneously Hypertensive Rat:高血圧自然発症ラット)に CAPs を 4 時

間曝露して、CAPs の吸入の即時影響があるかどうかを調べた。用いたのは CAPs、硫酸エアロゾル(MMAD : 160nm)、及び Ultrafine 硫酸粒子(MMAD;50 ~ 75nm)であった。曝露濃度はそれぞれ、CAPs : 平均 73 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸エアロゾル : 平均 225 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸微小粒子 : 468 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。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、硫酸エアロゾルもラットに曝露した。CAPs 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。同じラットに微小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、Ultrafine の硫酸粒子曝露では、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、微小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。

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 0.1~0.2 μm (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 5bpm で、曝露群のそれは 290 \pm 7bpm 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。光顕的には、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気中濃度の曝露が、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。

Campen ら (2000)は、ラットに ROFA を気管内投与し、体温や循環系への影響を調べた。

ラットの飼育環境温度及び曝露条件は、1 群(22 $^{\circ}\text{C}$ 環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与、2 群(10 $^{\circ}\text{C}$ 環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与、3 群(22 $^{\circ}\text{C}$ 環境飼育、O₃曝露は n=4、対照は n=3): 1ppmO₃ の曝露(6 時間)後、0、2.5mg ROFA 投与、4 群(22 $^{\circ}\text{C}$ 環境飼育、各 n=4): モノクロタリン処置後、0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与とした。モノクロタリンは腹腔内投与した。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 投与した 22 $^{\circ}\text{C}$ 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℃環境下よりも深刻だった。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。モノクロタリン投与群では濃度依存的に持続的に体温が下がり続け、致死率も高頻度であった。心拍数パターンはすべての群における深部体温のパターンに酷似していた。

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では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。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。本研究では、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。

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(不整脈等)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℃、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。

高齢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、不整脈等の悪影響は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

は混合で、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (105 μg)、 NiSO_4 (263 μg)、 VSO_4 (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 時間後に心拍数及び深部体温の低下、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。

Campen ら (2002)は、ROFA の曝露が心機能及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、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 NiSO_4 、 VSO_4 であった。曝露濃度や実験条件は、以下のとおりであった。

1 群(モノクロタリン非処置群、各 n=4):① 生理食塩水投与、② 0.105mg $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、③ 0.263mg NiSO_4 、④ 0.245mg VSO_4 、2 群(モノクロタリン処置群、各 n=10): ① 生理食塩水投与、② 0.105mg $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、③ 0.263mg NiSO_4 、④ 0.245mg VSO_4 、3 群(モノクロタリン処置・金属混合群、各 n=6): ① $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3+\text{VSO}_4$ 、② $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3+\text{NiSO}_4$ 、③ $\text{NiSO}_4+\text{VSO}_4$ 、④ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3+\text{NiSO}_4+\text{VSO}_4$ とした。

V は健康ラット及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°C 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。

Hwang ら (2005) は、粒子径平均 $389 \pm 2 \text{ nm}$ (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、及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、及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、及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、及び身体的活動の 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。

Wellenius ら (2003)は、6 匹のイヌに開胸手術を試行し、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。二匹を一組とし、CAPs (Harvard Ambient Particle Concentrator を使用 ; 345.25 ± 194.30 ($161.34 \sim 957.32$) $\mu\text{g}/\text{m}^3$) もしくは清浄空気を 6 時間/日、3 日間連続で吸入させた。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。冠動脈閉塞による 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。以上の結果から、浮遊粒子状物質は、冠動脈狭窄や閉塞に基づく心疾患を増悪する可能性が示唆された。

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

清浄空気曝露時の WKY ラット、SHR の相違では、同週齢で比較した体重当たりの肺・左室重量は SHR の方が WKY ラットよりも重かった。WKY ラットと比較して SHR では、アセチルコリンに対する気道反応性が低く、肺組織中に活性化したマクロファージ、好中球、出血を認め、BALF 中のタンパク質量、マクロファージ、好中球、赤血球、チオバルビタール酸反応物質、肺サイトカ

イン mRNA の発現量が高かった。加えて、SHR では、左心室心筋組織の炎症所見(心筋症と単球細胞浸潤)とサイトカイン mRNA 発現量の亢進が見られ、心電図波形で ST が低下していた。

ROFA 曝露効果では、SHR の方が肺組織の炎症所見が WKY ラットよりやや強く、BALF 中タンパク質、アルブミン量は有意に増加した。また、SHR においては BALF 中赤血球数の増加が見られ、このことは肺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。肺泡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 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- 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」と述べている。

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。高齢イヌ(ビーグル犬、n=4、10.5 歳)に対して、平均粒径 2.22 μ m の ROFA を、3mg/m³ 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。

Gordon ら (2000) は、F344 ラット(雄)にモノクロタリンを前投与して右心肥大と肺高血圧を誘導した後に、Gerber 遠心エアロゾル濃縮器を用いたニューヨークの CAPs を吸入曝露(曝露濃度:134~400 μ g/m³、3~6 時間/日、1 日)して、呼吸機能、心電図、BALF 中の炎症性細胞と LDH 活性を測定した。モノクロタリンを前投与したラットにおいて、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。

5.3.2.2. 微小粒子状物質の曝露によって、心血管系器官の構造や機能の変化をきたし、そのことが不整脈の発現性に影響を及ぼす

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 PM_{2.5} であり粒子サイズは 2.5 μ m より小さかった。ハローセン麻酔下で PM_{2.5} を 2.0mg/0.3 mL saline の量で単回投与した。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及び心室期外収縮等の不整脈が出現した(有意差あり)。また、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 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、CAPs の吸入及び都市大気粒子(UAP、Urban Air Particles)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 μ g/m³であった。SDラットに CAPs を吸入曝露(700 μ g/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。

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 μ m 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 等の構成要素から成っていた。蒸留水 1 mL に PM_{2.5} を 100 μ g 希釈したもの(PM100)または蒸留水 1 mL に PM_{2.5} を 500 μ g 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。

Campen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)及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及び曝露条件は、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、2.5mg ROFA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。

Gurgueira ら (2002)は、ラットに CAPs($300 \pm 60 \mu\text{g}/\text{m}^3$)を 1~5 時間吸入させ、人工呼吸下に肺、心臓、肝臓の化学発光量(酸化ストレスの指標)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($1.7 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、30 分)の曝露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。

Elder ら (2004)は、超微小粒子(UFP、UltraFine Particles)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 (平均粒子濃度 $37 \sim 106 \mu\text{g}/\text{m}^3$)に曝露した。高齢ラットは、高速道路上において曝露システム(mobile emissions laboratory)を使用し、①エアロゾル($<1\mu\text{m}$)と気相、②気相、③ろ過空気のいずれかに曝露した。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、及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た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的高齢ラットの肺と心血管系に影響があることを示している。

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の一種)、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: $110 \pm 79 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、ApoE^{-/-}: $120 \pm 90 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、DK(雄): $131 \pm 99 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、DK(雌): $131 \pm 99 \mu\text{g}/\text{m}^3$)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、及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($p=0.06$)に近かつ

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、及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 µg/m³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、Standard Deviation of R-R intervals)及び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及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心臓自律神経機能の攪乱を導くことが示唆された。

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 µg/m³、長期平均19.7 µg/m³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、及び身体的活動差と、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、及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。

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を貪食した肺泡マクロファージ数の増加が見られた。

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85 mg/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。

Kodavanti ら (2003)は、金属組成が都市部の大気中PMと類似したEPM (oil combustion emission particulate matter) 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、急性及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1.2 μ m、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 \times 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、及び線維化を認めた。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。

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 μ g/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 μ g/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。

5.3.2.3. 微小粒子状物質の曝露によって、自律神経機能に影響を及ぼす

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、Interstate 90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。道路上大気中の

浮遊粒子状物質濃度が $1.95 \sim 5.62 \times 10^5$ 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、 $37 \sim 106 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ であった。曝露時間は 6 時間/日であった。道路上大気中の浮遊粒子状物質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。道路上大気中の浮遊粒子状物質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。

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。

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。

Vincent ら (2001)は、オタワ標準粉じん(EHC-93)(48 mg/m³)とそれを水ろ過した EHC-93L (49 mg/m³)、Diesel soot(DS)(4.2 mg/m³)、CBP(4.6 mg/m³)を 4 時間吸入(鼻部)曝露した。EHC-93 曝露後 2 日で血圧が、32 時間でエンドセリン(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。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。水ろ過により極性有機化合物や可溶性成分を取り除く(EHC-93L)と、血行力学的影響が認められなかった。大気浮遊粒子の曝露による血漿 ET-1、ET-3 量の上昇について、血圧上昇との明確な相関関係は得られていないものの、ラットで EHC-93 曝露による血清エンドセリン量の上昇と血圧上昇が併行して起こることが示された。

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 0.1~0.2 μ m(空気力学的直径)の DE を、0、30、100、300、1,000 μ g/m³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 5bpm で、曝露群のそれは 290 \pm 7bpm 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。光顕的には、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気中濃度の曝露が、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。

Nightingale ら (2000)は、正常な志願者における Diesel exhaust particles (DEP : ディーゼル排気粒子) の吸入に対する炎症性反応を調べた。DEP は、ディーゼル・エンジンの排気から捕集され、市販の粒子分散器で再浮遊させ曝露チャンバーに導入した。10 人の健康な非喫煙者(男 3 名、女 7 名、平均年齢 28 歳)を空気力学径が 10 μ m 以下(PM₁₀)の粒子濃度を 200 μ g/m³にコントロールした DEP に、または清浄空気に、チャンバー内で、安静下で 2 時間曝露し

た。曝露後 4 時間に至る痰の誘発と静脈切開と同様に一連のスパイロメトリー、脈拍、血圧、呼出一酸化炭素 (CO) 及びメサコリン反応を測定し、曝露後 24 時間目にこれら全ての手技を繰り返した。DEP への曝露後、心血管系パラメーターや肺機能に変化はみられなかった。呼気 CO レベルは DEP 曝露後に増加し、1 時間目に最高となった (空気: 2.9 ± 0.2 ppm [平均 \pm SEM]; DEP: 4.4 ± 0.3 ppm; $p < 0.001$)。空気曝露後 4 時間と比較すると DEP 曝露後 4 時間では痰中の好中球 ($41 \pm 4\%$ 対 $32 \pm 4\%$) と myeloperoxidase (MPO) (151 ng/mL 対 115 ng/mL, $p < 0.01$) の増加がみられたが、末梢血中の IL-6、TNF- α 及び P-selectin の濃度に変化がみられなかった。以上の結果から、高濃度での DEP への曝露は、正常な志願者で気道の炎症性反応をおこすと述べている。

Petrovic ら (2000) は、ハーバード大気粒子濃縮機を用いて、トロントのダウンタウンの大気から濃縮された PM_{2.5} (CAPs) の健康影響を調べた。4 人の若い健康な非喫煙者 (男女各々 2 人、18~40 歳) をろ過空気 (FA) 及び $23 \sim 124 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の CAPs にマスクを介して鼻呼吸で、安静下で 2 時間曝露した。CAPs は、低 ($31.5 \pm 7.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、中 ($52.9 \pm 33.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、高レベル ($92.1 \pm 24.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$) に分類し、肺機能、症状報告、炎症性細胞、血液凝固因子及び心臓への影響を調べた。CAPs 曝露中の、平均ガス濃度は、O₃ が 9 ± 8 ppb、NO₂ が 20 ± 7 ppb であった。曝露後、心臓の影響を増強するために、130 bpm の心拍数を目標に 30 分の運動を行った。その間、心臓の反応を調べた。12 誘導の心電図 (ECG) データの心臓病専門医によるレビューでは、曝露中、曝露後や曝露後 24 時間に臨床的に有意な心臓への影響はみられなかった。高レベルの CAPs 曝露に続いて、運動後に測定された血漿フィブリノゲンは、FA 反応 (2% の平均増加) に比べ曝露前値以上の増加傾向 (10% の平均増加) を示した。統計的に唯一の肺機能への有意な影響 ($p < 0.01$) は、胸腔容量が FA 後の平均 5.6% の増加に比べて高レベルの CAPs 曝露後には平均 6.4% の小さな減少がみられたことであった。しかし、呼吸器症状の増加は伴わなかった。誘発された痰での評価では呼吸器の細胞性炎症性反応はみられなかった。しかし、CAPs 曝露後に鼻洗浄液中の好中球のパーセンテージの増加傾向がみられた。このパイロット研究の結果から、トロントにおける濃縮された大気 PM_{2.5} のこれらのレベルへの若い健康な志願者の曝露は、有意な急性の健康影響を引き起こさないかもしれないことを示している。PM_{2.5} の心肺系の影響をさらに調べるためには、より多くの被験者と感受性のある人々に関する研究がさらに必要であろうと述べている。

Gong ら (2003) は、18~45 歳の 12 人の健康な非喫煙者 (男女各々 6 人、平均年齢 28 歳) と 12 人の喘息患者 (男女各々 6 人、平均年齢 34 歳) を平均濃度が $174 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (範囲 99~224) の微小サイズ (PM_{2.5}) 範囲の濃縮大気粒子 (CAPs) とろ過空気 (FA) に曝露した。2 段式のハーバードのインパクト濃縮機と全

身ボディチャンバーを用い、間欠的運動下（分時換気量が 15～20L/min/m² 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し）で 2 時間曝露した。曝露前後に、症状質問票、血圧、Holter 心電図、動脈血酸素飽和度、スパイロメトリー（FVC、FEV₁）、採血を行った。血液は、血球数；全身性炎症マーカー [IL-6、IL-8、血清 amyloid A、血漿溶解性 ICAM-1；凝固性マーカー（フィブリノゲン、因子 VII、von Willebrand 因子）、誘発性痰については、総細胞数；細胞分画；気道炎症マーカー [IL-6、IL-8、そして喘息患者では ECP] を調べた。いずれのグループも、FA に比し CAPs 曝露に起因するスパイロメトリーやルーチンの血液学的測定で有意な変化を示さなかった。両方のグループは、曝露後誘発された痰中の CAPs 関連の円柱細胞の減少、血液凝固能及び全身性炎症におけるあるメディエーターの僅かな変化、及び心拍変動の副交感神経刺激における軽度の増加を示した。収縮期血圧は、FA に比し CAPs 曝露中、喘息患者で減少し、健康者では増加した。心血管系（呼吸器系ではない）症状（眩暈等）は、両方のグループで CAPs 曝露により僅かに増加した。以上の結果から、都市の微小粒子曝露は、CAPs と FA の間の統計的に有意な差をもつ異なった生物学的エンドポイントを引き出し、また血液の炎症及び心拍変動における観察された変化は、他の実験室や疫学研究から報告されている呼吸器系よりもむしろ全身的な影響と一致していると結論している。これらの結果を明確にするためには、他の生物学的エンドポイント、PM サイズ・モードやリスク因子を含めたさらなる研究が必要であろうと述べている。

Park ら (2005)は、マサチューセッツ州ボストン（米国）及びその近郊で 2000 年 11 月～2003 年 10 月に 497 人の男性(Normative aging study 参加者)を対象として、大気汚染物質と心拍変動の低下として、SDNN(Standard Deviation of Normal to Normal intervals)、頻脈及び徐脈のパワー(高周波成分、低周波成分)、及び低周波:高周波比との関係を調べた。大気汚染物質濃度の 4 時間、24 時間、48 時間の移動平均値は、PM_{2.5}(24 時間移動平均値[SD]=11.4µg/m³、個数濃度(同 28,942 個/cm³[13,957])、BC(同 0.92µg/m³[0.47])であった。交絡要因を調整後、PM_{2.5} の 48 時間移動平均値の SD 相当量(8µg/m³)あたり、高周波成分の低下(20.8%, 95% CI: 4.6, 34.2)、低周波:高周波比の増加(18.6%, 95% CI: 4.1, 35.2)が観察され、O₃ の 4 時間移動平均値の SD 相当量(13ppb)あたり、低周波の低下(11.5%[同:0.4-21.3])が観察された。この傾向は虚血性心疾患、高血圧を有するもので顕著であった。SDNN 及び低周波と PM_{2.5} の関連は糖尿病を有するもので強く、低周波と O₃ 及び PM_{2.5} の関連は Ca 拮抗薬、β 遮断薬を使用するもので減弱した。

Liao ら (1999)は、26 人の年配(平均年齢 81)の個人に対し、粒子状物質の日変化による心臓の自律神経反応への影響を調べた。被験者の住居の屋内の PM_{2.5}

と、野外の $PM_{2.5}$ 及び $PM_{2.5-10}$ について、24 時間の平均的な粒子状物質濃度を測定した。休息状態で 6 分間の R-R 波のインターバルデータを測定した。心臓の自律神経系の指標として、心拍変動の高周波成分と低周波成分及び R-R 間隔の標準偏差(SDNN)を測定した。心拍変動の高周波成分が、被験者個人の高周波成分の分布における最初の三分位値よりも低下した日を、その被験者独自の心拍変動の低い日とした。また、屋内の $PM_{2.5}$ 濃度が $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以上になった日を高曝露日とした。高曝露日における心拍変動の高周波成分の低下が発生するオッズ比(95%信頼区間)は $3.08(6.59-1.43)$ であった。屋内の $PM_{2.5}$ 濃度とした心拍変動の高周波成分と低周波成分、及び SDNN との定量的関連性を評価するためのモデルから求めた ss-coefficients は、それぞれ $-0.029(0.010)$ 、 $-0.027(0.009)$ 、及び $-0.004(0.003)$ であった。 $PM_{2.5}$ の日変化に対する心臓の自律神経系による調整に関し、本研究では、 $PM_{2.5}$ 濃度の増加は心臓の自律神経系の調整に関連していることを示しており、粒子状物質と循環器系疾患による死亡率との関連性について示唆している。

Creason ら (2001)は、ボルチモアの 56 人の年配(平均年齢 82)の非喫煙者の心拍数変動性を 24 日間観察した。研究期間の天候は温和であり、粒子物質($PM_{2.5}$)の濃度は $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ より低かった。環境中の平均的な $PM_{2.5}$ 濃度と心拍変動の高周波成分と負の相関が示された。24 日間すべての研究期間に対する混合効果分析の結果は、年齢、性別、心血管系の状態、傾向、気温、湿度、自己相関の残差等を調節すると、屋外の $PM_{2.5}$ 濃度と心拍変動の高周波成分の間に弱い負の関係を示し($PM_{2.5}$ の $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ 増分に対し心拍変動高周波成分ログ変換値は -0.03 変動する)、24 日間のうち一部のデータを除外すると、関係はより強くなった(同 -0.07 、95%CI : $-0.13 \sim -0.02$)。1~4 時間の $PM_{2.5}$ の急性曝露は、24 時間単位で観測した結果よりも強い関係を示さず、ラグを考慮しても 24 時間単位で測定した結果よりも強い相関はみられなかった。この結果は、 $PM_{2.5}$ への曝露によって高齢者の心拍変動が減少するという従来の結果と一致していた。

Holguin ら (2003)は、メキシコシティ (メキシコ) の介護施設に住む志願者 34 人 (喫煙者、ペースメーカー装着者または不整脈あり、平均年齢 79 歳、男性 44%) を対象として、大気汚染物質と心拍変動との関係を調べた。2000 年 2 月 8 日~4 月 30 日まで心拍変動を 1 日おきに、午前 8 時~午後 1 時までの間で 5 分間測定し、周波数により高周波成分 ($0.15-0.40\text{Hz}$)、低周波成分 ($0.04-0.15\text{Hz}$) 別に検討した。高周波成分に関して、 $PM_{2.5}$ と心拍変動との間に有意な負の関係 ($10\mu\text{g}/\text{m}^3$ の $PM_{2.5}$ 上昇で、心拍変動の高周波成分が 5%減少) が見られた。その関係は高血圧有症者に限ると、より大きな減少 (7%) が見られた。 O_3 については、高血圧患者で心拍変動の高周波成分との間に有意な負の関係が認められていたが、 $PM_{2.5}$ と O_3 を同時に組み込んだモデルでは関係は見

られなかった。その他の汚染物質と心拍変動との間に関係は見られなかった。

Liao ら (2004)は、1996～98 年に米国 *Atherosclerosis Risk in Communities Study* の対象者(45～64 歳)について大気汚染と心拍変動との関係を検討した。心拍変動に関連する循環器系疾患危険因子、湿度、気温、季節、人種、社会経済因子を調整後、PM₁₀濃度－SD 上昇 (11.5μg/m³) に関する偏回帰係数は、心拍変動の高周波成分 (0.15-0.40Hz) では-0.06 (SE: 0.018)、低周波成分 (0.04-0.15Hz) では-1.03 (SE: 0.32)、そして心拍数 (拍数/分) に対しては 0.32 (SE: 0.158) であった。同様に結果がガス状物質に対しても認められた。

5.3.2.4. 血液の凝固線溶系への影響がみられる

Sjogren (1997)は、粉じんへの職業被曝と虚血性心疾患(虚血性心疾患)との関係についてまとめた。砒素、アスベスト、ベリリウム、鉛、多環芳香族炭化水素、石英への曝露に関する文献をレビューした。選択した職業は、農業従事者、紙・紙パルプ労働者、林業従事者、溶接工であった。都市大気中の粒子状物質による大気汚染が、肺胞の炎症を引き起こし、メディエーターの放出が高感受性のヒトにおける血液凝血性を高め、循環器に関連する死亡を引き起こすという仮説が、1995 年に示された。このレビューでは、この仮説を拡大し、職業性曝露と虚血性心疾患の発生とを関連付けて検討した。その結果、この仮説を立証するためには、喫煙習慣等、その他の想定される関連因子をコントロールした条件で、粒子に曝露された作業者と曝露されていない作業者について、フィブリノゲン濃度を比較する等の方法で検証する必要がある。

Gardner ら (2000)は、雄の Sprague-Dawley ラット(60 日齢)、1 群 6 匹)に 0.3,1.7, 8.3mg/kg の重油燃焼飛散灰(ROFA)、あるいは 8.3mg/kg のセントヘレナ山の火山灰(MSH, median count diameter 1.4 μm)を気管内投与した。ROFA は、Florida の発電所燃焼炉下流の研究所で採集した (mass mean aerodynamic diameter 1.95 μm)。投与 24 時間後に静脈血を採血し、活性化された APTT (thromboplasmin time)、PT (Prothrombin Time)、PF (Plasma Fibrinogen)、PV (Plasma Viscosity)、CBC (Complete Blood Count)を測定した。ROFA 曝露では、APTT、PT ともに影響が認められなかったが、PF の有意な増加が 8.3mg 曝露群でのみ観察された。PV 値の増加も ROFA と MSH 曝露で認められたが、有意差はなかった。フィブリノゲンは、心肺疾患のリスク要因となることが報告されており、APTT、PT には有意差が認められなかったものの血液学的な指標は、粒子状物質による炎症性反応の指標として、特に心血管系リスクの高い集団に対して有効であるのかもしれないと述べている。

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。

Ulrich ら (2002)は、 O_3 で前処理した Wistar ラット (雄) に濃縮したオタワ標準粉じん(EHC-93、平均粒径 0.5 μm)を気管内投与した。 O_3 による前処理の条件は、0.8ppm、8 時間とした。 O_3 処理の 16 時間後に EHC-93 の曝露を行った。曝露後 2、4、7 日後の気管肺胞洗浄液、血液検査 (炎症に関する指標: 白血球数、各種サイトカイン、フィブリノゲン値等)、肺・心臓組織中の各種サイ

トカイン mRNA (リアルタイム PCR、Polymerase Chain Reaction) を調べた。結果として、1)炎症の指標とした BALF 中のタンパク質濃度は、2、4、7 日後のいずれの観察においても 3 倍に増加した。曝露 2 日後の BALF 中の TNF- α は、4 倍に上昇した。2)肺組織障害の指標として、エンドセリン mRNA の 60%低下 (肺内の血管内皮障害)、曝露 2 日後の iNOS mRNA の 3.5 倍増加 (肺組織における曝露後の NO 産生メカニズムを示唆) 等が認められた。3)血液中のフィブリノゲン値の 20%上昇 (血液濃縮及び血流障害を示唆) が見られた。

Ghio と Huang (2004)のレビューによると、疫学研究は、粒径 0.1~2.5 μm の微小粒子状物質状物質(PM)が、ヒトの健康に対して影響を及ぼすことを示唆した。大気中微小粒子状物質の濃縮装置は、僅かな質的な変化で環境中の微小粒子状物質を濃縮する技術である。濃縮装置の利点は、濃縮された粒子状物質 (CAPs) が、現実の環境に基づくものであり、大気中微小粒子状物質の適切な曝露を行うことが可能なことである。制限事項として、粒子状物質の量と構成成分の可変性と、データを解析するための統計的手法に関する何らかの不確実性を含んでいることが挙げられる。

多数の初期の調査において得られた結果は、人間と動物の両方で安全に CAPs への曝露実験が可能であることを示した。ヒトに対する CAPs 曝露研究により、血液成分の指標と心拍変動において、急性肺炎に関連する変化が認められた。動物実験の結果は、潜在的な肺炎症状の発生を示唆した。血液成分の変性、心臓における特定のエンドポイントの変化、そして、特定のモデル動物において感受性が高まることを示した。これらの研究は、微小粒子状物質の曝露と、呼吸器や循環器系における有害な健康影響との間にみられる因果関係の確認に至った。さらに、CAPs に含有されている特異的成分が、これらの組織に特異的に影響を及ぼすことが示唆された。

Petrovic ら (2000)は、ハーバード大気粒子濃縮機を用いて、トロントのダウンタウンの大気から濃縮された PM_{2.5} (CAPs) の健康影響を調べた。4 人の若い健康な非喫煙者(男女各々 2 人、18~40 歳)をろ過空気(FA)及び 23~124 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の CAPs にマスクを介して鼻呼吸で、安静下で 2 時間曝露した。CAPs は、低(31.5 \pm 7.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、中(52.9 \pm 33.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、高レベル(92.1 \pm 24.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) に分類し、肺機能、症状報告、炎症性細胞、血液凝固因子及び心臓への影響を調べた。CAPs 曝露中の、平均ガス濃度は、O₃ が 9 \pm 8 ppb、NO₂ が 20 \pm 7ppb であった。曝露後、心臓の影響を増強するために、130 bpm の心拍数を目標に 30 分の運動を行った。その間、心臓の反応を調べた。12 誘導の心電図 (ECG) データの心臓病専門医によるレビューでは、曝露中、曝露後や曝露後 24 時間に臨床的に有意な心臓への影響はみられなかった。高レベルの CAPs 曝露に続いて、運動後に測定された血漿フィブリノゲンは、FA 反応 (2%の平均増加) に比べ曝露前値以

上の増加傾向（10%の平均増加）を示した。統計的に唯一の肺機能への有意な影響（ $p < 0.01$ ）は、胸腔容量が FA 後の平均 5.6%の増加に比べて高レベルの CAPs 曝露後には平均 6.4%の小さな減少がみられたことであった。しかし、呼吸器症状の増加は伴わなかった。誘発された痰での評価では呼吸器の細胞性炎症性反応はみられなかった。しかし、CAPs 曝露後に鼻洗浄液中の好中球のパーセンテージの増加傾向がみられた。このパイロット研究の結果から、トロントにおける濃縮された大気 $PM_{2.5}$ のこれらのレベルへの若い健康な志願者の曝露は、有意な急性の健康影響を引き起こさないかもしれないことを示している。 $PM_{2.5}$ の心肺系の影響をさらに調べるためには、より多くの被験者と感受性のある人々に関する研究がさらに必要であろうと述べている。

Gong ら (2003)は、18~45 歳の 12 人の健康な非喫煙者（男女各々 6 人、平均年齢 28 歳）と 12 人の喘息患者（男女各々 6 人、平均年齢 34 歳）を平均濃度が $174\mu\text{g}/\text{m}^3$ （範囲 99~224）の微小サイズ（ $PM_{2.5}$ ）範囲の濃縮大気粒子（CAPs）とろ過空気（FA）に曝露した。2 段式のハーバードのインパクト濃縮機と全身ボディチャンバーを用い、間欠的運動下（分時換気量が $15\sim 20\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し）で 2 時間曝露した。曝露前後に、症状質問票、血圧、Holter 心電図、動脈血酸素飽和度、スパイロメトリー（FVC、FEV₁）、採血を行った。血液は、血球数；全身性炎症マーカー [IL-6、IL-8、血清 amyloid A、血漿溶解性 ICAM-1；凝固性マーカー（フィブリノゲン、因子 VII、von Willebrand 因子）、誘発性痰については、総細胞数；細胞分画；気道炎症マーカー [IL-6、IL-8、そして喘息患者では ECP] を調べた。いずれのグループも、FA に比し CAPs 曝露に起因するスパイロメトリーやルーチンの血液学的測定で有意な変化を示さなかった。両方のグループは、曝露後誘発された痰中の CAPs 関連の円柱細胞の減少、血液凝固能及び全身性炎症におけるあるメディエーターの僅かな変化、及び心拍変動の副交感神経刺激における軽度の増加を示した。収縮期血圧は、FA に比し CAPs 曝露中、喘息患者で減少し、健康者では増加した。心血管系（呼吸器系ではない）症状（眩暈等）は、両方のグループで CAPs 曝露により僅かに増加した。以上の結果から、都市の微小粒子曝露は、CAPs と FA の間の統計的に有意な差をもつ異なった生物学的エンドポイントを引き出し、また血液の炎症及び心拍変動における観察された変化は、他の実験室や疫学研究から報告されている呼吸器系よりもむしろ全身的な影響と一致していると結論している。これらの結果を明確にするためには、他の生物学的エンドポイント、PM サイズ・モードやリスク因子を含めたさらなる研究が必要であろうと述べている。

Huang ら (2003)は、CAPs に 2 時間曝露された正常者が、肺の好中球性炎症を進展し、血中フィブリノゲンの増加を示すことを以前に示した（Ghio ら、

2000) が、本研究は、CAPs 中の可溶性成分が、これらの変化にどのように寄与しているかを調べることにした。ろ過空気または CAPs の何れかに曝露された以前の研究 (Ghio ら、2000) から 37 人の若い健康な非喫煙者 (男 35 人、女 2 人、平均年齢 26.2 歳) に関するデータを再解析した。大気粒子は、Harvard/EPA の濃縮機を用いて Chapel Hill の大気から取り入れ、 $0.1\sim 2.5\mu\text{m}$ の粒径の粒子を曝露室の入口で 6~10 倍に濃縮した (CAPs 濃度: $23.1\sim 311.1\mu\text{g}/\text{m}^3$)。間欠的運動下 (分時換気量が $25\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 2 時間曝露した。曝露前及び曝露後の静脈血サンプルと同様に曝露後の BAL (BronchoAlveolar Lavage) について、細胞性及び急性炎症エンドポイントについて解析した。CAPs の水溶性分画中の 9 つの最も豊富な成分 (V、Fe、Ni、Cu、Zn、As、Se、Pb、 SO_4) を定量化し、主成分分析を用いて、これらの溶解成分濃度と BALF と末梢血の細胞性と生化学的エンドポイントを相関させた。硫酸塩/Fe/Se 因子は好中球の BAL パーセンテージの増加と、また Cu/Zn/V 因子は血中フィブリノゲンの増加と関連していた。硫酸塩、Fe 及び Se の濃度は、PM 質量と高度に相関 ($R>0.75$) し、PM と Cu/Zn/V との相関は大きくなかった ($R=0.2\sim 0.6$)。ヒトの調整された曝露からの結果は、PM の特異的成分と肺の好中球の流入及び血中フィブリノゲン増加と関連付けし、汚染粒子の溶解成分が、PM に曝露されたヒトにおける肺と血液系に特異的に影響を与えるかもしれないことを示していると述べている。

5.3.2.5. 心機能変化において呼吸器系の刺激が影響する

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ガ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及び心室期外収縮等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。

Campen ら (2000)は、ラットに ROFA を気管内投与し、体温や循環系への影響を調べた。ラットの飼育環境温度及び曝露条件は、1 群(22℃環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与、2 群(10℃環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与、3 群(22℃環境飼育、O₃曝露は n=4、対照は n=3): 1ppmO₃の曝露(6時間)後、0、2.5mg ROFA 投与、4 群(22℃環境飼育、各 n=4): モノクロタリン処置後、0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与とした。モノクロタリンは腹腔内投与した。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 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℃環境下よりも深刻だった。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。モノクロタリン投与群では濃度依存的に持続的に体温が下がり続け、致死率も高頻度であった。心拍数パターンはすべての群における深部体温のパターンに酷似していた。

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では 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。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。本研究では、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。

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(不整脈等)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℃、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。

高齢 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、不整脈等の悪影響は 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 時間後に心拍数及び深部体温の低下、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。

Campen ら (2002)は、ROFA の曝露が心機能及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、以下のとおりであった。

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):① Fe₂(SO₄)₃+VSO₄、② Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄、③ NiSO₄+VSO₄、④ Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄+VSO₄とした。

V は健康ラット及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

投与す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。

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。

Nadziejko ら (2002) は、血圧の発信装置を外科的に植え込んだ SHR(Spontaneously Hypertensive Rat:高血圧自然発症ラット)に CAPs を 4 時間曝露して、CAPs の吸入の即時影響があるかどうかを調べた。用いたのは CAPs、硫酸エアロゾル(MMAD : 160nm)、及び Ultrafine 硫酸粒子(MMAD;50~75nm)であった。曝露濃度はそれぞれ、CAPs : 平均 73 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸エアロゾル : 平均 225 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸微小粒子 : 468 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。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ので、硫酸エアロゾルもラットに曝露した。CAPs 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。同じラットに微小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、Ultrafine の硫酸粒子曝露では、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、微小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。

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、及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、及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、及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、及び身体的活動の 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。

Nadziejko ら (2004)は、高齢ラットにおける 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 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、超微小カーボン粒子で 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、1,280 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、SO₂ で 1.2 ppm であった。曝露時間を 4 時間とした。18 ヶ月齢を超えた高齢ラットは、若いラットに比べ不整脈が頻発するようになった。ここでは高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示した。

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。高齢イヌ(ビーグル犬、n=4、10.5 歳)に対して、平均粒径 2.22 μm の ROFA を、3 mg/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。

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、Interstate 90 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 $1\mu\text{m}$ 以下、 $15\sim 20\text{nm}$)を吸入曝露した。ORA 濃度が $1.95\sim 5.62\times 10^5$ 粒子/ cm^3 (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、 $37\sim 106\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 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。

5.3.2.6. 微小粒子(粒子中成分)は血液中に浸出し血液系に影響を及ぼす

Gurgueira ら (2002)は、ラットに CAPs($300\pm 60\mu\text{g}/\text{m}^3$)を 1~5 時間吸入させ、人工呼吸下に肺、心臓、肝臓の化学発光量(酸化ストレスの指標)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($1.7\text{ mg}/\text{m}^3$ 、30 分)の曝露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。

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。

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 PM_{2.5} であり粒子サイズは 2.5 μ m より小さかった。ハローセン麻酔下で PM_{2.5} を 2.0mg/0.3 mL saline の量で単回投与した。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及び心室期外収縮等の不整脈が出現した(有意差あり)。また、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 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。

5.3.2.7. 疾患モデル動物は正常動物に比べて循環機能変化に差異が生じる

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 PM_{2.5} であり粒子サイズは 2.5 μ m より小さかった。ハローセン麻酔下で PM_{2.5} を 2.0mg/0.3 mL saline の量で単回投与した。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及び心室期外収縮等の不整脈が出現した(有意差あり)。また、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 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。

Wellenius ら (2004)は、心筋梗塞モデル動物において不整脈等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 µg/m³、CO(一酸化炭素)を 35ppm、CAPs を 348.4µg/m³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 93.7~1,055.8µg/m³、冠動脈閉塞動物で 71.8~741.2µg/m³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。

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) Bagate ら (2004)、構成は Gerlofs-Nyland ら (2005)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、0.5 mL 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、ランゲ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、 Zn^{2+} (50 μ M)、PM(100 μ g/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。

Nadziejkoら(2002)は、血圧の発信装置を外科的に植え込んだSHR(Spontaneously Hypertensive Rat:高血圧自然発症ラット)にCAPsを4時間曝露して、CAPsの吸入の即時影響があるかどうかを調べた。用いたのはCAPs、硫酸エアロゾル(MMAD:160nm)、及びUltrafine硫酸粒子(MMAD;50~75nm)であった。曝露濃度はそれぞれ、CAPs:平均73 μ g/m³、硫酸エアロゾル:平均225 μ g/m³、硫酸微小粒子:468 μ g/m³であった。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、硫酸エアロゾルもラットに曝露した。CAPs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。同じラットに微小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、Ultrafineの硫酸粒子曝露では、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、微小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。

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0.1~0.2 μ m(空気力学的直径)のDEを、0、30、100、300、1,000 μ g/m³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 5bpmで、曝露群のそれは290 \pm 7bpm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。光顕的には、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。

Campen ら (2000)は、ラットに ROFA を気管内投与し、体温や循環系への影響を調べた。

ラットの飼育環境温度及び曝露条件は、1 群(22℃環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与、2 群(10℃環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与、3 群(22℃環境飼育、O₃ 曝露は n=4、対照は n=3): 1ppmO₃ の曝露(6 時間)後、0、2.5mg ROFA 投与、4 群(22℃環境飼育、各 n=4): モノクロタリン処置後、0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与とした。モノクロタリンは腹腔内投与した。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 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℃環境下よりも深刻だった。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。モノクロタリン投与群では濃度依存的に持続的に体温が下がり続け、致死率も高頻度であった。心拍数パターンはすべての群における深部体温のパターンに酷似していた。

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では 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。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。本研究では、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。

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(不整脈等)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℃、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。

高齢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、不整脈等の悪影響は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時間後に心拍数及び深部体温の低下、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。

Campenら(2002)は、ROFAの曝露が心機能及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、以下のとおりであった。

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):①

Fe₂(SO₄)₃+VSO₄、② Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄、③ NiSO₄+VSO₄、④ Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄+VSO₄とした。

Vは健康ラット及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。

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108~338μg/m³(9日平均240±77μg/m³)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。本研究では大気微小粒子は血圧及び心拍数に影響することが明らかになった。

Hwangら(2005)は、粒子径平均389±2nm(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、133μg/m³(範囲52~153μg/m³)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、及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、及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

において ApoE^{-/-}マウスでは心拍、体温、及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、及び身体的活動の 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。

Wellenius ら (2003)は、6 匹のイヌに開胸手術を試行し、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。二匹を一組とし、CAPs (Harvard Ambient Particle Concentrator を使用 ; 345.25 ± 194.30 ($161.34 \sim 957.32$) $\mu\text{g}/\text{m}^3$) もしくは清浄空気を 6 時間/日、3 日間連続で吸入させた。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。冠動脈閉塞による 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。以上の結果から、浮遊粒子状物質は、冠動脈狭窄や閉塞に基づく心疾患を増悪する可能性が示唆された。

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

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

ROFA 曝露効果では、SHR の方が肺組織の炎症所見が WKY ラットよりやや強く、BALF 中タンパク質、アルブミン量は有意に増加した。また、SHR においては BALF 中赤血球数の増加が見られ、このことは肺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。肺泡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 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- 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」と述べている。

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 $93.7\sim 1,055.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、冠動脈閉塞動物で $71.8\sim 741.2\mu\text{g}/\text{m}^3$ 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。

Wellenius ら (2003) は、6 匹のイヌに開胸手術を試行し、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。二匹を一組とし、CAPs (Harvard Ambient Particle Concentrator を使用 ; 345.25 ± 194.30 ($161.34\sim 957.32$) $\mu\text{g}/\text{m}^3$) もしくは清浄空気を 6 時間/日、3 日間連続で吸入させた。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。冠動脈閉塞による 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。以上の結果から、浮遊粒子状物質は、冠動脈狭窄や閉塞に基づく心疾患を増悪する可能性が示唆された。

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。高齢イヌ(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 \times 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。

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)及び 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及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。

Hwang ら (2005) は、粒子径平均 $389 \pm 2\text{nm}$ (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 $52 \sim 153\mu\text{g}/\text{m}^3$) 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、及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、及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、及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、及び身体的活動の 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 (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。

Wellenius ら (2004)は、心筋梗塞モデル動物において不整脈等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 35ppm、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。

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 μm の ROFA を 3.42 mg/m^3 の濃度で1時間の吸入曝露を行った。ROFA 吸入を行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。

Nadziejko ら (2002) は、血圧の発信装置を外科的に植え込んだ SHR (Spontaneously Hypertensive Rat: 高血圧自然発症ラット) に CAPs を 4 時間曝露して、CAPs の吸入の即時影響があるかどうかを調べた。用いたのは CAPs、硫酸エアロゾル (MMAD: 160nm)、及び Ultrafine 硫酸粒子 (MMAD; 50~75nm) であった。曝露濃度はそれぞれ、CAPs: 平均 $73\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸エアロゾル: 平均 $225\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸微小粒子: $468\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。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、硫酸エアロゾルもラットに曝露した。CAPs 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。同じラットに微小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、Ultrafine の硫酸粒子曝露では、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、微小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。

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。光顕的には、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気中濃度の曝露が、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。

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

清浄空気曝露時の WKY ラット、SHR の相違では、同週齢で比較した体重当たりの肺・左室重量は SHR の方が WKY ラットよりも重かった。WKY ラットと比較して SHR では、アセチルコリンに対する気道反応性が低く、肺組織中に活性化したマクロファージ、好中球、出血を認め、BALF 中のタンパク質量、

マクロファージ、好中球、赤血球、チオバルビタール酸反応物質、肺サイトカイン mRNA の発現量が高かった。加えて、SHR では、左心室心筋組織の炎症所見(心筋症と単球細胞浸潤)とサイトカイン mRNA 発現量の亢進が見られ、心電図波形で ST が低下していた。

ROFA 曝露効果では、SHR の方が肺組織の炎症所見が WKY ラットよりやや強く、BALF 中タンパク質、アルブミン量は有意に増加した。また、SHR においては BALF 中赤血球数の増加が見られ、このことは肺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、フィブロンectin、G6PD 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- 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」と述べている。

Vincent ら (2001)は、オタワ標準粉じん(EHC-93)(48 mg/m³)とそれを水ろ過した EHC-93L (49 mg/m³)、Diesel soot(DS)(4.2 mg/m³)、CBP(4.6 mg/m³)を 4 時間吸入(鼻部)曝露した。EHC-93 曝露後 2 日で血圧が、32 時間でエンドセリン(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。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。水ろ過により極性有機化合物や可溶性成分を取り除く(EHC-93L)と、血行力学的影響が認められなかった。大気浮遊粒子の曝露による血漿 ET-1、ET-3 量の上昇について、血圧上昇との明確な相関関係は得られていないものの、ラットで EHC-93 曝露による血清エンドセリン量の上昇と血圧上昇が併行して起こることが示された。

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 PM_{2.5} であり粒子サイズは 2.5 μ m より小さかった。ハローセン麻酔下で PM_{2.5} を 2.0mg/0.3 mL saline の量で単回投与した。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及び心室期外収縮等の不整脈が出現した(有意差あり)。また、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 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。

Campan ら (2000)は、ラットに ROFA を気管内投与し、体温や循環系への影響を調べた。ラットの飼育環境温度及び曝露条件は、1 群(22 $^{\circ}$ C 環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与、2 群(10 $^{\circ}$ C 環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mgROFA 投与、3 群(22 $^{\circ}$ C 環境飼育、O₃ 曝露は n=4、対照は n=3): 1ppmO₃ の曝露(6 時間)後、0、2.5mg ROFA 投与、4 群(22 $^{\circ}$ C 環境飼育、各 n=4): モノクロタリン処置後、0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与とした。モノクロタリンは腹腔内投与した。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 投与した 22 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 環境下群も深部体温は同様の濃度依存性を示したが、22 $^{\circ}$ C 環境下よりも深刻だった。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。モノクロタリン投与群では濃度依存的に持続的に体温が下がり続け、致死率も高頻度であった。心拍数パターンはすべての群における深部体温のパターンに酷似していた。

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では 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。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。本研究では、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。

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(不整脈等)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℃、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。

高齢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、不整脈等の悪影響は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時間後に心拍数及び深部体温の低下、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。

Campen ら (2002)は、ROFA の曝露が心機能及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、以下のとおりであった。

1 群(モノクロタリン非処置群、各 n=4): ① 生理食塩水投与、② 0.105mg Fe₂(SO₄)₃、③ 0.263mg NiSO₄、④ 0.245mg VSO₄、2 群(モノクロタリン処置群、各 n=10): ① 生理食塩水投与、② 0.105mg Fe₂(SO₄)₃、③ 0.263mg NiSO₄、④ 0.245mg VSO₄、3 群(モノクロタリン処置・金属混合群、各 n=6): ① Fe₂(SO₄)₃+VSO₄、② Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄、③ NiSO₄+VSO₄、④ Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄+VSO₄とした。

Vは健康ラット及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。

5.3.2.8. 複合大気汚染により影響の増悪が生じる

Ulrichら(2002)は、O₃で前処理したWistarラット(雄)に濃縮したオタワ標準粉じん(EHC-93、平均粒径0.5μm)を気管内投与した。O₃による前処理の条件は、0.8ppm、8時間とした。O₃処理の16時間後にEHC-93の暴露を行った。曝露後2、4、7日後の気管肺胞洗浄液、血液検査(炎症に関する指標:白血球数、各種サイトカイン、フィブリノゲン値等)、肺・心臓組織中の各種サイトカインmRNA(リアルタイムPCR)を調べた。結果として、1)炎症の指標としたBALF中のタンパク質濃度は、2、4、7日後のいずれの観察においても3倍に増加した。曝露2日後のBALF中のTNF-αは、4倍に上昇した。2)肺組織障害の指標として、エンドセリンmRNAの60%低下(肺内の血管内皮障害)、曝露2日後のiNOS mRNAの3.5倍増加(肺組織における曝露後のNO産生メカニズムを示唆)等が認められた。3)血液中のフィブリノゲン値の20%上昇(血液濃縮及び血流障害を示唆)が見られた。

Watkinsonら(1997)のレビューによると、Watkinsonらによる多くの研究において、げっ歯動物を生体内異物薬剤に曝露することによって観察される核心温と関連機能パラメーターの低下は、毒性反応を緩和することが示されている。さらに、それらの研究結果は、多くの実験条件が、低体温反応の大きさを変化

させることを示した。約 2°C の体温降下で特徴付けられた適度の低体温反応は、有害物質に対する最適の保護となっているようである。有害ガス、または粒子状物質等の吸入曝露実験では、実験動物が曝露される有害物質の用量は、有害物質の大気中濃度と実験動物の毎分換気量によって決定される。実験では、一般に曝露濃度は一定に保たれるが、毎分換気量は新陳代謝によって変動し、これらのパラメーターが、実験条件全般を変化させる可能性がある。しかしながら、曝露期間中の低体温反応の発現は、新陳代謝や毎分換気量等のパラメーターと、用量の低下と直接関連している。一般的に、吸入曝露による毒物研究では、安静状態の動物に曝露させるか、または運動を行っているヒトに対して曝露させる。動物実験では、運動時の呼吸を模倣し、ヒトでの研究により近似させるため、同時に CO₂ を曝露する。本レビューでは、吸入曝露実験で使われた実験的プロトコルに従って、(1) 動物種や動物の大きさの影響、ハンドリングによるストレスの影響、低体温反応、これらに付随する肺毒性への影響、(2) オゾン急性毒性への運動ストレスの付加的な影響、(3) 正常ラットと肺炎を誘発したラットに対する環境中粒状物質の毒性等に関する検討を行った。これらの研究の結果は、低体温反応の大きさが肺における有害物質の摂取量に正比例し、実験動物の現存量と曝露する際の周囲温度に反比例していることを示した。低体温反応は、実験動物の取り扱いやケージの条件変化等のストレスに対して敏感に反応を示す。運動が低体温反応を減衰させる。一方、運動の代替として通気中の CO₂ を増加させると反応は増強される。正常動物に対しては穏やかな反応を引き起こす有害物質の曝露量であっても、肺疾患、もしくは肺機能に障害を起こしている実験動物に対しては、顕著な低体温反応を誘導することもある。一般に、環境中に有害物質が存在する条件では、低体温反応は動物の毎分換気量を減少させ、大気中の有毒物質の摂取量を制限する。これらの吸入試験の結果は、毒性発現における低体温反応の影響に関する結論を支持し、体温変動をモニターし、毒性学的なデータの分析に組み込む必要性を強調している。一方、人間は有害物質の曝露による低体温反応を示さないため、動物の毒性研究で得られた結果をヒトに外挿することや、ヒトと動物の研究データを比較することは、かなり複雑である。

Watkinson ら (2001) は、O₃ 及び 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症ラットに対し、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等の環境条件の影響を強く受けた。ROFA 等、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及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、このような心機能及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。

Campen 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)及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及び曝露条件は、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。

5.3.3. 論文による仮説の検証

5.3.3.1. 微小粒子状物質の曝露によって不整脈が誘発されやすくなる

CAPs、粒子状物質、ROFA、金属粒子の曝露実験に関する報告では、これらの物質の気管内投与及び吸入によって、清浄空気曝露に比べて不整脈や徐脈を生じやすいとする報告や心電図波形の変化を生じやすいとする報告が多く示されている。

冠動脈閉塞による心筋梗塞モデルラットの実験 (Kang ら (2002)) では、自発的に徐脈と期外収縮を起こしているが、PM_{2.5} (2mg/0.3 mL saline) の気管内投与によって徐脈の悪化と心室期外収縮の悪化が誘発されている。この研究報告では心筋梗塞モデルラットは正常な sham ラットに比べて明らかに心機能異常を起こしやすいといえるが、PM_{2.5} を含まない対照液の投与実験がなされていないため、上記の変化が微小粒子状物質によるものか否かの確定を下すことはできない。別の心筋梗塞モデルラットの実験 (Wellenius ら (2004)) では、CAPs (350.5 mg/m³) への吸入曝露は、清浄空気及び CO への曝露とは異なり、心室期外収縮の発現頻度が有意差には至らないものの増大することを報告している。正常犬に対する CAPs の吸入曝露実験 (Godleski ら (2000)) では、心拍変動解析の低周波 (LF) パワー及び高周波 (HF) パワーの値が対照空気曝露にくらべて CAPs 曝露では有意に増大したが、自律神経バランス及び心拍数には有意な変化が認められていない。自然発症高血圧症ラット (SHR、Spontaneously Hypertensive Rats) にオタワ由来の粒子状物質及び生理食塩水、LPS(LipoPolySaccharide)を予め気管内投与した後に心臓を摘出し灌流標本作製して虚血再灌流の影響を観察した実験がある (Bagate ら (2006))。この実験では、冠動脈閉塞前の左室内圧は、生理食塩水群 > LPS 群 > 粒子状物質群の順に高いが、35 分間の冠動脈閉塞直後はいずれの群も同じレベルに左室内圧が低下した後、回復過程に差が認められ、生理食塩水群は回復に向かったのに比べて、LPS 群及び粒子状物質群は回復しなかった。SHR に CAPs を吸入曝露した実験 (Nadziejko ら (2002)) では、CAPs 曝露開始直後から呼吸数の減少と心拍数の減少が観察されている。これらの減少は CAPs の気道刺激受容器の刺激による効果であると考察している。SHR に清浄空気及び DE (30、100、300、1000µg/m³) を 6 時間/日 × 7 日間曝露した実験 (Campen ら (2003)) では、曝露中の明期の心拍数が清浄空気群では減少するのに対して、DE 曝露群では曝露期間中は心拍数が高く維持された。また心電図 PQ 間隔が DE 曝露群では用量依存性に延長することが示されている。正常動物及びモノクロタリン誘発肺高血圧症ラット等に、ROFA (0.25、1.0、2.5mg) または対照液を気管内投与した実験 (Campen ら (2000)) では、これらの動物で投与後に用量依存性の徐脈が

現れることが示されている。別の実験で ROFA (0.25、 1.0、 2.5mg) または対照液を正常ラットに気管内投与した実験 (Watkinson ら (2000)) では、投与後の 6 時間以内の急性期と 12~72 時間後の遅延期において徐脈と不整脈が 2 相性に現れることを述べている。この研究では、同時に SHR、モノクロタリン誘発肺高血圧症ラット、正常ラットに対して ROFA (15mg/m³×6 時間/日×3 日間) の吸入実験を行っており、上記と同様の心機能変化を観察している (SHR は正常ラットよりも異常が強い)。正常ラット及びモノクロタリン誘発肺高血圧症ラットに ROFA (Fe₂(SO₄)₃、NiSO₄、VSO₄) を気管内投与した実験 (Campen ら (2002)) では、VSO₄ で顕著な徐脈と不整脈が急性期に現れ、NiSO₄ では同様の変化が遅れて現れることを明らかにしている。正常マウス及び先天性にアテローム性動脈病変を有するマウス (ApoE^{-/-}マウス、ApoE^{-/-}LDLr^{-/-}DK マウス) に CAPs (52~153 µg/m³) を吸入曝露 (6 時間/日×5 日/週×5 ヶ月) した実験 (Hwang ら (2005)) では、CAPs の曝露によって上記の疾患モデルマウスにおいて徐脈が明瞭に発現し心拍変動も大きくなった。

冠動脈閉塞による心筋梗塞モデルのイヌに CAPs (345.25±194.30µg/m³、6 時間/日×3~4 日) を曝露した実験 (Wellenius ら (2003)) では、CAPs に曝露された心筋梗塞モデルイヌにおいて清浄空気に曝露した群よりも心電図 ST 上昇が顕著であったが、不整脈及び徐脈はみられなかった。また、正常ラット (WKY ラット) 及び SHR に ROFA (15mg/m³) を吸入曝露した実験 (Kodavanti ら (2000)) では、ROFA に曝露された SHR にのみ心電図波形の変化 (ST の低下) が認められている。一方、ROFA (3mg/m³) を高齢のビーグル犬に曝露した実験 (3 時間/日×3 日間) では、軽度の徐脈がみられたものの、不整脈は観察されず、T 波の波形、振幅に変化がみられなかった (Muggenburg ら (2000))。

また、Gordon ら (2000) は、ニューヨークで捕集された CAPs (実際の大气中濃度の約 10 倍) を正常ラット、正常ハムスター及びモノクロタリン誘発肺高血圧症ラット、心筋症ハムスターに 3 時間単回または 6 時間/日×3 日の条件で曝露したが心電図変化は観察されていない。

微小粒子状物質曝露影響調査研究報告において、麻酔下でキニジン投与したモルモット、高齢ラット及び高血圧ラットに CAPs を曝露した動物実験の結果を見ると、CAPs 曝露中に心拍数を減少させる効果は明らかではないものの、曝露後に心拍数が上昇する等、吸入曝露により実験動物の循環機能に何らかの変化が生じることが否定できないとされている。

数多くの研究で利用されて確立された疾患モデル動物を用いた研究において、微小粒子状物質の吸入あるいは気管内投与によって、期外収縮や徐脈等、心機能に明瞭な (統計的に有意な) 変化が観察されている。一部の報告では、疾患モデル動物に対応する正常動物との比較がなされていなく、国内の調査研究においても欧米の研究と比較して明瞭な変化は観察されないものの、ほとんどの報告で疾患モデル動物は対照の正常動物に比べて心機能の異常所見が多い。

これらの実験結果を俯瞰すると、心血管系に対する微小粒子状物質の影響について、影響が見られない知見も存在するが、それにもまして期外収縮や徐脈等、心機能に明瞭な変化を示す根拠が多く存在する。この知見による影響の違いが何によって生じているものかについては依然不明な点が多いものの、微小粒子状物質の吸入により、実験動物の循環機能について不整脈に関連する変化が生じやすくなるといえる。

5.3.3.2. 微小粒子状物質の曝露によって、心血管系器官の構造や機能の変化をきたし、そのことが不整脈の発現性に影響を及ぼす

CAPs、粒子状物質、ROFA、金属粒子の曝露実験に関する研究について、これらの物質の気管内投与及び吸入によって、不整脈の発現性に、血中エンドセリン濃度の上昇、心拍変動の増大等の生理学的、形態学的変化が影響を及ぼすとする報告が多く示されている。

気管内投与実験では、冠動脈閉塞ラットへの PM_{2.5} 曝露による血中エンドセリン濃度の上昇が不整脈の発現に関与すると考察している報告 (Kang ら (2002))、正常ラットへの CAPs 曝露では心拍変動のばらつきの増大 (標準偏差値増加、HF/LF 値の増加 = 副交感神経亢進) が生じ、そのような変化に自律神経活動による心臓の過酸化物質の増加が関与しているという報告 (Rhoden ら (2005)) がある。また、正常ラットへの粒子状物質の曝露により肺動脈内腔/壁厚比の減少、心臓湿重量/乾重量比の増加が生じるという報告がある (Rivero ら (2005))。モノクロタリン処理による肺高血圧症モデルラットでは、ROFA の曝露によって期外収縮、房室ブロック、徐脈が明瞭に認められたが、これらの曝露動物では右心肥大、肺重量増加、肺の炎症像が生じている (Campen ら (2000))。

これらの実験報告を全体的に考察すると、CAPs や粒子状物質の気管内投与は、心臓内部での生理活性物質の増加や過酸化物質の増加を起し、さらに肺動脈の狭窄や肺炎の進行による心臓への圧負荷等の要因が加わることによって、不整脈を誘発しやすくなるものと考えられる。

一方、吸入実験においても多くの生理的、形態的指標に変化が出現することが報告されている。すなわち、1) 正常ラットへの CAPs 及び ROFA の吸入曝露によって、心臓及び肺における酸化ストレス指標が正常レベルの約 2 倍に速やかに上昇する (Gurgueira ら (2002)) こと、2) 高齢ラットへの道路微小粒子の曝露は血漿エンドセリン-2 濃度の上昇をもたらす (Elder ら (2004)) こと、3) アテローム性動脈病変を有す DK マウスでは、CAPs 曝露により血管細胞の増殖性が促進され、大動脈プラークの大きさ、重症度に悪影響をもたらす (Chen と Nadziejko (2005)) こと、4) 先天性に動脈病変を有すマウス (ApoE^{-/-}) への CAPs 曝露によって動脈病変が悪化する (Chen と Hwang (2005)) こと、5) 同様のマウスへの PM_{2.5} の長期曝露によって心拍変動への影響と動脈病変

の悪化が認められる(Lippmann ら (2005a)) こと、6) 遺伝性高脂血症(WHHL、Watanabe Heritable HyperLipidemic)ラビットへの PM₁₀ の曝露により全身の動脈及び冠動脈の動脈硬化病変を悪化させる (Suwa ら (2002)) こと、7) 高脂肪食の apoE^{-/-}マウスへの PM_{2.5} 曝露によって、大動脈の粥状病変の悪化と血管収縮薬に対する収縮反応の亢進が認められる (Sun ら (2005)) こと、8) WKY ラットへの ROFA の長期の曝露によって心筋組織における多発性的変性像、線維化が生じる (Kodavanti ら (2003)) こと、等である。さらに、血液性状に関する報告もみられる。Gordon ら (1998)は、正常ラット及び肺高血圧症ラットへの CAPs の吸入曝露によって末梢血の血小板及び好中球が増加することを報告したが、常に増加するわけではない。

これらの実験結果を俯瞰すると、CAPs や ROFA の吸入曝露によって主に血管系の形態的な変化を促進する傾向が存在し、とくに潜在的に血管系に異常を持っている動物では血管病変の悪化がより促進されるといえる。このような血管系の異常は、心臓に対する圧負荷を増大させ、不整脈を誘発しやすくするものと考えられる。

5.3.3.3. 微小粒子状物質の曝露によって、自律神経機能に影響を及ぼす

微小粒子状物質の曝露によって自律神経機能に影響が現れることがいくつかの文献で報告されている。エンドトキシン処理を行った SHR に道路上大気を吸入させた実験では副交感神経の活動亢進による心拍数の減少と交感神経の活動の低下が示されており、道路上大気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確に述べられている (Elder ら (2007))。一方、ROFA (3.42mg/m³) を心筋梗塞モデルラットに 1 時間吸入曝露した研究では、心拍間隔のばらつきの減少 (副交感神経緊張の低下) がみられている (Wellenius ら (2002))。

正常ラットに CAPs (750 µg/300 µL saline) を気管内投与すると、投与直後～60 分間に心拍間隔のばらつきの増大、主に副交感神経活動を反映する高周波成分 (HF) /主に交感神経活動を反映する低周波成分 (LF) の増大が生じている (Rhoden ら (2005))。

微小粒子状物質曝露影響調査研究報告において、SHR に CAPs を曝露した動物実験の結果を見ると、副交感神経活動の指標となる HF の増加や心拍数の減少傾向が認められている。多くの動物実験の研究は副交感神経の活動の亢進を示したが、心拍数の増加を示した報告も少数存在する (Vincent ら (2001)、Campen ら (2003))。

一方、ヒト志願者実験では、PM_{2.5} や PM₁₀ の曝露で心拍数や心電図への影響が観察されないとする報告 (Nightingale ら (2000)、Petrovic ら (2000)、Gong ら (2003)) もみられるが、心拍変動解析結果には影響が現れるとする報告もある (Park ら (2005))。それらの多くは、PM_{2.5} の曝露 (Liao ら (1999)、Creason ら (2001)、Holguin ら (2003)、Park ら (2005)) または PM₁₀ (Liao ら (2004))

の曝露によって、心拍変動が全体的に低下することを示しているが、主に交感神経活動を反映する低周波成分と副交感神経活動を反映する高周波成分とを比較した場合、高周波成分の低下の方が低周波成分の低下よりも強く生じる傾向があることを明らかにしている。また、このような心拍変動の低下は健常者に比べて高血圧患者 (Holguin ら (2003))、心血管系患者 (Liao ら (2004)) あるいは糖尿病患者 (Park ら (2005)) でより強く生じる傾向がみられている。これらのヒトの研究で得られた自律神経機能影響に関する傾向は上述の動物実験による傾向とは必ずしも一致しないが、ヒトにおいても動物においても PM_{2.5} 及び PM₁₀ の曝露が自律神経機能に影響を及ぼすことが示唆される。

5.3.3.4. 血液の凝固線溶系への影響がみられる

CAPs、DEP 等の粒子状物質の曝露によって、凝固線溶系の変化が観察されるとする報告が比較的多く認められる (Sjogren (1997)、Gardner ら (2000)、Kodavanti ら (2002)、Ulrich ら (2002)、Ghio と Huang (2004)、Petrovic ら (2000)、Gong ら (2003))。

いくつかの文献で、ROFA の気管内投与による血漿フィブリノゲンの増加、DEP の気管内投与による静脈及び動脈の血栓形成の増大、血小板の活性化が起こることが示されている。DEP の気管内投与実験では、数種の動物種において静脈内の血栓形成の促進が投与量依存性に認められている点は注目される。

ヒト志願者の研究では、健康な非喫煙者への CAPs 曝露で、BALF 中の好中球の増加や血中フィブリノゲンの増加が認められており、Huang ら (2003) は、CAPs 中の硫酸塩/Fe/Se 因子が BALF 中の好中球の増加、Cu/Zn/V 因子が血中フィブリノゲン増加と関連していて、粒子状物質の特異的成分の重要性を指摘している。健康な志願者の間欠運動下での CAPs の曝露は、白血球数や LDH (Lactate DeHydrogenase) の両方の減少及びフィブリノゲン濃度の増加と関連していると結論している。

以上、粒子状物質や DEP の曝露に関する動物実験の結果から、一部の報告を除き血液成分に影響が現れるとする報告が多いといえる。多くの実験では高濃度の粒子状物質への曝露ではあるが、血液凝固系が活性化し、血栓の形成を誘導していくことが示唆された。このような結果は、ヒト志願者の研究における CAPs 曝露による血中フィブリノゲンの増加に関する報告や大気汚染物質の曝露による血栓症が起こる臨床的報告と傾向が一致している。このような血液性状の変化は、冠動脈閉塞や肺塞栓症を起こしやすくし、また末梢血管抵抗を増大することで心臓への圧負荷を高める可能性がある。

5.3.3.5. 心機能変化において呼吸器系の刺激が影響する

微小粒子状物質は気管支や肺実質を刺激し炎症性影響をもたらすことが知られている。一般に気管支や肺実質の炎症性変化が生じた場合に、心臓や血管系に及ぼす影響メカニズムとしては次の経路が考えられる。① 炎症部位からのサイトカインや生理活性物質の産生と血流への放出、② 気道知覚神経（気管支 C 線維、肺泡 C 線維、刺激受容器）の刺激による心血管系への自律神経反射、③ 炎症による肺循環障害である。① では心臓や血管の増殖性変化、血管収縮または弛緩等が、② では徐脈と血圧低下、③ では肺鬱血、肺高血圧症、右心負荷等が結果としてもたらされる。

ラットへの PM_{2.5} の気管内投与で誘発された不整脈の発現には心肺反射が主要な要因とは考えられないと考察した文献がある (Kang ら (2002))。しかしながら、気道の知覚神経終末、とくに C 線維の刺激は迷走神経反射による徐脈や血圧低下を誘発することが生理学的に広く知られている。したがって、呼吸器内に侵入した物質に気道刺激性が存在する場合には、迷走神経中の求心性神経 (C 線維) を介した遠心性神経 (副交感神経) の活性化による心臓影響を無視することはできないものと推測される。実際、PM_{2.5}、CAPs、ROFA の気管内投与実験の多くで投与直後から徐脈が出現している (Kang ら (2002)、Campen ら (2000)、Watkinson ら (2000)、Campen ら (2002))。また、これらの物質の吸入実験でも多くの例で徐脈が認められている (Godleski ら (2000)、Nadziejko ら (2002)、Hwang ら (2005)、Nadziejko ら (2004)、Muggenburg ら (2000)、Elder ら (2007))。上述の実験にはラットやマウスが多く使われており、これらの動物は本来的に交感神経緊張が高い動物であるため、気道刺激が存在する場合の心拍反応は副交感神経側に現れやすいものと考えられる。以上の動物実験の研究報告から呼吸器刺激は少なからず心血管系へ影響を及ぼすものと思われる。

5.3.3.6. 微小粒子（粒子中成分）は血液中に浸出し心血管系に影響を及ぼす

微小粒子が循環器系に浸出する過程としては、① 肺泡に沈着した可溶性粒子の一部が上皮細胞から吸収される経路、② 肺泡マクロファージの食作用によって取り込まれた粒子がマクロファージとともにリンパ系に移行した後に血流に入る経路、③ 沈着した粒子中の可溶性成分が溶解し血液中に移行する経路が考えられる。血液中に移行した超微小粒子の一部は血管系や中枢神経系へと侵入する可能性が示唆されている。これらの微小粒子が血流中に多量に存在する場合は、それらが血管内皮細胞を障害することで血栓形成を促進する可能性が考えられる。上述したように粒子状物質や DEP は血液凝固系を促進しうることを示唆されているが、血液中の微小粒子状物質と血液凝固系及び血管内皮障害との因果関係については機序を含めて直接的な証明を行った研究は乏しい。また、気管内投与実験等では、心臓内の酸化ストレス指標が増加することが報告

(Gurgueira ら (2002)) されている。これらの変化が血液内に侵入あるいは溶解した粒子成分による直接作用なのか、あるいは自律神経系 (Rhoden ら (2005)) や他の生体内内因性物質 (Kang ら (2002)) による二次的な影響なのかについても正確なことはまだわかっていない。

5.3.3.7. 疾患モデル動物は正常動物に比べて循環機能変化に差異が生じる

心筋梗塞モデル (Kang ら (2002)、Wellenius ら (2004)、Godleski ら (2000))、高血圧症モデル (Bagate ら (2006)、Nadziejko ら (2002)、Campen ら (2003))、肺高血圧症モデル (Campen ら (2000)、Watkinson ら (2000)、Campen ら (2002)、Cheng ら (2003)) 及び動脈硬化症モデル (Hwang ら (2005)) が、CAPs、粒子状物質、ROFA、金属粒子の曝露による心血管系影響の評価に有効に使用されている。これらの実験では、正常動物に比べて疾患モデル動物では期外収縮や徐脈等の心機能変化を起こしやすいか、あるいは心電図波形の変化を起こしやすい (Wellenius ら (2003)、Kodavanti ら (2000)) ことを述べた報告が多い。とくに心筋梗塞モデルのラットやイヌ、肺高血圧症モデルのラットでは曝露による不整脈や心電図変化が比較的明瞭に現れている。

心筋梗塞モデル犬を使った実験 (Godleski ら (2000)) では、ボストンの CAPs 吸入曝露によって心電図 ST 上昇がより速やかに発現すること、徐脈が出現すること、心拍変動のパワー (低周波成分と高周波成分) が増大することが示されている。一方、同じ研究で、正常犬では T 波交互脈が CAPs 曝露によって抑制されることから、正常個体では不整脈をむしろ抑制する方向の変化であるとみている。別の心筋梗塞モデル犬の CAPs 曝露実験 ($345.25 \pm 194.30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、6 時間 \times 3~4 日) では、心電図 ST 上昇が明瞭に出現したが不整脈及び徐脈はみられなかった (Wellenius ら (2003))。また、正常な高齢ビーグル犬 (平均 10.5 歳) に ROFA ($3 \text{mg}/\text{m}^3$ 、3 時間/日 \times 3 日間) を曝露した実験では、徐脈が認められたが、期外収縮等の不整脈は出現せず T 波の波形・振幅にも変化がみられなかった (Muggenburg ら (2000))。

アテローム性動脈病変を先天性に有す ApoE^{-/-}マウスに CAPs を曝露 ($110 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、6 時間 \times 5/週 \times ~5 ヶ月) した実験では、心臓自律神経系活動の曝露初期の亢進とその後の低下が示されている (Chen と Hwang (2005))。同じモデルマウスに CAPs を曝露 ($133 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、6 時間/日 \times 5 日/週 \times 5 ヶ月) した実験では、明瞭な徐脈が出現した (Hwang ら (2005))。また、同様の実験系で心拍数の減少は CAPs の日間変動に連動して変化している (Lippmann ら (2005b))。

冠動脈凝固閉塞による心筋梗塞モデルラットでは、PM_{2.5} ($350.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$) の吸入曝露後 10 分で期外収縮や房室ブロックが出現したが、とくに曝露前から期外収縮が多い個体は曝露によって期外収縮の発現が明らかに多くなった (Wellenius ら (2004))。同様の他の心筋梗塞モデルラットの実験では、ROFA の曝露 ($3.42 \text{mg}/\text{m}^3$ 、1 時間) によって期外収縮の著明な増加 (141%) が認め

られている (Wellenius ら (2002))。

CAPs ($73\mu\text{g}/\text{m}^3$) の SHR への曝露によって、曝露開始後 4 時間以内の観察で軽度の血圧低下がみられている (Nadziejko ら (2002))。高齢 F344 ラット (18 ヶ月齢) への CAPs 曝露 ($160, 200\mu\text{g}/\text{m}^3$; 4 時間) によって、期外収縮と徐脈が明瞭に出現している。SHR に DE を曝露 (0, 30, 100, 300, $1,000\mu\text{g}/\text{m}^3$; 6 時間/日 \times 7 日間) した実験では、軽度の期外収縮と明瞭な頻脈、PQ 間隔の延長が認められている (Campen ら (2003))。SHR 及び正常ラット (WKY ラット) に ROFA ($15\text{mg}/\text{m}^3$) を曝露した実験では、WKY ラットでは曝露による心電図影響はなかったが、SHR では ST 分節の低下が現れた (Kodavanti ら (2000))。正常 Wistar ラットにオタワ標準粉じん (EHC-93 $48\text{mg}/\text{m}^3$) を曝露した実験では、曝露中及び曝露終了後に心拍数増加 (頻脈) 及び血圧上昇が認められた (Vincent ら (2001))。

循環機能の変化は、気管内投与実験においてより明瞭に出現している。PM_{2.5} ($2.0\text{mg}/0.3\text{ mL saline}$) を心筋梗塞モデルラットに投与すると、10 分後に明瞭な期外収縮と徐脈が出現している (Kang ら (2002))。モノクロタリン肺高血圧症ラットに ROFA ($0.25\sim 2.5\text{mg}$) を投与した実験では期外収縮、房室ブロック、徐脈が明瞭に発現している (Campen ら (2000))。高濃度曝露では投与後 24 時間目においても心拍数の減少は回復していない。モノクロタリン肺高血圧症ラット及び SHR に ROFA ($0.25, 1.0, 2.5\text{ mg}/0.3\text{ mL saline}$) を投与した実験では、SHR で明瞭な期外収縮と徐脈が出現している (Watkinson ら (2000))。この実験では正常ラットにおいても徐脈と期外収縮が出現したが、発現性は疾患モデルラットで強く生じており、肺高血圧症ラットでは死亡率が上昇した (50% 上昇)。SHR の心臓障害は肺高血圧症ラットよりも弱かった。Fe₂(SO₄)₃、NiSO₄、VSO₄ の肺高血圧症ラットへの投与では明瞭な期外収縮と NiSO₄、VSO₄ では明瞭な徐脈が認められている (Campen ら (2002))。

日本国内の実験では、正常ラットのほかに SHR、高齢ラット、ドキシソルビシン投与心不全マウス、ラット等が疾患モデル動物として用いられ、PM_{2.5}あるいは DE の吸入曝露実験がなされている。また正常モルモットに対するキニジン誘発不整脈の発現性も観察している。キニジン誘発不整脈実験では、一部の実験の曝露群では QT 間隔の延長傾向が認められたが、再現性が乏しい。これらの国内研究報告では、曝露によると思われる特異的な循環機能 (心電図、血圧) 変化はほとんど見出されていない。

上記の各種の疾患モデル動物を用いた実験成績を俯瞰した場合、冠動脈の閉塞による心筋梗塞モデル動物及びモノクロタリン誘発肺高血圧症モデルにおいてとくに徐脈や不整脈といった心機能異常が現れやすいように見受けられる。心筋梗塞モデル動物では、虚血心筋部位と正常心筋部位との間で不整脈誘発の受攻性が異なることや心不全による酸素供給能の低下等が感受性亢進の要因として考えられ、肺高血圧症モデル動物では右心負荷による心臓への負担の増大

やそれに伴う心臓内の各種の内因性物質（サイトカインやエンドセリン等）の変化が関与する可能性が考えられる。

5.3.3.8. 複合大気汚染により影響の増悪が生じる

Ulrich ら (2002)はオタワ標準粉じん (EHC-93) を O_3 曝露したラットまたは O_3 曝露を行っていないラットに気管内投与 (0.1、1.5、5mg) し、生理食塩水の投与との比較を行っている。その結果、 O_3 曝露の有無にかかわらず、投与の2日後に血漿フィブリノゲンが20%増加したことを報告している。Watkinson 一派 (Watkinson ら (1997)、Watkinson ら (2001)、Campen ら (2000)) は、ROFA の気管内投与による生体反応が O_3 の前曝露や寒冷環境飼育のストレスによってどのような修飾を受けるかについて研究を行っている。これらの前処置を行った動物では ROFA の気管内投与によって徐脈、不整脈及び体温低下が無処置にくらべてより強く起こることを明らかにしている。微小粒子状物質以外の要因による複合影響に関する研究は少ないが、肺への O_3 や寒冷ストレス（交感神経緊張亢進）が ROFA 等の心血管系作用を高める可能性は否定できない。

5.4. 免疫系その他への影響

5.4.1. 仮説の紹介

ヒト及び実験動物における微小粒子状物質の吸入による感染抵抗性やアレルギー反応等、免疫系への影響に関する発現機序を解明する研究が、呼吸器系への影響に関する機序の解明と併せて行われている。また、近年、生殖器への影響や神経・行動に対する影響に関してもその機序を解明する研究が行われ始めている。

大気中の粒子状物質及びその成分による免疫系への影響に関して、2つの機構について仮説の検証を行う。

(1) 呼吸器における感染抵抗性が低下する

(2) アレルギー性疾患が増悪する

また、その他の影響として、2つの機構の仮説の検証を行う

(3) 生殖器への影響が生じる

(4) 神経・行動への影響が生じる

5.4.2. 論文の紹介

5.4.2.1. 呼吸器における感染抵抗性が低下する

Zelikoffら(2002)は、CAPs(粒径 $PM_{2.5}$ 、 $65\sim 90\mu g/m^3$)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。

Campbellら(1981)は、4~8週齢のCR/CD-1マウス(雌 一群20匹)を用いて、DE曝露を行いその後の感染抵抗性について検討した。DE曝露は、急性(2時間と6時間)、亜急性(8時間/日で8、15、16日間)、慢性(44、46週間)を行い、TSPとして平均 $6.4mg/m^3$ 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。

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 $2\text{mg}/\text{m}^3$ 炭粉群、 $2\text{mg}/\text{m}^3$ 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。

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

Harrod ら (2005)は、DE を $30 \sim 1,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 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($30 \sim 100 \mu\text{g}/\text{m}^3$)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 $30 \sim 100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 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。

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

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。

5.4.2.2. アレルギー性疾患が増悪する

Kleinman ら (2005)は、OVA 感作したマウスを CAPs に曝露しアレルギー反応への影響を各種指標(IL-5、IL13、OVA 特異的 IgE、IgG1、好酸球、多核白血球)を用いて検討した。実験は、道路沿道から 50m、150m 離れた地点で集めた CAPs を用いて行われた。曝露濃度は、50m 離れた地点で集めた CAPs は、fine (<2.5 μ m)で 498 μ g/m³、ultrafine(<0.15 μ m)で 433 μ g/m³、150m 離れた地点で集めた CAPs は、fine で 442 μ g/m³、ultrafine で 283 μ g/m³であった。

曝露群でのアレルギー反応指標の増加及び道路からの距離が近いほど強い影響を認め、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。道路からの距離が近いほど超微小粒子を多く含むことから、より粒径の小さい粒子の方がアレルギー反応を増悪する作用が強いことが示唆された。

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 PM (coarse 2.5~10 μ m、fine <2.5 μ m)を 3mg/ml、9mg/ml で気管内投与し、対照群：NaCl、OVA、OVA+オタワ標準粉じん(EHC-93)を気管内投与した。投与パターンは、OVA+PM により感作(0 日、14 日、9mg/ml、3mg/ml PM/個体)後、35、38、41 日に OVA でチャレンジ、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。

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及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)及び転写因子(NF- κ B)の有意な増加が認められ、微小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。

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。

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。

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。

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。

Diaz-Sanchez ら (1997)は、13 人のブタクサの皮内テストで陽性の非喫煙者 (男 6 人、女 7 人 : 21~49 歳) に対して DEP (0.30 mg) とブタクサ抗原の両者を組み合わせて、ヒトの鼻内にチャレンジを行い、局所の液性免疫に与える影響を検討した。DEP は、light-duty のディーゼル乗用車の排気から採集した。ブタクサ抗原単独のチャレンジと比較して、DEP とブタクサ抗原の組み合わせは抗原特異的 IgE の著明な増加をもたらしたが、総 IgE や IgE 分泌細胞数は変化しなかった。総 IgG4 や抗原特異的 IgG4 も増加したが、総 IgG は変化しなかった。両者の共同作用は alternative splicing による epsilon mRNA (CH4-M1'-M2、CH4-M2'、CH4-M2''、CH4-S、CH4'-CH5) のレベルにおいても CH4'-CH5 を除いて観察された。さらにブタクサ抗原単独では、低レベルのサイトカイン mRNA が検出されたにすぎなかったが、ブタクサ抗原と DEP の組み合わせは Th1 タイプのサイトカイン (IFN- γ や IL-2) の表現の減少をもたらしたが、他のサイトカイン (IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13) の mRNA の表現の増加をもたらした。DEP とアレルゲン曝露の相乗作用はアレルゲン誘導性の呼吸器系疾患の増加を示唆する重要な所見と考えられると述べている。

Fujieda ら (1998)は、8 人の健康な非喫煙者 (男 4 人、女 4 人 : 21~36 歳 : 全員がブタクサの皮内反応テストが陽性) 全員に、異なった日に、ブタクサ・アレルゲンのみ、DEP のみ、及び DEP+ブタクサ・アレルゲンのチャレンジを受けさせた。被験者は、ブタクサ・アレルゲン (Amb a I) を 10 AU から始めて即時アレルギー症状がでるまで 10 倍ずつ濃度をあげるか、1,000 AU まで鼻にスプレーすることによりチャレンジした。8 週間あけて、DEP (0.3 mg) とブタクサ・アレルゲンの両方あるいは DEP のみに、無作為にチャレンジされた。100 μ l の食塩水に DEP (0.15 mg) を含んだものを鼻孔にスプレーし、総量 0.3 mg の DEP を曝露した。各被験者は、チャレンジ前の三つの異なった日と、チャレンジ後 4 日目に 5 ml の生理食塩水で鼻洗浄を行い、鼻洗浄液について分析を行った。新しい nested polymerase chain reaction-based approach (ポリメラーゼ連鎖反応に基づいたアプローチ) による deleted switch circular DNA (switch circles) の検出を、IgE isotype switching が起きているという明確な分子的証拠として採用した。DEP にブタクサ抗原を加えてヒトの鼻にチャレンジすると、局所的な IgE 産生を増強し、局所的なサイトカイン産生を刺激し、ブタクサ・アレルゲンに対する粘膜の IgE 抗体を顕著に増加させることが示された。DEP+ブタクサ・アレルゲンのチャレンジ後 4 日目に、鼻洗浄細胞中に μ から ε への switching を示す deleted switch circular DNA (S_{ε}/S_{μ}) の

クローンを検出した。DEPのみあるいはブタクサ・アレルゲンのみでのチャレンジでは、鼻洗浄細胞中に switch circular DNA は検出されなかった。これらの結果は、DEPとブタクサ・アレルゲンの粘膜刺激の複合は、ブタクサ・アレルギーのヒトで in vivo の IgE isotype への switching を引き起こしうることを示している。これらの結果は、ヒトでの in vivo の IgE isotype の switching を直接的に初めて示したものであると述べている。

Diaz-Sanchez ら (1999)は、DEP が新抗原に対する粘膜 IgE 反応に対して粘膜アジュバントとして作用するかどうかを調べた。新抗原は、ヒトではクロス反応する既知の抗体をもたない marine mollusk (*Megathura crenulata* : 海の軟体動物)の血液から分離した糖タンパク質の keyhole limpet hemocyanin (KLH) を用いた。DEP は、ディーゼル乗用車からの排気を捕集したものである。被験者は、25 人の健康な非喫煙者 (男 11 人、女 14 人 ; 21~55 歳) で、全ての被験者は、塵ダニ・アレルゲンを除いて、少なくとも一つの空中アレルゲンに対して陽性の皮膚プリック・テストを示した。さらに全被験者は、季節性の気道アレルギーの既往があるが無症状であった。10 人のアトピーの被験者を、1 mg の KLH で鼻を最初に免疫して、次いで 100 μ g の KLH で隔週に 2 回鼻にチャレンジした。また、15 人の異なるアトピーの被験者に DEP を各 KLH 曝露の 24 時間前に投与し、全く同じ鼻の KLH 免疫を行った。DEP は 0.3 mg を 200 μ L の食塩水に浮遊させ鼻にスプレーした。最初の KLH 投与後、14、28、29 及び 32 日目に鼻洗浄を行い KLH に対する抗体を調べた。その結果、32 日目では、KLH のみへの曝露は、鼻洗浄液中で、抗 KLH IgG は全ての被験者に、IgA は 10 人中 8 人に、IgG4 は 10 人中 4 人に検出されたが抗 KLH IgE は誰にも検出されなかった。反対に、KLH に先立ち DEP でチャレンジすると、15 人のうち 9 人が抗 KLH 特異的 IgE を産生した。KLH のみでみられたのと同様のレベルで抗 KLH 特異的 IgG と抗 KLH 特異的 IgA も検出された。DEP と KLH を受けた被験者では、鼻洗浄液中の IL-4 レベルを有意に増加させたが、IFN- γ レベルは増加しなかった。一方、これらのレベルは、KLH のみを受けた被験者では変化がみられなかった。これらの研究は、DEP が新しい IgE 反応に粘膜アジュバントとして作用し、アレルギー感作を増加させるかもしれないことを示していると述べている。

Diaz-Sanchez ら (2000)は、プリック・テストでハウスダスト・ダニに陽性の 11 人の非喫煙者 (男 6 人、女 5 人 : 21~55 歳) に、既知の量の *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) を含むハウスダスト・ダニの抽出物を鼻にスプレーして、症状スコア (鼻搔痒感、鼻閉、鼻汁、くしゃみ) が 5 になるまで増量した。その後、被験者は、300 μ L の食塩水に 0.3 mg の DEP (Isuzu のディーゼル・エンジンの排気から捕集したもの) または CB を同様に含むもの、及び 300 μ L

の食塩水の何れかを鼻に噴霧し、次いでダスト・ダニ抗原で症状スコア 5 が得られるアレルゲン量を調べた。その結果、アレルゲンのみの症状スコアは 3.7、DEP のみは症状を誘発しなかったが、DEP+アレルゲンはスコアが 9.9、CB では症状スコアは増強しなかった。鼻洗浄液中のヒスタミン濃度は、アレルゲンのみに比し、DEP+アレルゲンでは約 3 倍近く増加した。DEP 中の化学物質がマスト細胞に直接作用するかどうかを調べるために、マウスの肥満細胞系 (MMC-34) を用いて、高親和性 IgE 受容体の IgE/ α -IgE クロスリンクのもとで、DEP の溶解性有機化学物質と一緒に培養すると、 β -hexosaminidase とヒスタミンの放出が増強され、DEP 濃度との間に量-反応関係がみられた。これらの結果は、DEP への曝露はマスト細胞の脱顆粒を増強することによりアレルゲンに対する臨床症状の重症度を増強させることを示唆していると述べている。

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ゲン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ゲン曝露 (session B)、及び ROFA 曝露の後にアレルゲンの曝露 (session C)。各曝露は、ROFA (目標濃度は 1.0 mg/m³ だったが、実際は 0.96 μ g/m³) 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 μ 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 μ m であった。花粉アレルゲンは、6 種類の吸入性アレルゲン [*Dermatophagoides 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ゲンを決めた。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ゲンが投与されたとき、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ゲン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。

Alexis ら (2006) は、9 人の健康な非喫煙者 (男 3 人、女 6 人 : 年齢 18~35

歳)に以下に示す3種類の被験物質をそれぞれネブライザーで、調整された500 mLの一回換気量で25吸入/分の頻度で、約30分間経口吸入させた。被験物質は、対照群としてネブライズされた食塩水(0.9%)、ノースカロライナ州のChapel HillでサンプリングしたPM_{10-2.5}で、生物学的物質を不活性化するために120°Cで20時間熱処理したPM_{10-2.5}(PM_{10-2.5}⁻)(3 mgのPM_{10-2.5}を4 mLの0.9%の無菌食塩水に再浮遊したもので、MMADは5 μm)または熱処理をしていないPM_{10-2.5}(PM_{10-2.5}⁺)で、これらを別々の日に同様に吸入した。食塩水吸入時に、Tc99m-sulfurコロイド(SC)粒子を食塩水に混合し、PM_{10-2.5}が気管支に供給されていることをガンマ・カメラで確認した。各々の吸入後3時間目に、痰を誘発させ、痰について炎症細胞とサイトカイン、炎症性サイトカインのmRNA、細胞表面の表現型及び貪食機能を調べた。その結果、PM_{10-2.5}⁺吸入で、食塩水吸入に比して、炎症マーカーである好中球%とマクロファージのTNF-αのmRNA発現量が有意(p<0.05)に誘発された。また、eotaxinが増加し、マクロファージの表現型で免疫調節能が増加し、単球の貪食能も増加した。生物活性がマイナスのPM_{10-2.5}⁻吸入では好中球増加への影響はみられなかったが、TNF-αのmRNA、eotaxinレベル、細胞表面マーカーの反応及び貪食能を有意(p<0.05)に弱めた。以上より、PM_{10-2.5}の生物学的構成要素は、必ずしも好中球の反応を誘発しないが、マクロファージの反応調節には必要であると述べている。また、単球の細胞を活性化し、潜在的に、eotaxinレベルを増強することによりアレルギー患者におけるアレルギーあるいは細菌に対する反応を増強する可能性が示唆されたと報告している。

Stenforsら(2004)は、25人の健康な非アトピー性の者(男16人、女9人:平均年齢24歳;19~42歳)及び15人のβ₂作動薬の吸入のみしている軽症の喘息患者(女5人:平均年齢30歳;22~52歳)を大気レベルのDE[10 μmの空気力学径の50%カット-オフの粒子(PM₁₀)濃度が108 μg/m³(94~124)、COは1.7 ppm(0.6~2.5)、NO₂は0.2 ppm(0.1~0.3)]に中等度の間欠的運動下(分時換気量が15-20L/min/m²の負荷で15分間の運動と安静の繰り返し)で2時間曝露し、肺機能と気道炎症を評価した。DEは、Volvoのディーゼル・エンジンで発生させた。肺機能はBody-plethysmographでsRaw(特異的気道抵抗)、FVC及びFEV₁を測定した。曝露後、6時間目に気管支鏡を行い、気管支生検、気管支洗浄液(BW)及びBALFを採集した。粘膜生検については、特異的細胞マーカー、血管内皮接着分子及び細胞内接着分子、サイトカインや転写因子を測定した。BW及びBALFについては、細胞分画、アルブミン、総タンパク質、IL-6、IL-8、GM-CSF、methyl-histamine、MPO及びECPを測定した。DE曝露後、FEV₁やFVCは、どのグループも影響がみられなかった。sRawは、空気曝露に比し、健康者では4.1%(p<0.01)、喘息患者では6.5%(p<0.01)の増加を示したが、グループ間では反応の大きさに統計的な差はみられなかつ

た。健康な被験者は、DE 曝露後、気道炎症を起こし、気道洗浄液における IL-6 と IL-8 タンパク質の増加、気管支粘膜における IL-8 mRNA の増加と内皮の接着分子 (P-selectin と VCAM-1) の upregulation を伴った気道の好中球増加とリンパ球増加を示した。喘息患者では、DE 曝露は、好中球性反応を引き起こしたり、既存の好酸球性気道炎症を増悪させたりすることはなかった。サイトカインの IL-10 の上皮染色は、喘息グループでは DE 後に増加していた。DE による IL-10 の誘発は、喘息患者の気道炎症の増強に寄与するかもしれない。現在の WHO の大気質基準以下の濃度で 50%カット・オフの空気力学径が $10\mu\text{m}$ の粒子が、健康者と喘息患者で異なる影響がみられることが、この研究で観察された。これらの異なる反応の意味を解明するには更に研究が必要であると述べている。

Holgate ら (2003)は、DEP への曝露による臨床的感受性が、急性の好中球性炎症あるいはアレルギー性気道炎症の増加で説明できるかどうかを、15 人の非喫煙者の喘息グループ (男 10 人、女 5 人、平均年齢 30 歳 ; 23~52 歳) と 25 人の非喫煙者のコントロール・グループ (男 16 人、女 9 人、平均年齢 25 歳 ; 19~42 歳) について調べた。DE は、Volvo TDIF-1990 で発生させ、曝露チャンバー内の平均濃度は $\text{PM}_{10} : 108.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $\text{CO} : 1.7\text{ppm}$ 、 $\text{NO} : 0.6\text{ppm}$ 、 $\text{NO}_2 : 0.2\text{ppm}$ 、 $\text{HC} : 1.4\text{ppm}$ 、 $\text{HCHO} : 43.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。被験者は間欠的運動下 (分時換気量が $15\sim 20\text{L}/\text{min}/\text{m}^2$ 体表面積の負荷で 15 分の運動と 15 分の安静の繰り返し) で 2 時間曝露され、曝露前後に鼻洗浄液採集、曝露終了後 6 時間目に気管支鏡を行った。コントロール・グループ及び喘息グループでは、気道抵抗の有意な増加がみられた。この増加は、コントロール・グループでは気管支洗浄液 (BW) 中の好中球の増加及び BAL 中のリンパ球の増加と関連していた。コントロール・グループの気管支生検組織では、内皮接着分子 P-selectin の upregulation がみられ、また BALF 中の IL-8 タンパク質濃度及び IL-8 mRNA 遺伝子発現量の有意な増加がみられた。末梢血中の赤血球や白血球数には変化がみられなかった。喘息グループの気道粘膜の生検組織は、空気曝露後に好酸球性気道炎症がみられたが、DE は、気道の好中球、好酸球やその他の炎症性細胞、またサイトカインや炎症のメディエーターの有意な変化をもたらさなかった。唯一の明確な影響は、生検組織の IL-10 染色で有意な増加がみられたことである。この研究は、あまり高くない濃度の DE であっても、コントロール被験者の気道に明白な炎症効果を及ぼすこと、IL-8 産生に直接影響し内皮接着分子の upregulation を起こすことを示している。DE に対する喘息患者の感受性が増加するという臨床報告があるが、この感受性は好中球性の炎症や既存の喘息の気道炎症の悪化によるものではなさそうである。喘息患者で DE への曝露後 IL-10 の増加がみられたことは、気道炎症に何らかの影響を引き起こすかもしれないことを示唆していると述べている。

5.4.2.3. 生殖器への影響が生じる

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、精巣及び前立腺の AHH (Aryl Hydrocarbon Hydroxylase)活性と EH (Epoxide Hydrolase) 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 ラット及びウサギ(ニュージーランドホワイトラビット)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、胎仔の平均体重等は、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、精子数の減少と睪丸重量の減少、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。

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)及び清浄空気(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及び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、精子産生能力及び精巣の形態変化等を調べた。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%及び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、精巣上体重量等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及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等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及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及び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、卵巣及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及び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。

5.4.2.4. 神経・行動への影響が生じる

Laurie ら (1978)は、SD ラット(雌)に対し、 $6\text{mg}/\text{m}^3$ 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 $6\text{mg}/\text{m}^3$ 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、Motorcycle Exhaust)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小粒子(MEP)を $0.1\text{g}/\text{kg}$ (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 (benzo[a]pyrene) を経口投与したマウスにおいて同様であった。排気ガスあるいは排気微小粒子の処理により、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。

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 $\text{PM}_{2.5}$ 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 (Magnetic Resonance Imaging) 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。

5.4.3. 論文による仮説の検証

5.4.3.1. 呼吸器における感染抵抗性が低下する

粒子状物質の曝露による呼吸器における感染防御機能への影響について、感
染モデルを用いた実験動物曝露実験の知見がある。

CAPs や都市大気の子状物質の影響に関して、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を低下させた
(Zelikoff ら (2002))。

マウスへの DE 曝露により、*Streptococcus pyogenes* 感染に対して致死率の増
加がみられ、インフルエンザウイルス感染に対しては肺のインターフェロンレ
ベルの抑制がみられた (Campbell ら (1981)、Hahon ら (1985))。

マウスに DE を曝露し、結核菌を感染させたところ、肺組織中の結核菌によ
るコロニー生成が増加した (Hiramatsu ら (2005))。

DE の短期間曝露では緑膿菌のクリアランスは低下し、その低下は低濃度領域
では濃度依存的であった (Harrod ら (2005))。

マウスに CB を気管内投与後 RSV (Respiratory Syncytial Virus)を感染し炎
症反応への影響を検討したところ、CB 処理により BALF 中炎症細胞誘導が認め
られた (Lambert ら (2003))。

Th2 タイプのサイトカイン・ケモカイン産生量は感染前 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、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が示唆され
た。

以上、CAPs や DE 曝露は、肺胞マクロファージの持つ細菌を殺す能力を低下
させ、インターフェロン産生を抑制し、*Streptococcus pneumonia*、
Streptococcus pyogenes、緑膿菌、結核菌感染の感受性を高める可能性が示唆さ
れた。また、感染要因が Th2 応答性に関与する知見が得られた。全身性の影響
として、血中の凝集抗体価の低下がみられている。しかしながら、肺からの細
菌クリアランス能は、6 ヶ月間の低濃度 DE 曝露において影響がないことも報告
されており、さらに解明に向けた研究の実施が望まれる。

5.4.3.2. アレルギー性疾患が増悪する

粒子状物質によるアレルギー性疾患の増悪についてはいくつか知見がある。

マウスに沿道で集めた CAPs を曝露したところ、アレルギー反応への影響 (IL-5(InterLeukin-5)、IgE(Immunoglobulin E)、好酸球)は道路からの距離が近いほど強いことが示唆された (Kleinman ら (2005))。

ヨーロッパ各都市で採集した粒子状物質のアレルギー反応におけるアジュバント効果を調べた検討では、粒子状物質 (fine) の方が粒子状物質 (coarse) より増強効果が高いこと、粒子状物質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唆された (Steerenberg ら (2005))。

アレルギー感作状態のマウスにロサンゼルス CAPs を曝露したところ、曝露群では炎症性サイトカイン (TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), IL-1 α) 及び転写因子 (NF- κ B (Nuclear Factor- κ B)) の有意な増加が認められた (Campbell ら (2005))。

新生児マウスに ROFA-アレルギーを曝露すると、メサコリンに対する気道反応性の亢進がみられ、抗原特異的な IgE と IgG 産生も増強した (Hamada ら (2000))。

DE 曝露とアレルギー感作を併用したところ、脾臓重量の増加が DE 高濃度曝露 (6 mg/m³) でみられ、血清中のアレルギー特異的 IgE 抗体価も高かった (Fujimaki ら (1997))。

脾臓細胞のサイトカイン産生では IL-4、IL-10 は高く、IFN- γ (InterFeroN- γ) は低い結果であった。アレルギー性炎症モデルに関しては、超微小カーボン粒子をマウスに曝露しアレルギー感作とのタイミングを検討したところ、最終のアレルギー感作より 1 日及び 4 日間前にカーボン粒子を曝露した群で、炎症反応やサイトカイン産生がより増強していた (Alessandrini ら (2006))。

マウスへのアレルギーと DEP の気管内投与により縦隔リンパ節細胞での細胞増殖の亢進と IL-4 の産生上昇が観察された (Fujimaki ら (1994))。

以上、動物実験では CAPs や DE 曝露を抗原感作と併用すると、肺における炎症性サイトカインの誘導だけでなく、脾臓における Th2 タイプのサイトカイン産生を増強させ、血中での IgE や IgG 抗体価の上昇をもたらす。また、曝露と抗原感作とのタイミングが免疫系の増強に重要であると考えられる。

ヒト志願者実験では、ヒトの鼻内へのブタクサ抗原と DEP の投与は Th1 タイプのサイトカイン (IFN- γ や IL-2) mRNA の発現の減少をもたらしたが、他のサイトカイン (IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13) の mRNA の発現の増加をもたらした (Diaz-Sanchez ら (1997))。

DEP とブタクサ抗原の粘膜刺激の複合作用としては、ブタクサ・アレルギーのヒトで *in vivo* の IgE isotype への switching を引き起こしうることを示して

いる (Fujieda ら (1998))。

ヒトが遭遇しない KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) 抗原を用いた研究では DEP が新しい IgE 反応に粘膜アジュバントとして作用し、アレルギー感作を増加させる可能性を示した (Diaz-Sanchez ら (1999))。

DEP の曝露はマスト細胞の脱顆粒を促進することによりアレルギーに対する臨床症状の重症度を増強させることを示唆した (Diaz-Sanchez ら (2000))。

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 (Hauser ら (2003))。

ノースカロライナ州の Chapel Hill でサンプリングした PM_{10-2.5} を使用した実験で PM_{10-2.5} の生物学的構成要素は、必ずしも好中球の反応を誘発しないが、マクロファージの反応調節には必要であると述べている。また、PM_{10-2.5} の曝露によって、単球の細胞を活性化し、潜在的に、eotaxin レベルを増強することによりアレルギー患者におけるアレルギーあるいは細菌に対する反応を増強する可能性が示唆された (Alexis ら (2006))。

しかしながら、喘息患者では、DE 曝露は、好中球性反応を引き起こしたり、既存の好酸球性気道炎症を増悪させたりすることはなかったこと (Stenfors ら (2004))、喘息グループの気道粘膜の生検組織は、空気曝露後に好酸球性気道炎症がみられたが、DE は、気道の好中球、好酸球やその他の炎症性細胞、またサイトカインや炎症のメディエーターの有意な変化をもたらさなかったとの報告もみられる (Holgate ら (2003))。

したがって、動物実験ではアレルギー性炎症の増悪が DE や DEP により認められたが、ヒト志願者実験では、喘息患者について増悪が引き起こされない知見とともに、アレルギー感作を増悪させる知見が存在している。総体として見ると DE や DEP がアレルギー感作の増悪に影響を生じさせていることが示唆された。

5.4.3.3. 生殖器への影響が生じる

粒子状物質による全身影響の 1 つとして生殖器への影響が考えられているが知見が限られている。

ラットに DE を曝露すると、肝及び前立腺の aryl hydrocarbon hydroxylase 活性に増加がみられた (Lee ら (1980))。

DE をマウスに曝露したが、精子の頭部異常はみられなかった (Pereira ら (1981))。次世代への影響、全体の繁殖能力、生存率にも著しい変化はなかったが、唯一、卵巣黄体数の顕著な減少を認めたという報告がある (Pepelko と Peirano (1983))。

一方、DEP をマウスの腹腔内に注射すると、第 1 代 F₁ マウスで精子数の減少と睾丸重量の減少、精子奇形等を認めた (Quinto と de Marinis (1984))。

成長期のラットに総 DE、除粒子 DE を曝露すると、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)濃度は曝露により増加し、卵胞刺激ホルモン濃度は逆に低下したと報告されている (Watanabe と Oonuki (1999))。

また、DE をマウスに曝露すると、ライディッヒ細胞の形態異常が観察され、黄体形成ホルモン受容体の mRNA の発現量も濃度に依存して低下した (Yoshida ら (1999))。

さらに、妊娠ラットを DE、除粒子 DE 及び清浄空気に曝露すると、性器-肛門間距離は DE 及び除粒子 DE 群で長かったという報告もある (Watanabe と Kurita (2001))。

以上のように、動物実験では、DE 中の粒子成分のみならずガス成分による生殖機能への種々の影響が示されているが、まだ科学的知見が十分でなくメカニズムの解明には至っていないのが現状である。

5.4.3.4. 神経・行動への影響が生じる

粒子状物質の神経・行動への影響に関する知見は限られている。

ラットに DE を曝露すると自発的な運動の減少が見られたという報告がある (Laurie ら (1978))。また、新生仔期に DE に曝露され、その後清浄空気下で飼育された動物では、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が見いだされた (Laurie と Boyes (1980))。

ラットにガソリン二輪車排気ガス(ME)を吸入曝露、あるいはガソリン二輪車排気ガス中微小粒子(MEP)を気管内投与したところ、運動機能が低下した (Liu ら (2002))。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。Apo E^{-/-}マウスにニューヨークの CAPs を曝露すると、黒質緻密核からのニューロンが減少し、星状細胞は増加した (Veronesi ら (2005))。

サルにメタルアークステンレス鋼溶接蒸気を曝露すると、大脳基底核の MRI T1 relaxation time が減少していくことが示され、溶接蒸気を長期に吸入すると血中 Mn が高値となり脳 MRI T1 signal が増強されることが示唆された (Sung ら (2007))。

以上のように、動物実験は、DE、CAPs や ME 等による動物の行動や神経系への影響を示しているが、科学的知見が不足していることからそのメカニズムについては不明である。