

であった。曝露濃度は a 群: 空気のみ、b 群: 0.3ppm O₃、c 群: 0.6ppm O₃、d 群: 0.48mg/m³ H₂SO₄、e 群: 1.00mg/m³ H₂SO₄、f 群: 0.31ppmO₃+0.41mg/m³ H₂SO₄、g 群: 0.31ppmO₃+1.04mg/m³ H₂SO₄、h 群: 0.6ppmO₃+0.52mg/m³ H₂SO₄、i 群: 0.6ppmO₃+0.86mg/m³ H₂SO₄ であった。

結果として、①肺組織学: Type1 病変は全群で変化無し、Type2 病変は H₂SO₄ 単独吸入で変化無し、O₃ 吸入で増加し、H₂SO₄ 濃度が濃いほど、その程度が低下、②DNA 合成は、鼻では O₃ 0.6ppm+H₂SO₄ 吸入により増加。気管ではどの群も変化無し。肺では、O₃ 0.6ppm+H₂SO₄ 吸入により増加。H₂SO₄ 濃度による影響は無し。③マクロファージの Fc レセプター発現はどの群でも変化無し。貪食能は H₂SO₄ 吸入群のすべてで低下した。O₃ と酸性微粒子の吸入が相乗的に肺の障害を起こすという仮説は支持されなかったと報告している。

Kleinman ら(2003)は、ラットを用いてカーボン粒子(EC:elementary carbon)と (NH₄)HSO₄ (ABS:ammonium bisulfate)との混合物の長期効果(曝露時間 4 時間/日、3 日連続/週、4 週間)を検討した。粒径 MMAD:は 0.3μm であった。各群の曝露濃度は、1 群:清浄空気、2 群:O₃0.198±0.004ppm、3 群:EC 51.35±12.15μg/m³+ABS 76.25±18.36μg/m³+O₃ 0.194±0.004ppm、4 群:EC 92.35±18.51μg/m³+ABS 136.29±27.61μg/m³+O₃ 0.197±0.003ppm であった。結果として、①BrdU ラベリングによる細胞再生の指標は、1 群を 100 として 2 群(O₃)で 120%、3 群で 310~340%、4 群で 200~290% ②BALF 中のアルブミンからみた透過性は 3 群でのみ有意に増加、しかし細胞の生存、回収率、細胞分画に影響なし、③マクロファージの Fc レセプター発現は 3、4 群で低下、呼吸バーストは 3 群、4 群で低下した。O₃ 単独よりも O₃ と微小粒子の混合物の方が、毒性があることが報告されている。

Elder ら(2000a)は、F344 ラット(雄、10 週齢、20 月齢)に Ultrafine carbon particles(UCP、CMD 25 nm、100 μg/m³、ヒトでは 50 μg/m³ に相当)と O₃(1 ppm)に、6 時間単独曝露あるいは混合曝露(LSP: 12 分、30 分後に UCP および O₃ 曝露開始、UCP および O₃: 6 時間曝露)した。

気道感染のモデルとして低濃度のエンドトキシン(LPS)吸入によるプライミングを行った。BALF の炎症指標と BALF 細胞からのオキシダント遊離を曝露 24 時間後に調べた。若年ラットでは UCP、O₃、LPS の肺炎作用が認められ、また O₃ と LPS の混合曝露では炎症が抑えられることが認められた。老年ラットでは LPS と O₃ のみ有意な炎症作用が認められ、UCP と O₃ の混合曝露では、それぞれの単独曝露以上の肺の炎症が認められた。BALF 細胞からのオキシダント遊離は一般的に多核白血球(PMN)反応と一致していたが、若年ラットでは LPS プライミングした UCP および O₃ 曝露群でオキシダント遊離が減少していた。老年ラットではこの混合曝露では逆にオキシダント遊離が増加していた。

著者らはこの結果から都市の UCP は感受性のあるヒト集団の罹患率上昇に関与し、また、加齢、高濃度 O₃ との混合曝露は肺の炎症および炎症細胞活性化に影響を及ぼすと述べてい

る。

Elder ら(2000b)は、大気中粒子状物質濃度の増加と高齢者における心肺疾患罹患率との間に関係があるといういくつかの疫学報告に基づいて、ultrafine carbonaceous particle(UCP)と O_3 が協働して肺の酸化ストレスや炎症を引き起こしており、さらに損傷を有する肺や老化した肺ではそれが増強するという仮説を立て、以下の実験を行った。損傷を有する肺のモデルとしてエンドトキシン曝露マウスと老化した肺気腫マウス(TSK マウス)を用いた。8 週齢または 22 月齢の F344 ラット (SPF)(雄)、および 14~17 月齢の TSK マウス(雄、肺気腫)に UCP(CMD25nm、110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)および O_3 (1 ppm)を単独あるいは混合で 6 時間曝露(エンドトキシン: 12 分、30 分後に UCP および O_3 曝露開始、UCP および O_3 : 6 時間曝露)した。エンドトキシン(Estimated alveolar deposited dose; 70 unit/個体 and 7.5 units/個体)の吸入は呼吸器感染のモデルとして用いた。曝露 24 時間後に BALF を調べた。肺胞腔内への炎症細胞の浸潤は両方の種、年齢で認められた。エンドトキシン処理に続く UCP と O_3 の混合曝露群がもっとも高い BALF 中好中球数を示した。BALF 中の炎症細胞からの活性酸素種遊離は刺激の有無にかかわらず好中球反応とよく相関していた。ANOVA 解析によると UCP と O_3 の相互関係と同様に UCP の有意な影響が認められた。しかしながら、若年ラットでは UCP と O_3 混合曝露では活性酸素種活性は抑えられたが、老年ラットおよび TSK マウスでは活性酸素種活性が増強していた。すなわち肺の炎症細胞遊離の機序が年齢依存的に異なるといえる。以上の結果から、UCP の短期間曝露で有意な肺の炎症や酸化ストレスが引き起こされ、この炎症や酸化ストレスは年齢や他の物質の同時曝露、さらには呼吸器の損傷により修飾されることが示された。

Madden ら(2000)は、 O_3 が直接粒子の生物活性と反応するのか、あるいは影響を及ぼすのかを検証するために、cell-free in vitro システムで DEP に O_3 を曝露し、肺障害のラットモデルに対する DEP の生物活性を調べた。DEP の標準試料 2975 に 0.1ppm の O_3 を 48 時間曝露し、SD ラットに気管内投与した。24 時間後に BALF を用いてラット肺の炎症と障害を調べた。 O_3 曝露した DEP は、 O_3 曝露しない DEP に比べ好中球、総タンパクおよび LDH 活性を増加させた。 O_3 曝露による DEP 活性の上昇は、空気による変質ではなく O_3 曝露期間中によるものであった。高濃度 O_3 (1ppm)の DEP への曝露は、粒子の生物活性を低下させた。これに対し、DEP に比べ有機物成分の低い CB では、0.1 ppm の O_3 曝露後に調べた如何なる生物活性も増加させなかった。DEP と O_3 の共存は、直線関係にあった。これらのデータは、大気濃度レベルの O_3 が DEP の生物学的効果を増加せしめることを示唆する。

3. 粒子状物質とガス状物質（オゾン以外）との複合影響に関する知見

1) SO₂との複合曝露

Vaughan ら(1969)は、イヌに 0.09 mg/m³の硫酸エアロゾルを 61 日間(16 時間/日)曝露した場合、SO₂ 1.10 mg/m³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。

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

Jakab ら(1996)は、大気中の SO₂が一定の湿度のもとで硫酸塩に変化して影響を及ぼすことを明らかにするために、SO₂と CB エアロゾルを種々の湿度のもとで混合曝露して肺胞マクロファージの Fc 受容体を介した食食能への影響について調べた。スイスマウス(雌)へ 10 ppm SO₂と 10 mg/m³の CB を種々の湿度のもとで 4 時間鼻部曝露して CB 上での硫酸塩濃度を測定した結果では、湿度 85%のときに有意に増加した。次に、湿度 85%のときに SO₂濃度を変えて CB 上の硫酸塩濃度と食食能との関連を調べると、硫酸塩濃度に依存した食食能の低下がみられた。また、10 ppm SO₂、10 mg/m³の CB、85%の湿度条件で 4 時間曝露後の時間経過による変動を調べると、曝露 1 日後から 7 日後まで食食能の有意な低下が認められた。

2) SO₂と NO₂との複合曝露

Ohyama ら(1999)は、F344 ラットに DEP 抽出物でコーティングした CB 粒子(DEcCBP)0.2mg を、CBP(DEcCBP)0.2mg を、1 回/週、計 4 回、気管内投与し、6 ppm の NO₂および 4 ppm の SO₂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および 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、肺腫瘍形成および DNA 付加物の形成は DEcCBP 気管内投与に NO₂および 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 損傷および肺胞上皮の増殖を惹起し、NO₂ および 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。

3) NO (NO 合成の全躯体物質である L-アルギニン)

Takano ら(1999)は、気道炎症の発現に NO が関与していることを別の角度から確認するために、ICR マウス(雄)に 1 週間に 1 回ずつ 9 週間にわたって 0.1mg の DEP を気管内投与しながら、NO 合成の前駆物質(原料)である L-アルギニンを飲料水として与え、気道炎症が悪化するかどうかを調べた。L-アルギニン投与だけでは好酸球の浸潤を伴う気道炎症は全く認められなかったが、DEP 投与動物に L-アルギニンを飲ませると気道粘膜下への好酸球の浸潤と粘液産生細胞の増生が顕著に亢進し、また、この顕著な亢進は iNOS 阻害剤投与でほぼ完全に抑制された。これらの結果から、気道炎症の発症には NO と ONOO⁻ のような活性酸素関連分子種が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

4) CO

Wellenius ら(2004) は、心筋梗塞モデル動物において不整脈などの心機能異常が発現するかどうかを調べるため、急性実験を行った。曝露物質は、CAPs(ボストン由来)であり、PM_{2.5} を 350.5 μg/m³、CO(一酸化炭素)を 3.5ppm、CAPs を 348.4μg/m³ の濃度とした。SD ラット、心筋梗塞モデル(SD ラットの左冠状動脈の分枝の 1~2 を手術用焼灼器を用いて閉塞)を用い、個体ごとの曝露チャンパー(流量 15L/分)にジアゼパム(12mg/kg(体重) i.p.)で鎮静化したラットを収容して吸入曝露した。曝露時間は、心筋梗塞術処置後、CAPs、CO とともに 1 時間であった。CAPs 単独曝露、あるいは CO との混合曝露を実施し、心臓への影響指標として不整脈の発現性を解析した。その結果、心室期外収縮の増加傾向が CAPs 単独曝露では認められたが、統計的な有意差は示されなかった。CO との混合曝露では相乗効果は見られなかった。

5) SO₂ 曝露による慢性気管支炎のモデル動物

Clarke ら(1999)は、慢性気管支炎罹患ラット(250ppm SO₂ 吸入による)12 匹に CAPs(1 回目: 206 μg/m³、2 回目: 733μg/m³、3 回目: 607 μg/m³)を、18 時間/日、連続 3 日間の条件で曝露したところ、健康群(対照群)および慢性気管支炎罹患群の曝露個体に、呼吸機能異常(深い呼吸運動の出現: increased peak expiratory flow and/or tidal volume)及び肺における炎症(BALF 中の好中球、リンパ球およびタンパク質含量の増加、および炎症組織所見)が見られた。それらの所見は、慢性気管支炎罹患群で程度が有意に強かった。CAPs の健康影響(肺における炎症)が認められ、炎症の程度としては、健康群に比べ慢性気管支炎誘

発群で高いことが示されたと述べている。

Kodavartiら(2000a)らは、気管支炎ラットモデルでCAPs曝露による肺への影響を検索するため、SDラット(雄)にSO₂を曝露して気管支炎を誘導した。SO₂最終曝露の翌日、正常または気管支炎の両方のラットを清浄空気(正常3匹、気管支炎4匹)、あるいは、CAPs(ノースカロライナ州リサーチトライアングルパーク)、(正常5匹、気管支炎4匹)で6時間/日、3日もしくは2日連続で全身吸入曝露させた。最終的なCAPs曝露後に肺の損傷を調べた。0時間を含む手順を4回繰り返したが(study #A、1997年11月; #B、1998年2月; #C and #D、1998年5月)、18時間のものは一度(#F)だけ実験した。曝露濃度は、それぞれ、1回目(#A): 約650 µg/m³、2回目(#B)約475 µg/m³、3回目(#C): 約869 µg/m³、4回目(#D): 約907 µg/m³であった。追加研究(#E)ではCAPsプロトコル(1998年2月)の模擬実験として、ラットをROFAに曝露した。

18時間(#F)後の検索ではBALF中で炎症マーカーに違いは見られなかった。4回のCAPs(0時間ポイント)の検索では、最初(#A)の実験でCAPs曝露したラットではBALF中タンパク質、アルブミン、NAG活性、およ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、および#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で曝露した正常およ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、およびFeであったが、肺の損傷とCAPs濃度、硫酸塩または基本的構成要素にはまったく関連が見られなかった。正常ラットに関しては、CAPs曝露の明らかな影響は見られなかった。組織学的検討でも、正常ラットに関しては、CAPs曝露の影響は見られなかった。慢性気管支炎ラットでは、うっ血、粘液産生細胞増加、炎症細胞浸潤が、CAPs曝露により増悪しているようであったが、有意差検定は施行されていない。

以上のことから、大気中のPMは感受性モデルの肺の損傷をもたらすかもしれないが、季節によりCAPsの構成要素が異なることと関連して曝露影響も異なることや、気管支炎などの呼吸器疾患が潜在しているときには、PM自体の毒性だけを明確にすることは困難かもしれないと報告している。

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 µg/m³(73.5~733 µg/m³))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 ± 9 ppm SO₂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、H₂SO₄、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、H₂SO₄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。

4. 沿道・道路上大気の影響に関する知見

1) 呼吸器系・循環器系

Elderら(2004a)は、F344 ラットに対し、超微小粒子(UFP)と高速道路上の大気を曝露した。平均粒子濃度は 37~106 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。また、高速道路上に設置された曝露システムを使用してエアロゾル(<1mm)と気相の混合物、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老齢の F344 ラットをこれらの UFP に曝露した。何匹かのラットは、(どっちが主語ですか?) 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を用いた実験ではろ過空気を曝露しているラットに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。

2) 循環器系

Elderら(2007)は、SHR にエンドトキシン処理を行い、実際の道路上大気 (ORA)を吸入曝露し、心臓血管系への影響を検討するため、急性実験を行った。SHR に対して、Interstate90 号のロチェスター-バッファロー間の 320 マイルの区間の浮遊粒子状物質(粒径 $1\mu\text{m}$ 以下、15~20nm)を吸入曝露した。ORA 濃度が $1.95\sim 5.62 \times 10^5$ 粒子/ cm^3 (チャンバー内ではなく、導入前の大気濃度)であり、曝露濃度の計算値は、 $37\sim 106\mu\text{g}/\text{cm}^3$ であった。曝露時間は 6 時間/日であった。ORA 処理による心拍数への影響を検討したところ、エンドトキシン(LPS)の併用処理を行うと心拍数の低下が曝露終了から 14 時間程度認められ、