

#### IV. 毒性学研究(動物実験)に関するレビュー

##### 1. 呼吸器系への影響

##### 1.1 吸入曝露

##### 1.1.1 CAPs 都市大気の子状物質の曝露

Gordon ら (1998)は、モノクロタリンにより肺高血圧症を発症させたラットにニューヨークの CAPs(110~360  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )を、3 時間鼻部曝露させた。モノクロタリンを投与したラットにおいて曝露終了 3 時間後に血中好中球数の上昇が見られたが、24 時間後には対照群との差はなくなった。モノクロタリンを投与したラットを 360  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の CAPs に曝露したところ、BALF 中の総細胞数、タンパク質、LDH 活性が約 2 倍に上昇した。

Clarke ら (1999)は、慢性気管支炎罹患ラット(250ppm  $\text{SO}_2$  吸入による)12 匹に CAPs(1 回目 : 206  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、2 回目 : 733  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、3 回目 : 607  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )を、18 時間/日、連続 3 日間の条件で曝露したところ、健康群(対照群)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。

Clarke ら (2000a)は、若齢ラットと老齢ラットを CAPs もしくは、清浄空気で 5 時間/日で連続して 3 日間曝露した。用いた大気粒子状物質(ボストン大気、平均粒径 : 0.18  $\mu\text{m}$ )の曝露濃度は、平均で 1 日目 : 80  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、2 日目 : 170  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、3 日目 : 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。最終曝露後に心臓穿刺により採血し、気管支肺胞洗浄(BAL)も行なった。若齢ラットは老齢ラットと比べ、かなり高い BALF 中の総細胞数を示し、CAPs 曝露後に多核白血球(PMN)の有意な増加が見られた。老齢ラットでは BALF 中の総細胞数、LDH、総白血球数、総白血球と PMN のパーセント、リンパ球、単核球の間に CAPs 曝露による顕著な変化はみられなかった。CAPs またはろ過空気曝露による老齢ラットと若齢ラットの影響の比較では、老齢ラットで BALF 中の総細胞数、総白血球数、血液中のリンパ球の比と血液ヘモグロビンにおいて有意な減少が見られ、また、血液中 PMN の割合では増加が見られた。以上のことから①若齢 Fisher ラットは CAPs 曝露による肺の炎症反応を調べる研究で敏感なモデルとなりうる。②老齢ラットで血液中の好中球の割合が高いのにも関わらず肺の炎症反応が小さいのは吸入粒子に対する感受性の低さを反映しているのかもしれないことを示唆している。

Clarke ら (2000b)は、CAPs(ボストン由来、曝露濃度 :  $361 \pm 267 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) を用いて、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 6 時間/日、3 日間連続曝露した。血液学的な検索では、CAPs またはろ過空気の曝露後、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かなり大きかった。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 因子 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 因子 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 の吸入が肺性およ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かもしれないということを示唆している。

Godleski ら (2000) は、CAPs の循環系への急性効果を検討した。曝露濃度は冠動脈無処置動物(イヌ)で  $93.7 \sim 1,055.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、冠動脈閉塞動物で  $71.8 \sim 741.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。曝露時間は、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。浮遊粒子状物質は、冠動脈無処置動物の自律神経系、心電図(心機能)、呼吸機能や、冠動脈狭窄や閉塞に基づく心機能増悪に悪影響を及ぼす可能性があるとして述べている。

Gordon ら (2000) は、F344 ラット(雄)にモノクロタリンを前投与して右心肥大と肺高血圧を誘導した後に、Gerber 遠心エアロゾル濃縮器を用いたニューヨークの CAPs を吸入曝露(曝露濃度: $134 \sim 400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、3~6 時間/日、1 日)して、呼吸機能、心電図、BALF 中の炎症性細胞と LDH 活性を測定した。モノクロタリンを前投与したラットにおいて、ニューヨークの CAPs の 6 時間曝露により BALF 中の好中球が有意に上昇したケースも見られたが、一定した傾向が見られず、心肺機能においても特筆すべき変化は見られなかった。

Kodavanti ら (2000a)らは、気管支炎ラットモデルで CAPs 曝露による肺への影響を検索するため、SD ラット(雄)に SO<sub>2</sub>を曝露して気管支炎を誘導した。SO<sub>2</sub>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  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、2 回目(#B)約 475  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、3 回目(#C):約 869  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、4 回目(#D):約 907  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 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。

Zelikoff ら (2003)は、CAPs (ニューヨーク由来)を、F344 ラット(雄、7~8 ヶ月齢)を第 1 群: 345  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、第 2 群: 107  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  の 2 群に分けて鼻部曝露を行い易感染性の実験を行った。第 1 群は CAPs を 3 時間曝露した後に肺炎球菌を気管内投与した。第 2 群には、肺炎球菌を投与してから 48 時間後に CAPs を 5 時間曝露した。影響としては、BALF 中のサイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha/\beta$ 、IL-6)、肺炎球菌の肺クリアランスなどであった。第 1 群は清浄空気曝露群に比べ大きな変化は見られなかったが、第 2 群では、CAPs 曝露群においてサイトカインの産生の有意な減少、肺炎球菌のクリアランスの遅延、血中好中球数の

上昇が見られた。これらのことから CAPs の単回曝露は、感染状態を悪化させることが示唆された。

Smith ら (2003)は、SD ラット(雄、9~10 週齢)に、4 時間/日、連続する 3 日間 CAPs (VACES-CAPs、カリフォルニア州由来、0.01~10 mm、40 倍濃縮、曝露濃度: 190~847  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )を曝露して曝露終了後に気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、炎症細胞数を数えた。CAPs の成分の多くは、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  と有機炭素成分であった。CAPs の吸入曝露により、清浄空気群と比較して BALF 中の細胞数、特に好中球数が上昇した。また、回収した細胞の生存率が有意に減少した。

Gurgueira ら (2002)は、ラットに CAPs(曝露濃度: 300( $\pm 60$ )  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )を 1、3、5 時間/日、1 日吸入させ、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 の曝露(1.7  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、30 分)において認められたが CB(300  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、5 時間)では変化は認められなかった。肺の化学発光量は、CAPs 中の Ca、Mn、Cu、Fe、Zn と、心臓の化学発光量は、Si、Al、Ti、Fe と相関が見られた。また、肺の障害指標としての乾湿重量比、組織障害指標としての血清 LDH、クレアチンホスホキナーゼ活性、肺の Mn-SOD とカタラーゼ活性、心臓の Cu/Zn-SOD と Mn-SOD 活性が CAPs の曝露により上昇した。

Nadziejko ら (2002b)は、血圧の発信装置を外科的に植え込んだ SHR に CAPs を 4 時間曝露して、CAPs の吸入の即時影響があるかどうかを調べた。用いたのは CAPs、硫酸エアロゾル(MMAD : 160nm)、および Ultrafine 硫酸粒子(MMAD;50~75nm)であった。曝露濃度はそれぞれ、CAPs : 平均 73  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸エアロゾル : 平均 225  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、硫酸微粒子 : 468  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。酸はひとつの粒子成分として、刺激的な受容体を活性化して影響する可能性があるため、硫酸エアロゾルもラットに曝露した。CAPs 曝露をはじめた直後に顕著に呼吸数が減少したが、CAPs の曝露停止により回復した。呼吸数の減少に伴い、心拍も減少した。同じラットに微粒子サイズの硫酸エアロゾルを曝露しても CAPs の影響と同様の呼吸数の減少を引き起こした。CAPs と比べて、Ultrafine の硫酸粒子曝露では、呼吸数は上昇した。酸はげっ歯類で知覚刺激反応を引き起こすが、微粒子サイズの酸のエアロゾルと CAPs の影響が類似していることから、CAPs も気道刺激受容体を活性化することが示唆された。

Goldsmith ら (2002)は、CAPs(ボストン由来、 $\text{PM}_{2.5}$ )の急性曝露効果を検討するために、OVA 感作若齢マウス(ヒトの喘息モデルを想定)に CAPs と  $\text{O}_3$ ( $\text{PM}_{2.5}$  : 63.5~1,568.6  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $\text{O}_3$  : 0.3%)を 5 時間/日、3 日間連続(生後 21、22、23 日目)曝露し、24 時間後の肺機能検査および炎症所見についての BALF および肺組織の形態学的検討を行った。その結

果、一過性かつわずかであるが(0.9%/100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )CAPs 曝露群で気道狭窄の指標としての Penh: enhanced pause(肺気流抵抗)の有意な上昇が認められた。炎症性変化は認められなかった。CAPs の元素組成のうち、Al-Si の影響が示唆された。

Saldiva ら (2002)は、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(5 時間/日、3 連続日)した。慢性気管支炎は  $\text{SO}_2$ (平均 276.4ppm)を吸入させることにより惹起させた。

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、前述の結果が得られた。好中球の増加は、粒子、V、Br、Pb、 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、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、 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、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。全体においては V および Br と組織所見、正常ラットにおいては Pb、Cl、元素状炭素、および有機炭素と組織所見の間に相関を認めたが、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。

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

Rhoden ら (2004)は、ラットに CAPs(ボストン由来、 $\text{PM}_{2.5}$ 、曝露濃度  $\text{PM}_{2.5}$ : 1,060  $\pm 300$   $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、CAPs: 1,228  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )を 5 時間曝露し、肺組織の生化学的およ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、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-Acetylcysteine 前処置により、酸化脂質産生、肺の湿重量増加、BALF 内の好中球浸潤およ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。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。

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

Harkema ら (2004)は、ラットに、CAPs(デトロイト由来、 $\text{PM}_{2.5}$ 、曝露濃度:7 月 :  $16 \sim 895 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、9 月 :  $81 \sim 755 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )の吸入曝露実験を行った。曝露は 10 時間/日で、1 日、4 日、あるいは 5 日間行った。都市部における大気中微小粒子( $\text{PM}_{2.5}$ )の、正常な状態と気道に炎症がおき粘液分泌が促進している状態での悪影響について検討した。その結果、正常なラットの上・下気道に悪影響はほとんどみられなかった。エンドトキシンで処置した F344 ラットでも曝露による影響は見られなかった。しかし、OVA で感作してアレルギー炎症を誘導しておいた Brown Norway(BN)ラットへの曝露では、9 月の 5 日間 CAPs 曝露で、気道粘液産生と気管支炎の増加が認められた。7 月の曝露では OVA 感作したラットへの影響は少なく、9 月の曝露による影響には、人間活動起源の La、V、S などが曝露したラットの肺組織中で多かったことから、これらの組成の違いがかかわっていることが示唆された。

次に、CAPs 中の原因物質を探るため、9 月の曝露で集めた粒子を可溶性、難溶性画分に分け OVA 感作した BN ラットに気管内投与して炎症増悪と物質との関連について調べたが、全身曝露でみられた結果が再現できず、同定はできなかった。

以上、9 月に曝露した  $\text{PM}_{2.5}$  では正常ラットでは影響はみられなかった。喘息モデルのラットでは気道粘液産生や気管支炎の増悪がみられ、デトロイトの南西部の粒子中に重量濃度に依存しない喘息の悪化にかかわる粒子が存在している可能性が肺沈着分析から明らかにされた。

Kobzik ら (2001)は、OVA 誘発性喘息モデルマウスにおける CAPs と  $0.3\text{ppm O}_3$  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<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 μg/m<sup>3</sup> につき 0.86%上昇)。②300~500 μg/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-γ で前刺激した肺胞マクロファージによる TNF-α 及び MIP-2 産生量に対する CAPs の影響を *in vitro* で検討したが、CAPs の元素組成と産生量の変化との間に相関は認めなかった。CAPs 曝露の直後において、比較的小さな気道反応性の亢進が短時間(<24 時間)見られることが示された。また、明瞭ではなかったものの、気道反応性亢進の程度は CAPs 中の Al-Si 含有率と正相関することが示された。

Zelikoff ら (2002)は、CAPs(粒径 PM<sub>2.5</sub>、65~90 μg/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負荷率(relative bacterial burdens)の増加を認めている。金属塩 (Fe, Ni, Mn の塩化物) 曝露では、とくに Fe (2 価)の曝露後に回収した BALF のマクロファージから産生されるスーパーオキシドアニオン (•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負荷は増加している。これらの結果から、ニューヨークでの大気粒子曝露と Fe 塩化物曝露の肺炎や免疫能に対して類似した影響を及ぼし、大気粒子の免疫毒性には Fe が関与していると考えられると述べている。

Kodavanti ら (2005)は、CAPs の急性曝露実験を行った。粒径は 1 日曝露実験(1-day exposure study)では 1.07~1.19 μm であり、2 日曝露実験(2-day exposure study)では 1.27~1.48 μm であった。曝露濃度は、1 日曝露実験で 1,138~1,765 μg/m<sup>3</sup>、2 日曝露実験では 144~2,758 μg/m<sup>3</sup> であった。1 日曝露実験では SHR をランダムに 2 群に分け 4 時間/日で 1 日間、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)。その結果、1 日曝露実験では、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 曝露群との間で生体影響に差はなかった。

2日曝露実験では、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中の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。

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。

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 $\mu$ g/m<sup>3</sup>(73.5~733 $\mu$ g/m<sup>3</sup>))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 $\pm$ 9ppm SO<sub>2</sub>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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>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。

GunnisonとChen(2005)は、動脈硬化をきたしやすいマウスを用い、CAPs(modified VACES system developed by Sioutas)を使用、131( $\pm$ 99) $\mu$ g/m<sup>3</sup>もしくは清浄空気を吸入

させた。6時間/日、5日間/週、約4ヶ月連続曝露終了後に、心臓と肺を摘出し、発現遺伝子を Affymetrix 社の GeneChip を用い、包括的に解析した。対照曝露群に比較し、CAPs 曝露群で 1.5 倍以上の有意な変化が見られた遺伝子は、肺に関しては存在しなかった。心臓に関しては、Rex3 遺伝子が、有意な変動を示した。解析法を修飾すると、心臓において 10 程度、肺において 30~40 の遺伝子が軽度に変動していた。

Vincent ら (1997)は、ラットにオタワ標準粉じん(EHC-93)と O<sub>3</sub>に、4時間/日、1日、それぞれの単独、または複合曝露(EHC-93：低濃度：5~6 mg/m<sup>3</sup>、高濃度：48 mg/m<sup>3</sup>、MMAD = 4.6 μm、O<sub>3</sub>：0.8 ppm)させ、曝露終了 32 時間後に[3H]-チミジンを投与して 90 分後の組織のラベル率(細胞増殖)を調べた。EHC-93 の約 20%は PM<sub>2.5</sub>を反映していた(硫酸塩の量などから推測)。一度捕集した粒子を吸入実験のために分散させてエアロゾル化したので、吸入チャンバー内の空気をフィルターで捕集し分析すると、アントラセン、フェナンスレンなどの低分子量の PAH が揮発してフィルターに吸着されるため、見かけ上は吸入チャンバー内のアントラセン、フェナンスレン濃度が高まっているような測定値となった(18~19.2 倍)。粒子単独曝露群では変化はみられなかったが、O<sub>3</sub>単独曝露群では終末細気管支と第一肺胞道のラベル率が有意に上昇した。粒子(低濃度、高濃度ともに)と O<sub>3</sub>の複合曝露群では、O<sub>3</sub>の影響がさらに強く見られた。第一肺胞道より抹消の気道に影響は見られなかった。粒子状物質が O<sub>3</sub>などのガス状都市大気汚染物質の呼吸器への影響を増悪させていることがはっきり示された。

Bouthillier ら (1998)は、ラットに一度捕集したオタワ標準粉じん(EHC-93)と O<sub>3</sub>に、4時間/日、1日、3日、それぞれの単独、または複合曝露(EHC-93：40 mg/m<sup>3</sup>、O<sub>3</sub>：0.8ppm)させ、肺の病理組織、BALF 中の炎症性細胞やフィブロネクチン、BALF 中に回収したマクロファージを培養した上清の亜硝酸(LPS 誘導)、TNF-α、MIP-2、エンドセリン(ET)-1 ならびにマクロファージの食活性を測定した。また、血清中の ET-1 も測定した。隔壁ならびに 2 型上皮細胞の形態計測学的変化(表面に対する体積)は複合曝露群においてのみ上昇した。BALF 中の炎症パラメーターは O<sub>3</sub>単独曝露群と複合曝露群においてのみ上昇が見られた。マクロファージの食活性は、O<sub>3</sub>単独曝露群と複合曝露群においてのみ低下が認められた。マクロファージ培養上清中の MIP-2 ならびに血清中の ET-1 は、粒子単独曝露群、ならびに複合曝露群に於いて上昇が認められた。

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)および 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/m<sup>3</sup>、EHC-93L: 49mg/m<sup>3</sup>、DS: 4.2mg/m<sup>3</sup> および CBP: 4.6mg/m<sup>3</sup>であった。

結果として、全ての曝露群で肺病理及びチミジ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。

Thomson ら (2004)は、オタワ標準粉じん(EHC-93、粒径：1.3~3.6  $\mu\text{m}$ 、曝露時間：4 時間、曝露濃度：0.8 ppm  $\text{O}_3$ + 49  $\text{mg}/\text{m}^3$ )を吸入した 2 時間後に、肺の preproET-1 および endothelin-converting enzyme (ECE)-1 の mRNA の発現を検討しこれらの増加を認めた。一方、preproET-3 の mRNA の発現は逆に低下した。 $\text{O}_3$  と SPM の曝露により肺のエンドセリン遺伝子の発現が増加した。

Thomson ら (2006)は、F344 ラットにオタワ標準粉じん(EHC-93)、 $\text{O}_3$  を 4 時間吸入させた。血中エンドセリン (ET)-1、ET-3 は EHC-93、 $\text{O}_3$  曝露後すぐ上昇した。吸入直後の肺の preproET-1 mRNA は増加したが、preproET-3 mRNA は減少した。血中 ET-2 は曝露により変化はなかった。この結果から肺での ET-3 合成は粒子吸入による血中 ET-3 の増加とは関連がなく、preproET-3 の調節は肺以外の他の部位で行われている可能性があると考えられた。粒子曝露により肺の preproET-1 の upregulation と preproET-3 の downregulation が同時に起こっているため、肺局所の ET-1/ET-A 受容体による血管収縮と ET-3/ET-B 受容体による血管拡張が整合していないと述べている。

Steerenberg ら (2003)は、マウスで DEP とオタワ標準粉じん(EHC-93)を用いて、さまざまな OVA 感作・誘発系で慢性影響を検討し、①腹腔感作/エアロゾル誘発群と点鼻感作/エアロゾル誘発群は同等の IgE 免疫反応を示したこと、また、点鼻感作/点鼻誘発群はより低い反応を示したこと、②細胞性炎症の強さは腹腔感作/エアロゾル誘発群>点鼻感作/点鼻誘発群>点鼻感作/エアロゾル誘発群の順であったこと、③点鼻感作/エアロゾル誘発群での DEP の影響では、点鼻感作 20  $\mu\text{g}$ 、エアロゾル誘発群 1%群で有意に IgE 反応を増強し、肺の炎症変化及び BALF 中好酸球の増加がみられたこと、④点鼻感作/点鼻誘発群での DEP

の影響では、点鼻感作 20  $\mu$ g/点鼻誘発 2  $\mu$ g 群で IgE 反応が増強され、また、炎症性変化や BALF 中好酸球の増加がみられたこと、⑤点鼻感作/点鼻誘発群での EHC-93 の影響としては IgE 反応の増強、炎症性変化や BALF 中好酸球の増加、気道過敏性の増強がみられたこと、⑥BALF 中の IL-4、IL-5、IFN- $\gamma$  の量には有意な変化が見られなかったことを報告した。本調査は、粒子物質の投与によりアレルギー反応へのアジュバント作用がみられることを示した。

### 1. 1. 2 ROFA・燃焼に伴って発生する粒子状物質の影響

Hamada ら (1999)は、マウス喘息モデルにおける ROFA 曝露の曝露時間 30 分/日の急性影響を調べた。ネブライザー曝露の曝露濃度は 50mg/ml。新生マウスの生後 3、7 日に OVA(5  $\mu$ g)を含有する水酸化アルミニウムゲル[Al(OH)<sub>3</sub>](1 mg)を腹腔内投与した。1 週間後にアレルギー(3% OVA in PBS、10 分/日、生後 14~16 日)をネブライザー投与した。その結果、処理マウスでは、メサコリンに対する気道過敏性の上昇、BALF 中の好酸球増加、気道の組織学的炎症像、抗 OVA IgE 増加を認めた。次にこの喘息のモデル動物を用いて、生後 15 日に OVA の代わりに ROFA 溶出液(supernatant of 50 mg/ml、30 分)を曝露すると、気道過敏性と炎症を認めた。なお、OVA 感作をしていないマウスでは ROFA 溶出液曝露による変化はなかった。感作マウスにおける ROFA による変化は抗酸化物質である DMTU(3mg/kg 個体、i.p.)により抑えられた。

Kodavanti ら (1999)は、SD ラット(60 日齢、体重 250~300 g)にモノクロタリン 60 mg/kg(体重)を腹腔内投与して肺障害/肺高血圧を引き起こした。対照群には生理食塩水(正常ラットと以下表記)を同様に投与した。10 日後に清浄空気または ROFA(15 mg/m<sup>3</sup>)を気管内投与(生理食塩水、0.83 あるいは 3.33 mg/kg(体重))、あるいは鼻部吸入曝露(15 mg/m<sup>3</sup> × 6 時間/日 × 3 日)を行い、肺の組織像、サイトカイン遺伝子発現、BALF を調べた。正常ラットでは ROFA 吸入により、肺浮腫、炎症細胞浸潤、肺胞壁の肥厚が認められた。BALF の炎症マーカーの上昇や IL-6、MIP-2 発現増加も認めた。モノクロタリン処理したラットでは、炎症細胞の血管周囲への浸潤、大きいマクロファージの存在、肺胞壁の肥厚が認められた。BALF 中タンパク質や炎症マーカー(マクロファージ数、好中球数)も上昇し、肺障害を示していた。モノクロタリン処理後に ROFA を気管内投与されたラットの 58%が 96 時間以内に死亡したのに対し、吸入曝露群では死亡例はなかった。モノクロタリン処理後に ROFA 吸入曝露したラット群では肺損傷の増悪が見られた。すなわち、肺水腫、肺胞壁の肥厚、炎症細胞浸潤であった。BALF 中のマクロファージ、好中球、好酸球および IL-6 発現は、モノクロタリン、ROFA それぞれ単独投与による増加の相加作用を上回る増加を示した。結論として、ROFA の気管内投与は肺障害/肺高血圧モデルラットの死亡率を引き上げたと言っている。

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

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

ROFA 曝露効果では、SHR の方が肺組織の炎症所見が WKY ラットよりやや強く、BALF 中タンパク質、アルブミン量は有意に増加した。また、SHR においては BALF 中赤血球数の増加が見られ、このことは肺実質において障害が引き起こされていることを示していた。肺胞マクロファージ数は、WKY ラット、SHR で清浄空気時に比較して有意に増加したが、WKY に比較して SHR で有意に多かったが、好中球数の増加は両ラットで同程度であった。グルタチオン、アスコルビン酸、尿酸は ROFA 曝露で有意な増加が見られたが、その増加の程度は WKY ラットに比べて SHR では小さかった。肺サイトカイン IL-6mRNA 発現量、フィブロネクチン、G6PD は WKY、SHR で同様に増加していたが、MIP-2mRNA 発現量は WKY ラットで増加したのに対して、SHR では減少した。左室心筋 IL-6、TGF- $\beta$  mRNA 発現量は、非曝露時では WKY ラットに比較して SHR で明らかに高かったが、ROFA 曝露による亢進は認めなかった。重油燃焼排気中の粒子状物質の吸入が、心機能の異常の発生と関連している可能性があるとして述べている。

Kodavanti ら (2002a)は、WKY ラットと SHR に ROFA(MMAD 1.3  $\mu$  m 以下、曝露時間 WKY ラット:6 時間/日、3 日/週、1 週間、4 週間、SHR:6 時間/日、3 日/週、1 週間、2 週間、4 週間、曝露濃度 15 mg/m<sup>3</sup>)を鼻部吸入及び気管内投与し、心肺血管系への影響を検討した。ROFA は SO<sub>4</sub>、Zn、Ni、Fe、V を含んでいた。

鼻部吸入及び気管内投与いずれにおいても ROFA 曝露による体重変動は認めなかった。肺病理は重傷度を数値化した指標で評価した。肺胞マクロファージの集積は肺の病巣や肺の広い範囲でみられ、中隔肥厚と関連した肺胞炎がみられた。気管支上皮の肥大と単核細胞の血管周囲への浸潤を認めた。BALF の評価では、気管内投与では、WKY ラット及び SHR 共に投与量の増加に従いアルブミン、LDH 活性、好中球数は有意に増加したが、5mg 投与群では投与後 2 日目でも有意な高値を示した。グルタチオンは WKY ラットのみ 5mg 投与群で有意に増加し、投与後 2 日目でも有意な高値を示した。鼻部吸入では、WKY ラット及び SHR 共にアルブミン、LDH 活性、好中球数は清浄空気群に比べ曝露群で有意に増加し、曝露期間が長くなるに従い増加傾向が認められ、WKY ラットに比べ SHR でアルブ

ミンの有意な増加を観察した。グルタチオンは 1 週間曝露の WKY ラットでのみ有意に増加した。

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

これらの結果から、SHR では PM 曝露が肺障害及び酸化ストレスと関連する急性の血栓形成反応を引き起こす可能性が示唆された。この結果は、心臓に疾患を持つヒトにおける PM 曝露と心血管疾患との関連性を示唆する疫学的結果と一致するものであると述べている。

Kodavanti ら (2002b)は、ラットを用いて、oil combustion emission particulate matter (EPM)の吸入曝露および気管内投与実験を行った。粒径は  $1.2 \mu\text{m}$ (MMAD、GSD=2.6)であった。吸入曝露実験では①EPM $10\text{mg}/\text{m}^3$ またはろ過空気、6 時間/日×1 日/週×16 週、② $10\text{mg}/\text{m}^3$ 、6 時間/日×1 日/週×4 週、③ $10\text{mg}/\text{m}^3$ 、6 時間/日×1 日/週×1 週、④ $10\text{mg}/\text{m}^3$ 、6 時間/日×4 日/週×1 週、⑤ $5\text{mg}/\text{m}^3$ 、6 時間/日×4 日/週×1 週、⑥ $2\text{mg}/\text{m}^3$ 、6 時間/日×4 日/週×1 週の 6 通りについて曝露を実施した。

EPM の気管内投与は、濃度依存性に、BALF 中へのタンパク質漏出や炎症細胞浸潤を増悪した。また、炎症反応は 96 時間後にはほぼ消失していた。

EPM 全体と EPM 水溶成分の成分、 $\text{ZnSO}_4$ 水溶液の気管内投与により、BALF 中へのタンパク質漏出や炎症細胞(好中球)浸潤が誘導された。

吸入曝露実験では、 $10\text{mg}/\text{m}^3 \times 6$  時間/日×1 日/週×1 週の曝露によってのみ、BALF 中へのタンパク質漏出が軽度に見られたが、系統差が存在していた。EPM 曝露により、曝露の濃度と期間に依存して BALF 中のマクロファージ数が増えていたが、好中球の浸潤は見られなかった。EPM の潜在的毒性と、それにおける水溶性の Zn 含有成分の重要性を示唆している。

Dormans ら (1999)は、CFA(MMAD 低濃度： $1.9 \pm 1.8 \mu\text{m}$ 、中濃度  $2.2 \sim 2.8 \pm 1.6 \mu\text{m}$ 、高濃度： $2.6 \pm 1.8 \mu\text{m}$ 、Total PAH  $27\text{mg}/\text{kg}$ )の吸入曝露による呼吸器、免疫系への影響を調べた。ラットに CFA(0、10、30、 $100 \text{mg}/\text{m}^3$ )を 4 週間(6 時間/日、5 日/週)吸入曝露した。

また、回復試験では CFA (0、100 mg/m<sup>3</sup>)を 1 週間曝露し、その後 3 週間清浄空気を吸わせた。肺重量は 30 mg/m<sup>3</sup>以上の曝露濃度で濃度依存性に増加した。100 mg/m<sup>3</sup>曝露後、肺への遊離粒子の沈着、肺胞マクロファージによる CFA 粒子の貪食が観察された。組織学的検討では単核細胞の浸潤、II 型細胞の増殖、軽度の線維化による肺胞隔壁の細胞数増加が認められた。3 週間の回復試験では、有意な回復は認められなかった。組織学的・臨床化学的検討、尿検査では毒性学的有意な変化を認めなかった。非特異的防御機構と特異的免疫反応の両者を認めた。肺リンパ節では T および B リンパ球の増加を観察した。T/B 比はいずれの曝露濃度でも変化がなかった。曝露群では血清 IgA 濃度が最大 150%上昇を示した。BALF 中マクロファージの貪食能は増加したが、細胞一個あたりの殺菌能に変化はなかった。ナチュラルキラー活性に有意な変化はなかった。

Fernandez ら (2002)は、マウスにおいて石炭と乾燥下水汚泥の燃焼由来粒子(MSS/coal ash)(平均粒径 3.5 μm、曝露濃度 0mg/m<sup>3</sup>、1,000 μg/m<sup>3</sup>、3,000 μg/m<sup>3</sup>、曝露時間 1 時間/日で 24 日連続曝露)の呼吸器への影響について検討した。肺におけるダイナミック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、肺の <sup>99m</sup>Tc (Technetium、テクネチウム)を用いた透過性の測定では、MSS/coal ash の濃度依存的な増加が認められた。一方、BALF の細胞数は、MSS/coal ash 群で濃度上昇とともに低下がみられた。粒子を溶解した溶液の pH に差がなかったため、粒子の組成が肺の障害にかかわる可能性を示唆している。

Fernandez ら (2003)は、マウスで石炭由来の粒子の毒性とごみ燃料との混合により発生する粒子(平均粒径 2 μm、曝露濃度平均 1,000 μg/m<sup>3</sup>、曝露時間 1 時間/日で 8、12、24 日連続曝露)の肺への毒性について比較検討した。肺の <sup>99m</sup>Tc クリアランスからみた透過性については、混合群では 8 日曝露で有意な透過性亢進がみられた。一方、石炭のみの燃焼由来の粒子では、3 日目に透過性の減少がみられたが、それ以降は対照群のレベルに回復した。肺コンプライアンス、気道抵抗、ダイナミックコンプライアンスにおいては、混合群において変動はみられなかったが、粒子の曝露による経時的变化と肺の透過性測定の重要性を示した。

Purdy ら (2005)は、ヤギを用いてテント状の室で 4 時間 Class C フライアッシュダスト(平均粒径 17.8 μm (範囲 0.1~130 μm)、曝露濃度 62.3 ± 30 g/m<sup>3</sup>)曝露を 3 ヶ月の間に 6 回(曝露時間:4 時間/回)行い、最終曝露の 2 時間後に解剖した。その後、直腸温の測定を 0、4、6、8、24、72 時間後に行った。また、0、24、72 時間後には血中の白血球数、ヘマトクリット値を測定した。対照群に比べ、直腸温は、4、6、8 時間後には増加したが、72 時間後では低下がみられた。ヘマトクリット値の増加もみられた。組織学的には、無気肺様病変がみられた。

Smith ら (2006)は、CFA ( $2.5 \mu\text{m}(\text{PM}_{2.5})$ 以下の CFA 平均濃度は  $1,400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )の肺障害と全身的炎症への影響を SD ラット(雄)に 4 時間/日×3 日の期間、清浄空気または CFA を曝露することにより検討した。動物は曝露 18 時間、36 時間後に調べた。CFA を化学的に分析した結果、主要な構成要素は Si、Ca、Al、Fe であった。有意に増加した血液白血球と共に、曝露後、BALF 内の総好中球数も増加した。CFA の曝露は MIP-2 をわずかに上昇させ、BALF 内のトランスフェリンも上昇を示した。肺組織における IL-1 $\beta$  や抗酸化ポテンシヤル(Total antioxidant potential)もまた CFA を曝露させたラットで上昇した。肺組織の組織学的検査では終末細気管支のすぐ先の肺胞において、局所的な肺胞隔壁の肥厚および細胞質の増大が認められた。それらの反応は、職業的に関連性のあるレベルで短時間の曝露により肺と血液中における軽度好中性炎症を導く CFA の能力に一致した。しかしながら、CAPs の影響と CFA の影響を比較したとき、CFA には肺の変性を引き起こす多大な力はみられなかった。

### 1. 1. 3 DEP やガソリン排気による影響

#### ① 呼吸機能への影響

Vinegar ら (1980)、Vinegar ら (1981a)、Vinegar ら (1981b)は、Chinese ハムスターを  $6.0\text{mg}/\text{m}^3$  の粒子を含む DE に 26 週間(8 時間/日、7 日/週、 $8,736\text{mg}\times\text{h}/\text{m}^3$ )曝露すると、肺活量、肺重量、肺残気量、CO<sub>2</sub> 拡散能が低下することを見いだした。静的 deflation volume は増加した。同様の影響が、 $12.0\text{mg}/\text{m}^3$  の粒子を含む DE に 26 週間(8 時間/日、7 日/週、 $17,472\text{mg}\times\text{h}/\text{m}^3$ )曝露した場合にも見いだされた。

Abraham ら (1980)は、低濃度急性の DEP 曝露が覚醒しているヤギの呼吸機能に及ぼす影響について検討した。DEP は流動化床(ベット)のダスト発生器によってエアロゾル化された。ダスト質量濃度レンジは  $400\sim 500 \mu\text{g}/\text{m}^3$  で MMAD は  $2.8 \mu\text{m}$  であった。ヤギには 30 分間のプレキシグラスヘルメット法で DEP を吸入させた。粒子(DEP)は曝露の前の値と比較して肺抵抗、エアロゾルカルバコールに対する気道反応、静的肺コンプライアンス、気道粘液速度に影響を与えなかった。

Pepelko ら (1980)は、28 日間の DE 曝露が呼吸器系に及ぼす影響について明らかにするため、呼吸機能の検討を行った。ネコ(雄)を 14 倍希釈した DE に 20 時間/日で 28 日間曝露した。曝露後に呼吸機能：肺容積と最大呼気流量、肺活量が 50 および 25、10%のときの最大呼気流量などを測定した。その結果、有意な機能的変化は、肺活量が 10%のときの最大呼気流量の減少を認めただけであった。

Gross (1981)は、F344 ラット(雄)を  $1.5\text{mg}/\text{m}^3$  の DEP を含む DE に 38 週間(20 時間/日、5.5 日/週)曝露した場合では呼吸機能には有意な影響はみられないが、87 週間(20 時間/日、

5.5 日/週)曝露した場合、機能的残気量(安静呼気状態における肺内気量)が増加することを見いだした。一方、40%および20%FVCにおける最大呼気流量とFEV<sub>0.1</sub>はDE曝露した動物では増加することを見いだした。

Heinrichら(1982)は、Wistarラットに3.9mg/m<sup>3</sup>の粒子を含むDEを104週間(7~8時間/日、5日/週、14,196~16,224mg×h/m<sup>3</sup>)曝露した場合でも呼吸速度、1分量、コンプライアンス、気道抵抗に影響がないことを見いだした。

Brightwellら(1986)は、F344ラットに0.7、2.2、6.6mg/m<sup>3</sup>の粒子を含むDEを104週間(16時間/日、5日/週、5,824、18,304、54,912mg×h/m<sup>3</sup>)曝露すると6.6mg/m<sup>3</sup>の場合では呼吸機能に濃度依存的な影響があることを見いだした。

Heinrichら(1986a)は、Syrianハムスターに4.24mg/m<sup>3</sup>の粒子を含むDEを120週間(19時間/日、5日/週、48,336mg×h/m<sup>3</sup>)曝露すると気道抵抗に著しい増加が見られることを見出した。

Mauderlyら(1988)およびMcClellanら(1986)は、F344ラットを0.35、3.5、7.1mg/m<sup>3</sup>のDEPを含むDEに130週間(7時間/日、5日/週)曝露し呼吸機能に及ぼす影響を検討した。その結果、7.1mg/m<sup>3</sup>の曝露では12ヶ月曝露後に全肺気量、動的肺コンプライアンス、FVC、CO拡散機能の低下が見られた。また、24ヶ月曝露後では全肺気量、動的肺コンプライアンス、準静的肺コンプライアンス、CO拡散能が低下することが見いだされた。3.5mg/m<sup>3</sup>でも同様の影響が認められたが、0.35mg/m<sup>3</sup>では影響は認められなかった。

Lewisら(1989)は、F344ラットに2.0mg/m<sup>3</sup>のDEPを含むDEを曝露し104週間目(7時間/日、5日/週)では呼吸機能には有意な影響がみられないことを報告している。濃度と曝露期間をともに考慮する指標として濃度×期間に当てはめるとGrossらの結果は14,355mg×h/m<sup>3</sup>の曝露であり、Lewisらの結果は7,280mg×h/m<sup>3</sup>の曝露量となり、曝露濃度と期間に依存した影響が出ている可能性がある。一方、同様の条件(2.0mg/m<sup>3</sup>のDEPを含むDE、7時間/日、5日/週、104週間、7,280mg×h/m<sup>3</sup>)でサルを用いた実験(Lewisら、1989)では25%の肺活量のところでの努力性呼気流量が減少した。また、40%の全肺気量のところでの努力性呼気流量の減少が見られたが肺の体積、拡散能または換気の分布(ventilation distribution)に影響は見られなかった。

## ② 喘息

Miyabaraら(1998c)はC3H/Heマウス(雄 6週齢)にOVAを含有する水酸化アルミニウムゲル1mgを腹腔内注射して感作した後、12時間/日、7日/週、5週間にわたってDEP濃

度として  $3\text{mg}/\text{m}^3$  の DE を吸入させ、さらに、3 週間に 1 回ずつ、1%OVA 溶液から発生させたミストを 15 分間ずつ吸入させ、呼吸抵抗と気道炎症指標ならびに各種サイトカイン濃度の変化を調べた。BALF 中の好酸球数は OVA+DE 曝露群でのみ増加( $1 \times 10^3$  個/総 BALF)し、好中球数は DE 曝露群と OVA+DE 曝露群で顕著に増加( $10 \sim 20 \times 10^4$  個/総 BALF)した。OVA+DE 曝露群の気道粘膜下への好酸球の浸潤は対照群の 80 倍で、OVA 群の 4.4 倍に増加し、粘液産生細胞の増生は OVA+DE 曝露群と OVA 曝露群で対照群の各々 66 倍と 6 倍に増加した。呼吸抵抗も OVA+DE 曝露群と OVA 群は対照群のそれぞれ 2.4 倍、1.5 倍へと上昇した。血清中の IgE と IgG1 の抗体価は OVA 群より OVA+DE 群で顕著に増加した。サイトカイン類は IL-5、IL-4、GM-CSF および IL-2 などが OVA+DE 群で OVA 群より有意に増加し、特に IL-5 の増加が顕著であった。また、IL-5 は IL-2 および気道の好酸球浸潤レベルと、IL-2 は IgE および IgG1 抗体価との間に有意な相関が認められた。

Miyabara ら (1998a)は ICR マウス(雄)に 12 時間/日で、一週間 DE を吸入させた後、OVA を含有する水酸化アルミニウムゲル  $1\text{mg}$  を腹腔内注射で感作し、その後さらに 12 時間/日、7 日/週、5 週間にわたって DEP 濃度として  $3\text{mg}/\text{m}^3$  の DE を吸入させ、さらにこの間、3 週間に 1 回ずつ、1%OVA から発生させたミストを 15 分間吸わせ、OVA 最終吸入後 1、2、3 および 7 日目に気道炎症指標の経時的変化を調べた。気道への好酸球の浸潤と粘液産生細胞の増生は OVA+DE 群で 3~7 日目に顕著に増加し、OVA 投与群では緩やかに増加した。血清中の IgE 抗体価も 3~7 日目にわずかに増加した。水酸化アルミニウムゲルを使わずに OVA を投与した実験では IgE は全く増加しなかったことと文献上の事実から考え、この増加は水酸化アルミニウムゲルを使用したことによるものと考えられた。IgG1 抗体価は 1 日後ですでに著しく高いレベルに増加し、その後は若干の増加傾向を示した。

Miyabara ら (1998b)は C3H/He マウス(雄)に、人工物質(ヒトが体内に摂取することはない、実験でのみ用いる物質)である水酸化アルミニウムゲルの使用をやめ、 $10\mu\text{g}$  の OVA のみを腹腔内注射して感作し、その後 12 時間/日、7 日/週、12 週間にわたって DEP 濃度として  $1\text{mg}/\text{m}^3$  曝露群あるいは  $3\text{mg}/\text{m}^3$  曝露群の DE を吸入させ、さらに、3 週間に 1 回ずつ 1%OVA から発生させたミストを 6 分間吸入させ、呼吸抵抗と気道炎症指標の変化を調べた。BALF 中の好酸球数、好中球数ともに DEP 濃度に依存して増加した。気道への好酸球の浸潤は  $1\text{mg}/\text{m}^3$  と  $3\text{mg}/\text{m}^3$  で OVA ミストのみの群の 2 倍、4.7 倍と有意に増加し、呼吸抵抗も DEP 濃度に依存して 2 倍、4.4 倍と上昇した。マスト細胞数は極めて少ないが、その増加率は好酸球の増加率に類似していた。粘液産生細胞の増生はそれぞれ OVA ミスト群の 2.8 倍と 6.6 倍であった。血清中の IgE と IgG1 の抗体価は OVA 群の値より DE 吸入群で 30 倍以上高く、かつ  $1\text{mg}/\text{m}^3$  群のほうが  $3\text{mg}/\text{m}^3$  群の値より増加した。これらの結果から、水酸化アルミニウムゲル投与による感作ではなくても C3H/HeN マウスでは OVA+DE 群で IgE と IgG1 がともに増加し、かつ好酸球の浸潤や粘液産生細胞の増生が起

こることを示している。

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 10 μg OVA を腹腔内注射して感作し、その後 3 週間ごとに 1%OVA のミストを 6 分間吸入させ、気道炎症指標の変化を 6 段階(一、±、+、++、+++、++++)の病理学的スコアーにより調査して、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。

Hashimoto ら (2001)はアレルギー性喘息におよぼす DE の影響を明らかにするために、モルモットに 3mg/m<sup>3</sup> の DE を 12 時間/日、8 週間吸入し、OVA を含有する水酸化アルミニウムゲルで感作した動物としない動物の気道過敏性の 2 相性変化を調べた。その結果、OVA の吸入チャレンジによって、DE 非曝露群に比べて、DE 曝露群では即時型気道過敏性(IAR)と遅発型気道過敏性(LAR)ともに増悪した。気道粘液も、即時型気道過敏性反応時に、DE 曝露感作動物で顕著に蓄積していた。BALF 中の好酸球数と粘液の指標であるシアル酸濃度もまた、DE 非曝露動物に比べて、DE 曝露感作動物で有意に増加していた。遅発型気道過敏性反応時には、気道上皮の細胞間隙が、DE 曝露感作群で、好酸球の顕著な浸潤によって拡張されていることを見いだした。また、BALF 中のアルブミン濃度も有意に増加していた。これらの結果から、DE 曝露が即時型気道過敏性反応時(IAR)には、粘液の過剰分泌と好酸球性炎症を増強し、DE 曝露が遅発型気道過敏性反応時(LAR)には、気道の透過性や気道炎症を増強し、モルモットのアレルゲン誘発性気道過敏性を増悪する作用があるとした。

Ohta ら (1999)は、A/J マウスおよび C57BL/6 マウスを用いて、DEP(粒径:  $0.4\mu\text{m}$ 、曝露濃度:  $0.25\text{mg/ml DEP in } 40\mu\text{l saline}$ )の影響を調べた。DEP の鼻腔内投与により、A/J 群ではアセチルコリンに対する気道反応性が上昇した。C57BL/6 群では DEP 投与後 2 週間後に気道反応性の上昇が確認された。これらの反応性の上昇は 13 日以上持続し、M3 受容体を介しアドレナリン  $\beta 2$  作動薬によって抑制された。GM-CSF 抗体投与によりこれらの気道反応性の上昇は抑制された。IL-4 に対する抗体においても弱いながらも同様の現象がみられた。また DEP 投与後では BALF 中のマクロファージ数が上昇した。さらに DEP 投与は上皮細胞のクララ細胞への置換を誘発したが、これらも GM-CSF 抗体の投与により抑制された。さらに DEP は肺における GM-CSF の mRNA 発現を高めることが示された。

Saito ら (2002)は、DEP(粒径:90%以上が $<2.5\mu\text{m}$ (PM<sub>2.5</sub>)、60%が  $0.33\mu\text{m}$  以下、曝露濃度:低濃度 DEP 群:  $95.4\pm 18.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、高濃度 DEP 群:  $3.15\pm 0.49\text{mg}/\text{m}^3$ )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- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12p40、IFN- $\gamma$ 、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-4mRNA 発現量は低濃度曝露群で増加し、高濃度曝露群ではむしろ減少傾向を示したが、IL-10mRNA 発現は低濃度、高濃度群で共に増加した。採取した BALF 肺胞マクロファージの培養上清中 TNF- $\alpha$  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: $0.29\sim 0.49\mu\text{m}$ 、曝露濃度:C:ろ過空気、L:低濃度群( $0.18\sim 0.21\text{mg}/\text{m}^3$ )、M:中等度濃度群( $0.92\sim 1.18\text{mg}/\text{m}^3$ )、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( $2.57\sim 2.94\text{mg}/\text{m}^3$ ))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  $\mu$  m、曝露濃度:C:ろ過空気、L:低濃度群(0.18~0.21mg/m<sup>3</sup>)、M:中等度濃度群(0.92~1.18mg/m<sup>3</sup>)、MG:中等度濃度群で粒子フィルター除(0.01mg/m<sup>3</sup>)、H:高濃度群(2.57~2.94mg/m<sup>3</sup>))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 TxB<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  $\mu$  gDEP/m<sup>3</sup> (103.1 $\pm$ 9.2  $\mu$  gDEP/m<sup>3</sup>)および 2 群(高濃度):約 3mgDEP/m<sup>3</sup>(3.1 $\pm$ 0.2mgDEP/m<sup>3</sup>)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。

Ichinose ら (2003)は、ハウスダストの抗原となるダニ(*Dermatophagoides farinae*, Der f)による気道炎症に対する DEP(粒径:DEP:0.4  $\mu$  m、曝露濃度:DEP:3.21 $\pm$ 0.34mg/m<sup>3</sup>、曝露時間 12 時間/日、毎日、8 週間)吸入の急性効果を検討した。Der f 投与によりマウス 3 種(BALB/c、ICR、C3H/He)の肺(気管支)に好酸球浸潤と杯細胞増生をみた。Der f+DEP 投与では BALB/c、ICR に好酸球浸潤がみられたが、C3H/He ではみられなかった。肺組織中の

IL-5、RANTES、eotaxin、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ はDer f+DEP投与によりマウス全種で増加したが、C3H/HeではIL-5がAir+Der fに比べてDEP+Der f投与時に減少した。IL-5量は肺の組織の炎症性変化と相関していた。IgG1産生に対するDEPのアジュバント効果はICRとC3H/Heで認められた。これらの結果から、DEP+Der fによる気道で観察された好酸球性炎症の程度についてのマウス系統差は、肺局所のIL-5、eotaxin、IgG1産生の違いが関与したものと考えられ、DEPによる炎症増強効果は主に局所のIL-5により調節されていると考えられると述べている。

Sureshkumarら(2005)は、ガソリンエンジン排気(GE)の鼻部曝露を行い、マウス肺における炎症像を検索した。粒径分布は4 $\mu$ m以上:34.17%、4~3 $\mu$ m:15.78%、3~2 $\mu$ m:15.78%、2~1.5 $\mu$ m:10.57%、1.5~0.5 $\mu$ m:5.29%、0.5 $\mu$ m以下:18.39%、曝露濃度は0.635 $\pm$ 0.10 mg PM/m<sup>3</sup>、SO<sub>2</sub> (0.11 mg/m<sup>3</sup>)、NO<sub>x</sub> (0.49 mg/m<sup>3</sup>)、CO (18.67 ppm)、曝露時間は15分/日、7日連続、14日連続、21日連続であった。GEの7日間曝露では変化はみられなかったが、14日、21日間曝露によりBALF中のTNF- $\alpha$ とIL-6産生の増加が認められた。同様に、ALP(alkaline phosphatase)、 $\gamma$ GT、LDH量でも有意な増加を認めた。病理組織学的検索では、14日曝露で、血管周囲や細気管支周囲への単球の集積、21日曝露での細気管支周囲での上皮の脱落、炎症性細胞の集積、肺胞での肺水腫様変化、肺胞壁肥厚がみられた。実験結果では、曝露時間に依存した反応がみられ、指標間でもほぼ一致した結果であった。

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 $\pm$ 0.01mg/m<sup>3</sup>、約0.3mg soot/m<sup>3</sup>(0.38 $\pm$ 0.02mg/m<sup>3</sup>)、約1.0mg soot/m<sup>3</sup>(1.40 $\pm$ 0.14mg/m<sup>3</sup>)、および約3.0mg soot/m<sup>3</sup>(2.99 $\pm$ 0.38mg/m<sup>3</sup>)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3mg soot/m<sup>3</sup>)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。

### ③ 肺胞マクロファージによる炎症の機構

Strom (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  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で、6ヶ月と12ヶ月行った。BALF中の細胞数は、750  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 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  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 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。

Lewisら(1989)は、F344ラットに2.0  $\text{mg}/\text{m}^3$ のDEPを含むDEを曝露し104週間(7時間/日、5日/週)の時点では呼吸機能には有意な影響はみられないことを報告している。濃度と曝露期間をともに考慮する指標として濃度×期間に当てはめるとGrossらの結果は14,355  $\text{mg}\times\text{h}/\text{m}^3$ の曝露であり、Lewisらの結果は7,280  $\text{mg}\times\text{h}/\text{m}^3$ の曝露量となり、曝露濃度と期間に依存した影響が出ている可能性がある。一方、同様の条件(2.0  $\text{mg}/\text{m}^3$ のDEPを含むDE、7時間/日、5日/週、104週間、7,280  $\text{mg}\times\text{h}/\text{m}^3$ )でサルを用いた実験(Lewisら、1989)では25%の肺活量のところでの努力性呼気流量が減少した。また、40%の全肺気量のところでの努力性呼気流量の減少が見られたが肺の体積、拡散能または換気の分布(ventilation distribution)に影響は見られなかった。

BormとDriscoll(1996)は、活性炭のように発がん物質を全く含まない微粒子の吸入過剰負荷による発がんメカニズムを検討した結果、微粒子を貪食したマクロファージ等が多量の活性酸素を産生し、その活性酸素が遺伝子を活性化し、その結果TNF- $\alpha$ やIL-8のような炎症性サイトカイン産生が促進され、それらサイトカインが多核白血球(PMN)の活性化や化学走化性を強化したり、細胞接着分子の発現や細胞増殖作用、細胞分裂作用などを発現し、がん化すると説明した。

### ④ アレルギー性鼻炎

KobayashiとIto(1995)は、懸濁したDEP(1.0, 10.0, 20.0  $\text{mg}/\text{kg}$ (体重))をモルモットに点鼻投与し、鼻腔内圧や血管透過性が高まることを見出した。また、同様にDEPを点鼻投与した動物に、ヒスタミンエアロゾルで誘発される鼻腔内圧、血管透過性の増大および分泌鼻汁の増加を観察した。さらに、1、3.2  $\text{mg}/\text{m}^3$ のDEに3時間および28日間曝露されたモルモットにも同様な反応が認められたことから、DEは鼻粘膜の反応性を亢進すると考えた(Kobayashiら(1997)、Kobayashiら(1998))。

Hirumaら(1999)も、モルモットに1、3.2  $\text{mg}/\text{m}^3$ のDEを28日間曝露し、DEは鼻上皮からの抗原の吸収を増加させて鼻粘膜の反応性を亢進することを報告した。

Fujimakiら(1994)、Fujimakiら(1995)は、抗原とDEPの混合物を気管内および点鼻

投与し、近接するリンパ節細胞の抗原特異的増殖反応と培養液中のサイトカインを試験管内試験で測定した。その結果、DEPは局所のT細胞を活性化し、Th1サイトカインの産生抑制、Th2サイトカインの産生亢進を促すことで抗原特異的IgE抗体の産生を亢進することを見出した。さらに、これらの知見はDE(6mg/m<sup>3</sup>)を曝露したマウスにも観察され、DEにもDEPと同じ作用がある可能性を指摘した。

Kobayashiら(1998)は、Hartley系モルモット(雄)をDEに曝露し、ヒスタミンに対する鼻粘膜の過敏性について検討した。モルモットは低濃度(1mg/m<sup>3</sup>)または高濃度(3.2mg/m<sup>3</sup>)のDEに3、7、28日間曝露し、ヒスタミンに誘発されるくしゃみの回数や鼻汁分泌、鼻腔抵抗を測定した。低濃度または高濃度のDEへの曝露は、それ自体では、くしゃみや鼻汁分泌、鼻腔抵抗に影響を及ぼさなかったが、高濃度のDEへの曝露は、ヒスタミンに誘発されるくしゃみの回数を増幅させた。低濃度のDEへの曝露では、そのような有意な変化はなかった。DEの7日間曝露と28日間曝露は、ヒスタミンに誘発される鼻汁分泌をDEの濃度依存的に増加させたが、有意な変化ではなかった。また、ヒスタミンに誘発される鼻腔内圧の増加において、高濃度または低濃度のDEの3日間、7日間曝露は顕著な影響を及ぼさなかったが、高濃度のDEの28日間曝露は有意に増幅した。低濃度のDEの28日間曝露は顕著な影響を及ぼさなかった。高濃度のDEへの4週間曝露は、モルモットの鼻粘膜の過敏性を誘発することが示唆された。

Kobayashi(2000)は、0.3および1.0mg/m<sup>3</sup>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0.3mg/m<sup>3</sup>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1.0mg/m<sup>3</sup>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1.0mg/m<sup>3</sup>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。

#### ⑤ 非アレルギー性気道炎症

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。

Dziedzic(1981)はモルモットにDEP濃度として1.5mg/m<sup>3</sup>のDEを20時間/日、5.5日/週、4週間あるいは8週間吸入させ、免疫系に及ぼす影響を調べた。B-リンパ球、T-リン

パ球、気管支内リンパ球細胞、脾臓細胞および血液から分離された null 細胞数等に DE 吸入の影響はなかった。また、トリパンブルー排除法による細胞の生存率にも影響はなかった。

Mentnech ら (1984)は、ラットに DEP 濃度として  $2\text{mg}/\text{m}^3$  の DE を 7 時間/日, 5 日/週, 2 週間吸入させ、脾臓中の抗体産生細胞数を測定することで免疫能を調べた。細胞分裂促進剤のコンカナバリン A やフイトヘマグルチニンに対する脾臓における T-リンパ細胞の増殖反応は、DE 吸入で変化は認められなかった。これらの結果から、DE は液性免疫にも細胞性免疫にも顕著な影響は及ぼしていないと述べている。

Henderson ら (1988)は F344 ラットと B6C3F1 マウスに  $3.5\text{mg}/\text{m}^3$  の DE を 7 時間/日, 5 日/週, 17 日間吸入させ、炎症に関与するロイコトリエン(LT)やプロスタグランジン(PG)の変化を調査した。ラットでは、DE 吸入 2 日目で好酸球遊走を引き起こすメディエータ(化学伝達物質)である  $\text{LTB}_4$  と血管拡張等に作用する  $\text{PGF}_2\alpha$  濃度が増加したが、その後対照レベルに戻った。マウスでは BALF 中の総細胞数、マクロファージ数および好酸球数が有意に増加したと報告している。

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

Kato ら (2000)は、Wistar ラット(雄、5 週齢)に 0.21, 1.2 および  $3.1\text{mg}/\text{m}^3$  の DE を 6, 12, 18 および 24 ヶ月間吸わせ、呼吸器の病理標本から炎症性細胞の変化を調べた。気道及び肺組織に遊走した炎症細胞は、肺胞マクロファージ、肥満細胞(M)、形質細胞(P)、好中球(N)、リンパ球(L)などで、肺胞マクロファージ数は DE の曝露濃度および曝露期間の延長につれて増加していた。その他の炎症細胞の出現数の変化は明確ではなかった。しかし、好酸球の浸潤はどの濃度群、どの期間でも認められなかった。

$1.2\text{mg}/\text{m}^3$  の DE 群から粒子を除いたガス成分のみの曝露の場合、炎症細胞反応はほとんど認められず、気道及び肺組織の形態変化も極めて軽微であった。これらのことより、炎症細胞の浸潤は DEP と DEP を貪食するために出現した肺胞マクロファージにより惹起されている可能性が示唆されている。

## ⑥ 気道及び肺組織への影響

Barnhart ら (1981)、Barnhart ら (1982)は、モルモットに 7~20 時間/日、5~5.5 日/週の頻度で 104~130 週間、DE を曝露した結果、肺胞膜の肥厚、細胞増殖、線維症などの微小構造の最小の反応が認められたとして 0.25mg/m<sup>3</sup> 以下を組織病理学的な無影響レベルと報告した。

Mauderly ら (1987)、Research Committee for HERP studies (1988)は、0.35、3.5、7.0mg soot /m<sup>3</sup> の DE を 7 時間/日、5 日/週の頻度で最大 30 ヶ月曝露した結果、ラットでは、炎症反応、線維症、気管および気管支上皮の繊毛の短縮、消失などの形態学的変化が認められなかったとして、0.11~0.35mg/m<sup>3</sup> を組織病理学的な無影響レベルと報告した。

Lewis ら (1989)は、2.0mg DEP/m<sup>3</sup> の DE を 7 時間/日、5 日/週の頻度で 104 週間曝露した結果、カニクイザルでは、1 濃度のみの結果ではあるが線維症、炎症、肺気腫などが観察されなかったとして、2mg/m<sup>3</sup> を組織病理学的な無影響レベルと報告した。

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を作製し、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 群では軽微な変化にとどまり、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、肺泡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 : 1 ppm、1mg/m<sup>3</sup>)、低濃度(L 群 : 0.2 ppm、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 : 1 ppm、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、肺泡壁に対する肺泡孔面積比率と肺泡当たりの肺泡孔数は曝露濃度と曝露期間に依存して増加した。肺泡のサイズには差異を認めなかった。MG 群では、M 群に比べ肺泡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泡サイズの拡大を伴わない肺泡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。

#### ⑦ 細菌類への感染と曝露

Yin ら (2005)は、ラット(雄)に 4 時間/日、5 日間連続してろ過空気(対照群)もしくは DEP(標準試料 2975、曝露濃度:21.2 ± 2.3 mg/m<sup>3</sup>)を鼻腔より吸入させ、最終曝露から 7 日後にリステリア菌を気管内投与した。肺組織内のリステリア菌増殖は対照群では感染 7 日後に収束したが、DEP 曝露群では 7 日目でも維持されていた。リステリア菌感染させると、分離した肺泡マクロファージ(AM)の IL-1β、TNF-α、IL-12 産生能あるいは CD4+、CD8+陽性リンパ球数とリンパ球の IL-10、IL-2、IFN-γ 産生能が増加するが、DEP 曝露群ではそれらが有意に抑制された。これらより、DEP の曝露は肺泡マクロファージの免疫機能や T リンパ球介在型の免疫反応の抑制によって、細菌感染に対する肺の感受性を増加させる可能性が示された。DEP の曝露は肺泡マクロファージの免疫機能や T リンパ球介在型の免疫反応を抑制することによって、細菌感染に対する肺の感受性を増加させる可能性が示されたと述べている。

Hiramatsu ら (2005)は、DE(曝露濃度 : 約 3mgDEP/m<sup>3</sup>(3.1±0.2mgDEP/m<sup>3</sup>))をマウスに 1 ヶ月、2 ヶ月、6 ヶ月間(7 時間/日、5 日間/週)曝露させた。それぞれ曝露終了日の翌日に結核菌(1×10<sup>6</sup> CFU、Kurono strain)を感染させ、感染から 7 週間後に肺の病変部の大きさを計測、および肺、脾臓組織中の結核菌を培養しコロニーを数えた。病変部の大きさは対照群に比べ DE6 ヶ月曝露群で有意に大きく、肺組織中の結核菌によるコロニー生成は

DE6 ヶ月曝露群で有意に増加した。また肺組織における TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12p40、IFN- $\gamma$ 、iNOS の mRNA 発現量は DE2 ヶ月間曝露群でわずかに上昇したが、DE6 ヶ月間曝露群では、IL-1 $\beta$ 、IL-12p40、IFN- $\gamma$ 、iNOS の mRNA 発現量が減少した。長期間の DE 曝露は肺の結核菌感染を増悪させることが示唆された。

Elder ら (2004a)は、超微小粒子(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 (平均粒子濃度 37~106  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )に曝露した。老齢ラットは、高速道路上において曝露システム(mobile emissions laboratory)を使用し、①エアロゾル<1mm)と気相、②気相、③ろ過空気のいずれかに曝露した。何匹かのラットは、前もって炎症を誘導するため低投与量の菌体内毒素もしくはインフルエンザ・ウイルスで処置した。全身チャンバーでの曝露はロチェスターとバッファローの間で Interstate90 号上の 6 時間の運転期間を一度または 3 日間連続で行われた。肺の炎症に関連する指標、炎症性細胞の活性化、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たラットでは測定指標に影響をあたえなかった。血管内皮細胞活性化の変化を示す血漿エンドセリン (ET)-2 の粒子関連の増加を見いだした。さらに、急性反応と炎症性細胞の活性化に関連する粒子による影響を認めた。また、前もって炎症誘導したラットで高速道路上の粒子との相互作用も見いだされた。これらの結果は、道路上の粒子混合物の曝露は易感染性の老齢ラットの肺と心血管系に影響があることを示している。

#### 1.1.4 酸性物質・炭素などによる影響

短時間曝露の場合、Amdur (1958)、Amdur ら (1978)は、モルモットに 0.1~1  $\text{mg}/\text{m}^3$ (MMD 0.3、1  $\mu\text{m}$ )、2~44  $\text{mg}/\text{m}^3$ (MMD 0.8、2.5  $\mu\text{m}$ )の硫酸エアロゾルを 1 時間曝露した場合、肺気流抵抗の上昇と動肺コンプライアンスの低下を報告している。

Sackner ら (1978)は、イヌに 4  $\text{mg}/\text{m}^3$ の硫酸エアロゾルを 4 時間曝露した場合、心肺機能は変化しなかったことを報告した。

Schlesinger ら (1978)も、ロバに 1.33~1.51  $\text{mg}/\text{m}^3$ (MMD0.4  $\mu\text{m}$ )の硫酸エアロゾルを 1 時間曝露した場合、肺気流抵抗と動肺コンプライアンスは変化しなかったと報告している。

短期曝露の場合、Lewkowski ら (1978)は、ラットに 4  $\text{mg}/\text{m}^3$ (MMD 0.5  $\mu\text{m}$ )の硫酸エアロゾルを 7~14 週間曝露した場合、肺気流抵抗と呼吸数の増加があったことを報告している。

Lewkowski ら (1978)は、ラットに 2~2.5  $\text{mg}/\text{m}^3$ (MMD 0.5  $\mu\text{m}$ )の硫酸エアロゾルを 7~14 週間曝露した場合は肺機能に有意な変化がなかったことを報告している。

長期曝露の場合、Alarie ら (1973)は、カニクイザルに  $2.43\text{mg}/\text{m}^3$  (MMD  $3.60\ \mu\text{m}$ )、 $4.79\text{mg}/\text{m}^3$  (MMD  $0.73\ \mu\text{m}$ )の硫酸エアロゾルを 78 週間曝露した場合、換気分布の悪化と呼吸数の増加があったことを報告している。

Vaughan ら (1969)は、イヌに  $0.09\text{mg}/\text{m}^3$ の硫酸エアロゾルを 61 日間(16 時間/日)曝露した場合、 $\text{SO}_2$   $1.10\text{mg}/\text{m}^3$ 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。

Kobayashi と Shinozaki (1993)は、モルモットに 1 または  $3.2\text{mg}/\text{m}^3$  (MMD  $0.54$ 、 $0.56\ \mu\text{m}$ )の硫酸エアロゾルを 3、7、14、30 日間曝露した場合、3 日目に  $3.2\text{mg}/\text{m}^3$  で気道の反応性が低下し、14 日目で気道が過敏になることを見いだした。この調査では  $1\text{mg}/\text{m}^3$  では有意な影響は見られなかった。

Amdur と Corn (1963)は、モルモットに  $0.25\sim 3.60\text{mg}/\text{m}^3$  (MMD  $0.4\ \mu\text{m}$ )の硫酸亜鉛アンモニウムエアロゾルを 1 時間曝露した場合、肺気流抵抗の上昇が見られたことを報告している。

Schlesinger ら (1978)は、ロバに  $2\text{mg}/\text{m}^3$  (MMD  $0.3\sim 0.6\ \mu\text{m}$ )の硫酸アンモニウムエアロゾルを 1 時間曝露した場合、肺気流抵抗と動肺コンプライアンスは変化しなかったことを報告している。

Lewkowski ら (1978)は、ラットまたはモルモットに  $2\sim 2.6\text{mg}/\text{m}^3$  (MMD  $1.4\sim 2.0\ \mu\text{m}$ )の硫酸アルミニウムエアロゾルを 7~14 週間曝露した場合は幼若ラットでは静的呼出量の増加を報告している。成熟ラットでは肺気流抵抗の上昇と静的コンプライアンスの低下、呼吸数の増加、モルモットで静的呼出量の減少が観察された。

Lee ら (1999)は、硫酸ミストエアロゾル(粒径: $0.9\ \mu\text{m}$ )吸入による肺への効果を検討した。曝露濃度はモルモットで  $43\text{mg}/\text{m}^3$ 、ラットで  $94\text{mg}/\text{m}^3$ 、曝露時間は 4 時間であった。モルモットでの顕著な肺サーファクタントの指標の変化に着目した。ラットでは曝露濃度が高いものの影響は小さかった。 $43\text{mg}/\text{m}^3$ の硫酸エアロゾルをモルモットに 4 時間曝露した後、直ちに BALF を採取し、サーファクタント成分を抽出し、 $300\ \mu\text{g}/\text{ml}$  のリン脂質溶液で再構成した。酸曝露モルモットでは最小表面張力が  $12.1\pm 8.48\text{mN}/\text{m}$  で対照群の  $2.0\pm 0.43$  より有意に高かった。平衡表面張力から最小値までの膜圧縮から得る膜面積変化では、対照群の  $16.3\pm 5.77\%$  に対して、酸曝露で  $62.9\pm 13.83\%$  となった。最も鋭敏なサーファクタント阻害の指標は最大膜圧縮率 (Cmax) で、酸曝露群では対照群の 119 倍であった。モル

モットでのサーファクタント活性の異常は、酸の直接の作用よりもむしろ、急性肺障害に対する細胞と体液の反応であると結論づけている。

Kleinman と Phalen (2006)は、ラットで O<sub>3</sub> ガスと硫酸エアロゾルの混合物の急性曝露効果(曝露時間 4 時間)を検討した。粒径は 0.23~0.28 μ m(硫酸粒子 MMD、GSD=2.1~2.3)であった。曝露濃度は a 群:空気のみ、b 群:0.3ppm O<sub>3</sub>、c 群:0.6ppm O<sub>3</sub>、d 群:0.48mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、e 群 :1.00mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、f 群 :0.31ppmO<sub>3</sub>+0.41mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、g 群 :0.31ppmO<sub>3</sub>+1.04mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、h 群 :0.6ppmO<sub>3</sub>+0.52mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、i 群:0.6ppmO<sub>3</sub>+0.86mg/m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> であった。

結果として、①肺組織学 : Type1 病変は全群で変化無し、Type2 病変は H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 単独吸入で変化無し、O<sub>3</sub> 吸入で増加し、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度が濃いほど、その程度が低下、②DNA 合成は、鼻では O<sub>3</sub> 0.6ppm+H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 吸入により増加。気管ではどの群も変化無し。肺では、O<sub>3</sub> 0.6ppm+H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 吸入により増加。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度による影響は無し。③マクロファージの Fc レセプター発現はどの群でも変化無し。貪食能は H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 吸入群のすべてで低下した。O<sub>3</sub> 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 (NH<sub>4</sub>)HSO<sub>4</sub> (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 0.3 μ m であった。各群の曝露濃度は、1 群:清浄空気、2 群:O<sub>3</sub>0.198±0.004ppm、3 群:EC 51.35±12.15 μ g/m<sup>3</sup>+ABS 76.25±18.36 μ g/m<sup>3</sup>+O<sub>3</sub> 0.194±0.004ppm、4 群:EC 92.35±18.51 μ g/m<sup>3</sup>+ABS 136.29±27.61 μ g/m<sup>3</sup>+O<sub>3</sub> 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(O<sub>3</sub>)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。O<sub>3</sub> 単独よりも O<sub>3</sub> 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。

Cassee ら (1997)は、マウスで NH<sub>4</sub>HSO<sub>4</sub> 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:235 μ g/m<sup>3</sup>、fine(low mass):78 μ g/m<sup>3</sup>、fine(high mass):972 μ g/m<sup>3</sup>、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(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 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  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$  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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  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: $0.03 \mu\text{m}$ 、fine: $0.3 \mu\text{m}$  で、曝露濃度は  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$  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。

Heyder ら (1999)は、イヌ(ビーグル犬)を用いて、中性亜硫酸塩(亜硫酸水素ナトリウム、 $\text{NaHSO}_3$ )および酸性硫酸塩(硫酸水素ナトリウム、 $\text{NaHSO}_4$ )粒子の急性から慢性の曝露影響を検討した。粒径は、中性亜硫酸塩が  $1.02 \pm 2.2 \mu\text{m}$ 、酸性硫酸塩が  $1.08 \mu\text{m}$  (MMAD、GSD=2.0)であった。曝露濃度は中性亜硫酸塩: $1.53 \pm 0.89\text{mg}/\text{m}^3$ 、酸性硫酸塩: $5.66 \pm 1.68\text{mg}/\text{m}^3$ 、曝露時間は中性亜硫酸塩:16.5 時間/日 + 酸性硫酸塩:6 時間/日、7 日/週、13 週であった。曝露物質相互が影響を相殺し、何ら病理学的な変化を引き起こさなかったと述べている。

Elder ら (2000a)は、F344 ラット(雄、10 週齢、20 月齢)に Ultrafine carbon particles(UCP、count median diameter : 25 nm、 $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、ヒトでは  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  に相当)と  $\text{O}_3$  (1 ppm)に、6 時間単独曝露あるいは混合曝露(LSP : 12 分、30 分後に UCP および  $\text{O}_3$  曝露開始、UCP および  $\text{O}_3$  : 6 時間曝露)した。

気道感染のモデルとして低濃度のエンドトキシン(LPS)吸入によるプライミングを行った。BALF の炎症指標と BALF 細胞からのオキシダント遊離を曝露 24 時間後に調べた。若年ラットでは UCP、 $\text{O}_3$ 、LPS の肺炎作用が認められ、また  $\text{O}_3$  と LPS の混合曝露では炎症が抑えられることが認められた。老年ラットでは LPS と  $\text{O}_3$  のみ有意な炎症作用が認められ、UCP と  $\text{O}_3$  の混合曝露ではそれぞれの単独曝露以上の肺の炎症が認められた。BALF 細胞からのオキシダント遊離は一般的に多核白血球(PMN)反応と一致していたが、若年ラットでは LPS プライミングした UCP および  $\text{O}_3$  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  $\text{O}_3$  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、UCP と  $\text{O}_3$  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(count median diameter : 25nm、110  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )および  $\text{O}_3$ (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  $\text{O}_3$  曝露開始、UCP および  $\text{O}_3$  : 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  $\text{O}_3$  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  $\text{O}_3$  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  $\text{O}_3$  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。

Elder ら (2004b)は、ラットにおいて 超微小カーボン粒子(UCP)(粒径 36nm、曝露濃度:150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )の急性曝露効果(曝露時間 6 時間)を検討した。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できた。

Alessandrini ら (2006)は、マウスで超微小カーボン粒子(Elemental carbon ultrafine particles、粒径:34.8 $\pm$ 0.5nm(count median diameter)、53.1 $\pm$ 13.4nm(volume median diameter)、曝露濃度:119、332、526  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均))のアレルギー性気道炎症への急性影響を調べた。カーボン粒子の曝露時間は 24 時間であるが、抗原感作とのタイミングを検討し、その影響メカニズムを解析した。その結果、最終の抗原感作より 24 時間前、及び 4 日間前にカーボン粒子を曝露した群でより炎症反応やサイトカイン産生が増強しており、抗原感作後の曝露では炎症反応の遅れやサイトカイン産生の低下がみられた。抗原感作前のカーボン粒子曝露は、強力なアジュバント効果を生じることが示された。

#### 1.1.5 金属成分による影響

Gilmour ら (1989)は、マウスにおいて、 $\text{TiO}_2$ (粒径:95%は 1.98  $\mu\text{m}$  未満、曝露濃度:実験 1:19 $\pm$ 3.5  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、1.9 $\pm$ 0.92 $\text{mg}/\text{m}^3$ 、実験 2:24 $\pm$ 9.3 $\text{mg}/\text{m}^3$ )を二濃度、二期間(20 時間/日、

10～28日)を組み合わせてエアロゾルとして全身吸入し、その後に、細菌をネブライザーで吸入播種し、経時的に肺からの細菌のクリアランスを検討した。実験1では、TiO<sub>2</sub>の曝露濃度と期間の影響、実験2ではTiO<sub>2</sub>吸入後の影響残存の程度を検討した。20mg/m<sup>3</sup>の高濃度曝露では、曝露期間にかかわらず、肺の細菌クリアランス能は低下していた。期間が長いほど影響は大きかった。しかし、2mg/m<sup>3</sup>の低濃度曝露では、曝露期間にかかわらず、肺の細菌クリアランス能に変化は認められなかった。影響の強度は肺に吸入された粒子量と相関していた。影響は、曝露後の時間経過が長くなると減弱していた。TiO<sub>2</sub>粒子は、高濃度においては、肺の細菌クリアランスを低下させ、感染症の成立に影響を及ぼす可能性も否定できなかった。

Campan ら (2001)は、VSO<sub>4</sub>、NiSO<sub>4</sub>、およびその複合曝露による心機能と肺障害に対する急性影響(曝露時間6時間/日、4日間)をSDラットを用いて検討した。粒径は平均0.65 μm(GSD 2.11)、曝露濃度は、清浄空気群、VSO<sub>4</sub>曝露: 0.3、0.6、0.9、1.7 mg/m<sup>3</sup>、NiSO<sub>4</sub>曝露: 0.37、0.49、1.3、2.1 mg/m<sup>3</sup>、VSO<sub>4</sub>+NiSO<sub>4</sub>曝露: 各0.5、1.3 mg/m<sup>3</sup>であった。

その結果、Vは最も高い濃度でも心拍数と深部体温の変化は認められず、徐脈及び体温の低下もわずかであった。しかし、肺障害及び炎症の指標に関しては、最終曝露24時間及び96時間後で曝露濃度に依存した増加傾向を認めた。NiSO<sub>4</sub>では1.3mg/m<sup>3</sup>、2.1mg/m<sup>3</sup>で体温の低下と不整脈を認めたが、低濃度(0.37、0.49mg/m<sup>3</sup>)ではこれらに影響は認めず、1.3mg/m<sup>3</sup>で心拍数は最大75bpm、深部体温は2℃低下、2.1mg/m<sup>3</sup>ではそれぞれ100bpm、3℃低下した。肺障害及び炎症の指標に関しては、NiSO<sub>4</sub>曝露の濃度に従い増加傾向を認めたが、この傾向はVSO<sub>4</sub>と比較し顕著であった。VSO<sub>4</sub>+NiSO<sub>4</sub>ではVSO<sub>4</sub>およびNiSO<sub>4</sub>単独曝露で影響を認めなかった0.5mg/m<sup>3</sup>で、曝露3日目より心拍が50bpm、深部体温が1.0℃低下し、その影響は30時間持続した。VSO<sub>4</sub>+NiSO<sub>4</sub>混合1.3mg/m<sup>3</sup>では、より顕著な低下が認められ(心拍160bpm、深部体温4.0℃)、NiSO<sub>4</sub>単独の最高曝露濃度時(2.1mg/m<sup>3</sup>)より変化が大きく、不整脈の頻度も増加した。肺障害の指標(LDH、タンパク質、MIA、NAG)は最終曝露24時間後でVSO<sub>4</sub>、NiSO<sub>4</sub>単独曝露の和よりも大きかったが、96時間後ではその影響は明確ではなかった。以上のことから、VSO<sub>4</sub>とNiSO<sub>4</sub>の複合曝露がそれぞれの単独曝露と比較して、心機能と肺障害に相乗的な影響を及ぼすことが示唆された。

Takenaka ら (2004)は、Ultrafine cadmium oxide particles (CdO)、(粒径: 40～50 nm、曝露濃度: 低曝露群: 70μg Cd/m<sup>3</sup>、1×10<sup>6</sup>個/cm<sup>3</sup>、高曝露群: 550μg Cd/m<sup>3</sup>、2.2×10<sup>6</sup>個/cm<sup>3</sup>)の急性曝露実験(曝露時間6時間)を行った。その結果、①ラットにCdOを吸入させたところ16～19%が肺に7日間滞留した。肝臓と腎臓のCd量も軽度だが増加した。②高濃度のCdOを吸入させると肺胞壁の肥厚と好中球およびリンパ球浸潤、BALF中の好中球増加がみられた。CdOの吸入は、肺に滞留するのみではなく、肝臓や腎臓に移行することが示された。

Pinkerton ら (2004)は、SD ラット(10 日齢)に対する soot(すす)および Fe 粒子の急性効果(曝露時間 6 時間/日、3 日間)を検討した。粒径のメディアン径は 72~74nm(combined mixture of Fe/soot particles)であり、soot と Fe の曝露濃度は  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $243 \pm 34 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )、このうち Fe の曝露濃度は  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $96 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )であった。解剖を行う 2 時間前に BrdU を腹腔内投与した。細気管支、肺実質、近位肺泡領域での BrdU の取り込みを検討した結果、近位肺泡領域においてのみ、soot+Fe 曝露群で有意な減少が認められた。肺胞サイズは、両群において有意な差は認められなかった。この結果は、微粒子曝露が肺泡形成を障害する可能性を示唆したと報告している。

Zhou ら (2003)は、正常成獣ラットに 6 時間/日で 3 日間にわたって soot(すす)単独( $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )、Fe 粒子単独( $57 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )、soot と Fe の併用(soot  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$  と Fe 粒子  $45 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )の 3 条件で曝露した。soot あるいは Fe 単独条件では効果がほとんど見られなかったのに対し、soot と Fe の併用曝露群では、肺組織のフェリチンの有意な誘導、抗酸化力の有意な減少、IL-1 $\beta$ の上昇とシトクロム P-450 の上昇および NF- $\kappa$ B の活性化がみられた。soot と Fe 粒子は、共存すると酸化ストレス作用を相乗的に引き起こすことが示された。

#### 1. 1. 6 その他の粒子による影響

Madl ら (1998)は、モノクロタリン処理することにより作製した肺高血圧ラットにおける粒子状物質の取り込みおよびマクロファージの機能について調べた。モノクロタリン処理 SD ラットに 2 種類の蛍光 microsphere(直径  $1 \mu\text{m}$ )をエアロゾル化により曝露(3 時間/日、3 日間連続)した。肺泡マクロファージによる粒子の貪食は対照群(モノクロタリン非処理 SD ラット)に比べて減少し、一方で上皮に付加した遊離粒子が増加した。BALF 中のマクロファージの Chemotaxis はモノクロタリン処理により明らかに障害されたが、貪食能は対照群と同程度であった。マクロファージの filamentous (F) actin と globular (G) actin を蛍光染色により調べたところ、モノクロタリン処理ラットでは F/G 比が有意に減少していた。このマイクロフィラメントの変化が、モノクロタリン処理ラットにおけるマクロファージ chemotaxis 抑制や粒子クリアランスの低下を引き起こしたかもしれない。マクロファージの機能低下の原因としてマイクロフィラメントの変化を示唆している。

### 1. 2 気管内投与

#### 1. 2. 1 CAPs 都市大気の粒子状物質の曝露

Gavett ら (2003)は、マウスで PM 曝露による感作増強に対する急性効果を検討した。CAPs(PM<sub>2.5</sub>)の投与量は  $10 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$  saline とした。ヘットシュテット(Hettstedt)(アレルギー体質の子供数が多い都市)由来 PM<sub>2.5</sub> 前処置(感作)マウスの方が、ツェルブスト(Zerbst)(アレルギー体質の子供数が多くはない都市)由来の粒子前措置マウスと比較して、

14 日後の OVA チャレンジ後に、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。本研究では、二つの異なる都市由来の PM<sub>2.5</sub>(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<sub>2.5</sub> 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)と郊外において採集した CAPs(coarse, fine)をラットの気管内に 0.32mg 投与し、18 時間後の BALF およ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を示した。このメカニズムに、エンドトキシンおよび他の汚染物質(O<sub>3</sub>、窒素酸化物やイオウ酸化物など)が関与している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、1ml の蒸留水に PM<sub>2.5</sub> を 100 $\mu$ g と 500  $\mu$ g 希釈した溶液(PM100、PM500)を各々気管内投与した。動物を気管内投与の 24 時間後に安楽死させ、形態学および乾湿重量比分析のため、血液、心臓、肺のサンプルが採取された。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 で増加した(p<0.05)。分葉好中核球(segmented neutrophils)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)。肺胞内肺細動脈の L/W(内腔/壁)比の投与量依存的減少が PM 群で観察された(p<0.001)。細気管支周囲動脈の管腔/壁の割合(L/W 比)は PM500 群で大きく減少していた(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、サンパウロにおける環境中の微小粒子状物質は肺と心臓の組織学的変性を引き起こすことが分かった。肺の脈管構造は明らかに粒子状物質の気管内投与により影響を受け、健康なラットにおいて重大な血管狭窄を示した。

Steenberg ら (2006)は、異なる種類のバイオアッセイの方法(ラット気管内投与 1.0、2.0mg、マウス OVA アレルギー感作モデル、培養細胞 in vitro アッセイ)を用い、CAPs(coarse 2.5~10  $\mu$  m、fine<2.5  $\mu$  m)による生体影響を解析した。その結果、各種のアッセイ内の結果(パラメーター)間には関連性があると認められたが、異なるアッセイの結果(パラメーター)間には関連性はあまり認められなかった。PM の生物学的影響は、単一のあるいは他の複数の PM 内の物質によって引き起こされるだろうが、原因物質とその影響については広い範囲のバイオアッセイの方法による確認が必要であると述べている。

Gerlofs-Nijland ら (2005)は、PM の生体影響を知る目的の一環として、高血圧モデルラットを用い毒性指標を測定した。PM<sub>10</sub> (Road tunnel dust)0.3、1、3、10mg/kg(体重)を気管

内に投与した。この調査は、実験条件(投与量、採取の時期)を決定することが目的であり、結果、24時間後に採取されたサンプル、3、10mg/kg(体重)の投与量が最も適していることが示された。

Li ら (1996)は、ラットで PM<sub>10</sub>(0.2mL PBS に 50~125 $\mu$ g の粒子を懸濁)および対照 CBP(fine、ultrafine を各 125 $\mu$ g/個体)を気管内に単回投与した。投与から 6 時間後では肺胞内への好中球の遊走、上皮細胞の透過性の亢進、BALF 中の総タンパク質および LDH の増加が観察された。Ultrafine CBP の投与により、より強い炎症反応が観察された。PM<sub>10</sub> には in vivo および in vitro においてフリーラジカルの活性が確認された。PM<sub>10</sub> に曝露されたラットから得られた白血球の NO と TNF の産生能は対照動物に比べて増大していた。これらの結果から、PM<sub>10</sub> はフリーラジカル活性を有し肺の炎症や上皮組織の障害に関与していることが明らかとなった。

Dye ら (2001)は、製鋼所(open-hearth steel mill) 付近において、1986 年の製鋼所閉鎖前、1987 年の閉鎖中、1988 年の再開後にフィルター捕集した大気環境中 PM からの抽出物を 8.33mg/kg(体重) または 2.5mg/個体の投与量で SD ラット(雄、60 週齢、各群 6 匹ずつ 3 群)に気管内投与した。対照群には 0.3ml 生理食塩水を投与した。

製鋼所の工場が閉鎖されていない 1986 年と 1988 年は、気管内投与 24 時間後の BALF 中の LDH とタンパク質量は明らかに増加していた。気管内投与 96 時間後には、LDH、タンパク質量ともに低下した。組織学的所見では、1986 年度に採取された PM 抽出物の気管内投与 24 時間後、肺胞隔炎と肺胞間隙の出血の痕跡が認められた。1986 年および 1988 年度の抽出物投与では、非特異的気道反応性の一過性(気管内投与後 24 時間)における亢進が認められた。1986 年度抽出物の 0.25mg/個体、1.0mg/個体をそれぞれ気管内注入した結果、濃度依存的に炎症性反応が生じた。工場閉鎖中の 1987 年度 PM 抽出物の気管内投与では、対照群と比較して軽度な好中球の増加とそれに付随する同様の LDH、タンパク質量の増加があったが、1986 年と比較すると影響は明らかに小さかった。工場閉鎖中の 1987 年度抽出物に含まれる物質は、広範囲にわたるが、1986 年、1988 年に比較するとほとんどの元素が低濃度であった。1986 年から 1988 年の大気中から得られた PM 抽出物に曝露されたことにより引き起こされたラット肺への影響と同時期のユタバレー住民の疫学調査から得られた呼吸器への健康影響はよく一致したと述べている。

Goto ら (2004)は、ウサギ(New Zealand White ラビット、雄、 $2.3 \pm 0.6$ kg、 $n=33$ )に対してオタワ標準粉じん(EHC-93、粒径  $0.8 \pm 0.4 \mu$ m、粒子の 99% $< 3.0 \mu$ m)と inert carbon(CC)(粒径  $1 \mu$ m 以下)を気管内投与した。投与量は、対照群で生理食塩水を 1ml/個体、EHC-93 群で 500 $\mu$ g/ml を 1ml/個体、CC 群で 10mg/ml を 1ml/個体、ヒト肺胞マクロファージ(AM)対照群で 0.6ml/kg(体重)、EHC-93+AM 群で 0.6ml/kg(体重)、CC+AM 群で

0.6ml/kg(体重)とした。粒子状物質のウサギ気管内投与による骨髄からの単球の放出とその放出に関与する肺胞マクロファージの役割について検討した論文で、粒子の質的差についても言及している。EHC-93、CC 投与により、両者で約 20%の肺胞マクロファージが粒子を貪食していた。投与 12 時間後から血液中細胞の増加を認め、単球数では 3 群間に有意差を認めなかったが、白血球総数と杆状核白血球が EHC-93 群で著増した。骨髄からの BrdU でラベルした単球の血液中への放出は、EHC-93 群と CC 群で投与後 8~12 時間後に速やかに増加した。EHC-93 と AM の 24 時間培養した上清では、GM-CSF、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、MCP-1 が増加した。また、上清をウサギ気管内に投与したところ、EHC-93 群で白血球数と杆状核白血球が増加し、また BrdU ラベル化単球の血液中への速やかな放出を認めた。単球の骨髄での移行時間は、対照群に比較して EHC-93 群、CC 群で短縮(p<0.05)したが、培養上清投与では EHC-93+AM 群でのみ有意に短かった。これらの結果から、大気中粒子状物質(EHC-93)は肺胞マクロファージのメディエータの産生放出を促し、それらに含まれるサイトカインが骨髄からの単球の放出を促進していることを報告している。この結果は、肺細胞の粒子貪食が単球応答に関与し、粒子の成分が全身性炎症反応の強度に寄与していることを示唆している。大気中粒子曝露後の骨髄からの単球の放出とメディエータの産生が、局所並びに全身性の病態で重要な役割をはたしている可能性を示していた。

### 1.2.2 ROFA・燃焼に伴って発生する粒子状物質の影響

Kodavanti ら (1996)は、SD ラットと F344 ラットに ROFA(8.3mg/kg(体重))を気管内投与した。SD ラットでは BALF 中の好中球と好酸球の増加がみられたが、F344 ラットでは好中球の増加のみが観察された。本論文は ROFA の肺への影響よりも、肺の RNA 抽出法の妥当性を主眼に記載された。

Kodavanti ら (1997)は、ROFA または ROFA に含有される金属(Fe、V、Ni)をラットの気管内に 1 回投与した。ROFA の粒径は  $1.95 \pm 1.61 \mu\text{m}$  で、投与量は ROFA(2.5 mg/個体)、Fe (0.54  $\mu\text{M}$ /個体)、V(1.66  $\mu\text{M}$ /個体)、Ni(1.0  $\mu\text{M}$ /個体)であった。いずれも 0.3 ml の生理食塩水(pH 2.5)に溶解した。投与 1 時間後から気道・肺胞領域の浮腫および出血性変化、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-1 $\beta$ 、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。

Ghio ら (1998)は、ラットの気管内に ROFA を投与し、曝露前～曝露後 4、24、48、96 時間に BALF の解析および肺の免疫組織染色を行なった。ROFA (#6)の粒径は  $3.6 \pm 0.8 \mu\text{m}$  で、投与量は生理食塩水(0.5 mL)または 500mg の ROFA を溶解した生理食塩水(0.5 mL)であった。ROFA 曝露 4 時間後には BALF 中の Fe、Ni、V 濃度が増加したが、Fe の無毒化作用があるトランスフェリンも 24 時間後をピークに増加した。肺の免疫組織染色では、曝露 4 時間後からマクロファージや気道上皮、肺胞上皮におけるフェリチンおよびラクトフェリンの発現が増加した。しかし 48 時間以後は減少し、96 時間後には非曝露動物と同様のレベルに回復していた。ROFA の曝露により、肺のフェリチン、ラクトフェリン、トランスフェリンなど、Fe 結合性タンパク質の濃度が増加した。

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

Kodavanti ら (1999)は、SD ラット(60 日齢、体重 250～300 g)にモノクロタリン 60 mg/kg(体重)を腹腔内投与して肺障害/肺高血圧を引き起こした。対照群には生理食塩水(正常ラットと以下表記)を同様に投与した。10 日後に ROFA を気管内投与(生理食塩水、0.83 or 3.33 mg/kg(体重))、あるいは鼻部吸入曝露(15 mg/m<sup>3</sup>、6 時間/日、3 日間)を行い、肺の組織像、サイトカイン遺伝子発現、BALF を調べた。正常ラットでは ROFA 吸入により、肺浮腫、炎症細胞浸潤、肺胞壁の肥厚が認められた。BALF の炎症マーカーの上昇や IL-6、MIP-2 発現増加も認めた。モノクロタリン処理したラットでは、炎症細胞の血管周囲への浸潤、巨マクロファージの存在、肺胞壁の肥厚を認めた。BALF 中タンパク質や炎症マーカー(マクロファージ数、好中球数)も上昇し、肺障害を示していた。モノクロタリン処理後に ROFA を気管内投与されたラットの 58%が 96 時間以内に死亡したのに対し、吸入曝露群では死亡例はなかった。モノクロタリン処理後に ROFA 吸入ラット群では、肺水腫、肺胞壁の肥厚、炎症細胞浸潤といった肺損傷の増悪が見られた。BALF 中のマクロファージ、好中球、好酸球および IL-6 発現は、モノクロタリン、ROFA それぞれ単独投与による増加の相加作用を上回る増加を示した。まとめとして、ROFA の気管内投与は肺障害/肺高血圧モデルラットの死亡率を引き上げた。このモデルラットは ROFA に感受性が高かった。

Madden ら (1999)は、ROFA の気管内投与が肺の過酸化脂質(アセトアルデヒド)を増加

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

Samet ら (2000) は、ラットの気管内に ROFA を投与した 24 時間後に BAL を行なった。ROFA の投与は 200 または 500  $\mu\text{g}$ /個体を生理食塩水 0.5ml に溶解して行った。ROFA 投与により BALF 中の PGE<sub>2</sub> 濃度が 2.4 倍に増加したが、COX2 阻害薬(NS398)の前処理によりその増加は抑制された。肺の免疫組織染色では、ROFA の投与 24 時間後に気道上皮細胞の COX2 の発現が増加していた。N398 で前処置したラットでは ROFA 投与後の BALF 中のタンパク質増加を抑制したが、好中球数や IL-6 濃度には影響を与えなかった。本研究では、ROFA の曝露により肺の COX2 の発現と PGE<sub>2</sub> の増加がみられた。しかしこれらの増加は肺の好中球性炎症の機序には関与していないと考えられたと述べている。

Campen ら (2000) は、ラットに ROFA を気管内投与し、体温や循環系への影響を調べた。ラットの飼育環境温度および曝露条件は、1 群(22°C 環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与、2 群(10°C 環境飼育、各 n=4):0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与、3 群(22°C 環境飼育、O<sub>3</sub> 曝露は n=4、対照は n=3): 1ppm O<sub>3</sub> の曝露(6 時間)後、0、2.5mg ROFA 投与、4 群(22°C 環境飼育、各 n=4): モノクロタリン処置後、0、0.25、1.0、2.5mg ROFA 投与とした。モノクロタリンは腹腔内投与した。すべての条件下で対照群は生理食塩水の気管内投与で深部体温が上昇したが、ROFA 投与した 22°C 環境下群は濃度依存的に低下した。高濃度 ROFA では遅発性の低体温症も誘発した。10°C 環境下群も深部体温は同様の濃度依存性を示したが、22°C 環境下よりも深刻だった。O<sub>3</sub> 曝露群でも同様であったが、回復には 18 時間ほど要し、遅発性の低体温症は誘発しなかった。モノクロタリン投与群では濃度依存的に持続的に体温が下がり続け、致死率も高頻度であった。心拍数パターンはすべての群における深部体温のパターンに酷似していた。

ROFA 曝露によりすべての群で AV ブロック等の不整脈発生頻度が濃度依存的に増大し、高濃度曝露では 48 時間もそれが続いた。O<sub>3</sub> 曝露群では不整脈は消失した。モノクロタリン処置群では ROFA 曝露後の不整脈は増大し、4 日以上続いた。さらに低体温や頻脈も、ST セグメントの持続的抑制や伝導異常による急性心筋障害といった心電図異常と共に観察され、致死率も増大した。すべての群で ROFA 投与後に肺重量の増加と炎症、壊死、浮腫が観察された。本研究では、ROFA は心機能や体温調節機構に重大な影響を与えることが示唆された。また、それは心肺ストレス下において、さらに重篤な症状を示すことが明らかになった。

Ghioら (2000)は、野生型マウス、トランスフェリン欠乏マウス(ホモ接合型およびヘテロ接合型)にROFAを気管内投与した。粒径は $1.95 \pm 0.8 \mu\text{m}$ で、 $50 \mu\text{g}$ を投与した。曝露前のトランスフェリン欠乏型ホモ接合マウスではBALFのFeとフェリチン、ラクトフェリン濃度が増加していた。ROFA曝露24時間後では、トランスフェリン欠乏型ホモ接合マウスにおいてBALFのMIP-2、TNF- $\alpha$ 、タンパク質、LDH増加が抑制され、肺組織の浮腫変化や好中球浸潤も軽微であった。トランスフェリン欠乏マウスでは予測に反してROFAによる肺の障害が抑制された。この原因はフェリチン、ラクトフェリンなどの他のFe結合性タンパク質の代償的な増加によるものかもしれないと述べている。

Nadadurら (2000)は、ROFAの気管内投与後に生じる肺の遺伝子発現を、cDNAマイクロアレイ法を用いて評価した。ROFA粒径は $1.95 \pm 2.14 \mu\text{m}$ で投与量はROFA ( $3.33\text{mg/kg}$ (体重))、Ni( $1.3 \mu\text{M/kg}$ (体重))、V( $2.2 \mu\text{M/kg}$ (体重))であった。検討対象は27の炎症性またはストレス遺伝子であった。ROFAの投与3時間後にはIL-6遺伝子の発現が増加し、24時間後にはIL-6、フィブロネクチン、ICAM-1、IL-1 $\beta$ 、iNOS、TIMP-1遺伝子の発現が増加した。NiやVの気管内投与後にもROFAと同様の遺伝子発現がみられた。これらの結果の一部はノザンブロット法により確認された。本研究では、ROFAやROFAに含まれるNiやVの曝露より肺の炎症性サイトカインの遺伝子発現増加が見られた。

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

Kodavantiら (2002a)は、WKYラットとSHRにROFAを鼻部吸入及び気管内投与し、心肺血管系への影響を検討した。ROFAはSO<sub>4</sub>、Zn、Ni、Fe、Vを含んでいた。粒径は $1.3 \mu\text{m}$  MMAD以下、投与量は $0.0 \text{ mg/kg}$ (体重)、 $1.0 \text{ mg/kg}$ (体重)、 $5.0 \text{ mg/kg}$ (体重)、投与回数は1回とした。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。肺病理は重傷度を数値化した指標で評価した。肺胞マクロファージの集積は肺の病巣や肺の広い範囲で見られ、中隔肥厚と関連した肺肺炎がみられた。気管支上皮の肥大と単核細胞の血管周囲への浸潤を認めた。BALFの評価では、気管内投与では、WKYラット及びSHR共に投与量の増加に従いアルブミン、LDH活性、好中球数は有意に増加したが、 $5\text{mg}$ 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。気管内投与では、血漿フィブリノゲンがWKYラット、SHR共に5mg投与群で有意に増加し、投与後1～2日間高値を示したがその後減少した。鼻部吸入では、血漿フィブリノゲンはSHRのみ曝露群で有意に増加したが、曝露期間が長くなるに従い減少傾向が認められた。白血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、好中球数は、気管内投与及び鼻部吸入いずれにおいても非曝露群ではWKYラットに比べSHRで高い傾向を示した。ヘマトクリット値は、気管内5mg投与WKYラットでのみ最初の2日間、非曝露群と比較し有意な増加を示したが、その他の指標には曝露影響を認めなかった。血小板数はWKYラット及びSHRで有意な変化を認めなかった。血漿粘度は、清浄空気群ではWKYラットとSHRで類似した値を示したが、気管内5mg投与群ではWKYラットに比べSHRで有意に増加した。

これらの結果から、SHRではPM曝露が肺障害及び酸化ストレスと関連する急性の血栓形成反応を引き起こす可能性が示唆された。この結果は、心臓に疾患を持つヒトにおけるPM曝露と心血管疾患との関連性を示唆する疫学的結果と一致するものであると述べている。

Kodavantiら(2002b)は、ラットにoil combustion emission particulate matter (EPM)(粒径 $1.2\mu\text{m}$ (MMAD、GSD=2.6))の気管内投与および吸入曝露を行った。実験1の投与量は、①EPM:0mg/kg(体重)、②EPM:0.8mg/kg(体重)、③EPM:3.3mg/kg(体重)、④EPM:8.3mg/kg(体重)とした。実験2では、EPMによる肺の障害とEPM中の水溶性Znの関連性を調べるため、2-a: ①生理食塩水、②EPM全体:8.3mg/kg(体重)、③EPM水溶成分(EPM:8.3mg/kg(体重)相当)、④EPM残渣粒子成分(EPM:8.3mg/kg(体重)相当)、2-b: ①生理食塩水、②ZnSO<sub>4</sub>: 33 $\mu\text{g Zn/kg}$ (体重)、③ZnSO<sub>4</sub>: 66 $\mu\text{g Zn/kg}$ (体重)を気管内投与した。

実験1では、EPMの気管内投与は、濃度依存性に、BALF中へのタンパク質漏出や炎症細胞浸潤を増悪した。炎症反応は96時間後にはほぼ消失していた。実験2では、2-a②EPM全体、③EPM水溶成分、2-b②、③のZnSO<sub>4</sub>水溶液の気管内投与により、BALF中へのタンパク質漏出や炎症細胞(好中球)浸潤が誘導された。

実験3ではラットに(SDラット、WKYラット、SHR)鼻部吸入曝露実験を行った。曝露濃度、期間を、①EPM 10mg/m<sup>3</sup>またはろ過空気、6時間/日×1日/週×16週間、②EPM 10mg/m<sup>3</sup>またはろ過空気、6時間/日×1日/週×4週間、③EPM 10mg/m<sup>3</sup>またはろ過空気、6時間/日×1日/週×1週間、④EPM 10mg/m<sup>3</sup>またはろ過空気、6時間/日×4日/週×1週間、⑤EPM 5mg/m<sup>3</sup>またはろ過空気、6時間/日×4日/週×1週間、⑥EPM 2mg/m<sup>3</sup>またはろ過空気、6時間/日×4日/週×1週間とした結果、③の10mg/m<sup>3</sup>×6時間/日×1日/週×1週間の曝露によってのみ、BALF中へのタンパク質漏出が軽度に見られたが、系統差が存在していた。EPM曝露により、曝露の濃度と期間に依存してBALF中のマクロファージ数が増

えていたが、好中球の浸潤は見られなかった。

本研究では、EPMは、高濃度の気管内投与により、肺における好中球性の炎症と障害をもたらすものであり、この効果には、水溶性のZn含有成分が重要と考えられると述べている。

Hollingsworthら(2004)は、C57BL/6TLR4+/+マウス、C57BL/6TLR4-/-マウスに環境毒素(ROFA、LPS、O<sub>3</sub>)を気管内投与(20 ng/個体)して、肺機能、炎症について解析した。LPS曝露に対しては、明らかにC57BL/6TLR4-/-マウスでは炎症誘導や気道抵抗上昇に反応がみられずマウス間で差があった。ところが、ROFAや急性O<sub>3</sub>曝露に対してはC57BL/6TLR4+/+マウスとC57BL/6TLR4-/-マウス間で差がみられなかった。次に、2ppm、3時間のO<sub>3</sub>急性曝露から0.3ppm、72時間の亜急性曝露に条件をかえて実験すると、気道抵抗の上昇に差がみられ、炎症にかかわるTLR4の働きが曝露条件で変化することが示された。

Lambertら(2000)は、ハウスダストの抗原となるダニをアレルゲンとして使用し、これによる呼吸器・免疫影響にROFAやそれに含まれる金属が及ぼす影響を検討した。用いた粒子はROFAおよびROFAに含まれる金属の水溶液で、ROFAの粒径は1.95 $\mu$ mであった。Brown Norwayラットへの投与量は、①生理食塩水: 0.3ml、②ROFA: 1mg、③NiSO<sub>4</sub>:105.12 $\mu$ g、④FeSO<sub>4</sub>: 58.49 $\mu$ g、⑤VSO<sub>4</sub>: 98.2 $\mu$ g、⑥金属混合: Ni+Fe+Vであった。抗原特異的IgE産生は、ROFA、Ni、V、金属混合の気管内投与により増悪した。気道反応性はNiにより増悪した。BALF所見では、好酸球浸潤はROFAとFeにより増悪した。肺における遺伝子発現に関しては、好酸球の活性化に関わるIL-5はROFA、Ni、Vで増加が認められた。

Gilmourら(2004)は、マウスにCFA気管内投与18時間後のBALF(各種炎症性指標)を解析した。粒径はultrafine ( $\leq 0.2\ \mu$ m)、fine ( $\leq 2.5\ \mu$ m)、coarse ( $> 2.5\ \mu$ m)で、投与量は2mg/ml原液から50 $\mu$ lを投与(100 $\mu$ g/50 $\mu$ l)した。毒性はより小さいサイズの粒子の方が大きい(ultrafine > fine > coarse)ことが示された。この結果から、粒子サイズが小さいほど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も関連するとした。

Nurkiewiczら(2004)は、SDラット(雄、7~8週齢)77匹に対して、生理食塩水、あるいはROFA(平均2.2 $\mu$ m)0.1mg、0.25mg、1mg、2mg/個体、TiO<sub>2</sub>粒子0.25mg/個体を生理食塩水300 $\mu$ lに懸濁させたものを気管内投与した。本論文では、ラットへのROFA気管内投与24時間後の、細動脈への影響を検討した。気管内投与の結果、ROFA投与群でBALF中の多核白血球数とアルブミン・LDH濃度の上昇(ROFA=1、2mg)、肺胞マクロファージ

による活性酸素産生量の増加(ROFA=2mg)が認められた。次に細動脈直径を測定するため、ラットに麻酔をかけた後に気道を確保し、脊柱僧帽筋を灌流し、intravital microscopy で血管の直径を測定した。その結果、気管内 ROFA 投与量の増大とともに血管内皮依存性の血管拡張阻害が認められた。同濃度の ROFA と TiO<sub>2</sub> では血管拡張阻害効果は同程度であった。また、一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤である L-NMMA(N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine)を加えたときの血管拡張阻害効果に比べて、ROFA 投与群ではより大きな阻害がみられたことから、ROFA は NO 依存性と非依存性の血管拡張作用を示した。NO ドナーであるニトロプルシドナトリウムを電氣的に僧帽筋にイオン導入したところ、ROFA 投与群と生理食塩水投与群で平滑筋の NO に対する感受性に差は認めなかった。Intravital microscopy の結果、ROFA 投与群では細静脈内皮での白血球の接着およびローリングが顕著に認められた。以上の結果は、肺炎症が認められない濃度の ROFA 曝露 24 時間後でも、血管内皮依存性の細動脈拡張阻害が起こることを示していた。これにより、全身性の微小血管機能の阻害が引き起こされている可能性が示唆された。

### 1.2.3 DEP やガソリン排気による影響

Sagai ら (1993)は、DEP の毒性メカニズムを調べる目的で DEP を 0.5%Tween80 を含むリン酸緩衝液(pH7.4)に懸濁して、0~1.0mg を ICR マウス(雄)に 1 回気管内投与した。この結果、DEP の気管内投与による LD<sub>50</sub> は 0.6mg/個体(20mg/kg(体重))であり、このマウスにポリエチレングリコールを結合させて体内半減期を長くするようにした SOD(PEG-SOD)酵素を前投与すると死亡率が著しく低下することを見いだした。このことは、DEP が肺内でマクロファージによる貪食作用を受けたり、DEP 中の有機化合物が薬物代謝酵素等によって代謝されることによってスーパーオキシドをはじめとする活性酸素が多量に放出され、それらが血管内皮細胞を損傷して肺水腫を引き起こしたことによると述べている。

Ichinose ら (1995)は、上記と同様に 0.8mg の DEP をマウスに気管内投与し、0.8mg の活性炭の毒性と比較を行った。肺の病理学的検討の結果、活性炭投与マウスでは肺泡マクロファージの集積が認められたが、肺水腫様変化は全く認められず、好中球の浸潤も極めて軽微であった。これに対して、DEP 投与群では肺水腫が顕著に見られたと共に好中球の顕著な浸潤が認められ、急性的炎症反応が起こっていたことを報告している。

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

活性酸素が深く関与している可能性が示唆されている。

Takano ら (1997)は ICR マウス(雄)に 0.1mg の DEP を懸濁溶液として 1 週間に 1 回ずつ 16 週間にわたって気管内投与し、さらにこの間 3 週間ごとに OVA1  $\mu$ g を気管内投与した実験を行った。その結果、OVA+DEP 群のマウスの気道粘膜下への好酸球浸潤は対照(溶媒)群の 330 倍、OVA 単独投与群の 7 倍、DEP 単独投与群より 35 倍増加していた。気道上皮の粘液産生細胞(杯細胞)の増生も各々 42 倍、13 倍、3.3 倍に増加していた。リンパ球浸潤は好酸球浸潤と類似の変化であった。また、好酸球浸潤を誘導し、好酸球を活性化するサイトカインである IL-5 は OVA+DEP 群でのみ対照群の 8 倍に増加し、他の群では対照群と全く変りがなかった。IL-5 産生は Th2 リンパ球に由来することが免疫染色法で確かめられている。GM-CSF も OVA+DEP 群で若干増加していた。一方、このとき IL-4 と IgE 値は全く変化していなかったが、IgG1 抗体価が 8 倍以上に増加していた。これらの結果から、顕著な好酸球浸潤を伴う気道炎症は Th2 リンパ球に由来する IL-5 や GM-CSF によって誘導され、さらには IgG1 が好酸球に作用、結合して、好酸球を活性化するというメカニズムで生じた可能性が示唆されている。

Ichinose ら (1997a)は好酸球浸潤と IgG1 抗体産生との関連をさらに別の角度から確認するため、5 系統の 10 週齢マウス(雄)に 0.05mg の DEP を毎週 1 回ずつ 6 週間にわたって気管内投与すると共に 3 週間ごとに 1  $\mu$ g の OVA を気管内投与した。その結果、各系統マウスの OVA+DEP 群ならびに OVA 群で認められた OVA 特異的 IgG1 抗体価と好酸球浸潤の程度との間には統計的に有意な相関が得られた。また、気道上皮の粘液産生細胞増生の程度と IgG1 値との間にも有意な相関が認められた。なお、気道粘膜下への好酸球浸潤の多い系統の順番は C3H/He > C57BL/6 > ICR > BDF1 > CBA2N であった。また、OVA 群と OVA+DEP 群間の相違に関しては C3H/He 以外の系統で有意差が認められた。これらの結果から、好酸球浸潤を伴う気道炎症には IgG1 が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

Lim ら (1998)は 8 週齢の ICR マウス(雄)に毎週 1 回ずつ 10 週間にわたって 0.1mg あるいは 0.2mg の DEP を気管内投与し、気道粘膜下への好酸球浸潤の程度と気道炎症に関与するメカニズムについて検討した。気道粘膜下への好中球浸潤は濃度依存的であるが、好酸球浸潤は 0.1mg 投与群のほうが 0.2mg 群の値より高かった。また、好酸球浸潤は PEG-SOD 前投与で 1/4 以下に低下した。一方、0.1mg DEP の繰り返し気管内投与で活性酸素を産生させる酵素である肺の NADPH シトクロム P-450 reductase 活性は有意に増加し、逆に活性酸素を消去する酵素である CuZn-SOD と Mn-SOD 活性は有意に低下し、特に Mn-SOD 活性は顕著に低下した。これら酵素は気道上皮細胞とクララ細胞内に存在していることが確認されている。このことは、DEP 投与は気道内で活性酸素産生を増加傾向にかたむけ、

酸化ストレスを亢進することを示唆している。また、気道上皮での NO 合成酵素(NOS)の誘導も免疫組織染色法で調べ、気道上皮内の cNOS とマクロファージ内の iNOS が顕著に誘導されていることと共に、呼気中の NO が DEP 投与群で有意に増加していることが認められた。さらに、DEP 投与で呼吸抵抗が 2.5 倍に増加し、NOS 阻害剤の投与で呼吸抵抗増加は完全に抑制された。これらの結果から、DEP による気道炎症の発現には、気道上皮細胞や肺胞マクロファージなどに由来する  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ 、NO あるいは ONOO $\cdot$  等の活性酸素が深くかかわっている可能性が示唆されている。

Takano ら (1998b)は上記と同様の実験系で呼吸抵抗の変化を調べ、OVA+DEP 群でのみ有意に亢進したこと、また OVA 群、DEP 群では対照群との間に全く相違がないことを認め、DEP は OVA による、呼吸抵抗に及ぼす影響を亢進し増強させる作用があることを示した。

Miyabara ら (1998d)は好酸球浸潤と IgG 抗体との関連を調べるために、IgG 抗体産生能が高い C3H/He マウス(IgG high responder)と低い BALB/c マウス(IgG low responder)に 0.025mg の DEP を毎週 1 回ずつ 5 週間にわたって気管内投与し、この間に 3 週間に 1 回ずつ 1 $\mu$ g の OVA を気管内投与し、気道の炎症反応を調べた。OVA 特異的 IgG1 抗体産生は C3H/He マウスで BALB/c マウスより 30 倍高かった。気道粘膜下への好酸球浸潤は両系統マウスとも OVA+DEP 群でのみ顕著に増加しているが、C3H/He マウスの値は BALB/c マウスの値より 4.6 倍高かった。リンパ球浸潤は両系統間で差はみられなかったが、OVA+DEP 群の粘液産生細胞の増生は C3H/He マウスが BALB/c マウスより 18 倍高かった。呼吸抵抗も C3H/He マウスの OVA+DEP 群でのみ 2~3 倍高く有意に増加したが、BALB/c マウスの呼吸抵抗は OVA 群、DEP 群、OVA+DEP 群とも対照群と比べて全く変化していなかった。炎症性サイトカインの IL-5 と IL-2 も C3H/He マウスの値が BALB/c マウスの値より 20 倍高かった。これらの結果から、好酸球性気道炎症は IgG1 との関連が深く、かつ IL-5 と IL-2 が気道炎症の重要な因子であることが示唆されている。

Murphy ら (1998)は、DEP と他の粒子(CB、結晶質シリカ、非結晶質シリカ)のラット呼吸上皮への影響について検討した。それぞれの粒子 1 mg をラット気管内に注入し、BALF の成分の変化を調べた。Respirable 結晶シリカは肺の透過性の亢進、持続的炎症、サーファクタントや上皮マーカー酵素の漸進的増加を曝露後 12 週間まで引き起こした。非結晶シリカの超微小粒子は進行性の影響を引き起こさなかったが、透過性の変化を伴う初期の上皮障害を生じた。しかし、この障害は時間とともに減弱した。対照的に、CB(ultrafine/fine)粒子は、上皮に障害や炎症を引き起こすといわれている量を投与しても、上皮マーカーの上昇や炎症を殆ど起こさなかった。僅かにあるとしても、肺の透過性の亢進がみられる程度であった。DEP は CB より粒子径も小さく、化学的性状も異なっているものの、DEP 投

与においても CB と同様に BALF 成分が最小限の変化を引き起こすに過ぎなかった。以上の結果から、DEP による呼吸上皮障害は SiO<sub>2</sub> より小さく、微粒子による生物学的反応はそのサイズよりも表面の化学的性状により左右されることがわかったと述べている。

Yang ら (1999)は、ラットに DEP、CB、シリカを 5、あるいは 35mg/kg(体重)で単回気管内投与し、1、3、7 日後に肺胞マクロファージ(AM)の活性を調べた。DEP 投与ラットからの肺胞マクロファージは IL-1 を産生し TNF- $\alpha$  ではみられなかったが、CB とシリカ投与では反対の結果であった。DEP 投与ラットからの肺胞マクロファージを試験管内試験で LPS 刺激すると TNF- $\alpha$  の減少がみられ、DEP 投与ラットに LPS を投与して得た肺胞マクロファージにおいてもサイトカイン産生の抑制がみられた。CB やシリカでは抑制反応はみられなかった。

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(原料)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 阻害剤投与では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 $\cdot$  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。

Madden ら (2000)は、O<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 曝露した DEP は、O<sub>3</sub> 曝露しない DEP に比べ好中球、総タンパク質および LDH 活性を増加させた。O<sub>3</sub> 曝露による DEP 活性の上昇は、空気による変質ではなく O<sub>3</sub> 曝露期間中によるものであった。高濃度 O<sub>3</sub>(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<sub>3</sub> 曝露後に調べた如何なる生物活性をも増加させなかった。<sup>18</sup>O でラベルした O<sub>3</sub> で調べると、DEP と取り込まれる O<sub>3</sub> の量は、直線関係にあった。これらのデータは、大気濃度レベルの O<sub>3</sub> が DEP の生物学的効果を増加せしめることを示唆する。

Yang ら (2001)は、ラットのリステリア感染症に対する DEP の影響を検討した。DEP あるいは CB(直径 0.1~0.6  $\mu$  m)を 5mg/kg(体重)気管内投与した。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 と CB の反応性の違いは有機成分の違いにあり、DEP はマクロファージの異物に対する反応性を減弱させることにより、呼吸器感染症のリスクを増加させる可能性があるとして述べている。

Walters ら (2001)は、気道反応性や BALF 中の細胞分布などに及ぼす実際の大气中浮遊粒子の影響を調べるために、ナイーブマウスに大气中粒子(PM)、CFA、DEP などを、0.5mg 粒子の量で 1 回投与した。PM が気道反応性を亢進し、BALF 中炎症細胞分布の増加を見出した。DEP は BALF 中炎症細胞の有意な増加を示したが、気道反応性の増加は有意でなかった。一方、CFA はそれらのいずれの変化も引き起こさなかった。また、各粒子投与後の気道反応性、BALF および肺内サイトカインの変化を調べたところ、PM による気道反応性は 7 日持続し、これは BALF 内好酸球の劇的増加と相関していることが判明した。一方、7 日以降の気道反応性の低下はマクロファージの増加と相関していた。Th2 型サイトカイン(IL-5、IL-13、eotaxin)も初期に観察され、その後 Th1 型 (IFN- $\gamma$ ) にシフトしていった。さらに、追加の実験で、PM の活性画分は水溶性ではなく、気道反応性と BALF の変化は PM 依存性であった。これらのことから、Walters らは、大气中粒子(PM)はナイーブマウスで喘息様指標を増加させ、喘息罹患率の増加に重要な役割を果たしていることを示唆している。

Takano ら (2002a)は、マウスに対して、DEP(粒径 0.4  $\mu$  m)(10、50、250  $\mu$  g)、溶媒(PBS)、および charcoal(250  $\mu$  g)を気管内投与した。その結果、①DEP は用量依存性にシトクロム P-450 1A1 の mRNA 発現(PCR)レベルを増加させた。Charcoal 曝露では増強はみられなかった。②アリール炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor、AhR) の mRNA レベルが用量依存性に低下した。③シトクロム P-450 1A1 のタンパク質発現(ウェスタンブロット)が用量依存性に増加した。本研究は、DEP 曝露による急性反応として phase I enzyme であるシトクロム P-450 1A1 が誘導されることを示し、バイオマーカーとしてのシトクロム P-450 1A1 を示唆した。

Rengasamy ら (2003)は、ラットに DEP と CB を気管内投与して肺組織における酵素タンパク質および活性を調べた。シトクロム P-450 1A1 は DEP(5、15、35mg/kg(体重))投与後 1 日目にタンパク質の誘導、活性上昇が起こり、5 日目には減少した。CB 投与では変化は見られなかった。シトクロム P-450 2B1 は DEP、CB(5、15、35mg/kg(体重))投与後 1 日目にタンパク質の誘導と酵素活性が減少し、7 日目まで回復しなかった。glutathione

S-transferase(GST)- $\pi$ タンパク質は DEP、CB (35mg/kg(体重))投与後 1 日目に減少し、投与後 1、7 日目において活性も減少していた。カタラーゼ活性も DEP、CB (35mg/kg(体重))投与後 1、7 日目まで減少した。キノン還元酵素活性は DEP(35mg/kg(体重))投与後 7 日目で誘導された。以上から、DEP は吸入された肺組織において、その中の化学成分によりシトクロム P-450 1A1 やキノン還元酵素を誘導するが、一方 DEP 中の炭素核がシトクロム P-450 2B1、GST、カタラーゼタンパク質の発現と活性を阻害することが示唆された。

Inoue ら (2005)は、PBS に溶解した 100  $\mu$ g の懸濁 DEP を NC/Nga マウスの気管内に 1 回/週、6 週間投与した。BALF を調べると炎症細胞数の増加、とくに好中球と単核球の増加がみられた。また同 BALF ならびに肺組織中の IL-4、KC、MIP-1 $\alpha$  の増加が認められた。DEP 投与により NC/Nga マウスでは気道に炎症細胞浸潤がみられ、局所の IL-4 やケモカインを介して生じていると考えられたと述べている。

Ichinose ら (2004)は、ハウスダストの抗原となるダニ(*Dermatophagoides farinae*, Der f)投与による肺炎症に対して、DEP の気管内投与の影響を検討した。Der f: 1  $\mu$ g および DEP: 50  $\mu$ g を 2 週間隔で 4 回投与した。各マウスに Der f を与えた群では、肺組織に好酸球とリンパ球の浸潤がみられ、好酸球の浸潤程度は BALB/c マウス < ICR マウス < C3H/He マウスであった。肺組織の eotaxin と IL-5 は好酸球浸潤の程度と相関していた。Der f+DEP 投与群では好酸球浸潤が増加し杯細胞の増加がみられ、eotaxin ならびに IL-5 の発現が増加した。また Der f 特異的 IgG<sub>1</sub> 量は BALB/c マウス < ICR マウス < C3H/He マウスの順であった。C3H/He マウスでは DEP によるアジュバント効果が認められた。これらの結果からマウス種の違いによる好酸球性炎症の程度の違いは肺局所の IL-5、eotaxin の発現の違いによると思われる。DEP による反応増強は局所のサイトカインを介して起こっている可能性がある。抗原特異的 IgG<sub>1</sub> は DEP により増強されるアレルギー喘息の病因に重要であると考えられたと述べている。

Nemmar ら (2003a)は、肺の炎症、血栓形成及び血小板の活性化(Closure time)を調べるため、ハムスターに対して DEP(直径 20~50nm、大きい粒子でもほとんどが 2.5  $\mu$ m 未満)を気管内投与した。投与量は 5、50、500  $\mu$ g で、対照群として生理食塩水を投与した。また、In vitro Closure time in the PFA を調べるため、DEP を 0.1、0.5、5  $\mu$ g/ml を血液に添加した。DEP 投与群(5、50、500  $\mu$ g)では、LDH を除いて BALF 中の多核白血球(PMN)、タンパク質及びヒスタミンが生理食塩水群に比べ有意に増加し、更にタンパク質及びヒスタミン濃度と DEP 投与量との間に量反応関係が認められた。同じ投与量の DEP を用いた in vivo 実験では、DEP 群で静脈及び動脈の血栓形成が増大し、静脈では DEP 投与量との間に量反応関係が認められた。動脈での血栓形成及び閉塞は静脈よりも早く起こり、一方、静脈での血栓は動脈に比べ徐々に現れ徐々に消失した。血小板活性化能を測定した ex vivo

実験では、DEP を 50  $\mu$ g 投与した群で 30 分、60 分の時点で closure time の短縮が認められた。また、in vitro 実験では、DEP 非処理の動物から得られた血液に DEP を添加すると、0.5  $\mu$ g/mL 以上の DEP 群で closure time の有意な短縮がみられ、その短縮は DEP 濃度に依存するものであった。

本研究の結果は DEP による肺の炎症、静脈及び動脈における血栓の形成及び血小板の活性化が起こることを示している。この DEP への曝露による血小板の活性化は、大気汚染物質への曝露後、血栓症が起こるといった臨床的報告と一致した。従って、この研究結果は、都市部での大気中粒子状物質が心血管疾患の罹患率及び死亡率の増加に寄与している可能性を示すと述べている。

Singh ら (2004)は、と、標準試料 2975 を気管内投与した。投与は単回投与で、投与量は 25、100  $\mu$ g/50  $\mu$ l saline であった。DEP の肺毒性の要因を知る目的で異なる 2 種の DEP をマウスの咽頭内に投与し、BALF 中の急性炎症マーカーを解析した。いずれの DEP も急性炎症を引き起こした。化学、物理学的性状の異なる 2 種類の DEP により、それぞれ異なる肺毒性結果が得られた。以上より、DEP 毒性実験のデータは、用いた DEP の由来(組成)により異なることが示されたものの、限られた指標の単純な比較では結論は導くことはできないとしている。

Nemmar ら (2003b)は、ハムスター(100~110g n=4~5)に対して DEP (標準試料 1650: the National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD)を 50  $\mu$ g(容量 120  $\mu$ l)投与した。ハムスターに対する DEP の気管内注入により以下の所見が観察された。①肺の好中球性炎症、②大腿動脈血栓、③血小板機能の亢進、④血中および BALF 中のヒスタミン濃度の増加。ヒスタミン H1 拮抗薬の前投与により肺の炎症と血栓形成が抑制された。DEP の曝露は、肺の炎症を誘導するのみではなく、血栓形成の原因となることが示された。

Takano ら (2002b)は、ICR マウス(雄、各群 3~9 匹ずつ)に対して、automobile DEP (Sagai ら 1996)(MMAD:0.4  $\mu$ m)、LPS、LPS+DEP を 250  $\mu$ g/0.1 ml PBS の投与量で単回投与した。マウスに LPS、DEP、LPS+DEP を気管内投与したところ、LPS による急性肺炎像が DEP により増悪することが示された。そのメカニズムとして、DEP 曝露により Toll-like レセプター、NF- $\kappa$ B の活性化、ひいてはサイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )、ケモカイン(マクロファージ走化性因子など)、接着分子の活性化が関与していることが示唆された。今回の結果から、DEP は細菌のエンドトキシンによる肺の化膿性炎症(好中球浸潤を伴う)を増悪させること、そのメカニズムとして、炎症性サイトカインの発現が関与し、また、それに先立ち、Toll-like レセプターおよび p65/p50 のような NF- $\kappa$ B の p65 含有ダイマーの活性化が起こることが示唆された。

#### 1.2.4 酸性物質・炭素などによる影響

Adamson と Bowden (1981)は、粒子に対する肺胞マクロファージの反応を明らかにするために CD-1 マウスに、0.1、1、2、4、8mg のカーボン(直径 0.03 $\mu\text{m}$ )あるいは 4mg ポリスチレンラテックス(直径 0.1 と 1 $\mu\text{m}$ )を気管内投与し、BALF 中のマクロファージ数の変化を検討した。カーボン投与 1 日後から 1mg 以上の濃度では細胞数の増加がみられた。ラテックスによる肺胞マクロファージの増加のピークは、直径 0.1 $\mu\text{m}$  の粒子では投与 3 日後、1 $\mu\text{m}$  の粒子では 2 日後であった。

Lambert ら (2003a)は、正常 BALB/c マウスに Respiratory Syncytial Virus (RSV)を播種した 1 日後に表面積 150 $\text{m}^2/\text{g}$  の CB 超微小粒子 40  $\mu\text{g}$  を気管内投与し、CB の影響を観察した。CB 曝露により Virus 力価とクリアランスは変わらなかったが、11 日目に BALF 中に好中球、リンパ球の増加がみられた。また RSV 誘発性気道過敏症が増強された。肺組織中の RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 タンパク質含量が CB 曝露により増加した。超微細の CB 粒子は RSV 感染性肺胞上皮細胞に作用し、肺炎症や肺障害を増悪させることが示された。

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

### 1.2.5 金属成分による影響

Campen ら (2002)は、ラットに Fe、Ni、V の粒子を気管内投与した。曝露量および実験条件は、1 群(モノクロタリン非処置群、各 n=4):①生理食塩水投与、②0.105mg Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、③0.263mg NiSO<sub>4</sub>、④0.245mg VSO<sub>4</sub>(n=4)、2 群(モノクロタリン処置群、各 n=10):①生理食塩水投与、②0.105mg Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、③0.263mg NiSO<sub>4</sub>、④0.245mg VSO<sub>4</sub>、3 群(モノクロタリン処置・金属混合群、各 n=6):①Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>+VSO<sub>4</sub>、②Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>+NiSO<sub>4</sub>、③NiSO<sub>4</sub>+VSO<sub>4</sub>、④Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>+NiSO<sub>4</sub>+VSO<sub>4</sub>とした。

その結果、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処理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ると、さらなる上昇を引き起こした。モノクロタリン処理群においても 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。

鷹屋ら(2005)は、ラットに対する希土類酸化物の呼吸器への影響について行った 4 年間のプロジェクト研究の中の気管内投与実験をまとめた。用いた粒子は、酸化イットリウム(Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、酸化ランタン(La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、酸化ネオジム(Nd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、酸化セリウム(CeO<sub>2</sub>)、CeO<sub>2</sub> 微粒子であった。Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Nd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、CeO<sub>2</sub>、CeO<sub>2</sub> 微粒子の粒径は、それぞれ 2.16、1.89、1.91、3.90、0.2 μm であった。粒子の投与量は 10mg/個体(約 34.0mg/kg(体重))であり、単回投与を行った。その後、急性から亜慢性として 3、7、14、30、90、180 日に観察し、慢性として 1 年、1.5 年に観察した。急性、亜慢性の期間では、CeO<sub>2</sub> 以外は BALF 総細胞、マクロファージ、好中球の増加がみられ、LDH 活性値も同様の傾向を示した。病理組織所見でも、CeO<sub>2</sub> 以外は肺病変が類似していた。慢性影響としては、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群で肺胞道から肺胞にかけ中等度の線維化がみられ、他の群でも軽度の線維化傾向が観察された。希土類酸化物の種類によって肺病変誘導における傾向の違いが示唆された。

### 1.2.6 その他の粒子による影響

Nemmar ら (1999)は、ウサギにおいて、ナノ粒子(polystyrene carboxylate-modified microspheres (Molecular Probes, Netherland)、粒径 44 ± 5nm)の気管内投与(4mg)の影響を検討した。ナノ粒子の気管内投与群にカプサイシン、カルバコール、substance P、C48/80

による刺激を加えると、ナノ粒子非投与群に比較し、有意な substance P やヒスタミン遊離の増加が観察された。

ナノ粒子の気管内投与により、好中球性の炎症や肺の水分量増加が観察されたが、タヒキニン受容体拮抗剤やヒスタミン受容体拮抗剤はこれらの変化を有意に抑制した。ナノ粒子により、電子顕微鏡的に、肺の上皮細胞や血管内皮細胞に障害が観察された。本研究は、化学的に安定なナノ粒子でも、量によっては、気管内投与により、肺に炎症や障害を惹起する可能性があることを示し、ヒスタミンやタヒキニンの重要性を示した。

Ghio ら (1999)は、TSP を、2 回にわたり 2,500g で 30 分遠心して可溶化画分と非可溶化画分に分けた。大気汚染粒子中における可溶化成分は C、H、N、O、S、中心に 13.1%、非可溶化成分は酸化された Si、Fe、Al を含む ash を中心に 86.9%だった。可溶化成分中のイオン化した金属は Ni、V に比べて Pb、Cu、Zn を多く含んでいた。両成分とも酸化物がデオキシリボースの酸化を触媒したが、Deferoxamin、DMTU、DMSO 等を含ませることによりほぼ完全に抑制された。BEAS-2 細胞に大気汚染粒子の可溶化成分、非可溶化成分 500  $\mu$ g を曝露し、IL-8 濃度を測定したところ、可溶化成分の方が有意に高かった。IL-8 濃度も Deferoxamin、DMTU、DMSO 等を含ませることによりほぼ完全に抑制された。ラットを用いた実験では 100~1,000 $\mu$ g の画分を生理食塩水に溶解して(おそらく)気管内投与(詳細は記載がなく不明)した。可溶化成分と非可溶化成分の投与により引き起こした炎症性肺障害はイオン化した金属、酸化物生成、サイトカイン放出を伴い、好中球の浸潤と BALF 中のタンパク質濃度の上昇がみられた。これは大気中の可溶化成分の方が非可溶化成分に比べてより生体に与える影響が大きいことを示唆した。

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

Yokohira ら (2007)は、F344 ラット(雄、10 週齢)に対して、石英(7  $\mu$  m 以下)、Hydrotalcite(7.81 $\pm$ 1.52 $\mu$ m)、Potassium octatitanate fibers(長さ 50 $\mu$ m 以下)、Palladium oxide(幅 2  $\mu$  m 以下)、CB(28nm)などの粒子状物質を気管内投与した。各粒子の投与量は 4mg/個体とし、CB以外の粒子を 0.2ml 生理食塩水に溶解して投与し、CBは PG-CMC(10% propylene glycol and 1% sodium carboxymethyl cellulose in saline)で溶解して投与した。

気管内投与 1 日後、肺重量は石英、hydrotalcite、potassium octatitanate 群で増加した。28 日後ではすべての微小粒子状物質の群は増加した。potassium octatitanate、palladium oxide、CB で投与後 1 日目、さらに 28 日後の石英投与群の肺胞でマクロファージに顆粒様変化が見られた。他の群の変化は大きくなかった。石英投与群は、1 日後好中球の浸潤の程度が強く、potassium octatitanate、palladium oxide が類似した結果を示した。BrdU 陽性細胞の数とエリアは石英投与群で高かった。potassium octatitanate 投与群では 1 日後は高かったが、28 日後には全ての群で低下した。iNOS は、石英投与群が 1 日後、28 日後とも他の群より高い値を示した。以上の結果から、分析には長所や短所がそれぞれあるが、気管内投与による微小粒子状物質吸入により急性あるいは亜急性の肺毒性効果を短期間で検討するためには BrdU や iNOS のような組織病理学的な評価やマーカーを使用することが有効であることが示された。

Duffin ら (2001)は、Wistar ラット(雄、4 週齢、各群 3 匹)に対し、DQ12(結晶性石英)および乳酸 Al 処理石英(0.08~2.67  $\mu\text{m}$ 、平均 0.91  $\mu\text{m}$ )を気管内投与した。投与量を 250  $\mu\text{g}$ (0.5 ml of 500  $\mu\text{g}$  DQ12/ml)とした。

結晶型石英は一般に肺に急性毒性および発がん性を有することが知られている。結晶型石英の表面を乳酸 Al 処理することで、活性酸素種産生および炎症の分子レベルでのカスケード(一連の反応)が抑制された。その結果、DQ12(結晶性石英)の毒性が著しく減弱した。

### 1.3 その他の曝露経路

#### 1.3.1 CAPs 都市大気の粒子状物質の曝露

Steerenberg ら (2004)は、マウスへのオタワ標準粉じん(EHC-93)の経鼻内投与による慢性曝露を行った。実験初日、第 14 日に 0.4mg/ml の OVA50  $\mu\text{L}$  を両側の鼻に投与して感作させ、第 35、38、41 日に同様に誘発した。粒子曝露群では、OVA とともに 3mg/mL の EHC-93 を感作時に投与した。OVA に対する免疫反応は EHC-93 の同時投与により増強されたが、マクロファージ活性化欠損マウスでは血清 OVA 特異的 IgE、IgG1、IgG2 や肺の組織学的変化は比較対照と差がなかった。抗酸化薬の N-アセチルシステイン投与マウスでは IgG2a 以外は比較対照と差がなかった。iNOS 欠損マウスでは、IgE では差がなかったが、IgG1、IgG2 は有意に増加した。IL-4 欠損マウスでは、IgE、IgG1 が低下しており、肺組織の炎症性変化が有意に軽度であった。本研究は、EHC-93 のもつアジュバント作用が IL-4 に依存性を有することを示した。

Steerenberg ら (2005)は、OVA に対する IgE 産生への CAPs の慢性曝露影響を調べた。粒径は coarse 2.5~10  $\mu\text{m}$ 、fine < 2.5  $\mu\text{m}$  であった。BALB/cByJ マウス(雄、6~8 週齢)の OVA 感作モデルを用い、ヨーロッパ各都市で採集した PM を鼻腔内投与した。その結果、

ウッチ(Lodz、ポーランド)、ローマ、オスロ、アムステルダム順にアジュバント効果が高いことが示された。また、fine PMの方がcoarse PMよりアジュバント効果が高く、PMの採集季節ごとに効果が異なり、水溶性およ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。

### 1.3.2 DEPやガソリン排気による影響

Muranakaら(1986)は、抗原とDEPの混合物を腹腔内に投与したマウスの方が、抗原のみを投与したマウスに比べ抗原特異IgE抗体の産生が高まることを報告した。

Takafujiら(1987)は、マウスに種々の量のDEP(1、5、25 $\mu$ g)とOVA(0.025、0.25、2.5、25 $\mu$ g)の混合物を点鼻投与し、最少の組み合わせであるDEP 1 $\mu$ g+OVA 0.25 $\mu$ gでOVA特異IgE抗体の産生が亢進したことからDEPのアジュバント作用の閾値を示唆する結果を報告した。

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。

Fujimakiら(1994)、Fujimakiら(1995)は、抗原とDEPの混合物を気管内および点鼻投与し、近接するリンパ節細胞の抗原特異的増殖反応と培養液中のサイトカインを試験管内試験で測定した。その結果、DEPは局所のT細胞を活性化し、Th1サイトカインの産生抑制、Th2サイトカインの産生亢進を促すことで抗原特異的IgE抗体の産生を亢進することを見出した。

KobayashiとIto(1995)は、DEPが鼻部過敏反応に及ぼす影響を調べるためHartleyモルモット(雄)にPBSあるいは濃度が1.0、10.0または20.0 mg/kg(体重)のDEPを300 $\mu$ L/kg(体重)鼻腔投与し、その後1.0 mMヒスタミンを10分間曝露して鼻腔内圧、鼻汁分泌を測定した。また血管透過性を皮膚で見た。その結果、DEP、ヒスタミンの濃度に依存していずれも増加した。このことからDEPによってヒスタミンへの感受性が高まり、過敏反応が引き起こされることがわかった。

Maejimaら(1997)は、性状の異なる5種類の粒子(関東ローム粉、CB、フライアッシュ、DEP、水酸化アルミニウムゲル)をマウスの鼻腔に点鼻投与し、直後にスギ花粉抗原エアロゾルおよびスギ花粉粒を経鼻的に投与した結果、いずれの粒子にも同程度に抗原特異IgE抗体の産生を早期に亢進する作用があることを報告した。

Ohyama ら (1998)は、OVA に比べより現実的なカビ抗原(30  $\mu$ g カビ抗原+100  $\mu$ g DEP)を用いて Fujimaki らと同様な実験を行い、DEP がカビ抗原に対してもアジュバント作用を有することを示した。

Ohta ら (1999)は気道反応性に及ぼす DEP の影響を明らかにするため、DEP を A/J マウスと C57BL/6 マウスに、2 週間にわたって点鼻投与して全身プレチスモグラフで呼吸機能を調べた。DEP 投与でアセチルコリンに対する気道反応性は両系統マウスで増加し、粘液分泌性クララ細胞が繊毛上皮細胞に置きかわっていた。アセチルコリンによる気道狭窄は、ヒトの喘息の特徴でもある  $\beta_2$ -アドレナリン拮抗薬のテルブタミン投与で回復した。DEP の点鼻投与で GM-CSF mRNA 発現を促進し、GM-CSF の抗体の点鼻投与で DEP 誘発性気道反応性の亢進が消失した。また、IL-4 抗体の点鼻投与も、抗 GM-CSF 抗体ほどではないが、DEP 誘発性気道反応性亢進を抑制した。これらのことから、彼らは DEP は GM-CSF 合成を促進することにより気道反応性の亢進が誘起されているものと結論づけている。

Yamashita ら (2001)は、DEP の投与により起きる気道の過敏やリモデリング (気道炎症からの回復過程で気道の組織が変質し気道壁の肥厚などに結びつくこと) に血小板由来増殖因子(PDGF)がどのような影響を及ぼしているかについて検討した。A/J マウス(雄)に抗-PDGF- $\beta$  の存在あるいは非存在下で 0.25mg/ml の DEP 懸濁液を 1 日おきに 2 週間点鼻投与した。麻酔下アセチルコリンに対する反応性を検討した。抗-PDGF- $\beta$  は、DEP の点鼻投与により起きるアセチルコリンに対する反応性の増加および気道壁の肥厚を抑制することが見いだされたが、BALF 中の細胞の浸潤には影響を与えなかった。このことから、DEP 投与により起きるリモデリングの過程に PDGF は重要な役割をしていることが示唆される。

### 1.3.3 酸性物質・炭素などによる影響

de Haar ら (2005)は、CBP(粒径 30~50 nm)と抗原との点鼻投与による炎症反応の誘導について調査した。肺における炎症反応は、BALF 中の炎症細胞、サイトカイン、及び組織学的検索によって評価した。CBP の投与量は、0  $\mu$ g/個体(OVA のみ)、2  $\mu$ g/個体、20  $\mu$ g/個体、200  $\mu$ g/個体(各群 6 匹)で、OVA と共に生理食塩水に懸濁し、第 0、1、2 日目にマウス(雌)に点鼻投与した。各群、一部のマウスについては、第 4、8 日目に BALF、リンパ節、肺組織の試料を採取した。さらに残りのマウスについては、第 25、26、27 日目に OVA のみ点鼻投与によるチャレンジを行い、第 28 日目に試料を採取した。好中球や TNF- $\alpha$  の増加が高濃度群(CBP(200  $\mu$ g/個体))で見られたが、他の群(OVA のみ、2  $\mu$ g/個体、20  $\mu$ g/個体)ではみられなかった。気管支周囲のリンパ節での CD19 陽性 B リンパ球の増加も高濃度群でみられた。リンパ節細胞からのサイトカイン産生では、IL-4、IL-5、IL-10 で CBP

量に依存的な亢進がみられた。また、第 21 日目および 28 日目には、血清中の OVA 特異的 IgE 産生の亢進が高濃度群で認められた。第 25、26、27 日目のチャレンジにより、気道炎症は好酸球が増加し、より Th2 タイプのサイトカイン産生が増加する結果であった。8 日目に確認されたアジュバント効果が、より後半の抗原投与のみでも増悪する結果は、初期効果の把握により後半の効果が予測できることを示唆している。