

心拍数のサーカディアンリズムをかく乱した。ORA 単独処理群では曝露終了直後に心拍数の低下は認められたが、その影響は 2~3 時間と LPS 併用処理と比べて短かった。また、副交感神経の活動も ORA 処理により高くなっており、心拍数同様 LPS 併用処理群でその影響は大きかった。さらに、交感神経の活動は反対に低下していた。これらの神経活動が心拍数に影響したと考えられる。以上のことから、本研究では ORA の吸入により自律神経系の活動に影響が生じることが明らかになった。

### 3) 呼吸器系・気道のアレルギー

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

### 4) 変異原性

Somers ら(2004)らは、オンタリオ州(カナダ)の製鋼所と高速道路に近い場所(ハミルトンハーバー(Hamilton Harbour))と 30km 離れた郊外の 2 か所でマウス(系統不明)への 9 週間の吸入曝露(全浮遊微粒子濃度  $16.2\sim 115.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ )を実施し、交配させた仔について ESTR loci の変異を検出した。また、それぞれの箇所でも HEPA フィルターによる除じん曝露、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。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. 動脈硬化に対する微小粒子状物質の作用機序に関する知見

### 1) 吸入曝露実験

Chen と Nadziejko ら(2005) は、PM への長期曝露がアテローム性動脈硬化症を悪化させることによって有害な心臓血管効果を引き起こすと仮定して、慢性実験を行った。C57 マウス、ApoE<sup>-/-</sup>マウス(動脈硬化疾患モデルマウス的一种)、DK マウスに対して、CAPs (PM<sub>2.5</sub>)(ニューヨーク州タキシード(Tuxedo)由来)を、平均曝露濃度  $110\mu\text{g}/\text{m}^3$ (C57: $110\pm 79\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、ApoE<sup>-/-</sup>: $120\pm 90\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、DK(雄): $131\pm 99\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、DK(雌): $131\pm 99\mu\text{g}/\text{m}^3$ )の濃度で、6 時間/日、5 日/週間の条件で 5 ヶ月間、吸入曝露した。DK マウスの大動脈根の横断面について病変の重症度、細胞性の範囲、および脂質含量を形態学的に検討した。曝露にかかわらず全ての DK マウスにおいて大動脈洞領域の広い範囲に病変を生じ、全領域の 79%以

上をカバーした。DK マウス(雄)では、大動脈洞領域の障害は CAPs 曝露によって高められるように見え、その変化は統計的な有意差( $p=0.06$ )に近かった。全体の大動脈を縦(長軸方向)に切開して調べたところ、ApoE<sup>-/-</sup>マウス、DK マウスの両方に、内腔表面の 40%以上をカバーする重篤なアテローム性動脈硬化症の顕著な部位がみられた。量的測定では、CAPs 曝露が ApoE<sup>-/-</sup>マウスにおいて識別可能なアテローム性動脈硬化型病変に覆われた大動脈内膜表面の割合を 57%まで増加させた。この研究で、アテローム性動脈硬化型病変を起こしやすいマウスの CAPs への亜慢性曝露が重大な影響を大動脈プラークのサイズ、重症度、および構成成分に与えることを示した。

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

Sun ら(2005) は、ApoE<sup>-/-</sup>マウスに PM<sub>2.5</sub> を 6 ヶ月吸入させ、大動脈のアテローム性動脈硬化について検討した。ApoE<sup>-/-</sup>マウスに対し、PM<sub>2.5</sub> を 85 $\text{mg}/\text{m}^3$  の曝露濃度で、6 時間/日、5 日/週の条件で 6 ヶ月間吸入曝露した。高脂食群では大動脈の粥腫面積率は PM<sub>2.5</sub> 群で 41.5%、脂肪面積率 30%で、それぞれ対照群より有意に大きかった。正常食群では PM<sub>2.5</sub> の影響はなかった。フェニレフリン、セロトニンによる動脈収縮率は高脂食群で PM<sub>2.5</sub> 群が対照群に比べて有意に高い値を示した。正常食群では有意差はなかった。アセチルコリンによる動脈弛緩率は高脂食群で PM<sub>2.5</sub> 群が対照群に比べて有意に減少した。これらの実験から、動脈病変をもつ ApoE<sup>-/-</sup>マウスでは低濃度 PM<sub>2.5</sub> の長期曝露によって血管運動緊張を変化させ、血管炎症を招き動脈硬化を増強することが示唆された。

Godleski (2000) は、ヒトの心筋梗塞に類似した病態をイヌで作製し、CAPs 曝露による循環機能(心電図)変化、自律神経機能の変化、BALF の変化を調べるため、急性実験を行った。CAPs を冠動脈無処置動物(6 匹)、冠動脈閉塞犬(6 匹)に最高で 30 倍に濃縮して吸入曝露を行った。曝露濃度は、冠動脈無処置動物で 93.7~1,055.8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、冠動脈閉塞動物で

71.8~741.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。曝露条件は、6時間/日、3日間連続であった。冠動脈無処置動物は、CAPs曝露により心電図の心拍変動の低周波成分と高周波成分が、清浄空気曝露に比較し、有意に上昇した。高周波成分と低周波成分が上昇しているときには、脈拍数が低下し、呼吸数、一回換気量も低下していた。CAPs曝露によりT波の低下も観察された。CAPs曝露により、BALF中の好中球の占有比率が、清浄空気曝露に比較し、増加していた。CAPs曝露により末梢血の白血球数に変動はなかったが、曝露開始後、3日目までフィブリノゲンの経時的増加傾向が認められた。冠動脈閉塞動物に関しては、冠動脈無処置動物に比較し、CAPs曝露による高周波成分上昇がより顕著であった。また、CAPs曝露群では、清浄空気曝露群に比較し、冠動脈閉塞によるST上昇がより早期に出現した。

Kodavantiら(2002a)は、高血圧モデルにおいてROFAの曝露が心肺血管系に及ぼす影響を及ぼすかを明らかにするため、WKYラットとSHRに対し、粒子径1.3 $\mu\text{m}$ 以下のROFAを15 $\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で、経鼻的に吸入曝露(鼻部のみ曝露)した。曝露条件は、6時間/日 $\times$ 3日/週 $\times$ 1, 2, 4週間とした。ROFAは $\text{SO}_4$ , Zn, Ni, Fe, Vを含んでいた。また、0.0 $\text{mg}/\text{kg}$ (体重)、1.0 $\text{mg}/\text{kg}$ (体重)、5.0 $\text{mg}/\text{kg}$ (体重)を単回、気管内投与した。

鼻部吸入及び気管内投与いずれにおいてもROFA曝露による体重変動は認めなかった。**肺病理**：重傷度を数値化した指標で評価した。肺胞マクロファージの集積は肺の病巣や肺の広い範囲で見られ、中隔肥厚と関連した肺肺炎がみられた。気管支上皮の肥大と単核細胞の血管周囲への浸潤を認めた。

**BALFの評価**：気管内投与では、WKYラット及びSHR共に投与量の増加に従いアルブミン、LDH活性、好中球数は有意に増加したが、5 $\text{mg}$ 投与群では投与後2日目でも有意な高値を示した。グルタチオンはWKYラットのみ5 $\text{mg}$ 投与群で有意に増加し、投与後2日目でも有意な高値を示した。鼻部吸入では、WKYラット及びSHR共にアルブミン、LDH活性、好中球数は清浄空気群に比べ曝露群で有意に増加し、曝露期間が長くなるに従い増加傾向が認められ、WKYラットに比べSHRでアルブミンの有意な増加を観察した。グルタチオンは1週間曝露のWKYラットでのみ有意に増加した。

**血液の評価**：気管内投与では、血漿フィブリノゲンがWKYラット、SHR共に5 $\text{mg}$ 投与群で有意に増加し、投与後1~2日間高値を示したがその後減少した。鼻部吸入では、血漿フィブリノゲンはSHRのみ曝露群で有意に増加したが、曝露期間が長くなるに従い減少傾向が認められた。白血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、好中球数は、気管内投与及び鼻部吸入いずれにおいても非曝露群ではWKYラットに比べSHRで高い傾向を示した。ヘマトクリット値は、気管内5 $\text{mg}$ 投与WKYラットでのみ最初の2日間、非曝露群と比較し有意な増加を示したが、その他の指標には曝露影響を認めなかった。血小板数はWKYラット及びSHRで有意な変化を認めなかった。血漿粘度は、清浄空気群ではWKYラットとSHRで類似した値を示したが、気管内5 $\text{mg}$ 投与群ではWKYラットに比べSHRで有意に増加した。

これらの結果から、SHR では PM 曝露が肺障害及び酸化ストレスと関連する急性の血栓由来の反応による血行動態の変化を引き起こす可能性が示唆された。

Elder ら(2004b)は、炭素微粒子の生体影響(肺、血液)に対する影響を明らかにする目的で急性実験を行った。F344 ラットと SHR に対し、粒径 36nm の超微小カーボン粒子 (UCP) を曝露濃度  $150\mu\text{g}/\text{m}^3$  で 6 時間の吸入曝露を行った。一部のラットでは LPS( $2\text{mg}/\text{kg}$ (体重)) を投与した。LPS は肺胞間隙の好中球には変化をあたえないが、血液還流中の好中球の割合を増加させた。F344 ラット、SHR とも UCP で肺の炎症は起こらなかった。UCP は血中の好中球を減少させ、細胞内が蛍光染色の酸化が増加した。また血清中のトロンビン-アンチトロンビン複合体とフィブリノゲンの値は増加した。2 種類のラットでトロンビン-アンチトロンビン複合体のレベルが異なっていた。都市大気中に時々生じる高濃度の粒子のモデルとして吸入された UCP は、高齢ラットの肺以外への影響と炎症性刺激の反応性に変化を与えることが示唆された。

Kodavanti ら(2005)は、1 日曝露実験(1-day exposure study)では SHR をランダムに 2 群に分け 4 時間/日で 1 日、清浄空気もしくは CAPs を吸入させ、同様の実験を 6 回繰り返した(2000 年 10 月~11 月)。2 日曝露実験(2-day exposure study)では、SHR 及び WKY ラットを各 2 群に分け 4 時間/日で 2 日間、清浄空気もしくは CAPs を吸入させ、同様の実験を 7 回繰り返した(2001 年 8 月~10 月)。曝露濃度の範囲は、1 日曝露実験では、 $1,138\sim 1,765\mu\text{g}/\text{m}^3$  であり、6 回の実験とも一貫した高濃度の粒子曝露であったが、清浄空気群と CAPs 曝露群との間で影響に差はなかった。2 日曝露実験では、 $144\sim 2,758\mu\text{g}/\text{m}^3$  であり、7 回の実験でそれぞれ CAPs 濃度が異なっていた。最も高濃度の 1 回目を除いては、WKY ラットで BALF 中総細胞数及びマクロファージが減少し、好中球が増加した。SHR では  $\gamma$ -GTP 活性及び血漿中フィブリノゲンの増加が見られた。吸気及び呼気時間の延長が SHR では見られたが、WKY ラットでは見られなかった。CAPs 濃度は硫酸塩、有機炭素、Zn との間に有意な相関がみられたが、生体影響との間に相関はみられなかった。7 回の実験の初回以外は濃度が低かったが、Zn、Cu、Al 量には数倍の違いがあり、CAPs mg 当たりの有機炭素は増加していた。6 回の実験では生理的影響を認めた。本研究では、CAPs の濃度ではなく化学物質構成に依存した種特異的な肺(WKY ラット)及び全身(SHR)影響を認めた。

## 2) 気管内投与実験

Kodavanti ら(2002a)は、高血圧モデルにおいて ROFA の曝露が心肺血管系にいかなる影響を及ぼすかを明らかにするため、WKY ラットと SHR に対し、粒子径  $1.3\mu\text{m}$  以下の ROFA を  $15\text{mg}/\text{m}^3$  の濃度で、経鼻的に吸入曝露(鼻部にのみ曝露)した。曝露条件は、6 時間/日  $\times$  3 日/週  $\times$  1, 2, 4 週間とした。ROFA は  $\text{SO}_4$ 、Zn、Ni、Fe、V を含んでいた。また、 $0.0\text{mg}/\text{kg}$ (体

重)、1.0 mg/kg(体重)、5.0 mg/kg(体重)を単回、気管内投与した。

鼻部吸入及び気管内投与いずれにおいても ROFA 曝露による体重変動は認めなかった。

肺病理：重傷度を数値化した指標で評価した。肺泡マクロファージの集積は肺の病巣や肺の広い範囲で見られ、中隔肥厚と関連した肺肺炎がみられた。気管支上皮の肥大と単核細胞の血管周囲への浸潤を認めた。

BALF の評価：気管内投与では、WKY ラット及び SHR 共に投与量の増加に従いアルブミン、LDH 活性、好中球数は有意に増加したが、5mg 投与群では投与後 2 日目でも有意な高値を示した。グルタチオンは WKY ラットのみ 5mg 投与群で有意に増加し、投与後 2 日目でも有意な高値を示した。鼻部吸入では、WKY ラット及び SHR 共にアルブミン、LDH 活性、好中球数は清浄空気群に比べ曝露群で有意に増加し、曝露期間が長くなるに従い増加傾向が認められ、WKY ラットに比べ SHR でアルブミンの有意な増加を観察した。グルタチオンは 1 週間曝露の WKY ラットでのみ有意に増加した。

血液の評価：気管内投与では、血漿フィブリノゲンが WKY ラット、SHR 共に 5mg 投与群で有意に増加し、投与後 1~2 日間高値を示したがその後減少した。鼻部吸入では、血漿フィブリノゲンは SHR のみ曝露群で有意に増加したが、曝露期間が長くなるに従い減少傾向が認められた。白血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、好中球数は、気管内投与及び鼻部吸入いずれにおいても非曝露群では WKY ラットに比べ SHR で高い傾向を示した。ヘマトクリット値は、気管内 5mg 投与 WKY ラットでのみ最初の 2 日間、非曝露群と比較し有意な増加を示したが、その他の指標には曝露影響を認めなかった。血小板数は WKY ラット及び SHR で有意な変化を認めなかった。血漿粘度は、清浄空気群では WKY ラットと SHR で類似した値を示したが、気管内 5mg 投与群では WKY ラットに比べ SHR で有意に増加した。

これらの結果から、SHR では PM 曝露が肺障害及び酸化ストレスと関連する急性の血栓由来の反応による血行動態の変化を引き起こす可能性が示唆された。

Rivero ら(2005)は、38 匹の健康な Wistar ラットに麻酔をかけたのち、挿管し、blank filter、1ml の蒸留水にサンパウロ由来 PM<sub>2.5</sub> を 100µg と 500µg 希釈した溶液(PM100、PM500)を各々気管内投与した。気管内投与の 24 時間後に、形態学および乾湿重量比分析のため、血液、心臓、肺のサンプルを採取した。PM<sub>2.5</sub> は次の構成要素：S、As、Br、Cl、Co、Fe、La、Mn、Sb、Sc、Th から成っていた。総網状赤血球は PM100 群と PM500 群で大きく増加し(p<0.05)、一方ヘマトクリット値は PM500 群で増加した(p<0.05)。分葉核球やフィブリノゲンの定量値は大きく減少を示し、一方、リンパ球の数値は PM100 群で増加した(p<0.05)。肺泡内肺細動脈の管腔/壁の割合(L/W 比)の投与量依存的減少が PM 群で観察された(p<0.001)。細気管支周囲動脈の L/W 比は PM500 群で大きく減少していた(p<0.001)。心臓における乾湿重量比の大きな増加は PM500 群で観察された(p<0.001)。結論として、

サンパウロ由来の環境粒子状物質は肺と心臓の組織学的変性を引き起こした。肺の脈管構造は明らかに粒子状物質の気管内投与に影響され、健康なラットにおいて重大な血管収縮に至った。本研究は、急性期において組織炎症の細胞マーカーが明らかな変化を示さない場合でさえも、環境粒子状物質の曝露が肺と心臓の変性を引き起こす可能性を示唆していた。

- 1 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. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 824-30.
- 2 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. *Environ Health Perspect*, 110, 1191-7.
- 3 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. *Am J Pathol*, 153, 1873-84.
- 4 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, 133-40.
- 5 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, 353-61.
- 6 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 National Institute of Public Health and the Environment (RIVM): Bilthoven, The Netherlands.
- 7 Cassee, F.R., Dormans, J.A.M.A., Van Loveren, H., Van Bree, L. & Rombout, P.J.A. (1998). 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. . National Institute of Public Health and the Environment (RIVM): Bilthoven, The Netherlands.
- 8 Cassee, F.R., Dormans, J.A.M.A., Van Loveren, H., Van Bree, L. & Rombout, P.J.A. (1998). Toxicity of ambient particulate matter III. Acute toxicity study in asthmatic