

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<sub>3</sub> の急性曝露影響について検討した。用いられた粒径は 0.15~2.5 $\mu$ 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(63.3~1,568.6 $\mu$ g/m<sup>3</sup>)と低用量(1.6~133.1 $\mu$ g/m<sup>3</sup>)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<sub>3</sub> 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 $\mu$ g/m<sup>3</sup> につき 0.86%上昇)。②300~500 $\mu$ g/m<sup>3</sup> CAPs と O<sub>3</sub> の複合曝露により、メサコリン誘導肺気流抵抗の上昇が認められた。①と②は CAPs 曝露直後にのみ認められ、曝露 24 時間後では認めなかった。③CAPs 中の元素組成と Penh との相関を検討した結果、CAPs 中の Al-Si 含有率に相関して Penh(ベースライン: メサコリン刺激無し)の上昇が認められた。④CAPs 単独曝露又は CAPs+O<sub>3</sub> 複合曝露 48 時間後において、BALF 中の全細胞数及びマクロファージ数の減少が認められた。

さらに本研究では、LPS と IFN- $\gamma$  で前刺激した肺胞マクロファージによる TNF- $\alpha$  及び MIP-2 産生量に対する CAPs の影響を *in vitro* で検討したが、CAPs の元素組成と産生量の変化との間に相関は認めなかった。CAPs 曝露の直後において、比較的小さな気道反応性の亢進が短時間(<24 時間)見られることが示された。また、明瞭ではなかったものの、気道反応性亢進の程度は CAPs 中の Al-Si 含有率と正相関することが示された。

Zelikoff ら (2002)は、CAPs(粒径 PM<sub>2.5</sub>、65~90 $\mu$ g/m<sup>3</sup>)の曝露時間 5 時間の急性曝露影響を検討し、PM<sub>2.5</sub> 曝露は感染ラット肺からの菌排出を遅らせること、および粒子中の Fe が関与していることを示唆する結果を得た。肺炎球菌に感染したラットへ CAPs を曝露すると 18 時間後、24 時間後には清浄空気曝露群に対して有意な細菌貯留率の増加を認めている。金属塩 (Fe, Ni, Mn の塩化物) 曝露では、とくに Fe (2 価) の曝露後に回収した BALF のマクロファージから産生されるスーパーオキシドアニオン ( $\cdot$ O<sub>2</sub><sup>-</sup>) が清浄空気曝露群より有意に高く、同じく BALF 中の好中球やリンパ球は有意に下がるがマクロファージは増加し、感染ラットでの細菌貯留は増加している。これらの結果から、ニューヨークでの大気粒子曝露と Fe 塩化物曝露の肺炎や免疫能に対して類似した影響を及ぼし、大気粒子の免疫毒性には Fe が関与していると考えられると述べている。

Moss ら(2001)は、大気中浮遊粒子状物質の慢性曝露影響を検討した。用いたのはメキシコ市街地由来の TSP、PM<sub>10</sub>、PM<sub>2.5</sub> であった。曝露濃度はそれぞれ TSP: 平均 68 $\mu$ g/m<sup>3</sup>、PM<sub>10</sub>: 平均 32 $\mu$ g/m<sup>3</sup>、PM<sub>2.5</sub>: 平均 16 $\mu$ g/m<sup>3</sup>であった。1997 年 5 月より 49 日間にわたる

F344 ラットへの曝露実験を施行した。曝露にあたっては5群を設定し、1群:健康状態観察群、2群:室内空気曝露群、3群:ろ過空気曝露群、4群:大気曝露群、5群:大気曝露+2週経過群とした。

21日、35日、49日曝露後に、各群についてラットの鼻と肺の組織を観察したが、実験群間に有意な差は認めなかった。

Ichinoseら(1998)はICRマウス(雄)に12時間/日、7日/週、34週間にわたって、DEP濃度として0mg/m<sup>3</sup>、0.3mg/m<sup>3</sup>、1.0mg/m<sup>3</sup>および3.0mg/m<sup>3</sup>のDEを吸入させ、この間、16週目に10μg OVAを腹腔内注射して感作し、その後3週間ごとに1%OVAのミストを6分間吸入させ、気道炎症指標の変化を6段階(-、±、+、++、+++、++++)の病理学的スコアにより調査して、気道粘膜下への好酸球浸潤と粘液産生細胞の増生はOVA+DE群でのみDEP濃度に依存して増加し、DEP濃度が1.0mg/m<sup>3</sup>以上でOVAミストのみを吸わせた群に比べて有意に増加した。また、DEだけを吸入させた群では上記2つの指標は全く増加しなかった。一方、気道粘膜下へのリンパ球の浸潤、気道上皮の肥大ならびに無繊毛上皮の増殖などの指標はDEのみの群でも濃度に依存して1mg/m<sup>3</sup>以上で有意に増加したが、OVA+DE群ではさらに増加する傾向にあり、無繊毛上皮増殖と上皮細胞肥大は対照群に比べて0.3mg/m<sup>3</sup>でも有意に増加したことが認められた。

Takanoら(1998a)は、上記のIchinoseら(1998)と同様の実験条件で、DE吸入期間をさらに6週間延長して40週間のDE吸入を行い、気道炎症指標、呼吸抵抗、サイトカイン産生等を調べた。気道粘膜下への好酸球浸潤、粘液産生細胞の増生および呼吸抵抗はOVA+DE群でのみ増加し、3.0mg/m<sup>3</sup>群で有意差を認めた。IL-5産生もDE濃度に依存して増加し、3.0mg/m<sup>3</sup>濃度のOVA+DE群でOVAのみの群の3.3倍に有意に増加した。GM-CSFも同様の傾向で増加し、3.0mg/m<sup>3</sup>群でOVAのみの群の60%強の、有意な増加を示した。IgG1は10万タイター以上に、IgEは10タイター前後に増加したが、DEP濃度の違いによる変化は全く認められなかった。

Saitoら(2002)は、DEP(粒径:90%以上が<2.5μm(PM<sub>2.5</sub>)、60%が0.33μm以下、曝露濃度:低濃度DEP群:95.4±18.8μg/m<sup>3</sup>、高濃度DEP群:3.15±0.49mg/m<sup>3</sup>)の慢性曝露影響(曝露時間7時間/日、5日/週、4週間)を検討した。BALB/cマウスへのDEP曝露影響について、肺病理と肺組織サイトカイン発現量により検討した。曝露終了1日後の低濃度曝露群では、DEPを内包した肺胞マクロファージが認められ、さらに、高濃度曝露群ではその数が増加し、DEP内包マクロファージの周囲で肺胞上皮細胞の過形成が観察された。BALF中のリンパ球と好中球の割合は、対照群の1.5%と1.4%に対し、低濃度曝露群で4.9%と3.3%、高濃度曝露群で19.8%と16.2%と増加した。DEP曝露により、肺組織では炎症性サイトカインであるTNF-α、IL-1β、IL-6、IL-12p40、IFN-γ、iNOSのmRNA発現量が減少し、

特に IL-6、IFN- $\gamma$ 、iNOS の mRNA 発現量の減少の程度が大きく、かつ量反応関係を認めた。IL-4 mRNA 発現量は低濃度曝露群で増加し、高濃度曝露群ではむしろ減少傾向を示したが、IL-10 mRNA 発現は低濃度、高濃度群で共に増加した。採取した BALF 肺胞マクロファージの培養上清中 TNF- $\alpha$  量は、清浄空気曝露群と比較し高濃度曝露群で有意に減少し、IL-10 量は低濃度及び高濃度曝露群で共に有意に増加した。培養細胞上清中の TNF- $\alpha$  と IL-10 の増減と、培養肺胞マクロファージ細胞の mRNA 発現量は類似した挙動を示した。以上の結果は、DEP 慢性曝露がマウス肺のサイトカイン発現に影響を及ぼしていることを示しており、DEP の免疫応答への影響や、DEP に対する感受性の亢進、更には低濃度曝露による IL-4 発現量の増加は喘息のようなアレルギー反応を誘発する可能性を示唆していた。

Ishihara と Kagawa(2002)は、DEP(粒径:0.29~0.49 $\mu\text{m}$ 、曝露濃度:C:ろ過空気、L:低濃度群(0.18~0.21 $\text{mg}/\text{m}^3$ )、M:中等度濃度群(0.92~1.18 $\text{mg}/\text{m}^3$ )、MG:中等度濃度群で粒子フィルター除(0.01 $\text{mg}/\text{m}^3$ )、H:高濃度群(2.57~2.94 $\text{mg}/\text{m}^3$ ))の生体影響を 16 時間/日、6 日/週、6、12、18、24 ヶ月間までモルモットで検討した。①死亡率には、曝露濃度による有意な影響はなかった(C: 38%、L: 41%、M: 42%、MG: 40%、H: 40%)。②体重変化にディーゼルによる影響はなかった。③好酸球数、総タンパク質、LDH が M、H 群では C 群と比較して有意に増加(12 ヶ月)した。L 群は C 群と有意な差はなかった。④M 群では 18 ヶ月から、H 群では 12 ヶ月から、BALF 中のフコースが有意に上昇した。M 群では 24 ヶ月から、H 群では 12 ヶ月から、BALF 中シアル酸が有意に上昇した。M 群では 18 ヶ月から、H 群では 12 ヶ月から、BALF 中リン脂質が有意に上昇した。M 群では 24 ヶ月から、H 群では 18 ヶ月から、血液中 LTC<sub>4</sub> が有意に上昇した。BALF 中 LTC<sub>4</sub> は両群で 24 ヶ月後に上昇した。

Ishihara と Kagawa(2003)は、ラットを用いて、DEP(粒径:MMD: 0.33~0.50 $\mu\text{m}$ 、曝露濃度:C:ろ過空気、L:低濃度群(0.18~0.21 $\text{mg}/\text{m}^3$ )、M:中等度濃度群(0.92~1.18 $\text{mg}/\text{m}^3$ )、MG:中等度濃度群で粒子フィルター除(0.01 $\text{mg}/\text{m}^3$ )、H:高濃度群(2.57~2.94 $\text{mg}/\text{m}^3$ ))の 16 時間/日、6 日/週、6、12、18、24 ヶ月間までの吸入長期曝露の影響を検討した。①死亡率は高濃度群で有意に他の群より高かった(C: 8%、L: 12%、M: 15%、MG: 12%、H: 23%)。②体重変化は高濃度群で有意に悪かった。③L 群では C 群と比較して有意な変化はなかった。④M、H 群では、BALF のパラメータ(細胞数、細胞分画、総タンパク質、フコース、シアル酸、リン脂質、ヒスタミン、LTB<sub>4</sub>、LTC<sub>4</sub>、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 、6-Keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub> 、11-D Tx B<sub>2</sub>、13,14D-15-Keto PGF<sub>2 $\alpha$</sub> )の有意な増加を認め、さらに H 群では M 群より高かった。一方、血漿のパラメータに影響はなかった。⑤PGE<sub>2</sub> は M、H 群の 6 ヶ月吸入で有意に低下した。⑥MG 群(中等度濃度で粒子除去群)では、以上の変化が有意に低かった。

Hiramatsu ら(2003)は、DE の曝露濃度:1 群(低濃度):約 100 $\mu\text{gDEP}/\text{m}^3$  (103.1 $\pm$ 9.2 $\mu\text{gDEP}/\text{m}^3$ )および 2 群(高濃度):約 3 $\text{mgDEP}/\text{m}^3$  (3.1 $\pm$ 0.2 $\text{mgDEP}/\text{m}^3$ )の長期曝露の検討

を行った。マウスに DE(低濃度、高濃度)または清浄空気を 1 ヶ月、3 ヶ月間(7 時間/日、5 日間/週)曝露させた。その後の肺組織の病理組織学的検討では、高濃度曝露群で気道系リンパ組織の形成が観察された。肺組織における炎症誘発性サイトカイン及び iNOS の mRNA 発現量の測定では、DE3 ヶ月曝露で低濃度、高濃度ともに TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、IL-4、IL-10 の mRNA 発現量がやや増加した一方、IL-1 $\beta$ 、iNOS の mRNA 発現量はわずかに減少した。また、BALF 中の Mac-1 陽性細胞をフローサイトメトリーにより計測したところ高濃度曝露群で有意な増加が認められた。DE は肺において異物として作用することで免疫応答を誘発した。また、低濃度の DE でもアレルギー反応を誘発することが示唆された。

Inoue ら(2006)は、DE の吸入による曝露時間 12 時間の急性効果を動物実験で検討した。DE の粒径のピークは 110nm であった。マウスに溶媒または LPS を気管内投与後、清浄空気または DE 曝露した。DE の曝露濃度は、 $0.03 \pm 0.01 \text{mg/m}^3$ 、約  $0.3 \text{mg soot/m}^3$ ( $0.38 \pm 0.02 \text{mg/m}^3$ )、約  $1.0 \text{mg soot/m}^3$ ( $1.40 \pm 0.14 \text{mg/m}^3$ )、および約  $3.0 \text{mg soot/m}^3$ ( $2.99 \pm 0.38 \text{mg/m}^3$ )であった。

曝露終了から 12 時間後に BALF 中の総細胞数、好中球数を計測した結果、溶媒群では、清浄空気曝露と DE 曝露の間に違いは認められなかったが、LPS 群では、総細胞数が DE 曝露(1 と  $3 \text{mg soot/m}^3$ )で有意な減少を認めた。また、溶媒群と LPS 群を比較すると、LPS 群で総細胞数、好中球数の有意な増加が認められた。HE 染色を用いた肺組織観察では、LPS 群で中程度の好中球浸潤が認められたが、清浄空気曝露と DE 曝露の間で違いは認められなかった。MCP-1 と KC の mRNA およびタンパク質発現は、溶媒群と比較して、LPS 群で有意な増加が認められ、両者ともに DE 曝露の方が清浄空気曝露より低値を示した。以上の結果から、短期間 DE 吸入は、LPS による肺の炎症や、炎症誘発性ケモカインの発現を増悪させないことを示唆すると述べている。

Strom ら(1984)は、6 週齢の F344 ラット(一群 6 匹)を用いて、DE 曝露の肺への影響を調べた。DE の曝露は、0、250、750、1,500、6,000  $\mu\text{g/m}^3$  の濃度で、6 ヶ月と 12 ヶ月行った。BALF 中の細胞数は、 $750 \mu\text{g/m}^3$  以上のものより、濃度依存的に増加し、その内訳はマクロファージ、好中球、リンパ球の順であった。また、 $750 \mu\text{g/m}^3$  からマクロファージの総体積の有意な増加、BALF に含まれる細胞で酸性フォスファターゼ活性の増加がみられた。

Kobayashi(2000)は、0.3 および  $1.0 \text{mg/m}^3$  の粒子を含む DE 曝露下のモルモット(雄)に抗原(OVA)を 1 週間に 1 回点鼻投与し、くしゃみ回数、鼻汁量、好酸球数、抗原特異的 IgG、IgE を測定した。抗原投与によるくしゃみ回数、鼻汁量、好酸球の浸潤数は  $0.3 \text{mg/m}^3$  の DE 曝露から増加することが見いだされた。また、抗原特異的 IgG と IgE 産生は  $1.0 \text{mg/m}^3$  の DE 曝露で増加することが見いだされた。これらのことより、0.3 および  $1.0 \text{mg/m}^3$  の粒

子を含む DE 曝露は鼻アレルギー反応を濃度依存的に増悪すると報告している。

Chaudhari ら(1981)はモルモットとラットに DEP 濃度として 0、0.25、1.5mg/m<sup>3</sup> の DE を 12 ヶ月間吸入させ、炎症反応に関与するプロスタグランジン脱水素酵素活性の変化を調べ、モルモットのプロスタグランジン脱水素酵素活性は、0.25mg/m<sup>3</sup> で 6 週間の曝露したとき対照群の 2 倍になったが、1.5mg/m<sup>3</sup> では対照群と差が認められなかった。曝露期間を 3 ヶ月、6 ヶ月でも同様であった。ラットについては、プロスタグランジン脱水素酵素活性が低く影響は不明であった。

Ichinose ら(1997a)は、DEP 濃度として 0、0.3、1.0 および 3.0mg/m<sup>3</sup> の DE を ICR マウス(雄)に 8 ヶ月間吸入させる実験を行い、アレルゲン非吸入時には気道粘膜下への好酸球の浸潤や粘液産生細胞の増生をどの濃度群でも認めなかったと報告している。一方、DE 曝露では、気道粘膜下へのリンパ球の浸潤や無繊毛上皮細胞の増殖や肥大が、1.0mg/m<sup>3</sup> 以上の濃度群で対照群より有意に増強されているとした。なお、この検討は病理学的変化を 6 段階に点数化し、ANOVA 解析で群間の有意差検定を行った。

Kato ら(2000)は、DE のラット呼吸器への影響の量反応関係を形態学的に調べた。実験群は、DE を希釈し、NO<sub>2</sub>(ppm)と粒子(mg/m<sup>3</sup>)を指標に高濃度(H 群：3ppm、3mg/m<sup>3</sup>)、中濃度(M 群：1 ppm、1mg/m<sup>3</sup>)、低濃度(L 群：0.2 ppm、0.2mg/m<sup>3</sup>)の 3 群と M 群から粒子を除去したガス成分の中濃度ガス(MG 群：1 ppm、0mg/m<sup>3</sup>)および清浄空気の対照群とし、Wistar ラット(雄、5 週齢)を 16 時間/日、6 日/週、24 ヶ月間、間欠曝露した。6 ヶ月毎に各群 6 匹のラットを用いて呼吸器の組織標本作製し、気道の炎症性変化、杯細胞内の粘液顆粒の酸性化および肺胞腔の断面積と肺胞孔数を光学顕微鏡、走査型および透過型電子顕微鏡で半定量的および定量的に観察と計測を行った。

(1)気道の炎症性変化：繊毛の短縮およびクララ細胞の増生が曝露濃度(濃度)および曝露期間(期間)依存性に増強したが、その程度は、L 群では軽微な変化を、M 群と MG 群は同程度の変化を示した。また、MG 群以外の群では、肺内気管支上皮下に粒子を貪食した肺胞マクロファージ、肥満細胞、形質細胞、好中球、リンパ球の浸潤が濃度および期間依存性に増強して認められ、細胞間接触もみられた。また、同様の実験群の気管支肺胞接合部では上皮の細気管支化が濃度および期間依存性に増強して認められた。

(2)杯細胞の変化：細気管支の杯細胞の増生や化生性変化は認められなかったが、細胞内の粘液顆粒の増加や粘液の酸性化が濃度および期間依存性に増強して認められた。これらの変化は L および MG 群では軽微であった。

(3)肺胞腔の断面積と肺胞孔数：肺胞腔の断面積は、H および M 群が 24 ヶ月で対照群に対して有意に増加した。肺胞孔数は、H 群が他の曝露群に対し 12~24 ヶ月で有意に増加し、12 ヶ月では濃度依存性がみられた。L、M および MG 群では軽度な変化にとどまり、M 群

は24ヶ月でのみMG群に対し有意に増加した。

DE曝露により、ラットの肺は炭粉沈着を呈するとともに、ラットの肺内気管支には各種の炎症細胞が浸潤し、細気管支の杯細胞内の粘液顆粒が酸性化を示した気道の炎症性変化は、主にDEPに起因するものと考えられ、その程度は濃度および期間に依存した。また、肺胞破壊にはガス成分の影響が関与する可能性も認められた。DEの24ヶ月間曝露を受けたラットの肺では、DEP沈着による組織反応が主体で、粒子除去により反応は軽減あるいは認められなくなったと報告している。

Nagaiら(1996)は、高濃度(H群:3ppm、3mg/m<sup>3</sup>)、中濃度(M群:1ppm、1mg/m<sup>3</sup>)、低濃度(L群:0.2ppm、0.2mg/m<sup>3</sup>)の希釈DEと、M群から粒子を除去したガス成分の中濃度ガス(MG群:1ppm、0mg/m<sup>3</sup>)および清浄空気(対照群)をモルモットに16時間/日、6日/週、24ヶ月間曝露した。12ヶ月曝露後では、肺胞壁に対する肺胞孔面積比率と肺胞当たりの肺胞孔数は曝露濃度と曝露期間に依存して増加した。肺胞のサイズには差異を認めなかった。MG群では、M群に比べ肺胞孔数の増加は少なかった。これらの知見は、DEが曝露濃度、曝露期間に依存した肺胞サイズの拡大を伴わない肺胞破壊の原因になりうることを示唆した。粒子状物質は、これらの障害に何らかの役割を担っているであろうと述べている。

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

Vaughanら(1969)は、イヌに0.09 mg/m<sup>3</sup>の硫酸エアロゾルを61日間(16時間/日)曝露した場合、SO<sub>2</sub> 1.10 mg/m<sup>3</sup>との混合でも肺機能上の変化は検出されなかったと報告している。