

5.5. 変異原性・遺伝子傷害性及び発がん影響

5.5.1. 仮説の紹介

実験動物への都市大気粒子曝露は、大気粒子の発がん影響を推定可能な試験法であるが検討例は少なく、発がん性を示唆する結果は得られていない。CAPsの曝露装置が開発され中・長期の曝露実験が実施されたが、発がん作用を直接示唆する有意な肺腫瘍発生の増加は報告されていない。

一方、都市大気粒子を構成する人為起源粒子の多くは石油系燃料の燃焼によって生成し、日本においては DEP の寄与が最も大きいことが報告されている。これら都市大気粒子については変異原性が認められているものの、変異原活性は、多環芳香族炭化水素(PAH、Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)含有量に基づく既知の変異原活性の総和よりもかなり大きいことから、新たな変異原成分や相互作用が推察されてきた。代謝活性化を必要としない強力な直接変異原である 1,6-ジニトロピレン、1,8-ジニトロピレン、3-ニトロベンズアントロンは高い含有量ではないが DEP の主要な変異原成分として注目される。これらのニトロアレン類は、それぞれ経気道肺内投与等による実験動物での DNA 付加体生成と肺腫瘍発生が確認されている。発生源の種類や分布による差はあるが、DEP 以外の大気粒子には、燃焼由来のベンゾ(a)ピレンをはじめとする変異原性を有する PAH、V、Cr、Ni 等、肺組織に炎症や浮腫を引き起こす重金属類が含有され、粒子自体も肺組織に DNA の酸化的損傷を引き起こす作用のあることが知られている。これらことから、大気中の微小粒子状物質が肺発がん性を有する可能性は否定できないと考えられるが、肺組織のどの部位あるいはどの細胞に作用し、多段階発がんのどの過程に最も影響を与える可能性があるかといった肺組織の特性を考慮した、より詳細な *in vivo* 研究が課題である。

なお既に、「ディーゼル排気微粒子リスク評価検討会(2002)」が DEP の発がん性について検討結果を発表しているが、その概略は以下のとおりである。

DEP は代謝活性化を必要としない直接変異原性物質を多く含み、哺乳動物細胞を用いる体細胞突然変異や姉妹染色分体交換の試験における一般に陽性の結果、また *in vivo* や *in vitro* での DNA 付加体の形成から、DEP には遺伝子傷害性があり、その発がん作用には閾値がないと考えるべきと判断される。また、DE の曝露と発がんリスクに関する職業集団を対象とした疫学調査は、その多くにおいて曝露評価が不完全であるが、多くの国で、また多くの職種において DE 曝露とヒト発がんとの関連を認め、各報告における推定リスクも類似している。一方、動物実験においては、DEP 曝露による腫瘍発生がラット以外では認められず、肺への過剰負荷による発がんという問題点も残るが、その発がん性は明らかである。

同検討会は、以上の知見を総合的に判断し、DEP のヒトに対する発がん性は強く示唆されると結論している。また、U.S.EPA による Health Assessment

Document for Diesel Engine Exhaust(U.S.EPA (2002))もほぼ同様な判断と結論を示している。

微小粒子状物質の発がん影響に関する評価では、主としてこれまでの実験的知見に基づく以下の2つの仮説を検証するが、DEPに関しては上記検討会報告と重複するところが多い。

- (1) 都市大気微小粒子は変異原性・遺伝子傷害性を有する
- (2) 都市大気微小粒子は発がん性を有する

5.5.2. 論文の紹介

5.5.2.1. 都市大気微小粒子は変異原性・遺伝子傷害性を有する

変異原性はAmesらがサルモネラ菌の復帰突然変異を観察するいわゆるAmes法を開発して以来、発がんの初期段階との関連性から化学物質の発がん性スクリーニングとして広く検討されてきた(表5.5.1)。

後藤ら(1982)は東京都内で季節ごとに採取した大気浮遊粉じんの変異原性と多環芳香族炭化水素(PAH)含有量との関係を調べ、PAHが変異原性に寄与しているもののS9添加による代謝活性化を必要としない未知の変異原が存在するとした。

Tokiwaら(1983)は、チリのサンティアゴで採取した都市大気粒子の変異原性と成分を調べて、含有量の多い1-ニトロピレンの変異原性の寄与は小さく、微量ではあるが1,6-ジニトロピレン、1,8-ジニトロピレンが直接変異原として重要であることを明らかにした。

Ohsawa(1983)は、都市と郊外で大気粒子の変異原性を比べると都市の方が高いと報告した。

大谷ら(1985)は、東京と前橋で季節ごとの大気粒子の変異原性を調べ、両地域ともに夏季に低い傾向を認めた。これらの研究は都市大気粒子の変異原性が代謝活性化を必要としない直接変異原の寄与が大きく、未知の変異原を示唆していたが、Enyaら(1997)は、強力な直接変異原である3-ニトロベンズアントロンを都市大気粒子とディーゼル排気粒子から同定した。哺乳動物細胞を使った姉妹染色分体交換(SCE、Sister Chromatid Exchange)やマウス小核試験による検討結果でも、陽性結果を認めている。

Wongら(1986)は、ラット(F344)に粒子濃度7.1mg/m³でDEの曝露を31ヵ月続け、肺内のDNA付加体が増加することを報告した。

Bondら(1988)は、呼吸器内のDNA付加体の位置を決定するため、ラット(F344)にDEPを粒子濃度10mg/m³で7時間/日、5日/週、12週間曝露し、呼吸器の部位別にDNA付加体を分析した。DNA付加体は、末梢の肺組織と鼻部組織で検出され、その量は18/10⁹NNであった。DNA付加体のレベルは発がん物質の効果量を測る上でよい指標である。

Bond ら (1989)は、マウス (B6C3F1)、ハムスター、ラット (F344)、カニクイザルに DEP と CB を曝露した。曝露濃度は DE(0.35~10 mg/m³)、CB (3.5 あるいは 10 mg/m³) であり、6~7 時間/日、5 日/週で、12 週間曝露した。ラットでは、DEP 曝露によって気道及び肺組織の DNA 付加体生成が示されたが、他の動物種について、ラットやサルで DNA 付加体が検出される条件で、マウス (B6C3F1)、ハムスターに曝露を行い同様に分析しても増加は認められなかった。

Bond ら (1990)は、ラット (F344) に、0.35、7.0、10 mg/m³ の粒子濃度で、16 時間/日、5 日/週、12 週間の曝露を行い、それらの DNA 付加体量には大きな差のないことを報告した。肺の DNA 付加体生成は、低濃度で飽和状態に達している可能性が考えられる。また、Bond らは、同じくラット (F344) に粒子濃度 7 mg/m³ で 12 週間まで曝露させ、開始から 2、4、8、12、14、16 週目の DNA 付加体量を測定したところ、曝露期間の延長にしたがい付加体量が増えた。そして曝露終了後には、速やかに減少し 4 週間後には対照群との間に有意の差がみられなくなった。さらに Bond らは、炭素粒子曝露による DNA 付加体形成について、CB の 0、3.5、10 mg/m³ で 12 週間ラットを曝露し、炭素粒子への高度曝露によっても DNA 付加体が増加するとした。

Gallagher ら (1993)、Gallagher ら (1994)は、ラット (Wistar、雌) への粒子濃度 7.5 mg/m³ の DE 及び 11.3 mg/m³ の CB に 18 時間/日、5 日/週で 24 ヶ月間曝露を行い、肺内の DNA 付加体を測定した。これらの 2 群の平均付加体量に大きな差はなく、対照群との間にも有意な差はみられなかった。DE 曝露によるラットの肺内 DNA 付加体量は、曝露 24 ヶ月後では同じく 2 または 6 ヶ月後よりも低い量であった。

Tsurudome ら (1999)は、ラット (F344) への DEP 経気道投与後 (2mg, 4mg) に肺組織の 8-ヒドロキシグアニン量と修復酵素であるオキソグアニングリコシレース (OGG1、8-OxoGuanine DNA Glycosylase) の変化を調べた。8-ヒドロキシグアニンは投与後速やかに上昇し、1 週間以内に対照と同程度に低下した。OGG1 の mRNA は、投与後、徐々に活性が低下するものの 5 日目には対照のレベルとなった。これは、DEP による 8-ヒドロキシグアニンの変化には、活性酸素種の生成だけでなく、修復酵素の低下が関わっているとされた。

Ohyama ら (1999)は、ラット (F344) にディーゼル排気粒子 (DEP) 抽出物でコーティングした CB 粒子 (DEcCBP; Carbon Black Particles coated with Diesel Exhaust) 0.2mg を、週 1 回、計 4 回、気管内投与し、6 ppm の NO₂ 及び 4 ppm の SO₂ を 10 ヶ月間曝露し、実験開始から 18 ヶ月後に肺病変を組織学的及び DNA 付加物について検討している。それによると、DEcCBP 単独投与群では肺胞道における小硝子塊の形成と硝子塊周辺の肺胞道上皮の気管支上皮化が認められるのみであったが、肺腫瘍形成及び DNA 付加体の生成は DEcCBP 気管内投与に NO₂ 及び SO₂ を曝露した群に認められた。これらのことから、硝

子塊から溶出した DEP 抽出物が肺胞上皮の DNA 損傷及び肺胞上皮の増殖を惹起し、NO₂ 及び SO₂ が DEP 抽出物による肺腫瘍の誘導を促進すると推測している。

Sato ら (2000) は、Big Blue ラット (*lambda/lacI* 遺伝子導入) を使って DE 曝露後の肺組織について変異頻度と変異スペクトルを調べた。1 または 6 mg/m³ の DE に 4 週間曝露した。6 mg/m³ DE への曝露後では、肺における変異頻度は、対照群より 4.8 倍高かったが、1 mg/m³ DE 曝露では増加がみられなかった。6 mg/m³ DE 曝露では 69 の変異が同定された。主要な変異は、A:T→G:C (18 変異) と G:C→A:T (19 変異) トランジションであった。とくに、*lacI* 遺伝子の 221 における G→T トランスバージョンは、DE に引き起こされたホットスポットで、6 mg/m³ DE 曝露では、重複変異がみられた。DE によって形成された DNA 付加体の量を ³²P-ポストラベル TLC 法と、8-ヒドロキシグアニン (8-hydroxy-deoxyguanosine) は HPLC で測定したところ、対照群のそれぞれ 3 倍及び 2.2 倍に増加した。ノーザンブロットによるチトクローム P4501A1 mRNA のレベルは、6 mg/m³ DE 曝露で 5.5 倍に増加した。これらの結果から、DE がラット肺においてゲノム DNA に対する変異原として作用すると結論づけている。

Iwai ら (2000) は、ラット (F344) に若齢時から、粒子濃度 3.5 mg/m³、17 時間/日、3 日/週で 1、3、6、9、12 ヶ月間曝露し、肺組織の 8-ヒドロキシグアニン量を測定した。その結果、曝露期間の延長にしたがって 8-ヒドロキシグアニン量は増加すると報告した。同時に分析した PAH によって形成される DNA 付加体の変化は対照的に、前述の如く曝露期間の延長に伴い減少した。この結果は、ラットにおける粒子過剰負荷による肺発がん機構について示唆するものと言及している。

Driscoll ら (1996) は、F344 雄ラットに CB (1.1、7.1、52.8 mg/m³) に 13 週間 (6 時間/日、5 日/週) 曝露し、直後及び終了後 12 週目と 32 週目に II 型肺胞上皮の *hprt* 変異を測定したところ、変異頻度は 2 つの高曝露群で有意に増加したが、7.1 mg/m³ 群では変異体頻度は 12 週で対照レベルまで戻り、52.8 mg/m³ 群では 32 週後でも対照群より高かった。Driscoll ら (1997) は、さらに CB、石英、及び TiO₂ の気管内注入後のラット肺胞上皮にも *hprt* 変異の誘導を認めた。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の好中球の有意な増加に示されるように、3 種の粒子すべては炎症反応を誘発し、BALF 中の好中球は活性酸素種の発生源である。活性酸素種から生じる DNA 損傷は二次的な遺伝毒性であり、この影響は高用量においてのみ認められる。曝露ラットからの BALF をラット肺上皮細胞株とともに培養しても、結果として *hprt* 変異が増加した。この反応は培養混合液中にカタラーゼが含まれると抑制され、細胞由来の酸化的傷害の証拠を示した。CB による酸化的損傷は用量反応関係に閾値が存在することを示唆すると考察している。

Finch ら (2002)は、大豆油を燃料としたバイオディーゼル排気をラット (CDF(F344)/Cr1BR) に低濃度 ($0.04\pm 0.03 \text{ mg/m}^3$)、中濃度 ($0.2\pm 0.1 \text{ mg/m}^3$) 及び高濃度 ($0.5\pm 0.1 \text{ mg/m}^3$) で曝露 (6 時間/日、5 日/週、14 週間) し、骨髓小核及び末梢リンパ球 SCE を観察したが有意な変化を認めなかった。

Soares ら (2003)は、マウス (BALB/C、雄、8~10 週齢) を交通量の多い地域 (サンパウロ) と少ない地域 (Atibaia) で、それぞれ終日、最長 120 日間の吸入曝露を行い、血液を用いた小核発生頻度の観察を行った。その結果、サンパウロで曝露されたマウスの小核頻度は Atibaia よりも高い傾向があり、採血前週平均の粒子濃度、CO 濃度及び NO_2 濃度と小核頻度に有意な相関関係を見いだしている。以上の結果から都市レベルの大気汚染は体細胞の遺伝子変異を誘導する原因となるとした。

Somers ら (2004)らは、カナダ、オンタリオ州の製鋼所と高速道路に近い場所 (Hamilton Harbour) と 30km 離れた郊外の 2 カ所でマウス (系統不明) への 9 週間の吸入曝露 (全浮遊微小粒子濃度 $16.2\sim 115.3 \mu\text{g/m}^3$) を実施し、交配させた仔について ESTR loci (Expanded Simple Tandem Repeat loci) の変異を検出した。また、それぞれの箇所で HEPA フィルター (High-Efficiency Particulate-Air filter) による除じん曝露、雄マウスのみ曝露して交配した仔での同様の観察も行った結果、都市工業地域での粒子状成分曝露が遺伝的な変異と強く関連し、母系よりも父系の影響であることが示された。

5.5.2.2. 都市大気微小粒子は発がん性を有する

5.5.2.2.1. 吸入曝露

Karagianes ら (1981)は、Wistar ラット(雄)を用いて、DE と炭粉曝露の生体影響を調べた。曝露条件は、6 時間/日、5 日/週で最長 20 ヶ月間行い、曝露群としては DE 曝露のみは 8.3mg/m^3 の濃度で、炭粉のみの曝露は低濃度が 6.6mg/m^3 、高濃度が 14.9mg/m^3 で行い、混合曝露では DE 曝露は 8.3mg/m^3 の濃度、炭粉曝露は 5.8mg/m^3 で行った。粒径は、DE では $0.71\mu\text{m}$ MMAD、炭粉では $2.1\mu\text{m}$ MMAD であった。その結果、4、8、16 ヶ月曝露ラットのヘマトクリット値、赤血球、白血球数に清浄空気曝露の対照群と比べ差はみられなかった。また、CO ヘモグロビンレベルは 4 ヶ月 DE 曝露で 3.7%、20 ヶ月曝露で 5%増加がみられ、混合曝露群の 4 ヶ月曝露で 4.1%、20 ヶ月曝露で 5.6%の増加がみられた。生存した 6 例中 1 例に肺腫瘍 (腺腫) を認めたが、DE の影響とは結論づけられない例数であった。

Orthofer ら (1981)は、マウス (A 系) に粒子濃度 6.4mg/m^3 、20 時間/日、7 日/週、7 週間吸入曝露し肺腫瘍発生を観察した。肺腺腫発生率は、対照群に比べて曝露群で高くなかった。ウレタンを投与して肺腫瘍発生を促進したマウスでは、曝露群の肺腺腫発生率が高くなったものの、DE 曝露の影響は対照群に比較して極めて小さい (Kaplan ら (1982)、Pepelko と Peirano (1983))。

Heinrich ら (1982)は、ハムスター (Syrian、雌、8 週齢) に DE または除粒子排気を吸入させ、毒性と発がん性を検討した (粒子濃度 3.9mg/m³、8 時間/日、5 日/週、2 年間)。ジベンゾ(a,h)アントラセン (DbahA; Dibenzo (a,h) anthracene) 経気道肺内投与あるいはジエチルニトロサミン (DEN; DiEthylNitrosamine) 皮下投与の併用により観察した結果、肺組織の増殖性変化や腫瘍発生率は全排気群が除粒子排気群より高くなったと報告した。

Heinrich ら (1985)、Heinrich ら (1986a)は、マウス (NMRI) に DbahA を皮下投与後、排気を曝露し (粒子濃度 4.0 mg/m³、19 時間/日、5 日/週、30 ヶ月)、肺腫瘍発生率に差はないが、個体あたりの肺腺腫数は曝露群で有意に高かったとした。また、マウス (NMRI) に同様の曝露のみで観察した結果、対照群に比べ高い肺腺腫、腺がん発生を認めたものの、除粒子群でも高く、全排気群との差はなかった。

Brightwell ら (1986)、ラット、ハムスターに 16 時間/日、5 日/週で 2 年間の DE 曝露を行い、肺腫瘍発生には量反応関係がみられ、除粒子排気で有意な増加はなく、雄の高濃度で 71 例中 16 例 (23%)、中濃度 72 例中 3 例 (4%)、低濃度 72 例中 1 例 (1%)、雌の高濃度で 72 例中 39 例 (54%)、中濃度で 72 例中 11 例 (15%)、低濃度で 72 例中 0 (0%)、対照群の雄では 140 例中 3 例、雌では 142 例中 1 例の肺腫瘍を観察した。除粒子排気曝露では、肺腫瘍の増加はなかった。ハムスターに DEN を皮下投与後に曝露を行い、気管に乳頭腫の発生を認めたが曝露群と対照群に有意差はなかった。以上の結果から、量反応関係があり、ろ過排ガスで腫瘍がみられないことから、ディーゼル排ガスによる腫瘍発生は疑いなく、粒子の沈着に伴うものであるとしていた。

Stöber (1986)は、DE または除粒子排気をハムスター、マウス、ラットに長期間曝露 (19 時間/日、5 日/週、140 週) し、腫瘍の発生を観察した。全排気群、除粒子群は対照群に比べて腺がんを発生した動物の割合が高く、除粒子排気群と対照群には過形成、化生、腺腫、扁平上皮腫瘍の発生が認めなかったが、全排気群には観察された。

Mauderly ら (1986)は、ラット (F344) に DE を 0.35、3.5、7.1 mg/m³ の粒子濃度で 1 日 7 時間、週 5 日、30 ヶ月曝露し、肺腫瘍発生率は、それぞれ 1.3、3.6、12.8% で明確な量反応関係を観察した。ラットにおいて明らかな量反応関係が認められ、ディーゼル排気の人に対する発がん性は無視できないとした。

Ishinishi ら (1986)は、ラット (F344) に重量級または軽量級 DE を 30 ヶ月吸入させた。肺腫瘍は、腺がん、扁平上皮がん、腺扁平上皮がんで、軽量級では濃度に関わらず発生し、重量級では濃度に依存して発生し、3.7 mg/m³ のみ対照に対し有意な差であった。ガス成分による気管や気管支上皮の繊毛の短縮や欠損がみられ、濃度や期間に伴い増加した。0.4 mg/m³ 以下では肺胞の変化はなく、それ以上でもわずかである。

Takemoto ら (1986)は、DE をラット (F344)、マウス (ICR 及び C57Bl) に

長期間曝露し（粒子濃度 0、2~4 mg/m³、4 時間/日、4 日/週、18~28 ヲ月または 19~28 ヲ月）、肺腫瘍発生を觀察した。ラットでは、DE 単独群に肺腫瘍の発生が觀察されなかったが、ジ-イソプロパノールニトロサミン（DIPN; DiIsoProanolNitrosamine）の投与と排気曝露を併用した群で、DIPN 単独群と比べ高い肺腫瘍発生率を觀察した。また、出生 24 時間以内からのマウス（C57Bl 及び B6C3F1）新生仔期から曝露を開始し、28 ヲ月までの継続曝露及び 9 ヲ月までの曝露から清浄空気で 30 ヲ月まで飼育し、対照群に比べ肺腫瘍発生率が高くなることを觀察した。

Takaki ら（1989）は、ラット（F344）に軽量級 DE を 0.1、0.4、1.1、2.3 mg/m³ の粒子濃度で 16 時間/日、5 日/週、30 ヲ月の曝露を行い、肺腫瘍を觀察した。曝露群の肺に腺腫、腺がん、腺扁平上皮がん、扁平上皮がんの発生を認めたが、対照群との明らかな差はなく、量反応関係もみられなかった。しかし、肺の過形成は曝露濃度に依存して病変の存在が高くなった。

Heinrich ら（1989）は、ハムスターへの DE（3.75 mg/m³）、除粒子曝露、NO₂ + SO₂ の曝露、ジエチルニトロサミン（DEN、3 または 6 mg/kg bw）との併用群を設定し、19 時間/日、5 日/週、6 週間、10.5 週間、18 週間の曝露をおこなった。DEN 高用量、排気曝露群で上部気道腫瘍の増加を認めたものの、他の群では排気曝露の影響はみられなかった。この実験結果及び他の研究結果から、ディーゼルは発がん補助物質（cocarcinogen）あるいは、この実験系での増強因子であると不十分ながら結論付けたいとしていた。

Brightwell ら（1989）は、ラット、ハムスターに粒子濃度 0、0.7、2.2、6.6 mg/m³、16 時間/日、5 日/週で 2 年間 DE を曝露し、肺腫瘍発生を觀察した。ラットでは腫瘍発生率に量反応関係がみられ、特に雄よりも雌で顕著に増加した。除粒子群には有意な肺腫瘍の増加はない。ハムスターでは明らかな腫瘍増加はなく、DEN 投与後に曝露を行ったが対照群との有意差はない。ラットで肺腫瘍発生を見るには、少なくとも 2200 µg/m³ 以上の粒子濃度が必要であるとした。

Kawabata ら（1994）は、ラット（F344）雌の 4 週齢時から DE を粒子濃度 4.7 mg/m³、15 時間/日、3 日/週で、6、12、18 ヲ月曝露し、その後 30 ヲ月までに発生した肺腫瘍を觀察し、曝露群に肺腫瘍の発生を認めたが、曝露期間の延長と発生率に関連の低いことが示唆され、早期の曝露もしくは曝露後の期間が影響していることを示した。

Heinrich ら（1992）、Heinrich ら（1995）は、ラット（Wistar）とマウス（NMRI）に DEP（粒子濃度、ラット：0.8、2.5、7 mg/m³、マウス：4.5 mg/m³）、TiO₂（粒子濃度 10.0 mg/m³）、CB（11.6 mg/m³）を 18 時間/日、5 日/週の条件で、ラット：24 ヲ月、マウス：13.5 ヲ月の期間で吸入曝露し、肺腫瘍発生を觀察した。高濃度の DE、TiO₂、CB 曝露によってラットに肺腫瘍発生がみられたものの、一方、マウスでは腫瘍発生率に曝露の影響はみられなかった。

Nikula ら（1995）は、DE 中に含まれる有機化合物のラット肺腫瘍の発生に対

する影響力を調べるために、DE と CB をラット (F344) に曝露した。粒子濃度は、DE 及び CB とともに 2.5、6.5 mg/m³ であり、16 時間/日、5 日/週の条件で 24 ヶ月間曝露した。高粒子濃度 6.5 mg/m³ の DE 及び CB による肺腫瘍発生率は両群で近い値で、Squamous cyst の発生割合、生存率ともに類似していた。2.5mg/m³ では DE 曝露による肺腫瘍に高い傾向があったが、肺に貯留した粒子量を測定してみると DE 曝露の方が高い傾向があり、これを基準とした肺腫瘍発生率を CB とディーゼルとで比較すると、ほぼ同等の発がんであった。その結果から、DE に含まれる有機化合物は、ラット肺腫瘍発生への寄与は小さいと述べている。

Mauderly ら (1996) は、ラット (F344) で肺腫瘍についての量反応関係を見いだした吸入実験と同じ条件でマウス (CD-1) への 0.35 から 7 mg/m³ の粒子濃度で、7 時間/日、5 日/週の曝露を 24 ヶ月間実施した。肺の腺腫、腺がんの発生率は全群で有意な差がなく、量反応関係も観察されず、マウスに対して DE の発がん性は示されなかった。げっ歯類の吸入実験はヒトの発がん性を考慮する上で有用な情報を提供するが、げっ歯類の肺腫瘍発生反応がヒトでの定量的なリスク評価に役立つかは不明であるとしていた。

Iwai ら (1997) は、DE をラット (F344) に粒子濃度 3.2~9.4 mg/m³、48~56 時間/週の条件で吸入曝露し、6 ヶ月後から II 型肺胞上皮や気管支上皮の増殖性病変が出現し、この病変は曝露期間の延長にしたがい拡大したと報告した。2 年間の曝露により肺の悪性腫瘍発生率を高めた。また、除粒子排気曝露群での主な死因は全排気曝露と同様に、白血病の合併を高頻度に伴う悪性リンパ腫で対照群の頻度よりも有意に高かった。乳腺腫瘍、皮膚の線維腫、線維肉腫も曝露群で高く、重複がんの発生は曝露群でのみ観察された。リンパ腫が除粒子群で多いのはガス成分の作用であり、肺腫瘍は排気粒子の作用と異なる発がん機構の存在について考察している。

Heinrich ら (1986b) は、マウス、ラット、ハムスターへの DE、除粒子 DE、または石炭炉煙道ガス (coal oven flue gas) 長期曝露実験を実施した。ラットへの DE 曝露 (ディーゼル排ガス、除粒子ディーゼル排ガス : 19 時間/日、5 日/週、2.5 年、濃度 : 4 mg/m³) は、肺腫瘍生成を 0 から 16% に上昇させ、マウスで (石炭炉煙道ガス、清浄空気 : 16 時間/日、5 日/週、22 月 濃度 : 3~7 mg/m³) は、DE、除粒子 DE とともに腫瘍形成を増加させ、ハムスターでは有意な変化はなかった。石炭炉煙道ガス曝露では、ラットの肺腫瘍を 0 から 18% に上昇させ、マウスでも腫瘍形成が増加した。ハムスターでは、肺の扁平上皮化生、喉頭及び気管の乳頭腫が増加していた。

5.5.2.2.2. 気管内投与

Shefner ら (1982) は、1.25 mg、2.5 mg あるいは 5.0 mg の DEP を週 1 回、15 週間、ハムスターに気管内投与したところ、ハムスターに腺様化生増殖や腺

腫を観察した。過形成、化生性病変が正常組織に戻るのか、あるいは腫瘍になるのか明らかにできなかった。

Kawabata ら (1986)は、ラット (F344、雌) に 1 mg/0.2ml の DEP または活性炭を週 1 回、1、4、10 週間、経気道投与し、時間の経過とともに増殖性病変が増加することを確認した。肺の悪性腫瘍は、DEP 群で 42 例中 20 例、活性炭群で 23 例中 11 例認めた。肺内に滞留した粒子はイニシエーターやプロモーターとして作用すると述べていた。また、ラット (F344、雌) に DEP を 4 段階 (0.125、0.5、2.0、8.0 mg/rat)、の用量で経気道肺内投与 (1 回/2 週、8 週間) し、投与量と肺腫瘍発生率に量反応関係を見いだした。投与量の少ない群では、肺に粒子の存在をわずかに認めるが肺病変は認められなかった。投与量の中程度の群では、肺間質に粒子、軽度の肺炎を認めた。投与量の多い群では、43% に肺腫瘍を認め、組織型は主に腺腫と腺がんであった。また、投与量の多い群を実験開始から 2 年経過後に、肺腫瘍の発生割合を観察したところ先に観察したときよりも 55% と高かった。これは、粒子の肺に対する影響の量反応関係を示すものと述べている岩井ら(1991)、河端ら(1993))。

Ichinose ら (1997b)は、マウス (ICR) への DEP、洗浄 DEP、TiO₂ の経気道肺内投与を実施し (毎回 0.1mg を週 1 回、10 週間投与)、肺腫瘍は DEP 投与群に最も高い発生率であったが、洗浄 DEP 及び TiO₂ の投与でも肺腫瘍が発生し対照群よりも高かったと報告している。また、Ichinose ら (1997a)は、週 1 回、10 週間に亘り、毎回 0.05mg, 0.1mg あるいは 0.2mg の DEP をマウスに経気道肺内投与し、発がん過程での活性酸素種の関与を明らかにするため脂肪量の異なる餌を与え検討した。その結果、餌の脂肪量は肺腫瘍数に促進的な影響を与え、肺組織 8-ヒドロキシグアニン量と肺腫瘍数との間に高い相関性を観察した。

岩井ら(1998)は、イオウ含量の異なる軽油を燃料とした DE から粒子を回収し、それをラットに毎回 2mg、2 週間ごとに 1、2、4 回、経気道肺内投与して 30 ヶ月後まで病理組織学的観察を行った。その結果、通常軽油群と低イオウ軽油群との肺腫瘍発生率は、2mg 投与群で 4.1% と 2.1%、4mg 群で 8.0% と 22.4%、8mg 群で 25.0% と 42.9% となった。低イオウ軽油群での肺腫瘍発生率は通常軽油に比べて高いが、低イオウ軽油の DEP は粒径が小さいために肺内への貯留粒子量も多いことが影響していると考察している。

Kunitake ら (1986)は、ハムスターに DEP タール (DET; Tar from Diesel Exhaust) : タバコ煙濃縮物 (CSC; Cigarette Smoke Concentrate) : BaP=3 : 5 : 6 の混合物を経気道投与、週 1 回、15 週の経気道投与、また、ハムスターに、週 1 回、15 週間、総投与量 DET 15、7.5、1.5mg、BaP 7.5mg+DET 1.5mg、BaP 7.5mg、BaP 0.03 µg、CSC 15mg を経気道投与し観察した。腫瘍発生は認めたが明らかな傾向はなく、各群間に有意差はみられなかった。DET はマウス皮膚腫瘍イニシエーターであるが、ハムスターの経気道投与による影響は確認できなかった。

Kawabata ら (1986)、河端ら(1988)は、ラット (F344) に 1 mg/0.2ml の活性炭または DEP を週 1 回、10 週間、経気道投与した結果、肺腫瘍は、活性炭投与群で 11 腫瘍/23 匹、DEP 投与群で 31 腫瘍/42 匹を観察した。活性炭のみでラットに肺腫瘍が発生することを初めて報告し、ラットにおける粒子過剰負荷と腫瘍発生に関連について注目されるようになった。

Pott と Roller (1994)は、DEP に近い材料として種々の炭粉をラット(Wistar、雌)に経気道肺内投与し(毎回 3mg を 10 回、あるいは 15 回)、腫瘍発生を観察した。粒子表面積の異なる炭粉等で比較したが、ほぼ同等の肺腫瘍発生率で、最も表面積の大きい活性炭では肺腫瘍発生率は低かった。

Dasenbrock ら (1996)は、ラットに週 1 回、16~17 週間、DEP (総投与量 15mg) と CB (総投与量 15mg)、及びそれらの洗浄粒子 (総投与量 15mg、30mg) や BaP 処理粒子 (総投与量 15mg、30mg) を経気道投与し、肺腫瘍発生を 800 日まで観察した。肺腫瘍発生は、洗浄 DEP 30mg (21%)、DEP 15mg (17%)、Printex 90 15mg(21%)、BaP 処理 Printex 90 15mg(27%)、BaP 15mg(25%) で、未処理の DEP が洗浄粒子より高かった。洗浄 CB の発がん性はオリジナルのサイズや特異表面積に依存しているとした。洗浄 CB の発がん性はオリジナルのサイズや特異表面積に依存した。ラットの肺腫瘍発生における PAH の影響は排除できず、ディーゼル粉じんや CB の発がん機序は不明としていた。

5. 5. 2. 2. 3. その他の曝露経路

Kotin ら (1955)は、DEP を暖機 (負荷なし) または荷重運転時に DEP を回収し、そのアセトン抽出物をマウスの皮膚に塗布し腫瘍の発生を観察した。暖機運転時の DEP 抽出物塗布でマウス (C57Bl) に 13 ヶ月後に 2 例の乳頭腫、荷重運転時の DEP 抽出物塗布では、マウス (A 系、雄) に 4 例の腫瘍 (組織型不明)、マウス (A 系、雌) に 17 例 (組織型不明) の腫瘍発生を認めた。

Nesnow ら (1983)は、DEP、ガソリンエンジン排気、石炭オーブン、屋根用タールをマウス (Sencar) の皮膚に塗布し、腫瘍イニシエーター、完全発がん物質 (complete carcinogen)、腫瘍プロモーターの作用について検討した。試験物質の投与条件は、腫瘍イニシエーターについて、0.1mg、0.5mg、2mg、10mg を単回投与、完全発がん物質について、毎週 1 回、0.1mg、0.5mg、1mg、2mg、4mg を 50~52 週間、腫瘍プロモーターについて、毎週 1 回、0.1mg、0.5mg、1mg、2mg、4mg を 34 週間投与とした。その結果、石炭オーブンと屋根用タールは腫瘍プロモーター、イニシエーター、完全発がん物質としての作用を、A 社製ディーゼルエンジンの DEP と F 社製ディーゼルエンジンの排気は腫瘍イニシエーターとしての作用を有していた。マウスあたりの乳頭腫数を非直線ポアソンモデルに当てはめると、乳頭腫発生に対する作用は、石炭オーブン>A 社製ディーゼルエンジン>屋根用タール>C 社製ディーゼル=F 社製ガソリンエンジンであった。

Depass ら (1982)は、DEP とその Dichloromethane 抽出液を 1 群 40 匹のマウス皮膚に塗布した。試験物質の投与条件は、ディーゼル粒子 5%、10%の Acetone 浮遊液、5%、10%、25%、50%の Dichloromethane 抽出液 25 μ L を、発がん試験では週 3 回投与、最高で 714 日まで継続、プロモーション試験では、1.5% BaP の単回塗布後、週 5 回投与、イニシエーション試験では試験物質の単回投与の 1 週間後から Phorbol myristate acetate を週 3 回投与した。いずれの試験でも腫瘍発生の有意な増加はなく、発がん性、プロモーション作用、イニシエーション作用はほとんどない。

Kunitake ら (1986)は、マウス (ICR、C57Bl)、ハムスターに DEP タール (DET) を皮膚塗布や皮膚投与後、皮膚腫瘍が有意に発生して発生率や時期に量-反応関係を認めた。イニシエーターとして ICR に DET 及び DET+BaP:45、15、5mg、タバコ煙濃縮物 (CSC) : 45mg、BaP : 1.8 μ g 皮膚塗布後、週 3 回 25 週 TPA (12-o-TetradecanoylPhorbol-13- Acetate) 塗布、C57Bl に DET と CSC : 10、25、50、100、200、500mg/kg 週 4 回、5 週皮下投与し、18 ヶ月観察した。ICR では、皮膚乳頭腫の発生率は低いが量反応関係を認め、C57Bl では、DET は最高用量で有意差を認めた。CSC は全群で有意差がみられた。発生時期は用量に依存していた。ICR と C57Bl 新生仔には、2.5、5、10mg DET と 0.5mg CSC 皮膚塗布し、24 ヶ月観察したが、ICR と C57Bl 新生仔では、雄で対照群より肝腫、リンパ腫、肺腫瘍が高い傾向だが有意差はなかった。皮膚腫瘍は発生しなかった。

Grimmer ら (1987)、Grimmer ら (1991)、は、DEP 中に含まれる種々の燃焼生成物について芳香族炭化水素 (PAH) と極性成分ほかで発がん性を比較しそれぞれの関与の程度を見積もっている。ラット (Osborne Mendel、雌) の胸腔に 2~3 環持つ PAH と非芳香族炭化水素 (19.2mg)、4 環以上持つ PAH (0.2mg)、極性 PAH (0.3mg)、nitroPAH (0.2mg) のサブ画分に分けた被験物質をビーズワックス法で埋込み、肺腫瘍発生を観察した。PAH は 35 例中 6 例に、nitroPAH は 35 例中 1 例に、扁平上皮がんの発生を認めた。DEP 抽出物のうち、疎水成分、さらに PAHs の発がん性への関与はおおよそ 80%と見積もられ、nitroPAH の影響はあるが大きくはないが、総抽出物のわずか 1% (重量) を構成する PAH 含有成分が DEP の発がん性の原因であることが示された。

5.5.3. -論文による仮説の検証

5.5.3.1. 都市大気微小粒子は変異原性・遺伝子傷害性を有する

後藤ら(1982)、Tokiwa ら (1983)、Ohsawa (1983)、大谷ら(1985)、Enya ら (1997)によって示された都市大気微小粒子の変異原性試験の結果は、大気粒子が発がん過程の初期段階に関与し得ることを示すものである(表 5.5.1)。

都市大気粒子の変異原性は DEP に含まれるニトロ PAH 類の影響が大きい。3-ニトロベンズアントロンの場合には、ディーゼルエンジンの運転条件が DEP

中の3-ニトロベンズアントロン濃度を変化させる。都市大気粒子にしめるDEPが減少することで変異原性は低下すると考えられる。

DE吸入曝露後の肺組織についてDNA付加体を分析して検討した報告によると、活性酸素種によってDNA中に生成する8-ヒドロキシグアニン(8-hydroxy-deoxyguanosine)はDE曝露によって増加することが明らかになっている(Driscollら(1997)、Ichinoseら(1997a)、Tsurudomeら(1999)、Iwaiら(2000)、Satoら(2000))。同様に、PAHやニトロPAHのDNA付加体量も、DE曝露による増加を認めているが(Wongら(1986)、Bondら(1988)、Ohyamaら(1999))、曝露期間の延長に従って増えるとする報告(Bondら(1990)、Iwaiら(2000))と対照的に減少するという報告もある(Gallagherら(1993)、Gallagherら(1994)、Iwaiら(2000))。また、動物種で比較した結果では、ラットとカニクイザルでDNA付加体が検出される条件で、マウス(B6C3F1)、ハムスターに曝露を行ったが増加は認められなかったとする報告がある(Bondら(1989))。

DE吸入曝露ラットでのDNAの酸化的損傷や付加体形成等の観察結果を総括すると、炭粉等、吸入粒子自体が活性酸素種等を介してDNA傷害性を持つこと、DEPに付着したPAHやニトロPAH等の変異原成分が付加体を介して遺伝子傷害性を示すことが証明されている。

都市大気粒子を構成すると考えられるDEP以外のガソリンエンジン排気、石炭燃焼粒子、木材燃焼粒子についても変異原性が認められている(表5.5.1)。

実験動物への吸入曝露で都市大気粒子の遺伝子傷害性を検討した例は少ない。Soaresら(2003)は、マウスに都市大気を吸入曝露して血液を用いて小核頻度を観察した結果、都市のレベルの大気汚染が体細胞の遺伝子変異を誘導する原因となりうることを示した。また、Somersら(2004)は、都市大気をマウスに吸入曝露し、交配させた仔においてESTR(Expanded Simple Tandem Repeat) lociの変異を観察した結果、都市工業地域の粒子状成分曝露が、遺伝的な変異と強く関連していることを示した。これらの結果から大気浮遊粒子によりマウスのDNA変異が起こることが示された。

5.5.3.2. 都市大気微小粒子は発がん性を有する

DEの実験動物への長期曝露による発がん影響は、ディーゼル排気微粒子リスク評価検討会(2002)にまとめられている。それによると、経気道的な曝露を想定した多くの検討が実施され、DEの吸入によってラットでは明らかな肺腫瘍の増加が観察されているが(Brightwellら(1986)、Brightwellら(1989)、Mauderlyら(1986)、Heinrichら(1992)、Heinrichら(1995)、Ishinishiら(1986)、Takakiら(1989)、Kawabataら(1994)、Nikulaら(1995)、Iwaiら(1997))、他のマウス、ハムスター等では肺腫瘍との関連を示唆する一致した知見がないとしている(Brightwellら(1986)、Brightwellら(1989)、Orthofer

ら (1981)、Heinrich ら (1982)、Heinrich ら (1985)、Heinrich ら (1986a)、Heinrich ら (1986b)、Heinrich ら (1989)、Heinrich ら (1992)、Heinrich ら (1995)、Stöber (1986)、Takemoto ら (1986)、Mauderly ら (1996))。これについては、過剰負荷曝露に対するラットに特異的な反応であろうとする見解を紹介している(ディーゼル排気微粒子リスク評価検討会 (2002))。

DE を実験動物に長期間にわたって吸入曝露し、その影響を検討した最初の報告は、Karagianes ら (1981)によるもので、ラット (Wistar、雄) に粒子濃度 $8.3\text{mg}/\text{m}^3$ 、6 時間/日、5 日/週の条件で 20 ヶ月の吸入曝露を行った。生存した 6 例中 1 例に肺腫瘍 (腺腫) を認めたが、DE の影響とは結論づけられない例数であった。

5.5.3.3. その他の関連因子の検討

1980 年代から日米欧各国で実施された DE 吸入実験では、同様にラットでの有意な肺腫瘍発生が観察されている。その一方、マウスやハムスターでは、肺腫瘍の発生を認めないことから、ラットに特異的な反応であり DE の発がん性評価が困難とする意見もある。ラットでの肺腫瘍発生には、肺からの沈着粒子クリアランスを上回る $3.5\text{mg}/\text{m}^3$ 以上の曝露濃度でのいわゆる過剰負荷曝露による炎症やマクロファージの関与する二次的な反応の影響が大きいとされている。これを確認する目的で実施された炭素や TiO_2 の微小粒子吸入実験では、DE と同様の濃度でラットに肺腫瘍発生を認めている (Ichinose ら (1997b)、Driscoll ら (1996)、Driscoll ら (1997)、Heinrich ら (1992)、Heinrich ら (1995)、岩井ら (1991)、Kawabata ら (1986)、河端ら (1988)、河端ら (1993)、Pott と Roller (1994)、Dasenbrock ら (1996))。また、曝露時期と肺腫瘍発生の関係について、幼若期や成長期の曝露が肺腫瘍発生に結びついていて、必ずしも曝露期間が腫瘍発生率に反映されないことも報告されている。

動物実験は曝露条件を設定した群の間で明確な比較ができる点で疫学よりも優れているが、ほかに例のないほどの吸入実験にもかかわらず、1 群の個体数は 100 匹ほどに限られているため、影響の有無を判断する感度は高くない。そこで、これらの数多くの動物実験をまとめたメタアナリシスが試みられている。Valberg と Crouch (1999)によれば曝露濃度を 30 ヶ月継続曝露平均濃度に換算すると、ラットでの有意な肺腫瘍発生を認めた濃度は Mauderly ら (1987)は $730\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、Nikula ら (1995)は $930\mu\text{g}/\text{m}^3$ となる。 $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下の濃度では肺腫瘍発生を認めないことから、これを閾値であると言及している。この濃度を Yu と Yoon (1991)のモデルでヒトの生涯 (70 歳) 曝露濃度に換算すると、 $1.375\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $1.95\text{mg}/\text{m}^3$ となり、最近の一般都市大気環境濃度との間に相当の開きのある高濃度曝露ということになる。これを根拠に U.S.EPA (<http://www.epa.gov/iriswebp/iris/subst/0642.htm>)は、ラットへの DE 吸入曝露による肺腫瘍発生を DE の発がん性の根拠として重要ではないとし、

変異原性や DEP 抽出成分を用いた動物実験の結果が DE の発がん性を示唆すると評価している。

5.5.3.4. まとめ

都市及び工業地域の大气微小粒子が変異原性、遺伝子傷害性を有することは微生物、培養細胞あるいは実験動物を用いた検討から支持されている。しかし、大气微小粒子を実験動物へ長期間曝露し肺腫瘍発生等を検討した例はほとんどなく、大气微小粒子に関する発がん性の実験的根拠は不足している。

都市大气微小粒子への寄与が大きいとされている DEP のヒト発がん性は遺伝子傷害性及び各種職業集団を対象とした疫学調査により示唆されている。ただ、実験動物における DE 吸入実験の成績は、ラットで肺腫瘍発生影響を認めているが、高濃度曝露でラットに特異的な過剰負荷による結果であり、ヒトへの外挿には不適切であると指摘されている。一方、メカニズムの面から見ると、DEP は沈着後に肺組織内で炎症あるいは貪食されたマクロファージを介して活性酸素を産生し 8-ヒドロキシグアニン等、変異の原因となる DNA 損傷を引き起こすことや、微量でも強力な変異原性を有するニトロ PAH 等が DNA と付加体を形成することによって発がんに関与する可能性のあることが示されている。

都市大气微小粒子の発がん性に関しては、都市大气微小粒子自体の発がん性の実験的根拠は不足しているものの、曝露情報から都市大气微小粒子を構成する成分として DEP や燃料燃焼由来粒子を含むことから、発がんに関与することが示唆される。しかしながら、都市大气微小粒子の質量濃度や成分組成は地域や時間によって変動し一様ではないことから、粒子が一様に発がん影響を有すると判定することは困難である。

表 5.5.1 生物学的短期アッセイ法による粒子状物質の変異原性・遺伝子傷害性

試験生物 環境中の粒子状物質	物質	発現影響	排気ガス	粒子	抽出物	文献
大気中粒子						
サルモネラ菌	都市大気粒子	点突然変異 (his)		+		後藤ら(1982)
サルモネラ菌	都市大気粒子	点突然変異 (his)		+		Ohsawa (1983)
サルモネラ菌	都市大気粒子	点突然変異 (his)		+		大谷ら(1985)
サルモネラ菌	都市大気粒子	点突然変異 (his)		+		Iwado ら (1994)
サルモネラ菌	都市大気粒子	点突然変異 (his)		+		高木ら(1994)ら
サルモネラ菌	都市大気粒子	点突然変異 (his)		+		Enya ら (1997)
サルモネラ菌、マウス骨髄細胞	都市大気粒子	点突然変異 (his)、 小核		+		Zhao (2002)
ヒト h1A1v2	都市大気粒子			+		Hannigan ら (1997)
ヒト 1A1v2	都市大気粒子			+		Hannigan ら (1998)
ハムスター・ラット気道上皮細胞	都市大気粒子	姉妹染色分体交換			+	Hornberg ら (1996)
ヒト気管支上皮細胞	都市大気粒子	姉妹染色分体交換			+	Hornberg ら (1998)
ハムスター腎臓細胞	都市大気粒子	SV-40 による変異			+	Seemayer と Hornberg (1998)
肝臓がん細胞	都市大気粒子	遺伝毒性			+	Hamers (2000)
肝腫瘍細胞	都市大気粒子	GJIC の阻害			-	Alink ら (1998)
ラット肝細胞、マウス骨髄細胞	都市大気粒子	不定期 DNA 合成、小 核		+		Zhao (2002)
野焼きに由来する排出物						
サルモネラ菌	野焼きに由来する粒子	点突然変異 (his)			+	Heussen ら (1994)
サルモネラ菌	野焼きに由来する粒子	点突然変異 (his)		+		Vinitketkumnuen ら (2002)
ヒト WBC	野焼きに由来する粒子	DNA 付加体			+	Heussen ら (1994)
ディーゼルエンジン排気						
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)			+	Crebelli ら (1995)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)			+	Ball と Young (1992)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)		+	+	Keane ら (1991)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)		+	+	Wallace ら (1990)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)			+	Rasmussen (1990)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)			+	Wallace ら (1987)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)			+	Bechtold ら (1986)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)			+	Salmeen ら (1984)

試験生物 環境中の粒子状物質	物質	発現影響	排気ガス	粒子	抽出物	文献
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)		+		Bünger ら (2000)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)		+		Houk ら (1991)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)		+		Löfroth (1981)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)		+		Rannug ら (1983)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)			+	Strandell ら (1994)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)	+	+		Crebelli ら (1991)
サルモネラ菌	DE	点突然変異 (his)	(+)	+		Seagrave ら (2002)
サルモネラ菌, 大腸菌	DE	点突然変異 (his)			+	Pohjola ら (2003)
大腸菌	DE	点突然変異 (his)			+	Lewtas (1983)
L5178Y マウスリンパ腫細胞	DE	点突然変異 (tk)			+	Lewtas (1983)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	DE	点突然変異 (hprt)			+	Li ら (1982)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	DE	点突然変異 (hprt)			+	Mitchell ら (1981)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	DE	点突然変異 (hprt)		+	(+)	Chescheir ら (1981)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	DE	点突然変異 (hprt)			(+)	Casto ら (1981)
ヒトリンパ芽細胞 TK6 細胞	DE	点突然変異 (hprt)			+	Barfknecht ら (1981)
Balb/c3T3 マウス線維芽細胞	DE	点突然変異 (ATPase)		+	(+)	Curren ら (1981)
ヒト肺胞上皮細胞 A549	DE	DNA 鎖切断			+	Carero ら (2001)
シリアン・ハムスター肺細胞	DE	DNA 鎖切断			-	Casto ら (1981)
ラット肝細胞	DE	不定期 DNA 合成			+	Lewtas (1983)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	DE	姉妹染色分体交換			+	Lewtas (1983)
チャイニーズハムスター卵巣細胞	DE	染色体異常			+	Lewtas (1983)
チャイニーズハムスター肺 V79 細胞	DE	染色体異常		+		Hasegawa ら (1988)
チャイニーズハムスター肺 V79 細胞	DE	姉妹染色分体交換		+		Hasegawa ら (1988)
チャイニーズハムスター肺 V79 細胞	DE	姉妹染色分体交換		+		Keane ら (1991)
ヒトリンパ細胞	DE	染色体異常			+	Lewtas (1983)
ヒトリンパ細胞	DE	姉妹染色分体交換			(+)	Tucker ら (1986)
ハムスター肺線維芽細胞	DE	小核			+	Schiffmann と Henschler (1992)
Balb/c3T3 マウス線維芽細胞	DE	細胞形質転換		(+)		Hasegawa ら (1988)
Balb/c3T3 マウス線維芽細胞	DE	細胞形質転換		(+)		Curren ら (1981)
ハムスター肺上皮細胞	DE	細胞形質転換			+	Mohr と Riebe-Imre (1992)

試験生物 環境中の粒子状物質	物質	発現影響	排気ガス	粒子	抽出物	文献
ハムスター肺線維芽細胞	DE	細胞形質転換			+	Schiffmann と Henschler (1992)
仔ウシ胸腺細胞	DE	DNA 付加体	+	(+)	+	Pohjola ら (2003)
肝腫瘍細胞	DEP	GJIC の阻害			+	Alink ら (1998)
ガソリンエンジン排気						
サルモネラ菌	ガソリンエンジン排気	点突然変異 (his)		(+)		Löfroth (1981)
サルモネラ菌	ガソリンエンジン排気	点突然変異 (his)		(+)		Rannug ら (1983)
サルモネラ菌	ガソリンエンジン排気	点突然変異 (his)		+		Strandell ら (1994)
サルモネラ菌	ガソリンエンジン排気	点突然変異 (his)		+		Seagrave ら (2002)
サルモネラ菌	ガソリンエンジン排気	点突然変異 (his)	(+)	+		Pohjola ら (2003)
サルモネラ菌	ガソリン+アルコールの エンジン排気	点突然変異 (his)		(+)		Rannug ら (1983)
サルモネラ菌	ガソリンエンジン排気	点突然変異 (his)			(+)	Pohjola ら (2003)
石炭燃焼粒子						
サルモネラ菌	石炭燃焼粒子	点突然変異 (his)		+		Houk ら (1991)
サルモネラ菌	石炭燃焼粒子	点突然変異 (his)			+	Granville ら (2003)
サルモネラ菌	石炭燃焼粒子	点突然変異 (his)			+	Mumford と Lewtas (1982)
木材燃焼粒子						
サルモネラ菌	木材燃焼粒子	点突然変異 (his)		(+)	+	Löfroth ら (1986)
サルモネラ菌	木材燃焼粒子	点突然変異 (his)		(+)		Houk ら (1991)
サルモネラ菌	木材燃焼粒子	点突然変異 (his)	+	+		Kim Oanh ら (2002)
その他の粒子						
サルモネラ菌	Wood smoke 濃縮物	点突然変異 (his)		-		Putnam ら (1999)
肝腫瘍細胞	金属工業由来 PM	GJIC の阻害			-	Alink ら (1998)
肝腫瘍細胞	コンポスト由来 PM	GJIC の阻害			+	Alink ら (1998)
肝腫瘍細胞	養鶏/畜産業由来 PM	GJIC の阻害			-	Alink ら (1998)
肝腫瘍細胞	ゴム工業由来 PM	GJIC の阻害			+	Alink ら (1998)

his : histidine independence (ヒスチジンの影響なし), trp : tryptophane independence

hprt : ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリルトランスフェラーゼ

ATPase : Na⁺/K⁺-ATPase, tk : チミジンキナーゼ

+: 陽性, (+) : 弱陽性

5. 6. 粒子成分と健康影響の関係

5. 6. 1. 仮説の紹介

粒子状物質は、様々な成分で構成され、地域や時間によって成分が変動する特徴を有している。成分の種類によって、生体内への影響の内容が異なることが考えられ、特定の成分によるヒトへの強い健康影響が生じる可能性もありうる。

大気粒子に含まれる構成成分による毒性発現の程度について考察するために、「微小粒子状物質の毒性は特定の成分により引き起こされる。」という仮説をたて、異なる成分を含む粒子を用いて同一の動物実験で実施し、毒性による影響の比較が可能な知見に基づき、仮説の確からしさの程度に関する検証を行なう。

5. 6. 2. 論文の紹介

Vincent ら (2001)は、Wistar ラットを用いてオタワ標準粉じん(EHC-93)とそれを水ろ過した EHC-93L、Diesel soot (DS)及び CBP の曝露時間 4 時間の急性曝露の影響を調べた。曝露濃度は、EHC-93: 48mg/m³、EHC-93L: 49mg/m³、DS: 4.2mg/m³ 及び CBP: 4.6mg/m³であった。

結果として、全ての曝露群で肺病理及びチミゼンの取り込みに違いは見られなかった。EHC-93 曝露では曝露 2 日後で血圧が、32 時間でエンドセリン(ET)-1 が、2 時間、32 時間、48 時間で ET-3 がそれぞれ曝露前と比較して有意に上昇した。これに対して EHC-93L では血圧に明確な影響はなかったが、ET-1 及び ET-2 が曝露後 2 時間で曝露前と比較して有意に増加し、ET-3 が有意ではないが 2、24 時間後に増加し、その後減少した。

DS 曝露では曝露後 32 時間で ET-3 が有意に増加したが血圧への影響はなかった。CBP 曝露ではいずれの指標に関しても明確な影響は見られなかった。

本研究では、都市部大気中の EHC-93 粒子の吸入が血漿中の ET-1 及び ET-3 レベルに影響を与え、急性の肺障害がなくても血管収縮が生じる可能性が示された。更に、極性有機化合物や可溶性成分を取り除くことにより粒子が血行力学的変化に影響を与える可能性が示唆された。ET 上昇の病態生理学的重要性はヒトにおいて確立されているので、本研究における観察結果は吸入された粒子が心血管へ影響を与える可能性を裏付けるものである。ラットでのこれらの知見は、ヒトにおける大気中の粒子状物質と心血管系疾患罹患及び死亡率との間の疫学的関連を支持する重要な証拠と考えられると著者は述べている。

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と比較して増加した。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、肺の障害に關与している可能性があることを示している。

Kotin ら (1955)は、暖機(負荷なし)または荷重運転時に DEP を回収し、そのアセトン抽出物をマウスの皮膚に塗布し腫瘍の発生を觀察した。暖機運転時の DEP 抽出物塗布で C57Bl マウスに 13 ヶ月後に 2 例の乳頭腫、荷重運転時の DEP 抽出物塗布では、A 系マウス(雄)に 4 例の腫瘍(組織型不明)、A 系マウス(雌)に 17 例(組織型不明)の腫瘍発生を認めた。

Suzuki ら (1993)は、DEP にも含まれるピレンと OVA との混合物をマウスの腹腔内に投与し、OVA のみを投与した動物に比べ混合物を投与した動物の方が OVA 特異 IgE 抗体の産生が高まったことからピレンにアジュバント作用がある可能性を指摘した。

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

Gavett ら (1997)は 2 種類の ROFA の肺への影響を比較し、ROFA のどの成分が大きく影響を及ぼすか検討した。2 種類の ROFA を用意し、それぞれ 2.5mg を 0.3mL の生理食塩水に懸濁し、R1、R2 とした。さらに R1、R2 の上清を R1s、R2s とした。SD ラット(雄)に R2、R2s、R1s または生理食塩水 0.3mL を気管内投与し、4 日後にアセチルコリン静脈注射による気道反応、BALF 中の細胞数及び成分を検討した。その結果、R2 を投与したラット 12 匹のうち 3 匹が、また 12 匹の R2s のうち 1 匹が 4 日後までに死亡した。またアセチルコリンへの反応性は R2、R2s が R1s に比べ強かった。BALF 細胞については R1s と比較して R2、R2s は好中球の増加がみられた。このことから ROFA 中の可溶性の金属の組成の違いが肺の障害や気道の過敏の進行に大きな影響を与えることが示された。

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 SO_2 を吸入させることにより惹起した。CAPs の曝露濃度は、 $126.1\sim 481.0\mu\text{g}/\text{m}^3$ (3 日平均)、 $73.5\sim 733.0\mu\text{g}/\text{m}^3$ (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、 H_2SO_4 、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。

Kodavanti ら (2000)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 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、大気中の粒子状物質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、粒子状物質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。

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

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られた。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られた。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。

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 $0.15 \sim 2.5\mu\text{m}$ (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($63.3 \sim 1,568.6\mu\text{g}/\text{m}^3$)と低用量($1.6 \sim 133.1\mu\text{g}/\text{m}^3$)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)。② $300 \sim 500\mu\text{g}/\text{m}^3$ 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+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。

Gavett ら (2003)らは、OVA 感作モデルに、①初回 OVA 処理の 2 日前にドイツの異なる 2 都市、ヘットシュテット(Hettstedt)(アレルギー体質の子供数が多い)とツェルブスト(Zerbst)(対照)に由来する PM_{2.5} を 10µg/50µl saline で投与(感作)、あるいは②初回 OVA 処理 14 日後に上記 PM_{2.5} を投与(チャレンジ)し、A、B それぞれについてその後の OVA 再投与による反応(メサコリン試験、OVA-IgE、BALF)を調べた。結果としてヘットシュテット由来の PM_{2.5} を投与したマウスの方が、OVA 再投与により強い気道の反応性所見(気道閉塞による減少した流入空気量)、メサコリンへの反応、肺の炎症所見を示した。OVA-IgE はヘットシュテット由来 PM_{2.5} による感作、チャレンジのいずれのマウスでも増加していた。二つの異なる都市由来の PM_{2.5}(金属の含有量の違いに注目)の肺への影響を動物実験により比較したところ、疫学データと同様の結果が得られ、そのメカニズムとして、PM_{2.5} の金属組成が肺のアレルギー性炎症に影響を与えていると述べている。

Schins ら (2004)は、工業地帯(都市部)と郊外より採集した粒子状物質(coarse、fine の 2 サイズ)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 の粒子状物質が、さらに、工業地帯よりも郊外の粒子状物質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。

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。

Gurgueira ら (2002)は、ラットに CAPs(300±60µg/m³)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 mg/m³、30 分)の曝露において認められたが CB(300 µg/m³)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。

Batalha ら (2002)は、CAPs に短期曝露された正常ラットや慢性気管支炎ラットの肺小動脈の形態変化の有無を検討するために、SD ラット(雄)を 6 群に分け CAPs(平均 $182.75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($73.5 \sim 733 \mu\text{g}/\text{m}^3$)または粒子を含まない空気を 5 時間/日、3 日間連続曝露した。慢性気管支炎ラットは $276 \pm 9 \text{ ppm SO}_2$ を 5 時間/日、5 日間/週、6 週間曝露して誘導した。CAPs の最終曝露 24 時間後に試料を採取し、肺葉の無作為に選んだ部位から組織標本を作製し、肺小動脈の横方向の切片から形態計測学的に管腔/壁の割合(L/W 比)を調べた。全ての正常ラットと慢性気管支炎ラットをまとめてデータ解析を行うと、粒子の質量、Si、Pb、 H_2SO_4 、元素状炭素、有機炭素が多いほど、L/W 比が減少した。各動物データからの単変量解析では、 H_2SO_4 との関連は正常ラットにのみ有意であるのに対し、Si は慢性気管支炎ラットと正常ラット共に有意に関連していた。全ての粒子要因が含まれた多変量解析では、Si との関連が有意であった。本研究結果は CAPs の短期的曝露が正常ラットまたは、慢性気管支炎ラットの肺小動脈の血管狭窄を誘導することを示唆している。この影響は特異的な粒子の成分と関連があり、肺の脈管構造が大気中粒子毒性のための重要な標的かもしれないということを示している。

Pott と Roller (1994)は、DEP に近い材料として種々の炭粉を Wistar ラット(雌)に経気道肺内投与し($3\text{mg}/\text{回}$ を 10 回、あるいは 15 回)、腫瘍発生を観察した。粒子表面積の異なる炭粉等で比較したが、ほぼ同等の肺腫瘍発生率で、最も表面積の大きい活性炭では肺腫瘍発生率は低かった。

Ohyama ら (1999)は、F344 ラットに DEP 抽出物でコーティングした CBP(DEcCBP) 0.2mg を、1 回/週、計 4 回、気管内投与し、6 ppm の NO_2 及び 4 ppm の SO_2 を 10 カ月間曝露し、実験開始から 18 カ月後に肺病変を組織学的及び DNA 付加物について検討した。それによると、DEcCBP 単独投与群では肺胞道における小硝子塊の形成と硝子塊周辺の肺胞道上皮の気管支上皮化が認められたのみであったが、肺腫瘍形成及び DNA 付加物の形成は DEcCBP 気管内投与に NO_2 及び SO_2 を曝露した群に認められた。これらのことから、硝子塊から溶出した DEP 抽出物が肺胞上皮の DNA 損傷及び肺胞上皮の増殖を惹起し、 NO_2 及び SO_2 が DEP 抽出物による肺腫瘍の誘導を促進すると推測している。

Heinrich ら (1994)によると、Wistar ラット(雌)への DEP、有機溶媒洗浄 DEP、CB(有機溶媒洗浄)投与実験の結果では、洗浄された DEP でも肺腫瘍発生を観察し、CB では表面積の大きな種類が高い肺腫瘍発生率であったと報告した。

Nikula ら (1995)は、DE 中に含まれる有機化合物のラット肺腫瘍の発生に対する影響力を調べるために、DE と CB を F344 ラットに曝露した。粒子濃度は、DE 及び CB とともに 2.5 、 $6.5 \text{ mg}/\text{m}^3$ であり、16 時間/日、5 日/週の条件で 24 カ月間曝露した。高粒子濃度 $6.5 \text{ mg}/\text{m}^3$ の DE 及び CB による肺腫瘍発生率は両群で近い値で、Squamous cyst の発生割合、生存率ともに類似していた。 $2.5\text{mg}/\text{m}^3$ では DE 曝露による肺腫瘍に高い傾向があったが、肺に貯留した粒子量を測定してみると DE 曝露の方が高い傾向があり、これを基準とした肺腫瘍発生率を CB と DE とで比較すると、ほぼ同等の発がんが認め

られた。その結果から、DE に含まれる有機化合物は、ラット肺腫瘍発生への寄与は小さいと述べている。

Depass ら (1982)は、DEP とそのジクロロメタン抽出液を 1 群 40 匹のマウス皮膚に塗布した。試験物質の投与条件は、ディーゼル粒子 5%、10%のアセトン浮遊液、5%、10%、25%、50%のジクロロメタン抽出液 25 μ L を、発がん試験では 3 回/週投与、最高で 714 日まで継続、プロモーション試験では、1.5% BaP の単回塗布後、5 回/週投与、イニシエーション試験では試験物質の単回投与の 1 週間後から Phorbol myristate acetate を 3 回/週投与した。いずれの試験でも腫瘍発生の有意な増加はなく、発がん性、プロモーション作用、イニシエーション作用はほとんどなかった。

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。

Kodavanti ら (1998)は、ROFA の金属含有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(0.83、3.33、8.3 mg/kg)をラットの気管内に投与した。24 時間の BALF 中のタンパク質、ヘモグロビン、LDH 量は Ni や Fe の含量と相関がみられた。一方、BALF 中の好中球数は V 含量と相関がみられた。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。

Fernandez ら (2002)は、石炭と乾燥下水汚泥の燃焼由来粒子(MSS/coal ash)を 0mg/m³、1,000 μ g/m³、3,000 μ g/m³ の濃度で C57BL/6 マウスに 1 時間/日、24 日間の連続曝露を行い、呼吸器への影響について検討した。また、Coal ash(3,000 μ g/m³)も同様に曝露した。動的肺コンプライアンスと気道抵抗には変化がみられなかったが、^{99m}Tc (Technetium、テクネチウム)を用いた肺の透過性の測定では、MSS/coal ash の濃度依存的な増加が認められ、BALF の細胞数は、どちらの濃度の MSS/coal ash 群でも同程度の低下がみられた。一方、Coal ash 曝露では ^{99m}Tc 透過性、BALF 中細胞数のいずれも明らかな変化を認めなかった。MSS/coal ash では Zn 濃度が Coal ash より有意に高かった。粒子を溶解した溶液の pH に差がないため、粒子の組成が肺の障害にかかわっている可能性を示唆していると考えられる。

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。正常イヌ(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。

Moyer ら (2002)は、4 種の化学物質 (InP、CoSO₄、V₂O₅及び GaAs)を B6C3F1 マウスに吸入曝露した。低濃度 (0.3~4 mg/m³、化学物質によって濃度は異なる。化学物質 1 種類につき 1 濃度)を 2 年間吸入曝露(1 日あたりの曝露時間は不明)をし、病理組織学的解析を行った。InP 曝露により心臓の筋性動脈 (細い動脈)において動脈炎が観察された。また、CoSO₄においても動脈炎が観察された。しかし、高濃度(16~100 mg/m³)90 日間曝露においては、雄雌のマウスともに対照群と比較して有意に動脈炎発症が増加するとの知見は得られなかった。

Watkinson ら (2000)は、高齢 SHR(雄、15 ヶ月齢、350~420g)にオタワ粉じん (OTT)2.5mg、燃焼に伴って発生する粒子状物質(ROFA)0.5mg、ヘレナ山の火山灰 (MSH)2.5mg を気管内投与し、心電図、心拍数、深部体温を曝露前 48 時間から曝露後 96 時間にわたりモニターした。心電図、心拍数、不整脈等の悪影響は OTT>ROFA>>MSH の順に大きかった。また、粒子状物質の重要な金属成分である Fe、V、Ni をそれぞれ単独あるいは混合(105 μ g of Fe₂(SO₄)₃、263 μ g of NiSO₄、245 μ g of VSO₄ in 0.3 ml acidified saline (pH=2))でモノクロタリン処理 SD ラット(肺血管炎/肺高血圧モデル)に気管内投与した。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。粒子状物質の循環器系への影響を明らかにした。

Campen ら (2002) は、①モノクロタリン非処置 SD ラットに生理食塩水、Fe₂(SO₄)₃ (0.105 mg)、NiSO₄(0.263 mg)、VSO₄ (0.245 mg)、②モノクロタリン処置ラットに生理食塩水、Fe₂(SO₄)₃、NiSO₄、VSO₄、③モノクロタリン処置ラットに Fe₂(SO₄)₃+VSO₄、Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄、NiSO₄+VSO₄ (n=6)、Fe₂(SO₄)₃+NiSO₄+VSO₄ を気管内投与し、曝露後 2~4 日の影響を調べた。すべての群において生理食塩水投与で心拍数と深部体温の上昇が見られた。Fe の投与でも同様の現象がみられた。V 投与では心拍数・深部体温とも低下し、不整脈発生頻度も増加した。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投与群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て投与するとさらなる上昇を引き起こした。モノクロタリン投与群においても Ni 投与により LDH レベルが上昇した。本研究により、心拍数や深部体温・心電図の異常等、自律神経系に悪影響を与えるだけでなく、致死率等においても Ni や V は悪影響を与えること、Fe が Ni や V によって引き起こされる心機能異常を抑える働きをすることが示されたと考えられる。

Muggenburg ら (2003)は、心血管系の異常を有する高齢ビーグル犬に、Mn、Ni、V、Fe、Cu、の酸化物、Ni、V の硫酸塩エアロゾルのいずれか一つを、0.05mg/m³ の濃度で3時間/日、連続3日間、口から吸入曝露し、心電図を記録して心拍数変化、心拍変動、波形異常との関連を評価した。その結果、これらの遷移金属エアロゾルへの曝露による心拍数、心拍変動、STセグメントへの有意な影響は認められなかった。

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 ± 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-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。

Cassee ら (1997)は、マウスで NH₄HSO₄ 粒子の曝露影響を検討した。粒径は ultrafine:85nm、fine(low mass):531nm、fine(high mass):453nm [mass median diameter]であり、曝露濃度は ultrafine:235µg/m³、fine(low mass):78µg/m³、fine(high mass):972µg/m³、曝露時間は4時間/日、連続3日間であった。肺やアレルギー反応に関するいずれの指標でも有意な結果を認めなかった。

Cassee ら (1998a)は、マウスで(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O 粒子の急性曝露効果(曝露時間4時間/日、連続3日間)を検討した。粒径は459nm、曝露濃度は250µg/m³であった。その結果、肺や気管に関するいずれの指標でも有意な結果を認めなかった。

Cassee ら (1998b)は、マウスで NH₄NO₃ 粒子の急性曝露効果(曝露時間4時間/日、連続3日間)を検討した。粒径は、ultrafine:0.03µm、fine:0.3µm で、曝露濃度は250µg/m³であった。肺やアレルギー反応に関するいずれの指標でも有意な結果を認めなかった。

Schlesinger と Cassee (2003)は、環境中のエアロゾルの主要成分である硫酸塩、硝酸塩への曝露が動物、ヒトに及ぼす生物学的影響について、臨床的曝露研究に関する学術論文及び一般に公開されているレポート類から得られるデータに基づき、レビューした。その結果、硫酸塩、硝酸塩の粒子は、環境中の濃度に相当するレベルの曝露では、健常なヒトや動物、限定的な障害を有するモデル動物に対し、生物学的影響を及ぼす可能性はほとんどないことが示唆された。ただし、実験と、実際の環境における曝露との相違に関連して注意すべき点があることを指摘している。

5.6.3. 論文による仮説の検証

CAPs (PM_{2.5})、DEP、ROFA、金属、酸性エアロゾル、生物起源エアロゾルに分け、

それぞれを構成する成分における特定のものが毒性発現と関係しているかどうか調べた。

5.6.3.1. CAPs (PM_{2.5})

CAPs (PM_{2.5}) とその抽出物や洗浄後粒子との比較により、成分の毒性発現への関与を調べた報告がいくつかある。Vincent ら (2001) は、オタワ標準粉じん (EHC-93) とそれを水ろ過した EHC-93L をラットに吸入(鼻部)曝露して循環器系への影響を比較検討し、水ろ過により極性有機化合物や可溶性成分を取り除くと、血行力学的影響が消失したと報告している。Molinelli ら (2002) によると、ラットの気管内への総浮遊粒子 (TSP) 抽出物投与により、BALF 中のタンパク質や LDH (Lactate DeHydrogenase) は増加した。金属類除去 TSP 抽出物ではこの変化は減弱し、金属類除去 TSP 抽出物に金属類を加えると毒性は復活した。

曝露影響評価報告書 (毒性分野) によると、ラット内皮細胞培養系を用いた研究で、PM_{2.5} 抽出物は、微小血管内皮細胞に酸化ストレスを与えることにより細胞障害を引き起こし、抗酸化系酵素の遺伝子発現量を増加させた。また、PM_{2.5} 抽出物は同細胞の細胞間接着構造に障害を与え、物質透過性を亢進した。さらに、PM_{2.5} 抽出物の気管内投与によりマウスの肺の炎症の増悪作用、高血圧ラットの心拍数減少や副交感神経活動への影響をもたらしていることも確認された。

一方、CAPs 中の個々の成分と毒性に関する研究は、実験動物 (正常イヌ、正常ラット、正常マウス、冠動脈閉塞モデルイヌ、慢性気管支炎ラット、アレルギー性喘息モデルマウス等) に CAPs を吸入曝露し、CAPs 中成分濃度と影響の程度の違いから両者の関係を推察したり、統計学的に解析する等の方法を用いて行われている。

結果として、正常ラットと SO₂ による慢性気管支炎ラットへの吸入曝露では、BALF 中の好中球増加が V、Br、Pb、H₂SO₄、元素状炭素(EC)、有機炭素(OC)、Si 濃度と相関したが、Cl 濃度とは相関しなかった。この結果は慢性気管支炎ラットにおいて顕著であった。BALF 中のタンパク質濃度も、Pb、H₂SO₄、EC、OC、Si 濃度と相関した。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 Pb、Cl、EC、OC と組織所見の間に相関を認めた。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 (Saldiva ら (2002))。しかし一方で、慢性気管支炎ラットに CAPs を吸入曝露しても BALF 中タンパク質、アルブミン、NAG (N-Acetyl Glucosaminidase) 活性、好中球数の増加が硫酸塩または基本的構成要素 (S、Zn、Mn、及び Fe) と関連しなかったという報告もある (Kodavanti ら (2000))。

正常イヌに曝露した報告では、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、血中の好中球と BALF のマクロファージの増加は V や Ni と関連していた。BALF の好中球の増加は、Br/Pb と CAPs 曝露の一部データのみで関連性がみられた。赤血球数やヘモグロビンレベルは S 濃度との間に負の相関がみられた (Clarke ら (2000))。

冠動脈閉塞(虚血性心疾患)モデル犬を用いた実験では、冠動脈閉塞による V4、V5 誘

導における ST 上昇が 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(Wellenius ら (2003))。

アレルギー性喘息モデルマウスへの吸入曝露では Al、Si 含有率とメサコリン応答性 (Penh)の上昇の間に相関が認められた(Kobzik ら (2001))。アレルギー性炎症モデルマウスにアレルギー体質の子供がより多い都市由来の PM_{2.5}を気管内投与すると、少ない都市由来のそれに比較し、気道反応性と肺の炎症所見がより強く観察され、Zn、Mg、Pb、Cu、Cd 等、金属含量の違いがアレルギー反応の違いに関与していることが想定された(Gavett ら (2003))。

一方、都市部工業地帯と郊外より採集した粒子状物質(coarse、fine)をラットの気管内に投与したところ、fine より coarse のサイズの粒子状物質が強く肺に炎症を誘導し、メカニズムとして、金属成分ではなく、エンドトキシンや他の汚染物質(O₃、NO_x や SO_x 等)の関与を示唆する報告もある(Schins ら (2004))。

循環器系への影響としては、ラットへ吸入曝露すると、チオバルビツール酸反応物質と CAPs 中の Al、Si、Fe 濃度との間に相関がみられた(Rhoden ら (2004))。また、他の研究では、肺の化学発光量(酸化ストレスの指標)は CAPs 中の Ca、Mn、Cu、Fe、Zn 濃度と、心臓の化学発光量は Si、Al、Ti、Fe 濃度と相関がみられた(Gurgueira ら (2002))。慢性気管支炎ラット及び正常ラットへの CAPs 短期曝露において、小肺動脈管腔/壁の割合(L/W 比)への影響が、単変量解析では、正常ラットで H₂SO₄との関連のみ有意であり、Si は慢性気管支炎ラット、正常ラット共に有意に関連していた。多変量解析では、Si との関連が有意であった(Batalha ら (2002))。

以上をまとめると、CAPs (PM_{2.5}) の成分は毒性発現の重要な要素である。その理由として 1) オタワ標準粉じんによる血行力学的影響が同粉じんの水ろ過により消失したこと(Vincent ら (2001))、2) TSP 抽出物における金属類の除去による肺障害の減弱及び再添加による肺障害の復活(Molinelli ら (2002))が挙げられる。しかしながら、個々の成分について検討すると、EC、OC、H₂SO₄、Br、Cl、S、Si、金属 (Al、Ca、Cd、Co、Cu、Fe、La、Mg、Mn、Pb、Ti、V、Zn 等)、あるいはエンドトキシンが毒性発現に重要であると示唆する論文があるが、結果は論文ごとに異なり明確な結論は見出せなかった。

5. 6. 3. 2. DEP

DEP の成分による毒性研究として、DEP と種々の炭粉によるラット経気道肺内投与後の肺腫瘍発生率の比較 (Pott と Roller (1994))、DEP 抽出物でコーティングした CBP(Carbon Black Particle)の気管内投与による肺腫瘍形成及び DNA 付加物の形成の検討 (Ohyama ら (1999))、DEP、有機溶媒洗浄 DEP、有機溶媒洗浄 CB、TiO₂ 粒子投与による肺腫瘍発生率の比較(Heinrich ら (1994))、DE と CB の吸入曝露による肺腫瘍発生率の比較(Nikula ら (1995))、DEP アセトン抽出物のマウス皮膚塗布試験(Kotin ら (1955))、DEP ジクロロメタン抽出液のマウス皮膚塗布試験(Depass ら (1982))、DEP と

CBの局所リンパ節試験の比較(Løvikら(1997))、DEPとCBのリステリア菌感染の感受性の比較(Yangら(2001))等の報告があるが、DEP中の個々の成分についての検討は行われていない。

一方、DEあるいはDEP曝露によって、多環芳香族炭化水素(PAH、Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)やニトロPAHと肺組織DNAが結合したDNA付加体の形成も認められており、DEPに含まれるPAHとニトロPAHが肺発がんの原因として重視すべきであるとされている。また、DEP成分には代謝活性化を必要としない直接変異原物質が多く含まれ、その大部分は強変異原性を示す物質を多く含むPAHや多環芳香族ケトン等のニトロ誘導体であると考えられている。

また、DEPに含まれるピレンにアジュバント作用があることが示唆されている(Suzukiら(1993))。また、DEP抽出物が試験管の中で非常に微量でヒトの精子の運動能力を低下させることも報告されている。

以上まとめると、DEP成分であるPAHやニトロPAHによる変異原性やDNA付加体形成、ピレンによるアジュバント作用が報告されているが、それ以外の特定のDEP成分と毒性発現との関係についての報告はほとんどない。

5.6.3.3. ROFA

ROFA(2種類)の懸濁液とその上清をラット気管内投与した実験から、ROFA中可溶性金属の組成の違いが肺の障害や気道の過敏の進行に大きな影響を与えることが想定されている(Gavettら(1997))。火力発電所の異なる部位から採集されたROFAをラット気管内投与した試験では、肺の炎症作用、マクロファージの活性化とVの関連、及び肺障害作用とNiの関連が示唆されている(Kodavantiら(1998))。マウスに鼻部曝露した乾燥下水汚泥の燃焼由来粒子(MSS)は、石炭燃焼由来粒子(coal ash)より肺の透過性を亢進した。粒子を溶解した溶液にpHの差はなく、ZnがMSSで有意に高かった(Fernandezら(2002))。

Muggenburgら(2000)は、正常犬に $3\text{mg}/\text{m}^3$ のROFAを吸入曝露しても心電図に一貫した変化は観測されなかったと報告している、この論文では金属の影響については特に述べられていないが、曝露された遷移金属濃度は米国都市大気より数桁高い値と考えられている。

以上まとめると、ROFAの懸濁液上清の気管内投与により、ROFA中可溶性金属の組成の違いが肺障害や気道過敏性亢進に大きな影響を与えるが、溶解性のFe、V、Niの含有量を濃縮大気中の粒子状物質よりかなり高くした吸入試験でも心臓に特に影響は観察されず、ROFA中の特定成分と毒性発現との間に明確な関係は見出せなかった。

5.6.3.4. 金属

微小粒子状物質の特定の金属成分が毒性を有するかどうかの研究には大きく2つの方法がある。一つは特定の金属塩を動物に投与する方法、もう一つは採取した種々の微小粒子状物質(CAPs、 $\text{PM}_{2.5}$)を動物に曝露し、その金属成分と毒性の関係を統計学的に

解析する方法である。

Moyer ら (2002)は、InP、CoSO₄、V₂O₅及びGaAsをマウスに2年間吸入曝露した。低濃度のInP、CoSO₄曝露により動脈炎が観察された。しかし、高濃度(16~100 mg/m³) 90日間曝露においては、雄性、雌性マウスともに対照群と比較して有意に動脈炎発症が増加する知見は得られなかった。Watkinson ら (2000)は、Fe、V、Niをそれぞれ単独あるいは混合でラット(肺血管炎/肺高血圧モデル)に気管内投与し、最も著しい影響はNiとV曝露により起こったと報告している。Campen ら (2002)はラットへのFe₂(SO₄)₃、NiSO₄、VSO₄の気管内投与により、NiやVが心拍数や深部体温・心電図の異常等、自律神経系、致死率等に悪影響を与えること、FeがNiやVによって引き起こされる心機能異常を抑える働きを示した。

Muggenburg ら (2003)はMn、Ni、V、Fe、Cuの酸化物及びNi、Vの硫酸塩をビーグル犬に吸入曝露(0.05 mg/m³: 大気濃度より2から4桁高濃度)したが、顕著な心血管系への影響は観察されなかったと報告している。

Fe、V、Niの硫酸塩のラット気管内投与による肺の炎症作用はNi>V>Feの順に大きいことが示唆されている(Kodavanti ら (1997))。

しかしながら、金属塩を実験動物に吸入曝露あるいは気管内曝露する試験が実際の大气による曝露をどの程度反映するか不明確である。

一方、CAPs、PM_{2.5}を用いた研究では、ラットの気管内にTSP抽出物を投与すると、BALF中のタンパク質やLDHは増加した。金属類除去TSP抽出物ではこの変化は減弱し、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ことが報告されており(Molinelli ら (2002))、金属成分の重要性は証明されている。しかし、特定の金属成分については、5.6.3.1. CAPs (PM_{2.5})で述べたように、すべての文献を比較して一貫した関係が認められない。また、CAPsを用いた研究は非常に限られたものであるため、曝露/反応に対して因子分析を行うには情報が不足している、等の理由から明確な結論は得られなかった。

以上をまとめると金属成分が微小粒子状物質の毒性発現の重要な要素である可能性は極めて高いが、一般的に、実験的研究は非常に高濃度の曝露を用いるため、一般の大气中のいずれの金属成分によって影響を生じるかは依然として不確かである。

5.6.3.5. 酸性エアロゾル

Saldiva ら (2002)は慢性気管支炎ラットへのCAPs吸入曝露試験で、CAPs中SO₄²⁻とBALF中のタンパク質と好中球増加との間にのみ有意の関係をみとめているが、Kodavanti ら (2000)、Clarke ら (2000)の報告ではCAPs中SO₄²⁻成分と有意な関係のある生体影響を認めていない。

1996年のU.S.EPA、PMAQCD (Particulate Matter Air Quality Criteria Document)にて要約された研究では、酸性エアロゾルは健康なヒトに対して肺機能の変化をほとんどもしくは全く引き起こさないと結論付けている。しかし、喘息患者では、肺機能のわずかな変化を生じる可能性があるともしている。

Cassee ら (1997)、Cassee ら (1998a)、Cassee ら (1998b)は、硫酸塩エアロゾル、硝酸塩エアロゾル等による顕著な生体影響は認められなかったと報告している。Schlesinger と Cassee (2003)は、硝酸塩、硫酸塩粒子に関するレビューを行い、環境レベルの濃度では生物学的な影響はほとんどないと結論付けた。

以上をまとめると、現在の環境レベルの酸性エアロゾルが健康な個体に顕著な影響を及ぼすことを示すのは困難である。

5.6.3.6. 生物起源エアロゾル

生物起源エアロゾルとして、1) 花粉及びその断片、2) 菌類及び孢子、3) 腐植土のような物質、4) 動物の残骸、例えばダニやその糞、5) 細菌及びその断片、例えば、エンドトキシン、6) ポリグルコース成分、7) ウィルス等が含まれる。菌類及び真菌孢子は屋外のバイオエアロゾルの最大の成分であり、アレルギー性鼻炎、喘息、アレルギー性マイコシス等と関連している (U.S.EPA (2004))。また、花粉は上気道に堆積してアレルギー性鼻炎を起こす。細菌の毒性のほとんどは、外側の細胞膜に存在するエンドトキシンによるものであり、サイトカインの産生及び炎症のカスケードを引き起こす (U.S.EPA (2004))。大気中粒子状物質(coarse)による強い肺の炎症の原因として、エンドトキシンの関与を示唆する報告がある (Schins ら (2004))が、通例エンドトキシンの大気中濃度は非常に低い。

以上をまとめると、生物起源エアロゾルとして花粉及び菌・孢子によるアレルギー、エンドトキシンによる肺の炎症が問題となる。しかしこれらの成分は主に粗大粒子モードに存在し、微小粒子状物質による毒性を引き起こす成分として示すことは困難である。

5.6.3.7. その他

曝露影響評価報告書 (毒性分野) (環境省 (2007)) によると、CAPs 中の EC 濃度、 NH_4^+ 濃度、 NO_3^- 濃度、OC 濃度、 SO_4^{2-} 濃度、CAPs 濃度と心拍数、血圧、深部体温の生体影響指標の間に明確な関係を予測させる成分は認められなかった。

5.6.3.8. まとめ

微小粒子状物質の成分である EC、OC、酸性エアロゾル (H_2SO_4 、 HNO_3 等)、Br、Cl、 NH_3 、ピレン、PAH、ニトロ PAH、Si、金属 (Al、V、Ni、Fe、Pb、Ca、Mn、Cu、Zn、Mg、Ti、La、Cd、In、Co 等) の毒性について検討した。これらの成分と毒性発現との関係の重要性を示唆する論文もあるが、結果は必ずしも一様ではなかった。CAPs の中に含まれる成分と毒性に関する研究は非常に限定的であり、微小粒子状物質の毒性は特定の成分により引き起こされるという明確な証拠はなかった。

5.7. 粒径と健康影響の関係

5.7.1. 仮説の紹介

不溶性の微小な粒子の場合、粒子の質量が同じとすると粗大粒子に比し表面積や個数が（それぞれ粒径比及び粒径比の二乗に逆比例することから）極めて大きくなる。粒子の表面の性状が毒性と関連する場合、表面積が大きくなると毒性が強くなる可能性がある。

粒子状物質について、粒径の大きさによって健康影響が異なる可能性があることから、毒性学の観点からも検証を行うため、平均粒径が異なり、曝露あるいは投与した粒子の質量濃度あるいは質量や化学的な組成が同一な粒子を用いた条件のもと細胞への曝露や気管内投与あるいは吸入曝露した実験の結果を以て、仮説「粒径（表面積の大きさ等）により健康影響（細胞損傷・炎症の強さ）に違いがある」の検証を行うこととする。

5.7.2. 論文の紹介

一つの研究の中で、平均粒径の異なる各種粒子を曝露した研究については、数が少ないものの、カーボンブラック(CB)、TiO₂、テフロン、ポリスチレン、Al₂O₃、Ga₂O₃、Ni含有粒子等を用いた研究がある。

Koike と Kobayashi (2006)は、14、56 及び 95nm の CB 粒子の酸化能を還元剤であるジチオスレイトールの消費でみると粒径の小さいものが同一質量の場合大きいこと、粒子の表面積と消費量がよく相関すること、ラット肺胞上皮細胞 (SV40T2) と肺胞マクロファージに曝露したときの酸化ストレスをヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の誘導で観察すると同一質量の場合粒径の小さいものの方が HO-1 を誘導することを見出した。

Monteiller ら (2007)は、難溶解性低毒性粒子(LSLTP)の表面積が、炎症反応を引き起こす作用の指標となるか検討するため、ヒト肺胞上皮の細胞系 A549 を用いた *in vitro* 試験を実施した。細胞を LSLTP として TiO₂ と CB の微小粒子と超微小粒子に曝露するとともに、反応性の高い表面構造を有する DQ12 石英粒子に曝露し、前炎症作用のマーカーである IL-8mRNA、IL-8 タンパク質の放出量と、酸化ストレスの指標としてグルタチオン(GSH、glutathione)を測定した。その結果、質量用量としては同用量の TiO₂ 微小粒子や CB 微小粒子と比較して、TiO₂ 超微小粒子と CB 超微小粒子はより強い前炎症反応を起こした。また、GSH 分析の結果は、表面積として同用量の微細金属粒子(Co、Ni)と TiO₂ 超微小粒子は、同等の酸化ストレスを細胞に及ぼすことが示された。反応性の高い表面構造を持つ DQ12 石英は、他の粒子状物質と比較してより炎症を起こしやすかった。これらの *in vitro* 試験で観測された用量反応関係は用量が標準化されていれば、*in vivo* 試験で示された用量反応関係と類似しているように見

えた。in vitro、in vivo の両方のデータセットによると、細胞表面積に対する粒子状物質の表面積として用量を表現したとき、約 $1\sim 10\text{cm}^2/\text{cm}^2$ に閾値が存在していることが示唆された。in vitro、in vivo とともに、LSLTP の用量を質量で表現するよりも表面積によって表現する方が、より適切であることが示された。

Oberdörster ら (2000)は、20 及び 250nm の TiO_2 粒子をラットに気管内投与し、24 時間後の肺胞洗浄液中の好中球の数を指標に炎症惹起作用を検討した。同一質量の場合、粒径の小さい 20nm の TiO_2 粒子のほうが 250nm の TiO_2 粒子よりも炎症惹起作用が強いこと、粒子の表面積に依存し炎症惹起作用が強くなることを見出された。

Tran ら (2000)は、Wistar ラットに対して、 TiO_2 と BaSO_4 のエアロゾルを吸入曝露した。 TiO_2 と BaSO_4 粒子の粒径は、MMAD として $2.1\ \mu\text{m}$ と $4.3\ \mu\text{m}$ であった。曝露濃度は、 TiO_2 : 25、50 mg/m^3 、 BaSO_4 : 37.5、75 mg/m^3 であり、曝露期間は、約 100~200 日であった。肺への負荷量は、粒子の重量、個数、表面積で表現した。

結果は肺負荷を粒子の総表面積として表現したとき、2 種類の粒子に起因する炎症反応 (BAL 中の好中球数や肺胞マクロファージ数) やリンパ節への移動の差異について、最もよく説明することが可能であることを示した。総表面積と炎症やリンパ節への移動との関連性をみると、肺負荷として表面積で約 200~300 cm^2 に閾値があることが示唆されている。

Brown ら (2001)は、64、202 及び 535nm のポリスチレン粒子をラットに気管内投与し 24 時間後の肺胞洗浄液中の好中球数を指標に炎症惹起作用を検討した。同一質量の場合、粒径の小さいポリスチレン粒子の方が炎症惹起作用が強いこと、粒子の表面積に依存し炎症惹起作用が強くなることを見出された。

これらの報告は、不溶性の粒子で表面の性状がほぼ同じと考えられる場合には、粒子の毒性は表面積に依存すること、同一質量の場合、粒径の小さい粒子の方が表面積が大きくなり毒性が強くなることを示唆している。

Oberdörster と Yu (1990)は、粒子表面積と肺腫瘍発生率との関連性をディーゼル及びその他の粒子の吸入研究の発表論文の評価により検討した。ラットにおける腫瘍誘発は、PAH 含有量に関係なく、粒子重量、粒子容積、粒子数等よりも、肺内に滞留した粒子の表面積に最も高い関連性を示した。この結果より、DE に曝露されたラットの腫瘍反応においては、粒子の表面積 (臨界表面積: Critical surface) 及びその特性が決定的な役割を果し、吸着された PAHs の関与は少ないことが示唆されている。DEP は、ラットにおいて特異的な発がん影

響を発現せず、むしろ粒子自体の非特異的影響が大きいとしている。

Oberdörster (1996)は、ラットに対する様々な粒子を曝露した慢性吸入曝露試験によって、粒子状物質が、肺クリアランスの障害、慢性肺炎症、肺線維症、及び肺腫瘍等を含む重要な健康影響を及ぼすことを示した。曝露された用量の範囲は、数 mg~250mg/m³であった。用量は、多くの場合、重量で表現されるが、これは観測された健康影響との相関関係を検討するための適切な用量ではない可能性がある。

例えば、肺胞マクロファージによる粒子状物質のクリアランスへの効果は、粒子状物質の体積で示した負荷量と最もよく関連し、粒子状物質による肺の炎症反応は、微小粒子状物質の表面積で示した負荷量と最もよく関連性が示される。粒子状物質の粒子径と表面積は、吸入した粒子状物質への反応において重要であり、ラットに TiO₂ や CB の超微小粒子を吸入曝露させると、より粒径の大きい粒子と比較すると、質量で示すとかなり低い用量において肺腫瘍が誘導された。しかしながら、異なるタイプの超微粒子の影響を表面積のみで説明することはできず、吸入された粒子の動態等も関連してくる。また、実験系の種差の問題もある。異なったエンドポイントに対する曝露反応関係や用量反応関係は、有害な作用が全く起こらない閾値の存在を示唆している。閾値については、呼吸器官における防御機構等で説明されている。慢性試験と亜慢性試験では、曝露時間の違いによって、用量反応関係や閾値がシフトする可能性があり、このようなシフトが存在することは、粒子状物質の亜慢性吸入曝露試験の結果から閾値を判断する際に困難な面があると述べている。

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。

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 0 μ g/個体、25 μ g/個体、125 μ g/個体、625 μ g/個体)を 4 回反復気管内投与した際の肺とリンパ節での炎症性サイトカイン・ケモカインと粒子サイズ、粒子濃度との関係について検討した。その結果、以下の 6 つの結論を示

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-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL-2、CCL-3 が濃度依存性に増加し、95nm でも同様な傾向を認めたが、IL-6、TNF- α の変動は少なかった。④縦隔リンパ節で粒子を少なくとも 3 個以上貪食している細胞数は、14nm、95nm 両方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-3 mRNA 量は 14nm、95nm で増加したが、リンパ節では 14nm が CCL-2、CCL-3 mRNA 量の増加を示したのに対し、95nm では CCL-2 mRNA 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。

Li ら (1997)は、PM₁₀ が酸化ストレスを惹起し気道上皮の炎症や損傷をもたらすとの仮説から、ラットに PM₁₀(50~125 μ g)を気管内投与し、6 時間後の BAL で BALF の検討と BALF 白血球を培養して *in vitro* の検討を行なった。それによると、BALF の総タンパク質、LDH は増加しグルタチオンは低下していた。PM₁₀ の効果との比較で、CB 微粒子(CB : Degussa Huber NG 90、直径 200~250 nm)及び CB 超微小粒子(ufCB : Degussa printex 19、直径 20 nm)についても検討した。それによると ufCB の気管内投与は PM₁₀ よりも強い炎症所見を示したが CB では認められなかった。さらに、PM₁₀ を投与されたラットの BALF 白血球は一酸化窒素(NO)及び TNF- α の産生が高まっていた。

著者らは PM₁₀ 浮遊液を超遠心することにより得られる上清は超微小粒子成分のみを含むものと考え、この上清がプラスミド DNA の切断をもたらしたことから、PM₁₀ のフリーラジカル活性の大半は超微小粒子によるものと報告した。そして、超微小粒子のなかでも TiO₂ がフリーラジカル活性を有するものと推測した。また、*in vitro* において認められた NO や TNF- α の増加は PM₁₀ そのものによるとしながらも PM₁₀ による酸化ストレスによってもたらされた可能性もあると報告している。

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 μ m(モンタナ産石炭由来)、fine 2.5 μ m、coarse >2.5 μ m

m(西ケンタッキー産由来)で、投与量は 2mg/ml 原液から 50 μ l を投与(100 μ g/50 μ 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。

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 で鼻腔内投与し、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、450mg 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 の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。

Steerenberg ら (2006)は、ヨーロッパ 4 都市で採取した PM(coarse 2.35~8.5 μ m、fine 0.12~2.35 μ m)をラット(気管内投与 1.0、2.5mgPM;呼吸器の炎症への影響の研究)、マウス(足蹠皮下投与 100、200 μ g/個体;アジュバント活性への影響の研究)、マウス OVA 感作モデル(点鼻投与 3.0mg;抗体産生、病理組織への影響の研究)、培養細胞(in vitro)におけるサイトカインの放出への影響の研究)に投与あるいは添加し、PM の生体影響を解析した。化学成分等から 5 のクラスターにわけ、13 の影響指標との関係について解析を行った。交通に由来する元素の Zn、Pb、Hg や hopane や sterane は finePM に含まれているが、これらは呼吸器のアジュバント活性の指標と相関した。このことより、交通、燃焼やごみ焼却由来の PM はアレルギーと関連があるかもしれないとした。木材燃焼由来の粒子(多くは finePM ;63~74% < 1 μ m; 26~37% > 1 μ m)は呼吸器のアレルギー指標と関連がある可能性が示唆された。Al、Si、K、Ca、Fe を含む粒子は多くは coarsePM であり、これらは肺の刺激や急性毒性との関連がある可能性が示唆された。硫酸塩、アンモニウム塩、硝酸塩、V、Ni、Se を含む粒子は 2 次生成や長距離輸送等が関連しバックグラウンドの粒子とみなしているが、OVA と粒子の皮下投与による IgE 反応との関連がある可能性が示唆された。Na と Cl は coarsePM の海塩粒子と考えられ、CC16 と関連がある可能性が示唆された。

以上のことから、PM は多方面の生物学的反応と関連する可能性があることから PM の健康影響には多くの機構が関与している可能性、また、化学的成分との関連性の解析から燃焼由来の PM は気道のアレルギーと、地殻に含まれ

る成分を含む PM は炎症や毒性と関連する可能性が示唆されるとしている。

Schins ら (2004)は、工業地帯(都市部)と郊外より採集した粒子(2 サイズ coarse $2.5\sim 10\mu\text{m}$ 、fine $<2.5\mu\text{m}$)をラットの気管内に 0.32mg 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 のサイズの PM が、肺での強い炎症誘導することを示した。このメカニズムに、エンドトキシン及び他の汚染物質(O_3 、窒素酸化物やイオウ酸化物等)が関与している可能性が示唆された。

Vallyathan ら (1995)は、石英粒子を破砕し、破砕直後の粒子と破砕後 2 ヶ月をへた粒子をラットに吸入曝露 (5 時間/日、10 日間)し、その炎症惹起作用を検討した。破砕直後の粒子の方が破砕後 2 ヶ月をへた粒子よりもラジカル量として高いこと、炎症惹起作用が強いことが見出された。

このことは、毒性は単に表面積だけではなく表面の化学的性状が関与することを示唆していることから組成の異なる粒子を比較する場合、留意することが必要と考えられる。

5.7.3. 論文による仮説の検証

細胞に対する毒性については、粒径が小さいものほど毒性が強いことや曝露量によって毒性が増加し、曝露量を表面積で換算するとその毒性が表面積と関連することを示唆する報告がある(Koike と Kobayashi (2006)、Monteiller ら (2007))。

また、気管内投与あるいは吸入曝露実験で、肺での炎症惹起作用を観察する研究においても、粒径がより小さい粒子の毒性が強いことや炎症の程度(炎症細胞の浸潤数等)が表面積と関連することを示唆する報告もある(Oberdörster ら (2000)、Tran ら (2000)、Brown ら (2001))。また、難溶解性で低毒性の TiO_2 や CB 粒子曝露における肺腫瘍の発生率においても、質量濃度より表面積濃度のほうがより関連しているとの報告がある(Oberdörster と Yu (1990)、Oberdörster (1996))。

現実の大気中の粒子のうち粒径が異なる粒子の毒性に関して、上述の小さい粒子の毒性が強いことを示す知見は多いが(Kleinman ら (2005)、Win-Shwe ら (2005)、Li ら (1997)、Gilmour ら (2004)、Steerenberg ら (2005))、大きい粒子も毒性を認める知見は存在する(Schins ら (2004)、Steerenberg ら (2006))。現実の大気中では粒径が異なると粒子の化学的組成や生物学的組成が異なることが予想される。毒性は単に表面積だけではなく表面の化学的性状が関与することが示唆されていること(Vallyathan ら (1995))から現実の大気中の粒子の場合においてはこれらの因子が毒性及び影響機構に寄与するものと考えられる。このため、粒子の健康影響については粒径の大きさのみならず粒

子の化学的・生物学的組成等の各種因子も考慮に入れて検討を行うことが妥当である。

5.8. まとめ

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、毒性学の影響メカニズムに関する知見を整理し評価を行った。具体的には、各器官における粒子状物質の影響に関して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(般大気、ROFA (Residual Oil Fly Ash)、DEP (Diesel Exhaust Particles) 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った。以下に各器官における評価のまとめを記述する。

5.8.1. 呼吸器系への影響

呼吸器系への影響について検証する仮説として、1) 肺障害及び炎症を誘導する；2) 気道反応性の亢進及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影響に差異が生じる；5) 複合大気汚染により影響が増悪する を挙げた。

以上の仮説の確からしさに対する現状での評価は、以下のようにまとめられるものと考えられる。1) 肺障害及び炎症を誘導する仮説に関して、粒子状物質の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の曝露により肺障害が生じることが認められている。2) 気道反応性の亢進及び喘息の悪化がみられる仮説に関して、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亢進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 (Diesel Exhaust) 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。3) 呼吸器感染に対する感受性が亢進する仮説に関して、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亢進が認められている。4) 疾患モデル動物では影響に差異が生じる仮説に関して、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、これらの結果が疾患を有するヒトにも同様に適用できるかについては議論がある。5) 複合大気汚染により影響が増悪する仮説に関して、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。

5.8.2. 循環器系(心血管系)への影響

循環器系(心血管系)への影響について検証する仮説として、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) 複合大気汚染物質により影響の増悪が生じる、を挙げた。

以上の仮説の確からしさに対する現状での評価は以下のようにまとめられるものと考えられる。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仮説に関して、影響が見られないとする知見もあるが、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。この相違の原因は不明な点が多いものの、粒子状物質の吸入により実験動物に不整脈に関連する変化が生じやすくなることが示唆される。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仮説に関して、CAPs (Concentrated Ambient Particles) 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なるものと考えられる。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仮説に関して、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。4) 血液の凝固線溶系への影響がみられる仮説に関して、粒子状物質や DEP 曝露に関する動物実験の結果から、血液成分に影響が現れるとする報告が多い。多くの実験で、血液凝固系が活性化し、血栓の形成を誘導することが示唆された。これらの結果は、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方向性が一致している。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、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) 心機能変化に呼吸器系の刺激が影響する仮説に関して、動物実験から、呼吸器刺激は心血管系へ少なからず影響を及ぼすものと思われる。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仮説に関して、血液中に移行した超微小粒子状物質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。これらの微小粒子状物質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も考えられる。大気中の粒子状物質や DEP は血液凝固系を促進しうるということが示唆されているが、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。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仮説に関して、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。8) 複合大気汚染物質により影響の増悪が生じる仮説に関して、微小粒子状物質以外の他の要因による複合影響に関する研究は少ないが、肺へのオゾンや寒冷ストレス（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。

5.8.3. 免疫系その他への影響

免疫系その他への影響について検証する仮説として、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；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 を挙げた。以上の仮説の確からしさに対する現状での評価は以下のようにまとめられるものと考えられる。1) 呼吸器における感染抵抗性が低下する仮説に関して、CAPs や DE 曝露は、肺胞マクロファージの持つ殺菌能を低下させ、インターフェロン産生を抑制し、*Streptococcus pneumonia*、*S. 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(T helper cells 2)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、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、さらなる研究の実施が望まれる。2) アレルギー性疾患が増悪する仮説に関して、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。3) 生殖器への影響が生じる仮説に関して、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。4) 神経・行動への影響が生じる仮説に関して、動物実験は、DE、CAPs や ME (Motorcycle Exhaust) 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。

5.8.4. 変異原性・遺伝子傷害性及び発がん影響

発がん影響について検証する仮説として、1) 都市大気微小粒子は変異原性・遺伝子傷害性を有する；2) 都市大気微小粒子は発がん性を有する を挙げた。以上の仮説の確からしさに対する現状での評価は以下のようにまとめられる

ものと考えられる。1) 都市大気微小粒子は変異原性・遺伝子傷害性を有する仮説に関して、都市及び工業地域の都市大気微小粒子が変異原性、遺伝子傷害性を有することは微生物、培養細胞あるいは実験動物を用いた検討から支持されている。2) 都市大気微小粒子は発がん性を有する仮説に関して、大気微小粒子を実験動物へ長期間曝露し肺腫瘍発生等を検討した例はほとんどなく、大気微小粒子に関する発がん性の実験的根拠は不足している。

都市大気微小粒子への寄与が大きいとされている DEP のヒト発がん性は遺伝子傷害性及び各種職業集団を対象とした疫学調査により示唆されている。ただ、実験動物における DE 吸入実験の成績は、ラットで肺腫瘍発生影響を認めているが、高濃度曝露でラットに特異的な過剰負荷による結果であり、ヒトへの外挿には不適切であると指摘されている。一方、メカニズムの面から見ると、DEP は沈着後に肺組織内で炎症あるいは貪食されたマクロファージを介して活性酸素を産生し 8-OHdG (8-hydroxy-deoxyguanosine) 等、変異の原因となる DNA 損傷を引き起こすことや、微量でも強力な変異原性を有するニトロ PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) 等が DNA と付加体を形成することによって発がんに関与する可能性のあることが示されている。

都市大気微小粒子の発がん性に関しては、都市大気微小粒子自体の発がん性の実験的根拠は不足しているものの、曝露情報から都市大気微小粒子を構成する成分として DEP や燃料燃焼由来粒子を含むことから、発がんに関与することが示唆される。しかしながら、都市大気微小粒子の質量濃度や成分組成は地域や時間によって変動し一様ではないことから、粒子が一様に発がん影響を有すると判定することは困難である。

5.8.5. 粒子成分と健康影響の関係

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、比較が可能な動物実験（吸入曝露、気管内投与）による知見を対象とし、粒子状物質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検証するための仮説としては、「微小粒子状物質の毒性は特定の成分により引き起こされる」を挙げた。

この仮説の確からしさに対する現状での評価は以下のようにまとめられるものと考えられる。微小粒子状物質の成分である元素状炭素、有機炭素、酸性エアロゾル (H_2SO_4 、 HNO_3 等)、Br、Cl、 NH_3 、ピレン、PAH、ニトロ PAH、Si、金属 (Al、V、Ni、Fe、Pb、Ca、Mn、Cu、Zn、Mg、Ti、La、Cd、In、Co 等) の毒性について検討した。これらの成分と毒性発現との関係の重要性を示唆する論文もあるが、結果は必ずしも一様ではなかった。CAPs の中に含まれる成分と毒性に関する研究は非常に限定的であり、微小粒子状物質の毒性は特定の成分により引き起こされるという明確な証拠はなかった。

5.8.6. 粒径と健康影響の関係

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、比較が可能な動物実験（吸入曝露、気管内投与）による知見を対象とし、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ための仮説として、粒径（表面積の大きさ等）により健康影響（細胞損傷・炎症の強さ）に違いがあるを挙げた。この仮説の確からしさに対する現状での評価は以下のようにまとめられるものと考えられる。

小さい粒子の毒性が強いことを示す知見は多いが、大きい粒子にも毒性を認める知見は存在する。現実の大気中では粒径が異なると粒子の化学的組成や生物学的組成が異なることが予想され、このため現実の大気中の粒子の場合においてはこれらの因子が毒性及び影響機構に寄与するものと考えられる。このため、一概に粒径の大きさのみによって毒性が決定されるものではなく、こうした各種因子も考慮に入れて検討を行うことが妥当である。

5.8.7. 粒子状物質に対する高感受性

粒子状物質の健康影響に対する高感受性についての現状は以下のようにまとめられるものと考えられる。粒子状物質の健康影響に対する感受性の影響は、年齢、遺伝性素因、既存疾患等、種々の宿主要因に左右される可能性がある。これらの影響メカニズムを観察するため、毒性学に関する研究が行われているものの、倫理上の観点から、環境と宿主に関連した変数については、主に動物モデルを用いた検討が進められている。

複数の疫学研究で、粒子状物質の曝露が、高齢者や小児あるいは既存疾患を有する集団に対して、より影響を生じさせることを示す知見が存在する。しかし、高齢あるいは若齢動物が粒子状物質に対し感受性が高いとする報告は、現在のところ、少数である。一方、既存疾患によって粒子状物質やその成分の曝露に対する病態生理学的応答が変わり得ることは広く認められている。疾患モデル動物を用いた研究の多くは未だ進行中の段階にあり、より綿密に検討、追跡される必要はあるが、易感染性宿主、アレルギー性喘息、肺高血圧、虚血性心疾患を持つ宿主では、吸入した粒子状物質に対する感受性が高まることを示唆する報告がある。遺伝的感受性に関しては、近年、グルタチオンSトランスフェラーゼ多型とDEPのアジュバント効果の間に関連があることが報告されている。

5.8.8. 共存汚染物質との相互作用

共存汚染物質との相互作用についての現状は以下のようにまとめられるものと考えられる。大気は、粒径や組成が異なる様々な粒子状物質と、多くのガス状共存汚染物（O₃、SO₂、NO₂、CO等）等の混合物で構成されている。粒子状

物質とガス状共存汚染物質の毒性学的な相互作用は相加的・相乗的若しくは相殺的なものが存在しうる。また、これらの相互作用は、混合物中の汚染物の化学的組成、大きさ、濃度、比率、曝露期間、さらに検討されるエンドポイントによって異なる可能性もある。これらの状況より、種々の相互作用を特定の汚染物の存在を手がかりに演繹的に予測することは困難である。

一方、粒子状物質とガス状物質の物理的・化学的な相互作用が生じる機構は以下によるものと考えられている。

- (1) ガス状物質と粒子状物質の化学的相互作用による 2 次生成物の形成
- (2) ガス状物質の粒子状物質への吸収・吸着、その後の末梢気道領域への運搬

しかし、粒子状物質とガス状汚染物質に関するこれまでの研究からは、粒子状物質とガス状汚染物質が、その組み合わせにより相加的・相乗的若しくは相殺的な作用を及ぼすことを示す証拠は、比較的限られたものしか得られていない。

5. 9. 参考文献

- Alessandrini, F., Schulz, H., Takenaka, S., Lentner, B., Karg, E., Behrendt, H. & Jakob, T. (2006) Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 824-830.
- Alexis, N.E., Lay, J.C., Zeman, K., Bennett, W.E., Peden, D.B., Soukup, J.M., Devlin, R.B. & Becker, S. (2006) Biological material on inhaled coarse fraction particulate matter activates airway phagocytes in vivo in healthy volunteers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 1396-1403.
- Alink, G.M., Sjogren, M., Bos, R.P., Doekes, G., Kromhout, H. & Scheepers, P.T. (1998) Effect of airborne particles from selected indoor and outdoor environments on gap-junctional intercellular communication. *Toxicology Letters*, 96-97, 209-213.
- Bünger, J., Müller, M.M., Krahl, J., Baum, K., Weigel, A., Hallier, E. & Schulz, T.G. (2000) Mutagenicity of diesel exhaust particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis*, 15, 391-397.
- Bagate, K., Meiring, J.J., Gerlofs-Nijland, M.E., Cassee, F.R., Wiegand, H., Osornio-Vargas, Á.R. & Borm, P.J. (2006) Ambient particulate matter affects cardiac recovery in a Langendorff ischemia model. *Inhalation Toxicology*, 18, 633-643.
- Bagate, K., Meiring, J.J., Gerlofs-Nijland, M.E., Vincent, R., Cassee, F.R. & Borm, P.J. (2004) Vascular effects of ambient particulate matter instillation in spontaneous hypertensive rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197, 29-39.
- Ball, J.C. & Young, W.C. (1992) Evidence for a new class of mutagens in diesel particulate extracts. *Environ Sci Technol*, 26, 2181 - 2186.
- Barfknecht, T.R., Andon, B.M., Thilly, W.G. & Hites, R.A. (1981) Soot and mutation in bacteria and human cells. In *Chemical analysis and biological fate: Polynuclear aromatic hydrocarbons* Cooke, M. & A.J.Dennis (eds) pp. 2. Battelle Press: Columbus, OH.
- Batalha, J.R., Saldiva, P.H., Clarke, R.W., Coull, B.A., Stearns, R.C., Lawrence, J., Murthy, G.G., Koutrakis, P. & Godleski, J.J. (2002) Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environmental Health Perspectives*, 110, 1191-1197.
- Bechtold, W.E., Henderson, T.R. & Brooks, A.L. (1986) Isolation, identification and bacterial mutagenicity of 2-nitro-9-fluorenone from diesel-exhaust particle extracts. *Mutation Research*, 173, 105-109.
- Bond, J.A., J.R., H., R.F., H., J.L., M., R.O., M. & Wolff, R.K. (1989) Molecular dosimetry of inhaled diesel exhaust. In *Assessment of inhalation hazards*, Mohr, U. (ed) pp. 315-324. Springer-Verlag: New York.
- Bond, J.A., Johnson, N.F., Snipes, M.B. & Mauderly, J.L. (1990) DNA adduct formation in rat alveolar type II cells: cells potentially at risk for inhaled diesel exhaust. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 16, 64-69.
- Bond, J.A., Wolff, R.K., Harkema, J.R., Mauderly, J.L., Henderson, R.F., Griffith, W.C. & McClellan, R.O. (1988) Distribution of DNA adducts in the respiratory tract of rats exposed to diesel exhaust. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 96, 336-346.

- Bouthillier, L., Vincent, R., Goegan, P., Adamson, I.Y., Bjarnason, S., Stewart, M., Guénette, J., Potvin, M. & Kumarathasan, P. (1998) Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *American Journal of Pathology*, 153, 1873-1884.
- Brightwell, J., Fouillet, X., Cassano-Zoppi, A.L., Bernstein, D., Crawley, F., Duchosal, F., Gatz, R., Perczel, S. & Pfeifer, H. (1989) Tumours of the respiratory tract in rats and hamsters following chronic inhalation of engine exhaust emissions. *Journal of Applied Toxicology*, 9, 23-31.
- Brightwell, J., Fouillet, X., Cassano-Zoppi, A.L., Gatz, R. & Duchosal, F. (1986) Neoplastic and functional changes in rodents after chronic inhalation of engine exhaust emissions. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 13, 471-485.
- Brown, D.M., Wilson, M.R., MacNee, W., Stone, V. & Donaldson, K. (2001) Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: A role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175, 191-199.
- Campbell, A., Oldham, M., Becaria, A., Bondy, S.C., Meacher, D., Sioutas, C., Misra, C., Mendez, L.B. & Kleinman, M. (2005) Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *Neurotoxicology*, 26, 133-140.
- Campbell, K.I., George, E.L. & Washington, I.S. (1981) Enhanced susceptibility to infection in mice after exposure to diluted exhaust from light duty diesel engines. *Environment International*, 5, 377-382.
- Campen, M.J., Costa, D.L. & Watkinson, W.P. (2000) Cardiac and thermoregulatory toxicity of residual oil fly ash in cardiopulmonary-compromised rats. *Inhalation Toxicology*, 12, 7-22.
- Campen, M.J., McDonald, J.D., Gigliotti, A.P., Seilkop, S.K., Reed, M.D. & Benson, J.M. (2003) Cardiovascular effects of inhaled diesel exhaust in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Toxicol*, 3, 353-361.
- Campen, M.J., Nolan, J.P., Schladweiler, M.C., Kodavanti, U.P., Costa, D.L. & Watkinson, W.P. (2002) Cardiac and thermoregulatory effects of instilled particulate matter-associated transition metals in healthy and cardiopulmonary-compromised rats. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 1615-1631.
- Campen, M.J., Nolan, J.P., Schladweiler, M.C., Kodavanti, U.P., Evansky, P.A., Costa, D.L. & Watkinson, W.P. (2001) Cardiovascular and thermoregulatory effects of inhaled PM-associated transition metals: a potential interaction between nickel and vanadium sulfate. *Toxicological Sciences*, 64, 243-252.
- Carero, A.D.P., Hoet, P.H.M., Verschaeve, L., Schoeters, G. & Nemery, B. (2001) Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1) *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37, 155-163.
- Cassee, F.R., Dormans, J.A.M.A., Van Loveren, H., Van Bree, L. & Rombout, P.J.A. (1997) Toxicity of Ambient Particulate Matter (PM₁₀) I. Acute toxicity study in asthmatic mice following 3-day exposure to ultrafine and fine ammonium bisulfate, a model compound for secondary aerosol fraction of PM₁₀

- Cassee, F.R., Dormans, J.A.M.A., Van Loveren, H., Van Bree, L. & Rombout, P.J.A. (1998a) Toxicity of ambient particulate matter II. Acute toxicity study in asthmatic mice following 3-day exposure to fine ammonium ferrosulfate, a model compound for secondary aerosol of PM10.
- Cassee, F.R., Dormans, J.A.M.A., Van Loveren, H., Van Bree, L. & Rombout, P.J.A. (1998b) Toxicity of ambient particulate matter III. Acute toxicity study in asthmatic mice following 3-day exposure to ultrafine and fine ammonium nitrate, a model compound for secondary aerosol fraction of PM10.
- Casto, B.C., Hatch, G.G., Huang, S.L., Lewtas, J., Nesnow, S. & Waters, M.D. (1981) Mutagenic and carcinogenic potency of extracts of diesel and related environmental emissions: In vitro mutagenesis and oncogenic transformation. *Environment International*, 5, 403-409.
- Chen, L.C. & Hwang, J.S. (2005) Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. IV. Characterization of acute and chronic effects of ambient air fine particulate matter exposures on heart-rate variability. *Inhalation Toxicology*, 17, 209-216.
- Chen, L.C. & Nadziejko, C. (2005) Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. V. CAPs exacerbate aortic plaque development in hyperlipidemic mice. *Inhalation Toxicology*, 17, 217-224.
- Cheng, T.J., Hwang, J.S., Wang, P.Y., Tsai, C.F., Chen, C.Y., Lin, S.H. & Chan, C.C. (2003) Effects of concentrated ambient particles on heart rate and blood pressure in pulmonary hypertensive rats. *Environmental Health Perspectives*, 111, 147-150.
- Chescheir, G.M., Garrett, N.E., Shelburne, J.D., Huisingh, J.L. & Waters, M.D. (1981) Mutagenic effects of environmental particulates in the CHO/HGPRT system. In *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures II*, Waters, M.D., Sandhu, S.S., Huisingh, J.L., Claxton, L. & Nesnow, S. (eds) pp. 337-350. Plenum Press: New York.
- Clarke, R.W., Catalano, P., Coull, B., Koutrakis, P., Krishna Murthy, G., Rice, T. & Godleski, J.J. (2000a) Age-related responses in rats to concentrated urban air particles (CAPs). *Inhalation Toxicology*, 12, 73-84.
- Clarke, R.W., Catalano, P.J., Koutrakis, P., Murthy, G.G., Sioutas, C., Paulauskis, J., Coull, B., Ferguson, S. & Godleski, J.J. (1999) Urban air particulate inhalation alters pulmonary function and induces pulmonary inflammation in a rodent model of chronic bronchitis. *Inhalation Toxicology*, 11, 637-656.
- Clarke, R.W., Coull, B., Reinisch, U., Catalano, P., Killingsworth, C.R., Koutrakis, P., Kavouras, I., Murthy, G.G., Lawrence, J., Lovett, E., Wolfson, J.M., Verrier, R.L. & Godleski, J.J. (2000b) Inhaled concentrated ambient particles are associated with hematologic and bronchoalveolar lavage changes in canines. *Environmental Health Perspectives*, 108, 1179-1187.
- Creason, J., Neas, L., Walsh, D., Williams, R., Sheldon, L., Liao, D. & Shy, C. (2001) Particulate matter and heart rate variability among elderly retirees: the Baltimore 1998 PM study. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 11, 116-122.
- Crebelli, R., Conti, L., Crochi, B., Carere, A., Bertoli, C. & Del Giacomo, N. (1995) The effect of fuel composition on the mutagenicity of diesel engine exhaust. *Mutation Research*, 346, 167-172.

- Crebelli, R., Fuselli, S., Conti, G., Conti, L. & Carere, A. (1991) Mutagenicity spectra in bacterial strains of airborne and engine exhaust particulate extracts. *Mutation Research*, 261, 237-248.
- Curren, R.D., Kouri, R.E., Kim, C.M. & Schechtman, L.M. (1981) Mutagenic and carcinogenic potency of extracts from diesel related environmental emissions: Simultaneous morphological transformation and mutagenesis in BALB/c 3T3 cells. *Environment International*, 5, 411-415.
- Dasenbrock, C., Peters, L., Creutzenberg, O. & Heinrich, U. (1996) The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. *Toxicology Letters*, 88, 15-21.
- Depass, L.R., Chen, K.C. & Peterson, L.G. (1982) Dermal carcinogenesis bioassays of diesel particulates and dichloromethane extract of diesel particulates in C3H mice. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 10, 321-327.
- Diaz-Sanchez, D., Dotson, A.R., Takenaka, H. & Saxon, A. (1994) Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *Journal of Clinical Investigation*, 94, 1417-1425.
- Diaz-Sanchez, D., Garcia, M.P., Wang, M., Jyrjala, M. & Saxon, A. (1999) Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104, 1183-1188.
- Diaz-Sanchez, D., Jyrjala, M., Ng, D., Nel, A. & Saxon, A. (2000a) In vivo nasal challenge with diesel exhaust particles enhances expression of the CC chemokines rantes, MIP-1alpha, and MCP-3 in humans. *Clinical Immunology*, 97, 140-145.
- Diaz-Sanchez, D., Penichet-Garcia, M. & Saxon, A. (2000b) Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106, 1140-1146.
- Diaz-Sanchez, D., Tsien, A., Casillas, A., Dotson, A.R. & Saxon, A. (1996) Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98, 114-123.
- Diaz-Sanchez, D., Tsien, A., Fleming, J. & Saxon, A. (1997) Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *Journal of Immunology*, 158, 2406-2413.
- Dreher, K.L., Jaskot, R.H., Lehmann, J.R., Richards, J.H., McGee, J.K., Ghio, A.J. & Costa, D.L. (1997) Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 50, 285-305.
- Driscoll, K.E., Deyo, L.C., Carter, J.M., Howard, B.W., Hassenbein, D.G. & Bertram, T.A. (1997) Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis*, 18, 423-430.
- Elder, A., Couderc, J.P., Gelein, R., Eberly, S., Cox, C., Xia, X., Zareba, W., Hopke, P., Watts, W., Kittelson, D., Frampton, M., Utell, M. & Oberdorster, G. (2007) Effects of on-road highway aerosol exposures on autonomic responses in aged, spontaneously hypertensive rats. *Inhalation Toxicology*, 19, 1-12.

- Elder, A., Gelein, R., Finkelstein, J., Phipps, R., Frampton, M., Utell, M., Kittelson, D.B., Watts, W.F., Hopke, P., Jeong, C.H., Kim, E., Liu, W., Zhao, W., Zhuo, L., Vincent, R., Kumarathasan, P. & Oberdorster, G. (2004) On-road exposure to highway aerosols. 2. Exposures of aged, compromised rats. *Inhalation Toxicology*, 16 Suppl 1, 41-53.
- Elder, A.C.P., Gelein, R., Finkelstein, J.N., Cox, C. & Oberdorster, G. (2000a) Endotoxin priming affects the lung response to ultrafine particles and ozone in young and old rats. *Inhalation Toxicology*, 12, 85-98.
- Elder, A.C.P., Gelein, R., Finkelstein, J.N., Cox, C. & Oberdorster, G. (2000b) Pulmonary inflammatory response to inhaled ultrafine particles is modified by age, ozone exposure, and bacterial toxin. *Inhalation Toxicology*, 12, 227-246.
- Enya, T., Suzuki, H., Watanabe, T., Hirayama, T. & Hisamatsu, Y. (1997) 3-Nitrobenzanthrone, a Powerful Bacterial Mutagen and Suspected Human Carcinogen Found in Diesel Exhaust and Airborne Particulates. *Environ Sci Technol*, 31, 2772 - 2776.
- Fernandez, A., Wendt, J.O., Cenni, R., Young, R.S. & Witten, M.L. (2002) Resuspension of coal and coal/municipal sewage sludge combustion generated fine particles for inhalation health effects studies. *Science of the Total Environment*, 287, 265-274.
- Finch, G.L., Hobbs, C.H., Blair, L.F., Barr, E.B., Hahn, F.F., Jaramillo, R.J., Kubatko, J.E., March, T.H., White, R.K., Krone, J.R., Ménache, M.G., Nikula, K.J., Mauderly, J.L., Van Gerpen, J., Merceica, M.D., Zielinska, B., Stankowski, L., Burling, K. & Howell, S. (2002) Effects of subchronic inhalation exposure of rats to emissions from a diesel engine burning soybean oil-derived biodiesel fuel. *Inhalation Toxicology*, 14, 1017-1048.
- Fujieda, S., Diaz-Sanchez, D. & Saxon, A. (1998) Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces *In vivo* IgE isotype switching. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 19, 507-512.
- Fujimaki, H., Nohara, O., Ichinose, T., Watanabe, N. & Saito, S. (1994) IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particulates and antigen. *Toxicology*, 92, 261-268.
- Fujimaki, H., Saneyoshi, K., Shiraishi, F., Imai, T. & Endo, T. (1997) Inhalation of diesel exhaust enhances antigen-specific IgE antibody production in mice. *Toxicology*, 116, 227-233.
- Gallagher, J., George, M., Kohan, M., Thompson, C., Shank, T. & Lewtas, J. (1993) Detection and comparison of DNA adducts after *in vitro* and *in vivo* diesel emission exposures. *Environmental Health Perspectives*, 99, 225-228.
- Gallagher, J., Heinrich, U., George, M., Hendee, L., Phillips, D.H. & Lewtas, J. (1994) Formation of DNA adducts in rat lung following chronic inhalation of diesel emissions, carbon black and titanium dioxide particles. *Carcinogenesis*, 15, 1291-1299.
- Gardner, S.Y., Lehmann, J.R. & Costa, D.L. (2000) Oil fly ash-induced elevation of plasma fibrinogen levels in rats. *Toxicological Sciences*, 56, 175-180.
- Gavett, S.H., Haykal-Coates, N., Copeland, L.B., Heinrich, J. & Gilmour, M.I. (2003) Metal composition of ambient PM_{2.5} influences severity of allergic airways disease in mice. *Environmental Health Perspectives*, 111, 1471-1477.

- Gavett, S.H., Madison, S.L., Dreher, K.L., Winsett, D.W., McGee, J.K. & Costa, D.L. (1997) Metal and sulfate composition of residual oil fly ash determines airway hyperreactivity and lung injury in rats. *Environmental Research*, 72, 162-172.
- Gerlofs-Nijland, M.E., Boere, A.J., Leseman, D.L., Dormans, J.A., Sandström, T., Salonen, R.O., van Bree, L. & Cassee, F.R. (2005) Effects of particulate matter on the pulmonary and vascular system: time course in spontaneously hypertensive rats. *Part Fibre Toxicol*, 2, 2.
- Ghio, A.J. & Devlin, R.B. (2001) Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164, 704-708.
- Ghio, A.J. & Huang, Y.C. (2004) Exposure to concentrated ambient particles (CAPs): a review. *Inhalation Toxicology*, 16, 53-59.
- Ghio, A.J., Kim, C. & Devlin, R.B. (2000) Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162, 981-988.
- Gilmour, M.I., O'Connor, S., Dick, C.A., Miller, C.A. & Linak, W.P. (2004) Differential pulmonary inflammation and in vitro cytotoxicity of size-fractionated fly ash particles from pulverized coal combustion. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 54, 286-295.
- Godleski, J.J., Verrier, R.L., Koutrakis, P., Catalano, P., Coull, B., Reinisch, U., Lovett, E.G., Lawrence, J., Murthy, G.G., Wolfson, J.M., Clarke, R.W., Nearing, B.D. & Killingsworth, C. (2000) Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient air particles. *Research Report / Health Effects Institute*, 5-88; discussion 89-103.
- Goldsmith, C.A., Ning, Y., Qin, G., Imrich, A., Lawrence, J., Murthy, G.G., Catalano, P.J. & Kobzik, L. (2002) Combined air pollution particle and ozone exposure increases airway responsiveness in mice. *Inhalation Toxicology*, 14, 325-347.
- Gong, H., Jr., Linn, W.S., Sioutas, C., Terrell, S.L., Clark, K.W., Anderson, K.R. & Terrell, L.L. (2003) Controlled exposures of healthy and asthmatic volunteers to concentrated ambient fine particles in Los Angeles. *Inhalation Toxicology*, 15, 305-325.
- Gordon, T., Nadziejko, C., Chen, L.C. & Schlesinger, R. (2000) Effects of concentrated ambient particles in rats and hamsters: an exploratory study. *Research Report / Health Effects Institute*, 5-34; discussion 35-42.
- Gordon, T., Nadziejko, C., Schlesinger, R. & Chen, L.C. (1998) Pulmonary and cardiovascular effects of acute exposure to concentrated ambient particulate matter in rats. *Toxicology Letters*, 96-97, 285-288.
- Granville, C.A., Hanley, N.M., Mumford, J.L. & DeMarini, D.M. (2003) Mutation spectra of smoky coal combustion emissions in *Salmonella* reflect the TP53 and KRAS mutations in lung tumors from smoky coal-exposed individuals. *Mutation Research*, 525, 77-83.
- Grimmer, G., Brune, H., Dettbarn, G., Jacob, J., Misfeld, J., Mohr, U., Naujack, K.-W., Timm, J. & Wenzel-Hartung, R. (1991) Relevance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 339, 792-795.

- Grimmer, G., Brune, H., Deutsch-Wenzel, R., Dettbarn, G., Jacob, J., Naujack, K.W., Mohr, U. & Ernst, H. (1987) Contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitro-derivatives to the carcinogenic impact of diesel engine exhaust condensate evaluated by implantation into the lungs of rats. *Cancer Letters*, 37, 173-180.
- Gurgueira, S.A., Lawrence, J., Coull, B., Murthy, G.G. & Gonzalez-Flecha, B. (2002) Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environmental Health Perspectives*, 110, 749-755.
- Hahon, N., Booth, J.A., Green, F. & Lewis, T.R. (1985) Influenza virus infection in mice after exposure to coal dust and diesel engine emissions. *Environmental Research*, 37, 44-60.
- Hamada, K., Goldsmith, C.A., Goldman, A. & Kobzik, L. (2000) Resistance of very young mice to inhaled allergen sensitization is overcome by coexposure to an air-pollutant aerosol. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161, 1285-1293.
- Hamada, K., Goldsmith, C.A. & Kobzik, L. (1999) Increased airway hyperresponsiveness and inflammation in a juvenile mouse model of asthma exposed to air-pollutant aerosol. *J Toxicol Environ Health A*, 58, 129-143.
- Hamers, T.V.S., M. D.; Felzel, E. C.; Murk, A. J.; Koeman, J. H. . (2000) The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution. . *Science of the Total Environment*, 262.
- Hannigan, M.P., Cass, G.R., Penman, B.W., Crespi, C.L., Lafleur, A.L., Busby, W.F., Jr. & Thilly, W.G. (1997) Human cell mutagens in Los Angeles air. *Environ Sci Technol*, 31, 438-447.
- Hannigan, M.P., Cass, G.R., Penman, B.W., Crespi, C.L., Lafleur, A.L., Busby, W.F., Jr., Thilly, W.G. & Simoneit, B.R.T. (1998) Bioassay-directed chemical analysis of Los Angeles airborne particulate matter using a human cell mutagenicity assay. *Environ Sci Technol*, 32, 3502-3514.
- Harder, S.D., Soukup, J.M., Ghio, A.J., Devlin, R.B. & Becker, S. (2001) Inhalation of PM_{2.5} does not modulate host defense or immune parameters in blood or lung of normal human subjects. *Environmental Health Perspectives*, 109 Suppl 4, 599-604.
- Harkema, J.R., Keeler, G., Wagner, J., Morishita, M., Timm, E., Hotchkiss, J., Marsik, F., Dvonch, T., Kaminski, N. & Barr, E. (2004) Effects of concentrated ambient particles on normal and hypersecretory airways in rats. *Research Report / Health Effects Institute*, 1-68; discussion 69-79.
- Harrod, K.S., Jaramillo, R.J., Berger, J.A., Gigliotti, A.P., Seilkop, S.K. & Reed, M.D. (2005) Inhaled diesel engine emissions reduce bacterial clearance and exacerbate lung disease to *Pseudomonas aeruginosa* infection in vivo. *Toxicological Sciences*, 83, 155-165.
- Hasegawa, M.M., Nishi, Y., Tsuda, H., Inui, N. & Morimoto, K. (1988) Effects of diesel exhaust particles on chromosome aberration, sister chromatid exchange and morphological transformation in cultured mammalian cells. *Cancer Letters*, 42, 61-66.

- Hashimoto, K., Ishii, Y., Uchida, Y., Kimura, T., Masuyama, K., Morishima, Y., Hirano, K., Nomura, A., Sakamoto, T., Takano, H., Sagai, M. & Sekizawa, K. (2001) Exposure to diesel exhaust exacerbates allergen-induced airway responses in guinea pigs. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164, 1957-1963.
- Hauser, R., Rice, T.M., Krishna Murthy, G.G., Wand, M.P., Lewis, D., Bledsoe, T. & Paulauskis, J. (2003) The upper airway response to pollen is enhanced by exposure to combustion particulates: a pilot human experimental challenge study. *Environmental Health Perspectives*, 111, 472-477.
- Heinrich, U., Dungworth, D.L., Pott, F. & et al. (1994) The carcinogenic effects of carbon black particles and tar-pitch condensation aerosol after inhalation exposure of rats. *Annals of Occupational Hygiene*, 48 351-356.
- Heinrich, U., Fuhst, R., Dasenbrock, C. & et al. (1992) Long term inhalation exposure of rats and mice to diesel exhaust, carbon black and titanium dioxide. In *The Ninth Health Effects Institute Annual Conference Program Monterey, C.A.* (ed): Cambridge.
- Heinrich, U., Mohr, U., Fuhst, R. & Brockmeyer, C. (1989) Investigation of a potential cotumorogenic effect of the dioxides of nitrogen and sulfur, and of diesel-engine exhaust, on the respiratory tract of Syrian golden hamsters. *Research Report / Health Effects Institute*, 1-27.
- Heinrich, U., Muhle, H., Takenaka, S., Ernst, H., Fuhst, R., Mohr, U., Pott, F. & Stöber, W. (1986a) Chronic effects on the respiratory tract of hamsters, mice and rats after long-term inhalation of high concentrations of filtered and unfiltered diesel engine emissions. *Journal of Applied Toxicology*, 6, 383-395.
- Heinrich, U., Peters, L., Funcke, W., Pott, F., Mohr, U. & Stöber, W. (1982) Investigation of toxic and carcinogenic effects of diesel exhaust in long-term inhalation exposure of rodents. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 10, 225-242.
- Heinrich, U., Pott, F., Mohr, U. & Stöber, W. (1985) Experimental methods for the detection of the carcinogenicity and/or cocarcinogenicity of inhaled polycyclic-aromatic-hydrocarbon-containing emissions. *Carcinogenesis; A Comprehensive Survey*, 8, 131-146.
- Heinrich, U., Pott, F. & Rittinghausen, S. (1986b) Comparison of chronic inhalation effects in rodents after long-term exposure to either coal oven flue gas mixed with pyrolyzed pitch or diesel engine exhaust. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 13, 441-457.
- Heinrich, U., R. Fuhst, Rittinghausen, S., Creutzenberg, O., Bellmann, B., Koch, W. & Levsen, K. (1995) Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhalation Toxicology*, 7, 533-556.
- Heussen, G.A.H., Bouman, H.G.M., Roggeband, R., Baan, R.A., Alink, G.M. & :. (1994) ³²P-postlabelling analysis of DNA adducts in white blood cells of humans exposed to residential wood combustion particulate matter. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 23, 121-127.
- Hiramatsu, K., Saito, Y., Sakakibara, K., Azuma, A., Takizawa, H. & Sugawara, I. (2005) The effects of inhalation of diesel exhaust on murine mycobacterial infection. *Experimental Lung Research*, 31, 405-415.

- Holgate, S.T., Devlin, R.B., Wilson, S.J. & Frew, A.J. (2003a) Health effects of acute exposure to air pollution. Part II: Healthy subjects exposed to concentrated ambient particles. Research Report / Health Effects Institute, 31-50; discussion 51-67.
- Holgate, S.T., Sandstrom, T., Frew, A.J., Stenfors, N., Nordenhäll, C., Salvi, S., Blomberg, A., Helleday, R. & Soderberg, M. (2003b) Health effects of acute exposure to air pollution. Part I: Healthy and asthmatic subjects exposed to diesel exhaust. Research Report / Health Effects Institute, 1-30; discussion 51-67.
- Holguin, F., Tellez-Rojo, M.M., Hernandez, M., Cortez, M., Chow, J.C., Watson, J.G., Mannino, D. & Romieu, I. (2003) Air pollution and heart rate variability among the elderly in Mexico City. *Epidemiology*, 14, 521-527.
- Hornberg, C., Maciuleviciute, L. & Seemayer, N.H. (1996) Sister chromatid exchanges in rodent tracheal epithelium exposed in vitro to environmental pollutants. *Toxicology Letters*, 88, 45-53.
- Hornberg, C., Maciuleviciute, L., Seemayer, N.H. & Kainka, E. (1998) Induction of sister chromatid exchanges (SCE) in human tracheal epithelial cells by the fractions PM-10 and PM-2.5 of airborne particulates. *Toxicology Letters*, 96-97, 215-220.
- Houk, V.S., Early, G. & Claxton, L.D. (1991) Use of the spiral Salmonella assay to detect the mutagenicity of complex environmental mixtures. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 17, 112-121.
- Huang, Y.C., Ghio, A.J., Stonehuerner, J., McGee, J., Carter, J.D., Grambow, S.C. & Devlin, R.B. (2003) The role of soluble components in ambient fine particles-induced changes in human lungs and blood. *Inhalation Toxicology*, 15, 327-342.
- Hwang, J.S., Nadziejko, C. & Chen, L.C. (2005) Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. III. Acute and chronic effects of CAPs on heart rate, heart-rate fluctuation, and body temperature. *Inhalation Toxicology*, 17, 199-207.
- Ichinose, T., Takano, H., Miyabara, Y. & Sagai, M. (1998) Long-term exposure to diesel exhaust enhances antigen-induced eosinophilic inflammation and epithelial damage in the murine airway. *Toxicological Sciences*, 44, 70-79.
- Ichinose, T., Takano, H., Miyabara, Y., Yanagisawa, R. & Sagai, M. (1997a) Murine strain differences in allergic airway inflammation and immunoglobulin production by a combination of antigen and diesel exhaust particles. *Toxicology*, 122, 183-192.
- Ichinose, T., Takano, H., Sadakane, K., Yanagisawa, R., Yoshikawa, T., Sagai, M. & Shibamoto, T. (2004) Mouse strain differences in eosinophilic airway inflammation caused by intratracheal instillation of mite allergen and diesel exhaust particles. *Journal of Applied Toxicology*, 24, 69-76.
- Ichinose, T., Yajima, Y., Nagashima, M., Takenoshita, S., Nagamachi, Y. & Sagai, M. (1997b) Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*, 18, 185-192.
- Ichinose, T., Yamanushi, T., Seto, H. & Sagai, M. (1997c) Oxygen radicals in lung carcinogenesis accompanying phagocytosis of diesel exhaust particles. *International Journal of Oncology*, 11, 571-575.

- Ishinishi, N., Kuwabara, N., Nagase, S., Suzuki, T., Ishiwata, S. & Kohno, T. (1986) Long-term inhalation studies on effects of exhaust from heavy and light duty diesel engines on F344 rats. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 13, 329-348.
- Iwado, H., Koyano, M., Goto, S., Kira, S. & Hayatsu, H. (1994) Ubiquitous presence of mutagenic and antimutagenic components in air-borne particulates of two Japanese cities. *Mutation Research*, 322, 329-339.
- Iwai, K., Adachi, S., Takahashi, M., Moller, L., Udagawa, T., Mizuno, S. & Sugawara, I. (2000) Early oxidative DNA damages and late development of lung cancer in diesel exhaust-exposed rats. *Environmental Research*, 84, 255-264.
- Iwai, K., Higuchi, K., Udagawa, T., Ohtomo, K. & Kawabata, Y. (1997) Lung tumor induced by long-term inhalation or intratracheal instillation of diesel exhaust particles. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 49, 393-401.
- Kang, Y.J., Li, Y., Zhou, Z., Roberts, A.M., Cai, L., Myers, S.R., Wang, L. & Schuchke, D.A. (2002) Elevation of serum endothelins and cardiotoxicity induced by particulate matter (PM_{2.5}) in rats with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Toxicol*, 2, 253-261.
- Kaplan, H.L., MacKenzie, W.F., Springer, K.J., Schreck, R.M. & Vostal, J.J. (1982) A subchronic study of the effects of exposure of three species of rodents to diesel exhaust. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 10, 161-182.
- Karagianes, M.T., Palmer, R.F. & Busch, R.H. (1981) Effects of inhaled diesel emissions and coal dust in rats. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 42, 382-391.
- Kawabata, Y., Iwai, K., Udagawa, T., Tukagoshi, K. & Higuchi, K. (1986) Effects of diesel soot on unscheduled DNA synthesis of tracheal epithelium and lung tumor formation. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 13, 213-222.
- Kawabata, Y., Udagawa, T., Higuchi, K. & et al. (1994) Early one year exposure to diesel engine exhaust causes lung tumors. In *Toxic and carcinogenic effects of solid particles in the respiratory tract*, Mohr, U., Dungworth, D.L., Mauderly, J.L. & Oberdorster, G. (eds). International Life Sciences Institute Press: Washington, DC.
- Keane, M.J., Xing, S.G., Harrison, J.C., Ong, T. & Wallace, W.E. (1991) Genotoxicity of diesel-exhaust particles dispersed in simulated pulmonary surfactant. *Mutation Research*, 260, 233-238.
- Kim Oanh, N.T., Nghiem le, H. & Phyu, Y.L. (2002) Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons, toxicity, and mutagenicity from domestic cooking using sawdust briquettes, wood, and kerosene. *Environ Sci Technol*, 36, 833-839.
- Kleinman, M. & Phalen, R. (2006) Toxicological interactions in the respiratory system after inhalation of ozone and sulfuric acid aerosol mixtures. *Inhalation Toxicology*, 18, 295-303.
- Kleinman, M.T., Hamade, A., Meacher, D., Oldham, M., Sioutas, C., Chakrabarti, B., Stram, D., Froines, J.R. & Cho, A.K. (2005) Inhalation of concentrated ambient particulate matter near a heavily trafficked road stimulates antigen-induced airway responses in mice. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 55, 1277-1288.

- Kleinman, M.T., Hyde, D.M., Bufalino, C., Basbaum, C., Bhalla, D.K. & Mautz, W.J. (2003) Toxicity of chemical components of fine particles inhaled by aged rats: effects of concentration. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 53, 1080-1087.
- Kobayashi, T. & Ito, T. (1995) Diesel exhaust particulates induce nasal mucosal hyperresponsiveness to inhaled histamine aerosol. *Fundamental and Applied Toxicology*, 27, 195-202.
- Kobzik, L., Goldsmith, C.A., Ning, Y.Y., Qin, G., Morgan, B., Imrich, A., Lawrence, J., Murthy, G.G. & Catalano, P.J. (2001) Effects of combined ozone and air pollution particle exposure in mice. *Research Report / Health Effects Institute*, 5-29; discussion 31-28.
- Kodavanti, U.P., Hauser, R., Christiani, D.C., Meng, Z.H., McGee, J., Ledbetter, A., Richards, J. & Costa, D.L. (1998) Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals. *Toxicological Sciences*, 43, 204-212.
- Kodavanti, U.P., Jackson, M.C., Ledbetter, A.D., Richards, J.R., Gardner, S.Y., Watkinson, W.P., Campen, M.J. & Costa, D.L. (1999) Lung injury from intratracheal and inhalation exposures to residual oil fly ash in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Toxicol Environ Health A*, 57, 543-563.
- Kodavanti, U.P., Jaskot, R.H., Costa, D.L. & Dreher, K.L. (1997) Pulmonary proinflammatory gene induction following acute exposure to residual oil fly ash: roles of particle-associated metals. *Inhalation Toxicology*, 9, 679-701.
- Kodavanti, U.P., Mebane, R., Ledbetter, A., Krantz, T., McGee, J., Jackson, M.C., Walsh, L., Hilliard, H., Chen, B.Y., Richards, J. & Costa, D.L. (2000a) Variable pulmonary responses from exposure to concentrated ambient air particles in a rat model of bronchitis. *Toxicological Sciences*, 54, 441-451.
- Kodavanti, U.P., Moyer, C.F., Ledbetter, A.D., Schladweiler, M.C., Costa, D.L., Hauser, R., Christiani, D.C. & Nyska, A. (2003) Inhaled environmental combustion particles cause myocardial injury in the Wistar Kyoto rat. *Toxicological Sciences*, 71, 237-245.
- Kodavanti, U.P., Schladweiler, M.C., Ledbetter, A.D., Hauser, R., Christiani, D.C., McGee, J., Richards, J.R. & Costa, D.L. (2002) Temporal association between pulmonary and systemic effects of particulate matter in healthy and cardiovascular compromised rats. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 1545-1569.
- Kodavanti, U.P., Schladweiler, M.C., Ledbetter, A.D., Watkinson, W.P., Campen, M.J., Winsett, D.W., Richards, J.R., Crissman, K.M., Hatch, G.E. & Costa, D.L. (2000b) The spontaneously hypertensive rat as a model of human cardiovascular disease: evidence of exacerbated cardiopulmonary injury and oxidative stress from inhaled emission particulate matter. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164, 250-263.
- Koike, E. & Kobayashi, T. (2006) Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles. *Chemosphere*, 65.
- Kotin, P., Falk, H.L. & Thomas, M. (1955) Aromatic hydrocarbons. III. Presence in the particulate phase of diesel-engine exhausts and the carcinogenicity of exhaust extracts. *AMA Arch Ind Health*, 11, 113-120.

- Kunitake, E., Shimamura, K., Katayama, H., Takemoto, K., Yamamoto, A., Hisanaga, A., Ohya, S. & Ishinishi, N. (1986) Studies concerning carcinogenesis of diesel particulate extracts following intratracheal instillation, subcutaneous injection, or skin application. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 13, 235-252.
- Kuschner, W.G., D'Alessandro, A., Wong, H. & Blanc, P.D. (1997) Early pulmonary cytokine responses to zinc oxide fume inhalation. *Environmental Research*, 75, 7-11.
- Löfroth, G. (1981) Comparison of the mutagenic activity in carbon particulate matter and in diesel and gasoline engine exhaust. In *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures II: proceedings of the second symposium on the application of short-term bioassays in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures*, Waters, M.D., Sandhu, S.S., Huisin, J.L., Claxton, L. & Nesnow, S. (eds) pp. 319-336: Williamsburg, VA. New York, NY: Plenum Press (Hollaender, A.; Welch, B. L.; Probst, R. F., eds. *Environmental science research series: v. 22*).
- Löfroth, G., Lazaridis, G. & Rudling, L. (1986) Mutagenicity assay of emission extracts from wood stoves: comparison with other emission parameters. *Science of the Total Environment*, 58, 199-208.
- Løvik, M., Hogseth, A.K., Gaarder, P.I., Hagemann, R. & Eide, I. (1997) Diesel exhaust particles and carbon black have adjuvant activity on the local lymph node response and systemic IgE production to ovalbumin. *Toxicology*, 121, 165-178.
- Lambert, A.L., Dong, W., Selgrade, M.K. & Gilmour, M.I. (2000) Enhanced allergic sensitization by residual oil fly ash particles is mediated by soluble metal constituents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 165, 84-93.
- Lambert, A.L., Trasti, F.S., Mangum, J.B. & Everitt, J.I. (2003) Effect of preexposure to ultrafine carbon black on respiratory syncytial virus infection in mice. *Toxicological Sciences*, 72, 331-338.
- Laurie, R.D. & Boyes, W.K. (1980) Neurophysiological alterations due to diesel exhaust exposure during the neonatal life of the rat. In *Health effects of diesel engine emissions : proceedings of International Symposium on the Health Effects of Diesel Engine Emissions, December 1979*, E. Pepelko, W., M. Danner, R. & A. Clarke, N. (eds). U.S. Environmental Protection Agency, Health Effects Research Laboratory: Cincinnati, Ohio.
- Laurie, R.D., Lewkowski, J.P., Cooper, G.P. & et al. (1978) Effects of diesel exhaust on behavior of the rat. In *71st annual meeting of the Air Pollution Control Association*. Air Pollution Control Association, Pittsburgh, PA: Houston, TX.
- Lay, J.C., Bennett, W.D., Ghio, A.J., Bromberg, P.A., Costa, D.L., Kim, C.S., Koren, H.S. & Devlin, R.B. (1999) Cellular and biochemical response of the human lung after intrapulmonary instillation of ferric oxide particles. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20, 631-642.
- Lee, I.P., Suzuki, K., Lee, S.D. & Dixon, R.L. (1980) Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rat lung, liver, and male reproductive organs following inhalation exposure to diesel emission. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 52, 181-184.

- Lei, Y.C., Chan, C.C., Wang, P.Y., Lee, C.T. & Cheng, T.J. (2004a) Effects of Asian dust event particles on inflammation markers in peripheral blood and bronchoalveolar lavage in pulmonary hypertensive rats. *Environmental Research*, 95, 71-76.
- Lei, Y.C., Chen, M.C., Chan, C.C., Wang, P.Y., Lee, C.T. & Cheng, T.J. (2004b) Effects of concentrated ambient particles on airway responsiveness and pulmonary inflammation in pulmonary hypertensive rats. *Inhalation Toxicology*, 16, 785-792.
- Lewtas, J. (1983) Evaluation of the mutagenicity and carcinogenicity of motor vehicle emissions in short-term bioassays. *Environmental Health Perspectives*, 47, 141-152.
- Li, A.P., Royer, R.E., Brooks, A.L. & McClellan, R.O. (1982) Cytotoxicity of diesel exhaust particle extract--a comparison among five diesel passenger cars of different manufactures. *Toxicology*, 24, 1-8.
- Li, X.Y., Gilmour, P.S., Donaldson, K. & MacNee, W. (1996) Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax*, 51, 1216-1222.
- Li, X.Y., Gilmour, P.S., Donaldson, K. & MacNee, W. (1997) In vivo and in vitro proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10). *Environmental Health Perspectives*, 105 Suppl 5, 1279-1283.
- Liao, D., Creason, J., Shy, C., Williams, R., Watts, R. & Zweidinger, R. (1999) Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environmental Health Perspectives*, 107, 521-525.
- Liao, D., Duan, Y., Whitsel, E.A., Zheng, Z.J., Heiss, G., Chinchilli, V.M. & Lin, H.M. (2004) Association of higher levels of ambient criteria pollutants with impaired cardiac autonomic control: a population-based study. *American Journal of Epidemiology*, 159, 768-777.
- Lim, H.B., Ichinose, T., Miyabara, Y., Takano, H., Kumagai, Y., Shimojyo, N., Devalia, J.L. & Sagai, M. (1998) Involvement of superoxide and nitric oxide on airway inflammation and hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 25, 635-644.
- Lippmann, M., Gordon, T. & Chen, L.C. (2005a) Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. I. Introduction, objectives, and experimental plan. *Inhalation Toxicology*, 17, 177-187.
- Lippmann, M., Gordon, T. & Chen, L.C. (2005b) Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles in mice. IX. Integral assessment and human health implications of subchronic exposures of mice to CAPs. *Inhalation Toxicology*, 17, 255-261.
- Liu, S.H., Wang, J.H., Chuu, J.J. & Lin-Shiau, S.Y. (2002) Alterations of motor nerve functions in animals exposed to motorcycle exhaust. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 803-812.
- Madden, M.C., Richards, J.H., Dailey, L.A., Hatch, G.E. & Ghio, A.J. (2000) Effect of ozone on diesel exhaust particle toxicity in rat lung. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168, 140-148.
- Madden, M.C., Thomas, M.J. & Ghio, A.J. (1999) Acetaldehyde (CH₃CHO) production in rodent lung after exposure to metal-rich particles. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1569-1577.

- Mauderly, J.L., Banas, D.A., Griffith, W.C., Hahn, F.F., Henderson, R.F. & McClellan, R.O. (1996) Diesel exhaust is not a pulmonary carcinogen in CD-1 mice exposed under conditions carcinogenic to F344 rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 30, 233-242.
- Mauderly, J.L., Jones, R.K., Griffith, W.C., Henderson, R.F. & McClellan, R.O. (1987) Diesel exhaust is a pulmonary carcinogen in rats exposed chronically by inhalation. *Fundamental and Applied Toxicology*, 9, 208-221.
- Mauderly, J.L., Jones, R.K., McClellan, R.O., Henderson, R.F. & Griffith, W.C. (1986) Carcinogenicity of diesel exhaust inhaled chronically by rats. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 13, 397-409.
- Mitchell, A.D., Evans, E.L., Jotz, M.M., Riccio, E.S., Mortelmans, K.E. & Simmon, V.F. (1981) Mutagenic and carcinogenic potency of extracts of diesel and related environmental emissions: In vitro mutagenesis and DNA damage. *Environment International*, 5, 393-401.
- Miyabara, Y., Ichinose, T., Takano, H. & Sagai, M. (1998a) Diesel exhaust inhalation enhances airway hyperresponsiveness in mice. *International Archives of Allergy and Immunology*, 116, 124-131.
- Miyabara, Y., Takano, H., Ichinose, T., Lim, H.B. & Sagai, M. (1998b) Diesel exhaust enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157, 1138-1144.
- Miyabara, Y., Yanagisawa, R., Shimojo, N., Takano, H., Lim, H.B., Ichinose, T. & Sagai, M. (1998c) Murine strain differences in airway inflammation caused by diesel exhaust particles. *European Respiratory Journal*, 11, 291-298.
- Mohr, U. & Riebe-Imre, M. (1992) Tests on the in vitro transformation of epithelial cells of the respiratory tract by automotive exhaust gases. In *Effects of diesel engine exhausts on health* pp. 31-38. GSF Research Centre for Environment and Health Inc.: Munich.
- Molhave, L., Kjaergaard, S.K., Sigsgaard, T. & Lebowitz, M. (2005) Interaction between ozone and airborne particulate matter in office air. *Indoor Air*, 15, 383-392.
- Molinelli, A.R., Madden, M.C., McGee, J.K., Stonehuerner, J.G. & Ghio, A.J. (2002) Effect of metal removal on the toxicity of airborne particulate matter from the Utah Valley. *Inhalation Toxicology*, 14, 1069-1086.
- Monteiller, C., Tran, L., MacNee, W., Faux, S., Jones, A., Miller, B. & Donaldson, K. (2007) The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occupational and Environmental Medicine*, 64, 609-615.
- Moyer, C.F., Kodavanti, U.P., Haseman, J.K., Costa, D.L. & Nyska, A. (2002) Systemic vascular disease in male B6C3F1 mice exposed to particulate matter by inhalation: studies conducted by the National Toxicology Program. *Toxicologic Pathology*, 30, 427-434.
- Muggenburg, B.A., Barr, E.B., Cheng, Y.S., Seagrave, J.C., Tilley, L.P. & Mauderley, J.L. (2000) Effect of inhaled residual oil fly ash on the electrocardiogram of dogs. *Inhalation Toxicology*, 12 Suppl 4, 189-208.
- Muggenburg, B.A., Benson, J.M., Barr, E.B., Kubatko, J. & Tilley, L.P. (2003) Short-term inhalation of particulate transition metals has little effect on the electrocardiograms of dogs having preexisting cardiac abnormalities. *Inhalation Toxicology*, 15, 357-371.

- Muranaka, M., Suzuki, S., Koizumi, K., Takafuji, S., Miyamoto, T., Ikemori, R. & Tokiwa, H. (1986) Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 77, 616-623.
- Nadziejko, C., Fang, K., Nadziejko, E., Narciso, S.P., Zhong, M. & Chen, L.C. (2002) Immediate effects of particulate air pollutants on heart rate and respiratory rate in hypertensive rats. *Cardiovasc Toxicol*, 2, 245-252.
- Nadziejko, C., Fang, K., Narciso, S., Zhong, M., Su, W.C., Gordon, T., Nádas, A. & Chen, L.C. (2004) Effect of particulate and gaseous pollutants on spontaneous arrhythmias in aged rats. *Inhalation Toxicology*, 16, 373-380.
- Nesnow, S., Triplett, L.L. & Slaga, T.J. (1983) Mouse skin tumor initiation-promotion and complete carcinogenesis bioassays: mechanisms and biological activities of emission samples. *Environmental Health Perspectives*, 47, 255-268.
- Nightingale, J.A., Maggs, R., Cullinan, P., Donnelly, L.E., Rogers, D.F., Kinnersley, R., Chung, K.F., Barnes, P.J., Ashmore, M. & Newman-Taylor, A. (2000) Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162, 161-166.
- Nikula, K.J., Snipes, M.B., Barr, E.B., Griffith, W.C., Henderson, R.F. & Mauderly, J.L. (1995) Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 25, 80-94.
- Nordenhäll, C., Pourazar, J., Blomberg, A., Levin, J.O., Sandstrom, T. & Adelroth, E. (2000) Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *European Respiratory Journal*, 15, 1046-1051.
- Nordenhäll, C., Pourazar, J., Ledin, M.C., Levin, J.O., Sandstrom, T. & Adelroth, E. (2001) Diesel exhaust enhances airway responsiveness in asthmatic subjects. *European Respiratory Journal*, 17, 909-915.
- Oberdörster, G. (1996) Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. *Inhalation Toxicology*, 8 Suppl, 73-89.
- Oberdörster, G., Finkelstein, J.N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R. & Elder, A.C. (2000) Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Research Report / Health Effects Institute*, 5-74; disc 75-86.
- Oberdörster, G. & Yu, C.P. (1990) The carcinogenic potential of inhaled diesel exhaust: a particle effect? *Journal of Aerosol Science*, Volume 21, S397-S401.
- Ohsawa, M., OCHI, T., HAYASHI, H. . (1983) Mutagenicity in Salmonella typhimurium mutants of serum extracts from airborne particulates. *Mutation Research*, 116, 83-90
- Ohta, K., Yamashita, N., Tajima, M., Miyasaka, T., Nakano, J., Nakajima, M., Ishii, A., Horiuchi, T., Mano, K. & Miyamoto, T. (1999) Diesel exhaust particulate induces airway hyperresponsiveness in a murine model: essential role of GM-CSF. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104, 1024-1030.
- Ohyama, K., Ito, T. & Kanisawa, M. (1999) The roles of diesel exhaust particle extracts and the promotive effects of NO₂ and/or SO₂ exposure on rat lung tumorigenesis. *Cancer Letters*, 139, 189-197.

- Ohyama, K., Taguchi, K. & T.Suzuki. (1998) Adjuvant activity of diesel exhaust particles in production of specific antibodies to fungi allergen in mice. 東京都立衛生研究所研究年報, 49, 232-236.
- Orthoefer, J.G., Moore, W., Kraemer, D., Truman, F., Crocker, W. & Yang, Y.Y. (1981) Carcinogenicity of diesel exhaust as tested in strain a mice. *Environment International*, 5, 461-471.
- Park, S.K., O'Neill, M.S., Vokonas, P.S., Sparrow, D. & Schwartz, J. (2005) Effects of air pollution on heart rate variability: the VA normative aging study. *Environmental Health Perspectives*, 113, 304-309.
- Pepelko, W.E. & Peirano, W.B. (1983) Health effects of exposure to diesel engine emissions: a summary of animal studies conducted by the U.S. Environmental Protection Agency's Health Effects Research Laboratories at Cincinnati, Ohio. *J Am Coll Toxicol*, 2, 253-306.
- Pereira, M.A., Sabharwal, P.S., Gordon, L. & Wyrobek, A.J. (1981) The effect of diesel exhaust on sperm-shape abnormalities in mice. *Environment International*, 5, 459-460.
- Petrovic, S., Urch, B., Brook, J., Datema, J., Purdham, J., Liu, L., Lukic, Z., Zimmerman, B., Tofler, G., Downar, E., Corey, P., Tarlo, S., Broder, I., Dales, R. & Silverman, F. (2000) Cardiorespiratory effects of concentrated ambient PM_{2.5}: A pilot study using controlled human exposures. *Inhalation Toxicology*, 12, 173-188
- Pohjola, S.K., Lappi, M., Honkanen, M. & Savela, K. (2003) Comparison of mutagenicity and calf thymus DNA adducts formed by the particulate and semivolatile fractions of vehicle exhausts. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42, 26-36.
- Pott, F. & Roller, M. (1994) Relevance of non-physiologic exposure routes for carcinogenicity studies of solid particles. In *Toxic and carcinogenic effects of solid particles in the respiratory tract*, Mohr, U., Dungworth, D.L., Mauderly, J.L. & Oberdorster, G. (eds) pp. 109-125. International Life Sciences Institute Press: Washington, DC.
- Pourazar, J., Mudway, I.S., Samet, J.M., Helleday, R., Blomberg, A., Wilson, S.J., Frew, A.J., Kelly, F.J. & Sandstrom, T. (2005) Diesel exhaust activates redox-sensitive transcription factors and kinases in human airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289, L724-730.
- Putnam, K.P., Bombick, D.W., Avalos, J.T. & Doolittle, D.J. (1999) Comparison of the cytotoxic and mutagenic potential of liquid smoke food flavourings, cigarette smoke condensate and wood smoke condensate. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 1113-1118.
- Quinto, I. & de Marinis, E. (1984) Sperm abnormalities in mice exposed to diesel particulate. *Mutation Research*, 130, 242.
- Rannug, U., Sundvall, A., Westerholm, R., Alsberg, T. & Stenberg, U. (1983) Some aspects of mutagenicity testing of the particulate phase and the gas phase of diluted and undiluted automobile exhaust. . In *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures III* Waters, M.D., Sandhu, S.S., Lewtas, J., Claxton, L., Chernoff, N. & Newnow, S. (eds). New York, NY: Plenum Press; (Environmental science research: v. 27).

- Rasmussen, R.E. (1990) Effect of fuel properties on mutagenic activity in extracts of heavy-duty diesel exhaust particulate. *J Air Waste Manage Assoc*, 40, 1391-1396.
- Rhoden, C.R., Lawrence, J., Godleski, J.J. & Gonzalez-Flecha, B. (2004) N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. *Toxicological Sciences*, 79, 296-303.
- Rhoden, C.R., Wellenius, G.A., Ghelfi, E., Lawrence, J. & Gonzalez-Flecha, B. (2005) PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725, 305-313.
- Rivero, D.H., Soares, S.R., Lorenzi-Filho, G., Saiki, M., Godleski, J.J., Antonangelo, L., Dolhnikoff, M. & Saldiva, P.H. (2005) Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of Sao Paulo, Brazil. *Toxicological Sciences*, 85, 898-905.
- Rudell, B., Blomberg, A., Helleday, R., Ledin, M.C., Lundback, B., Stjernberg, N., Horstedt, P. & Sandstrom, T. (1999) Bronchoalveolar inflammation after exposure to diesel exhaust: comparison between unfiltered and particle trap filtered exhaust. *Occupational and Environmental Medicine*, 56, 527-534.
- Rudell, B., Ledin, M.C., Hammarstrom, U., Stjernberg, N., Lundback, B. & Sandstrom, T. (1996) Effects on symptoms and lung function in humans experimentally exposed to diesel exhaust. *Occupational and Environmental Medicine*, 53, 658-662.
- Rudell, B., Sandström, T., Stjernberg, N. & Kolmodin-Hedman, B. (1990) Controlled diesel exhaust exposure in an exposure chamber: pulmonary effects investigated with bronchoalveolar lavage *Journal of Aerosol Science*, 21, S411-S414
- Sagai, M., Furuyama, A. & Ichinose, T. (1996) Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). III. Pathogenesis of asthma like symptoms in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 21, 199-209.
- Sagai, M., Saito, H., Ichinose, T., Kodama, M. & Mori, Y. (1993) Biological effects of diesel exhaust particles. I. In vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse. *Free Radical Biology and Medicine*, 14, 37-47.
- Saito, Y., Azuma, A., Kudo, S., Takizawa, H. & Sugawara, I. (2002) Long-term inhalation of diesel exhaust affects cytokine expression in murine lung tissues: comparison between low- and high-dose diesel exhaust exposure. *Experimental Lung Research*, 28, 493-506.
- Saldiva, P.H., Clarke, R.W., Coull, B.A., Stearns, R.C., Lawrence, J., Murthy, G.G., Diaz, E., Koutrakis, P., Suh, H., Tsuda, A. & Godleski, J.J. (2002) Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165, 1610-1617.
- Salmeen, I.T., Pero, A.M., Zator, R., Schuetzle, D. & Riley, T.L. (1984) Ames assay chromatograms and the identification of mutagens in diesel particle extracts. *Environ Sci Technol*, 18, 375 - 382.
- Salvi, S., Blomberg, A., Rudell, B., Kelly, F., Sandstrom, T., Holgate, S.T. & Frew, A. (1999) Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159, 702-709.

- Sato, H., Sone, H., Sagai, M., Suzuki, K.T. & Aoki, Y. (2000) Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis*, 21, 653-661.
- Schiffmann, D. & Henschler, D. (1992) Studies of diesel engine exhaust fractions on the genotoxic and celltransforming properties with the model of Syrian hamster embryo fibroblasts and with lung cells. In *Effects of diesel engine exhausts on health* pp. 39-42. GSF Research Centre for Environment and Health Inc.: Munich.
- Schins, R.P., Lightbody, J.H., Borm, P.J., Shi, T., Donaldson, K. & Stone, V. (2004) Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195, 1-11.
- Schlesinger, R.B. & Cassee, F. (2003) Atmospheric secondary inorganic particulate matter: the toxicological perspective as a basis for health effects risk assessment. *Inhalation Toxicology*, 15, 197-235.
- Seagrave, J., McDonald, J.D., Gigliotti, A.P., Nikula, K.J., Seilkop, S.K., Gurevich, M. & Mauderly, J.L. (2002) Mutagenicity and in vivo toxicity of combined particulate and semivolatile organic fractions of gasoline and diesel engine emissions. *Toxicological Sciences*, 70, 212-226.
- Seemayer, N.H. & Hornberg, C. (1998) Malignant transformation of Syrian hamster kidney cells in vitro by interaction of airborne particulates and simian virus (SV-) 40. *Toxicology Letters*, 96-97, 231-238.
- Shefner, A.M., Collins, B.R., Dooley, L., Fiks, A., Graf, J.L. & Preache, M.M. (1982) Respiratory carcinogenicity of diesel fuel emissions. Interim results. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 10, 329-350.
- Silbajoris, R., Ghio, A.J., Samet, J.M., Jaskot, R., Dreher, K.L. & Brighton, L.E. (2000) In vivo and in vitro correlation of pulmonary MAP kinase activation following metallic exposure. *Inhalation Toxicology*, 12, 453-468.
- Sjogren, B. (1997) Occupational exposure to dust: inflammation and ischaemic heart disease. *Occupational and Environmental Medicine*, 54, 466-469.
- Soares, S.R., Bueno-Guimaraes, H.M., Ferreira, C.M., Rivero, D.H., De Castro, I., Garcia, M.L. & Saldiva, P.H. (2003) Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. *Environmental Research*, 92, 191-196.
- Somers, C.M., McCarry, B.E., Malek, F. & Quinn, J.S. (2004) Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. *Science*, 304, 1008-1010.
- Soukup, J.M., Ghio, A.J. & Becker, S. (2000) Soluble components of Utah Valley particulate pollution alter alveolar macrophage function in vivo and in vitro. *Inhalation Toxicology*, 12, 401-414.
- Stöber, W. (1986) Experimental induction of tumors in hamsters, mice and rats after long-term inhalation of filtered and unfiltered diesel engine exhaust. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 13, 421-439.
- Steenenbergh, P.A., van Amelsvoort, L., Lovik, M., Hetland, R.B., Alberg, T., Halatek, T., Bloemen, H.J., Rydzynski, K., Swaen, G., Schwarze, P., Dybing, E. & Cassee, F.R. (2006) Relation between sources of particulate air pollution and biological effect parameters in samples from four European cities: an exploratory study. *Inhalation Toxicology*, 18, 333-346.

- Steerenberg, P.A., Withagen, C.E., van Dalen, W.J., Dormans, J.A., Heisterkamp, S.H., van Loveren, H. & Cassee, F.R. (2005) Dose dependency of adjuvant activity of particulate matter from five European sites in three seasons in an ovalbumin-mouse model. *Inhalation Toxicology*, 17, 133-145.
- Stenfors, N., Nordenhäll, C., Salvi, S.S., Mudway, I., Soderberg, M., Blomberg, A., Helleday, R., Levin, J.O., Holgate, S.T., Kelly, F.J., Frew, A.J. & Sandstrom, T. (2004) Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *European Respiratory Journal*, 23, 82-86.
- Strandell, M., Zakrisson, S., Alsberg, T., Westerholm, R., Winquist, L. & Rannug, U. (1994) Chemical analysis and biological testing of a polar fraction of ambient air, diesel engine, and gasoline engine particulate extracts. *Environmental Health Perspectives*, 102 Suppl 4, 85-92.
- Sun, Q., Wang, A., Jin, X., Natanzon, A., Duquaine, D., Brook, R.D., Aguinaldo, J.G., Fayad, Z.A., Fuster, V., Lippmann, M., Chen, L.C. & Rajagopalan, S. (2005) Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA*, 294, 3003-3010.
- Sung, J.H., Kim, C.Y., Yang, S.O., Khang, H.S., Cheong, H.K., Lee, J.S., Song, C.W., Park, J.D., Han, J.H., Chung, Y.H., Choi, B.S., Kwon, I.H., Cho, M.H. & Yu, I.J. (2007) Changes in blood manganese concentration and MRI t1 relaxation time during 180 days of stainless steel welding-fume exposure in cynomolgus monkeys. *Inhalation Toxicology*, 19, 47-55.
- Suwa, T., Hogg, J.C., Quinlan, K.B., Ohgami, A., Vincent, R. & van Eeden, S.F. (2002) Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 39, 935-942.
- Suzuki, T., Kanoh, T., Kanbayashi, M., Todome, Y. & Ohkuni, H. (1993) The adjuvant activity of pyrene in diesel exhaust on IgE antibody production in mice. *Arerugi Japanese Journal of Allergology*, 42, 963-968.
- Takafuji, S., Suzuki, S., Koizumi, K., Tadokoro, K., Miyamoto, T., Ikemori, R. & Muranaka, M. (1987) Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 79, 639-645.
- Takaki, Y., Kitamura, S., Kuwabara, N. & Fukuda, Y. (1989) Long-term inhalation studies of exhaust from the diesel engine in F-344 rats: the quantitative relationship between pulmonary hyperplasia and anthracosis. *Experimental Pathology*, 37, 56-61.
- Takano, H., Ichinose, T., Miyabara, Y., Shibuya, T., Lim, H.B., Yoshikawa, T. & Sagai, M. (1998a) Inhalation of diesel exhaust enhances allergen-related eosinophil recruitment and airway hyperresponsiveness in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 150, 328-337.
- Takano, H., Ichinose, T., Miyabara, Y., Yoshikawa, T. & Sagai, M. (1998b) Diesel exhaust particles enhance airway responsiveness following allergen exposure in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 20, 329-336.
- Takano, H., Yoshikawa, T., Ichinose, T., Miyabara, Y., Imaoka, K. & Sagai, M. (1997) Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156, 36-42.

- Takemoto, K., Yoshimura, H. & Katayama, H. (1986) Effects of chronic inhalation exposure to diesel exhaust on the development of lung tumors in di-isopropanol-nitrosamine-treated F344 rats and newborn C57BL and ICR mice. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 13, 311-327.
- Tokiwa, H., Kitamori, S., Nakagawa, R., Horikawa, K. & Matamala, L. (1983) Demonstration of a powerful mutagenic dinitropyrene in airborne particulate matter. *Mutation Research*, 121, 107-116.
- Tran, C.L., Buchanan, D., Cullen, R.T., Searl, A., Jones, A.D. & Donaldson, K. (2000) Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhalation Toxicology*, 12, 1113-1126.
- Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamato, H., Tanaka, I., Sagai, M., Hirano, H., Nagata, N., Itoh, H. & Kasai, H. (1999) Changes in levels of 8-hydroxyguanine in DNA, its repair and OGG1 mRNA in rat lungs after intratracheal administration of diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*, 20, 1573-1576.
- Tucker, J.D., Xu, J., Stewart, J., Baci, P.C. & Ong, T.M. (1986) Detection of sister chromatid exchanges induced by volatile genotoxicants. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 6, 15-21.
- Tunncliffe, W.S., Evans, D.E., Mark, D., Harrison, R.M. & Ayres, J.G. (2001) The effect of exposure to sulphuric acid on the early asthmatic response to inhaled grass pollen allergen. *European Respiratory Journal*, 18, 640-646.
- U.S.EPA. (2002) Health Assessment Document for Diesel Engine Exhaust. EPA Report no. EPA/600/8-90/057F.
- U.S.EPA. (2004) Air quality criteria for particulate matter. EPA report no. EPA/600/P-99/002aF.
- Ulrich, M.M., Alink, G.M., Kumarathasan, P., Vincent, R., Boere, A.J. & Cassee, F.R. (2002) Health effects and time course of particulate matter on the cardiopulmonary system in rats with lung inflammation. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 1571-1595.
- Valberg, P.A. & Crouch, E.A. (1999) Meta-analysis of rat lung tumors from lifetime inhalation of diesel exhaust. *Environmental Health Perspectives*, 107, 693-699.
- Vallyathan, V., Castranova, V., Pack, D., Leonard, S., Shumaker, J., Hubbs, A.F., Shoemaker, D.A., Ramsey, D.M., Pretty, J.R., McLaurin, J.L. & et al. (1995) Freshly fractured quartz inhalation leads to enhanced lung injury and inflammation. Potential role of free radicals. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 152, 1003-1009.
- Veronesi, B., Makwana, O., Pooler, M. & Chen, L.C. (2005) Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles. VII. Degeneration of dopaminergic neurons in Apo E^{-/-} mice. *Inhalation Toxicology*, 17, 235-241.
- Vincent, R., Bjarnason, S.G., Adamson, I.Y., Hedgecock, C., Kumarathasan, P., Guénette, J., Potvin, M., Goegan, P. & Bouthillier, L. (1997) Acute pulmonary toxicity of urban particulate matter and ozone. *American Journal of Pathology*, 151, 1563-1570.
- Vincent, R., Kumarathasan, P., Goegan, P., Bjarnason, S.G., Guénette, J., Bérubé, D., Adamson, I.Y., Desjardins, S., Burnett, R.T., Miller, F.J. & Battistini, B. (2001) Inhalation toxicology of urban ambient particulate matter: acute cardiovascular effects in rats. *Research Report / Health Effects Institute*, 5-54; discussion 55-62.

- Vinitketkumnuen, U., Kalayanamitra, K., Chewonarin, T. & Kamens, R. (2002) Particulate matter, PM10 & PM2.5 levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. *Mutation Research*, 519.
- Wallace, W.E., Keane, M.J., Hill, C.A., Xu, J. & Ong, T.M. (1987) Mutagenicity of diesel exhaust particles and oil shale particles dispersed in lecithin surfactant. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 21, 163-171.
- Wallace, W.E., Keane, M.J., Xing, S., Harrison, J., Gautam, M. & Ong, T. (1990) Mutagenicity of diesel exhaust soot dispersed in phospholipid surfactants. In *Environmental Hygiene II*, Seemayer, N.H. & Hadnagy, W. (eds) pp. 7-10. Springer Verlag, Berlin,.
- Watanabe, N. & Kurita, M. (2001) The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environmental Health Perspectives*, 109, 111-119.
- Watanabe, N. & Oonuki, Y. (1999) Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environmental Health Perspectives*, 107, 539-544.
- Watkinson, W.P., Campen, M.J., Lyon, J.Y., Highfill, J.W., Wiester, M.J. & Costa, D.L. (1997) Impact of the hypothermic response in inhalation toxicology studies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 813, 849-863.
- Watkinson, W.P., Campen, M.J., Nolan, J.P. & Costa, D.L. (2001) Cardiovascular and systemic responses to inhaled pollutants in rodents: effects of ozone and particulate matter. *Environmental Health Perspectives*, 109 Suppl 4, 539-546.
- Watkinson, W.P., Campen, M.J., Nolan, J.P., Kodavanti, U.P., Dreher, K.L., Su, W.Y., Highfill, J.W. & Costa, D.L. (2000) Cardiovascular effects following exposure to particulate matter in healthy and cardiopulmonary-compromised rats. In *Relationships between acute and chronic effects of air pollution* Heinrich, U. & Mohr, U. (eds) pp. 447-463. ISLI Press, : Washington, DC.
- Wellenius, G.A., Batalha, J.R., Diaz, E.A., Lawrence, J., Coull, B.A., Katz, T., Verrier, R.L. & Godleski, J.J. (2004) Cardiac effects of carbon monoxide and ambient particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicological Sciences*, 80, 367-376.
- Wellenius, G.A., Coull, B.A., Godleski, J.J., Koutrakis, P., Okabe, K., Savage, S.T., Lawrence, J.E., Murthy, G.G. & Verrier, R.L. (2003) Inhalation of concentrated ambient air particles exacerbates myocardial ischemia in conscious dogs. *Environmental Health Perspectives*, 111, 402-408.
- Wellenius, G.A., Saldiva, P.H., Batalha, J.R., Krishna Murthy, G.G., Coull, B.A., Verrier, R.L. & Godleski, J.J. (2002) Electrocardiographic changes during exposure to residual oil fly ash (ROFA) particles in a rat model of myocardial infarction. *Toxicological Sciences*, 66, 327-335.
- Win-Shwe, T.T., Yamamoto, S., Kakeyama, M., Kobayashi, T. & Fujimaki, H. (2005) Effect of intratracheal instillation of ultrafine carbon black on proinflammatory cytokine and chemokine release and mRNA expression in lung and lymph nodes of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209, 51-61.
- Wong, D., Mitchell, C.E., Wolff, R.K., Mauderly, J.L. & Jeffrey, A.M. (1986) Identification of DNA damage as a result of exposure of rats to diesel engine exhaust. *Carcinogenesis*, 7, 1595-1597.

- Yang, H.M., Antonini, J.M., Barger, M.W., Butterworth, L., Roberts, B.R., Ma, J.K., Castranova, V. & Ma, J.Y. (2001) Diesel exhaust particles suppress macrophage function and slow the pulmonary clearance of *Listeria monocytogenes* in rats. *Environmental Health Perspectives*, 109, 515-521.
- Yin, X.J., Dong, C.C., Ma, J.Y., Antonini, J.M., Roberts, J.R., Barger, M.W. & Ma, J.K. (2005) Sustained effect of inhaled diesel exhaust particles on T-lymphocyte-mediated immune responses against *Listeria monocytogenes*. *Toxicological Sciences*, 88, 73-81.
- Yoshida, S., Sagai, M., Oshio, S., Umeda, T., Ihara, T., Sugamata, M., Sugawara, I. & Takeda, K. (1999) Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology*, 22, 307-315.
- Yu, C.P. & Yoon, K.J. (1991) Retention modeling of diesel exhaust particles in rats and humans. *Research Report / Health Effects Institute*, 1-24.
- Zelikoff, J.T., Chen, L.C., Cohen, M.D., Fang, K., Gordon, T., Li, Y., Nadziejko, C. & Schlesinger, R.B. (2003) Effects of inhaled ambient particulate matter on pulmonary antimicrobial immune defense. *Inhalation Toxicology*, 15, 131-150.
- Zelikoff, J.T., Schermerhorn, K.R., Fang, K., Cohen, M.D. & Schlesinger, R.B. (2002) A role for associated transition metals in the immunotoxicity of inhaled ambient particulate matter. *Environmental Health Perspectives*, 110 Suppl 5, 871-875.
- Zhao, X., WAN, Z., CHEN, G., ZHU, H., JIANG, S., YAO, J. (2002) Genotoxic activity of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China. *Mutation Research*, 514, 177-192.
- ディーゼル排気微粒子リスク評価検討会. (2002)ディーゼル排気微粒子リスク評価検討会 平成13年度報告.
- 河端美則. (1988) 肺内での粒子沈着と関連する病変(気管支娘枝をめぐって)(第11回日本気管支学会総会特集). *気管支学*, 10, 502-506
- 河端美則, 岩井和郎, 宇田川忠, 樋口一恵, 山田博之, 高橋忠治, 橋本尚子. (1993) ディーゼル排出ガス中の粒子成分の肺注入による肺障害性と肺発癌, 注入粒子量・反応関係について. *大気汚染学会誌*, 28, 11-19.
- 環境省. (2007a) (4) CAPs 曝露がマウスの細菌毒素に関連する肺傷害に与える影響とメカニズム解明に関する研究. 微小粒子状物質曝露影響調査報告書.
- 環境省. (2007b) (6) CAPs 曝露が老齢ラットの心機能に与える影響に関する研究. 微小粒子状物質曝露影響調査報告書.
- 岩井和郎. (1998)低硫黄軽油使用時のディーゼル排出ガスの慢性健康影響調査
- 岩井和郎, 宇田川忠, 塚越謙吉. (1991) 気管支粒子注入実験(pilot study). In 昭和59年度環境庁委託業務結果報告書—ディーゼル排出ガス影響調査— pp. 22-24.
- 後藤純雄, 加藤幸彦, 折井章子, 田中一幸, 久松由東, 松下秀鶴. (1982) 大気浮遊粉じんの変異原性の終日変動. *大気汚染学会誌*, 17, 295-303.
- 高木敦彦, 羽田野昭, 光崎研一, 後藤純雄, 松下秀鶴. (1994) 空気浮遊粒子中の変異原物質への曝露要因に関する研究 個人曝露レベルと屋外空気汚染レベルとの比較. *大気汚染学会誌*, 29, 16-23.
- 大谷仁己, 嶋田好孝, 氏家淳雄, 西村哲治, 松下秀鶴. (1985) 大気浮遊粉じんの変異原性 前橋市と東京都港区との比較. *大気汚染学会誌*, 20, 463-469.